

· 中药工业 ·

延龄草总皂苷提取纯化工艺及其抗炎活性研究[△]符德静^{1,2}, 易红², 郭凤倩², 高慧敏², 李春², 闫利华², 王萍², 斯琴², 刘晓谦^{2*}, 王智民^{2*}

1. 广东药科大学, 广东 广州 510006;

2. 中国中医科学院 中药研究所/中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 优选延龄草总皂苷提取纯化工艺, 并对其纯化前后的抗炎活性进行对比。方法: 以延龄草总皂苷提取率为考察指标, 采用正交试验优化提取工艺; 应用大孔吸附树脂技术, 通过静、动态吸附和解吸附实验, 确定最佳纯化工艺; 为了证实工艺的合理性, 对纯化后的总皂苷抗炎活性进行验证。结果: 最佳提取工艺为乙醇体积分数 75%, 料液比 1:10, 加热回流提取 2 次, 每次 1.5 h。纯化工艺为 HPD400 大孔树脂, 以质量浓度为 0.1 g·mL⁻¹ 的药液上样, 上样量为折合生药 (g): 树脂 (mL) = 1:2, 以 1 BV·h⁻¹ 流速上样, 然后依次以水 2 BV、20% 乙醇水 3 BV 洗脱除杂, 收集 70% 乙醇水洗脱液 (5 BV), 经浓缩、干燥即得延龄草总皂苷收率为 7.42%, 总皂苷质量分数为 34.29%。该总皂苷在质量浓度为 5.00、1.00 μg·mL⁻¹ 时对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞释放一氧化氮有明显的抑制作用, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 3.79 μg·mL⁻¹, 而其醇提物的 IC₅₀ 值为 20.68 μg·mL⁻¹, 说明精制过程实现了药效成分的富集。结论: 该提取纯化工艺稳定、可行, 所得到的延龄草总皂苷与其醇提物相比具有更好的抗炎活性。

[关键词] 延龄草; 甾体皂苷; 大孔树脂; 抗炎活性; RAW264.7 细胞

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)10-1975-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220311001

Extraction and Purification of Total Saponins from *Trillium tschonoskii* and Its Anti-Inflammatory ActivityFU De-jing^{1,2}, YI Hong², GUO Feng-qian², GAO Hui-min², LI Chun², YAN Li-hua², WANG Ping², SI Qin²,
LIU Xiao-qian^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica/National Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Chinese
Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction and purification of total saponin from *Trillium tschonoskii* Maxim. and compare its anti-inflammatory activities before and after purification. **Methods:** The extraction rate of total saponin was used as the index to optimize the extraction process by the orthogonal test. The optimized purification process was determined by static and dynamic adsorption and desorption tests by macroporous adsorption resin technology. The anti-inflammatory activity of purified total saponin was tested to verify the rationality of the purification process. **Results:** The optimal extraction conditions were obtained as follows: ethanol volume fraction of 70%, the solid-to-liquid ratio of 1:10, and extraction twice by heating reflux, 1.5 h for each time. The optimized purification process was obtained. To be specific, 0.1 g·mL⁻¹ sample solution was loaded on the HPD400 macroporous adsorption resin with the loading volume of the crude drug (g):resin (mL) of 1:2 at the flow rate of 1 BV·h⁻¹, followed by elution and purification with 2 BV of water and 3 BV of 20% ethanol in sequence. The 70% ethanol eluate (5 BV) was collected, concentrated, and dried to obtain the total saponin of *T. tschonoskii* at a yield of 7.42%. The mass fraction of total saponin was 34.29%. The total saponin showed a significant inhibitory effect on LPS-induced nitric oxide (NO) release from RAW264.7 cells at mass concentrations of 5.00 and 1.00 μg·mL⁻¹, with an IC₅₀ value of 3.79 μg·mL⁻¹. The IC₅₀ value of its ethanol extract was 20.68 μg·mL⁻¹, indicating that the purification process achieved the enrichment of medicinal components. **Conclusion:** The extraction and purification process was stable and

[△] [基金项目] 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701900)

* [通信作者] 王智民, 首席研究员, 研究方向: 中药化学与质量标准评价; Tel: 010-84014128, E-mail: zhmw123@263.net
刘晓谦, 研究员, 研究方向: 中药制剂及质量评价; Tel: 010-64087242, E-mail: lanyun1127@126.com

feasible, and the obtained total saponin of *T. tschonokii* possessed superior anti-inflammatory activity to the ethanol extract.

[Keywords] *Trillium tschonokii* Maxim.; steroid saponin; macroporous resin; anti-inflammatory; RAW264. 7 cells

延龄草 *Trillium tschonokii* Maxim. 又名头顶一颗珠、芋儿七、狮儿七等,为百合科延龄草属植物,是著名的恩施土家族四大神药之一^[1],也是陕西“太白七药”之一^[2]。延龄草以干燥根及根茎入药,其味甘,性平,有小毒,具有镇静安神、活血止血、消炎镇痛、解毒等功效,主治头晕目眩、跌打损伤、神经衰弱、高血压和脑震荡后遗症等^[3-6]。延龄草中含有多种有效成分,如甾体皂苷、倍半萜苷、黄酮、多糖等^[7-8]。近年来关注最多是其甾体皂苷类成分,包括偏诺皂苷、薯蓣皂苷及延龄草烯苷等^[9-11],其中重楼皂苷Ⅶ、偏诺皂苷元-3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 4)-[*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(PRRG)和重楼皂苷Ⅵ均属于偏诺皂苷,且是其中含量较高的成分。现代药理学研究表明,偏诺皂苷具有止血^[12]、镇痛抗炎^[13]、抗菌^[14]、抗肿瘤^[15]等作用,具有明确的药用价值。因此,本研究旨在从延龄草中富集3个主要偏诺皂苷获得总皂苷,为延龄草总皂苷有效部位深入的药效评价服务。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000型高效液相色谱仪、Multiskan Go型酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; N-1100型EYELA旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); HEP-100 \times 60型颚式破碎机(鹤壁市银河分析仪器化工有限公司); DET-50型高速万能粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司); BT125D型十万分之一电子天平、BSA224S-CW型万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 98-1-B型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)、JULABO SW22型恒温水浴振荡器(优莱博技术有限公司); HWSY21-KP6型电热恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司); DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱(杭州艾普仪器设备有限公司); L530型医用离心机(湘仪离心机仪器有限公司); LDZX-50L-I型立式高压蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂); 3111型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司); CKX41型光学倒置显微镜(Olympus公司); MB100-2A型微孔板恒温振荡器(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品重楼皂苷Ⅶ(P1,批号:DSTDC003001,纯度 \geq 98%)、PRRG(P2,批号:DSTD005701,纯度 \geq 98%)、重楼皂苷Ⅵ(P3,批号:DSTDC002901,纯度 \geq 98%)均购自四川成都德思特生物科技有限公司;色谱甲醇、乙腈(美国Fisher公司);95%乙醇(国药集团化学试剂有限公司);HPD300、HPD400、HPD600型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩吸附材料有限公司);SP825I、SP700、SP70大孔吸附树脂(日本三菱化学公司);水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯;一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清(批号:2168090RP)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号:02221008)、DMEM高糖培养基(批号:8121475)、0.25%胰蛋白酶(批号:2276965)均购自美国Gibco公司;脂多糖(LPS,批号:L2880,美国Sigma公司);噻唑蓝(MTT,北京京汇科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,上海麦克林生化科技有限公司);HyClone SV30010青链霉素(双抗)混合液(美国Cytiva公司)。

延龄草药材购自湖北巴东一零八药材种植专业合作社,经中国科学院昆明植物所李恒研究员鉴定为百合科延龄草属植物延龄草 *Trillium tschonokii* Maxim. 的干燥根及根茎。

1.3 细胞

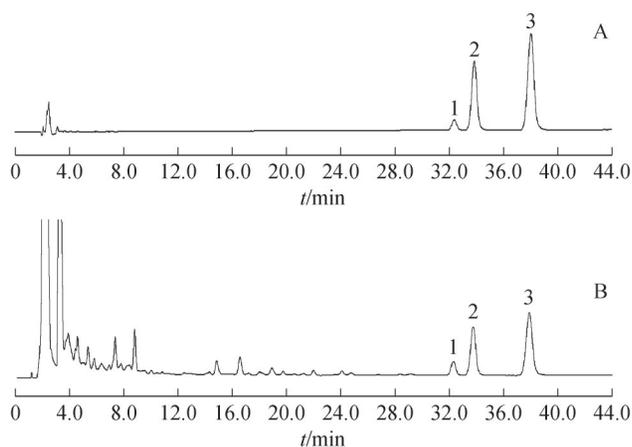
小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院上海细胞库。

2 方法与结果

2.1 延龄草总皂苷的含量测定方法建立

2.1.1 色谱条件 参考文献[16]方法对其色谱条件适当微调,调整后的方法:Kromasil C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~26 min, 30%~40%A; 26~45 min, 40%~41%A);检测波长:203 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL \cdot min⁻¹。高效液相色谱法(HPLC)图谱见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取重楼皂苷Ⅶ、PRRG、重楼皂苷Ⅵ对照品适量^[17],精密称定,加



注: A. 混合对照品; B. 延龄草; 1. 重楼皂苷VII; 2. PRRG; 3. 重楼皂苷VI。

图1 重楼皂苷VII、PRRG、重楼皂苷VI混合对照品和延龄草样品的HPLC图

甲醇配置成质量浓度分别为0.098 4、0.587 0、0.829 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 药材含量测定用样品: 称取延龄草根茎粉末(过50目筛)0.5 g, 精密称定, 置50 mL锥形瓶中, 加入乙醇25 mL, 称定质量, 加热回流30 min, 放冷, 再称定质量, 补足缺失的质量, 摇匀, 过0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。经测定所收集的延龄草药材的总皂苷的质量分数以3个皂苷质量分数之和计为4.97%。总皂苷提取物样品: 称取延龄草总皂苷提取物粉末(过80目筛)15 mg, 精密称定, 甲醇定容至10 mL即得延龄草总皂苷提取物供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 取2.1.2项下混合对照品溶液, 用甲醇分别稀释1、2、10、12.5、20、25倍, 配制成系列质量浓度的混合对照品进样, 以对照品质量浓度为横坐标(X)与峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。得到重楼皂苷VII、PRRG、重楼皂苷VI的线性回归方程: $Y_{p1}=45.358 0X+0.010 4$ ($r=0.999 9$)、 $Y_{p2}=55.466 0X+0.018 4$ ($r=1.000 0$)、 $Y_{p3}=65.624 0X+0.004 1$ ($r=1.000 0$), 重楼皂苷VII、PRRG、重楼皂苷VI分别在0.004 0~0.098 4、0.023 0~0.587 0、0.033 0~0.829 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2 数据处理

利用SPSS 26.0和GraphPad Prism 7软件对数据进行统计分析, 实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析和双侧 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.3 提取工艺

2.3.1 提取溶剂的单因素考察 对提取溶剂进行单因素考察, 选取50%、75%、95%乙醇为提取溶剂, 料液比1:10, 提取1 h。提取溶剂为50%乙醇、75%乙醇、95%乙醇的提取率分别为(80.81 \pm 0.88)%、(88.25 \pm 1.47)%、(85.31 \pm 0.44)%, 结果表明75%乙醇提取效果最佳。

2.3.2 正交试验设计 根据文献[18]及单因素考察结果, 确定提取溶剂为75%乙醇, 选取液料比(A)、提取时间(B)、提取次数(C)作为提取工艺的考察因素, 以延龄草总皂苷提取率为考察指标。称取延龄草药材(过50目筛)9份, 每份20 g。因素水平及结果见表1~3。由结果可知, 对延龄草总皂苷提取率影响顺序为 $C>A>B$ 。因素A和因素B为不显著因素, 因素C各水平对延龄草总皂苷的提取率影响差异有统计学意义($P<0.05$)。综合以上结果, 正交试验所得的最优工艺为 $A_3B_2C_3$, 即75%乙醇, 液料比为12:1, 提取3次, 每次90 min。考虑液料比对提取率影响不大, 从节约溶剂的角度, 调整液料比为10:1; 随着提取次数的增加, 提取率逐渐增大, 但提取2次和提取3次时延龄草总皂苷提取率增加不明显, 且提取次数的增加会导致能耗增加, 故将提取次数调整为2次, 即最优工艺为以75%乙醇为提取溶剂, 按液料比10:1加入提取溶剂, 加热回流提取2次, 每次1.5 h。

表1 延龄草总皂苷提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B/min	C/次
1	8:1	60	1
2	10:1	90	2
3	12:1	120	3

2.3.3 验证实验 按优选的最佳提取工艺进3批验证实验, 延龄草总皂苷提取率分别为88.57%、87.72%、89.44%, 均值为88.58%, 3批结果较为一致, 表明此工艺条件稳定可行。

2.4 大孔树脂纯化富集工艺

2.4.1 提取液的制备 取延龄草根茎粉末100 g, 按最佳工艺进行提取, 合并滤液, 减压浓缩至无醇味, 生药质量浓度为0.1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即为延龄草提取液。

2.4.2 大孔树脂型号筛选 称取经预处理后各型号(HPD300、HPD400、HPD600、SP70、SP700、SP8251)大孔吸附树脂各2 g, 置100 mL具塞锥形瓶

表2 延龄草总皂苷提取工艺正交试验设计结果

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	74.79
2	1	2	2	2	83.84
3	1	3	3	3	82.44
4	2	1	2	3	84.39
5	2	2	3	1	89.19
6	2	3	1	2	74.51
7	3	1	3	2	88.91
8	3	2	1	3	82.53
9	3	3	2	1	89.37
K ₁	80.36	82.70	77.28	84.45	
K ₂	82.70	85.19	85.87	82.42	
K ₃	86.94	82.11	86.85	83.12	
R	6.58	3.08	9.57	2.03	

表3 延龄草总皂苷提取工艺正交试验方差分析结果

因素	Ⅲ类平方和	均方	F值	P值
A	66.750	33.375	10.463	
B	16.035	8.017	2.513	
C	166.333	83.167	26.072	<0.05
D(误差)	6.380	3.190		

注: 自由度均为2; $F_{0.05}(1,2) = 19$ 。

中, 分别加入延龄草提取液 50 mL (挥至无醇味后, 加水定容至药液质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 于恒温水浴振荡器 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 中持续振荡 24 h 使其达到吸附平衡, 滤过, 取滤液定容至 100 mL, 得吸附后的溶液, 测定溶液中 3 个主要皂苷的含量, 计算得到各型号树脂的静态吸附量和吸附率。将达到饱和和吸附的各型号树脂滤出后分别另置 100 mL 锥形瓶中, 各加入 95% 乙醇 50 mL, 在相同条件下恒温振荡 24 h, 进行解吸附, 滤过, 滤液定容至 100 mL, 得解吸附后的溶液, 测定延龄草总皂苷含量, 计算各型号树脂的解吸率和转移率, 结果见表 4。综合各型号树脂的静态吸附数据, 以转移率[按公式(1)计算]为综合评分指标, SP700 和 HPD400 型树脂转移率均较高, 鉴于树脂价格考量, 选择 HPD400 型树脂进行纯化。

$$\text{转移率} = \text{吸附率} \times \text{解吸率} / 100\% \quad (1)$$

2.4.3 上样量和上样流速的考察 量取 5 份经预处理的 HPD400 型大孔树脂 30 mL, 分别装于 5 根色谱柱 (内径 1.5 cm, 高 35 cm, 树脂径高比约 1:10) 中, 分别以 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速进行上样, 分段收集流出液, 每个柱体积为 1 个流分, 共收集 10 BV, 测定各上样流出液中延龄草总皂苷的含

表4 各型号树脂延龄草皂苷的静态吸附率、解吸率及转移率结果

树脂型号	吸附率	解吸率	转移率
HPD300	79.53	94.30	75.00
HPD400	86.30	88.85	76.74
HPD600	68.10	94.56	64.39
SP70	79.92	91.79	73.36
SP700	86.09	90.44	77.93
SP8251	73.50	89.82	66.01

量, 并绘制泄漏曲线。由图 2 可知, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样总皂苷泄漏点出现最晚, 表明其吸附量最多, 因此选择 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 为上样流速。此时上样体积为 5 BV 时, 即折合生药量 15 g 时开始出现泄漏, 说明树脂已经达到吸附饱和, 因此最大上样量定为药材-树脂 (1:2), 药液质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

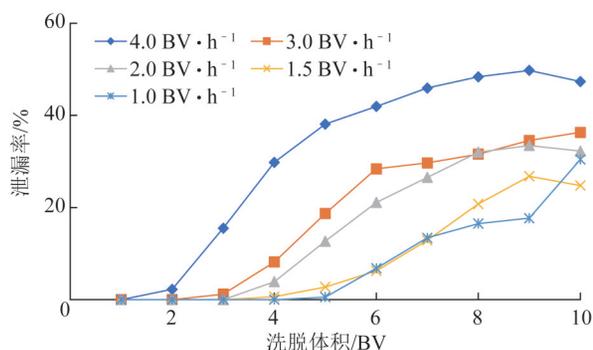


图2 延龄草总皂苷泄漏曲线

2.4.4 洗脱溶剂的考察 取 HPD400 型大孔树脂 30 mL, 装于色谱柱中, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速进行上样, 上样量为 150 mL 药液 [质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药)]。上样吸附完成后, 依次用水、20% 乙醇、30% 乙醇、40% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 洗脱溶剂用量均为 3 BV, 再分别用 6 BV 的 50%、60%、70%、95% 乙醇进行梯度洗脱, 收集洗脱液。每个柱体积为 1 个流分, 测定各流分中延龄草总皂苷的含量及浸膏含量。由图 3 结果可知, 总皂苷主要集中在 50%~70% 乙醇洗脱部位, 3 个部位总皂苷洗脱率之和达 90% 以上, 由表 5 可知, 以 50% 乙醇及 60% 乙醇部位含量较高, 为保证总皂苷收率, 最终纯化工艺定为上样完毕后, 以 20% 乙醇洗脱除去杂质, 再用 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液。

2.4.5 洗脱流速和洗脱体积的考察 量取 3 份 HPD400 型大孔树脂 30 mL, 装于色谱柱中, 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速进

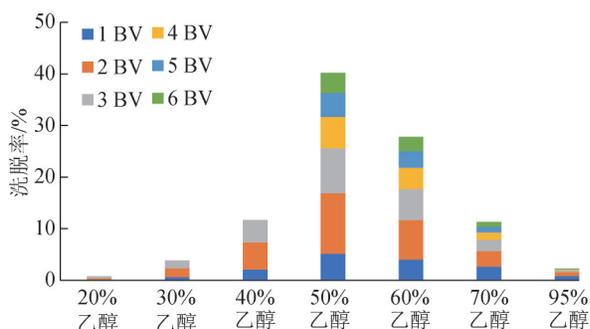


图3 各洗脱部位延龄草总皂苷的洗脱率变化

表5 各洗脱部位延龄草总皂苷质量分数及浸膏量

洗脱部位	浸膏量/g	总皂苷质量分数/%
20%乙醇	0.14	0.26
30%乙醇	0.27	1.28
40%乙醇	0.37	3.83
50%乙醇	0.65	13.19
60%乙醇	0.29	9.11
70%乙醇	0.12	3.71

行上样，上样量为生药（g）：树脂（mL）为1:2。上样吸附完成后，用3 BV的20%乙醇洗脱，除去杂质，收集70%乙醇洗脱部位，共收集10 BV，洗脱流速分别为1、2、3 BV·h⁻¹流速，分段收集洗脱液，每1 BV（30 mL）为1个流分，共收集10份，测定各流分中延龄草总皂苷的含量，计算洗脱率。由图4可知，当洗脱溶剂用量达5 BV时各组样品的总皂苷均基本洗脱完全，因此洗脱剂用量定为5 BV。为节约时间和提高洗脱效率，洗脱流速定为3 BV·h⁻¹。

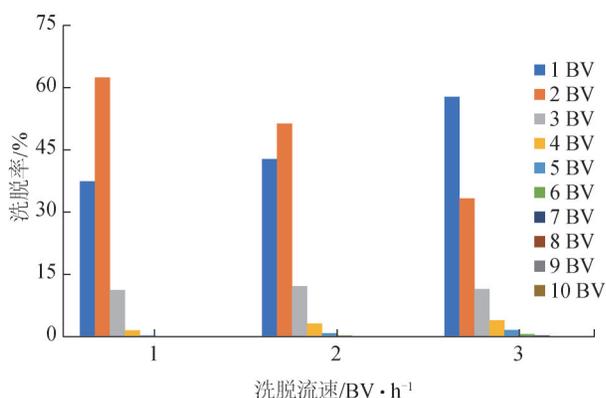


图4 不同流速下延龄草各流分的洗脱率变化

2.4.6 验证实验及中试放大试验 按优化的纯化工艺进行放大10倍验证实验，延龄草总皂苷的质量分数为35.16%，收率为8.04%，说明该纯化工艺稳定可行。开展了50 kg级的中试放大试验，结果与验证

实验的结果基本一致，20%乙醇洗脱部位几乎不含皂苷成分，说明能够有效将有效部位保留且除掉其他杂质；70%乙醇洗脱部位延龄草总皂苷的质量分数为34.29%，收率为7.42%。逐级放大实验的结果与实验室工艺一致，表明工艺具备放大的可行性，方法稳定、可控。

2.5 延龄草总皂苷提取物的抗炎活性

2.5.1 样品的制备 取延龄草醇提取物（CT，收率为38.10%，总皂苷质量分数为10.10%）及树脂纯化物（CH，收率为7.42%，总皂苷质量分数为34.29%），分别精密称取上述2种提取物适量，用DMSO溶解，配制成质量浓度为100 mg·mL⁻¹的储备液，于冰箱4℃保存（实验时用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养液稀释成不同的质量浓度，DMSO终体积分数不超过0.1%）。

2.5.2 MTT法检测细胞活性 取对数生长期的RAW264.7细胞，按细胞密度1×10⁵个/mL，每孔100 μL接种于96孔板中，分为空白组和实验组，于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后，实验组加入用完全培养基配制好的不同质量浓度（50.00、25.00、10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg·mL⁻¹）的CH和CT药液10 μL，每个质量浓度设置3个复孔，对照组加入等体积完全培养基，随后置于培养箱中培养24 h。给药孵育后，每孔中加入MTT 10 μL（避光加入），置于培养箱中孵育4 h，吸弃孔内培养基，每孔加入DMSO 150 μL，振荡10 min溶解结晶，置于酶标仪中，在570 nm波长^[19-21]下测定吸光度（A）值，按公式（2）计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\% \quad (2)$$

细胞存活率>90%可认为无细胞毒性，图5结果表明，CT组在25.00~0.05 μg·mL⁻¹与细胞共培养24 h无明显毒性，CH组在5.00~0.05 μg·mL⁻¹与细胞共培养24 h无明显毒性，因此两组可分别在无细胞毒性的质量浓度下进行后续实验研究。

2.5.3 Griess法测定NO浓度 取对数生长期的RAW264.7细胞按细胞密度1×10⁵个/mL，每孔100 μL接种于96孔板中，分为空白组、LPS组和实验组，每组设置5个复孔，于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中培养24 h至细胞贴壁。实验组加入用完全培养基配制好的不同质量浓度的CH（5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg·mL⁻¹）和CT（25.00、10.00、

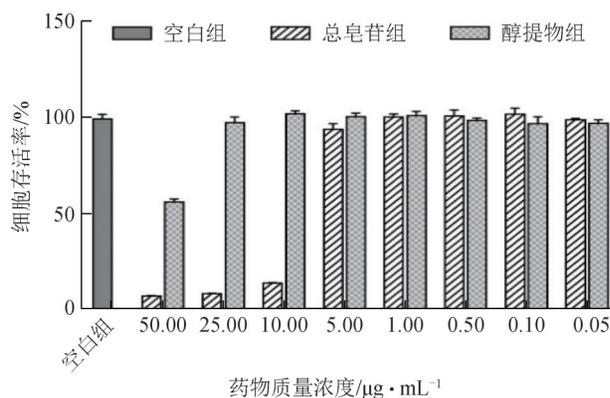
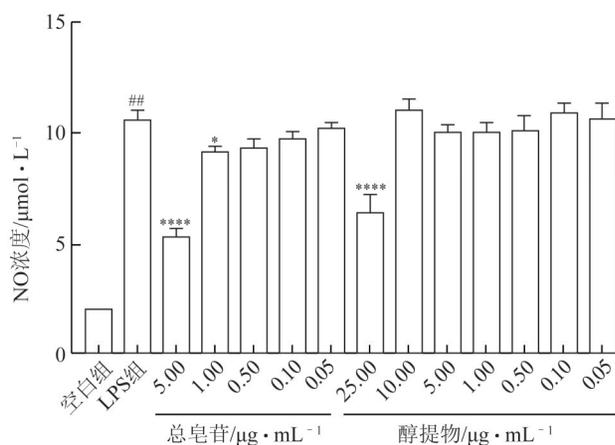


图5 延龄草CH和CT对RAW264.7细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 药液(空白组和LPS组加入等体积培养基) 20 μL , 实验组和LPS组加入终质量浓度为1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS(空白组加入等体积培养基) 20 μL 刺激24 h。各组吸取细胞培养基上清液50 μL , 分别加入的Griess I试剂和Griess II试剂50 μL , 置于酶标仪中, 在540 nm波长下测定A值, 计算上清液中NO的含量。

由图6可知, 与空白组相比, LPS模型组能显著增加NO的释放量, 说明LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型制备成功。与LPS模型组相比, CT组仅在25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度下对NO的释放表现出明显的抑制作用 ($P<0.0001$); CH组在5.00、1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质量浓度下均对NO的分泌有显著的抑制作用 ($P<0.0001, P<0.05$)。延龄草CT得率为38.10%, 延龄草CH得率为7.42%, 说明经树脂纯化后, 其抗炎效果明显提升。



注: 与空白组比较, $^{##}P<0.01$; 与LPS组比较, $^{*}P<0.05$, $^{****}P<0.0001$ 。

图6 延龄草CH和CT对LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

3 讨论

LPS诱导RAW264.7细胞产生多种炎症细胞因子, 是经典的筛选抗炎药物的炎症模型, 被广泛用于药物体外抗炎研究。NO是各种炎症介质之一, 参与介导细胞免疫和炎症毒性反应, 在调节多种生理功能方面起重要作用, 如扩张血管、神经传递和炎症应答等。以LPS激活RAW264.7巨噬细胞炎症信号通路, 在细胞培养液中释放产生大量NO, 加剧炎症反应, 此时通过药物进行干预, NO浓度的变化可以用来评价药物抑制炎症反应的强弱。CH和CT均可抑制LPS诱导的NO的释放, 在1.00~5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药物质量浓度, CH组的抑制作用呈剂量依赖性, 可显著抑制NO的释放, 其 IC_{50} 值为3.79 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而CT组的 IC_{50} 值为20.68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其效果与纯化前相比明显提升。

在树脂纯化工艺优化过程中, 考虑到70%洗脱部位总皂苷含量仍偏低, 曾尝试将除杂溶剂的乙醇体积分数提高至30%, 但70%洗脱部位总皂苷含量并未提高, 且收率反而明显下降, 故仍选择了20%乙醇洗脱杂质。

本研究对优化的提取、纯化工艺进行了逐级放大工艺验证, 证明了工艺的稳定性、可靠性, 经提取、纯化得到的延龄草总皂苷纯度较高, 工艺稳定、可控。

延龄草中的偏诺皂苷含量远高于其同属植物重楼^[22-23], 两者在传统应用习惯中也较为相似, 相比重楼, 延龄草作为一种量大、易得的药材具有更为广阔的发展前景。本研究基于延龄草皂苷确切的抗炎活性, 开展适合于工业化生产的延龄草抗炎有效部位的提取、纯化工艺研究, 为推动延龄草的发展提供支撑。

参考文献

- [1] 方志先, 朱诗立. 恩施州民族医药研究丛书[M]. 北京: 国际文化出版公司, 2002: 302.
- [2] 宋小妹, 刘海静. 太白七药研究与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 92.
- [3] 中国科学院武汉植物所. 湖北植物志: 第4册[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 2003: 453.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 401.
- [5] 赵敬华. 土家族医药学概论[M]. 北京: 中医古籍出版

- 社,2005:150.
- [6] 李淑琪,胡凡,文安,等. 延龄草甾体皂苷抗大鼠急性心肌缺血有效成分的研究[J]. 江西中医药大学学报, 2021,33(1):89-93.
- [7] 欧阳俊摇,邹海艳,李慢中,等. 延龄草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 433-437.
- [8] 付晓云,张红燕. 延龄草多糖研究进展[J]. 广州化工, 2021,49(12):1-3.
- [9] 李慧敏,潘究伟,梅其炳,等. 延龄草化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(7):509-516.
- [10] 李小沛,张亚玉,李乐,等. 延龄草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 特产研究,2017,39(2):71-78.
- [11] ONO M, TAKAMURA C, SUGITA F, et al. Two new steroid glycosides and a new sesquiterpenoid glycoside from the underground parts of *Trillium kamschaticum*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007, 55(4): 551-556.
- [12] FU Y L, YU Z Y, TANG X M, et al. Pennogenin glycosides with a spirostanol structure are strong platelet agonists: Structural requirement for activity and mode of platelet agonist synergism[J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(3):524-533.
- [13] 丁立帅,赵猛,李燕敏,等. 七叶一枝花根茎和地上部分提取物镇痛抗炎作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(5):832-839.
- [14] QIN X J, SUN D J, NI W, et al. Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. Steroids,2012,77(12):1242-1248.
- [15] 陈静文,陈先勇,赵龙飞,等. 延龄草总皂苷体内外抗结肠癌活性的作用[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2188-2192.
- [16] 欧阳俊摇,邹海艳,李慢中,等. 延龄草根茎 HPLC 定量与 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 定性研究[J]. 中药材, 2017, 40(2):373-378.
- [17] 杨印军,孙欣光,杨杰,等. 延龄草与吉林延龄草根茎及须根中3种皂苷成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2017,42(6):1146-1151.
- [18] 左月明,王亚芳,张忠立,等. 响应面分析法优化回流提取延龄草甾体皂苷工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2020,31(1):49-51.
- [19] 李苹,卢柏林,邓时贵,等. 不同分子量醋柴胡多糖对 RAW264.7 巨噬细胞抗炎免疫活性的影响[J]. 中国现代应用药学,2020,37(10):1153-1156.
- [20] 宁玉明,潘一帆,李范珠. 丹参酮 II_A 对阿霉素耐药人乳腺癌细胞的多药耐药逆转作用及机制研究[J]. 中草药,2021,52(22):6890-6896.
- [21] 李木子,张浩,崔国倩,等. 苦地丁的抗炎药效物质基础组分及作用机制研究[J]. 中国中药杂志,2020,45(11):2586-2594.
- [22] 巨博雅,朱厚达,李燕敏,等. 重楼药材和混伪品中5种皂苷的含量及对《中国药典》2015年版重楼含量测定修订的探讨[J]. 中国中药杂志,2020,45(8):1745-1755.
- [23] 贾天颖,张晓南,苏钰,等. 重楼质量研究及对《中国药典》重楼药材标准规定的思考[J]. 中国中药杂志, 2020,45(10):2425-2430.

(收稿日期: 2022-03-11 编辑: 王笑辉)