

## 含量测定结合指纹图谱筛选泽兰总黄酮 (酚酸)精制的树脂类型

黄月纯<sup>1\*</sup>, 黄樱华<sup>1</sup>, 刘翠玲<sup>2</sup>, 温远珍<sup>2</sup>, 魏刚<sup>2</sup>, 刘东辉<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 研究泽兰总黄酮(酚酸)精制的树脂类型。方法: 以总黄酮(酚酸)、咖啡酸含量结合指纹图谱主要特征峰面积转移率为考察指标; 采用紫外分光光度法测定总黄酮(酚酸)含量, HPLC 法测定咖啡酸含量, HPLC 法分析主要特征指纹峰。结果: 通过对 S-8, D-101, NKA, AB-8, X-5, D-4020, D-301 等不同树脂的静态吸附与动态吸附研究表明, S-8 型大孔树脂对泽兰的总黄酮(酚酸)类成分有较好的吸附与解吸特性。结论: S-8 型大孔树脂适合应用于泽兰总黄酮(酚酸)的分离与纯化。

[关键词] 泽兰; 总黄酮(酚酸); 咖啡酸; 指纹图谱; 大孔树脂吸附法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0032-05

## Study on Separation and Purification of Total Flavonoids (phenolic acids) from Herba Lycopi by Macroporous Adsorption Resins

HUANG Yue-chun<sup>1</sup>, HUANG Ying-hua<sup>1</sup>, LIU Cui-ling<sup>2</sup>, WEN Yuan-zhen<sup>2</sup>, WEI Gang<sup>2</sup>, LIU Dong-hui<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract] Objective:** To select the macroporous adsorption resins to separate and purify the total flavonoids (phenolic acids) from Herba Lycopi. **Method:** UV spectrophotometry was used to determine the total flavonoids (phenolic acids); HPLC was used to determine caffeic acid and analyze the characteristic peaks of Fingerprint. **Result:** S-8 was the best macroporous adsorption resin on the rate of static desorption and dynamic desorption. **Conclusion:** S-8 was fit for separating and purifying total flavonoids(phenolic acids) from Herba Lycopi.

**[Key words]** Herba Lycopi; total flavonoids(phenolic acids); caffeic acid; fingerprint; macroporous adsorption resin

双柏散是广州中医药大学用于外科、骨伤科的经验方, 由大黄、侧柏叶、黄柏、泽兰、薄荷 5 味药组成, 具有活血化瘀、清热解毒、消肿止痛等功效, 用于治疗跌打损伤早期、急性软组织损伤、急性踝关节扭伤、疮疡肿毒等有显著疗效<sup>[1]</sup>。泽兰是双柏散的臣药之一, 为唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus*

*Turcz. var. hirtus Regel* 的干燥地上部分, 有活血祛瘀、行水消肿的功能<sup>[2]</sup>。泽兰的成分包括木犀草素-7-O-葡萄糖醛苷<sup>[3]</sup>、咖啡酸<sup>[4]</sup>等黄酮类、酚酸类成分, 其中咖啡酸具有抗菌、抗炎、止痛等作用<sup>[5]</sup>, 为双柏散的有效成分之一。为研究开发双柏散新剂型, 在前期研究泽兰总黄酮(酚酸)最佳提取工艺的基础上, 进一步研究泽兰的精制工艺。本实验首次以总黄酮(酚酸)、咖啡酸的含量结合指纹图谱主要特征峰面积转移率为指标, 筛选精制泽兰总黄酮(酚酸)大孔吸附树脂的类型。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(1100, 安捷伦); 二极管阵列检

[收稿日期] 2009-11-06

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B074)

[通讯作者] \* 黄月纯, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药新药研究与指纹图谱分析, Tel: 020-36591724, E-mail: huangyuechun@163.com

测器(DAD, 安捷伦); TU-1221 型紫外-可见分光光度计(北京市通用仪器设备公司); 咖啡酸对照品(110885-200102, 含量测定用) 购自中国药品生物制品检定所; 泽兰购于广东天城药业有限公司; S-8 等大孔树脂均购于天津南开大学化工厂; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 泽兰总黄酮(酚酸)含量测定方法

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取咖啡酸对照品 5.04 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并定容至刻度, 得咖啡酸贮备液( $0.1008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 精密量取咖啡酸贮备液适量, 用 50% 乙醇配制成系列浓度的对照品溶液, 即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密吸取泽兰精制过程中各工艺样品适量, 加 50% 乙醇稀释至一定体积, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液(每 1 mL 含生药量  $0.0002 \sim 0.001 \text{ g}$ )。

**2.1.3 标准曲线的制备** 取咖啡酸系列浓度的对照品溶液, 照紫外分光光度法, 在 325 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 得标准曲线  $Y = 83.4X + 0.00384$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 9$ )。表明咖啡酸在  $0.5040 \sim 10.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  吸光度( $A$ )与浓度( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )具有良好的线性关系。

**2.1.4 样品的测定** 取 2.1.2 项下供试品溶液适量, 照紫外分光光度法, 在 325 nm 的波长处测定吸光度, 从标准曲线上求得总黄酮(酚酸)的量, 计算各样品的含量。

### 2.2 咖啡酸的 HPLC 含量测定方法<sup>[6]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱 ZOBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 - 0.1% 磷酸溶液(13:87); 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长 325 nm; 柱温 35 。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 取咖啡酸对照品适量, 精密称定, 用 50% 乙醇溶解配制成每 1 mL 含 0.02 mg 的对照品溶液。

**2.2.3 线性关系** 咖啡酸的回归方程  $Y = 5.83 \times 10^3 X + 2.52$ , 在  $0.020 \sim 0.50 \mu\text{g}$ , 线性关系良好,  $r = 0.9999$ 。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 精密吸取泽兰精制过程中各工艺样品适量, 加 50% 乙醇稀释至一定体积, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液

**2.2.5 样品的测定** 分别精密吸取对照品溶液 10

μL、供试品溶液 5 ~ 20 μL, 注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 按外标法计算中各样品的含量。

### 2.3 HPLC 指纹图谱分析方法

**2.3.1 色谱条件** 采用 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 20 min 乙腈由 13% 升为 25%, 20 ~ 40 min 乙腈由 25% 升为 38%, 40 ~ 50 min 乙腈由 38% 升为 70%, 50 ~ 60 min 乙腈由 70% 升为 95%; 检测波长为 330 nm; 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为 35 。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密吸取泽兰精制各工艺样品适量, 水浴蒸干, 残渣用 50% 乙醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

**2.3.3 方法学考察** 精密度、稳定性及重复性试验均符合指纹图谱方法学要求。

**2.3.4 样品的测定** 分别精密吸取供试品溶液 5 ~ 20 μL, 注入液相色谱仪中, 测定 5 个主要特征指纹峰的峰面积, 其中峰 1 为咖啡酸。以样品浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 进样量 10 μL 的峰面积作为基准, 其他不同浓度或不同进样量的样品所测定的峰面积按拟定的基准浓度与进样量进行折算, 即得单位生药折算峰面积, 以上样液的单位折算峰面积为 100%, 计算不同样品特征峰的吸附率、流失率、解吸率及转移率。

### 2.4 筛选精制泽兰总黄酮(酚酸)大孔树脂的类型

**2.4.1 上样液的制备** 按正交试验法筛选确定的提取工艺进行提取: 称取泽兰饮片适量, 加 15 倍量的 50% 乙醇, 浸泡 30 min, 加热回流 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 浓缩, 回收乙醇, 滤过, 取滤液, 加蒸馏水稀释成每 1 mL 含 0.1 g 生药的药液, 即得。

**2.4.2 大孔树脂的前处理** 本研究选用 X-5, NKA, D4020, AB-8, D-101, S-8 及 D-301 大孔树脂进行筛选。大孔吸附树脂分别用 95% 乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 弃去上层树脂细粒, 用 95% 乙醇冲洗, 直到取适量流出液加水不显白色浑浊为止, 再用蒸馏水冲洗至无醇味。

### 2.4.3 树脂的筛选

**2.4.3.1 静态吸附与解吸实验** 称取已预处理好的 7 种大孔树脂各 2 份, 每份 10 g(抽滤至不滴水), 置于具塞磨口锥形瓶中, 精密加入上样液 50 mL(相

当于 5 g 生药量), 振摇, 放置 24 h, 滤过, 即得剩余水液; 将上述 7 种树脂滤出, 吸干液体, 分别精密加入 70% 乙醇 50 mL, 振摇, 静置 24 h 后, 吸取上清液, 即得醇洗液。精密吸取上样液、剩余水液及醇洗液适量, 适当稀释或浓缩后测定咖啡酸、总黄酮(酚酸) 含量及指纹图谱主要特征峰面积, 并计算其静态吸附率及解吸率, 结果见表 1 ~2, 图 1 ~2。

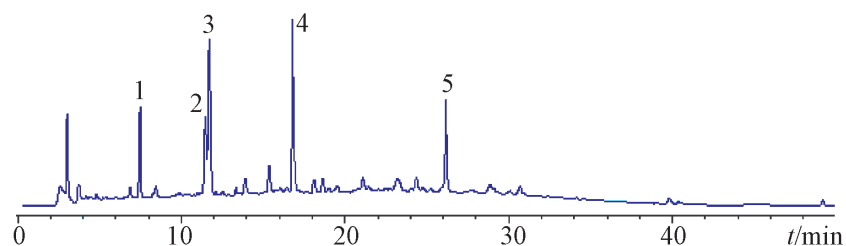


图 1 泽兰上样液的主要特征峰 HPLC 图谱  
1. 咖啡酸

表 1 不同类型树脂静态吸附率和解吸率 (n=2) %

树脂类型	咖啡酸		总黄酮(酚酸)	
	吸附率	解吸率	吸附率	解吸率
D-301	100.00	0.00	98.12	3.22
D-4020	96.64	5.35	92.16	50.12
NKA	93.20	6.28	89.19	62.27
AB-8	94.86	6.05	91.09	65.02
D-101	96.41	6.85	92.42	74.08
X-5	97.39	5.89	92.25	88.52
S-8	94.68	44.31	89.19	62.27

注: 静态吸附率 = (上样量 - 剩余水液量) / 上样量 × 100%

静态解吸率 = 醇洗液量 / (上样量 - 剩余水液量) × 100%

表 2 不同类型树脂静态吸附的主要特征峰分析 %

树脂类型	吸附率					解吸率				
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
D-301	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D-4020	96.66	97.55	96.91	95.04	99.55	5.37	58.39	61.65	67.70	65.60
NKA	93.16	94.41	93.06	90.22	99.07	6.17	57.26	60.38	65.49	66.48
AB-8	95.05	96.49	95.99	93.48	99.55	6.06	63.00	66.23	71.67	77.33
D-101	96.37	97.96	97.75	96.11	99.69	7.15	68.64	72.54	77.14	85.13
X-5	97.46	98.08	97.10	96.25	99.79	5.77	90.41	93.29	94.02	101.92
S-8	94.73	96.77	96.60	95.96	99.46	43.87	79.95	83.62	85.13	90.25

注: 某特征峰静态吸附率 = (某峰上样液峰面积 - 某峰剩余水液峰面积) / 某峰上样液峰面积 × 100%

某特征峰静态解吸率 = 某峰醇洗液峰面积 / (某峰上样液峰面积 - 某峰剩余水液峰面积) × 100%

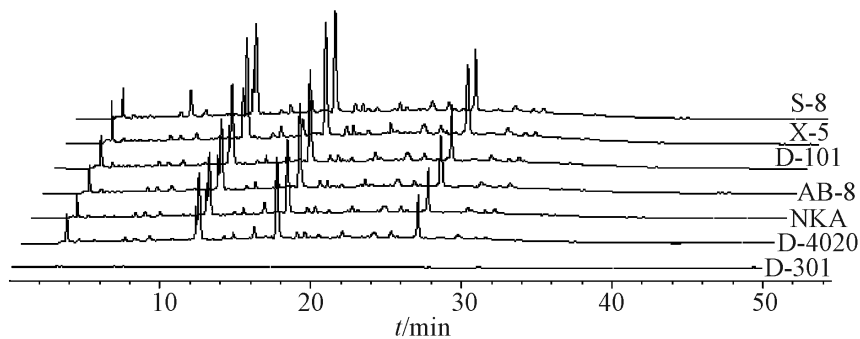


图 2 不同类型树脂静态吸附醇洗液的主要特征峰 HPLC 图谱

以上结果表明, 7 种树脂对咖啡酸的静态解吸率为 S-8 > D-101 > NKA > AB-8 > X-5 > D-4020 > D-301, 对总黄酮(酚酸)的静态解吸率为 X-5 > D-101 > AB-8 > S-8 > NKA > D-4020 > D-301; 指纹图谱显示, 咖啡酸的静态解吸率以 S-8 最优, X-5 除对咖啡酸解析率差外, 对其他特征峰的解吸率较优, D-101 > AB-8 > NKA > D-4020 > D-301, 因此, 本试验选择 S-8, X-5, D-101, AB-8 树脂做进一步动态吸附实验筛选。

#### 2.4.3.2 动态吸附与解吸实验 称取已预处理好

的 S-8, X-5, D-101, AB-8 大孔树脂 10 g (抽滤至不滴水), 分别装于层析柱 (1.8 cm × 30 cm) 中, 用水洗。分别取上样液 100 mL (相当于 10 g 生药量) 上样于树脂柱上, 以 1 mL · min<sup>-1</sup> 的流速进行动态吸附, 收集过柱液; 静置 2 h 使吸附完全, 加蒸馏水以 2 mL · min<sup>-1</sup> 的速率洗脱树脂柱, 收集水洗液; 再用 70% 乙醇洗脱树脂柱, 收集醇洗液。精密吸取上样液、过柱液、水洗液及醇洗液适量, 适当稀释或浓缩后测定咖啡酸、总黄酮(酚酸) 含量及指纹图谱主要特征峰面积, 并计算动态吸附率、水流失率、解吸率及转移率, 结果见表 3 ~4, 图 3。

试验结果显示, 4 种树脂对咖啡酸的动态吸附率、解吸率及转移率为 S-8 > X-5 > D-101 > AB-8, 表明 S-8 树脂对咖啡酸的吸附及解吸效果明显优于 X-5, D-101 及 AB-8。4 种树脂对总黄酮(酚酸) 的动态吸附率、解吸率及转移率相当。指纹图谱显示峰 1 (咖啡酸) 的吸附率及解吸率均为 S-8 > X-5 >

表 3 不同类型树脂动态吸附的分析结果

树脂类型	咖啡酸				总黄酮(酚酸)			
	吸附率	水洗流失率	解吸率	转移率	吸附率	水洗流失率	解吸率	转移率
AB-8	63.86	80.44	23.16	14.79	81.89	10.37	73.52	60.20
D-101	74.97	71.66	26.87	20.14	88.26	10.04	76.57	67.58
X-5	78.70	66.94	38.54	30.33	86.50	10.97	76.33	66.02
S-8	99.15	7.04	95.35	94.54	91.23	15.06	72.58	66.22

注: 动态吸附率 = (上样液量 - 过柱液量) / 上样量 × 100%; 水洗流失率 = 水洗液量 / 上样液量 × 100%; 动态解吸率 = 醇洗脱液量 / (上样液量 - 过柱液量) × 100%; 转移率 = 醇洗脱液量 / 上样液量 × 100%。

表 4 不同类型树脂动态吸附的主要特征峰分析

树脂类型	吸附率					水洗流失率					解吸率				
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
AB-8	64.97	90.18	88.38	94.26	95.50	76.57	21.79	24.17	22.88	9.03	22.48	71.99	73.45	74.98	80.45
D-101	75.91	95.58	94.69	97.11	98.87	68.93	17.56	20.95	18.73	7.09	25.95	71.11	71.72	73.46	82.68
X-5	79.39	93.70	92.83	96.45	98.06	66.55	19.32	20.72	16.79	10.45	36.90	75.28	76.82	81.19	72.04
S-8	99.18	98.29	98.25	99.59	99.74	6.82	31.69	32.44	15.21	13.10	93.49	63.88	66.46	84.67	80.76

注: 某特征峰动态吸附率 = (某峰上样液峰面积 - 某峰过柱液峰面积) / 某峰上样液峰面积 × 100%; 某特征峰水洗流失率 = 某峰水洗液峰面积 / 某峰上样液峰面积 × 100%; 某特征峰动态解吸率 = 某峰醇洗脱液峰面积 / (某峰上样液峰面积 - 某峰过柱液峰面积) × 100%。

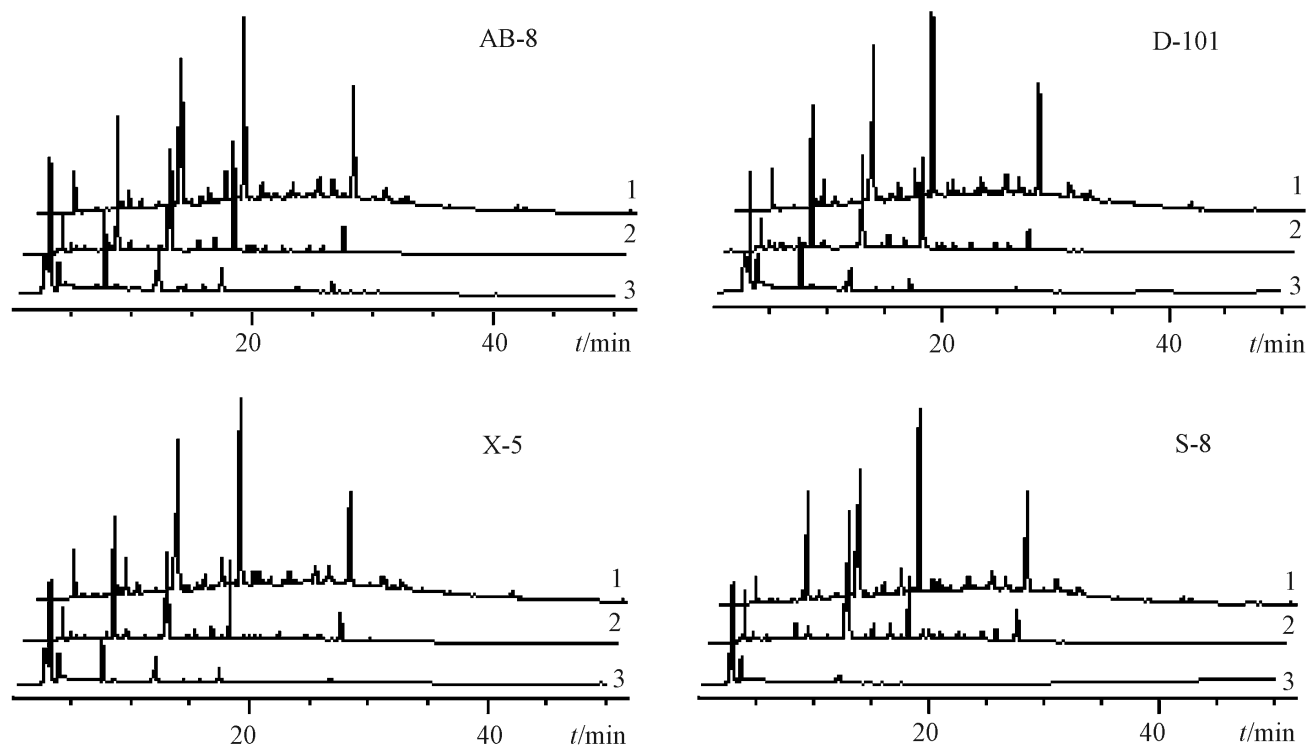


图 3 不同类型树脂动态吸附的主要特征峰 HPLC 图谱

1. 为醇洗脱液; 2. 为水洗液; 3. 为过柱液

D-101 > AB-8, 与含量测定结果一致; S-8 树脂对峰 2 及峰 3 的水洗流失率略高于其余 3 种树脂, 对峰 4 及峰 5 的吸附率略高于其余 3 种树脂, 对峰 2-5 的解吸率与其余 3 种树脂相当。

综合以上研究结果, 表明 S-8 型大孔树脂对泽兰总黄酮(酚酸) 尤其是有效成分咖啡酸有较好的吸附与解吸特性, 适合应用于泽兰总黄酮(酚酸) 的分离与纯化。

### 3 讨论

上样液浓度考察试验表明, 上样液浓度为

0.10, 0.20, 0.30 g·mL<sup>-1</sup> 时, 其总黄酮(酚酸) 含量的转移率分别为 99.27%, 94.78%, 82.49%。随着药液浓度的增大, 沉淀增多, 黏度增大, 总黄酮(酚酸) 的含量下降, 原因可能与泽兰中某些脂溶性较大的黄酮类、酚酸类成分分析出有关, 因此, 本研究采用 0.10 g·mL<sup>-1</sup> 的药液上样。

本研究首先通过静态吸附实验, 从 7 种树脂中筛选出 4 种对泽兰中咖啡酸、总黄酮(酚酸) 及指纹图谱主要特征峰的解吸率均较优的树脂进行动态吸附实验, 实验表明 S-8 型大孔树脂对泽兰总黄酮(酚

酸) 尤其是咖啡酸有较好的吸附与解吸特性, 适合应用于泽兰总黄酮( 酚酸) 的分离与纯化, 同时为含咖啡酸中药的大孔树脂精制提供了参考。

采用指纹图谱筛选泽兰精制的树脂类型, 追踪泽兰的 5 个主要特征峰在静态及动态实验中的吸附及解吸情况。静态实验中, 7 种树脂对峰 1-5 的吸附率相当, 但解吸率差别较大, 由于峰 1( 咖啡酸) 是泽兰抗菌、抗炎、止痛<sup>[5]</sup> 的有效成分, 因此选择峰 1( 咖啡酸) 解吸率较高, 且峰 2-5 解吸率较高的 4 种树脂进行下一步的动态实验; 动态实验中, S-8 树脂不仅对峰 1( 咖啡酸) 的吸附率及解吸率均最高, 且对峰 2-5 的吸附率及解吸率与其余 3 种树脂相当, 因此, S-8 型大孔树脂适合应用于泽兰总黄酮( 酚酸) 的分离与纯化。

本研究以咖啡酸、总黄酮( 酚酸) 含量测定结合指纹图谱主要特征峰面积转移率为考察指标筛选泽兰精制的最佳树脂, 采用紫外分光光度法测定总黄酮( 酚酸) 含量, HPLC 法测定咖啡酸含量, HPLC 法

分析指纹图谱主要特征峰面积, 能更好地分析不同类型树脂对单个有效成分( 咖啡酸) 及有效成分群( 总黄酮、酚酸) 的吸附及解吸特性。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 魏刚. 双柏散临床应用与研究进展[ J ]. 广州中医药大学学报, 1998, 15( 增刊 ) : 60.
- [ 2 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[ S ]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 157.
- [ 3 ] 贺全虎译. 泽兰的酚类成分[ J ]. 国外医学·中医中药分册, 2000: 22( 6 ) : 356.
- [ 4 ] 刘君. 泽兰的化学成分及药理研究进展[ J ]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10( 1 ) : 23.
- [ 5 ] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册[ M ]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1234.
- [ 6 ] 聂博, 刘勇, 徐青, 等. 高效液相法测定不同泽兰中咖啡酸的含量[ J ]. 中国中药杂志, 2006, 31( 11 ) : 882.

[ 责任编辑 仝燕 ]

## 《中国实验方剂学杂志》入编中文核心期刊信息

依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《中国实验方剂学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版( 即第五版) 之中国医学类的核心期刊。该核心期刊按《中国图书馆分类法》的学科体系, 列出了 73 个学科的核心期刊表, 并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括: 题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。该研究成果只是一种参考工具书, 主要是为图书情报部门对中文期刊的评估与订购、为读者导读提供参考。