

桦褐孔菌三萜提取纯化工艺及体外抗肿瘤作用研究

李鑫*, 李钰璐, 汤茗瑞, 王柳婷

哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150000

摘要:为了优选桦褐孔菌三萜的提取工艺及大孔树脂优化工艺。本实验以总三萜提取率为指标,选择提取溶剂、料液比、提取温度、提取时间、提取次数为考察因素,通过单因素考察和响应面法筛选桦褐孔菌三萜提取工艺。选取上样浓度、上样体积、上样 PH、上样流速、洗脱液浓度及体积为考察因素,采用单因素试验对 AB-8 型大孔树脂纯化最优工艺进行了研究。并通过 MTT 实验验证其抗胃癌活性。结果表明,用无水乙醇作为提取溶剂,90 HZ,超声 30 min 后,溶剂比 1:15,82 °C 提取 2 h。最优桦褐孔菌三萜纯化工艺为上样浓度 1 mg/mL,上样量 2 BV,上样最佳 pH = 5,上样最佳流速 2 mL/min,洗脱液选择 95% 乙醇,pH = 5。采用纯化后的桦褐孔菌三萜进行体外 MTT 实验,结果得出桦褐孔菌三萜具有显著性抑制 HeLa 细胞生长作用。该提取及纯化工艺可行,为桦褐孔菌三萜的开发打下基础。

关键词:桦褐孔菌;三萜;紫外分光光度法;响应曲面;大孔吸附树脂

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0076-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.014

Study on extraction and purification of triterpenoids from inonotus obliquus and its anti-tumor activity

LI Xin*, LI Yu-lu, TANG Ming-ru, WANG Liu-ting

College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150000, China

Abstract: In order to optimize extraction technology of *Inonotus obliquus* triterpenoids, and investigate its purification technology by macroporous resin. This experiment with the content of total saponins as index, extract solvent, solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and times were selected as factors, the single-factor investigation and response surface method were used to screen the extraction process of *Inonotus obliquus* triterpenoids. With sample concentration, sample volume, flow rate on sample PH, concentration and volume of eluent were selected was used to investigate purification technology. The single-factor investigation was used to AB-8 macroporous resin purification process. The MTT test validates its anti-gastric activity. The results showed that ethanol was used as the extraction solvent, 90 Hz, ultrasonic for 30 min, the solvent ratio was 1:15 and extraction was 82 °C for 2 h. The optimal purification process for *Inonotus obliquus* triterpenes: 1 mg/mL for sample loading, 2 BV for sample loading, optimal pH = 5 for sample loading, 2 mL/min for optimum flow rate, 95% ethanol for eluent, pH = 5. using purified *Inonotus obliquus* triterpenes can significantly inhibit HeLa cell growth. The extraction and purification process is feasible. And lay the foundation for the development of *Inonotus obliquus* triterpenoids.

Key words: *Inonotus obliquus*; triterpene; ultraviolet spectrophotometry; response surface method; macroporous resin

随着中医药事业的发展,中药对治疗癌症现已经显示出了独特的优势,因此从中草药里提取有效成分来治疗癌症,成为了研究焦点^[1-3]。通过桦褐孔菌三萜类药物对胃癌细胞的选择性抑制作用研究,可以为推广研究打下基础。桦褐孔菌三萜类物质不稳定,易溶于有机溶剂,本实验以桦褐孔菌为原材料

采用超声波辅助回流提取法提取三萜类物质。通过单因素及响应面设计^[4-8]对桦褐孔菌三萜类物质的提取工艺进行优化得出最佳提取工艺。并通过比较 AB-8、D101 两种大孔吸附树脂^[9-12]的吸附解吸性能,筛选出更为合适 AB-8 大孔树脂,较为系统的对桦褐孔菌三萜类化合物的吸附量、解吸率及影响因素进行了研究,为其工业化生产提供基本的工艺参数。

1 仪器与试剂

UV-2102C 型紫外可见分光光度计(尤尼科上海仪器有限公司);FA2204B 电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司);SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造);MCO-15AC CO₂ 培养箱(三洋电器生物医学);CKX41SF 倒置显微镜(OLYMPUS CORPORATION);LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。桦褐孔菌(购自购自黑龙江国药药材有限公司,经鉴定为多孔菌科纤孔菌属);齐墩果酸(纯度 $\geq 98\%$,京嘉世玉化工技术研究院);AB-8 型大孔树脂(天津市汇达化工有限公司 20170803);D-101 型大孔树脂(天津市汇达化工有限公司 20170802);胰蛋白酶(Sigma 公司 0621);溴化四氮唑蓝(Sigma 公司 0793);二甲基亚砜(Sigma 公司 D5879);5-氟尿嘧啶(天津金翘氨基酸有限公司 H12020906);HeLa 肿瘤细胞(中国科学院上海细胞研究所)。

2 方法与结果

2.1 桦褐孔菌三萜的含量测定

2.1.1 吸收波长选择

分别取齐墩果酸溶液标于试管中,水浴加热挥发掉溶剂,加入 0.3 mL 香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸,60 °C 水浴 20 min 后,迅速流水冷却至室温,用冰醋酸定容,充分震荡后,以不加样的空白组做对照,在 400 ~ 680 nm 范围内进行紫外全波长扫描。结果表明在 547 nm 处有最大吸收波长。

2.1.2 对照品溶液的配制

精密称取对照品 10.0 mg,用甲醇定容于 50 mL 容量瓶中,即得质量浓度为 0.2 mg/mL 的齐墩果酸标准品溶液。

2.1.3 样品溶液的配制

称取桦褐孔菌醇提物 0.1 g,置于 100 mL 容量瓶中,加入无水乙醇,超声 20 s 使溶解,即得样品溶液。

2.1.4 含量测定方法

取样品溶液,依次加入 0.3 mL 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 1 mL 高氯酸溶液,混合均匀,60 °C 水浴加热 20 min,冷水浴 5 min,用冰醋酸定容至 10 mL。以不加样的空白组做对照,在 547 nm 处测量吸光度。

2.1.5 齐墩果酸标准曲线绘制

精密移取齐墩果酸对照品溶液 0、0.1、0.2、

0.3、0.4、0.5 mL 分别加入 10 mL 具塞试管中,测量吸光度值。以齐墩果酸的质量为横坐标,吸光度为纵坐标,得到标准曲线。 $A = 0.0837C - 0.0218$, $R^2 = 0.9998$ (式中,A 为吸光度,C 为齐墩果酸标准品的浓度),相关系数 $R^2 = 0.9998$,结果表明,在 2 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,齐墩果酸浓度与吸光度值呈现良好的线性关系,可以用于三萜样品的测定。

2.1.6 精密度实验

精密配制浓度为 2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 的三份齐墩果酸对照品溶液,测吸光度值,1 天内重复测定 3 次,连续测定 3 天,计算得到日间精密度和 RSD 均小于 2%,说明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性实验

配制浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液,按照“2.1.4”方法每隔 10 min 测定一次,累计测定 60 min,实验结果 RSD 为 0.47%,小于 2%,三萜溶液在 1 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性实验

分别精密称取 6 份样品,测定吸光度,计算得知三萜含量的平均值为 0.644 mg, RSD 为 0.57%,小于 2%,因此方法重复性良好。

2.1.9 回收率实验

分别精密称取已知浓度样品 9 份,分别加入 6.0、6.0、6.0、6.5、6.5、6.5、7.0、7.0、7.0 mg 齐墩果酸对照品,制备样品溶液,测定吸光度并计算回收率与 RSD 值。试验结果 RSD 均小于 2%,回收率较好,满足测定条件。

2.2 桦褐孔菌三萜的提取工艺研究

将桦褐孔菌打碎过 40 目筛,称取 1.00 kg 桦褐孔菌粉,按一定料液比加入提取溶剂,90 Hz 超声 30 min 后,一定温度下加热回流提取,回收浸膏。

2.2.1 单因素实验

2.2.1.1 提取溶剂对总三萜提取率的影响

称取 6 份等量桦褐孔菌粉,分别加入 10 倍量体积的甲醇、无水乙醇、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯及氯仿,在 90 Hz 超声 30 min,70 °C 恒温水浴下回流提取 2 h,提取一次。异丙醇为提取溶剂时,三萜提取率最高,其次是无水乙醇和甲醇。考虑到为工业化提取节省经济成本故选择无水乙醇作为提取溶剂。

2.2.1.2 物料比对总三萜提取率的影响

称取 5 份等量桦褐孔菌粉,分别加入体积比为 1:5、1:10、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 的无水乙醇溶液,90 Hz 超声 30 min,70 °C 恒温水浴条件下回流

提取 2 h, 提取一次。随着料液比的增加, 提取率也不断增加。在料液比 1:15 的时候, 总三萜提取率升高幅度不明显。

2.2.1.3 提取温度对总三萜提取率的影响

称取 6 份等量桦褐孔菌粉, 各加入 15 mL 无水乙醇, 90 Hz 超声 30 min 后, 分别在 40、50、60、70、80、90 °C 温度条件下回流提取 2 h, 提取一次。随着温度的逐渐升高, 总三萜得率不断增加, 在 80 °C 时提取率增加幅度不大。

2.2.1.4 提取时间对总三萜提取率的影响

称取 4 份等量桦褐孔菌粉, 在 80 °C, 物料比 1:15, 90 Hz 超声 30 min 后, 分别在 1、2、3、4 h 下回流提取, 提取一次。三萜提取率随着提取时间的延长不断增加。在提取时间为 2 h 时, 总三萜提取率达到最高值且上升幅度小。

2.2.1.5 提取次数对总三萜提取率的影响

称取 3 份等量桦褐孔菌粉, 90 Hz 超声 30 min 后回流提取 2 h, 分别提取 1、2、3 次。提取次数越多, 三萜提取率越高, 但实验过程中为节省溶剂常选择提取两次。

2.2.2 响应曲面优化实验

2.2.2.1 响应曲面优化实验结果

在单因素试验的基础上, 根据响应面 Box-Behnken 设计原理, 选取 A 时间、B 药液比、C 温度共 3 个因素为自变量, 以提取率 L (%) 为响应值, 采用 3 因子 3 水平的响应面分析法, 每一个自变量的低、中、高试验水平分别以 -1, 0, +1 进行编码, 通过响应面分析得到二次回归方程, 并达到最大限度提高桦褐孔菌提取率。结果见表 1。

表 1 响应面实验方案及结果

Table 1 response surface experimental scheme and results

序号 No.	A 时间 A Time (min)	B 药液比 B Drug-liquid ratio (g/mL)	C 温度 C Temperature (°C)	L 提取率 L Extraction percentage (%)
1	0	0	0	12.25
2	1	0	1	11.62
3	0	1	-1	11.21
4	1	1	0	11.28
5	0	-1	1	11.62
6	0	1	1	12.01
7	1	0	-1	10.99
8	0	0	0	12.45
9	-1	0	1	11.32
10	0	-1	-1	11.95
11	0	0	0	12.38
12	0	0	0	12.34
13	1	-1	0	10.87
14	-1	-1	0	11.23
15	-1	0	-1	10.99
16	-1	1	0	11.12
17	0	0	0	12.45

2.2.2.2 方差分析

以桦褐孔菌三萜提取率 L (%) 为响应值, 采用 Design-Expert 7.5 软件对所得的数据进行回归分析

得到回归方程: L 提取率 (%) = 12.374 + 0.013A - 0.00625B + 0.179C + 0.13AB + 0.075AC + 0.283BC - 0.858A² - 0.391B² - 0.286C², 结果见表 2。

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance table

变异来源 Source of variation	平方和 Quadratic sum	自由度 Free degree	均方 Mean square	F	P	显著性 Conspicuousness
模型 Model	5.104 452	9	0.567 161	27.920 32	0.000 1	**
A-A 时间 A-A Time	0.001 25	1	0.001 25	0.061 535	0.811 2	-
C-C 温度 C-C Temperature	0.255 613	1	0.255 613	12.583 34	0.009 4	**
AB	0.067 6	1	0.067 6	3.327 824	0.110 9	-
AC	0.022 5	1	0.022 5	1.107 634	0.327 6	-
BC	0.319 225	1	0.319 225	15.714 86	0.005 4	**
A ²	3.101 444	1	3.101 444	152.678 4	< 0.000 1	**
B ²	0.642 887	1	0.642 887	31.648 13	0.000 8	**
C ²	0.343 802	1	0.343 802	16.924 76	0.004 5	**
残差 Residual	0.142 195	7	0.020 314	-	-	-
失拟合 Missing fitting	0.114 075	3	0.038 025	5.408 962	0.068 3	-
纯误差 Pure error	0.028 12	4	0.007 03	-	-	-
总离差 Total deviation	5.246 647	16	-	-	-	-

由表 2 可知,模型整体方差分析表明,F 值为 27.920, p 小于 0.01,模型具有统计学意义。失拟项 p 为 0.0683,说明失拟项不显著,实验误差小,无需再引入更多的自变量。 A^2 、 B^2 、 C^2 、BC、C 温度对提取率影响显著,对提取率影响由大到小为 A^2 、 B^2 、 C^2 、BC、C 温度。说明实验因素对提取率的影响既有线性影响,也有二次方的影响,且因素间存在交互效应。

2.2.2.3 验证实验

为验证最佳组合的可靠性,采用上述最佳条件进行实验,同时,考虑到实际操作的便利,将最佳条件修正为时间为 2 h,药液比为 1:10,温度为 82 °C 时,经过 3 次重复实验,实际得到的提取率平均值为 12.39%,与理论预测值 12.41% 的相对误差小于 2%。说明模型与实际情况拟合良好,表明该数学模型对优化实验条件是可行。

表 3 验证试验结果

Table 3 Verification test results

提取次数 Extraction times	提取率 Extraction percentage (%)	平均值 Average value (%)	RSD (%)
1	12.38		
2	12.45	12.39	1.28
3	12.35		

2.3 桦褐孔菌三萜的纯化工艺研究

2.3.1 大孔吸附树脂的选择

经预处理后的 AB-8 和 D101 两种大孔树脂各 5.0 g 于具塞磨口三角瓶中,分别加入 30 mL 已测定质量浓度的桦褐孔菌三萜样品液,置于摇床中,在室温下以 100 rpm 振荡 12 h,充分吸附后过滤,测定滤液中三萜的浓度。计算两种树脂对三萜的吸附容量和吸附率。

将吸附饱和的树脂放入具塞磨口三角瓶中,加入 30 mL 无水乙醇,置于摇床中,在室温下以 100 rpm 转速振荡 12 h 进行解吸,过滤,测定滤液中三萜的浓度,按下式计算两种树脂对三萜的解吸率。

结果得 AB-8 的吸附率和解吸率都高与 D-101 型大孔树脂,可能是 AB-8 型大孔树脂的极性与桦褐孔菌三萜类物质极性相似,因此选择 AB-8 型大孔树脂纯化三萜。

2.3.2 大孔树脂静态吸附-解吸动力学曲线

精密称取预处理后的 AB-8 树脂 5.0 g,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 30 mL 三萜 30% 乙醇溶液置于摇床中,室温条件下 120 rpm 振荡,每隔 1h 测定溶液中总三萜的浓度,以时间为横坐标,以大孔树脂吸附量为纵坐标,绘制静态吸附动力学曲线。从曲线看出桦褐孔菌三萜吸附量在 5 h 时趋于平衡。吸附量为 14.89 mg/g。

将已经吸附饱和的大孔树脂置于 100 mL 三角

瓶中,加入无水乙醇 30 mL,置于摇床中,在室温下 120 rpm 振荡,每隔 30 min 测定吸光值,并计算溶液中三萜的浓度,以时间为横坐标,解吸率为纵坐标作图,绘制静态解吸动力学曲线。从曲线看出 5 h 解吸达到平衡,解吸率为 75.49%。

2.3.3 大孔树脂动态吸附-解吸动力学曲线

2.3.3.1 上样浓度的选择

称取桦褐孔菌粗三萜 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 g 粉末,溶于 100 mL 30% 乙醇溶液,配成上样浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL 的溶液,上样量 1 BV,上样流速为 1 mL/min,收集流出液。上样浓度在 1 mg/mL 时,大孔树脂的吸附率较高。

2.3.3.2 上样体积的选择

称取桦褐孔菌粗三萜粉末 0.1 g,溶于 100 mL 30% 乙醇溶液,配成上样浓度为 1 mg/mL 的溶液。上样体积为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 BV, pH = 5,上样流速为 1 mL/min,收集流出液。当上样体积为 2 BV 时,吸附率趋于平衡,为 85.31%。

2.3.3.3 上样 PH 的选择

将桦褐孔菌粗三萜提取物配成浓度为 1 mg/mL 的溶液,上样体积为 2 BV 用 HCL 和 NaOH 配成 pH 值为 4、5、6、7、8 的溶液上样,流速为 1 mL/min,收集流出液。pH 值对吸附率有影响,pH = 5 时吸附率最大,接近三萜溶液的 pH 值。

2.3.3.4 上样流速的选择

将桦褐孔菌粗三萜提取物配成浓度为 1 mg/mL

的溶液,pH = 5,上样体积为 2 BV,上样流速为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 收集流出液。流速为 2 mL/min 时,吸附率达到最高值为 83.12%。

2.3.3.5 洗脱液浓度的选择

将桦褐孔菌粗三萜提取物配成浓度为 1 mg/mL 的溶液,pH = 5,上样体积为 2 BV,上样流速为 2.0 mL/min,进行上样,然后用 pH = 5,洗脱流速为 2.0 mL/min,乙醇浓度为 50%、60%、70%、80%、90% 及 95% 乙醇溶液进行洗脱,洗脱体积为 7 BV,收集流出液。乙醇浓度在 95% 时解吸率最大,为 75.94%。

2.3.3.6 洗脱液体积的选择

上样后用 95% 乙醇溶液作为洗脱液进行洗脱,洗脱流速为 2.0 mL/min, pH = 5,每 1 BV 收集一次。洗脱体积为 2 BV 时,泄露浓度很高,说明大量三萜类物质被解吸出来。而在 5-7 BV 时,泄露浓度较低,柱子中的大量三萜已经被解吸出来,因此可以选择收集 5 BV 洗脱液。

2.3.3.7 洗脱液 PH 的选择

配制 pH 为 4、5、6、7、8 的 95% 乙醇溶液作为洗脱液,洗脱流速为 2.0 mL/min,洗脱液体积为 5 BV。洗脱液的 pH 值为 5 时,解吸率值最高,达到 73.87%,与三萜溶液本身的 pH 值相近。

2.3.4 验证实验

通过单因素试验考察筛选出最优纯化工艺后,进行验证实验,测定三萜浓度并计算解吸率。

表 4 验证试验结果($n=3$)

Table 4 Verification test results($n=3$)

试验次数 Test number	1	2	3	平均值 Average value(%)
吸附率 Adsorption rate(%)	83.25	84.56	83.78	83.86
解吸率 Desorption rate(%)	73.36	73.78	73.93	73.69
三萜纯度 Triterpene purity(%)	52.34	51.12	52.46	51.97

由表 4 可知,三次验证实验结果:吸附率平均值为 83.86%,解吸率平均值为 73.69%,得到三萜的纯度平均值为 51.97%。

2.4 桦褐孔菌三萜的体外抗肿瘤药理作用

2.4.1 细胞接种和培养

细胞常规复苏后,待细胞生长至一定数量后,用 0.25% 胰酶消化 1~5 min,终止消化,并用含 10% 血清的 DMEM 培养基重悬细胞。计数后用完全培

养基调整细胞浓度为 5.0×10^5 /mL,按 0.1 mL /孔接种于 96 孔细胞板上,于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养。

2.4.2 细胞生长曲线的绘制

按“2.4.1”方法接种细胞,于接种后每 24 h 做一次 MTT 染色。每天取 4 个复孔细胞进行 MTT 染色,分别连续 12 天和 9 天。最后结果以细胞 MTT 染色 OD 490 为纵坐标,实验时间为横坐标,绘制出

细胞的生长曲线。结果可知细胞从培养 24 h 开始进入对数生长期,到 96 h 基本处于稳定的平台期,9 天之后经历缓慢凋亡期,HeLa 细胞第 5 天达到顶峰,然后迅速进入快速死亡期。因此选择细胞生长 72 h 为干预点对细胞进行干预研究。

2.4.3 分组及给药

待细胞贴壁培养 72 h 后,小心吸掉原有培养基,将给药组分别配制成浓度 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。并设有阴性对照组和阳性对照组。阳性药物为 5-Fu,浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4.4 MMT 法

调整细胞悬液浓度后均匀分布于 96 孔板中,每孔细胞个数控制在 3 000 个/孔,铺板后置于温箱中培养 24 h,培养 24 h 后分组给药,分别置于常氧及缺氧温箱中孵育 48 h,(24 h 补药)加药到时间

后,96 孔板中每孔加 10% 体积的 MTT 溶液,每板留一个孔用作空白对照孔,温箱孵育 4 h 后,弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,为了更加充分地使结晶物溶解,水平摇床上缓慢震荡 10 min,随后使用酶联免疫检测仪于 486 nm 处测定 96 孔板的吸光值(OD),重复三次。细胞生长抑制率% = $(1 - \text{OD 给药组} / \text{OD 阴性对照组}) \times 100\%$ 。各组 OD 值减去空白对照组 OD 值。

2.4.5 统计学方法

所有数据输入 SPSS 22.0 软件进行处理,所有数据均为计量资料,使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2.4.6 药物对胃癌 HeLa 肿瘤细胞的影响

测得药物对胃癌 HeLa 肿瘤细胞致死率的影响见表 5。

表 5 对胃癌 HeLa 肿瘤细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm \text{SD}, n = 3$)

Table 5 Effect on inhibition rate of HeLa tumor cells in gastric cancer($\bar{x} \pm \text{SD}, n = 3$)

组别 Group	浓度 Potency ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 h		48 h	
		OD 值 OD value (%)	细胞抑制率 Cell inhibition rate (%)	OD 值 OD value (%)	细胞抑制率 Cell inhibition rate (%)
阴性对照组 Negative control group	-	2.423 \pm 0.214	0	2.875 \pm 0.135	0
5-Fu	50	0.457 \pm 0.237 Δ	81.14	0.415 \pm 0.065 Δ	85.57
实验组 experimental group	20	1.749 \pm 0.254 $\Delta\#$	27.80	1.653 \pm 0.046 $\Delta\#$	42.50
实验组 experimental group	50	1.478 \pm 0.115 $\Delta\#$	39.00	1.360 \pm 0.251 $\Delta\#$	52.70
实验组 experimental group	100	0.838 \pm 0.477 $\Delta\#$	58.41	0.801 \pm 0.052 $\Delta\#$	66.14

注: Δ ,与阴性对照组比较, $P < 0.01$; $\#$,与阳性对照组比较, $P < 0.01$ 。

Note: Δ ,Compared with the negative control group $p < 0.01$; $\#$,Compared with the positive control group, $P < 0.01$.

由表 5 可知,采用 SPSS 分析得出结论:与阴性对照组比较:模型组 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OD 值明显低于阴性对照组和阳性对照组($P < 0.01$),与阳性药组比较:模型组 20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OD 值明显高于阳性对照组($P < 0.01$)。即桦褐孔菌三萜类物质对 HeLa 肿瘤细胞有选择性的抑制作用,且呈量效关系,随着剂量的递减,三萜类药物对 HeLa 细胞的抑制率也逐渐下降,且作用时间越长,细胞抑制率越高。

3 结论

对于桦褐孔菌三萜组分的提取,传统的提取工艺一般为回流提取,提取率低,对于本文采取的超声辅助回流提法,与传统的回流提取法相比能提高提取率。并且操作简单。本实验中,提取时间为 2 h 时提取率均上升不再明显,可能是有效成分三萜大部分被提取出来了。在分离纯化的过程中得出 AB-8 型大孔树脂纯化性能更好,可能是因为极性相似

的原因。本实验采用 30% 乙醇溶液作为溶剂上样,是因为桦褐孔菌三萜在水中溶解度较低,加入低浓度的醇,可以增加其溶解度。该法简单便于操作,适合用于纯化桦褐孔菌三萜。采用纯化后的桦褐孔菌三萜进行细胞体外 MTT 试验,细胞培养过程中全程杀菌消毒,以防止细胞污染影响实验结果。虽然 MTT 法重复性差,但方法简单可以最直接有效的看到结果。

在本课题中,桦褐孔菌三萜的提取和纯化的处方工艺符合预期的结果。而且用细胞体外培养充分证明了桦褐孔菌三萜有抗肿瘤的作用。因此对桦褐孔菌三萜的提取纯化进行研究具有重要的使用价值、实用价值和开发潜力。同时可以有效提高桦褐孔菌资源的利用率,为工业化生产奠定基础。能丰富临床用药品种,为进一步开发提供依据。

参考文献

- 1 Wang QB. Screening and separation and purification of antioxidant active components from *phellinus ignifus* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University (上海师范大学), 2011.
 - 2 Liang QL, Wang QY, Fan JH, et al. Overview of research on *inonotus obliquus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 4: 623-625.
 - 3 Guo QQ. Development and application of new Chinese medicine formulas [J]. *Intelligence* (才智), 2012, 33: 344.
 - 4 Niu GC, Yan BD, Zhu D, et al. Optimization of fermentation conditions of blackcurrant fruit vinegar by response surface methodology [J]. *Food Sci* (食品科学), 2012, 33: 157-161.
 - 5 Yan HQ. Optimization of liquid-jet spinning micro-nanofibers and their adsorption removal of heavy metal ions [D]. Shanghai: Donghua University (东华大学), 2014.
 - 6 Zhu X, Zhang YG, Tan LH, et al. Optimization and preliminary identification of polysaccharide extraction from jackfruit [J]. *Chin J Trop Crop* (热带作物学报), 2016, 37: 404-410.
 - 7 Han W. Research on processing technology and aroma components of xinjiang begonia fruit vinegar [D]. Shihezi: Shihezi University (石河子大学), 2015.
 - 8 Xie WX. Study on the extraction, purification, identification and anti-tumor inhibition of *stellera chamaejasme* [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology (广东工业大学), 2015.
 - 9 Yuan HB, Ye M, Liu WH. Separation and purification of macroporous resin from licorice total triterpenic acid [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2008, 2: 212-214.
 - 10 Hou YN. Adsorption characteristics of macroporous resin of *panax notoginseng* saponins [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (云南中医学院), 2016.
 - 11 Dong Q, Gao S, Cao LK. Purification of polyphenols from *inonotus obliquus* by macroporous resin and its components [J]. *Food Sci* (食品科学), 2015, 36: 131-136.
 - 12 Huang YJ, Hu XM, Tang J, et al. *In vitro* antitumor activity of four anticancer drugs against breast cancer MDA-MB-435 cells [J]. *Chin Germs* (中国老年学), 2014, 18: 5181-5183.
 - 13 Zhu L, Zhao FL, Yuan Y, et al. Antitumor activity of ginsenoside structure modification on human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 *in vitro* [J]. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2013, 17: 2075-2080.
-
- (上接第 101 页)
- 2 Asano N, Oseki K, Tomioka E, et al. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 259: 243-55.
 - 3 Kimura M, Chen F. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozocin-induced diabetic mice [J]. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, 1995, 12: 214-219.
 - 4 Qingpu L, Xuan L, Cunyu L, et al. 1-Deoxynojirimycin alleviates insulin resistance via activation of insulin signaling PI3K/AKT pathway in skeletal muscle of db/db mice [J]. *Molecules*, 2015, 20: 21700-21714.
 - 5 Li YG, Ji DF, Zhong S, et al. 1-Deoxynojirimycin inhibits glucose absorption and accelerates glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1377.
 - 6 Asano N, Oseki K, Kizu H, et al. Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidases [J]. *J Med Chem*, 1994, 37: 3701-3706.
 - 7 Molinar-Toribio E, Jara Pérez-Jiménez, Ramos-Romero S, et al. D-Fagomine attenuates metabolic alterations induced by a high-energy-dense diet in rats [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 2614-2619.
 - 8 Ouyang Z, Chen J, Li YH, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33: 817-820.
 - 9 Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, et al. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 5869-5874.