

紫外分光光度法测定金莲花中总黄酮的含量

张进祥¹, 段吉平^{2*}

(1. 宣化钢铁公司职工医院, 河北 宣化 075100; 2. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] 目的: 建立金莲花总黄酮的含量测定方法。方法: 分光光度法于波长(272±2) nm 处测定总黄酮的含量。结果: 平均加样回收率为 98.6%, RSD= 1.3%。结论: 该方法操作简单, 准确性和重复性好, 可用于金莲花中总黄酮含量的测定及质量控制。

[关键词] 金莲花; 总黄酮; 含量测定

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0036-02

金莲花具有清热解毒, 抗菌消炎的功效, 用于治疗扁桃体炎、咽炎、上呼吸道感染。其主要成分为黄酮类化合物, 属于 5-羟基黄酮类, 与芦丁的母核相类似, 故以芦丁为对照品测定其总黄酮的含量, 为金莲花的进一步开发和质量标准的制定提供了可靠的依据。

1 仪器与试剂

TU-1221 型紫外可见分光光度计(北京通用仪器设备公司); DL-360 超声波发生器(浙江象山县石浦海天电子仪器厂); Mettler AE163 电子天平(瑞士), Mettler AE 240 电子天平(瑞士), MA 260S 电子天平(上海); YA-1A 真空恒温干燥箱(天津); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 0080-9504); 金莲花样品(中国药材集团承德药材有限责任公司), 所用试剂均为分析纯。

2 供试品溶液的制备

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 120 °C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇适量, 超声片刻使溶解, 加 60% 乙醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含无水芦丁 80 μg)。

2.2 样品溶液制备条件的确定 取金莲花药材粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 采用正交试验法, 分别用 50%, 60%, 70% 乙醇作溶剂, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 5, 10, 20 min 制成供试品溶液, 用 10% 三氯化铝(AlCl₃) 试液显色后在 272.5 nm 处测定吸收度。结果用 60% 乙醇作溶剂, 超声处理

(功率 250 W, 频率 50 kHz) 10 min 和 20 min, 单位重量的样品吸收度较大且相互接近, 故选用 60% 乙醇作溶剂, 超声处理时间为 10 min。

2.3 样品溶液的制备 取金莲花药材粉末(过四号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 10 min, 放冷, 再称定重量, 用 60% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇至刻度, 摇匀。

2.4 测定波长的选定 取芦丁对照品 60% 乙醇溶液(0.086 0 mg·mL⁻¹) 3.0 mL 及金莲花样品 60% 乙醇溶液(2 mg·mL⁻¹) 2.0 mL 各两份, 分别置 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇至 6.0 mL, 1 份加水 1 mL, 另 1 份加 10% AlCl₃ 试液 1 mL, 摇匀, 加水至刻度, 摇匀, 绘制紫外-可见吸收光谱, 测定最大吸收波长。结果芦丁对照品和金莲花样品显色前最大吸收峰波长相差 ±2 nm(见图 1), 显色后在(272±2) nm 处均可见最大吸收峰(见图 1), 故确定本方法的测定波长为 272 nm ±2 nm。

2.5 标准曲线的制备 精密量取芦丁对照品溶液(0.086 0 mg·mL⁻¹) 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 与 6.0 mL, 分别置于 25 mL 容量瓶中, 用 60% 的乙醇补足至 6.0 mL, 加 10% AlCl₃ 1 mL, 摇匀, 加水至刻度, 摇匀, 在 272.5 nm 波长处测定吸收度, 计算, 回归方程: $Y = -0.01947 + 1.753X$, $r = 0.99998$ 实验结果表明: 芦丁对照品在 0.043~0.516 mg 间呈现良好的线性。

2.6 对照品溶液稳定性试验 精密量取芦丁对照品溶液(0.086 0 mg·mL⁻¹) 3.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇至 6.0 mL, 加入 10% AlCl₃ 试液 1 mL, 混

[收稿日期] 2008-12-09

[通讯作者] * 段吉平, Tel: (0311) 85212004-8042

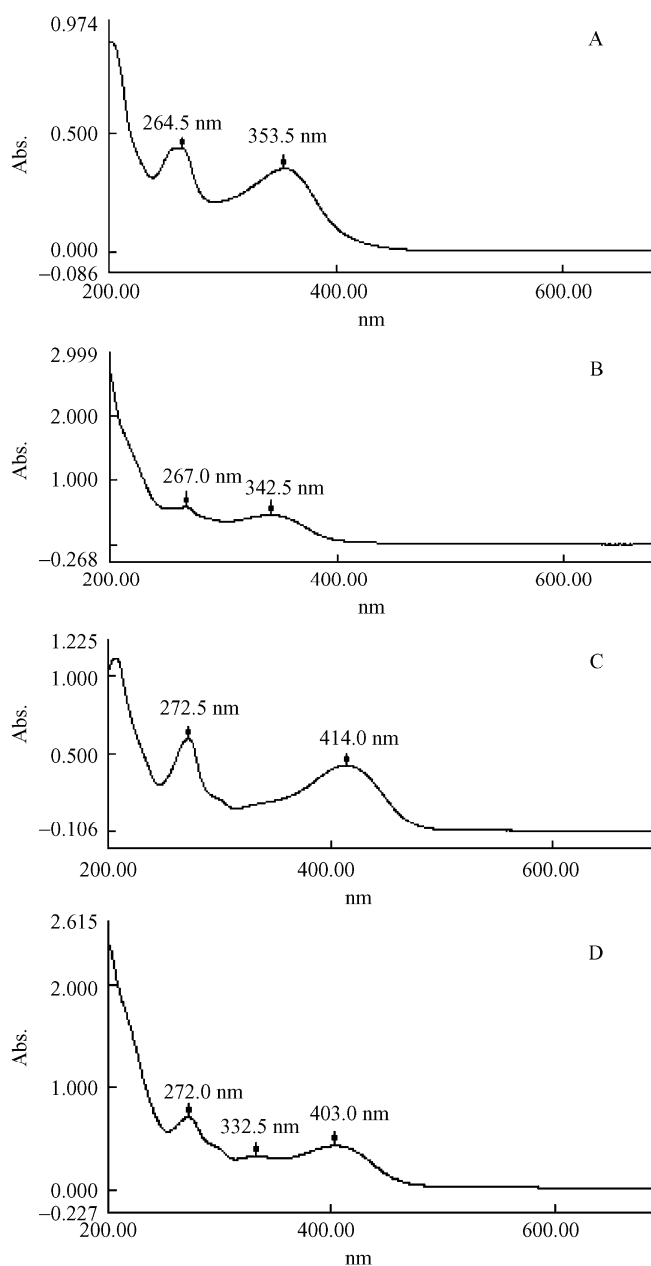


图 1 金莲花紫外-可见吸收光谱

A. 芦丁对照品溶液显色前; B. 金莲花样品溶液显色前; C. 芦丁对照品溶液显色后; D. 金莲花样品溶液显色后

匀,加水至刻度,摇匀,在 272.5 nm 波长处每隔 30 min 测定吸收度,结果 2 h 内 5 次测定所得吸收度值的 RSD 为 0.45%。

2.7 样品溶液稳定性试验 精密量取金莲花供试品溶液($2.012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加 60% 乙醇至 6.0 mL,加入 10% AlCl_3 溶液 1 mL,混匀,加水至刻度,摇匀,在 272.5 nm 波长处每隔 30 min 测定吸收度,结果 2 h 内 5 次测定所得吸收度值的 RSD 为 0.39%。

2.8 仪器精密度试验 取供试品溶液($2.012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加 60% 乙醇至 6.0 mL,加入 10% AlCl_3 试液 1 mL,混匀,加水至刻度,摇

匀,在 272.5 nm 波长处测定吸收度,5 次测定吸收度值的 RSD 为 0.57%。

2.9 重复性试验 取同一份均匀样品粉末(过四号筛) 0.4, 0.5, 0.6 g 各 3 份,精密称定,测定其总黄酮含量,9 份的含量平均值为 6.71%,RSD 为 1.5%。

2.10 加样回收率试验 取同一份均匀样品粉末(总黄酮含量 6.71%) 0.25 g 共 9 份,精密称定,分别加入不同量的芦丁对照品,照 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定吸收度,计算回收率,结果见表 1。

2.11 样品测定 取 10 批样品,按 2.4 的方法操作,测定其总黄酮含量,结果含量在 6.5%~9.0% 之间。

表 1 总黄酮加样回收率测定结果

编号	样品重(g)	样品中总黄酮含量(mg)	芦丁加入量(mg)	总黄酮测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.2519	16.90	24.16	40.89	99.3		
2	0.2531	16.98	24.29	41.25	99.9		
3	0.2519	16.90	24.16	40.89	99.3		
4	0.2522	16.92	17.12	33.83	98.8		
5	0.2543	17.06	17.03	33.48	96.4	98.6	1.3
6	0.2507	16.82	17.08	33.62	98.4		
7	0.2528	16.96	10.25	27.20	99.9		
8	0.2518	16.90	10.18	26.84	97.6		
9	0.2471	16.58	10.01	26.35	97.6		

3 讨论

总黄酮的含量测定方法一般采用供试液加 5% 亚硝酸钠、10% 硝酸铝及氢氧化钠显色后进行比色测定^[1],试验结果发现,用此种显色剂显色后,样品溶液的吸收度极不稳定,2 h 的相对标准偏差为 22.5%,并且对照品和供试品的最大吸收波长相差近 7 nm,而单独用 10% AlCl_3 水溶液为显色剂,直接加入到供试品 60% 乙醇溶液中,室温条件下即可显色,通过对样品溶液和对照品溶液用 10% AlCl_3 做显色剂显色前后吸收光谱的测定,结果芦丁对照品和金莲花样品显色前没有波长相差 $\pm 2 \text{ nm}$ 的最大吸收峰,显色后在 $(272 \pm 2) \text{ nm}$ 处均可见最大吸收峰,吸收度在 2 h 的相对标准偏差均小于 1%。

由于在 403~414 nm 之间供试品和对照品没有波长相接近的最大吸收峰,在此期间选择测定波长,可使不同仪器之间产生较大的测量误差。

AlCl_3 溶液在配制后,有时有不溶物,应过滤后使用。用 10% AlCl_3 做显色剂来测定总黄酮的含量,操作简单,重复性好。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[J]. 一部,北京:化学工业出版社,2000:292.