

3 讨论

近几年发展起来的氨基酸高效液相测定通常采用衍生法,分柱前和柱后衍生两类。后者需专用的反应器,这会引起分离度和灵敏度的损失。柱前衍生中最常用的衍生试剂是PA^[3],PA在室温下与伯氨基酸反应生成强荧光化物。

PA柱前衍生法具有灵敏度高、分辨率强的优点,但衍生产物不够稳定,所以要严格控制衍生反应时间^[3]。经过我们反复多次摸索比较,发现反应时间以90~120s为佳。2-巯基乙醇作还原剂虽使衍生产物不稳定,但有较强的荧光吸收^[4],有利于提高检测灵敏度,因此更适用于微量递质类氨基酸的分析测定。

采用高效液相法测定氨基酸含量时,柱温对色谱分析及保持色谱柱的高效能极为重要。由于Prostar高效液相色谱系统本身未带柱加温装置,因此最初检测时对柱温未加控制,尽管每次使用缓冲液后均及时冲洗,但色谱柱压力逐渐进行性升高,柱效下降,很快该色谱柱就报废了。分析原因,可能与柱温未加控制有关;更换新色谱柱后,将色谱柱浸浴在恒温水浴槽中并控制柱温于38℃~40℃,经过这

样的改进,该色谱柱压力一直稳定在100 atm左右,最长曾连续工作100 h,色谱行为和柱压始终稳定。

本方法利用梯度洗脱使标准品及脑组织中5种氨基酸在15 min内得到分离。能满足实际测定的需要。本方法灵敏度高,稳定性好,方法简便,对操作无特殊要求,易于推广,适用于神经系统生物样品中递质类氨基酸的分析测定。

参 考 文 献

- 1 许绍芬主编. 神经生物学. 第一版. 上海:上海医科大学出版社,1990,142.
- 2 Coman CW, Rothman SM, et al. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and hebb-type synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci*. 1998,11:61.
- 3 Liu HJ. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr*. 1994,670(1):69.
- 4 Allison LA, Mopper M. O-phthalaldehyde derivatives of amines for high-speed chromatography/electrochemistry. *ANN Chem*. 1984,54:1089.

(收稿日期:2001-07-04)

比色法测定舍尼通片中植物甾醇类物质的含量

蔡美明* 方杭君

江苏省药品检验所 (南京 210008)

舍尼通片(Cernilton tablets)是治疗良性前列腺增生、慢性、非细菌性前列腺炎和前列腺疼痛的天然药物^[1,2],目前临床上已广泛使用。它原由瑞典Pharmacia & Upjohn Allergon AB公司研制生产的,现国内拟引进生产。舍尼通片是从谷物花粉中提取的脂溶性与水溶性两类混合物作为原料药,而制成的片剂。根据国外研究公司提供的有关资料表明,其脂溶性原料药所含活性组分主要是植物甾醇类的

混合物,代号为EA-10;水溶性原料药所含活性混合物组分称P-5。由于原国外质量标准中,对EA-10的含量测定只采用粗糙的半定量方法^[3],我们在其质量标准制订过程中,以其结构类似的已知化合物胆固醇(Cholesterol)作为对照品,运用Liebermann-Burchard反应,建立了测定舍尼通片中植物甾醇类混合物EA-10含量的方法,并对片剂含量的稳定性进行了考察。实验结果表明胆固醇、EA-10浓度对其

* 江苏省自然科学基金资助项目 BJ 97088

反应值均呈良好的线性关系。并按定量分析的要求进行了方法学验证。

1 实验部分

1.1 试药及仪器

对照品:胆甾醇(Merck生化试剂,含量99.0%以上)。

样品:舍尼通片(南京美瑞制药有限公司)、EA-10原料(瑞典Allergon AB公司)

试剂:氯仿(含量99.5%,使用时加无水硫酸钠除水),醋酐(含量97.0%以上),硫酸(含量95-98%),以上试剂均为分析纯。

仪器:岛津UV265型紫外分光光度计,岛津UV2401型紫外分光光度计

1.2 对照品和样品溶液的制备

1.2.1 对照品溶液的制备 取胆甾醇对照品约50mg,精密称定,置50ml棕色量瓶中,加氯仿溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0ml,分别置10ml棕色量瓶中,加氯仿稀释至刻度,制成约0.05、0.1、0.2、0.3、0.4mg/ml的溶液作为对照品溶液。

1.2.2 样品溶液的制备 取舍尼通片20片,精密称定,置乳钵中充分研细,精密称取约相当于5片的量,置具塞试管中,精密加入氯仿10ml,振摇15min,经4#小型垂容玻璃漏斗快速抽滤,取滤液作为样品溶液。

1.3 测定方法

1.3.1 对照品溶液反应值(A_s)的测定 精密吸取醋酐2ml,置具塞试管中,加硫酸1滴,立即精密加入约0.2mg/ml的对照品溶液1ml,置旋涡振荡器中混均后,再立即倒入比色池中进行反应,并同时于625nm波长处观察其反应的吸收度变化情况,记录最大吸收度 A_s 值,其中以氯仿1ml代替上述反应中的对照品溶液,同法操作,作为空白对照。

1.3.2 样品溶液反应值(A_t)的测定 以精密加入样品溶液1ml代替上述 A_s 测定中的对照品溶液,同法操作,记录最大吸收度 A_t 值,而以氯仿2ml代替其中的醋酐同法操作,作为空白对照。

测定后,按比色法原理计算出舍尼通片的含量,即以胆甾醇($C_{27}H_{46}O$)来计算每片中含植物甾醇EA-10的含量。

1.4 标准曲线的绘制

1.4.1 对照品的线性测定 精密吸取上述5个不同浓度的对照品溶液各1ml,分别按上述 A_s 测定方

法进行操作,并以浓度 C (mg/ml)对测得的反应值 A_s 作图,结果在0.05~0.4mg/ml范围内浓度对反应值呈良好的线性关系,曲线过原点,线性回归方程为 $A=2.260C$, $r=0.9999$,而且经多次反复测定,曲线重现性良好, r 均在0.999以上。

1.4.2 植物甾醇EA-10的线性测定 取已知含量的EA-10原料适量,精密称定,置50ml棕色量瓶中,加氯仿溶解并稀释至刻度。精密吸取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0ml,分别置10ml棕色量瓶中,加氯仿稀释至刻度,制成含EA-10约0.05、0.1、0.2、0.3、0.4mg/ml的溶液。精密吸取各溶液1ml,分别按上述 A_t 测定的方法操作,同样得到一条基本过原点的直线,线性回归方程为 $A=2.292C+0.0006$, $r=0.9997$ 。

1.5 原、辅料的干扰试验

1.5.1 辅料的干扰 取各辅料,按处方量混合均匀后,称取相当于5片的量,约1.57g,照上述样品溶液的制备及 A_t 测定的方法操作,测得 A_t 值为-0.001。

1.5.2 原料药P5的干扰 舍尼通片中另一活性原料药是花粉中的水溶性提取物P5,称取相当于5片量的P5约350mg,与辅料的干扰同法试验,测得 A_t 值为0.001。

实验结果表明舍尼通片中其它原、辅料对本测定方法均无干扰。

1.6 回收率试验

按5片的处方量分别称取上述混合辅料及原料药P5,并按处方量的80%、90%、100%、110%、120%加入已知含量的EA-10原料,混合均匀后,按上述样品溶液的制备及测定方法测得每份EA-10的含量,计算回收率,结果见表1,平均回收率为100.4%(RSD=1.60%, $n=10$)。

表1 回收率试验

No.	EA10 加入量 (mg)	EA10 测得量 (mg)	回收率 (%)
1	16.09	16.180	100.6
2	16.31	16.325	100.1
3	18.24	17.966	98.5
4	18.29	18.064	98.8
5	19.93	20.423	102.5
6	19.64	20.138	102.5
7	22.55	22.789	101.1
8	22.09	22.494	101.8
9	24.07	23.923	99.4
10	23.95	23.534	98.3

1.7 精密度试验

取舍尼通片样品一批,由两操作者,各使用两台不同型号紫外分光光度计,在数天内经多次进行EA-10的含量测定。计算日内差(RSD=1.60%, $n=6$)和日间差(RSD=0.67%, $n=5$)。结果表明本方法精密度好。

1.8 舍尼通片样品的含量测定

取舍尼通片样品三批,分别按上述测定方法测得每批样品中EA-10的含量,以每片EA-10的含量表示,结果分别为0.297 mg/片、0.298 mg/片、0.295 mg/片,RSD=1.55%~1.96%($n=3$)。

1.9 对照品和样品溶液的稳定性

1.9.1 取室温避光放置的约0.2、1 mg/ml对照品溶液,分别于五日内每间隔24 h重复测定,结果测定值不变。所以对照品溶液可在五日内避光室温放置使用。

1.9.2 取避光室温放置的样品溶液,24 h内测定,结果EA-10含量不变。

1.10 舍尼通片中EA-10的稳定性考察

本实验对舍尼通片中EA-10的稳定性进行了

2 讨论

1)本方法采用一定量的醋酐与硫酸即时混合即时加样反应、测定。也可取醋酐和硫酸按一定比例预先配制成反应试剂,然后取此试剂进行测定,但此试剂极不稳定,10 min后必须重新配制使用。测定时,对照品反应达峰时间约10 min,样品反应达峰时间约6 min,两者峰值维持时间均为3 min左右,所以正文中要求加样反应开始后,立即将比色液置比色池中,观察吸收度变化情况,以便记录最大吸收度值。

2)选择625 nm为测定波长,虽然避免了样品溶液本身的吸收,但干扰仍一定程度的存在,所以本方法在At测定时以浓度对等的样品溶液作空白,进行测定,以减少测定误差。

3)因为对照品、样品(EA-10)是遇光极不稳定的物质,所以本实验操作必须避光。并且湿度和水分对本方法有一定干扰影响,所以在操作时应尽量控制湿度和水分,减少实验的误差。