

虎眼万年青总皂苷的纯化及抗氧化活性研究

曲中原¹, 张逸乔¹, 邹翔^{2,3*}, 石鑫¹, 方月妮³, 刘欣³, 季宇彬^{2,3}

¹ 哈尔滨商业大学药学院; ² 哈尔滨商业大学 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心;

³ 哈尔滨商业大学 药物研究所博士后科研工作站, 哈尔滨 150076

摘要: 对虎眼万年青总皂苷的纯化工艺及抗氧化活性进行研究。以比吸附量和比洗脱量为指标, 筛选大孔树脂型号, 进一步优化工艺条件。结果表明, AB-8 型大孔树脂对虎眼万年青总皂苷具有良好的吸附和洗脱效果, 最佳纯化条件为药材量与树脂用量比不超过 7: 1, 用水、30% 乙醇除杂, 70% 乙醇洗脱, 在此条件下得到的虎眼万年青总皂苷纯度为 55.18%。对纯化后虎眼万年青总皂苷的抗氧化活性进行研究, 发现虎眼万年青总皂苷对羟自由基、超氧自由基阴离子和 DPPH 自由基的 IC₅₀ 分别为 2.43、2.28 和 0.05 mg/mL, 具有良好的抗氧化活性。

关键词: 虎眼万年青; 总皂苷; 大孔吸附树脂; 纯化; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.015

Purification of Total Saponins from *Ornithogalum caudatum* and its Antioxidant Activity

QU Zhong-yuan¹, ZHANG Yi-qiao¹, ZOU Xiang^{2,3*}, SHI Xin¹, FANG Yue-ni³, LIU Xin³, JI Yu-bin^{2,3}

¹ College of Pharmacy, Harbin University of Commerce; ² Engineering Research Center of

Natural Antineoplastic Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce; ³ Post Doctoral

Research Center of Material Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: The purification process of total saponins from *Ornithogalum caudatum* and their antioxidant activity were studied. The adsorption and desorption rates of total saponins were selected as evaluation indexes, the types of macroreticular resin was screened and the purification parameters were further optimized. The results showed that AB-8 macroporous resin was considered to have favorable adsorption and desorption rates on total saponins of *O. caudatum* (OCTS). The optimal purification conditions were as follows: the ratio of *O. caudatum* dosage to the amount of macroporous resin did not exceed 7: 1; distilled water and 30% ethanol were used to clean the impurity, and 70% ethanol was selected to elute total saponin. Under these conditions, the purity of OCTS obtained was 55.18%. Then, the antioxidant activity of purified OCTS was studied. The IC₅₀ of OCTS on hydroxyl radical, superoxide anion radical and DPPH radical were 2.43, 2.28 and 0.05 mg/mL, respectively. It suggested that OCTS had good antioxidant activity.

Key words: *Ornithogalum caudatum*; total saponins; macroreticular resin; purification; antioxidant activity

虎眼万年青 (*Ornithogalum caudatum* Ait.) 为百合科虎眼万年青属多年生草本植物, 原产于非洲南部, 在我国北方得到广泛栽培^[1]。虎眼万年青具有清热解毒、消痰散结功效, 在民间主要用于消炎止痛、消除火毒之症^[2], 在治疗癌症, 肝纤维化等方面都有很好的疗效^[3,4]。以虎眼万年青为君药的复方

万年青胶囊用于治疗肺癌、肝癌、胃癌疗效显著。近年来对虎眼万年青的研究主要集中在抗肿瘤药效物质基础研究, 这些研究表明皂苷和多糖类物质是主要的抗肿瘤成分^[5-8]。目前报导虎眼万年青总皂苷抗肿瘤作用的文献大多以乙醇提取后的正丁醇萃取物或粗制皂苷为研究对象, 纯度不确定, 成分比较复杂。为此, 本文对虎眼万年青总皂苷的纯化工艺进行优化, 以期得到最佳的大孔树脂纯化工艺参数, 获得较高纯度的虎眼万年青总皂苷。此外, 对虎眼万年青总皂苷的抗氧化能力进行研究, 为其作为药品、保健品原药的开发提供依据。

收稿日期: 2015-10-12 接受日期: 2015-12-23

基金项目: 中国博士后科学基金(2013M321061); 黑龙江省博士后科研基金(LBH-Z11102); 黑龙江省青年科学基金(QC2011C050); 黑龙江省教育厅科技研究项目(12531155); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2015070)

* 通讯作者 Tel: 86-451-84866922; E-mail: zou8663202@163.com

1 材料与仪器

1.1 实验材料

虎眼万年青药材(购自吉林省长白朝鲜族自治县长白山中药研究所)经哈尔滨商业大学药学院张德连副教授鉴定为虎眼万年青 *Ornithogalum caudatum* Ait. 的干燥全草。

大孔吸附树脂 AB-8、D101、HPD100、H103、HPD826、NKA-9(沧州宝恩吸附材料有限公司);薯蓣皂苷对照品、Vc(天津一方科技有限公司);羟自由基测定试剂盒、超氧阴离子自由基试剂盒(南京建成生物工程研究所);DPPH(天津市致远化学试剂有限公司)。化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器

FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ5200DB 型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);BSA 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);DGH-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);N-1000 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);LD4-2A 低速离心机(北京京立离心机有限公司)等。

2 实验方法

2.1 虎眼万年青粗皂苷样品的制备

将虎眼万年青全草粉碎(20目),精确称量 250 g,采用 80% 乙醇浓度回流提取 3 次,每次 4 h,料液比为 1:20 g/mL。提取液合并过滤,减压回收乙醇至无醇味。加蒸馏水适量,经石油醚除杂,正丁醇萃取,合并醇相,干燥得到浸膏。蒸馏水复溶后定容至 250 mL 容量瓶,即得生药量为 1 g/mL,皂苷含量为 10.65%。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 2.5 mg 薯蓣皂苷标准品,置于 25 mL 容量瓶中。用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,备用。

2.3 大孔树脂预处理

取大孔树脂适量,加入 5 倍量的 95% 乙醇浸泡 24 h,装柱,用蒸馏水淋洗至流出液无醇味。然后 5% HCL 洗涤至流出液 pH 为 3 时,静置 2 h,蒸馏水冲至流出液 pH 至 7,再用 5% NaOH 洗涤至流出液 pH 至 9,静置 2 h,蒸馏水淋洗至流出液 pH 为 7,备用。

2.4 虎眼万年青总皂苷定量测定

2.4.1 薯蓣皂苷标准曲线的绘制

精密量取薯蓣皂苷对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置具塞试管中,80 °C 水浴挥干甲醇,然后分别向具塞试管内加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL,高氯酸 0.8 mL,充分摇匀后 60 °C 水浴保温 15 min,取出后立即放入冰水中冷却,加 5 mL 冰醋酸稀释,在 454 nm 处测吸光度(A)值。以对照品的质量为横坐标,以 A 值为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y = 4.3467X - 0.0116$ ($r = 0.9998$),表明薯蓣皂苷在 0.06 ~ 0.18 mg 范围内和 A 值呈良好的线性关系。

2.4.2 方法学考察

精密度实验 RSD 为 0.13% ($n = 6$),稳定性实验 RSD 为 0.14% ($n = 6$),重复性实验 RSD 为 0.77% ($n = 6$);薯蓣皂苷平均回收率为 98.42%,RSD 为 0.83% ($n = 6$)^[1]。

2.4.3 供试品总皂苷的含量测定

精密称取供试品溶液放入具塞试管中,其余步骤同“2.4.1”项下,测定吸光度,根据标准曲线计算虎眼万年青总皂苷的含量。

2.5 筛选大孔树脂型号

取预处理好的大孔吸附树脂各 15 g(M 树),置 100 mL 锥形瓶中,分别加入样品提取液各 50 mL,测定上样液中皂苷含量为 129.43 mg(M 上),放入振荡器中振荡 8 h 后,抽滤,收集滤液,测定滤液中皂苷质量(M 残)。然后将树脂装入层析柱(内径 1.5 cm、高 20 cm)中,径高比 1:9,用 3 BV 蒸馏水除杂,流速 2 BV/h,收集水液,测定皂苷质量(M 水),再用 60% 乙醇 100 mL 洗脱,流速 2 BV/h,收集洗脱液,定容于 100 mL 容量瓶中,测定皂苷质量(M 洗脱)。精密量取 50 mL 洗脱液减压回收乙醇并置浓缩液于蒸发皿中干燥恒重,其重量的 2 倍为 M 干膏。计算不同类型大孔吸附树脂对总皂苷的比吸附量(A,即单位质量的干树脂吸附的总皂苷质量)和比洗脱量(E,即单位质量的干树脂洗脱出的总皂苷质量)以及总皂苷在干膏中所占比例即干膏纯度(W 纯度),选择最优者。

$$A = (M_{上} - M_{残} - M_{水}) / M_{树} = M_{吸} / M_{树}$$

$$E = M_{洗脱} / M_{树}$$

$$\text{吸附率} = M_{吸} / M_{上}$$

$$\text{解吸率} = M_{洗脱} / M_{吸}$$

2.6 优化大孔吸附树脂纯化虎眼万年青总皂苷的工艺

2.6.1 药材量与树脂用量比例考察

首先绘制泄露曲线。取筛选好型号的大孔树脂约 15 g 装入层析柱中,另取样品提取液 100 mL 上样,流速 2 BV/h,每 10 mL 收集 1 份,共收集 10 份,测定每管的皂苷含量,以皂苷质量为纵坐标,上样药液体积为横坐标绘制泄露曲线。

取 4 根相同型号的层析柱,用大孔树脂约 15 g 装柱。根据泄露体积分别选取其附近 4 个不同体积上样,计算药材量与树脂用量比,流速均为 2 BV/h。上样后分别用 3 倍量蒸馏水洗脱,收集水洗液。检测水洗液中总皂苷的含量,计算总皂苷的泄露量和泄露率,得出最佳药材量与树脂用量比例。

2.6.2 洗脱剂浓度考察

取 4 根层析柱装柱,用大孔树脂 15 g 装柱,上样量为 15 mL,流速 2 BV/h。吸附 12 h 后先用 3 BV 蒸馏水除杂,再分别用 5 BV 10%、20%、30% 和 40% 乙醇溶液洗脱,流速 2 BV/h,收集洗脱液,测定各洗脱液中皂苷含量和干膏质量,计算皂苷纯度,确定适宜的乙醇除杂浓度。另取 4 根层析柱,用大孔树脂 15 g 装柱,上样量为 15 mL,流速 2 BV/h。吸附 12 h 后用 5 BV 蒸馏水和已确定的低浓度乙醇除杂,再分别用 60%、70%、80% 和 95% 乙醇进行洗脱,流速 2 BV/h,收集洗脱液,回收乙醇,测定各洗脱液中皂苷含量和干膏质量,计算皂苷纯度,确定乙醇洗脱浓度。

2.6.3 验证试验

采用筛选的最佳型号的大孔树脂对虎眼万年青粗皂苷样品按照上述最优条件进行纯化,测定树脂纯化前、后的皂苷的含量。

2.7 虎眼万年青总皂苷抗氧化活性研究

2.7.1 清除羟自由基、超氧阴离子自由基活性研究

虎眼万年青总皂苷分别配置成不同浓度的样液,参照羟基自由基、超氧阴离子自由基试剂盒所标明的操作方法进行实验。按式(1)计算样品对羟自由基、超氧阴离子自由基的抑制率。以 Vc 为阳性对照。

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中, A₀ 是对照管吸光度; A_s 是测定管吸光度。

2.7.2 清除 DPPH 自由基活性研究

虎眼万年青总皂苷分别配置成不同浓度的样液。取样品溶液 2 mL,加入 DPPH 乙醇溶液(0.025 mg/mL)2 mL,混匀后静置 30 min,用紫外可见分光光度计于 517 nm 处测定其吸光度值(A_s);取样品溶液 2 mL,加入蒸馏水 2 mL,测定其吸光度值(A_r);取 DPPH 乙醇溶液 2 mL,加入蒸馏水 2 mL,测定其吸光度值(A₀)。按式(2)计算样品对 DPPH 的抑制率。以 Vc 为阳性对照^[9-10]。

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - (A_s - A_r) / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

3 实验结果

3.1 优化大孔吸附树脂纯化虎眼万年青总皂苷的实验结果

3.1.1 大孔吸附树脂型号筛选结果

通过对 6 种不同型号的大孔吸附树脂进行筛选,实验结果如表 1。各种树脂对虎眼万年青总皂苷均表现出良好的吸附性,其中 AB-8 型树脂对皂苷的吸附率和解析率最高,因此选择 AB-8 树脂作为纯化虎眼万年青总皂苷的树脂,进行深入研究。

3.1.2 泄露曲线

实验结果如图 1,以皂苷泄露量为纵坐标,以上

表 1 不同型号大孔吸附树脂筛选结果

Table 1 Screening results of different types of macroporous adsorption resins

	A (mg)	E (mg)	吸附率 Adsorption rate (%)	解析率 Desorption rate (%)
AB-8	6.47	6.15	74.22	95.02
D101	5.38	4.91	62.32	91.33
HPD100	6.18	5.16	71.64	83.47
H103	6.06	5.62	70.21	92.71
HPD826	5.62	5.21	65.08	92.81
NKA-9	5.59	5.04	64.81	90.15

样药液体积为横坐标绘制泄漏曲线,结果见图1。上样70 mL后开始明显泄露,至上样90 mL时,树脂达吸附饱和而完全泄露。

3.1.3 药材量与树脂用量比例考察结果

根据泄露体积选择上样量65、70、75和80 mL,即药材量与树脂用量比分别为7:1、7.6:1、8.2:1、8.7:1。结果如表2,可见药材量与树脂用量比7.6:1、8.2:1、8.7:1时皂苷损失较大,因此药材量与树脂用量比应不超过7:1。

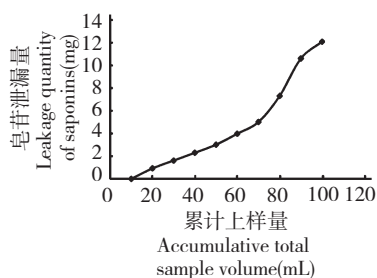


图1 虎眼万年青总皂苷泄露曲线

Fig. 1 Leakage curve of *O. caudatum* total saponin

表2 药材量与树脂用量比例考察

Table 2 Proportion of medicinal materials and resins

药材量:树脂量 Medicinal material: resin content (g: g)	上样体积 Sample volume (mL)	皂苷质量 Saponins quantity (mg)	泄漏量 Leakage quantity (mg)	泄漏率 Leakage rate (%)
7.0:1	65	106.41	7.95	7.47
7.6:1	70	114.6	16.09	14.07
8.2:1	75	122.78	25.96	21.15
8.7:1	80	130.97	35.12	26.88

3.1.4 洗脱剂浓度考察

乙醇除杂浓度选择结果见表3,乙醇30%浓度以下洗脱下来的干膏质量较低杂质较多,40%乙醇洗脱的皂苷质量明显增加,因此选择30%乙醇为除

杂浓度。乙醇洗脱浓度选择结果见表3。经蒸馏水和30%乙醇除杂后,70%乙醇洗脱下来的总皂苷纯度最高,因此确定最佳洗脱溶剂为70%乙醇。

表3 乙醇除杂和洗脱浓度选择

Table 3 Selection of ethanol concentration for removing impurities and elution

乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	皂苷质 Saponins quantity (mg)	干膏质量 Dry paste quantity (g)	干膏纯度 Dry extract purity (%)
10%	5.40	0.03	20.78
20%	10.36	0.05	19.11
30%	15.71	0.08	19.31
40%	20.25	0.10	20.23
60%	21.32	0.07	25.36
70%	39.25	0.07	54.98
80%	41.01	0.08	48.77
95%	42.15	0.09	46.78

3.2 验证实验

按最佳工艺条件进行验证,选用AB8型大孔树脂,上样液浓度1 g/mL,上样量15 mL,吸附12 h后用5 BV蒸馏水和30%乙醇除杂,6~8 BV 70%乙醇洗脱,经纯化虎眼万年青总皂苷的纯度由10.65%提高到55.18%。

3.3 虎眼万年青总皂苷抗氧化活性结果

虎眼万年青总皂苷对自由基的清除能力如图2~4所示。虎眼万年青总皂苷能显著抑制羟自由基、超氧自由基阴离子、DPPH自由基的产生,IC₅₀分别为2.43、2.28、0.05 mg/mL。

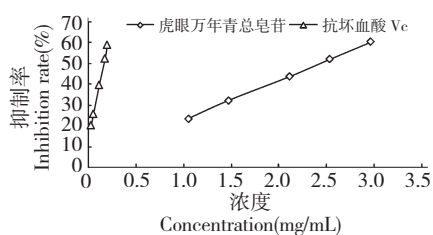


图2 虎眼万年青总皂苷和 Vc 对羟自由基的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of *O. caudatum* saponins and Vc on hydroxyl radical

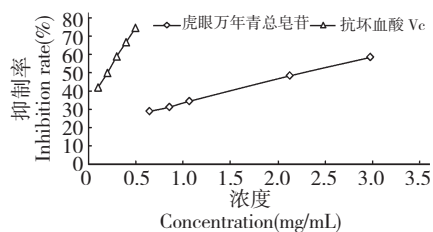


图3 虎眼万年青总皂苷和 Vc 对超氧自由基阴离子的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of *O. caudatum* saponins and Vc on superoxide radical anion

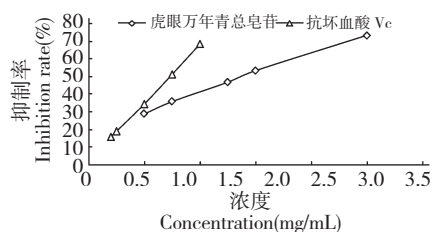


图4 虎眼万年青总皂苷和 Vc 对 DPPH 自由基的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effects of *O. caudatum* saponins and Vc on DPPH free radical

4 结论

AB-8 型大孔树脂是一种比较理想的纯化虎眼万年青总皂苷的树脂,最佳工艺条件:径高比 1:9,药材量与树脂用量比不超过 7:1,5 BV 蒸馏水和 30% 乙醇除杂,流速 2 BV/h,6~8 BV70% 乙醇洗脱皂苷,流速 2 BV/h,最终优选工艺得到的虎眼万年青总皂苷纯度为 55.18%。体外实验表明虎眼万年青总皂苷对羟自由基、超氧自由基阴离子、DPPH 自

由基的 IC_{50} 分别为 2.43、2.28、0.05 mg/mL,具有较好的抗氧化活性。本研究为虎眼万年青中皂苷类成分的分离纯化奠定了基础,也为虎眼万年青总皂苷有效部位的开发应用提供科学依据。

参考文献

- Zou X(邹翔), Lin L(林淋), Qu ZY(曲中原), et al. Extraction process of total saponins from *Ornithogalum caudatum*. *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2014, 27: 322-325.
- Tang YP, Yu B, Hu J, et al. The chemical constituents from the bulbs of *Ornithogalum caudatum*. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10: 169-171.
- Shi L, Li J, Liu WX, et al. Chemical characteristic of bioactive polysaccharides isolated from *Ornithogalum caudatum* Ait. *Chem Res Chin Univ*, 2003, 19: 286-289.
- Zhang Y(张瑜), He YF(赫玉芳), Nan ML(南敏伦), et al. Research progress of *Ornithogalum caudatum*. *Central South Pharm*, 2010, 4: 293-295.
- Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 955-963.
- Liu X(刘旭), Zhang YH(章永红). Effect of *Ornithogalum caudatum* ait saponins on apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells and its mechanism. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2012, 2: 121-124.
- Chen RZ, Meng FL, Liu ZQ, et al. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalum caudatum* Ait. *Carbohydr Polym*, 2010, 80: 845-851.
- Chen RZ(陈瑞战), Li SZ(李世哲), Liu ZQ(刘志强), et al. Purification and antitumor activities of polysaccharide from *Ornithogalum caudatum* ait. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2011, 21: 1630-1634.
- Cai Y(蔡艳), Li Y(李元), Dong H(董航), et al. Optimization of *Ornithogalum caudatum* polysaccharide extraction and antioxidant activity evaluation of orthogonal experiment. *J Changchun Normal Univ* (长春师范学院学报), 2012, 31(3): 75-80.
- Huang Z(黄增), Liu XM(刘雄民), Huang LK(黄丽葵), et al. Extraction, separation and antioxidant activity of saponins from *Eucalyptus grandis* xE. *Urophylla*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1113-1117.