

杠板归中总黄酮的含量测定

张明¹, 陈华国^{1,2}, 赵超^{1,2}, 周欣^{1,2*}, 谭济苍³, 薛静³, 杨世林^{1,2}

- (1. 贵州师范大学天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001;
2. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001;
3. 贵州远程制药有限责任公司, 贵阳 550018)

[摘要] 目的: 建立杠板归中总黄酮的含量测定方法。方法: 以芦丁为对照品, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AlCl}_3$ 溶液、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$ 溶液为显色剂, 检测波长 413 nm。结果: 芦丁吸光度与其浓度在 $6.24 \sim 21.84 \mu\text{g}$ 线性良好 ($r = 0.9998$), 总黄酮回归方程为 $Y = 38.183X - 0.001$; 平均加样回收率为 97.4%, RSD 2.2%。结论: 方法简便、稳定, 可用于杠板归中总黄酮的含量测定。

[关键词] 杠板归; 总黄酮; 比色法; 显色方式; 提取; 紫外-可见分光光度计

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)18-0077-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1207.026.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 12:07

Determination of Content of Total Flavonoids from *Polygonum perfoliatum*

ZHANG Ming¹, CHEN Hua-guo^{1,2}, ZHAO Chao^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2*},
TAN Ji-cang³, XUE Jing³, YANG Shi-lin^{1,2}

- (1. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;
2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;
3. Guizhou Long-range Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of total flavonoids in *Polygonum perfoliatum*. **Method:** Total flavonoids were determined by UV-Vis spectrophotometer with rutin as reference substance and $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AlCl}_3$, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$ as chromogenic agent; the detection wavelength was at 413 nm. **Result:** A good linear relationship was achieved over the concentration range of $6.24 \sim 21.84 \mu\text{g}$ ($r = 0.9998$) for Rutin. The regression equation of total flavonoids was $Y = 38.183X - 0.001$, with an average recovery of 97.4%, RSD 2.2%. **Conclusion:** The method is simple and stable, and it is suitable for the content determination of total flavonoids from *P. perfoliatum*.

[Key words] *Polygonum perfoliatum*; total flavonoids; colorimetry; the way of coloration; extraction; UV-Vis spectrophotometer

[收稿日期] 20120412(010)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2009BAI74B 02-4); 国家自然科学基金项目(81060340); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队(2011)4008); 贵阳市科技计划项目([2010]筑科成合同字第 1-创-27 号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合中药专字[2007]5023 号)

[第一作者] 张明, 在读硕士研究生, 中药学专业, E-mail: zhangming5363@126.com

[通讯作者] * 周欣, 博士, 教授, 从事中药、民族药质量控制、中药指纹图谱及中药新药研发等, Tel: 0851-6702167, E-mail: alice9800@sina.com

杠板归为蓼科植物杠板归的干燥地上部分,具有清热解毒、利水消肿、止咳的功能^[1],主要含有黄酮类、蒽醌类、苯丙素糖酯类和其他类化合物^[2]。杠板归具有抗病毒、抗氧化、抗菌、抗炎、止咳祛痰、护肝、抗癌等作用^[3]。用于肾炎水肿、百日咳、泻痢、湿疹、疖肿、毒蛇咬伤等^[4]。药材所含的黄酮类化合物较多,赵超等^[5]从杠板归中分离出槲皮素、芦丁等 7 个黄酮类化合物。现代研究证明,黄酮类化合物具有多种药理活性,本实验通过对杠板归总黄酮的含量测定方法的建立,为考察杠板归内在质量提供定量依据。

1 材料

药材经贵州师范大学陈华国副研究员鉴定为杠板归 *Polygonum perfoliatum* L., 过 60 目筛;对照品芦丁(中国药品生物制品检定所,批号 080-9303); Cary Bio 100 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司);AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪

器有限公司);实验所用甲醇、乙醇、三氯化铝、乙酸钠等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取已干燥至恒重的芦丁对照品,用 80% 的乙醇溶解,配成 0.156 g·L⁻¹ 的溶液,密封低温保存备用。

2.2 供试品溶液制备方法的确定 根据中药材固-液两相浸渍提取过程的理论与知识,影响提取过程的主要因素有:提取溶剂的浓度、料液比、温度、时间、次数等。采用单因素实验,对主要的提取影响因素进行考察,结果见图 1。

2.2.1 提取溶剂 精密称取杠板归药材 3 份,分别采用甲醇、乙醇、水作为提取溶剂,水浴回流提取,固液比 1:40,提取 1 次,时间 2 h,温度 60 ℃,滤液定容到 25 mL 量瓶中,显色测定,结果总黄酮提取率分别为 1.35%,1.90%,2.00%,最终选取乙醇作为提取溶液。结果见图 1。

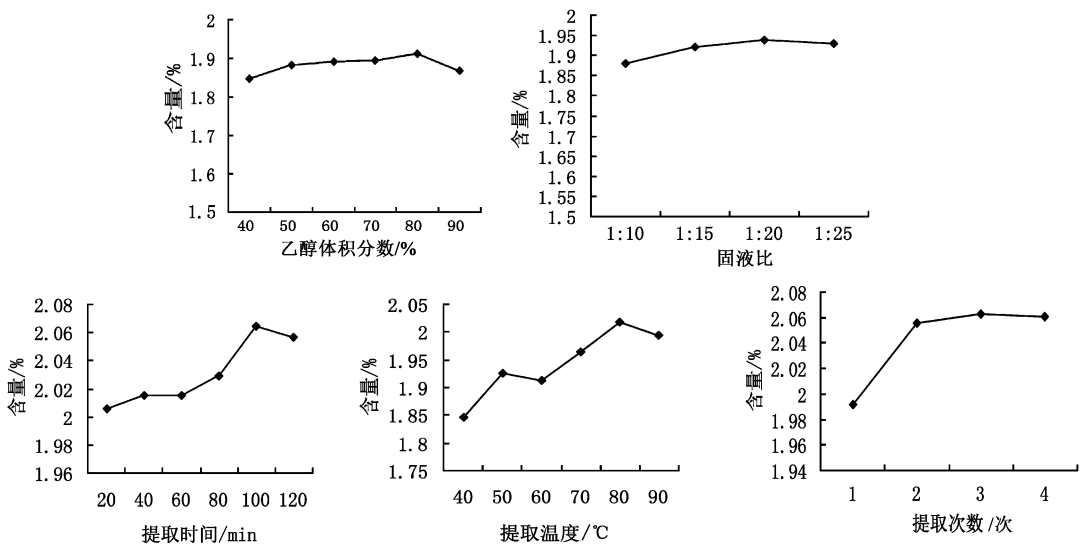


图 1 各因素对杠板归中总黄酮提取率的影响

2.2.2 溶剂浓度 精密称取杠板归药材 6 份,乙醇回流提取,提取 1 次,提取时间 2 h,提取温度 60 ℃,固液比 1:40,体积分数分别为 40%,50%,60%,70%,80%,90%,进行测定,优选提取浓度。最终选取 80% 乙醇作为总黄酮提取溶剂。

2.2.3 固液比 精密称取杠板归药材 4 份,80% 乙醇回流提取,提取 1 次,提取时间 2 h,提取温度 60 ℃,固液比分别为 1:10,1:15,1:20,1:25,进行测定,优选提取的固液比。最终选取固液比为 1:15。

2.2.4 提取温度 精密称取杠板归药材 6 份,80%

乙醇回流提取,提取 1 次,提取时间 2 h,固液比 1:15,提取温度分别为 40,50,60,70,80,90 ℃,进行测定,优选提取温度。最终选取提取温度为 80 ℃。

2.2.5 提取时间 精密称取杠板归药材 6 份,80% 乙醇回流提取,提取 1 次,固液比 1:15,提取温度 80 ℃,提取时间分别为 20,40,60,80,100,120 min,进行测定,优选提取时间。最终选取提取时间为 100 min。

2.2.6 提取次数 精密称取杠板归药材 4 份,80% 乙醇回流提取,固液比 1:15,提取温度 80 ℃,提取

时间 100 min,提取次数分别为 1,2,3,4 次,进行测定,优选提取次数。最终选取提取次数为 2 次。

供试品溶液制备方法为:精密称取杠板归药材约 0.4 g,采用 80% 的乙醇作为提取溶剂,水浴加热回流提取,固液比 1:15,提取 2 次,每次 100 min,提取温度 80 ℃,合并滤液,回收溶剂,用 80% 的乙醇溶液定容到 25 mL 的量瓶中,待用。

2.3 显色条件的确定

2.3.1 AlCl₃ 的加入量 精密吸取供试液 5 份,每份 0.5 mL,分别加入 0.1 mol·L⁻¹ AlCl₃ 水溶液 1,1.5,2,2.5,3 mL,加入 80% 的乙醇溶液至 10 mL,摇匀,用紫外-可见分光光度计,进行全波长扫描,测定最大吸收波长以及吸光度(A)。AlCl₃ 用量为 3 mL (最大吸收波长 λ_{max} = 403 nm) 反应达到饱和,故选用 0.1 mol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液 3 mL 作为显色剂(图 2)。

2.3.2 NaAc 溶液加入量 精密吸取供试液 6 份,每份 0.5 mL,加入 0.1 mol·L⁻¹ AlCl₃ 水溶液 3 mL,分别加入 NaAc 溶液 1,2,3,4,5,6 mL,加入 80% 的乙醇溶液至 10 mL,摇匀,进行全波长扫描,测定最大吸收波长以及吸光度(A)。NaAc 用量为 3 mL (λ_{max} = 413 nm),故选用 1 mol·L⁻¹ NaAc 水溶液 4 mL 作为显色剂(图 2)。

2.3.3 平衡时间的考察 精密吸取供试品液 5 份,每份 0.5 mL,放入 10 mL 量瓶,并放置在 25 ℃ 的水浴中,加入 AlCl₃ 溶液 3 mL,NaAc 溶液 4 mL 之后,经过 2,4,6,8,10 min 之后取出,放冷到室温,再加入 80% 乙醇至刻度,全波长扫描测定 λ_{max} 处吸光度,结果 RSD 0.9%,说明反应时间短,2 min 内即可达到平衡。

2.3.4 显色温度的考察 精密吸取供试品液 5 份,每份 0.5 mL,按 2.3.3 项下方法,显色时间 2 min,分别在 20,30,40,50,60 ℃ 水浴中进行操作,进行全波长扫描,测定结果 50,60 ℃ 下有沉淀产生。在 20,30,40 ℃ 温度条件下,测得 RSD 2.0%,在 20 ~ 40 ℃,吸光度的变化不大,故采用 20 ℃ 水浴条件下进行显色。

故确定本实验的显色方法为:把 10 mL 量瓶中放入 20 ℃ 水浴锅中,加样品后,加入 0.1 mol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液 3 mL,然后加入 1 mol·L⁻¹ NaAc 溶液 4 mL,反应 2 min 后取出,用 80% 乙醇定容,溶液温度到室温即可测定。以样品空白,用 80% 乙醇同法制备参比溶液。采用所得的显色方法显色,对芦丁溶液和样品溶液进行全波长扫描,结果芦丁溶液的 λ_{max} = 417 nm,样品溶液的 λ_{max} = 413 nm,故采用样

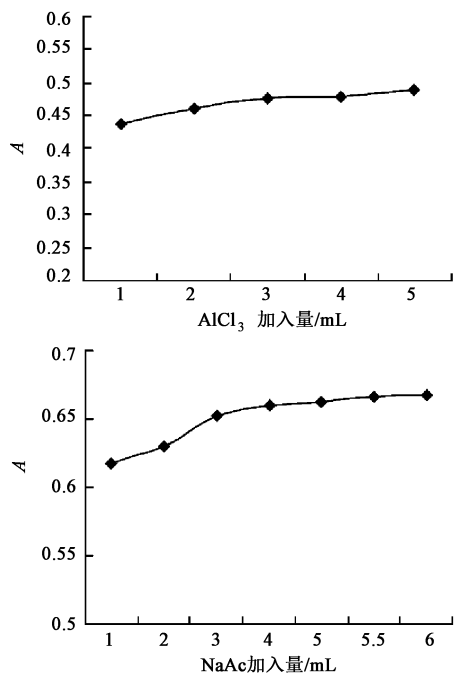


图 2 各显色试剂用量对吸光度的影响

品溶液的 λ_{max} = 413 nm 作为检测波长。

2.4 标准曲线的制作 精密吸取芦丁对照品溶液 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL,按 2.3 项下方法取进行显色,测定吸光度,以吸光度(Y)与质量浓度(X)绘制标准曲线,芦丁的回归方程为 $Y = 38.183X - 0.001$ ($r = 0.9998$);表明芦丁含量在 6.24 ~ 21.84 μg 其质量浓度与吸光度呈良好线性关系。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 精密吸取对照品溶液 6 份,每份 1 mL,按 2.3 项下方法取进行显色,测定吸光度,RSD 1.4%。

2.5.2 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,按 2.3 项下方法显色后,分别于 0,15,30,60,90,120 min 之后测定吸光度,计算 RSD 0.4%,表明其在显色后的 120 min 内稳定性较好。

2.5.3 重复性试验 精密称取杠板归药材约 0.4 g,共 6 份,按 2.2 项下方法制备杠板归供试品溶液;按上述显色方法显色,测定吸光度,杠板归中总黄酮的平均含量为 2.06%,RSD 1.6%;表明该方法重复性好。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取杠板归药材约 0.2 g,加入 3 个不同质量浓度的芦丁,质量浓度分别为供试品浓度的 0.8,1,1.2 倍,每个浓度制作 3 份进行测定,结果平均加样回收率为 97.4%,RSD

2.2%, 见表 1。

2.6 不同产地药材的含量测定 采用建立的含量测定方法, 分别对不同产地杠板归药材中总黄酮的含量进行测定, 结果见表 2。

表 1 杠板归中芦丁加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	\bar{x} /%	RSD /%
1	0.195 6	4.03	3.30	7.19	96.0		
2	0.193 0	3.98	3.30	7.08	94.2		
3	0.197 4	4.07	3.30	7.36	99.8		
4	0.196 4	4.05	4.12	8.15	99.7		
5	0.200 1	4.12	4.12	8.17	98.2	97.4	2.2
6	0.198 0	4.08	4.12	8.02	95.6		
7	0.196 2	4.04	4.94	8.96	99.5		
8	0.195 3	4.02	4.94	8.74	95.4		
9	0.197 2	4.06	4.94	8.90	97.8		

表 2 不同产地杠板归总黄酮含量测定 (n = 3) %

产地	采集时间	平均含量
湖南辰溪	2008-08-15	1.15
安徽大别山	2008-08	1.04
花溪区高坡	2008-06	1.76
花溪区牛郎关大兴田	2009-08-09	2.06

3 讨论

总黄酮的含量测定一般采用亚硝酸法 (NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH), 但该方法也存在一些缺点。郭亚健^[6]等以芦丁为对照品, 运用该方法测定多种黄酮及非黄酮化合物在 400 ~ 700 nm 的吸收曲线, 结果总黄酮方法专属性差, 有些黄酮类物质在 500 nm 处无最大吸收或吸收很弱, 而有些非黄酮类物质在 500 nm 处有最大吸收或有较强吸收, 非黄酮类物质 (如咖啡酸) 在 500 nm 左右有最大吸收, 而赵超^[7]等从杠板归中分离到咖啡酸, 刘青^[8]等测定杠板归药材中咖啡酸的含量, 若采用该显色方法测定, 所测含量可能偏大。在测定总黄酮含量的文献报道中, 有部分采用三氯化铝法^[9-11]进行测定; 采用 2.3 项下方法对咖啡酸对照品溶液进行显色, 测得 $\lambda_{\text{max}} = 342 \text{ nm}$, 在可见光区基本无吸收, 故本实验采用三氯化铝显色法进行, 但文献中该显色方法不固定, 故本

实验对显色剂的用量进行了考察。

对显色方法的考察, 当加入 AlCl_3 溶液时, 样品溶液 $\lambda_{\text{max}} = 403 \text{ nm}$, 再加入 NaAc 溶液, $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$, 吸光度值也增加, 芦丁对照品也出现这样的现象, 这是由于醋酸根离子对黄酮类化合物作用, 产生红移, 使得 λ_{max} 向可见光区偏移; NaAc 溶液的加入也使得吸光度增加, 故加入 NaAc 溶液。本实验样品溶液制备方法中, 用 80% 乙醇在 80 °C 水浴中回流提取; 一般提取温度保持在沸点以下或煮至近于沸点, 即所谓的微沸状态, 溶剂重复的蒸发、冷凝, 起到搅拌的作用, 低温对物质的损坏较少; 80% 乙醇在 80 °C 温度下处于微沸状态, 证明杠板归总黄酮的提取可能符合这一理论。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:155.
 [2] 李红芳, 赵友兴, 钱金楸, 等. 杠板归化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 86(27):11793.
 [3] 刘玉梅, 范文昌. 杠板归药理作用与临床应用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6):162.
 [4] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000:869.
 [5] 赵超, 陈华国, 龚小见, 等. 杠板归的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2010(3):365.
 [6] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2):98.
 [7] 赵超, 周欣, 秦翱, 等. 杠板归的化学成分研究[J]. 中成药, 2009, 31(10):1610.
 [8] 刘青, 黄家宇, 薛静, 等. 杠板归药材中咖啡酸的含量测定[J]. 临床医药实践, 2009, 18(6):1803.
 [9] 邢攀科, 杨洁红, 张宇燕, 等. 大孔吸附树脂分离纯化补阳还五汤中总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):2.
 [10] 宋学立, 杨维高. 正交设计法研究月腺大戟注射液最佳生产工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(5):14.
 [11] 赵法兴, 张亚梅, 郝岗平. 二仙汤有效部位群大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):24.

[责任编辑 顾雪竹]