

珠芽景天抗肿瘤活性研究及槲皮素和山柰素的含量测定

胡婧^{1,2}, 王璐瑶², 万定荣^{2*}, 梅青², 李聪³

(1. 张家界市食品药品检验所, 湖南 张家界 427000;

2. 中南民族大学药学院, 武汉 430074; 3. 东风汽车公司总医院, 湖北 十堰 442000)

[摘要] **目的:** 研究珠芽景天的有效部位及其体外抗肿瘤作用, 并建立其槲皮素与山柰素的含量测定方法。**方法:** 采用 MTT 法检测珠芽景天的乙酸乙酯、正丁醇提取部位及总黄酮提取物对人肝癌细胞株 HepG2、人食管癌细胞株 EC109、人结肠癌细胞株 SW480 的体外增殖抑制作用; 采用 HPLC 测定珠芽景天中槲皮素与山柰素的含量。**结果:** 珠芽景天的乙酸乙酯提取部位及总黄酮提取物对 3 种癌细胞株都有明显抑制作用, 其作用都随着质量浓度的增加而增强; 槲皮素、山柰素进样量分别在 0.03 ~ 0.36, 0.08 ~ 0.96 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.999\ 9$), 平均加样回收率分别为 98.90%, 98.27%, RSD 均 < 1.70% ($n = 6$)。**结论:** 珠芽景天具有较显著的体外抗肿瘤作用; 建立的 HPLC 含量测定方法准确可靠、重复性好, 可用作珠芽景天有关活性物质含量控制的参考依据。

[关键词] 珠芽景天; 抗肿瘤活性; 槲皮素; 山柰素; 含量测定

[中图分类号] R285.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0139-04

[doi] 10.11653/syfy2013240139

Determination of Quercetin and kaempferol in *Sedum bulbiferum* and Research on Its Anti-tumor Activities

HU Jing^{1,2}, WANG Lu-yao², WAN Ding-rong^{2*}, MEI Qing², LI Cong³

(1. Zhangjiajie Institute for Food and Drug Control, Zhangjiajie 427000, China;

2. College of Pharmacy, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

3. Dongfeng General Hospital, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anticancer effective part and anticancer effect of *Sedum bulbiferum* *in vitro*, and to establish a method for determination of quercetin and kaempferol in *S. bulbiferum* by HPLC. **Method:** The inhibitory activities of the the different extract fractions and the total flavones of *S. bulbiferum* on cancer cells proliferation of liver, esophageal and colon (HepG2, EC109, SW480) were tested by MTT assay. HPLC method for the determination of quercetin and kaempferol in *S. bulbiferum* was established. **Result:** The growth and proliferation of the 3 cancer cells were all significantly inhibited by ethyl acetate fractions and the total flavonoids of *S. bulbiferum*. With the increase of the concentration, inhibiting action increased. The linear ranges of quercetin and kaempferol were 0.03-0.36 μg ($r = 0.999\ 9$) and 0.08-0.96 μg ($r = 0.999\ 9$) respectively; their average recoveries were 98.90% (RSD 1.15%) and 98.27% (RSD 1.70%) respectively. **Conclusion:** *S. bulbiferum* has significant effect of anti-tumor *in vitro*. The method of HPLC is accurate, reproducible and could be used for active ingredient content determination of this crude drug.

[Key words] *Sedum bulbiferum*; anti-tumor activities; quercetin; kaempferol; content determination

[收稿日期] 20130304(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B06)

[第一作者] 胡婧, 硕士, 药师, 从事中药资源与质量控制研究, Tel: 18229550593, E-mail: 402387447@qq.com

[通讯作者] * 万定荣, 博士, 教授, 从事中药资源与质量评价研究, Tel: 18986065360, E-mail: wandr666@163.com

珠芽景天系景天科植物珠芽景天的干燥全草,为我国民族民间常用的一种植物药,文献记载用于治疗食积腹痛、风湿瘫痪、疟疾等病症^[1]。课题组前期发现该属几种近缘植物药的总黄酮成分具有显著的抗肿瘤活性^[2]。珠芽景天资源丰富,分布广泛,根据植物种亲缘关系相近其化学成分相近的规律,从资源学的角度出发,笔者对景天属的该种首次进行了其总黄酮提取物和乙酸乙酯、正丁醇提取部位的抗肿瘤活性研究,以期发现可能的抗肿瘤活性部位或活性物质,并建立该植物药中槲皮素、山柰素两种黄酮类成分的 HPLC 测定方法,用作为质量分析的方法之一。

1 材料

1.1 仪器 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),D101 大孔树脂(天津南开大学化工厂),柱色谱用聚酰胺(100 目,天津市海光化工有限公司),MCO-15AC 型 CO₂ 恒温细胞培养箱(Sanyo),Multiskan Ascent 酶标仪(Thermo Electron Corporation),96 孔板(Corning),戴安 Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国)。

1.2 试剂 胰蛋白酶、青霉素、链霉素、EDTA(Amresco),RPMI 1640(Gibco),MTT(Sigma),小牛血清、胎牛血清(四季青公司),槲皮素(批号 10081-200406)、山柰素(批号 0861-200002)均为供含量测定用对照品,购自中国食品药品检定研究院,甲醇、磷酸均为色谱纯,水为二次蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2、人食管癌细胞株 EC109 及人结肠癌细胞株 SW480 分别购自中国药科大学和武汉大学。

1.4 样品 药材样品采于武汉市洪山区,经中南民族大学药学院万定荣教授核实,均为景天科植物珠芽景天 *Sedum bulbiferum* Makino 的全草。

2 方法与结果

2.1 珠芽景天各萃取部位及总黄酮提取物对肿瘤细胞的抑制作用

2.1.1 试样的制备 称取珠芽景天样品粗粉 3 g,置索氏提取器中,用 70% 乙醇 60 mL 提取 6 h,将提取液浓缩成浸膏状,加蒸馏水 30 mL 使分散,用石油醚萃取 4 次,每次 30 mL,再依次以乙酸乙酯、正丁醇萃取 2 次,每次 30 mL。弃去石油醚部位和水部位,其余萃取部分回收溶剂,干燥,分别得珠芽景天样品的乙酸乙酯和正丁醇提取部位。珠芽景天总黄酮提取物为该药材样品的 80% 乙醇提取物分别过

大孔树脂及聚酰胺柱后,分别以水及不同体积分数的乙醇溶液进行洗脱,合并较高黄酮含量的洗脱液,回收溶剂得到总黄酮提取物的干燥物,其总黄酮含量为 52.1%。

2.1.2 MTT 法检测各试样的抗肿瘤活性 分别准确称取药材样品各提取部位及总黄酮提取物 20 mg,分别加入少量 DMSO 充分溶解后,加入适量培养基,制备成 5 g·L⁻¹ 的母液。在 37 °C,5% CO₂,饱和湿度的条件下,将肝癌细胞 HepG2、食管癌细胞 EC109 分别用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养,结肠癌细胞 SW480 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养,并分别用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取对数生长期细胞制成细胞悬液,稀释至 5 × 10⁴ 个/mL,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μL,置于 37 °C,5% CO₂,饱和湿度培养箱中培养 24 h,吸出培养液,加入含药材样品各提取部位及总黄酮提取物的培养基,分别制成 100,200,300,400 mg·L⁻¹ 的溶液,阳性药物顺铂浓度为 30 mmol·L⁻¹。每一质量浓度组均设 6 个平行孔。在加药后 48 h 加入 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,吸去培养液后加入 DMSO 150 μL,用酶标仪在 492 nm 处测定各孔吸光度(A),按下列公式计算抑制率(IR): $IR = (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{给药孔}}) / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 。结果见表 1。

结果表明,珠芽景天样品的乙酸乙酯和总黄酮提取物对体外培养的肝癌细胞 HepG2、食管癌细胞 EC109 及结肠癌 SW480 均有较好的抑制作用,随着提取物质量浓度的增加,其抑制率也增加,在测定质量浓度范围内呈现良好的剂量依赖性抑制作用。

2.2 珠芽景天中槲皮素和山柰素的 HPLC 含量测定

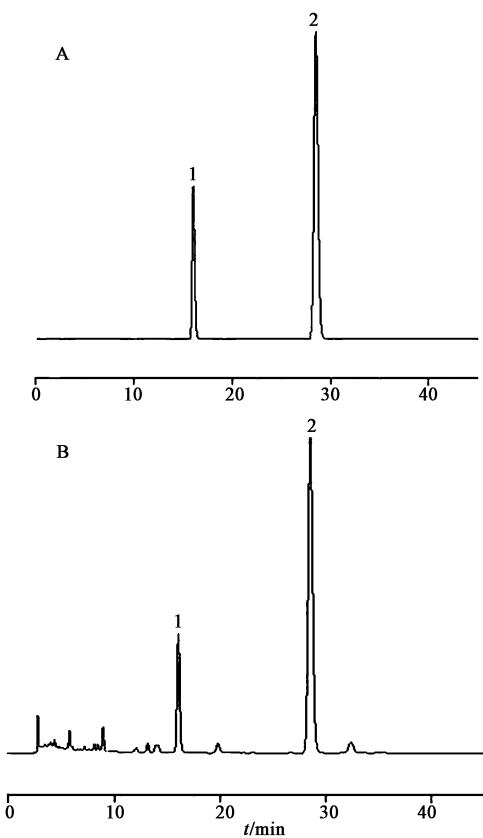
2.2.1 色谱条件 YMC-Pack ODS-A 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,槲皮素峰、山柰素峰与其他峰能很好地分离。对照品和供试品溶液(制备方法见后)的色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的槲皮素、山柰素对照品各适量,加甲醇制成每 1 mL 含槲皮素、山柰素分别为 36,96 μg 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取珠芽景天药材样品粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-25% 盐酸(4:1)混合溶液 50 mL,称定质量,加热

表1 珠芽景天各提取部位对3种肿瘤细胞株的抑制率

肿瘤细胞株	提取物名称	阳性对照	样品质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
		$30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	100	200	300	400
HepG2	乙酸乙酯	59.09	21.71	37.30	65.46	72.78
	正丁醇	49.95	13.55	18.96	27.51	39.82
	总黄酮	50.15	26.25	34.17	53.51	69.23
EC109	乙酸乙酯	69.46	32.84	53.40	65.05	74.59
	正丁醇	54.09	12.97	23.15	30.56	50.62
	总黄酮	61.15	21.82	37.04	54.09	69.55
SW480	乙酸乙酯	57.07	17.43	39.05	54.76	65.23
	正丁醇	56.03	46.15	12.07	21.76	37.45
	总黄酮	55.23	26.65	47.11	60.11	70.56



1. 槲皮素;2. 山柰素;A. 对照品;B. 珠芽景天

图1 对照品溶液与供试品溶液的HPLC

回流1 h,放冷,再称定质量,用甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶液补足减失的质量,摇匀,用微孔滤膜($0.45\ \mu\text{m}$)过滤,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察 将上述混合对照品溶液制成一系列不同质量浓度的对照品溶液,在拟定的色谱条件下,分别吸取 $10\ \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,均平行进样3次,测定峰面积值,以峰面积平均值(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,计

算得回归方程分别为 $Y_{\text{槲皮素}} = 0.665\ 1X - 0.022\ 7$ ($0.999\ 9$),线性范围 $0.03 \sim 0.36\ \mu\text{g}$; $Y_{\text{山柰素}} = 0.824\ 3X - 0.079\ 6$ ($0.999\ 9$),线性范围 $0.08 \sim 0.96\ \mu\text{g}$ 。结果表明槲皮素、山柰素混合对照品溶液在上述量的范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度、稳定性和重复性试验 吸取同一混合对照品溶液各 $10\ \mu\text{L}$,按上述色谱条件,连续进样检测6次,结果槲皮素、山柰素峰面积的RSD分别为 0.08% 、 0.03% ,表明仪器精密度良好;吸取同一供试品溶液分别在 $0, 2, 4, 8, 16, 24\ \text{h}$ 测定,结果槲皮素、山柰素峰面积的RSD分别为 1.65% 、 1.19% ,表明供试品溶液中该两种成分的测定结果在 $24\ \text{h}$ 内稳定;按2.2.3项下方法,对同一样品(4月22日)分别制备6份供试品溶液测定,结果槲皮素平均含量的RSD 2.59% ,山柰素平均含量的RSD 2.32% ,表明该方法重复性良好。

2.2.6 回收率试验 取已知含量的样品(5月12日)6份,每份约 $0.5\ \text{g}$,精密称定,分别添加质量浓度为 $0.200, 0.501\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的槲皮素、山柰素混合溶液各 $3\ \text{mL}$,按2.2.3项下方法制备供试品溶液并测定,结果槲皮素的平均回收率为 98.90% ,RSD 1.15% ;山柰素的平均回收率为 98.27% ,RSD 1.70% 。

2.2.7 样品的含量测定 分别称取珠芽景天3批样品各约 $1\ \text{g}$,精密称定,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按拟定的色谱条件,分别吸取供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,均平行进样3次,以峰面积平均值计算槲皮素、山柰素的含量。结果见表2。

3 讨论

研究结果显示,珠芽景天的总黄酮提取物及乙

表 2 珠芽景天中槲皮素、山柰素含量测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品编号	采收期	槲皮素	山柰素
1	04-22	1.27	4.50
2	05-12	1.17	2.99
3	06-07	0.33	3.16

酸乙酯提取部位均有显著的体外抗肿瘤活性,与我们前期研究报道的景天属植物药垂盆草、佛甲草、凹叶景天相应部位的抗肿瘤活性相当或相近^[2],表明可进行进一步的比较研究。由于黄酮类成分在乙酸乙酯中的含量较高,同时鉴于已知黄酮类成分是肯定的抗肿瘤活性物质^[3-4],本研究中珠芽景天总黄酮的抗肿瘤活性较强,由此认为黄酮类是珠芽景天的抗肿瘤有效成分之一;又由于乙酸乙酯提取部位对人肝癌细胞株 HepG2、人食管癌细胞株 EC109 的体外抗肿瘤活性也很强,故分析除黄酮类成分外,乙酸乙酯部位中还有其他活性较强的抗肿瘤成分,有待深入研究。

通过预实验,我们发现珠芽景天的石油醚和水提取部位的抗肿瘤活性均较弱,因此没有对其做进一步研究。

关于含量测定的测定波长的选择,笔者分别取槲皮素、山柰素对照品及珠芽景天供试品溶液经一定波长范围的光谱(200 ~ 700 nm)扫描,均显示在波长 360 nm 附近有较强的吸收,因此选择 360 nm 作为检测波长。在样品处理时,笔者曾将珠芽景天样品粉末用甲醇回流,经微孔滤膜过滤后直接进样测定,发现色谱图中几无槲皮素峰和山柰素峰,说明其含量极微,槲皮素和山柰素在珠芽景天中主要是以糖苷的形式存在,因此采用酸水解的方法^[5-6]测定水解产物中槲皮素和山柰素的含量。此外在实验过程中,对提取方法进行了筛选,结果表明采用回流提取时槲皮素、山柰素的含量明显高于超声提取,说明加热回流更有利于黄酮苷的水解。

珠芽景天生长期短,6 月下旬即开始枯萎。HPLC 含量测定的结果表明,4 月与 5 月样品的槲皮素、山柰素的总含量均明显高于 6 月样品,故初步认为该药材以 4 月下旬至 5 月中旬采收为宜。

槲皮素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、清除自由基等多种生物活性^[7]。在抗肿瘤机制方面,槲皮素可明显抑制特定的致癌基因与细胞周期控制基因,上调肿瘤抑制基因的表达^[8],可诱导

肝癌细胞 HepG2 凋亡^[9],使凋亡促进因子(Bax)表达增强,使 Bcl-2 表达减弱^[10],并对前列腺癌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达有抑制活性^[11];山柰素则具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、消炎、止咳、增强免疫功能等作用^[12-13]。因此二者作为活性成分及指标成分用于珠芽景天质量控制有一定价值。

[参考文献]

- [1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 下册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000:481.
- [2] 陈雨洁,林亲雄,万定荣,等. 景天属三种植物药不同提取部位及总黄酮抗肿瘤作用研究[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2011,20(2):88.
- [3] 杨博,李志裕,尤启冬. 黄酮类化合物的抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 药学进展,2008,32(9):391.
- [4] 唐勇,何薇,王玉芝,等. 鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):51.
- [5] 危华玲,杨青,韦红音. 高效液相色谱法测定山楂叶提取物中槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(8):10.
- [6] 付辉政,万凯化,罗跃华. RP-HPLC法测定肤痒片中山柰素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):8.
- [7] 舒毅,谭陶,张思宇,等. 槲皮素的药理学研究进展[J]. 华西药学杂志,2008,23(6):689.
- [8] Nair H K, Rao K V, Aalinkeel R. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes [J]. Clin Diag Lab Imm,2004,11(1):63.
- [9] Granado-Serrano A B, Martin M A, Bravo L. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ER K pathways in a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. Bio Mol Gen Mec, 2006,136(11):2715.
- [10] 张玉萌,郑作文. 黄酮类化合物抗肿瘤作用分子机制研究进展 [J]. 中国药物应用与检测,2006,15(5):51.
- [11] Vijayababu M R, Arunkumar A, Kanagara P. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3) [J]. Mol Cell Bio, 2006, 287(1/2):109.
- [12] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用 [M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995:156.
- [13] 陈育华,周克元,袁汉尧. 山柰酚药效的研究进展 [J]. 广东医学,2010,31(8):1064.

[责任编辑 邹晓翠]