

苦参汤有效部位总黄酮含量测定方法研究

刘 斌, 石任兵, 周素蓉
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要:目的: 建立苦参汤有效部位中总黄酮含量测定方法。方法: 以黄芩苷为对照品, 采用盐酸-镁粉反应比色法测定总黄酮含量。结果: 黄芩苷在 6.971~34.857 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系, 回归方程为 $C = 0.0221A + 0.0053$ ($r = 0.9994$)。黄芩苷平均回收率为 103.59%, $\text{RSD} = 0.74\%$ ($n = 5$)。结论: 3 批样品测定结果表明, 所建立的方法简便、准确, 可用于苦参汤有效部位总黄酮含量测定。

关键词: 苦参汤; 总黄酮; 盐酸-镁粉反应比色法

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)06-0024-03

Study on the Method of Determination of the Contents of Total Flavonoids in the Effective Fraction of Kushen Decoction

LIU Bin, SHI Ren-bing, ZHOU Su-rong

(The College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Objective To establish the method for the determination of the content of total flavonoids in the effective fraction of Kushen decoction. Methods The content of total flavonoids was determined with HCl-Mg reaction colorimetry, and selected baicalin as reference substance. Results Baicalin had a liner relationship with the absorbance in the range of 6.971~34.857 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the regression equation was as follows: $C = 0.0221A + 0.0053$ ($R^2 = 0.9994$). The average recovery for baicalin was 103.59%. $\text{RSD} = 0.74\%$ ($n = 5$). Conclusion The determination of the contents of total flavonoids of three batches of samples showed that the method was easy and accurate, and could be used to determine the contents of total flavonoids in the effective fraction of Kushen decoction.

Key words: Kushen Decoction; Total Flavonoids; HCl-Mg Reaction Colorimetry

苦参汤始载于《千金方》, 由苦参、黄芩、地黄三味中药组成, 具有清热燥湿、泻毒养阴的功效, 用治“热病五六日以上, 热交营分彻外壮热, 用苦参以燥湿除热, 搜逐肾家久伏之邪, 黄芩以泄肌肤之热, 生地以清血脉之邪”^[1]。现代主要用于治疗阴道炎、泌尿道感染、淋病、慢性结肠炎、慢性肝炎、病毒性心肌炎、心律失常、冠心病以及多种皮肤病等^[2-4]。我们运用复方有效部位研究思路与方法^[5], 对苦参汤有效部位进行了分离富集, 并且根据复方有效部位及其主要化学成分的研究分析, 确定以复方有效部位中总生物碱、总黄酮以及主要有效成分苦参碱、氧化苦参碱、黄芩苷的含量为指标, 控制和评价苦参汤有效部位的质量。本文首先报道了苦参汤有效部位中总黄酮的含量测定方法, 并对 3 批样品进行了含量测定。

1 仪器与试剂

1/100000 电子分析天平(日本岛津公司); Hitachi U-2000 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

苦参、地黄、黄芩药材购自北京同仁堂医药集团北城批发部, 经鉴定分别为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根和唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 黄芩苷对照品(供含量测定用)购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 供试液制备 对照品溶液: 精密称取黄芩苷对照品适量, 加 50% 乙醇制备成 0.1mg/mL 的对照品溶液。

样品溶液 I: 精密称取苦参汤有效部位约 6mg, 置 5mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为样品溶液 I。

样品溶液 II: 根据苦参汤原方比例, 称取苦参、黄芩二药, 混合, 按苦参汤有效部位制备工艺制备样品后, 采用样品溶液 I 制备方法制备样品溶液 II。

阴性样品溶液: 根据苦参汤原方比例称取地黄, 按苦参汤有效部位制备工艺制备阴性样品后, 采用样品溶液 I 制备方法制备阴性样品溶液。

2.2 显色试剂及测定波长的选择 盐酸-镁粉反应显色法: 精密吸取黄芩苷对照品溶液 2mL, 样品溶液 I、II 及阴性样品溶液各 0.5mL, 置加有镁粉 300mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴 (15℃左右) 中, 缓慢滴加浓 HCl 3mL, 并不时振摇试管。最后加 50% 乙醇补足至 7mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60min, 取出, 迅速冷却至室温, 在 400~700nm 范围内扫描测定吸收光谱。

Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 显色法: 精密吸取黄芩苷对照品溶液 3mL, 样品溶液 I、II 及阴性样品溶液各 2mL, 分别加入 5% NaNO₂ 1.0mL, 放置 6min, 然后加入 10% Al(NO₃)₃ 1.0mL, 混匀, 放置 6min, 再加入 10% NaOH 10mL, 用水稀释至 25mL, 放置 15min。在 400~700nm 范围内扫描测定吸收光谱。

AlCl₃ 显色法: 精密吸取黄芩苷对照品溶液 3mL, 样品溶液 I、II 及阴性样品溶液各 2mL, 分别置 10mL 量瓶中, 加入 0.1mol/L AlCl₃ 1.0mL, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 置 70℃水浴中, 加热 10min, 取出, 放置 15min。在 400~700nm 范围内扫描测定吸收光谱。

比较上述 3 种显色方法, 用盐酸-镁粉反应显色后, 黄芩苷对照品、样品 I (苦参汤有效部位)、样品 II 的 λ_{max} 基本一致, 均为 431 ± 1.5nm, 而且重现性好, 同时阴性样品显色前后及相应样品显色前在该波长处均无明显吸收。而用 Al(NO₃)₃-NaNO₂-NaOH 和 AlCl₃ 两种显色方法显色, 黄芩苷对照品和各样品在显色前后, 其吸收光谱均无明显位移, 在 400~700nm 范围无明显吸收峰。故选择盐酸-镁粉反应显色法, 在 431 ± 1.5nm 波长处测定苦参汤有效部位总黄酮含量。

2.3 显色条件考察

2.3.1 加热时间考察 精密吸取黄芩苷对照品溶液和样品溶液 I 各 5 份 (黄芩苷对照品溶液每份 2mL, 样品溶液 I 每份 0.3mL), 置加有镁粉 300mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴 (15℃左右) 中, 缓慢滴加浓 HCl 3mL, 并不时振摇试管。最后加 50% 乙醇补足至 7mL, 摇匀, 置沸水浴中分别加热

20、40、60、80、100min, 取出, 迅速冷却至室温, 依法测定吸光度。结果见表 1。结果显示加热 60min, 吸光度最大。

表 1 加热时间考察结果

加热时间 (min)	黄芩苷吸光度	样品 I 吸光度
20	0.444	0.305
40	0.488	0.307
60	0.514	0.463
80	0.511	0.433
100	0.399	0.369

2.3.2 镁粉用量考察 精密吸取黄芩苷对照品溶液和样品溶液 I 各 6 份 (黄芩苷对照品溶液每份 2mL, 样品溶液 I 每份 0.3mL), 分别置加有不同量镁粉的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴 (15℃左右) 中, 缓慢滴加浓 HCl 3mL, 并不时振摇试管。最后加 50% 乙醇补足至 7mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60min, 取出, 迅速冷却至室温, 依法测定吸光度。结果见表 2。结果显示镁粉用量为 300mg 时, 吸光度最大。

表 2 镁粉用量考察结果

用量 (mg)	黄芩苷吸光度	样品 I 吸光度
100	0.470	0.192
150	0.527	0.205
200	0.569	0.250
250	0.579	0.326
300	0.618	0.389
350	0.511	0.376

2.4 显色稳定性考察 精密吸取黄芩苷对照品溶液 2mL、样品溶液 I 0.3mL, 依法显色后放置不同时间, 测定吸光度。结果见表 3。由结果可知, 黄芩苷对照品和样品溶液 I 显色后 1h 内基本稳定, 吸光度相对标准偏差 RSD 分别为 1.31% 和 1.06%。

表 3 显色稳定性考察结果

放置时间 (min)	黄芩苷吸光度	样品 I 吸光度
10	0.679	0.463
20	0.669	0.472
30	0.666	0.474
40	0.663	0.474
50	0.657	0.476
60	0.655	0.477

2.5 线性关系考察 精密吸取黄芩苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5mL, 置加有镁粉 300mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴 (15℃左右) 中, 缓慢滴加浓 HCl 3mL, 并不时振摇试管。最后加 50%

乙醇补足至 7mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60min, 取出, 迅速冷却至室温, 于 431nm 处测定吸光度。以黄芩苷对照品浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得到回归方程:

$$C = 0.0221A + 0.0053 (r = 0.9994)$$

结果表明, 黄芩苷在 6.971~ 34.857 μ g/mL 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.6 精密度考察 精密吸取样品溶液 I 5 份, 每份 0.5mL, 按样品含量测定项下方法测定吸光度, 计算含量, 结果见表 4。结果表明, 该方法精密度良好。

表 4 精密度考察结果(%)

编号	含量	平均含量	RSD
1	20.67		
2	21.21		
3	20.02	20.95	2.96
4	21.45		
5	21.51		

2.7 重复性考察 取样品 I 5 份, 每份约 6mg, 精密称定, 置 5mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 0.5mL, 按样品含量测定项下方法测定吸光度, 计算含量, 结果见表 5。结果表明, 该方法重复性良好。

表 5 重复性考察结果(%)

编号	含量	平均含量	RSD
1	24.15		
2	23.72		
3	23.74	24.01	2.19
4	23.57		
5	24.87		

2.8 样品稳定性考察 取样品 I, 分别于配置溶液后 0.1 2 3 4 6 8h, 精密吸取 0.5mL, 按样品含量测定项下方法测定吸光度, 计算含量, 结果见表 6。结果表明, 样品溶液在 8h 内稳定。

表 6 样品稳定性考察结果(%)

时间(h)	含量	平均含量	RSD
0	24.15		
1	24.15		
2	23.68	24.26	2.72
3	23.68		
4	24.73		
6	25.51		
8	23.89		

2.9 回收率试验 取样品 I 5 份, 每份约 3mg, 精密称定, 置 5mL 量瓶中, 分别精密加入浓度为 0.24mg/mL 的黄芩苷对照品溶液 3mL, 再加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 0.5mL, 按样品含量测定项下方法测定含量, 计算平均回收率为

103.59%, RSD= 0.74%。结果见表 7。

表 7 回收率试验结果

编号	样品称样量 (mg)	样品中黄酮含量 (mg)	加入黄芩苷量 (mg)	回收率 (%)
1	2.97	0.7296		104.01
2	2.93	0.7032		102.57
3	3.00	0.7272	0.72	102.99
4	3.04	0.7128		104.04
5	3.06	0.7344		104.35

2.10 样品含量测定 取苦参汤有效部位约 6mg, 精密称定, 置 5mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述溶液 0.5mL、黄芩苷对照品溶液 1.0 和 2.0mL, 置加有镁粉 300mg 的具塞刻度试管中。将试管置冷水浴(15℃左右)中, 缓慢滴加浓 HCl 3mL, 并不时振摇试管。最后加 50% 乙醇补足至 7mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 60min, 取出, 迅速冷却至室温, 于 431nm 处测定吸光度。外标两点法计算含量, 结果见表 8。

表 8 苦参汤有效部位总黄酮含量测定结果(%, n=3)

样品	总黄酮含量	RSD
1	23.32	2.32
2	26.56	2.18
3	22.20	2.70

3 讨论

黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇均易在盐酸-镁粉作用下被还原, 生成橙红到红紫色物质, 该反应宜在 15℃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, 使产生的氢原子与黄酮类物质充分反应; 但滴加浓盐酸的时间不宜超过 20min。在滴加浓盐酸的过程中, 一定要不时振摇试管, 使显色剂与样品充分接触, 样品体积较大时尤其要注意振摇, 才能充分显色。

参考文献:

[1] 清·张璐著. 千金方衍义[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1995. 220.

[2] 张政. 苦参汤新用举偶[J]. 陕西中医, 1998, 19(4): 175-177.

[3] 王雅娟, 董西林, 范引侠. 苦参汤治疗霉菌性阴道炎 120 例[J]. 陕西中医, 1999, 20(1): 28-29.

[4] 李立. 苦参汤加味治疗慢性溃疡性结肠炎 28 例临床观察[J]. 甘肃中医, 1998, 11(2): 27-28.

[5] 梁吉春, 石任兵, 刘斌, 等. 银翘散研究方法的新探讨[J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(1): 37-38.