

大孔树脂对凤尾草水部位总黄酮的富集作用研究*

★ 刘建群** 张维 张锐 李青 赵元 (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘要:目的:研究凤尾草水部位中总黄酮含量经大孔树脂吸附前后的变化情况,建立凤尾草水部位中总黄酮含量测定的方法,为其提取工艺优化、化学成分研究及质量评价提供依据。方法:凤尾草采用70%乙醇提取,分部位萃取后,得水部位,利用LSA-40大孔树脂对凤尾草中水部位的总黄酮进行富集,采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色,利用紫外分光光度法测定凤尾草中的总黄酮含量,检测波长为510 nm。结果:回归方程为 $C=0.0871A+0.0007$, $R=0.9998$,总黄酮质量浓度在0.004~0.04 mg/ml范围内与吸收度线性关系良好,水部位以及大孔树脂95%乙醇洗脱部位平均加样回收率分别为99.64%和99.99%, RSD 为1.16%和1.47%。测得凤尾草水部位总黄酮含量为5.16%,经LSA-40大孔树脂富集后,总黄酮含量为27.08%,黄酮含量提高了5倍多。结论:该凤尾草水部位总黄酮测定方法操作简便,稳定性好,结果可靠;LSA-40大孔树脂对凤尾草水部位总黄酮有很好的富集作用。

关键词:凤尾草;总黄酮;紫外分光光度法;含量测定;大孔树脂

中图分类号:O657.32 文献标识码:A

Study on Accumulation of the Total Flavonoids of Water Soluble Fraction in *Pteris multifida* by Macroporous Resin

LIU Jian-qun, ZHANG Wei, ZHANG Rui, LI Qing, ZHAO Yuan

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To study the accumulation of the total flavonoids of the water soluble fraction in *Pteris multifida* by macroporous resin. Methods: The total flavonoids of the water soluble fraction were accumulated by the macroporous resin (LSA-40) and determined by UV spectrophotometry at wavelength 510 nm by $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ chromogenic agent. Results: A UV spectrophotometry for the determination of the total flavonoids of the water soluble fraction in *Pteris multifida* was developed. Under the selected experimental conditions, the regression equation was $C=0.0871A+0.0007$, $r=0.9998$, the linear range was 0.004~0.04 mg/ml. The average recoverys were 99.64% (RSD 1.16%, $n=6$) and 99.99% (RSD 1.47%, $n=6$) for the samples before and after treated by macroporous resin (LSA-40). The total flavonoid contents of the water soluble fraction in *Pteris multifida* were increased from 5.16% to 27.08% after treated by macroporous resin (LSA-40). Conclusion: The UV spectrophotometry was simple, stable and reliable for the determination of the total flavonoids of the water soluble fraction in *Pteris multifida*. The total flavonoids of the water soluble fraction in *Pteris multifida* can be accumulated by macroporous resin (LSA-40) with excellent efficiency.

Key words: *Pteris multifida*; total flavonoid; UV spectrophotometry; content determination; macroporous resin

凤尾草为凤尾蕨科植物凤尾草 *Pteris multifida* Poir. 的全草或根,具有清热解毒、凉血止血、消肿解毒等功效,民间用于治疗肝炎、菌痢、淋浊、便血、扁桃体炎、痈肿疮毒、湿疹等^[1]。现代药理研究表明,凤尾草含黄酮类、萜类化合物、甾醇类、挥发油、苯丙

素类等成分,具有广谱抗菌、抗肿瘤、抗病毒作用^[2~4]。

我们研究发现凤尾草水部位可以拮抗中药雷公藤甲素所致肝损伤,其有效成分可能为黄酮类成分。本文首次报道了凤尾草水部位经大孔树脂吸附前后

* 基金项目:江西省卫生厅中医药科研计划项目(2008B007)

** 作者简介:刘建群,男,副教授,博士。Tel:0791-7118657;E-mail:liu5308@sina.com

的总黄酮的含量变化情况,发现 LSA-40 大孔树脂对凤尾草中水部位中总黄酮的富集效果明显,为凤尾草水部位的进一步化学成分研究以及质量评价提供依据。

1 仪器与材料

岛津 U-3000 紫外分光光度计;分析天平 (TG328A)。药材凤尾草全草于 2007 年 9 月采自江西省南昌市,原植物由江西中医学院药用植物研究室赖学文教授鉴定为凤尾草 (*Pteris multifida* Poir.), 凭证标本 (No. 070901) 保存于江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室。芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 $\geq 99\%$), LSA-40 大孔树脂 (西安蓝深交换吸附材料有限责任公司), 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 树脂预处理

大孔吸附树脂,先用水漂洗去白色混浊物,再用 95% 乙醇泡 24 h 后使之充分溶胀,上柱,用 95% 乙醇洗至流出液中加水无混浊,然后用蒸馏水洗至无醇味,然后用 4% NaOH 溶液洗至呈碱性,浸泡 6 h,用蒸馏水洗至中性,再用 4% HCl 溶液洗至呈酸性,浸泡 6 h,用蒸馏水洗至中性,待用。

2.2 样品制备

称取粉碎后的凤尾草药材 2.2 kg,用 70% 乙醇回流提取 3 次,合并提取液过滤,回收乙醇,减压浓缩至无醇味,加水混悬至药液比 1:1,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取后,保留下层水部位,减压干燥,得水部位浸膏 (268 g)。称取 70 g 水部位浸膏用水溶解后,上 LSA-40 大孔树脂柱,静态吸附 5 h 后,先用水洗脱至基本无颜色后,再用 95% 乙醇洗脱,回收溶剂,得大孔树脂 95% 乙醇洗脱部位样品 9.5 g。

分别精密称取上述水部位样品 162 mg,95% 乙醇洗脱部位样品 20 mg,分别加 50% 乙醇定容至 50 ml,供试品溶液水部位溶液浓度为 3.24 mg/ml,供试品溶液大孔树脂 95% 洗脱部位溶液浓度为 0.40 mg/ml。

2.3 定性检查

两份样品溶液分别用三氯化铝反应、浓氨水反应、盐酸-镁粉反应检查,结果均为阳性反应。以上检查表明,供试品溶液中含有黄酮类化合物。

2.4 含量测定

2.4.1 芦丁标准溶液的配制 称取芦丁标准品 10 mg,用 50% 的乙醇溶解转移至 100 ml 容量瓶,稀释至刻度,备用。

2.4.2 测定波长的选择 精确吸取两供试品溶液和芦丁对照品溶液各 3 ml,分别置 25 ml 量瓶中,各瓶中分别加入 5% 的 NaNO_2 溶液 1 ml,摇匀,放置 6 min,10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 ml,摇匀,放置 6 min;各瓶中分别加入 4% NaOH 溶液 10 ml,用 50% 浓度的乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。用 50% 浓度的乙醇作空白,在 300 ~ 600 nm 波长范围内进行扫描,结果见图 1-4 所示,供试品溶液和对照品溶液在 510 nm 波长处均有最强吸收峰,而空白溶液在相同位置则无吸收峰,故选定 510 nm 为测定波长^[5,6]

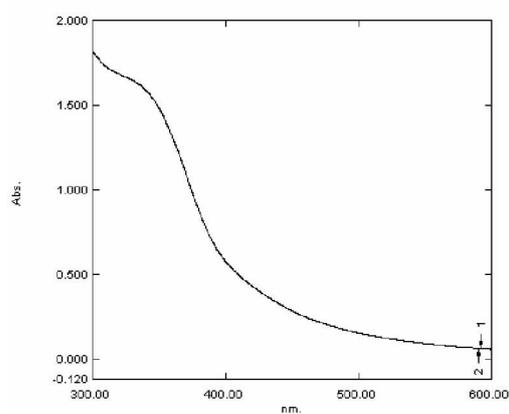


图 1 空白溶剂

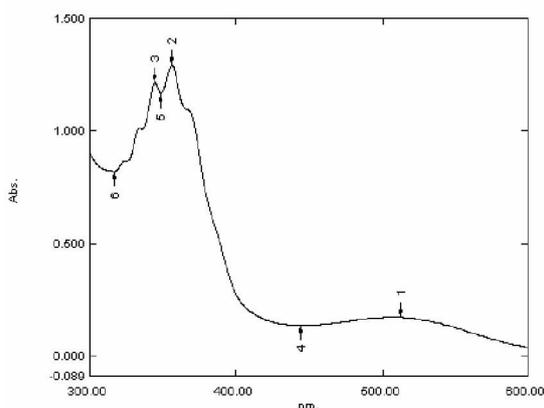


图 2 芦丁对照品

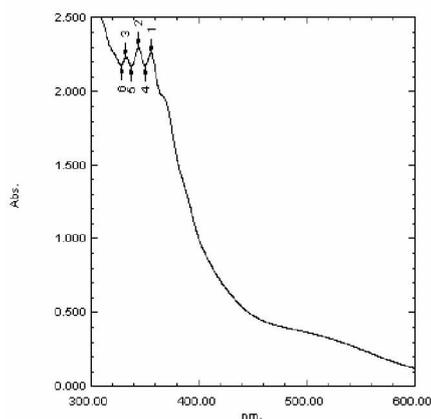


图 3 水部位样品

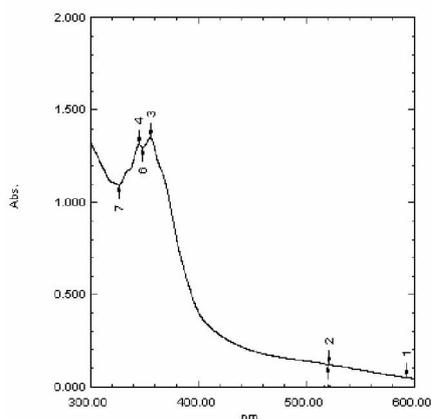


图4 95%洗脱部位样品

2.4.3 方法学考察 标准曲线绘制:精密移取对照品溶液0,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 ml,分别置25 ml量瓶中,各加5%的NaNO₂溶液1 ml,摇匀,放置6 min,10% Al(NO₃)₃溶液) 1 ml,摇匀,放置6 min,再加入4% NaOH溶液10 ml,用50%浓度的乙醇稀释至刻度,摇匀,放置15 min。以空白对照品溶液作空白,分别在510 nm波长处测定吸收度,以芦丁对照品溶液质量浓度(C)为纵坐标、吸收度(A)为横坐标绘制标准曲线,回归方程为 $C = 0.0871A + 0.0007$, $r = 0.9998$ 。结果表明,芦丁质量浓度在0.004~0.04 mg/ml范围内与吸收度呈线性关系。

精密度试验:精密吸取对照品溶液3 ml,共5份,分别置25 ml量瓶中,按标准曲线绘制项下方法进行显色操作,随行空白,于510 nm波长处测定其吸收度,吸收度平均值为0.133, RSD为1.56% (n=5)。

重现性试验:分别称取同批次水部位以及大孔树脂95%洗脱部位两样品,各6份,按2.2项下方法制得供试品溶液,再从每份供试品溶液中取3 ml,依照标准曲线绘制项下方法平行操作显色,于510 nm波长处测定其吸收度,计算两供试品中总黄酮含量,两样品总黄酮含量的平均值分别为5.15%, 27.10%, RSD分别为0.85%, 1.97% (n=6)。

稳定性试验:分别精密吸取同批次两供试品溶液,按标准曲线绘制项下进行显色操作,在5,20,35,50,65 min时测定吸收度。吸收度的RSD分别为2.10%, 2.05%,表明两供试品溶液在5~65 min内稳定。

加标回收试验:分别精密称取6份已知总黄酮含量的水部位粉末50mg以及大孔树脂95%洗脱部位粉末10 mg,分别加入干燥至恒重的芦丁对照品适量,依法制备供试品溶液并测定总黄酮含量,计算加标回收率,结果水部位和95%洗脱部位平均加标

回收率分别为99.64% (RSD1.16%), 99.99% (RSD1.47%)。

表1 水部位加标回收率

No	样品含量 /mg·ml ⁻¹	芦丁加入量 /mg·ml ⁻¹	测得总量 /mg·ml ⁻¹	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.1032	0.1023	0.2052	99.74		
2	0.1031	0.1057	0.2085	99.71		
3	0.1032	0.1034	0.2049	98.35	99.64	1.16
4	0.1031	0.1044	0.2059	98.47		
5	0.1032	0.1013	0.2045	100.00		
6	0.1032	0.1051	0.2099	101.50		

表2 大孔树脂95%洗脱部位加标回收率

No	样品含量 /mg·ml ⁻¹	芦丁加入量 /mg·ml ⁻¹	测得总量 /mg·ml ⁻¹	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	0.1089	0.1022	0.2098	98.69		
2	0.1086	0.1037	0.2110	98.73		
3	0.1092	0.1043	0.2125	99.08	99.99	1.47
4	0.1094	0.1026	0.2142	102.20		
5	0.1089	0.1037	0.2125	99.86		
6	0.1092	0.1043	0.2149	101.40		

2.4.4 样品含量测定 依法测定了水部位和大孔树脂95%洗脱部位各5批样品含量。结果水部位总黄酮含量分别为5.10%、5.18%、5.18%、5.19%、5.15%,平均含量5.16%;大孔树脂95%洗脱部位总黄酮含量分别为27.96%、26.78%、26.36%、27.09%、27.23%,平均含量27.08%。

3 讨论

本文利用LSA-40大孔树脂对凤尾草中水部位的总黄酮进行富集,富集前,凤尾草中水部位总黄酮含量为5.16%,富集后,总黄酮含量为27.08%,表明LSA-40大孔树脂对凤尾草中水部位中总黄酮的富集作用明显。

大孔树脂对化学成分的吸附及解吸作用,目前文献报道的有动态吸附法和静态吸附法。本实验过程中对样品静态吸附以及动态吸附进行考察,结果发现两者存在一定差异。与静态吸附相比,动态吸附的吸附量偏低,这可能与动态吸附过程中中药液在树脂上停留时间大大缩短有关,从而影响了树脂的吸附效果。

参考文献

- [1] 江苏新医学院, 中药大辞典上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社1993:487.
- [2] 孙海燕, 薛飞群, 张可煜, 等. 中药凤尾草研究进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15: 42-46.
- [3] 刘清飞, 秦明珠. 凤尾草的形态组织学研究[J]. 中药材, 2002, (10): 704-706.
- [4] 余有贵, 赵良忠, 段林东, 等. 凤尾草抗菌药物的提取与开发研究[J]. 邵阳高等专科学校学报, 2001(3): 199-203.
- [5] 乔俊缠, 陈理, 刘涛, 等. 叶菊总黄酮含量测定[J]. 中草药, 1998, 29(7): 453.
- [6] 李玉琪, 李玉, 张莉, 等. 赤土茯苓中总黄酮的含量测定[J]. 解放军药学学报, 2000, 16(4): 211-213.

(收稿日期:2009-06-24)