

基于谱效关系的朝鲜天南星和东北天南星相似性评价

王帅, 包永睿, 杨欣欣, 李天娇, 孟宪生*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省组分中药工程技术研究中心,
辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**对天南星药材指纹图谱与抗肿瘤药效进行相关分析,探讨基于主要药效成分的朝鲜天南星与东北天南星化学成分相似性,为朝鲜天南星临床合理应用提供实验数据。**方法:**采用高效液相色谱法,建立11批不同产地、不同采收期朝鲜天南星与东北天南星药材指纹图谱;采用噻唑蓝(MTT)比色法考察其对人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用;同时采用灰色关联度分析、偏最小二乘回归分析方法,对6批朝鲜天南星和5批东北天南星进行谱效相关性分析,找到各自药效贡献较大成分,评价二者相似性。**结果:**成功建立了11批不同来源天南星药材的指纹图谱,同时验证了不同来源天南星的抗肿瘤药理活性。灰色关联分析结果显示朝鲜天南星与药效关联系数 > 0.80 的15个成分中有12个与东北天南星一致;偏最小二乘回归分析验证了灰色关联分析结果的合理性。综合分析证明,基于主要药效成分的朝鲜天南星与东北天南星具有较好的相似性。**结论:**本实验以抗肿瘤药效为导向,验证了朝鲜天南星与东北天南星基于化学成分的相似性,为朝鲜天南星作为习用品提供合理依据的同时,也为其质量控制提供实验依据。

[关键词] 朝鲜天南星; 东北天南星; 抗肿瘤; 谱效关系; 相似性评价

[中图分类号] R284.1; R931.6; R282.6; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0044-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181018

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1319.049.html>

[网络出版时间] 2018-3-9 14:43

Similarity Evaluation of *Arisaema peninsulae* and *Arisaema amurense* Based on Spectrum-activity Relationship

WANG Shuai, BAO Yong-rui, YANG Xin-xin, LI Tian-jiao, MENG Xian-sheng*

(College of Pharmacy, Liaoning Province Multi-component Chinese Medicine Engineering
Technology Research Center, Liaoning Province Modern Traditional Chinese Medicine (TCM)
Research and Engineering Laboratory, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** Fingerprint and anti-tumor pharmacodynamic analysis were used to probe the similarity of the principal pharmacodynamic components of *Arisaema peninsulae* and *A. amurense*, providing data support for the rational clinical use of *A. peninsulae*. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) method was used to establish the fingerprint of 11 batches of *A. peninsulae* and *A. amurense* from different origins or harvest time points. Thiazolyl blue (MTT) assay was used to investigate their inhibition effect on SMMC-7721 cells proliferation. Grey relational analysis and partial least-squares regression analysis methods were used to analyze the spectrum-activity relationship of 6 batches of *A. peninsulae* and 5 batches of *A. amurense* respectively, aimed to find the ingredients with greater contribution to efficacy and evaluate the similarities. **Result:** The fingerprint of 11 batches of *A. peninsulae* and *A. amurense* from different origins or harvest time points was established, and their

[收稿日期] 20170826(003)

[基金项目] 辽宁省特聘教授项目(辽教发[2014]187号);辽宁省教育厅一般项目(L201605)

[第一作者] 王帅, 硕士, 实验师, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究, Tel: 0411-85890185, E-mail: christina8673028@126.com

[通信作者] *孟宪生, 教授, 从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究, Tel: 0411-85890185, E-mail: mxsvvv@126.com

anti-tumor activity was verified. Grey relational analysis results showed that 12 components from 15 components of *A. peninsulae* whose pharmacodynamic correlation coefficient was greater than 0.80 were the same as *A. amurense*. And the rationality of the grey relational analysis results was verified by partial least-squares regression analysis. The comprehensive analysis proved that *A. peninsulae* had a good similarity with *A. amurense* based on the main pharmacodynamic components. **Conclusion:** Guided by the anti-tumor efficacy, this experiment verified the similarity of chemical compositions between *A. peninsulae* and *A. amurense*, providing reasonable basis for the use of *A. peninsulae*, and providing experimental basis for its quality control.

[**Key words**] *Arisaema peninsulae*; *A. amurense*; anti-tumor; spectrum-activity relationship; similarity evaluation

朝鲜天南星为天南星科植物朝鲜天南星的块茎^[1],具有祛风化痰、消肿止痛的功效,其主要分布于吉林、辽宁、河南等省^[2]。东北天南星主要生于长白山山脉,分布于吉林、黑龙江、辽宁等地^[3-4]。朝鲜天南星与东北天南星、异叶天南星同属,虽未被列入 2015 年版《中国药典》,但其资源非常丰富^[5-6],功效与东北天南星相似^[7],在东北地区民间作为东北天南星习用品使用^[8-10]。本实验收集了 11 批 2012,2013 年 4 月,9 月采自辽宁不同地域的朝鲜天南星和东北天南星,旨在通过谱学研究,探讨基于抗肿瘤药效的朝鲜天南星与东北天南星主要药效化学成分的相似性,为其合理的临床应用提供数据支撑,同时也为更好地控制其药材质量提供研究依据。

1 材料

11 批不同产地或采收期天南星药材,经辽宁中医药大学许亮教授鉴定为天南星科植物朝鲜天南星 *Arisaema peninsulae* 或东北天南星 *A. amurense* 的干燥块茎,药材采集时间、品种及产地见表 1。

表 1 朝鲜天南星及东北天南星药材品种及其产地信息
Table 1 Variety and origin of medicinal materials of *Arisaema peninsulae* and *A. amurense*

No.	采集时间	品种	产地
S1	2013 年 4 月	朝鲜天南星 <i>Arisaema peninsulae</i>	辽宁丹东通远堡
S2	2013 年 9 月	朝鲜天南星 <i>A. peninsulae</i>	辽宁丹东通远堡
S3	2013 年 9 月	朝鲜天南星 <i>A. peninsulae</i>	辽宁本溪关门山
S4	2012 年 4 月	朝鲜天南星 <i>A. peninsulae</i>	辽宁丹东宽甸
S5	2012 年 9 月	朝鲜天南星 <i>A. peninsulae</i>	辽宁抚顺南杂木
S6	2012 年 9 月	朝鲜天南星 <i>A. peninsulae</i>	辽宁本溪桓仁
S7	2013 年 9 月	东北天南星 <i>A. amurense</i>	辽宁抚顺南杂木
S8	2013 年 4 月	东北天南星 <i>A. amurense</i>	辽宁丹东宽甸
S9	2013 年 9 月	东北天南星 <i>A. amurense</i>	辽宁丹东通远堡
S10	2012 年 9 月	东北天南星 <i>A. amurense</i>	辽宁本溪桓仁
S11	2012 年 4 月	东北天南星 <i>A. amurense</i>	辽宁丹东通远堡

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),CP2250D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯集团),Milli-Q 系列超纯水处理装置(美国 Millipore 公司),NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO₂ 培养箱(德国 Nuair 公司),SUNRISE 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110807-201308),乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司),乙醇、乙酸铵(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),DMEM 培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

人肝癌 SMMC-7721 细胞株,由中国科学院上海生命科学研究院细胞库提供。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取天南星药材 0.6 g,粉碎(过 60 目筛),精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇 50 mL,称定质量,超声提取(200 W, 40 kHz)45 min,冷却至室温并补足减失质量,滤过,精密量取续滤液 25 mL,挥干,加超纯水使之溶解于 2 mL 量瓶中,过滤,即得供试品溶液^[11]。

2.2 对照品溶液制备 精密称取腺苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.005 0 g·L⁻¹的对照品溶液,即得。

2.3 高效液相色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相 30 mmol 乙酸铵(A)-乙腈(B)溶液,洗脱梯度(0~8 min,2%~4% B;8~12 min,4%~7% B;12~20 min,7%~15% B;20~30 min,15%~30% B;30~35 min,30%~35% B);流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 270 nm;柱温设定 25 ℃;进样量 10 μL。

2.4 11 批天南星药材指纹图谱的建立 取同一批天南星药材,以腺苷色谱峰(S)为参照,考察方法的精密度、稳定性、重复性均<3%,符合指纹图谱方法学考察相关规定。另外分别选取 11 个不同产地或

采收期天南星药材,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件记录色谱图,将其导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)^[12-14],以 S1 样品为参照图谱,中位数法生成谱图,选择色谱分离度、对称度较好,且能够满足定性、定量要求的色谱峰作为特征峰,Mark 峰匹配法进行自动匹配,生成天南星药材对照指纹图谱 R,18 个特征峰保留时间分别为 4.578,5.103,6.340,7.062,7.681,7.982,10.316,11.493,11.967,12.826,14.471,15.906,17.729,18.186,22.664,25.033,27.259,28.042。见图 1,2。

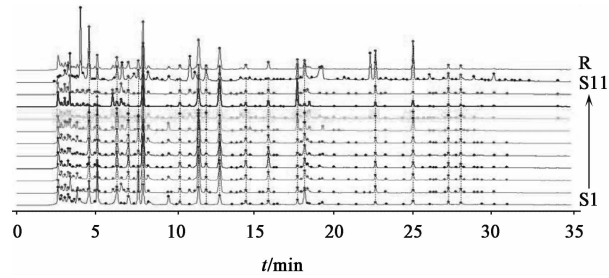


图 1 11 批天南星药材 HPLC 指纹谱
Fig. 1 Fingerprints of 11 batches of *Arisaema peninsulae* and *A. amurense*

的抗肝肿瘤作用。

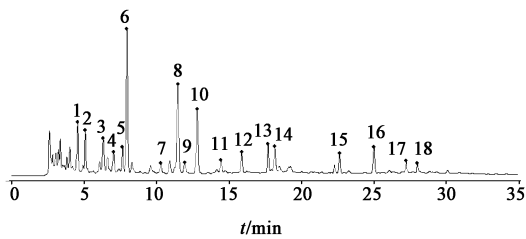
2.6 基于灰色关联分析的不同来源天南星化学成分相似性 根据朝鲜天南星与东北天南星的 18 个共有峰和药效数据,采用 Grey Modeling_V3.0 灰色关联度分析软件,将影响整体行为的数据进行分列,以细胞的增殖抑制率为母序列,天南星药材的不同峰面积为子序列。分别对朝鲜天南星和东北天南星的色谱峰与药效进行灰色相对关联度分析^[15],见表 2,3。结果可见朝鲜天南星与药效关联系数 > 0.80 (有较高关联度)^[16]的色谱峰为 1,3,4,7~18 共 15 个色谱峰;东北天南星与药效关联系数 > 0.80 的色谱峰为 3,6~14,16~18 共 13 个色谱峰,二者比较共有 12 个色谱峰一致,分别为 3,7~14,16~18 号色谱峰,说明朝鲜天南星与东北天南星在主要药效化学成分上具有较好的相似性。

2.7 基于偏最小二乘回归分析的不同来源天南星主要药效成分相似性验证 采用 SPSS 17.0 统计软件,分别将归一化后的朝鲜天南星与药效数据、东北天南星与药效数据进行偏最小二乘法(PLS)回归分析^[17],以肿瘤细胞增殖抑制率为 Y,各色谱峰面积为 X,计算出各 X 对应 Y 的回归系数,得朝鲜天南星的回归方程为 $Y_{朝} = 1.999 - 0.013X_1 - 0.018X_2 - 0.053X_3 - 0.019X_4 - 0.013X_5 + 0.031X_6 + 0.034X_7 + 0.049X_8 + 0.006X_9 + 0.056X_{10} - 0.025X_{11} + 0.011X_{13} - 0.038X_{14} - 0.006X_{15} - 0.040X_{16} - 0.038X_{17} - 0.034X_{18}$;东北天南星的回归方程为 $Y_{东} = 2.515 - 0.013X_1 + 0.018X_2 - 0.009X_3 + 0.066X_4 + 0.007X_5 + 0.012X_6 + 0.016X_7 + 0.029X_8 - 0.117X_9 + 0.024X_{10} - 0.053X_{11} - 0.025X_{12} - 0.013X_{13} - 0.032X_{14} - 0.055X_{15} - 0.036X_{16} - 0.081X_{17} - 0.138X_{18}$ 。可知,朝鲜天南星中对药效起促进作用的色谱峰主要为 6,7,8,10,13 号峰;东北天南星中对药效起促进作用的色谱峰主要为 2,4,6,7,8,10 号峰。二者共有峰为 6,7,8,10 号峰,说明朝鲜天南星与东北天南星主要药效成分具有较好的相似性。

3 讨论

朝鲜天南星与东北天南星、异叶天南星同属,其资源非常丰富^[5],在东北常作为天南星使用^[8],但其应用的合理性目前尚无理论支撑。本实验收集了 11 批 2012,2013 年 4 月,9 月采自辽宁不同地域的朝鲜天南星和东北天南星,建立了不同来源天南星药材化学成分指纹图谱,经指纹图谱相似度评价软件评价得到 18 个特征峰。在此基础上考察了不同

图 2 天南星药材 HPLC 对照指纹谱
Fig. 2 Reference fingerprint of *Arisaema*



2.5 不同来源天南星药材体外抗肝肿瘤药效 取处于对数生长期的人肝癌 SMMC-7721 细胞,调整密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L。设加药孔、空白孔和调零孔(只加培养基)($n = 5$),11 批天南星提取液给药 24 h 后,酶标仪 492 nm 处测定吸光度 A,计算药物对细胞的增殖抑制作用。细胞抑制率 = $(1 - A_{给药组} / A_{空白组}) \times 100\%$ 。结果 S1 ~ S6 号朝鲜天南星的抑制率分别为 $(59.37 \pm 1.03)\%$, $(87.35 \pm 2.05)\%$, $(57.07 \pm 0.96)\%$, $(74.37 \pm 1.49)\%$, $(71.31 \pm 2.50)\%$, $(79.10 \pm 2.85)\%$,S7 ~ S11 号东北天南星的抑制率分别为 $(76.49 \pm 2.20)\%$, $(57.02 \pm 1.40)\%$, $(67.16 \pm 1.61)\%$, $(57.80 \pm 1.96)\%$, $(32.10 \pm 1.58)\%$,朝鲜天南星与东北天南星均表现出较好

表 2 朝鲜天南星谱效相关性分析

Table 2 Spectrum-activity correlation analysis result of *Arisaema peninsulae*

色谱峰	峰面积归一化后数据						关联系数
	S1	S2	S3	S4	S5	S6 号	
1	2.659 7	1.839 9	2.641 9	1.990 8	2.527 9	2.641 9	0.821 7
2	2.861 0	1.589 1	2.491 7	2.121 3	2.443 2	2.491 7	0.733 4
3	2.690 0	2.192 7	2.501 7	2.565 6	2.536 8	2.501 7	0.903 2
4	2.440 0	1.872 0	2.299 2	2.442 9	2.498 3	2.299 2	0.953 4
5	2.847 6	1.249 7	2.463 3	1.494 5	2.017 5	2.463 3	0.677 4
6	2.673 5	3.119 6	3.112 2	3.285 8	3.130 7	3.112 2	0.774 2
7	1.839 5	2.011 2	1.895 9	2.157 3	1.974 3	1.895 9	0.906 7
8	2.745 6	3.041 4	3.011 9	3.177 7	3.080 4	3.011 9	0.848 7
9	1.793 2	1.929 2	2.021 6	2.120 4	1.954 9	2.021 6	0.846 5
10	2.477 0	2.935 3	2.767 2	2.889 0	2.811 6	2.767 2	0.809 8
11	1.981 3	1.804 1	2.104 2	2.264 0	2.117 0	2.104 2	0.996 2
12	1.963 3	1.976 0	2.267 7	2.514 4	2.293 4	2.267 7	0.803 1
13	1.925 1	1.952 6	1.810 2	1.625 9	1.777 3	1.810 2	0.945 9
14	2.590 5	2.027 7	2.381 8	2.370 6	2.460 6	2.381 8	0.870 0
15	1.798 8	2.110 5	2.036 7	2.086 6	1.794 2	2.036 7	0.849 9
16	2.037 2	1.958 8	2.221 0	2.224 3	2.127 8	2.221 0	0.991 2
17	1.782 3	1.940 8	1.978 1	1.966 2	1.750 3	1.978 1	0.929 1
18	1.746 6	1.888 0	1.867 2	1.902 7	1.728 6	1.867 2	0.971 5

表 3 东北天南星谱效相关性分析

Table 3 Spectrum-activity correlation analysis result of *Arisaema amurense*

色谱峰	峰面积归一化后数据					关联系数
	S7	S8	S9	S10	S11	
1	2.680 2	2.009 9	1.395 2	1.892 9	2.985 3	0.760 0
2	2.782 8	1.774 9	1.354 4	1.539 7	2.308 8	0.699 9
3	2.714 4	2.531 8	2.172 4	2.107 6	2.481 1	0.868 8
4	2.503 8	1.983 4	1.634 7	1.944 0	1.957 3	0.774 7
5	2.515 1	1.266 5	0.909 3	1.058 7	2.338 2	0.669 5
6	2.790 4	3.250 0	2.963 2	3.046 2	2.319 7	0.981 3
7	1.835 7	2.163 2	2.086 0	2.011 7	1.565 5	0.955 4
8	2.744 4	3.102 5	2.744 9	2.928 7	1.740 4	0.837 7
9	1.850 6	2.277 4	1.646 0	2.037 7	2.557 6	0.917 8
10	2.645 5	2.973 7	2.899 6	2.915 3	2.360 5	0.996 3
11	1.994 4	2.312 8	1.972 2	1.837 2	1.747 9	0.833 2
12	2.026 9	2.604 5	2.130 7	2.018 9	1.639 9	0.983 2
13	2.504 4	2.528 0	2.749 3	2.037 1	2.461 3	0.885 6
14	2.330 8	1.958 7	1.815 4	1.931 4	2.741 7	0.895 5
15	1.395 5	1.765 2	1.995 7	2.196 2	2.807 5	0.667 6
16	2.538 0	2.249 1	2.136 1	1.788 2	2.922 0	0.884 3
17	1.722 0	1.733 6	1.804 3	2.067 8	2.192 7	0.927 3
18	1.617 1	1.804 3	1.668 1	1.954 8	2.208 6	0.866 9

色关联分析的方法筛查,同时采用偏最小二乘回归分析方法验证,得到实验结果发现,基于主要抗肿瘤药效成分的朝鲜天南星和东北天南星在化学成分上具有较好的相似性。

灰色关联分析和偏最小二乘回归分析为中药谱效学研究较为常用的分析方法^[15],二者各具特色,与其他数据处理方法相比,灰色关联度分析对数据的要求较低,能分析小样本数据,操作简单,在谱效关系研究中运用较为广泛,但其只能给出与药效关联的强弱,不能给出相关性的正负;偏最小二乘回归分析在建立数学模型时可排除自变量多重线性的干扰,可给出相关性的正负,但回归方程最终引入了所有变量,包括没活性的变量,需甄别判断。本实验研究中通过灰色关联分析筛选出主要药效贡献成分,同时通过偏最小二乘回归分析验证的方法,从方法学角度验证了采用谱效学研究朝鲜天南星与东北天南星相似的合理性。本研究后续将进一步采用 UPLC-Q-TOF-MS 等技术,对筛选出的主要药效贡献成分进行指认,并通过成分缺失、化学分离等手段结合药效实验对这些成分的活性进行验证,以期更好地证明本研究的科学价值。

本实验以药效为导向,从谱效关系角度证明了朝鲜天南星临床应用的合理性,为其作为习用品提

来源朝鲜天南星与东北天南星的体外抗肝肿瘤活性,验证了朝鲜天南星的抗肿瘤活性。进而采用灰

供一定支持的同时,也为基于习用或替代药材的相似性与差异性评价提供一种新方法。

[参考文献]

[1] 汪荣斌,刘晓龙,王存琴,等.天南星的本草考证与药用品种调查[J].中药材,2010,33(7):1182-1185.
[2] 钱信忠.中国本草彩色图鉴[M].北京:人民卫生出版社,2003:114.
[3] 王志强.天南星化学成分与药理作用研究进展[J].药物评价研究,2009,32(2):144-149.
[4] 汤建华,任雁林,刘克勤,等.天南星药理作用和临床应用研究概况[J].陕西中医,2010,31(4):478-479.
[5] 李成华.朝鲜天南星果实中多糖的提取及含量测定[J].人参研究,2016,28(3):28-30.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:57.
[7] 高松.辽宁中药志:植物类[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2010:1176.
[8] 钟志群,刘志敏.天南星的来源考查[J].临床医学工程,2009,16(7):78-79.
[9] 谢宗万,郝近大.实用中药材经验鉴别[M].北京:人民卫生出版社,2009:63.
[10] 王惠清.中药材产销[M].成都:四川科学技术出版

社,2007:259.

[11] 罗芬,陆丹,池玉梅,等.天南星药材的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2011,36(23):3302-3305.
[12] 周琳琳,郝敏,白雁,等.河南连翘不同极性部位的 HPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):52-59.
[13] 汪艳平,戴德雄,谢媛媛,等.骨刺胶囊 HPLC 指纹图谱[J].中成药,2016,38(1):98-103.
[14] 王丹,张秋燕,杨兴鑫,等.基于 HPLC 指纹图谱的黄芩道地药材与非道地药材的鉴别研究[J].中国中药杂志,2013,38(12):1951-1960.
[15] 曾令军,林兵,宋洪涛.中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J].中国中药杂志,2015,40(8):1425-1432.
[16] 杨英来,崔方,胡芳,等.当归补血、活血作用的谱效关系研究[J].中国中药杂志,2013,38(22):3923-3927.
[17] 宋玉超,崔秀荣,连超杰,等.赤芍、白芍凉血作用比较研究(Ⅱ)-抑制脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞凋亡的谱效分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):181-184.

[责任编辑 顾雪竹]