

· 研究报告 ·

复方茵陈合剂总黄酮测定方法研究

刘晓玲, 蔡小辉, 倪晓霞, 王庆芬 (解放军 175 医院/厦门大学附属东南医院, 福建 漳州 363000)

[摘要] **目的** 建立紫外-可见分光光度法测定复方茵陈合剂中总黄酮含量。**方法** 以芦丁作为对照,依次用直接测定法、氯化铝-醋酸钠显色法、硝酸铝显色法,探究最优测定方法。**结果** 本品最优显色法为硝酸铝显色法,测定波长为 508 nm,在 0.012 5~0.062 6 g/L 范围内线性关系良好,线性回归方程为 $Y=12.127 30 X+0.000 14$ ($r=0.999 9$),加样回收率平均值为 99.49% ($n=9$,RSD 为 0.84%)。**结论** 硝酸铝显色法可作为复方茵陈合剂中总黄酮的含量测定方法,该法简便、快速、稳定可靠。

[关键词] 紫外分光光度法;复方茵陈合剂;总黄酮;含量测定

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)06-0547-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.016

Research on the determination of total flavonoids in compound Yinchen mixture

LIU Xiaoling, CAI Xiaohui, NI Xiaoxia, WANG Qingfen (No. 175 Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the determination of the total flavonoids content in compound Yinchen mixture by UV spectrophotometry. **Methods** Using rutin as comparison, three coloration methods were studied to find the optimal assay method. **Results** The sample was detected at 508 nm wavelength by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ reaction with rutin as reference. The rutin content had a liner relationship in the range of 0.012 5-0.062 6 g/L ($n=9$, $r=0.999 9$), and the average recovery rate was 99.49% with RSD of 0.84%. **Conclusion** The $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ coloration method is proved to be simple, quick, stable and reliable for the determination of total flavonoids in compound Yinchen mixture.

[Key words] UV spectrophotometry; compound Yinchen mixture; total flavonoids; content determination

复方茵陈合剂是解放军 175 医院临床协定处方制成的复方中药制剂,用于治疗急慢性肝炎,已在临床应用 10 余年。该处方由茵陈、栀子、大黄三味中药组成,方中茵陈为君药,据相关文献报道^[1-5],黄酮类成分是茵陈的主要有效成分,具有护肝、解肝毒等作用,在肝炎的治疗中发挥了很大功效。总黄酮测定方法包括紫外可见分光光度法^[6,7]、高效液相色谱法^[8]、毛细管电泳法^[9]等。其中,紫外可见分光光度法成为测定总黄酮含量最为简便和快速的方法,在日常检验中能很好地节约时间,包括直接测定法和比色法。近年来,金属离子络合法^[10,11]已成为总黄酮含量测定应用较为普遍的方法,该法是在酸性或碱性条件下,金属离子与黄酮发生络合,反应后形成有色的螯合物,再用比色法测定含量,最常用的显色方法有氯化铝-醋酸钠显色法($\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa}$

法)、硝酸铝显色法 $[\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}]$ 。复方茵陈合剂总黄酮测定方法未见报道,故笔者以芦丁为对照品,对直接测定法、 $\text{AlCl}_3\text{-CH}_3\text{COONa}$ 法和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法进行考察,建立适用于本品的总黄酮含量测定方法。

1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计(2550 岛津-苏州),电子分析天平(AUW120D 岛津-日本),低速离心机(LD5-2A,北京医用离心机厂),数显恒温水浴锅(HH2 江苏金坛市江南仪器厂),华美冷柜(SY-176 杭州华美电冰箱厂)。

芦丁对照品(贵州迪大生物科技有限责任公司,批号:0757-200206),氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氯化铝,均购自西陇化工股份有限公司,95%乙醇(上海化学试剂总厂)等试剂均为分析纯。复方茵陈合剂为本院自制,批号:20161230、20170208、20170218。

2 方法与结果

2.1 芦丁对照品溶液的制备 精确称取芦丁对照

[基金项目] 福建中医药大学临床专项校管课题(XB2016067)

[作者简介] 刘晓玲,药师,本科,研究方向:医院制剂, Tel: 15260686960, Email: 1018943143@qq.com

[通讯作者] 王庆芬,主管药师,研究方向:药学管理、医院制剂, Tel: 13559693060, Email: 58221899@qq.com

品 0.007 83 g, 置于 25 ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.313 2 g/L 的芦丁储备液。

2.2 供试品溶液的制备 取复方茵陈合剂(批号: 20170218), 精密量取 2.5 ml 置 50 ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇定容, 于 4 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得供试品溶液, 备用。

2.3 供试液本体干扰实验 精密量取供试品溶液 1.0 ml 置 25 ml 容量瓶中, 加 60% 乙醇至刻度, 以 60% 乙醇作为参比, 于 200~800 nm 处扫描, 测得 508 nm 处吸光度(A)为 0.015, 存在干扰, 作为供试品含量测定参比溶液; 另将 60% 乙醇及加显色剂的 60% 乙醇均按上述条件扫描, 均无吸收, 不存在干扰。

2.4 显色条件优选

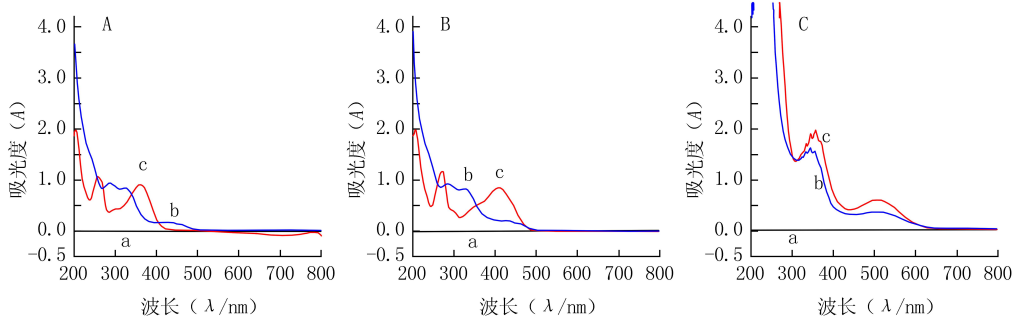


图 1 复方茵陈合剂中总黄酮测定方法的比较

A. 直接测定法; B. 氯化铝-醋酸钠显色法; C. 硝酸铝显色法; a. 空白; b. 供试品; c. 对照品

综上 3 种方法, 直接测定法与氯化铝测定法比较, 对照品与供试品最大吸收波长均不一致, 而硝酸铝显色法中, 芦丁对照品溶液与供试品溶液的最大吸收波长均为 508 nm, 吸光度分别为 0.352 和 0.361。笔者拟采用硝酸铝显色法, 并对其进行显色条件优化。

2.4.2 显色条件优选 均以供试品不加显色剂作为参比溶液。

硝酸铝浓度的考察: 精密量取供试品溶液 1.0 ml, 置 25 ml 容量瓶中, 按照“2.4.1”项下方法, 分别加入 6%、8%、10%、12%、14% 硝酸铝溶液, 于 200~800 nm 处扫描, 最大吸收波长一致, 结果浓度 10% 的硝酸铝在 508 nm 波长下, 吸光度值趋于稳定, 结果见图 2A。

氢氧化钠浓度的考察: 精密量取供试品溶液 1.0 ml, 置 25 ml 容量瓶中, 按照“2.4.1”项下方法, 分别加入 2%、4%、6%、8%、10% 氢氧化钠溶液, 于 200~800 nm 处扫描, 最大吸收波长一致, 结果 6%

2.4.1 显色系统优选 直接测定法: 精密量取对照品储备液和供试品溶液 1.0 ml 于 25 ml 容量瓶中, 用 60% 乙醇稀释并定容至刻度, 摇匀。于 200~800 nm 处扫描, 记录最大吸收波长(图 1A)。氯化铝-醋酸钠显色法: 分别精密量取对照品储备液和供试品溶液 1.0 ml 于 25 ml 容量瓶中, 依次加入 10% 氯化铝 1.0 ml, NaAC-HAC (pH=5.50) 1.0 ml, 用 60% 乙醇稀释并定容至 25 ml, 于 200~800 nm 处扫描, 记录最大吸收波长(图 1B)。

硝酸铝显色法: 分别精密量取对照品储备液和供试品溶液 1.0 ml 于 25 ml 容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 ml, 摇匀静置 6 min, 继续加 10% 硝酸铝溶液 1 ml, 摇匀静置 6 min, 最后加入 4% 氢氧化钠溶液 10 ml, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀静置 15 min, 在 200~800 nm 波长范围内扫描(图 1C)。

氢氧化钠溶液在 508 nm 波长下, 吸光度值最大, 结果见图 2B。

氢氧化钠用量的考察: 精密量取供试品溶液 1.0 ml, 置 25 ml 容量瓶中, 按照“2.4.1”项下方法, 分别加入 2、4、6、8、10 ml 氢氧化钠溶液, 于 200~800 nm 处扫描, 最大吸收波长一致, 结果 8 ml 氢氧化钠溶液在 508 nm 波长下, 吸光度值最大, 结果见图 2C。

2.5 显色条件确定 精密量取待测液 1.0 ml, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 ml, 摇匀放置 6 min; 继续加 10% 硝酸铝 1 ml, 摇匀放置 6 min; 最后加 6% 氢氧化钠溶液 8 ml, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以不加显色剂的供试品作为参比, 于 508 nm 处测定吸光度。

2.6 线性与回归方程 精密量取芦丁对照溶液(0.313 2 g/L) 0、1、2、3、4、5 ml, 分别置于 25 ml 量瓶中, 按“2.5”项下硝酸铝显色法, 制备系列浓度对照品溶液, 以同法制备参比溶液。在 508 nm 波长处

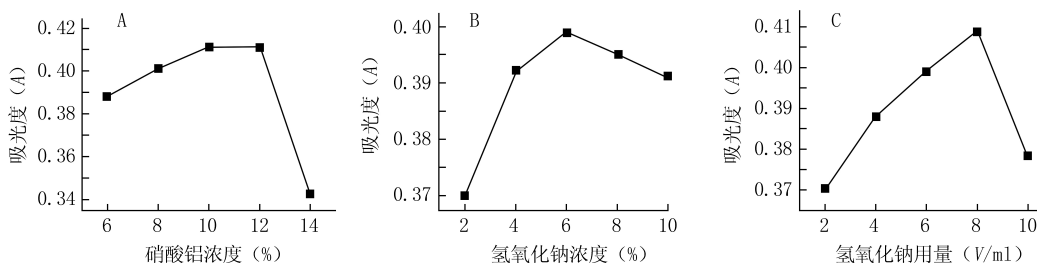


图2 复方茵陈合剂总黄酮测定中显色条件的考察

A. 硝酸铝浓度考察; B. 氢氧化钠浓度考察; C. 氢氧化钠用量考察

测定吸光度,以浓度(g/L)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线。计算得回归方程为: $Y = 12.12730X + 0.00014$, $r = 0.9999$,表明芦丁对照品浓度在0.0125~0.0626 g/L与吸光度之间呈现良好的线性关系。

2.7 精密度试验 精密量取按“2.1”项下制备的芦丁储备液1.0 ml(6份),置于25 ml量瓶中,按“2.5”项下方法依次添加各试剂,用60%乙醇定容至25 ml,以同法制备参比溶液,于508 nm波长处测定吸光度,以吸光度计算RSD%($n=6$),见表1。

2.8 重复性试验 精密量取按“2.2”项下制备的复方茵陈合剂供试品溶液(批号:20170218)1.0 ml,6份,置于25 ml量瓶中,按“2.5”项下硝酸铝显色法试验方案依次添加各试剂,用60%乙醇定容至25 ml,以同法制备参比溶液,在508 nm波长处测定吸光度,以吸光度计算RSD%($n=6$),见表1。

表1 复方茵陈合剂总黄酮精密度及重复性实验结果($n=6$)

| 项目 | 吸光度(A) | | | | | | RSD (%) | |
|-----|--------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | 平均值 |
| 精密度 | 0.442 | 0.442 | 0.441 | 0.442 | 0.441 | 0.441 | 0.441 | 0.12 |
| 重复性 | 0.410 | 0.409 | 0.422 | 0.411 | 0.414 | 0.409 | 0.413 | 1.21 |

2.9 稳定性试验 精密量取按“2.2”项下制备的复方茵陈合剂供试品溶液(批号:20170218)1.0 ml,置于25 ml量瓶中,按“2.5”项下硝酸铝显色法依次添加各试剂,用60%乙醇定容至25 ml,以同法制备参比溶液,每隔10 min测定一次,在508 nm波长处测定吸光度,以吸光度计算RSD为1.05%($n=6$),样品在60 min内稳定。

2.10 加样回收率试验 精密量取复方茵陈合剂供试品溶液(批号:20170218)1.25 ml,置于50 ml量瓶中,再精密量取1.0 ml,置于25 ml量瓶中,共9份,分成3组,分别加入芦丁对照品溶液(0.8200 g/L)0.50、1.00、1.54 ml,按“2.5”项下硝酸铝显色法依次添加各试剂,用60%乙醇定容至

25 ml;在508 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮含量,其回收率平均值为99.49%,RSD为0.8367%($n=9$),结果见表2。

表2 复方茵陈合剂总黄酮加样回收率试验结果($n=9$)

| 样品取 样量 (m/mg) | 样品 含量 (m/ μ g) | 加入量 (m/ μ g) | 测得量 (m/ μ g) | 回收率 (%) | 平均回 收率 (%) | RSD (%) |
|---------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|------------|------------------|------------|
| 21.25 | 425 | 205 | 628.5 | 99.24 | 99.49 | 0.8367 |
| 21.25 | 425 | 205 | 626.4 | 98.24 | | |
| 21.25 | 425 | 205 | 630.5 | 100.30 | | |
| 21.25 | 425 | 410 | 836.7 | 100.40 | | |
| 21.25 | 425 | 410 | 832.6 | 99.40 | | |
| 21.25 | 425 | 410 | 828.4 | 98.40 | | |
| 21.25 | 425 | 631.4 | 1059.3 | 100.50 | | |
| 21.25 | 425 | 631.4 | 1055.2 | 99.81 | | |
| 21.25 | 425 | 631.4 | 1051.1 | 99.15 | | |

2.11 复方茵陈合剂中总黄酮含量测定 按“2.2”项下制备复方茵陈合剂供试液3批(批号:20161230、20170208、20170218),按“2.5”项下硝酸铝显色法依次添加各试剂,用60%乙醇定容至25 ml;以不加显色剂的供试品作为参比溶液,在508 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮含量,结果见表3。

表3 复方茵陈合剂中总黄酮含量测定结果($n=3$)

| 批号 | 总黄酮 (μ g/g \cdot L ⁻¹) | 平均值 (μ g/g \cdot L ⁻¹) | RSD (%) |
|----------|--|--|------------|
| 20161230 | 13.888 | 13.902 | 0.1744 |
| | 13.930 | | |
| | 13.888 | | |
| 20170208 | 14.630 | 14.643 | 0.1616 |
| | 14.630 | | |
| | 14.671 | | |
| 20170218 | 15.249 | 15.235 | 0.1554 |
| | 15.208 | | |
| | 15.249 | | |

3 讨论

3.1 硝酸铝显色法及氯化铝显色法原理 前者原理为:亚硝酸钠作为还原剂将黄酮还原后,再加 Al^{3+} 进行络合反应,最后加 NaOH 提供碱性环境,使黄酮 C 环开裂生成查尔酮从而显示橙红色。后者原理为: Al^{3+} 在酸性条件下先与黄酮的 3-羟基-4-羰基、5-羟基-4-羰基和 B 环邻二酚羟基发生络合反应,形成的络合物会让紫外吸收红移至 420 nm,作为另一种鉴别方法^[12]。本品用比色法进行含量测定,参考文献[13,14],硝酸铝、氢氧化钠浓度及用量对总黄酮含量影响较大,故对其进行显色条件优化。

实验结果表明,本品在 420 nm 处没有显示与对照品一致的最大吸收,可能是由于本品黄酮类成分缺乏 3-羟基、B 环邻二酚羟基等结构,无法与 Al^{3+} 发生络合反应,不能用氯化铝显色法测定。

3.2 稳定性考察 试验考察供试液 60 min 内的稳定性,结果明显色反应后的供试液在 60 min 后总黄酮含量开始下降,故进行总黄酮含量测定时,应当在显色反应之后立即测定。

综上所述,本实验优选出的硝酸铝显色法用于测定复方茵陈合剂中总黄酮含量,具有简便、快速、准确可靠等优点,适用于院内制剂的快速检定。

【参考文献】

[1] 牛筛龙,张兴耐,吴之琳,等.茵陈总黄酮对急性肝损伤大鼠的保护作用[J].医药导报,2016,35(3):246-248.
[2] 张玲,李俊,黄艳,等.野菊花总黄酮对酒精致急性

肝损伤小鼠的保护作用[J].安徽医药,2011,15(10):1197-1200.

[3] 曹锦花.茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J].沈阳药科大学学报,2013,30(6):489-494.
[4] 王丽红,宋洋,肖艳,等.茵陈化学成分的分离与鉴定[J].中国药房,2011,22(11):1020-1022.
[5] 章林平,孙倩,王威,等.茵陈有效成分的药理作用及其临床应用的研究进展[J].抗感染药学,2014,11(1):28-31.
[6] 曾棋平,曹毅祥,黄丽珊,等.复方首乌藤合剂的薄层鉴别和总黄酮的含量测定[J].药学实践杂志,2016,34(5):424-427.
[7] 曾令军,柯小温,宋洪涛,白子草总黄酮及总多糖降血糖有效部位的提取工艺研究[J].药学实践杂志,2016,34(6):516-521.
[8] 邢桂珍,陶卿,崔玉梅,等.UV法和HPLC法测定甘草总黄酮混悬液中总黄酮和查尔酮含量[J].安徽医药,2014,18(2):2251-2255.
[9] Chen ML, Hu W, Zhang C, et al. Capillary electrophoresis method for the determination of flavonoids[J]. Yao Xue Xue Bao, 2011, 46(8): 883-889.
[10] 韦瑀龙,黄小鸥,蓝晓庆.固本补肾口服液的总黄酮含量测定方法研究[J].实用药物与临床,2016,19(10):1287-1289.
[11] 匡海学.中药化学[M].2版.北京:中国中医药出版社,2003:138-139.
[12] 任珊珊,包保全,毛婷,等.中药中总黄酮的含量测定方法研究进展[J].北方药学,2015,12(3):112-115.
[13] 马雯芳,邓慧连,蔡毅,等.冰糖草总黄酮含量测定及显色方法优化[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):112-115.
[14] 郑媛媛,李辰,封士兰,等.油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨[J].光谱学与光谱分析,2011,31(2):547-550.

【收稿日期】 2017-05-11 【修回日期】 2017-07-31

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 538 页)

为粉红色,提示酮康唑发生氧化。L-A 是油溶性的抗氧化剂,在软膏基质中溶解良好,含 L-A 的软膏性状稳定,颜色无明显变化,且经过影响因素试验和加速试验测试,含 0.5% L-A 软膏中的 3 种药物在高温、高湿和强光照下的含量均在 98% 以上。

以上结果表明,自制的复方酮康唑软膏具有优良的稳定性,下一步将研究其经皮渗透和药效学。

【参考文献】

[1] 刘淮,刘景楨.外用糖皮质激素的适应症与副作用[J].皮肤病与性病,2016,38(1):19-20.
[2] 孟甄,金建玲,刘玉庆,等.细菌耐药性的诱导与消除[J].中国药理学通报,2003,19(9):1047-1051.

[3] 中国中西医结合学会皮肤性病学会环境与职业性皮肤病学组.糠酸莫米松乳膏临床应用专家共识[J].中国中西医结合皮肤性病学期刊,2017,16(1):88-90.
[4] 谢阳,万苗坚.皮肤科常用糖皮质激素类药物的类型及适应症[J].中国医学文摘(皮肤科学),2015,32(3):283-288.
[5] 中国医师协会皮肤科分会.皮肤及软组织感染诊断和治疗共识[J].临床皮肤科杂志,2009,38(12):810-812.
[6] 朱雷.萘替芬酮康唑乳膏配方筛选及工艺[J].国外医药(抗生素分册),2016,37(3):128-130.
[7] 邢东志,邢晗,宝玲.复方酮康唑软膏的处方设计试验[J].中国现代药物应用,2010,04(16):165-165.
[8] 周月红,张继明,沈鸿.复方酮康唑乳膏中稳定剂的选择[J].医药导报,2004,23(5):331-332.

【收稿日期】 2017-03-08 【修回日期】 2017-07-07

【本文编辑】 李睿旻