

HPLC-ELSD 测定威灵仙中齐墩果酸的含量

钟保恒, 郭敏, 蓝晓玉(广西柳州食品药品检验所, 广西 柳州 545001)

摘要: 目的 建立威灵仙中齐墩果酸的高效液相色谱-蒸发光散射法测定方法。方法 采用 SumFire™ C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 柱温 40 ℃; 乙腈-水(85:15)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 蒸发光散射检测器漂移管温度 85 ℃, 空气流速 2.3 L·min⁻¹。结果 齐墩果酸在 0.214~1.92 μg 内线性关系良好, $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 98.8%, RSD 为 0.9%($n=6$)。结论 该方法简便, 快速, 准确, 可作为威灵仙的质量控制。

关键词: 高效液相色谱-蒸发光散射法; 威灵仙; 齐墩果酸

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)06-0494-03

Determination of Oleanolic Acid in Weilingxian by HPLC-ELSD

ZHONG Baoheng, GUO Min, LAN Xiaoyu(Guangxi Liuzhou Institute for Drug Control, Liuzhou 545001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-ELSD method for the determination of oleanolic acid in Weilingxian. **METHODS** Using SumFire™ C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 40 ℃, acetonitrile -water(85:15) was used as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. An evaporative light-scattering detector(ELSD) was used as detector with gas flow rate of 2.3 L·min⁻¹ and drift tube temperature of 85 ℃. **RESULTS** The oleanolic acid had a good linearity relationship between 0.214-1.92 μg($r=0.999\ 9$). The average recovery was 98.8% with RSD = 0.9%($n=6$). **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate, suitable for the quality control of Weilingxian.

KEY WORDS: HPLC-ELSD; Weilingxian; Oleanolic acid

威灵仙为毛茛科植物威灵仙(*Clematis chinensis* Osbeck)、棉团铁线莲(*Clematis hexapetala* Pall.)或东北铁线莲(*Clematis manshurica* Rupr.)的干燥根及根茎^[1]。威灵仙中主要含有齐墩果酸、白头翁素等成分^[2], 具有祛风除湿, 通络止痛的功效, 用于风湿痹痛, 肢体麻木, 筋脉拘挛等症, 是临床常用药材之一。目前有文献收载薄层扫描法^[3]、高效液相色谱-紫外检测法测定威灵仙中齐墩果酸的含量^[4], 未见文献报道 HPLC-ELSD 法测定其含量。笔者根据蒸发光散射检测器对齐墩果酸测定的特点^[5-6], 探索蒸发光散射法测定药材中齐墩果酸的含量, 结果表明该方法简便, 结果准确, 重复性好, 可作为控制该药材质量的方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国沃特斯公司); Alltech ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器(美国奥泰科技公司); Empower 色谱工作站; XWK-3A 空气泵(天津华生分析仪器厂); 齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110709-200505, 供含量测定用); 乙腈为色谱纯, 水为自制高纯水;

威灵仙药材由广西柳州市各药店提供, 经本所中药室李玲副主任中药师鉴定为毛茛科植物威灵仙, 棉团铁线莲、东北铁线莲。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

SumFire™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 40 ℃, 流动相为乙腈-水(85:15), 流速 1.0 mL·min⁻¹。ELSD 漂移管温度 85 ℃, 空气流速 2.3 L·min⁻¹, 进样量 10 μL。在该条件下, 供试品中的齐墩果酸与其他杂质峰均达到较好的分离, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取齐墩果酸对照品(使用前置五氧化二磷减压干燥器中干燥 20 h) 21.38 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为储备液。精密吸取储备液 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取威灵仙粉末约 1 g, 精密称定, 加乙醇 50 mL, 加热回流 2 h, 滤过, 滤液浓缩至约 20 mL,

加盐酸 3 mL，加热回流 1 h，加水 10 mL，放冷，加石油醚(60~90 ℃)振摇提取 4 次(每次 25 mL)，合并石油醚层，蒸干^[1]，残渣用甲醇溶解并定容至 50 mL，滤膜过滤后制成供试品溶液。

2.4 线性试验

精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 mL 至 10 mL 量瓶中，用甲醇分别定容后，10 μL 注入到高效液相色谱仪中，以对照品峰面积的对数 logA 为纵坐标，以进样量的对数 logC(μg)为横坐标，得回归方程为： $Y=1.597\ 646\ X+6.571\ 580$ ， $r=0.999\ 9$ ，线性范围为 0.214~1.92 μg。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取供试品溶液，重复进样 6 次，每次 10 μL，齐墩果酸峰面积的 RSD 为 1.0%，表明仪器性能良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别于 0, 4, 8, 12 h 进样，测定其峰面积的 RSD 为 1.5%，表明该供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一供试品(产地：四川)6 份，按“2.3”项下方法操作，分别测定每份的含量，最后得出齐墩果酸的平均含量为 0.623%，RSD 为 1.1%。

2.8 回收率试验

取 6 份已知含量的样品约 0.5 g，精密称定，分别准确加入对照品储备液 5 mL 和甲醇溶液 45 mL，按“2.3”项下方法操作，进样 10 μL 测定，计算回收率。结果平均回收率为 98.8%，RSD 为 0.9%。

2.9 样品测定

取 4 个不同产地的威灵仙，按拟定的色谱条件测定其含量，根据线性关系得出的回归方程进行计算，结果见表 1。对照品和供试品的色谱图见图 1。

表 1 样品含量测定结果

样 品	齐墩果酸含量/%	RSD/%
威灵仙(产地：四川)	0.623	1.1(n=6)
威灵仙(产地：广西)	0.750	0.54(n=3)
棉团铁线莲(产地：广西)	0.740	0.61(n=3)
东北铁线莲(产地不详)	0.592	0.59(n=3)

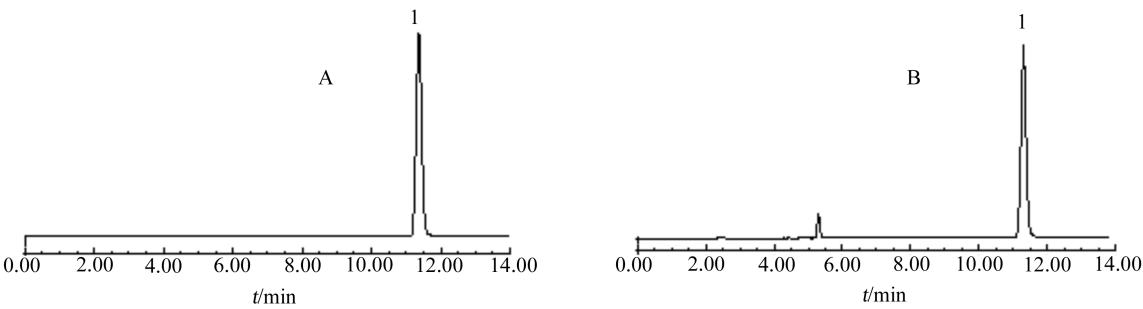


图 1 齐墩果酸 HPLC-ELSD 色谱图

A-对照品溶液;B-供试品溶液;1-齐墩果酸

Fig 1 The HPLC-ELSD chromatograms of oleanolic acid

A-solution of reference substances;B-sample solution;1-oleanolic acid

3 讨论

供试品溶液的制备采用了药典方法，药材中皂苷的提取和水解比较完全。比较了用甲醇和乙醇作为溶剂溶解残渣，发现甲醇较易溶解，在色谱分析中稳定性相对较好。

蒸发光散射检测器的分析条件：经实验摸索，本方法为最佳条件，齐墩果酸色谱峰的理论板数达到 20 000 以上，供试品溶液中各杂质峰与主峰的分离度均达到要求。

考察稳定性试验时，由于选择的溶剂为甲醇，

易挥发，24 h 后测定其含量发现略有升高，故建议测量时间在 12 h 内完成。

中国药典 2005 年版一部中，威灵仙药材项下未建立主要成分的含量测定指标及方法，本实验为进一步控制该药材的质量提供了有益的探索。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol I(中国药典 2005 年版一部)[S].2005: 175.
[2] XIAO P G. Modern Chinese Materia Medica(新编中药志) [M]. Vol I. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 681.

- [3] XIONG H L, ZHENG M X. Determination of oleanolic acid in Weilingxian by TLCS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(4): 357-359.
- [4] YANG L, PEI J, WAN D G. Content measurement of triterpenoidal sapogenin oleanofic acid in traditional chinese medicine Weilingxian by HPLC[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18(2): 313-315.
- [5] ZHAO Y X, LI M L. The effects of parameters on the ELSD detecting performance of oleanolic acid and sarsasapogenin [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(9): 1245-1247.
- [6] CHEN G Y, YANG G N, CHEN W P. Determination of oleanolic acid tablets by HPLC-ELSD[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(1): 62-64.

收稿日期: 2008-07-01