

[J]. *Phytother Res*, 2018, 32(4): 597-615.

[9] Liu B J, Liu X X, Ning Q, *et al.* Evaluation of toxicity and anti-osteoporosis effect in rats treated with the flavonoids of *Psoraleae Fructus*[J]. *J Funct Foods*, 2020, 75: 104262.

[10] 谭 鹏, 许 莉, 牛 明, 等. 一测多评法同时测定补骨脂中 16 种化学成分的含量[J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3937-3946.

[11] 李啸群, 徐凯航, 纪 方. 补骨脂异黄酮抑制破骨细胞分化缓解小鼠去卵巢骨质疏松[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(2): 186-190.

[12] 季宇彬, 王 敏, 王 姗, 等. 补骨脂二氢黄酮甲醚诱导 HepaRG 细胞损伤机制探讨[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4): 544-550.

[13] 高倩倩, 翁泽斌, 颜翠萍, 等. 补骨脂中 9 种黄酮类化合物的构效关系及对绝经后妇女成骨细胞的增殖、分化活性研究[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(16): 1397-1401.

[14] 李寒冰, 吴宿慧, 牛 明, 等. 中药品质生物评价的历史与发展[J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2809-2816.

[15] 江振作, 王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标志物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究[J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4127-4133.

[16] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.

[17] 岳慧英, 秦亚莉, 李 鹏, 等. 黄芩不同部位黄酮含量及抗氧化活性比较研究[J]. *中药材*, 2020, 43(12): 2901-2904.

[18] 张 姣, 德 吉, 付爱玲, 等. 密枝圆柏的化学成分及其抗补体、抗氧化活性[J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3008-3016.

[19] Gopal L C, Govindarajan M, Kavipriya M R, *et al.* Optimization strategies for improved biogas production by recycling of waste through response surface methodology and artificial neural network: Sustainable energy perspective research[J]. *J King Saud Univ Sci*, 2021, 33(1): 101241.

[20] Berkani F, Dahmoune F, Achat S, *et al.* Response surface methodology optimization of microwave-assisted polysaccharide extraction from Algerian jujube (*Zizyphus lotus* L.) pulp and peel[J]. *J Pharm Innov*, 2020. doi: 10.1007/s12247-020-09475-9.

[21] 于 淼, 王 冰, 付叶珊, 等. 响应面法优化刺五加根废弃物多糖提取工艺的研究[J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1610-1613.

[22] Tsegay Z T. Total titratable acidity and organic acids of wines produced from cactus pear (*Opuntia-ficus-indica*) fruit and *Lantana camara* (*L. camara*) fruit blended fermentation process employed response surface optimization[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(8): 4449-4462.

赶黄草中大环多酚大孔树脂纯化工艺的优化

史鹏杰, 黄豆豆, 徐艾娜, 程嘉希, 董志颖, 孙连娜*
(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: **目的** 优化赶黄草中大环多酚大孔树脂纯化工艺。**方法** 采用静态吸附、解吸附实验对 17 种大孔树脂进行筛选, 并对上样液体积流量、上样液质量浓度、径高比、上样体积、洗脱溶剂体积分数、洗脱液体积进行考察, HPLC 法测定大环多酚含量及其转移率。**结果** 最佳条件为 HPD-400 型大孔树脂, 大环多酚质量浓度 1.60~2.20 mg/mL, 以 2~2.5 BV/h 体积流量通入径高比 1:4 的树脂柱中, 上样 9 BV, 14 BV 40%乙醇洗脱除杂, 收集 10 BV 50%乙醇洗脱部位, 减压浓缩至干, 大环多酚含量可达 65% 以上, 转移率在 50% 以上, 得率为 6.56%。**结论** 该工艺稳定可行, 可用于大孔树脂纯化赶黄草中大环多酚。

关键词: 赶黄草; 大环多酚; 大孔树脂; 纯化工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)01-0197-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.037

收稿日期: 2020-02-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711000); 上海市自然科学基金项目 (13401900106)

作者简介: 史鹏杰 (1995—), 男, 硕士生, 研究方向为中药质量标准。Tel: 18961556366, E-mail: spj950406@163.com

* 通信作者: 孙连娜 (1973—), 女, 副教授, 研究方向为中药品质评价。Tel: (021) 51322211, E-mail: sssnmr@163.com

赶黄草是虎耳草科扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh. 的干燥地上部分,主产于四川古蔺,始载于明代《救荒本草》^[1],其水提取物主要具备抗脂肪肝、抗肝纤维化及治疗和保护肝损伤的作用^[2],还有一定解酒^[3]、降糖^[4]、缓解体力^[5]、抗衰老^[6]的作用。课题组前期研究结果表明,赶黄草中以黄酮苷连接没食子酰基的酚酸类化合物 pinocembrin-7-*O*-[4'',6''-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl]-β-*D*-glucose (PHG)、pinocembrin-7-*O*-[4'',6''-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl-3''-galloyl]-β-*D*-glucose (PGHG)、thonningianin A 具有较强的抗肝纤维化及保肝活性^[7-9],同时三者降糖活性较好^[4],开发前景广阔。大孔树脂作为环保可再生的纯化填料,具有性质稳定、成本低、样品回收率高的特点^[10-12],故本实验以大孔树脂为填料,对赶黄草中大环多酚纯化工艺进行优化,以期为进一步对该该成分的后续开发提供基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);XS105DU、XS104 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Centrifuge5810R 高速台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);N-1300 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社)。

1.2 试剂与药物 PHG(批号 20181117)、thonningianin A(批号 20181103)、PGHG(批号 20181103)对照品均为自制,经 HPLC 归一化法检测其纯度均≥98%。大孔树脂 AB-8、D-101、HPD-400(天津正天成澄清技术有限公司);DM-130、HP-20、HPD-450、HPD-600、HPD-750、BS-30、ABS-21、DA-201(蚌埠市辽源新材料有限公司);sepLite LX-17、sepLite LX-60、sepLite LX-3020、ztc-1、sepLite LX-12、sepLite XDA-8(西安蓝晓科技新材料股份有限公司)。赶黄草由四川新荷花中药饮片有限公司提供,批号 19050701,经上海中医药大学孙连娜副教授鉴定为虎耳草科扯根菜属植物扯根菜 *Penthorum chinense* Pursh. 的干燥地上部分,保存于上海中医药大学中药资源与生物技术研究中心。乙腈为色谱纯(美国赛默飞公司);甲酸为色谱纯(上海麦克林生化科技有限公司);乙醇、甲醇为分析纯(德国 Greagent 公司);水为超纯水。

2 方法与结果

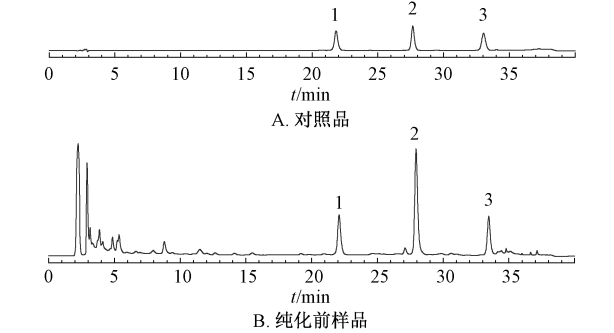
2.1 大环多酚含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取 PHG、PGHG、thonningianin A 对照品适量,80%甲醇制成质量浓度分别为 0.600 8、0.598 4、0.499 2 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取药材适量,80%甲醇溶解制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.5%甲酸(B),梯度洗脱(0~10 min,28%~30% A;10~20 min,30%~36% A;20~22 min,36%~39% A;22~30 min,39%~40% A;

30~35 min,40%~90% A;35~37 min,90%~28% A;37~40 min,28% A);体积流量 1 mL/min;检测波长 280 nm;进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1. PHG 2. PGHG 3. thonningianin A

图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.1.4 线性关系考察 将“2.1.1”项下对照品溶液依次稀释 2、4、10、50、100 倍,在“2.1.3”项色谱条件下进样测定。以各成分质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得 PHG、PGHG、thonningianin A 方程分别为 $Y = 19\,108.510\,7X - 0.055\,4$ ($R^2 = 1.000\,0$), $Y = 22\,849.421\,6X - 2.119\,0$ ($R^2 = 1.000\,0$), $Y = 23\,226.107\,9X + 6.499\,1$ ($R^2 = 1.000\,0$),分别在 6.01~600.80、5.98~598.40、4.99~499.20 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2 上样液制备 根据课题组前期优化所得赶黄草中大环多酚的最优提取工艺提取药材,具体方法为将药材切成 3~5 cm 小段,10 倍量 80%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味(液体体积-药材质量=4:1),向浓缩液中加入适量 95%乙醇,调节体积分数至 30%,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,即得。

2.3 静态吸附性能考察 取预处理好的大孔树脂抽滤,各精密称取 1 g,精密量取 20 mL 质量浓度为 3.85 mg/mL 的上样液,在恒温摇床上 50 r/min、25 ℃振荡吸附 24 h 后抽滤,取滤液,测定大环多酚含量,去离子水清洗树脂 2 次,抽滤至干,精密加入 95%乙醇 40 mL,在相同条件下振荡解吸 24 h,取上清液,测定大环多酚含量,计算吸附率、解吸率、解吸率,公式如下,其中 C_0 为上样液中大环多酚初始质量浓度(mg/mL), C_1 为吸附后上清液中大环多酚质量浓度(mg/mL), C_2 为解吸后上清液中大环多酚质量浓度(mg/mL), V_1 为上样液体积(mL), V_2 为解析溶液体积(mL), W 为树脂质量(g),结果见表 1。综合考虑吸附、解吸效果,选择 HPD-400 型大孔树脂进行动态吸附性能考察。

$$\text{吸附率} = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{W} \times 100\%$$
$$\text{解吸率} = \frac{C_2 \times V_2}{W} \times 100\%$$
$$\text{解吸效果} = \frac{\text{解吸率}}{\text{吸附率}} \times 100\%$$

2.4 吸附考察

表 1 不同型号大孔树脂吸附率、解吸附率测定结果				
类型	型号	吸附率/%	解吸率/%	解吸附效果/%
非极性	D101	51.82	36.82	71.05
	HP-20	48.83	28.75	65.47
	ZTC-1	51.61	20.79	66.79
	LX-60	57.51	34.82	67.18
弱极性	AB-8	50.92	39.45	77.49
	DM-130	31.39	20.02	71.10
	BS-30	32.07	21.37	74.15
中极性	HPD-750	56.38	31.57	62.17
	HPD-400	54.92	44.52	81.08
	HPD-450	45.99	28.77	69.83
极性	HPD-600	38.04	22.93	66.96
	DA-201	28.02	16.71	66.77
	XDA-8	17.09	8.07	53.43
高比表面活性	LX-17	55.64	30.71	61.72
	LX-3020	63.38	36.38	63.75
	LX-12	55.06	33.50	67.67

2.4.1 上样液质量浓度对吸附效果的影响 取“2.3”项下上样液，调节大环多酚总含量为 0.94、1.89、2.83、3.77 mg/mL，分别通入装有处理好的 HPD-400 型大孔树脂 12 g（体积 20 mL）、径高比 1：4 的色谱柱中，调节体积流量为 3.0 BV/h，每 1 BV 为 1 个流分，测定流出液中大环多酚总含量，计算泄漏点（流出液质量浓度为 0.189 mg/mL 时为泄漏点）前吸附率，公式为 吸附率 = $\frac{C_1 \times V_1 - C_2 \times V_2}{W} \times 100\%$ ，其中 C_1 表示上样液质量浓度（mg/mL）， C_2 表示上样流出液质量浓度（mg/mL）， W 表示树脂质量（g）， V_1 表示上样液体积（mL）， V_2 表示上样流出液体积（mL），吸附曲线见图 2。由此可知，随着上样液质量浓度增加，泄漏点逐渐提前，泄漏点前总吸附率呈先升后降的趋势，在质量浓度为 1.60~2.20 mg/mL 时较高，故选择该区间作进一步研究。

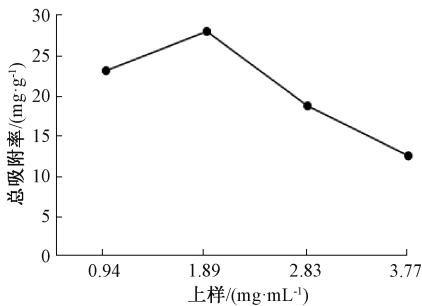


图 2 不同上样质量浓度下吸附曲线

2.4.2 径高比对吸附效果的影响 取“2.3”项下上样液，调节大环多酚总含量为 1.89 mg/mL，将其以 3 BV/h 的体积流量通入装有处理好的 HPD-400 型大孔树脂、径高比分别为 1：4、1：8、1：12 的色谱柱中，填料质量（体积）分别为 12 g（20 mL）、24 g（40 mL）、36 g（60 mL）。每 1 BV 为 1 个流分，测定流出液中大环多酚总含量，计算泄漏点的吸附率^[13]，吸附曲线见图 3。由此可知，随着径高

比增加泄漏点提前，总吸附率呈降低趋势，故选择 1：4 作进一步研究。

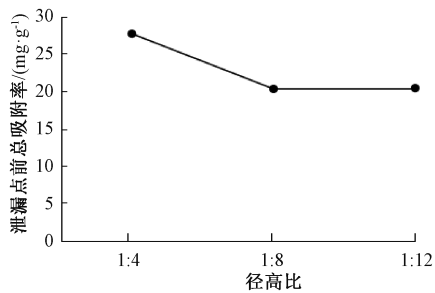


图 3 不同径高比下吸附曲线

2.4.3 上样体积流量 取“2.3”项下上样液，调节大环多酚总含量为 1.89 mg/mL，将其分别以 1、2、3 BV/h 的体积流量通入装有处理好的 HPD-400 型大孔树脂、径高比为 1：4 的色谱柱中，填料质量（体积）为 12 g（20 mL），每 1 BV 为 1 个流分，测定流出液中大环多酚总含量，计算泄漏点前吸附率，吸附曲线见图 4。由此可知，上样体积流量较低时吸附率高，但耗时长，故结合生产实际选择 2~2.5 BV/h 作进一步研究。

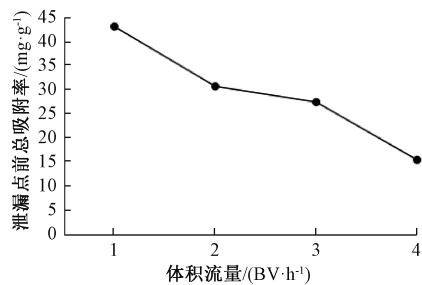


图 4 不同体积流量下吸附曲线

2.4.4 上样量 取“2.2.3”项下上样液，调节其大环多酚总含量为 1.89 mg/mL，将其以 2~2.5 BV/h 的体积流量通入装有处理好的 12 g（20 mL）HPD-400 型大孔树脂、径高比为 1：4 的色谱柱中，每 1 BV 为 1 个流分，测定流出液中大环多酚含量直至泄漏点，吸附曲线见图 5。由此可知，上样量为 10 BV 时流出液中大环多酚总含量为 0.255 mg/mL，已超过泄漏点，为减少样品损失，故选择 9 BV 作进一步研究。

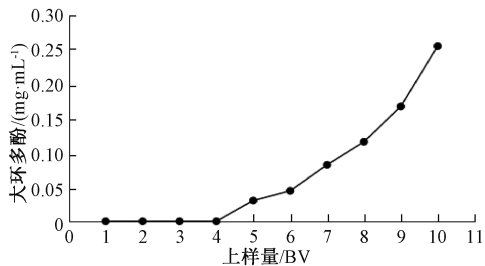


图 5 不同上样量下吸附曲线

2.5 解吸附考察

2.5.1 洗脱液（乙醇）体积分数 平行装柱（填料质量

12 g, 20 mL), 按“2.4”项下最优方式上样(大环多酚含量为 1.89 mg/mL), 依次加入体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80%、95% 的乙醇各 8 BV, 以 1.0~1.5 BV/h 体积流量洗脱, 计算洗脱液中 大环多酚总量、洗脱部位质量、大环多酚含量, 结果见表 2。由此可知, 大环多酚集中于 40%~60% 乙醇洗脱部位, 含量在 19.47%~35.43% 之间。

表 2 洗脱液体积分数考察结果

乙醇/%	大环多酚/mg	洗脱部位/g	大环多酚/%
30	—	0.61	—
40	77.50	0.40	19.47
50	126.53	0.45	28.43
60	57.39	0.16	35.43
70	—	0.05	—
80	—	0.04	—
95	—	0.01	—

2.5.2 杂质洗脱体积分数 平行装柱(填料质量 12 g, 20 mL), 按“2.4”项下最优方式上样, 分别用体积分数为 30%、33%、37%、40%、43% 的乙醇各 8 BV 洗脱除杂, 收集洗脱液, 减压干燥后称定质量, 测定大环多酚含量, 结果见图 6。由此可知, 随着乙醇体积分数增加, 大环多酚损失率逐渐升高, 为了在洗去较多杂质的同时减少损失, 选择杂质洗脱体积分数为 40%。

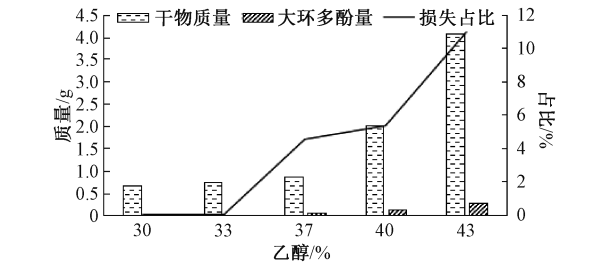


图 6 杂质洗脱体积分数对大环多酚含量的影响

2.5.3 杂质洗脱液用量 平行装柱(填料质量 96 g, 160 mL), 按“2.4”项下最优方式上样, 40% 乙醇洗脱除杂, 收集洗脱液, 减压干燥后称定质量, 结果见图 7。由此可知, 杂质洗脱液用量为 14 BV 时亲水性杂质基本被洗脱完全。

2.5.4 洗脱剂(乙醇)体积分数 平行装柱(填料质量 96 g, 160 mL), 按“2.4”项下最优方式上样, 14 BV40% 乙醇洗脱除杂后分别用体积分数为 45%、50%、55%、60% 的乙醇各 8 BV 洗脱, 收集洗脱液, 检测大环多酚含量, 计算其转移率, 结果见图 8。由此可知, 洗脱剂体积分数为 50% 时, 大环多酚含量接近 70%, 转移率高于 50%; 随着洗脱剂体积分数进一步增加, 转移率升高, 但含量明显降低, 故综合考虑后确定为 50%。

2.5.5 洗脱剂(乙醇)用量 装好大孔树脂柱(填料质

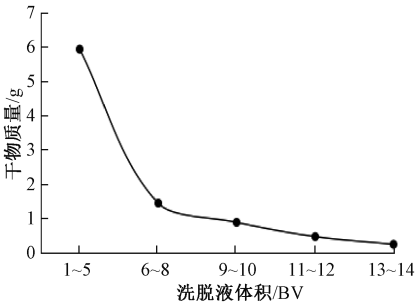


图 7 杂质洗脱曲线

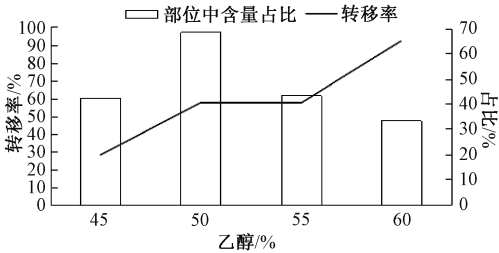


图 8 洗脱剂体积分数对大环多酚、转移率的影响

量 96 g, 160 mL), 按“2.4”项下最优方式上样, 以体积流量 1.0~1.5 BV/h 梯度洗脱, 先用 14 BV 40% 乙醇洗脱除杂, 再用 50% 乙醇洗脱, 收集 1~2、3~4、5~6、7~8、9~10 BV 段, 减压浓缩至干, 称定质量, 测定大环多酚含量, 结果见图 9。由此可知, 洗脱 10 BV 时基本可洗脱完全, 故选择其作为洗脱剂用量。

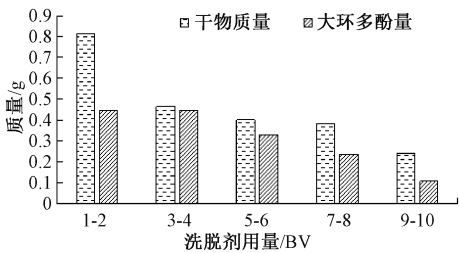


图 9 洗脱剂用量对大环多酚含量的影响

2.6 验证试验 称取处理好的 HPD-400 型大孔树脂 2.4 kg (4 L) 装柱, 调节上样液中 大环多酚质量浓度至 1.60~2.20 mg/mL (溶液质量浓度约为 20 mg/mL), 以 2~2.5 BV/h 体积流量通入径高比为 1:4 的 HPD-400 型大孔树脂柱中, 上样量 9 BV, 以 14 BV 40%、10 BV 50% 乙醇依次洗脱, 收集 50% 乙醇洗脱部位, 测定大环多酚含量、转移率、得率, 平行 3 批, 结果见表 3, 可知该工艺稳定可靠。

3 讨论

3.1 大孔树脂选择 大孔树脂是一类具有较好吸附性能的有机高聚物吸附剂, 性质稳定, 是一类理想的纯化填料。本实验中考察了 16 种大孔树脂, 涵盖了非极性、弱极性、中极性、极性、高表面活性 5 种不同性质的大孔树脂, 通过考察静态吸附、解析附以及静态吸附饱和时间, HPD-

表 3 验证试验结果 (n=3)

试验号	洗脱部位/g	大环多酚/%	转移率/%	得率/%
1	49. 12	65. 73	53. 70	6. 82
2	46. 32	71. 94	54. 88	6. 43
3	46. 32	71. 17	51. 75	6. 43
平均值	47. 25	69. 61	53. 44	6. 56
RSD/%	3. 42	3. 97	2. 41	3. 43

400 型大孔树脂具有较高的吸附率及最高的解吸附率，解吸附效果最佳，赶黄草中大环多酚属极性中等偏大，与 HPD-400 型大孔树脂性质一致，故选其为纯化填料。

3.2 上样液制备 前期赶黄草药材经提取后浓缩至无醇味，大环多酚在水中溶解度低，呈泥浆状，随溶媒乙醇体积分数升高溶解度增大。根据预实验，该类成分在本实验选择型号大孔树脂下，40% 乙醇冲洗即可被洗脱，为了减少该类成分损失，选择 30% 乙醇溶液作为溶媒。

3.3 结果分析 本实验采用 HPLC 法测定 PHG、PGHG、thonningianin A 含量，并以其总含量在所得部位中的占比及其总转移率为指标进行纯化工艺考察。通过 3 次放大验证此纯化过程，大环多酚洗脱率可达 90%，纯化所得产品中 大环多酚转移率达 50% 以上，含量由上样前的 8% 提高至 65% 以上，得率为 6. 56%，RSD 均小于 5%，说明该型号大孔树脂较为适用于赶黄草中大环多酚成分的纯化，且环保可重复利用，成本低，为赶黄草中该类成分的进一步开发研究提供了有力支持。

参考文献：

[1] 何述敏, 李 敏, 吴 众, 等. 扯根菜的研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(6): 102-103.

[2] 肖丽萍, 宋洋洋, 周彦希, 等. 赶黄草抗非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 125-129.

[3] 成 需, 顾慧莹, 宋 敏. 赶黄草对预防醉酒及解酒效能研究[J]. 医药世界, 2006(5): 142-144.

[4] Huang D D, Jiang Y, Chen W S, *et al.* Evaluation of

hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 163(2): 256-263.

[5] 杨彦哲, 张 红, 张 丹, 等. 赶黄草总黄酮缓解体力疲劳的作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(5): 430-434.

[6] 刘中飞, 刘明华, 孙 琴, 等. 赶黄草水提浓缩液抗衰老作用及其机制研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2319-2323.

[7] 黄豆豆. 肝苏颗粒质量控制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.

[8] Lu Q, Jiang J G. Response to comment on isolation and identification of compounds from *penthorum chinense pursh* with antioxidant and antihepatocarcinoma properties: bioactivities of pinocembrine group and its derivatives are noteworthy [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(6): 1417-1417.

[9] Wan J Y, Sun Z L, Zhang Y Z. Searching for potential biomarkers of *Penthorum chinense* Pursh by extraction method and HPLC-MS analysis integrated with evaluation of hepatoprotective effect[J]. *Curr Pharm Anal*, 2018, 14(4): 389-396

[10] 岑叶盛, 李小龙, 陈淑娟, 等. 大孔吸附树脂纯化白筋叶总多酚的工艺优化[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3071-3076.

[11] 热依木古丽·阿布都拉, 刘 力, 仲 婕, 等. 石榴花中多酚物质的纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2265-2267.

[12] 刘祖望, 许梦捷, 黄 真, 等. 大孔吸附树脂纯化刺梨多酚工艺的优化[J]. 中成药, 2019, 41(1): 16-22.

[13] 王毓杰. 管花肉苁蓉中苯乙醇苷的提取和大孔树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2014, 45(16): 2344-2348.