

## 大孔吸附树脂富集藏药镰形棘豆总黄酮的工艺研究

刘延彤<sup>1</sup>, 李茂星<sup>1</sup>, 杜青云<sup>2</sup>, 张汝学<sup>1</sup>, 贾正平<sup>1</sup> (1. 兰州军区总医院药材科, 甘肃 兰州 730050; 2. 中国人民解放军第 175 医院药材科, 福建 漳州 350005)

**摘要** 目的: 建立镰形棘豆总黄酮的大孔吸附树脂富集工艺。方法: 二氯氧锆比色法测定样品中总黄酮苷含量, 考察 D-101 大孔吸附树脂富集镰形棘豆水提取物中总黄酮的动态吸附能力, 解吸附溶媒浓度及体积, 以及树脂的重复利用能力等。结果: 富集后总黄酮苷含量达到 26%, 接近富集前的 5 倍。结论: D-101 型大孔吸附树脂对镰形棘豆水提取物中总黄酮成分有较好的吸附能力, 60% 乙醇溶液解吸附快速有效, 树脂重复利用度高。

**关键词** 镰形棘豆; 总黄酮; 大孔吸附树脂; 工艺

中图分类号: R94 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)06-0438-04

## Study on enriching technic process of total flavones from *Herba Oxytropis Falcatae* by macroporous resin

LIU Yan-tong<sup>1</sup>, LI Mao-xing<sup>1</sup>, DU Qing-yun<sup>2</sup>, ZHANG Ru-xue<sup>1</sup>, JIA Zheng-ping<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 2. Department of Pharmacy, the 175th Hospital of PLA, Zhangzhou 350005, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish an enriching technic process of total flavones from *Herba Oxytropis Falcatae* by macroporous resin. **Methods:** Zirconium oxychloride ( $ZrOCl_2$ ) chromatometry was used to determine the content of total flavones in samples. Dynamic state adsorbability, concentration and volume of adsorption stripping solvent, and the re-utilization of D-101 macroporous resin were studied. **Results:** The content of total flavones in enrichment is 26%, which was nearly five times of that before enriched. **Conclusion:** Chromatometry with zirconium oxychloride as developer is simple and credible. D-101 macroporous resin showed better adsorbability of flavones from the aqueous extract of *Herba Oxytropis Falcatae* with high re-availability, and 60% alcohol could be used as adsorption stripping solvent because it works quickly and efficiently.

**KEY WORDS** *Herba Oxytropis falcatae*; total flavones; D-101 macroporous resin; enriching technic process

镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Bunge 系豆科棘豆属药用植物, 产于青海, 甘肃南部, 四川西部的高山草原, 具小毒, 是草场害草, 同时其干燥全草是我国青藏高原地区常用的民间草药之一。据《晶珠本草》记载其全草入药, 被视为草药之王, 可愈疮, 治疫疔、中毒病等<sup>[1]</sup>。《中华本草》记其具有清热解毒, 生肌止痛之功效, 主治发热, 流感, 扁桃体炎, 咽喉炎, 急、慢性气管炎, 便血, 痢疾、痈疽疮肿, 刀伤等<sup>[2]</sup>。研究表明, 镰形棘豆含大量以鼠李柠檬素为代表的黄酮, 黄酮醇, 查尔酮等成分<sup>[3]</sup>。以酸水解工艺提取纯化得到的总黄酮苷元能增加肾上腺皮质功能且无皮质激素作用<sup>[4]</sup>, 具有治疗慢性气管炎, 祛痰等作用<sup>[4]</sup>。大孔吸附树脂用于植物黄酮的富

集具有广泛的适应性, 本文详细考察 D-101 型大孔吸附树脂富集镰形棘豆水提取物中总黄酮类的各项工艺参数, 建立良好的制备工艺, 为镰形棘豆的进一步药理学研究提供材料, 也为棘豆属植物开发利用开拓了思路。

### 1 材料

**1.1 仪器与试剂** HP 8453 型紫外可见分光光度计(美国惠普公司); 电子分析天平(Sartorius 公司 BP210S); 日本岛津 SPD-10AVP230CE2001 型紫外灯检测器; 无水甲醇(分析纯); 1 M 三氯化铝乙醇溶液; 2.5 M 盐酸甲醇溶液; 二氯氧锆(国药集团化学有限公司); D-101 型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司, 20070512)。

**1.2 试药** 镰形棘豆, 2006 年 8 月购于甘肃省曲玛县黄河源药材公司, 经兰州大学药学院赵汝能教授鉴定为豆科棘豆属植物镰形棘豆 *Oxytropis falcata* Bunge 全草, 镰形棘豆水提取物(实验室自制

基金项目: 全军医药卫生“十一五”课题面上项目(06MB100); 南京军区医药卫生科研课题(NJ06025)。

作者简介: 刘延彤(1972-), 男, 理学学士。E-mail: liuyant@yahoo.com.cn.

通讯作者: 李茂星. Tel.: (0931) 8975884, E-mail: limaox2005@yahoo.com.cn.

20060810)、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100080-200508)。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品中总黄酮的含量测定

**2.1.1 样品溶液及对照品溶液的制备** 精密称取镰形棘豆水提取物 0.1 g 用 100 mL 蒸馏水溶解(超声处理 20 min),定容于 250 mL 量瓶中,即得样品溶液;精密称取芦丁对照品 201 mg 于 100 mL 容量瓶中,无水乙醇定容,精密吸取 1 mL 稀释到 100 mL 即得对照品溶液(20.1 μg/mL)。

#### 2.1.2 实验条件的考察

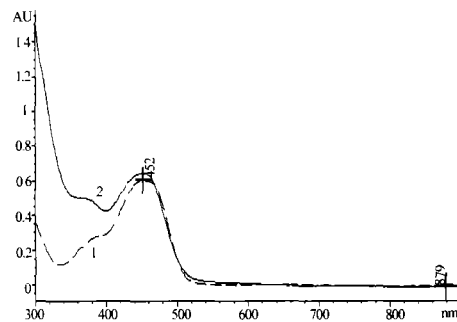
**2.1.2.1 亚硝酸钠-硝酸铝显色** 取样品溶液及对照品溶液各 5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,参照药典方法进行显色,测定紫外-可见吸收光谱。结果表明,样品溶液与对照品溶液波形差异较大,芦丁对照品在 508 nm 处有最大吸收,而样品溶液在此无明显吸收峰。

**2.1.2.2 三氯化铝显色** 取样品溶液及对照品溶液各 1 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 0.1 M 三氯化铝乙醇溶液 2 mL,蒸馏水定容,摇匀,测定紫外-可见吸收光谱。结果表明,芦丁对照品在 403 nm 处有最大吸收,样品溶液在 391 nm 处有吸收,且两者波形差异较大。

**2.1.2.3 二氯氧锆直接显色** 取 0.5 mL 对照品及样品溶液于 10 mL 量瓶,再加入 3% ZrOCl<sub>2</sub> 溶液 1.0 mL,无水甲醇定容,测定紫外-可见吸收光谱。结果表明,芦丁对照品在 410 nm 处有最大吸收,样品溶液在此无特征吸收峰,且两者波形差异较大。

**2.1.2.4 酸水解后二氯氧锆显色** 取 0.5 mL 对照品溶液及样品溶液于 10 mL 量瓶,加入 6 mL 2.5 M 盐酸甲醇溶液,90 °C 水浴水解 30 min,放冷后用无水甲醇定容,精密量取 2 mL 上述水解溶液,于 10 mL 量瓶,加入 3% ZrOCl<sub>2</sub> 溶液 1.0 mL,无水甲醇定容。用 UV 紫外-可见分光光度计于 300~900 nm 波长间进行扫描(图 1)。结果表明,水解后的样品溶液经 ZrOCl<sub>2</sub> 显色,在 300~900 nm 波长间其波形与对照品基本相同,最大吸收均在 453 ± 1 nm 波长处。本实验最终采用二氯氧锆作为显色剂,样品水解后测定总黄酮含量。

**2.1.3 标准曲线的制作** 精密量取对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,2.5 M 盐酸甲醇溶液分别补齐到 6.0 mL,参照 2.1.2.4 项下进行水解显色,测定 452 nm 波长处吸收度,以芦丁浓度和吸收度作标准曲线,得回归方程为  $A = 0.0366C + 0.0158$ ,  $r = 0.9994$ 。



1. 对照品溶液;2. 样品溶液  
图 1 酸水解后加锆盐显色波谱图  
(检测 452 nm 波长处的吸收度)

**2.1.4 精密度实验** 取对照品溶液 1.0 mL 6 份于 10 mL 容量瓶中,参照 2.1.2.4 项下进行水解显色,测定 453 nm 波长处吸收度值,平均值为 0.1595,  $RSD = 0.805\%$ 。

**2.1.5 重复性实验** 取同一批号的水提取物粉末,精密称取 6 份,按照 2.1.1 项制备样品溶液,参照 2.1.2.4 项下进行水解、显色,根据标准曲线计算总黄酮含量,  $RSD = 2.0\%$ ,表明分析方法的精密度良好。

**2.1.6 稳定性实验** 精密吸取同一样品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 测定,总黄酮含量无明显变化,  $RSD$  为 1.23%。

**2.1.7 加样回收率的测定** 精密量取已知浓度的样品溶液 2.0 mL 9 份于 10 mL 量瓶中,1~3 号加入芦丁对照品溶液 1.5 mL,4~6 号加入芦丁对照品溶液 3.0 mL,7~9 号加入芦丁对照品溶液 4.5 mL,2.5 M 盐酸甲醇溶液分别补齐到 6.5 mL,参照 2.1.2.4 项下进行水解、显色,根据标准曲线计算总黄酮含量并计算相应的回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率考察

样品含量 (μg)	对照品加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
57.8	30.3	88.69	101.95		
57.8	30.3	87.43	97.78		
57.8	30.3	88.15	100.17		
57.8	60.6	117.58	98.65		
57.8	60.6	116.26	96.47	99.02	2.05
57.8	60.6	117.45	98.43		
57.8	90.9	150.79	102.30		
57.8	90.9	147.10	98.24		
57.8	90.9	146.15	97.20		

**2.1.8 样品含量测定** 精密称取 0.10g 镰形棘豆水提取物 5 份于 250 mL 量瓶中,蒸馏水溶解(超声处理 20 min),定容于 250 mL 量瓶中,精密量取 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,按照 2.1.2.4 项下水解、显色

并测定 453 nm 波长处吸收度值,根据回归方程求样品溶液的含量,再计算样品中总黄酮含量(以芦丁计)分别为 59.63、56.18、57.00、57.99、58.78 mg/g,平均为 57.92 mg/g,  $RSD = 2.37\%$ 。

## 2.2 工艺参数考察

### 2.2.1 动态饱和吸附量的测定

精密称取水提物 3.0 g, 20 倍蒸馏水溶解, 上样于 20 mL D-101 型大孔吸附树脂柱(柱径:柱高=1:4), 用三氯化铝纸斑显色法紫外灯下检测流出液, 有黄色荧光出现, 说明树脂已饱和吸附。用蒸馏水洗至流出液无色后用 95% 乙醇洗脱, 测定醇洗脱物中总黄酮含量, 求出大孔吸附树脂的动态饱和吸附量为 7.3 mg 黄酮/mL 树脂。

### 2.2.2 乙醇解吸附液浓度的选择

称取水提物 15.0 g, 加入 20 倍量蒸馏水溶解, 上样于 100 mL D-101 型大孔吸附树脂柱, 蒸馏水洗至无色后依次用 5%、30%、60%、95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 称量洗脱物重量并测定其总黄酮含量。结果如表 2。

表 2 洗脱液浓度的选择

乙醇浓度	5%	30%	60%	95%
洗脱物重(g)	0.4381	1.048	0.9713	0.4712
黄酮含量(mg)	11.95	118.04	482.41	34.09
百分含量(%)	2.73	11.26	49.67	7.23
累积洗脱百分量(%)	1.85	20.11	94.73	100.00

结果显示 5% 至 95% 乙醇溶液均能洗脱出黄酮类成分, 但 5% 乙醇溶液的洗脱能力有限, 不能使黄酮类完全解吸附, 60% 乙醇溶液则能使其快速解吸附, 且洗脱容积小, 如果将 30% 和 60% 乙醇洗脱物合并, 总黄酮含量达 600.45 mg, 洗脱固物重 2.0193 g, 含量为 29.73%。故解吸洗脱溶媒定为 60% 乙醇溶液。

### 2.2.3 60% 乙醇洗脱量的确定

称取水提物 1.0 g, 蒸馏水溶解, 上样于 20 mL D-101 型大孔吸附树脂柱, 水洗后用 5% 乙醇洗至无色, 再用 60% 乙醇洗脱, 分段收集洗脱液, 水解后测定总黄酮含量, 计算总黄酮的累积洗脱率, 结果如图 2。

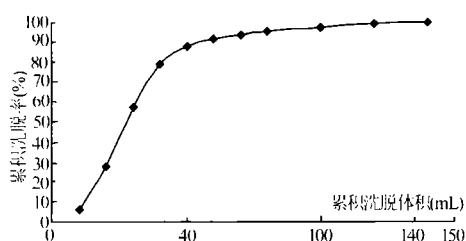


图 2 60% 乙醇洗脱曲线

结果显示, 用 140 mL 60% 乙醇可将黄酮洗脱完全, 故计算后确定其洗脱溶媒体积为树脂柱体积的 7 倍。

### 2.2.4 大孔吸附树脂富集程度的考察

精密称取水提物 1.0 g, 蒸馏水溶解, 上样于 10 mL 大孔吸附树脂柱, 水洗后用 5% 乙醇洗至无色, 用 60% 乙醇洗脱充分, 收集 60% 乙醇洗脱液干燥称重, 按含量方法测定上柱前和上柱后总固物中总黄酮含量, 结果见表 3。

表 3 大孔吸附树脂对总黄酮富集程度

项目	总固物总量 (g)	总黄酮量 (mg)	总黄酮含量 (%)
上柱前	1.0	57.92	5.792
上柱后	0.183	47.69	26.06
水洗脱物	0.801	0	0
总黄酮保留率(%)	-	82.34	-

### 2.2.5 大孔树脂的重复利用

树脂使用一次后, 一般用 95% 的乙醇洗脱至无色时, 树脂柱即已再生, 然后以大量水洗去乙醇, 即可进行下一次的分离。经反复使用后, 吸附树脂颜色变深, 吸附效果下降时, 可用 0.01% ~ 1 mol/L NaOH(或 HCl) 洗涤或浸泡适当时间, 至树脂接近原颜色为宜, 继续用水洗至中性即可再用。精密称取水提物 1.0 g, 蒸馏水溶解, 上样于 10 mL 大孔吸附树脂柱, 水洗后用 5% 乙醇洗至无色, 60% 乙醇, 95% 乙醇梯度洗脱, 收集 60% 乙醇洗脱部分, 蒸干称重, 测定总黄酮含量。再依照上述方法重复上样洗脱 8 次, 记录各次的总黄酮含量见表 4。表 4 结果显示, D-101 型大孔树脂吸附镰形棘豆中的总黄酮有很好的重复利用性。

表 4 D-101 大孔树脂的重复利用结果

上样次数	总黄酮上样量 (mg)	总黄酮洗脱量 (mg)	总黄酮得率 (%)	总固物中总黄酮含量 %
1	57.92	48.45	83.65	26.23
2	57.92	47.52	82.04	26.10
3	57.92	47.10	81.32	25.86
4	57.92	46.52	80.32	25.12
5	57.92	46.53	80.34	25.13
6	57.92	45.42	78.42	24.86
7	57.92	44.75	77.26	24.52
8	57.92	44.10	76.14	24.31

## 3 讨论

### 3.1 大孔吸附树脂在黄酮富集中具有广泛的适用性

实验中曾考察了 HPD-100、XDA-1、XDA-16、

(下转第 443 页)

(C-6), 113.8 (C-3), 114.3 (C-10), 129.4 (C-6'), 129.8 (C-5), 131.0 (C-4'), 135.2 (C-3'), 144.0 (C-4), 153.4 (C-9), 154.9 (C-7'), 156.8 (C-9), 159.6 (C-7), 159.8 (C-2'), 160.5 (C-2)。ESI-MS:  $m/z$  323  $[M+H]^+$ 。其光谱数据及理化常数与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致, 确定该化合物为结香素, 为首次从芫花条中分离得到。

**2.2.6 化合物 6** 白色粉末,  $C_{15}H_{16}O_8$ , mp 219 ~ 221 °C。Molish 反应阳性, 紫外灯(365 nm)下呈蓝色荧光,  $FeCl_3$  反应阳性。IR (KBr)  $cm^{-1}$ : 3 420, 2 910, 2 850, 1 720, 1 700, 1 620, 1 500, 1 400, 1 350, 1 280, 1 240, 1 200, 1 170, 1 120, 1 080, 1 020, 840。 $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 3.16 ~ 3.70 (5H, m, glu: H-2 ~ 6), 5.11 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, glu: H-1), 6.33 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-3), 7.02 (1H, dd,  $J=2.5, 8.5$  Hz, H-6), 7.06 (1H, d,  $J=2.5$  Hz, H-8), 7.65 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5), 8.01 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-4)。 $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)  $\delta$ : 60.6 (glu: C-6), 69.9 (glu: C-4), 73.1 (glu: C-2), 76.5 (glu: C-3), 77.1 (glu: C-5), 100.0 (glu: C-1), 103.2 (C-8), 113.1 (C-10), 113.2 (C-3), 113.6 (C-6), 129.4 (C-5), 144.2 (C-4), 155.0

(C-9), 160.2 (C-7), 160.2 (C-2)。ESI-MS:  $m/z$  324  $[M]^+$ 。其光谱数据及理化常数与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定为伞形花内酯 7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 为首次从芫花条中分离得到。

#### 参考文献:

- [1] 《中华本草》编委会.《中华本草》(第5分册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:402.
- [2] 国家药典编委会.《中华人民共和国药典》(一部)[M].北京:化学工业出版社,2005:150.
- [3] 赵成春, 孙名清, 王志亮, 等. 辣蓼芫花枝条制剂治疗手足癣 68 例 [J]. 中国民间疗法, 1999, (6): 45.
- [4] 赵成春, 邱士岭. 辣蓼芫花枝条制剂治疗手足癣 83 例 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2000, (2): 81.
- [5] 王明时, 刘卫国, 忻莉娟. 唐古特瑞香化学成分的研究 [J]. 南京药学院学报, 1984, 15(2): 1.
- [6] 王伟文, 周炳南, 王成瑞. 瑞香科植物毛瑞香的化学成分的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(11): 566.
- [7] Zhuang LG, Seligmann O, Juric K, et al. Constituents of *Daphne tangutica* [J]. *Planta medica*, 1982, 45: 172. [8] Ulubelen A, Terem B, Tuzlaci E. Coumarins and flavonoids from *Daphne guzdzozdes* [J]. *J Nat Prod* 1986, 49: 692. [9] Baba K, Tabata Y, Taniguti M, et al. Coumarins from *Edgeworthia chrysantha* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(1): 221.
- [10] 任玉琳, 杨峻山, 陈建民. 西藏雪莲花化学成分的研究 III [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(11): 732.

收稿日期: 2008-03-24

(上接第 440 页)

LSA-5B 等型树脂的动态饱和吸附率, 均小于 3 mg/mL 树脂, 吸附效果较差, 而天津海光化工有限公司的 D-101 型大孔吸附树脂对镰形棘豆水提取物中的黄酮类成分具有较好的吸附能力, 重复利用度高, 因此选用 D-101 型大孔吸附树脂为实验载体。

**3.2 植物中总黄酮含量测定** 一般均采用碱性条件下硝酸铝-亚硝酸钠比色法<sup>[6]</sup>, 但文献报道此特征反应要求黄酮 B 环 3', 4' 位具有特殊的邻二酚羟基结构, 同时具有邻二酚羟基结构的非黄酮类成分会显假阳性, 而不具有邻二酚羟基结构的黄酮类成分会显假阴性<sup>[7]</sup>。镰形棘豆含大量以鼠李柠檬素(3, 5, 4'-三羟基-7-甲氧基黄酮)为代表的黄酮类化合物<sup>[3]</sup>, 碱性条件下硝酸铝-亚硝酸钠显色并不显特征酒红色。锆盐是黄酮测定中常用的另一种络合剂<sup>[8]</sup>, 本文采用芦丁为标准品, 二氯氧锆为显色剂测定样品中总黄酮含量, 方法简便易行。

#### 参考文献:

- [1] 帝玛尔·丹增彭措著. 晶珠本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 111.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 第4卷, 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 583.
- [3] 吕芳, 徐俊杰. 藏药镰形棘豆中总黄酮类化学成分研究[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1303.
- [4] 李富银, 梅静如, 严青, 等. 镰形棘豆总黄酮甙元生产工艺的研究[J]. 中草药通讯, 1978, 3(11): 16.
- [5] 魏群, 贺幼平, 李经才, 等. 镰形棘豆总黄酮甙元对下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统的药理作用[J]. 中华医学杂志, 1979, 59(11): 677.
- [6] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典[M](一部), 北京: 化学工业出版社, 2000: 533, 564, 567, 578.
- [7] 郭亚键, 范莉, 王晓强, 等. 关于  $NaNO_2-Al(NO_3)_3-NaOH$  比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97.
- [8] 张汉明, 李茂星. 胃怡胶囊中总黄酮的含量测定[J]. 药实践杂志, 1995, 13(3): 178.

收稿日期: 2008-07-08