

SPE-HPLC 法分离合欢皮中抗血管新生的活性组分

蔡维维¹, 施建军¹, 冯磊², 杜斌², 邱丽颖^{1,2*}¹ 江南大学药学院; ² 江南大学无锡医学院, 无锡 214122

摘要:应用固相萃取-高效液相色谱法(SPE-HPLC),从合欢皮乙醇提取物-正丁醇相中分离得到若干个组分,再用 HMEC-1 细胞活性检测以及 HPLC 分析鉴定,筛选得到具有较高抑制新生血管活性的组分 II-4 ($IC_{50} = 1.45 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$),且组成较简单。本法简单快速,可以为中药材有效组分的快速分离提供新的方法,也为后续进一步分离得到细胞活性有效单体化合物提供组成比较简单的合欢皮活性组分提取物。

关键词:合欢皮;固相萃取;高效液相色谱;抗血管新生

中图分类号:Q946.91;R284.2

文献标识码:A

Isolation of Components with Anti-angiogenesis Activity from *Albizia julibrissin* by Solid Phase Extraction Coupled with Preparative HPLCCAI Wei-wei¹, SHI Jian-jun¹, FENG Lei², DU Bin², QIU Li-ying^{1,2*}¹ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University; ² Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In this study, several components with anti-angiogenesis activity were obtained from the *n*-butanol fraction of ethanol extract of *Albizia julibrissin* by solid phase extraction (SPE) coupled with preparative HPLC. The anti-angiogenesis effect and the composition analysis of the isolated components were monitored on HMEC-1 cells and by HPLC method, respectively. Finally, the component II-4 with higher anti-angiogenesis activity on HMEC-1 cells was obtained ($IC_{50} = 1.45 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$), and its composition was identified. The SPE-HPLC method was simple and fast, and can be used for rapid separation of Chinese herbal medicine at the same time it provided a reliable experimental materials for further separation of monomer compounds.

Key words: *Albizia julibrissin*; solid phase extraction; HPLC; anti-angiogenesis

合欢皮为豆科植物合欢 (*Albizia julibrissin* Durazz.) 的干燥树皮,具有解郁安神、活血消肿的作用,用于心神不安,忧郁失眠,跌扑伤痛^[1]。近代药理学研究发现,合欢皮还具有抗生育、抗过敏、抗肿瘤、免疫增强、镇静安神等作用^[2]。研究室前期研究已发现,合欢皮的乙醇提取物-正丁醇萃取组分(简称:合欢皮正丁醇相)是合欢皮中抑制肿瘤血管新生的有效部位^[3],经鉴定其活性组分群为皂苷类物质^[4]。本研究拟建立 SPE-HPLC 快速分离法,从合欢皮正丁醇相中分离得到抗血管新生活性高并且组成简单的有效部位,以替代传统的大孔树脂洗脱、薄层色谱分离等常规分离方法,为下一步分离得到活性单体提供合欢皮活性组分提取物。

1 仪器与材料

DIONEX Ultimate-3000 型液相色谱仪(戴安中国有限公司);R-201 型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司)。InnovationTM HLB Cartridge 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)、InnovationTM RTP Amide 制备色谱柱(21.2 mm × 250 mm, 10 μm)和 InnovationTM RTP Amide 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 10 μm)均为无锡科奥美萃生物科技有限公司产品。

合欢皮产于浙江,由南京中医药大学陈健伟教授鉴定为 *Albizia julibrissin* Durazz. 的干燥树皮。MC-DB 131 细胞培养基(美国 Gibco BRL 公司);胰蛋白酶、小牛血清和 L-谷氨酰胺(华美生物工程公司);磺酰罗丹明 B(SRB)和表皮生长因子(EGF)(美国 Sigma 公司);甲醇、乙腈为色谱纯,乙醇、正丁醇等均为分析纯,水为去离子水。

细胞株为 SV40 病毒转染的人微血管内皮细胞(HMEC-1)传代株,由法国国家卫生医学研究院

U553 研究所 (INSERM U553) 陆核教授馈赠, 保存于液氮灌中。

2 方法与结果

2.1 合欢皮正丁醇相的制备

称取合欢皮 100 g 置 2 L 圆底烧瓶中, 加入 75% 乙醇 1 L 加热回流两次, 每次 2 ~ 2.5 h, 冷却后合并提取液, 过滤。旋转蒸发至干, 以水复溶至 400 mL, 用等体积水饱和正丁醇萃取至正丁醇相无色, 合并正丁醇相, 旋转蒸发至干, 再用水复溶, 置 60 °C 真空干燥箱中干燥, 得黄棕色无定形粉末状合欢皮正丁醇相样品, 具有吸湿性和辛辣味, 干粉得率为 3.92%。

2.2 固相萃取法分离合欢皮正丁醇相样品

精密称取合欢皮正丁醇相干粉 20 mg, 加水制成浓度为 2 mg/mL 的溶液。取 Innovation™ HLB Cartridge 固相萃取柱, 用甲醇、超纯水活化。然后取样品溶液 3 mL 进行分离, 流速为 1 mL/min, 先用 3 倍体积的超纯水进行冲洗, 然后再分别用 3 倍体积的 50% 甲醇和 100% 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 将 50% 甲醇洗脱部分记为组分 I, 100% 甲醇洗脱部分记为组分 II, 分别旋转蒸发至干, 加水复溶, 真空干燥, 计算得组分 I 和 II 的干粉得率为 40.7% 和 49.25%。

2.3 RTP Amide 制备柱分离制备合欢皮有效部位

精密称取组分 II 50 mg, 加水定容至 10 mL, 得 5 mg/mL 的供试品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 备用。按以下色谱条件分离制备: 色谱柱 Innovation™ RTP Amide 制备色谱柱 (21.2 mm × 250 mm,

10 μm); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 2 min, 0% (A); 2 ~ 35 min, 0% ~ 25% (A); 35 ~ 50 min, 25% ~ 40% (A), 50 ~ 60 min, 40% ~ 100% (A); 流速: 10 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 0.5 mL。在 5 个不同的时间段收集样品, 分别记为组分 II-1 ~ 5, 并计算得各组分得率分别为 15.13%、17.06%、11.63%、34.88% 和 9.31%。

2.4 细胞活性评价

分别精密称取组分 I、组分 II 和组分 II-1 ~ 5 干粉各 2 mg, 用 MCDB131 培养基溶解, 得 1 mg/mL 母液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 备用。

将 HMEC-1 细胞正常培养, 至细胞消化前 1 d 换含 2% 小牛血清的培养基使之同步化。消化细胞, 计数, 按每孔 8000 个细胞铺 96 孔板, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中 24 h, 再加入不同浓度的各组分溶液, 设阴性对照组 (即不加药组), 每组设 4 个复孔, 重复试验 3 次。48 h 后取出 96 孔板, 弃去上清液, 每孔加入 100 mg/mL 三氯乙酸 (TCA) 200 μL 后置 4 °C 冰箱 40 min, 倒去 TCA 后用水冲洗 4 遍, 晾干; 各孔再加入 4 mg/mL SRB 溶液 100 μL 于 37 °C 放置 30 min, 倒去 SRB 溶液, 再用水洗 4 遍, 各孔再加入 10 mmol/L Tris 碱液 (pH 10.5) 150 μL 充分溶解, 在 540 nm 波长处测各孔吸光度值 (D), 按下式计算各组分的抑制率 (inhibition rate, IR) 及 IC₅₀ 值。

$$IR = \left[\frac{(D_{\text{对照组}} - D_{\text{药物组}})}{(D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})} \right] \times 100\%。$$

以抑制率大于 30% 确定为有效组分。

表 1 不同组分对 HMEC-1 细胞的抑制率 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Inhibition rates of different components of *A. julibrissin* on HMEC-1 cells ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

样品 Sample	IR/%					IC ₅₀ (μg/mL)
	50 μg/mL	25 μg/mL	12.5 μg/mL	6.25 μg/mL	3.125 μg/mL	
组分 I Component I	27.39 ± 2.56	14.78 ± 1.08	4.25 ± 0.77	-	-	n. d.
组分 II Component II	98.73 ± 2.39	70.75 ± 3.09	40.11 ± 1.88	33.78 ± 2.31	17.62 ± 1.45	11.58 ± 0.09
组分 II-1 Component II-1	18.33 ± 2.01	9.97 ± 1.78	7.05 ± 1.53	-	-	n. d.
组分 II-2 Component II-2	28.16 ± 1.68	13.33 ± 1.37	6.77 ± 1.98	-	-	n. d.
组分 II-3 Component II-3	68.49 ± 2.13	66.69 ± 1.66	62.72 ± 2.06	62.50 ± 0.99	30.55 ± 1.03	6.15 ± 0.08
组分 II-4 Component II-4	96.61 ± 2.12	73.82 ± 1.33	66.69 ± 1.82	60.05 ± 1.05	66.83 ± 1.22	1.45 ± 0.11
组分 II-5 Component II-5	22.68 ± 1.77	12.62 ± 1.42	5.97 ± 1.51	-	-	n. d.

注:“-”表示此浓度下的组分对 HMEC 细胞没有抑制作用;“n. d.”表示无法确定。

Note:“-” means no inhibitory effect on HMEC cells at that concentration;“n. d.” means not determined.

依据不同组分对 HMEC-1 细胞的抑制作用,结果见表 1。结果表明组分 II 的活性比组分 I 更佳,组分 II 的 IC_{50} 为 $(11.58 \pm 0.09) \mu\text{g/mL}$ 。实验证明固相萃取法中 100% 甲醇溶液洗脱能有效地富集合欢皮的活性部位。因此,将组分 II 作为制备色谱柱分离的原料。HMEC-1 细胞抑制实验结果也表明了组分 II-1、组分 II-2 和组分 II-5 没有抑制细胞生长的活性,组分 II-3 (IC_{50} 为 $6.15 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$) 与组分 II-4 (IC_{50} 为 $1.45 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) 均表现有一定的抑制作用,且组分 II-4 的抑制作用更明显。

2.5 样品溶液的 HPLC 分析

分别取合欢皮正丁醇相、组分 I、组分 II 及组分 II-4 干粉各 10 mg,用水溶解,定容至 10 mL,得 1

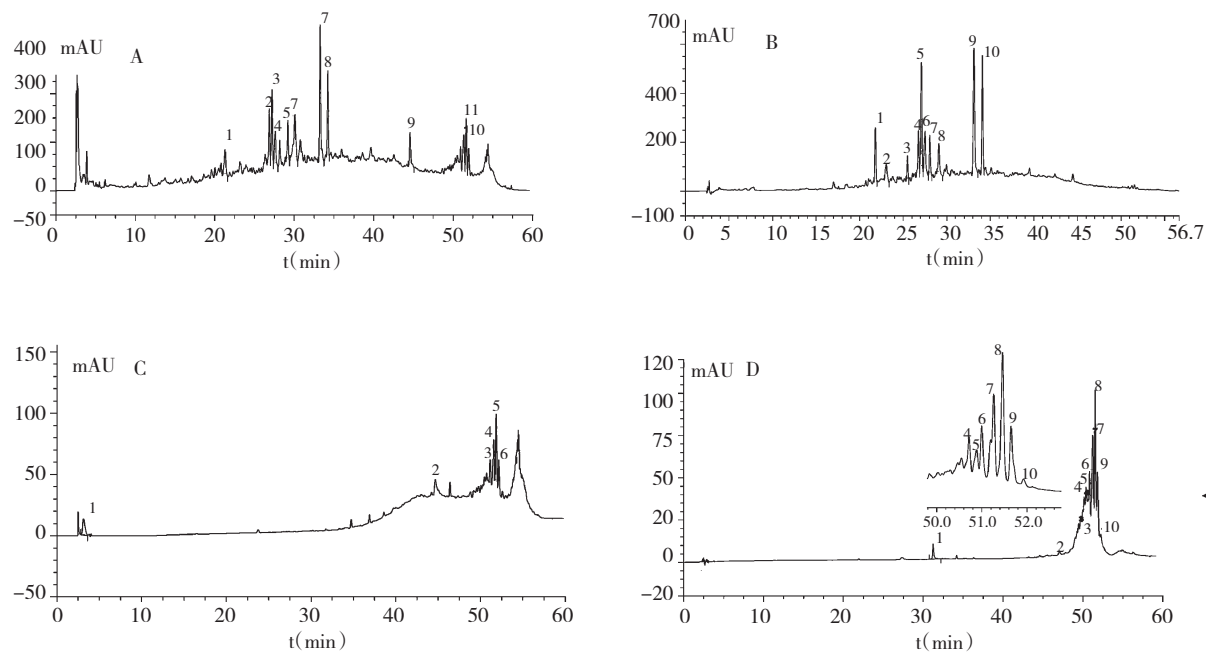


图 1 各组分样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of *A. julibrissin* ethanol reflux-n-butanol extract (A), component I (B), component II (C) and component II-4 (D)

A:合欢皮乙醇提取-正丁醇相;B:组分 I;C:组分 II;D:组分 II-4

分析组分 II-4 的 HPLC 色谱图(图 1D)发现,组分 II-4 的组成简单,物质主要集中在 50 ~ 52 min 内,且峰形较好,虽然在本 HPLC 分析条件下各个组分色谱峰的分度没有达到制备分离的要求,但可以在此基础上,通过改变色谱条件,分离得到活性单体,这也为后期合欢皮质量标准的建立提供实验依据。因此本研究将组分 II-4 定为抑制血管新生活性较好的最佳组分,作为后期分离单体的合欢皮活性组分提取物。

mg/mL 供试品溶液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。按以下色谱条件进行分析,色谱柱:Innovation™ RTP Amide 液相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 10 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱:0 ~ 5 min, 0% (A); 5 ~ 35 min, 0% ~ 25% (A); 35 ~ 50 min, 25% ~ 40% (A); 50 ~ 60 min, 40% ~ 100% (A);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:20 μL 。

比较合欢皮正丁醇相、组分 I、组分 II 的分析色谱图(图 1A、B、C),HLB 固相萃取柱能将合欢皮正丁醇相分为两部分,且组分 I 为合欢皮正丁醇相的 10 ~ 40 min 部分,组分 II 为其 40 ~ 60 min 部分。

3 讨论

传统的分离技术(如大孔树脂洗脱、薄层色谱分离等)存在工作量大、耗时长等缺点,因此需要寻求一种高效快速的分离方法以替代传统的分离技术。Innovation™ HLB Cartridge 固相萃取柱是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烯基吡咯烷酮两种单体按一定比例聚合成的超低压快速反相层析填料,它的基架为大小均一的坚硬的聚苯乙烯分子,适用

于天然产物的分离纯化^[5]以及环境水资源、生物样品的分析^[6,7]。这种 HLB 填料还可用于其他极性或非极性化合物的提取、富集和净化。InnovationTM RTP Amide 是酰胺极性嵌入式键合相,这种键合相的选择性独特,一些在 C₁₈ 键合相上分离困难的物质,可以在极性嵌入式键合相上获得很好的解决。它是在类似 C₁₈ 链长度的硅烷试剂中嵌入极性酰胺,使得键合相亲水,在 100% 水相条件下稳定。由于本研究中的合欢皮皂苷极性较大,实验结果证明使用 HLB 固相萃取柱可以很好的分离合欢皮正丁醇相,富集得到合欢皮的有效部位。实验还发现,合欢皮正丁醇相在 InnovationTM RTP Amide 液相色谱柱上的分离度较好,一些主要的有效物质峰,例如组分 II-4 能够被分离开,作为下一步分离有效单体的合欢皮活性组分提取物。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 134.
- Wei DH (蔚冬红), Qiao SY (乔善义), Zhao YM (赵毅民), *et al.* Advances in study on bark of *Albizia julibrissin*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29: 619-624.
- Li Q (李倩), Feng L (冯磊), Shi JJ (施建军), *et al.* Screening of active substances of anti-angiogenesis induced by tumour cell in Albizia. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2012, 34: 744-747.
- Hua H (花慧), Feng L (冯磊), Zhang XP (张小平), *et al.* Study on the compound isolated from *Albizia julibrissin* extract on proliferation of HMECs. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2011, 26: 229-231.
- Jauffrais T, Kilcoyne J, Séchet V, *et al.* Production and isolation of azaspiracid-1 and -2 from *Azadinium spinosum* culture in pilot scale photobioreactors. *Mar Drugs*, 2012, 10: 1360-1382.
- Yin J, Yang Y, Li KJ, *et al.* Analysis of anticancer drugs in Sewage water by selective SPE and UPLC-ESI-MS-MS. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48: 781-789.
- Tamura M, Takahashi A, Uyama A, *et al.* A method for multiple mycotoxin analysis in wines by solid phase extraction and multifunctional cartridge purification, and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Toxins*, 2012, 4: 476-486.
- Nagy ED, Guo Y, Tang S, *et al.* A high-density genetic map of *Arachis duranensis*, a diploid ancestor of cultivated peanut. *BMC Genomics*, 2012, 13: 469.
- Temsch EM, Greilhuber J. Genome size in *Arachis duranensis*: a critical study. *Genome*, 2001, 44: 826-830.
- Mantegna S, Binello A, Boffa L, *et al.* A one-pot ultrasound-assisted water extraction cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chem*, 2012, 130: 746-750.
- Xie HQ (谢红旗), Liu FB (刘发宝), Yang XX (杨星星), *et al.* General law of dynamic accumulation of resveratrol and viniferin in grape. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1079-21083.
- Sun JL (孙晋苓), Huang XL (黄晓兰), Wu HQ (吴惠勤), *et al.* HPLC/IT/MS analysis of glycosides radix *Polygonumtiflori*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 806-812.
- Han HB, Li H, Hao RL, *et al.* One-step column chromatographic extraction with gradient elution followed by automatic separation of volatiles, flavonoids and polysaccharides from *Citrus grandis*. *Food Chemistry*, 2014, 145: 542-548.
- Liu Y (刘一), Li Y (李媛), Zhao LB (赵立波), *et al.* Study on the Fragmentation Pathways of 4 Kinds of Resveratrol Compounds by ESI-MS^m. *China Pharm* (中国药房), 2013, 24: 33-36.
- Dong J (董静), Wang H (王弘), Wan LR (万乐人), *et al.* Identification and determination of major constituents in *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc by high performance liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry. *Chin J Chromatography* (色谱), 2009, 27: 425-430.
- Zhao K (赵康), Su ZY (苏政荣), Yang BW (杨碧文), *et al.* Determination of resveratrol and polydatin in *Mulberry*. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31: 241-244.
- Wu XY (吴向阳), Wang CX (王彩霞), Da ZL (笪祖林), *et al.* HPLC determination of resveratrol in roots, stems and leaves of peanut. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30: 240-242.
- Zhou L (周丽), Dong YH (董永海), Hu CL (胡传来), *et al.* Quantitative determination of resveratrol and resveratrol glucoside in grape juice (wine) by HPLC. *Acta Nut Sin* (营养学报), 2010, 32: 86-90.

(上接第 703 页)