

中草药有效成分 含量测定

(中草药化学补充教材)

北京中医学院编印

1979年11月

新
知
舟
PDC

目 录

第一章 中草药成分的含量测定	(1)
一、中草药成份含量测定的意义和要求	(1)
二、含量测定前的准备工作	(4)
三、含量测定	(7)
薄层定量测定	
(一) 薄层洗脱定量	(8)
(二) 薄层上直接测定	(12)
第二章 生物碱类成分的含量测定	(28)
一、重量法	(29)
(一) 游离硷直接称重法	(29)
(二) 形成不溶物沉淀称重法	(33)
二、容量法	(40)
(一) 水溶液酸硷滴定法	(40)
(二) 非水溶液碱量法	(45)
(三) 两项滴定法	(47)
(四) 络合量法	(51)
(五) 沉淀容量法	(54)
三、光度法	(58)
(一) 可见光分光光度法	(59)
(二) 紫外光分光光度法	(67)
四、层析方法在生物碱含量测定的应用	(70)
(一) 氧化铝吸附柱层析	(70)

(二) 硅藻土分配柱层析.....	(71)
(三) 离子交换层析.....	(73)
第三章 黄酮类成分的含量测定.....	(75)
一、比色法和紫外分光光度法测定中草药中黄酮类成份.....	(80)
二、利用聚酰胺柱层析分离测定总黄酮.....	(83)
第四章 强心甙类的含量测定.....	(85)
一、样品的干燥和提取分离.....	(87)
二、一般的测定方法.....	(87)
第五章 蒽醌类成分的含量测定.....	(93)
一、砷测定法.....	(93)
二、利用葡聚糖凝胶柱层析分离测定.....	(96)
第六章 皂甙类成份的含量测定.....	(99)
一、重量法.....	(99)
二、光度法.....	(100)
(一) 比色法.....	(100)
(二) 紫外光分光光度法.....	(107)
第七章 鞣质类成份的测定.....	(109)
一、高锰酸钾法.....	(109)
二、络合量法.....	(110)
第八章 含挥发油类成份的测定.....	(112)

一、中草药中挥发油的含量测定	(112)
二、物理常数的测定	(114)
三、官能团的测定	(114)
第九章 其他成分的含量测定	(123)
一、氰甙类成份的含量测定	(123)
二、酚甙类成份的含量测定	(124)
三、紫草中紫草素的含量测定	(127)
四、穿心莲总内酯、穿心莲内酯、和新穿心莲甙 的含量测定	(128)
五、秦皮中秦皮乙素的含量测定	(130)
六、金银花提取物中绿原酸的含量测定	(131)
七、鱼腥草素的含量测定	(132)
八、薹菜素的含量测定	(134)
九、斑蝥中斑蝥素的含量测定	(136)
十、植物药中糖的含量测定	(137)
第十章 气相和高速液相层析在中草药含量测定上的 应用	(140)
一、气相色谱法在中草药含量测定的应用	(140)
(一) 挥发油的应用	(140)
(二) 生物硷的应用	(145)
(三) 槐花蕾中芦丁的含量测定	(150)
(四) 人参或人参茶中皂甙的含量测定	(152)
(五) 蟾酥中主要成份的含量测定	(154)
二、高速液相色谱法在中草药含量测定的应用	(157)
(一) 五味子中五味子酯甲的测定	(157)

(二) 药材中小檗硷的含量测定·····	(159)
(三) 黄连中生物硷的含量测定·····	(161)
(四) 甘草中甘草皂甙的含量测定·····	(166)
透光率光密度表·····	(169)

第一章 中草药成分的含量测定

一、中草药成份含量测定的意义和要求

进行中草药的研究，除了研究其有效成份的提取、分离、纯化、检识外，尚需要了解其中有效成分的含量。由于中草药品种繁多，产地广泛，又存在着同名异物或同物异名的情况，有时同一品种亦往往因生长栽培条件，采收时期，加工方法和储存条件不同而影响其有效成份的含量，因此需要对其有效成份进行含量测定，以充分发挥其药效。中草药含量测定的意义可有以下几方面：

(一) 当某一中草药，已确定某一活性成分，要进行提取生产，则该中草药原材料的资源是一个重要问题。目前多利用植物亲缘关系和化学成份间的关系，从已知含此类成份的植物群中寻找高含量的新资源，因此需要了解其有效成份的含量，例如从石苇中提取祛痰药异芒果甙和芒果甙，其在石苇中含量仅0.1%，若进行投产则需很多生药石苇，但无法取得这么多的石苇，需寻找新资源，经含量测定找到知母叶，芒果树叶，扁桃叶中都含有异芒果甙和芒果甙，其中扁桃叶中含量为2%，为石苇中异芒果甙含量的20倍，而此三种资源原来都不入药，目前废物利用，又可投产。再有如要育选高含量品种，例如几种主要萜萜烷类生物碱在中国茄科植物中存在的情况。通过含量测定证明矮萜萜和青海萜萜的根中有较高含量的萜萜碱和山萜萜碱，因此是两种有价值的原科植物。

(二) 评价中草药质量优劣则需对有效成份进行含量比较，例如不同产地的远志，有效成分皂甙的含量，差别很大，高的含量可达14.1%（吉林产），低的含量（陕西产）仅有5.46%，江苏海门地区的延胡索品种含总生物碱为0.33%，浙江金华的为0.50%，而北京引种的为0.72%。

(三) 中草药种植采收条件的观察

中草药的引种栽培和种植采收的条件对中草药质量有着密切关系，通过含量测定对不同因素变化所收集的样品作测定观察，可以为种植采收条件的选择提供依据，例如从种植穿心莲叶中提取内酯，发现各地或同一产地的不同采收条件下内酯的含量变化很大，为摸清不同季节和生育期，各种穿心莲内酯的含量变化规律，分别采收8~10月份不同成熟程度的叶片（嫩叶、中叶、老叶）作定量测定，结果表明总内酯、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯均以9~10月份嫩叶中含量较高，各种内酯含量也分别随季节不同而变化。因此配合生产需要，可参考实验测定结果，选择合理采收期。又例如槐米中芦丁的含量，其花蕾期含量7%，盛开期含量3.5%，落地时含量2.4%，采收后阴干经24小时含量由7%下降到5.8%，数日后到达4%，一个月后到3.6%，若采收后立即蒸气处理十分钟，久放含量不变。

(四) 确定有效成份在中草药原植物各器官的分布，含量测定也有着实际意义，远志皮部测定皂甙含量为12.1%，而木心部仅为0.48%。为临床曾用远志皮部的实践经验，提供了科学依据，又例如罂粟各部份吗啡含量截然不同例如其蒴果含吗啡0.25~0.54%，茎为0.01~0.03%，叶为0.06~0.07%，种子内不含吗啡。为提取吗啡选用原材料提供依据。

(五) 中草药的合理加工炮制，对于确保用药安全有效是必不可少的。对黄芩的炮炙方法各地不一，经比较各种炮炙方法(冷浸，烫，煮，蒸)含量测定其总黄酮量，结果表明蒸黄芩，煮黄芩，生黄芩高于烫黄芩，冷浸黄芩。比较以上各种炮制方法认为以蒸制法最好。

(六) 目前中草药制剂，除了少数采用有效成分单体外，多缺乏质量标准，生产过程只有投料控制，没有质量控制，即只有含生药量，而没有有效成分含量的测定，因此制剂质量不稳定，要解决质量稳定的问题，须对其已明确的有效成分，进行含量测定，同时制剂工艺的选择也是主要环节之一，提取工艺合理与否将直接影响制剂质量与临床疗效，因此提取工艺的选择与考核具有重要意义，中草药注射剂常见以水醇法提取，但由于有效成份的化学性质差别很大，不作具体分析和测定选择合理工艺，就严重地影响质量。例如以水醇法制备的三黄注射液(黄芩、黄柏、大黄)，经含量测定，表明该制剂有效成分含量甚微或几乎损失殆尽。又例如鱼腥草素注射液，系水蒸汽蒸馏法制备，经含量测定知注射液内皆不含或含极微量癸酰乙醛，则进一步说明此种制剂工艺影响质量。

(七) 新药质量标准的制定

在临床试用阶段一个新药质量控制的目的是保证用药安全，送往临床试用药物质量应与药理实验的药物质量基本相同，并保证每批质量相同，这样才不致影响对该药物作出正确的评价和结论，有明确成分的都要求作到含量标准。在药物生产和推广使用阶段，则更需要含量测定保证大量生产的药物和小量生产的临床试用阶段的药物质量一致。新药质量控制的内容除了定性，杂质限度检查外，皆须对其主要成

份进行含量测定，含量测定方法确定之后，再需要据测定方法的精密度，结合生产水平，并经多批正式产品的分析结果，确定某新药中有效成分的含量范围，并注明在新药的质量控制范围之内。

总之，评价一种中草药或一种制剂的质量优劣，应以有效成份含量高低为标准。在发掘中草药资源，变野生为家种，育选高含量品种，确定有效成份在原植物器官的分布，寻找最合适的生产条件，了解各成份在制剂中的含量及稳定情况，制定新药的质量标准等都必需对中草药或其制剂中各成份进行含量测定。由于分析方法的发展，各种高性能分离技术和微量定量方法的利用，中草药中各成份的测定，已逐渐成为可能。

中草药成份分析，要求作到提取完全，分离完全，方法简便，测定结果可靠。根据要求可测定某一单一成份或一类总成份。（如总生物硷、总黄酮的测定。）

二、含量测定前的准备工作

（一）取样，干燥和粉碎。

在选取欲分析的中草药样品时，首先注意名称是否相符，核对其原植物品种及拉丁名称，并观察是否经过加工炮制或混有外来杂质，取样时应注意均匀性和代表性。分析用的样品需先经干燥，干燥方法依样品的具体情况采用烘干、晒干、阴干等方法，如含有挥发性成分的中草药应采用阴干方法进行干燥，若有效成份不稳定，应在干燥时注意控制温度不可过高，一般应在 60°C 以下，样品块较大的要先设法捣碎再干燥，含油脂类成份较多不易粉碎的中草药，先经脱脂，再粉碎，或尽量粉碎不过筛，根据不同样品的要求，研

磨成粉，过筛备用，一般可通过 20~60 目筛，必须注意将样品全部磨细过筛搅匀，置硅胶干燥器中备用。

(二) 欲测定成份的提取，净化和分离。

1、提取方法

①冷浸法 精密称量一定量粉末样品，置带塞三角瓶中，精密加入一定量适宜溶剂，摇匀后放置进行浸泡提取，溶剂用量为样品重量的 6~10~20 倍，并称重，浸泡时间 12~24~48 小时，在浸泡期间应注意经常振摇，浸泡后，再称重后，采用适宜过滤器过滤，精密量取一定体积的滤液，与一定重量样品相当，然后再将滤液根据各类成份的不同性质加以净化，分离和测定。

此法的优点是适宜于遇热不稳定的有效成份，操作简便应用较广。

②渗漉法 精密称量一定量粉末样品，加入少量适宜溶剂湿润，搅拌均匀后，装入小型渗漉筒，装筒时要注意厚度及松紧度均匀，然后装好溶剂浸泡过夜，再调整好渗漉速度进行渗漉，最后以适宜的试剂检查有效成份是否提取完全。可以将渗漉液全部用来作为含量测定，也可调整至精确体积后，精取一部份作为含量测定用。本法的优点是提取时样品不受热，对热不稳定的有效成份比较适宜，提取完全，其缺点为所需溶剂量大。

③连续回流提取 将样品置沙氏提取器中或简单回流提取装置中(图 1)，利用遇热可以挥发的溶剂进行反复回流提取，本法提取效率高，所需溶剂少，但遇热易破坏的

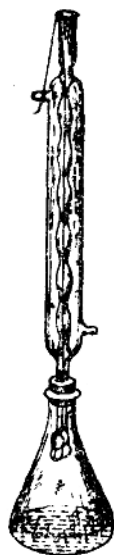


图 1 简易回流提取装置

有效成份，不宜用此法。

2、净化方法

中草药中除含被测成份外，还有一些其他成份，对被测成份的含量测定产生干扰，因此在测定前必须进行净化，净化的方法要能除去对测定有干扰的杂质，而又不损失欲测定的成分。净化的要求以能排除对所采用的测定方法产生的干扰为度。如用重量法测定亲脂性的有效成分时，脂肪油、树脂，及脂溶性色素会带来干扰，则应设法将其排除，又如采用酸碱滴定法测定生物碱含量时，色素的存在，会影响终点的观察，有机酸的存在会影响测定结果的准确性，均须设法除去，总之，净化方法的设计主要依据欲测定成分和杂质在理化性质上的差异，同时结合与所要采用的测定方法的要求，常用的净化方法可有以下几类：

①溶剂提取法：可采用适宜的溶剂直接提取杂质，使与欲测定成分分开，如用石油醚除去脂肪油，用石油醚，乙醚等除去脂溶性色素；还可利用有效成分溶解度的性质，经反复处理使其转溶于亲脂性溶剂和亲水性溶剂之间，以除去水溶性杂质及脂溶性杂质，如测定生物碱含量，可利用生物碱遇酸成盐溶于水，碱化后易溶于有机溶剂的性质，反复处理。又如蒽醌类和酚类化合物常可利用其具有的酚羟基能溶于碱性水溶液中的性质，使与杂质分开，一般可先使其溶于亲脂性溶剂中，如苯，氯仿，然后再以碱性水溶液自亲脂性溶剂中提取欲测定成份，使杂质残留于亲脂性溶剂中。

②沉淀法：可采用某些试剂使杂质产生沉淀，保留溶液，也可采用某些试剂使欲测成分沉淀，然后滤取沉淀，弃去滤液。这两种方法都可使欲测成分与杂质分开，例如硅钨酸，苦味酸，碘化铋钾可以与生物碱产生沉淀，可与杂质分开。

③蒸馏法：利用某些欲测定的成分具有挥发性，可以采用蒸馏法，收集馏液进行含量测定，而非挥发性杂质则可以残留下来，如含甙甙，酚类和挥发油类成分即可采用此法。

④层析法：吸附层析（包括柱层析和薄层层析），分配层析（柱层析，薄层层析和纸层析），离子交换层析，聚酰胺层析及凝胶层析等皆可作为净化方法，大多是将欲测成分吸留后，使杂质残留于溶液中，然后再设法将欲测定成分洗脱下来，进行含量测定。采用此法应注意回收率是否合乎要求，并应做空白实验，以校正结果。

3、分离

如果欲测定总成分的含量（如总生物碱，总黄酮，总强心甙等），则可在净化后，就进行含量测定，但如欲测定总成分中某一部分的含量，或测定某单一成分的含量时，则还应进行分离。中草药的成分复杂，在没有有效的分离方法以前，要准确定量测定其中的单一成分常遇到很多困难，例如测定总成分中酸碱性强弱不同的某单一成分，可依其性质的差异，采用合适溶剂提取。又如欲测定甙的含量而不测游离甙元的含量时，则利用甙与甙元溶解度不同的性质使之分离，但性质彼此类似的成分也有一同被提出的可能，因此准确度不一定很好。自有层析法以来，中草药成分的分离和定量测定有很大的进展，特别是高效液相层析和气相层析的应用，常能将几种或十几种单一成份在短时间内分离并定量测定。经典的柱层析，薄层层析，已广泛地应用于中草药成分的分离和含量测定。

三、含量测定

重量法、容量法、比色法、分光光度法等都能应用于中

草药成分的含量测定。

经典的柱层析早用于中草药成分的分离和提纯，氧化铝柱吸附性较强，常只能用作总成份（如生物碱）的定量分离和定量测定，用于单一成份，一般不易成功。硅藻土柱和离子交换树脂柱用途较广，分离单一成份常能得到良好的结果，以后用聚酰胺柱和葡聚糖凝胶柱曾作黄酮类和蒽醌甙的定量分离和测定。据前人经验认为经典柱层析操作手续虽然较繁，分析时间较长，但分析准确度和精密度尚能达到经典分析的水平。

气相层析和高效液相层析近来也常用于中草药成分的含量测定，目前多用于研究工作，较少地作为法定方法用于药物的常规定量分析。现将用较广泛和所需仪器设备易行的薄层层析定量方法的一般问题加以介绍。

薄层定量测定

薄层定量的方法可分为两大类：一类是将测定的化合物自薄层上洗脱后再选择适当方法测定，另一类是样品经层析后直接在薄层上进行测定。

薄层定量测定的准确度和层析分离的好坏有很大的关系，如展开后所测成分的色点集中，与其他色点分离清晰，则结果较好，因此在薄层定量时，对层析分离的要求较高，对层析操作的要求也要求严格。

（一）薄层洗脱定量

样品经层析分离后，用适当方法定出色点位置，然后将色点部位的吸附剂取下，用溶剂将化合物洗脱后进行测定，本方法操作所需时间较长，但洗脱不需贵重仪器设备，测定结果具有较好的准确度和精密度，所以是目前常用的一种方法。

洗脱测定方法的步骤如下：

①层离后色点的定位:

本身有色的化合物直接就能定位, 有荧光的化合物可于紫外光下观察定位, 但多数化合物是无色的, 则必须选用一个不影响下一步测定的显色试剂。

A. 直接定位:

可用荧光薄层检出对紫外光有吸收的化合物, 所用荧光剂必须不干扰测定。

碘蒸气显色是比较常用的一种方法, 很多化合物在碘蒸气中能显黄—棕色点, 碘显色时间要尽量短, 只要能看出色点位置就将薄层自碘蒸气中取出, 用针记下色点位置, 放置于空气中挥去碘, 显色时间太长, 色点太深, 在空气中挥去碘的时间太长。对与碘能发生作用的化合物或残留的微量碘影响测定时, 则不能用本法定位。有时也用碘的氯仿溶液喷雾显色代替碘蒸气显色, 若可找一种显色剂, 使斑点显色, 显色的斑点仍可用于随后的定量测定, 则最为理想, 例如测定茄科生物碱时, 用改良碘化铋钾试剂与碘—碘化钾试剂(1:1)喷雾显色后, 将显现的生物碱色点取下洗脱, 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 还原 $\text{I}_2 \rightarrow \text{I}^-$, 使显色剂不干扰测定。

B. 对照法:

上述几种直接定位的方法均不适用时, 则可用对照法定位, 即在同一块薄层上随同样品至少再点一个标准品点作为对照, 展开后, 将所要测定样品点的薄层部份用玻璃板或硬纸盖住, 对照的标准点用显色剂喷雾显色, 由显色后对照点的位置来确定未显色薄层上所测成分色点的位置, 将该位置的吸附剂取下, 洗脱测定。为了尽可能使样品与标准点展开情况一致, 使二者相应色点的位置完全一样, 所用薄层的厚度要均匀, 展开剂展开要平稳, 溶剂前沿不得歪斜, 而且要

注意防止边缘效应的产生。样品溶液中若杂质含量较多，杂质的存在也会影响到色点的 R_f 值，所以最好再同时多点一个样品点，展开后将标准点与对照用的样品点一起显色，由显色的对照品点中所要测定成分的位置来确定要测定的样品点中色点位置，这样定位能更准确些。本法由于仅用对照点显色来确定位置，而层析后样品色点位置有时多少仍会出现差别，尤其在组成比较复杂的样品中，若在所要测定色点的附近有其他色点存在，在画取色点位置时往往容易将邻近色点画入，或是将色点遗漏未画取完全，造成测定结果的偏高或偏低，所以在色点取下后，可以将薄层再喷雾显色，观察所取色点位置是否正确，若取的位置不正确，就不必往下进行测定。

②薄层上色点的取下和洗脱

薄层上色点位置确定以后，用吸集器将色点位置的吸附剂吸下，收集器是一个 10 厘米长的微量层析管，管下端塞一小块棉花，如棉花对定量有干扰（吸附所测定的成分或棉花上有杂质能被洗脱并干扰测定等）则改换一小块玻璃棉，玻璃棉预先用洗液洗涤处理，微量层析管的上端接一吸取头，其形状类似牛角管，吸取头借一小橡皮圈可塞在层析管的上端口上，或用特制磨口薄层收集器如图 2，层析管下端用橡皮管接在水泵上抽气，然后把吸取头尖的嘴靠近要测定的色点而把色点吸入层离管内，吸取时仔细定量地将色点全部吸下，然后用溶剂进行洗脱，先冲洗吸取头，再冲洗柱管部分，直到将吸附剂上的化合物全部定量洗下，为了增加洗脱速度，也可以在减压下洗脱，装置如图

洗脱剂要选择对洗脱的化合物有较大溶解度的挥发性溶剂，常用有乙醚，氯仿，丙酮，乙醇，甲醇等，若单一溶剂

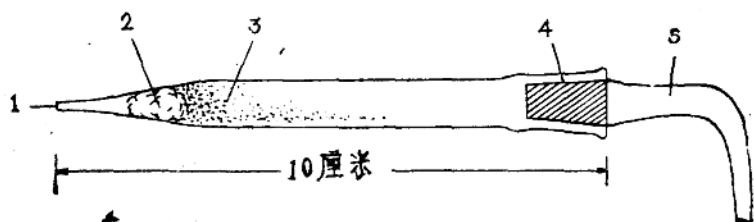


图2 吸集器

1 抽气 2 棉花 3 吸附剂 4 磨口塞 5 吸取头

洗脱效果不好时则可用混合溶剂，选用溶剂还应考虑下一步测定所用的方法，如用紫外分光光度法测定，则应注意对紫外有强度吸收的溶剂就尽可能不用，即或可以、将溶剂蒸去，也要防止可能存在的少许残留溶剂的干扰；若测定是在甲醇溶液中进行，而甲醇又能将化合物定量洗脱，则就选甲醇洗脱，以免去改换测定溶剂，增加操作手续。

在试验寻找合适的洗脱条件时，是将一定量样品点在薄层上，干后不经层析，直接将点样部分的吸附剂取下，洗脱测定，然后计算回收百分率，在定量测定中，回收率最好能在95%以上，试验时，一定要等点样溶液完全干后再取下吸附剂洗脱测定，因为在没有干的情况下，色点中的化合物被吸附剂吸附较弱，所以不能代表层析展开并

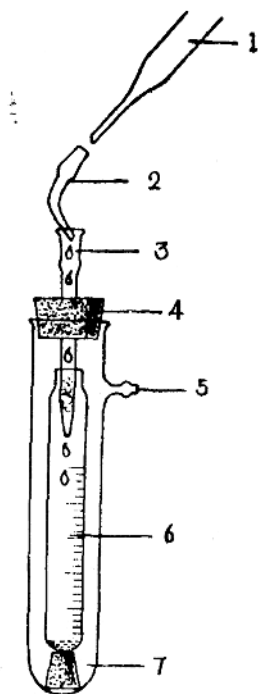


图3. 减压洗脱

1 滴管 2 吸取头
3 吸集器柱管 4 橡皮塞
5 抽气 6 带塞试管
7 抽滤管

干燥后再洗脱的情况。

除了上述用溶剂洗脱的方法外，也可将取下的吸附剂在离心管中用一定量溶剂浸泡并振摇一定时间，离心取上层清液测定，此方法适于用易自吸附剂上洗脱的化合物。

③测定 用于薄层层析的样品量一般很少，常为几微克或几十微克，偶有用几百微克。因此常用的测定方法是紫外及可见光光度法。

a. 紫外分光光度法

用合适溶剂将化合物洗脱后，并调整至一定体积，在化合物的最大吸收波长处进行测定，把样品色点相应位置的空白薄层吸附剂同样取下洗脱，作为测定时的空白对照溶液，因为吸附剂本身洗脱后往往也有一定的吸收值，必须在样品测定值中除去。

b. 比色法

选择灵敏度高，专属性好的比色反应测定化合物含量是较常用的方法。从吸附剂上洗下的洗脱液调整体积后，加入显色剂显色，若洗脱所用溶剂不适用于下一步的比色反应，则将溶剂蒸干后再进行比色。同时也应作空白试验。

(二) 薄层上直接测定

混合物经薄层分离后直接在薄层上进行定量，方法可分为三种，即（一）目测法（二）测面积法（三）仪器测量法。目测法是样品经层离后，直接观察色点的大小和颜色的深浅，与已知不同浓度的标准品在相同层离条件下展开所得到的一系列标准色点相比较，从而近似地推测样品中所欲测定成分的含量。此方法只是一种粗略的定量方法，误差较大，但可作为药物中杂质控制的限度试验。测面积法是利用展开后薄层上色点面积和样品量之间的关系，根据实验条件