

20 μL进样,按上述色谱条件进行测定,外标法计算含量。结果如表2。

表2 青藤碱微乳含量测定结果(n=3)

批号	相当于标示量的含量/%
20060412	98.2
20060413	99.5
20060414	99.3

### 3 讨论

用HPLC法含量测定青藤碱微乳含量时曾以甲醇-0.01 mol·mL<sup>-1</sup>磷酸二氢钠(50:50),甲醇-磷酸盐缓冲液(三乙胺调pH值至9)<sup>[2]</sup>,甲醇-水-乙二胺(500:500:0.05)等流动相进

行实验,青藤碱的峰形较差,有前沿或拖尾,后两种流动相pH值偏高,普通柱无法耐受。经反复实验,确定本研究选用的色谱条件为最佳,青藤碱与其他组分色谱峰能得到较好分离,且峰形对称。本研究建立的含量测定方法精密度高,线性关系良好,回收率满意。

#### [参考文献]

- [1] 周莉玲. 制剂药动学试验中药物累积法与血药浓度法的相关性研究[J]. 中成药,1996,18(9):176.
- [2] 张先洲,罗顺德,罗毅,等. 盐酸青藤碱凝胶剂的稳定性研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(3):204-205.

## 叶下珠中鞣质的含量测定

刘莹,熊富良,张雪琼,肖刚

(武汉理工大学化学工程学院,武汉 430070)

[摘要] 目的 建立稳定的测定叶下珠鞣质的方法。方法 对比采用磷钼钨酸法和普鲁士蓝法测定叶下珠鞣质含量,确定较优方法。结果 优选磷钼钨酸法,条件为:0.6 g干酪素吸附,1 mL磷钼钨酸试液作显色剂,20%碳酸钠溶液显色30 min后测定。结论 该法操作灵敏,结果稳定、可靠。

[关键词] 叶下珠;鞣质;含量测定

[中图分类号] R282.71;R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)10-1222-02

叶下珠为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草,具平肝清热、利水解毒之效,近年来用于病毒性乙型肝炎的预防和治疗。叶下珠含有木脂素、萜类、黄酮、鞣质等多种化合物,其鞣质类如柯里拉京、没食子酸等具抗菌、抗病毒、解毒作用<sup>[1]</sup>。笔者选取磷钼钨酸法和普鲁士蓝法测定叶下珠鞣质含量,比较并确定较优方法。

### 1 材料与仪器

1.1 药材与试剂 叶下珠(2006年8月产自湖北,购于武汉市红十字药业公司);没食子酸对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号:110831-200302);磷钼钨酸(按《中华人民共和国药典》2005年版一部附录XVB配制);干酪素(化学纯);水为重蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 UV1100分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);超声清洗器(天津赛恩斯科学仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 2 方法与结果

2.1 样品处理 取叶下珠药材100 g,用10倍量70%乙醇回流3次,每次1 h,提取液滤过,合并滤液,减压浓缩,真空干燥至干膏,出膏率为20.04%。精密称取0.1 g干膏,用甲醇超声提取30 min,定容至25 mL容量瓶中,精密量取1 mL溶液置25 mL容量瓶中,甲醇定容,得供试品溶液,待测。

### 2.2 标准曲线的绘制

2.2.1 磷钼钨酸法 2005年版《中华人民共和国药典》附录XB鞣质含量测定法,精密量取没食子酸对照品溶液(0.05 mg·mL<sup>-1</sup>)0.5,1.0,2.0,3.0,4.0和5.0 mL,分别置25 mL棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液1 mL,再分别加水11.5,11.0,10.0,9.0,8.0和7.0 mL,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min,以相应的试剂为空白,在760 nm的波长处测定吸光度(A)值,以A值为纵坐标,浓度(C,μg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为:A=0.119 6C+0.039 8,r=0.999 9,没食子酸在1.01~10.08 μg·mL<sup>-1</sup>浓度范围内与吸光度有较好的线性关系。

2.2.2 普鲁士蓝法 精密量取没食子酸对照品溶液(0.05 mg·mL<sup>-1</sup>)0.6,1.0,1.4,1.8,2.2 mL,分别置25 mL棕色量瓶中,依次加入0.1 mol·L<sup>-1</sup>氯化铁溶液0.5 mL,0.008 mol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>3</sub>溶液0.5 mL,0.10 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液0.5 mL定容,摇匀,放置15 min,以相应的试剂为空白,于695 nm的波长处测定A值,以A值为纵坐标,浓度(C,μg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为:A=0.378 7C+0.034 8,r=0.999 8,没食子酸在1.18~4.34 μg·mL<sup>-1</sup>浓度范围内与吸光度有较好的线性关系。

### 2.3 样品含量测定

2.3.1 磷钼钨酸法 ①总酚:精密量取供试品溶液2 mL,置25 mL棕色容量瓶中,照标准曲线的制备项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起,加水10 mL,依法测定A值,根据标准曲线计算即得。②不被吸附的多酚:精密量取供试品溶液25 mL,加至已盛有干酪素0.6 g的100 mL具塞锥形瓶中,密塞,置

[收稿日期] 2007-03-26

[作者简介] 刘莹(1982-),女,湖北武汉人,在读硕士,从事中药活性成分与制剂研究。电话:(0)13035136722,E-mail:becauseofyou@163.com。

30 ℃ 水浴中保温 1 h, 不停振摇, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起, 加水 10 mL, 依法测定 A 值, 根据标准曲线计算即得。鞣质含量 = 总酚量 - 不被吸附的多酚量。

**2.3.2 普鲁士蓝法** ①总酚: 精密量取供试品溶液 2 mL, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“依次加入 0.100 mol·L<sup>-1</sup>三氯化铁溶液 0.5 mL”起, 依法测定 A 值, 根据标准曲线计算即得。②不被吸附的多酚: 精密量取供试品溶液 25 mL, 加至已盛有干酪素 0.6 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中, 密塞, 置 30 ℃ 水浴中保温 1 h, 不停振摇, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 2 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 照标准曲线的制备项下的方法, 自“依次加入 0.100 mol·L<sup>-1</sup>氯化铁溶液 0.5 mL”起, 依法测定 A 值, 根据标准曲线计算即得。鞣质含量 = 总酚量 - 不被吸附的多酚量。

**2.3.3 结果与分析** 结果见表 1。结果可见, 两法测定叶下珠中鞣质的含量基本一致, 但实验发现, 普鲁士蓝法测定时, 其 A 值数值不稳, 影响读数, 且生成的普鲁士蓝对实验器皿染色, 难以清洗干净。磷钼钨酸法显色后读数稳定, 不会对器皿染色, 且重复性高, 因此采用此法测定。

表 1 两种方法鞣质含量测定结果 % , n = 3

方法	药材中鞣质	RSD
磷钼钨酸法	6.97	1.01
普鲁士蓝法	7.04	2.13

## 2.4 测定方法的优化

**2.4.1 碱液浓度的优化** 《中华人民共和国药典》2005 年版规定, 测定时碳酸钠溶液的浓度为 29%, 但温度对碳酸钠的溶解度影响较大, 且高浓度的碳酸钠较易析出晶体, 影响测定, 结合文献中多采用低浓度的碳酸钠溶液<sup>[2,3]</sup>, 拟考察 20%, 25%, 29% 碳酸钠的测定结果。取没食子酸对照品溶液 (0.05 mg·mL<sup>-1</sup>) 2 mL 进行显色测定, 结果表明, 三者所测 A 值基本一致, 故采用 20% 碳酸钠测定。

**2.4.2 显色时间的考察** 2005 年版《中华人民共和国药典》规定, 显色时间为 30 min, 欲考察显色稳定的时间段, 以方便操作, 取没食子酸对照品溶液 (0.05 mg·mL<sup>-1</sup>) 2 mL, 在 50 min 内进行显色测定, 结果显示, 显色 30 min 后, A 值稳定, 但为避免碳酸钠析出, 显色 30 min 测定。

**2.4.3 精密度考察** 取同一供试品溶液, 按磷钼钨酸法, 20%

碳酸钠溶液显色 30 min 后测定其 A 值, 重复 5 次, 测定叶下珠鞣质的平均含量为 6.91%, RSD 为 0.03%。

**2.4.4 重现性考察** 精密称取同一样品 5 份, 按样品含测项下操作, 测得叶下珠鞣质的平均含量为 6.94%, RSD 为 1.02%。

**2.4.5 回收率考察** 精密称取所得叶下珠醇提物 (含量为 34.93 mg·g<sup>-1</sup>) 约 0.05 g, 准确加入没食子酸对照品 17 mg, 照样品含测项下操作, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 没食子酸加样回收率实验结果

序号	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
1	17.48	17.00	34.39	99.47		
2	17.39	17.00	34.33	99.65		
3	17.42	17.00	34.38	99.76	99.64	0.11
4	17.44	17.00	34.37	99.59		
5	17.46	17.00	34.41	99.71		

**2.4.6 样品测定** 按优化的磷钼钨酸法, 即 20% 碳酸钠溶液显色 30 min 后测定叶下珠中鞣质的含量, 结果鞣质含量为 7.01%, 6.95% 和 6.94%, 平均含量 6.97%, RSD = 0.63%。

## 3 讨论

磷钼钨酸法的原理: 在碱性溶液中, 酚类化合物可以将钨钼钨酸还原 (使 W<sup>6+</sup> 变为 W<sup>5+</sup>), 生成蓝色的化合物, 颜色的深浅与酚含量呈正相关, 在约 760 nm 处有最大吸收。普鲁士蓝法的原理: 在酸性递质中酚类物质能将 Fe<sup>3+</sup> 还原成 Fe<sup>2+</sup>, 后者能与 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 生成深蓝色配位化合物, 颜色的深浅与酚含量呈正相关, 在 695 nm 处有最大吸收。两者测定的是总酚含量, 而干酪素能选择性结合有生理活性的鞣质, 故用总酚量减去不被干酪素吸附的多酚量, 所得的是鞣质的含量。

鞣质含量测定方法很多, 本实验选取的两种方法较滴定法和重量法更为简单、灵敏、可靠, 优选的磷钼钨酸法经相应改良测定叶下珠中鞣质的含量, 方法简单稳定。

实验发现强光照射会使显色体系吸光度下降, 故需使用棕色容量瓶且避光操作。

### [参考文献]

- [1] 蔡 瑾, 梁敬钰. 叶下珠化学成分及药理作用研究概况 [J]. 海峡药学, 2003, 15(1): 1-3.
- [2] 杨 铮, 秦丽娟, 高建萍, 等. 干酪素法测定诃子中鞣质的含量 [J]. 内蒙古中医药, 2005, 6(1): 31-32.
- [3] 陈 燕, 刘玉红, 易进海, 等. 二十五味大汤胶囊中鞣质的含量测定 [J]. 中成药, 2002, 24(10): 766-767.

《中国实验方剂学杂志》是经国家科技部批准, 由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的国家级专业性学术刊物。已被评为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊); “中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊; “中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。该刊创刊于 1995 年 10 月。本着以提高与普及相结合的办刊方针。设置: 质量标准、制剂工艺、药理、临床、综述、论著、论坛、方法探讨、基层园地、消息等栏

目; 交流方剂的药效学、毒理学、药动学、药物化学、制剂学、质量分析、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。月刊, 16 开本, 2008 年增至 80 页。标准刊号: ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期 10 元, 全年 120 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2-417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: BM4655, 欢迎订阅。地址: 北京市东直门内北新仓 18 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编: 100700。电话: (010) 84076882 或 64014411 转 2849; E-mail: shyfjx2007@sohu.com。