

分离提取技术

银叶树树叶三萜类成分的提取工艺及其抗氧化活性研究

皮睿^{1,2}, 张艳军^{*1,2}, 杨历^{1,2}, 邓勤^{1,2}, 尹艳镇^{*1,2}

(1.北部湾大学 石油与化工学院, 广西 钦州 535011;

2.广西绿色化工与新材料安全技术重点实验室, 广西 钦州 535000)

摘要:为研究药用红树林植物银叶树树叶中三萜类成分的提取工艺及其抗氧化活性,以该植物树叶为原材料,探究超声提取功率、乙醇浓度、料液比、超声提取时间 4 个单因素对提取率的影响;在单因素实验的基础上,采用正交试验优化提取工艺;利用大孔树脂对提取所得三萜进行纯化,高效液相色谱法分析纯化前后样品中桦木酸与齐墩果酸的含量;最后对纯化三萜进行抗氧化测定。实验结果表明,最佳工艺条件为:超声提取功率 240 W、乙醇浓度 80%、料液比 1:70 (g/mL)、超声时间 25 min,此条件下的银叶树三萜类成分提取率为 9.17%;大孔树脂纯化后的银叶树三萜纯度较纯化前提高了 1.69 倍;纯化前桦木酸含量为 0.942 mg/g,纯化后含量为 3.471 mg/g;纯化前齐墩果酸未检出,纯化后含量 0.412 mg/g。对纯化后的银叶树三萜类成分进行 DPPH 自由基清除实验、羟基自由基清除实验和还原能力实验,其对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 为 8.08 μg/mL,对羟基自由基 IC₅₀ 为 7.21 μg/mL,且还原能力随浓度的升高而增强,表明银叶树三萜类具有较好的抗氧化活性。该研究将为银叶树三萜作为抗氧化剂进一步开发利用提供数据基础。

关键词:银叶树;三萜;提取工艺;分离纯化;抗氧化活性

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2025)02-0046-09

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0396

Extraction process and Antioxidant Activity of Triterpenoids from the Leaves of *Heritiera littoralis* Dryand PI Rui^{1,2}, ZHANG Yan-jun^{*1,2}, YANG Li^{1,2}, DENG Qin^{1,2}, YIN Yan-zhen^{*1,2}(1.College of Petroleum and Chemical Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Green Chemical Materials and Safety Technology, Qinzhou 535000, China)

Abstract:To optimize the extraction process and evaluate the antioxidant activity *in vitro* of triterpenoids from the medicinal mangrove plant *Heritiera littoralis* Dryand, the leaves of *H. littoralis* as raw material were choosed. The influences of four single factors including ultrasonic extraction power, ethanol concentration, solid-liquid ratio, and ultrasonic extraction time on the extraction rates were explored. Orthogonal experiments were employed to optimize the extraction conditions obtained from the single-factor experiments. The macroporous resin was used to purify the extracted triterpenoids. The contents of betulinic acid and oleanolic acid in the samples before and after purification were analyzed by high performance liquid chromatography. Finally, the antioxidant activity of the purified triterpenoids was determined. The optimal process conditions for ultrasound-assisted extraction of *H. littoralis* triterpenoids were determined as follows: ultrasonic extraction power 240 W, ethanol concentration 80%, material-liquid ratio 1:70 (g/mL), and ultrasonic extraction time 25 min. The extraction rate of triterpenoids under the optimal extraction conditions was 9.17%. The purity of triterpenoids purified by macroporous resin was 1.69 times higher than that before purification. The contents of betulinic acid before and after purification were 0.942 and 3.471 mg/g, respectively. The oleanolic acid was not detected before purification and the content after purification was 0.412 mg/g. The DPPH radical scavenging experiment, hydroxyl radical scavenging experiment, and iron reduction ability experiment were conducted on the purified *H. littoralis* triterpenoids. The result showed that the IC₅₀ values of purified triterpenoids were 8.08 μg/mL for DPPH and 7.21 μg/mL for hydroxyl free radical. Moreover, the reducing capacity increased with the increase of concentration, indicating that *H*

收稿日期:2024-08-27;修回日期:2024-10-18

基金项目:药用红树林植物银叶树中萜类化合物的抗炎活性及其对 NF-KB 通路影响的应用基础研究项目(2021GXNSFBA220100);基于 OMAC 策略从广西红树林植物内生真菌代谢产物中发现抗炎活性成分的研究项目(2021KYQD05)。

作者简介:皮睿(2000-),男,北京人,硕士生,主要研究方向为天然产物成分分析及活性研究。

通讯作者:张艳军, E-mail: zhangyj201608@163.com;尹艳镇, E-mail: yinyanzhen2009@163.com。

littoralis triterpenoids possessed good antioxidant activity. This study provides a data basis for the further development and utilization of *H. littoralis* triterpenoids as antioxidants.

Key words: *Heritiera littoralis* Dryand.; triterpenoid; extraction process; separation and purification; antioxidant activity

银叶树 (*Heritiera littoralis* Dryand) 别名大白叶仔, 属于梧桐科, 银叶树属植物^[1]。在我国主要分布于广西壮族自治区的渔万岛、竹山村、黄竹江口等地。银叶树是典型的红树植物之一。银叶树的树皮可用于治疗腹泻和血尿症, 果仁可用于滋补品, 具有一定的药用价值^[2-5]。研究表明银叶树中含有黄酮、萜类、甾体、酚类等物质^[6-12], 且具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抑菌等活性^[6, 13-15]。而植物三萜类成分在自然界中广泛存在, 且具有多种生理活性^[16-18]。目前关于银叶树化学成分的研究大多集中在总黄酮、单宁、木质素等, 在银叶树的三萜类成分的提取、分离纯化及活性研究等方面的内容研究较少。因此, 本实验选取了广西防城的银叶树, 对其中的三萜类成分提取工艺、纯化及抗氧化活性进行研究。采用超声辅助对银叶树中的三萜类成分进行提取, 进行单因素实验与正交试验, 得出最佳提取工艺条件, 确定最佳提取工艺; 再利用大孔树脂对最佳工艺条件下提取的三萜类成分进行分离纯化; 最后对分离纯化后的三萜类成分进行 DPPH 自由基清除实验、羟基自由基清除实验和铁离子还原能力实验, 测定样品的抗氧化活性。本实验为进一步开发利用该资源提供提取工艺和实验基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

ATY124 型电子分析天平 (日本 Shimadzu 有限公司); DS-5510DTH 型超声波清洗器 (上海生析超声仪器有限公司); DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司); TU-1810PC 型紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); SHZ-D (Ⅲ) 型循环水式多用真空泵 (河南予华仪器有限公司); STRIKE 300V 型旋转蒸发器 (重庆雅马拓科技有限公司); BPG-9040A 型精密鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); TD5M 型低速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器化学公司); DW-HL218 型超低温冷冻储存箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); DGJ-10C 型冷冻干燥机 (上海博登生物科技有限公司); FW-100 型高速中药粉碎机 (天津市泰

斯特仪器有限公司); Agilent-1260 型高效液相色谱仪 (配备紫外检测器, 美国安捷伦科技有限公司)。

无水乙醇、冰乙酸、高氯酸、氢氧化钠 (分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 香草醛 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 水杨酸、30% 过氧化氢、盐酸、七水合硫酸亚铁、三氯乙酸 (西陇科学股份有限公司); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 (天津市大茂化学试剂厂); 三氯化铁 (Ⅲ) 六水合物 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 齐墩果酸标准品 (生物试剂, 上海源叶生物科技有限公司); L (+)-抗坏血酸 (分析纯, 广东光华科技股份有限公司); DPPH (98.5%)、D101、D301、AB-8、S-8、ADS-7 大孔树脂 (生物试剂, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 铁氰化钾 (国药集团化学试剂有限公司); 桦木酸 (分析标准品, 纯度 $\geq 98\%$, 合肥维克奇生物科技有限公司); 甲醇 (色谱纯, 美国赛默飞世尔科技公司); 水为娃哈哈纯净水。

1.2 实验方法

1.2.1 原材料预处理

新鲜银叶树树叶 2021 年 8 月采自广西防城港, 由海洋学院钟秋平教授鉴定为梧桐科银叶树 (*Heritiera littoralis* Dryand) 植物叶子。经干燥、粉碎, 过筛 (40 目), 置于干燥器中保存待用。

1.2.2 齐墩果酸标准溶液配制及曲线绘制

准确称取 5.0 mg 齐墩果酸标准品, 无水乙醇溶解, 然后转移到 50 mL 容量瓶中并定容, 混合均匀, 配制浓度为 0.10 mg/mL 的齐墩果酸标准品溶液。

参照李嗣乾等^[19]香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法, 方法略有改动。配制浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL 的齐墩果酸标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 将容量瓶置于 90 °C 水浴中挥干溶剂, 将 0.4 mL 新制的 5% 香草醛-冰乙酸、1 mL 高氯酸迅速摇匀并加入, 放入 65 °C 的水浴中加热 15 min 后, 立即冷却至室温, 加入冰乙酸定容, 混匀, 暗处放置显色 15 min。设定波长为 546 nm, 测吸光度。分别将吸光度和标准溶液的浓度设定为标准曲线的纵坐标和横坐标绘图, 建立回归方程。

1.2.3 银叶树三萜类成分的测定

准确吸取 0.4 mL 银叶树的提取液样品置于 10 mL 容量瓶中,加入 0.4 mL 的 5% 香草醛-冰醋酸和 1 mL 的高氯酸迅速摇匀,65 °C 水浴加热 15 min,冷却至室温,加入冰乙酸定容,摇匀。设定波长为 546 nm,平行测定 3 次吸光度取平均值。代入标准曲线方程计算三萜浓度。提取率如式(1)所示。

$$\text{银叶树三萜的提取率}(\%) = \frac{[(n \times C \times V)/(M \times 1000)] \times 100\%}{(1)} \quad (1)$$

式中: n 为提取液的稀释倍数; C 为提取液的质量浓度,mg/mL; V 为提取液稀释前的总体积,mL; M 为样品的总质量,g。

1.3 单因素实验

1.3.1 超声功率对三萜类成分提取率的影响

准确称量 5 份 0.50 g 的树叶粉末,分别设置超声功率为 180、210、240、270、300 W,固定超声时间 15 min,乙醇浓度 70% 以及料液比 1:70 (g/mL)。提取完成后,抽滤,定容。按照香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法测定。

1.3.2 乙醇浓度对三萜类成分提取率的影响

准确称量 5 份 0.50 g 的树叶粉末,分别加入质量分数为 70%、75%、80%、85%、90% 的乙醇,固定超声时间 15 min、料液比 1:70 (g/mL) 以及上一步骤中最佳超声功率。提取完成后抽滤,定容。按照香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法测定。

1.3.3 料液比对三萜类成分提取率的影响

准确称量 5 份 0.50 g 树叶粉末,使得料液比为 1:40、1:50、1:60、1:70、1:80 (g/mL),固定超声时间 15 min,上一步骤中最佳超声功率及乙醇浓度。提取完成后抽滤,定容。按照香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法测定。

1.3.4 超声提取时间对三萜类成分提取率的影响

准确称量出 5 份 0.50 g 树叶粉末,分别设置超声时间为 15、20、25、30、35 min,之前步骤中最佳超声功率、乙醇浓度以及料液比。提取完成后抽滤,定容。按照香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法测定。

1.4 正交试验

根据单因素的实验结果分别选择 4 个单因素实验中最佳的 3 个水平进行正交试验,以三萜类化合物提取率为评定指标,来确定银叶树提取液中三萜类成分提取率的最佳提取工艺参数。实验设计因素和水平如表 1 所示。

表 1 正交试验设计因素与水平

Tab.1 Orthogonal experimental design factors and levels

Level	Factor			
	Ultrasound power/W	Ethanol concentration/%	Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	Ultrasound time/min
1	210	75	1:50	20
2	240	80	1:60	25
3	270	85	1:70	30

1.5 提取液三萜类成分的分离纯化

1.5.1 大孔树脂的预处理

参考邵长森等^[20]的大孔树脂预处理方法略有改动。将新购大孔树脂用无水乙醇浸泡至其充分溶胀后,倒出漂浮物及无水乙醇,使用去离子水洗至无白色浑浊出现后,进行湿法填柱,再用去离子水洗至流出液无醇味;然后用浓度为 4% 的盐酸溶液将大孔树脂浸泡 4 h,水洗至流出液呈中性;最后用浓度为 4% 的氢氧化钠溶液将大孔树脂浸泡 4 h,水洗至流出液呈中性后备用。

1.5.2 大孔树脂型号的选择

利用静态吸附分析方法在空气恒温振荡摇床上进行平行实验以筛选大孔树脂,减小吸附速率、外界温度等因素对于实验的影响,且筛选速度较快,用此方法筛选适用于富集银叶树树叶粗提液中三萜类成分的大孔树脂型号。

选择不同型号的大孔吸附树脂各 5.0 g,装于 250 mL 带塞的锥形瓶中,加入 40 mL 总三萜浓度为 1.5 mg/mL 的提取液,置于空气恒温振荡摇床中 24 h (25 °C, 100 r/min),大孔树脂充分吸附后过滤,测定滤液总三萜的量 m_1 ,计算总三萜的吸附率。

取过滤后的树脂,加 100 mL 蒸馏水,25 °C 恒温振荡 2 h (100 r/min),过滤后得到水洗滤液,然后在过滤后的树脂中加入 100 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶液,恒温振荡 12 h (25 °C, 100 r/min),过滤得到醇洗滤液,将水洗滤液和醇洗滤液合并,测定滤液(解吸液)中总三萜的量 m_2 ,计算总三萜的解吸率。

$$\text{吸附率}(\%) = [(m_{\text{总}} - m_1)/m_{\text{总}}] \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{解吸率}(\%) = [m_2/(m_{\text{总}} - m_1)] \times 100\% \quad (3)$$

式中: $m_{\text{总}}$ 为吸附前溶液中总三萜的质量,mg; m_1 为吸附后滤液中总三萜的质量,mg; m_2 为解析后滤液中三萜的质量,mg。

1.5.3 三萜类成分的分离纯化

参考张林芳等^[21]的最佳分离条件与实验方法略有改动。利用最佳条件下提取三萜,配制样品,进行静态吸附,使银叶树树叶提取液中的成分

被大孔树脂完全吸附。完成吸附后,先用去离子水以 2.5 mL/min 的流速对大孔树脂进行洗脱,洗脱至流出液无颜色;再用体积分数为 30% 的乙醇溶液以 2.5 mL/min 的流速对大孔树脂进行洗脱,洗脱至流出液无颜色;最后用体积分数为 80% 的乙醇溶液以 2.5 mL/min 的流速对大孔树脂进行洗脱,洗脱至流出液无颜色,并收集该部分洗脱液。对比纯化前后的银叶树提取液的三萜类成分的含量测定。

1.5.4 纯化后提取液的三萜类成分含量测定

将纯化后的提取液进行浓缩,使用移液枪精确移取 0.1 mL 浓缩液至 10 mL 容量瓶中,然后用 70% 的乙醇定容至刻度线,再按照 1.2 的测定步骤进行纯化后的银叶树提取液的总三萜类成分的含量测定。

1.5.5 HPLC 法分析纯化前后样品中桦木酸与齐墩果酸的含量

参考吕吉胜等^[22]、邹盛勤等^[23]的测定方法;用甲醇精确配制浓度分别为:0.030、0.060、0.120、0.240、0.480 mg/mL 的桦木酸与齐墩果酸标准品溶液,采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为 V(甲醇):V(水)=85:15,流动相的流速 1.0 mL/min,检测波长 210 nm,色谱柱的柱温 30 ℃,进样 10 μL。分别绘制浓度与峰面积的回归曲线方程。测定纯化前后的桦木酸与齐墩果酸的峰面积,带入回归曲线,计算样品中两种萜的含量。

1.6 抗氧化活性测定

将纯化后的银叶树提取液的浓缩液冷冻干燥为粉末待进行抗氧化活性测试。

1.6.1 DPPH 自由基清除法测定抗氧化活性

参考张俊等^[24]的实验方法略有改动,以 L(+)-抗坏血酸为参照,DPPH 自由基清除率计算公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\% \quad (4)$$

1.6.2 羟基自由基清除法测定抗氧化活性

参考张艳军等^[25]的实验步骤略有改动。以 L(+)-抗坏血酸为参照,羟基自由基清除率公式为:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \{ [D_0 - (D_1 - D_2)] / D_0 \} \times 100\% \quad (5)$$

1.6.3 铁离子还原能力测定抗氧化活性

参考宋晓凡等^[26]的实验方法略有改动。以

L(+)-抗坏血酸为参照,考察纯化后的银叶树树叶提取液中的三萜类化合物的还原能力。

2 结果与讨论

2.1 齐墩果酸标准曲线的绘制

对不同浓度的齐墩果酸标准品溶液进行吸光度测定,测定所得数据经处理后,以浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,作齐墩果酸标准曲线图如图 1 所示,曲线方程: $y = 3.8048x + 0.0051$, $R^2 = 0.9991$,样品在 0~0.16 mg/mL 浓度范围内与吸光度有比较好的线性关系。

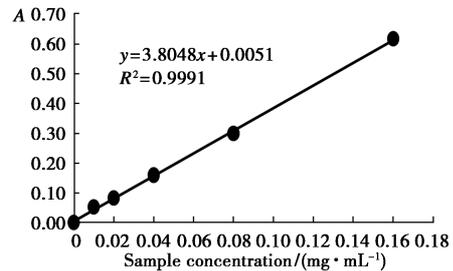


图 1 齐墩果酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of oleanolic acid

2.2 单因素实验的结果分析

2.2.1 超声提取功率对三萜类成分提取率的影响

由图 2 可知,超声提取功率在 180~300 W 的范围内,对提取率的影响是先升高再降低的。在超声功率为 180~240 W 时,可能是由于超声波产生的空化作用增加,使得样品中三萜类成分的析出加快,提取率增大;在超声功率为 240~300 W 时,可能是过于剧烈的空化作用对三萜类成分的结构造成了破坏,导致提取率减小。因此,选择最佳超声提取功率为 240 W。

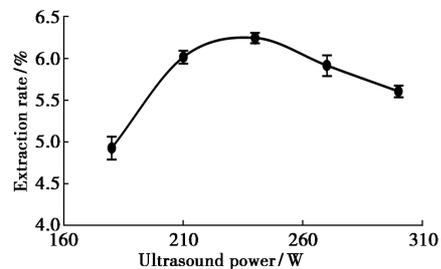


图 2 超声提取功率对三萜类成分提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of triterpenoids

2.2.2 乙醇浓度对三萜类成分提取率的影响

由图 3 可知,乙醇浓度在 70%~90% 的范围内对银叶树三萜类成分提取率的影响是先升高再

下降的,当乙醇浓度为 80% 时,提取率最高。在乙醇浓度为 70%~80% 时,根据“相似相溶”的原理,样品中三萜类成分的析出量变多,使得提取率增大,而后随着乙醇浓度的升高,溶剂极性下降;部分溶解的样品可能析出,导致提取率的减小。因此,最佳乙醇浓度为 80%。

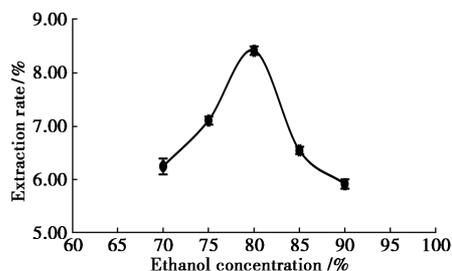


图 3 乙醇浓度对三萜类成分提取率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction rate of triterpenoids

由图 3 可知,乙醇浓度在 70%~90% 的范围内对银叶树三萜类成分提取率的影响是先升高再下降的,当乙醇浓度为 80% 时,提取率最高。在乙醇浓度为 70%~80% 时,根据“相似相溶”的原理,样品中三萜类成分的析出量变多,使得提取率增大,而后随着乙醇浓度的升高,溶剂极性下降;部分溶解的样品可能析出,导致提取率的减小。因此,最佳乙醇浓度为 80%。

2.2.3 料液比对三萜类成分提取率的影响

由图 4 可知,料液比在 1:40~1:80 (g/mL) 的范围内对银叶树三萜类成分提取率的影响是先升高后趋于平缓。在料液比为 1:40~1:60 (g/mL) 时,随着溶剂的增加,提取率增加趋势明显。主要是随着溶剂量的增加,溶液与样品的接触面积逐渐增加,有利于样品与乙醇溶液之间传质作用的进行,可以提高样品中三萜类化合物进入乙醇溶液的量,从而提高提取率;而后增长平缓,表明

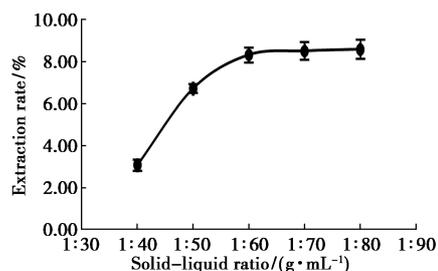


图 4 料液比对三萜类成分提取率的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of triterpenoids

三萜已经基本溶出完全,基于节约溶剂考虑,选择最佳料液比为 1:70 (g/mL)。

2.2.4 超声提取时间对三萜类成分提取率的影响

由图 5 可知,超声提取时间在 15~35 min 的范围内对银叶树三萜类成分提取率的影响是先升高再下降,当超声提取时间为 25 min 时,银叶树三萜类成分提取率达最大。在超声提取时间为 15~25 min 时,可能是因为随着超声时间的延长,银叶树树叶粉末被乙醇溶液提取的程度越充分,使得提取率上升;在超声提取时间为 25~35 min 时,可能是超声波较长时间的振动作用使得溶液的温度升高,导致了部分对温度敏感三萜类成分的结构改变,从而使得提取率下降。因此,最佳超声提取时间为 25 min。

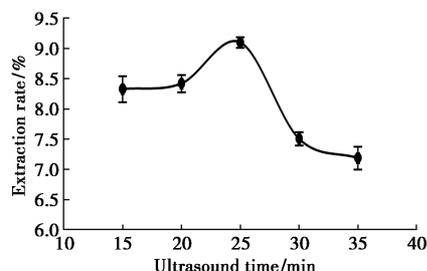


图 5 超声提取时间对三萜类提取率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic extraction time on the extraction rate of triterpenoids

2.3 正交试验结果分析

根据单因素的实验结果分别选择 4 个单因素实验中最佳的水平进行正交试验,设计四因素三水平的正交试验,如表 2 所示。

表 2 正交试验结果表

Tab.2 Result table of orthogonal test

Number	Factor					Extraction rate / %
	Ultrasound power / W	Ethanol concentration / %	Solid-liquid ratio / (g · mL ⁻¹)	Ultrasound time / min	Extraction rate / %	
1	210	75	1:50	20	6.69	
2	240	80	1:60	25	7.89	
3	270	85	1:70	30	6.75	
4	240	75	1:60	30	8.09	
5	270	80	1:70	20	8.79	
6	210	85	1:50	25	8.71	
7	270	75	1:70	25	8.14	
8	210	80	1:50	30	6.88	
9	240	85	1:60	20	7.45	

续表

Number	Factor			
	Ultrasound power/W	Ethanol concentration/%	Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)	Ultrasound time/min
K ₁	7.110	7.640	7.427	7.643
K ₂	8.530	7.853	7.810	8.247
K ₃	7.490	7.637	7.893	7.240
R	1.420	0.216	0.466	1.007

Influence Factor: Ultrasound power>Ultrasound time>Solid-liquid ratio>Ethanol concentration

由表 2 可得,正交试验优化出来的最佳提取工艺条件为:超声提取功率 240 W、乙醇浓度 80%、料液比 1:70(g/mL)、超声提取时间 25 min,且对提取银叶树三萜类成分的影响程度为超声功率>超声时间>料液比>乙醇浓度。

对最佳提取工艺条件进行验证实验,实验结果显示在最佳提取工艺条件下的银叶树三萜类成分的提取率为 9.17%。

2.4 银叶树三萜类纯化结果分析

2.4.1 大孔树脂筛选

根据 1.5.2 的步骤用不同型号的大孔树脂对银叶树总三萜吸附率、解吸率进行测定,对所得数据进行处理后,以大孔树脂的型号为横坐标,总三萜的吸附率、解吸率(%)为纵坐标,绘制不同型号大孔树脂对银叶树总三萜的吸附率、解吸率影响关系图,如图 6 所示。

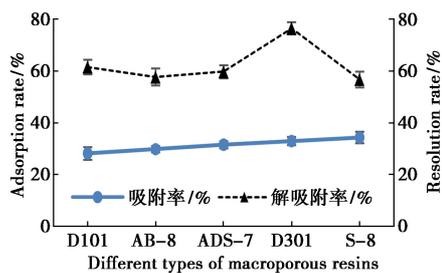


图 6 不同类型大孔树脂对三萜吸附解吸率影响

Fig.6 Effects of different types of macroporous resins on the absorption and desorption rates of the triterpenoids

由图 6 可知,对银叶树总三萜吸附和解吸附的效果在不同种类的大孔吸附树脂中表现不同。吸附率图中 S-8 和 D301 树脂的吸附率明显高于 D101、AB-8 和 ADS-7 树脂;而从解吸率图中分析看,用 80%乙醇作为洗脱剂进行洗脱,结果发现 D101 和 D301 树脂的解吸率显著高于 AB-8、ADS-7 和 S-8 树脂。因此,结合吸附率和解吸率

分析,D301 大孔树脂优于其他 4 种类型的大孔树脂,因此,本实验选用 D301 大孔树脂用于进一步的银叶树总三萜纯化条件的研究。

2.4.2 大孔树脂纯化前后纯度的对比

根据 1.5.3 的步骤对银叶树树叶三萜进行分离纯化,分离纯化前后银叶树三萜类成分的纯度对比如图 7 所示。

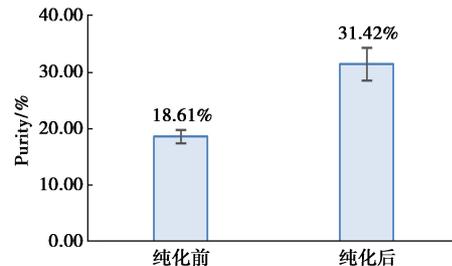


图 7 银叶树三萜类成分纯化前后的纯度对比图

Fig.7 Comparison of purity of triterpenoids from *H.Littoralis* before and after purification

由图 7 可知,纯化前的银叶树树叶提取液中三萜类成分的纯度(三萜质量/提取液含固量)为 18.61%,而纯化后的纯度为 31.42%,较纯化前高 1.69 倍,说明 D301 大孔树脂有效分离纯化的三萜类,提升了银叶树树叶提取液中的三萜类成分的纯度。

2.4.3 高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)法检测纯化前后样品中桦木酸与齐墩果酸的含量分析

将桦木酸与齐墩果酸标准溶液与纯化前后样品依次进样 10 μL,得到相应的色谱图(图 8),记录两种样品的峰面积,分别以对应的峰面积(Y)对其浓度作图(X)。桦木酸色谱峰面积与浓度在 0.03~0.48 mg/mL 范围内呈良好线性,线性方程为:Y=3 563X-47.95(R²=0.999);齐墩果酸色谱峰面积与浓度在 0.025~0.80 mg/mL 范围内呈良

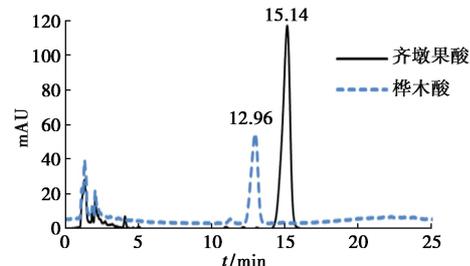


图 8 桦木酸与齐墩果酸标准品的高效液相色谱图

Fig.8 High performance liquid chromatography (HPLC) chromatograms of the standards of betulinic acid and oleanolic acid

好线性,线性方程为: $Y = 5\ 953X + 24.13$ ($R^2 = 0.999$);分别测试纯化前后的样品中桦木酸与齐墩果酸的含量(图 9),齐墩果酸纯化前未检出,纯化后含量为 $0.412\ \text{mg/g}$;桦木酸纯化前含量为 $0.942\ \text{mg/g}$,纯化后含量为 $3.471\ \text{mg/g}$ 。

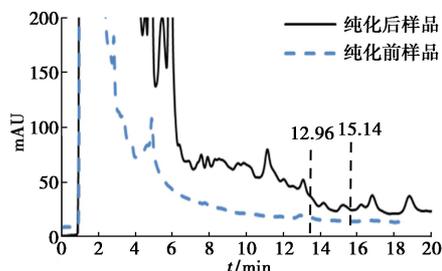


图 9 银叶树三萜类成分纯化前后的 HPLC 图
Fig.9 HPLC chromatograms of triterpenoids from *H.Littoralis* before and after purification

2.5 抗氧化活性测定实验结果分析

2.5.1 DPPH 自由基清除法测定抗氧化活性

对纯化后的样品进行 DPPH 自由基清除法实验测定其抗氧化活性,以银叶树三萜类成分的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以 DPPH 自由基清除率(%)为纵坐标作图,如图 10 所示。

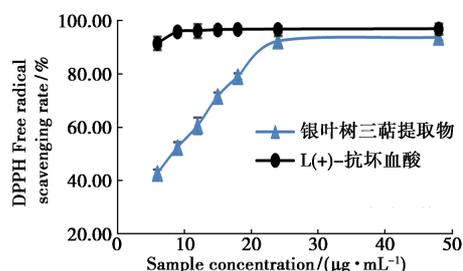


图 10 银叶树三萜类成分的 DPPH 自由基清除率
Fig.10 Scavenging rate of DPPH radical of the triterpenoids from *H.Littoralis*

由图 10 可知,样品浓度为 $6.0 \sim 24.0\ \mu\text{g/mL}$ 的范围内,随着样品浓度的增大,其对 DPPH 自由基的清除率也逐渐增大,存在线性关系 $y = 2.7937x + 27.436$, $R^2 = 0.992$,其中 IC_{50} 为 $8.08\ \mu\text{g/mL}$,浓度超过 $24.0\ \mu\text{g/mL}$ 后,对自由基的清除率已经超过 92% 。说明银叶树三萜类成分对 DPPH 自由基具有比较良好的清除效果。在相同浓度下,对照组 L(+)-抗坏血酸的 DPPH 自由基清除率均要高于样品。

2.5.2 羟基自由基清除法测定抗氧化活性

以银叶树三萜类成分的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以羟基自由基清除率(%)为纵坐标作图,如图 11 所示。

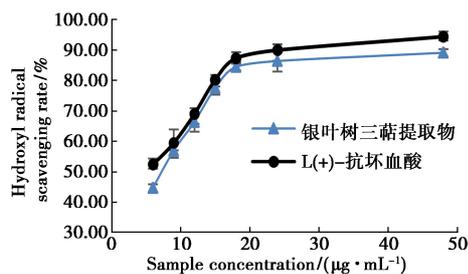


图 11 银叶树三萜类成分的羟基自由基清除率
Fig.11 Clearance rate of hydroxyl free radicals of the triterpenoids from *H.Littoralis*

由图 11 可得,样品浓度为 $6.0 \sim 48.0\ \mu\text{g/mL}$ 的范围内,随着样品浓度的增大,其对羟基自由基的清除率也随之增大。在 $6.0 \sim 18.0\ \mu\text{g/mL}$ 浓度范围, $y = 3.3366x + 25.943$, $R^2 = 0.993$,浓度与清除率呈线性关系,银叶树三萜类成分对羟基自由基的 $IC_{50} = 7.21\ \mu\text{g/mL}$,说明银叶树三萜类成分对羟基自由基具有较为良好的清除效果。在相同浓度下,样品的羟基自由基清除率略低于对照组 L(+)-抗坏血酸($IC_{50} = 5.50\ \mu\text{g/mL}$)。

2.5.3 铁离子还原能力测定

对纯化后的样品进行铁离子还原能力实验测定,以银叶树三萜类成分的浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,以吸光度为纵坐标作图,如图 12 所示。

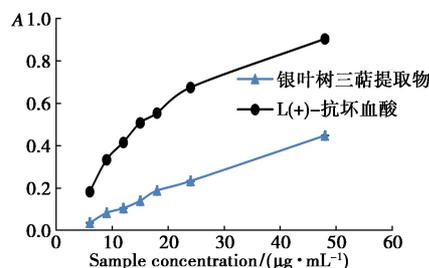


图 12 银叶树三萜类成分的铁离子还原能力
Fig.12 Iron ion reduction capacity of triterpenoids from *H.Littoralis*

由图 12 可得,样品的浓度为 $6.0 \sim 48.0\ \mu\text{g/mL}$ 的范围内,随着样品浓度的增大,其铁离子还原能力也随之增大。当银叶树三萜类成分的浓度为 $48.0\ \mu\text{g/mL}$ 时,说明银叶树三萜类成分有较为良好的铁离子还原能力。在相同浓度下,样品的铁离子还原能力均要低于对照组 L(+)-抗坏血酸。

3 结论

该研究以银叶树树叶为原材料,采用超声辅助提取法对银叶树树叶中的三萜类成分进行提取,并对超声功率、乙醇浓度、料液比、超声时间 4

个单因素对银叶树三萜类成分的提取率进行研究;再利用正交试验对单因素实验得到的最佳提取条件进行优化,获得提取三萜类成分的最优工艺条件;然后用 D301 大孔树脂对最优提取条件下提取的银叶树三萜类成分进行纯化;最后对纯化后的银叶树三萜类成分进行 DPPH 自由基清除实验、羟基自由基清除实验和铁离子还原能力实验以测定银叶树三萜类成分的抗氧化活性。

3.1 单因素及正交试验:在单因素的基础上,正交试验优化出最优提取工艺条件:超声提取功率 240 W、乙醇浓度 80%、料液比 1:70(g/mL)、超声提取时间 25 min,在此条件下,银叶树三萜类成分的提取率为 9.17%。

3.2 分离纯化:选用 D301 大孔树脂未纯化的银叶树三萜类纯度为 18.16%,纯化后的银叶树三萜类纯度为 31.42%,经过 D301 大孔树脂纯化后纯度提高了 1.69 倍,分离纯化效果较好;利用 HPLC 法检测其中两种萜类成分桦木酸与齐墩果酸,桦木酸纯化前含量为 0.942 mg/g,纯化后含量为 3.471 mg/g;齐墩果酸纯化前未检出,纯化后含量为 0.412 mg/g。

3.3 抗氧化活性测定:银叶树三萜类成分对 DPPH 自由基的清除效果随三萜类成分浓度的升高而增大,其对 DPPH 自由基的 $IC_{50} = 8.08 \mu\text{g/mL}$,其对羟基自由基的 $IC_{50} = 7.21 \mu\text{g/mL}$,对铁离子的还原能力随三萜类成分浓度的升高而增大。表明该三萜具有较好的抗氧化活性。

本实验采取价格低廉且毒性小的乙醇作为三萜的提取溶剂以及大孔树脂的洗脱剂,经济环保;超声辅助提取耗时短,提高提取效率;正交设计优化了提取工艺,用清除自由基等法评价抗氧化活性,表明抗氧化活性明显。本研究对银叶树总三萜的提取、纯化和抗氧化活性提供了依据,也将对该三萜下一步作为抗氧化剂深入研究和开发提供了物质基础。

参考文献:

- [1] Flora of China Editorial Committee. Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Beijing: Science Press, 1984.
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1984.
- [2] Lin P. *J. Mar. Drugs*, 1984, **12**(4): 45-51.
- [3] Du Q, Wei W M, Mi D Q. *Guihaia*, 2016, **36**(4): 405-412.
- [4] Ning X Q, Lin Y B, Tan Y F, Huang Y, Li J F, Deng J G. *Guide China Med.*, 2013, **11**(18): 73-75.
宁小清, 林莹波, 谈远锋, 黄艳, 李军芳, 邓家刚. 中国医药指南, 2013, **11**(18): 73-75.
- [5] Jiang J W. *Foreign Med. Sci.: Tradit. Chin. Med.*, 2003, **25**(2): 19-122.
江纪武. 国外医学中医中药分册, 2003, **25**(2): 19-122.
- [6] Zhang Y J, Peng Z W, Zheng Y Y, Zhong Q P, Ou R Z, Quan X H. *J. Chin. Med. Mater.*, 2013, **36**(10): 1674-168.
张艳军, 彭重威, 郑韵英, 钟秋平, 欧闰庄, 全小红. 中药材, 2013, **36**(10): 1674-168.
- [7] Tian Y, Wu J, Zhang S. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 2004, **13**(3): 214-216.
- [8] Tian Y. Research on the Chemical Constituents of the Mangrove Plant *Heritiera littoralis*. Guangzhou: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004.
田艳. 红树林植物银叶树的化学成分研究. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2004.
- [9] Ge L, Li Y J, Yang K D. *Chem. Nat. Compd.*, 2016, **52**: 603-604.
- [10] Miles I D H, Vallapa C W. *J. Nat. Prod.*, 1991, **4**: 286-289.
- [11] Li Y J. Study on the Chemical Constituents of *Heritiera littoralis* Dryand Leaves. Nanning: Guangxi University, 2012.
李月娟. 银叶树的化学成分研究. 南宁: 广西大学, 2012.
- [12] Liang X Q, Liu P, Li J, Guan X L, Zhang Y J, Li J. *Molecules*, 2023, **28**(4): 1 658.
- [13] Christopher R, Nyandora S S, Chacha M, De Koning C B. *Nat. Prod. Res.*, 2014, **28**(6): 351-358.
- [14] Tewtrakul S, Tansakul P, Daengrot C, Ponglimanont C, Karalai C. *Phytomedicine*, 2010, **17**(11): 851-855.
- [15] Dai H F, Mei W L, Hong K, Zeng Y B, Zhuang L. *Chin. J. Mar. Drug.*, 2005, **6**: 44-46.
戴好富, 梅文莉, 洪葵, 曾艳波, 庄令. 中国海洋药物, 2005, **6**: 44-46.
- [16] Ge J M, Liu Z, Zhong Z C, Wang L W, Zhuo X T, Li J J, Jiang X Y, Ye X Y, Xie T, Bai R R. *Bioorg. Chem.*, 2022, **124**: 105 817.
- [17] Ding W X, Du B L, Li J, Zhuang C L. *Acta Pharm. Sin.*, 2024, **59**(5): 1 163-1 175.
丁雯昕, 杜柏霖, 李娇, 庄春林. 药学学报, 2024, **59**(5): 1 163-1 175.

- [18] Liu L L, Tan Y, Yang F, Yi J E. *Chin. Ani. China Husb. Vet. Med.*, 2024, **51**(5): 2 228-2 236.
刘李林, 谭宇, 杨帆, 易金娥. 中国畜牧兽医, 2024, **51**(5): 2 228-2 236.
- [19] Li S Q, Chi H Y, Li Y, Liu C L, Xue Z H. *Food Res. Dev.*, 2010, **1**(12): 81-85.
李嗣乾, 迟洪影, 李艺, 刘春龙, 薛照辉. 食品研究与开发, 2010, **1**(12): 81-85.
- [20] Shao C S, Han Z Z, Zhang G Q, Lin G T, Qu Y J. *China Food Addit.*, 2018, **3**: 80-87.
邵长森, 韩真真, 张国青, 林桂涛, 曲远均. 中国食品添加剂, 2018, **3**: 80-87.
- [21] Zhang L F, Zou L, Sun T T. *China J. Tradit. Chin. Med. Pharm.*, 2016, **31**(4): 1 486-1 489.
张林芳, 邹莉, 孙婷婷. 中华中医药杂志, 2016, **31**(4): 1 486-1 489.
- [22] Lv J S, Hu Y H, LV Z X. *Chin. J. Pharm. Econ.*, 2014, **9**(S1): 60-61.
吕吉胜, 胡媛虹, 吕紫璇. 中国药物经济学, 2014, **9**(S1): 60-61.
- [23] Zou S Q, Mei Y X, Chen Q, Weng S Z, Du Y H. *J. Yichun Univ.*, 2022, **44**(3): 12-14.
邹盛勤, 梅应轩, 陈琴, 翁绍圳, 杜裕华. 宜春学院学报, 2022, **44**(3): 12-14.
- [24] Zhang J, Li J, LV H Y, Ma X. *Food Mach.*, 2018, **34**(2): 154-158.
张俊, 李进, 吕海英, 马雪. 食品与机械, 2018, **34**(2): 154-158.
- [25] Zhang Y J, Peng Z W, Zhong Q P, Ou R Z, Quan X H. *J. South. Agri.*, 2013, **44**(12): 2 066-2 070.
张艳军, 彭重威, 钟秋平, 欧闰庄, 全小红. 南方农业学报, 2013, **44**(12): 2 066-2 070.
- [26] Song X F, Li Y, Yuan Z Z, Ma F M. *Food Res. Dev.*, 2023, **44**(4): 86-91; 106.
宋晓凡, 李岩, 阮珍珍, 马馥梅. 食品研究与开发, 2023, **44**(4): 86-91; 106.