

喜碱鸢尾根水提取物抗炎活性部位筛选及其化学成分分析

穆巴热科·吾普尔, 马俊杰, 阿孜古丽·阿里木, 李玮, 王晓梅, 胡君萍, 李莉, 王新玲*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:建立脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞的炎症模型,筛选喜碱鸢尾根水提取物抗炎活性部位,并进行化学成分分析。方法:水提醇沉法提取,AB-8型大孔吸附树脂色谱法分离上清液,得上清液浸膏和水,20%乙醇,40%乙醇,60%乙醇洗脱物(YWG,YWG-0%,YWG-20%,YWG-40%,YWG-60%),细胞增殖与活性检测(CCK-8)法测定上清液和不同体积分数乙醇洗脱物对RAW264.7细胞活力的影响,Griess和酶联免疫吸附(ELISA)法分别测定细胞上清液中一氧化氮(NO),肿瘤坏死因子(TNF)- α 及白细胞介素(IL)-6,IL-10,IL-1 β 的水平。采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS)对YWG及抗炎活性最强部位进行成分辨识和比较。结果:不同体积分数乙醇洗脱物对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液中的NO,TNF- α ,IL-1 β ,IL-6的释放均有明显抑制作用($P<0.05$),对IL-10的释放具有明显促进作用($P<0.05$),且YWG-60%洗脱物作用极为显著($P<0.01$)。采用UHPLC-QTOF-MS/MS技术对YWG及YWG-60%进行比较分析,正负离子模式共检出127种物质,其中黄酮类物质61种。与YWG相比,YWG-60%中含量升高的黄酮类化合物有25种。结论:喜碱鸢尾根YWG-60%具有显著抗炎作用,且推测抗炎有效成分主要为黄酮类化合物,该研究为阐明喜碱鸢尾根水提取物药效物质基础提供了一定科学理论数据。

[关键词] 喜碱鸢尾根; RAW264.7细胞; 抗炎作用; 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS); 黄酮类

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0157-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210812

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210413.1321.003.html>

[网络出版日期] 2021-4-13 16:06

Screening of Anti-inflammatory Active Sites of Water Extract of *Iris halophila* Root and Analysis of Its Chemical Constituents

MUBAREKE Wupuer, MA Jun-jie, AZIGULI Alimu, LI Wei, WANG Xiao-mei,
HU Jun-ping, LI Li, WANG Xin-ling*
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory effects of water extract of the *Iris halophila* root on lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW264.7 cells and analyze its chemical constituents. **Method:** The supernatant of YWG prepared by water extraction and alcohol precipitation was separated by AB-8 macroporous adsorption resin column chromatography to obtain ethanol eluates with different concentrations (YWG, YWG-0%, YWG-20%, YWG-40%, and YWG-60%). Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to determine the effects of YWG-0%, YWG-20%, YWG-40%, and YWG-60% on the viability of RAW264.7 cells. Griess assay was employed to detect the nitric oxide (NO) level in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The release of tumor necrosis factor (TNF) - α , interleukin (IL) -6, IL-10, and IL-1 β was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). YWG and the elution site with the most robust anti-inflammatory activity were

[收稿日期] 20210122(025)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1708303);新疆维吾尔自治区的重点实验室项目(XJDX1713)

[第一作者] 穆巴热科·吾普尔,在读硕士,从事天然药物活性成分研究,E-mail:1584470791@qq.com

[通信作者] *王新玲,博士,副教授,从事天然药物活性成分研究与开发研究,E-mail:365021216@qq.com

identified and compared by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS). **Result:** Ethanol eluates with different concentrations inhibited the release of NO, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the supernatant of LPS induced RAW264.7 cells ($P < 0.05$), and promoted the release of IL-10 ($P < 0.05$). YWG-60% displayed a highly significant effect ($P < 0.01$). A total of 127 constituents were detected from the comparison of YWG and YWG-60% by UHPLC-Q-TOF-MS/MS in the positive and negative ion modes, including 61 flavonoids. YWG-60% contained 25 flavonoids with elevated content as compared with YWG. **Conclusion:** YWG-60% showed potent anti-inflammatory effect, and the effective anti-inflammatory constituents were presumedly flavonoids. The findings of this study are expected to provide a scientific theoretical basis for the basic research on the medicinal effect of the water extract of YWG.

[**Key words**] *Iris halophila* root; RAW264.7 cells; anti-inflammatory effect; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry(UHPLC-QTOF-MS/MS); flavonoids

喜碱鸢尾为鸢尾科鸢尾属多年生草本植物,是一种主要分布生长于新疆维吾尔自治区(简称新疆)沿天山北麓一带的抗盐碱植物,故也称为喜盐鸢尾^[1]。本品习以根茎入药,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(维吾尔药分册),其性干热,具有散风止痛、软坚通阻、消炎解紧、强筋健肌、除斑生肌的作用,可用于治疗咽喉肿痛、牙痛、疮痍、湿疹等^[2]。文献报道喜碱鸢尾根中主要含有黄酮类、香豆素类、糖和苷类、酚类和鞣质类等成分^[3]。

喜碱鸢尾根作为新疆地方常用药材之一,使用历史悠久,也是新疆民间抗哮喘古方罗欧咳祖帕复方中的一味重要药材。该方在新疆民间主要用于治疗哮喘、咳嗽及顽痰等,具有温肺平喘、止咳化痰等作用。该方由神香草、喜碱鸢尾根和蜂蜜组成,方中以神香草为主药,喜碱鸢尾根为助药,蜂蜜为矫正药^[4]。临床应用时将神香草和喜碱鸢尾根按一定比例混合,向水提醇沉法制得的上清液中加入蜂蜜搅拌均匀即得。目前对该方中单味药材——神香草的研究报道较多,但对喜碱鸢尾根的活性研究相对较少,有文献报道了喜碱鸢尾根提取物具有较好的清除自由基和抑制变异链球菌生物膜的作用^[5-6],但目前还未见对其水提取液的活性及其成分的相关研究报道。

故本研究以喜碱鸢尾根为研究对象,将水提醇沉法所得的上清液经 AB-8 大孔吸附树脂柱分离,得不同体积分数乙醇洗脱物,并进行抗炎活性部位的筛选,采用超高效液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS)对抗炎活性最强的部位进行化学成分的辨识与分析。为阐明喜碱鸢尾根水溶性药用部位的药效物质基础提供了一定理论依据,也为新疆民间抗哮喘古方罗欧咳祖帕复方的深入开发研究提供科学数据支撑。

1 材料

RAW264.7 细胞株(购自上海中乔新舟生物科技有限公司,编号 ZQ0098)。喜碱鸢尾根(批号 YWG-YP-190225)购于新疆安萨尔维吾尔饮片药业有限公司,由新疆医科大学药学院丛媛媛教授鉴定为鸢尾科植物喜碱鸢尾 *Iris halophila* 的干燥根茎,标本保存于新疆医科大学药学院天药/生药教研室。

DMEM 高糖培养基、青霉素+链霉素双抗、磷酸盐缓冲液(PBS,以色列 BI 公司,批号分别为 2035129,1936917,0015219);胎牛血清,0.25%胰蛋白酶消化液(美国 Gibco 公司,批号分别为 1807622,2063460);脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 039M4004V);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号 BJ05203090);一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物公司,批号 S0021M);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6, IL-10, IL-1 β 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海酶联公司,批号分别为 m1002095-2, m1002293-2, m1002285-2, m1063132-2)。L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司,批号 JL170417004,纯度 $\geq 98\%$)。水为超纯水,甲醇、乙腈、甲酸均为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

AB135-S 型 1/1 万电子天平(上海梅特勒托利多公司);Heracell 型 CO₂ 恒温培养箱(美国赛默飞公司);KS12 型超净工作台,KS12 型离心机,5424R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);BCD-275TMBC 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);HHW420 型电热恒温水浴锅(深圳市博大精密科技实业有限公司);MLS-3750 型高压蒸汽灭菌锅(日本三洋电机株式会社);BA210 型倒置显微镜(德国 Motic 公司);Multiskan GO 型全波长酶标仪

(赛默飞世尔科技有限公司); Nexera UHPLC LC-30A型超高效液相色谱仪(日本岛津公司); Triple TOF 5600型高分辨质谱仪(美国AB Sciex公司); JXFSTPRP-24型研磨仪(上海净信科技有限公司); 明澈-D24UV型纯水仪(德国默克密理博公司)。

2 方法

2.1 样品的制备 称取喜碱鸢尾根药材2.0 kg, 粉碎, 加蒸馏水煎煮2次, 合并2次提取液, 浓缩, 浓缩液中加入95%乙醇至乙醇体积分数为70%, 4℃静置过夜, 抽滤, 滤液减压浓缩, 使成浸膏, 记为鸢尾根水提醇沉后浸膏(YWG), 取部分备用; 另取部分浸膏经AB-8大孔吸附树脂柱色谱法分离, 经纯水, 20%, 40%, 60%乙醇梯度洗脱, 得不同体积分数乙醇洗脱液, 减压浓缩、干燥, 得干浸膏, 分别记为YWG-0%, YWG-20%, YWG-40%, YWG-60%, 用二甲基亚砜(DMSO)超声溶解, 0.22 μm滤膜过滤除菌, 4℃保存(DMSO的终浓度控制在≤0.1%)。

2.2 细胞培养 将RAW264.7细胞放在37℃, 5% CO₂条件下的培养箱中培养。细胞生长至70%~80%时进行传代。

2.3 CCK-8法检测细胞毒性 将处于对数生长期的RAW264.7细胞以5×10⁴个/mL, 接种于96孔培养板中, 每孔100 μL。实验分为7组, 即阴性组(加入无细胞完全培养基), 空白组(加入含细胞的完全培养基), YWG-0%组(YWG-0%质量浓度梯度为12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0, 500.0 mg·L⁻¹), YWG组和YWG-20%组(YWG及YWG-20%质量浓度梯度设定为12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 mg·L⁻¹), YWG-40%和YWG-60%(YWG-40%及YWG-60%质量浓度梯度为12.5, 25.0, 50.0, 100.0 mg·L⁻¹)。按上述方法培养细胞并分组, 每组设4个复孔, 37℃, 5% CO₂培养24 h后, 每孔加入CCK-8溶液10 μL, 培养1 h后用酶标仪测定450 nm处的吸光度A, 重复3次。按照公式计算细胞存活率, 细胞存活率=(A_{给药组}-A_{阴性组})/(A_{空白组}-A_{阴性组})×100%。

2.4 炎症递质的测定

2.4.1 细胞分组与干预 实验分为8组, 即空白组(加入含细胞的完全培养基), 模型组(加入质量浓度为1 mg·L⁻¹的LPS), 地塞米松组(加入浓度为20 μmol·L⁻¹的地塞米松), YWG低、中、高剂量组(12.5, 50.0, 200.0 mg·L⁻¹), YWG-0%低、中、高剂量组(25, 100, 400 mg·L⁻¹), YWG-20%低、中、高剂量组(12.5, 50.0, 200.0 mg·L⁻¹), YWG-40%低、中、高剂量组(12.5, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹), YWG-60%低、中、

高剂量组(12.5, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹)。取对数生长期的RAW264.7细胞, 以1×10⁵个/mL的密度接种于24孔板中, 放置培养箱孵育24 h后给药。空白组加入完全培养基, 模型组加入终质量浓度为1 mg·L⁻¹的LPS, 给药组分别加入低、中、高质量分数的喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物和终质量分数为1 mg·L⁻¹的LPS, 地塞米松组加入浓度为20 μmol·L⁻¹的地塞米松和终质量分数为1 mg·L⁻¹的LPS, 共同作用24 h。

2.4.2 Griess法测定给药组对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液中NO的含量 收集各组细胞上清液, 严格按照NO检测试剂盒说明书进行测定: 将试剂盒中的NaNO₂对照品用完全培养基稀释成系列浓度。按50 μL/孔, 在96孔板中加入各浓度的对照品溶液及样品, 每孔再加入室温Griess Reagent I及II各50 μL, 避光静置10 min。于酶标仪540 nm处测定吸光度A, 根据NaNO₂标准曲线计算出各组上清液中NO的含量。

2.4.3 ELISA法检测给药组对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液中TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10释放的影响 收集各组细胞上清液, 严格按照试剂盒说明书进行测定; 设置对照品孔和样本孔, 对照品孔各加不同浓度的对照品50 μL, 样本孔中加入待测样本50 μL, 对照品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体100 μL, 用封板膜封住反应孔, 37℃恒温箱温育60 min后将浓缩液稀释按照要求稀释用于洗涤各孔。每孔加入底物A, B 50 μL, 37℃避光孵育15 min后每孔加入终止液50 μL, 在450 nm波长处测各孔A。

2.5 成分分析

2.5.1 供试品溶液的制备 分别取YWG及YWG-60%粉末各20 mg, 精密称定, 分别加入80%甲醇1 000 μL, 涡旋30 s后冰水浴超声10 min, 4℃13 800×g离心15 min, 取上清液过0.22 μm微孔滤膜, 即得。

2.5.2 色谱条件 根据文献[7]方法ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3.5 min, 5%~15%B; 3.5~6 min, 15%~30%B; 6~6.5 min, 30%B; 6.5~12 min, 30%~70%B; 12~12.5 min, 70%B; 12.5~18 min, 70%~100%B; 18~25 min, 100%B; 25~30 min, 5%B), 流速400 μL·min⁻¹, 进样量5 μL。

2.5.3 质谱条件 Triple TOF 5600型质谱仪能够在

控制软件(Analyst TF 1.7, AB Sciex)控制下基于IDA功能进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中,筛选出强度最强且大于100的分子离子进行采集对应的二级质谱数据。轰击能量为40 eV,碰撞能差20 V,每50 ms扫描15张二级谱图。ESI离子源参数设置:雾化气压(GS1)379.21 kPa,辅助气压379.21 kPa,气帘气压241.32 kPa,温度550 °C,喷雾电压5.5 kV(正离子模式)或-4 kV(负离子模式)。

3 结果

3.1 喜碱鸢尾根不同浓度乙醇洗脱物对RAW264.7细胞活力的影响 与空白组相比,喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物对RAW264.7细胞作用24 h后,YWG-0%组在12.5~400 mg·L⁻¹,YWG及YWG-20%在12.5~200 mg·L⁻¹,YWG-40%组及YWG-60%组在12.5~50 mg·L⁻¹的质量浓度范围内对细胞没有毒性;YWG质量浓度为12.5,25 mg·L⁻¹时,YWG-20%质量浓度为25 mg·L⁻¹时,细胞存活率增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);确定YWG-0%的安全给药质量浓度为12.5~400 mg·L⁻¹;YWG,YWG-20%的安全给药质量浓度为12.5~200.0 mg·L⁻¹;YWG-40%,YWG-60%的安全给药质量浓度为12.5~50 mg·L⁻¹。超过此给药浓度范围,细胞活力下降,对细胞有毒性作用。结果见表1。

3.2 喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物对LPS诱导的RAW264.7细胞释放炎症递质的影响 与空白组比较,模型组细胞上清液中NO,TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的含量显著升高($P<0.01$),IL-10的含量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,YWG低中高各剂量组均能明显降低细胞NO,TNF- α 和IL-1 β 的释放($P<0.05$, $P<0.01$),显著降低细胞IL-6的释放($P<0.01$),中、高各剂量组能显著提高细胞IL-10的释放($P<0.01$);YWG-20%和YWG-40%低、中、高各剂量组均能明显降低细胞NO,TNF- α 的释放($P<0.05$, $P<0.01$),显著降低细胞IL-1 β 和IL-6的释放($P<0.01$),能显著提高细胞IL-10的释放($P<0.01$);YWG-60%低、中、高各剂量组均能显著降低细胞NO,TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的释放($P<0.01$),提高IL-10的释放($P<0.01$);而YWG-0%只有高剂量组才能明显降低NO,IL-1 β 和IL-6的释放($P<0.05$, $P<0.01$),显著提高IL-10的释放($P<0.01$),而对TNF- α 的释放差异无统计学意义。见表2。

3.3 成分分析

3.3.1 数据处理 采用UHPLC-QTOF-MS/MS对

表1 喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物对RAW264.7细胞的毒性($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 1 Cytotoxicity of alcohol eluents from root of *Iris halophila* in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白		100±0.00
YWG	12.5	109.67±3.94 ¹⁾
	25.0	110.92±5.57 ¹⁾
	50.0	103.66±5.13
	100.0	105.32±4.53
	200.0	101.73±2.69
	400.0	88.31±8.68 ¹⁾
YWG-0%	12.5	101.45±4.73
	25.0	102.80±2.67
	50.0	107.42±1.76
	100.0	107.54±5.40
	200.0	111.82±1.56
	400.0	107.98±8.91
YWG-20%	500.0	86.48±3.86 ¹⁾
	12.5	105.74±2.15
	25.0	109.76±2.41 ¹⁾
	50.0	105.64±2.60
	100.0	108.25±2.83
YWG-40%	200.0	103.13±5.29
	400.0	89.60±3.46 ¹⁾
	12.5	101.44±4.86
	25.0	103.34±4.23
YWG-60%	50.0	103.74±2.17
	100.0	78.18±8.77 ¹⁾
	12.5	103.68±2.11
	25.0	107.39±4.75
YWG-60%	50.0	109.42±6.55
	100.0	83.39±5.20 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

YWG及YWG-60%进行检测,YWG及YWG-60%的总离子流色谱图(TIC)见图1。使用Progenesis QI软件将质谱原始导入。进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作,同时创建复方中相应中药代谢库,利用自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有MS/MS数据的峰进行物质鉴定。正、负离子模式共检出127种物质,将YWG及YWG-60%中相同成分峰面积进行对比,见表3。

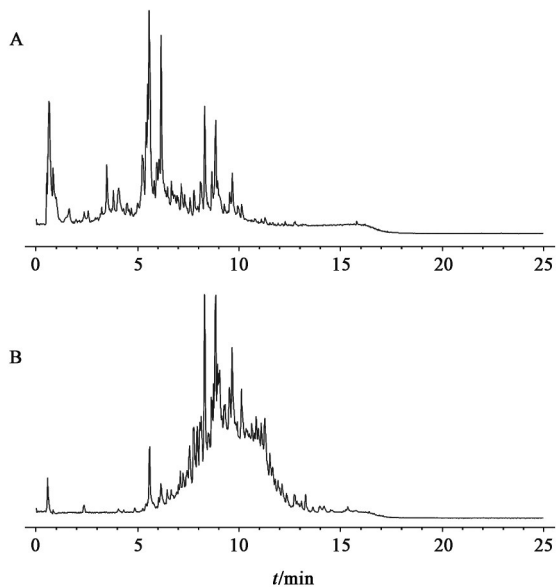
与YWG相比,YWG-60%中成分含量有升高、

表2 各药物组对NO, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6释放量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of alcohol eluents from root of *Iris halophila pall* on release of NO, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-10/ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
空白		8.84 \pm 1.42	91.31 \pm 3.23	55.20 \pm 1.68	12.31 \pm 2.57	7.96 \pm 0.02
模型		44.30 \pm 0.95 ¹⁾	342.63 \pm 7.77 ¹⁾	45.76 \pm 2.81 ¹⁾	66.20 \pm 0.21 ¹⁾	74.67 \pm 1.80 ¹⁾
地塞米松(mol·L ⁻¹)	20	28.42 \pm 0.87 ²⁾	286.66 \pm 11.55 ²⁾	79.08 \pm 1.28 ²⁾	32.76 \pm 0.26 ²⁾	49.30 \pm 0.44 ²⁾
YWG	12.5	39.06 \pm 1.37 ³⁾	319.72 \pm 4.29 ³⁾	55.34 \pm 0.82 ²⁾	63.61 \pm 0.36 ³⁾	68.00 \pm 1.04 ²⁾
	50.0	38.53 \pm 1.56 ³⁾	318.71 \pm 2.65 ³⁾	60.62 \pm 4.15 ²⁾	57.60 \pm 0.26 ²⁾	66.65 \pm 0.83 ²⁾
	200.0	37.31 \pm 0.81 ³⁾	315.30 \pm 9.05 ³⁾	63.51 \pm 1.16 ²⁾	52.62 \pm 0.34 ²⁾	63.08 \pm 1.54 ²⁾
YWG-0%	25	42.48 \pm 3.24	334.31 \pm 6.90	53.45 \pm 1.43 ²⁾	66.81 \pm 0.20	74.34 \pm 1.21
	100	42.25 \pm 2.00	326.50 \pm 8.18	56.30 \pm 1.22 ²⁾	65.80 \pm 1.14	72.14 \pm 2.16
	400	38.73 \pm 1.30 ³⁾	324.36 \pm 4.97	62.77 \pm 0.76 ²⁾	63.98 \pm 0.35 ³⁾	66.61 \pm 1.00 ²⁾
YWG-20%	12.5	38.24 \pm 0.99 ³⁾	319.31 \pm 4.30 ³⁾	52.72 \pm 0.71 ²⁾	59.32 \pm 0.39 ²⁾	65.47 \pm 1.56 ²⁾
	50.0	38.00 \pm 0.83 ³⁾	314.52 \pm 4.73 ³⁾	58.91 \pm 1.30 ²⁾	54.97 \pm 0.39 ²⁾	62.6 \pm 1.83 ²⁾
	200.0	36.50 \pm 1.78 ²⁾	311.49 \pm 8.59 ²⁾	66.96 \pm 0.41 ²⁾	49.93 \pm 0.30 ²⁾	61.06 \pm 2.14 ²⁾
YWG-40%	12.5	38.14 \pm 0.67 ³⁾	316.14 \pm 6.16 ³⁾	54.72 \pm 1.02 ²⁾	51.69 \pm 0.01 ²⁾	67.05 \pm 1.79 ²⁾
	25.0	35.28 \pm 3.16 ³⁾	303.57 \pm 7.86 ²⁾	60.73 \pm 1.10 ²⁾	50.26 \pm 0.42 ²⁾	62.14 \pm 1.03 ²⁾
	50.0	33.22 \pm 2.94 ²⁾	295.87 \pm 15.25 ²⁾	67.93 \pm 0.67 ²⁾	46.23 \pm 0.01 ²⁾	59.07 \pm 0.55 ²⁾
YWG-60%	12.5	37.04 \pm 0.57 ²⁾	310.31 \pm 4.64 ²⁾	61.81 \pm 1.46 ²⁾	49.82 \pm 0.15 ²⁾	59.92 \pm 1.05 ²⁾
	25.0	31.89 \pm 2.26 ²⁾	297.62 \pm 9.01 ²⁾	67.91 \pm 0.91 ²⁾	44.95 \pm 0.17 ²⁾	56.17 \pm 0.34 ²⁾
	50.0	30.67 \pm 2.01 ²⁾	294.13 \pm 6.94 ²⁾	74.01 \pm 1.02 ²⁾	39.02 \pm 0.48 ²⁾	52.39 \pm 0.88 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01,³⁾P<0.05。



A.YWG;B.YWG-60%

图1 YWG及YWG-60%UHPLC-QTOF-MS/MS检测的TIC

Fig. 1 TIC of YWG and YWG-60% determined by UHPLC-QTOF-MS/MS

下降和消失的情况。含量升高的物质有黄酮类(25种),三萜类,脂肪酸类,酯类和高分子饱和脂肪酸盐类等共45种;含量下降的有60种,包括少量黄酮类(20种),糖类,氨基酸类,有机酸类,香豆素和

生物碱类等;消失的物质有黄酮类(16种),糖类和氨基酸类等共21种。

各类成分在梯度洗脱下呈一定规律,3.50 min前洗脱的物质多为糖类和氨基酸类的初生代谢产物(31种),含量均呈现下降或消失的趋势;3.50~10.72 min洗脱的物质主要为黄酮类(61种)和极少量单萜、生物碱类和香豆素类物质的次级代谢产物,且这些物质的含量在3.50~6.50 min均呈下降或消失的趋势(黄酮物质21种),在6.50~9.66 min洗脱下来的黄酮化合物含量多呈上升趋势(25种),9.80~10.72 min洗脱下来的黄酮化合物含量又呈下降或消失的趋势(10种);10.75 min后洗脱下来的物质主要为三萜、脂肪酸、酯类等非黄酮类次级代谢产物(24种)。

3.3.2 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

基于UHPLC-QTOF-MS/MS所测数据具有物质种类多,检测样本量偏少的特性,在这些变量中既包含与分类变量相关的差异变量。因此,这可能会导致如果使用偏最小二乘法(PLS)或主成分分析(PCA)进行分析,由于相关变量的影响,差异变量会分散到更多的主成分上,导致后续分析无法进行的更好,故选择采用OPLS-DA对结果进行分析。通过

表3 YWG及YWG-60%UHPLC-QTOF-MS/MS检测的辨识成分

Table 3 Compositions of YWG and YWG-60% determined by UHPLC-QTOF-MS/MS

No.	t_r /min	加合方式	m/z	化合物名称	分子式	化合物类型	峰面积比 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	变化 情况
1	0.57	M+H	175.118 6	L-精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	氨基酸	0.36±0.01	↓
2	0.60	M+Na	527.157 7	松三糖,水合物	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	低聚糖	0.02±0.00	↓
3	0.60	M+Na	689.210 3	麦芽四糖	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	低聚糖	0.02±0.00	↓
4	0.60	M+Na	851.263 6	麦芽五糖	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	低聚糖	0.02±0.00	↓
5	0.60	M-H, M+FA-H	179.055 8	D-半乳糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	单糖	0.08±0.02	↓
6	0.62	M+Na	365.104 8	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	低聚糖	0.05±0.01	↓
7	0.64	M-H	133.013 9	DL-苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	有机酸	0.01±0.001	↓
8	0.64	M+H	130.085 7	N-甲基-L-脯氨酸	C ₆ H ₁₁ NO ₂	氨基酸	0.02±0.00	↓
9	0.64	M+H	144.101 7	水苏碱	C ₇ H ₁₃ NO ₂	生物碱	0.07±0.06	↓
10	0.66	M-H	195.050 8	D-葡萄糖	C ₆ H ₁₂ O ₇	单糖	0.03±0.001	↓
11	0.82	M+FA-H	549.168 0	棉子糖	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	低聚糖	0	-
12	0.82	M+FA-H	711.223 0	蔗果四糖	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	低聚糖	0	-
13	0.84	M-H	191.019 6	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	有机酸	0	-
14	0.86	M+H	182.080 7	L-酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	氨基酸	0.06±0.00	↓
15	0.86	M-H	188.056 4	N-乙酰-DL-谷氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	氨基酸	0	-
16	0.97	M-H	161.044 9	3-羟基-3-甲基谷氨酸	C ₆ H ₁₀ O ₅	氨基酸	0.03±0.01	↓
17	0.99	M+H	132.101 2	L-异亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	氨基酸	0.10±0.03	↓
18	1.04	M-H	169.014 0	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	多酚类	0.01±0.00	↓
19	1.48	M-H	164.071 2	L-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	氨基酸	0.17±0.01	↓
20	1.50	M+H-H ₂ O	120.079 6	2-氨基-1-苯乙醇	C ₈ H ₁₁ NO	醇类	0.13±0.02	↓
21	1.50	M+H	166.085 5	DL-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	氨基酸	0.20±0.02	↓
22	1.61	M-H	167.034 6	3,4-二羟基苯乙酸	C ₈ H ₈ O ₄	有机酸	0.01±0.001	↓
23	2.29	M+H	188.070 2	吡啶-3-丙烯酸	C ₁₁ H ₉ NO ₂	有机酸	0.60±0.03	↓
24	2.33	M+H-H ₂ O, M+H	143.105 9	丙位辛内酯	C ₈ H ₁₄ O ₂	脂类	0.11±0.02	↓
25	2.38	M-H	198.032 6	L-2-氯苯丙氨酸	C ₉ H ₁₀ ClNO ₂	氨基酸	1.31±0.08	↑
26	2.53	M-H	137.024 0	3,4-二羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₃	醛类	0.33±0.47	↓
27	2.59	M+H-H ₂ O, M+H	195.064 9	反式阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	苯丙酸类	0.01±0.00	↓
28	2.86	M-H	175.061 1	2-异丙基苹果酸	C ₇ H ₁₂ O ₅	有机酸	0	-
29	3.22	M-H	179.034 9	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	苯丙酸类	0.08±0.01	↓
30	3.24	M-H	167.034 9	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	有机酸	0.10±0.03	↓
31	3.48	M-H	121.029 3	对羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	醛类	2.99±0.43	↑
32	3.53	M-H	421.076 3	异芒果苷	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	苯并色原酮	0.03±0.001	↓
33	3.54	M+H	423.091 7	芒果苷	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	苯并色原酮	0.01±0.00	↓
34	3.72	M+H, M+Na	251.104 9	2-(1',2',3',4'-tetrahydroxybutyl)quinoxaline	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄	生物碱	0.02±0.00	↓
35	3.81	M+Na	473.104 4	黄诺马苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	二氢黄酮	0.01±0.00	↓
36	3.91	M-H	317.066 0	3,5,2',3'-四羟基-7-甲氧基二氢黄酮	C ₁₆ H ₁₄ O ₇	二氢黄酮	0	-
37	4.16	M+H-H ₂ O	768.233 7	malvidin 3-p-coumarylrutinoside	C ₃₈ H ₄₁ O ₁₈	花色苷类	0	-
38	4.28	M-H	163.039 7	邻羟基肉桂酸(邻香豆酸)	C ₉ H ₈ O ₃	苯丙酸类	0.21±0.07	↓
39	4.45	M-H	563.141 0	维采宁-3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	黄酮	0	-
40	4.48	M+H, M+Na	565.154 2	夏佛塔苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	黄酮	0	-
41	4.67	M+FA-H	669.168 0	鸢尾黄素 7-O-龙胆二糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	异黄酮	0.02±0.001	↓
42	4.87	M-H	173.081 7	辛二酸	C ₈ H ₁₄ O ₄	有机酸	0.19±0.06	↓
43	5.03	M-H	609.146 5	germanaism D	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	异黄酮	0	-
44	5.06	M+H-H ₂ O, M+H	121.100 6	异佛尔酮	C ₉ H ₁₄ O	萜类	0.09±0.01	↓

续表3

No.	t_r /min	加合方式	m/z	化合物名称	分子式	化合物类型	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
45	5.38	M-H	177.017 6	5,7-二羟基色原酮	C ₉ H ₆ O ₄	酮类	0.03±0.001	↓
46	5.57	M-H	653.173 0	5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyisoflavone-7-O-(6"-glucosylglucoside)	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇	异黄酮	0.18±0.02	↓
47	5.68	M+FA-H	507.113 6	射干苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	异黄酮	0.04±0.001	↓
48	5.72	M-H	207.029 5	秦皮素	C ₁₀ H ₈ O ₅	香豆素类	0.12±0.05	↓
49	5.83	M+FA-H	549.124 8	germanaism A	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂	异黄酮	0.46±0.03	↓
50	5.92	M-H	431.097 4	槐角苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	异黄酮	0.03±0.02	↓
51	6.03	M-H ₂ O-H	763.210 5	germanaism F	C ₃₅ H ₄₂ O ₂₀	异黄酮	0.11±0.001	↓
52	6.07	M+FA-H	505.134 0	irisolidone 7-O-rhamnoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	异黄酮	0	-
53	6.13	M+Na	659.156 9	germaism E	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	异黄酮	0.02±0.02	↓
54	6.15	M+H, M+Na	515.114 9	鸢尾甲苷 A	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	异黄酮	0.12±0.01	↓
55	6.22	M-H	187.097 2	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	有机酸	0.36±0.08	↓
56	6.25	M-H	461.107 6	高车前苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	黄酮	0.04±0.01	↓
57	6.29	M+FA-H	373.092 2	isocladrastin	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	异黄酮	0.10±0.01	↓
58	6.30	M+H-H ₂ O, M+H	357.096 6	irisjaponin B	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	异黄酮	0.02±0.01	↓
59	6.32	M+H	523.142 7	iridin	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	异黄酮	0	-
60	6.82	M-H	315.050 4	桉柳黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	黄酮	1.22±0.22	↑
61	6.93	M+FA-H	519.113 8	germanaism B	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	异黄酮	0.01±0.00	↓
62	6.97	M+FA-H	373.055 6	irisoid A	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	修饰黄酮	2.34±0.36	↑
63	7.13	M-H ₂ O-H, M+FA-H	443.097 9	日当药黄素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	黄酮	0	-
64	7.19	M+H-H ₂ O, M+H	237.184 1	莪术醇	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	萜类	0.06±0.00	↓
65	7.22	M-H	201.112 7	癸二酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	有机酸	0.27±0.15	↓
66	7.47	M+H, M+Na	513.099 2	iriflogenin 4'-O-glucoside	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	异黄酮	15.55±0.59	↑
67	7.56	M+H	477.138 0	irisolidone 7-O-β-D-glucoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	异黄酮	1.61±0.19	↑
68	7.57	M-H	315.050 4	6-甲氧基藤黄菌素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	黄酮	13.22±1.02	↑
69	7.57	M-H	491.118 4	橙黄决明素-6-O-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	蒽醌类	0.28±0.14	↓
70	7.61	M+H, M+Na	329.065 0	iriflogenin	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	异黄酮	20.41±1.81	↑
71	7.92	M+H	333.096 3	3,5,3'-trihydroxy-7,2'-dimethoxyflavanone	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	二氢黄酮	12.64±1.06	↑
72	7.93	M-H	269.045 2	金雀异黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	异黄酮	7.74±0.95	↑
73	8.06	M+H, M+Na	301.070 3	鸢尾黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	异黄酮	8.31±1.42	↑
74	8.10	M+FA-H	491.119 0	当药黄素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	黄酮	3.34±0.42	↑
75	8.28	M-H	215.128 2	十一烷二酸	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	有机酸	2.57±2.22	↑
76	8.61	M+H, M+Na	343.080 6	iriskashmirianin	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	异黄酮	9.87±1.17	↑
77	8.65	M-H	299.055 3	高车前素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	黄酮	3.14±0.14	↑
78	8.76	M-H	271.060 2	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	黄酮	4.62±0.22	↑
79	8.81	M+H, M+Na	327.049 3	irisoid D	C ₁₇ H ₁₀ O ₇	修饰黄酮	5.81±0.36	↑
80	8.81	M+H, M+Na	331.080 3	irisflavone A	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	黄酮	5.31±0.45	↑
81	8.83	M-H	299.055 2	红车轴草素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	异黄酮	3.32±0.22	↑
82	8.86	M+H	303.085 6	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	二氢黄酮	3.13±0.74	↑
83	8.91	M+H-H ₂ O	343.080 6	irisflavone C	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	黄酮	16.29±3.79	↑
84	9.02	M+H, M+Na	313.069 8	irisone A	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	异黄酮	3.68±0.28	↑
85	9.17	M+FA-H	343.044 9	德鸢尾素	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	异黄酮	4.57±0.33	↑
86	9.26	M-H	315.050 1	鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	黄酮	21.44±1.56	↑

续表 3

No.	t_R /min	加合方式	m/z	化合物名称	分子式	化合物类型	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
87	9.33	M+H	315.085 5	5,2'-dihydroxy-7,8-dimethoxyiso-flavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	异黄酮	11.73±0.63	↑
88	9.42	M-H	297.039 6	3',4'-methylenedioxyorobol	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	异黄酮	0.01±0.02	↓
89	9.42	M-H	343.081 1	5,3'-dihydroxy-6,7,4'-trimethoxy flavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	黄酮	0.33±0.01	↓
90	9.48	M+H-H ₂ O	299.055 1	5,6,7,4'-tetrahydroxy-8-methoxy isoflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异黄酮	0	-
91	9.64	M-H	313.037 2	tenuifone	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	异黄酮	9.47±0.98	↑
92	9.64	M+H,M+Na	315.085 2	irisolidone	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	异黄酮	3.53±0.08	↑
93	9.66	M-H	313.069 2	pectolarigenin	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	黄酮	1.86±0.14	↑
94	9.82	M+H-H ₂ O	299.055 2	5,6,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyisoflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异黄酮	0	-
95	9.97	M-H	255.066 2	pinocembrin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	二氢黄酮	0	-
96	10.01	M+H-H ₂ O	329.064 9	8-hydroxyiristectigenin A	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	异黄酮	0	-
97	10.03	M-H	297.039 5	irisoninB	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	异黄酮	0	-
98	10.08	M+H,M+Na	327.085 6	irisolone methyl ether	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	异黄酮	0	-
99	10.14	M-H	299.055 3	5,2'-dihydroxy-6,7-methylenedioxyflavanone	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	二氢黄酮	0.46±0.07	↓
100	10.17	M+H,M+Na	285.111 7	4',6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	查尔酮	0.14±0.04	↓
101	10.34	M+H-H ₂ O	285.075 4	5,2',3'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	二氢黄酮	0	-
102	10.54	M-H	285.076 1	山姜酮	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	二氢黄酮	0	-
103	10.72	M+H	313.069 9	4'-methoxy nigricin,5-hydroxy-4'-methoxy-6,7-methylenedioxyisoflavone	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	异黄酮	0.73±0.18	↓
104	10.75	M+H-H ₂ O	209.189 7	myristoleic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	脂肪酸	11.01±2.16	↑
105	10.99	M+FA-H	531.330 2	iridotectoral A	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	三萜类	16.72±0.99	↑
106	11.10	M-H	313.237 5	12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	脂肪酸	16.69±1.70	↑
107	11.27	M-H	313.237 4	(±)-苏式-9,10-二羟基-12(Z)-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	脂肪酸	15.53±0.78	↑
108	11.38	M+FA-H	535.360 4	iritectol B	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	三萜类	22.47±1.08	↑
109	11.73	M+Na	509.319 3	28-deacetylbelamcandal	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	三萜类	4.45±0.31	↑
110	11.92	M+FA-H	315.253 0	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	脂类	9.48±0.37	↑
111	12.12	M-H	265.147 0	十二烷基硫酸盐	C ₁₂ H ₂₆ O ₄ S	饱和脂肪醇盐	31.60±23.67	↑
112	12.28	M+H-H ₂ O	457.365 2	iridobelamal A	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	三萜类	2.00±0.14	↑
113	13.02	M+H-H ₂ O,M+H, M+Na	295.226 3	9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	脂肪酸	0.30±0.07	↓
114	13.12	M+H,M+Na	149.022 8	1,2-benzenedicarboxylic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	有机酸	1.80±0.34	↑
115	13.12	M+H-H ₂ O	205.085 6	邻苯二甲酸二乙酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	酯类	1.76±0.42	↑
116	13.12	M+H-H ₂ O	301.140 3	邻苯二甲酸二异丁酯	C ₈ H ₆ O ₄	酯类	1.12±0.16	≈
117	13.26	M-H	243.195 7	2-羟基十四烷酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	有机酸	15.51±2.35	↑
118	13.96	M-H	325.183 1	4-dodecyl-benzene sulfonate	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ S	磺酸盐	15.21±8.24	↑
119	14.20	M+H,M+Na	425.212 9	乙酰柠檬酸三丁酯	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	酯类	5.63±1.39	↑
120	14.95	M-H	435.250 3	1-oleoyl-L-α-lysophosphatidic acid	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P	脂肪酸	0.40±0.06	↓
121	15	M-H	271.227 3	2-羟基十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	有机酸	1.23±0.34	↑
122	15.56	M+H,M+Na	282.278 6	油酸酰胺	C ₁₈ H ₃₅ NO	酰胺类	0.98±0.73	↓
123	16.76	M+H,M+Na	284.294 3	硬脂酰胺	C ₁₈ H ₃₇ NO	酰胺类	2.57±3.78	↑
124	17.85	M+H,M+Na	393.295 9	己二酸二(2-乙基己)酯	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	酯类	0.47±0.10	↓
125	17.85	M+H,M+Na	413.264 5	邻苯二甲酸二辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	酯类	2.81±0.66	↑
126	17.87	M+H	259.189 9	己二酸二异丁酯	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	酯类	0.60±0.15	↓
127	18.05	M+H,M+Na	338.340 8	芥酸酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	酰胺类	0.79±0.38	↓

注:峰面积比表示 YWG-60% 与 YWG 中同一成分的峰面积比值;- .60% 乙醇洗脱后消失成分;≈.峰面积基本不变;↑.峰面积升高;↓.峰面积降低。

分析,可以过滤掉检出物中与分类变量不相关的正交变量,并对非正交变量和正交变量分别分析,从而获取更加可靠的检出物的组间差异与实验组的相关程度信息^[8-9]。YWG-60%对YWG的OPLS-DA模型得分散点图见图2,图中横坐标表示第一主成分的预测主成分得分,展示样本组间差异,纵坐标表示正交主成分得分,展示样本组内差异,每个散点代表一个样本,散点形状和颜色表示不同的实验分组。从OPLS-DA得分图的结果可以看出,两组样本区分非常明显,样本全部处于95%置信区间内,YWG和YWG-60%区分显著。经200次置换检验,对模型有效性做进一步的检验,说明建立的模型符合样本数据的真实情况,同时原模型具有良好的稳健性(正离子模式 $R^2Y=0.94$, $Q^2=-0.49$,负离子模式 $R^2Y=0.99$, $Q^2=-0.44$),不存在过拟合现象。

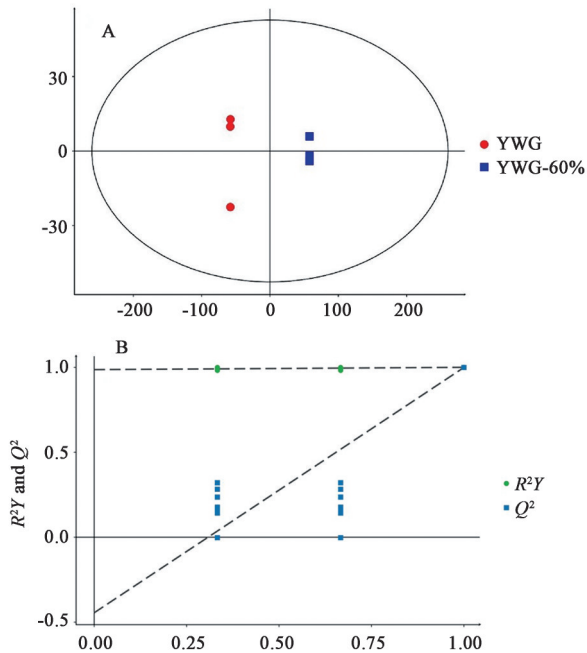


图2 YWG-60%组对YWG组的OPLS-DA(A)及置换检验(B) of OPLS-DA model for YWG-60% group vs YWG group

3.3.3 层次聚类分析 对差异性检测物归一化后的数据进行聚类分析,所得热力图见图3。横坐标代表YWG和YWG-60%,纵坐标代表该组对比的差异代谢物,不同位置的色块代表对应位置检出物的相对表达量(红色代表显著增加,蓝色代表显著降低),同样可见YWG和YWG-60%成分有差异。

3.3.4 黄酮类化合物的辨识与抗炎活性的构效关系 根据文献研究,鸢尾属植物抗炎、抗氧化、抗肿瘤活性成分主要为黄酮类化合物^[10-11],故对上述辨识的黄酮类化合物进行汇总及分析,共辨识出61种

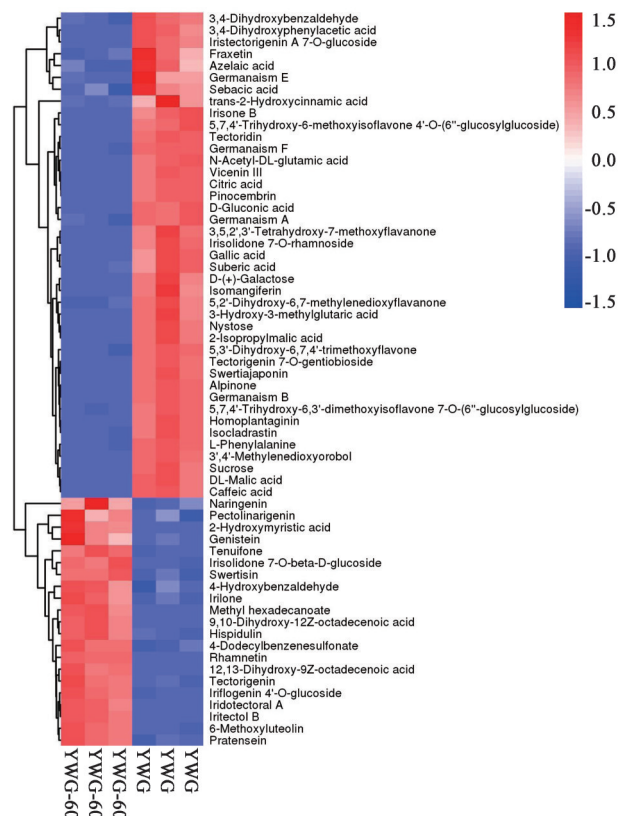


图3 YWG-60%组对YWG组的层次聚类分析热力分析
Fig. 3 Heatmap of hierarchical clustering analysis for YWG-60% group vs YWG group

黄酮类化合物。与YWG相比,YWG-60%中含量升高的黄酮类共25种,包括怪柳黄素,irisoid A,鸢尾黄素4'-O-葡萄糖苷,irisolidone 7-O-β-D-glucoside,6-甲氧基藤黄菌素,iriflogenin,3,5,3'-三羟基-7,2'-二甲氧基二氢黄酮,金雀异黄酮,鸢尾黄素,当药黄素,nigricanin,高车前素,柚皮素,irisoid D,irisflavone A,红车轴草素,5,8,2'-三羟基-7-甲氧基二氢黄酮,irisflavone C,irison A,德鸢尾素,鼠李素,5,2'-二羟基-7,8-二甲氧基异黄酮,tenuifone,尼泊尔鸢尾异黄酮,pectolinarigenin。

现已证实,不同分子结构的黄酮类化合物表现出不同程度的抗炎效果,一般来说,与羟基的位置和数量、羟基糖基化或甲氧基化等结构有关系^[12-13]。当黄酮A环的5和7位同时有甲氧基,A,B环酚羟基的数目增多,尤其B环含3',4'-邻二酚羟基结构或羟基甲基化时,其抗炎活性更强^[14-15]。在辨识的25种含量升高的黄酮化合物中,对峰面积比相对较高的黄酮类化合物(鼠李素,6-甲氧基藤黄菌素,当药黄素,高车前素,pectolinarigenin,柚皮素),异黄酮类化合物(金雀异黄酮,鸢尾黄素,红车轴草素,iriflogenin 4'-O-glucoside,德鸢尾素和tenuifone)等

12种化合物进行分析,发现这些化合物A环的5位和7位均有羟基取代或羟基被甲氧基化,B环上多含有3',4'-邻二酚羟基或羟基被甲基化。提示这些化合物A,B环上的羟基、甲氧基应该是YWG-60%抗炎活性的活性基团。YWG-60%中峰面积比显著上升的鼠李素,是一种甲基化的槲皮素,已有文献报道了具有抗炎、抗氧化等多种生物活性^[16-17]。同时YWG-60%中峰面积比显著上升的异黄酮类化合物金雀异黄酮、鸢尾黄素、德鸢尾素也有文献证实了具有较强的抗炎作用^[18-21]。

4 讨论

炎症反应是机体预防感染和防止损伤的一种防御机制,一般炎症对人体有益,有利于清除致病炎症因子,可防止细菌和病毒感染^[22]。然而长时间的炎症可能会导致机体产生一系列异常的应激反应,巨噬细胞会大量释放TNF- α ,IL-6,NO,IL-1 β 等炎症因子,对机体造成病理损伤,从而引起多种疾病^[23-24]。迄今,在临床上使用的抗炎药主要包括甾体抗生素(如地塞米松)和非甾体抗生素(如阿司匹林)。但因其诸多不良反应(例如引起类肾上腺皮质功能亢进症、严重的胃肠道反应等),限制了其在临床的应用^[25]。因此从天然药物中开发安全有效的抗炎药物成为研究焦点。

鸢尾属植物根及根状茎在许多国家和地区被广泛用于治疗炎症相关疾病^[26],鸢尾属植物活性成分主要为黄酮类化合物。黄酮类化合物是自然界常见的3大类植物活性物质之一,具有免疫调节、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、保护心肌细胞等多种功效^[27-32]。本实验将喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物干预LPS诱导的RAW264.7细胞后,NO,TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的分泌受到不同程度抑制,IL-10的分泌受到不同程度促进,说明喜碱鸢尾根不同体积分数乙醇洗脱物可以通过抑制巨噬细胞NO,TNF- α ,IL-1 β 和IL-6的释放,促进IL-10的分泌来发挥其抗炎作用。其中YWG-60%抗炎活性最显著,而YWG-0%抗炎活性不显著,说明这可能是纯水洗脱下来的物质多为色素和水溶性杂质的原因。实验结果也表明随着洗脱液中乙醇浓度的增大,洗脱物的抗炎活性逐渐增强。

与YWG相比,YWG-60%中含量升高的物质主要为黄酮类,且从黄酮母核结构分析看主要为A,B环上常有酚羟基、甲氧基等活性基团取代的黄酮类和异黄酮类,由此提示YWG-60%抗炎活性显著增强可能与其含有这些类型黄酮类成分有关。本实

验的研究为阐明喜碱鸢尾根水提物药效物质基础提供了一定科学理论基础,也为新疆民间抗哮喘古方罗欧咳祖帕复方的深入开发研究提供科学数据支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LIU Q Q, TANG J, WANG W L, et al. Transcriptome analysis reveals complex response of the medicinal/ornamental halophyte *Iris halophila* Pall. to high environmental Salinity [J]. *Ecotoxicol Environment Safety*, 2018, 165: 250-260.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999, 61.
- [3] MIKHAILENKO O A, KRECHUN A V, KOVALEV V N. Carboxylic acids from *Iris graminea* and *I. halophila* [J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54 (5): 956-958.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:维吾尔药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:297.
- [5] 李小飞,谢丽琼,田聪,等. 喜碱鸢尾根醇提取物抗氧化活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(11): 96-100.
- [6] 马玉,田春鸿,孙丽婷,等. 维药鸢尾根提取物抑制变异链球菌生物膜的初步研究[J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(15): 39-41.
- [7] LI Y Y, LIU X H, LIU S Q, et al. Untargeted metabolomics reveals the protective effect of a traditional Chinese herbal decoction on cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, doi: 10.1155/2020/8524132.
- [8] 石典花,戴衍朋,王丽凤,等. 基于UHPLC-QTOF-MS/MS辨识的侧柏叶炒炭前后化学成分分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(8): 107-116.
- [9] TRYGG J, WOLD S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)[J]. *J Chemometrics*, 2002, 16(3): 119-128.
- [10] 孟凡虹,赵瑞瑞,胡振宇,等. 鸢尾属植物的化学物质基础及其药用价值研究进展[J]. *南方农业*, 2016, 10(21): 91-93.
- [11] 杨阳,杨黎彬,赵长琦. 鸢尾属植物中的黄酮类成分及其生物活性[J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1692-1703.
- [12] 常军,王晨曦,李玉萍. 天然黄酮类化合物的构效关系最新研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(7): 1006-1010.

- [13] CHEN L, TENG H, XIE Z, et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: an update on structure-activity relationship [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(4):513-527.
- [14] NOSHITA T, MIURA K, IKEDA K, et al. Structure-activity relationships of flavanones, flavanone glycosides, and flavones in anti-degranulation activity in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells [J]. *J Nat Med*, 2018, 72(2):551-556.
- [15] CRASCI L, PANICO A. Protective effects of many citrus flavonoids on cartilage degradation process [J]. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2013, 4(3):279-283.
- [16] NOVO B M, HESSEL G H, FABRI B R C, et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A₂ [J]. *Molecules*, 2017, 22(9):E1441.
- [17] ZHANG W, LI B, GUO Y, et al. Rhamnetin attenuates cognitive deficit and inhibits hippocampal inflammatory response and oxidative stress in rats with traumatic brain injury [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(1):35-41.
- [18] 曾小云,张丽容. 不同剂量金雀异黄酮对骨关节炎模型大鼠关节疼痛、炎症的抑制作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35):5607-5612.
- [19] 杨阳,董晓芳,申美伦,等. 膜苞鸢尾和中亚鸢尾中抑制脂多糖诱导小鼠RAW264.7细胞产生NO的活性成分研究[J]. *中草药*, 2018, 49(23):5503-5509.
- [20] CONFORTI F, RIGANO D, MENICHINI F, et al. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1):62-67.
- [21] 吴怡,姜鸿,张颖,等. 探讨鸢尾黄素对感染后咳嗽豚鼠的抗气道炎症作用[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(2):106-109.
- [22] TOMANI J C D, KAGISHA V, TCHINDA A T, et al. The inhibition of NLRP3 inflammasome and IL-6 production by *Hibiscus noldeae* Baker f. Derived constituents provides a link to its anti-inflammatory therapeutic potentials [J]. *Molecules*, 2020, 25(20):4693.
- [23] 姜华,闫宜青,江维,等. NLRP3炎症小体活化、调控机制及相关疾病机制[J]. *中国科学:生命科学*, 2017, 47(1):125-131.
- [24] 王霞,王廷璞,袁毅君,等. 红茂草异紫堇碱对LPS诱导小鼠RAW264.7细胞炎症因子的影响[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(4):178-180, 183.
- [25] 杨莺,姚新月,李海波. 山楂叶金丝桃苷对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, doi: 11.3554.R.20200609.1618.004.
- [26] 杨阳,张绪阳,常利华,等. 5种鸢尾属药用植物甲醇提取物体外抗炎活性研究[J]. *中南药学*, 2019, 17(2):199-203.
- [27] 牟佳佳,邱爽,陈党辉,等. 天然黄酮类化合物抑制细胞周期蛋白依赖性激酶研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37(9):852-864.
- [28] JIANG H, ZHANG C, HE W. The Effects of dracocephalum heterophyllum benth flavonoid on hypertrophic cardiomyocytes induced by angiotensin II in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(24):6322-6330.
- [29] HUGHES S D, KETHEESAN N, HALEAGRAHARA N. The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(17):3601-3613.
- [30] 陈永钧,龙晓英,潘素静,等. 黄酮类化合物的药效机制及构效关系研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11):337-344.
- [31] 王虹,陈晓云,宁静等. 黄酮类化合物对免疫相关信号通路的调控作用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(12):102-105.
- [32] AL RIMAWI F, ABU LAFI S, ABBADI J, et al. Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* plant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity [J]. *Afr J Tradit Complem*, 2017, 14(2):130-141.

[责任编辑 顾雪竹]