糙叶败酱总环烯醚萜苷的纯化工艺及抗炎活性研究

鲁艳梅[1,2]，马趣环[1,2]，石晓峰[2*]，李婉玉[1,2]，郭玉儿[1,3]，董学凤[1,2]，叶倩女[1,2]，张家旭[1,2](1.甘肃中医药大学，兰州 730050；2.甘肃省医学科学研究院药物研究所，兰州 730050；3.兰州理工大学，兰州 730050)

摘要：目的 优选大孔树脂富集纯化糙叶败酱总环烯醚萜苷的工艺条件并研究其抗炎活性。**方法** 以紫外分光光度法测得的总环烯醚萜苷含量为指标，通过静态、动态吸附-解吸附能力考察，筛选适合纯化糙叶败酱总环烯醚萜苷的大孔树脂，进而通过考察上样浓度、最佳上样量、乙醇体积分数、洗脱剂用量、洗脱流速等优选其富集纯化工艺。采用二甲苯致小鼠耳肿胀试验，以阿司匹林为阳性对照药，对糙叶败酱总环烯醚萜苷的抗炎活性进行评价。**结果** AB-8 大孔树脂为纯化糙叶败酱总环烯醚萜苷的最适材料，最佳纯化工艺条件：上样量 4 BV、浓度为 1.10 mg·mL^{-1}，以 2 BV·h^{-1} 的流速进行动态吸附，加 4 BV 水洗脱除杂，然后用 4 BV 的 50%乙醇以 2 BV·h^{-1} 的流速进行解吸。在此条件下，总环烯醚萜苷含量由纯化前的 8.27%提高到纯化后的 35.92%，约为纯化前的 4.4 倍。纯化后的总环烯醚萜苷的高剂量组(200 mg·kg^{-1})能有效降低二甲苯诱发的小鼠耳肿胀，其抑制率达 53.20%，较空白对照组具有显著性差异。**结论** 优选得到的以 AB-8 大孔树脂为填料优化的纯化工艺可行；糙叶败酱总环烯醚萜苷具有一定的抗炎作用。

关键词：糙叶败酱；总环烯醚萜苷；大孔树脂；纯化工艺；抗炎作用

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2021)21-2675-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.008

引用本文：鲁艳梅, 马趣环, 石晓峰, 等. 糙叶败酱总环烯醚萜苷的纯化工艺及抗炎活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2675-2682.

Study on Purification Process and Anti-inflammatory Activity of Total Iridoid Glycosides from *Patrinia Scabra* Bunge

LU Yanmei[1,2], MA Quhuan[1,2], SHI Xiaofeng[2*], LI Wanyu[1,2], GUO Yu'er[1,3], DONG Xuefeng[1,2], YE Qiannyu[1,2], ZHANG Jiaxu[1,2](*1.Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 2.Institute of Materia Medica, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China; 3.Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the technological conditions for the enrichment and purification of total iridoid glycosides from *Patrinia scabra* Bunge by macroporous resin and study its anti-inflammatory activity. **METHODS** The content of total iridoid glycosides was determined through the ultraviolet spectrophotometry and was taken as an index. The macroporous resin which was suitable for purifying the total iridoid glycosides from *Patrinia scabra* Bunge was screened through the static and dynamic adsorption-desorption ability. Furthermore, the enrichment and purification process of *Patrinia scabra* was optimized by investigating the sample concentration, optimum sample volume, ethanol volume fraction, elution dosage, elution flow rate and so on. The anti-inflammatory activity of the total iridoid glycosides from *Patrinia scabra* Bunge was evaluated by the xylene-induced ear swelling test with the aspirin as positive control group. **RESULTS** AB-8 macroporous resin was the optimal material for the purification of total iridoid glycosides from *Patrinia scabra* Bunge. The optimum purification conditions were as follows: the dosage of sample volume was 4 BV, the concentration was 1.10 mg·mL^{-1}, the dynamic adsorption was carried out at the flow rate of 2 BV·h^{-1}, the impurity was washed out with 4 BV water, and then the desorption was carried out with 50% ethanol of 4 BV at the flow rate of 2 BV·h^{-1}. Under these conditions, the content of total iridoid glycosides increased from 8.27% to 35.92% after purification, which was about 4.4 times of that before purification. The high-dose group of total iridoid glycosides(200 mg·kg^{-1}) could effectively reduce the xylene-induced ear swelling in mice, and the inhibition rate reached 53.20%, which was significantly compared with the blank control group. **CONCLUSION** The optimized purification process with AB-8 macroporous resin as filler is feasible, and the total iridoid glycosides of *Patrinia scabra* Bunge possess certain anti-inflammatory effect.

KEYWORDS: *Patrinia scabra* Bunge; total iridoid glycosides; macroporous resin; purification process; anti-inflammatory

糙叶败酱 *Patrinia scabra* Bunge 为 20 种败酱属植物之一，俗称“墓头回”，常以根与根茎入药，主要用于治疗伤寒、温症、妇女崩中、赤白带下，疟疾，肠痈，急性阑尾炎初起等症[1-3]，具有止血、

基金项目：兰州市科技计划项目(2018-1-116)；兰州市科技发展指导性计划项目(2017-ZD-30)

作者简介：鲁艳梅，女，硕士生　Tel: 15713618528　E-mail: meizijiayou129@163.com　*通信作者：石晓峰，男，主任药师，教授　Tel: 13609353523　E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

抗肿瘤、免疫调节等作用[4-5]，目前已从糙叶败酱中发现环烯醚萜及其苷类、黄酮类、三萜类、甾体类、木脂素类、多糖类及挥发油等多种化学成分[6-9]。

糙叶败酱中含有丰富的环烯醚萜类化合物，已发现具有较好的抗肿瘤作用和免疫调节功能[10-12]，另有研究发现从糙叶败酱中分离出的环烯醚萜类化合物以浓度依赖的方式显著抑制脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞促炎介质 NO 产生，具有较好的抗炎活性[13-14]，有进一步开发研究价值。本课题组曾从糙叶败酱中分离出莫诺苷、白花败酱醇、异戊二烯烃类等多种环烯醚萜类化合物[15-16]，并对其中新环烯醚萜类成分异白花败酱醇的含量进行了定性定量分析，其含量很高，达到 18.8 mg·g^{-1}[17]。为此，本实验以糙叶败酱为原料，采用大孔吸附树脂技术对总环烯醚萜苷类成分进行富集纯化，以总环烯醚萜苷的含量为指标，对文献中曾用于考察纯化环烯醚萜类成分的 D101、X-5、HPD-100、HPD-450、HPD-600、XAD-16 以及 AB-8 等 7 种树脂的吸附及解吸附性能进行比较，从中筛选出最佳的大孔树脂型号[18-19]。通过对上样浓度、最佳上样量、乙醇体积分数、洗脱剂用量、洗脱流速等参数进行考察，优选出糙叶败酱中环烯醚萜苷类成分的富集纯化工艺。并通过二甲苯致小鼠耳肿胀试验，对富集出的糙叶败酱进行抗炎活性研究，为其深入研究提供依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

糙叶败酱根及根茎于 2016 年采自甘肃省兰州市兴隆山区，经甘肃省医学科学研究院石长栓研究员鉴定为败酱科败酱属植物糙叶败酱 *Patrinia scabra* Bunge。莫诺苷对照品(上海士锋生物科技有限公司，批号：20140419；纯度≥98%)；阿司匹林肠溶片(石药集团欧意药业有限公司，批号：018200506；规格：25 mg×100 片)。大孔树脂 D101(天津市海光化工有限公司，批号：191202)、大孔树脂 X-5(批号：190501)、HPD-100(批号：190301)、HPD-450(批号：190703)、HPD-600(批号：190401)、XAD-16(批号：190801)、AB-8(批号：190401)均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司，见表 1。甲醇(天津市百世化工有限公司，批号：20191105)；乙醇(天津市北联精细化学品开发有限公司，批号：20170620)；二甲苯(天津市百世化工有限公司，批号：20180705)；试剂均为分析纯。

表 1 大孔树脂类型及理化性质

Tab. 1 Physical and chemical properties of macroporous adsorption resins

树脂类型	极性大小	平均孔径/nm	比表面积/m^2·g^{-1}
D101	非极性	9~10	500~550
X-5	非极性	29~30	500~600
HPD-100	非极性	8.5~9	650~700
XAD-16	非极性	15	≥800
HPD-450	弱极性	9~11	500~550
AB-8	弱极性	13~14	480~520
HPD-600	极性	8	550~600

1.2 仪器

UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司生产)；AE260 万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)；CP225D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司)；VORTEX MIXER QL-901 漩涡混合器(海门市麒麟医用仪器厂)；KQ2200B 超声清洗仪器(昆山市超声仪器有限公司生产)；DKQ-02 型打孔器(思睿教学实验仪器厂)。

1.3 动物

清洁级昆明小鼠，♂，20~25 g，32 只，由兰州大学医学实验动物中心提供，动物生产许可证号：SCXK(甘)2018-0002。动物随机放置于饲养繁殖笼中，自由摄食，实验室自然通风，室温(28±2)℃，昼夜自然循环。每次实验开始前，动物皆在实验室里适应性饲养 1 周。

2 方法

2.1 总环烯醚萜苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备　精密称取对照品莫诺苷 11 mg，置于 10 mL 的量瓶中，加甲醇溶解并定容，配制成浓度为 1.1 mg·mL^{-1} 的莫诺苷对照品储备液。然后精密吸取上述莫诺苷对照品储备液 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，即得浓度为 0.11 mg·mL^{-1} 的莫诺苷对照品溶液。

2.1.2 线性关系的考察　依据本课题组前期建立的测定方法[20]，分别精密吸取莫诺苷对照品溶液 0，0.50，1.00，1.50，2.00，2.50，3.00，3.50 mL 于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，以甲醇作为空白参比，在 240 nm 处测定吸光度值。以莫诺苷浓度(x，mg·mL^{-1})为横坐标，吸光度(y)为纵坐标，绘制标准曲线。得到的线性回归方程为：y=28.448 05x+0.000 04，r^2=0.999 4。结果表明，莫诺苷溶液的浓度在 0.005 5~0.033 mg·mL^{-1} 内与吸光

度呈良好的线性关系。

2.1.3 乙醇提取物的制备 称取糙叶败酱干燥根及根茎 600 g，按 1∶14 料液比加入 50%乙醇 8 400 mL，回流提取 2 次，每次 2 h，过滤，合并滤液，减压回收乙醇，制得干浸膏 213.72 g(得率为 35.62%)，备用。

2.1.4 总环烯醚萜苷的测定 称取“2.1.3”项下制备的干浸膏粉 25 mg，加水溶解并定容至 25 mL，精密吸取 1 mL 于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度。按“2.1.2”项下的方法测定总环烯醚萜苷含量。

2.1.5 上样液的制备 根据上样条件分别取“2.1.3”项下制备的乙醇提取物干浸膏 0.67，1.33，2.00，2.66，2.99 g，各加 100 mL 水溶解，得到浓度分别为 0.55，1.10，1.65，2.20，2.47 $mg·mL^{-1}$ 的糙叶败酱总环烯醚萜苷上样液，以下的试验过程中按照此法进行上样液的配制。

2.2 大孔树脂的筛选

2.2.1 大孔树脂的预处理 称取适量不同型号的大孔树脂，加 95%的乙醇浸泡 24 h，湿法装柱，之后用 95%的乙醇洗脱至流出液与等量水混合不呈白色浑浊，再用纯水(2~3 BV)洗至无醇味，备用[21-22]。

2.2.2 静态吸附能力的考察 将预处理好的 7 种大孔吸附树脂(X-5、HPD-100、D-101、HPD-450、HPD-600、XAD-16 和 AB-8)各 10.0 g 分别置于具塞锥形瓶中，分别加入“2.1.5”项下制备的上样液(含总环烯醚萜苷 2.47 $mg·mL^{-1}$)20 mL，置于摇床中，于 25 ℃下振荡 24 h(150 $r·min^{-1}$)，以达到吸附平衡[23]。静置 20 min，倾出吸附后的样液；用 20 mL 蒸馏水快速冲洗大孔吸附树脂，收集水洗液；然后用 95%乙醇进行解吸附，收集解吸液；按“2.1.2”项下方法测定吸附后样液、水洗液及 95%乙醇解吸液的吸光度值，按线性回归方程计算浓度，得到总环烯醚萜苷的含量，以解吸量为主要考察指标，计算解吸量。

吸附量(mg)=吸附前总环烯醚萜苷质量−吸附后样液总环烯醚萜苷质量−水洗液总环烯醚萜苷质量；

吸附率(%)=吸附量/上样量×100%；

解吸量(mg)=解吸液的浓度($mg·mL^{-1}$)×解吸液体积(mL)；

解吸率(%)=解吸量/吸附量×100%。

2.2.3 动态吸附能力的考察 将筛选出的大孔吸附树脂按“2.2.1”项下方法进行预处理，然后各取 10.0 g 湿法装柱，再用 2~3 BV 的水洗至无醇味，以 0.6 $mL·min^{-1}$ 的流速上样(含总环烯醚萜苷 2.47 $mg·mL^{-1}$)20 mL，并收集经大孔吸附后流出液，待上样完成后(上样液面与树脂液面持平)，用 20 mL 蒸馏水快速冲洗大孔吸附柱，收集水洗液；然后用 20 mL 95%的乙醇进行解吸附，收集解吸液；按“2.1.2”项下方法测定经大孔树脂吸附后流出液、水洗液及 95%乙醇解吸液的吸光度值。以解吸量为主要考察指标，计算解吸量。

2.3 大孔树脂动态吸附-解吸条件的优化

将筛选的适合纯化糙叶败酱总环烯醚萜苷的大孔树脂，按“2.2.1”项下方法进行预处理，然后湿法装柱，分别以上样浓度(0.55，1.10，1.65，2.20 $mg·mL^{-1}$)、最佳上样量(以每隔 0.5 BV 为单位收集)、除杂溶剂(4 BV 水、8 BV 水、8 BV 水+2 BV 5%乙醇)、乙醇体积分数(10%，30%，50%，70%，95%)、洗脱流速(1，2，3，4，5 $BV·h^{-1}$)、洗脱剂用量(1，2，3，4，5 BV)等为变量考察其动态吸附及解吸率、回收率等，优选最佳纯化工艺条件并进行验证试验[24-25]。回收率(%)=(解吸液中总环烯醚萜苷质量/上样液中总环烯醚萜苷质量)×100%。

2.4 耳肿胀试验

清洁级昆明小鼠，♂，20~25 g，32 只，分为 4 组，每组 8 只，分别为空白组(生理盐水)、阳性对照阿司匹林组(500 $mg·kg^{-1}$)和糙叶败酱总环烯醚萜苷低剂量组(100 $mg·kg^{-1}$)、高剂量组(200 $mg·kg^{-1}$)。各组动物每天灌胃给药 1 次，连续给药 6 d，给药容量为 0.2 $mL·(20\ g)^{-1}$；空白对照组同法灌胃等体积生理盐水。末次给药后 1 h，于小鼠右耳双面均匀涂抹二甲苯 0.05 mL，左耳不涂作为正常耳，40 min 后脱臼处死小鼠，用直径 8 mm 的打孔器，分别在左、右耳同一部位打下耳片，用分析天平分别称重，依下列公式计算各组动物的耳肿胀率与耳肿胀抑制率[26-27]：耳肿胀率(%)=(右耳质量 − 左耳质量)/左耳质量×100%；

耳肿胀抑制率(%)=(对照组平均肿胀度 − 给药组平均肿胀度)/对照组平均肿胀度×100%。

2.5 数据处理

药理实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理，实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Kruskal-Wallis 单因素 ANOVA 检验分析，组间两两比较，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大孔树脂的筛选结果

3.1.1 静态吸附能力的考察结果 树脂 D-101、AB-8、XAD-16、HPD100、HPD450 的解吸量较高，HPD600 最差，HPD100 与 HPD450 相近，故选取前 4 种解吸量较好的大孔树脂进行动态吸附能力考察。结果见表 2。

3.1.2 动态吸附能力的考察结果 树脂 D-101 动态吸附与解吸附性能最差，树脂 XAD-16 与 HPD100 解吸附性能相近，树脂 AB-8 最佳，综合考虑，选用 AB-8 型大孔吸附树脂为吸附载体进行糙叶败酱中总环烯醚萜苷的富集纯化工艺研究。结果见表 3。

3.2 AB-8 型大孔树脂富集纯化工艺优选结果

3.2.1 上样浓度的考察结果 精密称取 AB-8 树脂约 10.0 g，4 份，分别装柱，分别将总环烯醚萜苷含量约为 0.55，1.10，1.65，2.20 mg·mL^{-1}的一系列等体积样品液以相同流速通过树脂柱，收集吸附余液。按“2.1.2”项下方法测算总环烯醚萜苷含量，计算吸附率。随着上样浓度的增加，吸附率也逐渐增加，当供试液的浓度达到 1.10 mg·mL^{-1}时，树脂的吸附量最高，之后呈现下降趋势，故确定上样液浓度为 1.10 mg·mL^{-1}。结果见图 1。

3.2.2 最佳上样量的考察结果 称取经预处理的 AB-8 型大孔树脂 10.0 g，量取糙叶败酱总环烯醚萜苷含量为 1.10 mg·mL^{-1} 的粗提液 6 BV，以 2 BV·h^{-1}的流速通过吸附柱，以 0.5 BV 为单位收集吸附余液，按“2.1.2”项下方法测定流出液中总环烯醚萜苷的浓度。以上样量(BV)为横坐标，总环烯醚萜苷的浓度为纵坐标，绘制泄露曲线。由流分 1~7 中检测的总环烯醚萜苷浓度较小，说明树脂吸附量大，随着流分数的增加，总环烯醚萜苷浓度不断上升，从流分 8 开始泄露浓度超过上样浓度的 10%[28]，之后出现明显泄露趋势，为保证药液吸附完全，确定上样液为 4 BV 时为最佳上样量。结果见图 2。

3.2.3 除杂溶剂的考察结果 量取总环烯醚萜苷含量为 1.10 mg·mL^{-1}的粗提液 4 BV，以 2 BV·h^{-1}流速通过装有 10.0 g AB-8 树脂的树脂柱进行吸附，加不同的溶剂除杂，用 50%的乙醇解吸附，收集解吸液，按“2.1.2”项下的方法测定收集液中总环烯醚萜苷的含量。用 4 BV 的水除杂时其总环烯醚萜苷的回收率及纯度均优于其他除杂溶剂，故而选取 4 BV 的水进行除杂。结果见表 4。

3.2.4 洗脱溶剂乙醇体积分数的考察结果 称取 5 份经预处理的 AB-8 型大孔树脂各 10.0 g，量取总环烯醚萜苷含量为 1.10 mg·mL^{-1} 的粗提液 4 BV，以 2 BV·h^{-1} 的流速通过吸附柱，再用 10 BV·h^{-1}的流速水洗 4 BV 后，分别用 10%，30%，50%，70%，95%的乙醇以 2 BV·h^{-1}的流速进行洗脱，收集洗脱液，按“2.1.2”项下方法测定洗脱液中总环烯醚萜苷的含量。当乙醇浓度为 50%时，回收率达 79.82%，故选取 50%的乙醇作为洗脱溶剂。结果见表 5。

3.2.5 洗脱流速考察结果 分别量取总环烯醚萜苷含量为 1.10 mg·mL^{-1}的 5 份粗提液，每份 4 BV，以 2 BV·h^{-1}流速通过装有 10.0 g AB-8 树脂的树脂柱进行吸附，再用 10 BV·h^{-1}流速水洗 4 BV 后，分别以 1，2，3，4，5 BV·h^{-1} 的流速用相同体积的 50%乙醇溶液进行洗脱，收集洗脱液，按“2.1.2”项下方法测定洗脱液中总环烯醚萜苷的含量，计算回收率。当洗脱流速为 2 BV·h^{-1} 时，总环烯醚萜苷的回收率及纯度均最大，故选用 2 BV·h^{-1} 的流速进行洗脱。结果见表 6。

表 2 7 种大孔吸附树脂静态吸附能力的考察($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 2 Investigation of static adsorption capacity of seven kinds of macroporous adsorption resin($\bar{x}\pm s$, n=3)

编号	树脂型号	未被吸附量/mg	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸率/%
1	X-5	5.31±0.04	44.18±0.04	89.27±0.08	22.74±0.08	51.47±0.22
2	D-101	9.00±0.06	40.49±0.06	81.81±0.12	26.79±0.10	66.16±0.34
3	HPD-100	7.31±0.05	42.18±0.05	85.23±0.10	23.39±0.09	55.45±0.20
4	HPD-450	7.87±0.06	41.62±0.06	84.10±0.11	23.31±0.07	56.01±0.11
5	HPD-600	8.46±0.14	41.03±0.14	82.91±0.29	21.23±0.08	51.74±0.35
6	XAD-16	6.47±0.05	43.02±0.05	86.92±0.10	24.45±0.11	56.83±0.19
7	AB-8	10.19±0.04	39.30±0.04	79.41±0.07	26.59±0.07	67.66±0.11

注：总环烯醚萜苷上样量均为 49.49 mg。

Note: Total iridoid glycosides loading quality were all 49.49 mg.

表 3 4 种大孔吸附树脂动态吸附能力的考察($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 3 Investigation of dynamic adsorption capacity of four kinds of macroporous adsorption resin($\bar{x}\pm s$, n=3)

编号	树脂型号	未被吸附量/mg	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸量排序
1	D-101	6.56±0.08	43.01±0.08	86.77±0.15	35.12±0.06	4
2	AB-8	6.26±0.05	43.31±0.05	87.37±0.10	43.06±0.04	1
3	XAD-16	3.64±0.06	45.93±0.06	92.65±0.13	40.52±0.08	2
4	HPD100	5.12±0.06	44.45±0.06	89.67±0.12	39.23±0.10	3

注：总环烯醚萜苷上样量均为 49.57 mg。

Note: The total iridoid glycosides loading quality were all 49.57 mg.

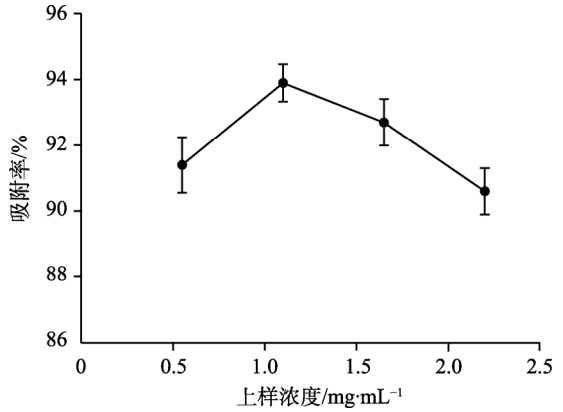

图 1 上样浓度对吸附率的影响(n=3)

Fig. 1 Effect of the sample concentration on adsorption rate(n=3)

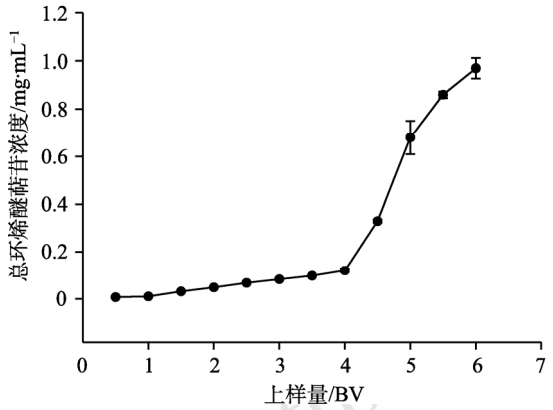

图 2 总环烯醚萜苷泄露曲线(n=3)

Fig. 2 Disclosure curves of total iridoid glycosides(n=3)

表 4 除杂溶剂考察结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 4 Results of impurity-removal solvent investigation ($\bar{x}\pm s$, n=3)

除杂溶剂及用量	解吸量/mg	回收率/%	总环烯醚萜苷纯度/%
4BV 水	55.24±0.03	83.69±0.04	34.11±0.03
8BV 水	52.32±0.01	79.28±0.14	32.74±0.03
8BV 水+2 BV 5%乙醇	48.62±0.03	73.67±0.04	29.82±0.01

3.2.6 洗脱剂用量考察结果　量取总环烯醚萜苷含量为 1.10 mg·mL^{-1} 的粗提液 4 BV，以 2 BV·h^{-1} 流速通过装有 10.0 g AB-8 树脂的树脂柱进行吸附，再用 10 BV·h^{-1} 流速水洗 4 BV 后，分别用 1，2，3，4，5 BV 的 50%乙醇溶液以 2 BV·h^{-1} 的流速进行洗脱，以 1 BV 为单位收集洗脱液，按“2.1.2”项下的方法测定洗脱液中总环烯醚萜苷的含量。当洗至第 4 个柱体积时，其累积解吸率达 99.12%，基本达到完全洗脱。洗至第 5 个柱体积时，其解吸率与 4 BV 的量相比仅高 0.08%，考虑到溶剂消耗量及洗脱时间等因素，故选用洗脱剂用量为 4 BV。结果见表 7。

表 5 乙醇体积分数考察结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 5 Results of ethanol concentration investigation ($\bar{x}\pm s$, n=3)

乙醇/%	解吸量/mg	回收率/%	总环烯醚萜苷纯度/%
10	18.89±0.16	28.62±0.01	27.19±0.03
30	35.05±0.14	53.11±0.03	33.66±0.03
50	52.68±0.92	79.82±0.23	34.07±0.10
70	49.74±0.42	75.36±0.18	34.09±0.06
95	48.33±0.28	73.22±0.28	34.13±0.03

表 6 洗脱流速考察结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 6 Results of the elution flow rate investigation($\bar{x}\pm s$, n=3)

洗脱剂流速/BV·h^{-1}	解吸量/mg	回收率/%	总环烯醚萜苷纯度/%
1	43.80±0.21	78.22±0.03	33.19±0.01
2	47.19±0.04	84.28±0.04	35.77±0.03
3	46.89±0.06	83.74±0.01	35.63±0.01
4	38.66±0.01	69.03±0.03	34.72±0.03
5	32.56±0.04	58.14±0.04	26.86±0.04

表 7 乙醇洗脱用量考察结果($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 7 Results of ethanol's elution volume investigation ($\bar{x}\pm s$, n=3)

洗脱剂用量/BV	解吸量/mg	总环烯醚萜苷解吸率/%
1	32.66±0.03	58.33±0.03
2	50.69±0.07	90.52±0.04
3	53.84±0.08	96.14±0.03
4	55.51±0.10	99.12±0.04
5	55.55±0.06	99.20±0.09

3.3 验证试验结果

按“2.1.5”项下方法配制糙叶败酱总环烯醚萜苷粗提液 3 份，分别按上述确定的最佳工艺条件进行上样、吸附及洗脱，然后收集洗脱液并计算总环烯醚萜苷提取物的含量。经过 AB-8 树脂纯化后的提取物中总环烯醚萜苷的含量达到 35.92%，而之前粗提物中总环烯醚萜苷的含量为 8.27%，约为纯化前的 4.4 倍。结果见表 8。

表 8 验证试验中糙叶败酱总环烯醚萜苷纯度($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 8 Purity of total iridoid glycosides from *Potrinia scabra* Bunge in verification tests($\bar{x}\pm s$, n=3) %

样品	纯化前	纯化后
1	8.12	36.34
2	8.07	35.82
3	8.62	35.61
平均值	8.27±0.30	35.92±0.38

3.4 耳肿胀试验结果

阳性对照药物阿司匹林(500 mg·kg^{-1})和糙叶败酱总环烯醚萜苷组均能有效降低二甲苯诱发的小鼠耳肿胀率。组间检验的结果显示，与空白组比较，糙叶败酱总环烯醚萜苷组能明显降低二甲苯诱发的小鼠耳肿胀率，且高剂量组(200 mg·kg^{-1})的抑制作用显著(P<0.01)。结果见表 9。

表 9 糙叶败酱 50%乙醇洗脱部位对二甲苯诱发的小鼠耳肿胀率的作用($\bar{x}\pm s$，n=8)

Tab. 9 Effects of 50% ethanol eluted fraction from *Patrinia scabra* Bunge on xylene-induced ear edema rate in mice($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量/mg·kg^{-1}	耳肿胀率/%	耳肿胀抑制率/%
空白组	–	91.77±11.82	–
阿司匹林组	500	22.62±4.74$^{2)}$	68.58
糙叶败酱总环烯醚萜苷组	100	52.15±7.41	39.56
	200	40.51±6.35$^{1)}$	53.20

注：与空白组比较，$^{1)}P$<0.01，$^{2)}P$<0.001。

Note: Compared with blank group, $^{1)}P$<0.01, $^{2)}P$<0.001.

4 讨论

目前虽然已从糙叶败酱中分离出多种环烯醚萜类成分，但并未发现其总环烯醚萜苷的富集纯化工艺方面的报道。环烯醚萜类化合物在糙叶败酱中所占比重较大，其含量达到 81.89 mg·g^{-1}[20]，且结构与糙叶败酱中其他环烯醚萜苷类成分的基本结构相似，本课题组前期从糙叶败酱中分离出莫诺苷[16]，故本实验选择莫诺苷为指标成分，采用大孔树脂法进行糙叶败酱总环烯醚萜苷的纯化富集工艺研究。大孔吸附树脂是一类新型非离子型具有大孔结构的高分子化合物，用于黄酮类、萜类的纯化，能有效除去水溶性色素、多糖和无机盐等水溶性杂质。本次实验所得的吸附纯化工艺归纳如下：AB-8 大孔树脂为纯化糙叶败酱总环烯醚萜苷的最适材料，上样量 4 BV、浓度为 1.10 mg·mL^{-1}，以 2 BV·h^{-1} 的流速进行动态吸附，加 4 BV 水洗脱除杂，然后用 4 BV 的 50%乙醇以 2 BV·h^{-1} 的流速进行解吸，经 AB-8 树脂纯化后的糙叶败酱总环烯醚萜苷的纯度由 8.27%提高到 35.92%，约为纯化前的 4.4 倍。

目前已有糙叶败酱的抗炎活性研究，如 Lee 等[13]利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞促炎介质 NO 生成的初步体外筛选程序，首次发现糙叶败酱 70%乙醇提取物具有抗炎活性，其中 2 个新的环烯醚萜(patriscabrins B 和 E)和已知的木脂素 B 以浓度依赖的方式显著抑制 LPS 诱导的 NO 产生，IC_{50} 值分别为 17.1，14.7 和 17.8 μmol·L^{-1}。推测出乙基化化合物可能在糙叶败酱醇提物的抗炎作用中起作用，但由于分离出的化合物有限，确定乙基在 NO 抑制活性中的作用机制尚不清楚[14]。Shin 等[29]研究了败酱草苷 F 在 LPS 激活的巨噬细胞中的抗炎作用，得出其通过抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NF-κB、AP-1、IRF3 和 JAK-STAT 活化而表现出抗炎特性，但败酱草苷 F 在抑制 LPS 激活的转录因子中的确切机制和分子靶点仍不清楚，对其能否作为一种潜在的抗炎药物还需进一步的研究。从以上体外活性研究中可以发现糙叶败酱中的环烯醚萜类成分具有一定的抗炎活性，但目前为止并未有糙叶败酱体内抗炎活性研究的报道。故本实验对经过大孔树脂富集之后的糙叶败酱进行了小鼠二甲苯耳肿胀的抗炎药理活性研究。

二甲苯致小鼠耳肿胀是以水肿和渗出为主的急性炎症反应[30]，为评价药物抗炎活性的经典模型，此炎症包括外周组织炎症和中枢敏化机制等刺激作用[31-32]，目前已广泛应用于中药、中成药及中药保健品抗炎药理活性的评价中。如赵桂芝等[33]研究发现白术 75%乙醇提取物能剂量依赖性地降低二甲苯诱发的小鼠耳肿胀，肿胀抑制率达到 56.3%。刘钱等[34]通过研究双黄连系列制剂对二甲苯诱发的小鼠耳肿胀抑制作用发现双黄连片剂能显著降低二甲苯致小鼠耳肿胀度，作用强于双黄连口服液与双黄连颗粒，其药效与阿司匹林药效

相当。阿司匹林作为非甾体抗炎药，在中药的抗炎药物研究中常作为阳性对照药[26,34-35]。目前发现其作用机制主要有促进抗炎成分的分泌，通过增加巨噬细胞的吞噬功能从而发挥抗炎作用；对巨噬细胞的表达和释放 TNF-α及 IL-6 起到抑制作用；通过降低炎症介质 NO 的释放达到镇痛抗炎的作用[35-36]。结合糙叶败酱中环烯醚萜类化合物抑制 LPS 诱导 NO 产生的抗炎机制，本实验选择以阿司匹林为阳性对照。

通过对制备出的糙叶败酱进行抗炎药理实验研究，得出其对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制率达到 53.20%，有一定的抗炎作用，具体的物质作用基础是否与环烯醚萜类化合物相关，值得深入研究。本实验建立的纯化方法简单可行，设备要求与生产成本低，回收率高，易于实现工业转化，对于工业化生产有一定的参考意义，并为糙叶败酱中环烯醚萜类成分的深入研究提供了物质基础，为其新药开发提供依据。

REFERENCES

[1] HE X, LUAN F, ZHAO Z, et al. The genus patrinia: A review of traditional uses, phytochemical and pharmacological studies[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(4): 637-666.

[2] LIU L. Study on anti-tumor active substance of *Patrinia heterophylla* Bung[D]. Taiyuan: Shanxi University of Chinese Medicine, 2017.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 567-570.

[4] LU W Z, GENG G X, LI Q W, et al. Anti-tumor activity of polysaccharides isolated from *Patrinia scabra* Bunge on U14 cervical carcinoma bearing mice[J]. Am J Chin Med, 2009, 37(5): 933-944.

[5] 顾正兵. 糙叶败酱免疫调节活性成分的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2001.

[6] 马趣环, 石晓峰, 范彬, 等. 糙叶败酱化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药师, 2010, 13(6): 879-881.

[7] SUN H X, SUN C, PAN Y J. Cytotoxic activity and constituents of the volatile oil from the roots of *Patrinia scabra* Bunge[J]. Chem Biodivers, 2005, 2(10): 1351-1357.

[8] DI L, YAN G Q, WANG L Y, et al. Two new neolignans from *Patrinia scabra* with potent cytotoxic activity against HeLa and MNK-45 cells[J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(10): 1198-1203.

[9] KOUNO I, KOYAMA I, JIANG Z H, et al. Patrinioside, an esterified monocyclic iridoid glucoside from *Patrinia scabra*[J]. Phytochemistry, 1995, 40(5): 1567-1568.

[10] YANG B, WANG Y Q, CHENG R B, et al. Antitumor effect of iridoid ester fraction from Patriniae Radix and its mechanism[J].中草药, 2013, 44(20): 2884-2888.

[11] MAO J Q, LI T J, QIU Y, et al. Effects of the iridoid aglycones from *Patrinia scabra* on colon cancer[J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2007, 25(1): 10-12.

[12] 储智勇, 李铁军, 邱彦, 等. 糙叶败酱中环烯醚萜苷元对小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材, 2008, 31(6): 882-885.

[13] LEE D H, SHIN J S, KANG S Y, et al. Iridoids from the roots of *Patrinia scabra* and their inhibitory potential on LPS-induced nitric oxide production[J]. J Nat Prod, 2018, 81(6): 1468-1473.

[14] LEE D H, SHIN J S, LEE J S, et al. Non-glycosidic iridoids from the roots of *Patrinia scabra* and their nitric oxide production inhibitory effects[J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(9): 766-772.

[15] MA Q H, SHI X F, FAN B, et al. Study on the chemical constituents from *Patrinia scabra*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2012, 35(8): 1257-1259.

[16] MA Q H, SHI X F, FAN B, et al. Chemical constituents of n-butanol fraction from *Patrinia scabra*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(11): 1593-1596.

[17] YAO Z Y, SHI X F, LIU D Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of isovillosol in *Patrinia scabra*[J]. China Pharm(中国药房), 2012, 23(7): 644-646.

[18] ZHANG Y, YANG J, QIN Z X, et al. Optimization of separation and enrichment process of iridoid glycosides from Lonicerae Japonicae Flos by macroporous resin[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(24): 18-21.

[19] LI M X, JIA Z P, HU Z D, et al. Research on isolation and purification of total iridoid glycosides from herbal *Lamiophlomis rotata*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(17): 1743-1747.

[20] 马趣环, 石晓峰, 沈薇, 等. 糙叶败酱中总环烯醚萜苷的含量测定与超声提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1853-1856.

[21] ZHOU W W, YE Y P. Separation and purification processes of total alkaloids from *Corydalis yanhusuo* with macroporous adsorption resins[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(3): 268-271.

[22] SHU Z M, JIANG J P, WANG J P, et al. Purification of total flavonoids from peels of Citrus Changshan-Huyou Y.B.Chang by macroporous resin[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 649-653.

[23] HOU M Y, HU W Z, XIU Z L, et al. Enrichment and purification of total flavonoids in *Citrus aurantium* flowers by macroporous adsorption resin[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2021, 43(1): 16-21.

[24] LUO S S, HAO T, ZHAO G Q. Optimization of enrichment and purification technology for total iridoid glycosides from *Jasminum officinale* by macroporous resin[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(15): 13-16.

[25] SHI X F, SHEN W, NING H X, et al. Purification and antioxidant activity of polyphenol from pine needles of *Cedrus deodara*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28(8): 1325-1331.

[26] XIE L, ZHONG X H, CHANG S H, et al. Purification of flavonoids extracts from persimmon by aqueous two-phase

system and study on its hemostatic, coagulant and anti-inflammatory effects[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1052-1058.

[27] JIANG Y C, HUANG A W, PENG Y L, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of ketoprofen esters of paeonol and its analogues[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 370-374.

[28] LIU D Y, ZHANG L X, DU R Q, et al. Simultaneous purification of shikimic acid and total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* by macroporous adsorption resin[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(24): 5136-5142.

[29] SHIN J S, KANG S Y, LEE H H, et al. Patriscabrin F from the roots of *Patrinia scabra* attenuates LPS-induced inflammation by downregulating NF-κB, AP-1, IRF3, and STAT1/3 activation in RAW 264.7 macrophages[J]. Phytomedicine, 2020(68): 153167.

[30] 陈奇. 中药药理研究方法学(第 2 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 346-368.

[31] SOKENG S D, TALLA E, SAKAVA P, et al. Anti-inflammatory and analgesic effect of arachic acid ethyl ester isolated from *Propolis*[J]. Biomed Res Int, 2020(2020): 1-8.

[32] SAJID M, KHAN M R, SHAH S A, et al. Investigations on anti-inflammatory and analgesic activities of *Alnus nitida* Spach (Endl). stem bark in Sprague Dawley rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017(198): 407-416.

[33] ZHAO G Z, PU J B, ZHOU J, et al. Study on anti-inflammatory and analgesic effect of ethanol extract of *Atractylodes Macrocephala* Koidz.[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1507-1512.

[34] LIU Q, ZHANG W W, YAO Y X, et al. Re-evaluation of Shuanghuanglian series preparations based on pharmacodynamics action value[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(4): 903-909.

[35] LIU X Q. Effect of cooling blood and dispersing blood stasis method on related inflammatory factors in atherosclerosis rabbits[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019.

[36] XU C G. Study on the effect of aspirin on biofilm formation of staphylococcus xylosus by iTRAQ[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018.

收稿日期：2021-03-23
(本文责编：陈怡心)

http://www.chinjmap.com