

毛鸡骨草中总黄酮含量测定方法

袁旭江，张平，吴燕红，霍务贞
(广东药学院 中药研究开发所，广州 510006)

[摘要] 目的:建立毛鸡骨草总黄酮含量的专属性测定方法。方法:采用紫外-可见分光光度法研究三乙胺显色剂及其不同含水乙醇溶液对黄酮类成分光谱吸收变化影响。结果:不同黄酮类显色后光谱吸收峰变化存在明显差异;三乙胺法适应于芹菜素黄酮类含量测定,且不同体积分数乙醇对其吸收光谱具有显著影响,当加入 50% 乙醇显色后光谱吸收值稳定在 400 nm,经方法学考察,芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷对照品在 0.507 ~ 101.4 mg·L⁻¹ 与吸光度具有良好的线性关系($r = 0.999\ 5$),平均加样回收率为 98.01%,RSD 2.1%。结论:毛鸡骨草总黄酮含量的测定可采用三乙胺-50% 乙醇显色法,该方法对于芹菜素母核黄酮类具有良好的专属性和准确性,操作简单易行。

[关键词] 毛鸡骨草; 芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷; 总黄酮; 紫外-可见分光光度法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)11-0080-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110080

Determination of Total Flavonoids in *Abrus mollis* YUAN Xu-jiang, ZHANG Ping, WU Yan-hong, HUO Wu-zhen (Research & Development Institute of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To establish an exclusive method to determine the content of total flavonoids in *Abrus mollis*. Method: UV-VIS spectrophotometry was used to study the absorption spectrum changes of flavonoids in triethylamine (TEA) chromogenic agent with different concentrations of ethanol aqueous solution medium. Result: There was obvious difference between different flavonoids before and after coloration. The TEA method could be used to determine the content of apigenin flavonoids and and their absorption spectra were remarkably influenced by different concentrations of ethanol aqueous solution with the stable absorption wavelength of 400 nm after coloration in 50% ethanol aqueous solution. After the methodological study, 6-C-glycopyranosyl-8-C-glycopyranosyl apigenin had a good linearity in the ringe of 0.507-101.4 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 5$), the average recovery was 98.01% with RSD of 2.1%. Conclusion: The content of total apigenin flavonoids in *A. mollis* can be determined by the TEA method in 50% EtOH aqueous solution with good specificity, accuracy and simple operation.

[Key words] *Abrus mollis*; 6-C-glycopyranosyl-8-C-glycopyranosyl apigenin; total flavonoids; UV-VIS

毛鸡骨草为华南地区常用草药,常作鸡骨草的替代品使用,主产广东和广西^[1-2],用于治疗 and 预防急性慢性肝炎等^[3]。毛鸡骨草富含生物碱^[4]、皂苷类^[5]和酰胺酸类成分^[6],还含有丰富的芹菜素为母核的黄酮类成分,如芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷、芹菜素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷等^[7]。黄酮类成分紫外吸收光谱和显色现象受所含羟基数目和位置不同而不同。目前应用于

中药材中总黄酮含量测定的方法主要有 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法^[8], Al(NO₃)₃ 或 AlCl₃ 法^[9], NaOH 或三乙胺法(TEA)^[10]等。文献报道的毛鸡骨草总黄酮测定方法为芦丁-NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法^[8,11],该法对于毛鸡骨草总黄酮测定的吸收峰不一致。针对上述现象,本文通过比较分析芦丁、芹菜素、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷在不同溶剂及其显色前后的紫外吸收光谱的差异,建立适合于毛鸡骨草总黄酮含量测定的专属方法,为毛

鸡骨草总黄酮成分含量测定和质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器 UV-1700 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津), BS124S, BP211 型电子分析天平(德国 Sartorius)。

1.2 试剂与药品 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200306), 芹菜素对照品(阿拉丁试剂公司,批号 22806), 芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷对照品(自制,经 HPLC 检测纯度 > 99%);毛鸡骨草采自广西和广东,经广东药学院中药鉴定教研室李书渊教授鉴定为豆科植物毛相思子 *Abrus mollis* 的干燥全草;氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、三乙胺(TEA)、乙醇等试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 3 个黄酮成分显色现象差异

2.1.1 对照品溶液配制 分别取芦丁、芹菜素、芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷对照品各 2 份,精密称定,一份加 95% 乙醇,另一份加 50% 乙醇,分别制

表 1 3 个黄酮类成分显色前后光谱吸收峰比较

Table 1 Comparison of the spectral absorption peaks of three flavonoids before and after coloration

不同溶剂和显色方法	最大吸收波长/nm		
	芦丁	芹菜素	芹菜素-6- <i>C</i> -葡萄糖-8- <i>C</i> -葡萄糖苷
乙醇	360,275	326,292	340,275
50% 乙醇	360,275	340,275	340,275
TEA 法乙醇	400,280	360,300,280	380,275
TEA 法(50% 乙醇)	415,280	400,320,280	400,340,280
NaNO ₂ -Al(NO ₃) ₃ -NaOH 法	500,360,280	395,310,280	360,295
AlCl ₃ 法	415,300,280	390,340,300,280	385,340,300,280

由表 1 分析可见,芦丁和芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷在显色前不同乙醇溶剂中光谱未见变化,芹菜素的光谱吸收峰波长却存在变化;TEA 法中采用 95% 乙醇时三者的吸收光谱明显出现不同的吸收位移值,但在用 50% 乙醇作为溶剂时芦丁 UV 吸收波长红移至 415 nm,而芹菜素及其苷类均红移至 400 nm;在 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法和 AlCl₃ 法中 3 个黄酮成分均出现变化不同的 UV 吸收波长。结果表明,采用芦丁法难以用于评价含芹菜素类黄酮成分的药材质量,而芹菜素类黄酮成分在不同溶剂中 TEA 显色现象不同,主要受含水量的影响。

2.2 不同体积分数乙醇水对 TEA 法显色光谱影响 取芹菜素对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加

成含 0.5 g·L⁻¹ 的 2 种不同溶剂对照品溶液。

2.1.2 TEA 法 取 TEA 5 mL 置于 500 mL 的量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,配成 1% TEA 乙醇溶液。分别取对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 1% TEA 乙醇溶液 5 mL,摇匀,分别用 95% 乙醇 50% 乙醇定容至刻度,摇匀,测定。

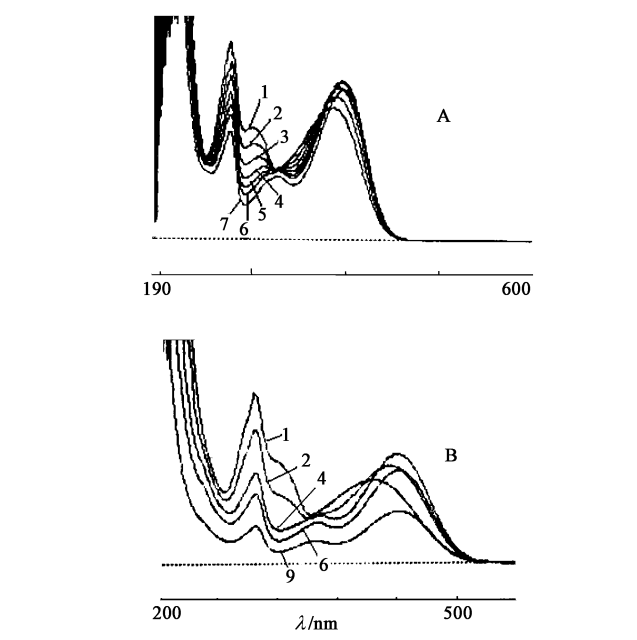
2.1.3 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 法 取对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加乙醇 4 mL,加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀,反应 6 min,加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀,反应 6 min,加 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 4.0 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,10 min 后测定。

2.1.4 AlCl₃ 法 取对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ AlCl₃ 溶液 2 mL,用 95% 乙醇定容,摇匀,测定。

2.1.5 显色结果 分别取对照品溶液适量,以相应溶剂作空白,于 190 ~ 700 nm 进行光谱扫描分析,得显色前的吸收光谱图,再分别取 2.1.2 ~ 2.1.4 项下制得的显色溶液,光谱扫描得到显色后的吸收光谱图,分析光谱图吸收峰,结果见表 1。

1% TEA 乙醇溶液 5 mL,分别加入不同体积分数乙醇(95%,90%,85%,80%,75%,70%)定容至刻度,摇匀,以相应溶剂为空白参比,于 190 ~ 700 nm 进行光谱扫描,最后在 70% 乙醇的测定溶液中滴加水降低乙醇量至 60%,光谱扫描。再取芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 1% TEA 乙醇溶液 5 mL,分别加入不同体积分数乙醇(95%,90%,80%)定容至刻度,摇匀,以相应溶剂为空白参比,于 190 ~ 700 nm 进行光谱扫描,最后在 80% 乙醇的测定溶液中分别逐步滴加水降低乙醇量至 70% 和 30%,光谱扫描。见图 1。

结果可见,芹菜素及其苷的 UV 最佳特征吸收峰由 385 nm 变化至 400 nm,当乙醇浓度降低至 80% 后,其吸收值增至最大值并稳定于 400 nm,通



A. 芹菜素;B. 芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷;1. 95% 乙醇;2. 90% 乙醇;3. 85% 乙醇;4. 80% 乙醇;5. 75% 乙醇;6. 70% 乙醇;7. 60% 乙醇(稀释);8. 70% 乙醇(稀释);9. 30% 乙醇(稀释)

图 1 不同体积分数乙醇水溶液对芹菜素及其苷显色后 UV

Fig. 1 Spectra of apigenin and its glycosides after coloration in different concentration of ethanol aqueous solution

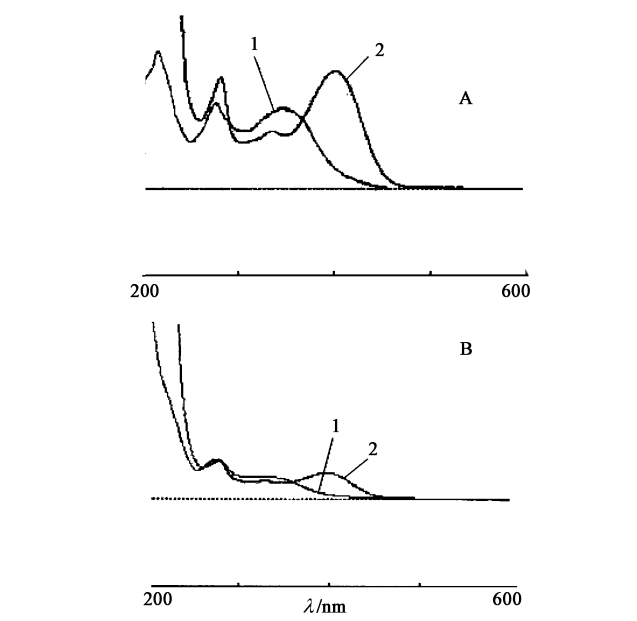
过继续增加含水量和总体积后吸收波长仍稳定在 400 nm 但吸收值下降得到确认。可见当加入的乙醇体积分数在 80% 以下时,芹菜素及其苷的 TEA 法显色法测定特征吸收峰波长可稳定在 400 nm 处。因此,TEA 法采用 50% 乙醇溶剂进行显色定容。

2.3 TEA 法建立和方法学考察

2.3.1 供试品溶液的制备 称取烘干至恒重的毛鸡骨草叶粉末 0.5 g(茎 1 g),精密称定,加 50% 乙醇溶液 100 mL,称重,超声处理 45 min,取出,补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 取芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加 50% 乙醇溶解定容,制成 0.507 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.3.3 显色方法和吸收波长 分别精密量取供试品溶液、对照品溶液各 1 mL,各 2 份,分别置 10 mL 量瓶中,一份只加入 50% 乙醇定容作为显色前溶液,一份加入 1% TEA 乙醇溶液 5 mL,用 50% 乙醇定容至刻度,摇匀,作为显色后溶液。以 50% 乙醇为空白,于 200~600 nm 进行光谱扫描,结果显示在 400 nm 处均有最大吸收,而未显色的供试品溶液、对照品溶液在此波长下未见明显的吸收峰,故选择 400 nm 为测定波长。见图 2。



A. 对照品;B. 供试品;1. 显色前;2. 显色后

图 2 芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷和供试品溶液显色前后 UV

Fig. 2 Spectra of 6-C-glycopyranosyl-8-C-glycopyranosyl apigenin and sample before and after coloration

2.3.4 标准曲线制备 精密量对照品溶液 0.010, 0.025, 0.050, 0.10, 0.50, 1.0, 2.0 mL, 每个各 2 份, 分别置 10 mL 量瓶中,一份用 50% 乙醇直接定容至刻度,摇匀,作为显色前溶液,另一份加 1% TEA 乙醇溶液 5 mL 显色,用 50% 乙醇定容至刻度,摇匀,作为显色后溶液。以 50% 乙醇为空白,于 400 nm 波长处分别测定显色前后的吸光度(A)。以显色前后的吸光度差值(A_{显色后} - A_{显色前})为纵坐标,浓度(g·L⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程 Y = 23.625X + 0.022 2 (r = 0.999 5), 在 0.507 ~ 101.4 mg·L⁻¹有良好的线性关系。

2.3.5 TEA 加入量的比较分析 取芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-葡萄糖苷对照品溶液 2 mL,分别加入不同量(1,2,4,5,6,7,8 mL)的 1% TEA 乙醇溶液,加入 50% 乙醇定容 10 mL 后,于 400 nm 处测定吸光度 A。结果显示,在有效测定范围内,当加入量 > 4 mL 时,吸光度达到最大值且保持稳定,最终确定加入量为 5 mL。

2.3.6 精密度试验 精密量取供试品溶液、对照品溶液各 1 mL 于 10 mL 量瓶中,依法显色定容后测定,重复 6 次,结果测得供试品溶液和对照品溶液的吸光度 RSD 分别为 1.4%, 1.1%, 表明精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 精密量取供试品溶液、对照品溶液各 1 mL 于 10 mL 量瓶中,依法显色定容后,分别于 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min 内测定吸光

度 A 的变化情况。结果测得供试品溶液和对照品溶液吸光度的 RSD 分别为 0.7% ,0.6% ,表明供试品溶液和对照品溶液在 3 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取同一批号(20120201)的毛鸡骨草叶粉末 0.5 g,共 6 份,精密称定,按 **2.3.1** 项下方法进行制备,精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,依法显色定容,测定吸光度,结果测得毛鸡骨草叶总黄酮平均质量分数为 2.05% ,其 RSD 2.4% ,表明重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量(20.51 mg·g⁻¹)的毛鸡骨草叶粉末 6 份,每份 0.25 g,精密称定,各加入 5.07 g·L⁻¹的芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷对照品溶液 1 mL,按 **2.3.1** 项下方法制备,按 **2.3.3** 项下方法显色并于 400 nm 处依法测定显色前后吸光度,代入标准曲线,计算回收率和 RSD。结果见表 2。

表 2 芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷显色加样回收率试验
Table 2 Recovery results of 6-*C*-glycopyranosyl-8-*C*-glycopyranosyl apigenin

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 2	5.132	10.01	96.21		
0.250 6	5.140	10.12	98.22		
0.249 9	5.125	10.20	100.10		
0.250 8	5.144	9.985	95.48	98.01	2.1
0.249 6	5.119	10.06	97.46		
0.251 1	5.150	10.25	100.60		

注:加入量均为 5.07 mg。

2.3.10 样品测定 取不同来源毛鸡骨草叶和茎,按 **2.3.1** 项下方法制备样品溶液,按 **2.3.3** 项下方法显色并依法测定显色前后吸光度,计算样品中总黄酮含量,结果见表 3。

3 讨论

通过对芹菜素、芦丁和芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷的显色现象研究,表明不同类型黄酮的在不同溶剂和显色方法中吸收光谱均有明显差异,提示总黄酮成分含量 UV 测定方法应选择吸收光谱变化专属一致的对照品进行测定,方能获得准确的含量信息。研究表明,TEA 法适合于芹菜素黄酮类成分的含量测定,且水分子对芹菜素黄酮类成分的 TEA 显色法具有明显影响,但当溶剂的含水量达到一定浓度后,其影响达到了最佳的平衡状况,其原理推测可能为水分子的存在可使黄酮的羟基达到完全

表 3 毛鸡骨草不同产地和部位中总黄酮含量($n=3$)
Table 3 Content of total flavonoids in *Abrus mollis* from different place of origins and parts ($n=3$)

No.	来源	部位	采集日期	总黄酮/%
1	广西玉林	茎	20120201	0.330
2	广西玉林	叶	20120201	2.051
3	广西桂林	茎	20101129	0.507
4	广西桂林	叶	20101129	2.470
5	广东连南	茎	20120215	0.396
6	广东连南	叶	20120215	2.160
7	广东广州	茎	20110901	1.020
8	广东广州	叶	20110901	4.800
9	广东广州	茎	20111101	0.372
10	广东广州	叶	20111101	2.820
11	广东广州	茎	20120301	0.295
12	广东广州	叶	20120301	3.070

解离状态,从而与三乙胺能够良好、充分、稳定的结合,当水分子进一步增多,显色平衡后再无影响。

芹菜素类黄酮含量测定对照品可以选择芹菜素或其糖苷,芹菜素适合评价苷元含量,评价总苷含量选择芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷更准确。毛鸡骨草富含以芹菜素为母核的黄酮苷类成分,本文以芹菜素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-葡萄糖苷为指标,经方法学考察并建立了 TEA 乙醇溶液显色含量测定方法,还比较了显色后吸光度($A_{\text{显色后}}$)及显色前后吸光度差值($A_{\text{显色后}} - A_{\text{显色前}}$)对含量计算的影响,结果显示以显色前后吸光度差值计算更为准确。

供试品制备方法方面,通过比较溶剂提取,乙醚萃取脂溶性成分及其母液,AB-8 大孔树脂柱纯化黄酮类部位及其非黄酮类部位对测定的影响,结果见表 4,可见含黄酮类成分部位的吸光度差值几乎一致(0.120 ~0.122),而非黄酮类部位的吸收光度差值非常小(0.002 ~0.005),对测定无明显影响,表明供试品溶液的制备可用 50% 乙醇提取后直接用于黄酮类成分的含量测定,无需进一步去脂处理或过柱纯化工艺。

含量测定结果表明毛鸡骨草叶中总黄酮含量明显高于茎,与先前文献报道的一致^[8]。不同产地毛鸡骨草中总黄酮含量存在明显差异,叶中总黄酮含量在 2.0% ~4.8%,茎部位含量在 0.29% ~1.1%,茎叶总黄酮含量值明显比先前文献报道的更高^[8],且笔者并未从毛鸡骨草根中测定黄酮类成分。本文所建立的 TEA 乙醇测定方法具有良好的专属性和

表 4 不同处理方法样品溶液显色前后吸收值比较

Table 4 Comparison of the spectral absorption value before and after coloration of samples by different method

处理方法	所含成分	显色前 A	显色后 A	$A_{\text{显色后}} - A_{\text{显色前}}$
50% 乙醇	黄酮类	0.024	0.144	0.120
乙醚萃取部分	脂溶性	0.000	0.002	0.002
乙醚萃取后母液	黄酮类	0.025	0.148	0.122
AB-8 型大孔树脂纯化水洗液部分	非黄酮	0.003	0.008	0.005
AB-8 型大孔树脂纯化 50% 乙醇洗脱部分	纯黄酮	0.034	0.154	0.120

注:取样量 0.5 mL,均定容至 10 mL。

准确度,适合于毛鸡骨草总黄酮类成分含量测定和评价。

[参考文献]

[1] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1998:1114.

[2] 胡彦,罗永明,刘大强,等. 鸡骨草与毛鸡骨草的形态学差异研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (3): 618-619.

[3] 陈晓白,王 晓 平,韦 敏. 毛 鸡 骨 草 醇 提 液 对 HepG2. 2. 15 细胞乙型肝炎表面抗原及乙型肝炎 E 抗原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (22):184-186.

[4] 黄平,麦秋良,蒙晓芳. 毛鸡骨草中相思子碱和下箴刺桐碱含量测定[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24 (6):62-64.

[5] 温晶,史海明,屠鹏飞. 毛鸡骨草的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(5):658-660.

[6] Yuan X, Lin L, Zhang X, et al. Abrusamide A and B, two hepatoprotective isomeric compounds from *Abrus mollis* Hance [J]. Phytochemistry Lett, 2014, 7 (1): 137-142.

[7] 刘卓伟,阙兆麟,叶志文,等. 毛鸡骨草地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6):415-417.

[8] 胡彦,罗永明,张志信,等. 鸡骨草、毛鸡骨草不同部位总黄酮含量的比较[J]. 文山师范高等专科学校学报, 2008, 21(1):99-101.

[9] 王丽丽,杜慧斌,叶志文,等. 紫外分光光度法测定毛鸡骨草提取物中总黄酮含量[J]. 药学与临床研究, 2011, 19(1):38-39.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:53.

[11] 黄荣韶,王永雄,胡艳,等. 鸡骨草总黄酮含量测定及其含量动态变化研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 13 (17):1428-1431.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,收取高额审稿费及版面费。
现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②[http://www. syfxzz. com](http://www.syfxzz.com) 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。