

文章编号: 1671-6833(2005)04-0051-02

HPLC 法测定齐墩果酸片中齐墩果酸的含量

韩志慧, 刘国际, 雒廷亮

(郑州大学化工学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 针对采用酸碱非水溶液滴定法控制齐墩果酸的质量不易掌握, 误差较大等缺点, 采用高效液相色谱法分离并测定齐墩果酸片中齐墩果酸的含量. 色谱条件为: 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 柱, 流动相为甲醇-水(90:10), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 215 nm , 柱温 27°C . 该条件下齐墩果酸在 $0.025 \sim 2.520 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 线性关系良好, $r = 0.9997$, 齐墩果酸平均回收率 99.4% , 13 min 左右出峰, $\text{RSD} = 1.9\%$. 这种方法结果准确, 可有效控制该制剂的质量.

关键词: 齐墩果酸; 含量; 高效液相色谱法

中图分类号: R 284.1 文献标识码: A

0 引言

齐墩果酸(oleanolic acid)片具有降低谷丙转氨酶, 促进细胞再生, 防止肝硬化, 抗炎及强心等作用, 目前国内有许多厂家生产齐墩果酸片剂. 生产上采用酸碱非水滴定法^[1]测定其含量, 但这种方法终点不易掌握, 专属性不强, 误差较大. 也有人采用比色法^[2]、双波长薄层扫描法^[3,4]、旋光法^[5]等, 但这些方法操作繁琐, 误差较大. 我们尝试使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定齐墩果酸片中有效成分的含量, 方法重现性好, 定量准确, 十几分钟即可完成测定, 可用于该制剂的质量控制. 应用本法测定了3批产品的含量, 并与非水溶液滴定法进行比较.

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统, DAD 检测器及色谱工作站; KQ-50 型超声波清洗器(昆山市淀山湖检测仪器厂); R201 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); 索氏提取装置; 甲醇(色谱纯); 乙醇(分析纯); 水(二次重蒸水); 齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 110709-200304, 定量分析用); 齐墩果酸片(江苏鹏鹞药业有限公司).

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 柱($5 \mu\text{m}$, $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 流动相: 甲醇-水(90:10); 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 215 nm ; 柱温: 27°C ; 进样量 $10 \mu\text{L}$. 齐墩果酸在 13 min 左右出峰, 由于采用手动进样方式, 导致样品和标准品保留时间稍有差异. 标准品和样品的 HPLC 谱图见图 1. 图中 1 为齐墩果酸.

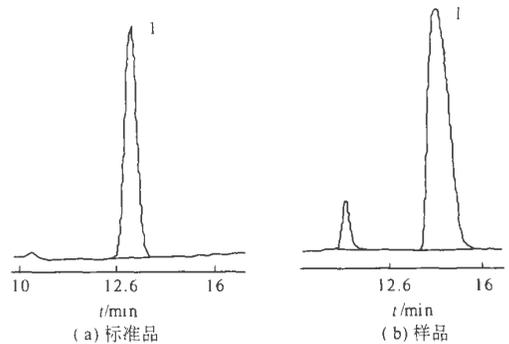


图 1 标准品和样品 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard sample

2.2 对照品溶液的制备

精密称取齐墩果酸对照品适量, 用甲醇溶解

收稿日期: 2005-06-28; 修订日期: 2005-09-10

基金项目: 河南省重点科技攻关资助项目(0523020300)

作者简介: 韩志慧(1970-), 女, 河南南阳人, 郑州大学讲师, 在读博士研究生, 主要从事天然产物提取分离方面的研究.

配制成浓度为 $2.52 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 贮备液. 精密吸取贮备液 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容. $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后即得.

2.3 供试品溶液的制备

精密称取齐墩果酸片适量, 研末, 加入 25 mL 无水乙醇 60°C 水浴回流提取两次, 每次 2 h, 过滤, 合并提取液, 50 mL 容量瓶定容, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后即得.

2.4 线性关系考察

以齐墩果酸的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线. 回归方程为: $A = 3.092C - 3.0473$, $r = 0.9997$, 线性范围为 $0.0252 \sim 2.520 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最小检出限 (信噪比 ≥ 3) 为 $0.028 \mu\text{g}$.

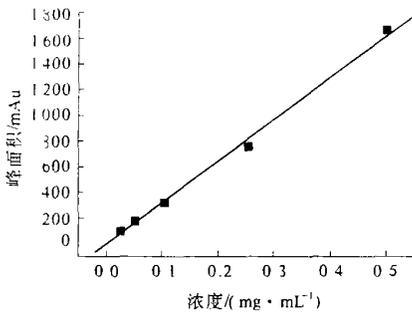


图2 齐墩果酸的工作曲线

Fig. 2 The calibration curves of oleanolic acid

2.5 精密度试验

精密吸取浓度为 $0.1080 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 重复进样测定, 齐墩果酸平均峰面积为 266.85 mAu ($n=6$), 相对标准偏差 (RSD) 为 0.4% .

2.6 稳定性试验

对同一对照品溶液间隔 0.2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、2 d、3 d 分别进样测定齐墩果酸峰面积. 结果 RSD 为 1.4% , 表明溶液稳定性良好.

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品 5 份, 相同方法提取, 测得齐墩果酸质量百分含量平均值为 11.12% , RSD 为 0.9% .

2.8 加样回收率试验

采用加样回收法. 精密称取已知含量的样品 5 份, 精密加入一定量的齐墩果酸对照品, 按样品测定方法测定并计算回收率. 结果见表 1. 其平均加样回收率为 99.4% , RSD 为 1.6% .

表 1 回收率试验结果

Tab. 1 The result of recovery rate

样品量	本底量	加入量	测得量	回收率
/g	/mg	/mg	/g	/%
0.503 2	0.585 2	2.520	3.096 4	99.65
0.508 6	0.591 5	1.260	1.869 7	101.44
0.515 1	0.599 0	0.252	0.843 0	96.83
0.516 4	0.600 1	0.504	1.093 2	97.84
0.514 7	0.598 6	0.756	1.363 6	101.19

3 样品含量测定

(1) 分别吸取齐墩果酸供试品溶液各 10 μL , 依上述色谱条件进样, 3 个批次齐墩果酸片中有有效成分齐墩果酸的含量见表 2, 并与非水溶液滴定法 (乙醇的 KOH 溶液作滴定液, 酚酞作指示剂) 进行了比较. 三个批次的含量均符合部颁标准, 含量均大于 10% , HPLC 法的 RSD 均低于滴定法, 这表明 HPLC 法实验重复性好, 结果精确可靠.

表 2 样品含量测定

Tab. 2 The content of oleanolic acid in sample %

批次	HPLC 法		滴定法	
	含量	RSD	含量	RSD
20030601	11.12	0.9	11.47	2.3
20030901	10.53	1.1	10.92	1.8
20040203	10.56	0.7	10.82	1.5

说明: n 为实验重复次数, $n=4$.

(2) 精密称取同一批次齐墩果酸片剂粉末 3 份, 分别使用: ① 无水乙醇 60°C 水浴回流提取 2 h; ② 无水乙醚 50°C 水浴回流提取 2 h; ③ 无水乙醇超声提取 20 min. 三种方法制备供试品溶液, 10 μL 色谱进样. 有效成分的百分含量分别为 11.12% , 8.56% , 11.06% , RSD 分别为 2.3% , 1.8% 和 1.3% .

4 结论

(1) 高效液相色谱法所探索的色谱条件一流动相: 甲醇: 水 = 90: 10, 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 215 nm , 柱温: 27°C , 可以使齐墩果酸片中的成分达到基线分离. 该方法方便、快捷, 十几分钟可完成测定, 结果准确可靠.

(2) 齐墩果酸转移率试验发现无水乙醚作溶剂转移不完全, 无水乙醇超声提取转移率高, 用时短, 结合 RP-HPLC 法可用于齐墩果酸的质量控制方法.

extracting is studied in this paper. The content of total flavonoids in sesame leaves is determined by spectrophotometric methods. The results show that the optimum conditions are obtained as follows: the ratio of material to solvent is 1:60; pH=5.0; the temperature of enzyme hydrolysis is at 45°C; the concentration of enzyme is 3 U/ml; the time of enzyme hydrolysis is 2.5 hours; the extraction time is 2.5 hours; the extraction temperature is 80°C. This process is new, simple and practical, and the yield of product is 12.31%.

Key words: enzyme hydrolysis; extraction; sesame leaves; flavonoids

(上接第52页)

参考文献:

- [1] WS-346(X-289)-94, 中华人民共和国卫生部药品标准(二部三册)[S].
- [2] 姜华. 薄层-比色法测定贞芪扶正口服液中齐墩果酸的含量[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(3): 103~104.
- [3] 都述虎, 饶金华, 耿武松. 薄层扫描法测定木瓜中齐墩果酸的含量[J]. 中草药, 2003, 34(1): 35~37.
- [4] 胡君萍, 杨建华, 都年生. 双波长薄层扫描法测定维吾尔药琐琐葡萄中齐墩果酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(1): 58~59.
- [5] 肖巧清, 李玉兰. 旋光法测定齐墩果酸片的含量[J]. 天津药学, 2002, 14(3): 80~81.

Determination of Oleanolic Acid in Tablets by HPLC

HAN Zhi-hui, LIU Guo-ji, LUO Ting-liang

(School of Chemical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The acid-base non-aqueous titration is used extensively to control the quality of OLA. But this method is unstable and the resulting error is great. In view of this, the isolation and determination of OLA in tablets by HPLC is reported. The chromatographic method is carried out on ZORBAX SB-C18 column using 90% methanol + 10% water as mobile phase, detector being set at 215 nm, the linear relation of calibration curve in the range of 0.0252~2.5200 mg·mL⁻¹ was excellent ($r=0.9997$). The average recovery is 99.4% with RSD=1.9%. The method is rapid, accurate and reliable for quality control of oleanolic acid tablets.

Key words: oleanolic acid (OLA); content; HPLC