

薄层色谱-化学衍生荧光分光光度法测定槐米中芦丁的含量

傅 强 梁明金 常 春 贺浪冲(西安 710061 西安交通大学药学院)

摘要 目的: 建立一种适应性强、灵敏、准确的方法用于测定槐米中芦丁的含量。方法: 以 95% 乙醇为溶剂进行索氏提取; 用醋酸乙酯-甲酸-水(4: 1: 1) 为展开剂分离; 洗脱后以 10% $AlCl_3$ 甲醇溶液作为反应试剂, 在 $E_x = 420nm$, $E_m = 513nm$ 处测定荧光强度。结果: 此方法的线性范围为 $0.2 \sim 1.2 \mu g/ml$, 平均回收率为 98.7%, 变异系数 RSD 为 2.71%。结论: 此方法稳定, 重现性好, 灵敏度高, 可用于槐米的质量评价。

关键词 薄层色谱-化学衍生荧光分光光度法; 槐米; 芦丁

Determination of rutin in flor sophorae by thin layer chromatography-chemical deviation fluorospectrophotometry

ABSTRACT OBJECTIVES: This paper reported a sensitive and accurate method for the assay of rutin in *Flor Sophorae*. **METHODS:** Rutin was extracted by 95% ethanol, and separated from the others components with ethyl acetate-formic acid-water (4: 1: 1) as developer and eluted from silica gel G with methanol. 10% $AlCl_3$ methanol solution was added to react with rutin and the fluorescence of rutin was determined at $Ex\ 420nm$ and $Em\ 513nm$. **RESULTS:** Linear range was between $0.2\ \mu g/ml$ and $1.2\ \mu g/ml$. The average recovery was 98.7%, with coefficient of variation of 2.71%. **CONCLUSIONS:** This method is feasible, stable, sensitive and has good repeatability, and could be used to control the quality of *Flor Sophorae*. **KEY WORD** thin layer chromatography-fluorospectrophotometry, content analysis, rutin, *Flor Sophorae*

槐米为豆科植物槐(*Sophora daponical* L.)的未开放花蕾。具有降低毛细血管前壁的脆性和调节毛细血管渗透性的作用,主要用于毛细血管性引起的出血症,并作为高血压症的辅助治疗药物,其主要有效成分为芦丁,文献报道可用荧光分光光度法^[1]、双波长分光光度法^[2]、高效液相色谱法^[3,4]及薄层扫描法^[5]测定其含量,但适用于药材质量控制的较灵敏、准确、方便的方法还未见报道,中国药典95版也尚未收载槐米生药中芦丁的含量测定项目。本文建立了薄层色谱-化学衍生荧光分光光度法并将其用于槐米中芦丁的含量控制。

1 仪器、样品与试剂

RF-540 荧光分光光度计(日本岛津);薄层色谱定量点样管(美国 Drummond Co.)。

硅胶 G 由青岛海洋化工集团公司生产,实验中所用甲醇、乙醇、甲酸、醋酸乙酯等均为分析纯。

芦丁对照品(中国药品生物制品检定所);槐米(*Flor Sophorae*)生药(市售,并由本院生药教研室鉴定)。

芦丁对照溶液的制备

取芦丁对照品约 10mg,精密称定,加甲醇使溶解,置于 10ml 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,放置备用。

2 方法与结果

2.1 薄层条件的选择

采用硅胶 G 板,用醋酸乙酯-甲醇-水(4: 1: 1)上行展开,展距 8cm,取出晾干,喷以 10% $AlCl_3$ 甲醇溶液显色,晾干后置紫外灯(365nm)下检视,芦丁呈现暗黄褐色荧光斑点,可见光下为黄色斑点, R_f 值约为 0.63。在此条件下,芦丁可以得到有效分离斑点圆整,无拖尾现象(见图 1)。



图 1 薄层展开图谱

1; 4 对照品斑点 2; 3 供试样品斑点

2.2 荧光测定条件的选择

刮取薄层展开后的芦丁斑点于离心管中,定量加入甲醇 1ml,振摇,充分洗脱 0.5h,置离心机中离心 10min(3000r/min)。取上清液 0.5ml,置 5ml 容量瓶中,加入 10% $AlCl_3$ 甲醇反应试剂 1.0ml,混匀,用甲醇稀释至刻度,用荧光分光光度计扫描测定,结果选择激发波长 $Ex = 420nm$,发射波长 $Em = 513nm$ (见图 2)。

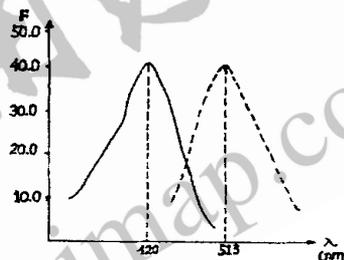


图 2 芦丁荧光图谱

2.3 线性关系试验

定量吸取芦丁对照品溶液 2、4、6、8、10、12、14 μl 分别点于硅胶 G 板上,按上述方法测定荧光强度。线性方程为 $F = 0.92 + 21.8C$ (其中 F 为荧光强度, C 为溶液浓度),线性范围为 $0.2 \sim 1.2\ \mu g/ml$, $r = 0.9997$ ($n = 7$)。由于所得直线不过原点,故采用外标两点法测定芦丁的含量。

2.4 稳定性试验

取芦丁对照品溶液加 10% $AlCl_3$ 甲醇溶液,定容后避光放置,在 0.1、0.2、0.5、1、2、4、12、24 小时后测定荧光强度。结果表明在 12h 内荧光强度基本稳定, $RSD\% < 5\%$ 。

2.5 精密度试验

板内误差 吸取芦丁对照品溶液点于在同一硅胶 G 板上呈等距离的 6 个点,点样量均为 $6\ \mu l$,测定其荧光强度,结果为 $RSD\% = 1.01\%$ 。同法点样量为 $3\ \mu l$ 时板内误差 $RSD\% = 2.51\%$ 。

板间误差 吸取芦丁对照品溶液分别点于不同的硅胶 G 板上,同上所述测定荧光强度。当点样量为 $6\ \mu l$ 时,结果为 $RSD\% = 2.97\%$;当点样量为 $3\ \mu l$ 时,结果为 $RSD\% = 3.86\%$ 。

2.6 回收率试验

取已知含量的槐米粉末 5 份,每份约 0.5g,精密称定;同

样取芦丁对照品 5 份, 每份约为 0.1g, 精密称定。将芦丁对照品分别加入槐米粉中混匀。以上述方法测定粉末中芦丁含量, 计算加样回收率。结果表明 5 份样品的平均回收率为 98.7%, RSD% = 2.71%。(见表 1)

表 1 槐米生药加样回收测定结果

取样量 (g)	芦丁原 有量(g)	芦丁加 入量(g)	测得量 (g)	回收率 (%)	\bar{x}	RSD
0.5011	0.1069	0.1000	0.2068	99.9		
0.5007	0.1068	0.1000	0.2041	97.3		
0.5006	0.1069	0.1000	0.2024	95.1	98.7%	2.71%
0.5010	0.1069	0.1000	0.2057	98.8		
0.5007	0.1068	0.1000	0.2097	102.2		

2.7 样品含量测定

取槐米的干燥粉末约 1g, 精密称定, 装入索氏提取器中, 以 95% 乙醇为溶剂, 提取至回流液无色, 静置放冷, 用 95% 乙醇定容至 100ml, 过滤, 定量吸取 3 μ l, 点于薄层板上, 随对照品溶液 ($C = 1.01 \text{ mg/ml}$) 3 μ l, 9 μ l, 展开, 刮取薄层展开后的芦丁斑点于离心管中, 定量加入甲醇 1ml, 振摇, 充分洗脱 0.5h, 置离心机中离心 10min (3000r/min)。取上清液 0.5ml, 置 5ml 容量瓶中, 加入 10% AlCl_3 甲醇反应试剂 1.0ml, 混匀, 用甲醇稀释至刻度, 用荧光分光光度计扫描测定, 利用外标两点法计算样品中芦丁的含量。测定 5 份槐米市售样品中芦丁的含量, 得槐米生药中芦丁的含量为 21.33%, RSD% = 3.78%。

3 讨论

3.1 所选薄层展开剂能够将样品中的成分完全分离, 芦丁的相对比移值为 0.63; 斑点圆整, 无拖尾现象; 本试验对提取条件^[6]进行了选择, 经对照试验后选择了 95% 乙醇索氏提取的方法。

3.2 本文将色谱法与光谱法相结合, 利用薄层色谱的分离效能和荧光分光光度法的高灵敏度检出的特点进行测定。并且利用黄酮类化合物与 AlCl_3 络合后荧光增强的性质使芦丁与 AlCl_3 络合, 试验酸碱度及溶剂对其荧光强度的影响, 选定以甲醇作试剂使芦丁与 10% AlCl_3 络合后测定的方法, 提高了芦丁测定的灵敏度, 重现性良好, 与薄层扫描法比较此法处理步骤较多, 但可以达到相同的定量限, 并且较灵敏, 测定浓度比紫外分光光度法低两个数量级, 更适合于芦丁的微量分析, 可望用于低浓度及复杂样品的分析。

参考文献

- 1 庞志功, 汪宝琪. 荧光分光光度法测定复方降糖粉中芦丁含量. 西北药学杂志, 1990, 5(3): 4.
- 2 李松武. 芦丁提取新工艺. 中成药, 1990, 12(9): 12.
- 3 中国药典, 1995 年版(一部), 1995: 311.
- 4 钱广生. 银杏和苦荞麦制品中芦丁 $\text{R}_p\text{-HPLC}$ 测定. 华西药学杂志, 1996, 11(1): 48.
- 5 何卫民. 芦丁及芦丁片测定方法改进. 中国医药工业杂志, 1995, 26(6): 264.
- 6 王明龙. 用 $\text{R}_p\text{-HPLC}$ 法测定含芦丁的原生药及制剂中芦丁的含量. 西北药学杂志, 1992, 7(1): 8.

收稿日期: 1999-09-29