

不同产地老鹳草指纹图谱的建立及抗肿瘤谱效关系研究

孙仁爽¹, 赵敏婧²

1. 通化师范学院医药学院(长白山天然药物重点实验室), 吉林 通化 134001

2. 梅河口市食品药品检验检测中心, 吉林 梅河口 135000

摘要:目的 建立老鹳草 *Geranium wilfordii* 指纹图谱, 研究老鹳草提取物的指纹图谱与抗肿瘤活性之间的谱效关系, 初步明确老鹳草抗肿瘤主要活性成分。方法 运用中药色谱指纹图谱相似度评价软件, 建立老鹳草抗肿瘤活性部位的 HPLC 指纹图谱。采用 MTT 法, 以人乳腺癌 MCF-7 细胞为模型, 对老鹳草样品的醋酸乙酯部位进行抗肿瘤活性测定。采用多元线性回归法, 将量化共有峰面积与 MTT 法测得老鹳草抗肿瘤活性结果相结合, 构建老鹳草抗肿瘤谱效关系。结果 通过指纹图谱的建立, 共标定了 16 个共有峰, 确定 1 号峰为没食子酸、7 号峰为柯里拉京、8 号峰为老鹳草素、12 号峰为鞣花酸。其中 29 批药材的相似度均大于 0.732, 运用主成分分析和聚类分析进一步分析样品间差异, 将距离较远的 30 号样品排除。HPLC 指纹图谱中的 16 个共有峰中, 有 8 个峰对 MCF-7 细胞有作用, 得到 MCF-7 的谱效方程, 经 6 批药材验证, 谱效方程计算值与实际值的偏差率不超过 10%。结论 该谱-效方程可用于预测老鹳草的抗乳腺癌作用物质基础。

关键词: 老鹳草; 指纹图谱; 抗肿瘤; 谱效关系; 没食子酸; 柯里拉京; 老鹳草素; 鞣花酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)15-5003-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.15.025

Establishment of fingerprints and spectrum-effect relationship of anti-tumor activity of *Geranium wilfordii* from different places of origin

SUN Ren-shuang¹, ZHAO Min-jing²

1. Changbai Mountain Key Laboratory for natural medicine, Medical College, Tonghua Normal University, Tonghua 134001, China

2. Meihekou Food and Drug Control, Meihekou 135000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Geranium wilfordii*, study the spectrum-effect relationship of anti-tumor activity of *G. wilfordii* and preliminarily clarify its main anti-tumor active components. **Methods** The similarity evaluation software of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints was used to establish the HPLC fingerprints of the anti-tumor active fractions of *G. wilfordii*. MTT method was used to determine the anti-tumor activity of effective parts of *G. wilfordii* by using human breast cancer cell MCF-7 as a model. Multiple linear regression method was used to combine the quantitative characteristic peak area with the anti-tumor activity results of *G. wilfordii* measured by MTT method to construct the anti-tumor spectrum effect relationship of *G. wilfordii*. **Results** Through the establishment of fingerprint, 16 common peaks were picked, it is determined that peak 1 is gallic acid, peak 7 is corrilagin, peak 8 is geranium, and peak 12 is ellagic acid. The similarity of each sample was higher than 0.732. Further analyze the differences between samples using principal component analysis and cluster analysis, and exclude sample 30 that is farther away. The results showed that 8 of the 16 common peaks in the HPLC fingerprint had effects on MCF-7 cells, and the spectral efficiency equation for MCF-7 was obtained. After verification by six batches of medicinal materials, the deviation rate between the calculated value of the spectral efficiency equation and the actual value was not exceed 10%.

Conclusion The spectrum-effect equation can be used to predict the anti-breast cancer effect of *G. wilfordii*.

Key words: *Geranium wilfordii* Maxim.; fingerprint; anti-tumor; spectrum-effect relationship; gallic acid; corrilagin; geraniin; ellagic acid

老鹳草为牻牛儿苗科植物老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 的干燥地上部分^[1], 具有祛风湿、通经络、止泻痢等作用^[2-3]。目前对老鹳草的研究多停留

在化学成分的含量测定及指纹图谱, 这些研究^[4-6]所获得的 HPLC 图谱不能反映出老鹳草的内在药效。老鹳草有明显的抗肿瘤作用, 常用于乳腺癌、结肠

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973431); 通化师范学院应用研究项目: 中药质量评价研究(01054)

作者简介: 孙仁爽, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础和质量控制研究。E-mail: 804590217@qq.com

癌和肺癌等肿瘤的治疗。老鹳草中含有多种生物活性成分，可以抑制癌细胞的生长和分裂，同时通过促进免疫功能，抵御癌症的侵袭，因此，老鹳草常被用于癌症的辅助治疗。本实验根据老鹳草的功效，选择其抗肿瘤作用作为药效指标，对老鹳草有效部位的指纹图谱和抗肿瘤作用的关系进行初步的探讨，建立能反映老鹳草抗肿瘤药效^[7-9]的谱效关系方程，阐明其抗肿瘤作用的物质基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

药材经通化师范学院医药学院于俊林教授鉴定为牻牛儿苗科老鹳草 *G. wilfordii* Maxim. 的干燥地上部分，其来源信息见表 1。

表 1 30 批老鹳草药材产地信息

Table 1 Origin information of 30 batches of *Geranium wilfordii*

编号	产地	编号	产地
S1	吉林通化集安	S16	辽宁本溪
S2	吉林梅河口	S17	辽宁清源
S3	吉林磐石松川	S18	辽宁海城
S4	吉林敦化	S19	辽宁沈阳
S5	吉林安图	S20	辽宁锦州
S6	黑龙江牡丹江	S21	北京香山
S7	黑龙江鸡西	S22	山东泰山
S8	黑龙江七台河	S23	河北成德
S9	黑龙江佳木斯	S24	天津蓟县
S10	黑龙江伊春铁力	S25	青岛崂山
S11	黑龙江哈尔滨	S26	河北易县
S12	辽宁铁岭	S27	河北遵化
S13	辽宁鞍山	S28	吉林通化集安
S14	辽宁丹东凤城	S29	吉林梅河口
S15	辽宁葫芦岛	S30	吉林通化玉皇山

1.2 试剂

对照品老鹳草素（批号 100503，上海融禾医药科技有限公司）、没食子酸（批号 110831-201906）、柯里拉京（批号 111623-200302）、鞣花酸（批号 111959-201903）、羟基喜树碱（批号 110832-201908）购自中国食品药品检定研究院，质量分数均 $\geq 98\%$ 。人乳腺癌细胞株 MCF-7 由首都医科大学中药学院传代保种。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司；甲醇和乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

WELLSCAN MK 3 型酶标仪（美国 Bio-Rad 公

司），Agilent1260 高效液相色谱仪，KQ3200 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），CP225D 型电子天平（德国 Sartorius 公司）。

2 方法

2.1 老鹳草 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称定没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对照品，置于 4 个 50 mL 量瓶中，分别用甲醇定容。制成分别含没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸 232、120、50、150 $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品溶液。再精密量取没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对照品溶液各 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，制成含没食子酸 23.2 $\mu\text{g/mL}$ 、柯里拉京 12 $\mu\text{g/mL}$ 、老鹳草素 5 $\mu\text{g/mL}$ 和鞣花酸 15 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取老鹳草约 1 g，精密称定，粉碎，用 18 mL 70%丙酮超声提取 60 min，滤过，滤液减压浓缩得浸膏，减压回收温度均不超过 40 $^{\circ}\text{C}$ ，浓缩液置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，得供试品溶液，备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱：Agilent XDB-C₁₈（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ），流动相见表 2，体积流量为 0.8 mL/min，检测波长 278 nm，进样体积 2 μL 。

2.1.4 精密度试验 取老鹳草样品（S1）适量，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次，将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）”，得到各图谱的相似度均大于 0.92，计算 16 个主要共有峰相对保留时间 RSD $< 2\%$ ，峰面积 RSD $< 2\%$ ，符合指纹图谱的要求。

表 2 流动相的梯度洗脱程序

Table 2 Gradient eluted program of mobile phase			
保留时间/min	乙腈/%	甲醇/%	0.3% H ₃ PO ₄ /%
0	0	5	95
5	3	2	95
10	8	1	91
35	10	1	89
45	14	0	86
65	15	0	85
80	16	14	70
90	17	26	57
95	17	26	57

2.1.5 稳定性试验 取老鹳草样品(S1)适量,按照“2.1.2”项方法制得供试品溶液,分别在0、4、8、12、24 h,按“2.1.3”项色谱条件进行测定,将所得数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”,得到各图谱的相似度均大于0.93,计算16个主要共有峰相对保留时间RSD<2%,峰面积RSD<2%,符合指纹图谱的要求。

2.1.6 重复性试验 取老鹳草样品(S1)适量,按照“2.1.2”项下方法平行制得6份供试品溶液,按“2.1.3”项色谱条件进行测定,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”,得到各图谱的相似度均大于0.91,计算16个主要共有峰相对保留时间RSD<2%,峰面积RSD<2%,符合指纹图谱的要求。

2.1.7 老鹳草化学指纹图谱的构建 精密吸取供试品溶液,分别注入液相色谱仪,按照“2.1.3”项色谱条件检测。采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”进行模式识别,获得了老鹳草指纹图谱的共有模式^[10]。以中国食品药品检定研究院提供的老鹳草对照药材为参照图谱,对照图谱的生成方法为平均数法。

2.2 抗肿瘤活性的测定

2.2.1 样品溶液制备 用蒸馏水悬浮分散浸膏后,依次用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取。分别称取各样品适量,用80 μL DMSO配成25 g/L的母液,再用RPMI-1640培养液分别稀释成0.5、5、50、100、250、500 mg/L溶液,备用。阳性药羟基喜树碱用RPMI-1640培养液稀释成0.01、0.1、1、10、100 mg/L溶液。

2.2.2 细胞培养 MCF-7细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液在37℃、5% CO₂培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

2.2.3 MTT法测定各样品的抗肿瘤活性 将对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成浓度为 1×10^4 个/mL的细胞悬液,按1000个/孔接种于96孔板,每孔加100 μL。次日加入含不同浓度药物及相应溶剂对照的新鲜培养基,每孔加100 μL(DMSO终浓度<0.5%),每药设4个剂量组,每组设6个平行孔,给药后于37℃继续培养72 h后,弃上清,每孔加100 μL新鲜配制的含0.5 mg/mL MTT的无血清培养基,继续培养4 h,弃上清液,每孔加200 μL DMSO溶解MTT甲簪沉淀,用微型振荡器振荡混匀,用酶标仪在参考波长490 nm,检测波长570 nm

条件下测定吸光度(A)值,以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,用公式计算药物对肿瘤细胞的抑制率。并按中效方程计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

抑制率=(对照组平均A值-给药组平均A值)/对照组平均A值

2.2.4 统计方法 运用SPSS 15.0 for windows进行数据统计分析,数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2.3 老鹳草抗肿瘤谱-效关系研究

2.3.1 建立老鹳草抗肿瘤谱-效关系方程 将HPLC法测定所得各峰面积均数化^[11],处理成量化共有峰数据。处理后的共有峰数据(X)为各峰与各峰平均面积的比值($X=i$ 峰的面积值/ i 峰平均面积值),以衡量样品中各成分含量的变化情况。以量化共有峰数据为自变量,肿瘤细胞增殖抑制率为因变量,使用软件SPSS 21.0,采用后退法建立谱效关系^[12]方程。

2.3.2 建立老鹳草抗肿瘤谱-效关系验证方程 为证明所列方程的合理性,将HPLC法测定各峰数据均数化峰面积,处理成量化共有峰数据,代入方程进行验证^[13]。

3 结果与分析

3.1 老鹳草 HPLC 指纹图谱分析

3.1.1 相似度评价 将30个老鹳草样品的AIA格式的数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》软件,以吉林通化药材(S1)作为参照谱图,多点校正生成对照图谱(R),计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱的相似度,相似度在0.589~0.976,大部分样品相似度较高,但是由于产地、生长环境和提取纯化过程等原因,个别样品与对照图谱差异较大,不能直接建立老鹳草药材指纹图谱^[14]的共有模式。运用主成分分析和聚类分析进一步分析样品间差异,以便最终能够建立合理的老鹳草药材的标准指纹图谱。

3.1.2 主成分分析(principal components analysis, PCA) 各老鹳草样本经过上述实验获得各自的色谱数据,通过色谱工作站将图谱进行积分后以保留时间和色谱峰面积作为数据的信息,以相对保留时间定位,以对应的峰面积的积分值作为数据源,形成30个样本数据矩阵。对数据矩阵进行PCA投影。老鹳草数据PCA的平面投影图见图1,结合旋转成份矩阵列表可知,30号样品和前3种成分的相关度都很低,属于第4种成分。可见30号样品与其他样品差距较大,进一步缩小了选择范围。

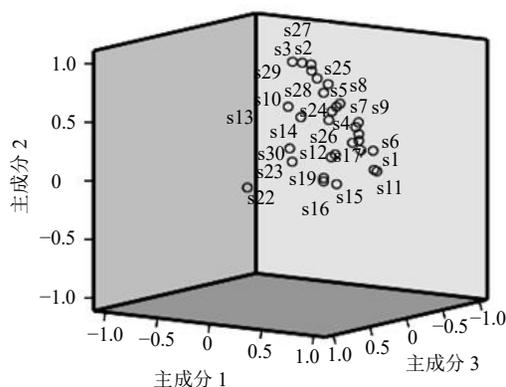


图1 PCA平面投影图

Fig. 1 PCA figure of samples

3.1.3 系统聚类分析 对 30 个样品数据进行系统聚类分析, 采用组内联结法、夹角余弦作为测量的距离变量, 聚类树形图见图 2, 结合 PCA 分析结果, 将距离较远的 30 号样品排除。

3.1.4 老鹳草药材标准指纹图谱的建立 将上述 29 批样品的 AIA 数据文件导入软件, 对上述药材进行相似度评价, 设定 S1 为参照, 多点校正, 设定参照图谱, 将谱峰自动匹配, 生成的叠加图见图 3, 得到的共有峰对照图谱见图 4, 结果 29 批老鹳草药材具有 16 个共有峰。相似度计算结果见表 3。相似度计算结果表明, 29 批样品与对照图谱比较,

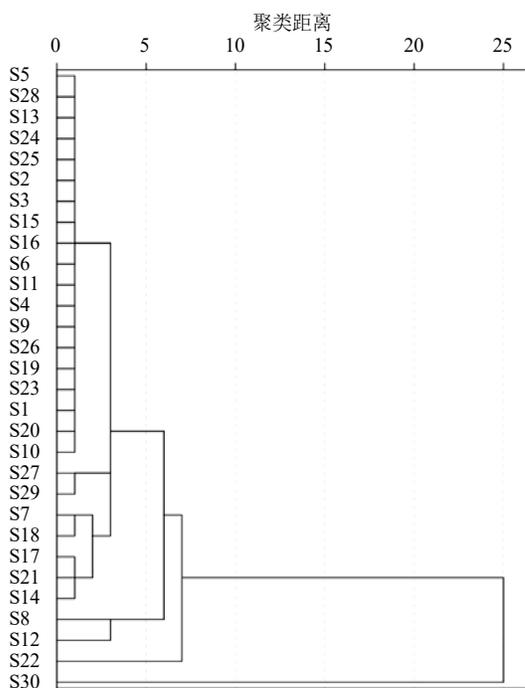


图2 老鹳草样品聚类分析

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of samples

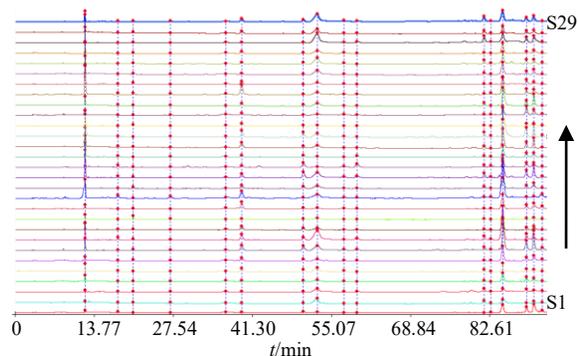
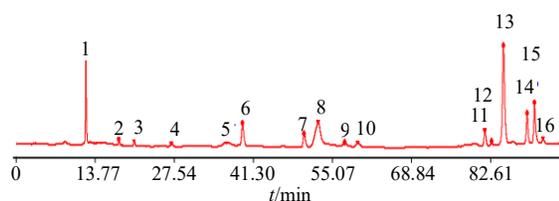


图3 29批老鹳草药材提取物的HPLC叠加图

Fig. 3 HPLC overlay graph of 29 batches of *G. wilfordii* extracts



1-没食子酸 7-柯里拉京 8-老鹳草素 12-鞣花酸
1-gallic acid 7-corilagin 8-geraniin 12-ellagic acid

图4 老鹳草药材提取物HPLC共有峰对照图谱

Fig. 4 HPLC characteristic peaks of extract from *G. wilfordii*

表3 29批样品相似度评价结果

Table 3 Similarities for 29 batches of samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.791	S16	0.885
S2	0.767	S17	0.945
S3	0.779	S18	0.956
S4	0.927	S19	0.885
S5	0.947	S20	0.862
S6	0.919	S21	0.950
S7	0.954	S22	0.732
S8	0.959	S23	0.859
S9	0.950	S24	0.944
S10	0.882	S25	0.934
S11	0.867	S26	0.955
S12	0.888	S27	0.822
S13	0.976	S28	0.911
S14	0.939	S29	0.892
S15	0.842	对照	1.000

相似度均在 0.732 以上, 说明不同来源老鹳草样品化学成分差异较大, 可为老鹳草药材的品质评价提供科学依据。

3.1.5 老鹤草主要共有峰归属 经过相似度软件分析出 29 个产地老鹤草药材具有 16 个共有峰。保留时间依次为 12.155、17.893、20.575、27.067、36.649、39.43、50.182、52.617、57.233、59.529、81.643、82.789、84.856、88.980、90.273、91.759 min。将各峰依次编号为 1~16。通过对照品色谱图指认，确定 1 号峰为没食子酸，7 号峰为柯里拉京，8 号峰为老鹤草素，12 号峰为鞣花酸。

3.2 抗肿瘤活性分析

3.2.1 老鹤草中各萃取部位的抗肿瘤活性 实验结果显示老鹤草的醋酸乙酯和正丁醇部位对肿瘤细胞都有一定的抑制作用，其中醋酸乙酯部位对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 为 (12.47±3.86) μg/mL (表 4)，小于 30 μg/mL。一般认为当植物粗提取物 IC₅₀≤30 μg/mL 时，可初步认为有一定的抗肿瘤作用，值得进一步研究^[15]。因此老鹤草 70%丙酮提取物的醋酸乙酯部位活性相对最强，确定为老鹤草的抗肿瘤活性部位。

表 4 老鹤草不同萃取部位对 MCF-7 细胞的 IC₅₀ (x̄ ± s, n = 3)
Table 4 IC₅₀ value of different parts of samples (x̄ ± s, n = 3)

提取物	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
氯仿	109.19±5.77
醋酸乙酯	12.47±3.86
正丁醇	38.63±4.14
羟基喜树碱	16.15±2.53

3.2.2 老鹤草醋酸乙酯部位抗肿瘤活性测定 29 份老鹤草药材的醋酸乙酯部位对肿瘤细胞 MCF-7 的抑制率见表 5。

3.3 老鹤草抗肿瘤谱-效关系研究

3.3.1 量化共有峰数据 随机选取 23 个样品的量化共有峰数据结果见表 6，将 16 个共有峰依次设为 X₁、X₂、X₃……X₁₆。剩余 6 个样品用于验证的量化共有峰数据见表 7。

表 5 老鹤草提取物对 MCF-7 细胞的抑制率
Table 5 Inhibiting rate of different sources of samples to MCF-7 cells

样品号	MCF-7 抑制率/%	样品号	MCF-7 抑制率/%
S1	42.9	S16	50.0
S2	49.5	S17	47.5
S3	34.7	S18	49.4
S4	34.1	S19	40.6
S5	36.5	S20	49.4
S6	36.6	S21	52.1
S7	49.5	S22	65.9
S8	47.5	S23	42.4
S9	32.6	S24	49.1
S10	35.0	S25	45.6
S11	36.0	S26	40.4
S12	53.2	S27	39.4
S13	34.2	S28	46.5
S14	57.2	S29	48.6
S15	54.3		

表 6 23 个老鹤草样品醋酸乙酯层的 HPLC 量化共有峰均数化数据
Table 6 Data of characteristic chromatographic peaks of 23 batches of samples

样品	共有峰均数							
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
S2	0.232	0.378	0.705	1.787	0.545	0.170	0.384	1.628
S3	0.122	0.587	0.731	1.195	0.624	0.119	0.284	1.060
S4	0.481	0.732	0.731	0.728	1.239	0.335	0.450	0.413
S5	0.572	0.555	0.298	0.558	0.657	0.971	1.180	1.057
S6	0.283	0.384	1.303	0.892	1.198	0.813	0.805	0.412
S7	0.820	0.835	1.269	0.916	0.761	1.814	2.631	1.581
S8	1.113	2.567	1.177	1.388	1.174	1.641	1.596	2.858
S9	0.407	0.633	0.683	0.529	0.911	1.040	1.044	0.538
S10	0.332	0.577	3.428	0.873	0.536	0.326	0.440	0.360
S11	0.293	0.270	0.709	0.418	1.167	1.839	0.621	0.231
S12	2.536	5.225	0.404	3.974	1.529	2.604	0.737	1.204
S13	0.609	0.455	1.275	0.502	0.643	1.040	1.177	0.979
S14	2.304	1.886	1.422	0.909	0.853	1.407	3.380	1.658
S15	1.189	2.115	0.315	1.098	1.070	0.521	2.329	0.191
S16	1.460	1.206	0.285	0.757	0.844	0.528	0.942	0.205
S17	1.624	1.266	0.849	0.834	0.857	1.513	0.950	0.677
S20	0.454	0.905	1.187	1.691	2.121	0.857	0.490	0.428
S21	0.777	1.304	0.739	0.908	0.810	0.797	1.100	1.008
S24	0.936	0.537	1.289	0.697	1.298	0.482	0.266	1.141
S25	0.527	0.235	0.773	0.592	0.804	0.530	0.885	1.664
S26	0.736	0.527	1.063	0.762	1.490	0.767	0.669	0.784
S28	0.461	0.506	1.212	0.611	1.098	0.652	0.652	1.226
S29	0.515	1.002	1.187	1.494	0.764	1.065	1.104	2.319

续表 6

样品	共有峰均数							
	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}
S2	0.262	0.485	1.452	1.207	0.371	0.439	0.555	1.706
S3	0.283	0.775	1.456	1.038	0.308	0.605	0.313	0.989
S4	0.818	0.361	0.568	0.345	0.653	0.996	0.685	0.755
S5	1.424	0.284	1.042	0.643	0.671	0.705	0.622	0.838
S6	0.662	0.618	0.294	0.358	0.993	0.640	0.702	0.732
S7	1.706	1.585	1.236	0.790	1.751	1.912	2.826	1.346
S8	1.968	2.705	1.884	1.433	2.498	1.320	1.633	1.057
S9	0.549	0.627	0.530	0.560	0.756	0.712	0.635	0.624
S10	0.549	0.387	0.194	0.173	0.174	0.231	0.211	0.163
S11	1.098	0.470	0.128	0.401	0.971	0.753	0.757	1.136
S12	1.444	1.131	0.801	0.789	2.754	0.207	0.265	2.721
S13	0.662	1.011	0.785	0.400	0.792	0.690	0.970	0.557
S14	1.849	3.504	1.736	1.293	1.138	1.814	2.055	1.418
S15	1.172	3.775	1.154	2.196	0.843	1.118	0.910	1.392
S16	0.495	1.172	0.567	1.276	0.864	0.969	0.837	1.566
S17	0.475	0.296	0.809	0.159	1.280	1.239	1.508	0.993
S20	1.593	0.667	0.253	0.637	0.588	1.719	0.802	0.979
S21	0.767	0.800	1.335	0.885	1.303	1.230	1.916	0.504
S24	1.283	0.436	1.158	1.354	1.059	0.855	0.857	0.709
S25	1.369	0.277	1.691	1.830	0.996	1.060	0.906	0.993
S26	1.938	0.844	0.444	0.639	0.758	0.421	0.450	0.320
S28	0.737	0.742	1.267	0.734	0.585	0.799	0.691	0.483
S29	1.427	0.823	2.124	1.724	0.929	0.966	1.093	0.573

表 7 6个验证样品的 HPLC 量化共有峰均数化数据

Table 7 Data of characteristic chromatographic peaks of six batches of verification samples

样品	共有峰均数							
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8
S1	0.288	0.830	0.240	0.787	1.138	0.242	0.532	0.125
S18	1.709	0.311	0.272	1.038	1.012	2.276	2.932	1.293
S19	0.803	0.585	1.047	0.438	0.763	0.780	0.391	0.177
S22	5.986	1.740	1.872	1.888	1.367	2.833	0.476	0.698
S23	1.338	0.435	1.785	0.461	0.817	0.806	0.216	0.408
S27	0.095	0.408	0.751	0.277	0.910	0.228	0.336	2.679

样品	共有峰均数							
	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}
S1	0.236	0.152	0.127	0.944	0.614	1.321	1.287	1.599
S18	1.401	1.048	1.812	1.869	2.234	2.100	2.326	1.694
S19	0.211	0.506	0.269	0.516	0.464	0.617	0.488	1.046
S22	1.677	1.608	0.854	1.897	1.292	1.191	0.923	0.835
S23	0.626	0.421	0.375	1.082	0.498	1.158	0.680	0.945
S27	0.318	1.489	2.655	1.829	0.864	1.215	1.095	0.327

3.3.2 老鹤草抗乳腺癌谱-效方程 用后退法筛选出来的对抑制MCF-7细胞株生长有显著贡献的变量有8个,即 X_1 、 X_2 、 X_5 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 。老鹤草抗乳腺癌谱-效方程为 $Y=0.234+0.047 X_1+0.052 X_2+0.102 X_5-0.033 X_{10}+0.097 X_{12}-0.112 X_{13}-0.086 X_{14}+0.157 X_{15}$

3.3.3 残差图 方程残差服从近似正态分布,自变量和因变量之间呈线性关系,说明所用模型适用于建立老鹤草醋酸乙酯提取物的抗乳腺癌谱-效关系方程,见图5、6。

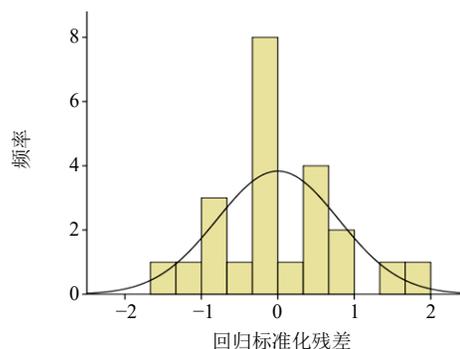


图5 因变量马氏距离分布直方图

Fig. 5 Mahalanobis distance histogram of dependent variable

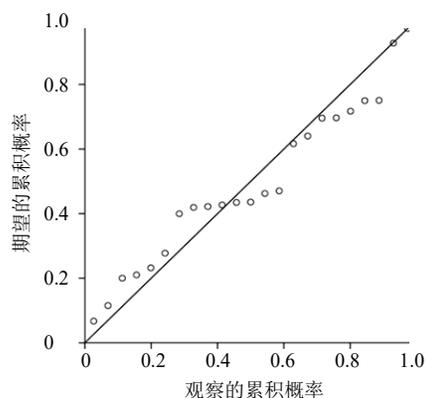


图6 因变量正态概率图

Fig. 6 Normal P-P plot of regression standardized residual

3.3.4 验证方程 将6个验证样品的量化共有峰数据代入老鹤草抗乳腺癌谱-效方程,计算偏差率。

$$\text{偏差率} = \text{估计值} / \text{真实值} - 1$$

从表8可以看出,由所建立的数学模型计算得到的6批老鹤草验证样品的抑制率估计值与实验测得真实值的偏差率全部在±10%以内。

4 讨论

4.1 最佳提取工艺的考察

本实验选用70%丙酮为溶剂对老鹤草中的成分

表8 老鹤草抗乳腺癌谱-效相关质量评价数学模型验证结果
Table 8 Result of verification on spectrum-effect relationships model of *G. wilfordii*

样品号	MCF-7 抑制率/%		偏差率%
	真实值	估计值	
S1	0.489	0.513	4.91
S18	0.494	0.515	4.32
S19	0.406	0.385	-5.05
S22	0.719	0.774	7.69
S23	0.424	0.445	5.02
S27	0.416	0.451	8.53

进行提取。通过干酪素法对总鞣质含量进行测定,确定老鹤草的最佳提取工艺。选取料液比(A)、超声时间(B)和超声频率(C)为主要考察因素,每个因素取3水平,正交试验表安排试验方案,分析结果表明,以总鞣质为考察指标时,各因素的影响大小均为A>C>B,即料液比影响最大,超声时间影响最小。根据正交试验确定的最佳提取条件为:液料比为1:18的70%丙酮在100 kHz超声频率下超声提取60 min。验证实验,重复3次,得到总鞣质质量分数为1.83%。结果表明确定的最佳提取工艺效率较高,切合实际。

4.2 色谱条件的考察

本实验以采于黑龙江大庆的9号老鹤草样本考察了Agilent XDB-C₁₈色谱柱、Agilent Zorbax-C₁₈色谱柱、Agilent Extend-C₁₈色谱柱、迪马C₁₈色谱柱、大连依利特C₁₈色谱柱和美国热电C₁₈等6种色谱柱的分离情况,色谱柱规格均为(250 mm×4.6 mm, 5 μm),结果发现各色谱柱基本都能达到基线分离,但是各色谱柱峰位顺序改变,因此选用其中一种分离情况最好、出峰最多的Agilent公司的XDB-C₁₈作为实验用色谱柱。本实验分别用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-0.3%磷酸盐为流动相,以不同梯度进行试验,结果表明用甲醇-乙腈-0.3%磷酸盐梯度洗脱效果最好;体积流量考察了0.8、1.0和1.2 mL/min,结果1.0、1.2 mL/min的体积流量分离效果不好,选用0.8 mL/min作为流动相的体积流量。

4.3 谱效关系

实验在不同批次老鹤草提取物HPLC指纹图谱共有峰与其抗肿瘤作用数据量化的基础上,采用后退法对老鹤草指纹图谱共有峰与抗肿瘤作用的大小

进行相关性研究。结果显示,采用体外活性筛选确定了老鹳草醋酸乙酯萃取部分对 MCF-7 细胞的生长抑制率最强,作为本实验老鹳草抗肿瘤的活性部位。以 29 个老鹳草样品为研究对象,开展高效液相色谱分析,所构建的老鹳草化学指纹图谱,共有 16 个共有峰,分析指纹图谱,可见各样品的共有峰面积有差别。由所建立的数学模型计算得到的 6 批老鹳草验证样品的抑制率估计值与实验测得真实值的偏差率均在 $\pm 10\%$ 以内。本实验建立了老鹳草抗乳腺癌谱效关系方程,体现了中药药效的产生是多成分相互协调、互补或制约的结果,为老鹳草药材质量控制提供参考^[16]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 124-125.
- [2] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 680-683.
- [3] 杨小双, 宋信莉, 甘莹莹, 等. 老鹳草巴布剂对类风湿性关节炎大鼠的药效作用 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1816-1821.
- [4] 张萌, 邓家刚, 韦玮, 等. 广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化瘀作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 601-607.
- [5] 孙露露, 王盈桐, 赵凤春, 等. 泰山虫草的高效液相色谱指纹图谱建立及谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5): 1105-1107.
- [6] 杨祎辰, 常晖, 王二欢, 等. 老鹳草属药用植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 918-927.
- [7] 马若婷, 孙佳楠, 赵生俊, 等. 新疆 3 种阿魏不同极性部位的抗肿瘤活性谱效关系研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5120-5125.
- [8] 许晓燕, 余梦瑶, 罗霞. HPLC 分析灵芝指纹图谱及体外抗肿瘤活性的谱效关系 [J]. 中国测试, 2020, 46(10): 23-27.
- [9] 杨超, 朱晓钗, 万浩婷, 等. 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5267-5274.
- [10] 李硕, 王志允, 常华杰, 等. 木香 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化、抗辐射作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2580-2587.
- [11] 刘林莉, 麻秀萍, 徐剑, 等. 白及正丁醇提取物止血作用的谱效关系研究 [J]. 中药材, 2022, 45(11): 2664-2670.
- [12] 曹阳洋, 张亚杰, 崔方, 等. 基于 HPLC-DAD 指纹图谱和化学计量法分析的红药子抗氧化活性谱效关联研究 [J]. 中国药事, 2022, 36(8): 943-953.
- [13] 彭丽颖, 梁悦, 施君君, 等. 丹参 HPLC 指纹图谱及总抗氧化活性谱效关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 110-115.
- [14] 柳慧芸, 吴巧凤. 苏叶黄连汤抗流感作用的谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2049-2053.
- [15] 朱京童, 白玉, 司文秀, 等. 中药白头翁提取物抗肿瘤活性的体外实验研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(1): 67-69.
- [16] 孔德暄, 陈运中, 朱映睿, 等. 虎杖 HPLC 指纹图谱及抗痛风性关节炎活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 569-574.

[责任编辑 时圣明]