

TLCS法与HPLC法测定二至丸中齐墩果酸含量的方法比较

孙小玲^{1*}, 何凡^{2#}, 宿亚柳²(1.辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110032; 2.辽宁中医药大学药学院, 沈阳 110847)

中图分类号 R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)12-1696-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.39

摘要 目的:比较薄层扫描(TLCS)法与高效液相色谱(HPLC)法测定二至丸中齐墩果酸含量的方法。方法:分别采用TLCS法和HPLC法。TLCS法参照2010年版《中国药典》(一部)的方法,波长分别为530、680 nm。HPLC法采用色谱柱为ODS,流动相为乙腈-水(80:20, V/V),检测波长为220 nm,流速为1 ml/min,柱温为25 ℃。结果:HPLC法中,齐墩果酸的进样量在0.200 68~1.003 4 μg范围内与峰面积呈良好线性关系;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为100.7%,RSD为0.7%(n=6)。TLCS法测得二至丸中齐墩果酸的含量为8.78 mg/g, HPLC法测得其含量为9.82 mg/g,二者比较差异无统计学意义(P>0.05)。结论:该研究所建立的HPLC方法操作快速、简便,结果稳定、可靠,更适用于二至丸中齐墩果酸的含量测定。

关键词 二至丸;齐墩果酸;薄层色谱;高效液相色谱法

Methods Comparison of the Content Determination of Oleanic Acid in Erzhi Pill by TLCS and HPLC

SUN Xiao-ling¹, HE Fan², SU Ya-liu²(1.Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110023, China; 2.School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the content determination method for oleanic acid in Erzhi pill by TLCS and HPLC. METHODS: TLCS and HPLC were conducted. *Chinese Pharmacopoeia* (first part, 2010 edition) was used for TLCS. In HPLC, the wavelengths were respectively 530 and 680 nm; the column was ODS with the mobile phase of acetonitrile-water (80:20, V/V) at the flow rate of 1 ml/min; the detection wavelength was 220 nm and the temperature was 25 ℃. RESULTS: In HPLC, there was a good linear relationship between the volume and the peak area in the range of 0.200 68-1.003 4 μg; the RSDs of precision, stability and repeatability was less than 2% and the average recovery was 100.7% (RSD=0.7%, n=6). TLCS showed that the content of oleanic acid in Erzhi pill was 8.78 mg/g and HPLC showed that the content was 9.82 mg/g, with no significant difference (P>0.05). CONCLUSIONS: The established HPLC is stable, reliable, rapid, easy and feasible. It is more suitable for the content determination of oleanic acid in Erzhi pill.

KEYWORDS Erzhi pill; Oleanic acid; TLCS; HPLC

二至丸是以中草药女贞子、墨旱莲为原料药制成的中成药,具有补益肝肾、滋阴止血、壮筋骨、乌须发之功效^[1]。对于肝肾阴虚所致的眩晕耳鸣、咽干鼻燥、腰膝酸痛、月经量多等证有较好的效果。2010年版《中国药典》(一部)中采用薄层扫描(TLCS)法测定二至丸中齐墩果酸的含量^[2],但该方法尚存在一些不足。为此,本研究分别采用TLCS法和高效液相色谱(HPLC)法测定女贞子中齐墩果酸的含量并进行了比较,为建立更方便、准确的测定方法提供参考^[3-7]。

1 材料

1.1 仪器

HPLC仪(美国Agilent公司);CP225D型分析天平(德国Sartorius公司);HH-4型数显恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);硅胶G(美国默克公司);Venticell 55型电热恒温鼓风干燥箱(美国3M公司);FW-135高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);Scanner 3型TLCS仪。

1.2 药品与试剂

* 副主任药师, 硕士。研究方向:药品质量标准研究。电话:024-31266308

通信作者:博士,副教授。研究方向:中药药效物质基础与作用机制研究。电话:0411-87586078

二至丸(自制);齐墩果酸对照品(科翔生物科技有限公司,批号:FY20120306);10%硫酸乙酸溶液、无水乙醇、环己烷、丙酮、乙酸乙酯均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLCS法

2.1.1 对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成每1 ml含1.003 4 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 照2010年版《中国药典》(一部)二至丸项下方法:取本品适量,研细,取约0.5 g,精密称定,置于索氏提取器中,加乙酸乙酯适量,加热回流提取6 h,提取液回收乙酸乙酯至干,残渣加乙酸乙酯使溶解,转移至5 ml量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.3 样品含量测定 照薄层色谱法[2010年版《中国药典》附录VI B]试验,精密吸取供试品溶液2 μl和对照品溶液各1.4 μl,分别交叉点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液显色,于110 ℃加热至斑点显色清晰,放冷。在薄层板上覆盖同样大小的玻璃板,周围用胶布固定,照薄层色谱法[2010年版《中国药典》附录VI B TLCS法]进行扫描,于530、

680 nm 波长处分别测定供试品溶液与对照品溶液吸光度的积分值,计算样品含量,平行测定 3 份,每份样品测定 3 次。结果,平均含量为 8.78 mg/g。

2.2 HPLC 法

2.2.1 色谱条件 色谱柱:ODS 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(80:20, V/V);检测波长:220 nm;流速:1 ml/min;柱温:25 °C。色谱见图 1。

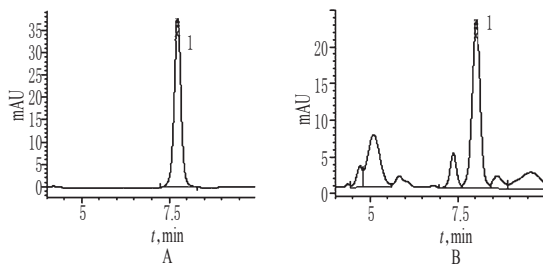


图 1 高效液相色谱图
A.对照品;B.供试品;1.齐墩果酸
Fig 1 HPLC chromatograms

A.control sample; B.test sample; 1.oleanolic acid

2.2.2 对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成每 1 ml 含 1.003 4 mg 的溶液;精密量取上述溶液 1 ml 至 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,精密称取 0.506 5 g,置索氏提取器中,加乙酸乙酯适量,加热回流提取 6 h,提取液回收乙酸乙酯至干,残渣加乙酸乙酯使溶解,并转移至 5 ml 量瓶中,定容,摇匀,作为供试品贮备液。精密量取供试品贮备液 1 ml 至 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取齐墩果酸对照品溶液 2、4、6、8、10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得齐墩果酸的回归方程为 $y=560.54x-8.33$ ($r=0.999 2$)。结果表明,齐墩果酸的进样量在 0.200 68~1.003 4 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果, $RSD=0.7\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μl,分别于放置 0、2、4、8、12 h 后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, $RSD=0.3\%$ ($n=5$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品 0.5 g,共 5 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果,5 份样品的平均含量为 9.93 mg/g, $RSD=0.7\%$ ($n=5$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品各 0.5 g,共 6 份,分别精密加入对照品溶液 1.5 ml(质量浓度为 1.003 4 mg/ml),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表 1。

2.2.9 样品含量测定 取 3 批样品各约 0.5 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果,3 批样品的含

量分别为 9.83、9.69、9.94 mg/g,平均含量为 9.82 mg/g。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of sample recovery test($n=6$)

称样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.506 5	5.019 4	5.017 0	10.045 7	100.1		
0.503 2	4.986 7	5.017 0	10.023 5	100.3		
0.499 8	4.953 0	5.017 0	10.006 5	100.7	100.7	0.7
0.502 1	4.975 8	5.017 0	10.100 3	102.1		
0.501 8	4.972 8	5.017 0	10.015 8	100.5		
0.503 9	4.993 6	5.017 0	10.037 5	100.5		

3 讨论

3.1 HPLC 法中检测波长的选择

取齐墩果酸对照品溶液适量,在 200~350 nm 波长范围内进行扫描。结果,齐墩果酸在 220 nm 波长附近有最大吸收峰,因此选择 220 nm 作为检测波长。

3.2 HPLC 法中流动相的选择

因女贞子中同时还含有熊果酸,后者是齐墩果酸的同分异构体,化学结构与性质极为相似,两者很难分离。在本研究中,笔者曾选用乙腈-甲醇-水体系作为流动相,但柱压太大,对色谱柱有损伤;后改用乙腈-水体系为流动相,并调节流动相的比例进行试验。结果表明,以乙腈-水(80:20, V/V)为流动相时的分离度好,而且保留时间适宜,因此选择乙腈-水(80:20, V/V)作为流动相。

3.3 两种检测方法的比较

采用 SPSS 10.0 统计软件对本研究两种方法的测定结果进行分析。结果,两种方法的含量测定结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。由此可见,两种方法均可应用于测定二至丸中齐墩果酸的含量。但从试验方法和过程可知, HPLC 法具有操作快速、简便,结果稳定、可靠的优点,更适用于二至丸中齐墩果酸的含量测定。因此,笔者建议采用 HPLC 法代替 TLCS 法测定二至丸中齐墩果酸的含量。

参考文献

- [1] 席军,佟力.二至丸药理作用研究进展[J].中外医疗,2009(21):98.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:130.
- [3] 罗玲英,陈燕军,吴铁荣.HPLC法测定二至丸中齐墩果酸含量实验条件的探索[J].亚太传统医药,2010,6(10):38.
- [4] 李芳美,祝晨蓀.女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J].今日药学,2009,4(4):37.
- [5] 胡俊明,蒋晓煌,蒋孟良.双波长薄层扫描法定量测定二至丸中齐墩果酸和熊果酸[J].福建中医学院学报,2013,6(6):1343.
- [6] 李梦.HPLC法测定二至丸中齐墩果酸的含量[J].中国药师,2009,12(1):129.
- [7] 林雄浩,吴岩斌.高效液相色谱法同时测定二至丸中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].福建中医学院学报,2009,19(6):23.

(收稿日期:2014-12-20 修回日期:2015-03-19)

(编辑:孙冰)