

紫外分光光度法测定青天葵药材总黄酮含量

徐灵源, 谢集照, 谢云峰, 邱莉*, 秦箬, 黄桂坤, 谢婷
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 建立一种青天葵药材中总黄酮含量测定的方法, 并考察 14 批青天葵药材中总黄酮的含量。方法: 以芦丁为对照品, $\text{AlCl}_3\text{-HAc-NaAc}$ (pH 5.5) 为显色体系, 采用紫外分光光度法于最大吸收波长 405 nm 处测定。结果: 芦丁在 $7.28 \sim 30.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好 ($r = 1.000$), 总黄酮平均回收率为 100.73%, RSD 1.92%。14 批青天葵药材中, 总黄酮含量范围为 1.25% ~ 3.12%。结论: 该方法操作简便、快速、准确、稳定可靠, 可用于青天葵药材中总黄酮的含量测定。

[关键词] 青天葵; 总黄酮; 紫外分光光度法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0088-03

Total Flavonoids Determination of *Nervilia fordii* by Ultraviolet Spectrophotometry

XU Ling-yuan, XIE Ji-zhao, XIE Yun-feng, QIU Li*, QIN Qing, HUANG Gui-kun, XIE Ting
(School of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** A method for the quality control of *Nervilia fordii* was developed, and the quality of 14 batches of *N. fordii* purchased from different markets was investigated. **Method:** Rutin and $\text{AlCl}_3\text{-HAc-NaAc}$ (pH 5.5) system were employed as reference substance and chromogenic reagent, respectively, the total flavonoids of *N. fordii* were measured by UV spectrophotometry at the 405 nm. **Result:** The linear relationship of rutin was in the range of $0.00728\text{-}0.0308 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r = 1.000$). The average recovery was 99.78% (RSD 1.94%). The range of the amount of the total flavonoids of 14 batches of *N. fordii* was 1.25% -3.12%. **Conclusion:** This method was proved to be simple, quick, accurated, stable and reliable, and it could be used to determine the total flavonoids of *N. fordii*.

[Key words] *Nervilia fordii*; total flavonoids; UV spectrophotometry

青天葵来源于兰科植物毛唇芋兰的全草或块茎, 具有润肺止咳、清热解毒、散瘀止痛、健脾消积等功效^[1-2]。在东南亚以及我国两广地区, 青天葵是民间习用的凉茶, 是我国传统出口的名贵药材。近年来, 关于青天葵药材的植物化学成分、药理活性物质基础方面的研究正在积极开展^[3-11], 但能够代表

青天葵临床应用药理活性的专属性指标成分尚未明确。目前的研究进展表明, 黄酮及其苷类物质是青天葵中一类主要的植物化学成分, 甄汉深等研究发现青天葵中的黄酮类化合物鼠李柠檬素具有一定的体外抗肿瘤活性^[12]。因此, 本文建立了青天葵中总黄酮含量的测定方法, 对青天葵药材质量控制具有重要的参考意义。

1 仪器与试剂

UV3010 型紫外分光光度计 (日本岛津), KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂制造), GR-202 1/10 万电子天平 (日本 AND), 超纯水机 Milli-Q Academic (美国 Millipore 公司), HB43 水分测定仪 (德国梅特勒-托利)。

[收稿日期] 20111105(003)

[基金项目] 广西自然科学基金项目 (桂科 0991026); 广西医科大学博士科研启动基金项目 (304203)

[第一作者] 徐灵源, 在读硕士研究生, 从事中药质量控制研究, E-mail: xly1813@126.com

[通讯作者] * 邱莉, 副教授, 博士, 从事中药药效物质基础及中药质量控制研究, Tel: 0771-5360143, E-mail: qlydmyyq@163.com

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号100080-200306),水(超纯水),甲醇、乙醇、石油醚(60~90℃)、 AlCl_3 , NaOH , NaNO_2 , $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,无水醋酸钠、冰醋酸等试剂均为分析纯。

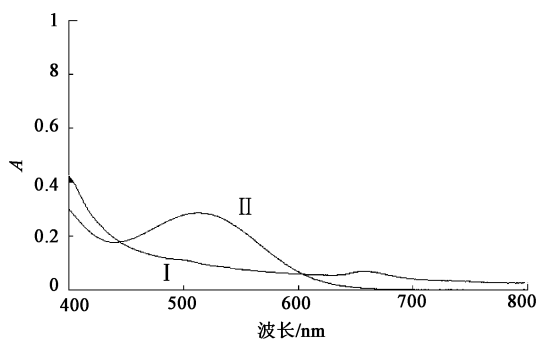
14批青天葵药材均经广西壮族自治区食品药品监督管理局韦家福主任中药师鉴定为 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 的全草。分别购买自广西、广东、云南、四川及香港的药材市场。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品35.0 mg,置20 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制得每1 mL含芦丁1.75 mg的对照品贮备液;精密吸取芦丁对照品贮备液4 mL置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 $0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。

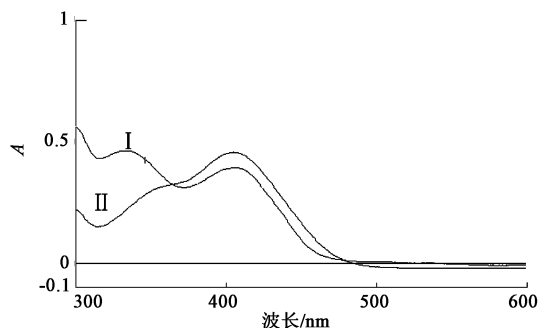
2.2 供试品溶液的制备 青天葵药材于60℃干燥4 h,粉碎后过4号筛,称取1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加石油醚(60~90℃)50 mL,超声处理30 min,取出,静置后过滤,除去石油醚液,重复3次,挥干药渣中的石油醚,精密加入70%乙醇75 mL,称定质量,超声处理60 min,取出,放冷,称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 显色体系和测定波长的选择 以芦丁为对照品,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色体系测定青天葵总黄酮时,在200~800 nm波长芦丁对照品及青天葵样品没有重叠的最大吸收波长(图1)。因此,对不同的显色体系及相应的测定波长进行了考察,最终确定采用 AlCl_3 - HAc - NaAc (pH 5.5)为显色体系。在200~800 nm扫描,芦丁对照品及青天葵样品在405 nm处有重叠的最大吸收波长(图2),故选择405 nm作为总黄酮的测定波长。



I. 青天葵样品; II. 芦丁对照品

图1 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色体系下紫外光谱



I. 青天葵样品; II. 芦丁对照品

图2 AlCl_3 - HAc - NaAc (pH5.5)显色体系下紫外光谱

2.4 标准曲线的制备 分别精密吸取芦丁对照品溶液($C = 0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)0, 1.3, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 mL置25 mL量瓶中,加 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AlCl_3 溶液1.5 mL,加 HAc - NaAc 缓冲溶液(pH 5.5)1 mL,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。以相应试剂为空白,在405 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,对照品质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程为 $A = 0.0268C + 0.0058$ ($r = 1$)。结果表明,芦丁在 $7.28 \sim 30.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液1.0 mL,按2.4项下操作,连续测定6次吸光度,结果RSD 1.30%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液,按2.4项下操作,每隔20 min测定1次吸光度,分别于0, 20, 40, 60, 80, 100 min测定其吸光度,RSD 1.02%,结果表明,供试品溶液在100 min内吸光度基本没有变化,稳定性良好。

2.7 重复性试验 平行称取同一批样品6份,每份约1 g,精密称定。按2.2项下操作制备样品溶液,按2.4项下操作,测定吸光度,计算样品中总黄酮含量,得出RSD 2.55%。

2.8 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的青天葵样品6份,每份约0.5 g,精密称定。每份均分别精密加入一定量的芦丁对照品,按2.2项下操作制备供试品溶液;按2.4项下操作测定各份样品的吸光度,计算回收率。结果表明平均回收率为100.73%,RSD 1.92%,说明该方法的准确性良好。见表1。

2.9 14批青天葵药材总黄酮的含量测定 分别称取从广西、广东、四川以及香港药材市场上购买的14批青天葵药材,每份约1 g,精密称定。按2.2项下制备供试品溶液,按2.4项下操作测定吸光度,计算样品总黄酮的含量,结果见表2。

表 1 青天葵药材中芦丁加样回收率试验考察

No.	称样量 /g	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.542 3	8.32	7.50	14.90	98.64		
2	0.504 3	7.73	7.50	14.86	98.14		
3	0.503 8	7.72	7.50	15.17	102.20		
4	0.505 8	7.75	7.50	15.08	101.06	100.73	1.92
5	0.524 5	8.04	7.50	15.22	102.94		
6	0.508 5	7.79	7.50	15.10	101.37		

表 2 14 批青天葵药材总黄酮含量测定数据 (n=2) %

No.	水分	含量	No.	水分	含量
S1(广西)	11.25	1.98	S8(云南)	10.84	1.52
S2(广西)	12.48	2.25	S9(云南)	10.26	1.32
S3(广西)	11.47	1.25	S7(云南)	11.24	2.44
S4(广东)	12.09	2.36	S11(香港)	10.23	1.40
S5(广东)	10.65	3.12	S12(香港)	9.44	1.54
S6(广东)	10.43	2.58	S13(香港)	8.97	2.22
S10(四川)	9.84	1.60	S14(香港)	9.34	1.71

注:水分测定参照《中国药典》(2010 年版)方法,用水分快速测定仪测定。

3 讨论

紫外分光光度法测定中药材中总黄酮含量时,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色体系针对具有邻二酚羟基结构片段的黄酮类成分具有很好的显色效果^[13]。由于青天葵中所含有的黄酮类成分结构中普遍缺乏邻二酚羟基结构片段^[3-6,11],采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色体系时,青天葵样品与芦丁对照品在 200~800 nm 波长没有重叠的最大吸收波长(图 1)。青天葵中所含黄酮类成分主要为 5 位—OH,4 位 $\text{C}=\text{O}$ ^[3-6,11],在酸性环境下易与 Al^{3+} 络合,产生的络合物在 400 nm 左右有最大吸收,且这个反应具有专属性。因此,我们采用 $\text{AlCl}_3\text{-HAc-NaAc}$ 为显色体系,并对该显色体系不同的 pH 条件进行了考察,从而确定了显色条件为 $\text{AlCl}_3\text{-HAc-NaAc}$ (pH 5.5),检测波长为 405 nm。

青天葵药材中茎叶部位较多,未经脱脂处理的供试品溶液在最大吸收波长 405 nm 处测定时干扰较大。因此,本研究考察了样品用石油醚超声脱脂的条件。分别采用石油醚(60~90℃)对样品进行脱脂 5 次,每次 50 mL,超声处理 30 min。结果表明,样品采用石油醚(60~90℃)超声脱脂 3 次后,含量即可保持基本恒定,因此确定样品脱脂条件为加石油醚(60~90℃)超声 3 次,每次 50 mL,每次 30 min。

考察了甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、乙醇、50% 乙

醇、70% 乙醇等提取溶剂的提取效率,结果表明 70% 乙醇、70% 甲醇提取较为完全,考虑到操作的安全性因素,故采用 70% 乙醇作为提取溶剂。对提取溶剂的用量、提取时间进行了考察,结果以 70% 乙醇为提取溶剂,样品量与提取溶剂用量为 1:75 时提取效果较好,提取时间为 60 min 时已基本提取完全。

14 批青天葵样品中总黄酮含量在 1.25%~3.12%,不同批次的青天葵总黄酮含量差别较大,从广东市场来源的青天葵药材总黄酮含量较高(3 批),其平均含量达 2.69%,其他市场来源的青天葵总黄酮含量则无明显差异。

【参考文献】

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 下册 [M]. 北京:人民卫生出版社,1996:340.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 8 册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:740.
- [3] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中药材,2007,30(8):942.
- [4] 卢传礼,周光雄,王恒山,等. 青天葵中酚性成分研究 [J]. 中药材,2009,32(3):373.
- [5] Tian L W, Pei Y, Zhang Y J, et al. 7-O-methylkaempferol and quercetin glycosides from the whole plant of *Nervilia fordii* [J]. J Nat Prod, 2009, 72:1057.
- [6] Zhou G X, Lu C L, Wang H S, et al. An acetyl flavonoid from *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(6):498.
- [7] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵活性部位的体内抗肿瘤作用研究 [J]. 中药材,2007,30(9):1095.
- [8] 王振华,杜秦,张奉学. 青天葵抗甲、乙型流感病毒研究 [J]. 时珍国医国药,2007,18(12):2490.
- [9] 范文昌,梅全喜,高玉桥. 12 种广东地产的清热解毒药的镇痛作用实验研究 [J]. 今日药学,2010, 20(2):12.
- [10] 杜秦,叶木荣,黄振华. 青天葵镇咳、平喘药理作用研究 [J]. 广州:广州中医药大学学报,2006,23(1):45.
- [11] 谢友良. 南药青天葵的抗急性肺损伤作用机理及其质量标准研究 [D]. 广州:广州中医药大学博士学位论文,2008.
- [12] 甄汉深,周燕园,袁叶飞,等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):36.
- [13] 刘东平,周亚球,王先荣. 罗布麻叶总黄酮的方法探讨 [J]. 时珍国医国药,2007,18(3):614.

[责任编辑 顾雪竹]