[科研报道]

蓝布正总鞣质提取纯化工艺的优化

王　凯[1]，　黄亚光[1]，　陶　薇[2]，　何毓敏[1]，　梅志刚[1,3*]，　冯知涛[1*]
(1. 三峡大学医学院，湖北 宜昌 443002；2. 天水市卫生学校，甘肃 天水 741099；3. 湖南中医药大学中西医结合学院，湖南 长沙 410208)

摘要：目的　优化蓝布正总鞣质提取纯化工艺。**方法**　以料液比、乙醇体积分数、超声温度、超声时间为影响因素，总鞣质提取率为评价指标，正交试验优化提取工艺；以洗脱剂（乙醇）体积分数、洗脱剂用量、上样质量浓度、上样量为影响因素，总鞣质吸附量和洗脱率为评价指标，单因素试验优化纯化工艺。HPLC 法测定纯化前后鞣花酸含量变化。**结果**　最优提取工艺为料液比 1∶10，乙醇体积分数 40%，超声温度 60 ℃，超声时间 60 min，总鞣质提取率为 3.16%；最优纯化工艺为取 HPD100 型大孔吸附树脂，加入 20 mL 1.15 mg/mL 上样液，40 mL 50% 乙醇洗脱。纯化后，鞣花酸含量大幅提高至纯化前的 2 倍。**结论**　该方法可靠稳定，可用于蓝布正总鞣质的提取纯化。

关键词：蓝布正；总鞣质；提取；纯化；正交试验；单因素试验；HPLC
中图分类号：R284.2　　**文献标志码**：B　　**文章编号**：1001-1528(2021)05-1291-05
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.034

蓝布正是蔷薇科植物路边青 *Geum aleppicum* jacq. 或柔毛路边青 *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle 的干燥全草[1]，民间主要用于治疗高血压、头晕头痛、月经不调、风湿腰腿痛等[2]，鞣花酸作为其主要成分，具有很好的抗氧化[3]、抗肿瘤[4]作用。近年来研究发现，蓝布正鞣质在抗凝血[5]、治疗缺血性心脑血管疾病[6-7]等方面疗效显著，其所含的鞣质特里马素Ⅱ、二聚鞣花鞣质 A、大麻黄鞣宁可通过抑制心肌细胞凋亡、促进冠状动脉内皮细胞的增殖来改善心肌缺血[8-9]。最新的流行病学调查显示，近 30 年来导致国人死亡主要原因已经从下呼吸道感染和新生儿疾病变为中风和缺血性心脏病[10]，这使得蓝布正总鞣质的开发前景和价值大大增加，但目前国内外对该植物的研究主要集中在化学成分[11-12]、药理作用[13]方面，鲜有涉及提取纯化，仅有其总多酚的相关报道[14]。因此，本实验优化蓝布正鞣质的提取纯化工艺，并采用 HPLC 法检验纯化效果，旨在为其在药品、功能食品中的推广应用奠定基础。

1　材料

1.1　药材　蓝布正购于中国安徽三义堂药业有限公司，经三峡大学医学院何毓敏博士鉴定为蔷薇科植物路边青 *Geum aleppicum* jacq. 或柔毛路边青 *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Bolle 的干燥全草，粉碎，过 3 号筛，备用。

1.2　试剂　没食子酸对照品购自上海源叶生物有限公司（纯度≥98%，批号 Y19M8C36143）；鞣花酸对照品购自南京源植生物科技有限公司（纯度≥98%，批号 Yz190317）。HPD100 大孔吸附树脂购自北京索莱宝科技有限公司；干酪素购自上海麦克林生化科技有限公司；磷钼钨酸试液购自福州飞净生物科技有限公司。乙腈，甲醇为色谱纯，购自美国天地公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.3　仪器　A390 扫描型紫外可见分光光度计（上海翱艺仪器有限公司）；AL204 电子天平［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］；N-1100 旋转蒸发仪［东京理化器械（株）独资工厂］；080ST 超声波清洗机（深圳市超洁科技实业有限公司）；RT-12HK 高速粉碎机（泓荃制药机械公司）；玻璃层析柱（1 cm×20 cm）；Alliance e2695 高相液相色谱仪、2489 紫外检测器（美国 Waters 公司）；SPOLAR C_{18} S5 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）（日本 Shiseido 公司）。

2　方法与结果

2.1　总鞣质提取　称取 4.0 g 干燥蓝布正粉末于 100 mL 具塞锥形瓶中，根据料液比用不同体积分数乙醇浸泡，置于不同温度的超声波清洗机中超声不同时间，抽滤，取续滤液，即得提取液。

2.2　总鞣质含量测定

2.2.1　线性关系考察　参考文献［15］报道。以没食子酸溶液质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得方程为 $A = 104.09X + 0.0361$（$R^2 = 0.9998$），在 0.001～0.010 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2.2　测定方法　总多酚含量：吸取“2.1”项下提取液

收稿日期：2019-11-28
作者简介：王　凯（1998—），男，从事中药有效成分工艺优化研究。E-mail：kaiwang9811@163.com
*通信作者：梅志刚（1977—），男，教授，硕士生导师，从事中医药防治脑病机制研究。E-mail：zhigangmei@139.com
冯知涛（1983—），男，博士，讲师，从事中药药理研究。E-mail：fengzhitao2008@126.com
网络出版日期：2020-05-06
网络出版地址：http：//kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200502.0924.002.html

1 mL，与 4 mL 双蒸水混匀，作为供试液，吸取 0.25 mL 于 25 mL 棕色量瓶中，加磷钼钨酸试液 1 mL、双蒸水 11.75 mL，29% 碳酸钠溶液定容至刻度，摇匀，30 min 后于 760 nm 波长处测定吸光度。不可吸附多酚含量：精密量取上述供试液 2 mL，加入盛有 0.6 g 干酪素的 100 mL 具塞锥形瓶中，加 14 mL 双蒸水，30 ℃水浴保温 60 min，其间不断振摇，取出冷却，摇匀，取续滤液 2 mL 于 25 mL 棕色量瓶中，加磷钼钨酸试液 1 mL、双蒸水 10 mL，29% 碳酸钠溶液定容至刻度，摇匀，30 min 后于 760 nm 波长处测定吸光度。将总多酚含量减去不可吸附多酚含量，即为总鞣质含量，其提取率计算公式为提取率 = ［（$C \times 500 \times V \times 10^{-3}$）/$M$］×100%，其中 C 为总鞣质含量，V 为提取液总体积，M 为蓝布正粉末质量。

2.3　单因素试验　考察不同乙醇体积分数（30%、40%、50%、60%、70%）、超声温度（20、30、40、50、60 ℃）、超声时间（30、60、90、120、150 min）、料液比（1∶5、1∶7.5、1∶10、1∶12.5、1∶15）对总鞣质提取率的影响，结果见图 1。由此可知，最优提取工艺为乙醇体积分数 40%，超声温度 40 ℃，超声时间 90 min，料液比1∶7.5。

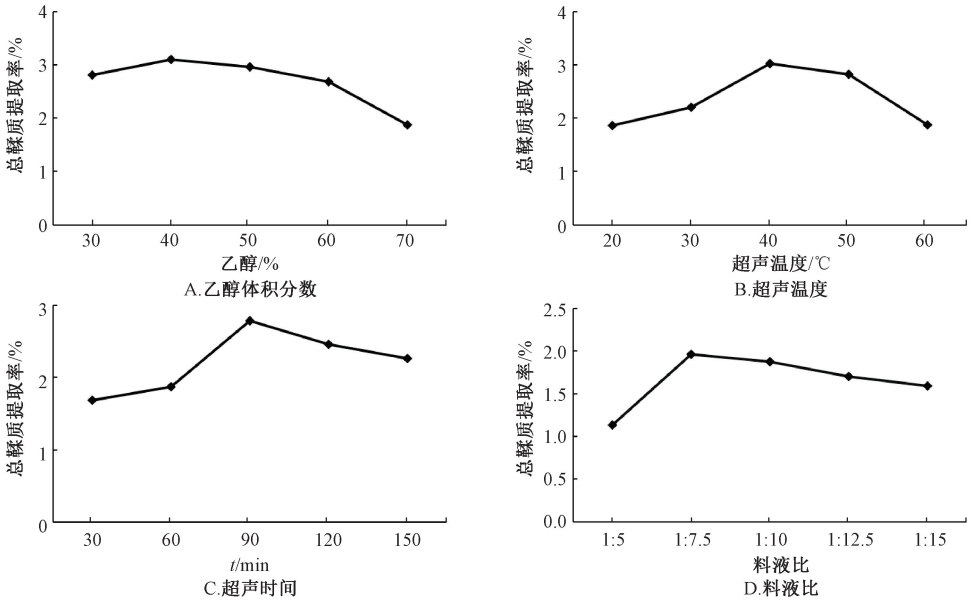


图 1　各因素对总鞣质提取率的影响

2.4　提取工艺优化　在单因素试验基础上，选择超声温度（A）、超声时间（B）、料液比（C）、乙醇体积分数（D）作为影响因素，总鞣质提取率作为评价指标（Y）进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，平行 3 次，取平均值，因素水平见表 1，结果见表 2。

表 1　因素水平

水平	因素			
	A 超声温度/℃	B 超声时间/min	C 料液比	D 乙醇/%
1	40	60	1∶5	30
2	50	90	1∶7.5	40
3	60	120	1∶10	50

由表 2 可知，各因素影响程度依次为 $C>D>A>B$，最优工艺为 $A_3B_1C_3D_2$，即料液比 1∶10，乙醇体积分数 40%，超声温度 60 ℃，超声时间 60 min，总鞣质提取率为 3.16%。称取蓝布正 12.0 g，按上述优化工艺进行提取，平行 3 次，测得总鞣质提取率分别为 3.11%、3.14%、3.16%，平均 3.14%，RSD 为 0.81%，表明工艺稳定可靠。

2.5　纯化工艺优化

2.5.1　大孔树脂预处理　参考文献［16］报道。取适量大孔树脂浸泡于 95% 乙醇中，24 h 后用双蒸水洗至无醇味，

表 2　试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	Y 总鞣质提取率/%
1	1	1	1	1	2.12
2	1	2	2	2	2.75
3	1	3	3	3	3.06
4	2	1	2	3	2.97
5	2	2	3	1	2.47
6	2	3	1	2	2.50
7	3	1	3	2	3.16
8	3	2	1	3	1.58
9	3	3	2	1	1.44
K_1	2.64	2.75	2.07	2.01	—
K_2	2.65	2.27	2.39	2.80	—
K_3	2.06	2.33	2.90	2.54	—
R	0.59	0.48	0.83	0.79	—

4% 盐酸冲洗 3 BV，双蒸水洗脱至中性，5% 氢氧化钠溶液冲洗 3 BV，双蒸水洗脱至中性，使用前抽滤至不滴水。

2.5.2　上样液质量浓度筛选　根据“2.4”项下正交试验结果，按“2.1”项下方法制备 5 份不同质量浓度的提取液，称取预处理后大孔树脂 2.5 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中，加 40 mL 提取液，室温振摇 24 h 后测定吸附残液中总鞣质含量，计算吸附率，公式为吸附率 = ［（C_0-C_1）/C_0］×

100%，其中 C_0 为提取液中总鞣质含量，C_1 为吸附残液中总鞣质含量，结果见图 2。由此可知，随着上样液质量浓度升高，大孔树脂吸附量先增加后降低，在 1.15 mg/mL 时达到最大，故确定为 1.15 mg/mL。

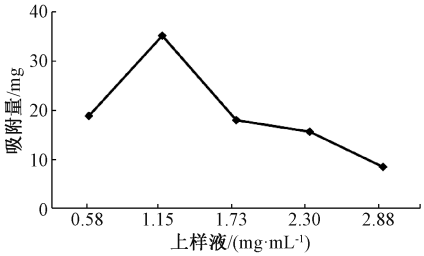


图 2　上样液质量浓度对总鞣质吸附量的影响

2.5.3　洗脱剂（乙醇）体积分数筛选　根据“2.4”项下正交试验结果，按“2.1”项下方法制备 1.15 mg/mL 提取液，称取 5 份预处理后的大孔树脂，每份 3.0 g，置于 100 mL具塞锥形瓶中，加入 50 mL 上述提取液，室温振摇 24 h，滤出残液，双蒸水洗涤吸附饱和的大孔树脂，抽滤至不滴水后置于 5 个具塞锥形瓶中，加入 10%、30%、50%、70%、90%乙醇各 50 mL，室温振摇 24 h 后取滤液，测定总鞣质含量，计算解吸率，公式为解吸率 = ｛（$C_2 \times V_2$）/［（$C_0 - C_1$）$\times V_1$］｝×100%，其中 C_0 为提取液中总鞣质含量，C_1 为吸附残液中总鞣质含量，C_2 为解吸液中总鞣质含量，V_1 为吸附液体积，V_2 为解吸液体积，结果见图 3。由此可知，随着乙醇体积分数升高，洗脱率不断增加，在 50%时达到最大，继续增加时可能会使洗脱液中醇溶性杂质变多，导致洗脱率稍有降低，考虑到经济性，故确定为 50%。

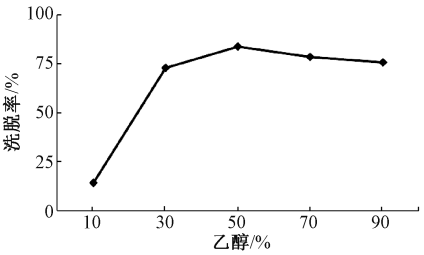


图 3　洗脱剂体积分数对总鞣质洗脱率的影响

2.5.4　洗脱剂（乙醇）用量筛选　根据“2.4”项下正交试验结果，按“2.1”项下方法制备 1.15 mg/mL 提取液，称取预处理后的大孔树脂 15.0 g，加入 250 mL 上述提取液于 500 mL 具塞锥形瓶中，室温振摇 24 h 后湿法装柱，双蒸水洗至流出液接近无色，50%乙醇洗脱，每 10 mL 收集 1 份流出液，测定总鞣质含量，结果见图 4。由此可知，随着乙醇用量增加，洗脱率不断升高，在 40 mL 时解吸已经达到平衡，继续增大时变化不明显，故确定为 40 mL（约 3 BV）。

2.5.5　上样量筛选　将预处理后的大孔树脂湿法装柱，以 1.15 mg/mL 质量浓度上样，分段收集流出液，每 10 mL 收集 1 份，测定其中总鞣质含量，当其达到初始进样质量浓度的 10%时即可认为出现泄漏[16]，通过泄漏点确定上样量，结果见图 5。由此可知，随着上样量增加，流出液中总鞣质含量不断增加，在 20 mL 时出现明显泄漏，故确定 20 mL（约 2 BV）。

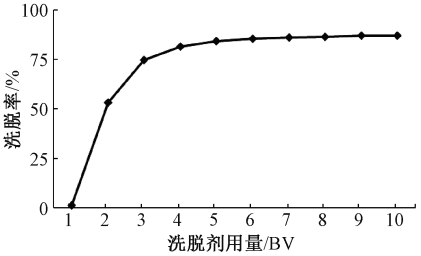


图 4　洗脱剂用量对鞣质洗脱率的影响

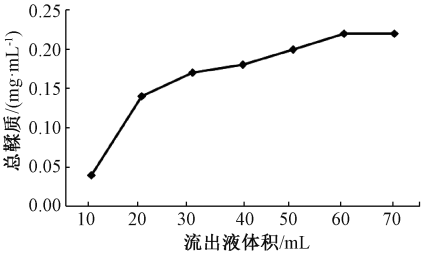


图 5　大孔树脂泄漏曲线

2.6　鞣花酸含量测定（HPLC 法）

2.6.1　色谱条件　SPOLAR C_{18} S5 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1%磷酸（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～30 min，90% A；30～35 min，75% A；35～45 min，90% A）；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 273 nm；进样量 10 μL。

2.6.2　对照品溶液制备　取鞣花酸对照品适量，甲醇超声溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

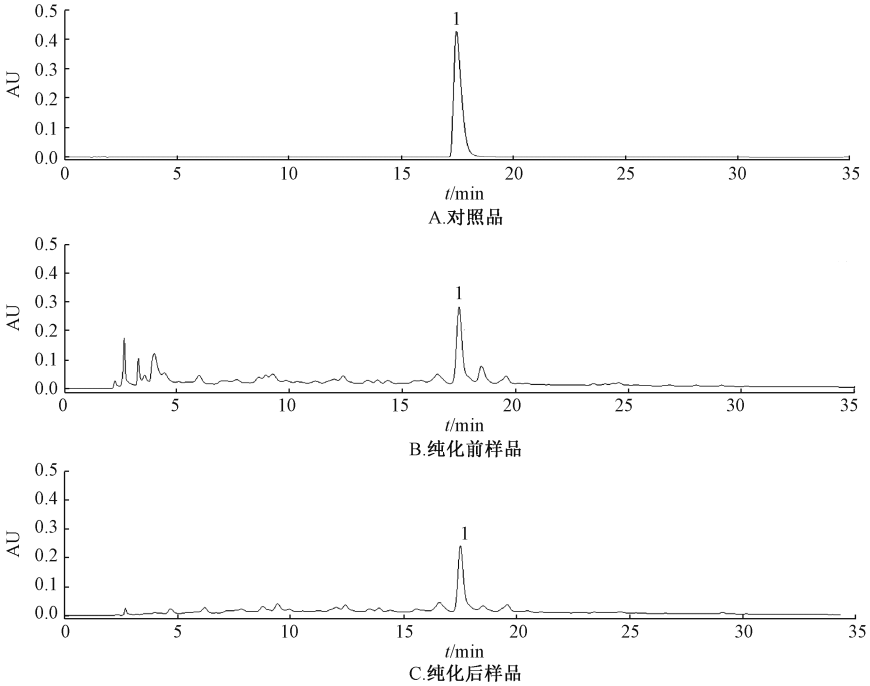
2.6.3　进样液制备　将 1.15 mg/mL 提取液中的乙醇旋转蒸发后，置于适量甲醇中溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜，在“2.6.1”项色谱条件下进样测定，即得。同法处理以最优纯化工艺纯化后的提取液。

2.6.4　测定方法　取“2.6.2”项下对照品溶液，在“2.6.1”项色谱条件下进样测定，通过与对照品保留时间进行对比结合文献［17］来确定纯化前后样品中鞣花酸色谱峰，再以其峰面积比值为指标计算其含量比值，结果见图 6。由此可知，峰 1 为鞣花酸，纯化前该成分峰面积为 17.84%，纯化后为 31.25%，即其含量提高约为 2 倍。

3　讨论

蓝布正作为我国民间药材，目前在市场上已有多个中药及民族药制剂将其作为原料用于治疗疾病[18]，但其药理活性成分及作用机制的研究目前仍不明晰，严重阻碍了临床推广应用与深度开发。鞣质作为蓝布的主要成分，具有抗动脉粥样硬化[19]、抗氧化[3]、抗癌[4]等作用，故本实验对该成分提取工艺进行优化以增加其提取率。

鞣质是一类富含酚羟基的化合物，在高温、光照条件下易发生变化，常用提取方法有超声、浸提法等。目前，



1. 鞣花酸

图 6　鞣花酸 HPLC 色谱图

关于蓝布正总鞣质提取纯化工艺的报道较少，仅欧阳玉祝等[14]采用超声协同双水相体系对路边青总多酚提取工艺进行优化，测得其提取率为 3.04%，但未进一步涉及总鞣质。本实验采用更简便、易于操作的超声辅助提取，得到蓝布正总鞣质最优提取工艺为料液比 1∶10，乙醇体积分数 40%，超声温度 60 ℃，超声时间 60 min，提取率为 3.16%。

然后，本实验通过大孔树脂纯化蓝布正总鞣质，得到最优工艺为取 HPD100 型大孔吸附树脂，加入 20 mL 1.15 mg/mL上样液，40 mL 50% 乙醇洗脱，纯化后鞣花酸含量大幅提高，而且该工艺合理简便，成本低廉，可为相关生产开发提供参考依据，具有较高的实用价值。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：350-351.

[2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编（上册）[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社，1996：895-896.

[3] Hseu Y C, Chou C W, Senthil Kumar K J, *et al*. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1245-1255.

[4] Edderkaoui M, Lugea A, Hui H X, *et al*. Ellagic acid and embelin affect key cellular components of pancreatic adenocarcinoma, cancer, and stellate cells[J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(8): 1232-1244.

[5] Dong H, Chen S X, Kini R M, *et al*. Effects of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor Xa of blood coagulation cascade[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1356-1360.

[6] Ou B J, Tao W, Yang S B, *et al*. The antiapoptosis effect of *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* extracts on cerebral ischemia reperfusion injury *via* PI3K/Akt pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 7290170.

[7] Chen H, Cheng L, Lin X L, *et al*. Reconstitution of coronary vasculature by an active fraction of *Geum japonicum* in ischemic hearts[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3962.

[8] Gu X M, Cheng L, Chueng W L, *et al*. Neovascularization of ischemic myocardium by newly isolated tannins prevents cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function[J]. *Mol Med*, 2006, 12(11-12): 275-283.

[9] Cheung W L, Cheng L, Liu H W, *et al*. The dual actions of angiogenesis and anti-apoptosis induced by an isolated fraction from *Geum japonicum* repair muscle ischemia[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459(1): 91-97.

[10] Zhou M G, Wang H D, Zeng X Y, *et al*. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.

[11] 王莉宁，徐必学，林华容，等. 蓝布正化学成分的研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(4)：798-799.

[12] 张怡莎，周　欣，陈华国，等. 不同方法提取的蓝布正挥发油的化学成分研究[J]. 药物分析杂志，2008，28(2)：263-266.

[13] 陶　薇，王　凯，王金凤，等. 民族药蓝布正化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药，2018，49(1)：233-238.

[14] 欧阳玉祝，张辞海，薛　慧，等. 超声协同双水相体系提取

路边青总多酚工艺[J]. 食品科学，2011，32(16)：89-92.
[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：203.
[16] 沈建福，李利敏，吴晓琴. 大孔树脂分离纯化油茶蒲鞣质工艺研究[J]. 中国食品学报，2013，13(7)：115-121.
[17] 何　迅，王　正，王爱民，等. 贵州苗药蓝布正的指纹图谱及其主要成分鞣花酸含量测定[J]. 中国新药杂志，2015，24(5)：584-587；591.
[18] 国家食品药品监督管理局. 国家中成药标准汇编[S]. 北京：人民卫生出版社，2002.
[19] Aviram M，Volkova N，Coleman R，*et al*. Pomegranate phenolics from the peels，arils，and flowers are antiatherogenic：studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins[J]. *J Agric Food Chem*，2008，56(3)：1148-1157.

含矿物类中药的活血止痛制剂中金属元素、形态砷元素的聚类分析

崔小兵[1]，　李香玉[1]，　柴　川[1]，　陆兔林[1,2*]，　彭国平[1*]
(1. 南京中医药大学药学院，江苏 南京 210023；2. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心，江苏 南京 210023)

摘要：目的　对含矿物类中药的活血止痛制剂中金属元素、形态砷元素进行聚类分析。**方法**　收集 7 个厂家 24 批样品，采用 LC-ICP-MS 法测定其中 16 种金属元素、5 种形态砷元素含量。对共有峰含量进行 *Z* 得分标准化标化折算后，进行聚类分析。**结果**　16 种金属元素聚为一类，二次开发新药的 6 批片剂与其余 18 批样品中的 10 个批次聚为一类；5 种形态砷元素聚为一类，二次开发新药的 6 批片剂与其余 18 批样品中的 12 个批次聚为一类。**结论**　通过二次开发不但能实现大部分金属元素聚类一致，支撑矿物类中药的活血止痛制剂的有效性，更能显著降低重金属、砷盐含量，从而提高制剂安全性。

关键词：活血止痛制剂；矿物类中药；金属元素；形态砷元素；LC-ICP-MS；聚类分析
中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1001-1528(2021)05-1295-05
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.035

在 2020 年版《中国药典》中，对重金属、禁用农药通用要求涉及药典收载的植物类药材标准有 544 个。由于重金属含量超出西方药品质量标准，传统中药大品种（如六神丸、安宫牛黄丸等虽然具有良好的疗效），但很难进入国际市场，故大品种二次开发成为矿物中成药现代制剂应用的策略。

活血止痛胶囊由当归、煅自然铜等 6 种中药饮片组成[1]，主要用于治疗跌打损伤，是骨伤科中药大品种，方中自然铜[2-5]含有较高的砷、铅、汞等多种有害元素，会使制剂中重金属、砷盐超标。文献表明，活血止痛片除了生产批件多家生产的品种外，还有一家具有新药证书[6]的二次开发品种，故本实验系统收集了活血止痛胶囊及其不同升级的片剂，共 7 个厂家 24 批样品，测定其中金属元素、形态砷元素的含量。

目前，重金属含量的检测方法主要有 AAS、ICP，以及比色法、紫外分光光度法、HPLC 法等[7-10]。本实验分别采用 ICP-MS、LC-ICP-MS 法对含矿物药的活血止痛制剂中 16 种金属元素及 5 种形态砷[11]的含量进行测定，并通过 SPSS 22.0 软件进行聚类分析[12]，可为含有矿物药的其他中成药的二次开发提供参考。

1　材料

1.1　仪器　电感耦合等离子体质谱仪（NexIONTM 350D ICP Mass Spectrometer，美国珀金埃尔默公司）；BP211D 分析天平（十万分之一，德国赛多利斯公司）；超纯水机（Milli-Q，美国默克公司）。

1.2　试剂与药物　多元素标准溶液（100 μg/mL，国家标

收稿日期：2020-10-25
基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFC1707000）
作者简介：崔小兵（1975—），男，博士，高级实验师，从事中药炮制机理及新药质量标准研究。Tel：13912977796，E-mail：xiaobingcui@163.com
*__通信作者：__陆兔林（1963—），男，博士，教授，博士生导师，从事中药炮制机制与饮片质量标准研究。Tel：(025) 85811513，E-mail：lutuling2005@126.com
彭国平（1963—），男，博士，教授，博士生导师，从事中药成分分离精制及新药研究。Tel：(025) 86798186，E-mail：guopingpeng@126.com