

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析龙脷叶醇提取物化学成分与咳嗽大鼠体内入血成分和代谢原型成分

丘 琴¹, 覃芳芳¹, 韦红杏¹, 叶梅芳¹, 甄丹丹^{1*}, 甄汉深¹, 宋 铭^{2*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530022

2. 广西壮族自治区人民医院, 广西 南宁 530000

摘要: **目的** 分析鉴定龙脷叶 *Sauropus spatulifolius* Beille 75%乙醇提取物化学成分及咳嗽大鼠体内入血成分和代谢原型成分。**方法** 通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析龙脷叶 75%乙醇提取物化学成分; 雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分为 6 组: 对照组、模型组、枸橼酸喷托维林片(阳性药, 10.521 mg·kg⁻¹) 组和龙脷叶 75%乙醇提取物高、中、低剂量(26.31、13.15、6.58 mg·kg⁻¹) 组, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 对照组和模型组均 ig 等量纯净水。在第 6 天给药后 1 h 和末次给药后 1 h, 应用辣椒素溶液建立大鼠咳嗽模型, 根据药效实验结果, 取对照组和提取物中剂量组的血清、对照组和高剂量组的粪便和尿液样本, 利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定入血成分及粪便和尿液中的代谢原型成分。**结果** 鉴定出龙脷叶 75%乙醇提取物化学成分 40 个, 以有机酸类为主, 从血清样本分析出大黄素、芹菜素等 19 个入血原型成分, 从粪便样本中分析出咖啡酸、异落叶松脂素等 17 个原型成分, 尿液样本中发现咖啡酸、东莨菪亭等 22 个原型成分。**结论** 确定了龙脷叶 75%乙醇提取物中的化学成分、入血原型成分以及在粪便和尿液中的代谢原型成分, 推测黄酮类和有机酸类成分可能是龙脷叶发挥止咳作用的药效物质。

关键词: 龙脷叶; 醇提取物; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 化学成分; 咳嗽; 入血成分; 代谢原型成分; 有机酸类; 黄酮类

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)01-0157-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.015

Study on chemical constituents of ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves and its blood components and metabolite prototype components in cough rats based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

QIU Qin¹, QIN Fangfang¹, WEI Hongxing¹, YE Meifang¹, ZHEN Dandan¹, ZHEN Hanshen¹, SONG Ming²

1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China

2. People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, China

Abstract: Objective To analyze and identify the chemical constituents of 75% ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves as well as constituents absorbed into blood and metabolites prototype components in cough rats. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS/MS technology was used to analyze the chemical constituents of 75% ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves. Totally 36 male SD rats were randomly divided into six groups: control group, model group, pentoverine citrate tablet (positive, 10.521 mg·kg⁻¹) group and 75 % ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves high, medium and low-dose (26.31, 13.15, 6.58 mg·kg⁻¹) groups, ig once a day for seven days, both the control and model groups received equal amounts of purified water. On the 6th day, 1 h after administration and

收稿日期: 2024-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460601)、广西壮瑶药重点实验室(桂科基字[2014]32号)、壮瑶药协同创新中心(桂教科研[2013]20号); 广西高等学校中青年骨干教师教育计划项目(桂教教师(2022)60号); 广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心(桂发改高技函[2020]2605号)、广西科技基地和人才专项(桂科 AD21238031)、广西重点研发计划项目(桂科 AB21196016)、广西中医药重点学科(壮药学)建设项目(GZXK-Z-20-64)、广西一流学科中药学(民族药学)(桂教科研[2018]12号); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科(壮药学)建设项目(国中医药人教函(2022)226号); 广西中医药大学“桂派杏林青年英才”培养项目(2022C032)

作者简介: 丘 琴(1983—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质及其质量评价。E-mail: 39446404@qq.com

***通信作者:** 甄丹丹(1983—), 女, 助理研究员, 主要从事中药与药学的科研与教学。E-mail: 8zhen@163.com

宋 铭(1990—), 男, 主治医师, 从事医学科研与临床工作。E-mail: 261195338@qq.com

1 h after the last administration, the rat cough model was established with capsaicin solution. According to the results of the efficacy experiment, serum samples from the control group and extract medium dose group, stool and urine samples from the control group and high dose group were taken, and the metabolic prototype components in blood and stool and urine were identified by UPLC-Q-TOF-MS/MS technique. **Results** A total of 40 chemical components were identified from the 75% ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves, mainly organic acids. A total of 19 constituents absorbed into blood were identified from serum samples, such as emodin and apigenin. A total of 17 metabolite prototype components were identified from fecal samples, such as caffeic acid and isolariciresinol. A total of 22 metabolite prototype components were identified in urine samples, such as caffeic acid and scopoletin. **Conclusion** The chemical composition, blood entering prototype components, and metabolic prototype components in feces and urine of the 75% ethanol extract of *Sauropus spatulifolius* leaves have been determined. It is speculated that flavonoids and organic acids may be the pharmacological substances of *Sauropus spatulifolius* leaves in relieving cough.

Key words: *Sauropus spatulifolius* Beille; ethanol extract; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical constituents; cough; blood components; metabolite prototype components; organic acids; flavonoids

龙脷叶为大戟科植物龙脷叶 *Sauropus spatulifolius* Beille 的干燥叶, 根据《中国药典》2020 年版, 龙脷叶性味甘、淡, 平, 归肺、胃经, 具有润肺止咳、通便的功效, 常用于治疗肺燥咳嗽、便秘等症状^[1]。本课题组经过前期的研究, 发现龙脷叶具有抗炎、止咳的药理作用, 抗炎活性部位为醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇, 抗炎机制主要与降低前列腺素 E₂ (PGE₂)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NO 的含量有关; 龙脷叶止咳活性部位为 75%乙醇和醋酸乙酯部位, 其止咳机制涉及激动中枢系统的阿片受体和 ATP 敏感性钾通道 (KATP) 通道^[2-3]。除此之外, 龙脷叶还具有抗菌、抗过敏、抗氧化、抗肿瘤等作用^[4]。

咳嗽是一种在临床上常见的症状, 有研究表明, 气道感觉神经末梢存在许多咳嗽感受器, 其以离子通道或受体的方式存在, 当受到异物刺激时, 咳嗽感受器会产生信号, 通过迷走神经传导到咳嗽中枢, 再通过传出神经刺激相应肌群, 从而产生咳嗽^[5]。研究表明, 造成社区重大疾病负担的原因与慢性咳嗽有关, 通过流行病学调查发现咳嗽是社区的常见症状, 全球成人发病率为 9.6%, 根据报道, 我国慢性咳嗽发病率为 2.0%~28.3%, 而且咳嗽具有发作反复、难以治愈的特点, 因此治疗慢性咳嗽刻不容缓^[6-7]。龙脷叶作为传统壮药, 其良好的止咳作用已被证实。本实验基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术探究龙脷叶醇提取物的化学成分及其在咳嗽大鼠血清、粪便、尿液中的成分, 为阐明龙脷叶止咳作用药效物质提供科学依据, 为后续龙脷叶药材的开发以及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g,

由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004, 饲养于广西中医药大学实验动物中心内, 符合 SPF 级别要求, 实验室使用许可证编号为 SYXK (桂) 2019-0001, 获得广西中医药大学动物实验福利伦理批准, 编号: DW20220527-107。

1.2 药材

龙脷叶药材采自广西南宁市, 经广西一心医药公司马脷飞副主任中药师鉴定为大戟科守宫木属植物龙脷叶 *S. spatulifolius* Beille 的干燥叶。

1.3 实验仪器与主要试剂

X500R 液质联用仪 (AB Sciex 公司); Accucore C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μ m, Thermo scientific 科技有限公司); TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); L600 台式低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); KQ5200B 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SQP 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; YC-390 医用冷藏箱 (青岛海尔特种电器有限公司); DW-HL398 超低温冷冻储存箱 (中科美菱低温科技股份有限公司)。

对照品: 阿魏酸 (批号 110773-200611)、咖啡酸 (批号 110885-201703) 购自中国药品生物制品检定所; 肉桂酸 (批号 20160610) 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 大黄素 (批号 RP190519)、豆甾醇 (批号 DSY180314-003)、山柰酚 3-O-龙胆二糖苷 (批号 DST180508-0144) 购自成都德思特生物科技有限公司; 山柰酚 (批号 110861-200808) 购自中国食品药品检定研究院; 丹皮酚 (批号 MUST-11071805) 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 辣椒素 (批号 S0928A) 购自大连美仑生物技术有限公

司,质量分数均 $\geq 98.0\%$;乙醇(批号 2210021,广西海盈酒精有限责任公司);甲醇(分析纯,批号 2204011),购自成都市科隆化学品有限公司;甲酸(分析纯,批号 20190408),购自天津市光复科技发展有限公司;乙腈(色谱纯,批号 L-33055)、甲醇(批号 L-21063,色谱纯)购自赛默飞世尔有限公司;枸橼酸喷托维林片(批号 211004)购自上海玉瑞生物科技药业有限公司;无水乙醇(批号 6001002-9)购自西陇科学股份有限公司;氯化钠注射液(批号 H21051109)购自广西裕源药业有限公司。

2 方法

2.1 龙脷叶乙醇提取物总浸膏的制备

龙脷叶鲜品晾晒后烘干,称取干燥叶 1 040 g,粉碎,加 75%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并提取液,浓缩成浸膏,得总浸膏 287.61 g,得膏率为 27.65%。

2.2 供试品溶液的制备

称取 2.5 mg 龙脷叶乙醇提取物总浸膏,加适量甲醇,溶解,超声,将溶液倒入 5 mL 量瓶中,甲醇定容到刻度,振荡均匀,取 2 mL 离心,微孔滤膜滤过,得滤液,待测。

2.3 对照品溶液的制备

阿魏酸、肉桂酸、大黄素、山柰酚-3-*O*-龙胆二糖苷、豆甾醇、山柰酚、丹皮酚、咖啡酸对照品各称取 1.0 mg,甲醇溶解后定容至刻度。各取 50 μL 制成混合对照品溶液,取 80 μL 混合对照品溶液置于 10 mL 量瓶,加甲醇稀释至刻度,取 2 mL 混合对照品溶液,微孔滤膜滤过,得滤液,待测。

2.4 ig 溶液制备

龙脷叶醇提取物供试液的准备:分别称取龙脷叶 75%乙醇提取物总浸膏 36.37、18.18、9.10 g,加入纯净水充分溶解混匀,定容至 50 mL,即得生药质量浓度为 2.631、1.315、0.658 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 75%乙醇提取物高、中、低剂量溶液。

枸橼酸喷托维林片(阳性药)溶液的制备:取适量枸橼酸喷托维林片,研细,称取 378.756 mg,加 50 mL 纯水,振荡,得到质量浓度为 1.0521 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的枸橼酸喷托维林片溶液。

辣椒素溶液的制备:称取辣椒素 0.459 5 g,加入 5 mL 无水乙醇和 5 mL 聚山梨酯 80 制备成原液,再加入 40 mL 0.9%氯化钠溶液稀释成 0.03 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的辣椒素溶液。

2.5 动物实验

2.5.1 动物分组、给药与造模 雄性 SD 大鼠 36 只,适应性饲养 5 d 后,随机分为 6 组,每组 6 只,分别为对照组、模型组、枸橼酸喷托维林片(阳性药,10.521 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和龙脷叶 75%乙醇提取物高、中、低剂量(26.31、13.15、6.58 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,对照组和模型组均 ig 等量纯净水,各组大鼠按照 1 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量 ig 给药,每天 1 次,连续 7 d。

给药第 6 天后,禁食不禁水,在第 6 天给药后 1 h 和末次给药后 1 h,启动雾化器,使箱子内充满雾化的 0.03 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒素溶液,对照组不做任何处理,其余各组大鼠放入自制雾化箱内,每个箱子 1 只,继续喷雾 120 s,结束后记录 10 min 内大鼠的咳嗽次数以及潜伏期。

2.5.2 样本的采集 (1) 粪便、尿液样本的采集:第 6 天造模结束后,收集大鼠 24 h 后的尿液与粪便。尿液样品离心后取上清液,存-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备测。粪便样品收集后存-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备测。

(1) 血液采集:第 7 天造模结束后,麻醉大鼠,进行腹主动脉取血,静置 1 h,离心取上清液,存放于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冷冻储存箱。

2.5.3 样本的处理 由药效学实验结果可知,给药第 6 天造模,高剂量组咳嗽次数显著性差异较好,第 7 天造模后,中剂量组咳嗽次数显著性差异较好,因此血清样本选择中剂量组,粪便和尿液样本选择高剂量组。

血清样品处理:分别取 3 只对照组大鼠和 3 只龙脷叶 75%乙醇提取物中剂量组咳嗽次数较少大鼠的血清,每只鼠各取 100 μL 血清,即得每组 300 μL 混合血清,加乙腈 900 μL ,漩涡 30 s,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,氮气吹干,加乙腈 900 μL ,漩涡后 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清 100 μL ,过微孔滤膜,得滤液,待测。

粪便样品处理:分别取 3 只对照组大鼠和 3 只龙脷叶 75%乙醇提取物高剂量组中咳嗽次数较少大鼠的粪便,各称取样品 0.1 g,即每组得混合样品 0.3 g,加 4 mL 甲醇溶解,超声 1 h 后 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清 3 mL,加等体积甲醇,涡旋,离心,取上清,过微孔滤膜至进样瓶中,待测。

尿液样品处理:取 3 只对照组大鼠的尿液各 100 μL ,混匀,取龙脷叶 75%乙醇提取物高剂量组中咳嗽次数较少的 3 只大鼠的尿液各 100 μL ,混匀,加 900 μL 甲醇,涡旋后静置 1 min,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$

离心 10 min, 取上清 600 μL , 氮气吹干后, 加乙腈 900 μL , 漩涡, 离心, 吸取上清液 100 μL , 过微孔滤膜, 得滤液, 待测。

2.6 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测方法

2.6.1 色谱及质谱条件 色谱条件: Hypersil Gold 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为乙腈, 洗脱程序为 0~20 min, 5%~95% B; 20~23 min, 95% B。体积流量为 0.4 mL $\cdot$ min⁻¹, 进样量为 3 μL , 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: 离子源为双喷雾 TurboV, 扫描方式为正、负离子, 扫描范围为 m/z 100~1 500, 正离子源电压为 5 500 V, 负离子源电压为-4 500 V, 离子源温度 600 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气压力为 379.21 kPa, 辅助气压力为 379.21 kPa, 气帘气压为 241.32 kPa, 母离子碰撞能量为-10 V, 去簇电压-80 V, 子离子碰撞能量为-35 V。

2.6.2 数据分析 首先采用 SCIEX OS 软件中 Analytics 对 UPLC-Q-TOF-MS/MS 采集的数据进行数据库匹配与数据筛选。数据库匹配的形式有: 根据文献检索, 找出龙俐叶目前已发现及被鉴定过的化合物, 将其化合物名称及分子式列成表格, 作为自建库数据, 将其导入 SCIEX OS 软件, 勾选相应数据进行匹配后, 进行相应条件限制筛选, 即得到所采集的数据与数据库匹配度较高的化合物的一系列信息。此外还可以通过 SCIEX OS 软件中

Explorer 进行相应化合物二级质谱图的提取。所得数据结合文献检索以及数据库比对以及对照品验证, 推测龙俐叶 75%乙醇提取物中化学成分的结构。对于化合物的同分异构体, 根据保留时间和二级质谱碎片差异并结合相关文献报道进行合理的判断和推测。

3 结果

3.1 龙俐叶醇提取物化学成分鉴定

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 按“2.7.1”项下色谱及质谱条件进行检测, 按“2.7.2”项下方法进行数据分析。在龙俐叶 75%乙醇提取物中共指认了 40 个化合物成分, 其中有机酸类 12 个、萜类 5 个、黄酮类 5 个、香豆素类 4 个、蒽醌类 2 个、酚类 2 个、木脂素类 2 个、甾醇类 1 个、糖苷类 1 个、柠檬苦素类 1 个、姜酚类 1 个、生物碱 1 个、其他类 3 个, 其中大多数为有机酸类化合物, 化合物 2 的裂解途径见图 1。龙俐叶 75%乙醇提取物正、负离子模式下总离子流图见图 2, 各成分具体信息见表 1。

3.2 龙俐叶 75%乙醇提取物止咳作用分析

给药第 7 天造模后, 与模型组相比, 枸橼酸喷托维林组与龙俐叶 75%乙醇提取物各给药组咳嗽次数均显著降低 ($P<0.05$), 潜伏期均延长, 龙俐叶 75%乙醇提取物中剂量组镇咳率最高。结果见表 2。

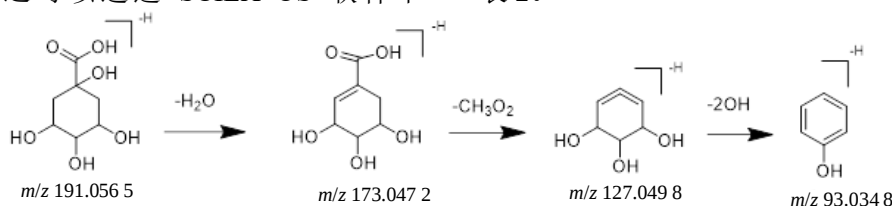


图 1 D-(-) 奎宁酸裂解途径

Fig. 1 D-(-) quinic acid cleavage pathway

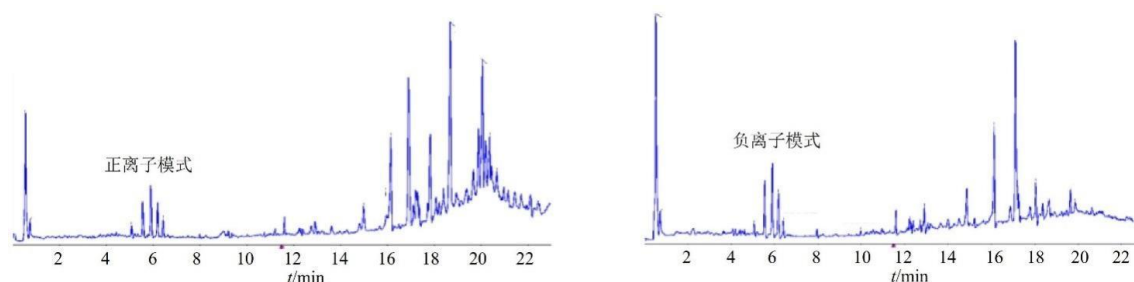


图 2 龙俐叶 75%乙醇提取物总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of 75 % ethanol extract of *S. spatulifolius* leaves

表 1 正、负离子模式下龙脑叶 75%乙醇提取物各成分二级质谱碎片信息

Table 1 MS/MS fragment information of each component of 75% ethanol extract of *S. spatulifolius* leaves under positive and negative modes

编号	tr/ min	分子式	化合物	实测值	误差/($\times 10^{-6}$)	模式	离子碎片	类型
1	0.54	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸	191.019 8	0.3	[M-H] ⁻	67.019 7、85.029 6、111.009 2、155.000 2	有机酸
2	0.63	C ₇ H ₁₂ O ₆	D-(-)奎宁酸	191.056 2	0.4	[M-H] ⁻	85.029 9、87.008 9、93.034 8、109.029 6、111.009 6、171.032 8、173.047 2	有机酸
3	2.81	C ₉ H ₆ O ₄	秦皮乙素	177.019 3	-0.1	[M-H] ⁻	105.044 5、133.037 9、149.024 5	香豆素类
4*	2.91	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸	179.035 0	0.3	[M-H] ⁻	89.039 6、107.050 7、117.033 8、135.045 1	有机酸
5	3.43	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	(-)-lyoniresinol	419.170 4	-1.8	[M-H] ⁻	359.112 1、373.185 5	木脂素
6	3.81	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	桑皮苷 A	567.169 2	-4.8	[M-H] ⁻	405.177 2	糖苷类
7*	4.40	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸	193.050 5	—	[M-H] ⁻	134.037 4、149.061 3、178.026 6	有机酸
	4.43			195.064 8	—	[M+H] ⁺	117.033 3、145.027 9、149.059 4、163.040 2、177.053 9	
8	4.45	C ₁₀ H ₈ O ₄	东莨菪内酯	193.049 6	0.1	[M+H] ⁺	133.104 4	香豆素类
9*	4.53	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山柰酚-3-O-β-D-龙胆二糖苷	193.049 6	—	[M-H] ⁻	285.040 7	黄酮类
	4.56			611.161 6	—	[M+H] ⁺	287.055 3	
10	4.71	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷	463.088 3	—	[M-H] ⁻	271.023 9、300.028 2、301.032 2	黄酮醇类
11	4.96	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	异落叶松脂素	359.149 6	-1.2	[M-H] ⁻	241.049 8、313.105 8、344.126 5	木脂素类
12	5.31	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素葡萄糖苷	431.098 3	-0.1	[M-H] ⁻	268.039 0、269.046 6	蒽醌类
13	6.71	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	咖啡酸乙酯	207.066 2	-0.3	[M-H] ⁻	135.045 1	酚类
14	6.95	C ₉ H ₆ O ₃	7-羟基香豆素	163.038 9	-0.3	[M+H] ⁺	77.038 8、91.055 1、135.044 0	香豆素类
15*	7.53	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄素	269.045 6	0.1	[M-H] ⁻	225.057 0	蒽醌类
16	7.53	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芹菜素	269.045 6	0.1	[M-H] ⁻	117.033 7、151.003 0、225.057 0	黄酮类
17*	7.66	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚	285.040 6	0.5	[M-H] ⁻	93.034 2、157.065 0、211.040 8	黄酮类
18	9.31	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	桉酮	233.117 3	0.5	[M+H] ⁺	77.038 5、91.053 8、105.068 9	柠檬苦素类
19	9.57	C ₁₀ H ₈ O ₃	7-甲氧基香豆素	177.054 5	-0.6	[M+H] ⁺	65.047 1、105.068 9、121.038 5、149.023 8	香豆素类
20	9.99	C ₉ H ₈ O ₃	对香豆酸	165.054 5	-0.5	[M+H] ⁺	91.053 9、147.046 0	有机酸
21	10.22	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 A	515.121 2	3.3	[M-H] ⁻	173.044 0	有机酸
22	10.83	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	椴树苷	593.130 2	0.2	[M-H] ⁻	121.029 8、165.055 7、209.046 0、225.055 9、313.072 8、357.062 6、417.098 3	黄酮苷类
23*	11.03	C ₉ H ₈ O ₂	肉桂酸	149.059 7	-0.1	[M+H] ⁺	51.022 3、77.038 2、93.033 0、103.054 6、133.014 3	有机酸
24*	11.03	C ₉ H ₁₀ O ₃	丹皮酚	167.070 0	-1.7	[M+H] ⁺	149.059 9	酚类
25	11.31	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	甘松新酮	251.164 2	0.1	[M+H] ⁺	91.055 1、105.068 7	倍半萜
26	12.80	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	10-姜酚	351.252 9	-0.4	[M+H] ⁺	165.127 7、261.223 8、289.216 9、333.241 2	姜酚类
27	13.23	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	亚麻酸	279.231 2	-2.2	[M+H] ⁺	95.085 9、109.101 0、121.028 1、149.023 4、261.220 0	脂肪酸
	16.14			277.232 9	-0.2	[M-H] ⁻	59.013 8、83.050 3、233.227 0、259.206 9	
28	15.69	C ₁₈ H ₃₀ O	金合欢基丙酮	263.237 0	0.3	[M+H] ⁺	67.054 6、81.068 4、91.055 0、95.085 8	萜类
29	16.16	C ₈ H ₈ O ₂	茴香醛	137.059 4	-2.1	[M+H] ⁺	65.036 0、77.038 2	其他类
30	16.24	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	十四酸	227.201 2	-1.9	[M-H] ⁻	209.191 2	脂肪酸
31	16.87	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	棕榈油酸	253.217 2	-0.2	[M-H] ⁻	71.012 5、235.205 5	脂肪酸
32	16.87	C ₁₆ H ₂₈ O	降龙涎香醚	237.221 3	-0.2	[M+H] ⁺	55.054 4、67.054 3、81.070 3、109.104 4、121.102 2、135.116 1、149.134 9	萜类
33	16.91	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	257.247 4	-0.6	[M+H] ⁺	57.069 9、67.054 2、71.085 7、81.070 4、131.110 8	脂肪酸
	18.07			255.232 9	-0.2	[M-H] ⁻	237.222 3	

表 1 (续)

编号	tr/min	分子式	化合物	实测值	误差/ ($\times 10^{-6}$)	模式	离子碎片	类型
34	16.92	C ₁₆ H ₃₀ O	麝香酮	239.236 7	-1.1	[M+H] ⁺	57.070 0、67.054 2、81.069 8、95.085 6、109.101 0、123.117 7	其他类
35	16.93	C ₁₈ H ₂₄ O	补骨脂酚	257.191 0	3.8	[M+H] ⁺	173.154 5、187.168 2、201.183 9	单萜类
36	16.97	C ₁₈ H ₃₅ NO	油酸酰胺	282.278 7	-1.4	[M+H] ⁺	83.085 5、97.101 0、111.080 5、135.116 9、149.132 4、177.163 8、191.179 3、226.215 5、247.241 6、265.252 5、282.278 2	生物碱
37	17.20	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸	279.232 9	-0.1	[M-H] ⁻	59.014 1、97.066 3、205.196 5、261.222 3	脂肪酸
38	19.65	C ₁₅ H ₂₂ O	α -香附酮	219.174 2	-0.5	[M+H] ⁺	77.039 6、105.053 7	其他类
39*	20.31	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾醇	413.378 1	0.8	[M+H] ⁺	159.117 2、199.150 7、255.211 9、395.368 5	甾醇类
40	20.68	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	山海棠素	313.180 0	0.5	[M+H] ⁺	133.063 9	二萜

*经对照品验证：阿魏酸、山柰酚-3-O- β -D-龙胆二糖苷、异槲皮苷经 IDA Explorer 提取所得。

*Verified by reference standards; Ferulic acid, kaempferol-3-O- β -D-gentiopicroside, and isoquercitrin were extracted using IDA Explorer.

表 2 给药第 7 天龙脰叶 75%乙醇提取物对咳嗽指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of 75% ethanolic extract of *S. spatulifolius* leaves on cough indices on 7th day of administration ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	潜伏期/s	咳嗽次数	镇咳率/%
模型	—	43.167 $\pm$ 11.822	42.00 $\pm$ 5.831	—
枸橼酸喷托维林	0.01	66.000 $\pm$ 15.086	15.33 $\pm$ 5.428*	62.75
龙脰叶 75%乙醇提取物	26.31	48.000 $\pm$ 21.735	18.33 $\pm$ 8.477*	54.85
	13.15	46.000 $\pm$ 21.578	15.17 $\pm$ 3.488*	62.60
	6.58	49.333 $\pm$ 23.407	18.67 $\pm$ 9.564*	54.65

与模型组比较：* $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs model group.

3.3 入血成分及代谢成分分析

运用“2.7”项下方法对龙脰叶 75%提取物入血成分及代谢成分进行分析。采用 SCIEX OS 软件对 UPLC-Q-TOF-MS/MS 采集的数据进行处理。原型成分的确认对比龙脰叶 75%醇提取物成分，其保留时

间、准分子离子峰与碎片离子峰和误差相符合的成分视为原型成分。

3.3.1 血清中入血成分分析 在血清样品中分析得到 19 个原型成分。正、负离子模式下，空白血清与含药血清的总离子流图见图 3，具体信息见表 3。

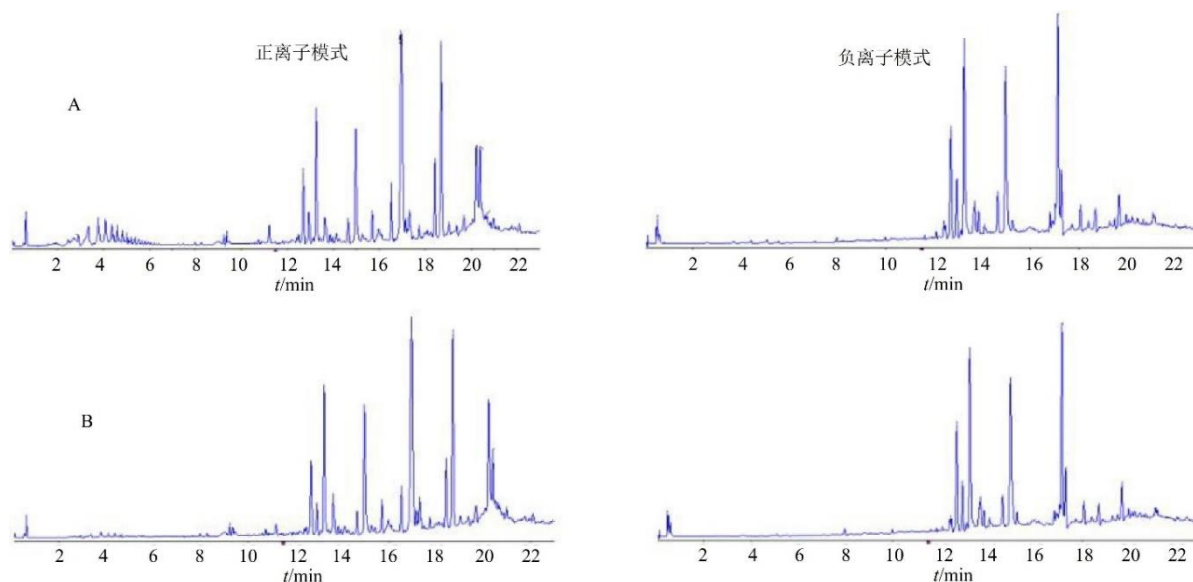


图 3 空白血清 (A)、含药血清 (B) 总离子流图

Fig. 3 Total ion flow diagram of blank serum sample (A) and drug-containing serum sample (B)

表 3 龙脷叶 75%乙醇提取物在咳嗽大鼠血清、粪便和尿液中原型成分的质谱信息

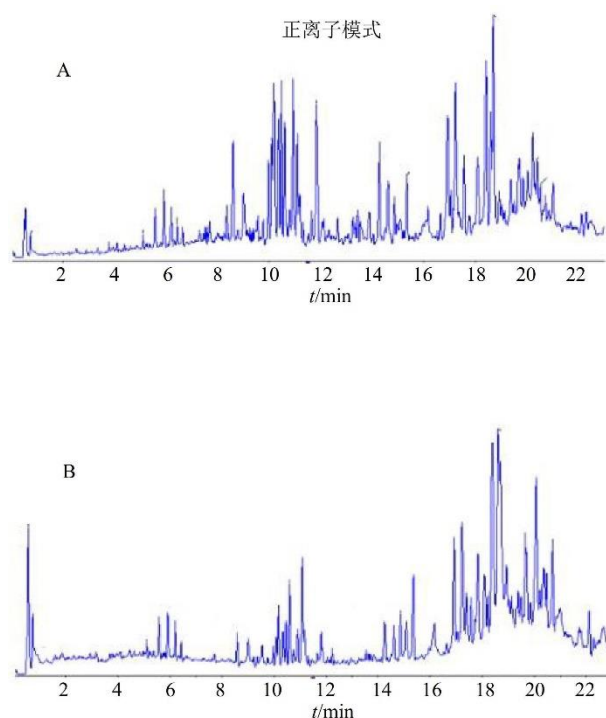
Table 3 Mass spectrometry details of prototype components in serum, feces and urine of 75% ethanol extract of *S. spatulifolius* leaves in cough rats

编号	t_R/min	模式	二级碎片	相对分子质量		分子式	鉴定成分	类别	来源
				实测值	理论值				
1	5.33	$[\text{M}-\text{H}]^-$	268.037 6	431.097 8	431.105 6	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	大黄素葡萄糖苷	蒽醌类	血清、尿液
2	6.94	$[\text{M}+\text{H}]^+$	77.038 2、91.053 7、 135.044 3	163.039 0	163.031 7	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	7-羟基香豆素	香豆素类	血清、粪便
3	7.54	$[\text{M}-\text{H}]^-$	225.058 9、181.064 1	269.045 2	269.052 8	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	大黄素	蒽醌类	血清、粪便、尿液
4	7.54	$[\text{M}-\text{H}]^-$	117.035 8、225.058 9	269.045 2	269.052 8	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	芹菜素	黄酮类	血清、粪便、尿液
5	9.32	$[\text{M}+\text{H}]^+$	105.070 0	233.117 5	233.109 9	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$	桉酮	柠檬苦素类	血清、尿液
6	9.57	$[\text{M}+\text{H}]^+$	149.023 8、121.041 6、 65.038 9	177.054 7	177.047 3	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$	7-甲氧基香豆素	香豆素类	血清、尿液
7	10.00	$[\text{M}+\text{H}]^+$	91.056 7	165.054 6	165.047 3	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	对香豆酸	有机酸类	血清、尿液
8	10.23	$[\text{M}-\text{H}]^-$	173.044 5	515.120 3	515.126 8	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	异绿原酸 A	有机酸类	血清
9	10.83	$[\text{M}-\text{H}]^-$	121.030 0、165.056 1、 209.045 6、225.055 8、 313.071 8、357.061 2、 417.097 3	593.128 9	593.137 3	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	椴树苷	黄酮类	血清、粪便、尿液
10	11.04	$[\text{M}+\text{H}]^+$	149.060 0	167.070 0	167.063 0	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	丹皮酚	酚类	血清、粪便、尿液
11	11.04	$[\text{M}+\text{H}]^+$	77.038 7、93.034 5、 103.052 6、133.009 4	149.059 7	149.052 4	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	肉桂酸	有机酸类	血清、尿液
12	12.80	$[\text{M}+\text{H}]^+$	333.240 5、289.216 6、 261.219 2、165.127 8	351.253 4	351.245 7	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$	10-姜酚	姜酚类	血清、粪便、尿液
13	13.20	$[\text{M}+\text{H}]^+$	95.003 9、121.028 9、 149.023 5	279.232 0	279.224 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	亚麻酸	有机酸类	血清、粪便、尿液
	16.15	$[\text{M}-\text{H}]^-$	233.156 9	277.216 9	277.224 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$			
14	15.68	$[\text{M}+\text{H}]^+$	133.101 1、95.085 8、 91.054 4、81.070 2、 67.054 5	263.236 7	263.229 7	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}$	金合欢基丙酮	萜类	血清、粪便、尿液
15	16.89	$[\text{M}-\text{H}]^-$	235.206 3	253.217 0	253.224 6	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	棕榈油酸	有机酸类	血清、粪便、尿液
16	16.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	81.070 0、71.085 4、 69.070 0、67.054 0、 57.070 1	257.247 6	257.240 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	棕榈酸	有机酸类	血清、粪便、尿液
	18.08	$[\text{M}-\text{H}]^-$	237.221 8	255.232 6	255.240 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$			
17	16.96	$[\text{M}+\text{H}]^+$	265.251 9、247.241 0、 226.217 1、191.179 6、 177.163 8、149.132 2、 135.116 5、97.064 5、 83.084 9	282.277 4	282.271 9	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}$	油酸酰胺	生物碱	血清、粪便、尿液
18	17.21	$[\text{M}-\text{H}]^-$	59.013 6、261.236 0	279.232 4	279.232 9	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	亚油酸	有机酸类	血清、粪便、尿液
19	19.65	$[\text{M}+\text{H}]^+$	77.037 8、105.069 5	219.174 5	219.167 1	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	α -香附酮	其他类	血清、尿液
20	2.94	$[\text{M}-\text{H}]^-$	89.040 3、107.050 6、 117.034 6、135.045 3	179.034 9	179.042 3	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	咖啡酸	有机酸	粪便、尿液
21	4.98	$[\text{M}-\text{H}]^-$	313.109 1、241.086 8	359.149 9	359.157 3	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$	异落叶松脂素	木脂素类	粪便
22	7.64	$[\text{M}-\text{H}]^-$	211.134 1、257.039 1	359.157 3	285.047 7	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	山柰酚	黄酮类	粪便
23	16.25	$[\text{M}-\text{H}]^-$	209.189 7	227.201 5	227.208 9	$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$	十四酸	有机酸	粪便

表 3 (续)

编号	t _R /min	模式	二级碎片	相对分子质量		分子式	鉴定成分	类别	来源
				实测值	理论值				
24	20.32	[M+H] ⁺	159.116 7、199.148 0、 255.212 1、395.367 1	413.378 3	413.370 5	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾醇	甾醇类	粪便
25	2.83	[M-H] ⁻	105.034 3、133.029 3、 149.024 7	177.019 0	177.026 6	C ₉ H ₆ O ₄	秦皮乙素	香豆素类	尿液
26	4.45	[M+H] ⁺	133.102 1	193.049 6	193.042 3	C ₁₀ H ₈ O ₄	东莨菪亭	香豆素类	尿液
27	6.73	[M-H] ⁻	135.045 6	207.066 3	207.073 6	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	咖啡酸乙酯	酚类	尿液
28	20.69	[M+H] ⁺	133.065 1	313.180 1	313.172 5	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	山海棠素	萜类	尿液

3.3.2 粪便中代谢成分分析 在粪便样品中共发现 17 个原型成分。正、负离子模式下，空白粪便与给药粪便的总离子流图见图 4，具体信息见表 3。



3.3.3 尿液中代谢成分分析 在尿液样本中共发现 22 个原型成分。正、负离子模式下，空白尿液与含药尿液的总离子流图见图 5，具体信息见表 3。

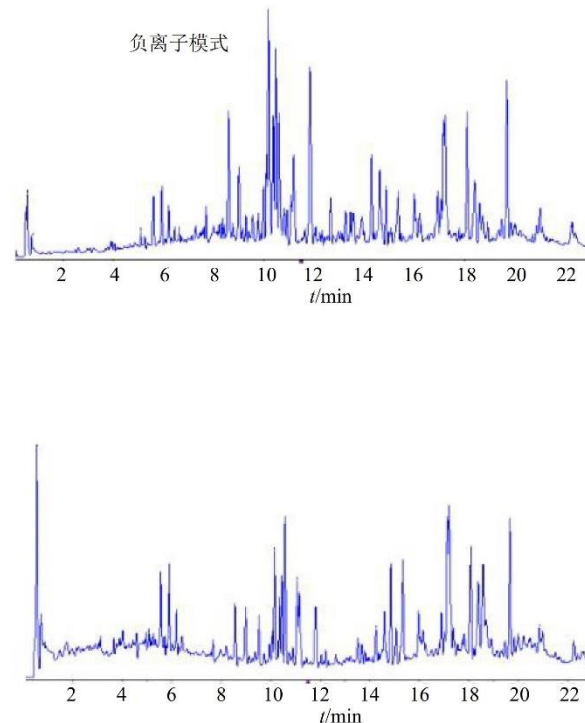


图 4 空白粪便 (A)、含药粪便 (B) 总离子流图

Fig. 4 Prime sub-flow diagram of blank fecal samples (A) and drug-containing fecal samples (B)

4 讨论

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术，对龙脷叶 75%乙醇提取物的化学成分进行初步研究，通过对照品对照，准分子离子峰、碎片离子峰信息及相关文献，初步推测出 40 个化学成分，包括柠檬酸、D-(-) 奎宁酸、秦皮乙素、咖啡酸、(-)-lyoniresinol、桑皮苷 A、阿魏酸、芹菜素、山柰酚、金合欢基丙酮等。

在给药大鼠血清中共鉴定出 19 个入血原型成

分，主要有以对香豆酸、异绿原酸 A、肉桂酸等为代表的有机酸类，以及以芹菜素、槲树苷为代表的黄酮类。在粪便样品中共发现 17 个代谢原型成分，主要包括有机酸类和黄酮类，如咖啡酸、亚麻酸、芹菜素和山柰酚等。在尿液样本中共发现 22 个代谢原型成分，主要包括有机酸类和香豆素类，如肉桂酸、咖啡酸、秦皮乙素、东莨菪亭等。有研究表明，入血成分的有机酸类具有良好的抗炎作用^[8]，黄酮类成分芹菜素能缓解慢性哮喘的气道炎症，其

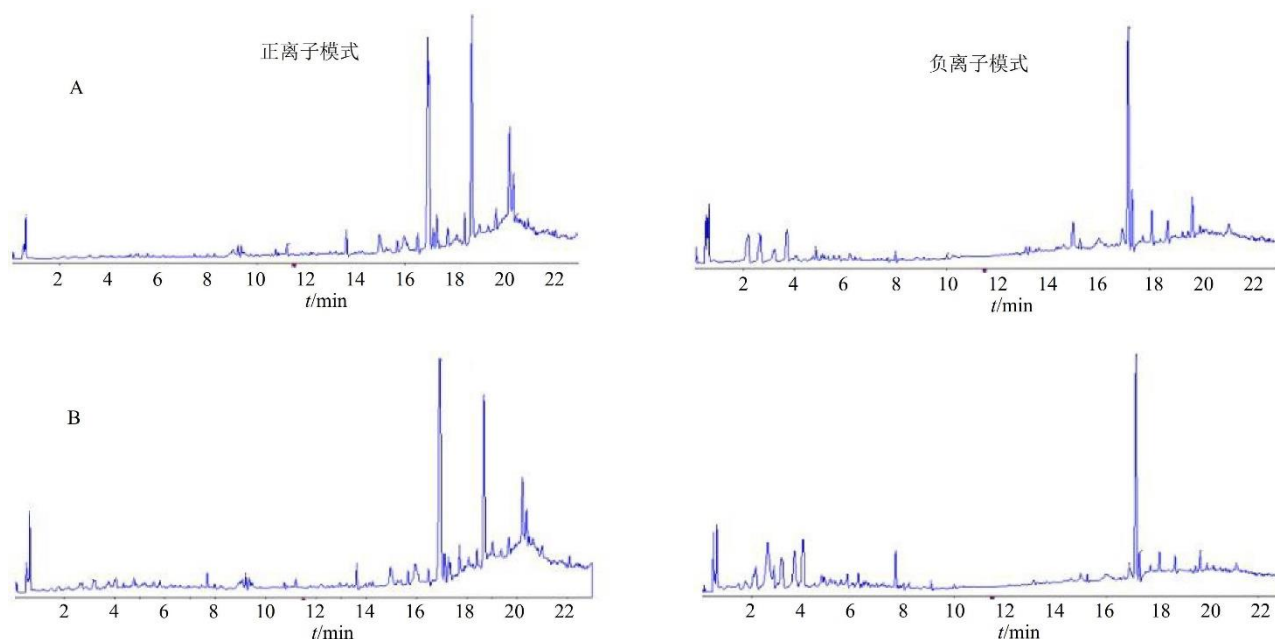


图 5 空白尿液 (A)、含药尿液 (B) 总离子流图

Fig. 5 Total ion flow diagram of blank urine samples (A) and drug-containing urine samples (B)

机制可能与 miR-503-5p/信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 通路发挥作用有关^[9], 山柰酚能抑制神经炎症, 其作用机制可能涉及抑制核因子- κ B (NF- κ B) 通路的激活^[10], 因此, 推测黄酮类成分和有机酸类成分可能是龙脷叶发挥止咳作用的药效物质。由于现有数据处理知识和软件的局限, 本研究只是系统地确定龙脷叶 75%乙醇提取物入血原型成分以及粪便、尿液代谢原型成分, 没有对血清、粪便和尿液再进行下一步代谢产物的分析。

通过对龙脷叶 75%乙醇提取物中化学成分的鉴定及对咳嗽大鼠血清、粪便、尿液入血成分和代谢成分的数据分析, 可为阐明龙脷叶止咳药效物质基础提供一定参考。

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]. 四部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.
- [2] 丘琴, 刘玉雯, 甄汉深, 等. 龙脷叶抗炎活性部位筛选及其作用机制的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 37-42.
Qiu Q, Liu Y W, Zhen H S, et al. Studies on anti-inflammatory effect and mechanism of different extraction parts from *Sauropus Rostratus* Miq. [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(4): 37-42.
- [3] 丘琴, 赵应学, 范秀春, 等. 龙脷叶止咳活性部位筛选及其作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1430-1434.
Qiu Q, Zhao Y x, Fan X c, et al. Antitussive effect and mechanism study of effective fractions from *Sauropus rostratus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(6): 1430-1434.
- [4] 关基敏. 壮药龙脷叶的研究进展 [J]. 中南农业科技, 2023(8): 235-238.
Guan J M. Research progress on the leaves of *Dioscorea nipponica* Thunb [J]. South Cent Agric Sci Technol, 2023(8): 235-238.
- [5] Singh N, Driessen A K, McGovern A E, et al. Peripheral and central mechanisms of cough hypersensitivity [J]. J Thorac Dis, 2020, 12(9): 5179-5193.
- [6] Song W J, Chang Y S, Faruqi S, et al. The global epidemiology of chronic cough in adults: A systematic review and meta-analysis [J]. Eur Respir J, 2015, 45(5): 1479-1481.
- [7] 刘智霖, 史利卿, 马建岭, 等. 基于“风邪伏肺”理论探讨慢性咳嗽脏腑相关病机 [J]. 现代中医临床, 2024, 31(2): 78-82.
Liu Z L, Shi L Q, Ma J L, et al. Exploring zangfu-related pathogenesis of chronic cough based on the theory of wind evils lurking in the lung [J]. Mod Chin Clin Med, 2024, 31(2): 78-82.
- [8] 汤喜兰, 刘建勋, 李磊. 中药有机酸类成分的药理作用

- 及在心血管疾病的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 243-246.
- Tang X L, Liu J X, Li L. Pharmacological effects of organic acids in Chinese herbs and its application in cardiovascular diseases [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2012, 18(5): 243-246.
- [9] 庞玲玲. 芹菜素上调 miR-503-5p 水平抑制慢性哮喘气道炎症反应的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- Pang L L. Mechanism of apigenin up-regulating miR-503-5p level to inhibit airway inflammation in chronic asthma [D]. Jinan: Shandong University, 2021.
- [10] 李伟瀚, 程笑, 杨滢霖, 等. 山柰酚通过抑制神经炎症及保护血脑屏障而改善大鼠脑缺血再灌注神经功能 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 673.
- Li W H, Cheng X, Yang Y L, et al. Shanna phenol improves neurological function in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neuroinflammation and protecting the blood-brain barrier [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(9): 673.

[责任编辑 兰新新]