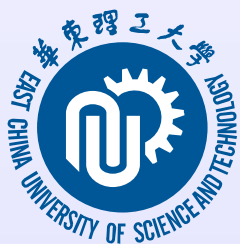




## 第六章 目标成分常用的定量方法（二）

前面内容回顾：

- ★ 光谱法含量测定方法（紫外-可见分光光度法）
- ★ 色谱法含量测定方法
  - ✓ 高效液相色谱法（HPLC法）
  - ✓ 气相色谱法（GC法）
  - ✓ 薄层色谱法（TLC）

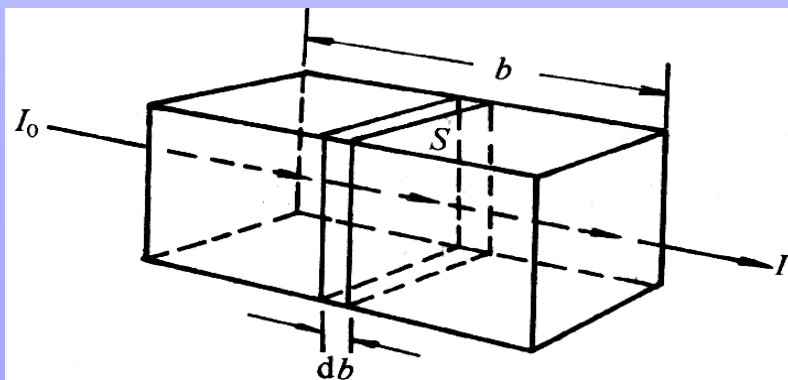


## 第二节 紫外-可见分光光度法定量

### ■ 定量依据:

#### 朗伯—比尔定律:光吸收的基本定律

当一束单色光穿过透明介质时，光的一部分将被溶液吸收，一部分透过溶液，还有一部分被器皿表面所反射。设入射光强度为  $I_0$ ，透过光强度为  $I$ ，溶液的浓度为  $c$ ，液层宽度为  $b$ ，它们之间有下列关系：**光强度的降低同入射光的强度、吸收介质的厚度、溶液的浓度成正比。**



$$A = \lg \frac{I_0}{I} = kcb$$

## 若有标准品——采用标准曲线法

- 1) **标准品和吸收波长的选择**: 选择待测物质的最大吸收波长, 灵敏度最高, 且可以避免其它物质的干扰。
- 2) **标准溶液的配制及标准曲线的绘制**: 以浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标, 作标准曲线。
- 3) **待测物的含量计算**: 直接将待测物质的吸光值代入标准曲线计算。如, 蛋白双缩脲法、Lowry法等。

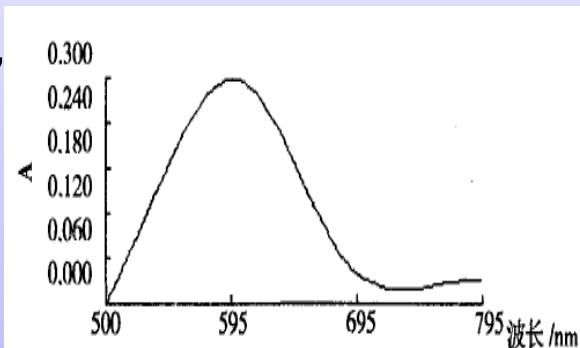
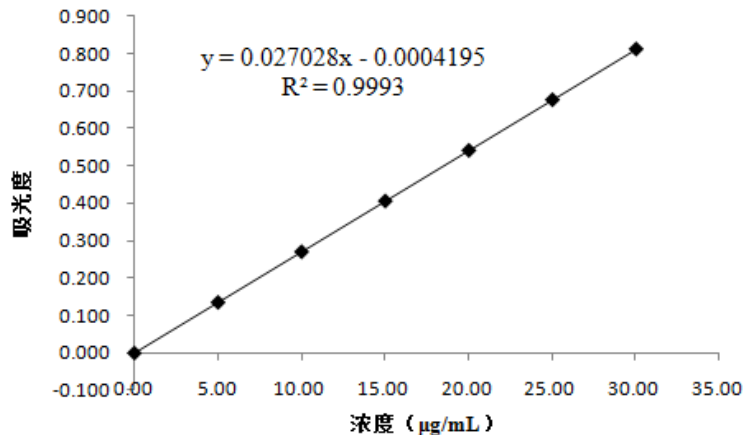


图1 血清蛋白吸收曲线

通常用 $r$ 来表示两个变量 $X$ 和 $Y$ 之间的直线相关程度,  $r$ 为 $X$ 和 $Y$ 的相关系数。 $r$ 值的绝对值越大, 两个变量之间的相关程度就越高。



例：

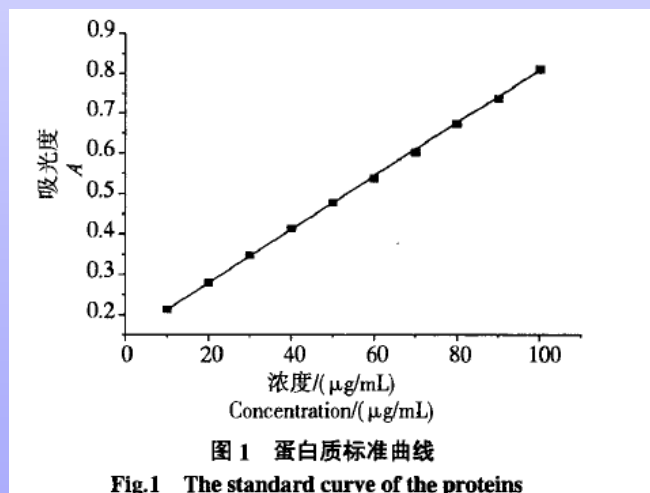
## 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量



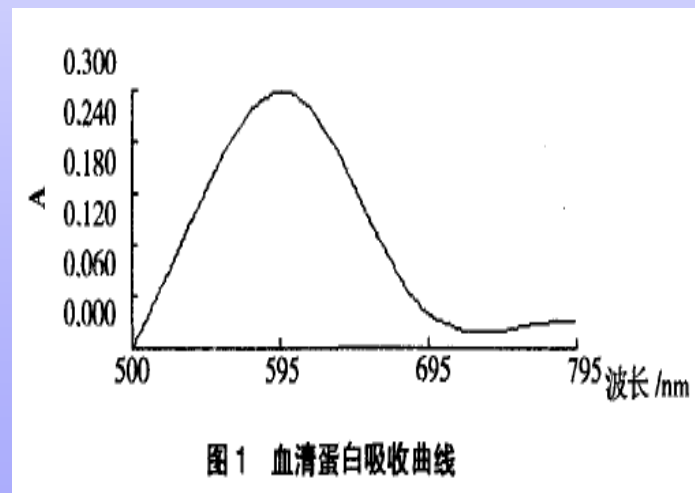
### ■ 标准品和测定波长的选择

取1mL标准蛋白质（**血清蛋白, BSA**）溶液，加入考马斯亮蓝G-250溶液5mL，放置10min，于500~800nm波长范围内扫描，结果蛋白质—考马斯亮蓝G-250复合在**595nm**处有吸收峰。

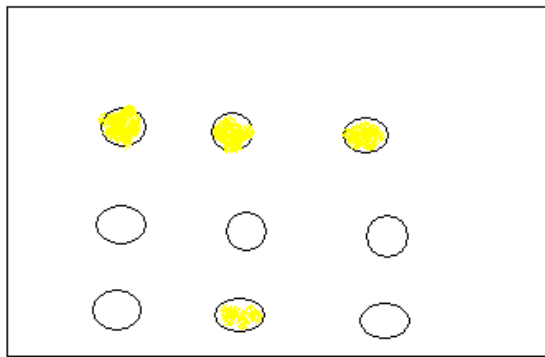
### ■ 标准曲线的绘制



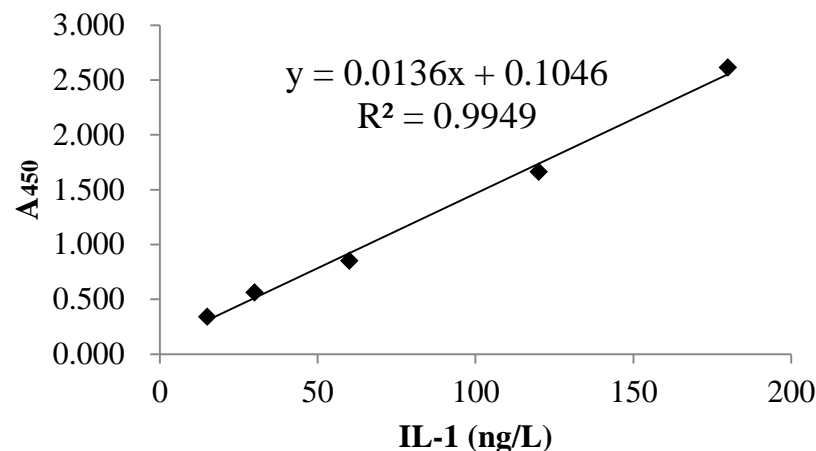
### ■ 待测物的含量计算



同时做三个重复，经测定吸光度值分别为0.290、0.282、0.286，计算蛋白质含量分别为12.57%、11.77%、12.17%，平均含量为12.17%。



## Sandwich Elisa 定量

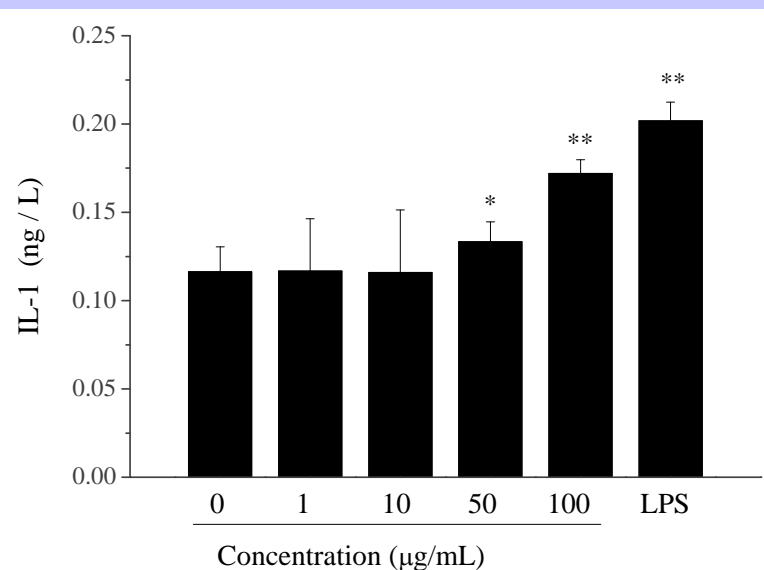


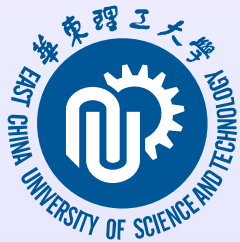
## IL-1标准曲线及样品含量计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

根据样品的OD 值和标准曲线的直线回归方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

## 药物对小鼠巨噬细胞Raw264.7分泌IL-1的影响





### 若无标准品——直接利用吸光系数来计算

#### ♣ 摩尔吸光系数(Molar Absorbance coefficient): $E$

是指物质在1mol/L的浓度下，比色杯厚度为1cm时的吸光度值。

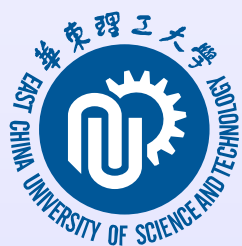
#### ♣ 比吸光系数;百分吸光系数(Percent Absorbance coefficient):

$E_{1\%}$

1cm

是指100ml溶液中含被测物质1g，比色杯厚度为1cm时的吸光度值。

该值可以从光谱数据表中查到。



例:

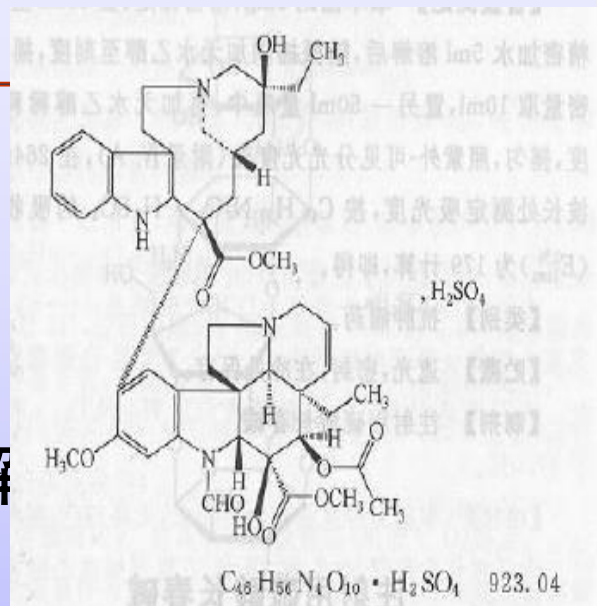
## 硫酸长春新碱

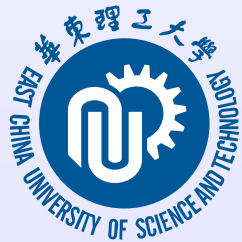
【类别】抗肿瘤药。

【性状】本品为白色或类白色的结晶性粉末；  
臭；有引湿性；遇光或热易变黄。

本品在水中易溶，在甲醇或三氯甲烷中溶解  
在乙醇中微溶。

【含量测定】取本品适量，精密称定，加甲醇溶  
解并定量稀释制成每1ml中约含20μg的溶液，  
照紫外-可见分光光度法，在297nm的波长处  
测定吸光度，按 $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ 的吸  
收系数( $E_{1\%}^{1cm}$ )为177计算，即得。



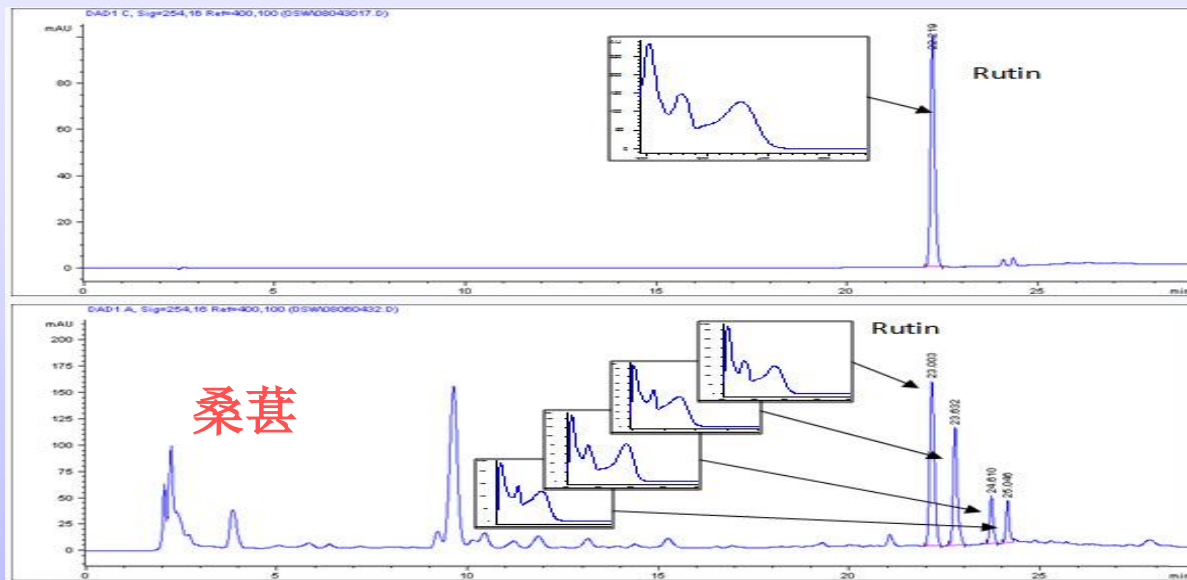


## 第三节 色谱法定量分析

- 高效液相色谱法 (HPLC)
- 气相色谱法 (GC)
- 薄层色谱法 (TLC)



# 高效液相色谱法和气相色谱法 (HPLC\GC)



色谱法不仅是一种**分离**方法，而且还是一种**定性**、**定量**检测方法。

**定性分析**：通常用与标准品比较保留值进行定性，即保留值相同**可能**是同样的组分；保留值不同，**肯定**不是同样的组分。

## **HPLC\GC**色谱定量分析的基本原理

定量分析是在定性分析的基础上，需要纯物质作为标准样品。

色谱的定量是相对的定量方法，即：由已知的标准样品推算出被测样品的量。

## HPLC/GC法定量的依据:

被测组分的量 (W) 与响应值 (A) (峰高或峰面积) 成正比,  $W=f \times A$ 。

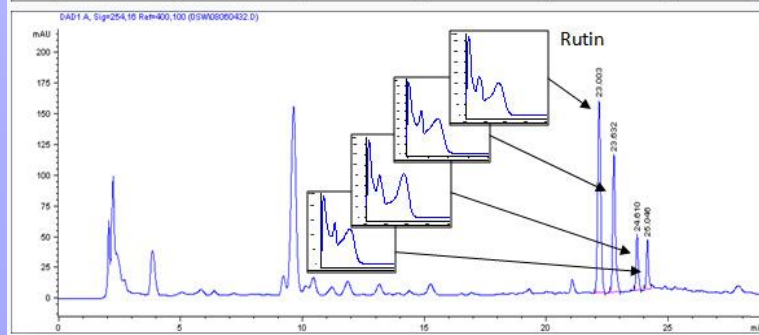
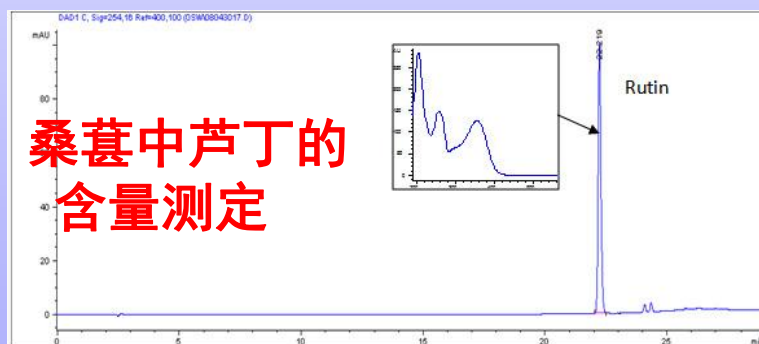
定量校正因子 (f)

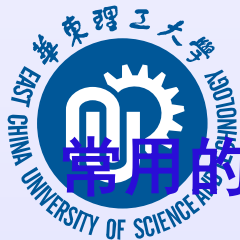
由已知标准样品的量及其响应值可以求得定量校正因子。

测定未知组分的响应值, 通过定量校正因子即可求得该组分的量。

$$\frac{W_s}{W_R} = \frac{A_s}{A_R}$$

$$W_s = A_s \cdot W_R / A_R$$



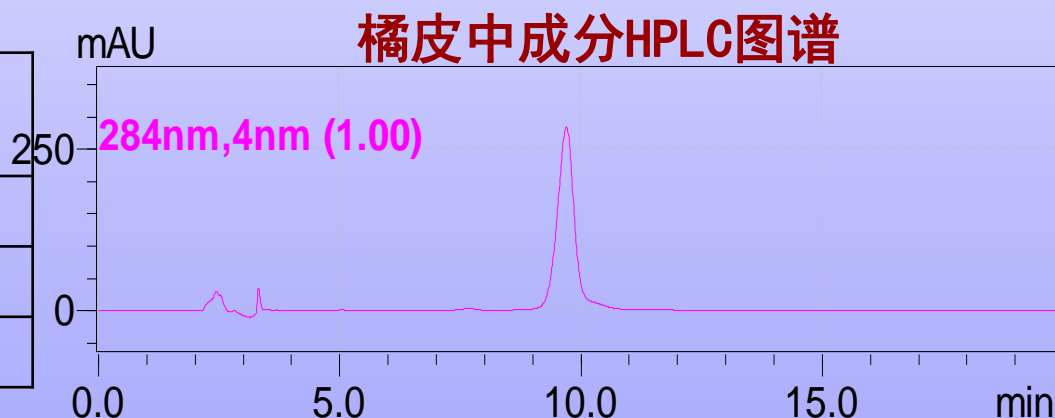


## 常用的定量方法: 面积归一化法、外标法和内标法。

**面积归一化法**: 即为计算各峰面积及其总和, 并求出占总峰面积的百分率。

优点是简便、准确, 当操作条件变化时对结果影响较小, 宜于分析多组分试样中各组分的含量。但是试样中所有组分必须全部出峰, 因此, 此法在使用中受到一定限制。

Peak#	RT	Area	Area%
1	2.091	873	0.0114
2	3.345	185879	2.4355
3	9.861	7445184	97.5530

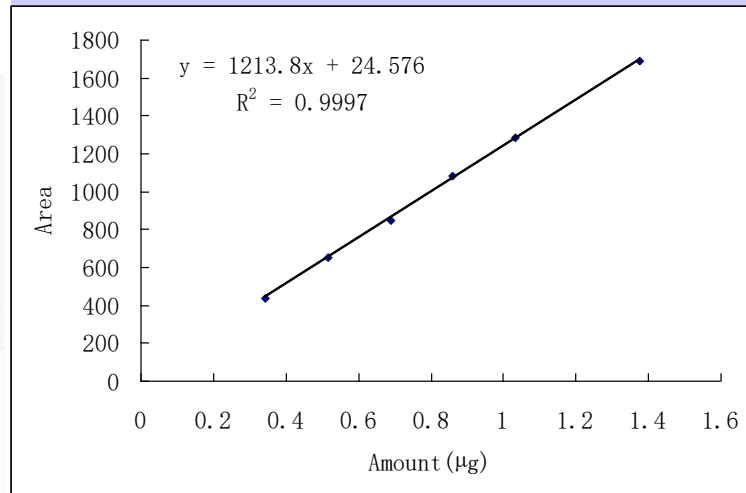
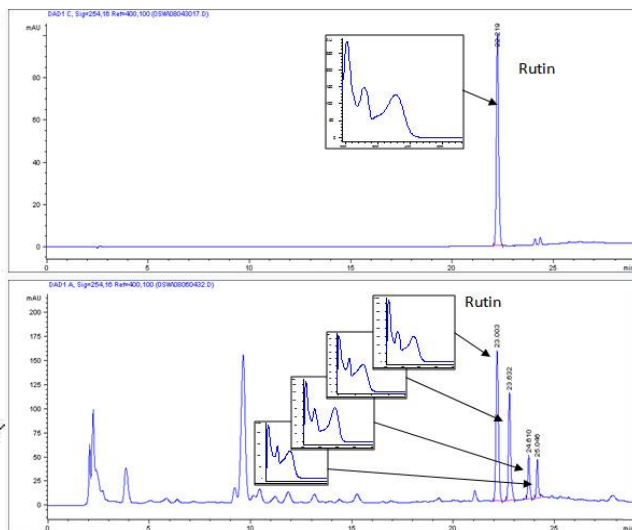
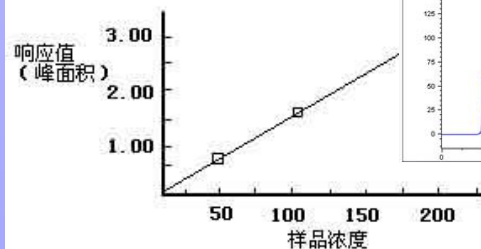


**外标法**在液相色谱中用的最多。

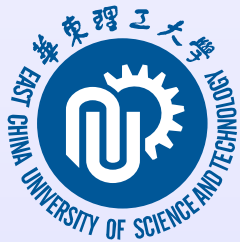
**内标法**准确但是麻烦, 在标准方法中用的最多, 而且在气相色谱中用的最多。

# External standard method(外标法)

- 标准溶液的配制：**用被测化合物的纯品作为标准样品，配制成一系列的已知浓度的标样（常5个浓度）。注入色谱柱的到其响应值（峰面积）。
- 标准曲线的绘制：**在一定范围内，标样的浓度与响应值之间存在较好的线性关系，即 $W=f \times A$ ，制成标准曲线。
- 待测组分含量的计算：**在完全相同的实验条件下，注入未知样品，得到欲测组分的响应值。根据已知的系数 $f$ ，即可求出欲测组分的浓度。



通常用  $r$  来表示两个变量  $X$  和  $Y$  之间的直线相关程度， $r$  为  $X$  和  $Y$  的相关系数。 $r$  值的绝对值越大，两个变量之间的相关程度就越高。



## ■ 外标法的优点：

操作、计算简单，是一种常用的定量方法。

无需各组分都被检出、洗脱。

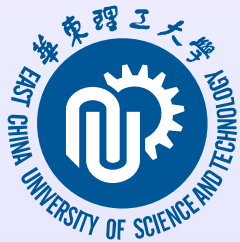
需要标样。

标样及未知样品的测定条件要一致。

进样体积要准确。

## 外标法缺点：

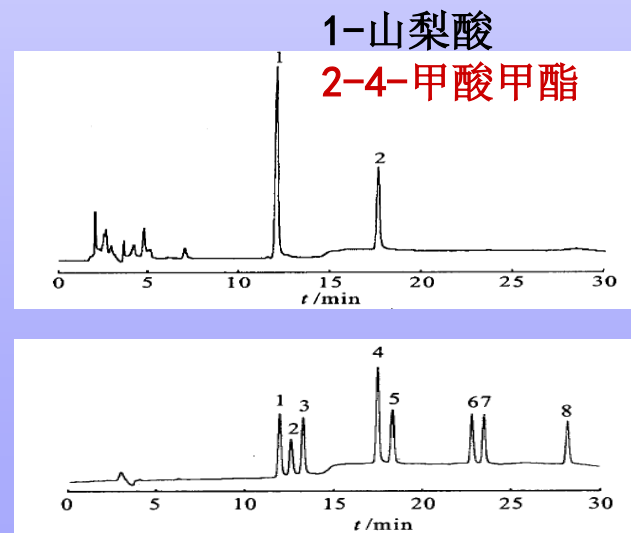
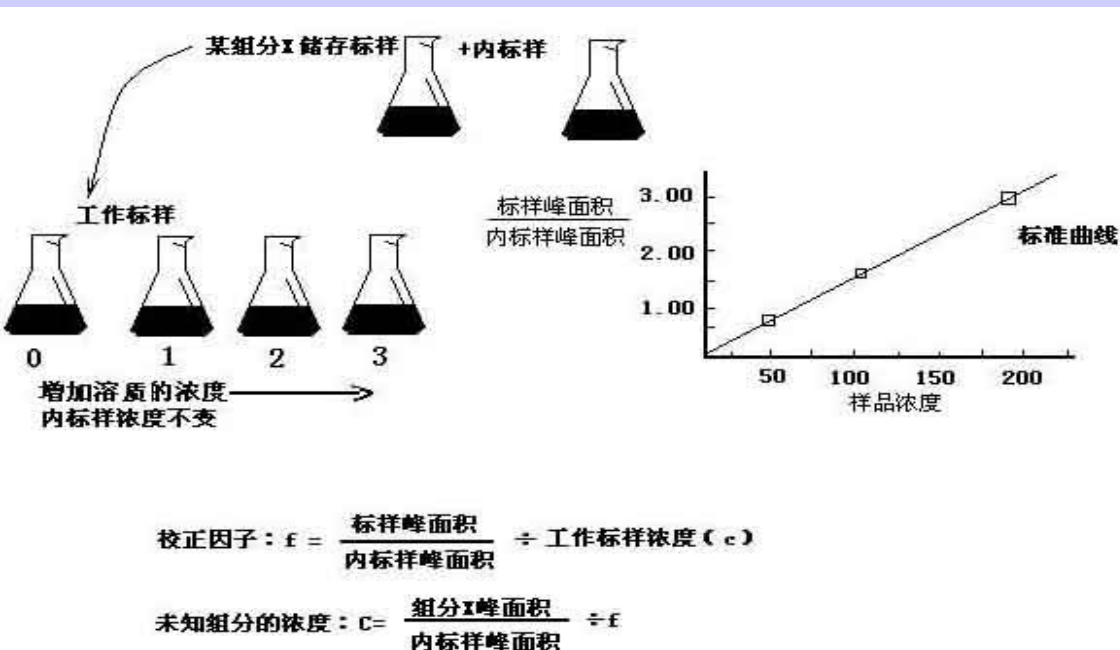
实验条件要求高，如检测器的灵敏度，流速、流动相组成等不能发生变化；每次进样体积要有好的重复性。



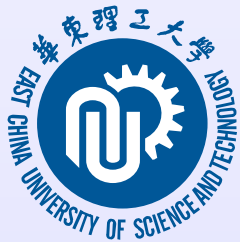
# 内标法

- 在分析测定样品中某组分含量时，加入一种**内标物质**以校准和消除出于操作条件的波动而对分析结果产生的影响，以提高分析结果的准确度。
- **内标物质**：使用内标法时，在样品中加入一定量的标准物质，它可被色谱柱所分离，又不受试样中其它组分峰的干扰，只要测定内标物和待测组分的峰面积相对响应值，即可求出待测组分在样品中的百分含量。
- **内标物质的选择**：采用内标法定量时，内标物的选择是一项十分重要的工作。理想地说：
  - 1) 内标物应当是一个能得到纯样的已知化合物，这样它能以准确、已知的量加到样品中去，
  - 2) 它应当和被分析的样品组分有基本相同或尽可能一致的物理化学性质(如化学结构、极性、挥发度及在溶剂中的溶解度等)、色谱行为和响应特征，最好是被分析物质的一个同系物。
  - 3) 在色谱分析条件下，内标物必须能与样品中各组分充分分离。

- 1、标准溶液的配制：**将已知量的内标样（浓度不变）加入标准样品（常5个浓度），制成混合标样，并配制一系列的已知浓度的工作标样。
- 2、标准曲线的绘制：**混合标样注入色谱柱，以（标样峰面积/内标样峰面积）为响应值。做重量比和面积比的关系曲线，此曲线即为标准曲线。  
即  $W = f \times A$ ,
- 3、待测组分的含量计算：**将已知量的内标样加入未知样品，注入色谱柱，得到欲测组分的响应值。  
根据已知的系数  $f$ ，即可求出欲测组分的浓度。



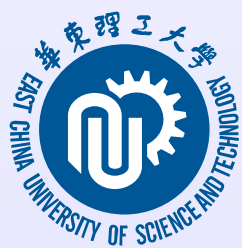




## ■ 内标法的特点：

- ★ 操作过程中样品和内标是混合在一起注入色谱柱的，因此只要混合溶液中被测组分与内标的量的比值恒定，上样体积的变化不会影响影响定量结果。
- ★ 内标法抵消了上样体积，乃至流动相、检测器的影响，因此比外标法精确。



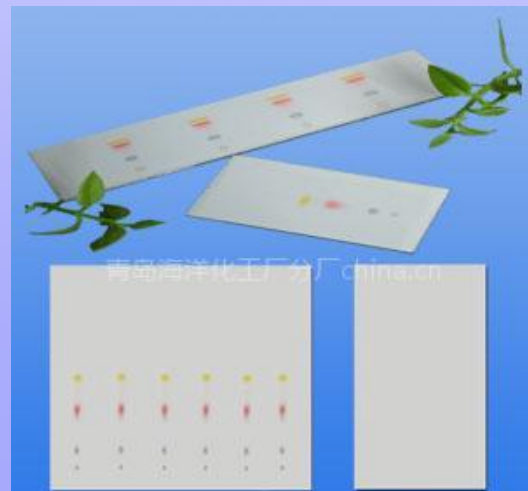


# 薄层色谱法

薄层色谱法根据展开后测定情况，又可分为薄层色谱-分光光度法和薄层扫描法。

## 1、 薄层色谱-分光光度法

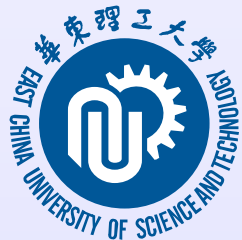
样品经薄层层析展开后，刮取与对照品斑点相应位置上的供试品条斑，用适当溶剂洗脱，收集洗脱液，采用分光光度法定量的一种方法。





### 例 防己中粉防己碱的含量测定（国家药典委员会，2000）

精密称取本品粉末（过三号筛）适量，置索氏提取器中，加浓氨试液适量，放置1 h，加氯仿适量，加热回流约6 h，提取液回收氯仿后，放冷，残渣用无水乙醇溶解制成供试品溶液。另取粉防己碱对照品适量，加氯仿制成对照品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液点于同一硅胶G薄层板上使成条状，以氯仿-丙酮-甲醇-浓氨试液（20：3：2：0.1）为展开剂，展开，取出，待溶剂挥尽，立即置紫外灯（365 nm）下照射数十分钟后，刮取与对照品斑点相应位置上的供试品条斑，同时刮取同一薄层板上与对照品条斑等面积的硅胶G作空白，置两个相同的色谱柱（0.7 cm×10 cm）中，用甲醇分次洗脱，洗脱液收集于蒸发皿中，蒸干，冷却，精密加0.1 mol/L盐酸溶液使残渣完全溶解，照分光光度法，在280 nm的波长处测定吸收度。按粉防己碱（C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>）的吸收系数（E）



## 2、薄层扫描法

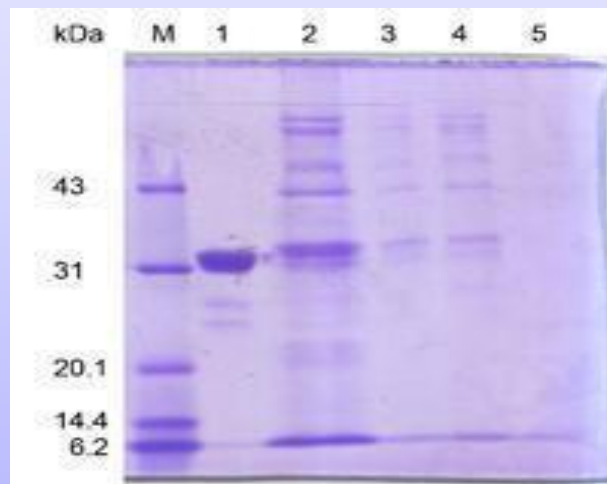
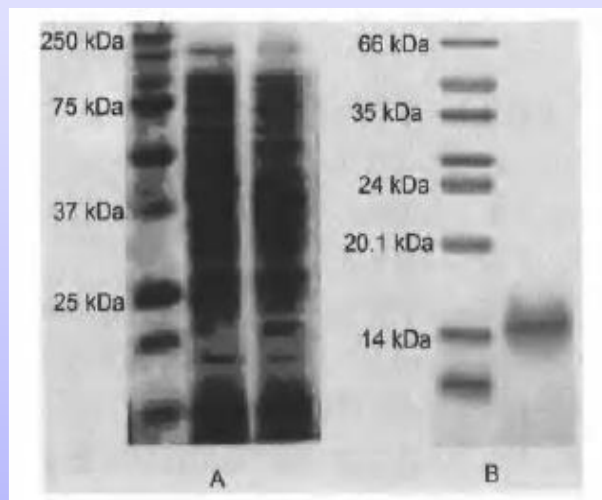
在薄层色谱板上，通过薄层扫描仪直接测定有效成分的光吸收度或荧光强度，计算出待测成分的含量的一种方法。此法较薄层层析-分光光度法简便、灵敏、稳定性好。

**例 两面针中两面针碱的含量测定**（国家药典委员会，2000）

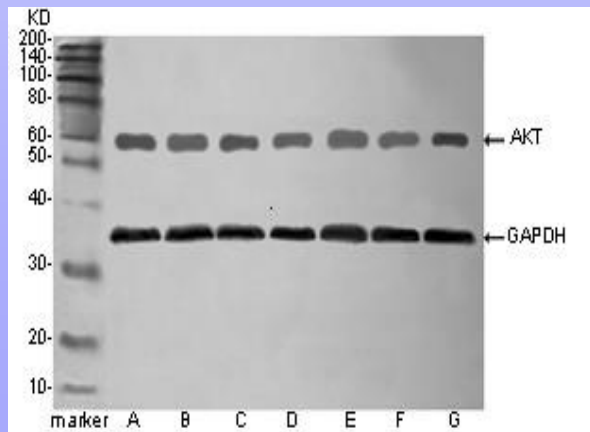
精密称取本品粗粉约适量，置索氏提取器中，加甲醇加热回流提取至回流液无色。回收甲醇，残渣用甲醇溶解作为供试品溶液。另精密称取氯化两面针碱对照品适量，加甲醇制成对照品溶液。精密吸取供试品溶液、对照品溶液，分别交叉点于同一硅胶G薄层板上，以苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液（20：5：3：1：0.12）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外灯（365 nm）下检视。于波长 $\lambda_S = 300 \text{ nm}$ ， $\lambda_R = 210 \text{ nm}$ 处进行扫描，测量供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值，计算，即得。

## 第四节 常用的电泳定量法

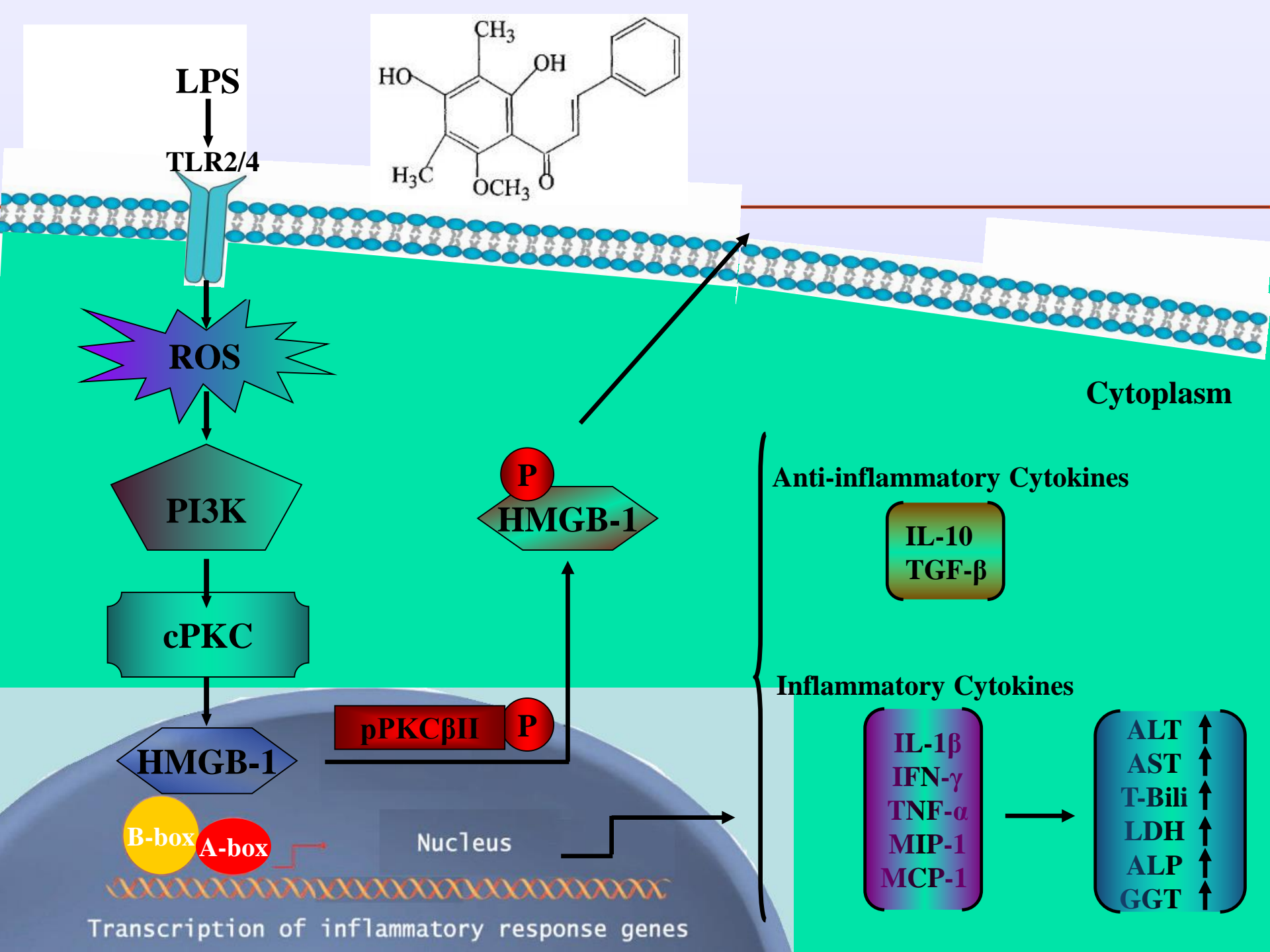
在电泳胶板上，通过凝胶成像扫描仪直接测定目标条带的光密度，计算出待测成分的含量的一种方法。



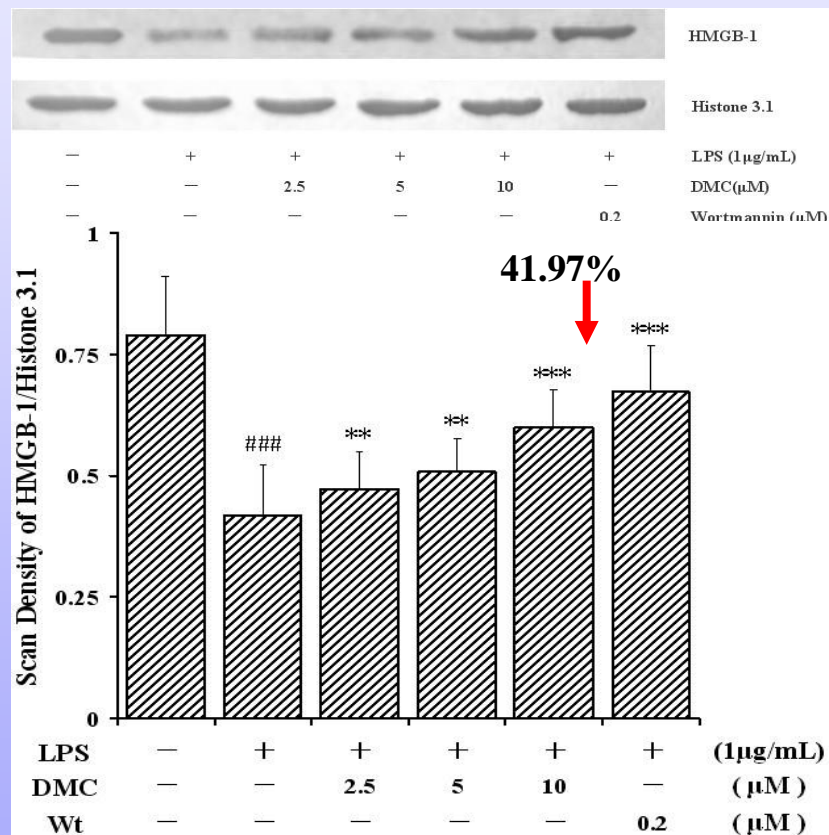
面积归一法



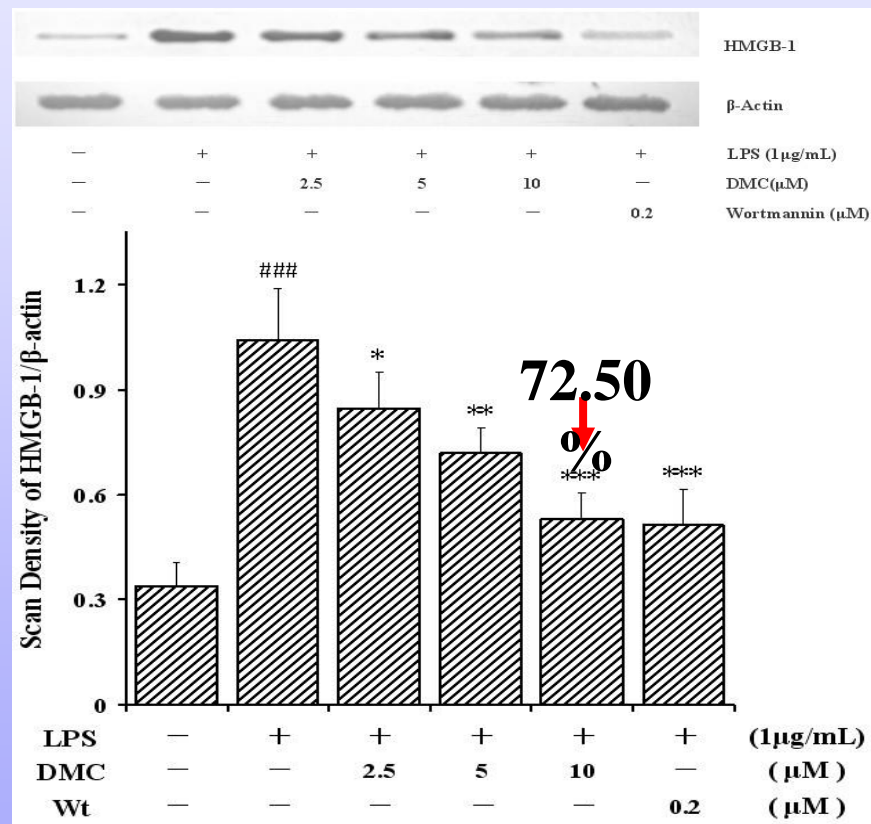
与内参蛋白光密度比值半定量



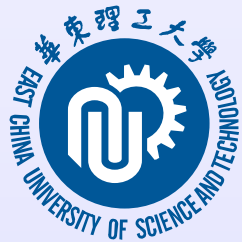
## DMC对细胞核中HMGB-1的影响



## DMC对细胞质中HMGB-1的影响



DMC具有抑制KupfferCell细胞核中HMGB-1向细胞质中转移的作用



## 第六章 目标成分常用定量方法（二）

问题：

定量是否准确？

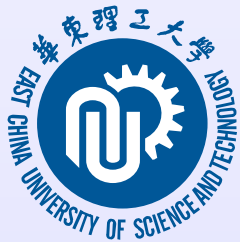
重复性是否好？

灵敏度是否高？

特异性是否高？

.....





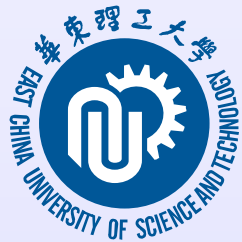
# 分析方法的验证

**目的：**证明所采用的方法适合于相应检测的要求。

一般起草药品/食品质量标准时、当生产方法变更或组分变更或原分析方法进行修订时，需要对质量标准分析方法进行验证。

**内容：**准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性、线性范围和耐用性。



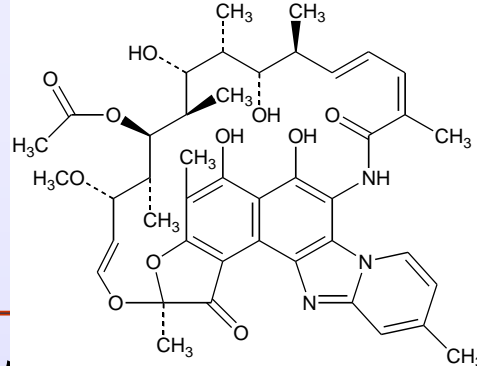
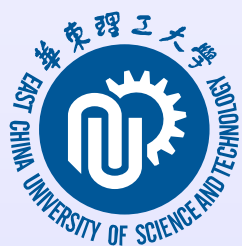


# 1. 准确度 (accuracy)

指用该方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度。

一般以回收率 (%), Recovery rate(%)表示

验证方法: 回收试验、加样回收试验



利福昔明	200g
羧甲基淀粉钠	15g
硬脂酸镁	18g
二氧化硅	1g
滑石粉	1g
微晶纤维素	25g

共制 1000片

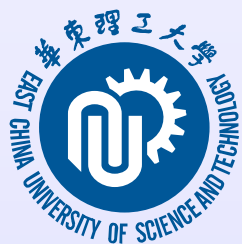
**回收试验：**空白+已知量A的对照品（或标准品）测定，测定值为M。

$$R\% = \frac{\overline{M}}{A} \times 100\%$$

**加样回收试验：**已测定含量P的真实样品+已知量A的对照品（或标准品）测定，测定值为M

$$R\% = \frac{\overline{M} - \overline{P}}{A} \times 100\%$$



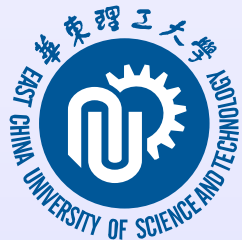


## 2015版药典

# 样品中待测定成分含量和回收率限度

**表 2 样品中待测定成分含量和回收率限度**

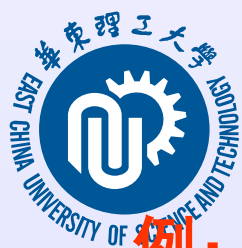
待测定成分含量	回收率限度 (%)
100 %	98~101
10 %	95~102
1 %	92~105
0.1 %	90~108
0.01 %	85~110
10 $\mu\text{g/g}$ (ppm)	80~115
1 $\mu\text{g/g}$	75~120
10 $\mu\text{g/kg}$ (ppb)	70~125



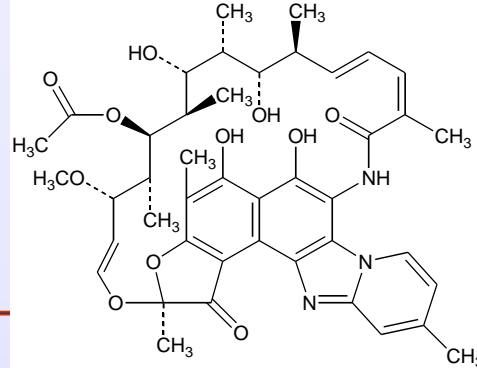
**数据要求：**规定的范围内，至少用**9次**测定结果评价。如，制备**3个不同浓度**样品各测**3次**。

原料药可用已知纯度（含量）的对照品或样品进行测定  
制剂可通过模拟配方进行测定。

《中国药典》（2015）：在规定范围内，取同一浓度（相当于100%）的供试品，至少测定**6份**的结果进行评判；或制备三个不同浓度，每个浓度3份，用**9次**测定的结果进行评价。  
**化学药：**采用测定含量所加量**1.2:1、1:1、0.8:1**；**中药：****1.5:1、1:1、0.5:1**



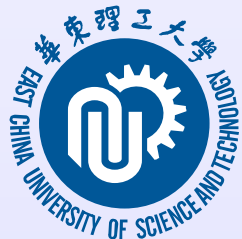
## 例：利福昔明片剂 回收试验



利福昔明	200g
羧甲基淀粉钠	15g
硬脂酸镁	18g
二氧化硅	1g
滑石粉	1g
微晶纤维素	25g
<hr/>	
共制	1000片

精密称取利福昔明对照品和本品辅料，按处方量的80%、100%、120%制备模拟样品，计算回收率。

序号	加入量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1 (80%)	160.0	158.3	98.9	100.54	0.08
2 (80%)	160.0	163.1	101.9		
3 (80%)	160.0	161.6	101.4		
4 (100%)	200.0	201.2	100.6		
5 (100%)	200.0	202.1	101.1		
6 (100%)	200.0	203.9	102.0		
7 (120%)	240.0	235.2	98.0		
8 (120%)	240.0	238.4	99.3		
9 (120%)	240.0	244.1	101.7		



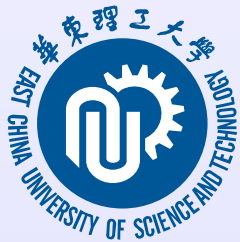
# 蜂胶总黄酮含量测定 加样回收试验

序号	取样 (mg)	黄酮含量 (mg, P)	标品加入量 (mg, A)	实测量 (mg, M-P)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	10.08	2.99	3.00	2.89	96.33		
2	10.08	2.99	3.00	3.11	103.67		
3	10.08	2.99	3.00	2.96	98.67	99.47	3.14
4	10.08	2.99	3.00	2.91	97.01		
5	10.08	2.99	3.00	3.05	101.67		

表 4 回收率实验结果

Table 4 The result of recovery rate experimentation

样品含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得总量/ $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均 /%	RSD/%
Sample content/ $\mu\text{g}$	Addition/ $\mu\text{g}$	Detected value/ $\mu\text{g}$	Recovery rate/%	Average value/%	
10.261	10	20.146	98.85		
10.261	20	31.073	104.06		
10.261	30	40.615	101.18	100.99	2.01
10.261	40	50.762	101.25		
10.261	50	60.078	99.63		



## 2. 精密度 (precision)

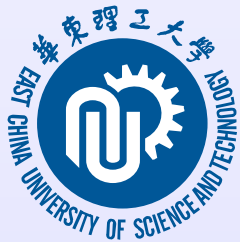
指在规定的测试条件下，同一均匀样品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。一般用偏差、标准偏差或相对标准偏差 (**RSD**) 表示。

相对标准 (偏) 差 (**RSD**)，也称变异系数 (**CV**)

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

不同分析方法, 对精密度的要求也不同。

**一般**: 紫外分光光度法和原子吸收分光光度法,  $RSD < 1.5\%$ ; HPLC和 GC:  $RSD < 2\%$ ; TLC和比色法:  $RSD < 4\%$



**精密度包括：重复性、中间精密度及重现性。**

**★ 重复性：**

相同条件下，同一个人测定所得结果的精密度。常同一样品，测**6次**进行评价。

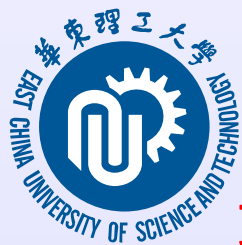
**★ 中间精密度：**

同一实验室，不同时间，不同分析人员用不同设备测定结果的精密度。

**★ 重现性：**

不同实验室，不同人员测定结果的精密度。





取同一批（20011102批）样品，按拟定的含量测定方法测定六次。

### 精密度试验

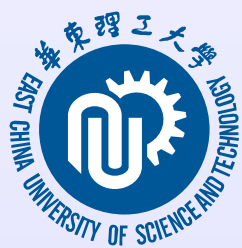
测定次数	1	2	3	4	5	6	均值	RSD (%)
含量 (%)	99.39	99.19	99.69	99.49	99.38	99.20	99.39	0.45

结果表明：本法精密度较好。

表 2 精密度实验结果

Table 2 The result of precision experimentation

样品号 Sample number	1	2	3	4	5	6	RSD/%
吸光度 A	0.542	0.547	0.546	0.550	0.551	0.543	0.58

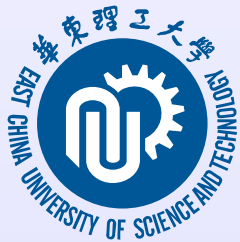


## 2015版药典

# 样品中待测定成分含量和精密度可接受范围

**表 3 样品中待测定成分含量和精密度 RSD 可接受范围**

待测定成分含量	重复性(RSD%)	重现性(RSD%)
100%	1	2
10%	1.5	3
1%	2	4
0.1%	3	6
0.01%	4	8
10 $\mu$ g/g (ppm)	6	11
1 $\mu$ g/g	8	16
10 $\mu$ g/kg (ppb)	15	32



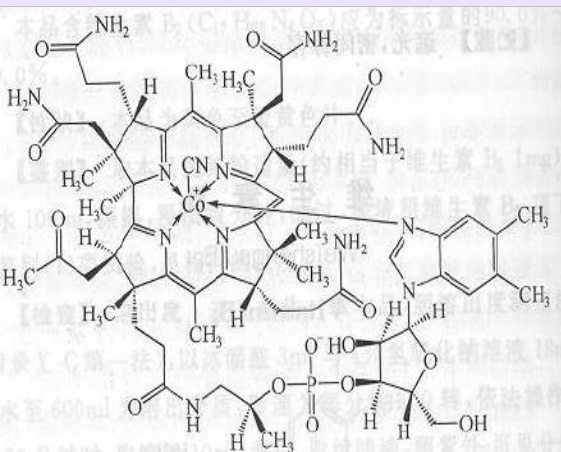
### 3. 专属性 (specificity)

指其它成分（如空白试剂、辅料、杂质、降解产物）可能存在的情况下，所采用的分析方法能准确测出被测物的能力，是对分析方法用于复杂样品分析时抗干扰程度的度量。

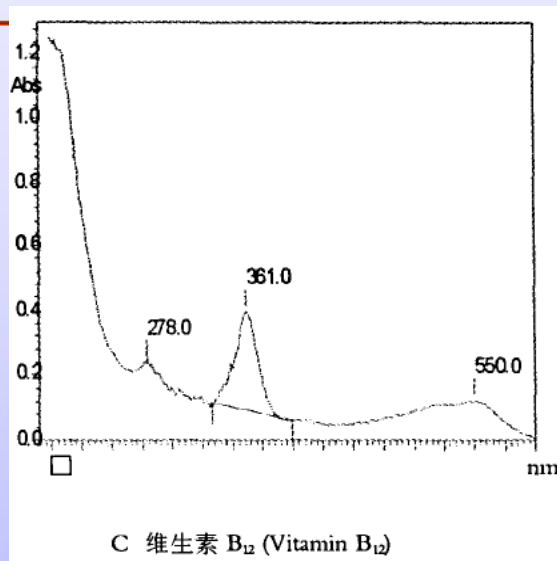
- 1) **空白干扰**：测试空白（包括溶剂、制剂的空白辅料等）。如果空白有吸收信号，应确认空白的信号和待测物信号完全分离或对含量测定没有影响。
- 2) **杂质干扰**：杂质可得时，往纯的待测品中加入适量的杂质，应证明加入后的测试结果没受收到影响。与原料、中间产物等混合，检查抗干扰程度。
- 3) **强降解试验**：当杂质或降解产物不可得时，可以把待测物强力降解（酸、碱、氧化、高温、强光、高湿），把降解后的试验结果和正常的测试结果进行比较，来研究降解产物的可能干扰。

分离度 $>1.5$

## 维生素B12片



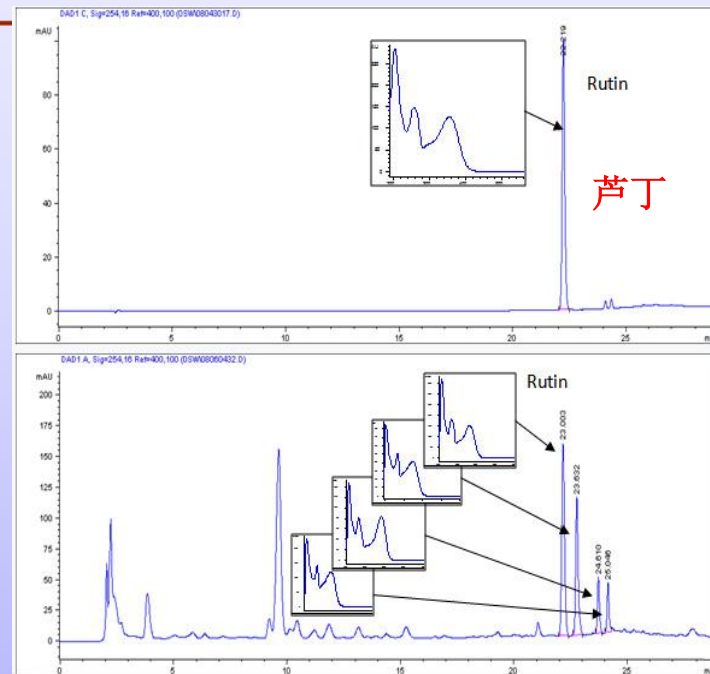
$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$  1355.38



在278nm, 361nm与550nm的波长处有最大吸收。361nm波长处的吸光度与278nm波长处的吸光度的比值应为1.70-1.88。361nm的波长处的吸光度与550nm波长处的吸光度的比值应为3.15-3.45。

测试用溶剂是否有吸收？  
片剂所用辅料溶液是否有吸收？

## 桑葚中芦丁的定量



测试所用流动相、溶剂是否干扰？

桑葚样品中杂质是否干扰？

## 青霉素V (PCV) 在提取和发酵过程中会产生一系列的降解产物

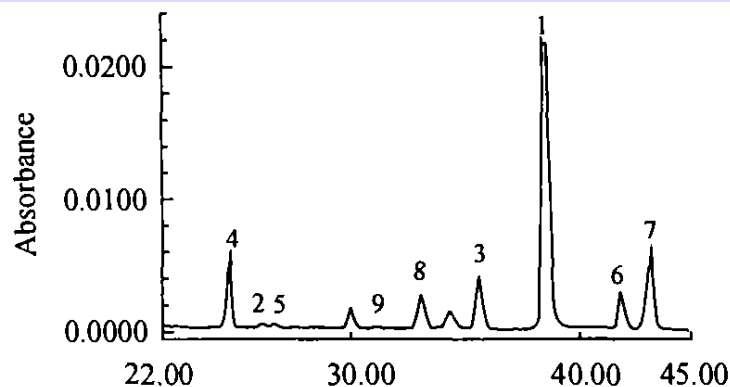
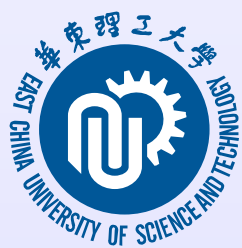


图1 PVC 发酵液 HPCE 图谱

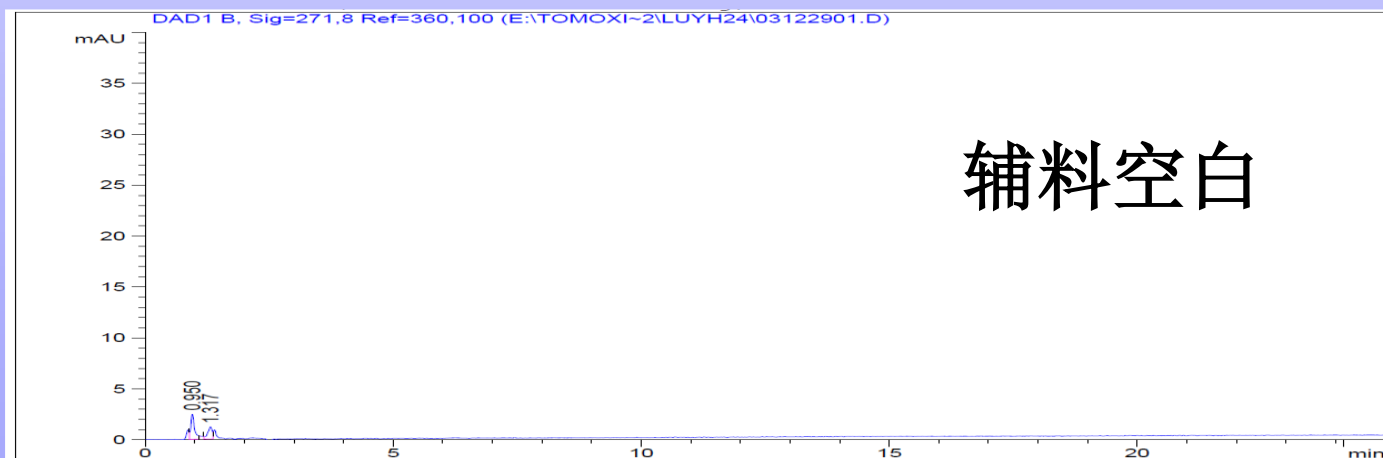
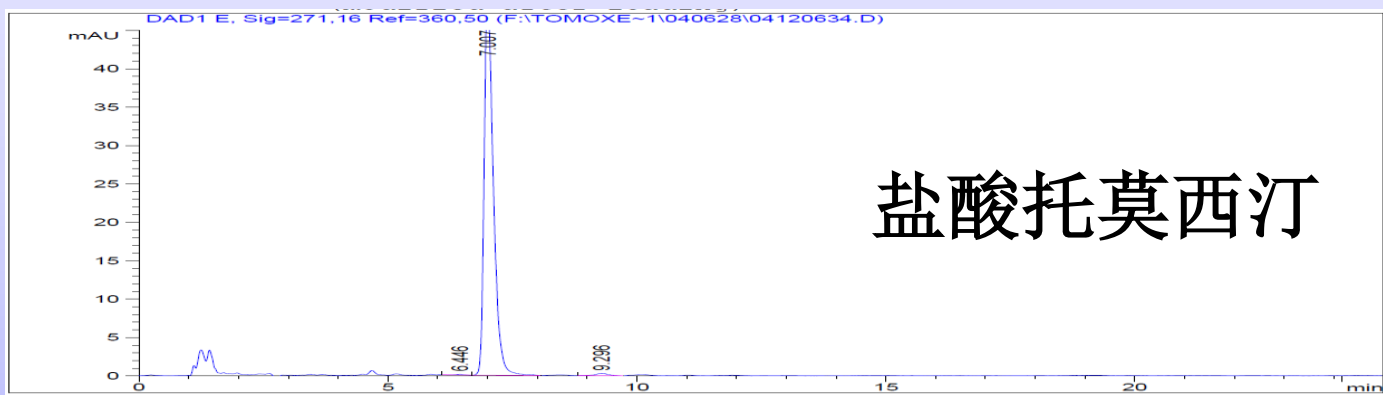
1:PCV 2:6-APA 3:苯氧乙酸 4:对羟基 PCV 5:PCG 6:PCV 噻唑酸(5S,6R) 7:PCV 噻唑酸(5S,6R) 8:PCV 脱羧噻唑酸(5R) 9:PCV 脱羧噻唑酸(5S)

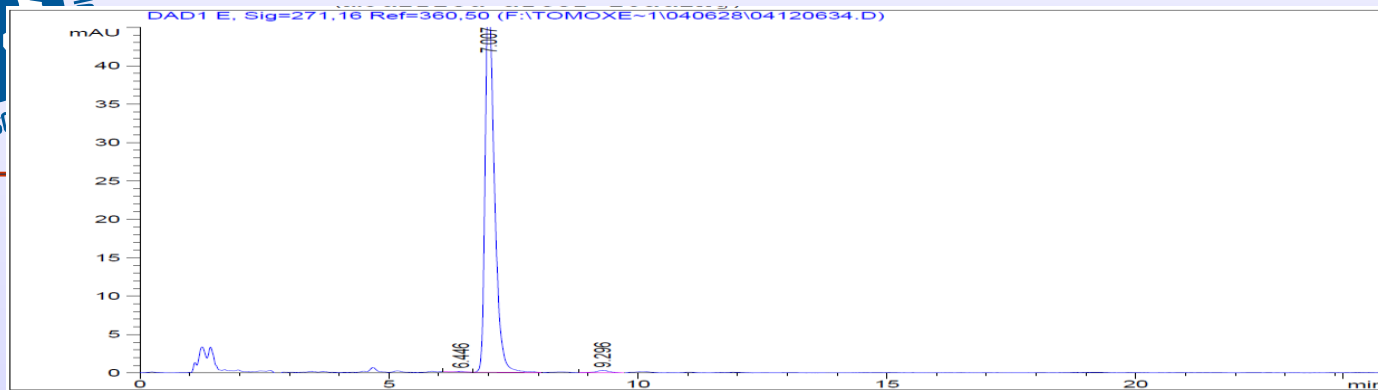
## 降解产物是否干扰？



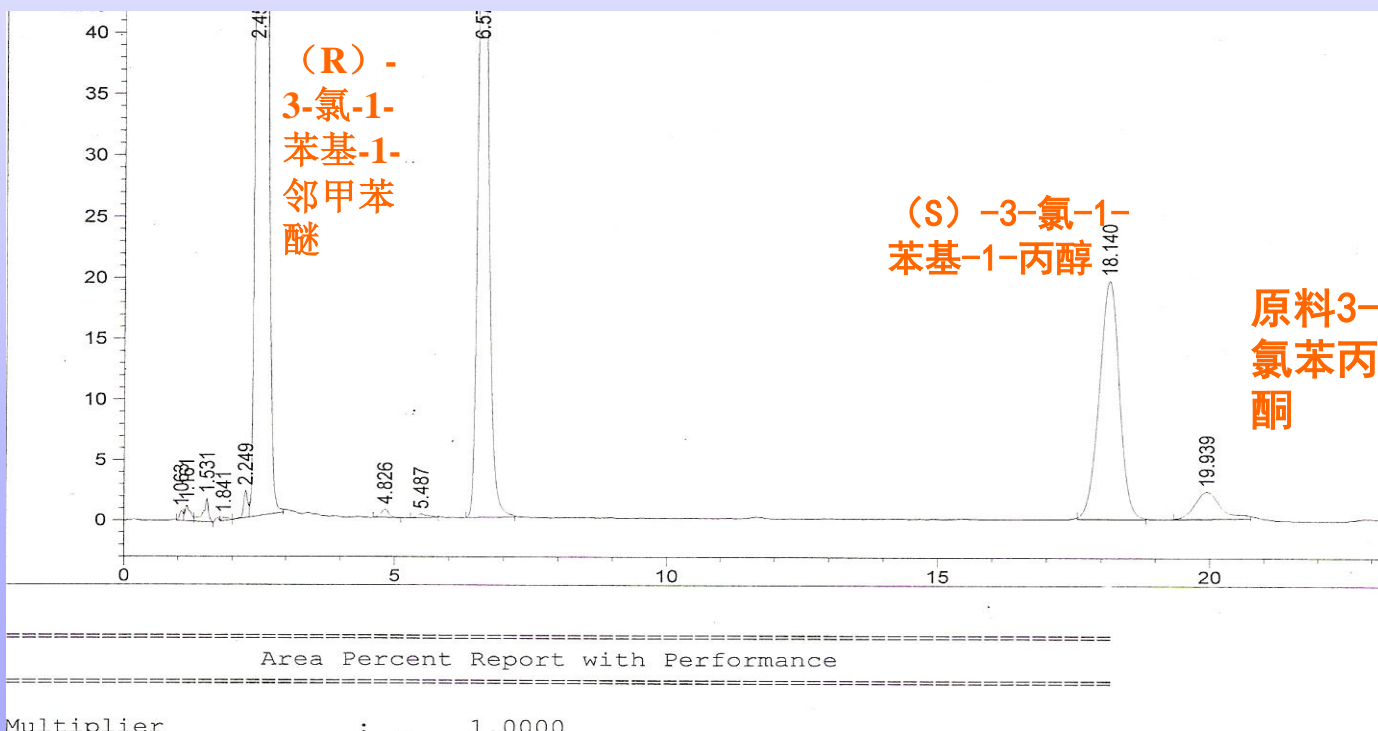
## 举例：盐酸托莫西汀药物（胶囊）

空白干扰

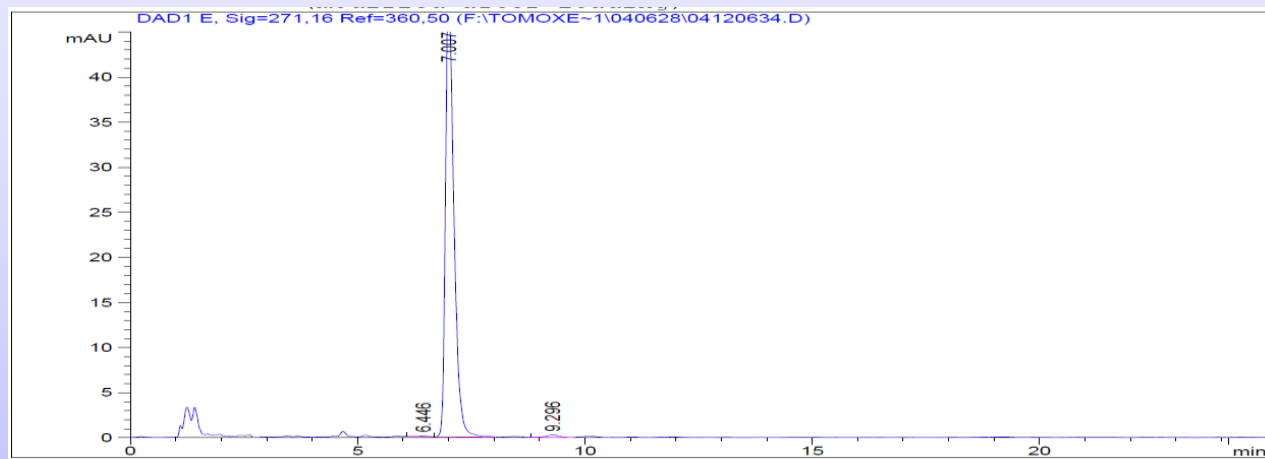




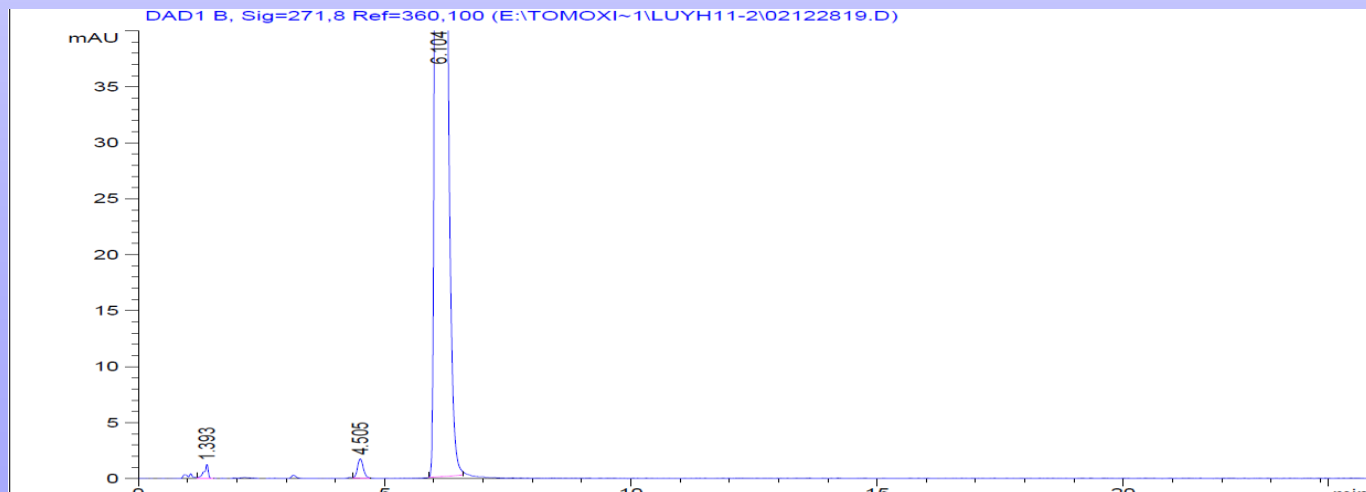
杂质干扰



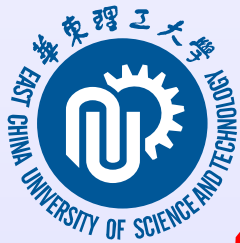
盐酸托莫西汀: 原料3-氯苯丙酮、合成过程中两步中间产物 (S) -3-氯-1-苯基-1-丙醇, (R) -3-氯-1-苯基-1-邻甲苯醚



盐酸托莫西汀  
强降解试验







## 4、检测限和定量限

**检测限 (limit of detection) :** 指试样中被测物能被检出的最低量。

**定量限 ( limit of quantitation ) :** 指试样中被测物能被定量测定的最低量。

**一般采用信噪比法:**

信噪比为 **3 : 1** 时被测物能被检出的量为检测限。

信噪比为 **10 : 1** 时被测物能被检出的量为定量限。



## 5、线性和线性范围

**线性 (linearity)**: 指在**一定浓度范围内**, 测试结果与被测物浓度呈正比关系的程度。通常用**相关系数 (r)** 表达

GC\HPLC法:  $r > 0.999$ ; 紫外分光光度法  $r > 0.9999$ ;  
一般分析方法  $r > 0.9950$

**线性范围 (linearity range)**: 指能达到一定精密度、准确度和线性的前提下, 测试方法所适用的高、低限浓度或量的区间。

### 例：线性关系试验

精密称定利福昔明对照品0.2g，置100ml量瓶中加适量甲醇溶解后，再加甲醇稀释至刻度，摇匀。精密量取0.6ml，0.8ml，1.0ml，1.2ml，1.5ml，2.0ml分别加流动相稀释到25ml摇匀备用。精密量取10 $\mu$ l，注入液相色谱仪，记录峰面积，结果见下表：

浓度 ( $\mu$ g/ml)	48	64	80	96	120	160
峰面积 (A)	1177283	1524432	1857849	2226518	2715906	3569759

以峰面积A对浓度C ( $\mu$ g/ml) 绘制标准曲线，回归方程：

$$A = 21352.48 C + 157256.29$$

$$r = 0.9999$$

结果证明利福昔明在48~160 $\mu$ g/ml的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

## 标准曲线的制作

精密吸取不同量的标准蛋白质（**血清蛋白**）溶液于试管中，各管加水至1mL，加入考马斯亮蓝G-250溶液5mL，混匀，放置10 min，**595 nm**处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标，绘制得其线性回归方程式：

$Y = 0.00635X + 0.15735$ ， $r = 0.9993$ ，表明蛋白质在 **$1.67\mu\text{g/mL}$ - $16.67\mu\text{g/mL}$** 范围内线性良好。

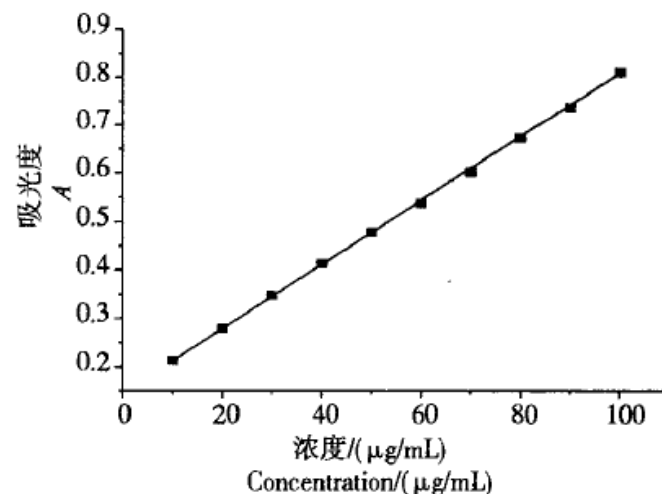
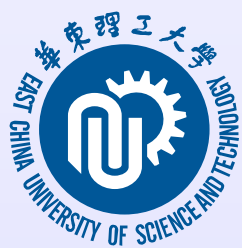


图1 蛋白质标准曲线

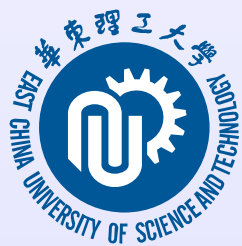
Fig.1 The standard curve of the proteins



## 6. 耐用性

指测定条件稍有变动时，结果不受影响的承受程度，为常规检验提供依据。是衡量实验室和工作人员之间在正常情况下实验结果重现性的尺度。

如，同样类型分析柱，但厂商不同；或同家厂商，型号同，批次不同.....



## HPLC法测定匹伐他汀钙片含量

### 1.2 色谱条件与系统适用性试验

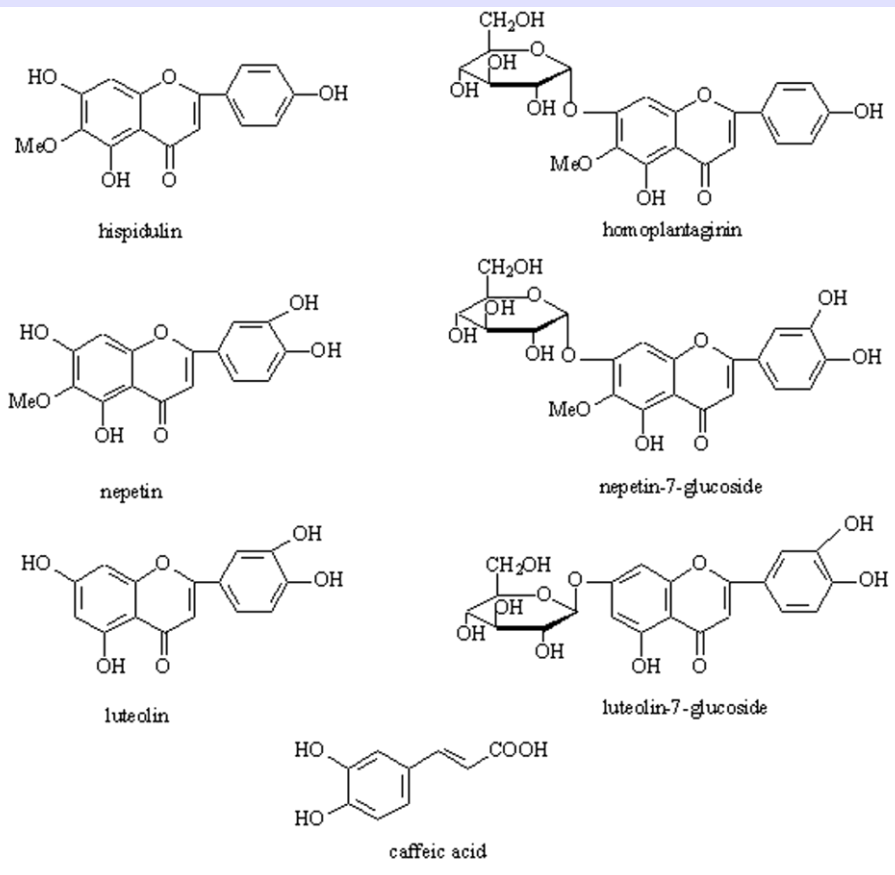
色谱柱: Agilent ZORBAX SB- $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm);  
流动相选择: 0.01 mol/L 醋酸溶液 - 甲醇(33 : 67) 进样量:  
10  $\mu$ L; 流速: 1.0 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 检测波长为 244 nm。

### 2.6 耐用性

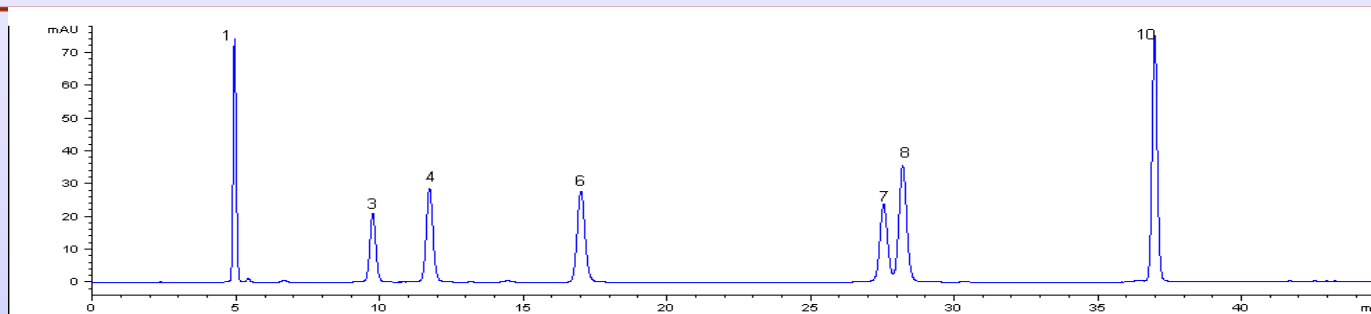
使用 Waters XBridge  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm) 色谱柱, 照色谱条件对同一批样品的含量进行测定, 色谱行为无明显改变。

# 应用举例

## 荔枝草中7种主要生物活性成分的定量分析



# ❖ 标准曲线的制定

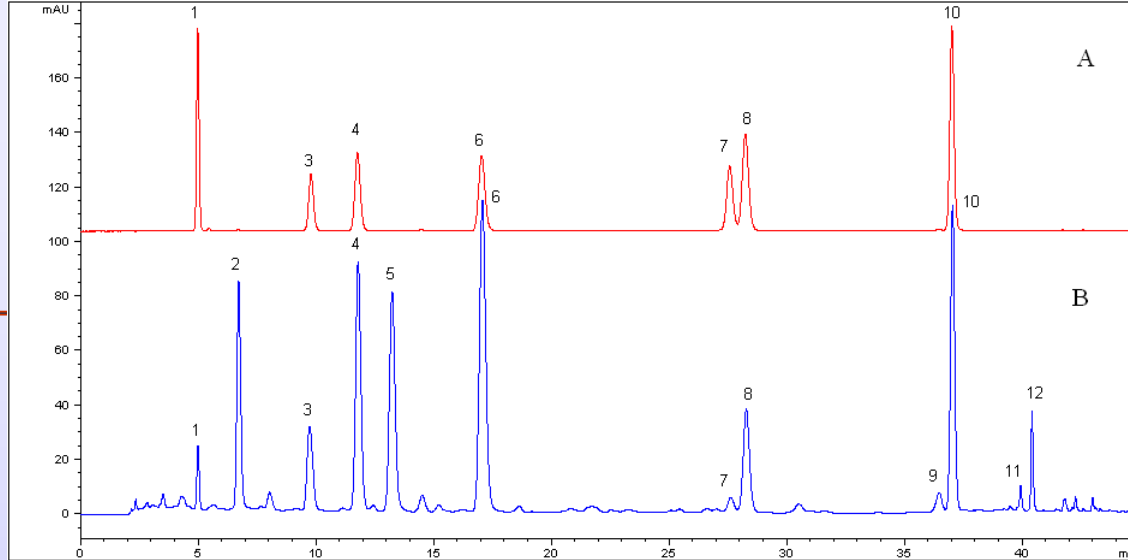


Analyte	Calibration curve	Linear range ( $\mu\text{g/ml}$ )	$R^2$	LOD (ng)	LOQ(ng)
caffeic acid	$y = 14.436x + 6.216$	1.90-38.0	0.9999	0.41	1.36
luteolin-7-glucoside	$y = 6.9116x + 1.9549$	2.20-44.0	0.9999	1.42	4.73
nepetin-7-glucoside	$y = 10.881x + 15.882$	2.00-40.0	0.9997	1.00	3.33
homoplantagin	$y = 11.746x + 0.7418$	2.24-44.8	0.9999	1.22	4.07
luteolin	$y = 11.252x + 3.7138$	2.00-40.0	0.9999	0.14	0.48
nepetin	$y = 14.759x + 10.272$	2.24-44.8	0.9998	0.21	0.69
hispidulin	$y = 22.063x + 2.6187$	2.16-43.2	0.9999	0.24	0.80

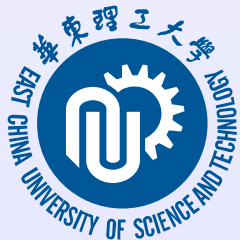




## 样品中含量测定 (n=3)



Samples	咖啡酸	木樨草苷	假荆芥属苷	高车前苷	木樨草素	泽兰黄酮	高车前素
Anhui(0701)	0.36	1.44	2.65	4.32	0.13	0.61	0.90
Guangxi(0708)	0.21	0.97	1.56	2.18	0.20	1.15	1.67
Hubei(0708)	0.30	1.28	2.30	3.65	0.13	0.65	1.03
Hubei(0710)	0.31	1.38	2.52	3.44	0.14	0.69	0.85
Hebei(0708)	0.33	2.22	3.40	4.44	0.23	1.19	1.45
Zhejiang(0709)	0.40	1.81	3.18	4.02	0.12	0.64	0.80
Hebei(0709)	0.36	2.18	3.36	4.74	0.24	1.22	1.66
Anhui(0609)	0.44	2.21	3.37	5.75	0.12	0.52	0.87
Anhui(0710)	0.42	1.92	3.36	4.60	0.13	0.70	0.91
Anhui(0710)	0.41	2.03	3.48	4.68	0.14	0.76	0.96

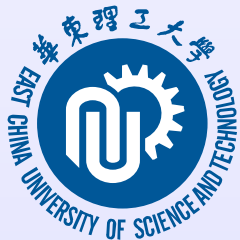


## 加样回收试验

Recovery of each analyte determined by standard addition method ( $n=3$ )

Analytes	Original (mg)	Spiked (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Caffeic acid	0.40	0.42	0.80	95.2	3.1
Luteolin-7-glucoside	1.81	1.80	3.56	97.2	2.8
Nepetin-7-glucoside	3.18	3.21	6.48	102.8	2.6
Homoplantagin	4.02	4.03	8.18	103.2	3.3
Luteolin	0.12	0.12	0.23	91.7	3.1
Nepetin	0.64	0.64	1.24	93.8	2.4
Hispidulin	0.80	0.82	1.58	95.1	2.9

The data was present as average of three determinations. The sample type used to carry out the recovery study was Zhejiang 0709.  $\text{Recovery}(\%) = 100 \times (\text{amount found} - \text{original amount}) / \text{amount spiked}$ .



## 精密度试验

Analyte	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=6)		Repeatability (n=5)	
	Content	RSD	Content	RSD	Content	RSD
	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)
caffeic acid	0.39	1.7	0.38	2.8	0.41	1.6
luteolin-7-glucoside	1.80	1.5	1.78	3.2	1.81	2.0
nepetin-7-glucoside	3.17	1.4	3.21	2.7	3.19	1.3
homoplantagin	4.02	1.1	3.98	2.6	4.01	1.4
luteolin	0.14	1.6	0.15	2.5	0.14	1.5
nepetin	0.67	1.8	0.68	2.8	0.65	1.8
hispidulin	0.78	1.5	0.76	2.9	0.79	1.7

# 蜂胶有效成分的含量测定及质量控制

朱恩圆<sup>1</sup>, 邹彦平<sup>2</sup>, 魏东芝<sup>2</sup>, 卢艳花<sup>2\*</sup>, 王峰涛<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 2001203; 2. 华东理工大学生物工程学院生物反应器国家重点实验室, 上海 200237)

关键词: 蜂胶; 总黄酮; 分光光度法; 质量控制

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2005)07-0835-01

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂并混入上颚腺分泌物和蜂蜡而成的芳香固体物。蜂胶的化学成分复杂, 迄今发现已有上百种之多。功效成分主要是黄酮类化合物, 研究显示具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、消炎镇痛、防腐保鲜等多种功效, 能增加机体免疫力, 促进组织再生。已越来越广泛地应用于医药、食品、化妆品等领域<sup>[1-3]</sup>。主要品种有纯蜂胶、蜂胶粉等。但目前市场上的蜂胶及其产品缺乏统一的质量控制标准。

## 1 仪器与试剂

UV-7504 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司); 超声清洗器(上海必能信超声有限公司)。芦丁标准品(中国生物制品检定所, 批号: 0080-9705, 含量 > 98%); 蜂胶由上海舜夏生物科技有限公司提供; 其他试剂均为分析纯。

## 2 实验方法和结果

### 2.1 标准曲线的测定

准确称取 10 mg 干燥至恒重的芦丁标准品, 置 50 mL 量瓶中, 以 75% 的乙醇溶液配成浓度为 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液备用。

分别量取上述标准溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 并补加 75% 乙醇至 5 mL。加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min 后, 加入 5% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min; 加 4% NaOH 溶液 4 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 静置 15 min 后, 于 510 nm 波长处测量吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为:  $A = 12.125C - 0.0188$ ,  $r = 0.9986$ , 线性范围为 0.005 ~ 0.1 mg。

### 2.2 重复性试验

精密吸取河南产提纯蜂胶 5 份, 按样品含量测定项下进行测定。平均值为 29.71%, RSD 为 1.85%, 结果表明重复性良好。

### 2.3 加样回收率试验

分别量取上述样品的供试品溶液 0.5 mL, 平行 5 份, 各

加入 1.5 mL 标准品溶液, 按样品含量测定项下进行测定, 测定结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果

序号	取样量 (mg)	黄酮含量 (mg)	对照品加 入量(mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	1.008	0.299	0.3	0.588	96.33		
2	1.008	0.299	0.3	0.610	103.67		
3	1.008	0.299	0.3	0.595	98.67		
4	1.008	0.299	0.3	0.590	97.00	99.468	3.14
5	1.008	0.299	0.3	0.604	101.67		

### 2.4 样品中总黄酮的含量测定

精密称取各样品 1 g, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加入 30 mL 75% 乙醇溶液, 超声溶解后, 用 75% 乙醇定容至 50 mL, 备用。各取上述溶液 1 mL, 稀释至 10 mL, 配成浓度为 2 mg · mL<sup>-1</sup> 左右的溶液, 作为供试品溶液, 备用。再取各溶液 0.5 mL, 按标准曲线的测定方法项下进行测定。各样品中黄酮含量按下式进行计算:

$$\text{黄酮含量}(\%) = \frac{A + 0.188}{12.125} \times 10 \times \frac{500}{0.5} \times 100$$

其中: A 为样品的吸光度; W 为样品重量(g);  $\frac{500}{0.5}$  为稀释倍数。

表 2 样品的测定结果

产地	样品	样品重量(g)	吸光度	黄酮含量(%)
河南	提纯蜂胶	1.010	0.345	29.71
	水溶性蜂胶	0.978	0.294	26.37
	蜂胶粉(60%)	0.952	0.180	17.22
	蜂胶粉(50%)	1.062	0.239	20.02
福建		0.950	0.368	33.58
浙江	No. 223252	0.960	0.070	7.63
	No. p923167	1.041	0.293	24.69
	No. 923827	1.058	0.219	18.54

## 3 讨论

蜂胶是一种复杂的混合物, 含有大量的生物活性成分,

收稿日期: 2004-05-17

作者简介: 朱恩圆(1975 ~), 男, 理学博士, 主要研究方向: 中药活性成分、作用机理、质量标准。电话: 021-51322506

\* 通讯作者。

左金丸由黄连与吴茱萸组成, 用于泻火疏肝、和胃止痛, 是最常用的中成药之一, 收载于《中华人民共和国药典》2000 年版一部。原标准采用回流提取、柱色谱、分光光度法测定总生物碱(以盐酸小檗碱计), 十分繁琐。本实验建立 HPLC 法测定盐酸小檗碱含量, 专属性好, 方法简便、准确。

## 1 仪器和试剂

LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6AV 紫外检测器。盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所), 乙腈(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。左金丸(市售)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 CLC-ODS  $C_{18}$  柱(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m)(Shim-pack), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(75 : 25), 检测波长 350 nm, 灵敏度为 0.1 AUFS, 柱温为室温, 进样量为 20  $\mu$ L, 流速为 1.0 mL/min。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1。

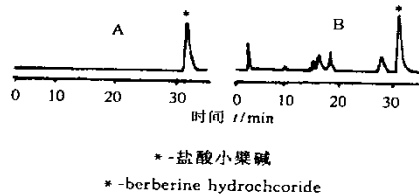


图 1 盐酸小檗碱对照品(A)与左金丸(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of berberine hydrochloride (A) and Zuojin Pill (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取在 100  $^{\circ}$ C 干燥 5 h 的盐酸小檗碱对照品约 30 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水-盐酸(100 : 1)适量, 超声 10 min 使溶解, 放冷, 加水-盐酸(100 : 1)至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用水-盐酸(100 : 1)稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 取左金丸适量研细(过 3

号筛), 取 1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加水-盐酸(100 : 1)适量, 超声 20 min 使溶解, 放冷, 加水-盐酸(100 : 1)至刻度, 摇匀, 离心。精密量取上清液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用水-盐酸(100 : 1)稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密吸取稀释前的对照品溶液(0.3 mg/mL)0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用水-盐酸(100 : 1)稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件测定盐酸小檗碱吸收峰面积。以浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归, 得方程:  $A = 39\,923\,C - 9\,651$ ,  $r = 0.999\,9$ 。结果表明: 盐酸小檗碱在 3~48  $\mu$ g/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密密度试验: 精密吸取同批供试品溶液注入高效液相色谱仪, 于同一日内重复进样 6 次, 测定盐酸小檗碱峰面积, 结果 RSD 为 0.61%。

2.6 稳定性试验: 取同批供试品溶液分别于 0, 5, 9, 24, 36, 48 h 注入高效液相色谱仪, 测定盐酸小檗碱峰面积, 结果 RSD 为 0.87%。

2.7 重现性试验: 精密称取同一批供试品 6 份, 按供试品溶液制备法制备, 并按 2.1 项色谱条件测试, 盐酸小檗碱含量 RSD 为 1.70%。

2.8 回收率试验: 采用加样回收率法。取已知含量的同批左金丸粉末 0.5 g, 精密称定, 精密加入盐酸小檗碱对照品, 按供试品溶液制备法制备, 并按 2.1 项色谱条件测试。结果平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.2% ( $n = 6$ )。

2.9 样品测定: 取 4 个厂家样品 8 批, 按供试品溶液制备法制备, 并按 2.1 项色谱条件测定, 结果见表 1。

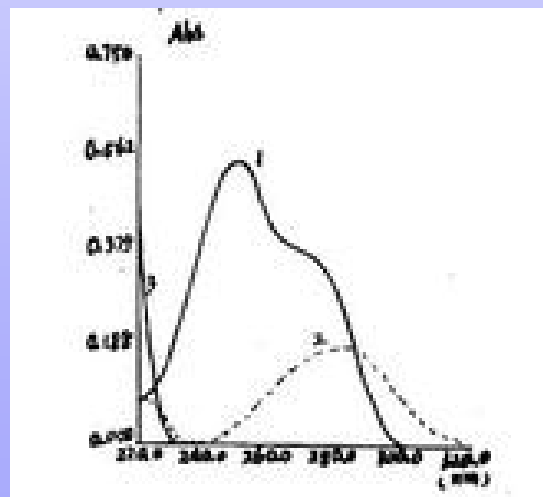
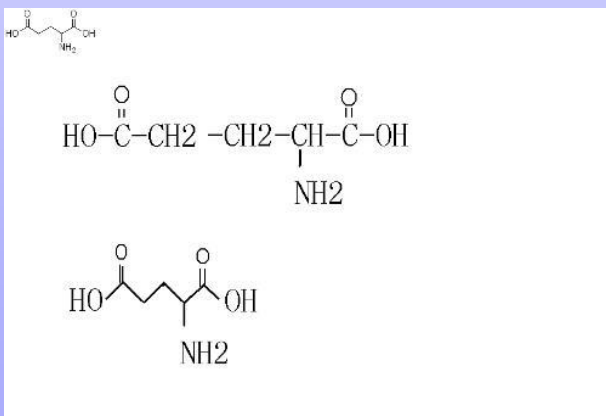
## 3 讨论

3.1 参考文献, 比较不同的紫外检测波长和流动相, 结果表明 350 nm 为检测波长, 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(75 : 25)为流动相, 分离效果较好。

3.2 供试品的提取考察了不同的溶剂和超声处理时间。结果表明以水为溶剂盐酸小檗碱的提取含量

# 问题

1. 发酵法生产谷氨酸时（谷氨酸纯化后碱中和成味精），如何检测发酵水平？（谷氨酸棒状杆菌等发酵）
2. 如何设计实验，进行方法学验证？



最大吸收波长在280nm左右

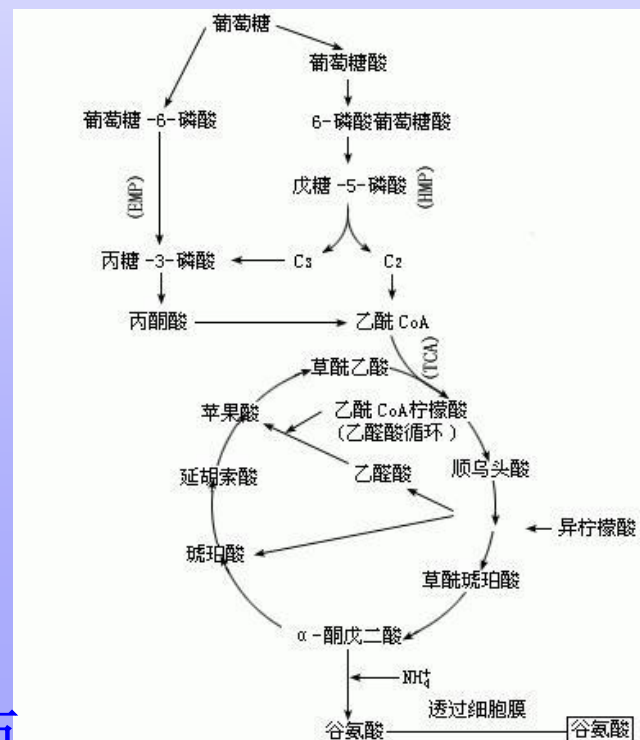


图 5-7 谷氨酸的生物合成途径