鼠麴草地上部分活性成分的高效富集和纯化工艺

陈　叶，韩清华，喻芳芳，宋嘉文，范思洋 *

（中国医药工业研究总院有限公司上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了 HPLC 法测定绿原酸、咖啡酸、4,5- 二咖啡酰奎宁酸、1,3,4- 三咖啡酰奎宁酸、木犀草素 5 个代表性活性成分的含量，探究各类树脂对上述 5 个成分的静态和动态吸附 / 解吸附性能，筛选最优树脂，并考察树脂柱上样和洗脱工艺参数。建立了 UPLC 法测定绿原酸、咖啡酸、咖啡酰奎宁酸、黄酮等 10 个代表性活性成分的含量，以活性成分含量和转移率为指标，探究碱沉工艺参数，如溶剂类型、溶剂添加顺序、料液比和加碱量等。结果显示，LS305 型大孔吸附树脂对 5 个代表性成分具有较好的吸附和解吸能力，采用 0.5％甲酸水溶液作为除杂溶剂，可除去约 82％的杂质固形物；碱沉试验中，采用经 LS305 型树脂、60％乙醇洗脱所得的产物为原料，以乙酸乙酯和乙醇（体积比 4 ∶ 1）为碱沉溶剂，总料液比 100 mg/mL，振荡混匀后加入 0.15％氨水，过滤，滤液减压浓缩干燥，得鼠麴草新型提取物，其中 10 个活性成分的总量可达 50％以上。

关键词：鼠麴草；大孔吸附树脂；碱沉；咖啡酰奎宁酸；黄酮；咖啡酸

中图分类号：R917；R284.2　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)12-1676-10

引用：陈　叶，韩清华，喻芳芳，等．鼠麴草地上部分活性成分的高效富集和纯化工艺［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(12)：1676-1685．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.12.010

High Enrichment and Purification Process of Active Components from the Aerial Parts of *Gnaphalium Affine*

CHEN Ye, HAN Qinghua, YU Fangfang, SONG Jiawen, FAN Siyang*

(*National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination and quantification of 5 representative compounds, namely chlorogenic acid, caffeic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 1,3,4-tricaffeoylquinic acid and luteolin, in the resin separation processes. The optimal resin was selected by the static and dynamic adsorption/desorption experiments. Process optimization of packed column separation was conducted. A UPLC method was also established for the determination and quantification of 10 representative compounds, e.g., chlorogenic acid, caffeic acid, caffeoylquinic acids and flavonoids, in alkali precipitation processes. The purities and recovery ratios of active compounds were determined to optimize the alkali precipitation process parameters, including solvent type, solvent addition sequence, material-liquid ratio and amount of alkali. The results showed that LS305 resin had better adsorption and desorption capacities for the five components. The majority of impurities could be washed by 0.5％ formic acid, which could remove about 82％ of impurities and solids. The efficient separation of active compounds could be achieved by 60％ aqueous ethanol. The alkali precipitation was carried out with ethyl acetate-ethanol (4 ∶ 1) as the precipitant in a material-liquid ratio of 100 mg ∶ 1 mL. Then, 0.15％ ammonia was added. After filtration and evaporation, the novel extract of *Gnaphalium affine* was obtained with the total contents (mass fraction) of 10 compounds more than 50％.

Key Words: *Gnaphalium affine*; macroporous resin; alkali precipitation; caffeoylquinic acid; flavonoid; caffeic acid

鼠麴草，又称鼠曲草、佛耳草等，为菊科鼠麴草属植物鼠麴草（*Gnaphalium affine* D. Don）的干燥地上部分，始载于《名医别录》，因富含多酚、黄酮苷等物质[1]，可用于治疗风湿痹痛[2]。鼠麴草提取物（*Gnaphalium affine* D. Don extract，GAD）是本课题组前期以降尿酸活性为导向，筛选出的活性组合物，通过萃取鼠麴草提取液、合并乙酸乙酯相和正丁醇相而制得[3]。前期研究表明，GAD 具有降尿酸（促进尿酸排泄、抑制尿酸生成）[4]、护肾[3—4]、保肝[3]的功效，其主要活性成分为黄酮（苷）、咖啡酸及咖啡酸衍生物（咖啡酰奎宁酸类、咖啡酸葡萄糖酯、咖啡酸甲 / 乙酯）等[5—7]。

原萃取工艺中使用了大量低沸点溶剂（如石油醚）[3]，安全系数低且对环境不友好，不适合工业化生产；另外，原萃取工艺得到的 GAD 含有大量非活性物质，这导致服用剂量增大，同时影响活性物质在体内的溶出和吸收[8]。因此，探索新方法（如大孔吸附树脂法）替代原萃取工艺，并进一步富集活性成分是此次研究的主要目的。

本研究以大孔树脂联合碱沉技术替代原萃取工艺，以期提高鼠麴草提取物中活性成分的含量，扩大提取物的应用范围，同时为具有相似性质的中药提取物的分离和纯化提供参考。

1 仪器与试药

Vanquish 型超高效液相色谱仪、U3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；MS105DU 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

树脂名称、类型及生产厂家如表 1 所示；化合物信息如表 2 所示；鼠麴草干燥地上部分于 2023 年 5 月采于中国浙江省衢州市，经上海医药工业研究院有限公司范思洋研究员鉴定为鼠麴草；乙腈为 HPLC 级，甲酸、乙醇、甲醇、乙酸乙酯均为分析级，水为纯化水。

收稿日期：2023-12-12

基金项目：国家自然科学基金项目（81603279）

作者简介：陈　叶（1998—），女，硕士研究生，专业方向：中药药效物质基础及中药制剂。

通信作者：范思洋（1982—），男，研究员，博士生导师，从事中药药效物质基础的研究。

E-mail：max_121@163.com

表 1　树脂名称、类型及生产厂家

Tab.1　Trade Names, Types and Suppliers Properties of the Resins

树脂名称	树脂类型	生产商家
LS305	聚苯乙烯型大孔吸附树脂	陕西蓝深特种树脂有限公司
LS300B	聚苯乙烯型大孔吸附树脂	陕西蓝深特种树脂有限公司
D101	聚苯乙烯型大孔吸附树脂	天津浩聚树脂科技有限公司
AB-8	聚苯乙烯型大孔吸附树脂	山东东鸿化工有限公司
HP20	聚苯乙烯型大孔吸附树脂	日本三菱化学公司
D113	强酸型阳离子交换树脂	陕西蓝深特种树脂有限公司
D001	强酸型阳离子交换树脂	陕西蓝深特种树脂有限公司

2 方法与结果

2.1 溶液配制及药材提取

混合对照品溶液：精密称取各对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加甲醇制成化合物 **1** ～ **10** 质量浓度分别为 0.2、0.06、0.8、0.4、0.3、0.4、0.3、0.06、0.3、0.15 mg/mL 的混合对照品溶液，用甲醇逐级稀释，配制成系列对照品溶液。

药材提取：取鼠麴草的干燥地上部分，切段，用 15 倍体积的 60％乙醇充分浸泡后，加热回流提取 2 次，每次 2 h；合并提取液，浓缩至无醇味，加水稀释至质量浓度约 0.5 kg/L，离心（1 509×*g*）10 min，得提取浓缩上清液，备用[9]。

树脂碱沉工艺后终产物：取大孔树脂 LS305 装柱，将浓缩上清液上样至完全，然后用 10 个柱床体积（bed volume，BV）的 0.05％甲酸洗脱除杂，再用 10 BV 的 60％乙醇溶液洗脱，收集洗脱液；洗脱液经减压蒸馏、浓缩、干燥，得树脂洗脱物。取树脂洗脱物，按总料液比为 100 mg/mL 加入沉淀剂［即乙醇和乙酸乙酯（体积比 1 ∶ 4）；先加入乙酸乙酯，振荡混匀后加入乙醇，再次振荡混匀］，过滤后得一次滤液；向上述滤液中加入 0.05％氨水，振荡混匀后过滤，将滤液减压浓缩、干燥，得树脂碱沉工艺后终产物。

2.2 色谱条件及化合物定量

化合物 **1**、**2**、**7**、**9**、**10** 的 HPLC 定量方法考察及验证参见文献[10]，化合物 **1** ～ **10** 的 UPLC 定量方法考察及验证参见文献[11]，液相色谱图及化合物结构如图 1 所示。

HPLC 色谱条件：色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1％

表 2　化合物的序号、名称、纯度及来源

Tab.2　Serial Numbers, Names, Purities and Sources of Chemical Compounds

化合物序号	化合物	英文全称	英文缩写	含量/%	生产厂家
1	绿原酸	chlorogenic acid	CGA	98.1	上海诗丹德生物技术有限公司
2	咖啡酸	caffeic acid	CA	96.8	上海诗丹德生物技术有限公司
3	4′- 羟基 -5- 甲氧基 -7-*O*-*β*-D- 吡喃葡萄糖基二氢黄酮	4′-hydroxy-5-mehtoxy-7-*O*-*β*-D-glucopyranosyl dihydroflavone	Flav-glc	≥ 95.0	自制
4	1,5- 二咖啡酰奎宁酸	1,5-dicaffeoylquinic acid	1,5-2CQA	≥ 98	上海诗丹德生物技术有限公司
5	3,5- 二咖啡酰奎宁酸	3,5-dicaffeoylquinic acid	3,5-2CQA	>98.0	上海诗丹德生物技术有限公司
6	木犀草素 -4′- 葡萄糖苷	luteolin-4′-glucoside	Lut-glc	≥ 95.0	自制
7	4,5- 二咖啡酰奎宁酸	4,5-dicaffeoylquinic acid	4,5-2CQA	91.3	上海诗丹德生物技术有限公司
8	1,3,5- 三咖啡酰奎宁酸	1,3,5-tricaffeoylquinic acid	1,3,5-3CQA	≥ 95.0	自制
9	木犀草素	luteolin	Lut	96.2	上海诗丹德生物技术有限公司
10	1,3,4- 三咖啡酰奎宁酸	1,3,4-tricaffeoylquinic acid	1,3,4-3CQA	≥ 95.0	自制

甲酸水溶液，B 为甲醇，梯度洗脱（0—10 min，B 10%—20%；10—20 min，B 20%—25%；20—25 min，B 25%—28%；25—29 min，B 28%；29—32 min，B 28 % —50 %；32—38 min，B 50 % —75%；38.01—40 min，B 10%）；检测波长 280 nm；流速 1 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 10 μL。

UPLC 色谱条件：色谱柱 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱（2.1 mm×150 mm，1.8 μm）；流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—9 min，B 8%—13%；9.01—17 min，B 22%—25%；17—25 min，B 25 % —50 %；25.01—35 min，B 90 %；35.01—40 min，B 8%）；检测波长 280 nm；流速 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 1 μL。

2.3　树脂工艺考察

2.3.1　树脂静态吸附与解吸试验

静态吸附试验（平行 3 次）：取表 1 中每种类型的干燥树脂 2 g，置锥形瓶中，加入“**2.1**”项下浓缩上清液 15 mL，密塞后置摇床中，于室温条件下振摇（120 r/min）24 h，树脂吸附饱和后，吸取适量上清液，经 0.22 μm 滤膜过滤，按“**2.2**”项下 HPLC 色谱条件进样测定，测定上清液中化合物 **1**、**2**、**7**、**9**、**10** 的质量浓度，并按式①计算树脂对 5 个代表性活性成分的吸附量，结果如表 3 所示，可见 LS305 和 D113 的静态吸附能力均表现较好。

静态解吸试验（平行 3 次）：将静态吸附后的上清液全部吸干，得吸附饱和后的树脂，分别用去离子水 15 mL 洗涤树脂，移去全部水洗液，加入 60%乙醇 15 mL，密塞，置摇床中，于室温条件下振摇（120 r/min）4 h，解吸完全后吸取适量上清液，过滤后按“**2.2**”项下 HPLC 色谱条件进样测定，测定化合物在上清液中的浓度，并计算树脂对 5 个成分的静态解吸率（式②），结果如表 4 所示，D113 对 **1**、**2**、**7**、**10** 的解吸效果很差，而 LS305 对大部分化合物的解吸效果均较好，故选择 LS305 进行下一步试验。

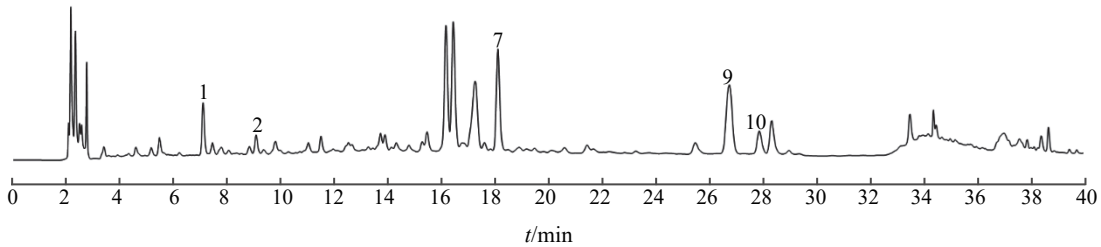
吸附量 =（浓缩上清液中化合物浓度 × 浓缩上清液体积 − 静态吸附后上清液中化合物浓度 × 浓缩上清液体积）/ 树脂质量　　①

解吸率 =（静态解吸后上清液中化合物浓度 × 静态解吸液体积）×100%/（浓缩上清液中化合物浓度 × 浓缩上清液体积 − 静态吸附后上清液中化合物浓度 × 浓缩上清液体积）　　②

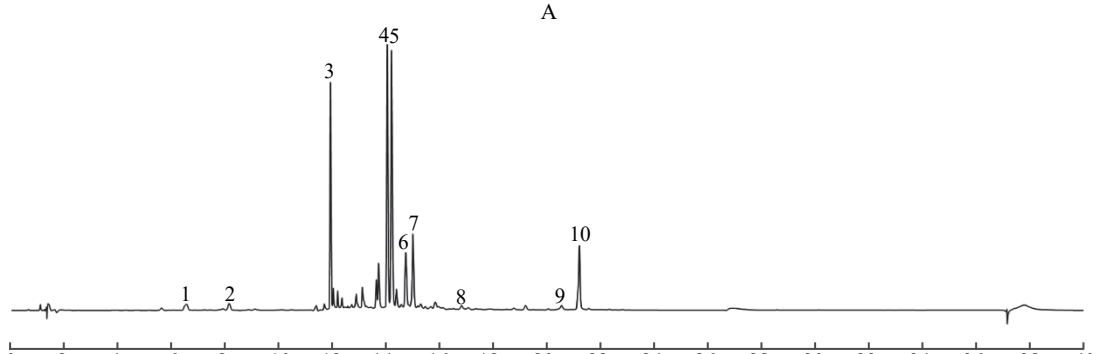
表 3　树脂对 5 个代表性成分的静态吸附量 /（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±s，n=3）

Tab.3　Static Adsorption Capacity of Resin on Five Active Representative Components/（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±s，n=3）

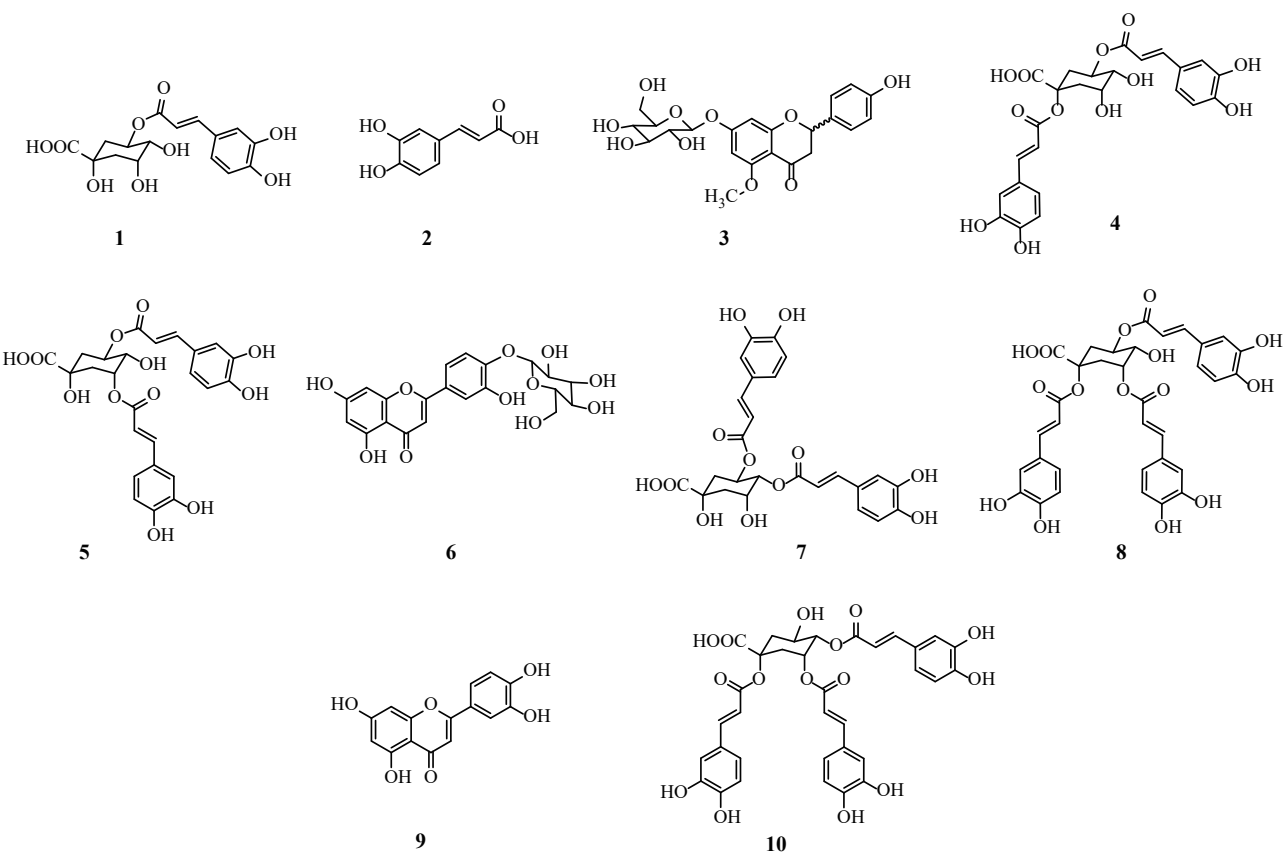
化合物	LS305	AB-8	D101	D113	D001	LS300B	HP20
1	0.36±0	0.19±0.01	0.20±0.03	0.38±0	0.07±0	0.03±0	0.18±0
2	0.01±0	0.01±0	0.01±0	0	0	0	0.01±0
7	0.39±0	0.38±0	0.39±0	0.39±0	0.32±0	0.25±0.01	0.38±0
9	0.07±0	0.07±0	0.07±0	0.07±0	0.07±0	0.07±0	0.07±0
10	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0
总和	0.87±0	0.68±0.01	0.70±0.03	0.86±0.01	0.50±0	0.38±0.02	0.68±0



A



B



C

A—鼠麴草浓缩上清液的 HPLC 色谱图（280 nm）及 5 个代表性活性成分的出峰情况；B—树脂碱沉工艺后终产物（碱沉上清液固形物）的 UPLC 色谱图（280 nm）及 10 个活性成分的出峰情况；C—10 个活性成分的化学结构。

图 1　液相色谱图及化合物 1 ～ 10 的化学结构

Fig.1　Liquid Chromatograms and Chemical Structures of Compounds **1** – **10**

表 4　树脂对 5 个代表性活性成分解吸率 /%（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4　Resin Static Desorption Rate of Five Active Representative Components/%（$\bar{x}\pm s$, n=3）

化合物	LS305	AB-8	D101	D113	D001	LS300B	HP20
1	82.42±1.64	91.90±3.62	88.09±4.87	5.54±0.94	>100	>100	84.34±1.24
2	71.42±1.49	>100				>100	>100
7	86.06±2.84	>100	>100		>100	64.38±6.28	>100
9	32.42±2.64	>100	>100	>100	>100	26.26±5.55	>100
10	82.84±7.80	>100	>100		>100	75.81±6.46	>100
总和	79.82±1.01	>100	>100	>100	>100	66.20±3.88	>100

2.3.2　LS305 大孔吸附树脂的动态吸附与解吸试验

将预处理好的 LS305 树脂进行湿法装柱（3 cm×17 cm，1BV=100 mL），取“**2.1**”项下浓缩上清液，以 0.5 BV/h 流速上样 200 mL（柱后得上样流出液），再以 2 BV/h 流速依次用去离子水（柱后得水洗液）以及 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%乙醇水溶液（柱后得不同体积分数乙醇洗脱液）各 500 mL（5 BV）洗脱，每 100 mL 收集为 1 个流份，每个流份经 0.22 μm 滤膜过滤后进 HPLC 检测，计算 5 个代表性活性成分的洗脱质量（质量浓度 × 流份体积）；从每个流份中再精密吸取 10 mL，蒸干后称重，计算固形物中代表性活性成分含量。不同流份固形物的洗脱质量及活性成分转移率（流份中活性成分质量 ×100% / 已上样的活性成分质量）结果如图 2 所示，5 个代表性活性成分单独以及总的洗脱质量如图 3 所示。

结果显示，上样流出液和 5 BV 的水洗液便可除去 82%（m/m）固形物，10%乙醇可将大部分化合物 **1** 洗脱下来；50%乙醇可将化合物 **2**、**7**、**10** 洗脱下来；60%、70%乙醇可将化合物 **9** 洗脱下来。综上所述，水的除杂效果较好，暂时选择水作为除杂溶剂；60%乙醇可将 5 个活性成分基本全部洗脱，最终选择 60%乙醇作为洗脱溶剂。另外，考虑到活性成分大多为酸性化合物，采用酸洗脱可能更有利于非酸性杂质成分的除去，同时可以较好地将酸性活性成分保留在树脂柱上，因此后续将考察上样液酸化或酸水洗脱对树脂除杂效果的影响。

2.3.3　上样液加酸量及不同浓度甲酸水洗脱液对活性成分富集效果的影响

取“**2.1**”项下浓缩上清液，分别用甲酸调至含酸量（甲酸体积分数）为 0.5%、0.1%、0.05%后，分别上 3 根（1 号、2 号和 3 号柱）LS305 柱（3 cm×17 cm，1 BV=100 mL）。上样后分别用对应浓度的酸水 500 mL（5 BV）洗脱，每 100 mL 收集为 1 个流份，每个流份取少量液体过滤后，按“**2.2**”项下 HPLC 色谱条件进样测定，计算活性成分流出质量。结果显示，含酸量为 0.5%的上样液中出现大量絮状沉淀（1 号柱），含酸量为 0.1%和 0.05%的上样液中均出现少量絮状沉淀（2 号、3 号柱），但不影响二者的上样过程。不同含酸量酸水的除杂效果如表 5 所示。2 号、3 号柱的上样流出液中固形物的质量与活性成分含量基本相同，表明酸化上样液对树脂吸附效果的影响不大，但在工艺放大时可能存在堵柱或转移率降低的风险，故以未酸化的浓缩上清液作为上样液即可。0.05%酸水溶液洗脱的固形物质量和活性成分转移率均优于 0.1%酸水溶液的洗脱效果，故选择 0.05%甲酸水溶液作为除杂溶剂。

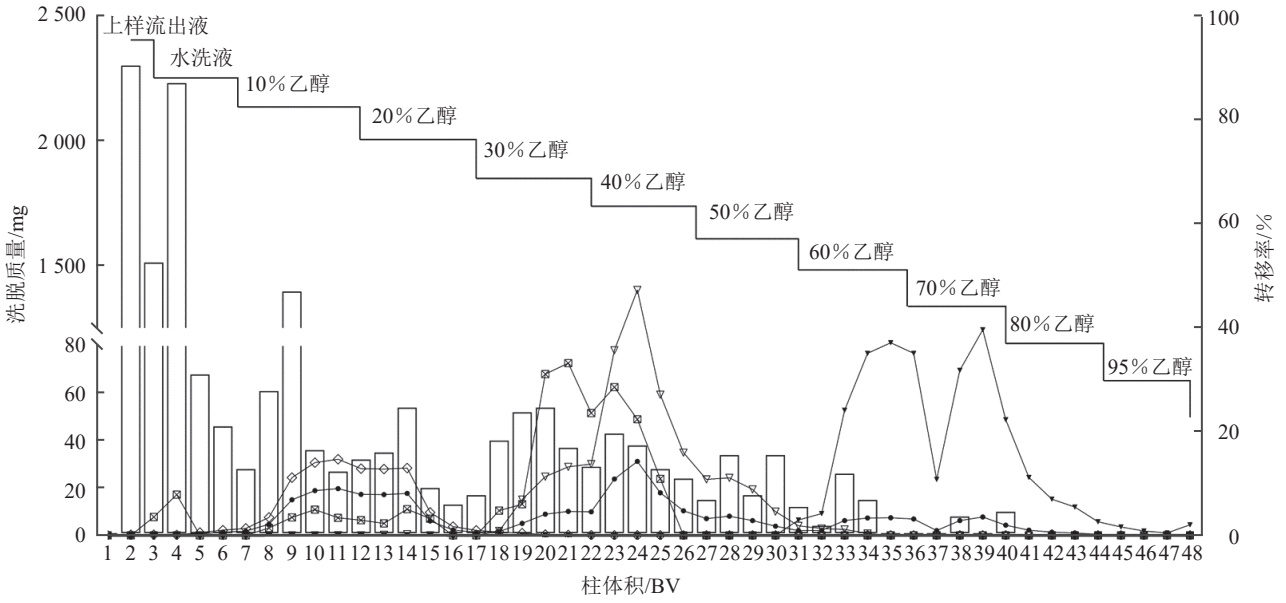
2.3.4　LS305 大孔吸附树脂工艺的验证与放大

取“**2.1**”项下浓缩上清液 4.14 L，以 0.5 BV/h 的流速上 LS305 柱（7 cm×48 cm，1 BV=2.4 L）至完全，再分别用 0.05%甲酸水溶液、60%乙醇水溶液各 5 BV 冲洗树脂床，收集 60%乙醇水洗脱液，减压蒸干，所得产物称作 LS305 乙醇洗脱物。精密称取适量洗脱物，用甲醇定量稀释后，吸取少量液体过滤后，按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定。

表 5　不同体积分数甲酸水溶液的除杂效果

Tab.5　Impurity Elution Capacities of Aqueous Formic Acid with Different Volume Fractions

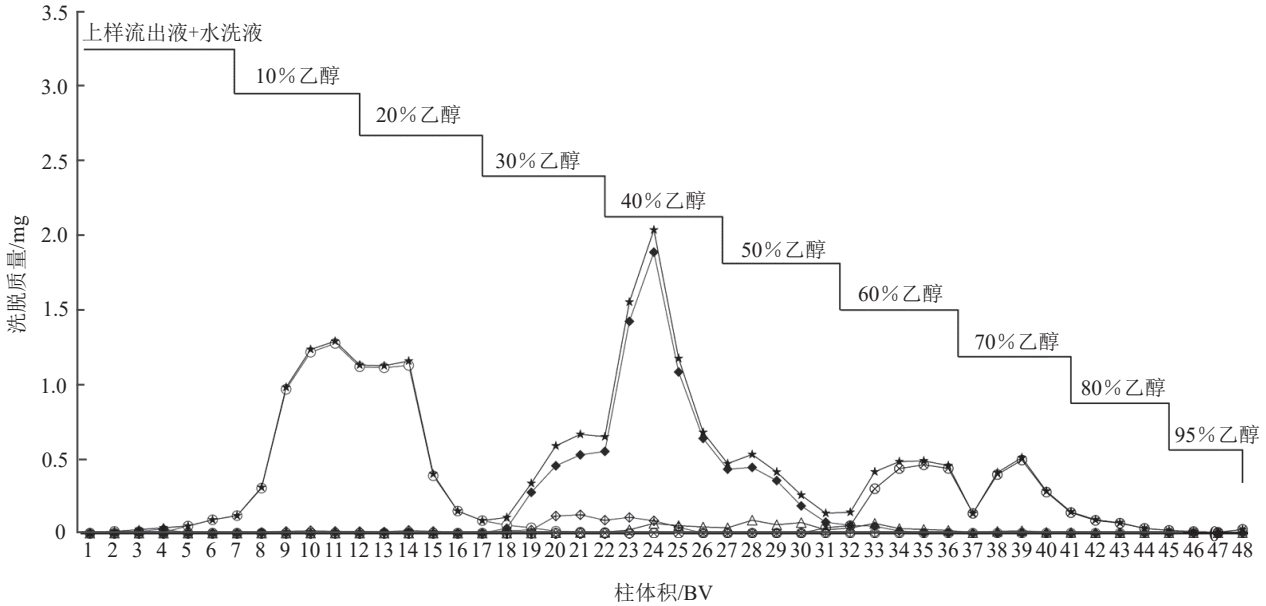
除杂效果	2 号柱		3 号柱	
	上样流出液	0.1%甲酸水洗	上样流出液	0.05%甲酸水洗
固形物洗脱质量 /mg	2 221	1 546	2 272	1 692
5 个活性成分总含量 /%	0.41	0.24	0.39	0.15



□—固形物洗脱质量 /mg；◇—**1** 转移率；⊠—**2** 转移率；▽—**7** 转移率；▼—**9** 转移率；◆—5 个活性成分总转移率。

图 2 不同洗脱溶剂洗脱除去的固形物质量及代表性活性成分转移率的变化曲线

Fig.2 Quality of the Eluted Substances by Different Elution Solvents and Variation Curves of the Transfer Rates of the Representative Active Components



○—**1**；⊕—**2**；◆—**7**；⊗—**9**；△—**10**；★—5 个活性成分总质量。

图 3 5 个活性成分（或 5 个活性成分加和）的动态洗脱曲线

Fig.3 Dynamic Elution Curves of the Five Active Components (or Sum of Five Active Components)

原萃取工艺与树脂工艺的对比结果如表 6 所示，其中 20200711、20211127 等数字编号代表不同时间制备得到的鼠麴草提取物。

结果表明，大孔吸附树脂工艺所得的固形物中，10 个活性成分含量在 270mg/g 左右，且新工艺避免了使用抗爆性差的有机溶剂（石油醚），树脂可重

复使用，更加适合工业化生产。

原萃取工艺与树脂吸附工艺在各指标成分之间差异显著，可能与使用不同批次的药材有关，另外药材贮存时间也可能是影响含量差异的原因。树脂工艺得到的固形物中 **1** 和 **2** 含量较萃取工艺明显降低，主要因为两者极性较大，在水洗脱过程中损失较多。虽然不同批次之间单个指标成分含量差异较大，但总黄酮类（144.59 ～ 159.32 mg/g，20200711 和 20220907 批；195.05 mg/g，20230612 批）、总咖啡酸酰奎宁酸类（85.39 ～ 112.40 mg/g）含量在不同批次间差异显著减小。另外，20230612 批中的总黄酮含量相对较高，可能是此次试验更换新的 LS305 柱填料，对黄酮类成分的吸附性能增强。

2.4　碱沉工艺考察

在大孔吸附树脂工艺制得的提取物（LS305 乙醇洗脱物）中，非活性成分占比仍较高，有必要进一步除杂以提高活性成分的含量。在尝试其他分离填料未取得理想效果的情况下，改用简便、易行的加碱沉淀杂质方法进一步除杂。以活性成分总含量及总回收率为考察指标，对碱沉溶剂、溶剂添加顺序、加碱量、料液比等工艺参数进行了考察。

2.4.1　碱沉溶剂的考察

取一定量 LS305 乙醇洗脱物，按 30 mg/mL 料液比浓度分别加入甲醇、乙醇、乙醇和乙酸乙酯不同体积比混合液（4 ∶ 1、2 ∶ 1、1 ∶ 1、1 ∶ 1、1 ∶ 2、1 ∶ 4、1 ∶ 8）和乙酸乙酯溶解，再加入体积分数为 0.2％氨水混匀，离心（2 654×g）10 min，将上清液蒸干称重，取适量蒸干后的固形物，用甲醇定量稀释后，取适量过 0.22 μm 滤膜，按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定，根据 10 个活性成分的总含量选取最佳溶剂。结果如图 4 所示，当乙醇和乙酸乙酯的体积比为 1 ∶ 4 时，活性成分含量达到最高，且成分从 LS305 乙醇洗脱物至碱沉上清液固形物的转移率接近 80％，故后续试验采用此混合溶剂进行碱沉试验。

2.4.2　碱沉溶剂添加顺序的考察

称取 LS305 乙醇洗脱物 3 份，按“**2.4.1**”中确定的溶剂和比例，第 1 份加入两者的混合溶剂，第 2 份先加乙酸乙酯再加乙醇，第 3 份先加乙醇后加乙酸乙酯，超声混匀后过滤。向滤液中加入 0.2％氨水溶液，振荡混合后离心（2 654×*g*）10 min，得上清液，精密量取上清液 5 mL，蒸干，称重，用甲醇定量稀释后，取适量溶液过 0.22 μm 滤膜，按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定。结果如表 7 所示，先加入乙酸乙酯再加入乙醇，所得碱沉上清液固形物中活性成分的总含量及转移率均最高。

2.4.3　料液比的考察

称取一定量的 LS305 乙醇洗脱物，先加入一定量乙酸乙酯，混合均匀后再加入乙醇混匀，其中乙酸乙酯与乙醇体积比为 4 ∶ 1，调节洗脱物与沉淀剂的料液比分别为 10、20、30、50、100、200、500、1 000 mg/mL，均超声混匀；过滤，向滤液中加入氨水，再次振荡混匀后离心（2 654×*g*）10 min，得上清液；精密量取适量上清液，蒸干后称重，用甲醇复溶

表 6　原萃取工艺与树脂吸附工艺对比结果 /（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±*s*，*n*=3）

Tab.6　Comparison Results between the Original Extraction Process and the Resin Adsorption Process /（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±*s*, *n*=3）

化合物	原萃取工艺			树脂工艺	
	20200711[3]	20211127[8]	20201225[1,10]	20220907	20230612
CGA（**1**）	15.53±0.70	15.54±0.01	16.63±0.40	6.76±0.55	3.13±0.01
CA（**2**）	1.47±0.10	1.50±0.01	3.99±0.10	3.00±0.42	0.54±0.03
Flav-glc（**3**）	34.44±0.30	53.11±0.00	42.46±0.99	57.94±0.87	59.22±0.01
1,5-2CQA（**4**）	21.55±0.10	64.39±0.01	19.60±0.48	38.85±1.19	57.94±0.01
3,5-2CQA（**5**）	13.29±0.10	34.10±0.01	19.44±0.47	28.34±0.95	61.52±0.13
Lut-glc（**6**）	66.76±0.32	19.08±0.07	66.94±0.45	24.98±0.71	26.37±0.06
4,5-2CQA（**7**）	55.60±0.13	21.40±0.01	60.36±0.51	26.40±1.69	23.22±0.87
1,3,5-3CQA（**8**）	24.83± 0.42	5.00±0.02	27.21±0.16	25.44±1.25	1.00±0.16
Lut（**9**）	2.96±0.02	13.20±0.01	3.00±0.08	19.50±1.92	5.34±0.12
1,3,4-3CQA（**10**）	13.79±0.25	12.02±0.06	16.08±0.25	32.24±0.17	48.24±0.12
总和	249.54±1.44	239.34±0.02	275.73±1.86	263.45±1.95	286.52±1.12

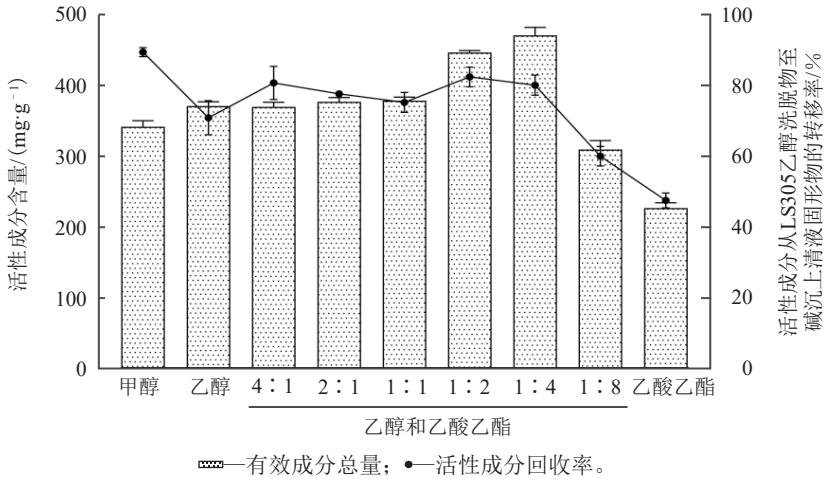


图 4 沉淀剂对碱沉后上清液中活性成分含量的影响（*n*=3）

Fig.4 Effect of Precipitant on the Contents of Active Components in Supernatant after Alkali Precipitation（*n*=3）

表 7 溶剂添加顺序对碱沉试验活性成分含量的影响 /（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±*s*，*n*=3）

Tab.7 Effect of Solvent Addition Order on Active Component Contents in Alkali Precipitation Experiment/（mg·g^{-1}）（$\bar{x}$±*s*, *n*=3）

化合物	先加乙酸乙酯后加乙醇	先加乙醇后加乙酸乙酯	直接加混合溶剂
1	3.61±0.17	4.28±1.33	3.16±0.35
2	8.50±0.32	7.24±1.10	8.02±0.70
3	102.88±1.68	91.71±1.11	98.50±0.58
4	57.23±1.29	56.83±1.37	48.06±1.93
5	44.60±1.38	41.99±0.25	39.00±3.91
6	48.43±1.73	42.98±5.60	46.39±3.54
7	38.77±0.77	35.92±0.72	35.29±1.03
8	24.74±1.18	25.02±0.46	21.91±1.39
9	36.98±1.66	31.88±1.25	35.39±0.88
10	31.20±1.50	33.49±1.22	26.00±5.92
总含量	396.94±1.57	371.35±1.91	361.72±1.78
转移率 /%	80.56±2.78	79.33±2.03	75.12±1.72

后取少量溶液，按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定。结果如图 5 所示，当料液比为 100 mg/mL 时，活性成分从 LS305 乙醇洗脱物至碱沉上清液固形物的转移率最高，且成分总含量约为 450 mg/g。考虑到料液比越低，溶剂使用剂量越大，基于环保和经济因素考虑，选择料液比为 100 mg/mL 进行后续试验。

2.4.4 氨水添加量的考察

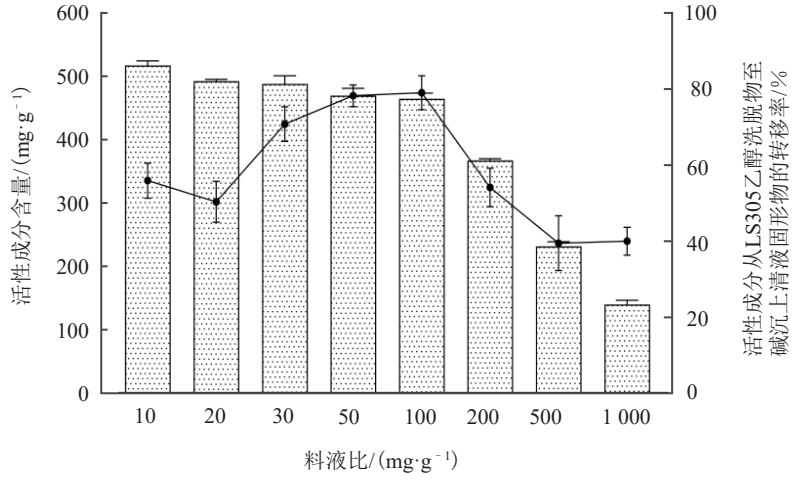
称取一定量的 LS305 乙醇洗脱，按最佳溶剂比例、添加顺序和料液比加入碱沉溶剂，振荡混匀后过滤，精密吸取上清液 20 mL，分别加入一定量氨水溶液，使氨水体积分数分别为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%，振荡混匀后离心（2 654×*g*）10 min，精密量取上清液 10 mL，蒸干，称重，用甲醇定容至 50 mL，取适量定容后，溶液过 0.22 μm 滤膜，按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定。结果如图 6 所示，当氨水体积分数为 0.15% 时，活性成分总含量较高，且活性成分从 LS305 树脂乙醇洗脱物至碱沉上清液固形物的转移率接近 80%。因此最终选择氨水体积分数为 0.15%。

2.4.5 碱沉工艺验证

称取适量 LS305 乙醇洗脱物，按最佳工艺进行碱沉试验，平行试验 3 次。精密称取碱沉后的上清液固形物，用定量甲醇稀释，取少量液体过滤后按“**2.2**”项下 UPLC 色谱条件进样测定，测定化合物 **1** ～ **10** 的含量。结果如表 8 所示，碱沉工艺重复性好，经碱沉精制后的固形物中 10 个成分总含量均约为 500 mg/g，且活性成分从 LS305 树脂乙醇洗脱物至碱沉上清液固形物的转移率均大于 80%。

3 讨论

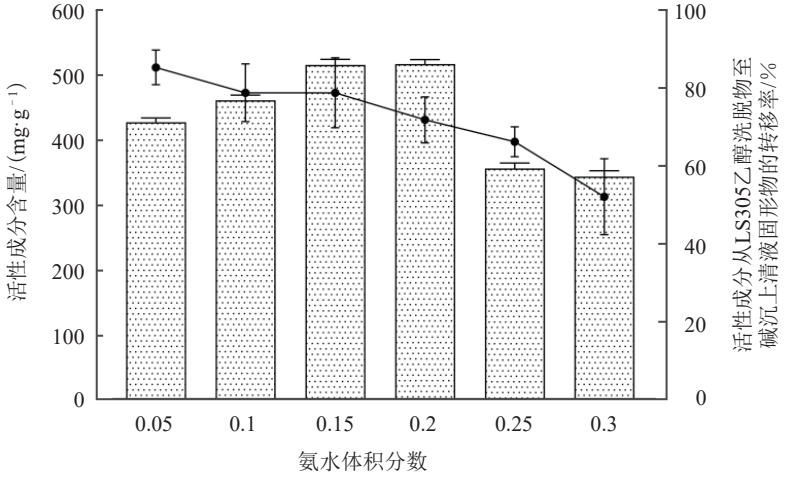
本课题组前期研究发现，原萃取工艺的可放大程度和可重复性有限（5 kg 以下药材投料，所得提取物活性成分含量占约 50%[9]；5 kg 以上药材投料，所得提取物活性成分含量仅占约 30%[3]）；同时，原萃取工艺使用石油醚，在放大生产中存在较大的安全隐患。本研究采用大孔吸附树脂工艺替代原萃取工



▭—有效成分总量；●—活性成分回收率。

图 5　料液比对碱沉试验的影响（*n*=3）

Fig.5　Effect of Material-liquid Ratio on Alkali Precipitation Efficacy（*n*=3）



▭—有效成分总量；●—活性成分回收率。

图 6　氨水添加量对碱沉试验的影响（*n*=3）

Fig.6　Effect of Volume Fraction of Ammonia on Alkali Precipitation Efficacy（*n*=3）

艺，不仅在活性成分含量方面还原了原萃取工艺的质量属性，同时还减少了抗爆性差的有机溶剂的使用，提高了安全生产系数，并且大孔吸附树脂技术具有操作方便、能耗和成本低、可重复利用等优点，更加适合工业化生产。本研究放大规模达到 10 kg 药材一次投料，为后续更大规模的放大工艺考察提供了基础。

由于工艺上游中间品干扰成分较多，造成其他活性成分难以在色谱图中分离，因此，树脂筛选试验中选取色谱峰分离度较好的 5 个代表性活性成分作为树脂性能筛选的指标成分，其中化合物 **1** 代表单咖啡酰奎宁酸类活性成分，化合物 **7** 代表二咖啡酰奎宁酸类活性成分，化合物 **10** 代表三咖啡酰奎宁酸类活性成分，化合物 **9** 代表黄酮类活性成分等。

树脂洗脱物中仍含有较多的非活性物质，需进一步除杂纯化。本研究考察了多种分离介质（硅胶、聚酰胺、十八烷基键合硅胶、阳 / 阴离子交换树脂、酸 / 碱 / 中性氧化铝等）的除杂工艺，但均无法实现 10 个活性成分含量的整体提高且同时维持较为理想

表 8 碱沉工艺的验证结果 /(mg·g^{-1}) ($\bar{x}$±s，n=3)

Tab.8 Validation Results of Alkali Precipitation Process/ (mg·g^{-1}) ($\bar{x}$±s, n=3)

化合物	验证试验 1	验证试验 2	验证试验 3
1	2.11±0.32	2.24±0.06	2.25±0.00
2	0.96±0.05	0.86±0.04	0.82±0.03
3	75.91±0.09	73.43±0.93	72.64±0.55
4	120.04±1.09	117.18±0.30	115.27±1.35
5	121.69±0.06	117.24±0.19	116.15±0.77
6	43.90±0.31	41.48±0.57	40.98±0.35
7	32.63±0.76	31.89±0.24	31.67±0.15
8	1.33±0.18	0.90±0.14	0.97±0.05
9	18.03±1.18	16.94 ± 0.52	16.71±0.16
10	99.71±3.71	101.32±2.19	101.97±0.46
总和	516.31±4.32	503.47±3.29	499.43±2.86
转移率 /%	80.65±1.09	81.20±2.18	82.33±2.36

的转移率。考虑到活性成分多为弱酸性，可利用向有机溶剂中加碱的方式，使活性成分与杂质成分在有机溶剂中形成溶解度差异，进而达到除杂的目的。另外，本研究考察了低温对碱沉效果的影响，在 10 ℃与室温（25 ℃）下碱沉所得到的上清液中，固形物中活性成分的含量无明显差别，基于操作简便的原则，在室温条件下进行碱沉工艺即可。

目前，对于鼠麴草多成分提取物的工艺研究只集中在同类型化合物（通常具有相近的理化性质）的富集，如总黄酮[12—14]。本研究中，树脂吸附联合碱沉工艺所得的鼠麴草提取物中同时包含咖啡酸、咖啡酰奎宁酸以及黄酮类成分，化合物类型复杂多样且富集效果显著，最终所得的固形物中 10 个活性成分总含量可达到 50%。另外，活性化合物（**1**、**2**、**4**～**6**、**7**～**10**）从药材到终产物（碱沉上清液固形物）的总转移率约为 40%。综上所述，本工艺成本低、操作过程较为简易，且解决了原萃取工艺放大后活性成分难以进一步富集的问题，同时也大幅降低了给药剂量，为后续制剂开发提供了更多口服剂型的选择。

参考文献：

[1] 刘 非，林 珊，吴春珍，等. 鼠麴草降尿酸活性研究 [J]. 沈阳药科大学学报，2020, **37**(1): 12-20.

[2] 张 伟，范思洋，吴春珍. 鼠麴草化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2016, **47**(8): 1057-1064.

[3] LIU X, HAN S, YANG Q, *et al*. Beneficial herb-drug interaction of *Gnaphalium affine* extract on benzbromarone: a pharmacokinetic and pharmacodynamic study in rats [J]. *Phytomedicine*, 2022, **102**: 154203.

[4] LIU F, LIU X Z, YANG Q, *et al*. Enhanced efficacy and reduced hepatotoxicity by combination of *Gnaphalium affine* extract and benzbromarone in the treatment of rats with hyperuricemic nephropathy [J]. *Pharmaceut Fronts*, 2021, **3**(3): e129-e137.

[5] ZHANG W, WU C Z, FAN S Y. Chemical constituents from *Gnaphalium affine* and their xanthine oxidase inhibitory activity [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, **16**(5): 347-353.

[6] 刘曦子，韩诗怡，陈 叶，等. 鼠麴草提取物中咖啡酸衍生物的含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报，2022. Doi: 10.14066/j. cnki. cn21-1349/r. 2022. 0138.

[7] JIA A N, LIU F, FAN S Y. *In vivo* antihyperuricemic activities of 3,4,5-*tri*-*O*-caffeoylquinic acid, 4,4',6'-trihydroxy-2'-methoxychalcone, and caffeic acid from the aerial parts of *Gnaphalium affine* [J]. *Pharmaceut Fronts*, 2023, **5**(2): e77-e83.

[8] HAN S Y, LIU X Z, CHEN Y, *et al*. Multiple component pharmacokinetics after oral administration of *Gnaphalium affine* extract in rats [J]. *Planta Med*, 2023, **89**(9): 903-915.

[9] 范思洋，吴春珍，张 伟. 鼠麴草提取物、鼠麴草有效物质富集物，制备方法与应用：中国，107126449A [P]. 2019-09-05.

[10] 张 伟. 鼠麴草降尿酸活性成分研究 [D]. 上海：上海医药工业研究院硕士学位论文，2017.

[11] 刘曦子. 鼠麴草提取物 (GAD) 干预苯溴马隆 (BBR) 体内处置过程的增效机制研究 [D]. 上海：中国医药工业研究总院硕士学位论文，2022.

[12] LI C, WANG E, ELSHIKH M S, *et al*. Extraction and purification of total flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don and their evaluation for free radicals′ scavenging and oxidative damage inhabitation potential in mice liver [J]. *Arab J Chem*, 2021, **14**(3): 103006.

[13] 林华婷，吕 峰，黄国钞. 鼠曲草类黄酮及其锌络合物的抑菌活性 [J]. 福建农林大学学报（自然科学版），2016, **45**(6): 680-684.

[14] 叶向丽，李 煌. 鼠曲草总黄酮治疗慢性支气管炎的试验研究 [J]. 海峡药学，2016, **28**(1): 22-24.