

(2) 盐酸异丙嗪的检测波长对及工作曲线 盐酸异丙嗪的 λ_{\max} 为 249nm, 设 $\lambda_1 = 249\text{nm}$; 而氯丙嗪在 249nm 与 259nm 处有大致相同的吸收, 则 $\lambda_2 = 259\text{nm}$, 同上法调通道 2 的 AUFS, 使氯丙嗪的干扰被消除, 得到仪器参数为:

通道 1 $\lambda_1 = 249\text{nm}$ 1.00AUFS
通道 2 $\lambda_2 = 259\text{nm}$ 0.880AUFS

按所设仪器参数进行盐酸异丙嗪 HPLC 测定, 以峰面积 Y 对进样量 X 回归, 得工作曲线方程为:

$$Y = 3.56 \times 10^4 X + 5.92 \quad (\gamma = 0.999)$$

(三) 样品含量测定

取复方氯丙嗪片 20 片, 精密称重, 求出平均片重, 研成粉末, 精密称取该粉适量 (约 40mg), 置于一个 25ml 棕色量瓶中, 用 0.01mol/L KH_2PO_4 液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经微孔滤膜过滤。按所设仪器条件, 10 μl 的进样量, 分别测定盐酸氯丙嗪和盐酸异丙嗪的含量, 并按下式计算标示量的百分含量, 结果见表 1。

表 1 测定结果 (标示量 \pm CV%)

测定方法	批号	盐酸氯丙嗪	盐酸异丙嗪
本文方法	I	94.6 \pm 0.980%	108 \pm 0.530%
	II	98.1 \pm 0.820%	94.6 \pm 0.770%
	III	96.7 \pm 0.510%	97.7 \pm 1.00%
文献方法	I	93.1%	106%
	II	98.2%	93.1%
	III	97.8%	96.0%

$$\text{标示量} \% = \frac{X \times 25/10}{W_{\text{样}} \times S/\bar{W}_{\text{粒}}} \times 100\%$$

其中 X 为按回归方程算出的测出量 (μg), $W_{\text{样}}$ 为称样量 (mg), S 为样品标示量 (每片含盐酸氯丙嗪和异丙嗪各 12.5mg), $\bar{W}_{\text{粒}}$ 为平均粒重 (mg/粒)。

用文献方法⁽²⁾进行测定比较, 结果也见表 1。

讨 论

(一) 本文将双波长法应用于 HPLC 检测, 初步获得成功, 其关键在于选好通道 2 的检测波长及 AUFS。同时, 由于用外标法测定, 需严格进样操作, 以减少误差。

(二) 当流动相为甲液: 乙液 = 40:60 时, 两被测组分的色谱峰可以分开, 但保留时间大大延长, 不仅测定速度慢, 而且峰宽变宽, 易引入测量误差。

(三) 盐酸氯丙嗪和盐酸异丙嗪易氧化分解, pH2—6 时较稳定⁽³⁾。本文用 0.01mol/L KH_2PO_4 为溶剂 (兼为流动相), pH 为 4 左右。

致谢 兰琪田同志提供了盐酸氯丙嗪和盐酸异丙嗪。

参 考 文 献

- (1) B. Li Jeanne, J. Anal. & Purific. Oct., 54(1986).
- (2) 高铁勇、杨晓平, 药物分析杂志, 6(1), 50(1986).
- (3) 董永武, 药物分析杂志, 2(1), 55(1982).

(收稿日期: 1990年3月14日)

Determination of the Active Ingredients in Tablet Chlorpromazine Hydrochloride Composite by High Performance Liquid Chromatography with Dual-Wavelength Detection Liang Hongxi, Miao Huarong* and Yu Ruigu, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; Jiangsu Institute for Drug Control, 314001

On a Waters 490 UV-detector, the principle of dual-wavelength spectrometry was applied to detect unresolved peaks in HPLC. The amounts of chlorpromazine hydrochloride (I) and promethazine hydrochloride (II) in tablet chlorpromazine ingredient were determined and satisfactory results were obtained. Comparison between the results from this method and those from literature is illustrated.

高效液相色谱法测定酶的活性

陈清轩

(中国科学院发育生物学研究所, 北京, 100080)

3 β , 20 α -羟基甾体脱氢酶 (3 β , 20 α -HSD) 是和胚胎的发育密切相关的⁽¹⁾; 我们于 1987 年首次从胎羊血中得到该酶的纯品⁽²⁾, 并对其有关性质进行了研究。但是繁杂的测酶活方法常常延误研究工作的顺利进行, 因此寻求一种简便有效的测定方法是很有意义的。经多次实验, 我们成功地高效液相色谱技术

Leonard O. Rosik Frederick Sweet

(华盛顿大学医学院, 美国圣路易斯)

(HPLC) 用于 3 β , 20 α -HSD 的活性测定, 大大缩短了测定时间, 促进了有关研究工作的顺利进行。本文将介绍这种新的测酶活方法。

实验部分

(一) 仪器与试剂

仪器 710 HPLC 控制器, SP 4270 积分仪, Beckman 110A 泵, Spectroflow 783 检测器, LiChrosorb RP-18 柱。

试剂 孕酮, 4-孕烯-20 α -羟基-3-酮, (Steraloids 公司); 乙醚, 乙酸乙酯, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) (Sigma Chemical 公司); 硅胶 G 板 (Eastman Kodak 公司); 乙腈等有机溶剂 (Fisher Scientific 公司); 3 β , 20 α -HSD 根据 Chen 的方法制备^[2]。

(二) 方法

1. 样品的制备 在 10×75mm 试管中加入 1.0 ml 含有 1.0 μ mol NADPH 和 0.1 μ mol 孕酮的 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 6.0; 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。反应如图 1 所示。反应液用乙醚/乙酸乙酯 (1:1) 混合液抽提, 把有机相转移到小试管中, 在 37 $^{\circ}$ C 的干燥气流中浓缩至干; 最后加入 200 μ l 乙腈, 制成待测样品。

2. 样品的测定 吸取样品 20 μ l, 注射进 HPLC 系统的 LiChrosorb RP-18 柱, 用重蒸过的 HPLC 级乙腈

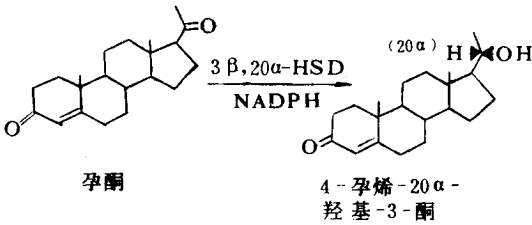


图 1 3 β , 20 α -HSD 催化反应方程式

洗脱, 流速为 2ml/min, 检测波长采用 240nm, 压力为 1000—1500psi (6.89×10⁶—10.34×10⁶Pa)。微电脑控制的记录仪自动绘出光吸收曲线, 并给出每个峰的积分面积及每个峰面积在总面积所占的百分比等数据; 产物峰面积所占的百分比即为转化率。由于孕酮和它的还原产物 4-孕烯-20 α -羟基-3-酮在波长 240nm 的消光系数相等, 因此它们的面积比即是它们的克分子比。我们把每分钟还原 1 μ mol 孕酮所需酶量定义为一个酶的活性单位。酶的活性按下式计算。

$$\text{酶活性 (unit)} = \frac{\text{孕酮量} (\mu\text{mol}) \times \text{转化率} (\%)}{\text{时间} (\text{min})}$$

对一样品我们也用同位素法, 即 TLC 法进行测定, 并比较两种方法测得的结果。

结果和讨论

从测酶活反应液所制得的抽提物样品主要含有底物孕酮和产物 4-孕烯-20 α -羟基-3-酮, 对这个混合

物的色谱分离效果很好, 见图 2。孕酮的保留时间为 1.0 分钟, 4-孕烯-20 α -羟基-3-酮的保留时间为 1.3 min, 整个色谱过程仅需 3.0min。

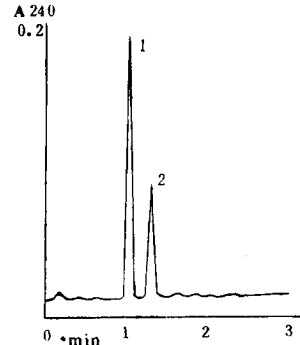


图 2 酶催化反应产物的 HPLC 谱图

1. 孕酮, 2. 4-孕烯-20 α -羟基-3-酮。

我们也用同位素法对相同的酶液进行了活性测定, 以便和 HPLC 法测得的结果相比较, 结果见表 1。从这些数据可知, 两种方法测得的结果是一致的; 这说明 HPLC 法可代替同位素法, 而且 HPLC 法的精确性和重复性远比同位素法好。由于同位素法在制得样品后不能直接用于酶的活性测定, 还要经过 TLC 色谱、放射性计数等过程, 因此至少要多用 4 个小时才能完成测定。

表 1 两种方法测得的结果比较

方法	酶活性 (m unit) (n=6)	平均值	标准偏差	变异系数 (%)
HPLC	5.67, 5.65, 5.68, 5.66, 5.65, 5.66	5.66	0.012	0.21
同位素	5.60, 5.65, 5.70, 5.64, 5.58, 5.72	5.65	0.042	0.74

用 HPLC 法分离纯化甾醇类化合物是十分有效的^[3,4], 它不仅简便、快速, 而且准确性、重复性极好。我们认为凡以甾体为底物的脱氢酶, 只要底物和产物都有紫外吸收, 其活性都可用 HPLC 法进行测定。

参考文献

- [1] C. D. Nancarrow, R. F. Seamark, Steroids, 12, 367 (1968).
- [2] Q. Chen, C. D. Nancarrow, F. Sweet, Steroids, 49, 447 (1987).
- [3] S. Shah, M. Ashraf-Khorassani, L. T. Taylor, Chromatographia, 27, 441 (1989).
- [4] 杨兰萍、罗康、於新根, 色谱, 6(2), 126 (1988).

(收稿日期: 1990 年 3 月 10 日)

for Determination of Enzymatic Activity *Chen Qingzuan, Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing, 100080; Leonard O. Rosik and Frederick Sweet, Washington University, School of Medicine, St. Louis, USA*

A high performance liquid chromatographic method for the determination of the 3 β ,20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity has been established. The assay proce-

dure includes sample preparation, chromatographic separation and data acquisition based on the HPLC system. The advantages of HPLC method over the isotope method for determining the conversion of progesterone to 4-pregnen-20 α -ol-3-one are higher accuracy, rapidity and reproducibility, and avoidance of radioactive hazards.

用最优化方法选择磺胺类药物的薄层色谱溶剂系统*

班允东 孙毓庆 王云鹏**

(沈阳药学院仪器分析研究室, 沈阳, 110015)

薄层色谱是药学工作者最常用的分离分析手段, 而溶剂系统的选择则是薄层色谱中最重要的问题。但目前在此问题上, 人们往往只凭借经验而无比较实用的系统化方法可循。若实验者的经验较少, 则会在溶剂系统选择上浪费大量时间或选出的溶剂系统不够合理。因此, 笔者等曾提出一种比较实用的系统化方法⁽¹⁾, 即利用均匀设计试验法选择溶剂系统组分, 再利用单纯形优化法选择溶剂系统配比。本文通过对磺胺类药物的成功分离, 进一步验证了该方法的可行性。

方法部分

(一) 溶剂系统组分的选择(均匀设计法)

为了避免在一个溶剂系统中出现两种或两种以上同类溶剂, 首先必须将色谱分析常用溶剂分类⁽²⁾。由于我们所涉及的问题大多是未知混合物的分离, 所以应采用“黑箱法”选择溶剂系统。即从电子授受体溶剂(I)、质子授受体溶剂(II、IV)、诱导作用力溶剂(V)及极性调节溶剂(III、VI)中分别选出一种来构成四元系统。为减少试验工作量, 本文应用均匀设计试验法⁽³⁾安排实验。由于选十二水平, 故应使用 $U_{12}(12^4)$ 表(表1), 仅十二次试验即可选出所需的溶剂系统组分。为防止干扰, 四元系统应按等体积配制, 其它实验条件也应保持一致。

说明一点, 因为表中的实验安排是确定的, 所以, 只要展开槽够用, 表中的实验可一次完成, 因而, 速度是非常快的。

表1 组分选择表- $U_{12}(12^4)$ 表

实验号 \ 组分	A	B	C	D
1		异丙醇		冰乙酸
2	甲苯	甲醇	二氯乙烷	四氯化碳
3	苯	乙醚	二氯甲烷	石油醚 ^{a)}
4	苯	甲醇		甲酸
5	氢苯	乙醚	二氯乙烷	氯仿
6	四氢呋喃	乙醇		石油醚 ^{a)}
7	四氢呋喃	乙醚	二氯乙烷	
8	乙酸乙酯	乙醇	二氯甲烷	甲酸
9	乙酸乙酯	乙醚		氯仿
10	丙酮	正丁醇	二氯乙烷	四氯化碳
11	乙腈		二氯甲烷	环己烷
12	乙腈	正丁醇	冰乙酸 ^{b)}	水

a) 沸程 60—90℃; b) 特殊安排, 以增大水的溶解度。

(二) 溶剂系统配比的选择(单纯形优化法)

要进行单纯形优化, 构造一个适当的初始单纯形对于迅速收敛是至关重要的。本文采用 $U_5(5^4)$ 均匀设计表(表2)构造初始单纯形, 其原因在于最优点是存在于均匀设计试验中或是接近于均匀设计试验的最好点。

表2 初始单纯形表- $U_5(5^4)$ 表

实验号 \ 组分	A(ml)	B(ml)	C(ml)	D(ml)
1		1.67	3.33	5.00
2	1.67	5.00		3.33
3	3.33		5.00	1.67
4	5.00	3.33	1.67	
5	2.50	2.50	2.50	2.50

一旦初始单纯形试验完成, 即可进行寻优计算,

* 国家自然科学基金资助项目。 ** 本院 89 届本科毕业生。