

鬼箭羽总黄酮含量测定方法的建立

党晓芳,曹飒丽,祁娟娟,张慧,张晋,付京,陈杨,倪健*
(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:建立鬼箭羽总黄酮的含量测定方法并筛选其提取方法。方法:以芦丁为对照品,通过单因素试验优选显色方法和显色条件,建立总黄酮含量测定的方法学考察并优选其提取方法。结果:采用盐酸-镁粉反应比色法,芦丁在 0.020 ~ 0.104 mg 与吸光度呈良好线性关系($r=0.997$),平均加样回收率 99.424% (RSD 2.220%)。结论:盐酸-镁粉显色法具有精密度高、重复性好等优势,适用于鬼箭羽总黄酮的定量分析。鬼箭羽总黄酮的提取宜采用回流法。

[关键词] 鬼箭羽;总黄酮;显色条件;单因素试验;方法学考察;提取方式

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0096-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.20140900096

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000070.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:52

Optimization of Determination for Total Flavonoids in *Euonymus alatus*

DANG Xiao-fang, CAO Sa-li, QI Juan-juan, ZHANG Hui, ZHANG Jin, FU Jing, CHEN Yang, NI Jian*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of the content of total flavonoids in *Euonymus alatus*. **Method:** Selecting rutin as a reference substance, single factor tests were adopted to optimize colorimetry methods and conditions, determination of the content of total flavonoids was established and optimized its extraction method. **Result:** Hydrochloric acid-Mg reaction assay was adopted, rutin had a liner relationship with absorbance in the range of 0.021-0.104 mg ($r=0.997$), average recovery was 99.424% with RSD of 2.220%. **Conclusion:** HCl-Mg colorimetry method appeared to be an accurate, reliable and repeatable system for determination of total flavonoids in *E. alatus*. Total flavonoids in *E. alatus* should employ reflux extraction method.

[收稿日期] 20130829(012)

[基金项目] 北京中医药大学复方中药制药创新团队项目(2011-CX70-13)

[第一作者] 党晓芳,在读硕士,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:18810481585,E-mail:yangmuju@163.com

[通讯作者] *倪健,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:010-84738607,E-mail:njtem@263.net

[3]

FU Guang-miao, YU Bo-yang, ZHU Dan-ni. Study on Chemical Constituents from *Breynia fruticosa* [J]. J China Pharmaceutical University, 2004, 35(2):114.

[4]

张臻.金荞麦中表儿茶素提取工艺的研究[J].中国医药咨讯,2011,3(21):34.

[5]

吴昭璇,唐勇琛.贵州野生和栽培钩藤药材中表儿茶素的含量测定[J].华夏医学,2011,24(1):16.

[6]

辛敏通,杨滨,李化,等.高效液相色谱-电化学检测法测定金荞麦饮片中表儿茶素的含量[J].中国中药杂志,2006,31(2):117.

[7]

何美珊,钱炳辉,王兆龙,等.HPLC 法测定金荞麦中

(-)-表儿茶素含量[J].中草药,2005,36(3):441.

[8]

杨君,宋纯清,陈明,等.大叶钩藤中表儿茶素含量的测定[J].中草药,2000,31(9):662.

[9]

边宝林,王宏洁,司南.鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(6):31.

[10]

刘利娥,李红萍,吴予明,等.反相高效液相色谱法测定青英中表儿茶素含量[J].郑州大学学报:医学版,2010,45(1):132.

[责任编辑 顾雪竹]

[**Key words**] *Euonymus alatus*; total flavonoids; colorimetry conditons; single factor test; methodological study; extraction method

鬼箭羽味酸甘涩,性微寒^[1],具有破血、痛经、杀虫、散瘀止痛等功效,主治闭经、产后腹痛、虫积腹痛、跌打损伤等症^[2]。现代药理研究发现鬼箭羽中黄酮类化合物具有降血糖、调血脂及延缓动脉粥样硬化等作用^[3],但其含量测定的相关报道较少。本实验拟比较 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$, AlCl_3 , HCl-Mg 显色法对鬼箭羽总黄酮含量测定的影响,为鬼箭羽的质量控制提供参考。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司)。鬼箭羽购于北京同仁堂有限责任公司,经北京中医药大学药系刘春生教授鉴定为卫矛科植物卫矛 *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. 的干燥翅状枝条及其附属物;芦丁对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 129723),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 称取鬼箭羽药材 200 g,加 70% 乙醇 2 L 回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,减压回收乙醇并浓缩干燥,得鬼箭羽干膏;精密称取干膏 0.25 g,置 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶解并定容,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取芦丁对照品适量,加 70% 乙醇定容于量瓶中,制成 $0.020\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液,即得。

2.2 显色试剂及检测波长的选择

2.2.1 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法 精密移取对照品溶液和供试品溶液各 3.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加 5% NaNO_2 溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% NaOH 试液 10 mL,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,显色 15 min,以相应试剂为空白,于 400 ~ 700 nm 进行全波长扫描,结果供试品溶液在 500 nm 附近未见吸收峰。

2.2.2 AlCl_3 显色法 精密移取对照品溶液 3.0 mL 和供试品溶液 1.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}\text{AlCl}_3$ 1.0 mL,加 70% 乙醇定容,摇匀,显色 15 min,以相应试剂为空白,于 300 ~ 500 nm 进行紫外扫描,结果显示 400 nm 附近供试品溶液未见吸收峰。

2.2.3 HCl-Mg 显色法 精密吸取对照品溶液 3.0 mL 和供试品溶液 0.5 mL,分别置于加有镁粉 300 mg 的具塞试管中,将试管置冷水浴(约 15 ℃)中,缓慢滴加浓盐酸 3 mL 并不时振摇试管,加 70% 乙醇补足至 10 mL,摇匀,置沸水浴中加热 60 min,取出,迅速冷却至室温,以相应试剂为空白,于 400 ~ 700 nm 进行紫外扫描,结果发现二者的最大吸收波长基本一致,均为 $(524 \pm 1)\text{ nm}$,且重复性好。而用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaNO}_2\text{-NaOH}$ 和 AlCl_3 显色时,对照品溶液和供试品溶液在 400 ~ 700 nm 均无相应吸收峰,故采用 HCl-Mg 显色法,检测波长 524 nm。

2.3 显色条件考察

2.3.1 加热时间 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 3.0, 0.5 mL,各 5 份,分别置于加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法操作,依次置于沸水浴中分别加热 20, 40, 60, 80, 100 min,取出,迅速冷却至室温,于 524 nm 处测定吸光度(A),结果表明加热 60 min 时,供试品溶液与对照品溶液同时具有最大吸收,故确定 HCl-Mg 粉显色的加热时间 60 min。

2.3.2 镁粉用量 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 3.0, 0.5 mL,各 5 份,分别置于加有镁粉 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 g 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法操作,于 524 nm 处测定 A ,结果显示镁粉用量为 300 mg 时二者的 A 最大。

2.4 显色稳定性考察 分别精密量取对照品溶液 3.0 mL 和供试品溶液 0.5 mL,各 7 份,分别于显色后放置 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,按 2.2.3 项下方法测定,结果 A 的 RSD 分别为 0%, 0.369%,表明对照品溶液和供试品溶液显色后 1 h 内基本稳定。

2.5 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液适量,配制成不同质量浓度溶液,分别置于加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法于 524 nm 处测定 A ,以对照品用量为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 6.755X - 0.017$ ($r = 0.997$),表明芦丁在 0.020 ~ 0.100 mg 与 A 呈良好线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取芦丁对照品溶液 6 份,每份 3.0 mL,置加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法于 524 nm 处测定 A ,计算 RSD 0%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液 6 份,

每份 2.0 mL,置加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法于 524 nm 处测定 A,计算 RSD 1.606%,表明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 称取过四号筛鬼箭羽药材 6 份,每份 7.030 mg,各加入一定量芦丁对照品,加入 95% 乙醇溶液 80 mL 于 30 ℃ 超声(150 W,40 kHz) 3 h,将提取液蒸至无醇味,加 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,精密移取 2.0 mL 分别置于加有镁粉 300 mg 的具塞刻度试管中,按 2.2.3 项下方法于 524 nm 处测定 A,计算回收率,结果见表 1。

表 1 鬼箭羽总黄酮含量测定的回收率试验

No.	加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	7.026	14.033	99.673	99.424	2.220
2	7.029	13.937	98.266		
3	7.032	14.068	100.085		
4	7.033	13.782	96.003		
5	7.028	14.046	98.829		
6	7.026	14.245	102.689		

2.9 提取方法 考察取鬼箭羽药材,粉碎,过四号筛(60 目),精密称取 3 份,每份 1 g,各加入 95% 乙醇 80 mL,分别采用索氏法(索式提取 4 h)、超声法^[4](30 ℃ 超声 3 h,150 W,40 kHz)、回流法(90 ℃ 加热回流 3 h)提取,提取液分别蒸至无醇味,加 70% 乙醇定容至 50 mL 量瓶中,作为供试品溶液,按 2.2.3 项下方法于 524 nm 处测定 A,结果总黄酮提取量分别为 8.593,11.952,14.056 mg·g⁻¹。采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行 One-Way ANOVA 方差分析及 Student-Newman-Keuls(SNK)多重比较分析,结果见表 2,3。方差分析及 SNK 结果表明,3 种提取方法差异极显著($P < 0.01$),均有统计学意义,表明回流提取法可将鬼箭羽中黄酮类物质提取完全,且操作较索氏提取法简便,故选择回流法作为鬼箭羽总黄酮的提取方式。

表 2 鬼箭羽总黄酮含量测定的 One-Way ANOVA 统计分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
组间	0.456	2	0.228	153.945	0.000
组内	0.009	6	0.001		

表 3 鬼箭羽中总黄酮含量测定的 SNK 多重比较分析

组别	N	子集 $\alpha = 0.05$		
		索氏提取法	超声提取法	回流提取法
超声提取法	3	0.859		
索氏提取法	3		1.195	
回流提取法	3			1.406
Sig.		1.000	1.000	1.000

3 讨论

总黄酮含量测定的方法主要包括 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色法、AlCl₃ 显色法和 HCl-Mg 显色法^[5-6]。当黄酮化合物的 B 环中不存在 3',4'-邻位二酚羟基的结构时,NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 体系是无法显色的^[8];AlCl₃ 显色法^[9]反应主要发生在 3-羟基、4-羰基和邻二酚羟基,只存在 5-羟基、4-羰基的黄酮类物质与 AlCl₃ 不发生反应;鬼箭羽中香橙素、柚皮素等成分的结构较为特殊,使得这两种显色方法不能用于鬼箭羽黄酮类成分的测定。而黄酮、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,故采用 HCl-Mg 显色法。

[参考文献]

[1] 张丽芬,赵进喜. 中药鬼箭羽研究近况[J]. 中国中药杂志,2005,30(24):1895.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1695.

[3] 陈云华,龚慕辛,卢旭然,等. 鬼箭羽及同属植物主要药理作用及有效成分研究进展[J]. 北京中医药,2010,29(2):143.

[4] 倪帆呈,刘增辉,于楠楠,等. 超声波辅助提取槐角总黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):23.

[5] 赵大洲,徐本明,刘珂. 三氯化铝络合分光光度法测定淫羊藿中总黄酮含量[J]. 中草药,2004,35(2):213.

[6] 夏泉,黄赵刚,刘志荣,等. 淫羊藿总黄酮胶囊质量标准的研究[J]. 中国药师,2003,6(3):151.

[7] 刘立群. 有机理论与药物分析[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:344.

[8] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京:化学工业出版社,2004:196.

[责任编辑 刘德文]