

紫外分光光度法和比色法测定具有邻苯二酚 结构的药物的含量

III 原儿茶酸及原儿茶醛的含量测定

刘训红* 池锦屏* 孟 怡 于如嘏

Spectrophotometric and Colorimetric Determination of
Drugs Containing Ortho Dihydric
Phenolic Structure

II Determination of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde

Liu Xunhong Chi Jinping Meng Yi Yu Rugu

【摘要】应用紫外分光光度法和比色法测定了原儿茶酸和原儿茶醛的含量和吸收系数。

原儿茶酸及原儿茶醛广泛存在于中草药中。例如,原儿茶酸存在于四季青^[1]、苧麻^[2]等中药中,其制剂制备、抗菌作用和临床应用亦有报导^{[3][4][5]};又如,原儿茶醛存在于四季青^[6]、丹参^[7]等中药中,其增加冠脉血流量和减少心肌耗氧量等作用也有报导^[8]。中国药典1977版已将原儿茶酸、原儿茶醛的显色反应和紫外吸收^[9]列为鉴别这些中药制剂的方法。

E. Emerson^[10]研究了酚类和4-氨基安替比林(简称4-AAP)的缩合显色反应。T. A. Larve 等^[11]应用4-AAP与儿茶酚类化合物的缩合显色反应,进行了儿茶酚类化合物分光光度法测定,但实验条件和方法的准确度未详细报导。P. M. Nair 等^[12]报导用亚硝酸钠—钨酸钠比色法测定原儿茶酸的含量。D. W. Barnuw 的实验表明钨酸钠不如钼酸钠^[13]。我们参考上述和其他有关文献资料^[14]以及以前报导^{[15][16]},对原儿茶酸及原儿茶醛的紫外分光光度法、亚硝酸钠—钼酸钠比色法和原儿茶酸的4-AAP比色法的各种实验条件以及方法的准确度进行了探索。

实验部分

一、仪器和试剂

(一) 仪器 同以前报导^{[15][16]}。

(二) 试剂 除另有说明外均为分析纯。

1979年11月10日收稿

* 我院1974年级毕业生

1. 原儿茶酸对照品 试剂经重结晶精制、熔点、纸层析及紫外光谱检查，符合要求。
105℃干燥至恒重备用。

2. 原儿茶醛对照品 同上要求，但在干燥器中室温干燥24小时。

3. 原儿茶酸标准溶液 精密称取已干燥至恒重的对照品12.5毫克，加95%乙醇5毫升使溶解，加1N HCl 5毫升，加水适量稀释，转移至50毫升容量瓶中，加水稀释至刻线，摇匀。

4. 原儿茶醛标准溶液 精密称取已干燥至恒重的对照品10毫克，按原儿茶酸标准溶液配制法配制（原儿茶醛易溶于水，不用乙醇溶解）。

5. 亚硝酸钠—钼酸钠溶液 取亚硝酸钠10克，钼酸钠15克，加水使溶解并稀释至100毫升，摇匀。

6. 4-AAP 溶液 取4-AAP 3克溶于100毫升水中，置冷暗处，一周内稳定。

7. 过硫酸铵溶液 0.01%溶液置冷暗处，一周内稳定。

二、紫外分光光度法

(一) 吸收曲线的测绘

精密吸取原儿茶酸（或原儿茶醛）标准溶液1毫升，置50毫升容量瓶中，加1N HCl 25毫升，加水稀释至刻度，摇匀，以试剂作空白，用1厘米石英吸收池在分光光度计上，200~400nm波长范围测绘吸收曲线。

(二) 吸收系数($E_{1cm}^{1\%}$)值的测定

分别精密吸取原儿茶酸（或原儿茶醛）标准溶液1毫升，置25毫升和50毫升容量瓶中，分别加1N HCl 12.5毫升，加水稀释至刻度，摇匀。以试剂作空白，置1厘米石英吸收池中，在波长 259 ± 1 nm处（原儿茶酸）或 230 ± 1 nm处（原儿茶醛）测定吸收值。

(三) 样品测定

取105°干燥至恒重的原儿茶酸（或在室温干燥器中干燥24小时的原儿茶醛）约10毫克，精密称定，加95%乙醇5毫升使溶解（如为原儿茶醛不加乙醇，加水溶解），置50毫升容量瓶中，加1N HCl 5毫升，加水至刻度，摇匀。置1厘米石英吸收池中，以试剂作空白，在波长 259 ± 1 nm处（原儿茶酸）或波长 230 ± 1 nm处（原儿茶醛）测定吸收值，计算百分含量。

三、亚硝酸钠—钼酸钠比色法

(一) 标准曲线

原儿茶酸

精密吸取原儿茶酸标准溶液适量，分别置5个25毫升容量瓶中，使各瓶中原儿茶酸浓度分别为2、4、6、8、10微克/毫升，各加6N HCl 0.4毫升，显色剂1毫升，1N NaOH溶液5毫升，置1厘米比色池中，在波长 500 ± 1 nm处，测定吸收值。以浓度对吸收值作图。

原儿茶醛

同原儿茶酸操作，但使原儿茶醛的浓度为5、10、15、20、25微克/毫升

(二) 样品测定

精密称取样品约8.00毫克，置50毫升容量瓶中（如为原儿茶酸，加95%乙醇5毫升），加1N HCl 5毫升，加水至刻度，摇匀。再精密吸取溶液1毫升，置25毫升容量瓶中，然

后按标准曲线项下自“各加 6 N HCl 0.4 毫升”起，依法操作。

四、4-氨基安替比林比色法

(一) 标准曲线

精密吸取原儿茶酸标准溶液适量，分别置于六个25毫升容量瓶中，使每瓶中原儿茶酸浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0微克/毫升。分别加1 N NaOH溶液0.3毫升，20%碳酸钠溶液1.5毫升，4-AAP溶液5毫升，过硫酸铵溶液0.2毫升，加水至刻度，在空气中室温20~25℃放置1小时，然后在波长 510 ± 1 nm处测定吸收值，以浓度对吸收值作图。

(二) 样品测定

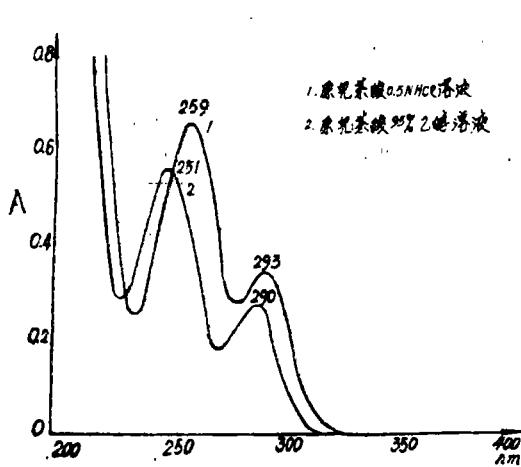
取干燥至恒重的样品约10毫克，精密称定，加95%乙醇5毫升使溶解，置200毫升容量瓶中，加1 N HCl 20毫升，加水稀释至刻度。吸取溶液1毫升，置25毫升容量瓶中，按标准曲线项下，自“加1 N NaOH溶液0.3毫升”起，依法操作。

结果与讨论

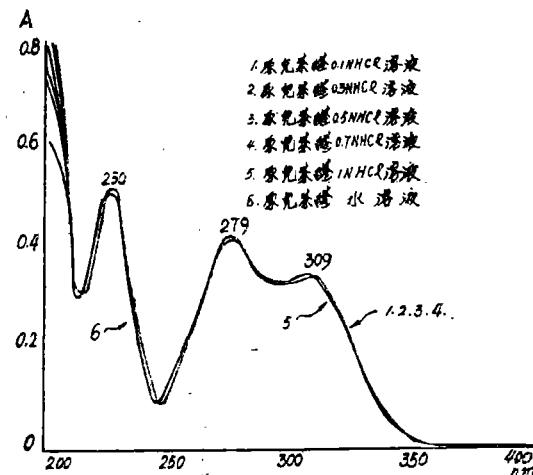
一、紫外分光光度法

(一) 吸收光谱

在UV-300型分光光度计上分别绘制原儿茶酸(图Ⅰ)和原儿茶醛(图Ⅱ)的吸收曲线。由图Ⅰ可见，原儿茶酸(0.5 N HCl溶液)在紫外区有两个吸峰，其一在 259 ± 1 nm处，另一在 293 ± 1 nm处，在 259 ± 1 nm处的是最大吸收峰。其 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为635.1(见后)，克分子吸收系数为 9.787×10^3 。由图Ⅱ可见，原儿茶醛(0.5 N HCl溶液)在紫外区有三个吸收峰， 230 ± 1 nm, 279 ± 1 nm, 309 ± 1 nm，其中以 230 ± 1 nm处的吸收峰为最强。其 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为900.8(见后)，克分子吸收系数为 1.244×10^4 。



图Ⅰ 原儿茶酸紫外吸收光谱



图Ⅱ 原儿茶醛吸收曲线

乙醇浓度和盐酸浓度对吸收峰峰位和吸收强度的影响与以前报导^{[15][16]}的它种邻苯二酚类药物相似。

(二) 吸收系数

原儿茶酸及原儿茶醛吸收系数测得值及数据处理见表 1 及表 2。

表 1 原儿茶酸吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 259) 值

仪 器 型 号	n	原 溶 液			稀 释 一 倍 溶 液		
		$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 259	d	d^2	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 259	d	d^2
751 (上分)	1	642.1	2.0	4.0	—	—	—
	2	641.3	1.2	1.4	628.8	6.5	42.3
	3	635.6	4.5	20.3	634.6	0.7	0.5
	4	638.4	1.7	2.9	641.0	5.7	32.5
	5	630.6	9.5	90.3	638.0	2.7	7.3
	6	632.5	7.6	57.8	627.5	7.8	60.8
	7	639.7	0.4	0.2	637.7	2.4	5.8
	8	642.1	2.0	4.0	631.9	3.4	11.6
	9	634.9	5.2	27.0	631.9	3.4	11.6
Q R - 50 (岛津)	10	646.9	6.8	46.2	626.7	8.6	74.0
	11	639.0	1.1	1.2	632.5	2.8	7.8
	12	636.5	3.6	13.0	632.5	2.8	7.8
	13	646.9	6.8	46.2	639.0	3.7	13.7
	14	639.8	0.3	0.1	632.7	2.6	6.8
	15	642.8	2.7	7.3	635.6	0.3	0.1
	16	646.2	6.1	37.2	632.8	2.5	6.3
	17	633.7	6.4	41.0	635.7	0.4	0.2
	18	648.2	8.1	65.6	—	—	—
U V - 300 (岛津)	19	641.5	1.4	2.0	643.6	8.3	68.9
	20	633.7	6.4	41.0	633.7	1.6	2.6
	21	639.7	0.4	0.2	631.9	3.4	11.6
	22	643.1	2.0	4.0	644.0	8.7	75.7
	23	647.1	7.0	49.0	650.0	14.7	216.1

$$n = 23 \quad \sum E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 14722.3 \quad n = 21 \quad \sum E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 13342.1$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 640.1$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 635.3$$

$$\sum d^2 = 658.1$$

$$\sum d^2 = 664.0$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = 5.47$$

$$S = 5.76$$

$$\sigma = \frac{S}{\sqrt{n}} = 1.14$$

$$\sigma = 1.26$$

$$\therefore E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 640.1 \pm 1.14$$

$$\therefore E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = 635.3 \pm 1.26$$

$$\text{平 均 值} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} 259 = \frac{640.1 + 635.3}{2} = 637.7$$

表 2 原儿茶醛吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 230) 值

仪 器 型 号	n	原 溶 液			稀 释 一 倍 溶 液		
		$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 230	d	d^2	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 230	d	d^2
751 (上分)	1	904.8	4.1	16.8	880.8	20	400
	2	897.8	2.9	8.4	—	—	—
	3	—	—	—	894.3	6.5	42.3
	4	898.2	2.5	6.3	904.0	3.2	10.2
	5	888.8	11.9	141.6	916.6	15.8	249.6
	6	897.3	3.4	11.6	897.1	3.7	13.7
	7	—	—	—	900.3	0.5	0.3
Q R - 50 (岛津)	8	919.4	18.7	349.7	899.5	1.3	1.7
	9	893.2	7.5	56.3	906.7	5.9	34.8
	10	901.8	1.1	1.2	893.9	6.9	47.6
	11	903.5	2.8	7.8	904.0	3.2	10.2
	12	899.9	0.8	0.6	899.9	0.9	0.8
	13	905.1	4.4	19.4	905.1	4.8	23.0
	14	903.1	2.4	5.8	—	—	—
(岛津)	15	906.9	6.2	38.4	912.0	11.2	125.4
	16	899.3	1.4	2.0	915.2	14.4	207.4
	17	900.3	0.4	0.2	916.6	15.8	249.6
	18	899.5	1.2	1.4	891.5	9.3	86.2
	19	—	—	—	880.4	20.4	416.2
	20	912.6	11.9	141.6	896.9	3.9	15.2
	21	889.0	11.7	136.9	—	—	—
	22	893.2	7.5	56.3	—	—	—

$$n = 19 \quad \sum E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 17113.9 \quad n = 18 \quad \sum E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 16214.8$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 900.7$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 900.8$$

$$\sum d^2 = 1002.3$$

$$\sum d^2 = 1934.5$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = 7.46$$

$$S = 10.67$$

$$\sigma = \frac{S}{\sqrt{n}} = 1.71$$

$$\sigma = 2.52$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 900.7 \pm 1.71$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = 900.8 \pm 2.5$$

$$\text{平 均 值} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} 230 = \frac{900.7 + 900.8}{2} = 900.8$$

(三) 样品测定

应用上述吸收系数进行了原儿茶酸和原儿茶醛样品的含量测定。结果列于表 3。

表 3 样品测定结果

样品名称	编 号	含量(%)	平均值(%)	偏差(%)
原儿茶酸	1	101.2 101.5	101.4	0.2
	2	100.9 100.1	100.5	0.4
	3	101.9 102.0	102.0	0.05
	4	102.4 —	102.4	—
	5	102.1 103.1	102.6	0.50
	6	99.21 98.73	98.97	0.24
	7	100.3 101.5	100.9	0.6
	8	100.1 100.2	100.2	0.05
	9	100.2 100.6	100.4	0.20
	10	101.7 102.0	101.9	0.15
原儿茶醛	11	102.1 101.7	101.9	0.20
	12	101.3 101.6	101.5	0.15

由表 3 中的结果可以看出，原儿茶酸测定的偏差未超过0.60%；原儿茶醛测定的偏差未超过0.20%。

二、亚硝酸钠—钼酸钠比色法

(一) 波长选择

实验结果见图Ⅲ。图Ⅲ表明，原儿茶酸显色溶液在可见光区的吸收峰在 500 ± 1 nm 处，其 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 约为 201.8，克分子吸收系数约为 3.23×10^3 。原儿茶醛显色溶液在可见光区的吸收峰也在 500 ± 1 nm 处，峰较平坦，其 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 约为 168.7，克分子吸收系数约为 2.3×10^3 。

(二) 显色剂的用量

实验结果见图Ⅳ。图Ⅳ表明，在同样条件下，在 25 毫升显色溶液中，加入显色剂 1 毫升和 3 毫升所得显色溶液的吸收值无明显差别，而加 5 毫升显色剂时，则显色溶液的吸收值有显著的降低。在放置过程中，加 3 毫升显色剂的显色液不如加 1 毫升显色剂的显色溶液稳定。因此，以加入 1 毫升显色剂为宜。这时，原儿茶酸和原儿茶醛的浓度分别为 6.5×10^{-5} M 和 5.8×10^{-5} M。而 NaNO_2 和 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 的浓度分别为 5.8×10^{-2} M 和 2.5×10^{-2} M。

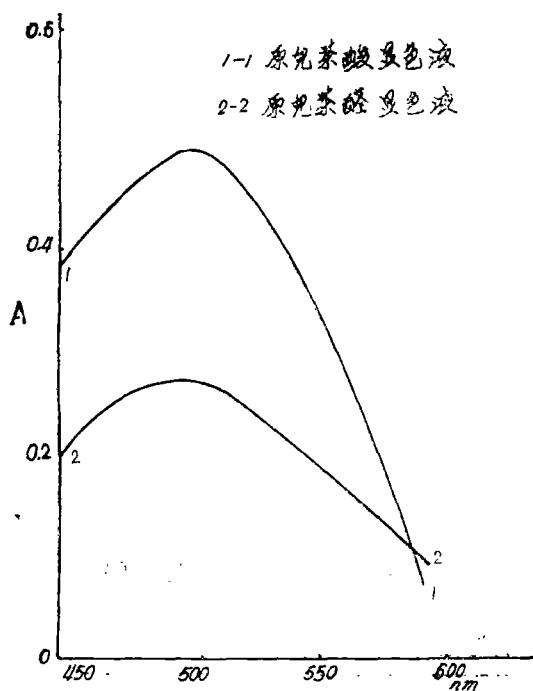


图 III 原儿茶酸、原儿茶醛显色液吸收曲线

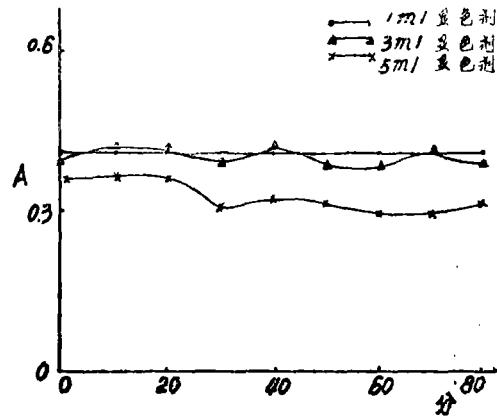


图 IV 显色剂的用量

(三) 显色溶液稳定性

实验结果见图 V。实验结果表明，显色溶液在一小时内是稳定的。放置八十分钟吸收值约下降 8 %。

(四) 浓度范围

实验结果见图 VI、图 VII。从图中可以看出，原儿茶酸浓度在 2~10 微克/毫升（即 $1.3 \times 10^{-5} \sim 6.4 \times 10^{-5} M$ ），原儿茶醛浓度在 1~15 微克/毫升（即 $7.2 \times 10^{-6} M \sim 1.08 \times 10^{-4} M$ ）范围内浓度和吸收值成正比关系，符合比尔定律。

(五) 样品测定

1. 标准曲线在可见光区范围内，有色化合物的最大吸收波长为 $500 \pm 1 nm$ ，原儿茶酸在 2~10 微克/毫升范围内，原儿茶醛在 1~15 微克/毫升范围内测定吸收值，用回归分析法制备标准曲线，其方程为：

$$\text{原儿茶酸 } A = 0.0463 C + 0.0250$$

$$\text{原儿茶醛 } A = 0.0278 C + 0.0206$$

式中 A 为吸收值，C 为浓度（微克/毫升）。

2. 样品测定结果见表 4

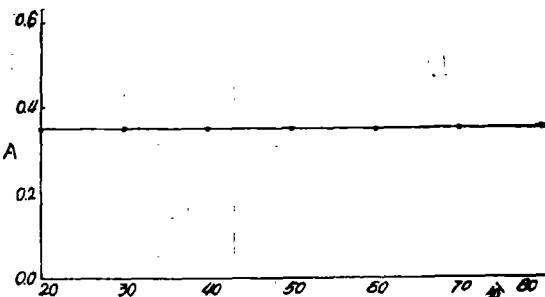


图 V 显色溶液的稳定性

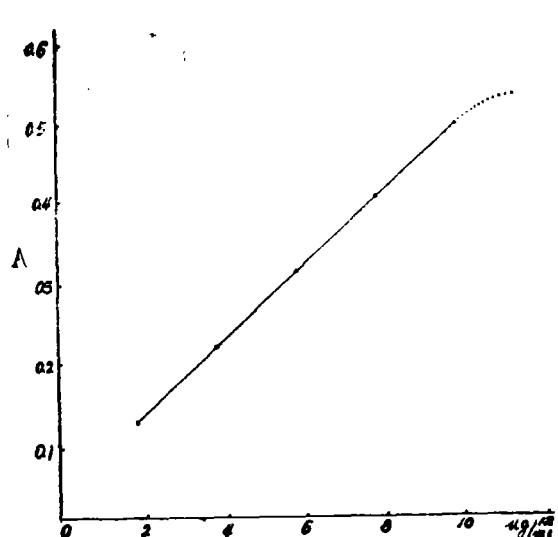


图 VI 原儿茶酸浓度范围

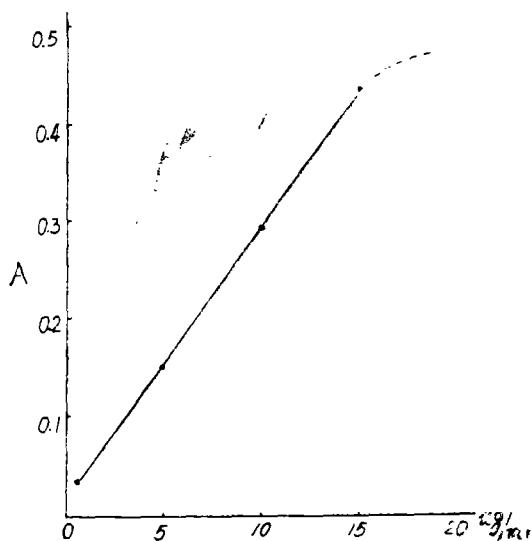


图 VII 原儿茶醛浓度范围

表 4 亚硝酸钠—钼酸钠比色法与紫外法测定结果比较

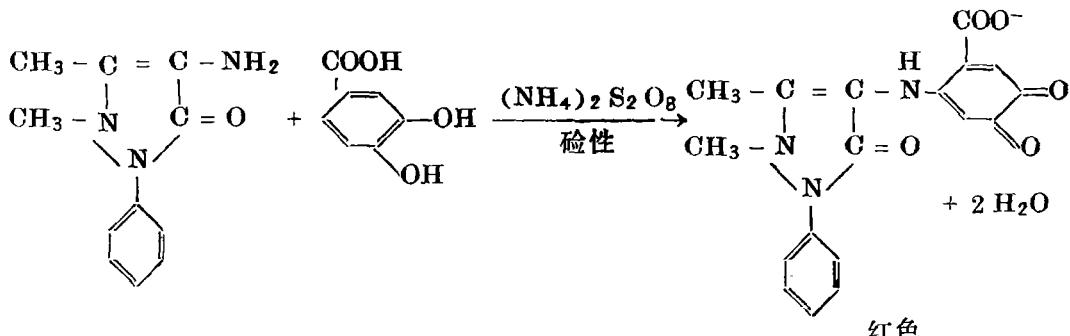
样品名称	编号	比 色 法			紫外法 (%)	二法相差 (%)
		含量(%)	平均值(%)	偏差(%)		
原儿茶酸	1	99.95 99.72	99.68	0.04	101.4	-1.72
	2	98.23 100.4	99.31	1.09	100.5	-1.19
	3	102.0 101.7	101.9	0.15	102.0	-0.10
	4	102.8 —	—	—	102.4	+0.40
	7	99.24 99.28	99.26	0.02	100.9	-1.64
原儿茶醛	1	99.06 98.58	98.82	0.24	100.2	-1.38
	2	100.5 100.4	100.5	0.05	100.4	+0.10
	3	99.45 100.2	99.83	0.38	100.2	-0.37
	4	101.0 101.8	101.4	0.40	101.9	-0.50
	5	100.0 —	—	—	101.9	-1.90

由表4可以看出，亚硝酸钠—钼酸钠比色法测定原儿茶酸或原儿茶醛的含量最大偏差分别为1.09和0.40；与紫外分光光度法结果比较，相差未超过2%。

三、4—氨基安替比林比色法

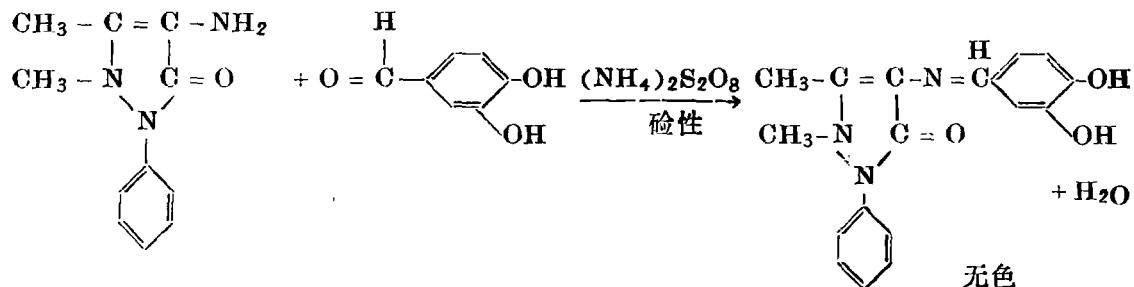
(一) 显色反应

根据E. Emerson 的报告^[10]，4-AAP 与原儿茶酸的反应，可能以式表示：



红色

经实验观察，原儿茶醛在同样条件下，不与4-AAP形成有色缩合物，可能是由于其分子中的-CHO基与4-AAP分子中的-NH₂基缩合形成式Shiffs' 碱所致，可以下式表示：



无色

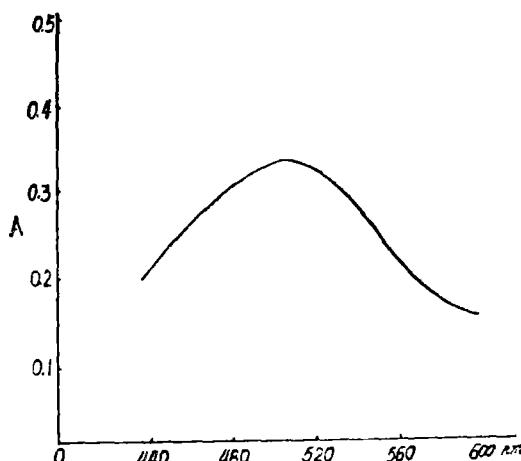
虽然在相同条件下，原儿茶醛不能利用同4-AAP比色法测定含量，但可以利用这一差别，测定原儿茶酸和原儿茶醛混合物中原儿茶酸的含量。

(二) 波长选择

图Ⅶ是4-AAP原儿茶酸缩合物在可见光区的吸收曲线。由曲线可以看出，其最大吸收在510nm波长处。其 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 约为335，克分子吸收系数约为 4.86×10^3 。

(三) 温度变化对显色反应的影响

原儿茶酸与4-AAP的显色反应进行慢，除4-AAP、碱以及 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的加入量要控制外，温度对反应影响也较大。图Ⅷ是温度变化对显色反应影响的实验结果。从图中曲线可以看出，在其它实验条件不变时，在室温20~25℃之间反应一



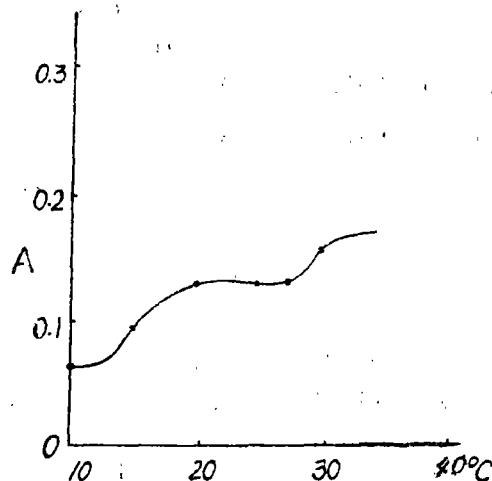
图Ⅶ 4—AAP—原儿茶酸吸收曲线

小时，有一段较平稳的吸收值，只要在平行条件下进行标准品和样品分析，在室温20~25℃之间反应一小时，还是可行的。

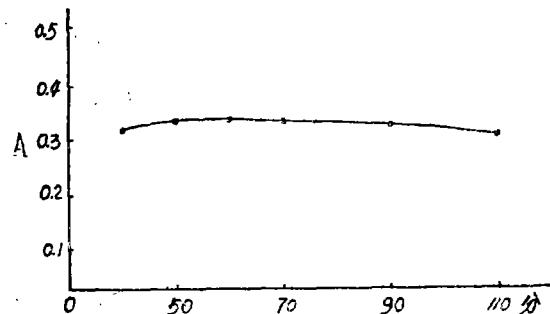
(四) 显色溶液的稳定性

结果见图X。由图X可以看出，显色液在70分钟内是稳定的。

(五) 浓度范围



图IX 温度对反应的影响



图X 显色溶液的稳定性

实验结果见图XI。从图中曲线可以看出，原儿茶酸在0.5~3微克/毫升浓度范围内，浓度与吸收值成直线关系，符合比尔定律。

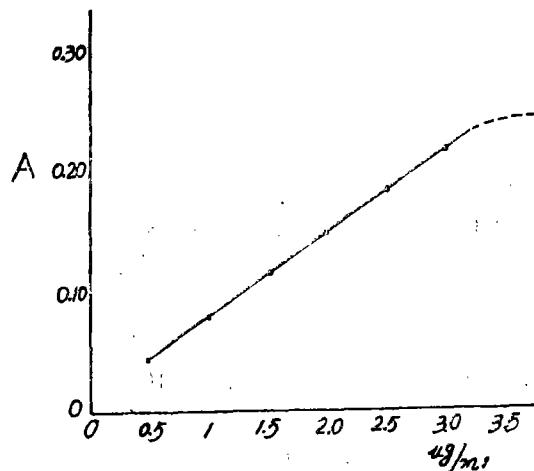
(六) 样品测定

1. 标准曲线 在可见光区内，有色化合物的最大吸收波长为 510 ± 1 nm，在原儿茶酸0.5~3微克/毫升范围内测定吸收值，用回归分析法制备标准曲线，其方程为

$$A = 0.0711C + 0.00800$$

2. 样品测定结果见表5。

由表5可以看出，4-AAP比色法与紫外法比较，二法相差未超过2.07%。但4-AAP比色法对反应温度和时间以及氧化剂用量要求较严格，不如亚硝酸钠-钼酸钠法简便。



图XI 原儿茶酸浓度范围

表 5 4-AAP 比色法与紫外法测定原儿茶酸含量结果比较

样品名称	编号	4 - AAP比色法			紫外法(%)	二法相差(%)
		含量(%)	平均值(%)	偏差(%)		
原儿茶酸	1	99.79 98.86	99.33	0.49	101.4	-2.07
	2	99.99 100.9	100.5	0.50	100.5	0.00
	3	99.65 101.9	100.8	1.13	100.0	-1.20
	4	102.1 100.5	101.3	0.8	102.4	-1.10

参 考 文 献

- [1] 南京药学院四季青科研组: 中草药通讯 (3):33, 1971
- [2] 江苏省药品标准办公室: 苓麻浸膏药典标准起草说明, 1973
- [3] 南通医学院四季青药理研究小组: 草药四季青资料汇编, 1972, 8页
- [4] 南通医学院附属医院内科: 同上汇编, 1972, 50页
- [5] 南通制药厂: 同上汇编, 1972, 6页
- [6] 王明时: 药学资料(南京药学院)(3):9, 1973
- [7] 姚俊严等: 南京药学院学报 (1):74, 1979
- [8] 江苏新医学院药理组: 中草药通讯 (2):35, 1975
- [9] 中华人民共和国药典1977版一部 160~161页; 280~281页; 115页
- [10] Emerson E: J Org Chem (8):417, 1943
- [11] Larue T A, Blakley E R: Anal Chim Acta 31(4):400, 1964
- [12] Nair P M, Vaidyanathan C S: Anal Biochem (7):315, 1964
- [13] Arnow L E: J BiO Chem 7(118):531, 1937
- [14] Barnuw D W: Anal Chim Acta (890):156, 1977
- [15] 孟 怡、于如嘏: 药检工作通讯 9(2):57, 1979
- [16] 韦世秀、于如嘏: 南京药学院学报(1):18, 1979