

中药金银花质量标准研究—总黄酮的含量测定

邢俊波 李会军 李 萍 许 力(南京 210038 中国药科大学生药理学教研室)

摘要 目的:建立金银花中总黄酮的含量测定方法。方法:比色法。结果:忍冬苷在 $0.006032 \sim 0.04826 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 线性关系良好,平均回收率 99.16%,RSD=2.37%。结论:本方法简便易行,重现性好。

关键词 比色法;金银花;忍冬苷;总黄酮

Studies on the Quality Control of Flos Lonicerae—Determination of Total Flavonoids

Xing Junbo, Li Huijun, Li Ping, Xu Li (Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To develop a method to determine total flavonoids in Flos Lonicerae. **METHOD:** Colorimetric method. **RESULTS:** The calibration curve of lonicerin had good linear relationship in the range of $0.006032 \sim 0.04826 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. The average recovery was 99.16%, and the relative standard deviation was 2.37%. **CONCLUSION:** The method was simple, easy and reproducible.

KEY WORDS colorimetric method, Flos Lonicerae, lonicerin, total flavonoids

绿原酸是金银花的主要有效成分之一,不但作为金银花生药的质量控制指标,也是一些成药和制剂的质量控制指标。但金银花除了含绿原酸外,还有黄酮类^[1,2]、皂苷类^[3,4]、环烯醚萜类^[5]等成分,本室研究表明,黄酮类是金银花抑菌有效成分之一,因此仅以绿原酸作为质量控制标准,不够全面,存在着局限性,因此有必要建立多指标综合分析该类药材的质量。

为此我们建立了金银花中总黄酮含量测定方法—比色法,并对该方法进行了考察,该方法简便、快速、稳定性较好,可用于金银花中总黄酮的测定。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

UV-2501 PC 分光光度计(岛津)、TG328B 型电光分析天平(上海天平厂)、HH-4 恒温水浴锅(常州电子仪器厂)。

1.2 试剂

对照品为自提,经 IR、MS、¹H NMR、¹³C NMR 鉴定为忍冬苷(lonicerin),HPLC 检查纯度 $\geq 99.0\%$ 。95%乙醇、乙酸乙酯、碳酸钠、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。

1.3 样品

金银花样品分别采自山东平邑、日照、河南封丘、新密,江苏南京,经鉴定为 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

2 实验部分

2.1 对照品、供试品溶液的制备

2.1.1 对照品溶液制备

精密称取忍冬苷 7.54 mg,加甲醇溶解,最后定容至 50 ml 刻度,摇匀,即得浓度为 0.1508 mg/ml 对照品贮备液。

精密吸取对照品液 1 ml,完全转移至 25 ml 容量瓶中,加入蒸馏水至 8 ml;加入 1 ml 0.5%亚硝酸钠溶液,放置 6 min;再加入 1 ml 10%硝酸铝,放置 6 min;加入 1 ml 10%氢氧化钠,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,备用。

2.1.2 供试品溶液制备

精密称取 2g 金银花药材粉末,加入 100 ml 圆底烧瓶中,用 50 ml 95%乙醇水浴(80℃)加热回流 4h(经考查黄酮类物质已提取完全),滤过,吸取 5 ml 滤液,置于蒸发皿上蒸干。用 25 ml 的蒸馏水溶解,转移至分液漏斗中,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,取下层液置于水浴上蒸干。用 25 ml 的 0.5%碳酸钠溶液完全溶解,吸取 5 ml 于 25 ml 的容量瓶中,加蒸馏水溶解,依“对照品溶液制备”项下显色,备用。

2.2 检测波长的选择

取对照品、供试品溶液适量,于 400~600 nm 扫描,得知对照品溶液与样品溶液最大吸收波长一致,均为 510 nm,故确定 510 nm 为测定波长。

2.3 线性关系的考察

精密吸取对照品贮备液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 ml 的标准品溶液,分别置于 25 ml 的容量瓶中,加蒸馏水至 8 ml,加 1 ml 5%亚硝酸钠,放置 6 min;加入 1 ml 10%硝酸铝,放置 6 min;再加入 10 ml 10%氢氧化钠,加蒸馏水至刻度,摇匀,放置 15 min。用阴性对照液作对照,在

510nm 处测定。

以浓度(X) 为横坐标,吸收度(Y) 为纵坐标,求得其回归方程为:

$$Y = 0.0485 X + 0.0373 \quad r = 0.9998$$

线性范围为 0.006032 ~ 0.04826 mg• ml⁻¹。

2.4 重复性实验

精密称取 5 份金银花药材样品适量,按“样品测定”项下测定,RSD 为 2.16 %。

2.5 稳定性实验

精密称取金银花药材样品适量,每隔一段时间,测定其吸收度,其在 2h 内基本稳定,RSD 为 2.57 %。

2.6 精密性实验

精密称取金银花药材样品适量,按“样品测定”项下测定 5 次,RSD 为 0.11 %。

2.7 回收率实验

称取已知含量的金银花药材细粉适量(5 份)加入对照品适量,按“样品测定”项下方法,进行测定,结果见表 1。

表 1 忍冬苷的回收率测定结果

加入量 / μg	测出量 / μg	平均吸收度	回收率 / %	RSD / %
150.8	148.3	0.400	98.35	2.37
150.8	154.5	0.402	102.40	
150.8	151.4	0.401	100.41	
150.8	148.3	0.400	98.35	
150.8	145.2	0.399	96.29	

2.8 样品测定

精密称取金银花药材粉末 2g(3 份),按“供试品溶液制备”项下制备样品,显色,以空白液对照,在 510nm 处测定,平行测定 3 次,按回归方程计算含量,结果见表 2。

表 2 不同产地样品中总黄酮的含量测定结果

编号	种	产地	含量/ %
1	<i>L. japonica</i>	山东日照	4.31
2	<i>L. japonica</i>	山东平邑	1.83
3	<i>L. japonica</i>	河南封丘	2.02
4	<i>L. japonica</i>	河南新密	2.47
5	<i>L. japonica</i>	江苏南京	0.65

3 结果与讨论

3.1 有关金银花中总黄酮的比色法测定仅有一篇报道^[6],但该方法是用芦丁作为对照品,因此缺乏一定的科学性和准确性,在本文中,我们采用金银花中主成分忍冬苷为照品,建立了其总黄酮测定的比色法。

3.2 用比色法测定金银花中总黄酮含量的方法,简便、快速、稳定,灵敏性高,但其存在着绿原酸成分的干扰问题。本方法采用乙酸乙酯萃取,以及加入碳酸钠使强酸弱碱结合反应除去绝大部分绿原酸成分,再加入黄酮特征显色剂,使之与铝离子络合,发生红移,在 510nm 处测定其含量。本方法可有效地消除干扰成分的影响,用于金银花中总黄酮的含量测定,可作为其质量控制的一种方法。

3.3 由表 2 可知,4 个道地产地的药材中,日照金银花中的总黄酮含量最高,大于其它 3 个道地产地药材中的含量,而其他三个道地产地药材总黄酮含量比较接近。

道地和非道地产地药材中总黄酮的含量差异悬殊,道地产地药材中的含量远高于非道地产地南京药材中含量,如日照的比南京的高 5.6 倍,其它 3 个产地的比南京的高 1.82 ~ 2.80 倍。提示产地不同,其质量存在差异。

参考文献

1 黄丽瑛,吕植祯,李继彪,等.中药金银花化学成分的研究.中草药,1996,27(11):645.

2 高玉敏,王名洲,王建平,等.金银花化学成分的研究.中草药,1995,26(11):568.

3 娄红祥,朗伟君,吕木坚.金银花中水溶性化合物的分离与结构鉴定.中草药,1996,27(4):195.

4 陈昌祥,王薇薇,倪伟,等.金银花花蕾中的新三萜皂苷.云南植物研究,2000,22(2):201.

5 Lamberto Tomassini, M. Francesca Cometa, Mauro Serafini, et al. Isolation of secoiridoid artifacts from *Lonicera japonica*. Journal of Naural Products, 1995,58(11):1756.

6 武雪芬,李玉贤,魏炜,等.金银花越冬老叶有效成分测定.中药材,1997,20(1):6.