

引用:但林蔚,高天慧,张东东,等.竹根七总皂苷的提取纯化工艺及抗炎活性研究[J].陕西中医药大学学报,2024,47(3):34-42.

竹根七总皂苷的提取纯化工艺 及抗炎活性研究*

但林蔚¹ 高天慧¹ 张东东^{1,2} 黄文丽^{1,2} 姜祎^{1,2} 王海芳³

宋小妹^{1,2} 王薇^{1,2} 李玉泽^{1,2**}

(1.陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;

2.陕西省太白七药研究与应用重点研究室,陕西 咸阳 712046;

3.陕西中医药大学陕西省中西医结合心血管病防治重点实验室,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 对提取与纯化竹根七中总皂苷的工艺条件进行优化与提升,初步探索验证其抗炎活性。方法 以总皂苷含量为评价指标,采用正交实验设计,通过回流提取法考察提取温度、时间、溶剂浓度及料液比对总皂苷含量的影响,进行统计分析;利用大孔树脂的吸附纯化作用,探究吸附和解吸附过程中不同条件对总皂苷纯度的影响,分析得出最佳纯化工艺;以 RAW264.7 细胞上清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平为指标,通过 CCK-8 法筛选最佳给药浓度及 ELISA 试剂盒检测细胞上清炎症因子水平,考察竹根七总皂苷抗炎活性。结果 最优回流提取工艺为乙醇浓度 70%,料液比 1:40,温度 80 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 30 min,竹根七总皂苷最终得率为 9.74%;在最优提取方法下,探究竹根七皂苷纯化富集工艺,选用 D101 大孔树脂,当上样量为 1 BV,吸附时间 12 h,洗脱剂为 50%乙醇-水,洗脱体积 5 BV 时,纯化后总皂苷纯度达到 70% 以上,由此得出其最佳纯化工艺;纯化后的总皂苷对 RAW264.7 细胞炎症具有抑制作用,其最低质量浓度为 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 本实验所得工艺能较好的富集竹根七总皂苷,该方法简单易行稳定可靠;所得竹根七皂苷具有较好的抗炎活性。

关键词:竹根七;总皂苷;提取工艺;纯化工艺;RAW264.7 细胞

中图分类号:R284.2;R285.5

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)03-0034-09

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.03.004

竹根七别名开口箭、竹节七,为百合科开口箭属植物开口箭 *Rohdea chinensis* (Baker) N.Tanaka 的根及根茎,是“太白七药”之一。主产于陕西(秦岭以南)、湖北、湖南、河南、四川、云南等省份。味辛、苦,性寒,有清热解毒、散瘀止痛、祛风除湿之功效,主治风湿痹痛、咽喉疼痛等症^[1]。竹根七主要含有甾体皂苷类^[2]、黄酮类、多糖和挥发油^[3-4]等化学成分,其中甾体皂苷主要有 Tupistroside E、Digitoxigenin、Ranmogenin A、Aspidoside A 和 Tupichinin A 等^[5-6];黄酮类主要有香豌豆酚、tupichinol A、(+)-儿茶素、tupichinol B 和 tupichinol C 等。现代药理学研究发现竹根七中的皂苷类成分是其主要活性成分,具有抗炎^[7-10]、抗肿瘤^[11-14]、抗动脉

粥样硬化^[15]等作用。本研究旨在优化竹根七总皂苷的提取和纯化工艺,并进行初步抗炎活性筛选,为秦巴山区竹根七开发与利用提供依据^[16-17]。

1 材料

1.1 仪器及试剂 竹根七购自眉县天源中草药开发有限公司,经陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为百合科开口箭属植物开口箭 *Rohdea chinensis* (Baker) N.Tanaka 的干燥根及根茎。本实验所用试剂为分析纯;对照品 1 β , 2 β , 3 β , 4 β , 5 β , 7 α -hexahydroxy-spirost-25(27)-ene-6-one 为实验室课题组前期分离得到^[5],经检验纯度 > 98%,符合要求。

* 基金项目:陕西省教育厅课题(22JK0344);陕西中医药大学校级课题(2021GP27);陕西中医药大学创新团队项目(2023-CXTD-05)

** 通讯作者:李玉泽,讲师。E-mail:lyz1990yeah@163.com

表1 仪器及试剂

名称	厂家
UV-2102C 型紫外-可见分光光度计	尤尼柯仪器有限公司
GB204 型电子天平(0.0001 g)	瑞士梅特勒-托利多公司
HH-2 型恒温水浴锅	北京科伟永兴仪器有限公司
BBS-DSC 型超净工作台	济南鑫贝西公司
CLM-170B-8-NF 型 CO ₂ 细胞培养箱	新加坡 ESCO 科技有限公司
血球计数板	上海求精生化公司
细胞培养皿 10 cm 皿	依科生物公司
细胞培养板 6、24、96 孔板	依科生物公司
D101 型大孔树脂	上海蓝季科技发展有限公司
AB-8 型大孔树脂	上海蓝季科技发展有限公司
HP20 型大孔树脂	上海蓝季科技发展有限公司
DM130 型大孔树脂	上海蓝季科技发展有限公司
LSA10 型大孔树脂	上海蓝季科技发展有限公司
高氯酸	天津市科密欧化学试剂有限公司
醋酸	天津市科密欧化学试剂有限公司
正丁醇	天津市科密欧化学试剂有限公司
乙醇	天津市科密欧化学试剂有限公司
胎牛血清	依赛科公司
RPMI-1640 培养基(批号:25200056)	美国 Hyclone 公司
青链霉素混合液(100×)	北京 Solarbio 公司
LPS(批号:DY40109)	Sigma 公司
胰酶消化液	Gbico 公司
Mouse IL-1β ELISA Kit	武汉博士德生物工程有限公司
Mouse IL-6 ELISA Kit	武汉博士德生物工程有限公司
Mouse TNF-α ELISA Kit	武汉博士德生物工程有限公司
超纯水	-
竹根七药材	眉县天源中草药开发有限公司
1β, 2β, 3β, 4β, 5β, 7α-hexahydroxy-spirost-25(27)-ene-6-one	本课题组自制 ^[5]

1.2 细胞 RAW264.7 细胞由陕西中医药大学中西医结合心血管实验室提供。

2 实验方法与结果

2.1 竹根七总皂苷含量测定方法建立

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取化合物 1β, 2β, 3β, 4β, 5β, 7α-hexahydroxy-spirost-25(27)-ene-6-one 4.80 mg, 用 CH₃OH 溶解并定容于 5 mL 棕色容量瓶中, 对照品溶液浓度为 0.96 mg·mL⁻¹, 摇匀后 4 ℃ 冰箱保存。

2.1.2 供试品溶液制备 称取竹根七干燥粗粉 5.0 g, 在 70 ℃, 料液比 1:20 的条件下, 按回流提

取的方法用 60% 乙醇提取 30 min, 回收溶剂得残留物, 用 50 mL 水将其溶解, 再加入水饱和正丁醇萃取 3 次, 每次加入萃取剂 40 mL。正丁醇层合并, 回收溶剂得残留物, 残留物使用甲醇溶解后转移至 25 mL 棕色容量瓶并定容。定容后, 吸取 1 mL 滤液至 10 mL 棕色容量瓶中并使用 CH₃OH 定容至刻度, 混匀即得。

2.1.3 测定波长选择 将上述制备好的对照品和供试品溶液分别吸取 200 μL, 转移至 10 mL 具塞试管中, 待溶剂挥干后, 吸取 5% 香草醛-冰醋酸溶液 200 μL 和 HClO₄ 800 μL 加入其中, 密塞混匀后, 将其放置于水浴锅中 60 ℃ 恒温水浴 15 min, 等待测样品的温度降至室温后加入 5 mL 冰 CH₃COOH 混匀。以 200 μL 甲醇作为空白试剂于 10 mL 具塞试管中, 进行相同制样操作, 扫描范围为 200~800 nm, 发现 460 nm 为其最大吸收波长, 所以将测定波长确定为 460 nm。

2.1.4 标准曲线线性考察 按 0.05 mL 间隔, 梯度吸取对照品溶液 0.10 至 0.45 mL, 转移至 8 个 10 mL 具塞试管中, 按“2.1.2”项下方法制备样品, 按“2.1.3”项下方法显色后在 460 nm 处测定其吸光度。将横坐标(X) (mg) 设置为对照品加样量, 纵坐标(Y) 设置为吸光度值, 绘制标准曲线。根据图 1 可知, 其回归方程为 Y=2.0065X-0.022, 其 r=0.9995 表明数据拟合度较高, 对照品加样量(X) 与吸光度值(Y) 在 0.096 ≤ X ≤ 0.4410 时线性关系良好, 可靠性高, 可用于后续数据计算。

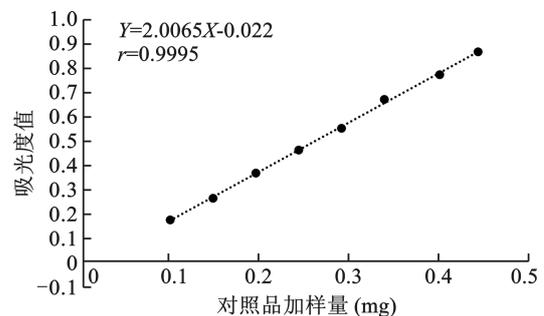


图1 标准曲线

2.1.5 方法学考察

2.1.5.1 精密度考察 精密量取对照品溶液 0.2 mL 于 10 mL 具塞试管, 显色后测定吸光度, 连续测定 6 次吸光度, 由结果计算 RSD 为 0.04%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5.2 稳定性考察 取同一供试品溶液,显色后分别于 0 h 至 3 h 内每 30 min 测定吸光度,由结果计算 RSD 为 0.14%,表明供试样品溶液在 3 h 内稳定。

2.1.5.3 重复性考察 分别称取同一批次药材 6 份,制备方法同上,显色后测定吸光度,结果显示 RSD 为 1.14%,表明此方法重复性良好。

2.1.5.4 加样回收考察 取已知含量的药材粗粉 6 份,制备方法同上,分别精密加入对照品适量,制样方法与显色方法同上,测定吸光度,计算平均回收率为 101.57%,RSD 值为 1.34%。

2.2 竹根七提取工艺优化

2.2.1 单因素考察

2.2.1.1 溶剂浓度考察 取竹根七药材干燥粉末约 5.0 g,精密称定,回流提取,溶剂按乙醇浓度每增加 10% 梯度设置,从 60%~100% 共 5 个平行组,其余条件按“2.1.2”项下方法制备。根据图 2 可知,结果显示 60%~80% 乙醇浓度范围内变化斜率最大,故选择 60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇为后续正交试验提取溶剂浓度水平。

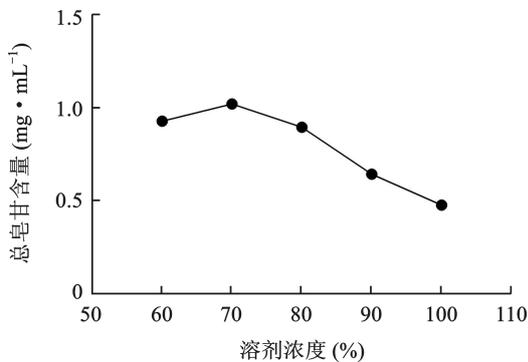


图 2 溶剂浓度影响

2.2.1.2 提取温度考察 取竹根七药材干燥粉末约 5.0 g,精密称定,回流提取,温度以每隔 10 °C 梯度设置,从 50 °C~90 °C 共 5 个平行组,其余条件按“2.1.2”项下方法制备。根据图 3 可知,结果显示 70 °C~90 °C 范围内变化斜率最大,故选择 70 °C、80 °C、90 °C 为后续正交试验提取温度水平。

2.2.1.3 提取时间考察 取竹根七药材干燥粉末约 5.0 g,精密称定,回流提取,以 60% 乙醇为溶剂,时长按间隔 30 min 梯度设置,从 30 min~120 min 共 4 个平行组,其余条件按“2.1.2”项下方法制备。根据图 4 可知,结果显示 30~90 min 范围

内变化斜率最大,故选择 30、60、90 min 为后续正交试验提取时间水平。

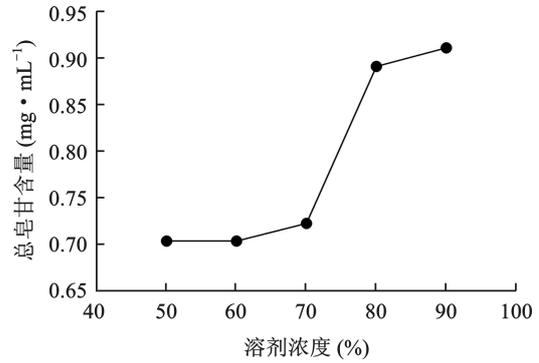


图 3 提取温度影响

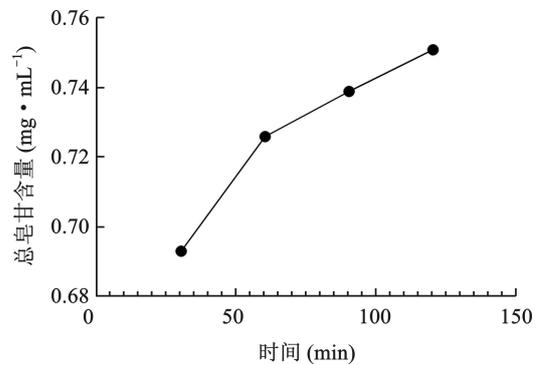


图 4 提取时间影响

2.2.1.4 料液比考察 取竹根七药材干燥粉末约 5.0 g,精密称定,回流提取,料液比按每增加 10 倍溶剂量梯度设置,从 1:10~1:50 共 5 个平行组,其余条件按“2.1.2”项下方法制备。根据图 5 可知,结果显示 1:20 至 1:40 范围内变化斜率最大,故选择 1:20、1:30、1:40 为提取总皂苷时料液比水平。

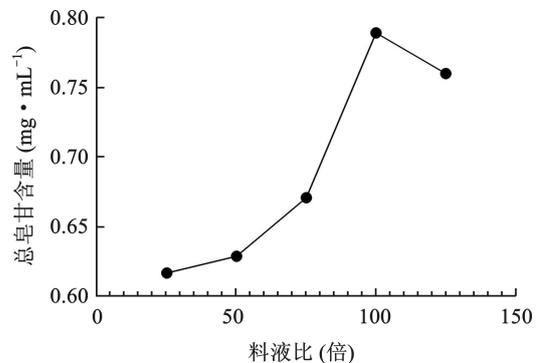


图 5 料液比影响

2.2.2 正交试验设计 根据单因素试验结果及相关参考文献^[3],共设置 4 个影响因素(见表 2),分别为溶剂浓度(A)、提取温度(B)、料液比(C)及

提取时间(D),将总皂苷的含量设定为评价指标,开展正交实验。最终计算总皂苷提取率并分析结果,根据表3中极差R的大小可以得出,不同因素影响皂苷得率的大小顺序为溶剂浓度最大,提取时间次之,提取温度再次之,料液比最小,不同水平下各因素的影响情况为A2、B2、C3、D1的影响程度最大。故可分析得出最佳提取工艺为,70%乙

醇回流提取,温度为80℃,料液比1:40,提取时间30 min。

表2 因素水平表

水平	A (%)	B (°C)	C (倍)	D (min)
1	60	70	1:20	30
2	70	80	1:30	60
3	80	90	1:40	90

表3 正交试验设计结果

序号	溶剂浓度 (%)	提取温度 (°C)	料液比 (倍)	提取时间 (min)	总皂苷得率 (%)
1	1	1	1	1	5.90
2	1	2	2	2	6.48
3	1	3	3	3	8.23
4	2	1	2	3	8.28
5	2	2	3	1	9.81
6	2	3	1	2	6.57
7	3	1	3	2	5.45
8	3	2	1	3	6.55
9	3	3	2	1	7.45
K1	6.870	6.543	6.340	7.720	
K2	8.220	7.613	7.403	6.167	
K3	6.483	7.417	7.830	7.687	
R	1.737	1.070	1.490	1.553	

2.2.3 验证试验 分别按正交试验得出的最佳提取工艺进行3次提取,根据“2.1.2”“2.1.3”项下方法制备供试品溶液并使用显色剂显色,测定吸光度后通过标准曲线计算可得到3次提取率分别为9.82%、9.77%、9.65%,平均值为9.74%,经分析3次结果变化不大,在统计范围内较为一致,说明该提取工艺下,竹根七皂苷的得率较为稳定,可以将其作为最佳提取工艺。

2.3 竹根七总皂苷纯化工艺研究

2.3.1 大孔树脂预处理 适量选取数种不同型号的大孔树脂置于容器中,使用无水乙醇浸泡使其溶胀,充分洗涤至清液无白色浑浊后装至柱中,取大量纯水冲洗树脂直至流出物醇味消失后备用。

2.3.2 提取液制备 称取竹根七药材粉末20 g,按照实验所得最佳工艺回流提取,提取液经过减压浓缩,测定生药质量浓度为0.4 g·mL⁻¹总皂苷含

量为41.6 mg·mL⁻¹即为竹根七提取液。

2.3.3 大孔树脂筛选

2.3.3.1 静态吸附试验 将上述预处理好的大孔树脂(型号分别为:DM130、LSA-10、D101、AB-8、HP-20)每种各量取10 g,转移至具塞的100 mL锥形瓶内,再分别量取“2.3.2”项下提取液20 mL加入其中,在室温条件下充分振摇4 h后再静置20 h使其吸附达到饱和。吸附完成后,将树脂液过滤,吸取1 mL上清液加入10 mL棕色容量瓶中并缓慢加入无水乙醇至容量瓶刻度线定容,振摇使其充分混匀。从中取0.2 mL按“2.3.2”项下方法显色完成后测量吸光度,计算各型号树脂对竹根七总皂苷的静态吸附率,公式如下:

$$\text{吸附率 } A(\%) = (C_0V_0 - C_1V_1) / C_0V_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{解吸率 } B(\%) = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{解吸附效果} = B/A \quad (3)$$

C_0 为吸附液初始浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), V_0 为吸附液体积(mL), C_1 为滤液1浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), V_1 为滤液1体积(mL), C_2 为洗脱液浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), V_2 为洗脱液体积(mL)。

2.3.3.2 静态解吸附试验 过滤“2.3.3.1”项下吸附饱和的大孔树脂,使用足量蒸馏水反复洗涤直至洗脱液澄清无色后转移至具塞锥形瓶内,取80 mL 95%乙醇加入其中,在室温条件下充分振摇4 h后放置20 h,将大孔树脂再次过滤干净,然后往10 mL容量瓶中吸取1.0 mL滤液,缓慢加入适量无水乙醇至刻度线定容,密塞混匀。吸取200 μL 样品溶液转移至具塞试管中,按“2.3.2”项下方法显色完成后测量吸光度,并按照公式2计算静态解吸附率,按公式3计算解吸附效果。

表4 各型号树脂竹根七皂苷的静态吸附率、解吸率考察

树脂型号	吸附率(%)	解吸率(%)	解吸附效果(%)
DM130	80.4	55.9	69.6
LSA-10	80.6	61.5	76.3
AB-8	80.3	60.3	75.2
HP-20	80.4	50.7	63.1
D101	79.7	63.6	80.4

2.3.4 上样浓度考察 取预处理完毕的大孔树脂10 g进行湿法装柱。当上样浓度大于 $41.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时样品溶液达到饱和,故选择4种浓度(41.6、20.8、10.4、5.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品溶液,以流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 体积1 BV的条件上样,吸附24 h后,纯水冲洗1 BV,收集流出液,测定其总皂苷吸光度值,计算吸附率。根据图6与表5结果表明,随着上样浓度增大,流出液吸光度降低,吸附率增大,当溶液达到饱和时($41.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),吸附率最大。故选择上样浓度为 $41.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表5 上样浓度考察结果

上样浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5.2	10.4	20.8	41.6
流出液吸光度	0.6609	0.5518	0.3892	0.1908
吸附率(%)	89.92	90.21	93.16	95.92

2.3.5 上样量考察 取预处理完毕的大孔树脂10 g进行湿法装柱。再取120 mL竹根七提取液,

以流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 上样,按每份10 mL收集12个流份。按“2.3.2”项下方法显色后,测定其总皂苷吸光度值并使其结果均在标曲范围内,计算各流份总皂苷浓度,将纵坐标设置为总皂苷含量,横坐标设置为流出液体积,制作泄露曲线。根据图7可知,总皂苷在第3份时开始明显泄露,故确定最大上样量为20 mL。

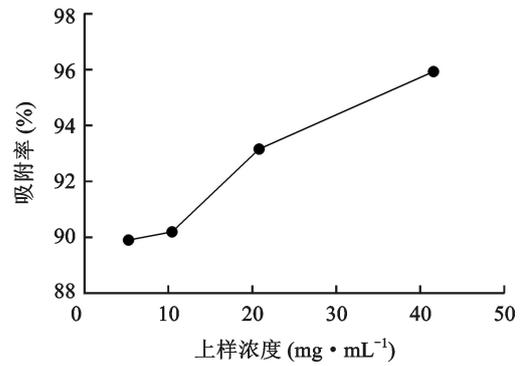


图6 上样浓度考察

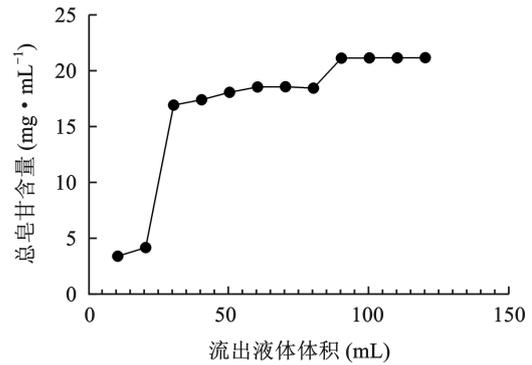


图7 上样量考察

2.3.6 洗脱溶剂浓度考察 称取预处理完毕的大孔树脂10 g,共10份分别进行湿法装柱,平行3份。再取20 mL提取液,按照流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件上样,等候过夜(12 h)使其充分吸附,再用蒸馏水洗脱柱内大孔树脂至流出液澄清无色,按照40 mL(2 BV)的体积, $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速条件用表6中不同浓度的乙醇进行洗脱,以每份40 mL收集洗脱液,显色后于460 nm测吸光度并使其结果均在标曲范围内,得出各流份总皂苷含量并计算解吸率。将纵坐标设置为总皂苷含量,横坐标设置为洗脱剂浓度,绘制曲线。由图8及表6可得,当洗脱剂浓度为50%乙醇时总皂苷含量最高,解吸率为73.8%,故用乙醇洗脱时最佳浓度为50%。

表6 洗脱溶剂浓度考察结果

考察项目	洗脱剂乙醇浓度									
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	无水乙醇
吸光度	0.0852	0.2637	0.6144	0.8190	0.8808	0.6237	0.2892	0.2187	0.1236	0.0693
总皂苷含量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.19	2.68	5.59	7.29	7.80	5.67	2.89	2.30	1.51	1.06

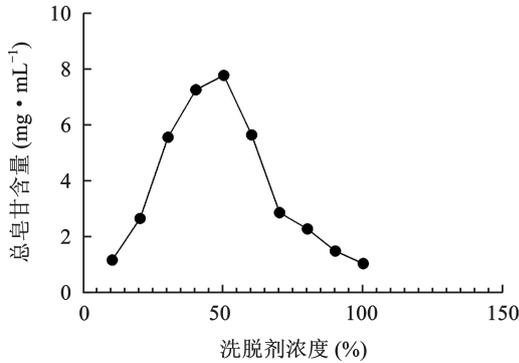


图8 洗脱溶剂浓度考察

2.3.7 洗脱体积考察 称取预处理完毕的大孔树脂 10 g 进行湿法装柱, 平行 3 份。再取 20 mL 提取液以流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件上样, 再用蒸馏水洗脱柱内大孔树脂至流出液澄清无色, 洗脱溶剂浓度定为 50% 乙醇, 按每份 10 mL 收集 15 份洗脱液。显色后于 460 nm 测吸光度并使其结果均在标曲范围内, 设置横坐标为流出液体积, 纵坐标为总皂苷含量, 绘制曲线。根据图 9 可知, 当洗脱剂用量为 100 mL (5 BV) 时, 可以将总皂苷洗脱完全, 故选用 5 BV 为洗脱剂用量。

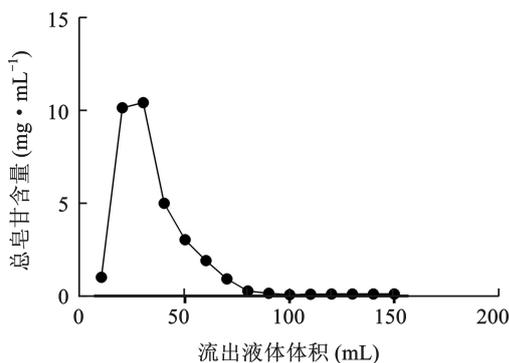


图9 洗脱体积考察

2.3.8 吸附时间考察 取预处理完毕的大孔树脂 10 g 进行湿法装柱。取 20 mL 提取液以流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件上样, 上样后分别吸附 3 h、6 h、12 h、24 h 后至蒸馏水洗出液无色, 按“2.3.6 和 2.3.7”项下所得洗脱剂浓度和体积进行洗脱,

收集洗脱液, 显色后于 460 nm 测吸光度并使其结果均在标曲范围内, 得出各流份总皂苷含量并计算解吸率。设置纵坐标为解吸率, 横坐标为时间, 绘制曲线。由图 10 与表 7 可知, 吸附 12 h 时解吸率为 79.61%, 吸附 24 h 时解吸率为 80.87%, 吸附时间翻倍解吸率仅提高了 1.1%, 故最终选择吸附时间为 12 h。

表7 不同吸附时间考察

吸附时间(h)	3	6	12	24
解吸率(%)	57.78	73.91	79.61	80.87

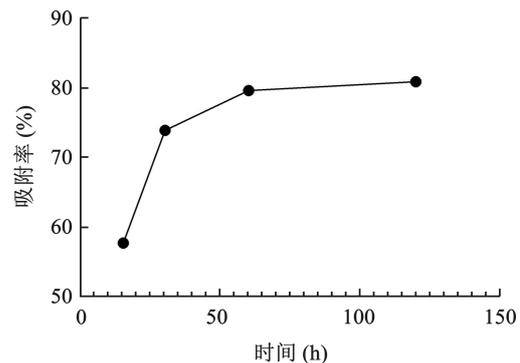


图10 吸附时间考察

2.3.9 验证试验 使用 3 根相同的大孔树脂柱按照上述所得最佳洗脱条件进行验证实验, 计算树脂解吸率(%), 竹根七总皂苷解吸率分别为 82.83%、80.19%、81.62%, 均值为 81.55%, 3 次结果比较一致, 表明此工艺条件稳定可行。

使用 3 根相同的 D101 大孔吸附树脂柱按照上述最佳纯化工艺进行总皂苷纯化实验, 浓缩洗脱液干燥恒重后得到纯化后的样品, 并称量其重量。再量取 10 mL 浓度为 $0.4 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (生药量) 的纯化前样品液同法处理, 得到干燥样品, 于 25 mL 容量瓶中溶解定容, 吸取 1 mL 稀释 10 倍后显色测定并计算总皂苷的含量, 最终可得样品纯化前后的纯度。由表 8 可得, 纯化后样品纯度提高明显, 按本实验所得最佳纯化工艺进行纯化效果显著。

表 8 纯度测定结果

实验号	纯化前纯度(%)	纯化后纯度(%)
1	9.82	72.00
2	9.65	73.29
3	9.77	72.88
平均纯度(%)	9.74	72.72

2.4 竹根七总皂苷抗炎活性研究

2.4.1 样品制备 按上述提取纯化方法所得竹根七总皂苷(ZGQ),以无菌 PBS 震荡溶解,配置成浓度为 100 mg·mL⁻¹的药液。

细胞实验时需将总皂苷用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 1640 培养液稀释成不同的质量浓度。

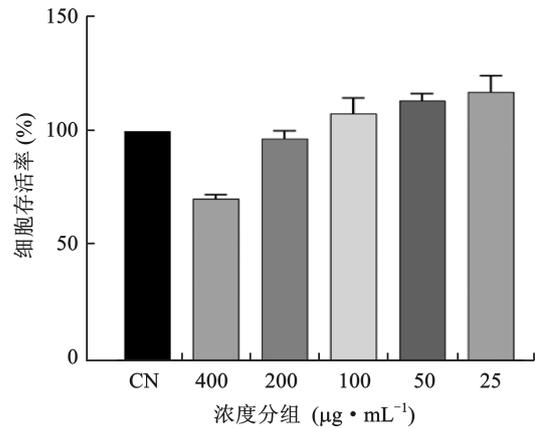
2.4.2 CCK-8 法测定竹根七总皂苷最佳给药浓度

使用胰酶消化细胞,使用细胞计数板将 10 μL 细胞悬液计数,并将细胞悬液密度调整至 2.5×10⁴ mL,于 96 孔板中接种细胞 100 μL 每孔,四周一圈加入无菌 1×PBS,孵育箱中培养 12 h 后,替换为含不同浓度(20 μg·mL⁻¹,50 μg·mL⁻¹,100 μg·mL⁻¹,200 μg·mL⁻¹,400 μg·mL⁻¹)竹根七皂苷的完全培养基 200 μL,各组(包含阴性对照组与空白培养基组)设定 5 个复孔,培养 24 h,替换含有 CCK-8 反应液的培养液 100 μL(培养液与 CCK-8 试剂的比例为 10:1),避光孵育 1 h,使用酶标仪在 450 nm 下测定 OD 值。以试剂盒说明书中公式 4 计算细胞存活率,根据图 11 可知 CCK-8 试验结果,RAW264.7 细胞存活率随竹根七皂苷浓度升高而降低;当其浓度为 400 μg·mL⁻¹时,细胞存活率约为

78%,可明显于显微镜下观察到细胞死亡后产生的漂浮碎片,当其浓度小于 200 μg·mL⁻¹时,细胞存活率均大于 100%,显微镜下未观察到细胞形态发生变化,对比 CN 组无显著性差异。

$$\text{细胞存活率} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\% \quad (4)$$

As:实验孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 溶液和药物溶液);Ac:对照孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 溶液,不含药物);Ab:空白孔吸光度(含培养基、CCK-8 溶液,不含细胞、药物)。



注:CN 为空白对照组;400~25 μg·mL⁻¹为竹根七总皂苷浓度

图 11 竹根七总皂苷最佳给药浓度筛选

2.4.3 ELISA 法检测竹根七皂苷对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量的影响

前处理:收集各组细胞上清液,6000 rpm·min⁻¹,15 min(4℃条件下),取上清液。按表 9 内步骤操作,使用 ELISA 试剂盒检测 RAW264.7 细胞上清液中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的水平。

表 9 ELISA 试剂盒操作步骤

序号	内容
①	1 mL 样品稀释液加入标准品管内,静置 10 min,各配置标准品浓度为 500 pg·mL ⁻¹ →15.6 pg·mL ⁻¹ ,500 pg·mL ⁻¹ →15.6 pg·mL ⁻¹ ,400 pg·mL ⁻¹ →12.5 pg·mL ⁻¹ 。加入细胞上清于无菌无酶离心管,以样品稀释液稀释。
②	3 组标准品和稀释后的样品加入酶标板各 100 μL/孔,空白孔只加入稀释后的样品。封板后,37℃反应 90 min。
③	甩去酶标板内液体,吸水纸上拍干。加入 IL-1β、IL-6、TNF-α 抗体工作液各 100 μL/孔。封板膜封板,37℃反应 60 min。
④	用 1X 洗涤液冲洗 3 次,1 min/次。
⑤	加入预热好的 ABC 工作液各 100 μL/孔,封板膜封板,37℃反应 30 min。
⑥	1X 洗涤液洗涤 5 次,2 min/次。
⑦	加入预热好的 TMB 显色液,37℃避光反应 15~20 min。
⑧	加入终止液各 100 μL/孔,在 450 nm 下测定 OD 值。

通过进一步检测 LPS 诱导、不同浓度竹根七皂苷预处理的 RAW264.7 细胞炎症因子的产生及

表达水平。根据图 12 可知,与空白组相比,LPS 组可显著升高 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平(P<0.05);其

中竹根七皂苷中剂量($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组在4 h时,高剂量($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组在4 h和24 h时均可显著降低IL- 1β 水平($P < 0.05$);竹根七皂苷低剂量($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组在24 h时,中剂量($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组在4 h和24 h时,高剂量($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组在4 h和24 h时均可显著降低IL-6水平($P < 0.05$);竹根七皂苷低剂量($8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,中剂量($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组及高剂量($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,在4 h和24 h时均可显著降低TNF- α 水平($P < 0.05$)。

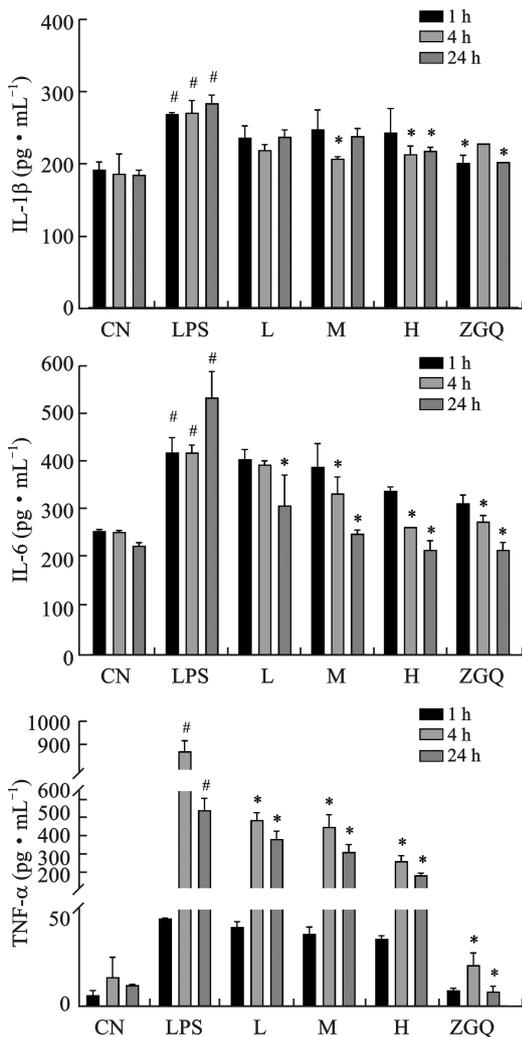


图12 细胞因子水平结果

2.5 数据处理 竹根七抗炎活性测试实验数据主要使用 GraphPad Prism 8 软件分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,分析模式使用单因素方差分析及双侧 t 检验,以 $P < 0.05$ 确定差异有统计学意义。

3 讨论

中药材中活性部位的得率受到多种因素的影

响,只有在合适的提取工艺下才能增加其得率^[18]。竹根七药材中主要含有皂苷类成分,故本实验以竹根七总皂苷含量为指标采用正交试验优化提取工艺,选取温度、料液比、时间、溶剂浓度四个因素,试验设计为四因素三水平,最终确定提取工艺为温度 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 、料液比 1:40、提取时间 30 min、溶剂浓度 70%乙醇-水;采用大孔树脂对提取液进行总皂苷富集纯化,确定了后续纯化试验选用 D101 大孔树脂进行研究,纯化条件为上样量 1 BV,吸附时间 12 h,洗脱体积 5 BV,洗脱浓度 50%乙醇-水,得到的总皂苷纯度为 70%以上,以此保证最大程度除去杂质且皂苷成分损失最少。此外,在对上样液浓度进行考察时,发现本实验数据中的流出液吸光度随上样液浓度增大而逐渐减小,推测原因可能是上样液浓度增大时大孔树脂对目标物质的吸附速度变快,且更易达到饱和;浓度低时上样液吸附缓慢且树脂可能无法达到其吸附最大容量,故流出液吸光度在上样液低浓度时较高。

作为经典的炎症模型,LPS 能诱导 RAW264.7 细胞产生 IL- 1β 、IL-6 和 TNF- α 等多种细胞炎症因子,其被广泛用于药物的体外抗炎研究^[19-26]。经验证,竹根七皂苷可显著下降 IL- 1β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子水平,具有显著的抗炎作用。

本文优化了竹根七皂苷的提取纯化工艺,该工艺充分考虑了时间、物料成本等因素,最大程度地保证了竹根七原药材中皂苷的提取率及杂质的去除。优化得到的制备工艺简单可行且稳定,纯化得到的皂苷表现出显著的抗炎作用,为竹根七药材后续的开发应用研究提供了依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 吴国庆,樊浩,李玉泽,等.竹根七的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2020,39(10): 50-60.
- [3] 肖艳华.开口箭化学成分及其抗禽流感 H5N1 活性研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2015.
- [4] 路强强,魏莹,陈智坤,等.开口箭地上部位脂溶性成分及抗菌活性分析[J].时珍国医国药,2018,29(12): 2880-2883.
- [5] 李玉泽,梁小飞,王西林,等.竹根七化学成分的研究

- [J].中成药,2019,41(10):2383-2388.
- [6]李玉泽,李真,张东东,等.响应面法优选竹根七总皂苷提取工艺[J].中南药学,2015,13(8):811-814.
- [7]XIANG LM,WANG YH,YI XM,et al.Antiproliferative and anti-inflammatory furostanol saponins from the rhizomes of *Tupistra chinensis*[J].Steroids,2016,116:28-37.
- [8]WU XF,FAN JJ,OUYANG ZJ,et al.*Tupistra chinensis* extract attenuates murine fulminant hepatitis with multiple targets against activated T lymphocytes[J].The Journal of Pharmacy and Pharmacology,2014,66(3):453-465.
- [9]谭刚,杨业玉,李建军.开口箭抗炎镇痛作用实验研究[J].实用中医药杂志,2013,29(7):513-515.
- [10]李小莉,张迎庆,洪蓓蓓.民间草药开口箭的抗炎镇痛作用的研究[J].湖北中医学院学报,2005,7(4):28-29.
- [11]沈鑫,夏玉坤,张莹雯,等.开口箭皂苷对人甲状腺髓样癌 TT 细胞的抑制作用及对 Notch1 的影响[J].天津中医药大学学报,2018,37(3):225-229.
- [12]王哲.开口箭总皂苷抗胃癌细胞增殖及其机制研究[D].广州:广东药科大学,2021.
- [13]易晓敏.开口箭中甾体皂苷诱导 HL-60 和 HepG2 细胞自噬与凋亡的机制研究[D].广州:广东药科大学,2018.
- [14]何瑞.竹根七抗肿瘤药效物质基础研究[D].咸阳:陕西中医药大学,2014:1-80.
- [15]廖安妮,向一,钱振宇,等.开口箭皂苷对高脂血症小鼠动脉粥样硬化的治疗作用[J].中国医院药学杂志,2009,29(13):1077-1080.
- [16]何瑞,刘琦,刘银环,等.珠子参叶化学成分研究[J].中国中药杂志,2014,39(9):1635-1638.
- [17]李真,范冬冬,张东东,等.窝儿七化学成分研究[J].西北药学杂志,2015,30(6):666-668.
- [18]赵璠,李家磐,段道,等.响应面法优化茜草总酚超声提取工艺[J].陕西中医药大学学报,2022,45(5):119-123.
- [19]何泓朴,许冠华,林进,等.巨噬细胞在类风湿关节炎中的作用[J].医学研究杂志,2022,51(2):8-11,15.
- [20]尹柏坤,左军,李冀.类风湿关节炎的中医药治疗进展[J].中医药信息,2022,39(1):84-88.
- [21]邹涵,李秋琼,李威,等.类风湿关节炎的中医药诊治研究进展[J].内蒙古中医药,2021,40(11):148-151.
- [22]OSTOJIC M,SOLJIC V,VUKOJEVIC K,et al.Immunohistochemical characterization of early and advanced knee osteoarthritis by NF- κ B and iNOS expression[J].Journal of Orthopaedic Research,2017,35(9):1990-1997.
- [23]CHEN LX,LIN L,WANG HJ,et al.Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF- κ Bp65-specific siRNA [J].Osteoarthritis and Cartilage,2008,16(2):174-184.
- [24]MITCHELL S,VARGAS J,HOFFMANN A.Signaling via the NF- κ B system [J].Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology & Medicine,2016,8(3):227-241.
- [25]温志华.类风湿性关节炎发病机制的临床研究进展[J].临床医学,2022,42(7):123-125.
- [26]李江,徐斌,乔治,等.强脊方对强直性脊柱炎患者 Th17 细胞及相关因子 IL-6、IL-23 影响的临床研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(1):88-92.

(修回日期:2023-10-08 编辑:崔春利)