

比色法测定龙血竭总黄酮含量

王建壮, 吕华冲*

(广东药学院药科学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**对龙血竭总黄酮的比色测定方法进行研究。**方法:**利用龙血竭总黄酮可与各种不同的显色试剂作用并产生颜色的特性,比较显色后的吸收曲线变化差异。**结果:**龙血竭用 HCl-Mg 粉显色后在 475 nm 处产生一个大的吸收峰,且此处的干扰较小,在 6 h 内稳定性良好,在 0.012 ~ 0.12 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r = 0.9993$);用其他显色剂显色后吸收峰均无太大变化。**结论:**总黄酮测定常用的 AlCl₃, NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法不适合龙血竭总黄酮的测定, HCl-Mg 粉可作比色法测定龙血竭总黄酮的显色剂,但仍需寻找合适的对照品。

[关键词] 龙血竭; 总黄酮; 含量测定方法; 比色法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0055-04

[doi] 10.11653/syfy2013160055

Content Determination of Total Flavonoids in Resina Draconis by Colorimetric Method

WANG Jian-zhuang, LV Hua-chong*

(School of Pharmacology, Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the colorimetric determination of total flavonoids in Resina Draconis. **Method:** Comparison on the difference of absorption curve was done using the characteristics that total flavonoids of Resina Draconis can produce color with various chromogenic reagents. **Result:** Resina Draconis colored by HCl-Mg power produce a large absorption peak at 475 nm where the interference is small. It had good stability within 6 h and showed a good linear relationship in the range of 0.012-0.12 g·L⁻¹ ($r = 0.9993$). And its absorption peak was not much change after colored by other chromogenic agent. **Conclusion:** AlCl₃, NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH colorimetries usually used for determination of total flavonoids were not suitable for Resina Draconis flavones assay. HCl-Mg powder can be used as chromogenic agent for colorimetric determination of the total flavonoids in Resina draconis. But it still needs to find a suitable reference substance.

[Key words] Resina Draconis; total flavonoids; determination method; colorimetric method

龙血竭为百合科剑叶龙血树的树脂,具有抗氧化、抗细菌、抗炎、活血止血等多种生理活性,黄酮类成分是其主要的活性成分^[1-2],结构类型多样,十分复杂^[3]。龙血竭的质量控制,《中国药典》采用 HPLC 测定,以龙血素 B 为控制指标。以龙血素 B 进行定量,不能很好反映出龙血竭总黄酮的生理活性,加上其在龙血竭中的含量较低,所以用单一的控制成分作为龙血竭药理活性的控制标准并不理想。

大类成分含量的测定通常会根据它们的结构特性,用 UV 法或比色法进行。UV 法通常受限于样品的本底干扰而较少应用。总黄酮的比色测定通常采用 AlCl₃ 进行显色,显色后最大吸收波长在 415 nm 附近^[4],或采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色,显色后最大吸收波长在 510 nm 附近^[5]。使用上述两法进行含量测定过程中经常遇到的问题是,样品往往在 415,510 nm 左右无最大吸收或吸收很弱,因此并不

[收稿日期] 20121106(025)

[第一作者] 王建壮,硕士研究生,实验师,从事天然药物活性成分及质量标准研究, Tel:020-39352140, E-mail:wjz506@163.com

[通讯作者] * 吕华冲,硕士生导师,副教授,从事天然药物活性成分及质量标准研究, Tel:020-39352140, E-mail:huachong_lu@163.com

普遍适用。本文利用黄酮类化合物能与多种试剂作用显色的特点,通过对总黄酮的比色方法考察,旨在为龙血竭总黄酮及其他大类成分含量测定方法的建立提供参考。

1 材料

龙血竭购自广西中医学院制药厂,经广东药学院药剂教研室金描真教授鉴定为百合科剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的树脂。橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110721-200512),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),甲醇(色谱纯,天津四友生物医学技术有限公司),去离子水,其他试剂均为分析纯。

JA1203N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),SK5200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),UV-2550 型紫外可见分光光度计(岛津香港有限公司),SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸公司),200 g DPY-200 型摇摆式高速中药粉碎机(温岭大德中药机械公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品及对照品溶液的制备

2.1.1 龙血竭供试液 精密称取样品 30.03 mg,置 50 mL 量瓶中,甲醇超声溶解并稀释至刻度,过滤,滤液作为供试品溶液。

2.1.2 橙皮苷对照品溶液 精密称取橙皮苷对照品 20.12 mg,置 100 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.1.3 芦丁对照品溶液 精密称取芦丁对照品 10.08 mg,置 100 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2 测定方法和结果

精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液和芦丁对照品供试液各 2.5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为测定样品溶液,以甲醇作为空白溶液,于 220 ~ 600 nm 进行扫描,结果见图 1。从图中可看出龙血竭的总黄酮类型跟芦丁明显不同,与橙皮苷较为相似,从吸收曲线上看,龙血竭总黄酮中可能以二氢黄酮类为主,故试用橙皮苷作为对照品进行测定。

2.2.1 NaOH 比色法^[6] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,加入 6 滴 4% NaOH,作为 NaOH 比色溶液,以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液,于 220 ~ 600 nm 进行扫描。

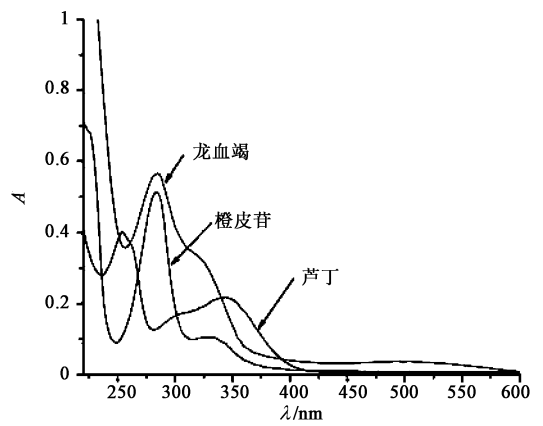
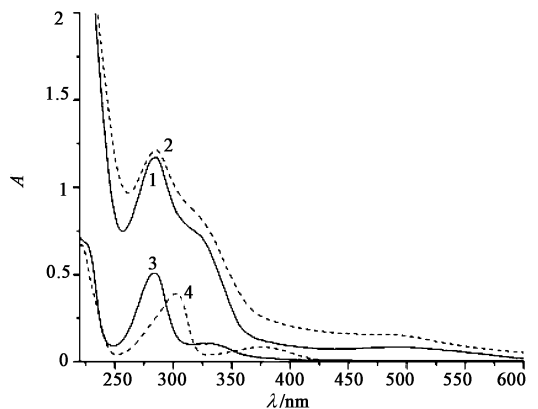


图 1 龙血竭、橙皮苷、芦丁甲醇光谱

从 NaOH 显色后的紫外光谱可以看出,虽然龙血竭的最大吸收峰发生位移,但位移不大,此处干扰太大,测定波长不理想,故 NaOH 法不可作龙血竭总黄酮的测定方法。

2.2.2 AlCl₃ 比色法^[7] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加入 1 mL 0.3 mol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液,用去离子水稀释至刻度,作为 AlCl₃ 比色溶液,以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液,于 220 ~ 600 nm 进行扫描。龙血竭显色前后的吸收峰没有太大变化(图 2),所以此法不适用龙血竭总黄酮的测定。



1. 龙血竭的甲醇光谱; 2. 龙血竭 AlCl₃ 显色后光谱;
3. 橙皮苷的甲醇光谱; 4. 橙皮苷 AlCl₃ 显色后光谱

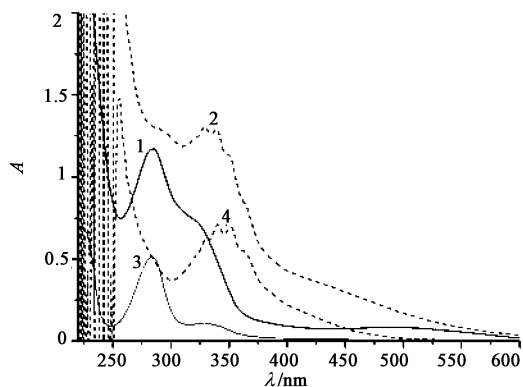
图 2 AlCl₃ 比色光谱

2.2.3 NaBH₄ 比色法^[8] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL,分别置于 25 mL 量瓶,加入 10 mL 2% NaBH₄,放置 1 min 后加 2 mL 浓 HCl,甲醇稀释至刻度,静置至无气泡,作为 NaBH₄ 比色溶液,以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液,于 220 ~ 600 nm 进行扫描,龙血竭显色前后的吸收峰没有太大变化,所以此法不适用龙血

竭总黄酮的测定。

2.2.4 MgAc₂ 比色法^[9] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入 0.5% 的 MgAc₂ 水溶液定容至刻度, 作为 MgAc₂ 比色溶液, 以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液, 于 220 ~ 600 nm 进行扫描, 龙血竭显色前后的吸收峰没有太大变化, 所以此法不适用龙血竭总黄酮的测定。

2.2.5 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法^[10] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入 1 mL 5% NaNO₂ 溶液, 放置 6 min 后, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 mL, 放置 6 min 后, 加 NaOH 试液 10 mL, 去离子水定容至刻度, 显色 15 min 后, 作为 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色溶液进行测定, 以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液, 于 220 ~ 600 nm 进行扫描, 从显色后的紫外光谱可以看出, 虽然龙血竭的最大吸收峰发生位移(图 3), 但位移不大, 此处干扰太大, 测定波长不理想, 故此法不可作龙血竭总黄酮的测定方法。



1. 龙血竭的甲醇光谱; 2. 龙血竭 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色后光谱;
3. 橙皮苷的甲醇光谱; 4. 橙皮苷 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色后光谱

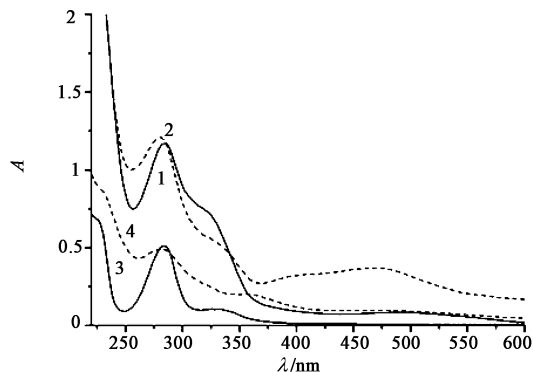
图 3 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色光谱

2.2.6 ZrOCl₂ 比色法^[11] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶, 加入 3.7 mL 2% ZrOCl₂ 溶液, 用甲醇稀释至刻度, 作为 ZrOCl₂ 比色溶液, 以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液, 于 220 ~ 600 nm 进行扫描, 龙血竭显色前后的吸收峰没有太大变化, 所以此法不适用龙血竭总黄酮的测定。

2.2.7 Na₂WO₄ 比色法^[12] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶, 加入 0.08 mol·L⁻¹ Na₂WO₄ 溶液 5 mL, 用甲醇稀释至刻度, 作为 Na₂WO₄ 比色溶液, 以甲醇

加入相应的比色试剂配制成空白溶液, 于 220 ~ 600 nm 进行扫描, 龙血竭显色前后的吸收峰没有太大变化, 所以此法不适用龙血竭总黄酮的测定。

2.2.8 HCl-Mg 比色法^[13] 精密吸取龙血竭供试品液、橙皮苷对照品供试液各 2.5 mL, 分别置于加有镁粉 300 mg 的 25 mL 量瓶中。将量瓶置冷水浴(15 ℃左右)中, 缓慢滴加浓盐酸 5 mL, 并不时振摇试管。最后加色谱甲醇补足至 25 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60 min, 取出, 迅速冷却至室温, 作为 HCl-Mg 比色溶液, 以甲醇加入相应的比色试剂配制成空白溶液, 于 220 ~ 600 nm 进行扫描, 龙血竭显色后在 475 nm 附近产生一个大的吸收峰(图 4), 且此处的干扰较小, 在选择合适对照品的情况下, 可选 HCl-Mg 粉作龙血竭总黄酮测定方法的显色剂。为了进一步验证此法的可行性, 又做了该法的稳定性试验和线性考察。



1. 龙血竭的甲醇光谱; 2. 龙血竭 HCl-Mg 粉显色后光谱;
3. 橙皮苷的甲醇光谱; 4. 橙皮苷 HCl-Mg 粉显色后光谱

图 4 HCl-Mg 比色光谱

2.2.9 HCl-Mg 法稳定性试验 取龙血竭样品溶液 3.0 mL 置于加有镁粉 300 mg 的 25 mL 量瓶中, 按照 2.2.3 项下的一般过程, 自“将量瓶置冷水浴(15 ℃左右)中”起同样操作, 以加有比色试剂的甲醇液为参比溶液, 分别放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 后, 于 475 nm 处测定吸光度, 结果表明龙血竭在 6 h 内稳定性良好, RSD 1.6%。

2.2.10 HCl-Mg 法的线性考察 精密吸取龙血竭供试品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别置于 6 个加有镁粉 300 mg 的 25 mL 量瓶中, 按照 2.2.3 项下的一般过程, 自“将量瓶置冷水浴(15 ℃左右)中”起同样操作, 以加有比色试剂的甲醇液为参比溶液, 于 475 nm 处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(Y), 以样品浓度为横坐标(X), 绘制曲线。结果表明龙血竭在 0.012 ~ 0.12 g·L⁻¹ 呈良好的线性

关系, 回归方程为 $Y = 3.6906X + 0.0200$ ($r = 0.9993$)。

3 讨论

采用芦丁作为对照品, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色测定中药或中药制剂中总黄酮含量最常用方法, 该方法会使测定物质在 510 nm 处附近无干扰区产生一个强的吸收峰^[14-15]。在本研究中, 龙血竭在 510 nm 左右几乎无吸收(图 3), 所以用芦丁作对照, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色测定方法并不适于血竭总黄酮的测定。但如果用橙皮苷作对照, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色后, 龙血竭和对照品新产生的位移峰极为吻合, 故可用橙皮苷作对照品, 在 350 nm 波长左右处进行测定, 但须注意的是, 龙血竭在此峰处有一定的本底吸收, 会影响到测定的准确性。

龙血竭总黄酮含量的测定, 一直未有很好的方法, 本文较为全面地收集了文献上报道过的总黄酮含量测定方法进行研究, 常用的总黄酮含量测定方法 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法和 AlCl_3 比色法并不适合龙血竭总黄酮含量的测定。总黄酮含量测定方法研究数据可为其他中药的总黄酮含量测定方法研究提供有益的参考。

HCl-Mg 粉可选作龙血竭总黄酮测定方法的显色剂, 但反应条件控制是测定重复性的关键。该反应宜在 15 °C 左右水浴中进行, 浓盐酸要逐渐滴加, 目的在于减缓盐酸与镁粉反应的剧烈程度, 使产生的氢原子与总黄酮成分充分反应。在滴加浓盐酸的过程中, 要不时振摇试管, 使显色剂与样品充分接触, 才能充分显色。

通过 HCl-Mg 法稳定性试验和线性考察, 初步确定 HCl-Mg 粉作龙血竭总黄酮测定方法的显色剂是可行的, 可为进一步考察龙血竭总黄酮含量测定方法提供有益的参考。

[参考文献]

[1] 张天宝, 吕敬慈, 雍克岚, 等. 广西龙血竭中几种化学

成分对血小板聚集影响的初步研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 695.

- [2] 周晓惠, 吕敬慈, 雍克岚. 广西龙血竭游离黄酮类化合物的分离鉴定及活性研究[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2007, 13(2): 212.
- [3] 刘芳, 戴荣继, 邓玉林, 等. 龙血竭化学成分研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1437.
- [4] 张明, 陈华国, 赵超, 等. 杠板归中总黄酮的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 77.
- [5] 屠鹏飞, 王钰芳, 邵杰, 等. 龙血竭中黄酮类成分提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 30.
- [6] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 180.
- [7] 马陶陶, 张群林, 李俊, 等. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 54.
- [8] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 179.
- [9] 王慧, 高晓霞, 张立伟. 决明子复方降脂茶总蒽醌含量测定[J]. 光谱实验室, 2007, 24(1): 19.
- [10] 黄永林, 阮俊, 文永新, 等. 不同部位紫玉盘总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1900.
- [11] 李茂星, 贾正平, 杜青云, 等. 二氯氧锆比色法测定镰形棘豆水提物中的总黄酮[J]. 华西药物杂志, 2008, 23(4): 466.
- [12] 上官小东, 郎惠云, 赵莉. 钨酸钠-分光光度法测定银杏黄酮含量[J]. 西部粮油科技, 2003, 28(2): 61.
- [13] 刘斌, 石任兵, 周素蓉. 苦参汤有效部位总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 24.
- [14] 任淑娟, 考玉萍, 陈世虎. 艾叶炒炭炮制品中总黄酮的含量测定[J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(4): 70.
- [15] 孙佩霞, 叶丽卡, 张晓丽, 等. 比色法测定淫羊藿胶囊中总黄酮的含量[J]. 辽宁药物与临床, 1998, 1(2): 59.

[责任编辑 顾雪竹]