

基于中药整体性的红豆杉抗乳腺癌活性成分筛选方法研究

薛 雪¹, 朱龙平², 杨得坡², 赵志敏^{2*}

1. 广东食品药品职业学院药学院 药学教研室, 广东 广州 510520

2. 中山大学药学院 生药与天然药化实验室, 广东 广州 510006

摘要:目的 基于中药整体性建立 2 种红豆杉抗乳腺癌活性成分筛选方法: 中空纤维细胞捕获结合高效液相色谱法 (HFCF-HPLC)、细胞捕获-分散液相微萃取结合高效液相色谱法 (CF-DLLME-HPLC)。方法 HFCF-HPLC 是在模拟人体内环境状态下, 将人乳腺癌 MCF-7 细胞种植到聚丙烯中空纤维管腔内部, 再将该中空纤维放入红豆杉提取液中, 筛选和捕获可以与细胞结合的抗乳腺癌活性成分群; CF-DLLME-HPLC 是将 MCF-7 细胞与红豆杉提取液在细胞正常代谢的基础上共孵育, 取不同孵育时间上清液进行分散液相微萃取处理, 然后进行不同时间段下色谱分析对比, 根据色谱峰变化发现潜在抗乳腺癌活性成分群。结果 HFCF-HPLC 筛选出的活性成分是脱乙酰巴卡亭、巴卡亭 III、紫杉碱 M、去乙酰紫杉醇、三尖杉宁碱、紫杉醇、云南紫杉烷; CF-DLLME-HPLC 筛选出的活性成分是脱乙酰巴卡亭、巴卡亭 III、紫杉碱 M、去乙酰紫杉醇、金松双黄酮。结论 2 种方法均可以筛选出有效的抗肿瘤活性成分群, 为活性成分的筛选、中药质量的综合评价提供一种方便、普适和高效的新方法。

关键词: 红豆杉; 抗乳腺癌; 筛选方法; 活性成分群; 中药整体性; 中空纤维细胞捕获结合高效液相色谱法; 细胞捕获-分散液相微萃取结合高效液相色谱法; 脱乙酰巴卡亭; 巴卡亭 III; 紫杉碱 M; 去乙酰紫杉醇; 三尖杉宁碱; 紫杉醇; 云南紫杉烷; 金松双黄酮

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)24-6278-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.017

Study on methods for screening anti-tumor active components of *Taxus chinensis* based on integrity of traditional Chinese medicine

XUE Xue¹, ZHU Long-ping², YANG De-po², ZHAO Zhi-min²

1. Pharmacy Department of School of Pharmaceutical Science, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

2. Laboratory of Raw Medicine and Natural Medicine, School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510006, China

Abstract: Objective Two screening methods for drug active constituents were established based on the integrity of traditional Chinese medicine to screen the anti-breast cancer active components, which were hollow fiber cell fishing-high performance liquid chromatography (HFCF-HPLC) and cell fishing-dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography (CF-DLLME-HPLC). **Methods** According to HFCF-HPLC, MCF-7 cells were planted into the cavity of polypropylene hollow fiber, and then the hollow fiber was put into the extract of *Taxus chinensis* to screen and capture the bioactive component groups combined with cells in a simulated human body environment. According to CF-DLLME-HPLC, on the basis of normal cell metabolism, MCF-7 cells were co-incubated with *T. chinensis* extract, supernatant of different incubation time was taken for liquid phase microextraction, and then chromatographic analysis was performed to find potential active component groups according to chromatographic peak changes. **Results** Anti-breast cancer active components of *T. chinensis* were obtained by these two methods.

收稿日期: 2020-04-02

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20201245); 广东省中医药局科研项目 (20181188); 广东省中医药局科研项目 (20211284); 广东省医学科研基金 (B2018258); 广东省重点平台和重大科研项目 (2017GkQNCX036)

作者简介: 薛 雪 (1986—), 博士, 从事液相微萃取技术的应用以及中药活性成分筛选研究。

Tel: 18825185735 E-mail: snow-angel-xuexue@163.com

*通信作者 赵志敏. Tel: 13560457084 E-mail: zhaozhm2mail.sysu.edu.cn

10-Deacetylbaecatin III, baecatin III, taxinine M, 10-deacetyltaxol, cephalomannine, taxol, taxuyunnanine C were obtained by HFCF-HPLC, and 10-deacetyltaxol, baecatin III, taxinine M, 10-deacetyltaxol, sciadopitysin were obtained by CF-DLLME-HPLC.

Conclusion The two methods can screen the effective antitumor active ingredients, and provide a convenient, universal and efficient new method for the screening of active ingredients and the comprehensive evaluation of the quality of traditional Chinese medicine.

Key words: *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.; anti-breast cancer; screening method; active components; integrity of traditional Chinese medicine; hollow fiber cell fishing-high performance liquid chromatography; cell fishing-dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography; 10-deacetylbaecatin III; baecatin III; taxinine M; 10-deacetyltaxol; cephalomannine; taxol; taxuyunnanine C; sciadopitysin

天然产物是抗肿瘤药物的重要来源, 红豆杉是珍贵的抗癌植物, 全世界有 23 种和 1 变种, 其中我国有 4 种和 1 变种, 有中国红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.、东北红化杉 *T. cuspidate* Seb. et Zucc.、西藏红豆杉 *T. wallichiana* Zucc.、云南红豆杉 *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 和南方红豆杉 *T. chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu^[1]。正是由于这个原因, 红豆杉在中国是一个受保护的物种。目前, 许多地区都在进行红豆杉提取物的研究, 但是除了紫杉醇^[2]外, 其他的活性成分研究相对较少^[3-4]。

中药药效物质基础是指中药及其复方中发挥作用的化学成分(群), 是中药针对某一病症发挥药效作用的物质基础总和^[5-6]。现代药理学研究表明, 药物可与细胞膜上的受体、离子通道等特异性结合从而发挥药理作用^[7], 如何快速筛选中药宝库中的活性成分, 发现潜在的天然候选化合物, 是中药新药开发的关键, 也是阐明中药药效物质基础及质量控制的关键^[8-9]。目前, 生物筛选联合化学分析作为一种有效工具已被广泛用于研究中药中的生物活性成分, 如生物亲和色谱法^[10]、细胞膜色谱法^[11-13]、透析分离^[14-15]被应用于中药生物活性成分的筛选。其中, 细胞膜色谱法^[16-17](CMC)已被证明是筛选中药中活性成分的有效方法。对于平衡透析方法是基于药物结合的平衡原理, 主要是在测定药物游离浓度上有广泛的应用, 此方法是研究中药活性成分血浆蛋白结合率的常用方法^[18]。

为阐明红豆杉中的抗乳腺癌活性成分群, 本实验采用的中空纤维细胞捕获结合高效液相色谱法(HFCF-HPLC)和细胞捕获-分散液相微萃取结合高效液相色谱法(CF-DLLME-HPLC)来筛选和捕获中药中的活性成分群。HFCF-HPLC 方法是在模拟细胞自然吸收的情况下, 直接测定与细胞结合的成分为活性成分; CF-DLLME-HPLC 则采用逆向思维

方式, 细胞与中药提取液共孵育, 根据不同时间段下, 细胞上清液成分的变化间接判断与细胞结合的活性成分。2 种方法的主要的影响条件得到了优化与筛选。在 HFCF-HPLC 中, 利用电泳对中空纤维细胞的内表面进行表征; 重现性得以验证; 利用他莫西芬与吡哆美辛作为阳性与阴性对照进一步验证该方法的可靠性; 通过比较与对照品的保留时间, 确定了与细胞结合的化合物的结构。在 CF-DLLME-HPLC 中, 考察和优化影响 CF-DLLME-HPLC 的变量因素。结果表明, 2 种方法可以简单、快速地进行中药生物活性成分的筛选和分析。2 种方法的成功应用为分析中药的生物活性提供新颖、有效和方便的方法, 并且可以扩展使用到其他中药活性成分的筛选研究中。

1 材料

1.1 仪器与试剂

LC-20A 系统高效液相色谱设备, 日本岛津公司; TDL-80-2B 低速离心机, 海安亭科学仪器厂; BC-J80S 通用水套 CO₂ 培养箱, 苏州净化设备有限公司; DF-11 磁力搅拌器, 江苏荣华仪器公司; XD5-1B 倒置显微镜, 德国 Leica 公司; N-1300V-WB 旋转蒸发仪, 日本 EYELA 公司; SB25-12DTD 超声波机器, 宁波 Scientz 生物技术有限公司; 分析纯试剂, 广东光华科技股份有限公司; 聚丙烯纤维(PP), 内径 0.55 mm, 孔隙大小 0.18 μm, 天津膜天膜生物科技有限公司; 甲醇和乙腈, 为色谱级试剂, 购自天津大茂化学试剂厂。

1.2 对照品和红豆杉药材

对照品去乙酰紫杉醇(批号 78432-77-6)、云南紫杉烷(批号 1605-68-1)、巴卡亭 III(批号 27548-93-2)、紫杉碱 M(批号 135730-55-1)、三尖杉宁碱(批号 71610-00-9)、紫杉醇(批号 33069-62-4)、金松双黄酮(批号 521-34-6)、紫杉素(批号 CB01468520)、脱乙酰巴卡亭(批号

32981-86-5), 质量分数均 $\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司; 他莫昔芬, 批号 H33021583, 宁波天衡药业股份有限公司; 吡啶美辛, 批号 H20067683, 河北御芝林药业有限公司。

红豆杉药材, 批号 20141121, 广州市大参林药店昌岗分店, 样品经过中山大学药学院生药与天然药物化学实验室杨得坡教授鉴定为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 *Taxus* L. 植物南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu。

1.3 细胞株

成年女性乳腺癌 MCF-7 细胞, 中山大学药理实验室。用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。实验所用细胞均处于对数生长期。

2 方法

2.1 溶液配制

对照品溶液: 精密称取 9 种对照品各 1.0 mg 溶于甲醇中, 称定质量, 超声, 溶解, 冷却后补足缺失的质量, 4 °C 保存待用。

细胞培养用的红豆杉提取物 (TCE): 精密称取干燥至恒定质量的样品粉末 1 g, 以 200 mL 二氯甲烷超声溶解, 滤过, 滤液以 200 mL 水萃取, 之后以二氯甲烷萃取水层 2 次, 收集二氯甲烷层, 水浴挥干溶剂二氯甲烷, 残渣溶解于 5 mL 甲醇中, 再用 0.45 μm 微孔滤膜, 最终配成终质量浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液供细胞培养实验用。

阳性、阴性对照溶液: 将 10 片他莫昔芬片、吡

啶美辛片研磨成粉, 称定质量, 精密称取相当于 1 片的质量, 放在 1 个 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释定容至 50 mL, 超声 50 min。冷却后, 损失的体积用甲醇补足, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得, 分别配成质量浓度为 0.2、0.5 mg/mL 溶液。

所有的溶液均在 4 °C 冰箱保存, 使用前恢复室温条件。

2.2 CF-DLLME-HPLC 方法

将 MCF-7 细胞按接种密度 5×10^5 个/cm² 培养在 6 孔培养板中, 置于 37 °C 培养箱, DMEM 培养基培养 24 h 后更换无血清培养基, 饥饿细胞 6 h 后, 加入 TCE (400 $\mu\text{g/mL}$) 溶液分别培养不同时间 (1、8、24 h), 取细胞上清液, 待用。

在 15 mL 带盖尖底带塞离心管中加入 6 mL 含有中药提取液的细胞上清液, 用注射器将分散剂四氢呋喃 (400 μL) 和萃取剂三氯甲烷 (60 μL) 的混合溶剂迅速注入含有中药提取液的细胞上清液中, 超声振荡 0.5 min, 形成均匀的乳浊液, 再以 3 000 r/min 离心 10 min, 用 1 mL 微量进样针将沉淀于离心管底部的萃取剂转移到样品瓶中, 水浴蒸发有机溶剂, 加入 50 μL 色谱级甲醇溶解, 取 20 μL 注入 HPLC 分析。所有的实验操作平行进行 3 次。具体操作如图 1 所示。

2.3 HFCH-HPLC 方法

HFCH-HPLC 过程如图 2 所示^[19]。取 5 mL 红豆杉提取液置于含搅拌子 (10 mm $\times$ 4 mm) 的样品瓶中。将种有乳腺癌 MCF-7 细胞的中空纤维两端用棉线封口, 弯成 U 型, 插入上述样品瓶。打开磁力搅

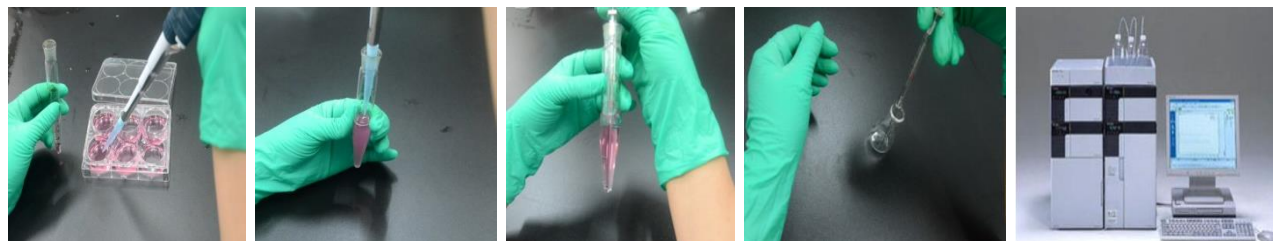


图 1 分散液-液微萃取过程

Fig. 1 Dispersive liquid-liquid microextraction process

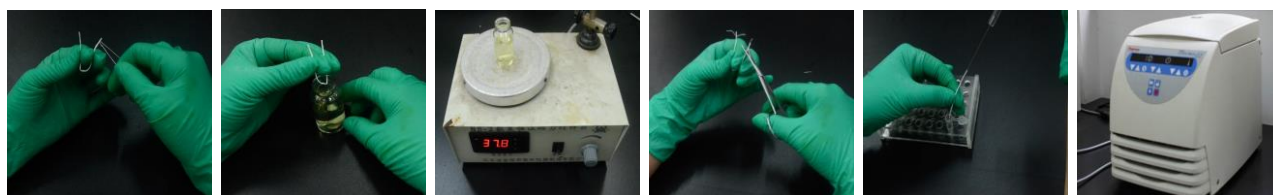


图 2 HFCH-HPLC 具体操作步骤

Fig. 2 HFCH-HPLC specific operation steps

拌器, 37 °C、600 r/min 筛选 3 h 后取出纤维, 剪掉两端封口, 将纤维管内液体打入 2 mL EP 管中, 分别用 40 μ L 甲醇洗脱与细胞结合的活性成分, 并和 EP 管中溶液合并。在 10 000 r/min 离心 20 min 后, 取上清液 (20 μ L) 进行分析。同时进行对照实验 (装有培养液中空纤维筛选)。每组实验平行 3 次。

2.4 色谱条件

TCE 的色谱条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-SP-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Agilent Technologies), 检测波长 227 nm, 柱温 37 °C, 进样量 20 μ L, 体积流量 0.8~1.0 mL/min, 流动相为乙腈-水, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 梯度洗脱: 0~10 min, 85% 乙腈; 10~50 min, 85%~4% 乙腈; 50~55 min, 4%~85% 乙腈。

他莫昔芬的色谱条件: 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ 分析柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 检测波长 238 nm, 柱温 37 °C, 进样量 20 μ L, 流动相为甲醇-水-三乙胺-醋酸 (80:20:0.2:0.2), 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 等度洗脱。

吲哚美辛的色谱条件: 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ 分析柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 检测波长 228 nm, 柱温 37 °C, 进样量 20 μ L, 流动相为 0.1 mol/L 醋酸-乙腈 (20:80), 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 等度洗脱。

3 结果与分析

3.1 CF-DLLME-HPLC

3.1.1 萃取条件优化 本实验考察了萃取剂种类、萃取剂体积、分散剂种类、分散剂体积对萃取效率的影响, 萃取剂选择了三氯甲烷、氯仿、氯苯、二氯甲烷、二氯乙烷; 萃取剂体积选择了 30、50、60、80、100 mL; 分散剂选择了乙腈、乙醇、四氢呋喃、丙酮、甲醇; 分散剂体积选择了 100、200、300、400、600 μ L 除上述筛选萃取条件优化外, 本实验还考察了细胞接种密度以及给药质量浓度对筛选效果的影响, 最终确定筛选条件: TCE 质量浓度为 400 μ g/mL; 细胞接种密度为 5×10^6 个; 萃取剂为 60 μ L 氯; 分散剂为 400 μ L 四氢呋喃。本实验利用 9 种对照品测定保留时间重现性, 保留时间 RSD<0.85%, 说明 CF-DLLME-HPLC 重现性良好, 分析结果准确可靠。

3.1.2 CF-DLLME-HPLC 筛选结果 如图 3 所示, TCE 与 MCF-7 细胞共孵育, 孵育时间从 1 h 延长到 24 h, 可以观察到活性成分显著变化, 1-脱乙酰巴

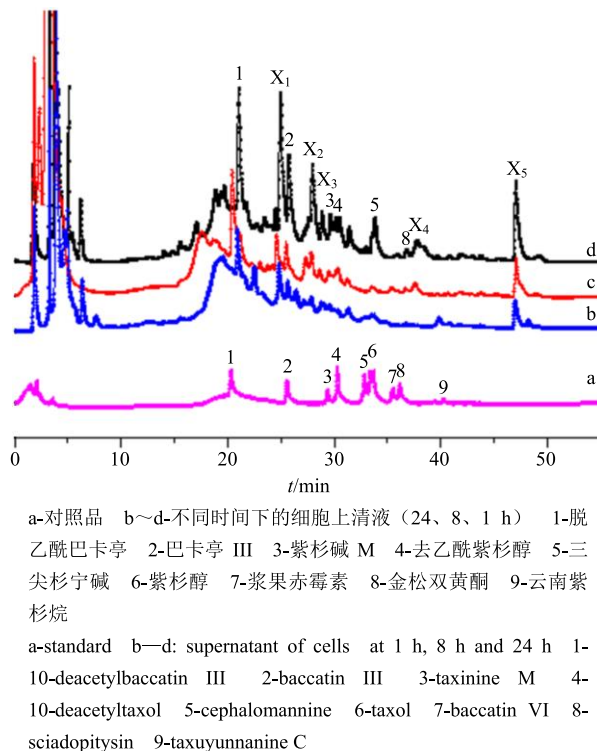


图 3 TCE 与 MCF-7 细胞作用 24 h 内的色谱行为

Fig. 3 HPLC chromatograms of active compounds in TCE with MCF-7 cells within 24 h

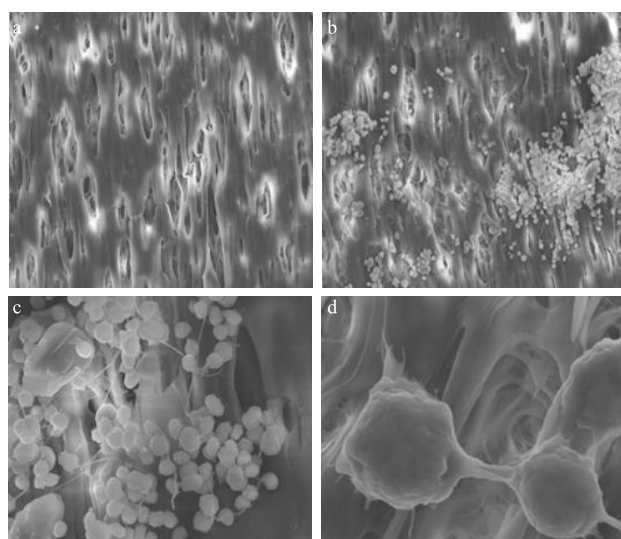
卡亭、2-巴卡亭 III、3-紫杉碱 M、4-去乙酰紫杉醇、5-三尖杉宁碱、8-金松双黄酮、X1~X5 含量逐渐减少。这些化合物可能与细胞相互作用从而可以被视为潜在的生物活性化合物。未知化合物 (X1~X5) 需要进一步使用色谱、质谱分析和文献对照来确定其可能的化学结构。在整个萃取过程中没有发现三尖杉宁碱, 可能的原因是细胞对此化合物的快速吸收导致。1 h 孵育后, 6-紫杉醇的含量逐渐降低并且趋于稳定。

3.2 HFCF-HPLC

3.2.1 萃取条件筛选

(1) 中空纤维的表征: 利用扫描电子显微镜观察聚丙烯中空纤维种植细胞后的形态学特征。测试电压: 10 kV。将中空纤维纵向切开, 外露了中空纤维的内壁。图 4 显示了不同放大倍数下细胞种植 (空白对照) 中空纤维内表面电镜图片, 含有培养液的空白对照中空纤维内壁: 平滑, 毛孔均匀分布, 没有任何添加物。图 4-b~d 显示了不同放大倍数下种植细胞后的中空纤维内壁: 细胞均匀分布, 在纤维孔径中健康生长并且覆盖中空纤维表面的空隙中。

此外, 通过图 4-c、d 可以看出, 圆形状的细胞不仅仅是简单的落在中空纤维的孔径中, 而是通过



a-空白纤维 10 kV ($\times 1\,800$) b-种植细胞纤维 10 kV ($\times 1\,800$) c-种植细胞纤维 10 kV ($\times 3\,000$) d-种植细胞纤维 10 kV ($\times 5\,400$)
a-fiber with blank 10 kV ($\times 1\,800$) b-fiber with cell 10 kV ($\times 1\,800$)
c-fiber with cell 10 kV ($\times 3\,000$) d-fiber with cell 10 kV ($\times 5\,400$)

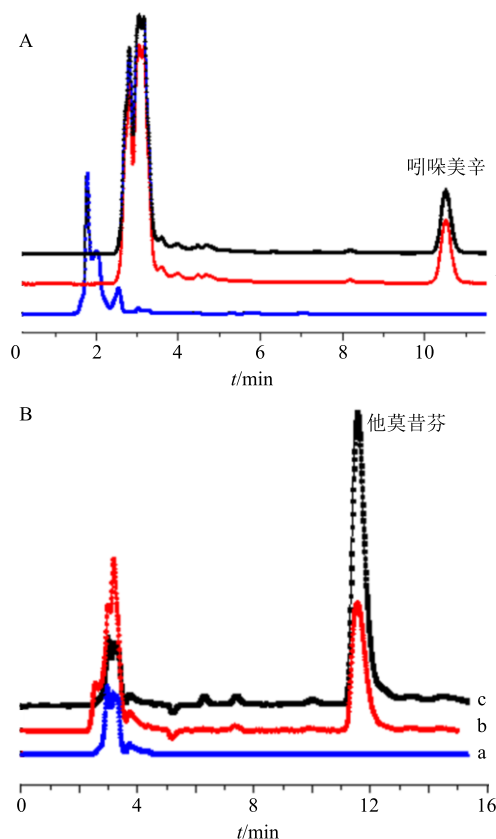
图 4 空白纤维与种植细胞纤维的内壁电镜图像

Fig. 4 SEM images of polypropylene fiber inwall with blank solution or cell

胞间连丝实现了细胞增值生长。细胞生长状态良好，粘连紧密，无凋亡现象，也说明了细胞与纤维之间具备良好亲性和。

(2) 搅拌速度与筛选时间的选择：为了使红豆杉中的活性成分在样品相与细胞接受相间达到筛选平衡，实验考察搅拌速度与筛选时间对目标分析物的萃取效率的影响。结果发现，随着搅拌速度的增加，有效成分的转运增强，但是过大的搅拌速度对细胞带来了不可逆的损伤。最终选择 600 r/min。在 600 r/min 搅拌速度下，实验分别对不同筛选时间进行优化。结果显示筛选 1 h 模型组与空白组没有显著性差异，随着筛选时间的延长，结合作用持续增强。筛选时间 3~4 h 的筛选结果相当，最终确定的筛选时间为 3 h。

(3) 活性成分与聚丙烯中空纤维之间的非特异性结合：为了验证方法的准确性，首先必须证明所用材料与活性成分之间没有或有很微弱的非特异性结合。利用空白中空纤维（纤维内装培养液同步筛选）对中药化学成分进行筛选，然后观察色谱行为的特征。由图 5 可见，空白中空纤维筛选的结果：色谱行为变化很小，说明中空纤维与活性成分之间存在微弱结合能力，可以忽略不计。细胞中空纤维在中药提取液中作用后给出的活性成分信息是细胞与化合物相互作用的结果，中空纤维在此过程中只



A-吲哚美辛萃取前后色谱图 B-他莫昔芬萃取前后色谱图 a-空白溶液 b-空白对照 c-HFCF-HPLC 萃取后
A-chromatogram before and after indomethacin extraction B-chromatogram before and after tamoxifen extraction a-blank solution b-blank control c-after HFCF-HPLC extraction

图 5 阳性对照 (阴性对照) 作用前后色谱图

Fig. 5 Chromatograms of positive control (negative control) before and after HFCF-HPLC

起承载和保护细胞的作用。

(4) 方法的重现性：筛选结果的重现性是影响结果可靠性的重要因素之一。用 HFCF-HPLC 法筛选红豆杉提取物中的活性成分群，每次筛选平行操作 3 次，活性成分保留时间的重现性结果如表 1 所示。活性成分的保留时间 $RSD < 0.12\%$ ，HFCF-HPLC 法对于筛选红豆杉提取物中的抗肿瘤活性成分群操作重现性良好，测试结果稳定、可靠、可信。

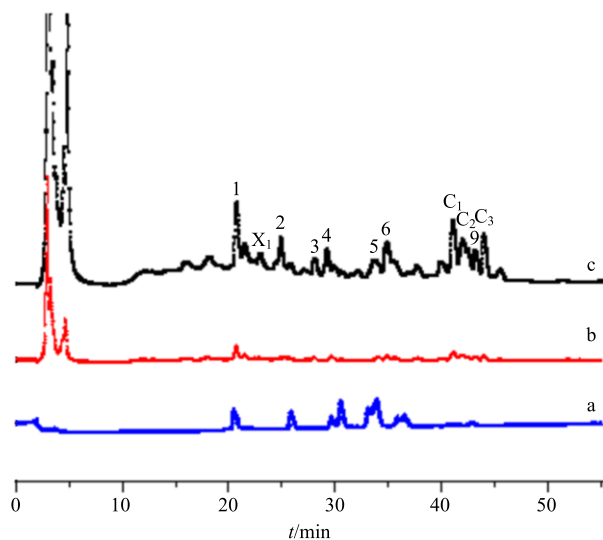
为了验证方法的特异选择性，本实验选用他莫昔芬、吲哚美辛作为阳性对照与阴性对照。文献资料证明^[20]，他莫昔芬对 MCF-7 细胞有特异选择性，而吲哚美辛对此细胞无结合作用。众所周知，药物要发挥药效必须要与体内细胞相结合。实验结果发现，与空白组比较，他莫西芬筛选后色谱峰面积增加显著，而吲哚美辛的色谱峰在筛选前后无明显变化，所以通过阳性与阴性对照证明了试验方法的准

表 1 细胞萃取活性筛选结果重现性 (MCF-7 细胞, $n=3$)
Table 1 Repeatability of screening results for active components in TCE using cell extraction (MCF-7 cells, $n=3$)

峰号	活性成分	t_R/min	RSD/%
1	脱乙酰巴卡亭	20.61	0.11
2	巴卡亭 III	25.72	0.12
3	紫杉碱 M	28.32	0.05
4	去乙酰紫杉醇	29.85	0.09
5	三尖杉宁碱	32.56	0.05
6	紫杉醇	33.78	0.05
7	浆果赤霉素	32.26	0.10
8	金松双黄酮	37.18	0.06
9	云南紫杉烷	40.69	0.04

确性, 特异性。

3.2.2 HFCF-HPLC 筛选结果 红豆杉中的活性成分利用种植 MCF-7 中空纤维细胞筛选进行, 图 6 显示了筛选前后的色谱图。可以看出筛选后色谱峰与空白筛选对照比较, 峰的个数与峰面积均有显著增加, 这个结果说明纤维内的细胞与药物存在结合作用, 而在空白对照组中, 中空纤维与培养液之间



a-对照品 b-空白中空纤维筛选 c-MCF-7 细胞中空纤维筛选
1-脱乙酰巴卡亭 2-巴卡亭 III 3-紫杉碱 M 4-去乙酰紫杉醇
5-三尖杉宁碱 6-紫杉醇 7-浆果赤霉素 8-金松双黄酮 9-云南紫杉烷
a-standard b-screening of blank hollow fibers c-McF-7 cell hollow fiber screening
1-10-deacetyl baccatin III 2-baccatin III 3-taxinine M 4-10-deacetyl taxol 5-cephalomannine 6-taxol 7-baccatin VI 8-sciadopitysin 9-taxuyunnanine C

图 6 HFCF-HPLC 筛选结果

Fig. 6 HFCF-HPLC chromatograms of active components in *T. chinensis*

不存在结合作用或者结合作用较弱。从图 6 中可以看出, MCF-7 中空纤维筛选后有 11 个活性成分被成功筛选出来, 与对照品保留时间比对, 它们分别是 1-脱乙酰巴卡亭、2-巴卡亭 III、3-紫杉碱 M、4-去乙酰紫杉醇、5-三尖杉宁碱、6-紫杉醇、9-云南紫杉烷, 未知的化合物 X_1 、 $C_1 \sim C_3$ 需要进一步通过质谱、红外等检测手段进行判定。筛选结果具体参数如表 2 所示。

表 2 2 种方法活性筛选结果

Table 2 Screening results for active components in TCE using two methods

方法	峰号	活性成分	t_R/min	RSD/%
CF-DLLME-HPLC	1	脱乙酰巴卡亭	20.65	0.19
	2	巴卡亭 III	25.56	0.06
	3	紫杉碱 M	29.30	1.04
	4	去乙酰紫杉醇	30.18	1.90
	6	紫杉醇	33.77	0.05
	8	金松双黄酮	36.62	0.17
	X_1	未知	25.06	0.21
	X_2	未知	26.35	0.07
	X_3	未知	27.23	0.08
	X_4	未知	36.94	0.21
	X_5	未知	47.60	0.05
HFCF-HPLC	1	脱乙酰巴卡亭	20.33	0.11
	2	巴卡亭 III	25.84	0.04
	3	紫杉碱 M	29.26	1.23
	4	去乙酰紫杉醇	30.17	1.95
	5	三尖杉宁碱	33.15	0.05
	6	紫杉醇	36.62	0.17
	9	云南紫杉烷	42.57	0.12
	X_1	未知	25.17	0.53
	C_1	未知	40.07	0.12
	C_2	未知	41.72	0.67
	C_3	未知	43.01	0.08

4 讨论

利用 2 种筛选方法对红豆杉抗乳腺癌活性成分群进行筛选, 与对照品比对可以确定共同的活性成分是脱乙酰巴卡亭、巴卡亭 III、紫杉碱 M、去乙酰紫杉醇、紫杉醇。

通过对比可以看出, HFCF-HPLC 筛选化合物的峰面积一般都小于 CF-DLLME。这可能是由于细胞捕获时间很短 (HFCF), 导致细胞和药物只有结合过程。而在 CF-DLLME 中却存在相关代谢发生。

在 HFCF-HPLC 操作过程中, 转子的搅拌可能会影响细胞在纤维内部上的代谢, 毕竟模拟生物体内环境不能完全反映真正的体内环境。未确定其结构的活性成分 (X1~X5、C1~C3) 可能具有潜在的抗乳腺癌活性, 因此有必要进一步通过 LC-MS 分析、光谱分析和查阅文献确定其结构。

CF-DLLME-HPLC 法的优点是将液相微萃取技术应用到抗肿瘤活性成分检测中, 回收率和富集效率高会相应提高方法的灵敏度, 因此可以筛选出有活性但含量低的活性成分; 同时, 此方法用完整的细胞作为筛选模型, 保持了细胞完整、特有的生物结构和特性, 从而确保了筛选结果的可靠性; 活性筛选和样品净化可以单独执行, 提高检测的准确性。HFCF-HPLC 法将活细胞种植于纤维内壁进行活性筛选, 方法保持了细胞完整的生物结构和特性; 利用聚丙烯中空纤维作为活细胞的载体, 起到了对红豆杉提取液的滤过、净化作用; 整个操作简单, 时间周期短, 节约细胞用量, 筛选成本低。

同时, 2 种方法也存在不足之处。HFCF-HPLC: (1) 通过 HFCF-HPLC 筛选的活性成分的药理作用, 活性成分与细胞作用机制有待进一步的生物实验验证。(2) 此方法不能直接得到活性成分物质或者很难收集足够量的活性成分, 若进行接下来深入的药理实验部分, 需要相应的活性成分对照品。(3) 筛选出但没有鉴别的活性成分, 需要利用 NMR、LC-MS、红外等技术等进一步对其进行结构确认。(4) 为了彻底消除非特异性结合的可能, 最终选择聚丙烯 (无活性基团), 并对聚丙烯活性中心进行惰性处理: 将中空纤维置于烧杯中, 分别依次用丙酮、甲醇、酸、碱、蒸馏水没过纤维, 超声处理 5~10 min (最后一次蒸馏水超声 3 次), 常温条件, 置于室内平板晾干后进行灭菌处理。种植细胞的过程中, 细胞会贴附于管壁管孔中, 对载体的活性中心也有一定的包封与抑制作用。

CF-DLLME-HPLC: 虽然回收率和富集效率高等特点, 可以对中药中低丰度成分进行定量分析和质量控制。但是 (1) 该法重现性较低, 灵敏度有限, 目标分析物不能得到有效净化。(2) 中药提取液在细胞内代谢情况复杂, 对于未筛选出的活性成分尚不能确定为没有活性的成分, 对未鉴定的活性成分需结合 NMR、LC-MS、红外等技术进一步明确结构。(3) 此方法只是一个体外实验过程。因此, 评估化合物的生物活性以及药理作用需要更广泛的体

外或体内药理模型支持。(4) 由于方法本身的制约, 很难获得大量的活性成分进行后续药理实验研究, 若进行接下来深入的药理实验, 需要相应的活性成分对照品支持。

2 种活性成分筛选方法, 快速、稳定、实用、高效, 可用于中药或复杂生物基质中活性成分的筛选, 以及中药多靶点、多组分的相互作用的研究。所建方法为阐明中药抗肿瘤 (乳腺癌) 药效物质奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 刘新星, 余响华, 刘学端. 红豆杉分布与培育技术研究进展 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(7): 51-57.
- [2] 罗 燕, 刘 斌. 紫杉醇在纤维化疾病中应用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(8): 2572-2576.
- [3] 姜 萍, 陈华芳, 黄海斌, 等. 东北红豆杉枝叶总黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性 [J]. 林产化学与工业, 2017, 37(6): 125-132.
- [4] 汤晓梅, 易向军. 同步放化疗联合复方红豆杉胶囊治疗局部晚期肺癌的临床研究 [J]. 当代医学, 2016, 22(17): 17-18.
- [5] 陈 君, 林朝展, 付剑江, 等. 2013 年国家自然科学基金“中药药效物质”研究方向项目申请与资助情况述评 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(2): 211-215.
- [6] 毕肖林, 马世堂, 狄留庆, 等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5229-5234.
- [7] 汤 丹, 肖 伟, 钱正明, 等. 活细胞固相色谱法联合高分辨质谱快速筛选龙血竭中镇痛活性成分 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2539-2544.
- [8] 张 慧, 徐 聪, 吴媛媛, 等. 超滤-质谱技术在中药活性成分筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5712-5718.
- [9] Li P, Qi L W, Liu E H, *et al.* Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models [J]. *Trends Analyt Chem*, 2008, 27(1): 66-77.
- [10] Gottschalk I, Lagerquist C, Zuo S S, *et al.* Immobilized-biomembrane affinity chromatography for binding studies of membrane proteins [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 768(1): 31-40.
- [11] 马晓伟, 于蒙蒙, 晋兴华, 等. 人参次苷 H 滴丸原料药中皂苷含量测定及细胞膜色谱技术对效应成分筛选 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2545-2550.
- [12] Yue Y, Xue H, Wang X, *et al.* High-expression β (1) adrenergic receptor/cell membrane chromatography

- method based on a target receptor to screen active ingredients from traditional Chinese medicines [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(3): 244-249.
- [13] Han S, Zhang T, Huang J, *et al.* New method of screening allergenic components from Shuang huang lian injection: with RBL-2H3/CMC model online HPLC/MS system [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 602-608.
- [14] Qiu J Y, Chen X, Zheng X X, *et al.* Target cell extraction coupled with LC-MS/MS analysis for screening potential bioactive components in *Ginkgo biloba* extract with preventive effect against diabetic nephropathy [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(2): 226-232.
- [15] Li J, Li W, Dai X, *et al.* Bioequivalence of paclitaxel protein-bound particles in patients with breast cancer: Determining total and unbound paclitaxel in plasma by rapid equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019 13(1): 1739-1749.
- [16] 张汉利, 杨广德, 贺浪冲, 等. 太白花活性成分的筛选与药理作用相关性研究 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(2): 92-95.
- [17] 杨兴鑫, 张艳利, 李晓妮. 细胞膜色谱法及其在药物研究中的应用进展 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(18): 1361-1364.
- [18] 高 迪, 王保军, 裴 玉, 等. 脂质体平衡透析与液质联用技术筛选脊痛宁片物质基础研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 668-672.
- [19] Xue X, Li L H, Chen X, *et al.* Hollow fiber cell fishing with high performance liquid chromatography for screening bioactive compounds from traditional Chinese medicines [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1280(8): 75-83.
- [20] 赵 丁, 秦 葵, 曹聪梅, 等. 南方红豆杉和东北红豆杉中的单体化合物对乳腺癌细胞增殖的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 19(4): 635-638.