

金莲花的薄层鉴别及其总黄酮含量测定

杨天寿^{1*}, 李居安¹, 魏锋², 王霞英¹, 张学良¹

(1. 宁夏固原市药品检验所, 宁夏固原 756000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的: 建立金莲花的薄层鉴别及其总黄酮含量的测定方法, 为完善该药材的质量控制体系提供参考。方法: 通过单因素试验筛选提取溶剂和展开系统, 建立金莲花的 TLC。选择荜草苷为指标成分, 采用比色法测定总黄酮含量, 以 10% 硝酸铝溶液为显色剂, 检测波长 510 nm, 考察不同产地金莲花中总黄酮含量的差异。结果: 展开剂为三氯甲烷-甲醇-丁酮-冰乙酸(4:2:3:3), 建立的 TLC 分离效果良好。荜草苷线性范围 8.096~56.672 mg·L⁻¹, 平均加样回收率为 98.8%; 1, 2, 3, 4, 5, 6 号样中总黄酮质量分数分别为 9.79%, 8.71%, 8.32%, 6.47%, 6.42%, 6.71%。结论: 建立的金莲花定性鉴别和定量检测方法简便、准确, 适用于该药材的质量控制。

[关键词] 金莲花; 荜草苷; 牡荆素; 总黄酮; 薄层色谱法; 比色法

[中图分类号] R282.5; R282.71; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0091-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240091

TLC Identification of *Trollius chinensis* and Its Determination of Total Flavonoids

YANG Tian-shou^{1*}, LI Ju-an¹, WEI Feng², WANG Xia-ying¹, ZHANG Xue-liang¹

(1. Guyuan Institute for Drug Control, Guyuan 756000, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a TLC Identification of *Trollius chinensis* and determination of total flavonoids in the herb. **Method:** Extraction solvent and deployment system in TLC identification method of *T. chinensis* was screened by single factor tests. A colorimetry was adopted to determine the content of total flavanoids in *T. chinensis* by taking orientoside as index component, 10% aluminum nitrate solution as color developing reagent and detection wavelength at 510 nm, then content difference of total flavanoids in *T. chinensis* from different origins was compared. **Result:** Developing agent was chloroform-methanol-butanone-acetic acid (4:2:3:3), this established TLC had a good separation effect of each component. Orientoside had a good linear relationship in the range of 8.096-56.672 mg·L⁻¹, average recovery was 98.8%; the mass fractions of total flavanoids in No. 1, 2, 3, 4, 5, 6 sample were 9.79%, 8.71%, 8.32%, 6.47%, 6.42% and 6.71%, respectively. **Conclusion:** These methods are simple, accurate and applicable for quality control of *T. chinensis*.

[Key words] *Trollii chinensis*; orientin; vitexin; total flavonoids; TLC; colorimetry

金莲花主产于河北、山西、内蒙、辽宁等地, 宁夏近年来多地引种成功。本品性寒、味苦、质滑, 具有清热解毒、滋阴降火、养阴清热和消炎杀菌的作用^[1-2]。现代药理学研究证明金莲花有抗菌消炎的作用, 用于治疗呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎、中耳炎

等^[1], 化学成分包括黄酮类、有机酸类、香豆素类、生物碱类等^[3-4], 其中黄酮类为抗菌的主要成分, 抑菌谱较广, 临床疗效显著, 已被较多厂家研制成制剂, 如金莲花片剂、冲剂、胶囊等^[5]。

金莲花的 TLC^[6]和总黄酮含量测定曾有文献报

[收稿日期] 20140827(012)

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目(NZ12274)

[通讯作者] * 杨天寿, 主管中药师, 从事药品检验及中药质量控制技术研究, Tel:0954-2851806, E-mail: yttss3@163.com

道^[7]。但 TLC 存在取样量大、提取溶剂不易浓缩、展开效果欠佳等问题;总黄酮含量测定选择芦丁为指标成分测定总黄酮,建立的方法缺乏专属性。本实验拟改善金莲花的 TLC,并选择荜草苷为指标成分,建立测定总黄酮含量的专属性方法,比较不同产地金莲花的 TLC 和总黄酮含量。结果表明建立的方法准确、专属性强,适用于金莲花的质量控制。

1 材料

Automatic TLC Samper4 型全自动点样仪和 TLC Visualizer 型摄影系统(瑞士 Cammag 公司),XS205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。金莲花样品分别采自宁夏固原市隆德县沙塘镇(1 号样)、宁夏固原市隆德县陈靳乡(2 号样)、宁夏固原市西吉县(3 号样)、中国医学科学院药植研究所药用植物园(4 号样)、河北承德(5 号样)和购自亳州药市(6 号样),均经杨天寿主管中药师鉴定为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* 的干燥花;聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),荜草苷(纯度 96.4%)、牡荆素对照品和金莲花对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111777-200801, 111687-200602, 121089-200903),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金莲花 TLC

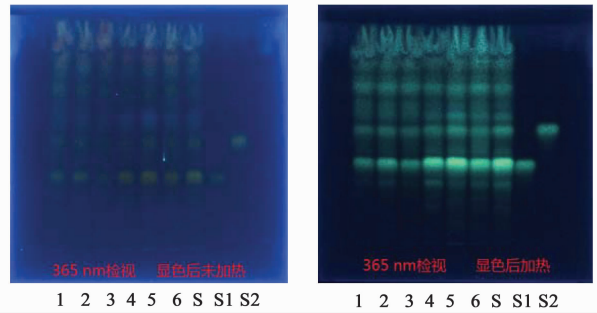
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取荜草苷对照品 6.90 mg,加甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,即得。另精密称取牡荆素对照品 4.95 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取不同产地的金莲花粉末(过三号筛)0.25 g,加入 70% 乙醇 25 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 溶解,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯溶液,水浴蒸干,残渣加甲醇 4 mL 溶解,即得。

2.1.3 对照药材溶液的制备 取金莲花对照药材 0.25 g,按 2.1.2 项下方法制备对照药材溶液。

2.1.4 薄层色谱展开与显色系统 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、对照药材溶液各 1 μ L,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以三氯甲烷-甲醇-丁酮-冰乙酸(4:2:3:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铝乙醇试液,热风吹至斑点显色清晰,分别置日光和紫外灯下(365 nm)检视,见图 1。结果表明各样品色谱在与对照药材和对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,在紫外灯(365 nm)下显相同

颜色的荧光斑点。



S. 对照药材;S1. 荜草苷对照品;S2. 牡荆素对照品;1~6. 供试品

图 1 金莲花 TLC

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取荜草苷对照品 5.25 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,得 0.202 4 g \cdot L⁻¹ 对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末(过三号筛)约 0.1 g,置锥形瓶中,各精密加入甲醇 50 mL,超声 30 min,放冷,加甲醇补足减失的质量,滤过,即得。

2.2.3 检测波长的确定 将荜草苷对照品溶液及供试品溶液分别置于紫外分光光度计中进行光谱扫描,结果表明二者均在 510 nm 处有最大吸收,故选择检测波长 510 nm。

2.2.4 标准曲线的制备 分别精密吸取荜草苷对照品溶液 0,1,2,3,5,7 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加水至 8 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min;加氢氧化钠试液 10 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在 510 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.571C + 0.007$ ($r = 0.9994$),线性范围 8.096 ~ 56.672 mg \cdot L⁻¹。

2.2.5 超声提取时间考察 精密称取 1 号样粉末(过三号筛)共 5 份,每份约 0.1 g,分别置于锥形瓶中,各精密加入甲醇 50 mL,分别超声 20,30,40,60,90 min,放冷,补重,滤过。精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加水至 8 mL,按 2.2.4 项下方法显色,依法测定 A。另取甲醇 5 mL 同法操作作为空白对照,计算总黄酮质量分数分别为 9.64%, 9.79%, 9.75%, 9.81%, 9.82%, 故选择超声 30 min。

2.2.6 显色稳定性试验 精密量取 1 号样供试品溶液 5 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水使成 8 mL,

按 2.2.4 项下自“加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL”起操作,显色后室温放置,分别在 10, 15, 20, 30, 45, 60 min 测定 A, 计算总黄酮平均质量分数 9.76%, RSD 3.0%, 表明供试品溶液在显色后 60 min 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取本品粉末(1 号样)共 6 份,每份约 0.1 g,分别置于锥形瓶中,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,精密量取续滤液 5 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水至 8 mL,按 2.2.4 项下自“加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL”起操作,计算总黄酮平均质量分数 9.79%, RSD 0.8%,说明本法重复性良好。

2.2.8 回收率试验 精密称取已知含量的金莲花粉末(1 号样)共 6 份,每份约 0.05 g,置锥形瓶中,精密加入定量荳蔻苷对照品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,各精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,各加水使成 8 mL,按 2.2.4 项下自“加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL”起操作,计算回收率,见表 1。

表 1 金莲花总黄酮含量测定加样回收率试验

样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
4.92	9.80	98.0	98.8	1.0
5.00	9.86	97.6		
4.95	9.92	99.8		
4.91	9.88	99.8		
5.01	9.89	98.0		
4.94	9.90	99.6		

注:荳蔻苷对照品加入量均为 4.98 mg。

2.2.9 样品测定 取不同产地的金莲花药材粉末各约 0.1 g,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.4 项下方法测定总黄酮含量,结果 1,2,3,4,5,6 号样中总黄酮质量分数分别为 9.79%, 8.71%, 8.32%, 6.47%, 6.42%, 6.71%。

3 讨论

预试验考察了金莲花的 TLC 条件^[5,7],包括提取溶媒、精制方法、色谱分离系统的选择及显色条件等。分别选择水、乙醇、甲醇及 70% 乙醇等为提取溶媒,超声提取 30 min 制成供试品溶液进行层析,结果各成分分离效果比较差;经多次反复试验,最终发现以 70% 乙醇 25 mL 超声处理 30 min,滤液蒸干,经乙酸乙酯萃取制备的溶液分离效果理想。色谱分离系统考察了无水乙醇-乙酸-水(9:0.5:0.5)、乙酸乙酯-甲醇(5:2)、三氯甲烷-丙酮-无水乙醇-水(4:2:3.6:0.4)、三氯甲烷-丙酮-无水乙醇-冰乙酸(4:1:3.6:0.4)、乙酸乙酯-甲醇-乙醇-冰乙酸(5:1:

2:2)等调整试验,色谱效果均不理想,最后发现以三氯甲烷-甲醇-丁酮-冰乙酸(4:2:3:3)为展开剂,在聚酰胺薄膜层析板上展开的分离效果好。显色条件以热吹为宜,热吹后,日光下即可见明显的黄色斑点,再结合荧光灯(365 nm)下检视,能够更好反应色谱行为的异同。

由于金莲花中荳蔻苷含量较高,荳蔻苷为二氢黄酮醇类成分,可与多种金属离子形成配位化合物而呈色,故本文采用比色法测定总黄酮含量,选择 5% 亚硝酸钠溶液和 10% 硝酸铝溶液为显色剂,43.0 g·L⁻¹ 氢氧化钠试液为碱性试剂^[3-4]。通过对显色剂加入量的考察,结果表明当 5% 亚硝酸钠溶液和 10% 硝酸铝溶液加入量各 1 mL,氢氧化钠试液加入量 10 mL 时,总黄酮含量较高;在上述条件下显色后,荳蔻苷对照品溶液和供试品溶液在 510 nm 均有最大吸收波长,故选择检测波长 510 nm。预试验考察了提取溶剂(甲醇、水、乙醇及 80% 乙醇)和时间对总黄酮含量的影响,最后确定以甲醇 50 mL 超声 30 min 时能够充分提取总黄酮。为保证实验的准确性,供试品溶液和对照品溶液应在显色后平行操作测定。

文献报道以芦丁为指标成分测定金莲花中总黄酮含量^[7],但尚无研究资料证实金莲花中含有芦丁这一黄酮类成分,建立的方法均缺乏专属性。金莲花中总黄酮类成分以荳蔻苷含量较高,故本文选择荳蔻苷为指标成分,并建立了测定金莲花中总黄酮含量的方法,该方法准确、专属性强,测定结果能够更好地反映该药材的内在质量。由比色法测定结果可知,金莲花中总黄酮含量差异较大。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1977:359.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 24.
- [3] 宋冬梅,孙启时. 阿尔泰金莲花化学成分的研究(I) [J]. 中国药物化学杂志,2004,14(4):233.
- [4] 魏金霞,李丹毅,华会明,等. 金莲花化学成分的分离与鉴定(II) [J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(1):12.
- [5] 丁万隆,陈震,陈君. 金莲花属药用植物资源及利用 [J]. 中国野生植物资源,2003,22(6):19.
- [6] 温瑞卿,张贵军,杨洋. 金莲花中药效成分荳蔻苷和牡荆苷的色谱鉴定 [J]. 国外医药·植物药分册,2008,23(5):214.
- [7] 白建华,赵二劳,王爱玲. 金莲花中总黄酮的分光光度法测定研究 [J]. 中华中医药学刊,2011,29(12):2719.

[责任编辑 刘德文]