

土茯苓中总黄酮的含量测定方法研究*

王 瑞¹ 展晓日² 张 惠¹ 曾昭武^{2△}

(1 山西中医学院中药系 山西 太原 030024 2 杭州师范大学生物医药与健康中心 浙江 杭州 310012)

摘要 目的 建立土茯苓总黄酮的含量测定方法。方法 采用 70%乙醇超声提取工艺和可见分光光度法测定土茯苓中总黄酮的含量,以芦丁为对照品,在 500 nm 波长处测量。结果 芦丁在 0.008~0.048 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=1.000$),平均加样回收率 ($n=6$)以芦丁计为 98.34%,RSD 为 3.4%。结论 此方法操作简单,精密性、稳定性和重复性良好,可用于土茯苓总黄酮含量测定。

关键词 土茯苓 总黄酮 含量测定 可见分光光度法

中图分类号 R284.2, R914.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 01-131-03

Study on the Determination Method of Total Flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabrae*

WANG Rui¹, ZHAN Xiao-ri², ZHANG Hui¹, ZENG Zhao-wu^{2△}

(1 Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2 Research Center for Biomedicine and Health, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

ABSTRACT Objective: To explore the determination method of total flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabrae. **Method:** Total flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabrae was determined by visible spectrophotometry. Lutin was used as reference substance, and the detection wavelength was set at 500 nm. An ultrasonic extraction process with 70% alcohol was adopted. **Results:** The linear ranges of Lutin was 0.008-0.048 mg·mL⁻¹ ($r=1.000$). The average recoveries ($n=6$) were 98.34% and the RSD was 3.4%. **Conclusion:** The visible spectrophotometry method is reliable. It could be used to determine the content of total flavonoids in Rhizoma smilax glabrae to control its quantity in the phamaceutical preparations.

Key words: Rhizoma Smilacis Glabrae; total flavonoids; determination; VIS spectortrophotography.

Chinese Library Classification: R284.2, R914.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-131-03

前言

土茯苓为百合植物光叶菝葜(Smilax glabr Roxb)^[1,2]的干燥根,又名红土苓,为中医临床常用中药。广泛分布于华南、中南及陕西、甘肃、四川、贵州、云南、浙江等地,是传统的清热解毒常用中药,具有调中止泻、健脾胃、强筋骨、除湿、利关节等功效,临床上用于治疗湿热淋浊、带下病、痛肿、瘰疬、梅毒及汞中毒所致肢体拘挛、筋骨疼痛等症^[3]。近年来临床和药理治疗实验表明,土茯苓在抗癌、抗动脉硬化和治疗冠心病、心绞痛等方面效果良好^[4]。土茯苓对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、白喉杆菌、炭疽杆菌等细菌有一定抑制作用^[5]。

土茯苓化学成分主要为黄酮、皂苷等,其中也有较多的以淀粉为主的多糖成分,经研究发现,土茯苓中含有的黄酮类成分是其药理活性物质^[6]。现行药典未收载土茯苓的测定方法,使土茯苓药材的质量难以控制。本文对土茯苓中总黄酮的提取方法、显色方法进行研究,采用可见分光光度法测定土茯苓中总黄酮的含量,为土茯苓药材的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

VIS-723G 可见光光度计, GX-9146MBE 数显鼓风干燥箱, HX-200A 型高速中药粉碎机, MD100-1 上皿电子天平, 循环式多用真空泵 SHB-A, KQ5200V 型超声波清洗器, HH-Ss 恒温水浴锅。

冰醋酸、甲醇和乙醇均为分析纯。芦丁对照品(批号: 080-9002) 购自中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%。

土茯苓饮片购自山西省太原市不同药店。

1.2 提取方法的选择

取土茯苓粉末(80 目) 1g (份), 精密称定, 加 70%乙醇 10 mL, 分别进行回流提取(2 次, 1 h/次) 和超声提取(2 次, 20 min/次), 提取液转移至 50 mL 量瓶中, 70%乙醇定容至刻度, 摇匀。精密量取 2.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀。精密量取 3 mL, 加水至 6 mL, 加 5%硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 按紫外-可见分光光度法, 在 500 nm 波长处测定吸光度。测定结果表明, 土茯苓超声提取显色后测量的吸光度值较大, 故选择超声提取的方法。

* 基金项目 国家自然科学基金青年基金(NO.81001647), 浙江省科技厅面上项目(2009C33005), 中国博士后科学基金面上项目(20100471757)

作者简介 王瑞(1978-), 女, 博士研究生, 研究方向 中药质量控制与体内代谢研究, Tel 0351-2272284, E-mail 3wrgreentea@163.com

△通讯作者: 曾昭武, Email: artgreenking@126.com

(收稿日期 2010-10-07 接受日期 2010-10-31)

1.3 正交试验设计

采用 $L_9(3)$ 正交表,对溶剂种类、溶剂量、提取时间和提取

次数等因素进行筛选,设计提取方案。见表 1。

表 1 $L_9(3)$ 因素水平表
Tab 1 $L_9(3)$ orthogonal test table

	solvent (A)	solvent volume (B ;mL)	extracting time (C ;min)	extracting times (D ;times)
1	70% Ethanol	15	10	1
2	95% Ethanol	20	20	2
3	Methanol	25	30	3

1.4 实验方法

取土茯苓粉末(80 目)9 份,每份 1 g,精密称定,按正交表安排分别进行提取,提取液置 100 mL 量瓶中,用提取溶剂定容至刻度,摇匀。精密量取 20 mL 于 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密量取 3 mL 于 25 mL 量瓶中,加水至 6 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加硝酸铝溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,在 500 nm 波长处测定吸光度。

土茯苓中总黄酮的最优提取方法为 1 g 土茯苓粉末加 70%乙醇 15 mL,超声提取 1 次 10 min。

1.5 土茯苓中总黄酮的显色方法的研究

1.5.1 供试品溶液的制备 取土茯苓粉末(80 目)1 g,精密称定,加 70%乙醇 15 mL 超声提取 10 min,提取液置 100 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,摇匀。精密量取 20 mL 于 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

1.5.2 显色方法的选择 分别精密量取供试品溶液 3 mL 于 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,分别改变 5%亚硝酸钠溶液、10%硝酸铝溶液及氢氧化钠试液的加入量,并在加入氢氧化钠试液后放置不同的时间,分别测定吸光度。测定结果表明,土茯苓中总黄酮的最优显色方法为 3 mL 供试品溶液至 25 mL 量瓶中,加入 5%亚硝酸钠溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10%硝酸铝溶液 0.5 mL,混匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 15 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 10 min 后测定吸光度。

2 结果

2.1 TLC 方法学评价

2.1.1 标准曲线的制备 精密称取芦丁对照品 0.0050 g,置 25 mL 量瓶中,加 70%乙醇适量使溶解,再加 70%乙醇至刻度,摇匀。精密量取 1、2、3、4、5、6 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 6 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 0.5 mL,混匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 15 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 10 min,以相应试剂为空白,于 500 nm 波长处测量吸光度 A。以 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,得回归方程 $C=0.052A+0.001$, $r=1.000$,表明芦丁在 0.008~0.048 $mg \cdot mL^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.1.2 精密度实验 取万民药房土茯苓药材粉末 1 g(80 目),精密称定,按"1.5.1 供试品溶液的制备"项下方法制备供试品溶

液,精密量取供试品溶液 3 mL 于 25 mL 量瓶中,按"2.1.1 标准曲线的制备"项下的方法,自"各加入 70%乙醇至 6 mL"起依法测定吸光度,连续测定 6 次,吸光度的 RSD 为 0.3%,表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性实验 取万民药房土茯苓药材粉末(80 目)6 份,每份 1 g,精密称定,按"1.5.1 供试品溶液的制备"项下方法制备供试品溶液,精密量取供试品溶液 3 mL 于 25 mL 量瓶中,按"2.1.1 标准曲线的制备"项下的方法,自"各加入 70%乙醇至 6 mL"起依法测定吸光度,计算土茯苓中总黄酮含量的 RSD 值为 2.6%,表明本方法的重复性良好。

2.1.4 加样回收率实验 取万民药房土茯苓药材粉末(80 目)6 份,每份 0.5 g,加入一定量芦丁对照品,按"1.5.1 供试品溶液的制备"项下方法制备供试品溶液,精密量取供试品溶液 3 mL 于 25 mL 量瓶中,按"2.1.1 标准曲线的制备"项下的方法,自"各加入 70%乙醇至 6 mL"起依法测定吸光度,计算土茯苓中总黄酮含量,以芦丁的含量计,平均加样回收率为 98.34%,RSD 为 3.4%。

2.2 样品测定

按"1.5.1 供试品溶液的制备"项下方法制备供试品溶液,依法测定样品吸光度,计算总黄酮含量,结果见表 2。

表 2 土茯苓药材中总黄酮的含量
Tab 2 Determination of total flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabra

No.	Sources(drugstore)	total flavonoids ($mg \cdot g^{-1}$)
1	Tongrentang	8.842
2	Tongantang	10.575
3	Renhe	40.963
4	Ronghua	12.850
5	Jinshile	16.425
6	Weikang	12.092
7	Kangle	12.742
8	Yuanshengtang	13.988
9	Wanmin	18.538

3 讨论

总黄酮类化合物含量测定方法有比色法^[7]、紫外分光光度

法^[8,9]等。以 AlCl_3 、 HAc - NaAc 缓冲液为显色剂,显色后溶液的颜色与提取液本身颜色很相近,误差较大。故本研究参照《中华人民共和国药典》测定槐花中芦丁含量方法^[10],供试品溶液与对照品在 500 nm 处有最大吸收,且该法操作简便,重复性好,结果准确,可用于测定土茯苓中总黄酮的含量。

不同药店的土茯苓中总黄酮的含量差异较大,说明不同来源的土茯苓质量差异较大。研究表明土茯苓中含有的黄酮类成分是其药理活性物质,因此,土茯苓中总黄酮的含量测定可以作为制定土茯苓质量标准的参考。

参考文献(References)

- [1] 李玉莲,李玉琪,曾平,等.土茯苓植物资源调查[J].中草药,2002,33(9):850-852
Li Yu-lian, Li Yu-qi, Zeng Ping, et al. Investigation of plant resources from *Rhizoma Smilacis Glabrae* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(9):850-852(In Chinese)
- [2] 董士力.土茯苓饮片鉴别 [J]. 中国药业,2009,18(4):54
Dong Shi-li. Yinbian identification of *Rhizoma Smilacis Glabrae*[J]. China Pharmaceuti, 2009, 18(6):54(In Chinese)
- [3] 吴博,马跃平,袁久志,等.土茯苓化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2010,27(2):116-119
Wu Bo, Ma Yue-ping, Yuan Jiu-zhi, et al. Isolation and identification of chemical constituents from stems of *Smilax glabra* Roxb[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2010, 27(2):116-119(In Chinese)
- [4] 秦汝兰,黄田玉,高璐.土茯苓中总黄酮提取方法及药理作用[J].通化师范学院学报,2010,31(2):39-41
Qin Ru-lan, Huang Tian-yu, Gao Lu. Extraction Method of Total Flavonoids from *Smilax glabra* Roxb and Pharmacological Effects[J]. Journal of Tonghua Teachers College, 2010,31(2):39-41(In Chinese)
- [5] 陈红梅,秀兰,吴占全.土茯苓的化学与药理研究进展[J].中国民族医药杂志,2008,16(11):71-73
Chen Hong-mei, Xiu Lan, Wu Zhan-quan. Progress of research on the chemical components and pharmaceutical action of *Rhizoma Smilacis Glabrae* [J]. Journal of Chinese Minority Medicine, 2008,16(11):71-73(In Chinese)
- [6] 纪莉莲,范怡梅.土茯苓体外抗菌活性实验[J].中国生化药物杂志,2002,23(5):239-24
Ji Li-lian, Fan Yi-mei. Antibacterial activity of *Smilax glabra* decoction [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2002,23(5):239-24(In Chinese)
- [7] 郭亚健,范莉,王晓强,等.关于 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J].药物分析杂志,2002,22(2):97-98
Guo Ya-jian, Fan Li, Wang Xiao-qiang, et al. Discussion about NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH colorimetry for determination of total flavonoids[J]. Chin J Pharm Anal, 2002,22(2):97-98(In Chinese)
- [8] 秦民坚,吉文亮,王峰涛.鸢尾不同产地、采收期总黄酮的含量测定[J].现代中药研究与实践,2004,18(4):23-25
Qin Min-jian, Ji Wen-liang, Wang Zheng-tao. Determination of Total Flavonoids in Rhizomes of *Iris tectorum* from Different Regions and Different Collecting Times [J]. Research and Practice of Chinese Medicines, 2004, 18(4):23-25(In Chinese)
- [9] 方圆,王雪彦,晁若冰.土茯苓药材中落新妇苷和总黄酮的含量测定方法研究[J].药物分析杂志,2010,30(9):1738-1741
Fang Yuan, Wang Xue-yan, Chao Ruo-bing. Study on the determination of astilbin and total flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae*[J]. Chin J Pharm Anal, 2010,30(9):1738-1741(In Chinese)
- [10] 中华人民共和国药典,2010年版(一部)[s].北京化学工业出版社,2010:333
ChP, 2010 (Vol 1) [s]. Beijing Chemical Industry Press, 2010:333(In Chinese)