

# 黄芩茎叶总黄酮制备工艺优化研究

许朝且<sup>1</sup>, 江群艳<sup>1</sup>, 蒋启航<sup>1</sup>, 徐明明<sup>1</sup>, 宿晓蓉<sup>1</sup>, 曾建国<sup>2</sup>, 段金廛<sup>1</sup>, 赵明<sup>1</sup>

(1.南京中医药大学,江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室,中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,江苏 南京 210023;2.湖南农业大学,兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心,中兽药湖南省重点实验室,湖南 长沙 410128)

**摘要:**目的 优选黄芩茎叶总黄酮制备工艺,为黄芩茎叶资源的合理利用开发提供依据。方法 以黄芩茎叶中 8 个黄酮类化合物的转移率为指标,采用单因素考察结合正交试验优选黄芩茎叶黄酮的提取工艺;比较酸沉法和大孔树脂法纯化茎叶总黄酮的转移率,并对大孔树脂纯化工艺进行优选。结果 以 12 倍量 40% 乙醇热回流提取 3 次,每次 1 h,为最佳提取工艺。提取物的纯化结果显示,大孔树脂法中黄芩茎叶黄酮的总体转移率(92.53%)显著高于酸沉法(76.69%)。在 pH 为 1.01 时,酸沉法虽然可以使野黄芩苷等化合物转移率达 90% 以上,但含量丰富的二氢黄酮类化合物异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的转移率仅为 64.76%、68.57%,而使用大孔树脂法纯化,其转移率均可达 90% 以上,可以实现各目标成分的高效转移。经优选,0.26 g/mL 药液上样,上样量为每 10 g HP-20 型干树脂上样 2.08 g 干燥提取物,树脂柱径高比为 1:3.4 BV 纯水除杂后,以 30% 乙醇洗脱 4 BV,为最佳纯化工艺,所得总黄酮质量分数可达 66.03%。结论 建立了稳定且环境友好型黄芩茎叶总黄酮制备工艺,可为黄芩茎叶的进一步开发利用提供参考。

**关键词:**黄芩茎叶;总黄酮;提取;纯化

**中图分类号:**R283

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-0482(2020)05-0593-07

**DOI:**10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0593

**引文格式:**许朝且,江群艳,蒋启航,等.黄芩茎叶总黄酮制备工艺优化研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(5):593-599.

## Preparation of Total Flavonoids from Stem and Leave of *Scutellaria Baicalensis*

XU Chao-qie<sup>1</sup>, JIANG Qun-yan<sup>1</sup>, JIANG Qi-hang<sup>1</sup>, XU Ming-ming<sup>1</sup>, SU Xiao-rong<sup>1</sup>, ZENG Jian-guo<sup>2</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1</sup>, ZHAO Ming<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization under State Administration of Traditional Chinese Medicine, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. National and Local Union Engineering Research Center of Veterinary Herbal Medicine Resource and Initiative, Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the technology of preparing total flavonoids from the stem-leave of *Scutellaria Baicalensis* and provide basis for the rational utilization and development of stem-leave resources of *Scutellaria Baicalensis*.

**METHODS** The transfer rates of 8 flavonoids compounds in the stem-leave of *Scutellaria Baicalensis* and the single factor combined with orthogonal design were applied to optimize the extraction process. In addition, the transfer rates of acid deposition and macroporous resin method to purify total flavonoids in the stem-leave were compared, and the purification technique of macroporous resin method was optimized. **RESULTS** The best extraction technology was to use 12 times amount of 40% ethanol with heat reflux, one time an hour. According to the result of purification of extraction, the transfer rate of total flavonoids in the stem-leave of *Scutellaria Baicalensis* with macroporous resin method was 92.53%, higher than that with acid deposition, 76.69%. When pH value was 1.01, with acid deposition, the transfer rate of compounds such as scutellarin was over 90%, while the transfer rate of enriched dihydroflavanone was quite low, for instance, 64.76% for isocyanin-7-O-β-D-glucuronide and 68.75% for safflower-7-O-β-D-glucuronide. However, as for macroporous resin method, the transfer rate could come up to over 90%, which promoted the efficient transfer of each target component. On the basis of optimum, the resource volume was 2.08 g dry extract per 10 g HP-20 type dry resin with 0.26 g/mL liquor. The ratio of resin column diameter to height was 1:3. The perfect purification technology was to wash the sample with 4 BV of distilled water and eluted with 4 BV

**收稿日期:**2020-08-29

**基金项目:**国家重点研发计划(2017YFD0501502);江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题(0120902002006-27);江苏省研究生科研创新计划(KYCX20\_1581)

**第一作者:**许朝且,男,硕士研究生,E-mail:1391007933@qq.com

**通信作者:**赵明,男,教授,博士生导师,主要从事中药资源化学与资源循环利用研究,E-mail:mingzhao@njucm.edu.cn;

段金廛,男,教授,博士生导师,主要从事中药资源化学与资源循环利用研究,E-mail:dja@njucm.edu.cn

of 30% ethanol, which could obtain 66.03% mass fraction of total flavonoids. **CONCLUSION** This study establishes a firm and environmental-friendly method of preparing total flavonoids from the stem-leave of *Scutellaria Baicalensis* and provides some reference for the further development and utilization of the stem-leave of *Scutellaria Baicalensis*.

**KEYWORDS:** stem and leave of *Scutellaria baicalensis*; total flavonoids; extraction; purification

中药黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 味苦, 性寒, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效, 用于胸闷呕恶, 肺热咳嗽, 胎动不安等<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 黄芩苷、汉黄芩苷及其苷元等黄酮类化合物是黄芩的主要功效物质<sup>[2]</sup>。黄芩在临床上使用广泛, 年需求量近 5 000 t, 目前在山西、陕西、河北、甘肃等地区已有大量栽培<sup>[3-4]</sup>。在黄芩药材生产过程中每年产生大量的黄芩茎叶, 但未能有效利用, 造成宝贵的自然资源浪费, 亟待提高其资源利用率。

黄芩茎叶与黄芩根均富含黄酮类成分, 但因与地下部分存在不同的类黄酮生物合成途径, 相对于黄芩根中的去 4'-OH 类黄酮化合物, 黄芩茎叶中主要含有 4'-OH 类黄酮化合物, 如野黄芩苷、异红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷等<sup>[5-6]</sup>。研究表明, 黄芩茎叶总黄酮具有抗菌、抗炎、心血管保护、肝脏保护和神经保护等药理活性<sup>[7-11]</sup>, 具有较好的药用价值。目前, 黄芩茎叶总黄酮的制备多集中于乙醇热回流、水煎煮法提取及酸沉耦合大孔树脂纯化<sup>[12-18]</sup>, 然而纯化过程中多涉及强酸、强碱的使用, 存在操作危险、环境污染等问题。因此, 本实验在比较酸沉法与树脂法对茎叶总黄酮转移效率的基础上, 优选黄芩茎叶黄酮提取、制备工艺, 为黄芩茎叶资源的合理利用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

戴生高速万能粉碎机(永康市九顺莹商贸有限公司); Sartorius BT125D 电子分析天平(德国塞利多斯公司); Sartorius PB-10 酸度计(德国塞利多斯公司); EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司); AnkeGL-16 GII 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

### 1.2 试剂和耗材

对照品野黄芩苷(批号: lw191012028)、黄芩苷(批号: lw18013013)、白杨素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(批号: lw18022903)购自南京良纬科技有限公司, 芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(批号: 18032802)购于南京金益柏生物科技有限公司, 异红

花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(2R 及 2S 异构体)、红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(2R 及 2S 异构体)、异高山黄芩素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷、异高山黄芩素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷由实验室分离制备获得, 纯度均大于 98%; D101、HDP-100、X-5、AB-8、HDP-450、S-8、NKA-9 型大孔吸附树脂均购自北京索莱宝科技有限公司; 甲酸、甲醇均为色谱纯, 购自德国默克公司; 超纯水经 Milli-Q 超纯水制备系统自制, 其他化学试剂均为分析纯, 购自南京化学试剂有限公司。

### 1.3 药材

黄芩茎叶药材于 2018 年 8 月采自陕西省渭南市澄城县, 植物基原经南京中医药大学段金廛教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的茎叶。样品于 60 °C 热风烘干, 干燥后粉碎过 40 目筛, 常温密封干燥保存备用。

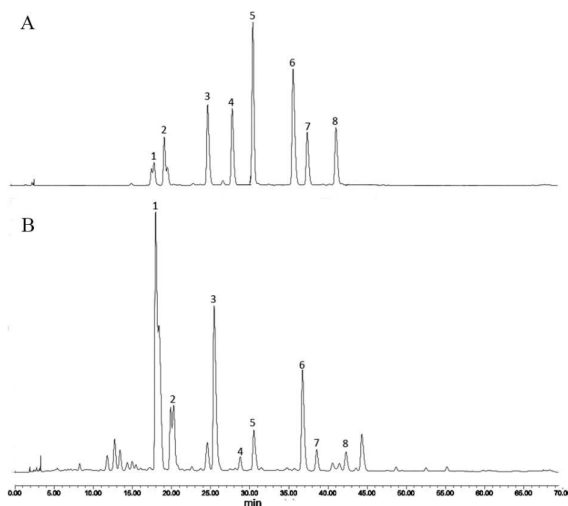
## 2 方法与结果

### 2.1 黄芩茎叶黄酮成分含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Tnature C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B); 梯度洗脱: 0~60 min, 30%~70% A; 60~65 min; 70%~95% A; 65~66 min, 95%~30% A; 66~70 min, 30% A; 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min, 进样体积 10  $\mu$ L, 检测波长 278 nm, 对照品及样品色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇制成含异红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.133 mg/mL、红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.267 mg/mL、野黄芩苷 0.267 mg/mL、异高山黄芩素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.267 mg/mL、芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.267 mg/mL、黄芩苷 0.267 mg/mL、异高山黄芩素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.273 mg/mL、白杨素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 0.268 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取待测样品, 定容至一定体积, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过即得。



注:1.异红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(2R及2S异构体);2.红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(2R及2S异构体);3.野黄芩苷;4.异高山黄芩素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷;5.芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷;6.黄芩苷;7.异高山黄芩素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷;8.白杨素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷

图1 混合对照品(A)、黄芩茎叶样品(B)HPLC图

## 2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系考察 取混合对照品溶液,2、5、8、20、50倍梯度稀释后,经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,按“2.1.1”项下色谱条件依次进样分析,以对照品的

表1 8个黄酮化合物的线性范围、精密度、稳定性、重复性及加样回收率( $n=6$ )

化合物	线性方程	线性范围/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$R^2$	精密 度/%	稳定 性/%	重复 性/%	加样回收率 均值	RSD/%
异红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=13\ 817\ 366X-6\ 820$	2.666~133.333	0.999 8	1.34	0.88	0.58	99.39	1.66
红花素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=12\ 148\ 080X+5\ 025$	5.332~266.667	1.000 0	0.84	0.96	0.72	101.49	2.15
野黄芩苷	$Y=17\ 554\ 837X+18\ 834$	5.332~266.667	0.999 9	0.86	1.52	0.68	101.37	2.01
异高山黄芩素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=16\ 377\ 121X+11\ 776$	5.332~266.667	1.000 0	1.52	1.25	1.13	99.63	1.90
芹菜素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=14\ 639\ 454X+6\ 675$	5.332~266.667	0.999 9	1.30	0.62	1.09	99.27	0.81
黄芩苷	$Y=29\ 068\ 842X+5\ 246$	5.332~266.667	0.999 8	0.87	0.59	1.16	98.04	1.19
异高山黄芩素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=11\ 768\ 623X+10\ 441$	5.466~273.333	0.999 9	0.69	0.74	0.80	99.89	1.82
白杨素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷	$Y=13\ 817\ 366X-6\ 820$	5.360~268.000	0.999 9	1.34	1.59	1.73	101.87	1.83

## 2.2 黄芩茎叶提取工艺研究

以各指标成分提取率为考察指标,单因素考察提取溶剂、料液比、提取时间、提取次数对黄酮类成分提取率的影响,并通过四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验优选黄芩茎叶黄酮最佳提取工艺。

### 2.2.1 单因素考察

2.2.1.1 提取溶剂体积分数考察 精密称取黄芩茎叶药材粉末2 g,以料液比1:10分别加入水及不同体积分数乙醇(30%、50%、60%、70%、80%),浸渍30 min后热回流提取2次,每次1 h,合并滤液,测定指标成分含量。结果表明(图2A),乙醇回流法的黄

质量浓度 $X$ 为横坐标,峰面积 $Y$ 为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表1。

2.1.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样6次,记录各对照品色谱峰峰面积。各对照品色谱峰峰面积的 $RSD$ 均小于1.52%(表1),表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 稳定性试验 取最优提取工艺所得供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录各色谱峰峰面积。各主要色谱峰峰面积的 $RSD$ 均小于1.59%(表1),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.4.4 重复性试验 依据最优提取工艺,按“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,依次进样测定,记录样品中各色谱峰峰面积。各主要色谱峰峰面积的 $RSD$ 均小于1.73%(表1),表明方法重复性良好。

2.1.4.5 加样回收率试验 取已知各指标成分量的样品溶液6份,精密加入一定量的对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,测定并记录各对照品的回收率。各指标成分的平均加样回收率为98.04%~101.87%, $RSD$ 为0.81%~2.15%(表1)。

酮提取率高于水煎煮法,且黄芩茎叶中黄酮类成分提取总量随乙醇体积分数升高而先增加后减少,其在乙醇体积分数为50%时达到峰值,后随乙醇体积分数的升高略有下降。

2.2.1.2 料液比考察 精密称取黄芩茎叶药材粉末2 g,分别加入不同体积的50%乙醇(料液比1:8、1:10、1:12、1:15、1:20),浸渍30 min后热回流提取2次,每次1 h,合并滤液,测定指标成分含量。结果表明(图2B),当料液比增加至1:10后,黄芩茎叶黄酮总量增加平缓。

2.2.1.3 提取时间考察 精密称取黄芩茎叶药材粉

末 2 g,以料液比 1:10 加入 50%乙醇,浸渍 30 min 后热回流提取 1 次,提取时间分别为 1、1.5、2、2.5、3 h,测定指标成分含量。结果表明(图 2C),黄芩茎叶中各指标成分的量随提取时间的增加不明显,各组间无明显差异。

2.2.1.4 提取次数考察 精密称取黄芩茎叶药材粉末 2 g,以料液比 1:10 加入 50%乙醇,浸渍 30 min 后热回流提取,提取时间为 1 h,抽滤,滤液定容至一定体积,滤渣以同样条件继续提取,重复 3 次,测定所得滤液中指标成分含量。结果表明(图 2D),黄芩茎叶经过 3 次提取后,黄酮类成分基本提取完全。

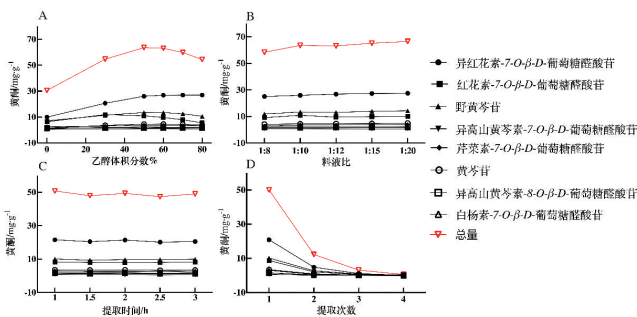


图 2 黄芩茎叶黄酮类成分提取条件单因素考察

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验设计及直观分析 ( $n=3$ )

试验号	A/%	B	C/h	D	总量/(mg·g <sup>-1</sup> )			
					1	2	3	总和
1	40(1)	1:8(1)	1(1)	1(1)	52.72	50.84	50.32	153.88
2	60(3)	1:10(2)	2(3)	1(1)	50.12	47.76	48.59	146.47
3	50(2)	1:10(2)	1(1)	2(2)	64.05	63.85	59.09	186.99
4	60(3)	1:8(1)	1.5(2)	2(2)	58.99	59.55	59.65	178.19
5	40(1)	1:10(2)	1.5(2)	3(3)	62.96	62.04	64.42	189.42
6	50(2)	1:8(1)	2(3)	3(3)	62.82	62.60	62.94	188.36
7	40(1)	1:12(3)	2(3)	2(2)	65.83	66.19	64.91	196.93
8	50(2)	1:12(3)	1.5(2)	1(1)	51.90	54.60	53.53	160.03
9	60(3)	1:12(3)	1(1)	3(3)	68.11	64.96	67.50	200.57
$K_1$	180.09	173.50	180.50	153.47				
$K_2$	178.46	174.29	175.88	187.37				
$K_3$	175.08	185.84	177.25	192.79				
$k_1$	60.03	57.83	60.16	51.15				
$k_2$	59.49	58.10	58.63	62.46				
$k_3$	58.36	61.95	59.08	64.26				
R	1.67	4.12	1.53	13.11				

### 2.3 黄芩茎叶黄酮有效部位纯化工艺考察

2.3.1 酸沉法纯化黄芩茎叶总黄酮 称取一定量黄芩茎叶 40%乙醇提取物,加入纯水制成其过饱和溶液(pH=4.82)后,分别加入浓盐酸调节 pH 值为 1.01、2.03、2.93,室温静置 48 h,析出沉淀,12 000 r/min 离心 10 min 后,分离上清液和沉淀,富

2.2.2 正交试验 精密称取黄芩茎叶药材粉末 2 g,按  $L_9(3^4)$  正交试验表进行试验。根据单因素试验结果,选取乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,各选取 3 个水平,优选黄芩茎叶黄酮提取条件。因素水平及试验结果见表 2,方差分析见表 3。结果表明,各因素对黄芩茎叶总黄酮提取效果影响的主次为  $D > B > A > C$ ,即提取次数 > 料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间,其中提取时间及乙醇体积分数对提取率的影响较小且各水平间无明显差异。因此,确定黄芩茎叶总黄酮的最佳提取工艺为  $A_1B_3C_1D_3$ 。

2.2.3 验证试验 以上述优选的最佳工艺条件,平行制备 3 份供试品溶液进行测定,其黄酮类总量均值为 78.34 mg/g, RSD 值为 1.20%。验证试验结果表明该优选工艺稳定可靠。

2.2.4 放大试验 取黄芩茎叶药材 1 kg,加入 12 倍量 40%乙醇,浸渍 30 min 后,热回流提取 3 次,每次提取 1 h,合并滤液,回收溶剂,得干燥提取物 273.30 g,其中黄酮的质量分数为 21.64%,黄酮类成分转移率约为 91.19%。

集沉淀,计算黄芩茎叶黄酮类成分的转移率。结果显示(图 3,表 4),随着 pH 值的降低,黄芩茎叶黄酮类成分的转移率逐渐增加,分别为 18.37%、58.01%、76.69%,其中,当 pH 值为 1.01 时野黄芩苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、黄芩苷的转移率分别可达 95.30%、94.88%、91.59%,转移率较

高,而异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的转移率较低,分别为64.76%、68.57%。

转移率=富集所得黄芩茎叶中(总)黄酮化合物的量/黄芩茎叶过饱和溶液中(总)黄酮化合物的量。

表3 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	13.117	2	6.558	3.363	$P>0.05$
B	95.446	2	47.723	24.473	$P<0.05$
C	11.271	2	5.636	2.890	$P>0.05$
D	907.549	2	453.775	232.704	$P<0.05$
误差	35.100	18	1.950		

注:  $f_1=2, f_2=18, F_{0.05(2,18)}=3.55$ 。

2.3.2 大孔树脂法纯化黄芩茎叶总黄酮 取预处理后的 AB-8 大孔树脂湿法装柱,精密量取“2.3.1”项下黄芩茎叶 40%乙醇提取物饱和水溶液上样,3 BV 纯水除杂后,以 4 BV 70%乙醇洗脱,合并洗脱液,检测其中目标黄酮类化合物,计算黄芩茎叶黄酮

表4 酸沉法和孔树脂法中黄芩茎叶(总)黄酮化合物的转移率(%)

纯化方法	1	2	3	4	5	6	7	8	总和
酸沉法(pH=1.01)	64.76	68.57	95.3	76.4	94.88	91.59	74.27	87.98	76.69
酸沉法(pH=2.03)	45.87	46.28	79.43	54.34	78.8	73.38	55.65	70.52	58.01
酸沉法(pH=2.93)	5.17	6.87	44.87	5.98	38.87	32.21	6.62	23.76	18.37
树脂法	91.65	94.34	96.31	95.32	98.72	90.82	85.56	85.59	92.53

注:1.异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;2.红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;3.野黄芩苷;4.异高山黄芩素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;5.芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;6.黄芩苷;7.异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷;8.白杨素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。

2.3.3 大孔树脂纯化黄芩茎叶总黄酮工艺优选

2.3.3.1 树脂的预处理 取不同极性的7种型号大孔吸附树脂适量,置于100 mL具塞锥形瓶中,用2倍体积的95%乙醇浸泡24 h,使其充分溶胀,湿法装柱,用约5倍体积的去离子水清洗至无醇味,备用。

2.3.3.2 大孔树脂型号的筛选 精密称取 HPD-100(非极性)、D101(非极性)、X-5(非极性)、AB-8(弱极性)、HPD-300(中极性)、NKA-9(强极性)、HP-20(非极性)湿树脂各1.0 g(抽滤至不滴水时质量),置于100 mL具塞磨口三角烧瓶中,分别加入最佳工艺黄芩茎叶浓缩提取液5 mL,置水平摇床振荡24 h(180 r/min),使目标成分充分被吸附,滤过,测定滤液中黄酮类成分含量,计算各树脂在室温下的饱和吸附量。将经静态饱和吸附的树脂滤出,精密加入70%乙醇50 mL,再次置于摇床中同法振荡24 h后,测定解吸液中黄酮类成分含量。结果显示(图4),7种型号大孔树脂对黄芩茎叶黄酮的吸附能

力强弱依次为:HPD-300>X-5、HP-20>HPD-100、AB-8>D101>NKA-9;对黄芩茎叶黄酮的解吸附能力强弱依次为:HP-20>HPD-100、HPD-300>AB-8、X-5、D101>NKA-9,故综合考虑,选择 HP-20 型大孔树脂作为本试验纯化茎叶总黄酮的填料。

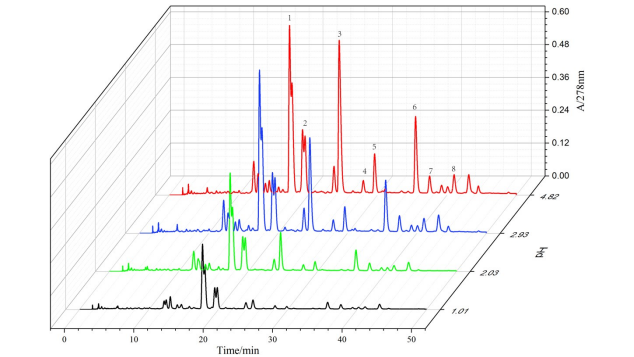


图3 不同 pH 值下黄芩茎叶提取物饱和水溶液上清液 HPLC 色谱图

力强弱依次为:HPD-300>X-5、HP-20>HPD-100、AB-8>D101>NKA-9;对黄芩茎叶黄酮的解吸附能力强弱依次为:HP-20>HPD-100、HPD-300>AB-8、X-5、D101>NKA-9,故综合考虑,选择 HP-20 型大孔树脂作为本试验纯化茎叶总黄酮的填料。

饱和吸附量=(吸附前溶液中成分含量-吸附后溶液中成分含量)/树脂质量。

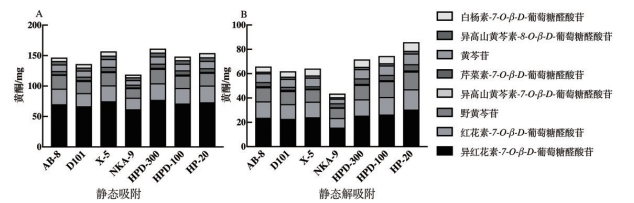


图4 不同型号树脂的静态吸附量和解吸附测定结果

2.3.3.3 洗脱剂乙醇体积分数考察 精密称取预处理好的 HP-20 大孔树脂 1 g,共 6 份,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入黄芩茎叶浓缩提取液 5 mL,按“2.3.2”项下方法震荡 24 h,使其达

到饱和吸附,分离树脂。对应加入体积分数为 10%、30%、50%、60%、70%、90% 的乙醇溶液各 50 mL,同法震荡洗脱 24 h 后滤过,测定洗脱液中黄酮类成分含量。结果显示(图 5A),当乙醇的体积分数为 30%、50%、60%、70% 时,解吸量均较高,且结合生产成本考虑,故选择 30% 乙醇为洗脱剂。

**2.3.3.4 上样液质量浓度考察** 精密称取 3 份处理好的 HP-20 大孔树脂 10 g,湿法装柱,分别加入含有 0.13 g/mL 药液 8 mL,0.26 g/mL 药液 4 mL,0.52 g/mL 药液 2 mL(以 40% 乙醇提取物计),乙醇提取物量均为 1.04 g。待完全吸附后以 3 BV 水除杂,4 BV 30% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,分别测定洗脱液中黄酮类成分的量。结果显示(图 5B),随着上样药液质量浓度增加,黄芩茎叶黄酮的转移率变小,故选择 0.26 g/mL 药液进行上样。

**2.3.3.5 上样量考察** 精密称取预处理好的 HP-20 大孔树脂约 10 g(抽滤至不滴水的质量),湿法装柱。量取上样液 80 mL(0.052 g/mL),进行动态吸附,收集过柱液,每 10 mL 接 1 管,共收集 7 管,测定各过柱液中黄酮的泄漏量。以 5% 为界限,计算泄漏率,确定最大上样量并绘制泄漏曲线。结果表明(图 5C),第 5 份流出液时开始大量泄漏(已扣除树脂间水分),故确定每克树脂上样量应小于等于 0.208 g 干燥提取物。

**2.3.3.6 大孔树脂柱径高比考察** 精密称取预处理好的 HP-20 大孔树脂约 10 g,分别装入不同型号的树脂柱中,使径高比为 1:2、1:3、1:5,量取上样液 10 mL(0.26 g/mL),进行动态吸附,以 3 BV 水除杂后,4 BV 30% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,分别测定洗脱液中黄酮类成分的量。结果表明(图 5D),随着径高比的增加,树脂柱对目标成分的吸附能力逐渐增强,但在工业化生产中,过高的树脂柱会产生巨大的压力,而且操作上不方便,故本实验中选择 1:3 为最佳径高比。

**2.3.3.7 除杂体积考察** 精密称取预处理好的 HP-20 大孔树脂约 10 g,湿法装柱(径高比为 1:3),量取上样液 8 mL(0.26 g/mL),进行动态吸附,分别以 2、3、4、5 BV 水除杂后,4 BV 30% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,回收溶剂后称定质量,并测定目标成分的含量,计算黄酮类成分的质量分数。结果显示(图 5E),经 4 BV 或 5 BV 水除杂后,其总黄酮的质量分数相近,分别为 65.92%、66.24%,故选择除杂水体积为 4 BV。

**2.3.3.8 洗脱剂用量考察** 取预处理好的 HP-20 大孔树脂 10 g,湿法装柱,量取上样液(0.26 g/mL) 5 mL,以 4 BV 水除杂,以 30% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,每 1 个 BV 收集为 1 份,测定各洗脱液中黄酮的量,计算其累积洗脱量,洗脱曲线见图 5F。结果表明,4 BV 后洗脱液中黄酮类成分的量基本不再增加,故选择以 4 BV 30% 乙醇洗脱。

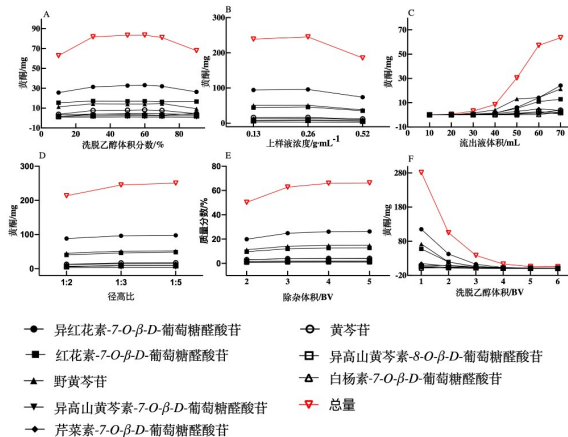


图 5 HP-20 大孔树脂纯化黄芩茎叶黄酮工艺参数考察

**2.3.3.9 验证实验** 称取已处理好的 HP-20 型大孔吸附树脂 20 g,湿法装柱,取 0.26 g/mL 药液上柱 16 mL,用 4 BV 水洗除杂,4 BV 30% 乙醇洗脱,收集洗脱液,浓缩干燥至恒定质量,计算得率并测定黄酮类成分含量。结果表明,黄芩茎叶纯化品的得率为 36.47%,黄酮类成分的质量分数为 66.03%,其中异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 26.10%、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 12.63%、野黄芩苷的质量分数为 14.80%、异高山黄芩素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 1.04%、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 3.99%、黄芩苷的质量分数为 4.09%、异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 1.97%、白杨素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的质量分数为 1.29%。验证实验结果表明该优选纯化工艺稳定可行。

### 3 讨论

黄芩茎叶是药用植物黄芩的地上部分,为非传统药用部位,其生物量约为黄芩根的 2 倍<sup>[19]</sup>,且富含黄酮类生物活性成分,是丰富、潜在的药用资源。然而,在黄芩药材生产过程中,黄芩茎叶多于秋冬季节自然枯萎后被粉碎弃置于大田,不仅造成自然资源的浪费,而且不利于黄芩的生态种植。研究表明,黄芩根系分泌物(包括黄芩苷)对自身生长具有显著自毒作用,能抑制有益根际微生物生长,促进病原微

生物繁殖<sup>[20]</sup>,是造成黄芩连作障碍的重要原因。而弃置于田的黄芩茎叶,富含黄芩苷等黄酮类成分,无疑加重了连作障碍效应。本研究以黄芩茎叶中黄酮类资源成分为对象,对其富集工艺进行系统研究,建立了一种高效、绿色制备黄芩茎叶总黄酮的方法,此方法不需要调节茎叶提取液 pH,简化了制备过程,无酸、碱废液产生,为黄芩茎叶资源的合理开发提供了科学依据,有利于黄芩茎叶资源的回收利用,从而促进黄芩种植产业的健康发展。

本实验通过单因素考察及正交试验对黄芩茎叶黄酮的提取工艺进行了筛选。结果表明,乙醇热回流法提取效率高于水煎煮法,且 40%~70%乙醇为适宜的提取溶剂。考虑到经济成本,最终确定的最佳提取工艺为:12 倍量 40%乙醇热回流提取 3 次,每次 1 h。

对提取物的纯化工艺考察结果显示,在 pH 为 1 时,酸沉法虽然可以使野黄芩苷、黄芩苷等化合物的转移率达 90%以上,但是含量丰富的异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的转移率较低,仅为 60%左右。异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷为二氢黄酮类化合物,在黄芩茎叶中含量丰富,具有抗氧化、α-葡萄糖苷酶抑制及心脑血管保护活性<sup>[21-23]</sup>。酸沉法会使二者大量损失,需要通过大孔树脂进一步进行富集。而选择大孔树脂直接进行富集时,野黄芩苷、异红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、红花素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的转移率可达 90%以上,可以实现各目标成分的高效转移。对树脂法纯化工艺的进一步优化结果显示,0.26 g/mL 药液上样,上样量为每 10 g 干树脂上样 2.08 g 干燥提取物,4 BV 纯水除杂后,以 30%乙醇洗脱 4 BV 为最佳纯化参数,最终得到的茎叶总黄酮纯度可达 66.03%。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:三部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2016.

[2] ZHAO Q, CHEN XY, MARTIN C. *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants[J]. *Sci Bull*, 2016, 61(18): 1391-1398.

[3] YAN B, XU W, SU S, et al. Comparative analysis of 15 chemical constituents in *Scutellaria baicalensis* stem-leaf from different regions in China by ultra-high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(18): 3570-3581.

[4] 王文涛,陈瑞,曹瑶,等. 中药黄芩资源研究进展[J]. 陕西农业

科学, 2019, 65(4): 87-91.

[5] ZHAO Q, ZHANG Y, WANG G, et al. A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant, *Scutellaria baicalensis*[J]. *Sci Adv*, 2016, 2(4): e1501780.

[6] LIU G, RAJESH N, WANG X, et al. Identification of flavonoids in the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(13/14): 1023-1028.

[7] 张琳. 黄芩茎叶抑菌抗炎活性及抗小鼠乳腺炎作用的研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2019.

[8] 杨志军, 杨秀娟, 李晶, 等. 甘肃不同产地黄芩茎叶和根对急性肝损伤小鼠的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(6): 61-63.

[9] 梅盛前, 肖捷, 李放, 等. 黄芩茎叶黄酮对大鼠急性脊髓损伤后的神经保护作用及对 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(5): 802-805, 816.

[10] 王秋杰, 辛立升, 吴晓光, 等. 黄芩茎叶总黄酮对大鼠学习记忆的影响及抗氧化作用机制研究[J]. 河北医学, 2011, 17(11): 1434-1436.

[11] 佟继铭, 陈光晖, 刘玉玲, 等. 黄芩茎叶总黄酮对家兔实验性动脉粥样硬化的预防作用[J]. 中草药, 2005, 36(1): 93-95.

[12] 史高峰, 祝娟娟, 张兴潜, 等. 黄芩茎叶中总黄酮提取工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 109-112.

[13] 张慧, 李媛, 徐倩文, 等. 黄芩茎叶中活性成分野黄芩苷的微波提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 74-78.

[14] 骆冉冉, 刘文娣, 邓丽莉, 等. 响应面法优化黄芩茎叶总黄酮提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1865-1872.

[15] 朱磊, 李君, 董海荣, 等. 黄芩茎叶提取物纯化方法优选[J]. 中国医药导报, 2014, 11(32): 90-93.

[16] 朱邦胜, 孙洪胜, 蔡明. 黄芩茎叶中野黄芩苷的提取工艺研究[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(5): 732-735.

[17] 李莉, 周卫涛, 李峰. 正交试验法优选黄芩茎叶中野黄芩苷提取工艺研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(62): 108-109.

[18] 张雅蓉, 徐犇, 李纳, 等. 响应面法优化黄芩茎叶对照提取物纯化工艺及其特征图谱研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 654-661.

[19] 严宝飞. 黄芩茎叶资源化学与新资源药材质量评价研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.

[20] 金毅力. 药用植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)他感作用的初步研究[D]. 杭州:浙江大学, 2010.

[21] LI K, YAO F, XUE Q, et al. Inhibitory effects against α-glucosidase and α-amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure-activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method[J]. *Chem Cent J*, 2018, 12(1): 82.

[22] LI K, FAN H, YIN PP, et al. Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots[J]. *Arab J Chem*, 2018, 11(2): 159-170.

[23] 何春年, 肖培根, 彭勇, 等. 一种含异红花素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的活性提取物及其用途: 中国, CN102492008A[P]. 2012-06-13.

(编辑:董宇)