

大孔树脂-纳滤联用技术精制素馨花中橄榄苦苷工艺优化

符胜男¹, 汤书婉¹, 章莲¹, 李存玉^{1,2}, 郑云枫^{1,2}, 彭国平^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏南京 210023)

摘要: 目的 优化大孔树脂-纳滤联用技术精制素馨花中橄榄苦苷工艺。方法 静态法、动态法筛选大孔树脂。以解吸剂(乙醇)体积、解吸剂体积流量、解吸剂体积分数为影响因素, 橄榄苦苷解吸率为评价指标, 正交试验优化富集纯化工艺。以橄榄苦苷质量浓度、pH、纳滤截留分子量为影响因素, 橄榄苦苷截留率为评价指标, 响应面法优化纳滤浓缩工艺。结果 最佳大孔树脂为 AB-8 型, 药材与树脂比例 1:3, 提取液以 3~4 mL/min 体积流量通过树脂柱, 依次以水、10%乙醇、50%乙醇各 4 BV 洗脱, 洗脱速度 2 BV/h。最佳富集纯化工艺为 50%乙醇以 2 BV/h 体积流量洗脱 4 BV, 橄榄苦苷解吸率为 95.65%。最佳纳滤浓缩工艺为橄榄苦苷质量浓度 0.85 mg/mL, pH 8.00, 纳滤截留分子量 450 Da, 操作压力 1.0 MPa, 橄榄苦苷截留率为 91.64%。另外, 上述优化工艺下橄榄苦苷转移率为 64.55%, 纯度为 75.40%。结论 大孔树脂-纳滤联用技术在工艺过程中不产生热效应, 可用于热不稳定成分橄榄苦苷的精制, 为素馨花后续开发提供技术支撑。

关键词: 素馨花; 橄榄苦苷; 大孔树脂; 纳滤; 精制工艺; 正交试验; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4106-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.033

素馨花为木犀科茉莉属植物素馨花 *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* 的干燥花蕾, 主要分布于云南、广西等地, 具有疏肝解郁、行气止痛之功, 在民间用于治疗消化不良、十二指肠球部溃疡、慢性肝炎、肝硬化等疾病^[1-3]。该植物中含环烯醚萜苷、三萜皂苷、黄酮等成分, 以环烯醚萜苷类为主, 其中橄榄苦苷为其特征性成分, 具有降血糖、抗肿瘤、抗氧化、保护肝脏等药理活性^[4-11]。

橄榄苦苷是一种苯酚类裂环烯醚萜苷, 酯键及烯醚键的存在导致该成分在加热过程中易氧化分解, 活性受到影响。目前, 主要采用回流提取-大孔树脂精制-热浓缩^[2-3, 12-14]对橄榄苦苷进行提取精制, 但难以避免该成分转化引起的转移率低下、资源浪费等技术难题。纳滤具有无热效应的分离优势, 为代替其热浓缩工艺提供了理论可行性^[15]。为提高素馨花粗提液中橄榄苦苷纯度, 本实验采用大孔树脂-纳滤联用技术^[12], 并通过正交试验优化该成分富集纯化工艺, 响应面法优化其纳滤浓缩工艺^[16], 以期为后续相关药学研究提供支撑。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪, 配置 PDA 2998 检测器(美国 Waters 公司); TNZ-1 纳滤分离设备、纳滤膜(聚酰胺复合膜, 纳滤截留分子量 100、450、800 Da(南京拓钰医药科技有限公司); SDHC8E15-210 苏泊尔电磁炉(浙江苏泊尔股份有限公司); PB-10 PH 计(德国

Sartorius 公司); MS105 电子天平(十万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); KH-250B 超声波清洁剂(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 橄榄苦苷对照品(批号 JBZ-0396, 纯度 98.75%, 南京金益柏生物科技有限公司); AB-8 大孔吸附树脂(批号 211122, 天津浩聚树脂科技有限公司); D101 大孔吸附树脂(批号 20201110, 国药集团化学试剂有限公司); HPD400 大孔吸附树脂(批号 20180304, 安徽三星树脂科技有限公司)。甲醇、乙腈(色谱纯, 安徽天地高纯溶剂有限公司); 95%乙醇(分析纯, 南京化学试剂股份有限公司); 水为纯化水。

1.3 药材 素馨花购自安徽亳州(批号 20201104, 产地广西), 经南京中医药大学严辉教授鉴定为木犀科茉莉属植物素馨花 *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* 的干燥花蕾。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 取药材饮片 5 kg(无需粉碎过筛), 14 倍量水回流提取 3 次, 每次 0.5 h, 过滤, 合并滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取橄榄苦苷对照品适量, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(橄榄苦苷质量浓度 0.100 8 mg/mL)。

收稿日期: 2024-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(82274106); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20211303)

作者简介: 符胜男(1998—), 女, 硕士生, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: fsn501216@163.com

* 通信作者: 彭国平(1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: guopingpeng@sohu.com

2.2 橄榄苦苷含量测定 采用HPLC法。

2.2.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 nm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱 (0~30 min, 10%~50% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 232 nm; 进样量 10 μL。

2.2.2 方法学考察 参照文献 [3] 报道。

2.2.2.1 线性关系考察 精密称取橄榄苦苷对照品适量, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 制成 0.100 8 mg/mL 贮备液, 逐级稀释成系列质量浓度, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程为 $Y = 1.355 \times 10^6 X - 2.204 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$), 可知橄榄苦苷在 5.04~60.48 mg/L 范围内线性关系良好。

2.2.2.2 精密度试验 选取回归方程中间质量浓度对照品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得橄榄苦苷峰面积 RSD 为 1.57%, 表明仪器精密度良好。

2.2.2.3 重复性试验 取药材适量, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 测得橄榄苦苷峰面积 RSD 为 2.59%, 表明该方法重复性良好。

2.2.2.4 稳定性试验 取供试品溶液适量, 于 0、2、6、8、12、24 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 测得橄榄苦苷峰面积 RSD 为 0.88%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.2.5 加样回收率试验 精密称取橄榄苦苷含量已知的药材粉末 0.25 g, 按 100% 水平加入对照品, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n=6)

取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
0.250 6	29.43	28.96	60.09	103.43	99.57	2.19
0.249 8	29.33	29.03	58.13	99.02		
0.251 3	29.51	28.71	57.36	97.76		
0.250 8	29.45	28.89	58.97	98.37		
0.248 9	29.23	29.03	58.85	101.54		
0.249 2	29.26	28.98	57.49	97.32		

2.3 大孔树脂-纳滤联用技术研究

2.3.1 树脂预处理 参照文献 [17-18] 报道, 取 AB-8、D101、HPD400 型树脂适量, 95% 乙醇浸泡 24 h, 除去碎片和杂物, 湿法装柱, 95% 乙醇洗至流出液与水不产生白色浑浊为止, 水洗至无醇味, 依次用 5% HCl 和 2% NaOH 溶液浸泡 2~4 h, 水洗至中性, 浸泡于蒸馏水中备用。

2.3.2 静态法

2.3.2.1 树脂筛选 称取已处理好的 AB-8、D101、HPD400 型树脂各 3 g, 置于 250 mL 具磨口三角瓶中, 加入 90 mL 药材水提液, 室温静置 12 h, 不时振摇以使其达到饱和和吸附, 真空抽滤, 取滤液。精密吸取水提液、滤液适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 计算比吸附量

$Q_{吸}$, 公式为 $Q_{吸} = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{W}$, 其中 C_0 为吸附前橄榄苦苷质量浓度, C_1 为吸附后橄榄苦苷溶液质量浓度, V_1 为溶液体积, W 为树脂质量, 结果见表 2, 可知 AB-8 型树脂性能最佳。

表 2 大孔吸附树脂静态吸附、解吸能力比较

型号	极性	橄榄苦苷比吸附量/ (mg·g ⁻¹ 干树脂)	橄榄苦苷比解吸量/ (mg·g ⁻¹ 干树脂)
AB-8	弱极性	63.44	60.24
D101	非极性	44.78	32.45
HPD400	中极性	53.93	40.23

2.3.2.2 上样质量浓度对静态吸附的影响 将药材水提液与纯化水混合均匀, 配制成不同质量浓度上样液, 采用大孔树脂吸附, 真空抽滤, 取滤液。精密吸取水提液、滤液适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 按“2.3.2.1”项下公式计算比吸附量, 结果见表 3。由此可知, 随着上样质量浓度增加, 比吸附量先升后降, 这是因为其质量浓度过高时橄榄苦苷与树脂接触面积减少, 同时药液中杂质也会相应增加, 从而影响树脂吸附, 考虑到大生产工艺的合理性, 选择水提液直接上样。

表 3 上样质量浓度对大孔吸附树脂静态吸附的影响

上样质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	橄榄苦苷比吸附量/(mg·g ⁻¹ 干树脂)
3.10	63.37
1.55	65.52
0.78	70.35
0.39	64.78

2.3.2.3 静态解吸剂筛选 用纯化水对已饱和和吸附的 AB-8 型树脂进行清洗, 收集水洗液, 加入不同体积 95% 乙醇, 室温静置 12 h, 不时振摇, 真空抽滤, 取滤液。精密吸取水洗液、滤液适量, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定,

计算比解吸量 $Q_{解}$ 、解吸率 D , 公式分别为 $Q_{解} = \frac{C_2 \times V_2}{Q_{吸} \times W}$

$D = \frac{Q_{解}}{Q_{吸}} \times 100\%$, 其中 C_2 为洗脱液中橄榄苦苷质量浓度, V_2

为洗脱液体积, 结果见表 4。由此可知, 4 BV 纯化水可洗去大部分树脂未吸附的橄榄苦苷; 95% 乙醇的解吸率较高, 可将该成分从树脂中洗脱, 故选择 95% 乙醇作为解吸溶剂, 洗脱体积为 4 BV。

表 4 解吸剂洗脱体积对橄榄苦苷解吸率的影响

洗脱体积/BV	解吸率/%
1	40.46
2	58.78
3	85.87
4	94.33

2.3.2.4 小结 最终确定, 素馨花水提液直接上样, 上样体积相当于树脂的 3 倍, 水洗用量相当于树脂的 4 倍, 95% 醇洗脱用量相当于树脂的 4 倍。

2.3.3 动态法

2.3.3.1 动态吸附试验 称取已处理好的 AB-8、D101、HPD400 型树脂各 40 g，装柱，水洗至无醇味，另取药材水提液 1 200 mL，以 2 mL/min 体积流量通过树脂柱，精密吸取水提液及流出液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，按“2.3.2.1”项下公式计算比吸附量。

2.3.3.2 动态解吸试验 将“2.3.3.1”项下充分吸附后的树脂以 4 BV 水洗至无色，再分别用 95% 乙醇以 3~4 mL/min 体积流量洗脱 4 BV，精密吸取洗脱液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，按“2.3.2.3”项下公式计算比解吸量。

2.3.3.3 结果分析 表 5 显示，在相同条件下树脂吸附能力依次为 AB-8>HPD400>D101，这是因为 AB-8 型树脂呈弱极性，而橄榄苦苷中含有酚羟基结构，其分子极性不大，故该类型树脂吸附效果较好。

表 5 大孔吸附树脂动态吸附、解吸能力比较

型号	极性	橄榄苦苷比吸附量/ (mg·g ⁻¹ 干树脂)	橄榄苦苷比解吸量/ (mg·g ⁻¹ 干树脂)
AB-8	弱极性	64.06	63.11
D101	非极性	29.94	27.77
HPD400	中极性	36.45	35.60

2.3.4 富集纯化工艺优化

2.3.4.1 上样量对树脂吸附效果的影响 图 1 显示，上样量与树脂比例为 15:1 时吸附效果最好，即药材与树脂比例 1:2，但进一步增加会超过饱和和吸附量。另外，药材加水回流提取后橄榄苦苷得率达 10%，大孔树脂吸附得率约为 3%，结合生产实际，最终确定药材与树脂比例 1:3。

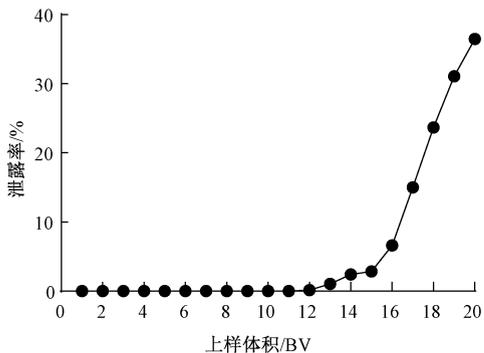


图 1 橄榄苦苷吸附泄露曲线

2.3.4.2 饱和吸附量测定 当流出液中橄榄苦苷质量浓度超过供试品溶液中的 5% 时，可认为树脂对该成分的吸附已饱和，此时上样体积即为泄露体积^[19-20]。再计算泄露率 L ，

公式为 $L = \frac{C_1}{C_0} \times 100\%$ ，其中 C_0 为提取液中橄榄苦苷质量浓度， C_1 为流出液中橄榄苦苷质量浓度。

2.3.4.3 解吸剂体积分数对橄榄苦苷解吸率影响 橄榄苦苷易溶于乙醇，故稀乙醇洗脱即可提高该成分解吸率。表 6 显示，30%~50% 乙醇解吸效果较好，但进一步增加其体积分数时解吸率未明显提高，而且会增加亲脂性杂质的解吸。

表 6 解吸剂体积分数对橄榄苦苷解吸率影响

乙醇体积分数/%	解吸率/%
10	0
20	3.61
30	58.91
40	88.61
50	89.02

2.3.4.4 正交试验 以解吸剂体积 (A)、解吸剂体积流量 (B)、解吸剂体积分数 (C) 为影响因素，橄榄苦苷解吸率为评价指标，进行三因素三水平设计，按“2.3.2.3”项下公式计算解吸率，因素水平见表 7，结果见表 8，方差分析见表 9。由表 9 可知，因素 C 有显著影响 ($P < 0.05$)，而 A 、 B 均无显著影响 ($P > 0.05$)。结合生产实际，最终确定最优工为 $A_2B_2C_3$ ，即 50% 乙醇以 2 BV/h 体积流量洗脱 4 BV，橄榄苦苷解吸率为 97.33%。

表 7 正交试验因素水平

水平	A 解吸剂体 积/BV	B 解吸剂体流量/ (BV·h ⁻¹)	C 解吸剂体 分数/%
1	3	1	30
2	4	2	40
3	5	3	50

表 8 正交试验设计与结果 ($\bar{x} \pm s$)

试验号	A 解吸剂 体积/BV	B 解吸剂体 流量/(BV·h ⁻¹)	C 解吸剂体 分数/%	解吸率/%
1	3	1	30	60.21±2.06
2	3	2	40	93.23±2.24
3	3	3	50	93.37±2.97
4	4	1	30	93.95±1.05
5	4	2	40	97.33±2.44
6	4	3	50	53.30±0.75
7	5	1	30	92.35±2.67
8	5	2	40	73.26±0.86
9	5	3	50	91.67±2.86
K_1	82.27	82.17	62.26	
K_2	81.53	87.94	92.95	
K_3	85.76	79.45	94.35	
R	4.23	8.49	32.09	

表 9 正交试验方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	30.65	2	0.39	19	>0.05
B	112.85	2	1.44	19	>0.05
C	1 974.02	2	25.13	19	<0.05
D (误差)	78.54	2	—	—	—

再按上述优化工艺进行 3 批验证试验，测得橄榄苦苷解吸率为 95.65%，表明该工艺稳定可行，而且该成分纯度达 49.02%。

2.3.5 纳滤浓缩工艺优化 取粗品溶液 2 L，梯度稀释橄榄苦苷质量浓度至符合本实验要求，再按照设计调节溶液环境、选择纳滤膜、组装纳滤系统，将药液置于纳滤系统中^[21]，选择温度常温，操作压力 1.0 MPa，平行 3 次，取

平均值。采用响应面法，以橄榄苦苷质量浓度(A)、pH(B)、纳滤截留分子量(C)作为影响因素，橄榄苦苷截留率(Y)为评价指标[公式为 $Y = (1 - A_N/A_p) \times 100\%$ ，其中 A_N 为纳滤液中橄榄苦苷峰面积， A_p 为平衡液中橄榄苦苷峰面积]，进行三因素三水平设计，因素水平见表10，结果见表11。

表10 响应面法因素水平

水平	A 橄榄苦苷质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	B pH	C 纳滤截留分子量/Da
-1	0.85	4.00	100
0	1.70	6.00	450
1	2.55	8.00	800

表11 响应面法设计与结果

试验号	A	B	C	Y 橄榄苦苷截留率/%	
				实际值	预测值
1	1	0	-1	90.07	89.58
2	0	0	0	90.32	90.47
3	0	1	-1	75.79	76.29
4	0	-1	1	99.78	99.28
5	1	0	1	92.09	92.49
6	0	0	0	90.15	90.47
7	-1	1	0	80.14	80.04
8	0	0	0	90.37	90.47
9	-1	0	-1	89.09	88.89
10	0	0	0	91.06	90.47
11	-1	-1	0	99.32	99.33
12	0	0	0	90.46	90.47
13	0	-1	-1	99.29	99.68
14	-1	0	1	92.35	92.84
15	1	1	0	80.15	80.14
16	0	1	1	84.15	83.76
17	1	-1	0	99.68	99.78

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对表11数据进行拟合，得二次多项回归方程为 $Y = 90.47 + 0.14A - 9.73B + 1.77C - 0.09AB - 0.31AC + 1.97BC + 0.25A^2 - 0.90B^2 + 0.18C^2$ ，方差分析见表12。由此可知，模型 $P < 0.01$ ，具有高度显著性；失拟项 $P > 0.05$ ，表明该模型预测性良好；因素B、C、BC、B²具有极显著影响($P < 0.01$)，表明模型可用于预测分析。

表12 响应面法方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	802.05	9	89.12	295.15	<0.000 1
A	0.15	1	0.15	0.49	0.505 7
B	757.38	1	757.38	2 508.42	<0.000 1
C	24.96	1	24.96	82.66	<0.000 1
AB	0.031	1	0.03	0.10	0.759 4
AC	0.38	1	0.38	1.27	0.296 4
BC	15.48	1	15.48	51.28	0.000 2
A ²	0.26	1	0.26	0.86	0.383 4
B ²	3.40	1	3.40	11.26	0.012 2
C ²	0.13	1	0.13	0.45	0.525 3
残差	2.11	7	0.30	—	—
失拟项	1.63	3	0.54	4.50	0.090 1
误差项	0.48	4	0.12	—	—
总和	804.16	16	—	—	—

响应面分析见图2~4。由此可知，随着纳滤截留分子量增加橄榄苦苷截留率明显降低，符合孔径筛分理论；随着pH增加，由于纳滤膜表面的电荷效应，截留率升高，而橄榄苦苷质量浓度对其无明显影响^[16]；橄榄苦苷质量浓度和pH的三维曲面图坡度平缓，即交互影响不明显，在后者不变的前提下随着前者增加，截留率缓慢升高，符合溶解扩散理论，而在前者不变的前提下随着后者增加，截留率缓慢升高，符合电荷效应理论；纳滤截留分子量和pH交互影响明显，其中前者占主导地位，其孔径尺寸决定了成分分离行为，而后者通过调节橄榄苦苷解离-游离比例来改变纳滤膜表面电荷效应，从而调控分离。另外，膜孔径为450 Da时在一定pH范围内橄榄苦苷均保持较高的截留率，此时其分子尺寸大于膜孔径；随着pH增加，橄榄苦苷逐步解离，截留率呈升高趋势，电荷效应与孔径筛分协同调节浓缩，可在保证截留率前提下达到分离效果^[22-23]。

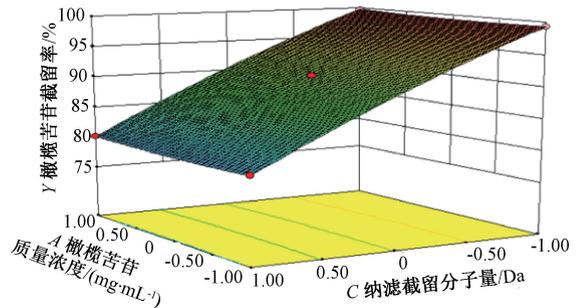


图2 橄榄苦苷质量浓度和纳滤截留分子量对橄榄苦苷截留率的影响

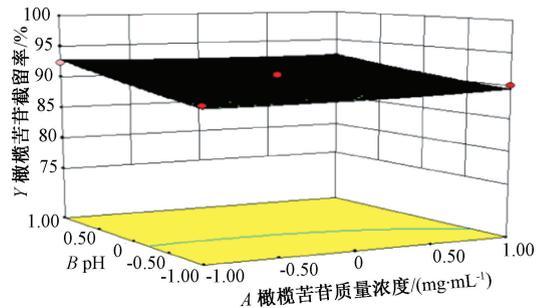


图3 橄榄苦苷质量浓度和pH对橄榄苦苷截留率的影响

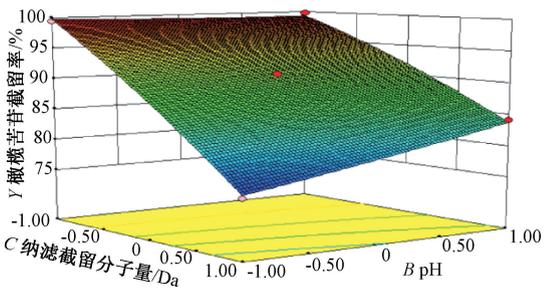


图4 pH和纳滤截留分子量对橄榄苦苷截留率的影响

通过 Design-Expert 8.0.6 软件确定最优工艺纳滤截留分子量450 Da，pH 8.00，橄榄苦苷质量浓度0.85 mg/mL，操作压力1.0 MPa，橄榄苦苷截留率为92.84%。按上述优

化工艺进行验证试验,测得橄榄苦苷截留率为91.64%,与预测值92.84%接近,并且该成分转移率为64.55%,纯度为75.40%,表明该工艺可行,可用于其纳滤浓缩。

3 讨论与结论

在常规树脂-纳滤联用技术中^[24-25],大多涉及到大孔树脂洗脱液的加热浓缩。本实验将上述2种分离技术直接耦合,减少了温度对热敏性成分橄榄苦苷的影响。

大孔树脂作为有机高聚吸附剂,广泛应用于各类有效成分的分离与除杂,可用于精制橄榄苦苷^[26],本实验发现精制后该成分纯度达49.02%。由于橄榄苦苷分子量较小,在进行纳滤时可以为指标来评价纳滤性能,本实验发现该成分质量浓度对截留率不产生明显影响,而纳滤截留分子量和pH对其截留率影响明显。在中性、酸性溶液环境中,橄榄苦苷主要以游离态存在,依靠分子筛分效应分离,随着溶液pH升高该成分逐步解离,膜表面电荷效应增强,电荷效应与孔径筛分效应起到协同作用,从而使截留率升高,纳滤效果较好。另外,经大孔树脂-纳滤联用技术精制后,橄榄苦苷转移率为64.55%,纯度为75.40%。

综上所述,大孔树脂-纳滤联用技术精制素馨花中橄榄苦苷时,在去除杂质的同时该成分可有效保留;纳滤液的中乙醇仍可循环使用,从而降低了制药企业生产成本;常温化处理避免了其发生转化,提高了得率,也为其他热不稳定成分的分离提供了新思路。

参考文献:

[1] 杜乾坤,刘东海,杨缓缓,等. 超声提取素馨花总环烯醚萜苷的单因素实验研究[J]. 承德医学院学报, 2013, 30(1): 75-76.

[2] 郝 婷. 素馨花总环烯醚萜苷提取纯化工艺及质量标准的研究[D]. 承德: 承德医学院, 2011.

[3] 郝 婷,张树峰,赵桂琴. 素馨花总环烯醚萜苷质量标准的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 69-71.

[4] Dikmen N, Cellat M, Etyemez M, et al. Ameliorative effects of oleuropein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in rats[J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2246-2259.

[5] Hong Z C, Lu Y, Liu B, et al. Glycolysis, a new mechanism of oleuropein against liver tumor [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154770.

[6] Basiricò L, Mastrogianni F, Lacetera N, et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of an oleuropein-enriched extract obtained from olives leaves on BME-UV1 cells[J]. *Nat Prod Res*, 2023, 37(10): 1725-1729.

[7] Çömez M S, Cellat M, Özkan H, et al. Protective effect of oleuropein on ketamine-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(9): 1691-1699.

[8] Silveri F, Scroccarello A, Della P F, et al. Rapid pretreatment-free evaluation of antioxidant capacity in extra virgin olive oil using a laser-nanodecorated electrochemical lab-on-strip [J]. *Food Chem*, 2023, 420: 136112.

[9] El-Rahmana S N A, Abubshaitb S A, Abubshaitc H A, et al. The anti-aging, anti-tuberculosis and antioxidant potential benefits of Saudi Arabia *Olea europaea* leaves extracts[J]. *Braz J Biol*, 2023, 84: e270885.

[10] 刘天亮,王玲洁,宋宗辉,等. 橄榄苦苷的药理作用及其研究进展[J]. 西南国防医药, 2016, 26(6): 685-687.

[11] 张育贵,张淑娟,辛二旦,等. 橄榄苦苷的药理作用研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(24): 3265-3268.

[12] 罗赛赛,郝 婷,赵桂琴. 素馨花总环烯醚萜苷的大孔树脂富集纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 13-16.

[13] 叶建中,高彩霞,周 昊,等. 油橄榄中橄榄苦苷的提取及纯化工艺研究[J]. 生物质化学工程, 2011, 45(3): 35-40.

[14] 田志祥,冯坤苗,狄志彪,等. 橄榄苦苷的提取优化及其降压活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2015, 140(10): 82-87.

[15] 普文英,张卫东,赵汉臣. 纳滤——新型的分离小分子有机物的膜技术[J]. 中国药房, 2000, 11(5): 44-46.

[16] 李存玉,马 赟,刘奕洲,等. Box-Behnken 响应面法优化川芎水提液纳滤工艺[J]. 中成药, 2017, 39(2): 296-300.

[17] 匡海学. 中药化学实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.

[18] 程建明,葛婷婷,彭国平,等. 大孔吸附树脂法优选荔枝草总黄酮纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 63-65.

[19] 郑云枫,黄 利,魏娟花,等. 不同类型树脂对4种丹参酚酸类成分的动态吸附研究[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1648-1652.

[20] 郑云枫,仲欢欢,王怡然,等. 野马追倍半萜内酯精制工艺的优化[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2050-2054.

[21] 李存玉,马 赟,吴晨曦,等. 响应面分析法优化金银花的纳滤浓缩工艺[J]. 中药材, 2017, 40(6): 1389-1392.

[22] 叶淑青,伍清萍,郑雨君,等. 基于临界分离效应的复杂溶液环境中丹酚酸B、苦参碱纳滤分离规律[J]. 中成药, 2021, 43(2): 314-320.

[23] 李存玉,马 赟,黄顺发,等. 响应曲面法优化纳滤浓缩延胡索水提液的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2641-2644.

[24] 李季文,景 明. 膜分离与树脂法联用提取分离胡芦巴总苷的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 12-13.

[25] 程文娟,谢海荣,秦 永,等. 膜分离与大孔树脂联用技术纯化茶皂素[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 172-177.

[26] 张蔚君,朱 莉,董晓莉,等. 大孔吸附树脂在中草药有效成分提纯中的应用及其影响因素[J]. 空军总医院学报, 2006, 22(2): 96-98.