

苦参总黄酮含量测定方法的优化

杨志欣¹, 王海威¹, 张文君², 谢国梁¹, 王祺茹¹, 冯宇飞¹, 王艳宏^{1*}
(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: **目的** 优化苦参 *Sophora flavescens* Ait. 总黄酮含有量的测定方法。**方法** 分别以 80% 乙醇、甲醇、乙酸乙酯和文献方法提取苦参, 分别采用苦参酮盐酸-镁粉反应、槐属二氢黄酮 G 盐酸-镁粉反应、苦参酮紫外分光光度、槐属二氢黄酮 G 紫外分光光度测定总黄酮含有量 (以苦参酮和槐属二氢黄酮 G 为对照), HPLC 法同时测定苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄腐醇含有量。以反应时间、镁粉加入量、浓盐酸加入量为影响因素, 苦参酮、槐属二氢黄酮 G 吸光度为评价指标, 正交试验优化显色条件。再通过双因素方差分析结合 LSD 法优化测定方法。**结果** 最佳显色条件为反应时间 60 min, 镁粉加入量 250 mg, 浓盐酸加入量 3.5 mL。主效应 A (4 种测定方法) 和主效应 B (4 种提取方法) 对总黄酮含有量的影响均有显著性差异 ($P < 0.01$)。苦参酮盐酸-镁粉显色法与其他方法相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 并与 HPLC 法测定结果的相关性最好。同时, 乙酸乙酯提取效果明显优于其他 3 种提取方法 ($P < 0.001$)。**结论** 乙酸乙酯提取苦参后, 以苦参酮为对照品的盐酸-镁粉反应更适合测定其总黄酮含有量。
关键词: 苦参; 总黄酮; 苦参酮; 槐属二氢黄酮 G; 盐酸-镁粉反应; 紫外分光光度; 双因素方差分析; LSD
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)05-0946-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.012

Optimization of content determination method of total flavonoids from *Sophora flavescens*

YANG Zhi-xin¹, WANG Hai-wei¹, ZHANG Wen-jun², XIE Guo-liang¹, WANG Qi-ru¹, FENG Yu-fei¹, WANG Yan-hong^{1*}
(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

KEY WORDS: *Sophora flavescens* Ait.; total flavonoids; kurarinone; sophoraflavanone G; HCl-Mg reaction; UV spectrophotometry; two-factor variance analysis; LSD

苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 首载于《神农本草经》, 被列为中品, 主心腹气结、癥瘕积聚、黄疸、溺有余沥、逐水、除痈肿, 主要含生物碱和黄酮^[1-4], 其中后者具有抗菌^[5-6]、抗癌^[7-9]、抗炎^[10]、截疟^[11]、神经保护^[12-13]等多种药理活性, 对于苦参功效的发挥举足轻重, 故对苦参及其提取物中黄酮类成分的质量控制很有必要。目前, 以芦丁^[14-16]或槐属二氢黄酮 G 为对照^[17-18], 采用比色法测定苦参总黄酮的

含有量已有报道, 并且以后者为对照时测定结果相对准确。

苦参中的黄酮类化合物大多为含有异戊烯基侧链的二氢黄酮和二氢黄酮醇^[1], 芦丁为槲皮素与芸香二糖形成的糖苷, 与各种显色剂反应所获得的可见光区扫描光谱均不同于苦参提取物, 而槐属二氢黄酮 G 为苦参中具有异戊烯基侧链的二氢黄酮类代表成分之一, 显色后光谱与苦参样品溶液一致^[17-18], 故近年来大多以其为对照测定总黄酮含

收稿日期: 2016-11-18
基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (H2016057); 国家教育部春晖计划 (Z2008-1-15016); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2012)
作者简介: 杨志欣 (1974—), 女, 副教授, 从事药物新剂型与新药研究。E-mail: zhixin.y@163.com
* 通信作者: 王艳宏 (1972—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药性味及新剂型研究。

有量。然而,该成分中苦参酮的含有量显著高于槐属二氢黄酮 G^[19-20],以前者为对照测定时的结果是否与以后者为对照一致尚不清楚,故本实验首次建立了 4 种方法测定苦参总黄酮含有量,并采用 SPSS 17.0 软件处理数据,旨在探索更科学、合理的方法用于苦参总黄酮质量控制。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695-2996 HPLC 色谱仪(美国 Waters 公司);WFZ UV-480ZH 紫外可见分光光度计(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);W-O 智能恒温水浴(北京市水光明医疗仪器厂);FA2004 电子分析天平(上海一恒科技有限公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);DZF-6090 真空干燥箱(上海良平仪器仪表厂);SB-5200D 超声波清洗机(上海顾村电光仪器厂)。

1.2 药物 苦参购自哈药集团世一堂制药厂,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄酮醇(自制,批号 20151108,含有量均大于 98%)。甲醇为色谱纯(美国 Dikma 公司);乙醇、甲醇、乙酸乙酯、盐酸、镁粉等均为分析纯(天津富宇化工有限公司);水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 提取物制备

2.1.1 80% 乙醇提取物 取干燥苦参 50 g,300 mL 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 60 min,合并滤液,减压浓缩,干燥,即得(总黄酮提取物 I)。

2.1.2 甲醇提取物 除提取溶剂为甲醇外,其他操作同“2.1.1”项,即得(总黄酮提取物 II)。

2.1.3 乙酸乙酯提取物 除提取溶剂为乙酸乙酯外,其他操作同“2.1.1”项,即得(总黄酮提取物 III)。

2.1.4 文献[21]方法 取干燥苦参 50 g,300 mL 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 60 min,合并滤液,减压干燥,得固体粉末,95% 乙醇超声溶解所得粉末,离心除残渣,回收溶剂,0.5% HCl 超声溶解所得固形物以去除生物碱,残渣用蒸馏水多次洗涤至中性,减压干燥,即得(总黄酮提取物 IV)。

2.2 盐酸-镁粉反应建立

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取槐属二氢黄酮 G、苦参酮对照品,加无水乙醇制成每 1 mL 分别含两者 402.8、403.2 μg 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密称取各提取物粉末(I 约为 120 mg、II 约为 120 mg、III 约为 40 mg、IV 约为 50mg),置于具塞锥形瓶中,精密加入 200 mL 无水乙醇,密塞,称定质量,超声(250 W、50 kHz) 30 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 检测波长选择 精密移取各供试品、对照品溶液 1.0 mL,置于加有 250 mg 镁粉的具塞刻度试管中(15 $^{\circ}\text{C}$ 冷水浴),缓慢滴加 3.5 mL 浓盐酸,摇匀,加无水乙醇至 10.0 mL,摇匀,置于沸水浴中加热 60 min,立即冷却终止反应,放至室温后补足溶液至 10 mL,摇匀,同法制备空白对照,在 400~600 nm 波长范围内扫描。结果,各溶液可见光区吸收基本一致,在 478 nm 波长处均有最大吸收,故确定检测波长为 478 nm。

2.2.4 显色条件选择 单因素试验发现,苦参酮和槐属二氢黄酮 G 均宜采用无水乙醇溶解样品,100 $^{\circ}\text{C}$ 下加热显色时吸光度最大,而且显色时间、镁粉加入量、浓盐酸加入量对显色的影响较大,故设计 $L_9(3^4)$ 正交试验进行考察,结果见表 1。由表可知,各因素均对显色反应有显著影响($P < 0.05$),程度依次为 $B > C > A$,最佳条件为 $A_2B_2C_2$,即反应时间 60 min,镁粉加入量 250 mg,盐酸加入量 3.5 mL。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液(槐属二氢黄酮 G 1.25、2.5、5.0、7.5、10 mL,苦参酮 1.25、2.5、3.75、4.5、5.0 mL),无水乙醇稀释定容至 10 mL,取 1.0 mL,按“2.2.4”项下最佳条件显色,并测定吸光度。以质量浓度(C)对吸光度(A)进行回归,得回归方程分别为槐属二氢黄酮 G $A = 0.02842C + 0.00747$ ($r = 0.9999$)、苦参酮 $A = 0.05968C + 0.00525$ ($r = 0.9997$),分别在 5.035~40.28、5.04~20.16 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验 苦参酮、槐属二氢黄酮 G 对照品溶液显色后连续测定 6 次,吸光度 RSD($n=6$)分别为 1.21% 和 1.54%,表明仪器精密度良好。以槐属二氢黄酮 G 为对照,测得总黄酮含有量 RSD 为 1.53%,表明该方法重复性良好。显色产物在室温下 12 h 内基本稳定,吸光度 RSD 为 0.83%。苦参酮和槐属二氢黄酮 G 的平均加样回收率分别为 100.90% 和 100.55%,RSD 分别为 1.54% 和 1.74%。

表 1 正交试验结果
Tab. 1 Results of orthogonal tests

试验号	反应时间/min	镁粉/g	浓盐酸/mL	空白列	苦参酮吸光度	槐属二氢黄酮 G 吸光度
1	1(30)	1(150)	1(2.5)	1	0.431 1	0.371 2
2	1(30)	2(250)	2(3.5)	2	0.604 5	0.553 6
3	1(30)	3(350)	3(4.5)	3	0.340 8	0.288 1
4	2(60)	1(150)	2(3.5)	3	0.571 2	0.526 6
5	2(60)	2(250)	3(4.5)	1	0.569 0	0.529 2
6	2(60)	3(350)	1(2.5)	2	0.514 4	0.467 3
7	3(90)	1(150)	3(4.5)	2	0.283 9	0.256 0
8	3(90)	2(250)	1(2.5)	3	0.568 3	0.513 8
9	3(90)	3(350)	2(3.5)	1	0.462 8	0.418 8
I _j	0.459/0.404	0.429/0.385	0.505/0.451	0.488/0.400		
II _j	0.552/0.508	0.581/0.532	0.546/0.500	0.468/0.426		
III _j	0.438/0.396	0.439/0.391	0.398/0.358	0.493/0.443		
R _j	0.114/0.112	0.152/0.147	0.148/0.148	0.025/0.017		

注：“/”前为苦参酮数据，“/”后为槐属二氢黄酮 G 数据

2.2.7 总黄酮含量测定 精密称取 4 种提取物适量，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.4”项下方法测定吸光度，以苦参酮和槐属二氢黄酮 G 为对照测定，平行 3 份，结果见表 2。

表 2 苦参酮和槐属二氢黄酮 G 含量测定结果（I）（n=3）

Tab. 2 Results of content determination of arinone and sophoraflavanone G（I）（n=3）

方法	提取物	提取物	提取物	提取物
	I/%	II/%	III/%	IV/%
盐酸-镁粉反应(苦参酮)	1.81	2.51	42.98	25.11
盐酸-镁粉反应(槐属二氢黄酮 G)	3.80	5.21	89.34	52.31
紫外分光光度法(苦参酮)	10.35	13.33	76.92	53.91
紫外分光光度法(槐属二氢黄酮 G)	8.77	12.05	71.39	49.66

2.3 紫外分光光度法建立

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取苦参酮、槐属二氢黄酮 G 对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含两者 260.0、300.0 μg 的溶液，即得。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取各提取物粉末（I 约为 40 mg、II 约为 40 mg、III 约为 40 mg、IV 约为 25 mg），置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 100 mL，密塞，称定质量，超声（250 W、50 kHz）30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液 5 mL，定容至 25 mL 量瓶中，即得。

2.3.3 检测波长选择 精密移取供试品、对照品溶液适量，以甲醇为空白对照，在 200~400 nm 波长范围内扫描。结果，苦参酮和槐属二氢黄酮 G 分别在 287 nm 和 294 nm 处有最大吸收，故确定两者检测波长分别为 287 nm 和 294 nm。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液 2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、

7.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，以质量浓度（C）对吸光度（A）进行回归，得苦参酮、槐属二氢黄酮 G 回归方程分别为 $A = 0.037\ 02\ C + 0.058\ 23$ （ $r = 0.999\ 7$ ）、 $A = 28.329\ C - 2.424\ 8$ （ $r = 0.999\ 8$ ），分别在 5.20~18.20、6.00~21.00 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验 将苦参酮、槐属二氢黄酮 G 对照品溶液连续测定 6 次，测得吸光度 RSD（ $n = 6$ ）分别为 0.94% 和 1.07%，表明仪器精密度良好。以苦参酮为对照，测得总黄酮含量 RSD 为 2.35%，而以槐属二氢黄酮 G 为对照，测得其含量 RSD 为 2.15%，表明该方法重复性良好。显色产物在室温下 12 h 内基本稳定，吸光度 RSD 为 0.89%。苦参酮和槐属二氢黄酮 G 的平均加样回收率分别为 100.98% 和 99.45%，RSD 分别为 2.38% 和 2.19%。

2.3.6 总黄酮含量测定 精密称取 4 种提取物适量，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，测定吸光度，以苦参酮和槐属二氢黄酮 G 为对照测定，平行 3 份，结果见表 2。

2.4 HPLC 法同时测定苦参提取物中 3 种黄酮含量

2.4.1 色谱条件 Dikma C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇-水（7:3），等度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 290 nm；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取苦参酮、槐属二氢黄酮 G、异黄腐醇对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含苦参酮 1 388.5 μg、槐属二氢黄酮 G 766.0 μg、异黄腐醇 217.5 μg 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液制备 精密称取各提取物粉末（Ⅰ约为145 mg、Ⅱ约为110 mg、Ⅲ约为25 mg、Ⅳ约为42 mg），置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇100 mL，密塞，称定质量，超声（250 W、50 kHz）30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

2.4.4 专属性考察 分别取甲醇、混合对照品、供试品溶液，按“2.4.1”项下方法进样检测，记录色谱图，结果见图1。苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇的保留时间分别为8.47、15.11、20.70 min，表明该方法专属性强。

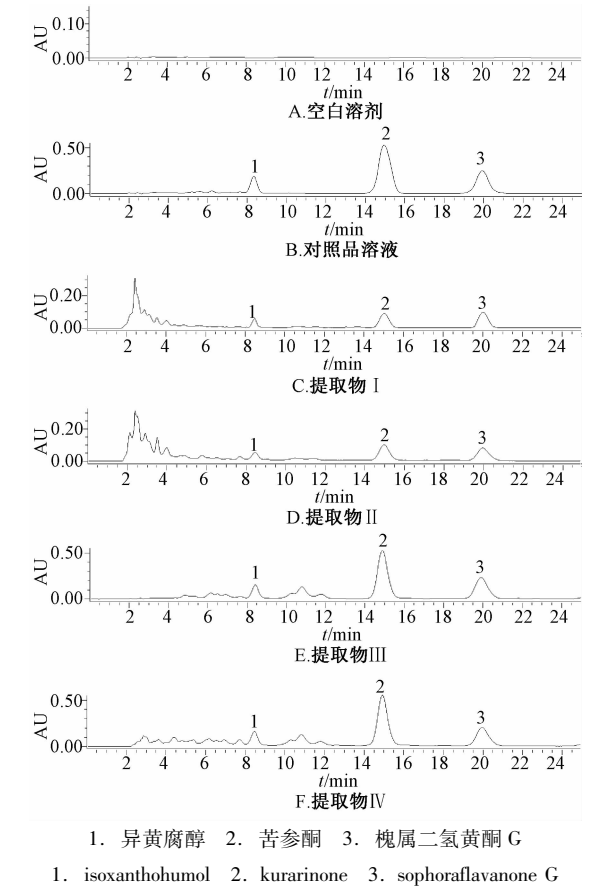


图1 3种成分HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of three constituents

2.4.5 线性关系考察 精密吸取对照品溶液20、40、100、250、500、1 000 μL，加甲醇定容至10 mL量瓶中，在“2.4.1”项色谱条件下测定，进样10 μL。以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表3，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.4.6 精密度、重复性、稳定性试验 取对照品溶液连续进样6次，测得苦参酮、槐属二氢黄酮G、异黄腐醇峰面积RSD（n=6）分别为0.96%、

表3 3种成分线性关系

Tab.3 Linear relationships of three constituents				
成分	线性范围/ng	回归方程	r	
苦参酮	27.77 ~ 1 388.5	$Y = 4\,502.2X + 39\,435$	0.999 6	
槐属二氢黄酮G	15.32 ~ 766.00	$Y = 4\,251.3X - 38\,165$	0.999 6	
异黄腐醇	4.35 ~ 217.5	$Y = 5\,741.8X + 7\,579.2$	0.999 9	

1.13%、1.05%，表明仪器精密度良好。取提取物Ⅲ6份，测得三者含有量RSD（n=6）分别为0.89%、1.06%、1.34%，表明该方法重复性良好。3种成分在12 h内峰面积RSD均小于2.1%，表明样品在室温下12 h内稳定性良好。

2.4.7 加样回收率试验 精密称取苦参提取物Ⅰ~Ⅳ，共24份（Ⅰ约为72 mg、Ⅱ约为55 mg、Ⅲ约为12 mg、Ⅳ约为22 mg），每种6份，按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4.1”项色谱条件下测定，结果见表4。

表4 3种成分加样回收率试验结果

Tab.4 Results of recovery tests for three constituents						
样品	成分	原有量/	加入量/	测得量/	平均回收	RSD/
		μg	mg	mg	率/%	%
提取物Ⅰ	苦参酮	459.66	469.20	935.17	101.35	1.89
	槐属二氢黄酮G	522.44	526.40	1 050.94	100.40	1.48
	异黄腐醇	111.13	110.30	221.34	99.92	1.97
提取物Ⅱ	苦参酮	486.93	469.20	958.76	100.55	1.44
	槐属二氢黄酮G	525.66	526.40	1 053.21	100.22	2.23
	异黄腐醇	106.80	110.30	216.72	99.66	1.68
提取物Ⅲ	苦参酮	2 675.26	2 777.00	5 456.87	100.16	1.42
	槐属二氢黄酮G	1 566.98	1 632.00	3 211.35	100.76	1.71
	异黄腐醇	432.00	435.00	866.12	99.80	1.56
提取物Ⅳ	苦参酮	2 675.17	2 777.00	5 469.27	100.62	1.91
	槐属二氢黄酮G	1 292.23	1 632.00	2 932.56	100.53	1.46
	异黄腐醇	448.76	435.00	883.68	99.98	1.77

2.4.8 含有量测定 取4种提取物，每种3批，按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液，每批3份，在“2.4.1”项色谱条件下进样10 μL测定，结果见表5。

表5 3种成分含有量测定结果（Ⅱ）（%，n=3）

Tab.5 Results of content determination of three constituents (Ⅱ) (% , n=3)				
成分	提取物Ⅰ	提取物Ⅱ	提取物Ⅲ	提取物Ⅳ
苦参酮	0.64	0.88	21.23	12.33
槐属二氢黄酮G	0.72	0.95	12.44	5.96
异黄腐醇	0.15	0.21	3.43	2.07

2.5 双因素方差分析 采用SPSS 17.0软件，对表3数据进行双因素方差分析，其中主效应A为4种测定方法，主效应B为4种制备方法，结果见表6。由表可知，主效应A、B对苦参总黄酮含有量均有极显著影响（P<0.01）。再进一步采用

LSD 检验法进行多重比较分析, 结果见表 7~8。

表 6 主体间效应检验结果

Tab. 6 Results of tests for between-subjects effects					
来源	Ⅲ型离均差平方和	d_f	均方	F 值	P 值
校正模型	39 808. 710	15	2 653. 914	836. 880	<0. 01
截距	50 567. 326	1	50 567. 326	15 945. 792	<0. 01
A	3 371. 874	3	1 123. 958	354. 426	<0. 01
B	34 288. 847	3	11 429. 616	3 604. 191	<0. 01
AB	2 147. 990	9	238. 666	75. 260	<0. 01
误差	101. 478	32	3. 171		
总计	90 477. 514	48			
校正总计	39 910. 188	47			

注: 校正模型 $R^2 = 0. 997$, $R^2_{adj} = 0. 996$

表 7 LSD 比较结果 (主效应 A)

Tab. 7 Results of LSD comparison (main effect A)						
(I)A	(J)A	均值差值 (I-J)	标准误差	P 值 ^a	差分的 95% 置信区间	
					下限	上限
A ₁	A ₂	2. 193	3. 024	0. 472	-3. 914	8. 300
	A ₃	19. 583 *	3. 024	0. 000	13. 476	25. 689
	A ₄	-0. 968	3. 024	0. 750	-7. 075	5. 138
A ₂	A ₁	-2. 193	3. 024	0. 472	-8. 300	3. 914
	A ₃	17. 390 *	3. 024	0. 000	11. 283	23. 497
	A ₄	-3. 161	3. 024	0. 302	-9. 268	2. 946
A ₃	A ₁	-19. 583 *	3. 024	0. 000	-25. 689	-13. 476
	A ₂	-17. 390 *	3. 024	0. 000	-23. 497	-11. 283
	A ₄	-20. 551 *	3. 024	0. 000	-26. 658	-14. 444
A ₄	A ₁	0. 968	3. 024	0. 750	-5. 138	7. 075
	A ₂	3. 161	3. 024	0. 302	-2. 946	9. 268
	A ₃	20. 551 *	3. 024	0. 000	14. 444	26. 658

注: A₁ 为槐属二氢黄酮 G 显色, A₂ 为槐属二氢黄酮 G 未显色, A₃ 为苦参酮显色, A₄ 为苦参酮未显色。a 表示对多个比较的调整, 为最不显著差别 (相当于未作调整)。* 表示均值差值在 0. 05 级别上较显著

表 8 LSD 比较结果 (主效应 B)

Tab. 8 Results of LSD comparison (main effect B)						
(I)B	(J)B	均值差值 (I-J)	标准误差	P 值 ^a	差分的 95% 置信区间	
					下限	上限
B ₁	B ₂	-1. 078	4. 005	0. 789	-9. 154	6. 998
	B ₃	-63. 344 *	4. 005	0. 000	-71. 420	-55. 268
	B ₄	-36. 023 *	4. 005	0. 000	-44. 099	-27. 947
B ₂	B ₁	1. 078	4. 005	0. 789	-6. 998	9. 154
	B ₃	-62. 265 *	4. 005	0. 000	-70. 341	-54. 189
	B ₄	-34. 944 *	4. 005	0. 000	-43. 020	-26. 868
B ₃	B ₁	63. 344 *	4. 005	0. 000	55. 268	71. 420
	B ₂	62. 265 *	4. 005	0. 000	54. 189	70. 341
	B ₄	27. 321 *	4. 005	0. 000	19. 245	35. 397
B ₄	B ₁	36. 023 *	4. 005	0. 000	27. 947	44. 099
	B ₂	34. 944 *	4. 005	0. 000	26. 868	43. 020
	B ₃	-27. 321 *	4. 005	0. 000	-35. 397	-19. 245

注: B₁ 为 80% 乙醇提取, B₂ 为甲醇提取, B₃ 为乙酸乙酯提取, B₄ 为文献方法提取

由表 6 可知, 效应 B 和 AB 对总黄酮含量有极显著影响 ($P < 0. 01$), 而且前者 (4 种制备方法) 影响更明显。

由表 7 可知, A₃ 法 (苦参酮显色) 测定结果与其他方法比较, 均有极显著差异 ($P < 0. 001$), 而其他 3 种方法之间无显著差异 ($P > 0. 05$)。将 HPLC 法 (表 5) 与苦参酮显色测定结果比较, 发现两者呈显著正相关 ($P = 0. 001$), 同法考察其他 3 种测定方法, 发现也均与其有显著相关性, 表明 4 种测定方法均能反映不同提取方法在有效成分含有量上的差异。结合表 2 和表 5, 可知苦参酮显色的测定结果更接近于 HPLC 法, 与其他 3 种方法比较, 均有显著差异 ($P < 0. 001$)。同时还发现, 苦参酮显色后的吸光度是同样浓度槐属二氢黄酮 G 的 2 倍, 表明若以槐属二氢黄酮 G 为对照测定总黄酮含量时, 结果将偏大, 可能与实际值不一致。综上所述, 以苦参酮显色为对照更适宜苦参提取物中总黄酮的定量测定。

由表 8 可知, B₃ 法和 B₄ 法 (乙酸乙酯提取法和文献方法) 与其他方法比较, 均有极显著差异 ($P < 0. 001$)。进一步对两者进行比较, 发现也有极显著差异 ($P < 0. 001$), 并以前者为大, 即乙酸乙酯提取效果最好。

3 讨论

本实验建立了 4 种方法测定苦参总黄酮含量, 发现各方法所得结果有较大差异, 其中以苦参酮及槐属二氢黄酮 G 为对照品, 在紫外条件下直接测定时偏大, 显色后测定时则偏小。由于不同结构母核可能均会在同一紫外波长处产生吸收, 故直接采用紫外波长处测定时专属性较差。苦参总黄酮的基本骨架类型为黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇, 均可与盐酸-镁粉发生还原反应, 可能有较强的专属性。在反应过程中, 黄酮 C 环上 C-O 键断开, C₂ 与 C₃ 形成双键, 共轭体系增大, 颜色加深, 一般呈红色或紫红色。研究发现, 苦参酮与槐属二氢黄酮 G 在同样浓度显色后吸光度的差异较大 (前者约为后者的 2 倍), 可能与两者结构有关, 前者 A 环 C5 位是-OCO₃, 而后者是-OH, 氧原子均可与苯环共轭, 使 C-O 键具有部分双键性质, 即都是强给电子基。在盐酸-镁粉反应中, 两者均可增大黄酮共轭体系电子云流动性, 减小分子中 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的能级差, 最大吸收波长移向长波, 发挥助色团作用。文献 [22] 报道, 在酸性条件下, -OH 活化苯环的能力弱于-OCO₃, 即后者与苯环的共轭效应略强于前者, 故在该反应中苦参酮的颜色深于槐属二氢黄酮 G。

同时, 以甲醇和 80% 乙醇制备的苦参提取物

中，总异戊烯黄酮含有量与文献 [19] 报道基本一致，但采用乙酸乙酯提取时，其含有量约为两者的 18 倍，表明宜采用乙酸乙酯作为溶剂提取苦参总黄酮。

参考文献：

[1] 张 翹, 马 悦, 高慧敏, 等. 苦参化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 205-214.

[2] 杨志欣, 李 霞, 单柏松, 等. 苦参总黄酮的研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1119-1123.

[3] 赵 宁, 李伟泽. 苦参碱纳米柔性脂质体的制备及包封率测定[J]. 中成药, 2016, 38(2): 444-446.

[4] 杨志欣, 单柏松, 李 霞, 等. 槐属二氢黄酮 H 的药理活性及构效关系评述[J]. 中药材, 2016, 39(2): 457-461.

[5] Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, *et al.* Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*[J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(12): 1595-1599.

[6] Sohn H Y, Son K H, Kwon C S, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L. , *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11 (7-8): 666-672.

[7] Kang T H, Jeong S J, Ko W G, *et al.* Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*[J]. *J Nat Prod*, 2000, 63 (5): 680-681.

[8] Ko W G, Kang T H, Kim N Y, *et al.* Lavandulyl flavonoids; a new class of *in vitro* apoptogenic agents from *Sophora flavescens* [J]. *Toxicol in Vitro*, 2000, 14(5): 429-433.

[9] Tashiro M, Suzuki F, Shirataki Y, *et al.* Effects of prenylflavanones from *Sophora* species on growth and activation of mouse macrophage-like cell line [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (1A): 53-58.

[10] Chi Y S, Jong H G, Son K H, *et al.* Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62(9): 1185-1191.

[11] Kim Y C, Kim H S, Wataya Y, *et al.* Antimalarial activity of lavandulyl flavanones isolated from the roots of *Sophora flavescens*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(5): 748-750.

[12] Jeong G S, Li B, Lee D S, *et al.* Lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens* protect mouse hippocampal cells against glutamate-induced neurotoxicity via the induction of heme oxygenase-1 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(10): 1964-1967.

[13] Hwang E M, Ryu Y B, Kim H Y, *et al.* BACE1 inhibitory effects of lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(14): 6669-6674.

[14] 刘鹏飞, 程爱卿, 邓天昇, 等. 苦参中总黄酮含量的测定及分布研究[J]. 中成药, 2007, 29(4): 596-598.

[15] 高红宁, 金万勤, 郭立玮. 微滤-大孔树脂法精制苦参中氧化苦参碱和苦参总黄酮的比较研究[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(4): 334 -341.

[16] 刘 斌, 石任兵, 周素蓉. 苦参汤有效部位总黄酮含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 24-26.

[17] 卢丽萍, 张 蕾, 廖琼峰, 等. 苦参中总黄酮含量测定方法的研究[J]. 今日药学, 2011, 21(3): 146-148.

[18] 赵凤春, 李 浩, 陈两绵, 等. 苦参提取物的质量标准研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 245-250.

[19] 马鸿雁, 周婉珊, 褚夫江, 等. 苦参中黄酮类成分的高效液相指纹图谱及 5 种成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2690-2695.

[20] 刘 怡, 孟 江, 陈 磊. 苦参黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 282-285.

[21] 张瑞菊. 苦参中黄酮类有效成分的提取、检测及相关性质的研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.

[22] 袁耀锋, 王文峰. 羟基和甲氧基活化苯环能力比较[J]. 化学教育, 2015, 36(10): 74-77.