

聚酰胺色谱法联合中压液相制备色谱法提取 分离镰形棘豆中活性黄酮类成分

牛俐燃^{1,2} 李冠聪^{1,2} 杨光明^{1,2} 潘 扬^{1,3} 蔡宝昌^{1,2}

(1 南京中医药大学药学院,南京,210023; 2 江苏省中药炮制重点实验室/国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室,南京,210023; 3 南京中医药大学药用菌与中药生物技术研究所,南京,210023)

摘要 目的:对藏药镰形棘豆中黄酮类成分进行提取分离,并将得到的黄酮化合物进行抗人肺腺癌 A549 细胞的活性筛选。方法:镰形棘豆药材浸提液经乙酸乙酯萃取,该萃取部位通过聚酰胺柱色谱梯度洗脱,结合中压液相制备色谱法进一步纯化分离,获得单一黄酮化合物,通过高效液相色谱法(HPLC)、质谱法(MS)及核磁共振波谱法(NMR)对化合物进行分析、鉴定;采用 CCK-8 法,检测黄酮化合物对人肺腺癌 A549 细胞的抑制作用。结果:从镰形棘豆的乙酸乙酯部位分离得到 2 个黄酮类单体,鉴定为 7-羟基二氢黄酮及 2',4'-二羟基二氢查尔酮,HPLC 分析两者纯度均大于 98%;CCK-8 法结果显示,7-羟基二氢黄酮及 2',4'-二羟基二氢查尔酮均能显著抑制 A549 细胞活力,并呈量效关系,48 h 的 IC₅₀ 值分别为 137.6 μg/mL 和 63.83 μg/mL。结论:分离得到的 2 个黄酮成分对 A549 细胞均有良好的抑制作用,为后期抗肺癌机制研究提供了实验基础。聚酰胺柱色谱法具有富集黄酮的作用,适用于分离黄酮类成分,聚酰胺色谱法联合中压制备液相色谱法,提取分离镰形棘豆中黄酮类成分,简便易行,为分离黄酮类成分提供参考。

关键词 镰形棘豆;黄酮化合物;聚酰胺色谱法;中压制备色谱法;A549 细胞;质谱法

Extraction and Separation of Bioactive Flavonoids from *Oxytropis Falcata* by Polyamide Chromatography Combined with Medium-pressure Liquid Chromatography

Niu Liran^{1,2}, Li Guancong^{1,2}, Yang Guangming^{1,2}, Pan Yang^{1,3}, Cai Baochang^{1,2}

(1 School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2 Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing & Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China; 3 Laboratory of Medical Fungi and Phyto-Biotech, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To extract and isolate the flavonoids from *Oxytropis falcata* (Of), and screen bioactive flavonoids on human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro. **Methods:** Crude extraction was extracted from Of by ethyl acetate. Ethyl acetate extraction was further separated by polyamide column chromatography with gradient elution and purified by medium-pressure liquid chromatography to obtain the flavonoids; High performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) were used to analyze and elucidate the structure of the obtained flavonoids. CCK-8 analysis was used to detect the inhibited viability of flavonoids on human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro. **Results:** There were 2 flavonoids isolated from Of ethyl acetate fraction, and were identified as 7-hydroxy dihydroflavone and 2',4'-dihydroxy dihydrochalcone. Purity of them were both greater than 98% by HPLC analyses; The results of CCK-8 showed that 7-hydroxy dihydroflavone and 2',4'-dihydroxy dihydrochalcone could significantly inhibit the viability of A549 cells in a dose dependent manner. The IC₅₀ values were 137.6 μg/mL and 63.83 μg/mL at 48 h, respectively. **Conclusion:** The 2 flavonoids have effective bioactivities on inhibiting proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells, which could provide the experimental basis for the further studies on anti-lung cancer mechanism. Polyamide column chromatography is suitable for enrichment and isolation of flavonoids. Polyamide column chromatography combined with medium pressure liquid chromatography is simple and easy to prepare various flavonoids. Thus, the method could provide a reference for obtaining flavonoids from Chinese medicines.

Key Words *Oxytropis falcata*; Flavonoids; Polyamide column chromatography; Medium-pressure liquid chromatography; A549 cells; Mass spectrometry

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.005

基金项目:国家自然科学基金项目(81473420,30902012);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PZYZ2015A070)

作者简介:牛俐燃(1994.01—),女,硕士研究生在读,研究方向:中药炮制与化学成分,E-mail:1604596228@qq.com

通信作者:杨光明(1974.09—),女,博士,副研究员,研究方向:中药炮制与中藏药有效成分研究,Tel:(025)86798185,E-mail:ygm0901@hotmail.com;蔡宝昌(1952.09—),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药炮制机制及质量标准研究,Tel:(025)68193567,E-mail:bccai@126.com

镰形棘豆 (*Oxytropis falcata* Bunge) 为豆科棘豆属植物, 多年生无茎草本, 藏族人称之为“莪大夏”“达夏”^[1]。据《晶珠本草》^[2]及《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药第 1 册记录^[3], 其根及根茎或全草入药, 味辛、性寒, 具有清热解毒、生肌愈疮、涩脉止血等疗效。内服可治疗流感、扁桃体炎、炭疽及麻风等, 外敷可治疗疮疖肿痛、创伤及骨伤等, 具有广阔的开发前景。藏药镰形棘豆中富含黄酮类化合物。文献报道已分离得到黄酮苷、黄酮及二氢黄酮、二氢查耳酮、查耳酮、黄酮醇、异黄酮及黄烷酮等成分^[4-6], 且这些黄酮成分具有显著的药理活性^[7-8], 是评价镰形棘豆药效的重要依据。因此, 完善镰形棘豆黄酮类成分的制备工艺, 提高黄酮类成分的得率及纯度, 对于进一步开发利用镰形棘豆的药用资源具有重要意义。聚酰胺色谱法对各种黄酮类化合物均有较好的富集纯化效果^[9-10], 中压制备液相色谱法单次上样量大、步骤简便, 适合单体的规模化提取分离^[11]。本实验采用聚酰胺色谱法结合中压液相制备色谱法, 提取分离纯化镰形棘豆中黄酮类成分。通过 2 种方法的结合, 实现了对镰形棘豆中黄酮类化合物快速、有效的分离纯化, 得到了 2 个高纯度的黄酮类化合物, 并将黄酮单体进行人肺腺癌 A549 细胞的活性筛选实验, 为探索镰形棘豆资源的进一步开发应用和抗肿瘤活性成分研究提供依据。

1 材料

镰形棘豆药材于 2016 年 12 月采购自青海省共和县, 经南京中医药大学药学院潘扬老师鉴定为豆科棘豆属植物镰形棘豆 (*Oxytropis falcata* Bunge) 的干燥全草; 柱色谱用聚酰胺 (100 ~ 200 目, 化学纯, 国药集团上海化学试剂有限公司), Reveleris 4 g 硅胶柱 (美国 GRACE 公司); 乙酸乙酯、无水乙醇、石油醚、丙酮等液体试剂均为分析纯 (南京化学试剂有限公司); 薄层层析硅胶 G 板 (青岛海洋化工厂); CCK-8 试剂盒 (南京恩晶公司, 批号 20180714); RPMI 1640 培养基、0.25% 胰酶、胎牛血清 (加拿大维森特公司, 批号 270636013)。

Mettler Toledo 电子天平; Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱仪; Büchi Reveleris X2 中压液相制备色谱仪; X-4 型数字显微熔点仪; LC/MS-2020 单极四级杆质谱仪; Bruker-500 核磁共振仪, TMS 内标; VS-1300-U 超净工作台; Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机; Perkin Elmer Victor X3 酶标仪。

A549 人肺腺癌细胞株, 由南京中医药大学药理

教研室惠赠。取 A549 细胞株于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/L 的 RPMI 1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、90% 相对湿度的培养箱中孵育, 待细胞长至 80% 融合时, 胰酶消化, 按照细胞浓度需求传代, 待细胞处于对数生长期时用于实验。

2 方法

2.1 提取与分离

2.1.1 镰形棘豆的提取 称取镰形棘豆药材 10 kg, 用体积分数 95% 的乙醇于室温下冷浸提取 3 次, 每次浸泡 3 d, 减压抽滤, 弃去残渣, 合并提取液, 于 50 $^{\circ}$ C 下减压浓缩成浸膏; 取上述浸膏 500 g, 经 2% 盐酸溶解, 过滤, 得酸性不溶物, 再经 2% 氢氧化钠处理后过滤, 滤液用 1% 盐酸调节 pH 至 5; 将酸水液经乙酸乙酯反复萃取, 得乙酸乙酯萃取物 100 g。

2.1.2 聚酰胺色谱富集分离 取 100 ~ 200 目聚酰胺粉, 用体积分数 95% 的沸乙醇冷凝回流 2 h 后, 抽滤、烘干。称取聚酰胺粉 500 g, 用超纯水搅拌均匀, 湿法装柱, 轻轻敲击玻璃柱至柱床面不再下沉, 过程中始终保持水面高于聚酰胺, 以超纯水为起始洗脱液, 调节流速至约 25 mL/min, 用超纯水冲洗平衡。

2.1.3 中压液相色谱分离纯化 取乙酸乙酯萃取物 20 g, 经中压聚酰胺柱色谱进行分离, 以水-无水乙醇为溶剂系统梯度洗脱 (无水乙醇 0 ~ 95%), 等体积收集, 各梯度流分经 TLC 检识合并, 30% 流分部位浓缩得到混合物 A (2.5 g), 50% 流分部位得到混合物 B (1.3 g); 混合物 A 和 B 分别取 0.5 g, 经中压液相制备硅胶柱进一步分离, 以石油醚-丙酮为溶剂系统梯度洗脱, 混合物 A 的流分 5 (石油醚-丙酮 = 100:25) 得到化合物 I (30 mg), 液相色谱分离行为见图 1; 混合物 B 的流分 3 (石油醚-丙酮 = 100:15) 得到化合物 II (20 mg), 液相色谱分离行为见图 2。分离流程见图 3。

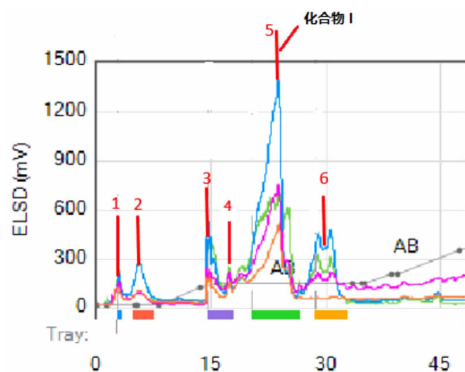


图 1 制备化合物 I 的中压制备液相色谱图

化合物 II: 白色针晶, mp 89 ~ 91 °C; ESI/MS (m/z): 242 [M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 12.72 (1H, s, OH), 7.63 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6'), 7.31 ~ 7.19 (3H, m, H-2, 4, 6), 5.68 (1H, brs, OH), 6.37 (2H, m, H-3', 5'), 3.20 (3H, t, H-2α), 3.04 (2H, t, H-2β); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 203.6 (CO), 140.83 (C-1), 128.38 (C-2, 6), 128.60 (C-3, 5), 126.30 (C-4), 113.91 (c-1'), 162.48 (C-2'), 103.64 (C-3'), 165.26 (C-4'), 107.71 (C-5'), 132.20 (C-6'), 39.67 (C-α), 30.37 (C-β)。以上数据与文献^[13]对照一致, 故确定化合物 II 为 2',4'-二羟基二氢查尔酮(2',4'-dihydroxy dihydrochalcone)。其核磁氢谱、碳谱数据见图 7 和图 8。结构式见图 9。

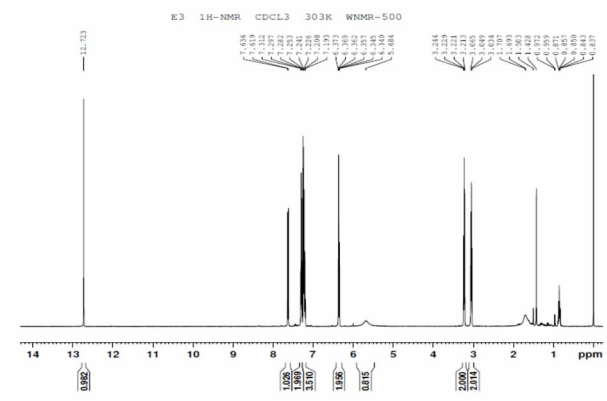


图 7 2',4'-二羟基二氢查尔酮的氢谱图

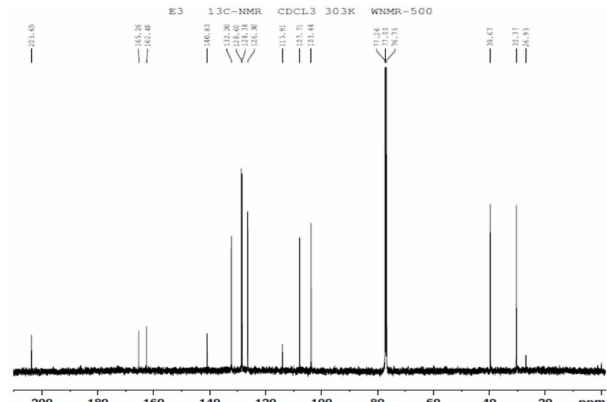


图 8 2',4'-二羟基二氢查尔酮的碳谱图

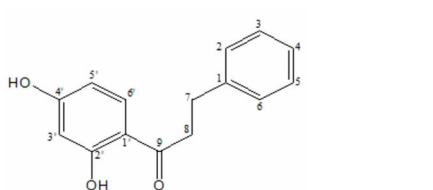


图 9 2',4'-二羟基二氢查尔酮的结构式

3.2 化合物 I、II 对 A549 肺癌细胞生长抑制作用 CCK-8 结果显示(见图 10), 7-羟基二氢黄酮(化合物 I)及 2',4'-二羟基二氢查尔酮(化合物 II)细胞给

药 24 h 后, 均对 A549 细胞的生长具有抑制作用, 且抑制效果具有剂量依赖趋势, 两者均在 400 μg/mL 时对细胞的增殖抑制作用最强, 抑制率分别为 62.3% 和 89.7%, 给药 48 h 后两者最高浓度对细胞的抑制率分别为 66.8% 和 90.6%, 抑制效果与作用时间呈正相关趋势; IC₅₀ 值结果显示(见表 1), 7-羟基二氢黄酮及 2',4'-二羟基二氢查尔酮细胞给药 48 h 后, IC₅₀ 值分别为 137.6 μg/mL 和 63.83 μg/mL。综上结果表明, 7-羟基二氢黄酮及 2',4'-二羟基二氢查尔酮能够显著抑制人肺癌 A549 细胞增殖, 具有良好的抗肺癌活性。

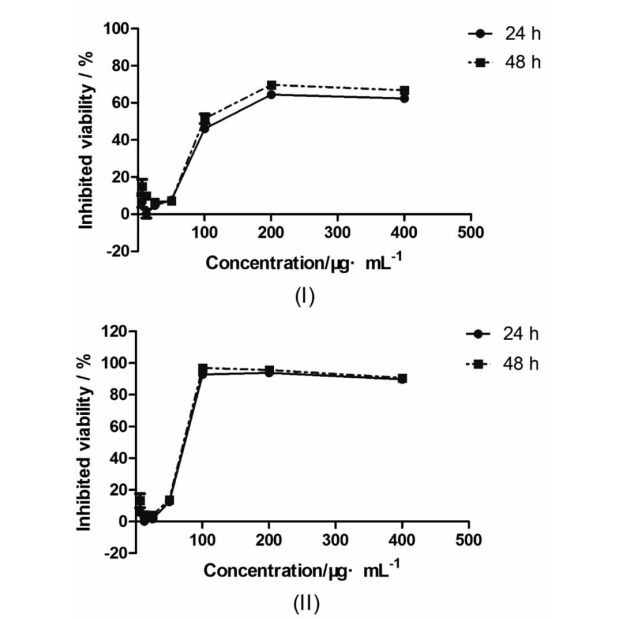


图 10 化合物 I、II 对人肺癌 A549 细胞生长的抑制作用

表 1 化合物 I、II 抑制 A549 细胞生长的 IC₅₀ 值

化合物	IC ₅₀ (μg/mL)	
	24 h	48 h
I	164.1	137.6
II	67.56	63.83

4 结论

藏药镰形棘豆具有镇痛抗炎、抗肿瘤等疗效, 被誉为“草药之王”。近年来, 确生^[14]、魏学红^[15]等国内学者对镰形棘豆的化学成分、提取工艺、药理作用和临床应用等方面开展了大量的研究工作, 为开发利用镰形棘豆的药用植物资源奠定了良好的基础。黄酮类化合物作为主要的活性物质是镰形棘豆抗炎抗肿瘤研究的热点^[16]。因此, 研究镰形棘豆黄酮类成分的提取分离技术具有科研意义。

本研究采用聚酰胺柱色谱联用中压制备色谱的方法对镰形棘豆乙酸乙酯萃取部位进行分离纯化, 得到 2 种黄酮单体成分; 取 7-羟基二氢黄酮及 2',4'-

二羟基二氢查尔酮进行体外抗肺癌 A549 细胞活性筛选,结果表明,2 种成分均能明显抑制 A549 细胞的增殖,并具有剂量依赖趋势,其中 2',4'-二羟基二氢查尔酮抑制效果更佳,给药 48 h 的 IC_{50} 值为 $63.83 \mu\text{g/mL}$ 。本文提取分离成分方法的创新之处在于,聚酰胺具有富集黄酮的作用,是较为理想的吸附剂,利用黄酮类化合物富含酚羟基的特点,通过分子中的酚羟基与聚酰胺分子中的酰胺基形成氢键缔合产生吸附,可显著提高黄酮成分纯度^[17];与中压制备液相色谱法联用提取分离镰形棘豆中的黄酮单一成分,简便易行,提取效率高,单体成分纯度高,是分离纯化镰形棘豆黄酮类化合物的新手段;将制备得到的黄酮单体进行体外抗肺癌 A549 细胞实验,检测其抗癌活性,为研究及阐述镰形棘豆抗肿瘤活性黄酮单体成分及其抗肿瘤的作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] 高博,李钦,杨丽霞,等. 镰形棘豆的研究现状与分析[J]. 中医研究,2017,30(1):75-78.
- [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第 1 册[S]. 1995:340.
- [4] 张晓晶,李凌宇,格桑罗布,等. 藏药镰形棘豆中的黄酮类化合物(英文)[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2014,23(2):99-105.
- [5] 顾鹏程,许惠琴. 镰形棘豆化学成分和药理毒理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2549-2550.
- [6] 陈锦珊,杨钦磊,刘晓玲,等. 藏药镰形棘豆的化学成分、药理作用

及毒理学研究进展[J]. 中国药房,2016,27(28):3945-3.

- [7] 楼成华,王明艳,杨欢,等. 镰形棘豆中黄酮类化合物抗肿瘤活性的体外实验研究[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(1):46-50.
- [8] 王栋,唐炜,杨光明,等. 藏药镰形棘豆黄酮类成分的抗炎、抗氧化及细胞毒性研究(英文)[J]. 中国天然药物,2010,8(6):461-465.
- [9] LI A, SUN A, LIU R, et al. An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B,2014,965:150-157.
- [10] LIU GY, ZHUANG LW, SONG DD, et al. Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Mill. /Pers.) [J]. Journal of Separation Science,2017,40:472-479.
- [11] 李旭升,蒋鑫炜,单晓煜,等. 黑豆皮花色苷的中压液相色谱制备及结构鉴定[J]. 食品与发酵工业,2018,44(6):51-57.
- [12] 杨欢,王栋,童丽,等. 镰形棘豆的化学成分研究(Ⅲ)[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(1):43-44.
- [13] 吕芳,徐筱杰. 藏药镰形棘豆中黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):318-320.
- [14] 确生. 藏药镰形棘豆化学成分的研究[D]. 兰州:西北师范大学,2003.
- [15] 魏学红,金莉. 藏药镰形棘豆的研究进展[J]. 中国药理学通报,2010,26(11):1535-1538.
- [16] 杨光明,燕珂,顾青,等. 藏药镰形棘豆对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国药学杂志,2013,48(24):2113-2116.
- [17] 孙兆林,王晓,王岱杰,等. 聚酰胺色谱结合高速逆流色谱分离制备蒺藜黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(5):854-8.

(2019-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 277 页)

- [6] 翁泽斌,颜翠萍,吴育,等. 盐制对杜仲治疗去卵巢大鼠骨质疏松症影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(12):1457-1463.
- [7] 翁泽斌,颜翠萍,高倩倩,等. 不同炮制品的杜仲含药血清及其环烯_省略_经后妇女成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 时珍国医国药,2015,26(11):2636-2638.
- [8] 马晓鹏,宋立群,陈雅超,等. 宋立群教授治疗肾衰竭药对举要[J]. 中医学报,2015,43(2):92-93.
- [9] 郑斌,杨瑞,解燕. 杜仲炭抗炎镇痛作用研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(16):126-127,165.
- [10] 陶益,盛辰,李伟东,等. 杜仲不同炮制品化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(22):4352-4355.
- [11] 党会章,刘磊磊,赵帅. 杜仲饮片中心尼平苷酸和京尼平苷的含量测定[J]. 抗感染药学,2014,11(4):315-317.

- [12] 李晔,刘峰,李彤晖,等. 杜仲药材含量测定方法的研究[J]. 西北药学杂志,2010,25(5):348-350.
- [13] 范彦博,袁明洋,张义生. 四川产杜仲药材高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 医药导报,2016,35(10):1121-1124.
- [14] 黄徐英,陈玲,程静,等. 不同产地杜仲药材水提液高效液相色谱指纹图谱及其共有模式[J]. 医药导报,2015,34(11):1497-1500.
- [15] 杨冰月,彭亮,颜永刚,等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析不同产地款冬花生品与蜜炙品[J]. 中草药,2018,49(11):4991-4997.
- [16] 孙立丽,王萌,任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(20):4339-4345.

(2019-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)