

高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定齐墩果酸片中的含量

陈桂云¹, 杨国浓², 陈卫平¹ (1. 丽水市药品检验所, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江省肿瘤医院, 杭州 310020)

摘要:目的 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定齐墩果酸片含量。方法 采用 Luna C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30℃; 乙腈-水 (88:12) 为流动相, 流速: 1.0 mL/min; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 90℃, 氮气流速: 2.30 L/min。结果 齐墩果酸在 0.21 ~ 4.16 μg 之间线性关系良好, $r = 0.9997$ ($n = 8$); 回收率为 99.24%, RSD = 0.44% ($n = 5$)。结论 本法灵敏、简便、准确, 重线性好。

关键词: 高效液相色谱-蒸发光散射检测法; 齐墩果酸

中图分类号: R917.720.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)01-0062-03

Determination of Oleanolic Acid Tablets by HPLC-ELSD

CHEN Gui-yun¹, YANG Guo-nong², CHEN Wei-ping¹ (1. Lishui Institute For Drug Control, Lishui 323000 China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-ELSD method for determination of oleanolic acid Tablets. **METHODS** With a Luna C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30℃, acetonitrile-water (88:12) was used as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min. An evaporative light-scattering detector (ELSD) was used as detector with gas flow rate of 2.30 L/min and drift tube temperature of 90℃. **RESULTS** The oleanolic acid had a good linearity relationship, $r = 0.9997$ ($n = 8$), between 0.21 ~ 4.16 μg. The average recovery was 99.24% with RSD = 0.44% ($n = 5$). **CONCLUSION** It was proved that the method was reliable, simple, accurate and reproducible.

KEY WORDS: HPLC-ELSD; oleanolic acid

齐墩果酸片是一种抗肝炎药,用于急慢性肝炎的辅助治疗。齐墩果酸的含量测定方法主要有酸碱滴定法^[1]、薄层扫描法^[2]、高效液相色谱法^[3]等。笔者采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定齐墩果酸含量,结果表明,本法灵敏、简便、结果准确。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国,安捷伦公司); Alltech - 2000ES型蒸发光散射检测器 (美国,奥泰科技公司)。乙腈、甲醇为色谱纯,纯净水,其余试剂为分析纯;齐墩果酸对照品购自中国生物制品检定所 (供含量测定用);齐墩果酸片 (浙江瑞新药业股份公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: LunaC₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm), 柱温: 30℃; 流动相: 乙腈-水 (88:12), 流速: 1.0mL/min; 蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 90℃, 氮气流速: 2.30L/min。

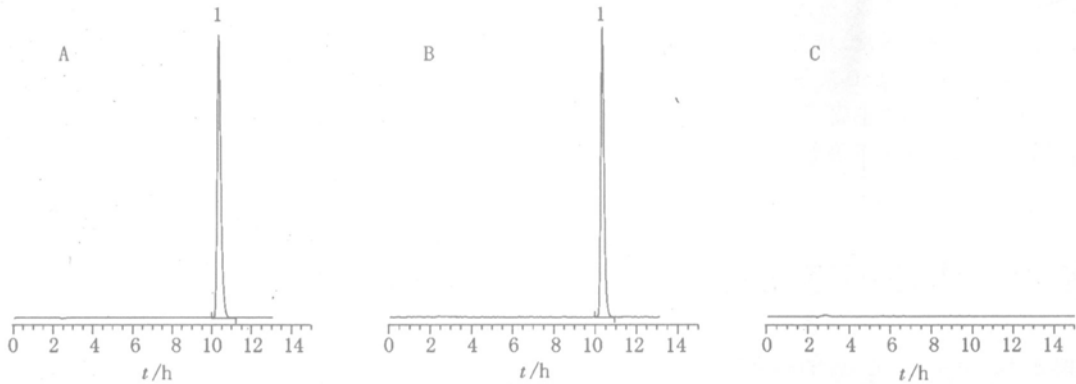


图 1 齐墩果酸 HPLC-ELSD图谱

Fig 1 The HPLC-ELSD of Olenolic acid

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照

A. standards; B. samples; C. blank solution

2.5 线性关系的考察

精密量取对照品溶液 5, 10, 15, 20μL 注入色谱仪, 以对照品峰面积的自然对数 LnA 为纵坐标, 以进样量的自然对数 LnC (μg) 为横坐标。得回归方程为: $Y = 1.663\ 6X + 7.804\ 7$, $r = 0.999\ 7$; 线性范围为: 0.21 ~ 4.16μg。

2.6 精密度试验

精密吸取供试品溶液, 连续进样 5 次, 每次进样 5μL, 齐墩果酸峰面积的 RSD = 0.29%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 0, 4, 6, 24, 72h 进样, 记录色谱图及峰面积值 RSD = 0.79%, 表明齐墩果酸在 72h 稳定, 可以满足实验要求。

2.8 重复性试验

取同一供试品 (批号: 20050317), 依法操作, 重复 5 次, 测定齐墩果酸平均含量为标示量的 95.8%, RSD = 0.57%。

2.9 回收率试验

精密称取已知含量的供试品细粉 (批号: 20050317) 适量

2.2 对照品溶液的制备

精密取齐墩果酸对照品 10.39mg 置 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 为储备液。精密吸取储备液 1.0mL 和 5.0mL 分置 25mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液及阴性供试品溶液的制备

取供试品 20 片精密称定, 研细, 精密称取细粉适量 (约相当于齐墩果酸 20mg) 置 50mL 量瓶中, 加甲醇约 40mL, 超声溶解 40min, 放冷, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。另取空白颗粒 (无齐墩果酸), 同法制成阴性供试品溶液。

2.4 阴性对照实验

分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液各 5μL 注入色谱仪中, 记录色谱图, 阴性供试品在齐墩果酸峰相应的保留时间处无干扰, 色谱图见图 1。

(相当于齐墩果酸 10mg), 加入一定的齐墩果酸对照品, 依法操作, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果 (n = 5)

Tab 1 The results of recovery tests (n = 5)

编号	取样量 /g	样品中 含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.0542	0.9527	0.4810	1.4302	99.76		
2	0.0548	0.9632	0.4810	1.4381	99.58		
3	0.0544	0.9562	0.4810	1.4197	98.78	99.24	0.44
4	0.0541	0.9509	0.4810	1.4151	98.03		
5	0.0537	0.9439	0.4810	1.4141	99.24		

2.10 样品测定

2.10.1 标准曲线的制备 精密称取齐墩果酸对照品 10.39mg, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。精密量取 5.0mL 置 25mL 量瓶中加甲醇定容至刻度, 摇匀。精密取 5, 10, 15μL 注入色谱仪, 以对照品的峰面积的自然对数为纵坐标, 以进样量的自然对数为横坐标, 得回归方程为 $Y =$

1. 6495 X + 7. 7953, $r=0.9999$ 。

2. 10.2 供试品测定 取三个不同批号的齐墩果酸片(浙江瑞新药业股份有限公司),依法测定,用上述标准曲线计算含量,测得批号为 20030911, 20040119, 20050317 的含量分别为标示量的 87.03%, 89.43%, 95.80%。同时采用国家标准酸碱滴定的经典方法和 HPLC-UV 法测得的结果分别为: 98.57%, 100.03%, 102.33%; 87.09%, 89.90%, 96.17%。

3 讨论

3.1 齐墩果酸片 收载于《卫生部药品标准》二部第三册,含量测定采用酸碱滴定法,用乙醇制氢氧化钾滴定液,其配制较为繁琐,测定终点不明显;薄层色谱法对薄层条件要求比较苛刻,重现性不理想;齐墩果酸为五环三类成分,在紫外 204nm 处有末端吸收,采用 HPLC-UV 检测时,受流动相影响大,基线不理想,检测灵敏度较低,只有当样品浓度加大时(约 1mg/mL),基线噪声被抑制,亦能准确定量。蒸发光散射检测器为通用型质量检测器,检测时流动相在检测器内挥发成气体,样品组分形成气溶胶,进入检测器产生响应,从而获得理想的基线和检测灵敏度,克服了紫外末端检测的不足。实验证明,采用 HPLC-ELSD 法与 HPLC-UV 法测得结果基本一致,而酸碱滴定法结果偏高。

3.2 实验时曾对一批齐墩果酸原料(浙江瑞新药业股份有

限公司),分别采用 HPLC-ELSD 法、HPLC-UV 法及酸碱滴定法进行含量测定,结果分别为: 99.15%, 99.32%, 98.88%, 三种方法结果基本一致,但酸碱滴定法测定原料药和片剂的含量时差异较大,可能是由于片剂辅料的干扰所致。建议片剂的含量测定宜采用 HPLC 法。

3.3 齐墩果酸 在氯仿中略溶,在甲醇、乙醇、丙酮中微溶,水中几乎不溶。由于氯仿毒性较大,用液相色谱最常用的试剂甲醇作为溶剂。在供试品溶液的制备中,采用超声 10, 20, 30, 40, 60min 溶解,结果显示超声 40min 能使齐墩果酸完全溶出。

参考文献

- [1] Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Part 2, Vol 6.
- [2] DU S H, ZHONG J H, GENG W S. Determination of Oleanolic acid in fructus chaenomelis by thin-layer scan chromatography [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2003, 34(1): 35.
- [3] XIE Y, HANG T J, CHENG Z. HPLC Determination of Oleanolic acid and Irolic Chinese Medicinal Herbs [J]. Chin J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2001, 26(9): 615.

收稿日期: 2006-03-17