

文章编号:1671-6833(2016)03-0036-04

草乌多糖金属配合物的制备、表征与抗癌活性研究

张 茜<sup>1</sup>, 芮 瑞<sup>2</sup>, 李佩佩<sup>1</sup>, 冯翠宁<sup>1</sup>, 雷 强<sup>1</sup>, 龙 跃<sup>1</sup>

(1. 郑州大学 化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 锡林郭勒盟蒙医医院 内窥镜科, 内蒙古 锡林浩特 026000)

**摘 要:**以水为提取溶剂从草乌中提取草乌多糖(RPS),确定了多糖提取的最佳工艺条件:提取温度 90℃;提取时间 4 h;料液比 1:50,并以草乌多糖为配体,制备了 4 种多糖金属配合物(RPS-Ca、RPS-Zn、RPS-Cu、RPS-Fe).采用 MTT(噻唑蓝)法,以配体草乌多糖为对照,测定了 4 种多糖金属配合物对肝癌细胞(HepG2)、乳腺癌细胞(MCF-7)和结肠癌细胞(HT-29)的抑制作用.实验结果显示,草乌多糖铜配合物对 3 种癌细胞表现出最强的抑制作用.草乌多糖铜配合物的结构经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、圆二色谱(CD)、电镜扫描(SEM)和热重分析(TGA)得到表征.

**关键词:**草乌;多糖金属配合物;制备;表征;抗癌活性

**中图分类号:** O629.1      **文献标志码:** A      doi:10.13705/j.issn.1671-6833.2016.03.008

0 引言

草乌(Radix Aconiti Kusnezoffii)为毛茛科植物北乌头的干燥块根,是中医和蒙医的常用药<sup>[1-3]</sup>.草乌中含有多糖类<sup>[4]</sup>,而近年来研究发现,多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化和免疫调节等多种生物学活性,且抗肿瘤活性显著并对人体毒副作用小,因此,将多糖开发为新型抗肿瘤药物是目前抗肿瘤药物研究领域的热点<sup>[5]</sup>.

在对多糖结构进行修饰时,人们意识到多糖结构中所含有的羟基、氨基和羧基等基团可以与金属离子配位,形成多糖金属配合物,这样以多糖作为载体,不但保留了多糖和金属离子各自的活性类型,而且还可以使其活性增强,减少其毒副作用,缩小产品体积<sup>[6-8]</sup>.铜配合物不仅具有抗癌活性,还具有抗炎、抗溃疡、抗抽搐、抗糖尿病和抗诱变剂等作用<sup>[9]</sup>.

笔者前期已经研究了草乌中氨基酸的含量和种类<sup>[10]</sup>,且有关草乌及草乌多糖研究的文献比较多,但草乌多糖与金属离子作用形成多糖金属配合物目前还未见报道.笔者采用水为提取溶剂和Savage溶剂除蛋白的方法从草乌中提取多糖,并优化了提取工艺,将草乌多糖与金属离子配位合成出 4 种草乌多糖金属配合物.通过抗癌活性实

验,筛选出的草乌多糖铜配合物对 3 种癌细胞表现出最强的抑制作用,并对其结构进行了表征.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

草乌(购自内蒙古通辽市);氢氧化钠、无水乙醇、丙酮、无水乙醚、氯化锌、氯化钙、氯化铜和氯化铁均为市售分析纯;测试所用肿瘤细胞购自中国科学院上海生命科学研究院.

循环水式多用真空泵(SHB-Ⅲ)、电子天平(CP214)、旋转蒸发器(RE5299)、透析袋(MD34)、紫外分光光度计(Perkin Elmer)、傅里叶变换红外光谱仪(Vector 22)、圆二色光谱仪(Applied Photophysics Ltd)、电镜扫描仪(JSM-7100F)、热重分析仪(STA7300).

1.2 实验方法

1.2.1 草乌中多糖的提取

将草乌样品粉碎后,过 250 μm 分子筛,乙醇回流脱脂 3 h,将其滤渣晾干备用.称取一定量干燥脱脂后的草乌样品按照一定料液比(草乌样品质量与提取溶液体积之比)加入提取溶剂(水、0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl),在一定温度下(60~100℃)提取 2~6 h,过滤,合并提取液,浓缩至原体积的 1/5.将 5 倍量的乙醇加入到上述浓缩液中静置

收稿日期:2015-09-20;修订日期:2015-11-26

基金项目:河南省科技攻关计划资助项目(0624420031);河南省基础研究基金资助项目(022463001)

通信作者:龙跃(1960—),男,湖南长沙人,郑州大学教授,主要从事药物合成及天然有机化学研究,E-mail: longyue@zzu.edu.cn.

24 h,过滤,用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤沉淀,干燥.将固体用适量热水溶解,转移至分液漏斗中,加入 1/3 体积 Sevae 溶剂除蛋白质(Sevae 溶剂组成为氯仿和正丁醇的摩尔比为 4:1),分出上层液体,加入 5 倍量乙醇沉淀 24 h,过滤,并用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥,得粗制多糖,称重,计算收率.

1.2.2 草乌多糖的纯化

将粗制多糖用少量热水溶解,转移至透析袋中用去离子水透析 2 d.透析过程中需每 12 h 换水一次.透析完毕后,将袋中液体倒入烧杯中,加入 5 倍量乙醇沉淀 24 h,过滤,并用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥,得到精品多糖.

1.2.3 多糖金属配合物的制备

取精品多糖 0.5 g 加入 15 mL 水溶解,用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH 值在 8.0 ~ 8.5,在 70 ℃ 水浴下搅拌,并缓慢滴加 2 mol/L 氯化铜溶液.当出现絮状沉淀时立即停止滴加,反应 1 h 后冷却至室温离心,取其上清液.向上清液中加入 5 倍体积的乙醇沉淀 24 h,过滤,并用乙醇、丙酮洗涤、干燥得粗制品 0.52 g,然后,将粗制的多糖金属配

合物溶于 20 mL 去离子水中透析 3 d.透析过程中需要不断换水.透析完毕后,将袋中液体倒入烧杯中,加入 5 倍量乙醇沉淀 24 h,过滤,并用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤,干燥,得到精制草乌多糖铜配合物 0.48 g.钙(Ⅱ)、锌(Ⅱ)、铁(Ⅲ)配合物的制备与上述方法相同.

2 抗癌活性的测定

2.1 实验中所用的肿瘤细胞

所用的肿瘤细胞:人肝癌细胞(HepG2)、乳腺癌细胞(MCF-7)和结肠癌细胞(HT-29).实验细胞均用改良的 RPMI-1640 培养基(含 10% 的胎牛血清和 1% 的双抗)在 37 ℃ 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养(95% 的氧气,5% 的 CO<sub>2</sub>,保持在适当的湿度).

2.2 抗癌活性的测定

采用 MTT 法染色原理,向每孔中加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL.4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,置于摇床摇 10 min 使结晶物溶解.在酶标仪上测其吸光度值 A(λ = 490 nm),结果以复孔 A 的均值表示.对测得的数值进行处理,计算抑制率,结果见表 1.

表 1 多糖金属配合物对癌细胞的抑制率  
Tab. 1 Growth inhibition rates of cancer cell lines with polysaccharide metal complexes %

化合物	人肝癌细胞(HEPG2)		乳腺癌细胞(MCF-7)		结肠癌细胞(HT-29)	
	100 μg/ml	200 μg/ml	100 μg/ml	200 μg/ml	100 μg/ml	200 μg/ml
RPS	22.80	48.55	4.68	3.13	2.65	5.22
RPS-Ca	35.60	51.46	3.60	6.91	27.14	33.13
RPS-Zn	40.77	55.91	10.11	14.09	27.13	60.40
RPS-Cu	47.78	68.98	25.73	35.29	46.13	62.77
RPS-Fe	15.30	28.20	<0	19.31	14.20	26.20

3 结果与讨论

3.1 提取条件的选择

3.1.1 提取溶剂的选择

按照一定料液比 1:40,分别以水、0.5 mol/L NaOH、0.5 mol/L HCl 为提取溶剂,100 ℃ 提取 3 h,计算粗制多糖收率,结果见图 1.

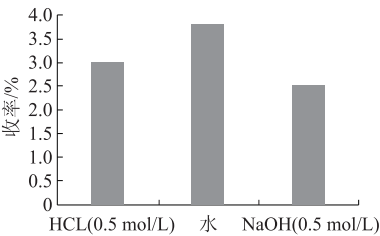


图 1 不同溶剂的影响  
Fig. 1 Effect of different solvents

由图 1 可以看出,水溶剂提取多糖的收率最大,因此,选定水为提取溶剂.

3.1.2 料液比的选择

以水为提取溶剂,料液比分别为 1:20、1:30、1:40、1:50 和 1:60,100 ℃ 提取 3 h,计算粗制多糖收率,结果见图 2.

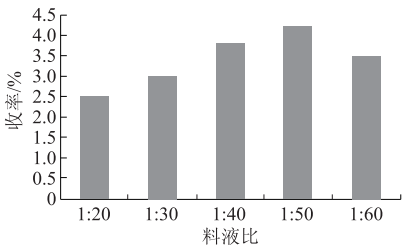


图 2 料液比的影响  
Fig. 2 Effect of ratio of material to liquid

由图 2 的结果可知,当料液比为 1:50 时,多糖的收率最大;当料液比小于 1:50 时,收率随着料液比的增加而增大;当料液比超过 1:50 时,收率减小.

### 3.1.3 提取温度的选择

以水为提取溶剂,料液比为 1:50,分别于 60、70、80、90、100 °C 提取 4 h,计算粗制多糖收率,结果见图 3. 由图 3 的结果可知,当提取温度由 60 °C 增加到 90 °C 时,多糖收率增加明显;当温度高于 90 °C 后,多糖收率增加趋势减缓,因此,选择 90 °C 为提取温度.

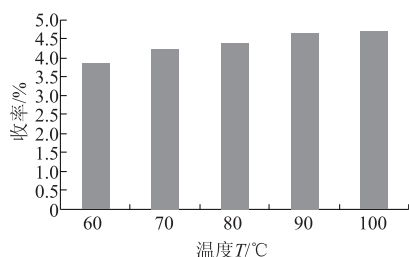


图 3 提取温度的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature

### 3.1.4 提取时间的选择

以水为提取溶剂,料液比为 1:50,90 °C 下提取 2、3、4、5、6 h,计算粗制多糖收率,结果见图 4.

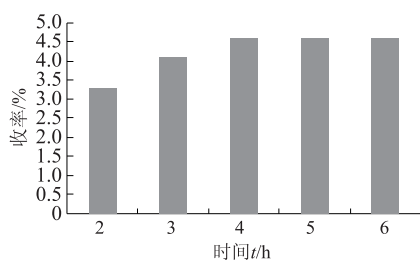


图 4 提取时间的影响

Fig.4 Effect of extraction time

由图 4 的结果可知,当提取时间由 2 h 增加到 4 h 时,多糖收率增加明显;4 h 后多糖收率增加趋势减缓,因此,选择 4 h 为提取时间.

## 3.2 抗癌活性结果

在合成的 4 种多糖金属配合物中,多糖钙配合物、多糖锌配合物和多糖铜配合物相对于草乌多糖对 3 种癌细胞的抑制率都有很大提高,其中多糖铜配合物的抑制作用最大. 而多糖铁配合物相对于草乌多糖对人肝癌细胞 (HepG2) 的抑制率有所降低,且浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时对乳腺癌细胞 (MCF-7) 几乎没有表现出抑制活性.

## 3.3 多糖金属配合物的表征

草乌多糖和草乌多糖铜配合物的红外光谱如图 5 所示. 草乌多糖红外光谱图主要吸收峰的归属:3 420  $\text{cm}^{-1}$  处为—OH 的伸缩振动吸收峰;1 732  $\text{cm}^{-1}$  处为羰基的伸缩振动吸收峰;1 649.82  $\text{cm}^{-1}$  处为—OH 的弯曲振动吸收峰. 草乌多糖铜配合物的红外光谱图中主要吸收峰的归属:3 416  $\text{cm}^{-1}$  处为—OH 的伸缩振动吸收峰,与多糖相比发生少量红移;1 648  $\text{cm}^{-1}$  处为羰基的伸缩振动吸收峰;1 623  $\text{cm}^{-1}$  处为—OH 的弯曲振动吸收峰,与多糖相比发生了明显的红移.

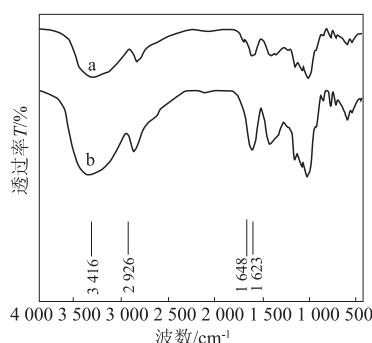


图 5 草乌多糖 (a) 和草乌多糖铜配合物 (b) 的红外光谱

Fig.5 IR spectra of RPS (a) and RPS-Cu (b)

草乌多糖和草乌多糖铜配合物的紫外光谱如图 6 所示. 可以看出,草乌多糖的最大吸收波长在 237 nm 处,与铜离子作用后最大吸收波长减小为 228 nm,这是由于形成配合物之后影响了电子的跃迁,从而导致最大吸收波长发生改变.

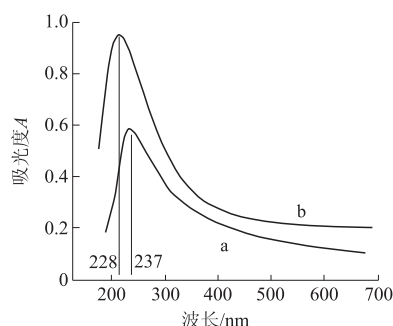


图 6 草乌多糖 (a) 和草乌多糖铜配合物 (b) 的紫外光谱

Fig.6 UV spectra of RPS (a) and RPS-Cu (b)

观察草乌多糖和草乌多糖金属铜配合物的 CD 谱如图 7 所示. 由图 7 可以发现,波长在 200 ~300 nm 时谱图变化较为明显,波长在 248 nm 附近铜配合物出现负 Cotton 效应,而多糖并没有此种效应.

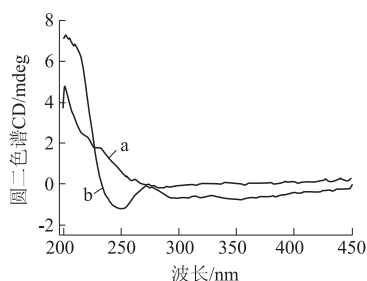


图7 草乌多糖(a)和草乌多糖铜配合物(b)的圆二色光谱

Fig. 7 CD spectra of RPS(a) and RPS-Cu(b)

扫描电镜是定性分析、表征化合物表面形貌的重要手段之一. 草乌多糖和草乌多糖铜配合物的扫描电镜图如图8所示. 从图8可以看出, 配体草乌多糖呈交联网状, 与铜离子配位后, 呈颗粒状, 配位前后, 表面形貌发生了显著的变化.

草乌多糖和草乌多糖铜配合物的热重曲线如图9所示. 从图9可以看出, 草乌多糖的第一段质

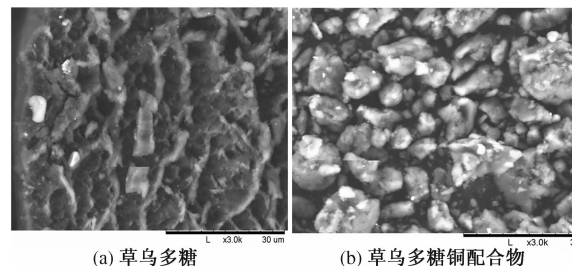
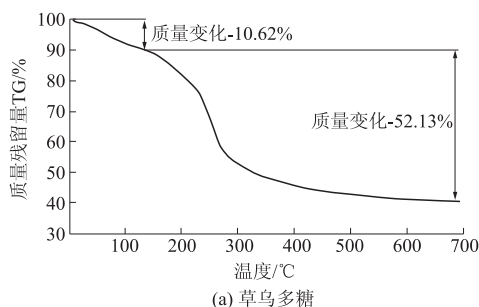
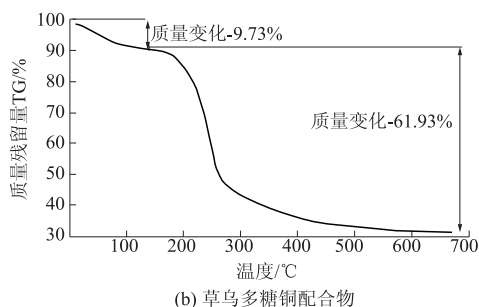


图8 草乌多糖(a)和草乌多糖铜配合物(b)的扫描电镜显微图

Fig. 8 SEM micrographs of RPS(a) and RPS-Cu(b)



(a) 草乌多糖



(b) 草乌多糖铜配合物

图9 草乌多糖和草乌多糖铜配合物的热重曲线

Fig. 9 TGA of RPS(a) and RPS-Cu(b)

## 4 结论

确定了草乌中多糖提取的最佳工艺条件: 提取溶剂为水, 提取温度 90 °C, 提取时间 4 h, 料液比 1:50. 通过体外抗癌活性筛选结果发现, 实验合成了4种草乌多糖金属配合物, 且4种草乌多糖金属配合物除草乌多糖铁外, 其余均表现出比草乌多糖高的抑制活性, 其中草乌多糖铜配合物对3种肿瘤细胞的抑制作用最强. 除此之外, 其结构经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、圆二色谱(CD)、电镜扫描(SEM)和热重分析(TGA)得到表征.

## 参考文献:

- [1] 肖培根. 川乌草乌附子[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2000.
- [2] 李正邦, 吕光华, 陈东林, 等. 草乌中生物碱的化学研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(1): 9-10.
- [3] 陈嫵, 朱元龙, 朱任宏. 中国乌头的研究[J]. 药学报, 1965, 12(7): 435-436.
- [4] 孙玉军, 陈彦, 吴佳静. 草乌多糖的分离纯化和组

量损失在小于 177 °C (质量损失 10.62%), 草乌多糖铜配合物的第一段质量损失在小于 216 °C (质量损失 9.73%), 通过对比草乌多糖及其配合物的热重曲线可以看出, 形成配合物后, 多糖的热稳定性增加. 综合以上结果, 可以说明多糖与金属离子发生了配位.

成性质研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(11): 731-732.

- [5] 林俊, 李萍, 陈靠山. 近5年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1116-1120.
- [6] 柴晓华, 王飞利, 黄洁. 金属药物研究新进展[J]. 化学试剂, 2008, 30(2): 99-103.
- [7] 王晓晖, 白海泉, 乌兰格日乐. 多糖金属配合物的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2014, 29(5): 516-518.
- [8] ZHU Yang, CHEN Yao, LI Qian, et al. Preparation, characterization, and anti-Helicobacter pylori activity of  $\text{Bi}^{3+}$ -Hericium erinaceus polysaccharide complex [J]. Carbohydrate polymers, 2014, 110: 231-237.
- [9] 尹富玲, 申佳, 邹佳嘉, 等. 2,2'-联吡啶和去甲基斑蝥酸根桥联双核铜(II)配合物的合成、结构表征及抗癌活性的研究[J]. 化学学报, 2003, 61(4): 556-561.
- [10] 姚学文, 黄丽华, 雷强, 等. 内蒙古草乌中氨基酸提取工艺的研究及测定[J]. 郑州大学学报(理学版), 2014, 46(4): 97-100.

(下转第43页)