

不同产地薏苡仁药效成分含量 与体外抗肺癌活性的相关性分析

刘聪燕, 黄萌萌, 周静, 陈彦*, 瞿鼎, 马益华

(江苏省中医药研究院 中药组分与微生态研究中心, 国家中医药管理局中药
释药系统重点实验室, 南京 210028)

[摘要] **目的:**考察不同产地薏苡仁的药效成分含量及其对肺癌细胞的增殖抑制作用,阐明药效组分含量与药效的相关性,确定薏苡仁的最优产地。**方法:**采用 HPLC-ELSD 和紫外分光光度法测定 5 个产地薏苡仁中甘油三油酸酯和总甘油三酯的含量,通过四甲基偶氮唑盐比色法测定不同产地薏苡仁提取液对人肺癌细胞 A549 和 SPC-A-1 的抑制率。**结果:**河北、辽宁、福建、贵州、山东产地的薏苡仁中甘油三油酸酯质量分数分别为 0.91%、1.14%、0.82%、0.77%、1.09%,总甘油三酯质量分数分别为 14.83、10.88、7.85、5.26、7.71 mg·g⁻¹。对 A549 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 2.33、2.77、3.15、3.24、3.08 g·L⁻¹,对 SPC-A-1 的 IC₅₀依次为 1.64、2.15、2.63、3.01、2.99 g·L⁻¹。**结论:**5 个产地薏苡仁中指标成分均符合 2010 年版《中国药典》的规定。河北产样品中总甘油三酯含量最高,抗肺癌活性最强,提示抗肺癌药效与总甘油三酯含量呈正相关。

[关键词] 薏苡仁; 产地; 甘油三油酸酯; 总甘油三酯; 抗肺癌活性

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0007-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110007

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150414.1126.010.html>

[网络出版时间] 2015-04-14 11:26

Correlation Analysis Between Content and Anti-lung Cancer Activity of Active Ingredients in Coicis Semen from Different Areas LIU Cong-yan, HUANG Meng-meng, ZHOU Jing, CHEN Yan*, QU Ding, MA Yi-hua
(Key Research Laboratory of Delivery System of Chinese Materia Medica, Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate correlation between content and anti-proliferative effect against lung carcinoma cell line SPC-A-1 and A549 of active ingredients in Coicis Semen from five places. **Method:** HPLC-ELSD and UV spectrophotometry were employed to determine contents of glycerol trioleate and total triglycerides in Coicis Semen, respectively. In addition, MTT assay was performed to explore anti-proliferative effect of Coicis Semen extract from various origins towards SPC-A-1 and A549 cells. **Result:** The content of glycerol trioleate in Coicis Semen from Hebei, Liaoning, Fujian, Guizhou, Shandong province was 0.91%, 1.14%, 0.82%, 0.77%, 1.09%, the content of total triglycerides was 14.83, 10.88, 7.85, 5.26, 7.71 mg·g⁻¹, respectively. IC₅₀ (median inhibitory concentration) against the lung carcinoma cell line A549 were 2.33, 2.77, 3.15, 3.24, 3.08 g·L⁻¹, IC₅₀ against SPC-A-1 were 1.64, 2.15, 2.63, 3.01, 2.99 g·L⁻¹, respectively. **Conclusion:** All samples originated from five provinces are in line with standards of the 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. However, samples from Hebei province have the highest content of total triglycerides and the strongest anti-lung cancer activity, suggesting a positive correlation between active ingredients content and

[收稿日期] 20140815(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373979);江苏省中医领军人才项目(LJ200913);江苏省自然科学基金面上项目(BK20141508)

[第一作者] 刘聪燕,研究实习员,从事中药制剂新剂型与新技术研究,Tel:15295757506,E-mail:liucongyan2007@126.com

[通讯作者] * 陈彦,研究员,博士生导师,从事中药新型给药系统及生物药剂学研究,Tel:025-85608672,E-mail:yichen202@hotmail.com

pharmacological activity.

[**Key words**] Coicis Semen; origins; glycerol trioleate; triglycerides; anti-lung cancer activity

中药材产地与其质量及疗效密切相关。同一种中药,由于生长环境的不同,会造成内在成分的质和量存在差异,进而导致疗效不一样^[1-2]。为保证药材能最大程度地发挥药效,药材产地的选择十分重要。薏苡仁味甘、淡,性凉,归脾、胃、肺经,功效利水渗湿、健脾止泻、除痹、排脓、解毒散结,临床用于治疗水肿、脚气、小便不利、脾虚泄泻等。近代药理研究表明薏苡仁具有抗肿瘤、免疫调节、抗病毒等药理活性,其中以薏苡仁的抗肿瘤作用研究最为深入^[3]。薏苡仁的抗肿瘤活性成分主要为甘油三酯类,包括甘油三油酸酯、甘油三亚油酸酯和 1,2-油酸-3-亚油酸-甘油三酯,1,2-亚油酸-3-油酸-甘油三酯等^[4]。临床应用普遍的康莱特注射液的有效成分即为薏苡仁中酯类(薏苡仁甘油三酯)^[5]。研究发现薏苡仁甘油三酯抗肿瘤的作用机制主要有抑制肿瘤细胞的分裂增殖、诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的转移、抑制环氧合酶-2 的活性、抑制脂肪酸合成酶的活性、抑制肿瘤血管的形成、增强放射敏感性、调节机体免疫系统功能^[6]。薏苡仁在我国各地区均有生长分布,自然资源十分丰富,但不同产地的薏苡仁中含有的甘油三酯类成分含量差异较大。本实验选择河北、辽宁、福建、贵州、山东 5 个产地的薏苡仁进行研究,采用 HPLC-ELSD 和紫外分光光度法测定甘油三油酸酯和总甘油三酯的含量,通过四甲基偶氮唑盐比色法评价不同产地薏苡仁提取物的体外抗肺癌活性,阐明有效组分含量与药效的相关性,以确定薏苡仁的最佳产地。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), ELSD-2000 型蒸发光散射检测器[美国奥泰科技(中国)有限公司],MV-2802 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司],DJ-04B 型万能粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司),ME104E 型电子分析天平和 AL104 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),HERA Cell 150 型 CO₂ 培养箱和 MK3 型酶标仪(美国热电集团)。

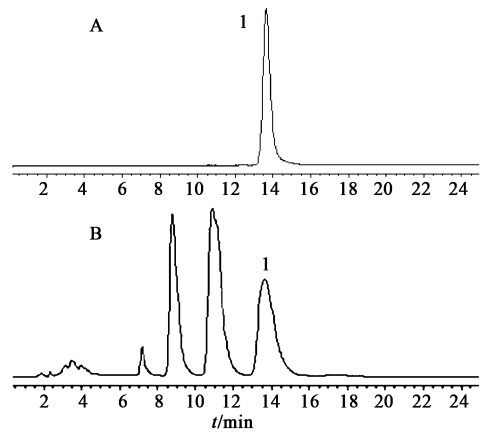
薏苡仁药材均购于安徽亳州药材有限公司,产地分别为河北省蔚县(20110816)、辽宁省庄河市(20110816)、福建省蒲城县(20110816)、贵州兴仁县(20110816)、山东汶上县(20110816),经江苏省中医药研究院钱士辉教授鉴定为禾本科植物薏苡

Coix lacryma-jobi var. *ma-yuen* 的干燥成熟种仁。甘油三油酸酯对照品(纯度≥98%,中国食品药品检定研究院,批号 111692-200501),顺铂(江苏恒瑞制药有限公司),四甲基偶氮唑盐[MTT,生兴生物技术(南京)有限公司],RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),人肺癌细胞 A549 细胞株、人肺癌 SPC-A-1 细胞株(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所,在本室长期传代培养),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘油三油酸酯的含量测定^[7]

2.1.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相乙腈-二氯甲烷(68:32),柱温 35℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。ELSD 参数为漂移管温度 65℃,氮气流速 1.7 L·min⁻¹,进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 甘油三油酸酯

图 1 薏苡仁提取液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Coicis Semen extract

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取甘油三油酸酯对照品适量,加流动相配制 0.130 8 g·L⁻¹对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL,分别按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积的对数为纵坐标,得回归方程 $Y = 1\ 915X + 12.117$ ($r = 0.997\ 8$),线性范围 0.261 6~2.616 μg。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取各产地的薏苡仁粉末(过 50 目筛)0.6 g,分别置具塞锥形瓶中,精密加入乙腈-二氯甲烷(65:35)50 mL,称定质量,

浸泡 2 h, 超声处理(300 W, 50 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 用流动相补足损失的质量, 摇匀, 即得。

2.1.5 样品测定 取各产地薏苡仁的样品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算河北、辽宁、福建、贵州、山东产地薏苡仁中甘油三油酸酯质量分数分别为 0.91%, 1.14%, 0.82%, 0.77%, 1.09%, 符合 2010 年版《中国药典》要求。

2.2 总甘油三酯的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密吸取甘油三油酸酯对照品适量, 加异丙醇溶解并定容至 10 mL, 得 1.044 g·L⁻¹对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取各产地薏苡仁粉末(过 60 目筛)1.0 g, 加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 加异丙醇定容至 25 mL, 即得。

2.2.3 显色方法及检测波长的确定 精密量取对照品溶液和供试品溶液各 1 mL, 分别置于棕色具塞试管中, 各加入 10% 氢氧化钾溶液 1 mL, 50 ℃ 水浴反应 15 min, 冷却至室温, 加入 0.1 mol·L⁻¹氯化钾溶液 0.5 mL 和氧化试剂(2 mol·L⁻¹乙酸溶液和 0.05 mol·L⁻¹高碘酸钠溶液等体积混合而成)1 mL 反应 10 min, 反应结束后加入显色试剂(乙酰丙酮 0.5 mL, 异丙醇 30 mL, 2 mol·L⁻¹乙酸铵溶液 100 mL, 2 mol·L⁻¹乙酸溶液 60 mL)5 mL, 于 50 ℃ 反应 30 min, 冷却至室温。另精密吸取异丙醇 1 mL 按上述方法显色作为参比溶液, 于 350 ~ 500 nm 进行紫外-可见光谱扫描, 结果发现供试品溶液和对照品溶液均在 412 nm 处有最大吸收峰, 且阴性无干扰。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mL 于 2 mL 量瓶中, 加异丙醇稀释至刻度, 得系列对照品溶液, 按 2.2.3 项下条件显色, 在 412 nm 处测定吸光度(A), 以质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标, 得线性方程 $A = 1.407C - 0.128$ ($r = 0.9997$), 线性范围 0.208 8 ~ 1.044 g·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 精密量取 1.044 g·L⁻¹甘油三油酸酯对照品溶液 1.0 mL, 按 2.2.3 项下条件显色, 在 412 nm 处连续测定 6 次, 计算 A 的 RSD 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取河北产薏苡仁粉末 6 份, 每份 1.0 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 取供试品溶液 1.0 mL, 按 2.2.3 项下条件显色, 在 412 nm 处测定 A, 计算 RSD 0.8%, 表明该方法重

复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取河北产薏苡仁供试品溶液 1.0 mL, 按 2.2.3 项下条件显色, 于 412 nm 处在 1 h 内每隔 10 min 测定 1 次 A, 计算 RSD 0.2%, 表明供试品溶液在 1 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的河北产薏苡仁供试品溶液 6 份, 每份 0.5 mL, 各精密加入 0.522 g·L⁻¹甘油三油酸酯对照品溶液 0.5 mL, 混匀, 按 2.2.3 项下条件显色, 在 412 nm 处测定 A, 计算回收率 101.9%, RSD 4.9%, 表明本方法具有良好的回收率。

2.2.9 样品测定 分别精密吸取各产地薏苡仁样品溶液 1.0 mL, 按 2.2.3 项下条件显色与测定, 计算河北、辽宁、福建、贵州、山东产地的薏苡仁中总甘油三酯质量分数分别为 14.83, 10.88, 7.85, 5.26, 7.71 mg·g⁻¹。

2.3 不同产地薏苡仁体外抗肺癌活性评价

2.3.1 给药溶液的配制 精密称取各产地的薏苡仁粉末(过 60 目筛)10 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 400 μL 用磷酸盐缓冲液稀释至 4 mL, 得 40 g·L⁻¹给药溶液。

2.3.2 MTT 试验 将对数生长期的肺癌细胞 SPC-A-1 和 A549 用胰酶消化, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基分别配制成 13×10^4 , 5×10^4 个/mL 的细胞悬液, 接种到 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 培养 24 h, 弃去培养基, 每孔加入无血清培养基 90 μL 及不同质量浓度药液 10 μL, 最终药物质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16 g·L⁻¹, 乙醇最终体积分数 < 1%。阳性组给予 50 mg·L⁻¹顺铂溶液, 空白组给予等体积磷酸盐缓冲液。继续培养 36 h, 每孔分别加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL, 培养 4 h 后终止, 弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砷 100 μL, 振荡 10 min, 用酶标仪测定每孔 A, 检测波长 550 nm, 参比波长 690 nm, 平行测定 3 次, 按 $(1 - A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 计算药液对细胞生长的抑制率, 见图 2。利用 SPSS 11.5 软件推算河北、辽宁、福建、贵州、山东产薏苡仁对 A549 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 2.33, 2.77, 3.15, 3.24, 3.08 g·L⁻¹, 对 SPC-A-1 的 IC₅₀ 依次为 1.64, 2.15, 2.63, 3.01, 2.99 g·L⁻¹。结果表明不同产地薏苡仁提取液均具有一定的抗肿瘤活性, 但以河北产薏苡仁的活性最强。

3 讨论

研究发现各产地薏苡仁中甘油三油酸酯和总甘油三酯含量均存在一定差异。不同产地薏苡仁均具

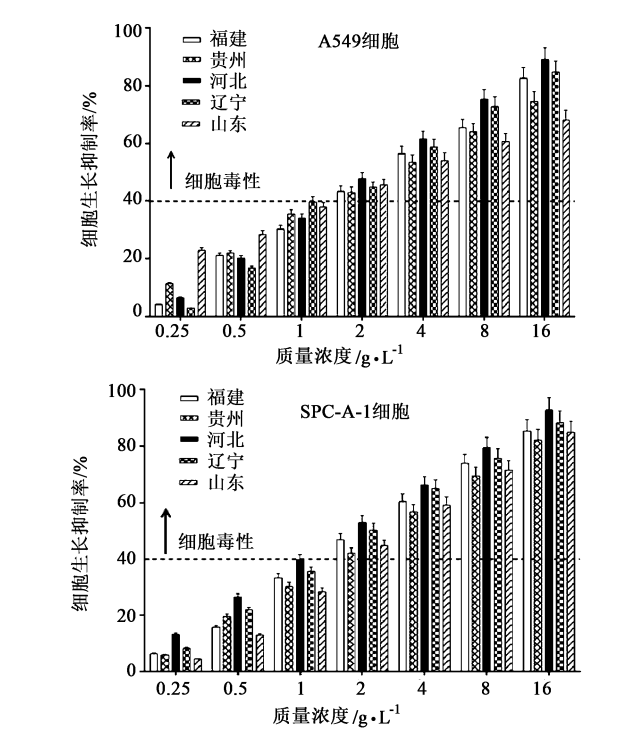


图 2 不同产地薏苡仁提取液对人肺癌细胞 A549 和 SPC-A-1 生长的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Growth inhibition rate of Coicis Semen extract from different regions on human lung cancer A549 and SPC-A-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

有一定抗肺癌活性,活性排序与总甘油三酯含量的排序一致,表明薏苡仁的抗肺癌活性与总甘油三酯含量呈正相关,与甘油三油酸酯的含量不具有相关性。在薏苡仁抗肿瘤活性的研究应用过程中,除了要按 2010 年版《中国药典》规定测定其甘油三油酸酯的含量,还应将总甘油三酯含量作为评价其质量与药效的 1 个重要指标。

本文利用甘油三酯经系列处理后,能与显色试剂发生反应而产生光谱吸收的原理,建立了 UV 测定薏苡仁中总甘油三酯含量的方法。试验设计原理为利用异丙醇配制一定质量浓度的甘油三酯溶液,

与 KOH 或 NaOH 溶液反应,使甘油三酯水解为甘油和脂肪酸,其中甘油在氯离子的协同作用下与氧化试剂发生氧化反应,反应产物与显色试剂发生反应,生成黄色的有机物质,该物质在 412 nm 处有最大光谱特征吸收峰,其颜色的深浅与甘油三酯含量成正比比例关系^[8-9]。该方法能够快速、准确测定油脂中甘油三酯含量,操作方便且成本较低,适用于实际生产过程中定量监测薏苡仁中甘油三酯的含量变化。

[参考文献]

[1] 陈新. 中药产地及采集季节对中药化学成分的影响[J]. 中国现代中药, 1999(3): 45-46.

[2] 田雪萍. 不同产地薏苡仁的质量评价[J]. 中医临床研究, 2011, 3(7): 4-6.

[3] 赵杨景, 杨峻山, 张聿梅, 等. 不同产地薏苡的经济性状和质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 694-696.

[4] 郑利, 陈丹, 曾令军, 等. UPLC-MS 测定不同产地薏苡仁中甘油三油酸酯的含量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(2): 200-204.

[5] 景俊杰, 李小玲, 南月清. 康莱特注射液对肿瘤治疗的作用研究进展[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(11): 1447-1448.

[6] 杜萌, 丁安伟, 陈彦. 薏苡仁化学成分及其防治肿瘤作用机制研究[J]. 吉林中医药, 2012, 32(2): 195-198, 201.

[7] 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: 353-354.

[8] 石海强, 何北海. 紫外-可见光谱测定马尾松纸浆树脂中甘油三酯含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(1): 135-138.

[9] 向智敏, 祝明, 陈碧莲, 等. HPLC-MS 分析薏苡仁油中的甘油三酯成分[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1436-1438.

[责任编辑 刘德文]