

鸡血藤中黄酮成分的高速逆流色谱分离及其抗肿瘤活性研究

冯雪娇¹, 任虹¹, 曹学丽^{1*}, 唐勇², 何薇², 王笑民^{2*}

1. 北京工商大学食品学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048

2. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010

摘要: 目的 采用高速逆流色谱(HSCCC)技术分离纯化鸡血藤中的黄酮类抗肿瘤活性成分。方法 运用活性跟踪分离思路, 优化制备型 HSCCC 分离条件, 快速分离鸡血藤醋酸乙酯萃取物中的黄酮类单体化合物; 根据理化性质和波谱方法(ESI-MS、UV、NMR 等)鉴定化合物结构; 采用 MTT 方法并结合细胞形态学观察评价化合物对人肺癌细胞 A549 的抗肿瘤活性。结果 利用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水四元两相溶剂体系, 通过 HSCCC 法从鸡血藤醋酸乙酯萃取物中分离得到 2 个黄酮类成分, 鉴定为甘草素(CS1)和刺芒柄花素(CS2), HPLC 峰面积归一化法分析二者的质量分数分别为 93.6%和 94.3%。MTT 法抗肿瘤活性测定发现 CS1 对 A549 细胞显示增殖抑制活性, 当质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 A549 细胞的增殖抑制率为 49.9%。结论 可以采用 HSCCC 技术分离纯化鸡血藤提取物中的黄酮类抗肿瘤活性成分, 该方法快速、简便、经济, 为鸡血藤活性成分研究提供了技术依据。

关键词: 鸡血藤; 高速逆流色谱; 黄酮类化合物; 甘草素; 刺芒柄花素; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2244-04

Isolation of flavonoids from *Spatholobus suberectus* by high speed countercurrent chromatography and study on their anti-tumor activities

FENG Xue-jiao¹, REN Hong¹, CAO Xue-li¹, TANG Yong², HE Wei², WANG Xiao-min²

1. Beijing Key Laboratory of Plant Resource Research and Development, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn; high speed countercurrent chromatography (HSCCC); flavonoids; liquiritigenin; formononetin; anti-tumor activity

鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn 是我国一种传统中药材, 入药历史悠久。《中国药典》2010 年版记载, 鸡血藤为豆科植物密花豆的干燥藤茎, 秋冬二季采收, 除去枝叶, 切片, 晒干即为鸡血藤。药理研究发现鸡血藤具有激活造血系统、补血活血、舒经活络的功效, 在民间用于血液系统、恶性肿瘤及风湿性关节炎等疾病的治疗。目前, 鸡血藤的研究仅见有关其提取物药理活性和单纯化学成分的研究报道^[1-5], 研究发现鸡血藤中黄酮类活性成分较多, 这些成分通常采用硅胶柱色谱分离, 速度较慢, 重现效果不理想^[6]。高速逆流色谱(high speed countercurrent chromatography, HSCCC)作为一种不需要

固相载体的液-液分配色谱, 现已在天然产物分离纯化领域得到广泛应用, 与传统柱色谱方法相比, 具有分离速度快、样品吸附低、分离重现性好等优点^[7-11]。本实验旨在利用 HSCCC 技术活性跟踪分离纯化鸡血藤醋酸乙酯提取物中的黄酮类抗肿瘤活性成分, 建立活性单体化合物的分离条件和分析方法, 并采用 MTT 方法评价单体化合物的抗肿瘤活性。

1 仪器与材料

TBE—300A 高速逆流色谱系统(上海同田生化技术有限公司); TBE—1000A 高速逆流色谱系统(上海同田生化技术有限公司); ALPHA 2—4 LSC 真空冷冻干燥箱(德国 Christ 公司); Agilent 1100

收稿日期: 2011-02-03

作者简介: 冯雪娇(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物分离工程。Tel: (010)68984898 E-mail: fengxuejiao113@sohu.com

*通讯作者 曹学丽 Tel: (010)68984898 E-mail: caoxl@th.btbu.edu.cn

王笑民 Tel: (010)52176508 E-mail: ntxm100@sina.com

高效液相谱和 1100 series LC/MSD Trap 电喷雾质谱 (美国 Agilent 公司); ECA400 核磁共振波谱仪 (日本电子株式会社)。

无水乙醇、醋酸乙酯、正丁醇、冰醋酸、甲醇、正己烷均为分析纯, 购自北京化学试剂公司; 甲醇 (色谱纯) 购自 Fisher 科学公司。鸡血藤饮片 (北京为仁中药饮片厂) 由首都医科大学附属北京中医医院王笑民教授鉴定为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎。

2 方法与结果

2.1 样品处理

取适量鸡血藤饮片, 粉碎并溶于 10 倍量 80% 乙醇中, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h。合并乙醇提取液, 冷却、滤过、浓缩干燥后, 得棕红色样品, 即为鸡血藤 80% 乙醇提取物。对 500 g 鸡血藤样品进行提取, 最终得到 60 g 鸡血藤 80% 乙醇提取物, 分别用醋酸乙酯、正丁醇依次萃取上述提取物, 取醋酸乙酯萃取液旋转蒸干, 置于真空干燥箱 45 °C 中完全干燥, 得到 5.9 g 醋酸乙酯萃取物。

2.2 HSCCC 分离黄酮类化合物

本实验所用溶剂系统为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水体系, 4 种溶剂按比例配制于分液漏斗中, 充分振荡后静置, 待平衡后分别得到上下两相, 上相作固定相, 下相作流动相, 超声脱气, 备用。称取适量样品充分溶解于下相 (流动相) 中, 待分离。

逆流体系平衡过程: 首先用恒流泵将固定相泵入柱体, 直到固定相充满柱体为止, 然后使柱体以一定的转速旋转, 同时以较低体积流量将流动相泵入柱体, 直到体系的出口端有流动相流出, 待流出的固定相体积保持不变时, 表明该逆流体系已建立平衡; 此时将待分离的样品溶液从进样阀注入, 样品在逆流色谱系统中进行分离, 同时根据紫外检测器信号收集各流份。半制备型 TBE-300A 逆流色谱选用的 HSCCC 条件: 转速为 850 r/min, 流动相体积流量为 2 mL/min; 对于制备型 TBE-1000A HSCCC, 转速为 500 r/min, 流动相体积流量为 6 mL/min; 检测波长为 254 nm 或 280 nm。

2.2.1 醋酸乙酯萃取物的分离 溶剂体系是决定 HSCCC 分离效果的最重要因素之一。不同的溶剂系统由于极性、黏度、密度等性质的差异, 对不同成分产生不同的分离效果。本实验中考察的溶剂体系有正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水体系、氯仿-甲醇-水体系以及醋酸乙酯-正丁醇-水体系, 根据分离所得

峰的数量及其分离度, 最终确定 HSCCC 分离条件为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (4 : 5 : 4 : 5) 体系; 固定相 (上相) 保留率为 76.67%; 样品鸡血藤 80% 乙醇提取物醋酸乙酯萃取物 2.0 g; 柱体积 900 mL; 仪器转速 500 r/min; 流动相体积流量 6 mL/min; 检测波长 254 nm; 在 M 点处, 换上相为流动相, 洗脱方向变为反方向洗脱。利用此四元两相体系对鸡血藤 80% 乙醇提取物的醋酸乙酯萃取物进行分离, 其 HSCCC 图谱如图 1 所示, 得到 Fr. 1~9 共 9 个级分, 经 MTT 活性检测及 HPLC 分析, 确定 Fr. 4 和 Fr. 6 为进一步分离的目标组分。

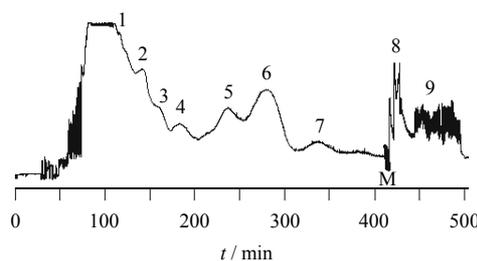


图 1 鸡血藤 80% 乙醇提取物醋酸乙酯萃取部分的 HSCCC 制备分离图谱

Fig. 1 Preparative HSCCC chromatogram of EtOAc fraction in 80% ethanol extract from *S. suberectus*

2.2.2 Fr. 4 和 Fr. 6 的分离 调整溶剂比例, 选用 HSCCC 条件: 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (3 : 5 : 3 : 5) 体系; 固定相 (上相) 保留率为 64.4%; 柱体积 280 mL; 转速 850 r/min; 体积流量 2 mL/min; 检测波长 280 nm, 对 Fr. 4 进行纯化, 得到 3 个级分, HSCCC 图谱见图 2。对其中级分 3 进行 HPLC 检测, 检测条件: 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~10% B; 5~50 min, 10%~100% B; 50~60 min, 100% B; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 280 nm; 参比波长 600 nm。如图 3 所示, 不同波长下呈一对称单峰, 最终从 2.0 g 鸡血藤醋酸乙酯萃取物中得到单体化合物 CS1 10.5 mg, HPLC 峰面积归一法确定其质量分数为 93.6%。

选用 HSCCC 条件: 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水 (4 : 5 : 4 : 5) 体系; 固定相 (上相) 保留率为 68.6%; 柱体积 280 mL; 转速 850 r/min; 体积流量 2 mL/min; 检测波长 254 nm, 对 Fr. 6 进行纯化, 得到 2 个主要级分, HSCCC 图谱如图 4 所示。对其中级分 2 进行 HPLC 检测, 如图 5 所示, 最终从 2.0 g 鸡血藤醋酸

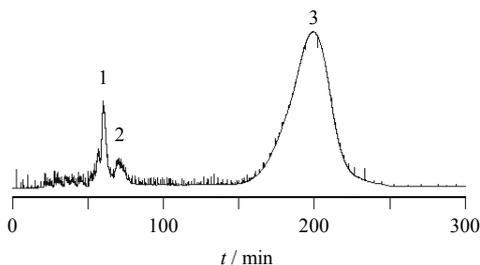


图 2 Fr. 4 的 HSCCC 纯化谱图

Fig. 2 HSCCC purification chromatogram of Fr. 4

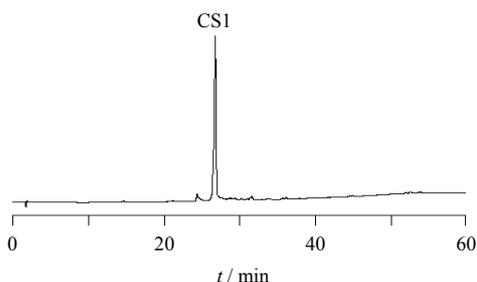


图 3 Fr. 4 中级分 3 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of 3 from Fr. 4

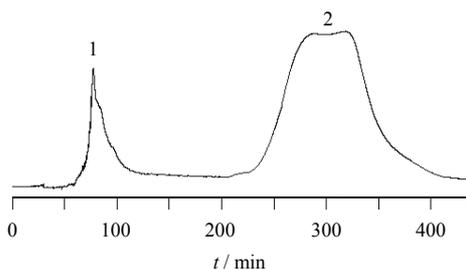


图 4 Fr. 6 的 HSCCC 纯化谱图

Fig. 4 HSCCC purification chromatogram of Fr. 6

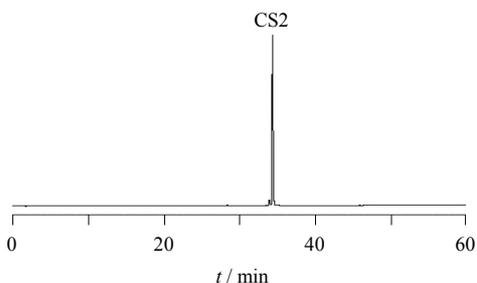


图 5 Fr. 6 中级分 2 的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of 2 from Fr. 6

乙酯萃取物中得到单体化合物 CS2 10.4 mg, HPLC 峰面积归一法确定其质量分数为 94.3%。

2.3 单体化合物结构鉴定

通过 UV、ESI-MS、NMR 等谱学数据以及与文献对照, 确定化合物结构。

化合物 CS1: 为白色针状结晶, UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 270、315, ESI-MS m/z : 279.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、255.0 $[\text{M}]^-$, ESI-MS-MS m/z : 135.0 $[\text{M}]^-$; 135.0 为甘草素特征碎

片峰(去掉苯酚基团后再发生 Cleavage C-O 重排^[12], 确定相对分子质量为 256; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.31 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.48 (1H, dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, H-6), 6.34 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.37 (1H, dd, $J = 12.8, 2.8$ Hz, H-2), 3.05 (1H, dd, $J = 16.8, 12.8$ Hz, H-3, *trans*), 2.68 (1H, dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, H-3, *cis*); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 192.2 (C-4), 165.5 (C-7), 164.3 (C-9), 157.7 (C-4'), 130.0 (C-5), 129.3 (C-1'), 127.7 (C-2', 6'), 114.9 (C-3', 5'), 113.6 (C-10), 110.4 (C-6), 102.5 (C-8), 79.7 (C-2), 47.4 (C-3)。以上数据与文献对照一致^[13], 确定化合物 CS1 为甘草素, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。

化合物 CS2: 为白色针状结晶, UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 246、310; ESI-MS m/z : 291.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 267.0 $[\text{M}]^-$, 确定相对分子质量为 268; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 8.15 (1H, s, H-2), 8.04 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.46 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.93 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 181.0 (C-4), 160.6 (C-7), 159.4 (C-4'), 154.4 (C-2), 154.3 (C-9), 130.9 (C-2', 6'), 127.9 (C-5), 125.2 (C-1'), 125.1 (C-3), 116.2 (C-6), 116.1 (C-10), 114.3 (C-3', 5'), 102.8 (C-8), 55.2 ($-\text{OCH}_3$); 经与文献报道比较^[14], 该化合物碳谱及氢谱数据及理化常数与已知化合物刺芒柄花素相符, 确定化合物 CS2 为刺芒柄花素, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。

2.4 单体化合物的抗肿瘤活性

抗肿瘤活性测试采用 MTT 方法^[15], 实验用肺癌细胞 A549 细胞由首都医科大学眼科学院提供。取对数生长期的肿瘤细胞, 将细胞密度调至 2×10^5 个/mL, 按每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞培养板中, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 4 h。样品分别设定 5 个质量浓度梯度, 每个质量浓度设 3 个平行样, 同时设阳性、阴性对照, 每孔加样品液或空白液各 2 μL , 培养 24 h, 然后每孔加 MTT 溶液 10 μL , 继续培养 4 h, 37 $^\circ\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 8 min, 吸去上清。每孔加入 DMSO 各 100 μL , 在微量振荡器上振荡 15 min, 至结晶完全溶解后, 酶标仪测定每孔 570 nm 处的吸光度 (A) 值。取 3 孔平均 A 值按抑制率 = $(A_{\text{空白对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白对照}}$ 计算样品对细胞增殖的抑制率, 并采用 bliss 法计算出半数抑制浓度 (IC_{50})。

采用 MTT 法结合显微镜细胞形态学观察评价化合物 CS1、CS2 的抗肿瘤活性。镜检发现 A549 细胞经化合物 CS1 处理 24 h 后,细胞形态发生明显变化,细胞表面暗淡、体积涨大,出现了明显的坏死性细胞毒活性^[16],而且细胞的存活数与对照组相比明显减少,同时,MTT 检测结果也显示化合物 CS1 对 A549 细胞具有一定程度的抑制作用,低质量浓度下抑制作用不明显,随着质量浓度升高,增殖抑制作用增强,当 CS1 为 200 μg/mL 时,对 A549 细胞的抑制率为 49.9%,表 1 显示了 CS1 在 0~200 μg/mL 对 A549 细胞增殖抑制的情况。但化合物 CS2 对 A549 未显示明显抑制作用。以上实验结果表明化合物 CS1 对 A549 细胞具有增殖抑制作用,是鸡血藤中的抗肿瘤活性成分之一。

表 1 不同质量浓度 CS1 对 A549 细胞的增殖抑制作用

Table 1 Inhibition on A549 cell proliferation treated with CS1 at different concentrations

CS1/(μg·mL ⁻¹)	抑制率/%	CS1/(μg·mL ⁻¹)	抑制率/%
3.125	2.37	50	10.88
6.25	2.89	100	22.03
12.5	3.18	200	49.94
25	3.29		

3 结论

本实验采用 HSCCC 技术从鸡血藤中快速分离得到两个黄酮类化合物,并通过理化性质和波谱数据鉴定两个化合物分别为甘草素和刺芒柄花素,进一步采用细胞形态学观察和 MTT 方法检测化合物对 A549 细胞的增殖抑制作用,发现化合物 CS1 具有一定程度的坏死性细胞毒活性,是鸡血藤中的抗肿瘤活性成分之一,该结果为从鸡血藤中分离纯化黄酮类化合物提供了技术依据,也为鸡血藤抗肿瘤活性成分的深入研究奠定了基础。

参考文献

[1] Wang D X, Liu P, Chen Y H, et al. Stimulating effect of catechin, an active component of *Spatholobus suberectus* Dunn, on bioactivity of hematopoietic growth factor [J]. *Chin Med J*, 2008, 121(8): 752-755.
 [2] 应 军, 肖百全, 杨 威, 等. 鸡血藤提取物对环磷酰胺致白细胞低下大鼠的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 752-755.
 [3] Wang H, Liu P, Dai C, et al. Effects of heterogenous suberect *spatholobus* stem on peripheral blood cell counts

of ⁶⁰Co gamma ray irradiated mice [J]. *J Chin Integ Med*, 2007, 5(2): 189-192.
 [4] Liu Y T, Wang F, Wang G X, et al. In vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Radix Angelicae Pubescentis*, *Fructus Bruceae*, *Caulis Spatholobi*, *Semen Aesculi*, and *Semen Pharbitidis* against *Dactylogyrus Intermedius* (*Monogenea*) in goldfish (*Carassius Auratus*) [J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(5): 1233-1239.
 [5] 邓家刚, 梁 宁, 林启云. 鸡血藤总黄酮对血虚模型小鼠造血功能的影响 [J]. *中草药*, 2007, 38(7): 1055-1056.
 [6] Kang I C, Kim S A, Song G Y, et al. Effects of the ethyl acetate fraction of *Spatholobi caulis* on tumour cell aggregation and migration [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 163-167.
 [7] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用 [M]. 北京: 化工出版社, 2005.
 [8] 蓝天凤, 于宗渊, 王岱杰, 等. 硅胶柱色谱结合高速逆流色谱法分离纯化丹参中丹参酮 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 466-469.
 [9] 李爱峰, 李晓鹏, 孙爱玲, 等. 高速逆流色谱分离纯化草豆蔻中山姜素和小豆蔻明 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 687-690.
 [10] 韩利文, 陈锡强, 袁延强, 等. 高速逆流色谱在中药现代化研究中的应用 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(4): 241-246.
 [11] Wan J Z, Chen X X, Qiu C M, et al. Isolation and purification of isoaloesin D and aloin from *Aloe vera* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 148-152.
 [12] 周 燕, 王明奎, 廖 循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析 [J]. *分析化学*, 2004, 32(2): 174-178.
 [13] Feng J, Liang H, Zhao Y Y, et al. Flavonoids from *Millettia nitita* var. *hirsutissima* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(3): 178-179.
 [14] Zielińska A, Paradowska K, Jakowski J, et al. 13C CP MAS NMR and GIAO-CHF/DFT calculations of flavonoids: Morin, kaempferol, tricetin, genistein, formononetin and 3, 7-dihydroxyflavone [J]. *J Mol Struct*, 2008, 873(1/3): 109-116.
 [15] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
 [16] Gao L, Shan B E, Chen J, et al. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells [J]. *Acta Pharm Sin*, 2005, 26(3): 369-376.