

猴耳环多酚改良型双水相萃取体系的建立[△]

古丽霞^{1*},傅咏梅²,张蜀^{1,3},林居逸¹,邓红^{1,3#},卢永美¹(1.广东药科大学广东省药物新剂型重点实验室,广州 510006;2.国药集团广东环球制药有限公司,广东佛山 528000;3.广东药科大学广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心,广州 510006)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)18-2236-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.18.10



摘要 目的:建立猴耳环多酚的改良型双水相萃取体系。方法:以猴耳环多酚含量、提取效率和分配系数为指标,采用单因素实验筛选双水相萃取体系的料液比、乙醇质量分数和超声时间。制备猴耳环不同极性部位的双水相萃取液,以多酚含量和抗氧化活性[1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)的半数抑制浓度(IC₅₀)]为指标,结合多酚类成分与抗氧化活性的灰色关联度分析,筛选改良剂。考察含不同质量分数(0~90%)改良剂的改良型双水相萃取体系对猴耳环多酚提取的影响,并与传统提取工艺(超声提取和加热回流提取)进行比较。结果:最优双水相萃取体系为料液比1:45,乙醇质量分数40%,硫酸铵质量分数11%,室温下超声提取20 min。3次验证实验中,猴耳环多酚含量、提取效率和分配系数分别为(28.35±1.01)% (RSD=3.56%, n=3)、(98.87±0.19)% (RSD=0.19%, n=3)和13.25±0.71 (RSD=5.39%, n=3)。改良剂为乙酸乙酯。当乙酸乙酯-乙醇混合溶液中乙酸乙酯的质量分数为70%时,改良型双水相萃取体系提取所得萃取物中多酚含量和抗氧化活性与超声提取、加热回流提取比较差异均无统计学意义(P>0.05),但得率和转移率均显著高于超声提取、加热回流提取(P<0.05)。结论:成功建立提取得率和转移率优于传统提取方法的改良型双水相萃取体系,可一步提取猴耳环多酚。

关键词 猴耳环;多酚;改良型双水相萃取;抗氧化活性

Establishment of Modified Aqueous Two-phase Extraction System of Polyphenols from *Archidendron clypearia*

GU Lixia¹, FU Yongmei², ZHANG Shu^{1,3}, LIN Juyi¹, DENG Hong^{1,3}, LU Yongmei¹(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery Systems, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Sinopharm Group Guangdong Medi-World Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Foshan 528000, China; 3. Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery Systems, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish modified aqueous two-phase extraction (ATPE) system of polyphenols from *Archidendron clypearia*. METHODS: Taking the polyphenol content, extraction efficiency and partition coefficient of *A. clypearia* as indexes, the solid-liquid ratio, ethanol mass fraction and ultrasonic time of ATPE system were selected by single factor tests. The aqueous two-phase extracts from different polar parts of *A. clypearia* was prepared. The modifier was selected by taking polyphenol content and antioxidant activity [IC₅₀ of 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH), 2, 2'-hydrazine bis (3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)] as indicators, combined with the grey correlation analysis between polyphenols and antioxidant activity. The effects of modified ATPE system with different mass fraction (0-90%) of modifier on the extraction of polyphenols from *A. clypearia* were investigated and compared with traditional extraction technology (ultrasonic extraction and heating reflux extraction). RESULTS: The optimal ATPE system included solid-liquid ratio of 1:45, ethanol mass fraction of 40%, (NH₄)₂SO₄ mass fraction of 11%, ultrasonic extraction time of 20 min, at room temperature. In 3 validation tests, polyphenol content, extraction efficiency and partition coefficient were (28.35±1.01)% (RSD=3.56%, n=3), (98.87±0.19)% (RSD=0.19%, n=3) and 13.25±0.71 (RSD=5.39%, n=3), respectively. The modifier was ethyl acetate. When the mass fraction of ethyl acetate in the ethyl acetate-ethanol mixed solvent was 70%, there was no significant difference in the content and anti-oxidant activity of polyphenols from *A. clypearia* of modified ATPE (P>0.05). The yield and transfer rate of it were significantly higher than those of ultrasonic extraction and heating reflux extraction (P<0.05). CONCLUSIONS: The modified ATPE system with better extraction yield and transfer rate than the traditional extraction technology is successfully established, which can extract polyphenols from *A. clypearia* in one step.

[△] 基金项目:广东省普通高校科研项目重点领域专项(乡村振兴)(No.2020ZDZX1030)

* 硕士研究生。研究方向:药品检验与分析。E-mail: 1048214903@qq.com

通信作者:高级工程师。研究方向:新药研发与质量标准。E-mail: dengh361@sohu.com

the modified ATPE system with better extraction yield and transfer rate than the traditional extraction technology is successfully established, which can extract polyphenols from *A. clypearia* in one step.

KEYWORDS *Archidendron clypearia*; Polyphenols; Modified aqueous two-phase extraction; Antioxidant activity

猴耳环 *Archidendron clypearia* (Jack) Benth 为含羞草科猴耳环属植物, 主要分布在广东、海南、广西、湖南等地, 是我国南方的特色中药材, 具有清热解毒、凉血消肿、止泻、去湿敛疮的功效^[1]。猴耳环的主要活性成分有黄酮类、黄烷类和有机酚酸类等多酚物质, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、降血糖等作用^[2-6]。

多酚提取方法包括溶剂回流/超声提取法、酶提取法、超临界流体萃取法等^[7-9], 这些方法存在提取率低、设备昂贵等缺点^[7-9]。双水相萃取是利用物质在两相中分配系数的差异进行分离提取的方法, 其中醇-盐双水相体系(如乙醇-硫酸铵)因其成本低、生物相容性好、条件温和、配制简单等优点, 在生物提取、天然产物分离等方面的应用日益广泛^[10-11]。乙醇-硫酸铵双水相萃取是利用乙醇和硫酸铵共同竞争水, 从而使乙醇在水中的溶解度降低而导致分层, 其中上相是含硫酸铵的乙醇溶液, 下相是含乙醇的硫酸铵溶液。上相富含乙醇, 有利于有效成分从药材中溶出释放, 而大极性杂质则转移至下相(水相)。但这一提取方法会在分离提取的同时引入硫酸铵, 因此有必要对双水相萃取体系进行改良^[12-14]。

目前, 猴耳环常用水、乙醇、甲醇为溶剂进行提取, 提取后还需要进一步纯化或者萃取才能得到有效部位^[15-17]。本课题从有效部位研究的角度出发, 以多酚含量、提取效率和分配系数为指标, 优化双水相萃取工艺参数, 并在此基础上, 加入改良剂(如乙酸乙酯、正丁醇等)建立改良型双水相萃取体系, 以期达到一步分离提取猴耳环多酚的目的, 为植物多酚的提取和双水相萃取的应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 ACQUITY 型超高效液相色谱(UPLC)仪及配备的光电二极管阵列(PDA)检测器(美国 Waters 公司)、UV1800 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司)、RV8 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司)、BSA224S-CW 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)、SK7200LHC 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

猴耳环药材[批号 DLS-20200422, 经课题组检测其多酚含量为 25.82% (g/g)]由广东态合堂实业有限公司提供, 经广东药科大学何伟教授鉴定为真品; 没食子酸对照品(批号 110831-201605, 纯度 90.8%)购自中国食品药品检定研究院; 乙醇、石油醚(60~90 °C)、乙酸乙酯、正丁醇、硫酸铵、磷酸、碳酸钠均购自天津市致远化学试剂有限公司; 福林酚、1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2, 2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)均购自上海麦克林生化科技有限公司; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯或实验室常用规格, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 双水相相图的绘制

根据浊点滴定法绘制双水相相图^[18]。取一定量的硫酸铵, 加水超声(功率 350 W, 频率 53 kHz, 下同)使溶解, 冷却至室温后加入适量乙醇, 溶液由澄清变为浑浊(静置, 振摇再静置, 均为浑浊), 此时为相变点, 记录体系总质量及乙醇质量; 加水约 2 mL, 体系由浑浊变为澄清(静置, 振摇再静置, 均为澄清), 即可进行下一个相变点的测定。重复上述操作, 采用 Origin 2019b 软件, 以硫酸铵质量分数(x)为横坐标、乙醇质量分数(y)为纵坐标绘制双水相相图, 结果见图 1。

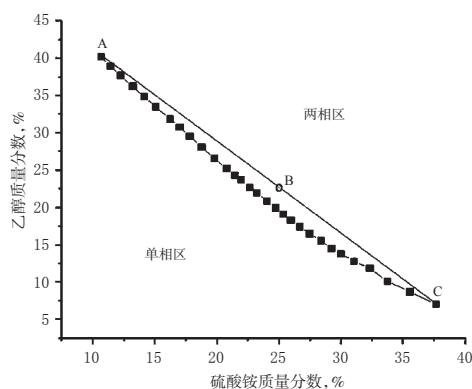


图 1 乙醇-硫酸铵双水相相图

Fig 1 Phase diagram of ethanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two-phase system

由图 1 可见, AC 为双节曲线, 其下方为单相区, 上方为两相区, 曲线上的点为成相临界点; ABC 为系线^[19-20]。采用 Excel 2016 软件计算, 得系线方程如下: $y = -1.2295x + 53.317$ 。

2.2 猴耳环多酚的双水相萃取

按图 1 中双相区内乙醇-硫酸铵的比例取硫酸铵适量, 加水超声使溶解, 冷却至室温后加入相应量的乙醇, 分相后即成双水相萃取体系。向该体系中加入猴耳环药材粉末 1 g, 超声提取 20 min, 滤去药渣, 分别取上相和下相溶液用于后续测定。

2.3 多酚含量、提取效率、分配系数的测定

采用福林酚比色法测定多酚含量^[21]。以没食子酸为对照品, 以紫外-可见分光光度计在 753 nm 波长处测定吸光度, 以待测物质量浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y = 0.0138x + 0.0213$ ($R^2 = 0.9998$), 并按此回归方程计算上、下相溶液中多酚的浓度(以没食子酸计)。该方法的方法学考察见文献^[21]。按如下公式计算多酚含量(Y)、提取效率(R)和分配系数(K): $Y = c_1V_1/M$, $R = c_1V_1/(c_1V_1 + c_2V_2) \times 100\%$, $K = c_1/c_2$ 。式中, c_1 为上相多酚浓度, V_1 为上相体积, M 为药材取样量, c_2 为下相多酚浓度, V_2 为下相体积。其中, 提取效率是指上相中的物质含量占双水相萃取出的总物质含量的比例, 分配系数是指物质在两相中

的分配情况,即上下相质量浓度之比^[22]。

2.4 双水相萃取体系优化

采用单因素实验优化猴耳环多酚的双水相萃取体系。以多酚含量、提取效率和分配系数为指标,考察料液比(g/mL,下同)、乙醇质量分数和超声时间对猴耳环多酚提取的影响。

2.4.1 料液比 固定乙醇质量分数为25%、超声时间为20 min,考察不同料液比(1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:60)对猴耳环多酚提取的影响。结果显示,多酚含量随着料液比的变化(1:25→1:60)呈先升高后降低的趋势,且在料液比1:45时达到峰值;提取效率随着料液比的变化(1:25→1:60)呈先升高后降低再升高的趋势,且在料液比1:40时达到峰值;当料液比在1:30~1:45范围内,分配系数较高且趋于平稳,详见图2A。综合考虑,选择料液比为1:45。

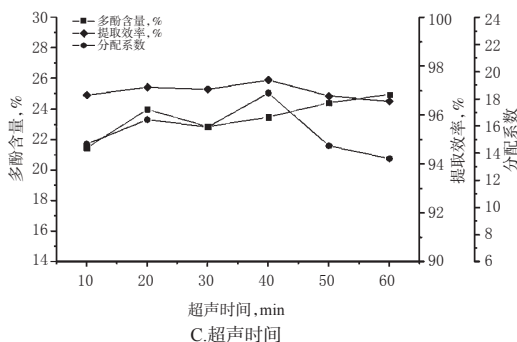
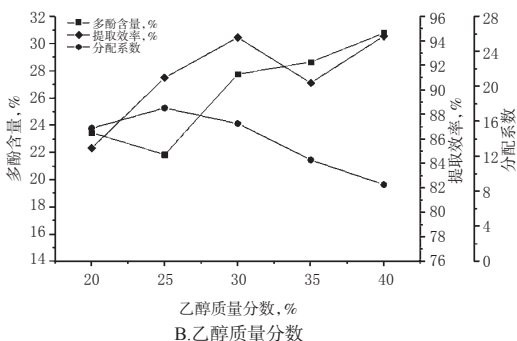
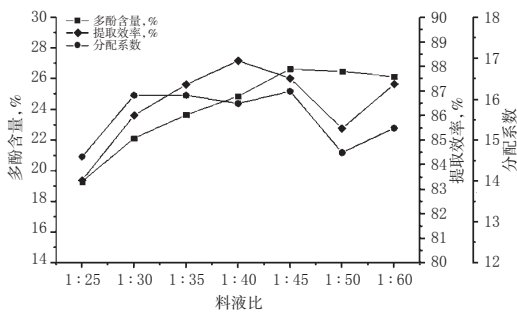


图2 双水相萃取体系中不同参数对猴耳环多酚提取的影响

Fig 2 Effects of different parameters on the extraction of polyphenols from *A. clypearia* in aqueous two-phase system

2.4.2 乙醇质量分数 固定料液比为1:45、超声时间为20 min,考察不同乙醇质量分数(20%、25%、30%、35%、40%)对猴耳环多酚提取的影响。结果显示,乙醇质量分数影响分水能力,当乙醇质量分数为20%~30%时,分配系数较高;当乙醇质量分数>30%时,多酚含量随乙醇质量分数的增加呈缓慢升高的趋势,提取效率呈先降低后升高的趋势,分配系数明显下降,详见图2B。综合考虑,选择乙醇质量分数为40%。

2.4.3 超声时间 固定料液比为1:45、乙醇质量分数为25%,考察不同超声时间(10、20、30、40、50、60 min)对猴耳环多酚提取的影响。结果显示,当超声时间为20~40 min时,分配系数较高;超声时间的变化对多酚含量、提取效率的影响不大,超声20 min后多酚含量和提取效率不再明显增加,详见图2C。综合考虑,选择超声时间为20 min。

2.4.4 验证实验 在料液比1:45、乙醇质量分数40%、硫酸铵质量分数11%(根据系线方程计算)、室温超声提取20 min的条件下,重复提取3次,按“2.3”项下方法测定并计算多酚含量、提取效率、分配系数。结果显示,猴耳环多酚含量为(28.35±1.01)% (RSD=3.56%, n=3),提取效率为(98.87±0.19)% (RSD=0.19%, n=3),分配系数为13.25±0.71 (RSD=5.39%, n=3),表明该体系稳定、可行,可用于猴耳环中多酚的提取。

2.5 改良剂的筛选

本研究结合药效学实验考察不同极性萃取剂对多酚富集情况的影响,选出最佳改良剂,以扩大两相极性差异,去除双水相萃取体系引入的硫酸铵。

2.5.1 样品的制备 按“2.4”项所得最优双水相萃取体系提取猴耳环多酚。取上相依次加入等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇,浓缩后于60℃干燥,用甲醇复溶并稀释、定容至10 mL量瓶中;剩余少量水层经60℃烘干后用水复溶并稀释、定容至10 mL量瓶中,分别得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水等4个部位的样品溶液,质量浓度均为200 mg/mL(以生药量计)。取各部位样品溶液适量,用水稀释成质量浓度分别均为5.0、2.0、1.0、0.5、0.05 mg/mL(均以生药量计)的不同极性部位的系列样品溶液。

2.5.2 猴耳环不同极性部位多酚含量的测定 取“2.5.1”项下不同极性部位的样品溶液,按“2.3”项下方法测定多酚含量。每份样品平行操作3次。结果显示,石油醚部位中未见多酚,乙酸乙酯部位中多酚含量最高,正丁醇部分次之,详见表1。

2.5.3 猴耳环不同极性部位抗氧化活性的检测 (1) DPPH自由基清除实验:取“2.5.1”项下不同极性部位的系列样品溶液各2 mL,分别加入0.1 mmol/L DPPH乙醇溶液2 mL,混匀,暗处放置30 min后,在517 nm波长处测定吸光度,同法测定对照溶液(样品+无水乙醇)和空

表1 猴耳环不同极性部位各项指标的结果(n=3)

Tab 1 Results of various indexes of different polar parts in *A. clypearia* (n=3)

不同极性部位	多酚含量($\bar{x} \pm s$), %	DPPH的IC ₅₀ , mg/mL	ABTS的IC ₅₀ , mg/mL
石油醚		>100	>100
乙酸乙酯	43.77 ± 1.26	<0.05	0.073
正丁醇	11.31 ± 0.84	0.297	1.155
水	4.08 ± 0.59	1.228	>100

白溶液(水+DPPH乙醇溶液)的吸光度,计算样品对DPPH自由基的清除率^[23]。(2)ABTS自由基清除实验:取“2.5.1”项下不同极性部位的系列样品溶液各0.4 mL,分别加入ABTS工作液(7 mmol/L的ABTS溶液与5.16 mmol/L的过硫酸钾溶液等体积混合)4 mL,混匀,室温下避光反应6 min后,在734 nm波长处测定吸光度,同法测定对照溶液(样品+无水乙醇)和空白溶液(水+ABTS工作液)的吸光度,计算样品对ABTS自由基的清除率^[24]。(3)DPPH或ABTS清除率的计算:DPPH或ABTS清除率(%)=[1-(A_{样品}-A_{对照})/A_{空白}] \times 100%。采用SPSS 25.0软件建立Probit回归以计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果显示,对DPPH自由基的清除活性由强到弱依次为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水部位>石油醚部位,对ABTS自由基的清除活性由强到弱依次为乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水部位 \approx 石油醚部位,由此可见,乙酸乙酯部位对DPPH和ABTS自由基的清除作用最强,正丁醇部位次之,石油醚部位清除DPPH和ABTS自由基的IC₅₀较大,基本无抗氧化活性,详见表1。

2.5.4 猴耳环不同极性部位色谱峰与抗氧化活性的关联度分析 取“2.5.1”项下质量浓度为5.0 mg/mL的各极性部位样品溶液,按如下色谱条件进行UPLC-PDA分析:以ACQUITY UPLC T3 C₁₈(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)为色谱柱,以甲醇为流动相A、0.2%磷酸溶液为流动相B进行梯度洗脱(0~2.00 min, 6% A \rightarrow 17% A; 2.00~10.00 min, 17% A \rightarrow 23% A; 10.00~15.00 min, 23% A \rightarrow 26% A; 15.00~20.00 min, 26% A \rightarrow 30% A; 20.00~25.00 min, 30% A \rightarrow 32% A; 25.00~30.00 min, 32% A; 30.00~40.00 min, 32% A \rightarrow 38% A; 40.00~50.00 min, 38% A \rightarrow 48% A; 50.00~55.00 min, 48% A \rightarrow 6% A),流速为0.3 mL/min,检测波长为270 nm,柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为3 μ L^[21]。其色谱图见图3,峰面积见表2。以DPPH和ABTS的IC₅₀的倒数为参考数列、多酚含量为评价数列、色谱图中各色谱峰的峰面积为比较数列进行灰色关联度分析^[25-26],结果见表3、表4。

由表3、表4可知,猴耳环多酚各色谱峰峰面积与DPPH、ABTS的IC₅₀关联度(前10位)均大于0.5,表明猴耳环对DPPH和ABTS自由基的清除活性与其多酚含量具有一定的相关性。由图3、表2可知,抗氧化活性贡献较大的多酚类成分大部分富集在猴耳环的乙酸乙酯部位。综合考虑,选择乙酸乙酯作为改良剂。

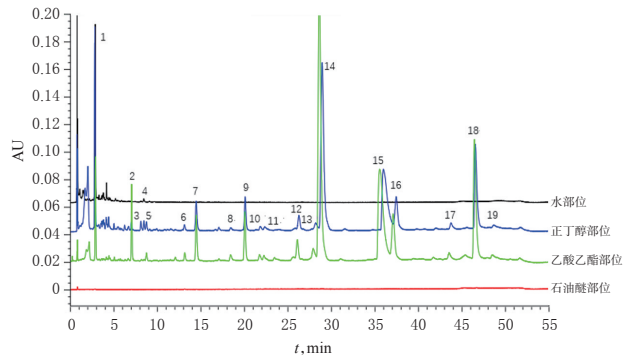


图3 猴耳环不同极性部位的超高效液相色谱图

Fig 3 UPLC chromatograms of different polar parts of *A. clypearia*

表2 猴耳环不同极性部位各色谱峰的峰面积

Tab 2 Peak areas of chromatographic peaks of different polar parts of *A. clypearia*

峰号	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水部位
1	1300	468 182	1 040 402	486 897
2	-	359 060	54 279	-
3	-	9 939	56 874	5 211
4	-	10 737	54 855	18 647
5	-	55 439	64 716	-
6	-	59 047	47 635	-
7	-	375 610	261 990	-
8	-	60 832	29 859	-
9	-	422 731	301 987	-
10	-	70 990	39 784	-
11	-	75 109	29 575	-
12	-	246 631	161 648	-
13	-	195 153	126 699	-
14	7 324	4 550 979	2 850 695	-
15	6 340	2 711 519	1 857 437	-
16	4 693	792 766	580 572	-
17	-	88 788	85 795	-
18	-	1 755 761	1 158 267	-
19	-	55 430	35 840	-

注:“-”表示未检出

Note:“-”means not detected

表3 猴耳环多酚各色谱峰峰面积与IC₅₀的关联度(DPPH,前10位)

Tab 3 Correlation of peak area of polyphenols from *A. clypearia* with IC₅₀(DPPH, top 10)

序号	峰号	关联度	序号	峰号	关联度
1	3	0.810 9	6	16	0.625 6
2	4	0.722 2	7	15	0.609 5
3	17	0.687 6	8	19	0.601 9
4	1	0.670 5	9	5	0.601 9
5	2	0.633 6	10	12	0.600 9

2.6 猴耳环多酚的改良型双水相萃取

按“2.4”项下方法超声,将其中冷却至室温后加入的乙醇替换为乙酸乙酯-乙醇混合溶液,分相后即为改良型双水相萃取体系。向改良型双水相萃取体系中加入猴耳环药材粉末1 g,超声提取20 min,滤去药渣,分别取上相和下相溶液用于后续测定。

表4 猴耳环多酚各色谱峰峰面积与IC₅₀的关联度 (ABTS, 前10位)

Tab 4 Correlation of peak area of polyphenols from *A. clypearia* with IC₅₀ (ABTS, top 10)

序号	峰号	关联度	序号	峰号	关联度
1	3	0.782 4	6	1	0.664 1
2	5	0.715 4	7	2	0.651 9
3	4	0.713 0	8	6	0.635 2
4	8	0.682 3	9	10	0.609 0
5	17	0.681 2	10	16	0.604 8

2.7 改良型双水相萃取体系中不同质量分数乙酸乙酯对猴耳环多酚提取的影响

按“2.6”项下方法配制改良型双水相萃取体系,考察乙酸乙酯-乙醇混合溶液中不同质量分数乙酸乙酯(0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)对猴耳环多酚提取的影响。结果显示,随着乙酸乙酯质量分数的增加,多酚含量呈先升高后降低的趋势,提取效率呈逐渐降低的趋势,且在乙酸乙酯质量分数为10%时,多酚含量最高,提取效率和分配系数均较高;此外,在乙酸乙酯质量分数为70%时有一突跃点,且此时分配系数达到最大,详见图4。这可能与上相极性改变而致部分大极性多酚转移至下相有关。

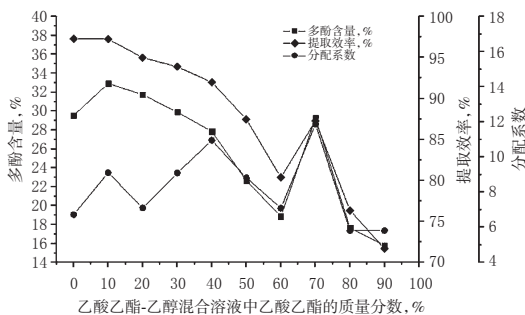


图4 改良型双水相萃取体系中不同比例乙酸乙酯对提取猴耳环多酚的影响

Fig 4 Effects of different proportions of ethyl acetate on the extraction of polyphenols from *A. clypearia* in modified aqueous two-phase system

2.8 改良型双水相萃取方法与传统提取方法的比较

2.8.1 样品溶液的制备 分别配制含10%、70%乙酸乙酯的乙酸乙酯-乙醇混合溶液的改良型双水相萃取体系,按“2.6”项下方法提取猴耳环多酚,取上相浓缩、冻干,制成A'样品和A样品。以70%乙醇为溶剂,液料比为1:45,室温超声提取20 min,取提取液浓缩后加入等体积乙酸乙酯萃取,取上层浓缩、冻干,制成B样品。以70%乙醇为溶剂,液料比为1:45,加热回流1 h,取提取液浓缩后加入等体积乙酸乙酯萃取,取上层浓缩、冻干,制成C样品。以水为溶剂,液料比为1:45,加热回流1 h,取提取液浓缩后加入等体积乙酸乙酯萃取,取上层浓缩、冻干,制成D样品。精密称取上述样品各20 mg,置

于20 mL量瓶中,加70%乙醇溶解、稀释并定容,制成质量浓度均为1 mg/mL的样品溶液。

2.8.2 萃取物提取指标和抗氧化活性的比较 取“2.8.1”项下样品溶液各适量,分别按照“2.3”项下方法测定其中的多酚含量,按如下公式计算得率和转移率:得率= $M_c/M \times 100\%$,转移率= $Y_c/Y_s \times 100\%$ ^[27-28]。式中, M_c 为萃取物质量, M 为药材投料量, Y_c 为萃取物中多酚含量, Y_s 为药材中多酚含量。按“2.5.3”项下方法检测“2.8.1”项下各样品溶液对DPPH和ABTS自由基的IC₅₀。采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,两两比较采用LSD法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。每样品平行3份操作,结果见表5。

表5 不同提取工艺对提取猴耳环多酚的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 5 Effects of different extraction technology on the extraction of polyphenols from *A. clypearia* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品	多酚含量,%	得率,%	转移率,%	DPPH的IC ₅₀ ,mg/mL	ABTS的IC ₅₀ ,mg/mL
A'	12.21±0.62	257.87±6.70			
A	65.29±1.04	34.56±0.59	87.42±2.89	0.004 6	0.024 4
B	66.40±1.10	18.54±0.53*	47.96±2.16*	0.004 5	0.019 2
C	66.06±1.65	18.04±0.68*	46.12±0.59*	0.004 7	0.019 9
D	69.32±0.90	14.14±0.71*	37.99±2.40*	0.004 5	0.021 7

注:与A样品比较,* $P<0.05$

Note: vs. sample A, * $P<0.05$

由表5可知,A'样品的得率超过100%,提示其中含有大量的硫酸铵,后续不再纳入分析。A、B、C、D样品中多酚含量和抗氧化活性组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),但A样品的得率和转移率均显著高于B、C、D样品($P<0.05$),说明加入适量的改良剂(乙酸乙酯)将有利于猴耳环多酚溶出和纯化。

2.8.3 萃取物的成分比较 取“2.8.1”项下A、B、C、D样品溶液各适量,按“2.5.4”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,上述4种样品的色谱图基本一致,详见图5。

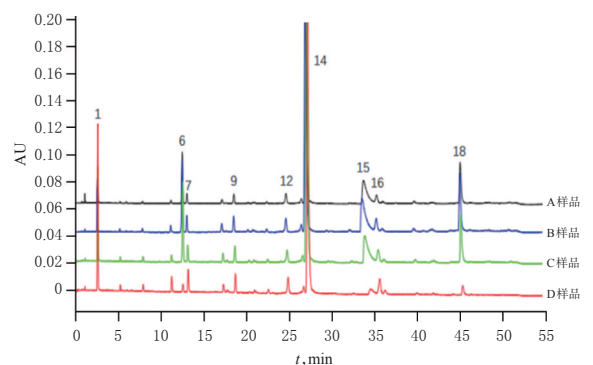


图5 不同提取工艺样品的超高效液相色谱图
Fig 5 UPLC chromatograms of samples with different extraction technologies

3 讨论

猴耳环加入至双水相萃取体系后,在超声的物理效应下,多酚从植物细胞中快速释放、扩散,并在上相富集,而杂质(如多糖类、蛋白类)由于极性较大易富集于下相,以此达到提取纯化的目的。本课题组前期曾对双水相萃取体系中的超声温度进行考察,发现随着温度的升高,双水相萃取体系的稳定性变差,在60℃时不分相。双水相萃取体系受分子间的作用力(范德华力、疏水作用、分子间的氢键、分子与分子之间电荷作用等)影响,在超声和高温条件下,体系黏度和密度均会发生改变,从而影响分子间的作用力^[29-30],故应严格控制在室温下提取。

灰色关联度分析对大、小样本量和有、无规律样本均同样适用,而且计算量小,十分方便,用于“成分-药效”分析的优势明显^[31-33]。本课题组前期研究发现,猴耳环不同极性部位色谱峰峰面积与DPPH、ABTS的IC₅₀呈负相关,因此本研究将DPPH、ABTS的IC₅₀进行倒数转换,再进行灰色关联度分析。结果显示,猴耳环多酚中各色谱峰与IC₅₀的倒数的关联度(前10位)均大于0.5,表明猴耳环的抗氧化活性与多酚类成分具有一定的关联性,抗氧化活性可能是各成分共同作用的结果。

本研究结果显示,乙酸乙酯可富集抗氧化活性贡献较大的多酚类成分,因此选择乙酸乙酯作为改良剂。以10%乙酸乙酯-乙醇混合溶剂配制的改良型双水相萃取体系提取猴耳环多酚的结果显示,萃取物中还含有较多的硫酸铵晶体;而以70%乙酸乙酯-乙醇混合溶剂配制的改良型双水相萃取体系提取猴耳环多酚的结果显示,上相中由于增加了有机溶剂的含量,扩大了两相的极性差异,使上相含水量降低,导致硫酸铵向下相转移,从而减少了硫酸铵的残留^[34]。因此,选择70%乙酸乙酯-乙醇混合溶液配制改良型双水相萃取体系。

回流/超声提取法是中药最常用的传统提取方法,与其比较,以70%乙酸乙酯-乙醇混合溶液的改良型双水相萃取体系提取的萃取物中猴耳环多酚含量、抗氧化活性均无明显差异,但得率和转移率显著升高。

综上所述,本研究成功建立了改良型双水相萃取体系,可一步提取猴耳环中的多酚类成分,为多酚的提取和双水相萃取的应用提供了参考。

参考文献

[1] 付元凤,刘芳,李思佳,等.猴耳环的研究进展[J].中草药,2018,49(5):1174-1183.

[2] YANG W S, LEE J, KIM T W, et al. SRC/NF- κ B-targeted inhibition of LPS-induced macrophage activation and dextran sodium sulphate-induced colitis by Archidendron clypearia methanol extract[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142(1):287-293.

[3] LI Y L, OOI L S, WANG H, et al. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland

China[J]. Phytother Res, 2004, 18(9):718-722.

[4] LEUNG K T, CHIU L C, LAM W S, et al. In vitro antiviral activities of chinese medicinal herbs against duck hepatitis B virus[J]. Phytother Res, 2006, 20(10):911-914.

[5] WANG Y X, DUAN Z K, CHANG Y, et al. Triterpenes from Archidendron clypearia (Jack) I.C.N. with anti- β -amyloid aggregation activity[J]. Nat Prod Res, 2021, 35(16):2789-2792.

[6] THAO N P, LUYEN B T T, VINH L B, et al. Rat intestinal sucrase inhibited by minor constituents from the leaves and twigs of Archidendron clypearia (Jack.) nielsen[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(17):4272-4276.

[7] CIRIC A, KRAJNC B, HEATH D, et al. Response surface methodology and artificial neural network approach for the optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from garlic[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 135:110976.

[8] SHAO Y, ZHANG Y H, ZHANG F, et al. Thermostable tannase from aspergillus niger and its application in the enzymatic extraction of green tea[J]. Molecules, 2020, 25(4):952.

[9] SRIDHAR A, PONNUCHAMY M, KUMAR P S, et al. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review[J]. Environ Chem Lett, 2021, 17:1-35.

[10] 巫永华,陆文静,刘梦虎,等.响应面优化超声波辅助双水相提取牛蒡多糖及抗氧化分析[J].食品与发酵工业,2020,46(5):215-223.

[11] NG H S, KEE P E, YIM H S, et al. Characterization of alcohol/salt aqueous two-phase system for optimal separation of gallic acids[J]. J Biosci Bioeng, 2021, 131(5):537-542.

[12] 刘小琴,张薇,范华均,等.双水相萃取分离苦参生物碱[J].过程工程学报,2012,12(4):641-647.

[13] 刘哲.微波辅助分离及纯化葛根异黄酮[D].武汉:武汉大学,2015.

[14] 孙伟鹏.沙棘果渣中主要有效成分的盐析萃取[D].石河子:石河子大学,2018.

[15] 李超.猴耳环提取方法和体外抑菌活性研究[J].四川畜牧兽医,2018,45(1):27-28.

[16] 付元凤.猴耳环的化学成分研究及对咪喹莫特诱导小鼠银屑病模型的干预作用[D].上海:上海中医药大学,2019.

[17] 王欢.猴耳环化学成分研究及其含量测定[D].广州:广州中医药大学,2014.

[18] ALBERTSSON P A. Partition of cell particles and macromolecules[M]. New York: Wiley, 1971:58-71.

[19] 邵圣娟,胡学豪,郭佳仪,等.超声辅助双水相提取山药皮总多酚工艺的优化[J].中成药,2020,42(3):740-744.

[20] 刘景煜,李晨,肖林刚,等.双水相萃取法分离纯化金针菇子实体多糖[J].食品与发酵工业,2017,43(5):255-260.

药物经济学评价中“免费仍不经济”类结果的原因分析

管欣^{1,2*}, 王璐颖^{1,2}, 李洪超^{1,2#} (1. 中国药科大学国际医药商学院, 南京 211198; 2. 中国药科大学药物经济学评价研究中心, 南京 211198)

中图分类号 R956 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)18-2242-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.18.11



摘要 目的:为今后开展相关药物经济学评价提供参考和借鉴。方法:通过4个药物经济学评价典型案例展示可能出现“免费仍不经济”的特殊情况,定义“净价值”的概念来协助进行理论分析,并归纳导致这种情况的可能原因。结果与结论:目标药物之外的背景治疗成本过高、患者存活期间生命质量过低、增量成本-效果比的意愿支付阈值过低、延长生存期间风险事件的成本过高或者健康损失过高以及对照方案价格过低等都有可能影响经济性评价的结果,甚至出现“免费仍不经济”的药物经济学评价困境。药物经济学评价讨论的是干预方案的经济性而非药物的经济性问题,对于存在多种原因所导致的不经济的结果,需要客观看待;从理论上来说,药物经济学评价中应当将所有“相关”和“不相关”的成本都纳入计算范畴;药物经济学主要解决的是若干治疗方案之间“性价比”问题,而医疗卫生领域常常还需要面对伦理和公平性等问题,故研究者可能需要跳出药物经济学分析的框架,从更高、更广的角度进行深入讨论。

关键词 药物经济学;免费仍不经济;背景治疗;成本;原因分析

Cause Analysis of “Not Cost-effective at a Zero Price” Results in Pharmacoeconomic Evaluation

GUAN Xin^{1,2}, WANG Luying^{1,2}, LI Hongchao^{1,2} (1. School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Pharmacoeconomic Evaluation Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the future pharmacoeconomic evaluation. METHODS: Four typical cases of pharmacoeconomic evaluation showed the special situation that “not cost-effective at a zero price”, defined the concept of “net value” to assist in theoretical analysis, and summarized the possible causes of this situation. RESULTS & CONCLUSIONS: The

- [21] 李志超,傅咏梅,张蜀,等.猴耳环多酚的大孔树脂纯化工艺及其组分分析[J].热带作物学报,2021,42(4):1127-1135.
- [22] 高晓燕.几种天然产物的双水相体系萃取研究[D].徐州:中国矿业大学,2019.
- [23] 阮沛桦,邓红,傅咏梅,等.基于灰色关联度的叠鞘石斛叶抗氧化部位的筛选[J].热带作物学报,2020,41(8):1700-1707.
- [24] 黎恩立.金钗石斛抗抑郁活性及超微粉碎对其理化性质影响的初步研究[D].广州:广东药科大学,2018.
- [25] 王艳平,崔永蕾,黄丽,等.基于灰色关联度法的枸杞子质量评价[J].中国现代中药,2020,22(11):1851-1856,1862.
- [26] 汪洋,彭潇,何燕玲,等.基于灰色关联分析探索艾纳香非挥发性部位的抗炎活性谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):180-186.
- [27] 方旖旎,王雅丽,陈惠琴,等.不同产地姜黄甲醇和石油醚部位化学成分的比较分析[J].中国药房,2020,31(16):1989-1995.
- [28] 朱红梅,刘涛,李鹏程,等.双黄连系列制剂制备工艺再评价[J].中成药,2017,39(5):1087-1090.
- [29] 吴琪,肖发新,杨玉茹,等.废催化剂回收钨工艺概况[J].贵金属,2018,39(3):79-86.
- [30] IQBAL M, TAO Y F, XIE S Y, et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications[J]. Biol Proced Online, 2016, 18: 18.
- [31] 卫强,刘克敏.中药谱效关系的研究进展[J].中药新药与临床药理,2019,30(5):634-638.
- [32] 谭静.血栓心脉宁片活血化瘀的化学物质基础研究[D].长春:吉林大学,2020.
- [33] 余悦.白附子及其炮制品的质效评价研究[D].广州:广东药学院,2015.
- [34] 易小琦.双水相提取丹皮中的丹皮酚及三液相提取丹参中成分的初步探究[D].重庆:重庆大学,2019.

* 博士。研究方向:药物经济学、卫生经济与政策。E-mail: GG_CPU@163.com;

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:药物经济学、卫生经济与政策。E-mail: lihongchao@cpu.edu.cn

(收稿日期:2021-05-12 修回日期:2021-08-24)

(编辑:邹丽娟)