Global Science Publishing

中药升麻总三萜制备工艺及其肿瘤细胞增殖抑制活性研究

孙诗阳，张俊儒，赵丽瞳，杨建群，田航周，张瑞瑞（通讯作者）
陕西国际商贸学院药学院，陕西咸阳

DOI:10.62836/medicine.v3i5.1521

摘要：目的：建立升麻总三萜的制备工艺并评价其体外抗肿瘤活性。方法：以总三萜转移率为指标，采用单因素试验结合L9(3⁴)正交设计优化醇提工艺；比较5种大孔吸附树脂的吸附解吸性能，考察动态泄漏与梯度洗脱参数；以MTT法测定总三萜对HepG2、MCF-7、A549及正常肝细胞LO2增殖的抑制作用。结果：最优醇提工艺为70%乙醇、料液比1∶10、每次1.5h、提取2次，总三萜转移率66.0%；D101树脂上样4BV、以50%乙醇洗脱，产物总三萜纯度达41.6%，为粗提物的3.5倍；总三萜对HepG2、MCF-7、A549细胞的IC50分别为84.6、102.3、126.8 μg·mL⁻¹，对LO2细胞的IC50为372.5 μg·mL⁻¹，选择性指数以HepG2最高（4.4）。结论：优化后的制备工艺稳定可行，升麻总三萜体外抗肿瘤活性确切且对正常肝细胞毒性较低，可为升麻的抗肿瘤相关开发提供依据。

关键词：升麻；总三萜；大孔吸附树脂；正交试验；抗肿瘤活性；MTT法

Preparation Process of Total Triterpenoids from Cimicifuga and Its Inhibitory Effect on Tumor Cell Proliferation

Shiyang Sun, Junru Zhang, Litong Zhao, Jianqun Yang, Hangzhou Tian, Ruirui Zhang (corresponding author)
Shaanxi University of International Trade & Commerce, Xianyang, Shaanxi

Abstract: Objective: To establish a preparation process for total triterpenoids from *Cimicifuga* (Shengma) and evaluate their *in vitro* anti-tumor activity. Methods: Using the transfer rate of total triterpenoids as an indicator, the ethanol extraction process was optimized through single-factor experiments combined with an L9(3^4) orthogonal design. The adsorption and desorption performance of five types of macroporous adsorption resins were compared, and parameters for dynamic breakthrough and gradient elution were investigated. The inhibitory effects of the total triterpenoids on the proliferation of HepG2, MCF-7, and A549 cells, as well as normal liver cells (LO2), were assessed using the MTT assay. Results: The optimal ethanol extraction process involved using 70% ethanol at a solid-to-liquid ratio of 1:10, with two extraction cycles of 1.5 hours each, resulting in a total triterpenoid transfer rate of 66.0%. Using D101 resin with a sample loading volume of 4 bed volumes (BV) and elution with 50% ethanol, the purity of the total triterpenoids reached 41.6%—a 3.5-fold increase compared to the crude extract. The IC50 values for the total triterpenoids against HepG2, MCF-7, and A549 cells were 84.6, 102.3, and 126.8

*陕西省大学生创新创业训练计划项目，项目名称“升麻中总三萜的提取、分离纯化及抗肿瘤活性初步研究”（编号：S2024131230062）。

μg·mL^{-1}, respectively, while the IC50 for LO2 cells was 372.5 μg·mL^{-1}; the selectivity index was highest for HepG2 cells (4.4). Conclusion: The optimized preparation process is stable and feasible. The total triterpenoids from *Cimicifuga* exhibit clear *in vitro* anti-tumor activity with relatively low toxicity toward normal liver cells, providing a basis for the potential development of *Cimicifuga*-based anti-tumor agents.

Keywords: *Cimicifuga* (Shengma); total triterpenoids; macroporous adsorption resin; orthogonal experiment; anti-tumor activity; MTT assay

1 引言

升麻为毛茛科植物大三叶升麻、兴安升麻或升麻的干燥根茎，具发表透疹、清热解毒、升举阳气之功效[1]。现代研究表明，升麻的主要活性成分为环菠萝蜜烷型三萜及其苷类，兼含色酮、酚酸等成分，其提取物与总苷对多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用，并可诱导肿瘤细胞凋亡[2,3]，是升麻“主解百毒”功效的重要物质基础。药典现行标准尚无总三萜相关定量指标，升麻药材及含升麻制剂的质量控制多依赖升麻苷H-1等个别成分，难以反映整体三萜类成分的量与质。

然而，现有研究多集中于单体成分的分离鉴定与活性筛选，面向总三萜富集的规模化制备工艺报道有限。靳波等虽建立了以总酚酸和总三萜皂苷双指标综合评价的大孔树脂纯化方法[4]，但其目标为提取物整体精制，未衔接纯化产物与抗肿瘤活性的对应关系；曹丽等虽证实兴安升麻总苷的体内外抗肿瘤药效[5]，亦未给出可放大的制备工艺参数。以总三萜为单一目标、贯通“提取—纯化—活性”的完整工艺链仍缺乏系统数据。

据此，本研究以总三萜转移率与纯度为主线，先以单因素结合正交设计优化醇提参数，继以大孔树脂动态吸附-梯度洗脱实现总三萜富集，再以MTT法考察纯化产物对HepG2、MCF-7、A549三种人肿瘤细胞及正常肝细胞LO2的增殖抑制作用，并引入选择性指数评估其安全性窗口，构建“提取-纯化-活性”一体化评价体系，为升麻总三萜的制备及其抗肿瘤相关产品开发提供工艺与药效学依据。

2 材料与方法

采用紫外分光光度计、高效液相色谱仪、CO_2培养箱、酶标仪等设备；升麻饮片经鉴定为升麻干燥根茎，齐墩果酸为对照品，选用5种大孔吸附树脂，人肝癌HepG2、乳腺癌MCF-7、肺癌A549及正常肝LO2细胞购自中科院细胞库。以香草醛-高氯酸比色法测定总三萜含量并完成方法学验证。以总三萜转移率为指标，经单因素考察后开展$L_9(3^4)$正交试验，优化回流提取工艺并放大验证。通过静态吸附-解吸试验筛选适宜大孔树脂，动态试验确定上样量与梯度洗脱条件，获得总三萜纯化物。采用MTT法评价粗提物与纯化物体外抗肿瘤活性，设置顺铂为阳性对照，计算抑制率、IC50及选择性指数SI。使用SPSS 26.0、Python 3.13开展统计分析，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 醇提工艺优化

单因素结果显示，总三萜转移率随乙醇体积分数升高呈先升后降趋势，50%乙醇时仅为54.8%，70%乙醇时达峰（63.1%），继续升至80%、90%时分别降至60.2%、55.4%（**图1**a）。这与升麻三萜苷的极性特征相符：糖基数较多的苷类在低浓度乙醇中溶解较好，而苷元比例高的三萜更易溶于高浓度乙醇，70%乙醇对两类成分的溶出较为均衡；同时高浓度乙醇也使叶绿素、色素等脂溶性杂质共溶出增加，不利于后续树脂纯化。料液比与提取次数的单因素结果亦显示1∶10、提取2次后转移率增幅趋缓，考虑溶

剂与能耗成本，选择两者中值水平进入正交设计。

正交试验结果见**表1**，极差分析（**图1b**）表明各因素影响次序为A（R=8.6）>B（R=4.7）>D（R=2.9）>C（R=1.9），乙醇体积分数为主要影响因素，最优水平组合为$A_2B_2C_2D_2$，即70%乙醇、料液比1∶10、每次1.5h、提取2次。值得注意的是，正交表中转移率最高的处理组合为5号（65.4%），其提取时间与次数并非最优水平，而极差分析所得最优组合在表外，遂按该组合进行3批验证，转移率分别为65.6%、66.2%、66.1%（RSD=0.5%），均高于正交表中任一处理组合，表明模型预测可靠，工艺稳定可行。

3.2 大孔树脂筛选与动态纯化

大孔树脂的吸附性能取决于比表面积、孔径及表面极性与目标分子的匹配程度。5种树脂的静态吸附解吸性能见**图2a**：D101与HPD-100同属非极性树脂，D101吸附量86.2mg·g^{-1}、解吸率87.4%，均居首位；HPD-100吸附量相近（82.5mg·g^{-1}）但解吸率仅78.9%，提示其孔道内部分吸附位点结合过强，目标成分难以完全洗脱；弱极性AB-8各项适中；NKA-9、S-8吸附量明显偏低。升麻三萜苷以疏水苷元为吸附锚定位点、糖基朝向溶液，非极性表面与适中孔径的组合最利于可逆吸附，故选定D101进行动态试验。

泄漏曲线（**图2b**）显示，上样初期泄漏率低于2%，至4BV时升至5.6%、6BV时达16.5%，此后迅速上升，说明树脂吸附位点趋于饱和；以泄漏率5%为工作终点，确定上样量以4BV为宜，此时树脂工作容量得到充分利用而目标成分损失可控。动态吸附量折算约72.6mg·g^{-1}，为静态值的84%，符合柱色谱动态传质的一般规律。

3.3 梯度洗脱与纯化效果

梯度洗脱结果见**图3a**：水与30%乙醇流分以糖类、有机酸等高极性杂质为主，二者合计占固体量的27.4%，但总三萜纯度仅3.1%、9.8%，可直接弃去，起到快速除杂作用；50%乙醇流分固体占比38.5%、总三萜纯度41.6%，为主要目标流分；70%

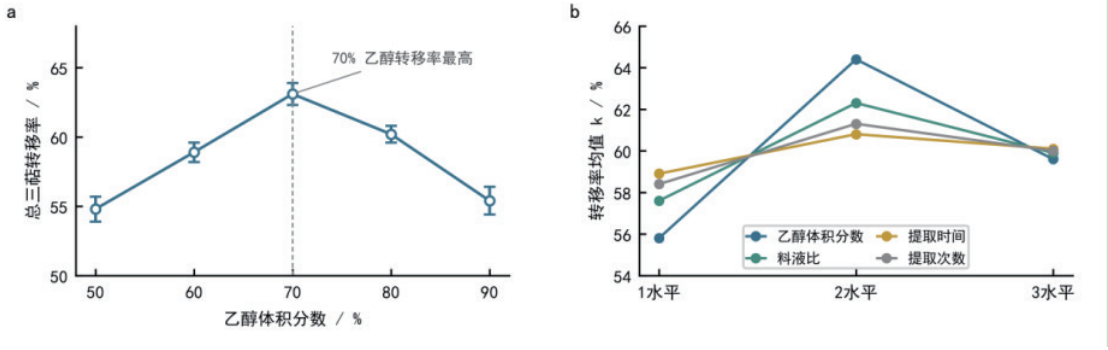


图1. 乙醇体积分数对转移率的影响（a）及正交试验极差分析（b）

表1. L9 (3^4) 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	转移率/%
1	60%	1∶8	1.0 h	1次	50.9
2	60%	1∶10	1.5 h	2次	60.5
3	60%	1∶12	2.0 h	3次	56.0
4	70%	1∶8	1.5 h	3次	63.0
5	70%	1∶10	2.0 h	1次	65.4
6	70%	1∶12	1.0 h	2次	64.7
7	80%	1∶8	2.0 h	2次	58.8
8	80%	1∶10	1.0 h	3次	61.0
9	80%	1∶12	1.5 h	1次	59.0

注：A.乙醇体积分数；B.料液比；C.提取时间；D.提取次数

乙醇流分纯度28.3%，仍含较多三萜苷元与脂溶性成分；90%乙醇流分以色素类杂质为主，纯度回落至12.4%。合并50%与70%流分，总三萜纯度为36.9%。与醇提粗提物相比（**图3b**），纯化物总三萜纯度由11.8%提高至36.9%，纯化倍数3.1，转移率58.3%，兼顾了纯度与收率；继续提高洗脱溶剂浓度会使杂质共溶出增加，纯度不升反降，故不再细分洗脱梯度。3批纯化试验的纯度RSD为1.8%，工艺重现性良好。

3.4 总三萜体外抗肿瘤活性

MTT结果见**表2**、总三萜对HepG2、MCF-7、A549细胞的增殖抑制呈明确剂量依赖性，在100μg·mL^{-1}以上抑制率随浓度快速上升，Hill拟合斜率1.45；IC50分别为84.6、102.3、126.8μg·mL^{-1}，活性均强于同剂量下的粗提物（HepG2 IC50为168.0μg·mL^{-1}），提示纯化过程对活性成分的富集具有明确增益，且增益幅度与总三萜纯度提升幅度基本相当。

安全性维度上，总三萜对正常肝细胞LO2的IC50为372.5μg·mL^{-1}，约为HepG2的4.4倍，选择性指数依次为HepG2（4.4）>MCF-7（3.6）>A549（2.9），对HepG2的选择性最为突出，提示升麻总三萜在有效浓度窗口内对正常肝细胞毒性较低，具备进一步开发的活性基础。粗提物对LO2的IC50亦高于总三萜组，但两种样品的细胞毒谱整体平行，说明纯化未引入新的毒性组分。

表2. 总三萜与粗提物对4种细胞的IC50及选择性指数

细胞	总三萜IC50/(μg·mL^{-1})	粗提物IC50/(μg·mL^{-1})	SI
HepG2	84.6	168.0	4.4
MCF-7	102.3	205.4	3.6
A549	126.8	238.6	2.9
LO2	372.5	490.7	—

4 讨论

本研究将制备与活性评价衔接为完整链条。工艺层面，70%乙醇提取与D101树脂50%乙醇洗脱的组合使总三萜纯度提高3.1倍且转移率保持在58%

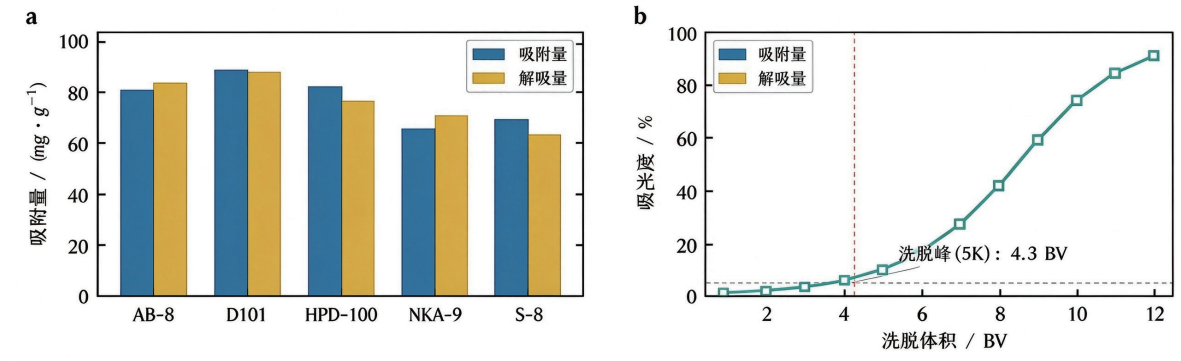


图2. 5种大孔树脂静态吸附解吸性能（a）及D101动态泄漏曲线（b）

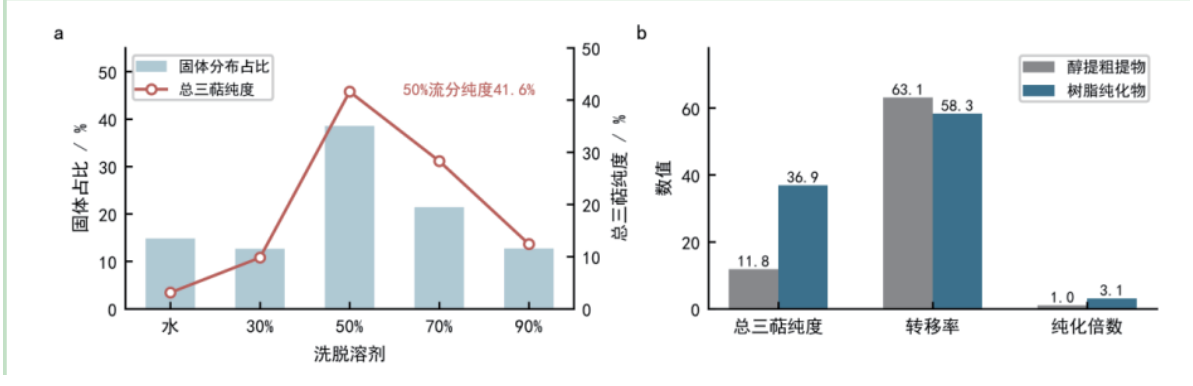


图3. 梯度洗脱流分分布与纯度（a）及纯化前后质量指标对比（b）

以上，各步操作均为常规设备可实现的单元过程，具备放大基础。与靳波等以双指标综合评价所得的AB-8工艺相比[4]，本研究以总三萜为单一目标，目标流分集中、纯化倍数更高，更契合以抗肿瘤为导向的产品定位；水洗与30%乙醇洗脱弃去部分占固体量近三成，说明除杂阶段对减轻树脂产物杂质负荷贡献明显。

活性层面，总三萜对3种肿瘤细胞的抑制作用呈明确的剂量-效应关系，纯化物活性强于粗提物且增益幅度与纯度提升基本相符，说明总三萜是升麻抗肿瘤作用的主要载体，与文献报道的环菠萝蜜烷型三萜苷对HepG2、MCF-7等细胞的抑制活性一致[3,5]。孙海燕等分离的25-O-乙酰基-7,8-去氢升麻醇-3-O-β-D-吡喃木糖苷对MCF-7、HepG2的IC50分别为17.7、22.0μmol·L^{-1}[3]，折算质量浓度约为10～12μg·mL^{-1}，强于本研究总三萜部位，提示部位活性来自其中高活性苷类的加和，后续可结合HPLC谱-效关联锁定贡献最大的单体成分。

值得注意，总三萜对LO2细胞的IC50远高于肿瘤细胞，选择性指数达4.4，提示其在有效浓度窗口内对正常肝细胞毒性较低；但本研究仅进行了48h的体外细胞实验，未涉及体内药效、代谢与长期毒性，结果外推需谨慎。此外，比色法测定总三萜以齐墩果酸为对照，与升麻实际的环菠萝蜜烷型三萜结构存在差异，纯度与转移率的绝对值可能存在一定系统偏差，后续宜结合HPLC多成分定量加以校正[1]；总三萜中三萜苷与游离苷元的比例对树脂吸附行为及活性均有影响，值得在后续试验中分层考察。

5 结论

本研究建立了升麻总三萜“70%乙醇提取—D101树脂纯化—50%乙醇洗脱”的制备工艺，总三萜纯度达36.9%（目标流分41.6%），转移率58.3%；所得总三萜对HepG2、MCF-7、A549细胞增殖具有明确抑制作用，且对正常肝细胞选择性较高。工艺稳定可行、活性数据完整，可为升麻总三萜的规模化制备及其抗肿瘤相关开发提供参考。

参考文献

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:73-74.

[2]陈李乙,李佳欣,张美晴,等.升麻药材化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2023,54(5):1685-1704.

[3]孙海燕,刘蓓蓓,陈四保.升麻中环菠萝蜜烷三萜化学成分及其抗肿瘤活性的研究[J].中南药学,2015,13(3):234-238.

[4]靳波,刘友平,陈鸿平,等.升麻提取物纯化工艺研究[J].中成药,2011,33(10):1807-1810.

[5]曹丽,杨卫杉,潘瑞乐,等.兴安升麻总苷抗肿瘤药效研究[J].中国中医药信息杂志,2008,15(12):31-33.

Copyright © 2026 by author(s) and Global Science Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access