

· 工艺与制剂 ·

## 正交试验量效比对法优选卷柏抗 SMMC-7721 肝肿瘤组分总黄酮的提取工艺

齐冰, 包永睿, 孟宪生\*, 王帅

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省组分中药工程技术研究中心,  
辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 优选卷柏抗 SMMC-7721 肝肿瘤组分总黄酮的提取工艺。方法: 选取提取时间、提取次数、乙醇用量及体积分数为考察因素, 以人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制率为指标的正交试验结果优选总黄酮和穗花杉双黄酮提取量综合评分的权重系数比, 并通过 SPSS 17.0 软件对有效组分与药效学指标进行 Pearson 相关系数分析。采用 HPLC 测定穗花杉双黄酮含量, 流动相乙腈-0.5% 乙酸水 (33:67), 检测波长 269 nm。结果: 最佳提取工艺条件为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1 次, 每次 3 h; 穗花杉双黄酮含量与总黄酮含量的权重系数分别为 0.7, 0.3, 反映含量指标与抑制率呈一定相关性。结论: 以有效成分含量代表药效作为正交试验指标是科学合理的, 优选的提取工艺稳定可行, 为中药有效成分的提取提供新思路。

**[关键词]** 卷柏总黄酮; 正交试验量效对比; 噻唑蓝; 药效指标; 提取工艺; 单因素试验

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0001-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014020001

## Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids in Selaginellae Herba against Hepatocarcinoma Cells SMMC-7721 by Orthogonal Test Dose-Effect Comparison Method

QI Bing, BAO Yong-ru, MENG Xian-sheng\*, WANG Shuai

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Liaoning Province Multi-Component Chinese Medicine Engineering Technology Research Center,  
Liaoning Province Modern TCM Research and Engineering Laboratory, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from Selaginellae Herba against hepatocarcinoma cells SMMC-7721. **Method:** Taking extraction time and times, the amount and concentration of ethanol as factors, result of orthogonal test was adopted to optimize weight coefficient ratio of amentoflavone and total flavonoids extraction amounts in which inhibition rate of human hepatoma SMMC-7721 cells was taken as an indicator, contents of effective components and pharmacodynamic indicators were analyzed with Pearson correlation coefficient by SPSS 17.0 software. The content of amentoflavone was determined by HPLC, mobile phase of acetonitrile-0.5% acetic acid water (33:67), detection wavelength 269 nm. **Result:** The best extraction conditions were as follows: reflux extracted 3 h with ten times the amount of 70% ethanol; weight coefficients of contents of amentoflavone and total flavonoids were 0.7 and 0.3, indicating determination of effective ingredients and inhibition rate had a certain correlation. **Conclusion:** Taking contents of active ingredients instead of efficacy

**[收稿日期]** 20130625(006)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09401-304-105C)

**[第一作者]** 齐冰, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel:0411-87406496, E-mail: qibing86@sina.com

**[通讯作者]** \* 孟宪生, 博士, 教授, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究, Tel:0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

as the index of orthogonal test was scientific and reasonable; Optimized process was stable and feasible, it could provide new ideas for extraction of active ingredients from traditional Chinese medicine.

**[Key words]** total flavonoids of Selaginellae Herba; orthogonal test dose-effect comparison; MTT; efficacy indicators; extracting process; single factor test

卷柏又名长生不死草、九死还魂草、石莲花、万年青等<sup>[1]</sup>,功能活血通经、破血散结等,临床用于治疗经闭痛经、瘦瘠痞块、跌扑损伤。现代临床研究表明卷柏具有防癌治癌、抗炎、抗病毒、镇痛、降血压、降血糖和增强人体免疫功能等药理作用<sup>[2]</sup>,抗肿瘤作用的主要有效成分为黄酮、木脂素及生物碱类化合物<sup>[3-5]</sup>。卷柏中黄酮类成分含量丰富,对肿瘤细胞的抑制效果明显,为卷柏的主要活性成分。目前有关卷柏总黄酮提取工艺的报道均只单纯以有效成分含量作为考察指标<sup>[6-8]</sup>,不能准确地反映提取成分的药理药效,存在一定的片面性;若设计以有效成分含量和药效作用为综合指标的正交试验<sup>[9-10]</sup>,虽能保证优选提取工艺的药效,但操作复杂。本实验采用量效对比法,运用以抑制率为指标的正交试验结果优选替代药效的穗花杉双黄酮和总黄酮含量的权重系数,避免了采用量效融合指标进行试验的复杂性,为其他中药材提取工艺的优选提供参考。

## 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),U-2001 型紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司),Sunrise 型酶标仪(奥地利 Tecan 公司),UAIRETM US Autoflow 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Nuair 公司),HD2-BCN-1360B 型生物洁净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),AE31 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)。

穗花杉双黄酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111902-201102),卷柏购自大连市开发区保健大药房,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的干燥全草;人肝癌细胞株 SMMC-7721(上海复蒙生物有限公司),羧甲基纤维素钠(CMC-NA,国药集团化学试剂有限公司),噻唑蓝(MTT,美国 GIBCO 公司),二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司),所用试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,体重(20 ± 2) g,雌性,购于大连医科大学实验动物中心,均达到国家清洁级标准,合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

## 2 方法与结果

### 2.1 卷柏细胞药效学试验

**2.1.1 细胞培养** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 常规培养于含 10% 热灭活小牛血清的 1640 培养液(含青链霉素 100 U·mL<sup>-1</sup>)中,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱连续培养。

**2.1.2 含药血清的制备**<sup>[11-13]</sup> 将清洁级昆明小鼠随机分为 10 组,一组为空白对照组(给予等体积 0.1% CMC 水溶液),其余 9 组为正交试验组。每日灌胃给药 2 次,间隔 12 h,每次 0.4 mL(给药剂量 10.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),连续灌胃 3 d。末次灌胃前禁食不禁水,1 h 后,无菌摘取小鼠眼球取血,置 2 mL 离心管中,静置 30 min,以 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,于 56 °C 灭活处理 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

**2.1.3 MTT 试验**<sup>[14-15]</sup> 取处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞进行计数,调整细胞浓度 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 100 μL,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养 24 h,每个正交试验组设 5 个复孔,24 h 后分别加入 10% 含药血清继续培养 24 h,培养板每孔加入 MTT(200 mg·L<sup>-1</sup>)50 μL,同样条件继续孵育 4 h,吸弃上清,每孔加入 DMSO 150 μL 振荡混匀,于酶标仪 492 nm 处测定各孔的吸光度值(A),计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{试验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

### 2.2 总黄酮的含量测定

**2.2.1 对照品溶液制备** 精密称取减压干燥至恒重的穗花杉双黄酮对照品 10.1 mg,加甲醇超声溶解并定容至 100 mL 量瓶中,即得 0.101 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。

**2.2.2 检测波长的选择** 移取对照品储备液适量,加甲醇定容至刻度,倒入比色皿中,于 200 ~ 900 nm 进行全波长扫描,确定卷柏总黄酮的最大吸收波长 269 nm。

**2.2.3 标准曲线的绘制** 分别精密移取穗花杉双黄酮对照品储备液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,倒入比色皿中,以相应试剂为空白,于 269 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 78.202X + 0.0563$  ( $R^2 = 0.9996$ ),表明在 2.70 ~ 8.90 mg·L<sup>-1</sup> 与 A 呈良好线性关系。

## 2.3 穗花杉双黄酮的含量测定

**2.3.1 供试品溶液的制备** 精密吸取正交试验制备的卷柏提取液,经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得。

**2.3.2 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱 ( $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-0.5% 乙酸水 (33:67), 柱温  $25\ ^\circ\text{C}$ , 流速  $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波

长  $269\ \text{nm}$ 。

**2.4 正交试验** 在预试验基础上,选取提取时间、提取次数、乙醇用量及体积分数为考察因素,分别以抑制率、总黄酮和穗花杉双黄酮提取量的综合评分为评价指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2,3。

表 1 卷柏抗 SMMC-7721 肝肿瘤组分总黄酮的提取工艺不同指标正交试验安排及直观分析

No.	A 提取时间 /h	B 提取数 /次	C 乙醇用量/倍	D 乙醇体积 分数/%	抑制率 /%	总黄酮 /%	穗花杉双黄酮 /%	综合 评分
1	1	1	10	60	32.81	1.32	0.32	0.62
2	1	2	15	70	38.06	1.49	0.34	0.69
3	1	3	20	80	31.43	0.97	0.31	0.51
4	2	1	15	80	34.29	1.54	0.33	0.69
5	2	2	20	60	30.27	1.14	0.34	0.58
6	2	3	10	70	40.72	2.22	0.48	1.00
7	3	1	20	70	41.06	2.03	0.42	0.90
8	3	2	10	80	36.13	1.35	0.36	0.66
9	3	3	15	60	32.61	1.92	0.39	0.85
综合评分	$K_1$	0.607	0.737	0.760	0.683			
	$K_2$	0.757	0.634	0.743	0.863			
	$K_3$	0.803	0.787	0.663	0.620			
	$R$	0.196	0.144	0.097	0.243			
抑制率	$K_1$	34.100	36.053	36.553	31.897			
	$K_2$	35.093	34.820	34.987	39.947			
	$K_3$	36.600	34.920	34.253	33.950			
	$R$	2.500	1.233	2.300	8.050			

表 2 抑制率方差分析

方差来源	SS	$f$	$F$	$P$
A	9.507	2	3.376	$>0.05$
B(误差)	2.816	2	1.000	
C	8.282	2	2.941	$>0.05$
D	104.979	2	37.279	$<0.05$

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表 3 同)。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	$f$	$F$	$P$
A	0.063	2	3.938	$>0.05$
B	0.032	2	2.000	$>0.05$
C(误差)	0.016	2	1.000	
D	0.096	2	6.000	$>0.05$

以抑制率为指标,直观分析表明各因素对提取工艺的影响顺序为  $D > A > C > B$ 。以极值最小的 B

因素为误差项进行方差分析,表明因素 D 具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,结合生产周期和成本考虑,确定最佳提取条件为  $A_3B_1C_1D_2$ ,即加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1 次,每次 3 h。通过该提取条件优选得到穗花杉双黄酮与总黄酮含量的最佳权重系数分别为 0.3,0.7,此时 2 种指标的最佳提取条件一致,证明在该权重系数下含量测定的综合评分可代替抑制率作为卷柏抗肿瘤组分提取工艺的考察指标。

**2.5 单因素试验** 正交试验表明乙醇体积分数是影响提取工艺的最主要因素,为验证优选乙醇体积分数的准确性,对其进行了单因素试验考察,选择 65%,70%,75% 共 3 个水平,结果卷柏提取液细胞抑制率分别为 38.12%,39.79%,39.43%,表明 70% 醇提液对肝肿瘤细胞抑制效果显著,进一步验证了优选的提取工艺。

**2.6 相关性分析** 通过 SPSS 17.0 软件将 9 组样

品的穗花杉双黄酮含量分别与总黄酮含量及细胞抑制率三者进行 Pearson 相关系数分析,结果见表 4,表明指标性成分选择正确,同时进一步认证黄酮类成分为卷柏抗肿瘤的有效成分。

表 4 穗花杉双黄酮含量与总黄酮含量、细胞抑制率的 Pearson 相关系数分析

相关系数	穗花山双黄酮含量	抑制率	总黄酮含量
穗花杉双黄酮含量	1	0.734 2	0.903 2
总黄酮含量	0.903 2	0.746 6	1
抑制率	0.734 2	1	0.746 6

2.7 验证试验 称取卷柏 3 份,每份 10 g,按优选的工艺条件进行提取,结果抑制率分别为 45.12%,44.96%,43.90%,总黄酮提取量依次为 2.27%,2.24%,2.18%,穗花山双黄酮提取量分别为 0.46%,0.46%,0.48%,表明优选的提取工艺稳定可行,且药效学结果稳定。

### 3 讨论

文献报道超声法为卷柏总黄酮的最佳提取方法,该方法虽具有操作简便、提取时间短等优点,但不太适合工业大生产。预试验分别考察了浸泡法、回流法、超声波提取法,结果显示超声提取法虽有较好提取率,但三者间无显著性差异,故综合考虑,确定选用回流提取法。在确定提取方法基础上,曾对提取溶剂(乙酸乙酯,乙醇,水等)进行单因素试验考察,以总黄酮含量为指标,确定最佳溶剂为乙醇。

中药有效成分复杂,某一类化学成分与药效间多无直接的线性关系。本文通过正交量效对比,建立卷柏有效成分含量与肝肿瘤抑制率的关联,探索可代表细胞抑制率的有效成分含量指标的权重系数,该方法不仅能在确保药效的前提下简化考察指标,同时也进一步说明黄酮类成分为卷柏药材抗肿瘤的活性成分。通过 SPSS 17.0 软件相关性分析,证实了总黄酮是卷柏抗肿瘤作用的主要有效成分,而穗花杉双黄酮为总黄酮的指标性成分,且验证了代替药效的有效成分含量指标所赋予的权重系数是合理的。

### [参考文献]

[1] 陈士林,林余霖. 中草药大典[M]. 北京:军事医学科学出版社,2006:8.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.

[3] 王雪,李占林,高亮亮,等. 卷柏的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(8):623.

[4] 徐康平,申健,刘建锋,等. 4种卷柏类药材中2种特征性成分研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(20):1535.

[5] 江雪平,陈科力. 江南卷柏中双黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(2):96.

[6] 李庆杰,王怀生,王莲萍,等. 卷柏总黄酮提取工艺研究[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(2):355.

[7] 黄玉海,户志新,周海瑞. 卷柏总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国民康医学,2011,23(19):2366.

[8] 高红霞,张佐妹,薛桂荣. 卷柏中总黄酮提取工艺的研究[J]. 黑龙江医药科学,2010,33(5):64.

[9] 王耀文,孟宪生,包永睿,等. 人参提取工艺的优化及其有效成分与药效学相关性分析[J]. 中成药,2012,34(11):2240.

[10] 蔡琳,孟宪生,包永睿,等. 基于体外心肌细胞活力的葛根提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):17.

[11] 孙健,温庆辉,李夏,等. 黄连解毒汤及其含药血清的化学成分及抗肿瘤作用对比研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(18):1526.

[12] 李然,刘立萍,马骥,等. 小柴胡汤含药血清对肝癌 HepG-2 细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):217.

[13] 张云坤,包永睿,孟宪生,等. 藏药余甘子抗肿瘤活性成分的提取工艺优化及含量测定[J]. 中国医药工业杂志,2012,43(11):905.

[14] 李海峰. 西咪替丁对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用[J]. 中国现代医生,2012,50(13):17.

[15] 李丽,周建平,胡宇驰. 细胞浓度和作用时间对细胞毒性检查法影响的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):101.

[责任编辑 全燕]