

毓麟原方中总黄酮提取纯化工艺优化

廖雪清¹, 董晶晶², 朱建勇¹, 张若曦¹, 张玉莹^{1*}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 2. 河北省沧州中西医结合医院中药学部, 河北 沧州 061000)

摘要: **目的** 优化毓麟原方中总黄酮提取纯化工艺。**方法** 在单因素试验基础上, 以料液比、乙醇体积分数、提取时间为影响因素, 总黄酮含量、得膏率、淫羊藿苷含量为评价指标, 正交试验优化提取工艺。以树脂种类、上样质量浓度、最大上样量、上样体积流量、洗脱剂种类、洗脱剂用量为影响因素, 总黄酮含量及指标成分(淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝霍苷 I) 总含量为评价指标, 单因素试验优化纯化工艺。**结果** 最佳提取工艺为料液比 1:18, 乙醇体积分数 60%, 提取时间 2.5 h, 提取次数 2 次, 总黄酮含量、得膏率、淫羊藿苷含量分别为 387.55 mg/g、39.71%、1.62 mg/g。最佳纯化工艺为 AB-8 型树脂上样质量浓度 0.3 g/mL, 最大上样量 20 mL, 上样体积流量 1.5 mL/min, 洗脱剂(70%乙醇)用量 12 BV, 总黄酮含量、指标成分总含量分别为 302.48、3.09 mg/g。**结论** 该方法稳定可行, 可用于毓麟原方中总黄酮的提取纯化, 为其后期开发利用提供依据。

关键词: 毓麟原方; 总黄酮; 提取纯化工艺; 正交试验; 单因素试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4111-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.034

毓麟原方(沪药制字 Z05050604)为上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院的院内制剂, 由该院名中医乐秀珍教授的经验方转化而来, 全方由淫羊藿、黄精等多味中药组成, 具有温肾填精、调经种子功效, 用于治疗不孕症^[1-2], 治愈率可达 85% 以上^[3]。方中君药淫羊藿主要有效成分为黄酮^[4], 以淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝霍苷为代表。研究表明, 淫羊藿总黄酮对大鼠睾丸生殖功能具有保护作用^[5], 可改善 PCOS 大鼠高雄激素血症, 调节 LH/FSH, 升高雌激素水平^[6-7]; 淫羊藿苷与朝藿定 C 具有拟雌激素活性^[8], 具有升高雌激素、增加子宫重量、降低雄激素作用^[9-10]。

目前, 尚无关于毓麟原方黄酮类成分提取纯化工艺的研究。因此, 本实验采用正交试验优化方中总黄酮提取工艺, 单因素试验优化该成分纯化工艺, 以期为其后期药效研究提供依据, 也为其药效物质研究奠定基础。

1 材料

1.1 试剂与药物 朝藿定 A (批号 20102221, 纯度 ≥ 98%)、朝藿定 B (批号 20031131, 纯度 ≥ 98%)、朝藿定 C (批号 20010232, 纯度 ≥ 98%)、宝霍苷 I (批号 20011831, 纯度 ≥ 98%)、淫羊藿苷 (批号 17061731, 纯度 ≥ 98%) 对照品均购自上海同田生物技术有限公司。AB-8、D101、LX-38 型大孔吸附树脂(天津允开树脂科技有限

公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器 RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪、Cary 8454 紫外可见分光光度计(美国 Agilent 公司); ES225SM-DR 电子分析天平(瑞士普利塞斯公司); CQ-250-DST 超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂); 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司); FD-1C-50 冷冻干燥机(上海比朗仪器有限公司)。

1.3 药材 淫羊藿(批号 20220214-1)、续断(批号 20220108-1)(上海万仕诚国药制品有限公司); 制黄精(批号 220118)、香附(批号 220205)(上海虹桥中药饮片有限公司); 石菖蒲(批号 211227, 上海青浦中药饮片有限公司); 甘草(批号 21082708, 吴江上海蔡同德堂中药饮片有限公司), 均经专家鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的淫羊藿苷对照品 2.80 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声溶解, 放冷, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成 0.28 mg/mL 的溶液, 即得。

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-JSFC-2-2019); 上海中医药大学预算内项目(自然科学类)(2016YSN50); 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院院级项目(2019YYQ01)

作者简介: 廖雪清(1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药复方成分分析。Tel: 18049967034, E-mail: xqinliao@163.com

* 通信作者: 张玉莹(1982—), 女, 博士, 主任药师, 研究方向为中药复方成分分析。Tel: (021) 65161782, E-mail: 1323688673@qq.com

2.1.2 供试品溶液制备 按照处方称取 1 倍量各药材，参考正交试验设计进行乙醇回流提取，过滤，合并滤液，浓缩至 0.5 g/mL，摇匀，即得。

2.1.3 测定波长选择 精密吸取对照品溶液 1 mL，置于 20 mL 量瓶中，60% 乙醇定容至刻度，摇匀，在 250~500 nm 波长处进行扫描，发现 270 nm 波长处有最大吸收，即为最大吸收波长。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系考察 分别精密吸取 0.07、0.091、0.134 4、0.14、0.224、0.28 mg/mL 对照品溶液适量，按“2.1.3”项下方法稀释，以 60% 乙醇为空白，在 270 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标（A），溶液质量浓度为横坐标（X）进行回归，得方程为 $A = 3.716X - 0.008\ 9$ ($r = 0.999\ 5$)，在 0.07~0.28 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4.2 精密度试验 精密吸取 0.07 mg/mL 对照品溶液适量，按“2.1.3”项下方法稀释，在 270 nm 波长处测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 0.39%，表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 重复性试验 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在 270 nm 波长处测定吸光度，测得其 RSD 为 2.34%，表明该方法重复性良好。

2.1.4.4 稳定性试验 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、15、30、60、120、180 min 在 270 nm 波长处测定吸光度，测得其 RSD 为 0.81%，表明溶液在 3 h 内稳定性良好。

2.1.4.5 加样回收率试验 取含量已知的处方药材适量，按“2.1.2”项下方法平行制备 9 份供试品溶液，分别按 80%、100%、120% 水平精密加入对照品溶液，在 270 nm 波长处测定吸光度，计算回收率。结果，淫羊藿苷平均加样回收率为 99.09%，RSD 为 2.45%。

2.2 指标成分总含量测定 采用 HPLC 法。

2.2.1 对照品溶液制备 分别精密称取淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝霍苷 I 对照品 3.1、2.9、3.3、2.9、3.1 mg，甲醇定容至 10 mL 量瓶中，即得，置于 4 ℃ 冰箱中保存。

2.2.2 供试品溶液制备 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得提取液供试品溶液；将上述溶液按照单因素试验设计制备纯化样品，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得纯化液供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 Agilent ZORBAX ELipse XDB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 0.1% 磷酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~30 min，24%~26% B；30~35 min，26%~50% B；35~40 min，50% B；40~43 min，50%~24% B；43~48 min，24% B）；体积流量 1 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 270 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 分别取“2.2.1”项下对照品溶液 1、0.5、0.3、0.2、0.1 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定。

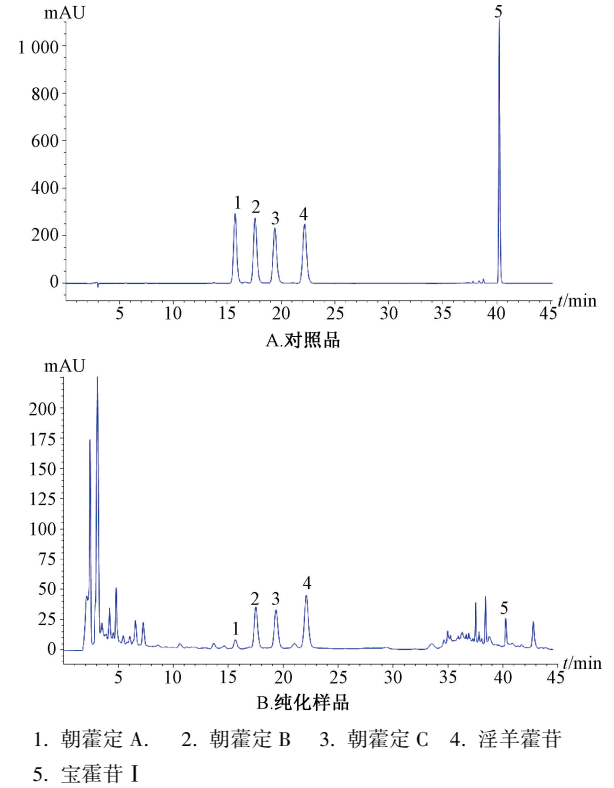


图 1 各指标成分 HPLC 色谱图

以对照品峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 1，可知各指标成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各指标成分线性关系

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
朝藿定 A	$Y = 20\ 573X + 1.791\ 7$	0.999 6	2.9~290
朝藿定 B	$Y = 18\ 384X + 1.259\ 8$	0.999 7	3.3~330
朝藿定 C	$Y = 18\ 884X + 1.236\ 4$	0.999 6	2.9~290
淫羊藿苷	$Y = 20\ 073X + 1.549\ 0$	0.999 5	3.1~310
宝霍苷 I	$Y = 27\ 462X + 2.167\ 4$	0.999 8	3.1~310

2.2.4.2 精密度试验 取同一份对照品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝霍苷 I 峰面积 RSD 分别为 1.73%、1.30%、1.48%、1.31%、1.33%，表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 重复性试验 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝霍苷 I 峰面积 RSD 分别为 3.77%、4.13%、3.64%、3.80%、3.79%，表明该方法重复性良好。

2.2.4.4 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、24、48 h 在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，测得朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝霍苷 I 峰面积 RSD 分别为 0.58%、0.95%、0.72%、0.99%、3.04%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 取同一份本品，分别按 80%、100%、120% 水平精密加入对照品溶液，按“2.2.2”项下

方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 平均加样回收率分别为 99.62%、94.65%、97.36%、99.77%、98.37%，RSD 分别为 2.74%、3.05%、4.51%、4.29%、3.96%。

2.3 提取工艺优化

2.3.1 单因素试验 按照处方称取 1 倍量各药材，固定料液比 1：15，提取时间 2 h，60% 乙醇分别提取 1、2、3 次。结果，提取 2 次时总黄酮含量、指标成分总含量高于 3 次，故最终确定为 2 次，不再进行后续优化，见图 2~3。

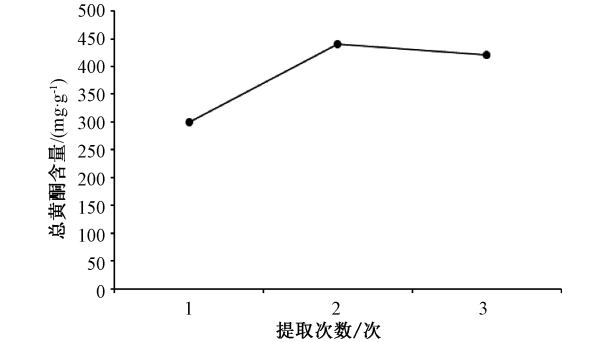


图 2 提取次数对总黄酮含量的影响

2.3.2 正交试验 以料液比 (A)、乙醇体积分数 (B)、提取时间 (C) 为影响因素，总黄酮含量、淫羊藿苷含量、干膏得率为评价指标，计算综合评分 (Y)，因素水平见表 2，权重分配见表 3，结果见表 4。由此可知，各因素影响

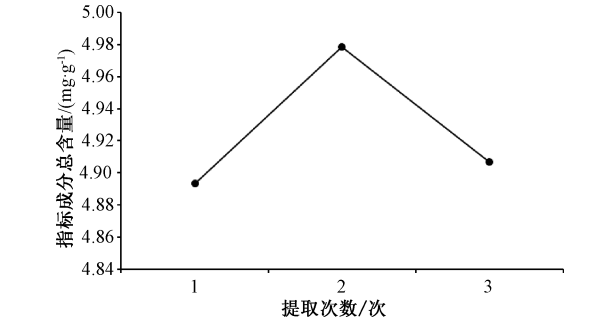


图 3 提取次数对指标成分总含量的影响

程度依次为提取时间>料液比>乙醇体积分数，最优提取工艺为 A₃B₂C₃，即料液比 1：18，乙醇体积分数 60%，提取时间 2.5 h，提取次数 2 次。

表 2 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 料液比	B 乙醇体积分数/%	C 提取时间/h
1	1：12	50	1.5
2	1：15	60	2
3	1：18	70	2.5

表 3 各评价指标权重分配

评价指标	权重分配
总黄酮含量	0.5
得膏率	0.3
淫羊藿苷含量	0.2

表 4 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	总黄酮含量/ (mg·g ⁻¹)	得膏率/%	淫羊藿苷含量/ (μg·mL ⁻¹)	总黄酮含量 评分/分	得膏率 评分/分	淫羊藿苷含量 评分/分	综合评 分/分
1	1	1	1	1	291.81	30.11	102.27	29.66	24.46	14.48	68.59
2	1	2	3	2	491.93	28.25	113.48	50.00	22.95	16.06	89.01
3	1	3	2	3	407.29	28.65	122.45	41.40	23.27	17.33	82.00
4	2	1	3	3	365.91	36.93	141.30	37.19	30.00	20.00	87.19
5	2	2	2	1	325.31	27.82	101.11	33.06	22.59	14.31	69.97
6	2	3	1	2	336.43	28.67	111.58	34.19	23.28	15.79	73.27
7	3	1	2	2	405.63	34.65	99.02	41.23	28.14	14.02	83.39
8	3	2	1	3	399.96	34.37	125.52	40.65	27.92	17.77	86.34
9	3	3	3	1	458.85	26.95	120.66	46.64	21.89	17.08	85.61
总黄酮含量 K ₁	397.01	354.45	342.73	358.66							
总黄酮含量 K ₂	342.55	405.73	379.41	411.33							
总黄酮含量 K ₃	421.48	400.86	438.89	391.05							
总黄酮含量 R	78.93	51.28	96.16	52.67							
得膏率 K ₁	29.01	33.90	31.05	28.29							
得膏率 K ₂	31.14	30.15	30.37	30.52							
得膏率 K ₃	31.99	28.09	30.71	33.32							
得膏率 R	2.98	5.81	0.68	5.03							
淫羊藿苷含量 K ₁	112.73	114.20	113.12	108.01							
淫羊藿苷含量 K ₂	118.00	113.37	107.53	108.03							
淫羊藿苷含量 K ₃	115.07	118.23	125.15	129.76							
淫羊藿苷含量 R	5.26	4.87	17.62	21.74							
综合评分 K ₁	40.35	36.03	34.84	36.45							
综合评分 K ₂	34.82	41.24	38.56	41.81							
综合评分 K ₃	42.84	40.74	44.61	39.75							
综合评分 R	8.02	5.21	9.77	5.35							

注：综合评分计算公式为综合评分=（总黄酮含量/最大总黄酮含量）×100×0.5+（得膏率/最大得膏率含量）×100×0.3+（淫羊藿苷含量/最大淫羊藿苷含量）×100×0.2。

2.3.3 验证试验 按照处方称取各药材 1 倍量，平行 3 份，按“2.3.2”项下优化工艺进行提取，在 270 nm 波长处测定吸光度，结果见表 5。由此可知，该方法重复性良好，工艺稳定可行。

表 5 提取工艺验证试验结果 (n=3)

试验号	总黄酮含量/ (mg·g ⁻¹)	得膏率/%	淫羊藿苷含量/ (mg·g ⁻¹)
1	397.86	41.13	1.61
2	388.78	39.66	1.52
3	376.01	38.34	1.74
平均值	387.55	39.71	1.62
RSD/%	2.83	3.51	6.81

2.4 纯化工艺优化

2.4.1 上样液制备 将“2.3.2”项下优化工艺得到的提取液浓缩至 0.5 g/mL，稀乙醇稀释成指定质量浓度，即得。

2.4.2 树脂预处理 根据总黄酮性质结合文献 [13-15]，

表 6 总黄酮、指标成分吸附率、洗脱率测定结果 (n=3)

树脂型号	总黄酮			指标成分		
	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	洗脱率/%	吸附量/(μg·g ⁻¹)	吸附率/%	洗脱率/%
D101	377.67	85.67	52.51	78.98	81.91	42.25
LX-38	392.74	89.08	58.32	83.48	87.09	43.71
AB-8	413.62	93.82	67.25	84.27	90.84	45.81

2.4.3.3 结果分析 由表 6 可知，AB-8 型树脂吸附率和洗脱率均较高，故本实验将其用于后续研究。

2.4.4 单因素试验

2.4.4.1 上样质量浓度 精密称取预处理好的 AB-8 型树脂 5 份，湿法缓慢装入吸附柱（1.0 cm×20 cm）中，分别精密吸取 0.5 g/mL 浓缩液 4、8、12、16、20 mL，置于 20 mL 量瓶中，60% 乙醇定容至刻度，超声混匀，以 1 mL/min

表 7 上样质量浓度对总黄酮、指标成分吸附量、吸附率的影响

上样质量浓度/(g·mL ⁻¹)	总黄酮		指标成分	
	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%
0.1	45.51	94.53	6.77	98.50
0.2	87.26	95.89	54.26	99.81
0.3	156.50	96.73	98.78	99.89
0.4	174.01	96.78	67.96	99.84

2.4.4.2 上样体积流量 精密称取预处理好的 AB-8 型树脂 3 份，湿法缓慢装入吸附柱（1.0 cm×20 cm）中，精密吸取 30 mL 0.5 g/mL 浓缩液，置于 50 mL 量瓶中，去离子水定容至刻度，超声混匀，分别以 0.5、1.5、2.5 mL/min 体积流量上样，动态吸附后加入 8 BV 去离子水除杂，收集未吸附的溶液、水洗液及上样液，在 270 nm 波长处测定吸

表 8 上样体积流量对总黄酮、指标成分吸附量、吸附率的影响

上样体积流量/ (mL·min ⁻¹)	总黄酮			指标成分		
	吸附量/(mg·g ⁻¹)	吸附率/%	洗脱率/%	吸附量/(μg·g ⁻¹)	吸附率/%	洗脱率/%
0.5	635.72	98.71	93.05	100.41	100.00	98.03
1.5	634.11	98.46	85.74	98.35	98.04	96.46
2.5	614.60	95.43	60.03	76.56	76.32	90.78

本实验选择 LX-38、D101、AB-8 型树脂，使用前均用 95% 乙醇浸泡过夜，使其充分溶胀，取 1 mL 95% 浸泡液，加入 9 mL 蒸馏水，当不出现浑浊时即可湿法上柱，并用蒸馏水洗至无醇味。

2.4.3 树脂型号筛选

2.4.3.1 吸附率 取湿重状态下 D101、LX-38、AB-8 型树脂各 5.0 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 5 mL 上样液，置于恒温空气振荡器中，25 ℃、100 r/min 恒温振荡吸附 24 h，使其达到吸附饱和，过滤，上层滤液作为吸附液；载体树脂中加入 35 mL 80% 乙醇，25 ℃、100 r/min 恒温振荡解吸 24 h，过滤，上层滤液作为解吸液，测定吸附前后总黄酮、淫羊藿含量，计算吸附率，结果见表 6。

2.4.3.2 洗脱率 取饱和 D101、LX-38、AB-8 型树脂适量，置于具塞锥形瓶中，蒸馏水洗涤后加入 35 mL 80% 乙醇，密塞，置于 25 ℃恒温振荡器中振荡 24 h，过滤，测定续滤液中总黄酮含量，计算洗脱率，结果见表 6。

体积流量上样，动态吸附后加入 8 BV（1 BV = 15 mL）去离子水除杂，收集未吸附的溶液、水洗液及上样液，在 270 nm 波长处测定吸光度，计算吸附量、吸附率，结果见表 7。由此可知，上样质量浓度为 0.3~0.4 g/mL 时，总黄酮吸附量较高；为 0.4 g/mL 时，指标成分吸附量、吸附率略有降低；为 0.5 g/mL 时，上样液未全部通过动态吸附，故最终确定为 0.30 g/mL。

光度，计算吸附量、吸附率，结果见表 8。由此可知，上样体积流量为 2.5 mL/min 时，总黄酮、指标成分吸附量、吸附率均显著降低；为 0.5 mL/min 时，速度过慢及上样液含有部分黏性物质而导致柱子堵塞；为 1.5 mL/min 时，总黄酮、指标成分吸附量、吸附率均较高，而且不易堵塞柱子，故最终确定为 1.5 mL/min。

2.4.4.3 最大上样量 精密称取预处理好的 AB-8 型树脂 1 份，湿法缓慢装入吸附柱（1.0 cm×20 cm）中，精密量取 30 mL 0.5 g/mL 浓缩液，置于 50 mL 量瓶中，去离子水定容至刻度，超声混匀，以 1.5 mL/min 体积流量上样，每 5 mL 为 1 份，逐份收集，依次编号，测定总黄酮含量，绘制泄露曲线，结果见图 4。由此可知，总黄酮含量随着流出液体积增加逐渐升高，在 20 mL 后开始明显泄露，故最终确定为 20 mL。

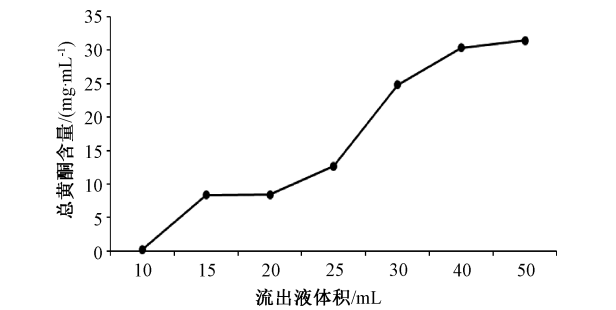


图 4 总黄酮泄露曲线

2.4.4.4 洗脱液种类 精密称取预处理好的 AB-8 型树脂 4 份，湿法缓慢装入吸附柱（1.0 cm×20 cm）中，精密量取 30 mL 0.5 g/mL 浓缩液，置于 50 mL 量瓶中，去离子水定容至刻度，超声混匀，以 1.5 mL/min 体积流量上样，动态吸附后加入 8 BV 去离子水除杂，再分别用 10 BV 50%、60%、70%、80% 乙醇以 1.5 mL/min 体积流量梯度洗脱，收集洗脱液，在 270 nm 波长处测定吸光度，计算洗脱率，结果见表 9。由此可知，70%、80% 乙醇能将大部分总黄酮和指标成分洗脱下来，综合考虑富集效果及资源节约，最终确定为 70% 乙醇。

表 9 洗脱液种类对总黄酮、指标成分洗脱率的影响		
乙醇体积分数/%	洗脱率/%	
	总黄酮	指标成分
50	46.64	56.88
60	58.36	64.73
70	63.55	88.23
80	63.40	82.98

2.4.4.5 洗脱液用量 精密称取预处理好的 AB-8 型树脂 1 份，湿法缓慢装入吸附柱（1.0 cm×20 cm）中，精密量取 30 mL 0.5 g/mL 浓缩液，置于 50 mL 量瓶中，去离子水定容至刻度，超声混匀，以 1.5 mL/min 体积流量上样，动态吸附后加入 8 BV 水除杂，80% 乙醇洗脱，分段收集洗脱液，每份 2 BV，共 6 份，测定总黄酮含量，结果见图 5。由此可知，随着洗脱剂用量增加，总黄酮洗脱效果逐渐加强，为 12 BV 时可将该成分完全洗脱，故最终确定为 12 BV。

2.4.5 验证试验 根据单因素试验结果，确定最优工艺为 AB-8 型树脂，上样质量浓度 0.3 g/mL，最大上样量 20 mL，上样体积流量 1.5 mL/min，洗脱剂 70% 乙醇，洗脱剂体积 12 BV。按上述优化工艺进行 3 批验证试验，结果见表 10，可知该工艺稳定可行，可为相关后期工业化生产提供依据。

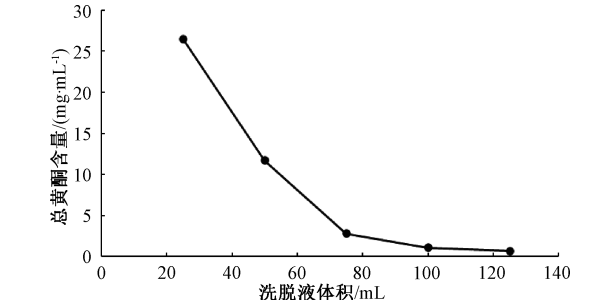


图 5 洗脱液用量对总黄酮含量的影响

表 10 纯化工艺验证试验结果（n=3）		
试验号	总黄酮含量/(mg·g ⁻¹)	指标成分总含量/(mg·g ⁻¹)
1	297.67	3.21
2	309.78	2.99
3	299.98	3.07
平均值	302.48	3.09
RSD/%	2.12	3.60

3 讨论与结论

由毓麟原方制成的毓麟合剂在临床上对不孕症患者具有显著疗效^[3]，课题组前期研究证实该方具有良好的药理活性^[11-14]，但其具有服用量大、不便储存与运输的缺点。本实验对方中总黄酮分别采用乙醇回流提取法提取、大孔树脂吸附法纯化^[15]，分析其药效物质基础，以期为其工业化生产与进一步开发利用提供依据。

黄酮类成分极性较小，本实验分别考察了 D101、LX-38、AB-8 型大孔树脂^[16-20]，发现弱极性的 AB-8、LX-38 对毓麟原方中总黄酮及指标成分淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I 的吸附、解吸附性能均明显优于非极性的 D101。另外，文献 [17-18] 报道采用 AB-8 型大孔树脂分离总黄酮，它具有较大的极性、孔径与比表面积，更有利于该成分进入树脂内部并充分吸附，同时也有助于洗脱溶剂将其从树脂上洗脱下来。因此，本实验选择 AB-8 型大孔树脂纯化毓麟原方中总黄酮。

综上所述，本实验所建立的方法成熟、稳定、可行，可用于毓麟原方中总黄酮的提取纯化，为该方进一步开发利用提供依据。目前，课题组正对纯化后的该成分进行体内药效研究，结果均显示较好的疗效，进一步印证了本实验的意义。

参考文献：

[1] 张玉萱, 年 华, 徐玲玲. 毓麟原方的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(2): 46-47.

[2] 王 凌, 徐玲玲. 毓麟原方质量标准研究[J]. 中成药, 2006, 28(2): 194-197.

[3] 唐菊芳. 自拟毓麟糖浆治疗不孕症 100 例[J]. 上海中医药杂志, 1996, 30(3): 24.

[4] 李新液, 张玉萱, 徐玲玲, 等. 毓麟原方中总黄酮和淫羊藿苷的含量测定[J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 8(11): 842-843.

[5] 张玉萱, 徐玲玲, 年 华. HPLC 法测定毓麟原方中甘草酸和淫羊藿苷的含量[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(2): 157-159.

[6] 杜丽娜, 王 超, 王 芳, 等. 三七总皂苷与淫羊藿总黄酮联合对自然衰老大鼠睾丸生殖功能衰退的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(9): 31-34.

[7] 徐彩生, 罗丽莉, 曾如辉, 等. 淫羊藿总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(2): 147-150.

[8] 张 磊, 王 岚, 吴 瑕, 等. 淫羊藿总黄酮对不同性别大鼠性器官及相关激素的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1): 31-33.

[9] 王 静, 张贵林, 任光友. 朝藿定 C 与淫羊藿苷对去卵巢小鼠子宫的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(3): 193-195.

[10] 王大伟, 邓秀兰, 牛建昭, 等. 淫羊藿及淫羊藿苷在小鼠体内雌激素样作用的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(3): 164-166.

[11] 张玉萱, 徐玲玲. 毓麟原方对肾阳虚型排卵障碍大鼠卵巢功能的影响研究[J]. 中国药师, 2017, 20(4): 621-623.

[12] 张玉萱, 徐玲玲, 朱全刚. 毓麟原方及其拆方对大鼠卵巢颗粒细胞增殖与分泌的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 855-857.

[13] 张玉萱, 徐玲玲. 毓麟原方对自体移植复制子宫内膜异位症大鼠血浆神经内啡肽的影响[J]. 中国药师, 2013, 16(4): 501-503.

[14] 李新液, 张玉萱, 徐玲玲, 等. 毓麟原方对自体移植复制子宫内膜异位症大鼠血清孕酮和雌二醇的影响[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(2): 109-111.

[15] 徐 赫, 李荣华, 夏岩石, 等. 黄酮类化合物提取、分离纯化方法研究现状及展望[J]. 应用化工, 2021, 50(6): 1677-1682.

[16] 杨 茹, 刘聪燕, 许 婷, 等. 5 种大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的吸附特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 113-120.

[17] 李冬梅, 尹晓飞, 蔡大伟. AB-8 大孔吸附树脂分离纯化淫羊藿中总黄酮的研究[J]. 中国药师, 2006, 9(12): 1109-1111.

[18] 李 杰, 臧 晋, 罗建成, 等. AB-8 大孔树脂对甘草黄酮动态吸附条件的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(5): 136-138.

[19] 兰 海, 刘欣妍, 余 玲, 等. 大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷工艺研究[J]. 中草药, 2020, 51(17): 4473-4481.

[20] 张 燕. 大孔吸附树脂分离纯化淫羊藿 EF5 黄酮[J]. 北方药学, 2015, 12(11): 11-13.

金蝉花多糖树脂法脱色、脱蛋白工艺优化及其抗氧化活性研究

杜 敏¹, 曾子叶¹, 颜书柳², 林 烁¹, 曾淑芳¹, 苏颖文¹, 张华林^{1*}
(1. 岭南师范学院化学化工学院, 广东 湛江 524048; 2. 湛江中医学校, 广东 湛江 524094)

摘要: **目的** 优化金蝉花多糖树脂法脱色、脱蛋白工艺, 并考察其抗氧化活性。**方法** 以脱色率、脱蛋白率、多糖保留率为评价指标, 静态单因素试验优化脱色时间、脱色温度、pH 值、树脂用量, 筛选树脂类型, 动态单因素试验优化上样体积流量、上样体积、金蝉花用量。再考察多糖对 DPPH·、OH· 的清除能力, O₂⁻· 的抑制能力、Fe²⁺ 的螯合能力。**结果** D301 树脂效果最好, 最佳静态工艺为脱色时间 3 h, 脱色温度 30 ℃, pH 值 5, 树脂用量 3 g, 脱色率、脱蛋白率、多糖保留率分别为 81.74%、69.05%、82.06 %; 最佳动态工艺为上样体积流量 3 BV/h, 上样体积 2 BV, 金蝉花用量 2.0 g。DPPH· 清除率、OH· 清除率、O₂⁻· 抑制率、Fe²⁺ 螯合率分别为 87.42%、88.93%、68.62%、95.72%。**结论** D301 树脂具有良好的脱色、脱蛋白能力, 而且不影响金蝉花多糖抗氧化活性。
关键词: 金蝉花; 多糖; 树脂; 脱色工艺; 脱蛋白工艺; 抗氧化活性; 单因素试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)12-4116-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.035

金蝉花 *Cordyceps cicadae* 又名蝉花、蝉蛹草、蝉茸等, 是我国古老而名贵的药食两用真菌, 与同为虫草家族的冬虫夏草、北虫草并称为三大药用虫草, 含有腺苷、核苷、过氧化麦角固醇、虫草素、虫草酸、麦角甾醇、多糖等与冬虫夏草类似的成分^[1], 具有护肝、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、降血糖等作用^[2-7], 有望作为冬虫夏草平价替代品。

收稿日期: 2024-01-25
基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A03007037)
作者简介: 杜 敏 (1998—), 女, 研究方向为天然产物开发。Tel: (0759) 3182455, E-mail: 1767599088@qq.com
***通信作者:** 张华林 (1979—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物开发。Tel: (0759) 3182455, E-mail: zhanghualin303@163.com