

王不留行黄酮苷的分离纯化及对细胞增殖活性的影响

王旭¹, 侯豹², 蔡维维¹, 邱丽颖^{1*}

¹江南大学无锡医学院; ²江南大学药学院, 无锡 214122

摘要: 本文以炒王不留行中王不留行黄酮苷含量为考察指标, 采用动静态吸附试验相结合的方式, 从大孔树脂型号、吸附时间、最大上样量和洗脱剂浓度等方面考察大孔吸附树脂对炒王不留行中王不留行黄酮苷的分离纯化工艺, 得到了稳定可行的工艺路线和吸附参数。同时利用 SRB 法测定皂苷对内皮细胞增殖的影响。本研究可为炒王不留行中王不留行黄酮苷的大孔树脂分离纯化精制工艺的确定提供参考, 同时进一步研究发现王不留行黄酮苷可显著促进内皮细胞增殖。

关键词: 炒王不留行; 王不留行黄酮苷; 大孔吸附树脂; 静态吸附; 动态吸附; 细胞增殖

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.024

Separation, Purification and Cell Proliferative Effect of Vaccarin

WANG Xu¹, HOU Bao², CAI Wei-wei¹, QIU Li-ying^{1*}

¹Wuxi Medical School, Jiangnan University; ²School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: The separation and purification of vaccarin in Semen Vaccariae with macroporous resin had been studied in this research. The refinement process and adsorption factor were compared by static and dynamic adsorbing experiments. Vaccarin was developed as its quality standard, screening out the best refinement process and adsorption factor. The optimized refinement process and adsorption factor were stable and feasible. The effect of vaccarin on the proliferation of endothelial cells was detected by SRB assay. The result of this study provided reference for the refinement of Semen Vaccariae with macroporous resin. In addition, it was also found that vaccarin markedly promoted the proliferation of endothelial cells.

Key words: Semen Vaccariae; vaccarin; macroporous resin; static adsorption; dynamic adsorption; cell proliferation

王不留行为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 的干燥成熟种子, 药典记载其具有活血痛经, 下乳消肿, 利尿通淋的作用, 用于经闭, 痛经, 乳汁不下, 乳痈肿痛, 淋证涩痛^[1]。文献报道王不留行中含多种皂苷、黄酮苷、环肽、类脂、脂肪酸、单糖、生物素及香豆素类化合物等成分^[2]。王不留行黄酮苷(vaccarin)是从王不留行中提取出来的一种黄酮三糖苷, 为淡黄色颗粒状结晶, 易溶于甲醇、甲醇-水、乙醇、乙醇-水、正丁醇等, 难溶于氯仿、乙酸乙酯、石油醚等^[3]。王不留行黄酮苷的初步分离, 结构鉴定和超声波提取工艺已有报道^[4,5], 但王不留行黄酮苷进一步分离纯化的工艺及其对细胞增殖活性的影响目前和尚未有研究。本实验对王不留行黄酮苷进行了分离、提纯, 并对王不留行黄酮苷在体

外对内皮细胞增殖活性进行了初步研究, 旨在推动王不留行黄酮苷的研发。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

炒王不留行(批号: 110320)购自安徽顺生堂中药饮片有限公司; 王不留行黄酮苷标准品(批号: 15112310)购自上海士峰生物科技有限公司; 大孔吸附树脂 HPD100、HPD300、HPD600、HP20、D101、AB-8 购自沧州宝恩吸附材料有限公司; 除高效液相所用为色谱纯外, 水为超纯水, 其它试剂均为分析纯。胎牛血清(Gibco BRL 公司); DMEM 高糖培养(cellgro, 美国 Mediatech 公司); 青霉素(华北制药股份有限公司), 链霉素(大连美罗大药厂); 磺酰罗丹明 B (SRB) 试剂(美国 Sigma 公司); 葡萄糖(国药集团); 维生素 C(国药集团); 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号: 20130620)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号: 20130608)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:

20130618)、BCA 试剂盒(批号:20130619)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器

Ultimate 3000 戴安高效液相色谱仪(Dionex 公司);KQ-800KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL104 型分析天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司);Milli-Q 纯水仪(Millipore 公司)。CO₂ 细胞培养箱(Thermo Forma 公司,型号:SY18-WJ2/3);紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司,型号:UV-2100);自动酶标仪(Lab-system 公司,型号:Multiskan MK3);分析天平(METTLER TOLEDO,型号:AL104);超净工作台(青岛丹佳净化设备有限公司,型号:SW-CJ-IF)。

1.3 细胞株

人微血管内皮细胞(HMEC-1)由法国国家卫生医学研究院 U553 研究所提供。

2 实验方法

2.1 王不留行黄酮苷的含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流速:0.5 mL/min;流动相:甲醇(A)-0.3% 磷酸-水溶液(B);梯度洗脱程序:0 ~ 10 min, 65% (B);10 ~ 20 min, 65% ~ 60% (B);20 ~ 35 min, 60% ~ 50% (B);检测波长:280 nm;进样量:10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备

精确称取王不留行黄酮苷对照品,加 70% 甲醇溶液,于 5 mL 容量瓶中定容,制成浓度分别为 12.5、25、48、96、120、144、168、240 μg/mL 的标准品溶液,经 0.45 μm 微孔有机滤膜滤过后,4 ℃ 保存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备

将每一步所得王不留行黄酮苷样品溶液置于 60 ℃ 真空干燥箱中烘干,加入配置好的 70% 甲醇-水溶液 1 mL,经 0.45 μm 微孔有机滤膜滤过后既得王不留行黄酮苷供试品溶液。

2.1.4 标准曲线绘制

按上述 2.1.2 方法制得不同浓度标准品溶液,依次进样 10 μL,按所确定的色谱条件测定王不留行黄酮苷的峰面积。以王不留行黄酮苷含量(μg)为横坐标,峰面积(mAu * min)为纵坐标,绘制标准曲线,王不留行黄酮苷的回归方程为: $Y = 50.956X -$

$0.6521 (R^2 = 0.9994)$,进样量在 0.125 ~ 2.40 μg 的范围内与峰面积呈现良好的线性关系。

2.1.5 含量测定

分别吸取上述供试品溶液适量,注入液相色谱仪,测定,计算各供试品溶液中王不留行黄酮苷的含量。

2.2 王不留行提取液的制备

称取 200 g 已粉碎的炒王不留行药材,置于圆底烧瓶中,按料液比 1:15 (g:mL) 加入 60% 乙醇溶液,微沸状态下回流提取 2 次,每次 2 h,合并两次提取液,过滤,得上清液,旋干,加去离子水复溶,定容至 250 mL,取 1 mL 干燥,备用。

2.3 大孔树脂的预处理

以 95% 乙醇湿法装柱,以 95% 乙醇洗脱,不时检测流出的乙醇,当流出的乙醇与水混合后不呈白色浑浊时即可,再以蒸馏水洗至无醇味。实际操作中,乙醇洗至柱体积的 4 倍时与水混合不浑浊,洗至 6 倍时,无树脂味。

2.4 影响大孔树脂静态吸附的因素

2.4.1 树脂型号的选择

参考文献^[6],按 2.3 方法对 HPD100、HPD300、HPD600、HP20、AB-8、D101 等 6 种大孔树脂进行预处理,分别准确称取 0.5 g 不同树脂于 100 mL 广口锥形瓶中,分别加入浓度为 0.2981 mg/mL 的王不留行黄酮苷提取液 10 mL,保鲜膜封口后,室温下放入 120 rpm 的摇床中振荡,24 h 后检测各组样品的王不留行黄酮苷浓度。将吸附时间为 24 h 的各组大孔树脂,过滤除去上清液,均加入 10 mL 95% 乙醇,同样环境下摇床振荡,24 h 后检测各组样品的王不留行黄酮苷浓度。按下式分别计算吸附能力和解吸率,从中筛选出性能最优的大孔吸附树脂。

$$A = \frac{(C_0 - C_e)V_0}{W}$$

$$D = \frac{C_d V_d}{(C_0 - C_e)V_0}$$

其中,A 代表吸附能力(mg/g),D 代表解吸率(%),C₀ 表示起始时样品溶液中的黄酮苷含量(mg/mL),C_e 表示平衡时样品溶液中的黄酮苷含量(mg/mL),V₀ 表示样品溶液的起始体积(mL),W 表示树脂重量(g),C_d 表示解吸附溶液中的黄酮苷含量(mg/mL),V_d 表示解吸溶液的体积(mL)。结果如表 1 所示,可以看出,HPD100 大孔树脂的吸附能力为 13.61 ± 0.94 mg/g,解吸率达到 79.35 ±

1.71%,均优于其他5种树脂,所以在接下来的实验中,采用HPD100大孔树脂作为分离纯化的树脂。

表1 王不留行黄酮苷在不同大孔树脂上的吸附和解吸能力($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 The adsorption capacities and desorption ratio of vaccarin on different macroporous resins($\bar{x} \pm s, n=3$)

树脂型号 Model resin	吸附能力 Adsorption ability (mg/g)	解吸率 Desorption rate (%)
D101	8.70 ± 1.13	33.13 ± 4.86
AB-8	12.38 ± 1.04	59.05 ± 2.32
HP20	3.31 ± 0.06	34.63 ± 2.56
HPD100	13.61 ± 0.94	79.35 ± 1.71
HPD300	6.39 ± 0.22	74.00 ± 1.04
HPD600	6.07 ± 1.10	56.79 ± 3.40

2.4.2 吸附时间的考察

分别准确称取0.5 g预处理好的HPD100大孔树脂,置于6个100 mL三角瓶中,按王不留行黄酮苷含量计配制水溶液0.2981 mg/mL,在室温下分别向6个三角瓶中加入该溶液10 mL,依次静置吸附0.5、1、2、4、6、8 h,吸取出上清液1 mL, HPLC法检测各组样品的王不留行黄酮苷含量,按吸附能力公式计算静态吸附量。如图1所示,2 h时,王不留行黄酮苷在HPD100树脂上的吸附能力达到平衡,因此,在接下来的实验中,药物在树脂上的吸附时间为2 h。

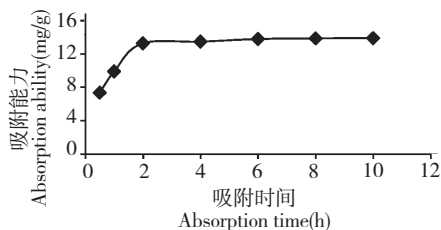


图1 王不留行黄酮苷的吸附时间曲线

Fig. 1 The adsorption time curve of vaccarin

2.5 影响大孔树脂动态吸附的因素

2.5.1 最大上样量的考察

称取已经预处理的,体积为3 mL的HPD100大孔树脂,置于1.5 cm × 6 cm的层析柱中,将王不留行黄酮苷样品水溶液(50 mL,含量为0.4041 mg/mL)以流速1.5 mL/min的速度流出层析柱,每5 mL收集一次,总计10个流份,经样品前处理后, HPLC法测定王不留行黄酮苷含量,按以下公式可计算渗漏率,当动态渗漏达到平衡时,可以计算出最大上样量。

$$LF = \frac{C_n}{C_{n+1}}$$

其中,LF表示渗漏率(Leak fraction ratio), C_n 表示第n次收集的流份中王不留行黄酮苷的含量, C_{n+1} 表示第n+1次收集的流份中王不留行黄酮苷的含量。如图2所示,第6个组分时,王不留行黄酮苷的渗漏率达到最大,为99.5%,之后其渗漏率开始下降,说明药物在树脂中的最大负载量为前六个组分之和,由此计算,其最大上样量为4.04 mg 黄酮苷/(1 mL树脂)。

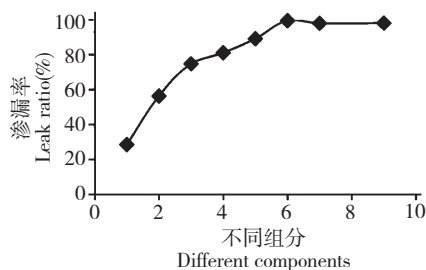


图2 王不留行黄酮苷的动态渗漏率

Fig. 2 The leached fraction and absorption capacity in the kinetic assay of vaccarin

2.5.2 洗脱剂浓度的考察

将预处理好的HPD100大孔树脂进行湿法装柱,柱体积为100 mL。称取0.4 g王不留行乙醇提取物干粉(王不留行黄酮苷含量为10.46 mg),去离子水充分溶解,上柱吸附2 h,依次用蒸馏水、15%、30%、50%、70%、95%乙醇水溶液各5 BV洗脱,洗脱流速为1.5 mL/min,收集每个柱体积的流份,检测各组中的王不留行黄酮苷含量。如图3所示,经过不同浓度的乙醇-水溶液洗脱后, HPLC检测,发现

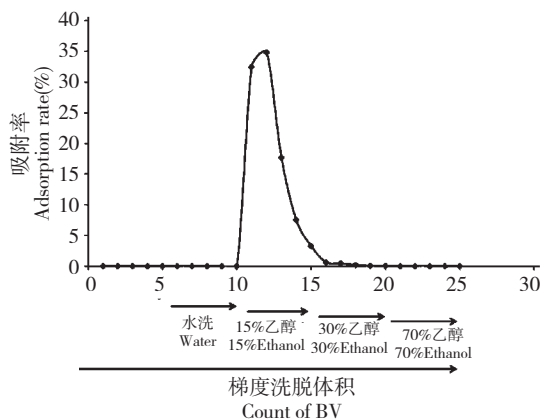


图3 不同溶剂梯度洗脱曲线

Fig. 3 The kinetic desorption curve based on the gradient elution program

王不留行黄酮苷主要集中在 HPD100 大孔树脂洗脱的 30% 乙醇组分中,且 5 个柱体积就可以将目标产物现王不留行黄酮苷主要集中在 HPD100 大孔树脂洗脱的 30% 乙醇组分中,且 5 个柱体积就可以将目标产物完全洗脱下来,因此在接下来的正交实验中,将先进行水洗,15% 乙醇洗脱除杂,然后再用 30% 乙醇溶液将王不留行黄酮苷全部富集起来。现王不留行黄酮苷主要集中在 HPD100 大孔树脂洗脱的 30% 乙醇组分中,且 5 个柱体积就可以将目标产物完全洗脱下来,因此在接下来的正交实验中,将先进行水洗,15% 乙醇洗脱除杂,然后再用 30% 乙醇溶液将王不留行黄酮苷全部富集起来。

2.6 $L_9(3^4)$ 正交实验优化大孔树脂洗脱条件

为了更充分地研究 HPD100 大孔树脂纯化王不留行黄酮苷(vaccarin)的最佳工艺参数,因此采用 $L_9(3^4)$ 正交实验考察其洗脱流速、水洗体积、15% 乙醇洗脱体积,30% 乙醇洗脱体积。如表 2 所示,根据所得结果,按下式计算 vaccarin 纯度和收率,再进行方差分析,可得最佳组合条件。

$$\text{vaccarin 纯度} = \frac{\text{洗脱液中 vaccarin 质量}}{\text{洗脱液中干物质质量}}$$

$$\text{vaccarin 收率} = \frac{\text{洗脱液中 vaccarin 质量}}{\text{上柱前 vaccarin 质量}}$$

$$\text{总指标} = \text{收率} \times 0.5 + \text{纯度} \times 0.5$$

表 2 $L_9(3^4)$ 正交因素水平表

Table 2 The parameters tested in the orthogonal experiment

序号	(A) 洗脱流速 Elute flowrate (mL/min)	(B) 30% 醇洗体积 Volume of 30% ethanolsolution for elution (BV)	(C) 水洗体积 Volume of water for elution (BV)	(D) 15% 醇洗体积 Volume of 15 % ethanolsolution for elution (BV)
1	1	3	3	3
2	1.5	4	4	4
3	2	5	5	5

按照上述实验中所获得的最优洗脱条件组合,取王不留行黄酮苷提取液进行反复上柱、吸附、洗脱,共进行三次平行实验,计算王不留行黄酮苷收率和纯度。正交结果如表 3 所示。再经过表 4 的综合指标分析和表 5 的正交方差差异性分析可以得出,只有洗脱流速和 30% 乙醇洗脱体积具有显著性差异

($P < 0.05$),结合资源利用等因素,可以得出,正交实验的最佳优化条件为:洗脱流速 1 mL/min,水洗体积 3 BV,15% 乙醇洗脱体积 3 BV,30% 乙醇洗脱体积 5 BV。根据所得最佳组合,进行平行实验验证,结果如表 6,最佳组合的综合指标优于所有实验组的综合指标。

表 3 正交实验结果

Table 3 Results of the orthogonal experiment

组别 Group	干物质得量 Yield mass of extract (mg)	王不留行黄酮苷得量 Yield mass of vaccarin (mg)	王不留行黄酮苷收率 Yield of vaccarin (mg)	王不留行黄酮苷纯度 Content of vaccarin (%)
1	285.0	33.2	82.1	11.6
2	345.1	38.1	94.2	11.0
3	360.1	38.1	94.2	10.6
4	270.1	32.1	79.5	11.9
5	284.9	33.1	81.9	11.6
6	300.1	35.2	87.1	11.7
7	224.9	27.3	67.5	12.1
8	269.9	31.8	78.7	11.8
9	300.1	33.4	82.7	11.1

表 4 正交实验结果分析王不留行黄酮苷的综合指标

Table 4 Analysis of the orthogonal experiment

组别 Group	A	B	C	D	综合指标 Comprehensive index
1	1	1	1	1	46.8
2	1	2	2	2	52.6
3	1	3	3	3	52.4
4	2	1	2	3	45.7
5	2	2	3	1	46.7
6	2	3	1	2	49.4
7	3	1	3	2	39.8
8	3	2	1	3	45.2
9	3	3	2	1	46.9
K1	151.8	132.3	141.5	140.5	
K2	141.8	144.6	145.2	141.8	
K3	132	148.7	138.9	143.3	
Rj	19.9	16.4	6.3	2.8	

表 5 T 检验差异性分析

Table 5 Tests of between-subjects effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	121.093 a	6	20.182	28.786	0.034
Intercept	20116.69	1	20116.69	28692.59	0
(A) 洗脱流速 Elute flow rate	66.002	2	33.001	47.07	0.021
(B) 30% 醇洗体积 Volume of 30% ethanol solution for elution	48.382	2	24.191	34.504	0.028
(C) 水洗体积 Volume of water for elution	6.709	2	3.354	4.784	0.173
Error	1.402	2	0.701		
Total	20239.19	9			
Corrected Total	122.496	8			

a. R Squared = 0.989 (Adjusted R Squared = 0.954).

表 6 验证实验结果

Table 6 Results of confirmation experiment

组别 Group	王不留行黄酮苷纯度 Content of vaccarin (%)	王不留行黄酮苷收率 Yield of vaccarin (mg)	综合指标 Comprehensive index
1	11.52	94.54	53.03
2	12.01	95.28	53.65
3	12.99	94.33	53.66
平均 Mean	12.17 ± 0.75	94.72 ± 0.05	

2.7 SRB 法细胞体外增殖分析

选择对数生长期的 HMEC-1 细胞,胰酶消化制成细胞悬液,调整细胞浓度,按每孔 6000 个细胞接

种于 96 孔板,每孔接种 150 μL ,每组设 6 个复孔。24 h 后,空白组加入 150 μL 新鲜培养基。阳性对照组 (FGF-2 组) 加入 150 μL 含 FGF-2 的新鲜培养基,

使 FGF-2 的终浓度为 20 ng/mL。给药组分别加入 150 μ L 相应浓度等体积王不留行黄酮苷的药液,使药物终浓度分别为 0.4、0.79、1.76 μ g/mL (即 0.54、1.08、2.15 μ mol/L),于 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后,SRB 法检测细胞活力。

将所制得的王不留行黄酮苷在 HMEC-1 细胞上做活性评价,其检测结果见表 7。从表 7 可以看出,王不留行黄酮苷对 HMEC-1 细胞的增殖有显著促进作用。

表 7 王不留行黄酮苷对 HMEC-1 细胞的增殖率($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别 Group	增殖率/(% 相对于空白对照组) Proliferation ratio/ (% Compared with the control)
空白组	0 \pm 0.68
阳性对照组 (FGF-2 20 ng/mL)	48.32 \pm 2.52 **
Vaccarin (0.4 μ g/mL)	8.48 \pm 1.03 *
Vaccarin (0.79 μ g/mL)	11.24 \pm 0.98 **
Vaccarin (1.76 μ g/mL)	29.67 \pm 1.43 **

3 讨论与结论

王不留行黄酮苷的含量测定方法主要参考 2015 版药典方法^[1],将每一步所得王不留行黄酮苷样品溶液置于 60 $^{\circ}$ C 真空干燥箱中烘干,加入配置好的 70% 甲醇-水溶液 1 mL,经 0.45 μ m 微孔有机滤膜滤过后,HPLC 法测定含量,检测波长为 280 nm。综合上述实验研究,大孔树脂对炒王不留行中王不留行黄酮苷的分离纯化工艺为:选用 HPD100 型大孔树脂,吸附时间为 2 h,最大上样量为 4.04 mg 黄酮苷/(1 mL 树脂),洗脱流速为 1 mL/min。先用 3 倍柱体积蒸馏水和 3 倍柱体积 15% 乙醇洗脱弃去,再用 5 倍柱体积的 30% 乙醇洗脱,收集洗脱液,减压干燥,既得。本文“2.2 王不留行提取液的制备”

项下所制备的上柱药液含王不留行黄酮苷约为 2.62%,本文通过大孔吸附树脂富集后,样品中王不留行黄酮苷含量约达到 12.17%,为上柱药液含量的 4.6 倍。通过验证试验说明该富集方法的工艺路线稳定可行,吸附参数准确可靠。

本文所建立的王不留行黄酮苷大孔吸附树脂富集方法,具有操作简便,重现性好,能耗少,所得有效部位含量高的优点,为工业化分离纯化王不留行黄酮苷提供重要的理论依据,有较好的应用前景。本研究发现王不留行黄酮苷对血管内皮细胞具有显著促增殖作用,为开发王不留行黄酮苷作为促进血管新生和治疗血管性疾病的药物提供重要理论依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典), Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 53.
- 2 Li F (李帆), Liang JY (梁敬钰). Research progress of *Vaccaria segetalis*. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2007, 19: 1-5.
- 3 Meng H (孟贺), Chen YP (陈玉平), Qin WJ (秦文杰), et al. Isolation and identification of vaccarin from *Vaccariae Semen*. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 874-876.
- 4 Meng H (孟贺), Chen YP (陈玉平), Qin WJ (秦文杰), et al. Isolation and identification of vaccarin from *Vaccariae Semen*. *Chin Trad Herbal Drugs* (中草药), 2011, 42: 874-876.
- 5 Fu QF (付起凤), Xue J (薛娟), Zhang WP (张万鹏), et al. Orthogonal optimization of ultrasonic extraction technology of flavonoid glycosides in cowherb seed. *Harbin Med J* (哈尔滨医药), 2016, 1: 69-70.
- 6 Wei H, Ruan JL, Lei YF, et al. Enrichment and purification of flavones from rhizomes of *Abacopteris penangiana* by macroporous resins. *Chin J Nat Med*, 2012, 10: 119-124.