

中药白芨水浸液的荧光光谱研究

史训立, 魏永巨*, 张英华, 王亚敏, 刘翠格

河北师范大学化学与材料科学学院, 河北 石家庄 050016

摘要 报道了白芨沸水浸取液的三维荧光光谱和紫外吸收光谱。在三维荧光光谱图中出现3个荧光峰, 分别位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 227/299 \text{ nm}$, $271/299 \text{ nm}$ 和 $258/389 \text{ nm}$ 。其中前2个荧光峰具有相同的发射波长, 是由同一种荧光组分产生的, 后1个荧光峰是由另外一种荧光组分产生的。三维荧光光谱具有特征性, 可以用于白芨的定性鉴别。两种荧光组分的发射波长相距90 nm, 可以不经分离而分别测量。在稀溶液条件下, 两种组分的荧光强度与浓度之间都存在良好的线性关系, 据此可以对两种组分进行定量分析。在pH 1.5~12.5范围内改变溶液的pH值时, 两种组分的荧光强度有明显改变, 表明两种组分的分子结构中存在可以离解的质子。

关键词 白芨; 三维荧光光谱; 中药指纹图谱

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2007)04-0769-04

引言

中药白芨系兰科植物白芨(*Bletilla striata* (Thunb) Reichb. f.)的干燥块茎, 具有收敛止血, 清热利湿, 消肿生肌之功效, 是一种常用的中药^[1]。关于白芨化学成分的研究, 国内外已有一些报道^[1-7], 已经分离出芪类、联苕类、菲类、联菲类、联菲醚类、菲并吡喃类、联苕糖苷类、菲并螺甾内酯类、甾体、三萜、花色素苷类以及大黄素甲醚、丁香树脂酚和咖啡酸等几十种化合物。在白芨真伪鉴别及质量评价方面, 所采用的方法主要是形状比较、显微鉴别、紫外光谱和薄层色谱等^[8, 9], 未见有荧光光谱的研究报道。我们在实验中观测到白芨沸水浸取液具有良好的荧光性质, 可以用于白芨的定性鉴别和荧光成分的定量分析, 本文对此进行了初步研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光分光光度计 (Hitachi); UV-2501PC 分光光度计 (Shimadzu); 868 型 pH/ISE 测试仪 (Orion)。

中药白芨(*Bletilla striata*)购自石家庄神威大药房, 粉碎后准确称取0.1000 g, 置于小烧杯中, 加入20 mL 蒸馏水, 加热煮沸10 min, 冷却, 过滤, 滤液移至100 mL 容量瓶中,

以水稀释至刻度, 摇匀, 得到每 mL 相当于1.00 mg 药材的水浸液(浓度表示为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 用时适当稀释。Britton-Robinson pH 缓冲溶液, 二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在一系列10 mL 容量瓶中分别加入白芨水浸液, pH 缓冲溶液, 定容至刻度, 摇匀, 扫描荧光光谱和紫外光谱, 再测量溶液的pH值。

2 结果与讨论

2.1 白芨水浸液的三维荧光光谱

白芨水浸液的三维荧光等高线光谱如图1所示。图中纵坐标为激发波长 λ_{ex} , 横坐标为发射波长 λ_{em} , 等高线表示荧光强度。图中有3个荧光峰, 分别位于 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 227/299 \text{ nm}$, $271/299 \text{ nm}$ 和 $258/389 \text{ nm}$ 。其中前两个峰的荧光激发波长不同, 发射波长均为299 nm, 根据荧光光谱的一般规律, 可以推知前两个峰是由一种荧光组分(设为组分A)产生的, 后1个峰则是另外一种荧光组分(设为组分B)产生的。三维荧光光谱是一种形象的指纹图谱, 其中包含物质组成和含量的信息, 具有特征性, 可以用于白芨的定性鉴别。组分A和组分B的荧光发射波长相距90 nm, 基本上相互不干扰, 可以不经分离而分别测量。此外, 由于组分A的斯托克斯位移 $\Delta\lambda_{\text{A}} = 28 \text{ nm}$, 而组分B的斯托克斯位移 $\Delta\lambda_{\text{B}} = 131 \text{ nm}$, 利用同步荧光法也易于分别测量两种组分。

收稿日期: 2005-12-12, 修订日期: 2006-03-28

基金项目: 河北省自然科学基金项目(B2005000149)和河北师范大学科研基金项目(L2004204)资助

作者简介: 史训立, 1979年生, 河北师范大学化学与材料科学学院硕士研究生

*通讯联系人

e-mail: weiyju@heinfo.net

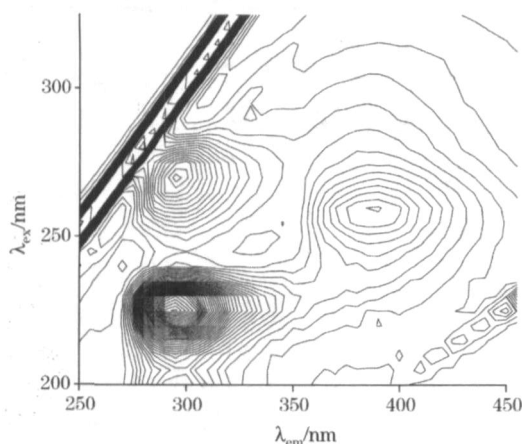


Fig 1 Three dimension fluorescence spectrum of *Bletilla striata* aqueous extraction
CBS = 0.07 mg · mL⁻¹; Slit: 5.0/5.0 nm

2.2 白芨水浸液的紫外吸收光谱

图 2 是白芨水浸液的紫外吸收光谱。在 222 和 275 nm 处有两个吸收峰，与图 1 中组分 A 的激发峰位置基本一致。组分 B 的吸收峰在图 2 中看不出来，可能是因为组分 B 与组分 A 的吸收光谱重叠，且组分 B 的浓度较小。对比图 1 和图 2 可以看出，对于白芨荧光成分分析而言，荧光分析法比紫外吸光光度法的分辨率好、灵敏度高。

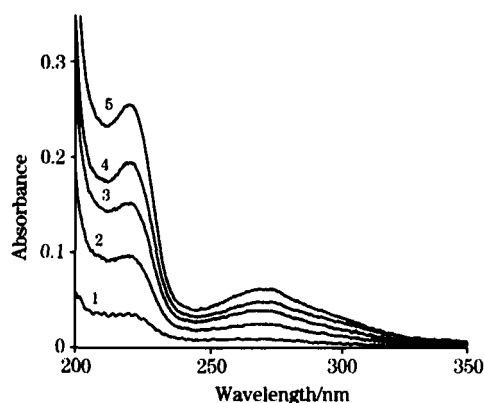


Fig 2 Ultraviolet absorption spectra of *Bletilla striata* aqueous extraction at different concentrations
CBS / mg · mL⁻¹ —1: 0.01; 2: 0.03; 3: 0.05; 4: 0.07; 5: 0.09

2.3 荧光组分的二维荧光光谱

由图 1 可知，通过选择合适的测量波长可以分别绘制组分 A 和组分 B 的二维荧光光谱。图 3 为组分 A 的二维荧光光谱。由图 3 可见，在发射波长为 299 nm 时，可产生 2 个荧光激发峰，分别位于 227 和 271 nm，与图 1 一致。虽然 227 nm 的荧光激发峰较强，但在浓度较大时，由于受组分 A 自身吸光性质的影响（见图 2），荧光自猝灭现象较为严重。因此，在定量分析时，宜选用 271 nm 为激发波长。

图 4 为组分 B 的二维荧光光谱。由图 4 可见，在发射波长为 389 nm 时，组分 B 只产生 1 个荧光激发峰，位于 258 nm。在定量分析时，可选用 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 258/389$ nm 为组分 B

的测量波长。

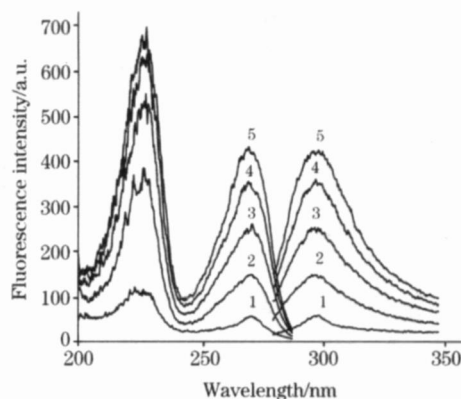


Fig 3 Fluorescence spectra of component A of *Bletilla striata* aqueous extraction at different concentrations
 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 271/299 nm; Slit: 5.0/5.0 nm
CBS / mg · mL⁻¹ —1: 0.01; 2: 0.05; 3: 0.10; 4: 0.15; 5: 0.20

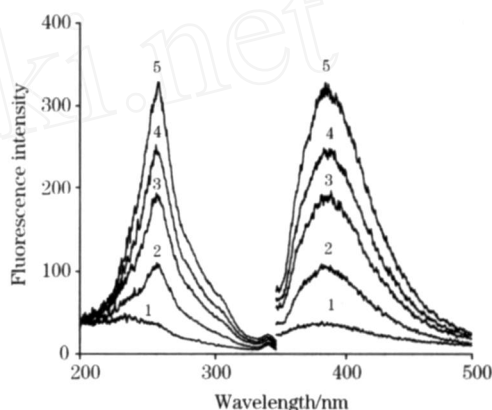


Fig 4 Fluorescence spectra of component B of *Bletilla striata* aqueous extraction at different concentrations
 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 258/389 nm; Slit: 5.0/5.0 nm
CBS / mg · mL⁻¹ —1: 0.01; 2: 0.05; 3: 0.10; 4: 0.15; 5: 0.20

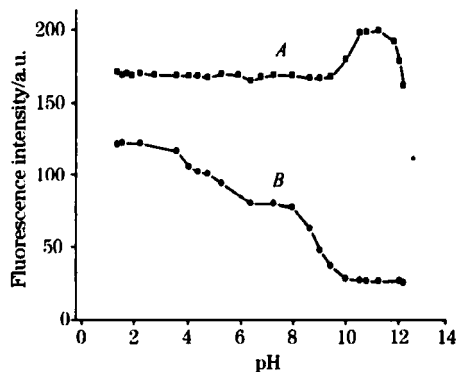


Fig 5 Influence of acidity on fluorescence intensity of two components of *Bletilla striata* aqueous extraction
CBS: 0.07 mg · mL⁻¹; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$:

A: 271/299 nm; B: 258/389 nm; Slit: 5.0/5.0 nm

2.4 溶液酸度对荧光光谱和荧光强度的影响

试验发现，对于组分 A，在 pH 1.5 ~ 12.5 范围内改变溶液的 pH 值，荧光光谱的形状变化不大，但荧光强度有所

变化。在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 271/299 \text{ nm}$ 波长下, 荧光强度随 pH 的变化如图 5 中曲线 A 所示。参照某些有机分子光谱性质与质子化作用的关系^[10-12], 推测组分 A 有三种质子化程度不同的荧光型体, 存在于 pH 11.5 左右的型体是强荧光型体, 在 pH 9.5 ~ 12.5 之间有两个质子离解。对于组分 B, 在 pH 1.5 ~ 12.5 范围内改变溶液的 pH 值, 最大激发和发射波长也基本上不变, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 大致保持在 258/389 nm, 荧光强度随 pH 的变化如图 5 中曲线 B 所示。可以推断组分 B 随着酸度变化也有三种荧光型体, 其中在酸性条件下存在的型体是强荧光型体, 随质子逐步离解, 荧光强度降低。两种组分在不同 pH 条件下的质子离解包含有分子结构的信息, 深入探讨光谱性质、质子化作用与分子结构的关系, 可以为确定两种荧光组分的分子结构提供依据。

对于有机荧光分子而言, 当 pH 值改变导致荧光分子质子离解而形成两种不同的荧光型体时, 常常发生荧光激发波长或发射波长的位移^[10-12]。但本文中两种荧光组分的质子离解基本上没有造成荧光激发或发射波长的位移, 仅仅是荧光强度的变化, 这是一个值得注意的光谱现象, 其结构方面的原因有待进一步思考。

由图 5 可见, 对两种组分进行定量分析时, 应当在 pH 11.5 条件下测定组分 A, 此时组分 B 不干扰; 测定组分 B 则应在 pH 2 左右进行, 此条件下测量灵敏度较高, 选择 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 258/389 \text{ nm}$ 为测量波长, 组分 A 基本上不干扰。

2.5 荧光强度与溶液浓度的关系

实验表明, 在不经分离的情况下, 白芨水浸液中两种组分的荧光强度与浓度之间都存在良好的线性关系。组分 A 在

0.01 ~ 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度 (如前所述, 这里浓度的含义是每毫升溶液相当于白芨的毫克数) 范围内, 由 11 个实验点的荧光强度 F 与浓度 c 数据所得回归方程为 $F = 40 + 2110c$, 相关系数 $r = 0.999$ 。组分 B 在 0.01 ~ 0.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 由 9 个实验点的数据所得回归方程为 $F = 19 + 1714c$, 相关系数 $r = 0.998$ 。

荧光强度与浓度之间的线性关系为两组分的定量分析提供了实验基础。但荧光分析法是相对分析, 要测定白芨中两组分的含量, 需要两种组分的标准溶液作为对照, 这就需要知道两种组分究竟是何种物质, 并且获得两种物质的纯品, 有关研究有待深入进行。

3 结 论

中药白芨的化学成分复杂, 但白芨水浸液荧光光谱图中只出现两种组分的荧光峰, 其中一种组分的荧光激发波长为 227 和 271 nm, 发射波长为 299 nm, 另一种组分的荧光激发和发射波长分别为 258 和 389 nm。两种组分的荧光发射峰相距 90 nm, 可以不经分离而分别测量。与紫外吸收光谱相比, 三维荧光光谱的分辨率好、灵敏度高, 可以用于白芨的定性鉴别。选择合适的测量波长, 可以分别绘制两种组分的二维荧光光谱。当溶液酸度在 pH 1.5 ~ 12.5 范围内改变时, 两种组分的荧光强度发生变化, 表明分子结构中包含可离解的质子。在实验条件一定时, 两种组分荧光强度都与浓度呈良好的线性关系, 可以作为两种组分定量分析的基础。

参 考 文 献

- [1] LUO Xin-gen, LIU Wen-yong, ZHANG Wei-dong, et al (罗新根, 刘文庸, 张卫东, 等). The Journal of Pharmaceutical Practice (药学实践杂志), 1999, 17(6): 359.
- [2] Shuzo T, Masae Y, Keiko I. Phytochemistry, 1983, 22(4): 1011.
- [3] Masae Y, Li B, Keiko I, et al. Phytochemistry, 1990, 29(7): 2285.
- [4] HAN Guang-xuan, WANG Li-xin, GU Zheng-bing, et al (韩广轩, 王立新, 顾正兵, 等). Acta Pharmaceutica Sinica (药学学报), 2002, 37(3): 194.
- [5] WANG Li-xin, HAN Guang-xuan, SHU Ying, et al (王立新, 韩广轩, 舒莹, 等). China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2001, 26(10): 690.
- [6] HAN Guang-xuan, WANG Li-xin, WANG Mai-li, et al (韩广轩, 王立新, 王麦莉, 等). The Journal of Pharmaceutical Practice (药学实践杂志), 2001, 19(6): 360.
- [7] HAN Guang-xuan, WANG Li-xin, ZHANG Wei-dong, et al (韩广轩, 王立新, 张卫东, 等). Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ. (第二军医大学学报), 2002, 23(9): 1029.
- [8] XU Mu-gen, ZHU Shan-yin (徐木根, 朱山寅). China Pharmaceuticals (中国药业), 2013, 12(7): 60.
- [9] LI Ji, ZHANG Li-xin, ZHOU Shi-yu (李 及, 张立新, 周世玉). Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学学报), 2005, 28(2): 57.
- [10] WEI Yong-ju, LI Na, QIN Sheng-jun (魏永巨, 李 娜, 秦身钧). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2004, 24(6): 647.
- [11] LIU Cui-ge, XU Yi-Zhuang, WEI Yong-ju, et al (刘翠格, 徐怡庄, 魏永巨, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(4): 584.
- [12] LIU Cui-ge, XU Yi-Zhuang, WEI Yong-ju, et al (刘翠格, 徐怡庄, 魏永巨, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(9): 1446.

Fluorescence Spectra of *Bletilla Striata* Aqueous Extraction

SHI Xun-li, WEI Yong-ju^{*}, ZHANG Ying-hua, WANG Ya-min, LIU Cui-ge

College of Chemistry and Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract Three-dimensional fluorescence spectrum and ultraviolet absorption spectrum of *Bletilla striata* extraction drawn by boiling water were reported. Three fluorescence peaks, located at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 227/299 \text{ nm}$, $271/299 \text{ nm}$ and $258/389 \text{ nm}$ respectively, were observed in the three-dimensional fluorescence spectrum. Among them, the two former peaks having the same emission wavelengths were produced by one fluorescent component, while the latter peak was produced by another. Three-dimensional fluorescence spectrum is a characteristic mark of *Bletilla striata*, therefore it can be used in qualitative identification. The distance between emission wavelengths of the two components was 90 nm, so the fluorescence intensity of two components could be measured separately without pre-separation. For dilute solutions of *Bletilla striata* aqueous extraction, good linear relationships between fluorescence intensity and concentration of two components were obtained, thereby the quantitative determination of the two components may be carried out. In the range of pH 1.5 to pH 12.5, the fluorescence intensity of the two components changes with the increase in pH, indicating dissociable protons exist in the molecular structure of the two components.

Keywords *Bletilla striata*; Three-dimensional fluorescence spectrum; Fingerprint of traditional Chinese medicine

(Received Dec. 12, 2005; accepted Mar. 28, 2006)

* Corresponding author