

文章编号:1673-1689(2009)05-0637-05

3-甲磺酰基丙基异硫代氰酸酯的 提取分离与抗肿瘤的体外试验

王伟, 苏光耀, 沈莲清*

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

摘要: 为了得到具有抗癌有活性的、较高纯度的 3-甲磺酰基丙基异硫代氰酸酯(iberin), 作者研究了 iberin 的提取、分离及纯化工艺。确定了以丙酮为溶剂, 从甘蓝种子的硫苷酶解产物中超声提取 iberin 粗提物, 并用 GC-MS 鉴定其结构, 再依次通过正相硅胶柱与 Sephadex LH-20 凝胶柱分离提纯得到 iberin 样品, HPLC 测定其纯度为 80.9%。采用体外细胞筛选试验研究 iberin 的抗肿瘤活性, 结果显示 iberin 对小鼠白血病细胞 P388 和人鼻咽癌细胞 CNE 均有很强的抑制效果。

关键词: 甘蓝种子; 异硫代氰酸酯; Iberin; 提取分离; 抗肿瘤活性

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

Studies on Purification and Antitumor in Vitro Experiment of Iberin

WANG Wei, SU Guang-yao, SHEN Lian-qing*

(College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: In order to obtain anticancer and high purified 3-methylsulpropane isothiocyanate (iberin), the extraction, separation and purification of iberin obtained from enzymatic hydrolysates of glucosinolates in cabbage seed were carefully investigated. The iberin was ultrasonic extracted from cabbage seed with acetone and then determined by GC-MS. The extract were separated and purified by using the silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. The purity of iberin was 80.9%, which was determined by high performance liquid chromatograph (HPLC). Moreover, the antitumor effects of iberin were also tested. The results present here demonstrated that iberin exhibited a higher inhibition effect on the proliferation of P388 and CNE tumor cell.

Key words: cabbage seed, isothiocyanate, iberin, extraction and purification, antitumor activity

甘蓝类植物(*Brassica oleracea* L) 是十字花科(Cruciferae) 芥属(*Brassicaceae*) 的一个种, 起源于地中海沿岸和西北欧的海滨^[1]。甘蓝属蔬菜是全世界栽培历史最长、种植面积最广的十字花科蔬菜,

原料易得且具有较强的防癌作用, 因为十字花科植物中含有比较丰富的硫代葡萄糖苷(Glucosinolate), 它是一种含硫含氮的阴离子亲水性植物次生代谢产物, 可被芥子酶(myrosinase) 或胃肠道中细

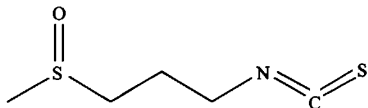
收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 浙江省政府重大科技专项招标项目(2004C12005)。

* 通讯作者: 沈莲清(1946-), 女, 江苏苏州人, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品加工及天然活性物质提取方面的研究。Email: zjlqshen@163.com

菌酶降解生成异硫代氰酸酯、硫代氰酸酯、腈类化合物、噻唑烷硫酮等化合物^[2-3]。其中异硫代氰酸酯具有高度的生物活性^[4],已经证实异硫代氰酸酯可增加或上调一些解毒酶的活性,促进清除致癌物,降低癌症发生的危险,具有防癌作用^[5-6]。美国科学家瓦特伯格博士是第一个发现十字花科甘蓝属蔬菜具有防癌作用的科学家。早在1977年他就发现从包心菜中提取的异硫氰酸酯类化合物可抑制由致癌物诱发的小鼠恶性肿瘤。大多数研究者认为,异硫代氰酸酯是通过了对致癌物的代谢调控机制起作用^[7-8]。

3-甲磺酰基丙基异硫代氰酸酯(Iberin)是3-甲磺酰基丙基硫代葡萄糖苷(Glucoiberin)经黑芥子酶水解或酸水解产生的一类异硫代氰酸酯^[9],相对分子质量为163.30,分子式 $\text{CH}_3\text{SOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}$,结构式为:



作者以鸡心甘蓝种子为原料,利用植物种子本身内在的芥子酶,研究了甘蓝种子中硫苷的酶解产物异硫代氰酸酯的提取、分离和纯化工艺,并鉴定其结构。通过研究溶剂、超声对iberin提取的影响,确定了提高iberin含量的提取工艺,此外采用体外细胞筛选试验研究iberin的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 原料

鸡心甘蓝种子:杭州市种子分公司购买;Iberin标样:SIGMA公司产品。

1.2 试剂

甲醇:MERCK公司产品,为色谱纯;丙酮,正己烷,浓盐酸试剂:杭州华东化工试剂有限公司产品,均为分析纯;200~300目柱层析硅胶:青岛海洋化工厂生产;Sephadex™ LH-20;安玛西亚公司产品。

1.3 仪器

SK5200LH超声仪:上海科导仪器有限公司制造;LOOYE ZX98-1旋转蒸发器:上海申胜仪器厂制造;BSZ-100自动部分收集器:上海沪西分析仪器有限公司制造;LGJ-10冷冻干燥机:北京四环科学仪器厂制造;Shimadzu LC-20A高效液相色谱仪:日本岛津公司制造;Trace 2000 GC/DSQ MS:美国热电公司,配有NIST V2.0谱库。

1.4 检测方法

1.4.1 HPLC检测条件 色谱柱:Shimadzu RP-

18C(250 mm×4.6 mm带预柱);检测波长:201 nm;流动相: $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=4:6$;流速:0.8 mL/min;柱温:25℃;进样量:10 μL;检测时间:20 min。

1.4.2 GC-MS检测条件 色谱柱:HP-5ms石英毛细管柱(15 m×0.25 mm×0.25 μm);载气:高纯氮气,恒流流速;进样口温度:250℃;升温程序:50℃保持2 min,然后以10℃/min升温至250℃,保持8 min。GC-MS接口温度250℃,扫描范围35~500 amu,扫描频率2次/s,EI离子源温度200℃,EI能量70 eV。

1.5 实验方法

1.5.1 Iberin的制备与提取工艺的优化

1) 硫苷的酶解:参照文献^[10]中硫苷最佳酶解条件进行酶解。1 000 g甘蓝种子机械粉碎后,添加2 000 mL蒸馏水和20 mg抗坏血酸,用盐酸调节至pH 4,搅拌后用保鲜膜封好,置于摇床(25℃,200 r/min)中酶解8 h。将酶解好的样品冷冻干燥,得到种子粉末待用。由于种子粉末中iberin的含量比较低,作者通过对提取工艺的优化提高iberin的提取率。

2) 不同溶剂对提取率的影响:准确称取3份2 g的干燥粉末,然后分别加入40 mL的二氯甲烷、丙酮、乙酸乙酯作为提取溶剂,在摇床中浸提8 h,过滤,浓缩滤液。浓缩物加2 mL水定溶后过0.22 μm水系滤膜,HPLC定量分析,求出各个样品中iberin的提取率,通过提取率的大小比较不同溶剂的提取效果,确定提取溶剂。

3) 超声时间对提取率的影响:准确称取9份2 g的干燥粉末,每份都加入40 mL丙酮,分别超声提取15、30、45、60、75、90、105、120 min,其中一份作为对照在摇床中浸提8 h,过滤,浓缩滤液。浓缩物加2 mL水定溶后过0.22 μm水系滤膜,HPLC定量分析,求出iberin的提取率,通过提取率的大小比较超声提取和摇床提取的效果并确定超声提取时间。

4) Iberin的提取:剩余的干燥粉末加20 L丙酮,超声提取,抽滤除去粉末,粉末再用10 L丙酮超声提取,合并两次丙酮浸提液,浓缩并回收溶剂,浓缩物用正己烷充分脱脂后得到硫苷酶解粗提物。用HPLC和GC-MS定性、定量检测粗提物中iberin的含量,粗提物用于进一步的分离纯化。

1.5.2 Iberin的分离 粗提物用少量丙酮溶解后,湿法上硅胶层析柱(4 cm×70 cm,柱体积800 mL),再依次用 $V(\text{正己烷}):V(\text{丙酮})=5:5,4:6,3:7$ 共3个梯度的洗脱剂系统进行洗脱,每个梯度的洗

脱体积为 5 L,调到最大流速 15 mL/min 左右,每 250 mL 收集 1 瓶。用 GF₂₅₄ 硅胶板对收集物进行 TLC 分析,根据结果合并含有 iberin 的馏分, HPLC 检测 iberin 的纯度。

1.5.3 Iberin 的纯化 采用 Sephadex LH-20 凝胶层析柱(2.5 cm×100 cm,柱体积 400 mL)对粗样品进一步纯化。浓缩的 iberin 粗样品用少量丙酮溶解,过 0.22 μm 的有机膜除去杂质后上样。以丙酮为洗脱液,洗脱体积为 400 mL,控制流速为 20 s/滴,部分收集器每 2 h 收集 1 管,用 GF₂₅₄ 硅胶板对收集物进行 TLC 分析,根据结果合并含有 iberin 的馏分, HPLC 检测 iberin 的纯度。

1.5.4 体外抗肿瘤活性研究—MTT 法

1) 受试物:纯化后的 iberin 样品(纯度>80%),以适量 DMSO 溶解,临用时以无血清 DMEM 稀释至所需浓度,DMSO 终浓度低于 0.1%。

细胞株及培养条件:人宫颈癌 HeLa 细胞、人骨髓细胞白血病 HL-60 细胞、人鼻咽癌 CNE 细胞和人前列腺癌 PC3 细胞购自中科院上海细胞库;小鼠白血病 P388 细胞由浙江大学孙红祥教授馈赠。上述肿瘤细胞用含 10% 新生牛血清、40 U/mL 庆大霉素的 DMEM 培养液,于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

2) 体外肿瘤细胞增殖抑制试验^[11]:取对数生长期肿瘤细胞,调整细胞悬液浓度,每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,接种 24 h 后给药(100 μL/孔),分别设空白对照组、细胞对照组以及 5 个质量浓度受试物组。继续培养 72 h 后每孔加入 100 μL MTT (质量浓度 1 mg/mL,以 DMEM 培养液溶解),37℃培养 4 h,弃去各孔内液体后加入 150 μL 酸化异丙醇(含 0.04 mol/L HCl),避光放置 30 min,DG3022A 型酶联免疫检测仪测定 570 nm 处吸光度,计算不同质量浓度受试物对肿瘤细胞的体外增殖抑制率,并以孙瑞元教授编写的 NDST(New Drug Statistical Treatment)计算机程序计算受试物对肿瘤细胞增殖(72 h)的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2 结果与讨论

2.1 Iberin 提取工艺的优化

2.1.1 不同溶剂对提取率的影响 目前提取异硫代氰酸酯常用溶剂是二氯甲烷,提取效果比较好,但缺点是毒性较大。由于异硫代氰酸酯极性较小,常用的溶剂有丙酮和乙酸乙酯,试验结果见图 1。丙酮的提取效果跟二氯甲烷差不多,但毒性小、沸点低、易于旋转蒸发,可以缩短提取时间。而乙酸

乙酯提取效果不如二氯甲烷和丙酮,所以选用丙酮作为提取溶剂。

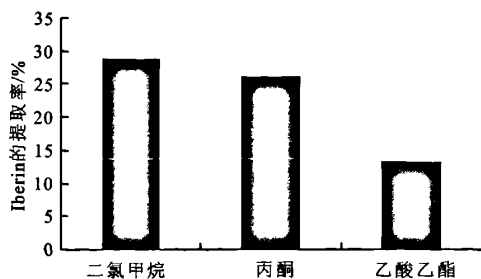


图 1 不同溶剂对 iberin 提取率的影响

Fig. 1 Effect of different solvents on extraction of iberin

2.1.2 超声时间对提取率的影响 种子经机械粉碎,由于有些细胞没有完全被破碎,酶解后有很多异硫代氰酸酯残留在细胞内,一般的提取方法就很难将细胞内的 iberin 提取出来,而超声提取就有这方面的优势。超声提取原理是利用超声波产生的强烈振动、空化效应、粉碎等作用使细胞破碎,将细胞内所含成分提取到溶剂中。

采用摇床浸提 8 h 的方法,iberin 的提取率为 28.6%。超声时间对 iberin 提取的影响见图 2。由图 2 可见,超声提取能够提高异硫代氰酸酯的提取率,超声 30 min 后 iberin 的提取率达到 28.3%。iberin 的提取率随超声时间的增加而增大,到 75 min 时 iberin 的提取率达到最高,为 39.0%,但过 75 min 后提取率开始减少,因此超声时间控制在 75 min 内较为合适。有研究表明:在超声提取过程中,异硫代氰酸酯在丙酮溶液中是稳定的。这种现象可能是由于温度对 iberin 的稳定性有影响,超声时间过长或温度升高会导致其部分分解。根据实验结果确定种子粉末用丙酮超声提取 75 min。

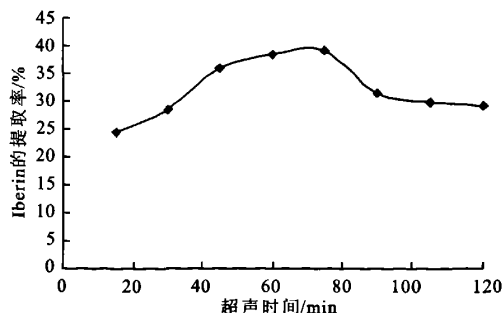


图 2 超声时间对 iberin 提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic time on extraction of iberin

2.1.3 提取工艺流程的确定 甘蓝种子→粉碎→酶解 8 h→冷冻干燥→丙酮超声提取 75 min,提取二次→抽滤合并两次滤液→浓缩→浓缩物正己烷脱脂→硫苷酶解粗提物。

2.2 硫苷酶解粗提物的 HPLC 检测

Iberin 标品的 HPLC 分析结果见图 3。用 HPLC 分析测定样品,分别以保留时间和峰面积对样品中 iberin 进行定性和定量分析。硫苷酶解粗提物的 HPLC 检测结果见图 4,对照标品的出峰时间,初步确定样品中含有 iberin。

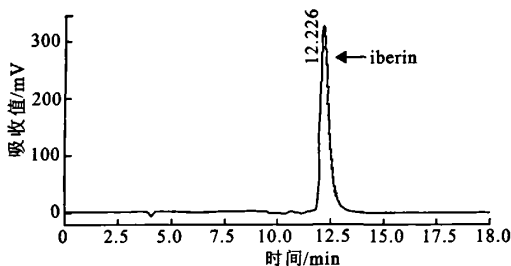


图 3 Iberin 标品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograph of standard iberin

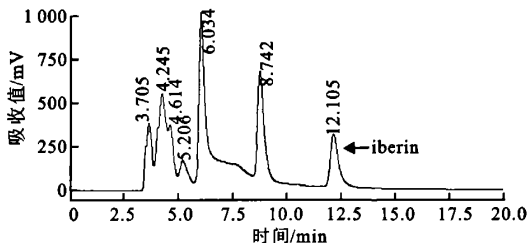


图 4 硫苷酶解产物的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatograph of enzymatic hydrolysates of glucosinolates

2.3 硫苷酶解粗提物的 GC-MS 检测

硫苷酶解粗提物的 GC 图谱见图 5。图 5 中保留时间为 11.92 min 的化合物经在线计算机谱库检索,并根据有机化合物质谱断裂的一般规律和有关数据进行定性(将该化合物的质谱图与标准质谱图对照),确定硫苷酶解粗提物中含有 iberin,其谱库检索相关性达到 90.87%,相对丰度为 45.35%。

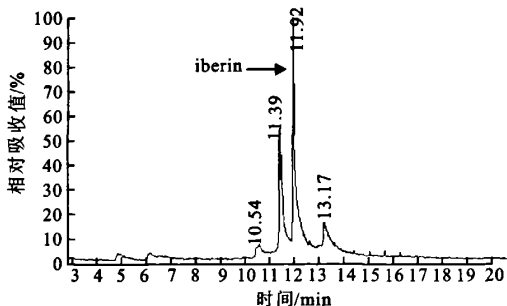


图 5 硫苷酶解粗提物的 GC 图谱

Fig. 5 GC chromatograph of enzymatic hydrolysates of glucosinolates

2.4 Iberin 的分离

大约 8 g 的 iberin 粗提物上硅胶层析柱,梯度

洗脱后,共收集 60 瓶。浓缩每瓶收集物,用硅胶板对收集物进行 TLC 分析,合并含有 iberin 的馏分, HPLC 分析 iberin 样品的纯度,结果见图 6。根据在 201 nm 下 iberin 对应的峰面积的百分比,得出样品中 iberin 的纯度为 51.5%。

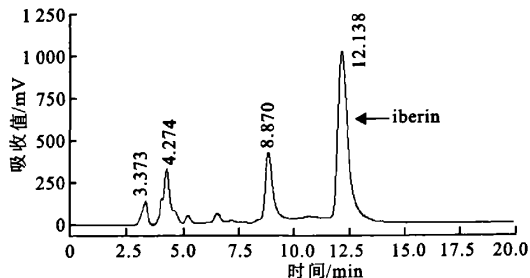


图 6 硅胶层析柱分离后 iberin 粗样品的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatograph of iberin sample separated by silica gel column chromatography

2.5 Iberin 的纯化

经硅胶柱层析分离得到的 iberin 粗样品上 Sephadex LH-20 凝胶层析柱进一步纯化,共收集 40 管馏分,用 GF₂₅₄ 硅胶板对收集物进行 TLC 分析。合并含有 iberin 的馏分,用 HPLC 分析 iberin 的纯度,结果见图 7。图 7 中杂质峰较少,说明该馏分中杂质比较少,iberin 的纯化效果较好。根据 201 nm 处 iberin 对应峰面积的百分比,得出该馏分中 iberin 的纯度为 80.9%。

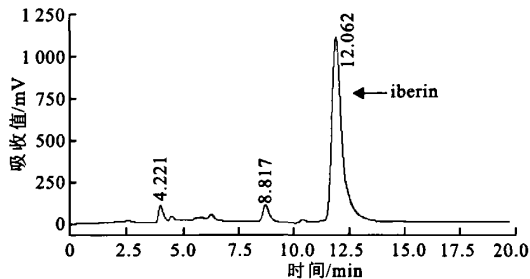


图 7 Sephadex LH-20 凝胶层析柱纯化后 iberin 样品的 HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC chromatograph of iberin sample purified by Sephadex LH-20 gel column chromatography

2.6 Iberin 的体外抗肿瘤活性

选用人宫颈癌 HeLa 细胞、人骨髓细胞白血病 HL-60 细胞、人鼻咽癌 CNE 细胞、人前列腺癌 PC3 细胞、小鼠白血病 P388 细胞,用质量浓度分别为 0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 $\mu\text{g/mL}$ 共 5 个剂量的受试药物作用于肿瘤细胞,72 h 后各组的肿瘤细胞抑制率见表 1。

以孙瑞元教授编写的 NDST(New Drug Statistical Treatment)计算机程序计算受试物对肿瘤细胞增

殖(72 h)的半数抑制浓度(IC₅₀),结果见表 2。

表 1 Iberin 对不同肿瘤细胞株的抑制作用
Tab. 1 Inhibition effects of iberin on different tumor cell lines

抑制率/%	受试药物剂量/(μg/mL)				
	0. 625	1. 250	2. 500	5. 000	10. 000
HeLa	11.9 ± 6.3	18.1 ± 5.2	29.9 ± 2.3	58.0 ± 10.5	74.3 ± 2.1
HL-60	0.0 ± 3.7	4.5 ± 2.5	28.7 ± 16.7	78.9 ± 13.2	91.8 ± 1.6
CNE	0.8 ± 3.5	9.0 ± 9.8	52.9 ± 2.6	85.7 ± 3.6	83.0 ± 9.0
PC3	-1.8 ± 2.7	7.8 ± 0.4	14.6 ± 3.9	51.4 ± 2.2	68.9 ± 7.8
P388	21.9 ± 2.6	30.9 ± 5.1	46.4 ± 2.0	62.6 ± 0.8	82.4 ± 1.1

表 2 Iberin 对不同肿瘤细胞的 IC50 (72 h)
Tab. 2 IC₅₀ (72 h) of iberin on different tumor cell

肿瘤细胞	IC ₅₀ /(μg/mL)
HeLa	3.79 ± 0.14
HL-60	3.45 ± 0.66
CNE	2.77 ± 0.37
PC3	5.27 ± 0.46
P388	2.65 ± 0.08

试验结果显示,iberin 对多种肿瘤细胞株(HeLa、HL-60、CNE、PC3 以及 P388 细胞)均有体外增殖抑制活性。其中对小鼠白血病细胞 P388 和人鼻咽癌细胞 CNE 抑制作用最强,其次对人宫颈癌细胞 Hela 和人白血病细胞 HL-60 也有很强的抑制,对人前列腺癌细胞 PC3 抑制作用较弱。

参考文献(References):

[1] 刘英,王超. 简述甘蓝类植物的起源及分类[J]. 北方园艺, 2006, (3): 58-60.
LIU Ying, WANG Chao. The origin and classification of *Brassica oleracea* L[J]. *Northern Horticulture*, 2006, (3): 58-60. (in Chinese)

[2] Steven F V, Mark A B. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation and purification[J]. *Industrial Crops and Products*, 2005, 21: 193-202.

[3] 段礼新,陈芳. 天然硫苷化合物的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37: 111-114.
DUAN Li-xin, CHEN Fang. Research progress of natural glucosinolate[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, 37: 111-114. (in Chinese)

[4] 孙静,黄建. 十字花科蔬菜的防癌作用[J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(1): 19-24.
SUN Jing, HUANG Jian. The effects of prevention of cancer by cruciferous vegetables[J]. *Foreign Medical Science Hygiene*, 2003, 30 (1): 19-24. (in Chinese)

[5] 吕静,陶文沂,程景才等. 十字花科蔬菜提取物抗肿瘤作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 27(4): 105-109.
LU Jing, TAO Wen-yi, Chen Jing-cai, et al. Antitumor effects of extract from cruciferous vegetables[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 27(4): 105-109. (in Chinese)

[6] Maria T, Richard M. Glucosinolates, isothiocyanates and human health[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 5: 1568-1572.

[7] J Alan A Renwick, Meena H, Sandrine G, et al. Isothiocyanates stimulating oviposition by the diamondback moth, *Plutella xylostella*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2006, 32: 755-766.

[8] Maria E C, Pablo V. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 7: 213-229.

[9] Golge S, Julietta M, Ruth M C, et al. High glucosinolate *Broccoli*: a delivery system for sulforaphane[J]. *Mol Breeding*, 2006, 18: 219-228.

[10] 苏光耀, 沈莲清, 王向阳, 等. 西兰花籽中硫代葡萄糖苷酶解条件的研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23 (2): 179-182.
SU Guang-yao, SHEN Lian-qing, WANG Xiang-yang, et al. Enzymatic hydrolysis conditons of glucosinolate in *Broccoli* seeds[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2008, 23 (2): 179-182.

[11] Zheng X L, Sun H X, Liu X L, et al. Stilbic acid induced COLO205 cell apoptosis by regulating bcl-2 and bax expression and activating caspase-3[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(8): 1090-1095.

(责任编辑:李春丽)