

0211167),重复进样 6次,结果蒙花苷峰面积的 RSD为 0.3%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液(批号 0211167),于配制后的 0 1 2 3 4 5 6 12 h分别进样 20 μ L测定,结果表明供试品溶液在 12 h内稳定,蒙花苷峰面积的 RSD为 0.9%。

2.8 重现性试验:取同一批样品(批号 0211167)5份,制备供试品溶液,测定每份样品中蒙花苷的量,结果蒙花苷的平均质量分数为 5.768 mg/g, RSD为 0.4%。

2.9 加样回收率试验:取批号 0211167样品 6份,每份 0.1 g,精密称定,分别精密添加 0.1168 mg/mL蒙花苷对照品溶液 5 mL,制备供试品溶液,分别进样 20 μ L,结果平均回收率为 100.6%, RSD为 1.0%。

2.10 样品测定:取批号不同的样品 3批,制备供试品溶液。精密吸取蒙花苷对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L,分别注入色谱仪,测定,计算蒙花苷的质量分数,测定结果见表 1

3 讨论

以往的研究中,一般把绿原酸作为野菊花的指标成分,但是由于绿原酸不稳定,见光易分解,故参照《中国药典》2005年版一部野菊花项下内容,将蒙

表 1 复方柳菊片中蒙花苷的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of buddleoglucoside in Compound Liuju Tablets ($n=3$)

批号	蒙花苷/(mg \cdot g $^{-1}$)	RSD/%
0211167	5.768	0.4
0309118	5.902	0.2
0312150	5.857	0.7

花苷作为野菊花指标成分。

以甲醇为溶剂,分别考察了超声提取和加热回流提取,结果超声和加热回流提取效果相当,考虑到节约成本,故选择超声提取

提取时间的考察:精密称取同一批样品 3份,各 0.2 g,精密称定,分别超声(功率为 250 W,频率为 25 kHz)处理 20 30 40 min,结果表明超声处理 30 min后,蒙花苷的量基本不再增加,故确定超声时间为 30 min

提取溶剂的选择:精密称取同一批样品 3份,分别用甲醇 50% 甲醇 乙醇 3种溶剂进行考察,采用超声提取方法进行提取,结果采用乙醇为溶剂所得的蒙花苷峰形发生变形,采用甲醇和 50% 甲醇为溶剂的提取率相当,但采用 50% 甲醇为提取溶剂的供试品颜色很深,且杂质多,不利于色谱柱,故确定甲醇为最佳提取溶剂

Kedde比色法测定复方雷公藤片中总内酯^①

陈银芳^{1,2},徐群志³,魏惠珍¹,张红红¹,金浩鑫¹,饶毅^{1,2}

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,江西 南昌 330006 2. 江西中医学院,江西 南昌 330006

3. 南昌市食品药品监督管理局,江西 南昌 330038)

复方雷公藤片是由雷公藤提取物和高甲醚加入适宜的辅料制成的制剂,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病。其主要药效成分为环氧二萜内酯类、三萜内酯类等总内酯成分^[1]。该内酯成分大多含有 α,β -不饱和内酯环结构,而 Kedde反应常用于含有这一结构物质的定性鉴别。其反应原理是在碱性溶液中,内酯环上的不饱和双键转位能形成活性次甲基,形成的次甲基非常活泼,可以和 3,5-二硝基苯甲酸等试剂进行缩和反应,氧化生成具有醌式结构的物质而呈紫红色,并在可见光区有

特征吸收峰^[2]。因此本实验应用 Kedde显色反应,对复方雷公藤片中含有 α,β -不饱和内酯环的雷公藤总内酯进行定量分析,建立了复方雷公藤片中总内酯的测定方法

1 仪器与试剂

Shimadzu UV-2550分光光度计,UV-Probe工作站;岛津 AB-104N 十万分之一分析天平;KQ-250DB型数控超声清洗器

3,5-二硝基苯甲酸为化学纯,其他试剂均为分析纯,雷公藤甲素对照品(批号 111567-200201)由

① 收稿日期:2007-09-23

基金项目:江西省科技攻关计划项目(赣科发计字[2004]65号)

作者简介:陈银芳(1984-),女,江西万载人,研究生,主要从事中药质量控制研究工作。Tel (0791)7119625

E-mail: chenyingfang_1984@126.com

* 通讯作者 饶毅 Tel (0791)7119609 E-mail: raoyi99@126.com

中国药品生物制品检定所提供,复方雷公藤片(规格 0.1 g/片)由江西本草天工科技有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取雷公藤甲素对照品适量,加 60%乙醇制成 0.05 mg/mL 的溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备:取本品,研成细粉,精密称取 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 60%乙醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 60%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 阴性对照溶液的制备:取处方中除缺雷公藤提取物的原料(即蒿甲醚与辅料),照供试品溶液的制备项下方法操作,即得。

2.4 Kedde 试液的配制:称取 3,5-二硝基苯甲酸和氢氧化钾适量,分别置于锥形瓶中,加入 60%乙醇溶解,制成 0.02 g/mL 溶液,临用前按体积比 1:1 混合,即得。

2.5 检测波长的选定:取雷公藤甲素对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液适量,分别加入一定量的 Kedde 试液显色后,于 400~600 nm 扫描,结果雷公藤甲素对照品溶液和供试品溶液的最大吸收波长均为 540 nm,且阴性无干扰。

2.6 线性关系考察:精密吸取雷公藤甲素对照品溶液 1 2 3 4 5 6 mL 分别置 10 mL 量瓶中,加新制的 Kedde 试液 4 mL,立即加 60%乙醇稀释至刻度,振摇,待反应 4 min 后,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法《中国药典》2005 年版一部附录 V A) 在 540 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标,质量为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 2.665X - 0.012$, $r = 0.9999$,表明雷公藤甲素在 0.05~0.3 mg 与吸光度的线性关系良好。

2.7 精密度试验:精密吸取雷公藤甲素对照品溶液和供试品溶液适量,分别显色反应 6 次,测定吸光度,计算,结果对照品溶液吸光度 RSD 为 0.35%,供试品溶液吸光度 RSD 为 1.13%。

2.8 重现性试验:取批号 070101 复方雷公藤片样品 6 份,制备供试品溶液,测定吸光度,计算质量分数,结果总内酯的质量分数为 1.22 mg/g, RSD 为 2.54%。

2.9 稳定性试验:取雷公藤甲素对照品溶液和供试品溶液,分别于 0 2 4 5 6 min 后测定吸光度,计算。结果对照品溶液吸光度 RSD 为 1.5%,供试品溶液吸光度 RSD 为 1.88%。表明溶液在显色 6 min

内较稳定,溶液显色后应在 6 min 内完成测定。

2.10 回收率试验:取批号 070101 复方雷公藤片样品约 0.25 g(含雷公藤总内酯约 0.30 mg),6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入雷公藤甲素对照品 0.262 6 0.315 1 0.367 6 mg,制备供试品溶液,测定吸光度,计算回收率,结果平均回收率为 102.70%, RSD 为 0.88%。

2.11 样品测定:取 3 批复方雷公藤片样品,制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 4 mL,置 10 mL 量瓶中,加新制的 Kedde 试液 4 mL,立即加 60%乙醇稀释至刻度,振摇,待反应 4 min 后,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法《中国药典》2005 年版一部附录 V A) 在 540 nm 波长处测定吸光度。另取雷公藤甲素对照品溶液适量,同法测定,按外标法以吸光度计算总内酯,结果见表 1。

表 1 复方雷公藤片中总内酯的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of total lactones in Compound Leigongteng Tablets ($n = 3$)

批号	总内酯/(mg·片 ⁻¹)
070101	0.12
070201	0.13
070301	0.12

3 讨论

显色剂的配制和加入方法对显色反应及吸光度值的测定有很大影响。本实验过程中曾考察用甲醇、乙醇^[3,4]、水分别配制 3,5-二硝基苯甲酸和氢氧化钾溶液。结果 3,5-二硝基苯甲酸在水中完全不溶,而氢氧化钾则在甲醇、乙醇中溶解困难,如溶剂选择用水或甲醇、乙醇,则显色反应时会产生大量絮凝沉淀,影响实验结果的准确性。因此本实验选择 60%乙醇为溶剂,消除了这一影响,保证了测定结果的可靠性。同时实验还考察了碱液浓度,研究表明,浓度过高时,反应过快,显色极不稳定,本实验选择 0.020 g/mL 碱液能够满足反应要求,且显色较缓慢稳定。

此外, Kedde 显色反应勿需水浴,在室温下即可进行,因此,室内温度对反应快慢有很大影响,当室温过高时,反应太快,溶液不稳定。为保证较好的重现性,本实验宜在可控的室温下进行。

Kedde 显色反应已广泛地应用于各类含不饱和内酯环化合物的鉴别分析,但用该比色来进行定量分析的报道很少。本实验根据 Kedde 试剂与不饱和内酯环基团的专属性反应原理,建立了雷公藤制剂中总内酯的测定方法,为其他具不饱和内酯环结构的内酯类成分的测定研究提供参考。

参考文献:

- [1] 张伟江,潘德济,张罗修,等.雷公藤三萜成分研究[J].药学学报,1986,21(8): 592-598.
- [2] 姚新生.天然药物化学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2004.

- [3] 杨晓东,刘四妹.雷公藤多甙片的紫外分光光度测定[J].中国医药工业杂志,1995,26(3): 128-129.
- [4] 张一萍,杨小平.复方雷公藤药膜检测方法研究[J].中药材,2005,28(9): 825-827.

人参果中化合物 K 的 HPLC 法测定^①王继彦^{1,2},李向高²,杨秀伟^{3*}

(1. 长春中医药大学药学院,吉林 长春 130117; 2. 吉林农业大学中药材学院,吉林 长春 130118;
3. 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100083)

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属植物,不但其根药用,而且其叶和果实亦供药用,并有广泛的生物学活性。笔者从人参浆果中分离得到苯甲酸 异人参皂苷 Rh₃ 人参皂苷 Rh₃ 人参皂苷 Rh₄ 人参皂苷 Rg₁ 人参皂苷 Re 人参皂苷 Rd 人参皂苷 Rg 人参皂苷 Rb₁ 人参皂苷 Rb₂ β-谷甾醇和化合物 K 12个化合物^[1,2]。药理学研究表明:不但化合物 K 原形有广泛的药理学活性^[3-7],而且其在肝脏转化形成的脂肪酸酯(EM1)在抗癌转移方面亦表现出了特殊性,如在离体试验中,化合物 K 及其代谢产物 EM1 皆能抑制 B16-F10 黑色素瘤细胞的生长,但 EM1 的毒性比化合物 K 低。在整体试验中,将 EM1 和化合物 K 分别直接注入(静脉注射可能会导致血浆酯酶水解 EM1)肝移植性 B16-F10 黑色素瘤细胞癌灶内,发现 EM1 对肿瘤细胞生长的抑制作用比化合物 K 更强;在抗癌细胞转移方面,两者的作用几乎相同。因此,化合物 K 在人参果药理作用上可能扮演了重要作用。因此本文报道人参果中化合物 K 的 HPLC 法测定,为其质量控制提供方法。

1 仪器、试剂和样品

Agilent 1100型高效液相色谱仪(四元梯度泵,再线脱气机,柱温箱,VWD检测器),Agilent Chem Station 色谱数据工作站

实验材料于 2001年 8月上旬采自吉林省长白县,经吉林农业大学中药材学院李向高教授鉴定为人参 *P. ginseng* C. A. Meyer 的新鲜果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(150

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: H₂O (A)-CH₃CN (B),二元梯度洗脱: 0→16 min, 56% B; 16→20 min, 56%→100% B; 20→38 min, 100% B; 38→45 min, 100%→56% B; 45→60 min, 56% B; 检测波长: 203 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃。供试品和对照品溶液进样量分别为 20 μL。所有组分皆在 50 min 内分析完成,分析时间定为 60 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取在 60℃ 减压干燥 10 h 的化合物 K 10 mg 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度。精密吸取 0.4 mL 溶液置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取两份粉碎后的人参果肉冻干粉(40目),每份 2 g,精密称定,1份干燥测定含水量;1份置索氏提取器中加氯仿-甲醇(15:1) 100 mL,于水浴上加热回流提取至无色。将提取液滤过后置水浴上蒸发皿中挥干,加甲醇溶解,滤过并定容于 25 mL 量瓶中,摇匀,微孔滤膜滤过,即得供试品溶液,备用。

2.3 线性关系考察: 精密称取在 60℃ 减压干燥 10 h 的化合物 K 10 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,使对照品溶液的质量浓度约为 1 mg/mL。分别吸取此溶液 50 100 200 400 800 1 600 3 200 μL 分别置于 10 mL 量瓶中。加甲醇稀释至刻度,即得不同质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取 20 μL,进样分析。以色谱峰面积(Y)为纵坐标,进样质量(X)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 405.3819X + 32.4856$ ($r = 0.99924$),表明化合物 K 在 0.103~6.592 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

① 收稿日期: 2007-04-10

作者简介: 王继彦(1953-),男,长春人,教授,博士,主要从事中药化学和中药新药开发研究。

Tel: (0431) 86172211 E-mail: jianwang126@126.com

* 通讯作者 杨秀伟 Tel: (010) 82805106 E-mail: xwuang@bjmu.edu.cn