

分光光度法测定凤仙花中总黄酮的含量

李晓明, 姜华*, 李军, 时清亮, 徐幽, 崔娇娇, 杨莹莹 (河南科技大学化工与制药学院, 河南洛阳 471003)

摘要 [目的] 建立能够准确测定凤仙花中总黄酮含量的方法。[方法] 分别以芦丁、山柰酚为对照品, 可见分光光度法是采用 $AlCl_3$ 显色, 在 412 nm 波长处测定总黄酮的含量; 紫外分光光度法在 270 nm 处测定总黄酮的含量。[结果] 以芦丁、山柰酚为对照品采用可见分光光度法测得总黄酮含量的平均回收率分别为 98.52%、99.72%, RSD 分别为 2.38%、3.14%; 紫外分光光度法测得总黄酮含量的平均回收率分别为 97.53%、98.75%, RSD 分别为 2.71%、2.86%。[结论] 以山柰酚为对照品、采用 $AlCl_3$ 为显色剂的可见分光光度法是一种较理想的测定凤仙花中总黄酮含量的方法。

关键词 凤仙花; 总黄酮; 可见分光光度法; 紫外分光光度法

中图分类号 O657.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16378-02

Content Determination of Flavonoids in *Impatiens balsamina* L. by Spectrophotometry

LI Xiao-ming et al (College of Chemical Engineering and Pharmaceutics, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract [Objective] The research aimed to study the determination method of total flavonoids content in *Impatiens balsamina* L. by visible light and ultraviolet spectrophotometry. [Method] With rutin and kaempferol as reference substances respectively, by using visible light spectrophotometry and $AlCl_3$ as chromogenic reagent, the content of total flavonoids was determined at the wavelength of 412 nm. By using ultraviolet spectrophotometry, the content of total flavonoids was determined at the wavelength of 270 nm. [Result] With rutin and kaempferol as reference substances respectively, the average recoveries by visible light method were 98.52% and 99.72%, with RSD of 2.38% and 3.14% resp. The average recoveries by visible light method were 97.53% and 98.75%, with RSD of 2.71% and 2.86% resp. [Conclusion] By using visible light spectrophotometry, with kaempferol as reference substance is a kind of more ideal determination method of total flavonoids in *Impatiens balsamina* L.

Key words *Impatiens balsamina* L.; Total flavonoids; Visible light spectrophotometry; Ultraviolet spectrophotometry

凤仙花 (*Impatiens balsamina* L.) 为凤仙花科 (Balsaminaceae) 中凤仙花属 (*Impatiens*) 1 年生草本植物, 味甘苦, 性微温, 具有祛风除湿、活血止痛、解毒杀虫之功效^[1]。研究表明, 黄酮、香豆素、萜醌等为凤仙花的主要活性成分^[2]。目前文献报道的测定凤仙花中总黄酮含量的方法较少且仅为紫外分光光度法^[3], 而用可见分光光度法测定凤仙花中总黄酮含量的方法还未见报道。笔者运用芦丁、山柰酚 2 种不同的对照品, 分别采用可见分光光度法与紫外分光光度法测定凤仙花中总黄酮含量, 并对不同测量方法进行了比较, 拟寻找一种准确而简便的测定凤仙花中总黄酮含量的方法, 旨在为进一步合理开发凤仙花提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料。 凤仙花干花瓣购自安徽亳州药材市场, 经鉴定为凤仙花科植物凤仙花的干燥花瓣。

1.1.2 仪器和试剂。 UV-2501 型紫外可见分光光度计 (日本岛津); KQ-50DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。芦丁标准品购于中国药品生物制品检定所 (批号 100080-200707), 山柰酚标准品购于中国药品生物制品检定所 (批号 110861-200606)。甲醇、三氯化铝、无水乙醇均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 样品制备。 先称量 1 g 的凤仙花干花瓣, 溶剂为甲醇, 料液比为 1:20, 超声温度为 20 °C, 超声 (功率 50 W, 频率 40 kHz) 30 min, 提取 1 次。得到的提取液定容至 25 ml 容量

瓶中, 作为供试品溶液。

1.2.2 可见分光光度法标准曲线的制备。 精密称取 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 2.1 mg, 以甲醇溶解并定容至 5 ml 容量瓶中, 摇匀, 即得浓度为 0.42 mg/ml 的芦丁对照品溶液。精密称取 120 °C 干燥至恒重的山柰酚标准品 2.2 mg, 以甲醇溶解并定容至 5 ml 容量瓶中, 得浓度为 0.44 mg/ml 的山柰酚标准品溶液, 再精密吸取该对照品溶液 0.8 ml 定容至 25 ml 容量瓶中, 即得浓度为 0.014 1 mg/ml 的山柰酚对照品溶液。分别精密量取浓度为 0.42 mg/ml 芦丁对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml 和 0.014 1 mg/ml 的山柰酚对照品溶液 1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 ml 于 10 ml 容量瓶中, 再分别加入 5 ml 1% $AlCl_3$ 溶液, 摇匀后用甲醇定容, 以相应试剂为空白对照, 其中芦丁标准品显色后于 414 nm 处测定吸光度, 得回归方程, 山柰酚标准品显色后于 416 nm 处测定吸光度, 得回归方程。

1.2.3 紫外分光光度法标准曲线的制备。 精密吸取“1.2.2”项下浓度为 0.42 mg/ml 的芦丁标准品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml 于 10 ml 容量瓶中, 并用甲醇定容至刻度, 于 258 nm 处测定吸光度, 得回归方程。另精密吸取“1.2.2”项下浓度为 0.44 mg/ml 的山柰酚标准品溶液 0.5 ml 定容至 10 ml 容量瓶中, 再分别精密吸取浓度为 0.022 mg/ml 溶液 1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 ml 于 10 ml 容量瓶中, 并用甲醇定容。于 268 nm 处测定吸光度, 得回归方程。

1.2.4 回收率试验。 精密量取 6 份“1.2.1”项下已知总黄酮含量的凤仙花样品, 分别加入一定量的芦丁、山柰酚对照品, 摇匀, 分别按照“1.2.2”项下可见分光光度法和“1.2.3”项下紫外分光光度法测定吸光度, 由回归方程计算总黄酮含量, 计算回收率:

基金项目 大学生研究训练计划项目 (2008058)。

作者简介 李晓明 (1985 -), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物研究与新药开发。* 通讯作者。

收稿日期 2009-07-23

回收率(%) = (测得量 - 样品已知含量) / 加入对照品量 × 100

1.2.5 样品的总黄酮含量测定。精密吸取 0.1 ml “1.2.1”项制备的样品至 10 ml 容量瓶中,分别按照“1.2.2”项下可见分光光度法和“1.2.3”项下紫外分光光度法测定吸光度,由回归方程计算样品中总黄酮的含量。

2 结果与分析

2.1 可见分光光度法回归方程的确定 分别将“1.2.2”项下配制好的不同浓度(*C*)的芦丁、山柰酚对照品溶液,经 AlCl_3 显色后在 400 ~ 800 nm 波长范围内进行扫描,并在最大吸收波长处测定吸光度值 *A*。以芦丁为对照品,在 414 nm 处测得吸光度值,得回归方程为 $A = 28.79C - 0.0452$, $r = 0.9987$,表明芦丁在 0.0042 ~ 0.0252 mg/ml 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。以山柰酚为对照品,在 416 nm 处测得吸光度值,得回归方程为 $A = 79.68C - 0.0086$, $r = 0.9991$,表明山柰酚在 0.0014 ~ 0.0070 mg/ml 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2 紫外分光光度法回归方程的确定 分别将“1.2.3”项下配制好的不同浓度(*C*)的芦丁、山柰酚对照品溶液在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描,并在最大吸收波长处测定吸光度值(*A*)。以芦丁为对照品,在 258 nm 处测定吸光度值得回归方程为 $A = 34.937C + 0.0058$, $r = 0.9995$,表明芦丁在 0.0042 ~ 0.0252 mg/ml 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。以山柰酚为对照品,在 268 nm 处测定吸光度值得回归方程为 $A = 73.436C + 0.0435$, $r = 0.9988$,表明山柰酚在 0.0022 ~ 0.0110 mg/ml 的浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.3 加样回收率试验 按照“1.2.4”项下方法进行回收率试验。采用可见分光光度法,以芦丁为对照品测总黄酮含量时,加样回收率为 98.52%,*RSD* 为 2.38%;以山柰酚为标准品时,加样回收率为 99.72%,*RSD* 为 3.14%。采用紫外分光光度法,以芦丁为对照品测总黄酮含量时,加样回收率为 97.53%,*RSD* 为 2.71%;以山柰酚为标准品时,加样回收率为 98.75%,*RSD* 为 2.86%。

2.4 样品的总黄酮含量测定 采用可见分光光度法时,样品在 412 nm 处有最大吸收峰;以芦丁为对照品时,样品中总黄酮的平均含量为 33.21 mg/g;以山柰酚为标准品时,样品中总黄酮的平均含量为 10.85 mg/g。采用紫外分光光度法时,样品在 270 nm 处有最大吸收峰;以芦丁为对照品时,样品中总黄酮的平均含量为 44.01 mg/g;以山柰酚为标准品时,样品中总黄酮的平均含量为 19.66 mg/g。

3 结论与讨论

试验结果表明,无论以芦丁还是山柰酚为对照品,采用可见分光光度法和紫外分光光度法测定凤仙花中总黄酮的含量都有较好的线性关系和回收率。但是以不同的对照品,采用不同的含量测定方法,得到的测定结果差异明显,所以为了正确地评价凤仙花中总黄酮的含量,有必要先对其总黄酮含量测定方法进行对比研究。在对凤仙花中总黄酮含量进行测定中,除了运用可见分光光度法和紫外分光光度法外,还尝试用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 法和浓 HCl-Mg 粉法进行含量测定,但前者因山柰酚和样品均不显色,后者因存在色素类成分的干扰,2 种方法均不能运用到凤仙花总黄酮的含量测定中。

黄酮类化合物在 200 ~ 400 nm 的紫外吸收光谱由 2 个吸收带组成,分别出现在 240 ~ 280 nm 和 300 ~ 400 nm。试验中,芦丁经紫外光谱扫描在 258 nm 和 358 nm 处有最大吸收峰,山柰酚经紫外光谱扫描在 268 nm 和 368 nm 处有最大吸收峰,样品经紫外光谱扫描在 270 nm 和 367 nm 处有最大吸收峰,选择 240 ~ 280 nm 吸收带进行紫外分光光度法的含量测定。采用 AlCl_3 显色后,在 400 ~ 800 nm 波长范围内进行测定,其中芦丁最大吸收峰在 414 nm 处,山柰酚最大吸收峰在 416 nm 处,样品最大吸收峰在 412 nm 处。通过对照品和样品显色前后图谱进行比较可知,山柰酚的吸收图谱和样品较为接近,所以山柰酚作为凤仙花中总黄酮含量测定的对照品较为合适。另有研究表明^[4],凤仙花中的黄酮类成分多为山柰酚、山柰酚糖苷、槲皮素、芦丁、杨梅素和各种花色苷及苷类化合物,该类化合物均可与 AlCl_3 络合采用可见分光光度法进行含量测定,避免了其余化合物在紫外区测定时的干扰。因此,采用 AlCl_3 显色的可见分光法比紫外分光法专属性要强。综上所述,以山柰酚为对照品,采用 AlCl_3 显色的可见分光光度法来测定凤仙花中总黄酮含量较为准确合理。

参考文献

- [1] 田代华. 实用中药辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:388-389.
- [2] 鞠培俊,孔德云,李晓波. 凤仙花化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(5):320-324.
- [3] 连桂香,刘玉芬,李滨. 凤仙花中总黄酮的含量测定[J]. 化工时刊,2006,20(12):45-46.
- [4] LIN H, ZHAO F P, LIAN S C, et al. Separation of kaempferols in *Impatiens balsamina* flowers by capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 909:297-303.
- [5] GAO S Y. Determination of the trace element contents in plants using atomic absorption spectrophotometer[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(2):6-9.