

辣蓼中芦丁的薄层及紫外光谱鉴别

常 璞¹ 王四旺¹ 张 超² 王剑波¹ 谢艳华¹

(1 第四军医大学药理学系药物研究所 西安 710032 2 成都华高药业有限公司 成都 610041)

摘要 目的:确定辣蓼中有效成分芦丁的定性鉴别和总黄酮含量的测定方法。方法:采用薄层层析(TLC)、紫外分光光度法(UV)对辣蓼分别进行理化鉴别和含量测定。结果:芦丁确系辣蓼中主要有效成分;同时建立 UV 检测中浓度在 0.00808 - 0.04848mg/ml 范围内与吸收度间的具有良好线性关系,其回归方程为 $A = 11.4716C - 0.0003$ ($r = 0.9928, n = 6$),平均回收率为 97.95% (RSD = 1.88%);辣蓼样品中总黄酮的平均含量为 1.939%。结论:本方法简便、快速、准确;为辣蓼开发新药及其相关质量标准的研究提供了依据。

关键词: 辣蓼; 芦丁; 薄层层析; 紫外分光光度法; 总黄酮; 含量

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A

The Identification of Rutin in Laliao by TLC and UV

CHANG Ying¹, WANG Si-wang¹, ZHANG Chao², WANG Jian-bo¹, XIE Yan-hua¹

(1 Institute of Materia Medica, School of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

2 Chengdu Wagott Pharmaceutical limited company, Chengdu 610041, Sichuan, China)

ABSTRACT Objective: To qualitatively determine rutin in Laliao, and to establish a method for the content determination of total flavonoids in Laliao. **Methods:** Physicochemical Properties and assaying of Laliao were identified by the methods of thin-layer chromatography (TLC) and ultra-violet spectrophotometry (UV). **Results:** Rutin was mainly active component in Laliao. Good linear relationship with the absorbability was achieved when the detection concentration of rutin was within a range of 0.00808 - 0.04848mg/ml ($r = 0.9928$), the regression equation was $A = 11.4716C - 0.0003$ ($r = 0.9928, n = 6$) and the average recovery rate was 97.95% (RSD = 1.88%). Meanwhile, the average content of total flavonoids was 1.939% in Laliao sample. **Conclusion:** This method was simple, rapid and accurate. It provided data for the exploitation and quality criteria of Laliao research.

Key words: Laliao; Rutin; TLC; UV; Total flavonoids; Content

辣蓼为蓼科植物水辣蓼 *Polygonum Hydropiper* 或旱辣蓼 *Polygonum Flaccidum* Meisn 的干燥全草,其叫法各地有差异通常是指水蓼、红辣蓼、辣尿草等^[1-3]。产于我国南北各地,多生于溪边,山坡湿地。传统医学认为,辣蓼辛、温,无毒。具有健脾化湿、除湿化滞、止痢止痛、解毒化痰的功效;适用于感染和饮食不忌等引起的腹泻、腹痛、痢疾等的治疗。现代临床医学研究表明^[4],辣蓼具有抗菌、抗病毒,抗炎,抗氧化,止血,抗肿瘤,镇痛等功效,总黄酮为其有效成分。其水提液能明显降低大鼠肾盂肾炎模型尿中的白细胞和红细胞。明显降低大肠杆菌感染小鼠的死亡率,降低发热家兔的体温^[5]。笔者以芦丁为对照品,采用分光光度法^[6],对其中的总黄酮进行含量测定,现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器:

紫外可见分光光度计 (specord 200 型,德国耶拿 jena 公司);石英比色皿 (德国耶拿 jena 公司);1/10 万电子分析天平 (D200 型,德国 Sartorius 公司);电子恒温水浴锅 (天津泰斯特科学仪器有限公司)。

1.2 试药:

芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所,批号:100080-200306);辣蓼产于湖北鄂州市 (药材经陕西省药品检验所鉴定);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性检验

2.2.1 盐酸-镁粉还原反应试验:取本品粉末约 1g,加乙醇 15ml,于水浴上 30min,滤过。取滤液 2ml,加入镁粉 50mg,滴加浓盐酸数滴,溶液呈微樱桃红色,说明银杏根中有黄酮化合物存在。

2.2.2 辣蓼中芦丁的薄层鉴别:取辣蓼粉末 1g,加乙醇 15ml,于水浴上温浸 2 小时,滤过,回收乙醇,浓缩成稠浸膏状,加乙醇 0.5ml 溶解后为供试品溶液。另取芦丁对照品,加乙醇制成 2mg/ml 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验,吸取上述两种溶液分别点于同一聚酰胺薄膜上,以醋酸乙酯-甲酸-水 (8:1:1) 为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液,待乙醇挥发后,置紫外光灯 (365nm) 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的黄绿色荧光斑点图 1。

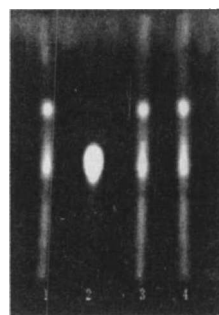


图 1 薄层色谱图

1.3.4 辣蓼供试品; 2. 芦丁标准品

Fig 1 Picture of thin-layer chromatogram

1.3.4 Testing sample of Laliao; 2. Standard preparation of rutin.

作者简介:常璞 (1980-),女,陕西西安人,在读硕士。

研究方向:中药新药研发。Tel: (029) 84773689

通讯作者:王四旺 (1958-),男,湖北武汉人,教授,硕士生导师。

Tel: (029) 84774748 wangsiw@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2006-07-20 接受日期:2006-08-23)

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备:准确称取于 120 ℃ 下干燥至恒重的芦丁对照品 10.05mg,置于 50ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.201mg/ml 的芦丁对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备:称取辣蓼粉末约 1g,准确称定,分别置于索氏提取器中,加石油醚适量,加热回流至提取液无色,弃去石油醚液。药渣放冷,再加甲醇适量,加热回流至提取液无色,移置 100ml 容量瓶中,用少量甲醇洗涤容器,洗涤液并入容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密量取 25mL,置 50mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 测定波长的选择:分取“2.2.1”项下对照品溶液和“2.2.2”项下供试品溶液 3ml,分别置于 25ml 容量瓶中,各加水至 6ml,再加 5%亚硝酸钠溶液 1ml,摇匀,放置 6min。加 10%硝酸铝溶液 1ml,摇匀,放置 6min。加 4%氢氧化钠试液 10ml,再加水至刻度,摇匀,放置 15min。以水平行试验为空白参比,在 200nm-600nm 波长范围内扫描,结果对照品和供试品溶液均在 500nm 波长处有最大吸收峰,故以 500nm 为测定波长。

2.2.4 标准曲线的绘制:精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.0ml,分别置于 25mL 容量瓶中,按“2.2.3”项下方法进行操作,并在 500nm 波长处测定吸收度。以吸收度(A)为纵坐标,浓度(c)为横坐标,绘制标准曲线图 2,得回归方程 $A = 11.4716C - 0.0003$ ($r = 0.9928, n = 6$),表明样品检测浓度在 0.00808-0.04848mg/ml 的范围内与吸收度线性关系良好。

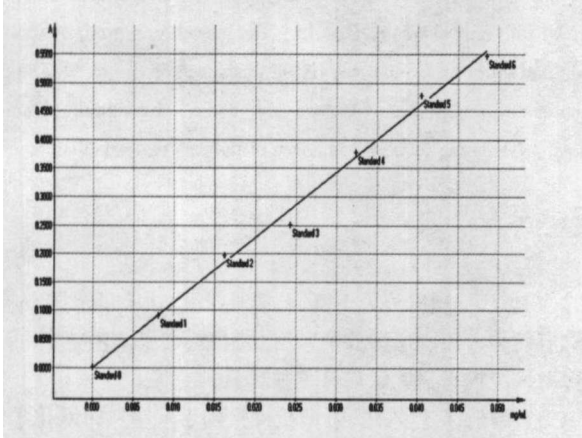


图2 标准曲线[横坐标为芦丁标准品含量(mg/ml);纵坐标为吸收度(A)]

Fig 2 Standard curve[X - axis: content of rutin(mg/ml); Y - axis: absorbance (A)]

2.2.5 精密度试验:精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 3ml,共 6 份,按“2.2.4”项下方法操作,分别测定吸收度。结果吸收度平均值为 0.1207, RSD = 0.3859%,表明本方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验:精密吸取供试品溶液 3ml,按“2.2.4”项下方法操作,摇匀后于 10、20、30、40、50、60min 时分别测定吸收度。结果 30min 内测得吸收度的 RSD = 1.450%,表明在 30min 内完成测定时结果准确。

2.2.7 重复性试验:取同一编号的辣蓼粉末,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液 6 份,分别从中准确吸取 3ml,按“2.2.4”项下方法操作,测定吸收度。结果该样品中总黄酮平均含量为 1.959%, RSD = 1.23%,表明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验:准确取已知含量的辣蓼粉末 1mg,共 9 份,再按低、中、高系列浓度分别加入对照品溶液 0.1、0.2、0.3ml,每种浓度 3 份,其后按“2.2.4”项下方法测定吸收度,计算

平均回收率,结果详见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test					
样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
0.01939	0.0201	0.03850	95.07	97.95	1.88
0.01978	0.0201	0.03903	95.77		
0.01978	0.0201	0.03996	100.40		
0.01939	0.0402	0.05932	99.33		
0.01978	0.0402	0.05961	99.08		
0.01997	0.0402	0.05955	98.46		
0.01939	0.0603	0.07938	99.49		
0.01997	0.0603	0.07816	96.50		
0.01997	0.0603	0.07871	97.41		

2.2.9 样品含量测定:准确称取药材粉末 1g,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,分别从中准确吸取 3ml,按“2.2.4”项下方法操作,测定吸收度,代入回归方程中计算供试品含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Content determination results of samples(n=3)				
编号	称样量(g)	总黄酮含量(%)	$\bar{x}$ (%)	RSD(%)
1	1.01200	1.959	1.939	2.40
2	1.00278	1.974		
3	1.05661	1.887		

3 讨论

薄层色谱的检测原理及特性:实验中以芦丁为对照品,采用硝酸铝作为黄酮类物质比色测定的显色剂,主要是因为黄酮母核中含有碱性氧原子,一般又多带酚羟基,能和铝离子产生黄色络合物。加入亚硝酸钠和氢氧化钠,可使之在碱性溶液中显红色,但显色反应要及时测定,放置过久易褪色。

紫外分光光度法检测波长的选择:文献报道总黄酮测定的波长多采用 257nm、358nm、510nm 等^[7]。经过我们比较研究中发现,波长为 500nm 处干扰较小,且样品不需要特别处理即可进行测定。实验结果表明,该方法回收率高,重复性好,方法准确、简单快捷,易于普及。近年大量药理试验研究表明^[8],辣蓼有抑菌、抗炎效果。水提液体外抑菌实验证明,辣蓼对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、福氏痢疾杆菌等肠道感染常见的细菌具有不同程度的抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌的抑菌作用更强。动物体内实验结果表明,辣蓼对二甲苯引起的小鼠耳肿胀、蛋清引起的大鼠足肿胀、醋酸导致的小鼠腹腔毛细血管通透性增高均有显著的抑制作用,说明辣蓼能够抑制炎症早期的渗出和水肿。辣蓼减少角叉菜胶引起的大鼠胸腔白细胞数、抑制小鼠滤纸片致肉芽肿的生长,说明辣蓼能够拮抗炎症中期白细胞趋化和游走,抑制炎症晚期肉芽肿的形成。提示辣蓼对炎症的早、中、晚期均有明显的抑制作用,起作用成分可能与黄酮类化合物有关,为其应用展示了良好的前景,有关辣蓼的抗炎作用机理有待进一步研究。黄酮类化合物有抗炎、降脂、抗血栓、抗衰老、抗氧化、抗心率失常等作用。本文探讨的辣蓼薄层色谱鉴别及其总黄酮含量测定的方法研究,为该药材的质量标准研究及新药研发奠定了基础。

(下转第 51 页)

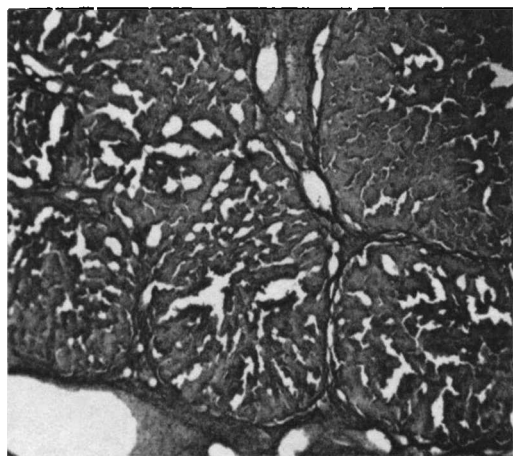


图 1-3 大鼠肝硬化肝脏 HE 染色 ×400 倍

Fig 1-3 HE staining (×400) for rats with cirrhosis of liver

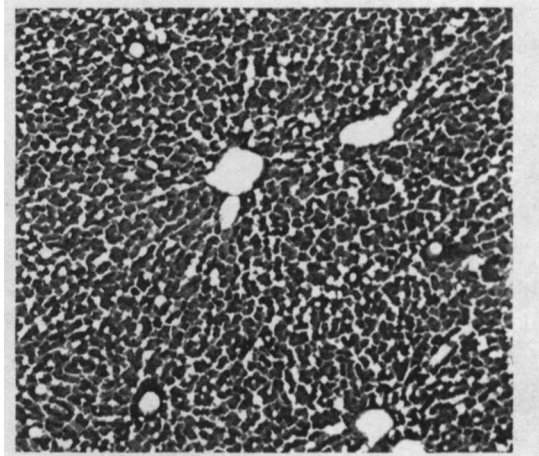


图 1-4 大鼠正常肝脏 HE 染色 ×400 倍

Fig 1-4 Liver HE staining (×400) for healthy rats

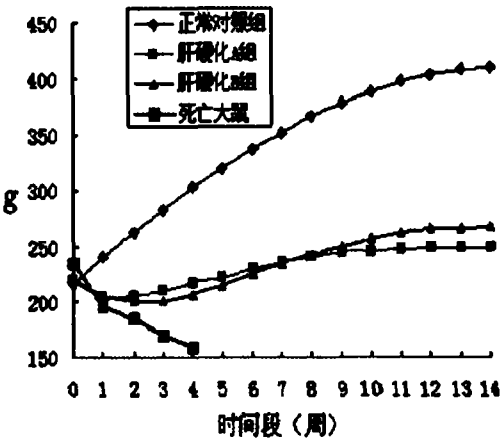


图 1-5 3组大鼠体重变化曲线

Fig 1-5 Weight changes curve for the three groups of rats

(上接第 47 页)

参 考 文 献

[1] 中国科学院植物志编辑委员会.中国植物志[M]:第 20 卷第 1 分册.北京:科学出版社,1998:1-10

[2] 湖北省植物研究所.湖北植物志[M]:第 1 卷.武汉:湖北人民出版社,1958:229-230

[3] 中国科学院华南植物研究所.海南植物志[M]:第 1 卷.北京:科学出版社,1964:385-394

[4] 巩忠福,杨国林,严作廷,谢家声.蓼属植物的化学成分与药理学活性研究进展[J].中草药,2002,33(1):82-84

[5] 任光友,常凤岗.石莽草的药理研究[J].中国中药杂志,1995,20(2):107-109

[6] 何文胜.紫外分光光度法测定脑灵胶囊中银杏黄酮的含量[J].海峡药学,2002,14(2):37-38

[7] 毛丽珍,徐世芳.蜂胶口服液中黄酮类化合物的测定[J].中草药,1998,29(4):231-232

[8] 缪珊,施新猷.辣蓼的抑菌抗炎实验研究[J].中国新医药,2004,3(2):29-31