

HPLC 测定齐酞酸钠含量及其有关物质

麻秀萍, 蒋朝晖*, 贾宪生, 陈聪, 邓华湘
(贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:用高效液相色谱法测定齐酞酸钠的含量及其有关物质。方法:采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液(80:10:10)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 210 nm。结果:齐酞酸钠与其相邻杂质峰能完全分离, 齐酞酸钠在 0.052 5 ~ 0.997 5 μg 进样量与峰面积呈良好线性关系($r = 0.999 9$), 最低检出限为 3 ng; 精密性良好(RSD 0.38%), 平均回收率为 99.53% ($n = 9$)。结论:该方法简便、准确、专属性好、灵敏度高, 可用于齐酞酸钠的含量及有关物质测定。

[关键词] 齐酞酸钠; 含量; 有关物质; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0089-03

HPLC Determination of the Content of Oleanolic Acid 3β-phthalic Monoester Disodium Salt and its Related Substances

MA Xiu-ping, JIANG Zhao-hui*, JIA Xian-sheng, CHEN Cong, DEN Hua-xiang
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content and the related substances of oleanolic acid 3β-phthalic monoester disodium salt (OAPES) by HPLC. **Method:** The separation was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), column temperature at 35 °C with mobile phase of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (80:10:10). The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ with detection at 210 nm. **Result:** There was a good linear relationship within the range of 0.052 5-0.997 5 μg ($r = 0.999 9$), the least detective range is 3 ng. The precision in a day is good (RSD 0.38%). The average recovery was 99.53% ($n = 9$). **Conclusion:** The method is simple, accurate, specific and sensitiveness for the determination OAPES content and its related substances.

[Key words] oleanolic acid 3β-phthalic monoester disodium salt; content; related substances; HPLC

齐酞酸钠(oleanolic acid 3β-phthalic monoester disodium salt, OAPES, C₃₈H₅₀O₆Na₂)是根据前体药物的理论^[1-2], 对治疗急慢性肝炎的天然药物齐墩果酸(oleanolic acid, OA)进行结构修饰得到的一个新化合物^[3], 其水溶性和保肝作用比 OA 有显著改

善^[4]。准确测定齐酞酸钠含量和检查有关物质是 OAPES 新药开发的需要, 也是合成 OAPES 时质量监控的需要。目前对 OAPES 的含量测定方法采用非水滴定法和紫外分光光度法(吸收系数法)^[5], 不能直接分析其有关物质。为更有效控制其质量, 本文采用高效液相色谱方法测定 OAPES 含量, 分析有关物质, 为该药的含量测定和杂质检查提供简便可靠、专属性强、灵敏度高的分析方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(真空脱气机, 二元泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, Agilent 化学工作站)。齐酞酸钠原料药(批号 20080601)和对照品为自制。齐酞酸钠对照品(经

[收稿日期] 20110629(004)

[基金项目] 贵州省科技厅攻关项目(黔科合字[1998]9号)

[第一作者] 麻秀萍, 副教授, 从事分析化学及中药制剂分析和科研工作, Tel: 0851-5601577, E-mail: mxp001130@sina.com.cn

[通讯作者] * 蒋朝晖, 副教授, 从事中药化学及新药研发工作, E-mail: jiangzengwang@yeah.net

紫外光谱、红外光谱、核磁及质谱确认结构,采用 HPLC 检测其纯度为 99.2%);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

2 方法和结果

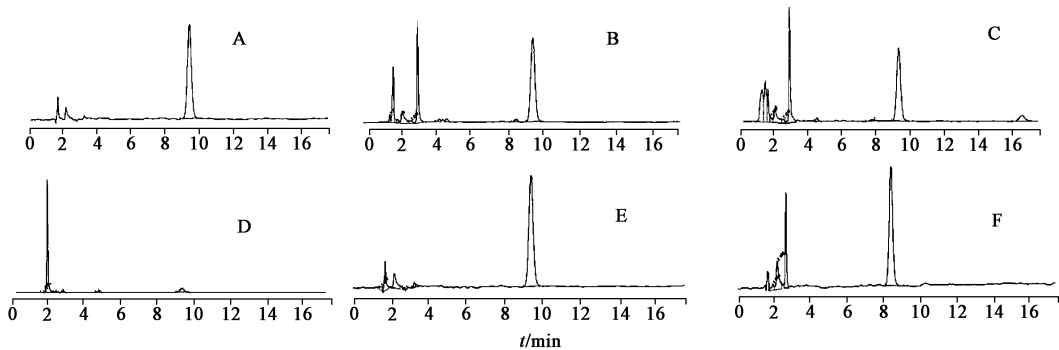
2.1 色谱条件和系统适用性 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液(80:10:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 35 °C,进样体积 5 μL,按 OAPES 峰计算理论板数不低于 3 000,齐酞酸钠与各杂质峰间的分离度均大于 1.5。

2.2 空白试验 以 90% 甲醇溶液为空白实验对照,取该溶液进样 5 μL,在上述色谱条件下测定,记录色谱图,在 3 min 前有色谱峰出现,但不干扰 OAPES 的测定。

2.3 破坏性试验 取齐酞酸钠 0.1 g 各 2 份,精密称定,分别置 50 mL 的圆底烧瓶中,分别加入 0.5% 的盐酸甲醇溶液、1% 氢氧化钠甲醇溶液各 20 mL,

超声处理使其充分溶解,水浴回流 1 h,将上述回流后的溶液分别全部转移至 50 mL 的量瓶中,用 90% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中,用 90% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,滤过。另取齐酞酸钠适量置光强度为 3 800 Lx 的光源下照射 23 d,取光照后的齐酞酸钠 0.1 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用 90% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,精密量取该溶液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中,用 90% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,滤过。

分别取破坏性试验溶液各 5 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定。出峰时间:齐酞酸钠为 9.4 min;酸破坏条件下产生的杂质 a 为 3.0 min,杂质 b 为 4.6 min,杂质 c 为 7.9 min,杂质 e 为 16.5 min;碱破坏条件下产生杂质 a, b, 及杂质 d(OA) 为 8.4 min;光照条件下未测出杂质 a, c, d, e, 但在 1.8 min 出现一大峰,并有杂质 b。主要成分齐酞酸钠与降解产物均达到完全分离。见图 1。



A. OAPES 对照品($t_R = 9.4$ min); B. 酸破坏产物; C. 碱破坏产物;
D. 光照破坏产物; E. OAPES 样品; F. 齐墩果酸对照品($t_R = 8.4$ min)

图 1 HPLC 专属性考察

2.4 测定方法 取齐酞酸钠样品约 50 mg,精密称定,置 50 mL 的量瓶中,以 90% 甲醇超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 10 min,使其充分溶解,放冷,定容至刻度,再精密量取 1 mL 置 10 mL 的量瓶中,以 90% 甲醇稀释至刻度,即得供试品溶液。精密称取齐酞酸钠对照品适量,以 90% 甲醇溶解,制成 0.1 g·L⁻¹ 对照品溶液。

取供试品和对照品溶液各 5 μL 按 2.1 项下色谱条件,分别进样分析,记录色谱图,采用外标法计算齐酞酸钠的含量。

2.5 线性关系考察 精密称取齐酞酸钠对照品适量,加 90% 甲醇溶液配成系列对照品溶液,分别精密取各溶液 5 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积值。以 OAPES 的进样量(μg)对峰面积进行线性回归,得回归方程 $Y = 7\,155.8X + 8.724\,6$ ($r = 0.999\,4$);

结果表明 OAPES 进样量在 0.052 5 ~ 0.997 5 μg 线性关系良好。

2.6 检测限 配制齐酞酸钠低浓度溶液,用 90% 甲醇逐步稀释,分别进样 5 μL,记录色谱图。以峰高接近基线噪音 3 倍时的进样量为最低检测限,齐酞酸钠最低检测限为 3 ng。

2.7 精密度试验 精密吸取 OAPES 对照品溶液($C = 0.113$ g·L⁻¹) 5 μL,连续进样 6 次,结果齐酞酸钠峰面积 RSD 0.38%,表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取齐酞酸钠样品(20080601),制备 6 份样品,测得供试品中齐酞酸钠百分含量平均值为 97.91%,RSD 0.61%,表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取 OAPES 溶液,分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 后测定,结果齐酞酸钠峰面积值

RSD 0.48%,表明齐酞酸钠溶液至少在 10 h 内稳定。

2.10 回收率试验 取 25 mg 齐酞酸钠(批号 20080601,含量为 97.91%)9 份,精密称定,置 50 mL 的量瓶中,分别精密加入 $2.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 齐酞酸钠对照品溶液 8,10,12 mL 各 3 份,以 90% 甲醇定容至刻度,过滤,再精密量取 1 mL 置 10 mL 的量瓶中,以 90% 甲醇稀释至刻度,精密取 5 μL 注入液相色谱仪,计算回收率,结果平均回收率为 99.53%,RSD 0.76%。

表 1 加样回收实验测定结果(齐酞酸钠含量:97.91%, $n=9$)

序号	称量 /mg	样品中齐酞酸钠的量/mg	加入齐酞酸钠的量/mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	25.04	24.516 7	19.60	43.903 1	98.91	99.53	0.76
2	25.05	24.526 4	19.60	43.922 6	98.96		
3	25.03	24.506 9	19.60	43.995 2	99.43		
4	25.01	24.487 3	24.50	48.985 0	99.99		
5	25.08	24.555 8	24.50	49.346 6	101.19		
6	25.07	24.546 0	24.50	48.961 4	99.65		
7	25.02	24.497 1	29.40	53.714 8	99.38		
8	25.03	24.506 9	29.40	53.498 2	98.61		
9	25.07	24.546 0	29.40	53.837 2	99.63		

2.11 样品的测定 取 3 批样品,按 2.4 项下方法制备,2.1 项下方法测定,结果齐酞酸钠的含量分别为 98.43%,98.16%,97.48%。

2.12 有关物质测定 采用不加校正因子的主成分自身对照法测定有关物质含量^[6]。取齐酞酸钠适量,以 90% 甲醇超声溶解并稀释制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,作为供试品溶液。精密取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用 90% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。精密取对照溶液 5 μL 注入液相色谱仪,调节灵敏度,使主成分峰高约为满量程的 25%;再精密取供试品溶液 5 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。供试品色谱图中如显示杂质峰,除溶剂峰外,取杂质峰面积与对照溶液齐酞酸钠主峰面积比较并计算。测得 3 批样品有关物质含量分别为 0.95%,1.01%,1.36%。

3 讨论

3.1 溶剂及测定波长的选择 OA 为五环三萜化合物,几乎不溶于水。OAPES 是根据前体药物的理论,对 OA 进行结构修饰,在 $\text{C}_3\text{-OH}$ 与二元酸形成单酯,再转化成二钠盐,使其成为可溶于水的新化合物,两者极性差别较大,故选择 90% 甲醇作为溶剂,

对 OA 和 OAPES 都有较好的溶解性。于 190~400 nm 测定,OAPES 在 210,237,278 nm 处均有最大吸收。在 210 nm 处,OAPES 及其杂质均有较大吸收,溶剂干扰较小,因此选择 210 nm 作为 OAPES 含量测定及其有关物检查的检测波长。

3.2 色谱条件选择 OAPES 在合成过程中可能会带入中间体 OA 等相关杂质,试验比较了正相色谱法,分别用氨基、氰基色谱柱,OAPES 与 OA 不能分离。采用反相色谱法,以十八烷基硅烷键合硅胶柱为色谱柱,在中性流动相[甲醇-水(80:20)、乙腈-水(80:20)]条件下,色谱峰分离情况不佳;在碱性流动相[甲醇-0.1% 三乙胺(75:25)、乙腈-甲醇-0.7% 三乙胺(55:33:12)]条件下,色谱峰峰形较差,OA 色谱峰未检出;在酸性流动相[乙腈-四氢呋喃-0.7% 三乙胺(50:20:30)(H_3PO_4 调 pH 为 3),乙腈-0.1% 磷酸溶液(80:20)]条件下进行分析,OAPES 与 OA 能分离,但色谱峰拖尾。以甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液(80:10:10)为流动相时,OAPES 与 OA 等相关物质分离度及峰形均较好。专属性试验结果表明,本文色谱条件能有效地分离 OAPES 与酸、碱、光照破坏产物,经与 OA 对照品图谱比较,杂质 d 为 OA。

3.3 色谱图记录时间 根据各破坏条件下记录的色谱图可以发现在主峰保留时间的 2 倍后,碱破坏和光照实验的图谱中无色谱峰,酸破坏实验图谱中在约 16 min 有峰出现,故在有关物质检查中可确定色谱图记录至主峰保留时间的 2 倍。在齐酞酸钠样品经酸、碱、光照破坏产物图谱中主要产生杂质 a, b, c, d 等杂质峰,除杂质 d(OA)外其他杂质的化学结构有待进一步研究,以全面考察酸、碱、光照对齐酞酸钠的影响。

[参考文献]

- [1] 顾学裘. 药物制剂新剂型选编[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:71.
- [2] 王润玲. 前体药物应用现状[J]. 中国药学杂志,1990,25(5):262.
- [3] 蒋朝晖,宛蕾,陈秀芬. 齐酞酸钠及其药物组合物[P]. 中国:ZL 93 1 09828.9,1994-07-20.
- [4] 宛蕾,陈秀芬,蒋朝晖. 齐酞酸钠对大鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国药学杂志,1998,33(2):80.
- [5] 杨玉琴,蒋朝晖,刘毅. 紫外分光光度法测定制剂中齐酞酸钠的含量[J]. 药物分析杂志,1997,17(5):349.
- [6] 中国药典. 二部[S]. 2010; 附录 VID.

[责任编辑 蔡仲德]