

## 白英抗肿瘤成分提取工艺的研究

韩重<sup>1</sup>, 黄霁<sup>1</sup>, 何珉<sup>2</sup>, 董春娇<sup>1</sup>, 王敏伟<sup>1</sup>, 孙立新<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 大连长白山医药有限公司, 辽宁 大连 116021)

**摘要:**目的 探讨白英抗肿瘤成分提取工艺的最佳工艺条件。方法 采用  $L_9(3^4)$  正交设计法, 分别以浸膏率、半数有效抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 和薯蓣皂苷元的质量分数为考察指标, 对白英提取工艺条件进行筛选。结果 以浸膏率为考察指标时, 其优选工艺为  $A_2B_3C_3$ , 其中提取次数对浸膏率有显著性影响; 以  $IC_{50}$  为考察指标时, 其优选工艺为  $A_3B_3C_1$ ; 以薯蓣皂苷元的质量分数为考察指标时, 其优选工艺为  $A_2B_2C_1$ 。综合考察采用 50% 的乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h 为最佳工艺条件。结论 本实验所采用的方法适合白英抗肿瘤成分的提取。

**关键词:** 白英; 正交设计; 提取工艺

**中图分类号:** R284.2; R286.02; R286.91

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2006)10-1500-03

### Extracting technology for anti-tumor components in *Solanum lyratum*

HAN Zhong<sup>1</sup>, HUANG Ji<sup>1</sup>, HE Min<sup>2</sup>, DONG Chun-jiao<sup>1</sup>, WANG Min-wei<sup>1</sup>, SUN Li-xin<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Dalian Changbaishan Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116021, China)

**Key words:** *Solanum lyratum* Thunb.; orthogonal design; extracting technology

白英为茄科植物白英 *Solanum lyratum* Thunb. 的干燥全草, 具有清热解毒、祛风化痰、祛风除湿等功效。白英中主要化学成分有甾体皂苷类、甾体生物碱类等, 临床上多用于治疗肺癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌等多种癌症, 但白英的提取工艺研究尚未见报道。本实验通过正交试验优选出白英抗肿瘤活性成分的最佳提取工艺条件, 为其进一步开发利用提供实验依据。

#### 1 实验材料

旋转蒸发器 RE-52AA (上海亚荣仪器厂); F039003 型酶标定量测试仪 (奥地利 TECAN 公司); NU-4750 型  $CO_2$  培养箱 (美国); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) (美国 Amresco 产品); RPMI-1640 MEDIUM (HyClone, AMC15824), 胎牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所, 050902); Shimadzu SLC-6A 高效液相色谱仪、日本岛津 SPD-6AV 紫外检测器、ANSTAR 色谱工作站; 薯蓣皂苷元对照品 (中国药品生物制品检定所); 其他试剂均为分析纯。

白英饮片购于上海市徐汇中药饮片厂, 由沈阳药科大学孙启时教授鉴定。人宫颈癌 HeLa 细胞由本实验室传代保种。

#### 2 方法与结果

2.1 因素水平的选择<sup>[1]</sup>: 影响白英提取的主要因素有乙醇体积分数、提取时间、提取次数, 故选用 3 个因素, 每个因素选择 3 个水平进行试验, 以优选出最佳工艺, 因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 提取次数/次	C 回流时间/h
1	25	1	1
2	50	2	1.5
3	75	3	2

2.2 浸膏得率的测定: 将 50 g 药材加入对应量的乙醇体积分数浸泡过夜, 然后加热至沸腾并保持微沸, 提取时间从沸腾开始计时。提取结束后, 合并各滤液, 减压浓缩, 冷冻干燥, 记录干浸膏质量, 计算干浸膏得率。

2.3 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 的测定: 收集对数生长期的 HeLa 细胞, PBS 洗涤后, RPMI-1640 培养基重悬细胞, 调整细胞浓度  $5 \times 10^4$  /mL, 加于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 埋板 12 h 后加药。实验孔每孔加不同质量浓度白英提取液各 100  $\mu$ L (终质量浓度分别为 24、12、6、3、1.5 mg/mL), 阳性对照孔加  $\beta$ -榄香烯

收稿日期: 2006-02-08

基金项目: 沈阳市科技局攻关项目 (1032041-3-09)

作者简介: 韩重 (1981-), 女, 海南文昌人, 在读硕士, 研究方向为抗肿瘤中药的新药开发研究。

\* 通讯作者 孙立新 Tel: (024) 23986281 Fax: (024) 23915428 E-mail: slx04@163.com

E-mail: hanzhong66k@126.com

100  $\mu\text{L}$  (终浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$ ), 阴性对照孔加 100  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 培养基, 每个浓度设 3 个复孔, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和条件下培养 48 h 后, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔以 PBS 洗 1 次, 再将上清液吸弃。每孔加完全 RPMI-1640 培养液 100  $\mu\text{L}$ , MTT 液 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和, 继续孵育 4 h 后中止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 酶标仪 492 nm 处测吸光度(A)值。按照生长抑制率=[(正常对照组 A 值 - 用药组 A 值)/正常对照组 A 值]  $\times$  100% 计算。NOSA 2.30 软件 BLISS 法计算  $\text{IC}_{50}$ 。

2.4 薯蓣皂苷元的测定

2.4.1 色谱条件: 色谱柱: Apollo C<sub>18</sub> 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-水 (94 : 6); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 室温。

2.4.2 对照品溶液的制备: 取薯蓣皂苷元对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

2.4.3 供试品溶液的制备: 称取正交试验中各个提取物干浸膏约 80 mg, 精密称定, 加 50 mL 2 mol/L HCl 加热回流 2.5 h, 冷却, 用 30 mL 氯仿分 3 次回流萃取, 每次 15 min。合并氯仿萃取液, 水浴蒸干溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容到 10 mL, 经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

2.4.4 标准曲线的制备: 分别精密吸取薯蓣皂苷元对照品溶液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 20  $\mu\text{L}$ , 注入色谱仪。以薯蓣皂苷元的峰面积(A)为纵坐标, 质量浓度(C)为横坐标作标准曲线, 得回归方程  $A = 5.0 \times 10^6 C - 2.0 \times 10^4$  ( $R^2 = 0.9995$ ), 表明薯蓣皂苷元在 0.04~0.2 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.4.5 样品测定: 取供试品溶液, 每次吸取 20  $\mu\text{L}$ , 重复 3 次, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 将各样品测定的峰面积代入标准曲线的回归方程, 计算相应薯蓣皂苷元质量分数。

2.5 统计方法: 采用 SPSS11.5 软件正交设计分析方法。

2.6 试验结果: 正交试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

以浸膏率为考察指标, 极差值显示, 各因素作用主次为  $B > C > A$ ; 方差分析结果表明: B 因素对浸膏率有显著的影响 ( $P < 0.05$ ), A 和 C 因素的影响

均无显著性意义, 以  $A_2B_3C_3$  为佳; 以  $\text{IC}_{50}$  为考察指标, 极差值显示, 各因素作用主次为  $C > B > A$ ; 方差分析结果表明: A、B、C 因素的影响均无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 以  $A_3B_3C_1$  为佳; 以薯蓣皂苷元为考察指标, 极差值显示, 各因素作用主次为  $B > C > A$ ; 方差分析结果表明: A、B、C 因素的影响均无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 以  $A_2B_2C_1$  为佳。综合上述 3 项考察指标; 优化水平组合应为  $A_2B_3C_1$ , 即 50% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h。在 3 个因素中只有 B 因素对考察指标有显著性影响, 因此选择  $B_3$ , 由于 A 和 C 因素对考察指标无显著性影响, 从节能消耗方面考虑选  $A_2$  而不选  $A_3$ , 从提取周期方面考虑选  $C_1$  而不选  $C_3$ 。

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计和结果

Table 2 Design and result of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白)	浸膏率/%	IC <sub>50</sub> (mg · mL <sup>-1</sup> )	薯蓣皂苷元/%
1	1	1	1	1	8.57	19.92	1.35
2	1	2	2	2	12.78	14.23	1.65
3	1	3	3	3	15.36	17.21	1.23
4	2	1	2	3	11.22	17.39	1.66
5	2	2	3	1	13.17	18.35	1.33
6	2	3	1	2	13.1	5.84	1.77
7	3	1	3	2	9.4	8.87	1.57
8	3	2	1	3	9.68	9.72	0.99
9	3	3	2	1	12.39	13.43	1.31
浸膏率 k <sub>1</sub>	12.24	9.73	10.45	11.38			
k <sub>2</sub>	12.50	11.88	12.13	11.76			
k <sub>3</sub>	10.49	13.62	12.64	12.09			
R	2.01	3.89	2.19	0.73			
IC <sub>50</sub> k <sub>1</sub>	17.12	15.39	11.83	17.23			
k <sub>2</sub>	13.86	14.10	15.02	9.65			
k <sub>3</sub>	10.67	12.16	14.81	14.77			
R	6.45	3.23	3.19	7.59			
薯蓣 k <sub>1</sub>	1.410	1.203	1.330	1.527			
皂苷元 k <sub>2</sub>	1.420	1.540	1.496	1.323			
k <sub>3</sub>	1.290	1.377	1.293	1.220			
R	0.130	0.337	0.203	0.257			

表 3 方差分析统计结果

Table 3 Result of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
浸膏率 A	7.145	2	3.573	9.429	
B	22.742	2	11.371	30.012	$P < 0.05$
C	7.897	2	3.948	10.421	
D(误差)	0.758	2	0.379		
IC <sub>50</sub> A	1 031.800	2	515.900	0.672	
B	153.606	2	76.803	0.100	
C	914.980	2	457.490	0.596	
D(误差)	1 535.833	2	767.916		
薯蓣皂 A	110.749	2	55.374	0.081	
苷元 B	1 320.309	2	660.154	0.961	
C	2 908.562	2	1 454.281	2.118	
D(误差)	1 373.282	2	686.641		

F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.00

2.7 提取工艺的验证:用选定正交试验的优化工艺作了 3 次平行验证,结果平均浸膏率为 12.86%, $IC_{50}$  为 5.23 mg/mL 薯蓣皂苷元的质量分数为 1.29%,表明该工艺稳定、可行、重现性好。

### 3 讨论

本实验以  $IC_{50}$  作为提取工艺考察的指标之一,从药理学方面考察工艺的合理性,更直观、更全面地反映结果的可靠性。

近些年来已有许多学者报道薯蓣皂苷元有抗肿瘤活性<sup>[2,3,4]</sup>,本课题研究已证明白英中含有薯蓣皂苷元,因此本实验选用薯蓣皂苷元为另一指标,从质量控制方面考察提取工艺的合理性。

从实验结果可以看出,在 6 号试验中, $IC_{50}$  为 5.84 mg/mL,薯蓣皂苷元质量分数为 1.77% 均为

各列之首,提示  $IC_{50}$  与薯蓣皂苷元可能是有相关性的,即薯蓣皂苷元质量分数越高, $IC_{50}$  的值越小,体外细胞增殖抑制作用越强。

### References:

- [1] Shi Y P, Wang H. Study on the process for extracting flavonoids from *Hypericum perforatum* L. by orthogonal test [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(3): 325-327.
- [2] Hong Z Q, Lin J H. Antitumor activity of diosgenin *in vitro* [J]. *J Fujian Coll Tradit Chin Med* (福建中医学院学报), 2005, 15(4): 37-39.
- [3] Wang L J, Wang Y, Chen S W, et al. The antitumor activity of diosgenin *in vivo* and *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(10): 60-62.
- [4] Chen S W, Wang Y, Sun C J, et al. Effect of diosgenin on tumor growth of nude mice bearing human gastric cancer [J]. *J Jilin Univ: Med Sci* (吉林大学学报:医学版), 2003, 29(2): 26-27.

## 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究

房信胜<sup>1</sup>, 谭晓梅<sup>2</sup>, 王建华<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018; 2. 南方医科大学 中药新药研究重点实验室, 广东 广州 510515)

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,活血调经、凉血消痈、安神,在临床得到了广泛应用,并且是许多制剂的原料。其中的酚酸类成分是水溶性主要有效部位,具有明显的抑制血小板聚集、抗凝、溶纤及抗脂质过氧化的作用<sup>[1]</sup>,是丹参活血化瘀的主要活性成分。该类化合物主要有原儿茶醛、原儿茶酸、丹参素、丹酚酸 A, B, C、迷迭香酸等<sup>[2~4]</sup>。以往的精制主要采用水提醇沉法,总酚酸的量低;也有报道用大孔树脂分离丹参中的水溶性成分<sup>[5]</sup>,但只是用原儿茶醛和丹参素为指标,缺乏对总成分和分离条件的系统研究。本实验采用大孔吸附树脂纯化该有效部位,并研究分离的工艺条件和参数。

### 1 仪器、材料和试剂

HP-8453 紫外-可见分光光度计(美国惠普公司);HP-1100 高效液相色谱仪(美国惠普公司),G1315A 紫外-可见光二级管阵列检测器。

丹参药材购自广东省药材公司,产地四川中江,由本系刘传明讲师鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge 的根;原儿茶醛对照品(中国药品生

物制品检定所,批号 110810-200205);大孔吸附树脂(南开大学和成树脂厂,均为药用型)。

无水乙醇、乙醚、冰醋酸、95%乙醇均为分析纯,甲醇(分析纯,色谱纯),蒸馏水(超纯水)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 丹参总酚酸的测定

2.1.1 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的原儿茶醛对照品 16.08 mg,用无水乙醇配成 128.6  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。分别吸取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 量瓶中,无水乙醇定容,随行溶剂做空白,用紫外-可见分光光度计于 281 nm 依次测定吸光度,以质量浓度(C)为纵坐标,吸光度(A)为横坐标绘制标准曲线。结果标准曲线  $C=0.26842+13.855A$ ,  $r=0.9995$ ,线性范围为 2.6~15  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 样品测定:吸取样品液适量,用乙醚萃取 4 次,萃取液水浴挥干乙醚,加无水乙醇溶解,滤过,定容,作为待测液,取待测液适量,用无水乙醇稀释至合适质量浓度后按标准曲线的绘制项下方法测定,计算总酚酸的量。

收稿日期:2005-12-14

作者简介:房信胜(1974—),男,山东莱芜市人,硕士,主要从事中药药剂学教学及中药制剂开发和质量控制研究。

Tel: (0538) 8248073 E-mail: xinshf@126.com