

中图分类号: R932; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0057-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.013



预知子总皂苷大孔树脂分离纯化工艺优化及抗氧化活性研究*

杨晨^{1,2}, 武正华², 石文清³, 吴江平², 范国荣^{1,2,Δ}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 上海交通大学附属第一人民医院, 上海 200940;
3. 同济大学附属上海市第四人民医院, 上海 200434)

摘要:目的 优化大孔树脂分离纯化预知子总皂苷的工艺, 并对其体外抗氧化活性进行研究。方法 通过比较不同树脂对预知子提取物的吸附率、解吸附率、解吸附效果, 选择适当的大孔树脂对预知子进行分离纯化; 以总皂苷含量为指标, 通过单因素试验考察上样条件; 采用 Box-Behnken 响应面法优化预知子总皂苷洗脱工艺。通过检测预知子总皂苷对 2,2-二苯基-1-苦基胍(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基的清除能力及总抗氧化能力, 评价其体外抗氧化活性。结果 上样条件为 S-8 型大孔树脂, 上样液质量浓度为 200 mg/mL, 上样量与树脂体积比为 2:1(V/V), pH 为 2.5, 流速为 1.0 mL/min; 洗脱条件为 9 BV 60% 乙醇溶液洗脱, 流速为 1.0 mL/min。预知子总皂苷对 DPPH 和 ABTS 自由基清除率的半数抑制浓度分别为 0.15, 1.54 mg/mL; 总抗氧化能力为 4.86 μmol/mL。结论 S-8 型大孔树脂能很好地分离纯化预知子总皂苷, 优化的上样及洗脱工艺可为该药的开发提供理论依据。预知子总皂苷具有一定抗氧化活性。

关键词: 预知子; 大孔树脂; 总皂苷; 分离纯化; 抗氧化活性

Optimization of Purification Process of Total Saponins from Akebiae Fructus by Macroporous Resin and Research on Its Antioxidant Activity

YANG Chen^{1,2}, WU Zhenghua², SHI Wenqing³, WU Jiangping², FAN Guorong^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. The General Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China 200940; 3. Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University School of Medicine, Shanghai, China 200434)

Abstract: Objective To optimize the separation and purification process of total saponins from Akebiae Fructus by macroporous resin, and to study their *in vitro* antioxidant activity. **Methods** Appropriate macroporous resins were selected for separation and purification of Akebiae Fructus by comparing the adsorption rate, desorption rate, and desorption effect of different resins on the Akebiae Fructus extracts. Taking the total saponins content as the index, the sample loading conditions were determined by the

*基金项目: 上海市卫生健康委员会临床重点专科项目[shslczdzk06501]。

第一作者: 杨晨, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析, (电子信箱)1772432508@qq.com。

Δ通信作者: 范国荣, 男, 博士研究生, 主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)guofan@163.com。

2006:103.

[2] 中华医学会肠外肠内营养学分会. 肠外营养多腔袋临床应用专家共识[J]. 中华外科杂志, 2022, 60(4):321-328.

[3] 徐帆, 肖舒文, 朱建宁, 等. 静脉用药调配中心药师参与的肠外营养支持模式的探讨[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(6): 740-742.

[4] 杨香瑜, 张韶辉, 郭珩, 等. 营养专科临床药师参与临床营养支持工作的实践[J]. 中南药学, 2018, 16(5):692-694.

[5] 卫峻琦, 施芳红, 李浩, 等. 高风险注射剂标识方式的帕累托法则分析及标准化研究[J]. 中国药业, 2020, 29(6): 61-63.

[6] 王亚峰, 贺葵邦, 白菊, 等. 基于“药师+智慧软件”的 PIVAS 全医嘱审核药学服务模式[J]. 医药导报, 2019, 38(3): 403-406.

[7] 中华医学会肠外肠内营养学分会药学协作组. 规范肠外营养液配制[J]. 协和医学杂志, 2018, 9(4):320-331.

[8] 广东省药学会. 肠外营养临床药学共识(第二版)[J]. 今日药学, 2017, 27(5):289-303.

[9] BOULLATA JI, GILBERT K, SACKS G, et al. A. S. P. E. N. clinical guidelines: parenteral nutrition ordering, order review, compounding, labeling, and dispensing [J]. JPEN J Parenter Enter Nutr, 2014, 38(3):334-377.

[10] 吴国豪. 临床营养治疗理论与实践[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2015:172-205.

[11] SOBTKA L. 临床营养基础(第4版)[M]. 蔡威, 译. 上海:复旦大学出版社, 2013:403-407.

[12] 杨志海, 张幸国, 马葵芬, 等. 我国临床药学科发展现状调研分析及思考[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(17):1553-1557.

[13] 褚燕琦, 王之舟, 刘智纯, 等. 临床药师参与 260 例临床会诊的作用与价值[J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(8):49-51.

[14] 严定强, 费中亚. TPN 处方自动化审核模式在 PIVAS 的建立与应用[J]. 药学与临床研究, 2020, 28(2):157-160.

[15] 周鹏翔, 董淑杰, 李潇潇, 等. 基于 PDCA 循环法构建标准化药学会诊模式[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(20): 2177-2181.

(收稿日期:2023-01-29;修回日期:2023-05-17)

single factor test, and the elution process of total saponins from *Akebiae Fructus* was optimized by the Box - Behnken response surface design. The scavenging capacity of DPPH and ABTS free radicals and the total antioxidant capacity of saponins from *Akebiae Fructus* were determined to evaluate their antioxidant activities *in vitro*. **Results** The sample loading conditions were determined as follows: S - 8 macroporous resin was used, the mass concentration of the sample solution was 200 mg / mL, the ratio of sample volume to resin volume was 2:1 (V / V), the pH was 2.5, and the flow rate was 1.0 mL / min. The sample was eluted with 9 BV 60% ethanol solution at a flow rate of 1.0 mL / min. The IC_{50} values of total saponins of *Akebiae Fructus* on DPPH and ABTS radical scavenging were 0.15 mg / mL and 1.54 mg / mL, respectively. The total antioxidant capacity was 4.86 μ mol / mL. **Conclusion** S - 8 macroporous resin can effectively separate and purify the total saponins of *Akebiae Fructus*, and the optimal sample loading and elution process can provide a theoretical basis for the development of this herb. The total saponins of *Akebiae Fructus* have certain antioxidant activity.

Key words: *Akebiae Fructus*; macroporous resin; total saponins; separation and purification; antioxidant activity

预知子 *Akebiae Fructus* 为木通科植物木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Dence、三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 或白木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koide. var. *australis* (Diels) Rehd. 的干燥近成熟果实, 又称“八月瓜”“八月炸”, 广泛分布于江苏、浙江、安徽等地。预知子气微香, 味苦, 性寒, 归胆、肝、胃、膀胱经, 具有疏肝理气、活血止痛、散结、利尿等功效^[1]。现代药理学研究表明, 其主要含有三萜皂苷、绿原酸、黄酮等成分^[2-3], 其中三萜皂苷作为预知子的主要成分, 具有抗炎^[4-5]、抗菌^[6-7]、抗抑郁^[8-9]、抗癌^[10-12]等活性。另外, 预知子中富含多种人体生长所需的营养成分, 成熟后味甜。四川、云南等地将其作为水果食用, 因其含有较多种子, 部分地区也用其种子榨油, 具有很好的开发前景^[13]。随着三叶木通人工种植技术的不断成熟, 以三叶木通为原料的产品开始进入大众视野, 但其加工的产品还不能满足市场需求^[14]。大孔树脂作为一类由有机高分子聚合物形成的具有网状结构的圆形吸附材料, 具有成本低、无污染、提取效率高、可再生等优点, 被广泛应用于化工、医药、食品等行业^[15]。越来越多证据表明, 氧化应激反应与人类多种疾病关系密切, 故通过补充天然的抗氧化剂来平衡生物系统中的活性氧 (ROS) 水平具有重要意义^[16]。而目前对预知子总皂苷抗氧化活性的研究较少, 故本研究中使用大孔树脂对预知子提取物中三萜皂苷进行分离纯化, 并研究其总皂苷的抗氧化活性, 以期对预知子的药效物质基础及产品的深度开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

50 Conc型紫外分光光度计(美国 Varian公司); TS - 1型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); AUW220D型电子天平(日本 Shimadzu公司, 精度为十万分之一); RS - FS - 1411型粉碎机(合肥荣事达电子电器集团有限公司); R5005K2D型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); pH计(梅特勒 - 托利多仪器 <上海> 有限公司)。

1.2 试剂

预知子(上海万仕诚国药制品有限公司, 批号为 20210728 - 2); 齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 110709 - 202109, 含量以 95.8% 计); D101, AB - 8, D1300, HPD300, HPD400, HPD500, ADS - 7, ADS - 8, S - 8, D4020型大孔树脂(郑州和成新材料科技有限公司, 批号为 HC220619); 2,2 - 二苯基 - 1 - 苦基肼(DPPH, 北京华迈科生物技术有限公司, 批号为 D310202, 含量不低于 97%); 2,2 - 联氮 - 二(3 - 乙基苯并噻唑啉 - 6 - 磺酸)二铵盐(ABTS, 上海源叶生物科技有限公司, 批号为 A02GS143434, 含量不低于 98%); 总抗氧化能力检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号为 BC1310); 过硫酸钾、香草醛、高氯酸、冰醋酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 预知子提取物溶液制备

取预知子, 粉碎, 过 2 号筛, 按比例 1:20 (m / V) 加入 85% 乙醇, 浸泡 60 min, 85 $^{\circ}$ C 回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 取上清液, 减压浓缩去乙醇, 即得预知子提取物。加入适量水, 配制质量浓度为 100 ~ 800 mg / mL 的预知子提取物溶液, 备用。

2.2 总皂苷含量测定^[17]

取齐墩果酸对照品 5.10 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得对照品溶液; 以甲醇为空白对照。精密量取上述对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL, 挥尽甲醇, 精密加入 5% 香草醛 - 冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.4 mL, 充分摇匀, 60 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min, 取出, 冷却至室温, 精密加入冰乙酸 5 mL, 摇匀, 于 540 nm 波长处测定吸光度。以对照品溶液质量浓度 (X, μ g / mL) 为横坐标、吸光度 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.008 X - 0.0106$ ($R^2 = 0.9995$, $n = 6$)。结果表明, 总皂苷(以齐墩果酸计)质量浓度在 9.11 ~ 54.64 μ g / mL 范围内与吸光度线性关系良好。

2.3 大孔树脂预处理

分别称取一定量的D101, AB-8, D1300, HPD300, HPD400, HPD500, ADS-7, ADS-8, S-8, D4020型大孔树脂, 在无水乙醇中浸泡24 h后用纯水洗至无醇味, 依次用5倍体积4%盐酸溶液、纯水、4%氢氧化钠溶液淋洗, 用纯水洗至中性, 晾干, 得各型号干树脂备用。

2.4 大孔树脂型号筛选

静态吸附试验: 称取D101, AB-8, D1300, HPD300, HPD400, HPD500, ADS-7, ADS-8, S-8, D4020型干树脂各1.0 g, 加入20 mL质量浓度为400 mg/mL的预知子提取物溶液, 置100 mL具塞锥形瓶中, 密封, 置摇床上(转速为150 r/min)振荡24 h, 充分吸附, 滤过, 取一定体积吸附后的液体, 按2.2项下方法测定滤液中总皂苷的含量, 并计算不同型号大孔树脂对预知子总皂苷的吸附率, 吸附率(%) = $[(C_0 - C_1)V_1 / W] \times 100\%$ 。式中, C_0 为初始总皂苷质量浓度, C_1 为吸附后上清液中总皂苷质量浓度, V_1 为上样体积, W 为树脂质量(干重)。详见表1。

静态解析试验: 将上述静态吸附后的10种树脂水洗后晾干, 分别置100 mL具塞锥形瓶中, 分别加入80%乙醇溶液20 mL, 密封, 置摇床(转速为150 r/min)振荡12 h, 使其充分解析, 取一定量吸附后液体, 按2.2项下方法测定总皂苷吸光度, 并计算不同型号大孔树脂对预知子总皂苷的解吸附率与解吸附效果, 解吸附率(%) = $C_2C_V / W \times 100\%$, 解吸附效果(%) = 解吸附率 / 吸附率 $\times 100\%$ 。式中, C_2 为解析浓度, C_V 为解析体积。详见表1。可见, S-8型大孔树脂对预知子总皂苷的吸附率、解吸附率与解吸附效果均较其他树脂高, 故选择S-8型树脂用于后续预知子总皂苷的分离与纯化。

2.5 上样条件考察

上样液pH: 精密量取8份5 mL预处理过的S-8型大孔树脂, 加入pH分别为2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5,

8.5, 9.5的预知子提取物溶液15 mL, 置摇床(转速为150 r/min)振荡12 h, 测定吸附前后溶液中总皂苷的含量。由图1可知, pH为2.5时吸附率最高(52.72%), 故最佳上样液pH为2.5。这可能是因为皂苷类化合物中含有羧基, 在酸性条件下较稳定。由于三萜皂苷中有连接糖链, pH过低会导致其水解成苷元, 故上样液pH最终选择2.5。

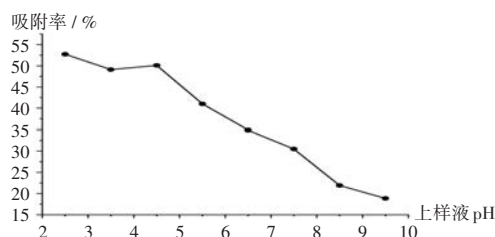


图1 上样液pH对总皂苷吸附效果的影响

Fig. 1 Effect of pH of the sample solution on the adsorption effect of total saponins

吸附等温线: 精密量取8份预处理过的S-8型大孔树脂5 mL, 置100 mL具塞锥形瓶中, 分别加入质量浓度为100~800 mg/mL的预知子提取物溶液, 于0, 25, 50 °C水浴摇床恒温振荡12 h, 测定吸附前后溶液中总皂苷的含量, 并计算平衡吸附量(Q_e), $Q_e = (C_0 - C_e)V / W$ 。式中, C_0 为初始总皂苷质量浓度, C_e 为吸附平衡后预知子总皂苷浓度, V 为溶液体积。由图2可知, 树脂平衡吸附量随提取物浓度的增大而增加, 随温度的升高而降

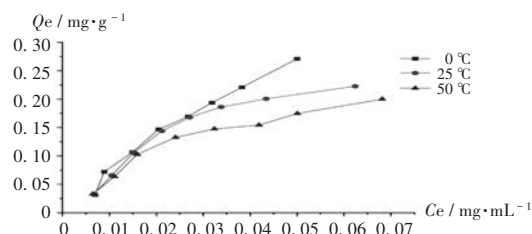


图2 S-8型大孔树脂对预知子提取物的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherm of S-8 macroporous resin on the Akebiae Fructus extract

表1 不同型号大孔树脂对预知子总皂苷的静态吸附和静态解析试验结果

Tab. 1 Static adsorption and analytical comparison of total saponins of Akebiae Fructus by different macroporous resins

型号	极性	粒径(mm)	比表面积(m ² /g)	平均孔径(nm)	吸附率(%)	解吸附率(%)	解吸附效果(%)
D101	非极性	0.20~0.60	400~600	10.0~12.0	44.67	40.27	90.15
D1300	非极性	0.30~1.25	≥600	9.0~10.0	38.27	34.83	91.01
AB-8	弱极性	0.30~1.25	480~520	13.0~14.0	49.44	42.55	86.06
HPD300	非极性	0.30~1.20	800~870	5.0~5.5	46.18	36.66	79.39
HPD400	弱极性	0.30~1.20	500~550	7.5~8.0	32.65	29.70	90.96
HPD500	极性	0.30~1.20	500~550	5.5~7.5	33.34	30.38	91.12
ADS-7	强极性	0.30~1.25	≥100	25~30	61.33	53.22	86.78
ADS-8	非极性	0.30~1.20	450~500	12~16	44.74	37.38	83.55
S-8	极性	0.315~1.25	100~120	25~30	68.58	66.46	96.91
D4020	非极性	0.30~1.25	540~580	10.0~10.5	55.10	48.57	88.15

低,表明低温有助于树脂的吸附,故S-8型树脂对预知子的吸附属放热过程。

吸附等压线:精密量取预处理过的S-8型大孔树脂5 mL,分别置100 mL具塞锥形瓶中,加入质量浓度为200 mg/mL预知子提取物溶液15 mL,25℃下水浴摇床(转速为150 r/min)恒温振荡,每10 min取出1个锥形瓶,至浓度基本不变时停止,测定总皂苷含量,并计算瞬时吸附量(Q_t), $Q_t = (C_0 - C_t)V/W$ 。式中, C_t 为 t 时刻总皂苷浓度。由图3可知,0~40 min内吸附量随时间的增加而快速上升,40~120 min内吸附率逐渐减缓,120 min后逐渐趋于平衡,为避免浪费提取液,故选择静态吸附2.5 h后进行洗脱。

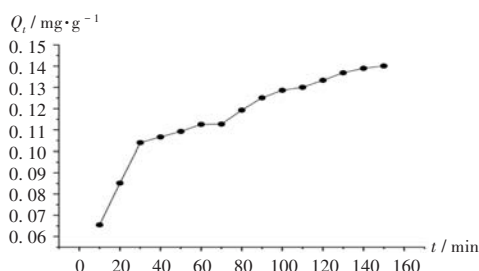


图3 S-8型大孔树脂对预知子提取物的吸附动力学曲线
Fig. 3 Adsorption kinetics curve of S-8 macroporous resin on the Akebiae Fructus extract

上样量:取预处理后的S-8型树脂40 mL,湿法缓慢装入吸附柱中,以一定质量浓度的预知子提取物溶液上样,保持流速为1.0 mL/min,每20 mL收集1份流出液,测定总皂苷质量浓度,绘制泄露曲线。当流出液中该成分质量浓度为上样液的1/10时,认为达到泄露点。由图4可知,第5份流出液中总皂苷质量浓度急剧上升,并超过上样液的1/10,故确定最大上样量为80 mL,即上样量与树脂体积比为2:1(V/V)。

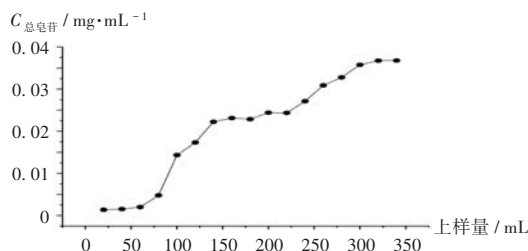


图4 S-8型大孔树脂对预知子提取物的泄露曲线
Fig. 4 Leakage curve of S-8 macroporous resin on the Akebiae Fructus extract

2.6 洗脱条件考察

洗脱液体积分数:取预处理好的S-8型大孔树脂20 mL,湿法装柱,取40 mL pH为2.5的预知子提取物溶液(质量浓度为200 mg/mL),以1 mL/min的流速上样,动态吸附2.5 h后用6 BV体积蒸馏水除杂,依次用3 BV 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%乙醇溶液梯度洗脱,收集洗脱液,于540 nm波长处测定

吸光度,计算总皂苷洗脱量。由图5可知,3 BV 50%乙醇可洗脱大部分皂苷。综合考虑对预知子总皂苷的最大富集效果及节约溶剂,分别选用6, 9, 12 BV体积的40%, 50%, 60%乙醇溶液进行响应面实验,选择最佳洗脱工艺。

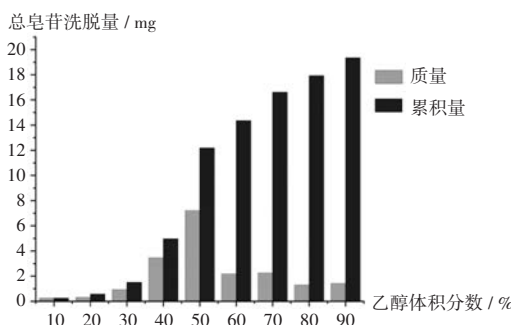


图5 不同乙醇体积分数洗脱剂下总皂苷的洗脱量

Fig. 5 Elution amount of total saponins under different volume fractions of ethanol as eluents

Box-Behnken 响应面实验考察洗脱工艺:影响洗脱工艺的因素主要包括洗脱剂体积(因素A)、洗脱剂体积分数(因素B)、洗脱流速(因素C)。由于洗脱流速越大,洗脱剂与树脂作用时间越短,则需要更多的洗脱剂将物质洗脱下来,综合洗脱效果与生产效率,选择0.5, 1.0, 1.5 mL/min进行响应面实验。采用三因素三水平响应面法,取40 mL pH为2.5、生药质量浓度为200 mg/mL的预知子提取物溶液,以1.0 mL/min的流速上样,按2.2项下方法测定总皂苷吸光度。响应面实验因素与水平见表2,试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。采用Design Expert 10.0.1软件分析,以洗脱剂体积、洗脱剂体积分数、洗脱流速为响应变量,总皂苷回收率为响应值,进行回归拟合分析,得模型 $Y = 10.27635A + 6.84528B + 37.23737C - 0.10321AB - 0.82019AC - 0.059156BC - 0.18725A^2 - 0.049331B^2 - 12.29081C^2 - 191.55293$ 。由表4可知,其中A, B, B²的影响极显著($P < 0.01$), AB, C²的影响显著($P < 0.05$);由F值可知,各因素对总皂苷回收率的影响程度由大至小为洗脱剂体积分数 > 洗脱剂体积 > 洗脱流速。绘制各影响因素相互作用对预知子总皂苷回收率影响的三维响应面图,结果见图6。可知,响应面优化条件为,洗脱剂体积9.00 BV,洗脱剂体积分数59.80%、洗脱流速1.12 mL/min。考虑到试验的可操作性,决定采用9 BV 60%乙醇溶液为洗脱剂,洗脱流速为1.0 mL/min,进行验证试验。

验证试验:精密量取S-8型大孔树脂20 mL,加入pH为2.5的预知子提取物溶液40 mL,以1.0 mL/min的流速上样,9 BV 60%乙醇洗脱(流速为1.0 mL/min),平行3份。结果预知子总皂苷转移率分别为76.09%,

表2 Box - Behnken 响应面试验因素与水平

Tab. 2 Factors and levels of the Box - Behnken test

水平	因素A(BV)	因素B(%)	因素C(mL/min)
1	6	40	0.5
2	9	50	1.0
3	12	60	1.5

表3 Box - Behnken 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the Box - Behnken test

序号	因素			总皂苷回收率(%)	序号	因素			总皂苷回收率(%)
	A	B	C			A	B	C	
1	1	1	2	49.69	10	2	3	1	71.67
2	3	1	2	62.96	11	2	1	3	58.63
3	1	3	2	75.72	12	2	3	3	75.16
4	3	3	2	76.61	13	2	2	2	73.78
5	1	2	1	64.59	14	2	2	2	73.22
6	3	2	1	71.07	15	2	2	2	69.46
7	1	2	3	67.60	16	2	2	2	74.51
8	3	2	3	69.16	17	2	2	2	73.35
9	2	1	1	53.96					

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	968.78	9	107.64	25.01	0.0002
A	61.6	1	61.6	14.31	0.0069
B	683.12	1	683.12	158.71	<0.0001
C	10.73	1	10.73	2.49	0.1584
AB	38.35	1	38.35	8.91	0.0204
AC	6.05	1	6.05	1.41	0.2743
BC	0.35	1	0.35	0.08	0.7838
A ²	11.96	1	11.96	2.78	0.1395
B ²	102.47	1	102.47	23.81	0.0018
C ²	39.75	1	39.75	9.24	0.0189
残差	30.13	7	4.30		
失拟项	14.64	3	4.88	1.26	0.4001
纯误差	15.49	4	3.87		
总差	998.91	16			

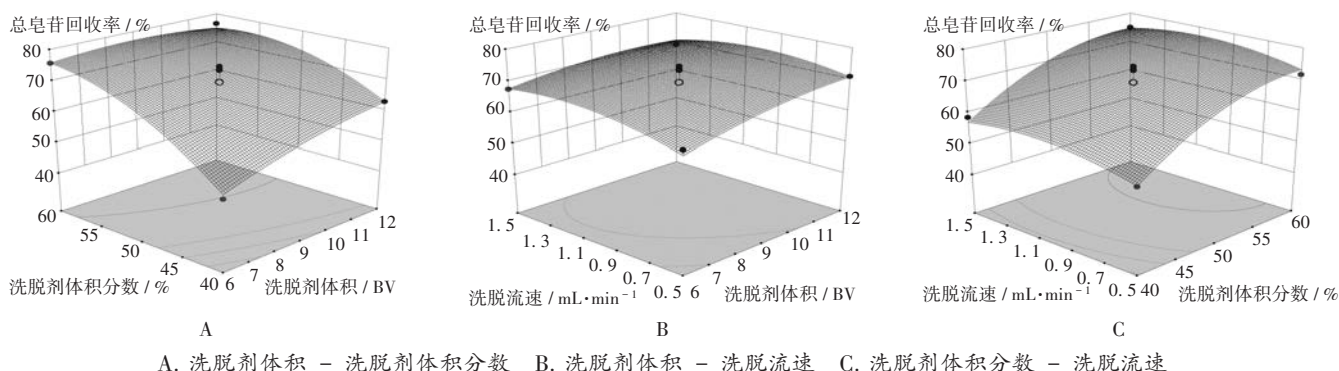


图6 各因素相互作用对预知子总皂苷回收率影响的三维响应面图

A. Volume of eluent - Volume fraction of eluent B. Volume of eluent - Flow rate of elution C. Volume fraction of eluent - Flow rate of elution

Fig. 6 Three dimensional response surface plot of the influence of the interaction of various factors on the recovery rate of total saponins from Akebiae Fructus

76.64%, 76.59%, 平均为 76.44% (RSD 为 0.40%), 与预测值 77.21% 相差 -0.77%, 表明该工艺稳定、可靠。

2.7 预知子总皂苷体外抗氧化活性测定

DPPH 自由基清除能力测定: 参考文献[18], 用 95% 乙醇溶液配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液(临用现配)。吸取 0.4 mL 乙醇与 0.2 mL DPPH 溶液, 混匀, 作为空白对照组(A₀); 吸取 0.4 mL 不同浓度总皂苷样品溶液与 0.2 mL 无水乙醇, 混匀, 作为样品对照组(A₁); 吸取 0.4 mL 不同浓度总皂苷样品溶液与 0.2 mL DPPH 溶液, 混匀, 作为试验组(A₂)。37 °C 避光孵育 30 min, 于 517 nm 波长处测定吸光度。DPPH 自由基清除率(%) = [1 - (A₂ - A₁) / A₀] × 100%。结果表明, 总皂苷样品溶液的质量浓度在 0.03 ~ 1.67 mg/mL 范围内与 DPPH 自由

基清除率量效关系良好。得拟合方程 Y = 0.0035X - 0.0091 (R² = 0.9946), 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.15 mg/mL。

ABTS 自由基清除能力测定: 参考文献[19], 吸取 7 mmol/L ABTS 溶液与 4.9 mmol/L 过硫酸钾溶液, 按 1:1 (V/V) 混合, 室温避光反应 12 ~ 16 h, 使用前用去离子水稀释, 于 734 nm 波长处测定吸光度为 0.70 ± 0.02。吸取 0.5 mL ABTS 溶液, 加 0.1 mL 去离子水, 混匀, 作为空白对照组(A₀); 吸取 0.5 mL ABTS 溶液与过硫酸钾溶液, 混匀, 加 0.1 mL 不同浓度总皂苷溶液, 作为试验组(A₁)。室温避光反应 20 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度。ABTS 自由基清除率(%) = [(A₀ - A₁) / A₀] × 100%。得拟合方程 Y = 0.3185X + 0.0273 (R² = 0.9988), IC₅₀ 为 1.54 mg/mL, 表明总皂苷样品溶液质量浓度在 0.33 ~

2. 67 mg / mL 范围内与 ABTS 自由基清除率量效关系良好。

总抗氧化能力检测 :按总抗氧化能力检测试剂盒说明书操作,将硫酸亚铁标准溶液用蒸馏水稀释为不同梯度浓度,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4.4218X + 0.0011$ ($R^2 = 0.9993$),表明硫酸亚铁浓度在 $0.00156 \sim 0.05 \mu\text{mol} / \text{mL}$ 范围内线性关系良好。按 7:1:1 的比例将试剂 1、试剂 2、试剂 3 混合成混合液,吸取混合液 0.9 mL,加 0.12 mL 蒸馏水作为 $A_{\text{空白}}$,加 0.3 mL 样品与 0.12 mL 蒸馏水作为 $A_{\text{测定}}$ 。按公式 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 计算 $\Delta A_{\text{测定}}$,由回归方程可知预知子提取物浓度,计算总抗氧化能力。总抗氧化能力 ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) = $XV_{\text{反应}} / V_{\text{样}}$ 。式中, X 为样本浓度, $V_{\text{反应}}$ 为反应总体积, $V_{\text{样}}$ 为反应中样本体积。按药材量计算质量浓度为 80 mg / mL 的预知子总皂苷的总抗氧化能力为 $4.86 \mu\text{mol} / \text{mL}$ 。

3 讨论

三萜皂苷为预知子中的主要成分,药理活性广泛。本研究中首次利用大孔树脂分离纯化预知子中的总皂苷,并通过考察 10 种不同极性的大孔树脂对预知子总皂苷的吸附率及解吸附率,筛选出 S-8 型大孔树脂用于分离纯化预知子总皂苷;通过单因素试验结合 Box - Behnken 响应面法确定了上样及洗脱工艺,确定了以上样液质量浓度为 200 mg / mL,上样液体积与树脂体积比为 2:1 (V / V), pH 为 2.5,以 9 BV 60% 乙醇溶液洗脱,流速为 1.0 mL / min 为条件进行分离纯化,且预测值和验证结果相符,表明该工艺稳定可靠。

预知子作为一种药食同源的中药,由于目前对其生物活性及药理作用机制尚不明确,导致其应用并不广泛。而 DPPH 和 ABTS 自由基清除及总抗氧化能力由于方法简单、快速、经济、可靠,被广泛应用于天然产物抗氧化活性的评价中^[20]。本研究结果表明,预知子总皂苷具有一定抗氧化能力,可为功能性食品开发及后续有关预知子中三萜皂苷的研究提供参考。

参考文献

[1] 周向文,王艳,王娜. 预知子的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中南药学,2021,19(4):691-696.
[2] 范姣姣,文红梅,单晨啸,等. 基于 UFLC-Q-TOF/MS 技术的八月札化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(23):3282-3288.
[3] 邓俊杰,贺晶晶,马汉玉. HPLC-Q-TOF-MS 技术在预知子配方颗粒指纹图谱建立和化学成分归属中的应用[J]. 中国现代应用药学,2021,38(6):715-720.
[4] WANG XY, YU NX, WANG ZL, et al. *Akebia trifoliata* pericarp extract ameliorates inflammation through NF- κ B / MAPK signaling pathways and modifies gut microbiota [J]. Food Funct, 2020,11(5):4682-4696.
[5] WANG XY, YU NX, PENG HL, et al. The profiling of bioac-

tives in *Akebia trifoliata* pericarp and metabolites, bioavailability and *in vivo* anti-inflammatory activities in DSS-induced colitis mice [J]. Food Funct, 2019,10(7):3977-3991.
[6] WANG J, REN H, XU QL, et al. Antibacterial oleanane-type triterpenoids from pericarps of *Akebia trifoliata* [J]. Food Chem, 2015,168:623-629.
[7] JIANG YL, YIN H, ZHOU XF, et al. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract / montmorillonite and its application [J]. Food Chem, 2021,361:130111.
[8] LIANG BF, HUANG F, WANG HT, et al. Involvement of norepinephrine and serotonin system in antidepressant-like effects of hederagenin in the rat model of unpredictable chronic mild stress-induced depression [J]. Pharm Biol, 2015,53(3):368-377.
[9] LIN RH, LIU LL, SILVA M, et al. Hederagenin Protects PC12 Cells Against Corticosterone-Induced Injury by the Activation of the PI3K / AKT Pathway [J]. Front Pharmacol, 2021,12:712876.
[10] 张夜航,卢文丽,彭佩克,等. α -常春藤皂苷协同雷公藤红素对 SMMC7721 肝癌细胞增殖和周期的影响 [J]. 中成药, 2022,44(4):1099-1106.
[11] 张可兰,韦日明,葱博婷,等. 三叶木通总黄酮对急性肝损伤小鼠的保护作用及机制研究 [J]. 中药材,2018,41(3):707-710.
[12] 卢涛,许群瑶,郝尧,等. 不同成熟度预知子种子对人肝癌细胞恶性增殖的影响实验 [J]. 中华中医药学刊, 2018,36(1):193-196.
[13] 彭莞云,马倩倩,王志德,等. 三叶木通加工利用研究进展 [J]. 现代农业科技,2021(2):201-202.
[14] 孙晓东,张心伟,谭书明. 三叶木通果皮茶工艺优化 [J]. 贵州农业科学,2018,46(11):134-137.
[15] 王丹丹,刘莞汐,左甜甜,等. 大孔吸附树脂及其在中药领域应用研究进展 [J]. 中国药事,2022,36(7):826-835.
[16] ZHANG YC, WU XY, WANG XH, et al. Grey Relational Analysis Combined With Network Pharmacology to Identify Antioxidant Components and Uncover Its Mechanism From Moutan Cortex [J]. Front Pharmacol, 2021,12:748501.
[17] 严国俊,蔡宝昌,潘金火,等. CCD-RSM 法优化大孔吸附树脂纯化垂盆草复方中总黄酮及总皂苷工艺 [J]. 中华中医药杂志,2012,27(4):847-852.
[18] 张华,孟博,王莉,等. 桑叶多糖超声-微波协同提取工艺优化及其抗氧化活性 [J]. 中成药,2020,42(8):1972-1977.
[19] 马雪洁,程路峰,杨淑梅,等. 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究 [J]. 中南药学,2021,19(6):1130-1133.
[20] ZHAO XQ, YUAN ZH. Anthocyanins from Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Their Role in Antioxidant Capacities *in Vitro* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2021,18(10):e210039.
(收稿日期:2023-04-18;修回日期:2023-05-18)