

超声辅助大孔树脂技术富集荆芥穗中总黄酮和总酚的工艺研究

王冰倩¹, 周瑾欣¹, 魏 星¹, 于 生^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 吴啟南^{1,2}, 单鸣秋^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 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** 通过超声辅助大孔树脂对荆芥穗 *Schizonepetae Spica* 水提物中总黄酮和总酚类化合物进行富集并对比处理前后化合物含量及活性变化。**方法** 从 7 种不同类型树脂中筛选超声辅助最佳树脂型号, 在吸附动力学和吸附热力学研究下, 对超声温度、功率、上样质量浓度及解吸溶剂百分比等影响因素进行工艺优化。测定了优化处理前后各成分含量及活性变化。**结果** 动力学和热力学的研究表明, 荆芥穗总黄酮适用于 Langmuir 模型, 且吸附过程为自发吸热熵增, 总酚则为自发放热熵减并适用于 Freundlich 模型, 据此不同的吸附机制优化了 2 类成分同时富集的最佳工艺, 在超声辅助 AB-8 大孔树脂, 温度 25 °C、时间 2.5 h, 功率 150 W, 上样质量浓度 0.1 g/mL, 70%乙醇解吸附的过程下, 荆芥穗水提物中总黄酮和总酚类化合物含量增加 2~3 倍, 其单体成分的含量及抗氧化和神经氨酸酶抑制活性均显著增加。**结论** 超声辅助大孔树脂技术为荆芥穗总黄酮和总酚类成分的有效可行富集技术。

关键词: 荆芥穗; 大孔树脂; 超声辅助; 总黄酮; 总酚; 吸附动力学; 吸附热力学; 神经氨酸酶; 橙皮苷; 木犀草苷; 迷迭香酸; 木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5541-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.008

Research on process of enriching total flavonoids and total phenols in *Schizonepetae Spica* by ultrasound-assisted macroporous resin technology

WANG Bing-qian¹, ZHOU Jin-xin¹, WEI Xing¹, YU Sheng^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, WU Qi-nan^{1,2}, SHAN Ming-qiu^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To enrich the total flavonoids and total phenolic in the aqueous extracts of Jingjiesui (*Schizonepetae Spica*, SS) by ultrasonic-assisted macroporous resin, and compare with the changes of compound content and activity before and after treatment.

Methods The best ultrasound-assisted resin model was screened from seven different types of resins, and the influencing factors such as ultrasonic temperature, power, sample concentration and percentage of solvent desorption were optimized under the study of adsorption dynamics and thermodynamics. The changes in content and activity of each compound before and after the enrichment treatment were evaluated in terms of DPPH radical scavenging capacity and neuraminidase inhibition capacity. **Results** The study of kinetics and thermodynamics showed that the total flavonoids is suitable for the Langmuir model, the adsorption process is spontaneous endothermic entropy increase, the total phenol is spontaneous exothermic, and the optimal process for the simultaneous enrichment of the two types of components is optimized through this adsorption mechanism. In the process of ultrasound-assisted AB-8 macroporous resin (25 °C for temperature, 2.5 h for time, 150 W for power, 0.1 g/mL for sample concentration, 70% ethanol for desorption solvent), the content of total flavonoids and total phenolic compounds in the water extract of SS increased 2—3 times, and the content of monomer components and its antioxidant and neuraminidase inhibitory activities were increased significantly. **Conclusion** Ultrasonic-assisted macroporous resin technique is a effective enrichment technique of total flavonoids and total phenolic components in SS.

Key words: *Schizonepetae Spica*; macroporous resin; ultrasonic assistance; total flavonoids; total phenols; adsorption kinetics; adsorption thermodynamics; neuroaminidase; hesperidin; luteoloside; rosmarinic acid; luteolin-7-O-glucuronide

收稿日期: 2023-02-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973435); 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2022005)

作者简介: 王冰倩 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与分析技术。E-mail: 20200895@njucm.edu.cn

*通信作者: 单鸣秋, 副教授。E-mail: shanmingqiu@njucm.edu.cn

荆芥穗是唇形科荆芥属植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥花穗，具有解表散风、透疹、消疮等功效。临床应用中通常使用荆芥穗的水煎液形式，或者先将荆芥穗挥发油提取出来，药渣再经水提后制备为水提浓缩物，与其他组分混合后再喷入挥发油制备成各种剂型^[1]以治疗感冒、发烧、过敏性皮炎和湿疹等疾病。可以看出，除了公认的挥发油外，水提取物也是荆芥穗临床疗效的物质基础之一。许多药理研究表明，荆芥穗水提物具有抗病毒、免疫调节、抗炎、抗氧化等活性^[2]。而这些广泛的生物活性主要归因于其富含酚类和黄酮类物质。据报道，荆芥穗活性物质中的木犀草苷、橙皮苷及迷迭香酸等具有显著抑菌、抗癌、抗病毒和抗氧化作用，在呼吸系统、心血管和中枢神经系统中均有不俗的表现^[3-5]。尽管用水做提取溶剂时安全无污染，成本低，但是单一的水提方法，存在黄酮类等活性物质提取率较低、杂质较多、纯度不高的缺点^[6]。

近年来，大孔树脂吸附技术被引入并应用于中药中活性成分或有效部位和组分的分离富集，具有选择性佳、机械强度高、再生方便、吸附速度快等特点^[7-8]。另外，超声辅助萃取技术具有对植物化学物质活性影响较小、原料利用较好、溶剂和时间消耗较少、经济效益显著等优点。目前，很多研究将该方法与大孔树脂吸附技术相结合，可以有效地提高多种生物活性成分^[9-10]的纯化和富集。

然而，在对荆芥穗活性物质纯化和富集的研究中，还未见使用到超声波辅助大孔树脂的技术。本研究将应用此技术对荆芥穗总黄酮和总酚类化合物进行纯化富集，评价处理前后化合物含量以及活性的变化。期望能为其他研究者更有效地从中药中富集甚至分离活性组分和成分提供参考。

1 仪器和材料

1.1 仪器

UV-1600 型紫外可见分光光度计，上海 Mapapa 设备有限公司；SB25-12DTD 型超声设备，南京赛飞生物科技有限公司；Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪，DAD 检测器，CM7.2 色谱工作站，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；Waters 2695 型高效液相色谱仪，2998 型二极管阵列检测器，美国沃特世公司；Spark 10M 型多功能酶标仪，帝肯（上海）实验器材有限公司；Milli-Q 纯水仪，美国 Millipore 公司。

1.2 试药

荆芥穗购自河北省安国市中草药市场，经南京

中医药大学吴啟南教授鉴定，为唇形科荆芥属植物荆芥 *S. tenuifolia* Briq. 的干燥花穗。1,1-二苯-2-吡啶肼自由基（DPPH），购自北京百灵威科技有限公司；福林酚试剂，购自日本化工（南京）有限公司；对照品芦丁（批号 100080-201811，质量分数 92.2%）、绿原酸（批号 110753-201817，质量分数 96.3%）、橙皮苷（批号 110721-200211，质量分数 95.3%），购自中国食品药品检定研究院；对照品木犀草苷（批号 AF20072618，质量分数 96.6%）购自成都埃法生物科技有限公司；对照品迷迭香酸（批号 20060201，质量分数 98.1%）购自南京金益柏生物科技有限公司；对照品木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷（批号 DSTDM0670，质量分数 97.7%）购自成都德斯特生物技术有限公司；神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒（批号 P0309），购自上海碧云天生物技术公司；乙腈和甲醇，HPLC 级，购自美国 Tedia 公司；HPLC 级甲酸购自上海阿拉丁生化技术有限公司；其他化学试剂均为分析级化学试剂。

大孔树脂 HPD100、HPD600、HPD826 型均购自河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司；大孔树脂 HPD300、HP200 购自北京索莱宝生物技术有限公司；大孔树脂 AB-8、D101 购自上海 Macklin 生化技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

根据《中国药典》2020 年版中水蒸气蒸馏法^[11]，取荆芥穗 300 g 剪碎置于圆底烧瓶中加入 10 倍量水。经电热套加热利用挥发油提取器提取挥发油，待提取器中挥发油液面不再上升后收集挥发油并滤过水提液，再加入 8 倍量水继续提取药渣 2 h 后滤过并合并 2 次提取液。将提取液经旋转蒸发仪浓缩及真空干燥箱干燥制成固体粉末，得到荆芥穗水提物样品 60 g（以生药量计算得率为 20%）。取 5 g 水提物样品经超声辅助大孔树脂最佳工艺处理后的解吸液进行浓缩干燥成固体粉末，得到荆芥穗处理后样品 1 g（以生药量计算得率为 4%）。

2.2 总黄酮和总酚的测定

称取适量荆芥穗水提物样品及处理后样品，分别加入纯水和 70%乙醇超声完全溶解配制成一定质量浓度的水提物供试品溶液和处理后供试品溶液。

采用三氯化铝比色法^[12]测定总黄酮的含量。

总酚含量则采用福林酚法测定，具体测定方法在文献报道^[13]的基础上略有修改。将 0.5 mL 样品

溶液加入到 0.5 mL 0.25 mol/L 的福林酚试剂中混合均匀, 静置 3 min 后, 加入 1 mL 的 10% 碳酸钠溶液, 混合均匀后在室温下静置 30 min, 然后在 4000 r/min 下离心 10 min 取上清液在 760 nm 处测定其吸光度。

分别以芦丁和绿原酸作为总黄酮和总酚的对照品做标准曲线, 以质量浓度为 X 轴, 相应的吸光度为 Y 轴拟合回归方程并计算, 结果拟合方程分别为总黄酮 $Y=0.4547X-0.0059$, $r=0.9995$; 总酚酸 $Y=16.8091X+0.0276$, $r=0.9991$ 。

2.3 大孔树脂预处理

每个树脂在 95% 乙醇中浸泡 24 h 后用纯水冲洗至无醇味, 然后在 2% HCl 溶液中浸泡 4 h, 水洗至中性后在 4% NaOH 溶液中再浸泡 4 h。然后水洗至中性后备用。

2.4 大孔树脂型号筛选

取荆芥穗水提物样品适量, 加纯水完全溶解后配制成 0.1 g/mL 水提物溶液。再取各型号预处理后

树脂 4 g, 加入 20 mL 水提物溶液并在相同条件下进行超声辅助吸附后滤过, 用纯水清洗树脂表面去除残留后, 加入 20 mL 的 95% 乙醇解吸附。测定总黄酮和总酚含量并计算吸附能力(Q_1)、吸附率(R_1)、解吸附能力(Q_2)、解吸率(R_2)^[9]。

$$Q_1=(C_0-C_1)V_0/W$$

$$R_1=(C_0-C_1)/C_0$$

$$Q_2=C_dV_d/W$$

$$R_2=C_dV_d/(C_0-C_1)V_0$$

C_0 和 C_1 为溶液中的初始质量浓度和平衡质量浓度, V_0 为样品溶液体积, W 为所用树脂的干质量, C_d 为解吸溶液中的质量浓度, V_d 为解吸剂 95% 乙醇的体积

结果如表 1 所示, AB-8 的每个指标均高于其他类型, 在富集能力和再生能力中表现最好。根据“相似相溶”的原理, 极性树脂通常对极性化合物具有较高的吸附率, AB-8 属于弱极性这表明荆芥穗水提液中大多数黄酮类和酚类物质具有弱极性且具有一定极性的范德华力和氢键都较低。

表 1 不同型号大孔树脂的筛选

Table 1 Screening of different types of macroporous resin

树脂型号	总黄酮				总酚			
	$Q_1/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Q_2/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$R_1/\%$	$R_2/\%$	$Q_1/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Q_2/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$R_1/\%$	$R_2/\%$
D101	31.09	26.10	78.90	56.57	15.54	15.10	83.57	60.37
HP-20	32.63	26.87	80.23	54.57	15.49	15.29	83.20	60.67
HPD-300	29.91	25.31	78.60	57.07	15.22	14.73	83.30	60.43
AB-8	34.61	28.75	81.87	61.97	19.27	17.07	84.80	63.10
HPD-600	32.78	28.17	81.20	57.43	17.84	16.35	83.17	62.20
S-8	28.75	23.45	79.80	57.90	14.64	13.76	81.99	59.97
HPD-826	32.88	27.97	78.63	61.37	16.67	16.36	84.70	59.57

2.5 吸附动力学研究

取荆芥穗水提物适量加纯水溶解配制成一定质量浓度的水提物溶液 20 mL, 加入到 4 g 预处理好的 AB-8 大孔树脂中, 在功率 150 W, 温度 25、35、45 °C 下进行超声辅助吸附处理。间隔相同时间取吸附液检测吸光度以监测总黄酮和总酚含量。采用 3 种动力学模型(伪一阶、伪二阶和粒子内扩散)来描述吸附过程^[14]。动力学模型的方程如下。

伪一阶动力学模型: $\ln(Q_e-Q_t)=\ln Q_e-K_0t$

伪二阶动力学模型: $t/Q_t=1/(K_1Q_e^2)+t/Q_e$

粒子内扩散模型: $Q_t=K_2t^{1/2}+M$

K_0 、 K_1 和 K_2 分别为伪一阶模型、伪二阶模型、粒子扩散模型的速率常数, Q_t 为单位树脂在 t 时刻的吸附量, Q_e 为单位

树脂在平衡时间时的吸附量

总黄酮和总酚在 AB-8 大孔树脂中的吸附动力学曲线如图 1 所示。结果表明, 吸附能力随时间和温度的增加而升高。此外, 在总黄酮方面, 35 °C 下的平衡吸附能力几乎与 45 °C 相同; 在总酚方面, 35 °C 时的吸附能力明显优于 45 °C。因此, 对于 2 类化合物来说, 35 °C 为最佳吸附温度。

3 种动力学模型如表 2 所示, 可以发现伪二阶模型更适合于总黄酮和总酚的吸附(系数均 > 0.99), 则控速步骤为树脂内部的化学吸附, 其力可能来自于吸附质和树脂之间的电子共享或电子转移^[17]。另外一般来说吸附过程分为液膜扩散、粒子内扩散和吸附反应 3 个步骤, 结果如表 2 所示, 粒子内扩散

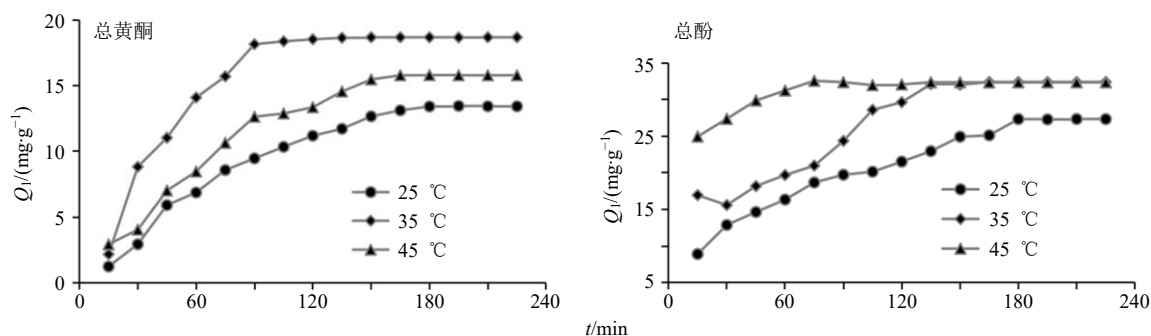


图 1 不同温度下总黄酮和总酚在 AB-8 树脂上的吸附动力曲线

Fig. 1 Adsorption kinetic curves of total flavonoids and total phenols on AB-8 resins at different temperatures

表 2 总黄酮和总酚在 AB-8 树脂上的吸附动力学方程

Table 2 Adsorption kinetics equations and parameters of total flavonoids and total phenols on AB-8 macroporous resin

物质	$T/^{\circ}\text{C}$	伪一阶模型	伪二阶模型	粒子内扩散模型
总黄酮	25	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.013\ 3\ t - 0.074\ 2\ (R^2 = 0.939\ 4)$	$t/Q_t = 0.920\ 4\ t + 32.80\ (R^2 = 0.991\ 5)$	$Q_t = 0.072\ 8\ t^{1/2} + 0.061\ 3\ (R^2 = 0.983\ 0)$
	35	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.030\ 2\ t - 0.141\ 4\ (R^2 = 0.978\ 3)$	$t/Q_t = 1.237\ 6\ t + 40.11\ (R^2 = 0.994\ 7)$	$Q_t = 0.074\ 6\ t^{1/2} - 0.105\ 9\ (R^2 = 0.901\ 1)$
	45	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.031\ 5\ t - 0.959\ 0\ (R^2 = 0.982\ 3)$	$t/Q_t = 0.799\ 1\ t + 48.77\ (R^2 = 0.998\ 1)$	$Q_t = 0.131\ 6\ t^{1/2} - 0.450\ 3\ (R^2 = 0.865\ 8)$
总酚	25	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.014\ 1\ t - 0.424\ 5\ (R^2 = 0.910\ 2)$	$t/Q_t = 1.741\ 0\ t + 68.27\ (R^2 = 0.993\ 8)$	$Q_t = 0.043\ 2\ t^{1/2} - 0.001\ 8\ (R^2 = 0.985\ 0)$
	35	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.042\ 1\ t - 0.266\ 3\ (R^2 = 0.968\ 5)$	$t/Q_t = 1.138\ 0\ t + 16.83\ (R^2 = 0.996\ 0)$	$Q_t = 0.067\ 5\ t^{1/2} - 0.062\ 5\ (R^2 = 0.914\ 5)$
	45	$\ln(Q_e - Q_t) = -0.033\ 8\ t - 0.450\ 3\ (R^2 = 0.989\ 8)$	$t/Q_t = 1.269\ 0\ t + 83.93\ (R^2 = 0.995\ 6)$	$Q_t = 0.051\ 0\ t^{1/2} - 0.025\ 1\ (R^2 = 0.976\ 2)$

模型的所有曲线都没有通过原点,这说明 2 类化合物的吸附速率的控制不仅仅受到粒子扩散的影响,也受到液膜扩散的影响。

2.6 吸附热力学研究

2.6.1 吸附等温线 总黄酮和总酚在 AB-8 上的吸附等温线如图 2 所示。总体上总黄酮和总酚的吸附能力均随温度的升高而增加。而 35 °C 时的总酚的等温线高于 45 °C,这表明总黄酮的吸附是吸热,温度升高有利于吸附,而总酚则是放热,在一定范围内的低温有利于吸附。

分别取 4 g 预处理好的 AB-8 树脂,加入配制好的 5 种不同质量浓度水提物溶液,分别在 3 种温度(25、35、45 °C)下超声辅助吸附这 5 种不同质量浓度溶液并计算树脂平衡吸附量 (Q_e)。采用

Langmuir/Freundlich 方程分析了它们的适应度。相关方程式如下^[15]。

$$R_L = 1/(1 + K_L C_0)$$

$$\text{Langmuir 模型: } C_e/Q_e = C_e/Q_m + 1/(K_L Q_m)$$

$$\text{Freundlich 模型: } \ln Q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e$$

R_L 为平衡参数, K_L 和 K_F 分别为 Langmuir 常数和 Freundlich 常数, C_0 为初始质量浓度, C_e 为平衡质量浓度, Q_m 为理论最大吸附能力

表 3 中总结了等温方程和相应参数,可以看出总酚更适合于 Freundlich 模型,而总黄酮则适合于 Langmuir 模型。 n 表明了吸附性能^[18],所有的 $1/n$ 值都在 0.7~0.9, AB-8 树脂吸附为有利吸附,与分离系数 R_L 一致。 Q_m 值同样反应了 35 °C 作为适合吸附温度的依据。

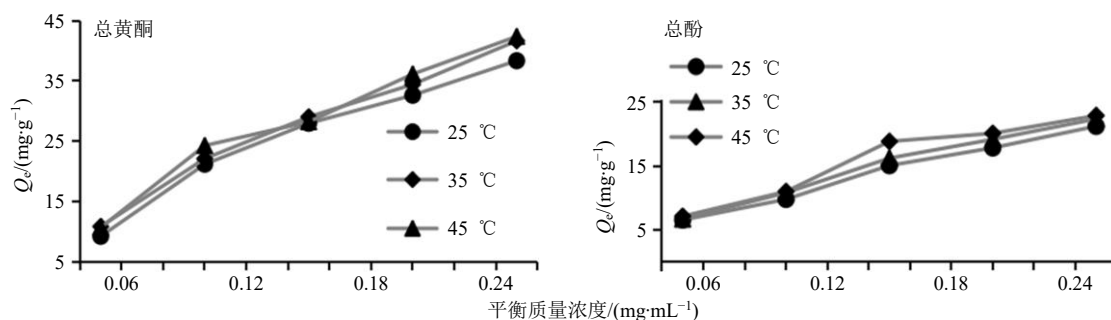


图 2 不同温度下总黄酮和总酚在 AB-8 树脂上的吸附等温曲线

Fig. 2 Adsorption isotherms of AB-8 for total flavonoids and total phenols at different temperatures

表 3 总黄酮和总酚在 AB-8 树脂上的吸附等温方程

Table 3 Adsorption isotherms of total flavonoids and total phenols on AB-8 macroporous resin

物质	$T/^{\circ}\text{C}$	Freundlich 模型				Langmuir 模型			
		方程	K_F	$1/n$	R^2	方程	Q_m	R_L	R^2
总黄酮	25	$\ln Q_e = 0.872\ 9 \ln C_e + 4.923$	137.5	0.872 6	0.971 1	$C_e/Q_e = 0.005\ 200\ C_e + 0.002\ 300$	192.3	0.895 1~0.915 4	0.983 3
	35	$\ln Q_e = 0.821\ 3 \ln C_e + 4.895$	138.6	0.821 0	0.980 0	$C_e/Q_e = 0.004\ 473\ C_e + 0.004\ 889$	223.6	0.954 7~0.963 9	0.987 8
	45	$\ln Q_e = 0.833\ 7 \ln C_e + 4.945$	140.5	0.833 3	0.969 3	$C_e/Q_e = 0.004\ 200\ C_e + 0.006\ 200$	238.1	0.973 2~0.978 4	0.994 3
总酚	25	$\ln Q_e = 0.751\ 0 \ln C_e + 4.090$	59.72	0.750 8	0.989 2	$C_e/Q_e = 0.007\ 300\ C_e + 0.014\ 000$	137.0	0.983 9~0.988 7	0.935 1
	35	$\ln Q_e = 0.765\ 2 \ln C_e + 4.242$	69.51	0.770 4	0.994 9	$C_e/Q_e = 0.006\ 200\ C_e + 0.019\ 000$	161.3	0.989 8~0.992 9	0.991 9
	45	$\ln Q_e = 0.770\ 4 \ln C_e + 4.192$	66.15	0.765 1	0.976 4				

2.6.2 热力学参数 研究了吉布斯自由能变化 (ΔG)、焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS) 3 个指标^[15], 将 3 个 Q_e 值设为 5、10、15 mg/g, 相关 C_e 值采用上述方程计算。 $1/T$ 和 $\ln C_e$ 分别作为横坐标和纵坐标, 得到 Clapeyron-Clausius 方程和 ΔH 。

$$\ln C_e = \Delta H/RT - \ln K_0$$

K_0 为常数, R 为气体常数 [$8.314\text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$], T 为热力学温度, ΔG 可以由 Gibbs 方程和 Freundlich 方程推导出

$$\Delta G = -nRT$$

n 是 Freundlich 方程中的表观常数, ΔS 由 Gibbs Helmholtz 方程得到

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$$

结果如表 4 所示, 列出了 AB-8 大孔树脂上总黄酮和总酚的热力学参数。 ΔG 均 <0 , 吸附为自发反应。 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 表明总黄酮的吸附是一个自发、吸热和熵增的过程并随着吸附量的增加 ΔH 减小, 这可能是由于吸附质中偶极矩的存在和吸附剂表面吸附中心能量的差异所致。 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 表明总酚的吸附是一个自发、放热和熵减的过程。

2.7 超声波辅助的大孔树脂富集工艺优化

2.7.1 最佳温度筛选 其他条件相同下分别于 25、35、45 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下进行超声辅助吸附处理, 吸附过

程中间隔相同时间分别取出一定体积的吸附溶液进行吸光度测定评价总黄酮和总酚的吸附来筛选最佳温度。如图 3 所示, 结果表明了不同温度下总黄酮和总酚的吸附情况, 其现象与热力学研究结果一致, 因此, 确定 35 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳工艺温度。另外 2 类成分在最佳温度下, 均能在 2.5 h 达到吸附平衡。因此, 确定 2.5 h 为最佳工艺时间。

2.7.2 最佳功率筛选 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下分别于 50、100、150、200 W 的不同功率下进行超声辅助吸附处理。吸附过程中间隔相同时间分别取出一定体积的吸附溶液进行吸光度测定评价总黄酮和总酚的吸附来筛选最佳功率。如图 4 所示, 结果表明总黄酮和总酚的吸附能力均随超声功率的增加而增加。而当功率 200 W 时, 会发现一些非基因断裂的树脂粒子。因此, 确定 150 W 为工艺最佳功率。

2.7.3 最佳上样质量浓度筛选 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、150 W 下分别加入 5 种不同质量浓度水提物溶液 (0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g/mL) 超声辅助吸附/解吸附处理。分别计算不同质量浓度溶液的吸附率和解吸率筛选出最佳上样质量浓度。结果如表 5 所示, 显示了不同的提取物质质量浓度对吸附率和解吸率的影响。以这 2 个比率的乘积值作为回收率进行评价。结果表

表 4 AB-8 树脂上总黄酮和总酚的热力学参数

Table 4 Adsorption thermodynamics of total flavonoids and total phenols on AB-8 macroporous resin

物质	$Q_e/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1})$			$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K})$		
			298 K	308 K	318 K	298 K	308 K	318 K
总黄酮	5	851	-2838	-3118	-3171	3.728	12.886	13.497
	10	683				3.218	12.340	12.120
	15	575				2.855	11.989	11.780
总酚	5	-3983	-3299	-3324	-3455	-2.295	-2.141	-1.661
	10	-3910				-2.051	-1.904	-1.432
	15	-3857				-1.873	-1.732	-1.265

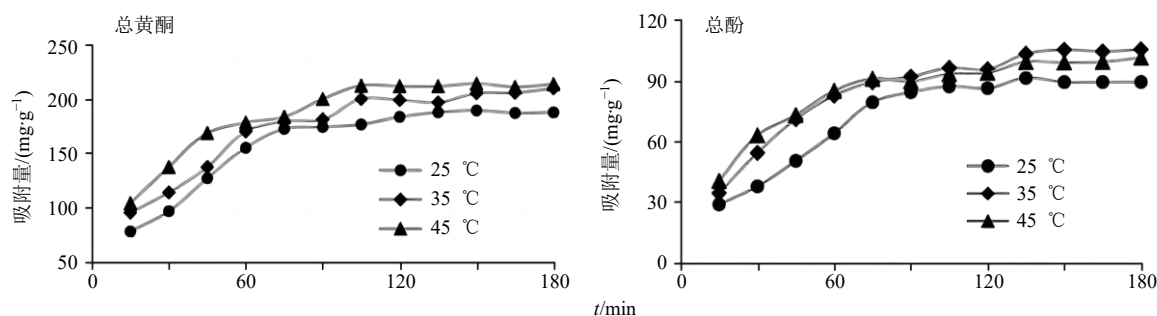


图 3 最佳温度的筛选

Fig. 3 Screening of optimal temperature

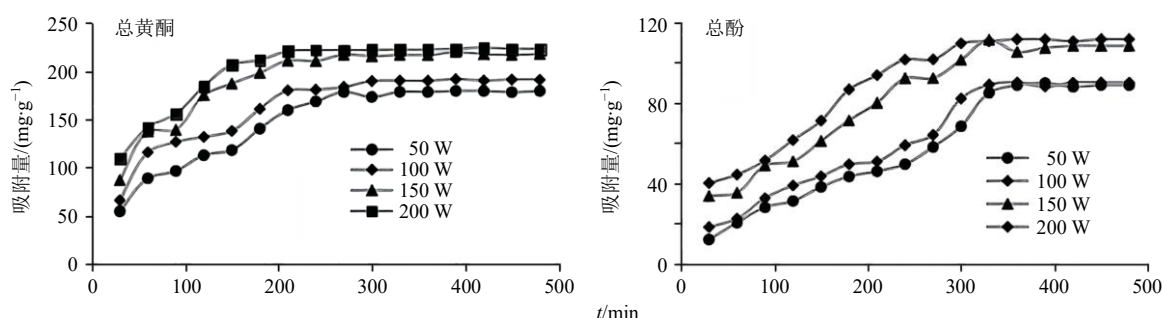


图 4 最佳功率的筛选

Fig. 4 Screening of optimal power

表 5 最佳上样质量浓度筛选

Table 5 Screening of optimal sample concentration

上样质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	总黄酮			总酚		
	吸附率/%	解吸附率/%	回收率/%	吸附率/%	解吸附率/%	回收率/%
0.05	61.20	68.80	42.11	86.90	49.70	43.19
0.10	55.30	91.90	50.82	74.80	79.70	59.62
0.15	50.00	91.30	45.65	70.00	80.70	56.50
0.20	34.00	98.60	33.52	57.00	82.50	47.03
0.25	51.25	85.40	43.77	71.40	72.30	51.62

明, 在 0.1 g/mL 时 2 类化合物的回收率均最高。因此, 确定最佳上样质量浓度为 0.1 g/mL。

2.7.4 最佳解吸乙醇体积分数筛选 在最佳温度、体积分数浓度和功率下吸附后, 分别使用 60%、70%、80%、95%乙醇作为解吸溶剂进行解吸附。计算不同百分比解吸剂的解吸率来筛选出最佳洗脱剂百分比。结果如表 6 所示, 显示了不同乙醇体积分

数对解吸率的影响。当以 70%乙醇为解吸溶剂时, 总黄酮和总酚的解吸率均为最高。因此, 确定 70%乙醇作为最佳解吸附溶剂。

2.8 HPLC 定量分析

2.8.1 色谱条件 色谱柱为 Waters X-Select C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 温度为 30 °C; 体积流量为 0.8 mL/min; 进样体积为 10 μL; 流动相为 0.3%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序: 0~10 min, 5%~13%乙腈; 10~21 min, 13%~17%乙腈; 21~38 min, 17%~25%乙腈; 38~50 min, 25%~32%乙腈; 50~60 min, 32%~45%乙腈; 60~70 min, 45%~95%乙腈; 70~75 min, 95%~5%乙腈; 检测波长设置为 270 nm。

2.8.2 对照品溶液的制备 分别精密称取橙皮苷、

表 6 最佳乙醇体积分数筛选

Table 6 Screening of optimal ethanol concentration

乙醇/%	解吸率/%		乙醇/%	解吸率/%	
	总黄酮	总酚		总黄酮	总酚
60	53.80	78.40	80	54.20	74.40
70	81.90	83.90	95	58.78	69.30

木犀草苷、迷迭香酸和木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷对照品适量，加入 70%乙醇制成含橙皮苷 99.41 $\mu\text{g/mL}$ ，木犀草苷 100.80 $\mu\text{g/mL}$ ，木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷 105.3 $\mu\text{g/mL}$ 和迷迭香酸 100.12 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.8.3 供试品溶液的制备 精确称取 100 mg 水提物样品和 100 mg 处理后样品，分别加入 50 mL 纯水和 50 mL 70%乙醇溶解，经 0.22 μm 滤膜滤过后制成水提物供试品溶液和处理后供试品溶液。

2.8.4 方法学考察 对其定量分析进行了方法学验证，包括线性、精度、重复性、稳定性和回收率。结果见表 7，4 种成分具有良好的线性关系，精密度、重复性和稳定性的 RSD 值均小于 3%，回收率

限度符合《中国药典》2020 年版规定^[11]。即分析方法可用于这 4 种成分的测定。

2.8.5 样品测定 按照上述优化后的工艺制备了处理后样品。测定其总黄酮和总酚及 4 个单体成分(木犀草苷、橙皮苷、迷迭香酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷)的含量，结果见表 8，色谱图见图 5。很容易观察到超声辅助大孔树脂处理显著使总黄酮和总酚含量增加。

2.9 DPPH 自由基清除和神经氨酸酶抑制活性评价

2.9.1 DPPH 自由基清除活性测定 取 DPPH 适量，用甲醇溶解后稀释为 0.1 mg/mL 待用，分别配制不同质量浓度的水提物供试品溶液和处理后供试品溶液(12.5、25.0、50.0、75.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$)。DPPH

表 7 4 种成分的线性、精密度、重复性、回收率和稳定性

Table 7 Calibration curves, precision, repeatability, stability and recovery of four analytes

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%			平均回收率/%	
				精密度	重复性	稳定性	平均值	RSD
橙皮苷	$Y=0.243\ 9\ X-0.115\ 2$	0.999\ 94	6.213~99.410	1.35	2.17	1.80	97.34	4.90
木犀草苷	$Y=0.448\ 3\ X-0.524\ 7$	0.999\ 95	6.300~100.800	2.37	2.94	2.68	99.66	3.76
木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	$Y=0.380\ 5\ X-0.297\ 0$	0.999\ 87	6.581~105.300	0.56	1.10	1.18	95.18	3.25
迷迭香酸	$Y=0.196\ 6\ X-0.221\ 9$	0.999\ 99	6.258~100.100	2.43	2.89	1.73	99.25	4.78

表 8 大孔树脂处理前后荆芥穗提取物中总黄酮、总酚含量与单体成分含量的比较

Table 8 Comparison of total flavonoids, total phenols and monomers in extracts of SS before and after treatment with macroporous resin

样品	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	橙皮苷	木犀草苷	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	迷迭香酸	总黄酮	总酚
处理前	4.975	10.872	4.832	0.780	228.901	118.918
处理后	14.480	28.983	7.131	2.449	514.607	323.410

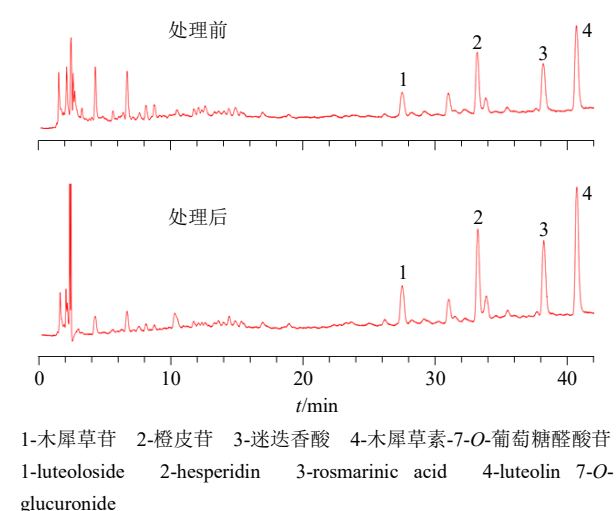


图 5 处理前后样品的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of samples before and after treatment

自由基清除能力测定参照文献报道^[16]进行。根据色谱中的 DPPH 峰面积，计算自由基清除率，结果见表 9。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = (\text{PA}_{\text{空白}} - \text{PA}_{\text{样品}}) / \text{PA}_{\text{空白}}$$

$\text{PA}_{\text{空白}}$ 和 $\text{PA}_{\text{样品}}$ 分别表示空白对照溶液和反应溶液的 DPPH 峰面积

分别以质量浓度为 X 轴，以水提物的抑制率及处理后的抑制率为 Y 轴拟合方程(处理前 $Y=0.559\ 9\ X+27.768$, $R^2=0.940\ 6$; 处理后 $Y=0.631\ 3\ X+36.272$, $R^2=0.945\ 7$)并计算 DPPH 清除的半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50})，结果如表 10 所示。通过计算可以看出，经超声辅助大孔树脂处理后的抗氧化活性提高约 1.8 倍。

2.9.2 神经氨酸酶抑制活性测定 神经氨酸酶抑制

表 9 水提物供试品溶液和处理后供试品溶液色谱中的 DPPH 峰面积

Table 9 DPPH peak area in chromatography of aqueous extract test solution and treated test solution

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	PA _{空白}	处理前水提物		处理后水提物	
		PA _{样品}	抑制率/%	PA _{样品}	抑制率/%
12.50	6.498 2	4.583 3	29.47	4.047 4	37.72
25.00		3.252 7	49.95	2.924 8	54.99
50.00		3.035 0	53.29	1.675 8	74.21
75.00		2.033 9	68.70	0.799 3	87.71
100.00		1.142 9	82.41	0.391 8	93.97

表 10 处理前后抗氧化和神经氨酸酶抑制活性比较

Table 10 Comparison of antioxidant and neuraminidase inhibitory activities before and after treatment

样品	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	DPPH 自由基清除	神经氨酸酶抑制
处理前	39.83	315.71
处理后	21.80	88.24

剂 (neuraminidase inhibitor, NAI) 筛选按照试剂盒说明进行操作。

(1) 绘制标准曲线: 在 96 孔荧光酶标板内每孔加入 70 μL 检测缓冲液, 再分别加入 0、1.0、2.0、5.0、7.5、10.0 μL 的神经氨酸酶, 用纯水补足至总体积 90 μL 。得回归方程 $Y=-610.25 X+66\ 317.0$, $R^2=0.986\ 9$ 。

(2) 样品测定: 在加入神经氨酸酶后再加入 10 μL 样品后纯水补足体积。振动混匀 1 min 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min 使完全反应后, 每孔加入 10 μL 荧光底物。再振动混匀 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后进行荧光测定。激发波长为 322 nm, 发射波长为 450 nm。计算神经氨酸酶抑制率, 结果见表 11。

$$\text{神经氨酸酶抑制率}=(A_0-A)/A_0$$

A_0 为对照组的吸光度, A 为样品溶液的吸光度

处理前后的样品分别设置不同的质量浓度检测荧光强度, 计算对应的抑制率。以质量浓度为 X 轴, 抑制率为 Y 轴建立曲线, 并计算神经氨酸酶抑制的 IC₅₀ 值, 结果如表 10 所示。通过计算可以看出, 经超声辅助大孔树脂处理后的神经氨酸酶抑制活性增加了约 3.5 倍。

对于黄酮和酚类成分的抗氧化和抗流感活性^[19-21]已有很多报道, 经过超声辅助大孔树脂处理后的样品抗氧化和抗流感的活性有明显提高, 这可能是由

表 11 处理前后供试品溶液的神经氨酸酶抑制率

Table 11 Neuraminidase inhibition rate of test solution before and after treatment

水提物	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	回归方程
处理前	2 500.0	100.00	$Y=0.230\ 6 \ln X+0.766\ 1$,
	1 250.0	78.53	$R^2=0.986\ 6$
	625.0	65.43	
	312.5	51.09	
处理后	1 250.0	103.00	$Y=0.219\ 8 \ln X+1.033\ 6$,
	625.0	99.37	$R^2=0.916\ 7$
	312.5	83.11	
	208.3	63.59	
	156.3	61.46	

于处理后的总黄酮和总酚含量的增加以及特定生物活性成分的富集所致。

3 结论

对机体来说, 氧化和抗氧化失衡会导致组织损伤, 是引发各种疾病的因素之一, 对健康极为不利。流感病毒则高发于春冬两季, 传播速度快且易引起其他严重呼吸道并发症。而荆芥穗在许多研究中都表现出明显的抗氧化和抗病毒作用且大都集中在挥发油组分的研究上^[16,22], 在大健康时代背景下寻求更多生物活性显著的植物药例如荆芥穗, 和积极实现资源利用最大化, 扩大药用部位和范围, 对于助力恢复和保持健康是极为重要的。本研究以荆芥穗水提物为例, 对超声辅助大孔树脂吸附/解吸对某些中药中黄酮类和酚类物质的富集提供了思路。在吸附过程中, 研究了荆芥穗总黄酮和总酚吸附的动力学和热力学, 发现这 2 类成分的吸附机制有所差异, 针对此, 本实验合理优化了同时富集 2 类成分时的关键因素。在此技术和条件下, 有效提高了荆芥穗水提物中活性物质的含量并增强了抗氧化和抗流感的作用, 该技术的使用也可以为扩大荆芥穗的应用范围提供帮助。研究表明, 超声波辅助大孔树脂处理是一种有效的富集和纯化技术, 被认为可以促进树脂表面氢键的形成和粗糙度的改变, 促进吸附过程。在此基础上, 也希望为超声辅助大孔树脂吸附/解吸富集和纯化活性组分和成分提供一些研究证据和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 243-244, 543-544, 994-995,

- 1121-1122, 1403-1404, 1626, 1650.
- [2] Wang L X, Wu H W, Liu C, *et al.* A review of the botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Stemonae Radix* [J]. *Phytochem Rev*, 2022, 21(3): 835-862.
- [3] 管仁伟, 曲永胜, 顾正位, 等. 木犀草苷的药理作用研究 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(1): 1-3.
- [4] 钱俊臻, 王伯初. 橙皮苷的药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(1): 176-180.
- [5] Guan H Q, Luo W B, Bao B H, *et al.* A comprehensive review of rosmarinic acid: From phytochemistry to pharmacology and its new insight [J]. *Molecules*, 2022, 27(10): 3292.
- [6] 景联鹏, 唐徐禹, 顾丽莉, 等. 植物中黄酮类化合物提取技术研究进展 [J]. 纤维素科学与技术, 2021, 29(4): 60-70.
- [7] Lee J, Kim J, Lee Y, *et al.* Radiation protection effects of *Schizonepeta tenuifolia* water extracts by gender in SD rats [J]. *J Korean Soc Radiol*, 2021, 15: 313-320.
- [8] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [9] Shen D B, Labreche F, Wu C E, *et al.* Ultrasound-assisted adsorption/desorption of jujube peel flavonoids using macroporous resins [J]. *Food Chem*, 2022, 368: 130800.
- [10] Wang L, Boussetta N, Lebovka N, *et al.* Ultrasound assisted purification of polyphenols of apple skins by adsorption/desorption procedure [J]. *Ultrason Sonochem*, 2019, 55: 18-24.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2022: 233, 480.
- [12] 马雪洁, 程路峰, 杨淑梅, 等. 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1130-1133.
- [13] Hou M Y, Zhang L B. Adsorption/desorption characteristics and chromatographic purification of polyphenols from *Vernonia patula* (Dryand.) Merr. using macroporous adsorption resin [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 170: 113729.
- [14] 谭佳琪, 孙旗, 刘春成, 等. 大孔树脂吸附树莓花色苷的吸附性能 [J]. 食品科技, 2018, 43(9): 302-309.
- [15] 张媛, 康龙丽, 金天博, 等. 西藏雪莲总黄酮在大孔吸附树脂上的吸附动力学和热力学研究 [J]. 离子交换与吸附, 2016, 32(4): 358-367.
- [16] Guo S C, Yu S, Qian Y, *et al.* Correlation of antioxidant activity and volatile oil chemical components from *Schizonepeta tenuifolia* herbs by chemometric methods [J]. *Int J Food Prop*, 2017, 20(Sup1): S1082-S1092.
- [17] 娄嵩, 刘永峰, 白清清, 等. 大孔吸附树脂的吸附机理 [J]. 化学进展, 2012, 24(8): 1427-1436.
- [18] 熊利芝, 王溶, 田伟, 等. 大孔吸附树脂对杜仲叶总黄酮的吸附热力学和动力学研究 [J]. 离子交换与吸附, 2013, 29(06): 526-534.
- [19] 赵薪苑, 陈婧, 方建国, 等. 中药和天然药物中黄酮抗病毒活性及其机制研究进展 [J]. 医药导报, 2018, 37(4): 410-415.
- [20] 吴红伟, 李东辉, 宋沁洁, 等. 黄芪趁鲜切制饮片与传统饮片化学成分及体外抗氧化活性比较研究 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7039-7047.
- [21] Sekizawa H, Ikuta K, Mizuta K, *et al.* Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects of berries [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(9): 2239-2241.
- [22] 何婷, 汤奇, 曾南, 等. 荆芥挥发油及其主要成分抗流感病毒作用与机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1772-1777.

[责任编辑 郑礼胜]