

柚寄生总黄酮的提取工艺优化及其体外抑制人肝癌细胞 Hep3B 作用的初步评价

廖彭莹*, 卓生华, 邱志彬, 蔡少芳
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 优选柚寄生总黄酮的提取工艺, 并初步评价总黄酮体外抑制人肝癌细胞 Hep3B 的作用。方法: 以芦丁为对照品测定柚寄生提取液的总黄酮含量, 选取提取时间、提取温度、料液比及乙醇体积分数为影响因素, 采用正交试验法优选柚寄生总黄酮的提取工艺条件, 采用单因素试验考察提取次数; 采用 MTT 法测定总黄酮对人肝癌细胞 Hep3B 的体外抑制作用。结果: 优选的提取工艺为加 30 倍量 60% 乙醇于 80 °C 提取 2 次, 每次 2 h; 体外抗肿瘤活性试验结果表明, 总黄酮质量浓度 500 mg·L⁻¹ 时对人肝癌细胞 Hep3B 的生长抑制率 51.40%。结论: 优选出的柚寄生总黄酮提取工艺条件稳定可行, 柚寄生总黄酮有一定的体外抑制人肝癌细胞 Hep3B 的作用。

[关键词] 柚寄生, 总黄酮, 提取工艺, 抗肿瘤

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0037-03

Optimization of Extraction Process and Preliminary Evaluation of *in vitro* Inhibitory Activity on Human Hepatoma Cell Hep3B of Total Flavonoids from *Viscum ovalifolium*

LIAO Peng-ying*, ZHUO Sheng-hua, QIU Zhi-bin, CAI Shao-fang
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from *Viscum ovalifolium*, and to preliminary evaluate *in vitro* inhibitory effect of total flavonoids on human hepatoma cell Hep3B. **Method:** With rutin as standard substance, the content of total flavonoids was determined by UV, orthogonal test was used to optimize extraction technology of total flavonoid from *V. ovalifolium* with extraction time, extraction temperature, solid-liquid ratio and the concentration of ethanol as factors, extraction times was investigated by single factor test; *In vitro* inhibition effect of total flavonoids on Hep3B was measured by MTT method. **Result:** Optimum extraction technology was: extracted 2 times with 30 times the amount of 60% ethanol at 80 °C, 2 h per time; *In vitro* anti-tumor activity screening showed, when treated with the concentration of total flavonoid 500 mg·L⁻¹, rate of growth inhibition on Hep3B was 51.40%. **Conclusion:** Optimized extraction conditions was stable and feasible, total flavonoids from *V. ovalifolium* showed some *in vitro* inhibitory effect on Hep3B.

[Key words] *Viscum ovalifolium*; total flavonoids; extraction process; anti-tumor

柚寄生, 别名柚树寄生、缘柚寄生, 主要分布于

华南及云南等地, 是黎族和苗族常用药材, 以带短段寄主的全株入药, 鲜用或晒干使用, 味苦、辛, 性凉, 具有祛风除湿、活血止痛、化痰止咳、解毒的功效^[1-2]。研究表明柚寄生含有总黄酮类成分^[3], 目前植物总黄酮已被证实有丰富的生理活性, 包括心血管系统活性、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等^[4]。为更深入地认识和利用柚寄生中总黄酮类成分, 本试验采用回流提取法, 以总黄酮含量为指标, 采用正交试验

[收稿日期] 20120718(019)

[基金项目] 2012年度广西高等学校立项科研项目(201204LX201); 广西中医学院校级普通课题(P2010062)

[通讯作者] * 廖彭莹, 讲师, 硕士, 从事天然药物化学研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: gxlpy@163.com

及单因素试验优选柚寄生中总黄酮的提取工艺,并对其体外抑制人肝癌细胞 Hep3B 的作用进行初步评价。

1 材料

BS 2245 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Agilent 8453 型可见-紫外分光光度计(美国安捷伦科技有限公司),PowerWave XS 型全波长酶标仪(Bio-tek 公司),芦丁(实验室自制,经 HPLC 测定纯度 >98%),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯,柚寄生(2009 年购于玉林药材市场,由广西中医药大学韦松基教授鉴定为寄生于柚树的桑寄生科槲寄生属植物瘤果槲寄生 *Viscum ovalifolium* DC. 的干燥带叶茎枝,药材烘干、粉碎,过 60 目筛。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 精密称量烘干至恒重的芦丁对照品约 20 mg,加 70% 乙醇超声溶解并定容至 100 mL,即为 0.20 g·L⁻¹ 对照品溶液;精密称取药材 1 g,精密量取 70% 乙醇 20 mL,加热回流提取约 60 min,提取 1 次,过滤,即得供试品溶液。

2.2 检测波长的选择 精密吸取对照品溶液 10 mL 及供试品溶液 0.3 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,加 5% NaNO₂ 溶液 2 mL,摇匀后放置 6 min,加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 2 mL,摇匀,放置 6 min,加 20% NaOH 溶液 20 mL,加水定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以试剂空白为参比,采用紫外分光光度法在 400~700 nm 进行扫描,结果芦丁对照品溶液的最大吸收波长在 515 nm 附近,供试品溶液最大吸收波长在 485 nm 附近,二者的最大吸收波长有偏差,由于本试验以芦丁对照品溶液为参照测定样品的总黄酮含量^[5],故确定检测波长 515 nm。

2.3 标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0,14.0,16.0 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 12.411C - 0.0143 (r = 0.9994)$,线性范围 0.008~0.056 g·L⁻¹。

2.4 精密度试验 精密吸取芦丁对照品溶液 10.0 mL,置于 50 mL 量瓶中,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定 A,重复测定 6 次,结果 RSD 0.92%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取芦丁对照品溶液 10.0 mL,置于 50 mL 量瓶中,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定 A,每隔 10 min 测 1 次,2 h 内 RSD 0.71%,表明对照品溶液在 2 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称取 6 份药材,每份 1 g,按 2.1 项下方法制备成 6 份样品溶液,精密吸取 0.8 mL 置于 50 mL 量瓶中,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定 A,结果 RSD 1.30%,说明方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密吸取 6 份已知总黄酮含量的样品溶液 0.4 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,分别精密加入 0.20 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液 4 mL,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定 A,计算平均加样回收率 97.61%,RSD 2.18%,说明该方法可行。

2.8 正交试验设计^[6-7] 选择乙醇体积分数、提取温度、提取时间、料液比 4 个因素,每个因素选 3 个水平,设计 L₉(3⁴) 正交试验,因素水平见表 1。每组试验均精密称取药材 1 g,均提取 1 次,过滤得提取液,精密吸取适量提取液,置于 50 mL 量瓶中,按 2.2 项下方法于 515 nm 处测定 A,计算总黄酮含量。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 柚寄生总黄酮的提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数 /%	B 提取温度 /℃	C 提取时间 /min	D 料液比
1	60	60	60	1:20
2	70	70	90	1:30
3	80	80	120	1:40

表 2 柚寄生总黄酮的提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮质量 分数/%
1	1	1	1	1	10.67
2	1	2	2	2	11.33
3	1	3	3	3	11.97
4	2	1	2	3	11.00
5	2	2	3	1	10.90
6	2	3	1	2	11.51
7	3	1	3	2	9.69
8	3	2	1	3	9.25
9	3	3	2	1	9.10
K ₁	11.32	10.45	10.48	10.22	
K ₂	11.14	10.49	10.48	10.84	
K ₃	9.35	10.86	10.85	10.74	
R	1.97	0.41	0.37	0.62	

由表 2 结果可知,4 个因素对总黄酮提取工艺的影响大小为乙醇体积分数 > 料液比 > 提取温度 > 提取时间。以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析^[6],结果表明乙醇体积分数的影响具有显著

表3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	7.146	2	3.573	25.184	<0.05
B	0.301	2	0.151	1.062	
C(误差)	0.284	2	0.142	1.00	
D	0.662	2	0.331	2.333	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

性差异,其他3个因素的影响差异不显著。确定总黄酮的提取工艺条件为 $A_1B_3C_3D_2$,即乙醇体积分数60%,提取温度80℃,料液比1:30,提取时间2h。

2.9 提取次数考察 精密称量药材4份,每份1g,按优选的工艺条件分别提取1,2,3,4次,过滤,得提取液,取适量体积置于50 mL量瓶中,按2.2项下方法于515 nm处测定A,计算总黄酮质量分数分别为11.97%,12.44%,11.34%,12.16%。说明随提取次数增加,提取液总黄酮含量有所增大,而当提取次数>3时,总黄酮含量反而减少,结合生产实际考虑,确定提取2次。

2.10 验证试验 精密称取药材3份,每份1g,按优选工艺进行提取,取提取液适量体积置于50 mL量瓶中,按2.2项下方法于515 nm处测定A,计算总黄酮平均质量分数12.36%,RSD 0.61%。将提取液蒸干,精密称定质量,计算总黄酮得率分别为26.27%,29.27%,26.97%;总黄酮纯度依次为47.15%,41.98%,46.30%。说明优选的工艺稳定可行。

2.11 总黄酮的抗肿瘤活性初步评价^[8] 取2.10项下按优化工艺提取所得的总黄酮提取物粉末适量,将其溶于DMSO中,采用MTT法测定其对人肝癌细胞Hep3B的体外抑制作用。将处于对数生长期的Hep3B细胞 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 接种于96孔微量培养板中, 7.5×10^3 细胞/孔,培养24 h后加入以培养基稀释的总黄酮溶液,使其最终质量浓度为500,250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个质量浓度均为3个复孔,另设空白对照孔。细胞在37℃,5% CO_2 条件下分别培养48 h,去除培养基,PBS洗1次,按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入新鲜培养基,按 $20 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加 $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT,继续培养4 h,去

除孔中培养基和MTT,按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 加入DMSO,立即用酶标仪测 $A_{570-630 \text{ nm}}$ 值,计算肿瘤细胞生长抑制率分别为51.40% ($P < 0.01$),9.65%。

3 讨论

本试验采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法测定柚寄生的总黄酮含量,进行的方法学考察结果均良好,不同文献关于 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色法的各试剂加样量有不同的描述,本试验参照文献[9]进行操作。本试验进行提取工艺优选时,选用回流提取法提取总黄酮,以乙醇为提取溶剂,优选的工艺简便、成本低廉、环保,初步满足工业生产要求。本试验对柚寄生总黄酮的体外抗肿瘤活性进行了初步评价,结果表明其对人肝癌细胞Hep3B有一定的体外抑制作用,为进一步揭示柚寄生药材的药效物质基础提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第5卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:619.
- [2] 罗集鹏,张电光. 瘤果榭寄生的形态组织和紫外光谱鉴别[J]. 中药材,2001,24(11):797.
- [3] 庞瑞媛,黎建玲. 广寄生、瘤果榭寄生总黄酮含量的测定及比较[J]. 玉林师范学院学报,2008,29(5):67.
- [4] 徐任生. 天然产物化学[M]. 2版. 北京:科学出版社,2004:562.
- [5] 李姣娟,黄克瀛,龚建良,等. 川桂叶中黄酮类化合物的提取与测定[J]. 光谱实验室,2009,26(3):530.
- [6] 熊蔚蔚,徐铭键,刘健,等. 毛樱桃总黄酮超声提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):29.
- [7] 王幸,帅延琼,覃鸿恩,等. 多指标综合评价法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):46.
- [8] 李元圆,杨莉,王长虹,等. 草豆蔻化学成分及体外抗肿瘤作用研究[J]. 上海中医药大学学报,2010,24(1):72.
- [9] 赵超,陈华国,靳风云,等. 槐枝中总黄酮的含量测定[J]. 光谱实验室,2010,27(1):188.

[责任编辑 仝燕]