

入山虎不同提取部位抗类风湿性关节炎活性研究

曾英港¹, 王柳萍^{1,2,3*}, 奉建芳^{1,2,3*}, 唐丹丹¹, 蒙泔竹¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

3. 广西优势中成药与民族药开发工程技术研究中心, 广西 南宁 530020

摘要: **目的** 考察入山虎 *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* 不同提取部位对类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的治疗作用及提取部位的化学成分分析。**方法** 考察入山虎不同提取部位对人 RA 成纤维样滑膜 MH7A 细胞增殖活性和炎症因子含量的影响, 通过对大鼠足跖部皮内注射完全弗氏佐剂建立 RA 大鼠模型, 测定大鼠体质量、全身评分、关节炎指数、足跖肿胀度、脏器系数、血清中炎症因子含量, 采用苏木素-伊红染色观察踝关节组织病理, 以评价入山虎不同提取部位的抗 RA 活性作用。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析入山虎提取部位的化学成分。**结果** 入山虎中的氯仿及石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水提取部位在体外对 RA 均具有良好的抗炎作用。在体外, 能够抑制 MH7A 细胞的增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-17A、IL-1 β 的分泌 ($P < 0.01$); 在体内, 入山虎的提取部位可不同程度降低 RA 大鼠的足跖肿胀度、全身评分及关节炎评分 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善踝关节的病理改变, 缓解 RA 大鼠的炎症反应, 还能减少促炎因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 的分泌 ($P < 0.01$), 增加抗炎因子 IL-4、IL-10 的分泌 ($P < 0.01$)。对入山虎的提取部位进行化学成分分析, 发现入山虎的提取物含有的化合物比较相似, 含有生物碱、黄酮、香豆素等其他化合物, 以生物碱类居多, 主要包括呋喃萜类、苄基异萜类、原小檗碱类、阿朴啡类、苯并菲啶类、酰胺类等。**结论** 入山虎中的氯仿及石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位在体外对 RA 均具有良好的抗炎作用, 入山虎提取物主要含有生物碱、黄酮、香豆素等其他化合物。**关键词:** 入山虎; 不同提取部位; 类风湿性关节炎; 炎症因子; 生物碱; 黄酮; 香豆素; 木兰花碱; 橙皮苷; 两面针碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)13-4186-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.012

Anti-rheumatoid arthritis activity of different extracts from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum*

ZENG Ying-gang¹, WANG Liu-ping^{1,2,3}, FENG Jian-fang^{1,2,3}, TANG Dan-dan¹, MENG Gan-zhu¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Guangxi Superior Chinese Patent Medicine and National Medicine Development Engineering Technology Research Center, Nanning 530020, China

Abstract: Objective To investigate the effect of different extraction parts from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* (ZN) on rheumatoid arthritis (RA) and chemical composition analysis of extraction parts. **Methods** The human RA fibroblast-like synoviocyte cell line MH7A cells were used to investigate the effects of different extraction parts of ZN on the proliferation activity and contents of inflammatory factors. RA rat model was established by intradermal injection of Freund's complete adjuvant into the toes of rats. The body weight, whole body score, arthritis score, degree of swelling, organ coefficient and contents of inflammatory factor of rats were measured, pathology of ankle joint tissue was used by HE staining to evaluate the anti-RA activity of different extraction parts of ZN. And the chemical constituents of the

收稿日期: 2023-02-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1712304); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD20238058); 广西壮瑶药重点实验室项目 (GXZYKF2022-16); 广西中医药管理局科研课题 (GXZY20210068)

作者简介: 曾英港 (1997—), 女, 壮族, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂。Tel: 14777264959 E-mail: zengyinggang2016@163.com

***通信作者:** 王柳萍 (1978—), 女, 壮族, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药、民族药的品质与药效研究。

Tel: 18607713396 E-mail: rousel@126.com

奉建芳 (1966—), 男, 瑶族, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药、民族药制剂研究。

Tel: 13817588549 E-mail: fengjianfang@vip.163.com

extract were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS. **Results** Chloroform, petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and water extraction parts of ZN had good anti-inflammatory effects on RA *in vivo* and *in vitro*. ZN could inhibit the proliferation of MH7A cells *in vitro* ($P < 0.05$, 0.01), reduce the secretion of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), IL-17A and IL-1 β ($P < 0.01$). *In vivo*, the extraction parts of ZN could reduce the paw swelling, whole body score and arthritis score of RA rats to varying degrees ($P < 0.05$, 0.01), improve the pathological changes of ankle joint, alleviate the inflammatory symptoms of RA rats, reduce the secretion of pro-inflammatory factors IL-6, IL-17A and IL-1 β ($P < 0.01$), increase the secretion of anti-inflammatory factors IL-4 and IL-10 ($P < 0.01$). The chemical constituent analysis showed that the extracts of ZN contained similar compounds, including alkaloids, flavonoids, coumarins and other compounds. Most of them were alkaloids, including furan quinolines, benzylisoquinolines, protoberberines, aporphines, benzophenanthridines, amides and so on. **Conclusion** Chloroform, petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and water extraction parts of ZN have good anti-inflammatory effects on RA *in vivo* and *in vitro*. The extract mainly contains alkaloids, flavonoids, coumarins and other compounds.

Key words: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. var. *tomentosum* Huang; different extraction parts; rheumatoid arthritis; inflammatory factors; alkaloids; flavonoids; coumarins; magnoflorine; hesperidin; nitidine

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的、病因未明的慢性自生免疫性疾病, 病理学表现为滑膜增生、血管翳形成、炎症细胞浸润、软骨侵蚀等, 临床表现为关节功能降低、关节疼痛、肿胀, 最终造成关节畸形或者严重的残疾^[1-3]。目前, RA 治疗药物主要为非甾体抗炎药、改善风湿病情的药物、糖皮质激素、生物制剂等, 但这些药物价格昂贵且伴有心血管和胃肠道出血、肝肾毒性和生长抑制等不良反应^[4-6]。我国民族医药、中药具有多成分、多靶点、不良反应小等特色优势, 在临床及实验研究中许多活性成分和作用机制得到了证实, 具有良好的应用前景^[7-9]。

入山虎为芸香科植物毛叶两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. var. *tomentosum* Huang 的干燥根和茎^[10], 是传统瑶药“五虎”“九牛”“十八钻”“七十二风”104 种老班药之首药, 临床使用量较大。具有清热解毒、消肿止痛、活血散瘀、杀虫止痒的功效, 用于治疗风湿、RA、坐骨神经痛、胃痛、腹痛、牙痛、咽喉肿痛等。现代研究表明, 入山虎含有生物碱、黄酮类等成分, 具有抗菌、抗癌、抗炎、抗血栓等药理活性^[11-14]。但入山虎作为常用的抗 RA 瑶族民间草药, 其抗 RA 药效物质基础研究还很薄弱。因此, 本实验以入山虎为研究对象, 探讨其不同提取部位的抗 RA 活性, 寻找活性较强的提取部位, 并对入山虎的提取物进行化学成分分析, 为入山虎的抗 RA 作用研究提供初步的科学依据, 为抗 RA 药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 6 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可

证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物饲养于广西中医药大学 SPF 级动物实验室, 实验动物使用许可证 SYXK (桂) 2019-0001, 饲养环境相对湿度 50%, 温度 (22±1) °C, 光线控制 12 h 明暗交替, 用标准颗粒饲料喂养并自由饮用灭菌水。动物实验经广西中医药大学伦理委员会批准 (批准号 DW20220526-114)。

1.2 细胞

人 RA 成纤维 MH7A 细胞 (批号 220303) 购自北纳生物科技有限公司。

1.3 药材

入山虎药材样品购自广西壮族自治区来宾市金秀瑶族自治县桐木镇草药街, 样品均经过广西中医药大学韦松基教授、朱意麟讲师鉴定为芸香科植物毛叶两面针 *Z. nitidum* (Roxb.) DC. var. *tomentosum* Huang 的干燥根或茎。

1.4 药品与试剂

DMEM 培养基、0.25%胰酶-EDTA 消化液、PBS (批号分别为 8122082、2376021、8122063) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 T210420H501) 购自赛业生物科技有限公司; 青链霉素混合液 (批号 20211120)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 814O035) 购自北京索莱宝科技有限公司; MTT (批号 917Q0514) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 重组人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 031825) 购自美国 PEPROTECH 公司; 人白细胞介素-17A (interleukin-17A, IL-17A)、IL-6、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号分别为 UX0728043972、UX08R02H5223、UX09PN026474) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 MAN0016898)、大鼠 IL-1 β

ELISA 试剂盒(批号 MAN0016903)、大鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(批号 MAN0016900)、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(批号 MAN0016902)、质谱纯的纯净水(批号 W6-4)、甲醇(批号 A456-4)、乙腈(批号 A955-4)、甲酸(批号 A117-50)购自赛默飞世尔科技公司;大鼠 IL-17A ELISA 试剂盒(批号 CSB-E07451r)购自武汉华美生物工程有限公司;甲氨蝶呤(methotrexate, MTX, 批号 036200804)购自上海上药信谊药厂有限公司;完全弗氏佐剂(批号 F5881)购自美国 Sigma 公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 批号 20211004)购自天津市大茂化学试剂厂;对照品两面针碱(质量分数为 99.81%)、二氢白屈菜红碱(质量分数为 99.21%)、盐酸白屈菜红碱(质量分数为 99.41%)、盐酸血根碱(质量分数为 99.50%)、花椒碱(质量分数为 99.94%)、毛两面针素(质量分数为 99.91%)、白鲜碱(质量分数为 99.98%)、盐酸巴马汀(质量分数为 98.75%)、盐酸药根碱(质量分数为 99.50%)、木兰花碱(质量分数为 99.82%)、橙皮苷(质量分数为 98.88%)均购自成都曼思特生物科技有限公司,批号依次为 MUST-22111707、MUST-22032004、MUST-21101002、MUST-23022212、MUST-21101701、MUST-22121906、MUST-22100807、MUST-21022604、MUST-23022212、MUST-22020816、MUST-21042811;对照品茵芋碱(质量分数为 99.62%)、盐酸四氢巴马汀(质量分数为 99.97%)、飞龙掌血素(质量分数为 99.50%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司,批号分别为 PRF10081202、PRF21102042、PRF20082821;去甲乌药碱对照品(质量分数为 97.00%,批号 Y-115-150716)购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.5 仪器

RE-5205 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Alpha 2-4 LSCbasic 型冰冻干燥机(德国 Main Christ 公司);MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(三洋电机株式会社);CK40 型倒置显微镜(奥林巴斯株式会社);SW-CJ-1FD 型垂直净化工作台(苏州净化设备有限公司);ST16R 型低温离心机、Multiskan Sky 全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司);MH-2 型微型振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司);SL01-1 型游标卡尺(德清盛泰芯电子科技有限公司)。UPLC-H CLASS 超快速液相色谱、XEVO-G2 S qtof 四极杆飞行时间质谱、Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ 真空离心浓缩仪、Masslynx 质谱数据采集软件(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 入山虎不同提取部位的制备

取入山虎根、茎粗粉 8.5 kg 于渗漉筒铺平,加入 10 倍量 0.8% 稀盐酸,浸渍 3 d,渗漉,收集提取液,合并,加入氨水调节 pH 至 10,抽滤得到生物碱沉淀,同时将滤液减压浓缩,再用三氯甲烷根据生物碱的脂溶性将其萃取到氯仿层中,得到氯仿部位(总生物碱提取物)。

取 8.5 kg 入山虎根、茎粗粉用 10 倍量 70% 乙醇同法渗漉,浓缩,得乙醇总提取物浸膏。按 1:2 向乙醇总提取物浸膏中加入蒸馏水混悬,依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇对混悬液萃取,浓缩,即得石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位以及水部位的提取物。

2.2 入山虎不同提取部位的体外抗 RA 活性研究

2.2.1 MTT 检测 MH7A 细胞增殖活性 取对数生长期的 MH7A 细胞,以 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,待细胞贴壁生长 24 h 后,给药组分别加入不同质量浓度的氯仿提取液(终质量浓度为 25.000 0、12.500 0、6.250 0、3.125 0、1.562 5、0.781 3、0.390 6 mg/mL),石油醚、水部位提取液(终质量浓度为 6.250 0、3.125 0、1.562 5、0.781 3、0.390 6、0.195 3、0.097 7 mg/mL),醋酸乙酯部位提取液(终质量浓度为 12.500 0、6.250 0、3.125 0、1.562 5、0.781 3、0.390 6、0.195 3 mg/mL),正丁醇部位提取液(终质量浓度为 3.125 0、1.562 5、0.781 3、0.390 6、0.195 3、0.097 7、0.048 8 mg/mL),同时设置阴性对照组(有细胞、培养基、无药物)以及空白组(仅有培养基),每组 6 个复孔,继续培养 24 h 后,弃去培养液,每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL),继续孵育 4 h 后,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡摇匀 10 min,于 570 nm 处检测各组的吸光度(A)值,计算细胞的增殖抑制率和半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)。实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.2 ELISA 检测 MH7A 细胞上清液中炎症因子含量 取对数生长期的 MH7A 细胞,以 5×10^4 个/mL 接种在 24 孔板上,每孔 500 μ L,待 24 h 细胞贴壁,分别加入含有入山虎氯仿、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位、MTX 的培养基(质量浓度分别为 IC₅₀ 的 1/2、1/4、1/8),空白组、模型组加入等体积的完全培养基,再加入 TNF- α (终质量浓度为 20 ng/mL),干预 24 h,收集细胞上清液,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。按照试剂盒说明书测定

上清液中 IL-6、IL-17A 和 IL-1 β 的含量。

2.3 入山虎不同提取部位的体内抗 RA 活性研究

2.3.1 动物模型的构建、分组与给药 按照参考文献方法^[15-17], 取 96 只 SD 雄性大鼠, 适应性饲养 7 d 后, 随机分成空白组、模型组、MTX (0.5 mg/kg, 2 次/周) 组、氯仿部位 (6 g/kg, 1 次/d) 组、石油醚部位 (6 g/kg, 1 次/d) 组、醋酸乙酯部位 (6 g/kg, 1 次/d) 组、正丁醇部位 (6 g/kg, 1 次/d) 组、水部位 (6 g/kg, 1 次/d) 组。除空白组, 其余组大鼠右后足趾部皮内注射完全弗氏佐剂 0.2 mL 致炎。造模成功后, 空白组和模型组 ig 0.5% CMC-Na 水溶液, 其余组连续 22 d ig 相应药物。

2.3.2 观测指标

(1) 体质量变化: 每 4 天测定每只大鼠的体质量, 并记录。

(2) 全身评分: 造模成功后观察并记录各组大鼠后足关节病变程度, 每 4 天进行 1 次全身评分, 每只大鼠评分为 0~8 分, 评分标准见表 1。

(3) 关节炎指数测定: 造模成功后观察并记录各组大鼠后足关节病变程度, 每 4 天进行 1 次关节炎评分。每只大鼠的关节炎指数评分为单只大鼠后足关节炎评分乘以 4, 评分标准见表 2。

(4) RA 大鼠足趾肿胀度测定: 用游标卡尺测量全部大鼠右后足厚度, 分别在注射佐剂前及造模成功后每 4 天进行测量, 计算肿胀度。

肿胀度=造模后足趾厚度-造模前足趾厚度

(5) 脏器系数的测定: 末次 ig 给药后 24 h, ip 20% 乌拉坦溶液, 随后颈椎脱臼处死大鼠, 快速取出大鼠的脏器, 称定质量, 并计算脏器指数。

脏器指数=脏器质量/体质量

表 1 全身评分项目及标准

Table 1 Items and standards of whole body score

项目	评分标准
耳	无结节和发红=0, 1 只耳结节和发红=1, 2 只耳结节和发红=2
鼻	无结缔组织肿胀=0, 结缔组织肿胀=1
尾	无结节=0, 有结节=1
前足爪	无肿胀=0, 1 个足爪肿胀=1, 2 个足爪肿胀=2
后足爪	无肿胀=0, 1 个足爪肿胀=1, 2 个足爪肿胀=2

表 2 关节炎指数评分标准

Table 2 Items and standards of arthritis score

评分标准	评分
正常, 无症状	0
踝或腕关节出现轻微肿胀或少量红斑	1
踝及腕关节出现轻微肿胀、少量红斑	2
踝关节至跖骨处或掌关节出现中度肿胀、较多的红斑	3
踝关节至跖骨出现严重的肿胀和大量的红斑	4

(6) 组织病理学观察: 颈椎脱臼处死大鼠后, 分离右足踝关节部位, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察并拍照。

(7) ELISA 法检测 RA 大鼠血清中炎症因子含量: 大鼠 ip 20% 乌拉坦 (1 g/kg), 随后颈椎脱臼处死大鼠, 腹主动脉取血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 IL-1 β 、IL-17A、IL-6、IL-4、IL-10 含量。

2.3.3 统计学分析 利用 Excel 2019 对实验所得数据进行初步整理, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 24.0 进行各组之间差异性的比较, 两组样本的比较采用 t 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析。利用 GraphPad Prism 7.0 进行图片绘制。

2.4 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析入山虎提取物的化学成分

考虑到石油醚提取物大多数是低极性成分, 主要为长链脂肪烃等成分, 活性成分可能较少; 水提取物大多是极性大的维生素、氨基酸等成分, 活性成分可能也较少, 同时因正丁醇、醋酸乙酯、氯仿提取物在体内外具有良好的抗 RA 活性, 且极性中等, 因此选择正丁醇、醋酸乙酯、氯仿的提取物进行定性分析。

2.4.1 待测样品的处理 取入山虎正丁醇、醋酸乙酯、氯仿提取物的浸膏 1.0 g, 加入 20 mL 甲醇溶解, 取 1 mL 加甲醇定容到 10 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。两面针碱、二氢白屈菜红碱、盐酸白屈菜红碱、盐酸血根碱、花椒碱、毛两面针素、白鲜碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、木兰花碱、茵芋碱、盐酸四氢巴马汀、飞龙掌血素、去甲乌药碱对照品均用甲醇配成 100 $\mu\text{g/mL}$ 对照品储备液, 取对照品储备液用甲醇稀释制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液, 即可。

2.4.2 色谱和质谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~25 min, 98%~55% A; 25~32 min, 55%~10% A; 32~32.1 min, 10%~98% A; 32.1~35 min, 98% A; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1.0 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱分析采用 Waters 电喷雾离子源的四极杆飞行时间质谱分析仪。正离子源碰撞电压分别为 3 kV; 离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 样品锥孔电压 40 kV; 萃取锥孔电压 4 kV; 锥孔气体积流量 50 L/h; 溶媒挥发体积流量 600 L/h; 扫描范围 m/z 100~1200; 低碰撞能量 10 eV; 高碰撞能量

30 eV。采用 MSE Continuum 扫描模式（非数据依赖扫描模式）对化合物进行鉴定。液质系统、数据采集、定量处理由 Masslynx 4.1 软件控制。

2.4.3 化合物定性 通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 平台采集得到原始数据，采用 Progenesis QI 软件对原始数据进行导入、峰对齐、峰提取、归一化处理，最终形成保留时间、质荷比和峰强度的化合物库，通过加氢和加钠等均去卷积到每个离子特征。对一级质谱数据分析得到可能的分子式和候选化合物，通过二级质谱碎片，结合对照品的裂解规律及相关裂解途径，文献资料、质谱数据库推导可能的骨架结构，及已报道的同科同属两面针化学成分相关研究推导最终的分子结构。

2.4.4 入山虎不同提取物化学成分差异分析 将入山虎不同提取物（每个提取物重复 6 个样品）中的峰面积数据进行收集，以质谱离子流图中峰的响应强度值作为相对定量的原数据。帕莱托换算（Paerto Scaling）是代谢组学中常用的换算方法，本研究采用帕莱托换算对原数据进行数据标度换算，将定量数据提交在线软件 Metaboanalyst 5.0 进行聚类分析并绘制热图，以直观分析入山虎不同提取物间化学成分的含量差异。

2.5 高效液相法测定化合物含量

2.5.1 色谱条件 Welch Ultimate XB C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈（A）-水（B）溶液（含 0.2%甲酸、0.25%三乙胺）为流动相进行梯度洗脱：0~5 min，15% A；5~10 min，15%~20% A；10~25 min，20%~35% A；25~35 min，

35%~60% A；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL；检测波长 271 nm。

2.5.2 混合对照品的制备 精密称取木兰花碱、橙皮苷、两面针碱对照品适量，用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色量瓶中，制成质量浓度分别为 0.816 0、0.898 0、0.202 0 mg/mL 的混合对照品溶液。并稀释得到木兰花碱的质量浓度分别为 0.816 0、0.326 4、0.130 6、0.052 2、0.020 9 mg/mL，橙皮苷的质量浓度分别为 0.898 0、0.143 7、0.057 5、0.023 0、0.009 2 mg/mL，两面针碱的质量浓度分别为 0.202 0、0.080 8、0.032 3、0.012 9、0.005 2 mg/mL 的一系列混合对照品溶液，按上述色谱条件进样分析。

2.5.3 供试品溶液的制备 取入山虎水部位提取物约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL 超声溶解，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，按上述色谱条件进样分析。

3 结果

3.1 入山虎不同提取部位的体外抗 RA 活性

3.1.1 入山虎不同提取部位对 MH7A 细胞增殖的影响 如图 1 所示，入山虎的不同提取部位对 MH7A 细胞均有抑制增殖的作用，氯仿、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位的 IC₅₀ 分别为（6.421 8±0.479 3）、（2.252 0±0.357 8）、（6.886 2±0.177 3）、（1.307 0±0.098 1）、（5.479 7±0.393 7）mg/mL，IC₅₀ 从大到小依次为醋酸乙酯、氯仿、水、石油醚、正丁醇部位。因入山虎不同提取部位 IC₅₀ 的 1/2、1/4、1/8 在一定质量浓度范围内随给药浓度的增加，细胞增殖率下降越明显，后续选择 IC₅₀ 的 1/2、1/4、1/8 进行实验。

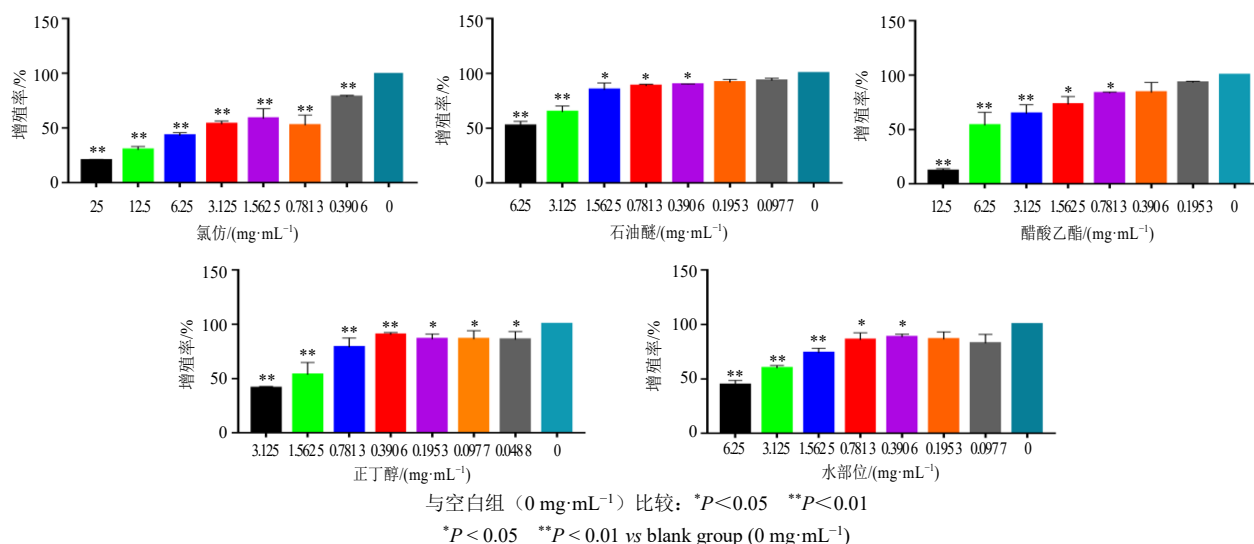


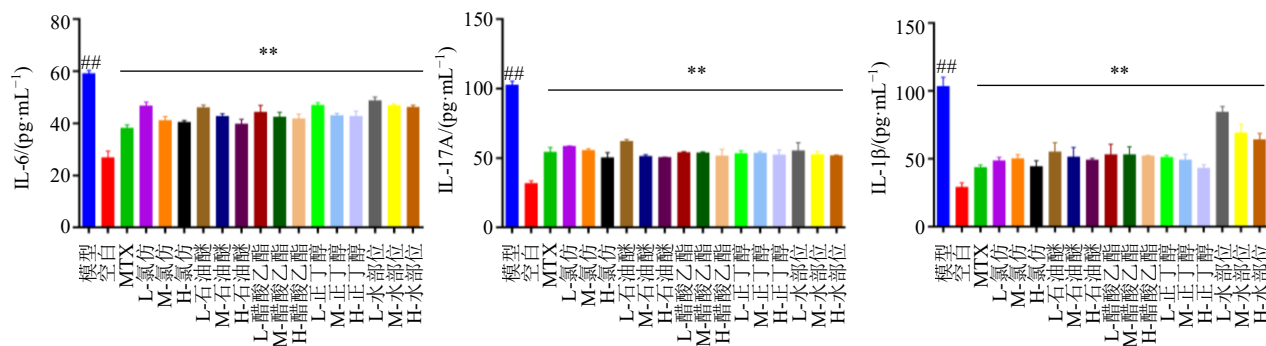
图 1 入山虎不同提取部位对 MH7A 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on proliferation of MH7A cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.2 入山虎不同提取部位对 MH7A 细胞上清液中炎症因子含量的影响 如图 2 所示,在炎症因子 TNF- α 的刺激下,与空白组比较,模型组 IL-6、IL-17A、IL-1 β 含量显著升高 ($P<0.01$); 用入山虎不同提取部位干预后,与模型组比较,不同质量浓度的氯仿及石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位组 IL-6、IL-17A、IL-1 β 含量均显著减少 ($P<0.01$)。

3.2 入山虎不同提取部位的体内抗 RA 作用

3.2.1 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠体质量的影响 如图 3 所示,模型组以及入山虎不同提取部位的大鼠体质量均低于空白组 ($P<0.05$ 、 0.01),但入山虎各组大鼠体质量均呈现增长的趋势,大鼠体质量也比较接近,提示入山虎不同提取部位对 RA 大鼠的体质量增长有一定的促进作用。

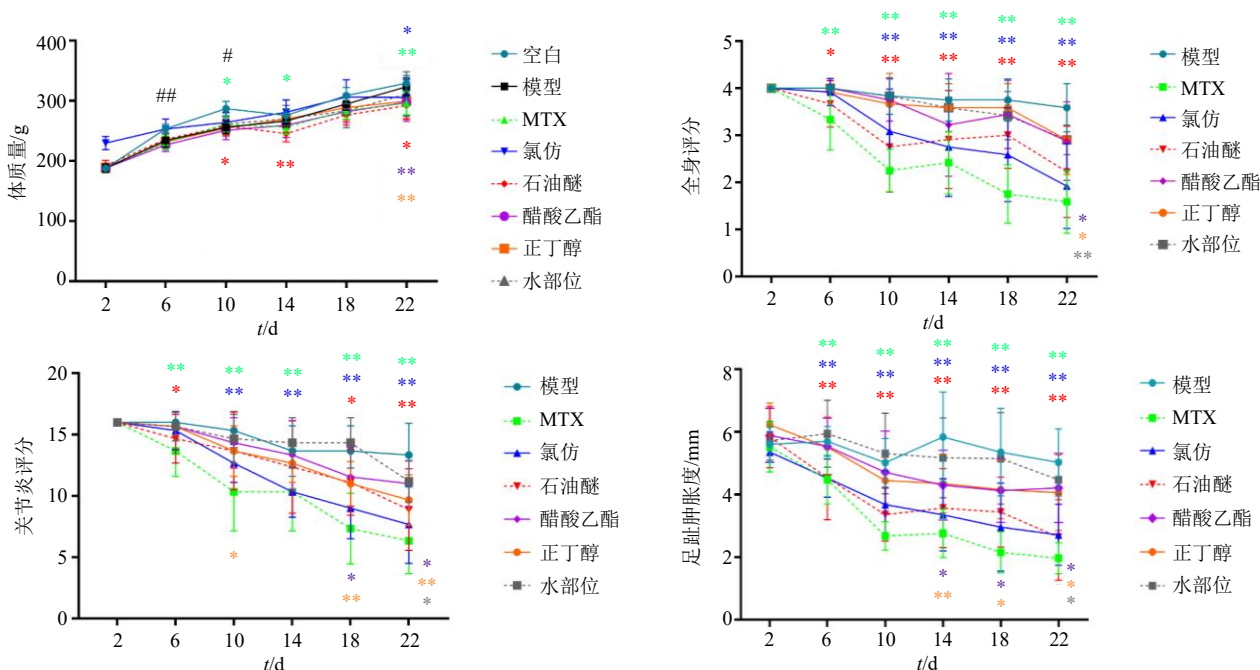


与空白组比较: ## $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$; L、M、H 分别代表低、中、高剂量组,分别为 IC₅₀ 的 1/8、1/4、1/2

$P<0.01$ vs blank group; ** $P<0.01$ vs model group; L, M and H represent low-, medium- and high-dose groups, which are 1/8, 1/4 and 1/2 of IC₅₀, respectively

图 2 入山虎不同提取部位对 MH7A 细胞上清液中炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on levels of inflammatory factors in supernatant of MH7A cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)



与空白组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下图同

$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs blank group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as below figures

图 3 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠体质量、全身评分、关节炎评分和足趾肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 3 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on body weight, whole body score, arthritis score and toe swelling degree of RA rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

3.2.2 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠全身评分的影响 MTX 组、石油醚组在 6 d 后全身评分均明显低于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)，氯仿组大鼠在 10 d 后全身评分均显著低于模型组 ($P < 0.01$)，在 18~22 d，入山虎不同提取部位组的大鼠全身评分均低于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)，全身评分的分数由低到高依次为氯仿组、石油醚、醋酸乙酯、水部位、正丁醇组，见图 3。

3.2.3 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠关节炎指数 与模型组比较，MTX 组在 6 d 后大鼠的关节炎评分显著降低 ($P < 0.01$)，氯仿组在 10 d 后大鼠的关节炎评分显著降低 ($P < 0.01$)，石油醚组、醋酸乙酯组、正丁醇组在 18 d 后，能够缓解 RA 大鼠的关节炎症状，明显降低了大鼠的关节炎评分 ($P < 0.05$ 、 0.01)。水部位组的 RA 大鼠关节炎症状在 22 d 也有改善 ($P < 0.05$)。关节炎指数评分由低到高依次为氯仿组、石油醚组、正丁醇组、醋酸乙酯组、水部位组，见图 3。

3.2.4 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠足趾肿胀度 的影响 采用完全弗氏佐剂在右后足趾皮内注射造模后，右后足趾开始逐渐变红、肿胀明显，在造模

3、4 d 左右达到峰值，脚趾关节间及前足趾出现关节肿大，触及关节大鼠呈现疼痛反射，后肢伸屈不利，睡眠时右足趾不着地。在 6 d 后 MTX 组、氯仿组、石油醚组的 RA 大鼠肿胀度均明显小于模型组 ($P < 0.01$)。在 14 d 后，醋酸乙酯组、正丁醇组的 RA 大鼠的肿胀度显著低于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)，而水部位组的 RA 大鼠在 22 d 后其右足趾肿胀度也有所改善，且低于模型组 ($P < 0.05$)。足趾肿胀度由低到高依次为石油醚组、氯仿组、正丁醇组、水部位组、醋酸乙酯组，见图 3。

3.2.5 入山虎不同部位对 RA 大鼠脏器指数的影响 如图 4 所示，与空白组比较，模型组的脾脏指数和肝脏指数显著增高 ($P < 0.01$)，表现出一定的免疫亢进。与模型组比较，氯仿、石油醚、正丁醇、水提取部位组和 MTX 组均能够降低 RA 大鼠的脾脏、肝脏指数 ($P < 0.05$ 、 0.01)。醋酸乙酯组也具有降低 RA 大鼠的脾脏指数和肝脏指数的趋势，但无显著性差异。

3.2.6 入山虎不同部位对 RA 大鼠踝关节病理的影响 如图 5 所示，空白组大鼠关节软骨平整，关节腔内干净，滑膜细胞及结缔组织未见增生，未见明

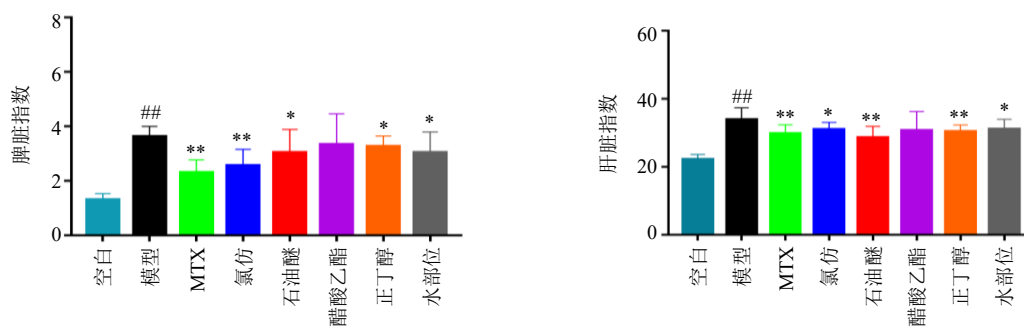


图 4 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠脾脏和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 4 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on spleen and liver index of RA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

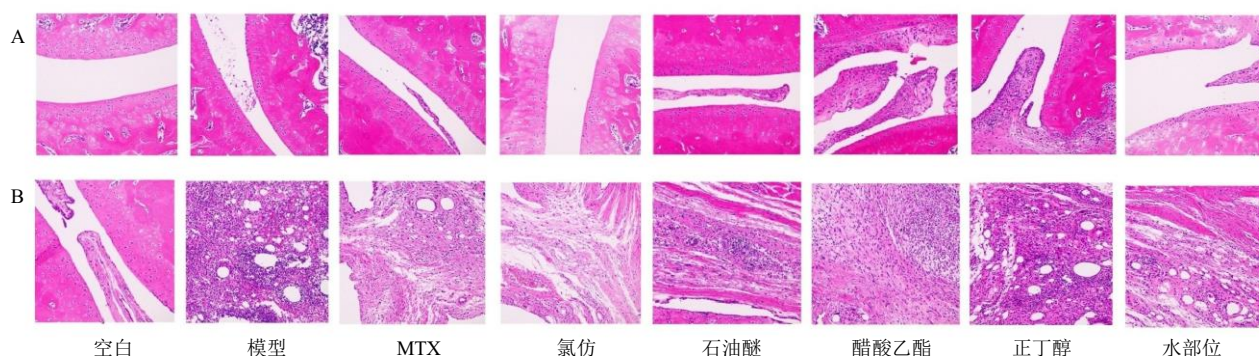


图 5 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠踝关节 (A) 及滑膜组织 (B) 病理变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 5 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on pathological changes of ankle joint (A) and synovial tissue (B) in RA rats (HE, $\times 100$)

显异常。模型组大鼠踝关节结缔组织增生、可见被结缔组织包裹的巨噬细胞团，局部关节软骨损伤、可见一定量的结缔组织增生，大量的炎性细胞浸润，滑膜增生。ig 入山虎不同提取物后，上述病理改变均得到不同程度的改善，尤其以氯仿组效果最为明显。表明入山虎不同提取物具有良好的改善 RA 模型大鼠踝关节组织病变的作用，即具有较好的抗 RA 作用。

3.2.7 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠血清中致炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17A 水平的影响 如图 6 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 的含量明显提高 ($P<0.01$)；与模型组比较，

MTX 组以及入山虎的不同提取部位组能够减少 RA 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 的含量 ($P<0.01$)。

3.2.8 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠血清中抗炎因子 IL-4 和 IL-10 水平的影响 如图 7 所示，与空白组比较，模型组大鼠血清中 IL-4、IL-10 的含量明显降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，入山虎提取部位中氯仿组以及 MTX 组的 IL-4 的含量均显著升高 ($P<0.01$)，石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位组的 IL-4 的含量也有升高，但是差异不具有统计学意义。入山虎的不同提取部位组均能够升高 RA 大鼠血清中的 IL-10 的含量 ($P<0.01$)。其中，氯仿组 IL-4、IL-10 的含量与 MTX 组相当。

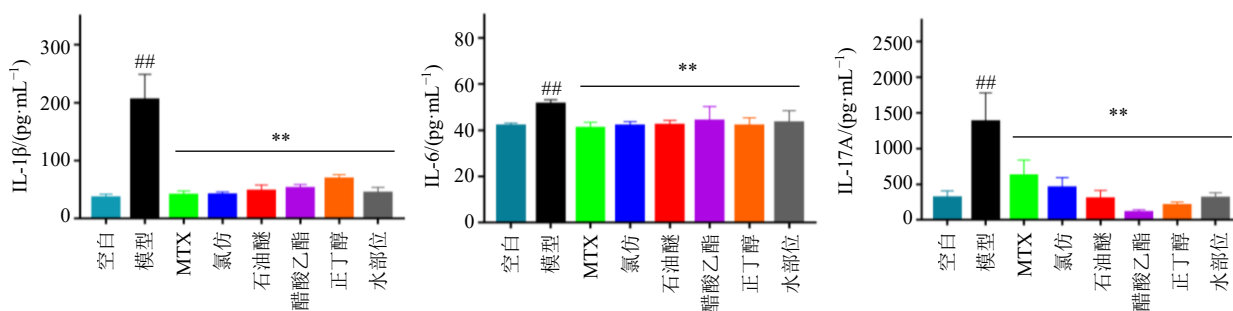


图 6 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 IL-17A 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 6 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on IL-1 β , IL-6 and IL-17A levels in serum of RA rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

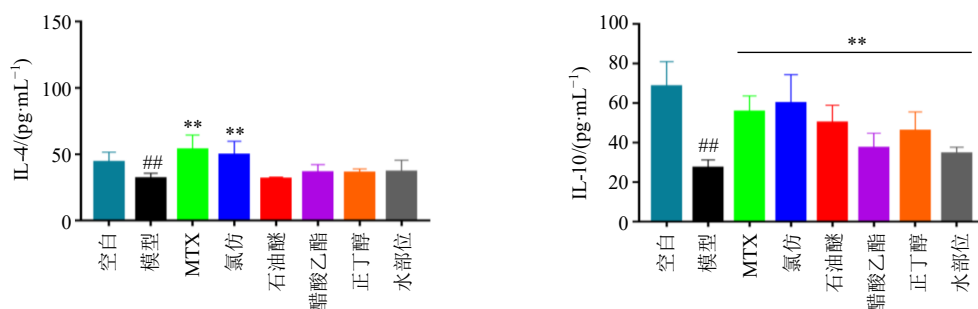


图 7 入山虎不同提取部位对 RA 大鼠血清中 IL-4 和 IL-10 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 7 Effect of different extracts of *Z. nitidum* var. *tomentosum* on IL-4 and IL-10 levels in serum of RA rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

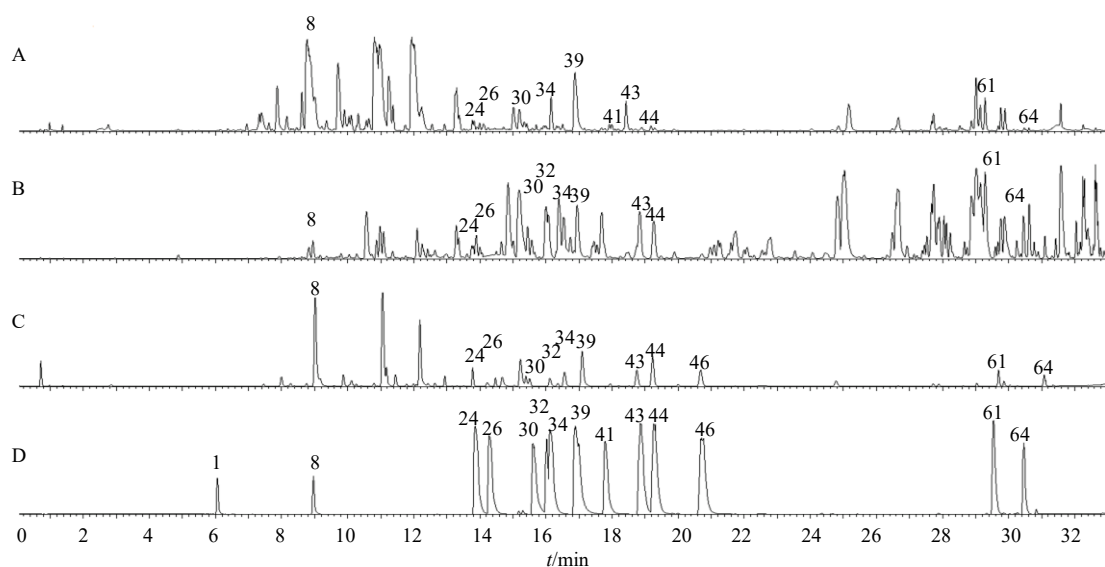
3.3 入山虎提取部位的化学成分分析

参考两面针药材化学成分分析相关文献报道^[36]，本实验选择正离子模式进行分析，得到混合对照品及提取物的一级质谱基峰图，见图 8。结合对照品图谱中的保留时间、准分子离子、二级碎片离子信息、裂解规律，以及相关文献报道^[37-56]，最终初步筛选得到入山虎化合物 69 个，初步鉴定结构 55 个，未知 14 个。鉴定结果见表 3，入山虎提取的化学成分比较相近，主要以生物碱类的成分居多，包括咪唑啉类、苄基异喹啉类、原小檗碱类、阿朴啡类、

苯并菲啶类、酰胺类等生物碱以及黄酮、香豆素等其他化合物。

3.4 入山虎不同提取物化学成分差异分析结果

聚类热图(图 9)显示，入山虎不同提取物的化学成分含量具有显著差异，而不同提取物的重复样品内的化学成分含量相似。结果显示，68 个化合物可以明显地聚类成 2 个大类群。同时每个大类群又聚类成 2 个亚群。来自于大类群 I 中的 2 个亚群的化合物在醋酸乙酯提取物组的含量显著高于氯仿和正丁醇组，氯仿组最低，同时 2 个亚群的代谢物又



A、B、C 依次为正丁醇、醋酸乙酯、氯仿提取部位，D 为混合对照品

A, B, C are *n*-butanol, ethyl acetate and chloroform extraction parts, respectively, D is mixed standard

图 8 入山虎提取物和混合对照品的一级质谱基峰图

Fig. 8 Primary mass spectra of extract of *Z. nitidum* var. *tomentosum* and mixed reference substance

表 3 入山虎提取物的化学成分 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴别结果

Table 3 Identification of chemical constituents in extract of *Z. nitidum* var. *tomentosum* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R / min	准分子 离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	主要碎片离子 (m/z)	类别	来源
1	6.06	M+H	272.128 8	272.128 6	0.2	$C_{16}H_{17}NO_3$	去甲乌药碱 [△]	272.128 8, 255.100 9, 107.047 6, 161.060 3	9, 苄基异喹啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
2	6.96	M+H	193.094 1	193.097 1	-3.0	$C_{10}H_{12}N_2O_2$	4-methoxycinnamic acid hydrazide [△]	161.066 5, 133.069 5	1, 苯丙烷类	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
3	7.35	M+H	476.248 8	476.227 2	21.6	$C_{25}H_{33}NO_8$	3'-glucosyl-6,7-dimethoxyl- <i>N</i> -methylbenzyltetrahydroisoquinoline [△]	314.189 7, 177.063 1	8, 苄基异喹啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
4	7.45	M+H	203.162 7	203.162 0	0.7	$C_7H_{18}N_6O$	未知	144.085 3, 115.059 7, 203.162 7	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
5	7.92	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	轮环藤酚碱	192.108 6, 177.087 6, 148.081 9	9, 原小檗碱类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
6	8.16	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	轮环藤酚碱异构体	192.108 6, 177.087 6, 148.081 9	9, 原小檗碱类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
7	8.67	M+H	344.185 7	344.186 1	-0.4	$C_{20}H_{26}NO_4$	tembetarine or isomer [△]	344.198 8, 175.083 7, 299.140 6	6, 苄基异喹啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
8	8.92	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	木兰花碱 [△]	342.170 1, 265.086 4	7, 阿朴啡类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
9	9.08	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	木兰花碱异构体	342.170 1, 265.086 4, 177.084 9	7, 阿朴啡类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
10	9.37	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	轮环藤酚碱异构体	177.060 4, 117.039 2, 369.132 4	0, 原小檗碱类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
11	9.79	M+H	342.170 1	342.170 5	-0.4	$C_{20}H_{24}NO_4$	木兰花碱异构体	342.185 9, 265.095 8, 205.071 7	2, 阿朴啡类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
12	9.97	M+H	314.175 4	314.175 6	-0.2	$C_{19}H_{24}NO_3$	木兰箭毒碱	314.189 7, 269.129 0, 189.100 0	5, 苄基异喹啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
13	10.06	M+H	358.201 2	358.201 8	-0.6	$C_{21}H_{28}NO_4$	<i>N</i> -methylpalaudinium [△]	358.214 2, 249.122 1, 189.100 0	0, 苄基异喹啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
14	10.12	M+H	249.122 1	249.123 3	-1.2	$C_{13}H_{16}N_2O_3$	未知	249.122 1, 128.066 0, 187.082 2	7, 酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物

续表 3

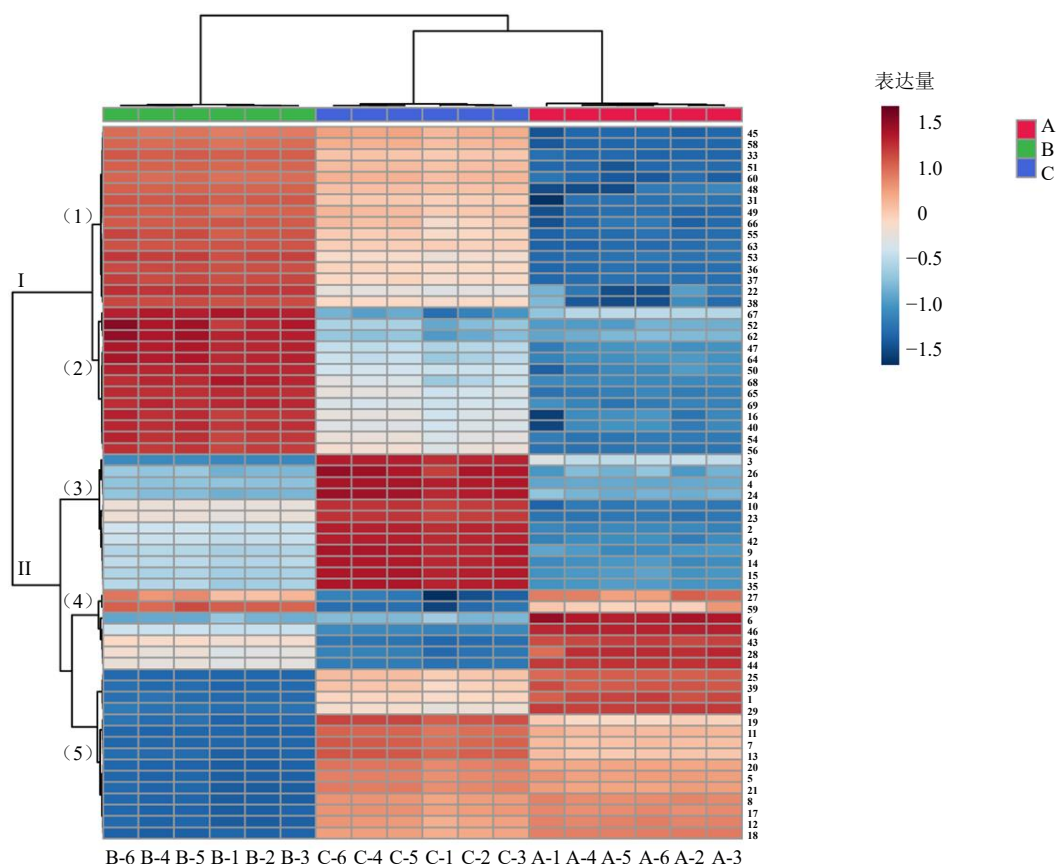
峰号	t_R / min	准分子 离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	主要碎片离子 (m/z)	类别	来源
15	10.33	M+H	249.122 1	249.123 3	-1.2	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₃	未知	249.122 1, 192.108 6, 187.082 2, 115.059 7, 128.066 0	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
16	10.57	M+H	200.128 2	200.128 1	0.1	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	未知	200.137 8, 154.128 5, 182.125 2	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
17	10.70	M+H	340.154 4	340.154 8	-0.4	C ₂₀ H ₂₂ NO ₄	未知	190.094 6, 340.167 5, 阿朴啡类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
18	10.97	M+H	356.185 7	356.186 1	-0.4	C ₂₀ H ₂₂ NO ₅	menisperine or isomer [△]	356.203 2, 279.112 8, 阿朴啡类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
19	11.05	M+H	344.185 7	344.186 1	-0.4	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	tembetarine or isomer [△]	344.198 8, 137.064 6, 苜蓿异喹啉类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
20	11.32	M+H	328.188 0	328.191 2	-3.2	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	4'-hydroxy-6,7-dimethoxy- <i>N,N</i> -dimethyltetrahydroisoquinoline [△]	328.205 2, 121.069 1, 苜蓿异喹啉类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
21	12.07	M+H	356.185 6	356.186 1	-0.5	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	menisperine or isomer [△]	280.122 2, 356.199 3, 阿朴啡类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
22	12.25	M+H	356.185 6	356.186 1	-0.5	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	menisperine or isomer [△]	311.139 5, 265.095 8, 296.118 8	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
23	13.29	M+H	611.220 9	611.197 5	23.4	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷	192.108 6, 356.199 3, 阿朴啡类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
24	13.86	M+H	356.186 0	356.186 1	-0.1	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	四氢巴马汀 [▲]	177.084 9, 246.085 8	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
25	14.17	M+H	322.107 6	322.107 9	-0.3	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	小檗碱 [△]	611.220 9, 465.159 1, 黄酮类	—	醋酸乙酯、正丁醇提取物
26	14.27	M+H	338.139 6	338.139 2	0.4	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	药根碱 [▲]	449.159 8, 344.198 8, 303.096 2	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
27	15.03	M+H	276.065 9	276.066 0	-0.1	C ₁₇ H ₉ NO ₃	鹅掌楸碱	192.104 4, 356.190 8, 原小檗碱类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
28	15.22	M+H	206.089 8	206.088 3	1.5	C ₅ H ₁₁ N ₅ O ₄	未知	176.072 2, 165.092 2	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
29	15.31	M+H	334.107 5	334.107 9	-0.4	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	dihydroavicine [△]	307.095 7, 322.120 7, 原小檗碱类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
30	15.61	M+H	332.093 9	332.092 2	1.7	C ₂₀ H ₁₄ NO ₄	血根碱 [▲]	279.099 1	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
31	16.01	M+H	262.180 1	262.191 9	-11.8	C ₁₅ H ₂₄ N ₃ O	未知	338.139 6, 322.105 7, 原小檗碱类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
32	16.02	M+H	309.135 8	309.133 8	2.0	C ₁₆ H ₂₀ O ₆	毛两面针素 [▲]	294.111 8, 280.095 1	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
33	16.08	M+H	264.195 6	264.196 3	-0.7	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	hydroxy- α -sanshool isomer [△]	276.078 5, 190.07 20, 阿朴啡类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
34	16.12	M+H	352.155 1	352.154 8	0.3	C ₂₁ H ₂₂ NO	巴马汀 [▲]	218.068 0	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
35	16.24	M+H	504.259 6	504.259 7	-0.1	C ₂₇ H ₃₇ NO ₈	未知	206.089 8, 191.066 3, 162.062 7	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
36	16.40	M+H	264.195 6	264.196 3	-0.7	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	hydroxy- α -sanshool isomer [△]	334.118 5, 319.094 3, 苯并菲啶类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
37	16.55	M+H	264.195 6	264.196 3	-0.7	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	羟基- α -山椒素	291.101 4, 206.089 8	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
38	16.75	M+H	280.190 8	280.200 9	-10.1	—	未知	332.093 9, 274.086 7, 苯并菲啶类生物碱	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
39	16.96	M+H	348.123 3	348.123 5	-0.2	C ₂₁ H ₁₈ NO ₄	两面针碱 [▲]	317.068 7, 304.094 5	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
40	17.70	M+H	234.157 9	234.160 0	-2.1	C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O	未知	128.066 0, 262.191 9, 182.125 2, 189.097 2	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
41	17.79	M+H	348.123 3	348.123 5	-0.2	C ₂₁ H ₁₈ NO ₄	白屈菜红碱 [▲]	309.135 8, 205.049 5, 香豆素类	—	醋酸乙酯、正丁醇提取物
42	18.49	M+H	588.295 6	588.259 7	35.9	C ₃₄ H ₃₇ NO ₈	buesgenine [△]	235.058 4, 219.064 4	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
43	18.87	M+H	260.092 8	260.092 3	0.5	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	茵芋碱 [▲]	264.207 0	—	酰胺类生物碱

续表 3

峰号	t_R / min	准分子 离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	主要碎片离子 (m/z)	类别	来源
44	19.28	M+H	230.081 4	230.081 2	0.3	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	花椒碱 [▲]	200.034 9, 230.084 3, 215.060 9, 172.039 1, 186.055 1	3, 咪唑啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
45	19.89	M+H	285.100 2	286.098 0	-997.8	C ₁₈ H ₁₁ N ₃ O	7,8-dehydrorutaecarpine or isomer [△]	286.119 9, 271.093 0	咪唑啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
46	20.73	M+H	200.070 8	200.070 6	0.2	C ₁₂ H ₉ NO ₂	白鲜碱 [▲]	185.048 9, 200.072 5	咪唑啉类生物碱	氯仿提取物
47	21.21	M+H	312.159 7	312.159 9	-0.2	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	ailanthamide [△]	147.050 3, 312.172 6, 135.085 8, 166.130 8	6, 酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
48	21.75	M+H	246.185 3	246.185 2	0.1	C ₁₆ H ₂₃ NO	未知	246.194 9, 105.073 3, 145.106 4, 147.122 3	—	醋酸乙酯、正丁醇提取物
49	21.99	M+H	382.128 6	382.129 0	-0.4	C ₂₁ H ₁₉ NO ₆	arnottianamide [△]	364.133 0, 382.144 1, 292.083 3, 277.058 5	1, 苯并菲啶类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
50	22.79	M+H	264.195 6	264.196 3	-0.7	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	hydroxy- α -sanshool isomer [△]	or 264.207 0	酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
51	24.84	M+H	308.190 4	308.128 6	61.8	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃	<i>N</i> -acetylanonaine [△]	134.065 1, 308.190 4, 116.054 0, 144.087 8	4, 阿朴啡类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
52	25.10	M+H	320.092 0	320.092 2	-0.2	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	coptisine [△]	305.080 2, 277.082 4, 320.104 0, 248.080 0, 219.075 4	4, 原小檗碱类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
53	26.49	M+H	318.123 8	318.076 6	47.2	C ₁₉ H ₁₁ NO ₄	noravicine [△]	318.137 4, 302.103 1	苯并菲啶类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
54	26.67	M+H	288.113 2	288.113 6	-0.4	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	rutaecarpine [△]	288.124 0, 273.101 4, 244.096 4	4, 咪唑啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
55	27.72	M+H	383.128 8	383.128 3	0.5	C ₂₅ H ₁₈ O ₄	未知	383.128 8, 135.050 2, 365.117 6, 165.061 7, 334.096 0	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
56	27.91	M+H	286.097 8	286.098 0	-0.2	C ₁₈ H ₁₁ N ₃ O	7,8-dehydrorutaecarpine or isomer [△]	286.109 5, 257.104 3, 167.065 8	3, 咪唑啉类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
57	28.87	M+H	248.201 1	248.200 8	0.3	C ₁₆ H ₂₃ NO	sanshool or isomer [△]	248.212 1, 133.107 3, 149.139 6, 147.122 3, 154.128 5	3, 酰胺类生物碱	醋酸乙酯提取物
58	29.02	M+H	248.201 1	248.201 1	0.0	C ₁₆ H ₂₅ NO	sanshool or isomer [△]	248.212 1, 133.107 3, 149.139 6, 147.122 3, 154.128 5	3, 酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
59	29.15	M+H	248.201 1	248.201 1	0.0	C ₁₆ H ₂₅ NO	sanshool or isomer [△]	248.212 1, 133.107 3, 149.139 6, 147.122 3, 154.128 5	3, 酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
60	29.29	M+H	288.172 6	288.171 2	1.4	C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₂	sanshool or isomer [△]	232.108 4, 201.088 4, 159.075 6, 174.099 5, 288.172 6	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
61	29.52	M+H	275.128 8	275.128 3	0.5	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	飞龙掌血素 [▲]	275.131 1, 217.049 0, 205.049 5, 161.060 3	0, 香豆素类	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
62	29.78	M+H	334.107 8	334.107 9	-0.1	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	去-N-甲基白屈菜红碱	334.122 2, 318.089 9, 290.093 3, 276.078 5	9, 苯并菲啶类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
63	29.87	M+H	262.216 8	262.180 7	36.1	C ₁₆ H ₂₃ NO ₂	hydroxy- α -sanshool isomer [△]	or 262.228 4, 204.146 8, 188.113 6	8, 酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
64	30.47	M+H	350.139 0	350.139 2	-0.2	C ₂₁ H ₁₉ NO ₄	二氢白屈菜红碱 [▲]	334.106 8, 350.142 0, 290.083 0, 318.078 7	0, 苯并菲啶类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
65	30.63	M+H	252.245 3	252.244 0	1.3	C ₁₅ H ₂₉ N ₃	(5 <i>S</i>)-5-butyl-1-[(4-methyl- cyclohexyl)methyl]-4,5- dihydroimidazol-2-amine [△]	252.245 3, 227.137 9	酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
66	31.57	M+H	254.261 0	254.117 5	143.5	C ₁₆ H ₁₅ NO ₂	alatamide [△]	254.261 0, 198.194 3	酰胺类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
67	32.05	M+H	392.186 8	392.149 7	37.1	C ₂₃ H ₂₁ NO ₅	Dihydrocherythrinyl- acetaldehyde [△]	334.125 9, 392.209 9, 348.143 0, 360.180 5	9, 苯并菲啶类生物碱	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物
68	32.26	M+H	495.425 7	—	—	C ₃₀ H ₅₂ N ₆	未知	495.425 7, 348.143 0, 248.215 4	—	醋酸乙酯、正丁醇提取物
69	32.63	M+H	495.425 7	—	—	C ₃₀ H ₅₂ N ₆	未知	495.425 7, 348.143 0, 248.215 4	—	氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取物

▲代表经过对照品比对, △参考文献、数据库数据, 无标记表示无文献参考

▲ represents that after comparison of reference substances, △ references literature and database data, unmarked means no literature reference



A、B、C 依次为氯仿、醋酸乙酯、正丁醇提取部位

A, B, C are chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol extraction parts, respectively

图 9 入山虎提取物的聚类分析热图

Fig. 9 Cluster analysis heat map of extract of *Z. nitidum* var. *tomentosum*

存在一定差异,即醋酸乙酯提取物中 coptisine(52)、rutaecarpine(54)、去 *N*-甲基白屈菜红碱(62)、二氢白屈菜红碱(64)等的含量相对较高。而来自大类群 II 中亚群 3 的化合物在正丁醇提取物组中的含量显著高于氯仿和醋酸乙酯组,正丁醇提取物中的橙皮苷(23)、四氢巴马汀(24)、药根碱(26)等的含量相对较高。而亚群 4 的化合物在氯仿提取物组的含量显著高于正丁醇和醋酸乙酯组,亚群 5 的化合物在醋酸乙酯提取物组的含量显著低于氯仿和正丁醇组,氯仿提取物中的去甲乌药碱(1)、小檗红碱(25)、两面针碱(39)、茵芋碱(43)、白藜碱(46)、木兰花碱(8)等的含量相对较高。

3.5 入山虎化合物定量结果

由“3.4”项下入山虎不同提取物的化学成分差异分析结果可知,木兰花碱、橙皮苷、两面针碱在入山虎提取物中的含量相对较高,在高效液相色谱仪中也能够鉴定这个 3 个成分,因此,选择木兰花碱、橙皮苷、两面针碱进行定量测定。

3.5.1 方法学考察结果

(1) 线性考察:将混合对照品按“2.5.1”项下的色谱条件进样测定,记录木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的峰面积。以质量浓度为横坐标(X)、以峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得到木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的回归方程分别为 $Y=8\,006.3X+178\,659$, $R^2=0.999\,1$; $Y=9\,377.9X-151\,624$, $R^2=0.999\,1$; $Y=50\,224X-55\,478$, $R^2=0.999\,9$ 。结果表明,3 种成分在相应的质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

(2) 精密度考察:将入山虎供试品溶液按“2.5.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算木兰花碱、橙皮苷、两面针碱峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.62%、1.57%,表明仪器精密度良好。

(3) 稳定性考察:分别在 0、2、4、8、12、24 h 将入山虎供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样,计算木兰花碱、橙皮苷、两面针碱峰面积的 RSD 分别为 1.86%、0.91%、1.33%,表明供试品溶液在

24 h 内稳定性良好。

(4) 重复性考察：平行制备 6 份供试品溶液，按“2.5.1”项下色谱方法进样，计算木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的质量分数 RSD 分别为 2.39%、2.07%、2.62%，表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率考察：取入山虎供试品溶液 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，并精密加入等量的木兰花碱、橙皮苷、两面针碱对照品，按“2.5.1”项下色谱条件进样测定，计算木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的峰面积，木兰花碱、橙皮苷、两面针碱加样回收率为 95.00%~105.00%，RSD 分别为 2.23%、1.86%、2.16%，表明该方法的准确度良好。

3.5.2 定量结果 将混合对照品和供试品溶液按“2.5.1”项下色谱条件进样测定，计算木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的峰面积，HPLC 图谱见图 10。以质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得到木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的回归方程分别为 $Y=8\,006.3X+178\,659$, $R^2=0.999\,1$; $Y=9\,377.9X-151\,624$, $R^2=0.999\,1$; $Y=50\,224X-55\,478$, $R^2=0.999\,9$ 。根据回归方程计算得到木兰花碱、橙皮苷、两面针碱的质量分数分别为 $(2.992\,0\pm 0.024\,0)$ 、 $(4.253\,2\pm 0.045\,9)$ 、 $(0.965\,8\pm 0.001\,1)$ mg/g。橙皮苷含量较高，木兰花碱、两面针碱次之。

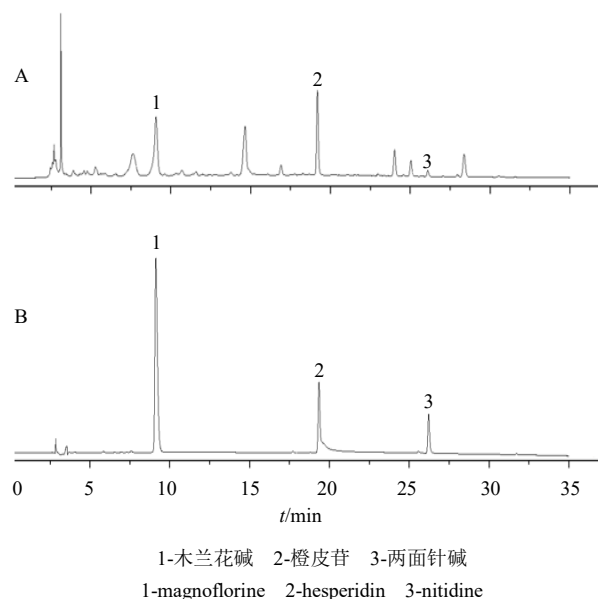


图 10 入山虎水部位提取物 (A) 和混合对照品 (B) 的高效液相图谱

Fig. 10 High performance liquid chromatogram of water extraction part of *Z. nitidum* var. *tomentosum* (A) and mixed standard (B)

4 讨论

研究表明，抑制 RA 成纤维样滑膜细胞的增生和炎症反应能够缓解 RA 的疼痛，同时，有效抑制炎症因子的分泌对 RA 治疗也具有重要意义^[18-19]。而 MH7A 滑膜纤维细胞是从 RA 患者的关节滑膜处提取得到，具有类似人 RA 成纤维样滑膜细胞的特点^[20]，增殖速度较快，可多次传代，可代替人 RA 成纤维样滑膜细胞用于 RA 的研究。因此，本研究采用入山虎的不同提取部位对 MH7A 细胞进行干预，考察其增殖活性和炎症因子的含量。结果显示，入山虎的氯仿、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水提取部位组均能够有效抑制 MH7A 细胞的增殖，从增殖抑制率上看，正丁醇部位的抑制率较好，氯仿、石油醚、水部位的效果比较接近，水部位次之。

采用 TNF- α 诱导 MH7A 细胞后，模型组炎症因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 含量增加，与文献报道一致，在炎症因子刺激下，滑膜成纤维细胞可以分泌其他相关的炎症因子，如 IL-1 β 、IL-17 等^[21-25]。还有研究表明，作为致炎因子的 IL-1 β 能够在 RA 滑膜组织中大量表达，同时还会诱导其他相关炎症因子的表达，加重 RA 的炎症反应^[26-27]。IL-6、IL-17A 等炎症因子能够促进 RA 滑膜细胞的增殖、迁移和侵袭，甚至诱导关节软骨侵蚀^[28-30]。在本研究中，入山虎不同提取部位可有效降低 TNF- α 诱导 MH7A 细胞分泌的炎症因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 的含量。

足肿胀程度和关节病理变化是评价抗 RA 药物治疗的重要指标^[31-33]。本研究参照文献^[15-17]中的造模方法，在大鼠的足跖部注射完全弗氏佐剂建立大鼠 RA 动物模型，造模后大鼠的全身评分 ≥ 4 、关节炎指数评分 ≥ 16 ，出现前足或后足关节红肿、踝关节明显肿胀，严重者还会出现拖行现象，与文献^[34-35]报道一致，视为造模成功。因此，本次研究中已成功造模，模型组大鼠的足跖肿胀度及全身评分、关节炎指数显著升高，且 HE 染色结果可以看出模型组结缔组织增生，有大量的炎性细胞浸润等现象，而 ig 给予入山虎的不同提取部位后，均可在不同程度上降低完全弗氏佐剂诱导的 RA 大鼠的足跖肿胀度、全身评分及关节炎评分，能改善大鼠踝关节组织的病理改变、降低脏器指数。对 RA 大鼠血清中的炎症因子进行测定，结果也提示入山虎的不同提取部位具有良好的抗 RA 作用，均能够减少炎症因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 的含量，升高抗炎因子 IL-10 的含量。其中，在体内实验中的全身评分、关节

炎指数评价中,以氯仿部位的效果相对较好,在 RA 大鼠血清的抗炎因子 IL-10 结果中,以氯仿部位的效果相对较好,同时氯仿部位还能升高抗炎因子 IL-4 的含量。而在体外实验中,入山虎不同提取物的炎症因子水平各组间结果相近,无统计学差异,以上结果提示氯仿部位可能是入山虎的抗 RA 的主要活性部位。

入山虎的化学成分、质量标志物相关研究报道比较少,在一定程度上制约了入山虎的临床应用与实验研究。本研究采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术对入山虎的正丁醇、醋酸乙酯、氯仿提取物进行化学成分分析,筛选得到化合物 69 个,初步鉴定结构 55 个,未知 14 个。结果可见,入山虎的提取物主要含有生物碱类成分,主要包括呋喃喹啉类、苜基异喹啉类、原小檗碱类、阿朴啡类、苯并菲啶类、酰胺类等生物碱,同时还含有黄酮类、香豆素等其他化合物。本研究未对入山虎总提取物进行抗 RA 活性研究,而化学成分鉴定可知,入山虎不同提取物均具有结构多样化的生物碱类成分,这些生物碱类成分可能是入山虎抗 RA 的活性成分。因此,其总提取物应具有更广泛的生物碱类成分,更具有一定的抗 RA 活性作用。而体内外实验结果提示,入山虎的氯仿部位可能是入山虎抗 RA 的活性部位,而在化学成分差异分析中,氯仿提取物中的去甲乌药碱、小檗红碱、两面针碱、茵芋碱、白藜碱、木兰花碱等一类亚群化合物的含量相对于醋酸乙酯组、正丁醇组较高,与其他 2 组具有一定的差异,推测这一类亚群的成分可能是导致不同提取物抗 RA 作用的差异成分。因此,后续应需要继续对氯仿部位分离、纯化、鉴定,进一步研究入山虎抗 RA 的活性成分。同时本研究还对入山虎的两面针碱、木兰花碱、橙皮苷进行定量,可为后续入山虎质量标准的研究提供参考。

综上,入山虎中的氯仿、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、水部位在体内外对 RA 均具有良好的抗炎作用,在体外能够抑制 MH7A 细胞的增殖,减少炎症因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 的分泌;在体内对 RA 大鼠有良好的抗炎作用,还能减少促炎因子 IL-6、IL-17A、IL-1 β 的分泌,增加抗炎因子 IL-4、IL-10 的分泌,综合来看以氯仿部位的效果较优,且入山虎的提取部位主要含有生物碱类成分。本研究可为入山虎治疗 RA 的药效物质基础提供一定的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄清惠. 雷公藤治疗类风湿关节炎的现状思考 [J]. 中国民间疗法, 2020, 28(20): 115-117.
- [2] Aletaha D, Smolen J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis [J]. *JAMA*, 2018, 320(13): 1360.
- [3] 卢敏辉, 郭娟, 张清, 等. 唑来膦酸治疗风湿病合并骨质疏松患者 70 例临床观察 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(8): 19-23.
- [4] Watanabe T, Fujiwara Y, Chan F K L. Current knowledge on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small-bowel damage: A comprehensive review [J]. *J Gastroenterol*, 2020, 55(5): 481-495.
- [5] 周晓, 孙伟, 隋晓杰, 等. 糖皮质激素引发骨质疏松或骨坏死等不良反应研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2015, 14(5): 534-540.
- [6] 陈小奇. 生物制剂在风湿病的应用 [J]. 医学新知, 2019, 29(5): 537-540.
- [7] 曹知勇, 张青槐, 庞宇舟. 壮药青风藤总生物碱对类风湿性关节炎模型大鼠血清 P-选择素、PECAM-1 表达的影响 [J]. 西部中医药, 2022, 35(8): 23-25.
- [8] 梁小鑫, 刘静昀, 张家立. 瑶医“老班药”在骨伤科疾病中的用药规律和特色分析 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(10): 17-20.
- [9] 雷长国, 覃建峰, 余跃生, 等. 瑶药痹痛消抗类风湿性关节炎作用的实验研究 [J]. 四川中医, 2016, 34(6): 41-43.
- [10] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准-第一卷 (2014 年版) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2014: 6-13.
- [11] Qin F, Wang C Y, Kim D, et al. Nitidumpeptins A and B, cyclohexapeptides isolated from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum*: Structural elucidation, total synthesis, and antiproliferative activity in cancer cells [J]. *J Org Chem*, 2021, 86(2): 1462-1470.
- [12] Qin F, Wang C Y, Hu R C, et al. Anti-inflammatory activity of isobutylamides from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* [J]. *Fitoterapia*, 2020, 142: 104486.
- [13] Qin F, Wang F F, Wang C G, et al. The neurotrophic and antineuroinflammatory effects of phenylpropanoids from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* (Rutaceae) [J]. *Fitoterapia*, 2021, 153: 104990.
- [14] Yu B, Zhang G P, Jin L L, et al. Inhibition of PAI-1 activity by toddalolactone as a mechanism for promoting blood circulation and removing stasis by Chinese herb *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 489.
- [15] 杨丽. 树参抗类风湿性关节炎的物质基础及作用机制

- 研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [16] Jia P, Chen G, Qin W Y, *et al.* Xitong Wan attenuates inflammation development through inhibiting the activation of nuclear factor- κ B in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 266-271.
- [17] Pan T, Cheng T F, Jia Y R, *et al.* Anti-rheumatoid arthritis effects of traditional Chinese herb couple in adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205: 1-7.
- [18] Shen Y, Teng L, Qu Y H, *et al.* Anti-proliferation and anti-inflammation effects of corilagin in rheumatoid arthritis by downregulating NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114791.
- [19] Zhou M Y, Cai L, Feng X W, *et al.* Lentivirus-mediated overexpression or silencing of aquaporin 1 affects the proliferation, migration and invasion of TNF- α -stimulated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1945-1957.
- [20] 李宇馨, 李瑞海. 苍术挥发油抗炎活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2): 71-72.
- [21] You X, Boyle D L, Hammaker D, *et al.* PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53 [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R157.
- [22] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(1): 24-33.
- [23] Koch A E. Review: Angiogenesis: Implications for rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(6): 951-962.
- [24] Paleolog E M. Angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(Suppl 3): S81-S90.
- [25] Xu J, Itoh Y, Hayashi H, *et al.* Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1 α or tumor necrosis factor α -induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(11): 1724-1730.
- [26] Brennan F M, McInnes I B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3537-3545.
- [27] Niu X Y, Chen G J. Clinical biomarkers and pathogenic-related cytokines in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 1-7.
- [28] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(1): 24-33.
- [29] Lerner A, Matthias T. Rheumatoid arthritis-celiac disease relationship: Joints get that gut feeling [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(11): 1038-1047.
- [30] Ahmad S F, Ansari M A, Nadeem A, *et al.* The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG126 reduces activation of inflammatory cells and increases Foxp3⁺ regulatory T cells during pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Mol Immunol*, 2016, 78: 65-78.
- [31] Gou K J, Zeng R, Ren X D, *et al.* Anti-rheumatoid arthritis effects in adjuvant-induced arthritis in rats and molecular docking studies of *Polygonum orientale* L. extracts [J]. *Immunol Lett*, 2018, 201: 59-69.
- [32] 姚晓阳, 蒋秀娣, 马晨芸, 等. 抗氨甲酰化蛋白抗体检测对类风湿关节炎诊治的临床价值 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(1): 77-80.
- [33] 赵桂芝, 徐攀, 浦锦宝, 等. 白术醇提物对佐剂性关节炎大鼠足跖肿胀度和炎性细胞因子的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(1): 32-37.
- [34] Pottier G, Bernards N, Dollé F, *et al.* [¹⁸F]DPA-714 as a biomarker for positron emission tomography imaging of rheumatoid arthritis in an animal model [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(2): 1-10.
- [35] 蔡文虹, 孙保东, 张宝凤, 等. 类风湿性关节炎动物模型研究进展 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(4): 10-12.
- [36] Lin Q Y, Pu H L, Guan H D, *et al.* Rapid identification and pharmacokinetic studies of multiple active alkaloids in rat plasma through UPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS after the oral administration of *Zanthoxylum nitidum* extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 186: 113232.
- [37] 袁海梅, 邱露, 谢贞建, 等. 花椒属植物生物碱类成分及其药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4573-4584.
- [38] Huang A H, Chi Y G, Liu J W, *et al.* Profiling and pharmacokinetic studies of alkaloids in rats after oral administration of *Zanthoxylum nitidum* decoction by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 585.
- [39] Wei W J, Chen X H, Guo T, *et al.* A review on classification and biological activities of alkaloids from the genus *Zanthoxylum* species [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(3): 336-361.
- [40] 贾昌平, 黄雪丽, 李允, 等. HPLC-DAD/ESI-Q-TOF-MS 分析两面针中的生物碱 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1198-1202.
- [41] Zhou J, Sun J B, Zheng P, *et al.* Orthogonal array design for optimization of hollow-fiber-based liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for study of the pharmacokinetics of magnoflorine in rat plasma [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403(7): 1951-1960.

- [42] Jeong E K, Lee S Y, Yu S M, *et al.* Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(15): 1661-1674.
- [43] Kotake Y, Okuda K, Kamizono M, *et al.* Detection and determination of reticuline and *N*-methylococulaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 806(1): 75-78.
- [44] 卿志星, 程辟, 曾建国. 博落回中生物碱质谱裂解规律研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(20): 2929-2939.
- [45] Wang D W, Liu Z Q, Guo M Q, *et al.* Structural elucidation and identification of alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2004, 39(11): 1356-1365.
- [46] Wu W, Song F R, Yan C Y, *et al.* Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI-FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MS(n) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(3): 437-446.
- [47] Liu Q X, Zhou B B, Wang X L, *et al.* Establishment of a search library about benzyloquinoline alkaloids based on selective separation on the binaphthyl column and standard analysis on C₁₈ column [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(23): 3317-3325.
- [48] Schmidt J, Boettcher C, Kuhnt C, *et al.* Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [ring-¹³C₆]-tyramine feeding [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(2): 189-202.
- [49] Hu Y H, Jiang P, Wang S P, *et al.* Plasma pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel pharmacokinetics based approach to screening potential bioactive components in Huang-Lian-Jie-Du-Tang using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 728-735.
- [50] 黄飞飞, 王荣, 陈玥, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的分子网络技术快速分析夏天无生物碱 [J]. *质谱学报*, 2021, 42(3): 228-240.
- [51] 张榆, 胡少伟, 杨佳颖, 等. 基于 UPLC-LTQ Orbitrap MS 的益气降脂颗粒化学组成分析 [J]. *质谱学报*, 2020, 41(5): 411-426.
- [52] 杨鹏, 卿志星, 左姿, 等. HPLC-Q-TOF/MS 鉴定白屈菜中异喹啉类生物碱 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(2): 174-182.
- [53] 宛玉祥, 李家宇, 秦优, 等. 液质联用鉴定单面针中的化学成分 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(4): 496-499.
- [54] Wang P, Sun J B, Gao E Z, *et al.* Simultaneous determination of limonin, dictamnine, obacunone and fraxinellone in rat plasma by a validated UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Cortex Dictamni extract [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 928: 44-51.
- [55] Yang G H, Chen D F. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects [J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(9): 1718-1722.
- [56] Terezan A P, Rossi R A, Almeida R N A, *et al.* Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus [J]. *J Braz Chem Soc*, 2010, 21(5): 882-886.

[责任编辑 李亚楠]