

生理病理状态下大鼠体内荭草花抗心肌缺血再灌注损伤活性成分筛选[△]

仁莎莎^{1,2*},胡建春³,张元现^{1,2},陈轻轻^{1,2},刘春花⁴,郑林¹,巩仔鹏¹,黄勇¹,金阳¹,李月婷^{1#}(1.贵州省药物制剂重点实验室/贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室,贵阳 550004;2.贵州医科大学药学院,贵阳 550004;3.贵州工业职业技术学院化学与环境工程系,贵州清镇 551400;4.贵州医科大学民族药与中药开发利用教育部工程研究中心,贵阳 550004)

中图分类号 R917;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)16-1957-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.04



摘要 目的 基于生理病理状态筛选大鼠体内荭草花抗心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的潜在活性成分。方法 将SD大鼠分为正常对照组、正常给药组、MIRI对照组和MIRI给药组,每组5只。经药物干预或造模、药物干预后,收集各组大鼠的血浆样品,使用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术进行色谱分离和质谱数据采集,经比对对照品图谱、各血浆样品图谱并参考相关文献后,对原型入血成分和代谢产物进行分析;同时,确定正常给药组和MIRI给药组大鼠血浆样品中的共有峰,结合主成分分析和“有监督”的正交偏最小二乘法-判别分析,以变量重要性投影(VIP)值>1为标准,筛选差异移行成分,并推测生理病理状态下荭草花抗MIRI的潜在活性成分。将SD大鼠分为对照组、MIRI组、阳性对照组(复方丹参片0.2 g/kg,每天3次)、各潜在活性成分组(各潜在活性成分均为10 mg/kg,每天2次),每组5只。各药物组大鼠灌胃相应药液,连续3 d。末次给药后,对各组大鼠血浆中超氧化物歧化酶(SOD)活性和乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cTn I)泄漏量进行检测、比较。结果 从荭草花提取物总离子流图中获取主要色谱峰26个,确定了其中14个色谱峰,包括没食子酸、儿茶素、原儿茶酸等。从正常大鼠血浆样品中检测到移行成分15个,其中原型入血成分6个、代谢产物9个;从MIRI大鼠血浆样品中检测到移行成分19个,其中原型入血成分6个、代谢产物13个。两者共有移行成分8个,其中山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物、槲皮素的羧基化代谢产物和N-p-香豆酰胺对应色谱峰的VIP值均大于1。与MIRI组比较,各潜在活性成分组大鼠血浆SOD活性均显著升高($P<0.01$),LDH、CK-MB、cTn I泄漏量均显著降低($P<0.01$)。结论 N-p-香豆酰胺、槲皮素、山柰酚和山柰素-3-O-β-D-葡萄糖苷可能是荭草花提取物抗MIRI的潜在活性成分。

关键词 蓉草花;心肌缺血再灌注损伤;活性成分;血浆药物化学

Screening of active components of *Polygonum orientale* flower against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats under physiological and pathological states

REN Shasha^{1,2}, HU Jianchun³, ZHANG Yuanxian^{1,2}, CHEN Qingqing^{1,2}, LIU Chunhua⁴, ZHENG Lin¹, GONG Zipeng¹, HUANG Yong¹, JIN Yang¹, LI Yueteng¹(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Guizhou Industry Polytechnic College, Guizhou Qingzhen 551400, China; 4. Engineering Research Center of the Ministry of Education for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To screen the potential active components of *Polygonum orientale* flower against myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats based on physiological and pathological states. **METHODS** SD rats were divided into normal control group, normal administration group, MIRI control group and MIRI administration group, with 5 rats in each group. After drug intervention or modeling and drug intervention, chromatographic separation plasma samples were collected, and chromatographic separation and mass spectrometry data collection were performed by using UPLC-Q-TOF/MS. The prototype components and metabolites were analyzed by comparing the reference substance maps, the maps of each plasma sample, and the relevant literature. At the same time, the common peaks in plasma samples of rats in normal administration group and MIRI administration group were identified. Combined with principal component analysis and orthogonal partial least square-discriminant analysis, the differential transitional components were screened out according to the value of variable importance

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82260779);贵州省基础研究项目(No.黔科合基础[2019]1439号);贵州省科技创新基地建设项目(No.黔科合中引地[2023]006)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:药物新剂型、新技术及药动学。E-mail:3201880564@qq.com

#通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质、作用机制及质量控制。电话:0851-86908648。E-mail:nhwslyt@163.com

in the projection (VIP) >1 , to speculate the potential active components of *P. orientale* flower in rats under physiological and pathological states. The SD rats were divided into control group, MIRI group, positive control group (Compound danshen tablets 0.2 g/kg, 3 times a day), and potentially active compound groups (10 mg/kg, twice a day), with 5 rats in each group. The rats in administration groups were given relevant medicine intragastrically, for 3 consecutive days. The activity of superoxide dismutase (SOD), the leakages of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB) and cardiac troponin I (cTn I) in plasma were detected after the last administration. **RESULTS** Twenty-six main chromatographic peaks were obtained from the total ion chromatogram of the extract of *P. orientale* flower, and 14 of them were determined, including gallic acid, catechin, protocatechuic acid and so on. There were fifteen (including 6 absorbed prototype components and 9 metabolites) and nineteen transitional components (including 6 absorbed prototype components and 13 metabolites) in the plasma sample of normal rats and MIRI rats. Eight transitional components were detected in both normal rats and MIRI rats, and the VIP values of kaempferol glucuronidation metabolites, quercetin carbonylation metabolites and *N*-*p*-paprazine to the corresponding peak were higher than 1. Compared with MIRI group, the activities of SOD were increased significantly in the plasma of MIRI rats in each potential active compound group ($P<0.01$), and the leakages of LDH, CK-MB, and cTn I in the plasma of MIRI rats were reduced significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** The potential anti-MIRI active components in extract of *P. orientale* flower are *N*-*p*-paprazine, quercetin, kaempferol and kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside.

KEYWORDS *Polygonum orientale* flower; myocardial ischemia-reperfusion injury; active ingredients; plasma pharmacology

荭草为蓼科植物荭草 *Polygonum orientale* L. 的全草, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[1], 为贵州常用民间药, 用于冠心病、心绞痛的疗效确切。本课题组前期研究证实, 蓼草的干燥花序(即荭草花)对大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)有较好的改善效果, 且抗心肌缺血的作用较其全草更明显, 但具体药效成分尚不明确^[2]。

学界普遍认为, 口服后吸收入血的成分是中药发挥药效的活性成分^[3]。但中药成分复杂, 入血成分可能是药物的原型成分, 亦可能是代谢产物^[4]。血浆药物化学以体内直接作用物质为切入点, 通过分析口服后能进入血液的中药化学成分及其代谢产物, 从而探讨中药在体内发挥作用的药效物质^[5], 被广泛应用于中药药效物质基础研究。然而, 既往血浆药物化学研究大多基于正常动物, 忽略了病理状态下机体肠道菌群、代谢酶功能等改变所导致的药物动力学行为的变化; 基于生理病理差异的血浆药物化学研究则利用了血浆药物化学在中药药效物质研究领域的优势, 同时结合了疾病状态对机体的影响, 有助于筛选出发挥药效作用的有效物质^[6-7]。基于此, 本研究应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight/mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS), 分析正常大鼠和MIRI模型大鼠经荭草花干预后的血浆移行成分, 利用多元统计方法筛选出生理病理状态下荭草花中抗MIRI的潜在活性成分, 并对这些成分进行初步活性验证, 以期为荭草花药效物质基础的阐释及其药用资源的深层次开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括G2-XS Q-TOF型UPLC-Q-TOF/MS仪(美国Waters公司), BL-420型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司), Model 680型酶标仪(美国Bio-Rad公司), MTN-2800D型氮吹浓缩装置、DH6000B II型电热恒温培养箱(天津奥特塞恩斯仪器有

限公司), EL240型十万分之一电子天平、EL204型万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

荭草花药材(批号20181010)购自贵州省药用植物园种植基地, 由贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为蓼科植物荭草 *P. orientale* L. 的干燥花序。

槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷对照品(批号MB6680)购自大连美伦生物科技有限公司, 山柰酚、槲皮素、山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品(批号分别为PRF8082323、PRF8052241、PRF8082421)均购自成都普瑞法科技开发有限公司, 没食子酸对照品(批号M32-110518)购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 表儿茶素对照品(批号YA0402SC138)购自上海源叶生物科技有限公司, *N*-*p*-香豆酰胺、儿茶素、山柰素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、原儿茶酸、花旗松素对照品(批号分别为wkq170328、wkq161101、wkq1603094、wkq150710、wkq150328)均购自四川省维克奇生物科技有限公司, 以上对照品纯度均不低于98%; 复方丹参片(批号G17A007, 规格0.32 g)购自广州白云山和记黄埔中药有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)检测试剂盒(批号分别为20170904、20170904、20170922、20170922)均购自南京建成生物工程研究所; TTC试剂(批号BCBP3272V)购自美国Sigma-Aldrich公司; 甲酸、乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯净水。

1.3 实验动物

雄性SD大鼠, SPF级, 体重230~270 g, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司, 生产许可证号为SCXK(渝)2019-0008。上述动物均在室温18~25 °C、相对湿度50%~70%的环境中正常喂养1周。本文所有实验操作均获得贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(编号2201021)。

2 方法

2.1 药液的制备

2.1.1 茜草花提取物溶液

取茜草花药材7 kg,按本课题组前期所得提取方法进行操作^[2]:药材粉碎后,用10倍量水煎煮1 h×3次,过滤,合并滤液并浓缩至1 g/mL(以生药量计);在搅拌条件下,缓慢加入乙醇使浓缩液含醇量达65%,继续搅拌30 min,静置12 h,抽滤,将滤液浓缩至1 g/mL(以生药量计);以水饱和的正丁醇萃取4次,合并正丁醇相并减压回收溶剂,干燥,得正丁醇提取物;取上述提取物,加80%乙醇适量溶解,经聚酰胺柱,用8倍柱体积的80%乙醇洗脱,收集流穿液和洗脱液,减压回收乙醇并真空干燥,得茜草花提取物(得率为3.43%,含原儿茶酸0.83%、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷2.29%、槲皮素1.31%、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷1.07%、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷1.77%、N-p-香豆酰酷胺0.82%)。精密称取茜草花提取物0.009 0 g,加50%甲醇溶解后定容至10 mL,摇匀。取上述溶液1 mL至100 mL容量瓶中,同法处理,制成质量浓度为9 μ g/mL(以提取物质量计)的茜草花提取物溶液,备用。

2.1.2 混合对照品溶液

(1)对照品储备液:分别精密称取槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、槲皮素、山柰酚、没食子酸、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、N-p-香豆酰酷胺、儿茶素、表儿茶素、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷、原儿茶酸、花旗松素对照品适量,加甲醇溶解后定容,分别制成质量浓度约为1 mg/mL的单一对照品储备液。

(2)混合对照品溶液的配制:分别精密量取上述各单一对照品储备液适量,加甲醇稀释,制成质量浓度均为250 ng/mL的混合对照品溶液。

2.2 血浆的制备与处理

2.2.1 正常大鼠血浆样品的制备

取SD大鼠10只,随机分为正常对照组和正常给药组(每组5只)。禁食、不禁水12 h后,正常给药组大鼠灌胃茜草花提取物溶液86 g/kg(以生药量计)^[2],正常对照组大鼠灌胃等体积1%羧甲基纤维素钠溶液,每天2次,共3 d。末次给药45 min后,采集两组大鼠的股动脉血,置于含肝素钠的抗凝EP管中,在4 °C下以5 000 r/min离心10 min,得相应血浆样品。

2.2.2 MIRI大鼠血浆样品的制备

采用冠脉结扎法^[2]复制MIRI模型。取造模后24 h(即再灌注24 h)的大鼠10只,随机分为MIRI对照组和MIRI给药组(每组5只),其余按“2.2.1”项下方法操作,得相应血浆样品。

2.2.3 血浆样品的处理

分别取正常对照组、正常给药组、MIRI对照组和MIRI给药组大鼠血浆各1 mL,加乙酸乙酯5 mL,涡旋混匀5 min,超声10 min,在4 °C下以8 000 r/min离心10 min(共3次),合并上清液并用氮气流吹干,残渣用50%甲醇200 μ L复溶后,以15 000 r/min离心5 min,得备检

血浆样品。

2.3 色谱与质谱条件

色谱柱为Waters BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m),保护柱为Waters VanGuard BEH C₁₈(2.1 mm×5 mm, 1.7 μ m)。流动相为0.01%甲酸水溶液(A)-0.01%甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱程序如下:0~1 min, 5% B; 1~3 min, 5% B→18% B; 3~10 min, 18% B→20% B; 10~13 min, 20% B→95% B; 13~15 min, 95% B; 15~18 min, 95% B→5% B。柱温为40 °C,流速为0.25 mL/min,进样量为1 μ L。

采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)进行正、负离子(ESI⁺、ESI⁻)扫描,扫描范围为m/z 50~1 200;毛细管电压为2.0 kV(ESI⁺)和1.5 kV(ESI⁻);离子源温度为110 °C(ESI⁺)和120 °C(ESI⁻);去溶剂气温度为300 °C;气体体积流量为600 L/h。

2.4 样品分析与数据处理

取“2.1.1”项下茜草花提取物溶液1 mL,以15 000 r/min离心5 min,取上清液,按“2.3”项下条件进样分析,得茜草花提取物总离子流图。取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.3”项下条件进样分析,得混合对照品总离子流图。通过比对上述总离子流图,在参考相关文献的基础上,对茜草花化学成分进行分析。

取“2.2.1”“2.2.2”项下各组大鼠血浆样品适量,按“2.2.3”项下方法处理后,按“2.3”项下条件进样分析,获得相应总离子流图。以正常对照组/MIRI对照组大鼠血浆样品为对照(扣除其中内源性成分),结合前述茜草花化学成分,利用MassLynx 4.1、UNIFI软件进行数据采集、分析,并结合相关文献进行色谱峰保留时间(t_R)、m/z、二级质谱信息比对,挖掘生理病理状态下茜草花在大鼠体内的移行成分;同时,明确正常给药组大鼠和MIRI给药组大鼠血浆样品中的共有峰,以其峰面积为数据源,利用SIMCA 13.0软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、“有监督”的正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least square-discrimination analysis, OPLS-DA),以各共有成分的变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值>1为标准^[8],筛选出差异移行成分,以推测茜草花抗MIRI的潜在活性成分。

2.5 茜草花抗MIRI潜在活性成分的活性验证

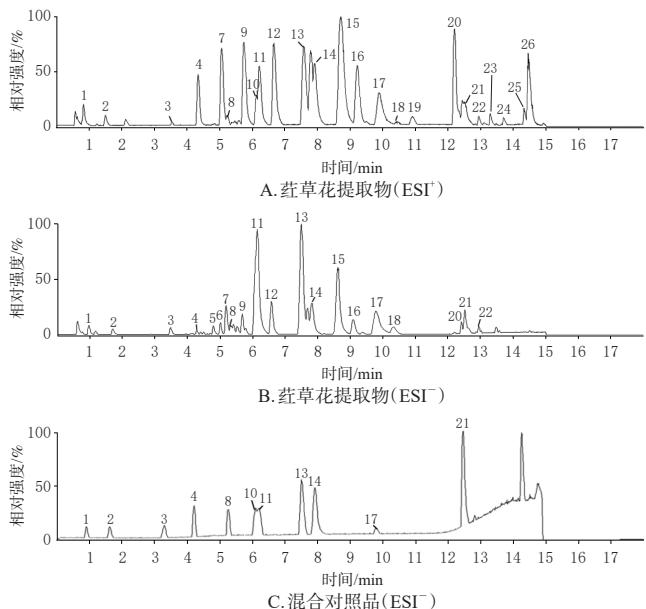
另取SD大鼠,随机分为对照组、MIRI组、阳性对照组、各潜在活性成分组(具体成分参考“2.4”项下结果),每组5只。除对照组外,其余各组大鼠均采用冠脉结扎法^[2]复制MIRI模型。再灌注24 h后,阳性对照组大鼠按0.2 g/kg灌胃复方丹参片药液(以1%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂,剂量参考预实验结果设置),每天3次,共3 d;各潜在活性成分组大鼠分别按10 mg/kg灌胃相应药液(以1%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂,剂量参考预实验结果设置),每天2次,共3 d;对照组和MIRI组大鼠灌胃等体积1%羧甲基纤维素钠溶液,每天2次,共3 d。末次给药后,按“2.2.1”项下方法收集各组大鼠血浆样品适量,

按对应试剂盒说明书方法操作,对其SOD活性和LDH、CK-MB、cTn I泄漏量进行检测,用以评价各潜在活性成分的抗MIRI活性。采用SPSS 18.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Dunnett-t检验(方差齐)或Dunnett's T3检验(方差不齐),检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 莼草花化学成分分析

莼草花提取物总离子流色谱图中,主要色谱峰有26个;通过与混合对照品溶液和相关文献^[9-17]比对,确定了1、2、3、4、8、10、11、13、14、17、21号峰分别为没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、花旗松素、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷、N-p-香豆酰酷胺、槲皮素、山柰酚;同时,通过与相关文献^[12-13,18]比对,确定了5、7、15号峰分别为槲皮素-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷、N-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺。结果见图1(ESI⁻下,可覆盖所有对照品信息,故只展示该条件下图谱)。



1:没食子酸;2:原儿茶酸;3:儿茶素;4:表儿茶素;5:槲皮素-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷;7:山柰酚-3-O-(2"-O- α -L-鼠李糖基)- β -D-葡萄糖醛酸苷;8:花旗松素;10:山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷;11:槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷;13:山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷;14:N-p-香豆酰酷胺;15:N-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺;17:槲皮素;21:山柰酚;其余未知。

图1 莼草花提取物及混合对照品的总离子流色谱图

3.2 莼草花在大鼠体内的移行成分分析

3.2.1 莼草花在正常大鼠体内的移行成分分析

通过对比正常给药组大鼠和正常对照组大鼠血浆样品的总离子流图,再对比“3.1”项下所得莼草花化学成分和相关文献^[13,18],共发现移行成分15个,其中原型入血成分6个、代谢产物9个。部分总离子流图见图2,成分分析结果见表1(限于篇幅,所有总离子流图可在本文首二维码链接中的“增强出版”板块查看)。

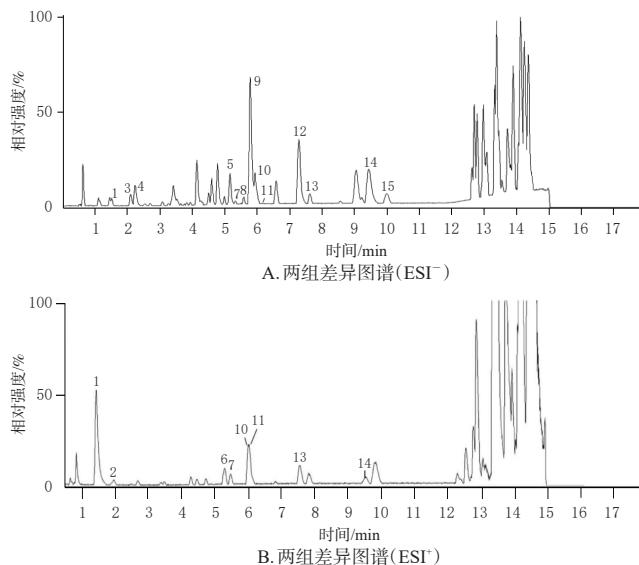


图2 莼草花在正常大鼠体内的总离子流图(部分)

表1 莼草花在正常大鼠体内的移行成分分析结果

峰号	保留时间/min	离子模式	实测m/z	预测分子式	误差/ ppm	主要碎片离子	原型入血成分/代谢产物
1 ^a	1.58	[M-H] ⁻	153.019 5	C ₆ H ₄ O ₄	4.6	-	原儿茶酸
2	1.91	[M+H] ⁺	158.118 1	C ₈ H ₆ NO ₂	0	-	未知代谢产物
3	2.10	[M-H] ⁻	477.063 2	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	-7.8	-	槲皮素的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
4	2.20	[M+H] ⁺	463.086 2	C ₃ H ₁₉ O ₁₂	2.2	176.964 7	未知代谢产物
5	5.16	[M-H] ⁻	607.130 2	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₆	0.5	431.100 8, 176.961 7	山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷的葡萄糖醛酸化代谢产物
6	5.25	[M+H] ⁺	460.160 8	C ₂₃ H ₂₈ NO ₉	-3.9	176.080 6	N-p-香豆酰酷胺的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
7	5.30	[M+H] ⁺	490.171 8	C ₂₃ H ₂₈ NO ₁₀	1.0	176.070 6	N-反式阿魏酰胺的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
8	5.57	[M-H] ⁻	411.237 2	C ₁₆ H ₁₁ O ₁₃ S	2.2	301.031 7, 80.480 8	槲皮素的去氢、羟基化、甲基化和硫酸酯化代谢产物
9	5.78	[M-H] ⁻	461.072 5	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	1.1	285.040 0	山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
		[M+H] ⁺	463.085 7	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-4.3	287.055 1	产物 ^[13]
10 ^a	5.95	[M-H] ⁻	447.095 2	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	2.7	-	山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷
		[M+H] ⁺	449.109 1	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	1.6	-	
11 ^a	6.15	[M-H] ⁻	447.095 2	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	2.7	-	槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷
12 ^a	7.29	[M-H] ⁻	431.097 8	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	0.7	-	山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷
		[M+H] ⁺	433.113 1	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	-0.9	-	
13 ^a	7.60	[M-H] ⁻	282.113 0	C ₁₇ H ₁₆ NO ₃	0	-	N-p-香豆酰酷胺
		[M+H] ⁺	284.128 4	C ₁₇ H ₁₈ NO ₃	-1.1	-	
14	9.47	[M-H] ⁻	329.000 3	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	1.8	-	槲皮素的碳基化代谢产物 ^[18]
15	10.10	[M-H] ⁻	329.030 3	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	2.7	-	莼草花提取物中的未知成分
		[M+H] ⁺	331.046 0	C ₁₉ H ₂₁ O ₈	1.8	-	

a:有相对对照品; -:无碎片离子信息。

3.2.2 莼草花在MIRI大鼠体内的移行成分分析

通过对比MIRI给药组大鼠和MIRI对照组大鼠血浆样品的总离子流图,再对比“3.1”项下所得莼草花化学成分和相关文献^[13,18],共发现19个移行成分,其中原型入血成分6个、代谢产物13个。部分总离子流图见图3,成分分析结果见表2(限于篇幅,所有总离子流图可在本文首二维码链接中的“增强出版”板块查看)。

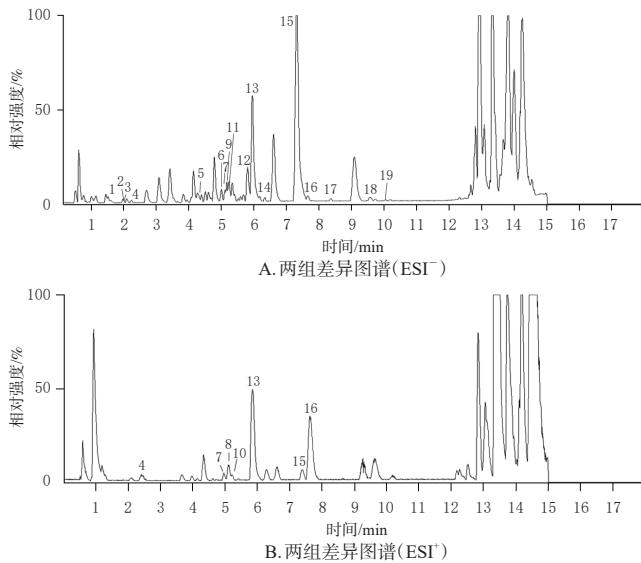


图3 莼草花在MIRI大鼠体内的总离子流图(部分)

表2 莼草花在MIRI大鼠体内的移行成分分析结果

峰号	保留时间/min	离子模式	实测 m/z	预测分子式	误差/ ppm	主要碎片离子	原型/入血成分/代谢产物
1 ^a	1.59	[M-H] ⁻	153.0189	C ₈ H ₆ O ₄	1.3	-	原儿茶酸
2	2.00	[M-H] ⁻	288.0297	C ₁₇ H ₁₈ NO ₄	0.7	-	未知代谢产物
3	2.10	[M-H] ⁻	477.0576	C ₂₁ H ₁₇ O ₃	4.7	-	槲皮素的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
4	2.20	[M+H] ⁺	463.0887	C ₂₁ H ₁₉ O ₂	2.2	176.9619	未知代谢产物
5	4.40	[M-H] ⁻	246.9915	C ₈ H ₁₀ S	2.4	167.0348	槲皮素的O-C2键裂解环/硫化代谢产物 ^[13]
6	5.00	[M-H] ⁻	477.0668	C ₂₁ H ₁₇ O ₃	-0.2	301.0357, 176.0868	槲皮素的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
7	5.10	[M-H] ⁻	607.1309	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	1.6	-	山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷的葡萄糖醛酸化代谢产物
		[M+H] ⁺	609.1461	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	0.8	-	
8	5.11	[M+H] ⁺	460.1591	C ₂₁ H ₂₀ NO ₃	-3.7	284.1273, 176.0806	N-p-香豆酰胺的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
9	5.16	[M-H] ⁻	383.0073	C ₁₅ H ₁₁ O ₁₀ S	1.8	301.0349, 80.1082	槲皮素的加氢/硫酸酯化代谢产物
10	5.23	[M+H] ⁺	490.1703	C ₂₁ H ₂₀ NO ₁₀	-3.5	314.1384, 176.0706	N-反式阿魏酰胺的葡萄糖醛酸化代谢产物 ^[13]
11	5.25	[M-H] ⁻	383.0073	C ₁₅ H ₁₁ O ₁₀ S	1.8	301.0349, 80.1082	槲皮素的加氢/硫酸酯化代谢产物
12	5.81	[M-H] ⁻	461.0720	C ₂₁ H ₁₉ O ₂	2.8	285.046, 176.9635	山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物
		[M+H] ⁺	463.0873	C ₂₁ H ₁₉ O ₂	-0.9	287.0562	
13 ^a	5.96	[M-H] ⁻	447.0933	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	2.0	-	山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷
		[M+H] ⁺	449.1080	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.9	-	
14 ^a	6.35	[M-H] ⁻	447.0927	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	0.2	-	槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷
		[M+H] ⁺	449.1086	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.4	-	
15 ^a	7.32	[M-H] ⁻	431.0978	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	2.1	-	山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷
		[M+H] ⁺	433.1150	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	3.5	-	
16 ^a	7.68	[M-H] ⁻	282.1130	C ₁₇ H ₁₆ NO ₃	1.1	-	N-p-香豆酰胺
		[M+H] ⁺	284.1290	C ₁₇ H ₁₈ NO ₃	1.1	-	
17	8.37	[M-H] ⁻	209.1178	C ₁₂ H ₁₁ O ₃	0	-	未知代谢产物
18	9.57	[M-H] ⁻	329.0297	C ₁₆ H ₁₀ S	2.7	-	槲皮素的羧基化代谢产物 ^[13]
19	10.03	[M-H] ⁻	329.0302	C ₁₆ H ₁₀ S	4.2	-	莼草花提取物中的未知成分

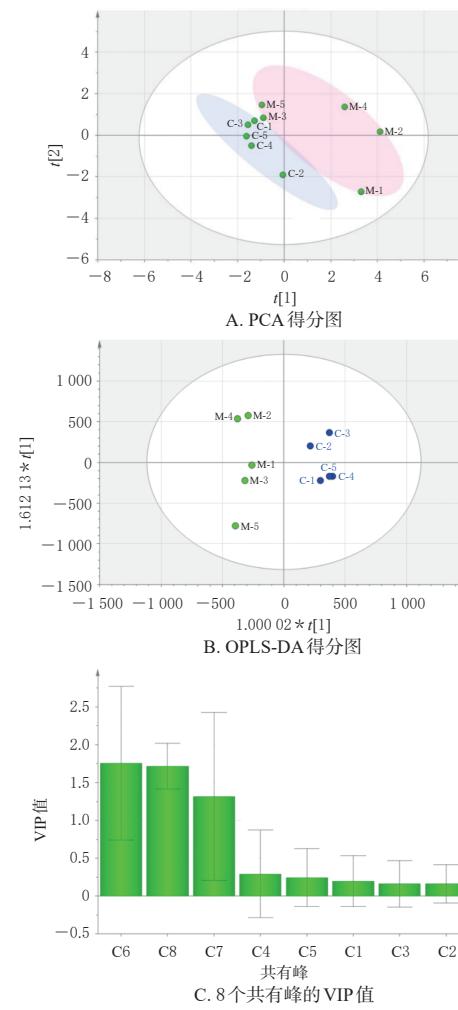
a:有相对对照品; -:无碎片离子信息。

3.2.3 莼草花在正常和MIRI大鼠含药血浆中的差异移行成分分析

通过比对正常给药组和MIRI给药组大鼠血浆样品的总离子流图后发现,两者血浆样品中有共有峰8个,依次为原儿茶酸、槲皮素的葡萄糖醛酸化代谢产物、保留

时间为2.20 min的未知代谢产物、山柰素-3-O- α -L-鼠李糖苷的葡萄糖醛酸化代谢产物、N-反式阿魏酰胺的葡萄糖醛酸化代谢产物、山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物、N-p-香豆酰胺、槲皮素的羧基化代谢产物(按出峰先后依次称为C1~C8号峰)。

以上述8个共有峰峰面积为变量进行的PCA结果显示,正常给药组和MIRI给药组大鼠血浆样品可被分为两类(图4A)。进一步的OPLS-DA得分图也得出了相同的结果(图4B);同时,由OPLS-DA结果可知,模型的解释能力参数 R^2X 、稳定性参数 R^2Y 和模型的预测能力参数 Q^2 分别为0.468、1.000、0.997,表明所建OPLS-DA模型的稳定性和预测能力较好^[8];山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物、槲皮素的羧基化代谢产物和N-p-香豆酰胺对应色谱峰(C6、C8、C7号峰)的VIP值均大于1,提示这3个物质可能是莼草花提取物发挥药效的差异移行成分(图4C)。



C-1~C-5:正常给药组5只大鼠的血浆样品;M-1~M-5:MIRI给药组5只大鼠的血浆样品。

图4 生理病理状态下莼草花在大鼠体内的差异移行成分分析结果

从上述结果可知,莼草花提取物中含有槲皮素,经大鼠机体代谢后有可能生成羧基化代谢产物;另外,莼草花提取物中的山柰酚、山柰素-3-O- β -D-葡萄糖苷经大

鼠机体生物转化后,均有可能产生山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物。因此,基于生理病理状态下的差异移行成分,本研究推测原型入血成分N-*p*-香豆酰酷胺以及代谢产物的原型成分槲皮素、山柰酚和山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷可能是荭草花抗MIRI的潜在活性成分。

3.3 荓草花抗MIRI潜在活性成分的验证

活性验证实验结果显示,与对照组比较,MIRI组大鼠血浆中SOD活性显著降低($P<0.01$),LDH、CK-MB、cTn I泄漏量均显著升高($P<0.01$);与MIRI组比较,各潜在活性成分组大鼠血浆SOD活性均显著升高($P<0.01$),LDH、CK-MB、cTn I泄漏量均显著降低($P<0.01$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血浆中SOD活性和LDH、CK-MB、cTn I泄漏量比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	SOD活性/(U/mL)	LDH泄漏量/(U/L)	CK-MB泄漏量/(ng/mL)	cTn I泄漏量/(ng/L)
对照组	117.11 \pm 3.01	1 499.34 \pm 425.43	68.65 \pm 3.75	24.78 \pm 2.30
MIRI组	61.04 \pm 4.95 ^a	2 845.03 \pm 219.92 ^a	157.99 \pm 16.99 ^a	69.23 \pm 2.78 ^a
阳性对照组	101.28 \pm 16.46 ^b	1 274.17 \pm 347.59 ^b	87.86 \pm 2.88 ^b	44.05 \pm 3.83 ^b
槲皮素组	91.74 \pm 11.51 ^b	2 251.66 \pm 369.56 ^b	74.58 \pm 6.71 ^b	12.49 \pm 1.48 ^b
山柰酚组	74.53 \pm 16.46 ^b	1 668.87 \pm 188.48 ^b	95.32 \pm 3.81 ^b	29.91 \pm 2.64 ^b
N- <i>p</i> -香豆酰酷胺组	109.95 \pm 16.35 ^b	1 483.44 \pm 305.64 ^b	84.71 \pm 5.37 ^b	31.17 \pm 4.99 ^b
山柰素-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷组	110.75 \pm 8.90 ^b	1 925.42 \pm 816.13 ^b	74.88 \pm 4.51 ^b	29.01 \pm 2.40 ^b

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与MIRI组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

口服是中药的主要给药方式,药物成分经机体吸收入血是其发挥疗效的重要影响途径。血浆药物化学以体内直接作用物质为切入点,分析血浆样品中的移行成分(原型入血成分、代谢产物等),有助于发现入血原型成分,明确药物在体内的活性代谢产物,已成为快速、准确研究中药药效物质基础的有效途径。本研究同时考虑了生理病理状态对药物动力学行为的影响,以深入挖掘中药活性成分。本研究在正常大鼠血浆中发现了15个移行成分,包括6个原型入血成分、9个代谢产物;在MIRI大鼠血浆中发现了19个移行成分,包括6个原型入血成分、13个代谢产物;有8个移行成分同时在正常给药组大鼠和MIRI给药组大鼠血浆样品中被检测到,包括2个原型入血成分、6个代谢产物。PCA和OPLS-DA结果显示,8个共有移行成分中,山柰酚的葡萄糖醛酸化代谢产物、槲皮素的羧基化代谢产物和N-*p*-香豆酰酷胺可能是荭草花提取物发挥药效的差异移行成分。由此本研究推测,原型入血成分N-*p*-香豆酰酷胺以及差异代谢物的原型成分槲皮素、山柰酚和山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷可能是荭草花抗MIRI的潜在活性成分。

氧化损伤是心肌MIRI的重要病因^[19]。其中,SOD是抗氧化自由基的重要催化剂,CK-MB和cTn I是心肌细胞胞浆中的特异性酶,是心肌缺血临床评价的“金标准”。LDH、CK-MB、cTn I泄漏量可间接反映患者心肌受损的程度,其升高程度与心肌梗死程度成正比^[20]。基于此,本研究对各组大鼠血浆中SOD活性和LDH、CK-MB、cTn I泄漏量进行比较,结果显示,N-*p*-香豆酰酷

胺、槲皮素、山柰酚和山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷均能显著升高MIRI大鼠血浆中SOD活性,降低MIRI大鼠血浆中LDH、CK-MB、cTn I泄漏量,均表现出了良好的抗MIRI作用,可能是荭草花抗MIRI的活性成分。

综上所述,本研究采用基于生理病理差异的血浆药物化学方法,筛选出了荭草花提取物抗MIRI的4个潜在活性成分,即N-*p*-香豆酰酷胺、槲皮素、山柰酚和山柰素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷,其药效的发挥可能与抗氧化损伤有关。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准:2003年版[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:267-268.
Guizhou Provincial Drug Administration. Quality standards for traditional Chinese medicine and ethnic medicinal materials in Guizhou province: 2003 edition[M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House, 2003:267-268.
- [2] 刘俊宏,王昌权,夏涛,等.荭草花提取物对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2019,30(1):68-72.
LIU J H, WANG C Q, XIA T, et al. Study on protective effects of *Polygonum orientale* extract on myocardial ischemia-reperfusion injury model rats[J]. China Pharm, 2019, 30(1):68-72.
- [3] 付昌丽,刘春花,潘洁,等.基于血浆药物化学和网络药理学分析良附滴丸治疗胃肠道疾病的活性成分和潜在分子机制[J].中国中药杂志,2021,46(20):5393-5402.
FU C L, LIU C H, PAN J, et al. Mechanism of Liangfu dropping pills in treatment of gastrointestinal diseases based on plasma pharmacokinetics and network pharmacology[J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(20):5393-5402.
- [4] 姚维一,王春,龚弟鸿,等.基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS快速鉴定补阳还五汤及其在人血浆和尿液中药物化学成分[J].中国现代应用药学,2020,37(14):1719-1725.
YAO W Y, WANG C, GONG D H, et al. Rapid identification of chemical constituents for Buyang huanwu decoction and its chemical constituents in human plasma and urine by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(14):1719-1725.
- [5] 金汉台,刘建庭,王建方,等.基于UPLC-Q-TOF/MS的复方鱼腥草合剂大鼠血清药物化学研究[J].中草药,2021,52(10):2890-2896.
JIN H T, LIU J T, WANG J F, et al. Identification of absorbed components in rat plasma after oral administration of Yuxingcao mixture by UPLC-Q-TOF/MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(10):2890-2896.
- [6] 王元清,严建业,李顺祥,等.淫藤骨痹康方有效部位群在正常大鼠与急性血瘀大鼠体内药物化学对比研究[J].中药材,2013,36(12):1973-1978.
WANG Y Q, YAN J Y, LI S X, et al. Comparison of

- pharmaceutical chemistry difference of effective parts from Yinteng gubi kang prescription in normal rats and rats with acute blood stasis[J]. *J Chin Med Mater*, 2013, 36 (12):1973-1978.
- [7] 董婉茹, 丁雅光, 荆雷, 等. 病理及生理状态下的栀子血清药物化学对比研究[J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2270-2274.
- DONG W R, DING Y G, JING L, et al. Comparative study on serum pharmacochemistry of *Gardenia jasminoides* under physiological and pathological status[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2011, 42(11):2270-2274.
- [8] 李睿, 纪树亮, 章洁淳, 等. 清热活血汤改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的药效成分及作用机制研究[J]. *中国药房*, 2022, 33(23):2845-2851.
- LI R, JI S L, ZHANG J C, et al. Study on pharmacological components and mechanism of Qingre huoxue decoction in improving myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *China Pharm*, 2022, 33(23):2845-2851.
- [9] 王永春, 董金香, 李军鸽, 等. UPLC-Q-TOF/MS技术结合UNIFI数据库快速分析经典名方温经汤标准汤剂的化学成分[J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(6):639-652.
- WANG Y C, DONG J X, LI J G, et al. Rapid analysis of chemical components of Wenjing decoction standard decoction based on UPLC-Q-TOF/MS technology combined with UNIFI database[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2022, 39 (6):639-652.
- [10] 沈瑶, 黄思红, 刘依茹, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS分析覆盆子不同部位的化学成分及其9种成分含量的快速测定[J]. *中草药*, 2023, 54(15):4789-4803.
- SHEN Y, HUANG S H, LIU Y R, et al. Analysis of chemical components in different parts of *Rubus chingii* and rapid determination of its nine main components by UHPLC-Q-Orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(15):4789-4803.
- [11] 肖观林, 江洁怡, 胥爱丽, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS结合多元统计分析不同产地布渣叶化学成分的差异[J]. *湖南中医杂志*, 2021, 37(12):171-177.
- XIAO G L, JIANG J Y, XU A L, et al. Difference in chemical components between *Microcos paniculata* from different producing areas based on ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analyses[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2021, 37(12):171-177.
- [12] 向文英, 梅朝叶, 孙慧园, 等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS分析荭草花提取物在H9c2心肌细胞中效应物质[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12):90-95.
- XIANG W Y, MEI C Y, SUN H Y, et al. Identification of effective substances from *Polygonum orientale* flower extract in H9c2 myocardial cells by UHPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2017, 23(12):90-95.
- [13] 赵平, 王昌权, 郑林, 等. 蓼草花有效组分在大鼠粪便和胆汁中的代谢研究[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(1): 96-104.
- ZHAO P, WANG C Q, ZHENG L, et al. Metabolism study on effective fractions from *Polygonum orientale* L. in rat feces and bile[J]. *Chin J N Drugs*, 2020, 29 (1) : 96-104.
- [14] 陈虹霞, 周昊, 陶冉, 等. 基质固相分散和HPLC-IT-TOF/MS联用研究漆树木材中多酚成分[J]. *林产化学与工业*, 2022, 42(1):10-20.
- CHEN H X, ZHOU H, TAO R, et al. Study on polyphenols in lacquer tree by matrix solid-phase dispersion and HPLC-IT-TOF/MS[J]. *Chem Ind For Prod*, 2022, 42(1) : 10-20.
- [15] 刘淑莹, 宋凤瑞, 刘志强. 中药质谱分析[M]. 北京: 科学出版社, 2012:109-116.
- LIU S Y, SONG F R, LIU Z Q. Mass spectrometry analysis of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: Science Publishing House, 2012:109-116.
- [16] IWASHINA T, NAKATA M, NAKANE T, et al. Flavonoid glycosides from *Hylotelephium sieboldii* var. *sieboldii* and var. *ettyuense* endemic to Japan[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2022, 105:104505.
- [17] 王艺, 冯丽萍, 黄李璐, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术快速鉴定木芙蓉花化学成分[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(12):2042-2052.
- WANG Y, FENG L P, HUANG L L, et al. Rapid identification on chemical constituents of *Hibiscus mutabilis* flowers by UPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2021, 33(12):2042-2052.
- [18] 陈浩, 王昌权, 夏涛, 等. 蓼草花有效组分在人肠道菌群中体外代谢特征分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30 (12):2097-2103, 2062.
- CHEN H, WANG C Q, XIA T, et al. Analysis of *in vitro* metabolic characteristics of effective components of *Polygonum orientale* flower in human intestinal flora[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2018, 30(12):2097-2103, 2062.
- [19] 李先超, 杨云朝, 喻希, 等. 环泊酚对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国心血管病研究*, 2023, 21(10):956-960.
- LI X C, YANG Y Z, YU X, et al. Protective effect of ciprofloxacin on myocardial ischemia reperfusion injury in mice and its mechanism[J]. *Chin J Cardiovasc Res*, 2023, 21 (10):956-960.
- [20] 杨沛勋, 刘恣璇, 刘婧, 等. 龙血通络胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用[J]. *中草药*, 2023, 54 (20):6712-6721.
- YANG P X, LIU M X, LIU J, et al. Protective effect of Longxuetongluo capsule on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(20):6712-6721.

(收稿日期:2024-01-11 修回日期:2024-05-16)

(编辑:张元媛)