

大黄中蒽醌衍生物的薄层色谱—胶束荧光法测定

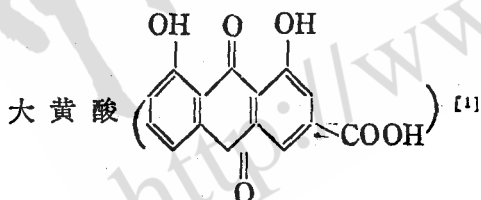
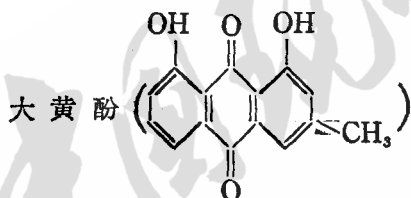
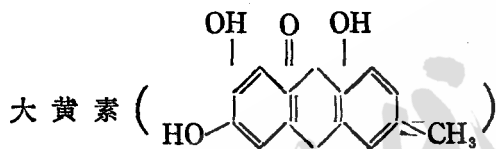
汪宝琪 庞志功 李生有

(西安医科大学药物研究所, 西安 710061)

摘要 对大黄中主要蒽醌物质大黄素、大黄酚、大黄酸的胶束荧光法测定进行了研究。

关键词 蒽醌 环糊精 荧光法 含量测定

大黄为常用的泻热通肠中药, 含蒽醌类化合物, 主要成分有:



对大黄的测定除比色法外, 尚有用极谱法、容量法、光密度法等。对大黄中蒽醌类物质采用纸层析进行分离已有报道^[2], 本文采用薄层层析— β -CD 单分子胶束荧光法进行测定。

β -环糊精 (β -cyclodextrin) 简称 β -CD, 它是由 7 个葡萄糖分子以甙键连接而成的低聚糖化合物, 具有中空略呈锥形的园环结构, 在空腔外部及空腔两端开口处属于亲水区,

在空腔内属疏水区, 这种特殊结构就形成了一个单分子胶束, 当外界客体分子 (Guest or enclosed molecule) 的直径与主体分子 (Host molecule) β -CD 空洞直径相当时, 就可以嵌入腔内, 由于腔内的疏水区微环境改变就可以达到增液作用^[3]。蒽醌类化合物大黄素、大黄酚、大黄酸均为客体分子, 都可嵌入 β -CD 空腔内形成包合物, 增加在胶束中溶解度, 减少相互碰撞机率, 使荧光量子效率提高而有利于荧光强度的增加。

1 实验部分

1.1 蒽醌类化合物的提取和薄层分离

1.1.1 提取 称恒重的大黄样品 2.000 g 置沙氏提取器中以氯仿提取至无色为止。蒸去氯仿, 得游离态蒽醌衍生物 A。

游离态蒽醌衍生物提出后的大黄残渣, 用 20% 硫酸和氯仿混合物 (1:4) 在水浴上回流 4~8 h, 以水解和提取甙类结合状态蒽醌衍生物, 分出氯仿层, 重复水解及提取若干次, 直至无色为止, 合并各次分出的氯仿层, 并用水洗氯仿提取液以除去硫酸, 蒸去氯仿, 得甙类结合状态蒽醌衍生物 B。

甙类结合状态蒽醌衍生物提出后的大黄残渣, 先用浓氢氧化钾溶液中和其中残余的酸, 再加入过量 5% 氢氧化钾溶液呈明显碱

性，煮沸15 min，此时溶液呈红色。将液体分出后，再用5%氢氧化钾溶液提取1~2次，合并提取液，加入盐酸至呈酸性，有黄色沉淀产生。过滤，用水洗涤沉淀，干后得树脂类结合状态蒽醌衍生物C。

将A、B、C分别溶于乙醇中，并用乙醇稀释至50 ml量瓶中待分离。

1.1.2 薄层分离 用微量注射器分别移取40 μ l A、B、C样品，在硅胶GF254薄板上点样，并用大黄素、大黄酚、大黄酸对照品点样对

照，以石油醚：二甲苯：甲苯：甲醇(4:1:1:2)为展开剂分离大黄素、大黄酚，用甲苯：丙酮：水(2:1.5:1)(下层)作大黄酸的展开剂，分别在层析缸中上行展开，待溶液前沿达20 cm时，于254 nm紫外灯下观察荧光斑点，见图1、2。分别刮取与大黄素、大黄酚、大黄酸对照品 R_f 值相当的各个斑点，分别置小试管中浸泡2 h后，于垂熔漏斗中用95%乙醇溶液洗涤3~4次，过滤定容至10 ml量瓶中待测。

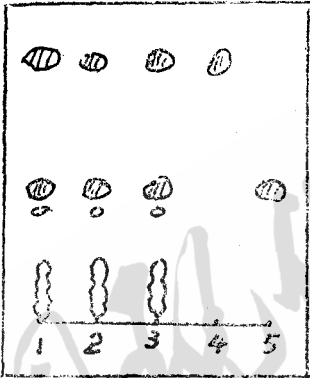


图1 大黄素薄层层析图谱

1. 样品A 2. 样品B
3. 样品C 4. 大黄酚标准品
5. 大黄素标准品

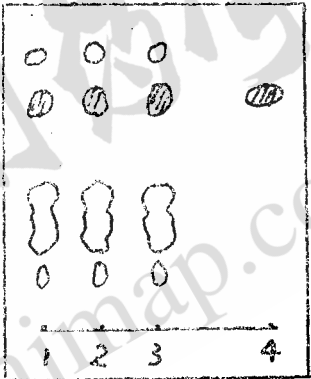


图2 大黄酸薄层层析图谱

1. 样品A 2. 样品B
3. 样品C 4. 大黄酸标准品

1.2 测定

1.2.1 测定方法：在930型荧光光度计上，于 λ_{ex} 为360 nm， λ_{em} 为470 nm的实验条

件下，测定荧光强度，依荧光强度对浓度绘制工作曲线，求取样品含量。

1.2.2 测定结果：测定结果见表1。

表1 测定结果

样品 编号	大黄素含量(%)				大黄酚含量(%)				大黄酸含量(%)			
	A	B	C	总量	A	B	C	总量	A	B	C	总量
1	0.46	0.52	0.19	1.17	0.29	0.45	0.050	0.79	0.37	0.48	0.11	0.96
2	0.45	0.53	0.19	1.17	0.29	0.46	0.049	0.80	0.37	0.48	0.12	0.97
3	0.46	0.52	0.18	1.16	0.28	0.46	0.047	0.787	0.37	0.47	0.12	0.96
4	0.45	0.52	0.20	1.17	0.29	0.45	0.048	0.788	0.36	0.48	0.11	0.95
5	0.46	0.52	0.19	1.17	0.29	0.46	0.049	0.79	0.37	0.49	0.12	0.96
CV%	1.27	0.96	4.29	0.43	2.07	1.32	3.12	1.25	1.36	1.05	5.20	0.83

2 讨论

2.1 激发波长与发射波长的选择 经 $R_F=540$ 荧光分光光度计扫描, 大黄素、大黄酚、大黄酸的激发波长(λ_{ex})为 360nm, 发射波长(λ_{em})为 470 nm, 加入 β -CD 后激发和发射波长无红移、紫移现象(见图 3)。

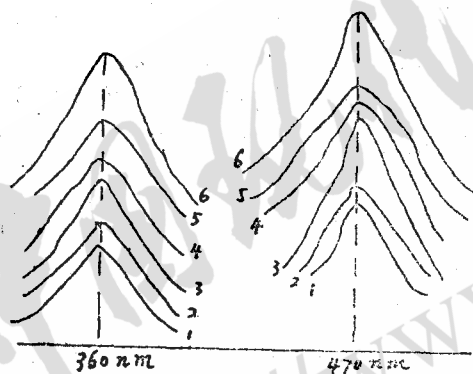


图 3 激发波长与发射波长

1. 大黄素 2. 大黄酚 3. 大黄酸 4. β -CD 大黄素 5. β -CD 大黄酚 6. β -CD 大黄酸

2.2 实验条件的选择 经实验本文选用 尿素增溶的 5% β -CD 工作液 2.5 ml 为最佳用

量; 选用振荡 15 min 为包含物最佳形成时间; 选用待测物自身溶液为酸度介质条件, 在室温下进行实验。经对 2×10^{-8} g/ml 大黄素对照品溶液连续进行 11 次测定, 其变异系数为 0.96%, 检测下限为 5.6×10^{-10} g/ml。采用标准加入法分别求得回收率: 大黄素为 94.5%、大黄酚为 96.15%、大黄酸为 92.45%。

2.3 线性范围的考察 本文分别对 10^{-6} g/ml、 10^{-7} g/ml、 10^{-8} g/ml 三个数量级的大黄素、大黄酚、大黄酸标准溶液进行了线性考察实验, 结果表明, 在 $2 \times 10^{-8} \sim 8 \times 10^{-6}$ g/ml 三个数量级内均呈线性关系。

参 考 文 献

- 1 沙世炎等. 中草药有效成分分析法(上册). 北京: 人民卫生出版社, 1985. 21.
- 2 苏学良等, 药学报, 1963, 12(10): 725
- 3 吴秀兰, 西北药学杂志, 1988, 3(4): 29

收稿日期: 1991-10-09