忧遁草总皂苷的提取工艺及其抗氧化活性研究

王 超[1]， 唐年初[*1]， 刘诚毅[2]
（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 海南博禾农业发展有限公司，海南 海口 570100）

摘要： 为了探究忧遁草中总皂苷的最佳提取工艺条件、组成成分和抗氧化能力，采用单因素和响应面设计实验，优化超声辅助提取忧遁草总皂苷的工艺条件，采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱（UPLC-QTOF-MS）分析最佳工艺条件下的总皂苷组成并进行抗氧化活性的检测。结果表明：最佳提取参数为乙醇体积分数 92%，料液质量体积比 1 g:44 mL，提取时间 0.6 h，温度 66 ℃，此时忧遁草总皂苷的提取率为 2.30%，并且从中鉴定出 5 种三萜皂苷；抗氧化实验表明，忧遁草总皂苷具有较强的抗氧化活性，其质量浓度与 $ABTS^+$清除率、$DPPH^+$清除率和 Fe^{3+}还原力呈现较好的相关性，对应自由基清除率的半抑制质量浓度分别为 0.407 mg/mL 和 0.562 mg/mL。研究结果为进一步开发利用忧遁草皂苷提供了参考。

关键词： 忧遁草；总皂苷；响应面法；提取工艺；抗氧化活性
中图分类号：TS 201.2　**文章编号：**1673-1689(2023)05-0063-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.05.009

Extraction of Total Saponins from *Clinacanthus nutans* and Its Antioxidant Activity

WANG Chao[1]， *TANG Nianchu*[*1]， *LIU Chengyi*[2]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Hainan Bohe Agricultural Development Co., Ltd., Haikou 570100, China)

Abstract: In order to explore the optimal extraction conditions, composition and antioxidant capacity of total saponins from *Clinacanthus nutans*, single factor and response surface methodology were used to optimize the ultrasonic-assisted extraction conditions of total saponins from *Clinacanthus nutans*. The composition of total saponins under the optimal extraction conditions was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) and the antioxidant activity was detected. The results indicated that the optimal extraction parameters included 92% volume fraction of ethanol, solid-liquid ratio of 1 g:44 mL, extraction time of 0.6 h, and extraction temperature of 66 ℃, which yielded a total saponin extraction rate of 2.30%. Five triterpene saponins were then identified. The antioxidant experiment showed that the total saponins of *Clinacanthus nutans* had strong antioxidant activity, and there was a good correlation between their mass concentration and their $ABTS^+$ scavenging rate, $DPPH^+$ scavenging rate, and Fe^{3+} reduction ability. The corresponding semi-inhibitory concentrations to free radical

收稿日期： 2021-12-03
基金项目： 企业委托研究项目(170780)。
* **通信作者：** 唐年初(1962—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事油脂加工和工厂设计等研究。
E-mail：tangnc@126.com

scavenging rate were 0.407 mg/mL and 0.562 mg/mL, respectively. The results provide beneficial reference information for further development and utilization of saponins from *Clinacanthus nutans*.
Keywords: *Clinacanthus nutans*, total saponins, response surface methodology, extraction process, antioxidant activity

忧遁草(*Clinacanthus nutans*)是爵床科鳄嘴花属植物,别名扭序花、沙巴蛇草等,在马来西亚、泰国、越南等地广泛分布,在中国主要产于海南、广西和云南等地区[1]。研究表明,忧遁草中含有多种不同类型的化合物,如糖苷类黄酮[2]、酚类、多糖、甾醇类[3]、三萜类[4]、皂苷类以及叶绿素[5]等,具有抗病毒、抗菌、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等药理作用[6-8]。皂苷的结构复杂,根据皂苷元结构可分为三萜皂苷和甾体皂苷,广泛存在于自然界,在单子叶和双子叶植物中均有分布[9]。皂苷具有降血糖、调节免疫、改善学习记忆、抗抑郁等作用[10],除此以外,也有诸多研究发现其具有抗氧化、清除自由基等功能[11]。皂苷提取的常规方法有溶剂提取法、索氏提取法、表面活性剂提取法和超声辅助提取法等[12]。

目前,有关忧遁草中活性成分的研究主要集中在通过各种溶剂提取与萃取、柱层析、结晶等手段,结合质谱和核磁共振等方法,对活性成分进行分离纯化与结构鉴定[13]。但针对总皂苷的提取、皂苷组成以及生物活性等研究少之又少,因此,作者通过超声辅助乙醇提取的方法,在单因素实验的基础上,通过响应面设计对忧遁草中的总皂苷提取工艺进行优化,通过 Liebermann-Burchard 反应和 UPLC-QTOF-MS 进行皂苷定性,并通过测定自由基清除能力和还原力评价抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

忧遁草叶:海南博禾农业发展有限公司产品;DPPH、ABTS、TPTZ:上海源叶生物科技有限公司产品;齐墩果酸、冰乙酸、甲醇、乙醇、高氯酸、乙酐、浓硫酸、过硫酸钾、无水乙酸钠、六水氯化铁、盐酸、磷酸缓冲液、抗坏血酸:国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器设备

HC-350Y 型高速多功能粉碎机、UVmini-1240 型分光光度计:日本岛津公司产品;RE5203 型旋转蒸发仪:上海亚荣仪器厂产品;KQ-300DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;X500R 型超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱仪:ABSCIEX 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 忧遁草总皂苷提取 称取一定量的低温烘干粉碎的忧遁草粉末于烧杯中,加入乙醇溶液,保鲜膜密封,进行超声提取,趁热抽滤取上清液,按等体积加入石油醚进行萃取,弃去上层液,除去叶绿素,减压浓缩至无石油醚味,再次加入等体积饱和正丁醇萃取,将正丁醇相减压浓缩至一定体积即为总皂苷溶液。

1.3.2 皂苷的定性分析 根据 Liebermann-Burchard 反应判别皂苷类型。取 50 mL 的总皂苷溶液在 65 ℃旋转蒸发仪中蒸发,将残渣固体溶于乙酐中,缓慢滴加配好的浓硫酸-乙酐(体积比 1:20)溶液数滴,观察最后呈现的颜色。

1.3.3 齐墩果酸标准曲线的绘制 分别取 0、20、40、80、160、320 μL 的 1 mg/mL 的齐墩果酸标准溶液加到洁净的试管中,在水浴中蒸发,然后添加 0.4 mL 体积分数 5%的香草醛-冰乙酸溶液,完全溶解后,再加入 1.6 mL 的高氯酸,涡旋振荡混匀后,70 ℃水浴加热 20 min,自来水快速冷却至室温,最后,加入 10 mL 的冰乙酸,充分混匀,以不添加齐墩果酸的溶液作空白对照,于 540 nm 处测吸光度[14],得到:

$$A=47.75\rho-0.045\ 3,R^2=0.993\ 3 \quad (1)$$

式中:A 为吸光度,ρ 为齐墩果酸质量浓度。

1.3.4 总皂苷提取率的测定 取浓缩液 100 μL,水浴挥干,按照 1.3.3 步骤操作,平行重复 3 次。

$$m_1=\rho_1\times N\times V \quad (2)$$

$$r=\frac{m_1}{m_0}\times 100\% \quad (3)$$

式中:m_1 为总皂苷质量,mg;ρ_1 为总皂苷质量浓度,mg/mL;N 为稀释因子;V 为提取液体积,mL;m_0 为原料质量,mg;r 为总皂苷提取率,%。

1.3.5 单因素实验 固定超声功率 100 W,对四因素五水平的方案进行探究,以忧遁草总皂苷提取率为指标,考察乙醇体积分数(60%、70%、80%、90%、

100%)、料液质量体积比(1 g:25 mL、1 g:30 mL、1 g:35 mL、1 g:40 mL、1 g:45 mL)、提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)和温度(40、50、60、70、80 ℃)对提取率的影响,实验平行重复 3 次,取平均值。

1.3.6 响应面实验设计 采用 Design-Expert 12 软件进行响应面实验优化,设计影响总皂苷提取率的 4 种提取条件。根据单因素实验,确定每种影响因素的最佳水平,以四因素三水平排列出 29 个组合,响应值为总皂苷提取率,对乙醇体积分数(A,80%~100%)、料液质量体积比(B,1 g:35 mL~1 g:45 mL)、提取时间(C,0.5~1.5 h)、温度(D,60~80 ℃)进行评价。实验因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 实验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 料液质量体积比	C 提取时间/h	D 温度/℃
−1	80	1 g:35 mL	0.5	60
0	90	1 g:40 mL	1.0	70
1	100	1 g:45 mL	1.5	80

1.3.7 忧遁草总皂苷组成分析 采用 UPLC-QTOF-MS 分析,检测条件:色谱柱为 BEH C18 柱(2.1 mm×150 mm,1.7 μm),柱温为 45 ℃,流动相 A 为异丙醇,流动相 B 为乙腈,按照 0~20 min 时 40% A 和 60% B、20~30 min 时 60% A 和 40% B(以上均为体积分数)的梯度进行洗脱。进样量为 5 μL,流量为 0.3 mL/min。在正离子模式下使用点喷雾(ESI)源,N_2 雾化的压力为 275.8 kPa,干燥 N_2 的温度为 400 ℃,流量为 9 L/min,毛细管电压为 3.5 kV,扫描范围为 m/z 100~1 500,离子源温度为 120 ℃。

采用 MassLynxV4.1 软件处理质谱图,根据母离子和碎片信息从 MSfinder 软件中搜索,得到可能的物质分子式和结构式,并通过 Chemspider 数据库进行对比分析,确定总皂苷组成。

1.3.8 ABTS 自由基清除能力的测定 参照 Hu 等的方法[15]稍加修改,将等体积混合制备的 ABTS 工作液,避光放置 16 h,用 PBS 稀释,至 734 nm 处的吸光度为 0.70。将忧遁草总皂苷提取液依次制备成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 的样品溶液备用,各取 0.5 mL 于洁净试管中与 2.5 mL 的 ABTS 工作液涡旋振荡,混匀,避光放置 20 min,然后在 734 nm 处测混合物的吸光度。其中,用 PBS 代替总皂苷溶液作空白对照,用 PBS 代替 ABTS 工作液作样品对照,以同等质量浓度的抗坏血酸作阳性对照,重复实验 3 次,取平均值,按公式(4)计算 ABTS 自由基清除率。

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

式中:R_s 为自由基清除率,A_0 为不含样品溶液的吸光度,A_1 为含有样品溶液吸光度,A_2 为不含 ABTS 工作液的吸光度。

1.3.9 DPPH 自由基清除能力的测定 参照 Hu 等的方法[15]稍加修改,将 31.3 mg 的 DPPH 用乙醇溶解转移至 100 mL 棕色容量瓶中,定容。取 2 mL 不同质量浓度的样品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL)于试管中,加入上述 DPPH-乙醇溶液 3 mL,混合避光反应 0.5 h,在 517 nm 处测吸光度,空白对照为乙醇溶液代替样品溶液,样品对照为 PBS 代替 DPPH 溶液,阳性对照为 VC 代替样品溶液,重复实验 3 次,取平均值,DPPH 自由基清除率按公式(4)计算。

1.3.10 还原力测定 参照段佳辉等的方法[16]配置 FRAP 溶液,取 0.3 mL 质量浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL 的忧遁草总皂苷溶液与 2 mL 的 FRAP 溶液混合,再加入 7.5 mL 的去离子水,摇匀后避光放置 10 min,在 593 nm 处测吸光度,吸光度的大小决定还原力的强弱,同等质量浓度的 VC 作阳性对照,重复实验 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 忧遁草总皂苷定性分析

通过颜色反应并根据皂苷的理化性质,可以初步判断出忧遁草中的皂苷为三萜皂苷,这与刁鸿章等[17]分离出的羽扇豆醇、谷甾醇和黄丹民[18]鉴定的乙酸乙酯部位为五环三萜皂苷相吻合。其中颜色反应中,最后呈现红紫色,这是因为皂苷与浓硫酸溶液在分子内发生重排导致的[19-20]。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 乙醇体积分数对总皂苷提取率的影响 从图 1 可以看出,忧遁草总皂苷提取率随着乙醇体积分数的增加先上升后降低,可能是有些皂苷元结合的糖所含有的羟基的数目较多,导致皂苷极性大,难以溶于体积分数较小的乙醇溶液中;当乙醇体积分数为 90%时,提取率最高,此时忧遁草中总皂苷

全部溶出;随后,部分杂质会溶于无水乙醇中,影响了皂苷的得率[21]。因此,选用乙醇体积分数为 90%进行后续单因素实验,在乙醇体积分数为 80%~100%条件下进行响应面优化。

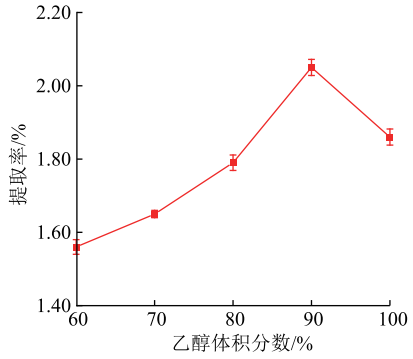


图 1 乙醇体积分数对总皂苷提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol volume fraction on the extraction efficiency of total saponins

2.2.2 料液质量体积比对总皂苷提取率的影响

从图 2 中可以看出,忧遁草总皂苷提取率随着料液质量体积比中乙醇溶液体积的增大先增大后趋于平缓,可能是当乙醇溶液体积过少,总皂苷的浸出会达到溶液饱和,使得总皂苷不能完全浸出,提取率在料液质量体积比 1 g:40 mL 时达到最大,此时继续增加乙醇溶液,提取率趋于稳定。考虑到增加乙醇溶液并不能使提取率升高[22],因此,选用料液质量体积比 1 g:40 mL 进行后续单因素实验,在 1 g:35 mL~1 g:45 mL 条件下进行响应面优化。

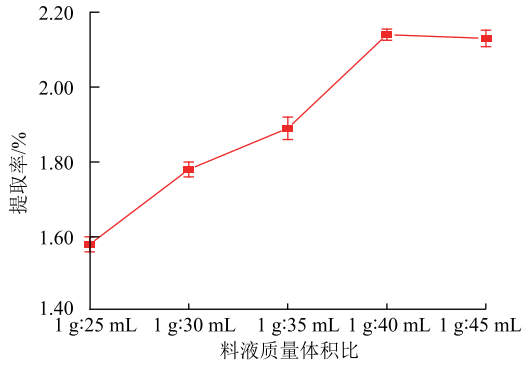


图 2 料液质量体积比对总皂苷提取率的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on the extraction efficiency of total saponins

2.2.3 提取时间对总皂苷提取率的影响

从图 3 中可以看出,当提取时间延长时,总皂苷的提取率出现先快速上升后缓慢下降的趋势。当提取时间为 1.0 h 时,提取率最高。当继续超声辅助提取,一方面,长时间与乙醇溶液接触,其他物质也会溶出,可能会阻碍皂苷溶出的通道;另一方面,受到超声波的影响,也会导致提取液中的部分皂苷发生水解,从而降低总皂苷的提取率[23]。因此,选用提取时间 1.0 h 进行后续单因素实验,在 0.5~1.5 h 条件下进行响应面优化。

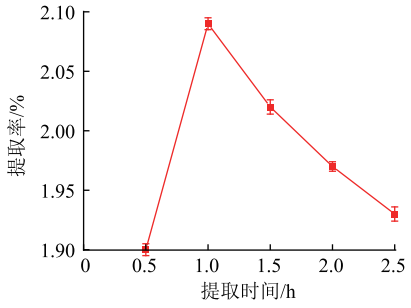


图 3 提取时间对总皂苷提取率的影响

Fig. 3 Effect of time on the on the extraction efficiency of total saponins

2.2.4 温度对总皂苷提取率的影响

从图 4 中可以看出,忧遁草总皂苷提取率随着温度的升高先增加后减少,可能是不同的温度会影响皂苷分子的运动速度,当温度提升时,皂苷分子运动加快,扩散速度加快,从粉末中大量溶出,当温度为 70 ℃,溶液中皂苷含量达到最大。随着温度的进一步升高,高温可能会破坏溶剂中的皂苷结构[24],从而影响了皂苷的提取率。因此,选用温度 70 ℃进行后续单因素实验,在 60~80 ℃条件下进行响应面优化。

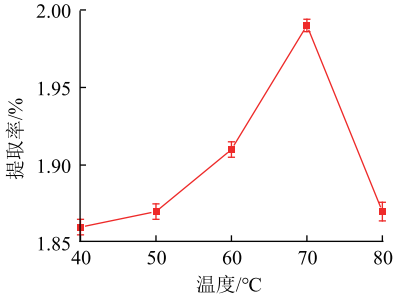


图 4 温度对总皂苷提取率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the extraction efficiency of total saponins

2.3 响应面优化实验结果

根据响应面软件设计出来的实验点进行实验,其提取率如表 2 所示。对实验数据进行方差分析,结果如表 3 所示,经回归拟合后,得到提取率(Y)回归方程:$Y=2.03+0.104\ 9A+0.127\ 3B+0.060\ 6C-$

0.082 4D−0.006 7AB−0.170 0AC−0.105 2AD−0.303 5BC−0.084 8BD−0.054 9CD−0.004 4A^2−0.070 7B^2+0.062 6C^2+0.126 1D^2。

通过方差分析可以看出模型为极显著(P<0.000 1),失拟项为不显著(P>0.05)。该回归模型的总决定系数 R^2 为 0.919 6,且调整 R^2 与预测 R^2 之间的差值为 0.2 左右,说明该回归模型与实验数据的误差较小,实验数据与预测的提取率比较吻合。A、B、D、AC、BC、D^2 均达到极显著水平,C、AD 达到显著水平,说明乙醇体积分数、料液质量体积比、提取时间和温度对总皂苷的提取率有显著影响,且根据 F 值大小,可以看出各因素对总皂苷提取率的影响次序为 B>A>D>C,即料液质量体积比>乙醇体积分数>温度>提取时间[25]。

表 2 响应面设计与结果

Table 2 Response surface Box–Behnken design arrangement and experimental results

实验号	因素				提取率/%
	A 乙醇体积分数/%	B 料液质量体积比	C 提取时间/h	D 温度/℃	
1	90	1 g:35 mL	1.0	80	1.99
2	90	1 g:40 mL	0.5	60	2.15
3	90	1 g:45 mL	1.5	70	1.79
4	90	1 g:40 mL	1.0	70	2.10
5	80	1 g:40 mL	1.0	80	1.99
6	100	1 g:40 mL	1.0	80	2.04
7	90	1 g:40 mL	0.5	80	2.10
8	90	1 g:40 mL	1.5	80	2.14
9	80	1 g:40 mL	1.0	60	2.01
10	90	1 g:45 mL	1.0	80	2.12
11	80	1 g:45 mL	1.0	70	1.94
12	90	1 g:40 mL	1.0	70	1.95
13	90	1 g:45 mL	1.0	60	2.40
14	90	1 g:40 mL	1.0	70	1.97
15	100	1 g:40 mL	1.5	70	2.09
16	90	1 g:40 mL	1.0	70	1.97
17	80	1 g:40 mL	0.5	70	1.80
18	80	1 g:35 mL	1.0	70	1.65
19	100	1 g:45 mL	1.0	70	2.21
20	100	1 g:40 mL	0.5	70	2.22
21	90	1 g:40 mL	1.0	70	2.14
22	90	1 g:35 mL	0.5	70	1.60
23	90	1 g:45 mL	0.5	70	2.39
24	90	1 g:35 mL	1.0	60	1.93
25	90	1 g:35 mL	1.5	70	2.21
26	100	1 g:40 mL	1.0	60	2.48
27	100	1 g:35 mL	1.0	70	1.95
28	80	1 g:40 mL	1.5	70	2.35
29	90	1 g:40 mL	1.5	60	2.41

表 3　回归方程方差分析表

Table 3　Analysis of variance for the regression equation

项目	平方和	自由度	均方差	*F*	*P*	显著性
模型	1.210 0	14	0.086 3	11.440 0	<0.000 1	极显著
A	0.132 0	1	0.132 0	17.510 0	0.000 9	**
B	0.194 4	1	0.194 4	25.780 0	0.000 2	**
C	0.044 1	1	0.044 1	5.850 0	0.029 8	*
D	0.081 5	1	0.081 5	10.800 0	0.005 4	**
AB	0.000 2	1	0.000 2	0.023 8	0.879 5	
AC	0.115 5	1	0.115 5	15.320 0	0.001 6	**
AD	0.044 3	1	0.044 1	5.870 0	0.029 5	*
BC	0.368 5	1	0.368 5	48.860 0	<0.000 1	**
BD	0.028 8	1	0.028 8	3.820 0	0.071 0	
CD	0.012 0	1	0.012 0	1.600 0	0.227 1	
A^2	0.000 1	1	0.000 1	0.016 4	0.899 8	
B^2	0.032 4	1	0.032 4	4.300 0	0.057 1	
C^2	0.025 5	1	0.025 5	3.380 0	0.087 5	
D^2	0.103 2	1	0.103 2	13.690 0	0.002 4	**
残差	0.105 6	14	0.007 5			
失拟项	0.075 0	10	0.007 5	0.981 4	0.557 0	不显著
纯误差	0.030 6	4	0.007 6			
总离差	1.310 0	28				

注：** 表示 $P<0.01$，差异极显著；* 表示 $P<0.05$，差异显著。

2.4　最佳工艺的验证

根据回归模型，从忧遁草中提取总皂苷的最佳工艺为：乙醇体积分数 92.29%、料液质量体积比 1 g:44.32 mL、提取时间 0.62 h、温度 66.70 ℃，该条件预测忧遁草总皂苷的提取率为 2.349%，为了便于实际操作，调整后乙醇体积分数 92%，料液质量体积比 1 g:44 mL，提取时间 0.6 h，温度 66 ℃，在此条件下进行 3 次重复实验，并取平均值与预测值进行比较，得出忧遁草总皂苷的实际提取率为 2.30%，与预测值较为接近。因此，说明该模型能够有效地优化忧遁草总皂苷的提取工艺。

2.5　总皂苷组成分析

在正离子模式下对忧遁草醇提物进行 UPLC-QTOF-MS 检测，总离子流图如图 5 所示，初步鉴定忧遁草中含有 5 种三萜皂苷，如表 4 所示。忧遁草中皂苷成分的出峰时间主要在 17~28 min，*m/z* 集中在 900~1 000。5 种三萜皂苷均为首次从忧遁草中鉴定出来，对忧遁草皂苷成分的分离与纯化提供一定的理论依据。

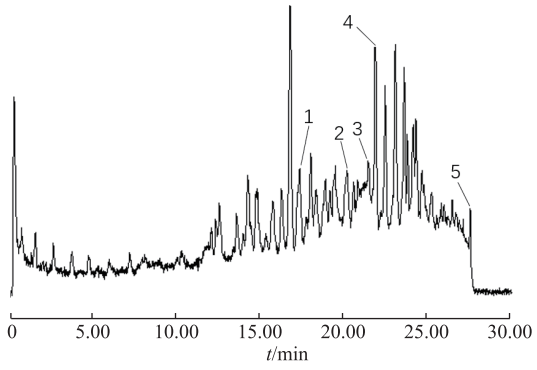


图 5　忧遁草醇提物的 UPLC-QTOF-MS 总离子流色谱图

Fig. 5　UPLC-QTOF-MS total ion chromatograms of alcohol extract of *Clinacanthus nutans*

2.6　抗氧化活性分析

2.6.1　对 ABTS 自由基清除效果　从图 6 中可以看出，总皂苷在质量浓度为 0.2~1.4 mg/mL 时，对 ABTS 自由基清除率呈现先增加后平缓稳定的趋势，且质量浓度与清除率存在一定的量效关系，而 VC 对 ABTS 自由基清除率一直处于较高且稳定的趋势，平均清除率达到 99.00%。总皂苷质量浓度为

表 4 忧遁草醇提物中皂苷成分的初步鉴定结果

Table 4 Preliminary identification results of saponins in alcohol extract of *Clinacanthus nutans*

色谱峰编号	保留时间/min	化合物名称	分子式	相对分子质量	[M+H] *m/z*
1	17.802	(3β,16α,21β,22α)-16,21-diacetoxy-28-hydroxy-22-[(3-methylbutanoyl)oxy]olean-12-en-3-yl 2-O-β-D-galactopyranosyl-β-D-glucopyranosiduronicacid	$C_{51}H_{80}O_{19}$	997.169 5	997.592
2	20.871	kaikasaponin Ⅲ[26]	$C_{48}H_{78}O_{17}$	927.122 7	927.776
3	21.353	araliasaponin I	$C_{47}H_{76}O_{18}$	929.095 5	929.773
4	21.910	gypenoside XXV	$C_{47}H_{78}O_{18}$	931.111 0	931.758
5	27.190	28-glucosyl-30-methyl-3b,23-dihydroxy-12-oleanene-28,30-dioate 3-[arabinosyl-(1->3)-glucuronide]	$C_{48}H_{74}O_{21}$	987.089 0	987.974

1.0 mg/mL 时,对 ABTS 自由基清除率达到最大(97.55%),接近 VC 对自由基的清除能力,且半抑制质量浓度 IC_{50} 为 0.407 mg/mL,说明忧遁草总皂苷对 ABTS 自由基具有较好的清除效果。

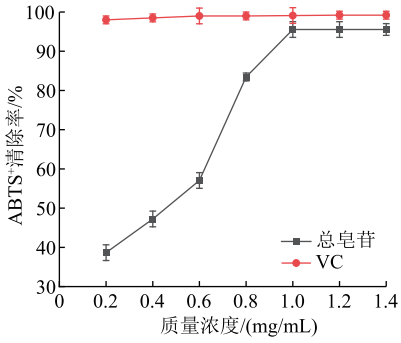


图 6 忧遁草总皂苷及 VC 对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 6 ABTS⁺ scavenging activity of total saponins from *Clinacanthus nutans* and VC

2.6.2 对 DPPH 自由基清除效果 如图 7 所示,在质量浓度为 0.2~1.4 mg/mL 时,VC 一开始就出现较高且维持稳定的清除能力,清除率达到 99.00%。与VC 相比,忧遁草总皂苷对 DPPH 自由基的清除率随着质量浓度的增加呈现先升高后稳定的趋势,当质量浓度为 1.2 mg/mL 时,达到最大清除率 94.67%,且 IC_{50} 为 0.562 mg/mL,因此,说明忧遁草总皂苷对 DPPH 自由基具有较好的清除能力,但要弱于 VC。

2.6.3 还原力的测定 如图 8 所示,在实验的质量浓度范围内,忧遁草总皂苷和 VC 对 Fe^{3+}的还原力与质量浓度存在明显的正相关,且增长趋势相同,即随着质量浓度的增加,还原力也在不断地升高,但与VC 相比,在同等质量浓度下,忧遁草总皂苷的还原力低于 VC。总的来说,忧遁草对 Fe^{3+}具有一定的还原力。

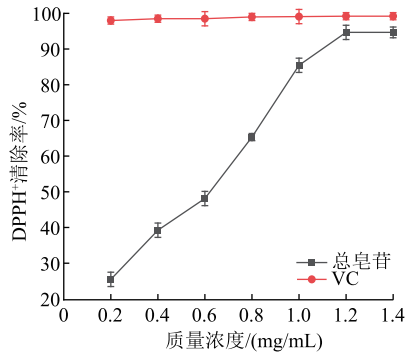


图 7 忧遁草总皂苷及 VC 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 7 DPPH⁺ scavenging activity of total saponins from *Clinacanthus nutans* and VC

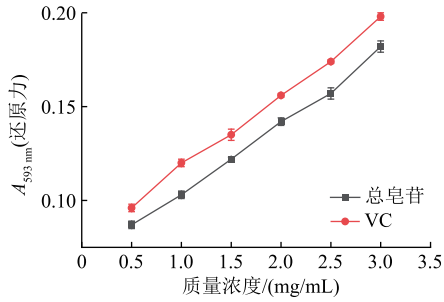


图 8 忧遁草总皂苷及 VC 的还原能力

Fig. 8 Reducing power of total saponins from *Clinacanthus nutans* and VC

3 结 语

通过研究忧遁草总皂苷的提取工艺、皂苷组成以及抗氧化活性,最佳提取参数根据单因素和响应面实验结果如下:乙醇体积分数 92%,料液质量体积比 1 g:44 mL,提取时间 0.6 h,温度 66 ℃,此时测得的忧遁草总皂苷提取率为 2.30%,该工艺将为后续的进一步优化提供理论基础。根据皂苷的理化性

质，通过颜色反应和沉淀反应，鉴定忧遁草中的皂苷属于三萜皂苷，并通过质谱分析出忧遁草中含有5种三萜皂苷，为皂苷成分的相关药理活性提供重要参考。体外抗氧化实验中忧遁草总皂苷对ABTS自由基和DPPH自由基具有较好的清除作用，其IC_{50}分别为0.407 mg/mL和0.562 mg/mL，对Fe^{3+}也具有较强的还原力，该研究为忧遁草治疗由氧化应激导致的疾病提供一定的参考。

参考文献：

[1] 任楠，张文熙，张泽明，等. 鳄嘴花不同萃取部位的抗肿瘤活性及化学成分分析[J]. 湖北民族大学学报，2021，38(1)：17-21.
[2] TESHINA K，KANEKO T，OHTANI K，et al. C-glycosyl flavones from *Clinacanthus nutans* [J]. **Natural Medicines**，1997，51(6)：557.
[3] 易博，徐文彤，邓盾，等. 鳄嘴花叶氨基酸和微量元素分析及其化学成分研究[J]. 解放军药学学报，2012，28(5)：396-399.
[4] 王瑶，钟希文，张文霞. 鳄嘴花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房，2016，27(1)：108-111.
[5] 段佳辉. 忧遁草叶提取物解酒、保肝及抗氧化功能的研究[D]. 无锡：江南大学，2019.
[6] WANIKIAT P，PANTHONG A，SUJAYANON P，et al. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts[J]. **Journal of Ethnopharmacology**，2008，116(2)：234-244.
[7] DANMIN H，WEN J G，JING G，et al. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response[J]. **Molecules**，2015，20(9)：17405-17428.
[8] TU S F，LIU R S，CHENG Y B，et al. Chemical constituents and bioactivities of *Clinacanthus nutans* aerial parts[J]. **Molecules**，2014，19(12)：20382-20390.
[9] 刘克明，佟继铭，刘永平，等. 三萜皂苷分离纯化方法的研究进展[J]. 承德医学院学报，2017,34(2)：154-156.
[10] BYUNG C，BOSIRE K O，LEE E S，et al. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells[J]. **Cancer Letters**，2005，218(1)：81-90.
[11] CARDENAS C，QUESADA R，MEDINA M A. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process [J]. **Biochemical and Biophysical Research**，2004，320(2)：402-408.
[12] 杨钰蓉，赵佳桃，吴宁，等. 刺蒺藜中总皂苷的提取及分析测试方法研究[J]. 化学工程师，2021,35(2)：57-59.
[13] 冷鹏，黄丽蓉，宋小平，等. 忧遁草化学成分的研究[J]. 中成药，2018,40(9)：1995-2000.
[14] WANG N，WANG H Y，WENG Z，et al. Decolorization of sapindus pericarp extract by hydrogen peroxide and a comparison of basic characteristics before and after decolorization[J]. **Journal of Surfactants and Detergents**，2014，17(5)：1003-1011.
[15] HU X，TANG J R，ZHANG G L，et al. Optimization of extraction process and antioxidant activities of saponins from *Camelia fascicularis* leaves[J]. **Journal of Food Measurement and Characterization**，2021，15：1889-1898.
[16] 段佳辉，徐德平，钱志娟，等. 忧遁草抗氧化功效与成分的研究[J]. 食品科技，2019，44(3)：205-210.
[17] 刁鸿章，陈文豪，宋小平，等. 鳄嘴花全草的化学成分研究[J]. 中药材，2017，40(5)：1101-1104.
[18] 黄丹民. 鳄嘴花特征活性组分对HepA移植瘤小鼠的抗肿瘤机制与安全性评价的研究[D]. 镇江：江苏大学，2016.
[19] 王珂，张志宇，赵茜茜，等. 文冠果种仁总皂苷的提取纯化及其抗氧化活性[J]. 陕西师范大学学报，2016，44(2)：116-124.
[20] 杨俊杰，吕平.天然药物化学[M]. 北京：化学工业出版社，2018：164-165.
[21] LE A V，PARKS S E，NGUYEN M，et al. Optimisation of the microwave-assisted ethanol extraction of saponins from gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) seeds[J]. **Medicines**，2018，5(3)：1-13.
[22] 杨秀东，白子凡，徐永涛，等. 响应面法优化托盘根总皂苷提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技，2021，42(18)：183-189.
[23] 姬海刚，杨秀芳，惠昱昱，等. 响应曲面法优化提取柴胡总皂苷的工艺[J]. 应用化工，2020，49(11)：2787-2790.
[24] 石子林，李军乔，王雅琼，等. 密花香薷总皂苷提取工艺优化及其生物活性[J]. 江苏农业学报，2021，37(1)：185-191.
[25] 马艳弘，孟勇，崔晋，等. 牛蒡多酚超声辅助酶法提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(1)：38-45.
[26] 谢璐欣，黄秋连，杨碧穗，等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析不同变种来源葛花的化学成分差异性[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(19)：149-156.