

金莲花不同溶剂提取物抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的谱-效关系研究^Δ

南敏伦^{1*}, 孙琦², 杨振¹, 司学玲³, 马春霞⁴, 白雪⁴, 赫玉芳^{5#}(1.吉林省中医药科学院植物化学研究所, 长春 130012; 2.吉林正容医药发展有限责任公司, 吉林敦化 133700; 3.修正药业集团长春高新制药有限公司, 长春 130012; 4.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 5.长春中医药大学健康管理学院, 长春 130117)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)18-2219-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.18.08

摘要 目的:研究金莲花11种不同溶剂提取物抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的谱-效关系。方法:利用高效液相色谱-串联质谱法建立金莲花11种不同溶剂提取物的指纹图谱,通过与对照品、文献信息比对,指认共有峰对应的化合物。采用MTT法检测金莲花11种不同溶剂提取物对缺氧/复氧损伤大鼠心肌细胞H9c2存活率的影响,采用酶联免疫吸附测定法检测细胞中丙二醛(MDA)含量、活性氧(ROS)水平和上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。通过灰色关联度分析法(GRA)和偏最小二乘法(PLS)联合分析共有峰对应成分与抗心肌细胞缺氧/复氧损伤(药效)的谱-效关系。结果:金莲花11种不同溶剂提取物的指纹图谱中有22个共有峰,指认出22个化合物。与缺氧/复氧损伤组比较,缺氧/复氧+S1~S6、S9、S10组细胞的存活率均显著升高,MDA含量、ROS水平、LDH含量均显著降低($P<0.05$);缺氧/复氧+S8组细胞的ROS水平、LDH含量均显著降低($P<0.05$)。22个化合物与药效的GRA关联度均大于0.8;除峰1、2、7、13、14、21外,其余峰对应化合物与药效的PLS分析回归系数均大于0(即成正相关);贡献排名前9位的共有峰均为峰6>11>4>5>8>9>12>10>15。结论:苈草苷(峰6)、牡荆苷(峰11)、苈草素-2"-O-β-L-半乳糖苷(峰4)、苈草素-2"-O-β-D-吡喃木糖苷(峰5)、槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷(峰8)、牡荆素-2"-O-β-L-半乳糖苷(峰9)、金丝桃苷(峰12)、牡荆素-2"-O-β-D-吡喃木糖苷(峰10)、2"-O-(2"-甲基丁酰基)-苈草苷(峰15)可能是金莲花抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的主要成分。

关键词 金莲花;心肌细胞H9c2;缺氧/复氧损伤;谱-效关系;灰色关联度分析法;偏最小二乘法

Study on the Spectrum-effect Relationship of Different Solvent Extracts from *Trollius chinensis* against Hypoxia/reoxygenation Injury of Cardiomyocyte

NAN Minlun¹, SUN Qi², YANG Zhen¹, SI Xueling³, MA Chunxia⁴, BAI Xue⁴, HE Yufang⁵ (1. Institute of Phytochemistry, Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130012, China; 2. Jilin Zhengrong Medical Development Co., Ltd., Jilin Dunhua 133700, China; 3. Xiuzheng Pharmaceutical Group Changchun High-tech Pharmaceutical Co., Ltd., Changchun 130012, China; 4. College of TCM, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 5. College of Health Management, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study spectrum-effect relationship of 11 different solvent extracts from *Trollius chinensis* against hypoxia/reoxygenation injury of cardiomyocyte. METHODS: HPLC-MS/MS method was used to establish the fingerprints of 11 different solvent extracts from *T. chinensis*, the compounds corresponding to the common peaks were identified by comparing with the substance control and literature information. MTT assay was used to detect the effects of 11 different solvent extracts from *T. chinensis* on the survival rate of rat myocardial H9c2 cells injured by hypoxia/reoxygenation. The MDA content, ROS level in cells and LDH content in the supernatant were detected by ELISA. GRA and PLS method were used to analyze the spectrum-effect relationship between the compounds corresponding to common peak and anti-hypoxia/reoxygenation injury of cardiomyocyte (drug effect). RESULTS: There were 22 common peaks in 11 different solvent extracts from *T. chinensis*, and 22 compounds were identified. Compared with hypoxia/reoxygenation injury group, survival rate of hypoxia/reoxygenation injury+S1-S6, S9 and S10 groups were increased significantly, while MDA content, ROS level and LDH content were decreased significantly ($P<0.05$); ROS level and LDH content of hypoxia/reoxygenation injury+S8 group were decreased significantly ($P<0.05$). The r of GRA analysis of 22 compounds with drug effects were all higher than 0.8. Except for peaks 1, 2, 7, 13, 14 and 21, r of PLS analysis of rest peaks with drug effects were higher than 0 (being positive correlation). Top 9 common peaks in the list of contribution rate were peak 6>11>4>5>8>9>12>10>15. CONCLUSIONS: Orientin (peak 6), vitexin (peak 11),

Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20150203010YY);吉林省中医药科技项目(No.2019031)

* 副研究员, 硕士。研究方向:中药化学成分提取、分离及产品开发。电话:0431-86058683。E-mail:nml2000@163.com

通信作者:教授, 博士。研究方向:中药化学成分提取、分离及产品开发。电话:0431-86058683。E-mail:hyf_1992@163.com

orientin-2''-O-β-L-galactopyranosyl (peak 4), orientin-2''-O-β-D-Pyrine xylosides (peak 5), quercetin-3-O-glucopyranoside (peak 8), vitexin-2''-O-β-L-galactoside (peak 9), hyperoside (peak 12), vitexin-2''-O-β-D-pyrine xylosides (peak 10), 2''-O-(2'''-methylbutyryloxy)-orientin (peak 15) may be the main components of anti-hypoxia/reoxygenation injury of cardiomyocytes.

KEYWORDS *Trollius chinensis*; Myocardial cells H9c2; Hypoxia/reoxygenation injury; Spectrum-effect relationship; GRA; PLS

金莲花为毛茛科植物金莲花(*Trollius chinensis* Bunge.)的干燥花,别名有旱荷、寒金莲等,性寒、无毒^[1],主要分布于我国内蒙古、黑龙江、河北、吉林等地。金莲花主要含黄酮类成分,含量最高的为荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷^[2]。该药具有抗菌、抗炎、抗病毒等活性,主要用于治疗咽炎、呼吸道炎、扁桃体炎等疾病^[3]。现代药理研究表明,金莲花除上述药理活性外,还具有抗心肌缺血的作用^[4],但有关抗心肌缺血药效物质基础尚鲜有报道。目前,谱效学已被广泛应用于中药有效成分与药效关系的研究^[5-6],但是对于金莲花抗心肌缺血方面的研究尚未见报道。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS),建立金莲花11种不同溶剂提取物的指纹图谱,确认共有峰,通过与对照品、文献信息比对,指认共有峰对应的化合物,再结合各提取物对大鼠心肌细胞H9c2缺氧/复氧损伤的保护作用,通过灰色关联度分析法(GRA)和偏最小二乘法(PLS)联合分析共有峰与抗心肌细胞缺氧/复氧损伤(药效)的谱-效关系,旨在为金莲花抗心肌缺血再灌注损伤的药效物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 Series LC-MSD 型液相色谱质谱联用仪,包括多级离子阱质谱仪、低压四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、Chemstation C.01.02 化学工作站等(美国 Agilent 公司);GL-21M 型高速低温离心机(湖南迈达仪器有限公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);Multiskan FC 型全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Thermo HERAcell 150 i 型 CO₂ 细胞培养箱(山东博科仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

金莲花药材(批号:180501)购自吉林省宏检大药房,经吉林省中医药科学院赵全成教授鉴定为毛茛科植物金莲花(*T. chinensis* Bunge.)的干燥花;荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷对照品(吉林省中医药科学院植物化学研究所自制,批号:20180001,纯度:≥98%);荜草苷、牡荆苷、槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110732-200907、110713-201613、112026-201601,纯度:≥98%);胎牛血清(上海玉博生物科技有限公司);DMEM 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);胰蛋白酶(湖北远成药业有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT 试剂盒(货号:M8182)均购自北京索莱宝科技有限公司;丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、乳酸脱

氢酶(LDH)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A003-2、A015-6、A020-3);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 细胞

大鼠心肌细胞H9c2由吉林大学基础医学院提供。

2 方法与结果

2.1 金莲花提取物指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ACE C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 3% A→12% A; 20~50 min, 12% A; 50~65 min, 12% A→15% A; 65~75 min, 15% A→20% A; 75~85 min, 20% A→30% A; 85~95 min, 30% A→40% A; 95~105 min, 40% A→50% A; 105~110 min, 50% A→3% A; 110~115 min, 3% A);检测波长:360 nm;流速:0.8 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 质谱条件 电离源:电喷雾离子源(ESI);检测方式:负离子检测;扫描范围:*m/z* 50~1 500;干燥气温度:350 ℃;干燥气流量:9.0 L/min;雾化气压强:0.24 MPa;毛细管电压:4 kV。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取金莲花药材适量,分别用10倍量(mL/g,下同)90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、60%乙醇、50%乙醇和水回流提取2次,每次2 h,滤过,合并相同溶剂的滤液,浓缩,干燥至粉末,即得金莲花6种提取物,记为S1~S6。另称取金莲花药材适量,依次用10倍量95%乙醇、70%乙醇各回流提取1次,每次2 h,滤过,合并滤液,浓缩至无醇味,加水稀释至每1 mL含1 mg药材的溶液,再依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,将上述4种溶剂的萃取液和水相分别减压回收,干燥至粉末,即得金莲花5种提取物,记为S7~S11。精密称取上述11种提取物粉末各100 mg,分别溶于甲醇25 mL中,溶解后经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得相应的供试品溶液。

2.1.4 混合对照品溶液的制备 精密称取荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草苷、牡荆苷、槲皮素对照品适量,加甲醇溶解制备质量浓度分别为0.05、0.25、0.05、0.01 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S3)适量,按“2.1.1”“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样测定,连续6次,以荜草苷峰(峰6)为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.19%(*n*=6),相对峰面积的RSD均小于1.22%(*n*=6),表明本方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S3)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样测定,以荜苳昔峰(峰6)为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.22%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于1.33%($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取金莲花药材粉末100 mg,共6份,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液(编号:S3),再按“2.1.1”“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样测定,以荜苳昔峰(峰6)为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,22个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.38%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.02%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.8 指纹图谱生成及特征峰确认 按“2.1.3”项下方法制备金莲花11种提取物的供试品溶液,再按“2.1.1”“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录色谱图。将图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,设置时间窗宽度为0.1 min,图谱间距为20 mV,通过多点校正及自动匹配生成金莲花11种提取物的叠加指纹图谱,结果见图1。由于S3图谱吸收信号较强、峰形明显、稳定性较好,故选择S3样品的图谱作为参照图谱。依据各色谱峰的准分子离子峰及二级质谱碎片信息,通过与对照品、文献信息^[3,7-13]比对,指认金莲花中共有峰对应的化学成分。结果,金莲花11种提取物指纹图谱中有共有峰22个,化学成分的指认结果见表1。

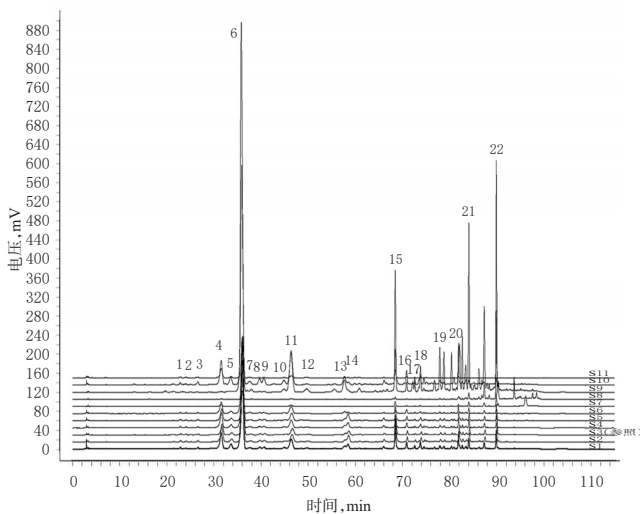


图1 金莲花11种提取物的叠加指纹图谱

Fig 1 Superimposed fingerprint of 11 kinds of extracts of *T. chinensis*

2.2 金莲花提取物对H9c2细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

2.2.1 细胞培养 将H9c2细胞放置在培养箱中,用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5%CO₂条件下

培养,每2 d更换1次培养基,待细胞生长至80%~90%时进行传代,并取得对数生长期的细胞进行后续试验。

表1 金莲花提取物中化学成分的指认结果

Tab 1 Designation results of chemical constituents of *T. chinensis* extracts

峰号	保留时间, min	准分子离子峰[M-H] ⁺	分子式	二级碎片离子	化合物
1	22.943	137.156 2	C ₇ H ₆ O ₃	121	羟基苯甲酸
2	24.162	181.362 4	C ₉ H ₁₀ O ₄	165, 139, 124	藜芦酸
3	26.681	179.168 1	C ₈ H ₆ O ₄	135	咖啡酸
4	31.709	609.146 9	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₆	449, 431, 413	荜苳素-2''-O-β-L-半乳糖苷
5	33.508	579.170 5	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₅	449, 431, 413	荜苳素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷
6	36.133	447.162 0	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	431, 413	荜苳昔
7	37.847	167.112 6	C ₈ H ₆ O ₄	151, 125, 110	香草酸
8	39.819	463.174 8	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	303	槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷
9	40.770	593.169 8	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₅	433, 415, 397	牡荆素-2''-O-β-L-半乳糖苷
10	45.171	563.151 4	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₄	433, 415	牡荆素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷
11	46.646	431.161 5	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	415, 397, 367	牡荆昔
12	50.036	463.161 2	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	303	金丝桃昔
13	57.927	193.123 6	C ₁₀ H ₈ O ₄	180, 151, 136	阿魏酸
14	58.615	235.171 3	C ₁₃ H ₁₀ O ₄	219	金莲酸
15	68.639	531.178 2	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	515, 431, 413	2''-O-(2''-甲基丁酰基)-荜苳昔
16	71.026	285.162 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	217, 151	木犀草素
17	72.703	595.133 3	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₃	579, 477, 415	2''-O-(3'', 4''-二甲苯)-丁酰基牡荆昔
18	74.173	515.168 2	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₁	433, 415, 397	2''-O-(2''-甲基丁酰基)牡荆昔
19	78.108	545.131 4	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₂	445, 385	7-甲氧基-2''-O-(2''-甲基丁酰基)荜苳昔
20	82.031	301.100 8	C ₉ H ₈ O ₇	179, 151	槲皮素
21	84.232	269.162 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	181, 149	芹菜素
22	90.046	455.136 2	C ₂₈ H ₃₈ O ₃	439	齐墩果酸

2.2.2 分组与处理 将对数生长期的H9c2细胞分为13组,分别为正常对照组、缺氧/复氧组、缺氧/复氧+各提取物(S1~S11)组。正常对照组细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、5%CO₂条件下培养3 h;缺氧/复氧组细胞用无糖、无血清的DMEM培养基于37℃、5%CO₂、95%N₂条件下培养3 h,再按正常对照组条件培养3 h;缺氧/复氧+各提取物组细胞先分别用0.1 μg/L(按预试验结果设置,以提取物质量计)的S1~S11预处理30 min后,再按照缺氧/复氧组条件培养。

2.2.3 H9c2细胞存活率检测 采用MTT法检测。将H9c2细胞按5×10³个/孔接种于96孔板中,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h,按“2.2.2”项下方法分组、处理后,分别加入MTT试剂100 μL,于37℃条件下继续培养4 h,弃上清液,加入DMSO 100 μL,振荡反应10 min,用酶标仪于490 nm波长处检测各孔光密度(OD)值,以不含细胞的空白培养基作为空白组,计算细胞存活率:细胞存活率=(试验组OD值/空白组OD值)×100%。每组设6个复孔,试验重复3次。

2.2.4 H9c2细胞中MDA含量、ROS水平和上清液中LDH含量检测 采用ELISA法检测。将H9c2细胞按5×10³个/孔接种于96孔板中,于37℃、5%CO₂条件下培养24 h,按“2.2.2”项下方法分组、处理后,按试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔OD

值,计算细胞中MDA含量和ROS水平以及上清液中LDH含量。试验重复3次。

2.2.5 数据处理及结果分析 使用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。各组细胞的存活率、MDA含量、ROS水平、LDH含量的检测结果见表2。

表2 各组细胞的存活率、MDA含量、ROS水平、LDH含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of survival rate, MDA content, ROS level and LDH content of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞存活率,%	MDA, $\mu\text{mol/g}$	ROS,U/mL	LDH,U/L
正常对照组	99.98 ± 4.05	1.78 ± 0.34	1.28 ± 0.22	40.58 ± 2.66
缺氧/复氧组	38.69 ± 3.85*	4.66 ± 0.32*	7.86 ± 0.85*	167.25 ± 10.68*
缺氧/复氧+S1组	54.26 ± 3.72 [#]	3.75 ± 0.28 [#]	5.25 ± 0.33 [#]	135.27 ± 8.83 [#]
缺氧/复氧+S2组	69.65 ± 4.02 [#]	2.25 ± 0.36 [#]	3.05 ± 0.28 [#]	99.58 ± 7.13 [#]
缺氧/复氧+S3组	75.86 ± 3.99 [#]	2.45 ± 0.19 [#]	2.88 ± 0.42 [#]	82.65 ± 10.12 [#]
缺氧/复氧+S4组	78.69 ± 3.82 [#]	2.11 ± 0.32 [#]	1.86 ± 0.52 [#]	80.25 ± 8.66 [#]
缺氧/复氧+S5组	70.96 ± 3.72 [#]	2.85 ± 0.41 [#]	2.58 ± 0.41 [#]	89.27 ± 9.07 [#]
缺氧/复氧+S6组	68.25 ± 3.68 [#]	3.48 ± 0.52 [#]	3.08 ± 0.27 [#]	101.36 ± 10.82 [#]
缺氧/复氧+S7组	41.65 ± 3.14	4.48 ± 0.36	7.14 ± 0.29	168.99 ± 9.98
缺氧/复氧+S8组	49.68 ± 3.75	3.99 ± 0.36	5.95 ± 0.35 [#]	146.89 ± 12.48 [#]
缺氧/复氧+S9组	92.58 ± 4.08 [#]	2.04 ± 0.22 [#]	1.56 ± 0.45 [#]	69.68 ± 5.95 [#]
缺氧/复氧+S10组	85.69 ± 4.96 [#]	2.06 ± 0.50 [#]	1.77 ± 0.38 [#]	78.62 ± 6.74 [#]
缺氧/复氧+S11组	44.69 ± 3.99	4.15 ± 0.36	6.89 ± 0.42	155.88 ± 9.58

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与缺氧/复氧组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. hypoxia/reoxygenation group, [#] $P < 0.05$

由表2可见,与正常对照组比较,缺氧/复氧组细胞的存活率显著降低,MDA含量、ROS水平、LDH含量均显著升高($P < 0.05$);与缺氧/复氧组比较,除缺氧/复氧+S7组、缺氧/复氧+S8组、缺氧/复氧+S11组外其余各组细胞的存活率均显著升高,MDA含量均显著降低($P < 0.05$);除缺氧/复氧+S7组、缺氧/复氧+S11组外其余各组细胞的ROS水平、LDH含量均显著降低($P < 0.05$)。

2.3 金莲花化学成分与抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的谱-效分析

2.3.1 GRA 利用DPS-3.01软件,根据细胞存活率、MDA含量、ROS水平、LDH含量计算金莲花抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的综合活性数据,加权系数均为0.25。将共有峰峰面积数据与综合活性数据进行关联,通过对原始数据进行标准化转化处理后,计算关联度并排序,以评估各共有峰对药效的贡献,结果见表3。由表3可见,22个共有峰所对应的化学成分与药效的关联度均大于0.8,贡献排名前9位的共有峰依次为峰6>11>4>5>8>9>12>10>15。

2.3.2 PLS分析 利用SIMCA-11软件,经过多次提取

主成分、多次迭代后,拟合出22个共有峰所对应的化学成分对抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的重要程度(即标准化回归系数)并排序,结果见表4。

表3 金莲花不同提取物中22个共有峰与药效的GRA结果

Tab 3 GRA results of 22 common peaks of different extracts of *T. chinensis* with drug effects

峰号	保留时间,min	关联度	排序	峰号	保留时间,min	关联度	排序
1	22.943	0.816 0	21	12	50.036	0.863 9	7
2	24.162	0.817 0	20	13	57.927	0.820 5	19
3	26.681	0.840 1	12	14	58.615	0.823 4	18
4	31.709	0.883 3	3	15	68.639	0.847 8	9
5	33.508	0.882 2	4	16	71.026	0.830 4	14
6	36.133	0.902 9	1	17	72.703	0.833 4	13
7	37.847	0.815 9	22	18	74.173	0.843 2	10
8	39.819	0.873 4	5	19	78.108	0.840 8	11
9	40.77	0.866 3	6	20	82.031	0.826 8	15
10	45.171	0.857 0	8	21	84.232	0.824 8	17
11	46.646	0.887 1	2	22	90.046	0.825 9	16

表4 金莲花不同提取物中22个共有峰与药效的PLS分析结果

Tab 4 PLS analysis results of 22 common peaks of different extracts of *T. chinensis* with drug effects

峰号	保留时间,min	标准化回归系数	排序	峰号	保留时间,min	标准化回归系数	排序
1	22.943	-0.010 1	20	12	50.036	0.063 8	7
2	24.162	-0.015 9	21	13	57.927	-0.004 4	18
3	26.681	0.036 9	12	14	58.615	-0.005 4	19
4	31.709	0.102 1	3	15	68.639	0.046 5	9
5	33.508	0.092 1	4	16	71.026	0.031 7	14
6	36.133	0.163 3	1	17	72.703	0.036 1	13
7	37.847	-0.013 7	22	18	74.173	0.040 8	10
8	39.819	0.070 5	5	19	78.108	0.038 7	11
9	40.770	0.065 9	6	20	82.031	0.029 9	15
10	45.171	0.053 6	8	21	84.232	-0.001 1	17
11	46.646	0.136 5	2	22	90.046	0.025 4	16

由表4可见,22个共有峰所对应化学成分对药效的贡献程度与GRA结果基本一致。除峰1、2、7、13、14、21外,其余各峰与抗心肌细胞缺氧/复氧损伤活性的标准化回归系数均大于0,即成正相关;贡献排名前9位的共有峰依次为峰6>11>4>5>8>9>12>10>15。

3 讨论

据文献报道,谱-效关系的统计学分析有多种方法,如相关分析法、GRA法、聚类分析法及PLS法^[5]。本文应用了GRA法和PLS法联合分析了金银花11种不同溶剂提取物中22个共有峰对应成分与抗心肌细胞缺氧/复氧损伤(药效)的谱-效关系。GRA法主要分析两种因素在发展过程中的关联度大小,但其只能单独考察各成分的重要性,并不能反映各成分对药效的综合作用^[6-7],故本文又采用了PLS法,通过拟合药效与色谱峰之间的相关

性,分析各成分对药效的重要程度^[14-15]。

据文献报道,金莲花中主要成分是黄酮类成分,此外还有少量的挥发油、生物碱、有机酸、多糖、醇类、苷类等多种成分^[9]。由于化学成分的多样性,提取方法也较多,常用的提取方法有微波提取法、回流提取法、超声提取法和超临界流体提取法等^[16-17],回流提取能尽可能得提取有效成分^[13],故本研究选择了回流提取法。此外,不同溶剂对不同类化学成分的溶解性不同,如挥发油易溶解于石油醚中,生物碱、醇类易溶解于三氯甲烷中,黄酮易溶解于高浓度乙醇或乙酸乙酯中,黄酮苷易溶解于低浓度乙醇或正丁醇中,多糖易溶解于水中,故为了尽可能地将各类成分均提取出来,本文选择了“2.1.3”项下的提取方法,并得到了11种提取物。

本研究初步评价了金莲花90%、80%、70%、60%、50%乙醇提取物以及石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水萃提取物对心肌细胞缺氧/复氧损伤的主要指标细胞存活率、MDA含量、ROS水平、LDH含量的影响。研究表明,其中不同体积分数乙醇提取物以及乙酸乙酯、正丁醇、水萃提取物对各指标的影响较为显著。

本研究分析鉴定了金莲花11种提取物中22个化学成分,通过谱-效分析确定了其中对心肌细胞缺氧/复氧损伤起保护作用的主要化学成分可能为峰6、11、4、5、8、9、12、10、15,即荜草苷、牡荆苷、荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷、荜草素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷、槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷、牡荆素-2''-O-β-L-半乳糖苷、金丝桃苷、牡荆素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷、2''-O-(2'''-甲基丁酰基)-荜草苷,主要为黄酮类化合物,提示金莲花的抗心肌细胞缺氧/复氧损伤作用可能与上述成分相关。有文献报道,荜草苷、牡荆苷等黄酮类成分为金莲花的主要活性成分^[12],且上述成分均有一定的抗心肌缺血作用^[4],进一步论证了本研究的可靠性。这对于阐明金莲花抗心肌缺血的药效物质基础研究、金莲花及其提取物多指标质量控制标准的建立具有积极意义。

综上所述,荜草苷(峰6)、牡荆苷(峰11)、荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷(峰4)、荜草素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷(峰5)、槲皮素-3-O-吡喃葡萄糖苷(峰8)、牡荆素-2''-O-β-L-半乳糖苷(峰9)、金丝桃苷(峰12)、牡荆素-2''-O-β-D-吡喃木糖苷(峰10)、2''-O-(2'''-甲基丁酰基)-荜草苷(峰15)可能是金莲花抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的主要成分。

参考文献

- [1] 赵学敏.本草纲目拾遗[M].北京:人民卫生出版社,1983:256.
- [2] 南敏伦,赵昱玮,司学玲,等.不同采收期金莲花中三种碳苷黄酮成分动态变化研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):118-120.
- [3] 宋冬梅,孙启时.金莲花属植物研究进展[J].沈阳药科大学学报,2005,22(3):232-234.
- [4] 赵全成,南敏伦,赫玉芳,等.荜草素-2''-O-β-L-半乳糖苷及组合在制备抗心肌缺血药物中的应用:中国,CN101559066 A[P].2009-10-21.
- [5] 刘英,徐永莉,李力.中药谱效关系研究思路与应用概况[J].时珍国医国药,2018,29(3):677-680.
- [6] 郑林,李靖,陈慧,等.荜草对H₂O₂诱导的心肌细胞氧化损伤保护作用的谱效关系研究[J].中国中药杂志,2012,37(17):2585-2588.
- [7] 刘智,王丽,李雯,等.HPLC测定金莲花制剂中荜草苷和牡荆苷的含量[J].中国中药杂志,2004,29(11):1049-1051.
- [8] 张怡,耿叙武.金莲花片质量标准研究[J].黑龙江医药,2002,16(6):423-424.
- [9] 任正博,张振学,周伟利,等.金莲花化学成分研究[J].中国现代中药,2006,8(2):14-15.
- [10] 彭玉帅,刘莉嘉,赵灿,等.金莲花中首次分离的1个酚酸类化合物及其抗炎和抑菌活性[J].中华中医药学刊,2015,33(6):1349-1351.
- [11] 白云娥,漆小梅,高品一,等.金莲花水-醇提取工艺比较[J].中成药,2007,29(10):1521-1523.
- [12] 王如峰,赧迪,吴秀稳,等.金莲花中4种主要成分的抗炎活性研究[J].时珍国医国药,2012,23(9):2115-2116.
- [13] 王如峰,赧迪,吴秀稳,等.RP-HPLC法同时测定金莲花中5种黄酮苷类成分的含量性[J].沈阳药科大学学报,2018,35(1):47-52.
- [14] 李力,潘倩雯,刘宏.灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J].中国药房,2018,29(11):1581-1584.
- [15] 林梦雅,张玉萍,李雅,等.基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J].中草药,2017,48(16):3447-3452.
- [16] 刘晓燕,蒋益萍,张嘉宝,等.啤酒花的HPLC指纹图谱建立及其抗氧化作用谱效关系研究[J].中国药房,2020,31(2):138-143.
- [17] 贾富霞,罗容,王秀娟.谱效关系研究方法在中药研究中的应用进展[J].北京中医药,2015,34(12):996-1000.

(收稿日期:2020-05-07 修回日期:2020-06-17)

(编辑:邹丽娟)