

基于药效学跟踪试验提取分离龙须藤总黄酮及其含量测定

林丽微, 周毅生*, 周臻, 孟江, 孙志胜
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:考察龙须藤的最佳乙醇提取浓度,并以硅胶柱色谱法分离得到龙须藤总黄酮,对分离得到的龙须藤总黄酮进行含量测定。方法:采用药效学跟踪试验,参考龙须藤不同浓度乙醇提取物对膝关节炎症模型大鼠的抗炎作用,选取龙须藤的最佳乙醇提取浓度,采用硅胶柱色谱方法从龙须藤乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离得到龙须藤总黄酮,HPLC 对分离得到的龙须藤总黄酮进行含量测定。结果:龙须藤的 70% 乙醇提取物抗炎作用最好,采用溶剂系统为二氯甲烷-乙酸乙酯(8:1~4:1)梯度洗脱分离得到的龙须藤总黄酮中 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮、3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮含量分别为 21.3%,46.7%。结论:龙须藤的最佳乙醇提取浓度为 70%,溶剂系统为二氯甲烷/乙酸乙酯(8/1~4/1)梯度洗脱分离龙须藤总黄酮的方法可行。

[关键词] 龙须藤总黄酮;药效学跟踪;3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮;3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮

[中图分类号] R284.1;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)05-0103-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050103

Extraction, Separation and Determination of Total Flavonoids from *Bauhinia chaampioni* Based on Pharmacodynamics Tracking Test LIN Li-wei, ZHOU Yi-sheng*, ZHOU Zhen, MENG Jiang, SUN Zhi-sheng (Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To optimize the concentration of ethanol to extract total flavonoids from *Bauhinia championii*, and purified using silica gel column chromatography. Quantitative determine the content of two major flavonoids in total flavonoids. Method: The optimized concentration of ethanol was selected based on anti-inflammatory effects of extract from *B. chaampioni* on knee osteoarthritis model in rats. The total flavonoids were enriched by silica gel column chromatography. The contents of two flavonoids, 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxyflavone and 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxyflavone was determined by HPLC. Result: The 70% ethanol extract of *B. chaampioni* had the strongest anti-inflammatory effect. The solvent system used in silica gel column chromatography was dichloromethane-ethyl acetate (8: 1 to 4: 1). The content of 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxyflavone and 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxyflavone in total flavonoids were 21.3% and 46.7%, respectively. Conclusion: The established route to obtain total flavonoid from *B. chaampioni* was feasible.

[Key words] *Bauhinia championii* total flavonoids; pharmacodynamic tracking; quantitative determination; 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxyflavone; 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxyflavone

龙须藤药材别名过岗圆龙、九龙藤、梅花入骨丹、羊蹄藤、乌郎藤等,在浙江、江西、福建、广东、广西、湖南、湖北、贵州等省区均有分布^[1]。龙须藤的药理作用和生物活性是多方面的^[2-3],主要是抗炎、镇痛、抗感染、抗血小板凝集等,其主要化学成分为黄酮类化合物,另外还含有原花青素类、挥发油、糖类及没食子酸等。大量研究表明龙须藤的黄酮类化合物是龙须藤抗炎镇痛、治疗类风湿性关节炎的有效成分^[3-6],但尚未见有关龙须藤总黄酮提取工艺及含量测定的文献报道。本文采用药效学跟踪试验,参考龙须藤不同体积分数乙醇提取物对膝关节炎症模型大鼠的抗炎作用,选取龙须藤的最佳乙醇

[收稿日期] 20140710(014)
[第一作者] 林丽微,在读硕士,从事药物新剂型及新技术的研究,Tel:15014219650,E-mail:may.may24@163.com
[通讯作者] *周毅生,教授,从事药物新剂型及新技术的研究,Tel:020-39352168,Fax:020-39352168,E-mail:yishzhou@aliyun.com

提取体积分数,并以硅胶柱色谱方法分离得到龙须藤总黄酮,对龙须藤总黄酮进行含量测定,为龙须藤总黄酮的提取分离提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津), Luna C₁₈ 色谱柱(Phenomenex, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm), BP211D 型分析天平(德国赛多利斯有限公司, d = 0.01 mg), AY120 型分析天平(日本岛津, d = 0.1 mg), BS 系列电子天平(上海友声衡器有限公司制造)。

1.2 试药 龙须藤药材购置于广东清平药材市场,经广东药学院中药学院李书渊教授鉴定为豆科苏木亚科植物龙须藤 *Bauhinia chaampioni* 的干燥藤茎; 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮、3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮(自制,面积归一化法测得纯度大于 98.0%);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 BCR 公司);屈臣氏蒸馏水(广州市屈臣氏食品饮料有限公司);乙醇、甲醇(天津市致远化学试剂有限公司);二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚(天津百世试剂有限公司);碘乙酸钠(Aladdin 试剂有限公司,纯度 ≥ 98.0%);阿司匹林(湖南新汇制药股份有限公司,产品批号 130903);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠,体重(280 ± 20) g,广州中医院大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0020。

2 方法与结果

2.1 模型的复制及给药剂量 在大鼠膝关节腔内注射碘乙酸钠溶液进行大鼠膝关节炎模型的复制,碘乙酸钠浓度为 1 g·L⁻¹,注射量为 0.1 mL/只。参考广东省药品检验所的龙须藤质量标准^[7],龙须藤

生药的成人用药剂量为 15 g·d⁻¹,折算成大鼠的生药给药剂量为 1.4 g·kg⁻¹·d⁻¹;参考阿司匹林说明书,阿司匹林起抗炎镇痛消肿作用的成人用药剂量为 1.6 g·d⁻¹,折算成大鼠的给药剂量为 1.5 × 10⁻¹ g·kg⁻¹·d⁻¹;各组药物均用 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液溶解。

2.2 考察龙须藤的最佳乙醇提取体积分数 取干燥粉碎的龙须藤药材 3 份,分别加入 6 倍量 50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇,分别回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液后过滤并减压回收乙醇,得到龙须藤的 50% 乙醇提取浸膏、70% 乙醇提取浸膏、90% 乙醇提取浸膏。随机抽取 8 只健康的大鼠为空白对照组,其余各组均为膝关节炎症模型大鼠,将其随机分为模型组、阳性对照组、50% 醇提物组、70% 醇提物组、90% 醇提物组,灌胃给药。药效指标选择为大鼠的体重和足跖容积。实验前称重,并在大鼠右后肢膝关节处做好标记,以后每 4 d 称重,用游标卡尺测量关节直径、足跖容积仪测量足跖容积,记录结果。

对比龙须藤的 50% 乙醇提取浸膏、70% 乙醇提取浸膏、90% 乙醇提取浸膏对膝关节模型大鼠的抗炎作用,确定龙须藤 70% 乙醇提取浸膏的抗炎作用最好,最终选取 70% 乙醇为最佳提取体积分数。

2.3 足跖容积的变化 70% 乙醇提物组在给药后第 8 d 起,与模型组比较具有非常显著的差异($P < 0.01$),与阳性对照组比较无显著性差异($P > 0.05$);此时,50% 乙醇提物组、90% 乙醇提物组与模型组比较均不具有显著性差异($P > 0.05$),说明龙须藤的 70% 乙醇提取物对膝关节炎症模型大鼠的抗炎作用起效快、作用显著。见表 1。

表 1 各组大鼠足跖容积变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Paw volume changes in each group of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模前 /mL	造模后 /mL	给药后/mL			
				4 d	8 d	12 d	16 d
空白对照	—	1.413 ± 0.073	1.434 ± 0.058	1.434 ± 0.054	1.438 ± 0.168	1.436 ± 0.557	1.437 ± 0.049
模型	—	1.418 ± 0.041	1.725 ± 0.149 ²⁾	1.691 ± 0.154 ²⁾	1.700 ± 0.174 ²⁾	1.681 ± 0.106 ²⁾	1.672 ± 0.049 ²⁾
阳性对照	0.15	1.411 ± 0.075	1.700 ± 0.130	1.581 ± 0.150	1.400 ± 0.162 ²⁾	1.436 ± 0.095 ²⁾	1.430 ± 0.090 ²⁾
50% 醇提取物	1.4	1.424 ± 0.068	1.746 ± 0.164	1.648 ± 0.157	1.600 ± 0.171	1.537 ± 0.147 ¹⁾	1.479 ± 0.137 ²⁾
70% 醇提取物	1.4	1.417 ± 0.097	1.703 ± 0.119	1.543 ± 0.154	1.451 ± 0.155 ²⁾	1.430 ± 0.113 ²⁾	1.423 ± 0.117 ²⁾
90% 醇提取物	1.4	1.412 ± 0.083	1.728 ± 0.156	1.658 ± 0.161	1.568 ± 0.168	1.520 ± 0.115 ¹⁾	1.428 ± 0.105 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;模型组是与空白组比较,阳性药组与模型组比较,乙醇提取物组与模型组和阳性对照组比较。

2.4 龙须藤总黄酮的提取分离 选取龙须藤的最佳乙醇提取体积分数后,取干燥粉碎的龙须藤药材,

加入 6 倍量该体积分数乙醇,回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液后过滤并减压回收乙醇,得到龙须藤

的乙醇提取浸膏 750 g。将浸膏用水分散后依次使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇溶液萃取。乙酸乙酯萃取液减压回收乙酸乙酯,得到乙酸乙酯萃取浸膏 135 g。取适量该浸膏为上样样品,进行硅胶柱色谱分离。采用溶剂系统为二氯甲烷-乙酸乙酯(8:1~4:1)梯度洗脱,TLC 跟踪分析,合并相同的部位,得到龙须藤总黄酮。

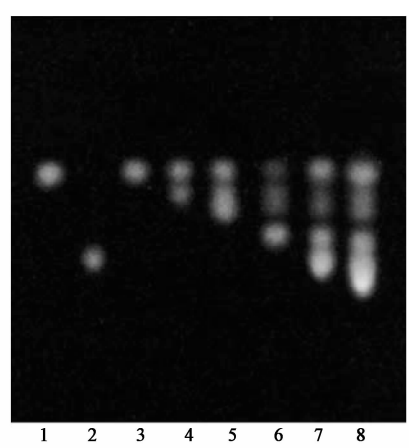
按 2.2 项下龙须藤的乙醇提取浸膏的制备方法得到龙须藤的 70% 乙醇提取浸膏,按 2.3 项下龙须藤乙酸乙酯萃取浸膏的制备方法获得龙须藤乙酸乙酯浸膏。取该浸膏为上样样品,进行硅胶柱色谱分离。采用溶剂系统为二氯甲烷-乙酸乙酯,梯度洗脱,TLC 跟踪分析,合并相同的部位。先使用二氯甲烷-乙酸乙酯(8:1)洗脱,薄层检验出现斑点时后改用二氯甲烷-乙酸乙酯(6:1)洗脱得到第 1 组分~第 3 组分;使用二氯甲烷-乙酸乙酯(5:1)洗脱得到第 4 组分;使用二氯甲烷-乙酸乙酯(4:1)洗脱得到第 5 组分和第 6 组分。第 1 组分在紫外光($\lambda=365\text{ nm}$)下显示 1 个斑点,第 2 组分在紫外光($\lambda=365\text{ nm}$)下显示 2 个斑点,如此类推,第 6 组分在紫外光($\lambda=365\text{ nm}$)下显示 6 个斑点。第 6 组分分离产物 3.7 g(经 HPLC 测定,其中 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮含量为 21.3%,3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮含量为 46.7%,两种黄酮含量达 68%,称该组分为龙须藤总黄酮)。

以 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮为对照品,石油醚-乙酸乙酯(3:10)为展开系统,对分离得到的各组分进行薄层鉴别,置紫外灯($\lambda=365\text{ nm}$)下检视,见图 1。

2.5 龙须藤总黄酮的含量测定 HPLC 测定龙须藤总黄酮中 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮的含量。

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称量 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮 9.84 mg 和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮 11.16 mg,置 10 mL 量瓶中加入适量甲醇,超声 10 min 完全溶解后加入甲醇定容。精密移取前者 1.5 mL 和后者 3.0 mL 于 100 mL 的量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮质量浓度分别为 14.76,33.48 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样。

2.5.2 供试品溶液的制备 精密称量龙须藤总黄酮 10.23 mg,置 100 mL 量瓶中加入适量甲醇,超声



1. 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮;2. 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮;3. 第 1 组分;4. 第 2 组分;5. 第 3 组分;6. 第 4 组分;7. 第 5 组分;8. 第 6 组分

图 1 龙须藤抗炎有效部位的分离产物 TLC
Fig.1 Thin layer chromatogram of the anti-inflammatory effective parts from *Bauhiniae Championii* Caulis

10 min 完全溶解后加入甲醇定容,摇匀,制成龙须藤总黄酮质量浓度为 102.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的供试品溶液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样。

2.5.3 色谱条件 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min,30%~40% A;20~36 min,40%~48% A;36~60 min,48% A),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 325 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.4 标准曲线的确定 精密吸取 2.5.1 项下的对照品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件分别进样 2,5,10,15,20,25,30 μL ,记录峰面积。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮的线性方程为 $Y=1\,083\,101X-2\,685.9$ ($r=0.999\,9$),线性范围 0.029 52~0.442 8 mg ;3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮的线性方程为 $Y=919\,507X-5\,007.3$ ($r=1$),线性范围 0.066 96~1.004 4 mg 。

2.5.5 精密度试验 精密吸取 2.5.1 项下的对照品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件重复进样 6 次,3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮峰面积的 RSD 分别为 0.8% 和 0.5%,表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 精密吸取 2.5.2 项下供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 进样,按 2.5.3 项下色谱条件测定,3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮峰面积的 RSD 分别为 3.0% 和 2.0%,表明供试品溶

液 24 h 内稳定。

2.5.7 重复性试验 按 2.5.2 项下供试品溶液的制备方法,平行制备供试品 6 份,按 2.5.3 项下色谱条件测定,3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮峰面积的 RSD 分别为 2.8% 和 2.3%,表明该方法重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的龙须藤总黄酮约 11.5 mg,甲醇定容至 100 mL,分别移取 3 mL(3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮、3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮的质量浓度分别约为 24,54 mg·L⁻¹),精密加入 2.5.1 项下混合对照品溶液 5 mL 于 10 mL 量瓶内甲醇定容,按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定,3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮的回收率为 102.71% (RSD 2.0%),3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮的回收率为 100.59% (RSD 1.9%)。

2.5.9 总黄酮含量的测定 精密称量龙须藤总黄酮 3 份,按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定,取平均值,结果样品中 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮质量分数为 21.3%,3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮质量分数为 46.7%,两者的总质量分数为 68.0%。

3 讨论

骨关节炎模型的常用造模方法有^[8]①关节腔内注射化合物诱导骨关节炎;②骨关节炎制动造模;③前交叉韧带横断模型;④动物半月板切除骨关节炎模型;⑤骨关节炎负重模型;⑥自发性骨关节炎模型。骨关节炎制动造模方法需要固定动物肢体,而操作过程中动物不同程度的挣扎造成肢体损伤,差异大;前交叉韧带横断模型、动物半月板切除骨关节炎模型、骨关节炎负重模型的模型建立均需要进行手术操作,对操作者要求高;自发性骨关节炎模型 的动物多为大型动物和转基因动物,造模成本高;而关节腔内注射化合物诱导骨关节炎的造模方法简单易行、对操作者要求低、操作误差小、成本低,故本实验采用关节腔内注射碘乙酸钠诱导骨关节炎的造模方法。药效指标选择了大鼠的体重、足跖容积,优点是直观、测定方法简便易行。

药效学跟踪试验,是以药物的药效为标准追踪药物的有效成分,根据药物疗效确定药物的提取工艺,然后再对药物的提取分离部位进行活性追踪,探讨药物药效作用的有效部位、有效成分,在一定程度上更

有利于阐明药物的有效成分及作用机制。本实验采用药效学跟踪试验,以龙须藤对膝关节炎症模型大鼠的抗炎作用为依据考察了龙须藤的 50%,70%,90%乙醇提取物对膝关节模型大鼠的抗炎作用,最终选取了 70%乙醇为最佳乙醇提取浓度。本实验对龙须藤乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位进一步分离得到龙须藤总黄酮,使用溶剂系统为二氯甲烷-乙酸乙酯(8:1~4:1)梯度洗脱分离龙须藤总黄酮的方法分离得到的两种已知黄酮含量较高,达 68.0%,为龙须藤总黄酮的提取分离提供了实验依据。

本实验前期研究从龙须藤乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离的 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮和 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮单体,两种已知黄酮含量较高并且具有较强的抗炎作用,故将其作为指标成分,评价龙须藤总黄酮的质量。

我国龙须藤的植物资源丰富,今后可采用药效学跟踪试验等方法优化龙须藤总黄酮的提取分离工艺,加强龙须藤系统的药理研究,有利于将龙须藤总黄酮开发成治疗类风湿关节炎、风湿关节炎的的抗炎药物,带来较大的社会效益和经济效益。

[参考文献]

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 264-265.

[2] 洪振丰, 郑海音, 徐伟, 等. 康美肤烧伤膏抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2007, 14 (6): 410-411.

[3] 张玉琴. 龙须藤抗类风湿关节炎的药效物质基础及作用机制研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.

[4] 易荆丽, 张嘉家, 周毅生, 等. 龙须藤提取物镇痛抗炎作用的研究 [J]. 广东药学院学报, 2012, 28 (6): 593-597.

[5] 赵永恒, 周毅生, 王嵩, 等. 龙须藤分散片的处方优化及质量控制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (1): 35-39.

[6] 赵永恒, 周毅生, 王嵩, 等. 星点设计效应面法优化龙须藤的大孔树脂纯化工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (9): 36-40.

[7] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第二册 [S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 91-92, 114-115.

[8] 吴雷, 黄朝梁. 骨关节炎动物实验模型的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2007, 23 (12): 1742-1743.

[责任编辑 顾雪竹]