

## · 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<sup>[1-5]</sup>,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<sup>[6,7]</sup>、高效液相色谱法<sup>[8]</sup>、毛细管电泳法<sup>[9]</sup>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<sup>[10,11]</sup>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

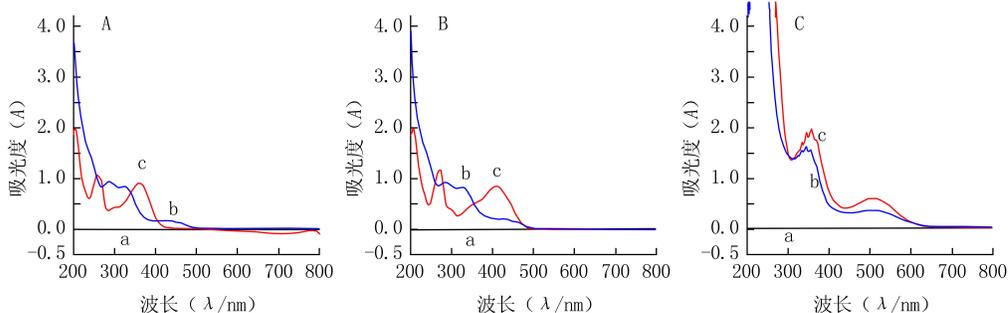


图 1 复方茵陈合剂中总黄酮测定方法的比较

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

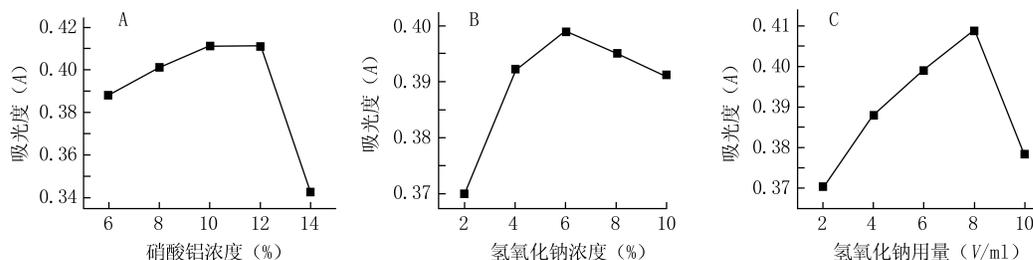


图2 复方茵陈合剂总黄酮测定中显色条件的考察

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/ $\mu$ g)	加入量 (m/ $\mu$ g)	测得量 (m/ $\mu$ 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 ( $\mu$ g/g $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	平均值 ( $\mu$ g/g $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	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<sup>[12]</sup>。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