



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106596771 B

(45)授权公告日 2019.03.29

(21)申请号 201611149150.4

(22)申请日 2016.12.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106596771 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 广州白云山汉方现代药业有限公司

地址 510000 广东省广州市从化温泉大道8号

(72)发明人 王小妹 温恺嘉 李益 罗明琍
梁北梅 曾荣华

(74)专利代理机构 广州市深研专利事务所
44229

代理人 姜若天

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

(56)对比文件

CN 104381586 A,2015.03.04,

CN 101574146 A,2009.11.11,

Jeffrey H. Baxter et al..Direct Determination of β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB) in Liquid Nutritional Products.《Food Anal. Methods》.2010,第4卷

曾静 等. β -羟基- β -甲基丁酸盐的临床作用及机制.《肿瘤代谢与营养电子杂志》.2015,第2卷(第2期),

审查员 黎作佳

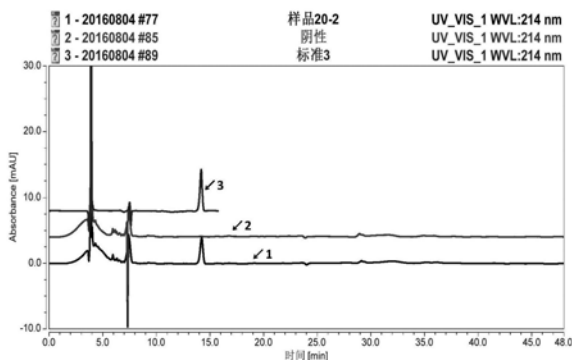
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法

(57)摘要

本发明公开了一种测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法,包括:(1)样品溶液的制备:取样品加入0.1mol/L的盐酸溶液,溶解后以乙腈稀释至刻度,振摇,滤过,精密吸取续滤液以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为样品溶液;(2)对照品溶液的制备:取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物对照品,加0.1mol/L的盐酸并稀释,制成每ml含 β -羟基- β -甲基丁酸为0.1mg、0.3mg、0.5mg、0.7mg、1.0mg的对照品。(3) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:采用十八烷基硅烷硅胶为填充剂的色谱柱,0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈为流动相,洗脱分离目标成分,用线性回归方程计算 β -羟基- β -甲基丁酸含量。本方法能准确有效地测定 β -羟基- β -甲基丁酸的含量,方法简便,经济实效,重现性好,准确度高。



1. 一种高效液相色谱外标法测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 样品溶液的制备: 取样品0.6g, 精密称定, 置25ml量瓶中, 加入0.1mol/L的盐酸溶液5ml, 用力振摇使固体溶解, 以乙腈稀释至刻度, 振摇1分钟, 滤过, 精密吸取续滤液2.0ml置5ml量瓶中, 以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 经0.45 μ m滤膜滤过, 取续滤液, 作为样品溶液;

(2) 对照品溶液的制备: 取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物对照品适量, 加0.1mol/L的盐酸溶液溶解并稀释, 制成每ml含 β -羟基- β -甲基丁酸为0.1mg、0.3mg、0.5mg、0.7mg、1.0mg的对照品溶液;

(3) β -羟基- β -甲基丁酸含量测定方法:

色谱条件: 色谱柱为十八烷基硅烷硅胶为填充剂, 以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈为流动相, 柱温为35 $^{\circ}$ C, 流速为0.4~0.6ml/min, 样品进样量: 5 μ l, 检测波长为214nm;

测定法: 精密量取对照品溶液1~5各5 μ l, 注入液相色谱仪, 按浓度对峰面积绘制标准曲线计算回归方程; 另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪, 记录色谱图, 用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量;

所述步骤(3)的液相色谱条件中色谱柱为PhenomexUranus C18, 5 μ m, 长度: 250 \times 4.6mm;

所述步骤(3)的液相色谱条件中流动相为0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈, 两者的体积比为93~97:7~3;

所述步骤(3)的液相色谱条件中流动相流速: 0.5ml/min;

所述步骤(3)的液相色谱条件中, 流动相用10%磷酸溶液调节pH值为2.8~3.2。

一种测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于特殊医学用途配方食品、保健食品及药品领域,具体地说,涉及一种高效液相色谱外标法测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法。

背景技术

[0002] β -羟基- β -甲基丁酸(HMB)是一种五碳有机酸,是必须氨基酸亮氨酸在体内通过其代谢产物 α -酮异己酸产生的一种衍生物。大量研究表明HMB具有预防肌肉减少,增加肌肉量的作用,在运动及健美方面得到广泛的应用。而许多疾病,如严重创伤、肿瘤、艾滋病、老年人肌肉萎缩等都会导致肌肉的流失,所以近年来HMB也被应用于临床上对肌肉消耗的治疗。目前,随着对HMB在以上几方面关注度的增多,陆续出现含HMB成分的各种食品或制剂产品,而检测这些产品中 β -羟基- β -甲基丁酸(HMB)含量的文献未见有报道, β -羟基- β -甲基丁酸钙为卫生部2011年批准使用的新资源食品,执行企业标准。为了有效控制含HMB成分的产品质量,建立了一种高效液相色谱外标法测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量,该检测方法简便快速、准确可靠,实用性强。

发明内容

[0003] 本发明的目的是使大豆肽蛋白质粉质量可控,填补国内特殊医学用途配方食品、保健食品及药品行业关于HMB质量检测的空白,提供一种利用高效液相色谱外标法检测大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法。该方法采用高效液相色谱技术,以可耐受95%以上水分的Uranus C₁₈为固定相及0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为2.8~3.2)为流动相,进行洗脱分离目标成分,紫外检测器检测,并利用乙腈使本产品中的蛋白质变性沉淀除去,消除对HMB的干扰。方法简便快捷,准确可靠,经济实效,为大豆肽蛋白质粉的质量标准制订及制备工艺的筛选提供技术支持和参考。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 一种高效液相色谱外标法测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸含量的方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 样品溶液的制备:取样品0.6g,精密称定,置25ml量瓶中,加入0.1mol/L的盐酸溶液5ml,用力振摇使固体溶解,以乙腈稀释至刻度,振摇1分钟,滤过,精密吸取续滤液2.0ml置5ml量瓶中,以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,经0.45 μ m滤膜滤过,取续滤液,作为样品溶液;

[0007] (2) 对照品溶液的制备:取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物对照品适量,加0.1mol/L的盐酸溶液溶解并稀释,制成每ml含 β -羟基- β -甲基丁酸为0.1mg、0.3mg、0.5mg、0.7mg、1.0mg的对照品溶液。

[0008] (3) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0009] 色谱条件:色谱柱为十八烷基硅烷硅胶为填充剂(耐高比例水),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(10%磷酸溶液调节pH值为2.8~3.2)为流动相,柱温为35 $^{\circ}$ C,流速为0.4

~0.6ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0010] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线计算回归方程;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量。

[0011] 在上述含量测定方法中,所述步骤(3)的色谱条件中色谱柱为PhenomexUranus C₁₈(5 μ m,长度:250 \times 4.6mm);

[0012] 在上述含量测定方法中,所述步骤(3)的色谱条件中流动相为0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈,两者的体积比为93~97:7~3;优选为95:5;

[0013] 在上述含量测定方法中,所述步骤(3)的色谱条件中流动相pH值优选为3.0;

[0014] 在上述含量测定方法中,所述步骤(3)的色谱条件中流速优选为0.5ml/min。

[0015] 与现有技术比较,本发明具有如下有益效果:采用高效液相色谱技术,以可耐受95%以上水分的Uranus C₁₈为固定相及0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为2.8~3.2)为流动相,进行洗脱分离目标成分,并利用乙腈有效除去样品中的蛋白质,消除对HMB的干扰,色谱条件专属性好,HMB主峰峰型良好,峰宽小,理论塔板数高,故该检测方法能准确有效地测定大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量,方法简便,经济实效,重现性好,准确度高,不但为该产品质量标准的制订及制备工艺的筛选提供数据支持和参考,还填补了国内特殊医学用途配方食品、保健食品及药品行业关于HMB质量检测及产品质量标准的空白。

附图说明

[0016] 图1为实施例10的HPLC色谱图;

[0017] 1、样品;2、阴性样品;3、 β -羟基- β -甲基丁酸对照品。

[0018] 图2为实施例10的样品测定HPLC色谱图。

[0019] 1、样品;2、 β -羟基- β -甲基丁酸对照品。

具体实施方案

[0020] 实施例1

[0021] (一)样品溶液的制备

[0022] 样品溶液的制备:取样品0.6g,精密称定,置25ml量瓶中,加入0.1mol/L的盐酸溶液5ml,用力振摇使固体溶解,以乙腈稀释至刻度,振摇1分钟,滤过,精密吸取续滤液2.0ml置5ml量瓶中,以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,经0.45 μ m滤膜滤过,取续滤液,作为样品溶液;

[0023] 阴性溶液的制备:取阴性样品0.6g,精密称定,置25ml量瓶中,加入0.1mol/L的盐酸溶液5ml,用力振摇使固体溶解,以乙腈稀释至刻度,振摇1分钟,滤过,精密吸取续滤液2.0ml置5ml量瓶中,以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,经0.45 μ m滤膜滤过,取续滤液,作为阴性样品溶液;

[0024] 对照品溶液的制备:取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物对照品适量,加0.1mol/L的盐酸溶液溶解并稀释,制成每ml含 β -羟基- β -甲基丁酸为0.1mg、0.3mg、0.5mg、0.7mg、1.0mg的对照品溶液。

[0025] (二) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0026] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm,5 μ m),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0)为流动相,柱温为35℃,流速为0.5ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0027] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线并计算回归方程;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量。

[0028] 1专属性与系统适用性试验精密量取阴性样品溶液、对照品溶液1、样品溶液各5 μ l,按“实施例1”的色谱条件进样测定,记录色谱图,如图1所示,从色谱图得出,主峰之前、之后无干扰峰,阴性样品溶液对试验无干扰;另精密量取“对照品溶液1”5 μ l,连续进样4次,记录色谱图及其峰面积,求RSD,试验结果见表1。

[0029] 表1系统适用性试验试验数据

[0030]

进样序号	1	2	3	4	RSD
峰面积(mAu)	0.312	0.312	0.310	0.316	0.8%

[0031] 2检测限与定量限取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物对照品配制成信噪比约为10:1的溶液,作为定量限对照液;制成信噪比为3:1的溶液,作为检测限对照液,按“实施例1”的色谱条件进样测定,记录色谱图。测得 β -羟基- β -甲基丁酸的定量限为0.37 μ g,检测限为0.09 μ g。

[0032] 3线性关系试验按“实施例1”的色谱条件,分别精密吸取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,得出标准曲线方程及其相关系数,结果见表2,从结果可知, β -羟基- β -甲基丁酸的标准曲线方程: $y=3.566x-0.006$,相关系数 $r^2=1.000$,表明该方法在0.8867mg/ml~0.8867mg/ml浓度范围内呈良好线性。

[0033] 表2线性关系试验结果

线性试验液 序号	1	2	3	4	5
浓度(mg/ml)	0.08867	0.2660	0.4433	0.6650	0.8867
峰面积 (mAu)	0.316	0.930	1.580	2.367	3.155
回归方程	$y = 3.566 x - 0.006$				

[0035] 4重复性试验取一批样品,称取6份,每份0.6g,按“实施例1”的规定进行测定,记录色谱图,按外标法计算大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸百分含量、平均百分含量、相对标准偏差,结果见表3,RSD为1.3%,说明重复性良好。

[0036] 表3重复性试验结果

[0037]

序号	1	2	3	4	5	6
含量	3.6%	3.6%	3.5%	3.6%	3.7%	3.6%
平均值	3.6%					
RSD	1.3%					

[0038] 5加样回收试验取已知含量(含量为3.6%)的大豆肽蛋白质粉样品0.24g、0.30g、0.36g,每个重量各称取3份样品,分别置25ml量瓶中,得回收率样品1~9,备用;精密称取β-羟基-β-甲基丁酸钙水合物对照品约60mg、75mg、90mg各一份,置25ml量瓶中,以0.1mol/L盐酸溶液溶解并稀释至刻度,得对照溶液A、B、C。精密加入5ml对照溶液A至回收率样品1~3、精密加入5ml对照溶液B至回收率样品4~6、精密加入5ml对照溶液C至回收率样品7~9,振摇使样品溶解,加入乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,精密吸取续滤液2ml置5ml量瓶中,以0.1mol/L盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,溶液经0.45μm薄膜滤过,取续滤液,得回收率试验溶液1~9。按“实施例1”的色谱条件,精密吸取5μl注入液相色谱仪,记录色谱图,测定大豆肽蛋白质粉中β-羟基-β-甲基丁酸含量的平均回收率为:99.6%,RSD为3.4%,说明含量测定方法的准确度高(当成分含量约为5%时,回收率测定结果的RSD可接受标准为应小于5%)。结果见表4。

[0039] 表4加样回收率试验结果(n=9)

[0040]

序号	样品称取量 g	已知供试品含被测称分量 mg	加入对照品量 mg	实测量 mg	回收率	平均值	RSD
1	0.23521	8.47	9.22	17.31	95.90%	99.6%	3.4%
2	0.23087	8.31	9.22	17.36	98.16%		
3	0.24086	8.67	9.22	17.92	100.3%		
4	0.32344	11.64	11.60	23.53	102.4%		
5	0.30392	10.94	11.60	22.83	102.5%		
6	0.31583	11.37	11.60	23.40	103.7%		
7	0.36241	13.05	14.26	26.75	96.08%		

[0041]

8	0.38805	13.97	14.26	28.58	102.4%		
9	0.34078	12.27	14.26	25.84	95.19%		

[0042] 6稳定性试验取样品溶液,按“实施例1”的色谱条件,在0小时,2小时,4小时,8小时,12小时,24小时分别精密吸取5μl注入液相色谱仪,记录色谱图与峰面积,结果见表5,说明样品溶液在24h内相对稳定。

[0043] 表5稳定性试验结果

[0044]

时间	0h	2h	4h	8h	12h	24h	RSD
峰面积 (mAu)	1.268	1.266	1.270	1.258	1.264	1.279	0.6%

[0045] 7中间精密度试验

[0046] 取一批样品,称取6份,每份0.6g,按“实施例1”的规定进行测定,记录色谱图,按外标法计算大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸百分含量、平均百分含量、相对标准偏差,结果见表6,RSD为1.3%,说明重复性良好。

[0047] 表6中间精密度试验结果

[0048]

序号	1	2	3	4	5	6
含量	3.6%	3.6%	3.7%	3.5%	3.6%	3.7%
平均值	3.6%					
RSD	1.5%					

[0049] 8样品的测定

[0050] 取样品10批,各约0.6g,按“实施例1”项下规定的方法测定,记录色谱图,如图2所示,并按标准曲线外标法计算大豆肽蛋白质粉中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量,结果见表7。

[0051] 表7 β -羟基- β -甲基丁酸的含量测定结果(10批样品)

[0052]

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
含量	3.6%	3.7%	3.6%	3.9%	3.6%	3.5%	3.6%	3.7%	3.8%	3.7%

[0053] 实施例2:样品溶解过程的优化

[0054] 取样品2.3g,置100ml量瓶中,以0.1mol/L盐酸溶液直接溶解样品,得到的样品溶液,呈胶体状,无法通过0.45 μ m滤膜滤过并进样进行液相色谱测定,因此须除去样品溶液中的蛋白质,消除干扰。

[0055] 取样品和阴性样品各0.6g,置25ml量瓶中,加入0.1mol/L的盐酸溶液5ml,用力振摇使固体溶解,以乙腈稀释至刻度,振摇1分钟,滤过,精密吸取续滤液2.0ml置5ml量瓶中,以0.1mol/L的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,经0.45 μ m滤膜滤过,取续滤液,作为样品溶液。有机溶剂能降低溶液的电解常数,增加蛋白质分子上不同电荷的引力,使蛋白质溶解度降低而沉淀;故利用乙腈把蛋白质沉降达到除去的目的。

[0056] 实施例3:流动相的选择

[0057] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及阴性样品溶液;

[0058] (2)对照溶液的制备:称取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物标准品约60mg,置50ml量瓶中,以0.1mol/L盐酸溶液溶解并稀释至刻度,即得对照品溶液。

[0059] (3)色谱条件:

[0060] 色谱柱:Phenomex Uranus C₁₈色谱柱,250mm \times 4.6mm,5 μ m。

[0061] 流速:0.5ml/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ l;

[0062] 流动相1:0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0);

[0063] 流动相2:0.01mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为2.6);

[0064] 分别以流动相1与流动相2进行试验,精密量取样品溶液、阴性样品溶液、对照品溶液各5 μ l,注入液相色谱仪,从二者图谱结果得出,流动相1测得的图谱主峰峰型好,基线噪音小,干扰峰少,流动相2测得的图谱基线噪音大,干扰峰多,HMB与未知物质分离效果差,专属性低,因此选择0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)作为流动相。

[0065] 实施例4:庚烷磺酸钠溶液浓度的选择

[0066] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及阴性样品溶液;

[0067] (2)对照溶液的制备:称取 β -羟基- β -甲基丁酸钙水合物标准品约60mg,置50ml量瓶中,以0.1mol/L盐酸溶液溶解并稀释至刻度,即得对照品溶液。

[0068] (3)色谱条件:

[0069] 色谱柱:Phenomex Uranus C₁₈色谱柱,250mm \times 4.6mm,5 μ m。

[0070] 流速:0.5ml/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ l;

[0071] 流动相1:0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0);

[0072] 流动相3:0.02mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0);

[0073] 分别以流动相1与流动相3进行试验,精密量取样品溶液、阴性样品溶液、对照品溶液各5 μ l,注入液相色谱仪,二者图谱结果无明显区别,从色谱柱寿命的考虑,低浓度的缓冲盐溶液对色谱柱的不可逆损伤较小,因此选择庚烷磺酸钠溶液的浓度为0.01mol/L。

[0074] 实施例5:

[0075] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0076] (2) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0077] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为2.8)为流动相,柱温为35 $^{\circ}$ C,流速为0.5ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0078] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量;结果见表8。

[0079] 表8 pH值为2.8时测定结果

[0080]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.5%	3.5%	3.5%	3.5%	3.5%	0.5%

[0081] 实施例6:

[0082] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0083] (2) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0084] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m),以

0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.2)为流动相,柱温为35℃,流速为0.5ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0085] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量;结果见表9。

[0086] 表9 pH值为3.2时测定结果

[0087]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.6%	3.6%	3.7%	3.6%	3.6%	1.6%

[0088] 实施例7:

[0089] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0090] (2) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0091] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0)为流动相,柱温为35℃,流速为0.4ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0092] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量;结果见表10。

[0093] 表10流速为0.4ml/min时测定结果

[0094]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.6%	3.6%	3.5%	3.5%	3.6%	1.5%

[0095] 实施例8:

[0096] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0097] (2) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0098] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(95:5)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0)为流动相,柱温为35℃,流速为0.6ml/min,样品进样量:5 μ l,检测波长为214nm。

[0099] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5 μ l,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中 β -羟基- β -甲基丁酸的含量;结果见表11。

[0100] 表11流速为0.6ml/min时测定结果

[0101]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.7%	3.7%	3.6%	3.6%	3.6%	1.2%

[0102] 实施例9:

[0103] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0104] (2) β -羟基- β -甲基丁酸含量的测定:

[0105] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m),以

0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(93:7)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0)为流动相,柱温为35℃,流速为0.5ml/min,样品进样量:5μl,检测波长为214nm。

[0106] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5μl,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5μl注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中β-羟基-β-甲基丁酸的含量;结果见表12。

[0107] 表12 0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈=93:7时测定结果

[0108]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.4%	3.4%	3.5%	3.5%	3.4%	1.7%

[0109] 实施例10:

[0110] (1)以“实施例1”所述配制样品溶液及对照品溶液1~5;

[0111] (2)β-羟基-β-甲基丁酸含量的测定:

[0112] 色谱条件:色谱柱为Phenomex Uranus C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm,5μm),以0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈(97:3)(10%磷酸溶液调节pH值为3.0)为流动相,柱温为35℃,流速为0.5ml/min,样品进样量:5μl,检测波长为214nm。

[0113] 测定法:精密量取对照品溶液1~5各5μl,注入液相色谱仪,按浓度对峰面积绘制标准曲线;另精密量取样品溶液5μl注入液相色谱仪,记录色谱图,用回归方程计算样品中β-羟基-β-甲基丁酸的含量;结果见表13。

[0114] 表13 0.01mol/L庚烷磺酸钠溶液-乙腈=97:3时测定结果

[0115]

试验序号	1	2	3	4	平均	RSD
含量	3.6%	3.6%	3.7%	3.7%	3.6%	1.6%

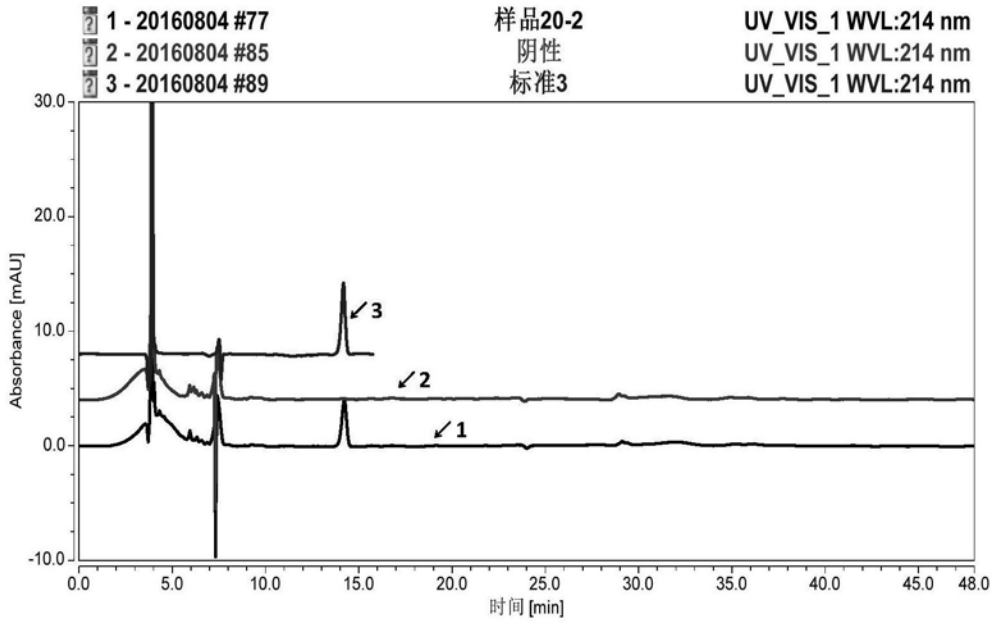


图1

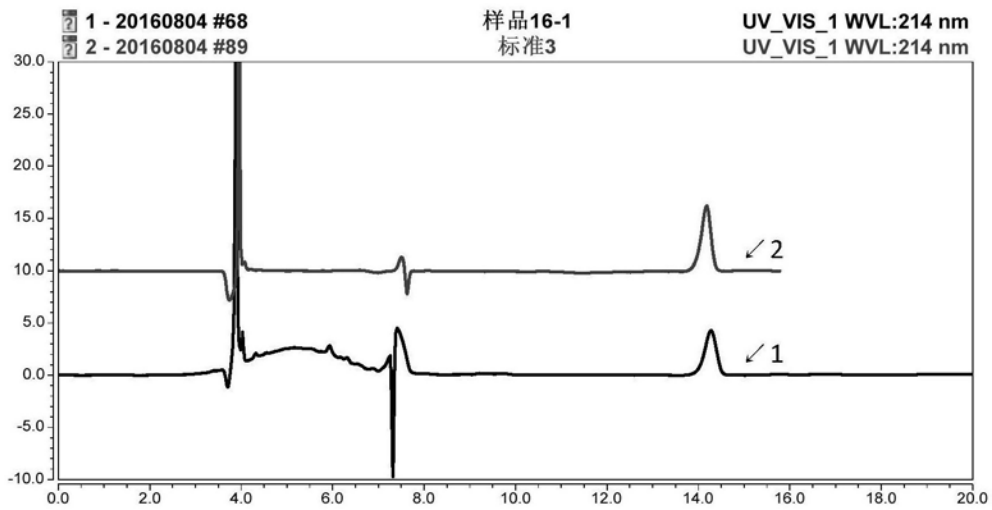


图2