

枳实化学成分与治疗功能性消化不良关联性分析及实验验证

曲中原¹, 李苏楠¹, 孙志伟¹, 孙向明¹, 于佳慧¹, 舒淇¹, 邹翔¹, 罗容^{2*}

1. 哈尔滨商业大学药学院(药物工程技术研究中心), 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要: **目的** 研究枳实治疗功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)的药效物质基础。**方法** 运用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术对10批枳实水煎液进行分析,确定共有成分;采用不规则喂养和夹尾刺激建立FD大鼠模型,以小肠碳末推进率、胃排空率及血清中胃动素、胃泌素水平为药效指标,采用灰色关联度分析法和Pearson双变量相关性分析建立色谱图中共有峰峰面积与药效指标的相关性,筛选出枳实治疗FD的药效物质,并通过斑马鱼肠蠕动模型进行药效验证。**结果** 10批枳实水煎液中共指认35个共有成分,通过灰色关联度和Pearson双变量相关性分析,筛选出辛弗林、马尔敏、黄柏酮、N-甲基酪胺、圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷共8个成分为枳实治疗FD的潜在药效物质。选择药效相关性较强、易得、可测的圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林进行实验验证,发现这5个成分均显著促进斑马鱼肠道蠕动($P < 0.01$)。**结论** 圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林为枳实治疗FD的药效物质。

关键词: 枳实; 功能性消化不良; 肠道蠕动; 圣草次苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 辛弗林

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)20-6521-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.024

Correlation analysis and experimental verification between chemical components of *Aurantii Fructus Immaturus* and treatment of functional dyspepsia

QU Zhong-yuan¹, LI Su-nan¹, SUN Zhi-wei¹, SUN Xiang-ming¹, YU Jia-hui¹, SHU Qi¹, ZOU Xiang¹, LUO Rong²

1. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To study the pharmacodynamic basis of Zhishi (*Aurantii Fructus Immaturus*) in the treatment of functional dyspepsia (FD). **Methods** UPLC-Q-TOF-MS/MS technology was used to analyze the common components of 10 batches of *Aurantii Fructus Immaturus*. FD model of rats was established by irregular feeding and tail pinching stimulation, small intestine carbon end advance rate, gastric emptying rate and levels of motilin and gastrin in serum were used as pharmacodynamic indexes, grey correlation analysis method and Pearson bivariate correlation analysis were used to establish the correlation between the peak area of common peak in chromatogram and pharmacodynamic index. Pharmacodynamic substances of *Aurantii Fructus Immaturus* in the treatment of FD were screened out, and efficacy was verified by zebrafish intestinal motility model. **Results** A total of 35 common components were identified in 10 batches of *Aurantii Fructus Immaturus* decoction. Synephrine, malmin, obacunone, N-methyltyramine, eriocitrin, naringin, hesperidin and neohesperidin eight components were screened out as potential pharmacodynamic substances of *Aurantii Fructus Immaturus* in the treatment of FD through grey correlation and Pearson bivariate correlation analysis. Eriocitrin, naringin, hesperidin, neohesperidin and synephrine with strong efficacy correlation, easy to obtain and measurable were selected for experimental verification, above five components significantly promoted zebrafish intestines peristalsis ($P < 0.01$). **Conclusion** Eriocitrin, naringin, hesperidin, neohesperidin and synephrine are the pharmacodynamic substances of *Aurantii Fructus Immaturus* in the treatment of FD.

收稿日期: 2022-07-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973431)

作者简介: 曲中原(1980—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及中药炮制研究。E-mail: qiuqiuqu@163.com

*通信作者: 罗容(1978—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药鉴定方法学和中药质量标准研究。E-mail: zhongyaojianding@126.com

Key words: *Aurantii Fructus Immaturus*; functional dyspepsia; intestinal peristalsis; eriocitrin; naringin; hesperidin; neohesperidin; synephrine

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是临床上最常见的功能性胃肠道疾病, 是以持续或反复发作的上腹部症状如上腹痛或不适、腹部胀气、嗝气、厌食、恶心、呕吐、早饱、烧心、反胃等为特点的一组症候群^[1]。FD 的发病机制可能与胃肠运动异常、内脏高敏感、幽门螺杆菌感染、脑肠轴功能紊乱、肠道微生态失衡、十二指肠屏障受损与微炎症、遗传因素、精神、心理等因素密切相关^[2]。目前治疗 FD 的主要方法包括促动力药物治疗、根除幽门螺杆菌治疗、抑酸治疗、心理辅助治疗等。质子泵抑制剂可以通过抑制盐酸分泌改善上腹部的烧灼感。但越来越多的证据表明, 长期使用质子泵抑制剂会产生肝、肾毒性, 增加患胃癌的风险^[3-5]。

中医药在 FD 治疗上优势凸显, 虽不如化学药迅捷, 但疗效稳定, 不良反应小, 复发率较低。中医称功能性消化不良为“痞满”, 属于“胃脘痛”“胃痞”范畴^[6]。枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *C. sinensis* Osbeck 的干燥幼果, 具有破气消积、化痰消痞的功效, 常用于治疗积滞内停、痞满胀痛、大便不通等症, 能够缓解 FD 引起的胸腹痛, 对 FD 有显著疗效^[7-8]。目前枳实治疗 FD 疗效确切, 但其药效物质基础尚未完全明确。本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术分析 10 批不同产地枳实水煎液的共有成分, 结合药效数据构建化学成分相对含量与治疗 FD 药效的关联性, 并采用斑马鱼蠕动模型对药效物质进行验证, 筛选出有效、可测的质量标志物, 为枳实的质量标准提升提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 (200±20) g, 购自哈尔滨医科大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (黑) 2013-001。动物饲养于温度 25~28 °C、相对湿度 50%~70%, 光照 14 h/黑暗 10 h 的环境中。动物实验经哈尔滨商业大学药学院实验动物伦理委员会批准 (批准号 180315)。

野生型 AB 系斑马鱼由山东省科学院生物研究所提供, 饲养于本实验室循环养殖系统中。动物实验经哈尔滨商业大学药学院实验动物伦理委员会批

准 (批准号 200318)。

1.2 药材

10 批枳实药材由首都医科大学中医学院罗容副教授收集并鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果, 详细信息见表 1。

表 1 枳实药材信息

Table 1 Information of *Aurantii Fructus Immaturus*

批号	来源	产地
S1	河北安国中药材专业市场	江西
S2	江西樟树中药材专业市场	江西
S3	江西樟树中药材专业市场	江西
S4	河北安国中药材专业市场	湖南
S5	河北安国中药材专业市场	湖南
S6	河北安国中药材专业市场	湖南
S7	河北安国中药材专业市场	湖南
S8	河北安国中药材专业市场	湖南
S9	河北安国中药材专业市场	湖南
S10	河北安国中药材专业市场	江西

1.3 药品与试剂

对照品柚皮苷 (批号 DSTDY009902)、圣草次苷 (批号 DST211225-014)、橙皮苷 (批号 DST211108-038)、新橙皮苷 (批号 DSTDX003901)、辛弗林 (批号 DSTCP110727) 均购自天津一方科技有限公司, 质量分数≥98%; 色谱甲醇、乙腈购自德国默克公司; 蒸馏水购自屈臣氏; 氯化钠注射液 (批号 16031609) 购自哈尔滨药业集团三精药业股份有限公司; 多潘立酮 (批号 LJ2K49) 购自西安杨森制药有限公司; 尼罗红 (批号 S19279)、盐酸洛哌丁胺 (批号 S26615) 购自上海源叶生物科技有限公司; 三卡因 (批号 C1259391) 购自天津阿尔法生物科技有限公司; 胃泌素 ELISA 试剂盒 (批号 DRE20863) 和胃动素 ELISA 试剂盒 (批号 DRE10129) 购自上海邦奕生物科技有限公司。

1.4 仪器

超高效液相色谱仪 (UPLC, 美国 Waters 公司); AB Scea Triple TOF™ 5600 型质谱仪 (美国应用生物系统公司); 斑马鱼养殖系统 (上海海圣生物实验设备有限公司); DMI3000B 型荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 不同批次枳实水煎液的化学成分分析

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取 10 批枳实药材粉末各 0.5 g (过 60 目筛), 放入圆底烧瓶中, 加

入10倍的蒸馏水,回流提取2次,每次1h。合并2次滤液,浓缩,定容至25 mL,经0.22 μm微孔滤膜滤过,得到供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取辛弗林、圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷对照品各1.0 mg,分别加甲醇超声溶解,于5 mL量瓶定容,制成0.2 mg/mL的对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为水(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~13 min, 90%~62%A; 13~26 min, 62%~10%A; 26~28 min, 10%~90%A。柱温35℃;进样体积0.5 μL;体积流量0.2 mL/min;检测波长274 nm。

2.1.4 质谱条件 ESI离子源;正离子模式扫描;碰撞能量15 eV;干燥气温度320℃;体积流量8 L/min;雾化器压力241.325 kPa;毛细管电压3500 V;鞘气温度350℃;鞘气体积流量11 L/min。数据采集采用高分辨率模式,扫描范围 m/z 100~3000,采样速度为1 spectra/s。

2.2 不同批次枳实对FD的治疗作用

2.2.1 给药溶液的制备 取10批枳实药材,按“2.1.1”项下方法制备,取适量浸膏,加水溶解成质量浓度为0.103 g/mL的溶液,备用。

2.2.2 分组、造模与给药 大鼠适应性喂养1周,随机分为13组,每组8只,分别为对照组、模型组、多潘立酮(1.03 mg/kg,多潘立酮片研磨成粉末,用生理盐水配制成0.103 mg/mL的溶液)组以及10个批次的枳实(2.06 g/kg,相当于临床剂量的2倍)组。除对照组外,其余各组采用不规则喂养和夹尾刺激法建立大鼠FD模型^[9-10]。大鼠正常饮水,隔日禁食,每天用长海绵钳夹大鼠尾部远端1/3处,每次0.5 h,每隔3 h刺激1次,4次/d,连续14 d。造模结束后,恢复正常的饮食和饮水,各给药组ig相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组ig等体积生理盐水,1次/d,连续14 d。

2.2.3 一般行为学观察 对实验过程中大鼠的食物摄入量、水摄入量、体质量、活动度、毛发、粪便等进行观察和评估。

2.2.4 胃排空率和小肠碳末推进率测定 将羧甲基纤维素钠溶于250 mL蒸馏水中,然后分别加入10 g淀粉、8 g糖、8 g淀粉和2 g活性炭粉末,均匀搅拌,制成300 mL的碳末糊,于4℃保存。各组大鼠禁食24 h,ig碳末糊(10 mL/kg),30 min后麻

醉,摘眼球取血,脱臼处死。打开腹腔,结扎胃贲门和幽门,取胃,擦干,称定胃全质量,然后剪开胃体,洗去内容物后擦干,称定净质量;同时,迅速取出小肠,铺于白瓷盘上,测量幽门至回盲肠部全长及幽门至碳末前沿的距离。计算胃排空率和小肠碳末推进率。

胃排空率=[ig碳末糊质量-(胃全质量-胃净质量)]/ig碳末糊质量

小肠碳末推进率=碳末推进距离/小肠全长

2.2.5 血清胃动素、胃泌素的测定 各组大鼠血样于室温下静止20 min,3000 r/min离心20 min,分离血清,按试剂盒说明书测定血清中胃动素及胃泌素水平。

2.3 谱效相关性分析

2.3.1 灰色关联度分析 灰色关联度分析是一种多因素统计分析方法,对原始数据采用均值变化法进行无量纲处理,分别将小肠碳末推进率、胃排空率、胃动素和胃泌素4个药效指标作为母序列,枳实10批次35个共有峰峰面积作为子序列,计算关联度(r)。

2.3.2 Pearson双变量相关性分析 以10批枳实35个共有峰峰面积为自变量,4个药效指标为因变量,通过皮尔森双变量相关性分析计算两者之间的Pearson相关系数。

2.4 枳实单体成分对斑马鱼肠道蠕动的促进作用

2.4.1 最大耐受浓度测定 随机选取180尾受精后6 d(6 day post fertilization, 6 dpf)的斑马鱼胚胎于6孔板中,每孔30尾,分别加入3 mL质量浓度为125、250、500、1000、2000 μg/mL的药物(圣草次苷、辛弗林、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷),同时设置对照组(不含药物)。处理24 h后,观察并记录斑马鱼的死亡情况,确定各药物对斑马鱼的最大耐受浓度。

2.4.2 斑马鱼肠道蠕动模型的建立及给药 斑马鱼在5 dpf表现出自发的节律性肌肉收缩,开始外源性自发进食^[11]。将140尾5 dpf的野生型AB斑马鱼置于6孔板中,每孔20尾,设置对照组、模型组、多潘立酮(30 μg/mL)组、圣草次苷(250 μg/mL)组、柚皮苷(250 μg/mL)组、橙皮苷(250 μg/mL)组、新橙皮苷(250 μg/mL)组和辛弗林(250 μg/mL)组。各组加入3 mL尼罗红(10 μg/mL),作用16 h后清洗3遍。除对照组外,其余各组给予3 mL盐酸洛哌丁胺(20 μg/mL)造模,对照组用胚胎培养

水正常培养。造模同时，各给药组给予 3 mL 相应药物，对照组和模型组给予等体积胚胎培养水，于 28 ℃ 恒温水浴避光培养 24 h。

2.4.3 斑马鱼的肠蠕动促进率测定 按“2.4.2”项下方法给药 24 h 后，用 0.02% 三卡因进行麻醉。各组随机选取 10 尾斑马鱼置于荧光显微镜下对胃肠部进行拍照，采集斑马鱼肠道内容物（尼罗红）荧光强度（S），用 Image J 图像处理软件进行统计，计算肠蠕动促进率。

$$\text{肠蠕动促进率} = 1 - (S_{\text{给药}} - S_{\text{对照}}) / (S_{\text{模型}} - S_{\text{对照}})$$

2.5 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据均通过 IBM SPSS Statistics 21.0 软件进行分析，多样本组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）和 LSD 多重比较分析。

3 结果

3.1 枳实水煎液特征图谱的建立

对正离子模式下 10 批枳实水煎液基峰离子色谱图（base peak chromatograms, BPC）进行叠加（图 1-A），共标记 35 个共有峰（图 1-B）。通过对比保留时间，分析一级、二级质谱信息并结合相关文献报道，对共有峰成分进行分析鉴定，结果见表 2。

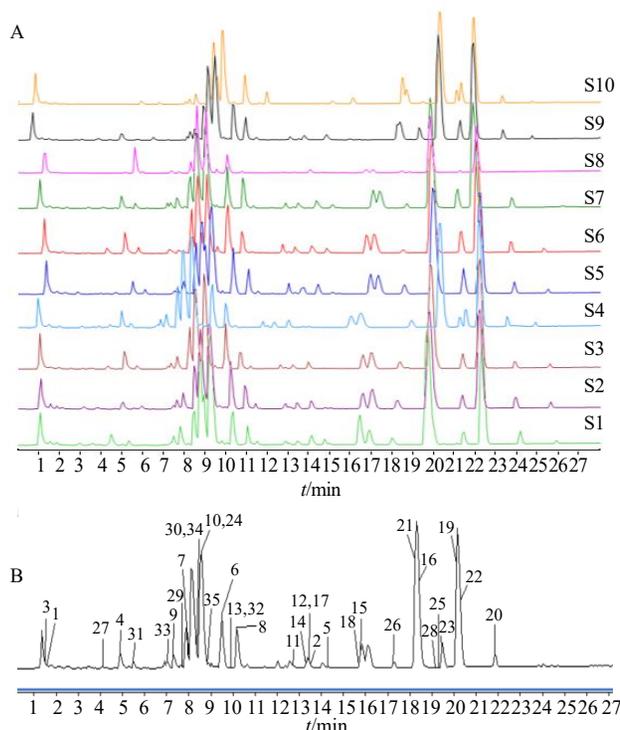


图 1 10 批枳实水煎液正离子模式下的 BPC 叠加图 (A) 和共有峰 (B)

Fig. 1 BPC superposition diagram (A) and common peak (B) of 10 batches of *Aurantii Fructus Immaturus* decoction in positive ion mode

表 2 10 批枳实共有峰成分分析

Table 2 Analysis of common peaks in 10 batches of *Aurantii Fructus Immaturus*

峰号	tr/ min	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子模式	m/z		离子碎片 (m/z)	分子式	化合物
				理论值	实验值			
1	1.55	1.26	[M+H] ⁺	152.107 0	152.106 8	121.064 9, 103.055 1, 91.056 0, 77.040 7, 65.042 1, 51.028 3	C ₉ H ₁₃ NO	N-甲基酪胺 ^[12]
2	13.47	1.67	[M+H] ⁺	163.039 0	163.038 7	119.049 8, 107.049 6, 91.055 4, 77.040 7, 65.041 8, 51.027 4	C ₉ H ₆ O ₃	伞形花内酯 ^[12]
3	1.48	1.23	[M+H] ⁺	168.101 9	168.101 7	150.091 5, 107.050 9, 91.055 6, 77.040 7, 65.042 0	C ₉ H ₁₃ NO ₂	辛弗林 ^[12-13]
4	4.91	2.16	[M+H] ⁺	179.033 9	179.033 5	161.022 8, 155.033 5, 137.022 9, 133.028 1, 123.043 6, 111.043 7	C ₉ H ₆ O ₄	5,7-二羟基香豆素 ^[13]
5	14.32	-0.57	[M+H] ⁺	203.033 9	203.034 0	175.038 4, 159.043 5, 147.043 6, 131.048 8, 119.048 7	C ₁₁ H ₆ O ₄	花椒毒酚 ^[12]
6	9.48	0.14	[M+H] ⁺	261.112 1	261.112 1	243.100 4, 159.043 6, 103.054 5	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	橙皮内酯 ^[12]
7	8.05	1.29	[M+H] ⁺	273.075 7	273.075 4	153.017 3, 91.055 1	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素 ^[13]
8	10.15	-0.70	[M+H] ⁺	287.091 4	287.091 6	153.017 2, 133.064 9	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	野樱素 ^[14]
9	7.35	-0.82	[M+H] ⁺	289.070 7	289.070 9	153.017 8	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	圣草酚 ^[14]
10	8.55	-0.94	[M+H] ⁺	303.086 3	303.086 6	153.017 0, 117.033 7	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	高圣草素 ^[14]
11	12.68	-0.94	[M+H] ⁺	303.086 3	303.086 6	153.017 2, 89.039 5	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	橙皮素 ^[13]
12	13.40	-0.68	[M+H] ⁺	315.151 0	315.159 3	163.038 1, 107.049 7	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	环氧橙皮油素 ^[15]
13	9.73	-1.08	[M+H] ⁺	279.122 7	279.123 0	261.112 8, 243.100 4, 189.054 3, 103.054 7	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	水合橙皮内酯 ^[14]
14	13.32	0.15	[M+H] ⁺	333.169 7	333.169 6	163.038 3, 107.085 8	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	马尔敏 ^[12]
15	15.75	-0.25	[M+H] ⁺	343.117 6	343.117 7	328.091 5, 313.067 8, 153.016 8	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	4',5',7,8-四甲氧基黄酮 ^[14]
16	18.42	-0.25	[M+H] ⁺	343.117 6	343.117 7	313.067 8, 285.073 4, 153.017 1	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	3',4',7,8-四甲氧基黄酮 ^[14]

续表 2

峰号	t_R / min	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子模式	m/z		离子碎片 (m/z)	分子式	化合物
				理论值	实验值			
17	13.35	0.21	[M+H] ⁺	373.128 2	373.128 1	358.102 3, 181.012 1, 153.017 3	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	异甜橙黄酮 ^[14]
18	15.68	0.21	[M+H] ⁺	373.128 2	373.128 1	343.077 7, 211.021 7, 135.043 2	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	甜橙黄酮 ^[12]
19	20.08	0.21	[M+H] ⁺	373.128 2	373.128 1	343.076 8, 313.069 4, 153.017 3	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	橘皮素 ^[12]
20	21.80	-0.02	[M+H] ⁺	389.123 1	389.123 1	374.099 5, 313.069 8	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	5-O-去甲基川陈皮素 ^[14]
21	18.22	0.61	[M+H] ⁺	403.138 7	403.138 5	373.087 2, 165.050 3	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	川陈皮素 ^[12]
22	20.25	-0.58	[M+H] ⁺	419.133 7	419.133 9	404.109 0, 389.084 7, 371.075 1, 211.022 9	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	3-羟基-3',4',5,6,7,8-六甲氧基黄酮 ^[12]
23	19.42	0.48	[M+H] ⁺	433.149 3	433.149 1	418.123 5, 165.053 5	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	3',4',3,5,6,7,8-七甲氧基黄酮 ^[12]
24	8.48	0.17	[M+H] ⁺	435.128 6	435.128 5	273.073 3, 153.016 9	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	樱桃苷 ^[14]
25	19.33	0.07	[M+H] ⁺	455.206 4	455.206 4	409.200 2, 161.059 4	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	黄柏酮 ^[13]
26	17.22	0.73	[M+H] ⁺	471.201 3	471.201 0	425.193 5, 339.194 1, 161.059 2, 95.014 0	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	柠檬苦素 ^[12]
27	4.08	0.04	[M+H] ⁺	487.144 6	487.144 6	341.084 8, 179.032 9	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₃	法箬枝苷 ^[13]
28	19.15	1.87	[M+H] ⁺	515.227 6	515.226 6	469.218 0, 411.214 6, 161.058 5, 95.013 0	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	诺米林 ^[12]
29	7.88	1.00	[M+H] ⁺	581.186 5	581.185 9	419.131 8, 273.073 6, 153.017 3	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	芸香柚皮苷 ^[14]
30	8.42	1.00	[M+H] ⁺	581.186 5	581.185 9	383.110 6, 273.072 8, 153.017 2	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	柚皮苷 ^{*[12-13]}
31	5.51	-0.76	[M+H] ⁺	595.165 7	595.166 2	577.151 5, 457.108 7, 295.060 3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	忍冬苦苷 ^[14]
32	10.00	0.05	[M+H] ⁺	595.202 1	595.202 1	433.147 8, 287.090 0, 153.017 9	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	香风草苷 ^[12]
33	7.08	0.16	[M+H] ⁺	597.181 4	597.181 3	435.127 8, 289.070 3, 153.019 0	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	圣草次苷 ^{*[12-13]}
34	8.28	1.55	[M+H] ⁺	611.197 0	611.196 1	449.143 2, 303.084 2, 153.017 4	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷 ^{*[12-13]}
35	8.82	1.55	[M+H] ⁺	611.197 0	611.196 1	449.142 4, 303.083 6, 153.017 2	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	新橙皮苷 ^{*[12-13]}

*与对照品比对的化合物

*compounds compared to standard

3.2 枳实对FD的影响

3.2.1 一般行为学观察 对照组大鼠饮水、饮食、皮毛色泽、粪便无明显变化，精神状态良好，体质量增加。模型组大鼠饮水量和饮食逐渐减少，皮毛呈黄色，粪便柔软，气味恶臭和刺鼻，精神状态差，容易被激怒，体质量下降。与模型组相比，给予多潘立酮和不同批次枳实干预后，大鼠饮水量、进食量逐渐增加，皮毛恢复光泽，粪便干燥，气味稍脏，性情温和，体质量趋于正常水平。

3.2.2 胃肠动力及血清药效指标测定 如图 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠胃排空率、小肠碳末推进率及血清中胃动素、胃泌素水平均显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠胃排空率、小肠碳末推进率及血清中胃动素、胃泌素水平均显著升高 ($P<0.01$)，且 10 批枳实组间无显著差异。

3.3 谱效指标相关性分析

通过灰色关联度法和 Pearson 双变量相关性分析计算 35 个共有峰峰面积与药效指标的关联度，灰色关联度数值越大，表明色谱峰代表的化学成分与药效指标关联性越大。成分与药效指标的灰色关联度值如

图 3-A 所示，根据平均关联度值大于 0.7 进行筛选，共筛选出 10 个与药效指标相关性强的成分，相关性程度依次为峰 1>峰 3>峰 14>峰 34>峰 17>峰 2>峰 30>峰 33>峰 25>峰 35。成分与药效指标的 Pearson 相关系数数值如图 3-B 所示，根据平均值大于 0.6 筛选出与 4 个药效指标呈正相关的成分，相关性程度依次为峰 3>峰 14>峰 33>峰 35>峰 34>峰 30>峰 25>峰 1。综合分析 2 种方法可知辛弗林 (峰 3)、马尔敏 (峰 14)、黄柏酮 (峰 25)、*N*-甲基酪胺 (峰 1)、圣草次苷 (峰 33)、柚皮苷 (峰 30)、橙皮苷 (峰 34)、新橙皮苷 (峰 35) 8 个成分与枳实治疗 FD 关联性较强。结合文献报道及相关性结果，选择相关性较高、易得、可测的圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、辛弗林 5 个成分进行斑马鱼肠道蠕动模型验证。

3.4 枳实单体成分的最大耐受剂量测定

如图 4 所示，圣草次苷、辛弗林、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷 5 个单体成分在 125~500 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下，斑马鱼无死亡。1000、2000 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下有不同程度的死亡，因此本研究中 5 个单体对斑马鱼的最大耐受剂量为 500 $\mu\text{g/mL}$ 。

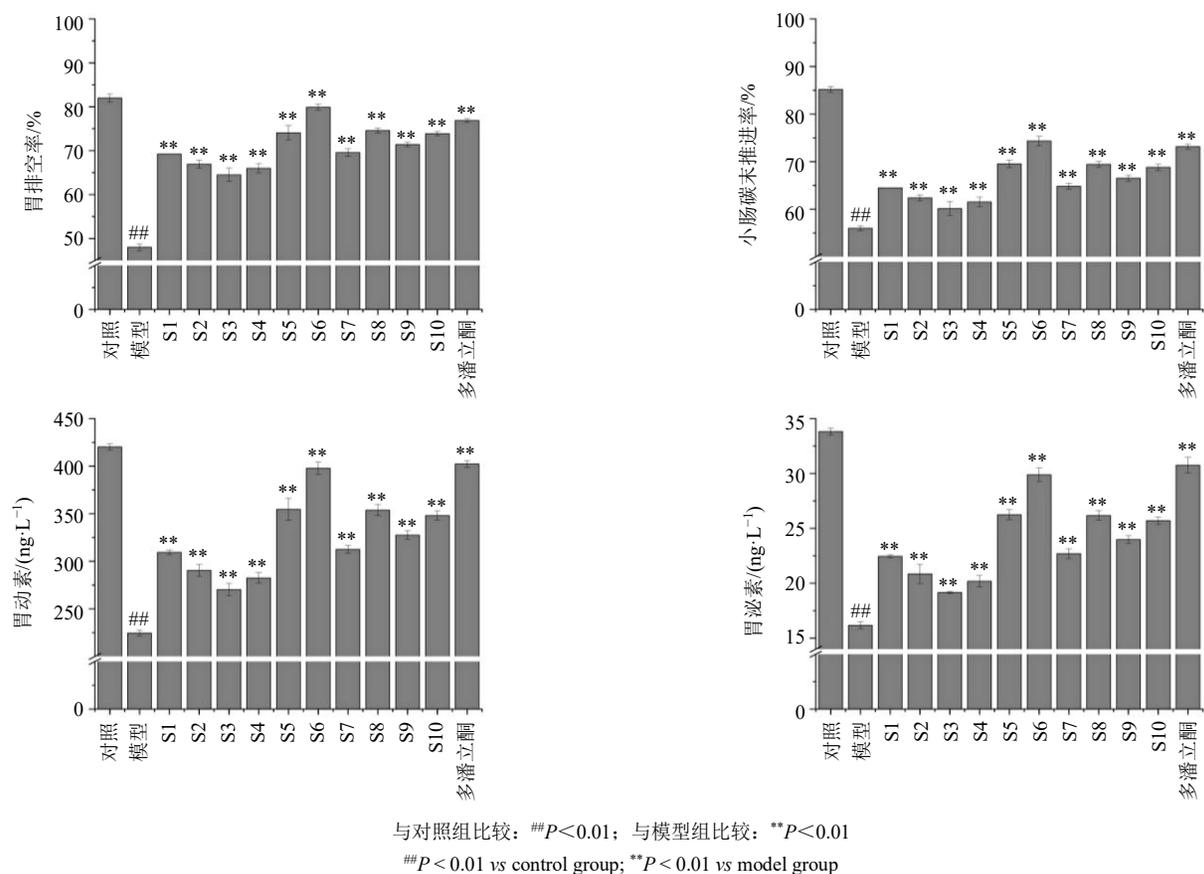


图2 枳实对FD大鼠胃排空率、小肠碳末推进率及血清中胃动素、胃泌素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of *Aurantii Fructus Immaturus* on gastric emptying rate, small intestine carbon end advance rate and motilin, gastrin levels in serum of FD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

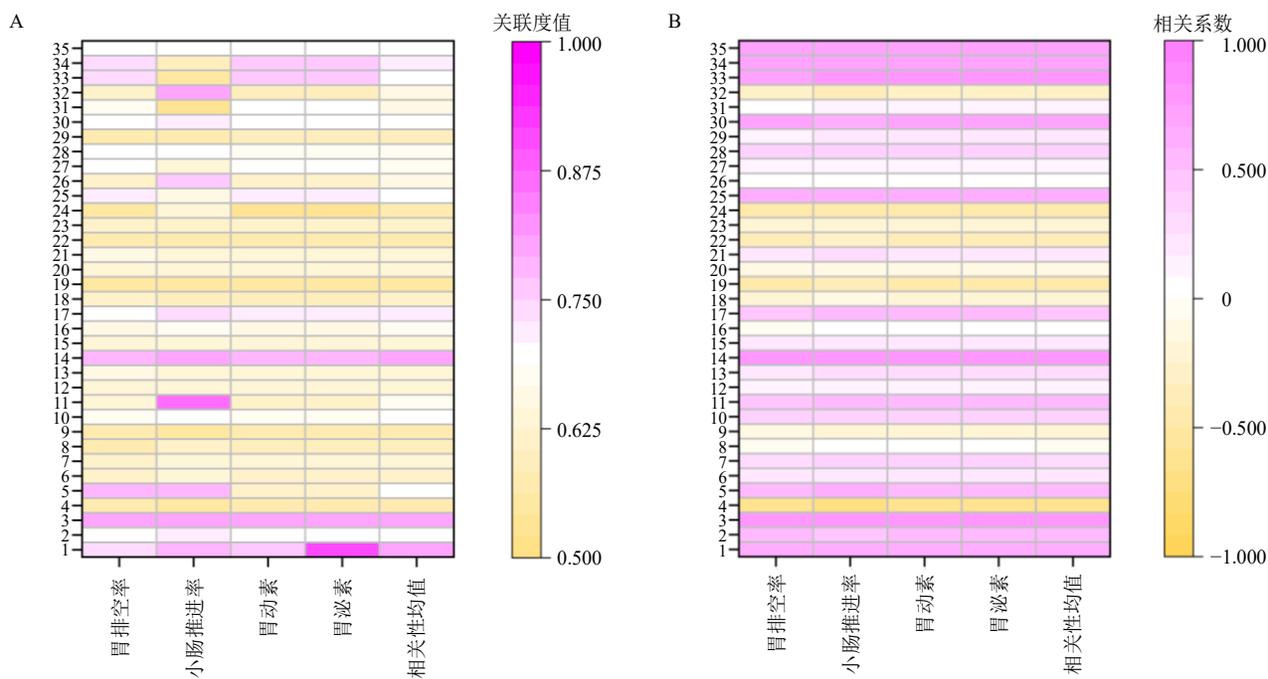


图3 枳实共有峰峰面积与药效指标灰色关联度 (A) 和 Pearson 双变量相关性 (B) 分析

Fig. 3 Grey correlation (A) and Pearson bivariate correlation (B) analysis between common peaks of *Aurantii Fructus Immaturus* and pharmacodynamic indexes

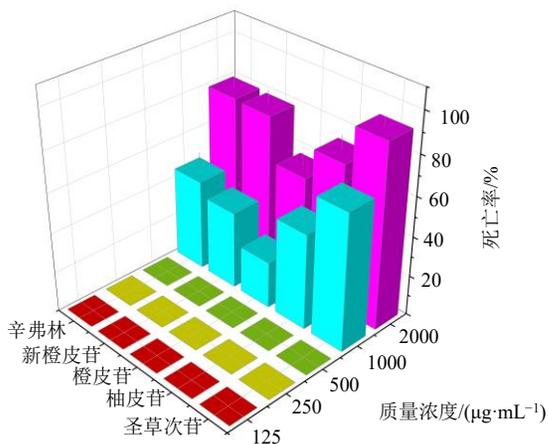


图4 单体剂量-死亡率图

Fig. 4 Monomeric dose-mortality rate

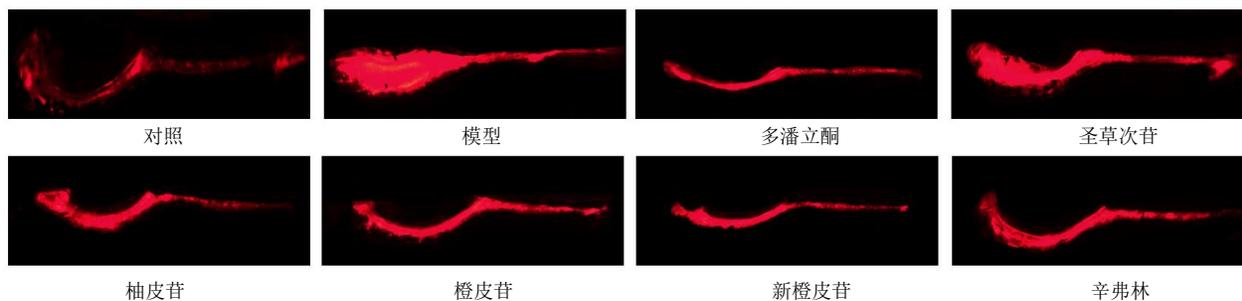


图5 各组斑马鱼肠道内容物的荧光显微成像图 (×4)

Fig. 5 Fluorescence microscopic imaging of intestinal contents of zebrafish in each group (× 4)

表3 枳实单体成分对斑马鱼肠蠕动的促进作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Promoting effect of monomer components of *Aurantii Fructus Immaturus* on intestinal peristalsis of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	斑马鱼肠道内容物 荧光强度	肠蠕动促进率/%
对照	—	541.79 ± 214.12	100.00
模型	—	1 376.86 ± 354.85 ^{##}	0
多潘立酮	30	741.65 ± 280.05 ^{**}	76.07
圣草次苷	250	881.96 ± 250.37 ^{**}	59.26
柚皮苷	250	761.88 ± 338.53 ^{**}	73.64
橙皮苷	250	827.62 ± 202.39 ^{**}	65.77
新橙皮苷	250	758.31 ± 173.04 ^{**}	74.07
辛弗林	250	774.27 ± 283.44 ^{**}	72.16

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

丸、枳术丸、四逆散^[18]等治疗 FD 也取得了良好疗效, 但其药效物质基础尚不明晰。

本研究首先采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对 10 批枳实的水煎液进行分析, 对色谱图进行叠加获得共有峰, 确认了 35 个共有峰, 通过保留时间以及

3.5 枳实单体成分对斑马鱼肠蠕动的促进作用

如图 5 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组斑马鱼肠道内容物荧光强度明显增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组斑马鱼肠道内容物荧光强度明显降低 ($P < 0.01$), 其对斑马鱼肠道蠕动的促进效果依次为新橙皮苷 > 柚皮苷 > 辛弗林 > 橙皮苷 > 圣草次苷。

4 讨论

中医学认为 FD 属于“痞满”“胃脘痛”“积滞”等范畴, 主要与情志不畅、外邪侵袭、饮食所伤、脾胃虚弱等因素有关, 临床上中医辨证施治, 以健脾和胃、理气降逆为主^[16]。枳实具有破气消积、化痰消痞的功效, 为中医临床治疗 FD 的常用中药之一, 以其为君药的复方如枳实消痞丸^[17]、枳实导滞

文献信息对共有峰成分进行分析鉴定。其次, 采用不规则喂养和夹尾刺激复合因素建立 FD 大鼠模型, 通过观察大鼠行为学以及枳实对大鼠胃排空率、小肠推进率及血清中胃动素、胃泌素水平的影响, 探究枳实对 FD 大鼠的影响^[19]。进一步运用化学计量学方法建立枳实图谱数据与中药药效活性的内在联系, 有助于探明药效物质基础, 能够推测与药效相关的成分群^[20]。灰色关联度分析能够很好地识别出与药效具有较高相关性的峰, 但不能精确识别出正相关或者负相关; 而 Pearson 双变量相关性分析可以筛选出与药效呈正相关的成分。本研究将 2 种方法相结合, 初步筛选出辛弗林、马尔敏、黄柏酮、N-甲基酪胺、圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷与枳实治疗 FD 的关联性较强。研究发现, 辛弗林能够显著提高胃泌素和辛酰化饥饿激素的含量, 更好地促进胃肠蠕动^[21]; 橙皮苷能够促进胃动素的释放, 增加胃排空率和小肠碳末推进率, 促进胃肠动力, 从而改善 FD 症状^[22]; 新橙皮苷具有较好的抗氧化作用, 可以改善胃黏膜损伤, 增加黏液含量,

且可显著降低胃酸分泌和排出, 增加胃 pH 值, 促进胃肠动力^[23]; 辛弗林、柚皮苷、新橙皮苷能够影响胃肠激素分泌, 从而促进脾虚模型大鼠的胃肠运动^[24]。枳实的主要药效成分为生物碱和黄酮 2 类物质, 黄酮类成分含量较高, 占 5%~28%, 为促进肠胃蠕动的成分^[25-26]; 生物碱类成分为强心、升压的主要成分^[25], 其中辛弗林也具有促进胃肠道蠕动的的作用^[21]。本研究通过谱效相关性筛选出的 8 个成分中, 马尔敏不易获得, *N*-甲基酪胺在枳实中含量较低, 黄柏酮与药效指标相关性相对较低。因此从 8 个成分中选出与药效相关性高、易得、可测的圣草次苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林 5 个成分进行斑马鱼肠道蠕动模型的验证, 结果表明 5 个单体均能促进肠道蠕动, 为枳实治疗 FD 的效物质。

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 采用 FD 大鼠模型和斑马鱼肠道蠕动模型阐明了枳实治疗 FD 的药效物质, 并筛选出潜在药效物质基础, 对枳实药材、饮片及制剂的质量标准提升具有重要的参考价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Stanghellini V, Chan F K L, Hasler W L, et al. Gastrointestinal disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1380-1392.
- [2] 王治铭, 伍丽萍, 孙晓滨, 等. 功能性消化不良发病机制研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50(6): 161-164.
- [3] Eusebi L H, Rabitti S, Artesiani M L, et al. Proton pump inhibitors: Risks of long-term use [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(7): 1295-1302.
- [4] Waldum H L, Sørdal Ø, Fossmark R. Proton pump inhibitors (PPIs) may cause gastric cancer-clinical consequences [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2018, 53(6): 639-642.
- [5] Ueberschaer H, Allescher H D. Proton pump inhibitor-side effects and complications of long-term proton pump inhibitor administration [J]. *Z Gastroenterol*, 2017, 55(1): 63-74.
- [6] 顾文婷. 功能性消化不良中医药治疗研究进展 [J]. 中国社区医师, 2021, 37(22): 4-5.
- [7] Wu H L, Jing Z W, Tang X D, et al. To compare the efficacy of two kinds of Zhizhu Pills in the treatment of functional dyspepsia of spleen-deficiency and qi-stagnation syndrome: A randomized group sequential comparative trial [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11: 81.
- [8] Xu Z R, Jiang C H, Fan S Y, et al. Comparative pharmacokinetics of naringin and neohesperidin after oral administration of flavonoid glycosides from *Aurantii Fructus Immaturus* in normal and gastrointestinal motility disorders mice [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(3): 314-320.
- [9] 陶睿智, 顾任钧, 夏雅雯, 等. 功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 283-290.
- [10] 秦兰, 游景瑞, 潘洁, 等. 隔山消提取物对功能性消化不良模型大鼠脑肠肽及胃肠道功能的作用机制研究 [J]. 中国药业, 2021, 30(13): 23-26.
- [11] Kuhlman J, Eisen J S. Genetic screen for mutations affecting development and function of the enteric nervous system [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(1): 118-127.
- [12] 祝婧, 袁恩, 牟俊雅, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析江西特色炮制工艺对枳壳化学成分的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 142-153.
- [13] 于国华, 杨洪军, 李俊芳, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析枳实中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3371-3378.
- [14] 郑玉莹, 庞文静, 白杨, 等. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术的枳实传统饮片及破壁饮片化学成分系统分析 [J]. 中南药学, 2018, 16(4): 443-450.
- [15] 陆杰, 王婷婷, 梁琨, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法分析大承气汤化学成分 [J]. 中成药, 2020, 42(12): 3275-3280.
- [16] 刘瑜璇, 朱凌宇. 功能性消化不良的中医治疗概况 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(3): 214-217.
- [17] Lin J, Cai G, Xu J Y. A comparison between Zhishi Xiaopiwan and cisapride in treatment of functional dyspepsia [J]. *World J Gastroenterol*, 1998, 4(6): 544-547.
- [18] Ling W, Li Y, Jiang W, et al. Common mechanism of pathogenesis in gastrointestinal diseases implied by consistent efficacy of single Chinese medicine formula: A PRISMA-compliant systematic review and Meta-analysis [J]. *Medicine*, 2015, 94(27): e1111.
- [19] 张正选, 李鲜. 枳实改善功能性消化不良大鼠胃动力障碍的机制研究 [J]. 陕西中医, 2018, 39(8): 998-1000.
- [20] Xu G L, Xie M, Yang X Y, et al. Spectrum-effect relationships as a systematic approach to traditional Chinese medicine research: Current status and future perspectives [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 17897-17925.
- [21] 王云. 枳壳芍药及吸收成分辛弗林和芍药苷抗抑郁促动力的多靶点机制 [D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- [22] 黄爱华, 迟玉广, 曾元儿, 等. 枳实黄酮对功能性消化不良大鼠胃肠动力的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 612-615.
- [23] Lee J H, Lee S H, Kim Y S, et al. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(12): 1748-1753.
- [24] 胡源祥, 陈海芳, 宋玉鹏, 等. 枳实及其主要活性成分促进脾虚模型大鼠胃肠运动的机制研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(13): 1747-1750.
- [25] 黄雪丽, 陈玉宇. 中药枳实的化学成分及分析方法研究进展 [J]. 广州化工, 2016, 44(17): 22-25.
- [26] Stevens Y, Rymenant E V, Grootaert C, et al. The intestinal fate of *Citrus* flavanones and their effects on gastrointestinal health [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1464-1481.

[责任编辑 李亚楠]