

· 研究报告 ·

紫外-可见分光光度法测定防暑清热饮中总黄酮和总多糖含量

李杰, 杨育儒, 王庆芬, 郑绍忠, 陈锦珊(中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院/厦门大学附属东南医院制剂科, 福建漳州 363000)

[摘要] 目的 建立紫外-可见分光光度法测定防暑清热饮中总黄酮和总多糖含量的方法。方法 采用紫外-可见分光光度法,以芦丁、无水葡萄糖为对照品,在波长分别为 508、487 nm 处测定防暑清热饮中总黄酮和总多糖的含量。结果 防暑清热饮中总黄酮含量在 0.00~59.20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内,平均加样回收率为 104.4%($n=6$, RSD 为 1.11%);总多糖含量在 10.92~109.20 $\mu\text{g/ml}$,平均加样回收率为 104.8%($n=6$, RSD 为 1.88%)。结论 采用紫外-可见分光光度法测定防暑清热饮中总黄酮和总多糖含量的方法操作简便、重复性好、准确可靠,可作为防暑清热饮中总黄酮和总多糖含量的测定方法。

[关键词] 紫外-可见分光光度法;防暑清热饮;总黄酮;总多糖;芦丁;无水葡萄糖

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)01-0063-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201904019

Content determination of total flavones and polysaccharides in Fangshu Qingre mixture by UV-Vis spectrophotometry

LI Jie, YANG Yuru, WANG Qingfen, ZHENG Shaozhong, CHEN Jinshan (Department of Pharmacy, 909th Hospital of Joint Service Support Force/Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for content determination of total flavones and polysaccharides in Fangshu Qingre mixture by UV-Vis Spectrophotometry. **Methods** The contents of total flavones and polysaccharides in Fangshu Qingre mixture were determined by UV-Vis spectroscopy with rutin and anhydrous glucose as reference substance, and the wavelength was set at 508 nm and 487 nm. **Results** The contents were from 0.00 to 59.20 $\mu\text{g/ml}$ for total flavones and from 10.92 to 109.20 $\mu\text{g/ml}$ for total polysaccharides in Fangshu Qingre mixture. The recoveries of total flavones and total polysaccharides were 104.4% and 104.8% respectively. **Conclusion** The method of using ultraviolet spectroscopy was simple, reproducible, accurate and reliable, which could be preferably used as the method for content determination of total flavones and polysaccharides in Fangshu Qingre mixture.

[Key words] UV-Vis spectrophotometry; Fangshu Qingre mixture; total flavones; total polysaccharides; rutin; anhydrous glucose

福建地处我国南方,夏季气温高、湿度大,驻地部队经常需要组织开展高强度的军事作业,极易发生中暑^[1]。联勤保障部队第九〇九医院协定处方防暑清热饮由广藿香、白茅根、菊花、薄荷、枸杞等药材组成,具有芳香化湿、清热解毒、解渴生津之功效。现代药理研究表明,中药材菊花、薄荷、白茅根及中药复方制剂中的总黄酮和总多糖具有免疫调节、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、生殖功能保护和改善等作用^[2-6],总黄酮和总多糖是防暑清热饮的

主要活性成分,因此,对方中总黄酮和总多糖进行质量控制尤为重要^[7-13]。

1 仪器与试剂

电子分析天平(AUX220,日本-岛津);紫外-可见分光光度计(2550,岛津-苏州);低速离心机(LD5-2A,北京医用离心机厂);数显恒温水浴锅(HH2江苏金坛市江南仪器厂);华美冷柜(SY-176,杭州华美电冰箱厂)。芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707),无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201205)。无水乙醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、浓硫酸、苯酚等试剂均为分析纯,水为纯化水。防暑清热饮(批号:20190107、20181212、

[基金项目] 医院青年苗圃基金(17Y019)

[作者简介] 李杰,主管药师,硕士研究生,研究方向:制剂工艺及质量标准研究, Tel: 17705963635, Email: lichenjie1004@163.com

[通讯作者] 陈锦珊,副主任药师,研究方向:医院药学, Email: cjs18659341758@163.com

20181210, 规格: 100 ml/瓶, 第九〇九医院制剂科)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 芦丁对照品溶液

精确称取芦丁对照品 14.8 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加 65% 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 296 $\mu\text{g/ml}$ 的芦丁对照品溶液。

2.1.2 葡萄糖对照品溶液

精密称取 105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒质量的无水葡萄糖对照品 10.92 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 109.2 $\mu\text{g/ml}$ 的葡萄糖对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 总黄酮供试品溶液

精密量取防暑清热饮上清液 10 ml, 置 100 ml 烧杯中, 搅拌下加 95% 乙醇, 使含醇量达 65%, 冷藏 5 h 后取出, 4 500 r/min 离心 10 min, 倾取上清液, 转移至 50 ml 量瓶中, 加 65% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 总多糖供试品溶液

取 100 ml 防暑清热饮, 4 500 r/min 离心 10 min, 再精密量取上清液 1 ml, 置 100 ml 量瓶中, 加纯化水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 紫外检测波长的确定

取适中浓度芦丁、葡萄糖对照品溶液及供试品溶液, 采用紫外-可见分光光度法在 200 ~ 800 nm 范围内进行全波长扫描。结果表明, 芦丁与总黄酮的最大吸收波长均为 508 nm, 无水葡萄糖和总多糖最大吸收波长为 487 nm, 见图 1。

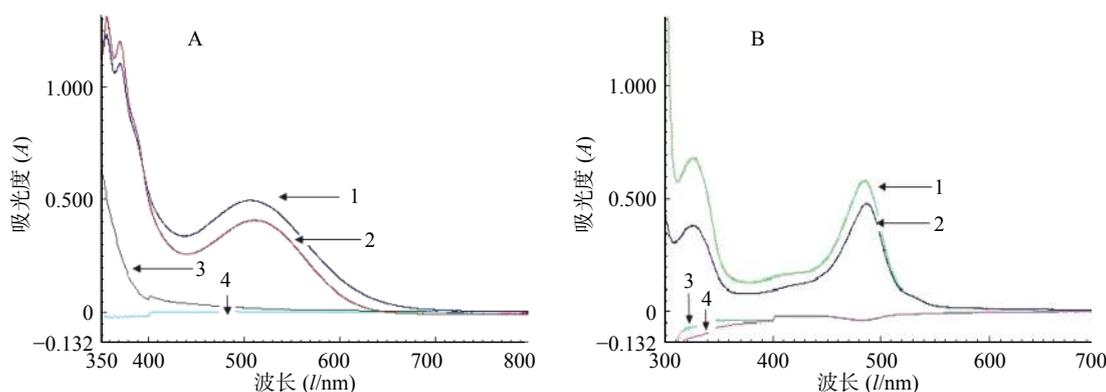


图 1 总黄酮和总多糖最佳吸收扫描结果

A.总黄酮测定光谱; B.总多糖测定光谱 1.防暑清热饮供试品溶液; 2.芦丁/葡萄糖对照品溶液; 3.防暑清热饮本体液; 4.溶剂空白阴性对照

2.4 测定方法

2.4.1 亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠法

精密量取芦丁对照品溶液和供试品溶液各 5.0 ml, 分别置于 25 ml 量瓶中, 加入 65% 乙醇 6 ml, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 ml, 摇匀放置 6 min 后, 加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 ml, 摇匀放置 6 min 后, 加入 4% 氢氧化钠溶液 10.0 ml, 再加水至刻度, 摇匀放置 15 min, 以相应的试剂作为空白对照, 于 508 nm 处测定其吸光度。

2.4.2 苯酚硫酸法

精密量取葡萄糖对照品溶液 0.5 ml 和供试品溶液 1.0 ml, 分别置于 25 ml 具塞刻度试管中, 分别加纯化水至 2 ml, 再各加 50 mg/ml 苯酚溶液 1.0 ml、浓硫酸 5.0 ml, 摇匀, 静置 5 min, 置沸水浴中显色 15 min, 冰水浴冷却至室温, 以相应的试剂作为空白对照, 于 487 nm 处测定其吸光度。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

(1)总黄酮线性关系: 精密量取“2.1.1”项下芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5 ml, 分别置于 25 ml 量瓶中, 按“2.4.1”项下方法制备系列浓度对照品溶液, 以 65% 乙醇同法制备参比溶液, 在 508 nm 波长处测定吸光度, 以浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线。回归方程: $A=0.011C-0.005$, $r=0.9995$ 。表明芦丁对照品浓度在 0.00~59.20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内吸光度呈良好线性关系。

(2)总多糖线性关系: 精密量取“2.1.2”葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 ml, 分别置于 25 ml 具塞刻度试管中, 按照“2.4.2”项下自“分别加纯化水至 2 ml, ……”, 同法操作的相应溶剂为参比溶液”, 在 487 nm 波长处测定吸光度。以浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标绘制标准

曲线,得回归方程: $A=0.009C$, $r=0.9995$,表明葡萄糖对照品浓度在 10.92~109.20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内吸光度呈良好线性关系。

2.5.2 精密性考察

精密量取浓度分别为 296、54.6 $\mu\text{g/ml}$ 芦丁和葡萄糖对照品溶液,芦丁对照品溶液按总黄酮线性关系考察方法在 508 nm 波长处重复测定 6 次,计算得 RSD 为 0.14%,无水葡萄糖对照品溶液显色后在 487 nm 波长处重复测定 6 次,计算得 RSD 为 0.07%,表明仪器精密性良好。

2.5.3 重复性考察

分别精密量取防暑清热饮(批号:20190107) 6 份,按“2.2”项下方法制备总黄酮和总多糖供试品溶液,分别在 508、487 nm 波长处进行测定。结果总黄酮平均含量为 0.825 mg/ml, RSD 为 0.59%,总多糖平均含量为 4.434 mg/ml, RSD 为 2.0%,表明本方法重复性良好。

2.5.4 稳定性考察

(1)总黄酮稳定性:精密量取按“2.2.1”项下方法制备防暑清热饮(批号:20190107) 5.0 ml,按“2.4.1”项下硝酸铝显色法,以 65% 乙醇同法制备参比溶液,分别于 0、10、15、20、30、40 min 在 508 nm 波长处测定吸光度,标准曲线法计算总黄酮含量平均值为 0.814 mg/ml, RSD 为 1.82%($n=6$),表明本方法在 40 min 内稳定。

(2)总多糖稳定性:精密量取按“2.2.2”项下方法制备防暑清热饮(批号:20190107) 1.0 ml,按“2.4.2”项下苯酚硫酸显色法,以纯化水同法制备参比溶液,分别于 0、10、20、30、40、60 min 在 487 nm 波长处测定吸光度,标准曲线法计算总多糖含量平

均值为 4.488 mg/ml, RSD 为 0.5%($n=6$),表明本方法在 60 min 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验

(1)总黄酮加样回收试验:精密量取防暑清热饮上清液(批号:20190107)5.0 ml,按“2.2.1”项下制备供试品溶液。精密量取供试品溶液 5 ml(82.5 $\mu\text{g/ml}$),置于 25 ml 量瓶中,共 6 份,分别加入芦丁对照品溶液(296 $\mu\text{g/ml}$)1.5 ml,按“2.4.1”项下硝酸铝显色法,以 65% 乙醇为参比液,在 508 nm 波长处测定吸收度,标准曲线法计算总黄酮含量,并计算得出回收率平均值为 104.4%, RSD 为 1.11%($n=6$),结果见表 1。

(2)总多糖加样回收试验:精密量取防暑清热饮上清液(批号:20190107)0.5 ml,按“2.2.2”项下制备供试品溶液。精密量取供试品溶液(22.17 $\mu\text{g/ml}$)1.0 ml,置于 25 ml 具塞比色管中,共 6 份,分别加入葡萄糖对照品溶液(109.2 $\mu\text{g/ml}$)0.2 ml,按“2.4.2”项下苯酚硫酸法,以纯化水为参比液,在 487 nm 波长处测定吸收度,用标准曲线法计算总黄酮含量,并计算得回收率平均值为 104.8%, RSD 为 1.88%($n=6$),结果见表 1。

2.6 样品含量测定

取 3 个批号的防暑清热饮样品(批号:20181210、20181212、20190107),各 3 份,按“2.2”项下方法制备的防暑清热饮总黄酮和总多糖供试品溶液,并分别按照“2.4”项下方法操作,分别在 508 nm 和 487 nm 波长处进行测定,将所测得的吸光度值代入回归方程,计算总黄酮和总多糖含量。结果见表 2。

表 1 防暑清热饮总黄酮和总多糖加样回收率试验结果 ($n=6$)

成分	供试液含量($m/\mu\text{g}$)	加入量($m/\mu\text{g}$)	测得量($m/\mu\text{g}$)	回收率(%)	平均值(%)	RSD(%)
总黄酮	412.50	444.00	880.00	105.30	104.40	1.11
	412.50	444.00	875.00	104.20		
	412.50	444.00	869.00	102.80		
	412.50	444.00	871.00	103.30		
	412.50	444.00	884.00	106.20		
	412.50	444.00	878.00	104.80		
总多糖	22.17	21.84	44.66	103.00	104.80	1.88
	22.17	21.84	44.31	101.40		
	22.17	21.84	45.22	105.50		
	22.17	21.84	45.64	106.10		
	22.17	21.84	45.53	107.00		
	22.17	21.84	46.02	106.00		

表2 防暑清热饮总黄酮和总多糖含量测定结果 ($n=3$, $\mu\text{g/ml}$)

批号	总黄酮含量	总多糖含量
20181210	855.2	5 085
20181212	869.2	5 108
20190107	828.0	4 420

3 讨论

防暑清热饮为医院协定处方,可用于夏季作业及训练保障,方中总黄酮和总多糖协同发挥作用。通过测定方中总黄酮和总多糖的含量,更好地控制制剂质量,发挥保障作用。

防暑清热饮总黄酮供试品溶液前处理方法的确定:通过查阅文献及实验条件摸索,确定65%乙醇进行醇沉,冷藏5 h,4 500 r/min离心10 min。其中,若乙醇浓度过低会使总黄酮提取不完全,而乙醇浓度过高不易定容至准确浓度,冷藏时间考察了5、10、20 h,含量差别不大。另外,本实验对防暑清热饮本体液进行光谱扫描,在508 nm和487 nm处吸收峰很弱,基本无干扰,故采用溶剂空白为对照(图1)。

金属离子络合法是测定总黄酮含量最为常见的方法,其原理是在一定条件下,黄酮与金属离子发生络合反应,形成有颜色的络合物,通过比色法测定总黄酮含量,本实验通过对三氯化铝法和亚硝酸钠法考察,发现亚硝酸钠法显色测量的总黄酮结果较好。经过比较防暑清热饮经5、10、20倍稀释后在508 nm处测得吸光度值,5倍稀释后供试液的 A_{508} 落在0.3~0.7之间,确定5倍为适宜的稀释倍数。稳定性试验发现在40 min内比较稳定,建议反应完成后尽快测定,避免测量误差。

苯酚硫酸法测总多糖是利用糖在浓硫酸作用下,脱水生成的糠醛或羟甲基糠醛能与苯酚缩合成一种橙红色化合物。经过比较防暑清热饮稀释1、50、100倍后在487 nm处测得吸光度值,100倍稀

释后供试液的 A_{487} 落在0.3~0.7之间,100倍为适宜的稀释倍数。总多糖测定结果影响因素比较多,对测量用具的洁净度要求较高,每种试剂加入的方式对结果影响明显,因此,苯酚应临用现配,向样品中加入苯酚溶液需要迅速摇匀,在硫酸沿壁流下加完立即摇匀。

本实验建立的总黄酮和总多糖供试品溶液制备方法简便、快速、准确、灵敏,可作为防暑清热饮质控方法,因不同批次中药材质量差异较大,后续需要经过多批次测定以确定质控标准。

【参考文献】

- [1] 王利华,林淑瑜,黄阳.驻南方某部夏季野战训练官兵中暑情况调查及防治[J].人民军医,2013,56(4):416-417.
- [2] 马倩倩,李骏,张松杰,等.枸杞多糖生物活性的研究进展[J].农产品加工(下),2017(7):59-61.
- [3] 谢占芳,张倩倩,朱凌佳,等.菊花化学成分及药理活性研究进展[J].河南大学学报(医学版),2015,34(4):290-300.
- [4] 刘荣华,付丽娜,陈兰英,等.白茅根化学成分与药理研究进展[J].江西中医学院学报,2010,22(4):80-83.
- [5] 魏金凤,王士苗,沈丹,等.藿香与广藿香抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(23):117-120.
- [6] 刘群群.薄荷属植物的化学成分及药理学作用研究[J].现代食品,2016(7):44-45.
- [7] 杨秀娟,杨志军,牛鹏贤,等.甘肃不同产地红芪中总黄酮及总多糖含量测定研究[J].中国中医药信息杂志,2018,25(2):79-82.
- [8] 热孜亚·吾甫尔,艾尼瓦尔·塔力甫,买迪娜·米吉提,等.紫外分光光度法测定维吾尔药复方艾皮提蒙合剂中总黄酮含量[J].中国民族医药杂志,2017,23(8):44-45.
- [9] 黄莉,文敏,陈文明,等.益气扶正合剂中总皂苷、总黄酮含量的测定[J].湖南中医杂志,2018,34(2):149-150.
- [10] 易徐航,张钰琪,袁娟丽.紫外分光光度法测定鸭脚通颗粒中总黄酮的含量[J].江西中医药,2018,49(8):58-59.
- [11] 蔡延渠,邓剑壕,朱志东,等.不同产地原桃胶的多糖含量研究[J].广东药科大学学报,2018,34(1):25-28.
- [12] 韦瑀龙,黄小鸥,蓝晓庆.固本补肾口服液的总黄酮含量测定方法研究[J].实用药物与临床,2016,19(10):1287-1289.
- [13] 倪晓霞,王庆芬,魏浩泽,等.紫外分光光度法测定蒲地灌肠液中总黄酮含量[J].中医药导报,2017,23(2):57-59.

【收稿日期】 2019-04-03 【修回日期】 2019-10-22

【本文编辑】 李睿旻

(上接第51页)

- [11] CHUNG C H, KIM J H, JUNG J, et al. Nuclease-resistant DNA aptamer on gold nanoparticles for the simultaneous detection of Pb^{2+} and Hg^{2+} in human serum[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 827-832.
- [12] HUANG Y Z, HERNANDEZ F J, GU B, et al. RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, TrkB[J]. *Mol Pharmacol*, 2012, 82(4): 623-635.
- [13] SUNDARAM P, KURNIAWAN H, BYRNE M E, et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials[J]. *Eur J Pharm Sci*,

2013, 48(1-2): 259-271.

- [14] PALMERSTON MENDES L, PAN J Y, TORCHILIN V P. Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy[J]. *Molecules*, 2017, 22(9): E1401.
- [15] LU Y, JIANG W J, WU X, et al. Peptide T7-modified poly-peptide with disulfide bonds for targeted delivery of plasmid DNA for gene therapy of prostate cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 6913-6927.

【收稿日期】 2019-06-14 【修回日期】 2019-07-26

【本文编辑】 李睿旻