

[学术探讨]

## 紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量的方法学考察要点

郑杭生<sup>1</sup>, 李计萍<sup>2</sup>, 韩 炜<sup>2</sup>, 张永文<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 国家食品药品监督管理局药品审评中心, 北京 100038)

关键词: 分光光度法; 总黄酮; 含量测定; 方法学考察

中图分类号: R284.1

文献标识码: B

文章编号: 1001-1528(2008)09-1364-02

按照《药品注册管理办法》, 中药、天然药物注册分类的第五类为“未在国内上市销售的从植物、动物、矿物等物质中提取的有效部位及其制剂”。其中有效部位一词有别于有效成分, 它一般是指从中药材中提取的大类成分, 如总黄酮、总生物碱、总蒽醌、总皂苷等。有效部位中的大类成分在化学结构上有相似性, 故在药理作用上也有相似性, 所以, 将其用作治疗剂有一定的合理性。作为中药五类新药的有效部位要求其中大类成分(一类或数类)的含量占提取物的50%以上, 且提取物应从单一植物、动物、矿物等物质中提取; 在六类新药、改剂型或仿制品种中含有大类成分的情况更为普遍, 有的可能其含量未必能达到提取物的50%。测定大类成分含量目前较常用的方法是紫外-可见分光光度法(比色法), 它主要依据大类成分特征性的结构具有特定的显色反应, 利用适当的显色剂显色, 在适当的最大波长下测定吸光度值, 从而实现对其化学结构上具有共同特征的大类成分实现定量。经查阅数个有总黄酮含量测定的品种的质量标准与相关文献, 发现总黄酮的含量测定中常有方法学不规范与不科学的现象, 故本文将结合实例分析紫外-可见分光光度法(比色法)测定总黄酮含量的方法学考察要点, 旨在为总黄酮及其他大类成分的含量测定方法的建立与审评提供参考, 以规范大类成分的含量测定方法。

### 1 标准曲线的制备

一般过程: 精密量取芦丁对照品溶液一系列体积, 分别置量瓶中, 加水或一定浓度乙醇至一定体积, 将量瓶置于一定温度的水浴中, 加一定量亚硝酸钠溶液, 混匀, 放置一定时间, 加一定量硝酸铝溶液, 混匀, 放置一定时间, 加一定量氢氧化钠试液, 加水至刻度, 摇匀, 放置一定时间, 以溶剂及各显色试剂为参比溶液, 在最大吸收波长处(510 nm附近)测定吸收度。以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并作线性回归, 得线性方程。

要点与分析: 一般选用芦丁作为对照品, 参比不加对照品溶液, 但是显色试剂亚硝酸钠、硝酸铝及氢氧化钠液均应加入。参比溶液与系列浓度的对照品溶液应平行配制。一般要求标准曲线线性方程的相关系数R值不低于0.999, 线性关系的存在反映总黄酮(芦丁)的量与规定波长下的吸收

度成线性关系, 是本法定量的基础。

### 2 供试品溶液的测定

一般过程: 取供试品溶液, 精密量取适当体积, 置量瓶中。按照“标准曲线”项下的一般过程, 自“加水或一定浓度乙醇至一定体积”起同样操作, 测定吸收度, 以未加硝酸铝溶液(或氢氧化钠或所有显色试剂)的供试液为参比溶液, 按标准曲线法计算, 即得。

要点与分析: 参比溶液可选用未加硝酸铝溶液(或氢氧化钠或所有显色试剂)的供试液(不同于标准曲线制备中的参比溶液)。中国药典2000版中某些品种以显色试剂作为参比溶液是不合适的, 因为供试液本身有颜色, 或者其中有的成分在显色前在测定波长处就有吸收, 故供试液本身对比色测定有干扰(见图1、图2<sup>[1]</sup>), 所以, 以不加硝酸铝显色液的供试液为参比溶液进行测定, 结果更为合理准确。除了以不加硝酸铝显色液的供试液为参比溶液, 在目前国家药品标准与新报的一些品种中, 有的品种以不加氢氧化钠试液的供试液作为参比溶液, 有的品种以亚硝酸钠、硝酸铝与氢氧化钠三种试液均不加的供试液为参比溶液<sup>[2]</sup>, 样品测定中上述三种参比溶液的选用均考虑了供试液本身干扰的消除, 同时, 各有各的特点, 前两种方法在考虑消除供试液本身干扰的基础上, 进一步对部分显色用试剂可能产生的干扰进行了消除, 但是, 这两种方法的缺点就在于(a)消除的仅仅是部分显色剂的干扰, 如第一种方法消除了亚硝酸钠、氢氧化钠的干扰, 却没有消除硝酸铝的干扰, (b)未考虑部分显色剂可能产生的显色作用, 如第一种方法中, 亚硝酸钠与氢氧化钠是否会引发参比溶液在测定波长处吸收度增加, 第二种方法中, 亚硝酸钠和硝酸铝是否会引发参比溶液在测定波长处吸收度增加, 故在方法学考察上应该进行相应的对比实验。第三种方法的优点在于消除供试液本身的干扰上是准确的, 其缺点是完全不考虑显色用试剂本身可能存在的干扰, 故在方法学考察上同样应进行验证实验。对比前两种方法与第三种方法, 第三种方法的证实实验比较简单, 而且, 3种显色用试剂均为无机试剂, 只要它们纯度足够高, 无有色杂质, 它们在510 nm处附近应该没有吸收; 相反, 前两种情况要复杂得多, 因为提取物中黄酮类和非黄酮类成分跟部分显色剂的

收稿日期: 2008-02-14

作者简介: 郑杭生(1973-), 男, 讲师, 研究方向: 中药新剂型及其体内过程, 电话: 021-51322210。

作用是否会导致测定波长处吸收度增加是很难预测的。有文献报道<sup>[1]</sup>,以水为参比,不加硝酸铝的参比供试液,吸收度随时间增加略有减小,85 min由 0.105变为 0.087,暗示只加入显色试剂亚硝酸钠与氢氧化钠也会在一定程度上显色。因此,在参比溶液的选择中本文建议采用第 3种,中国药典 2005年版也基本采用这种方法。

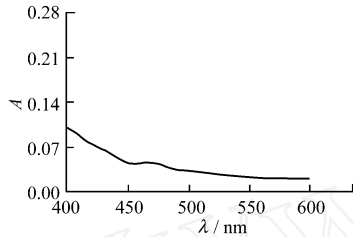


图 1 未加显色剂硝酸铝的供试液的紫外-可见吸收图谱

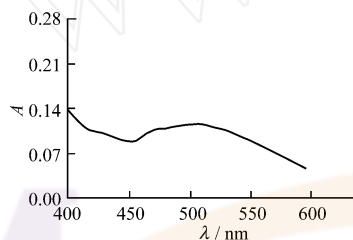


图 2 加所有显色试剂的供试液的紫外-可见吸收图谱

因为总黄酮的含量测定中,标准曲线制备中的参比溶液与样品测定中的参比溶液是不同的,所以在含量测定方法的描述中应分别予以明确描述。在标准曲线的制备中可以描述为“以相应的试剂溶液作参比”,在供试品的测定中可以描述为“取本品的供试液(或其稀释液)一定体积置一定体积的量瓶中,加溶剂至刻度,摇匀,作参比”。

### 3 样品制备过程中的参数确定

样品制备过程中的一些参数,如显色剂的种类、浓度与用量、显色温度、显色时间等,对测得的吸收度值都会有一定的影响,故在方法建立中必要时应对这些参数进行优选以达到测定值在一定时间内稳定的目的。

#### 3.1 显色剂的种类、浓度与用量

总黄酮测定中常用的显色试剂为亚硝酸钠、硝酸铝与氢氧化钠。有标准<sup>[3]</sup>与报道<sup>[4]</sup>也采用 0.1 mol/L(或 10%)三氯化铝溶液与适当 pH 缓冲液进行显色,0.1 mol/L 醋酸钾溶液为常用的缓冲液。显色剂的选用依据主要是显色后最大吸收波长处的吸收强度<sup>[4]</sup>和稳定性,如采用硝酸铝进行显色,最大吸收波长在 510 nm 附近,如采用三氯化铝进行显色,最大吸收波长在 415 nm 附近。一般地供试液中总黄酮的总量在 200 ~ 1 200 μg 时,可以用 5%亚硝酸钠溶液 1 mL、10%硝酸铝溶液 1 mL、1 mol/L 氢氧化钠试液 10 mL;供试液中总黄酮的总量在 30 ~ 300 μg 时,可以用 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 2 mL、0.1 mol/L 醋酸钾溶液 3 mL,总黄酮的总量在 148 ~ 740 μg 时,可以用 10%三氯化铝溶液 1 mL、pH 缓冲液 5.0 mL,必要时可以根据显色效果调整显色试剂的用量。

#### 3.2 显色温度

有文献<sup>[1]</sup>以空白溶液为参比,分别考察对照品(芦丁)

溶液和供试溶液显色受温度的影响。结果表明,对照品溶液无论是在室温还是在 40 °C 进行显色,测得显色后(15 min 与 30 min)的吸收度均稳定一致。因此,只要严格按照规定的时间进行操作,标准曲线的制备不受温度的影响。供试品溶液在不同温度及不同放置时间(15 min 与 30 min)测得的吸收度有明显差异,在室温(20 °C)条件下,测得的吸收度波动较大(由 0.221 减小到 0.212),而在 40 °C 水浴中进行显色与测定,测得数据比较稳定(由 0.206 减小到 0.203),故供试液样品显色建议在 40 °C 水浴中进行。目前上报品种中总黄酮含量测定的样品处理一般在室温下进行,如果含测结果不稳定,根据上述报道可以尝试在 40 °C 水浴中进行显色,必要时针对具体品种进行显色温度的优选。

#### 3.3 显色时间

显色时间包括三个时间:还原剂亚硝酸钠的反应时间、络合剂硝酸铝的反应时间与开环剂氢氧化钠的反应时间,这三个时间对吸收度值都有一定的影响。因此,有必要时应进行考察,选择合适的反应时间,并固定下来,以保证测得的吸收度值稳定。目前,药品质量标准<sup>[3]</sup>与文献<sup>[1,5]</sup>中的上述三个反应时间一般分别定为 6 min、6 min 与 15 min。有文献报道<sup>[1]</sup>,供试液和不加硝酸铝的供试液以水为参比,显色后的吸收度随时间增加均略有减小。但在加入氢氧化钠溶液后的 30 min 内,以不加硝酸铝的供试液为参比,测得供试液显色后的吸收度基本稳定。因此,建议比色测定应在加入氢氧化钠溶液后的 15 min 后立即进行。王峥等人<sup>[4]</sup>的研究中采用三氯化铝为显色剂,稳定性考察结果表明显色后 15 min 至 120 min 样品的吸收度值基本稳定,因此,使用三氯化铝为显色剂时,测定时间相对较为宽松。

#### 3.4 待测液的溶媒

不同品种的待测液制备中溶媒有选择水、一定浓度(60%、70%或 95%)的乙醇或甲醇,选择的主要依据是待测黄酮类成分的溶解度,如果制得的待测液有不溶物析出,应考虑改变溶媒的种类或比例,使待测液澄清,以免影响吸收度的测定。

以上是对总黄酮比色法含量测定过程中经常遇到的一些共性问题的讨论,主要内容可以概括为样品干扰的消除与使吸光度测定值稳定两个方面。这些问题在其他中药大类成分的紫外-可见分光光度法(比色法)测定中同样存在,本文希望通过对总黄酮含量测定中的一些具体问题的探讨能起到抛砖引玉的作用。

### 参考文献:

- [1] 吴晓鸾,杭太俊,陈 瑞. 独一味软胶囊中总黄酮含量的比色测定[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(4): 24.
- [2] 中国药典 2005年版一部[S]. 2005: 575.
- [3] 卫生部药品标准中药成方制剂第二十册[S]. 1998: 221.
- [4] 王 峥,李绍顺. 百蕊草药材及其制剂中总黄酮的含量测定研究[J]. 中成药, 2007, 29(1): 138.
- [5] 徐春波,温 艳,闫美霞. 独一味分散片中木犀草素和总黄酮的含量测定[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1389.