

• Q-Marker 研究 •

基于谱效关联分析的吴茱萸抗炎活性的质量标志物研究

惠 慧¹, 陈祺松², 田 港¹, 单琪媛^{1*}, 秦路平^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 宁波市鄞州区第二医院, 浙江 宁波 315192

摘要: 目的 采用谱效关联分析方法探索吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 抗炎活性的质量标志物 (quality marker, Q-Marker), 为其抗炎活性的质量控制提供依据。方法 采用超高效液相色谱 (UPLC) 对 24 批吴茱萸药材进行指纹图谱分析; 以脂多糖诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎症细胞模型, 考察 24 批吴茱萸药材对细胞上清液中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 以及细胞内诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide-synthase, iNOS) 水平的影响; 采用 SPSS 软件关联指纹图谱色谱峰面积与抗炎活性的关系, 并采用 UPLC-四级杆飞行时间质谱 (QTOF-MS) 对吴茱萸的抗炎活性成分进行指认。结果 24 批吴茱萸药材对 RAW264.7 细胞上清液 NO 抑制率为 12%~82%, 谱效关联分析共筛选出 14 个吴茱萸潜在抗炎成分, 分别为吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱等吲哚喹啉类生物碱以及奎宁酸类成分、绿原酸类成分、喹诺酮类生物碱等。与模型组比较, 柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸、隐绿原酸可显著抑制 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平及细胞内 iNOS 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸和隐绿原酸为吴茱萸抗炎活性的 Q-Marker。

关键词: 质量标志物; 吴茱萸; 超高效液相色谱; 抗炎; 谱效关联分析; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 奎宁酸; 去氢吴茱萸碱; 二氢吴茱萸卡品碱; 绿原酸; 隐绿原酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)09-2589-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.010

Study on anti-inflammatory quality markers of *Euodia rutaecarpa* based on spectrum-efficacy correlation analysisHUI Hui¹, CHEN Qi-song², TIAN Gang¹, SHAN Qi-yuan¹, QIN Lu-ping¹

1. School of Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311402, China

2. Ningbo Yinzhou No.2 Hospital, Ningbo 315192, China

Abstract: Objective To explore quality markers (Q-Marker) of anti-inflammatory activity of Wuzhuyu (*Euodia rutaecarpa*) by spectrum efficacy correlation analysis and provide basis for the quality control of anti-inflammatory effect of *E. rutaecarpa*. **Methods** Fingerprints of 24 batches of *E. rutaecarpa* were analyzed by ultra performance liquid chromatography (UPLC). LPS was used to induce RAW264.7 cells to establish an *in vitro* inflammatory cell model, the effect of 24 batches of *E. rutaecarpa* on nitric oxide (NO) levels in supernatant and intracellular inducible nitric oxide-synthase (iNOS) level were detected; SPSS software was used to correlate the relationship between fingerprint chromatographic peak area and anti-inflammatory drug efficacy. UPLC-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QTOF-MS) was used to identify anti-inflammatory active ingredients of *E. rutaecarpa*. **Results** NO inhibition rate of 24 batches of *E. rutaecarpa* extracts was 12% — 82%. A total of 14 potential anti-inflammatory components of *E. rutaecarpa* were screened out by spectrum-efficacy correlation, including indolequinazoline alkaloids such as evodiamine, rutaecarpine, dehydroevodiamine, quinic acid, chlorogenic acid, and quinolone alkaloids. Compared with model group, limonin, evodiamine, rutaecarpine, quinic acid,

收稿日期: 2021-03-05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81703707); 浙江省中医药科技计划项目 (2019ZA038); 宁波市鄞州区农业与社会发展科技项目 (20191YZQ010017)

作者简介: 惠 慧 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与品质评价。E-mail: hhui@zcmu.edu.cn

*通信作者: 单琪媛, 女, 实验师。E-mail: shanqiyan@zcmu.edu.cn

秦路平, 男, 博士生导师, 教授。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

dehydroaevodiamine, dihydroevodiocarpine, chlorogenic acid, and neochlorogenic acid significantly inhibited NO level in supernatant and iNOS level of RAW264.7 cells ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Limonin, evodiamine, rutaecarpine, quinic acid, dehydroaevodiamine, dihydroevodiocarpine, chlorogenic acid, and neochlorogenic acid may be anti-inflammatory Q-Marker of *E. rutaecarpa*.

Key words: quality marker; *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; ultra performance liquid chromatography; anti-inflammatory; spectrum-efficacy correlation analysis; limonin; evodiamine; rutaecarpine; quinic acid; dehydroaevodiamine; dihydroevodiocarpine; chlorogenic acid; neochlorogenic acid

吴茱萸作为一种传统中药,最早收录于《神农本草经》,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻等功效,广泛应用于临床^[1]。吴茱萸在我国分布较为广泛^[2],然而由于其生长环境、采收时期、种植管理等因素差异,不同地区、批次药材的化学成分和生物学特性也存在差异^[3]。《中国药典》2020年版仅规定了吴茱萸中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量标准,对其药效的质量评价参考较为局限。在中药材来源、产地、种植条件多样的特点下,如何科学、合理地评价中药质量成为目前亟待解决的问题。基于现有质量评价与控制方法存在的问题,刘昌孝院士^[4]提出中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 的新概念。Q-Marker 策略目前已广泛应用于中药材的质量评价中^[5-13]。陈洋等^[14]运用 Q-Marker 方法发现吴茱萸止呕效果与芦丁、柠檬苦素、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、柯伊利素-7-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-β-D-半乳糖苷、1-甲基-2-正十一烷基-4-(1H)-喹诺酮、1-甲基-2-[(Z)-4-壬烯基]-4-(1H)-喹诺酮有关;潘学强等^[15]通过谱效相关分析发现吴茱萸汤偏头痛疗效与人参皂苷 Rg₁、吴茱萸苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱相关。Q-Marker 为明确吴茱萸药材及其复方药效与成分间的内在关系以及制定科学的质量标准提供基础。中药具有多成分、多靶点的特点,其药效往往是多种成分共同作用的结果,目前大多数中药的药效及毒性物质基础尚不明确。中药指纹图谱能全面表征中药的化学特征^[16-18],从整体上反馈药材的质量。以中药指纹图谱为成分表征,结合细胞活性筛选,建立成分与药效间的关联,可以客观、合理地反映药材内在质量。

在机体的炎症过程中,巨噬细胞被激活,产生炎症反应,免疫细胞可释放炎症介质和促炎细胞因子,炎症介质的过度表达可进一步加重炎症反应,诱发关节炎、痴呆、心血管疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病、癌症等多种慢性疾病^[19]。现代药理学研究表明,吴茱萸乙醇提取物能够预防脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的内毒素血症大鼠

的循环衰竭、血管对苯肾上腺素的低反应性、肝功能障碍等症状,并抑制血清中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的过量产生,且呈剂量相关性^[20]。Woo 等^[21]发现吴茱萸中的主要活性成分吴茱萸次碱能够抑制小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 中前列腺素的生成。课题组前期研究发现,吴茱萸醇提物对角叉菜胶致足肿胀、二甲苯致耳肿胀小鼠模型均有显著的抗炎作用^[22]。因此,本研究采用指纹图谱结合细胞炎症模型,筛选吴茱萸潜在的抗炎活性成分为 Q-Marker,为药效导向的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 药材

分别于 2017 年、2018 年、2019 年从湖南、浙江、江西、贵州、广西等地采集 24 批吴茱萸药材 (表 1),经浙江中医药大学药学院陈孔荣教授鉴定均为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。

1.3 药品与试剂

柠檬苦素对照品 (批号 H23J9K65962, 质量分数 ≥ 98%)、LPS 购自上海源叶生物科技有限公司;对照品去氢吴茱萸碱 (批号 DSTDQ013601, 质量分数 ≥ 98%)、吴茱萸碱 (批号 MUST-18031410, 质量分数 ≥ 99.87%)、吴茱萸次碱 (批号 MUST-18031411, 质量分数 ≥ 99.18%) 购自成都曼斯特生物科技有限公司;色谱级甲醇、乙腈购自美国 Tedia 公司;分析级无水乙醇购自广东光华科技股份有限公司;二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司;细胞裂解液 (批号 031020200604)、蛋白酶抑制剂 (批号 101620201209)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 082820201207)、NO 测定试剂盒 (批号 090420201111) 购自上海碧云天生物科技有限公司;小鼠诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide-synthase, iNOS) ELISA 试剂盒 (批号 202103) 购自江苏酶免实业有限公司。

表 1 24 批吴茱萸药材中主要成分的质量分数

Table 1 Contents of principal components in 24 batches of *E. rutaecarpa*

| 批次 | 批号 | 产地 | 质量分数/(mg·g ⁻¹) | | | |
|-----|----------|--------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 去氢吴茱萸碱 | 柠檬苦素 | 吴茱萸碱 | 吴茱萸次碱 |
| S1 | 20190810 | 湖南省岳阳市 | 2.90±0.05 | 1.21±0.01 | 0.69±0.03 | 0.51±0.01 |
| S2 | 20170826 | 湖南省岳阳市 | 2.13±0.01 | 0.70±0.02 | 0.68±0.01 | 0.36±0.01 |
| S3 | 20180812 | 湖南省岳阳市 | 3.32±0.07 | 0.66±0.01 | 1.55±0.01 | 1.08±0.01 |
| S4 | 20170902 | 湖南省益阳市 | 2.70±0.02 | 3.92±0.03 | 0.15±0 | 0.59±0 |
| S5 | 20170826 | 湖南省邵阳市 | 0.50±0.01 | 0.97±0.01 | 0.17±0 | 0.12±0 |
| S6 | 20190907 | 湖南省邵阳市 | 3.10±0.02 | 0.50±0 | 1.55±0.01 | 0.91±0.01 |
| S7 | 20170929 | 湖南省花垣县 | 1.80±0.02 | 0.18±0 | 0.25±0.01 | 0.18±0 |
| S8 | 20170908 | 湖南省怀化市 | 2.63±0.01 | 0.55±0.01 | 0.73±0 | 0.72±0.01 |
| S9 | 20170817 | 浙江省磐安县 | 7.00±0 | 5.70±0.01 | 0.68±0 | 0.69±0 |
| S10 | 20160916 | 浙江省临安区 | 5.22±0.03 | 1.60±0.01 | 0.27±0 | 0.20±0 |
| S11 | 20170816 | 浙江省缙云县 | 8.46±0.03 | 6.67±0.04 | 0.79±0 | 0.69±0.01 |
| S12 | 20190923 | 浙江省兰溪市 | 4.07±0.12 | 5.03±0.01 | 0.77±0 | 0.52±0 |
| S13 | 20180725 | 浙江省建德市 | 6.31±0.07 | 3.49±0.01 | 0.53±0 | 0.40±0.01 |
| S14 | 20190912 | 浙江省建德市 | 4.98±0.04 | 2.49±0.02 | 0.34±0 | 0.20±0 |
| S15 | 20190926 | 浙江省建德市 | 3.76±0.05 | 5.27±0.02 | 0.63±0 | 0.49±0.01 |
| S16 | 20160925 | 贵州省都匀市 | 0.81±0.02 | 0.76±0.07 | 0.04±0 | 0.17±0.01 |
| S17 | 20160928 | 贵州省铜仁市 | 2.36±0.01 | 3.01±0.02 | 0.15±0 | 0.52±0.01 |
| S18 | 20170917 | 江西省樟树市 | 2.65±0.04 | 2.64±0.03 | 0.47±0 | 0.39±0 |
| S19 | 20190831 | 江西省樟树市 | 3.72±0.04 | 4.62±0.07 | 1.16±0.01 | 0.73±0 |
| S20 | 20171008 | 江西省临江市 | 2.02±0.02 | 3.03±0.01 | 0.08±0 | 0.13±0 |
| S21 | 20170804 | 江西省靖安县 | 4.13±0.07 | 0.95±0.02 | 1.32±0.01 | 1.09±0.01 |
| S22 | 20171011 | 江西省九江市 | 0.84±0.02 | 1.44±0.01 | 0.38±0 | 0.21±0 |
| S23 | 20190716 | 广西省河池市 | 4.23±0.01 | 0.70±0 | 1.08±0.01 | 0.95±0.02 |
| S24 | 20190723 | 广西省河池市 | 2.63±0.08 | 0.45±0 | 6.71±0.05 | 4.42±0.07 |

1.4 仪器

Acquity 超高效液相色谱 (UPLC) H-Class 超高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水处理系统 (德国 Merck 公司); KQ300DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 1510 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 半微量天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~0.3 min, 6.0% A; 0.3~5.0 min, 6.0%~8.0% A; 5.0~8.0 min, 8.0%~14.5% A; 8.0~15.5 min, 14.5%~22.0% A; 15.5~18.5 min, 22.0%~48.0% A; 18.5~20.5 min, 48.0% A; 20.5~23.5 min, 48.0%~70.0% A; 23.5~25.5 min, 70.0% A; 25.5~27.5 min, 70.0%~95.0% A; 27.5~29.0 min, 95.0% A; 29.0~29.2 min, 95.0%~6.0% A; 29.2~31.0 min, 6.0% A; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 0.5 μL; 自动进样器温度为 20 °C; 柱温为 (30±5) °C; 检测波长为 254 nm; 检测器为光电二极管阵列。

2.2 样品溶液和对照品溶液的制备

2.2.1 样品溶液的制备 将吴茱萸药材打粉, 精密

称定 5.00 g 吴茱萸粉末置 100 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 70%乙醇, 混匀静置 1 h, 超声提取 40 min, 滤过, 采用旋转蒸发器浓缩, 于 5 mL 量瓶定容。取 0.075 mL 溶液, 以 70%乙腈稀释至 1.5 mL, 经 0.22 μm 滤膜滤过后进样, 用于 UPLC 分析; 取 2.5 mL 溶液采用旋转蒸发器蒸干, 用 2.5 mL 50% DMSO 溶解, 于 -20 °C 保存, 用于细胞实验。

2.2.2 对照品溶液的制备 去氢吴茱萸碱为吴茱萸中主要活性成分吴茱萸碱和吴茱萸次碱的结构类似物, 具有良好的抗炎活性^[23], 且在吴茱萸中质量分数较高, 因此本研究增加去氢吴茱萸碱为待考察定量成分。分别称取柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱对照品 4.16、3.86、4.54、8.10 mg 置 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容, 得到对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的制备 去氢吴茱萸碱、柠檬苦素和吴茱萸次碱的最大吸收波长为 216 nm, 吴茱萸次碱的最大吸收波长为 225 nm。将对照品溶液梯度稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 各成分色谱峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到标准曲线方程。去氢吴茱萸碱回归方程为 $Y=5\ 195.50 X-10\ 414.00$, 线

性范围为 810.00~1.58 μg/mL; 柠檬苦素回归方程为 $Y=587.23 X-312.16$, 线性范围为 416.00~3.25 μg/mL; 吴茱萸碱回归方程为 $Y=9\ 711.50 X+2\ 003.30$, 线性范围为 386.00~0.37 μg/mL; 吴茱萸次碱回归方程为 $Y=7\ 179.80 X+6\ 056.30$, 线性范围为 454.00~3.55 μg/mL; 所有回归方程 r 均 $\geq 0.999\ 0$ 。

2.3.2 精密度试验 取吴茱萸样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.98%、1.63%、0.49%、0.68%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按“2.2.1”项下方法制备 6 份同一批次吴茱萸样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。各成分色谱峰峰面积的 RSD 均小于 2.66%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取吴茱萸样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 于 0、1、2、4、6、8、10、12、16、18、24 h 进样分析。各成分色谱峰峰面积的 RSD 均小于 1.43%, 表明样品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密称定 2.50 g 吴茱萸粉末 6 份, 分别加入去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品, 按“2.2.1”项下方法制备吴茱萸样品溶液, 进样测定, 记录色谱图。各成分加样回收率为 95.97%~104.65%, 去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰峰面积的 RSD 分别为 0.99%、3.33%、0.80%、1.72%。

2.3.6 样品中各成分的含量测定 取 24 批吴茱萸药材, 按“2.2.1”项下方法平行制备 3 份样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 计算吴茱萸中去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的质量分数, 见表 1。

2.4 24 批吴茱萸药材指纹图谱的建立与分析

将 24 批吴茱萸的色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版), 以 S13 批次的吴茱萸药材指纹图谱为参照, 采用中值法生成对照指纹图谱, 经多点校正和自动匹配后生成吴茱萸指纹图谱见图 1。 t_R 相近、峰形相同的色谱峰被认为是具有指纹图谱意义的共有峰, 从图 1 可以看出, 有 28 个共有峰, 占总峰面积的 90% 以上, 不同批次的吴茱萸药材中成分不同, 各成分的质量分数也不同, 可以用于谱效相关分析。其相似度分析结果见表 2, 各批次吴茱萸与对照指纹图谱相似度为 0.658~0.959, 表明 24 批吴茱萸药材存在一定差异。

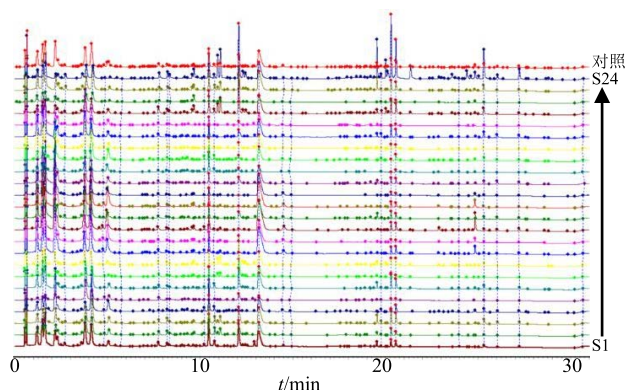


图 1 24 批吴茱萸药材的 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of 24 batches of *E. rutaecarpa*

表 2 24 批吴茱萸药材指纹图谱相似度分析

Table 2 Fingerprint similarity analysis of 24 batches of *E. rutaecarpa*

| 批次 | 相似度 | 批次 | 相似度 |
|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.948 | S13 | 0.950 |
| S2 | 0.900 | S14 | 0.910 |
| S3 | 0.959 | S15 | 0.944 |
| S4 | 0.893 | S16 | 0.867 |
| S5 | 0.760 | S17 | 0.867 |
| S6 | 0.976 | S18 | 0.945 |
| S7 | 0.909 | S19 | 0.939 |
| S8 | 0.932 | S20 | 0.917 |
| S9 | 0.940 | S21 | 0.849 |
| S10 | 0.954 | S22 | 0.903 |
| S11 | 0.942 | S23 | 0.943 |
| S12 | 0.931 | S24 | 0.658 |

2.5 24 批吴茱萸药材体外抗炎活性的测定

2.5.1 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 1% 双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 融合度达到 70%~80% 进行传代。

2.5.2 细胞活力的测定 RAW264.7 细胞以 4×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 100 μL/孔, 培养 6 h。设置对照组、模型组、地塞米松 (5 μmol/L) 组和吴茱萸 (0.4 mg/mL) 组, 各给药组加入相应药物预处理 2 h 后, 模型组及各给药组再加入 LPS (1 μg/mL), 对照组加入不含药物的培养基, 培养 40 h。弃去上清液, 加入含 10% CCK8 的无血清 DMEM 培养基, 于 37 °C 孵育, 采用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。结果如图 2 所示, 42 h 内 85% 以上批次吴茱萸药材对 RAW264.7 细胞活力无明显影响。

2.5.3 细胞上清液中 NO 水平的测定 按“2.5.2”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书测定细胞上清液中 NO 水平。结果如表 3 所示, 不同批次的吴茱萸药材的抗炎作用有较大差异, 浙江、广西产地的吴茱萸 (S9~S15、S23、S24 批次) 抗炎作用较

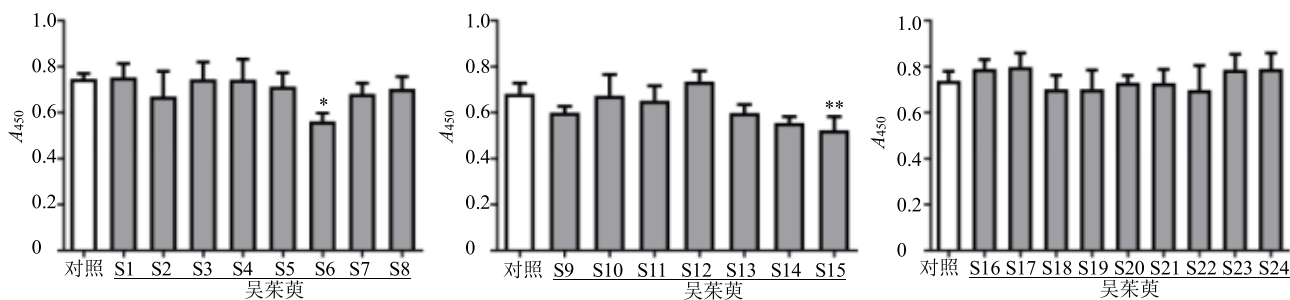


图2 24批吴茱萸药材对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of 24 batches of *E. rutaecarpa* on viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表3 24批吴茱萸药材对 RAW264.7 细胞的 NO 抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibition rate of NO of 24 batches of *E. rutaecarpa* on RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 批次 | 抑制率/% | 批次 | 抑制率/% |
|-----|--------------|-----|--------------|
| S1 | 63.09 ± 0.92 | S13 | 82.15 ± 1.15 |
| S2 | 36.25 ± 3.15 | S14 | 74.04 ± 2.57 |
| S3 | 34.36 ± 2.42 | S15 | 66.62 ± 2.14 |
| S4 | 36.40 ± 4.51 | S16 | 49.08 ± 2.29 |
| S5 | 12.26 ± 2.23 | S17 | 45.82 ± 3.51 |
| S6 | 58.36 ± 1.49 | S18 | 25.33 ± 4.05 |
| S7 | 41.10 ± 1.40 | S19 | 39.07 ± 1.67 |
| S8 | 29.56 ± 2.55 | S20 | 42.64 ± 4.37 |
| S9 | 67.88 ± 1.62 | S21 | 31.17 ± 1.55 |
| S10 | 70.80 ± 2.33 | S22 | 31.76 ± 3.34 |
| S11 | 59.76 ± 1.05 | S23 | 67.20 ± 2.86 |
| S12 | 65.58 ± 1.48 | S24 | 65.63 ± 1.56 |

强, NO 抑制率达 60%以上, 湖南邵阳产地的吴茱萸 (S5 批次) 抗炎作用较弱, NO 抑制率为 12%, 可能由于吴茱萸的采摘及储存时间、果实成熟度和生长环境的不同, 导致不同批次、地区的吴茱萸中化学成分发生变化, 进而造成了各批次吴茱萸药材抗炎活性的差异。因此, 关于 24 批吴茱萸药材的信息可以进行后续谱效相关性分析。

2.6 谱效相关分析

Pearson 相关系数是一种统计方法, 可以定量地度量变量之间的相关性, 广泛应用于谱毒或谱效的相关分析。在谱效相关分析中, 半数以上的指纹图谱共有峰峰面积为自变量, NO 抑制率为因变量, 共筛选出 20 个 Pearson 相关系数大于 0.40 的色谱峰。采用 UPLC-QTOF-MS 技术对 S3 批次吴茱萸药材提取液进行分析与成分指认, 总离子流色谱图见图 3, 共鉴定并筛选出 14 个化学成分为潜在抗炎标志物见表 4, 进一步选择能获得对照品的化学成分 (柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、绿原酸、隐绿原酸、喹诺酮类生物碱等) 进行体外抗炎活性验证, 因谱效相关分析筛选出的

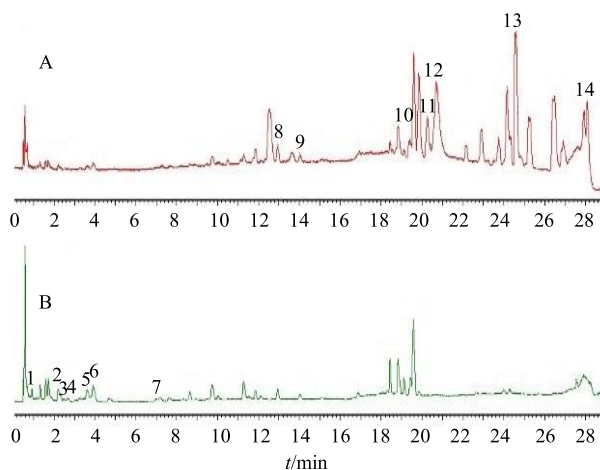


图3 正离子 (A) 与负离子 (B) 模式下的 UPLC-QTOF-MS 总离子流色谱图

Fig. 3 UPLC-QTOF-MS total ion chromatography in positive ion (A) and negative ion (B) mode

表4 吴茱萸中的主要抗炎成分

Table 4 Main anti-inflammatory components in *E. rutaecarpa*

| 编号 | t_r /min | Pearson 相关系数 | P 值 | 化学成分 |
|----|------------|--------------|-------|------------------------|
| 1 | 0.664 | 0.529 | 0.008 | 奎宁酸* |
| 2 | 2.191 | 0.511 | 0.011 | 新绿原酸 |
| 3 | 2.531 | 0.581 | 0.003 | 咖啡酸-4-葡萄糖苷 |
| 4 | 2.707 | 0.575 | 0.003 | 原花青素 B1 |
| 5 | 4.140 | 0.504 | 0.012 | 绿原酸* |
| 6 | 4.575 | 0.495 | 0.014 | 隐绿原酸* |
| 7 | 6.999 | 0.438 | 0.032 | 4-对香豆酰奎宁酸 |
| 8 | 13.167 | 0.621 | 0.001 | 去氢吴茱萸碱* |
| 9 | 14.472 | 0.620 | 0.001 | 吴茱萸宁碱 |
| 10 | 19.481 | 0.697 | 0.037 | 柠檬苦素* |
| 11 | 20.303 | 0.887 | 0.018 | 吴茱萸碱* |
| 12 | 20.564 | 0.839 | 0.037 | 吴茱萸次碱* |
| 13 | 24.843 | 0.434 | 0.034 | 2-十三烷基-4-(1H)-喹诺酮 |
| 14 | 28.604 | 0.463 | 0.023 | 1-甲基-2-十五烷基-4-(1H)-喹诺酮 |

*表示该化学成分有对照品

** means compound has a reference substance

喹诺酮类生物碱大部分无法获得，以同类型喹诺酮类生物碱二氢吴茱萸卡品碱为代表。

2.7 吴茱萸潜在抗炎标志物的验证

2.7.1 细胞上清液中 NO 水平的测定 根据预实验，设置对照组、模型组、地塞米松（5 μmol/L）组、柠檬苦素（10、20、40 μmol/L）组、吴茱萸碱（1.25、2.50、5.00 μmol/L）组、吴茱萸次碱（20、40、80 μmol/L）组、奎宁酸（20、40、80 μmol/L）组、去氢吴茱萸碱（5、10、20 μmol/L）组、二氢吴茱萸卡品碱（5、10、20 μmol/L）组、绿原酸（0.25、0.50、1.00 mmol/L）组和隐绿原酸（0.25、0.50、1.00 mmol/L）组，按“2.5.2”项下方法处理细胞，按照试剂盒说明书测定细胞上清液中 NO 水平。结果如图 4 所示，与模型组比较，柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸、隐绿原酸均可显著抑制细胞上清液中 NO 水平（ $P < 0.05$ 、 0.01 ），呈剂量相关性。

2.7.2 细胞内 iNOS 水平的测定 RAW264.7 细胞以 8×10^5 /mL 接种于 6 孔板中，2 mL/孔，培养 6 h。按“2.7.1”项下方法处理细胞，提取细胞总蛋白，

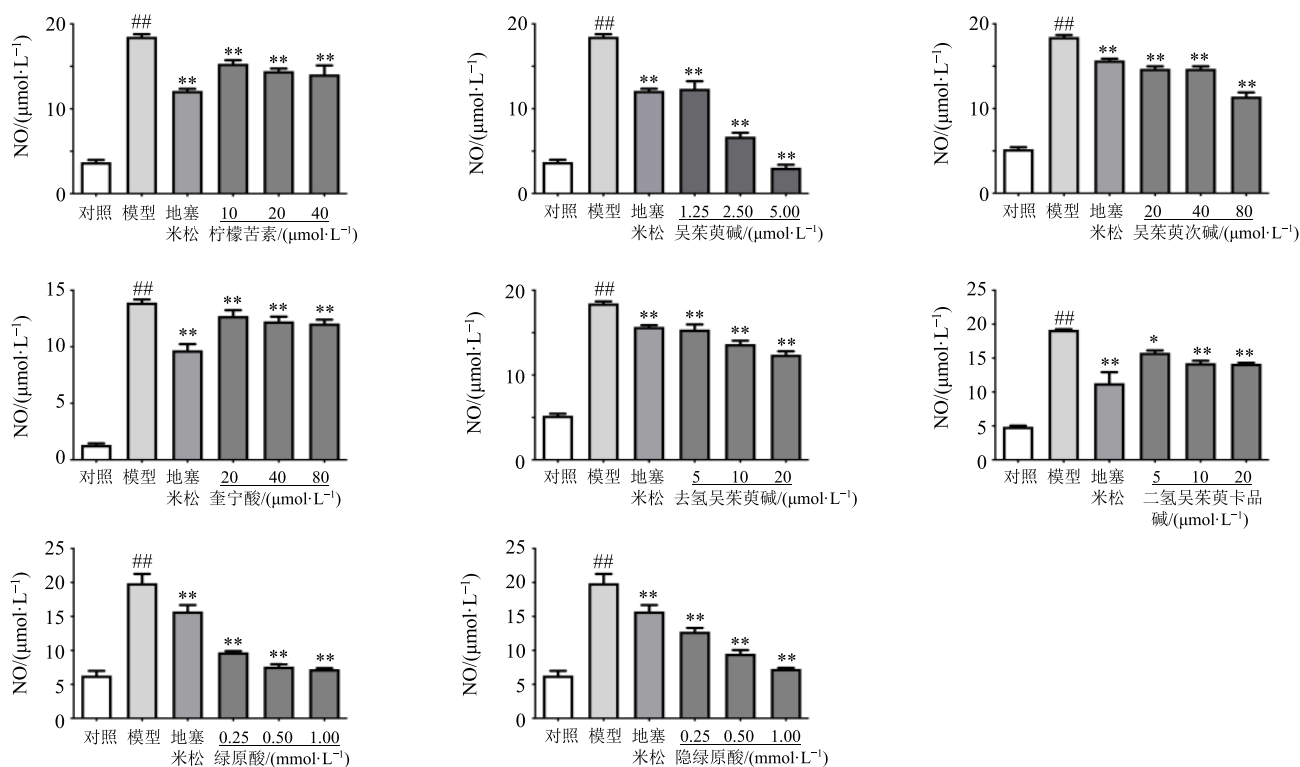
采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度，按照试剂盒说明书测定细胞内 iNOS 水平。结果如图 5 所示，与模型组比较，柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸、隐绿原酸均可显著抑制细胞内 iNOS 水平（ $P < 0.01$ ），呈剂量相关性。

2.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 21.0 软件的单因素方差分析（One-way ANOVA）进行比较，使用 Graphpad Prism 5.0 软件绘图。

3 讨论

本研究通过对吴茱萸药材指纹图谱和 NO 抑制率的谱效相关分析，确定 24 批吴茱萸药材指纹图谱中半数以上批次的共有峰与吴茱萸的抗炎活性有关，共挖掘出 20 个 Pearson 相关系数大于 0.40 的色谱峰；通过 UPLC-QTOF-MS 定性分析，共鉴定出 14 个化学成分，主要为柠檬苦素、奎宁酸类成分、绿原酸类成分、喹诺酮类生物碱等。NO 由 iNOS 诱导催化产生，NO 的累积会进一步加重炎症反应的发生。通过对柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、



与对照组比较：## $P < 0.01$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 4 吴茱萸中不同成分对 RAW264.7 细胞上清液中 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of different components in *E. rutaecarpa* on NO level in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

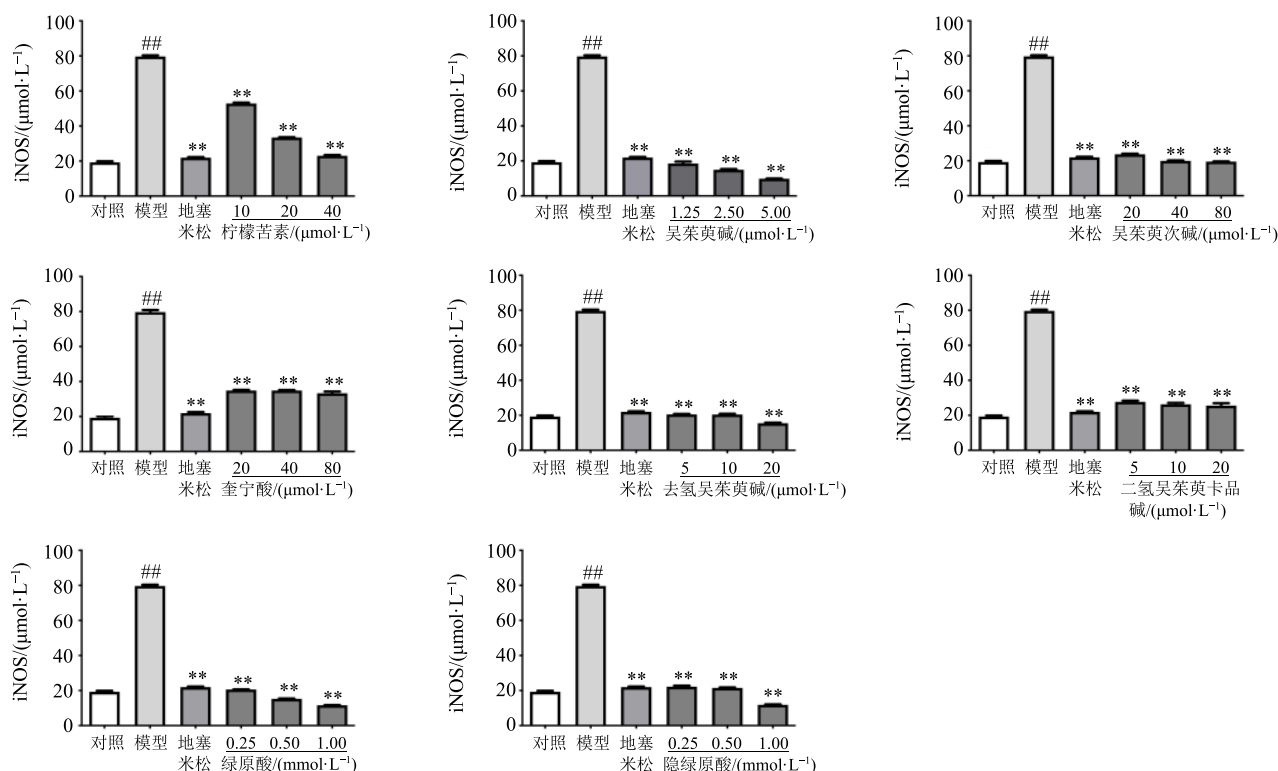


图5 吴茱萸中不同成分对 RAW264.7 细胞内 iNOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of different components in *E. rutaecarpa* on iNOS level in intracellular of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸、隐绿原酸的抗炎活性验证,发现以上8种化学成分均可显著抑制细胞上清液中 NO 和细胞内 iNOS 水平,与文献报道相符^[13,23-26]。本研究基于谱效相关分析方法挖掘吴茱萸抗炎 Q-Marker,发现除《中国药典》2020年版规定的柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱外,去氢吴茱萸碱和二氢吴茱萸卡品碱也具有较好的体外抗炎作用。课题组前期在吴茱萸体内抗炎研究中发现吡啶类生物碱、喹诺酮类生物碱和柠檬苦素具有良好抗炎作用^[22],与文献报道一致^[27-28]。但本研究中抗炎指标较少,无法全面评价吴茱萸的抗炎作用,且对于含量差异小的成分不能通过谱效相关分析方法进行指认,因此,更多药效方面的吴茱萸 Q-Marker 的确认仍需要更深入的研究。

综上所述,本研究发现吴茱萸的抗炎作用来源于多种成分,并指出柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、奎宁酸、去氢吴茱萸碱、二氢吴茱萸卡品碱、绿原酸、隐绿原酸为吴茱萸的抗炎 Q-Marker,为中药药效结合成分的 Q-Marker 研究策略提供科学依据。

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]. 一部. 2020: 178.
- [2] Shan Q Y, Sang X N, Hui H, *et al.* Processing and polyherbal formulation of *Tetradium ruticarpum* (A. juss.) hartley: Phytochemistry, pharmacokinetics, and toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 133.
- [3] Zhao Y, Li Z W, Zhou X, *et al.* Quality evaluation of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(4): 1230-1236.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [5] 杨宁娟, 刘妍如, 唐志书, 等. 基于“质量标志物-生物活性”关联分析评价丹参的等级 [J]. *中草药*, 2021, 52(4): 1135-1142.
- [6] 胡淑曼, 付志飞, 魏宝红, 等. HPLC 法测定海藻药材质量标志物岩藻糖的含量 [J]. *中国海洋药物*, 2021, 40(1): 11-15.
- [7] 马兆臣, 陈奎奎, 潘琦雪, 等. 丹荷颗粒治疗高脂血症质量标志物发现研究 [J]. *分析测试学报*, 2021, 40(1): 43-49.
- [8] Dai Y T, Li Q, Tong J Y, *et al.* Quality marker identification based on standard decoction of differently processed materials of *Ephedrae Herba* [J]. *J*

- Ethnopharmacol*, 2019, 237: 47-54.
- [9] 董玉. 基于质量标志物的蒙药质量标准体系建设 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 56-59.
- [10] 冯利梅, 陈艳琰, 乐世俊, 等. 基于层次分析-熵权法的中药质量标志物量化辨识方法研究: 以芍药甘草汤为例 [J]. 药学学报, 2021, 56(1): 296-305.
- [11] 闫孟琳, 丛龙飞, 张子玥, 等. 基于质量标志物的当归抗炎功效近红外快速评价 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(11): 1320-1326.
- [12] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 1-8.
- [13] 刘丽, 张笑敏, 许浚, 等. 吴茱萸化学成分和药理作用及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2689-2702.
- [14] 陈洋, 梁健, 董伟, 等. 基于谱-效相关分析的吴茱萸止呕药效物质的初步研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(11): 1737-1742.
- [15] 潘学强, 吴燕川, 龚慕辛, 等. 外翻肠囊吸收成分与药效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛的药效物质 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 126-133.
- [16] Cuadros-Rodríguez L, Ruiz-Samblás C, Valverde-Som L, et al. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication-A tutorial [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 909: 9-23.
- [17] Lu W Y, Jiang Q Q, Shi H M, et al. Partial least-squares-discriminant analysis differentiating Chinese wolfberries by UPLC-MS and flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(37): 9073-9080.
- [18] Schulze A E, de Beer D, de Villiers A, et al. Chemometric analysis of chromatographic fingerprints shows potential of *Cyclopia maculata* (Andrews) kies for production of standardized extracts with high xanthone content [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(43): 10542-10551.
- [19] Park J Y, Lee J W, Lee C H, et al. Synthesis and inhibitory effect of *cis*-guggulsterone on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide in macrophages [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(5): 126962.
- [20] Liao J F, Chiou W F, Shen Y C, et al. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components [J]. *Chin Med*, 2011, 6(1): 6.
- [21] Woo H G, Lee C H, Noh M S, et al. Rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, inhibits prostaglandin production in RAW264.7 macrophages [J]. *Planta Med*, 2001, 67(6): 505-509.
- [22] Shan Q, Tian G, Wang J, et al. Change in the active component of processed *Tetradium ruticarpum* extracts leads to improvement in efficacy and toxicity attenuation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113292.
- [23] Noh E J, Ahn K S, Shin E M, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression by dehydroevodiamine through suppression of NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophages [J]. *Life Sci*, 2006, 79: 695-701.
- [24] 于金倩, 王召平, 朱姮, 等. 忍冬根的化学成分及其抗炎作用 [J]. 药学学报, 2016, 51(7): 1110-1116.
- [25] 吴秀稳, 杨秀伟. 羌活中的香豆素类成分及其抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成活性的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3383-3392.
- [26] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2273-2280.
- [27] Wang S, Liu L, Zhang Y B, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of main components of the fruits of *Euodia rutaecarpa* in a co-culture model of the human colorectal adenocarcinoma cells and RAW264.7 macrophages [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2020, 29(12): 868-879.
- [28] 尤文挺, 王洒, 何龙, 等. 柠檬苦素单体的药理活性研究进展 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 242-246.

[责任编辑 李亚楠]