

丹皮酚的提取工艺及荧光性质^①

李玉贤^② 左静静

(河南中医学院药学院 郑州市金水路 1 号 450008)

摘 要 以牡丹皮为原料研究了丹皮酚的提取工艺,并对丹皮酚的荧光光谱性质进行了研究,探讨了酸碱对丹皮酚荧光性质的影响。研究表明,随着丹皮酚浓度的增加荧光强度逐渐减弱;在酸性溶液中荧光强度均随 pH 的降低而减弱,在碱性溶液中荧光强度均随 pH 的升高而减弱,甚至产生荧光猝灭。此外,丹皮酚与人血清白蛋白(HSA)结合,可导致 HSA 荧光猝灭。

关键词 牡丹皮;丹皮酚;荧光光谱

中图分类号:O657.32 文献标识码:A 文章编号:1004-8138(2011)05-2626-05

1 引言

丹皮酚(Paeonol,简称Pae),又称牡丹酚,是从萝藦科植物徐长卿[*Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa]干燥根或全草及毛茛科芍药属植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)、芍药(*P. lactiflora* Pall.)的根皮中提取分离出来的活性成分^[1]。丹皮酚的药理活性广泛:镇痛、解热、解痉、抗过敏、消炎、抑菌、免疫、调节、活血、化淤、抗肿瘤等^[2]。近代药理和临床研究指出:丹皮酚有治疗高血压、改善局部循环、增加肌体非特异性免疫等作用^[3]。丹皮酚对湿疹、瘙痒、皮炎、寻麻疹等多种皮肤病疗效甚佳。因此丹皮酚可用于多种日用化妆品、牙膏、香皂、浴液、生发液、医用消毒纸、妇女、婴儿卫生用品、食品添加剂、保健茶品、饲料添加剂^[4]。有关丹皮酚提取及含量测定的研究很多^[5],本文采用水蒸气蒸馏的方法提取丹皮酚,利用正交试验优化丹皮酚的提取工艺。对丹皮酚在不同 pH 下及它与生物大分子的相互作用的荧光光谱进行研究,为了解丹皮酚的结构及生物活性提供实验依据。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

牡丹皮(购自河南中医学院第一附属医院,中药行,产地安徽,批号 100715);丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 110708-200505);无水乙醇、氢氧化钠、浓硫酸均为分析纯。实验用水为重蒸水。

F-4500 荧光光谱仪(日本日立公司);FA 2004 上皿电子天平(上海精天电子仪器有限公司);SHZ-95B 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);KQ500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-2201 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

① 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2009B150015)

② 联系人,电话:(0371)66686930;手机:(0)13733177676;E-mail:lyx@hactcm.edu.cn 或 lilindian@163.com

作者简介:李玉贤(1963—),女,河南省叶县人,副教授,硕士,主要从事天然植物活性成分提取及结构改造研究工作。

收稿日期:2011-02-14;接受日期:2011-05-25

2.2 丹皮酚的提取

采用盐水浸泡-超声波提取-水蒸气蒸馏法提取丹皮酚。称取牡丹皮饮片 50g, 置于 1000mL 圆底烧瓶中, 用氯化钠溶液浸泡 2h, 浸泡水浴温度 40℃, 超声功率 400W, 收集蒸馏液 500mL。

分别以超声提取温度(℃)、超声提取时间(min)、氯化钠溶液浓度(%)、氯化钠溶液用量(mL)作为考查因素, 以丹皮酚提取量为评价指标, 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行实验。因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	超声提取温度(℃)	超声提取时间(min)	氯化钠溶液浓度(%)	氯化钠溶液用量(mL)
	(A)	(B)	(C)	(D)
1	30	15	3	400
2	40	20	5	500
3	50	30	8	300

2.3 丹皮酚的含量测定

2.3.1 对照品溶液制备

准确称取丹皮酚对照品 0.0153g, 溶于少量无水乙醇, 转入 50mL 容量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀静置, 即得 $0.306\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 校准曲线的绘制

准确吸取对照品溶液 1、2、3、4、5、6、7、8、9mL, 分别置于 50mL 容量瓶内, 迅速加重蒸水定容, 摇匀, 另以重蒸水作空白对照, 在 274.4nm 处测定吸光度, 得回归方程 $A = 80.3397C - 0.0068$, $r = 0.9996$ 。

2.3.3 样品中丹皮酚含量测定

准确称取 5 份牡丹皮样品 0.15g, 各加无水乙醇 25mL, 浸泡 20min 后过滤, 取 1mL 滤液用重蒸水定容至 50mL, 在校准曲线项下测定其浓度, 计算牡丹皮样品中丹皮酚的平均含量为 2.25%, RSD 为 1.67%。

2.3.4 丹皮酚粗品含量测定

准确称取丹皮酚粗品约 0.0150g, 溶于少量无水乙醇, 转入 50mL 容量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 得粗样品溶液。准确吸取该粗样品溶液 5mL 置于 50mL 容量瓶内, 迅速加重蒸水至刻度, 摇匀, 另以重蒸水作空白对照, 在 274.4nm 处测定吸光度, 并计算提取量及提取率。

2.4 丹皮酚的荧光测定

2.4.1 丹皮酚在乙醇-水溶剂中的荧光光谱测定

在一系列 10mL 容量瓶中分别加入 1、2、3……10mL 的 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚乙醇液, 再用重蒸水稀释至刻度, 从而在 F-4500 荧光分光光度计上测得不同浓度的丹皮酚溶液的荧光光谱。

2.4.2 丹皮酚在不同 pH 下的荧光光谱测定

在一系列 10mL 的容量瓶中分别加入不同体积的 $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液和不同体积的 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液, 配制不同 pH 值的溶液, 然后分别加入 1mL $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚乙醇溶液, 再用重蒸水定容, 摇匀, 测量 pH 值, 在日立 F-4500 荧光分光光度计上测定丹皮酚的荧光光谱。

2.4.3 丹皮酚-血清液的荧光光谱测定

在一系列 10mL 容量瓶中分别加入 1、2、3、4、5、6、7、8、9mL 的 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚乙醇液, 再分别加入 1mL 的 1% 的血清溶液, 再用重蒸水定容, 在 F-4500 荧光分光光度计上测得丹皮酚

-血清液的荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 丹皮酚提取结果

按实验部分 2.2 项下安排实验, 按实验部分 2.3.4 项下测定丹皮酚粗品含量并计算提取量和提取率, 结果见表 2。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	丹皮酚提取量(g)	提取率(%)
1	1	1	1	1	0.8479	75.37
2	1	2	2	2	0.8900	79.11
3	1	3	3	3	0.8891	79.03
4	2	1	2	3	0.8187	72.77
5	2	2	3	1	0.8932	79.40
6	2	3	1	2	0.9139	81.24
7	3	1	3	2	0.9087	80.77
8	3	2	1	3	0.9640	85.69
9	3	3	2	1	0.9377	83.35
I i	233.51	228.91	242.30	238.12		
II i	233.41	244.20	235.23	241.12		
III i	249.81	243.62	239.20	237.49		
$\overline{I_i}$	77.84	76.30	80.77	79.37		
$\overline{II_i}$	77.80	81.40	78.41	80.37		
$\overline{III_i}$	83.27	81.21	79.73	79.16		
R	5.47	5.10	2.36	1.21		

由表 1 中的极差分析可知, 影响盐水浸泡-超声波提取-水蒸气蒸馏法提取结果的因素顺序是: 超声提取温度(A)> 超声提取时间(B)> 氯化钠溶液浓度(C)> 氯化钠溶液用量(D)。丹皮酚的最佳工艺提取条件: 超声提取温度 50℃, 超声提取时间 20min, 氯化钠溶液浓度 3%, 氯化钠溶液用量 500mL。

3.2 丹皮酚浓度对其荧光光谱的影响

研究了丹皮酚在乙醇-水溶剂中的荧光光谱, 所得结果见图 1。

由图 1 可以看出, 随着浓度的增加, 丹皮酚的荧光强度逐渐降低, 当浓度较高时, 475nm 左右的峰基本上消失, 这是由于在浓度较高的溶液中, 溶质与溶剂之间可能发生相互作用, 形成氢键或聚合成二聚体或多聚体, 从而导致荧光强度降低甚至猝灭, 随着浓度的降低, 氢键消失或聚合物逐渐离散成单分子体, 由此导致猝灭的机会减少, 荧光强度也就相应增加。

3.3 pH 值对丹皮酚荧光光谱的影响

3.3.1 近中性条件下 丹皮酚的荧光光谱测定

研究了丹皮酚在近中性条件下的荧光光谱, 所得结果见图 2。

由图 2 可知, 发射光谱随 pH 值的改变并无明显变化。当 pH 值较高时(光谱曲线 2), 最大发射波长在 363nm 处, 随 pH 值降低, 最大发射波长逐步蓝移至 351nm, 荧光强度基本不变。

3.3.2 酸性条件下 丹皮酚的荧光光谱测定

丹皮酚的荧光性能与其质子化作用和共轭程度有关, 图 3 为丹皮酚在酸性的溶液中的荧光光

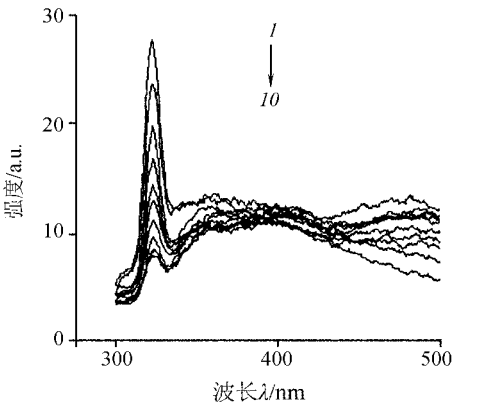


图 1 不同浓度丹皮酚溶液的荧光光谱
1→10 曲线中丹皮酚的浓度($\times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$):
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

谱。

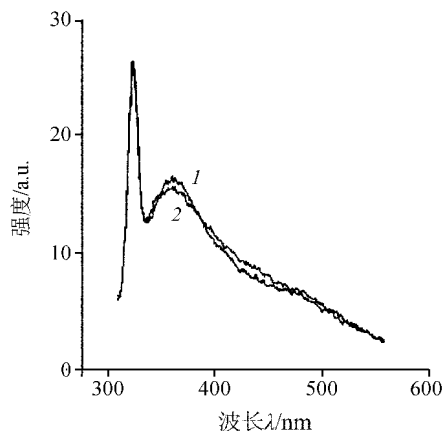


图 2 近中性条件下丹皮酚的
荧光发射光谱

丹皮酚浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

1—pH= 7.1; 2—pH= 7.5。

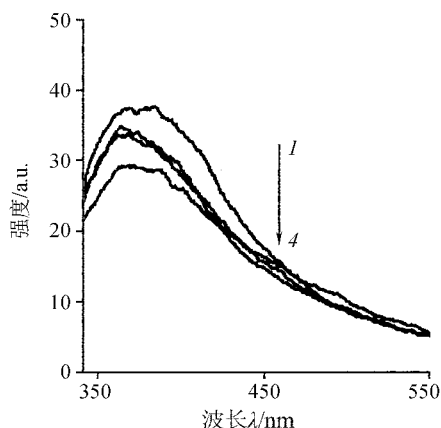


图 3 酸性条件下丹皮酚的荧光光谱

丹皮酚浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

曲线 1—4: pH= 6.11, 4.25, 2.95, 1.02。

由图 3 可以看出, 在 pH= 1.02—6.11 的酸性条件下, 随 pH 值的降低, 荧光强度逐渐降低, 且最大发射波长蓝移, 表明丹皮酚 A 可能结合质子, 即丹皮酚 A 转化为 AH^+ 。对于质子的结合位点, 应该在羰基氧上, 使分子的共轭程度减小从而影响丹皮酚的荧光性质, 因为 π 电子共轭程度越大, 荧光强度越大, 而荧光波长长移(红移)。

3.3.3 碱性条件下丹皮酚的荧光光谱测定

在 pH= 8—12 的碱性条件下, 研究了丹皮酚的荧光光谱, 所得结果见图 4。

由图 4 可以看出, 最大发射波长为 365nm。随 pH 的升高, 荧光强度逐渐降低至荧光基本消失, 且峰形变化较大, 这表明丹皮酚失去羟基上的质子, 转化为荧光强度低的负离子, 即丹皮酚 A 转化为 A^- 。

3.3.4 弱碱性条件下丹皮酚的荧光光谱测定

由于在 pH= 9—10 的溶液中, 丹皮酚的荧光光谱变化较大, 故在 9—10 之间又配了 5 份样品溶液, 所得结果见图 5。

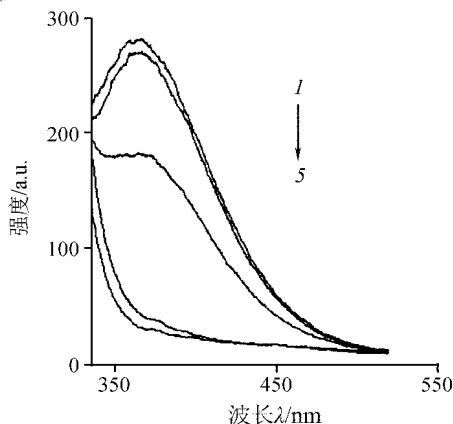


图 4 碱性条件下丹皮酚的荧光光谱

浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

曲线 1—5: pH= 8, 9, 10, 11, 12。

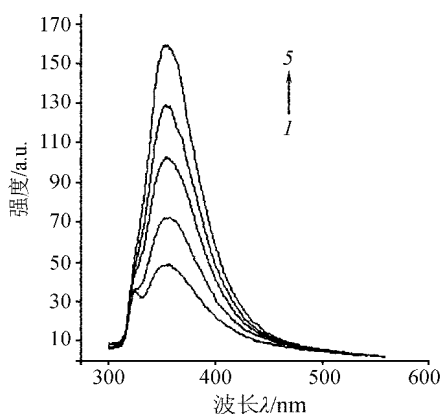


图 5 在 pH 9—10 间丹皮酚的
荧光发射光谱

浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

曲线 1—5: pH= 9.81, 9.63, 9.43, 9.25, 9.12。

由图 5 可知, 荧光发射光谱图的形状变化与其他 pH 值的荧光发射光谱图相比, 变化较大, 而且随着其 pH 值的增大, 荧光强度变弱, 发射波长在 320nm 处形成等荧光点。其原因可能是丹皮酚具有酚羟基, 而显弱酸性, 再碱反应, 而这种光谱特征表明丹皮酚的存在形式在 pH9—10 间, 发生了质子离解作用, 两种不同的存在形式有不同的荧光性质。

3.4 丹皮酚与 HSA 结合的荧光特性

研究了丹皮酚-HSA 的荧光光谱, 所得结果见图 6。

由图 6 可知, 丹皮酚浓度对血清荧光强度有明显的影响, 但红移或蓝移的现象不明显, 随着丹皮酚浓度的增大荧光强度从 413 降低到 264, 说明随着丹皮酚浓度的增大, 其发生了荧光猝灭现象, 从而表明丹皮酚影响 HSA 的荧光性质。

4 结论

正交试验结果表明, 影响丹皮酚提取量的主要因素是超声提取温度和超声提取时间。最佳提取工艺是超声提取温度 50℃, 超声提取时间 20min, 氯化钠溶液浓度为 3%, 氯化钠溶液用量为 500mL。

丹皮酚溶于适当溶剂中, 浓度不同时形成二聚体或多聚体, 影响其荧光强度; 丹皮酚分子中含有羰基和羟基, 当其所处溶液的酸碱度不同时, 丹皮酚分子会获取或释放 H 离子, 从而改变其质子化状态。质子化状态的不同会影响分子结构的共轭范围, 进而对其荧光光谱行为产生影响, 在较高酸度的硫酸溶液中, 丹皮酚主要以质子化程度较高, 分子共轭程度较低的结构存在, 在较高碱度的氢氧化钠溶液中, 丹皮酚以离子形式存在, 故而荧光强度较低甚至猝灭。不同浓度的丹皮酚溶液对血清荧光强度有明显的影响, 导致 HSA 荧光被猝灭, 对于猝灭的机制及其二者的结合位点本文未作进一步的探讨。

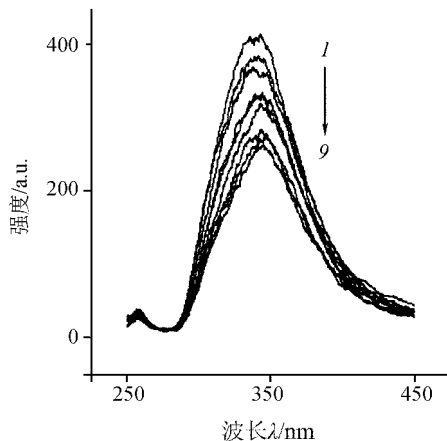


图 6 不同浓度下丹皮酚的血清荧光发射光谱
丹皮酚浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 曲线 1—9:
丹皮酚体积 $V(\text{mL})$: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9。

参考文献

- [1] 胡春弟, 张杰. 丹皮酚的药理作用及合成研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 17—18.
- [2] 孙国平, 沈玉先, 张玲玲等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 160—162.
- [3] 郭齐, 李贻奎, 王志国等. 丹皮酚药理研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 20—22.
- [4] 雷学军. 丹皮酚的提取及其在化妆品中的应用[J]. 香料香精化妆品, 1996, 24(4): 20—22.
- [5] 叶青, 郑大贵. 微波辅助萃取水蒸气蒸馏技术在中药有效成分分析中的应用研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 1077—1080.

Extraction Process and Fluorescence Properties of Paeonol

LI Yu-Xian ZUO Jing-Jing

(Department of Pharmaceutical, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, P. R. China)

Abstract The extraction process of paeonol was investigated with cortex moutan as material raw, and the fluorescence properties of paeonol were studied, and the effect of acid-base on fluorescence properties of paeonol was discussed. The fluorescence intensity was lower along with increase of paeonol concentration, and that also decreased with increase of pH value in acid solution, while the in the alkaline solution fluorescence intensity decreased even fluorescence quenching with increasing of pH values. In addition, fluorescence quenching of HSA occurred in order to paeonol combined with human serum albumin (HSA).

Key words Cortex moutan; Paeonol Fluorescence Spectrum