2 苯肽氨酸质量分数的测定

2.1 方法提要

试样用重蒸的乙腈溶解，以苯甲酸为内标物、乙腈＋磷酸缓冲盐溶液（pH＝5.5）＋十六烷基三甲基溴化铵为流动相[1]，使用以 Lichrsorb-C18（5 μm）为填充物的不锈钢柱和紫外检测器，对试样中苯肽氨酸进行高效液相色谱分离和测定。

2.2 试剂和溶液

苯肽氨酸标样：已知含量≥99.9%；内标物：苯甲酸（郑州市红兴化工有限公司），应不含有干扰分析的杂质；乙腈（北京海之润生物技术有限公司）：色谱纯；十六烷基三甲基溴化铵（江苏省金坛市西南化工研究所生产）：分析纯；磷酸二氢钠（西安化学试剂厂）：分析纯；磷酸氢二钠（西安化学试剂厂）：分析纯。

2.3 仪器

Waters 高效液相色谱仪：具有可变波长紫外检测器；色谱数据处理机；色谱柱：Lichrsorb-C18（4.6 mm×150 mm，5 μm）；色谱工作站（浙江大学 N2000 型）；溶剂过滤器（汉邦 HL-01 型，过滤膜孔径 0.45 μm）；电子分析天平（上海精密科学仪器厂 FA1004N）；超声波清洗池（上海超声波仪器厂 HS3120D 型）。

2.4 高效液相色谱操作条件

流动相：乙腈－磷酸缓冲盐溶液（体积比 37.5 ∶ 62.5，pH＝5.5），加入十六烷基溴化铵（250 mmol/L）；流动相流速：2.0 mL/min；检测波长：233 nm；检测灵敏度（AUFS）：0.5；进样量：10 μL；保留时间：苯肽氨酸 4.2 min（如图 1、图 2 所示）.

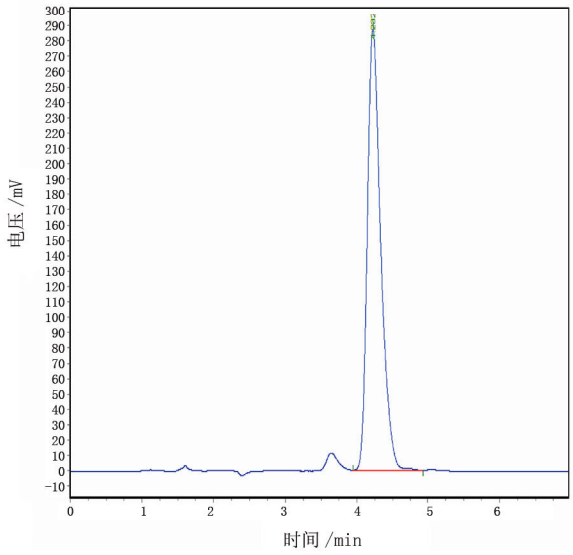

图 1 苯肽氨酸标样图谱
Fig. 1 Phthalanilic acid standard sample map

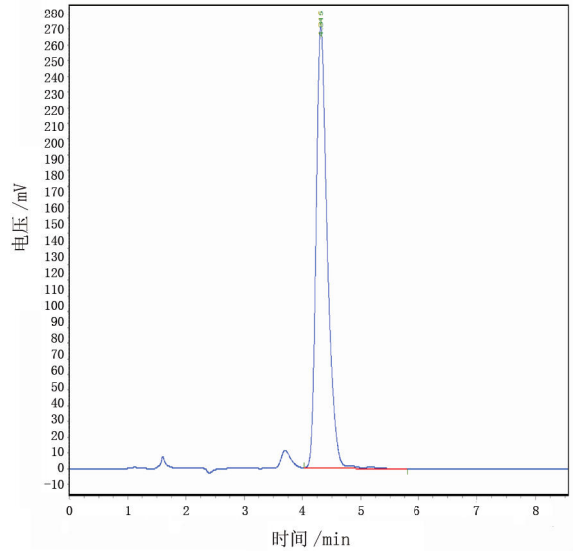

图 2 试样宝赢图谱
Fig. 2 Baoying sample map

2.5 测定步骤

2.5.1 标样溶液的配制

准确称取苯肽氨酸标样 0.05 g（精确至 0.000 2 g）于 50 mL 容量瓶中，加入重蒸乙腈溶液并稀释至刻度，摇匀[2]。

2.5.2 试样溶液的配制

准确称取试样 0.25 g（精确至 0.000 2 g）于 50 mL 容量瓶中，加入重蒸乙腈溶液并稀释至刻度，

摇匀。

2.5.3 测定

在上述色谱测定条件下，待仪器基线稳定后，连续注入数针标样溶液，并计算各针相对响应值，待相邻两针的相对响应值变化小于 1.0%时，按标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液顺序进样进行测定。分别称取 4 批样品粉末各约 0.25 g，按拟定的样品制备方法，分别制成样品溶液，按上述色谱条件对各溶液进行测定，图谱如图 1、图 2 所示。测定 4 批样品中苯肽氨酸的含量，每批测 2 次，结果如表 1 所示。

表 1 样品含量测定结果（mg/g）

Tab. 1 Content of the sample determination results (mg/g)

样品批号	苯肽氨酸含量		平均值
	第一次测定	第二次测定	
20090305	20.05	20.07	20.06
20090308	20.06	20.07	20.07
20090313	20.04	20.05	20.05
20090317	20.05	20.06	20.06

2.5.4 计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中苯肽氨酸的峰面积，分别进行平均，苯肽氨酸质量百分含量 $X1$，按式（1）计算：

$$X1=\frac{r_1 \cdot m_2 \cdot p}{r_2 \cdot m_1}\times 100\%, \quad (1)$$

其中，r_1 为试样溶液中苯肽氨酸峰面积的平均值；r_2 为标样溶液中苯肽氨酸峰面积的平均值；m_1 为试样的质量（g）；m_2 为标样的质量（g）；p 为苯肽氨酸标样的质量百分含量（%）。

3 线性关系考察

精密吸取对照品溶液各 1.0，2.5，5.0，10.0，20.0 mL 置于 50 mL 量瓶，加甲醇稀释至刻度，摇匀[3]，分别吸取上述一系列对照品溶液各 20 μL 注入色谱仪，测定峰面积积分值，以峰面积（Y）为纵坐标，对照品的浓度（X）为横坐标进行线性回归，得苯肽氨酸回归方程 $Y=23\ 935X-20\ 713$（$r=1$）. 结果：在 6.8～230.0 μg/mL 范围内，苯肽氨酸面积积分值 Y 与苯肽氨酸对照品浓度 X(mg/L)线性关系良好。

4 精密度实验

精密吸取对照品溶液 5 μL，重复进样 6 次，依法测定峰面积积分值[4]，结果 RSD 为 1.31%（$n=5$），表明仪器精密度良好。

5 稳定性实验

将对照品溶液置阴暗处室温密闭放置，于不同时间间隔 0，3，6，12，24 h 取出，测定其峰面积积分值[5]。结果 RSD 为 1.30%（$n=5$），说明供试液在 24 h 内稳定性良好。

6 重复性实验

取同一批号样品，按拟定的含量测定方法，平行制备供试品溶液，依法测定峰面积积分值并计算含量[6]。结果 RSD 为 0.96%（$n=6$），表明此实验方法重复性良好。

7 加样回收率实验

精密吸取苯肽氨酸对照品溶液 5 mL，分别置于 6 个 50 mL 的容量瓶中，取已知含量的样品 0.04 g（6 份），精密称定，分别置于上述容量瓶中，按供试品溶液的制备方法制成回收率测定样品，按含量

测定方法进行测定，计算回收率。结果：苯肽氨酸平均回收率为99.50%，RSD为1.38%（n=6），如表2所示，表明本方法具有较好的回收率。

表2 加样回收率结果

Tab. 2 The average recovery results

试验号	样品重/g	样品中苯肽氨酸的质量/mg	加入苯肽氨酸的质量/mg	测得苯肽氨酸的质量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.040 2	0.160 8	0.500 0	0.660 5	95.46		
2	0.040 2	0.160 8	0.500 0	0.660 7	98.49		
3	0.040 1	0.160 4	0.500 0	0.660 3	98.49	97.99	1.57
4	0.041 6	0.166 4	0.500 0	0.666 2	97.00		
5	0.041 2	0.164 8	0.500 0	0.664 6	97.00		
6	0.040 8	0.163 2	0.500 0	0.663 3	101.50		

8 结论

苯肽氨酸的含量测定方法很少有文献报道，为寻找检测方法，参照没食子酸的检测方法经过反复实验和调整，最终找到了稳定可行的检测方法。找到的乙腈＋磷酸缓冲盐溶液（pH＝5.5）＝37.5∶62.5（体积比）加入十六烷基溴化铵浓度为250 mmol/L检测苯肽氨酸的方法有良好回收率，本方法中平均回收率为97.99%，RSD为1.57%. 含量测定结果表明：本品的含量限度是以每克苯肽氨酸不得少于5.5 mg. 该方法简便易行、稳定可靠、重现性好，可以用来检测宝赢的含量和提高质量控制水平。

[参考文献] (References)

[1] 邓科君，张艺，王平，等. 反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量[J]. 色谱，2006，24（6）：652～653.
DENG K J，ZHANG Y，WANG P，et al. Simultaneous determination of gallic acid and protocatechuic acid in choerospondias axillaries by RP-HPLC[J]. Chinese Journal of Chromatography，2006，24（6）：652～653.（in Chinese）

[2] 张百臻，季颖，叶纪明. 农药分析（4版）[M]. 北京：化学工业出版社，2005.
ZHANG B Z，JI Y，YE J M. Pesticide analysis（4th Edition）[M]. Beijing：Chemical Industry Press，2005.（in Chinese）

[3] 徐炳祥，韩公羽，刘明珠. 映山红有效成份的研究Ⅲ——乌索酸的分离和鉴定[J]. 第二军医大学学报，1982（4）：298～299.
XU B X，HAN G Y，LIU M Z. Studies of the effective constituents of *Rhododendren simsii* planch（Ⅲ）：the isolation and identification of ursoiic acip[J]. Academic Journal of Second Military Medical University，1982(4)：298～299.（in Chinese）

[4] 孙菁，李玉林，纪兰菊，等. 不同生长季节下藏药麻花秦艽活性成分含量研究[J]. 云南植物研究，2006，28（2）：219～222.
SUN J，LI Y L，JI L J，et al. HPLC determination of contents of four active constituents in tibetan medicine *Gentiana straminea*（Gentianaceae）during different growing period[J]. Acta Botanica Yunnanica，2006，28(2)：219～222.（in Chinese）

[5] 姜秋凤. 反相高效液相色谱法对藏药麻花秦艽中龙胆苦苷的测定[J]. 青海大学学报（自然科学版），2005，23（6）：70～71.
JIANG Q F. Gentiopicroside in *Gentiana straminea* herbs by RP-HPLC[J]. Journal of Qinghai University（Nature Science），2005，23(6)：70～71.（in Chinese）

[6] 袁珂，李根林，李俊芝，等. 车前草中熊果酸、齐墩果酸的HPLC测定[J]. 中草药，1999，30（12）：901～903.
YUAN K，LI G L，LI J Z，et al. Determination of ursolic acid and oleanolic acid in asiatic plantain（*Plantago asiatica*）by RP-HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs，1999，30(12)：901～903.（in Chinese）