

分光光度法测定田基黄中总黄酮的含量

唐丹,张琳,田景奎* (浙江大学药学院现代中药研究所,杭州 310058)

摘要:目的 建立紫外分光光度法测定田基黄药材中总黄酮含量的方法。方法 利用黄酮类化合物母核上的酚羟基能与铝离子络合而显色,采用分光光度法,以槲皮苷为对照品,以 10%三氯化铝醇溶液为显色剂,在波长 273 nm 处对样品中的总黄酮进行含量测定。结果 总黄酮在 $3.20 \sim 16.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好 ($r=0.9999$);该法的平均加样回收率为 98.25%,RSD 为 2.21% ($n=9$);且该法稳定性较好,24.0 h 内吸光度基本无变化,RSD 为 0.40% ($n=6$)。结论 该方法稳定、简便、快速,适用于田基黄药材中总黄酮的含量测定。

关键词:田基黄;分光光度法;总黄酮;含量测定

中图分类号:R917.102 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2007)07-0620-03

Determination of Total Flavone in Hypericum Japonicum by Spectrophotometry

TANG Dan, ZHANG Lin, TIAN Jing-kui* (Institute of Modern Chinese Traditional Medicine of Pharmacy College, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A method for determination of total flavone in Hypericum japonicum was set up. **METHODS** Using the characteristic that the phenolic hydroxyl group of the parent nucleus of flavonoids compound can easily complexed with Al^{3+} . Reference substance was Quercitrin, 10% AlCl_3 was chromogenic agent and the detection wavelength was at 273 nm. **RESULTS** The linear range was between $3.20 \sim 16.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$) and the average recovery was 98.25% with corresponding RSD of 2.21% ($n=9$). **CONCLUSION** This method is convenient, simple, rapid and is suitable for determination of total flavone in Hypericum japonicum.

KEY WORDS: Hypericum japonicum; spectrophotometry; total flavone; determination

田基黄,又名地耳草,系藤黄科金丝桃属植物地耳草(Hypericum japonicum Thunb.)的干燥全草^[1]。田基黄的主要有效成分为总黄酮类^[1-3],现代药理研究表明总黄酮类化合物是田基黄发挥药效的主要物质基础^[1-3]。目前有文献报道以芦丁为对照品,以亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠为显色剂测定田基黄中总黄酮的含量,因芦丁不是田基黄中的成分,所以测定结果不理想。

笔者用田基黄总黄酮中的主要化学成分槲皮苷为对照品,利用黄酮类化合物母核上的酚羟基能与铝离子络合显色的特性,建立了一种适用于测定田基黄中总黄酮含量的分析方法。

1 仪器、样品与试剂

752-PC 全波长扫描紫外-可见分光光度仪(上海光谱仪器有限公司),KQ 3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Sartorius CP225D 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);SB-2000 旋转蒸发仪(日本东京理化)。

槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111538-200302);本实验所用田基黄药材购自浙江杭州中药饮片,

由浙江大学药学院中药研究所田景奎副教授鉴定;石油醚、甲醇、三氯化铝等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的制备

槲皮苷对照品于 75℃ 减压干燥箱中干燥 6.0 h,精密称取 10.01 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得,冰箱内保存,备用。

2.2 样品溶液的制备

田基黄药材粉碎,过三号筛,取约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加适量石油醚(60~90℃)提取至无色,弃去醚液,药渣挥去石油醚,加适量甲醇继续提取至无色,转移至 100 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 显色溶液的制备

精密吸取 0.5 mL 对照品储备液或样品溶液于 10 mL 量瓶中,准确加入 10%三氯化铝醇溶液 1.0 mL,摇匀,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品或样品的显色溶液。

2.4 检测波长的选择及显色剂用量的确定

分别取适量样品溶液和槲皮苷对照品溶液于 10 mL 量

瓶中,加甲醇溶解并定容,以甲醇溶液为空白,在 200 ~ 600 nm 波长范围内扫描,扫描结果表明两者在不加显色剂的情况下,最大吸收波长相差较远,分别为 282 nm 和 257 nm。吸收光谱见图 1。

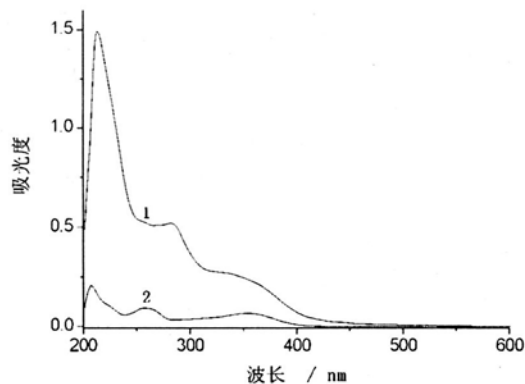


图 1 样品溶液和槲皮苷对照品溶液显色前紫外吸收光谱图
1. 样品溶液; 2. 对照品溶液

Fig 1 UV absorption spectra of sample and reference substance before coloration

1. the solution of sample; 2. the solution of reference substance

分别取适量样品溶液和槲皮苷对照品溶液于 10 mL 量瓶中,按“2.3”项下方法显色,在 200 ~ 600 nm 波长范围内扫描,表明对照品溶液与样品溶液显色后的最大吸收波长分别在 273 nm 和 276 nm,较为接近。故选择测定的波长为 273 nm。吸收光谱见图 2。

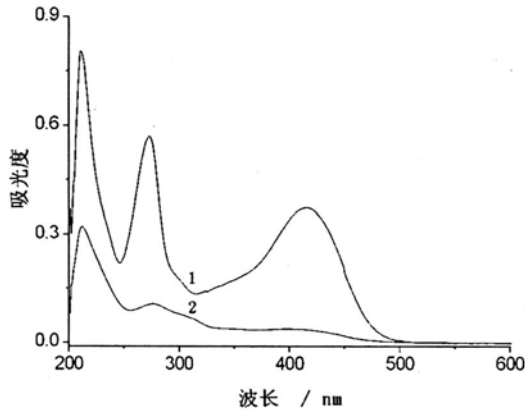


图 2 样品溶液和槲皮苷对照品溶液显色后紫外吸收光谱图
1. 对照品显色溶液; 2. 样品显色溶液

Fig 2 UV absorption spectra of sample and reference substance after coloration

1. the chromogenic solution of reference substance; 2. the chromogenic solution of sample

精密吸取槲皮苷对照品溶液 0.5 mL ($n=4$) 和样品溶液 0.5 mL ($n=4$), 分别置 10 mL 量瓶中, 各准确加入 10% 三氯化铝醇溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 显色, 甲醇稀释定容, 摇匀; 以同法制得的 4 份空白为参比, 在 273 nm 处测定吸光度, 结果表明: 10% 三氯化铝醇溶液的用量在 0.5 ~ 2.0 mL 范围内不影响测定结果; 故确定显色剂的用量为 1.0 mL。

2.5 标准曲线的绘制

精密吸取对照品储备液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 按“2.3”项下方法显色, 于 273 nm 处测定吸光度, 以吸光度值 A 为纵坐标, 浓度 $C(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标进行线性回归, 得方程为: $A = 0.05456C + 0.01700$, $r = 0.9999$ 。线性范围为 3.20 ~ 16.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 样品的测定

精密吸取待做含量测定的样品溶液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 按“2.3”项下方法显色, 在 273 nm 处测定吸光度, 计算总黄酮含量。

2.7 精密度实验

重复精密吸取同一份样品溶液共 6 份, 按“2.6”项下样品测定方法测定吸光度, 计算总黄酮含量, 以总黄酮含量计算 RSD, 结果见表 1。

表 1 精密度实验结果 ($n=6$)

Tab 1 The result of precision test ($n=6$)			
样品	吸光度	总黄酮含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %
1	0.534	9.48	0.85
2	0.542	9.62	
3	0.546	9.69	
4	0.537	9.53	
5	0.540	9.58	
6	0.535	9.49	

2.8 稳定性实验

精密吸取 1.0 mL 样品溶液于 25 mL 量瓶中, 按“2.6”项下样品测定方法显色, 分别于 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min 在 273 nm 处测定吸光度, 结果显示样品在 2.0 h 内稳定; 以吸光度计算 RSD, 结果见表 2。

表 2 稳定性实验结果 ($n=8$)

Tab 2 The result of stability test ($n=8$)		
时间 / min	吸光度	RSD / %
0	0.455	0.40
5	0.456	
10	0.451	
20	0.454	
30	0.451	
60	0.454	
90	0.454	
120	0.455	

2.9 重复性实验

取同一批田基黄药材粉末 5 份, 分别按“2.2”项下样品溶液制备方法制备样品溶液, 再按“2.6”项下样品测定方法测定吸光度, 计算总黄酮含量, 结果分别为 2.75%, 2.74%, 2.70%, 2.71% 和 2.72%, $RSD = 0.76\%$ 。

2.10 加样回收率实验

精密称取已知总黄酮含量的干燥样品 10.01 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容至刻度。分别将对照品按与样品 (以总黄酮计) 5:4, 1:1, 4:1 的比例加入到已量取好的样品溶液中, 每组 3 份; 按“2.6”项下样品测定方法测定吸光度,

计算平均回收率为 98.25%, RSD为 2.21%。

3 讨论与小结

3.1 显色剂的确定

黄酮类化合物分子中的 3-羟基、5-羟基或邻二酚羟基易与金属盐试剂反应,生成有色的金属络合物,通过比色法可测定总黄酮的含量。本实验选择比较了 4 种中草药中总黄酮类化合物含量测定常用的显色剂^[5]:亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠、10%硝酸铝-三氯化铝-醋酸钾和 10%三氯化铝,结果表明以 10%三氯化铝作为显色剂时光谱最大吸收波长重叠较好,且显色后样品稳定。

3.2 对照品的确定

以田基黄黄酮类主要化学成分槲皮苷为对照品,以 10%三氯化铝作为显色剂测定田基黄总黄酮含量的方法比较合理,所测的结果能够近似代表田基黄中总黄酮的含量。

参考文献

[1] FU P, TIAN H L, ZHANG W D. Advances in research on Hyper-

cum japonicum [J]. Journal of pharmaceutical Practice(药学实践杂志), 2004, 22(2): 98-101.

[2] SU J, FU P, ZHANG W D, *et al.* Experimental study on extracts of Hypericum japonicum in liver-protective effect[J]. Journal of pharmaceutical Practice(药学实践杂志), 2005, 23(6): 342-344.

[3] FU P, LI T Z, LIU R H, *et al.* Studies on the Flavonoids of Hypericum japonicum Thunb. ex Murray[J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2004, 2(5): 283-284.

[4] FU P, ZHANG W D, LI T Z, *et al.* Study on chemical constituents of Hypericum japonicum Thunb. ex Murray[J]. Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报), 2004, 25(11): 1274-1275.

[5] YAN R L, LIU Z G. Overview on determination methods of Total Flavone in Chinese herbal medicine and Chinese drugs pharmaceuticals[J]. Guangzhou Medicine(广州医药), 2005, 36(6): 6-10.

收稿日期: 2006-05-30