

浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析[△]

程斌^{1*}, 周爱珍^{1#}, 彭昕², 王昕蕾³, 王娟¹(1. 浙江医药高等专科学校中药学院, 浙江宁波 315000; 2. 浙江大学宁波研究院, 浙江宁波 315000; 3. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

中图分类号 R284.1; R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2129-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.15

摘要 目的: 建立浙贝母超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)指纹图谱, 并确定其抗炎质量标志物。方法: 色谱柱为 Eclipse Plus C₁₈, 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 2 μL; 采用电喷雾离子源, 以正、负离子模式检测, 在质荷比(*m/z*)50~1 200 范围内进行扫描。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)建立 10 批不同产地浙贝母的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱。以小鼠耳肿胀度和血清中丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平为抗炎指标, 采用双变量相关分析法和灰色关联度分析法对浙贝母指纹图谱中各共有峰相对峰面积与抗炎指标的相关性进行分析, 筛选质量标志物并进行结构鉴定。结果: 在正、负离子模式下, 10 批浙贝母药材分别各有共有峰 26、10 个。综合双变量相关分析和灰色关联度分析结果, 共发现与抗炎作用相关的质量标志物 9 个, 经鉴定分别为贝母素乙、贝母素甲、环巴胺、胡萝卜苷、Polyphyllin V、苦鬼白毒素、植物甾醇、Ent-kaur-15-en-17-ol、Ent-17-norkauran-16-one。结论: 所建立的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱可用于评价浙贝母药材的质量; 贝母素乙、贝母素甲、环巴胺等可能是浙贝母具有抗炎作用的质量标志物。

关键词 浙贝母; 抗炎作用; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱; 双变量相关分析; 灰色关联度分析; 质量标志物

Establishment of UPLC-Q-TOF-MS/MS Fingerprint of *Fritillaria thunbergii* and Analysis of Anti-inflammatory Quality Markers

CHENG Bin¹, ZHOU Aizhen¹, PENG Xin², WANG Xinlei³, WANG Juan¹ (1. School of TCM, Zhejiang Pharmaceutical College, Zhejiang Ningbo 315100, China; 2. Ningbo Research Institute of Zhejiang University, Zhejiang Ningbo 315000, China; 3. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprint of *Fritillaria thunbergii*, and to define its anti-inflammatory quality markers. METHODS: The determination was performed on Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and injection volume was 2 μL. The electrospray ion source was used to scan in the range of *m/z* 50-1 200 with positive and negative ion detection mode. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprints of 10 batches of *F. thunbergii* from different habitats were established by using the *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprints* (2004A edition). With ear swelling degree, the serum levels of MDA and NO as anti-inflammatory indexes, the correlation between the relative area of common peaks in fingerprint and the anti-inflammatory indexes was analyzed by using bivariate correlation analysis and grey correlation analysis, and the quality markers were screened and identified. RESULTS: In positive and negative ion mode, 10 batches of *F. thunbergii* had 26 peaks and 10 peaks. Based on bivariate correlation analysis and grey correlation analysis, nine quality markers related to anti-inflammatory effect were found, which were identified as peiminine, peimine, cyclobalamine, daucidin, polyphyllin V, bitumen podophyllotoxin, phytosterol, ent-kaur-15-en-17-ol, ent-17-norkauran-16-one. CONCLUSIONS: Established UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprint can be used to evaluate the quality of *F. thunbergii*; peiminine, peimine and cyclobalamine and so on may be the quality markers of anti-inflammatory effect of *F. thunbergii*.

KEYWORDS *Fritillaria thunbergii*; Anti-inflammatory effect; UPLC-Q-TOF-MS/MS; Bivariate correlation analysis; Grey correlation analysis; Quality markers

△ 基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(No.LGN19H280002); 浙江省食品药品监督管理局 2018 年度科技计划项目(No.2018018); 宁波市科技创新 2025 重大专项(No.2019B10008)

* 副教授, 博士。研究方向: 中药质量标准及药效物质。电话: 0574-88222783。E-mail: 44418972@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药炮制及质量分析。电话: 0574-88830928。E-mail: 79200929@qq.com

浙贝母是百合科植物浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)的干燥鳞茎, 具有清热、化痰、止咳、解毒、散结、消痈等功效, 主治风热犯肺、痰火咳嗽、肺痈、乳痈、瘰疬和疮毒等症^[1]。近年来研究表明, 浙贝母的化痰、止咳、松弛气管平滑肌、抗炎等作用是其治疗呼吸系统疾病的药

理学基础^[2],其中浙贝母化痰、止咳的活性成分已较为明确,但对其抗炎活性成分的研究相对较少,主要集中在生物碱类成分贝母素甲和贝母素乙^[3-5]。

质量标志物是2016年提出的中药质量评价新概念,即通过一系列筛选和验证研究,确定与该药物目标活性成分相关的成分,作为反映其安全性和有效性的标志性物质进行质量控制^[6-7]。中药谱-效研究是筛选中药质量标志物的重要方法和技术之一,即先将化学指纹图谱中有用的化学信息提取出来,然后与药效实验结果相结合,通过线性或非线性数学处理,建立谱-效数学模型,从而确定与药效相关的化合物^[8]。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)建立10批不同产地浙贝母的指纹图谱;以小鼠耳肿胀度和血清中丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平为药效指标,采用双变量相关分析法和灰色关联度分析法对UPLC-Q-TOF-MS/MS指纹图谱中各共有峰与抗炎药效指标的相关性进行分析,从而筛选出质量标志物并进行鉴定,以期初步揭示浙贝母具有抗炎作用的药效物质基础,为其质量控制和资源开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Acquity型UPLC色谱仪、PGA495型MS仪(美国Waters公司);125D-1CN型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);VS10-300C型超声波清洗器(无锡沃信仪器制造有限公司);HH-W420型电热恒温水浴锅(济南欧莱博科学仪器有限公司);UV-5200PC型紫外可见分光光度计(上海力申科学仪器有限公司);HBS-1096A型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);Frontier™ 5000型微量高速离心机(美国Ohaus公司)。

1.2 药品与试剂

西贝素、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:B21331、B20082、B20080、B20081,纯度均大于99.0%);MDA、NO酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20190203、20190119);地塞米松片(遂成药业股份有限公司,批号:180803,规格:0.75 mg);甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸为质谱级,水为纯净水。浙贝母药材购于浙江磐安药材市场,经浙江医药高等专科学校中药学院杨雄志教授鉴定为百合科植物浙贝母(*F. thunbergii* Miq.)的干燥鳞茎,药材信息详见表1。

1.3 动物

洁净级ICR小鼠,雌雄各半,体质量(20±2)g,购于长春市伊斯实验动物技术有限责任公司,动物生产许可证号:SCXK(吉)2018-0007。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax HPLC Eclipse

表1 浙贝母药材信息

Tab 1 Sample information of *F. thunbergii*

| 编号 | 产地 | 加工工艺 |
|-----|-------|------|
| S1 | 贵州黔西南 | 去皮 |
| S2 | 浙江章水 | 无硫熏 |
| S3 | 浙江龙观 | 无硫熏 |
| S4 | 浙江舟山 | 无硫熏 |
| S5 | 浙江磐安 | 硫熏 |
| S6 | 湖南安化 | 硫熏 |
| S7 | 贵州兴义 | 未去皮 |
| S8 | 浙江金华 | 无硫熏 |
| S9 | 江苏南通 | 无硫熏 |
| S10 | 贵州兴义 | 无硫熏 |

Plus C₁₈(150 mm×3 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 2% A→25% A; 5~10 min, 25% A→45% A; 10~15 min, 45% A→80% A; 15~25 min, 80% A→100% A; 25~30 min, 100% A; 30~33 min, 100% A→2% A);流速为0.4 mL/min;柱温为30℃;进样量为2 μL。

质谱条件:电喷雾离子源,V模式,电压为3.0 kV,离子源温度为100℃,去溶剂气温度为400℃;正、负离子扫描模式,扫描范围为质荷比(*m/z*)50~1 200;去溶剂气流速为800 L/h。

2.2 供试品溶液的制备

取浙贝母药材适量,粉碎,过四号筛(下同),取其粉末2 g,加入浓氨水溶液4 mL,浸润1 h,加入三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)40 mL,混匀,称定质量,于80℃水浴加热回流2 h,放冷,补足减失的质量,过滤;取续滤液10 mL,于98~100℃水浴条件下蒸干,残渣以甲醇溶解并定容于2 mL量瓶中,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

本研究在正、负离子扫描模式下均进行方法学考察。

2.3.1 精密度试验 取浙贝母药材(编号:S1)粉末2 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱与质谱条件连续进样5次。在正、负离子扫描模式下,分别以6号峰(贝母素甲)、5号峰(浙贝素)的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,在正离子扫描模式下,26个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.40%(*n*=5);在负离子扫描模式下,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.80%(*n*=5),详见表2、表3。这表明本方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取浙贝母药材(编号:S1)粉末2 g,共5份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析。在正、负离子扫描模式下,分别以6号峰(贝母素甲)、5号峰(浙贝素)的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,在正离子扫描模式下,26个共有峰相对

表2 正离子扫描模式下方法学考察结果

Tab 2 Results of methodology investigation under positive ion scanning mode

| 峰号 | 相对保留时间RSD,% | | | 相对峰面积RSD,% | | |
|-------|-------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 精密度试验 | 重复性试验 | 稳定性试验 | 精密度试验 | 重复性试验 | 稳定性试验 |
| 1 | 0.44 | 0.78 | 1.72 | 1.90 | 2.99 | 2.39 |
| 2 | 0.55 | 1.11 | 0.97 | 1.39 | 1.09 | 2.79 |
| 3 | 0.74 | 1.97 | 0.75 | 1.57 | 2.12 | 1.45 |
| 4 | 0.60 | 1.43 | 0.50 | 1.39 | 1.82 | 2.28 |
| 5 | 0.36 | 1.45 | 0.89 | 1.95 | 1.53 | 1.22 |
| 6(参照) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 7 | 0.85 | 1.83 | 2.57 | 1.63 | 1.33 | 1.02 |
| 8 | 0.54 | 2.32 | 1.57 | 1.54 | 0.89 | 1.03 |
| 9 | 0.46 | 0.68 | 2.55 | 1.85 | 1.23 | 2.63 |
| 10 | 0.33 | 2.27 | 2.07 | 2.09 | 0.37 | 1.19 |
| 11 | 0.54 | 1.83 | 1.45 | 1.62 | 0.02 | 1.01 |
| 12 | 0.88 | 0.64 | 1.93 | 1.21 | 1.39 | 1.25 |
| 13 | 0.93 | 0.89 | 2.51 | 2.15 | 0.83 | 1.89 |
| 14 | 0.68 | 1.61 | 1.83 | 2.38 | 0.73 | 1.97 |
| 15 | 1.28 | 0.64 | 2.76 | 1.93 | 1.89 | 2.11 |
| 16 | 0.74 | 0.67 | 2.08 | 1.57 | 1.46 | 2.88 |
| 17 | 0.39 | 1.06 | 1.71 | 2.09 | 1.03 | 2.01 |
| 18 | 0.24 | 0.96 | 1.25 | 2.33 | 1.93 | 1.54 |
| 19 | 1.25 | 2.47 | 2.27 | 1.36 | 2.30 | 2.55 |
| 20 | 0.31 | 0.92 | 2.53 | 1.15 | 1.94 | 1.95 |
| 21 | 0.33 | 1.08 | 1.32 | 2.14 | 1.18 | 1.98 |
| 22 | 0.46 | 0.64 | 0.30 | 2.22 | 1.34 | 0.83 |
| 23 | 0.83 | 0.34 | 1.03 | 1.99 | 1.19 | 1.04 |
| 24 | 0.91 | 2.30 | 0.20 | 1.23 | 0.69 | 2.02 |
| 25 | 0.40 | 1.09 | 1.02 | 2.18 | 0.78 | 2.08 |
| 26 | 0.59 | 1.91 | 0.31 | 1.03 | 1.21 | 0.64 |

表3 负离子扫描模式下方法学考察结果

Tab 3 Results of methodology investigation under negative ion scanning mode

| 峰号 | 相对保留时间RSD,% | | | 相对峰面积RSD,% | | |
|-------|-------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 精密度试验 | 重复性试验 | 稳定性试验 | 精密度试验 | 重复性试验 | 稳定性试验 |
| 1 | 0.33 | 0.94 | 1.31 | 0.77 | 1.84 | 2.91 |
| 2 | 0.29 | 0.76 | 1.69 | 2.78 | 2.33 | 2.82 |
| 3 | 1.66 | 1.42 | 2.55 | 0.63 | 1.60 | 2.63 |
| 4 | 0.34 | 1.87 | 2.02 | 2.73 | 0.43 | 2.29 |
| 5(参照) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 6 | 0.27 | 1.82 | 0.72 | 2.77 | 1.39 | 2.55 |
| 7 | 0.98 | 1.36 | 0.94 | 1.34 | 1.58 | 1.35 |
| 8 | 0.33 | 0.87 | 1.05 | 2.05 | 2.65 | 0.52 |
| 9 | 0.21 | 0.64 | 0.31 | 0.62 | 1.09 | 2.15 |
| 10 | 1.49 | 0.55 | 1.10 | 1.63 | 1.30 | 1.65 |

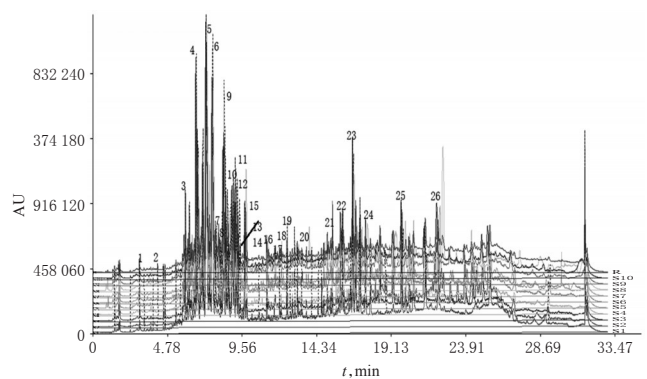
保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.00% (n=5);在负离子扫描模式下,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.70% (n=5),详见表2、表3。这表明本方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取浙贝母药材(编号:S1)粉末2 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、12、24 h后,按“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析。在正、负离子扫描模式下,分别以6号峰(贝母素甲)、5号峰(浙贝素)的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,在正离

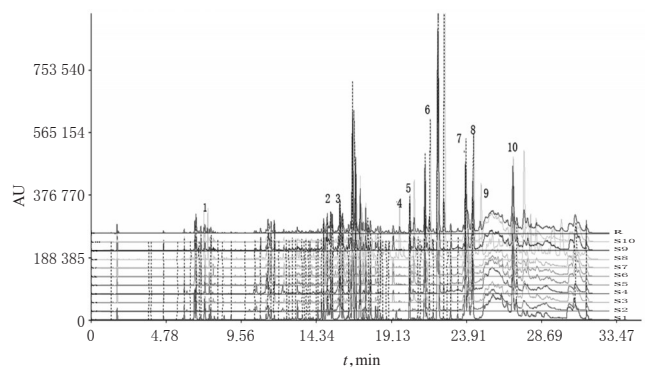
子扫描模式下,26个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2.90% (n=5);在负离子扫描模式下,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.00% (n=5),详见表2、表3。这表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4 浙贝母UPLC-Q-TOF-MS/MS指纹图谱的生成及相似度分析

2.4.1 指纹图谱的生成 取10批浙贝母药材样品粉末,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析,分别在正、负离子扫描模式下采集图谱,然后将图谱文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版),以中位数法生成UPLC-Q-TOF-MS/MS指纹图谱。结果,在正、负离子模式下,10批浙贝母药材分别各有共有峰26、10个,详见图1。



A. 正离子模式下10批浙贝母药材的叠加指纹图谱



B. 负离子模式下10批浙贝母药材的叠加指纹图谱

图1 10批浙贝母药材的叠加指纹图谱

Fig 1 Superimposed fingerprint of 10 batches of *F. thunbergii*

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)进行相似度评价,按照相关步骤进行色谱峰的匹配及对照图谱(R)的生成。以对照图谱为参照图谱,将10批浙贝母指纹图谱分别与其进行比较,并计算相似度值。结果,在正、负离子模式下,10批浙贝母药材的相似度均分别大于0.840、0.810,表明不同产地浙贝母药材中所含化学成分有一定的差异,详见表4。

2.5 浙贝母的抗炎作用考察

2.5.1 分组、造模与给药 将小鼠分为模型组(生理盐水)、阳性对照组(地塞米松,0.000 4 g/kg,根据人与小鼠

表4 相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results

| 样品编号 | 相似度 | |
|------|--------|--------|
| | 正离子模式下 | 负离子模式下 |
| S1 | 0.892 | 0.859 |
| S2 | 0.890 | 0.816 |
| S3 | 0.929 | 0.927 |
| S4 | 0.916 | 0.911 |
| S5 | 0.887 | 0.896 |
| S6 | 0.956 | 0.925 |
| S7 | 0.938 | 0.910 |
| S8 | 0.841 | 0.834 |
| S9 | 0.926 | 0.932 |
| S10 | 0.915 | 0.883 |

等效剂量系数换算)和10批浙贝母高、低剂量组(1.3、0.325 g/kg,均以生药量计,根据人与小鼠等效剂量系数换算,其中高剂量为临床等效剂量的2倍),共22组,每组10只,每天灌胃给药1次(临用时均用水制成相应药液),连续给药7 d。末次灌胃给药30 min后,取20 μL二甲苯涂布于各组小鼠右耳的前后两面以复制炎症模型,并以其左耳作为空白对照,涂布生理盐水。

2.5.2 小鼠血清中MDA、NO水平检测 造模1 h后,各组小鼠摘眼球取血,以3 500 r/min离心后取上层血清,根据相应试剂盒说明书操作,检测血清中MDA、NO的水平。结果,与模型组比较,阳性对照组和10批浙贝母高、低剂量组小鼠血清中MDA水平均显著升高,NO水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表5。

表5 10批浙贝母抗炎作用考察结果($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab 5 Anti-inflammatory effect of 10 batches of *F. thunbergii* ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量,g/kg | MDA,nmol/mL | NO, μmol/L | 耳肿胀度,mg |
|---------|---------|-------------|--------------|--------------|
| 模型组 | | 0.42±0.30 | 33.78±2.02 | 24.08±1.75 |
| 阳性对照组 | 0.000 4 | 3.17±0.14** | 14.53±3.67** | 9.82±1.62** |
| S1高剂量组 | 1.3 | 2.74±0.20* | 22.11±1.88** | 17.56±4.43** |
| S1低剂量组 | 0.325 | 1.77±0.08* | 26.74±3.02* | 19.70±2.82** |
| S2高剂量组 | 1.3 | 2.25±0.31* | 20.21±1.23** | 14.62±3.94** |
| S2低剂量组 | 0.325 | 1.36±0.14* | 24.84±2.79** | 17.74±4.47** |
| S3高剂量组 | 1.3 | 2.44±0.15* | 21.89±2.04** | 16.36±3.12** |
| S3低剂量组 | 0.325 | 1.39±0.05* | 25.77±2.86** | 19.28±1.36** |
| S4高剂量组 | 1.3 | 2.21±0.06* | 23.58±2.17** | 18.22±2.60** |
| S4低剂量组 | 0.325 | 1.33±0.17* | 30.95±2.54* | 20.84±4.28* |
| S5高剂量组 | 1.3 | 2.67±0.05* | 20.42±2.17** | 14.80±3.65** |
| S5低剂量组 | 0.325 | 1.70±0.05* | 25.05±0.79** | 18.60±3.43** |
| S6高剂量组 | 1.3 | 2.79±0.42* | 22.53±2.87* | 17.96±3.57** |
| S6低剂量组 | 0.325 | 1.81±0.03* | 27.79±1.71* | 20.50±3.44* |
| S7高剂量组 | 1.3 | 2.72±0.21* | 21.85±1.50** | 15.94±4.07** |
| S7低剂量组 | 0.325 | 1.77±0.07* | 25.47±3.56** | 19.16±4.05** |
| S8高剂量组 | 1.3 | 2.57±0.29* | 19.58±1.95** | 13.50±3.50** |
| S8低剂量组 | 0.325 | 1.43±0.10* | 23.79±1.26** | 14.80±1.63** |
| S9高剂量组 | 1.3 | 3.11±0.31** | 20.00±2.74** | 13.98±3.21** |
| S9低剂量组 | 0.325 | 2.01±0.18** | 24.84±2.45** | 17.68±3.26** |
| S10高剂量组 | 1.3 | 2.64±0.10* | 22.11±1.49** | 16.73±3.70** |
| S10低剂量组 | 0.325 | 1.49±0.09* | 26.32±2.58* | 19.30±3.19** |

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.5.3 小鼠耳肿胀度的检测 参考相关文献方法^[9],将各组小鼠脱颈处死,用直径为9 mm的打孔器在小鼠左、右耳对称部位打下圆耳片,称定质量,并计算耳肿胀度(耳肿胀度=右圆耳片质量-左圆耳片质量)。结果,与模型组比较,阳性对照组和10批浙贝母高、低剂量组小鼠耳肿胀度均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表5。

2.6 浙贝母谱-效相关性分析

2.6.1 双变量相关分析 参考相关文献方法^[10],以均值化后的10批浙贝母指纹图谱的共有峰相对峰面积为因变量,抗炎指标小鼠耳肿胀度和血清MDA、NO水平为自变量,采用SPSS 19.0软件进行双变量相关分析,计算各变量与共有峰相对峰面积的相关系数。当相关系数绝对值大于0.6时,表示显著相关;当该值大于0.7时,表示极显著相关。结果,在正离子模式下,12、21号峰相对峰面积与耳肿胀度显著相关,5、6、7、9、11、17号峰相对峰面积与NO水平显著相关,12、14号峰相对峰面积与NO水平极显著相关;负离子模式下没有色谱峰与抗炎指标呈显著相关,详见表6、表7。

表6 正离子模式下各共有峰相对峰面积与抗炎指标的相关系数

Tab 6 Correlation coefficients of relative area of common peak with anti-inflammatory index under positive ion scanning mode

| 峰号 | 耳肿胀度 | MDA水平 | NO水平 |
|----|---------|--------|----------|
| 1 | -0.097 | -0.424 | -0.254 |
| 2 | -0.548 | 0.231 | -0.230 |
| 3 | 0.006 | -0.020 | -0.290 |
| 4 | 0.031 | -0.169 | -0.441 |
| 5 | 0.064 | -0.186 | -0.638* |
| 6 | -0.404 | -0.090 | -0.675* |
| 7 | -0.431 | 0.103 | -0.682* |
| 8 | -0.133 | 0.192 | -0.521 |
| 9 | -0.067 | 0.401 | -0.622* |
| 10 | 0.025 | -0.091 | 0.509 |
| 11 | -0.279 | 0.035 | -0.695* |
| 12 | -0.625* | 0.161 | -0.726** |
| 13 | -0.359 | 0.047 | 0.006 |
| 14 | -0.520 | 0.116 | -0.733** |
| 15 | -0.121 | -0.028 | 0.345 |
| 16 | -0.329 | 0.415 | 0.152 |
| 17 | -0.438 | -0.044 | -0.694* |
| 18 | -0.205 | -0.203 | -0.511 |
| 19 | -0.224 | -0.010 | 0.173 |
| 20 | -0.470 | 0.294 | -0.539 |
| 21 | 0.694* | -0.025 | 0.005 |
| 22 | 0.407 | 0.212 | 0.200 |
| 23 | 0.287 | -0.387 | 0.406 |
| 24 | -0.302 | 0.228 | -0.235 |
| 25 | 0.232 | 0.223 | 0.202 |
| 26 | -0.212 | 0.123 | -0.166 |

注:“*”表示显著相关,“**”表示极显著相关

Note:“*” means significant correlation,“**” means extremely significant correlation

表7 负离子模式下各共有峰相对峰面积与抗炎指标的相关系数

Tab 7 Correlation coefficient of relative area of common peak with anti-inflammatory index under negative ion scanning mode

| 峰号 | 耳肿胀度 | MDA水平 | NO水平 |
|----|--------|--------|--------|
| 1 | -0.274 | 0.424 | -0.357 |
| 2 | -0.286 | 0.428 | -0.365 |
| 3 | -0.289 | 0.429 | -0.367 |
| 4 | -0.291 | 0.436 | -0.370 |
| 5 | -0.280 | 0.414 | -0.352 |
| 6 | -0.180 | 0.358 | -0.267 |
| 7 | 0.341 | -0.366 | 0.235 |
| 8 | -0.331 | 0.461 | -0.404 |
| 9 | -0.242 | 0.403 | -0.325 |
| 10 | -0.229 | 0.383 | -0.310 |

2.6.2 灰色关联度分析 以10批浙贝母指纹图谱共有峰的相对峰面积为子序列,以小鼠耳肿胀度和血清中MDA、NO水平为母序列,进行灰色关联度分析。当关联度>0.5时,认为子序列与母序列之间有着一定的关联性,且关联度数值越高,说明关联性越强^[11]。结果,在正离子模式下,1、3、4、5、6、7、9、10、11、12、14、17、20、21、24、26号峰与耳肿胀度和MDA、NO水平均相关;在负离子模式下,3、5号峰与耳肿胀度和MDA、NO水平均相关,详见表8、表9。

综合双变量相关分析和灰关联度分析结果可知,与抗炎指标相关的共有峰分别为5、6、7、9、11、12、14、17、21号峰,初步推测这9个峰所对应的化合物为浙贝母抗炎作用的质量标志物。

2.7 浙贝母抗炎质量标志物的化学成分鉴定

通过查阅相关文献^[12-18],构建浙贝母化学成分的数据集,包括化学成分、英文名称、分子式、结构以及化学物质登录号等。利用Waters Masslynx 4.1软件,对“2.6”项下筛选出的与抗炎作用相关的9个共有峰进行成分结构表征。方法参数设置如下:保留时间范围为0~33 min,保留时间误差限为0.01 min,质量误差限为0.01 Da,质量精确度小于10 ppm。将各共有峰的峰强度、保留时间和m/z等信息与对照品进行比较,同时结合化合物的一、二级质谱信息和裂解规律,参考文献资料进行分析,结果详见表10。

由表10可知,浙贝母质量标志物为贝母素乙、贝母素甲、环巴胺、胡萝卜苷、Polyphyllin V、苦鬼白毒素、植物甾醇、Ent-kaur-15-en-17-ol、Ent-17-norkauran-16-one。

3 讨论

UPLC-Q-TOF-MS/MS法将液相色谱的高分离效能与质谱的强大结构鉴定功能相结合,故在中药化学成分分析、中药质量控制等研究中得到广泛应用。本研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术建立了10批不同产地浙贝母药材的指纹图谱。在试验前期,笔者考察了色谱分

表8 正离子模式下各共有峰相对峰面积与抗炎指标的关联序和关联度

Tab 8 Correlation order and correlation degree of relative area of common peak and anti-inflammatory index under positive ion scanning mode

| 关联序 | 耳肿胀度 | | MDA水平 | | NO水平 | |
|-----|------|---------|-------|---------|------|---------|
| | 峰号 | 关联度 | 峰号 | 关联度 | 峰号 | 关联度 |
| 1 | 11 | 0.750 6 | 11 | 0.756 8 | 11 | 0.748 8 |
| 2 | 5 | 0.749 5 | 7 | 0.754 4 | 5 | 0.748 7 |
| 3 | 7 | 0.747 7 | 5 | 0.754 2 | 7 | 0.746 2 |
| 4 | 9 | 0.746 1 | 9 | 0.752 6 | 9 | 0.744 6 |
| 5 | 10 | 0.745 9 | 21 | 0.751 7 | 21 | 0.744 1 |
| 6 | 21 | 0.745 9 | 10 | 0.750 5 | 10 | 0.743 5 |
| 7 | 6 | 0.745 5 | 6 | 0.750 4 | 6 | 0.742 6 |
| 8 | 12 | 0.744 4 | 3 | 0.750 1 | 3 | 0.742 1 |
| 9 | 3 | 0.743 4 | 12 | 0.749 2 | 12 | 0.744 7 |
| 10 | 14 | 0.743 0 | 24 | 0.749 1 | 24 | 0.741 4 |
| 11 | 24 | 0.742 9 | 14 | 0.748 5 | 14 | 0.741 1 |
| 12 | 1 | 0.742 6 | 26 | 0.748 4 | 26 | 0.740 8 |
| 13 | 26 | 0.742 5 | 1 | 0.748 3 | 1 | 0.740 8 |
| 14 | 17 | 0.741 1 | 4 | 0.747 0 | 17 | 0.739 5 |
| 15 | 4 | 0.740 4 | 17 | 0.746 3 | 4 | 0.739 1 |
| 16 | 20 | 0.739 9 | 20 | 0.746 0 | 20 | 0.738 3 |
| 17 | 8 | 0.439 9 | 8 | 0.445 7 | 8 | 0.438 3 |
| 18 | 19 | 0.439 8 | 19 | 0.445 6 | 19 | 0.438 0 |
| 19 | 23 | 0.439 7 | 13 | 0.445 4 | 13 | 0.437 6 |
| 20 | 25 | 0.439 7 | 25 | 0.445 2 | 25 | 0.438 1 |
| 21 | 13 | 0.339 5 | 23 | 0.345 1 | 23 | 0.337 9 |
| 22 | 16 | 0.339 5 | 16 | 0.345 0 | 16 | 0.337 7 |
| 23 | 2 | 0.338 9 | 2 | 0.344 8 | 2 | 0.337 3 |
| 24 | 22 | 0.337 9 | 22 | 0.343 7 | 22 | 0.336 4 |
| 25 | 15 | 0.337 6 | 15 | 0.343 2 | 15 | 0.336 0 |
| 26 | 18 | 0.337 3 | 18 | 0.342 8 | 18 | 0.335 7 |

表9 负离子模式下各共有峰相对峰面积与抗炎指标的关联序和关联度

Tab 9 Correlation order and correlation degree of relative area of common peak and anti-inflammatory index under negative ion mode

| 关联序 | 耳肿胀度 | | MDA水平 | | NO水平 | |
|-----|------|---------|-------|---------|------|---------|
| | 峰号 | 关联度 | 峰号 | 关联度 | 峰号 | 关联度 |
| 1 | 5 | 0.593 3 | 5 | 0.502 5 | 5 | 0.605 9 |
| 2 | 3 | 0.567 9 | 3 | 0.525 7 | 3 | 0.549 9 |
| 3 | 7 | 0.492 5 | 7 | 0.495 4 | 7 | 0.494 3 |
| 4 | 8 | 0.470 7 | 8 | 0.482 0 | 8 | 0.478 0 |
| 5 | 6 | 0.462 6 | 6 | 0.476 1 | 6 | 0.471 5 |
| 6 | 1 | 0.451 5 | 1 | 0.474 7 | 1 | 0.470 1 |
| 7 | 2 | 0.426 2 | 2 | 0.473 6 | 2 | 0.469 6 |
| 8 | 5 | 0.428 9 | 5 | 0.472 2 | 9 | 0.468 3 |
| 9 | 9 | 0.418 4 | 9 | 0.472 1 | 5 | 0.468 0 |
| 10 | 10 | 0.408 1 | 10 | 0.471 9 | 10 | 0.467 6 |

析的条件后发现,利用乙腈-0.1%甲酸水溶液梯度洗脱的分离效果优于甲醇-水溶液,且色谱图中各峰峰形稳定、分离度良好。

地塞米松是一种人工合成的皮质类固醇,属于肾上腺皮质激素类药,可抑制炎症部位中白细胞和巨噬细胞的聚集,减弱两者的吞噬作用,并对溶酶体酶以及炎症

表 10 浙贝母抗炎质量标志物的化学成分鉴定结果
Tab 10 Identification result of chemical composition of anti-inflammatory quality marker of *F. thunbergii*

| 峰号 | 保留时间, min | m/z(正离子模式) | | 分子量 | 分子式 | 化合物推测 |
|----|-----------|------------|-----------|-----------|---|---|
| | | 准分子离子峰 | 二级碎片 | | | |
| 5 | 6.79 | 430.332 1 | 426.320 3 | 429.324 3 | C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ | 贝母素乙 ^[1] |
| | | | 415.328 1 | | | |
| | | | 412.331 1 | | | |
| 6 | 7.30 | 432.347 8 | 431.334 4 | 431.339 9 | C ₂₇ H ₄₅ NO ₃ | 贝母素甲 ^[10,13] |
| | | | 430.332 0 | | | |
| | | | 413.334 8 | | | |
| | | | 412.324 6 | | | |
| 7 | 7.69 | 412.321 6 | 411.337 7 | 411.313 7 | C ₂₇ H ₄₅ NO ₂ | 环巴胺 ^[2] |
| | | | 396.303 4 | | | |
| | | | 394.303 6 | | | |
| 9 | 8.12 | 577.446 8 | 575.460 3 | 576.439 0 | C ₃₃ H ₅₀ O ₆ | 胡萝卜苷 ^[14] |
| | | | 560.436 9 | | | |
| | | | 558.458 7 | | | |
| 11 | 8.49 | 723.432 3 | 722.448 5 | 722.424 1 | C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂ | Polyphyllin V ^[14] |
| | | | 708.433 8 | | | |
| | | | 704.428 8 | | | |
| 12 | 8.60 | 415.139 3 | 397.131 8 | 414.131 5 | C ₂₃ H ₃₂ O ₈ | 苦鬼白毒素 ^[5] |
| | | | 384.148 7 | | | |
| | | | 369.157 1 | | | |
| 14 | 9.25 | 415.394 0 | 414.401 8 | 414.386 2 | C ₂₆ H ₃₆ O | 植物甾醇 ^[5] |
| | | | 400.382 4 | | | |
| | | | 398.400 8 | | | |
| 17 | 12.49 | 289.253 1 | 240.227 8 | 289.255 9 | C ₂₉ H ₄₂ O | Ent-kaur-15-en-17-ol ^[16] |
| 21 | 15.91 | 275.237 5 | 273.241 3 | 274.245 3 | C ₃₁ H ₅₀ O | Ent-17-norkauran-16-one ^[16] |
| | | | 260.229 9 | | | |
| | | | 245.230 3 | | | |

介质的合成和释放起到抑制作用,能够减轻和防止炎症反应,从而达到减轻炎症的效果^[19],故在浙贝母抗炎作用实验中将其作为阳性对照。

本研究选用二甲苯对小鼠耳廓进行造模,可迅速引起小鼠耳血管内液向组织液渗出,导致耳肿胀,产生炎症^[20]。炎症状态下,MDA 是氧自由基与细胞膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物,可间接反映血浆中氧自由基的水平,且其水平与抗炎效果呈正相关;NO 由内源性一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸生成,NOS 主要分布于巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞中,在炎症状态下大量产生,继而催化产生大量 NO,加重炎症反应^[21]。本研究结果显示,不同产地浙贝母药材均具有良好的抗炎作用。

双变量相关分析是研究 2 个或 2 个以上随机变量间相关关系的统计分析方法^[22],本研究将中药指纹图谱中各色谱峰看作为一个变量,各抗炎指标也可看作一个变量,分析两者之间的相关程度。灰色关联度分析适用于系统信息量较少而涉及因素多的图谱,有利于体现各成分间的相互作用,同时关联系数可反映 2 个被比较序列的紧密程度^[23-24]。本研究综合双变量相关分析和灰关联度分析的结果,推测出与抗炎作用相关的共有峰有 9 个,经鉴定分析确定为贝母素乙(5 号峰)、贝母素甲(6 号

峰)、环巴胺(7 号峰)、胡萝卜苷(9 号峰)、Polyphyllin V(11 号峰)、苦鬼白毒素(12 号峰)、植物甾醇(14 号峰)、Ent-kaur-15-en-17-ol(17 号峰)、Ent-17-norkauran-16-one(21 号峰)。

综上所述,本研究建立了不同产地浙贝母的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱,并初步推测贝母素乙、贝母素甲、环巴胺、胡萝卜苷、Polyphyllin V、苦鬼白毒素、植物甾醇、Ent-kaur-15-en-17-ol、Ent-17-norkauran-16-one 是其具有抗炎作用的质量标志物,这可为后续浙贝母的质量控制及资源开发提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:292.
- [2] 赵金凯,杜伟锋,应泽茜,等.浙贝母的现代研究进展[J]. 时珍国医国药,2019,30(1):177-180.
- [3] YI PF, WU YC, DONG HB, et al. Peimine impairs pro-inflammatory cytokine secretion through the inhibition of the activation of NF-κB and MAPK in LPS-induced RAW264.7 macrophages[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(5):567-572.
- [4] 归改霞. 贝母素甲对急性肺损伤小鼠 TNF-α、IL-4、IL-10 及 PGE-2 时空表达的影响[J]. 中医临床研究, 2017, 9(1):1-4.
- [5] PARK JH, LEE B, KIN HK, et al. Peimine inhibits the production of pro-inflammatory cytokine secretion through regulation of the phosphorylation of NF-κB and MAPKs in HMC-1 cells[J]. *Pharmac Magazine*, 2017, 13(2):359-364.
- [6] 彭任,陆兔林,胡立宏,等.中药饮片质量标志物(Q-marker)研究进展[J]. 中草药,2020,51(10):2603-2610.
- [7] 叶霁,李睿旻,曾华武,等.基于整体观中药质量标志物的发现及研究进展[J]. 中草药,2019,50(19):4529-4537.
- [8] 蔡靛,张倩,杨丰庆.中药谱效学的应用进展[J]. 中草药,2017,48(23):5005-5011.
- [9] 甘露,任振堃,叶彪,等.威灵仙不同提取物的抗炎、镇痛、平痉作用[J]. 华西药学期刊,2020,35(2):179-182.
- [10] 俞静静,苏洁,颜美秋,等.陈皮降脂药效与黄酮类成分的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(15):3335-3342.
- [11] 郝鹏升,范嘉育,耿淑琴,等.数据分析技术在中药抗氧化谱效关系研究中的应用进展[J]. 中国现代应用药学,2019,36(7):877-884.
- [12] 崔琳琳,包永睿,王帅,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定补肺健脾方的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(9):184-193.
- [13] 李成容,李冬连,李玲蕊,等.栽培瓦布贝母中生物碱类成分的研究[J]. 华西药学期刊,2019,34(5):463-467.
- [14] 张雯霞. 还贝止咳方止咳作用的药物质基础研究[D]. 太原:山西中医药大学,2019.
- [15] 康俊丽,黄海英,刘雅敏,等.基于 UPLC-QE-Orbitrap-

灵芝多糖粗提物对雌二醇诱导小鼠胸腺萎缩的改善作用研究[△]

孙 嫣^{1*}, 范 新¹, 王 刚^{1#}, 朱韵辰²(1. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院药学部, 杭州 310006; 2. 延边大学医学院, 吉林延吉 133002)

中图分类号 R392.5; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2135-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.16

摘要 目的: 研究灵芝多糖粗提物对雌二醇诱导小鼠胸腺萎缩的改善作用。方法: 将60只雌性ICR小鼠随机分为正常对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和灵芝多糖粗提物高、低剂量组(400、100 mg/kg, 以生药量计), 每组15只。除正常对照组外, 其余各组小鼠均隔天腹腔注射雌二醇(0.1 mg/只, 共6次)建立胸腺萎缩模型。造模结束后次日, 小鼠灌胃给药, 每天1次, 连续给药14 d。末次给药24 h后, 测定小鼠脏器(胸腺、脾)指数以及血浆中丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽S-转氨酶(GST)活性, 采用苏木精-伊红染色法观察小鼠胸腺、脾组织的病理学变化, 采用原位末端标记法检测小鼠胸腺细胞凋亡情况, 并采用流式细胞术检测其外周血中T细胞亚群分类。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠胸腺指数和外周血中CD3⁺CD4⁺T细胞比例、CD4⁺/CD8⁺T比值均显著降低($P < 0.01$), 脾指数、血浆中MDA含量、胸腺细胞凋亡水平以及外周血中CD3⁺CD8⁺T细胞比例均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 小鼠胸腺皮质和髓质分界模糊、细胞间隙增大、皮质出现部分细胞损伤凋亡, 脾组织未见明显病理学变化。与模型组比较, 灵芝多糖粗提物高剂量组小鼠胸腺指数、血浆中GST活性以及外周血中CD3⁺CD4⁺T细胞比例、CD4⁺/CD8⁺比值均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血浆中MDA含量、胸腺细胞凋亡水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且胸腺组织病理学变化明显改善; 灵芝多糖粗提物低剂量组小鼠仅血浆中MDA含量显著降低($P < 0.01$), 其余指标/病理学变化均不明显。结论: 高剂量(400 mg/kg)灵芝多糖粗提物对雌二醇诱导的小鼠胸腺萎缩具有一定的改善作用。

关键词 灵芝多糖粗提物; 雌二醇; 胸腺萎缩; 免疫调节; 小鼠

Study on Improvement Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharide Crude Extract on Estradiol-induced Thymus Atrophy in Mice

SUN Yan¹, FAN Xin¹, WANG Gang¹, ZHU Yunchen²(1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hangzhou First People's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. School of Medicine, Yanbian University, Jilin Yanji 133002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides crude extract on estradiol-induced thymus atrophy in mice. METHODS: Totally 60 female ICR mice were randomly divided into normal control group (normal saline), model group (normal saline), *G. lucidum* polysaccharides crude extract high-dose and low-dose groups

- MS法测定补肺益肾方中10个人血成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 441-450.
- [16] 张宁. 基于中药质量标志物的杏仁止咳颗粒质量标准提升研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [17] 黄海英, 康俊丽, 余亚辉, 等. 基于UPLC-Q-Orbitrap MS法分析补肺益肾方的化学成分[J]. 分析测试学报, 2019, 38(1): 1-13.
- [18] 张宁, 高霞, 周宇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析杏仁止咳颗粒化学成分[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4439-4449.
- [19] 彭小平, 郭慧琴, 陈虹. 地塞米松联合抗炎、抗感染治疗虹膜睫状体炎的有效性观察[J]. 药品评价, 2019, 16(18): 20-24.
- [20] 薛焱, 刘欣媛, 高洪皮, 等. 蒙药阿给水提物的抗炎作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(12): 1425-1429.
- [21] 李金儒. 愈溃方对实验性溃疡性结肠炎大鼠SOD、MDA、NO及iNOS、MPO影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [22] 郝鹏升, 范嘉育, 耿淑琴, 等. 数据分析技术在中药抗氧化谱效关系研究中的应用进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 877-884.
- [23] 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584.
- [24] 周爱珍, 鲍珍珠, 程斌, 等. 温郁金中5种成分的含量测定及其产地加工方法优化[J]. 中国药房, 2019, 30(3): 381-386.

△ 基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(No.2020ZA085)

* 主管药师。研究方向: 中药药理。电话: 0571-56007912。E-mail: 61012796@qq.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 神经药理。电话: 0571-56007915。E-mail: 88485534@163.com

(收稿日期: 2020-02-24 修回日期: 2020-06-04)

(编辑: 唐晓莲)