DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00893

分光光度测定总黄酮法的适用性

池玉梅* 居 羚 邓海山 姚卫峰 陆 丹
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

摘 要 为建立测定天南星总黄酮含量的方法, 通过比较黄酮及苷、黄酮醇及 3位苷共 12个化合物的 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH 法和 $AlCl_3$–KAc法的紫外和可见光谱, 分析了分光光度测定总黄酮法的适用性。结果显示, 与相应方法的有关原理相矛盾, 尤其是芦菜素及苷在两方法中均未有相应现象产生。为此, 进行了新方法研究, 比较了各黄酮在三乙胺介质中的紫外可见光谱, 结果显示, 黄酮及苷和 3-黄酮醇苷最大吸收均红移; 将三乙胺法应用于天南星, 方法验证结果符合含量测定要求, 对照品夏佛托苷在 1.54~ 21.5 mg/L范围内与吸光度有良好线性关系 (r= 0.9997), 平均回收率为 99.3% (RSD= 1.1%, n= 9)。方法重现性好, 可操作性强。适用性研究表明, 3种方法均只适用于部分黄酮类成分分析。

关键词 黄酮; 紫外可见分光光度法; 天南星; 三乙胺

1 引 言

黄酮类化合物 (Flavonoids)是广泛存在于自然界中的一大类化合物, 常以游离态或糖苷形式存在, 具有抗菌消炎、扩张冠状动脉、防治高血压及脑溢血、抗癌等多方面生物活性, 常作为药效学指标进行定性与定量分析[1]。总黄酮含量作为质量控制指标, 常采用可见分光光度法测定。应用较广的有 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH法和 $AlCl_3$–KAc法[2~5], 前者是基于具有 3-羟基、4-羰基或 5-羟基、4-羰基或邻二酚羟基的黄酮类化合物与 $NaNO_2$和 $Al(NO_3)_3$可形成配合物, 并在碱性条件下进一步重排成红色产物, 在 510 nm处有最大吸收[2,3]; 后者是依据具有 3-羟基、4-羰基或 5-羟基、4-羰基的黄酮与 Al^{3+}形成配合物使吸收峰红移的性质, 测定总黄酮含量。文献[6]报道, 应用 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH法检测槲皮素时, 在 510 nm处无最大吸收。本研究组在分析一些含黄酮中药, 如侧柏、天南星 (Rhizoma Arisaematis)时, 均未见有与上述两种方法相应的现象产生。

目前, 尚未见有关总黄酮可见分光光度测定法适用性的研究报道, 为此, 本研究以黄酮类化合物芦菜素及苷、槲皮素及苷等为研究对象, 比较了不同显色法的适用性, 同时依据黄酮在碱性介质中紫外可见光谱红移的性质, 以天南星为研究对象, 进行了总黄酮含量测定方法的研究, 弥补了现有方法的不足。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-2401分光光度计 (日本岛津公司); UV-752分光光度计 (上海分析化学仪器公司)。

芦菜素与杨梅素对照品 (> 98.5%, 上海融禾医药科技有限公司); 夏佛托苷和异夏佛托苷对照品 (> 98.5%, 自制)。其它对照品均购于中国生物制品检定所, 均配制成 1 g/L溶液备用; 试剂均为分析纯。

天南星药材, 产地分别为东北、江苏、安徽和四川, 经南京中医药大学药植鉴定专家王春根、谈献和等教授鉴定为天南星药典品种。

2.2 实验方法

2.2.1 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH法 取适量对照品溶液于 10 mL容量瓶中, 加 60%乙醇至 5 mL, 加 5% $NaNO_2$溶液 0.3 mL, 摇匀, 反应 6 min, 加 10% $Al(NO_3)_3$溶液 0.3 mL, 摇匀, 反应 6 min, 加 1 mol/L NaOH溶液 4.0 mL, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 10 min后以试剂空白作参比, 在 200~

2009-11-04收稿; 2009-12-24接受
本文系国家药典委员会资助项目 (No. Yz-133)
* E-mail: ymchi@njutcm.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

650 nm进行扫描分析。

2.2.2 $AlCl_3$–KAc法 取适量对照品溶液于 10 mL容量瓶中, 加 0.1 mol/L $AlCl_3$溶液 2 mL, 1 mol/L KAc溶液 3 mL, 用 60% 乙醇定容, 摇匀, 以试剂空白为参比, 在 200~650 nm进行扫描分析。

2.2.3 TEA法 取适量对照品溶液于 10 mL容量瓶中, 加 60% 乙醇至 5 mL, 以 1% 三乙胺(TEA)定容, 摇匀, 以试剂空白为参比, 在 200~650 nm进行扫描分析。

2.2.4 天南星总黄酮含量测定法 准确称定药材粉末约 0.6 g, 置具塞锥形瓶中, 加 60% 乙醇 50 mL, 密塞, 称重, 超声提取 45 min, 放冷, 称重, 用 60% 乙醇补足减失重量, 摇匀, 过滤。准确量取滤液 5 mL于 10 mL容量瓶中, 以 1% 三乙胺溶液定容, 摇匀, 按《中国药典》2005版一部附录 VA 紫外-可见分光光度法, 以试剂空白为参比, 在 400 nm波长处测定吸光度。

3 结果与讨论

3.1 现有方法的适用性分析

以 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH法分析了 12种对照品(终浓度均为 50 mg/L), 光谱见图 1A(10~12对照品的光谱图一致, 故仅列 10, 下同), 结果显示, 仅芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷在 510 nm处有最大吸收, 其余均未显示此现象。

以 $AlCl_3$–KAc法分析 12种对照品, 光谱见图 1B(终浓度均为 50 mg/L), 结果显示, 芹菜素及苷未有位移, 其余对照品的最大吸收均可位移至 400 nm以上, 但位移值有所不同。

分析 12种黄酮类化合物的结构, 均具有 3-羟基、4-羰基或 5-羟基、4-羰基或邻二酚羟基, 本实验结果与测定总黄酮方法的有关原理相矛盾, 具有 5-羟基、4-羰基结构的芹菜素及苷在两种方法中均未产生相应的现象。

3.2 三乙胺法的建立

芹菜素在不同酸度的溶液中的紫外可见光谱显示, 在 pH > 10的溶液中最大吸收红移, 比较了 $NH_3 \cdot H_2O$, TEA, NaOH等体系, 以 TEA体系最为方便和稳定。以 TEA法对 12个黄酮成分进行分析, 光谱见图 1C(对照品终浓度分别在 10~20 mg/L)。结果显示: 黄酮及苷和 3-黄酮醇苷的最大吸收峰均位移至 400 nm处, 但黄酮醇苷元的现象不一。

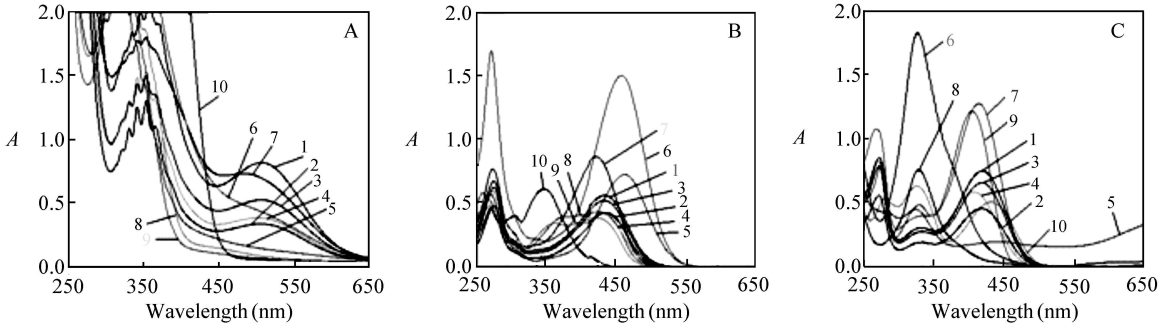

图 1 对照品显色溶液的紫外可见光谱图

Fig. 1 UV-Vis spectra of reference substance after reaction

A. $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH method; B. $AlCl_3$–KAc method; C 三乙胺法(Triethylamine, TEA method)。1. 芦丁(Rution); 2. 金丝桃苷(Hyperoside); 3. 异槲皮苷(Isoquercitrin); 4. 槲皮苷(Quercitrin); 5. 杨梅素(Myricetin); 6. 槲皮素(Quercetin); 7. 木犀草素(Luteolin); 8. 异鼠李素(Isorhamnetin); 9. 山萘素(Kaempfenol); 10. 芹菜素(Apipgenin); 11. 夏佛托苷(Schaftoside); 12. 异夏佛托苷(Isoschaftoside)。

采用超高效液相-二极管阵列-电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱分析天南星成分, 显示有 4组精确质量数一致的化合物, 经解析主要为苷元是芹菜素的双糖碳苷类黄酮, 结合文献[7]分析, 以夏佛托苷(芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-α-L-阿拉伯糖苷)含量为最高。

分别以 $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH和 $AlCl_3$–KAc法分析药材, 在 200~600 nm均未见有显著红移现象, 但在三乙胺介质中, 吸收峰红移至 400 nm处。此结果与对照品一致, 位移大于 60 nm, 并显示吸收

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

强度增加 (图 2与图 3)。

考察三乙胺用量的实验结果显示, 1%三乙胺的加入量大于 2 mL时, 吸光度无差异。考虑操作简便, 采用量取供试品溶液 5 mL于 10 mL容量瓶中, 用 1%三乙胺定容的方法。

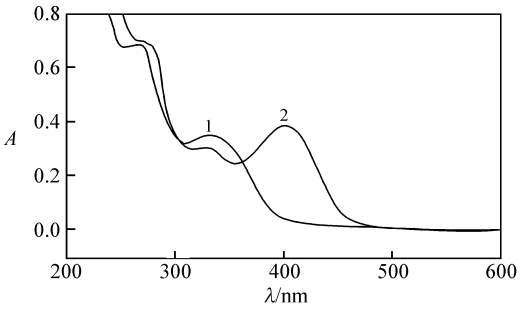

图 2　样品紫外可见光谱 (6 g/L)

Fig. 2　UV-Vis spectra of samples(6 g/L)

1. 不含三乙胺的样品溶液 (Sample without TEA); 2. 含三乙胺样品溶液 (Sample with TEA)。

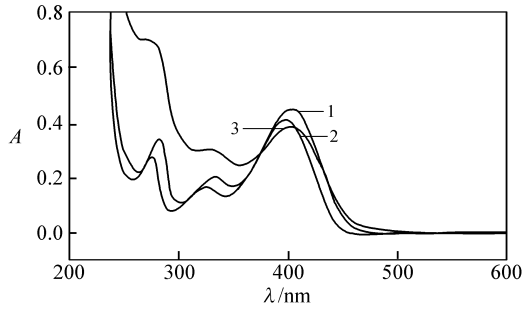

图 3　对照品和含三乙胺样品的溶液的紫外可见光谱

Fig. 3　UV-Vis spectra of reference substances & sample with TEA

1. 夏佛托苷 (Schaftoside) 10 mg/L; 2. 芹菜素 (Apigenin) 5 mg/L; 3. 样品 (Sample) 6 g/L。

3.3　三乙胺法的方法学考察

按 2005版《中国药典》附录ⅩⅧA“中药质量标准分析方法验证指导原则”, 进行了方法验证。结果显示: 夏佛托苷浓度在 1.54~21.5 mg/L范围内, 相应吸光度在 0.09~1.0范围内有良好线性, 回归方程为 $A = 0.0478C + 0.007$, 相关系数为 0.9997; 平均回收率为 99.3% (RSD = 1.13%, $n = 9$); 在 150 min内进行稳定性实验, RSD为 0.2%, 溶液稳定; 精密度与重复性实验的 RSD分别为 0.1%和 0.7%, 说明本方法符合定量测定要求。

3.4　三乙胺法的应用

以建立的分析方法对收集的 18批天南星进行了分析, 总黄酮含量以夏佛托苷 ($C_{26}H_{28}O_{14}$)计, 含量在 0.06% ~ 0.24%内, RSD均小于 2% ($n = 3$), 显示本方法可用于天南星总黄酮含量测定。

3.5　小结

实验结果说明, 现有的总黄酮含量测定法欠全面, $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH法测定含以 3-黄酮醇苷为主的总黄酮时, 对照品设置用槲皮素不太合理。适用性研究显示, 3种方法均只使部分黄酮类成分的紫外可见光谱红移, 都不能测定所有黄酮类成分的总含量。文献 [8]曾报道测定所有黄酮类成分的方法, 但鉴于方法的复杂性, 用于质量控制可操作性较差。因此, 在建立测定总黄酮含量方法时, 可根据中药中黄酮类成分常以一类结构成堆出现的现象, 应先分析黄酮类成分种类与结构, 再选择合适的测定方法。

本研究以 TEA为位移试剂, 克服了在强碱条件下显色溶液稳定性差的弊端, 溶液稳定, 应用于天南星中总黄酮含量测定, 方法操作简单, 重复性好。

References

1　LI Jian-Rong(励建荣), HAN Xiao-Xiang(韩晓祥). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(3): 365~368

2　CAI Bao-Chang(蔡宝昌). *Analysis of Chinese Medicine Preparation*(中药制剂分析), Higher Education Press (高等教育出版社), **2007**, 132, 271

3　LIANG Sheng-Wang(梁生旺). *Analysis of Chinese Medicine Preparation* (中药制剂分析), China Press of Traditional Chinese Medicine (中国中医药出版社), **2008**, 5, 110, 335

4　Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia-one* (中华人民共和国药典 一部), Chemical Industry Publishers(化学工业出版社), **2005**, 23, 39, 247, 541, 579

5　HE Shu-Mei(何书美), LIU Jing-Lan(刘敬兰). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(9): 1365~1368

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

6 GUO Ya-Jian(郭亚健), FAN Li(范 莉), WANG Xiao-Qiang(王晓强). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*(药物分析), **2002**, 22(2): 97~99
7 DU Shu-Shan(杜树山), LEI Ning(雷 宁), XU Yan-Chun(徐艳春). *Chinese Pharmaceutical Journaol*(中国药学杂志), **2005**, 40(19): 1457~1459
8 He X J, Liu D, Liu R H. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(20): 9337~9344

Suitability of Spectrophotometry for Determination of Total Flavonoids Spectrophotometry

CHI Yu-Mei*, JU Ling, DENG Hai-Shan, YAO Wei-Feng, LU Dan
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046)

Abstract To develop a method for determining the total flavonoids in Rhizoma Arisaematis, the suitability of $NaNO_2$–$Al(NO_3)_3$–NaOH and AlCl$_3$–KAc ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometric methods were studied by comparing the spectra of 12 compounds, containing flavonoids and their glycosides, flavonols and 3-flavonol glycosides. The results showed that the expected phenomenon of the apigenin and its glycosides did not appear. In the medium of triethylamine, theses compounds could produce a red shift of the maximum absorption. This phenomenon could be applied for determining the total flavonoids in Rhizoma Arisaemati. The method was verified to satisfy the requirements of quantitative analysis. There was a good linear relationship between the concentrations and the absorbance of schaftoside (the reference standard) in the ranges of 1.54–21.5 mg/L (r = 0.9997), and the average recovery was 99.3% (RSD = 1.13%, n = 9). The method, which is convenient and reproducible, can be used to control the quality of flavonoids.

Keywords Flavonoid; Ultraviolet-visible spectrophotometry; Rhizoma Arisaematis; Triethylamine
(Received 4 November 2009; accepted 24 December 2009)

《气相色谱在石油化工中的应用》

该书是色谱金属丛书中气相色谱在石油化工中的应用篇,针对石化分析的主要应用范围分别对一些重要的应用方法作了详尽的描述,重点讨论了各种方法的特点,总结了实际应用的经验。该书选择的方法兼顾了生产控制、产品标准和新的研究方法,包括了一些适用范围宽、可扩展性强、有行业特色和先进性的方法。

该书与一般标准分析方法手册相比,更强调方法原理的理解和如何应用的技巧。

该书可供石化领域的研究与工作人员、分析化学相关专业的师生及企业分析人员参考。

该书由杨海鹰等 编著,化学工业出版社出版,定价 35.00元。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net