文章编号:1001-6880(2014)4-0486-05

海滨锦葵块根总黄酮的提取鉴别及其对体外细胞增殖活性的影响

张焕仕,刘　鑫,钦　佩*,张鹤云

南京大学盐生植物实验室,南京 210093

摘　要:本文报道了海滨锦葵块根中总黄酮的提取、纯化、鉴别方法,以及总黄酮对小鼠免疫和肿瘤细胞的体外增殖活性的影响。采用超声波法对海滨锦葵块根总黄酮进行粗提,再通过 D101 型大孔树脂柱层析法对所得黄酮粗提物进行纯化;通过分光光度法测定了其中的总黄酮含量,并经薄层层析(GF_{254})和显色反应进行了初步定性鉴定;最后利用细胞增值试验测定了总黄酮的生物活性。结果表明,所得干物质中的总黄酮含量为 12.5%,所含黄酮类化合物属于黄酮或黄酮醇类;总黄酮在 60 μg/mL 时对小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞增值起显著促进作用;在 80 μg/mL 时对于肿瘤细胞增殖具有较强的抑制作用。

关键词:海滨锦葵;总黄酮;提取;鉴别;生物活性

中图分类号:R284;R73-36　　**文献标识码**:A

Extraction, Identification and Cell Proliferative Effect of Total Flavonoids from Root Tuber of *Kosteletzkyavirginica*

ZHANG Huan-shi, LIU Xin, QIN Pei*, ZHANG He-yun

Halophyte Research Lab, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: This paper reported theextraction, purification and identificationof total flavonoidsfrom root tuber of *Kosteletzkyavirginica*. *In vitro* immunization and antitumoractivities of the totalflavonoids were also tested. Total flavonoidsof root tuber were crude extracted by ultrasound, and were purifiedusing D101 macroporous resin. The purified compoundswereprimary identified by silica GF_{254} thin-layer chromatography and color reactions. The contents of total flavonoids of the crude extracts were measured by spectrophotometer. At last, biological activity ofthe totalflavonoids were tested by MTT assay. The experimental results showed that the total content of flavonoids in dry material was12.5%. The root tuber of *K. virginica*mainly contained flavonoids and flavonol compounds. The total flavonoidsshowed good promotion effects on thymus and spleenlymphocyteproliferation at 60 μg/mL, and showed strong inhibition effects onHepS cell proliferation at 80μg/mL.

Key words: *Kosteletzkyavirginica*; total flavonoids; extraction; identification; bioactivity

海滨锦葵(*Kosteletzkyavirginica*)是锦葵科锦葵属多年生宿根盐生植物,天然分布于美国东部沿海从特拉华州至得克萨斯州的盐沼海岸带,1992 ~ 1993 年由南京大学盐生植物实验室钦佩教授引种至我国。海滨锦葵是多用途的优良耐盐草本经济植物,含有较高的多元不饱和脂肪酸,可以用作保健品[1]。美国东部印第安土著则有用海滨锦葵的地下块根治疗上呼吸道炎症的习俗。初步研究证明海滨锦葵根部含有具有药用价值的皂甙、多糖、黄酮等活性物质。

黄酮类化合物(flavoniod)是在植物中分布非常广泛的一类天然产物,其在植物体内大部分与糖结合成苷类,有一部分是以游离态(苷元)的形式存在。黄酮类化合物具有治疗冠心病、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化自由基、消炎、镇痛和保肝等重要的生物活性功能[2-5]。黄酮类化合物多具有颜色,且较早发现的化合物具有 2-苯基色原酮(2-phenylchromone)的结构,故称黄酮或黄酮体。现在则泛指两个苯环(A 环与 B 环)通过中央三碳相互联结而成的一系列化合物。根据中央三碳的氧化程度、是

收稿日期:2013-02-28　接受日期:2013-06-13

基金项目:江苏省产学研联合创新资金项目(BY2012136)

* 通讯作者 Tel:86-25-83592684;E-mail:qinpei@nju.edu.cn

否成环、B 环的连接位置(2 或 3 位)及两分子黄酮类化合物的结合等特点,可将黄酮类化合物分成黄酮类(flavones)、黄酮醇类(flavonols)、双氢黄酮类(flavanones)、双氢黄酮醇类(flavanonols)、异黄酮类(isoflavones)、双氢异黄酮类(isoflavanones)、查尔酮类(chalcones)、花色素类(anthocyanidins)、双黄酮类(biflavonoids)等。黄酮类化合物可与镁粉(或锌粉)、盐酸、三氯化铝、氢氧化钠等试剂产生特征性的颜色反应,可用于黄酮类化合物的鉴别[6]。

目前关于海滨锦葵的研究主要集中在生理生态方面[7-9],未见海滨锦葵块根黄酮类物质的相关研究。因此,本试验尝试从海滨锦葵根部初步提取黄酮类物质,通过特征反应鉴别提取物中的黄酮类化合物种类,并测试其免疫活性和抗肿瘤活性,以期为后续从海滨锦葵块根中提取、分离黄酮类化合物的单体物质及其药理作用研究提供理论指导,同时,也为海滨锦葵的工业开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海滨锦葵块根,采自江苏大丰金海农场种植基地;昆明种小白鼠,雌雄各半,体重 17 ~22 g,由南京医科大学动物饲养中心提供,清洁级,二级。动物合格证号:SCXK(苏) 2011-0030。肝癌 HepS 细胞株由中科院上海药物研究所提供,本实验室培养传代;乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇、甲醇、三氯化铝、硼酸、乙酸镁、氢氧化钠等均为分析纯。芦丁对照品由南京大治生物科技有限公司提供。实验用水为重蒸水。

DG5033A 酶联免疫检测仪,南京华东电子集团医疗装备有限公司;UV2201 型紫外分光光度计,日本岛津;ZF 型紫外透射反射分析仪,上海伊利仪器制造有限公司;硅胶 GF_{254} 薄板,上海研拓生物科技有限公司;CO_2 培养箱,Thermo Forma 公司;TG162W 型微量高速离心机,长沙湘仪离心机仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总黄酮的初步提取、分离与纯化

取海滨锦葵块根洗净、干燥、用粉碎机制成粉末。称取 50 g 海滨锦葵根粉,以 1∶15(w∶v)的比例加蒸馏水(750 mL),用超声仪超声提取,超声条件:温度 60 ℃,功率 200 W,时间 60 min。超声后用纱布过滤。重复以上步骤用超声仪提取一次。得到 950 mL 滤液。滤液通过旋转蒸发仪进行浓缩。浓缩至 325 mL,加 910 mL95% 的酒精沉淀多糖,用真空泵抽滤多次,得到褐色丝状不溶物(主要是多糖)和黄色透明的滤液(主要成分是黄酮和皂甙)。滤液旋转蒸发进行浓缩,得到 165 mL 溶液。

用 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 D101 大孔树脂 3 h,浸泡后,用蒸馏水洗至中性(pH 为 6.5 ~7.0),并尽量除去悬浮杂质。将层析柱(高度为 20 cm)垂直安装,装入树脂后稳定 5 min,然后接蒸馏水,并调整流速,平衡 0.5 h(本次操作用蒸馏水 450 mL)。调整平衡后,截断蒸馏水,打开平衡好的层析柱底端出口,使柱内液体流至与床体表面相平时,将吸管插入黄酮、皂甙混合粗提物,粗提物缓缓加入树脂,直至样品全部加完。上样结束后用蒸馏水洗至流出液无杂质。水洗后,接上 500 mL 40% 乙醇溶液,并打开柱下端出口,调整流速,开始洗涤。40% 的乙醇洗出液得到淡黄色的总黄酮溶液 315 mL,然后用旋转蒸发仪浓缩至 32 mL。浓缩物在抽真空、-50 ℃ ~-60 ℃条件下冷冻干燥,得到干粉,密封储藏备用。

1.2.2 芦丁对照品标准曲线的绘制

精密称取无水芦丁对照品 20.56 mg,置于 100 mL 量瓶中,加 70% 乙醇至刻度,摇匀,即得芦丁对照品溶液。精密吸取芦丁对照品溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 10mL 容量瓶中,依次加入 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 5 min;再加 10% 硝酸铝 0.3 mL,摇匀,放置 5 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,最后用 50% 甲醇定容,摇匀,放置 5 min 后在 510 nm 波长处测定各组分的吸光度。

1.2.3 总黄酮含量的测定

称取 5.1 mg 海滨锦葵根粉,用 10 mL 甲醇溶液溶解、过滤后取 1 mL 样品溶液,加 0.3 mL 5% 亚硝酸钠试剂,摇匀,静置 5 min;再加 10% 硝酸铝试剂 0.3 mL,摇匀,静置 5 min;再加 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用 50% 甲醇试剂定容至 10 mL,摇匀,放置显色 5 min。在 510 nm 波长下测定吸光度。再取 2 mL 样品溶液,重复以上步骤一次。

1.2.4 总黄酮的鉴别

1.2.4.1 薄层色谱法

取本品粉末 0.5 g,加甲醇 10 mL,密塞,超声提取 15 min,滤过,浓缩至 1 mL,滤液作为供试品溶液。另取芦丁对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 4 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述两种溶液各 10 μL,分别点于同一硅胶 GF_{254} 薄层板上,两者之间的距离为 1.5 cm。将点样后的硅胶板浸入展层剂(展

层剂为乙酸乙酯: 甲酸: 水 = 8: 1: 1),经过 30 min,展层完毕,取出硅胶板,晾干后喷以三氯化铝试液,待乙醇挥发完全后,置紫外光灯下检视。

1.2.4.2 颜色反应[10]

本试验利用三氯化铝法、硼酸法、乙酸镁法、氢氧化钠法、浓氨水法对总黄酮提取物中的黄酮类化合物进行定性鉴别。

1.2.5 MTT 法细胞体外增殖分析

准确称取 49 mg 总黄酮提取物,配成 10 mL 溶液,作为以下试验的样液。

1.2.5.1 对淋巴细胞体外增殖的影响

于无菌条件下,取雄性 17 ~ 22 g 重小鼠脾脏和胸腺各 2 只,置于培养皿中,加 Hanks 洗涤,在无菌不锈钢网上研磨,制成单个细胞悬液,1800 rps 离心 4 min,去上清,将细胞悬浮在 5 mL 的 RPMI-1640 培养基(内含 10% 小牛血清)中,用血球计数板进行细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^7/mL 和 2×10^7/mL,加入 4 块 96 孔板,80 μL /孔。随后加入不同稀释度的黄酮样品,80 μL/孔,对照孔加 1640 培养基 80 μL/孔。将板置于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养 24 h,然后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 8.5 μL,继续培养 4 ~ 6 h,再加入 20% SDS 溶液 40 μL/孔,培养过夜。次日在酶标仪上测定吸光度值,以无细胞培养基调零。

1.2.5.2 对肝癌细胞(HepS)体外增殖的抑制作用

于无菌条件下,取已感染肿瘤细胞的 17 ~ 22 g 重小鼠的腹腔液,加 Hanks 洗涤,制成单个细胞悬液,1800 rps 离心 4 min,去上清,将细胞悬浮在 5 mL 的 RPMI-1640 培养基(内含 10% 小牛血清)中,用血球计数板进行细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^6/mL,加入 2 块 96 孔板中,80 μL /孔。随后加入用 1640 培养基稀释的不同浓度黄酮样品,80 μL /孔,对照孔加 1640 培养基 80 μL/孔。将板置于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱内,一块培养 24 h,另一块培养 48 h。然后每孔加入 2.5 mg/mL 的 MTT 8.5 μL,继续培养 4 ~ 6 h,再加入 20% SDS 溶液 40 μL /孔,培养过夜。次日在酶标仪上测定吸光度值,用无细胞培养基调零。本试验重复一次,重复步骤同上,重复过程中使用 3 块 96 孔板,分别培养细胞 24、48 和 72 h。

1.2.6 数据分析

以上所得数据用平均值 ± 标准偏差表示,利用 SPSS18.0 进行差异显著性检验。当 $P \leqslant 0.05$ 时,有显著性差异;当 $P \leqslant 0.01$ 时,有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 海滨锦葵块根总黄酮得率

以吸光度(y)为纵坐标,各标准液浓度(x)为横坐标绘制标准曲线。将所得数据做回归处理得回归方程为 $y = 1.076x - 0.0057$,其中 $R^2 = 0.9988$,在 0 ~ 0.5 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。根据此回归方程计算得海滨锦葵根粉配成的样液黄酮浓度为 0.066 mg/mL,而提取物中总黄酮含量为 12.5%。结果表明,该种提取纯化方法得到的总黄酮纯度有较大提高。

表 1 总黄酮的颜色反应

Table 1 Color reaction results of the total flavones

试剂 Reagent	三氯化铝 $AlCl_3$	硼酸 H_3BO_3	醋酸镁 $Mg(Ac)_2$	氢氧化钠 NaOH	浓氨水 NH_3
可见光 Visible light	黄	黄	黄	深黄	亮黄
紫外光 UV	黄绿色荧光	黄	黄色荧光	黄	黄

2.2 海滨锦葵块根总黄酮的初步鉴定

黄酮类化合物的颜色反应比较多,主要利用分子中酚羟基和 γ-吡喃酮环的性质显色,通过显色反应可以对黄酮的种类及结构进行初步推测。在本研究的供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。由此可见提取物的主要成分为黄酮类化合物。由表 1 可见,显色反应结果较符合黄酮类化合物的特征颜色反应,结合薄层色谱检验结果可知样品中黄酮类化合物属于黄酮或黄酮醇类。由于本试验中所列的反应颜色只是某类黄酮体中大多数化合物所具有的共同颜色,要明确该粗品中的具体黄酮成分仍需做进一步的鉴定。

2.3 海滨锦葵块根总黄酮对体外细胞增殖活性的影响

黄酮类化合物具有抗癌、抗肿瘤、抗心脑血管疾病、免疫调节、抑菌抗病毒、抗氧化、抗辐射等作用。随着天然药物开发的日益兴起,植物源药物以其天然低毒的特点倍受青睐,而黄酮类化合物以其广谱

的药理作用备受关注。本试验结果表明,总黄酮在比较低的浓度下(60 μg/mL 以内,在约 60 μg/mL 达到峰值),对胸腺和脾脏的淋巴细胞增值起着促进作用(表 2)。而浓度变大以后,就体现出一定的抑制作用。当浓度达到 100 μg/mL 时,抑制作用较为明显。

表 2　总黄酮对小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞增值的影响

Table 2　Effects of the total flavonoids on mouse spleen lymphocytes and thymus lymphocyte proliferation

浓度 Concentration (μg/mL)	T-Cell	B-Cell
CK	0.7376 ± 0.0245	0.7333 ± 0.0201
10	0.7521 ± 0.0466 *	0.7629 ± 0.0350
20	0.7536 ± 0.0329 * *	0.7681 ± 0.0228
40	0.7898 ± 0.0592 * *	0.7899 ± 0.0531 *
60	0.7943 ± 0.0632 * *	0.7943 ± 0.0534 *
80	0.7849 ± 0.0428 * *	0.7849 ± 0.0332
100	0.6964 ± 0.0583 *	0.6904 ± 0.0469 *

注:B-Cell:脾淋巴细胞;T-Cell:胸腺淋巴细胞,* *:$P<0.01$,* * *:$P<0.001$,下同。

Note:B-Cell:spleen lymphocytes,T-Cell:thymus lymphocyte,* *:$P<0.01$,* * *:$P<0.001$。

海滨锦葵块根总黄酮对体外培养的 HepS 细胞增殖的影响结果见表 3。在 24、48、72 h 三个时段的测定都出现类似结果,即在较低浓度条件下,锦葵总黄酮对肿瘤细胞无抑制作用或抑制作用很小;当浓度增大到 60 μg/mL 时出现一定程度的抑制作用,而在 80 μg/mL 的浓度下抑制作用最好。当浓度继续增高时,抑制作用逐渐降低。除 40 和 60 μg/mL 处理在 48 h 时肿瘤细胞有促进效应外,其它浓度的抑制作用都随时间延长而加强。由此可见,锦葵总黄酮对于肿瘤细胞具有一定的抑制作用,但是对于浓度的精确度要求较高。如果浓度掌握不好,可能会使抑制作用不明显或失去抑制作用。

实际上,海滨锦葵根粉中除黄酮外,还包含皂甙、多糖等有效成分,且二者含量都较高。皂甙和多糖都有一定的抗肿瘤、促进免疫和保肝护肝的作用。因此,本试验中海滨锦葵总黄酮提取物表现出的生物活性也有可能是其中某种物质作用结果或某几种物质联合作用结果。由于皂甙和黄酮结构和功能上都有一定的相似性,可以尝试用二者(或更多已知成分的混合物质)的混合试剂进行抗肿瘤、免疫等细胞实验,期待出现更好的治疗效果。

表 3　总黄酮对 HepS 细胞生长的抑制作用($n\geqslant10$)

Table 3　Effects of the total flavonoids on HepS cellproliferation ($n\geqslant10$)

浓度 Concentration (μg/mL)	24 h	48 h	72 h
CK	1.0314 ± 0.0450	0.9056 ± 0.0420	0.7065 ± 0.1091
10	1.0120 ± 0.0960	0.9760 ± 0.0620 * *	0.6320 ± 0.0734
20	1.0072 ± 0.0509	0.9713 ± 0.1150 *	0.5871 ± 0.0512 *
40	0.8447 ± 0.0326 * * *	1.0136 ± 0.0901 * * *	0.7616 ± 0.0920
60	0.6008 ± 0.1026 * * *	0.8240 ± 0.0314 * * *	0.5980 ± 0.1695
80	0.4272 ± 0.0931 * * *	0.1413 ± 0.0093 * * *	0.1221 ± 0.0148 * * *
100	0.4363 ± 0.1002 * * *	0.2817 ± 0.0672 * * *	0.3358 ± 0.1140 * * *

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;* * $P<0.01$;* * * $P<0.001$。

Note:Compare with control,* $P<0.05$;* * $P<0.01$;* * * $P<0.001$.

3　结论

本研究结果表明,利用超声波提取并通过 D101 型大孔树脂分离纯化海滨锦葵块根总黄酮具有提取率高、吸附快、洗脱率高、纯化度高、树脂再生简便等特点,是锦葵总黄酮分离纯化的有效技术,此方法采用全物理过程,无任何污染,是一条理想的提取黄酮类物质的途径。海滨锦葵块根所含黄酮类化合物属于黄酮或黄酮醇类,且具有较好的免疫活性和抗肿瘤活性,若作为免疫增强剂及抗衰老制剂适度补充可有利于提高人体及动物的健康水平,具有广阔的应用前景。

参考文献

1　Ruan CJ(阮成江),Qin P(钦佩),Chen JW(陈景文),*et al*. Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkyavirginica*. *Acta Agron Sin*(作物学报),2004,30:901-905.

(下转第 530 页)