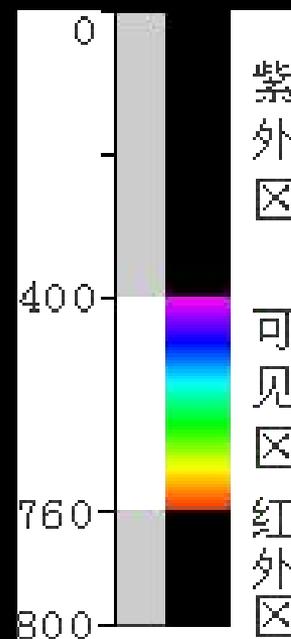


光谱法测定药物的含量

一、基本概念

紫外可见分光光度法概念

□是基于物质分子对200-760nm区域光的选择性吸收而建立起来的分析方法。



✎ 紫外可见分光光度法分类

- **分光光度法**：根据物质对不同波长的单色光的吸收程度不同而对物质进行定性和定量分析的方法。
 - 紫外分光光度法 & 可见分光光度法
- **比色法**：
 - **【定义一】** 在可见光区，一些本身对光没有吸收的物质，可在一定条件下加入显色剂或经过适当处理使其显色后再测定的方法；（特指可见分光光度法）
 - **【定义二】** 利用比较待测溶液本身的颜色或加入试剂后呈现的颜色深浅来测定溶液中待测物质的浓度的方法。包括目视比色法和光电比色法（紫外可见分光光度法）

二、分析条件的选择

1. 仪器测量条件的选择

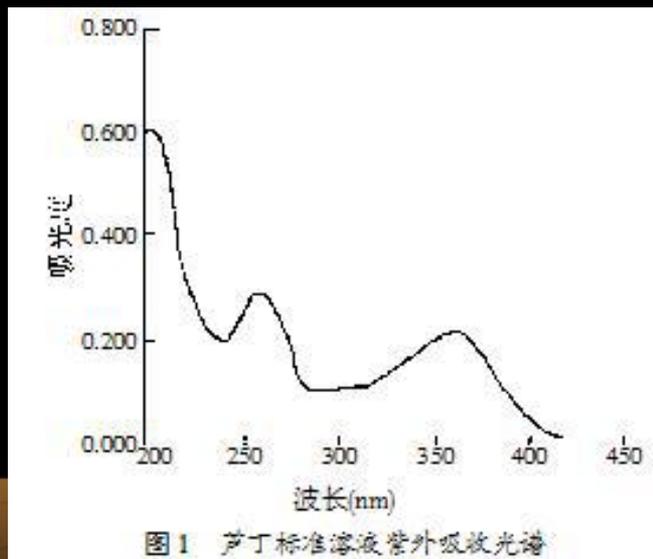
吸光度范围0.3~0.7之间为宜。

吸光度是否可能小于0或大于1?

所测吸光度超出最适宜范围的实验数据是否可用?

2.入射光波长的选择

通常是根据被测组分的吸收光谱，选择最强吸收带的最大吸收波长为入射波长。当最强吸收峰的峰形比较尖锐时，往往选用吸收稍低，峰形稍平坦的次强峰或肩峰进行测定。



3. 显色反应条件的选择

对多种物质进行测定，常利用显色反应将被测组分转变为在一定波长范围有吸收的物质。

多糖类成分
黄酮类成分
生物碱类成分
皂苷类成分

专属显色反应是什么？

这些显色反应，必须满足以下条件：

1. 反应的生成物必须在**紫外-可见光区有较强的吸光能力**，即摩尔吸光系数较大；
2. 反应有**较高的选择性**，即被测组分生成的化合物吸收曲线应与共存物质的吸收光谱有明显的差别；
3. 反应生成的产物有**足够的稳定性**，以保证测量过程中溶液的吸光度不变；
4. 反应生成物的组成恒定。

4. 参比溶液的选择

测定试样溶液的吸光度，需先用参比溶液调节透光度为100%（吸光度为0），以消除其它成分及吸光池和溶剂等对光的反射和吸收带来的测定误差。

如：**平行操作参比** 用不含被测组分的试样，在相同的条件下与被测试样同时进行处理，由此得到平行操作参比溶液。

三、测定方法

1. 单组分定量方法

单组分是指样品溶液中含有一种组分，或者是在混合物溶液中待测组分的吸收峰与其他共有物质的吸收峰无重叠。

其定量方法包括**校准曲线法**、标准对比法和吸收系数法等。

(1) 校准曲线法

方法：配制一系列不同含量的标准溶液，选用适宜的参比，在相同的条件下，测定系列标准溶液的吸光度，作**A-c曲线**，即**标准曲线/线性回归方程**。

在相同条件下测定未知试样的吸光度，从标准曲线上就可以找到与之对应的未知试样的浓度。

例 · 多糖含量测定

铁皮石斛采后加工及提取方法对多糖的影响

李聪¹, 宁丽丹¹, 斯金平¹, 吴令上¹, 刘京晶^{1*}, 宋仙水², 俞巧仙³

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 浙江省铁皮石斛产业技术创新战略联盟, 浙江 临安 311300; 2. 乐清铁枫铁皮石斛生物科技有限公司, 浙江 乐清 325616; 3. 森宇控股集团有限公司, 浙江 义乌 322000)

【摘要】 目的:揭示采后加工及提取方法对铁皮石斛多糖的影响。方法:采用直接烘干、烫后烘干、边搓边烘、烫后边搓边烘4种方法,分别在不同温度下烘干后测定药材中多糖含量;以药材粉碎与否、料液比、提取时间、提取次数为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验研究铁皮枫斗多糖的水煮溶出量。结果:不同采后加工方法得到的铁皮石斛药材多糖质量分数为26.59%~32.70%,边搓边烘100℃和80℃处理的铁皮石斛药材多糖含量最高;粉碎程度是影响铁皮枫斗多糖快速提取率的关键因素,直接投料水煮的方法提取率极低(仅为10.28%~38.00%)。结论:80℃边搓边烘的铁皮枫斗传统加工工艺可加速药材的干燥,且保留了较多多糖成分;而传统的铁皮枫斗直接投料法“宽汤久煮”也未必能充分提取药材中的多糖,建议临床及保健食用时选用粉碎后水煮。

【关键词】 铁皮石斛;多糖;质量;采后加工;水煮;苯酚-硫酸比色法

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 具有益胃生津、滋阴清热等功效,2010年版《中国药典》单独收载,多糖含量是判断药材质量的主要依据^[1-2]。铁皮石斛的加工,2010年版《中国药典》规定有2种方法:一是边加热边扭成螺旋形或弹簧状,烘干,习称“铁皮枫斗”;二是切成段,干燥或低温烘干,二者谁更科学尚不明确。铁皮枫斗的应用,民间常直接用于煲汤,但水煮过程如何令多糖成分快速溶出,至今未见报道。为提高铁皮石斛药材的质量,最大程度的发挥其保健及临床的功效,本文着重探讨了采后加工与水煮处理对铁皮石斛多糖的影响。

1 材料与amp;方法

HERAEUS公司);电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号110833-200904);所用试剂均为分析纯。

1.2 处理

1.2.1 采后加工试验 供试样品2012年9月采自中国森宇控股集团浙江省义乌市铁皮石斛种植基地。采集二年生铁皮石斛茎,除叶片后采用直接烘干、烫后烘干、边搓边烘、烫后边搓边烘4种方法,分别在不同温度下烘干后备用。①直接烘干:将新鲜茎条分别在室温,60,80,100℃4个不同的温度下烘干;②烫后烘干:先将新鲜茎条在沸水中浸烫5

■ 1 样品处理

铁皮石斛样品烘干后粉碎，过60目筛。按药典方法取各样品粗粉0.3 g，精密称定，加水200 mL，加热回流提取2 h，放冷，转移至250 mL容量瓶中，用少量水分次洗涤容器，洗液并入同一量瓶中，加水至刻度，摇匀，虑过，精密量取续滤液5 mL，置50 mL离心管中，精密加入无水乙醇25 mL，摇匀，冷藏1 h，取出，离心（转速为4 000 r·min⁻¹）20 min，弃去上清液，沉淀加80%乙醇洗涤2次，每次20 mL，离心，弃去上清液，沉淀加热水溶解，转移至50 mL量瓶中，放冷，加水至刻度，摇匀，取1mL以苯酚-硫酸比色法测定含量，试验平行3次。

■ 2 线性关系考察

精密称取干燥恒重的无水葡萄糖对照品10.0 mg，加水溶解并定容至100 mL。每10 μ L含葡萄糖1 μ g。精密吸取0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 mL，分别置于具塞试管中，各加蒸馏水至2.0 mL，再加5%苯酚溶液1.0 mL，摇匀，迅速加入浓硫酸5.0 mL，摇匀后放置5 min，沸水浴加热15 min，取出快速冷却至室温，另以蒸馏水2.0 mL为空白，同法操作，于490 nm处测定吸光度，得吸光度与浓度的回归方程： $y = 10.470\ 90\ x - 0.010\ 02$ ， $r = 0.999\ 8$ 。在0.03~0.18 mg，浓度(x)与吸光度(y)具有良好的线性关系。

■ 3 数据处理

请计算：某样品吸光度测定平均值为0.29，其多糖含量是多少？

$$(y = 10x - 0.01)$$

烘干法测得该样品水分含量为10%，**按干燥品计算**，该样品多糖含量是多少？

(2) 对照品比较法

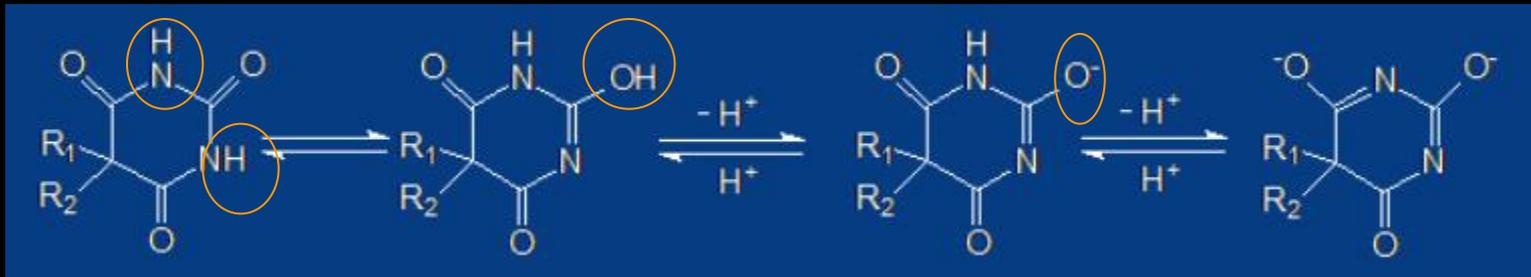
将待测溶液与某一标样溶液，在相同的条件下，测定各自的吸光度，建立朗伯-比尔定律，解方程求出未知样浓度与含量。

$$A_s = Kc_s \quad A_x = Kc_x$$

$$c_x = \frac{c_s A_x}{A_s}$$

例.巴比妥类药物的含量测定

- 巴比妥类药物具有丙二酰脲结构，在不同pH介质中具有以下平衡：

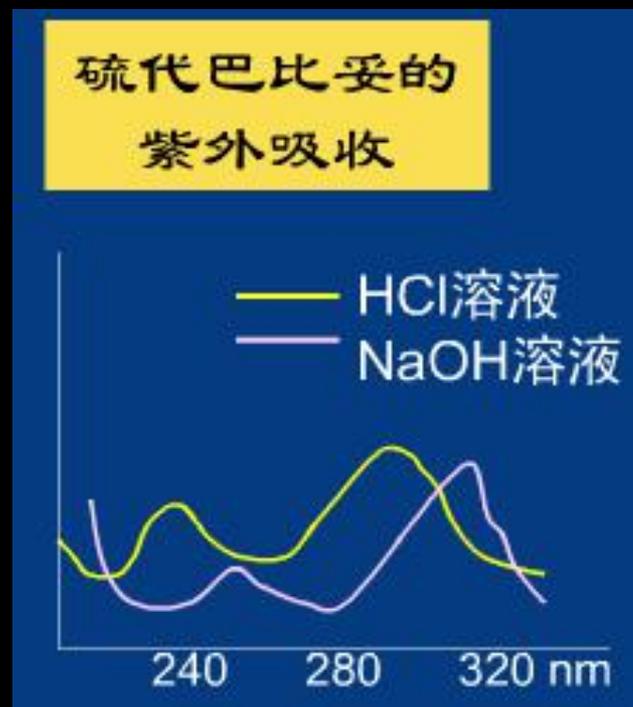
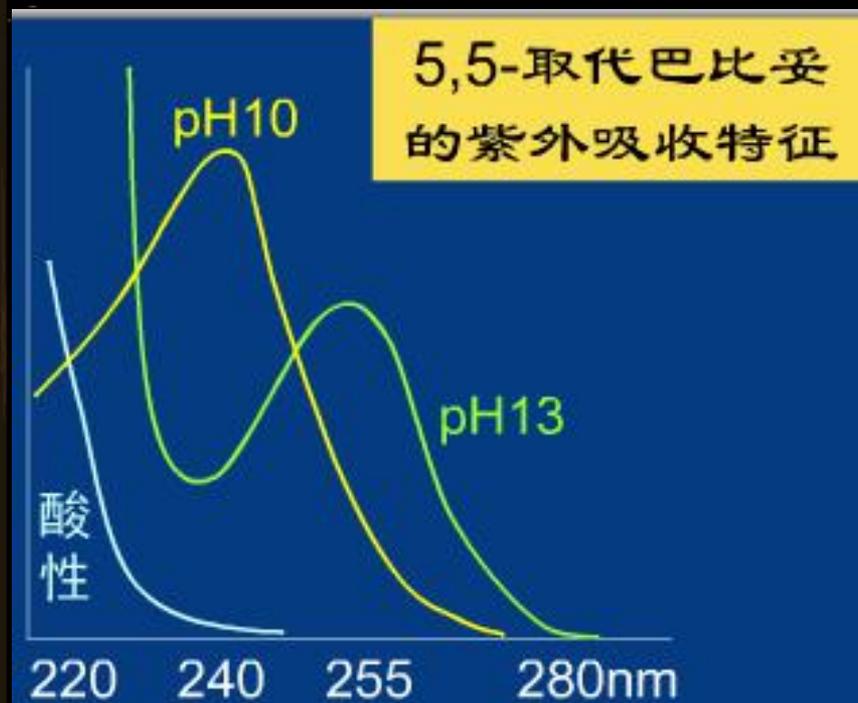


酸性介质中
互变异构
无明显紫外吸收

pH10
一级电离
5,5-取代
1,5,5-取代类
最大吸收240nm

pH13
二级电离
5,5-取代—255nm;
1,5,5-取代不发生
二级电离，仍为240nm

巴比妥类药物的紫外光谱特点



● 注射用硫喷妥钠的含量测定 (Ch.P.法)

④ 取相当于硫喷妥钠0.25g，用水稀释至500ml，再用0.4%氢氧化钠溶液稀释至5ug/ml。另取硫喷妥为对照品，用0.4%氢氧化钠溶液稀释至5ug/ml，于304 nm波长处分别测定吸光度，计算含量

④ 已知：称取本品(规格0.5g)内容物0.2658g，对照品浓度5.05 μ g/mL，测得样品A=0.446，对照品A=0.477，5支内容物重2.6481g。求相当于标示量的百分含量？

(3) 吸收系数法

$$C=A/EL$$

注意：百分吸收系数E值小于100的一般不宜采用，并注意溶剂、溶液pH值的影响。

(4) 计算分光光度法

如： 双波长法

双波长法基本原理

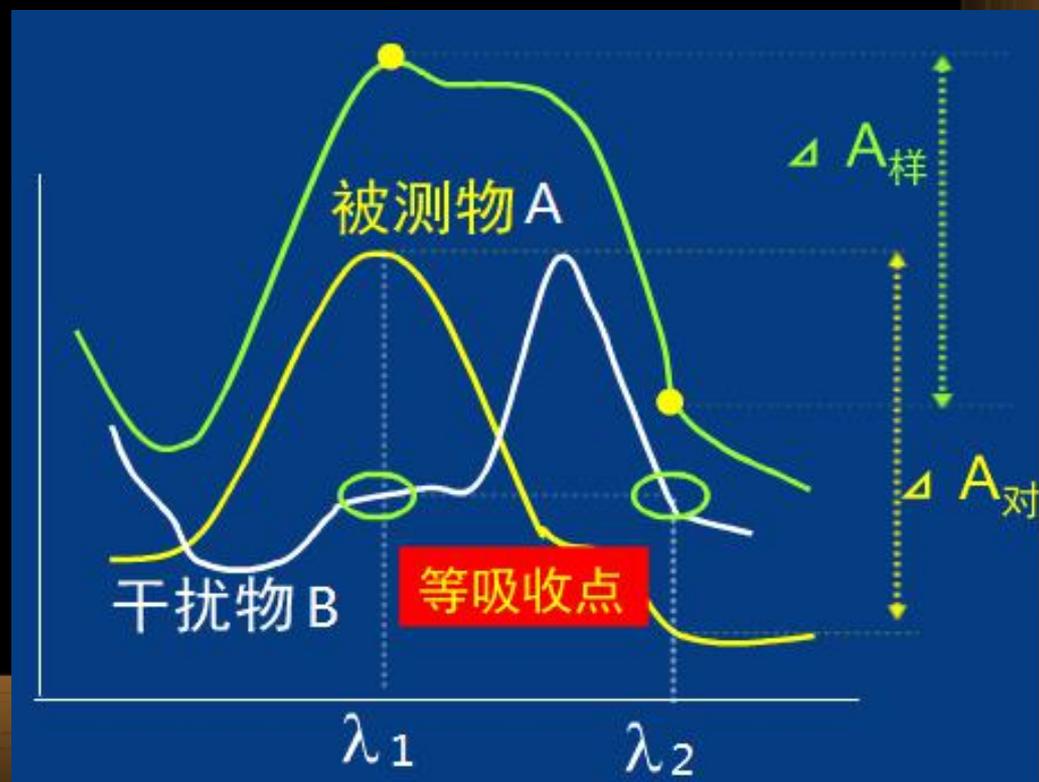
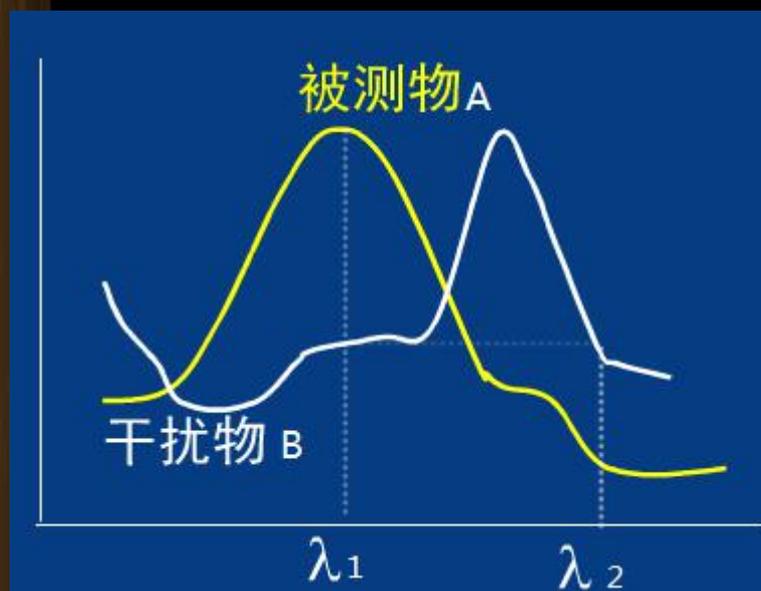
试样中含有A、B两组分，组分B干扰组分A的测定。若采用双波长分光光度法，可不分离B而直接测定A的含量。

为了消除干扰组分B的吸收，分析波长 λ_1 选择在组分A的最大吸收峰或它的附近，参比波长 λ_2 用作图法确定，如下图所示。

所选择的 λ_2 和 λ_1 应符合以下条件：

第一，干扰组分在该两波长处的吸光度相同；

第二，被测组分在该两波长处的吸光度差 ΔA 要足够大。



由吸光度加和性知，混合试样在 λ_2 和 λ_1 处的吸光度可表示为：

$$A_{\lambda_2} = A_{\lambda_2}^A + A_{\lambda_2}^B$$

$$A_{\lambda_1} = A_{\lambda_1}^A + A_{\lambda_1}^B$$

双波长分光光度计的输出信号为 ΔA ：

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1}$$

合并以上三式

$$\Delta A = A_{\lambda_2}^A + A_{\lambda_2}^B - A_{\lambda_1}^A - A_{\lambda_1}^B$$

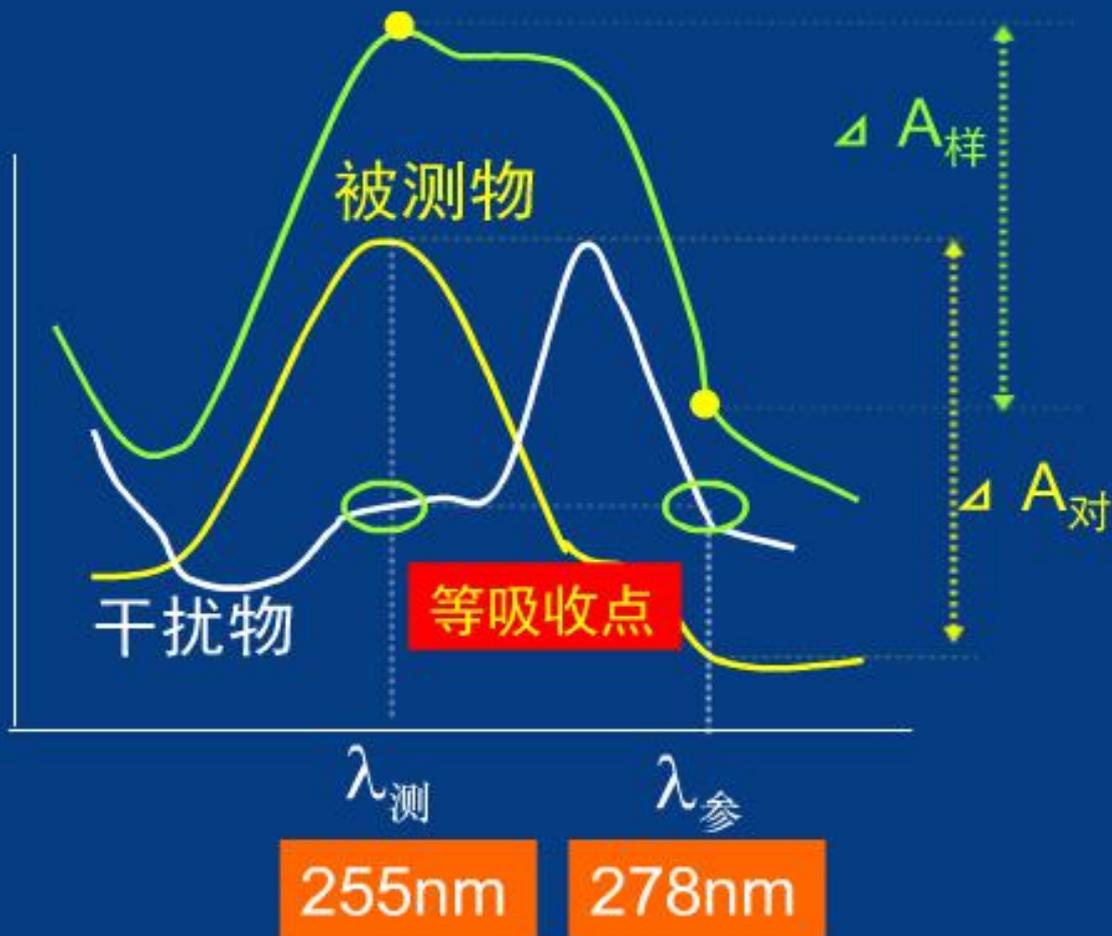
因

$$A_{\lambda_2}^B = A_{\lambda_1}^B$$

所以

$$\begin{aligned}\Delta A &= A_{\lambda_2}^A - A_{\lambda_1}^A \\ &= (\varepsilon_{\lambda_2}^A - \varepsilon_{\lambda_1}^A)bc\end{aligned}$$

该式表明，此时测得的 ΔA 与干扰组分无关。



$$\Delta A_{样} = A_{测}' - A_{参}'$$

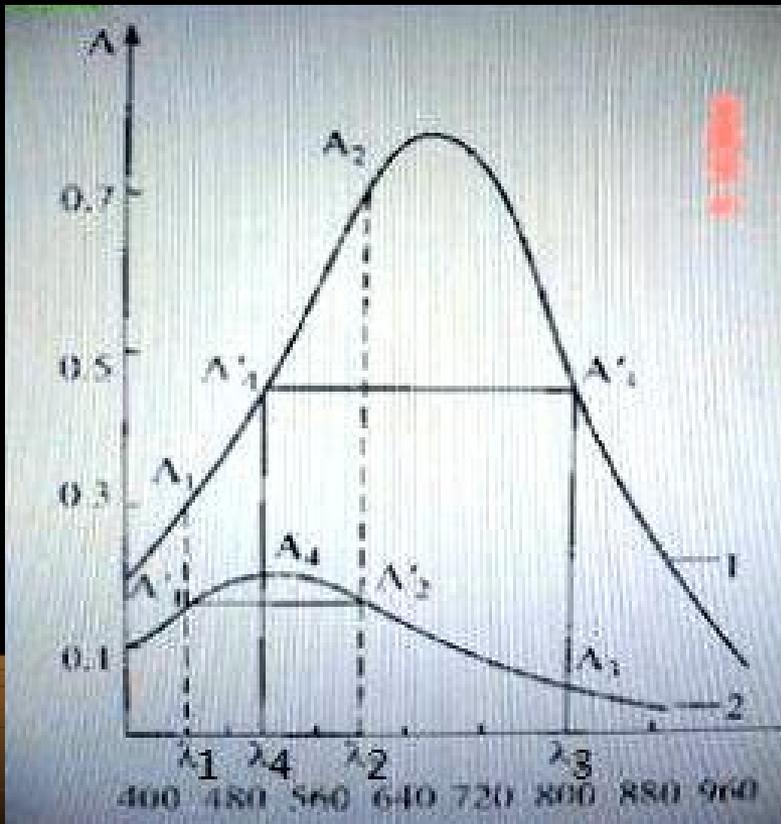
$$\Delta A_{杂} = 0$$

$$\Delta A_{对} = A_{测} - A_{参}$$

$$C_{样} = \frac{\Delta A_{样}}{\Delta A_{对}} \times C_{对}$$

例题

- 直链淀粉与碘作用产生纯蓝色，支链淀粉与碘作用生成紫红色。如果用两种淀粉的标准溶液分别与碘反应，然后在同一个坐标系里进行扫描（400 - 960 nm）或做吸收曲线，可以得到图所示结果。
- 图中1为直链淀粉的吸收曲线，2为支链淀粉的吸收曲线。



如图分别在以下四个波长处测定吸光度 λ_1 ， λ_4 ， λ_2 ， λ_3 。

请问：

ΔA 直链， ΔA 支链
分别如何计算？

作业

- 双波长分光光度法测定盐酸三氟拉嗪注射液含量：精密量取本品1mL（约相当于盐酸三氟拉嗪20 mg），置250 mL分液漏斗中，加入2 mol/L硫酸10 mL，用四氯化碳提取3次，每次25 mL，弃去四氯化碳层。余下水层加氨水10mL，用环己烷提取5次，每次40mL；合并环己烷层，用0.1mol/L盐酸溶液提取5次，每次50mL，合并水层置500mL量瓶中，加0.1mol/L盐酸溶液稀释至刻度，混匀，作为供试品溶液。另取盐酸三氟拉嗪（分子量为480.4）对照品，加0.1mol/L盐酸溶液配制成浓度为12.0 μ g/mL的对照品溶液。以0.1mol/L盐酸溶液为空白溶剂，同时测定供试品溶液和对照品溶液在255nm和278nm处的吸光度。
- 测得结果如下：供试品溶液在255nm处吸光度 $A_{255u}=0.731$ ，在278nm处吸光度 $A_{278u}=0.331$ ；对照品溶液在255nm处吸光度 $A_{255s}=0.650$ ，在278nm处吸光度 $A_{278s}=0.350$ 。
- 计算每1mL注射液中三氟拉嗪（分子量为407.5）的含量。

四、比色法及其应用

- 1. 酸性染料比色法
 - 溴甲酚绿比色法测铁皮石斛中总生物碱含量
- 2. 四氮唑比色法
 - MTT法

MTT法

- 又称MTT比色法， 四甲基偶氮唑盐比色法
- MTT全称为3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，汉语化学名为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐，商品名：噻唑蓝。是一种黄颜色的染料。

MTT法，是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶（SDH）能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。

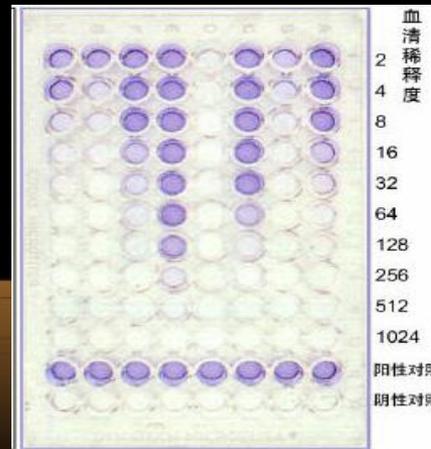
二甲基亚砷（DMSO）能溶解细胞中的甲臞，用酶联免疫检测仪（酶标仪）在490nm波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT结晶形成的量与细胞数成正比。

它的特点是灵敏度高、经济。

酶联免疫检测仪（酶标仪）

MicroplateReader

- 是对酶联免疫检测（EIA）实验结果进行读取和分析的专业仪器。其核心都是一个比色计,即用比色法来分析抗原或抗体的含量。
- EIA是一种特异而敏感的检测技术，可以在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的所在部位，也可以在微克、甚至纳克水平上对其进行半定量、定量测定。



目前MTT法常用于以下几个方面的研究：

- 1、检测细胞活性：常作为细胞毒性试验的一种方法。
- 2、体外药物敏感实验：该方法简便、经济、快速，重复性好，所需的细胞数较少，没有放射性，目前广泛的用于临床前的抗癌药物的筛选研究。
- 3、一些细胞因子活性的研究。
- 4、肿瘤放射敏感性测定。

检测细胞活性

- 细胞死亡率% =
$$\frac{\text{OD对照组} - \text{OD实验组}}{\text{OD对照组}}$$

思考题

1. 双波长分光光度法测定复方制剂有何优点?如何应用?

思考题

2. 应用双波长分光光度法应如何选择测定波长和参比波长?

思考题

3. 简述吩噻嗪类药物的紫外光谱特征。如何消除氧化物、注射剂中的抗氧化剂及各种干扰物质对紫外测定的影响？

练习题

1. 硫酸阿托品含量测定：取本品20片，称重（0.1011g），研细，去片粉适量（40.4mg），加水至50mL，过滤，去续滤液作为供试品溶液。另取本品对照品适量，加水制成50 μ g/mL的溶液。去对照品溶液和供试品溶液各2.0mL，置分液漏斗中，加10mL三氯甲烷，2.0mL溴甲酚绿溶液，振摇提取，分取三氯甲烷层，于420nm波长处分别测定吸光度，计算，并将结果与1.027相乘，即得供试品中含硫酸阿托品[(C₁₇H₂₃NO₃)₂·H₂SO₄·H₂O]的重量。已知：对照品吸光度为0.405，供试品溶液吸光度为0.390，规格0.3mg，求片剂的含量，是否符合规定的含量限度。

2. 取对乙酰氨基酚片（标示量为0.3g）10片，精密称定，总重为3.3660g，研细，称出44.9mg，置250ml量瓶中，加0.4%氢氧化钠溶液50ml及水50ml，振摇15min，加水至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液5ml，置100ml量瓶中，加0.4%氢氧化钠溶液10ml，加水至刻度，摇匀，照紫外-可见分光光度法测定，在257nm的波长处的吸光度为0.583，求此片剂中对乙酰氨基酚为标示量的多少？（百分吸光系数为715）



Thank you ...