

法和间羟基联苯法求得校正因子 ($f = m_{\text{实际量}} / m_{\text{测得量}}$), 分别为 $f_{\text{咔}} = 1.25$ ($n = 5$), $f_{\text{间}} = 1.23$ ($n = 5$)。通过校正因子计算出银耳多糖中糖醛酸质量分数分别为 12.65% ($n = 5$), 12.76% ($n = 5$)。

表 2 银耳多糖中糖醛酸的测定结果 ($n = 5$)

Table 2 Quantitative determination of uronic acids from TP ($n = 5$)

方 法	糖醛酸/%
不含氨基磺酸	
咔唑法	30.12
间羟基联苯法	22.57
含氨基磺酸	
咔唑法	23.58
间羟基联苯法	16.30

2.6 银耳多糖测定结果: 取糖醛酸适量, 加水配成 0.05 mg/mL 溶液, 分别取 0.1、0.2、0.3、0.4 mL 加水至 0.4 mL, 加 75 mmol/L 硼酸钠-硫酸溶液 2.4 mL, 水浴加热 15 min, 加间羟基联苯显色, 得回归方程为: $A = 0.034 + 0.0152X$, $r = 0.9994$ 。按上述方法操作, 加咔唑显色, 得回归方程为: $A = -0.0405 + 0.0252X$, $r = 0.9970$ 。另取银耳多糖分别配成 0.20、0.25、0.50、0.75 mg/mL 溶液, 分别取 0.2 mL 加水至 0.4 mL, 按上述两种方法测定糖醛酸质量分数。间羟基联苯法测得结果分别为: 9.07%、12.21%、12.69%、14.02% ($n = 5$)。咔唑法测得结果分别为: 16.47%、18.33%、18.95%、19.78% ($n = 5$)。

3 讨论

从表 1 结果得出测定糖醛酸的咔唑法和间羟基联苯法均可使中性糖在 525 nm 处有不同程度的吸收, 且发现中性糖对咔唑法的干扰更明显。同时也显示出氨基磺酸在两种方法中对中性糖的显色具有较强的抑制作用。说明对酸性杂多糖中糖醛酸含量测定时, 中性糖的存在对测定结果的干扰是随酸性糖

含量的降低而误差增大, 表 2 结果已证明了这一推测。氨基磺酸的加入对每种中性糖均有不同程度的抑制作用。表 1 可见, 咔唑法中氨基磺酸对中性糖的平均抑制率为 77%, 间羟基联苯法的抑制率为 66%, 均达不到完全抑制。为了考察氨基磺酸的加入量对中性糖、酸性糖的抑制率的关系, 实验对不同剂量氨基磺酸和各单糖及样品在两种测定方法中的吸光度值 (A) 作曲线 (图 1)。结果显示, 氨基磺酸加入量对中性糖的抑制作用在一定范围内成正比, 超出范围, 氨基磺酸抑制作用呈恒定趋势, 且两种方法对糖醛酸也有 10% 的抑制作用, 所以对糖醛酸含量低的酸性杂多糖加氨基磺酸法测定糖醛酸是不合适的。如果把校正因子求得的银耳多糖中糖醛酸的结果作为实际含量, 那么 2.6 项结果显示, 采用间羟基联苯法对糖醛酸含量低的酸性杂多糖配制质量浓度在 0.25~0.50 mg/mL 时, 所测得的结果与实际值非常接近。

综上所述, 咔唑法和间羟基联苯法均为糖醛酸测定的经典方法, 但天然多糖中糖醛酸含量往往偏低, 由于中性糖的干扰而产生较大的误差。利用校正因子求得糖醛酸含量, 虽然可以避免这些误差, 但是实际过程繁琐, 不适合快速测定。本实验通过把样品配制成低质量浓度, 采用间羟基联苯法, 可使样品中中性糖的干扰降至最低, 所得结果更接近于实际值。

References

- [1] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-334.
- [2] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54: 484-489.
- [3] Filisetti-Cozzi T M C C, Capita N C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 157-162.
- [4] Jones T M, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell [J]. *Plant Physiol*, 1972, 49: 926-936.

RP-HPLC 法测定类风关巴布剂中雷公藤甲素的含量

陈凌云¹, 叶建晨¹, 张卫兵^{2*}

(1. 温州市药品检验所, 浙江 温州 325028; 2. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325000)

类风关巴布剂是温州医学院附属第一医院“穴位贴敷治疗类风湿关节炎研究”课题组研制的治疗

类风湿关节炎的外用制剂, 由涂膜剂改良而成。该制剂主要是雷公藤、防风、丹参等中药饮片的醇提取

* 收稿日期: 2004-02-06

基金项目: 浙江省中医药科研课题 (2000C83)

作者简介: 陈凌云 (1969—), 女, 浙江温州人, 主管中药师, 1989 年毕业于浙江中医学院, 主要从事中药材及中成药质量分析。

Tel: (0577) 88513920 E-mail: cly-nanyang@163.com

物。其中雷公藤甲素既是有效成分,又具有毒副作用^[1],因此控制雷公藤甲素的含量十分必要。本实验建立 RP-HPLC 法测定该制剂中雷公藤甲素的含量,以控制制剂质量。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱系统,515 泵,2487 紫外检测器,717 自动进样系统,柱温箱。雷公藤甲素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:1566-200201),类风关巴布剂(温州医学院附属第一医院制剂室提供,黄棕色至棕色的片状巴布膏,2.5 cm × 2.5 cm)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1]: Alltech 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 225 nm; 流动相: 甲醇-水(48:52); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取雷公藤甲素对照品适量,加甲醇制成 9.3 μg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品一张,除去盖衬,剪成碎块,混匀后称取 0.5 g,置圆底烧瓶中,精密加入 60% 甲醇溶液 100 mL,称定质量,浸渍 4 h,加热回流 2 h,补足减少的质量,倾出上清液,高速离心,微孔薄膜滤过,即得。

2.4 空白试验: 按处方制备不含雷公藤提取物的样品,同“供试品溶液的制备”方法制成空白溶液,注入液相色谱仪。结果色谱图中与雷公藤甲素对应的位置无色谱峰,说明缺味空白对照无干扰,见图 1。

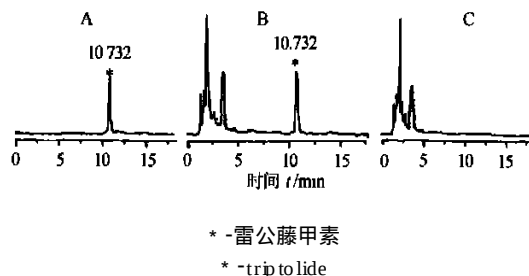


图 1 雷公藤甲素对照品(A)、类风关巴布剂(B)和空白(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of triptolide (A), Leifengguan Sticking Plaster (B), and negative sample (C)

2.5 线性关系及线性范围: 分别精密吸取雷公藤甲素对照品溶液 2.5、5、10、15、20 μL,按上述色谱条件进样测定,分别重复进样 3 次,测定峰面积。以雷公藤甲素质量浓度为横坐标,以峰面积平均值为纵坐标,绘制标准曲线,进行回归,得线性回归方程为: $Y = 26\,737\,978.569\,4 X$, $r = 0.999\,7$ 。表明雷公藤

甲素在 1.86~18.6 μg 与峰面积有良好的线性关系。

2.6 精密度试验: 精密吸取同一供试品溶液,重复进样 5 次,测定雷公藤甲素的峰面积,计算得其 RSD 为 0.74% ($n = 5$)。

2.7 稳定性试验: 取同一份供试品溶液分别在 1、2、4、8、24、48 h 进样,测定雷公藤甲素的峰面积,计算得其 RSD 为 0.64% ($n = 6$)。表明该供试品溶液在 48 h 内是稳定的。

2.8 重现性试验: 取同一批次样品 6 份,分别制备供试品溶液,测定雷公藤甲素的质量分数,计算得其 RSD 为 0.60% ($n = 6$)。

2.9 加样回收率试验: 取批号为 030101 的样品 5 份,各约 0.25 g,分别精密加入雷公藤甲素对照品 0.420 0 mg,按供试品溶液制备法处理,测定,计算回收率,结果平均回收率为 97.65%,RSD 为 0.42% ($n = 5$)。

2.10 样品测定: 分别取 5 批的类风关巴布剂,制备供试品溶液,测定,结果见表 1。

表 1 类风关巴布剂中雷公藤甲素的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Triptolide in Leifengguan Sticking Plaster ($n = 3$)

批 号	雷公藤甲素/(mg · g ⁻¹)
030101	1.721
030102	1.718
030105	1.720
031201	1.709
031205	1.712

3 讨论

3.1 在提取方法的选择时,比较加热回流与超声处理提取,结果显示加热回流的提取效率高,可能是加热回流使膏体膨胀,有效成分易于从膏体中提取完全。

3.2 雷公藤是本处方中的君药,但具有一定的毒副作用,明确其成分含量非常必要。雷公藤甲素是三环二萜类化合物,是一种脂溶性成分,能溶于甲醇、醋酸乙酯、氯仿等。用甲醇回流提取巴布剂,有效成分溶解性良好,但巴布剂膏体收缩,雷公藤甲素提取不完全;用 30% 甲醇提取,雷公藤甲素溶解性稍逊,膏体膨胀破碎,提取液浑浊,含有较多水溶性高分子杂质,含量测定结果偏低;用 60% 甲醇提取,雷公藤甲素溶解性良好,膏体膨胀,雷公藤甲素易提取完全,含量测定结果最高。其他条件不变的情况下把加热回流时间增至 3 h 和 4 h,测得结果无明显变化,说明此方法已提取完全。

Reference:

- [1] Chi Y M, Wen H M, Xu J G. Determination of content of triptolide in *Tripterygium wilfordii* herbal pieces with HPLC method [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2001, 17(1): 32-33.