

元宝枫叶中黄酮类化合物的提取工艺优选

李 珺¹, 陈钧坚¹, 朱志翔¹, 张瑾峰², 王 喆², 张英侠^{1*}, 田维熙³

(1. 首都医科大学化学生物学与药学院, 北京 100069; 2. 首都医科大学 细胞生物学系, 北京 100069;

3. 中国科学院研究生院 生物系, 北京 100049)

摘要:目的 优化提取元宝枫叶中黄酮类化合物, 并比较不同条件下元宝枫提取物抑制脂肪酸合成酶(FAS)活性的大小。方法 采用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验考察不同提取工艺条件, 测定元宝枫叶中黄酮类化合物的量及其抑制FAS活性的大小。结果 黄酮类化合物的最佳浸提工艺: 25℃温度下, 乙醇体积分数为40%, 固液比为1:15, 提取2.5 h。结论 元宝枫叶中黄酮类化合物的量及其对FAS的抑制率之间不呈现正相关。其中一部分黄酮类成分对FAS有抑制作用。

关键词:元宝枫; 黄酮类化合物; FAS抑制剂; 正交试验

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1184-03

Optimum technology for extracting flavonoid from *Acer truncatum* leavesLI Jun¹, CHEN Jun-jian¹, ZHU Zhi-xiang¹, ZHANG Jin-feng², WANG Zhe²,ZHANG Ying-xia¹, TIAN Wei-xi³

(1. School of Chemical Biology and Pharmaceutical Sciences, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China;

2. Department of Cell Biology and Genetics, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China;

3. Department of Biology, Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Key words: *Acer Truncatum* Bunge; flavonoids; FAS inhibitors; orthogonal test

元宝枫 *Acer truncatum* Bunge 为槭树科落叶乔木, 在我国分布广泛, 资源相当丰富。元宝枫叶中含有黄酮、强心苷、绿原酸、甾体、鞣质和多糖等成分, 其中黄酮类化合物的量较高。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)是体内合成脂肪途径中一个很重要的酶, 通过催化乙酰辅酶A和丙二酸单酰辅酶A生成长链脂肪酸。肿瘤生物学的观点指出脂肪酸的合成与侵犯型肿瘤的生长、存活存在一定关系^[1,2], 说明FAS是治疗癌症的新的潜在靶部位, 抑制FAS有可能成为一条新的化疗途径。本课题的酶动力学实验表明元宝枫叶对FAS有强抑制作用, 元宝枫落叶提取物在20~30 μg/mL对肝癌细胞(BEL-7402)的抑制率即可达55%以上, 对食道癌细胞(CAES-17)、胃癌细胞(BGC823)和乳腺癌细胞(MCF7)都有抑制作用, 是广谱抗癌剂。Li等^[3]从天然植物中提取的13种化合物, 这些化合物分属于5种化学类型, 即异黄酮、黄酮、双黄酮类物质、可水解鞣质衍生物、蒽类, 考察了它们对FAS的抑制活性。发现其中2种黄酮类物质是最具潜力的FAS的抑

制剂。因此研究元宝枫叶中主成分黄酮类化合物与抑制FAS存在一定的相关性可以促进元宝枫叶中黄酮的分离和利用。总黄酮的提取方法主要有有机溶剂回流法、冷浸法、超声波提取法、渗漉法和水煮法等^[4~6]。本实验设计了采用乙醇浸提法提取元宝枫叶中黄酮类化合物的正交试验优化, 验证其对FAS的抑制率, 对两者的相关性进行了比较研究, 为元宝枫叶的开发利用和筛选FAS天然抑制剂提供科学依据。

1 仪器与材料

FZ102型微型植物试样粉碎机(黄骅市齐家务科学仪器厂); HH-601恒温水浴锅(金坛市荣华仪器制造有限公司); TGL-16G台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Shimadzu UV 2201、UV 2550紫外-可见分光光度计。

芦丁由中国药品生物制品检定所提供; 乙酰辅酶A、丙二酸单酰辅酶A、NADPH购自Sigma公司; 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯; 元宝枫落叶采自北京百望山。

收稿日期: 2006-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500648); 北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200610025006)

作者简介: 李 珺(1974—), 女, 湖北人, 讲师, 1999年获得湖北大学硕士学位, 2003年获得中国科学院研究生院博士学位, 研究方向为天然产物有效成分分离和分析。Tel: (010)83911522 E-mail: junily88@sohu.com

* 通讯作者 张英侠 E-mail: zhangyue@cpums.edu.cn

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定^[7]:采用 $L_{16}(4^4)$ 正交表。以影响黄酮类化合物的量和对 FAS 的抑制率的提取温度 (A)、时间 (B)、溶剂乙醇体积分数 (C)、固液比 (D) 为考察因素,见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/℃	B/h	C/%	D
1	25	1	40	1:15
2	35	1.5	50	1:20
3	45	2	60	1:25
4	55	2.5	70	1:30

2.2 工艺过程的设计:称取 3 g 元宝枫叶粉末(过 40 目筛)置于锥形瓶中,按一定液固比加入一定体积分数的乙醇,置于一定温度水浴中提取一定时间,每隔 5 min 搅拌 1 次。完毕后,在室温放冷,备用。

2.3 黄酮类化合物的测定

2.3.1 对照品溶液的制备:精密称取芦丁对照品 12.05 mg,置 50 mL 量瓶中,用 50%乙醇溶解,并加至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 标准曲线的绘制:精密量取芦丁对照品溶液 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加 5% NaNO_2 水溶液 1.0 mL 摇匀,6 min 后加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液 1.0 mL 摇匀,6 min 后再加 4% NaOH 水溶液 10 mL 摇匀,15 min 后加 50%乙醇至刻度,摇匀。同时做空白液。在 505 nm 下测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程 $Y=11.7283X$, $r=1.0000$ 。

2.3.3 样品的测定:16 个样品溶液 8 000 r/min 离心 5 min,分别精密量取上清液 300 μL 于 25 mL 量瓶中,其余操作同 2.3.2 项下方法。根据回归方程计算黄酮的质量分数。

2.4 FAS 抑制活性的测定:在 2 mL 测活体系中加入 1.85 mL 0.1 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.0), 37 ℃ 恒温,再依次加入 25 μL 0.2 mmol/L 乙酰辅酶 A、50 μL 0.4 mmol/L 丙二酸单酰辅酶 A、50 μL 1.3 mmol/L NADPH,在一定提取液存在下,加入 10 μg FAS 启动酶促反应。于 340 nm 波长下测定 NADPH 每分钟吸光度的变化值 (ΔA_t) 作为酶活性指标,只加入萃取溶剂的结果 (ΔA_0) 作为对照,计算快结合抑制程度 $I_t/I_t=(1-\Delta A_t/\Delta A_0)\times 100\%$ 作为对 FAS 的抑制率。测定不同提取液的量对 FAS 的抑制程度,根据提取物质量

浓度-抑制率曲线得比色皿中 FAS 酶活力降到一半时抑制剂的浓度 (IC_{50}) 作为衡量快结合抑制能力的指标。

2.5 测定结果:实验所得数据见表 2。就黄酮而言,极差分析结果表明,4 个因素对提取效果影响的顺序为 $D>C>A>B$ 。因此最佳的提取条件是 $A_2B_1C_4D_4$,即 35 ℃ 温度下,乙醇体积分数为 70%,固液比为 1:30,提取 1 h。就 IC_{50} 而言,极差分析得 4 个因素对酶活影响顺序为 $D>C>A>B$,最佳条件为 $A_4B_3C_2D_4$,即 55 ℃ 温度下,乙醇体积分数为 50%,固液比为 1:30,提取 2 h。综合考察总黄酮和 IC_{50} 两个因素,根据本研究目的是提取有活性的黄酮类化合物,指标 $\text{IC}_{50}(Y_2)$ 要比黄酮提取率 ($Y_1=\text{总黄酮质量}/\text{干叶质量}\times 100\%$) 重要,权重系数分别取为 0.6 和 0.4。为在统一标准下综合评分,分别将两项最好的指标都定为 100 分,公式 $Y=0.4(100+1/7.48-1/Y_1)+0.6(100+0.01-Y_2)$ 。所得数据见表 2、3。极差分析结果表明,4 个因素对提取效果影响的大小顺序为 $D>C>A>B$ 。方差分析结果表明,C 因素对黄酮的量影响的差异具有非常显著性,D 因素对黄酮的量有显著影响,因素 A、B 影响的差异都无显著性。因此最佳的提取条件是 $A_1B_4C_1D_1$,即 25 ℃ 温度下,乙醇体积分数为 40%,固液比为 1:15,提取 2.5 h。

2.6 验证试验:最佳工艺条件即 25 ℃ 温度下,乙醇体积分数为 40%,固液比为 1:15,提取 2.5 h,平行 3 次试验所得黄酮的提取率为 5.73%, IC_{50} 为 0.008 mg/mL。

3 讨论

不同因素评价的最佳提取条件不同,含最多黄酮的提取物对 FAS 抑制不是最强,如提取 2.5 h 含总黄酮最多,但提取 2 h 时,对 FAS 抑制性最强,这可能是由于时间过长,破坏了对 FAS 有抑制活性的成分。25 ℃ 时总黄酮最多,但此水平时,对 FAS 抑制性是最弱的,55 ℃ 时抑制性最强,这可能是由于黄酮类化合物中只有几种物质有抑制 FAS 的活性,是有效成分,而在 55 ℃ 时有效成分的提取率比 25 ℃ 时大。另外乙醇体积分数为 70% 时得到的总黄酮最多,但 50% 乙醇提取物的 FAS 抑制性是最强的。综合评价得出的最佳提取条件与分别评价亦有所不同。综合加权评分在多指标提取工艺实验中可以作为权衡各项指标的参考方法。元宝枫叶提取物中黄酮类物质的量与对 FAS 抑制效果之间具有相关性。但不是正相关,表明只有一部分黄酮类成分

表 2 正交试验结果与分析
Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E	黄酮提取率/%	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	综合评分
1	1	1	1	1	1	5.82	0.014	99.982
2	1	2	2	2	2	6.84	0.013	99.993
3	1	3	3	3	3	7.09	0.011	99.996
4	1	4	4	4	4	7.35	0.017	99.995
5	2	1	2	3	4	7.48	0.011	99.999
6	2	2	1	4	3	6.76	0.010	99.994
7	2	3	4	1	2	6.64	0.013	99.991
8	2	4	3	2	1	7.17	0.013	99.996
9	3	1	3	4	2	7.44	0.010	100.000
10	3	2	4	3	1	7.26	0.014	99.996
11	3	3	1	2	4	6.64	0.013	99.991
12	3	4	2	1	3	6.69	0.011	99.993
13	4	1	4	2	3	7.24	0.012	99.997
14	4	2	3	1	4	6.74	0.012	99.993
15	4	3	2	4	1	7.25	0.010	99.998
16	4	4	1	3	2	6.57	0.012	99.991
黄酮提取率								
K ₁	27.11	27.98	25.79	25.89	27.51			
K ₂	28.06	27.60	28.26	27.88	27.49			
K ₃	28.03	27.63	28.44	28.40	27.79			
K ₄	27.80	27.78	28.50	28.81	28.21			
R	0.95	0.38	2.71	2.92	0.72			
IC ₅₀								
K ₁	0.049	0.047	0.048	0.050	0.050			
K ₂	0.047	0.048	0.045	0.050	0.048			
K ₃	0.048	0.047	0.046	0.048	0.044			
K ₄	0.045	0.048	0.051	0.042	0.047			
R	0.004	0.001	0.006	0.008	0.006			
综合评分								
K ₁	399.967	399.979	399.960	399.960	399.973			
K ₂	399.981	399.976	399.984	399.977	399.976			
K ₃	399.980	399.978	399.985	399.983	399.981			
K ₄	399.980	399.975	399.983	399.987	399.979			
R	0.014	0.004	0.025	0.027	0.008			

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	1.0×10 ⁻⁴	3	3.4×10 ⁻⁵	3.47	
B	4.7×10 ⁻⁶	3	1.6×10 ⁻⁶	0.16	
C	2.46	3	0.82	84 407.88	P<0.01
D	3.3×10 ⁻⁴	3	1.1×10 ⁻⁴	11.31	P<0.05
E	2.9×10 ⁻⁵	3	1.0×10 ⁻⁵		

$F_{0.05}(3,3)=9.28$ $F_{0.01}(3,3)=29.46$

对 FAS 有抑制作用。

References:

[1] Kuhajda F P, Pizer E S, Li J N, *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3450-3454.
[2] Kuhajda F P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology [J]. *Nutrition*,

2000, 16(3): 202-208.
[3] Li X C, Joshi A S, Elsohly H N, *et al.* Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(5): 1909-1914.
[4] Wang L Z, Ma X H, Wang Z Q, *et al.* A study on the extraction of flavonoids from the leaves of *Acer truncatum* [J]. *J Northwest Forest Coll* (西北林学院学报), 1997, 12(4): 64-67.
[5] Shi W S, Lei X. A study on the extraction of flavonoids from the leaves of *Acer truncatum* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(11): 948-949.
[6] Liu X Y. Study on the extraction of flavonoids from the leaves of *Acer Truncatum* by ultrasonic treatment [J]. *Yunnan Chem Tech* (云南化工), 2003, 30(1): 27-28.
[7] Zhang C H, Yan Y L. *Medicine Mathematical Statistics* (医药数理统计) [M]. Beijing: Science Press, 2001.