定含量, 计算平均回收率(表 1)。

表 1 回收率试验结果

Table 1 The results of recovery test

Original/ mg	Added/ mg	Measured/mg	Recovery/ %	$\overline{X}$/%	RSD/ %
1.23	1.52	2.76	100.7	99.68	0.80
1.28	1.48	2.75	99.32		
1.26	1.55	2.82	100.6		
1.25	1.25	2.49	99.20		
1.34	1.28	2.60	98.43		
1.29	1.24	2.54	100.8		
1.31	1.01	2.32	100.0		
1.26	1.05	2.30	99.05		
1.24	1.08	2.31	99.07		

1.4.3 重复性 取同一批混匀的样品, 平行测定 6 次, 其含量分别为 24.7%、25.2%、24.6%、25.3%、24.8%、24.2%、24.8%, 平均 24.8%, *RSD* = 1.7%。

2 讨论

3 批样品用用三阶导数光谱法测定, 平均值分别为 25.6%、26.2%、27.3% (*RSD* 分别为 0.45%、0.43%、0.35%)。用直接紫外分光光度法测定平均值分别为 27.9%、28.3%、29.6% (*RSD* 分别为 0.62%、0.80%、0.65%)。由此可知, 直接紫外分光光度法测定值偏高, 且吸光度的精密度较差。

聚二肽的紫外吸收光谱类似二次曲线。紫杉肽中聚二肽含量约为 70%~ 80%。在光谱中, 聚二肽的吸光度约为紫杉肽的 10%, 在 230 nm 直接用标准品对照法测定紫杉肽的含量会引起测定值较实际值偏高 10%。聚二肽的一阶导数光谱类似一次函数, 二阶导数光谱为常数, 三阶导数光谱干扰为零。因此, 不同阶的导数光谱, 聚二肽对紫杉肽的含量测定影响不同(表 2)。

表 2 不同阶导数光谱的聚二肽对测定结果的影响(%)

Table 2 The influence of polydipeptide on the result with different derivative ultraviolet spectrograms(%)

Derivative ultraviolet	$A_{Polydipeptide}/A_{paclitaxtide}$	Recovery/ %
0	10	104.9
1	35.9	113.6
2	22.7	85.2
3	0	100.2

导数光谱可选择的定量方法较多[3], 在三阶导数光谱图中(图 2), 紫杉肽和紫杉醇在 242、256 nm 分别有峰值和谷值。由于聚二肽在 242 nm 的峰高为 -1×10^{-4}, 在 256 nm 的峰高为 0, 因此, 选用 256 nm 作为测定波长, 用峰- 零法测定紫杉醇的含量。导数光谱法是解决光谱干扰的一种技术, 常用于消除背景吸收的干扰[4,5]。文中方法能消除药物载体的影响, 对此类药物的含量测定提供借鉴方法。

参考文献:

[1] 施安国, 王平全. 紫杉醇的毒性研究[J]. 上海第二医科大学学报, 2000, 20(2): 138
[2] 艾毅清, 谢道昌, 彭丽沙. 紫杉醇在治疗中晚期恶性肿瘤中的不良反应[J]. 云南医药, 1997, 18(5): 173
[3] 于如嘏. 分析化学[M], 北京: 人民卫生出版社, 1986 68
[4] Savitzky A, Golay M. Smoothing and differentiation of data by Simplified least squares procedures[J]. Anal Chem, 1964, 36(8): 1627
[5] 张锦, 张晓松. 一阶导数光谱法测定复方氨酚烷胺片中对乙酰氨基酚含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(4): 665

收稿日期: 2005- 03

HPLC 测定通关藤中绿原酸的含量

赖玉菡, 王 曙*
(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立测定通关藤中绿原酸含量的方法, 并测定不同产地、不同生长年限通关藤中绿原酸的含量。方法 采用 HPLC 法。结果 绿原酸的峰面积与其质量在 0.08~ 1.59 μg 内呈良好的线性关系(r = 0.9998), 平均加样回收率为 101.41%, *RSD* = 1.59%。结论 所用方法简单、快速、准确, 为通光藤质量评价提供了依据。

关键词: 高效液相色谱; 绿原酸; 通关藤
中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0103 (2006) 01- 0079- 03

Determination of chlorogenic acid in *Marsdenia tenacissima* by HPLC

LAI Yu- han, WANG Shu*
(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: OBJECTIVE To detect the chlorogenic acid in *Marsdenia tenacissima* from different areas and in different growing periods.

作者简介: 赖玉菡, 女, 正攻读生药学专业的硕士学位。
* 通讯作者(Correspondent author)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

METHODS An HPLC method was used. **RESULTS** The calibration curve of chlorogenic acid was linear over the ranges of 0.08– 1.59 μg (r = 0.9998). The average recovery was 101.41% with *RSD* of 1.59%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and can provide scientific evaluation for quality control of *Marsdenia tenacissima*.

Key words: HPLC; Chlorogenic acid; *Marsdenia tenacissima*

CLC number: R927.2 **Document code:** A **Article ID:** 1003– 0106(2006)01– 0079– 03

通关藤 *Marsdenia tenacissima* Robx. Wight et Am 为萝藦科牛奶菜属植物通光散的干燥藤茎, 含有多种 C_{21} 甾体皂苷及有机酸等化学成分[1], 有止咳平喘、调节免疫和抗癌等作用。通关藤中绿原酸含量较高, 为其有效成分之一[2]。因此, 我们选用绿原酸为指标, 测定不同产地、不同生长年限的通关藤中的绿原酸含量, 拟为评价该药材的品质提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

LC– 10AT HPLC 仪(日本岛津); Shim– pack ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm); SPD– 10A 紫外可见检测器; SAGE 色谱工作站; 超声清洗器(上海船舶电子设备研究所)。绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0753– 9910); 通关藤分别采自云南、贵州、广西、广东, 经王曙教授鉴定其原植物为 *M. tenacissima*; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法和结果

1.2.1 色谱条件 Shim– pack ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm); 流动相为乙腈– 0.4% 磷酸(27∶73); 流速 1.0 ml·min^{-1}; 柱温 30 ℃; 进样体积 10 μl; 检测波长 327 nm。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 15.92 mg, 置 100 ml 棕色量瓶中, 加 50% 甲醇溶解定容, 摇匀。精密量取 1 ml, 置 10 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 作为对照品溶液(0.0159 mg·ml^{-1})。

1.2.3 标准曲线的绘制 分别取绿原酸对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10.0 ml, 置 10 ml 棕色量瓶中, 用 50% 甲醇稀释定容, 按"1.2.1"项下条件测定, 以绝对进样量 W(μg) 对峰面积 A 进行线性回归, 回归方程为: $A = 2.001 \times 10^5 W - 3.681 \times 10^4$ (r = 0.9998), 绿原酸在 0.08~ 1.59 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

1.2.4 精密度试验 精密吸取绿原酸对照品溶液, 重复进样 5 次, 绿原酸峰面积的 *RSD* < 2%, 表明进样精密度良好。

1.2.5 稳定性试验 取供试品溶液, 按"1.2.1"项下条件分别于配制后 0、2、4、6、8 h 进样, 计算其峰面积的 *RSD* = 0.68%, 表明供试品在 8 h 内稳定。

1.2.6 重复性试验 同批样品按"1.2.1"项下方法测定含量, 平行测定 5 份, *RSD* = 0.69%, 表明该方法精密度好。

1.2.7 加样回收率试验 取已知绿原酸含量的通关藤(2.62 mg·g^{-1}) 5 份, 精密称定, 分别加入对照品溶液 4 ml, 按"1.2.8"项下方法测定含量, 平均回收率为 101.41%, *RSD* = 1.59%, 表明方法回收率良好。

1.2.8 样品的测定 准确称取不同产地及不同生长期的通关藤粉末 1.0 g(60 ℃干燥 4 h 并过 60 目筛), 置 50 ml 的量瓶中, 加 50% 甲醇约 20 ml, 超声处理(80 W, 40 kHz) 20 min 后, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 4 × 10^3 r·min^{-1} 离心 5 min, 取上清液作为供试品溶液。分别取供试品溶液 10 μl, 按"1.2.1"项测定, 用峰面积对标准曲线计算含量(表 1、2)。

表 1 不同产地通关藤中绿原酸的含量(n = 3)

Table 1 Contents of samples from different areas(n = 3)

Area	Chlorogenic acid/mg·g^{-1}	*RSD*/%
Yunan	3.0351	1.23
Guizhou	2.1164	1.52
Guangxi	1.0844	1.05
Guangdong	1.6397	0.92

表 2 云南地区不同生长期通关中藤绿原酸的含量(n = 3)

Table 2 Contents of samples of different growing age in Yunnan (n = 3)

Growing years	Chlorogenic acid/ mg·g^{-1}	*RSD*/%
1	0.4517	0.85
2	1.5393	0.92
3	3.0198	1.24
4	2.9872	0.69
5	2.8925	0.89

2 讨论

同一样品分别选用甲醇、乙醇、50% 甲醇和水提取后测定, 结果表明, 用 50% 甲醇提取含量最高, 杂质峰较少, 峰形对称, 故选用 50% 甲醇为提取溶媒。

以 50% 甲醇为提取溶媒比较加热回流提取与超声提取, 发现前者提取 30 min 时提取率低, 而超声提取 20、30、40 min, 提取率基本无变化, 加热使绿原酸不稳定[3], 故选择超声 20 min, 提取液避光冷藏。

比较了柱温 30 ℃时不同比例的乙腈– 0.4% 磷酸(20∶80、25∶75、27∶73、30∶70) 流动相系统对通关藤中绿原酸与杂质的分离度与保留时间。发现比例为 27∶73 时, 能保证绿原酸与杂峰完全分离, 色谱峰形对称而尖锐。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从表1可看出,不同产地通关藤中绿原酸含量有显著差异,其中云南产通关藤中绿原酸含量最高,这与云南产通关藤为道地药材相吻合。从表2可看出,3年生通关藤绿原酸含量达到最高,以后含量变化不明显,说明3年生通关藤已生长成熟,可以采挖。

参考文献:

[1] 叶栋枢. 鸟骨藤治疗恶性肿瘤初探[J]. 中华肿瘤杂志, 1987, 9(2): 126
[2] 刘峰群, 曹红, 靳守东, 等. 通关藤注射液酚酸类成分指纹图谱的HPLC测定[J]. 中成药, 2003, 25(3): 175
[3] 顾利红, 朱品业. 日光和温度对绿原酸供试液稳定性的影响[J]. 中成药, 1999, 21(11): 568

收稿日期: 2005- 06

HPLC测定*L*- 天门冬氨酸中的有关物质

谭 畅, 晁若冰*
(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立L- 天门冬氨酸中羟基丁二酸、丁二酸和富马酸等有关物质的检查方法。方法 采用HPLC法, 使用AQ C_{18}色谱柱, 0.01 mol·L^{-1}的磷酸二氢钾水溶液(磷酸调pH3)为流动相, 检测波长200 nm。结果 主成分和杂质可完全分离。结论 建立的方法灵敏、专属, 可用于L- 天门冬氨酸中有关物质的测定。

关键词: L- 天门冬氨酸; 有关物质; 高效液相色谱法; 羟基丁二酸; 丁二酸; 富马酸
中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0103(2006)01- 0081- 03

Determination of the related substances in aspartic acid by HPLC

TAN Chang, CHAO Ruo- bing*
(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: OBJECTIVE To establish a method for determination of the related substances, malic acid, succinic acid and fumaric acid in aspartic acid. **METHODS** A liquid chromatography was carried out using a AQ C_{18} column with detective wavelength at 200 nm. The mobile phase was water solution of monopotassium phosphate (adjusting pH 3.0 with phosphoric acid). **RESULTS** Aspartic acid and the impurities could be separated. **CONCLUSION** The method is sensitive, specific and suitable to determine the related substance in aspartic acid.

Key words: L- Aspartic acid; Related substance; HPLC; Malic acid; Fumaric acid; Succinic acid
CLC number: 927.2 **Document code:** A **Article ID:** 1006- 0103(2006)01- 0081- 03

L- 天门冬氨酸(*L*- aspartic acid)作为一种保健药,具有增强机体抵抗力、消除疲劳、解除氨毒、促进肝功能和保护心肌等作用[1,2],广泛用于医药、食品、化妆品及工业原料中,需求量很大。L- 天门冬氨酸脱氨基后,可能生成羟基丁二酸、丁二酸、富马酸等物质,至今未见测定方法的报道。现建立HPLC法,测定L- 天门冬氨酸中上述3种有关物质。

1 实验部分

1.1 仪器和试药

LC- 10ATvp高效液相色谱仪; SPD- 10Avp紫外检测器; Class- VP色谱工作站; AichromBond- AQ C_{18}柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本岛津公司)。羟基丁二酸、富马酸、丁二酸对照品(Fluka公司, 含量≥99%); 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件的选择

1.2.1 *色谱柱的选择* 采用AichromBond- AQ C_{18}柱, 其pH耐受范围为1.5~ 9.0, 可使用纯水作为流动相。

1.2.2 *流动相pH的确定* 分别将流动相pH调至2.0、2.5、3.0、4.0试验, 随pH增大, 除主峰外, 3个杂质峰的保留时间均减小, 其中富马酸 t_R 减小的速度最快。在pH2和pH3时, 3个杂质峰的分离均较好, 但pH2时基线不稳。故流动相确定为pH3。

1.2.3 *离子浓度的影响* 将流动相中 KH_2PO_4 的浓度配制为0、10、20、30 mmol·L^{-1}, 分别试验。结果表明, 未加入 KH_2PO_4 时富马酸和丁二酸的分离不佳。加入 KH_2PO_4 后, 两者分离度提高。随离子浓度增加, 主峰和杂质峰的保留时间变化不大, 但当浓度增加至10 mmol·L^{-1}时, 丁二酸峰形最好。所以, 确定

作者简介: 谭畅(1981-), 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。
* 通讯作者(Correspondent author): E- mail: chaorb@163.net

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net