

· 研究简报 ·

大黄提取物中 蒽类化合物含量的双波长薄层扫描测定

浙江中医学院分子医学研究所 谢志慧 付文淑 梁炳圻 洪行球 金明敏

Hyun Kul Lee 等人发现大黄水提取物对 T_A 菌株具有抑菌作用和诱变作用, 但未发现抗诱变作用^[2]。同时又证明了用苯、醇等溶剂所得的大黄提取物只有抑菌作用而无诱变作用^[3]。作者等对该抗诱变有效的大黄水提物的化学成分进行了研究, 以期阐述其生长抑制、诱变和抗诱变的可分性, 并为进一步论证药效与成分的关系提供量的依据。本文报道了化学研究的初步结果。

实验材料

CS-930 双波长色谱扫描仪 日本岛津
1.8-二羟基蒽醌 西德 Marck 公司
硅胶 G (10~40 μ), 青岛海洋化工厂
试剂 均为 AR 级

方法和结果

一、水提物制备及化学定性

生药饮片 25 g, 加蒸馏水适量, 煮沸 30 分钟, 稍冷后倾出上液, 使相当于生药 0.25 g/ml。冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h, 1500 rpm/min 离心 10 分钟, 取上清液供试。

化学成分定性结果见表 1。

表 1

类别	蒽醌类	黄酮类	鞣质	肽类	生物碱	糖类
结果	+	+	+	+	-	+

二、蒽类化合物含量测定^[3]

1. 总蒽类化合物提取——包括氧化、水解。

准确取大黄水提液 10 ml, 浓缩至浸膏状, 然后用甲醇分次提取至甲醇提取液基本无色, 得黄色甲醇液 50 ml。准确取此液 0.3 ml, 挥去溶剂, 加 1.5 ml 水, 0.5 ml 40% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 液, 沸水浴加热 20 分钟, 稍冷后再加 HCl 0.2 ml, 再水浴加热 20 分钟, 并不断振摇, 然后迅速流水冷却, 用 10 ml 乙醚萃取, 密闭振摇 3 分钟。吸取此液 8 ml, 挥去乙醚, 加甲醇 1.2 ml 溶解残渣, 即得大黄甲醇液。相当于生药 10 mg/ml。

2. 薄层展开

标准品 1.8-二羟基蒽醌 甲醇液 0.123 mg/ml。

样品 大黄甲醇液

吸附剂 含 0.5% CMC 的硅胶 G

展开剂 石油醚—己烷—醋酸乙酯—甲酸—水 (1.5: 3: 1.5: 0.1: 0.5)

上层

结果 可见光下有 4 个浅黄色斑点。与文献一致^[5]。

3. 含量测定

(1) 测定条件

样品波长为 425 nm, 参比波长为 600 nm

扫描方式 反射法锯齿形扫描

狭缝 $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$

线性系数 $SX = 3$

灵敏度 $\times 2$

(2) 标准曲线线性范围:

1.8-二羟基蒽醌标准溶液(0.123 mg/ml)

1、2、4、6、8 μl 分别点在薄层板上, 展开后经扫描得面积值, 以面积值对点样量作图, 用最小二乘法线性回归后, 可得一直线, 在0.984 mg 范围内呈线性。

回归方程 $Y = 1.9819X + 0.2148$

相关系数 $r = 0.9964$

(3) 精密度测定:

将标准溶液点在不同的板上, 展开后扫描可得面积值, 结果见表 2。

表 2 精密度测定结果

板	2 μl	2 μl	$\bar{x} \pm SD$	变异系数
1	43320	43890		
2	44437	42505	42892 ± 1207	2.8%
3	41940	41260		

(4) 样品测定

用外标二点法测定。将标准液及大黄甲醇液分别点在同一薄层板上, 用展开剂展开后, 挥去溶剂。80℃烘30分钟, 然后用 CS—930 双波长薄层扫描仪扫描, 并经数据处理, 结果见表 3。

小结和讨论

1. 本文报导了对具有抗基因突变和 DNA 损伤作用的大黄水提物进行的化学研

表 3 样品扫描测定结果

斑	样品中浓度 (ng)				水提液中
点	样品 1	样品 2	样品 3	$\bar{x} \pm SD$	浓度 (mg/ml)
1	165	203	184	184 ± 19.0	1.150 ± 0.119
2	27	30	33	30 ± 3.0	0.188 ± 0.019
3	23	32	23	26 ± 5.2	0.163 ± 0.073
4	52	67	75	65 ± 11.7	0.406 ± 0.073
总量				305 ± 38.9	1.907 ± 0.244

究工作。我们首先选择蒽醌类进行含量测定, 是因为大黄的化学成分以蒽醌类比较有代表性, 而且已有实验证明, 蒽醌类对细菌细胞内核酸和蛋白合成有作用。结合我所实验结果是对基因突变和 DNA 损伤有作用, 因而考虑到是否蒽醌类与抗突变间存在着某些联系? 至于进一步的实验论证, 正有待进行。

2. 由于缺乏相应的标准品, 例如大黄素, 大黄素甲醚, 大黄酚, 芦荟大黄素和大黄酸, 我们权以其母核 1.8-二羟基蒽醌作为标准对照品, 测得的是相对含量。并且由于此对照品 R_f 值与斑点 4 很接近, 不易分开, 所以不能测其回收率。但因为大黄及其制剂的临床和实验室研究相当广泛, 而相应的标准品不易得到, 因而用 1.8-二羟基蒽醌作为标准对照品, 还是有其切实可行的实用意义的。

3. 由于供试样品为水煎剂, 未经分离, 提纯, 影响含量的因素比较多, 使得本实验结果标准偏差较大, 但实验所提供的信息和数据, 对进一步的药理追踪, 量-效关系的探求均有指导意义。