

基于相关性分析的金银花和山银花正丁醇提取物的抗肿瘤活性谱-效关系研究

万丹^{1,2,3}, 张水寒^{1,2,3}, 沈冰冰¹, 袁清照¹, 蔡萍^{*1}

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410013;

2. 湖南省中药原料质量监测技术服务中心, 湖南长沙 410013;

3. 湖南省 2011 数字中医药协同创新中心, 湖南长沙 410013)

摘要: 本文采用相关性分析, 研究了金银花和山银花正丁醇提取物的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)图谱与抗肿瘤活性的谱-效关系。首先采用 HPLC-MS/MS 法对金银花和山银花正丁醇提取物进行分析, 得到各提取物的化学成分, 同时采用噻唑蓝(MTT)法观察金银花和山银花正丁醇提取物对 Mcf-7、Hela、Ht29 细胞株的抑制作用, 然后利用最小二乘法分析其谱-效关系, 通过分析化学成分与药效活性的相关性, 从中筛选出具有代表性的化合物, 进而探索金银花和山银花抗肿瘤作用的药效物质基础。

关键词: 金银花和山银花正丁醇提取物; 抗肿瘤作用; 谱-效关系

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1006-6144(2020)01-037-05

金银花为忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的干燥花蕾或带初开的花。山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides*)、红腺忍冬(*Lonicera hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*Lonicera Confusa* DC.)或黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng)的干燥花蕾或带初开的花, 具有疏风散热、凉血解毒的功效, 其主要化学成分有咖啡酰基奎宁酸类^[1]、黄酮类^[2]、环烯醚萜类以及皂苷类^[3]。现代药理研究表明金银花具有抗肿瘤^[4]、保肝、抗炎以及抗菌^[5]等多种生理活性, 但对其抗肿瘤物质基础的研究较少。

本研究以金银花和山银花为对象, 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法对它们的正丁醇提取物进行分析, 并建立它们正丁醇提取物的 HPLC 指纹图谱, 比较主要化学成分的异同, 同时对其抗肿瘤活性进行评价, 采用最小二乘法计算指纹图谱特征峰与抗肿瘤作用的关联度。运用建立的“谱-效”相关性模型能较好地体现金银花、山银花的物质成分与抗肿瘤活性之间的相关性, 从而为阐明其抗肿瘤作用的药效物质基础提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 6530 型液-质联用仪、Agilent Technologies 1290 Infinity 型高效液相色谱仪(美国, Agilent 公司); Mettler Toledo XPE105 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); Thermo Fisher-Multi-skan FC 酶标仪。

人乳腺癌细胞株(Mcf-7)、人宫颈癌细胞株(Hela)、人结肠癌细胞株(Ht29)均购自中科院上海细胞

收稿日期: 2018-11-06

修回日期: 2018-12-25

基金项目: 湖南省自然科学基金(No. 2016JJ6086); 湖南省中医药管理局项目(201702); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开发基金(No. ZYFT201508)

* 通讯作者: 蔡萍, 博士, 副研究员, 主要从事中药制剂及质量标准的研究。E-mail: 330343348@qq.com

生物研究所;灰毡毛忍冬皂苷乙(批号:111814-201604)、川续断皂苷乙(批号:111813-201403)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙醇、正丁醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,德国默克化工技术有限公司)。

4 批药材经湖南省中医药研究院刘浩助理研究员鉴定为:灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides*, 湖南隆回)、红腺忍冬(*Lonicera hypoglauca* Miq., 广西都安)、黄褐毛忍冬(*Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng, 广西隆林)、忍冬(*Lonicera japonica* Thunb., 河南封丘)。

1.2 实验方法

1.2.1 正丁醇提取物的制备 称取已粉碎的 4 个样品各 200 g,以料液比 1:8 加入 70%乙醇,于 70℃回流提取 1.5 h,提取 3 次,过滤,合并提取液,浓缩干燥后得醇提浸膏。将该浸膏加水分散至质量浓度为 0.5 g/mL,加入正丁醇:浸膏分散液=1:1(V/V)萃取 3 次,移出正定醇层,蒸干,加少量水溶解,冷冻干燥,即得。

1.2.2 供试品溶液制备 精密称取 4 种正丁醇提取物,加甲醇溶解并定容后,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,进行 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

1.2.3 对照品溶液配制 取灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品适量,加入甲醇,分别配制成浓度为 0.1 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.4 HPLC-MS/MS 条件 采用 InertSustain-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以 0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)作为流动相,采用梯度洗脱模式:0~10 min,7%~11.5%B;10~12 min,11.5%~20%B;12~30 min,20%~29%B;30~45 min,29%~31%B;45~48 min,31%~45%B。流速:1 mL/min,柱温:30℃,紫外检测波长:207 nm,进样量:10 μL。质谱采用电喷雾电离,正、负离子(ESI⁺、ESI⁻)模式,扫描范围 m/z 100~1 800。扫描方式:全扫描和选择离子扫描,雾化气温度:320℃,干燥气流速:8 L/min,鞘气(N₂)温度:320℃,鞘气流速:11 L/min,碎裂电压:185 V。

1.2.5 体外抗肿瘤活性实验 取提取物和对照抗肿瘤药顺铂,用 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)分别配成不同浓度的供试液,取对数生长期的 Mcf-7、Hela、Ht29,消化制成单细胞悬液,调整浓度为 2.0×10^4 cell/mL,每孔 100 μL 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中。隔夜培养后加入供试液。培养 48 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL 噻唑蓝(MTT)工作液 20 μL,孵育 4 h,去除上清后,加入 150 μL/hole 二甲基亚砜(DMSO),于旋涡振荡器上振荡 10 min 充分溶解结晶。然后在酶标仪上,于 570 nm 波长处测定每孔的吸光度值(OD)。细胞增殖抑制率=(对照组 OD 值-药物组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。依次计算药物对癌细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。

2 结果与讨论

2.1 色谱峰的归属^[6-10]

按照 1.2.2 方法制备得到样本,采用 HPLC-MS/MS 法进行分析检测,以正、负离子扫描方式采集质谱信息,ESI⁻ 模式下的总离子流色谱图见图 1。对其特征峰进行定性分析,结合对照品和文献信息共鉴定出 31 个化合物(表 1)。

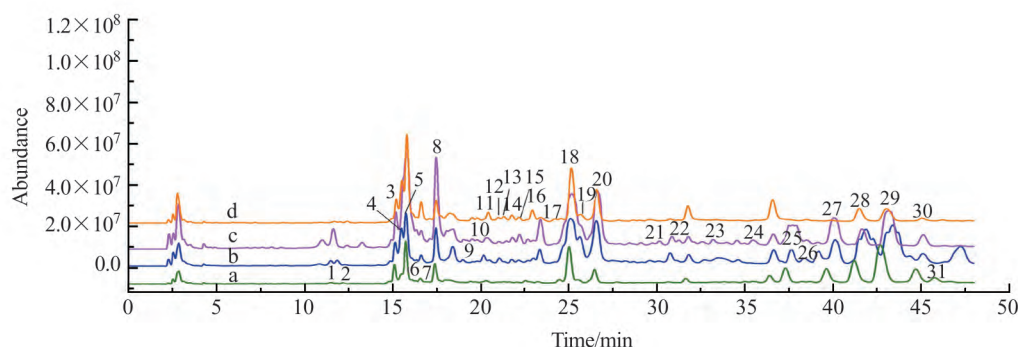


图 1 各提取物 ESI⁻ 模式的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of each extracts in ESI⁻ mode

a. *Lonicera hypoglauca* Miq.; b. *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng; c. *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz; d. *Lonicera japonica* Thunb. .

表 1 各提取物的化学成分鉴定
Table 1 Identification of chemical constituents of each extracts

No.	t_R (min)	Formula	Compound	Fragmental ion mode(m/z)	Error	MS/MS	Plant			
							A	B	C	D
1	11.50	$C_{16}H_{18}O_9$	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	353.0835[M-H] ⁻	-10.76	284,191,179,135	+	+	+	+
2	12.21	$C_{16}H_{24}O_{10}$	8-Loganic acid	375.1254[M-H] ⁻	-9.86	213,179,169,135	+		+	
3	15.10	$C_{16}H_{22}O_{11}$	Scandoside	389.1053[M-H] ⁻	-7.97	345,305,165,121	+	+	+	+
4	15.43	$C_{16}H_{22}O_{10}$	Secologanic acid	373.1101[M-H] ⁻	-9.11	211,167,149,119,101	+	+		+
5	15.53	$C_{16}H_{18}O_9$	Chlorogenic acid	353.0843[M-H] ⁻	0.00	191,173,135	+	+		
6	15.75	$C_{16}H_{18}O_9$	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	707.1786[2M-H] ⁻	-5.23	353,191	+	+	+	+
7	16.55	$C_{17}H_{24}O_{11}$	Secologanoside-7-methylester	403.1208[M-H] ⁻	-7.94	357,195,125	+	+		
8	17.40	$C_{17}H_{24}O_{11}$	Secoxyloganin	807.2517[2M-H] ⁻	-5.20	403,371,179,119	+	+	+	+
9	18.99	$C_{16}H_{24}O_9$	7-Deoxy-8- <i>epi</i> -loganic acid	359.1352[M-H] ⁻	2.78	315,197		+		
10	19.85	$C_{16}H_{16}O_8$	3- <i>O</i> -caffeoylshikimic acid	335.0750[M-H] ⁻	-5.07	291,163			+	
11	20.41	$C_{34}H_{26}O_{11}$	Rutin	609.1428[M-H] ⁻	5.09	301,271				+
12	21.06	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside	593.1528[M-H] ⁻	-9.61	431,285		+		+
13	21.63	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Luteolin	447.0897[M-H] ⁻	-6.71	285,174,119	+	+	+	+
14	22.03	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	463.0842[M-H] ⁻	-7.56	301	+	+	+	+
15	22.94	$C_{34}H_{46}O_{19}$	Centaurosides	757.2523[M-H] ⁻	-4.23	595,577,525,179				+
16	23.23	$C_{25}H_{24}O_{12}$	1,4-Dicaffeoylquinic acid	515.1159[M-H] ⁻	-6.02	353,191,179,135	+	+	+	+
17	24.18	$C_{34}H_{46}O_{19}$	Aldosecologanin	757.2522[M-H] ⁻	-4.36	595,525,493,179				+
18	25.02	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,5-Dicaffeoylquinic acid	515.1160[M-H] ⁻ 1031.2416[2M-H] ⁻	-5.82 -3.98	3515,53,191,179,135	+	+	+	+
19	25.58	$C_{25}H_{24}O_{12}$	4,5-Dicaffeoylquinic acid	515.1156[M-H] ⁻	-6.60	353,191,179,135	+	+	+	+
20	26.48	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3,4-Dicaffeoylquinic acid	515.1162[M-H] ⁻	-5.44	353,191,179,135	+	+	+	+
21	30.06	$C_{25}H_{24}O_{11}$	Coumaroyl caffeoyl quinic acid	499.1271[M-H] ⁻	6.21	353,191,179		+	+	
22	31.20	$C_{26}H_{26}O_{12}$	Methyl dicaffeoyl quinic acid	529.1378[M-H] ⁻	6.05	367,353,191,173	+	+		
23	33.20	$C_{30}H_{26}O_{14}$	3-Cinnamic-5-rhamnose-quercetin	609.1227[M-H] ⁻	-15.76	447,431,179,147			+	
24	35.64	$C_{20}H_{26}O_9$	<i>Butyl</i> -4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	409.1476[M-H] ⁻	5.62	309,247,163			+	+
25	37.30	$C_{65}H_{106}O_{32}$	Macranthoidin B	1397.6540[M-H] ⁻	-3.51	1073,721	+	+	+	
26	38.24	$C_{15}H_{10}O_6$	Luteolin	285.0368[M-H] ⁻	-10.88	241,199,151,	+	+	+	+
27	39.67	$C_{59}H_{96}O_{27}$	Maeranthoidin A	1235.6010[M-H] ⁻	-4.13	911,603	+	+	+	+
28	41.24	$C_{58}H_{94}O_{26}$	Acutoside C	1205.5903[M-H] ⁻	-4.31	881,749,603,323	+	+	+	+
29	42.67	$C_{53}H_{86}O_{22}$	Dipsacoside B	1073.5487[M-H] ⁻	-4.19	911,749	+	+	+	+
30	44.67	$C_{47}H_{76}O_{18}$	Asperosaponin VI	927.4919[M-H] ⁻ 973.4966[M-H+HCOOH] ⁻	-3.67 -4.31	973,603,323	+	+	+	+
31	45.77	$C_{67}H_{108}O_{33}$	Aster saponin B	1439.6662[M-H] ⁻	-2.29	1307,1073,	+			

+:detected.

2.2 体外抗肿瘤活性

按照 1.2.5 项进行各样品的体外抗肿瘤活性测试, MCF-7、Hela、Ht29 三个细胞株的结果见表 2。由表 2 可知, 各样品有一定的抗肿瘤活性, 其中红腺忍冬对 MCF-7 的效果与药物顺铂相当。

表 2 各提取物对三种人体肿瘤细胞株的抑制作用(IC_{50})
Table 2 Growth inhibition of each extract against three human tumor cell lines(IC_{50})

	Mcf-7	Hela	Ht29
Cisplatin	25.6	3.98	8.02
n-Butanol extract from <i>Lonicera macranthoides</i>	34.78	>100	25.95
n-Butanol extract from <i>Lonicera fulvotomentosa</i> Hsu et S. C. Cheng	82.21	>100	52.61
n-Butanol extract from <i>Lonicera hypoglaucha</i> Miq.	27.06	67.87	37.6
n-Butanol extract from <i>Lonicera japonica</i> Thunb.	51.99	47.91	43.01

2.3 正丁醇提取物指纹图谱与抗肿瘤活性的相关性分析^[11-13]

对 4 个样品在 3 个不同浓度(100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$, 构建为矩阵 X)的抗肿瘤活性进行测试, 分别得到不同浓度下的活性值(构建为活性矩阵 Y)。结果表明: MCF-7 和 Ht29 细胞系实验中抗肿瘤活性之间存在明显的相关性, 拟合相关系数(R^2)分别达到了 0.9681 和 0.9673, 说明样品的物质成分与抗肿瘤活性之间存在明显的相关性。以实验结果与拟合的结果分别为横坐标和纵坐标作图, 得到图 2 和图 3。在建立拟合模型的过程中, 得到每个物质的拟合系数, 从而明确每个物质对抗肿瘤活性贡献度。从图 4 中可见, 峰 8(断氧化马钱子苷)、峰 20(3,4-二咖啡酰奎宁酸)、峰 29(川续断皂苷乙)等具有较高的抗肿瘤活性贡献度, 是其抗肿瘤活性的主要来源。有研究发现 3,4-二咖啡酰奎宁酸能抑制 MCF-7 的生长和增殖, 诱导 MCF-7 发生凋亡, 这与本实验中发现 3,4-二咖啡酰奎宁酸具有抗肿瘤活性结论一致。

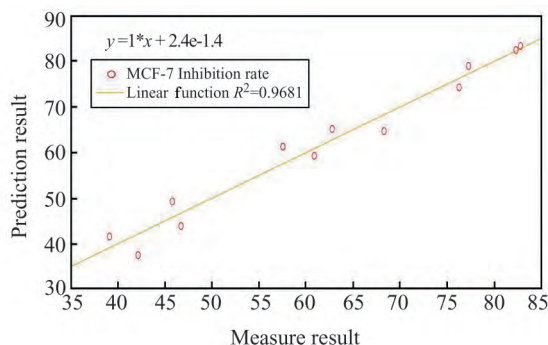


图 2 各物质与 MCF-7 细胞株活性最小二乘拟合结果
Fig 2 The fitting results obtained by using active substances and MCF-7 cell line

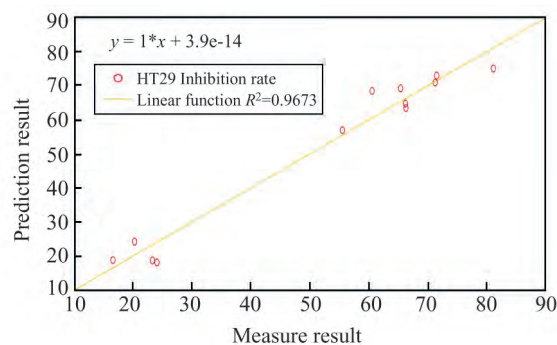


图 3 各物质与 Ht29 细胞株活性最小二乘拟合结果
Fig 3 The fitting results obtained by using active substances and Ht29 cell line

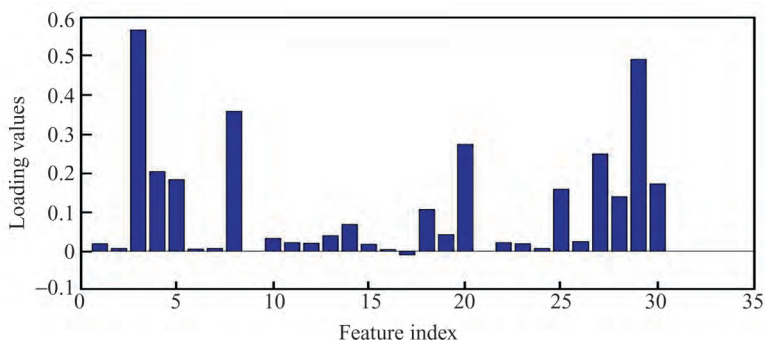


图 4 各物质对抗肿瘤活性的重要度
Fig 4 The variable importance of each substance

3 结论

本实验采用液-质联用分析金银花和山银花正丁醇提取物的抗肿瘤活性, 通过分析化学成分与药效活性的相关性, 从中筛选出具有代表性的化合物, 这对金银花和山银花的抗肿瘤物质基础的进一步研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Hu X, Chen L, Shi S, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, **124**:254.
- [2] XIE Y F, XU W L, LIU G, et al. Anti-tumor Pharmacy(谢雁飞, 徐望龙, 刘刚等. 肿瘤药理学), 2015, (6):420.
- [3] Chai X, Li S, Li P. Journal of Chromatography A, 2005, **1070**:43.
- [4] Wang J, Zhao X, Qi Q, et al. Food and Chemical Toxicology, 2009, **47**:1716.
- [5] BAI Z J, REN Q L, FENG T T, et al. Research and Practice on Chinese Medicines(白仲杰, 任群利, 俸婷婷等. 现代中药研究与实践), 2015, **29**(5):35.
- [6] Onnuri S, Gonsup K, Semin P, et al. Food Chemistry, 2012, **134**(1):572.

- [7] ZHANG W B, WANG Z C, ZHANG Y L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry(张维冰, 王智聪, 张凌怡. 分析化学), 2013, **41**(12):1851.
- [8] LI P L, LI C Y, LIU M H, et al. Central South Pharmacy(李泮霖, 李楚源, 刘孟华等. 中南药学), 2016, (4):363.
- [9] Dung N T, Bajpai V K, Rahman A, et al. Journal of Food Biochemistry, 2011, **35**(1):148.
- [10] ZHANG L Y, LI Y B, LI L X, et al. Central South Pharmacy(张丽媛, 李遇伯, 李利新等. 中南药学), 2012, **10**(3):204.
- [11] SHI S T, ZHANG X J, YI L C. Journal of Analytical Science(石书婷, 章晓娟, 易伦朝. 分析科学学报), 2015, **31**(2):237.
- [12] DING X X, NI Y N. Journal of Analytical Science(丁晓晓, 倪永年. 分析科学学报), 2014, **30**(4):445.
- [13] WANG M Y. The Inhibitory Effects of Dicafeoylquinic Acid from Ilex Kudingcha on Human Cancer Cells and Its Mechanism of Action in Vitro, Hu Bei, Hubei University of Chinese Medicine(王明彦. 苦丁茶中二咖啡酰基奎宁酸对人肿瘤细胞的体外抑制作用及其机制研究. 湖北:湖北中医药大学), 2014:1.

Spectra-effect Relationship of Antitumor Effects of n-Butanol of *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos* Based on Correlation Analysis

WAN Dan^{1,2,3}, ZHANG Shuihan^{1,2,3}, SHEN Bingbing¹,
YUAN Qingzhao¹, CAI Ping^{*1}

(1. Hunan Institute of TCM, Changsha 410013;

2. Hunan TCM Raw Material Quality Monitoring Technology Service Center, Changsha 410013;

3. 2011 Collaboration and Innovation Center for Digital Chinese Medicine in Hunan, Changsha 410013)

Abstract: The spectra-effect relationship between high performance liquid chromatography fingerprints and antitumor effects of n-butanol extracts of *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos* was studied. HPLC-MS/MS method was used to analyze n-butyl alcohol extracts from *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos*, the inhibition of n-butyl alcohol extracts from *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos* to Mcf-7, Hela and Ht29 was observed by MTT method, and the effect relationship was analyzed by least square method. In this study, the representative compounds were screened by analyzing the correlation between chemical constituents and pharmacodynamic activities, which provides a way to explore the pharmacodynamic material base of *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos*.

Keywords: n-Butyl alcohol extracts from *Lonicera japonicae Flos* and *Lonicera Flos*; Antitumor effects; Spectra-effect relationship