

大孔树脂分离纯化蜘蛛香总酚酸及其生物活性研究

程盛勇¹, 胡光线², 刘兴赋³, 沈祥春³, 罗喜荣^{3*}, 杨军^{4*}

(1. 贵州护理职业技术学院 基础医学部, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中观生物技术有限公司, 贵州 贵阳 550081;
3. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 中国科学院 地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 优化 AB-8 大孔树脂富集纯化蜘蛛香中总酚酸的工艺条件, 并测定其抗氧化、抗乙酰胆碱酯酶的生物活性。以吸附率、解析率、总酚酸含量为评价指标, 优化 AB-8 大孔树脂对蜘蛛香总酚酸的纯化工艺条件, 并集成溶剂萃取法制备质量分数 $\geq 50\%$ 蜘蛛香总酚酸, 采用清除 DPPH· 和 PTIO· 的方法评价蜘蛛香总酚酸的抗氧化活性, 采用改良版的 Ellman 比色法测定蜘蛛香总酚酸抗乙酰胆碱酯酶活性。结果表明, 最佳工艺条件为: 上样质量浓度为 $2.66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、上样液 $\text{pH}=4.6$ 、上样流速 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 、上样体积 2 BV、水洗用量 5 BV、除杂剂 20% 乙醇 4 BV、洗脱剂 50% 乙醇 4 BV; 粗提液先用有机溶剂萃取再经大孔树脂分离纯化得 57.77% 蜘蛛香总酚酸; 纯化后样品对 DPPH·、PTIO· 有较好的清除能力和有较好的抗乙酰胆碱酯酶活性, IC_{50} 值分别为 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5.40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。优化所得工艺稳定可行, 纯化的蜘蛛香总酚酸具有较好的抗氧化和抗乙酰胆碱酯酶活性, 为其研究开发提供一定的参考依据。

关键词: 蜘蛛香; 总酚酸; AB-8 大孔树脂; 分离纯化; 抗氧化; 抗乙酰胆碱酯酶

中图分类号: TQ028

文献标识码: A

文章编号: 1671-0460 (2023) 12-2876-07

DOI:10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2023.12.013

Separation and Purification of Total Phenolic Acid From Valeriana Jatamansi Jones With Macroporous Resins and Evaluation on Its Biological Activities

CHENG Sheng-yong¹, HU Guang-xian², LIU Xing-fu³, SHEN Xiang-chun³, LUO Xi-rong^{3*}, YANG Jun^{4*}

(1. Department of Basic Medicine, Guizhou Nursing Vocational College, Guiyang Guizhou 550025, China;
2. Guizhou Zhongguan Biotechnology Co., Ltd., Guiyang Guizhou 550081, China;
3. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550025, China;
4. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang Guizhou 550081, China)

Abstract: The process conditions were optimized for the enrichment and purification of total phenolic acid in valeriana jatamansi jones by AB-8 macroporous resin, and its antioxidant and anti-acetylcholinesterase biological activities were determined. Using adsorption rate, resolution rate, and total phenolic acid content as evaluation indicators, the purification process conditions of AB-8 macroporous resin for total phenolic acids of valeriana jatamansi jones incense were optimized, and the solvent extraction method was integrated to prepare the total phenolic acids of Valeriana jatamansi Jones incense with a mass fraction of $\geq 50\%$, the antioxidant activity of valeriana jatamansi jones total phenolic acid was evaluated by clearing DPPH· and PTIO·, and the anti-acetylcholinesterase activity of valeriana jatamansi jones total phenolic acid was determined by the improved Ellman colorimetric method. The results showed that the optimal process conditions were as follows: sample mass concentration $2.66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sample solution $\text{pH}=4.6$, sample flow rate $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, sample volume 2 BV, water washing amount 5 BV, impurity remover 20% ethanol of 4 BV, eluent 50% ethanol of 4 BV. The crude extract was first extracted with organic solvents, and then separated and purified by macroporous resin to obtain 57.77% total phenolic acid from valeriana jatamansi jones. After being purified, the samples exhibited significant scavenging ability and anti-acetylcholinesterase activity against DPPH· and PTIO·, with IC_{50} values of $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $5.40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The optimized process demonstrates stability and feasibility, while the purified arachnophenolic acid exhibits commendable antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. These findings provide valuable insights for its further research and development.

Key words: Valeriana jatamansi jones; Total phenolic acid; AB-8 macroporous resin; Separation and purification; Antioxidant activity; Anti-acetylcholinesterase activity

蜘蛛香系败酱科缬草属植物蜘蛛香的干燥根茎及根, 又名马蹄香、臭药等, 其性温、味辛、微苦,

具有镇静安神、理气止痛、消炎止泻、祛风除湿之功效, 用于治疗脘腹胀痛、呕吐泄泻、风寒湿痹、

基金项目: 贵州省科技创新基地(黔科合中引地[2023]003); 贵州护理职业技术学院硕士基金课题(项目编号: gzhlyj2022-06)。

收稿日期: 2023-10-13

作者简介: 程盛勇(1994-), 男, 贵州省惠水县人, 助教, 硕士研究生, 研究方向: 中药民族药及药效物质基础研究。E-mail:1950349547@qq.com。

通信作者: 罗喜荣(1973-), 女, 贵州省贵阳市人, 教授, 研究方向: 天然药物化学研究。E-mail:1341323603@qq.com。

杨军(1972-), 男, 贵州省贵阳市人, 副研究员, 研究方向: 药物分析。E-mail: yjsfe@sohu.com。

小儿疳积等^[1-5]。蜘蛛香化学成分丰富,主要含有挥发油、环烯醚萜类、黄酮类、多糖等多种化合物^[6]。目前对蜘蛛香有效成分的提取分离研究主要集中在蜘蛛香挥发油^[7]、蜘蛛香总缬草三酯^[8]、蜘蛛香总黄酮^[9]、蜘蛛香多糖^[10]。课题组前期研究表明酚酸类物质是蜘蛛香中含量较高的化合物,主要包括新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿酸 B、异绿酸 A、异绿酸 C 等有效成分^[11-15]。酚酸类化合物具有广泛生物活性,具有抗氧化、抑制突变、抗菌抗炎、活血降压和抗癌等药理作用,有良好的研究和开发利用价值^[16],且目前尚未见有关蜘蛛香总酚酸分离纯化工艺的研究报道。

大孔吸附树脂具有物理化学稳定性高、比表面积较大、选择性好、吸附容量大、吸附速度快、解吸速度快且条件温和、再生处理快捷方便、使用寿命长、节省费用等诸多优点,被广泛应用于植物有效成分的分离纯化。酚酸类成分含有较多的亲水基团,易被大孔树脂吸附,且易被乙醇等溶液洗脱,操作简单易行^[17-18]。课题组前期研究表明,AB-8 树脂可较好地用于蜘蛛香总酚酸分离纯化^[19],因此本研究拟建立 AB-8 大孔树脂纯化蜘蛛香总酚酸最佳分离纯化工艺,并采用有机溶剂萃取联合树脂吸附法富集蜘蛛香总酚酸的质量分数达到 50% 以上,拟提供一种简单且易于工业化生产的蜘蛛香总酚酸分离纯化的方法,并测定纯化后样品的生物活性,为高效应用、发展蜘蛛香药用价值及实现蜘蛛香药材资源的高值化利用提供新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器设备

蜘蛛香药材采自贵州省惠水县,由贵州医科大学药学院覃容贵教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香的干燥根茎及根。

绿原酸标准品(HPLC \geq 98%),成都曼思特生物科技有限公司;AB-8 大孔树脂,北京索莱宝科技有限公司;二苯代苦味酰肼自由基(DPPH \cdot),上海源叶生物科技有限公司;2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-3-氧代-1-氧自由基(PTIO \cdot),江苏九鼎生物科技有限公司;维生素 C(VC),天津市登科化学试剂有限公司;乙酰胆碱酯酶(AchE)、二硫二硝基苯甲酸(DTNB)、硫代乙酰胆碱(ATCh)、石杉碱甲,北京索莱宝科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),北京鼎国昌盛生物技术有限公司;水为重蒸水。

UV-2700 型紫外可见分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司;PHS-3C 型 PH 计,上海仪电科学仪

器股份有限公司;BSA224S 型电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;SHZ-C 型水浴恒温振荡器,上海浦东物理光学仪器厂;KQ3200E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HGZF-101-0 型电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蜘蛛香供试品制备

取蜘蛛香粉(过 60 目筛,即粒径小于 0.25 mm)适量,石油醚脱脂,按料液比 1:20(g \cdot mL⁻¹)加入 50%乙醇超声(功率 150 W、频率 40 kHz)提取 26 min,将提取液真空浓缩得浸膏,加水溶解,滤过,制成吸附实验所需浓度的原料液,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 蜘蛛香总酚酸含量的测定

以绿原酸为对照品,采用紫外分光光度法测定蜘蛛香总酚酸的含量^[11-19]。于波长 327 nm 处测定绿原酸甲醇溶液吸光度,以吸光度 Y 为纵坐标、绿原酸质量浓度 X (μ g \cdot mL⁻¹)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.0677X+0.0063$, $R^2=0.9995$ 。

1.2.3 AB-8 树脂纯化蜘蛛香总酚酸的工艺优化

1) 上样液质量浓度考察。取“1.2.1”项下供试液配制 5 个不同质量浓度的总酚酸上样液。取称取已经过预处理的 AB-8 树脂 5.0 g 共 5 份,置于 100 mL 广口瓶中,分别加入不同质量浓度的总酚酸样液 10 mL,分别于 25 $^{\circ}$ C 摇床 120 r \cdot min⁻¹ 振摇 45 min^[13],滤过,测定残液中总酚酸质量浓度,按式(1)计算其吸附率。

$$E=(C_0-C_e)/C_0\times 100\% \quad (1)$$

式中: E —吸附率,%;

C_0 —加入的样品溶液总酚酸质量浓度,mg \cdot mL⁻¹;

C_e —吸附平衡时样品溶液总酚酸质量浓度,mg \cdot mL⁻¹。

2) 上样液 pH 考察。称取已经过处理的 AB-8 树脂 6 份各 5 g,置于 100 mL 广口瓶中,分别加入“1.2.1”项下 pH 为 1、2、3、4、4.6(原液)、5 的蜘蛛香提取液 10 mL,充分混匀,室温下于恒温振荡器(120 r \cdot min⁻¹)中振摇 12 h,滤过,测定吸附残液中总酚酸含量。滤出的树脂分别置于 100 mL 广口瓶中,加入 30 mL 50%乙醇解析,充分混匀,室温下于恒温振荡器(120 r \cdot min⁻¹)中振摇 12 h,滤过,测定其解析液中总酚酸的含量,按式(2)计算树脂吸附容量。

$$Q=(m_1-m_2)/W \quad (2)$$

式中: Q —吸附容量,mg \cdot g⁻¹;

m_1 —供试液中总酚酸质量, mg;
 m_2 —未被吸附的总酚酸质量, mg;
 W —树脂质量, g。

3) 上样流速、上样体积考察。称取已处理的 AB-8 树脂 5 g 共 3 份, 分别置于 3 根同一型号的层析柱, 湿法装柱, 抽滤除水, 加入上述确定的质量浓度及 pH 上样液适量, 分别调节流速为 1、2、3 BV·h⁻¹ 上样, 每 0.5 BV 分段收集流出液, 测定各段流出液中总酚酸质量浓度。以上样体积 (BV) 为横坐标、流出液中总酚酸质量浓度 (mg·mL⁻¹) 为纵坐标, 绘制总酚酸泄漏曲线。

4) 水洗用量考察。按上述优选参数装柱、上样、动态吸附, 药液再静态吸附 45 min^[19], 用水按上述确定的上样流速洗至流出液近无色, 每 1 BV 分段收集流出液, 测定各段流出液中蜘蛛香总酚酸质量浓度, 绘制水洗脱曲线。

5) 洗脱剂、除杂剂的筛选。按上述项下优选方法装柱、上样、吸附、水洗, 再依次用 1 BV 不同体积分数 (10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%) 乙醇洗脱, 收集各乙醇体积分数洗脱液, 测定各段洗脱液中总酚酸质量浓度, 按式 (3) 计算其解吸率, 绘制梯度洗脱曲线。

$$D = m/m_3 \times 100\% \quad (3)$$

式中: D —解析率, %;
 m —洗脱液总酚酸质量, mg;
 m_3 —上样总酚酸质量, mg。

6) 除杂剂、洗脱剂用量考察。称取 AB-8 树脂适量, 按上述优选方法装柱、上样、除杂、洗脱, 每 0.5 BV 分段收集洗脱液, 测定流出液总酚酸质量浓度, 计算其解吸率, 绘制洗脱曲线。

1.2.4 蜘蛛香总酚酸的分离纯化

取“1.2.1”项下粗提液适量, 加入等体积乙酸乙酯萃取, 合并上层萃取液, 回收乙酸乙酯, 得干浸膏; 再取上述干浸膏用适量乙酸乙酯溶解加入等体积水萃取, 合并上层萃取液, 回收乙酸乙酯, 得干浸膏, 浸膏配制成“1.2.3”项下确定质量浓度及上样液 pH 的上样液, 称取 AB-8 树脂适量装柱, 按“1.2.3”项下优选的方法上样、除杂、洗脱, 每 0.5 BV 分段收集洗脱液, 重复 3 次此实验, 测定洗脱液总酚酸含量。

1.2.5 蜘蛛香总酚酸抗氧化活性测定

1) 清除 DPPH·能力的测定。参考已报道的方法^[20], 称取 0.012 9 g DPPH·置 50 mL 容量瓶中, 用 50% 乙醇定容, 配制成 0.65 mmol·L⁻¹ 的储备液。分别取“1.2.4”项下纯化后的不同质量浓度总酚酸溶

液 2 mL, 加入 DPPH·溶液 2 mL, 混合均匀, 室温放置 30 min 后 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 于 525 nm 处测定吸光值 (用 50% 乙醇做空白调 0)。以 VC 为阳性对照, 平行测定 3 次, 取平均值。样品对 DPPH·的清除率按式 (4) 计算。

$$A = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (4)$$

式中: A —DPPH·清除率, %;
 A_0 —2 mL 50% 乙醇+2 mL DPPH·溶液的吸光值;
 A_1 —2 mL 样品溶液+2 mL DPPH·溶液的吸光值;
 A_2 —2 mL 样品溶液+2 mL 50% 乙醇的吸光值。

2) 清除 PTIO·能力的测定。称取 0.005 0 g PTIO·置 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 配制成 0.43 mmol·L⁻¹ 的储备液。分别取“1.2.4”项下纯化后总酚酸不同质量浓度受试液 1 mL, 加入 PTIO·溶液 3 mL, 混合均匀后水浴 37 °C 反应 2 h, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 于 560 nm 处测定吸光值 (用水做空白调 0)。以 VC 为阳性对照, 平行测定 3 次, 取平均值。样品对 PTIO·的清除率按式 (5) 计算。

$$B = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}) \times 100\% \quad (5)$$

式中: B —PTIO·清除率, %;
 B_0 —1 mL 50% 乙醇+3 mL PTIO·溶液的吸光值;
 B_1 —1 mL 样品溶液+3 mL PTIO·溶液的吸光值;
 B_2 —1 mL 样品溶液+3 mL 水的吸光值。

1.2.6 蜘蛛香总酚酸抗乙酰胆碱酯酶活性测定

采用改良版的 Ellman 比色法^[21], 参照文献^[22], 将 50 μL 6.67 U·mL⁻¹ AChE、100 μL “1.2.4”项下纯化后总酚酸样品溶液和 100 μL 15 mmol·L⁻¹ DTNB 依次加入含有 2650 μL 50 mmol·L⁻¹ PBS 的试管内, 于 37 °C 水浴预热 2 min, 加入 100 μL 15 mmol·L⁻¹ 的 ATCh, 再置于 37 °C 水浴反应 20 min 后, 立即加入 1 mL 4% SDS 终止反应, 将所得溶液立即在 412 nm 下测量吸光值。每梯度做 3 个平行, 计算平均抑制率。阳性对照为石杉碱甲。按式 (6) 计算抑制率。

$$C = (1 - \frac{C_1 - C_2}{C_0}) \times 100\% \quad (6)$$

式中: C —抑制率, %;
 C_0 —未添加样品溶液组的吸光值
(2 650 μL PBS+50 μL AChE+100 μL 50% 乙醇溶液+100 μL DTNB+100 μL ATCh+1 mL SDS);
 C_1 —样品溶液组的吸光值
(2 650 μL PBS+50 μL AChE+100 μL 样品溶液+100 μL DTNB+100 μL ATCh+1 mL SDS);
 C_2 —未添加乙酰胆碱酯酶液的本底对照组吸光值

(2 650 μL PBS+50 μL PBS 缓冲液+100 μL 样品溶液+100 μL DTNB+100 μL ATCh+1mL SDS)。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 AB-8 树脂纯化蜘蛛香总酚酸的工艺考察

2.1.1 上样液质量浓度考察

上样液质量浓度考察结果见图 1。由图 1 可知, 上样液质量浓度为 $2.66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, AB-8 树脂对蜘蛛香总酚酸的吸附率最高, 故确定上样液质量浓度为 $2.66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

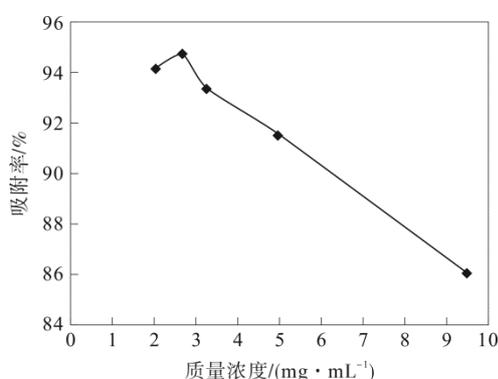


图 1 上样液质量浓度对吸附率的影响
Fig.1 Effect of mass concentration of loading solution on adsorption rate

2.1.2 上样液 pH 考察

上样液 pH 考察结果见图 2。

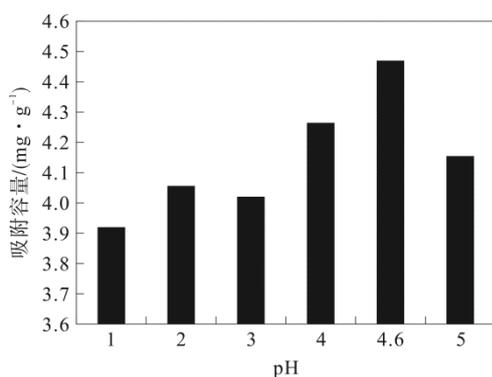


图 2 上样液 pH 对大孔树脂吸附容量的影响
Fig.2 Effect of pH of sample solution on adsorption capacity of macroporous resin

由图 2 可知, 上样液 pH 为 4.6 (原液) 时的 AB-8 树脂吸附容量为 $4.47 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 高于其他上样液 pH 的吸附容量, 故选择 pH 为 4.6 的上样液。

2.1.3 上样流速、上样体积考察

总酚酸泄漏曲线见图 3, 上样浓度一致时, 流

速越快被吸附分子未及扩散至树脂内部即被流走, 使被吸附物和大孔树脂的接触时间降低, 容易造成泄漏现象。为减少被吸附物质流失, 使其更多地被树脂吸附, 通常以泄漏点最迟出现的吸附流速为最佳上样吸附流速。结果表明, 泄漏点随着上样流速的增大而提前出现, 上样流速为 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 时的泄漏点为 2 BV, 比其他流速的泄漏点晚出现, 考虑到工艺成本和时间效率, 故确定最佳上样流速为 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 上样体积为 2 BV。

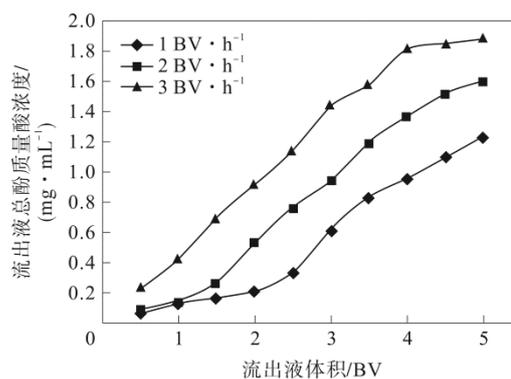


图 3 泄漏曲线
Fig.3 Leakage curve

2.1.4 水洗用量考察

水洗用量考察结果见图 4。结果表明, 水洗流出液总酚酸质量浓度随水洗用量增加而减小, 考虑到工艺成本和时间效率, 故确定最佳水洗用量为 5 BV。

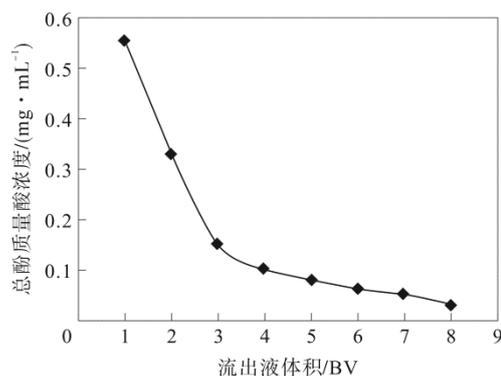


图 4 水洗脱曲线
Fig.4 Elution curve

2.1.5 除杂剂、洗脱剂的筛选

除杂剂和洗脱剂的筛选结果如图 5 所示。结果表明, 除杂剂可选择 10%乙醇、20%乙醇、30%乙醇, 为除去更多杂质提高蜘蛛香总酚酸纯度, 减少总酚酸的损失, 综合考虑最佳除杂剂为 20%乙醇; 解析率随洗脱剂体积分数的增加而升高, 当洗脱液体积分数达到 50%之后达到解析平衡, 即达到解析

平衡点为最佳洗脱剂,故最佳洗脱剂为50%乙醇。

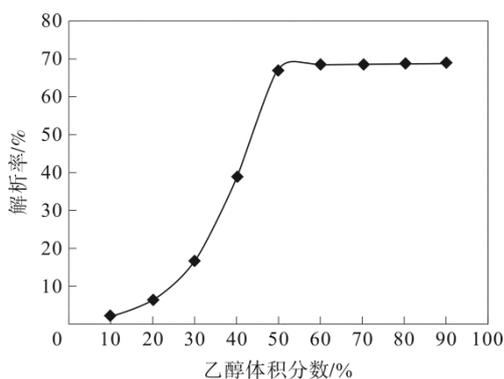


图5 梯度洗脱曲线
Fig.5 Gradient elution curve

2.1.6 除杂剂、洗脱剂用量考察

除杂剂用量考察结果如图6所示。结果表明,蜘蛛香总酚酸质量浓度随除杂剂用量的升高而到达最高之后又随之而降低,最后洗脱液中总酚酸质量浓度趋于平衡,说明除杂剂最佳用量4 BV。

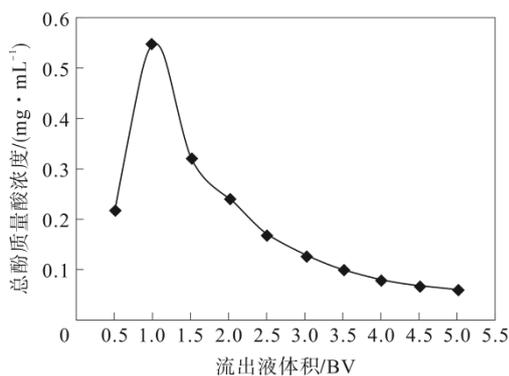


图6 20%乙醇洗脱曲线
Fig.6 Elution curve of 20% ethanol

洗脱剂用量考察结果如图7所示。结果表明,解析率随洗脱剂用量的增加而增大,当洗脱剂达到一定量时,解析率达到平衡,而达到平衡的点为最佳洗脱剂用量,故洗脱剂50%乙醇的最佳用量为4 BV。

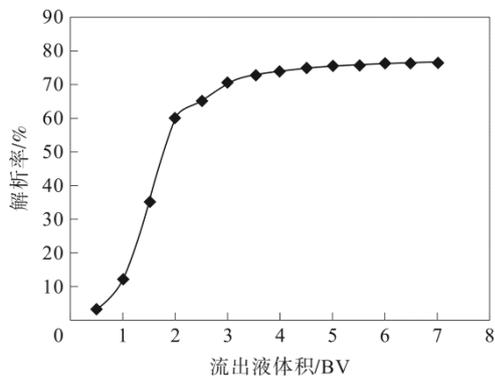


图7 50%乙醇洗脱曲线
Fig.7 Elution curve of 50% ethanol

2.2 蜘蛛香总酚酸集成工艺考察

蜘蛛香粗提液总酚酸质量分数为5.61%,先用有机溶剂萃取得总酚酸质量分数为36.26%,再经大孔树脂分离纯化得总酚酸质量分数为57.77%,其>50%,总酚酸平均收率为70.71%。于200~400 nm分别扫描蜘蛛香总酚酸溶液和绿原酸对照品溶液,结果二者UV图谱基本一致,UV图谱见图8。

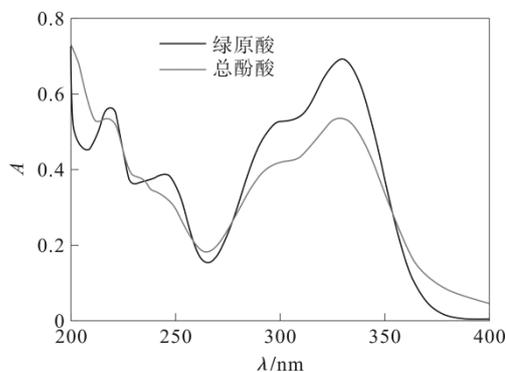


图8 总酚酸 UV 图谱
Fig.8 UV spectrum of total phenolic acids in *Valeriana jatamansi* Jones

2.3 蜘蛛香总酚酸的生物活性研究

2.3.1 蜘蛛香总酚酸抗氧化活性测定

1) 清除 DPPH·能力测定。蜘蛛香总酚酸清除 DPPH·能力测定结果见图9,蜘蛛香总酚酸 IC_{50} 为 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, VC 的 IC_{50} 为 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明蜘蛛香总酚酸具有较好的 DPPH·清除能力。

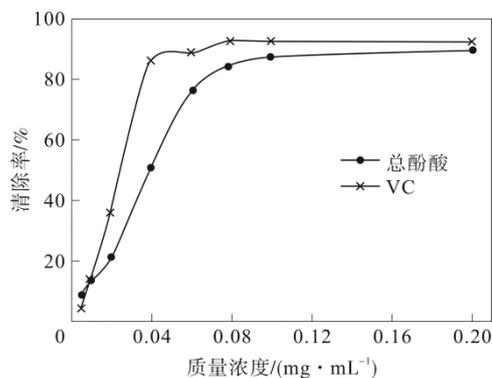


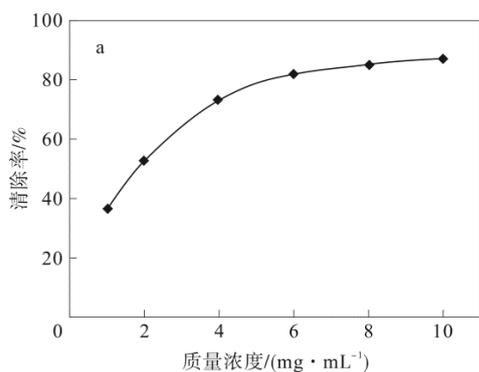
图9 DPPH·清除能力测定
Fig.9 Determination of DPPH· scavenging ability

2) 清除 PTIO·能力测定。蜘蛛香总酚酸清除 PTIO·能力测定结果见图10,蜘蛛香总酚酸 IC_{50} 为 $2.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, VC 的 IC_{50} 为 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明蜘蛛香总酚酸具有较好的 PTIO·清除能力。

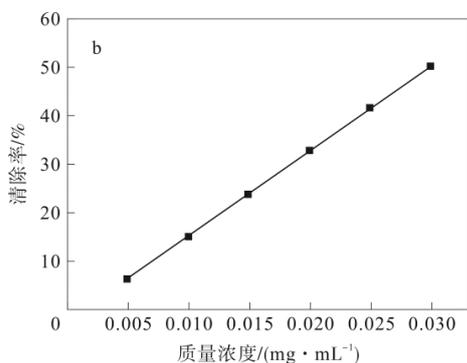
2.3.2 蜘蛛香总酚酸抗乙酰胆碱酯酶活性测定

蜘蛛香总酚酸抗乙酰胆碱酯酶活性测定结果见图11,蜘蛛香总酚酸 IC_{50} 为 $5.40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,石杉碱甲 IC_{50} 为 $7.3\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明蜘蛛香总酚酸具有

较好的抗乙酰胆碱酯酶活性。



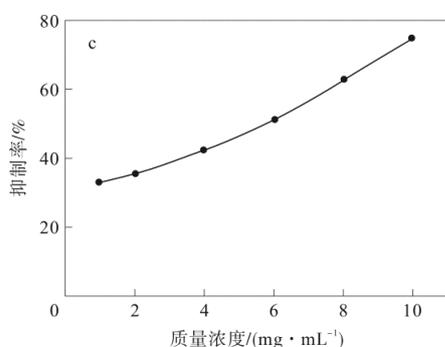
(a) 蜘蛛香总酚酸对 PTIO·清除能力



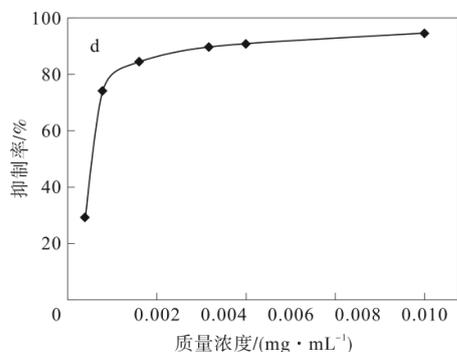
(b) VC 对 PTIO·清除能力

图 10 PTIO·清除能力测定

Fig.10 Determination of PTIO· scavenging ability



(a) 蜘蛛香总酚酸对 AChE 抑制率



(b) 石杉碱甲对 AChE 抑制率

图 11 蜘蛛香总酚酸抗乙酰胆碱酯酶活性测定

Fig.11 Determination of anti acetylcholinesterase activity of total phenolic acid from valeriana jatamansi jones

3 讨论

大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂,它具有吸附选择性好、富集效果好、交换速度较快、热稳定好等优点,植物提取物中的有效成分可以通过氢键或者范德华力等分子间作用力吸附于大孔树脂上,又在溶剂作用下溶解于溶液中,达到分离纯化的目的^[23-24]。本实验研究了蜘蛛香总酚酸分离纯化的上样条件和洗脱条件,优化条件为上样液 pH=4.6、上样流速 1 BV·h⁻¹、上样体积 2 BV、水洗用量 5 BV、除杂剂 20%乙醇 4 BV、洗脱剂 50%乙醇 4 BV。

本实验还考察了有机溶剂萃取法、金属离子沉淀法、树脂吸附法、有机溶剂萃取联合树脂吸附法等方法对蜘蛛香总酚酸的分离纯化效果,结果发现有机溶剂萃取联合树脂吸附法对蜘蛛香总酚酸的分离纯化效果较好,并比较了先纯化后萃取和先萃取后纯化工艺,结果表明采用先经纯化后用有机溶剂萃取所得总酚酸质量分数均 < 50%;采用先有机溶剂萃取后用 AB-8 大孔树脂纯化工艺所得总酚酸质量分数为 57.77%,其 > 50%,故蜘蛛香总酚酸分离纯化技术路线选择有机溶剂萃取联合树脂吸附法的先萃取后纯化工艺。

体内的自由基可分为活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS)。ROS 和 RNS 过量堆积会引起氧化应激,发生各种病变,加速机体衰老。许多中药对 ROS 和 RNS 都有较强的清除作用,可以缓解氧化应激。RNS 和 ROS 不稳定,很难直接用于抗氧化评价实验。DPPH·较稳定,其成单电子位于 N 原子上,可与苯环形成 p-π 共轭,但 DPPH·法只能用于评价 RNS 清除水平。要评价 ROS 清除水平,必须用相对稳定的氧自由基,PTIO·有成单电子位于 O 原子上,其旁边有大的 π-π 共轭体系,是一种相对稳定的氧自由基。因此,本实验将清除 DPPH·和 PTIO·有机结合,同时反映 RNS 和 ROS 清除水平,有利于蜘蛛香抗氧化活性的全面评价。本实验还采用改良版的 Ellman 比色法,测定纯化后总酚酸的抗乙酰胆碱酯酶活性。蜘蛛香总酚酸的生物活性研究结果表明,蜘蛛香总酚酸具有较好的抗氧化和抗乙酰胆碱酯酶活性。

4 结论

本实验采用有机溶剂萃取联合树脂吸附法优化了蜘蛛香总酚酸分离纯化工艺,该工艺操作简单、稳

定可行, 获得了质量分数大于 50% 的蜘蛛香总酚酸。纯化后的总酚酸具有很好的清除 DPPH·、PTIO· 的能力和抑制 AChE 活性的能力。本研究不仅为蜘蛛香药材资源的深度开发利用提供了参考, 同时也为后续提升蜘蛛香产品附加值提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 罗喜荣, 罗俊, 杨军, 等. 蜘蛛香不同部位中总缬草三酯含量测定[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16): 8884.
- [3] 杨军, 龙庆德, 罗喜荣, 等. 超临界二氧化碳萃取蜘蛛香油工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 157-158.
- [4] VERMA R S, VERMA R K, PADALIA R C, et al. Chemical diversity in the essential oil of Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones) [J]. *Chem. Biodivers.*, 2011, 8(10): 1921-1929.
- [5] SINGH R D, GOPICHAND, MEENA L R, et al. Seasonal variation of Bioactive components in *Valeriana jatamansi* from Himachal Pradesh, India [J]. *Ind. Crops. Prod.*, 2010, 32(3): 292-296.
- [6] 胡营, 俞巧玲, 郭晓云, 等. 基于非靶向代谢组学的蜘蛛香不同部位差异代谢物分析[J]. 中国现代中药, 2023, 25(7): 1619-1626.
- [7] 龙庆德, 杨南赞, 龙春升, 等. 不同海拔蜘蛛香挥发油 GC-MS 分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 182-185.
- [8] 罗喜荣, 苑天红, 杨军, 等. 超临界 CO₂ 萃取蜘蛛香中总缬草三酯的工艺研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(16): 119-121.
- [9] 郜红利, 谭玉柱. 大孔吸附树脂纯化蜘蛛香总黄酮的工艺研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(10): 1100-1104.
- [10] 李强, 郑伟, 陈林, 等. 蜘蛛香多糖提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 273-277.

- [11] 刘开萍, 杨军, 罗喜荣, 等. 蜘蛛香中绿原酸及总酚酸的含量测定[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(2): 288-290.
- [12] 刘开萍, 杨军, 程盛勇, 等. HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分含量[J]. 中药材, 2018, 41(4): 922-924.
- [13] 程盛勇, 付洋, 郁林娜, 等. 蜘蛛香 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(6): 489-493.
- [14] 程盛勇, 付洋, 郁林娜, 等. 蜘蛛香 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2019, 42(5): 1080-1084.
- [15] 付洋, 程盛勇, 郁林娜, 等. 一测多评法测定蜘蛛香中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1666-1672.
- [16] 石梦瑶, 赵薇, 杨安全, 等. 酚酸类化合物在化妆品中的原料制备与应用[J]. 精细化工. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1203.TQ.20230705.1537.006.html>.
- [17] 王斌, 赵升铭, 袁松竹, 等. 大孔树脂对二醇型、三醇型人参皂苷的纯化研究[J]. 化学试剂, 2023, 45(3): 67-73.
- [18] 刘丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [19] 刘兴赋, 程盛勇, 陈慧, 等. 大孔树脂对蜘蛛香总酚酸的吸附热力学和动力学研究[J]. 离子交换与吸附, 2020, 36(5): 443-450.
- [20] 杨惠舒, 林学洋, 陈成龙, 等. 响应面法优化石韦多糖提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 当代化工, 2022, 51(2): 354-357.
- [21] EILMAN G L, COURTENEY K D, VALENTINO A J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7(2): 88-95.
- [22] 涂昆. 蜡梅叶抗乙酰胆碱酯酶活性成分分析[D]. 南昌: 江西师范大学, 2017.
- [23] 魏静, 杨倩, 郑茜, 等. 大孔树脂纯化蝴蝶花总黄酮及其体外生物活性研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2): 266-270.
- [24] 张腊腊, 王玉峰, 胡浩斌, 等. HPD-600 型大孔树脂纯化黄花菜多酚工艺优化[J]. 当代化工, 2023, 52(6): 1345-1349.

(上接第 2861 页)

3) 钢纤维的掺入能够大幅度地提高混凝土试件的劈裂抗拉强度值, 与空白混凝土试件相比, 掺入 2% 钢纤维的混凝土试件在 5%Na₂SO₄ 和 10%Na₂SO₄ 溶液中干湿循环 180 次后的劈裂抗拉强度可以分别提高 117.96% 和 139.21%, 均提升了 1 倍以上。

4) 混凝土中掺入钢纤维能够有效提高隧道工程用混凝土的抗硫酸盐侵蚀能力, 建议在条件允许的情况下, 尽可能地提高钢纤维的掺入量, 以最大限度地提升隧道工程用混凝土结构在硫酸盐侵蚀环境下的使用寿命。

参考文献:

- [1] 陈湘生, 徐志豪, 包小华, 等. 中国隧道建设面临的若干挑战与技术突破[J]. 中国公路学报, 2020, 33(12): 1-14.
- [2] 杜宇本, 蒋良文, 陈明浩, 等. 中国铁路隧道勘察技术的发展与展望[J]. 隧道建设(中英文), 2021, 41(11): 1943-1952.
- [3] 同月苹, 王艳, 张少辉. 隧道衬砌纤维混凝土力学性能与耐久性能的研究进展[J]. 材料科学与工程学报, 2022, 40(3): 528-536.
- [4] 王明, 胡敏, 徐可, 等. 隧道混凝土工程裂缝控制技术研究[J]. 混凝土

世界, 2022(8): 66-71.

- [5] 何柳. 机制砂成分对隧道混凝土抗硫酸盐侵蚀性能的影响[J]. 混凝土与水泥制品, 2022(5): 21-25.
- [6] 安枫垒. 隧道二次衬砌高性能混凝土配比优化实验研究[J]. 粉煤灰综合利用, 2021, 35(2): 100-104.
- [7] 程璐, 徐勃, 占文, 等. 混掺玄武岩纤维混凝土在滨海暗埋隧道工程中的应用[J]. 中国港湾建设, 2022, 42(10): 31-35.
- [8] 张匡宇. 铁路隧道聚丙烯纤维喷射混凝土力学与耐久性能研究[J]. 当代化工, 2022, 51(2): 278-281.
- [9] 葛辉, 张启志. 高性能混凝土制备及其耐久性性能的试验分析[J]. 化学与粘合, 2022, 44(4): 355-358.
- [10] 孙晓华, 刘阳. 玄武岩纤维与粉煤灰改性高强混凝土力学性能研究[J]. 当代化工, 2021, 50(11): 2545-2548.
- [11] 韩铁生. 钢纤维混凝土硫酸盐侵蚀长期性能研究[D]. 重庆: 重庆交通大学, 2020.
- [12] 陈宇良, 姜锐, 陈宗平, 等. 钢纤维再生混凝土的直剪力学性能[J]. 建筑材料学报, 2022, 25(9): 984-990.
- [13] 谭刚. 钢纤维混凝土技术在公路桥梁施工中的应用[J]. 建筑技术开发, 2022, 49(16): 131-133.
- [14] 王振, 胡朋. 路桥工程中钢纤维混凝土施工技术的应用[J]. 工程技术研究, 2021, 6(5): 91-92.