|  |
| --- |
| 分类号：Q949 单位代码：10389  密 级： 学 号：1101407 |
| **福建农林大学硕士学位论文** |
| **金丝草水提物降低慢性肾衰小鼠血肌酐、尿素氮活性及成分研究** |
| 学 科 门 类：理 学一级学科名称：生物学二级学科名称：植物学  研 究 方 向：天然产物化学 研 究 生：陈锡铖  指 导 教 师：叶舟教授  论文完成时间：二 0 一三年五月 |

|  |
| --- |
| **Dissertation for Master’Degree of FAFU** |
| **Studies** on the water extracts in **Pogonatherum** **crinitum** **to** **reduce** **the SCr，Bun** **on chronic** renal  **failure** rats **and** **the** **chemieal** **constituents** |
| Discipline：Science Subject： Biology Specialty： Botany  Research Fields：Chemistry of Natural Product Postgraduate: Chen Xicheng Supervisor: Prof.Ye Zhou  Submitted time：May，2013 |

**独创性声明**

本人声明，所呈交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：日期：

**论文使用授权的说明**

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。□不保密，本论文属于不保密。□

学位（毕业）论文作者亲笔签名：日期：

指导教师亲笔签名：日期：

目 录

[摘 要](#_Toc686324016) 5

[Abstract](#_Toc686324017) 5

[前 言](#_Toc686324018) 6

[第一章 绪论金丝草研究概况](#_Toc686324019) 6

[1.1 金丝草本草考证](#_Toc686324020) 6

[1.2 金丝草药理活性研究](#_Toc686324021) 6

[1.3 金丝草成分研究](#_Toc686324022) 6

[2.1 禾本科植物中药药理活性研究](#_Toc686324023) 7

[2.1.1 利尿作用](#_Toc686324024) 7

[2.1.2 抗氧化作用](#_Toc686324025) 7

[2.1.3 抗菌作用](#_Toc686324026) 7

[2.1.4 抗肿瘤作用](#_Toc686324027) 8

[2.1.5 降血糖作用](#_Toc686324028) 8

[2.1.6 调节免疫作用](#_Toc686324029) 8

[2.1.7 其他作用](#_Toc686324030) 8

[2.2 禾本科植物中药化学成分研究概述](#_Toc686324031) 8

[2.2.1 三萜类化合物](#_Toc686324032) 8

[2.2.2 甾体类化合物](#_Toc686324033) 10

[2.2.3 黄酮及色酮类化合物](#_Toc686324034) 11

[2.2.4 苯丙素类化合物](#_Toc686324035) 13

[2.2.5 有机酸](#_Toc686324036) 14

[2.2.6 脂肪酸酯类](#_Toc686324037) 14

[2.2.7 糖类](#_Toc686324038) 14

[2.2.8 微量元素](#_Toc686324039) 14

[第二章 腺嘌呤致慢性肾衰小鼠模型的建立](#_Toc686324040) 14

[1 材料与方法](#_Toc686324041) 15

[1.1 实验材料](#_Toc686324042) 15

[1.2 实验方法](#_Toc686324043) 15

[2 实验结果](#_Toc686324044) 15

[2.1 小鼠一般状态](#_Toc686324045) 15

[2.2 小鼠Th化指标](#_Toc686324046) 15

[3 讨论](#_Toc686324047) 15

[第三章 金丝草水提液成分的初步检识](#_Toc686324048) 15

[1 材料与试剂](#_Toc686324049) 16

[2 实验方法](#_Toc686324050) 16

[2.1 实验样品处理方法：](#_Toc686324051) 16

[2.2 实验样品检识方法[65-67]](#_Toc686324052) 16

[2.2.1 蛋白质、多肽、氨基酸](#_Toc686324053) 16

[2.2.2 皂苷](#_Toc686324054) 16

[2.2.3 糖和苷](#_Toc686324055) 16

[2.2.4 黄酮及其苷类](#_Toc686324056) 16

[2.2.5 酚类和鞣质](#_Toc686324057) 16

[2.2.6 Th物碱](#_Toc686324058) 16

[2.2.7 有机酸](#_Toc686324059) 16

[2.2.8 甾体](#_Toc686324060) 16

[2.2.9 香豆素、萜类内酯化合物](#_Toc686324061) 17

[2.2.10 强心苷](#_Toc686324062) 17

[2.2.11 蒽醌](#_Toc686324063) 17

[3 检识结果汇总](#_Toc686324064) 17

[4 小结](#_Toc686324065) 20

[第四章 金丝草水提物分部分离-活性跟踪实验](#_Toc686324066) 20

[一 次药效试验](#_Toc686324067) 20

[1 材料与仪器](#_Toc686324068) 20

[1.1 材料](#_Toc686324069) 20

[1.2 仪器](#_Toc686324070) 20

[2 实验方法](#_Toc686324071) 20

[2.1 样品药的制备[68]](#_Toc686324072) 20

[2.2 模型制备](#_Toc686324073) 20

[2.3 动物给药](#_Toc686324074) 20

[2.4 血样采集与Th化分析](#_Toc686324075) 20

[3 结果](#_Toc686324076) 20

[3.1 实验过程动物一般状态](#_Toc686324077) 20

[3.2 小鼠Th化指标的变化](#_Toc686324078) 20

[3.3 小鼠体重变化](#_Toc686324079) 21

[4 小结](#_Toc686324080) 23

[1 材料和仪器](#_Toc686324081) 23

[1.1 材料](#_Toc686324082) 23

[1.2 仪器](#_Toc686324083) 23

[2 实验方法](#_Toc686324084) 23

[2.1 样品药的制备](#_Toc686324085) 23

[2.1.1 大孔树脂分离[71-73]](#_Toc686324086) 23

[2.2 动物分组](#_Toc686324087) 23

[2.3 其他方法步骤](#_Toc686324088) 23

[3 结果](#_Toc686324089) 23

[3.1 大孔树脂分离](#_Toc686324090) 23

[3.2 实验过程动物一般状态](#_Toc686324091) 23

[3.3 小鼠Th化指标](#_Toc686324092) 24

[3.4 各组小鼠体重变化](#_Toc686324093) 25

[4 小结](#_Toc686324094) 26

[第五章 D101大孔树脂富集金丝草总黄酮工艺研究](#_Toc686324095) 26

[1 仪器和材料](#_Toc686324096) 26

[1.1 仪器](#_Toc686324097) 26

[1.2 材料](#_Toc686324098) 27

[2 方法](#_Toc686324099) 27

[2.1 标准曲线的绘制](#_Toc686324100)[[71]](#_Toc686324100) 27

[2.2 金丝草供试液的制备](#_Toc686324101) 27

[2.3 树脂的预处理](#_Toc686324102) 27

[2.4 树脂的静态吸附与解析](#_Toc686324103)[[72, 73]](#_Toc686324103) 27

[2.5 树脂的动态吸附[74, 75]](#_Toc686324104) 27

[2.5.1 上样浓度考察](#_Toc686324105) 27

[2.5.2 上样量考察](#_Toc686324106) 27

[2.5.3 上样速度考察](#_Toc686324107) 27

[2.5.4 动态解析[84-86]](#_Toc686324108) 27

[3 结果与分析](#_Toc686324109) 27

[3.1 树脂的静态吸附与解析](#_Toc686324110)[[78-80]](#_Toc686324110) 27

[3.2 树脂的动态吸附](#_Toc686324111)[[81-83]](#_Toc686324111) 28

[3.2.1 上样浓度考察](#_Toc686324112) 28

[3.2.2 上样量考察](#_Toc686324113) 28

[3.2.3 上样速度考察](#_Toc686324114) 29

[3.2.4 动态解析[84-86]](#_Toc686324115) 29

[4 结论](#_Toc686324116) 29

[第六章 金丝草活性部位化学成分分析正丁醇部位成分分析](#_Toc686324117) 29

[1 材料与仪器](#_Toc686324118) 30

[1.1 材料](#_Toc686324119) 30

[1.2 仪器](#_Toc686324120) 30

[2 实验方法](#_Toc686324121) 30

[2.1 正丁醇萃取部位的制备](#_Toc686324122) 30

[2.2 正丁醇萃取部位分离纯化过程](#_Toc686324123) 30

[2.2.1 大孔树脂分离](#_Toc686324124) 30

[2.2.2 硅胶层析分离[77, 78]](#_Toc686324125) 30

[2.2.3 中压制备分离及液相检测结果](#_Toc686324126) 31

[1 材料与仪器](#_Toc686324127) 33

[1.1 材料](#_Toc686324128) 33

[1.2 仪器](#_Toc686324129) 33

[2 实验方法](#_Toc686324130) 33

[3 高效液相检测](#_Toc686324131) 34

[4 小结](#_Toc686324132) 35

[第七章 总结与展望](#_Toc686324133) 35

[参考文献：](#_Toc686324134) 35

表格目录

表 2-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量 15

表3-1 水提液检识汇总 17

表3-2 乙酸乙酯部位检识汇总 18

表3-3 正丁醇部位检识汇总 18

表格3-4 乙醇部位检识汇总 19

表 3-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量 20

表3-2 小鼠体重（g）变化 21

表 3-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量变化 24

表3-2 小鼠体重（g）变化 25

表3-1 D101树脂对金丝草总黄酮吸附解析率 27

2.5.2[上样量考察31](#_bookmark90)

[2.5.3 上样速度考察 31](#_bookmark91)

[3 结果与分析 32](#_bookmark92)

[3.2 树脂的动态吸附 32](#_bookmark93)

[3.2.1 上样浓度考察 32](#_bookmark94)

[3.2.2 上样量考察 33](#_bookmark95)

[3.2.3 上样速度考察 33](#_bookmark96)

[4 结论 35](#_bookmark97)

[第六章 金丝草活性部位化学成分分析 36](#_bookmark98)

[正丁醇部位成分分析 36](#_bookmark99)

[1 材料与仪器 36](#_bookmark100)

[1.1 材料 36](#_bookmark101)

[1.2 仪器 36](#_bookmark102)

[2 实验方法 37](#_bookmark103)

[2.1 正丁醇萃取部位的制备 37](#_bookmark104)

[2.2 正丁醇萃取部位分离纯化过程 37](#_bookmark105)

[2.2.1 大孔树脂分离 37](#_bookmark106)

[2.2.3 中压制备分离及液相检测结果 39](#_bookmark107)

[2.2.3 中压制备分离及液相检测结果 40](#_bookmark108)

[4 小结 45](#_bookmark109)

[乙醇部位成分分析 46](#_bookmark110)

[1 材料与仪器 46](#_bookmark111)

[1.1 材料 46](#_bookmark112)

[1.2 仪器 46](#_bookmark113)

[2 实验方法 46](#_bookmark114)

[3 高效液相检测 49](#_bookmark115)

[4 小结 51](#_bookmark116)

[第七章 总结与展望 52](#_bookmark117)

[致 谢 59](#_bookmark193)

摘 要

金丝草[*Pogonatherum crinitum* (Thunb.) Kunth]，禾本科金丝草属植物金丝草的全草，主要分布于福建、江西、广西、广东、湖南、云南等我国南方地区。金丝草常以全草入药，具有清热，解暑，利尿利湿等功效。临床资料显示，金丝草水煎液作为治疗慢性肾衰的辅助药物使用，能够延缓部分患者病情进程。本文对金丝草水提物降低慢性肾衰小鼠模型血肌酐、尿素氮活性，及其活性部位的化学成分进行了研究。

首先，以水煎煮金丝草得到水提物，以乙酸乙酯、正丁醇萃取、乙醇沉淀，大孔树脂分离等手段将金丝草水提物分部分离。采用腺嘌呤致慢性肾衰小鼠模型，灌胃给药进行分离部的活性跟踪试验，观察其对模型小鼠血肌酐、尿素氮的干预作用。

然后，对各分离部位进行成分检识，结果提示金丝草水提物含有氨基酸、皂苷、黄酮及其苷、有机酸、酚类、鞣质、甾体、萜类化合物；可能不含有有多肽、蒽醌、强心苷类、生物碱、香豆素、内酯类化合物。

再次，采用D101大孔树脂研究金丝草水提物中总黄酮的富集工艺。

最后，采用硅胶柱色谱法(CC)、PR-C-18柱色谱法（ODS）,薄层色谱法(TLC)、中压制备色谱（MPLC）等分离方法和技术手段，对确定有活性的部位进行成分分离检测。确定活性部位药效成分可能为黄酮、皂苷类。

本论文丰富了金丝草的化学成分和药效活性研究，为本课题的继续研究及将来其临床应用和资源进一步开发利用提供科学依据。

**关键词：金丝草；慢性肾衰；血肌酐；尿素氮；化学成分**

Abstract

“*Pogonatherum crinitum*" is the total herb of *Pogonatherum crinitum* (Thunb.)Kunth Gramineae, mainly distributes in Zejiang, Jiangxi, Fujian, Taiwan, Hunan, Guangxi, Sichun and Yunnan Provines, and it is has been used as traditional Chinese hErb to relieve internal heat, increase urine, reduce edema. It is widely used as herbal tea and ancillary drug of chronic renal

Failure, CRF) in Fujian Province. In order to improve the exploiting and using of" *Pogonatherum crinitum*", the investigations on bioactivities and the chemical constituents of have been carried out in this paper.

First, the chemical constituents of" *Pogonatherum crinitum*" have been tested systematically by means of pretest. It found that it may contains amino acid, peptide, and proteins, saponins, saccharides and glycosides,, flavoniods, carboxylic, terpenoids, phenols, tannin, there is no anthraquinones, cardiac glycosides, alkaloids, coumarin, steroids, macrolides, volatile oils.

Then, by means of water decocting, ethyl acetate, n-butanol extracting 80% ethanol precipitating, the water extracts has been divide into several parts. Every part was evaluated for its reduce the serum creatinine (SCr) and urea nitrogen (UN) effect on adenine induced CRF rats.

Again, use the D101 macroporous resin research the total flavonoids in the water extracts of the total herb of *Pogonatherum crinitum.*

Finally, it was confimed that the activitie comptents of n- butanol were saponins and flavoniods, and seven compounds were isolate from the 80% ethanol part by means of column chromatography(CC), RP-C18 column chromatography thin layer chromatography((TLC), Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC), recrystallization, etc.

Results of the chemical compositions and pharmacological function in the thesis provided scientific theoretical evidences for using of the issue further research, medicines applying, exploiting and using of" *Pogonatherum crinitum*".

**Key Words: *Pogonatherum crinitum*; Serum creatinine (SCr) and urea nitrogen (Bun )**

**Chemical constituents；**

前 言

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是一种肾脏代谢紊乱疾病，通常肾脏实质组织已经损伤，肾小球滤过功能下降。肾脏移植和血液透析是治疗该病的两种主要手段，但治疗费用极其昂贵，难以普及。故治疗CRF的新药物、新疗法为国内外肾病专家所重视，迫切希望能够从植物等生药中寻找到有治疗慢性肾衰的天然活性物质。

金丝草有清热，解暑，利尿利湿等功效，用于治疗感冒高热，中暑，尿路感染，肾炎水肿，黄疸型肝炎，糖尿病等，在福建民间主要作为凉茶饮用。据导师委托相关医院医生收集的资料显示，金丝草对某些肾衰患者确有相应的辅助治疗作用，能够明显的延缓病情进程。目前国内外对金丝草的研究只鉴于其成分的初步探讨，及民间用药习惯，还没有系统的阐述成分及药理活性。

本实验室通过与福建省医学科学研究院的合作，已经开展了金丝草提取物对腺嘌呤致肾衰大鼠模型肾功能药效研究，发现其能够延缓慢性肾衰大鼠模型病情进展，尤其表现在降低血肌酐、尿素氮含量活性上。同时，其化学成分有了初步的探讨，明确了给药剂量及其化学成分的理化鉴定，为本实验提供了一定的数据支持。

# 第一章 绪论金丝草研究概况

## 1.1 金丝草本草考证

金丝草[*Pogonatherum crinitum* (Thunb.) Kunth.]，禾本科金丝草属植物金丝草的全草，多年生草本，高30～70 cm。根细弱，较稠密，基部常密生分蘖。秆直立，丛生，或基部膝曲。叶鞘光滑或微粗糙，上部者短于节间，下部者长于节间；叶舌透明膜质，顶端撕裂而两侧下延；叶片质较薄，茎时常卷折，无毛或上面疏生柔毛。主要分布于浙江、江西、福建、台湾、湖南、广东、广西、四川、云南等地[[1]](#_bookmark118)。

李时珍《本草纲目》[[2]](#_bookmark119)金丝草：“气味苦寒，无毒。主治：咳血吐血，衄血下血，血崩瘴气，解诸药毒，疗痈疽疔肿恶疮，凉血散热。”另有资料记载，金丝草具有清热，解暑，利尿等功效；用于感冒高热，中暑，尿路感染，肾炎水肿，黄疸型肝炎，糖尿病，小儿久热不退；清热解毒，凉血止血，利湿；主热病烦渴、吐血、衄血、咳血、尿血、血崩、黄疸、水肿、淋浊带下、泻痢；小儿疳热，疔疮痈肿[[3]](#_bookmark120)。

## 1.2 金丝草药理活性研究

目前，国内外对金丝草的药理活性研究较少，据研究报道，金丝草水提液能够有效降低慢性肾衰大鼠血肌酐、尿素氮含量，延缓肾脏衰竭病程进展[[4]](#_bookmark121)。金丝草70％乙醇提取物对乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原的分泌，且具有剂量依赖性的抑制作用，半数抑制浓度为

108.5 g·mL-1[[5](#_bookmark122)] 。

## 1.3 金丝草成分研究

研究表明，金丝草含有多种类型的化学成分，主要为黄酮及其苷类、皂苷类、有机酸及其衍生物、多糖等化合物。

金丝草含有丰富的黄酮类物质。赵贵琴[[6]](#_bookmark123)等从金丝草干燥全草的70%乙醇水溶液提取物中分离得到6个黄酮类化合物，分别鉴定为：ft奈酚-7-O-ɑ-L-吡喃鼠李糖（Kaempferol

%0-O -ɑ-L-rhamnose）、ft奈酚-3-O-β-D-芸香糖苷（Kaempferol -3-O-β-D-rutinoside）、ft奈酚

-3, 7-二-O-β-D-吡喃葡糖糖苷（Kaempferol-3, 7-二-O-β-D-glucoside）、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷（Quercetin-3, 7-二-O-β-D-glucoside）、异鼠李素-7-O-β-D-龙胆双糖苷

（Isorhamnetin-7-O-β-D- digentiana glycoside）、异鼠李素-3, 7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷

（Isorhamnetin-3, 7-二-O-β-D-glucoside）。朱迪[[7]](#_bookmark124)等应用聚酰胺柱层析、硅胶柱层析和

SephadexLH-20柱层析方法从金丝草中分离纯化得到一个黄酮碳苷（6-C-β-boivinopyrano- side-7-O-β-glucopyrano-side）。陈伟国[[8]](#_bookmark125)从金丝草70%乙醇提取物中氯仿萃取部位中分离得到苜蓿素(Tricin)和3’，4’，5，5’,7-五甲氧基黄酮(3, 4, 5, 5, 7-5 methoxy flavone). 同时从金丝草脂溶性成分中发现β-谷甾醇（β-Sitosterol）和β-胡萝卜苷（β-Daucosterol）。

OCH3

OH

HO

O

OH3C

CH3O

O

CH3O

OCH3 CH3O

OH O

CH3O O

(1) 4, 5, 7-trihydroxy-3',5'-dimethoxy flavon (2) 3',4,5,5',7-pentamethoxyl

HO

OH

O

HO

O

OH

O

H3C

O

OH

O

HO

HO

OH

OH

(3) 6-C-β-boivinopyranoside-7-O-β-glucopyranoside

###### 禾本科植物中药研究概况

禾本科有660属近10000种，居有花植物科中的第5位，种数在单子叶植物中仅次于[兰科](http://baike.baidu.com/view/61896.htm)。中国产230余属约1500种，其中多种具有药用价值。目前我国常用的禾本科植物中药主要有[[9]](#_bookmark126)：白茅根（*Imperata cylindrical*）、生竹心（*Bambusoideae*）、淡竹叶（*Lophatherum*

*gracile*）、玉米须（*Stigma Maydis*）、香茅（*Cymbopogon citrates*）、芦根头（*Phragmites communis*

*Trin*）、薏苡仁（*Semen Coicis*）等。由于金丝草是金丝草属的单种植物，其药理活性及化学成分无同属植物可供参考，因此针对禾本科植物中药药理活性及化学成分作简要概述，以便参考。

## 2.1 禾本科植物中药药理活性研究

禾本科植物中药一般味淡、性平，当前研究表明其主要有利尿、抗氧化、抗菌、抗肿瘤、降血糖、调节免疫等多种功效。现将其药理活性概述如下

### 2.1.1 利尿作用

禾本科植物中药多有利尿作用，增加氯化物排出量，抑制实验性高草酸尿症小鼠肾脏草酸钙结晶的形成[[10-12]](#_bookmark127)；可扩充血容量，降低血液黏滞度、改善微循环，增加肾小球的滤过机能[[10]](#_bookmark127)。陈沛林等[[11](#_bookmark128)]临床运用玉米须煎剂对泌尿系结石患者治疗，观察显示玉米须煎剂对泌尿系结石治疗作用优于正磷酸盐。D. V. O. Velazquez等[[12]](#_bookmark129)研究认为玉米须提取物能够改善小鼠肾小管功能，促进钾的排泄，并且跟给药剂量相关，在500 mg·kg -1时有很好的利尿作用。

白茅根水煎剂对正常家兔灌胃给药，在5-10 d时有明显的利尿作用，15 d之后逐渐不明显，此现象可能与周围神经系统有关，切断肾周围神经，其利尿作用消失。也有学者认为白茅根含有丰富的钾盐参与利尿作用。白茅根还可作用于缓解肾血管痉挛，从而增加肾血流量及肾小球滤过率而产生利尿作用，同时抑制肾素产生，改善肾缺血，维持血压稳定，临床主要用于治疗急慢性肾炎[[13,](#_bookmark130) [14]](#_bookmark131)。

### 2.1.2 抗氧化作用

自由基与许多疾病和生命现象紧密相关，如脑血栓、动脉粥样硬化及癌症的发生、细胞的老化等。许多医药学家正在努力探究，试图从天然药物中分离得到抗自由基天然活性物质，进而发现新型安全的治疗癌症、心脑血管疾病的药物。玉米须具有抗氧化活性，主要表现在抑制自由基的产生及清除自由基两方面。因为其含有丰富的黄酮类化合物，而该类化合物最重要的生物活性之一就是抗氧化活性。Farsi DA等[[15]](#_bookmark132)从玉米须中提取的异荭草

素-2’’-α-L-鼠李糖苷（Isoorientin-2''-O-a-L-rhamnoside）能够清除二苯基苦基苯肼自由基

（DPPH），起到抗氧化效果。在鲁米诺CuSO4-H2O2发光系统中，玉米须水提物显示良好的清除自由基的能力，优于大豆异黄酮、维生素C、刺槐花、花生壳乙醇提取物和怀ft药醇提取物[[16]](#_bookmark133)。同时，采用不同的有机溶剂、不同的溶剂浓度提取，得到的提取物也显示不同的抗氧化作用，通过对比发现水提取要对醇提取抗氧化强，但是在不同的检测体系中又显示不同的结果[[17,](#_bookmark134) [18]](#_bookmark135)。例如刘平等[[[18](#_bookmark135)]]在DPPH体系中测试表明正丁醇提取物抗氧化活性要优于其他有机溶剂，氯仿提取物次之；但在Fe诱发卵黄脂蛋白多不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化体系中，氯仿提取物抗氧化能力最强，乙酸乙酯提取物次之[[19]](#_bookmark136)。此外，李志洲[[20](#_bookmark137)]热水提取的淡竹叶多糖抗氧化实验结果表明，其对﹒OH和O2-均有较强的清除能力，当淡竹叶多糖溶液的浓度为0.838 mg·mL -1时，清除率分别达到54.37％和41.37％。

### 2.1.3 抗菌作用

钟有添等[[21]](#_bookmark138)采用琼脂扩散法和试管稀释法，研究发现玉米须50％乙醇提取物对乙型溶血性链球菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性明显，最低抑菌浓度为0.5 g·mL -1；对大肠埃希菌、伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌无明显影响。玉米须的水提取物中壳多糖和葡聚糖酶对曲菌酶生长有明显抑制作用。白茅根水提物在试管内对宋内氏、弗氏痢疾杆菌有明显的抑制作用，对卡他球菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌、流感杆菌等也有抑制作用，但对舒氏及志贺氏痢疾杆菌无作用[[22]](#_bookmark139)。淡竹叶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、绿脓杆菌和大肠杆菌都有较好的抑制作用。耐热性好，抑菌pH范围在pH4~9之间，具有良好的防腐保鲜效果[[23]](#_bookmark140)。

### 2.1.4 抗肿瘤作用

中药薏苡仁中含有多种活性成分，主要包括薏苡仁酯、甘油三酯类、脂肪酸类、内酰胺类、薏苡内酯、糖类、甾醇类、三萜类等化合物。薏苡仁通过破坏肿瘤细胞的DNA来抑制其分裂增殖，诱导肿瘤细胞的凋亡，抑制肿瘤细胞的转移，抑制脂肪酸合成酶(FAS)的活性，抑制环氧合酶-2(COX-2)的活性，抑制肿瘤血管的形成，增强放射敏感性，调节机体免疫系统功能，有效的防治肿瘤[[24]](#_bookmark141)。

玉米须提取物在抗肿瘤研究中，也显示具有良好的作用。昌友权等[[25](#_bookmark142)]发现玉米须提取物在较低剂量时可显著延长S180荷瘤鼠死亡时间。马虹等[[26](#_bookmark143)]研究显示玉米须乙醇提取物能提高人胃癌细胞SGC及白血病细胞K562的体外死亡率。吕冬霞等[[27]](#_bookmark144)研究发现玉米须多糖可以抑制肝癌SMMC-7721细胞的生长；观察HE染色显示可诱导细胞凋亡，抑制SMMC-7721肝癌细胞的增殖，且与浓度有关。

### 2.1.5 降血糖作用

白茅根多糖、玉米须多糖，能够降低链脲霉素致高血糖小鼠模型体内的糖化血清蛋白

（GSP）、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)，升高糖尿病小鼠的肝糖原和高密度脂蛋白(HDL-C)水平，提高耐受力，有效改善糖尿病小鼠的血糖和血脂代谢紊乱情况[[24,](#_bookmark141) [28]](#_bookmark145)。玉米须总黄酮能够降低注射链尿佐菌素及垂体后叶索复制糖尿病合并心肌缺血动物模型血清中糖化血红蛋白和乳酸含量[[29]](#_bookmark146)。此外，玉米须黄酮能够显著降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型血糖水平和延缓消瘦症状的作用，这种作用与剂量相关。另外，玉米须黄酮能显著提高模型鼠超氧歧化酶（SOD）活力，减少脂质过氧化物的分泌，减轻四氧嘧啶对胰岛组织损伤，或促进已损伤的组织修复，增强胰岛素的分泌，从而改善高血糖反应

[[30]](#_bookmark147)。

### 2.1.6 调节免疫作用

玉米须粗多糖能够升高动物模型胸腺指数、血清IL-2含量，恢复脾脏T淋巴细胞亚群比例失衡，还可以一定程度调节小鼠巨噬细胞功能[[31,](#_bookmark148) [32](#_bookmark149)]。白茅根多糖能够提高正常及免疫功能低下小鼠外周血CD4-T淋巴细胞和ANAE阳性细胞百分率，降低CD8-T淋巴细胞百分率，并调节CD4-/CD8-比值趋向功能化，以此调节增强免疫功能[[33]](#_bookmark150)。

### 2.1.7 其他作用

香茅油可以抗焦虑，Celso A. Rodrigues de等[[34]](#_bookmark151)研究证实香茅油通过GABAA受体-苯二氮复合体实现抗焦虑过程。白茅根的生品和碳品均能明显的缩短小鼠的出血时间、凝血时间和血浆的复钙时间，炒碳后止血作用提高[[35]](#_bookmark152)。薏苡仁还具有镇痛作用，对痛风、风湿病患者肢体或关节疼痛有很好的止痛效果[[36]](#_bookmark153)。

## 2.2 禾本科植物中药化学成分研究概述

禾本科植物中药含有丰富的天然活性成分，如三萜类、黄酮类、苯丙素类、有机酸类、脂肪酸酯类、多糖类以及氨基酸和微量元素。通过了解相同科属植物中药化学成分类型及分离方法来指导本实验成分分析，现将其及化学成分概述如下。

### 2.2.1 三萜类化合物

付丽娜等[[37]](#_bookmark154)以95%乙醇回流提取法从白茅根提取得到芦竹素(Arundoin)、白茅素

（Cylindrin）、木栓酮（Friedelin）；刘轩等[[38]](#_bookmark155)研究发现白茅根还含有羊齿烯醇(Fernenol)、西米杜鹃醇(Simiarenol)、粘霉酮(Glutinone)等。

R

H3C

CH3 H

CH H

3

CH3



H CH3

CH3

CH3 CH3

R

H3C

CH3 H

CH H

3

CH3



H CH3

CH3

CH3 CH3

Cylindrin R=OCH3 Isoarborinol R=OH

Arundoin R=OCH3 Fernenol R=OH

H3C CH3

CH3

O

CH

CH3

CH3

CH3

HO

CH3

3

CH3

H3C

CH3



CH3

H

H

H

CH3

CH3

CH3

CH3

Friedelin

Simiarenol

### 2.2.2 甾体类化合物

禾本科植物中药还含有大量的甾体化合物，如β-谷甾醇（β-Sitosterol）、油菜素甾醇

（Brassinosteroids, BR）、胡萝卜苷（Daucosterol）、豆甾醇（Stigmasterol），以及具有细胞毒活性的β-谷甾醇-3-0-D-吡喃葡萄糖苷-6-十四烷酸盐（β-sitosterol-3-O-D-glucopyranoside

-6-tetradecanoicacid)等[[39]](#_bookmark156)。徐燕等[[40]](#_bookmark157)从玉米须中得到豆甾-4-烯-3β，6β-二醇(Stigmasta-4-an- 3β，6β-diol)、β-谷甾醇-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷（β-sitosterol-3-O-β-D- glucopyranoside）、豆甾-4,22-二烯-3β，6β-二醇(Stigmasta-4,22-diene-3β，6β-dio1)、豆甾醇-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(Stigmasterol-3-O-β-D-glu-copyranoside)。

CH3 H

H3C

CH3

CH3 CH3

CH3

H3C

CH3

H

H3C

CH3 CH3

H H H H

H

O HO



sitosterol

stgmasterol

CH3

H3C

CH3

CH3

CH

OH

H3C

CH3

CH3

3

H3C H

HO CH3

H3C

H

H H

O

H OH HO

H H

CH3

O O

HO OH

HO H O OH

Brassinosteroids, BR

Daucosterol

### 2.2.3 黄酮及色酮类化合物

[黄酮类化合物](http://baike.baidu.com/view/63037.htm)（Flavonoids）是一类存在于[自然界](http://baike.baidu.com/view/262972.htm)的、具有2-苯基色原酮结构的化合物。它们分子中有一个酮式羰基，第一位上的氧原子具碱性，能与强酸成盐，其[羟基](http://baike.baidu.com/view/27034.htm)衍生物多具黄色，故又称黄碱素或黄酮。刘轩等[[41]](#_bookmark158)从白茅根乙醇提取物的正丁醇萃取部位中得到8-羟基-2-（-苯乙基）色原酮(8-hydroxy-2-(2-phenyl-ethyl) chromone)、2-（2-苯乙基）色原酮-2-(色原酮-8-O-β-吡喃葡萄糖苷(2-(2-phenylethyl) chromone-8-O-β-Dglucopyranoside)、

4'异氧黄酮-6-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(4’-methoxyflavone 6-O-β-D-glucopyranoside)、5-羟基

-2-(2-苯乙基)色原酮( 5-hydroxy-2-(2-phenylethyl) chromone)、4’-羟基-5-甲氧基黄酮

（4’-hydroxy-5-methoxyflavone）和5-羟基黄酮（5-hydroxyflavone）。Artur Figueirinha等[[42]](#_bookmark159)

从香茅草叶子中提取得到多种黄酮类化合物：毛地黄黄酮（6-C-Hexosyl-8- C-Pentosyl）

芹黄素（6-C-Pentosyl-8-C-hexosyl）、异荭草素(4,6-C-Glucosyl luteolin)等。刘军等[[43]](#_bookmark160)从玉米须95%乙醇提取物中分离得到异荭草素-2’’’-O-α-L-鼠李糖苷(isoorien-tin-2'''-O-a-L-rhamn oside)和3’-甲氧基球蛋白(3'-methoxymaysin)。张慧恩等[[44]](#_bookmark161)采用多种色谱层析手段，对玉米须的水提物进行分离、纯化和鉴定到得3个黄酮类化合物，分别为：刺芒柄花素

（7-hydroxy-4-methoxyflavone），2“-O-a-L-鼠李糖基-6-C-(3-脱氧葡萄糖基) -3-甲氧基木犀草素(2’’-O-α-L-rhamnoside-6-C-(deoxy-glucose) -3-methoxy Luteolin)，2”-O-a-L-鼠李糖基

-6-C-(6-脱氧-ax-5-甲基-木-己-4-羰基) -3-甲氧基木犀草素(2’’-O-α-L-rhamnoside-6-C- (deoxidize-ax-5-methyl-timber-hexyl-4-carbonyl) -3-methoxy luteolin). 张靖等[[45]](#_bookmark162)从淡竹叶中分离得到Tri-cin -4′-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether(salcolin A)、tricin 4′-O-(erythro-β-Guaiacy

-lglyceryl) ether (salcolin B)。

R4

R1

OH OH

O

+

OH

HO O HO

R3 O

R2 OH

Tricin R1=H R2=OH R3=H R4=OCH3 R5=OCH3 Jaceidin R1=OCH3 R2=OH R3=OCH3 R4=OCH3 R5=H

HO

Luteolinidin

HO

O R

HO OH

HO O

OH OH

CH3

R O

OH O

HO OH

OH

HO O

O

OCH3

O

OH

OH O

OCH3

Apigenin R=H Luteolin R=OH

SalcolinA: threo SalcolinB: erythro



H

H

HO

O

Me

O

OH O

O

O

Me

OH O

HO

O OH



HO

O

O

OH O

HO

O

Me

OH O

HO

O OH

HO

OH

Isooriein-2'''-O-L-rhamnoside

OH

2(3-methoxymaysi n)

### 2.2.4 苯丙素类化合物

早在1994年K. Matsunaga[[46]](#_bookmark163)就从白茅属植物中分离出多个木脂素化合物，1-(3,4,5-三甲氧基苯基) -1,2,3-丙三醇(1-3,4,5-triethoxy phenyl)，1-O-对香豆酰基甘油酯(1-O-iridoid glycoside glyceride)，4-甲氧基-5-甲基香豆素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(4-methoxyl-5-methyl coumarin-7O-D-glucopyranoside)，4,7-二甲氧基-5-甲基香豆素（4,7-dimethoxyl-5-methyl- cumarin）。

HO HO



OMe

H

O

O

O

H

MeO

MeO

MeO



H

O

O

O H

OH

GraminonesA

OMe OH

GraminoneB

H3C

CH3

O

CH3

CH3

OH3C O

O

4,6,8-megastigmatri en-3-on

CH3

CH3O

4,7-dimethoxyl-5-methyl cumari

### 2.2.5 有机酸

禾本科植物中药含有大量的有机酸，草酸(Oxalic acid)、苹果酸(2-Hydrox-ybu- tanedioic

acid)、柠檬酸（2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid）、酒石酸（2,3-dihyd-roxybutanedioic

acid)，对羟基桂皮酸(3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid)、棕榈酸(十六烷酸（Hexadecanoic

acid)、对羟基苯甲酸（4-hydroxybenzene-carboxylic acid）、3,4-二羟基苯甲酸（3,4-dihydroxy- benzoic acid）及大量的有机酸钙盐和钾盐。马长振等[[47]](#_bookmark164)采用UPLC-ESI-MSn法从白茅根中分离得到7个奎尼酸类化合物，鉴定为：1-咖啡酰奎尼酸(1-O-caffeoylquinic acid, 1-cqa)、3-咖啡酰奎尼酸(3-O-caffeoylquinic acid, 3-cqa)、5-咖啡酰奎尼酸(5-O-caffeoylquinic acid, 5-caq)、4-咖啡酰奎尼酸(4-O-caffeoylquinic acid, 4-cqa)；咖啡酸(Cafeicac)、3-阿魏酰奎尼酸(3-Feruloylquinic acids, fqa)、二咖啡酰奎尼酸(Dicaffeoylquinic acid, dicqa)。

### 2.2.6 脂肪酸酯类

薏苡仁(Semen Coicis),为禾本科植物薏苡Coixlacryma-jobi L. var. mayuen ( Roman. )

Stapf的干燥成熟种仁，富含薏苡仁酯(Coixenolide)[[48]](#_bookmark165)、薏苡内酯[[49]](#_bookmark166)，1,2-亚油酸-3-油酸甘油三酯(1,2-Dilioley-3-oleylglycerol)、2,3-油酸-1-亚油酸甘油三酯(2,3-Dioley-1-Linol

eylglycerol)、棕榈酸二亚油酸甘油酯(1, 2-Dilinoley-3-palmitoylglycerol)、棕榈酸亚油酸油酸甘油酯(2-Linoley-3-oley-1-palmitoy-l glycerol)、棕榈酸二油酸甘油酯(2,3-Dioley-1- palmitoyl-l-glycerol)、甘油三油酸酯(1,2,3-Trioleylglycerol)、甘油三亚油酸酯(1,2,3-Trilin- oleylglycerol)[[50]](#_bookmark167). 另外，有报道从白茅根中分离得到薏苡素(Coixol)[[51]](#_bookmark168)。

### 2.2.7 糖类

糖类化合物在禾本科植物中药中占很大比重，提取方法一般为水提取法。V. Pinilla[[52]](#_bookmark169)从白茅根中得到6种单糖苷：半乳糖苷、葡萄糖苷、木糖苷、树胶醛糖苷、甘露糖苷、鼠李糖苷。刘晓飞等[[53]](#_bookmark170)运用Sephrose柱层析、离子交换层析等手段进行分离纯化，从玉米须中得出3个多糖，分别为CSPS1a-1a，组分为葡萄糖、甘露糖、半乳糖；CSPS1a-2a，组分

为阿拉伯糖、木糖、甘露聚糖；CSPS1a-1b，组分为阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、木糖。

### 2.2.8 微量元素

微量元素Fe、Cu、Zn、Mn、Ca、Mg广泛的存在禾本科植物中药中，玉米须、淡竹叶中还发现含钾（K）、钠(Na)、钴(CO)、镍(Ni)、锌(Zn)、镁(Mg)、铬(Cr)等微量元素

[[54,](#_bookmark171) [55]](#_bookmark172). 这些金属微量元素参与体内各种各样的生化反应，在人体的正常代谢中起着非常重

要作用。有的作为酶的活性因子，起着酶激活作用，有的参与激素的调节作用，协助维持正常生理作用。

# 第二章 腺嘌呤致慢性肾衰小鼠模型的建立

制备CRF的动物模型，对研究CRF的发病机理，探讨组织形态的变化与生化指标及临床表现的相互关系，筛选有效药物，阐明疗效机制均有重要作用。建立CRF模型方法主要有物理方法和化学方法。物理方法一般为肾大部分切除法、肾动脉分支结扎加切除法、冷冻加切除法、电凝加切除法、透热加切除法等；化学方法一般为腺嘌呤灌胃法、阿霉素腹腔注射法、氯化镉混合饲料喂养法等[[56]](#_bookmark173)。物理方法均是建立在手术的基础上，操作繁琐，技术难度大，不容易控制，容易造成高死亡率；而本实验室前期工作对腺嘌呤制模已经积累了一定基础，故选用腺嘌呤制备模型。目前，腺嘌呤致慢性肾衰大鼠模型已经相对成熟

[[57-59]](#_bookmark174)，但小鼠模型报道较少[[60,](#_bookmark175) [61]](#_bookmark176)。本文研究需多次进行活性跟踪试验，动物需要量大，与

采用大鼠作为试验动物相比，采用小鼠建模无论是从试验室条件，还是试验经费上都占优，因此选择小鼠为活性试验的试验动物

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

普通级雄性Km小鼠，体重（20±2 g）：上海斯莱克实验动物有限公司；腺嘌呤：上海丽珠东风生物技术有限公司产品；尿素氮检测试剂盒，血肌酐检测试剂盒：均为[上海杰美基因医药科技有限公司](http://www.biomart.cn/ff808081200f55b901201875abe41a90/index.htm)。半自动生化分析仪：ft东高密仪器厂。

### 1.2 实验方法

将30只Km小鼠适养一周，随机分成空白组(15只)和模型组(15只)。模型组分别于第1、

3、5 d，按250 mg·kg-1（每kg鼠重灌胃250 mg腺嘌呤）剂量灌胃给予腺嘌呤，从第7 d开始，每隔五天给予腺嘌呤250 mg·kg-1灌胃1次，持续造成肾损伤；空白组给予蒸馏水。于第24 d当晚禁食不进水10 h，第25 d眼眶取血，检测血肌酐、尿素氮含量[[62,](#_bookmark177) [63]](#_bookmark178)。

## 2 实验结果

### 2.1 小鼠一般状态

第3 d开始造模组小鼠出现多饮、多尿、进食量逐渐减少，精神萎靡不振，耳廓苍白，眯眼，眼睑浮肿，尾巴湿冷，活动量减少，日益消瘦，毛色干枯，出现个别死亡；第5 d尿量开始逐渐减少，体重明显减轻，出现个别死亡；第8 d起状态略有恢复，饮食稍增，

体重缓慢增加，但仍有小鼠不断死亡。实验进行到20 d时，空白组一般状态明显好于造模组，活动较多，饮食、饮水正常，体重增长较快。

### 2.2 小鼠Th化指标

表 2-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量

Tab. 3-1 The content of mice’s BUN and SCr

| 组别 | N | BUN(mmo l/L) | SCr(umol /L) |
| --- | --- | --- | --- |
| 正常组  模型组 | 14  10 | 7.68±0.45\*\*  35.86±5.98 | 60±5.70\*\*  89.60±7.63 |

注：\*\*指与模型组比较，差异性极显著；\*指与模型组比较差异性显著

## 3 讨论

腺嘌呤造模机理是腺嘌呤在动物体内经一系列酶的水解，形成尿酸。当血中尿酸浓度超过一定量时，尿酸盐析出结晶，沉积于肾小管与肾间质部位，形成尿酸盐异物肉芽肿性炎症，并堵塞肾小管腔引起相应的肾小管腔呈囊状扩张。随着病程的进展，肾单位大量丧失，导致肾功能衰竭，进而出现一系列的病灶表现，如动物竖毛拱背，畏寒怕冷，活动及觅食减少，生命质量下降。本实验最主要的是观察小鼠血肌酐、尿素氮含量，如表2-1所示，模型组小鼠血肌酐、尿素氮含量显著高于空白组，表明造模成功。

# 第三章 金丝草水提液成分的初步检识

中草药的化学成分比较复杂，有些成分是一般高等植物普遍共有的，如糖类、油脂、蛋白质、色素、无机盐等；另一些成分则是存在于某些植物的某种器官中的特殊成分，如生物碱类、黄酮类、皂苷类、强心苷、蒽醌类、挥发油、有机酸、香豆素、木质素类等[[64]](#_bookmark179)。这就需要各类化学成分的定性预实验，根据预实验的结果，判断可能含有哪些类型的化学成分，然后按照所含化学成分的性质，设计不同的分离方法，做进一步的研究。

## 1 材料与试剂

金丝草（购买于福州西洪路中草药店）；氯化铝（分析纯，批号：20050518，国药集团化学试剂有限公司）；a-萘酚（分析纯，上海展云化工有限公司，批号：1008147）；明胶

（天津化学试剂厂）；茚三酮（分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号：20050412）；氯化铁（分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号：QD）；氨水（分析纯，中国上海试剂厂，批号：020424）；三氯乙酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；氢氧化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号：F20080717）；铁氰化钾（分析纯，国药集团试剂有限公司）；盐酸（分析纯，北京化工厂，批号：20010823）；乙酸铅（分析纯，广东陇西化工厂）

## 2 实验方法

### 2.1 实验样品处理方法：

（1）水提取液：取样品粉末100 g加水20倍量，浸泡半小时，以大火煎煮0.5 h，再用文

火煎煮0.5 h，合并，过滤，浓缩待用。

（2）乙酸乙酯萃取液：将上述水提物浸膏溶于少量水中，用乙酸乙酯萃取，得到乙酸乙酯萃取液，挥去溶剂后取0.2 g 溶于20 mL乙酸乙酯中待用。

（3）正丁醇萃取液：即上述经乙酸乙酯萃取后，继续用正丁醇萃取，得到正丁醇萃取液，挥去溶剂后取0.2 g溶于20 mL乙醇中待用。

（4）乙醇上清液：即上述经正丁醇萃取后，用80%乙醇沉淀，离心得到上清液。挥去溶剂后取0.2 g溶于20 mL乙醇中待用。

### 2.2 实验样品检识方法[[65-67]](#_bookmark180)

#### 2.2.1 蛋白质、多肽、氨基酸

（1）茚三酮反应（Ninhydrin 反应）：用毛细管吸取水提取液点在滤纸片上，喷洒0.2%茚三酮乙醇溶液后，在100℃的烘箱中烘烤2 min，如呈紫红色或蓝色斑点，表示存在氨基酸或者多肽，也有少数氨基酸呈黄色斑点。

（2）双缩脲反应（Biuret反应）：试剂为1%CuSO4溶液与40%NaOH溶液等量混合。本试剂主要是Cu2+与蛋白质或肽分子中的肽键-CO-NH-络合显色。取1.5 mL水提液加入上述试剂，振荡，观察溶液颜色变化，如显紫红色，表明为阳性反应。

（3）薄层色谱检查：将水提取液点于硅胶板上，以甲醇：水（9:1）为展开剂展开后，用

0.5％茚三酮丙酮溶液显色，如有紫红色或蓝色斑点，少数氨基酸呈黄色斑点，则表明含有氨基酸、多肽或蛋白质。

#### 2.2.2 皂苷

（1）泡沫反应：分别取供试液3 mL于具塞试管中，用力振荡，如产生持久性泡沫（维持10 min以上），且泡沫体积不少于液体体积的1/3，即使加热或加入甲醇，泡沫也不明显减少，表明可能含有皂苷。

（2）醋酐-浓硫酸试验（Liebrmann-Burchard反应）：取分别取供试液置试管中，水浴加热将乙醇蒸干，加入0.5 mL冰醋酸，浓缩物溶解，滴加1滴浓硫酸，如果呈现紫红色并且溶液上层逐渐变成绿色，则表明含有皂苷。

（3）硫酸甲醇试验：分别取供试液1滴滴于滤纸上，喷硫酸-甲醇（1:1）溶液，不同的皂苷元可显红褐色、紫红色、黄色或黑色，所显颜色与温度有关。

（4）氯仿-硫酸试验：分别取供试液置试管中，水浴加热将乙醇蒸干，浓缩物溶解于氯仿，沿管壁滴加浓硫酸，氯仿层显血红色或青色，硫酸层显绿色，则表明含有皂苷。

#### 2.2.3 糖和苷

（1）Molish反应：取稀释到一定程度的浓缩液1-2 mL，加入5％α-萘酚乙醇溶液混合后，沿器壁滴加浓硫酸，使酸层集于下层。观察在浓硫酸与供试液的界面处是否产生紫红色环。

（2）菲林反应（Fehling反应）：溶液Ⅰ：7.0 g结晶CUSO4溶于10 mL水中；溶液Ⅱ：35 g

KC4H5O6及10 g NaOH溶于100 mL水中，临用前等体积混合即得菲林试剂。

取水提取液3 mL于试管中，加1 mL菲林试剂，沸水浴加热几分钟。如产生红色的

Cu2O沉淀，证明含有还原糖。若试样中不含还原糖，可将水提液加入少量HCl煮沸约0.5 h后，加NaOH溶液中和至碱性，然后再加菲林试剂在沸水浴上加热数分钟。如产生红色沉淀，则可能含有多糖或糖苷类化合物。

#### 2.2.4 黄酮及其苷类

（1）AlCl3试验：分别取供试液点于滤纸片上，吹干后，喷1％AlCl3乙醇溶液，在紫外光灯下观察，呈现黄色、绿色、橙色等荧光为黄酮类。

（2）碱液试验：分别取供试液点于滤纸片上，干后，喷1％Na2CO3溶液或在氨蒸汽中熏几分钟，阳性反应呈现黄、绿或橙黄色。将氨气熏过的滤纸放置空气中，颜色会逐渐褪去而变为原有的颜色。

#### 2.2.5 酚类和鞣质

（1）1% FeCl3试验：分别取供试液1 mL，加1% FeCl3试液1-2滴，观察颜色：阳性反应呈现绿色、污绿色、蓝黑色或暗紫色（可水解鞣质显蓝－蓝黑色，缩合鞣质显绿色-污绿色）。

（2）香草醛-盐酸试验：试剂：0.5 g C8H8O3溶解于50 mL HCl中。将供试液点于滤纸片上，稍干后，喷洒上C8H8O3-HCl试剂，如立即呈不同程度的红色。阳性反应，则表明含有间苯二酚或间苯三酚结构的化合物。

（3）明胶试验：试剂为0.5%的明胶水溶液加等量的10%NaCl溶液。分别取供试溶液1 mL，加上述试剂2-3滴，生成白色沉淀物，则表明可能含有鞣质。

（4）薄层色谱检查：将供试液点于硅胶板上，以甲醇-醋酸（98:2）为展开剂展开，取出后用1% FeCl3乙醇溶液与1％K3[Fe(CN) 6]水溶液（1:1）显色，阳性反应显蓝紫色斑点。

#### 2.2.6 Th物碱

（1）显色反应：分别取供试液放置试管中水浴蒸干，再加5%H2SO4 4 mL溶解残渣，过滤。取1.5 mL滤液于试管中，加2-3滴H3PO4·12MoO 3试剂，如立刻有白色或淡黄色沉淀产生，表明可能含有生物碱。

#### 2.2.7 有机酸

（1）用pH试纸检查：将水提取液和乙醇提取液分别用pH试纸检查，如呈酸性，则可能含有酚性化合物或游离酸。

（2）C19H10Br4O5S试验：分别取供试液点于滤纸片上，喷洒0.1% C19H10Br4O5溶液，如在蓝色背景上立即呈现黄色斑点，表明可能含有机酸，如不明显，可再喷洒氨水，然后暴露在HCl气体中，背景逐渐由蓝色变为黄色，而斑点逐渐变为蓝色，则表明可能含有有机酸。

（3）薄层色谱检查：分别取供试点于硅胶板上，以苯-甲醇（7:3）为展开剂展开，取出后用0.1%C19H10Br4O5S试液显色，蓝色背景上呈黄色斑点，则为阳性反应。

#### 2.2.8 甾体

分别取供试液2 mL，将溶液挥干后做以下实验：

（1）醋酐-浓硫酸（Libermann-Burchard）反应：取样品中加入1 mL冰乙酸使之溶解，再加入1 mL醋酐，最后滴入1滴浓硫酸，阳性反应可产生黄-红-紫-蓝等颜色变化，而后褪色。

（2）氯仿-浓硫酸反应：将样品溶于氯仿，加入浓硫酸后，在氯仿层显红色或蓝色，氯仿层有绿色荧光反应。

（3）SbCl3反应：在样品中加入SbCl3的氯仿饱和溶液，干燥后100℃加热，阳性反应显黄色，灰蓝色，灰紫色。

（4）薄层色谱检查：分别取供试液点于硅胶GF254板上，以氯仿-甲醇为展开剂展开，取出后在254 nm下观察荧光，有紫色斑点，之后用10% H3PO4·12MoO 3显色，有斑点出现为阳性反应。

#### 2.2.9 香豆素、萜类内酯化合物

（1）观察荧光：分别取供试液点于滤纸片上，放在紫外灯光下观察，如有蓝色荧光，加碱后变成黄色荧光，表明可能含有香豆素及其苷类。

（2）开环-闭环反应：分别取供试液1 mL液于试管中，加2 mL 1%NaOH溶液，水浴加热4-5 min，得澄清溶液，再加3-5滴2%HCl使溶液酸化，如溶液变为混浊，表明可能含有萜类内酯或香豆素化合物。

#### 2.2.10 强心苷

（1）K-K反应（冰醋酸-三氯化铁反应）：分别取供试液3 mL于蒸发皿中，水浴蒸干，残渣加0.5 mL冰醋酸-三氯化铁试剂溶解后，置于试管内，沿管壁缓慢加入1 mL浓硫酸，使分成两层，如上层为蓝绿色，界面处为紫色或红色环，表明可能含有2, 6-二去氧糖的强心苷类。

（2）苦味酸试验：1.0 g苦味酸溶于25 mL甲醇，再加1%NaOH 2.5 mL，最后用蒸馏水稀释至50 mL。分别取供试液l mL，加入上述试剂2-3 mL，放置15 min，如有红色出现，表明可能含有强心苷。

#### 2.2.11 蒽醌

（1）NaOH溶液试验：分别取供试液l mL，加入1%NaOH水溶液l mL，如产生红色，加入少量30% H2O2溶液，加热后，红色不褪，用酸液酸化，如红色褪去，表明可能含有蒽醌及其苷类。

（2）1%H3BO3水溶液试验：分别将供试液点于滤纸片上，喷洒1%H3BO3水溶液，如呈黄橙、红色或橙色，表明含有蒽醌及其苷类。

## 3 检识结果汇总

表3-1 水提液检识汇总

Tab. 3-1 The identification result of water extraction

| 检测项目 检测实验 检测结果 |
| --- |
| 1.蛋白质、氨基酸、多肽 （1）茚三酮反应 +  （2）双缩脲反应 -  （3）薄层色谱检查 +  2.皂苷类 （1）泡沫反应 +  （2）醋酐-浓硫酸试验 -  （3）硫酸甲醇试验 -  3.糖及糖苷类 (1)Molish 反应 +  （2）菲林反应 -  4.黄酮及其苷类 (1)AlCl3 试验 +  （2）碱液试验 -  5.酚类和鞣质 (1) FeCl3 试验 +  （2）香草醛-盐酸试验 -  （3）明胶试验 +  （4）薄层色谱检查 +  6.生物碱类 （1）磷钼酸反应 -  7.有机酸类 (1)pH 试纸检查 +  （2）溴酚蓝试验 -  （3）薄层色谱检查 +  8.甾体或三萜类 （1）醋酐-浓硫酸反应 +  （2） 氯仿-浓硫酸反应 -  9.香豆素及内酯类 （1）荧光反应 -  （2）开闭环反应 -  10.强心苷类 (1)K-K 反应 -  （2）苦味酸试验 -  11.蒽醌及其苷类 (1)NaOH 溶液试验 -  （2）硼酸水溶液反应 - |

表3-2 乙酸乙酯部位检识汇总

Tab. 3-1 The identification result of ethyl acetate parts

| 检测项目 检测实验 检测结果 |
| --- |
| 2.皂苷类 （1）泡沫反应 -  （2）醋酐-浓硫酸试验 -  （3）硫酸甲醇试验 -  3.糖及糖苷类 (1)Molish 反应 +  （2）菲林反应 -  4.黄酮及其苷类 (1)AlCl3 试验 +  （2）碱液试验 -  5.酚类和鞣质 (1)FeCl3 试验 +  （2）香草醛-盐酸试验 +  （3）明胶试验 -  （4）薄层色谱检查 -  6.生物碱类 （1）磷钼酸反应 -  7.有机酸类 (1)pH 试纸检查 -  （2）溴酚蓝试验 -  （3）薄层色谱检查 +  8.甾体或三萜类 （1）醋酐-浓硫酸反应 +  （2） 氯仿-浓硫酸反应 -  9.香豆素及内酯类 （1）荧光反应 -  （2）开闭环反应 -  10.强心苷类 (1)K-K 反应 -  （2）苦味酸试验 -  11.蒽醌及其苷类 (1)NaOH 溶液试验 -  （2）硼酸水溶液反应 - |

表3-3 正丁醇部位检识汇总

Tab. 3-1 The identification result of n-butyl alcohol parts

| 检测项目 检测实验 检测结果 |
| --- |
| 2.皂苷类 （1）泡沫反应 +  （2）醋酐-浓硫酸试验 -  （3）硫酸甲醇试验 -  3.糖及糖苷类 (1)Molish 反应 +  （2）菲林反应 -  4.黄酮及其苷类 (1)AlCl3 试验 +  （2）碱液试验 -  5.酚类和鞣质 (1)FeCl3 试验 -  （2）香草醛-盐酸试验 -  （3）明胶试验 +  （4）薄层色谱检查 +  6.生物碱类 （1）磷钼酸反应 -  7.有机酸类 (1)pH 试纸检查 +  （2）溴酚蓝试验 -  （3）薄层色谱检查 -  8.甾体或三萜类 （1）醋酐-浓硫酸反应 +  （2） 氯仿-浓硫酸反应 -  9.香豆素及内酯类 （1）荧光反应 -  （2）开闭环反应 -  10.强心苷类 (1)K-K 反应 -  （2）苦味酸试验 -  11.蒽醌及其苷类 (1)NaOH 溶液试验 -  （2）硼酸水溶液反应 - |

表格3-4 乙醇部位检识汇总

Tab. 3-4 The identification result of ethanol parts

| 检测项目 检测实验 检测结果 |
| --- |
| 2.皂苷类 （1）泡沫反应 -  （2）醋酐-浓硫酸试验 -  （3）硫酸甲醇试验 -  3.糖及糖苷类 (1)Molish 反应 +  （2）菲林反应 -  4.黄酮及其苷类 (1)AlCl3 试验 +  （2）碱液试验 -  5.酚类和鞣质 (1)FeCl3 试验 +  （2）香草醛-盐酸试验 +  （3）明胶试验 -  （4）薄层色谱检查 -  6.生物碱类 （1）磷钼酸反应 -  7.有机酸类 (1)pH 试纸检查 -  （2）溴酚蓝试验 -  （3）薄层色谱检查 -  8.甾体或三萜类 （1）醋酐-浓硫酸反应 -  （2） 氯仿-浓硫酸反应 -  9.香豆素及内酯类 （1）荧光反应 -  （2）开闭环反应 -  10.强心苷类 (1)K-K 反应 -  （2）苦味酸试验 -  11.蒽醌及其苷类 (1)NaOH 溶液试验 -  （2）硼酸水溶液反应 - |

## 4 小结

金丝草作为金丝草属的单种植物，它所含有的化合物类型无同属植物可供对比。本实验结果表明，金丝草热水提取液可能含有糖苷类，黄酮类，有机酸类，皂苷类，氨基酸、酚类和鞣质类化合物；可能不含有单糖，生物碱类，香豆素、内酯，强心苷，蒽醌及其苷类。乙酸乙酯部位可能含有黄酮类，糖苷类，三萜类，多酚类；正丁醇部位可能含有黄酮类，皂苷类，三萜类，糖苷类，多酚和鞣质类；乙醇部位可能含有黄酮苷类，糖苷类，多酚和鞣质类。

本实验多采用试管反应进行供试液颜色变化判断，这种方法往往会因为供试液本来的颜色会遮盖一些反应过程出现的颜色，再加上主观判断，可能影响实验结论，所以本实验在溶液颜色反应的的基础上结合薄层色谱分析作进一步判断，使实验结果较为客观、可靠，这对后续的提取及分离工作奠定一定的基础。

# 第四章 金丝草水提物分部分离-活性跟踪实验

临床上金丝草的用药方法是以水煎煮服用，因此本实验采用热水提取法提取。水提取物中成分极为复杂，若先从分离纯化出单一成分后，再进行活性试验，一方面势必造成分离过程中成分的损失，另一方面缺乏针对性，并非针对有效成分成分分析。所以本试验采用分部分离，对得到的每一个部位进行活性跟踪试验，这样既可以缩小工作量，又能够探讨成分之间是否存在协调或拮抗作用。

# 一 次药效试验

### 1 材料与仪器

### 1.1 材料

Km 小鼠：雄性，体重（20±2 g），上海斯莱克实验动物有限公司；金丝草：购买于福州西洪路中草药店；乙酸乙酯、正丁醇、乙醇均为分析纯：国药集团化学试剂有限公司；自制蒸馏水；腺嘌呤：上海东风生物技术有限公司

### 1.2 仪器

RE-52AA旋转蒸发器：上海亚荣生化仪器厂；SHB-III循环水式多用真空泵：郑州长城科工贸有限公司；BSA1245电子天平：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；WFZV-20000型紫外可见分光光度计：尤尼科（上海）仪器有限公司；电子调温电炉：江阴市保利科研器械有限公司；超声波清洗器：型号，KQ2500B昆ft市超声仪器有限公司；半自动生化分析仪：ft东高密仪器厂

### 2 实验方法

### 2.1 样品药的制备[[68]](#_bookmark181)

称取金丝草1 kg，加20倍量蒸馏水，浸泡0.5 h，以大火煎煮0.5 h，再用文火煎煮0.5

h，如此两次，合并水煎液，水煎液用文火约为55-60℃挥干浓缩，过滤，再旋蒸浓缩至约为1.5 g·mL-1（每mL液体含1.5g生药），依次用乙酸乙酯，正丁醇萃取，乙醇沉淀。即：先以乙酸乙酯-浓缩液为（2:1）一次萃取，之后（1:1）再萃取两次，得到乙酸乙酯层和水相Ⅰ，乙酸乙酯层浓缩得乙酸乙酯部位5 g(CXC-Ⅰ-20-1)；再以正丁醇： 水相Ⅰ（2:1）一

次萃取，之后（1:1）再萃取两次，得到正丁醇层和水相II，正丁醇层浓缩得正丁醇部位45 g(CXC-Ⅰ-20-2)；最后以乙醇：水相II（4:1）一次醇沉，之后（1:1）醇沉四次，得得乙醇层和沉淀部分，乙醇层浓缩得乙醇部位38.2 g(CXC-Ⅰ-20-3)。另取100 g金丝草按上述煎

煮方法煎煮，浓缩得浸膏15 g(CXC-Ⅰ-20-5)。如此，弃去乙醇沉淀部分，得到乙酸乙酯部

位、正丁醇部位、乙醇部位和水煎浸膏4个样品供如下活性试验。

### 2.2 模型制备

将所有Km小鼠适养一周，按区组随机分组方法随机分为10组，每组6只，而后分别于第1、3、5 d，均按250 mg·kg-1剂量灌胃给予腺嘌呤，空白对照组给予等体积的蒸馏水。从第7 d开始，每隔五天给予腺嘌呤250 mg·kg-1灌胃1次，持续造成肾损伤；空白组给予等体积蒸馏水。

### 2.3 动物给药

将上述造模成功动物的组别进行编号：空白组（K）、乙酸乙酯低剂量组（EACl）、乙酸乙酯高剂量组（EACh）、正丁醇低剂量组（NBAl）、正丁醇高剂量组（NBAh）、乙醇低剂量组（Etl）、乙醇高剂量组（Eth）、水煎剂低剂量组（Wl）、水煎剂高剂量组（Wh）、模型组（M）。

各组除空白组和模型组外均每日灌胃给药1次，给药剂量按每千克小鼠重所给的生药

量计算，分别为：高剂量11.4 g·kg-1，低剂量5.6 g·kg-1，（以下活性试验均采用此剂量）连续给药25 d空白对照组与腺嘌呤模型组予蒸馏水。在给药期间，除空白对照组外，其余各组均每五天给予腺嘌呤250mg·kg-1灌胃1次，持续造成肾损伤，用以观察药物干预作用。

### 2.4 血样采集与Th化分析

给药第24 d当晚，禁食不禁水10 h，于第25 d称重，眼眶取血，分离血清，放置-4℃保存待测。血清用半自动生化分析仪脲酶法测定尿素氮含量，苦味酸法测定血肌酐含量。

### 3 结果

### 3.1 实验过程动物一般状态

第3 d开始造模组小鼠出现多饮、多尿、进食量逐渐减少，精神萎靡不振，耳廓苍白，眯眼，眼睑浮肿，尾巴湿冷，活动量减少，日益消瘦，毛色干枯，出现个别死亡；第5 d尿量开始逐渐减少，体重明显减轻，出现个别死亡；第8 d起状态略有恢复，饮食稍增，体重缓慢增加，但仍有小鼠不断死亡。实验进行到第21 d时乙酸乙酯低剂量组（EACl）

出现大量死亡，正丁醇低剂量组（NBAl）、乙醇低剂量组（Etl）、乙醇高剂量组（Eth）及水煎剂低剂量组（Wl）一般状态好于模型组。空白组一般状态明显好于模型组，活动较多，饮食、饮水正常，体重增长较快。

### 3.2 小鼠Th化指标的变化

表 3-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量

Tab. 3-1 The content of mice’s BUN and SCr

| 组别 | N | BUN(mmol·L -1) | SCr(umol·L -1) |
| --- | --- | --- | --- |
| 模型组  空白组  乙酸乙酯高剂量正丁醇低剂量 正丁醇高剂量 乙醇低剂量  乙醇高剂量 水煎剂低剂量水煎剂高剂量 | 5  5  5  6  5  5  5  5  6 | 39.8280±12.8143  33.1380±17.1426  14.0983±6.3746\*\*  36.3560±25.8579  16.7420±10.5374\*  16.3540±8.4953\*\*  20.0260±12.0910\*  65.4083±27.8853 | 93.4330±21.7401  63.6700±13.4626\*  83.7360±21.9104  70.2880±5.8982\*  71.0260±4.5826  85.4740±17.4104  80.1420±10.3862  70.0660±11.9151  79.8780±16.9534 |

注：\*\*指与模型组比较，差异性极显著；\*指与模型组比较差异性显著

如表3-1所示，模型组（M）小鼠尿素氮、血肌酐含量显著高于空白组，表明造模成功；正丁醇低剂量组（NBAl）、乙醇高剂量组（Eth）小鼠尿素氮含量极显著低于模型组（M），正丁醇高剂量组（NBAh）、水煎剂低剂量组（Wl）显著低于模型组（M）；而血肌酐含量只有正丁醇低剂量组（NBAl）小鼠显著低于模型组（M），其余各组均无明显差异。

### 3.3 小鼠体重变化

表3-2 小鼠体重（g）变化

Tab. 3-2 The body weight of mice

| 组别 | N | 造模后 | 7d | 13d | 21d | 25d |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| M  EACh NBAl NBAh  Etl Eth Wl  Wh | 5  5  5  6  5  5  5  6 | 31.72±0.67  30.80±1.13  31.05±2.86  31.02±2.41  32.30±0.61  31.28±1.24  32.08±1.10  31.40±1.40 | 31.02±1.46  29.98±2.09  32.03±4.20  31.33±2.92  33.35±1.54 \*  31.26±2.16  32.38±1. 95  30.08±1.64 | 31.25±2.73  28.75±4.67  32.55±5.60  30.33±3.11  31.93±3.76  30.83±4.32  31.60±3.82  27.32±1.89 ∆ | 30.02±2.33  28.66±5.57  32.52±6.52  28.85±4.10  33.21±3.90  31.44±5.20  33.38±4.07  26.86±2.70 | 28.04±1.45  27.90±4.58  35.70±7.25 \*  29.57±4.42  34.97±2.96 \*\*  35.39±1.65 \*\*  35.22±4.48 \*\*  27.30±3.62 |

注：\*\*指与模型组比较，体重差极显著高于模型组；\*指与模型组比较，体重显著高于模型组；

∆指与模型组比较，体重显著低于模型组

如表3-2所示在给药的第3 d，各组小鼠体重有明显下降，随后的变化趋势趋于平缓，从第15 d起直到结束正丁醇部位低剂量组（NBAl）、乙醇部位低剂量组（Etl）、乙醇部位高剂量组（Eth）、水煎液低剂量组（Wl）的体重均高于模型组（M）；乙酸乙酯部位高剂量组（EACh）、正丁醇部位高剂量组（NBAh）、水煎液高剂量组（Wh）的体重与模型组基本持平。

### 4 小结

模型组小鼠尿素氮、血肌酐含量显著高于空白组，表明造模成功（p<0.01）。乙酸乙酯低剂量组（EACl）全部死亡，可见不仅其不仅没有防治作用，反而加速小鼠死亡，具体的作用机制还需要进一步研究。正丁醇低剂量组（NBAl）、乙醇高剂量组（Eth）能够极显著降低小鼠尿素氮含量，表明其能够促进尿素氮的排泄；除正丁醇低剂量组（NBAl）外，其余各组小鼠血肌酐含量与模型组比较均无明显差异，可能是由于血肌酐并非反映肾实质受损的情况的敏感指标。血肌酐含量高出正常值虽多数意味肾脏受损，但是肾实质受损程度并非与血肌酐含量成正相关[[69]](#_bookmark182)。

二次药效试验

根据一次药效试验的结果，可以初步的确定正丁醇部位、乙醇部位为活性部位。将此两个部位做进一步分离，再次活性跟踪。

### 1 材料和仪器

### 1.1 材料

Km小鼠：雄性，体重（20±2 g），购买于吴氏动物在线；金丝草水提物的正丁醇萃取部、乙醇部位；乙醇：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；自制蒸馏水；腺嘌呤：上海东风生物技术有限公司；D101型大孔树脂：天津市海光化工有限公司

### 1.2 仪器

玻璃层析柱（2\*30 cm）：上海亚荣生化仪器厂；其余仪器见一次药效试验1.2。

### 2 实验方法

### 2.1 样品药的制备

“一次药效试验2.1”得到的正丁醇部位、乙醇部位，采用D101大孔树脂各分离成 2

个部分，分别为正丁醇-醇洗脱相、正丁醇-水洗脱相、乙醇-醇洗脱相、乙醇-醇水洗脱相。

#### 2.1.1 大孔树脂分离[[71-73]](#_bookmark184)

1）大孔树脂的前处理与再生

取一定量的D101型大孔树脂湿法装柱，再用乙醇淋洗杂质，控制流速为5 mL·min -1，洗至1 mL洗脱液与2 mL蒸馏水混合澄清为止，再用蒸馏水洗至洗脱液无醇味时即可，最后用水浸泡备用。使用过的大孔吸附柱用95％乙醇洗至流出液变为无色，再用水洗至无醇昧后即可再度利用。树脂经反复使用后，颜色变深，吸附效果下降，用4%HCl浸泡，用水洗至中性，再用4%NaOH浸泡12 h后，用水洗至中性即可。

2）大孔树脂柱的装填

湿法装柱，将预处理好的树脂倒入层析柱中，打开阀门，控制流速为5 mL·min -1，用洗耳球轻轻敲打层析柱，待其慢慢沉淀压实。

3）正丁醇部位上样与洗脱

将正丁醇部位浸膏，用水溶解，超声，过滤，澄清滤液加入D101大孔树脂层析柱，控制上柱流速1 mL·min -1，待上样完全，经水洗脱，洗脱流速控制为2 mL·min -1, Molish检测呈阴性，浓缩得到正丁醇部位-水洗脱为正丁醇水相；再分别用10%、20%、30%、40%、

50%、70%乙醇洗脱，洗脱流速控制为2 mL·min -1，合并乙醇梯度洗脱部位，浓缩得到正丁醇部位-乙醇洗脱为正丁醇醇相。

4）乙醇部位上样与洗脱

将乙醇部位浸膏，用水溶解，超声，过滤，澄清滤液加入D101大孔树脂层析柱，控制上柱流速1 mL·min -1，待上样完全，经水洗脱，Molish检测呈阴性，浓缩得到乙醇部位-水洗脱为乙醇水相；再分别用10%、20%、30%、40%、50%、70%乙醇洗脱，洗脱流速控制为2 mL·min -1，合并乙醇梯度洗脱部位，浓缩得到乙醇部位-乙醇洗脱为乙醇醇相。

### 2.2 动物分组

将上述造模成功动物组别分别进行编号：空白组（A）、正丁醇醇相低剂量组（B）、正丁醇醇相高剂量组（C）、正丁醇水相低剂量组（D）、正丁醇水相高剂量组（E）乙醇醇相低剂量组（F）、乙醇醇相高剂量组（G）、乙醇水相低剂量组（H）、乙醇水相高剂量组（I）、模型组（J）

### 2.3 其他方法步骤

动物模型制备，给药剂量，给药方法，血样采集与生化分析见一次药效试验2.2-2.4。

### 3 结果

### 3.1 大孔树脂分离

大孔树脂吸附样品后，经水洗脱后不宜直接采用乙醇洗脱，需采用不同浓度的乙醇梯度洗脱，才可将样品尽可能的完全洗脱。将梯度洗脱下的样品合并为乙醇醇相样。

### 3.2 实验过程动物一般状态

第3 d开始造模组小鼠出现多饮、多尿、进食量逐渐减少，精神萎靡不振，耳廓苍白，眯眼，眼睑浮肿，尾巴湿冷，活动量减少，日益消瘦，毛色干枯；出现个别死亡；第5 d尿量开始逐渐减少，但是体重没有明显减轻，没有出现死亡。实验过程中乙醇醇相低剂量组

（F）和正丁醇醇相高剂量组（C）一般状态好于模型组。空白组一般状态明显好于造模组，活动较多，饮食、饮水正常，体重增长较快。

### 3.3 小鼠Th化指标

表 3-1 小鼠尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）含量变化

Tab. 3-1 The content of mice’s BUN and SCr

| 组别 | N | Bun(mmol·L-1) | Scr(umol·L-1) |
| --- | --- | --- | --- |
| 模型组（J） 空白组(A)  正丁醇醇相低(B) 正丁醇醇相高(C) 正丁醇水相低(D) 正丁醇水相高(E) 乙醇醇相低(F) 乙醇醇相高(G) 乙醇水相低(H)  乙醇水相高(I) | 6  3  6  5  6  6  5  5  6  6 | 14.2750±2.7620  9.7467±1.1318\*\*  12.6267±3.1996  13.5560±6.8023  12.6267±5.2935  15.1533±1.8873  8.9280±1.3514\*\*  10.7520±3.4952  11.7117±2.1792  13.0750±2.4155 | 67.0217±9.8743  41.4000±6.5410\*\*  55.6680±3.6997\*  57.3314±11.9315  68.6383±16.3424  75.9367±15.1212  53.4833±7.6625\*  53.6940±8.6381\*  61.3851±9.7282  68.1817±9.7596 |

注：\*\*指与模型组比较，差异性极显著；\*指与模型组比较差异性显著

如表3-1所示，空白组与模型组有极显著差异（p<0.01），表明造模成功；在降低尿素氮方面只有乙醇醇相低剂量组（F）与模型组相比有极显著差异；正丁醇醇相低剂量组（B）、乙醇醇相低剂量组（F）、乙醇醇相高剂量组（G）在降低血肌酐方面与模型组比较有显著差异（p<0.05）。

### 3.4 各组小鼠体重变化

表3-2 小鼠体重（g）变化

Tab. 3-2 The body weight of mice

| 组别 | N | 造模后 | 5 天 | 17 天 | 21 天 | 25 天 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型组 | 6 | 28.30±3.51 | 33.32±1.03 | 35.13±2.77 | 34.55±1.35 | 34.70±1.18 |
| 正醇低 | 6 | 28.32±2.88 | 31.20±3.02 | 36.58±4.48 | 37.14±3.65 | 36.74±3.80 |
| 正醇高 | 6 | 29.10±2.47 | 34.96±2.75 | 35.85±3.58 | 37.17±4.90 | 39.68±3.37\* |
| 正水低 | 6 | 29.53±2.23 | 32.56±2.05 | 36.91±3.20 | 32.55±3.67 | 37.88±4.27 |
| 正水高 | 6 | 28.07±1.24 | 32.61±2.06 | 34.80±5.04 | 33.86±3.98 | 33.25±5.56 |
| 乙醇低 | 6 | 29.40±1.84 | 35.84±2.47\* | 38.86±2.72\* | 40.23±3.40\* | 39.13±3.84\* |
| 乙醇高 | 6 | 27.80±1.25 | 33.34±3.20 | 35.28±5.40 | 35.22±4.44 | 35.60±3.21 |
| 乙水低 | 6 | 27.48±2.23 | 31.95±3.46 | 36.18±1.90 | 34.40±1.38 | 35.80±0.84 |
| 乙水高 | 6 | 27.18±2.30 | 27.52±3.64 △ | 32.52±4.12 | 28.66±4.66 △ | 34.33±5.06 |

注：\*\*指与模型组比较，体重差极显著高于模型组；\*指与模型组比较，体重显著高于模型组；

∆指与模型组比较，体重显著低于模型组

如表3-2所示乙醇水相低剂量组（H）、乙醇水相高剂量组（I）、正丁醇水相低剂量组（D）小鼠体重变化波动起伏较大，乙醇醇相低剂量组（F）、正丁醇醇相高剂量组（C）小鼠体重呈平稳上升趋势，其余各组体重变化较为平缓。

### 4 小结

将正丁醇部位经大孔树脂分离成乙醇洗脱部位和水洗脱部位后，在降低尿素氮方面两个部位的高低剂量组与模型组比较均无显著差异性，可能分离后的两个部位存在一定程度的协同作用；乙醇部位经大孔树脂分离成醇洗部位和水洗部位后，其乙醇醇相低剂量组不仅保留良好的降低尿素氮作用，而且还表现出良好的降低血肌酐的作用，推测可能经分离的两个部位不存在着协同作用；同时，在降低尿素氮有极显著差异上由“一次药效实验”的高剂量转为低剂量，则说明乙醇醇相和乙醇水相之间可能存在着拮抗作用。

# 第五章 D101大孔树脂富集金丝草总黄酮工艺研究

经上述分部分离、动物实验表明正丁醇部位有较之其他部位更好的降低小鼠模型血肌酐、尿素氮活性作用。正丁醇部位成分含有较多的黄酮类物质。大孔吸附树脂兼具极性吸附和分子筛分离原理，目前，已较多地应用于中草药化学成分的富集，资料显示D101大孔树脂对黄酮类成分具有良好的吸附解析性能[[70]](#_bookmark183)。本文采用D101大孔树脂对金丝草总黄酮分离纯化的主要影响因素进行了实验考察，优化了分离纯化工艺条件，为开发利用金丝草黄酮提供了实验依据。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

RE-52AA旋转蒸发器：上海亚荣生化仪器厂；SHB- III循环水式多用真空泵：郑州长城科工贸有限公司；DBS-160F电脑自动部份收集器：上海精科实业有限公司；BSA1245电子天平：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；WFZ UV-20000型紫外可见分光光度计：尤尼科（上海）仪器有限公司；电子调温电炉：江阴市保利科研器械有限公司；玻璃层析柱（2\*30 cm）；冷冻干燥机；KQ2500B超声波清洗器：昆ft市超声仪器有限公司；

### 1.2 材料

金丝草：购买于福州西洪路中草药店；芦丁标准品：国药集团化学试剂有限公司；D101大孔树脂：天津市海光化工有限公司；亚硝酸钠（NaNO2）、硝酸铝(Al(NO3) 3)、氢氧化钠（NaOH）、无水乙醇（CH3CH2OH），均为分析纯试剂：国药集团化学试剂有限公司；

D101型大孔树脂：天津市海光化工有限公司；自制蒸馏水

## 2 方法

### 2.1 标准曲线的绘制[[71](#_bookmark184)]

精确称取干燥至恒重的芦丁标准品，用30%乙醇溶解并定容100 mL，配得浓度为0.2 mg·mL -1标准溶液。分别取芦丁标准溶液0，1.0，2.0，4.0，6.0, 8.0 mL于6只25 mL的比色管中，用30%乙醇补充至12.5 mL，加入0.7 mL质量分数5% NaNO2溶液摇匀，放置5 min后加入0.7 mL 10%Al(NO3) 3溶液，6 min后加入5 mL4%NaOH溶液，混匀，用30%乙醇稀释至刻度，静置l0 min。在紫外分可见光光度计上于200-600 nm扫描。在510 nm吸收波长下，以浓度（C）与吸光度（A）绘制标准曲线。

### 2.2 金丝草供试液的制备

称取200 g的金丝草，加20倍量蒸馏水浸泡0.5 h，以1000 w·h -1煎煮0.5 h，再用500

w・h -1煎煮0.5 h，如此二次，合并水煎液，浓缩得浓缩液。再用石油醚萃取，除去脂溶性色素等干扰性物质。

### 2.3 树脂的预处理

大孔树脂预处理见“二次药效试验2.1.1”

### 2.4 树脂的静态吸附与解析[[72](#_bookmark185), [73](#_bookmark186)]

称取一定量预处理好的树脂于250 mL锥形瓶中，加入已配制的一系列不同浓度的水煎液50 mL，置于摇床上震荡3 h，再静置12 h，待充分吸附后过滤，按2.1项测定滤液黄

酮的含量，计算出吸附量。将过滤后的树脂抽干，置250 mL的锥形瓶中，加入30 mL 70%

的乙醇置于摇床上震荡3 h，静置1 h，过滤，滤液用30%乙醇定容至50 mL容量瓶中，按

2.1项测定黄酮含量，计算解析率。

### 2.5 树脂的动态吸附[[74,](#_bookmark187) [75](#_bookmark188)]

#### 2.5.1 上样浓度考察

称取5份相同量上述预处理好的D101大孔树脂（5 g）装柱，配制5个不同浓度的上样液各30 mL，控制在一定的流速下进行动态吸附，然后按2.1项测定流出液中总黄酮含量，以上样液浓度为横坐标，树脂吸附的总黄酮量为纵坐标作图。

#### 2.5.2 上样量考察

配制上样液浓度为510 mg·L -1，称取预处理的树脂5 g，装柱，控制在一定流速下进行

动态吸附，分段收集流出液，每份5 mL，收集20份，按照2.1项测定吸光度，计算出每份中总黄酮含量，然后以收集试管序号为横坐标，每份中总黄酮含量为纵坐标绘制泄露曲线。

#### 2.5.3 上样速度考察

称取3份预处理好的树脂（2.5 g），装柱；配制3份50 mL浓度为510 mg·L -1的上样液，分别以0.5 ml·min-1、1 ml·min-1、2 ml·min-1的流速进行动态吸附，按照2.1项测定流出液中总黄酮含量，算出树脂吸附量，确定上样流速

#### 2.5.4 动态解析[84-86]

##### **3.2.4.1** 洗脱剂浓度的考察

量取50 ml 510 mg·L -1的上样液以1 ml·min-1的流速加入装有经预处理好的2.5 g树脂色谱柱上进行动态吸附。吸附后平衡1 h，同等流速下先用适量蒸馏水洗脱（Molish反应阴性），再依次用10%、30%、40%、50%、60%、70%乙醇洗脱，收集各浓度乙醇洗脱部部份，按2.1项测定吸光度，计算各部份总黄酮含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 树脂的静态吸附与解析[[78-80]](#_bookmark191)

D101大孔树脂对金丝草总黄酮具有良好吸附和解析性能，结果如表3-1：

表3-1 D101树脂对金丝草总黄酮吸附解析率

Tab. 3-1 The adsorption and resolution of D101 resin for*Pogonatherum crinitum* flavonoids

| 吸附量（mg·g -1） | 吸附率（%） | 解析率（%） |
| --- | --- | --- |
| 1.862  0.927  0.621  0.466  0.367 | 94.4  94.0  94.4  94.5  93.2 | 85.7  84.2  82.3  84.0  85.0 |

注：吸附率=(初始浓度-吸附后浓度) /初始浓×100%；解析率= (洗脱液浓度×洗脱液体积) / (初始浓度-吸附后浓度) /吸附液体积×100%。

### 3.2 树脂的动态吸附[81-83]

#### 3.2.1 上样浓度考察

在上样液体积固定，上样流速一定的情况下，当上样液浓度逐渐增大时，树脂吸附金丝草总黄酮的量不断增加，当上样液浓度超过530 mg·L-1时，吸附的总黄酮量不再增加，树脂柱容量达到饱和状态，吸附率明显降低。所以用D101大孔树脂富集总黄酮时，上样浓度以400 mg·L-1-530 mg·L-1为较佳。结果如图3-1：

**200**

**1 50**

**1 00**

吸附量

**50**

**0**

**0** **200** **400** **600** **800**

上样浓度（mg/L）

上样浓度对吸附量的影响

Fig. 3-1 Effect of sample concentration on the adsorption capacity

#### 3.2.2 上样量考察

当树脂量一定时，增加上柱样品量，由于吸附不完全，过柱后流出液中总黄酮含量会随着上样量增加而逐渐增加，导致树脂的吸附选择性变差，同时还会造成总黄酮的流失。所以上样量与树脂量要遵循合理的比例原则，从泄露曲线可以看出，金丝草总黄酮从第10份开始泄露趋势趋于稳定，故确定最大上样量为50mL**。**结果如图3-2：

**25**

**20**

**15**

吸附量（mg）

**10**

**5**

**0**

**0** 5 **10** 15 **20** **25**

试管序号上样量考察

Fig. 3-2 Effect of sample capacity on the adsorption capacity

#### 3.2.3 上样速度考察

树脂吸附总黄酮的量随着上样流速的增大而减小，说明流速越大，对金丝草总黄酮吸附越不充分，吸附性能下降，但流速过慢，会大大降低工作效率，当流速分别为0.5 ml·min-1

和1 ml·min-1这两种情况下，黄酮的吸附量相差不大，因此本试验选择上样流速1 ml·min-1

上样流速。结果如图3-3：

**310**

**290**

**270**

**250**

吸附量（mg）

**230**

**210**

**1 90**

**1 70**

**1 50**

**0** **0.5** **1** 1**.5** **2** **2.5**

流速（mL/min）上样流速对吸附量的影响

#### 3.2.4 动态解析[84-86]

Fig. 3-3 Effects of velocity review of adsorption capacity

##### **3.2.4.1** 洗脱剂浓度的考察

金丝草总黄酮主要集中在30%洗脱液中，当用50%乙醇洗脱时仍然能够洗脱出黄酮且基本可以全部洗脱下来。为了避免溶剂的浪费，不宜直接就用50%的乙醇洗脱，应先用30%乙醇洗脱，再用50%乙醇洗脱直至完全洗脱。

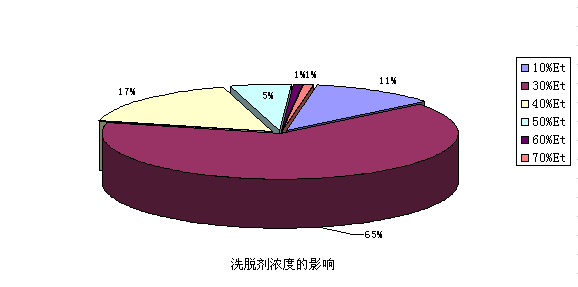


Fig. 3-4 Content review of elution concentration

## 4 结论

通过静态吸附实验得出D101大孔树脂对金丝草总黄酮具有良好的吸附和解析性能，适合用来富集金丝草总黄酮。通过动态吸附实验得出D101大孔树脂富集金丝草总黄酮的较佳工艺条件为：上样浓度为400 mg·L -1-530 mg·L -1，生药量：树脂量比为1: 2，上样流速为1 ml·mi n-1，洗脱剂为30%乙醇。

大孔树脂吸附分离技术作为一项新的技术，在国外已广泛被使用，在我国70年代末开始将其应用于中草药成分的提取分离。与传统的提取技术和分离技术相比，大孔树脂具有可重复利用性，污染少等等独特的优势，在生产研究中越来越被广泛地使用，它是对提取工艺影响最大、带动面最广的技术之一[[76]](#_bookmark189)。

# 第六章 金丝草活性部位化学成分分析正丁醇部位成分分析

上述“一次药效试验”表明，水提物中正丁醇萃取部位和乙醇部位为活性部位，二次药效试验结果显示，经分离会造成活性作用下降，因此不再进行活性跟踪试验，选择对活性部位的化学成分分析。由第四章成分初步检识提示，正丁醇部位可能含有黄酮类，皂苷类，多酚类。资料显示硅胶作为最为常用色谱层析填料，价格便宜，使用方便广泛，并且对黄酮类、皂苷类成分也具有良好的分离作用。因此选用硅胶作为正丁醇部位化学成分初步探索的填料。经硅胶开口柱层析后得到的部位，通过中压制备色谱分离得到相对单一的化合物。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

金丝草水提物的正丁醇萃取部位（本实验室前期制备见一次药效试验2.1）；乙腈（色谱纯，Merck），甲醇（色谱纯，Merck）；磷酸：（分析纯，国药集团化学试剂有限公司），哇哈哈纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；甲醇、乙醇、氯仿、正丁醇（均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；薄层硅胶GF254（化学纯，青岛海洋化工有限公司）；柱层析硅胶（100-200目，试剂级，青岛海洋化工厂分厂）

### 1.2 仪器

旋转蒸发仪：型号RE-52AA，上海亚荣生化仪器厂；SHB- III循环水式多用真空泵：郑州长城科工贸有限公司；BSA1245电子天平：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；WFZ UV-20000型紫外可见分光光度计：尤尼科（上海）仪器有限公司；电子调温电炉：江阴市保利科研器械有限公司；KQ2500B超声波清洗器：昆ft市超声仪器有限公司；Agilent 1260液相色谱仪：安捷伦科技有限公司；DAD检测器：安捷伦科技有限公司；Agilent TC-C18：安捷伦科技有限公司；Spursil C18-EP：迪马科技；中压制备色谱仪：西化仪（北京）科技有限公司；中压制备C-18柱：西化仪（北京）科技有限公司

## 2 实验方法

### 2.1 正丁醇萃取部位的制备

本实验以前期工作已证明的活性部位即“金丝草水提液正丁醇萃取部位”为研究对象，其制备方法于前期实验相同，见一次药效试验2实验方法。

### 2.2 正丁醇萃取部位分离纯化过程

#### 2.2.1 大孔树脂分离

大孔树脂分离方法见一次药效试验2.1.1。经大孔树脂吸附，乙醇梯度洗脱分别得到10%乙醇洗脱部位（a）5 g，20%乙醇洗脱部位（b）6.5 g，30%乙醇洗脱部位（c）7.7 g，40%乙醇洗脱部位（d）5 g，50%乙醇洗脱部位（e）5 g。

#### 2.2.2 硅胶层析分离[[77,](#_bookmark190) [78]](#_bookmark191)

（1）上样硅胶的制备

称取正丁醇部位的30%乙醇洗脱部位4.5 g，置于瓷杯中，用少量的甲醇溶解。另外称取柱层析硅胶（5.5 g），将硅胶加入到瓷杯中，于通风橱中充分搅拌，挥干液体研成细粉状。

（2）硅胶柱的装填

采用的规格为4\*100cm。在层析柱的下方垫上一层脱脂棉花，防止填料漏出。用胶皮管和铁夹封号下管口。向层析柱中加入三氯甲烷，用长玻璃棒压实，排出气泡。称取300 g层析硅胶，加入适量三氯甲烷，搅拌混匀，超声排出气泡。后用玻璃棒引流导入已经装好的玻璃层析柱中。继续加入氯仿，打开下管口，使硅胶沉降压实。

（3）上样

保证硅胶柱上方的三氯甲烷液体有一定高度。将（1）中获得的样品缓慢加入层析柱中，沉降大约0.5 h后，形成深色的上样硅胶层。

（4）洗脱

打开螺旋夹，分别经氯仿-甲醇-水（10:2:1），氯仿-甲醇-水（10:3:1），氯仿-甲醇-水

（10:5:1），氯仿-甲醇-水（10:10:1）洗脱，氯仿-甲醇-水三相混合后，如有分层取上层，一个梯度洗脱至基本无色再换小一个梯度洗脱，每50mL收集一份，薄层跟踪检测，合并相同馏分，分别得到e1、e2、e3、e4、e5、e6、e7七个部位。

（5）40%乙醇部位洗脱

40%乙醇部位的上样硅胶制备、硅胶柱的装填、上样、与上述一样，洗脱过程分别经氯仿-甲醇（5:1），氯仿-甲醇-（3:1），氯仿-甲醇（2:1），氯仿-甲醇（1:1），甲醇，30%

甲醇梯度洗脱，每25 mL收集一份，薄层跟踪检测，合并相同馏分，分别得到d1、d2、d3三个部位。

（6）50%乙醇部位洗脱

50%乙醇部位的上样硅胶制备、硅胶柱的装填、上样、与上述一样，洗脱过程分别经氯仿-甲醇（5:1），氯仿-甲醇（3:1），氯仿-甲醇（2:1），氯仿-甲醇（1:1），甲醇梯度洗脱，每25 mL收集一份，薄层跟踪检测，合并相同馏分，分别得到e1、e2、e3、e4、e5、e6、

e7、e8八个部位。

正丁醇部位分离流程图：

金丝草（*Pogonatherum crinitum*）

热水提取

依次以乙酸乙酯、正丁醇萃取、乙醇沉淀

水提取物

乙酸乙酯部位正丁醇部位乙醇部位

大孔树脂柱层析，水/乙醇洗脱

a、b c d

氯仿-甲醇-水梯度洗脱

**c.1-2 c.3-5 c.6-7 d.2 d.3**

e

**e.1-2 e 3-4 e 5-8**

MPLC MPLC

**CXC-Ⅱ-7-1～4 CXC-Ⅱ-8-1～3**

Isolation Proeedureof *Pogonatherum crinitum*n-butyl alcohol parts

#### 2.2.3 中压制备分离及液相检测结果

##### 2.2.2 硅胶层析分离得到的c3、c4、c5、e3、e4、在试验过程通过薄层检测，认为纯度相对较高作为中压制备分离部位，分别将其配制成浓度约为800 mg/mL上样，以氯仿-甲醇梯度洗脱，洗脱流速为8mL﹒min-1，检测波长为220 nm。经中压制备分离后收集相应的峰，液相检测分析，结果如下图所示

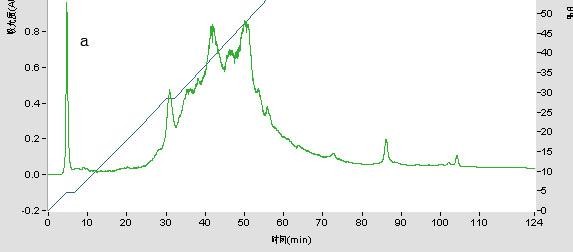


图2-1 c3 Fig.2-1 c3



图2-2 CXC-Ⅱ-7-1

Fig. 2-2 CXC-Ⅱ-7-1

如图2-2为图2-1中a峰收集得到。HPLC色谱条件：20%-80%甲醇梯度洗脱，洗脱时间为65min，检测波长为220nm。



图2-3 c4

Fig. 2-3 c4



图.2-4 CXC-Ⅱ-7-2

Fig. 2-4 CXC-Ⅱ-7-2

如图2-4为图2-3中b峰收集得到；HPLC色谱条件：20%-80%甲醇梯度洗脱，洗脱时间为80min，检测波长为220nm。



图2-5 c5 Fig.2-5 c5



图2-6 CXC-Ⅱ-7-3



Fig. 2-6 CXC-Ⅱ-7-3

图2-7 CXC-Ⅱ-7-4

Fig. 2-7 CXC-Ⅱ-7-4

如图2-6、2-7分别为图2-5中c、d峰收集得到；HPLC色谱条件：20%-80%甲醇梯度洗脱，洗脱时间为80min，检测波长为220nm。



图2-8 e3 Fig.2-8 e3



图2-9 CXC-Ⅱ-8-1

Fig. 2-9 CXC-Ⅱ-8-1

如图2-9为图2-8中e峰收集得到；HPLC色谱条件：30%-80%甲醇梯度洗脱，洗脱时间为80min，检测波长为220nm。





图2-10 e4 Fig.2-10 e4

图2-11 CXC-Ⅱ-8-2 Fig.2-11 CXC-Ⅱ-8-2



图4-12 CXC-Ⅱ-8-3 Fig.4-12 CXC-Ⅱ-8-3

如图2-11、2-12分别为图2-10中f、g峰收集得到；HPLC色谱条件：20%-80%甲醇梯度洗脱，洗脱时间为80min，检测波长为220nm。

4小结

正丁醇萃取部位采用正相硅胶初步分离，然后再经中压制备色谱分离，得到几个较高纯度物质，但是并无实现“全成分”分离。首先由于正丁醇部位所含的化合物极性偏大，不容易从正相硅胶柱上洗脱，可能造成较为严重的死吸附，损失的成分较多。再次，中压制备色谱仪的进样系统为手动，不能够较好的控制，样品很容易在进样口溢出，造成损失

[[79]](#_bookmark192)。

乙醇部位成分分析

正丁醇部位化学成分分离结果显示，成分死吸附严重，分离效果并不理想。乙醇部位化学成分相较正丁醇部位而言，成分的极性可能更大，如果采用硅胶作为层析填料，更加容易造成死吸附。ODS是十八烷基硅烷键合硅胶填料，有较高的碳含量和更好的疏水性，对大极性化学物有更强的适应能力，因此选用ODS作为层析填料，进行乙醇部位成分分离。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

金丝草乙醇部位（本实验前期制备见）；D101大孔树脂（天津市海光化工有限公司）；反相薄层硅胶（化学纯，北京慧德易科技有限责任公司）；反相硅胶（化学纯，北京慧德易科技有限责任公司）；甲醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；氯仿（分析纯，国药集团化学试剂有限公司，批号：20050412）

### 1.2 仪器

RE-52AA旋转蒸发器：上海亚荣生化仪器厂；SHB- III循环水式多用真空泵：郑州长城科工贸有限公司；BSA1245电子天平：赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；WFZ UV-20000型紫外可见分光光度计：尤尼科（上海）仪器有限公司；电子调温电炉：江阴市保利科研器械有限公司；KQ2500B超声波清洗器：昆ft市超声仪器有限公司；Agilent 1260液相色谱仪：安捷伦科技有限公司；DAD检测器：安捷伦科技有限公司；SP-120-C18-AP (4.6mm\*250mm, Global Chromatography Co., Ltd)

## 2 实验方法

本实验以前期工作已证明的活性部位即“金丝草水提液80%乙醇沉淀后离心得到的上清液部分”为研究对象，其制备方法见“一次药效试验-2实验方法”。将乙醇部位浸膏（38.2

g），用水溶解，超声，液加入D101大孔树脂层析柱，控制上柱流速1 ml·min-1 ，待上样完全，经水洗脱，Molish反应检测呈阴性再分别用10%乙醇、30%乙醇、50%乙醇洗脱，洗脱流速控制为2 ml·min-1，分别得到水洗脱部分（CXC-Ⅲ-4-1）20 g、10%乙醇洗脱部分

（CXC-Ⅲ-4-2）2 g、30%乙醇洗脱部分（CXC-Ⅲ-4-3）7.7 g、50%乙醇洗脱部分（CXC-Ⅲ-4-4）5 g、CXC-Ⅲ-4-3用甲醇沉淀，得到溶于甲醇部分（CXC-Ⅲ-5-1）3 g。

称取30%乙醇部位（CXC-Ⅲ-5-1）0.6 g经ODS柱层析，水/甲醇(80:20-0:100)梯度洗脱，经TLC分析合并，最后得到10个馏分。馏分3-6经反复ODS柱色谱进行分离纯化，分离得到化合物CXC-Ⅲ-6-1(l0.3 mg)，CXC-Ⅲ-6-2(8.5 mg)，CXC-Ⅲ-6-3(6.7 mg)。

称取50%乙醇洗脱部分（CXC-Ⅲ-4-4）1 g经ODS柱层析，水/甲醇(100:0-0:100)梯度洗脱，经TLC分析合并，最后得到5个馏分。馏分3-4经反复ODS柱色谱分离纯化，分离得到化合物CXC-Ⅲ-7-1(2.6 mg)，CXC-Ⅲ-7-2(6.6 mg)，CXC-Ⅲ-7-3(1.2 mg)，CXC-Ⅲ-7-4(3.1 mg)。

乙醇部位分离流程图：

金丝草（*Pogonatherum crinitum*）

热水提取

水提取物

依次以乙酸乙酯、正丁醇萃取、乙醇沉淀

乙酸乙酯部位正丁醇部位乙醇部位

大孔树脂柱层析，水/乙醇洗脱

水洗脱部位10%乙醇部位30%乙醇部位50%乙醇部位

ODS柱，甲醇-水洗脱ODS柱，甲醇-水洗脱

**Fr.1-2 Fr.3-6 Fr.7 Fr.1-2 Fr.3-4 Fr.5**

ODS柱，甲醇-水洗脱ODS柱，甲醇-水洗脱

**CXC-Ⅲ-6-1～3 CXC-Ⅲ-7-1～4**

Isolation Proeedure of *Pogonatherum crinitum* ethyl acetate parts

## 3 高效液相检测

将分离得到的化合物经高效液相检测，检测条件：0-20 min，20-25%乙腈梯度洗脱，检测波长254 nm，流速0.5 ml·min -1。结果如下图：



图3-1 CXC-Ⅲ-6-1

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-6-1



图3-2 CXC-Ⅲ-6-2

50

40

30

20

10

0

2.5

5

7.5

10

12.5

15

17.5

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-6-2

7

图3-3 CXC-Ⅲ-7-1

2.905

3.925

7.503

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-7-1



图3-4 CXC-Ⅲ-7-2

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-7-2



图3-5 CXC-Ⅲ-7-3

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-7-3



图3-6 CXC-Ⅲ-7-4



Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-7-4

图3-7 CXC-Ⅲ-7-5

Fig. 3-1 CXC-Ⅲ-6-1

## 4 小结

金丝草水提物经过“一次药效试验2”处理得到的乙醇部位，其极性较大，用吸附硅胶分离，势必造成严重的死吸附。ODS柱色谱分离克服了死吸附严重的问题，能够很好的将化合物洗脱；洗脱剂一般为甲醇-水，避免了氯仿、二氯甲烷等有毒有机溶剂的大量使用。如上图所示，样品只经过开口ODS柱色谱分离就得到较纯净的化合物。因此，不宜用吸附硅胶分离，应采用反相硅胶色谱分离。

# 第七章 总结与展望

本实验是建立在金丝草临床用药方法，即水煎煮口服给药，因此金丝草水提取是前提，灌胃给药方式进行活性跟踪是关键。本文在活性跟踪试验上得到了较好的试验结果，但需要更加全面的进行动物模型与给药动物的比较，如肾脏质量的变化，肾脏切片的制备与分析。在有效部位成分分析上遇到了较大的困难，可能是由于水的极性大以及物质溶解的相对性，所以经水煎后得到的浸膏所含的化合物类型广、数量多，选择正相硅胶作为填料时，死吸附严重，分离效果差。经过不断的摸索，选择大孔树脂作为成分分离的填料。大孔吸附树脂相较硅胶而言，极容易吸附解析，最大程度的保证了成分的不损失。再者，反相硅胶（ODS）可作为本实验的分离纯化填料，由于其特殊的结构，使其具有独特的优势，分离效果好，但是其费用昂贵，限制了使用的普遍性。根据试验经验及文献资料，推测葡聚糖凝胶-LH-20也可作为本实验的分离填料。

由于试验条件及时间的限制，本实验分离得到较高纯度物质，还未进一步证实其明确的活性作用。同时，在活性试验确定的前提下需要对化合物的结构进行鉴定，通常在色谱分离的基础上结合质谱法，紫外、红外光谱法以及核磁共振法分析鉴定。

此外，本实验希望结合数学方法，引入计算机软件分析，如聚类分析。聚类分析能有效的对中药成分分析得到的指纹图谱数据进行深层次的挖掘，研究其潜在的关系，从计算机数据分析的角度研究中药成分的有效性，达到其检测的目的。

参考文献：

[1]谢宗万，梁爱华．全国中草药汇编[M]．人民卫生出版社：1996．

[2]张兴．《本草纲目》“金丝草” 考证[J]．时珍国药研究，1996, 7(2)：67-68．

[3]谢宗万．本草纲目拾遗[J]．中国中药杂志，2000, 25(1)：49-49．

[4]王秀芳．复方金丝草对大鼠慢性肾衰治疗作用的研[D]．福建农林大学：2007．

[5]赵桂琴．素馨花化学成分及抗HBV 活性的研究[J]．北京： 军事医学科学院放射与辐射医学研究所：

2008．

[6]赵桂琴，刘丽艳，毛晓霞，*et al*．金丝草黄酮醇苷类化学成分研究[J]．中国新药杂志，2011, 20(5)：467-470．

[7] Zhu D, Yang J, Deng X-T*, et al*．A new<i> C </i> -glycosylflavone from<i> Pogonatherum crinitum </i>[J]．Chinese Journal of Natural Medicines, 2009, 7(3)：184-186．

[8]陈国伟，李鑫，史志龙，*et al*．金丝草脂溶性化学成分研究[J]．承德医学院学报，2010, 27(002)：216-217．

[9]江苏新，医学院．中药大辞典[J]．上海： 上海人民出版社，1977, 754．

[10]陈民胜，张学鉴，陈峰．淡竹叶辅佐治疗多发性骨髓瘤16 例报告[J]．中原医刊，1999, 26(7)：12-12．

[11]陈沛林，王新元，杨静．玉米须煎剂治疗泌尿系结石[J]．临床肾脏病杂志，2009, 9(1)：35-35．

[12] Velazquez D, Xavier H, Batista J*, et al*．<i> Zea mays </i> L. extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats[J]．Phytomedicine, 2005, 12(5)：363-369．

[13]于庆海，杨丽君．白茅根药理研究[J]．中药材，1995, 18(2)：88-90．

[14]焦坤，陈佩东，和颖颖，*et al*．白茅根研究概况[J]．江苏中医药，2008, 40(1)：91-93．

[15] Farsi DA, Harris CS, Reid L*, et al*．Inhibition of non‐enzymatic glycation by silk extracts from a Mexican land race and modern inbred lines of maize (Zea mays)[J]．Phytotherapy Research, 2008, 22(1)：108-112．

[16]李明静，邱永宽，刘绣华，*et al*．化学发光法测定几种天然产物的抗自由基活性[J]．化学研究，2003，

14(3)．

[17]方敏，宫智勇，王耀峰．玉米须乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J]．中国食物与营养，2008, 4: 45-47．

[18]刘平，段玉峰，肖红，*et al*．玉米须萃取物的抗氧化活性[J]．江苏农业学报，2006, 22(3)：293-296．

[19]柏桦，海春旭，梁欣，*et al*．玉米须提取物清除自由基和抑制脂质过氧化作用[J]．癌变. 畸变. 突变，

2008，20(1)：36-40．

[20]李志洲．淡竹叶多糖的提取及体外抗氧化性研究[J]．中成药，2008, 30(003)：434-437．

[21]钟有添，陈玉帅，毛晓洁，*et al*．玉米须抗菌活性的初步研究[J]．赣南医学院学报，2008, 28(4)：477-478．

[22]陈进军，王建华，耿果霞，*et al*．千里光的化学成分鉴定及体外抗菌试验[J]．动物医学进展，1999, 20（4）：

35-37．

[23]刘晓蓉，张媛媛．淡竹叶提取物抑菌作用的研究[J]．食品科技，2008, 33(12)：211-214．

[24]崔珏，李超，尤健，*et al*．白茅根多糖改善糖尿病小鼠糖脂代谢作用的研究[J]．食品科学，2012, 33（19）：

303．

[25]昌友权，王维佳，杨世杰，*et al*．玉米须提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]．营养学报，2005, 6．

[26]马虹，高凌．玉米须提取物ESM 对K562 和SGC 细胞的作用[J]．南京中医药大学学报，1998，

14(1): 28-29．

[27]吕冬霞，王晓丽，魏凤香，*et al*．玉米须多糖诱导人肝癌SMMC-7721 细胞凋亡的研究[J]．黑龙江医药科学，2006, 29(4)：28-29．

[28] Zhao W, Yin Y, Yu Z*, et al*．Comparison of anti-diabetic effects of polysaccharides from corn silk on normal and hyperglycemia rats[J]．International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(4)：1133-1137．

[29]黄晓巍，王晓婷，衣春光，*et al*．玉米须总黄酮对糖尿病合并心肌缺血大鼠血清中乳酸及糖化血红蛋白含量的影响[J]．吉林中医药，2009, 29(1)：75-76．

[30]李凤林，余蕾．玉米须黄酮的提取及其降糖作用[J]．中国食品添加剂，2009, 3: 121-124．

[31]鲁彦，吴绍宇，姚嵩坡，*et al*．玉米须对老年小鼠细胞免疫功能的影响[J]．中国老年学杂志，2005，

25(11): 1387-1388．

[32]郑鸿雁，闵伟红，昌友权，*et al*．玉米须多糖调节免疫功能研究[J]．食品科学，2004, 25(10)：291-293．

[33]寸磊，熊斌，白丰沛．自茅根对小白鼠细胞免疫功能影响[J]．黑龙江医药科学，2004, 23(2)：17-18．

[34] Costa CA, Kohn DO, de Lima VM*, et al*．The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from<i> Cymbopogon citratus </i>(lemongrass)[J]．Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(1)：828-836．

[35]宋劲诗，陈康．白茅根炒炭后的止血作用研究[J]．中ft大学学报论丛，2000, 20(5)：45-48．

[36] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H*, et al*．Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]．Autophagy, 2012, 8(4)：445-544．

[37]付丽娜，陈兰英，刘荣华，*et al*．白茅根的化学成分及其抗补体活性[J]．中药材，2010(12)：1871-1874．

[38]刘轩，张彬锋，侴桂新，*et al*．白茅根的化学成分研究[J]．中国中药杂志，2012, 37（15）．

[39] Duke SO, Dayan FE．Modes of action of phytotoxins from plants．In: Allelopathy: Springer: 2006，pp．511-536．

[40]徐燕，梁敬钰．玉米须的化学成分研究[J]．中草药，2006, 37(6)：831-833．

[41] LIU X, ZHANG B-F, YANG L*, et al*．Two new chromones and a new flavone glycoside from<i>

Imperata cylindrica </i>[J]．Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(1)：77-80．

[42] Figueirinha A, Paranhos A, Pérez -Alonso JJ*, et al*．<i> Cymbopogon citratus </i> leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols[J]．Food Chemistry, 2008, 110(3)：718-728．

[43] Liu J, Wang C, Wang Z*, et al*．The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (<i> Zea mays </i> L.) and related flavone glycosides[J]．Food Chemistry, 2011, 126(1)：261-269．

[44]张慧恩，徐德平．玉米须黄酮类成分的研究[J]．中药材，2007, 30(2)：164-166．

[45]张靖，王英，张晓琦，*et al*．淡竹叶化学成分研究[J]．中国天然药物，2009, 7(006)：428-431．

[46] Matsunaga K, Shibuya M, Ohizumi Y．Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from Imperata cylindrica[J]．Journal of natural products, 1994, 57(12)：1734-1736．

[47]马长振，陈佩东，张丽，*et al*．UPLC-ESI-MS^ n 法分析白茅根中的化学成分[J]．中成药，2010, 32（4）：

625-628．

[48] Hu A-j, Zhao S, Liang H*, et al*．Ultrasound assisted supercritical fluid extraction of oil and coixenolide from adlay seed[J]．Ultrasonics sonochemistry, 2007, 14(2)：219-224．

[49] Yang J-H, Tseng Y-H, Chang H-L*, et al*．Storage stability of monascal adlay[J]．Food Chemistry, 2005, 90(1)：303-309．

[50] Yu F, Gao J, Zeng Y*, et al*．Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity[J]．Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119(2)：252-258．

[51]肖立峰，张天虹，刘江涛，*et al*．中药薏苡仁酯作用喉癌Hep 一2 细胞的体外研究[J]．哈尔滨医科大学学报，2004, 38(3)：252．

[52]吕燕宁．白茅中多糖物质的分离及其部分免疫刺激作用的研究[J]．国外医学. 中医中药分册，2000, 6：

043．

[53]刘晓飞，刘宁，张娜，*et al*．气相色谱-质谱联用法测定玉米须多糖的单糖组成[J]．食品科学，2012，

33(20): 249．

[54]王英平．玉米须化学成分及其抗氧化作用研究[J]．吉林农业大学博士学位论文，2004, 1303．

[55]熊海涛．微波消解样品-火焰原子吸收光谱法测定淡竹叶中痕量元素[J]．理化检验： 化学分册，2012，

48(001): 58-60．

[56]肖炜，马云，傅江南．慢性肾衰动物模型方法学研究现状[J]．中国实验动物学杂志，2002, 12(3)：176-179．

[57]黄迪，何立群，杨雪军，*et al*．腺嘌呤诱发慢性肾衰模型大鼠内分泌变化的研究[J]．实验动物与比较医学，2008, 2: 010．

[58]李华荣，彭家清，钱宏波．肾灵Ⅱ号片治疗慢性肾衰竭模型大鼠的实验研究[J]．医药导报，2008，

27(12): 1451-1452．

[59]李春雨，孟宪丽，沈晓飞，*et al*．腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭的实验研究[J]．．

[60]刘兰兰，王友群．附子对腺嘌呤造成的小鼠慢性肾衰的疗效及其机制探讨[J]．亚太传统医药，2010，

6(006): 28-30．

[61]高华，张贺龙，楚溪，*et al*．化毒胶囊对腺嘌呤所致慢性肾衰竭小鼠肾功能及病理形态学的影响

[J]．河北中医，2010, 32(007)：1068-1070．

[62] Pang LL, Hou LB, Mei QX*, et al*．[Effects of compound Centella asiatica enema on kidneys coefficient, electrolytes and blood in chronic renal failure rats][J]．Zhong Yao Cai, 2010, 33(5)：775-778．

[63]徐鹏．肾衰保肾胶囊对慢性肾衰竭大鼠肾脏ECM 积聚影响的实验研究[D]．黑龙江中医药大学：

2008．

[64]晏春耕，曹瑞芳．玉竹的研究进展与开发利用[J]．中国现代中药，2007, 9(4)：33-37．

[65]唐得时，中药化学．中药化学：人民卫生出版社：1986．

[66]吴立军，药物化学．天然药物化学：人民卫生出版社：2007．

[67]薛鸿燕．ft丹黄参化学成分及生物活性研究[D]．兰州理工大学：2011．

[68]汤建平．金钮扣的化学成分及紫外鉴别研究[D]．广东药学院：2010．

[69]叶任高，陈裕盛，方敬爱．肾脏病诊断与治疗及疗效标准专题讨论纪要[J]．中国中西医结合肾病杂志，2003, 4(6)：355-357．

[70] Chen NF, Chen K, Zhang L*, et al*．[Study on purification of total flavonoids from Rosa laevigata with macroporous resin column chromatography][J]．Zhong Yao Cai, 2007, 30(8)：1013-1016．

[71] Dong H, Ning Z, Yu L*, et al*．Preparative separation and identification of the flavonoid phlorhizin from the crude extract of Lithocarpus polystachyus Rehd[J]．Molecules, 2007, 12(3)：552-562．

[72]李淑珍，李进，杨志江，*et al*．大孔树脂分离纯化黑果枸杞总黄酮的研究[J]．食品科学，2009, 30(1)：19-24．

[73] Wan C, Zheng X, Chen H*, et al*．[Flavonoid constituents from herbs of Sarcopyramis bodinieri var. delicata][J]．Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2009, 34(2)：172-174．

[74]邓亚宁，谢蓉蓉，杜瑞杰，*et al*．大孔吸附树脂分离纯化鬼针草总黄酮的研究[J]．中国药物与临床，

2008, 8(2)：143-144

[75] Yu DN, Xu DS, Feng Y*, et al*．[Enriching of total flavonoids from Herba Leonuri with polyamide and macroporous resin][J]．Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2008, 33(3)：264-268．

[76] Qu L, Xin H, Su Y*, et al*．Combined application of macroporous resin and high speed counter-current chromatography for preparative separation of three flavonoid triglycosides from the leaves of Actinidia valvata Dunn[J]．J Sep Sci, 2012, 35(7)：883-892．

[77]黄永林，朱廷春，文永新，*et al*．艾纳香化学成分的分离与鉴定[J]．广西植物，2010, 30(004)：560-562．

[78] 姜洪芳, 张玖, 单承莺． 亳菊花中黄酮类化合物的分离鉴定[J]． 中国野生植物资源, 2008, 27(5): 50-52．

[79] Sakulnarmrat K, Konczak I．Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and<i> in vitro </i> inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome[J]．Food Chemistry, 2012．

致**谢**

本论文从选题、方案的设计以及论文的撰写，都是在叶舟老师的悉心指导完成的。在三年的硕士生活中，导师的严谨求真的作风使我受益匪浅，从叶老师那里我不但学到了专业的科研知识，同时懂得了很多做人的道理。我对叶老师的精心培养表示衷心的感谢！

特别感谢师兄吕千、康彦斌，师姐吕杨兰，师妹方振霞、齐清华，师弟罗永亮及实验室的本科生在实验过程中给予我的大力支持、关心和帮助！

天然活性物质研究室及生命科学学院的其他各位老师在我实验完成过程中给予了热心的帮助，在此我向各位老师表示诚挚的谢意！

感谢父母对我的关心支持和爱护，他们以辛勤的劳动和汗水为我创造了三年硕士的学习机会！

最后，向所有关心和支持过我的老师和同学表示感谢！