

二阶导数同步荧光光谱法同时直接测定厚朴酚及和厚朴酚

杨军¹ 余德顺^{*1,2} 刘绍璞² 田弋夫¹ 莫彬彬¹

¹(中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

²(西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要 研究了厚朴酚与和厚朴酚及其混合溶液的二阶导数同步荧光光谱, 结果两者的二阶导数同步荧光光谱得到完全分离, 消除了彼此间的干扰, 据此建立了一种二阶导数同步荧光光谱法同时直接测定混合物中厚朴酚与和厚朴酚的新方法。厚朴酚与和厚朴酚的线性范围分别为 2.8 ~ 500.0 $\mu\text{g/L}$ 和 4.3 ~ 560.0 $\mu\text{g/L}$; 检出限分别为 0.84 和 1.30 $\mu\text{g/L}$, 回收率分别为 94.65% ~ 105.58% 和 95.09% ~ 104.51%; 相对标准偏差均低于 4.08%。本方法用于同时直接测定厚朴药材及其提取物中厚朴酚与和厚朴酚含量, 结果令人满意。

关键词 二阶导数同步荧光光谱, 厚朴酚, 和厚朴酚, 厚朴

1 引言

厚朴酚(magnolol, MOL)与和厚朴酚(honokiol, HOL)为同分异构体属联苯酚类化合物, 有较强的荧光, 具有抗肿瘤、抗菌、镇痛等多种药理活性, 是我国常用传统中药厚朴(*Magnolia officinalis*)的有效成分和质量控制指标。目前全国采用厚朴配方的中西成药及日化产品多达 300 余种^[1,2]。厚朴酚与和厚朴酚的检测方法有高效液相色谱法(HPLC)^[3]、荧光光度法^[4-6]、同步荧光法^[7]和紫外光度法^[8]。HPLC 法两者分离度好, 可同时直接测定, 但操作繁琐、耗时长、成本较高; 而采用荧光光谱、同步荧光光谱、紫外吸收光谱时, 原朴酚与和原扑酚的光谱相互重叠不能同时直接测定, 需解联立方程式或用校正算法进行间接测定, 计算复杂, 且样品前处理需加入表面活性剂、缓冲溶液等较为繁杂, 难以普及推广。

同分异构体的测定一直是分析工作中的难点和热点, 用常规光谱分析方法很难达到分别测定的目的。本研究利用二阶导数同步荧光光谱法对厚朴酚与和厚朴酚及其混合溶液进行荧光光谱分析, 有效地分离了相互重叠的荧光峰, 提高了检测的选择性和灵敏度, 据此建立了二阶导数同步荧光光谱法同时直接测定混合物中厚朴酚与和厚朴酚的新方法。与现有光谱法比较, 本方法厚朴酚与和厚朴酚分离度好, 分辨率高, 样品前处理简单, 有机溶剂用量少, 计算容易, 便于普及推广; 与药典 HPLC 法相比, 两种方法测定结果有良好的一致性, 但本法更简单快捷、成本较低。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

F-2500 型荧光分光光度计(日本日立公司), HP1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司)。厚朴酚及和厚朴酚标准品(中国药品生物制品检定所), 厚朴药材(购于贵阳市花果园药材市场)粉碎过 0.30 mm 孔径筛, 厚朴超临界流体萃取物(自制); 甲醇、冰乙酸、乙酸钠为分析纯, 实验用水为去离子水。

2.2 标准品及样品制备

标准品制备:称取一定量的和厚朴酚、厚朴酚标准品用甲醇溶解, 分别配制成 280、250 mg/L 的标准贮备液; 分别取和厚朴酚、厚朴酚标准贮备液 2、4、6、8、10 μL 置于 5 mL 比色管中, 加水定容至刻度, 摇匀, 配制成系列标准工作溶液。样品制备:取厚朴粉 0.2 g 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声提取 40 min, 补足损失溶剂, 摇匀, 过滤, 取滤液 10 μL 按标准工作溶液制备方法处理得到待测样品溶液; 将厚朴萃取物 10 mg 用甲醇溶解定容于 25 mL 容量瓶中, 取定容后的样品液 10 μL 按标准工作溶液制备方法处理得到待测样品溶液。

2008-06-25 收稿; 2008-09-20 接受

本文系国家自然科学基金项目(No. 20475045)、贵州省工业攻关项目(No. 黔科合 GY 字(2007)3059)和中科院地化所领域前沿项目(No. 2006QY015)资助

* E-mail: yudeshun@tom.com

2.3 实验方法

用1 cm 石英荧光池,设置 $\Delta\lambda = 110$ nm,激发、发射通带 10 nm,扫描速度 1500 nm/min,在 240 ~ 350 nm 范围内对样品进行同步荧光光谱扫描,并作二阶导数处理。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱

分别对和厚朴酚、厚朴酚标准工作溶液及其混合溶液进行荧光光谱扫描,测得它们的最大激发波长均为 285 nm;和厚朴酚、厚朴酚最大发射波长分别为 347 和 405 nm,由图 1 可知两者荧光光谱都具有宽带结构,相互重叠彼此干扰,用常规荧光法难以同时直接测定。

3.2 导数同步荧光光谱

应用导数同步荧光法测定组分,最重要的参数是 $\Delta\lambda$ 的选择,它直接影响方法的灵敏度与选择性。每隔 10 nm,分别考察了 $\Delta\lambda = 0 \sim 160$ nm 波长范围内和厚朴酚、厚朴酚标准工作溶液及其混合溶液的同步荧光光谱,结果表明 $\Delta\lambda = 110$ nm 时两者的荧光光谱分辨率最好,结果如图 2 所示。

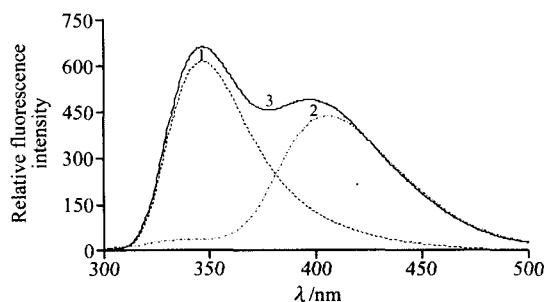


图 1 和厚朴酚、厚朴酚及二者混合物的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of honokiol (HOL), magnolol (MOL) and their mixture

1. HOL 224 $\mu\text{g/L}$; 2. MOL 200 $\mu\text{g/L}$; 3. HOL + MOL.

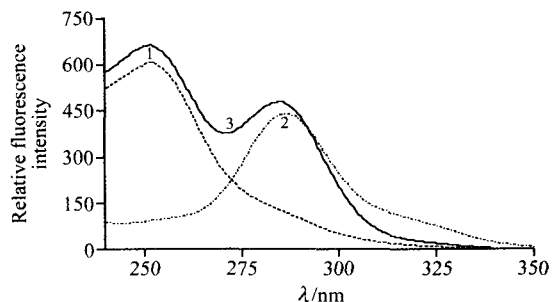


图 2 和厚朴酚、厚朴酚及二者混合物的同步荧光光谱

Fig. 2 Synchronous fluorescence spectra of HOL, MOL and their mixture

1. HOL 224 $\mu\text{g/L}$; 2. MOL 200 $\mu\text{g/L}$; 3. HOL + MOL. $\Delta\lambda = 110$ nm.

由图 2 可知相对于常规荧光光谱,两者的同步

荧光光谱谱带宽度变窄,相互重叠的荧光峰得到了一定的分离,但荧光峰仍重叠较多干扰严重。经二阶导数处理后,两者的导数同步荧光光谱达到完全分离,结果如图 3 所示。

3.3 甲醇用量的影响

厚朴酚在乙醇中具有自猝灭特性^[9]。分别考察了不同甲醇用量对和厚朴酚与厚朴酚混合溶液二阶导数同步荧光光谱的影响。图 4b 结果表明和厚朴酚 $d^2F/d\lambda^2$ 随体系甲醇浓度增加而增大。当体系

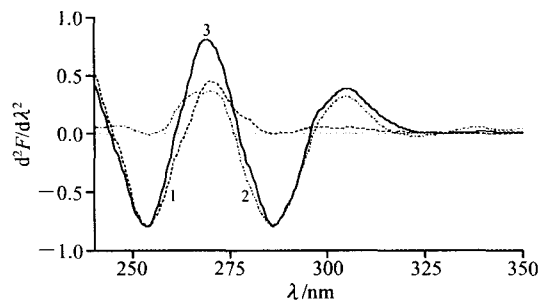


图 3 和厚朴酚、厚朴酚及二者混合物的二阶导数同步荧光光谱

Fig. 3 Second order derivative synchronous fluorescence spectrum of HOL, MOL and their mixture

1. HOL 224 $\mu\text{g/L}$; 2. MOL 200 $\mu\text{g/L}$; 3. HOL + MOL.

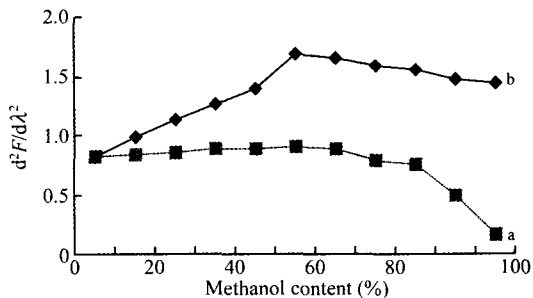


图 4 甲醇用量对厚朴酚(a)及和厚朴酚(b)二阶导数值的影响

Fig. 4 Effect of methanol content on $d^2F/d\lambda^2$ of MOL (a) and HOL (b)

HOL 224 $\mu\text{g/L}$, MOL 200 $\mu\text{g/L}$.

甲醇浓度 $\geq 50\%$ 则逐渐下降;图 4a 结果表明厚朴酚 $d^2F/d\lambda^2$ 在体系甲醇浓度 $\leq 80\%$ 时较稳定;而当体系甲醇浓度 $\geq 90\%$ 时即发生荧光自猝灭。本实验选用 $\leq 10\%$ 甲醇为测试体系,虽然牺牲了一定的和厚朴酚的测定灵敏度,但可减少甲醇的挥发,且价廉、环保。

3.4 酸度的影响

厚朴酚与和厚朴酚分子内均含 2 个酚羟基,但二者光酸性不同。当 $\text{pH} < 4.0$ 时,由于质子猝灭导致厚朴酚与和厚朴酚的荧光效率降低^[5]。向和厚朴酚与厚朴酚混合溶液中分别加入醋酸-醋酸钠缓冲液($\text{pH} = 4.5$) 0 ~ 5 mL,用水定容至 5 mL,观察两者二阶导数同步荧光光谱的光酸性变化。由图 5b 可见,和厚朴酚 $d^2F/d\lambda^2$ 随缓冲液体积增加而逐渐降低,表明酸性介质对其有猝灭作用;由图 5a 可见,当缓冲液体积为 4 mL 时厚朴酚 $d^2F/d\lambda^2$ 最大,表明酸性介质对其有增敏作用。本实验选用水为稀释剂,虽然牺牲了一定的厚朴酚的测定灵敏度,但经济、操作便利。

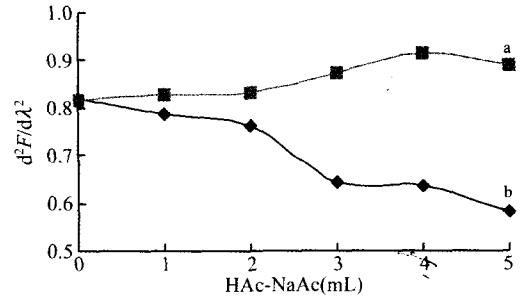


图 5 缓冲液体积对厚朴酚(a)及和厚朴酚(b)二阶导数值的影响

Fig. 5 Effect of HAc-NaAc ($\text{pH} = 4.5$) volume on $d^2F/d\lambda^2$ of MOL(a) and HOL(b)

HOL 224 $\mu\text{g/L}$; MOL 200 $\mu\text{g/L}$.

3.5 工作曲线、检出限和回收率

如图 3 所示,分别选取 254 与 286 nm,采用峰-零法按实验步骤绘制和厚朴酚、厚朴酚的工作曲线;以 0.2% 甲醇溶液为空白溶液按实验步骤在相同条件下平行测定 11 次,以 $10\sigma/k$ 计算和厚朴酚、厚朴酚的定量下限,以 $3\sigma/k$ 计算和厚朴酚、厚朴酚的检出限,结果见表 1。以标准加入法 6 次平行测定厚朴样品中和厚朴酚回收率为 95.09% ~ 104.51%;RSD 为 3.93%;厚朴酚回收率为 94.65% ~ 105.58%;RSD 为 4.08%,准确性较好,符合分析要求。

表 1 线性范围及检出限

Table 1 Related parameters of calibration graphs and detection limits

组分 Compound	线性范围($\mu\text{g/L}$) Linear range	线性回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	检出限($\mu\text{g/L}$) Limit of detection
HOL	4.3 ~ 560.0	$d^2F/d\lambda^2 = 3.6643C + 0.0256$	0.9952	1.30
MOL	2.8 ~ 500.0	$d^2F/d\lambda^2 = 3.592C + 0.039$	0.9963	0.84

3.6 样品分析

按实验方法同时直接测定了几种厚朴样品中和厚朴酚、厚朴酚的含量,并将测定结果与中国药典 HPLC 法^[1]测定结果相比较,表 2 结果表明相对偏差都在痕量分析的允许范围之内,具有较好的重现性和可靠性。

表 2 与 HPLC 法测定结果的比较

Table 2 Comparisons of results for the determination of HOL and MOL by derivative synchronous fluorimetry and HPLC

样品 Sample	OL 含量(content) (mg/g)		偏差 Relative deviation (%)	MOL 含量(content) (mg/g)		偏差 Relative deviation (%)
	导数同步荧光法 Derivative synchronous fluorimetry	HPLC		导数同步荧光法 Derivative synchronous fluorimetry	HPLC	
枝朴 Branch bark of magnolia	10.83	10.55	2.6	15.94	15.52	2.7
筒朴 Stalk bark of magnolia	13.04	12.65	3.1	15.86	15.48	2.4
靴脚朴 Trunk bark of magnolia	44.69	43.64	2.4	38.73	38.92	-0.49
根朴 Root bark of magnolia	63.02	62.31	1.1	57.88	58.73	-1.4
萃取物-1 Magnolia bark extract-1	421.7	440.8	-4.3	444.9	435.7	2.1
萃取物-2 Magnolia bark extract-2	311.0	298.5	4.2	455.4	444.4	2.5
萃取物-3 Magnolia bark extract-3	446.3	457.1	-2.4	450.9	476.2	-5.3
萃取物-4 Magnolia bark extract-4	391.1	380.4	2.8	410.7	416.7	-1.4

References

- 1 The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China(国家药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia*(中国药典). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005, Vol I(一部): 176
- 2 Wang Cheng-Nan(王承南), XIA Chuan-Ge(夏传格). *Economic Forest Researches*(经济林研究), 2003, 21(3): 80~81
- 3 Meng Chao(孟超), Wu Feng(吴丰), Ma Lin(马林). *Natural Product Research and Development*(天然产物研究与开发), 2007, 19(6): 1024~1026
- 4 Pang Li-Ye(庞立业), Chen Guan-Hua(陈冠华), Tian Yi-Ling(田益玲), Li Yue-Qiu(李月秋). *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*(河北大学学报(自然科学版)), 2004, 24(2): 159~162
- 5 Li Hong-Mei(黎红梅), Hu Fang(胡芳), Hu Yu-Zhu(胡育筑). *Journal of Wuyi University(Natural Science Edition)*(五邑大学学报(自然科学版)), 2007, 21(4): 35~39
- 6 Jiang Jun-Duo(江军朵), Wu Hai-Long(吴海龙), Xia A-lin(夏阿林), Zhu Shao-Hua(朱绍华), Liu Di-Si(刘迪思), Zhang Hui-Feng(张卉枫), Yu Ru-Qin(俞汝勤). *Chem. J. Chinese Universitys*(高等学校化学学报), 2008, 29(1): 71~76
- 7 Zhang M, Du L M. *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17(12): 1603~1606
- 8 Bao Zhi-Juan(保志娟), Yang G Xue-Qiong(杨雪琼), Ding Zhong-Ta(丁中涛), Cao Qiu-E(曹秋娥), Zou Yong-Ming(邹永明). *Natural Product Research and Development*(天然产物研究与开发), 2004, 16(5): 435~438
- 9 Li Hong-Mei(黎红梅), Chen Ya-Dong(陈亚东), Yan Zheng-Yu(严拯宇), Hu Yu-Zhu(胡育筑). *Acta Physico-Chimica Sinica*(物理化学学报), 2007, 23(9): 1454~1458

Simultaneous Direct Determination of Magnolol and Honokiol by Second Order Derivative Synchronous Fluorimetry

YANG Jun¹, YU De-Shun^{*1,2}, LIU Shao-Pu², TIAN Yi-Fu¹, MO Bin-Bin¹

¹(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002)

²(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest China University, Chongqing 400715)

Abstract The second order derivative synchronous fluorescence spectra of magnolol, honokiol and their mixture in 0.08% - 0.16% methanol solution were studied. The experiment results indicate that their second order derivative synchronous fluorescence spectra were separated absolutely, which eliminated the disturbance between them. A novel method was developed for the simultaneous direct determination of magnolol and honokiol in mixed solution by second order derivative synchronous fluorescence. For magnolol and honokiol, the linear ranges are 2.8 - 500.0 $\mu\text{g/L}$ and 4.3 - 560.0 $\mu\text{g/L}$, the detection limits are 0.84 $\mu\text{g/L}$ and 1.30 $\mu\text{g/L}$, and the recoveries are 94.65% - 105.58% and 95.09% - 104.51%, respectively, the relative standard deviations(RSD) are all under 4.1%. This method has been successfully used to direct determine magnolol and honokiol in the magnolia bark and their supercritical fluid extract simultaneously.

Keywords Second order derivative synchronous fluorimetry, magnolol, honokiol, magnolia officinalis

(Received 25 June 2008; accepted 20 September 2008)