

- ◆ 中国科技核心期刊
- ◆ 美国CA、波兰IC收录期刊
- ◆ 中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊
- ◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊



ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

2025年1月 第23卷 第1期
Volume 23 Number 1 January 2025

CENTRAL
SOUTH
PHARMACY

- ◆ 固有免疫与心脑血管疾病专题
- ◆ 现代分析技术在中药研究中的应用研究专题
- ◆ 基于血浆非靶向代谢组学的慢性疲劳综合征大鼠发病机制的初步研究
- ◆ 天然产物香草木宁的大规模全合成

ISSN 1672-2981



1
2025



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

经过多项学术指标综合评定及同行专家
评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期
刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2024年9月

证书编号: 2023-G599-0867

有效期至: 2025年12月





中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第23卷 第1期(总第228期) 2025年1月20日出版

目 次

顾问

周宏灏

主编

李焕德

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省科学技术协会

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民中路 139 号中南

大学湘雅二医院内

出版: 《中南药 学》编辑部

发行: 湖南省报刊发行局

印刷: 长沙建华印务有限公司

订阅: 全国各地邮局

定价: 每期 30.00 元, 全年 360.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证: 4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2025 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

固有免疫与心脑血管疾病专题

(1) 胞质 DNA 感受器在动脉粥样硬化中的研究进展

..... 陈靓雯, 章越凡

(9) 中性粒细胞在创伤性脑损伤中的研究进展

..... 侯志琦, 马玉林, 章越凡

现代分析技术在中药研究中的应用研究专题

(14) 现代仪器分析技术在中药多糖结构表征中的应用

..... 张玲雨, 王影, 高志杰, 等

(23) 基于离线二维色谱 - 质谱联用技术的何首乌化学成分表征研究

..... 母乃匀, 周琳, 范新玉, 等

研究论文

(32) 基于血浆非靶向代谢组学的慢性疲劳综合征大鼠发病机制的初步研究

..... 苏芮, 王婷婷, 田骄, 等

(41) 华重楼的化学成分研究

..... 王冰雯, 张从钰, 田韵远, 等

(46) 天然产物香草木宁的大规模全合成

..... 张引弟, 方静, 蒋跃平, 等

(51) 基于 GC-MS 技术分析金钱白花蛇蛇油不同脱腥方法差异

..... 胡祖成, 董爽, 张馨雨, 等

(60) 野蚕豆根中化学成分及抗肿瘤活性研究

..... 高艳梅, 刘鑫澜, 朱朋艳, 等

(66) 茯神木中三萜类化学成分研究

..... 杨财子, 邓子怡, 孙云鹏, 等

(73) 不同产地老鹰茶挥发油化学成分分析与比较

..... 陈欢, 谈利红, 曹纬国, 等

(78) 不同等级茯苓块、茯苓片的外观性状与内在成分的相关性研究

..... 黄佳静, 房悦, 王妍妍, 等

(84) 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法的化痰合剂体外及入血成分分析

..... 孟慧頔, 程雪梅, 党蕊, 等

(94) 四神丸改善肠道屏障功能缓解伊立替康肠道毒性的研究

..... 朱娇娇, 朱晓俊, 严自强

(100) 熊果酸通过 Hippo-YAP 信号通路抑制乳腺癌细胞增殖、迁移与凋亡的研究

..... 陶然然, 胡俊杰, 郑国华, 等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (排名不分先后)

王 玉 向大雄 刘 韶 刘芳群
孙国祥 孙铁民 苏薇薇 张毕奎
范国荣 赵志刚 原永芳 潘卫三

编委 (排名不分先后)

丁劲松 于海洋 马恩龙 王 玉
王 峰 王 珊 王立辉 王永军
王淑梅 王朝辉 文晓柯 方平飞
尹 桃 邓银华 左美玲 左笑丛
卢海儒 史志华 冯 星 边 原
吕永宁 朱运贵 朱荣华 向大雄
刘 娜 刘 韶 刘文虎 刘艺平
刘芳群 刘茂柏 刘建平 刘高峰
刘塔斯 刘雁鸣 汤海峰 孙 进
孙平华 孙国祥 孙铁民 劳海燕
苏薇薇 李 昕 李 勇 李文龙
李文莉 李顺祥 李晓宇 李健和
李湘平 杨志平 杨星钢 杨献文
肖 雪 肖贵南 何 丹 何江江
何鸽飞 余自成 谷福根 张 俐
张 峻 张毕奎 张洪文 陈 力
陈 琦 陈 碧 陈卫东 陈西敬
陈勇川 武新安 范国荣 金鹏飞
周 权 屈 建 孟宪生 赵立波
赵志刚 姜志平 姜德建 姜月芬
宫 建 祝德秋 秦红岩 袁 成
袁 易 贾素洁 夏道宗 原永芳
徐 珽 徐 萍 徐必学 徐华丽
高利臣 郭 韧 郭怀忠 郭建军
唐 芳 曹 玲 常福厚 章超凡
巢志茂 彭文兴 董亚琳 董得时
蒋孟良 覃 丽 傅 强 温金华
谢 诚 谢奕丹 睢大策 肇丽梅
翟 青 黎 敏 颜 苗 潘卫三
魏高文

- (107) 4, 4'-二甲氧基查耳酮对人胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制
..... 曹开美, 王腾飞, 陈凤, 等
- (114) 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法和网络药理学探讨草归除湿活血颗粒治疗高尿酸血症的机制 ... 古丽达力·赛里克, 汪建萍, 林欣悦, 等
- (124) 檀香醇提物的化学成分研究 彭红星, 马懿飞, 汤杰豪, 等
- (129) 基于网络药理学探讨欣力康胶囊对 EGFR 依赖性 & 奥希替尼耐药性非小细胞肺癌细胞增殖抑制作用及机制验证
..... 杨灿, 张丽娜, 刘霞, 等
- (138) 龙藤复方对类风湿关节炎大鼠模型的治疗作用研究
..... 刘皓玲, 赵一颖, 赵驿歌, 等
- (143) 没食子酸改善 CAR-T 诱发的细胞因子风暴研究
..... 罗志强, 史甲儒, 姜其耀, 等
- (149) 猪、牛、羊源依诺肝素钠的制备及结构研究
..... 杜曦, 杨祎, 王亮, 等

综述

- (156) 基于多维谱效关系的中药质量控制与安全性评价的研究进展
..... 廖威, 李文晴, 吕颖, 等
- (165) 细粒剂的制备工艺研究及应用进展 ... 黄倩萌, 赵祥程, 丁劲松
- (174) 鞘内 / 脑室内注射抗菌药物治疗中枢神经系统感染的研究进展
..... 赵宗彪, 赵为陈, 何春远, 等
- (179) 抗体药物偶联物相关间质性肺疾病的研究进展
..... 黎红豆, 邢孔浪
- (184) 托法替布在幼年特发性关节炎中的应用研究进展
..... 周敬强, 林穆娜, 张亚萍, 等
- (189) 用于治疗骨关节炎的非甾体抗炎药关节内递送系统研究进展
..... 赵跃萍, 徐锁成, 李晓丹, 等
- (196) 异黄酮酚药理作用及机制的研究进展
..... 王海波, 刘静蕊, 高莹莹, 等
- (203) 高海拔缺氧对降糖药体内代谢的影响研究进展
..... 桓芝兰, 王鸽, 许贵琴, 等

药物分析与检验

- (208) 防风炒炭前后 HPLC 指纹图谱和 4 种色原酮成分含量变化研究
..... 王艾琳, 吴周威, 谢瑜, 等
- (215) “桂十味”道地药材鸡骨草中金属元素的风险评估及相关性分析
..... 田兆红, 陈凤, 梁韧, 等
- (222) 不同产地少花龙葵 HPLC 指纹图谱的建立及其不同药用部位 3 种生物碱含量的测定 辛灵怡, 杨洋, 梅全喜, 等
- (228) 电感耦合等离子体质谱法测定重酒石酸去甲肾上腺素注射液包材相容性中 23 种元素杂质 宋金红, 苏庆斌, 孙国祥

青年编委 (排名不分先后)

丁 骁 于世慧 王 刚 王 洪
 王春江 方伟进 孔维军 兰丽丽
 朱志红 刘 宏 刘心如 刘丽华
 刘宏飞 刘剑敏 刘梦扬 孙 逸
 孙万阳 孙丙军 孙晓慧 苏 丹
 杜恩明 李 丹 李 娟 李语玲
 李新刚 肖朝江 吴成军 邱玉玲
 何 艳 邹振兴 张 弘 张 凭
 张妙红 张纯刚 张程亮 陈 倩
 陈 璐 陈国宁 陈富超 呼庆勋
 罗 聪 金 锐 周志旭 赵 亮
 赵 娣 胡 楠 姜 雷 秦 超
 贾王平 徐 硕 徐文峰 郭海彪
 黄 芳 黄亚辉 梅升辉 龚力民
 梁光平 寇龙发 董德刚 蒋跃平
 蒋德旗 韩立峰 韩晓芳 韩晓鹏
 舒 畅 曾贵荣 蒙光义 廖德华
 潘 昊 魏 博

编辑: 邬志娟 彭金飞 李 科
 陆窈窈

本刊声明:

本刊已入编中国知网、万方等数据库,其收录论文作者著作权使用费与本刊稿酬一并支付。凡不同意编入数据库的稿件,请在来稿时声明。

除非特别声明,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

- (234) 硝苯地平控释片中释放度测定的不确定度评定
 郝海光, 许朗晴, 刘晶, 等
- (240) 基于高效液相色谱法的达原饮颗粒剂指纹图谱的构建及主要成分含量测定 黄琪, 彭静, 王义坤, 等

中药资源开发与利用

- (246) 河北小五台山区域药用植物资源调查与分析
 陈红艳, 张焕, 李俊雪, 等

医院药学

- (252) 统计过程控制在医疗机构制剂质量回顾分析中的应用
 岳凤芹, 杨思成, 黄菊, 等
- (258) 114 例医院内大肠杆菌感染病例的临床分析
 刘芳, 周利, 彭懿

临床药师在临床

- (262) 临床药师通过不同切入点参与肾移植受者围妊娠期药学服务的案例分析 刘露, 朱佳蕾, 张芸婷, 等

药事管理

- (266) 基于演化博弈理论的医疗机构制剂监管研究及仿真分析
 杨彦坤, 赵玉绒, 张琪, 等

药学教育

- (273) 《药学创新创业教育与实践》课程的探索和研究
 桂玲智, 陈俊香, 王昊, 等

药品不良反应

- (277) 木糖醇注射液致严重乳酸酸中毒 3 例
 徐保平, 徐辉, 彭怀文, 等
- (282) 艾司西酞普兰致 QTc 间期延长 1 例分析 刘苏瑶, 张慧
- (285) 正常谷浓度伏立康唑致肾移植患者精神异常、幻视及幻听 1 例
 王琴, 廖贵益, 丁汉东
- (287) 碘帕醇致晚发性弥漫性红斑 1 例并文献分析
 受国徽, 杨全石, 夏浩, 等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*290*zh*P*30.0*700*46*2025-1

本期责任编辑: 彭金飞, 邬志娟, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 1 January 20 2025

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Hunan Association for Science and
Technology

Edited by

Editorial Board of Central South
Pharmacy (139 Middle Renmin
Road, Changsha, China)

Tel

(0731) 82258487/84895602

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

<http://znyx.cbpt.cnki.net>

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Advertisement Publishing Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (1) **Research progress in cytosolic DNA sensor in atherosclerosis**
..... CHEN Liang-wen, ZHANG Yue-fan
- (9) **Advance in role of neutrophils in traumatic brain injury**
..... HOU Zhi-qi, MA Yu-lin, ZHANG Yue-fan
- (15) **Modern instrumental analysis in the structure characterization of traditional Chinese medicine polysaccharides**
..... ZHANG Ling-yu, WANG Ying, GAO Zhi-jie, et al
- (23) **Characterization of chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. based on off-line two-dimensional chromatography-mass spectrometry**
..... MU Nai-yun, ZHOU Lin, FAN Xin-yu, et al
- (32) **Mechanism of chronic fatigue syndrome in rats based on plasma non-targeted metabolomics**
..... SU Rui, WANG Ting-ting, TIAN Jiao, et al
- (41) **Chemical constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara**
..... WANG Bing-wen, ZHANG Cong-yu, TIAN Yun-yuan, et al
- (46) **Large-scale total synthesis of natural product kokusaginine**
..... ZHANG Yin-di, FANG Jing, JIANG Yue-ping, et al
- (51) **Differences in deodorization methods for *Bungarus multicinctus* oil by GC-MS spectrometry**
..... HU Zu-cheng, DONG Shuang, ZHANG Xin-yu, et al
- (60) **Chemical compositions and their antitumor activity of the *Centranthera grandiflora* Benth roots**
..... GAO Yan-mei, LIU Xin-lan, ZHU Peng-yan, et al
- (66) **Chemical constituents of triterpenes in *Pini Radix* in *Poria***
..... YANG Cai-zi, DENG Zi-yi, SUN Yun-peng, et al
- (73) **Volatile oil components in hawk tea from different habitats**
..... CHEN Huan, TAN Li-hong, CAO Wei-guo, et al
- (78) **Correlation between the appearance and components of *Poria cocos* blocks and *Poria cocos* pieces of different quality grades**
..... HUANG Jia-jing, FANG Yue, WANG Yan-yan, et al
- (84) **Chemical constituents and absorbed components of Huatan mixture based on UPLC-Q-TOF-MS/MS**
..... MENG Hui-di, CHENG Xue-mei, DANG Rui, et al

Postal code

42-290

PublishEditorial Department of Central
South Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for
subscription please contact the
Publishing House of our journal**Price**

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2025 by the
Central South Pharmacy**

All articles published represent the
opinions of the authors, do not reflect
the official policy of the Editorial
Board, unless this is clearly specified.

- (94) **Sishen pill alleviating irinotecan-triggered intestinal toxicity via improving intestinal barrier function**
..... ZHU Jiao-jiao, ZHU Xiao-jun, YAN Zi-qiang
- (100) **Inhibitory effect of ursolic acid on the proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cells via Hippo-YAP signaling pathway**
..... TAO Ran-ran, HU Jun-jie, ZHENG Guo-hua, et al
- (107) **Inhibitory effect of 4, 4'-dimethoxychalcone on the proliferation of human pancreatic cancer cells and related mechanisms**
..... CAO Kai-mei, WANG Teng-fei, CHEN Feng, et al
- (114) **Mechanism of Caogui Chushi Huoxue granules for hyperuricemia based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology**
..... Gulidali Sailike, WANG Jian-ping, LIN Xin-yue, et al
- (124) **Chemical composition of the alcoholic extract of *Santalum album* L.**
..... PENG Hong-xing, MA Yi-fei, TANG Jie-hao, et al
- (129) **Effect of Xinlikang capsules on the proliferation of EGFR-dependent and osimertinib-resistant non-small cell lung cancer and related mechanism based on network pharmacology**
..... YANG Can, ZHANG Li-na, LIU Xia, et al
- (138) **Therapeutic effect of Longteng compound on the rat model of rheumatoid arthritis** LIU Hao-ling, ZHAO Yi-ying, ZHAO Yi-ge, et al
- (143) **Research of gallic acid in improving CAR-T induced cytokine storms**
..... LUO Zhi-qiang, SHI Jia-ru, JIANG Qi-yao, et al
- (149) **Preparation and structure of enoxaparin sodium from porcine, bovine and ovine sources** DU Xi, YANG Yi, WANG Liang, et al
- (156) **Quality control and safety evaluation of traditional Chinese medicine based on multidimensional spectral effect relationship**
..... LIAO Wei, LI Wen-qing, LYU Ying, et al
- (165) **Preparation and application of fine granules**
..... HUANG Qian-meng, ZHAO Xiang-cheng, DING Jin-song
- (174) **Research progress in intrathecal/intraventricular injection of antibiotics for central nervous system infection**
..... ZHAO Zong-biao, ZHAO Wei-chen, HE Chun-yuan, et al
- (179) **Research progress in antibody-drug conjugate-induced interstitial lung disease** LI Hong-dou, XING Kong-lang
- (184) **Research progress in the application of tofacitinib for juvenile idiopathic arthritis** ZHOU Jing-qiang, LIN Mu-na, ZHANG Ya-ping, et al
- (189) **Intra-articular delivery system of non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis**
..... ZHAO Yue-ping, XU Suo-cheng, LI Xiao-dan, et al
- (196) **Research progress in the pharmacological effect of isoxanthohumol**
..... WANG Hai-bo, LIU Jing-rui, GAO Ying-ying, et al

- (203) **Research progress in the effect of high-altitude hypoxia on the metabolism of hypoglycemic drugs in vivo**
..... *HUAN Zhi-lan, WANG Ge, XU Gui-qin, et al*
- (208) **Changes of HPLC fingerprint and contents of 4 chromones components in *Saposhnikovia divaricata* before and after charcoal-frying**
..... *WANG Ai-lin, WU Zhou-wei, XIE Yu, et al*
- (215) **Risk assessment and correlation of metal elements in “Guishiwei” native herbs *Abrus cantoniensis* Hance**
..... *TIAN Zhao-hong, CHEN Feng, LIANG Ren, et al*
- (222) **HPLC fingerprints and content determination of three alkaloids in different medicinal parts of *Solanum americanum* Mill. from different origins**
..... *XIN Ling-yi, YANG Yang, MEI Quan-xi, et al*
- (228) **Determination of the packaging compatibility of 23 elemental impurities in norepinephrine bitartrate injection by ICP-MS**
..... *SONG Jin-hong, SU Qing-bin, SUN Guo-xiang*
- (234) **Determination of uncertainty in release of nifedipine in controlled-release tablets** *HAO Hai-guang, XU Lang-qing, LIU Jing, et al*
- (240) **Fingerprint and content determination of key components in Dayuan-yin granules by high performance liquid chromatography**
..... *HUANG Qi, PENG Jing, WANG Yi-kun, et al*
- (246) **Medicinal plant resources in Xiaowutai mountain region in Hebei**
..... *CHEN Hong-yan, ZHANG Huan, LI Jun-xue, et al*
- (252) **Role of statistical process control in retrospective analysis of the quality of preparations in medical institutions**
..... *YUE Feng-qin, YANG Si-cheng, HUANG Ju, et al*
- (258) **Clinical characteristics in 114 cases of *Enterococcus gallinarum* nosocomial infection** *LIU Fang, ZHOU Li, PENG Yi*
- (262) **Case study of clinical pharmacists’ interventions in pharmaceutical care for kidney transplant recipients during periconception at different points**
..... *LIU Lu, ZHU Jia-lei, ZHANG Yun-ting, et al*
- (266) **Research and simulation of supervision of medical institution preparations based on evolutionary game theory**
..... *YANG Yan-kun, ZHAO Yu-rong, ZHANG Qi, et al*

固有免疫与心脑血管疾病专题

【编者按】

固有免疫是机体抵御病原体入侵的第一道防线，由多种细胞组成，包括巨噬细胞、小胶质细胞、中性粒细胞等，这些细胞通过模式识别受体来感知病原体相关分子模式和损伤相关分子模式，从而启动免疫反应。心脑血管疾病泛指由高脂血症、血液黏稠、动脉粥样硬化、高血压等所导致的心脏、大脑发生的缺血性或出血性疾病。这些疾病是目前人类面临的主要健康威胁。近些年研究发现，固有免疫相关的炎症反应在心脑血管疾病的发生和发展中扮演着重要角色。本专栏综述固有免疫在心脑血管疾病中的研究进展，旨在为探索心脑血管疾病发病机制和开发相关靶向药物提供思路。

【主持人简介】



于永生，男，上海大学医学院副研究员，硕士研究生导师。主要从事免疫药理学研究，主持国家自然科学基金（青年）1 项、面上项目 1 项；近五年以第一作者或通信作者在 *J Clin Invest*、*Br J Pharmacol*、*J Invest Dermatol* 等杂志中发表文章 10 篇。目前是南京市卫生科技发展专项资金资助项目（课题）及医学新技术奖评审专家库成员，国家自然科学基金通讯评审专家。

胞质 DNA 感受器在动脉粥样硬化中的研究进展

陈靓雯¹，章越凡^{2*}（1. 三明医学科技职业学院，福建 三明 365000；2. 上海大学医学院，上海 200444）

摘要：胞质 DNA 感受器可通过识别因入侵病原体或内在损伤而出现在细胞质内的 DNA，进而激活细胞内部的不同信号通路，以调控天然免疫防御，维持机体稳态。近年研究发现，DNA 感受器在动脉粥样硬化发生发展的各个环节中发挥重要作用，现将胞质 DNA 感受器的激活机制及其在动脉粥样硬化中的作用进行综述，为后续动脉粥样硬化的机制研究和靶向治疗提供新的思路。

关键词：天然免疫；损伤相关模式分子；DNA 感受器；动脉粥样硬化

中图分类号：R96

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2025)01-0001-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.001

Research progress in cytosolic DNA sensors in atherosclerosis

CHEN Liang-wen¹, ZHANG Yue-fan^{2*} (1. Sanming Medical and Polytechnic Vocational College, Sanming Fujian 365000; 2. School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444)

Abstract: Cytosolic DNA sensors activate diverse signaling pathways to regulate the innate immune defense and maintain homeostasis by recognizing DNA in the cytoplasm from invasion of pathogens or intrinsic damage. Recently studies found that DNA sensors play an important role in the initiation and progression of atherosclerosis. This article reviewed the activation mechanisms of cytosolic DNA sensors and their roles in atherosclerosis, aiming to offer novel insights for mechanism research and target therapy.

Key words: innate immune; damage-associated molecular pattern; DNA sensor; atherosclerosis

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81971017）。

作者简介：陈靓雯，女，讲师，主要从事药物作用机制及中药药理研究，email: dtclw@163.com * 通信作者：章越凡，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物作用机制及靶点研究，email: yuefanzhang@shu.edu.cn

天然免疫系统是人体的第一道防线,在抵抗病原体入侵、抵御损伤和防止疾病发生中均有非常重要的作用。它既能通过模式识别受体 (PRRs) 感应病原体相关模式分子 (PAMPs) 来检测和防御入侵的病原体,也可识别损伤相关模式分子 (DAMPs),启动和维持对创伤、缺血和组织损伤的免疫^[1]。PRRs 可识别肽聚糖、脂多糖和核酸等在内的多种成分,其中,通过识别外源或异常 DNA 片段而激活天然免疫系统的 PRRs 被称为 DNA 感受器。近年来,因其分布广泛,且与众多疾病相关而受到越来越多的关注。目前,常见的 DNA 感受器包括 Toll 样受体家族中的 TLR9、cGMP-AMP 合成酶 (cGAS) 以及人类 PYHIN 家族成员的黑色素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、干扰素 (IFN) γ 诱导蛋白 16 (IFI16)、IFN 诱导胞质 DNA 蛋白 X (IFIX) 等,它们都能识别胞质 DNA,其中 IFI16、IFIX 也能识别核 DNA。此外,其他胞质 DNA 感受器,如 Z-DNA 结合蛋白 1 (ZBP1)、RNA 聚合酶 III (RNA Pol III)、富含亮氨酸重复序列蛋白 (LncRRF1P1)、Ku70/Ku80 蛋白、DEAH 盒解旋酶 9 (DDX9)、DEAH 盒解旋酶 41 (DDX41) 等也有被报道。

心血管疾病 (CVD) 是全球范围内导致死亡和残疾的首要原因。在中国,近 20 年来心血管疾病死亡率持续位居所有疾病首位,患病人数不断增加^[2]。流行病学研究表明,动脉粥样硬化 (AS) 及其所致的动脉粥样硬化性 CVD 的发病率与死亡率呈逐年上升趋势^[3]。AS 是心血管疾病的主要病因,也是急性和慢性冠状动脉综合征、中风和周围血管病变的基础。越来越多的研究表明,AS 的疾病进程不是单纯的血管内皮下脂质积累和钙盐沉积,与免疫和炎症反应也紧密相关^[4]。研究者们认为 AS 的形成与细胞内关键通路的失调和不同细胞类型之间复杂的相互作用有关,AS 是大、中动脉内膜对致动脉粥样硬化脂蛋白反应的一种不可逆慢性炎症性疾病^[5]。胞质 DNA 感受器具有介导天然免疫和诱导炎症的特性,广泛参与 AS 的病理进程,对其生物学功能进行综述,介绍其在 AS 病程中的作用及研究进展,可为治疗 AS 提供新思路。

1 细胞损伤与胞质 DNA 来源

DNA 作为基因的载体,储存着生命孕育、生长、凋亡过程的全部信息,是机体的重要组成。DNA 也是一种内在的反应分子,在电离辐射、重金属等外源性因素及含氮化合物、活性氧 (ROS) 等内源性因素的影响下,可发生化学修饰,引起损伤。尽管细胞具有复杂的 DNA 损伤修复系统,但在病理条件下,这些机制可能会因不堪重负导

致功能失调^[6]。正常细胞的 DNA 存在于细胞核和线粒体内,仅在病理状态下出现在细胞质中 (即胞质 DNA),胞质 DNA 有以下三种常见的来源:一是线粒体 DNA,细胞应激诱导线粒体损伤伴随 ROS 的生成,导致氧化的线粒体 DNA 释放于细胞质中;二是染色体 DNA,断裂而无法修复的双链 DNA (dsDNA) 可能在主核外形成微粒,这些微粒不能复制或转录,表面缺乏核纤层,在细胞质中易发生不可逆的膜破裂,从而释放其中受损的 DNA;三是外源性 DNA,主要源于吞噬细胞死亡或微生物病原体^[7]。对于少量的胞质 DNA,真核细胞能够通过激活自噬流促进胞质 DNA 的分离与降解,但细胞自噬缺陷会导致细胞质内 DNA 的累积,这些损伤 DNA 会被 DNA 感受器识别,继而激活多条信号通路 (见图 1),启动天然免疫系统,诱发持续的炎症反应,研究表明细胞自噬缺陷会导致 AS 的发展^[8-9]。免疫炎症反应不仅是机体消除细菌、真菌、病毒等病原微生物的基本防御过程,也是机械刺激或代谢危险因素引起的组织器官损伤的必要修复措施。虽然蛋白质、脂质和多糖可以激活免疫传感器引起的炎症级联反应,但这些配体易通过修饰机制逃避感受器的检测。相比之下,核酸结构相对稳定,易被稳定识别。越来越多的证据表明,DNA 感应机制,不但作为先天免疫系统参与机体对病原体的自我防御,亦与内源性 DNA 片段反应的炎症性疾病的进展有关。

2 胞质 DNA 感受器生物学功能概述

2.1 TLR9

TLR9 是目前研究最多的核酸 DNA 感受器之一,它能识别含有未甲基化的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤 DNA (CpG DNA) 序列的 DNA 片段,在先天性免疫系统中发挥重要作用^[10]。TLR9 在巨噬细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞和浆细胞等多种类型的免疫细胞内表达,定位于内质网^[11]。当免疫细胞吞噬细菌等外物后,TLR9 立即从内质网重新分配到核内体,识别其中的非甲基化 CpG DNA 序列,启动下游信号通路,介导免疫应答^[12]。非甲基化 CpG 序列在真核生物基因组中很少见,但在原核生物中大量存在。除了识别细菌 DNA 外,TLR9 还与 AS 的发展密切相关,因为血管坏死期间释放的核酸中的 CpG 基序能将其激活。TLR9 与配体结合被激活后,通过髓样分化因子 88-IFN 调节转录因子 7 (MyD88-IRF7) 产生 I 型 IFN (IFN- I),或通过 MyD88-核因子 κB (NF- κB) 途径产生炎症细胞因子,从而加速炎症反应^[13]。

2.2 AIM2 和 IFI16

AIM2 因最早被鉴定为黑色素瘤细胞系中缺

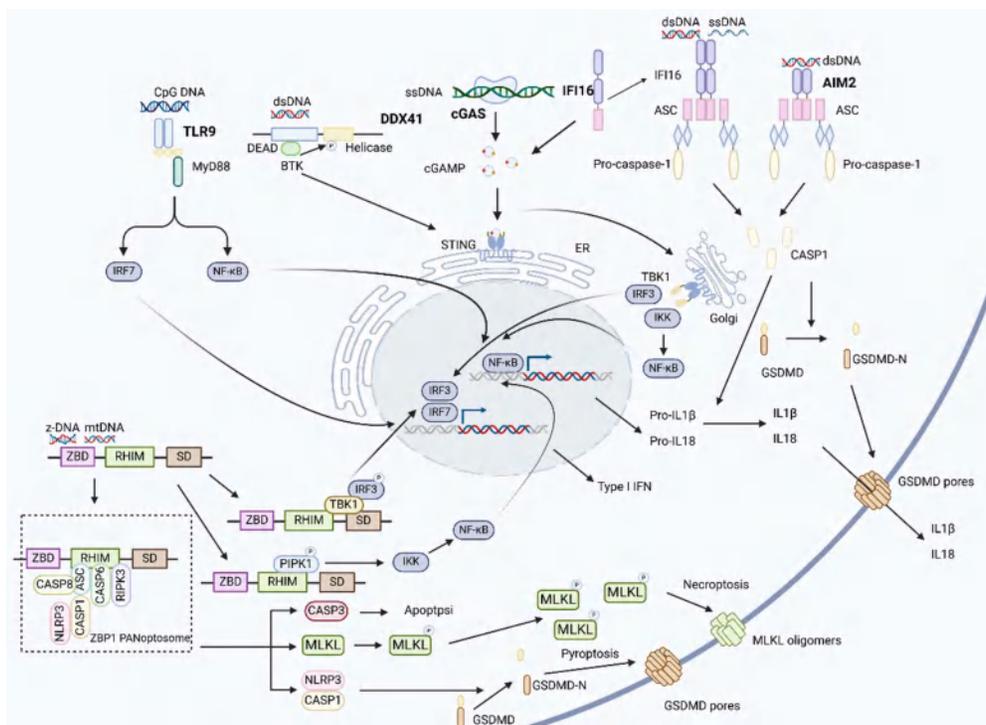


图 1 胞质 DNA 感受器信号通路

Fig 1 Signaling pathways for DNA sensors

失的基因而得名，其表达缺失会导致细胞无限增殖。AIM2 由 N 端的热蛋白结构域 (PYD) 和 C 端 HIN 结构域组成，能识别无法被清除的胞质 dsDNA。一旦与 DNA 结合，AIM2 随即启动炎症小体复合物的组装，首先通过 PYD-PYD 的相互作用可聚集配体凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)；随后 ASC 利用自身的半胱天冬酶募集结构域 (CARD) 招募同样具有 CARD 的 Pro-caspase-1，形成炎症小体——活化的 Caspase-1^[14]；Caspase-1 进一步介导白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18 (IL-18) 等炎症因子的成熟和分泌，加速 Gasdermin 蛋白家族 GSDMD 的切割，形成 GSDMD-N；最终 GSDMD-N 能靶向细胞膜，与细胞膜上的磷脂蛋白结合，发生多聚化并在细胞膜上形成孔洞，细胞膜遭受破坏，造成细胞肿胀、裂解和死亡。且 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子的释放，诱发进一步的炎症反应^[15]。

IFI16 同属 PYHIN 家族，N 端亦为 PYD，C 端有两个 HIN 结构域^[16]。IFI16 的 HIN 结构域能特异性识别胞质内各种来源的 dsDNA 和单链 DNA (ssDNA)，与 DNA 结合后，IFI16 会发生构象变化，从而促进寡聚化，随后可诱发级联免疫反应，激活 Caspase-1，加速 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子释放^[17]。此外，当 IFI16 蛋白受到胞质 dsDNA 刺激时，还能募集 IFN 基因刺激因子 (STING)，通过激活 IFN 调节因子 3 (IRF3) 和 NF- κ B 转录因子来促进 IFN- I 的表达。IRF3 作为重要的转录因子，

不仅能参与 IFN- I 和其他抗病毒基因转录的调节，还能有效调节心脏代谢性疾病，通过影响这些疾病的多个方面来应对心脏代谢应激，如代谢紊乱、血管损伤和心肌肥大^[18]。

2.3 cGAS

cGAS 是以“胞质 DNA 感受器”的概念而被首次提出，它可识别各种来源的胞质 DNA^[19]。cGAS 被激活后，可催化三磷酸腺苷 (ATP) 和鸟苷三磷酸 (GTP) 生成环化鸟苷酸-单磷酸腺苷 (cGAMP)，cGAMP 迅速扩散到整个细胞，并与内质网膜上的 STING 结合，形成 STING-cGAMP 复合物，转位进入高尔基体，随后激活蛋白激酶 TANK 结合激酶 1 (TBK1)。磷酸化的 TBK1 一方面促进 IRF3 磷酸化，导致其二聚化并转位入核^[20]；另一方面通过激活 IRF3 和 κ B 抑制因子激酶 (IKK) 促进 NF- κ B 的激活^[21]，NF- κ B 作为转录因子转位进入细胞核，在两方面共同作用下，最终影响 IFN- I 和炎症性细胞因子如肿瘤坏死因子 (TNF- α)、IL-1 β 和 IL-6 的转录和分泌^[22]。研究表明，IFN- I 等参与了动脉粥样硬化形成的整个过程，增加巨噬细胞的吞噬作用，促进泡沫细胞和胞外诱捕网的形成；此外，IFN- I 还可以改变树突状细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的表型，引起免疫反应，加速 AS 的进一步恶化^[23]。

2.4 DDX41

DDX41 核心由两个保守的 RecA-like 结构域组成，即 DEAD 结构域和解旋酶结构域^[24]。DDX41

通过其 DEAD 结构域识别胞质 dsDNA, 随后布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 结合 DEAD 结构域, 引起解旋酶结构域 Y414 位点酪氨酸磷酸化, 从而激活 DDX41, 激活的 DDX41 可识别到具有 DEAD 结构域的外源 PAMPs, 进而激活 STING^[25]。活化的 STING 从内质网转移到高尔基体, 与 TBK1 相互作用, 触发 STING-TBK1-IRF3/NF- κ B-IFN- γ 信号通路, 以激活天然免疫系统, 启动和维持对创伤、缺血和组织损伤的免疫^[26]。

2.5 ZBP1

ZBP1, 也被称为 DNA 依赖的 IFN 调节因子激活剂 (DAI), 在肿瘤、周围基质组织以及活化的巨噬细胞中显著上调。ZBP1 最初被报道为一种 IFN 诱导的肿瘤相关蛋白, 并被鉴定为一种能够感应胞质 DNA (尤其是 Z 型双链 DNA) 的天然免疫激活剂^[27]。ZBP1 在其 N 端包含两个串联的 Z-核酸结合结构域 (ZBD), 其后是两个受体相互作用蛋白同型相互作用基序 (RHIM) 和一个 C 末端信号结构域 (SD)。ZBP1 可通过三种途径发挥天然免疫作用: 第一, ZBP1 通过 ZBD 感知 Z 型核酸而被激活, 激活的 ZBP1 能够招募 TBK1、IRF3 来激活 IFN- γ ; 第二, ZBP1 通过 RHIM 依赖的相互作用与内源性受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (RIPK1) 结合并共定位在特征性的胞质颗粒上, 从而激活 IKK-NF- κ B 通路; 第三, ZBP1 也能通过组装 ZBP1 泛凋亡小体 (ZBP1、NLRP3、ASC、CASP1、CASP6、CASP8、RIPK3 复合体), 激活 CASP3, 促进混合谱系激酶结构域样假激酶 (MLKL) 寡聚体和 GSDMD 孔的形成, 诱导泛凋亡 (包括细胞焦亡、细胞凋亡和坏死性凋亡)^[28]。

3 胞质 DNA 感受器与 AS

AS 是动脉血管壁的慢性炎症性疾病, 是心肌梗死、缺血性脑卒中等心血管疾病发生的基础。因此, AS 被认为是世界范围内致死和致残的主要原因之一, 其特征是脂肪组织和纤维组织 (即粥样斑块) 在内皮下层空间积聚, 一般好发于血流振荡剪切力高的部位^[29]。AS 发病与内皮细胞、免疫细胞、血管平滑肌细胞 (VSMC) 等细胞的稳态失衡及代谢异常密切相关, 多项研究证明, 在这个过程中胞质 DNA 感受器起着重要作用, 现从细胞分型角度予以归纳。

3.1 胞质 DNA 感受器与内皮细胞

AS 病理过程起始于吸烟、喝酒、血脂异常、高血压、糖尿病等多种心血管危险因素触发的保护性内皮功能受损, 从而促使血浆脂蛋白, 尤其是低密度脂蛋白 (LDL), 积累到内皮下间隙^[30], LDL 在内膜中与带负电荷的细胞外基质蛋白聚糖结合,

继而炎症细胞释放的 ROS 和 / 或酶氧化修饰形成氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)^[5]; oxLDL 可加重内皮细胞功能障碍, 并通过促进炎症因子 [如 IL-1、IL-6、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等]、趋化因子 [C-C-基元配体 1 (CCL1)、CCL2] 以及过表达黏附分子 [如血小板内皮细胞黏附分子-1 (PECAM-1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)] 的分泌, 加速免疫细胞在内膜下间隙聚集^[31]。

Krogmann 等^[32]研究了静脉注射 ODN1826 (激活 TLR9 的 B 型寡核苷酸) 的效果, 结果显示, 在 *ApoE*^{-/-} 小鼠中, TLR9 的刺激会损害急性血管损伤后的再内皮化, 增加斑块的形成。Lüsebrink 等^[33]研究表明, 细胞层面上, AIM2 的激活会诱导人冠状动脉内皮细胞的凋亡和迁移; 进一步的动物研究表明, 给予急性血管损伤的小鼠模型静脉注射 AIM2 的合成配体双链 poly dA:dT, 可以系统地刺激 AIM2, 导致内皮细胞再生减少, 促炎细胞因子产生增加以及循环内皮微粒 (EMP) 数量增加。对于 *ApoE*^{-/-} 小鼠模型, 连续皮下注射 poly dA:dT, 可以观察到主动脉中 ROS 生成增加、循环 EMP 数量增加以及 AS 斑块形成增加。Liu 等^[34]进一步研究证实, 血浆游离脂肪酸 (FFAs) 水平升高可导致内皮细胞-间充质转化 (EndMT), 且这一过程由 mtDNA 介导激活 cGAS-STING 通路实现。另外, 在此过程中, 主动脉内皮细胞表型发生转变, 细胞活力和细胞内一氧化氮降低, 迁移能力和细胞氧化应激反应升高, 推进了 AS 进程^[35]。综合上述研究证明, 胞质 DNA 感受器 TLR9、AIM2、cGAS-STING 的激活, 会导致血管内皮损伤, 促进 AS 的发展。

3.2 胞质 DNA 感受器与巨噬细胞

在 AS 的初始阶段 (即脂纹期), oxLDL 的持续聚集促进了血液中单核细胞的募集和向组织巨噬细胞的转化, 巨噬细胞通过清道夫受体吞噬 oxLDL 形成了富含脂质的泡沫细胞^[36]。在 AS 的进展期, 巨噬细胞通过产生多种生物活性物质而参与 AS 的形成, 包括产生 IL-1 和 TNF- α 促进白细胞的黏附, 产生单核细胞趋化因子 (MCP-1) 等促进白细胞进入斑块内, 产生 ROS 促进斑块内 LDL 的氧化等。同时, 巨噬细胞与 T 淋巴细胞 (CD4⁺ 和 CD8⁺) 作用, 激活细胞免疫反应, 进一步促进 AS 进程。在 AS 晚期, 巨噬细胞和 VSMC 死亡促进坏死核心形成和纤维帽变薄, 增加斑块易损性和血栓形成。此外, 斑块的边缘富含活化的巨噬细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤 T 淋巴细胞和树突状细胞等炎症细胞, 尤其是纤维帽的“肩部”区域, 这些细

胞一方面可产生蛋白水解酶水解细胞外基质, 另一方面可产生炎症介质, 最终促进晚期 AS 的外膜炎, 加速破裂、出血以及血栓生成^[4]。

Ma 等^[37]使用免疫调节性寡核苷酸 (IRS869) 灭活 *ApoE*^{-/-} 小鼠的 TLR9, 结果发现其斑块面积显著减少, 易损性降低, 且斑块中的 TLR9、MyD88、p-p65-NF- κ B 及 IRF7 表达量减少; 进一步体外实验表明, TLR9 的灭活使促炎巨噬细胞 (M1) 的活性分流到抗炎巨噬细胞 (M2), 进而减轻 AS。Karper 等^[38]通过临床观察发现, AS 血管介入手术后发生再狭窄情况时, TLR7/9 表达上调; 当阻断 TLR7/9 的表达时, 巨噬细胞的活化和泡沫细胞的形成均减少, 介入术后再狭窄和 AS 比例下降。Fukuda 等^[39]通过基因敲除或药物阻断 TLR9, 结果显示 TLR9 在血管紧张素 II (Ang II) 诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠血管炎症和 AS 的发展中起关键性作用, TLR9 阻断后可减轻血管炎症和 AS 的发生。随后的体外实验表明, TLR9 的激活至少部分是通过 p38 MAPK 促进巨噬细胞的促炎活化来实现的。然而, Koulis 等^[40]通过研究得出了相反的结论, 研究中采用了同时缺乏 *TLR9* 和 *ApoE* 的双基因敲除小鼠模型探讨了主动脉窦动脉粥样硬化病变的发展, 结果显示, 与 *ApoE*^{-/-} 小鼠相比, *ApoE*^{-/-}/*TLR9*^{-/-} 小鼠的脂质沉积增加, AS 斑块大小增加了 33%; 与对照动物相比, *ApoE*^{-/-}/*TLR9*^{-/-} 小鼠的血管系统中巨噬细胞、树突状细胞和 IFN- α 显著积累。两项研究中, 选择了相似的动物模型, 却得出了相反的结论, 这可能与饲养条件或 Ang II 注射等存在差异有关, 这有待进一步的研究。

Pan 等^[41]研究发现 AIM2 的过表达导致巨噬细胞的募集, shRNA 沉默 AIM2 处理的小鼠相较正常对照组明显减少。Zhuo 等^[42]通过生物信息学分析和体外研究表明, AIM2 抑制胆固醇流出蛋白 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 表达, 引起巨噬细胞胆固醇代谢异常, 抑制巨噬细胞胆固醇流出, 导致细胞内胆固醇水平升高, 进而促进泡沫细胞形成。此外, Lu 等^[43]进行测序分析发现, cGAS 通过 TLRs、STAT、IRF 和 IFN 的协同信号加剧炎症级联反应, 触发巨噬细胞 M1 型极化, 从而通过上调胆固醇摄取相关分子增加脂质沉积, 促进泡沫细胞的形成。Huangfu 等^[44]发现反式作用 DNA 结合蛋白 43 kDa 通过触发线粒体 DNA 释放来激活 cGAS-STING 信号, 从而促进 NF- κ B 的活化, 增加巨噬细胞中炎症因子的表达, 参与 AS 的发生发展。

综上所述, 大部分研究者认为, 抑制 TLR9 会抑制巨噬细胞的促炎活化, 减少泡沫细胞的形成, 降低脂质沉积和缩小 AS 斑块大小^[37-39]。有关 Koulis 等^[40]的相反结论, 有待进一步研究。

对于 AIM2 和 cGAS 在 AS 中的作用研究比较一致, 均认为它们的过表达会促进巨噬细胞募集及泡沫细胞的生成, 加速 AS 的形成。

此外, Pan 等^[41]研究发现高脂饮食喂养的小鼠与普通饮食喂养小鼠相比, LDL 水平升高, AIM2 表达增加, ICAM-1 水平升高, GSDMD-N 增加引起死亡细胞百分比升高, 斑块中巨噬细胞增加。Pham 等^[45]发现高脂喂养的 *ApoE*^{-/-} 小鼠的主动脉中 STING 及 STING 激动剂 cGAMP、DNA 损伤标志物 (如 cH2AX、p53) 及 ssDNA 在巨噬细胞中有更高的积累, 促进了 AS 的发生发展。同等条件下, *STING* 敲除的 *ApoE*^{-/-} 小鼠, 主动脉弓中的 AS 病变、斑块中脂质和巨噬细胞的积累, 以及炎症分子的表达均减少。进一步的体外研究表明, 这一过程与 cGAS-STING-TBK1 通路和 STING-IKK-NF- κ B 通路的激活有关。上述两项研究表明高脂饮食借由胞质 DNA 感受器刺激巨噬细胞加速 AS 进程, 此过程或可经由阻断 DNA 感受器而实现。

3.3 胞质 DNA 感受器与血管平滑肌细胞

在 AS 进展期, 血小板源性生产因子 (PDGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、转化生长因子- α (TGF- α) 和平滑肌源性催化因子等促进中膜 VSMC 的迁移入内膜并增生。迁移或增生的 VSMC 发生表型转变, 由收缩型转变为合成型, 表面产生 LDL 受体, 摄取 LDL 及 VLDL 形成肌源性泡沫细胞, 为进展期泡沫细胞的主要来源。增生的内膜平滑肌细胞, 还能合成大量胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖等细胞外基质, 使病变内膜增厚变硬^[31]。斑块内细胞因坏死、凋亡、焦亡等方式大量死亡, 最终超过吞噬细胞的胞葬能力^[46], 死亡细胞的碎片和胆固醇结晶在斑块内积累形成坏死核心。随着病变进展为纤维粥样斑块, VSMC、胶原蛋白和其他细胞外基质分子建立纤维帽, 覆盖整个病变和坏死核心。

Niessner 等^[47]在浆细胞样树突状细胞中通过含 CpG 的核苷酸序列激活 TLR9, 发现 IFN- α 的分泌增加, CD4⁺ T 细胞对血管平滑肌细胞的毒性也增加。Pan 等^[41]研究发现 AIM2 过表达增加 *ApoE*^{-/-} 小鼠 GSDMD 活性和 DNA 片段化, 导致 VSMC 死亡。随后的细胞实验显示, AIM2 表达增加可以通过 ASC、Caspase-1 途径促进 VSMC 中 GSDMD-N 形成, 从而加速 VSMC 的焦亡, 抑制 AIM2 也可减轻 VSMC 的焦亡。Uryga 等^[48]研究发现, 持续的端粒损伤可促进 VSMC 衰老, 导致 dsDNA (包括端粒起源) 释放到细胞质中, 随后细胞质 DNA 片段可激活 cGAS-STING-TBK1 通路, 诱导下游 NF- κ B 和细胞衰老相关分泌表型 (SASP) 细胞因子基因表达, 最终招募各种免疫细胞和炎症细胞, 推动 AS 发展。Sakai 等^[49]建立了 DNA 双链断裂修复蛋白 Ku80 缺失的载

脂蛋白 E 基因敲除小鼠模型 ($Ku80^{+/-} ApoE^{-/-}$), 发现其主动脉 VSMC 中 DNA 双链断裂的数量和炎症因子 IL-6、MCP-1 的 mRNA 水平显著增加, 主动脉斑块大小增加; 体外实验验证表明, 此过程与 DNA 双链断裂积累和 cGAS-STING-IRF3 途径激活表达有关。IQ 基元 GTP 酶激活蛋白 1 (IQGAP1) 是一种基于细胞骨架调控和信号传导的蛋白质。An 等^[50]发现敲低 IQGAP1 可减轻 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的 AS 进程, 人脐静脉内皮细胞体外研究证明 IQGAP1 能促进 ROS 生成, 导致 mtDNA 释放到细胞质, 激活 cGAS-STING 诱导内皮细胞焦亡, 形成 AS。由此可知, DNA 感受器激活或过表达, 会激发 VSMC 的天然免疫反应, 进而引起细胞死亡, 促进 AS 发展。

此外, AS 是慢性肾病患者心血管疾病发病和死亡的主要原因, 载脂蛋白 E 基因敲除的慢性肾病小鼠 ($CKD/ApoE^{-/-}$ 小鼠) 的斑块具有易损性和易破裂的特点, 更易发生血栓事件^[51]。Bi 等^[52]在 $CKD/ApoE^{-/-}$ 小鼠中, 利用氧化应激诱导线粒体损伤导致了 mtDNA 的释放, 释放的 mtDNA 通过激活 cGAS-STING-IRF3 通路促进 VSMC 中 IFN- β 的表达, 导致其早衰及表型转变, 使 AS 斑块纤维帽变薄、面积减少、坏死核心区域增加, 增加斑块破裂的风险。

4 以胞质 DNA 感受器为靶点的药物治疗

基于胞质 DNA 感受器在 AS 进程中的作用, 目前治疗药物主要通过抑制相应通路来治疗 AS。如 cGAS-STING 被抑制能通过减轻内皮细胞的炎症反应, 减少细胞凋亡从而延缓 AS 的疾病进程。Bi 等^[52]使用 STING 抑制剂 C-176 及其衍生物 H-151^[53] 或 JAK-STAT 抑制剂芦可替尼可抑制 VSMC 的 IFN- β 反应、早衰和表型转换, 延缓 AS 进展, 并改善了斑块的易损性。使用特异性抑制剂 C176 对 STING 进行阻断, 改善了 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的 AS 形成。Pham 等^[45]同样验证了 C-176 及 TBK1 抑制剂氨来占诺均可改善 cGAMP 诱导的 TNF- α 、CCL2 和 IFN- β 等炎症因子的表达, 从而改善了 $ApoE^{-/-}$ 鼠的 AS 形成。An 等^[50]使用 cGAS-STING 小分子抑制剂 RU.521 及 C-176 分别作用于人脐静脉内皮细胞, 发现 IQGAP1 促进炎症小体释放和细胞焦亡诱发 AS 的作用会被逆转。

一些治疗药物也被报道, 通过抑制 TLR9 和 AIM2, 减轻炎症反应, 减少泡沫细胞产生, 增加斑块稳定性, 减缓 AS 的发展。Li 等^[54]在研究电子烟对 AS 的作用过程中发现, 同样每日 2 h 暴露于由吸烟机加热定量烟液产生的气溶胶烟雾中, 药物阻断组 $ApoE^{-/-}$ 小鼠于暴露前 1 h 腹腔注射 TLR9 拮抗剂 IRS869, 对比对照组, 其血浆中促炎细胞因子 TNF- α 、RANTES 和 IL-6 的水平下

调, 斑块处脂质沉积及镜下病变明显减少。Huang 等^[55]研究表明, 养心舒脉颗粒可降低高脂喂养的 $ApoE^{-/-}$ 小鼠的血脂水平, 改善 AS 斑块大小和炎性浸润。研究其机制得知, 养心舒脉颗粒通过抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 通路, 抑制主动脉窦巨噬细胞向 M1 极化, 促进其向 M2 极化, 来减轻动脉炎症, 从而改善 AS。解毒祛瘀滋阴方通过 TLR9/MyD88/NF- κ B 通路, 抑制了主动脉斑块的沉积, 刺激了脂质代谢, 同时增加了调节胆固醇流出基因的表达, 包括 ABCA1、ATP 结合盒 G 亚家族成员 1、B 类清道夫受体 I 型和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ , 而减少了泡沫细胞形成^[56]。Paulin 等^[57]发现敲除 AIM2 基因或使用 AIM2 抑制剂 A151 能通过增加内膜平滑肌细胞和胶原蛋白含量, 增厚纤维帽, 促进 AS 斑块的稳定。Wang 等^[58]研究证明, 牛磺熊去氧胆酸通过抑制 AIM2 炎症小体, 增加 ABCA1 蛋白的表达从而增强巨噬细胞胆固醇流出能力, 减少了 oxLDL 诱导的泡沫细胞形成来缓解 AS。由此可见, 胞内 DNA 感受器在健康的机体中常保持静默, 而在损伤的状态下被激活而介导 AS 的疾病进程, 将其作为靶点的抑制剂的研究, 或可为新药的开发提供思路。

5 总结与展望

胞质 DNA 感受器作为 PRRs 中的一员, 可特异性识别多种来源的胞质 DNA, 并通过不同的激活机制介导细胞的免疫反应及程序性死亡。近年来, 对胞质 DNA 感受器的研究逐步从 PAMPs 向 DAMPs 衍生, 在抵抗细菌、病毒等病原体的作用之外, 逐步开始发掘其在癌症、心脑血管疾病、自身免疫性疾病等中的作用。本文主要总结了 TLR9、AIM2、cGAS 等胞质 DNA 感受器的生物学功能及相关信号通路, 从与 AS 直接相关的内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞三类细胞, 归纳胞质 DNA 感受器对 AS 发生发展的影响。除此之外, 其他 DNA 感受器在 AS 中的作用也在被研究者们关注。例如, Chang 等^[59]阐述了 IFI16 参与多种细胞的死亡过程, 在泛凋亡中也发挥重要的调控作用, 而泛凋亡又与 AS 息息相关, 以此论证 IFI16 对 AS 病理生理过程的影响。不过, IFI16 在 AS 中的直接作用还未有报道, 或可成为新的研究方向。AIM2 与 ZBP1 亦有报道与泛凋亡相关^[60]。编码 ZBP1 的 *Zbp1* 基因在单核细胞和巨噬细胞中的表达高于内皮细胞和成纤维细胞, 生成的 ZBP1 通过其 Za2 结构域识别 Z-DNA/RNA, 从而激活 RIPK3 触发炎症和泛凋亡, 在非经典坏死性凋亡和炎症信号传导中发挥作用。因此, *Zbp1* 基因可能是一种 AS 修饰基因, 能通过增加病变坏死而发

挥作用^[61-62]。DDX41 被报道与心肌细胞 DNA 损伤有关,抑制 DDX41 可促进修复 DNA 损伤,或有助于防止 AS 的进展^[63]。以胞质 DNA 感受器为靶点的药物正在陆续被发现,但临床研究仍然缺乏。未来对 DNA 感受器的进一步认识以及有效的靶向药物的寻找,对于干预 AS 的进程至关重要。

参考文献

- [1] Tang D, Kang R, Coyne CB, et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity [J]. *Immunol Rev*, 2012, 249 (1): 158-175.
- [2] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2023 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2024.
- [3] Zhao D, Liu J, Wang M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16 (4): 203-212.
- [4] Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates [J]. *Clin Sci*, 2018, 132 (12): 1243-1252.
- [5] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. *Nat Med*, 2011, 17 (11): 1410-1422.
- [6] Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58 (5): 235-263.
- [7] Kong LZ, Kim SM, Wang C, et al. Understanding nucleic acid sensing and its therapeutic applications [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55 (11): 2320-2331.
- [8] Santovito D, Steffens S. DNA damage and extranuclear DNA sensors: a dangerous duo in atherosclerosis [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (42): 4349-4351.
- [9] Henderson JM, Weber C, Santovito D. Beyond self-recycling: cell-specific role of autophagy in atherosclerosis [J]. *Cells*, 2021, 10 (3): 625.
- [10] Roshan MHK, Tambo A, Pace NP. The role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Int J Inflamm*, 2016, 2016: 1532832.
- [11] Kou MY, Wang LY. Surface toll-like receptor 9 on immune cells and its immunomodulatory effect [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1259989.
- [12] Karapetyan L, Luke JJ, Davar D. Toll-like receptor 9 agonists in cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 10039-10061.
- [13] Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways [J]. *Front Immunol*, 2014, 5 (461): 1-7.
- [14] Lugin J, Martinon F. The AIM2 inflammasome: sensor of pathogens and cellular perturbations [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281 (1): 99-114.
- [15] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signaling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16 (7): 407-420.
- [16] Unterholzner L, Keating SE, Baran M, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11 (11): 997-1004.
- [17] Ansari MA, Singh VV, Dutta S, et al. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells [J]. *J Virol*, 2013, 87 (15): 8606-8623.
- [18] Zhang XJ, Zhang P, Li H. Interferon regulatory factor signalings in cardiometabolic diseases [J]. *Hypertension*, 2015, 66 (2): 222-247.
- [19] Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response [J]. *Immunity*, 2006, 24 (1): 93-103.
- [20] Zhang BC, Nandakumar R, Reinert LS, et al. STEEP mediates STING ER exit and activation of signaling [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21 (8): 868-879.
- [21] Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway [J]. *Sci Signal*, 2012, 5 (214): 1-19.
- [22] Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (9): 501-521.
- [23] An C, Li Z, Chen Y, et al. The cGAS-STING pathway in cardiovascular diseases: from basic research to clinical perspectives [J]. *Cell Biosci*, 2024, 14: 58.
- [24] Omura H, Oikawa D, Nakane T, et al. Structural and functional analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1): 34756.
- [25] Jiang Y, Zhu YP, Liu ZJ, et al. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases [J]. *Protein Cell*, 2017, 8 (2): 83-89.
- [26] Ma J, Ross SR. Multifunctional role of DEAD-box helicase 41 in innate immunity, hematopoiesis and disease [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1451705.
- [27] Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response [J]. *Nature*, 2007, 448 (7152): 501-505.
- [28] Song QX, Fan YH, Zhang HL, et al. Z-DNA binding protein 1 orchestrates innate immunity and inflammatory cell death [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2024, 77: 15-29.
- [29] Jia MP, Li QH, Guo JY, et al. Deletion of BACH1 attenuates atherosclerosis by reducing endothelial inflammation [J]. *Circ Res*, 2022, 130 (7): 1038-1055.
- [30] Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (4): 620-636.
- [31] Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16 (12): 727-744.
- [32] Krogmann AO, Lüsebrink E, Steinmetz M, et al. Proinflammatory stimulation of Toll-like receptor 9 with high dose CpG ODN 1826 impairs endothelial regeneration and promotes atherosclerosis in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (1): e0146326.
- [33] Lüsebrink E, Goody PR, Lahrman C, et al. AIM2 stimulation impairs reendothelialization and promotes the development of atherosclerosis in mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 582482.
- [34] Liu Q, Cheng Z, Huang B, et al. Palmitic acid promotes endothelial-to-mesenchymal transition via activation of the cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway [J]. *Arch Biochem*

- Biophys, 2022, 727: 109321.
- [35] Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, et al. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability [J]. *Nat Commun*, 2016, 7 (1): 11853.
- [36] Williams JW, Zaitsev K, Kim KW, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21 (10): 1194-1204.
- [37] Ma CM, Ouyang QF, Huang ZY, et al. Toll-like receptor 9 inactivation alleviated atherosclerotic progression and inhibited macrophage polarized to M1 phenotype in *ApoE*^{-/-} mice [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 909572.
- [38] Karper JC, Ewing MM, Habets KLL, et al. Blocking Toll-like receptors 7 and 9 reduces postinterventional remodeling via reduced macrophage activation, foam cell formation, and migration [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (8): e72-80.
- [39] Fukuda D, Nishimoto S, Aini K, et al. Toll-like receptor 9 plays a pivotal role in angiotensin II-induced atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8 (7): e010860.
- [40] Koullis C, Chen YC, Hausding C, et al. Protective role for Toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34 (3): 516-525.
- [41] Pan JY, Han L, Guo J, et al. AIM2 accelerates the atherosclerotic plaque progressions in *ApoE*^{-/-} mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498 (3): 487-494.
- [42] Zhuo S, Song SF, Wang CY, et al. Inflammatory corpuscle AIM2 facilitates macrophage foam cell formation by inhibiting cholesterol efflux protein ABCA1 [J]. *Sci Rep*, 2024 (14): 10782.
- [43] Lu GF, Chen SC, Xia YP, et al. Synergistic inflammatory signaling by cGAS may be involved in the development of atherosclerosis [J]. *Aging*, 2021, 13 (4): 5650-5673.
- [44] Huangfu N, Wang Y, Xu ZY, et al. TDP43 exacerbates atherosclerosis progression by promoting inflammation and lipid uptake of macrophages [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 687169.
- [45] Pham PT, Fukuda D, Nishimoto S, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (42): 4336-4348.
- [46] Rayner KJ. Cell death in the vessel wall: the good, the bad, the ugly [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37 (7): e75-e81.
- [47] Niessner A, Sato K, Chaikof EL, et al. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha [J]. *Circulation*, 2006, 114 (23): 2482-2489.
- [48] Uryga AK, Grootaert MOJ, Garrido AM, et al. Telomere damage promotes vascular smooth muscle cell senescence and immune cell recruitment after vessel injury [J]. *Commun Biol*, 2021, 4 (1): 611.
- [49] Sakai C, Ueda K, Goda K, et al. A possible role for proinflammatory activation via cGAS-STING pathway in atherosclerosis induced by accumulation of DNA double-strand breaks [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 16470.
- [50] An C, Sun F, Liu C, et al. IQGAP1 promotes mitochondrial damage and activation of the mtDNA sensor cGAS-STING pathway to induce endothelial cell pyroptosis leading to atherosclerosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123: 110795.
- [51] Yang K, Du CH, Wang XM, et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2017, 129 (19): 2667-2679.
- [52] Bi XJ, Du CH, Wang XM, et al. Mitochondrial damage-induced innate immune activation in vascular smooth muscle cells promotes chronic kidney disease-associated plaque vulnerability [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8 (5): 2002738.
- [53] Haag SM, Gulen MF, Reymond L, et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. *Nature*, 2018, 559 (7713): 269-273.
- [54] Li J, Huynh L, Cornwell WD, et al. Electronic cigarettes induce mitochondrial DNA damage and trigger TLR9 (Toll-like receptor 9)-mediated atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41 (2): 839-853.
- [55] Huang H, Sun ZQ, Xu JY, et al. Yang-Xin-Shu-Mai granule alleviates atherosclerosis by regulating macrophage polarization via the TLR9/MyD88/NF-κB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318: 116868.
- [56] He YF, Tian WY, Zhang M, et al. Jieduquyuziyin prescription alleviates SLE complicated by atherosclerosis via promoting cholesterol efflux and suppressing TLR9/MyD88 activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116283.
- [57] Paulin N, Viola JR, Maas SL, et al. Double-strand DNA sensing AIM2 inflammasome regulates atherosclerotic plaque vulnerability [J]. *Circulation*, 2018, 138 (3): 321-323.
- [58] Wang XY, Zhang YS, Du LP, et al. TUDCA alleviates atherosclerosis by inhibiting AIM2 inflammasome and enhancing cholesterol efflux capacity in macrophage [J]. *iScience*, 2024, 27 (6): 109849.
- [59] Chang XD, Wang B, Zhao YL, et al. The role of IFI16 in regulating PANoptosis and implication in heart diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10 (1): 204.
- [60] Lee S, Karki R, Wang YQ, et al. AIM2 forms a complex with pyrin and ZBP1 to drive PANoptosis and host defence [J]. *Nature*, 2021, 597 (7876): 415-419.
- [61] Han J, Opoku E, Smith JD. Abstract 252: is Zbp1 an atherosclerosis modifier gene? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43 (Suppl_1): A252-A252.
- [62] Smith JD, Han J. Abstract 446: evaluation of Zbp1 as an atherosclerosis modifier gene [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42 (Suppl_1): 446.
- [63] Liu W, Higashikuni Y, Obana T, et al. Abstract 16593: the DEAD-Box RNA helicase Ddx41 contributes to adverse cardiac remodeling during pressure overload through modulation of RNA metabolism [J]. *Circulation*, 2023, 148 (Suppl_1): A16593-A16593.

(收稿日期: 2024-08-03; 修回日期: 2024-11-16)

中性粒细胞在创伤性脑损伤中的研究进展

侯志琦, 马玉林, 章越凡* (上海大学医学院, 上海 200444)

摘要: 创伤性脑损伤 (TBI) 是由外力引起脑组织结构破坏或功能紊乱的神经系统疾病。其发病率、致死率和致残率居高不下, 给患者家庭和社会带来了巨大负担。中性粒细胞作为损伤部位的第一线转运固有免疫细胞, 高度参与 TBI 的发生、发展和恢复过程。本文综述了中性粒细胞与 TBI 后脑灌注压异常、脑水肿、凝血功能亢进和神经修复的关系以及靶向中性粒细胞治疗 TBI 的活性分子, 旨在为 TBI 的研究奠定基础。

关键词: 创伤性脑损伤; 固有免疫; 中性粒细胞; 脑灌注压; 脑水肿; 神经修复

中图分类号: R651.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0009-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.002

Advance in role of neutrophils in traumatic brain injury

HOU Zhi-qi, MA Yu-lin, ZHANG Yue-fan* (*School of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200444*)

Abstract: Traumatic brain injury (TBI) is a neurological disorder in which an external force strikes the head, leading to structural damage or functional disorders in the brain tissue. Its high morbidity, mortality, and disability rates impose a severe burden on patients' families and the society. Neutrophils, as first-line innate immune cells at the site of injury, play a crucial role in the occurrence, development, and recovery of TBI. This paper reviewed the relationship between neutrophils and abnormal cerebral perfusion pressure, cerebral edema, hypercoagulation, and neural repair after the TBI, and examined active molecules targeting neutrophils in TBI treatment, aiming to lay a foundation for further research.

Key words: traumatic brain injury; innate immunity; neutrophil; cerebral perfusion pressure; cerebral edema; neural repair

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是由外力引起脑组织结构破坏或功能紊乱的神经系统疾病^[1]。它是导致全球患者死亡和残疾的主要原因^[2], 给社会带来了巨大的经济负担, 影响个人及其家庭的生活质量^[3]。TBI 引起颅内压 (intracranial pressure, ICP) 升高、脑水肿、神经炎症和免疫反应等^[4-5], 会导致长期的脑损伤。TBI 损伤程度和发病机制的多样性以及病理解剖亚型的异质性导致了其病程和结局的差异^[6], 所以仍需不断探索 TBI 的发病机制及治疗方法, 从而改善 TBI 患者的临床结局。免疫细胞在 TBI 发病机制中的作用受到越来越多的关注。TBI 后外周免疫细胞的浸润以及脑组织驻留免疫细胞的激活会导致神经炎症^[7], 进一步加重脑损伤。

中性粒细胞是哺乳动物固有免疫系统的主要成分, 是循环中最常见的白细胞^[8], 也是神经炎症的起始因素^[9]。生理情况下, 成熟的中性粒细胞位于骨髓、脾、肝和肺中, 释放后仅存活数小时, 通过凋亡而死亡, 并被肝脏和脾脏中的巨噬细胞清除。然而细胞环境可以改变中性粒细胞的寿命, 在广泛组织损伤的情况下, 肝脏或脾脏对循环中性粒细胞的清除延迟^[10]。在中枢神经系统中, 由于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的存在, 中性粒细胞极少存在于脑实质中。在脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 和软脑膜等部位有少量的中性粒细胞和其他免疫细胞提供免疫监视。在感染、创伤、缺血、出血等病理条件下, 中性粒细胞进入脑组织的数量增加^[11]。聚集的中性粒

作者简介: 侯志琦, 男, 硕士研究生, 主要从事药物作用机制研究, email: 17368836525@163.com * 通信作者: 章越凡, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物作用机制及靶点研究, email: yuefanzhang@shu.edu.cn

细胞在脑组织中通过吞噬、脱颗粒和中性粒细胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 清除病原体, 形成天然免疫系统的第一道防线^[12]。

中性粒细胞在 TBI 中十分重要。当外周或中枢神经系统发生组织损伤时, 中性粒细胞是最先对组织损伤发生反应的免疫细胞^[13], 高度参与 TBI 的发生、发展和恢复过程。TBI 的严重程度与外周血和脑损伤部位的中性粒细胞数量成正相关^[14]。

1 中性粒细胞在 TBI 中的作用

TBI 后中性粒细胞在脑中募集。TBI 早期, 血清儿茶酚胺和糖皮质激素迅速增加, 诱导外周血中性粒细胞显著增加^[15]。中性粒细胞通过细胞黏附分子紧贴并沿着内皮细胞层移动^[16], 进入损伤的大脑, 随后牢牢地黏附在内皮细胞层上, 最后它们通过细胞旁途径或跨细胞途径穿过内皮细胞^[17], 进入脑实质 (见图 1)。TBI 后 24 ~ 48 h 内, 中性粒细胞在脑中达到高峰, 7 d 则显著下降, 随后其在损伤组织中离散地持续存在, 至少持续到第 15 日^[18]。

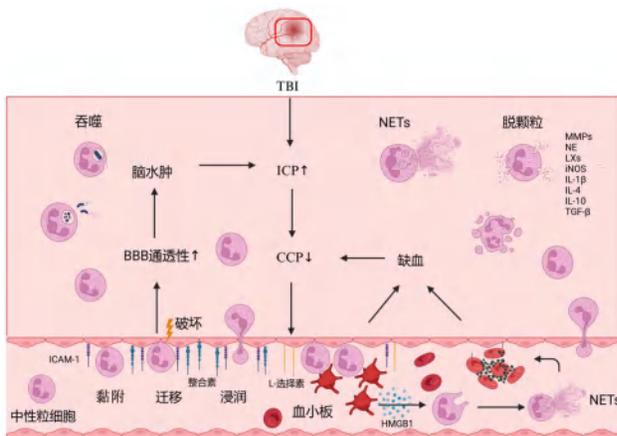


图 1 中性粒细胞在 TBI 中的作用机制图

Fig 1 Mechanism diagram of role of neutrophils in TBI

1.1 中性粒细胞与 TBI 后脑灌注压异常

TBI 早期常伴随 ICP 升高, 脑灌注压 (cerebral perfusion pressure, CPP) 降低, 血流低灌注增强中性粒细胞与血管的相互作用, 并通过诱导内皮细胞中 L-选择素和细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的表达, 促进中性粒细胞黏附。活化的中性粒细胞可以形成伪足并与内皮细胞和血小板结合, 阻碍通过微血管系统的血流^[19]。这将导致低灌注压和中性粒细胞黏附的恶性循环, 进一步加重 TBI 后脑缺血。

研究表明, TBI 后 24 h 至 6 d 内, 患者的平均脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 增加^[20]。充血参与 TBI 急性期中性粒细胞浸润、脑水肿和脑出血等^[21]。中性粒细胞释放的高活性基质金属蛋白酶-9

(MMP-9) 会降解基底膜中的 IV 型胶原蛋白, 从而破坏血管的完整性并可能导致出血病灶的扩大^[22]。同时, 中性粒细胞可以表达诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 促进脑血管扩张, 进一步加重脑出血。

1.2 中性粒细胞与 TBI 后脑水肿

TBI 后脑水肿与中性粒细胞也密切相关。TBI 后中性粒细胞在脑内迁移的同时^[23], 破坏 BBB 内皮细胞间的紧密连接, 损伤 BBB 的完整性, 从而提高 BBB 的通透性^[24], 间接导致血管源性脑水肿。脑水肿会增加 ICP, 导致 CCP 异常, 并加重 TBI 后继发的缺血性脑损伤。这些是影响 TBI 患者生存、神经功能结局和疾病进展的关键因素^[18]。其中, 中性粒细胞对 BBB 的破坏将有助于募集更多的免疫细胞对抗病原体, 但同时也会导致组织损伤。

浸润脑组织的中性粒细胞可进入脉络丛, 参与损伤部位附近的 CSF 循环, 加重脑水肿^[25]。研究发现中性粒细胞可在脉络膜基质细胞旁迁移, 破坏其完整性^[26]。同时, 这些中性粒细胞在损伤后 24 h 内聚集在第三脑室脉络组织池, 直接分泌血管内皮生长因子到细胞外基质中, 并随 CSF 循环, 增强血管生成和微血管通透性, 加重脑水肿。

TBI 后脑灌注压异常会出现血液和组织之间的渗透失衡, 导致渗透性水肿。脑内浸润的中性粒细胞释放的中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、脂氧素 (LXs) 通过影响血管通透性, 调节渗透性水肿。研究表明, TBI 后 4 h 内中性粒细胞的耗竭对水肿没有影响, 然而在 TBI 后 24 ~ 48 h 或更长的时间内, 中性粒细胞的耗竭减少了损伤引起的组织水肿^[27]。

1.3 中性粒细胞与 TBI 后凝血功能亢进

TBI 后可诱发全身性凝血功能亢进, 与 NETs 相关。NETs 是一种由中性粒细胞释放的胞外网状结构, 会加剧炎症反应^[8] 和血栓形成^[28], 与较差的 TBI 结局相关^[14]。TBI 后中性粒细胞通过释放 NETs 来捕获病原体并诱导 TBI 急性期凝血^[12, 29]。NETs 的产生由活化的血小板高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 介导, 并通过暴露磷脂酰丝氨酸和表达组织因子后结合凝血因子启动促凝活性。同时, NETs 还可以破坏内皮屏障, 并使这些细胞呈现促凝表型^[30], 诱导 TBI 急性期凝血。

1.4 中性粒细胞与 TBI 后神经修复

TBI 后中性粒细胞被积极地募集到损伤的脑组织中清理碎片, 保护暴露的脑实质免受感染, 并促进神经组织再生。其促进神经组织再生作用与 P2X7 受体 (P2X7R) 有关。TBI 后, 中性粒细

胞以 P2X7R 依赖的方式募集,并在损伤后 1 h 内到达受损的脑膜^[31]。中性粒细胞受刺激后可以分泌一些促进神经元细胞存活的分子^[32],其中转化生长因子(TGF- β)通过刺激神经生长因子的产生以及控制损伤后星形胶质细胞的增生和瘢痕的形成,进而促进神经组织再生。研究表明,通过阻断 P2X7R 信号增加了脑膜中细胞的死亡数量^[31]。

血管生成是 TBI 后受损脑组织恢复灌注必不可少的过程^[33]。中性粒细胞本身是血管内皮生长因子的来源,以自分泌的方式调节其迁移并有助于血管生成。TBI 后中性粒细胞也可以释放一些细胞因子促进炎症消退,如白细胞介素(IL)-4、IL-10 和 TGF- β 等^[34]。然而中性粒细胞的作用是促进神经修复还是加剧炎症反应,目前尚不清楚。

2 靶向中性粒细胞治疗 TBI 的活性分子

2.1 干扰中性粒细胞募集的活性分子

2.1.1 天然产物来源的药物 很多天然产物来源的药物对中性粒细胞具有调节作用。虫草素是一种首次从蛹虫草中分离得到的物质,具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病原微生物等^[35]。虫草素通过抑制 TBI 后中性粒细胞浸润,保持 BBB 的完整性并且改变小胶质细胞/巨噬细胞极化,从而发挥神经保护作用^[23]。梓醇是一种环烯醚萜苷,主要来源于中药干地黄的根,具有保肝、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用。梓醇显著抑制 TBI 后小胶质细胞活化和中性粒细胞浸润,减少促炎细胞因子 IL-1 β 的产生,抑制大鼠 TBI 后的氧化应激和神经炎症,从而发挥神经保护作用^[36]。咖啡豆醇是一种抗炎二萜,具有神经保护作用。研究发现,咖啡豆醇显著减少促炎细胞因子的分泌,减少小胶质细胞/巨噬细胞的活化以及中性粒细胞和白细胞的浸润,从而减轻 TBI 小鼠的继发性脑损伤^[37]。黄烷醇(-)-表儿茶素(EC)是一种黄酮类化合物,具有抗氧化应激的作用。EC 通过激活 Nrf2 通路,抑制血红素加氧酶-1(HO-1)的表达和中性粒细胞浸润,减少铁沉积,从而发挥神经保护作用^[38]。

2.1.2 化学药物 很多化学药物具有调节中性粒细胞的作用。他汀类药物是一类常用的降脂药物,具有免疫调节和抗炎特性。阿托伐他汀可以减少 TBI 后小鼠 T 细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞的浸润^[39],也可以减少促炎细胞因子和趋化因子的产生,发挥神经保护作用。马拉韦罗是第一个获得美国食品药品监督管理局许可的 C-C 趋化因子受体 5(CCR5)拮抗剂。马拉韦罗可以调节 TBI 后小胶质

细胞从 M1 型向 M2 型极化,减少中性粒细胞和巨噬细胞浸润,并抑制 TBI 后炎症因子的释放^[40-41],减少炎症反应从而发挥保护作用。髓样细胞触发受体 2(TREM2)是免疫球蛋白超家族的跨膜受体,主要表达于髓样细胞,在阿尔茨海默病、多发性硬化和帕金森病中具有神经保护作用。TREM2 的激动剂 COG1410 能够减少 TBI 后 BBB 破坏和脑水肿,并且通过抑制中性粒细胞浸润和小胶质细胞活化,抑制 TBI 后神经炎症,发挥神经保护作用^[42]。

2.1.3 生物药物 膜联蛋白 A2 (AXNA2) 是一种由钙离子介导的磷脂结合的蛋白质。TBI 后给予重组膜联蛋白 A2 (rA2) 可显著减轻中性粒细胞活化和脑浸润。同时, rA2 在 TBI 后 12 h 结合并降低中性粒细胞表面 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达,抑制中性粒细胞中的 TLR4/NF- κ B 信号通路,减轻 TBI 后炎症相关的神经退行性病变及神经功能缺损^[43](见表 1)。

2.2 抑制 NETs 形成的活性分子

NETs 是中性粒细胞引起损伤的重要机制,抑制其形成可以改善 TBI 后脑损伤。Cl- 脘是肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4 (PAD4) 抑制剂,通过 STING 依赖的 IRE1 α /ASK1/JNK 信号通路抑制 NETs 的形成,减少脑损伤体积,减轻 BBB 破坏,抑制免疫细胞浸润,减轻脑水肿,恢复 CBF,改善 TBI 后神经炎症、神经元凋亡和神经功能缺损从而产生神经保护作用^[8]。Cl- 脘治疗可能为 TBI 的早期治疗提供一种有前途的治疗方法。Mu 等^[14]研究设计并合成了一种负载 PAD4 抑制剂 GSK484 的活性氧(ROS)响应性中性粒细胞靶向递送系统,可以抑制脑损伤部位 NETs 的形成,显著抑制神经炎症并改善神经功能缺损,提高 TBI 小鼠的存活率。该靶向递送系统可能为开发 TBI 的靶向治疗诊断学奠定基础。

3 总结与展望

中性粒细胞是固有免疫系统的重要组成部分。TBI 后,中性粒细胞会浸润到大脑中,且其过度激活可能导致脑组织损伤。目前, TBI 后脑内局部环境如何调节中性粒细胞功能,以及中性粒细胞如何调节脑组织的损伤和修复的分子机制尚未得到充分阐明。因此,需要进一步研究明确中性粒细胞在 TBI 不同阶段的复杂作用及其潜在的作用机制。上述研究表明,减少中性粒细胞浸润或靶向抑制其过度激活可能是一种有效的 TBI 治疗策略。然而,未来可能会发展出新的综合治疗策略,这些策略在维持中性粒细胞在 TBI 中的有益作用的同时,选择性地消除其有害作用。

表 1 干扰中性粒细胞募集的活性分子

Tab 1 Active molecules that interfere the recruitment of neutrophils

分类	活性成分	模型	药理作用及作用机制	文献
天然产物来源药物	虫草素	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	抑制 TBI 后小胶质细胞 / 巨噬细胞促炎极化, 促进抗炎极化, 减轻 BBB 的破坏, 抑制中性粒细胞的浸润	[23]
	梓醇	控制性皮质撞击法建立大鼠 TBI 模型	改善 TBI 后神经功能损伤、BBB 破坏、脑水肿和神经元凋亡, 减轻 TBI 诱导的氧化损伤, 抑制 TBI 后小胶质细胞活化和中性粒细胞浸润	[36]
	咖啡豆醇	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	改善 TBI 后神经行为学结果, 减少促炎细胞因子分泌和小胶质细胞 / 巨噬细胞活化, 减少中性粒细胞和白细胞浸润	[37]
	EC	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	减少 TBI 后脑白质损伤、中性粒细胞浸润, 降低 MMP-9 活性, 抑制 HO-1 蛋白的表达, 减少铁沉积	[38]
化学药物	阿托伐他汀	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	减少 TBI 后神经元凋亡, 改善行为学缺陷, 减少 T 细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞的浸润, 减少促炎细胞因子和趋化因子的产生	[39]
	马拉韦罗	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	调节小胶质细胞从 M1 型向 M2 型极化, 减少中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 抑制 TBI 后炎症因子的释放	[40-41]
	COG1410	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	抑制 TBI 后中性粒细胞浸润和小胶质细胞活化, 抑制神经炎症, 缓解 BBB 破坏和脑水肿, 恢复创伤部位脑血流量, 抑制神经细胞凋亡	[42]
生物药物	膜联蛋白 A2	控制性皮质撞击法建立 TBI 小鼠模型	减轻 TBI 后中性粒细胞活化和脑浸润, 降低中性粒细胞表面 TLR4 表达, 抑制中性粒细胞中的 TLR4/NF- κ B 信号通路	[43]

参考文献

[1] Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management [J]. *Med Clin N Am*, 2020, 104 (2): 213-238.

[2] Smith AM, Taylor EB, Brooks RJ, et al. Cerebral and peripheral immune cell changes following rodent juvenile traumatic brain injury [J]. *Brain Sci*, 2024, 14 (4): 398.

[3] Jiang JY, Gao GY, Feng JF, et al. Traumatic brain injury in China [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18 (3): 286-295.

[4] Zhou M, Liu YWY, He YH, et al. FOXO1 reshapes neutrophils to aggravate acute brain damage and promote late depression after traumatic brain injury [J]. *Military Med Res*, 2024, 11 (1): 20.

[5] Newell-Rogers MK, Duong A, Nazarali R, et al. Unilateral cervical vagotomy modulates immune cell profiles and the response to a traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (17): 9851.

[6] Li FJ, Li L, Peng RL, et al. Brain-derived extracellular vesicles mediate systemic coagulopathy and inflammation after traumatic brain injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 130: 111674.

[7] Toutonji A, Krieg C, Borucki DM, et al. Mass cytometric analysis of the immune cell landscape after traumatic brain injury elucidates the role of complement and complement receptors in neurologic outcomes [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11 (1): 92.

[8] Shi GH, Liu L, Cao YY, et al. Inhibition of neutrophil extracellular trap formation ameliorates neuroinflammation and neuronal apoptosis via STING-dependent IRE1 α /ASK1/JNK signaling pathway in mice with traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2023, 20 (1): 222.

[9] Kong LZ, Zhang RL, Hu SH, et al. Military traumatic brain injury: a challenge straddling neurology and psychiatry [J]. *Military Med Res*, 2022, 9 (1): 2.

[10] Von Leden RE, Parker KN, Bates AA, et al. The emerging role of neutrophils as modifiers of recovery after traumatic injury to the developing brain [J]. *Exp Neurol*, 2019, 317: 144-154.

[11] Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (5): 1368-1379.

[12] Lou JB, Zhang JN, Deng QJ, et al. Neutrophil extracellular traps mediate neuro-immunothrombosis [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19 (8): 1734-1740.

[13] Kalafati L, Hatzioannou A, Hajishengallis G, et al. The role of neutrophils in trained immunity [J]. *Immunol Rev*, 2023, 314 (1): 142-157.

[14] Mu QC, Yao K, Syeda MZ, et al. Neutrophil targeting platform reduces neutrophil extracellular traps for improved traumatic brain injury and stroke theranostics [J]. *Adv Sci*, 2024, 11 (21): e2308719.

[15] Alam A, Thelin EP, Tajsic T, et al. Cellular infiltration in traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2020, 17 (1): 328.

[16] Li Y, Xu X, Wang HJ, et al. Endoplasmic reticulum protein 72 regulates integrin Mac-1 activity to influence neutrophil recruitment [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2024, 44 (3): e82-e98.

[17] Filippi MD. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives [J]. *Blood*, 2019, 133 (20): 2149-2158.

[18] Pedragosa J, Mercurio D, Oggioni M, et al. Mannose-binding lectin promotes blood-brain barrier breakdown and exacerbates axonal damage after traumatic brain injury

- in mice [J]. *Exp Neurol*, 2021, 346: 113865.
- [19] Chou ML, Babamale AO, Walker TL, et al. Blood-brain crosstalk: the roles of neutrophils, platelets, and neutrophil extracellular traps in neuropathologies [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46 (9): 764-779.
- [20] Kelly DF, Martin NA, Kordestani R, et al. Cerebral blood flow as a predictor of outcome following traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 1997, 86 (4): 633-641.
- [21] Roca-Cusachs P, Almendros I, Sunyer R, et al. Rheology of passive and adhesion-activated neutrophils probed by atomic force microscopy [J]. *Biophys J*, 2006, 91 (9): 3508-3518.
- [22] Chen JL, Zhu ZL, Li QY, et al. Neutrophils enhance cutaneous vascular dilation and permeability to aggravate psoriasis by releasing matrix metalloproteinase 9 [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141 (4): 787-799.
- [23] Wei PJ, Wang K, Luo C, et al. Cordycepin confers long-term neuroprotection via inhibiting neutrophil infiltration and neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2021, 18 (1): 137.
- [24] Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30 (4): 1153-1166.
- [25] Baruch K, Kertser A, Porat Z, et al. Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NF- κ B-dependent gateway activity for leukocyte trafficking [J]. *Embo J*, 2015, 34 (13): 1816-1828.
- [26] Szymdynger-Chodowska J, Strazielle N, Zink BJ, et al. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29 (9): 1503-1516.
- [27] Whalen MJ, Carlos TM, Dixon CE. Reduced brain edema after traumatic brain injury in mice deficient in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 [J]. *J Leukocyte Biol*, 1999, 67 (2): 160-168.
- [28] Sharma S, Hofbauer TM, Ondracek AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote fibrous vascular occlusions in chronic thrombosis [J]. *Blood*, 2021, 137 (8): 1104-1116.
- [29] Schultz BM, Acevedo OA, Kalergis AM, et al. Role of extracellular trap release during bacterial and viral infection [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 798853.
- [30] Jin JQ, Wang F, Tian JW, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to coagulopathy after traumatic brain injury [J]. *JCI Insight*, 2023, 8 (6): e141110.
- [31] Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, et al. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury [J]. *Nature*, 2013, 505 (7482): 223-228.
- [32] Royo NC, Conte V, Saatman KE, et al. Hippocampal vulnerability following traumatic brain injury: a potential role for neurotrophin-4/5 in pyramidal cell neuroprotection [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23 (5): 1089-1102.
- [33] Liu XY, Wu CH, Zhang YS, et al. Hyaluronan-based hydrogel integrating exosomes for traumatic brain injury repair by promoting angiogenesis and neurogenesis [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 306: 120578.
- [34] Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis [J]. *Blood*, 2004, 104 (8): 2543-2548.
- [35] Lu RJ, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565-574.
- [36] Ni HB, Rui Q, Kan XG, et al. Catalpol ameliorates oxidative stress and neuroinflammation after traumatic brain injury in rats [J]. *Neurochem Res*, 2022, 48 (2): 681-695.
- [37] Lee HF, Lin JS, Chang CF. Acute Kahweol treatment attenuates traumatic brain injury neuroinflammation and functional deficits [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (10): 2301.
- [38] Cheng T, Wang WZ, Li Q, et al. Cerebroprotection of flavanol (-)-epicatechin after traumatic brain injury via Nrf2-dependent and-independent pathways [J]. *Free Radical Bio Med*, 2016, 92: 15-28.
- [39] Xu X, Gao WW, Cheng SQ, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2017, 14 (1): 167.
- [40] Zhang JN, Zhang S, Zhou Y, et al. Maraviroc promotes recovery from traumatic brain injury in mice by suppression of neuroinflammation and activation of neurotoxic reactive astrocytes [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18 (1): 141-149.
- [41] Friedman-Levi Y, Liraz-Zaltsman S, Shemesh C, et al. Pharmacological blockers of CCR5 and CXCR4 improve recovery after traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2021, 338: 113604.
- [42] Yan J, Zhang Y, Wang L, et al. TREM2 activation alleviates neural damage via Akt/CREB/BDNF signalling after traumatic brain injury in mice [J]. *J Neuroinflamm*, 2022, 19 (1): 289.
- [43] Liu N, Han JR, Li YD, et al. Recombinant annexin A2 inhibits peripheral leukocyte activation and brain infiltration after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2021, 18 (1): 173.

(收稿日期: 2024-05-02; 修回日期: 2024-07-20)

现代分析技术在中药研究中的应用研究专题

【编者按】

中药是来源于植物、动物、矿物的药物，其采收、炮制及临床应用均具有完整的理论体系。中药药效物质、质量标准、体内代谢、作用机制及安全性等研究都属于现代中药研究范畴。然而，中药所含化学成分复杂、活性成分含量低、分离纯化步骤烦琐、结构解析难度大，使得现代中药研究充满挑战。随着科技进步，许多现代仪器分析技术和方法被广泛应用到中药研究中来，提高了对中药复杂体系的解析速度和准确度。本课题组多年来从事中药化学、中药分析等方向的研究，本专题主要对现代分析技术在中药研究中的应用进行综述和相关成果报道，以期为更好地开发与利用中药提供有益参考。

【主持人简介】



韩立峰，男，天津中医药大学测试中心主任，中药学博士研究生导师，中国科学院武汉物理与数学研究所博士后，意大利佛罗伦萨大学访问学者，天津市分析测试协会常务理事、天津色谱研究会理事、欧洲药用植物和天然产物研究学会（GA）会员。目前任天津市中药化学与分析重点实验室副主任，主要从事中药化学成分分离鉴定、质量控制、体内过程、药物相互作用与代谢组学等相关研究，获得国家自然科学基金、天津市自然科学基金、高等学校科技发展基金计划等项目资助，同时作为课题骨干参与了国自然重点项目、重大新药创制、中药标准化等 10 余个项目。入选“天津市十二五优秀青年教师培养计划”、天津市“131”创新型人才培养工程第二层次、天津市高校“中青年骨干创新人才培养计划”等人才项目。以第一作者或通信作者发表 SCI 论文 60 余篇；申请或授权发明专利 10 余项，获得教育部科技进步一等奖、二等奖各 1 项，中华中医药学会一等奖 1 项，天津市科技进步二等奖 2 项、三等奖 1 项，天津市教学成果特等奖 1 项。

现代仪器分析技术在中药多糖结构表征中的应用

张玲雨^{1,2}，王影^{1,2}，高志杰^{1,2}，毛骏祎³，杜翔³，刘宁³，韩立峰²，付志飞^{1,2*}（1.天津中医药大学中医药研究院，天津 301617；2.天津中医药大学组分中药国家重点实验室，天津 301617；3.天津中医药大学中药学院，天津 301617）

摘要：多糖是中药煎剂的重要组成成分，具有调节免疫、抗氧化、抗炎等广泛的药理活性。多糖的活性与分子量、单糖组成、糖残基的连接方式、取代基结构类型等信息息息相关。多糖作为复杂的高分子化合物，结构解析困难，且难以形成结晶，作用靶点不清，构效关系难以阐明。因此系统表征多糖的化学结构，以便更好地开发利用中药多糖是亟待开展的重要工作。现代分析技术如色谱技术、质谱技术、光谱技术以及核磁共振波谱技术等已成为解析中药多糖结构的重要手段，本文系统综述了这些仪器分析技术在多糖分子量、单糖组成、糖苷键的连接方式以及高级结构测定等方面的应用，以期为多糖结构的解析提供参考。

关键词：中药多糖；结构表征；液相色谱；质谱；光谱；核磁共振波谱

中图分类号：R286

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2025)01-0014-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.003

基金项目：天津市科技计划项目（No. 24ZYJDS00310）。

作者简介：张玲雨，女，硕士，主要从事中药药效物质基础研究，email: zly18812811500@163.com *通信作者：付志飞，女，助理研究员，主要从事中药药效物质基础研究，email: fuzhifei@tjutc.edu.cn

Modern instrumental analysis in the structure characterization of traditional Chinese medicine polysaccharides

ZHANG Ling-yu^{1,2}, WANG Ying^{1,2}, GAO Zhi-jie^{1,2}, MAO Jun-yi³, DU Xiang³, LIU Ning³, HAN Li-feng², FU Zhi-fei^{1,2*} (1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Key Laboratory of Component Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Polysaccharides are important constituents of herbal decoctions and have a wide range of pharmacological activities such as immune regulation, antioxidation and anti-inflammation. The activity of polysaccharides is closely related to the molecular weight, monosaccharide composition, linkage of sugar residues, substituent structure type and other information. As complex macromolecular compounds, polysaccharides are difficult to characterize structurally, in addition, polysaccharides are difficult to form crystals, the target of action and structure-activity relationship are difficult to elucidate. Therefore, it is an urgent task to systematically characterize the chemical structures of polysaccharides to better exploit polysaccharides. Modern analytical techniques such as chromatography, mass spectrometry, spectrum, and nuclear magnetic resonance spectroscopy have become important tools in analyzing the structure of polysaccharides. This paper systematically reviewed these instrumental analytical techniques in the determination of molecular weight, monosaccharides composition, linkage of glycosidic bonds and senior structure, aiming to provide reference for the analysis of polysaccharide structure.

Key words: traditional Chinese medicine polysaccharide; structure characterization; liquid chromatography; mass spectrometry; spectrum; nuclear magnetic resonance spectroscopy

多糖广泛存在于多种生物中,包括植物、动物、真菌、细菌和藻类^[1],其结构复杂,相比核酸和蛋白质具有更大的生物信息承载能力。临床中中药使用多以水煎煮方式提取,多糖在提取物中往往占有很大比例,多糖具有抗氧化^[2]、抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病^[3]、神经保护^[4]和免疫调节^[5]等作用。多糖是由单糖组成的大分子物质^[6],分子量从数千到数百万不等,结构受单糖组成种类、数量和连接方式以及高级结构等的影响。多糖的生物活性取决于其分子结构^[7],因此系统地研究多糖的结构至关重要。随着气相色谱质谱联用仪(GC-MS)、超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS)、核磁共振波谱(NMR)等高分辨率仪器的出现,多糖结构的研究取得了很大的进展^[8]。

本文综述了色谱技术、质谱技术、色谱质谱联用技术、红外光谱技术以及核磁共振波谱等技术在中药多糖的分子量、单糖组成以及糖苷键的连接方式测定方面的应用,以期为进一步研究中中药多糖的结构提供参考,为中药多糖的开发利用、质量控制研究提供方法学借鉴。

1 多糖的纯度及分子量分布

多糖是天然高分子化合物,而纯品多糖是指分子量在一定范围内的均一组分,代表相似链长的多糖的平均分布^[9]。多糖纯度常用的鉴别方法有比旋光度法、

凝胶色谱法、电泳法、超滤离心法、薄层色谱法等。

高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)是多糖分子量和纯度分析中最常用的方法^[10],它结合了凝胶渗透色谱(GPC)和高效液相色谱(HPLC)的优点,使其特别适用于分析高黏性或高浓度的多糖样品,是一种强大的分析技术。HPGPC法是根据多糖样品分子量的大小不同进行分离,分子量小的多糖能进入凝胶空隙中,出峰时间晚,反之,分子量大的多糖出峰时间早;而具有相近分子量的均一多糖几乎在同一时间出峰,体现在色谱图上为单一对称峰。超过凝胶填料孔径的样品分子不能被分离,因此测定时需选择合适排阻限度的色谱柱。多糖分子量测定常用的色谱柱有 TSK-gel G/PW 系列、Shodex SB-80 XHQ 系列和 Shodex Sugar KS 系列。中药粗多糖分子量分布范围往往跨度很大,因此在分子量测定时常将同系列或同型号色谱柱进行串联,以便获取更大的线性范围。如张义平等^[11]采用 TSK G4000 PW 和 KS 801 柱串联的 HPGPC 法测定分子量相近的右旋糖酐对照品,以及经右旋糖酐蔗糖酶粗酶液发酵蔗糖而得到的发酵液,结果能够使样品中的大小分子同时实现有效分离。流动相通常采用高浓度的盐溶液,如 NaNO₃、NaCl 或 Na₂SO₄ 等,以消除离子型样品存在的离子间的排斥作用,但高分子量多糖

样品通常难以溶解,测定时常用流动相提前溶胀 24 h。多糖分子量的分布常用的表示方法有数均分子量 (M_n)、重均分子量 (M_w)、黏均分子量 (M_η)、峰位分子量 (M_p)、Z 均分子量 (M_z)。其大小关系一般是: Z 均分子量 > 重均分子量 > 黏均分子量 > 数均分子量^[12]。分子量分布和宽度 (D) (M_w/M_n) 的比值又称多分散系数,表征分散程度, D 越大越分散。用已知分子量的样品(葡聚糖、普鲁兰多糖等)作对照,以保留时间和相对分子量对数作图,可求得待测多糖的相对分子量。

由于多糖的紫外吸收和荧光响应较弱, HPGPC 通常采用示差折光检测器 (RID)、多角度激光散射检测器 (MALLS) 和蒸发光散射检测器 (ELSD) 等检测器。ELSD 是一种“通用型”“质量型”检测器,其无需考虑物质的光学特性以及分子结构,不受结构中官能团和光学吸收的影响,通用性非常强^[13]。Chen 等^[14]采用 HPGPC-ELSD 法测得经 DEAE cellulose-52 和 Sephadex G-100 纯化后的枸杞花粉多糖的分子量为 (1540.10 ± 48.78) kDa。Sun 等^[15]采用 HPGPC-ELSD 法测得紫珠叶多糖的分子量分布在 $4.24 \sim 8771.35$ kDa。GPC 法还可与 MALLS 联用,不仅可以测定多糖的相对分子量,还可以得到多糖的绝对分子量。光散射法与多糖的分子量大小、链形态、溶液浓度、散射光角度和折光指数增量 (dn/dc 值)等相关。利用 GPC 分离功能可将样品分离为分子量不同的片段,而每个片段的浓度和分子量分别由示差检测器和激光检测器测得,从而可测定绝对分子量及分子量分布,此方法不需要多糖标准品、校正曲线,即可直接计算绝对分子量,但需准确测定样品的 dn/dc 值。

质谱法也可用于中药多糖分子量的测定。如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS),是一种新兴的软电离有机质谱技术,其利用脉冲激光产生离子化能量,并通过测量离子的飞行时间来确定其质荷比,实现样本的分离和鉴定。MALDI-TOF-MS 采用先进的反射模式代替传统的线性模式以获得更高的分辨率,通过质量差异重新聚焦样品离子,其主要优点包括高灵敏度、高精度、高通量、对杂质有较高耐受性,具有快速检测能力和良好的再现性^[16],且无需样品衍生化,现已被广泛应用于多糖、寡糖、糖脂及蛋白质等生物大分子的分析。Guo 等^[17]以 2, 5-二羟基苯甲酸为基质,采用 MALDI-TOF-MS 法测定五味子醋蒸处理后五味子多糖分子量集中在 $800 \sim 2400$ Da,经醋炙后, 5000 Da 以上的峰消失。

此外,多糖具有旋光性,比旋光度是多糖的固有属性,比旋光度相同,证明为均一组分。电泳法包括聚丙烯酰胺凝胶电泳和醋酸纤维素薄膜电泳等也可用于多糖纯度的鉴定,但更多见于低聚糖纯度

的鉴定。此外还有薄层色谱法和纸色谱法等也用于多糖纯度的分析。

2 多糖的单糖组成

单糖组成分析作为多糖结构和功能研究的基石,其结果的精确性对于后续甲基化分析以及 NMR 图谱解析的效率具有至关重要的影响。多糖的单糖组成分析需要先进行水解,生成单糖混合物,再进行测定。多糖常用的水解方法有酸水解(三氟乙酸、盐酸、硫酸)法、酶水解法、氧化降解法、超声降解法、辐射降解法等^[18]。单糖组成分析常用的方法有柱前/柱后衍生高效液相色谱法 (HPLC)、离子色谱法 (HPIC)、气相色谱法 (GC) 等。

2.1 HPLC 法

HPLC 法是分析中药多糖单糖组成的常用、简单、快速的方法之一^[19],常用检测器有紫外可见检测器 (VWD)、光电二极管阵列检测器 (DAD)、荧光检测器 (FLD)、RID、ELSD、电喷雾检测器 (CAD)、电化学检测器 (ECD) 和质谱检测器 (MS)。根据所用检测器的不同,可分为衍生化后测定和直接测定两种情况。

与 VWD、FLD 或 MS 检测器联用时,水解后的单糖需经衍生化反应才能被测定。衍生化可以提高分析的灵敏度和选择性,但也有些局限,如增加了分析样品的复杂性、衍生过程中可能导致多糖原始信息的丢失,因此,应根据具体的分析条件和被分析的多糖考虑是否衍生及选择合适的衍生试剂。常用的衍生化试剂有 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP)、2-氨基吡啶 (2-AP)、对氨基苯甲酸酯 (p -AMBA)、8-萘胺-1, 3, 6-三磺酸 (ANTS)、苯甲酰氯^[12]等,其中 PMP 最为常用,能同时测定酸性、中性和碱性多糖。PMP-HPLC-VWD 法灵敏度高,重现性好,适用于复杂单糖样品分析^[20]。Li 等^[21]采用 PMP 柱前衍生-HPLC-DAD 分析得出莼菜多糖的单糖组成为 57.9% 的鼠李糖、12.1% 的葡萄糖、16.3% 的葡糖醛酸、13.7% 的木糖。Yu 等^[22]采用三氟乙酸水解, PMP-HPLC-VWD 法获得不同产地的防风多糖的指纹图谱,以及不同产地的差异标志性单糖,为防风多糖的鉴定和质量控制提供了基础。 p -AMBA 也是一种常见的衍生化试剂,Chen 等^[23]建立 p -AMBA-HPLC-FLD 分析麦冬多糖单糖组成的方法,该方法操作简单,可同时检测醛糖、酮糖及糖醛酸,为麦冬多糖类成分的研究奠定了基础。HPLC-MS 联用技术目前也常应用于中药多糖的单糖组成的分析。Wang 等^[20]采用 PMP 柱前衍生化、高效液相色谱和电喷雾电离串联质谱 (HPLC/ESI-MSⁿ) 相结合的方法,对附子多糖单糖组成进行了分析,测得其由甘露糖、葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖、焦糖和阿拉伯糖组成。Wu 等^[24]优化了 PMP 衍生化后

使用 HPLC-ESI-MS 联用技术分析羊栖菜多糖中单糖组成的方法,测得其主要包括甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖以及葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸中的一种或两种。Wang 等^[25]通过 LC-MS/MS 技术,在蒙古白丽蘑多糖样品中鉴定了果糖、甘露糖、葡萄糖、木糖、海藻糖和半乳糖 6 种主要单糖。

与 RID、ELSD、CAD 检测器联用时,无需对单糖进行衍生化^[26]。常用的色谱柱为氨基柱,如 Eurokat H、Asahipak NH₂P-50 4E、BEH amide 等。但还原性的糖(如葡萄糖、果糖和半乳糖等)容易与氨基发生反应,可能会导致固定相的化学性质发生变化,从而影响色谱柱的分离性能和使用寿命,且氨基柱的流动相平衡时间长,不适用于大量样品的快速分析^[18]。Feriani 等^[27]采用 HPLC-RID 检测麦冬多糖水解后的单糖组成,发现其由阿拉伯糖、半乳糖醛酸、岩藻糖和葡萄糖组成。Zhang 等^[28]采用 HPLC-ELSD 法比较了 23 批地黄样品以及 25 批地黄加工样品的单糖组成,从 23 批地黄样品和 25 批地黄加工样品中分别鉴定出 8 个共有色谱峰,该方法可作为地黄加工质量的标准。Lv 等^[29]采用 HPLC-CAD 法对黄芪水提取物中多糖进行定性定量测定,分析结果显示,其多糖由大量的半乳糖醛酸组成。

2.2 GC 法

GC 法是一种在早期阶段广泛应用于多糖中单糖组成分析的有效技术^[30],这种方法主要通过使用特定的衍生试剂对多糖进行完全水解后得到的单糖进行化学修饰,进而生成具有挥发性和热稳定性的衍生物,随后利用 GC 分析,并通过与对照品进行对比,实现单糖组成的定性和定量分析。GC 具有高灵敏度和高分离度的特点,测定多糖单糖组成的过程中,氢火焰检测器(FID)、MS 是常用的检测器,常用的方法为三甲基硅醚化、糖腈乙酸酯化、糖醇乙酸酯化、三氟乙酯化等^[31]。GC 只适用于中性多糖的测定,而不适宜糖醛酸及 *N*-乙酰氨基糖的检测,原因是酸性多糖中的糖醛酸一经水解释放,容易发生内酯化,其内酯化程度难以重复,使测定结果重复性低。

Xia 等^[32]建立了通过三甲基甲硅烷基糖醇衍生化进行 GC-MS 分析的方法,可在 25 min 内检测知母多糖的 8 种中性糖和 2 种糖醛酸。Pascual-Maté 等^[33]使用 GC-FID 对蜂蜜多糖进行分析,测得其由 2 个单糖、5 个双糖、6 个三糖和 1 个四糖组成。Maskat 等^[34]通过 GC-FID 分析海藻多糖的单糖组成,发现其主要由岩藻糖和葡萄糖醛酸组成。GC-MS 联用,GC 技术的高效分离能力和 MS 技术高准确定性能力可实现对复杂多糖样品同时进行定性、定量分析。Peng 等^[35]使用 GC-MS 对黑木耳多糖进行分析,结果表明,黑木

耳多糖主要由中性糖葡萄糖和甘露糖组成,摩尔比为 82.97 : 12.93。Li 等^[36]对松藻多糖进行水解衍生,采用 GC-MS 分析,结果表明半乳糖是其主要的单糖。

2.3 HPIC 法

离子色谱法(IC)是一种新型离子分离分析技术,以离子交换机制进行分离^[37]。常用的检测器为电导检测器(ELCD)或脉冲安培检测器(PAD)。IC 采用 PAD 可直接对多糖水解样品进行单糖组成测定^[38],常用的色谱柱为 Dionex CarboPac PA20 (150 mm×3.0 mm, 10 μm),一般中性糖出峰在前,酸性糖出峰在后。赵雪莲等^[39]采用 HPIC 法,以 H₂O、0.1 mol·L⁻¹ NaOH、0.1 mol·L⁻¹ NaOH、0.2 mol·L⁻¹ CH₃COONa 为流动相,色谱柱为 Dionex CarboPac PA20 (150 mm×3.0 mm, 10 μm)测得生黄芪多糖的单糖组成为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖。Guo 等^[40]采用 IC 法联用 PAD 检测器,对红毛五加多糖进行定性和定量分析,结果表明其由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸等单糖组成,摩尔比为 29.5 : 24.6 : 23.8 : 4.4 : 5.7 : 8.8 : 3.1。

2.4 高效毛细管电泳(HPCE)法

HPCE 的原理是带电粒子在电场力的驱动下,在毛细管中按其淌度或分配系数不同而进行分离,具有分离效率高、快速、操作简便、可选择模式多及安全无毒等特点^[41],被广泛应用于各种活性多糖的单糖组成分析^[42]。与 HPLC 相比,HPCE 法大幅缩短了单糖的分析时间,但其定量重复性不如 HPLC。付昆等^[43]对附子多糖进行了研究,首先将多糖水解成单糖,经 α -萘胺衍生化后用硼砂作电泳介质得到多糖的毛细管区带电泳谱图,最终得到附子多糖由葡萄糖和半乳糖组成。Yang 等^[44]建立了一种简单灵敏的 HPCE 方法,将南瓜多糖水解成单糖,PMP 衍生后使用 HPCE 分析,结果表明葡萄糖(21.7%)和葡萄糖醛酸(18.9%)为主要组成单糖。

3 多糖的糖苷键构型、连接方式及连接位点

多糖中单糖的连接方式有很多种,受糖苷键构型、连接方式及位点、糖环类型、糖残基排列顺序等的影响。实际在解析多糖结构的时候通常多种方法联合使用:化学方法包括高碘酸氧化、Smith 降解和甲基化分析;光谱和波谱方法有红外光谱(IR)、核磁共振波谱和质谱等;生物酶法包括内切酶和外切酶等。各个方法的结果可以互相补充或验证,使获得的多糖结构更加准确。

3.1 高碘酸氧化和 Smith 降解

高碘酸(HIO₄)可以选择性氧化糖分子中的连二羟基或连三羟基,生成相应的多糖醛、甲醛或甲

酸, 每断裂 1 个 C-C 消耗 1 分子的 HIO_4 , 可以根据 HIO_4 的消耗量及甲酸的生成量, 判断糖苷键的连接方式^[45]。对于 1→2 或 1→4 连接的糖苷键, 每断裂 1 个糖苷键消耗 1 分子 HIO_4 , 无甲酸释放; 1→或 1→6 连接的糖苷键, 每断裂 1 个糖苷键消耗 2 分子 HIO_4 同时释放 1 分子 HCOOH ; 1→3 连接的糖苷键不被高碘酸氧化, 不产生甲酸^[46]。

Smith 降解是 HIO_4 氧化的一种延伸, 主要过程为将 HIO_4 氧化后生成的不同产物用硼氢化合物还原成稳定的多羟基化合物^[47], 再进行完全或部分酸水解和乙酰化, 最后进行 GC-MS 分析, 可以获得糖苷键连接方式等信息。1→2 连接的糖苷键, 产生 2 分子甘油; 1→3 连接的糖苷键, 产生葡萄糖; 1→4 连接的糖苷键, 产生赤藓糖醇和乙二醇; 1→6 连接的糖苷键, 产生 1 分子甘油和甲酸。Diao 等^[48] 对秀丽莓多糖的 Smith 降解产物进行 GC 分析, 检测到甘油和赤藓糖醇, 表明在多糖中存在 1→2、1→2, 6、1→4 或 1→4, 6 几种类型的糖苷键。

3.2 甲基化反应和 GC-MS 分析

甲基化反应的原理为将多糖中的各单糖残基游离羟基全部甲基化, 再将多糖水解, 所得产物羟基所在的位置即为连接位置, 同时也可计算出不同连接类型单糖的比例。目前, 糖苷键连接方式的分析主要采用甲基化反应结合 GC-MS 技术, 此法具有快速、高效, 灵敏度高的优势。甲基化的反应条件较为严苛, 所用试剂及样品均需充分干燥。糖醛酸样品测定前需要进行还原^[49], 可加入 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐, pH 4.8 下室温反应 1 h, 活化羧基后加入 1 mL 新配制 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaBH}_4$, 50°C 下反应 1.5 h 后, 用盐酸溶液调节 pH 7, 室温反应 1.5 h, 3500 Da 膜透析后冻干, 水解、 NaBH_4 还原、乙酰化以及 GC-MS 分析。糖醇乙酸酯用 NaBD_4 还原可使含 C1 的碎片质量呈偶数, 由此可区分己糖醛酸和己糖还原产物。

Tang 等^[50] 通过甲基化和 GC-MS 分析, 阐明 *Lepidium meyenii* Walp 多糖具有 1, 3-Galp、1, 3-Glcp 和 1, 3-Manp 的重复单位, 比例为 5 : 4 : 1。Yang 等^[51] 采用甲基化分析确定了中草药复合多糖 CPs-1 糖苷键的连接方式, 结果表明, 在 CPs-1 中主要存在 1→6 和 1→3, 6 连接的糖苷键。Zhu 等^[52] 采用甲基化的方法, 阐明何首乌多糖的主要连接方式为 1→6 连接的吡喃葡萄糖。Muttaillu 等^[53] 通过甲基化和 GC-MS 技术分析甘草多糖, 结果表明甘草多糖中主要的糖苷键包括 1, 4-Glcp、T-Glcp、1, 4, 6-Glcp 和 1, 6-Glcp。Jing 等^[54] 用甲基化、GC-MS 技术对北沙参多糖 (GLP) 进行结构分析, 结果表明, GLP 中 2, 3, 4, 6-Me₄-Glc、2, 3, 6-Me₃-Glc 和 2, 3-Me₂-Glc 三种成分的摩尔比为

5.58 : 87.13 : 7.29, 鉴定其主要组成单糖为葡萄糖, 连接方式为 1→、1→4、1→4, 6 连接。

3.3 LC-MS 技术

糖类化合物在 MS 中裂解容易产生 4 种类型的离子, 最常见的为糖苷键断裂产生的碎片离子, 其次是跨环断裂产生的碎片离子, 其他类型的离子还包括糖链多个位点的糖苷键断裂以及糖环内裂解产生的碎片离子^[55]。电子轰击、快原子轰击、电喷雾离子化以及基质辅助激光解析电离技术, 都适合分析极性大、难挥发及热不稳定的糖类样品。相较于传统技术, 质谱展现出更高的分析效率、灵敏度和重现性^[56]。它能精确提供多糖样品中未知组分的结构信息, 如单糖组成、糖苷键顺序等。在 Castillo 等^[57] 的研究中, 通过对低聚糖进行甲基化、酸水解和 PMP 衍生后进行分析, 对部分甲基化产物进行超高效液相色谱-三重四极杆质谱 (UHPLC-QQQ MS) 分析并与文献比对, 得到低聚糖糖苷键的两种连接方式: T-Glc 和 →4)-Glc。另有研究采用液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 鉴定了谷物麸皮多糖的连接方式, 分析表明麸皮多糖中普遍存在 →6)-Glc、→4)-Glc、T-Glc、T-Ara 和 T-Xyl 连接方式^[58]。

3.4 红外光谱法

红外光谱法是表征多糖化学结构的常用方法之一^[59], 多糖中某些特征基团可以在红外光谱上有特征吸收峰。如多糖在红外光谱图的 $3400 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ 处有一个宽而强的羟基伸缩振动, 在 $3000 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 处有一个弱的 C-H 伸缩振动, 在 $1200 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 之间约 1077 cm^{-1} 处出现的峰是 C-O-C 键拉伸振动, 这都是多糖的典型特征^[60]。另外, 多糖中若存在羧基, 则在 1615 cm^{-1} 处有一个强吸收峰。若存在硫酸基, 则在 1255 cm^{-1} 左右有一个强吸收峰^[61]。 $970 \sim 730 \text{ cm}^{-1}$ 间的峰可用作端基碳构型的判断, 一般 α -L 吡喃糖通常在 840 cm^{-1} 处有吸收峰, β -D 吡喃糖构型通常在 890 cm^{-1} 处有吸收峰。天竺葵多糖组分 GCP 和 GNP 在 937 cm^{-1} 处显示 β -糖苷键的特征带, GCP、GNP 和 GAP 在 832 cm^{-1} 处显示 α -糖苷键的特征吸收带^[62]。

3.5 核磁共振波谱法

早期一维 NMR (1D NMR) 主要解决多糖结构中糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目, 随着二维核磁共振 (2D NMR) 的出现和发展, NMR 逐渐成为获得多糖结构信息有力的工具。NMR 具有不破坏样品的优点, 在获取多糖的结构信息后, 可对多糖样品进行回收和利用, 重现性高^[63]。对于 1D NMR 图谱, 可依据 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据确定糖环类型以及糖苷键构型。一般情况下, 异头氢质子 H-1 的化学位移通常处于较低场, 在 $4.5 \sim 5.5$ 内有几个氢质子信号, 提示可能有几种糖残基。 α 型

吡喃糖 H-1 的化学位移通常在 4.9 ~ 5.8, 而 β 型通常在 4.4 ~ 4.9。糖环质子的信号通常在 3.5 ~ 4.5, 鼠李糖的甲基质子信号在 1.0 附近。异头碳的化学位移通常在 90 ~ 112, α 型吡喃糖 C-1 的化学位移通常在 90 ~ 102, 而 β 型为 102 ~ 112。异头碳也能提供一些糖残基的数目信息, 但分子量较大, 组成复杂的多糖一维谱图往往信号重叠严重, 难以进行信号的全归属, 若要进一步确定糖残基的数目, 仍需结合 2D NMR。2D NMR 信息是不同糖残基中 C 和 H 化学位移归属和糖残基连接顺序推断的主要依据, 常用的 2D NMR 有氢-氢相关谱 (H-H COSY)、全相关谱 (TOCSY)、二维核欧沃豪斯效应谱 (NOESY) 等同核化学位移相关技术, 以及异核多量子相关谱 (HMQC)、异核单量子相关谱 (HSQC)、异核多键相关谱 (HMBC) 等异核化学位移相关技术。HSQC 反映的是异核单量子近程相关^[64], 可以确定的是同一位点的 H 与 C 的偶合关系。首先, 通过 HSQC 图谱中异头碳与对应异头氢的化学位移计算 $J_{C-1, H-1}$ 偶合常数, 通常 α 构型 $J_{C-1, H-1}$ 在 170 Hz, 而 β 构型 $J_{C-1, H-1}$ 在 160 Hz 左右; 其次, 根据异头氢的化学位移在 1H - 1H COSY 谱中可找到 C2 氢的化学位移, 再在 HSQC 谱找到与氢相连碳的化学位移。在多糖的结构分析中, TOCSY 和 NOESY 是两种不可或缺的 NMR 技术, TOCSY 谱通过展示分子中氢原子之间的直接和间接连接性, 帮助确定多糖的连接方式和连接位点; 而 NOESY 谱则通过测量氢原子间的空间接近度, 揭示糖苷键的构型信息。HSQC-TOCSY 作为一种结合了 HSQC 和 TOCSY 技术的 NMR 方法, 可以直接观察到多糖分子中 C-H 键的连接方式, 从而确定其糖苷键的类型和连接方式, 同时, 通过 H-H 偶合的间接连接性, 可以进一步揭示多糖分子中不同糖基之间的连接顺序和构象。最后, HMBC 反映的是异核远程相关信息, 可以确定糖环之间的连接方式。

Zhou 等^[65]将 TOCSY 结合 HSQC 谱解析鉴定芦苇多糖中的残基 H 信号判断糖残基的类型, 将 TOCSY 谱中的氢核相关信号和 HMBC 谱 1H - ^{13}C 相关信号相结合, 可以推断出糖残基序列, 得到芦苇多糖组分 PRP-2 的主要糖苷键为 $\rightarrow 2, 3) -\alpha-L$ -Fucp- (1 \rightarrow 。吡喃糖中端基碳的 C-H 偶合常数 (J_{C1-H1}) 可用于糖苷键构型的确定。 α -糖苷键 J_{C1-H1} 为 165 ~ 170 Hz, β -糖苷键 J_{C1-H1} 为 155 ~ 160 Hz。Miranda 等^[66]研究了嘉宝果多糖的 HSQC 谱发现, 在 δ 值为 98.7/4.63 及 99.7/4.50 处对应的偶合常数分别为 162 和 161 Hz, 表明 β 构型糖苷键, 而在 δ 102.7/5.39 处对应的偶合常数值 171 Hz, 表明其为 α 构型糖苷键, 结合 TOCSY 谱对质子进行鉴定, 通过 HSQC 分析确定了其相应碳的化学位移, 得到嘉

宝果多糖的结构为主链 $\rightarrow 4) -Galp-$ (1 \rightarrow , 侧链含有 α -D-Galp、Rhap、Araf、Glc 及少量糖醛酸。多糖的分子量越大, NMR 谱图中峰的重叠越严重, 对于结构复杂且未知的多糖, 结构解析难度依然很大。

4 多糖的高级结构表征

多糖的高级结构, 如二级结构、三级结构和四级结构, 对生物活性起着至关重要的作用^[67]。研究多糖的高级结构需要考察多糖链的大小和状态、主链和侧链之间的相互作用、多糖分子的空间构象和形态特征等因素常借助于刚果红试验、原子力显微镜 (AFM)、扫描电子显微镜 (SEM)、拉曼光谱等技术手段。

4.1 刚果红染色

刚果红是一种广泛使用的酸性染料, 能够与呈现三螺旋构象的多糖形成复合结构^[60]。通过观察刚果红-多糖复合物的最大吸收波长与溶液中刚果红的最大吸收波长相比发生的红移, 可以确定是否存在这种三螺旋结构。Li 等^[68]通过刚果红染色发现, 蛇床子多糖可以与刚果红发生特征性反应, 具有三螺旋结构。此外, Mei 等^[69]的实验发现, 在 0 ~ 0.6 mol \cdot L⁻¹ NaOH 存在下, 刚果红-多糖复合物的最大吸收波长发生红移, 表明香梨多糖具有相对稳定的三螺旋结构。Zhu 等^[70]比较了刚果红和刚果红与天麻多糖复合物的最大吸收波长, 发现复合物的最大吸收波长没有红移, 表明天麻多糖中不存在三螺旋结构。

4.2 AFM

AFM 可在纳米级别上直观表征大分子多糖的表面形貌及空间分布, 用于确定糖链的特征, 包括链直径、链长和链分布等^[71], 而且不损坏样品。研究表明, AFM 可用于表征中药多糖的链结构。例如, Xu 等^[67]用 AFM 分析了银耳多糖 (TFP), 发现它们以平均厚度为 1.1 nm 的柔性链形式存在, TFP 的高度平均为 0.1 ~ 1 nm, 高于单个多糖链的高度, 表明 TFP 结构中的分支是交织在一起的。同样, Deng 等^[72]利用 AFM 研究了柴胡种子多糖 F3 的分子形貌, 发现它以轮状链的形式存在, 多条链紧密排列, 表面有突出的分支, 表明存在支链。Zhang 等^[73]也使用 AFM 观察到小花清风藤多糖 SPS60 聚集成直径为 21 nm 的球形块。这些发现证明了 AFM 能够提供有关多糖链结构的形态学特征。

4.3 SEM

SEM 可提供详细的显微图像, 是一种用于观察多糖表面微观结构的强大技术^[74]。例如, Yan 等^[75]使用 SEM 研究了巴戟天多糖 MOW90-1 的形态, 发现它主要呈现出片状和球状的混合结构。Patel 等^[76]也用 SEM 比较了从车前子叶片或种子中提取的粗多糖和纯化多糖的形态, 发现粗多糖具有形状不规则、无孔、表面光滑、线状和片状卷曲等特点, 而纯化多糖则具有多孔和纤维状特点。Al-Wraikat 等^[77]对从枸

杞叶中提纯的枸杞多糖 (CLP) 和用过氧化氢降解的枸杞多糖 (DLP) 的扫描电镜图像进行了比较, 发现 CLP 外观呈深色、黏稠、厚实、粗糙、多孔, 有明显可见的聚集团块, 包括多糖颗粒, 而相比之下, DLP 外观呈浅色、光滑、丝状, 外观相对均匀。

4.4 拉曼光谱

拉曼光谱法研究化合物分子受光照射后所产生的非弹性散射、散射光与入射光能极差及化合物振动频率、转动频率间关系, 具有快速、无损、准确、样品制备简单的优点^[78], 可用于多糖的结构表征及定性分析。拉曼光谱原理跟红外光谱有些类似, Yuen 等^[79]通过羧甲基化方法修饰了纤维素、瓜尔豆胶、刺槐豆胶和黄原胶四种不同结构类型的非淀粉多糖, 采用拉曼光谱和傅里叶变换红外光谱分析这四种多糖的取代度, 旨在取代传统的湿化学方法。Pereira 等^[80]采用红外光谱和拉曼光谱对多种海藻多糖, 如褐藻胶、卡拉胶进行有效的区分。

5 总结与展望

中药多糖由于其天然、无毒、含量高, 具有潜在的药用价值, 近年来成为众多学者的研究对象, 为了更好地进行药效物质基础的研究, 对其进行分离、纯化和结构表征十分必要。多糖结构复杂, 导致其分离纯化步骤复杂, 制备高纯度多糖耗时费力, 且质控困难; 结构表征步骤烦琐, 单一技术难以给出精确结构。但随着现代仪器分析技术的发展, 结合人工智能技术, 如分子动力学模拟和量子力学计算, 可以提供多糖在溶液中的动力学和相互作用等信息, 将会为中药多糖的结构表征提供更多的思路和新方法, 为中草药多糖的质量研究和食品开发提供有益的参考。

参考文献

- [1] Liu Y, Sun YY, Huang GL. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 780-786.
- [2] Cheng H, Huang GL. Extraction, characterisation and antioxidant activity of *Allium sativum* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 415-419.
- [3] Luo Y, Peng B, Wei WQ, et al. Antioxidant and anti-diabetic activities of polysaccharides from guava leaves [J]. *Molecules*, 2019, 24 (7): 1343.
- [4] Gao QH, Fu XY, Zhang R, et al. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: a review of the mechanisms [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 749-754.
- [5] Sun BN, Yu S, Zhao DY, et al. Polysaccharides as vaccine adjuvants [J]. *Vaccine*, 2018, 36 (35): 5226-5234.
- [6] Mei XY, Yang WJ, Huang GL, et al. The antioxidant activities of balsam pear polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 142: 232-236.
- [7] Xu Y, Wu YJ, Sun PL, et al. Chemically modified polysaccharides: synthesis, characterization, structure activity relationships of action [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 970-977.
- [8] Wu Y, Zhou H, Wei KH, et al. Structure of a new glycyrrhiza polysaccharide and its immunomodulatory activity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1007186.
- [9] Zhao B, Wang XY, Luo W, et al. Isolation and structural elucidation of a low-molecular-weight polysaccharide from the roots of *Panax ginseng* CA Meyer [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36 (2): 493-500.
- [10] Zhou SY, Huang GL, Chen GY. Extraction, structural analysis, derivatization and antioxidant activity of polysaccharide from Chinese yam [J]. *Food Chem*, 2021, 361: 130089.
- [11] 张义平, 浦媛媛, 邹青松, 等. HPGPC 柱串联法测定肠膜明串珠菌发酵产物研究 [J]. *食品科技*, 2013, 38 (10): 308-312.
- [12] 周雪艳, 常贺, 苟海芹, 等. 分子量影响多糖生物活性的研究进展 [J]. *河南工业大学学报 (自然科学版)*, 2024, 45 (1): 124-132.
- [13] 许歆瑶. 糖类化合物分析新方法研究及中药葛根多糖的提取、纯化与结构鉴定 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [14] Chen F, Ran LW, Mi J, et al. Isolation, characterization and antitumor effect on DU145 cells of a main polysaccharide in pollen of Chinese wolfberry [J]. *Molecules*, 2018, 23 (10): 2430.
- [15] Sun W, Xu JD, Zhang W, et al. Holistic quality evaluation of *Callicarpae formosanae* Folium by multi-chromatography-based qualitative and quantitative analysis of polysaccharides and small molecules [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 227: 115282.
- [16] Šebela M. Biomolecular profiling by MALDI-TOF mass spectrometry in food and beverage analyses [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022; 23 (21): 13631.
- [17] Guo ZJ, Zhang W, Xu JG, et al. Effect of vinegar steaming on the composition and structure of *Schisandra chinensis* polysaccharide and its anti-colitis activity [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38 (3): e5811.
- [18] 万晓莹, 刘振丽, 宋志前, 等. 中药多糖定性鉴别与糖谱的研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27 (5): 876-881.
- [19] Ma XL, Song FF, Zhang H, et al. Compositional monosaccharide analysis of *Morus nigra* Linn by HPLC and HPCE quantitative determination and comparison of polysaccharide from *Morus nigra* Linn by HPCE and HPLC [J]. *Curr Pharm Anal*, 2017, 13 (5): 433-437.
- [20] Wang BB, Wang JL, Yuan J, et al. Sugar composition analysis of Fuzi polysaccharides by HPLC-MSⁿ and their protective effects on Schwann cells exposed to high glucose [J]. *Molecules*, 2016, 21 (11): 1496.
- [21] Li YP, Wang XP, Jiang YC, et al. Structure characterization of low molecular weight sulfate *Ulva* polysaccharide and the effect of its derivative on iron deficiency anemia [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 747-754.
- [22] Yu MQ, Xu G, Qin M, et al. Multiple fingerprints and spectrum-effect relationship of polysaccharides from *Saposhnikovia radix* [J]. *Molecules*, 2022, 27 (16): 5278.
- [23] Chen ZR, Zhu BJ, Peng X, et al. Quality evaluation of ophiopogon japonicus from two authentic geographical origins in China based on physicochemical and pharmacological properties of their polysaccharides [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (10): 1491.
- [24] Wu XD, Jiang W, Lu JJ, et al. Analysis of the monosaccha-

- ride composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2014, 145: 976-983.
- [25] Wang XY, Bao HY, Bau T. Investigation of the possible mechanism of polysaccharides extracted from *Leucocalocybe mongolica* in exerting antitumor effects in H22 tumor-bearing mice [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45 (4): e13514.
- [26] Ghosh R, Kline P. HPLC with charged aerosol detector (CAD) as a quality control platform for analysis of carbohydrate polymers [J]. *BMC Res Notes*, 2019, 12 (1): 1-7.
- [27] Feriani A, Tir M, Hamed M, et al. Multidirectional insights on polysaccharides from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: physicochemical and functional profiles, in vitro antioxidant, anti-genotoxicity, antidiabetic, and antihemolytic capacities, and in vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165: 2576-2587.
- [28] Zhang Y, Li HF, Ma Y, et al. Microwave assisted extraction-solid phase extraction for high-efficient and rapid analysis of monosaccharides in plants [J]. *Talanta*, 2014, 129: 404-410.
- [29] Lv GP, Hu DJ, Cheong KL, et al. Decoding glycome of *Astragalus membranaceus* based on pressurized liquid extraction, microwave-assisted hydrolysis and chromatographic analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1409: 19-29.
- [30] 王丹丹, 杨铭, 管珂, 等. GC-MS/MS 测定中药中 13 个挥发性有机化合物 [J]. *中国现代中药*, 2024, 26 (5): 856-861.
- [31] 杜镇, 张玲, 曹桂云, 等. 薏苡仁多糖的分离纯化、单糖组成分析及对脾气虚证调节作用 [J]. *中草药*, 2023, 54 (6): 1736-1742.
- [32] Xia YG, Wang TL, Sun HM, et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based trimethylsilyl-alditol derivatives for quantitation and fingerprint analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 198: 155-163.
- [33] Pascual-Maté A, Osés SM, Marcazzan GL, et al. Sugar composition and sugar-related parameters of honeys from the northern Iberian Plateau [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 74: 34-43.
- [34] Maskat Y, Seng N, Mond NS, et al. Monosaccharide profile and antioxidant activities of sulphated polysaccharide extracted from Indonesian brown seaweed (*Sargassum* sp.) [J]. *Sains Malays*, 2022, 51 (10): 3195-3202.
- [35] Peng XB, Li Q, Ou LN, et al. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its inhibition against skin aging in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47 (2): 304-307.
- [36] Li N, Gai YY, Su L, et al. Study on the chemical composition analysis from green pine algae [J]. *Fresen Environ Bull*, 2021, 30 (7): 8624-8629.
- [37] Tian T, Rumachik N, Sinrod AJ, et al. Coupling an ion chromatography to high resolution mass spectrometry (IC-MS) for the discovery of potentially prebiotic oligosaccharides in Chardonnay grape marc [J]. *J Chromatogr B*, 2023, 1214: 123540.
- [38] Zhang C, Li Z, Zhang CY, et al. Extract methods, molecular characteristics, and bioactivities of polysaccharide from alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (5): 1181.
- [39] 赵雪莲, 赵文晓, 段晨晨, 等. 黄芪多糖化学表征与免疫性调节关系的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42 (3): 108-112.
- [40] Guo XX, Hao HH, Meng AX, et al. Analysis of *Acanthopanax giraldii* harms polysaccharide II composition and its immune-protective role in a cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice model [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2021, 2021 (1): 3387396.
- [41] 陈传平, 吴剑峰, 方士英, 等. 柱前衍生-高效毛细管电泳法分析金樱子多糖中单糖组成 [J]. *黄山学院学报*, 2018, 20 (3): 60-64.
- [42] Chen ND, Meng YF, Yao HJ, et al. Study on monosaccharide compositions of polysaccharide in *Dendrobium* stems of different resources by PMP-HPCE [J]. *Chin Med Mat*, 2015, 38 (8): 1607-1610.
- [43] 付昆, 叶强. 高效毛细管电泳法分析附子多糖中单糖组分 [J]. *中国药业*, 2014, 23 (13): 17-19.
- [44] Yang XB, Zhao Y, Lv Y. Chemical composition and antioxidant activity of an acidic polysaccharide extracted from *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55 (12): 4684-4690.
- [45] Pandeirada CO, Achterweust M, Janssen HG, et al. Periodate oxidation of plant polysaccharides provides polysaccharide-specific oligosaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 291: 119540.
- [46] Huang HD, Wu MM, Yang HP, et al. Structural and physical properties of sanxan polysaccharide from *Sphingomonas sanxanigenens* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 410-418.
- [47] Yoshihara K, Saheki T, Christensen BE, et al. Conformation and cooperative order-disorder transition in aqueous solutions of β -1, 3-d-glucan with different degree of branching varied by the Smith degradation [J]. *Biopolymers*, 2019, 110 (9): e23315.
- [48] Diao YL, Shan JJ, Ma H, et al. A polysaccharide from the stems of *Rubus amabilis* Focke and its immunological enhancement activity [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18 (9): 897-907.
- [49] 谢慧荣, 邓靖, 杨小生, 等. 刺梨多糖 RRTFP-2 结构分析及类 NGF 神经营养活性研究 [J]. *食品科技*, 2022, 47 (4): 224-230.
- [50] Tang Y, Zhu ZY, Pan LC, et al. Structure analysis and anti-fatigue activity of a polysaccharide from *Lepidium meyenii* Walp [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33 (17): 2480-2489.
- [51] Yang X, Ji HY, Feng YY, et al. Novel compound polysaccharides from Chinese herbal medicines: purification, characterization, and antioxidant activities [J]. *Oxid Med Cell Longevity*, 2022, 2022 (1): 9973419.
- [52] Zhu WL, Xue XP, Zhang ZJ. Ultrasonic-assisted extraction, structure and antitumor activity of polysaccharide from *Polygonum multiflorum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 132-142.
- [53] Mutaillifu P, Bobakulov K, Abuduwaili A, et al. Structural characterization and antioxidant activities of a water soluble polysaccharide isolated from *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 144: 751-759.
- [54] Jing YS, Li JY, Zhang YW, et al. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from *Glehnia littoralis* and its application in preparation of nano-silver [J]. *Int J*

- Biol Macromol, 2021, 183: 1317-1326.
- [55] Hu PF, Fang LQ, Jones CM, et al. Collective sampling of intact anionic polysaccharide components and application in quantitative determination by LC-MS [J]. Carbohydr Res, 2011, 346 (14): 2268-2273.
- [56] Tamara S, den Boer MA, Heck AJ. High-resolution native mass spectrometry [J]. Chem Rev, 2021, 122 (8): 7269-7326.
- [57] Castillo JJ, Galermo AG, Amicucci MJ, et al. A multidimensional mass spectrometry-based workflow for de novo structural elucidation of oligosaccharides from polysaccharides [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2021, 32 (8): 2175-2185.
- [58] Pasha I, Ahmad F. Monosaccharide composition and carbohydrates linkage identification in cereal brans using UHPLC/QqQ-DMRM-MS [J]. J Food Compos Anal, 2021, 96: 103732.
- [59] Chylińska M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. FT-IR and FT-Raman characterization of non-cellulosic polysaccharides fractions isolated from plant cell wall [J]. Carbohydr Polym, 2016, 154: 48-54.
- [60] Liu D, Sun QW, Xu J, et al. Purification, characterization, and bioactivities of a polysaccharide from mycelial fermentation of *Bjerkandera fumosa* [J]. Carbohydr Polym, 2017, 167: 115-122.
- [61] 宋照凤, 谭杰安, 周子凡, 等. 黄芪多糖衍生物的制备及乳化性能研究 [J]. 轻工科技, 2023, 39 (5): 8-15.
- [62] Feng JY, Xie YQ, Zhang P, et al. Hepatoprotective polysaccharides from *geranium wilfordii*: purification, structural characterization, and their mechanism [J]. Molecules, 2022, 27 (11): 3602.
- [63] Perepelov AV, Chen T, Senchenkova SN, et al. Structure and genetics of the *O*-specific polysaccharide of *Escherichia coli* O27 [J]. Carbohydr Polym, 2018, 456: 1-4.
- [64] Ndukwe IE, Black I, Heiss C, et al. Evaluating the utility of permethylated polysaccharide solution NMR data for characterization of insoluble plant cell wall polysaccharides [J]. Anal Chem, 2020, 92 (19): 13221-13228.
- [65] Zhou RM, Cui MX, Wang Y, et al. Isolation, structure identification and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from *Phragmites rhizoma* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 161: 810-817.
- [66] Miranda BM, Di-Medeiros MC, Batista KA, et al. A galactose-rich heteropolysaccharide extracted from "jaboticaba" (*Plinia cauliflora*) peels [J]. Carbohydr Polym, 2020, 249: 116821.
- [67] Xu XQ, Chen AJ, Ge XY, et al. Chain conformation and physicochemical properties of polysaccharide (glucuronoxylomannan) from fruit bodies of *Tremella fuciformis* [J]. Carbohydr Polym, 2020, 245: 116354.
- [68] Li XY, Wang L. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 270-276.
- [69] Mei XY, Yang WJ, Huang GL, et al. The antioxidant activities of balsam pear polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 142: 232-236.
- [70] Zhu ZY, Chen CJ, Sun HQ, et al. Structural characterization and ACE-inhibitory activities of polysaccharide from *Gastrodia elata* Blume [J]. Nat Prod Res, 2019, 33 (12): 1721-1726.
- [71] Schefer L, Adamcik J, Mezzenga R. Unravelling secondary structure changes on individual anionic polysaccharide chains by atomic force microscopy [J]. Angew Chem, Int Ed, 2014, 53 (21): 5376-5379.
- [72] Deng YJ, Huang LX, Zhang CH, et al. Novel polysaccharide from *Chaenomeles speciosa* seeds: structural characterization, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity evaluation [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 153: 755-766.
- [73] Zhang XX, Li JQ, Li MS, et al. Isolation, structure identification and hepatoprotective activity of a polysaccharide from *Sabia parviflora* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2021, 32: 127719.
- [74] Zhang JX, Wen CT, Zhang HH, et al. Review of isolation, structural properties, chain conformation, and bioactivities of psyllium polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 139: 409-420.
- [75] Yan CY, Huang D, Shen X, et al. Identification and characterization of a polysaccharide from the roots of *Morinda officinalis*, as an inducer of bone formation by up-regulation of target gene expression [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133: 446-456.
- [76] Patel MK, Tanna B, Gupta H, et al. Physicochemical, scavenging and anti-proliferative analyses of polysaccharides extracted from psyllium (*Plantago ovata* Forssk) husk and seeds [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133: 190-201.
- [77] Al-Wraikat M, Liu Y, Wu LM, et al. Structural characterization of degraded *Lycium barbarum* L. leaves' polysaccharide using ascorbic acid and hydrogen peroxide [J]. Polymers, 2022, 14 (7): 1404.
- [78] Tahir M, Majeed MI, Nawaz H, et al. Raman spectroscopy for the analysis of different exo-polysaccharides produced by bacteria [J]. Spectrochim Acta, 2020, 237: 118408.
- [79] Yuen SN, Choi SM, Phillips DL, et al. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides [J]. Food Chem, 2009, 114 (3): 1091-1098.
- [80] Pereira L, Amado AM, Critchley AT, et al. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman) [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23 (7): 1903-1909.

(收稿日期: 2024-05-30; 修回日期: 2024-07-25)

基于离线二维色谱 - 质谱联用技术的何首乌化学成分表征研究

母乃匀¹, 周琳², 范新玉², 韩立峰², 王丽明^{2*} (1. 河北港口集团有限公司秦皇岛中西医结合医院, 河北 秦皇岛 066005; 2. 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津中医药大学测试中心, 天津 301617)

摘要: **目的** 基于液质联用技术对何首乌九蒸九晒炮制品的化学成分进行表征。**方法** 通过优化离线二维色谱的固定相、流动相、柱温、进样量等条件, 构建了离线二维液相色谱与四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用的方法(2D-LC-Q-Orbitrap MS), 表征何首乌炮制品中的化学成分, 并对其裂解规律进行解析。**结果** 构建了由亲水相互作用色谱柱 XBridge Amide (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) 与反相色谱柱 CORTECS Shield RP18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 组成的离线二维液相色谱系统, 通过对何首乌炮制品中的化学成分进行定性分析, 共表征了 139 个化学成分。**结论** 本文构建的离线二维液相色谱相比于一维色谱更有利于何首乌化学成分的表征, 可为探寻何首乌中的药效和毒性物质基础提供数据支持, 为后续药理、毒理研究提供参考。

关键词: 离线二维; 何首乌; 化学成分; 液质联用

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0023-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.004

Characterization of chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. based on off-line two-dimensional chromatography-mass spectrometry

MU Nai-yun¹, ZHOU Lin², FAN Xin-yu², HAN Li-feng², WANG Li-ming^{2*} (1. *Qinhuangdao Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Port Group Co., Ltd., Qinhuangdao Hebei 066005*; 2. *Tianjin Key Laboratory of Chemistry and Analysis of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine Test Center, Tianjin 301617*)

Abstract: Objective To characterize the chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. after steaming and drying times. **Methods** By optimizing the off-line two-dimensional stationary phase, mobile phase, column temperature, sample volume and other conditions, we established off-line two-dimensional liquid chromatography and quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (2D-LC-Q-Orbitrap MS) to analyze the cracking law of chemical constituents in *Polygonum multiflorum* Thunb.. **Results** An off-line two-dimensional liquid chromatography system consisting of hydrophilic interaction chromatography XBridge Amide (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) and reversed-phase chromatography CORTECS Shield RP18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was established. Totally 139 chemical constituents were characterized by qualitative analysis of the constituents in the processed *Polygonum multiflorum* Thunb.. **Conclusion** This study provides a reference for exploring the material basis of liver injury caused by *Polygonum multiflorum* Thunb., and for subsequent pharmacological and toxicological research.

Key words: off-line two-dimensional; *Polygonum multiflorum* Thunb.; chemical component; LC-MS

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 中医临床有生品及炮制品之分, 但无论是生品还是炮制品, 均含有蒽醌类、二苯乙烯类、有机酸类、黄酮类以及磷脂等化学成分。何首乌生品具有解毒、消痈、润肠通

便和截疟的功效, 而制首乌则具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨的功效。近年来关于何首乌临床不良反应的报道一直存在, 特别是在肝损伤方面^[1-3]。个体肝脏代谢酶的遗传多态性、代谢酶缺陷和免疫应激状态与何首乌诱导的肝损伤密切

基金项目: 秦皇岛市科学技术局计划项目 (No.202201B020); 国家自然科学基金面上项目 (No.82274362)。

作者简介: 母乃匀, 女, 主治医师, 主要从事中医临床工作, email: 1149646790@qq.com ***通信作者:** 王丽明, 男, 高级工程师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: wangliming_111@163.com

相关^[4-6]。毒性成分主要集中在二苯乙烯苷^[7]、蒽醌类^[8]以及鞣质类^[9-10]化学成分^[11]。但是,因何首乌所致肝损伤的机制较为复杂,目前未有明确的结论。

中药具有复杂的化学组成,并且其所含成分含量及极性差异很大。基于常规的一维液相色谱,对中药成分的分离与检测通量有限,往往会忽略掉具有很好活性的微量成分。二维液相色谱(2D-LC)是由两种分离机制不同且相互独立的色谱柱串联而成的分离系统,相比于传统一维液相色谱,可以提供更大的峰容量,使得大多数目标化合物基线分离,有助于微量成分的发现与表征。目前二维液相色谱已越来越多地用于中药成分的分离检测^[12-19]。

本研究开发了一种离线二维液相色谱-质谱串联技术,并将其成功应用于对制何首乌的化学成分表征研究,现报道如下。

1 材料

1.1 药材

何首乌生品购自河北美威药业有限公司(批号:20210310),经天津中医药大学张丽娟教授鉴定为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根。黑豆(产自黑龙江)购买自哈尔滨鑫恒德食品有限公司(批号:20200514)。何首乌九蒸九晒炮制品为实验室蒸制。

1.2 仪器

Ultimate 3000 超高效液相仪(美国赛默飞世尔科技公司),高分辨质谱仪 Q-Exactive-Orbitrap MS(德国赛默飞世尔科技公司),KQ-250E 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),AX205 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司),BP121S 万分之一天平(德国赛多利斯公司),涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂),5424R 低温高速离心机(德国艾本德公司)。

1.3 试剂

HPLC 级乙腈、甲醇、乙酸铵(美国 Fisher 公司),甲酸(美国 ACS 公司),乙酸(美国 Sigma-Aldrich 公司),甲酸铵(上海 Aldin 公司)。所用超纯水为屈臣氏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。顺式二苯乙烯苷(纯度>98%,批号:T819464)、反式二苯乙烯苷(纯度:99%,批号:T874838)(上海麦克林生化科技股份有限公司),大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷(纯度:98%,成都瑞芬思德丹科技有限公司,批号:B20241),儿茶素(批号:B21722)、表儿茶酸(批号:B20102)、表儿茶素没食子酸酯(批号:B20103)、染料木苷(批号:T91712)、黄豆苷元(批号:B20227)、原花青素 B1(批号:B21616)、染料木素(批号:B21039)(纯度

均为 98%,上海源叶生物技术有限公司),大黄素(纯度>98%,成都普菲德生物技术有限公司,批号:19051504),大黄素-甲醚(纯度:98%,中国食品药品检定研究院,批号:110758-200912)。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 何首乌炮制品的制备 黑豆九蒸九晒何首乌:取 1 kg 何首乌,先用米泔水浸泡 12 h,再将何首乌与 500 g 黑豆放入蒸锅中,铺豆一层,何首乌一层,层层铺尽,隔水蒸制 12 h。弃去黑豆,将何首乌露天晒 12 h,然后用烘箱 50℃ 烘至恒重,再以豆蒸,反复蒸晒九次,每次留样备用。每次炮制“蒸”之前,将 500 g 黑豆加入 1 L 的水浸泡过夜,每次将黑豆弃去,蒸制前换用新的黑豆。取同批次的何首乌,平行蒸制 3 份。米泔水的制备:将 1 kg 大米用适量的水漂洗一次,将水倒掉,再加入 3 L 的水漂洗,即得实验所用米泔水。

2.1.2 离线二维液相色谱用的样品制备 精密称取何首乌炮制品粉末(过 3 号筛),加入适量 70% 甲醇配制成 50 mg·mL⁻¹ 的溶液,涡旋混匀,超声提取(功率 250 W,频率 50 kHz) 1 h,冷却后 13 200 g 离心 20 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,滤液进样分析。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 离线二维液相色谱条件 构建亲水相互作用和反相色谱(HILIC×RPLC)的离线二维液相色谱系统,第一维液相色谱分离在 Ultimate 3000 双三元超高效液相色谱系统上完成,配备有 DAD 检测器,使用仪器的右泵完成第一维的液相分离。色谱柱为 Waters Xbridge Amide(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm),流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),柱温为 30℃,流速为 1 mL·min⁻¹,进样量为 5 μL,检测波长为 254 nm,洗脱梯度:0~8 min, 5%~8%A; 8~14 min, 8%~11%A; 14~22 min, 11%~20%A; 22~30 min, 20%~50%A; 30~32 min, 50%A。

第二维液相色谱分离在 Ultimate 3000 超高效液相色谱系统上完成。色谱柱为反相色谱柱 Waters CORTECS UPLC Shield RP18(2.1 mm×100 mm, 1.6 μm),流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),柱温为 30℃,流速为 0.3 mL·min⁻¹,进样量为 5 μL,第二维优化的色谱洗脱梯度为:0~1 min, 5%B; 1~10 min, 5%~20%B; 10~15 min, 20%~45%B; 15~21 min, 45%~100%B; 21~25 min, 100%B; 25~25.5 min, 100%~5%B; 25.5~30 min, 5%B。

2.2.2 质谱条件 使用 Q-Exactive 质谱仪负离子扫描模式,配有加热的电喷雾离子源(HESI),参数

设置如下：喷雾电压 - 3 kV；鞘气 (N_2) 流速为 $35 L \cdot h^{-1}$ ；辅助气 (N_2) 流速为 $10 L \cdot h^{-1}$ ；毛细管温度： $350 ^\circ C$ ；辅助气温度： $400 ^\circ C$ ；本实验采用了 Full MS/dd MS² 的扫描模式，扫描范围 m/z 为 100 ~ 1500，分辨率为 70 000，MS² 质谱扫描是动态质量范围，分辨率为 17 500。高能碰撞诱导解离在归一化碰撞能量 10/30/50 V 下进行，动态背景排除时间为 10 s。

2.3 离线二维液相色谱的分段制备

本研究对何首乌炮制品按照色谱保留时间进行分段制备。根据时间依次分割为 0 ~ 3 min (Fr. 1)，3 ~ 5 min (Fr. 2)，5 ~ 6 min (Fr. 3)，6 ~ 8 min (Fr. 4)，8 ~ 10 min (Fr. 5)，10 ~ 13 min (Fr. 6)，13 ~ 18 min (Fr. 7)，18 ~ 21 min (Fr. 8)，21 ~ 23 min (Fr. 9)，23 ~ 25 min (Fr. 10)，25 ~ 32 min (Fr. 11)，重复进样 8 针，按照上述时间分割点，将样品分段制备后氮气吹干，加入适量的 70% 甲醇复溶，取上清液即得待测样品， $4 ^\circ C$ 保存，最终用于二维液相色谱的分析。

2.4 提取溶剂的选择

分别考察水、50% 甲醇 - 水、70% 甲醇 - 水和纯甲醇作为何首乌提取溶剂时的区别。通过对比不同提取溶剂的总离子流图，根据 SEIVE 对比提取的色谱峰个数，结果：水 (597 个)、50% 甲醇 - 水 (686 个)、70% 甲醇 - 水 (756 个) 和纯甲醇 (372 个)，为了检测到更多的化合物，同时兼顾极性 & 非极性样品的提取，最终选择 70% 甲醇 - 水作为样品的提取溶剂。

2.5 离线二维液相色谱系统的构建

2.5.1 固定相的选择 第二维固定相的筛选：二维液相色谱是由两根具有不同分离机制且又相互独立的色谱柱构成，样品经过 ¹D 色谱柱分离后，再经过 ²D 进一步的分离并通过质谱进行化合物表征。由于 ²D 色谱与质谱联用，直接影响质谱数据的质量，所以本研究首先筛选了第二维固定相。

反相色谱柱应用较广泛，对多数化合物有较好的分离度，主要应用于中药等复杂成分分析，与质谱联用具有良好的兼容性，可获得丰富的数据信息，因此，在离线二维液质联用系统中常被用作第二维固定相的色谱柱。在本研究中主要筛选了 5 种不同类型的色谱柱 [Waters CORTECS UPLC Shield RP18 ($2.1 mm \times 100 mm$, $1.6 \mu m$)；Waters BEH C₁₈ ($2.1 mm \times 100 mm$, $1.7 \mu m$)；Waters HSS T₃ ($2.1 mm \times 100 mm$, $1.8 \mu m$)；Waters CORTECS C₁₈ ($2.1 mm \times 100 mm$, $1.6 \mu m$)；Waters HSS C₁₈ SB ($2.1 mm \times 100 mm$, $1.8 \mu m$)]。使用 UHPLC/Q-Orbitrap MS 系统采集数据，结果见图 1。RP18 与 HSS T₃

柱提取色谱峰个数相对较多，但相比于 HSS T₃ 柱，保留时间在 12 ~ 15 min 与 18 ~ 22 min RP18 柱的 TIC 图有更好的分离度与峰形。综合考虑色谱峰的分度及个数，选择 RP18 柱作为第二维固定相的色谱柱。

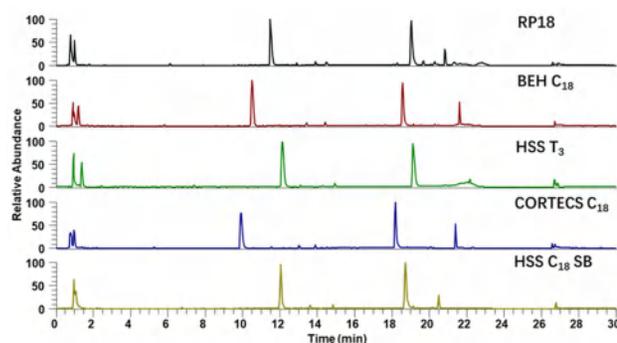


图 1 离线二维液相系统第二维固定相的筛选

Fig 1 Screening of the second stationary phase of off-line two-dimensional liquid phase system

第一维固定相的筛选：第一维固定相色谱柱的筛选，主要基于与第二维固定相色谱柱分离的差异。HILIC 色谱被视为“高度含水的正相色谱”，常以乙腈和水作为流动相，与反相色谱柱分离具有较大差异性。本研究第一维固定相色谱柱筛选了 Waters XBridge Amide ($4.6 mm \times 150 mm$, $3.5 \mu m$) 和 Acchrom XAmide ($4.6 mm \times 150 mm$, $5 \mu m$)。选取何首乌中的 11 个成分作为指标，记录其在两根 HILIC 和 RP18 色谱柱上的保留时间，并计算其相对保留时间 (见式 1)，然后以化合物在 HILIC 色谱柱的相对保留时间为 X 轴，在 RP18 柱的相对保留时间为 Y 轴，分别做散点图，根据相关系数 (R^2) 大小评价两根色谱柱的正交性。 R^2 值越大，说明两根色谱柱的保留行为越相似；反之，说明两根色谱柱保留行为差异较大，正交性好。通过计算可以得出两根 HILIC 与 RP18 色谱柱的 R^2 值：XBridge Amide (0.3772) < XAmide (0.5237)，所以第一维色谱柱选择 XBridge Amide 色谱柱。

2.5.2 液相色谱条件的优化

① 第一维色谱条件的优化：对流动相 (0.1% 甲酸水 - 乙腈，纯水 - 乙腈， $10 mmol \cdot L^{-1}$ 甲酸铵水 - 乙腈， $10 mmol \cdot L^{-1}$ 乙酸铵水 - 乙腈)、柱温 (25 、 35 、 $45 ^\circ C$) 及进样体积 (2 、 5 、 10 、 $20 \mu L$) 进行了考察。在保留时间为 $4 \sim 7 min$ 时，柱温为 $25 ^\circ C$ ，进样体积为 $5 \mu L$ ，流动相为 0.1% 甲酸水 - 乙腈时具有更好的峰形及分离度。

② 第二维液相色谱条件的优化：主要优化了流动相 (0.1% 甲酸水 - 乙腈，纯水 - 乙腈，0.1% 乙酸水 - 乙腈)、柱温 (30 、 35 、 $40 ^\circ C$) 两个因素，结果

表明流动相为 0.1% 甲酸水 - 乙腈，柱温为 30 °C 时峰形及分离度良好。因此，第二维的色谱分离流动相选择为 0.1% 甲酸水 - 乙腈，柱温为 30 °C。

2.5.3 离线二维液相色谱的正交性与峰容量 利用 Camenzuli 等^[20] 提出的星号方程对构建的二维液相色谱进行正交性评价。本实验选取 50 个成分分别记录其在两个维度上的保留时间，根据式 (1)，将保留时间转换为规范化的保留时间 $[t_{R, norm(i)}]$ ， $t_{R(i)}$ 是成分 i 的保留时间， $t_{R, first}$ 和 $t_{R, last}$ 分别是最先洗脱成分和最后洗脱成分的保留时间。用四条交叉线 (Z_- , Z_+ , Z_1 和 Z_2) 来分隔空间， S_{Z_-} 、 S_{Z_+} 、 S_{Z_1} 、 S_{Z_2} 分别表示在不同方向上的分布，并通过在式 (2) ~ (5) (σ 为标准差) 所示取这些距离的标准差来确定这四条线周围的 50 个成分的扩散程度。将计算的值输入到式 (6) ~ (9) 中得到 Z 参数，给出测量正交性 (A_0) 的值。使用式 (10) 来计算正交性 (见图 2)，得测量正交性为 55%。第一维和第二维平均峰宽分别为 0.29 min 和 0.23 min，有效梯度时间分别为 30 min 和 21 min，根据峰容量计算公式 (11) 和 (12)，计算得峰容量为 9373，表明该方法有利于更多化学成分的分和表征。

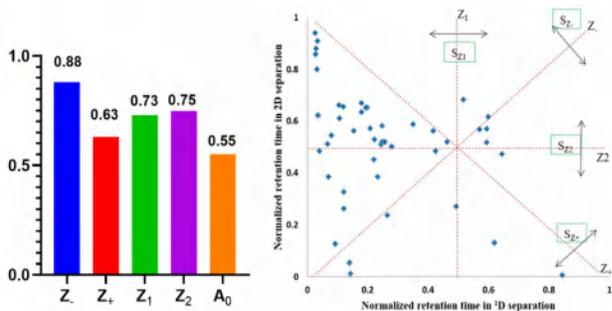


图 2 离线二维液相色谱系统正交性结果
Fig 2 Orthogonality of off-line two-dimensional liquid chromatography system

2.6 化学成分与结构解析^[21-28]

所有组分通过第一维分离共获得 11 个馏份，然后通过优化的 UHPLC Q/Orbitrap-MS 方法分别对其进行分析 (见图 3)。通过与相关文献数据库比对，初步表征得到 139 个化合物，其中 12 个化合物与对照品进行比对。化合物结构鉴定结果见表 1。

2.6.1 二苯乙烯类 以反式二苯乙烯苷为例，质荷比为 405.1190 ($C_{20}H_{22}O_9$) 的 $[M-H]^-$ 母离子脱去一分子葡萄糖基 ($C_6H_{10}O_5$, 162 Da) 后，产生质荷比为 243.0660 ($C_{14}H_{11}O_4$) 的 $[M-H]^-$ 离子，通过失去一个 H_2O (18 Da)，产生质荷比为 225.0547 ($C_{14}H_9O_3$) 的 $[M-H]^-$ 离子，被表征为反式二苯乙烯苷^[21-22]，裂解规律及碎片离子见图 4A。

2.6.2 蒽醌类 以大黄素为例，质荷比为 269.0457 ($C_{15}H_{10}O_5$) 的 $[M-H]^-$ 母离子连续丢失 $-CO$ (28 Da)

$$t_{R, norm(i)} = \frac{t_{R(i)} - t_{R, first}}{t_{R, last} - t_{R, first}} \quad (1)$$

$$S_{Z_-} = \sigma(t_{R, norm(i)}^1 - t_{R, norm(i)}^2) \quad (2)$$

$$S_{Z_+} = \sigma\{t_{R, norm(i)}^2 - (1 - t_{R, norm(i)}^1)\} \quad (3)$$

$$S_{Z_1} = \sigma(t_{R, norm(i)}^1 - 0.5) \quad (4)$$

$$S_{Z_2} = \sigma(t_{R, norm(i)}^2 - 0.5) \quad (5)$$

$$Z_- = |1 - 2.5|S_{Z_-} - 0.4|| \quad (6)$$

$$Z_+ = |1 - 2.5|S_{Z_+} - 0.4|| \quad (7)$$

$$Z_1 = 1 - |2.5S_{Z_1}\sqrt{2} - 1| \quad (8)$$

$$Z_2 = 1 - |2.5S_{Z_2}\sqrt{2} - 1| \quad (9)$$

$$A_0 = \sqrt{Z_- \times Z_+ \times Z_1 \times Z_2} \quad (10)$$

$$n_{grd} = t_G / W_b \quad (11)$$

$$n_{2D} = n_{grd}^1 \times n_{grd}^2 \quad (12)$$

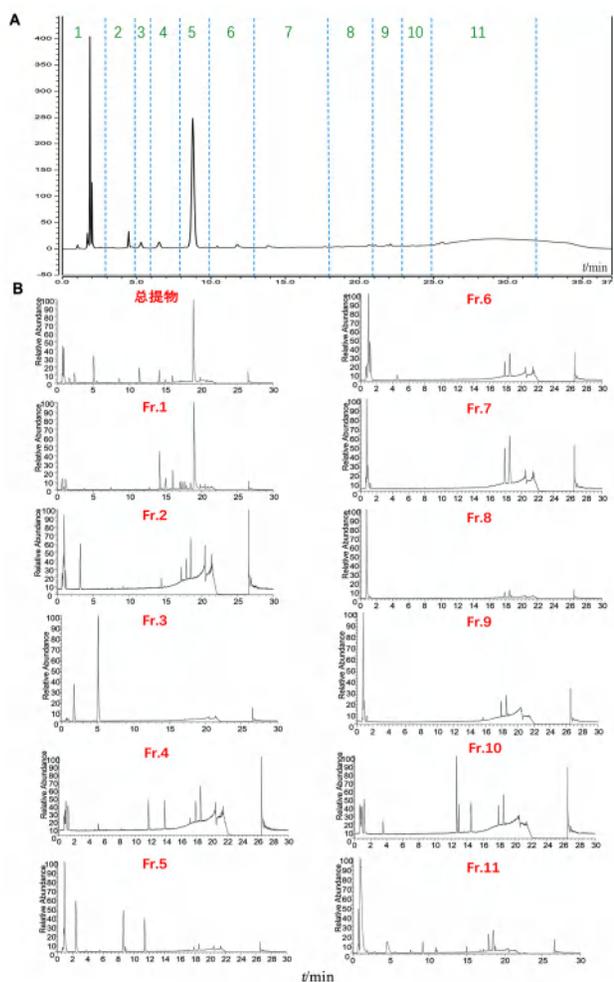


图 3 基于第一维和第二维各馏份样品的总离子流色谱图
Fig 3 Total ion chromatogram of the sample based on the 1D and the 2D
A. 基于第一维样品的馏份分段收集方法 (fractionation of sample collection method based on first-dimension); B. 总离子流图 (total ion chromatograms)

和 $-O$ (16 Da)，产生质荷比为 241.0497 ($C_{14}H_{10}O_4$)，225.0553 ($C_{14}H_{10}O_3$) 和 197.0600 ($C_{13}H_{10}O_2$) 的 $[M-H]^-$ 离子，如图 4B 所示，被表征为大黄素^[22]。

2.6.3 多酚类 以儿茶素为例，质荷比为 289.0719

($C_{15}H_{14}O_6$) 的 $[M-H]^-$ 母离子, 二级质谱中的主要碎片离子峰有 245.0815, 203.0707, 137.0232, 125.0232 等 $[M-H]^-$ 离子, 如图 4C 所示, 被表征为儿茶素^[21]。

2.6.4 黄酮类 黄酮类成分主要存在于黑豆为辅料的炮制品中, 以染料木素的裂解规律为例, 质

荷比为 269.0456 ($C_{15}H_{10}O_5$) 的 $[M-H]^-$ 母离子连续丢失 $-CO$ (28 Da) 和 $-O$ (16 Da), 产生质荷比为 241.0496 ($C_{14}H_{10}O_4$), 225.0552 ($C_{14}H_{10}O_3$) 的 $[M-H]^-$ 离子, 如图 4D 所示, 通过与对照品比对被表征为染料木素^[28]。

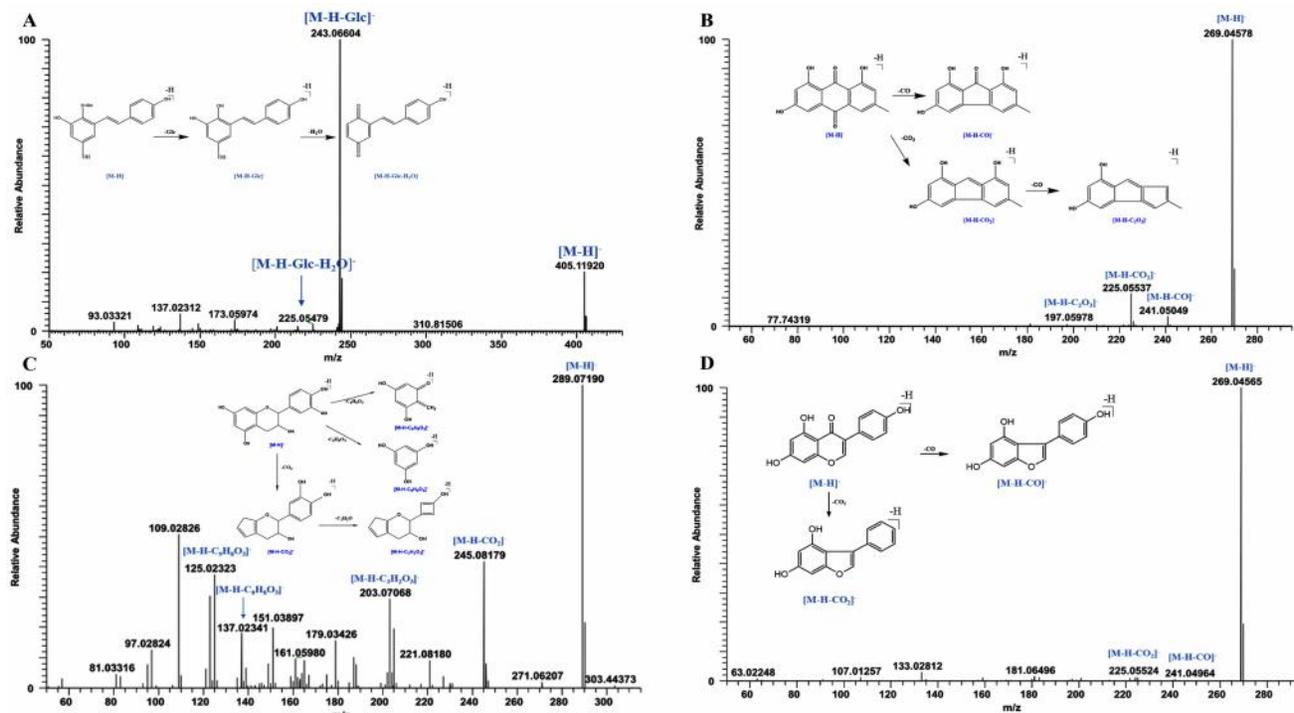


图 4 何首乌中化合物的二级质谱及可能的裂解途径

Fig 4 Secondary mass spectra of compounds in *Polygonum Multiflorum* Thunb. and possible fragmentation pathways

A. *trans*-THSG; B. 大黄素 (emodin); C. 儿茶素 (catechin); D. 染料木素 (genistein)

表 1 基于二维液相色谱质谱表征的化合物信息

Tab 1 Compound information characterized by two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry

No.	化合物	馏份	t_R (2D) (1D) /min	分子式	母离子	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片
1	cephalac ^[21]	Fr.11	0.74	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.1090	3.25	179.0552, 101.0230, 89.0231, 71.0125, 59.0125
2	羟基琥珀酸 ^[21]	Fr.3	0.79	$C_4H_6O_5$	133.0130	-1.12	115.0024, 89.0230, 71.0125
3	富马酸 ^[23]	Fr.3	0.79	$C_4H_4O_4$	115.0025	-5.5	115.0023, 71.0125
4	4-氧脯氨酸	Fr.2	0.95	$C_5H_7NO_3$	128.0342	-4.43	128.0340, 84.0441, 82.0284
5	柠康酸	Fr.5	0.95	$C_5H_6O_4$	129.0184	-2.98	85.0281, 83.0125, 67.0175, 59.0125
6	hydrocerol A ^[21]	Fr.5	0.97	$C_6H_8O_7$	191.0190	-0.89	129.0181, 111.0075, 87.0074
7	(2 <i>S</i> , 2' <i>S</i>)-pyrosaccharopine	Fr.10	1.11	$C_{11}H_{18}N_2O_5$	257.1143	2.16	239.1030, 213.1242, 195.1133, 128.0340, 84.0442, 74.0234
8	没食子酰葡萄糖 ^[22]	Fr.8	1.43	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0672	3.72	271.0458, 211.0241, 169.0135, 125.0230
9	gamma-L-glutamyl-L-pipecolic-acid	Fr.10	1.50	$C_{11}H_{18}N_2O_5$	257.1143	2.14	213.1238, 195.1131, 169.1338, 128.0340, 84.0441, 74.0234, 72.0078
10	isomer of galloyl glucose ^[22]	Fr.8	1.61	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0668	2.42	271.0458, 211.0241, 169.0132, 125.0231
11	gallic acid ^[21] *	Fr.3	1.74	$C_7H_6O_5$	169.0133	0.82	125.0232, 97.0282
12	gamma-glutamyl isomer of protocatechuic acid isoleucine	Fr.10	2.26	$C_{11}H_{20}N_2O_5$	259.1297	1.05	241.1188, 197.1292, 130.0860, 128.0340
13	picidic acid	Fr.5	2.44	$C_{11}H_{12}O_7$	255.0507	0.77	193.0497, 179.0340, 165.0546, 72.9917
14	羧基香草酸	Fr.3	2.44	$C_9H_8O_6$	211.0241	-0.73	167.0340, 123.0439, 105.0331
15	原儿茶酸异构体 ^[24]	Fr.1	3.16	$C_7H_6O_4$	153.0184	-2.50	151.0184, 109.0285, 108.0441, 81.0333
16	原儿茶酸-O-葡萄糖苷 ^[22]	Fr.5	3.32	$C_{13}H_{16}O_9$	315.0723	2.21	153.0183, 109.0283
17	羟脯氨酸 ^[24]	Fr.5	3.36	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	245.1293	1.22	186.0557, 142.0650
18	2-vinyl-1H-indole-3-carboxylic acid ^[24]	Fr.6	3.38	$C_{11}H_9NO_2$	186.0551	-2.11	142.0650, 116.0493

续表 1

No.	化合物	馏份 (¹ D)	t_R (² D) /min	分子式	母离子	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片
19	3-羟基苯甲酸 ^[24]	Fr.5	3.78	C ₇ H ₆ O ₃	137.0233	-0.16	137.0233, 93.0332
20	isomer of polygonumside E ^[21]	Fr.5	4.63	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	393.1196	2.72	231.0657, 189.0549
21	原儿茶酸 ^[24]	Fr.1	4.95	C ₇ H ₆ O ₄	153.0181	-0.14	109.0281, 108.0281, 81.0332
22	3-苯基丙酸	Fr.3	5.10	C ₉ H ₁₀ O ₂	149.0595	-5.12	134.0360, 121.0283, 107.0488, 94.9916
23	4-羟基苯甲醛	Fr.1	5.58	C ₇ H ₆ O ₂	121.0285	-3.75	108.0203, 93.0334
24	儿茶素 ^{[21]*}	Fr.2	6.05	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0719	4.16	245.0815, 205.0500, 203.0707, 151.0389, 137.0232, 123.0439
25	polygonumside E ^[21]	Fr.7	6.55	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	393.1193	3.19	231.0660, 189.0550
26	L-蔗糖酸	Fr.8	6.72	C ₄ H ₈ O ₅	135.0441	-3.73	117.0181, 89.0230, 87.0074, 75.0074, 71.0125, 59.0125
27	polygonumside A/B ^[24]	Fr.10	7.22	C ₄₀ H ₄₄ O ₁₉	827.2416	2.08	827.2416, 665.1865
28	表儿茶酸 ^{[22]*}	Fr.2	7.41	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0719	4.17	245.0816, 205.0503, 203.0708, 151.0387, 137.0231, 123.0440
29	polygoniminitin C ^[21]	Fr.8	7.44	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	567.1722	2.39	567.1722, 243.0660
30	isomer of polygonumside E	Fr.6	8.24	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	393.1197	2.89	231.0657, 189.0538
31	dianthron derivatives ^[24]	Fr.5	8.28	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₅	693.1825	0.81	541.1325, 405.1011, 243.0654, 125.0230
32	四羟基二苯乙烯-O-二葡萄糖苷	Fr.9	8.34	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	567.1722	2.37	405.1158, 243.0658, 225.0553, 197.0602, 173.0594, 137.0234
33	(+)-lyoniresinol-2 α -O- β -glucoside	Fr.6	8.38	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581.2239	0.91	419.1708, 389.1244, 359.1135
34	isomer of polygonumside E	Fr.5	8.59	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	393.1159	-6.72	231.0658, 189.0546
35	顺式二苯乙烯苷 ^{[22]*}	Fr.5	8.63	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	405.1190	2.36	243.0660, 225.0555, 215.0710, 197.0602
36	乙酰大黄素邻己糖	Fr.5	8.64	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473.1080	-0.76	311.0559, 269.0455
37	氧化白藜芦醇 ^[24]	Fr.5	8.66	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243.0661	3.60	225.0548, 201.0545, 159.0439
38	daidzin	Fr.5	8.90	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.1036	2.86	415.1036, 252.0426, 223.0397
39	肉桂酰没食子酰己糖 ^[21]	Fr.5	8.90	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1090	2.62	415.1034, 253.0503
40	isomer of picetanol	Fr.9	9.05	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243.0657	-0.07	225.0560, 201.0539
41	黄芪苷	Fr.5	9.38	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0935	1.72	285.0400, 284.0326, 255.0298, 227.0344
42	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2, 3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷	Fr.7	9.64	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	555.1136	-0.48	393.0618, 274.0119
43	虎黄酮-8-O-D-葡萄糖苷的异构体 ^[21]	Fr.5	9.67	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	407.1344	0.48	245.0815, 230.0578, 215.0342, 202.0631
44	norrubrofusarin-6-O- β -D-glucopyranoside	Fr.5	9.89	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	419.0987	2.18	419.0987, 257.0454
45	原花青素 B ₁ -3-O-没食子酸酯 ^[21]	Fr.9	10.00	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.1428	-3.83	577.1321, 407.0765, 289.0721
46	2, 4-二羟基-6-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙炔基]苯基- β -D-吡喃木糖苷或异构体	Fr.3	10.00	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	375.1086	2.96	375.1086, 243.0660
47	四羟基二苯乙烯-O-二葡萄糖苷的异构体	Fr.8	10.44	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	567.1718	0.66	243.0658, 225.0555, 137.0230
48	fisetinidol	Fr.2	10.57	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	273.0763	-0.04	149.0232, 123.0437, 105.0331
49	香草酸 ^[24]	Fr.1	10.66	C ₈ H ₈ O ₄	167.0340	-2.73	152.0105, 123.0439
50	原花青素 B ₁ -3-O-没食子酸酯异构体 ^[21]	Fr.9	10.87	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.1417	-5.36	407.0773, 289.0719
51	四羟基二苯乙烯-O-(乙酰基)-己糖或异构体	Fr.5	10.87	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	447.1293	0.48	243.0659, 225.0553
52	大豆苷异构体	Fr.5	10.92	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.1035	2.79	252.0426, 223.0395
53	虎杖苷 ^[22]	Fr.5	11.21	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1243	3.10	389.1243, 227.0714
54	二氢榭皮素 ^[21]	Fr.2	11.22	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0509	1.40	303.0509, 153.0176, 151.0391, 125.0231
55	白皮杉醇	Fr.5	11.37	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243.0658	0.08	225.0551, 201.0551, 175.0756, 159.0437
56	反式二苯乙烯苷 ^{[21]*}	Fr.5	11.37	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	405.1190	2.43	243.0660, 225.0547, 215.0705, 197.0595
57	6-甲氧基-2-乙酰基-3-甲基胡桃醌-8-O- β -D-葡萄糖苷	Fr.5	11.40	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀	421.1139	1.08	421.1139, 259.0610, 241.0503, 213.0550
58	大黄素-O-(O-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷 ^[21]	Fr.5	11.40	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473.1082	-0.51	311.0552, 269.0456, 243.0653
59	polygonumside A/B ^[24]	Fr.5	11.41	C ₄₀ H ₄₄ O ₁₉	827.2424	3.05	665.1889
60	水杨酸	Fr.5	11.41	C ₇ H ₆ O ₃	137.0233	-4.30	108.0200, 93.0236
61	何首乌苷 B	Fr.5	11.43	C ₄₀ H ₄₄ O ₁₈	811.2460	1.32	811.2460, 405.1189, 243.0659
62	Di-THSG/multiflorumside H/I	Fr.5	11.44	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	809.2285	6.88	647.1758, 485.1242
63	dianthron derivatives ^[24]	Fr.5	11.44	C ₄₃ H ₄₄ O ₁₈	847.2455	0.67	416.1107, 254.0582
64	大黄素-O-(O-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷的异构体 ^[21]	Fr.5	11.57	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473.1083	-0.24	311.0552, 269.0454, 225.0551
65	表儿茶素没食子酸酯 ^{[21]*}	Fr.4	11.63	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0821	1.14	289.0715, 243.0660, 225.0562, 169.0134, 137.0231
66	荆芥素-7-O-葡萄糖苷 ^[21]	Fr.4	11.71	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1039	2.50	431.0982, 269.0454

续表 1

No.	化合物	馏份 (¹ D)	t_R (² D) /min	分子式	母离子	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片
67	染料木苷 ^{[21]*}	Fr.4	11.72	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0982	2.11	270.0493, 269.0450, 268.0378
68	四羟基二苯乙烯-O-(没食子酰基)-葡萄糖苷或异构体	Fr.6	11.81	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	557.1306	2.98	405.1190, 313.0564, 243.0661, 169.0133
69	虎杖苷异构体	Fr.5	11.91	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1228	-2.23	227.0701, 137.0232
70	dianthron derivatives ^[24]	Fr.9	12.22	C ₄₇ H ₄₆ O ₂₂	961.2419	1.73	727.7421, 555.1128, 393.0614, 285.0041, 243.0656
71	2, 4-二羟基-6-[(1E)-2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯基-β-D-吡喃木糖苷或异构体 ^[21]	Fr.3	12.29	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	375.1087	1.98	375.1087, 243.0660
72	catechin gallate	Fr.4	12.38	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0835	2.95	289.0710, 243.0636, 169.0132, 137.0233, 125.0229
73	dianthron derivatives ^[24]	Fr.9	12.39	C ₄₇ H ₄₆ O ₂₂	961.2402	-0.06	555.1142, 393.0612, 313.0560, 285.0037, 274.0117, 243.0657
74	原花青素 B ₂ -3, 3'-二-O-没食子酸酯	Fr.8	12.40	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	881.1588	2.54	407.0774, 289.0720
75	glycitin	Fr.4	12.55	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.1136	1.58	283.0600, 267.0296, 239.0347
76	phlorizin ^[21]	Fr.4	12.55	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	435.1300	3.29	273.0770, 167.0340
77	isomer of fisetinidol	Fr.4	12.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	273.0771	5.01	229.0867, 167.0341, 123.0440
78	四羟基二苯乙烯-O-(乙酰基)-己糖的异构体	Fr.5	12.71	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	447.1293	0.48	405.1233, 243.0659, 225.0556
79	Di-THSG/multiflorumisides H/I	Fr.8	12.73	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	809.2294	0.18	647.1762, 485.1239, 405.1187, 243.0658
80	虎杖苷 A ^[22]	Fr.9	12.74	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	555.1136	-0.48	393.0618, 349.0694, 300.9985
81	四羟基二苯乙烯-O-(没食子酰基)-葡萄糖苷或异构体	Fr.6	12.84	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	557.1302	2.20	405.1140, 313.0564, 243.0659, 169.0133
82	isomer of picetannol	Fr.5	12.90	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243.0659	0.57	243.0659, 225.0548
83	白藜芦醇-4'-O-σ-D-(6"-O-没食子酰基)-吡喃葡萄糖苷	Fr.6	12.91	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	541.1351	0.99	313.0564, 227.0709, 169.0133
84	大黄素-1-O-葡萄糖苷 ^[21]	Fr.4	13.16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0981	0.54	269.0455, 240.0424, 225.0551
85	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-鼠李糖苷	Fr.2	13.22	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1242	1.31	243.0658, 227.0707, 173.0600, 143.0487, 137.0231
86	虎黄酮-8-O-D-葡萄糖苷 ^[21]	Fr.2	13.35	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	407.1348	2.89	245.0818, 230.0581
87	Di-THSG/multiflorumisides H/I	Fr.8	13.49	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₈	809.2283	-1.19	647.1765, 485.1242, 241.0504
88	二氢榭皮素异构体 ^[21]	Fr.2	13.54	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0504	-0.43	303.0503, 151.0389, 125.0232
89	N-trans-feruloyl tyramine ^[22]	Fr.1	13.55	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	312.1242	3.66	297.1003, 253.0867, 190.0501, 178.0501, 148.0519, 135.0439
90	trans-N-feruloyl-3-O-methyldopamine ^[21]	Fr.1	13.57	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	342.1346	2.96	327.1113, 178.0501
91	Di-emodin-Di-glucoside ^[22]	Fr.8	13.77	C ₄₂ H ₄₂ O ₁₈	833.2274	-2.26	671.1600, 509.1103
92	dianthron derivatives ^[24]	Fr.7	13.82	C ₄₅ H ₄₄ O ₂₁	919.2302	0.57	458.1219, 416.1111, 254.0581, 225.0558
93	大黄素异构体	Fr.3	13.83	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0452	3.01	241.0496, 225.0551, 197.0598
94	原花青素 C ₁	Fr.4	13.84	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1981	0.09	577.1387, 289.0718, 179.0337
95	大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 ^{[22]*}	Fr.4	13.85	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0981	2.00	269.0455, 241.0499, 225.0551
96	牡荆素-O-没食子酸酯 ^[24]	Fr.5	14.04	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	583.1091	1.44	313.0569, 269.0455, 169.0127, 125.0232
97	四羟基二苯乙烯-2-O-(阿魏酰基)-己糖 ^[21]	Fr.4	14.15	C ₃₀ H ₂₉ O ₁₂	581.1667	2.30	405.1187, 243.0660
98	黄豆苷元 ^{[22]*}	Fr.1	14.18	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0505	3.61	224.0473, 208.0527
99	四羟基二苯乙烯-2-O-(香豆酰基)-葡萄糖苷 ^[21]	Fr.4	14.19	C ₂₉ H ₂₈ O ₁₁	551.1558	1.88	551.1558, 405.1193, 243.0659
100	虎黄酮-8-O-(6"-O-没食子酰基)-β-D-葡萄糖苷	Fr.4	14.20	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	559.1456	1.71	313.0563, 245.0814, 230.0579, 215.0342, 169.0132, 125.0232
101	白藜芦醇 ^[22]	Fr.1	14.22	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227.0711	1.16	185.0599, 143.0488
102	isomer of physcion-8-O-β-D-glucoside ^[21]	Fr.2	14.27	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.1139	1.02	283.0611, 241.0457, 240.0424, 225.0552
103	虎黄酮-8-O-(6-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷 ^[21]	Fr.2	14.27	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀	449.1458	2.28	245.0816, 230.0579, 215.0345
104	牡荆素-O-没食子酸酯异构体 ^[24]	Fr.6	14.33	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄	583.1121	6.56	313.0581, 269.0459, 169.0129, 125.0233
105	大黄素-8-O-β-D-己糖硫酸酯 ^[21]	Fr.1	14.37	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃ S	511.0551	0.82	431.09810, 311.0563, 269.0455
106	大黄素异构体	Fr.3	14.40	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0452	3.12	241.0502, 225.0554, 197.0595
107	芹菜素 7-葡萄糖苷	Fr.3	14.42	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0981	0.54	269.0447, 268.0375, 267.0298, 240.0404, 239.0347
108	大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷 ^[21]	Fr.2	14.45	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.1140	1.15	283.0611, 269.0443, 241.0457, 240.0424
109	Di-emodin-Di-hexose ^[21]	Fr.8	14.47	C ₄₂ H ₄₂ O ₁₈	833.2274	-2.26	405.1189, 243.0659
110	polygonumolides A1	Fr.5	14.52	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₃	689.1934	0.73	416.1113, 254.0582
111	大黄素-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷	Fr.4	14.58	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	517.0983	1.18	473.1089, 269.0456
112	大黄素-O-(O-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷 ^[21]	Fr.5	14.58	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	473.1090	1.20	269.0452, 225.0543

续表 1

No.	化合物	馏份 (¹ D)	t_R (² D) /min	分子式	母离子	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片
113	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.7	14.86	C ₄₅ H ₄₄ O ₂₁	919.2280	-1.82	713.1896, 458.1216, 416.1104, 254.0579, 225.0550
114	原花青素 B ₁ ^{[21]*}	Fr.3	15.01	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1351	1.88	425.0882, 407.0749, 289.0718, 203.0707, 161.0234
115	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.7	15.02	C ₄₅ H ₄₄ O ₂₁	919.2336	4.32	875.2448, 713.1887, 458.1224, 416.1103, 254.0582
116	大黄素异构体 ^[22]	Fr.3	15.12	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0453	3.23	241.0500, 225.0552, 197.0602
117	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.7	15.26	C ₄₆ H ₄₆ O ₂₁	933.2393	-6.46	889.2491, 458.1216, 416.1112, 254.0581
118	原花青素 B ₂ ^[21]	Fr.3	15.47	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1356	2.60	425.0879, 407.0773, 289.0718, 203.0706, 161.0234
119	isomer of quercetin	Fr.1	15.48	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0611	1.61	268.0375, 240.0424, 212.0470
120	染料木素 ^{[28]*}	Fr.1	16.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0456	4.12	269.0449, 201.8347
121	polygonumolides A ₂	Fr.5	16.09	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₃	689.1934	0.73	416.1119, 254.0581
122	2-羟基大黄素 ^[21]	Fr.1	16.23	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	3.78	257.0456, 241.0504
123	polygonumolides C ₁	Fr.4	16.23	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₃	671.1770	0.82	416.1112, 254.0583
124	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.4	16.72	C ₃₉ H ₃₄ O ₁₆	757.1784	2.04	713.1894, 458.1220, 254.0582
125	polygonumolides C ₂	Fr.4	16.81	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₄	671.1770	0.82	416.1112, 254.0582
126	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.2	17.03	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₃	685.1916	-0.76	685.1916, 254.0581
127	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.4	17.17	C ₃₉ H ₃₄ O ₁₆	757.1774	0.72	713.1883, 458.1223, 254.0591
128	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.2	17.22	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₃	685.1911	-1.49	416.1112, 254.0582
129	2-乙酰大黄素异构体 ^[22]	Fr.1	17.26	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	311.0562	1.99	269.0443, 267.0662, 255.0658, 240.0424
130	quercetin	Fr.1	17.29	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0612	3.86	268.0374, 240.0424, 212.0474
131	dianthrone derivatives ^[24]	Fr.4	17.47	C ₃₉ H ₃₄ O ₁₆	757.1774	0.72	458.1219, 254.0581
132	2-羟基大黄素的异构体	Fr.1	17.85	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	2.07	268.0373, 257.0451, 241.0503, 227.0343, 211.0394
133	2-乙酰大黄素 ^[22]	Fr.1	18.50	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	311.0564	4.35	269.0417, 267.0667, 240.0424
134	gingerglycolipid B	Fr.6	18.86	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₄	677.3754	0.85	397.1353, 279.2330, 89.0229, 59.0125
135	大黄素 ^{[22]*}	Fr.3	18.97	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0457	4.47	241.0497, 225.0553, 197.0600
136	2-羟基大黄素的异构体	Fr.1	19.07	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0403	1.40	257.0453, 241.0501, 211.0400
137	大黄素二蒽酮类	Fr.1	19.57	C ₃₀ H ₂₂ O ₈	509.1237	1.24	509.1237, 254.0582
138	大黄素-甲醚 [*]	Fr.1	19.58	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0610	1.39	268.0375, 240.0424, 212.0475
139	2-羟基大黄素的异构体	Fr.1	19.85	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	1.86	257.0454, 241.0503, 211.0395

注：“*”表示与对照品比对的化合物。

Note: “*” Indicates the compound compared with the standard.

3 讨论

本研究中构建的 HILIC×RPLC 离线二维色谱的正交性达 55%。但离线二维色谱也存在一些缺点,如需要手动收集馏份,操作烦琐,向第二维转移的过程中可能会出现样品污染、损失的情况。

本实验建立了离线二维液相色谱系统与四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用的方法对何首乌炮制品进行化学成分分析,共表征出 139 个化学成分。离线二维系统为 HILIC×RPLC 的模式,分别对其第一维和第二维液相色谱的条件进行了优化,最终第一维分段制备了 11 个馏份后进行第二维分析,相比于一维色谱,实现了更大的峰容量,使微量成分得以检出。

参考文献

[1] Liu YP, Wang WY, Sun M, et al. Polygonum multiflorum-induced liver injury: clinical characteristics, risk factors,

material basis, action mechanism and current challenges [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1467.

- [2] 朱云,刘树红,王伽伯,等.何首乌及其制剂导致药物性肝损伤的临床分析[J].中国中西医结合杂志,2015,35(12):1442-1447.
- [3] 李娜,吕颖,花慧莲.152例药物性肝损伤病例分析[J].中国药物评价,2019,36(1):53-56.
- [4] Gao D, Pang JY, Zhang CE, et al. Poria attenuates idiosyncratic liver injury induced by Polygoni Multiflori Radix Praeparata [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 00386.
- [5] 逢瑜,汪祺.基于二相代谢酶探讨何首乌肝毒性风险及其发生机制[J].中国药物评价,2021,38(4):284-287.
- [6] 汪祺,李勇,王亚丹,等.基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究[J].药物评价研究,2019,42(4):635-640.
- [7] Wang JB, Li CY, Zhu Y, et al. Integrated evidence chain-based identification of Chinese herbal medicine-induced hepatotoxicity and rational usage: exemplification by *Polygonum Multiflorum* (He shou wu) [J]. China J, 2016, 61(9): 971.

- [8] Tu C, Gao D, Li XF, et al. Inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6 (233): 233.
- [9] Blumenberg FW, Enneker C, Kessler FJ. On the question of the hepatotoxic effect of orally administered tannins and their galloyl components [J]. *Arzneimittelforschung*, 1960, 10 (10): 223-226.
- [10] Chandranayagam C, Veeraraghavan G, Subash A, et al. Restoration of arsenite induced hepato-toxicity by crude tannin rich fraction of *Theobroma cacao* in Sprague Dawley rat [J]. *Food Res Int*, 2013, 50 (1): 46-54.
- [11] 杨建波, 高博闻, 孙华, 等. 何首乌肝毒性物质基础研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2022, 19 (6): 610-614.
- [12] 叶楚璇, 黄文静, 覃思意, 等. 2D-LC 在中药分析与质量控制中的应用进展 [J]. *化学试剂*, 2022, 44 (8): 1103-1110.
- [13] 朱雪妍. 二维液相色谱在中药质量控制中的应用研究进展 [J]. *中国药物警戒*, 2020, 17 (9): 643-646.
- [14] 吴瑞军, 钟国跃, 曾金祥, 等. 基于全二维液相色谱的牛黄上清丸指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2019, 50 (3): 588-597.
- [15] Shang ZP, Xu LL, Xiao Y, et al. A global profiling strategy using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with dual-mass spectrometry platforms: chemical analysis of a multi-herb Chinese medicine formula as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1642: 462021.
- [16] Qiao X, Wang Q, Song W, et al. A chemical profiling solution for Chinese medicine formulas using comprehensive and loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1438: 198-204.
- [17] 田东, 朱栋梁, 徐志强, 等. 二维液相色谱分离及鉴定滁菊中的多酚类化合物 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34 (8): 917-922.
- [18] Wang SS, Cao JL, Deng JG, et al. Chemical characterization of flavonoids and alkaloids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupled with hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chem X*, 2021, 12: 100143.
- [19] 陈煜, 周楠, 朱云, 等. NPLC×RPLC 二维液相色谱系统分离分析牛黄解毒片提取物成分的实验研究 [J]. *福建分析测试*, 2019, 28 (2): 32-35.
- [20] Camenzuli M, Schoenmakers PJ. A new measure of orthogonality for multi-dimensional chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014 (838): 93-101.
- [21] Li L, Jun X, Zhou WW, et al. Integrating targeted and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 934.
- [22] Wang SY, Sun XZ, An S, et al. High-throughput identification of organic compounds from *polygoni multiflori radix praeparata* (Zhiheshouwu) by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS [J]. *Molecules*, 2021, 26 (13): 3977.
- [23] Shi Y, Tse S, Rago B, et al. Quantification of fumarate and investigation of endogenous and exogenous fumarate stability in rat plasma by LC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2016, 8 (7): 661-675.
- [24] Wang LL, Sang MM, Liu EW, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 45-61.
- [25] Xing YC, Yan Z, Li YH, et al. An effective strategy for distinguishing the processing degree of *Polygonum multiflorum* based on the analysis of substance and taste by LC-MS, ICP-OES and electronic tongue [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 205: 114328.
- [26] Jiang YP, Liu R, Chen JJ, et al. Application of multifold characteristic ion filtering combined with statistical analysis for comprehensive profiling of chemical constituents in anti-renal interstitial fibrosis I decoction by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1600: 197-208.
- [27] 孙进华, 贺石麟. 基于超高效液相质谱联用和多重质量亏损过滤技术研究儿茶素的体外代谢产物 [J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36 (15): 1264-1268.
- [28] Liu M, Jiang YP, Liu R, et al. Structural features guided “fishing” strategy to identification of flavonoids from lotus plumule in a self-built data “pool” by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1124: 122-134.

(收稿日期: 2024-08-05; 修回日期: 2024-10-05)

研究论文

基于血浆非靶向代谢组学的慢性疲劳综合征大鼠发病机制的初步研究

苏芮¹, 王婷婷^{1, 2}, 田骄¹, 裴海鸾^{1, 2}, 许明阳³, 左泽平², 王晶^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 北京 100071; 3. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于血浆非靶向代谢组学及相关指标的测定, 初步探究多因素复合应激诱导的慢性疲劳综合征 (CFS) 大鼠的发病机制。**方法** 采用多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠模型, 造模 6 周后, 进行力竭游泳、悬尾、高架十字迷宫、戊巴比妥钠诱导睡眠、机械性缩足反射阈值 (MWT) 及 Barnes 迷宫行为学实验; 采用高效液相色谱-质谱联用技术进行血浆非靶向代谢组学检测; 生化法检测骨骼肌丙酮酸、三磷酸腺苷 (ATP)、丙二醛 (MDA) 及还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量, 以及丙酮酸脱氢酶 (PDH)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、ATP 合酶、超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。**结果** 与空白组相比, 模型组大鼠下沉潜伏期、睡眠持续时间显著缩短, 开放臂滞留时间百分比 (OT%)、痛阈阈值显著降低 ($P < 0.01$); 悬尾累计不动时间、Barnes 迷宫实验探索洞口潜伏期显著延长 ($P < 0.01$); 模型组共有 851 种代谢产物发生变化, 发现了乙醛酸和二羧酸代谢、嘌呤代谢等与 CFS 有显著相关性的通路; 骨骼肌丙酮酸、ATP 及 GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01); MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); PDH、SDH、ATP 合酶、SOD 及 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 三羧酸循环障碍及线粒体功能障碍引起的机体能量代谢紊乱可能是 CFS 的发病机制之一。

关键词: 慢性疲劳综合征; 多因素复合应激; 非靶向代谢组学; 能量代谢

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0032-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.005

Mechanism of chronic fatigue syndrome in rats based on plasma non-targeted metabolomics

SU Rui¹, WANG Ting-ting^{1, 2}, TIAN Jiao¹, PEI Hai-luan^{1, 2}, XU Ming-yang³, ZUO Ze-ping², WANG Jing^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Pharmaceutical Factory, Beijing Tongrentang Technologies Co., Ltd., Beijing 100071; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To preliminarily explore the pathogenesis of rats with chronic fatigue syndrome (CFS) induced by multifactor compound stress based on non-targeted plasma metabolomics and determination of related indicators. **Methods** The rat model of CFS was adopted. After 6 weeks of modeling, we conducted behavioral experiments including exhaustive swimming experiment, tail suspension experiment, elevated cross maze experiment, pentobarbital sodium induced sleep experiment, mechanical pain threshold experiment, and Barnes maze experiment. LC-MS method was used to detect non-targeted metabolomics in the plasma. The contents of pyruvate, adenosine tri-phosphate (ATP), malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH), and the activities of pyruvate dehydrogenase (PDH), succinate dehydrogenase (SDH), ATP synthase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2019YFC1711400)。

作者简介: 苏芮, 女, 硕士研究生, 主要从事中药消化药理、中药神经药理研究, email: surui080620@126.com *通信作者: 王晶, 女, 副教授, 主要从事中药消化药理、心血管药理以及神经药理研究, email: wangj@bucm.edu.cn

peroxidase (GSH-Px) in the skeletal muscle were detected by biochemical methods. **Results** Compared with the blank group, the subsidence latency, sleep duration, the percentage of open arm lag time, and pain threshold of rats in the model group were significantly decreased ($P < 0.01$). The accumulative immobile time in the tail hanging experiment and the incubation period in the Barnes maze experiment were significantly increased ($P < 0.01$). Totally 851 metabolites in the model group showed certain change. The pathways of glyoxylate and dicarboxylate metabolism and purine metabolism were found to be significantly related to CFS. The contents of pyruvate, ATP and GSH in the skeletal muscle were significantly decreased ($P < 0.05$ or 0.01). MDA content was significantly increased ($P < 0.01$), while the activities of PDH, SDH, ATP synthase, SOD and GSH-Px were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The disturbance of energy metabolism caused by tricarboxylic acid cycle circulation disorder and mitochondrial dysfunction may be a possible pathogenesis of CFS.

Key words: chronic fatigue syndrome; multiple factor compound stress; non-targeted metabolomics; energy metabolism

慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome, CFS) 又称肌痛性脑脊髓炎 / 慢性疲劳综合征 (myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome, ME/CFS), 是一种严重、慢性、复杂的多系统性疾病^[1]。该病主要表现为病理性疲劳和劳累后更严重的不适、认知功能障碍、免疫功能障碍、睡眠不清醒、疼痛、自主神经功能障碍等^[2]。据估计, 全球 CFS 的患病率为 0.2% ~ 2.6%^[3]。随着现代社会的发展, 人们的生活强度和工作压力增大, 缺乏体育锻炼, 且长期处于紧张、焦虑等应激状态, 最终导致 CFS 的发病率逐年升高。

CFS 的发病涉及机体的多个系统, 发病机制尚不明确。目前, 越来越多的研究者通过采集 CFS 患者血浆进行代谢组学分析, 探究 CFS 的发病机制及生物标志物等^[4-7]。2015 年初, 美国医学研究所发布了一份报告, 提出了 CFS 的新病例定义, 建议将该疾病重新命名为系统性运动不耐受疾病 (systemic exertion intolerance disease, SEID)^[8]。这种新的病例定义包括 CFS 患者完成病前活动的的能力大幅下降, 睡眠不清醒, 运动后不适, 认知或站立不耐受等症状, 强调了 CFS 患者的患病症状与生物能量代谢障碍之间的关系。近年来, 机体能量代谢不足导致的 CFS 逐渐引起研究者的关注和研究^[9]。线粒体功能障碍、5'-腺苷单磷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 损伤、氧化应激和骨骼肌细胞酸中毒等因素均与 CFS 表型相关^[10-11]。能量代谢异常已被确定为 CFS 研究的一个关键领域, 但能量代谢异常与 CFS 发病机制的内在联系仍需进一步探索。本实验参考文献^[12-15]以多因素复合应激诱导复制 CFS 大鼠模型, 采用液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography mass spectrometer, LC-MS) 的非靶向代谢组学方法,

探究 CFS 大鼠模型血浆显著差异代谢途径, 并通过对三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA 循环)、氧化应激、线粒体代谢等相关指标的研究, 探究能量代谢异常与多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠模型发病机制的联系, 以期为 CFS 基础及临床研究奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物

140 ~ 160 g SPF 级 SD 大鼠 22 只, 雌雄各半 [北京斯贝福生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010]。动物饲养于北京中医药大学动物室屏障环境中, 使用许可证: SYXK (京) 2023-0011, 动物室温度: 22 ~ 25 °C, 相对湿度: 55% ~ 70%。伦理编号: BUCM-2023031401-1035。

1.2 试剂

三磷酸腺苷 (ATP) 检测试剂盒 (Beyotime, 批号: 072523231019); 线粒体提取试剂盒 (Solarbio, 批号: 2309001); 线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒 (Solarbio, 批号: 2311003); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (雅酶, 批号: 037B1500); 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒 (Solarbio, 批号: 2401001); 丙酮酸测试盒 (南京建成, 批号: 20240305); 丙酮酸脱氢酶检测试剂盒 (Solarbio, 批号: 2402001); 总超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 测试盒 (南京建成, 批号: 20240419、20240401、20240407); 甲醇、乙腈 (Merck); L-2-氯苯丙氨酸 (上海阿拉丁); 甲酸 (TCL)。

1.3 仪器

信息化集成化信号采集与处理系统 (成都泰盟软件有限公司, 型号: BL-420I); 采集分析系统 (荷兰 Noldus 公司, 型号: Noldus Etho Vision XT9);

电子 Von Frey 压力测痛仪 (型号: 2390, 美国 Life Science 公司); 大鼠高架十字迷宫 (安徽正华生物仪器设备有限公司, 型号: ZH-DSG); 巴恩斯迷宫 (安徽正华生物仪器设备有限公司, 型号: ZH); 酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 型号: MuttiSkan Mk3]; Milli-Q 超纯水系统 (上海默克密理博实验室设备有限公司, 型号: Milli-Q Advantage); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf AG 公司, 型号: Centrifuge 5810); Waters UPLC Acquity I-Class PLUS 超高效液相、Waters UPLC Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱、Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm) (美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 CFS 大鼠模型的复制

22 只 SD 大鼠适应性喂养一周后, 随机分为空白组 (10 只) 和造模组 (12 只)。空白组大鼠正常饮食, 不做任何应激干预。造模组大鼠给予多种应激, 包括束缚、夹尾、睡眠剥夺^[16-17]、强迫游泳。具体操作方法:

① 束缚: 将大鼠置于自制束缚器中, 第一次束缚 2 h, 其后每次增加 30 min, 一日 2 次, 上午、下午各一次。② 夹尾: 自制夹尾钳夹住鼠尾端 1/3 处, 2 min/次, 一日 6 次, 上午、下午各 3 次。③ 睡眠剥夺: 连续进行 2 d, 第一日 10: 00 将大鼠放入自制水平台中, 第二日 8: 00 取出进食进水, 上午 10: 00 继续放入, 第三日早上 8: 00 取出, 进行负重游泳。每日更换睡眠剥夺箱中清水, 保持箱内清洁。④ 强迫游泳: 在其他因素应激结束第二日进行强迫游泳, 负重 4%, 以老鼠全身没入水中下沉时间 5 s 仍不能返回水面上为标准, 记录大鼠下沉潜伏期。

2.2 行为学实验

造模 6 周后, 进行力竭游泳实验、悬尾实验、高架十字迷宫实验、机械性缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 实验、戊巴比妥钠诱导睡眠实验及巴恩斯实验。

2.2.1 力竭游泳实验 造模结束后, 测试当日将大鼠放入行为学实验室适应环境 1 h。大鼠尾部负重 (自身体重的 6%) 力竭游泳, 大鼠从开始测试至口鼻沉入水中超过 6 s 仍不能返回水面上判定为力竭。记录力竭潜伏期时间。

2.2.2 悬尾实验 将大鼠距尾端中部的尾巴倒挂在自制大鼠悬尾仪上, 大鼠挣扎活动时会出现间断性停止挣扎状态, 悬挂 6 min, 记录后 4 min 停止挣扎时间即为悬尾不动时间。

2.2.3 高架十字迷宫 实验室采用动物灯照明, 大鼠在测试之前需适应环境 2 h, 然后将大鼠头部面向开放臂放入高架十字迷宫中央区, 用 Noldus

EthoVision 分析系统实时追踪并记录大鼠 5 min 内分别进入开放臂滞留时间 (open arm time, OT) 和封闭臂滞留时间 (close arm time, CT), 按照公式 (1) 计算开放臂滞留时间百分比 (OT%)。

$$\text{OT}\% (\%) = \text{OT} / (\text{OT} + \text{CT}) \times 100\% \quad (1)$$

2.2.4 MWT 实验 将大鼠置于笼子中 30 min, 底部为 0.5 cm \times 0.5 cm 孔径的铁丝网。待大鼠安静后, 使用电子 Von Frey 压力测痛仪测定大鼠左足底跖侧皮肤直至抬腿或主动缩足, 测得机械缩足阈值 (用 g 表示)。每只大鼠测定 3 次, 每次相隔 5 min 取平均值。

2.2.5 戊巴比妥钠诱导睡眠实验 大鼠灌胃给药 1 h 后腹腔注射阈剂量戊巴比妥钠 30 mg \cdot kg⁻¹, 记录翻正反射消失时间以及翻正反射重现时间。计算睡眠持续时间。大鼠入睡判断标准: 大鼠注射戊巴比妥钠后, 其翻正反射消失 1 min 以上即判断为入眠。

2.2.6 巴恩斯迷宫 将目标盒放于实验平台一洞口处, 并在实验区域外做标记, 以后实验均将目标盒安装在标记洞口处。实验开始, 将大鼠轻放在平台中央, 使用一不透光圆桶扣住动物使其适应 10 s 后拿起圆桶, 观察录像装置, 若 3 min 内大鼠未找到目标盒, 则将大鼠引导至目标盒, 停留 60 s, 若大鼠在规定时间内找到目标盒, 也待其停留 60 s 后取出。每日如此训练两次, 4 d 后开始测试。测试方法同训练, 观察 3 min 内大鼠活动情况, 无论是否找到目标盒均不再引导, 统计大鼠的逃避潜伏期。

2.3 样本采集

在行为学实验结束后, 将所有大鼠禁食 12 h, 按 3.3 mL \cdot kg⁻¹ 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠进行麻醉, 腹主动脉取血, 肝素钠抗凝管采集全血, 室温放置 1 h 内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液收集血浆, 分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。迅速取出骨骼肌分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 血浆非靶向代谢组学分析

2.4.1 样本处理 取 100 μL 血浆, 加入 500 μL 含有 L-2-氯苯丙氨酸内标物的提取液 (甲醇-乙腈 = 1:1, 内标浓度 20 mg \cdot L⁻¹), 涡旋混匀 30 s 后, 冰水浴超声 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取出 500 μL 上清液于 EP 管中, 在真空浓缩器中干燥提取物。向干燥后的代谢物加入 160 μL 50% 乙腈水溶液复溶, 涡旋 30 s, 冰水浴超声 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取 120 μL 上清液于 2 mL 进样瓶, 另外, 每个样本各取 10 μL 混合成 QC 样本进样检测。

2.4.2 色谱、质谱分析 样本经 ACQUITY-

UPLC-T3 色谱柱进行预分离。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 0.5 min, 5%B; 0.5 ~ 5.5 min, 5% ~ 50%B; 5.5 ~ 9 min, 50% ~ 95%B; 9 ~ 10.5 min, 95%B; 10.5 ~ 12.0 min, 95% ~ 5%B)。

预分离后的样本代谢分析物经 Xevo G2-XS QToF 高分辨质谱分析, 同时对 2 V 低碰撞能量及 10 ~ 40 V 高碰撞能量进行双通道数据采集。ESI 离子源参数: 毛细管电压正离子模式为 2000 V, 或负离子模式下为 -1500 V, 锥体电压为 30 V, 离子源温度为 150 °C, 溶剂气体温度为 500 °C, 反冲洗气体流量为 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气体流量为 800 L·h⁻¹。

2.4.3 代谢数据处理 采用主成分分析和 Spearman 相关分析法判断组内样品和质量对照样品的重复性。在 KEGG、HMDB 和脂质图数据库中搜索鉴定出的代谢产物, 以明确各代谢产物的分类及富集通路。根据分组信息, 计算和比较差异倍数, 采用 *t* 检验计算每种代谢产物的 *P* 值。采用 R 语言包 ropls 进行 OPLS-DA 建模, 并进行 200 次排列测试验证模型的可靠性。采用 OPLS-DA 模型的差异倍数、*P* 值和 VIP 值相结合的方法, 以筛选标准: FC > 1, *P* < 0.05 和 VIP > 1 筛选差异代谢产物。用 Metabo Analyst 软件对其进行富集分析和拓扑分析, 以筛选 CFS 大鼠血浆中

涉及的关键差异代谢通路。

2.5 骨骼肌指标检测

取大鼠骨骼肌, 根据生化试剂盒说明书检测大鼠骨骼肌中 ATP 含量、ATP 合酶活性、丙酮酸含量、PDH 活性、SDH 活性、MDA 含量、GSH 含量、SOD 活性及 GSH-Px 酶活力。

2.6 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 20.0 软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数列均呈正态分布时, 两组数据比较采用 *t* 检验; 一组及以上的数列呈现非正态分布时, 采用非参数检验 (Kruskal-Wallis H 秩和检验)。

3 结果

3.1 多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠行为学实验结果

造模 6 周后, 与空白组比, 模型组大鼠力竭时间 (见图 1A) 及睡眠持续时间 (见图 1D) 显著缩短 (*P* < 0.01), 悬尾累计不动时间 (见图 1B) 显著延长 (*P* < 0.01)(见图 1C)(*P* < 0.01)、痛阈阈值 (图 1E) 显著降低 (*P* < 0.01)。从巴恩斯迷宫训练阶段的第 2 日开始, 与空白组大鼠相比, 模型组大鼠首次找到正确洞口所花费的时间显著增加 (*P* < 0.05 或 0.01) (见图 1F), 在第 5 日正式测试时这样的情况依然持续。第 5 日测试结果显示, 与空白组相比, 模型组大鼠进洞前探索时间显著增加 (*P* < 0.01)(见图 1G)。

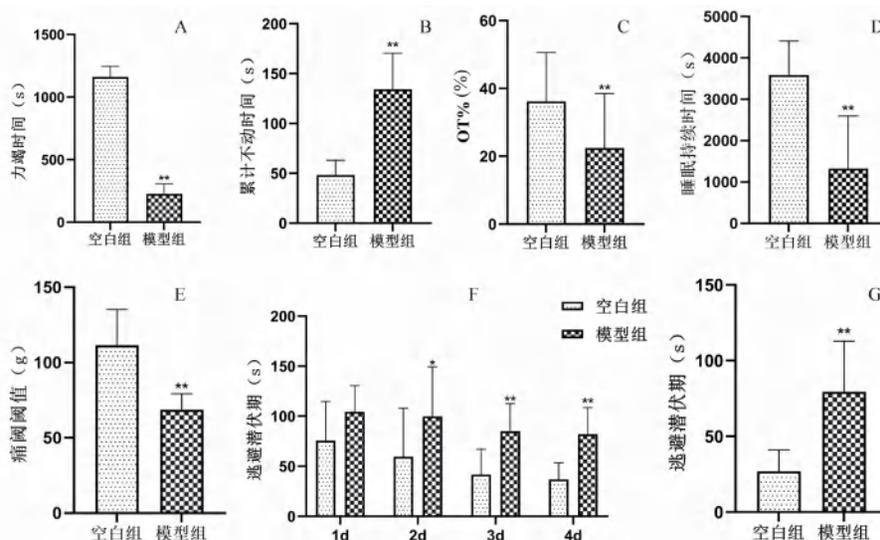


图 1 多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠行为学变化 ($\bar{x} \pm s$)

Fig 1 Behavioral changes in CFS rats induced by multi-factor compound stress ($\bar{x} \pm s$)

注: 与空白组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。

Note: Compared with the blank group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

3.2 血浆非靶向代谢组学分析

3.2.1 代谢物统计分析 PCA 无监督模式识别的多维数据统计分析发现 (见图 2), 模型组与空白组初步分离, 采用有监督的 OPLS-DA 模式对该模型进一步分析发现 (见图 3), 模型组与空白组

显著分离, OPLS-DA 得分图中 Q²Y 为 0.85, 大于 0.5, R²Y 为 0.988 接近 1, 表明该数据模型预测能力强, 结果可靠, 可通过代谢表达量区分两组样品, 疲劳大鼠与正常大鼠血浆代谢物组成存在差异。

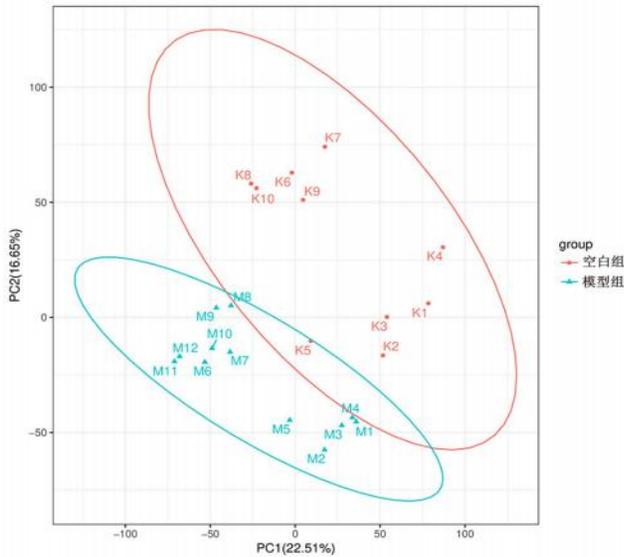


图 2 全部样本血浆代谢组的 PCA 图
Fig 2 PCA of plasma metabolomics in all samples

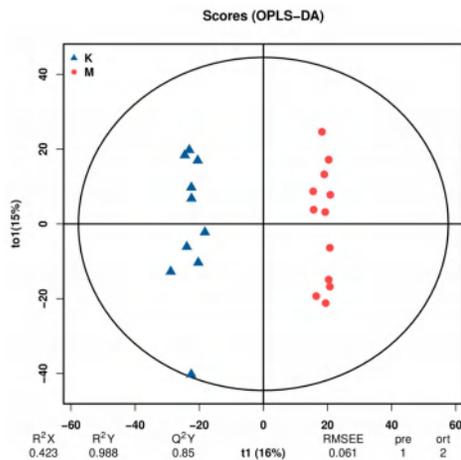


图 3 空白组与模型组的 OPLS-DA 图
Fig 3 OPLS-DA plots of blank group and model group

3.2.2 血浆非靶向差异代谢物 本实验通过 OPLS-DA, 以 $FC > 1$, $P < 0.05$ 和 $VIP > 1$ 作为代谢产物的显著性差异筛选准则对模型组大鼠血浆初步分析, 与空白组比较, 共有 851 种差异代谢产物, 其中 439 种代谢产物含量上升, 412 种代谢产物含量降低 (见图 4)。其后通过对 KEGG、HMDB 和脂质图数据库中的搜索, 对差异代谢产物进行分类。KEGG 代谢途径可分为 10 类 (见图 5), 包括氨基酸代谢、其他次生代谢物的生物合成、消化系统、脂质代谢、核苷酸代谢等。以 VIP 值排序, 前 25 个差异代谢物见表 1。

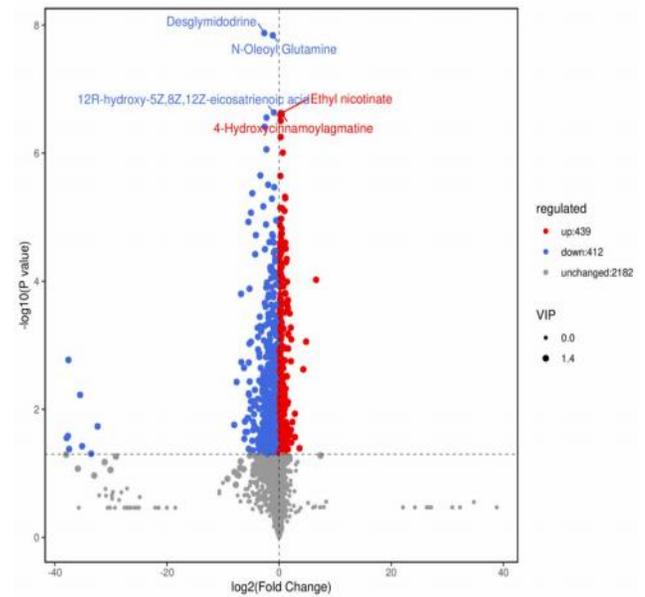


图 4 组间差异代谢物筛选的火山图
Fig 4 Screening volcanic map for differential metabolites between combinations

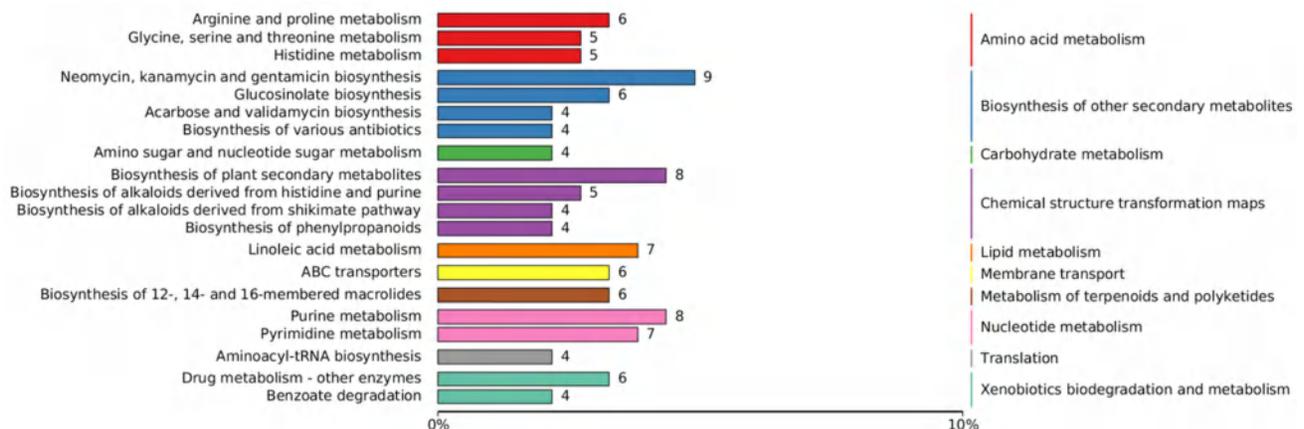


图 5 CFS 组大鼠血浆差异代谢产物的分类图
Fig 5 Classification of plasma differential metabolites in CFS group

3.2.3 血浆差异代谢产物通路分析 采用超几何分布实验计算 KEGG 途径富集意义的不同代谢物, 以富集分析的 $P < 0.05$ 作为通路筛选条件, 筛选与 CFS 相关的代谢途径。通路分析结果见图

6, 结果显示乙醛酸和二羧酸代谢及嘌呤代谢等与 CFS 有显著相关性的通路。
3.3 多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠骨骼肌生化指标检测结果

表 1 模型组和空白组前 25 个血浆差异代谢物

Tab 1 Totally 25 plasma differential metabolites between the model group and the blank group

化合物	分子式	P	VIP	调节
6- 硫鸟嘌呤 -5'- 单磷酸盐	C ₅ H ₅ N ₅ S	< 0.05	2.13	↑
尿苷 -2', 3'- 环磷酸盐	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₈ P	< 0.05	2.05	↑
柚皮素 -7- 硫酸盐	C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	< 0.05	2.03	↑
棕榈酰芳酸 -C	C ₂₅ H ₄₃ N ₃ O ₆	< 0.05	2.02	↓
异油蛋白酶	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O	< 0.05	1.88	↑
甘乌内酯	C ₃₁ H ₄₄ O ₆	< 0.05	1.86	↓
N- 二十碳五烯酰苯丙氨酸	C ₂₉ H ₃₉ NO ₃	< 0.05	1.83	↓
天冬氨酸	C ₂₈ H ₄₅ NO ₈	< 0.05	1.69	↓
维生素 D ₂ - 葡萄糖苷酸酯	C ₃₄ H ₅₂ O ₇	< 0.05	1.66	↓
D- 果糖 6- 磷酸	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	< 0.05	1.64	↑
黄嘌呤	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	< 0.05	1.64	↓
13 (S) - 丙二苯醚	C ₁₈ H ₃₂	< 0.05	1.62	↓
4, 8- 二羟基喹啉	C ₈ H ₆ O ₅	< 0.05	1.52	↓
邻磷酸 -L- 丝氨酸	C ₃ H ₈ NO ₆ P	< 0.05	1.52	↓
N- 氨基甲酰基腐胺	C ₅ H ₁₃ N ₃ O	< 0.05	1.42	↓
顺式 -3- 羧乙基 -3, 5- 环己二烯 -1, 2- 二醇	C ₇ H ₁₁ O ₄	< 0.05	1.40	↓
吡啶丙酮酸	C ₁₁ H ₉ NO ₃	< 0.05	1.39	↑
乙醛酸	C ₂ H ₂ O ₃	< 0.05	1.35	↑
3, 4- 二羟基 -L- 苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₄	< 0.05	1.26	↓
5- (5- 磷酸 -D- 核糖基氨基甲酰基) -1- (5- 磷酸核糖基) 咪唑 -4- 甲酰胺	C ₁₅ H ₂₄ N ₅ O ₁₅ P ₂	< 0.05	1.24	↓
2, 3- 二去甲基 -8- 异前列腺素 F _{1α}	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	< 0.05	1.20	↓
反式 -3- 羟基 -L- 脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₃	< 0.05	1.20	↓
甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	< 0.05	1.15	↓
4- 氨基丁醛	C ₄ H ₉ NO	< 0.05	1.15	↓
羟基四氢嘧啶	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃	< 0.05	1.10	↓

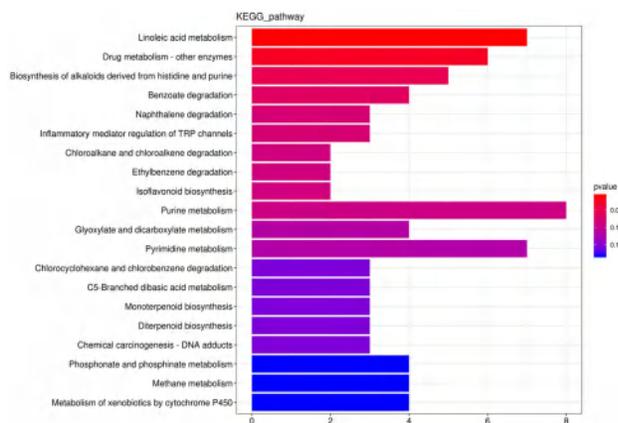


图 6 KEGG 富集柱状图

Fig 6 KEGG enrichment bar chart

造模 6 周后，与空白组相比，模型组大鼠骨骼肌 ATP 含量、丙酮酸含量、GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$)，ATP 合酶 (线粒体呼吸链复合物 V)、PDH、SDH、SOD 及 GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$)，详见图 7。

4 讨论

CFS 是一种异质性疾病，以无法解释的、持续的全身不适和持续性疲劳为特征。该病主要表

现为病理性疲劳和劳累后更严重的不适、认知功能障碍、免疫功能障碍、睡眠不清醒、疼痛、自主神经功能障碍等^[18]。该疾病不仅对患者身体造成影响，也给予其工作生活和家庭带来负担。因此研究 CFS 的病因及其治疗管理方法十分重要。

4.1 多因素复合应激诱导的 CFS 大鼠模型的复制及鉴定

单一应激因素造模仅能复制部分 CFS 症状，难以完美地模拟 CFS 的全部症状，故实验研究中大多数选用多因素复合应激因素对 CFS 动物模型进行复制^[19]。本实验采用束缚、夹尾、睡眠剥夺、强迫游泳多种应激因素复合应激诱导的造模方法，注重给予动物躯体与精神双重刺激。强迫游泳是最早且最为广泛用于 CFS 研究的造模方法，可以使造模动物具有疲劳、认知障碍等 CFS 核心症状，其病理改变在 CFS 临床患者中也有发现^[20]。束缚及睡眠剥夺均属于神经刺激类应激源，可引起动物挣扎、尖叫、惊恐甚至绝望等行为学状态^[21]，模拟了人类长时间受到刺激后身心产生疾病的过程^[22]。这些躯体与精神多重应激因素的叠加，极易诱导造模动物产生无法缓解的疲

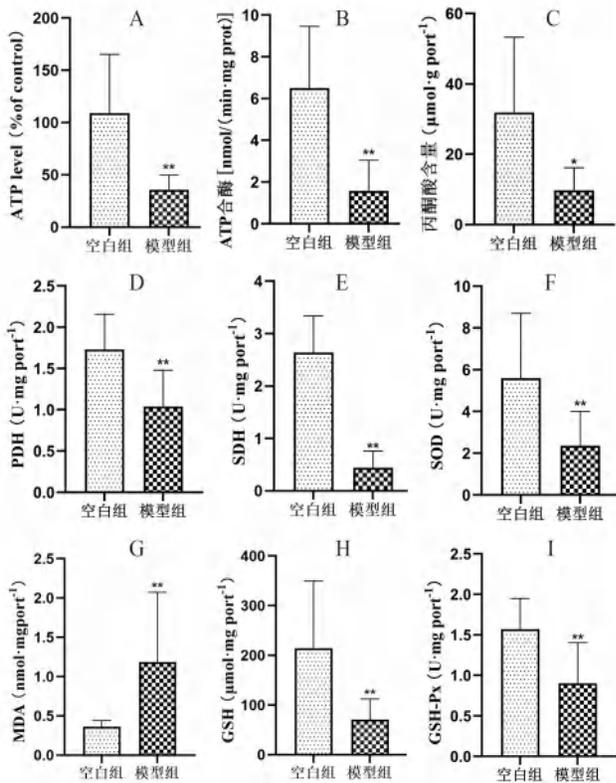


图 7 CFS 大鼠骨骼肌生化指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Fig 7 Biochemical indexes of skeletal muscle in CFS rats ($\bar{x} \pm s$)

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

劳及其他 CFS 相关症状。

本实验造模 6 周后对模型组大鼠进行力竭游泳、悬尾、高架十字迷宫、MWT、戊巴比妥钠诱导睡眠及巴恩斯迷宫等行为学实验，结果模型组大鼠出现疲劳、疼痛、认知障碍、焦虑、抑郁及睡眠障碍等症状，与 CFS 患者临床症状相符，证明 CFS 大鼠模型复制成功^[23-26]。

4.2 多因素复合应激诱导的 CFS 对大鼠非靶向血浆代谢组学的影响

关于 CFS 外周肌肉疲劳的病理生理基础，人们提出了多种可能的机制，其中大部分集中在能量代谢紊乱方面^[27-28]。有研究者发现患者血浆嘌呤含量显著降低，如黄嘌呤等^[4-5]。嘌呤代谢参与机体能量供应与代谢调节^[29]，血浆嘌呤减少将导致 ATP 的合成减少以及储备能力下降。本研究中，CFS 大鼠血浆中黄嘌呤含量显著下调，与文献研究结果一致，表明 CFS 大鼠嘌呤代谢能力下降，ATP 含量减少，导致机体供能不足，使大鼠出现疲劳症状。

同时有研究报道发现，CFS 患者血浆中乙醛酸和二羧酸代谢通路出现紊乱且丙酮酸等与 TCA 循环相关物质含量显著降低^[6-7]。乙醛酸和二羧酸代谢通路作为 TCA 循环的支路，可通过影响

TCA 循环关键酶的活性及产物的含量导致 TCA 循环中的各种反应物和产物水平异常^[30-33]。丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 是进入 TCA 循环的第一步，丙酮酸含量减少，机体供能将受到较大的影响，导致机体疲劳。本实验血浆代谢组学虽未发现直接与 TCA 循环相关代谢产物出现显著变化，但发现 CFS 大鼠乙醛酸和二羧酸代谢通路出现紊乱，为进一步验证 CFS 大鼠 TCA 循环是否出现障碍，本研究对 CFS 大鼠骨骼肌丙酮酸含量进行检测，发现与空白组比较，模型组大鼠骨骼肌丙酮酸含量明显降低，与文献结果一致^[6-7]，初步验证了 CFS 大鼠 TCA 循环出现了障碍，机体供能受阻。

Germain 等^[6]还发现 CFS 患者体内 L-脯氨酸、2-戊酮酸等代谢产物含量出现变化，导致如色氨酸、精氨酸及脯氨酸等氨基酸代谢、生物合成或降解途径出现紊乱，影响其参与 TCA 循环供能，使得机体出现疲劳。本实验通过对 CFS 大鼠血浆非靶向代谢组学分析发现，CFS 大鼠血浆代谢物邻磷酸-L-丝氨酸、D-果糖 6-磷酸等差异代谢产物含量降低，导致色氨酸、精氨酸和脯氨酸代谢等代谢通路发生紊乱，该结果与文献研究结论基本一致^[6]。

参与 TCA 循环的物质含量降低、酶活性降低或为 TCA 循环提供原料的蛋白质代谢过程的减少都会直接或间接导致 TCA 循环的代谢异常，导致其为机体提供的能量减少。结合其他研究者实验结果^[4-7]及本实验血浆非靶向代谢组学结果，我们推测 TCA 循环及其能量代谢相关产物的紊乱可能为 CFS 发病机制之一。

4.3 多因素复合应激诱导的 CFS 对大鼠骨骼肌 TCA 循环相关指标的影响

PDH 及 SDH 与糖酵解、TCA 循环和氧化磷酸化有关，对肌肉功能和运动十分重要^[34-35]。Fluge 等^[36]发现 CFS 患者线粒体丙酮酸氧化受损、PDH 的功能受损。SDH 同时也是呼吸链复合体 II 的组成部分，参与呼吸链供能^[37]。本实验结果中 CFS 模型组大鼠骨骼肌 PDH 及 SDH 活性明显降低，表明 CFS 大鼠 PDH 的功能受损，TCA 循环能力下降，呼吸链供能受阻，能量代谢出现紊乱。

4.4 多因素复合应激诱导的 CFS 对大鼠骨骼肌 ATP 含量的影响

TCA 循环反复脱氢反应还可为氧化磷酸化提供足够的 NADH 和 FADH₂，其可进入呼吸链，参与合成 ATP。故 TCA 循环受阻后，亦将影响呼吸链 ATP 的产生，使得 CFS 患者体内能量缺口进一步增大，产生疲劳感^[3]。本研究中模型组大鼠

ATP 含量显著低于空白组, 与血浆非靶向代谢结果相符合, 也与临床 CFS 患者相似。

4.5 多因素复合应激诱导的 CFS 对大鼠骨骼肌线粒体 ATP 合酶活性的影响

ATP 合酶是线粒体呼吸链 (electron transport chain, ETC) 的最后一个复合物, 以 ADP、Pi 及 Mg^{2+} 为原料合成 ATP, 为细胞供能。Missailidis 等^[38]通过分析 CFS 患者的永生淋巴细胞发现 CFS 患者淋巴细胞具有复杂的 Complex V 缺陷, 造成了线粒体功能障碍, ATP 合成能力下降。本实验结果表明, 模型组大鼠线粒体复合物 V 活性显著降低, 影响线粒体呼吸链合成 ATP, 造成线粒体功能障碍, 导致供能减少。

4.6 多因素复合应激诱导的 CFS 对大鼠骨骼肌氧化应激相关指标的影响

有研究报道, 氧化代谢功能出现障碍导致线粒体失常, 也是 CFS 患者出现疲劳和劳累后不适的重要因素之一^[39]。氧化应激相关的生化标志物也被报道在骨骼肌疲劳中起关键作用^[40]。过量产生的自由基会攻击细胞膜上的脂肪酸, 最终代谢为 MDA, 加重机体氧化应激, 导致疲劳症状^[41]。活性氧 (ROS) 的积累亦会扰乱机体代谢平衡, 导致疲劳症状^[42]。部分 CFS 患者体内抗氧化剂如 GSH、SOD 等水平降低。SOD 和 GSH-Px 作为重要的抗氧化酶, 是体内 ROS 的天然清除剂^[43]。SOD、GSH-Px 活性及 CSH 含量的下降, 表明机体内的抗氧化体系已不能有效地抵抗自由基的氧化, 过多的自由基将损害线粒体功能, 导致其为机体供能出现障碍。本实验结果显示, 模型组大鼠骨骼肌 GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性显著降低, MDA 含量显著升高, 表明 CFS 大鼠体内清除氧化产物能力减弱, 自由基过多, 骨骼肌脂质过氧化程度较高, 加大了自由基对组织细胞的损伤程度, 造成线粒体功能障碍, 导致供能减少。

5 结论

本实验通过力竭游泳、悬尾、高架十字迷宫、MWT、戊巴比妥钠诱导睡眠及巴恩斯实验, 发现多因素复合应激的方法可较好地复制 CFS 大鼠模型, 初步推测 TCA 循环障碍及线粒体功能障碍引起的机体能量代谢紊乱可能是 CFS 的发病机制之一。在未来的研究中我们将进一步对 CFS 的发病机制及其相关治疗药物展开研究。

参考文献

[1] Huth TK, Eaton-Fitch N, Staines D, et al. A systematic review of metabolomic dysregulation in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis/systemic exertion intolerance disease (CFS/ME/SEID) [J]. *J Transl Med*,

2020, 18 (1): 1-4.

- [2] Bested AC, Marshall LM. Review of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: an evidence-based approach to diagnosis and management by clinicians [J]. *Rev Environ*, 2015, 30 (4): 223-249.
- [3] Słomko J, Newton JL, Kujawski S, et al. Prevalence and characteristics of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) in Poland: a cross-sectional study [J]. *BMJ*, 2019, 9 (3): e023955.
- [4] Xiong RY, Gunter C, Fleming E, et al. Multi-omics of gut microbiome-host interactions in short-and long-term myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31 (2): 273-287.
- [5] Naviaux RK, Naviaux JC, Li KF, et al. Metabolic features of chronic fatigue syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (37): E5472-E5480.
- [6] Germain A, Ruppert D, Levine SM, et al. Metabolic profiling of a myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome discovery cohort reveals disturbances in fatty acid and lipid metabolism [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13 (2): 371-379.
- [7] Jason LA, Conroy KE, Furst J, et al. Pre-illness data reveals differences in multiple metabolites and metabolic pathways in those who do and do not recover from infectious mononucleosis [J]. *Mol Omics*, 2022, 18 (7): 662-665.
- [8] Blomberg J, Gottfries CG, Elfaitouri A, et al. Infection elicited autoimmunity and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: an explanatory model [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 229-249.
- [9] 冯雯, 张彤, 徐诗静. 从中西医结合角度谈慢性疲劳综合征 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16 (69): 266-267.
- [10] Filler K, Lyon D, Bennett J, et al. Association of mitochondrial dysfunction and fatigue: a review of the literature [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1: 12-23.
- [11] Myhill S, Booth NE, McLaren-Howard J. Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2009, 2 (1): 1-16.
- [12] 杨燕, 孙忠人, 李超然, 等. 电针干预对慢性疲劳综合征大鼠海马组织蛋白质磷酸化表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2024, 49 (6): 594-603.
- [13] 梁惠嘉, 史爽, 王纠, 等. 复方五指毛桃膏对小鼠慢性疲劳综合征的改善作用 [J]. *广东药科大学学报*, 2024, 40 (3): 11-17.
- [14] 卢秋玉, 刘金花, 宾彬, 等. 参杞强精颗粒对慢性疲劳综合征脾肾阳虚证大鼠免疫调节作用研究 [J]. *世界中医药*, 2024, 19 (7): 969-974.
- [15] Li CR, Yan Y, Feng CW, et al. Integrated omics analysis for the gut microbiota response to moxibustion in a rat model of chronic fatigue syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 43 (6): 1176.
- [16] 钟晓玲, 童伯瑛, 杨一涵, 等. 经皮穴位电刺激对慢性

- 疲劳综合征大鼠学习记忆能力的影响及其机制探讨[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 317-324.
- [17] 周鹏, 尹建平, 金小千, 等. 电针背俞穴对慢性疲劳大鼠下丘脑 CRHmRNA 表达及血清 ACTH、CORT 的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(12): 32-35, 41.
- [18] Briggs NC, Levine PH. A Comparative review of systemic and symptomatology in 12 outbreaks collectively described as chronic fatigue syndrome, epidemic neuromyasthenia, and myalgic encephalomyelitis [J]. Clin Infect Dis, 1994, Suppl 1: S32-S42.
- [19] 王一晓, 王慧芳, 侯亚薇, 等. 慢性疲劳综合征动物模型特点分析及在针灸研究中的应用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(11): 2088-2093.
- [20] Wood E, Hall KH, Tate W. Role of mitochondria, oxidative stress and the response to antioxidants in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a possible approach to SARS-CoV-2 'long-haulers' ? [J]. Chron Dis Transl Med, 2021, 7(1): 14-26.
- [21] Guedri K, Frih H, Chettoum A, et al. Chronic restraint stress induced neurobehavioral alterations and histological changes in rat [J]. Toxicol Environ Health Sci, 2017, 9: 123-129.
- [22] Church S, Rogers E, Rockwood K, et al. A scoping review of the clinical frailty scale [J]. BMC Geriatrics, 2020, 20: 1-18.
- [23] Ohba T, Domoto S, Tanaka M, et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome induced by repeated forced swimming in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(7): 1140-1145.
- [24] 刘群, 周晨, 张雯晰, 等. 深浅不同针刺对慢性束缚应激大鼠抑郁样行为及皮质神经营养因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(1): 152-156.
- [25] 韦春昕, 胡亦明, 黄仕琦, 等. 基于 p38 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤干预广泛性焦虑模型大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 114-123.
- [26] Shao CZ, Ren YM, Wang ZN, et al. Detection of urine metabolites in a rat model of chronic fatigue syndrome before and after exercise [J]. Biomed Res Int, 2017(2017): 1-12.
- [27] Reuter SE, Evans AM. Long-chain acylcarnitine deficiency in patients with chronic fatigue syndrome. Potential involvement of altered carnitine palmitoyltransferase- I activity [J]. J Intern Med, 2011, 270(1): 76-84.
- [28] Deshpande N. Chronic fatigue syndrome versus systemic exertion intolerance disease [J]. Fatigue, 2015, 3(3): 127-141.
- [29] 郭引弟, 妥强, 刘杰, 等. 枸杞叶对大鼠生长性能、血清生化与抗氧化指标及血浆代谢组的影响[J]. 动物营养学报, 2024, 36(1): 610-625.
- [30] 丁欢, 陈丽虹, 陈宇婧, 等. 基于尿液代谢组学数据评价不同刮痧方案干预腰椎间盘突出症模型大鼠的效果[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(23): 3654-3659.
- [31] 于静波, 韩越, 谢新, 等. 脾胃湿热证大鼠模型的尿液代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10): 166-173.
- [32] Yao MX, Yang ZQ, Rong X, et al. The exploration of fetal growth restriction based on metabolomics: a systematic review [J]. Metabolites, 2022, 12(9): 860-877.
- [33] Ma WN, Song J, Wang HR, et al. Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depressionlike behavior, energy metabolism and microbial changes in rats [J]. Life Sci, 2019, 225: 88-97.
- [34] Constantin-Teodosiu D. Regulation of muscle pyruvate dehydrogenase complex in insulin resistance: effects of exercise and dichloroacetate [J]. Diabetes Metab J, 2013, 37(5): 301-314.
- [35] Zimmer AD, Walbrech G, Kozar I, et al. Phosphorylation of the PDH complex precedes HIF-1-mediated effects and PDK1 upregulation during the first hours of hypoxic treatment in HCC cells [J]. Hypoxia, 2016, 4: 135-145.
- [36] Fluge Ø, Mella O, Bruland O, et al. Metabolic profiling indicates impaired pyruvate dehydrogenase function in myalgic encephalopathy/chronic fatigue syndrome [J]. JCI Insight, 2016, 1(21): 22-41.
- [37] Zhang WH, Lang R. Succinate metabolism: a promising therapeutic target for inflammation, ischemia/reperfusion injury and cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1266973.
- [38] Missailidis D, Annesley S, Allan C, et al. An isolated complex V inefficiency and dysregulated mitochondrial function in immortalized lymphocytes from ME/CFS patients [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1074.
- [39] Jones DEJ, Hollingsworth KG, Taylor R, et al. Abnormalities in pH handling by peripheral muscle and potential regulation by the autonomic nervous system in chronic fatigue syndrome [J]. J Intern Med, 2010, 267(4): 394-401.
- [40] Crane JD, Arkan A, Hettinga BP, et al. Elevated mitochondrial oxidative stress impairs metabolic adaptations to exercise in skeletal muscle [J]. PLoS, 2013, 8(12): e81879.
- [41] Shankar V, Wilhelmy J, Michael B, et al. Oxidative stress is a shared characteristic of ME/CFS and long COVID [J]. bioRxiv, 2024, doi: 10.1101/2024.05.04.592477.
- [42] Muluye RA, Bian YH, Wang L, et al. Placenta peptide can protect mitochondrial dysfunction through inhibiting ROS and TNF- α generation, by maintaining mitochondrial dynamic network and by increasing IL-6 level during chronic fatigue [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 328.
- [43] Keenoy BM, Moorkens G, Vertommen J, et al. Antioxidant status and lipoprotein peroxidation in chronic fatigue syndrome [J]. Life Sci, 2001, 68(17): 2037-2049.

(收稿日期: 2024-05-30; 修回日期: 2024-08-14)

华重楼的化学成分研究

王冰雯¹, 张从钰¹, 田韵远¹, 曹宇¹, 张倩¹, 袁晓峰¹, 魏伊莎¹, 汤海峰^{1*}, 陆云阳^{1*}, 盖守昌²
(1. 空军军医大学药理学系中药与天然药物学教研室, 西安 710032; 2. 陆军第七十九集团军医院药剂科, 辽宁 辽阳 111000)

摘要: 目的 研究陕产华重楼根茎中的化学成分, 并对其进行结构鉴定。方法 利用 HPD 100 型大孔树脂、硅胶层析柱、RP-18、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶、Flash 快速制备等柱色谱以及半制备高效液相等技术, 从华重楼根茎乙醇提取物的水饱和正丁醇萃取物中, 分离纯化得到单体成分, 通过波谱数据分析结合化学水解、衍生的方法对其进行结构鉴定。结果 共分离出 6 个化合物, 分别鉴定为 β -ecdysone (1)、shidasterone (2)、spongipregnolide A (3)、prosapogenin A (4)、polyphyllin VI (5) 和 (3 β , 25R)-3-羟基螺甾烷-5-烯-7-酮-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (6)。结论 化合物 1 和 2 为蜕皮激素类化合物, 化合物 3 为孕甾烷醇型皂苷, 化合物 4、5 和 6 为异螺甾烷醇型皂苷, 其中化合物 2、4 和 6 为首次在华重楼中分离得到。

关键词: 华重楼; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0041-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.006

Chemical constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara

WANG Bing-wen¹, ZHANG Cong-yu¹, TIAN Yun-yuan¹, CAO Yu¹, ZHANG Qian¹, YUAN Xiao-feng¹, WEI Yi-sha¹, TANG Hai-feng^{1*}, LU Yun-yang^{1*}, GAI Shou-chang² (1. Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 2. Department of Pharmacy, No.79 Army Group Hospital of People's Liberation Army Ground Force, Liaoyang Liaoning 111000)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of the rhizomes of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara collected from Shaanxi. **Methods** The rhizomes were extracted by ethanol and portioned by *n*-butanol to obtain the crude extract. Then macroporous resin HPD 100, silica gel chromatographic columns, RP-18, Sephadex LH-20 glycogen gel, flash chromatography, and semi-preparative HPLC were used to purify the crude extract. The structures of the isolated compounds were elucidated based on comprehensive analysis of spectral data and chemical derivatization methods. **Results** Totally 6 compounds were isolated and identified as β -ecdysone (1), shidasterone (2), spongipregnolide A (3), prosapogenin A (4), polyphyllin VI (5), and (3 β , 25R)-3-hydroxyspirost-5-en-7-one-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (6). **Conclusion** Compounds 1 and 2 are identified as ecdysteroid derivatives, compound 3 is pregnane-type saponin, and compounds 4, 5, and 6 have been isospirostane-type saponins. Moreover, compounds 2, 4, and 6 are isolated from *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara for the first time.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; chemical constituent; structure identification

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81973132); 陕西省重点研发计划 (No.2024SF-ZDCYL-03-17 和 2023YBSF-514); 陕西省中医药管理局科研项目 (No.SZY-KJCYC-2023-001)。

作者简介: 王冰雯, 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究, email: wbw134610@163.com *通信作者: 汤海峰, 男, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事天然药化研究和中药、海洋药物开发, email: tanghaifeng71@163.com; 陆云阳, 男, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质和新药研发工作, email: luyunyangqq@163.com

重楼 (*Paris*) 作为藜芦科 (Melanthiaceae) 多年生草本植物, 在中国境内分布广泛, 已知约有 27 种及 15 变种^[1]。在传统中医药领域, 重楼根茎以其清热解毒、消肿止痛和凉肝定惊的药用功效而备受珍视, 广泛应用于治疗跌打损伤、毒蛇咬伤、血瘀以及惊风等症状。现代科学研究揭示, 重楼属植物体内含有丰富的化学成分, 包括甾体皂苷、黄酮类和植物甾醇等, 目前已鉴定出约 323 种不同的化合物^[2]。这些成分赋予了重楼显著的药理活性和药用价值, 尤其在抗肿瘤、抗炎和免疫调节等方面展现出巨大潜力^[3]。

2020 年版《中国药典》将七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 与云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 共同作为中药重楼的基原植物^[4]。其中 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 在《中国植物志》中名为华重楼, 分布于江苏、浙江、江西、福建、台湾、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州和云南。通过资源考察, 发现华重楼在陕西多地均有分布, 尤其在汉中市镇巴县有较为丰富的资源^[5]。为进一步明确陕产华重楼的化学成分, 并为其开发利用提供理论支撑, 本研究以陕西省汉中市镇巴县的华重楼根茎为研究对象, 从其乙醇提取物的正丁醇萃取部位, 通过一系列的分离纯化和结构鉴定, 得到 6 个化合物, 化合物 1~6 的结构式见图 1。其中化合物 2、4 和 6 为首次在华重楼中分离得到, 现报道如下。

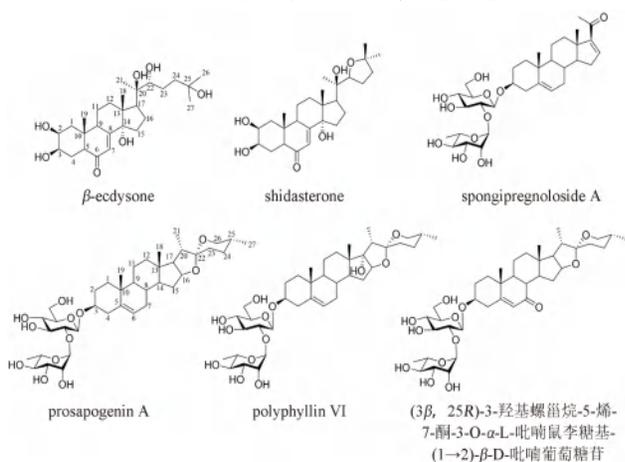


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig 1 Structures of compounds 1~6

1 材料

X500R 高分辨液质联用仪 (AB SCIEX); Bruker AVANCE 800 型核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); Pure C-810 中压快速色谱仪 (瑞士 BUCHI 公司); Gilson 2050 高效液相色谱仪 (Gilson 公司); 岛津 GCMS-QP2010 气相色谱仪 (SHIMADZU 公司); Sephadex LH-20 凝胶 (GE 公司); 预制硅胶板 G、柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 电子天平

(精度: 0.0001 g, 赛多利斯科学仪器有限公司); 低温冷却循环泵 (DLSB-40 型, 陕西爱信仪器有限公司); 隔膜真空泵 (V-100 型, 瑞士 BUCHI 公司); 旋转蒸发仪 (N-1300 型)、电热恒温水浴锅 (OSB-2100 型)(上海爱朗仪器有限公司); 电热鼓风干燥箱 (DHG-9240A 型, 上海一恒科学仪器有限公司); 色谱纯甲醇 (天津科密欧公司); 氘代试剂 (Merck 公司); 显色剂 (10% 硫酸/乙醇); 其他试剂均为分析纯。

药材于 2023 年 8 月采自陕西省汉中市镇巴县, 经空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室汤海峰教授鉴定为华重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的根茎, 药材标本 (编号: 20230804) 保存于该教研室标本室。

2 提取与分离

取华重楼的干燥根茎 4.1 kg, 用 70% 乙醇溶液加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液。提取液经减压回收得流浸膏共 1703.5 g。将流浸膏用适量水分散后, 依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇各萃取 5 次, 回收正丁醇层得总皂苷 355.9 g。将正丁醇层用蒸馏水溶解, 过 HPD 100 型大孔树脂柱, 不同浓度乙醇 (0%、30%、50%、70%、90%) 梯度洗脱, 利用薄层色谱 (TLC) 对其进行检视后合并洗脱液, 得到 4 个部分 (Fr.1~Fr.4)。用中低压制备液相硅胶柱色谱对 Fr.3 (137.3 g) 进行分离, 选择 $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}$ (50:1~0:1) 作为洗脱剂, 通过 TLC 对其进行检视后合并洗脱液, 得到 9 个部分 (Fr.3-1~Fr.3-9)。

Fr.3-4 (3.6 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进行分离, 洗脱剂为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{二氯甲烷}}$ (4:1), 得到 Fr.3-4-1~Fr.3-4-2。Fr.3-4-2 (1.57 g) 通过中低压制备液相 C_{18} 硅胶柱色谱进行分离, 选择 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (1:9~10:0) 为洗脱剂梯度洗脱, 合并洗脱液, 获得 Fr.3-4-2-1~Fr.3-4-2-5。Fr.3-4-2-2 通过半制备高效液相色谱分离纯化 (流速 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 206、254 nm), 48% 甲醇洗脱得到化合物 1 (78.0 mg, $t_R = 9.5 \text{ min}$)、化合物 2 (5.5 mg, $t_R = 15.0 \text{ min}$)、化合物 3 (14.7 mg, $t_R = 46.5 \text{ min}$)。Fr.3-4-2-2 通过半制备高效液相色谱分离纯化, 60% 甲醇洗脱得到化合物 4 (14.9 mg, $t_R = 34.0 \text{ min}$)。

Fr.3-5 (62.9 g) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱除去杂质, 洗脱剂为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{二氯甲烷}}$ (1:1), 得到 Fr.3-5-1~Fr.3-5-5。Fr.3-5-2 (2.3 g) 通过中低压制备液相 C_{18} 硅胶柱色谱进行分离, 选择 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (1:9~10:0) 为洗脱剂梯度洗脱, 合并洗脱液, 获得 Fr.3-5-2-1~Fr.3-5-2-5。Fr.3-5-2-3 通过半制备高效液相色谱分离纯化 (流速 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 206、254 nm), 65% 甲醇洗脱得到化合物 5 (20.1 mg, $t_R = 52.0 \text{ min}$)、化合物 6 (40.4 mg, $t_R = 61.3 \text{ min}$)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 503.2996 $[M + Na]^+$ (计算值 503.2985), ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 数据显示, 化合物有 27 个碳信号, 推断其分子式为 $C_{27}H_{44}O_7$ 。分析化合物的 1H -NMR 和 HSQC 数据谱, 显示化合物分子中有 5 个甲基氢信号 δ_H 0.84 (s)、0.92 (s)、1.15 (s)、1.16 (s) 和 1.16 (s), 分别对应化学位移为 δ_C 18.1、24.4、28.9、21.0 和 29.7 的甲基碳信号; 1 个烯烃氢信号 δ_H 5.74 (br s), 其对应的三取代烯烃碳信号分别为 δ_C 122.1 和 168.0; 同时分子中还有 1 个酮羰基信号 δ_C 206.5。综合分析以上特征碳氢信号, 并通过 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 归属其碳氢信号 (见表 1), 对比发现其波谱数据与文献^[6]报道的化合物 β -ecdysone 的数据一致。从而确定化合物 **1** 为 (2 β , 3 β , 5 β , 22 R)-2, 3, 14, 20, 22, 25-六羟基胆固醇-7-烯-6-酮, 即 β -ecdysone。

化合物 2: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 463.2965 $[M + H]^+$ (计算值 463.2981), 结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{27}H_{42}O_6$ 。其 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 数据, 结果显示, 化合物共有 27 个碳信号, 包括 5 个甲基碳, 8 个亚甲基碳, 7 个次甲基碳和 7 个季碳。结合化合物的 1H -NMR 和 HSQC 谱数据, 显示化合物分子中有 5 个甲基氢信号 δ_H 0.84 (s)、0.92 (s)、1.15 (s)、1.16 (s) 和 1.16 (s), 分别对应化学位移为 δ_C 18.1、24.4、28.9、21.0 和 29.7 的甲基碳信号; 1 个烯烃氢信号 δ_H 5.74 (br s), 分别对应的三取代烯烃碳信号分别为 δ_C 122.1 和 168.0。此外, 通过 ^{13}C -NMR 谱可以发现分子结构中还有一个化学位移为 δ_C 206.5 的羰基碳信号。通过综合分析以上特征碳氢信号, 并与化合物 **1** 进行对比, 发现化合物 **2** 中 C-22 和 C-25 的化学位移分别向低场移动了 7.1 和 10.4, 并且化合物 **2** 的相对分子质量比化合物 **1** 小 18, 因此推断该化合物在 C-22 和 C-25 之间形成了含氧环。通过 1D 和 2D NMR 对化合物 **2** 的碳氢信号进行归属, 数据见表 1。将化合物 **2** 与 shidasterone^[7] 的波谱数据对比, 发现这两个化合物具有同样的结构。综上所述, 将化合物 **2** 的结构确定为 (2 β , 3 β , 5 β , 22 R)-2, 3, 14, 20-四羟基胆固醇-22, 25-环氧基-7-烯-6-酮, 即 shidasterone。

化合物 3: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 645.3171 $[M + Na]^+$ (计算值 645.3164), 结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{33}H_{50}O_{11}$ 。分析其 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 数据, 结果显示化合物的 33 个碳信号中, 有 21 个属于苷元部分, 包括 3 个甲基碳, 7 个亚甲基碳, 6 个次甲基碳和 5 个季碳。结合 1H -NMR 和 HSQC 谱数据, 显示化合物分子中有 3 个甲基氢信号 δ_H 0.93 (s)、1.08 (s)

和 2.26 (s), 分别对应化学位移为 δ_C 16.1、19.7 和 27.1 的甲基碳信号; 2 个烯烃氢信号 δ_H 5.41 (br s) 和 6.92 (br s), 其对应的三取代烯烃碳信号分别为 δ_C 122.4, 142.3 以及 δ_C 147.3, 156.3; 此外, 通过 ^{13}C -NMR 谱可以发现分子结构中还有 1 个化学位移为 δ_C 199.4 的羰基碳信号。在 HMBC 谱中, δ_H 1.08 (s, H-19) 与 C-5 存在远程相关信号, δ_H 2.47 (m, H-4)、2.04 (m, H-7) 与 C-5、C-6 分别存在远程相关信号, 表明 5 (6) 位上有双键。 δ_H 0.93 (s, H-18)、 δ_H 2.26 (s, H-21) 与 C-17 有远程相关信号, δ_H 2.35 (m, H-15) 与 C-17、C-16 有远程相关信号, 表明 16 (17) 位上有双键。 δ_H 2.26 (s, H-21) 与 C-20、C-17 存在远程相关信号, δ_H 6.92 (br s, H-16) 与 C-20 存在远程相关信号, 表明 C-17 位上连有乙酰基, 形成了一个 α/β 不饱和酮结构。以上特征碳氢信号表明化合物的苷元是孕二烯醇酮型结构^[8]。

化合物 **3** 用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸水解, 按文献方法^[9] 将所得单糖制备为三甲基硅醚化 L-半胱氨酸衍生物。以同样的方法制备标准糖衍生物作为对照品, 进行 GC 分析, 表明化合物 **3** 的单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha (1 : 1)。在 1H NMR 谱中, 显示 2 个糖基的端基氢信号为 δ_H 5.01 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, Glc) 和 6.44 (br s, Rha), 在 HSQC 谱中分别对应化学位移为 δ_C 100.5 和 102.1 的端基碳信号。由葡萄糖端基氢的偶合常数 ($J > 7.0 \text{ Hz}$) 可知化合物中吡喃葡萄糖基为 β 构型。由鼠李糖 C-3 和 C-5 化学位移分别为 δ_C 72.2 和 69.7 可知吡喃鼠李糖基为 α 构型^[10]。在 HMBC 谱中, Rha 的 H-1 与 Glc 的 C-2 存在远程相关, 表明 Rha 连接于 Glc 的 2 位。Glc 的 H-1 与苷元 C-3 存在远程相关, 说明 Glc 连接于苷元 C-3 位; 通过 2D NMR 分析归属了化合物 **3** 的所有碳氢信号, 苷元和糖基的碳谱数据见表 1。通过数据库检索, 发现化合物 **3** 的波谱数据与文献报道的化合物 spongipregnoside A^[11] 的数据一致, 从而确定化合物 **3** 为孕甾烷-5, 16-二烯-20-酮- β -O- α -L-鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-葡萄糖苷, 即 spongipregnoside A。

化合物 4: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 723.4277 $[M + H]^+$ (计算值 723.4241), 结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{39}H_{62}O_{12}$ 。分析其 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 数据, 结果显示, 化合物的 39 个碳信号中, 有 27 个属于苷元部分, 包括 4 个甲基碳, 10 个亚甲基碳, 9 个次甲基碳和 4 个季碳。结合 1H -NMR 和 HSQC 谱数据, 显示在高场区域内存在 4 个甲基氢信号 δ_H 0.68 (d, $J = 5.84 \text{ Hz}$)、0.81 (s)、1.03 (s) 和 1.12 (d, $J = 7.24 \text{ Hz}$), 分别对应化学位移为 δ_C 17.5、16.5、19.6 和 15.2 的甲基碳信号; 1 个烯氢质子信号 δ_H 5.30 (br s), 其对应的三取代烯烃碳信号分别为 δ_C 121.9 和 141.0; 通过 ^{13}C -NMR 谱发现分子

结构中还有 1 个化学位移为 δ_c 109.5 的半缩醛季碳信号。此外, 根据 H_2 -26 化学位移值的差 ($\Delta \delta_H = 3.57 - 3.48 = 0.09 < 0.48$), 从而确定 C-25 为 *R* 构型^[12], 以上数据表明化合物 4 是异螺甾烷醇型甾体皂苷^[7]。在 HMBC 谱中, δ_H 1.03 (s, H-19) 与 C-5 存在远程相关信号, δ_H 2.79 (m, H-4)、1.44 (m, H-7) 与 C-5、C-6 分别存在远程相关信号, 表明双键位于 5 (6) 位。在 NOESY 谱中, δ_H 1.03 (s, H-19) 和 δ_H 1.71 (m, H-1b) 分别在 δ_H 0.95 (m, H-1a) 和 δ_H 3.93 (m, H-3) 有相关信号, 表明 3-OH 是 β 构型^[13]。以上特征碳氢信号表明化合物的苷元为薯蓣皂苷元。

用化合物 3 的单糖水解方法检测化合物 4 的单糖组成, 表明化合物 4 的单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha (1 : 1)。在 1H NMR 谱中显示 2 个糖基的端基氢信号为 δ_H 5.01 (d, $J = 7.7$ Hz, Glc) 和 6.435 (br s, Rha), 在 HSQC 谱中分别对应化学位移为 δ_c 100.5 和 102.3 的端基碳信号。在 HMBC 谱中, Rha 的 H-1 与 Glc 的 C-2 存在远程相关, 表明 Rha 连接于 Glc 的 2 位。Glc 的 H-1 与苷元 C-3 存在远程相关, 说明 Glc 连接于苷元 C-3 位; 通过 2D NMR 分析归属了化合物 4 的所有碳氢信号, 苷元和糖基的碳谱数据见表 1。通过数据库检索发现, 化合物 4 的波谱数据与文献^[14]报道的化合物 prosapogenin A 的数据一致, 从而确定化合物 4 为薯蓣皂苷元 -3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 - (1 \rightarrow 2) - β -D-吡喃葡萄糖苷, 即 prosapogenin A。

化合物 5: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 761.4014 $[M + Na]^+$ (计算值 761.4035), 其 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 谱数据显示, 化合物有 39 个碳信号, 因此推断其分子式为 $C_{39}H_{62}O_{13}$ 。化合物 5 苷元部分的碳谱信号与化合物 4 的信号基本一致, 不同之处在于化合物 5 的 C-16 和 C-17 信号分别向低场位移至 δ_c 90.5 和 91.3, 据此推测化合物 5 的 C-17 位连有羟基。这一推测还可以通过化合物 4 和 5 的高分辨质谱进行确证。同时, 按照生源途径, 该羟基应为 α 构型^[15]。因此确定化合物 5 的苷元为偏诺皂苷元。

用化合物 3 的单糖水解方法检测化合物 5 的单糖组成, 表明化合物 5 的单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha (1 : 1)。在 1H NMR 谱中显示 2 个糖基的端基氢信号为 δ_H 4.43 (d, $J = 7.84$ Hz, Glc) 和 5.14 (br s, Rha), 在 HSQC 谱中分别对应化学位移为 δ_c 100.5 和 102.2 的端基碳信号。在 HMBC 谱中, Rha 的 H-1 与 Glc 的 C-2 存在远程相关, 表明 Rha 连接于 Glc 的 2 位。Glc 的 H-1 与苷元 C-3 存在远程相关, 说明 Glc 连接于苷元 C-3 位; 对比发现化合物 5 的波谱数据与文献^[16]报道的化合物 polyphyllin VI 数据一致, 从而确定化合物 5 为偏

诺皂苷元 -3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 - (1 \rightarrow 2) - β -D-吡喃葡萄糖苷, 即 polyphyllin VI。

化合物 6: 白色无定形粉末。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 759.3848 $[M + Na]^+$ (计算值 759.3862)。其 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, C_5D_5N) 和 DEPT 谱数据显示, 化合物有 39 个碳信号, 因此推断其分子式为 $C_{39}H_{60}O_{13}$ 。化合物 6 苷元部分的碳谱信号与化合物 4 的信号基本一致, 不同之处在于化合物 6 苷元部分少了 1 个亚甲基信号, 多了 1 个化学位移为 δ_c 201.4 的羰基碳信号, 同时 C-5、C-6 和 C-8 分别向低场移动了 24.6、4.7 和 13.5。而在 HMBC 谱中, δ_c 201.4 (C-7) 与 δ_H 2.38 (t, $J = 11.76$, H-8)、 δ_H 5.76 (s, H-6) 存在远程相关信号, 表明羰基位于 7 位。综上分析确定化合物 6 的苷元为 (3 β , 25*R*)-3-羟基螺甾烷 -5-烯 -7-酮。

用化合物 3 的单糖水解方法检测化合物 6 的单糖组成, 表明化合物 6 的单糖组成为 D-Glc 和 L-Rha (1 : 1)。在 1H NMR 谱中显示 2 个糖基的端基氢信号为 δ_H 5.04 (d, $J = 7.63$ Hz, Glc) 和 6.43 (br s, Rha), 在 HSQC 谱中分别对应化学位移为 δ_c 100.8 和 102.3 的端基碳信号。在 HMBC 谱中, Rha 的 H-1 与 Glc 的 C-2 存在远程相关, 表明 Rha 连接于 Glc 的 2 位。Glc 的 H-1 与苷元 C-3 存在远程相关, 说明 Glc 连接于苷元 C-3 位; 通过 2D NMR 分析归属了化合物 6 的碳氢信号, 苷元和糖基的碳谱数据见表 1。对比发现化合物 6 的波谱数据与文献^[17]报道的化合物基本一致, 从而确定化合物 6 为 (3 β , 25*R*)-3-羟基螺甾烷 -5-烯 -7-酮 -3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基 - (1 \rightarrow 2) - β -D-吡喃葡萄糖苷。

4 结果与讨论

重楼作为一种珍贵的中药材, 它不仅是中药临床常用饮片之一, 更是云南白药、热毒清片等众多中成药的关键原料。正是这种高需求性, 使得重楼的自然更新速度难以跟上消耗的步伐, 导致野生资源日益稀缺^[18]。因此, 寻找重楼的优质种源, 对其进行有效的资源保护迫在眉睫。

尽管在重楼属植物的化学成分和药理作用研究方面已取得了显著的进展, 但目前的研究大多集中于云南重楼, 对于同样作为基原植物的华重楼, 相关研究还较少。本研究通过运用一系列色谱分离技术和波谱解析技术, 从陕产华重楼的根茎部分成功分离并鉴定出 6 种化合物, 其中化合物 2、4 和 6 是首次从华重楼中分离获得, 而化合物 4、6 曾在云南重楼中被发现^[16-17], 化合物 2 仅在石生蝇子草^[7]、漆姑草^[19]中被发现。这些化合物中只有化合物 4 被研究发现有抗甲状腺癌的药理活性^[20], 而其他化合物的药理作用并未被研究。因此本研究不仅丰富了华重楼的化学成分库, 也

表 1 化合物 1 ~ 6 的 ¹³C-NMR 数据 (200 MHz, C₅D₅N)
Tab 1 ¹³C-NMR data of compounds 1 ~ 6 (200 MHz, C₅D₅N)

编号	化合物					
	1	2	3	4	5	6
1	37.3	37.3	38.4	37.7	38.6	36.8
2	68.4	68.6	30.7	30.4	30.8	30.1
3	68.6	68.4	79.2	78.2	79.1	77.2
4	32.8	32.8	39.5	39.1	39.5	39.2
5	51.7	51.7	142.3	141.0	141.9	165.6
6	206.4	206.4	122.4	121.9	122.6	126.6
7	122.1	122.0	32.6	32.4	33.2	201.4
8	168.0	167.9	31.5	31.8	33.3	45.3
9	35.0	34.9	52.1	50.4	51.5	50.1
10	39.2	39.1	38.1	37.3	38.0	39.1
11	21.5	21.4	21.8	21.3	21.7	21.4
12	32.4	32.2	36.0	40.0	32.9	39.2
13	48.1	48.2	47.3	40.6	45.9	41.5
14	85.2	85.1	57.8	56.8	53.9	50.3
15	31.7	31.6	33.3	32.0	32.1	34.7
16	21.4	21.6	147.4	81.3	90.5	81.7
17	50.5	51.7	156.4	63.0	91.3	62.2
18	18.1	18.0	16.1	16.5	17.5	16.8
19	24.4	24.3	19.8	19.6	19.9	17.4
20	77.9	76.9	199.4	42.1	45.5	42.3
21	21.1	20.6	27.1	15.2	9.15	15.5
22	78.3	85.4		109.5	110.9	109.6
23	27.3	28.3		32.5	32.5	32.1
24	42.3	39.5		29.4	29.4	29.6
25	71.3	81.7		30.8	31.3	30.9
26	29.7	28.1		67.0	67.7	67.1
27	28.9	28.2		17.5	17.6	17.7
Glc						
1			100.5	100.5	100.5	100.9
2			79.0	78.2	79.0	77.8
3			79.4	79.7	79.4	79.9
4			71.8	72.0	71.8	72.1
5			77.7	78.4	77.7	78.8
6			62.8	62.8	62.7	63.0
Rha						
1			102.2	102.3	102.2	102.3
2			72.2	72.7	72.2	72.9
3			72.4	73.0	72.4	73.1
4			73.9	74.3	73.9	74.5
5			69.7	69.7	69.7	69.8
6			18.0	18.9	18.0	19.0

为其药理活性研究提供了新的线索。未来, 本课题组将进一步开展化学和药理活性研究, 为明确华重楼治疗疾病的药效物质基础提供科学依据。

参考文献

[1] Yu LL, Ling SS, Gao WT, et al. Parisfargosides A-E, five new cholestane glycosides from the rhizomes of *Paris fargesii* [J]. *Fitoterapia*, 2022, 158: 105174.
[2] Ding YG, Zhao YL, Zhang J, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Paris* L. (Liliaceae): a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114293.

[3] Wei JC, Gao WY, Yan XD, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Paris* [J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11 (9): 1277-1297.
[4] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 520-522.
[5] 程虎印, 徐进, 颜永刚, 等. 陕产重楼属药用植物的研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2017, 40 (1): 107-111.
[6] Pis J, Budesinsky M, Vokac K, et al. Ecdysteroids from the roots of *Leuzea carthamoides* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37 (3): 707-711.
[7] Liang XF, Li YZ, Fan H, et al. Chemical constituents from the roots and rhizomes of *Silene tatarinowii* Regel [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2019, 86: 103932
[8] Qin XJ, Yu MY, Ni W, et al. Steroidal saponins from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 121: 20-29.
[9] 樊培, 陆云阳, 刘杨, 等. 巴山重楼的皂苷类化学成分研究 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (5): 794-800.
[10] Kasai R, Okihara M, Asakawa J, et al. ¹³C NMR study of α -anomeric and β -anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides [J]. *Tetrahedron*, 1979, 35: 1427-1432.
[11] Yin J, Kouda K, Tezuka Y, et al. Steroidal glycosides from the rhizomes of *Dioscorea spongiosa* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66 (5): 646-50.
[12] Wei JC, Gao WY, Yan XD, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Paris* [J]. *Chem Biodivers*, 2014, 11 (9): 1277-1297.
[13] Qin XJ, Zhang LJ, Zhang Y, et al. Polyphyllsides A-F, six new spirostanol saponins from the stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103788.
[14] Agrawal PK, Jain DC, Gupta RK, et al. Carbon-¹³NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24 (11): 2479-2496.
[15] Liu Y, Wang MC, Liu K, et al. New steroidal saponins from the rhizomes of *Paris vietnamensis* and their cytotoxicity [J]. *Molecules*, 2018, 23 (3): 588.
[16] Zhao Y, Kang LP, Liu YX, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75 (4): 356-363.
[17] Wu X, Wang L, Wang H, et al. Steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 2012, 81: 133-143.
[18] 张翔宇, 陈晓芳, 柳敏, 等. 重楼属药用植物资源分布及少数民族应用研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2023, 42 (1): 103-109, 116.
[19] Jia AQ, Li Y, Zhou J, et al. Three phytoecdysteroids from *Sagina japonica* and potential biotransforming pathways of japonicone [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46: 738-741.
[20] Liu YY, Guo YW, Zeng Q, et al. Prosapogenin A induces GSDME-dependent pyroptosis of anaplastic thyroid cancer through vacuolar ATPase activation-mediated lysosomal over-acidification [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15 (8): 586.
(收稿日期: 2024-09-19; 修回日期: 2024-10-08)

天然产物香草木宁的大规模全合成

张引弟^{1,2}, 方静^{1,2}, 蒋跃平^{1,2}, 葛成昱^{1,2}, 尚恺琪^{1,2}, 刘韶^{1,2*} (1. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心, 长沙 410008)

摘要: **目的** 对从芸香科植物芸香中分离得到的抗肾纤维化活性天然产物香草木宁进行化学全合成研究, 以实现大规模制备。**方法** 该合成路线使用廉价的市售化工材料 3, 4-二甲氧基苯胺为起始原料, 经缩合、加热环化、氯代、氢化还原、脱水消除和烷氧取代六步反应合成得到香草木宁。**结果** 最终得香草木宁的总产率为 25%, 纯度大于 95%。**结论** 本文完成了香草木宁的克级规模首次化学合成, 且六步反应仅通过单次柱层析纯化即得天然产物纯品, 方法成本低、简单易行、绿色高效, 为大规模制备香草木宁提供了新方法, 为后续香草木宁的药物开发奠定了基础。

关键词: 香草木宁; 化学合成; 工艺优化; 大规模制备

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0046-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.007

Large-scale total synthesis of natural product kokusaginine

ZHANG Yin-di^{1,2}, FANG Jing^{1,2}, JIANG Yue-ping^{1,2}, GE Cheng-yu^{1,2}, SHANG Kai-qi^{1,2}, LIU Shao^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 2. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Objective To achieve large-scale total synthesis of the anti-renal fibrosis compound kokusaginine, which is isolated from *Ruta graveolens* L.(Rutaceae). **Methods** The synthesis route used inexpensive and commercially available chemical material, 3, 4-dimethoxyaniline, as the starting compound. The synthesis involved six steps: condensation, thermal cyclization, chlorination, hydrogenation-reduction, dehydration-elimination, and alkoxy substitution. **Results** Finally the total yield of kokusaginine was 25%, with purity higher than 95%. **Conclusion** This study has successfully achieved the first chemical synthesis of kokusaginine on a gram scale. Notably, the six-step reaction yields the pure natural product through a single round of column chromatography. This method is cost-effective, straightforward, and environmentally friendly, providing a new approach for the large-scale production of kokusaginine and future drug development.

Key words: kokusaginine; chemical synthesis; process optimization; large-scale preparation

芸香科植物是我国传统中药的重要来源。该科有 1600 多种具有药用价值的植物, 如陈皮、枳实和佛手等^[1]。芸香 (*Ruta graveolens* L.) 属于芸香科芸香属, 是一种多年生草本药用植物, 主要含挥发油、脂肪油、黄酮类、生物碱、香豆素类等成分^[2]。香草木宁于 1933 年首次从芸香根皮中分离, 外观呈白色粉末, 弱碱性, 溶液具有强

烈的荧光^[3]。后续研究表明, 该化合物具有多种生物活性, 如抗阿尔茨海默病^[4]、抗血小板聚集活性^[5]、抗多药耐药^[6]、抗肿瘤^[7]、抗菌^[8]、抗锥虫活性^[9]、抗病毒活性^[10]等作用, 本课题组前期经生物学评价, 发现香草木宁在体内体外均表现出优良的抗肾纤维化的活性^[11]。然而, 从植物中提取和分离香草木宁的成本过于高昂且不符合

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No. 2024JJ8111)。

作者简介: 张引弟, 女, 硕士, 主要从事药物化学研究, email: 228112404@csu.edu.cn * 通信作者: 刘韶, 男, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事中药和新药研发相关研究, email: liushao999@csu.edu.cn

环保标准,市售香草木宁的价格也十分昂贵且供应量有限。因此,本研究采用廉价的市售化工材料 3,4-二甲氧基苯胺为起始原料,经缩合、加热环化、氯代、氢化还原、脱水消除和烷氧取代六步反应,进行香草木宁的全合成,方法简单,成本低,简单易行,绿色环保,现报道如下。

1 材料

Varian INOVA-400FT 核磁共振仪、Varian INOVA-500FT 核磁共振仪、Varian INOVA-600FT 核磁共振仪(美国 Varian 公司);旋转蒸发器 RE-2000B/E、百里奚真空泵 DVP-12、冷冻干燥机 BILON-FD80BD、超声波清洗机 BILON3-120C(上海比朗仪器制造有限公司);搅拌台、加热套(德国 IKA 集团)。

氘代氯仿、三氯氧磷(POCl_3)、二氯亚砷(SOCl_2)、甲基三辛基氯化铵($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2]_3\text{N}(\text{Cl})\text{CH}_3$)、氢化锂铝(LiAlH_4)、硼氢化钠(NaBH_4)、氰基硼氢化钠(NaBH_3CN)、三乙酰氧基硼氢化钠 $[\text{NaBH}(\text{OAc})_3]$ (阿达玛斯试剂有限公司);氘代二甲基亚砷、二苯醚(Ph_2O)(北京伊诺凯科技有限公司);3,4-二甲氧基苯胺、丙二酸二乙酯(上海毕得医药科技股份有限公司);氢化钠(NaH)、四氢呋喃(THF)、氯乙酰氯(ClAcCl)、二氯甲烷(CH_2Cl_2)、甲醇(MeOH)、硫酸氢钾(KHSO_4)、1,4-二氧六环(1,4-dioxane)、甲醇钠

(MeONa)、草酰氯(安耐吉医药化学有限公司);三乙胺(TEA)、*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)(阿拉丁试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 合成路线

香草木宁的基本结构单元为 4,6,7-三甲氧基呋喃[2,3-*b*]喹啉。该分子包括三个基本区域:苯环区、吡啶环区和呋喃环区。其中,苯环区相对稳定,而吡啶环区和呋喃环区较为不稳定,可通过后续反应生成。因此,本研究以 3,4-二甲氧基苯胺作为起始原料,同时借助丙二酸二乙酯的自缩合反应合成呋喃酮(如图 1 所示)。随后,在碱性条件下通过 C-N 缩合反应合成中间体 YD-1^[12]。获得中间体 YD-1 后,选择在高温溶剂中加热以实现环化反应,从而生成吡啶环,构建香草木宁的基本骨架 YD-2。接下来,在表面活性剂甲基三辛基氯化铵和催化剂三氯氧磷的协同作用下,进行氯代反应,生成关键中间体 YD-3^[13],此时,可以选择以下两条合成路线:第一条路线,针对呋喃酮的环结构进行还原^[14]和消除反应^[15],以获得呋喃环的母核结构,随后通过亲核取代反应合成目标产物;第二条路线,通过亲核取代反应在吡啶环上引入甲氧基取代基,并对呋喃酮进行还原反应,在路易斯酸的存在下进行进一步的还原反应^[16],以获得最终产物。

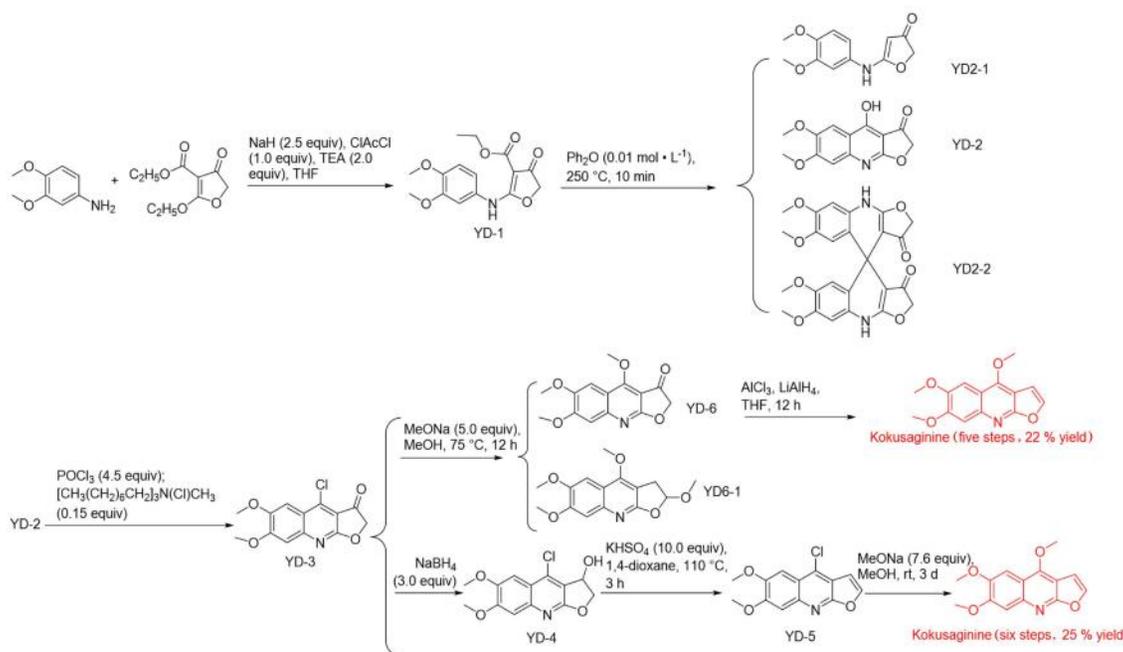


图 1 香草木宁的全合成路线

Fig 1 The total synthesis route of kokusaginine

2.2 化学合成

2.2.1 路线一

① 化合物 YD-1 的合成: 在 500 mL 的圆底

瓶中, 22 g 氢化钠(60%)加入 75 mL 干燥四氢呋喃中分散, 冰浴搅拌, 1 h 内缓慢滴加丙二酸二乙酯(69 mL), 滴加完毕备用。另取 500 mL

反应瓶, 将氯乙酰氯 (19.2 mL) 用 102 mL 干燥四氢呋喃溶解后, 冰浴下将前一步制备的溶液 1 h 内缓慢滴加入该反应瓶, 控制反应温度低于 30 °C。滴毕后室温搅拌 1 h, 随后加入三乙胺 (60.6 mL), 继续搅拌 2 h。随后在冰浴下, 1 h 内缓慢滴加 3, 4-二甲氧基苯胺 (35.1 g) 的四氢呋喃 (150 mL) 溶液, 控制温度不超过 30 °C, 滴毕后室温搅拌过夜。薄层色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 1 : 1) 监测原料反应完全后, 减压浓缩除去四氢呋喃, 加入 100 mL 乙酸乙酯和 50 mL 水萃取, 有机相过滤, 可得化合物 YD-1 纯品 40 g。水相用乙酸乙酯多次萃取后, 将滤液的有机相干燥, 减压浓缩后用乙醚搅拌分散, 过滤得到粗品, 粗品加入 50 mL 乙醇重结晶得 9.3 g 化合物 YD-1, 灰白色固体, 产率 71%。

针对第一步 C-N 缩合反应, 本研究比较了氢氧化钠的当量、催化剂的类型 (即碱性条件的选择) 以及反应温度对反应的影响。结果发现在氢氧化钠的当量为 2.5 eq 时产率最高, 增加或减少其当量都会使产率明显降低, 催化剂为三乙胺, 室温反应时可得最高产率。因条件筛选时本研究选的毫克级原料投入反应, 无法重结晶使得产率整体偏低, 在大批量生产时, 本研究主要以重结晶为主, 采用氢氧化钠当量为 2.5 eq, 催化剂为三乙胺, 温度为 90 °C 的条件进行反应, 使得产率大幅提升, 可达 71%。

YD-1 核磁数据为: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 9.26 (s, 1H), 6.23 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.19 ~ 6.05 (m, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.89 (d, $J = 1.5$ Hz, 6H), 1.63 (dt, $J = 3.6, 1.8$ Hz, 6H)。 $^1\text{HR-MS}$: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_6$, 理论值: 308.1129 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 实测值: 308.1148。

② 化合物 YD-2 的合成: 在 1000 mL 反应瓶中, 将化合物 YD-1 (5 g) 用 30 mL (0.5 mol · L⁻¹) 二苯醚超声分散成混悬液, 缓慢加入 600 mL (0.02 mol · L⁻¹) 煮沸的二苯醚中, 回流 10 min, 薄层色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 1 : 1) 分析原料反应完全, 薄层色谱 (二氯甲烷 - 甲醇 = 10 : 1) 监测产物已生成, 冷却至室温; 将反应液倒入 1000 mL 石油醚中, 将产生的固体过滤, 滤饼用石油醚淋洗, 得到 4.3 g 褐色固体化合物 YD-2 粗品, 产率为 81%。

在 YD-2 的合成过程中, 本研究主要对反应温度和反应浓度进行了研究, 发现在温度低于 250 °C 时, 化合物 YD-1 会脱掉酯, 生成 YD-2-1 (MS: 235.9, 结构式见图 1)。当反应浓度过高

时, YD-1 会发生分子间反应, 主要生成 YD-2-2 (MS: 464.9, 结构式见图 1)。在反应浓度降为 0.02 mol · L⁻¹ 时, 主要成分为 YD-2 (MS: 261.9)。

YD-2 核磁数据为: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ : 7.22 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H)。HR-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$, 理论值: 262.0710 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 实测值: 262.0724。

③ 化合物 YD-3 的合成: 在 100 mL 的反应瓶中加入 6 g YD-2, 加入 1 g 甲基三辛基氯化铵, N₂ 保护下, 加入 45 mL 二氯甲烷和 9 mL 三氯氧磷, N₂ 保护下回流 5 h, 薄层色谱 (二氯甲烷 - 甲醇 = 10 : 1 或石油醚 - 乙酸乙酯 = 1 : 1) 监测原料反应完全, 将反应液倒入 100 mL 碎冰中, 完全淬灭后, 加 Na₂CO₃/NaHCO₃ 调和呈中性, 加二氯甲烷萃取, 水相反萃取, 合并有机相, 浓缩后用二氯甲烷/石油醚重结晶, 过滤的化合物 YD-3 粗品 5.5 g。产率为 85%。

本研究主要对 YD-3 的合成过程中的催化剂和溶剂进行了筛选, 如表 1 所示, 当使用其他氧化剂如 SOCl₂、草酰氯时, 产率颇低, 当直接用 POCl₃ 作为溶剂时, 产率虽有所升高, 但仍相对较低; 当催化剂作为 POCl₃, 且添加表面活性剂甲基三辛基氯化铵并以二氯甲烷作为溶剂时, 产率大幅提升, 达 85%。

表 1 中间体 YD-3 氯代反应的条件优化

Tab 1 Optimization of conditions for intermediate YD-3 chlorination reaction

催化剂	表面活性剂	溶剂	温度	产率/%
SOCl ₂	[CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂] ₃ N(Cl)CH ₃	CH ₂ Cl ₂	50 °C	0
草酰氯	[CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂] ₃ N(Cl)CH ₃	CH ₂ Cl ₂	50 °C	26
POCl ₃	[CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂] ₃ N(Cl)CH ₃	—	rt	35
POCl ₃	—	CH ₂ Cl ₂	50 °C	48
POCl ₃	[CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂] ₃ N(Cl)CH ₃	CH ₂ Cl ₂	50 °C	85

YD-3 核磁数据为: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ : 7.46 (s, 1H), 7.41 ~ 7.31 (m, 1H), 5.33 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.97 (s, 3H)。HR-MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_4$, 理论值: 280.0371 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 实测值: 280.0388。

④ 化合物 YD-4 的合成: 上一步的化合物 YD-3 用 200 mL (0.1 mol · L⁻¹) 二氯甲烷 - 甲醇 = 1 : 1 混合溶剂溶解, 冰浴下加入 3.72 g 硼氢化钠 (5.0 eq), 室温搅拌反应 1 h。薄层色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 1 : 1) 分析原料反应完全后, 加入 10 mL 水淬灭硼氢化钠, 40 °C 下减压除去二氯甲烷和甲醇, 二氯甲烷 (3 × 100 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩除去二氯甲烷得化合物 YD-4 粗品 5.88 g, 产率为 90%。

在 YD-4 的合成过程中, 本研究主要对还原

剂进行了筛选, 结果如表 2 所示, 使用硼氢化钠还原时, 产率最高 (90%)。

表 2 中间体 YD-4 还原反应的条件优化

Tab 2 Optimization of conditions for intermediate YD-4 reduction reaction

还原剂	产率 /%
NaBH ₃ CN	0
NaBH(OAc) ₃	35
LiAlH ₄	44
NaBH ₄	90

YD-4 核磁数据为: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.21 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 4.73 (dd, *J* = 10.5, 6.6 Hz, 1H), 4.63 (dd, *J* = 10.5, 2.3 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.05 (s, 1H)。HR-MS: C₁₃H₁₂ClNO₄, 理论值: 282.0528 [M + H]⁺, 实测值: 282.0553。

⑤ 化合物 YD-5 的合成: 化合物 YD-4 加入干燥的 1, 4-二氧六环 (200 mL, 0.1 mol·L⁻¹) 搅拌, 加入硫酸氢钾 14 g (5.0 eq), 升温至 110 °C 回流搅拌过夜。薄层色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 2 : 1) 分析原料反应完全, 减压除去二氧六环, 加 100 mL 二氯甲烷萃取, 饱和碳酸钠水溶液 (3 × 50 mL) 洗涤至中性, 水相用二氯甲烷 (3 × 100 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到化合物 YD-5 粗品 5.1 g, 产率为 93%。

YD-5 核磁数据为: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.74 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.94 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 4.06 (s, 3H)。HR-MS: C₁₃H₁₀ClNO₃, 理论值: 264.0422 [M + H]⁺, 实测值: 264.0446。

⑥ 化合物 YD-6 (香草木宁) 的合成: 化合物 YD-5 粗品加入甲醇 (135 mL, 0.15 mol·L⁻¹) 室温搅拌, 加入甲醇钠甲醇溶液 (5.4 mol·L⁻¹) 7.9 mL (7.6 eq), 40 ~ 50 °C 加热回流反应 3 d。薄层色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 1 : 1) 分析原料反应完全, 40 °C 减压除去甲醇, 加入 100 mL 二氯甲烷和 30 mL 水萃取, 水相用二氯甲烷 (3 × 100 mL) 萃取, 合并干燥, 过滤浓缩得到粗品, 粗品经硅胶正相层析柱分离 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 3 : 1 ~ 1 : 1), 得到香草木宁 3.0 g, 产率 60%, 六步总产率 25%。

在 YD-6 的合成过程中, 本研究对条件进行了优化, 结果如表 3 所示。反应会生成副产物 YD 6-1 (结构式见图 1)。HR-MS: C₁₅H₁₇NO₅, 理论值: 292.1179 [M + H]⁺, 实测值: 292.1190。核磁数据为: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.34 (s, 1H),

6.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.96 ~ 4.89 (m, 1H), 4.03 ~ 3.99 (m, 2H), 3.96 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 3.39 (s, 6H), 3.26 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H)。温度在 40 ~ 50 °C 时, 反应时间延长, 但无副产物生成。

表 3 香草木宁烷氧取代反应的条件优化

Tab 3 Optimization of conditions for kokusaginine alkoxy substitution reaction

反应条件	产率 /%
50 °C, 回流	60
90 °C, 封管	43

香草木宁的核磁数据: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.56 (t, *J* = 11.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.45 (s, 3H), 4.03 (s, 7H)。HR-MS: C₁₄H₁₃NO₅, 理论值: 276.0866 [M + H]⁺, 实测值: 276.0894。

2.2.2 路线二 前三步反应同“2.2.1”项下, 合成化合物 YD-3 后再进行后续反应, 该方法共需五步即可获得最终产物。在保持相同总产率的条件下, 可替代 NaBH₄ 的使用, 且所需步骤更少, 耗时更短。

① YD-6 的合成: 在 N₂ 保护下, 在反应瓶加入 5 g YD-3 后, 加入 90 mL 甲醇作为溶剂, 加入 5 mL 甲醇钠甲醇溶液搅拌均匀后, 回流过夜, 薄层色谱检测反应完全后, 40 °C 下减压除去甲醇, 用二氯甲烷和水萃取, 水相反萃取后, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩除去二氯甲烷得化合物 YD-6 粗品 3.95 g, 产率 80%。核磁数据: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.41 (s, 1H), 7.20 ~ 7.18 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.61 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.96 (s, 3H)。HR-MS: C₁₄H₁₃NO₅, 理论值: 276.0866 [M + H]⁺, 实测值: 276.0894。

② 香草木宁的合成: 在反应瓶中加入 1 g YD-6 和 1.7 g 氯化铝后, N₂ 保护下加入 72 mL 四氢呋喃, 冰浴条件下分批次加入 0.24 g 氢化锂铝, 室温搅拌过夜, 薄层色谱监测反应完全后, 使用水 - 氢氧化钠 - 水淬灭反应后, 乙酸乙酯 / 饱和食盐水萃取后, 水相反萃取后, 浓缩有机相得粗品, 粗品经硅胶正相层析柱分离 (石油醚 - 乙酸乙酯 = 3 : 1 ~ 1 : 1), 得到香草木宁 0.52 g, 产率 55%, 核磁数据同“2.2.1”项下, 五步总产率 22%。

3 讨论

本研究以 3, 4-二甲基苯胺作为起始原料, 经过缩合、加热环化、氯代、氢化还原、脱水消除及烷氧取代六步反应, 首次实现了香草木宁的大规模全合成, 且总产率达到 25%。在此过程中,

所有中间体均可通过简单的萃取或重结晶即可直接用于后续反应, 操作简便, 收率高。

参考文献

- [1] Mutinda ES, Mkala EM, Nanjala C, et al. Traditional medicinal uses, pharmacology, phytochemistry, and distribution of the genus *fagaropsis* (rutaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114781.
- [2] Ombito JQ, Chi GF, Wansi JD. Ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *vepris* (rutaceae): a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113622.
- [3] Narahashi K. Alkaloids of the root-bark of *Orixa japonica* Thunb. XI. The structures of orixidine and orixidinine [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1962, 10: 792-803.
- [4] Belén Valdez M, Bernal Giménez DM, Fernández LR, et al. Antiparasitic derivatives of the furoquinoline alkaloids kokusaginine and flindersiamine [J]. *Chem Med Chem*, 2022, 17 (5): e202100784.
- [5] Chen KS, Chang YL, Teng CM, et al. Furoquinolines with antiplatelet aggregation activity from leaves of *Melicope confusa* [J]. *Planta Med*, 2000, 66 (1): 80-81.
- [6] Chen H, Li SG, Wang SB, et al. The inhibitory effect of kokusaginine on the growth of human breast cancer cells and MDR-resistant cells is mediated by the inhibition of tubulin assembly [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28 (14): 2490-2492.
- [7] Molnár J, Ocsosvzki I, Puskás L, et al. Investigation of the antiproliferative action of the quinoline alkaloids kokusaginine and skimmianine on human cell lines [J]. *Curr Signal Transd T*, 2013, 8 (2): 148-155.
- [8] Hanawa F, Fokialakis N, Skaltsounis AL. Photo-activated DNA binding and antimicrobial activities of furoquinoline and pyranoquinolone alkaloids from rutaceae [J]. *Planta Med*, 2004, 70 (6): 531-535.
- [9] Valdez MB, Giménez DMB, Fernández LR, et al. Antiparasitic derivatives of the furoquinoline alkaloids kokusaginine and flindersiamine [J]. *Chem Med Chem*, 2022, 17 (5): e202100784.
- [10] Wahyuni TS, Widawaruyanti A, Lusida MI, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves [J]. *Fito-terapia*, 2014, 99: 276-283.
- [11] Wang YX, Han YY, Shang KQ, et al. Kokusaginine attenuates renal fibrosis by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 175: 116695.
- [12] Lohar MV, Mundada R, Bhonde M, et al. Design and synthesis of novel furoquinoline based inhibitors of multiple targets in the PI3K/Akt-mTOR pathway [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18 (12): 3603-3606.
- [13] Li YY, Shi XF, Xie N, et al. 3, 3-dimethyl-1H-pyrrolo[3, 2-g]quinolin-2 (3H)-one derivatives as novel Raf kinase inhibitors [J]. *Med Chem Commun*, 2013, 4 (2): 367-370.
- [14] Chen Q, Smith A. I-like 3-deazaneplanocin analogues: synthesis and antiviral properties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29 (19): 126613.
- [15] Kuo SC, Huang SC, Huang LJ, et al. Nakamura, studies of heterocyclic compounds. VIII. Synthesis, anti-inflammatory and antiallergic activities of *n*-alkyl-2, 3, 4, 9-tetrahydrofuro[2, 3-b]quinoline-3, 4-diones and related compounds [J]. *J Heterocyclic Chem*, 2009, 28: 955-963.
- [16] Nguyen ST, Williams JD, Majgier-Baranowska J, et al. Concise synthesis of 6-cyanobenzo[b]furan, a useful building block [J]. *Synth Commun*, 2014, 44 (9): 1307-1313.

(收稿日期: 2024-08-21; 修回日期: 2024-10-23)

基于 GC-MS 技术分析金钱白花蛇蛇油不同脱腥方法差异

胡祖成, 董爽, 张馨雨, 王浩捷, 闫丽文, 张芹, 张丽群, 陆洋* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 对比研究不同脱腥方法对金钱白花蛇蛇油的脱腥效果。**方法** 采用水蒸气蒸馏、活性炭吸附、氧化脱腥法脱腥处理蛇油, 对三种脱腥方法进行单因素试验优化, 感官评价各方法的脱腥效果; 通过气质联用 (GC-MS) 法检测各脱腥法脱腥前后蛇油的脂肪酸成分, 采用顶空固相微萃取-气质联用 (HS-SPME-GC-MS) 分析各脱腥方法脱腥前后蛇油的挥发性成分, 采用分层聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 对脂肪酸成分进行分析, 采用气味活度值法 (OAV) 评价各挥发性成分对气味的贡献。**结果** 腥味脱除效果: 水蒸气蒸馏法 > 氧化脱腥法 > 活性炭吸附法, 水蒸气蒸馏法脱腥后脂肪酸成分构成最接近脱腥前。**结论** 水蒸气蒸馏法对金钱白花蛇蛇油影响最小, 脱腥效果最优, 建立的分析方法可为金钱白花蛇蛇油开发利用提供参考。

关键词: 金钱白花蛇; 蛇油; 脱腥; 气质联用; 顶空固相微萃取

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0051-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.008

Differences in deodorization methods for *Bungarus multicinctus* oil by GC-MS spectrometry

HU Zu-cheng, DONG Shuang, ZHANG Xin-yu, WANG Hao-jie, YAN Li-wen, ZHANG Qin, ZHANG Li-qun, LU Yang* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To compare the efficacy of different deodorization methods on the odor from the oil of *Bungarus multicinctus*. **Methods** The deodorization treatments used for snake oil included steam distillation, activated carbon adsorption, and oxidative deodorization. Single-factor experiments were conducted to optimize each deodorization method, and sensory evaluations were performed to assess the effectiveness of each. The fatty acid composition of the snake oil before and after the deodorization were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The volatile components before and after the deodorization were analyzed with headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were employed to analyze the fatty acid compositions. The odor activity value (OAV) was used to evaluate the contribution of each volatile component to the overall odor. **Results** The steam distillation method showed the best deodorization effect, followed by oxidative deodorization, with activated carbon adsorption being the least effective. After steam distillation, the fatty acid compositions of the snake oil were most similar to those before the deodorization. **Conclusion** Steam distillation has the minimal impact on the oil of *Bungarus multicinctus* but with the optimal deodorization effect. The established analytical methods provide a reference for the development and utilization of *Bungarus multicinctus* oil.

Key words: *Bungarus multicinctus*; snake oil; deodorization; GC-MS; HS-SPME

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82173989)。

作者简介: 胡祖成, 男, 在读硕士研究生, 主要从事传统油类中药开发方面的研究, email: huzuc36@163.com *通信作者: 陆洋, 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术、传统油类中药开发方面的研究, email: luyang@bucm.edu.cn

金钱白花蛇为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth 的幼蛇干燥体, 为前沟牙类毒蛇。一般取完蛇毒蛇胆后, 会将其脂肪组织进一步炼制成蛇油。《本草纲目》中记载, 蛇脂“绵裹塞耳聋, 亦傅肿毒”, 又“摩着物, 皆透也”。蛇油现被证实具有抗炎、抗氧化等药理活性^[1-2], 具有较大的医疗及保健价值, 但它特有的腥味限制了其临床及市场应用。目前已有研究^[3-4]利用各种脱腥方法对动物脂肪油脱腥, 一些脱腥方法对油脂脂肪酸构成比的影响目前还少有报道。油脂的过度精炼处理可能会导致脂肪酸成分结构改变、活性成分丧失、反式脂肪酸等有害物质增加^[5]。有研究表明蛇油的抗氧化作用与其中含量高的大类脂肪酸组成及比例密切相关, 而抗炎活性可能还取决于一些其他低含量成分^[6]。金钱白花蛇蛇油的功效一定程度上取决于所有脂肪酸的综合构成比, 现有一些脱腥工艺可能会对蛇油原始脂肪酸的构成造成一定影响, 进而影响蛇油的功效。在腥味有效脱除的同时尽量降低对金钱白花蛇蛇油物质基底的影响, 是目前亟待解决的难题。本研究采用活性炭吸附、水蒸气蒸馏、氧化脱腥法处理金钱白花蛇蛇油, 对各方法进行单因素试验优化, 通过感官评分评价三种方法的腥味脱除效果, 以腥味值优选最佳脱腥工艺。GC-MS 技术是分析油类物质成分的重要手段, 具有良好的灵敏度、准确度及精密度, 结合顶空固相微萃取技术可在无溶剂情况下准确分析物质挥发性成分, 高效便捷^[7-8]。本研究通过 GC-MS 并结合多元统计方法评估各方法最佳脱腥工艺处理对蛇油脂肪酸成分的影响, HS-SPME-GC-MS 分析各方法最佳脱腥工艺处理后蛇油挥发性成分的变化, 结合气味活度值法 (OAV) 分析关键挥发性成分对气味的贡献, 直观探究腥味的脱除效果, 为科学改善金钱白花蛇蛇油腥味提供参考。

1 材料

Agilent 7980B/5977 GC-MS 气相色谱质谱联用仪; HP-5ms 色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm, Agilent); SPME 纤维头、顶空瓶 (Agilent); HJ-4H 多头恒温磁力搅拌器 (常州市凯航仪器有限公司); 涡旋振荡仪 (MS-X, DragonLab); TGL-16 型医用离心机 (长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); 赛多利斯 BSA 223S 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; 电热套 (北京科伟永兴仪器有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9140A 型, 上海一恒科学仪器有限公司); 新鲜金钱白花蛇脂肪 (北京

建生药业有限公司); 活性炭 [200 目, 赞城 (天津) 科技有限公司]; 30% 过氧化氢 (北京市通广精细化工公司); 2-甲基-3-庚酮 (国药集团化学试剂有限公司); 37 种脂肪酸甲酯混标 (批号: B25881, 上海源叶生物科技有限公司, 每种脂肪酸甲酯纯度均 > 99%); 氢氧化钾、甲醇、正己烷、氯化钠、无水乙醇均为分析纯。

2 方法

2.1 蛇油脱腥前处理

金钱白花蛇脂肪洗净剪碎后, 电陶炉文火炼制, 过滤得到炼制蛇油, 再经过脱酸处理^[9], 加入适量氢氧化钾至油液 pH 呈中性, 经沉降、离心、过滤得到脱腥前蛇油。

2.2 脱腥方法

比较活性炭吸附法、水蒸气蒸馏法、氧化脱腥法对蛇油的脱腥效果, 通过感官评分优选最佳脱腥工艺。

2.2.1 活性炭吸附法 考察活性炭添加量对脱腥效果的影响, 活性炭预先放入 100 °C 烘箱中活化 1 h, 在 20 g 蛇油样品中加入 0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% 活性炭 (200 目), 然后在 40 °C 水浴条件下磁力搅拌 5 min, 抽滤, 得到脱腥蛇油。

2.2.2 水蒸气蒸馏法 考察水蒸气通入时间对脱腥效果的影响, 在水蒸气蒸馏装置中放入 20 g 蛇油样品, 采用最大蒸汽流量分别蒸馏 20、30、40、50、60 min, 待油温降至室温后取出样品, 静置、离心, 分取上层油液, 得到脱腥蛇油。

2.2.3 氧化脱腥法 考察过氧化氢加入量对脱腥效果的影响, 在 20 g 蛇油中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 30% 过氧化氢, 然后在 40 °C 水浴条件下磁力搅拌 5 min, 静置, 分取上层油液, 加入一定量的氢氧化钾直至油液 pH 呈中性, 离心, 得到脱腥蛇油。

2.3 感官评价

以腥臭味感官评价为指标, 参考邢贵鹏等^[3]的方法并稍加改进, 采用较高温度 (70 °C) 激发样品气味, 选取 10 名志愿者对各个样品的腥味值进行打分 (10 分制): 0 分, 无腥味; 1~2 分, 略有腥味; 3~4 分, 腥味较弱; 5~6 分, 腥味一般; 7~8 分, 腥味偏重; 9~10 分, 腥味很重; 腥味越重评分越高。每个样品评定间隔 5 min, 并以蒸馏水清理口鼻腔。

2.4 蛇油脱腥前后脂肪酸成分检测

2.4.1 实验样品前处理 参考庄红等^[10]的甲酯化方法, 取 1 mL 蛇油样品, 加入 2.5 mL 氢氧化钾-甲醇溶液 (2 mol·L⁻¹), 40 °C 水浴 20 min 进行脂

肪酸甲酯化, 加入 2.5 mL 正己烷, 旋涡 30 s, 静置分层后, 取上层正己烷溶液适当稀释, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 置于样品瓶中待测。

2.4.2 脂肪酸成分 GC-MS 检测

① GC 条件: HP-5ms 色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm, Agilent); 载气为氦气; 进样口温度为 320 °C; 程序升温为初温 50 °C 保持 2 min, 以 10 °C·min⁻¹ 上升至 180 °C, 保持 2 min, 以 5 °C·min⁻¹ 上升至 275 °C, 保持 10 min; 进样量为 1 μL; 不分流, 流速为 1 mL·min⁻¹; GC-MS 接口温度为 250 °C。

② MS 条件: 离子源为 EI; 离子源温度为 230 °C; 传输线温度为 260 °C; 溶剂延迟 3 min; 质量扫描范围 *m/z*: 40 ~ 500。

2.5 蛇油脱腥前后挥发性成分检测

2.5.1 蛇油挥发性成分顶空固相微萃取 (HS-SPME)

称取 1.0 g 样品至 20 mL 顶空瓶中, 加入适量饱和氯化钠, 加入内标 2-甲基-3-庚酮 (1 mg·mL⁻¹, 无水乙醇配制) 10 μL, 80 °C 水浴加热 30 min, 然后将顶空微萃取进样针扎入顶空瓶中继续加热 30 min 后, 250 °C 进样口解吸 5 min。

2.5.2 挥发性成分 GC-MS 检测

① GC 条件: HP-5ms 色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm, Agilent); 载气为氦气; 进样口温度为 250 °C; 程序升温为初温 50 °C, 以 5 °C·min⁻¹ 上升至 180 °C, 保持 5 min, 以 10 °C·min⁻¹ 上升至

250 °C, 保持 5 min; 进样量为 1 μL; 不分流, 流速为 1 mL·min⁻¹。

② MS 条件: 离子源为 EI; 离子源温度为 230 °C; 四极杆温度: 150 °C; 传输线温度为 280 °C; 质量扫描范围 *m/z*: 40 ~ 600。

2.6 数据分析

腥味值评价结果以 $\bar{x} \pm s$ 值表示, GC-MS 测定后经过质谱解卷积, 结果在 NIST 20 谱库中检索, 并结合脂肪酸甲酯对照品保留时间进行定性分析, 按峰面积归一化法确定蛇油中各脂肪酸成分的相对百分含量; 蛇油中挥发性成分通过内标法进行半定量分析, 其计算公式为: 挥发性成分含量 (%) = (各组分峰面积 × 内标浓度 × 内标体积) / (内标峰面积 × 样品质量) × 100%。

3 结果

3.1 脱腥效果感官评价

由感官评价结果可知, 脱腥前蛇油腥味较重, 经过三种脱腥方法处理后, 腥味值均有不同程度的降低。单因素试验结果表明, 活性炭吸附法的最佳活性炭添加量为 1.5%, 水蒸气蒸馏法的最优工艺为水蒸气通入 60 min, 氧化脱腥法的最优 30% 过氧化氢添加量为 0.8 mL。从最终腥味脱除效果来看, 水蒸气蒸馏法 > 氧化脱腥法 > 活性炭吸附法 (见图 1)。经水蒸气蒸馏脱腥 60 min 后, 蛇油腥味大大降低, 使用者普遍容易接受。

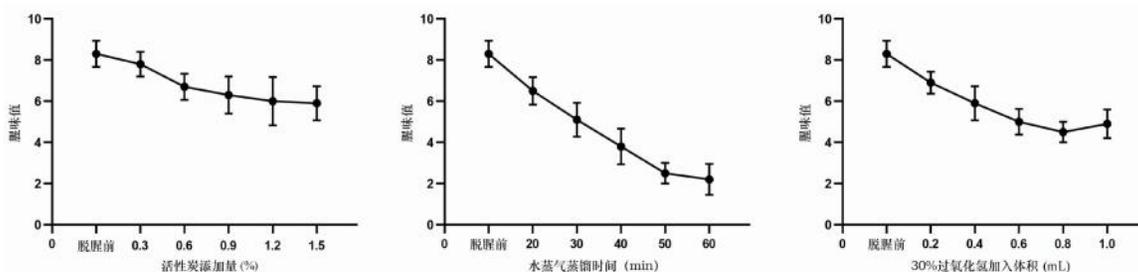


图 1 不同方法处理蛇油的脱腥效果

Fig 1 Deodorization effects of snake oil treated by different methods

3.2 脱腥前后脂肪酸成分分析

3.2.1 脱腥前后蛇油脂肪酸成分相对百分含量变化 对脱腥前蛇油及各脱腥方法最佳工艺脱腥后的蛇油样品进行脂肪酸成分 GC-MS 分析, 共鉴定出 26 种脂肪酸, 除此之外, 还有 1 种含量低的未知酸, 具体结果见表 1。由表 1 结果可知, 金钱白花蛇蛇油主要脂肪酸包括油酸、棕榈酸、硬脂酸、棕榈油酸等, 不饱和脂肪酸含量较高, 总占比超过 60%。仅从饱和 / 不饱和脂肪酸比例来看, 水蒸气蒸馏法脱腥后饱和脂肪酸总占比基本维持不变, 活性炭吸附法及氧化脱腥法脱腥后饱和脂肪酸占比略有降低, 水蒸气蒸馏法脱

腥对饱和 / 不饱和脂肪酸构成比影响最小。水蒸气蒸馏法脱腥后含量增多的主要为十七烷酸、9, 12-十八碳二烯酸 (亚油酸) 以及 4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸 (DPA), 含量降低的主要为 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸 (EPA)。十七烷酸具有一定的镇痛抗炎作用, 其他多不饱和脂肪酸对健康也具有积极作用。有研究表明, 局部涂抹富含 9, 12-十八碳二烯酸 (亚油酸) 的红花油能够通过抗炎机制预防并缓解偏头痛^[11], 膳食补充 DPA 能够增加溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群多样性并改变肠道菌群的组成^[12], 大鼠膳食补充 DPA 可在肝脏中转化为 4, 7, 10, 13, 16, 19-

表 1 金钱白花蛇蛇油各脱腥方法最佳工艺脱腥前后脂肪酸成分及相对百分含量

Tab 1 Fatty acid composition and relative percentage of *Bungarus multicinctus* oil before and after the deodorization using optimal conditions for each method

名称	碳数 / 不饱和数	相对百分含量 / %			
		脱腥前	活性炭吸附法	水蒸气蒸馏法	氧化脱腥法
月桂酸	C12: 0	0.53	0.35	—	—
肉豆蔻酸	C14: 0	2.26	1.10	1.14	1.43
十五烷酸	C15: 0	1.30	1.15	1.20	1.47
棕榈酸	C16: 0	21.36	18.57	20.68	19.04
棕榈油酸	C16: 1	5.45	4.70	4.89	5.56
顺-11-十六碳烯酸	C16: 1	0.39	—	—	0.41
14-甲基十六烷酸	C17: 0	2.48	0.82	1.53	1.10
顺-10-十七碳烯酸	C17: 1	0.60	0.54	1.23	0.74
十七烷酸	C17: 0	0.95	2.22	4.52	2.93
9, 12-十八碳二烯酸	C18: 2	—	0.35	2.85	—
油酸	C18: 1	39.60	37.23	38.89	39.04
硬脂酸	C18: 0	7.30	7.65	7.16	7.48
顺-10-十九碳烯酸	C19: 1	0.87	1.58	0.44	0.93
非腺果酸	C19: 0	—	0.40	—	—
5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸	C20: 4	2.23	3.88	2.23	2.60
5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸	C20: 5	3.30	3.51	—	0.71
8, 11, 14-二十碳三烯酸	C20: 3	0.73	1.33	0.55	0.84
γ -亚麻酸	C18: 3	0.51	0.98	—	0.61
顺-11-二十碳烯酸	C20: 1	3.38	6.55	3.15	4.12
花生酸	C20: 0	0.69	1.32	0.68	0.80
4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸	C22: 5	0.45	0.42	3.02	0.52
7, 10, 13, 16, 19-二十二碳五烯酸	C22: 5	—	—	—	2.79
4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸	C22: 6	1.50	1.42	1.53	1.90
顺-7, 10, 13, 16-二十二碳四烯酸	C22: 4	2.68	2.50	2.72	2.92
芥酸	C22: 1	0.45	0.45	0.49	0.94
神经酸	C24: 1	0.51	0.46	0.57	0.57
未知酸		0.49	0.52	0.53	0.59
饱和脂肪酸		36.88	33.58	36.90	34.25
不饱和脂肪酸		62.63	65.90	62.57	65.16
单不饱和脂肪酸		51.25	51.51	49.65	52.31
多不饱和脂肪酸		11.38	14.39	12.92	12.85

二十二碳六烯酸 (DHA), 并且还在肝脏、脂肪、心脏和骨骼肌中部分转化为 EPA^[13]。水蒸气蒸馏法脱腥后降低的 EPA 含量可能可以由含量增高的 DPA 在体内补充转化得到, 在一定程度上说明蛇油原生功效进行了有效延续。

3.2.2 分层聚类分析 (HCA) 对脱腥前后蛇油脂肪酸成分相对百分含量数据进行 HCA, 以评估不同脱腥方法所得脱腥蛇油的脂肪酸构成与脱腥前蛇油所存在的差异。结果表明上述四组 (脱腥前及三种脱腥法处理) 可分为两类, 其中水蒸气蒸馏法及氧化脱腥法所得脱腥蛇油脂肪酸构成与脱腥前蛇油较为相似, 可聚为一类, 活性炭吸附法为另一类, 可认为活性炭吸附法所得脱腥蛇油脂肪酸构成与脱腥前存在一定差异 (见图 2)。

3.2.3 主成分分析 (PCA) 采用 SIMIC 14.1 软件对脱腥前后蛇油脂肪酸相对百分含量数据进行 PCA, 共提取 3 个主成分, 主成分特征根及方差解

释率如表 2 所示, 累计方差解释率达到 100%, 表示这 3 个主成分能反映蛇油样品脂肪酸成分特征群。双标图结果显示 (见图 3), 水蒸气蒸馏法及氧化脱腥法的脂肪酸成分特征与脱腥前较为相似, 活性炭吸附法与脱腥前存在差异, 表明水蒸气蒸馏法及氧化脱腥法对蛇油原始脂肪酸构成影响较小, 能够最大程度地延续蛇油原本功效活性, 活性炭吸附法则存在一定影响, 与 HCA 结果一致。进一步通过线性组合系数矩阵计算各主成分得分, 再由公式 ($F = 0.485F_1 + 0.271F_2 + 0.244F_3$) 计算脱腥前后蛇油样品的综合得分, 结果可知活性炭吸附法得分最低, 水蒸气蒸馏法得分与脱腥前得分最为接近 (见表 3), 进一步表明水蒸气蒸馏法所得蛇油脂肪酸构成与脱腥前最为相似。

3.3 脱腥前后挥发性成分分析

3.3.1 脱腥前后挥发性成分类别及含量分析 经 HS-SPME-GC-MS 联用分析可知, 金钱白花蛇蛇

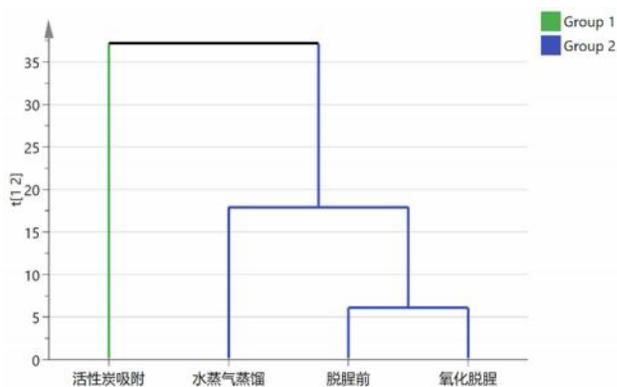


图 2 蛇油脂肪酸成分构成的聚类分析图

Fig 2 Cluster analysis of fatty acid composition in snake oil

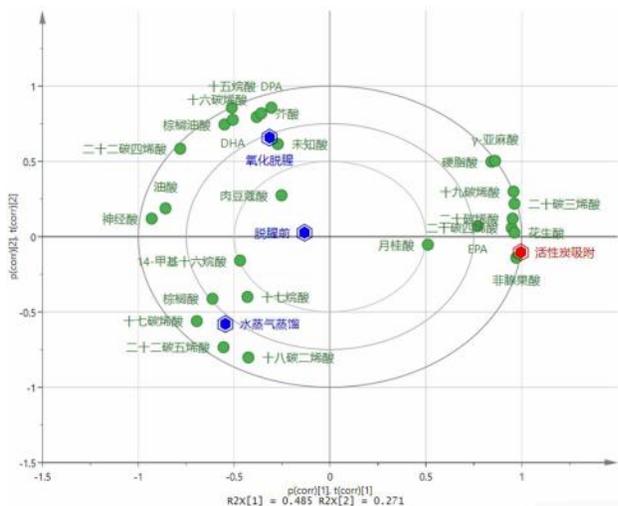


图 3 蛇油脂肪酸成分的 PCA 双标图

Fig 3 Biplot of PCA of fatty acid composition in snake oil

表 2 主成分特征值及方差解释率

Tab 2 Eigen value and variance explanation rate of principal components

主成分	特征根	方差解释率 /%	累计方差解释率 /%
PC1	13.108	48.549	48.549
PC2	7.306	27.059	75.608
PC3	6.586	24.392	100

表 3 脱腥前后蛇油样品的主成分得分及综合得分

Tab 3 Principal component scores and comprehensive scores of snake oil samples before and after the deodorization

组别	F ₁	F ₂	F ₃	F
脱腥前	0.70	0.16	- 3.81	- 0.55
水蒸气蒸馏	2.89	- 3.08	1.45	0.92
活性炭吸附	- 5.26	- 0.56	0.79	- 2.51
氧化脱腥	1.67	3.48	1.58	2.14

油脱腥前挥发性成分主要包括烃类、酯类、醛类、酮类、醇类、含氮化合物、硅氧烷类以及一些其他物质，具体结果见表 4。不同于其他植物油类，在脱腥前蛇油挥发性成分中含有较多含氮化合物，大部分有机含氮化合物具有特殊气味，如烯丙胺有较强烈的氨味和焦灼味，4-庚基苯胺有较

特殊的芳香气味，异氰酸异丙酯有较明显令人不愉快的气味，这些物质也可能是导致金钱白花蛇蛇油腥味严重，令人难以接受的原因，硅氧烷类化合物通常气味不明显。经三种方法脱腥后，蛇油的挥发性成分均发生了一定程度的变化，活性炭吸附法脱腥后挥发性成分总量略微下降，其中含氮化合物、醛类物质含量下降最多，酮类、酯类物质含量明显升高；水蒸气蒸馏法脱腥后挥发性成分总量下降最多，其中酯类、含氮化合物含量明显下降，醛类及酮类化合物完全脱除，醇类物质含量略有升高；氧化脱腥法脱腥后酯类、醛类、含氮化合物含量下降明显，三种脱腥方法对硅氧烷类化合物的含量均无明显影响（见图 4）。从总离子流图可看出，水蒸气蒸馏法脱腥后色谱峰数量明显减少（见图 5）。

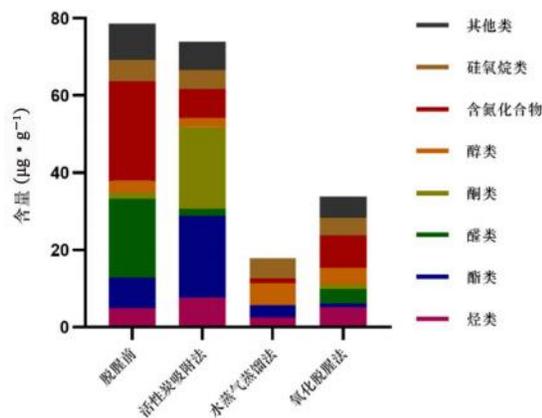


图 4 脱腥前后蛇油挥发性成分类别含量分析图

Fig 4 Volatile compound categories in snake oil before and after the deodorization

3.3.2 挥发性成分的气味活度值法 (OAV) 分析
挥发性成分含量的高低并不足以完全反映气味特征，蛇油的整体气味由挥发性成分的含量及其气味阈值共同决定，通常赋予蛇油特征气味的是具有较高 OAV 值的挥发性成分。有研究认为，OAV 大于 1 时表示此挥发性成分气味对整体气味具有一定修饰和影响作用，OAV 大于 10 时表示此挥发性成分气味对整体气味具有极大贡献^[14-15]。可计算气味活度值的挥发性成分共有 27 种^[16]（见表 5）。脱腥前，蛇油挥发性成分中 OAV 值较高的有 D-柠檬烯、戊酸酐、丙酸酐、2-丙烯醛、反-2-辛烯醛、壬醛、烯丙胺和十甲基环戊硅氧烷，在经过三种方法脱腥处理后，蛇油的挥发性成分发生了较大变化。活性炭吸附法脱腥后挥发性成分 OVA 值较高的有 1-乙基-2, 4-二甲基苯、丁二酸酐、2, 3-己二酮、2, 3-庚烷二酮、异佛尔酮、十甲基环戊硅氧烷、2-戊基咪喃等，综合这些物

表 4 各脱腥方法最佳工艺脱腥前后挥发性成分半定量分析

Tab 4 Semi-quantitative analysis of volatile compounds before and after the deodorization with optimal conditions for each method

类别	名称	分子式	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)				
			脱腥前	活性炭 吸附法	水蒸气 蒸馏法	氧化 脱腥法	
烃类	D-柠檬烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	4.92	—	—	3.50	
	十一烷	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}$	—	—	1.53	—	
	十二烷	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	—	—	0.70	—	
	5-丙基-壬烷	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	—	—	0.25	—	
	新戊烷	C_5H_{12}	—	0.75	—	—	
	1-乙基-2,4-二甲基苯	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}$	—	0.71	—	—	
	2,3-二甲基双环[2.2.1]庚-2-烯	C_9H_{14}	—	0.67	—	—	
	1-亚甲基-4-(1-亚甲基乙烯基)环己烷	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	—	4.49	—	—	
	2,5-二甲基-1,5-己二烯	C_8H_{14}	—	0.98	—	—	
	α -水芹烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	—	—	—	1.46	
	异丁烷	C_4H_{10}	—	—	—	0.30	
	酯类	1-环戊烯-3-基-2,4-戊二烯酸酯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$	0.21	—	—	—
		5-甲基-4-己烯-1-基乙酸酯	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$	0.29	—	—	—
戊酸酐		$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$	0.90	—	—	—	
丙酸酐		$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$	6.54	—	3.29	—	
甲氧基乙酸酐		$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$	—	2.76	—	—	
丁二酸酐		$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_3$	—	7.45	—	—	
双(2-异丙基-5-甲基环己基)甲基磷酸酯		$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{O}_3\text{P}$	—	0.15	—	—	
氯乙酸-2-四氢呋喃甲基酯		$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{ClO}_3$	—	1.04	—	—	
4-羟基扁桃酸乙酯		$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$	—	0.52	—	—	
扁桃酸苄酯		$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$	—	1.89	—	—	
磷酸二甲酯丁酯		$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$	—	1.46	—	—	
磷酸三乙酯		$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$	—	5.90	—	—	
2,2-二甲基丙酸酐		$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$	—	—	—	0.82	
醛类	2-丙烯醛	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}$	13.09	—	—	—	
	反-2-辛烯醛	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$	5.07	—	—	1.52	
	壬醛	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	2.24	1.82	—	2.11	
	2-(3-甲基-2-环戊烯-1-基)-2-甲基丙醛	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	—	—	—	0.18	
酮类	1-(2-呋喃基)-1-丙酮	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	0.47	—	—	—	
	3,5-辛二烯-2-酮	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}$	1.07	—	—	1.17	
	2,3-己二酮	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$	—	0.32	—	—	
	3-戊酮	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$	—	2.16	—	—	
	3,3-二甲基-2-己酮	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$	—	10.00	—	—	
	2,3-庚烷二酮	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_2$	—	8.05	—	—	
醇类	异佛尔酮	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}$	—	0.68	—	—	
	3,3,6-三甲基-1,5-庚二烯-4-醇	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	—	—	1.00	—	
	(S)-(+) -1,2-丙二醇	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$	3.18	—	—	1.01	
	2-十一烯-4-醇	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}$	—	—	0.18	—	
	紫罗醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	—	—	4.41	—	
	5,5-二甲基-3-环己烯-1-醇	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$	—	2.35	—	—	
含氮化合物	1-辛烯-3-醇	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}$	—	—	—	3.29	
	烯丙胺	$\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$	3.90	—	—	—	
	2-(氮杂环丙烷-1-基)乙胺	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2$	1.49	—	—	—	
	5-氨基-6-亚硝基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$	—	—	0.63	—	
	1-异丁基-3-甲基-2-吡啶啉	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2$	—	0.24	—	—	
	硝酸-1-甲基乙基酯	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	—	2.65	—	—	
	倍他啉	$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$	—	0.55	—	—	
	环丙胺	$\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$	—	1.33	—	—	
	N-二甲基氨基甲基-叔丁基-丁基异丙基膦	$\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{NP}$	0.64	—	—	—	
	2-氯丙酰胺	$\text{C}_3\text{H}_6\text{ClNO}$	0.58	—	—	—	
	N-(2-氯乙氧羰基)-N-甲基-L-亮氨酸十二烷酯	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{ClNO}_4$	—	0.06	—	—	
	抗-2-乙酰氧基乙醛肟	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3$	—	0.44	—	—	
	二氧化氮	NO_2	—	—	—	2.16	

续表 4

类别	名称	分子式	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			
			脱腥前	活性炭 吸附法	水蒸气 蒸馏法	氧化 脱腥法
	2-甲基-3-氧代丁腈	C ₅ H ₇ NO	—	—	—	1.21
	4, 8-二乙酰基二(1, 2, 5-噁二唑)[3, 4-b: 3, 4-E]吡嗪	C ₈ H ₆ N ₆ O ₄	—	—	—	1.72
	N-(2-氯乙氧羰基)-N-甲基-L-亮氨酸十四烷基酯	C ₂₄ H ₄₆ ClNO ₄	—	—	—	0.04
	N, N-二乙基庚胺	C ₁₁ H ₂₅ N	—	—	—	0.54
	N-烯丙氧羰基-L-丙氨酸十四烷基酯	C ₂₁ H ₃₉ NO ₄	—	—	—	1.57
	异亚硝基乙酰丙酮	C ₅ H ₇ NO ₃	—	—	—	0.42
	N-氯二氟乙酰基-3-苯扎酰胺香豆素	C ₁₈ H ₁₀ ClF ₂ NO ₄	—	—	—	0.48
	1-甲基-1H-1, 2, 4-三唑	C ₃ H ₅ N ₃	—	—	—	0.18
	3, 5-二氨基-1, 2, 4-三唑	C ₂ H ₅ N ₅	—	0.19	—	—
	吡啶	C ₅ H ₅ N	—	0.21	—	—
	1H-吡啶-4-甲腈	C ₄ H ₃ N ₃	0.65	—	—	—
	2, 4, 5-三羟基嘧啶	C ₄ H ₄ N ₂ O ₃	8.72	—	—	—
	6-氨基-1, 3, 5-三嗪-2, 4(1H, 3H)-二酮	C ₃ H ₄ N ₄ O ₂	4.21	—	—	—
	4-庚基苯胺	C ₁₃ H ₂₁ N	0.30	—	—	—
	异氰酸异丙酯	C ₄ H ₇ NO	0.33	—	—	—
	4-甲基-1-(戊-4-烯-1-基)-2, 3-二氮杂双环[2.2.1]庚-2-烯	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	3.80	—	—	—
	1-甲基-2-(1-甲基乙烯基)环丁烷乙腈	C ₁₀ H ₁₅ N	—	0.16	—	—
	乙基吡嗪	C ₆ H ₈ N ₂	—	0.25	—	—
	2, 3-二氢-3-羟基-2-(4-二甲氨基苯基)铬-4-酮	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	0.43	—	—	—
	(3-环己基-5-三氟甲基-5-羟基-2-吡啶啉-1-基)(3-甲基苯基)甲酮	C ₁₈ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	0.18	—	—	—
	噻啶-4-羧酸-2-羟基-甲酯	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃	—	0.86	—	—
	糠基甲基苯丙胺	C ₁₅ H ₁₉ NO	—	0.04	—	—
	4-氨基吡嗪	C ₄ H ₅ N ₃	0.26	—	—	—
	1-甲基-1, 2, 4-三唑	C ₃ H ₅ N ₃	0.36	—	—	—
	2-氯-6-(2-呋喃基甲氧基)-4-(三氯甲基)吡啶	C ₁₁ H ₇ Cl ₄ NO ₂	0.25	—	—	—
	4-乙基-4H-1, 2, 4-三唑	C ₄ H ₇ N ₃	0.24	—	—	—
	甲苄	C ₁₃ H ₁₉ ClN ₂ O ₅ S ₂	—	—	0.29	—
	1-脯氨酸-正七氟丁酰基-异丁酯	C ₁₃ H ₁₆ F ₇ NO ₃	—	—	0.13	—
	2-氨基-2-(3-噻吩基)乙酸	C ₆ H ₇ NO ₂ S	—	—	0.06	—
	5-甲基-5H-萘并[2, 3-c]咪唑	C ₂₁ H ₁₅ N	—	—	0.22	—
硅氧烷类	六甲基环三硅氧烷	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	—	—	0.02	—
	八甲基环四硅氧烷	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	—	0.16	0.54	—
	十甲基环戊硅氧烷	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	1.05	1.83	0.77	1.41
	十二甲基环己硅氧烷	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	1.41	1.36	1.45	1.29
	2, 5-双[(三甲基硅)氧基]-苯甲醛	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂	1.05	—	—	—
	十四甲基环庚硅氧烷	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si ₇	1.45	1.10	1.31	1.21
	十六甲基环辛硅氧烷	C ₁₆ H ₄₈ O ₈ Si ₈	0.60	0.40	0.65	0.67
	十八甲基环壬硅氧烷	C ₁₈ H ₅₄ O ₉ Si ₉	—	—	0.38	—
其他	三甲基铝	C ₃ H ₉ Al	1.75	—	—	—
	2-正丙基呋喃	C ₇ H ₁₀ O	1.84	—	—	—
	1-溴-3-甲基环己烷	C ₇ H ₁₃ Br	—	0.64	—	—
	2-戊基呋喃	C ₉ H ₁₄ O	—	5.11	—	4.01
	呋喃	C ₄ H ₄ O	—	1.00	—	—
	4-己烯-1-醇三氟乙酸盐	C ₈ H ₁₁ F ₃ O ₂	—	0.65	—	—
	四氯化碳	CCl ₄	—	—	—	0.16
	苏式-2, 5-二甲基-2-(2-甲基-2-四氢呋喃基)四氢呋喃	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	—	—	—	0.38
	2-乙基-5-甲基呋喃	C ₇ H ₁₀ O	—	—	—	0.29
	2-己基呋喃	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	—	0.81
	2-氯-1, 1, 2-三氟-1-甲氧基乙烷	C ₃ H ₄ ClF ₃ O	—	—	0.07	—
	甲磺酰氟	CH ₃ FOS	1.99	—	—	—
	1, 1-二氯-3, 3-二甲基-2-丁酮	C ₆ H ₁₀ Cl ₂ O	0.35	—	—	—
	1-甲氧基-1-丁烯	C ₅ H ₁₀ O	2.82	—	—	—
	溴环庚烷	C ₇ H ₁₃ Br	0.60	—	—	—

注 (Note): “—” 表示未检出 (“—” Means not detected)。

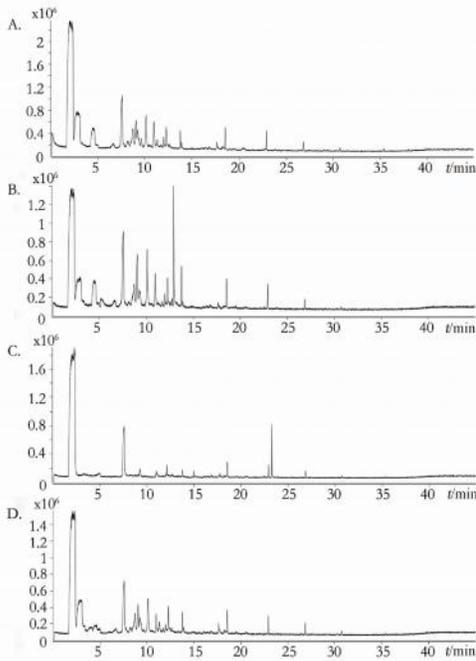


图 5 挥发性成分 TIC 图

Fig 5 TIC chromatograms of volatile compounds

A. 脱腥前 (before the deodorization); B. 活性炭吸附 (activated carbon adsorption); C. 水蒸气蒸馏 (steam distillation); D. 氧化脱腥 (oxidative deodorization)

质的气味描述, 可见在活性炭吸附脱腥后还存在较大的酸味、发酵味等刺激性气味; 水蒸气蒸馏法脱腥后, OAV 值较高的成分有丙酸酐、2-十一烯-4-醇、紫罗醇、十甲基环戊硅氧烷等, 丙酸酐相较脱腥前 OAV 值下降了 49.68%, 气味中的酸味明显下降, 2-丙烯醛、反-2-辛烯醛完全脱除, 脂肪腥味大幅降低, 增加的醇类物质具有芳香、花香味, 一定程度上改善了蛇油的腥味; 氧化脱腥法脱腥后 OAV 值较高的物质有 D-柠檬烯、 α -水芹烯、反-2-辛烯醛、壬醛、1-辛烯-3-醇、二氧化氮、十甲基环戊硅氧烷、2-戊基呋喃等, 蛇油原本气味中的酸味基本脱除, 反-2-辛烯醛 OAV 值相较于脱腥前下降了 70.02%, 增加的 α -水芹烯、1-辛烯-3-醇、2-戊基呋喃等物质赋予了一些清新草本、泥土类气味。

4 结论

活性炭吸附法、水蒸气蒸馏法及氧化脱腥法处理金钱白花蛇蛇油均有一定程度的脱腥效果, 感官评价发现水蒸气蒸馏法脱腥效果最好, 氧化脱腥法效果次之, 活性炭吸附法效果最弱。经

表 5 关键挥发性成分在三种脱腥方法中的气味活度值

Tab 5 Odor activity values of key volatile compounds in each group

物质	阈值	OAV				气味描述
		脱腥前	活性炭吸附法	水蒸气蒸馏法	氧化脱腥法	
D-柠檬烯	0.01	492.00	0.00	0.00	350.00	柠檬气味
十一烷	3	0.00	0.00	0.51	0.00	轻微烃类气味
十二烷	3	0.00	0.00	0.23	0.00	轻微烃类气味
新戊烷	10	0.00	0.08	0.00	0.00	轻微烃类气味
1-乙基-2,4-二甲基苯	0.1	0.00	7.10	0.00	0.00	芳香气味、轻微辛辣感
α -水芹烯	0.01	0.00	0.00	0.00	146.00	松脂气味、清新的树木香气
异丁烷	10	0.00	0.00	0.00	0.03	轻微烃类气味
戊酸酐	0.3	3.00	0.00	0.00	0.00	刺鼻酸味
丙酸酐	0.3	21.80	0.00	10.97	0.00	刺鼻酸味
丁二酸酐	0.1	0.00	74.50	0.00	0.00	刺鼻酸味
2-丙烯醛	0.09	145.44	0.00	0.00	0.00	脂肪焦味、辣味
反-2-辛烯醛	0.004	1267.50	0.00	0.00	380.00	香蕉叶样脂肪气息、鱼腥味
壬醛	0.26	8.62	7.00	0.00	8.12	水果味、花香味、玫瑰味
2,3-己二酮	0.02	0.00	16.00	0.00	0.00	刺鼻的化学气味、发酵味
3-戊酮	0.6	0.00	3.60	0.00	0.00	水果味
2,3-庚烷二酮	0.03	0.00	268.33	0.00	0.00	刺鼻的化学气味、发酵味
异佛尔酮	0.02	0.00	34.00	0.00	0.00	刺鼻的化学气味
2-十一烯-4-醇	0.004	0.00	0.00	45.00	0.00	芳香、果香、柑橘香
紫罗醇	0.1	0.00	0.00	44.10	0.00	甜美的玫瑰或花香味
1-辛烯-3-醇	0.034	0.00	0.00	0.00	96.76	霉味、蘑菇气味、草本气味
烯丙胺	2	1.95	0.00	0.00	0.00	强烈的氨味、刺激性气味
环丙胺	2	0.00	0.67	0.00	0.00	强烈的氨味、刺激性气味
二氧化氮	0.2	0.00	0.00	0.00	10.80	臭氧气味、刺激性气味
吡啶	1	0.00	0.21	0.00	0.00	鱼腥味、腐烂组织气味、刺激性的气味
乙基吡嗪	0.1	0.00	2.50	0.00	0.00	坚果或土质气味
十甲基环戊硅氧烷	0.5	2.10	3.66	1.54	2.82	轻微、微甜气味
2-戊基呋喃	0.1	0.00	51.10	0.00	40.10	豆腥味、果味、泥土味

GC-MS 分析发现水蒸气蒸馏脱腥处理后饱和脂肪酸成分占比变化不明显, HCA 及 PCA 分析说明水蒸气蒸馏法对金钱白花蛇油原始脂肪酸构成比影响最小, 能够最大程度地延续蛇油功效。活性炭吸附法吸附后肉眼直观可见蛇油色泽变淡, 推测可能由于活性炭较强的吸附力, 导致了部分脂肪酸成分、蛇油色素分子等物质的强力脱除, 对蛇油的物质基底影响较大, 可能会影响蛇油功效, 后续研究工作将继续对各脱腥方法所得脱腥蛇油进行动物实验功效评价, 以期更深入地评价各脱腥方法对蛇油功效的影响。孙培冬等^[17]通过水蒸气蒸馏法对某种蛇油进行脱腥, 发现挥发性成分中的不饱和醛、酮下降了 60%~100%。本研究采用 HS-SPME-GC-MS 分析发现, 经水蒸气蒸馏法脱腥处理后, 蛇油挥发性成分中易引发腥味的成分含量大幅降低, 如醛类、酮类成分在脱腥后均未检出, 含氮化合物总含量由 $25.75 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $1.33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 含量大幅降低, 与已有报道研究结果较为一致^[17-18]。OAV 分析结果再次表明, 经各脱腥方法脱腥后, 蛇油气味发生了较大变化, 其中水蒸气蒸馏法对气味贡献较大的关键挥发性成分气味容易令人接受, 氧化脱腥法次之, 活性炭吸附法的气味改善效果最弱, 与感官评价结果一致。总体来看, 水蒸气蒸馏法脱腥后蛇油的气味易于被接受, 对脂肪酸成分构成比影响最小, 该方法可行性良好, 有助于进一步推动金钱白花蛇油的产业化生产及市场应用。

参考文献

- [1] 刘一唯, 杨成对, 陈培榕, 等. 蛇油中游离脂肪酸成份分析及其体外淬灭单线态氧能力的研究[J]. 现代科学仪器, 2007 (4): 96-99.
- [2] 黄国鑫, 任薇, 武文, 等. 精制蟒蛇油抗炎抗过敏止痒作用的实验研究[J]. 新中医, 2010, 42 (12): 119-121.
- [3] 邢贵鹏, 黄卉, 李来好, 等. 罗非鱼加工副产物脱腥工艺及其腥味物质分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40 (20): 140-145.
- [4] 周佳, 徐瑾, 赵文俊, 等. 牦牛脂肪不同脱腥处理比较及腥味物质分析[J]. 中国油脂. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.240094>.
- [5] Medina-Juárez LA, Gámez-Meza N, Ortega-García J, et al. Trans fatty acid composition and tocopherol content in vegetable oils produced in Mexico [J]. J Am Oil Chem Soc, 2000, 77 (7): 721-724.
- [6] Si YL, Liu W, McClements DJ, et al. Ameliorative effects of snake (*deinagkistrodon acutus*) oil and its main fatty acids against UVB-induced skin photodamage in mice [J]. J Photoch Photobio B, 2019, 197: 111538.
- [7] 王凡一, 高如汐, 郑威, 等. HS-GC-MS 结合保留指数法探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律[J]. 中南药学, 2022, 20 (12): 2877-2886.
- [8] 郭慧玲, 罗江南, 熊耀坤, 等. 顶空-气质联用比较不同产地金银花与山银花挥发性成分差异[J]. 中南药学, 2021, 19 (6): 1182-1189.
- [9] 胡祥, 刘云, 杨晶晶, 等. 蒜头果油水化脱胶和碱炼脱酸工艺优化[J]. 中国油脂, 2020, 45 (8): 9-13.
- [10] 庄红, 郑艳, 周永康, 等. 扬子鳄油脱腥前后挥发性成分及脂肪酸成分 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2018, 41 (8): 1899-1903.
- [11] Santos C, Weaver DF. Topically applied linoleic/linolenic acid for chronic migraine [J]. J Clin Neurosci, 2018, 58: 200-201.
- [12] Dong Y, Huang C, Yang JC, et al. Docosapentaenoic acid (dpa, 22: 5n-3) alleviates ulcerative colitis via modification of gut microbiota and their metabolism [J]. Nutrients, 2022, 14 (19): 4204.
- [13] Kaur G, Begg DP, Barr D, et al. Short-term docosapentaenoic acid (22: 5n-3) supplementation increases tissue docosapentaenoic acid, DHA and EPA concentrations in rats [J]. Brit J Nutr, 2010, 103 (1): 32-37.
- [14] Frank S, Reglitz K, Mall V, et al. Molecular background of the undesired odor of polypropylene materials and insights into the sources of key odorants [J]. Indoor Air, 2021, 31 (4): 1038-1049.
- [15] Pang XL, Zhang YZ, Qiu J, et al. Coupled multidimensional GC and odor activity value calculation to identify off-odors in thermally processed muskmelon juice [J]. Food Chem, 2019, 301: 125307.
- [16] Hamilton EI. Compilation of odour threshold values in air and water [J]. Sci Total Environ, 1978, 9: 300-301.
- [17] 孙培冬, 马樱. 蛇油的挥发性成分分析和脱腥[J]. 分析试验室, 2007, 26 (11): 74-78.
- [18] 杨静, 叶慧, 马鸿雁, 等. 地龙腥臭气特征、来源及除臭方法研究进展[J]. 中草药, 2024, 55 (2): 670-677.
(收稿日期: 2024-08-09; 修回日期: 2024-10-10)

野蚕豆根中化学成分及抗肿瘤活性研究

高艳梅¹, 刘鑫澜^{2, 3}, 朱朋艳³, 马金蓉^{2, 3}, 王新婷^{2, 3}, 韦茜³, 王星月³, 袁文娟^{2*} (1. 云南省红河州检验检测院, 云南 红河哈尼族彝族自治州 661199; 2. 云南农业大学食品科学技术学院, 昆明 650201; 3. 云南农业大学理学院, 昆明 650201)

摘要: **目的** 研究野蚕豆根中的化学成分及其抗肿瘤活性。**方法** 采用硅胶柱色谱法、反相 MCI 柱色谱法、制备高效液相色谱法等分离方法对野蚕豆根的成分进行分离纯化, 根据波谱数据确定化合物结构, 采用 MTS 法对化合物进行抗肿瘤活性筛选。**结果** 共分离鉴定了 7 个糖苷类化合物和 3 个萜类化合物, 分别为二羟基- β -紫罗兰酮 (1)、熊果酸 (2)、三羟基- β -紫罗兰酮 (3)、玉叶金花苷 (4)、地黄紫罗兰苷 C (5)、黑蒴苷 (6)、苯甲醇- β -巢菜糖苷 (7)、2-甲氧基-4-甲基苯基- O - β -D-阿朴呋喃糖基-(1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷 (8)、桃叶珊瑚苷 (9) 和 5- O - β -槐糖基单密力特苷 (10)。MTS 结果显示化合物 2 在 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能够显著抑制 HL-60、A549、SMMC-7721、MDA-MB-231 和 SW480 细胞的生长。**结论** 化合物 1、2、3、7、8 和 10 为首次从野蚕豆根中分离得到, 化合物 2 能够抑制多种肿瘤细胞的生长。

关键词: 野蚕豆根; 化学成分; 抗肿瘤活性; 环烯醚萜苷; 熊果酸

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0060-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.009

Chemical compositions and their antitumor activity of the *Centranthera grandiflora* Benth roots

GAO Yan-mei¹, LIU Xin-lan^{2, 3}, ZHU Peng-yan³, MA Jin-rong^{2, 3}, WANG Xin-ting^{2, 3}, WEI Xi³, WANG Xing-yue³, YUAN Wen-juan^{2*} (1. *Inspection and Testing Center of Yunnan Honghe Prefecture, Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture Yunnan* 661199; 2. *College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming* 650201; 3. *College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming* 650201)

Abstract: Objective To determine the chemical compositions and related antitumor activity in *Centranthera grandiflora* (*C. grandiflora*) Benth roots. **Methods** *C. grandiflora* Benth roots were isolated and purified by silica gel column chromatography, MCI chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. The structures of the compounds were determined by spectral data. Finally, the compounds were screened for their antitumor activity by MTS method. **Results** Totally 7 glycoside type compounds and 3 terpenoids were isolated and identified, namely trihydroxy- β -ionone (1), ursolic acid (2), dihydroxy- β -ionone (3), mussaenoside (4), rehmaionoside C (5), melasmoside (6), benzyl alcohol- β -vicianoside (7), 2-methoxy-4-methylphenyl- O - β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (8), aucubin (9), and 5- O - β -sophorosyl-monomelittoside (10). The MTS showed that compound 2 at 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ greatly inhibited the growth of HL-60, A549, SMMC-7721, MDA-MB-231 and SW480 cells. **Conclusion** Compounds 1, 2, 3, 7, 8 and 10 have been isolated for the first time from *C. grandiflora* Benth roots, and compound 2 can inhibit the growth of many tumour cells.

Key words: *C. grandiflora* Benth root; chemical composition; antitumor activity; iridoid glycoside; ursolic acid

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.32060084); 云南省农业基础研究联合专项重点项目 (No.202301BD070001-025)。

作者简介: 高艳梅, 女, 副主任药师, 主要从事中药材质量标准研究, email: 156070953@qq.com *通信作者: 袁文娟, 女, 副教授, 主要从事药用植物化学及生物活性研究, email: yuanwj0805@126.com

野蚕豆根为玄参科 (Scrophulariaceae) 胡麻草属 (*Centranthera*) 植物大花胡麻草 (*Centranthera grandiflora* Benth) 的根, 民间又称化血丹、灵芝草等, 主要产自云南、贵州、广西等地^[1-2], 具有活血化瘀、止血止疼等功效。在云南民间, 常用其泡酒饮用来防治脑血栓、脑梗死等疾病^[3]。现代药理学研究发现其具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血和抗心肌缺血等良好的生物活性, 在云南已广泛应用于民族医药^[4-7]。野蚕豆根中化学成分丰富, 主要包括环烯醚萜苷、苯乙醇苷、紫罗兰酮苷、单萜苷等多种类型^[8-9]。其中, 环烯醚萜苷类成分最为常见, 也是研究的重点, 大量研究表明其具有抗炎、保肝、降糖等药理活性^[10-13]。

目前国内外关于野蚕豆根化学成分的报道较少, 仅见 30 余个^[8-9, 14-15]。为了进一步明确野蚕豆根的药用价值, 课题组对野蚕豆根成分进行系统研究, 并对分离得到的化合物进行抗肿瘤活性的初步筛选, 现报道如下。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪和 Agilent 1290/6538 Q-TOF 液质联用色谱仪 (美国安捷伦公司); AVANCE III 500 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); 超声清洗机 (上海科导超声仪器公司); 旋转蒸发器 (德国海道夫公司); DZG-303A 型超纯水机 (上海普利菲尔); YMC-Pack ODS-A-HG 色谱柱 (250 mm×20 mm, 5 μm); Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (250 mm×9.4 mm, 5 μm); Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱 (9.4 mm×250 mm, 5 μm); Multiskan Mk3 型酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司)。

野蚕豆根采自云南省屏边苗族自治县和平乡镇, 由云南省红河州检验检测院高艳梅药师鉴定为玄参科胡麻草属植物大花胡麻草 *Centranthera grandiflora* Benth 的根; 本次实验所使用的化学试剂均购于天津大茂化学试剂厂, 纯度为分析纯。二甲基亚砜 (DMSO, VWR LIFE SCIENCE); 胎牛血清 (美国赛默飞世尔科技公司); MTS、磷酸盐缓冲液 (PBS)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (索莱宝生物科技有限公司); DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基 (海克隆实验室有限责任公司)。MCI-gel CHP20/P120 (75 ~ 150 μm, Mitsubishi Chemical Co., Ltd.); 薄层层析用预制硅胶 GF-254 (青岛海浪硅胶干燥剂厂); 硅胶 (100 ~ 200 目、200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂); 紫杉醇 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: B32862)。

人白血病细胞 (HL-60)、人肺癌细胞 (A549)、

人肝癌细胞 (SMMC-7721)、人乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 和人结肠癌细胞 (SW480) 由云南农业大学普洱茶教育部重点实验室细胞库提供。

2 方法

2.1 提取分离

干燥的野蚕豆根 (3 kg) 粉碎, 用 8 倍量的乙酸乙酯回流提取 3 次, 每次提取时间 1 h。合并提取液, 过滤, 滤液减压浓缩, 得乙酸乙酯提取部分 248 g。过高效液相色谱制备得到化合物 1 (8.8 mg, 甲醇-水 = 85 : 15, 检测波长: 210 nm, $t_R = 15.737$ min), 化合物 2 (21.3 mg, 甲醇-水 = 90 : 10, 检测波长: 210 nm, $t_R = 10.311$ min), 化合物 3 (9.2 mg, 甲醇-水 = 85 : 15, 检测波长: 210 nm, $t_R = 13.564$ min)。药渣以 10 倍量水回流提取 3 次, 每次提取时间 1 h, 提取液减压浓缩, 得到水提部分 587 g。水提部分经硅胶柱色谱 (200 ~ 300 目), 用二氯甲烷-甲醇 (1 : 0, 1 : 1, 0 : 1) 体系梯度洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩, 得到 3 个馏份, 分别为 Fr. A ~ Fr. C。Fr. B 部分过反相 MCI 柱, 经过不同浓度甲醇 (20% ~ 100%) 体系进行梯度洗脱, 得到 5 个馏份 Fr. B I ~ Fr. B V。Fr. B I 部分过硅胶色谱柱 (100 ~ 200 目), 用二氯甲烷-甲醇 (10 : 1 ~ 0 : 1) 体系洗脱, 得到 5 个馏份, 即 Fr. B I 1 ~ Fr. B I 5, 进一步通过高效液相色谱分离得到化合物 4 (167.4 mg, 乙腈-水 = 10 : 90, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 10.121$ min)、化合物 5 (387.3 mg, 乙腈-水 = 10 : 90, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 11.813$ min) 和化合物 6 (108.7 mg, 乙腈-水 = 10 : 90, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 14.007$ min)。Fr. B II ~ Fr. B IV 部分经 TLC 检测合并后过硅胶色谱柱 (100 ~ 200 目), 用二氯甲烷-甲醇 (20 : 1 ~ 0 : 1) 体系进行洗脱, 得到 6 个馏份, 分别为 J1 ~ J6, J2 经高效液相色谱分离得到化合物 7 (27.8 mg, 乙腈-水 = 20 : 80, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 16.322$ min), J4 经高效液相色谱分离得到化合物 8 (14.5 mg, 乙腈-水 = 12 : 88, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 18.799$ min), J5 经高效液相色谱分离得到化合物 9 (24.2 mg, 乙腈-水 = 8 : 92, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 16.118$ min) 和化合物 10 (32.6 mg, 乙腈-水 = 8 : 92, 检测波长: 210、254 nm, $t_R = 18.832$ min)。

2.2 结构鉴定

根据所分离化合物的理化性质, 采用核磁共振波谱、质谱等技术, 同时对比相关文献数据, 确定各化合物的化学结构。

2.3 MTS 检测

对 HL-60、A549、SMMC-7721、MDA-MB-231 和 SW480 进行 MTS 检测。细胞以每孔 3000 ~ 15 000 个接种到 96 孔培养皿中，在含 10% 胎牛血清的培养基 (DMEM 或 RPMI1640) 中培养。培养 24 h 后，用浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (DMSO 为载体，最大浓度为 0.1%) 的化合物处理细胞。在 37°C 培养 48 h 后，弃去孔内培养基，每孔加 MTS 溶液 $20 \mu\text{L}$ 和培养基 $100 \mu\text{L}$ 。设 3 个空白复孔 (MTS 溶液 $20 \mu\text{L}$ 和培养基 $100 \mu\text{L}$ 的混合液)，继续孵育 2 ~ 4 h，使反应充分进行后，在 492 nm 处用酶标仪测量

每孔的吸光度，记录结果，处理数据。

2.4 IC_{50} 检测

采用“2.3”项下方法，化合物以 40、8、1.6、0.32、 $0.064 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度进行复筛，以紫杉醇作为阳性对照，记录数据，计算 IC_{50} 值。

3 结果

3.1 化合物结构鉴定

共从野蚕豆根中分离得到了 10 个化合物，结构见图 1，包括 7 个糖苷类化合物 (化合物 4、5、6、7、8、9、10) 以及 3 个萜类化合物 (化合物 1、2、3)。

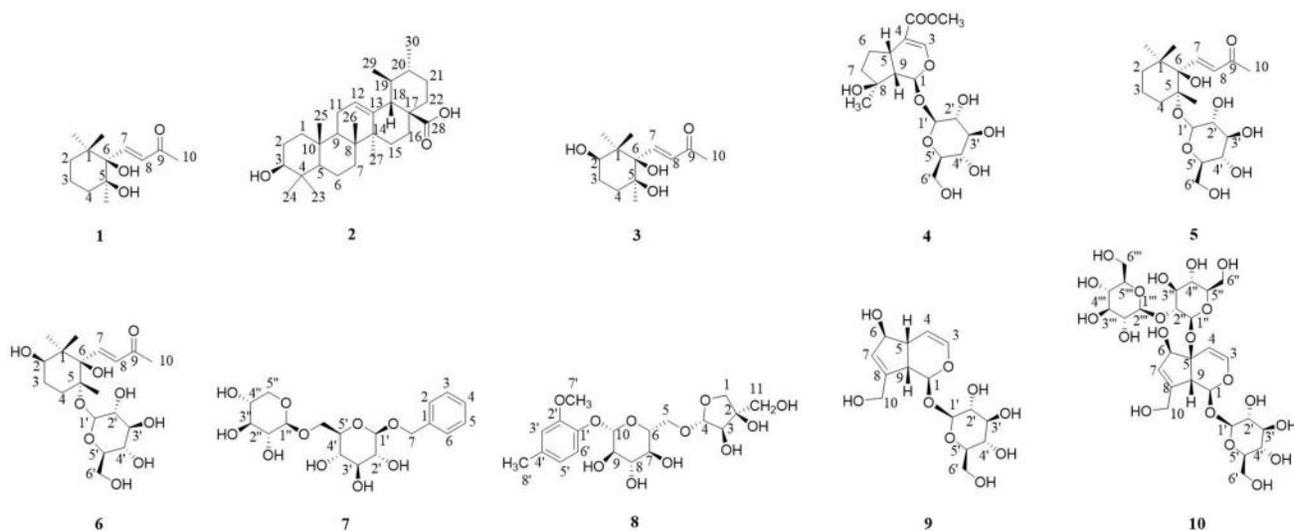


图 1 化合物 1 ~ 10 的结构

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 10

化合物 1: 白色粉末; ESI-MS: m/z 247 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[\alpha]_D^{22}$: -30.2 (C 0.1, MeOH); 分子式为: $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.32 (1H, d, $J = 16.2 \text{ Hz}$, H-7), 6.34 (1H, d, $J = 16.2 \text{ Hz}$, H-8), 2.31 (3H, s, H-10), 1.22 (3H, s, 1- CH_3), 1.12 (3H, s, 5- CH_3), 0.82 (3H, s, 1- CH_3)。 $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, CDCl_3) δ : 198.5 (C-9), 149.6 (C-7), 130.9 (C-8), 79.6 (C-6), 75.0 (C-5), 38.5 (C-1), 36.2 (C-2), 36.2 (C-4), 27.7 (1- CH_3), 27.4 (C-10), 26.6 (5- CH_3), 25.2 (1- CH_3), 17.8 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[16]，故鉴定化合物 1 为二羟基- β -紫罗兰酮。

化合物 2: 白色粉末; ESI-MS: m/z 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[\alpha]_D^{22}$: $+65.2$ (C 0.1, MeOH); 分子式为: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.23 (1H, t, $J = 3.7 \text{ Hz}$, H-12), 3.16 (2H, dd, $J = 11.3, 4.7 \text{ Hz}$, H-3), 1.12 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-29), 0.96 (3H, s, H-30), 0.89 (3H, d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, H-27), 0.85

(3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-24)。 $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 181.7 (C-28), 139.7 (C-13), 126.9 (C-12), 79.7 (C-3), 56.7 (C-18), 54.4 (C-5), 43.2 (C-17), 40.8 (C-9), 40.4 (C-14), 40.4 (C-8), 40.0 (C-19), 39.8 (C-4), 38.1 (C-1), 34.3 (C-22), 34.3 (C-10), 31.8 (C-7), 29.2 (C-21), 28.8 (C-23), 28.8 (C-15), 27.9 (C-2), 25.3 (C-16), 24.4 (C-11), 24.1 (C-27), 21.6 (C-30), 19.5 (C-6), 17.8 (C-26), 17.7 (C-29), 16.4 (C-24), 16.0 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[17]，故鉴定化合物 2 为熊果酸。

化合物 3: 白色粉末; ESI-MS: m/z 263 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[\alpha]_D^{22}$: -30.2 (C 0.1, MeOH); 分子式为: $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.15 (1H, d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, H-7), 6.48 (1H, d, $J = 15.9 \text{ Hz}$, H-8), 3.69 (1H, dd, $J = 5 \text{ Hz}$, H-2), 2.30 (3H, s, H-10), 2.26 (1H, m, H-3), 2.18 (1H, td, $J = 14.1, 3.7 \text{ Hz}$, H-6), 1.66 (1H, m, H-4), 1.39 (1H, m, H-5), 1.20 (3H, s, 1- CH_3), 1.18

(3H, s, 5-CH₃), 0.99 (3H, s, 1-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 198.7 (C-9), 147.3 (C-7), 131.6 (C-8), 79.9 (C-6), 77.5 (C-5), 75.4 (C-2), 41.1 (C-1), 30.0 (C-4), 28.3 (C-3), 27.7 (C-10), 25.1 (5-CH₃), 24.7 (1-CH₃), 22.7 (1-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **3** 为三羟基-β-紫罗兰酮。

化合物 **4**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 413 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -87.7 (C 0.1, MeOH); 分子式为: C₁₆H₂₄O₁₀。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.34 (1H, s, H-3), 5.40 (1H, d, J = 4.2 Hz, H-1), 4.61 (1H, d, J = 7.9 Hz, Glc-H-1), 3.84 (1H, d, J = 11.9 Hz, Glc-H-6a), 3.64 (3H, s, COOCH₃), 3.58 (1H, dd, J = 11.9, 6.3 Hz, Glc-H-6b), 2.23 (1H, m, H-6b), 2.16 (1H, dd, J = 9.2, 4.2 Hz, H-9), 1.66 (2H, m, H-7), 1.37 (1H, m, Glc-H-6a), 1.26 (3H, s, H-10)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 169.4 (CO), 152.0 (C-3), 113.4 (C-4), 99.8 (C-1'), 95.4 (C-1), 80.5 (C-8), 78.4 (C-3'), 78.0 (C-5'), 74.7 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.9 (C-6'), 52.3 (C-9), 51.7 (OCH₃), 40.7 (C-7), 32.0 (C-5), 30.7 (C-6), 24.6 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **4** 为玉叶金花苷。

化合物 **5**: 白色结晶; ESI-MS: m/z 411 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -59.4 (C 0.1, MeOH); 分子式为: C₁₉H₃₂O₈。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.54 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-7), 6.32 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-8), 4.47 (1H, d, J = 7.8 Hz, Glc-H-1), 2.32 (3H, s, H-10), 1.23 (3H, s, 1-CH₃), 1.20 (3H, s, 5-CH₃), 0.84 (3H, s, 1-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 201.9 (C-9), 153.8 (C-7), 131.3 (C-8), 98.2 (C-1'), 83.4 (C-5), 80.3 (C-6), 79.1 (C-5'), 77.5 ((C-3'), 75.4 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.9 (C-6'), 39.8 (C-1), 37.0 (C-2), 32.5 (C-3), 27.5 (C-10), 27.2 (C-4), 25.9 (1-CH₃), 22.4 (5-CH₃), 18.6 (1-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **5** 为地黄紫罗兰苷 C。

化合物 **6**: 无色针晶; ESI-MS: m/z 427 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -20.3 (C 0.1, MeOH); 分子式为: C₁₉H₃₂O₉。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.37 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-7), 6.34 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-8), 4.49 (1H, d, J = 7.8 Hz, Glc-H-1), 2.50 (1H, m, H-2), 2.32 (3H, s,

H-10), 1.96 (1H, m, H-4), 1.68 (1H, m, H-4), 1.53 (1H, m, H-3), 1.21 (3H, s, 1-CH₃), 1.20 (3H, s, 5-CH₃), 0.96 (3H, s, 1-CH₃)。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 202.0 (C-9), 151.6 (C-7), 132.2 (C-8), 98.4 (C-1'), 83.6 (C-5), 81.2 (C-6), 79.1 (C-5'), 77.5 (C-3'), 77.5 (C-2), 75.4 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.9 (C-6'), 42.0 (C-1), 27.3 (C-10), 26.5 (C-4), 25.7 (C-3), 25.0 (1-CH₃), 23.7 (1-CH₃), 22.2 (5-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为黑蒴苷。

化合物 **7**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 425 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -68.3 (C 0.1, MeOH); 分子式为: C₁₈H₂₆O₁₀。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.42 (2H, d, J = 6.9 Hz, H-3, 5), 7.33 (2H, m, H-2, 6), 7.28 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-4), 4.36 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-1', 1'')。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 139.0 (C-1), 129.3 (C-2, 3, 5, 6), 128.7 (C-4), 105.6 (C-1''), 103.3 (C-1'), 78.0 (C-3'), 77.7 (C-3''), 77.1 (C-5'), 75.1 (C-2'), 74.9 (C-2''), 71.9 (C-7''), 71.5 (C-4'), 71.2 (C-4''), 69.8 (C-6'), 66.9 (C-5'')。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **7** 为苯甲醇-β-巢菜糖苷。

化合物 **8**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 455 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -100.1 (C 0.1, MeOH); 分子式为: C₁₉H₂₈O₁₁。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.04 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.82 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.73 (1H, dd, J = 8.3, 2.0 Hz, H-6'), 4.97 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 4.77 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-10), 3.84 (3H, s, H-7'), 2.28 (3H, s, H-8')。¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 150.6 (C-1'), 145.8 (C-2'), 134.1 (C-4'), 122.6 (C-5'), 118.4 (C-6'), 114.6 (C-3'), 111.0 (C-4), 103.2 (C-10), 80.5 (C-2), 78.0 (C-9), 77.8 (C-8), 77.0 (C-3), 75.0 (C-1), 74.9 (C-6), 71.6 (C-7), 68.7 (C-5), 65.6 (C-11), 56.7 (C-7'), 21.1 (C-8')。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **8** 为 2-甲氧基-4-甲基苯基-O-β-D-阿朴呋喃糖基-(1→6)-β-D-葡萄糖苷。

化合物 **9**: 无色针晶; ESI-MS: m/z 369 [M + Na]⁺; $[\alpha]_D^{25}$: -150.5 (C 0.1, H₂O); 分子式为: C₁₅H₂₂O₉。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.31 (1H, dd, J = 6.1, 1.9 Hz, H-3), 5.76 (1H, s,

H-7), 5.09 (1H, dd, $J = 6.1, 3.9$ Hz, H-4), 4.94 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1), 4.67 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Glc-H-1), 4.43 (1H, m, H-6), 4.34 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-10), 4.17 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-10), 3.85 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, Glc-H-6), 3.65 (1H, dd, $J = 11.8, 5.3$ Hz, Glc-H-6), 2.89 (1H, t, $J = 14.8, 7.4$ Hz, H-9), 2.65 (1H, m, H-5)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 148.0 (C-8), 141.6 (C-3), 130.2 (C-7), 105.7 (C-4), 99.9 (C-1'), 97.7 (C-1), 82.8 (C-6), 78.2 (C-3'), 77.9 (C-5'), 74.9 (C-2'), 71.5 (C-4'), 62.6 (C-6'), 61.4 (C-10), 47.9 (C-9), 46.2 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 9 为桃叶珊瑚苷。

化合物 10: 白色粉末; ESI-MS: m/z 709 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $[\alpha]_D^{25}$: -26.9 (C 0.1, H_2O); 分子式为: $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_{20}$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.47 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-3), 5.76 (1H, s, H-7), 5.29 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-4), 5.24 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1), 4.74 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glc-H-1), 4.65 (1H, s, H-6), 4.63 (1H, m,

H-10), 4.16 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-10)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 146.1 (C-3), 144.8 (C-8), 129.0 (C-7), 106.1 (C-4), 105.8 (C-1''), 99.2 (C-1'), 97.9 (C-1''), 97.1 (C-1), 84.0 (C-5), 82.8 (C-6), 82.3 (C-2''), 78.6 (C-3'''), 8.4 (C-3'), 78.0 (C-3''), 77.8 (C-5'), 77.8 (C-5''), 77.6 (C-5'''), 76.1 (C-2''), 74.8 (C-2'), 71.6 (C-4'''), 71.2 (C-4''), 71.0 (C-4'), 62.7 (C-6''), 62.7 (C-6'''), 62.3 (C-6'), 61.4 (C-10), 52.8 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 10 为 5-O- β - 槐糖基单密力特苷。

3.2 MTS 法检测化合物对 5 种肿瘤细胞的生长抑制作用

采用“2.3”项下 MTS 活性筛选方法, 对化合物 1 ~ 6、9 和 10 进行肿瘤细胞毒活性检测。结果显示, 浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 化合物 2 对 HL-60、A549、SMMC-7721、MDA-MB-231 和 SW480 这 5 种肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 见图 2。进一步浓度筛选发现, 化合物 2 对以上 5 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 17.41、17.43、17.17、14.84、16.82 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见表 1。

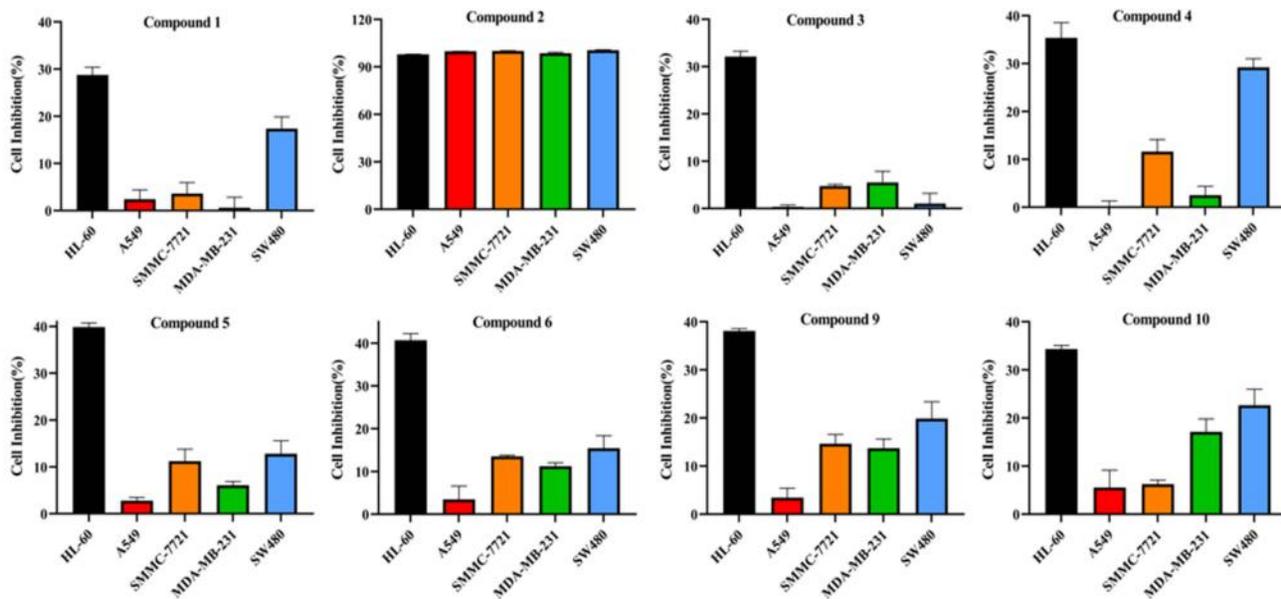


图 2 部分化合物的细胞生长抑制活性

Fig 2 Cell growth inhibitory activity of compounds

表 1 化合物 2 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Cytotoxicity of compound 2 ($\bar{x} \pm s$)

化合物	IC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	HL-60	A549	SMMC-7721	MDA-MB-231	SW480
化合物 2	17.41 ± 0.27	17.43 ± 0.11	17.17 ± 0.42	14.84 ± 0.17	16.82 ± 0.16
紫杉醇	< 0.016	< 0.016	< 0.016	< 0.016	< 0.016

4 讨论

随着人们对于野蚕豆根药用价值的不断认识,导致其价格高涨,资源被过度采挖。因此明确其具体的作用成分,做到合理高效地利用十分必要且迫切。天然产物中存在丰富的具有抗肿瘤活性的物质,熊果酸作为一种五环三萜成分,大量研究表明其具有良好的抗肿瘤活性。Luo 等^[23]发现熊果酸能够抑制乳腺癌细胞的增殖以及促进其凋亡和自噬,从而发挥抗肿瘤活性。Zheng 等^[24]也发现熊果酸可以以一定浓度引发直肠癌的凋亡。同时也有研究发现,熊果酸能够通过抑制或改善炎症反应,抑制肿瘤的生长和繁殖^[25-26]。此外,也有研究表明,熊果酸可以降低小鼠血管内皮生长因子的表达,抑制肿瘤生长^[27]。

本文对野蚕豆根水提部分以及乙酸乙酯提取部分进行研究,共得到 10 个化合物,包括 7 个糖苷类化合物以及 3 个萜类化合物,其中化合物 1、2、3、7、8 和 10 为首次从野蚕豆根中分离得到。通过 MTS 法对分离得到的化合物进行活性筛选,发现化合物 2 对 HL-60、A549、SMMC-7721、MDA-MB-231 和 SW480 的细胞活性均具有显著的抑制作用,其 IC_{50} 值均小于 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,由于其他实验的损耗,化合物 7 和 8 的样品量较少,因此未进行 MTS 活性检测,有待进一步研究。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六十七卷第二分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 344-346.

[2] 《云南中草药》整理组. 云南中草药[M]. 昆明: 云南人民出版社, 2011: 86.

[3] 李丽娟, 李妹梅, 赵佳, 等. 野蚕豆根生药学特征及基源植物大花胡麻草显微特征研究[J]. 南方农业, 2021, 15(6): 5-8.

[4] Yang SY, Chou GX, Li Q. Cardioprotective role of azafrin in against myocardial injury in rats via activation of the Nrf2-ARE pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 47: 12-22.

[5] 李莉, 李海宁, 闫鸿丽, 等. 野蚕豆根总环烯醚萜苷的响应面优化提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(1): 18-25.

[6] Gao XM, Dong WH, Xia CL, et al. Centranthera grandiflora alleviates alcohol-induced oxidative stress and cell apoptosis[J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(8): 572-579.

[7] 吴梅, 张洁, 张国云, 等. 野蚕豆根生药学探究[J]. 中成药, 2021, 43(2): 540-543.

[8] 廖立平. 化血丹化学成分与活性研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2014.

[9] 梁钜忠, 张嘉硕, 马孝本, 等. 大花胡麻草中化学成分的鉴定[J]. 中药通报, 1985, 10(5): 37-38.

[10] 戴瑶瑶, 闫滨滨, 颜雨豪, 等. 玄参中环烯醚萜类化合物的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(9): 2993-3003.

[11] 孙克寒, 杨会, 王淑琪, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析四妙勇安汤的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(10): 2658-2667.

[12] 王菲菲, 张聿梅, 郑笑为, 等. 环烯醚萜类化合物的结构和生物学活性研究进展[J]. 中国药事, 2019, 33(3): 323-330.

[13] 占丽丽, 叶先文, 张敏, 等. 紫珠属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 江西中医药, 2020, 51(8): 66-73.

[14] Liang XX, Li Q, Li HJ, et al. Centrantheroside F, a new ionone glycoside from *Centranthera grandiflora* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2022, 24(8): 777-783.

[15] Gao XM, Dong WH, Xia CL, et al. Centranthera grandiflora alleviates alcohol-induced oxidative stress and cell apoptosis[J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(8): 572-579.

[16] Hiroshi S, Takashi M, Hiroaki N, et al. Norcarotenoids of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(6): 1997-2001.

[17] 满兴战, 周峰, 谭洋, 等. 福建野鸦椿化学成分的研究[J]. 中草药, 2019, 50(24): 5924-5929.

[18] 胡琼. 野蚕豆根的化学成分研究[J]. 中医临床研究, 2016, 8(22): 49-53.

[19] 王立波, 王健伟, 王策, 等. 沙生蜡菊降脂活性部位的化学成分(III)[J]. 中国药物化学杂志, 2012, 22(3): 220-222, 226.

[20] Hiroaki N, Hiroshi S, Takashi M, et al. Six glycosides from *Rehmannia glutinosa* var. *Purpurea* [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 3303-3306.

[21] 廖立平, 张紫佳, 胡之璧, 等. 大花胡麻草环烯醚萜苷类化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2369-2371.

[22] Haruji O, Hiroyuki I. Iridoid glycosides of *rehmannia glutinosa* [J]. Phytochemistry, 1981, 21(11): 133-138.

[23] Luo J, Hu YL, Wang H. Ursolic acid inhibits breast cancer growth by inhibiting proliferation, inducing autophagy and apoptosis, and suppressing inflammatory responses via the PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathways in vitro [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3623-3631.

[24] Zheng JL, Wang SS, Shen KP, et al. Ursolic acid induces apoptosis and anoikis in colorectal carcinoma RKO cells [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 52.

[25] Prasad S, Yadav VR, Sung B, et al. Ursolic acid inhibits the growth of human pancreatic cancer and enhances the antitumor potential of gemcitabine in an orthotopic mouse model through suppression of the inflammatory microenvironment [J]. Oncotarget, 2016, 7(11): 13182-13196.

[26] Zhang N, Liu SN, Shi SY, et al. Solubilization and delivery of Ursolic acid for modulating tumor microenvironment and regulatory T cell activities in cancer immunotherapy [J]. J Control Release, 2020, 320: 168-178.

[27] Saraswati S, Agrawal SS, Alhaider AA. Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor [J]. Chem Biol Interact, 2013, 206(2): 153-165.

(收稿日期: 2024-06-05; 修回日期: 2024-07-09)

茯神木中三萜类化学成分研究

杨财子¹, 邓子怡¹, 孙云鹏^{1, 2}, 王国凯^{1, 2}, 郁阳^{1, 2, 3*}, 刘劲松^{1, 2*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.中药功效物质校级重点实验室, 合肥 230012; 3.食药用菌功能活性与资源利用安徽省联合共建学科重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 研究茯神木中三萜类化学成分。**方法** 运用硅胶柱色谱、RP-18 中压柱色谱、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶、半制备 HPLC 等分离手段进行分离纯化, 所获得的单体化合物经核磁共振波谱和质谱数据鉴定。**结果** 从茯神木中分离鉴定出 16 个单体化合物, 分别为齿孔酸 (1)、栓菌酸 (2)、松苓新酸 (3)、脱氢齿孔酸 (4)、茯苓酸 (5)、去氢茯苓酸 (6)、猪苓酸 (7)、茯苓新酸 AM (8)、茯苓新酸 DM (9)、 3β , -16α -二羟基羊毛甾-7, 9 (11), 24-三烯-21-酸 (10)、 16α -羟基松苓新酸 (11)、茯苓新酸 B (12)、去氢土莫酸 (13)、茯苓新酸 A (14)、茯苓新酸 BM (15)、茯苓新酸 G (16)。**结论** 以上 16 个化合物皆为首次从茯神木中分离鉴定。

关键词: 茯神木; 化学成分; 结构鉴定; 三萜类化合物

中图分类号: R283, R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0066-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.010

Chemical constituents of triterpenes in Pini Radix in Poria

YANG Cai-zi¹, DENG Zi-yi¹, SUN Yun-peng^{1, 2}, WANG Guo-kai^{1, 2}, YU Yang^{1, 2, 3*}, LIU Jin-song^{1, 2*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Key Laboratory for Functional Substances of Chinese Medicine and Natural Medicine, Hefei 230012; 3. Functional Activity and Resource Utilization of Edible and Medicinal Fungi, Joint Laboratory of Anhui Province, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of triterpenes in Pini Radix in Poria. **Methods** Triterpenes were separated and purified with chromatographic techniques such as silica gel column, RP-18 medium pressure column, Sephadex LH-20 column, and preparative HPLC, and identified by NMR and MS spectroscopy. **Results** Totally 16 triterpenes were isolated from Pini Radix in Poria, and identified as eburicoic acid (1), trametenolic acid (2), dehydrotrametenolic acid (3), dehydroeburicoic acid (4), pachymic acid (5), dehydropachymic acid (6), polyporenic acid (7), poricoic acid AM (8), poricoic acid DM (9), 3β , -16α -dihydroxylanosta-7, 9 (11), 24-trien-21-oic acid (10), 16α -hydroxytrametenolic acid (11), poricoic acid B (12), dehydrotumulosic acid (13), poricoic acid A (14), poricoic acid BM (15), and poricoic acid G (16). **Conclusion** All the 16 compounds have been obtained from the Pini Radix in Poria for the first time.

Key words: Pini Radix in Poria; chemical constituent; structure identification; triterpene

茯神木为茯苓的中间松根部分, 性甘平, 具有平肝安神的功效, 临床用于惊悸健忘、中风等, 该药首次在《药性论》中记载^[1-2]; 后经诸多医家发掘应用, 并在多部医药典籍中记录传世, 其治疗肝风内扰心神不宁, 有非常好的疗效。茯神木作为传统中药, 运用广泛, 药效颇佳, 是一味具

有现代研究开发潜力的药材。茯苓寄生在松树根部, 药用部分为茯苓菌核中间白色部位, 不含茯苓表皮及近表皮的淡红色部分和松根^[3-5]。茯神 (Poria cum Pini Radix) 即茯苓内抱有松根, 松根直径不超过 1.5 cm, 明《本草经疏》云:“茯神抱木心而生, 以此别于茯苓”^[6-7]。

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科中药化学学科开放课题 (No.HKDCCM2024011)。

作者简介: 杨财子, 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: 1622923962@qq.com *通信作者: 郁阳, 男, 助理研究员, 主要从事药用植物化学研究, email: yyang71@ahtcm.edu.cn; 刘劲松, 男, 教授, 主要从事中药与天然药物活性成分的研究, email: jinsongliu@ahtcm.edu.cn

茯苓、茯神、茯神木三者均源于茯苓菌核，由于药用部位不同，功效各有偏重。茯苓味甘淡，性平，归心、脾经，具渗水利湿、健脾安神等作用，临床以渗水利湿、健脾功效见长，辅有安神，现代药理学表明其抗肿瘤功效显著。茯神味甘淡，性平，归心、脾经，具宁心、镇静安神等作用，现代药理学表明其镇静催眠作用显著^[8]；茯神在传统中医临床应用中重其内抱松根，以确镇静安神之效。茯苓和茯神的化学成分相似，但具体种类和含量有所差别，茯苓主要化学成分为三萜及多糖类化合物，目前已报道一百余种茯苓三萜类化合物，其他化合物有二萜类、甾醇类、挥发油类、蛋白质类、氨基酸类等^[3, 8-9]；茯神的主要化学成分为多糖类、三萜类、挥发性成分、黄酮类、脂肪酸等，相较于茯苓的化学成分研究现状，茯神的化学成分研究较少^[3, 6]。茯神、茯苓区别于其内是否抱有松根，而内抱松根的茯神镇静安神作用显著，此松根中药即为茯神木。为进一步辨明茯苓、茯神、茯神木成分联系和区别，为后续研究三者功效成分差异提供资料，本实验基于前期研究基础上^[10]，展开对茯神木化学成分的研究，以填补茯神木作为传统中药化学成分分离鉴定的研究空白，为茯神木的现代药理研究提供物质基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters 1525 制备型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；METTLER TOLEDO AB135-S 型电子天平（十万分之一）（瑞士梅特勒-托利多公司）；Waters 1525 分析型高效液相色谱仪、Waters XBridge C18 反相色谱分析柱、Waters XBridge 制备柱（美国 Waters 公司）；Bruker AV III-600（德国 Bruker 公司）；KQ2200 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

柱色谱硅胶 200 ~ 300 目和 100 ~ 200 目（青岛海洋化工有限公司）；反相 C-18 柱色谱硅胶填充材料（日本 Fujisilysia 化工有限公司）；Sephadex LH-20 凝胶（美国 CE 公司）；氘代吡啶（美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司）；GF254 薄层硅胶板（50 mm × 100 mm）（青岛海洋化工有限公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；甲醇、乙腈色谱级（瑞典 Oceanpak 公司）；甲酸、二氯甲烷等所用其他试剂皆为分析纯。

茯神木样品取自茯苓菌核的松根部分，该茯苓为课题组于金寨县采集。后经中国科学院彭华胜教授鉴定其为茯神木。药材标本茯神木（No. LA20221002）保存于安徽中医药大学药学院教研室。

2 提取与分离

取药材茯神木 9.2 kg，捣碎至粗粉，等分成 3 组，分别加入 100% 甲醇 20 L，加热回流提取 3 次，将所得全部提取液减压浓缩，得到茯神木总浸膏 650 g。将浸膏与 100 ~ 200 目硅胶均匀拌样，后经硅胶色谱柱（二氯甲烷-甲醇，100 : 0 ~ 0 : 100 梯度洗脱）层析分离，用 TLC 薄层色谱检识法合并相同组分，最终合并为 9 个组分，分别命名为 A ~ I。

C 组分中有大量沉淀析出，取出部分沉淀，用二氯甲烷和甲醇溶去杂质，得组分命名为 Cd。Cd 组分静置析出粗结晶，后经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水（70 : 30）作为流动相，等度洗脱 30 min，最终得到 5 个化合物，经鉴定为化合物 1（15.7 mg，11.2 min），化合物 2（9.8 mg，12.1 min），化合物 3（16.8 mg，13.5 min），化合物 4（5.7 mg，14.2 min），化合物 5（7.5 mg，17.2 min）。取 C 组分子母液，经 ODS RP-18 柱梯度洗脱，洗脱剂为甲醇-水（40 : 60 ~ 100 : 0），用 TLC 法合并相同组分共得到 30 个组分，分别命名为 C1 ~ C30。将组分 C30 过 ODS RP-18 柱分离方法重新分离，洗脱剂为甲醇-水（60 : 40 ~ 100 : 0），TLC 法合并相同组分共得到 12 个组分，将其命名为 C30-1 ~ C30-12。组分 C30-12 经分析型 HPLC 分析后，经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水（70 : 30 ~ 100 : 0）作为流动相，梯度洗脱 30 min，所得化合物经鉴定为化合物 6（9.5 mg，17.7 min）。组分 C30-9 分离手段与组分 C30-12 相同，使用乙腈-0.01% 甲酸水（70 : 30）作为流动相，等度洗脱 30 min，所得化合物经鉴定为化合物 7（14.5 mg，19 min）、化合物 8（7.5 mg，22.5 min）。

D 组分采用 ODS RP-18 柱梯度分离方法分离纯化，洗脱剂为甲醇-水（20 : 80 ~ 100 : 0），合并相同组分，共得到 9 个组分，分别命名为 Da ~ Di。将组分 Dc 重复 D 组分分离纯化方法，用 ODS RP-18 柱分离，共得到 7 个组分，分别命名为 Dca ~ Dcg。将组分 Dcd 采用 Sephadex LH-20 凝胶柱（甲醇）分离方式，共分离得到 7 个组分，分别命名为 Dcd-1 ~ Dcd-7。将组分 Dcd-5 经分析型 HPLC 分析后，经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水（60 : 40）作为流动相，等度洗脱 15 min，分离得到化合物 9（17.4 mg，13.5 min）。组分 Dcd-6 分离方法与 Dcd-5 相同，经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水（65 : 35）作为流动相，等度洗脱 20 min，经鉴定得化合物 10（12.5 mg，18.5 min）。将组分 Dce 采用 ODS RP-18 柱梯度分离方法分离纯化，洗脱剂为甲醇-水（50 : 50 ~ 100 : 0），合并相同组分后得到 9 个组分，分别命名为 Dcea ~ Dcei。复

将组分 Dcec 通过 ODS RP-18 柱梯度洗脱, 洗脱剂为甲醇-水 (60:40 ~ 90:10) 共得到 9 个组分, 分别命名为 Dcec-1 ~ Dcec-9。将组分 Dcec-4 经分析型 HPLC 分析后, 经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水 (65:35) 作为流动相, 等度洗脱 20 min, 共分离得到 3 个化合物, 分别为化合物 11 (11.2 mg, 16.1 min), 化合物 12 (8.2 mg, 17.2 min), 化

合物 13 (9.6 mg, 18.8 min)。将组分 Dcec-8 经分析型 HPLC 分析后, 经 HPLC 使用乙腈-0.01% 甲酸水 (55:45 ~ 70:30) 作为流动相, 梯度洗脱 30 min, 共分离得到 3 个化合物分别为化合物 14 (17.3 mg, 20.2 min), 化合物 15 (6.7 mg, 26.8 min), 化合物 16 (5.5 mg, 29.5 min)。

化合物 1 ~ 16 的化学结构见图 1。

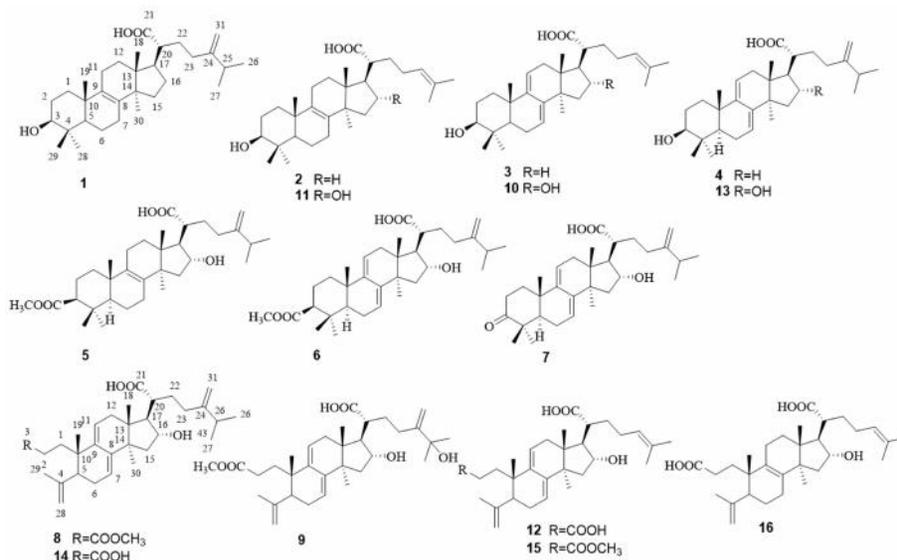


图 1 化合物 1 ~ 16 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 16

3 结构鉴定

化合物 1: 分子式为 C₃₁H₅₀O₃。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于二甲基亚砜。ESI-MS *m/z*: 469.38 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 4.93 (brs, 1H, H-31a), 4.92 (brs, 1H, H-31b), 3.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3), 2.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-17), 2.35 (dd, *J* = 11.1 Hz, 5.3 Hz, 1H, H-25), 1.24 (s, 3H, H-29), 1.16 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-19), 1.06 (brs, 3H, H-26), 1.05 (brs, 6H, H-28, 30), 1.02 (brs, 3H, H-27)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 1 为齿孔酸。

化合物 2: 分子式为 C₃₀H₄₈O₃。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于二甲基亚砜。ESI-MS *m/z*: 455.36 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.34 (m, 1H, H-24), 3.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-3), 2.66 (td, *J* = 11.2 Hz, 3.3 Hz, 1H, H-20), 2.45 (m, 1H, H-17), 1.67 (brs, 3H, H-27), 1.62 (brs, 3H, H-26), 1.25 (s, 3H, H-30), 1.09 (s, 3H, H-18), 1.08 (s, 3H, H-19), 1.03 (s, 3H, H-29), 1.01 (s, 3H, H-28)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。

综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 2 为栓菌酸。

化合物 3: 分子式为 C₃₀H₄₆O₅。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于二甲基亚砜。ESI-MS *m/z*: 453.34 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.62 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-7), 5.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-11), 5.33 (m, 1H, H-24), 3.45 (t, *J* = 7.38 Hz, 1H, H-3), 2.66 (td, *J* = 11.1 Hz, 3.2 Hz, 1H, H-20), 2.54 (m, 1H, H-17), 1.66 (s, 3H, H-26), 1.62 (s, 3H, H-27), 1.22 (s, 3H, H-30), 1.13 (s, 3H, H-18), 1.06 (brs, 6H, H-19, H-29), 1.01 (s, 3H, H-28)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 3 为松苓新酸。

化合物 4: 分子式为 C₃₁H₄₈O₃。白色无定形粉末状。易溶于吡啶、氯仿。ESI-MS *m/z*: 467.36 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.62 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-7), 5.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 4.93 (brs, 1H, H-31a), 4.90 (brs, 1H, H-31b), 3.45 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3), 2.63 (td, *J* = 11.1 Hz, 3.2 Hz, 1H, H-20), 1.26 (m, 1H, H-5), 1.21 (s, 3H, H-29), 1.11 (s,

3H, H-30), 1.07 (brs, 6H, H-19, H-28), 1.04 (brs, 3H, H-18), 1.03 (brs, 3H, H-27), 1.02 (brs, 3H, H-26)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 4 为脱氢齿孔酸。

化合物 5: 分子式为 C₃₃H₅₂O₅。白色无定形粉末状。易溶于吡啶、氯仿。ESI-MS *m/z*: 527.38 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 4.94 (brs, 1H, H-31a), 4.85 (brs, 1H, H-31b), 4.63 (dd, *J* = 11.9 Hz, 4.3 Hz, 1H, H-3), 4.51 (dd, *J* = 8.5, 5.7 Hz, 1H, H-16), 2.92 (td, *J* = 11.0 Hz, 3.3 Hz, 1H, H-20), 2.82 (dt, *J* = 11.3 Hz, 4.7 Hz, 1H, H-17), 2.28 (m, 1H, H-25), 2.04 (s, 3H, H-2), 1.45 (s, 1H, H-30), 1.13 (s, 3H, H-18), 1.00 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H, H-26), 0.99 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, H-27), 0.96 (s, 3H, H-19), 0.93 (s, 3H, H-29), 0.92 (s, 3H, H-28)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 5 为茯苓酸。

化合物 6: 分子式为 C₃₃H₅₀O₅。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于二甲基亚砷。ESI-MS *m/z*: 525.37 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.57 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-7), 5.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-11), 4.95 (brs, 1H, H-31a), 4.85 (brs, 1H, H-31b), 4.71 (dd, *J* = 11.7, 4.2 Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd, *J* = 8.4 Hz, 5.6 Hz, 1H, H-16), 2.89 (m, 1H, H-17), 2.05 (s, 3H, H-2), 1.50 (s, 3H, H-20), 1.05 (s, 3H, H-18), 1.01 (d, *J* = 1.8 Hz, 3H, H-26), 0.99 (q, *J* = 3.9, 3.3 Hz, 9H, H-19, H-28, H-29), 0.90 (s, 3H, H-28)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 6 为去氢茯苓酸。

化合物 7: 分子式为 C₃₁H₄₆O₄。白色无定形粉末状。易溶于吡啶、氯仿, 微溶于甲醇。ESI-MS *m/z*: 481.34 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-7), 5.34 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-11), 4.98 (brs, 1H, H-31a), 4.84 (brs, 1H, H-31b), 4.53 (dd, *J* = 8.3, 5.8 Hz, 1H, H-25), 2.97 (td, *J* = 10.9, 3.2 Hz, 1H, H-20), 2.88 (dd, *J* = 11.2, 5.9 Hz, 1H, H-17), 1.45 (s, 3H, H-30), 1.13 (s, 6H, H-28, H-18), 1.06 (s, 3H, H-29), 1.05 (s, 3H, H-19), 1.00 (d, *J* =

3.7 Hz, 3H, H-26), 0.98 (d, *J* = 3.8 Hz, 3H, H-27)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 1。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 7 为猪苓酸。

化合物 8: 分子式为 C₃₂H₄₈O₅。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS *m/z*: 511.35 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.28 (m, 1H, H-11), 5.26 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-7), 4.97 (brs, 1H, H-31a), 4.83 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-31b), 4.81 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-28a), 4.75 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H, H-28b), 4.52 (dd, *J* = 8.3, 6.0 Hz, 1H, H-16), 3.62 (s, 3H, H-19), 2.94 (td, *J* = 10.9, 3.2 Hz, 1H, H-20), 2.85 (dd, *J* = 11.2, 6.0 Hz, 1H, H-17), 1.72 (s, 3H, H-29), 1.42 (s, 3H, H-30), 1.09 (s, 3H, H-18), 1.00 (d, *J* = 3.6 Hz, 3H, H-29), 0.98 (d, *J* = 3.7 Hz, 3H, H-27), 0.96 (s, 3H, H-19)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 8 为茯苓新酸 AM。

化合物 9: 分子式为 C₃₂H₄₈O₆。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于甲醇。ESI-MS *m/z*: 527.35 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.46 (s, 1H, H-31a), 5.29 (s, 1H, H-11), 5.27 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-31b), 5.14 (s, 1H, H-7), 4.78 (s, 1H, H-28a), 4.73 (s, 1H, H-28b), 4.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-16), 3.62 (s, 3H, H-OMe), 2.97 (t, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-20), 2.86 (dd, *J* = 11.2, 6.1 Hz, 1H, H-17), 1.68 (s, 3H, H-29), 1.53 (s, 3H, H-26), 1.52 (s, 3H, H-27), 1.39 (s, 3H, H-30), 1.03 (s, 3H, H-18), 0.93 (s, 3H, H-19)。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[10]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 9 为茯苓新酸 DM。

化合物 10: 分子式为 C₃₀H₄₆O₄。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS *m/z*: 469.34 [M-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) δ_H: 5.63 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-7), 5.40 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-11), 5.35 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-24), 4.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3), 2.97 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H, H-20), 2.88 (dd, *J* = 11.3, 5.8 Hz, 1H), 2.72 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H, H-17), 1.62 (s, 3H, H-26), 1.60 (s, 3H, H-27), 1.51 (s, 3H, H-30), 1.22 (s, 3H, H-28), 1.14 (s, 3H, H-18), 1.08 (s, 6H, H-19, H-29)。¹³C-NMR

(150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 3β , -16α -二羟基羊毛甾-7, 9(11), 24-三烯-21-酸。

化合物 **11**: 分子式为 $C_{30}H_{48}O_4$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS m/z : 471.36 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.34 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-24), 4.55 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-16), 3.46 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-3), 2.97 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-20), 2.82 (dd, $J = 11.3, 5.9$ Hz, 1H, H-17), 1.62 (brs, 3H, H-27), 1.60 (brs, 3H, H-26), 1.50 (s, 3H, H-30), 1.26 (brs, 3H, H-18), 1.17 (s, 3H, H-19), 1.09 (s, 3H, H-29), 1.04 (s, 3H, H-28)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 16α -羟基松苓新酸。

化合物 **12**: 分子式为 $C_{30}H_{44}O_5$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于甲醇。ESI-MS m/z : 483.32 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.33 (s, 1H, H-11), 5.28 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-7), 4.83 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-28a), 4.76 (s, 1H, H-28b), 4.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-16), 2.95 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-20), 2.85 (dd, $J = 11.3$ Hz, 6.0 Hz, 1H, H-17), 1.73 (brs, 3H, H-29), 1.61 (brs, 3H, H-26), 1.59 (brs, 3H, H-27), 1.46 (brs, 3H, H-30), 1.05 (brs, 3H, H-18), 1.00 (brs, 3H, H-19)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[12]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为茯苓新酸 B。

化合物 **13**: 分子式为 $C_{31}H_{48}O_4$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS m/z : 483.36 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.64 (s, 1H, H-7), 5.40 (s, 1H, H-11), 4.99 (s, 1H, H-31), 4.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-16), 3.50~3.44 (m, 1H, H-3), 2.97 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-20), 1.52 (s, 3H, H-30), 1.22 (s, 3H, H-18), 1.08 (s, 6H, H-19, H-29), 1.00 (dd, $J = 6.9, 4.4$ Hz, H-28, H-27)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[13]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为去氢土莫酸。

化合物 **14**: 分子式为 $C_{31}H_{46}O_5$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于甲醇。ESI-MS m/z : 497.33 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.34 (s, 1H, H-11), 5.29 (brs, 1H,

H-7), 4.98 (brs, 1H, H-31a), 4.85 (brs, 1H, H-31b), 4.83 (brs, 1H, H-28a), 4.77 (brs, 1H, H-20), 4.53 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-16), 2.95 (dt, $J = 11.1, 7.1$ Hz, 1H, H-16), 2.87 (dd, $J = 11.3, 6.0$ Hz, 1H, H-17), 1.74 (s, 3H, H-29), 1.50 (s, 3H, H-30), 1.10 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19), 0.99 (dd, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-27, H-26)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[10]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **14** 为茯苓新酸 A。

化合物 **15**: 分子式为 $C_{31}H_{46}O_5$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS m/z : 497.33 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.33 (brs, 1H, H-11), 5.26 (brs, 1H, H-7), 4.80 (s, 1H, H-28a), 4.72 (s, 1H, H-28b), 4.51 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-16), 3.62 (s, 3H, OMe), 2.94 (t, $J = 10.7$ Hz, 1H, H-20), 2.84 (dd, $J = 11.4, 5.8$ Hz, 1H, H-17), 1.71 (brs, 3H, H-29), 1.61 (brs, 3H, H-26), 1.58 (brs, 3H, H-27), 1.42 (s, 3H, H-30), 1.07 (s, 3H, H-18), 0.95 (s, 3H, H-19)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[11]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **15** 为茯苓新酸 BM。

化合物 **16**: 分子式为 $C_{30}H_{46}O_5$ 。白色无定形粉末状。易溶于吡啶, 微溶于氯仿。ESI-MS m/z : 485.33 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, C_5D_5N) δ_H : 5.34 (brs, 1H, H-24), 5.00 (s, 1H, H-28b), 4.90 (s, 1H, H-28a), 4.53 (brs, 1H, H-16), 2.99-2.92 (m, 1H, H-20), 2.82 (m, 1H, H-17), 2.70 (m, 1H, H-2b), 2.54~2.45 (m, 2H, H-23b, H-23a), 1.80 (brs, 3H, H-29), 1.62 (d, $J = 3.8$ Hz, 3H, H-26), 1.60 (d, $J = 4.0$ Hz, 3H, H-27), 1.51 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H, H-30), 1.17 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H, H-18), 0.96 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H, H-19)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, C_5D_5N) 数据见表 2。综合以上氢谱、碳谱数据, 并与文献^[14]报道数据比对, 结果基本一致, 故鉴定化合物 **16** 为茯苓新酸 G。

4 讨论

在临床药用中, 茯神较茯苓镇静安神作用显著, 从中药配伍角度分析, 茯神是茯苓与茯神木两味药材的天然配伍, 茯苓利水渗湿、健脾, 茯神木平肝安神。从化学成分分析, 王宏侠^[15]对茯苓、茯神、茯苓皮总三萜成分的研究表明, 茯苓中总三萜含量最高, 其次是茯神, 最后是茯苓皮; 茯苓、茯神中所含总三萜类化合物的表征构型和含量

表 1 化合物 1 ~ 7 的 ¹³C-NMR 数据 (¹³C-NMR 为 150 MHz, 均在 C₅D₅N 中测量)

Tab 1 ¹³C-NMR data for compounds 1 ~ 7 (150 MHz for ¹³C-NMR, measured in C₅D₅N)

位置	1	2	3	4	5	6	7
1	36.6	36.5	36.3	36.1	35.3	35.5	37.1
2	29.4	29.1	28.7	28.4	24.8	24.9	35.2
3	78.3	78.3	78.1	77.6	81.0	80.9	215.6
4	39.5	39.3	39.3	39.1	38.2	38.6	47.6
5	51.1	51.2	49.8	49.6	51.1	49.9	51.3
6	16.6	16.1	23.5	23.2	18.2	23.4	24.2
7	27.9	27.7	121.4	121.1	27.1	121.1	121.0
8	134.6	135.1	142.7	142.3	134.2	143.1	143.1
9	135.3	135.5	146.7	146.2	135.3	146.1	145.1
10	37.6	37.7	37.8	37.4	37.2	37.6	37.7
11	21.7	21.5	116.7	116.2	21.3	117.4	118.1
12	29.6	29.7	36.1	35.8	30.0	36.3	36.5
13	45.3	45.2	44.3	44.0	46.2	45.4	45.2
14	50.2	50.2	50.5	50.2	49.1	49.7	49.7
15	31.2	31.2	31.7	31.2	44.0	44.5	44.6
16	27.1	27.2	27.3	27.0	77.0	76.5	76.6
17	48.1	48.1	48.1	47.5	57.3	57.9	57.7
18	19.1	24.8	16.3	16.0	18.1	18.1	17.8
19	19.7	16.7	23.0	22.4	19.5	23.2	22.7
20	49.6	49.4	49.0	48.6	49.0	48.3	48.8
21	176.0	179.1	178.5	178.3	179.1	179.0	179.3
22	32.2	33.7	33.3	31.4	31.5	31.5	31.6
23	33.1	27.1	26.8	32.5	33.6	34.5	33.5
24	156.2	125.2	124.8	155.2	156.6	156.3	156.3
25	34.6	132.1	131.8	34.0	34.5	34.0	131.3
26	26.5	26.6	25.8	21.3	22.3	22.3	25.3
27	22.1	18.1	17.6	21.3	22.2	18.0	17.5
28	29.0	29.0	28.9	28.6	28.3	28.5	114.3
29	29.0	16.7	16.8	16.4	17.1	17.3	66.3
30	24.4	16.1	25.5	25.4	25.5	26.9	26.0
31	107.4			106.8	107.4	107.4	
OAc-COOR					171.0	170.9	
OAc-CH ₃					21.1	21.4	

差异, 是决定茯神镇静安神功效强于茯苓的重要因素^[16]从药理作用分析, 茯神和茯苓的现代药理研究表明, 其分别偏重于镇静安神和利水渗湿^[17-21]。

本实验通过多种色谱分离技术及波谱学手段, 对茯神木的化学成分进行系统性研究, 首次分离鉴定出 16 个羊毛甾烷型、裂环羊毛甾烷型三萜类化合物: 其具体结构表征为羊毛甾 -8- 烯型化合物 **1**、**2**、**5**、**11**; 3, 4- 开环 - 羊毛甾 -8- 烯型化合物 **16**; 羊毛甾 -7, 9 (11) - 二烯型化合物 **3**、**4**、**6**、**7**、**10**、**13**; 3, 4- 开环 - 羊毛甾 -7, 9 (11) - 二烯型化合物 **9**、**12**、**15**^[9]。羊毛甾烷型及 3, 4 开环羊毛甾烷型化合物, 具有很好的抗肾纤维化活性, 通过抑制转化生长因子-β1 和血管紧张素 II 诱导的 HK-2 细胞纤维化来起到抗肾纤维化作用, 其中 3, 4 开环羊毛甾烷型化合物的 3 号位含有羧基及其侧链含有羟基的结构, 抗肾纤维化活性大于羊毛甾烷型^[11]。齿孔酸 (**1**)、脱氢齿孔酸 (**4**)、茯苓酸 (**5**) 等是茯苓三萜酸中抗利尿作用的主要活性成分; 茯苓酸 (**5**) 具有镇静催眠及抗阿尔茨海默病的活性; 茯苓酸 (**5**)、去氢茯苓酸 (**6**) 和茯苓新酸 A (**14**) 具有抗肿瘤的活性研究^[9]。

茯神木分离鉴定出的化合物, 已全部在茯苓中分离鉴定出; 部分化合物, 如茯苓新酸 BM、去氢土莫酸、去氢茯苓酸等已在茯神中分离鉴定出^[9]; 目前, 已报道文献中, 松根未见该类型化合物, 其主要化合物结构为二萜类等^[22]; 综上, 茯神的镇静安神效果可能与茯神木中三萜类化合物及松根中二萜类化合物等多成分协同作用有关。此外, 茯神木选以赤松或马尾松的幼根, 其具有祛风、活络、止血的功效^[2]; 因此茯神木综合了茯苓类药材和松根活性, 具有平肝安神作用, 可用于治疗中风、惊悸健忘, 可作为现代抗中风药剂配伍, 具有新药开发的潜在药用价值。

表 2 化合物 8 ~ 16 的 ¹³C-NMR 数据 (¹³C-NMR 为 150 MHz, 均在 C₅D₅N 中测量)

Tab 2 ¹³C-NMR data for compounds 8 ~ 16 (150 MHz for ¹³C-NMR, measured in C₅D₅N)

位置	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	36.2	35.6	36.7	36.6	36.8	36.5	36.6	36.6	33.6
2	29.6	29.4	26.1	29.0	30.4	28.6	29.2	30.7	30.3
3	147.9	174.6	78.3	78.5	176.6	78.1	174.3	175.3	176.8
4	149.5	148.9	78.3	39.4	149.6	39.1	149.2	149.0	148.2
5	51.3	50.5	39.3	51.3	51.1	50.3	51.2	52.0	46.5
6	28.8	28.2	23.3	19.3	28.9	23.5	28.8	28.3	24.7
7	118.2	117.2	121.3	27.5	118.3	121.2	118.2	118.3	26.2
8	142.1	141.3	143.0	135.1	142.2	142.6	142.3	141.6	139.5
9	137.5	136.4	146.7	135.2	137.9	146.4	137.7	137.6	130.7
10	39.1	28.3	38.1	37.3	39.2	37.6	38.8	39.4	41.0
11	120.6	120.4	116.8	21.2	120.7	116.3	120.1	120.5	22.0
12	37.3	36.7	36.2	30.1	37.3	36.0	36.0	37.3	30.3
13	45.6	45.5	45.4	49.1	46.1	45.4	45.4	46.5	46.5

续表 2

位置	8	9	10	11	12	13	14	15	16
14	49.6	49.1	49.2	46.4	49.5	49.1	49.2	49.1	50.5
15	44.1	43.7	44.7	44.1	44.3	44.6	43.4	44.1	44.2
16	76.4	76.3	76.7	76.1	76.8	76.2	76.3	76.2	76.3
17	57.9	57.3	57.5	57.3	57.8	57.7	57.4	58.5	57.8
18	18.5	18.2	18.0	18.0	18.7	17.6	18.1	18.8	18.2
19	22.4	21.7	23.8	19.4	22.4	22.8	22.2	22.3	22.9
20	48.5	48.6	48.5	48.2	48.5	48.2	48.3	48.2	48.5
21	179.0	176.3	179.2	179.2	177.9	178.7	178.4	179.4	179.2
22	31.5	32.1	33.6	33.6	33.4	31.1	31.2	33.3	33.5
23	33.6	32.0	27.3	27.3	27.5	33.5	33.2	27.5	27.5
24	156.3	157.5	125.4	125.3	125.5	155.8	125.3	125.2	125.6
25	34.4	72.4	131.8	131.5	132.0	33.8	131.9	132.8	131.9
26	22.4	29.8	25.1	26.1	26.1	21.8	21.7	26.1	26.5
27	22.4	29.6	18.1	18.1	17.8	21.6	21.6	18.1	18.1
28	112.6	112.0	29.0	29.0	112.5	28.7	111.8	112.5	114.5
29	22.2	21.8	16.3	16.3	22.5	16.4	22.2	22.6	23.7
30	25.1	24.5	26.4	28.2	25.2	26.6	24.6	25.4	26.7
31	107.3	106.6				106.6	106.7		
OAc-CH ₃	51.7								
OMe		51.1						51.7	

本实验首次分离鉴定的化合物, 为茯神木鉴别于松根提供中药化学理论依据, 更进一步丰富了茯苓类药材的化学库。

参考文献

- [1] 王娜, 刘欣侗, 刘军玲, 等. 高效液相色谱波长切换法结合双标线性校正法用于茯神木指纹图谱的定性研究[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(10): 1791-1799.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典(第二版)[M]. 下册. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2155-2156.
- [3] 路平, 史汶龙, 杨思雨, 等. 茯苓化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1246-1254.
- [4] 王国定, 李光华, 杨长群, 等. 马尾松林下套种茯苓栽培技术[J]. 现代农业科技, 2019(21): 91-92.
- [5] 李娜. 茯苓类药材质量标准研究及应用[D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [6] 王军民, 刘思远, 杨莹, 等. 茯神化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43(10): 2728-2732.
- [7] 缪希雍·明. 神农本草经疏. 30卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 199.
- [8] 聂磊. 茯苓、茯神和茯苓皮成分比较研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.
- [9] 黄兴琳, 杨泽荣, 李林哲, 等. 基于茯苓菌核的三种药材的化学成分及药理研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20240703.1728.006.html>.
- [10] 邓子怡, 郁阳, 李莉, 等. 茯神裂环羊毛甾烷型化学成分研究[J]. 中南药学, 2024, 22(2): 404-408.
- [11] 王明. 茯苓皮抗肾纤维化物质基础及其作用机制研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [12] Tai T, Shingu T, Kikuchi T, et al. Triterpenes from the surface layer of *Poria cocos* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(5): 1165-1169.
- [13] Zhou L, Zhang YC, Gapter LA, et al. Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2008, 56(10): 1459-1462.
- [14] Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, et al. Inhibition of tumor-promoting effects by poricoic acids G and H and other lanostane-type triterpenes and cytotoxic activity of poricoic acids A and G from *Poria cocos* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(4): 462-465.
- [15] 王宏侠. 茯苓不同药用部位化学成分分析及赤茯苓质量标准研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [16] 王军民, 刘思远, 杨莹, 等. 茯神化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43(10): 2728-2732.
- [17] 游秋云, 王平. 茯苓、茯神水煎液对小鼠镇静催眠作用的比较研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(2): 15-17.
- [18] 林斌, 何艳梅. 茯苓三萜化合物的药理作用研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2014(31): 77.
- [19] 刘惠知, 吴胜莲, 张德元, 等. 茯苓药物成分提取分离及其药用价值研究进展[J]. 中国食用菌, 2015, 34(6): 1-6.
- [20] 王耀登, 安靖, 聂磊, 等. 不同产地茯苓饮片的多糖的含量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 321-322.
- [21] 邓刚民, 许津. 茯苓素一种潜在的醛固酮拮抗剂[J]. 中国抗生素杂志, 1992, 17(1): 34-37.
- [22] Rogachev AD, Salakhutdinov NF. Chemical composition of *Pinus sibirica* (Pinaceae) [J]. *Chem Biodivers*, 2015, 12(1): 1-53.

(收稿日期: 2024-09-23; 修回日期: 2024-11-05)

不同产地老鹰茶挥发油化学成分分析与比较

陈欢¹, 谈利红², 曹纬国¹, 余保^{1*} (1.重庆中医药学院, 重庆 402760; 2.重庆医药高等专科学校, 重庆 401331)

摘要: **目的** 比较不同产地老鹰挥发油的化学成分。**方法** 采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 利用气相色谱-质谱联用技术分析不同产地老鹰茶挥发性成分的化学组成, 归一化法测定其相对含量。**结果** 不同产地的老鹰茶挥发油含量不同, 巫溪县老鹰茶挥发油含量最高(0.38%), 广元市老鹰茶挥发油含量最低(0.19%); 不同产区老鹰茶挥发油主要成分大体相同, 但是共有成分的含量差异较大, 1, 8-桉叶精、十二醛、榄香醇、柠檬醛、橙花叔醇和蒎烯在不同产地老鹰茶挥发油中占比较高; 聚类分析结果显示巫山县和巫溪县产地为第 I 类, 广元市和遵义市产地为第 II 类, 武隆区产地为第 III 类。**结论** 不同产地老鹰茶挥发油主要成分种类相似, 含量存在差异, 本研究可为老鹰茶资源开发及质量评估提供参考。

关键词: 老鹰茶; 不同地区; 挥发油; 气相色谱-质谱联用

中图分类号: R914.4, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0073-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.011

Volatile oil components in hawk tea from different habitats

CHEN Huan¹, TAN Li-hong², CAO Wei-guo¹, YU Bao^{1*} (1. *Chongqing College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402760*; 2. *Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331*)

Abstract: Objective To compare the chemical compositions of volatile oil in hawk tea from different habitats. **Methods** The volatile oil was extracted by steam distillation, and the chemical compositions of the volatile oil in hawk tea from different habitats were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and the relative content was determined by normalization method. **Results** The content of volatile oil in hawk tea from different habitats was different, with the highest content of volatile oils from Wuxi county, reaching 0.38%, while the lowest content of volatile oil from Guangyuan city (0.19%). The main components of volatile oil from different habitats were generally the same, but the content of common components varied greatly: 1, 8-cineole, dodecanal, linalool, citral, nerolidol and camphene accounted for a high proportion in the volatile oil in hawk tea from different habitats. The cluster analysis showed that Wushan county and Wuxi county were classified as type I, while Guangyuan city and Zunyi city as type II, and Wulong district as type III. **Conclusion** The main components of volatile oil in hawk tea from different habitats are similar, but the content varies. This study provides a reference for the development and quality evaluation of hawk tea resources.

Key words: hawk tea; different regions; volatile oil; gas chromatography-mass spectrometry

老鹰茶是我国特有的古茶种, 来源于樟科植物毛豹皮樟 *Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P.H.Huang 的嫩茎, 主要分布在我国四川、重庆和贵州等地区, 是一种重要的经济作物^[1]。老鹰茶因不含咖啡因, 被称为“非茶之

茶”, 其性甘凉, 具有止咳、祛痰、平喘、消暑、解渴等功效^[2]。现代研究表明老鹰茶还具有降糖、降脂、保肝、抗紫外线、抗炎及免疫调节等多方面的药理作用^[3-5]。

老鹰茶香气浓郁, 隔夜不馊, 这一现象与其所

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (No.CSTB2022NSCQ-MSX1646); 重庆市教育委员会科学技术研究项目 (No.KJQN202215132)。

作者简介: 陈欢, 女, 副教授, 主要从事中药药理学研究, email: chenhuan2020@cqmu.edu.cn * **通信作者:** 余保, 男, 助理研究员, 主要从事中药药效物质基础研究, email: yubao@cqctcm.edu.cn

含挥发油成分密切相关。研究表明,老鹰茶挥发油主要成分为 α -蒎烯、石竹烯、柠檬醛、1, 8-桉叶素、橙花叔醇和大根香叶烯 B 等^[6]。石竹烯具有丁香香气,柠檬醛具有浓郁的柠檬香味,榄香醇带有清香的花香气味,它们都具有香味增效作用,可能是老鹰茶茶汤香气浓郁和持久的原因^[7]; α -蒎烯、柠檬醛具有平喘、祛痰、抑菌的作用,1, 8-桉叶素、橙花叔醇具有抗菌、消炎、驱虫等作用,这可能与老鹰茶隔夜不馊的独特现象有关^[8]。

目前,已经有文献报道了个别地区老鹰茶挥发油的组成,但是对于不同产地老鹰茶挥发油的含量及其组成特点尚未见报道。为全面了解各个产区老鹰茶挥发油的差异,本研究利用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析了四川、重庆和贵州等主要产区老鹰茶挥发油的含量及其组成,旨在为老鹰茶深加工及其产品开发提供科学参考,同时促进老鹰茶的规范化种植。

1 材料

挥发油提取器(上海平环燃烧设备工程技术有限公司);BSA224S-CW千分之一分析天平(德国赛多利斯);Agilent 5977B气相色谱-质谱联用仪(Thermo Fisher Scientific公司);NIST谱库(美国国家标准与技术局)。

老鹰茶样品分别采自重庆市巫山县、巫溪县、武隆区,四川省广元市和贵州省遵义市,经重庆中医药学院张丹教授鉴定为樟科木姜子属植物毛豹皮樟 [*Litsea coreana* var. *lanuginosa* (Migo) Yang et P.H.Huang] 的叶片。

2 方法与结果

2.1 挥发油的含量测定

参照《中国药典》2020年版(通则2204)挥发油测定法甲法提取挥发油。称取老鹰茶粉末250g置于5000mL圆底烧瓶中,水蒸气蒸馏3h,待冷却至室温,量取挥发油体积,重复3次,计算含量,结果见表1。不同产地老鹰茶挥发油含量差异较大,挥发油含量范围在0.19%~0.38%,含量为巫溪县>遵义市>巫山县>武隆区>广元市。巫溪县的老鹰茶挥发油含量最高,巫山县、武隆区、广元市及遵义市老鹰茶挥发油均明显低于巫溪县($P < 0.05$)。

2.2 挥发油的成分分析

采用Agilent 5977B气相色谱-质谱联用仪,火焰离子化检测器(FID),HP-5MS毛细管柱(30m×0.25mm,0.25 μ m),载气为氮气(1.0mL·min⁻¹)。升温程序:70℃保持2min;以10℃·min⁻¹升至120℃;以2℃·min⁻¹升至130℃,保持3min;以3℃·min⁻¹升至160℃;以8℃·min⁻¹升至220℃。质谱条件:EI离子源,

表1 不同产地老鹰茶挥发油含量和性状

Tab 1 Content and characteristics of volatile oil in hawk tea from different habitats

采集地点	采集时间	挥发油含量/%	色状
巫山县	2023年3月	0.24±0.2**	黄绿色透明液体
巫溪县	2023年3月	0.38±0.4	黄绿色透明液体
武隆区	2023年3月	0.23±0.4**	黄绿色透明液体
广元市	2023年3月	0.19±0.2**	黄绿色透明液体
遵义市	2023年3月	0.28±0.3*	黄绿色透明液体

注:与巫溪县比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Wuxi county, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

电离电压70eV;离子源温度230℃;接口温度250℃;扫描范围:30~800m/z。

对老鹰茶挥发油进行GC-MS分析,得到5个产地老鹰茶挥发油的总离子色谱图(见图1),利用NIST08标准谱库对各个挥发性成分进行碎片对比,结合相关文献报道和相对保留时间,确定老鹰茶挥发油中化合物结构,按照峰面积归一化法计算样品中各成分的相对含量。从5个不同产地的老鹰茶挥发油中共鉴定出92个化合物,包含1, 8-桉油精、十二醛、柠檬醛、柠檬烯、薄荷酮、丁子香烯、榄香醇、viridiflorene、pethylbrene等,其中没有特有化合物。结果见表2。

2.3 聚类分析

以5个产地老鹰茶挥发油的化学成分相对含量为变量,采用SPSS 26.0软件组间联接系统聚类法,以Euclidean距离为测度进行聚类分析,结果见图2。当类间距为10时,5个产地样品可以聚为三类,巫山县和巫溪县为第I类,广元市和遵义市为第II类,武隆区为第III类;当类间距为20时,5个产地样品可以聚为两类,巫山县、巫溪县、广元市和遵义市为第I类,武隆区为第II类。结果表明,老鹰茶挥发油的化学成分及含量与样品的产地有关,这种差异与各个地区的海拔、地形等环境因素的相关性有待进一步研究。

2.4 数据分析

试验结果采用Origin 2021软件作图,SPSS 26.0软件进行数据统计和整理,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

老鹰茶挥发油含量测定结果显示,不同产地挥发油含量差异较大,巫溪县的老鹰茶挥发油含量最高(0.38%),广元市的老鹰茶挥发油含量最低(0.19%)。从挥发油含量的角度来看,巫溪县老鹰茶品质更优。通过GC-MS技术比较分析,发现不同产区老鹰茶挥发油主要成分大体相同,但是共有成分的含量差异较大。1, 8-桉叶精、十二醛、榄香醇、柠檬醛、橙花叔醇和蒎烯,这6种

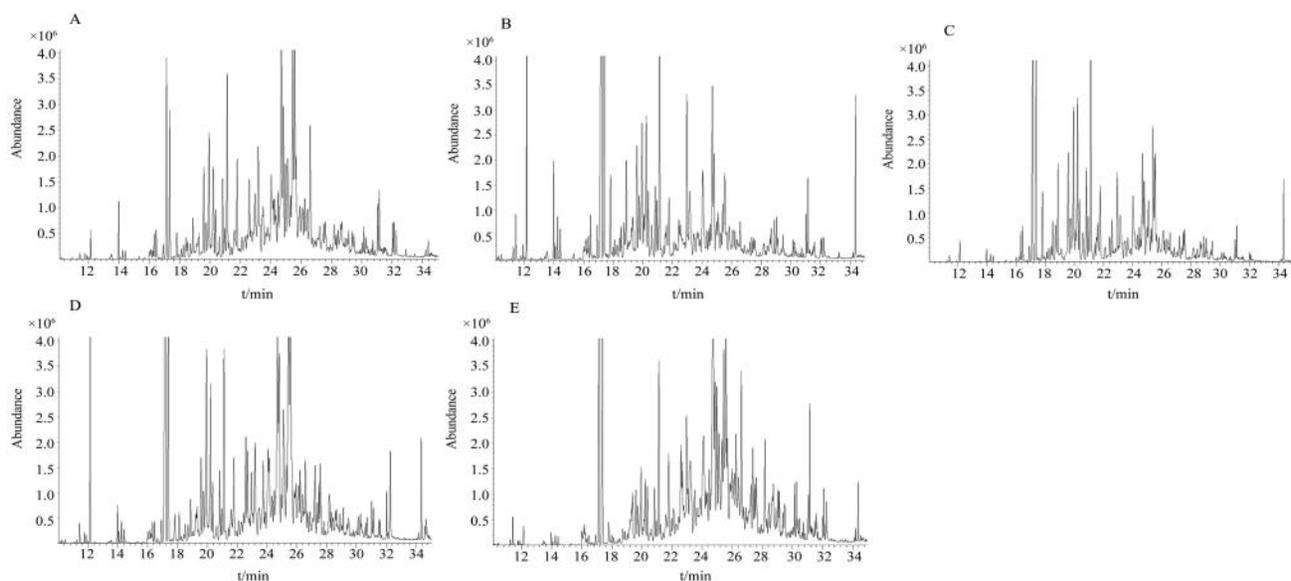


图 1 不同产地老鹰茶挥发油总离子色谱图

Fig 1 Total ion chromatogram of volatile oil in hawk tea from different habitats

A. 广元市 (Guangyuan city); B. 巫山县 (Wushan county); C. 巫溪县 (Wuxi county); D. 武隆区 (Wulong district); E. 遵义市 (Zunyi city)

表 2 不同产地老鹰茶挥发油成分和相对含量

Tab 2 Composition and relative content of volatile oil in hawk tea from different habitats

序号	化合物名称	化学式	相对含量 /%				
			巫山县	巫溪县	武隆区	广元市	遵义市
1	萘烯	C ₁₀ H ₁₆	2.83	2.50	2.78	2.68	3.23
2	邻伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	0.63	0.09	0.34	0.65	0.31
3	1-十三碳烯	C ₁₃ H ₂₆	0.02	0.23	—	0.56	—
4	2-十一烷酮	C ₁₁ H ₂₄ O	—	0.91	0.81	—	0.08
5	十一烷	C ₁₁ H ₂₄	—	0.53	0.44	0.04	1.40
6	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	0.30	1.16	1.53	1.20	1.61
7	葑醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.47	1.03	0.17	0.47	0.12
8	异冰片	C ₁₀ H ₁₈ O	0.15	—	—	—	0.25
9	十四烷醛	C ₁₄ H ₂₈ O	0.60	1.22	0.19	0.11	—
10	萘	C ₁₀ H ₈	—	0.01	1.25	0.10	—
11	α-松油醇乙酸酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.18	—	0.25	0.10	0.06
12	异薄荷醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.04	0.12	—	—	0.05
13	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	2.86	0.16	1.07	0.10	0.05
14	壬酸	C ₉ H ₁₈ O ₂	0.29	—	—	0.12	—
15	乙酸肉桂酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1.35	0.21	0.34	0.73	0.13
16	2-十一烷酮	C ₁₁ H ₂₂ O	0.25	—	0.13	—	—
17	10-十一烯醛	C ₁₁ H ₂₀ O	0.62	0.13	0.22	0.14	0.11
18	十一醛	C ₁₁ H ₂₂ O	0.45	0.11	0.14	0.05	0.09
19	氧化芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.14	—	—	1.07	—
20	沉香醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.17	0.07	—	—	0.02
21	癸二醇	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	0.17	0.10	0.05	0.15	0.20
22	N-癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.58	—	0.23	0.23	0.45
23	1-十一醇	C ₁₁ H ₂₄ O	0.25	0.08	—	0.18	0.15
24	依兰烯	C ₁₅ H ₂₄	0.48	0.67	0.26	0.45	0.39
25	α-古巴烯	C ₁₅ H ₂₄	0.82	0.71	0.26	0.55	0.14
26	α-愈创木烯	C ₁₅ H ₂₄	0.30	—	—	0.12	0.08
27	醋酸冰片酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.39	0.37	0.30	0.17	0.08
28	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	1.00	—	9.21	—	3.14
29	十二醛	C ₁₂ H ₂₄ O	5.65	6.51	4.60	2.45	3.81
30	异戊二烯	C ₁₅ H ₂₄	0.08	—	0.06	0.08	—
31	蓝桉醇	C ₁₅ H ₂₆ O	2.01	1.80	0.52	0.72	0.20
32	α-紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	0.20	—	0.05	—	0.15

续表 2

序号	化合物名称	化学式	相对含量 /%				
			巫山县	巫溪县	武隆区	广元市	遵义市
33	β -可巴烯	C ₁₅ H ₂₄	0.44	0.01	0.20	0.23	0.10
34	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.84	1.02	0.19	0.19	2.01
35	γ -榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	—	—	0.10	3.40	—
36	α -马啊里烯	C ₁₅ H ₂₄	0.77	1.14	0.30	0.44	0.14
37	表萜澄茄油烯醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.54	0.45	0.20	—	0.04
38	异勒烯	C ₁₅ H ₂₄	0.52	0.69	0.06	0.39	—
39	τ -依兰醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1.15	—	0.38	—	0.40
40	异戊酸香叶酯	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	2.35	2.47	0.40	0.86	0.24
41	δ -榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.37	—	0.19	0.47	0.21
42	十一酸	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1.10	0.01	0.53	0.58	1.19
43	丁子香烯	C ₁₅ H ₂₄	—	4.16	1.71	2.08	1.24
44	aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄	3.32	1.77	0.56	—	0.84
45	蛇麻烯	C ₁₅ H ₂₄	2.13	—	0.62	1.17	—
46	viridiflorene	C ₁₅ H ₂₄	4.30	4.82	3.70	3.08	1.77
47	大香叶烯 B	C ₁₅ H ₂₄	0.97	0.83	0.28	1.08	0.33
48	2-十三烷酮	C ₁₃ H ₂₆ O	—	1.17	0.53	0.59	0.31
49	pethylbrene	C ₁₅ H ₂₄	4.21	5.05	2.84	2.44	1.15
50	α -依兰烯	C ₁₅ H ₂₄	1.61	1.73	0.96	1.07	0.95
51	δ -杜松油烯	C ₁₅ H ₂₄	1.67	2.34	1.09	1.57	0.10
52	菖蒲萜烯	C ₁₅ H ₂₂	1.30	1.20	0.54	0.41	0.49
53	1, 8-桉油精	C ₁₀ H ₁₈ O	8.02	7.00	9.85	7.62	10.91
54	γ -依兰油烯	C ₁₅ H ₂₄	0.43	0.60	—	0.40	0.39
55	β -愈创木烯	C ₁₅ H ₂₄	—	0.84	0.20	1.22	—
56	α -白菖考烯	C ₁₅ H ₂₀	1.97	2.47	1.34	2.20	1.72
57	萜澄茄油烯醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1.26	1.29	1.10	0.27	0.61
58	白菖考烯 B	C ₁₅ H ₂₀	1.15	0.65	0.57	0.74	2.15
59	十二酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.71	1.29	1.83	—	2.21
60	喇叭茶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	1.59	0.02	—
61	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	3.99	2.46	1.32	2.40	2.50
62	β -costol	C ₁₅ H ₂₄ O	3.11	2.28	2.70	3.86	—
63	β -紫罗兰酮环氧化物	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	0.76	0.65	—	—	1.84
64	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	—	1.31	0.61	2.44	1.14
65	蛇麻二烯醇	C ₁₅ H ₂₆ O	—	1.46	2.13	1.50	—
66	橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	4.08	2.84	2.19	3.29	4.58
67	沉香螺醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.89	0.64	0.83	1.37	0.97
68	刺柏烯醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.99	1.10	1.11	1.16	1.17
69	α -考绕咖烯	C ₁₅ H ₂₀	0.80	1.04	1.01	—	1.57
70	柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	4.46	3.50	4.95	4.68	7.66
71	5-十一碳烯	C ₁₁ H ₂₂	—	0.06	1.73	2.46	2.20
72	τ -杜松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1.76	2.70	3.80	4.06	3.32
73	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	0.83	1.05	1.37	1.67	—
74	薄荷酮	C ₁₀ H ₁₈ O	1.46	4.04	0.51	6.59	3.90
75	榄香醇	C ₁₅ H ₂₆ O	3.09	4.02	7.57	5.98	4.58
76	喇叭茶萜醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.84	0.96	1.08	—	1.34
77	十三烷酸	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	—	1.70	1.20	2.52	2.02
78	卡达烯	C ₁₅ H ₁₈	0.86	0.70	1.20	1.64	2.21
79	雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.65	0.50	1.56	3.81	3.60
80	延胡索酮	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	—	0.72	0.84	—	0.97
81	刺柏脑	C ₁₅ H ₂₆ O	0.41	0.30	0.51	0.40	—
82	α -香附酮	C ₁₅ H ₂₂ O	0.25	0.71	0.48	0.55	0.44
83	肉豆蔻烯酸	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	0.41	0.53	0.70	0.94	1.03
84	豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.55	0.56	0.53	0.60	0.59
85	肉豆蔻酸乙烯基酯	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.82	0.54	—	—	0.94
86	香附烯酮	C ₁₅ H ₂₂ O	0.52	0.32	0.50	—	0.80
87	麝香梨内酯	C ₁₆ H ₂₈ O ₂	0.15	0.08	—	0.08	—
88	2-十三醇	C ₁₃ H ₂₈ O	0.22	—	0.07	0.17	0.82

续表 2

序号	化合物名称	化学式	相对含量 /%				
			巫山县	巫溪县	武隆区	广元市	遵义市
89	法尼基丙酮	C ₁₈ H ₃₀ O	—	0.40	—	—	0.04
90	santalcamphor	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0.34	—	0.01	0.55	1.57
91	正十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.48	0.07	0.20	0.78	0.88
92	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	2.28	0.21	0.92	0.29	0.85

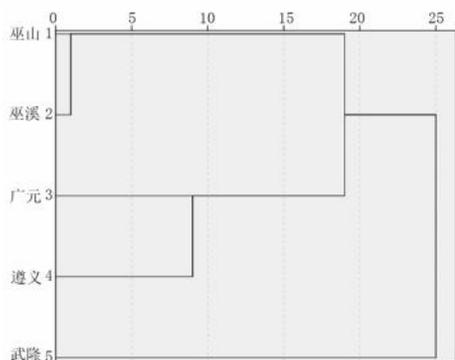


图 2 不同产地老鹰茶挥发油聚类树状图
Fig 2 Cluster tree diagram of volatile oil in hawk tea from different habitats

成分在不同产地老鹰茶挥发油中占比都较高，可以考虑作为含量测定的参考指标。1, 8- 桉叶精是所有地区老鹰茶挥发油含量最高的化合物，含量均≥ 7.00%，其中遵义市的高达 10.91%，与 Yu 等^[9]报道重庆西阳老鹰茶挥发油主要成分为 1, 8- 桉叶精相一致，但与赵欣等^[10]报道的四川蒙顶山的老鹰茶挥发油的主要成分为癸醛不同。不同产地老鹰茶中十二醛的含量差异较大，巫溪县的含量最高 (6.51%)，其次为巫山县 (5.65%)、武隆区 (4.60%)、遵义市 (3.81%)、广元市 (2.45%)；榄香醇在武隆区老鹰茶中含量最高 (7.57%)；柠檬醛在遵义市老鹰茶中含量最高 (7.66%)；橙花叔醇在巫山县老鹰茶中含量最高 (4.08%)；苾烯除了遵义市外，含量差别不大。挥发油主要成分的差异，可能是不同地区间植物的生长环境不同。研究显示，不同地区或生境下生长的植物，其挥发油的组成可能存在化学差异，这也是植物适应环境的内部体现^[11-12]。此外，研究结果表明 5 个不同产地的老鹰茶挥发油不含特有化合物。

四川、重庆和贵州是老鹰茶的三大主产地，特别是重庆的巫溪县，2023 年全县的老鹰茶年产量达到了 100 吨，产值达到 1.5 亿元。全面了解各个产地老鹰茶挥发油的差异，有利于老鹰茶资源的深入开发利用。本研究通过对不同地区老鹰

茶挥发油的成分进行比较研究，可为其资源的开发利用、挥发油的质量控制、化学成分指纹图谱的制定提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1986: 296.
- [2] 许利嘉, 肖伟, 马培, 等. 中国古茶种 - 老鹰茶 [J]. 中国现代中药, 2012, 14 (2): 60-63.
- [3] Yang YY, Peng J, Li QQ, et al. Optimization of pile-fermentation process, quality and microbial diversity analysis of dark hawk tea (*Machilus rehderi*) [J]. LWT-Food Sci Technol, 2024, 192: 115707.
- [4] Tao W, Cao WG, Yu B, et al. Hawk tea prevents high-fat diet-induced obesity in mice by activating the AMPK/ACC/SREBP1c signaling pathways and regulating the gut microbiota [J]. Food Funct, 2022, 13 (11): 6056-6071.
- [5] Yu B, Zhang D, Wu YQ, et al. A new polysaccharide from Hawk tea: structural characterization and immunomodulatory activity associated with regulating gut microbiota [J]. Food Chem, 2023, 418: 135917.
- [6] 余保. 不同基源老鹰茶黄酮类和挥发油的成分分析及活性比较 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [7] 屈恋, 张闻扬, 刘雄民, 等. 柠檬桉果实、叶挥发油的成分分析及对比 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (12): 71-75.
- [8] 韦玮, 罗秋月, 姚金娥. 乌榄叶挥发油提取工艺优选及化学成分分析 [J]. 中南药学, 2018, 16 (4): 500-503.
- [9] Yu B, Zhang D, Yan XW, et al. Comparative evaluation of the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the volatile oils of Hawk tea from six botanical origins [J]. Chem Biodivers, 2016, 13 (11): 1573-1583.
- [10] 赵欣, 李贵节. 四川蒙顶地区老鹰茶香气成分分析和体外功能性效果研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (7): 83-86.
- [11] 郁建平, 古练权, 任三香. 贵州老鹰茶 (豹皮樟) 挥发油成分研究 [J]. 食品科学, 2001, 22 (7): 63-64.
- [12] Qin Z, Feng K, Wang WS, et al. Comparative study on the essential oils of six Hawk tea (*Litsea coreana* Levl. var. *lanuginosa*) from China: yields, chemical compositions and biological activities [J]. Ind Crop Prod, 2018, 124: 126-135.

(收稿日期: 2024-05-07; 修回日期: 2024-06-26)

不同等级茯苓块、茯苓片的外观性状与内在成分的相关性研究

黄佳静¹, 房悦¹, 王妍妍^{1, 2}, 张越^{1, 2, 4}, 王雷^{1, 2, 3, 5}, 俞年军^{1, 2, 3, 4, 5}, 彭代银^{1, 2, 3, 4, 5}, 陈卫东^{1, 2, 3, 4, 5, 6*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 3. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 4. 直接口服中药饮片亳州市重点实验室, 安徽 亳州 236800; 5. 中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 6. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 探究不同等级茯苓块、茯苓片外观性状与内在成分之间的关系, 为茯苓质量评价提供科学依据。**方法** 依据 2020 年版《中国药典》规定, 收集不同等级的茯苓块及茯苓片, 通过市场调研将茯苓块分为选货一等、选货二等和统货, 茯苓片分为选货和统货, 按照药典要求测定浸出物和总灰分含量, 同时测定活性成分水溶性多糖、碱溶性多糖及总三萜酸的含量, 并对内在指标进行相关性分析。**结果** 茯苓块选货一等的浸出物、总灰分、水溶性多糖和总三萜酸含量显著低于统货, 而碱溶性多糖含量显著高于统货; 茯苓片选货的浸出物、总灰分、水溶性多糖显著低于统货, 总三萜酸含量差异无统计学意义, 而碱溶性多糖含量显著高于统货。相关性分析显示, 碱溶性多糖含量与总灰分、水溶性多糖含量成显著负相关。**结论** 市场上不同等级茯苓饮片的划分依据与水溶性多糖和总三萜酸含量无关, 而与碱溶性多糖含量有关, 本研究为茯苓的质量评价提供了参考。

关键词: 茯苓块; 茯苓片; 外观性状; 等级; 内在成分

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0078-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.012

Correlation between the appearance and components of *Poria cocos* blocks and *Poria cocos* pieces of different quality grades

HUANG Jia-jing¹, FANG Yue¹, WANG Yan-yan^{1, 2}, ZHANG Yue^{1, 2, 4}, WANG Lei^{1, 2, 3, 5}, YU Nian-jun^{1, 2, 3, 4, 5}, PENG Dai-yin^{1, 2, 3, 4, 5}, CHEN Wei-dong^{1, 2, 3, 4, 5, 6*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Ministry of Education-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012; 3. Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012; 4. Bozhou Key Laboratory of Direct Oral Administration of Chinese Medicine Decoction Pieces, Bozhou Anhui 236800; 5. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei 230012; 6. Anhui Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the relationship between the appearance and components of *Poria cocos* blocks and *Poria cocos* pieces of different quality grades, providing scientific basis for the evaluation of *Poria cocos*. **Methods** Based on the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition), *Poria cocos* blocks and *Poria cocos* pieces were collected. According to market research, *Poria cocos* blocks were mainly divided into three grades (first grade, second grade, and unified goods), while *Poria cocos* pieces were mainly divided into two grades (selection and unified goods). The content of extract and total ash was measured according to the limited index of *Poria cocos* based on the pharmacopoeia, and the content of water-soluble polysaccharides, alkali soluble polysaccharides, and total triterpenoid acids were also measured. The correlation between the internal indicators was analyzed. **Results** The content of extract, total ash, water-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82073923); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 82204748); 中华中医学学会青年人才托举工程项目 (No. CACM-2022-QNRC2-B03); 高水平中医药重点学科建设项目 (国中医药人教函 [2023]85 号); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (No. 2022AH050512)。

作者简介: 黄佳静, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药代动力学研究, email: 17718263138@163.com * **通信作者:** 陈卫东, 男, 博士研究生导师, 主要从事药代动力学、药剂学方面的研究, email: wdchen@ahtcm.edu.cn

soluble polysaccharides, and total triterpenoid acids in the first grade of *Poria cocos* blocks was much lower than that in the unified goods, while the content of alkali soluble polysaccharides in the first grade of *Poria cocos* blocks was obviously higher than that in the unified goods. The extract, total ash content, and water-soluble polysaccharides in the selection of *Poria cocos* pieces were also much lower than those in the unified goods. There was no obvious difference in total triterpenoid acids, while the alkaline soluble polysaccharides in the selection of *Poria cocos* pieces were much higher than those in the unified goods. The content and total ash content and water-soluble polysaccharides were negatively correlated.

Conclusion At present, the division of different grades of *Poria cocos* in the market is not related to the content of water-soluble polysaccharides and total triterpenoid acids, but to the content of alkali-soluble polysaccharides. This study provides reference for the quality evaluation of *Poria cocos*.

Key words: *Poria cocos* block; *Poria cocos* piece; characteristics of appearance; quality grade; component

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 传统功效为利水渗湿、健脾、宁心^[1], 主产于大别山区及云贵地区, 湖南、福建、四川等地也有栽培。现代研究表明, 茯苓的主要有效成分是多糖、三萜类等, 具有抗炎、保肝、抗肿瘤、调节免疫等药理活性^[2-5]。

历代本草研究表明, 茯苓以质量坚实、断面色白细腻者为佳^[6-7]。现行的茯苓中药材等级的划分依据为 1984 年颁布的《76 种药材商品规格标准》, 认为质坚色白者为佳。2020 年版《中国药典》规定茯苓项下仅有水分、灰分、浸出物的限量要求, 并不能体现茯苓中药饮片商品规格等级与内在含量的关系。因此, 本研究基于传统和市场上的分级方法, 对茯苓中药饮片进行分级, 测定不同等级茯苓块和茯苓片中多成分指标含量, 为不同等级茯苓饮片的划分及其质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AB135-S 型十万分之一电子分析天平 (德国梅特勒-托利多公司); UV-1900 型紫外可见光度计 (上海元析仪器有限公司); LC20AD 型高效液相色谱仪 (日本岛津实验仪器有限公司); CR-100S 型超声波清洗机 (深圳市春霖清洗设备有限公司); SHZ-D (III) 型循环水真空泵 (郑州市仪特仪器有限公司)。

1.2 试药

D-无水葡萄糖 (批号: 23013474, 纯度 ≥ 98%, 北京兰杰柯科技有限公司); 齐墩果酸 (批号: B20954, 纯度 ≥ 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 浓硫酸 (批号: 2023120703, 成都市科隆化学有限公司); 香草醛 (批号: 210524Q)、冰乙酸 (批号: 20180810JN)、高氯酸 (批号: 20210613)、苯酚 (批号: 20170501)、无水乙醇 (批号: 20190310JN) (上海润捷化学试剂有限公司)。

50 批茯苓样品由课题组成员先后前往安徽、湖北、湖南、云南收集, 经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 干燥菌核的不同规格饮片, 茯苓饮片信息详见表 1。

表 1 茯苓饮片信息

Tab 1 Information on *Poria cocos* decoction pieces

No.	规格	产地	等级	No.	规格	产地	等级
1	茯苓块	云南腾冲	选货一等	27	茯苓块	安徽霍山	选货一等
2			选货二等	28			选货二等
3			统货	29			统货
4		安徽岳西	选货一等	30			统货
5			选货二等	31	茯苓片	云南腾冲	选货
6			选货二等	32			选货
7			统货	33			选货
8		湖北罗田	选货一等	34			统货
9			选货二等	35			统货
10			统货	36			统货
11		湖南靖州	选货一等	37		湖北罗田	选货
12			选货二等	38			选货
13		安徽亳州	选货一等	39			选货
14			选货二等	40			统货
15			统货	41			统货
16			统货	42			统货
17		安徽金寨	选货一等	43			统货
18			选货一等	44		安徽岳西	选货
19			选货二等	45			选货
20			统货	46			选货
21		湖北英山	选货一等	47			选货
22			选货二等	48			统货
23			统货	49			统货
24		安徽亳州	选货一等	50			统货
25			选货二等				
26			统货				

2 方法

2.1 本草考证及市场调研

通过查阅历代本草、相关文献、现代资料等对茯苓道地产区和质量评价进行本草考证; 通过

走访安徽、湖北、云南等地药材市场调研茯苓的产地、市场规模、等级分级及流通情况。

2.2 总灰分、浸出物测定

按照 2020 年版《中国药典》通则 (2302)“总灰分测定法”和通则 (2201)“浸出物测定法”中的热浸法,分别测定茯苓样品的总灰分和浸出物。

2.3 水溶性多糖含量测定

茯苓样品中水溶性多糖含量采用苯酚-浓硫酸法进行测定^[8]。

2.3.1 对照品溶液与供试品溶液的制备 精密称取 D-无水葡萄糖对照品 10.0 mg,加纯水溶解并定容至 100 mL,即得 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖对照品溶液。

取表 1 中不同规格等级的茯苓饮片粉碎,过 60 目筛,于 55°C 烘箱中烘干,得茯苓粉末。精密称取茯苓粉末 1.0 g,加纯水溶解并定容至 50 mL,超声 30 min,过滤,取续滤液 10 mL,加纯水定容至 50 mL,即得供试品溶液。

2.3.2 标准曲线的制备及方法学考察 分别精密移取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,加纯水定容至 1 mL,再加入 6% 苯酚溶液 1 mL、浓硫酸溶液 4 mL,沸水浴 25 min、冰水浴 15 min。通过全波长扫描确定最大吸收波长为 487 nm。以对照品浓度为横坐标 (X),吸光度为纵坐标 (Y) 进行线性回归。考察仪器精密度、方法重复性、加样回收率和样品稳定性。

2.3.3 样品含量测定 取待测茯苓样品,按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.3.2”项下显色反应操作,在 487 nm 波长下测定其吸光度,并依据标准曲线计算各样品中水溶性多糖的含量。

2.4 碱溶性多糖含量测定

碱溶性多糖含量测定参照文献中的方法进行^[9]。

2.4.1 对照品溶液与供试品溶液的制备 精密称取 D-无水葡萄糖对照品 8.0 mg,加纯水溶解并定容至 50 mL,即得 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

参照“2.3.1”项下方法制备茯苓粉末,精密称取茯苓粉末 0.05 g,加入 50 mL 氢氧化钠溶液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),冷浸过夜后过滤,取续滤液 1 mL,加纯水定容至 40 mL,即得供试品溶液。

2.4.2 标准曲线的制备及方法学考察 分别精密移取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,加纯水定容至 2 mL,再加入 5% 苯酚溶液 1 mL、浓硫酸溶液 5 mL,涡旋 30 s,室温静置 20 min。通过全波长扫描确定最大吸收波长为 490 nm。以对照品浓度为横坐标 (X),吸光度为纵坐标 (Y) 进行线性回归。考察仪器精密度、方法重复性、加样回收率和样品稳定性。

2.4.3 样品含量测定 取待测茯苓样品,按照

“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.4.2”项下显色反应操作,在 490 nm 波长下测定其吸光度,并依据标准曲线计算各样品中碱溶性多糖的含量。

2.5 总三萜酸含量测定

采用香草醛-高氯酸法测定总三萜酸含量^[8]。

2.5.1 对照品溶液与供试品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 10.0 mg,加甲醇溶解并定容至 100 mL,即得 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的齐墩果酸对照品溶液。

参照“2.3.1”项下方法制备茯苓粉末,精密称取茯苓粉末 1.0 g,加入 30 mL 乙酸乙酯,超声 30 min,收取滤液蒸发浓缩,再用 5 mL 甲醇复溶,即得供试品溶液。

2.5.2 标准曲线的制备及方法学考察 分别精密移取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,加入 5% 香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL、高氯酸 1 mL,于 60°C 水浴 15 min,取出,冷却至室温,加冰乙酸 5 mL,摇匀,室温放置。通过全波长扫描确定最大吸收波长为 545.5 nm。以对照品浓度为横坐标 (X),吸光度为纵坐标 (Y) 进行线性回归。考察仪器精密度、方法重复性、加样回收率和样品稳定性。

2.5.3 样品含量测定 取待测茯苓样品,按照“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.5.2”项下显色反应操作,在 545.5 nm 波长下测定其吸光度,并依据标准曲线计算各样品中总三萜酸的含量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 本草考证及市场调研

3.1.1 本草学考证 茯苓的产地记载最早可追溯到秦汉时期,《神农本草经》中记载“茯苓生太山山谷”^[10];南北朝时期,陶弘景于《本草经集注》中记载“茯苓出郁州”^[11];两宋时期,苏颂于《本草图经》中记载“茯苓生泰山、华山、嵩山山谷”^[12];明清时期,陈嘉谟于《本草蒙筌》中记载“云贵茯苓独佳”^[13];近现代,陈仁山于《药物出产辨》中记载了产自云南的云苓和产自安徽的安苓^[14];《药材资料汇编》中记载安徽、湖北等地已成为我国重要的茯苓种植产区^[15]。

茯苓的质量评价最早载于秦汉时期,司马迁于《史记·龟策列传》中记载:“以坚实而大者为佳”^[16];陶弘景于《本草经集注》中记载“外皮黑细皱,内坚白……者良”^[17];李时珍于《本草纲目》中记载:“茯苓有坚如石者,绝胜”^[18]。

由此可见,茯苓的道地产区不断变迁,但质

量评价标准一直以来与现今市场基本一致，以“色白，质坚”为佳。

3.1.2 市场调研 市场调查结果表明，当前市场上的茯苓主要来自安徽、云南、湖北、贵州和湖南靖州地区。2020 年版《中国药典》规定茯苓主要规格为“茯苓个、茯苓片和茯苓块”，目前市

场上茯苓主要以茯苓块和茯苓片的形式流通，片的厚薄及块的大小不一，分级方法主要依据其色泽、整齐度、质地程度划分，以“色白、质坚、规整”者为佳，见表 2 及图 1。茯苓块主要分为三个等级：选货一等、选货二等和统货；茯苓片主要分为两个等级：选货和统货。

表 2 茯苓饮片市场等级分级参数
Tab 2 Market grading parameters for *Poria cocos* decoction pieces

规格	等级	外观颜色	整齐度	质地	虫蛀霉变
茯苓块	选货一等	色白	平整，无裂隙，较少量碎块	质坚	无
	选货二等	色白，带有赤褐色	有裂隙，少量碎块	质坚	无
	统货	淡红或赤褐色	粗糙，有碎丁，有大量裂隙	松软	无
茯苓片	选货	色白	平整，无裂隙，有碎片	质坚、易碎	无
	统货	色白，略有赤褐色	平整，无裂隙，有大量碎片	质坚、易碎	无

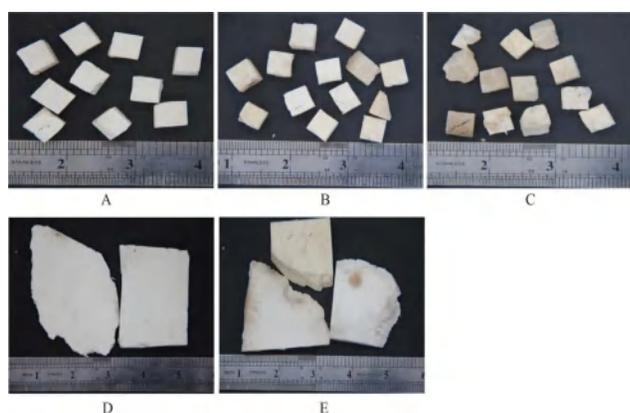


图 1 茯苓市场等级分级划分依据图

Fig 1 Market grading basis for the level of *Poria cocos*

A. 茯苓块选货一等 (the first grade of *Poria cocos* block); B. 茯苓块选货二等 (the second grade of *Poria cocos* block selection); C. 茯苓块统货 (unified goods of *Poria cocos* block); D. 茯苓片选货 (selection of *Poria cocos* pieces); E. 茯苓片统货 (unified goods of *Poria cocos* pieces)

3.2 总灰分和浸出物含量测定

如图 2A 所示，不同规格等级的茯苓总灰分含量均低于 2.0%。其中，茯苓片统货的总灰分含量最高，平均值为 0.549%，显著高于选货 ($P < 0.01$)。茯苓块选货一等的总灰分含量最低，平均值为 0.187%。如图 2B 所示，不同规格等级的茯苓浸出物含量均不低于 2.5%，其中，茯苓块统货的浸出物含量最高，平均值为 3.72%；茯苓片选货的浸出物含量最低，平均值为 2.87%。茯苓块统货与选货一等浸出物含量差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果均符合 2020 年版《中国药典》中对茯苓药材总灰分和浸出物含量测定的要求。

3.3 水溶性多糖、碱溶性多糖和总三萜酸含量测定

水溶性多糖含量的标准曲线为 $Y = 8.429X + 0.1273$ ($r = 0.9998$)，线性范围为 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密度试验 RSD 为 0.67%、重复性试验 RSD 为 1.4%、稳定性试验 RSD 为 1.8%。

碱溶性多糖含量的标准曲线为 $Y = 9.012X +$

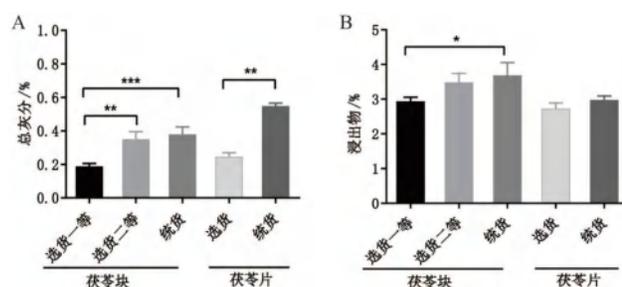


图 2 不同规格等级茯苓总灰分 (A) 和浸出物 (B) 含量 ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)

Fig 2 Total ash content (A) and extract content (B) of *Poria cocos* in different specifications and grades ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$)

0.2589 ($r = 0.9940$)，线性范围为 $0.008 \sim 0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密度试验 RSD 为 0.71%、重复性试验 RSD 为 0.60%、稳定性试验 RSD 为 2.0%。

总三萜酸含量的标准曲线为 $Y = 8.014X - 0.0349$ ($r = 0.9995$)，线性范围为 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。精密度试验 RSD 为 1.3%、重复性试验 RSD 为 2.7%、稳定性试验 RSD 为 2.9%。

如图 3A 所示，茯苓块统货的水溶性多糖含量最高 (平均值为 2.13%)，茯苓块选货一等的水溶性多糖含量最低 (平均值为 1.23%)，水溶性多糖含量的排序为选货一等 < 选货二等 < 统货；茯苓片中选货的水溶性多糖含量显著低于统货 ($P < 0.01$)。如图 3B 所示，茯苓块选货一等的碱溶性多糖含量最高，平均值为 88.0%，碱溶性多糖的含量排序为选货一等 > 选货二等 > 统货，三组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；茯苓片选货中的碱溶性多糖含量显著高于统货 ($P < 0.05$)；如图 3C 所示，茯苓块选货一等和选货二等中总三萜酸含量显著低于统货；茯苓片选货与统货之间差异没有统计学意义。由以上结果可知，碱溶性总多糖可作为不同等级茯苓饮片的划分依据。

3.4 内在含量指标的相关性分析

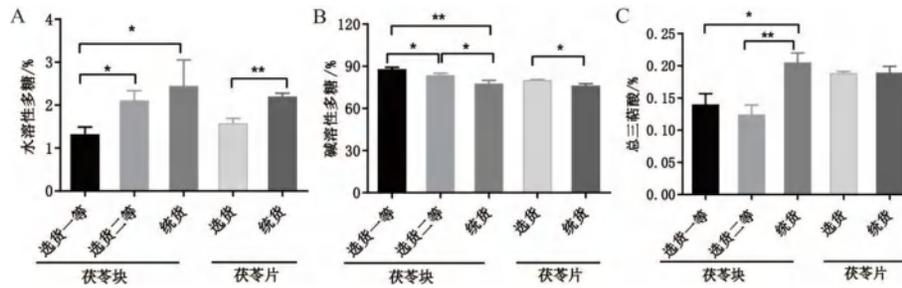


图 3 不同规格等级茯苓多糖和总三萜酸含量 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 3 Polysaccharide and total triterpenoid content in *Poria cocos* of different specifications and grades (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

A. 水溶性多糖 (water-soluble polysaccharides); B. 碱溶性多糖 (alkali soluble polysaccharides); C. 总三萜酸 (total triterpene acids)

运用 SPSS 26.0 软件对 50 批不同规格等级茯苓各指标进行相关性分析。在茯苓片中 (见表 3), 浸出物含量与水溶性多糖含量成显著正相关, 总灰分含量、水溶性多糖含量均与碱溶性多糖含量成显著负相关, 表明这三项内在评价指标间有较强的相关性。在茯苓块中 (见表 4), 总灰分含量、水溶性多糖含量均与碱溶性多糖含量成显著负相关, 总灰分含量与水溶性多糖含量成显著正相关。

表 3 茯苓片各指标含量的相关性分析

Tab 3 Correlation of various index contents in *Poria cocos* pieces

项目	总灰分	浸出物	水溶性多糖	碱溶性多糖	总三萜酸
总灰分	1.000	0.193	0.206	-0.376*	-0.165
浸出物	0.193	1.000	0.421*	-0.162	-0.306
水溶性多糖	0.206	0.421*	1.000	-0.588**	0.122
碱溶性多糖	-0.376*	-0.162	-0.588**	1.000	-0.195
总三萜酸	-0.165	0.306	0.122	-0.195	1.000

注: 两两之间相关性分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Correlation analysis between pairs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 4 茯苓块各指标含量的相关性分析

Tab 4 Correlation of various index contents in *Poria cocos* blocks

项目	总灰分	浸出物	水溶性多糖	碱溶性多糖	总三萜酸
总灰分	1.000	0.364	0.677**	-0.449*	-0.194
浸出物	0.364	1.000	0.302	0.267	0.074
水溶性多糖	0.677**	0.302	1.000	-0.463*	0.215
碱溶性多糖	-0.449*	0.267	-0.463*	1.000	-0.107
总三萜酸	0.194	0.074	0.215	-0.107	1.000

注: 两两之间相关性分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Correlation analysis between pairs, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论与总结

自 2015 年版《中国药典》增加茯苓片这一规格后, 2020 年版《中国药典》将茯苓分为茯苓个、茯苓块和茯苓片三种规格。在产地、加工和市场调查时发现, 主要流通的两种规格为茯苓块和茯苓片, 并依据其色泽、整齐度和质地程度划分为不同等级。“色白, 质坚”为茯苓传统品质评价经验, 当前市场对茯苓的规格等级划分依据与传统评价基本一致。本研究共收集了 50 批不同规格等级的茯苓饮

片, 根据药典规定, 茯苓总灰分不高于 2.0%, 浸出物不得低于 2.5%^[19]。结果表明 50 批茯苓饮片的总灰分和浸出物含量均符合 2020 年版《中国药典》要求, 但茯苓块选货一等中的浸出物含量显著低于统货, 虽然茯苓片选货中的浸出物含量也低于统货, 但差异没有统计学意义, 提示浸出物可能不适合作为茯苓不同等级饮片的划分依据。

本研究测定了 50 批不同规格等级的茯苓饮片中水溶性多糖、碱溶性多糖、总三萜酸的含量, 结果表明茯苓块选货一等和茯苓片选货中的水溶性多糖含量均低于统货, 总三萜酸的含量在茯苓块中选货低于统货, 在茯苓片中则差异无统计学意义。而茯苓块和茯苓片中的碱溶性多糖含量选货均高于统货。通过分析表 2 中茯苓饮片的等级划分依据, 我们发现市场上茯苓饮片的等级主要是根据茯苓药材由外到内加工成不同规格而定。靠近茯苓皮的部分颜色淡红或赤褐色, 质地松软, 常作为统货; 而茯苓中心部位颜色洁白, 质地坚硬, 常加工为选货。有相关文献显示茯苓皮部三萜酸含量高于茯苓中心部位^[20], 可能是由于茯苓外皮部位三萜酸的生物合成更为活跃, 所以本研究显示茯苓三萜酸含量统货高于选货。此外, 本研究结果显示茯苓中心部位的水溶性多糖含量显著低于外皮, 而碱溶性多糖含量显著高于外皮, 则可能与茯苓组织结构、生理功能和化学成分的差异有关。茯苓皮作为菌核外层, 主要功能是保护内层组织, 因而含有较高的水溶性多糖以增强保水和防护功能; 而茯苓中心部位主要储存养分和维持结构, 因而含有较高的碱溶性多糖以提供结构稳定性和储存功能。

本研究结果表明, 目前市场上不同等级茯苓饮片的划分依据与茯苓中水溶性多糖和总三萜含量无关, 而可能与碱溶性多糖含量有关, 提示碱溶性多糖可能适合作为茯苓不同等级饮片的划分依据。现代研究多集中于茯苓水溶性多糖, 而含量高达 90% 的碱溶性茯苓多糖因水溶性差研究较少, 但其也具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、免疫

调节和保肝等活性^[21-24]。因此,亟须加大茯苓碱性多糖的化学成分分析、生物活性研究、作用机制研究和安全性评价,以推动茯苓饮片的科学化和标准化,提高其在临床中的应用效果和安全性。现有茯苓饮片等级的划分主要依据外观性状,但这种方法无法准确反映其内在药效成分。因此本研究通过引入碱性多糖含量尝试作为等级划分依据,可以提升茯苓饮片的质量控制。此外,了解不同等级茯苓的内在成分差异,可以为茯苓的加工工艺优化提供科学依据。

总之,通过本研究,我们不仅明确了茯苓不同等级的内在成分差异,还提出了碱性多糖含量可能适合作为茯苓不同等级饮片的划分依据。这对于未来提高茯苓的质量控制、优化加工工艺、促进市场推广、推动科研与开发以及满足市场需求具有重要的实际意义。此外,传统等级划分依据的合理性需要进一步通过药效学研究证明^[25-26]。后续可进一步构建茯苓核心功效的动物疾病模型,系统开展不同规格等级茯苓不同提取成分的药效学比较,以进一步揭示传统等级划分依据的合理性,促进茯苓质量和临床疗效的提升。因此,对不同规格等级茯苓的质量评价需综合考虑其外观性状、内在指标和药效作用,以提供科学的定价依据,规范市场流通秩序。

参考文献

- [1] 张超伟,张钰,苏珊,等.茯苓类药材本草学、化学成分和药理作用研究进展[J].湖北农业科学,2021,60(2):9-14.
- [2] 孙明杰,张越,姚亮,等.茯苓多糖的分离纯化、组成及其抗氧化活性研究[J].安徽中医药大学学报,2022,41(1):86-91.
- [3] 程玥,丁泽贤,张越,等.茯苓多糖及其衍生物的化学结构与药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(18):4332-4340.
- [4] Duan YT, Huang JJ, Sun MJ, et al. *Poria cocos* polysaccharide improves intestinal barrier function and maintains intestinal homeostasis in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125953.
- [5] Wang HB, Luo YY, Chu ZW, et al. Poria acid, triterpenoids extracted from *Poria cocos*, inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells [J]. Molecules, 2022, 27(11): 3629.
- [6] 尚炳娴,戴子琦,吴倩文,等.经典名方开心散的处方与本草考证[J].西北药学杂志,2022,37(3):12-19.
- [7] 陈卫东,彭慧,王妍妍,等.茯苓药材的历史沿革与变迁[J].中草药,2017,48(23):5032-5038.
- [8] 张越,程玥,刘洁,等.不同生长环境下茯苓总三萜和水溶性总多糖含量比较[J].安徽中医药大学学报,2019,38(4):81-84.
- [9] Jiang W, Jiang K, Wu P. Extraction of alkali-soluble polysaccharide from *Jiuzihe poria* [J]. Agr Sci Tech, 2016, 17(8): 1938-1940.
- [10] 佚名.神农本草经[M].尚志钧,校注.北京:学苑出版社,2008:33-34.
- [11] 陶弘景.本草经集注[M].尚志钧,尚元胜,校辑.北京:人民卫生出版社,1994:208-209.
- [12] 苏颂.本草图经[M].尚志钧,校辑.合肥:安徽科学技术出版社,1994:93-94.
- [13] 陈嘉谟.本草蒙筌[M].周超凡,陈湘萍,王淑民,点校.北京:人民卫生出版社,1988:19-20.
- [14] 陈仁山.药物出产辨[M].广州:广东中医药专门学校,1930:118.
- [15] 中国药学会上海分会,上海市药材公司.药材资料汇编:上集[M].上海:科技卫生出版社,1959:222.
- [16] 王家豪,薛昊,陈仁寿.基于古今文献的儿科经典名方异功散考证[J].南京中医药大学学报,2023,39(11):1143-1154.
- [17] 孟珈同,邱智东,李军鸽,等.荆防败毒散关键信息考证[J].中成药,2024,46(4):1262-1271.
- [18] 李时珍.本草纲目[M].下册.北京:华夏出版社,2008:1437-1441.
- [19] 罗卓雅,谭宏渊,谢佳琳,等.碱性茯苓多糖的抗氧化作用[J].食品研究与开发,2022,43(22):86-91.
- [20] 徐雷,张群,刘常丽,等.茯苓菌核不同药用部位有效成分含量[J].江苏农业科学,2014,42(6):289-290.
- [21] 王峰,何佳,王林园,等.羧甲基茯苓多糖对溃疡性结肠炎大鼠的研究[J].中国临床药理学杂志,2022,38(12):1368-1372.
- [22] 刘星汶,杨继国,徐晓飞.羧甲基茯苓多糖的水媒法制备及其免疫活性研究[J].菌物学报,2021,40(6):1575-1582.
- [23] 冯燕茹,刘玮,杨继国.不同分子量羧甲基茯苓多糖的制备及其抗氧化活性的研究[J].中国食品添加剂,2019,30(3):67-74.
- [24] 杨焕治,熊芳琪,杨岚,等.不同组分羧甲基茯苓多糖对 HepG2 细胞增殖的影响[J].中国食物与营养,2019,25(12):26-28.
- [25] 赵华叶,闫沛沛,杨文华,等.浅议中药材商品规格等级标准研究方法[J].中国中药杂志,2015,40(4):765-769.
- [26] 何盼,李震宇,刘月涛,等.基于中药质量标志物的多效药材商品规格等级标准研究思考[J].中草药,2022,53(6):1868-1874.

(收稿日期:2024-05-17;修回日期:2024-08-05)

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法的化痰合剂体外及 入血成分分析

孟慧颀^{1,2}, 程雪梅², 党蕊², 王长虹², 时扣荣¹, 刘娟¹, 范伟^{1*}, 罗兰^{1*} (1. 上海中医药大学附属第七人民医院药学部, 上海 200137; 2. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

摘要: **目的** 阐明化痰合剂的化学成分和口服吸收入血成分。**方法** 在大鼠灌胃化痰合剂 10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 后采集血清。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法测定, 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱; 柱温 45 °C; 流速 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 5 μL; 电喷雾离子源 (ESI); 正、负离子模式检测。经 Analyst TF 1.6 采集数据, Peak View 1.2 分析数据, 根据保留时间、相对分子质量、一级和二级质谱数据, 结合对照品和参考文献对化痰合剂及其口服入血的化学成分进行表征。**结果** 从化痰合剂中共鉴定出 133 种成分, 包括黄酮类 67 种、香豆素类 22 种、皂苷类 15 种、有机酸类 14 种、生物碱类 3 种、其他类 12 种; 从含药血清中鉴定出 15 种成分。**结论** UPLC-Q-TOF-MS/MS 法可较全面地鉴定化痰合剂中的化学成分和口服吸收入血成分, 为化痰合剂的进一步研究提供依据。

关键词: 化痰合剂; 化学成分; UPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0084-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.013

Chemical constituents and absorbed components of Huatan mixture based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

MENG Hui-di^{1,2}, CHENG Xue-mei², DANG Rui², WANG Chang-hong², SHI Kou-rong¹, LIU Juan¹, FAN Wei^{1*}, LUO Lan^{1*} (1. Department of Pharmacy, Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137; 2. Institute of Chinese Materia Medica, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Abstract: Objective To determine the chemical compositions and the absorbed components of Huatan mixture via oral administration. **Methods** Serum was collected from rats after gavage administration of Huatan mixture for 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h and 8 h. The ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) method was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The gradient elution was used with mobile phase of 0.1% formic acid in water (A)-acetonitrile (B). The column temperature was 45 °C. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹ and the injection volume was 5 μL. The detection was performed with electrospray ionization (ESI) source in both positive and negative modes. The data were collected by Analyst TF 1.6 and then analyzed by Peak View 1.2. The chemical constituents and bioactive components were characterized according to the relative retention time, the relative molecular mass, and the first and second level mass spectrometry data in combination with the data of reference substance and literatures. **Results** Totally 133 components, including 67 flavonoids, 22 coumarins, 15 saponins, 14 organic acids, 3 alkaloids and 12 others were identified from Huatan mixture. Totally 15 components were

基金项目: 上海市浦东新区卫生健康委员会学科建设中药制剂转化医学项目 (No. PWXx2020-04); 上海市浦东新区卫生健康委员会学科建设中西医结合临床药学项目 (No. PWZxk2022-07)。

作者简介: 孟慧颀, 女, 硕士, 主要从事中药新制剂与体内过程研究, email: mhd0221@163.com ***通信作者:** 范伟, 男, 主任药师, 主要从事中药制剂研发与靶向给药系统的研究, email: 24882582@qq.com; 罗兰, 女, 副教授, 主要从事新药研发、中药药效物质基础和机制研究, email: ll4820703@163.com

identified from the serum after Huatan mixture administration. **Conclusion** The UPLC-Q-TOF-MS/MS can comprehensively identify the chemical constituents and bioactive components of Huatan mixture via oral administration, providing evidence for further research and development of Huatan mixture.

Key words: Huatan mixture; chemical composition; UPLC-Q-TOF-MS/MS

化痰合剂是上海市第七人民医院研发的止咳化痰经验方,临床上主要用于治疗急性支气管炎、慢性支气管炎、肺气肿,经长期应用证明其疗效显著。该方由前胡、白前、紫菀、陈皮、桔梗、甘草、半夏七味药材组成。方中前胡宣肺化痰^[1],为君药;白前、紫菀协助宣肺、化痰止咳^[2-3],共为臣药;陈皮、桔梗开肺气化痰^[4-5],为佐药;半夏化痰湿^[6],甘草调和诸药^[7],为使药。虽然该中药复方中单味药的化学成分均有文献报道^[7-13],但尚无对全方物质组成以及口服吸收入血成分的研究,导致无法揭示化痰合剂治疗急慢性支气管炎的药理机制。目前化痰合剂尚无质控指标性成分,无法确保制剂质量,制约了院内制剂的进一步开发应用。

血清药物化学方法通过检测血清中的化学物质来分析外源性活性物质及其作用和代谢规律,在中药及其复方的药效物质基础研究领域应用广泛^[14]。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术具有高分辨率、高灵敏度和高效的特点,是定性分析中药复方复杂组分的有力工具^[15]。本研究利用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对化痰合剂进行血清药物化学研究,为其药效物质基础、药效物质传递及作用机制研究提供参考,并为制订化痰合剂的质量标准奠定基础。

1 材料

1.1 动物

6只SPF级健康雄性SD大鼠,体重(220±20)g[上海必凯科翼生物科技有限公司,实验动物使用许可证号为:SYXK(沪)2020-0009],饲养于上海中医药大学动物实验中心,温度(24±2)℃,相对湿度(50±10)%,适应性饲养1周,实验前禁食12h。操作流程均符合实验动物管理、保护的相关规定(伦理批件号为:PZSHUTCM2306200004)。

1.2 仪器

Shimadzu LC 30A-AB Sciex Q-TOF 5600 超高效液相色谱串联飞行时间质谱仪(岛津);BT25S型十万分之一电子分析天平(赛多利斯仪器系统有限公司);SB-9型恒温水浴锅(EYELA, Tokyo);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);台式冷冻离心机(Himac, Takeda);HGC-36A干式加热氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);全自动煎药壶(湖州市建高电器有限公司);Milli-Q纯水仪(Millipore)。

1.3 试药

对照品白花前胡甲素(批号:A24IB223974)、白花前胡乙素(批号:M21HB178705)、槲皮素(批号:C01J10Y91727)(上海源叶生物科技有限公司);橙皮苷(批号:DSTDC003803)、甘草苷(批号:DSTDG000902)、绿原酸(批号:DSTD002103)、木犀草素(批号:DSTDM003201)(成都德思特生物技术有限公司);阿魏酸(批号:010001-201604,上海奈启生物科技有限公司);川陈皮素(批号:AFCG1851,成都埃法生物科技有限公司),所有对照品纯度均大于98%。前胡(批号:230724,上海虹桥中药饮片有限公司),经鉴定为伞形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 的干燥根;白前(批号:211101,上海康桥中药饮片有限公司),经鉴定为萝藦科植物柳叶白前 *Cynanchum stauntonii* (Decne.) Schltr.ex Lévl. 的干燥根茎和根;蜜紫菀(批号:230518,上海虹桥中药饮片有限公司),经鉴定为菊科植物紫菀 *Aster tataricus* L.f. 的干燥根及根茎;陈皮(批号:20231030-1,上海万仕诚国药制品有限公司),经鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮;桔梗(批号:2022103103,上海华浦中药饮片有限公司),经鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根;甘草(批号:2023090756,上海德华国药制品有限公司),经鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎;制半夏(批号:2023091250,上海德华国药制品有限公司),经鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎,以上药材饮片经上海市第七人民医院副主任中药师公丕君鉴定为质量合格的中药饮片。甲醇、甲酸、乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);水为超纯水,由 Milli-Q 超纯水系统制得。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

按化痰合剂处方比例称取单剂量处方饮片约112.5g,加入12倍药材量的蒸馏水,煎煮3次,每次1h(武火煮沸、文火慢煎),合并煎液,浓缩至100mL,得到原方药液,于4℃保存备用。

精密量取原方溶液0.20mL,加入色谱甲醇至10mL,涡旋1min,4℃、12000r·min⁻¹离心15min,取上清液,经0.22μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2 对照品溶液制备

精密称取白花前胡甲素、白花前胡乙素、橙皮苷、川陈皮素、槲皮素、甘草苷、绿原酸、木犀草素、阿魏酸对照品各 10 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各对照品储备液，于 4°C 避光保存。吸取上述各对照品储备液适量，加甲醇稀释后摇匀，即得 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 大鼠给药方案及生物样品采集

取 SD 大鼠 6 只，按 $14.29 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次灌胃“2.1”项下原方药液，于给药前 0 h 与给药后 10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 眼底静脉丛取血约 0.5 mL， 4°C 、 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，收集上清液，得到各组的血浆样品，分装后于 -80°C 保存备用。

2.4 生物样品处理

空白血清与含药血清于 4°C 解冻后，将 6 只 SD 大鼠同一时间点的血清各取 20 μL 置于离心管中，混匀后加入 4 倍量的乙腈，涡旋 2 min， 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，取上清液后 37°C ，氮气吹干，精密加入 100 μL 色谱甲醇涡旋 2 min， 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，即可待测。

2.5 分析条件

色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$)，流动相：0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 5%B; 1 ~ 11 min, 5% ~ 90%B; 11 ~ 13 min, 90% ~ 95%B; 13 ~ 15 min, 95%B; 15 ~ 17 min, 95% ~ 5%B; 17 ~ 18 min, 5%B)，柱温 45°C ，流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，进样量 5 μL 。采用电喷雾离子源 (ESI)，正、负离子模式检测，扫描范围 m/z 50 ~ 1500，毛细管电压 5.5 kV，离子源温度 550°C ，辅助气、雾化气 $55 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；帘气 $35 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；去簇电压 80 V；碰撞能量 25 V，碰撞能量扩展 15 V。

2.6 成分鉴定

检索国内外与化痰剂处方中 7 味药材相关的文献，建立包括化合物名称、分子式、相对分子质量、加合离子类型、二级质谱碎片信息的化学成分数据库。经 Analyst TF 1.6 采集数据，Peak View 1.2 分析样品中各化学成分的质谱信息及保留时间，结合对照品与相关文献数据，完成对化痰剂体外及入血成分的分析鉴定。

3 结果

3.1 体内外成分分析

取“2.1”“2.2”及“2.4”项下溶液，进样测定。依据“2.6”项下建立的成分数据库，初步鉴定出化痰剂中包含的 133 种化合物，包括黄酮类 67 种、香豆

素类 22 种、皂苷类 15 种、有机酸类 14 种、生物碱类 3 种、其他类 12 种，从大鼠血清样品中鉴定出 15 种成分。正、负离子模式下化痰剂及混合对照品总离子流图见图 1 和图 2，质谱信息见表 1 和表 2^[16-35]。

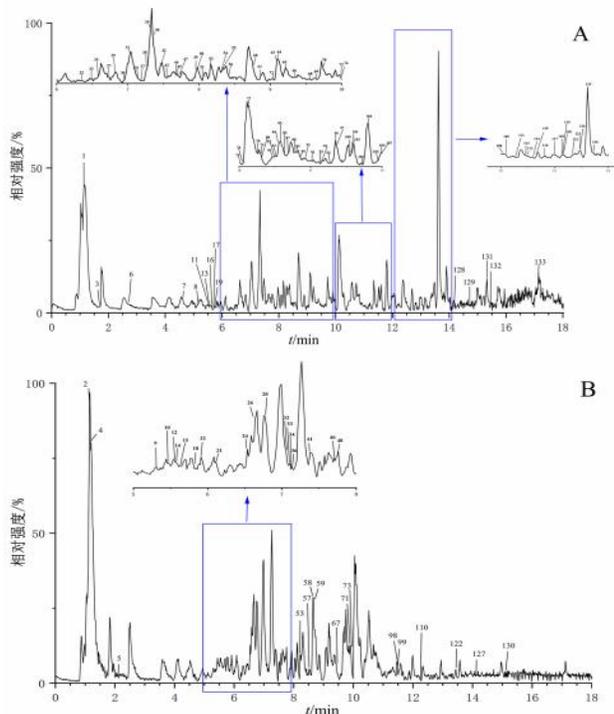


图 1 化痰剂体外化学成分正 (A)、负 (B) 离子模式下的总离子流图
Fig 1 Total ion chromatogram of Huatan mixture in vitro components in positive ion (A) and negative ion (B) mode

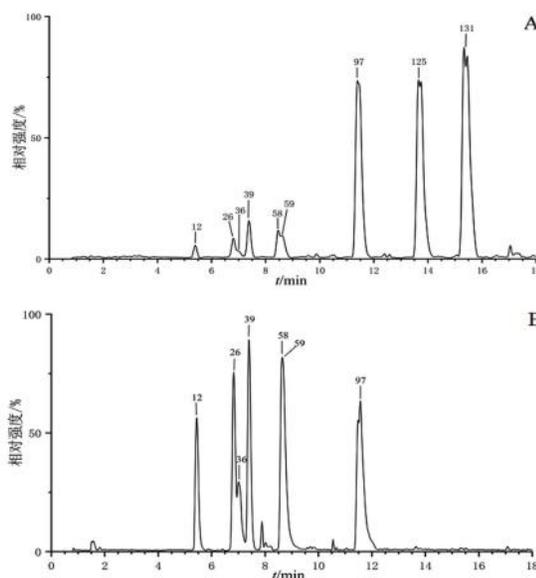


图 2 混合对照品正 (A)、负 (B) 离子模式下的总离子流图
Fig 2 Total ion chromatogram of mixed reference in positive ion (A) and negative ion (B) mode

12. 绿原酸 (chlorogenic acid); 26. 甘草苷 (liquiritin); 36. 阿魏酸 (ferulic acid); 39. 橙皮苷 (hesperidin); 58. 木犀草素 (luteolin); 59. 槲皮素 (quercetin); 97. 川陈皮素 (nobiletin); 125. 白花前胡甲素 (praeruptorin A); 131. 白花前胡乙素 (praeruptorin B)

表 1 化痰合剂体外化学成分鉴定
Tab 1 Identification of chemical components in Huatan mixture

No.	t_R / min	化学式	离子模式	理论值	实际值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子	化合物	类型	文献
1	1.13	C ₇ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	144.1019	144.1017	- 1.40	84.0806	水苏碱	生物碱	[16]
2	1.14	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.0561	191.0560	- 0.50	85.0244, 111.0014, 127.0312, 173.0358	奎宁酸	有机酸	[17]
3	1.67	C ₉ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	168.1019	168.1016	- 1.80	135.0708, 150.0851	辛弗林	生物碱	[18]
4	1.97	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.0197	191.0200	1.60	87.0091, 111.0088, 129.0198, 173.0093	柠檬酸	有机酸	[19]
5	2.11	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.0193	117.0193	0.00	73.0291, 99.9240	琥珀酸	有机酸	[20]
6	2.72	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.1040	268.1040	0.00	119.0351, 136.0606, 224.1028, 250.1060	腺苷	生物碱	[21]
7	4.62	C ₈ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	169.0495	169.0493	- 1.20	65.0401, 125.0612	香草酸	有机酸	[20]
8	5.16	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	188.0706	188.0706	0.00	115.0534, 118.0647, 144.0814, 146.0589	3-氨基-2-萘酸	有机酸	[22]
9	5.31	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	209.0456	209.0458	1.00	59.0119, 119.0474, 121.0674, 165.0547	2-(4-羟苄基)丙二酸	有机酸	[23]
10	5.46	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	165.0557	165.0559	1.20	59.0135, 93.0340, 119.0507, 121.0660	苯乳酸	有机酸	[24]
11	5.53	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	[M+H] ⁺	193.0859	193.0861	1.00	105.0764, 115.0585, 161.0608	肉豆蔻醚	其他	[24]
12	5.54	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0880	0.60	135.0467, 173.0466, 179.0363, 191.0581	绿原酸*	有机酸	[25]
13	5.55	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M+H] ⁺	355.1024	355.1021	- 0.80	135.0440, 145.0265, 163.0380, 193.0483	咖啡酰奎宁酸	有机酸	[26]
14	5.59	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	579.1719	579.1731	2.10	175.0642, 255.0672, 417.1193	glucoisoliquiritin	黄酮	[24]
15	5.61	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	711.2142	711.2198	7.90	255.0652, 429.1060, 549.1637	glucoisoliquiritin apioside	黄酮	[24]
16	5.63	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	193.0495	193.0494	- 0.50	133.0650, 150.0330	东莨菪素	香豆素	[27]
17	5.70	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.1658	595.1654	- 0.70	295.0688, 427.1108, 541, 1345, 559.1352, 577.1535	维采宁-2	黄酮	[16]
18	5.81	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.1195	515.1200	1.00	179.0333, 191.0580, 335.0786, 353.0871, 469.2335	二咖啡酰奎宁酸或洋茴素	有机酸	[20, 25]
19	5.95	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	625.1763	625.1755	- 1.30	385.0954, 409.0915, 439.0996, 487.1238, 607.1647	香叶木素-6, 8-二-C-葡萄糖苷 [金圣革(黄)素-6, 8-二-C-葡萄糖苷]	黄酮	[18]
20	5.98	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	179.0351	0.60	134.0378, 135.0447	咖啡酸	有机酸	[25]
21	6.09	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.1406	563.1419	2.30	353.0678, 383.0811, 413.0983, 443.1037, 473.1117, 517.2271	夏佛塔苷	黄酮	[20]
22	6.34	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	177.0546	177.0546	0.00	89.0392, 117.0319, 145.0316, 145.0448	4-甲氧基香豆素	香豆素	[27]
23	6.48	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M+H] ⁺	579.1708	579.1696	- 2.10	525.1368, 561.1591	槐苷	黄酮	[22]
24	6.54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.1461	609.1485	3.90	301.0371, 463.0990	芸香苷	黄酮	[20]
25	6.58	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	465.1028	465.1023	- 1.10	303.0505	异槲皮苷	黄酮	[25]
26	6.64	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.1180	417.1195	3.60	119.0513, 135.0086, 255.0674	甘草苷*	黄酮	[28]
27	6.72	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₀	[M+H] ⁺	427.1599	427.1596	- 0.70	201.0648, 229.0835, 247.0931, 265.1095	白花前胡苷 VI	香豆素	[27]
28	6.76	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.0882	463.0888	1.30	255.0697, 301.0394, 417.1212	金丝桃素	其他	[26]
29	6.82	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	257.0808	257.0807	- 0.40	137.0238, 147.0439, 239.0718	甘草素	黄酮	[20]
30	6.96	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	463.1235	463.1230	- 1.10	313.0703, 328.0562, 343.0808, 367.0788, 409.0917, 427.1034	金雀花素或 diosmetin-6-C-glucoside	黄酮	[28]
31	7.04	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M+H] ⁺	581.1865	581.1859	- 1.00	85.0227, 273.0754, 383.1118, 419.1318	柚皮苷	黄酮	[28]
32	7.06	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.1195	515.1200	1.00	179.0367, 191.0592, 335.0804, 353.0915	二咖啡酰奎宁酸或洋茴素	有机酸	[20, 25]
33	7.09	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0878	353.0880	0.60	179.0332, 191.0558	异绿原酸 B	有机酸	[25]
34	7.12	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0933	447.0939	1.30	255.0274, 284.0337, 285.0434, 445.6713	木犀草苷	黄酮	[21]
35	7.14	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	177.0546	177.0546	0.00	89.0377, 117.0307, 145.0290	5-甲氧基香豆素	香豆素	[27]

续表 1

No.	t_R / min	化学式	离子模式	理论值	实际值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子	化合物	类型	文献
36	7.15	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0506	193.0510	2.10	134.0376, 149.0613, 178.0275	阿魏酸 [*]	有机酸	[24]
37	7.19	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	193.0495	193.0494	- 0.50	133.0278, 137.0584, 178.0256	异萜萆亭	香豆素	[27]
38	7.26	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M+H] ⁺	609.1814	609.1773	- 6.40	286.0418, 301.0701, 463.0864, 463.1207	香叶木苷	黄酮	[28]
39	7.32	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	[M+H] ⁺	611.1971	611.1966	- 0.80	153.0183, 195.0294, 303.0864, 449.1442	橙皮苷 [*]	黄酮	[29-30]
40	7.35	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	303.0863	303.0863	0.00	149.0280, 153.0178, 177.0550	橙皮素	黄酮	[28]
41	7.37	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.1140	433.1148	1.80	151.0038, 271.0620	四羟基查耳酮 4'-O-葡萄糖苷	黄酮	[24]
42	7.50	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	301.0707	301.0705	- 0.70	134.0357, 167.0336, 216.04023, 231.0659, 268.0380, 286.0445	羟基甾花素	黄酮	[16]
43	7.56	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	[M+H] ⁺	551.1759	551.1749	- 1.80	137.0226, 257.0805, 419.1327	异龙脑苷或甘草素 4'-邻-阿朴糖基-邻-葡萄糖苷	黄酮	[22]
44	7.67	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	223.0601	223.0599	- 0.90	163.0407, 162.0303, 207.0298	异嗟皮啶	香豆素	[27]
45	7.69	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	[M+H] ⁺	409.1493	409.1493	0.00	187.0392, 175.0367, 229.0857, 247.0973	紫花前胡苷	香豆素	[27]
46	7.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.0456	269.0457	0.40	181.1189, 225.1146	芹菜素	黄酮	[25]
47	7.71	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.1337	419.1330	- 1.70	147.0401, 257.0796, 313.1700	新甘草苷	黄酮	[25]
48	7.76	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.1191	417.1195	1.00	135.0090, 255.0673, 254.0582	异甘草苷	黄酮	[24]
49	7.96	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	431.1337	431.1333	- 0.90	269.0808	芒柄花苷	黄酮	[31]
50	7.98	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	[M+H] ⁺	1225.5848	1225.5836	- 1.00	485.3248, 521.3473, 667.4009, 799.4492, 961.4969, 1093.5415	桔梗皂苷 D	皂苷	[17]
51	8.06	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	255.0652	255.0643	- 3.50	153.0729, 227.0662	白杨黄素	黄酮	[16]
52	8.17	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	[M+H] ⁺	323.1278	323.1285	2.20	161.0558, 199.0704	新补骨脂异黄酮	黄酮	[16]
53	8.22	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	285.0769	285.0767	- 0.70	150.0321, 270.0547	甘草查尔酮 B	黄酮	[23]
54	8.30	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₅	[M+H] ⁺	1135.5531	1135.5535	0.40	189.0757, 321.1140, 521.3426, 653.3850, 683.3988, 841.4537, 1003.5105	桔梗皂苷 B	皂苷	[17]
55	8.31	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₆	[M+H] ⁺	1149.5324	1149.5321	- 0.30	499.3025, 517.3135, 535.3294, 697.3759, 829.4493, 1017.4890	桔梗苷酸 D	皂苷	[17]
56	8.41	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	[M+H] ⁺	595.2021	595.2016	- 0.80	153.0189, 287.0907, 415.1376, 433.1486, 449.1416	枸橼苷	黄酮	[18]
57	8.51	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	695.1981	695.2046	9.30	135.0042, 169.0376, 255.0667, 389.0884, 531.1544, 549.1715	甘草苷 D ₁ 或甘草苷 D ₂	黄酮	[24]
58	8.54	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.0394	285.0393	- 0.40	133.0282, 151.0000, 199.0388	木犀草素 [*]	黄酮	[19]
59	8.60	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.0343	301.0340	- 1.00	121.0297, 151.0058, 229.0535	槲皮素 [*]	黄酮	[20]
60	8.76	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	[M+H] ⁺	985.4639	985.4627	- 1.20	453.3364, 615.3907, 809.4332	甘草皂苷 A ₃	皂苷	[25]
61	8.87	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.1286	447.1279	- 1.60	152.0090, 253.0531.285.0757, 343.0146	三叶豆紫檀苷	黄酮	[16]
62	9.04	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M+H] ⁺	581.1865	581.1859	- 1.00	389.0862, 419.1336	芸香柚皮苷	黄酮	[28]
63	9.10	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	[M+H] ⁺	881.4165	881.4157	- 0.90	511.3407, 529.3553, 705.3807	22β-乙酰氧基甘草甜素	皂苷	[25]
64	9.11	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	[M+H] ⁺	725.2287	725.2281	- 0.80	389.0866, 419.1332	柚皮黄素 -3-O- (3-羟基-3-甲基戊二酸) -葡萄糖苷	黄酮	[18]
65	9.22	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	839.4060	839.4054	- 0.70	469.3300, 663.3713	甘草皂苷 G ₂	皂苷	[25]
66	9.35	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.0601	271.0601	0.00	91.0502, 121.0321, 149.0301, 169.0648, 215.0699, 243.0667	金雀异黄酮	黄酮	[16]
67	9.42	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	695.3648	695.3676	4.00	471.3162, 485.2887, 489.3176, 665.3703	3-Oβ-吡喃葡萄糖基桔梗酸	皂苷	[31]
68	9.55	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	301.0707	301.0705	- 0.70	258.0558, 286.0552	香叶木素	黄酮	[20]
69	9.64	C ₁₁ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	187.0390	187.0390	0.00	115.0514, 131.0490, 143.0545	补骨脂素	香豆素	[20]
70	9.73	C ₄₉ H ₅₈ O ₁₂	[M+H] ⁺	839.4001	839.4041	4.80	451.3206, 469.3295, 487.3399, 627.3509, 663.3715	乌拉尔甘草皂苷 N	皂苷	[25]
71	9.85	C ₂₀ H ₃₂ O ₆	[M-H] ⁻	367.2126	367.2120	- 1.60	139.1129, 171.1023, 179.0342, 329.2347, 331.2510	lingulatusin	其他	[20]
72	9.90	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.0495	217.0494	- 0.50	118.0404, 146.0354, 161.0600, 174.0318, 202.0281	手柑内酯或 6-甲氧基当归素	香豆素	[27]

续表 1

No.	t_R / min	化学式	离子模式	理论值	实际值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子	化合物	类型	文献
73	9.91	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.0663	255.0667	1.60	91.0181, 119.0497, 135.0082	异甘草素	黄酮	[23]
74	9.93	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	[M+H] ⁺	389.1231	389.1226	- 1.30	341.0665, 359.0753, 374.0969	羟基 - 五甲氧基黄酮	黄酮	[18]
75	10.02	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	359.1125	359.1125	0.00	301.0766, 329.0643	羟基 - 四甲氧基黄酮	黄酮	[18]
76	10.06	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	373.1282	373.1281	- 0.30	343.0821, 355.1618, 357.0972	甜橙黄酮	黄酮	[28]
77	10.12	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	823.4111	823.4103	- 1.00	453.3340, 471.3445, 647.3758	甘草酸	皂苷	[25, 32]
78	10.26	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	[M+H] ⁺	389.1231	389.1226	- 1.30	341.0579, 359.0759, 374.0989	羟基 - 五甲氧基黄酮	黄酮	[18]
79	10.30	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.0808	269.0806	- 0.70	197.0613, 226.0621, 253.0479, 254.0600	刺芒柄花素	黄酮	[31]
80	10.32	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.1337	419.1330	- 1.70	371.0808, 389.0859, 404.1104	羟基 - 六甲氧基黄酮或梔子黄素 A	黄酮	[18]
81	10.46	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.0495	217.0494	- 0.50	118.0415, 174.0319, 202.0269	花椒毒素	香豆素	[27]
82	10.49	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	[M+H] ⁺	274.2741	274.2741	0.00	256.2668	十六烷基基鞘氨醇	其他	[22]
83	10.53	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.1387	403.1385	- 0.50	327.0869, 342.1066, 373.0914, 388.1156	六甲氧基黄酮	黄酮	[18]
84	10.56	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M+H] ⁺	943.5261	943.5241	- 2.10	423.3666, 441.3712, 453.3205, 599.3870, 797.4695	大豆皂苷 Bb	皂苷	[16]
85	10.59	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	823.4111	823.4103	- 1.00	453.3355, 647.3794	乌拉尔甘草皂苷 B	皂苷	[25]
86	10.63	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.1337	419.1330	- 1.70	371.0707, 389.0854, 404.1078	羟基 - 六甲氧基黄酮或梔子黄素 A	黄酮	[18]
87	10.69	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	[M+H] ⁺	343.1176	343.1175	- 0.30	285.0753, 328.0920, 313.0701	四甲氧基黄酮	黄酮	[18]
88	10.80	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	[M+H] ⁺	471.2013	471.2008	- 1.10	161.0596, 339.1976, 367.1903, 425.1951, 453.1896	柠檬苦素	其他	[28]
89	10.81	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	[M+H] ⁺	389.1231	389.1226	- 1.30	359.0727, 374.1000	羟基 - 五甲氧基黄酮	黄酮	[18]
90	10.85	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	405.1180	405.1175	- 1.20	357.0626, 375.0698, 405.1167, 403.8517	二羟基 - 五甲氧基黄酮	黄酮	[28]
91	10.92	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	[M+H] ⁺	455.3520	455.3489	- 6.80	95.0846, 189.1631, 261.1885, 289.2237, 437.3437	去氧甘草内酯	皂苷	[25]
92	11.02	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	271.0965	271.0964	- 0.40	137.0589, 161.0577	美迪紫檀素	黄酮	[16]
93	11.14	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺	345.0969	345.0967	- 0.60	157.0975, 213.1414, 237.1208, 297.0318, 315.1932	二羟基 - 三甲氧基黄酮	黄酮	[28]
94	11.16	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.1387	403.1385	- 0.50	327.0858, 355.0828, 373.0928, 387.1068	六甲氧基黄酮	黄酮	[18]
95	11.27	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.0914	287.0902	- 4.20	175.0387, 227.0699, 245.0811	异氧化前胡素	香豆素	[27]
96	11.34	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	[M+H] ⁺	375.1074	375.1073	- 0.30	327.0416, 345.0608, 360.0807	二羟基 - 四甲氧基黄酮	黄酮	[28]
97	11.35	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.1387	403.1385	- 0.50	355.1118, 373.0914, 388.1150	川陈皮素 [*]	黄酮	[18]
98	11.46	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	635.3801	635.3832	4.90	473.3256, 633.3639	platycodonoids B	皂苷	[21]
99	11.49	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	665.3906	665.3931	3.80	309.2063, 309.2301, 619.3254	3-O-β-D-吡喃葡萄糖基远志酸	皂苷	[21]
100	11.53	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	392.1704	392.1700	- 1.00	217.0905, 227.0656, 245.0851, 287.0968	hyuganin D	香豆素	[33]
101	11.57	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	364.1391	364.1388	- 0.80	175.0398, 227.0707, 245.0820, 287.0920	3', 4'-二乙酰氧基凯尔消旋内酯	香豆素	[34]
102	11.59	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	[M+H] ⁺	302.3054	302.3055	0.30	57.0695, 88.0754, 284.2981	二氢鞘氨醇	其他	[22]
103	11.73	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	405.1180	405.1175	- 1.20	375.0768, 390.0910	二羟基 - 五甲氧基黄酮	黄酮	[28]
104	11.81	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	[M+H] ⁺	433.1493	433.1492	- 0.20	403.1028, 418.1270	七甲氧基黄酮	黄酮	[18]
105	11.94	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	[M+H] ⁺	355.1176	355.1168	- 2.30	299.0556	异甘草黄酮	其他	[22]
106	11.98	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	373.1282	373.1281	- 0.30	325.0709, 343.0808	橘皮素	黄酮	[18]
107	11.99	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	[M+H] ⁺	193.1223	193.1221	- 1.00	77.0384, 91.0531, 137.0579, 147.1175, 175.1107	4-正戊基苯甲酸	其他	[23]
108	12.04	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.1337	419.1330	- 1.70	361.0923, 389.0864, 419.1337, 404.1096	羟基 - 六甲氧基黄酮	黄酮	[18]
109	12.09	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺	355.1540	355.1535	- 1.40	123.0437, 179.0337, 299.0909	1-甲氧基莱豆素	黄酮	[16]
110	12.26	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻	365.1031	365.1035	1.10	282.0230, 295.0226, 307.0265	甘草酚	黄酮	[25]

续表 1

No.	t_R / min	化学式	离子模式	理论值	实际值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子	化合物	类型	文献
111	12.28	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	359.1125	359.1125	0.00	282.0496, 315.0754, 326.0828, 343.0787	羟基-四甲氧基黄酮	黄酮	[18]
112	12.45	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	405.1180	405.1175	-1.20	332.0561, 347.0795, 357.0625, 375.0702, 390.0950	二羟基-五甲氧基黄酮	黄酮	[28]
113	12.49	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.1387	403.1385	-0.50	342.0909, 373.0910	六甲氧基黄酮	黄酮	[18]
114	12.59	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	[M+H] ⁺	389.1231	389.1226	-1.30	359.0758, 374.0982	羟基-五甲氧基黄酮	黄酮	[18]
115	12.70	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	360.1442	360.1440	-0.60	83.0492, 215.0693, 243.0653, 261.0758, 343.1170	前胡香豆素 E	香豆素	[34]
116	12.82	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	[M+H] ⁺	389.1231	389.1226	-1.30	298.0489, 316.0545, 331.0813, 359.0756, 374.1003, 387.8883	羟基-五甲氧基黄酮	黄酮	[18]
117	13.01	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.1337	419.1330	-1.70	361.0930, 371.0742, 389.0863, 404.1099	羟基-六甲氧基黄酮	黄酮	[18]
118	13.14	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	420.2017	420.2014	-0.70	227.0807, 245.0792, 287.1039, 315.1139, 390.0657	3'-乙酰基-4'-己酰黄内酯	香豆素	[33]
119	13.15	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	359.1125	359.1125	0.00	258.0498, 285.0756, 301.0789, 329.0612, 344.0904	羟基-四甲氧基黄酮	黄酮	[18]
120	13.17	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	392.1704	392.1700	-1.00	175.0397, 227.0714, 245.0819, 287.0925, 315.1237	3'-异丁酰-4'-乙酰基黄内酯	香豆素	[33]
121	13.35	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.0914	287.0916	0.70	175.0406, 227.0710, 245.0817	氧化前胡素	香豆素	[27]
122	13.43	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	[M-H] ⁻	369.1708	369.1717	2.40	135.0462, 147.0472, 337.1476	粗毛甘草素 D	黄酮	[24]
123	13.46	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	[M+H] ⁺	227.0703	227.0702	-0.40	128.0627, 199.0747, 212.0557	arnocoumarin	香豆素	[27]
124	13.47	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.0914	287.0916	0.70	128.0611, 175.0386, 227.0707, 245.0810	甘草查尔酮 B	黄酮	[16]
125	13.61	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	404.1704	404.1705	0.20	227.0711, 245.0811, 327.1231	白花前胡素*	香豆素	[33, 35]
126	13.74	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	[M+H] ⁺	454.2928	454.2917	-2.40	213.0560, 282.2813, 313.2754, 436.2835	3-[(2-氨基乙氧基)(羟基)磷酸]氧基}-2-羟基丙基棕榈酸酯	其他	[22]
127	14.12	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.2330	255.2331	0.40	134.8915, 201.8427, 211.0998	棕榈酸	其他	[19]
128	14.18	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	235.1693	235.1682	-4.70	57.0703, 123.0446, 179.1056	3, 5-二叔丁基-4-羟基苯甲醛	其他	[26]
129	14.71	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	420.2017	420.2014	-0.70	175.0399, 227.0725, 245.0818, 301.1100, 329.1419	3'-己酰-4'-乙酰基黄内酯	香豆素	[33]
130	15.10	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	[M-H] ⁻	469.3323	469.3334	2.30	425.3374, 467.8374	甘草次酸	皂苷	[24]
131	15.33	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	444.2017	444.2022	1.10	227.0701, 327.1223	白花前胡素*	香豆素	[31, 33]
132	15.47	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	446.2173	446.2172	-0.20	175.0390, 227.0687, 245.0798, 327.1227	白花前胡素 E	香豆素	[33, 35]
133	17.15	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	[M+H] ⁺	331.2843	331.2843	0.00	257.2514, 313.2758	甘油单棕榈酸酯	其他	[22]

注: * 通过对照品比对确认。

Note: * Confirmed by comparison with reference standard.

表 2 化痰剂口服给予大鼠后血浆中的化学成分鉴定

Tab 2 Identification of chemical components in the rat plasma after oral administration of Huatan mixture

编号	化学式	离子模式	理论值	实际值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子	化合物	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
2	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.0561	191.0559	-1.30	85.0241, 111.0054, 127.0320	奎宁酸				+	+		
4	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.0197	191.0208	5.40	87.0014, 111.0011	柠檬酸	+	+	+	+	+	+	+
26	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.1180	417.1177	-0.70	135.0005, 255.0518	甘草苷*	+	+	+	+	+	+	+
29	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	257.0808	257.0810	0.40	137.0277, 239.0763	甘草素	+	+	+	+	+	+	+
31	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M+H] ⁺	581.1865	581.1857	-1.30	85.0312, 273.0753, 383.1076, 419.1234	柚皮苷		+	+				
36	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.0506	193.0511	2.40	134.0281, 149.0475, 178.0158	阿魏酸*	+	+	+	+	+		
39	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	[M+H] ⁺	611.1971	611.1932	-6.30	303.0866, 449.1292	橙皮苷*	+	+	+				
40	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	303.0863	303.0852	-3.60	149.0579, 153.0141, 177.0615	橙皮素		+	+	+	+	+	+

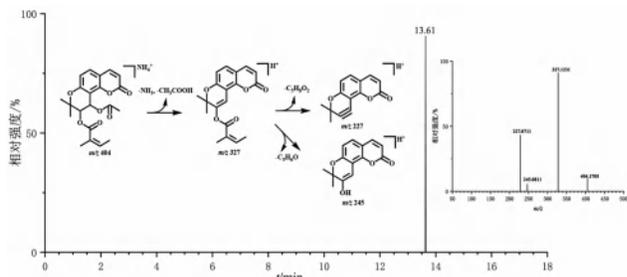


图 4 白花前胡甲素的提取离子流图、二级质谱及裂解规律

Fig 4 MS/MS spectrums, extract ion chromatography and fragmentation pathways of praeruptorin A

3.2.6 其他 化痰合剂还鉴定出醇胺类、脂肪酸甘油酯类等化合物。

4 讨论

本研究发现不同的入血成分会出现在不同采血时间点样本中，在化痰合剂给药 30 min 血清中鉴定出的化合物种类最多，能够检测到 11 个成分，后随时间推移依次减少，原因可能是不同成分在体内的吸收和代谢速度不同^[38]。白花前胡甲素、甘草苷、甘草素在 10 min ~ 6 h 内时间点样本中均可检测出，表明以上成分相对稳定。柚皮苷只在 30 min 及 1 h 取血点可以检测到，同文献报道的柚皮苷在给药后 1 h 后迅速消除一致^[39]。

本研究应用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法对化痰合剂样品及含药血清中的成分进行鉴别，共识别出 133 种化合物。在正离子模式下鉴别出的化合物种类较多，其中黄酮类化合物占比最高，其次是香豆素类、皂苷类、有机酸类、生物碱类。

除紫菀中的紫菀酮，处方中各味药材在 2020 年版《中国药典》中的质量控制成分均在化痰合剂中鉴别出。分析紫菀酮未检测出的原因，可能是紫菀酮水溶性差，或者水提工艺提取时紫菀酮受热分解或挥发所致^[40-41]。研究报道，白花前胡甲素具有镇咳化痰、抗炎等作用，可以抑制 NF- κ B、STAT3 等信号通路的激活，以及抑制巨噬细胞中的一氧化氮 (NO)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 等炎症因子的释放^[42-43]。前胡香豆素 E 能够改善肺损伤小鼠的中性粒细胞浸润、细胞因子释放以及蛋白渗出。橙皮苷、橙皮素通过抑制 Txnip、NLRP3、MAPK 和 NF- κ B 等炎症信号通路发挥抗炎作用^[44]。川陈皮素对支气管有舒张作用，有平喘的治疗效果^[45]。甘草苷可减少气道中 TNF- α 、IL-6、IL-13、TLR2、TGF- β 1、IgE 等细胞因子及炎性介质的释放以减少对咳嗽中枢的刺激，达到止咳的目的^[46]。甘草酸通过作用于 B 细胞受体信号通路、NOD 样受体信号通路等一系列炎症

反应途径改善气道黏液分泌的情况，发挥消炎化痰作用^[47]。上述入血成分可能是该方治疗急、慢性支气管炎的主要药效物质基础。

另外，化痰合剂中白前的某些已知成分未在本研究中检测到，可能与 ESI 离子化效率有关，也可能与提取方法、药材产地、生长和采收时间、液质条件等因素有关^[48]，具体有待进一步研究。

综上所述，本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对化痰合剂体外及入血化学成分进行表征，可为阐明其药理作用机制、筛选质量控制指标等后期研究提供依据。

参考文献

- [1] 骆前飞, 石燕红, 王瑞, 等. 前胡国内外质量标准研究进展 [J]. 中成药, 2023, 45 (8): 2670-2675.
- [2] 柳佚雯, 李睿, 罗寅珠, 等. 白前化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (8): 17-28.
- [3] 余志媛, 马耿佳, 梁红英. 中药紫菀的本草考证 [J]. 中药材, 2023, 46 (9): 2346-2352.
- [4] 黄博臻, 宋姗姗, 王亮, 等. 基于体质与证候辨析的痰湿体质主药主方筛选 [J]. 中南药学, 2024, 22 (6): 1628-1632.
- [5] 许伟辰, 罗子宸, 谢彤, 等. 中药桔梗研究进展及其质量标志物预测初步分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (2): 294-302.
- [6] 王龙, 高鑫, 郭栩廷, 等. 经典名方半夏厚朴汤研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20 (9): 2000-2007.
- [7] 汪洋, 黄宇飞, 金文芳, 等. 甘草饮片指纹图谱的建立及主要成分的含量测定 [J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2149-2153.
- [8] 宋芷琪, 李斌, 田琨宇, 等. 前胡与紫花前胡的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (3): 948-964.
- [9] 柳佚雯, 李睿, 罗寅珠, 等. 白前化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (8): 17-28.
- [10] 陈奕君. 紫菀润肺平喘的药效物质基础及作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [11] 吴建雄, 杨嵩虹, 郭怡敬, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的陈皮醋制前后成分分析 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38 (9): 4321-4327.
- [12] 张迟, 王新红, 曾金祥, 等. 基于谱效关系的桔梗镇咳祛痰活性成分研究 [J]. 中药材, 2020, 43 (8): 1918-1925.
- [13] 郭浩楠, 李花花, 姜苗苗, 等. 生半夏化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2024, 59 (3): 235-240.
- [14] 李太平, 谭枢恩, 张孟丽, 等. 基于中药血清药物化学的玉泉胶囊质量标志物研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (7): 1802-1813.
- [15] 谢斌, 吴学峰, 黄晓兰, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 法鉴定补肾益智方有效部位化学成分 [J]. 中成药, 2023, 45 (1): 299-310.
- [16] 吴红燕. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 及网络药理学研究桔梗汤治疗急性肺损伤的作用机制 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.

- [17] 王翠竹. 桔梗不同部位化学成分及抗抑郁作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [18] 黄芳, 周熙, 罗辉泰, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 及化学模式识别方法对陈皮的化学成分快速鉴别及产地判别研究 [J]. 中草药, 2022, 53 (20): 6361-6368.
- [19] Li CH, Fang W, Wu QQ, et al. Identification and characterization of chemical constituents in Huatan Jiangqi capsules by UPLC-QTOF-MS method [J]. J AOAC Int, 2021, 104 (4): 983-998.
- [20] 陈奕君, 吴浩, 魏紫奕, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的紫菀药材全成分解析 [J]. 药学学报, 2019, 54 (9): 1645-1654.
- [21] Deng YL, Ren HM, Ye XW, et al. Integrated phytochemical analysis based on UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, and experiment verification to explore the potential mechanism of *Platycodon grandiflorum* for chronic bronchitis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 564131.
- [22] 崔美娜, 钟凌云, 兰泽伦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析多物料多流程炮制对半夏化学成分的影响 [J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7428-7437.
- [23] Liu YN, Hu MT, Qian J, et al. Characterization of the chemical constituents of Jie-Geng-Tang and the metabolites in the serums and lungs of mice after oral administration by LC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19 (4): 284-294.
- [24] 方伟. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 法的化痰降气方化学成分分析及慢性阻塞性肺疾病代谢组学初步研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [25] 环敦涵, 李曼琳, 邢建国, 等. 基于色谱-质谱联用技术的复方木尼孜其颗粒化学成分分析与鉴定 [J]. 中成药, 2021, 43 (5): 1366-1375.
- [26] 刘渝. 款冬花、紫菀配方颗粒研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- [27] 吉春亮, 苏艳, 张金戈, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析前胡化学物质组及体内成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38 (12): 1143-1155.
- [28] 张琪, 胡安琪, 范倩, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的柑普茶外果皮、鲜陈皮和鲜砂糖橘皮的全成分对比分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2021, 60 (6): 128-141.
- [29] 赵毅萌, 张礼欣, 杨舒昀, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的中药荆芥穗化学成分表征与鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (2): 420-430.
- [30] 刘小妹, 杨媛媛, 胡静, 等. 冯了性风湿跌打药酒的化学成分鉴定 [J]. 中国药房, 2020, 31 (20): 2473-2480.
- [31] 许伟辰, 罗子宸, 何钰, 等. 基于液质联用技术的南北产地桔梗药材皂苷谱差异研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38 (6): 541-549.
- [32] 王婷婷, 安靓, 梁琨, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析 [J]. 中草药, 2020, 51 (6): 1498-1507.
- [33] 姜锡娟. 基于液质联用与质谱库检索技术的前期胡化学成分分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [34] 李颖硕, 周秀, 李瑞芳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 法分析不同产地前胡药材质量 [J]. 中成药, 2019, 41 (5): 1110-1114.
- [35] 田玉路. 前胡质量评价方法及呋喃香豆素类同分异构体质谱分析方法研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [36] 蔡信福, 徐雅, 刘和平, 等. 基于液质联用技术的经典名方羌活胜湿汤标准煎液的化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (2): 343-357.
- [37] 王梦晴, 于慧, 刘鑫, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术探究和表征杜仲提取物在腺嘌呤致肾纤维化大鼠中的入血成分及其代谢产物 [J]. 药学学报, 2022, 57 (4): 1136-1146.
- [38] 潘翔. 茯苓总三萜抗抑郁作用机制及效应成分研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [39] 温静. 四逆散抗肝损伤药效物质基础与配伍机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012.
- [40] 周建国. 止咳丸质量控制研究 [J]. 中成药, 1995, 17 (1): 15-17.
- [41] 巢颖欣, 刘梦诗, 杨秀娟, 等. 薄层色谱法快速鉴别广陈皮与陈皮 [J]. 中成药, 2021, 43 (7): 1937-1940.
- [42] Lee J, Lee YJ, Kim J, et al. Pyranocoumarins from root extracts of *peucedanum praeruptorum* dunn with multidrug resistance reversal and anti-inflammatory activities [J]. Molecules, 2015, 20 (12): 20967-20978.
- [43] Xu KB, Chen ZY, Hou JL, et al. Praeruptorin B inhibits osteoclastogenesis by targeting GSTP1 and impacting on the S-glutathionylation of IKK β [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113529.
- [44] 刘蕊, 李晓丹. 柑橘属黄酮类化合物橙皮苷和橙皮素的抗氧化和抗炎特性分子机制综述 [J]. 中国医药导刊, 2019, 21 (12): 749-752.
- [45] 梅全喜, 杨得坡. 新会陈皮的研究与应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- [46] 陈千, 熊富良, 张雪琼, 等. 甘草苷对感染后咳嗽 (肺阴虚证) 小鼠的止咳作用机制及抗氧化作用的研究 [J]. 华中师范大学学报 (自然科学版), 2020, 54 (5): 841-848, 873.
- [47] 钟仁兴, 丁子禾, 杨燕妮, 等. 基于网络药理学分析的橘红痰咳液主治“痰、咳、喘”的药效物质基础与作用机制研究 [J]. 药学学报, 2020, 55 (9): 2134-2144.
- [48] 肖观林, 李素梅, 陈昭, 等. 银蓝调脂胶囊化学成分鉴定及其药材归属 [J]. 中成药, 2023, 45 (7): 2420-2427.

(收稿日期: 2024-05-27; 修回日期: 2024-08-23)

四神丸改善肠道屏障功能缓解伊立替康肠道毒性的研究

朱娇娇¹, 朱晓俊², 严自强^{2*} (1.海军军医大学附属长海医院急诊科, 上海 200433; 2.海军军医大学附属长海医院药剂科, 上海 200433)

摘要: **目的** 研究四神丸对伊立替康肠道毒性的改善作用及其作用机制。**方法** 将小鼠分为对照组, 模型组 (伊立替康 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和四神丸低、高剂量 (2.5 、 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及阳性药组 (洛哌丁胺 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。记录小鼠体重变化, DAI 评分, 粪便隐血情况, 结肠组织病理学变化, 炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达, 观察四神丸对伊立替康肠道毒性的改善作用; 采用灌胃 FITC 标记葡聚糖, 4 h 后检测血清中的荧光强度、脂多糖 (LPS) 和二胺氧化酶 (DAO) 含量, 观察四神丸对伊立替康小鼠肠道通透性的影响; 采用 Western blot 和免疫荧光检测小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达, 观察四神丸对伊立替康小鼠肠道屏障的影响。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠体重明显降低, DAI 评分、小鼠粪便隐血阳性率、结肠组织中炎症因子 (TNF- α 、IL- 1β 和 IL-6) 的表达显著升高 ($P < 0.01$); 小鼠血清中荧光强度、LPS 和 DAO 含量明显增多; 小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 Claudin 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。四神丸低、高剂量干预后, 小鼠体重显著恢复, DAI 评分、小鼠粪便隐血阳性率和小鼠结肠组织中 TNF- α 、IL- 1β 、IL-6、ZO-1、Occludin 和 Claudin 的表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 小鼠肠道通透性显著改善 ($P < 0.01$)。**结论** 四神丸可以有效改善伊立替康的肠道毒性, 其作用机制可能与促进紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达从而恢复肠道屏障功能有关。

关键词: 伊立替康; 肠道毒性; 四神丸; 肠道屏障; 紧密连接蛋白

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0094-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.014

Sishen pill alleviating irinotecan-triggered intestinal toxicity via improving intestinal barrier function

ZHU Jiao-jiao¹, ZHU Xiao-jun², YAN Zi-qiang^{2*} (1. Department of Emergency, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433; 2. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: Objective To determine the ameliorating effect of Sishen pill on irinotecan-triggered intestinal toxicity and related mechanism. **Methods** The mice were divided into a control group, a model group (irinotecan $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Sishen pill low dose and high dose (2.5 and $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups and a positive group (loperamide $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The effects of Sishen pill on alleviating the irinotecan triggered intestinal toxicity were determined by recording the body weight, DAI scores, fecal occult blood, colonic and histopathology and the expressions of inflammatory factors [tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1β (IL- 1β), and interleukin 6 (IL-6)]. The effects of Sishen pill on the intestinal permeability, lipopolysaccharide (LPS) and diamine oxidase (DAO) contents were observed by fluorescence intensity in the serum 4 h after intragastric administration of FITC-dextran. The effects of Sishen pill on the intestinal barrier of irinotecan mice were observed by the expression of ZO-1, Occludin and Claudin in the colon tissue, detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** The weight was markedly decreased ($P < 0.01$), while the DAI score, fecal occult blood positive rate, and the expression of TNF- α , IL- 1β and

基金项目: 上海市普陀区卫生系统科技创新项目 (No.ptkwws202204)。

作者简介: 朱娇娇, 女, 主管护师, 主要从事医院临床护理研究, email: 923007221@qq.com *通信作者: 严自强, 男, 主管药师, 主要从事临床药理学研究, email: 13585775766@163.com

IL-6 greatly increased, the fluorescence intensity, LPS and DAO contents obviously increased, but the expressions of ZO-1, Occludin and Claudin were significantly decreased in the model group, compared with those of the control group ($P < 0.01$). The body weight of the mice recovered significantly ($P < 0.01$), the DAI scores, fecal occult blood positive rate, the expressions of TNF- α , IL-1 β , IL-6, ZO-1, Occludin and Claudin were decreased significantly after the intervention of both low and high doses of Sishen pill ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The intestinal permeability of mice was significantly improved ($P < 0.01$).

Conclusion Sishen pill effectively alleviates irinotecan triggered intestinal toxicity, the mechanism may be related to promoting the expression of tight junction proteins (ZO-1, Occludin and Claudin) to restore the intestinal barrier function.

Key words: irinotecan; intestinal toxicity; Sishen pill; intestinal barrier; tight junction protein

伊立替康 (irinotecan, CPT11) 是一种半合成的水溶性喜树碱衍生物, 是脱氧核糖核酸拓扑异构酶 I 的抑制剂, 常用于晚期结直肠癌及术后辅助化疗, 也是肺癌、乳腺癌、胰腺癌的一线用药^[1-2]。伊立替康常见的不良反应包括骨髓抑制、脱发、呼吸急促和肠道毒性^[3]。其中, 伊立替康的活性代谢产物 SN-38 在肠道累积继而破坏肠上皮并导致肠黏膜炎症引起的肠道毒性, 严重影响患者的依从性, 导致患者耐受性下降^[4-5]。因此, 迫切需要寻找改善伊立替康肠道毒性的药物。

四神丸是治疗脾肾阳虚泄泻的经典名方, 由肉豆蔻 (煨)、补骨脂 (盐炒)、五味子 (醋制)、吴茱萸 (制)、大枣去核、生姜六味中药组成, 临床疗效显著^[6]。前期研究显示, 四神丸可通过调节肠道菌群及代谢水平、抗炎、调节免疫等不同机制治疗结肠炎^[7-8]。然而四神丸对于药物导致的肠道损伤的保护作用研究较少。本研究拟探讨四神丸对伊立替康肠道毒性的保护作用以及可能的作用机制。

1 材料

1.1 试药与仪器

四神丸 [北京同仁堂天然药物 (唐山) 有限公司, 规格: 27 g/瓶, 批号: 17080051]; 伊立替康 (批号: S25911)、洛哌丁胺 (批号: S26615-5g) (上海源叶生物科技有限公司); 小鼠粪便隐血检测试剂盒 (苏州艾博生物科技有限公司, 批号: V277200); 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (批号: E-EL-M3063)、白细胞介素-6 (IL-6) (批号: E-EL-M0044)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) (批号: E-EL-M0037) ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 小鼠内毒素脂多糖 (LPS) ELISA 试剂盒 (武汉华美生物科技有限公司, 批号: CSB-E13066m); 小鼠二胺氧化酶 (DAO) ELISA 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 批号: MU30134); FITC 标记葡聚糖 (FD-4) (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: 46944); ZO-1 (批号:

ab307799)、Occludin (批号: ab216327)、Claudin (批号: ab211737) 一抗和山羊抗兔对应二抗 (批号: ab6721) (美国 Abcam 公司)。SpectraMax iD3 多模式酶标仪 (美国 MD 公司); 电泳系统、凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验动物

30 只 C57BL/6 雄性小鼠, 体重 20 ~ 22 g [上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, SYXK (沪) 2022-0009], 所有动物在恒湿 (55% ~ 65%)、恒温 (24 ~ 26 °C)、12 h/12 h 昼夜条件下自由进食和饮水。本实验符合上海中医药大学动物伦理审查标准 (伦理批件号: PZSHUTCM2311130003)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将 30 只小鼠适应性喂养一周后, 随机分成 5 组: 对照组、模型组 (伊立替康 75 mg · kg⁻¹)、四神丸低剂量组 (2.5 g · kg⁻¹)、四神丸高剂量组 (5 g · kg⁻¹)、阳性药组 (洛哌丁胺 10 mg · kg⁻¹)。除对照组外, 其余各组小鼠均从第 4 日开始腹腔注射伊立替康 (75 mg · kg⁻¹), 对照组小鼠腹腔注射等量的生理盐水, 连续注射 10 d。第 1 日开始, 四神丸低、高剂量组和阳性药组小鼠每日灌胃相应的药物量, 对照组和模型组小鼠每日灌胃等量的溶剂, 连续 2 周。

实验结束时, 记录小鼠的体重, 粪便黏稠程度和粪便隐血情况, 并记录小鼠每日活动指数 (DAI) 评分^[9]。DAI 的最终评分取决于以下 3 个评分标准: 体重减轻情况 (0: 体重无减轻、1: 体重减轻 1% ~ 5%、2: 体重减轻 5% ~ 10%、3: 体重减轻 10% ~ 20%、4: 体重减轻 \geq 20%); 粪便性状 (0: 正常、2: 软便、4: 腹泻); 粪便隐血情况 (0: 正常、2: 隐血阳性、4: 肉眼血便), 分别判断每项评分标准所获得的分数, 最后取 3 项评分的平均值作为最终的 DAI 评分。分离各组小鼠结肠, 对每组小鼠结肠长

度进行测量和拍照，并把各组小鼠结肠分为两部分，其中一部分用 4% 多聚甲醛固定，另一部分用液氮速冻后放 -80℃ 冰箱保存。

2.2 小鼠粪便隐血测试

实验结束时，收集各组小鼠粪便，采用粪便隐血实验检查粪便中是否有隐血情况，将新鲜粪便 (20 mg) 与生理盐水打碎混匀，按照试剂盒说明书操作，用试剂盒内一次性试纸进行粪便潜血测试。并计算粪便隐血阳性率。

2.3 小鼠结肠组织形态学观察

将 4% 多聚甲醛固定的结肠组织用石蜡包埋，切成 5 μm 厚度的切片，并进行 HE 染色，染色后用全数字扫描仪拍照分析。

2.4 小鼠结肠组织免疫荧光染色

将固定的结肠组织用石蜡包埋，切成 5 μm 厚度的切片，用柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 对切片进行抗原修复 20 min，并用山羊血清稀释液在室温下进行封闭，添加适量的 ZO-1 抗体于冰箱中 4℃ 孵育过夜，用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗切片 3 次，每次 5 min，滴加相应的二抗，在 37℃ 下孵育 30 min，再用 DAPI 染液染色。在室温下孵育 10 min，再次用 PBS 冲洗切片 3 次，每次 5 min，最后，滴加抗荧光衰减封片剂并加盖玻片封片，利用荧光显微镜观察和分析。

2.5 小鼠结肠组织炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 检测

称取适量的冷冻保存结肠组织，用 3 倍量的 PBS 匀浆，在 4℃ 下离心 20 min (12 000 r · min⁻¹) 取上清液。然后用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度并调整成统一浓度。根据说明书，采用试剂盒测定组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的含量。

2.6 小鼠血清 FD-4、LPS 和 DAO 检测

实验终点前一日各组小鼠禁食过夜，实验终点当日对各组小鼠灌胃 FD-4 (0.4 g · kg⁻¹)，各组小鼠

4 h 后取血，分离血清，用 PBS 稀释血清，用酶标仪检测荧光强度 (激发波长为 485 nm，发射波长为 528 nm)，用 PBS 稀释 FD-4 制备标准曲线。以未灌胃 FD-4 的小鼠血清作为背景对照。小鼠血清 LPS 和 DAO 含量检测采用 ELISA 试剂盒。血清 1:10 稀释，操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.7 小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达水平检测

称取适量的冷冻保存结肠组织 (30 mg)，在 5 倍体积的 RIPA 裂解缓冲液中匀浆，在 4℃ 下离心 20 min (12 000 r · min⁻¹)，取上清液。用 BCA 法测定上清液中蛋白浓度，并用 5×Loading buffer 缓冲液对蛋白变性。变性后的蛋白质样品通过凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离，并转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h，然后用 ZO-1、Occludin 和 Claudin 一抗 (1:1000) 在冰箱中 4℃ 孵育过夜。然后用相应的辣根过氧化物酶偶联二抗 (1:10 000) 孵育 1 h。PVDF 膜用 ECL 超敏发光试剂显色，用化学发光成像系统 (Bio-Rad) 显影。Image J 软件对结果进行定量分析。

2.8 统计学处理

采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用 Students-*t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四神丸对伊立替康小鼠体重、粪便隐血的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠体重明显减轻、DAI 评分明显升高、小鼠粪便隐血阳性率明显升高 (*P* < 0.01)。给予低、高剂量四神丸干预后，小鼠体重显著恢复、小鼠 DAI 评分显著降低、小鼠粪便隐血阳性率显著下降 (*P* < 0.01)。而且，四神丸高剂量组小鼠体重恢复优于阳性药洛哌丁胺。以上结果初步表明，四神丸能够有效缓解伊立替康的肠道毒性。

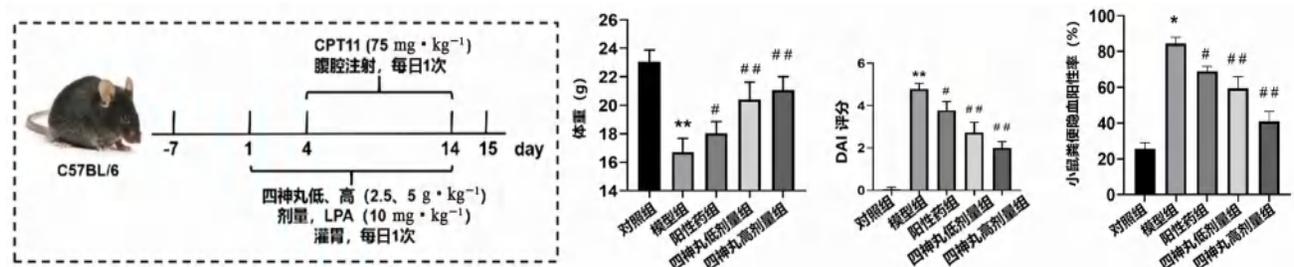


图 1 四神丸对伊立替康小鼠体重、粪便隐血的影响

Fig 1 Effect of Sishen pill on body weight and fecal occult blood of mice treated with irinotecan

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

Note: Compared with the control group, ***P* < 0.01; compared with the model group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01.

3.2 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织形态学的影响
 结果如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的结肠长度明显缩短 ($P < 0.01$), 结肠组织形态破坏较明显, 其中绒毛、隐窝、杯状细胞大量减少, 并伴有炎性细胞浸润。与模型组比较, 给予

低、高剂量四神丸干预后, 小鼠的结肠长度明显增长 ($P < 0.01$), 结肠组织形态相对完整, 其绒毛、隐窝、杯状细胞都有不同程度的恢复, 而且炎性细胞浸润也有一定程度的减轻。以上结果表明, 四神丸可有效减轻伊立替康小鼠结肠组织形态损伤。

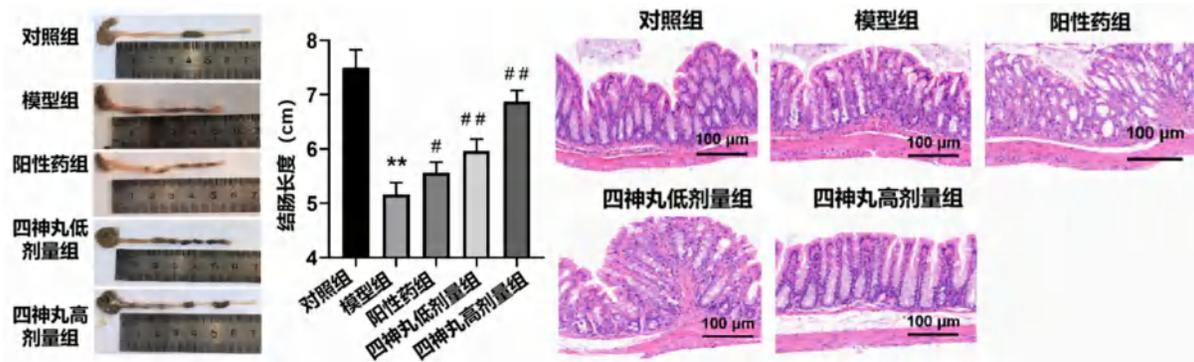


图 2 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织形态学的影响
 Fig 2 Effect of Sishen pill on histomorphology in the colon tissue of mice treated with irinotecan

注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the control group, $**P < 0.01$; compared with the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

3.3 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织炎症因子的影响

结果如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量显著升高 ($P < 0.01$), 给予低、高剂量四神丸干预后, 小鼠的结肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量明显降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 四神丸具有明显的抗炎作用, 可减轻伊立替康小鼠结肠组织的炎症损伤。

明, 四神丸对伊立替康小鼠肠道通透性具有明显的保护作用。

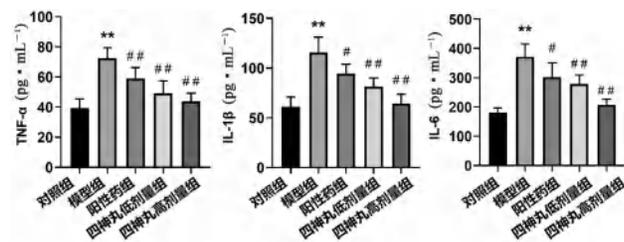


图 3 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织炎症因子的影响
 Fig 3 Effect of Sishen pill on the expression of the tight junction related proteins in the colon tissue of mice treated with irinotecan

注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.01$; compared with the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

3.4 四神丸对伊立替康小鼠肠道通透性的影响

结果如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 FD-4、LPS 和 DAO 含量明显增多 ($P < 0.01$)。给予低、高剂量四神丸干预后, 小鼠血清中 FD-4、LPS 和 DAO 含量显著降低 ($P < 0.01$)。以上结果表

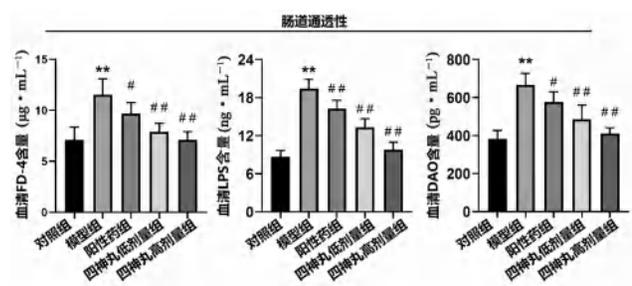


图 4 四神丸对伊立替康小鼠肠道通透性的影响
 Fig 4 Effect of Sishen pill on the intestinal permeability of mice treated with irinotecan

注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.01$; compared with the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

3.5 四神丸对伊立替康小鼠肠道屏障完整性的影响

结果如图 5, Western blot 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。给予低、高剂量四神丸干预后, 小鼠结肠组织中紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达则显著增多 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。小鼠结肠组织中 ZO-1 免疫荧光染色结果也显示 (见图 6), 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中的荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), 给予低、高剂量四神丸干预后, 小鼠结肠组织中的荧光强度明显增强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

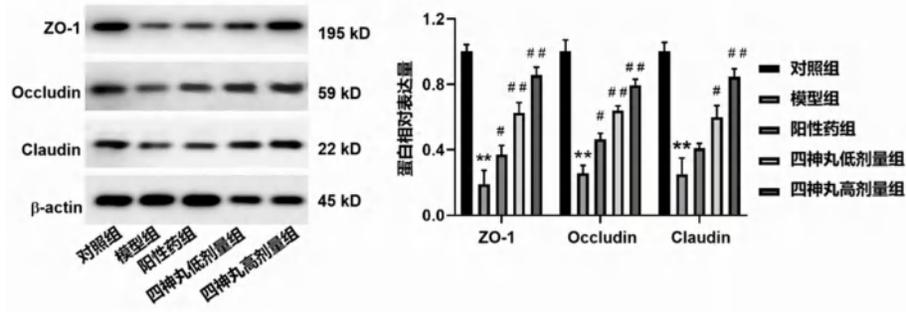


图 5 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织中紧密连接相关蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of Sishen pill on the expression of the tight junction related proteins in the colon tissue of mice treated with irinotecan

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

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

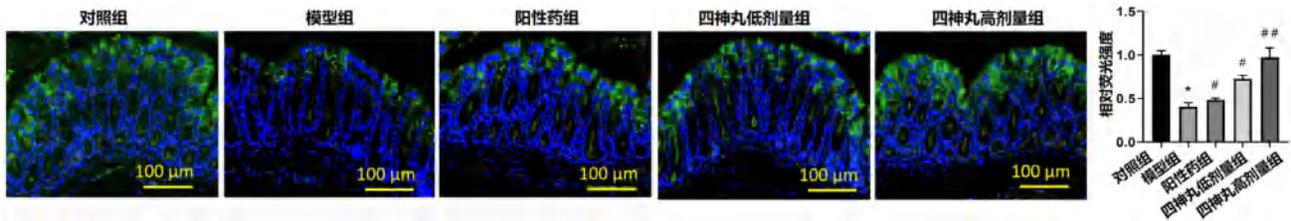


图 6 四神丸对伊立替康小鼠结肠组织中 ZO-1 免疫荧光染色的影响 (Bar = 100 μm)

Fig 6 Effect of Sishen pill on ZO-1 immunofluorescence staining in the colon tissue of mice treated with irinotecan (Bar = 100 μm)

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

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

4 讨论

伊立替康是治疗晚期结直肠癌、肺癌和乳腺癌辅助化疗的一线药物^[1]。然而，它的使用受到肠道功能障碍的限制，如呕吐和腹泻。伊立替康肠道毒性在有的患者中很严重，甚至无法控制而面临停药或者换药^[10]。伊立替康是一种化学前体药物，本身不具有药理活性，当其进入体内后，通过羧酸酯酶转化为活性产物 SN-38，从而发挥抗肿瘤作用^[11]。SN-38 在尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶的作用下与葡糖醛酸结合形成 SN-38G，经由胆汁入肠腔^[12]。在肠道内，SN-38G 经肠道细菌产生的 β -葡萄糖苷酸酶作用，产生游离的 SN-38，进一步导致肠腔中 SN-38 的累积，导致肠道上皮黏膜细胞引起黏膜损伤，引发肠道毒性^[13-14]。本研究以伊立替康 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量连续给药 10 d 的小鼠为研究对象，结果显示，伊立替康给药后小鼠体重减轻、DAI 评分升高和结肠长度缩短等现象，表明伊立替康给药小鼠可引起肠道毒性表现。

四神丸是临床治疗肠道疾病的经典名方，疗效显著^[15]。四神丸可通过不同的作用机制缓解肠道疾病。刘佳星等^[16]研究发现，四神丸可通过调节肠道菌群的结构而发挥治疗腹泻型肠易激综合征的作用。柳荣等^[17]研究发现，四神丸可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善 UC 大鼠肠黏膜损伤

的作用。葛巍等^[9]研究发现，四神丸可抑制 HK2、PFK1 和 PKM2 信号介导的糖酵解，重塑巨噬细胞 M1/M2 的平衡，从而有效治疗 DSS 诱导的小鼠慢性结肠炎。本研究 HE 染色证实了伊立替康治疗小鼠的肠道损伤，如杯状细胞减少、肠上皮内中性粒细胞增多、黏膜水肿加重，连续 14 d 给予四神丸治疗可减少肠道功能障碍，结肠组织中炎症因子的减少是组织病理学变化改善的最重要证据，表明四神丸能够有效缓解伊立替康肠道毒性。

紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 是一种位于结肠组织紧密连接处的完整膜蛋白，它在维持肠道屏障和结肠上皮紧密连接中起着关键作用^[18-19]，ZO-1 是紧密连接复合体中的一种重要蛋白，与肠上皮完整性的保持密切相关，并作为肠屏障的独特标志物^[20]。肠道屏障完整性的维持与杯状细胞分泌的黏蛋白也密切相关^[21]。伊立替康化疗药物等导致肠道受损时，杯状细胞大量丢失，导致黏蛋白大幅减少，使细菌等大量入侵，激活炎症反应。本研究发现伊立替康明显降低 ZO-1、Occludin 和 Claudin 水平，破坏肠道屏障的完整性。而给予四神丸干预可显著促进紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达来降低肠道通透性，维持肠道屏障功能。而四神丸对于黏蛋白的表达情况后续有待进一步研究。

综上，四神丸可通过促进肠道紧密连接蛋白

(ZO-1、Occludin 和 Claudin) 的表达来降低肠道通透性, 改善肠道屏障功能, 进而缓解伊立替康肠道毒性。

参考文献

- [1] Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 148: 104398.
- [2] 高前艳, 杨金玉, 李国栋, 等. 伊立替康诱导结直肠癌肝转移患者脂肪性肝炎的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (13): 1391-1394.
- [3] 胡艳玲, 史爱欣, 傅得兴, 等. 基因多态性影响伊立替康疗效及毒性作用的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (15): 1298-1302.
- [4] de With M, van Doorn L, Bins S, et al. Irinotecan-induced toxicity: a pharmacogenetic study beyond UGT1A1 [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2023, 62 (11): 1589-1597.
- [5] Yue B, Gao RY, Wang ZT, et al. Microbiota-host-irinotecan axis: a new insight toward irinotecan chemotherapy [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 710945.
- [6] 李雪莹, 王佐梅, 姚欣卉, 等. 四神丸药理作用及临床应用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23 (4): 122-126.
- [7] Wang YY, Zhu XD, Liang YL, et al. Sishen pill treats ulcerative colitis in rats by regulating gut microbiota and restoring the Treg/Th17 balance [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1432816.
- [8] Wang HY, Zhao HM, Liu D, et al. Sishen pill ameliorated trinitrobenzene-sulfonic-acid-induced chronic colitis via NEMO/NLK signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 170.
- [9] Zhang Y, Tao M, Chen C, et al. BAFF blockade attenuates DSS-induced chronic colitis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- κ B activation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 783254.
- [10] Kciuk M, Marciniak B, Kontek R. Irinotecan-still an important player in cancer chemotherapy: a comprehensive overview [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (14): 4919.
- [11] 桑明敏, 熊友香, 方剑文. 羧酸酯酶对酯类药物代谢与肠道毒性的影响 [J]. *浙江创伤外科*, 2023, 28 (3): 596-598.
- [12] Yue B, Gao RY, Lv C, et al. Berberine improves irinotecan-induced intestinal mucositis without impairing the anti-colorectal cancer efficacy of irinotecan by inhibiting bacterial β -glucuronidase [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 774560.
- [13] Kodawara T, Higashi T, Nakamura T, et al. The inhibitory effect of ciprofloxacin on the β -glucuronidase-mediated deconjugation of the irinotecan metabolite SN-38-G [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 118 (5): 333-337.
- [14] 卢红文, 郁浩, 蔡东焱, 等. 伊立替康及其主要活性代谢产物在人血浆和唾液中的药物浓度及药动学 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32 (23): 1877-1882.
- [15] 朱旭彤, 高新梅, 戴帅, 等. 四神丸治疗溃疡性结肠炎临床及机制研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2024, 20 (2): 225-231.
- [16] 刘佳星, 王彦礼, 李彧, 等. 四神丸对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群影响的实验研究 [J]. *药理学报*, 2019, 54 (4): 670-677.
- [17] 柳荣, 王燕, 朱向东, 等. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (4): 16-23.
- [18] Heinemann U, Schuetz A. Structural features of tight-junction proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (23): 6020.
- [19] 姚静漪, 邓博文, 李承乘, 等. 益艾康胶囊对 IFN- γ 损伤肠黏膜屏障的紧密连接及相关蛋白 Claudin-1、Claudin-5 表达的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (8): 897-901.
- [20] 冯雯, 张亚薇, 张祎, 等. 中药活性物质对肠屏障功能的保护作用研究进展 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (5): 1300-1306.
- [21] 吕梦婷, 章超凡. cGAS-STING 通路在肠道屏障中的作用研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (11): 2463-2469.

(收稿日期: 2024-05-30; 修回日期: 2024-09-27)

熊果酸通过 Hippo-YAP 信号通路抑制乳腺癌 细胞增殖、迁移与凋亡的研究

陶然然¹, 胡俊杰¹, 郑国华², 吴勇^{1*} (1. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学 中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

摘要: **目的** 探究熊果酸(UA)对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移与凋亡的影响以及Hippo-YAP信号通路发挥的作用。**方法** 采用显微镜观察法检测细胞形态, MTT法检测细胞活力, 划痕实验检测细胞迁移情况, 平板克隆形成实验检测细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡率, RT-qPCR检测Hippo信号通路相关基因的mRNA表达情况, 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测Hippo信号通路相关蛋白表达情况。**结果** UA能明显改变MDA-MB-231细胞形态, 抑制MDA-MB-231细胞增殖, 并呈浓度依赖性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 抑制MDA-MB-231细胞克隆和迁移($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 诱导细胞凋亡, 使细胞凋亡率显著增加且呈现出浓度依赖性并促进MDA-MB-231细胞凋亡($P < 0.01$)。UA显著上调Bax蛋白表达水平, 显著下调Bal-2蛋白水平($P < 0.01$); UA可明显下调YAP、CTGF、CYR61的mRNA表达, 降低YAP、CTGF、CYR61蛋白表达量, 升高p-YAP的蛋白表达量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 可显著上调细胞质中YAP和p-YAP蛋白水平, 下调细胞核中YAP蛋白水平($P < 0.01$)。**结论** UA抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖和迁移, 并促进细胞凋亡, 可能与Hippo-YAP通路有关。

关键词: 熊果酸; Hippo信号通路; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0100-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.015

Inhibitory effect of ursolic acid on the proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cells via Hippo-YAP signaling pathway

TAO Ran-ran¹, HU Jun-jie¹, ZHENG Guo-hua², WU Yong^{1*} (1. School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Key Laboratory of TCM Resources and Compounds of Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065)

Abstract: Objective To determine the effect of ursolic acid (UA) on the proliferation, migration and apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cells and the role of Hippo-YAP signaling pathway. **Methods** Cell morphology was detected by microscopes, cell viability by MTT assay, cell migration by scratch assay, cell proliferation by plate cloning, and cell cycle and apoptosis by flow cytometry. The mRNA expression of genes related to Hippo signaling pathway was determined by RT-qPCR, and protein expression related to the Hippo signaling pathway by protein immunoblotting (Western blot). **Results** UA significantly changed the morphology of MDA-MB-231 cells, inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and inhibited the MDA-MB-231 cell cloning and migration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The apoptosis rate of MDA-MB-231 cells was significantly increased by inducing the apoptosis ($P < 0.01$). UA significantly up-regulated the expression level of Bax protein, and down-regulated the level of Bal-2 protein ($P < 0.01$). UA greatly down-regulated the mRNA expression of YAP, CTGF and CYR61, decreased the protein expression of YAP, CTGF and CYR61, and

基金项目: 湖北省科技重大专项 (No.2020ACAO19-04)。

作者简介: 陶然然, 女, 硕士研究生, 主要从事中药抗肿瘤药物方面的研究, email: 1132330912@qq.com *通信作者: 吴勇, 男, 副教授, 主要从事中药质量控制与分析方面的研究, email: 465142062@qq.com

increased the protein expression of p-YAP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). YAP and p-YAP protein levels in the cytoplasm were substantially up-regulated, while YAP protein levels in the nucleus were down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** UA inhibits the proliferation and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells and promotes the apoptosis, which may be related to the Hippo-YAP pathway.

Key words: ursolic acid; Hippo signaling pathway; breast cancer; proliferation; migration; apoptosis

乳腺癌是一种以乳腺上皮为主要来源的恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升趋势,在女性恶性肿瘤中位居第一^[1]。乳腺癌严重威胁女性健康且其发病趋于年轻化。因此探索乳腺癌所涉及的分子机制并改进乳腺癌治疗策略至关重要。研究表明, Hippo 信号及其主要效应物 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 在乳腺发育和乳腺癌发生发展中起着至关重要的作用^[2]。在乳腺癌中, YAP 是一种重要的抑癌基因。YAP/TAZ 复合体是乳腺癌干细胞特性的重要调控因子^[3], 在乳腺癌发生、发展、转移等方面发挥重要作用^[4-5]。熊果酸具有抗肿瘤、抗病毒、护肝、抗炎、免疫调节等多种生理功能^[6], 已成为研究热点。大量研究表明, 熊果酸通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和抑制血管生成从而抑制乳腺癌细胞增殖、迁移与侵袭^[7]。但目前还未见熊果酸通过调控 Hippo 信号通路发挥抗乳腺癌作用的研究报道。因此, 本研究以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为对象, 探究熊果酸对 MDA-MB-231 细胞生物学行为的影响, 初步探索熊果酸是否通过 Hippo-YAP 信号通路抑制 MDA-MB-231 细胞增殖迁移, 为熊果酸治疗药物的研发提供参考和实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株 (上海信裕生物科技有限公司)。

1.2 试剂

熊果酸 (纯度 $\geq 98\%$, 麦克林有限公司, 货号 77-52-1), L15 基础培养基 (上海信裕生物科技有限公司, 批号: 2022120801); 141 血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 10099-141); 0.25% 胰蛋白酶消化液、青霉素、链霉素 (美国 Hyclone 公司, 批号分别为 J200033、J200033、J200044); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 大连美伦生物技术有限公司, 批号: MA0015-Apr-23H); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 10N0317); 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (康为世纪科技有限公司, 批号分别为 CW2200、CW2383S); ECL 超敏发光液 (Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: WP20005);

细胞凋亡检测试剂盒 (广州捷倍斯生物科技有限公司, 批号为 G7642); Bcl-2、Bax、YAP、CTGF、CYR61、p-YAP、 β -actin 单克隆抗体及兔二抗、鼠二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司和美国 CST 公司, 货号分别为 16026-1-AP、50599-2-Ig、P46937、P29279、26689-1-AP、29018-1-AP、HRP-6008、7074、7076)。

1.3 仪器

xMark 全波长酶标仪 (美国 Bio-Rad Corporation); MCO-15AC-二氧化碳细胞培养器 (日本 Sanyo Corporation); 流式细胞术 (NovoCyt-eD2040R) (艾森生物技术公司); 超洁净工作台 SW-CJ-1FD (安泰气动科技股份有限公司); 深冷高速离心机 Centrifuge 5424 R (德国 Eppendorf); CKX31 倒置显微镜 (日本 Olympus Corporation); TC20 型细胞计数器、Power Pac Basic 型电泳仪、Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白转膜仪 (美国 BIO-RAD 公司); G-BOX 图像分析仪 (英国 Syngene 公司); XB220A (Precisa Corporation)。

2 方法

2.1 细胞培养

将乳腺癌 MDA-MB-231 细胞置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养, 根据细胞的生长状态, 每 2 日更换一次新鲜培养基, 当细胞密度达 $80\% \sim 90\%$ 时, 以 1:2 的比例传代。

2.2 熊果酸母液的配制

熊果酸用 DMSO 溶解并配制成 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 使用时用完全培养基配制成不同浓度。

2.3 熊果酸对细胞形态的影响

将对数期的 MDA-MB-231 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板上, 细胞培养 24 h 贴壁后, 以不加药物细胞为对照组 (Control 组, 下同), 加入浓 2 、 4 、 $8\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果酸培养液 24 h 后, 在倒置显微镜下观察实验组与对照组的细胞形态差异, 并拍照记录。

2.4 MTT 法检测熊果酸对细胞存活率的影响

取对数期 MDA-MB-231 细胞, 以 1×10^4 /孔 ($100\ \mu\text{L}$) 均匀接种于 96 孔细胞培养板内, 待细胞

培养过夜后, 每孔对应加入含不同浓度药物的培养液 100 μL , 培养 24 h 和 48 h。每孔添加 20 μL 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 置培养箱中培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 150 μL 的 DMSO, 避光振荡 10 min。采用全自动酶标仪, 在 490 nm 波长下测量光密度 (OD)。计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = (实验组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值) \times 100%。

2.5 平板克隆形成实验

将对数期 MDA-MB-231 细胞, 按 200 ~ 500 个 / 孔接种到 6 孔板中, 置于恒温培养箱中 24 h。培养 24 h 后, 更换含有药物的培养基, 持续培养 7 ~ 14 d, 其间每 3 日更换一次液体, 观察到细胞有明显的集落形成, 终止培养。用 PBS 轻轻清洗 2 次。在每个孔中添加 1 mL 4% 多聚甲醛, 固定 15 min 后, 弃去固定液, 用 0.1% 1 mL 的结晶紫染液静置 15 min, 用流水慢慢冲洗, 在室温下干燥, 相机拍照。

2.6 细胞划痕实验

将对数期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板上过夜培养, 观察其生长情况。用 200 μL 枪头在 6 孔平板中心画十字形, 用 PBS 慢速冲洗 2 ~ 3 遍, 直至刮掉的细胞全部清除, 再添加含有药物的无血清培养液, 在倒置显微镜下观察 0、24、48 h 划痕情况并拍照, 用 Image J 软件测量划痕区域, 以 0 h 划痕面积为基础, 分别计算 24 h 和 48 h 的划痕愈合率。

2.7 流式细胞术检测熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡率的影响

采用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒, 把细胞培养液转至离心管内, 用 PBS 清洗 1 次, 胰酶消化, 经室温孵育后转至离心管, 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。添加 10 μL 的碘化丙啶染料, 轻轻混匀, 室温避光孵育 10 ~ 20 min, 用铝箔包住将其放置在冰水浴中, 轻轻敲打细胞后上机检测。

2.8 RT-qPCR 检测熊果酸对 MDA-MB-231 细胞 Hippo 通路相关 mRNA 表达的影响

将对数期 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔板中, 培养过夜, 加入含不同浓度药物的培养基, 继续培养 24 h, 弃去上清液, PBS 清洗后加入 Trizol 试剂裂解细胞, 提取 RNA, RNA 经反转录试剂盒得到 cDNA, 提取各组细胞总 RNA, 测定 RNA 浓

度, 并按照逆转录和扩增试剂盒说明书, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行扩增, PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$, 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、55 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共进行 40 个循环。每组 6 个复孔, 以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算各 mRNA 的相对表达, 所得数据进行归一化处理。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

引物	序列
YAP	上游 5'TCTTCCTGATGGATGGGAAC3'
	下游 5'GGCTGTTTCACTGGAGCACT3'
CYR61	上游 5'ACTTCATGGTCCCACTGCGC3'
	下游 5'AAATCCGGGTTTCTTTCACA3'
CTGF	上游 5'GCAGGCTAGAGAAGCAGAGC3'
	下游 5'ATGTCCTCATGCTGGTGCAGC3'
β -actin	上游 5'TGGGTGTGAACCATGAGA3'
	下游 5'GGTGCAGGAGGCATTGCT3'

2.9 Western blot 法检测熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡及通路相关蛋白表达的影响

将对数期 MDA-MB-231 细胞接种于培养皿中, 培养过夜。加入不同浓度的熊果酸溶液, 培养 24 h, 按 100 : 1 : 1 加入裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂等共 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 40 min, 每 10 min 涡旋至充分裂解, 离心, 取上层清液。BCA 法测定蛋白浓度之后进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜 23 min, 封闭 2 h, 一抗孵育, 二抗孵育。结束后采用化学发光成像系统显影, 以 β -actin、Histone-h3 (H3) 为内参, 采用 ImageLab3.0 软件对蛋白条带进行定量分析。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行单因素方差 (One-way ANOVA) 统计分析, 实验均独立重复 3 次及以上, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 呈现。GraphPad Prism 绘制图表展现分析结果。

3 结果

3.1 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞形态的影响

与对照组相比, 不同浓度的熊果酸处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞的黏附作用显著减弱, 细胞起皱, 呈球形, 且随熊果酸浓度的增加, 细胞的皱缩、破碎现象显著增多, 表明熊果酸能诱导 MDA-MB-231 细胞形态的改变 (见图 1)。

3.2 熊果酸抑制 MDA-MB-231 细胞增殖

在熊果酸 (0、2.5、5、10、15、20、25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

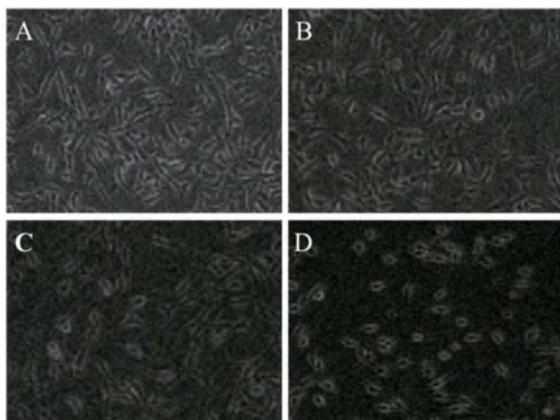


图 1 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞形态的影响 (×10)
Fig 1 Effect of ursolic acid on the morphology of MDA-MB-231 cells (×10)
A. 对照组 (control group); B ~ D. 2、4、8 μmol·L⁻¹ 熊果酸组 (2, 4, and 8 μmol·L⁻¹ ursolic acid group)

作用 24 h 和 48 h 后, 采用 MTT 法检测肿瘤细胞增殖能力, 结果显示, 与对照组相比, 熊果酸能显著降低 MDA-MB-231 细胞存活率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈浓度依赖性, 其半数抑制浓度 $IC_{50} = 8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究将采用 2、4、8 μmol·L⁻¹ 作为后续实验浓度 (见图 2)。

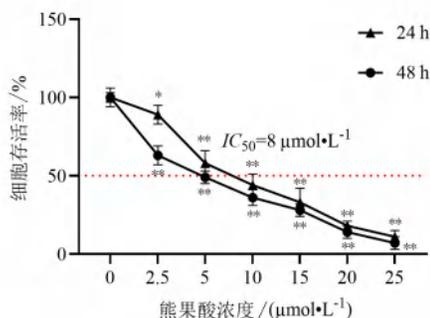


图 2 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($n = 3$)
Fig 2 Effect of ursolic acid on the proliferation of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)
注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 熊果酸抑制 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力
与对照组相比, 不同浓度 (2、4、8 μmol·L⁻¹) 的熊果酸对 MDA-MB-231 细胞的克隆形成能力具有抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且具有浓度依赖性 (见图 3 及表 2)。

3.4 熊果酸抑制 MDA-MB-231 细胞迁移
与对照组相比, 熊果酸作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 和 48 h 后, 随着熊果酸浓度的增加, 划痕愈合率逐渐降低, 表明熊果酸可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 4 及表 3)。

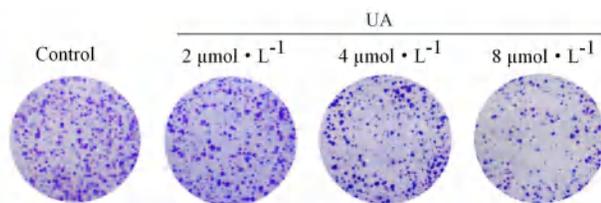


图 3 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响 ($n = 3$)
Fig 3 Effect of ursolic acid on the colony-formation ability of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

表 2 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞克隆形成率的影响 ($n = 3$)
Tab 2 Effect of ursolic acid on the clone-formation rate of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

组别	浓度 / (μmol·L ⁻¹)	克隆形成率 / %
对照组	0	100.33 ± 4.51
熊果酸	2	78.00 ± 4.00*
	4	60.33 ± 3.51*
	8	32.67 ± 5.69**

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

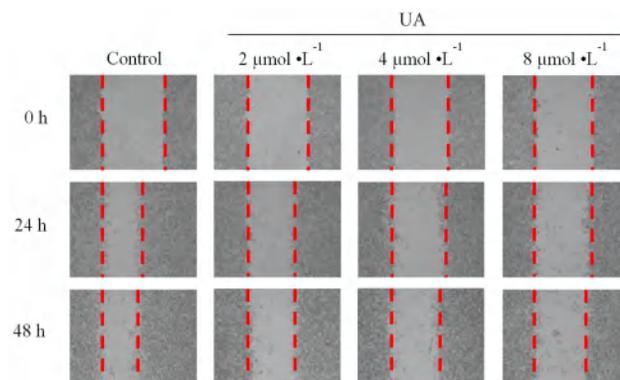


图 4 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 ($n = 3$)
Fig 4 Effect of ursolic acid on the migration of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

表 3 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 ($n = 3$)
Tab 3 Effect of ursolic acid on the migration of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

组别	浓度 / (μmol·L ⁻¹)	迁移率 / %	
		24 h	48 h
对照组	0	48.32 ± 0.75	52.98 ± 1.90
熊果酸	2	34.01 ± 1.88*	40.84 ± 1.34*
	4	22.60 ± 4.66**	30.41 ± 3.20**
	8	13.00 ± 1.83**	16.09 ± 4.96**

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.5 熊果酸诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡
流式细胞凋亡实验结果显示, 与对照组相比, 不同浓度 (2、4、8 μmol·L⁻¹) 的熊果酸处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 后可诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$), 且随着熊果酸浓度的增加, 细胞凋亡率增大 (见图 5 及表 4)。

3.6 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞 Hippo-YAP 信号通路相关因子 mRNA 表达水平的影响

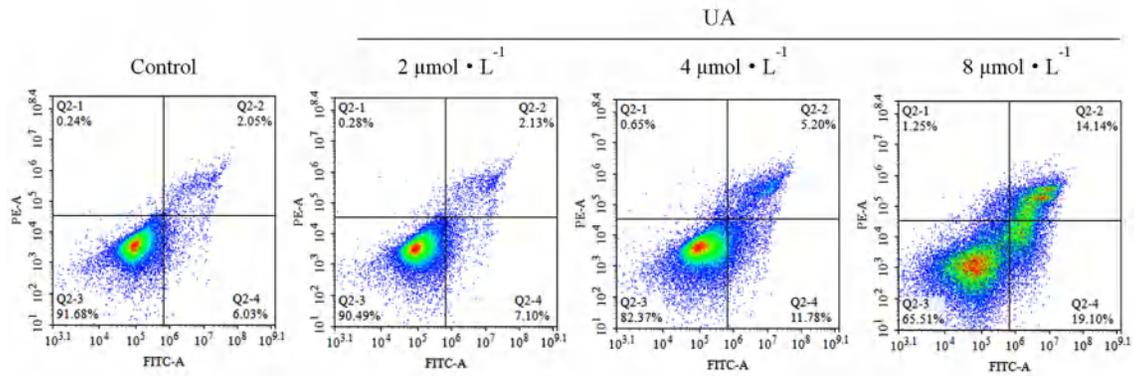


图 5 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($n = 3$)
Fig 5 Effect of ursolic acid on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

表 4 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($n = 3$)

Tab 4 Effect of ursolic acid on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

组别	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率 / %
对照组	0	7.21 ± 0.8
熊果酸	2	10.04 ± 0.81
	4	16.51 ± 0.68**
	8	35.68 ± 3.07**

注：与对照组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

与对照组相比，不同浓度 (2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的熊果酸处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 后能显著降低 *YAP* 以及通路下游靶基因 *CTGF*、*CYR61* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明熊果酸对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用与其参与了 Hippo 信号通路的调节有关 (见表 5)。

表 5 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞 Hippo-YAP 信号通路相关基因 *YAP*、*CYR61*、*CTGF* 的 mRNA 表达水平的影响 ($n = 3$)

Tab 5 Effect of ursolic acid on mRNA expression levels of Hippo-YAP signaling pathway related genes *YAP*, *CYR61* and *CTGF* in MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

组别	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	mRNA		
		<i>YAP</i>	<i>CYR61</i>	<i>CTGF</i>
对照组	0	1.08 ± 0.16	1.08 ± 0.09	0.98 ± 0.04
熊果酸	2	0.63 ± 0.05*	0.71 ± 0.05*	0.70 ± 0.01**
	4	0.53 ± 0.03*	0.64 ± 0.09*	0.61 ± 0.05*
	8	0.34 ± 0.02**	0.45 ± 0.05**	0.59 ± 0.01*

注：与对照组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

3.7 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡及通路中相关蛋白的影响

Western blot 结果显示，与对照组相比，熊果酸可上调 MDA-MB-231 细胞促凋亡蛋白 Bax 表达，下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P < 0.01$)。同时熊果酸可抑制 *YAP*、*CYR61* 和 *CTGF* 等基因的表达，表明熊果酸可能通过调控 Hippo-YAP 信号途径发挥作用 (见图 6 及图 7)。

UA

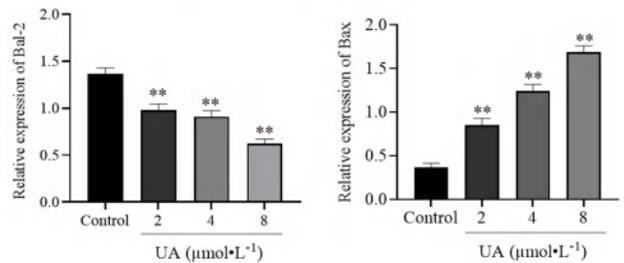
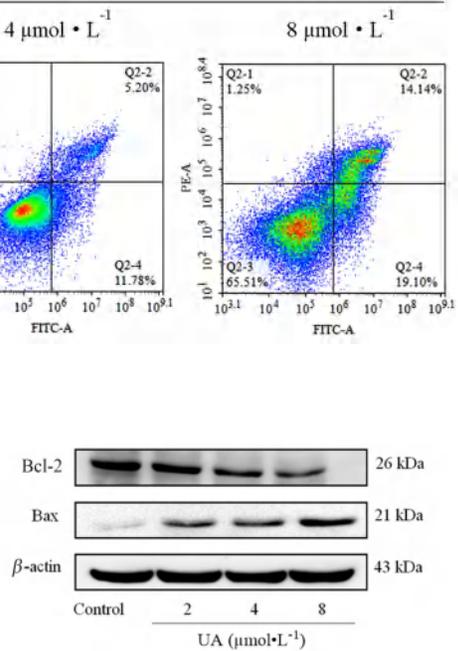


图 6 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($n = 3$)
Fig 6 Effect of ursolic acid on expression of apoptosis-related proteins in MDA-MB-231 cells ($n = 3$)

注：与对照组相比，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

3.8 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞核内 YAP 和 p-YAP 蛋白表达的影响

与对照组相比，熊果酸可下调 YAP 在细胞核中的表达，上调细胞质 YAP 及 p-YAP 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明熊果酸通过促进 YAP 磷酸化，使其滞留于细胞质，减少 YAP 入核，从而抑制 MDA-MB-231 细胞增殖 (见图 8)。

4 讨论

乳腺癌是我国女性恶性肿瘤中最常见的一种，增殖和转移是其发生发展的关键因素，深入研究其调控的分子机制对于提高乳腺癌的治疗水平和预后具有十分重要的意义^[8]。Hippo 通路的主要效应分子 YAP 是一种促进乳腺癌发生和发展的癌蛋白，YAP 入核与 TEAD 转录因子结合促进靶基因 *CTGF* 和 *CYR61* 的转录，进而促进细胞增殖和存活^[9]。有研究发现，Hippo 通路激活后，可促进 YAP 的磷酸化，抑制 YAP 表达，显著抑制宫颈癌细胞的增

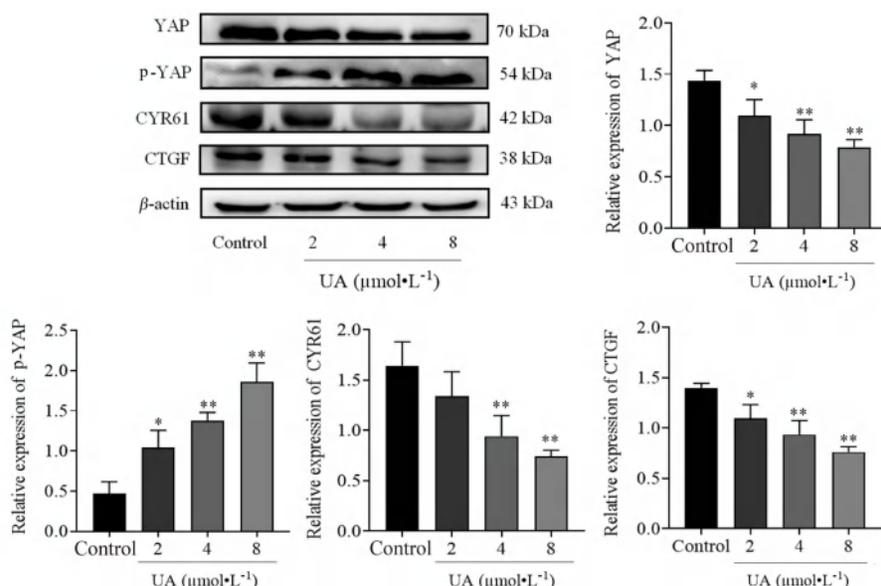


图 7 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞中 Hippo 信号通路相关蛋白表达的影响 (n = 3)

Fig 7 Effect of ursolic acid on expression of Hippo signaling pathway-related proteins in MDA-MB-231 cells (n = 3)

注: 与对照组相比, *P < 0.05, **P < 0.01.

Note: Compared with the control group, *P < 0.05, **P < 0.01.

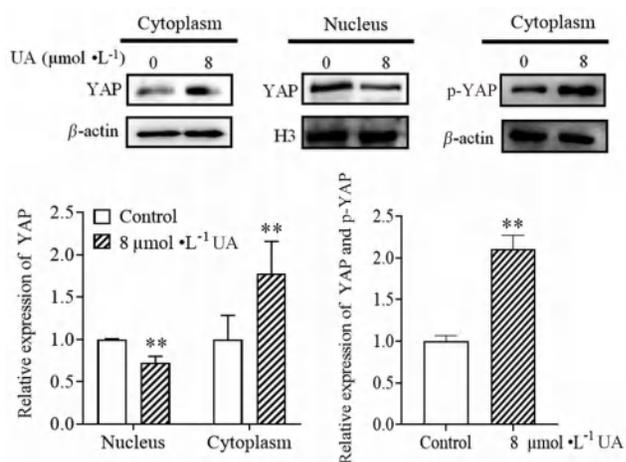


图 8 熊果酸对 MDA-MB-231 细胞质和细胞核中 Hippo 信号通路中 YAP、p-YAP 蛋白表达的影响 (n = 3)

Fig 8 Effect of ursolic acid on the expression of YAP and p-YAP protein in the Hippo signaling pathway in MDA-MB-231 cells (n = 3)

注: 与对照组相比, **P < 0.01.

Note: Compared with the control group, **P < 0.01.

殖和转移^[10]; 干预 Hippo 信号通路, 提高 p-YAP 蛋白表达, 也可阻滞细胞于 G₀/G₁ 期, 抑制迁移侵袭活力^[11]。本研究发现熊果酸可通过下调 YAP 在细胞核内的表达, 上调细胞质中的 YAP, 并使 YAP 磷酸化不能由细胞质入核, 进而减少与细胞增殖相关的 CTGF、CYR61 等基因的表达, 明显抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和转移。

熊果酸是从夏枯草植物中提取出来的一种具有抗肿瘤活性的天然化合物^[12], 可诱导肿瘤细胞凋亡和自噬, 抑制肿瘤细胞增殖, 抑制肿瘤的生

长和扩散等^[13-14]。文献报道, 熊果酸对乳腺癌细胞 MCF-7 具有明显的抑制作用, 并能促进乳腺癌细胞的凋亡^[15]。张誉宝^[16]研究发现, 熊果酸可显著抑制 MDA-MB-231、MDA-MB-468 的增殖、迁移及侵袭能力, 促进肿瘤细胞凋亡。Bax 是一种重要的凋亡因子, 随着细胞凋亡, Bax 的表达明显增加^[17-18]。Bcl-2 作为 Bcl-2 家族细胞凋亡调节蛋白, 在细胞凋亡调控中发挥重要作用。本研究结果显示, 熊果酸可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 使细胞形态发生较大的变化, 且细胞的增殖和集落形成能力下降, 划痕愈合率下降。熊果酸提高了 MDA-MB-231 细胞的凋亡率且上调 Bax 蛋白表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 诱导细胞发生凋亡, 表明熊果酸能够通过诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞发生凋亡, 抑制其增殖与迁移。

Hippo 信号途径可通过多个激酶级联途径来维持增殖和凋亡的稳态, 进而影响器官发育和肿瘤发生^[19]。其主要效应分子 YAP 是一种促进乳腺癌发生和发展的癌蛋白, 当 Hippo 信号通路被激活时, 活化的上游激酶 LATS1/2 磷酸化 YAP 使其失活^[20]。YAP 非磷酸化状态下可从胞质入核, 与转录因子 TEADs 结合, 作为转录辅助因子, 促进与细胞增殖有关的靶基因 CTGF、CYR61 的转录, 从而导致细胞过度增殖, 凋亡减少, 最终形成肿瘤^[21]。本研究发现, 熊果酸可降低 MDA-MB-231 细胞中 YAP、CTGF、CYR61 的 mRNA 水平和蛋白水平, 而显著上调 p-YAP 蛋白水平, 下调细胞核中的 YAP 蛋白水

平,上调细胞质中的 YAP 和 p-YAP 蛋白水平,表明熊果酸可能通过抑制 Hippo-YAP 信号通路,抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与迁移,促进其凋亡。

综上所述,本研究发现熊果酸能显著抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、克隆,且诱导细胞凋亡,且与 Hippo-YAP 信号通路的激活有关。然而,关于熊果酸激活 Hippo/YAP 信号通路具体的分子机制还没有明确的证据,需要进一步研究。本研究为熊果酸的抗乳腺癌作用提供了一些数据,为其抗乳腺癌机制提供了新的见解。

参考文献

- [1] 雷秋模. 21 世纪乳腺癌研究的方向及展望[J]. 现代诊断与治疗, 2006, 17 (2): 65-67.
- [2] Shi PG, Feng J, Chen CS. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47 (1): 53-59.
- [3] Liu J, Li J, Li PP, et al. DLG 5 suppresses breast cancer stem cell-like characteristics to restore tamoxifen sensitivity by inhibiting TAZ expression[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (1): 512-521.
- [4] Marcello MS, Ruggero DM. Hippo pathway and breast cancer stem cells[J]. Crit Rev Oncol Hemat, 2016, 99 (3): 115-122.
- [5] Shuai YTS, Karin EM. Targeting the Hippo pathway: clinical implications and therapeutics[J]. Pharmacol Res, 2016, 103 (1): 270-278.
- [6] Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K, et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds Minireview[J]. Neoplasma, 2004, 51 (5): 327-333.
- [7] Mallepogu V, Sankaran KR, Pasala C, et al. Ursolic acid regulates key EMT transcription factors, induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, an in-vitro and in silico studies[J]. J Cell Biochem, 2023, 124 (12): 1900-1918.
- [8] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72 (1): 7-33.
- [9] Li HD, Wu BK, Kanchwala M, et al. YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine-eIF5A hypusination-LSD1 axis[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24 (3): 373-383.
- [10] Wang DY, He JX, Dong JX, et al. UM-6 induces autophagy and apoptosis via the Hippo-YAP signaling pathway in cervical cancer[J]. Cancer Lett, 2021, 519 (24): 2-19.
- [11] Zhang CQ, Bao CC, Zhang XX, et al. Knockdown of lncRNA LEF1-AS1 inhibited the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) via Hippo signaling pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20 (9): 1213-1222.
- [12] 柏玉冰, 李春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2015, 46 (24): 3623-3629.
- [13] 李梦琦, 石玉, 杨诗宇, 等. 夏枯草抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41 (5): 716-726.
- [14] 丁雯昕, 杜柏霖, 李娇, 等. 五环三萜类天然产物研究进展[J]. 药学学报, 2024, 59 (5): 1163-1175.
- [15] 张维文, 黎银燕, 张贵平, 等. 熊果酸诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的实验研究[J]. 中药材, 2005, 28 (4): 297-301.
- [16] 张誉宝. 基于网络药理学探讨熊果酸抗三阴性乳腺癌细胞的机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [17] 张贵平, 黎银燕, 吕嘉春, 等. 熊果酸对乳腺癌细胞 caspase-3 和 PARP 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (2): 141-144.
- [18] Magaña AG, Blanco FJ. Human PCNA structure, function, and interactions[J]. Biomolecules, 2020, 10 (4): 570.
- [19] Wu HT, Xiao YB, Zhang SH, et al. The Ets transcription factor GABP is a component of the Hippo pathway essential for growth and antioxidant defense[J]. Cell Rep, 2013, 3 (5): 1663-1677.
- [20] Hansen CG, Ng YLD, Lam WLM, et al. The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1[J]. Cell Res, 2015, 25 (12): 1299-1313.
- [21] Pan DJ. The Hippo signaling pathway in development and cancer[J]. Dev Cell, 2010, 19 (4): 491-505.

(收稿日期: 2024-08-16; 修回日期: 2024-09-18)

4, 4'-二甲氧基查耳酮对人胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制

曹开美^{1,2}, 王腾飞^{1,2}, 陈凤^{1,2}, 齐玲², 宋美慧^{2*} (1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 广州医科大学附属清远医院(清远市人民医院)消化内科, 消化病研究所, 广东 清远 511500)

摘要: **目的** 探讨 4, 4'-二甲氧基查耳酮 (DMC) 对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响, 并阐明其可能的机制。**方法** 取对数生长期的人源胰腺癌 PANC-1 细胞和 MIA PaCa-2 细胞分为对照组和 DMC 处理组, 通过 CCK-8 法检测细胞活力, 克隆形成实验检测细胞集落形成能力, EDU 法检测细胞增殖能力, Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率, 流式细胞术检测活性氧 (ROS) 的水平。Western blot 法检测 Cleaved PARP、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 等凋亡相关蛋白的表达水平。免疫荧光染色法检测 Cleaved Caspase-3 的表达情况。**结果** 细胞学实验表明, 与对照组相比, DMC 处理 48 h 后, 胰腺癌 PANC-1 细胞和 MIA PaCa-2 细胞的活力、增殖能力、集落形成能力均降低; PANC-1 细胞内产生的 ROS 增多, 细胞凋亡率升高, Cleaved PARP、Bax、Cleaved Caspase-3 等蛋白的表达增多, Bcl-2 的蛋白表达减少, 添加活性氧抑制剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预后, 改善了细胞内 ROS 的累积, 使 Cleaved PARP、Bax、Cleaved Caspase-3 表达减少, Bcl-2 表达增多。**结论** DMC 可抑制人胰腺癌细胞增殖, 其机制可能与提高细胞中 ROS 水平并诱导细胞凋亡有关。

关键词: 4, 4'-二甲氧基查耳酮; 胰腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 活性氧

中图分类号: R285, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0107-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.016

Inhibitory effect of 4, 4'-dimethoxychalcone on the proliferation of human pancreatic cancer cells and related mechanisms

CAO Kai-mei^{1,2}, WANG Teng-fei^{1,2}, CHEN Feng^{1,2}, QI Ling², SONG Mei-hui^{2*} (1. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Gastroenterology, Qingyuan People's Hospital, Guangzhou Medical University, Qingyuan Guangdong 511500)

Abstract: Objective To determine the effect of 4, 4'-dimethoxychalcone (DMC) on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells, and its potential mechanisms. **Methods** Human pancreatic cancer cell lines PANC-1 and MIA PaCa-2 were cultured at the logarithmic growth phase and divided into a control group and a DMC treatment group. The cell viability was assessed with CCK-8, while the ability to form colonies was evaluated with a cloning assay. Cell proliferation was measured with the EDU method, and the apoptosis rate was determined via Annexin V/PI double staining. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS) were quantified by flow cytometry. The expression levels of apoptosis-related proteins, such as Cleaved PARP, Bcl-2, Bax, and Cleaved Caspase-3, were analyzed with Western blot. The expression of Cleaved Caspase-3 was evaluated with immunofluorescence staining. **Results** Cytological experiments showed that, after 48 hours of DMC treatment, the viability, proliferation, and colony-forming abilities of PANC-1 and MIA PaCa-2 cells were substantially reduced as compared with those of the control group. In PANC-1 cells, ROS levels increased, leading to a higher apoptosis rate and elevated expression of proteins such as

基金项目: 广东省基础研究委员会基础与应用基础研究基金项目 (No.2021A1515111095); 国家自然科学基金项目 (No.82203351)。

作者简介: 曹开美, 女, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤与 DNA 损伤修复方面的研究, email: 2767397259@qq.com *通信作者: 宋美慧, 女, 博士, 主要从事肿瘤与 DNA 损伤修复方面的研究, email: songmeihui.gzhmu@foxmail.com

Cleaved PARP, Bax, and Cleaved Caspase-3, while Bcl-2 expression decreased. However, addition of the ROS inhibitor *N*-acetylcysteine improved intracellular ROS levels. After the *N*-acetylcysteine treatment, the expression of Cleaved PARP, Bax, and Cleaved Caspase-3 decreased, while Bcl-2 expression increased. **Conclusion** DMC can inhibit the proliferation of human pancreatic cancer cells, whose mechanism might involve increased ROS levels and further induction of apoptosis.

Key words: 4, 4'-dimethoxychalcone; pancreatic cancer; cell proliferation; apoptosis; reactive oxygen species

胰腺癌是一种预后差、死亡率高的恶性肿瘤，是全球最致命的癌症之一^[1]。近年来，全球范围内胰腺癌的患病率不断上升^[2]，严重威胁着人类的健康^[3]。由于胰腺癌早期诊断比较困难，且侵袭性强、复发率高，使得胰腺癌患者的5年生存率不足10%^[4]。此外，绝大部分患者确诊时已经处于晚期阶段，无法进行手术切除治疗，主要通过药物进行治疗^[5-6]。然而，绝大多数化疗药物都存在耐药性和毒副作用大的问题^[7]。因此，需要寻找一种安全性高、疗效好的新型抗胰腺癌药物。

4, 4'-二甲氧基查耳酮(4, 4'-dimethoxychalcone, DMC)是一种天然的类黄酮化合物，具有抗肿瘤、抗炎和抗衰老等多种药理活性^[8]。研究发现，DMC作为一种天然的自噬诱导剂^[9]，能促进酵母、蠕虫和苍蝇的长寿，并保护小鼠免受心脏损伤和肝脏毒性^[10]。另有研究证明，DMC能够诱导肿瘤细胞产生活性氧(ROS)，并且加剧ROS引发的氧化应激，使细胞停滞在G₂/M期而抑制肿瘤细胞的增殖，促进凋亡^[11]。Yang等^[12]研究发现，DMC通过协同激活Keap1/Nrf2/HMOX1通路和抑制FECH蛋白表达，诱导铁蛋白自噬，从而诱导细胞铁死亡的发生。此外，DMC还具有神经保护特性，能够减轻帕金森小鼠模型的运动损伤^[13]。DMC在多种疾病中都展示出了巨大的治疗潜力。然而，DMC对胰腺癌细胞的作用及机制尚未见报道。因此，本研究旨在探究DMC对胰腺癌的作用，并初步探讨其作用机制，以期为后续胰腺癌治疗新药的开发提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 细胞系

人源胰腺癌PANC-1细胞和人源胰腺癌MIA PaCa-2细胞(美国ATCC细胞库)。

1.2 试剂与仪器

DMC(广州信禾生物科技有限公司)，*N*-乙酰半胱氨酸(NAC, 美国Selleck生物科技有限公司)，DMEM高糖培养基、链霉素/青霉素和胰蛋白酶(美国GIBCO公司)，胎牛血清(澳大利亚

ExCell Bio公司)，4%~12% FuturePAGETM蛋白预制胶(常州伯仪生物科技有限公司)，BCA蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio公司)，RIPA Lysis Buffer(康为世纪生物科技有限公司)，CCK-8试剂盒(CCK-8)、SuperKine超敏型ECL发光液(Abbkine公司)，Cleaved Caspase-3、PARP、 α -Tubulin抗体(Cell Signaling Technology公司)，Bcl-2、Bax(Abmart公司)，Annexin V/PI凋亡试剂盒(日本DOJINDO公司)，ROS检测试剂盒(Beyotime公司)，CO₂恒温培养箱(ESCO公司)，冷冻离心机(广州火元医疗器械有限公司)，共聚焦激光显微镜(Zeiss公司)，伯乐Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)，金属浴(上海一恒科技有限公司)，酶标仪(SPECTOR Star公司)。

2 方法

2.1 药物配制

将DMC粉末用二甲基亚砜(DMSO)配制为10 mmol·L⁻¹的储备液(-80℃储存)，再根据实验需求稀释成不同浓度。

2.2 细胞培养

将胰腺癌PANC-1细胞和MIA PaCa-2细胞培养在含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM高糖培养基中，置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。

2.3 CCK-8法检测细胞活力

将对数生长期的PANC-1细胞、MIA PaCa-2细胞按照每孔 8×10^3 个的密度接种于96孔板中，待细胞贴壁后，分别加入不同浓度DMC(0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预，每组设置3个平行复孔。在DMC作用48 h后，每孔加入100 μL 10%的CCK-8试剂，孵育2 h，酶标仪在450 nm处测量吸光度(*A*)值，计算细胞活力。细胞活力(%) = $(A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。用GraphPad Prism 8.0软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.4 光学显微镜观察各组细胞形态表现

将对数生长期的PANC-1细胞和MIA PaCa-2

细胞接种在 96 孔板中, 每孔接种 8×10^3 个细胞。细胞贴壁后, 加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h, 用光学显微镜观察各组细胞形态表现。

2.5 克隆形成实验检测各组胰腺癌细胞克隆形成率

将对数生长期的 PANC-1 细胞和 MIA PaCa-2 细胞, 以每孔 500 个的数量分别接种到 6 孔板中。待细胞充分贴壁后, 分别加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理, 48 h 之后换液, 继续培养 14 d。4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% 的结晶紫染色 5 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去多余的结晶紫。自然晾干后用显微镜观察阳性克隆, 扫描拍照后统计细胞克隆数目计算克隆形成率。阳性克隆的定义为: 每个克隆 > 50 个细胞。克隆形成率 (%) = (加药组克隆数 / 对照组克隆数) \times 100%。

2.6 EDU 法检测细胞增殖能力

收集对数生长期的 PANC-1 细胞和 MIA PaCa-2 细胞, 按每孔 8×10^3 个细胞接种到 96 孔板中。细胞贴壁后, 分别加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h, 每组设 3 个复孔。每孔加入 100 μL 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDU 染液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h。固定、透化之后加入 EDU 反应复合物, 在室温下孵育 30 min, Hoechst 33342 复染细胞核 10 min。采用荧光显微镜检测各组 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞中 EDU 阳性表达率。EDU 阳性表达率 (%) = (EDU 阳性细胞数 / Hoechst33342 阳性细胞数) \times 100%。

2.7 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡

取对数生长期的 PANC-1 细胞, 以每孔 1.5×10^5 个细胞的密度接种在 6 孔板中, 常规培养 24 h 后, 加入 2 mL 含有不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无血清培养基, 继续培养 48 h, 每组设置 3 个复孔。胰酶消化并收集细胞, 用 PBS 洗涤两次。每管加入 400 μL 预先配好的膜联蛋白结合缓冲液重悬细胞, 向细胞悬液中加入 5 μL 荧光素 FITC 标记的膜联蛋白-V 复合物 (Annexin V-FITC), 再加入 5 μL 的碘化丙啶 (PI) 染液, 室温避光孵育 15 min, 立即在流式细胞仪上进行检测。使用 FlowJo 软件分析细胞凋亡率。细胞凋亡率 (%) = [(早调细胞数 + 晚调细胞数) / 细胞总数] \times 100%。

2.8 流式细胞术检测 PANC-1 细胞中 ROS 的含量

将对数生长期的 PANC-1 细胞以每孔 1.5×10^5 个的密度接种在 6 孔板中, 继续培养 24 h 后, 加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h。每孔加入 1 mL DCFH-DA ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 25 min [阳性对

照 Rosup 组先加入 1 mL 含有 1/1000 活性氧对照试剂 (Rosup) 的无血清培养基孵育 40 min, 再加入 1 mL $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 溶液, 避光孵育 25 min]。消化细胞然后加入 300 μL 的 PBS 重悬, 用流式细胞仪分析 PANC-1 细胞中 ROS 的水平。

2.9 Western blot 检测 PANC-1 细胞中 Cleaved PARP、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达

将对数生长期的 PANC-1 细胞按照每孔 2×10^5 个的密度接种在 6 孔板中, 待细胞长至 70% ~ 80% 的密度, 加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMC + NAC、NAC (2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 后, 收集细胞, 冰上裂解细胞 30 min, 提取细胞中的总蛋白。利用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 加入蛋白上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性。上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。加入一抗 (1 : 1000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。加入二抗 (1 : 2000 稀释) 孵育 1.5 h, 凝胶成像系统拍照, 使用 Image J 软件对目的蛋白进行半定量分析。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

2.10 免疫荧光染色检测 PANC-1 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达

将对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 8 孔腔室盖玻片中, 每孔 1.5×10^4 个细胞。待细胞长至 70% ~ 80% 时, 加入不同浓度 DMC (0、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMC + NAC (2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、NAC (2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 后, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 加入 Cleaved Caspase-3 抗体 (1 : 400 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入荧光二抗 (1 : 1000 稀释) 避光孵育 2 h, DAPI 染液复染细胞核 10 min。使用激光共聚焦显微镜, 分别在 340 nm (DAPI) 和 594 nm (FITC) 波长处进行拍照。通过 Image J 软件统计各组 Cleaved Caspase-3 蛋白荧光强度。

2.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件作图和对实验数据进行分析, 处理结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blot 使用 Image J 软件进行灰度值定量分析。

3 结果

3.1 DMC 对胰腺癌细胞活力的影响

CCK-8 结果显示, 与对照组比较, 不同浓度的 DMC (0、12.5、25.0、37.5、50.0、62.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 后, 细胞活力显著下降 ($P < 0.01$), 并

且呈现出药物剂量依赖性。计算得 DMC 对 PANC-1 的 IC_{50} 值为 $37.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MIA PaCa-2 的 IC_{50} 值为 $35.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结果见表 1。综合两种细胞的 IC_{50} 值, 设置 DMC 的低、中、高浓度为 20、30、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 来进行后续实验。

表 1 DMC 对胰腺癌细胞 PANC-1 和 MIA PaCa-2 活力的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of DMC on the activity of PANC-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

DMC 浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	PANC-1 细胞活力 / %	MIA PaCa-2 细胞活力 / %
0	100	100
12.5	98.94 ± 2.24	98.84 ± 1.70
25.0	$91.24 \pm 4.11^{**}$	$89.04 \pm 1.46^{**}$
37.5	$40.72 \pm 1.45^{**}$	$38.55 \pm 2.73^{**}$
50.0	$27.11 \pm 1.33^{**}$	$16.48 \pm 2.07^{**}$
62.5	$16.94 \pm 1.38^{**}$	$9.50 \pm 0.28^{**}$

注: 与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $^{**}P < 0.01$.

3.2 DMC 对胰腺癌细胞形态的影响

通过光学显微镜观察发现, 对照组细胞呈长梭形, 状态良好, 紧密且贴壁生长; 与对照组比较, 给予不同浓度 ($20、30、40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) DMC 处理的各组细胞, 随着 DMC 浓度的增加, 细胞逐渐皱缩、脱落, 且细胞碎片增多 (见图 1)。

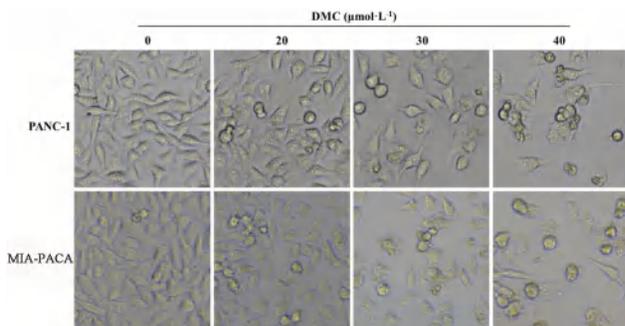


图 1 DMC 对胰腺癌细胞 PANC-1 和 MIA PaCa-2 形态的影响

Fig 1 Effect of DMC on the morphology of PANC-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells

3.3 DMC 对胰腺癌细胞集落形成能力的影响

克隆形成实验结果显示, 与对照组相比, DMC 处理的 PANC-1 细胞和 MIA PaCa-2 细胞的集落形成能力均减弱 ($P < 0.001$), 且呈浓度依赖性, 见图 2。

3.4 DMC 对胰腺癌细胞增殖能力的影响

EDU 实验结果显示, 与对照组相比, 不同浓度 DMC 处理的 PANC-1 和 MIA PaCa-2 细胞的增殖能力均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$), 且呈现浓度依赖趋势, 见图 3。

3.5 DMC 对胰腺癌细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 双染法检测发现, 与对照组细胞凋亡率 (7.52 ± 1.29) % 相比, 不同浓度 DMC 处理 48 h 后, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (11.63 ± 0.76) %、 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (16.01 ± 0.53) % 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (24.21 ± 0.69) % 的细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4。

3.6 DMC 对 ROS 产生的影响

DCFH-DA 荧光探针检测发现, 与对照组相比, DMC 处理的 $20、30、40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 PANC-1 细胞内 ROS 含量显著增加 ($P < 0.001$), 见图 5。

3.7 DMC 对凋亡相关蛋白 Cleaved PARP、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 表达的影响

Western blot 结果显示, 与对照组相比, DMC 处理的 $20、30、40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 PANC-1 细胞中 Cleaved PARP、Bax、Cleaved Caspase-3 的表达水平显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01, P < 0.001$); 与 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, 加入 NAC 干预后, Cleaved PARP、Bax、Cleaved Caspase-3 的表达水平降低 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达增加 ($P < 0.001$), 见图 6。

3.8 DMC 对凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 表达的影响

免疫荧光实验结果显示, 与对照组相比, 不同浓度 ($20、30、40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) DMC 处理的 PANC-1 细胞 Cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$)。与 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, 添加 NAC 进行干预后, Cleaved Caspase-3 的表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 见图 7。

4 讨论

目前, 胰腺癌尚无治愈的方法, 其治疗过程中存在手术切除率低、化疗易耐药以及患者预后差、死亡率高等问题。有效治疗胰腺癌、改善患者预后和延长患者生存期仍然是临床面临的巨大挑战。DMC 是一种具有多种生物学活性的类黄酮化合物, 现有研究证实, DMC 可以通过使肿瘤细胞发生自噬、促进细胞凋亡和周期阻滞发挥抑制增殖作用。本研究采用不同浓度的 DMC 对胰腺癌细胞进行处理, 评估 DMC 对胰腺癌细胞增殖的影响。结果显示, DMC 可以显著抑制胰腺癌细胞 PANC-1 和 MIA PaCa-2 的增殖能力与集落形成能力, 并且展示出浓度依赖特性。

ROS 是源自分子氧的各种分子和自由基的总称, 其参与多个细胞信号传导途径的调控, 影响细胞的增殖分化、凋亡和代谢^[14]。当细胞内的 ROS 含量过多时, 氧化应激反应加剧进而引起细胞损害, 最终导致细胞凋亡或坏死^[15]。另有研究表明,

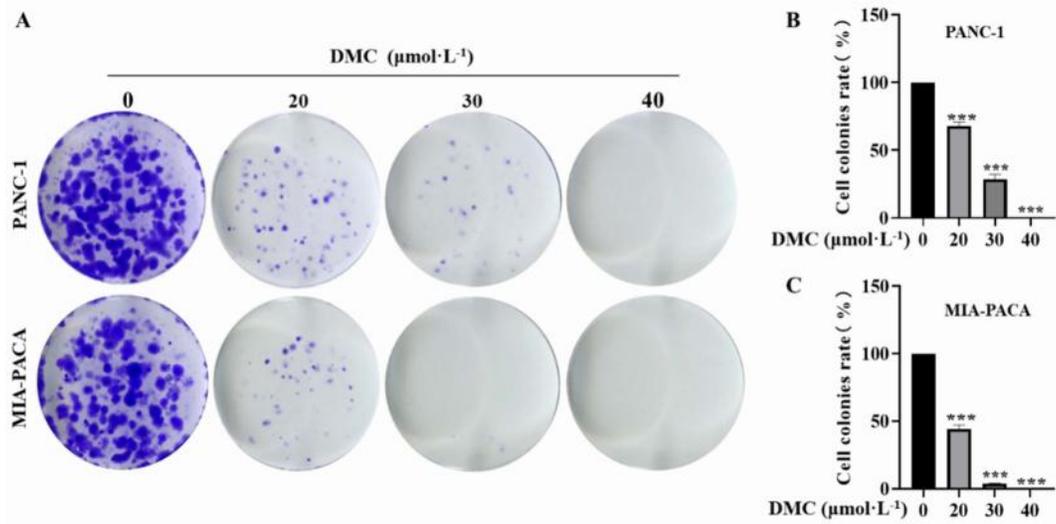


图2 DMC对胰腺癌细胞PANC-1和MIA-PACA集落形成能力的影响

Fig 2 Effect of DMC on the colony-forming ability of PANC-1 and MIA-PACA pancreatic cancer cells

注: 与对照组(0 μmol·L⁻¹)相比, ****P* < 0.001。

Note: Compared with the control group (0 μmol·L⁻¹), ****P* < 0.001.

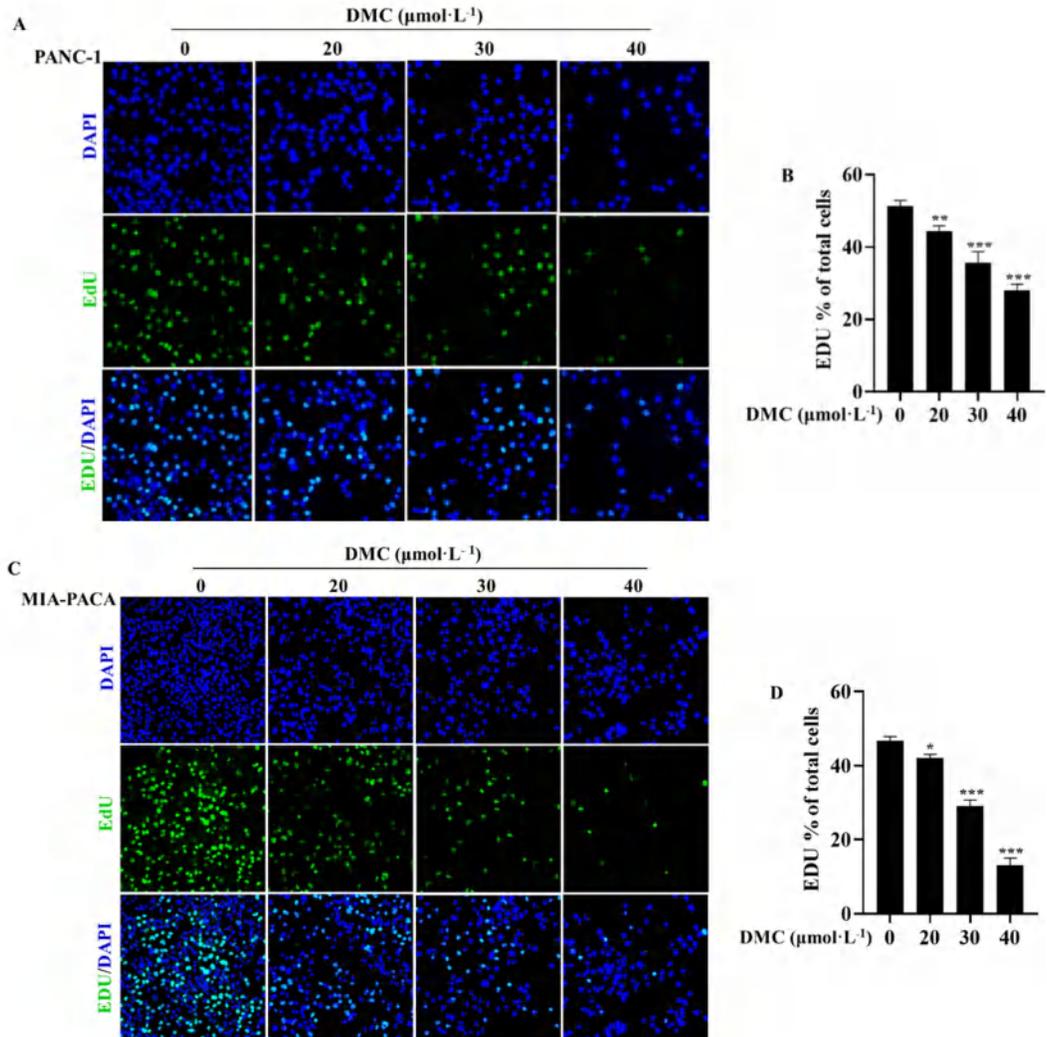


图3 DMC对胰腺癌细胞PANC-1和MIA-PACA增殖能力的影响

Fig 3 Effect of DMC on the proliferation of PANC-1 and MIA-PACA pancreatic cancer cells

注: 与对照组(0 μmol·L⁻¹)相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。

Note: Compared with the control group (0 μmol·L⁻¹), **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

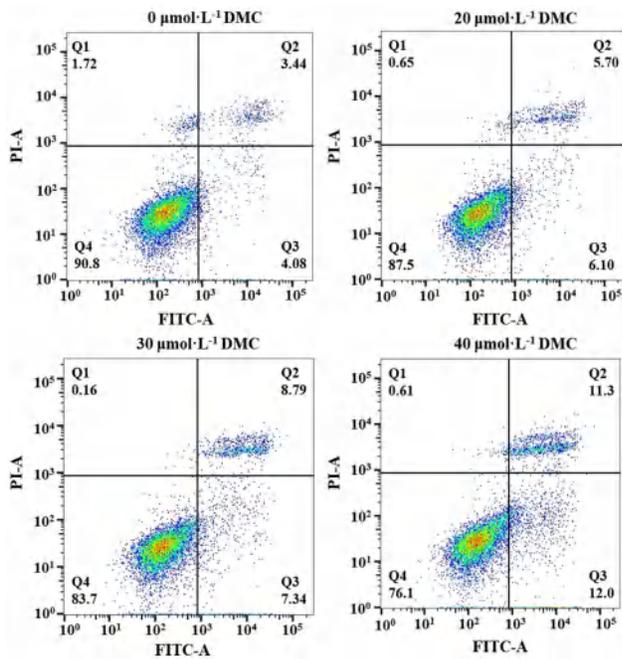


图 4 DMC 对胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡率的影响
Fig 4 Effect of DMC on the apoptosis rate of PANC-1 cells in pancreatic cancer

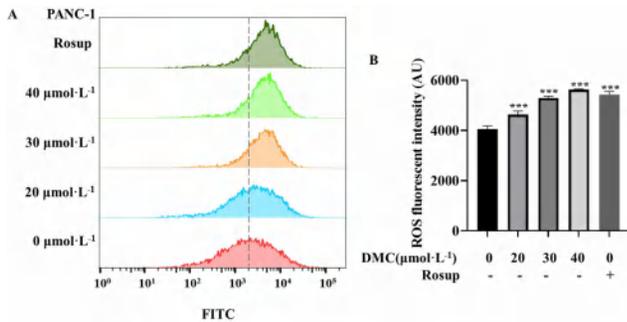


图 5 DMC 对胰腺癌 PANC-1 细胞内 ROS 产生的影响
Fig 5 Effect of DMC on intracellular ROS production in PANC-1 pancreatic cancer cells

注: 与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, $***P < 0.001$ 。
Note: Compared with the control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $***P < 0.001$.

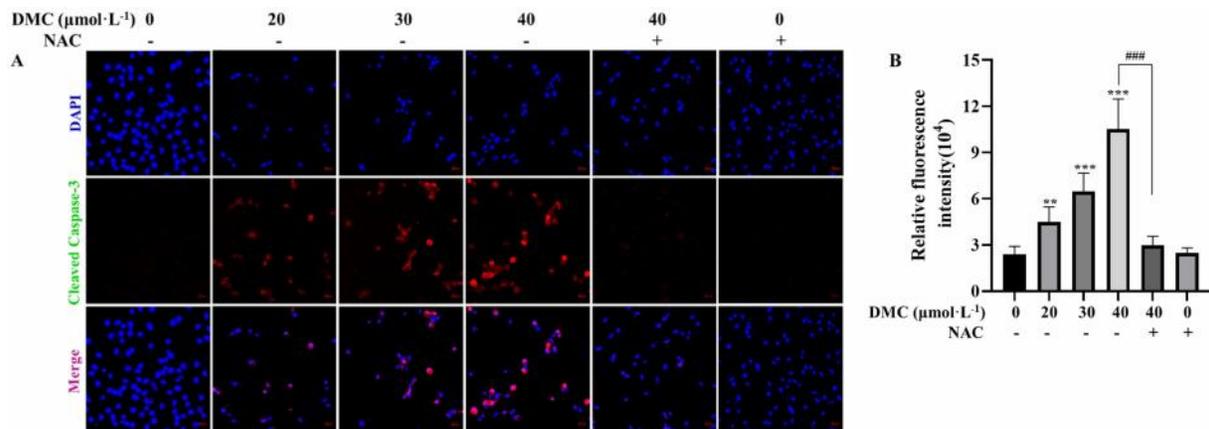


图 7 DMC 对 PANC-1 细胞凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3 表达的影响
Fig 7 Effect of DMC on the expression of Cleaved Caspase-3 associated with apoptosis in PANC-1 cells

注: 与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, $####P < 0.001$ 。
Note: Compared with the control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; compared with the $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, $####P < 0.001$.

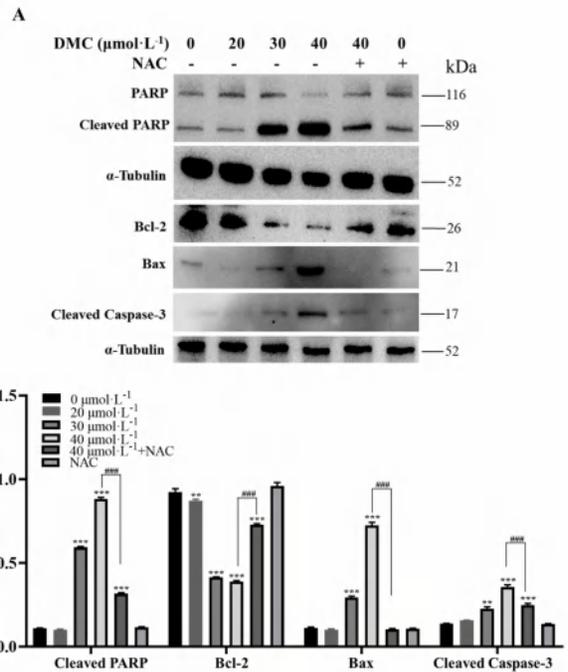


图 6 DMC 对 PANC-1 细胞凋亡相关蛋白 Cleaved PARP、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 表达的影响

Fig 6 Effect of DMC on the expression of Cleaved PARP, Bcl-2, Bax, and Cleaved Caspase-3 associated with apoptosis in PANC-1 cells
注: 与对照组 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; 与 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, $####P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; compared with the $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, $####P < 0.001$.

ROS 能够使细胞线粒体膜上的通透性转换孔开启, 导致细胞释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子, 进一步触发 Caspase 级联反应, 最终促使细胞凋亡^[16]。本研究结果显示, 用 DMC 处理胰腺癌 PANC-1 细胞后, 随着 DMC 浓度增加, ROS 含量增加, 细胞凋亡增多。由此, 我们推测 DMC 能够调控胰腺癌

细胞内 ROS 的水平, 并通过诱导 ROS 的产生来控制细胞凋亡。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 是一种由特定蛋白质或者细胞信号调控的细胞自我毁灭过程, 当细胞不再被需要或是细胞遭受严重损伤时, 细胞死亡途径就会被激活^[17]。细胞凋亡途径由多种蛋白质参与调控, 其中, Caspase 发挥着关键的作用, 而 Caspase-3 被认为是 Caspase 中最重要的一种, 当 Caspase-3 被激活之后, 会进一步触发 Caspase 的级联反应^[18], 对细胞中的 α -Tubulin、PARP 等底物进行切割, 最终导致细胞凋亡。Bax 和 Bcl-2 是抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白的成员, 通过调节线粒体的完整性来实现对细胞凋亡的调控^[19-20]。本研究发现, 经 DMC 处理之后, PANC-1 细胞中的 Cleaved PARP、Bax 和 Cleaved Caspase-3 等蛋白的表达增多, Bcl-2 蛋白的表达减少, 加入 NAC 干预后, Cleaved PARP、Bax 和 Cleaved Caspase-3 等蛋白的表达减少, Bcl-2 蛋白的表达增多, 表明 DMC 诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡可能是通过调控 ROS 发挥作用的。

综上所述, DMC 具有显著的抗胰腺癌活性, 其能够有效抑制胰腺癌细胞增殖, 并通过促进细胞内 ROS 水平的增加, 从而调节凋亡相关蛋白 Cleaved PARP、Bax、Cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 的表达水平来促进胰腺癌细胞凋亡。本研究为胰腺癌的治疗提供了一种新的思路, 为后期 DMC 开发并应用于胰腺癌的治疗提供了前期研究基础。

参考文献

- [1] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22 (44): 9694-9705.
- [2] Siri FH, Salehiniya H. Pancreatic cancer in Iran: an epidemiological review [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51 (2): 418-424.
- [3] Rosenzweig A, Berlin J, Chari S, et al. Management of patients with pancreatic cancer using the "Right Track" model [J]. *Oncologist*, 2023, 28 (7): 584-595.
- [4] Zhao ZY, Liu W. Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820962117.
- [5] Trikudanathan G, Lou E, Maitra A, et al. Early detection of pancreatic cancer: current state and future opportunities [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2021, 37 (5): 532-538.
- [6] Khadka R, Tian WJ, Hao X, et al. Risk factor, early diagnosis and overall survival on outcome of association between pancreatic cancer and diabetes mellitus: changes and advances, a review [J]. *Int J Surg*, 2018, 52: 342-346.
- [7] Lim KH, Chung E, Khan A, et al. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? [J]. *Oncologist*, 2012, 17 (2): 192-200.
- [8] Wang TX, Yang CM, Li ZQ, et al. Flavonoid 4, 4'-dimethoxychalcone selectively eliminates senescent cells via activating ferritinophagy [J]. *Redox Biol*, 2024, 69: 103017.
- [9] Carmona-Gutierrez D, Zimmermann A, Kainz K, et al. The flavonoid 4, 4'-dimethoxychalcone promotes autophagy-dependent longevity across species [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 651.
- [10] Zimmermann A, Kainz K, Hofer SJ, et al. 4, 4'-dimethoxychalcone: a natural flavonoid that promotes health through autophagy-dependent and-independent effects [J]. *Autophagy*, 2019, 15 (9): 1662-1664.
- [11] Yang CM, Zhu SB, Chen YL, et al. Flavonoid 4, 4'-dimethoxychalcone suppresses cell proliferation via dehydrogenase inhibition and oxidative stress aggravation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 175: 206-215.
- [12] Yang CM, Wang TX, Zhao YJ, et al. Flavonoid 4, 4'-dimethoxychalcone induced ferroptosis in cancer cells by synergistically activating Keap1/Nrf2/HMOX1 pathway and inhibiting FECH [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 14-23.
- [13] Gong JW, Zhang WL, Ding LY, et al. 4, 4'-dimethoxychalcone regulates redox homeostasis by targeting riboflavin metabolism in Parkinson's disease therapy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 174: 40-56.
- [14] Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? [J]. *Dev Biol*, 2008, 320 (1): 1-11.
- [15] Qu K, Shen NY, Xu XS, et al. Emodin induces human T cell apoptosis in vitro by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34 (9): 1217-1228.
- [16] Ye CJ, Zheng SY, Jiang DG, et al. Initiation and execution of programmed cell death and regulation of reactive oxygen species in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 12942.
- [17] Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells [J]. *Biochem J*, 2005, 392 (Pt 2): 335-344.
- [18] Cai J, Chen HD, Lu M, et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: trends, risk factors, screening, and prognosis [J]. *Cancer Lett*, 2021, 520: 1-11.
- [19] Flores-Romero H, Dadsena S, García-Sáez AJ. Mitochondrial pores at the crossroad between cell death and inflammatory signaling [J]. *Mol Cell*, 2023, 83 (6): 843-856.
- [20] Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (6): 2885-2888.

(收稿日期: 2024-08-09; 修回日期: 2024-10-25)

基于 UPLC-Q-TOF-MS 法和网络药理学探讨 草归除湿活血颗粒治疗高尿酸血症的机制

古丽达力·赛里克¹, 汪建萍^{2, 5}, 林欣悦², 赵翡翠^{2, 3, 4*} (1. 新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆维吾尔自治区中药炮制研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 4. 新疆维吾尔自治区名老中医药专家传承工作室, 乌鲁木齐 830000; 5. 新疆维吾尔自治区重点实验室, 新疆名医名方与特色方剂学实验室, 乌鲁木齐 830017)

摘要: **目的** 考察草归除湿活血颗粒剂的提取工艺, 并探究其通过降尿酸治疗高尿酸血症的机制。**方法** 通过 HPLC 测定草归除湿活血颗粒水提液中各成分的含量, 筛选最佳提取条件; 利用 UPLC-Q-TOF-MS 分析其活性成分, 再将得到的活性成分结合高尿酸血症的潜在靶点, 进行 PPI 网络构建及 GO、KEGG 分析。**结果** 最佳提取工艺为 10 倍水浸泡 0.5 h, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h。UPLC-Q-TOF-MS 得 221 个活性成分, 网络药理学分析得到 183 个潜在交集靶点, 富集分析得到 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、HIF-1 等信号通路。**结论** 草归除湿活血颗粒可能通过调节 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、HIF-1 等信号通路来发挥降尿酸的作用。

关键词: 草归除湿活血颗粒; 高尿酸血症; 制备工艺; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学

中图分类号: R285, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0114-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.017

Mechanism of Caogui Chushi Huoxue granules for hyperuricemia based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology

Gulidali Sailike¹, WANG Jian-ping^{2, 5}, LIN Xin-yue², ZHAO Fei-cui^{2, 3, 4*} (1. *The Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054*; 2. *Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000*; 3. *Xinjiang Uygur Autonomous Region Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing Research, Urumqi 830000*; 4. *Inheritance Studio Program of Famous Traditional Chinese Medicine Experts, Urumqi 830000*; 5. *Key Laboratory of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Urumqi 830017*)

Abstract: Objective To determine the extraction process of Caogui Chushi Huoxue granules, and its mechanism in lowering the uric acid for hyperuricemia. **Methods** The content of the components in the aqueous extract of Caogui Chushi Huoxue granules was determined by HPLC, and the optimal extraction conditions were obtained. The active components were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS, and then the obtained active components were combined with hyperuricemia targets to serve as potential targets. PPI network was constructed and GO and KEGG analyses conducted. **Results** The optimal extraction process included 10-fold water soaked for 0.5 h, heating, and reflux extraction twice, 1 h for each. Totally 221 active components were obtained by UPLC-Q-TOF-MS, and 183 potential targets by PPI network. The signaling pathways, such as PI3K-Akt pathway, lipid and atherosclerosis, and HIF-1, were obtained by enrichment analysis. **Conclusion** Caogui Chushi Huoxue granules may regulate the signaling pathways such as TNF, PI3K-Akt, and cancer to lower the uric acid.

Key words: Caogui Chushi Huoxue granule; hyperuricemia; preparation process; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03019); 新疆维吾尔自治区科学技术厅, 重点实验室开放课题 (No. 2020D04024)。
作者简介: 古丽达力·赛里克, 女, 硕士研究生, 主要从事新药及质量标准研究, email: 1061799564@qq.com ***通信作者:** 赵翡翠, 女, 主任中药师, 主要从事中药炮制、新药及质量标准研究, email: 1017987429@qq.com

随着我国经济的蓬勃发展,人们的日常膳食结构也显著调整。具体而言,膳食中高嘌呤食物的比重逐渐增加,这一趋势不可避免地导致了高尿酸血症患者群体的急剧扩大,其患病率显著攀升^[1]。尽管现代医学中的西药疗法在短期内能够有效促进尿酸水平的下降并缓解相关症状,然而,长期依赖此类药物治疗往往伴随着潜在的健康风险,例如非布司他和别嘌醇都能有效降低血清尿酸,但别嘌醇可能会产生轻微的皮疹和严重的皮肤反应^[2],而非布司它具有更高的心血管死亡率风险^[3]。苯溴马龙是一种广泛使用的利尿药物,但使用过程中可能出现并发症,如肝毒性,这凸显了寻找更为安全、长效治疗方案的紧迫性。

中药疗法凭借其多途径、多靶点的综合作用模式,不仅能够有效降低尿酸水平,还能在更深层次上调节机体功能,从而弥补西药治疗的不足^[2, 4],草归除湿活血颗粒治疗注重健脾、温和清热,辅以健脾补肾,灵活温阳或清热,并强化活血化瘀与化痰排浊,通过整合多种中药的协同作用,实现清热利湿、活血化瘀之效。核心成分为金钱草、白茅根等,经多年临床实践验证,对高尿酸血症有显著治疗效果^[5]。

中药化学成分的药理作用广泛且多样,给研究工作带来了挑战,如药物成分不明确、作用机制不清晰以及研究成果难以直接应用于临床等。而网络药理学的核心理念在于强调整体、系统及相互关联,将其应用于中药复方研究中,能够有助于揭示药物作用机制、识别有效药物成分及活性组合,从而为新药研发开辟新的途径。UPLC-Q-TOF-MS 是液相色谱技术的一种,它通过采用高压输液泵、高效微粒固定相及高灵敏度检测器等装置,实现对样品的高效、快速分离和检测,在中药质量控制中发挥着越来越重要的作用^[6]。通过该技术的应用,可以实现对中药成分的精确分析、指纹图谱的构建以及质量控制标准的制定,为中药的现代化和标准化提供了有力的技术支撑。

1 材料

1.1 试药

对照品阿魏酸(批号:110773-201614,纯度为98%)、绿原酸(批号:110573-202119,纯度为98%)(中国食品药品检定院);乙腈、甲醇(色谱级,美国 Fisher 公司);中药饮片均购自安徽济善堂中药科技有限公司,由新疆医科大学附属中医医院李永和主任中药师鉴定,均符合《中国药典》2020 年版一部要求。

1.2 仪器

E2695-Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);MS205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);SK250LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);KDM 调温电热套(山东鄄城光明仪器有限公司);HHS-24 电热恒温水浴锅(上海东星建材试验设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 采用 X TERRA MS-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱;柱温:30℃;流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:327 nm;流动相:乙腈(A相)、0.1%磷酸水溶液(B相);梯度洗脱程序:0~40 min, 0%~10%A;40~55 min, 10%~11%A;55~70 min, 11%~5%A。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称定绿原酸 1.82 mg、阿魏酸 1.66 mg, 甲醇溶液定容至 10 mL 量瓶中,超声混匀得混合对照品溶液,质量浓度分别为 0.182 mg·mL⁻¹、0.166 mg·mL⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 按方取药材放入 2000 mL 圆底烧瓶,加 10 倍量水回流提两次,各 1 h,滤后取滤液 10 mL 蒸干,加甲醇 5 mL 溶解,经 0.45 μm 滤膜滤过得供试品溶液。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 取去除金钱草和当归的处方药材,按照颗粒的处方工艺,制得阴性样品,按照“2.1.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 浸膏得率的考察

按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,过滤静置后取澄清液 25 mL,置恒重蒸发皿(A₁)蒸干,105℃烘至恒重,称定重量(A₂)。计算浸膏得率,浸膏得率(%)=(A₂-A₁)×V/(M×25)×100%。M 为药物的总重量,V 为提取液的总体积。

2.3 提取工艺的考察

按处方量称取药材,考察提取次数、提取时间、加水倍量和浸泡时间对指标成分的影响,进而筛选出最佳的提取工艺,结果见表 1~4。根据单因素实验结果,确定最终提取工艺:加 10 倍量水,浸泡 0.5 h,提取 2 次,每次 1 h,过滤并合并滤液。在此工艺下进行验证实验,绿原酸含量为 205.9347 mg·mL⁻¹,阿魏酸含量为 14.2944 mg·mL⁻¹,浸膏的得率为 29.19%。

2.4 草归除湿活血颗粒化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

2.4.1 色谱条件 采用 UPLC I-Class 超高效液相色谱及反相色谱柱进行分析。色谱柱:Waters

表 1 提取次数对草归除湿活血颗粒提取液指标成分的影响

Tab 1 Effect of the extraction times on the index components in Caogui Chushi Huoxue granules extract

提取次数	绿原酸含量 / (mg · g ⁻¹)	阿魏酸含量 / (mg · g ⁻¹)	浸膏得率 /%
1	20.8650	6.0450	19.84
2	43.6500	12.7500	28.31
3	49.0465	13.8930	27.37

表 2 提取时间对草归除湿活血颗粒提取液指标成分的影响

Tab 2 Effect of the extraction time on the index components in Caogui Chushi Huoxue granules extract

提取时间 /h	绿原酸含量 / (mg · g ⁻¹)	阿魏酸含量 / (mg · g ⁻¹)	浸膏得率 /%
0.5	201.9600	14.8500	25.15
1	206.9550	16.3800	28.30
1.5	139.8000	9.7500	29.56
2	98.3010	6.6440	29.22

表 3 加水倍量对草归除湿活血颗粒提取液指标成分的影响

Tab 3 Effect of the amount of water on the index components in Caogui Chushi Huoxue granules extract

加水倍量	绿原酸含量 / (mg · g ⁻¹)	阿魏酸含量 / (mg · g ⁻¹)	浸膏得率 /%
8	19.9716	6.17100	25.66
10	49.0500	13.3500	26.50
12	31.6410	10.1490	31.37
14	41.9525	14.5500	32.38

表 4 浸泡时间对草归除湿活血颗粒提取液指标成分的影响

Tab 4 Effect of the soaking time on the index components in Caogui Chushi Huoxue granules extract

浸泡时间 /h	绿原酸含量 / (mg · g ⁻¹)	阿魏酸含量 / (mg · g ⁻¹)	浸膏得率 /%
0	192.7530	12.6225	22.17
0.5	208.5300	18.4275	28.46
1	153.9000	13.6500	29.47
1.5	181.8040	15.8550	28.50

UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 0.3 mL · min⁻¹; 进样量: 4.0 μL; 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水, B 相为甲醇; 洗脱梯度: 0 ~ 1.0 min, 98%A; 1.0 ~ 5.5 min, 98% ~ 0%A; 5.5 ~ 14.0 min, 0%A; 14.0 ~ 14.1 min, 0% ~ 98%A; 14.1 ~ 16 min, 98%A。

2.4.2 质谱条件 选用集成热电喷雾离子源技术的 Q Exactive 四极杆-轨道阱质谱仪, 以确保分析精度与效率。对于正、负离子生成, 分别设定离子源电压为 3.7 kV 与 3.5 kV, 毛细管加热至 320 °C 以促进离子传输。鞘气与辅助气均选用氮气, 压力分别为 30 psi 与 10 psi, 同时溶剂蒸发温度设定为 300 °C, 以优化溶剂去除效率。质谱仪的碰撞气同样采用氮气, 压力维持在 1.5 mTorr。

一级质谱扫描参数: 分辨率提升至 70 000, 自

动增益控制目标设定为 1 × 10⁶, 确保信号强度适中; 最大离子隔离时间设为 50 ms, 质荷比扫描范围 150 ~ 2250。通过外标法校准质谱质量轴, 质量误差低至 5 ppm (× 10⁻⁶), 满足高精度分析的需求。

二级质谱参数: 分辨率设定为 17 500, 自动增益控制目标调整为 1 × 10⁵, 最大隔离时间维持 50 ms; 同时, 实施动态排除策略, 最多选取 10 个离子进行二级碎片扫描, 质量分离窗口设定为 2, 碰撞能量设定为 30 V, 并设置强度阈值为 1 × 10⁵, 以确保仅对高强度离子进行深度分析。

整个液质系统由 Xcalibur 2.2 SP1.48 软件控制。

2.4.3 成分分析 草归除湿活血颗粒提取液中共鉴定出 221 个化学成分, 总离子流图见图 1, 成分鉴定结果见表 5。

2.5 网络药理学

2.5.1 草归除湿活血颗粒活性成分的靶点筛选

将 UPLC-Q-TOF-MS 分析得到的草归除湿活血颗粒中化学成分名输入 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行规范, 并下载各成分 sdf 文件, 通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 得到化合物对应的靶标蛋白的 UniProt ID, 再用 Uniport 数据库的 IDmappin 工具转换成 Gene Symbol, 去除重复项后得到各成分作用靶点。

2.5.2 获取交集基因 以“高尿酸血症”为关键词从 GeneCards (Score > 50)、CTD (Inference Score > 30)、Drugbank、Pharmgkb 和 Disgenet 数据库筛选相关靶点信息 848 个。把活性成分作用的 1037 个靶点和高尿酸血症相关的 848 个靶点输入 Venny 2.1 软件, 去重后取交集作用靶点作为草归除湿活血颗粒干预高尿酸血症的潜在靶点, 共得到 183 个。

2.5.3 蛋白互作 (PPI) 网络的构建 将筛选出来的 183 个潜在靶点导入 STRING 数据库, 生物物种定为“Homo sapiens”, 最低相互作用得分设置为 > 0.9, 绘制 PPI 网络图, 将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析, 并通过 CytoHubba 插件筛选出关键靶点。计算了节点的 6 个拓扑参数: 中间性中心性 (BC)、接近中心性 (CC)、度中心性 (DC)、特征向量中心性 (EC)、网络中心性 (NC) 和局部平均连通性 (LAC), 对交互网络中节点属性深入分析。参数值定量越高, 网络中节点的意义越大。仅保留 PPI 网络中 6 个参数均高于相应中值的目标节点, 构建新的 PPI 网络以进一步研究。同样, 在新的网络中, 计算 6 个参数, 保留 6 个参数均高于相应中值的节点, 构建核心 PPI 网络。筛选

表 5 草归除湿活血颗粒中的活性成分

Tab 5 Component analysis of Caogui Chushi Huoxue granule

No.	t_R/min	化合物名称	分子式	结合类型	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 / $\times 10^{-6}$
1	0.784	N_6, N_6, N_6 -trimethyl-L-lysine	$C_9H_{20}NO_2$	阳离子	189.1596	188.1524	- 0.62
2	0.842	胆碱	$C_5H_{13}NO$	阳离子	104.1075	103.1002	4.77
3	0.850	甜菜碱	$C_5H_{11}NO_2$	阳离子	118.0865	117.0792	1.72
4	0.863	5- ({3-chloro-5- (trifluoromethyl) -2-pyridyl}methyl)thio) -4-pentyl-4H-1, 2, 4-triazol-3-ol	$C_{14}H_{16}ClF_3N_4OS$	阳离子	381.0784	380.0711	- 1.44
5	0.878	L-缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	阳离子	118.0864	117.0790	- 3.56
6	0.901	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	阳离子	192.027	191.0182	5.10
7	0.906	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	阴离子	341.1087	342.1162	0.85
8	0.907	乳糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	阴离子	387.1143	388.1216	1.42
9	0.910	脯氨酸	$C_5H_9NO_2$	阳离子	116.0708	115.0636	1.90
10	0.910	3- 哌啶甲酸	$C_6H_{11}NO_2$	阳离子	130.0862	129.0789	- 0.81
11	0.915	D- 棉子糖	$C_{18}H_{32}O_{16}$	阳离子	543.131	504.1683	- 1.52
12	0.918	D- (-) - 甘露醇	$C_6H_{14}O_6$	阴离子	181.0701	182.0774	2.82
13	0.944	腺嘌呤	$C_5H_5N_5$	阳离子	136.0616	135.0543	- 1.39
14	1.236	异柠檬酸	$C_6H_8O_7$	阴离子	191.0183	192.0256	2.88
15	1.281	莽草酸	$C_7H_{10}O_5$	阴离子	173.0439	174.0512	3.18
16	1.330	哌可酸	$C_6H_{11}NO_2$	阳离子	130.0862	129.0790	- 0.21
17	1.331	鸟嘌呤	$C_5H_5N_5O$	阳离子	152.0565	151.0492	- 1.41
18	1.346	氧化脯氨酸	$C_5H_7NO_3$	阴离子	128.0331	129.0404	4.30
19	1.355	L- 焦谷氨酸	$C_5H_7NO_3$	阳离子	130.0500	129.0427	0.59
20	1.377	尿苷	$C_9H_{12}N_2O_6$	阴离子	243.0619	244.0693	- 0.81
21	1.390	尿嘧啶	$C_4H_4N_2O_2$	阳离子	113.0350	112.0277	3.81
22	1.470	腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	阳离子	268.1035	267.0962	- 2.13
23	1.505	鸟苷	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	阳离子	284.0984	283.0912	- 1.52
24	1.528	2'-deoxyadenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	阳离子	252.1087	251.1015	- 1.52
25	1.539	异亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	阳离子	132.1019	131.0946	0.06
26	1.549	DL- 亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	阴离子	130.0852	131.0924	4.23
27	1.619	α, α - 海藻糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	阴离子	341.1091	342.1165	0.79
28	1.655	L- 亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	阳离子	132.1019	131.0946	- 0.29
29	1.936	大麦芽碱	$C_{10}H_{15}NO$	阳离子	166.1225	165.1152	- 0.77
30	1.956	没食子酸	$C_7H_6O_5$	阴离子	169.0125	170.0198	3.25
31	2.437	5- (hydroxymethyl) -4-methoxy-2, 5-dihydrofuran-2-one	$C_6H_8O_4$	阳离子	127.0392	126.0319	- 4.25
32	2.703	2'-O-methyladenosine	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	阳离子	282.1192	281.1120	- 1.59
33	3.325	2, 4-dihydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_4$	阴离子	153.0174	154.0247	3.59
34	3.362	乙基丙二酸	$C_5H_8O_4$	阴离子	131.0328	132.0401	4.27
35	3.431	邻苯三酚	$C_6H_6O_3$	阳离子	127.0391	126.0319	1.95
37	3.635	丹参素	$C_9H_{10}O_5$	阴离子	197.0444	198.0517	2.59
38	3.794	表没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	阴离子	305.0672	306.0740	3.54
39	3.807	2- (2-pyridyl) -2- {2-[4- (trifluoromethoxy) phenyl]hydrazono}acetoneitrile	$C_{14}H_9F_3N_4O$	阴离子	305.0671	306.0740	3.64
40	3.882	DL- 色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	阴离子	203.0816	204.0889	- 4.96
41	3.887	2, 3-dihydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_4$	阴离子	153.0174	154.0247	3.59
42	4.023	去甲乌药碱	$C_{16}H_{17}NO_3$	阳离子	272.1276	271.1204	- 1.82
43	4.075	4-hydroxyindole	C_8H_7NO	阴离子	132.0434	133.0506	4.24
44	4.225	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	阴离子	353.0880	354.0952	0.35
45	4.246	反式 -3- 吡啶丙烯酸	$C_{11}H_9NO_2$	阳离子	188.0703	187.0630	- 1.75
46	4.246	4-indolecarbaldehyde	C_9H_7NO	阳离子	146.0598	145.0525	- 1.87
47	4.246	4-ethynylaniline	C_8H_7N	阳离子	118.0654	117.0580	1.15
48	4.272	2-methylbenzoic acid	$C_8H_8O_2$	阴离子	135.0431	136.0503	4.07
49	4.302	曲酸	$C_6H_6O_4$	阳离子	143.0338	142.0265	- 0.51
50	4.401	1- 咖啡酰奎宁酸	$C_{16}H_{18}O_9$	阴离子	353.0880	354.0951	2.24
51	4.538	原花青素 B ₂	$C_{30}H_{26}O_{12}$	阳离子	579.1490	578.1424	- 2.19
52	4.557	3, 4, 5- 三甲氧基苯甲酸	$C_{10}H_{12}O_5$	阳离子	213.0755	212.0678	- 3.43
53	4.613	山梨酸	$C_6H_8O_2$	阳离子	113.0601	112.0528	3.35
54	4.613	2, 5-dihydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_3$	阴离子	137.0223	138.0296	4.01
55	4.657	表儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	阳离子	291.0854	290.0784	- 2.16
56	4.681	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	阴离子	353.0881	354.0952	0.24

续表 5

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	结合类型	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 / $\times 10^{-6}$
57	4.682	D-(-)-奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	阴离子	191.0547	192.0620	2.88
58	4.698	龙胆酸	C ₇ H ₆ O ₄	阴离子	153.0174	154.0247	3.59
59	4.698	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	阴离子	353.0881	354.0951	2.32
60	4.724	normorphine	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	阳离子	272.1276	271.1203	-1.94
61	4.751	6-甲基喹啉	C ₁₀ H ₉ N	阳离子	144.0806	143.0733	-1.57
62	4.752	2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H- β -carboline-3-carboxylic acid	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	阳离子	217.0968	216.0895	-1.57
63	4.793	原花青素 B ₁	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	阴离子	577.1360	578.1425	0.09
64	4.799	间苯三酚	C ₆ H ₆ O ₃	阳离子	127.0390	126.0318	0.49
65	4.802	脱氢醋酸	C ₈ H ₈ O ₄	阴离子	167.0333	168.0405	3.23
66	4.885	维采宁 II	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	阳离子	595.1645	594.1583	-0.30
67	4.924	对苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	阴离子	165.0176	166.0249	3.15
68	4.978	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	阴离子	179.0334	180.0407	3.07
69	5.006	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	阳离子	291.0855	290.0787	-1.05
70	5.012	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	阳离子	271.0596	270.0528	-4.06
71	5.015	pelargonidin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	阳离子	289.0701	288.0628	-1.87
72	5.017	西伯利亚远志糖 A ₅	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	阴离子	517.1565	518.1638	0.42
73	5.025	4-methoxysalicic acid	C ₈ H ₈ O ₄	阴离子	167.0332	168.0405	3.35
74	5.043	西伯利亚远志糖 A ₁	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	阴离子	547.1666	548.1739	-0.40
75	5.070	6-acetylcodeine	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	阳离子	342.1692	341.1619	-2.33
76	5.072	马鞭草苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	阳离子	389.1432	388.1370	-4.01
77	5.078	夏佛塔苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	阴离子	563.1412	564.1479	1.94
78	5.078	维采宁 III	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	阴离子	563.1411	564.1479	1.83
79	5.125	伞花耳草苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	阳离子	565.1542	564.1471	-1.43
80	5.125	myricetin 3-O-beta-D-galactopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	阳离子	481.0968	480.0895	-1.80
81	5.134	杨梅素	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	阳离子	319.0440	318.0367	-2.73
82	5.179	(1 ξ)-1, 5-anhydro-1-[2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-D-galactitol	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阳离子	449.1070	448.0997	-1.91
83	5.279	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	阳离子	287.0542	286.0469	-2.96
84	5.282	5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl-(1-2)-[6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl-(1-6)]hexopyranoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	阴离子	739.2105	740.2167	0.39
85	5.286	罗汉果黄素	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	阴离子	739.2108	740.2164	2.98
86	5.299	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	阴离子	609.1470	610.1537	0.47
87	5.311	N-acetyl-L-leucine	C ₈ H ₁₅ NO ₃	阴离子	172.0962	173.1035	3.25
88	5.333	4-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	阴离子	121.0272	122.0345	4.54
89	5.339	5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6, 8-bis(3, 4, 5-trihydroxyoxan-2-yl)-4H-chromen-4-one	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	阳离子	535.1434	534.1367	-1.17
90	5.355	3-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	阴离子	163.0383	164.0456	3.37
91	5.373	山茶苷 B	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	阴离子	725.1951	726.2023	2.23
92	5.387	2-hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃	阳离子	147.0438	146.0364	-3.54
93	5.394	异麦角甾苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	阴离子	623.1989	624.2061	1.14
94	5.416	quercetin 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	阳离子	611.1592	610.1520	-2.33
95	5.502	三叶豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阳离子	449.1067	448.0994	-2.49
96	5.538	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	阴离子	463.0887	464.0955	2.29
97	5.544	异麦角甾苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	阴离子	623.1988	624.2060	0.88
98	5.546	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	阳离子	465.1018	464.0946	-1.97
99	5.558	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	阴离子	477.0676	478.0745	-0.44
100	5.559	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	阴离子	623.1988	624.2054	1.93
101	5.560	鞣花酸	C ₁₄ H ₆ O ₈	阴离子	300.9990	302.0063	0.11
102	5.571	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	阴离子	119.0479	120.0552	4.62
103	5.585	白皮杉醇葡萄糖苷	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	阴离子	405.1194	406.1263	-0.23
104	5.616	5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-(6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl) hexopyranoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	阳离子	625.1744	624.1671	-3.10
105	5.643	肉桂酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	阳离子	163.0749	162.0675	-3.49
106	5.662	百蕊草素 I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	阴离子	593.1521	594.1585	2.46
107	5.662	忍冬苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	阴离子	593.1520	594.1585	2.26
108	5.677	二苯胺	C ₁₄ H ₁₅ N	阳离子	198.1273	197.1200	-2.10

续表 5

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	结合类型	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 / $\times 10^{-6}$
109	5.716	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	阳离子	625.1744	624.1690	- 3.95
110	5.720	香兰素 / 异香兰素	C ₈ H ₈ O ₃	阳离子	153.0542	152.0470	- 2.55
111	5.736	香兰素 / 异香兰素	C ₈ H ₈ O ₃	阴离子	151.0381	152.0454	3.71
112	5.756	5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-[(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-3, 4, 5-trihydroxy-6-methoxyloxan-2-yl]oxy)methyl)oxan-2-yl]oxy)-4H-chromen-4-one	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	阳离子	579.1694	578.1628	- 1.28
113	5.764	紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阴离子	447.0936	448.1002	- 0.87
114	5.786	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	阴离子	515.1196	516.1268	1.20
115	5.792	芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	阴离子	223.0604	224.0677	- 3.34
116	5.823	异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	阴离子	515.1196	516.1266	- 0.36
117	5.826	2-(2-oxo-8, 9-dihydro-2H-furo[2, 3- <i>h</i>]chromen-8-yl)-2-propanyl-beta-D-glucopyranoside	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	阳离子	391.1376	408.1414	- 1.60
118	5.828	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阳离子	195.0648	194.0575	- 2.04
119	5.829	异荛苳苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阴离子	447.0935	448.1006	1.81
120	5.841	二氢槲皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	阳离子	287.0541	304.0574	- 2.97
121	5.846	紫云英苷或异构体	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阴离子	447.0935	448.1002	- 0.84
122	5.902	5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i>)-3, 4, 5-trihydroxy-6-methoxyloxan-2-yl]oxy)methyl)oxan-2-yl]oxy)-4H-chromen-4-one	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	阳离子	609.1796	608.1732	- 1.49
123	5.939	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	阳离子	479.1173	446.0843	- 1.29
124	5.955	异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	阴离子	515.1198	516.1269	0.13
125	5.959	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	阳离子	611.1954	610.1881	- 2.70
126	6.035	丹酚酸 A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	阴离子	493.1148	494.1213	2.60
127	6.056	茜草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	阴离子	253.0505	254.0579	0.09
128	6.067	迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	阴离子	359.0776	360.0845	2.48
129	6.125	洛塞琳	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	阴离子	427.1610	428.1683	0.09
130	6.152	alternariolmethylether	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阳离子	273.0749	272.0676	- 3.27
131	6.180	交链孢酚	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	阳离子	259.0594	258.0521	- 2.85
132	6.214	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阴离子	447.0937	448.1009	0.78
133	6.242	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	阴离子	187.0962	188.1034	2.94
134	6.249	(3 <i>aS</i> , 5 <i>aR</i> , 6 <i>R</i> , 9 <i>aS</i> , 9 <i>bS</i>)-6-hydroxy-5 <i>a</i> -methyl-3, 9-dimethylidene-dodecahydronaphtho[1, 2- <i>B</i>]furan-2-one	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	阳离子	249.1478	248.1406	- 2.73
135	6.259	6- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-phenyl-2-propenoyl]-1- <i>O</i> -(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)-β-D-glucopyranose	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	阴离子	461.1096	462.1164	0.49
136	6.282	橙黄决明素-6- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	阴离子	491.1198	492.1268	1.69
137	6.309	prunin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	阳离子	435.1276	434.1204	- 2.19
138	6.311	1, 6-dihydroxy-3-methoxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阳离子	273.0749	272.0676	- 3.16
139	6.373	<i>N</i> -(<i>p</i> -coumaroyl) serotonin	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃	阳离子	323.1381	322.1311	- 2.06
140	6.426	norlichexanthone	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	阴离子	259.0594	258.0522	- 2.52
141	6.446	quercetin-3β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	阴离子	463.0889	464.0960	1.19
142	6.471	藜本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	阳离子	191.1061	190.0989	- 2.71
143	6.484	槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	阳离子	449.1067	448.1002	- 0.77
144	6.567	5-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-7-[(3, 4, 5-trihydroxy-6-[(3, 4, 5-trihydroxy-6-methoxyloxan-2-yl)oxy]methyl)oxan-2-yl)oxy]-4H-chromen-4-one	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	阳离子	593.1850	592.1784	- 1.42
145	6.600	洋川芎内酯 H	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	阳离子	207.1011	224.1044	- 1.95
146	6.645	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	阳离子	595.1643	594.1570	- 2.53
147	6.742	圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	阳离子	289.0699	288.0630	- 1.41
148	6.795	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阳离子	273.0749	272.0676	- 3.06
149	6.809	桑黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	阴离子	301.0354	302.0427	1.83
150	6.814	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	阴离子	301.0354	302.0423	- 1.05
151	6.828	apigetrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	阴离子	431.0984	432.1057	0.07
152	6.830	大黄素-8- <i>O</i> -β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	阴离子	431.0985	432.1057	1.46
153	6.830	异牡荆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	阴离子	431.0984	432.1057	1.32
154	6.878	(±)-脱落酸	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	阳离子	247.1322	264.1356	- 2.20
155	6.906	(2 <i>S</i>)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-2H, 3H, 7H-furo[3, 2- <i>G</i>]chromen-7-one	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	阳离子	247.0959	246.0886	- 2.50

续表 5

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	结合类型	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 / $\times 10^{-6}$
156	6.991	十二烷二酸	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	阴离子	289.1660	230.1516	- 0.87
157	7.023	12-oxo phytodienoic acid	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	阳离子	275.2000	274.1927	- 2.00
158	7.148	cis-2-decenoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	阴离子	169.1217	170.1294	1.06
159	7.267	柚皮苷查尔酮	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阴离子	271.0615	272.0685	3.03
160	7.267	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阴离子	271.0615	272.0685	3.03
161	7.280	柚皮素异构体	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	阳离子	273.0749	272.0682	- 1.15
162	7.355	1-O-[(2 α , 3 β , 5 ξ , 9 ξ , 18 ξ)-2, 3, 19-trihydroxy-28-oxours-12-en-28-yl] β -D-glucopyranose	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	阴离子	695.4021	696.4094	0.79
163	7.377	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	阴离子	285.0405	286.0473	- 1.61
164	7.380	corchorifatty acid F	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	阴离子	327.2177	328.2249	- 0.23
165	7.550	皮诺敛酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	阳离子	279.2311	278.2238	- 2.69
166	7.797	齐墩果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	阳离子	439.3563	438.3489	- 0.98
167	7.830	鹰嘴豆芽素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	阳离子	285.0749	284.0678	- 2.37
168	7.835	醉鱼草皂苷 IVb	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	阳离子	943.5233	942.5188	- 3.60
169	7.835	齐墩果酮酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	阳离子	455.3507	454.3447	- 3.97
170	8.091	(-)-caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	阳离子	203.1790	220.1822	- 2.42
171	8.113	香紫苏内酯	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	阳离子	251.1999	250.1926	- 2.66
172	8.129	大豆皂苷 I	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	阳离子	943.5237	942.5178	- 1.07
173	8.133	橙黄决明素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	阳离子	331.0802	330.0740	- 4.83
174	8.223	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	阴离子	315.0514	316.0582	- 0.25
175	8.415	5-methoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	阳离子	253.0853	252.0780	- 2.61
176	8.522	6, 7-dihydro-5H-dibenzo[d, f][1, 3]diazepin-6-one	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O	阳离子	211.0861	210.0788	- 2.23
177	8.523	黄豆黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	阴离子	283.0613	284.0682	- 1.11
178	8.620	邻苯二甲酸单苄酯	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	阴离子	255.0662	256.0735	- 0.29
179	8.738	川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	阳离子	403.1379	402.1306	- 2.15
180	8.843	癸酰胺	C ₁₀ H ₂₁ NO	阳离子	172.1692	171.1619	- 2.29
181	8.866	(3E)-3-(hydroxymethyl)-2-oxo-5-[(1S, 8aS)-5, 5, 8a-trimethyl-2-methylenedecahydro-1-naphthalenyl]-3-pentenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	阳离子	335.2185	334.2113	- 9.42
182	9.138	异泽兰黄素	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	阴离子	343.0823	344.0896	0.03
183	9.163	橘皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	阳离子	373.1273	372.1200	- 2.31
184	9.169	洋川芎内酯 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	阳离子	193.1221	192.1148	- 1.33
185	9.260	正丁基苯酚	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	阳离子	191.1062	190.0989	- 2.29
186	9.332	(2 α , 3 β , 19 α)-2, 3, 19-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	阴离子	487.3434	488.3503	0.17
187	9.361	bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	阳离子	415.2106	414.2035	- 1.69
188	9.462	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	阴离子	269.0456	270.0528	2.23
189	9.465	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	阴离子	269.0456	270.0529	0.17
190	9.476	(+/-)-9, 10-dihydroxy-12Z-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	阴离子	313.2385	314.2458	0.30
191	9.530	3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl-2-(prop-1-en-2-yl)-2, 3-dihydro-1-benzofuran-5-carboxylate	C ₁₈ H ₂₂ O ₈	阳离子	389.1221	388.1148	- 1.41
192	9.707	二苯胺	C ₁₂ H ₁₁ N	阳离子	170.0961	169.0888	- 1.93
193	9.762	十六碳二酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	阴离子	285.2072	286.2145	0.39
194	9.830	蛇床子素	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	阳离子	245.1167	244.1094	- 2.20
195	9.920	N-[2-(2-furylsulfanyl) ethyl]-4, 6-dimethyl-1H-indole-2-carboxamide	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ S	阳离子	329.1374		- 1.67
196	9.935	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	阴离子	315.2539	316.2611	1.78
197	9.960	11-(4-chloroanilino)-2, 3-dihydro-1H-cyclopenta[4, 5]pyrido[1, 2-A]benzimidazole-4-carbonitrile	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₄	阳离子	359.1115	358.1042	- 1.53
198	10.117	mono(2-ethylhexyl) phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	阴离子	277.1444	278.1517	- 0.33
199	10.123	2-(8-hydroxy-4A, 8-dimethyldecahydro-2-naphthalenyl) acrylic acid	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	阳离子	253.1794	252.1722	- 1.35
200	10.244	(3 β , 5 ξ , 9 ξ)-3, 23-dihydroxy-1-oxoolean-12-en-28-oic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	阴离子	485.3275	486.3346	0.12
201	10.273	11, 12-epoxy-(5Z, 8Z, 11Z)-icosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	阴离子	319.2280	320.2354	0.66
202	10.280	十三烷酸	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	阴离子	213.1851	214.1924	- 4.27
203	10.402	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	阳离子	279.2312	278.2246	- 4.33	
204	10.410	磷酸二丁酯	C ₈ H ₁₉ O ₄ P	阳离子	211.1089	210.1017	- 2.09
205	10.476	2, 5-di-tert-butylhydroquinone	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	阴离子	221.1539	222.1612	- 3.61
206	10.579	大豆黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	阴离子	253.0505	254.0577	- 0.67
207	10.794	9-oxo-10(E), 12(E)-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	阳离子	295.2260	294.2190	- 1.63

续表 5

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	结合类型	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 / $\times 10^{-6}$
208	10.911	2-hydroxyestradiol	$C_{18}H_{24}O_3$	阳离子	289.1792	288.1721	- 1.50
209	11.123	欧当归内酯 A	$C_{24}H_{28}O_4$	阳离子	381.2050	380.1988	- 4.14
210	11.386	linoleoyl ethanolamide	$C_{20}H_{37}NO_2$	阳离子	324.2890	323.2817	- 2.18
211	11.648	4-hydroxy-3-[(2 <i>E</i> , 6 <i>E</i>)-4-hydroxy-3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trien-1-yl]benzoic acid	$C_{22}H_{30}O_4$	阳离子	381.2051	380.1978	- 1.50
212	11.716	9 (<i>Z</i>), 11 (<i>E</i>), 13 (<i>E</i>)-octadecatrienoic acid methyl ester	$C_{19}H_{32}O_2$	阳离子	293.2464	292.2392	- 3.69
213	12.308	2, 2'-methylenebis (4-methyl-6-tert-butylphenol)	$C_{23}H_{32}O_2$	阴离子	339.2327	340.2400	- 0.67
214	12.995	methanandamide	$C_{23}H_{39}NO_2$	阳离子	362.3043	361.2970	- 3.03
215	13.482	硬脂酰胺	$C_{18}H_{37}NO$	阳离子	284.2938	283.2866	- 3.42
216	13.674	硬脂酸单乙醇酰胺	$C_{20}H_{41}NO_2$	阳离子	310.3095	309.3022	- 1.77
217	13.955	4-dodecylbenzenesulfonic acid	$C_{18}H_{30}O_3S$	阴离子	325.1843	326.1915	- 0.07
218	14.146	bis (2-ethylhexyl) terephthalate	$C_{24}H_{38}O_4$	阳离子	391.2834	390.2761	- 2.23
219	14.596	己内酰胺	$C_6H_{11}NO$	阳离子	114.0917	113.0844	2.89
220	15.889	二乙醇胺	$C_4H_{11}NO_2$	阳离子	106.0868	105.0795	4.67
221	15.918	palmitoyl sphingomyelin	$C_{39}H_{79}N_2O_6P$	阳离子	703.5740	702.5667	- 1.26

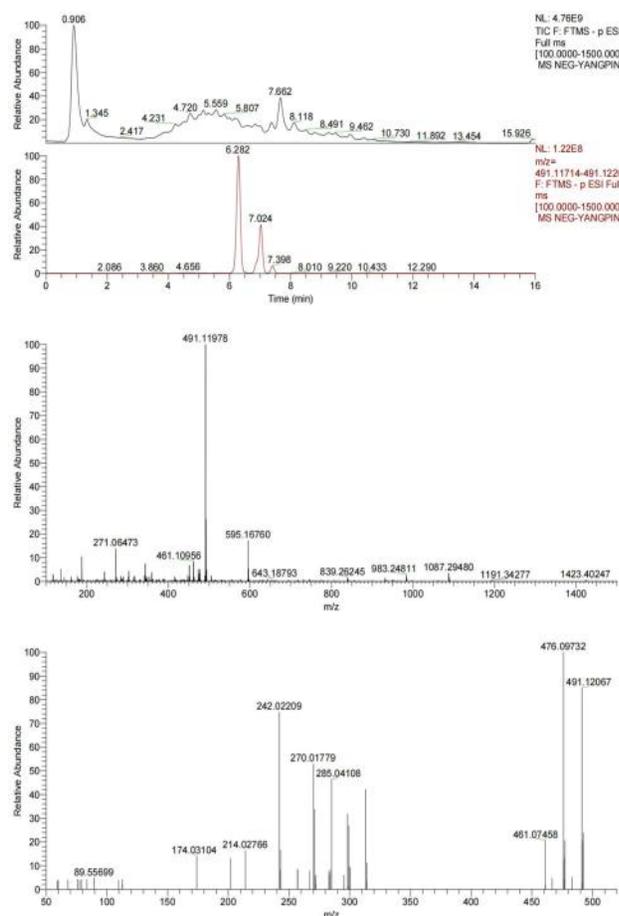


图 1 草归除湿活血颗粒 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of Caogui Chushi Huoxue granule

提取分析得到该网络体系中的核心子网络与枢纽基因。根据靶点的度值从大到小进行排序, 选取前 30 个靶点, 见图 2。在这些靶点中, INS、ALB、IL-6、TNF、MAPK3 和 IL-1 β 有相对较高的数值, 可能为草归除湿活血颗粒治疗高尿酸血症的最主要核心靶点。

2.5.4 交集基因的富集分析 将药物靶点与疾病靶点的交集靶点信息导入 Metascape 数据库, 进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 并将结果导入 DAVID, 然后使用柱状图和气泡图直观地表示前 30 个结果。依据 $P < 0.001$ 筛选出 GO 条目, 其中生物学过程 (BP) 共涉及 4258 个, 主要为对肽的反应、对营养水平的反应、对细胞外刺激的反应等; 得到分子功能 (MF) 517 个, 主要为受体配体活性、信号受体激活活性、激素活性; 得到细胞组成 (CC) 310 个, 主要为囊腔、细胞质小泡、分泌颗粒腔等; KEGG 富集通路显示共有 275 个通路, 选取前 30 条进行可视化, 主要包括 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、HIF-1 信号通路等, 这些分析旨在揭示与关键靶点相关的主要分子生物学过程和信号通路, 见图 3。

3 讨论

本研究通过单因素试验筛选出了最佳的提取工艺为加 10 倍量水, 浸泡 0.5 h, 提取 2 次; 同时基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术^[7], 对草归除湿活血颗粒进行了详尽的成分分析, 共鉴定出 221 种活性成分; 采用网络药理学方法探究了该药物在降低尿酸过程中的潜在作用机制^[8]。通过对网络中关键蛋白的基因功能与信号通路进行系统性解析, 明确了与高尿酸血症紧密相关的 6 个高连接度靶点: INS、TNF、IL-1 β 、IL-6、ALB 和 MAPK3, 推测本颗粒的有效成分可能通过这些关键靶点调控尿酸代谢。富集分析结果揭示了丰富的生物过程与通路信息, 包括 GO 条目 1288 项及 KEGG 通路 172 条, 广泛涉及凋亡负调控、蛋白质磷酸化、炎症反应调控、蛋白激酶活性维持以及 PI3K-Akt 信号通路等多个

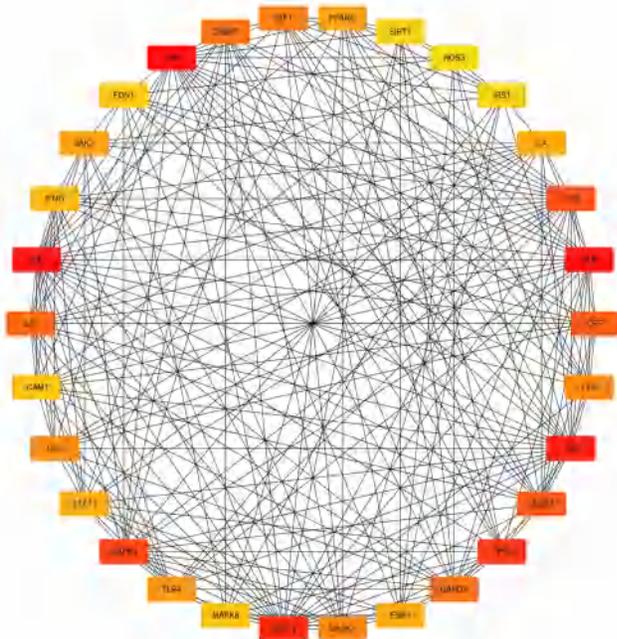


图 2 草归除湿活血颗粒治疗高尿酸血症的交集靶点 PPI 网络图
Fig 2 Intersection target PPI network of Caogui Chushi Huoxue granule for hyperuricemia

注：节点颜色越深代表度值越大。
Note: Darker node colours represent larger degree values.

层面。值得注意的是，PI3K-Akt 通路作为调控细胞增殖与凋亡的关键途径，对于促进血管生成、加速生物转化进程及增强尿酸排泄具有重要意义，从而有效调节血液中尿酸水平^[9]。

此外，研究发现高尿酸血症患者体内 IL-6 表达显著上调，此细胞因子在高尿酸环境下具有促炎效应，并在关节损伤过程中扮演核心角色^[10-12]。关节内独特的微环境易于促进可溶性尿酸盐沉积，进而激活滑膜巨噬细胞，触发 IL-6、IL-1 β 等细胞因子的合成与释放，这一系列反应诱导基质金属蛋白酶及毒性氧自由基的生成，吸引单核细胞与中性粒细胞向病灶聚集，最终导致关节的炎症表现如红肿热痛^[13]。ALB 是由哺乳动物肝细胞合成的蛋白质。作为人血浆中最重要的蛋白质，它具有维持和稳定血浆渗透压、参与物质运输等重要的生理功能。ALB 基因表达具有组织特异性，即白蛋白只能由肝细胞合成，而其他组织中的 ALB 基因不表达^[14]。据报道，ALB 通过抑制自由基的产生和清除过氧自由基而具有很强的抗氧化性能^[15-17]。MAPK3（也称为 ERK1）是丝裂原活化

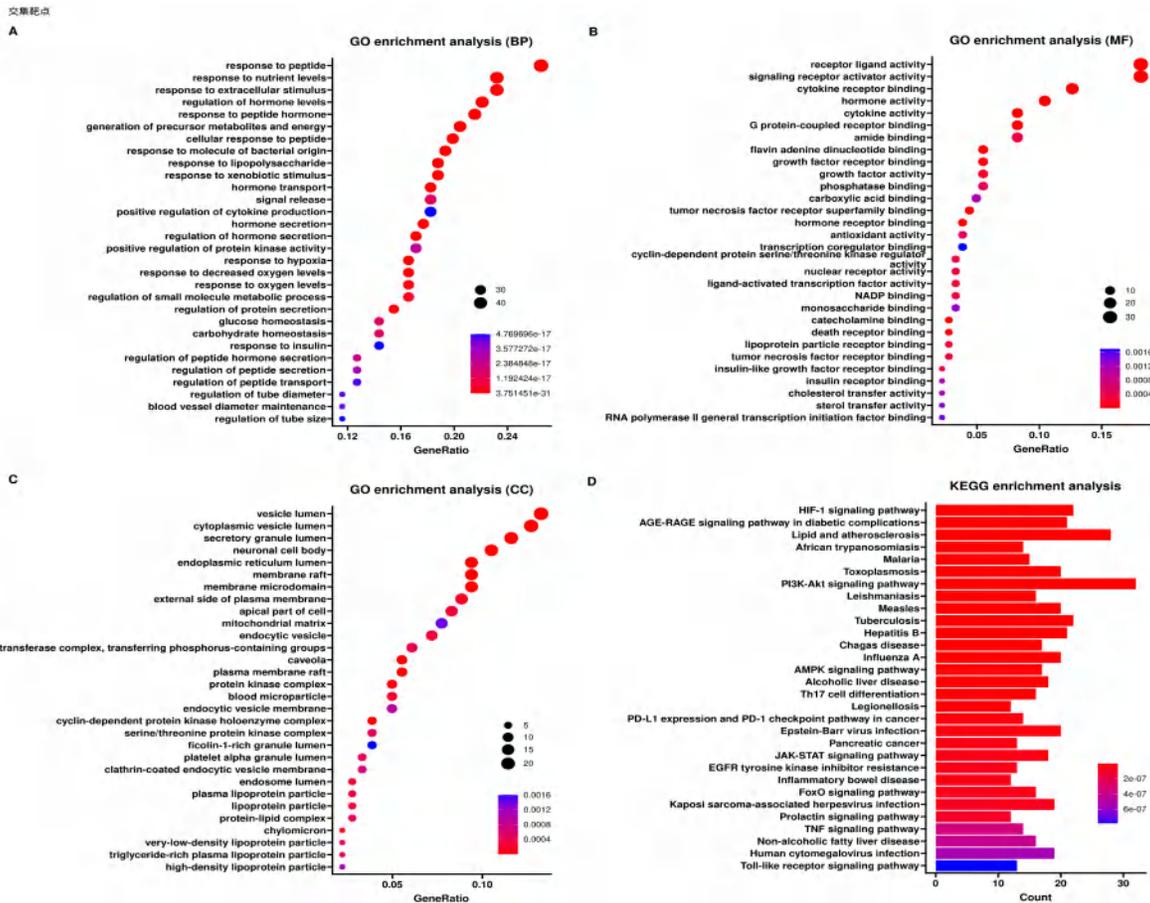


图 3 GO 功能富集分析 (A、B、C) 和 KEGG 通路富集分析 (D)
Fig 3 GO function enrichment analysis (A, B, and C) and KEGG pathway enrichment analysis (D) in hyperuricemia treated with Caogui Chushi Huoxue Granule

蛋白激酶, 可以介导细胞生长、分化、炎症反应、增殖、细胞凋亡和其他病理过程的进展^[18]。根据 UPLC-Q-TOF-MS 分析结果, 草归除湿活血颗粒中富含多种酚酸类化合物, 因为多酚类化合物含有较多的电负性基团, 能够与黄嘌呤氧化酶 (XOD) 之间发生较强的相互作用, 抑制 XOD 活性。诸如阿魏酸、绿原酸、迷迭香酸、没食子酸及咖啡酸等, 均展现出对 XOD 活性的显著抑制效能, 尤以阿魏酸、绿原酸表现最为突出^[19]; 阿魏酸, 能够减轻脂肪沉积、氧化应激和炎症反应, 抑制尿酸的生成^[20]。绿原酸可以通过抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF 等促炎细胞因子的分泌, 降低血清尿酸水平, 改善高尿酸症状^[21]。

4 结论

综上所述, 网络药理学的结果显示草归除湿活血颗粒可能通过调节 PI3K-Akt 信号通路、脂质和动脉粥样硬化、HIF-1 等信号通路来发挥降尿酸的作用。本研究成果不仅为深入探索草归除湿活血颗粒治疗高尿酸血症机制提供了理论基础, 而且为中医药领域针对高尿酸血症的治疗策略提供了新的启示, 这一发现不仅加深了我们对草归除湿活血颗粒药理作用及机制的理解, 还可启发中医药研究者在探索高尿酸血症治疗方法时, 思考更为广阔与创新的思路与方向。

参考文献

[1] 叶文静, 程亚伟, 邱晓堂. 中医药治疗高尿酸血症的研究进展 [J]. 海南医学, 2020, 31 (9): 1187-1190.

[2] Strilchuk L, Fogacci F, Cicero AF. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: a critical review [J]. Expert Opin Drug Saf, 2019, 18 (4): 261-271.

[3] White WB, Saag KG, Becker MA, et al. Cardiovascular safety of febuxostat or allopurinol in patients with gout [J]. N Engl J Med, 2018, 378 (13): 1200-1210.

[4] 陆飞, 周恩超. 基于“肾毒”理论辨治尿酸性肾病摘要 [J]. 江苏中医药, 2023, 55 (12): 38-42.

[5] 王珍珍. 白茅饮治疗高尿酸血症的临床疗效观察 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.

[6] 车爽. UPLC-Q-TOF-MS 联合 UNIFI 技术在中药分析领域的应用进展 [J]. 天津药学, 2022, 34 (3): 67-74.

[7] Jensen T, Niwa K, Hisatome I, et al. Increased serum uric acid over five years is a risk factor for developing fatty liver [J].

Sci Rep, 2018, 8 (1): 11735.

[8] King C, Lanasa MA, Jensen T, et al. Uric acid as a cause of the metabolic syndrome [J]. Contrib Nephrol, 2018, 192: 88-102.

[9] 高陆地. 温针灸联合耳针治疗脾虚湿阻型肥胖并发高脂血症患者的应用效果研究 [J]. 中外医疗, 2018, 37 (16): 158-160.

[10] 覃柳群, 石祥, 李文朝, 等. 血清前白蛋白水平与痛风疾病活动的相关性分析 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36 (1): 87-90.

[11] Spaetgens B, de Vries, Driessen JHM, et al. Risk of infections in patients with gout: a population-based cohort study [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 1429.

[12] 刘圳奋, 马红霞, 李秀宁, 等. 痛风性关节炎与高尿酸血症炎性细胞因子水平比较 [J]. 西部中医药, 2014, 27 (8): 157-158.

[13] 韩晶雪, 刘鹏, 刘毓, 等. 基于网络药理学研究“丹参-姜黄”药对降尿酸作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (3): 172-176, 269-271.

[14] Kong X, Liang H, An W, et al. Rapid identification of early renal damage in asymptomatic hyperuricemia patients based on urine Raman spectroscopy and bioinformatics analysis [J]. Front Chem, 2023, 11: 1045697.

[15] Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, et al. Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins [J]. FEBS Lett, 1985, 187 (1): 33-37.

[16] Halliwell B. Albumin—an important extracellular antioxidant? [J]. Biochem Pharmacol, 1988, 37 (4): 569-571.

[17] Roche M, Rondeau P, Singh NR, et al. The antioxidant properties of serum albumin [J]. FEBS Lett, 2008, 582 (13): 1783-1787.

[18] Kong LD, Yang C, Ge F, et al. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 93 (2-3): 325-330.

[19] 张南海, 金雨楠, 陈怡冉, 等. 阿魏酸对黄嘌呤氧化酶的抑制机理 [J]. 食品科学技术学报, 2023, 41 (1): 115-125.

[20] Zhang NH, Zhou JX, Zhao L, et al. Dietary ferulic acid ameliorates metabolism syndrome-associated hyperuricemia in rats via regulating uric acid synthesis, glycolipid metabolism, and hepatic injury [J]. Front Nutr, 2022, 9: 946556.

[21] Meng ZQ, Tang ZH, Yan YX, et al. Study on the anti-gout activity of chlorogenic acid: improvement on hyperuricemia and gouty inflammation [J]. Am J Chin Med, 2014, 42 (6): 1471-1483.

(收稿日期: 2024-08-19; 修回日期: 2024-10-23)

檀香醇提物的化学成分研究

彭红星^{1,2}, 马懿飞², 汤杰豪³, 邱海宝^{1,2}, 陈向东², 魏梅^{2*} (1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244; 3. 广东药科大学, 广州 510006)

摘要: 目的 对檀香 *Santalum album* L. 中的化学成分进行研究。方法 采用 ODS 凝胶柱层析方法以及 HPLC 等色谱技术进行分离纯化, 结合 UV、MS 和 NMR 等波谱数据进行化合物的结构鉴定。结果 从檀香乙醇提取物中分离得到 9 个化合物, 分别鉴定为原儿茶酸 (1)、原儿茶酸甲酯 (2)、香草酸 (3)、7-甲基-10-羟基喜树碱 (4)、阿魏酸 (5)、肉桂酸乙酯 (6)、松柏醛 (7)、(7*R*, 8*S*)-3, 5'-dimethoxy-4', 7-epoxy-8, 3'-neolignane-5, 9, 9'-triol (8)、(3*S*, 4*S*)-3-methyl-4-[[6-*O*-(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]octanoic acid (9)。结论 化合物 2、4、8、9 为首次从檀香属植物中分离得到。

关键词: 檀香; 酚类化合物; 提取分离

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0124-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.018

Chemical composition of the alcoholic extract of *Santalum album* L.

PENG Hong-xing^{1,2}, MA Yi-fei², TANG Jie-hao³, QIU Hai-bao^{1,2}, CHEN Xiang-dong², WEI Mei^{2*} (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan Guangdong 528244; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of *Santalum album* L.. **Methods** The separation and purification were conducted by chromatographic techniques such as ODS gel column chromatography and HPLC, and structure of the compounds was identified by combining spectrum data such as UV, MS and NMR. **Results** Nine compounds were isolated from the alcoholic extract of *Santalum album* L., and identified as protocatechuic acid (1), methyl 3, 4-dihydroxybenzoate (2), vanillic acid (3), 7-methyl-10-hydroxycamptothecin (4), ferulic acid (5), ethyl cinnamate (6), transferulaldehyde (7), (7*R*, 8*S*)-3, 5'-dimethoxy-4', 7-epoxy-8, 3'-neolignane-5, 9, 9'-triol (8), and (3*S*, 4*S*)-3-methyl-4-[[6-*O*-(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]octanoic acid (9). **Conclusion** Compounds 2, 4, 8, and 9 have been isolated for the first time from *Santalum*.

Key words: *Santalum album* L.; phenolic compound; extraction and separation

檀香 *Santalum album* L. 为檀香科檀香属植物檀香树干的心材, 分布在印度、马来西亚、澳大利亚及印度尼西亚等地, 在我国台湾、广东等地亦有栽培。檀香有多种功效, 《本草拾遗》指出“主心腹霍乱, 中恶, 杀虫”。《本草备要》提及“其能调脾胃, 利胸膈, 为理气要药”。研究表明, 檀香中的化学成分主要为挥发油^[1-2]、木质素类^[3-4]、酚酸类^[5]及脂肪酸类^[6]化合物等。现代药理学研究表明檀香具有调节胃肠道^[7-9]、抗肿

瘤^[10-11]、抗氧化^[12]、神经保护^[13]等作用。

为进一步开发和利用檀香的药效物质, 本研究利用多种色谱方法从檀香中分离出 7 个酚类化合物、1 个酯类化合物以及 1 个生物碱类化合物, 分别鉴定为原儿茶酸 (1)、原儿茶酸甲酯 (2)、香草酸 (3)、7-甲基-10-羟基喜树碱 (4)、阿魏酸 (5)、肉桂酸乙酯 (6)、松柏醛 (7)、(7*R*, 8*S*)-3, 5'-dimethoxy-4', 7-epoxy-8, 3'-neolignane-5, 9, 9'-triol (8)、(3*S*, 4*S*)-3-methyl-4-[[6-*O*-(3,

基金项目: 2022 年佛山市南海区重点领域科技攻关专项 (No. 南科[2023]20 号-18)。

作者简介: 彭红星, 男, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学成分的研究, email: 2874630016@qq.com * 通信作者: 魏梅, 女, 主任药师, 主要从事新药研发, email: weimei@126.com

4, 5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy} octanoic acid (9), 其中化合物 2、4、8、9 为首次从檀香属中分离得到。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); 1260 型高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); 色谱柱 YMC Triart C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); AVANCE IIIITM HD 600 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 BRUKER 公司); RE-3000A 旋转蒸发仪、SHZ-D 循环水真空泵、DLSB-5120 低温冷却液循环水泵 (上海予华仪器有限公司); KQ-500DE 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ME204E 型万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 型级超纯水系统 (德国默克股份有限公司)。

1.2 试剂

YMC ODS 填料 (南通海箬化学有限公司), 氘代二甲基亚砜、甲醇、乙腈、甲酸 (德国默克股份有限公司, 色谱级), 水为超纯水 (实验室自制); 其余试剂均为市售分析纯。

檀香药材于 2020 年在广州清平市场收集, 经中国中医科学院中药研究所孟祥霄分析员鉴定为檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 树干的干燥心材。药材 (编号: G2107148) 存放于广东一方制药有限公司研发部仓库。

2 提取与分离

将干燥的檀香药材 (5 kg) 充分粉碎至无明显碎屑木块, 采用体积分数为 30%、70%、95% 的乙醇回流提取两次, 每次提取 2 h, 合并提取液, 过滤后浓缩至适量, 并用等量的乙酸乙酯萃取, 得 30% 乙醇提取部分的乙酸乙酯浸膏 32.94 g, 70% 乙醇提取部分的乙酸乙酯浸膏 22.30 g, 95% 乙醇提取部分的乙酸乙酯浸膏 10.02 g。

选用 5 cm \times 80 cm 的玻璃层析柱, 湿法装柱, 用甲醇装入 400 g ODS 填料搅拌后备用。将 30% 乙醇、70% 乙醇和 95% 乙醇提取部分的乙酸乙酯层浸膏用适量 50% 甲醇溶解, 湿法上样, ODS 填料柱依次用 5%~100% 甲醇洗脱 (按 5% 递增), 每次收取 500 mL 馏份, 经 HPLC 检测后合并相同组分, 分别得到 30% 乙醇提取物的 15% 甲醇洗脱馏份 (66.2 mg)、20% 甲醇洗脱馏份 (274.0 mg)、25% 甲醇洗脱馏份 (886.5 mg)、40% 甲醇洗脱馏份 (977.8 mg)、45% 甲醇洗脱馏份 (1772.7 mg)、70% 乙醇提取物的 45% 甲醇洗脱馏份 (432.3 mg) 以及 95% 乙醇提取物的 75% 甲醇洗脱馏份 (349.0 mg)。

15% 甲醇洗脱馏份经 [甲醇-乙腈 (2:1)]-水

(10:90 \rightarrow 50:50), 进行梯度洗脱, 得到化合物 1 (t_R = 10.8 min, 10.9 mg); 20% 甲醇洗脱馏份经 [甲醇-乙腈 (2:1)]-0.1% 甲酸 (22:78) 等度洗脱, 合并相同馏份, 得到化合物 2 (t_R = 11.3 min, 13.8 mg) 以及化合物 3 (t_R = 12.9 min, 7.3 mg); 25% 甲醇洗脱馏份经 [甲醇-乙腈 (2:1)]-0.1% 甲酸 (28:72) 等度洗脱, 合并相同馏份, 得到化合物 4 (t_R = 8.2 min, 4.2 mg) 以及化合物 5 (t_R = 12.3 min, 1.8 mg); 40% 甲醇洗脱馏份经 [甲醇-乙腈 (2:1)]-0.1% 甲酸 (50:50) 等度洗脱, 得到化合物 6 (t_R = 5.0 min, 14.8 mg); 45% 甲醇洗脱馏份经 [甲醇-乙腈 (2:1)]-0.1% 甲酸 (55:45) 等度洗脱, 得到化合物 7 (t_R = 5.8 min, 2.2 mg); 70% 乙醇提取物的 45% 甲醇洗脱馏份经乙腈-0.1% 甲酸 (20:80 \rightarrow 40:60) 进行梯度洗脱, 得到化合物 8 (t_R = 9.6 min, 4.7 mg); 95% 乙醇提取物的 75% 甲醇洗脱馏份经乙腈-水 (75:25) 等度洗脱, 得到化合物 9 (t_R = 5.2 min, 18.9 mg)。

以上经 HPLC 制备所得馏份均通过纯度检验, 纯度值均大于 95%, 通过一维核磁共振波谱、UHPLC-ESI-Q-TOF/MS 对实验中分离得到的化合物结构进行解析, 利用 Mestrenova 软件处理核磁数据, 结合 UV 光谱对结构进行验证, 并查阅微谱数据库以及 SciFinder 数据库进行比对分析, 最终确定 9 个化合物的结构, 见表 1。

3 结构鉴定

化合物 1: 淡黄色粉末, 易溶于甲醇、二甲基亚砜 (DMSO) 等有机溶剂, 最大吸收波长 (甲醇) 为 259.2、293.7 nm。HR-ESI-MS 负离子模式下给出化合物的准分子离子峰 m/z : 153.0179 [M-H] $^-$, 分子式为 C₇H₆O₄, 在负离子模式下丢失 1 分子羧基得到碎片离子 m/z : 109.0279 [M-COOH-H] $^-$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.4 (1H, s, -COOH), 7.3 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 7.3 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 6.8 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 5.4 (1H, s, -OH), 5.3 (1H, dd, J = 5.5, 4.2 Hz, -OH); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 129.7 (C-1), 116.6 (C-2), 144.8 (C-3), 115.1 (C-5), 121.8 (C-6), 174.3 (C-7)。以上核磁数据与文献报道数据^[14]基本相符, 因此确定该化合物为原儿茶酸。

化合物 2: 淡黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂, 最大吸收波长 (甲醇) 为 216.9、303.5 nm。HR-ESI-MS 负离子模式下给出化合物的准分子离子峰 m/z : 167.2336 [M-H] $^-$, 分子式为 C₈H₈O₄, 在负离子模式下丢失 1 分子甲基得到碎片离子 m/z : 152.0100 [M-CH₃-H] $^-$ 。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.0 (2H, dd, J = 1.9, 12.2 Hz, H-2, H-6), 6.7 (1H, s, H-5), 5.3 (1H, dd,

表 1 檀香药材醇提物乙酸乙酯部位分离得到的化合物
 Tab 1 Compounds isolated from the ethyl acetate site of the alcoholic extract of *Santalum album* L.

No.	名称	分子式	理论分子质量	实际分子质量	模式	碎片离子	结构式	类别
1	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	154.1201	154.0179	[M-H] ⁻	109.0270、131.4616、153.0179		酚类
2	原儿茶酸甲酯*	C ₈ H ₈ O ₄	168.1467	168.0336	[M-H] ⁻	152.0100、167.0336		酚类
3	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	168.1467	168.0336	[M-H] ⁻	108.0201、123.1436、152.0101、167.0336		酚类
4	7-甲基-10-羟基喜树碱*	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₅	378.3780	378.1237	[M-H] ⁻	139.0021、332.0901、347.1133、377.1237		生物碱类
5	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.1840	194.1177	[M+H] ⁺	135.0041、145.0286、177.0547、195.0652		酚类
6	肉桂酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176.2118	176.0547	[M+H] ⁺	103.0456、131.0493、149.0595、177.0547		酯类
7	松柏醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178.1846	178.0711	[M+H] ⁺	119.0498、133.0652、147.0445、161.0601、179.0711		酚类
8	(7 <i>R</i> , 8 <i>S</i>)-3, 5'-dimethoxy-4', 7-epoxy-8, 3'-neolignane-5, 9, 9'-triol*	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	360.4010	360.1468	[M+H] ⁺	163.4146、217.0473、383.1468		酚类
9	(3 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-3-methyl-4-[[6- <i>O</i> -(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]octanoic acid*	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	488.4823	488.1812	[M-H] ⁻	96.9680、179.0701、341.1228、487.1812		酚类

注：*表示首次从檀香及檀香属中分离得到的化合物。

Note: *Indicates the first compound isolated from *Santalum album* L. and *Santalum*.

$J = 4.2, 5.5$ Hz, -OH), 3.8 (3H, s, O-CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 174.3 (C-7), 148.5 (C-4), 146.2 (C-3), 129.7 (C-6), 105.1 (C-2), 48.6 (O-CH₃)。以上核磁数据与文献报道数据^[15]基本相符, 因此确定该化合物为原儿茶酸甲酯。

化合物 3: 棕色粉末, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂, 最大吸收波长(甲醇)为 217.6、259.7 nm。HR-ESI-MS 负离子模式下给出化合物的准分子离子峰 m/z : 167.0336 [M-H]⁻, 分子式为 C₈H₈O₄, 在负离子模式下丢失 1 分子甲基得到碎片离子 m/z : 152.0101 [M-CH₃-H]⁻, 再脱去 1 分子羧酸根离子得

到碎片离子 m/z : 108.0101 [M-CH₃-COO-H]⁻。 ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.4 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.4 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6), 6.8 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 3.8 (3H, s, O-CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 123.2 (C-1), 114.8 (C-2), 150.4 (C-3), 147.0 (C-4), 112.8 (C-5), 129.7 (C-6), 174.3 (C-7), 55.5 (3-OMe)。以上核磁数据与文献报道数据^[16]基本相符, 因此确定该化合物为香草酸。

化合物 4: 淡黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂, 最大吸收波长(甲醇)为 204.8、304.7

nm。HR-ESI-MS 负离子模式下给出化合物的准分子离子峰 m/z : 377.1237 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{21}H_{18}N_2O_5$ 。在正离子模式下丢失 1 分子甲基和羟基得到碎片离子 m/z : 347.1133 $[M-OH-CH_3-H]^-$, 再脱去 1 分子甲基得到碎片离子 m/z : 332.0901 $[M-OH-2CH_3-H]^-$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.3 (3H, s, H-5', H-7', H-8'), 5.4 (2H, s, 6'-OH), 3.7~3.7 (2H, m, H-1'), 3.7~3.6 (4H, m, H-11'), 1.2 (5H, d, $J = 6.8$ Hz, 4- CH_2CH_3); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz) δ : 177.1 (C-2), 174.3 (C-7), 159.5 (C-10'), 151.8 (C-10), 147.5 (C-6'), 146.6 (C-8), 129.7 (C-6), 114.7 (C-7'), 114.5 (C-9'), 106.5 (C-5'), 66.7 (C-3), 48.6 (C-1'), 22.1 (C-4), 14.0 (C-11')。以上核磁数据与文献报道数据^[17]基本相符, 因此确定该化合物为 7-甲基-10-羟基喜树碱。

化合物 5: 淡黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂, 最大吸收波长(甲醇)为 322.1 nm。HR-ESI-MS 正离子模式下给出化合物的准分子离子峰 195.0652 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 在正离子模式下丢失 1 分子水得到碎片离子 177.0547 $[M-H_2O + H]^+$, 再脱去 1 分子甲氧基得到碎片离子 145.0286 $[M-OCH_3-H_2O + H]^+$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.4 (1H, s, -COOH), 7.6 (1H, s, H-7), 7.2 (1H, s, H-6), 7.0 (1H, s, H-5), 6.7~6.6 (1H, m, H-4), 6.5 (1H, s, H-8), 5.5 (1H, s, -OH), 3.6 (3H, s, O- CH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.3 (C-9), 159.5 (C-7), 129.7 (C-1), 115.5 (C-5), 48.6 (O- CH_3)。以上数据与文献报道数据^[18]基本相符, 因此确定该化合物为阿魏酸。

化合物 6: 黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂。最大吸收波长(甲醇)为 207.3、270.9 nm。HR-ESI-MS 正离子模式下给出化合物的准分子离子峰 177.0547 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{11}H_{12}O_2$, 在正离子模式下丢失 1 分子乙基得到碎片离子 149.0598 $[M-C_2H_5 + H]^+$, 再脱去 1 分子水得到碎片离子 131.0493 $[M-C_2H_5-H_2O + H]^+$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.5 (1H, s, H-4), 7.8, 7.6 (2H, s, H-5), 7.6, 7.5 (2H, s, H-6), 7.2 (1H, s, H-7), 6.7 (1H, s, H-3), 3.7 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-2), 1.2 (3H, s, H-1)。以上核磁数据与文献报道数据^[19]基本相符, 因此确定该化合物为肉桂酸乙酯。

化合物 7: 黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂。最大吸收波长(甲醇)为 242.7、335.7 nm。HR-ESI-MS 正离子模式下给出化合物的准分子离子峰 179.0711 $[M + H]^+$, 其分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$, 在正离子模式下丢失 1 分子水得到碎

片离子 161.0601 $[M-H_2O + H]^+$, 再脱去 1 分子甲基得到碎片离子 147.0445 $[M-H_2O-CH_3 + H]^+$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.8 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9), 7.6 (1H, s, H-7), 6.8 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 6.2 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.1 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 5.7 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5), 4.1 (1H, s, -OH), 4.0 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, - OCH_3); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.3 (C-9), 148.4 (C-7), 145.7 (C-3), 135.9 (C-4), 129.7 (C-1), 127.1 (C-6), 126.2 (C-5), 55.9 (O- CH_3)。以上核磁数据与文献报道数据^[20]基本相符, 因此确定该化合物为松柏醛。

化合物 8: 黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂。最大吸收波长(甲醇)为 204.3、281.3 nm。HR-ESI-MS 正离子模式下给出化合物的准分子离子峰 383.1468 $[M + Na]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{21}O_6$, 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.7 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.7 (1H, m, H-4), 5.5 (1H, s, H-7), 3.8 (12H, s, 3-OMe, 5'-OMe, 9-H, 9'-H, 8-H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.6 (C-3), 146.4 (C-5), 145.5 (C-4'), 143.3 (C-5'), 135.0 (C-1'), 132.5 (C-1), 129.7 (C-3'), 118.5 (C-6), 116.5 (C-2'), 115.3 (C-4), 112.4 (C-6'), 110.3 (C-2), 86.9 (C-7), 63.0 (C-9), 60.2 (C-9'), 55.7 (3-OMe), 55.6 (5'-OMe), 53.3 (C-8), 34.8 (C-8'), 31.6 (C-7')。以上核磁数据与文献报道数据^[21]基本相符, 因此确定该化合物为 (7R, 8S)-3, 5'-dimethoxy-4', 7-epoxy-8, 3'-neolignane-5, 9, 9'-triol。

化合物 9: 黄色油状物, 易溶于甲醇、DMSO 等有机溶剂。最大吸收波长(甲醇)为 267.2 nm。HR-ESI-MS 负离子模式下给出化合物的准分子离子峰 487.1812 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{22}H_{32}O_{12}$, ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 139.1 (C-4), 134.9 (C-3), 133.0 (C-5), 126.6 (C-1), 126.4 (C-2), 121.3 (C-6), 117.6 (C-5'), 72.1 (C-4'), 63.2 (C-2'), 59.4 (C-3'), 56.5 (C-1'), 45.6 (C-1''), 42.9 (C-5''), 37.6 (C-6''), 31.2 (C-7''), 30.6 (C-2''), 19.0 (- CH_3)。以上核磁数据与文献报道数据^[22]基本相符, 因此确定该化合物为 (3S, 4S)-3-methyl-4-{[6-O-(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy}octanoic acid。

4 结论

本文对檀香醇提取物化学成分进行研究, 共分离得到 7 个酚类化合物, 1 个酯类化合物, 1 个生物碱类化合物, 其中化合物 2、4、8、9 为首次从檀香属中分离得到。原儿茶酸是抗病毒、扩张血管及内皮细胞的主要活性成分, 近年来的研究发现原

儿茶酸还具有抗氧化、抗肿瘤及介导肿瘤细胞凋亡等多种药理作用^[23]；原儿茶酸甲酯是在绿茶中发现的抗氧化多酚的主要代谢产物，具有抗氧化和抗炎作用^[24]；香草酸存在于各种饮食来源和药用植物中，在食品中可作为调味剂，具有抗肿瘤、抗肥胖、抗糖尿病、抗菌等作用，近几年研究指出其还有心脏保护潜力^[25]；阿魏酸已发现的药理作用包括抗血栓、降血脂、抗病毒等，在临床上多用于治疗冠心病、肾病、阿尔茨海默病等^[26]；肉桂酸乙酯可作为香精与香料的合成原料；松柏醛具有抗氧化和抗炎活性，有研究指出，在 RAW264.7 巨噬细胞中，松柏醛能通过 PKC α/β II/Nrf-2/HO-1 途径抑制脂多糖 (LPS) 诱导的细胞凋亡^[27]。以上化合物均可能是檀香药材发挥其潜在抗炎、抗菌以及抗氧化等功效的物质基础，其中以原儿茶酸为代表的酚酸类化合物的母体结构可能与抗炎抗菌作用相关，后续可针对此类结构开展相关活性成分研究。

本研究丰富了檀香中化学成分的结构类型，以往的研究主要集中在檀香挥发油中的相关成分，对于其酚类成分研究较少，本研究分离得到的 9 个化合物对于檀香药材药用价值研究以及新药开发提供了参考依据，但化合物 4、8、9 的药理活性及机制未有相关报道，仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 颜仁梁, 林励. 檀香的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14 (3): 218-220.
- [2] Brand JE, Fox JED, Pronk G, et al. Comparison of oil concentration and oil quality from *Santalum spicatum* and *S. album* plantations, 8 ~ 25 years old, with those from mature *S. spicatum* natural stands [J]. Aust For, 2007, 70 (4): 235-241.
- [3] Kim TH, Ito H, Hayashi K, et al. Aromatic constituents from the heartwood of *Santalum album* L [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53 (6): 641-644.
- [4] Matsuo Y, Mimaki Y. Lignans from *Santalum album* and their cytotoxic activities [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58 (4): 587-590.
- [5] 涂永元, 黄玉香, 邱飞. 热脱附-气质联用法分析檀香及其燃香烟气成分 [J]. 中成药, 2020, 42 (1): 243-247.
- [6] Misra BB, Das SS, Dey S. Volatile profiling from heartwood of East Indian sandalwood tree [J]. Pharm Res, 2013, 7 (4): 299-303.
- [7] 郭建生, 曾贵荣, 王小娟, 等. 檀香挥发油对豚鼠离体回肠和小肠推动功能的影响 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2010, 31 (3): 366-369.
- [8] 郭建生, 刘红艳, 王小娟, 等. 檀香不同提取部位对小肠推进和胃排空的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (2): 139-143.
- [9] 刘红艳, 郭建生, 张猛, 等. 檀香对胃实寒模型大鼠的胃排空率、cAMP 及 cGMP 的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27 (5): 74-76.
- [10] Dwivedi C, Maydew ER, Hora JJ, et al. Chemopreventive effects of various concentrations of α -santalol on skin cancer development in CD-1 mice [J]. Eur J Cancer Prev, 2005, 14 (5): 473-476.
- [11] Palep S, Moore J, Lebowohl M, et al. Inhibitory effects of alpha and beta santalol on UVB-induced mouse skin carcinogenesis [J]. J Invest Dermatol, 2005, 124 (4): 21-26.
- [12] 李丽月. 檀香挥发油质控及其对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [13] Satou T, Miyagawa M, Seimiya H, et al. Prolonged anxiolytic-like activity of sandalwood (*Santalum album* L.) oil in stress-loaded mice [J]. Flavour Fragr J, 2014, 29 (1): 35-38.
- [14] Kalmode HP, Vadagaonkar KS, Shinde SL, et al. Metal-free dehomologative oxidation of arylacetic acids for the synthesis of aryl carboxylic acids [J]. J Org Chem, 2017, 82: 3781-3786.
- [15] 李奕星, 左文健, 王辉, 等. 异叶三宝木枝条的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2012, 22 (2): 120-123.
- [16] Wei F, Deng JT, Cheng HT, et al. A pair of new phenylpropanoid enantiomers from *Cordia dichotoma* fruits [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57: 1863-1867.
- [17] 王思莹. 羟基喜树碱的提取和仿生给药体系的构建及抗癌活性评价 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023.
- [18] Kurata T, Misawa N, Hosoya T, et al. Isolation and identification of components from Wasabi (*Wasabia japonica* Matsumura) flowers and investigation of their antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. Food Sci Technol Res, 2019, 25 (3): 449-457.
- [19] 张奎. 山柰的生药学研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- [20] 赵湘湘, 郑承剑, 秦路平. 黄荆子的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43 (12): 2346-2350.
- [21] Li X, Luo JG, Wang XB, et al. Phenolics from *Leontopodium leontopodioides* inhibiting nitric oxide production [J]. Fitoterapia, 2012, 83 (5): 883-887.
- [22] Cai WC, Wang YR, Wang WP, et al. Insights into the Aroma Profile of Sauce-Flavor Baijiu by GC-IMS combined with multivariate statistical analysis [J]. J Anal Methods Chem, 2022, 2022: 4614330.
- [23] 关水, 刘天庆, 葛丹, 等. 原儿茶酸对体外培养的神经干/祖细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (4): 448-452.
- [24] Ameeramja J, Perumal E. Protocatechuic acid methyl ester ameliorates fluoride toxicity in A549 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 109 (Pt 2): 941-950.
- [25] Yalameha B, Nejabati HR, Nouri M. Cardioprotective potential of vanillic acid [J]. Clin Exp Pharmacol P, 2023, 50 (3): 193-204.
- [26] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22 (1): 138-147.
- [27] Kim KM, Heo DR, Kim YA, et al. Coniferaldehyde inhibits LPS-induced apoptosis through the PKC α/β II/Nrf-2/HO-1 dependent pathway in RAW264.7 macrophage cells [J]. Environ Toxicol Phar, 2016, 48: 85-93.

(收稿日期: 2024-09-09; 修回日期: 2024-10-11)

基于网络药理学探讨欣力康胶囊对 EGFR 依赖性 & 奥希替尼耐药性非小细胞肺癌细胞增殖抑制作用及机制验证

杨灿^{1, 2, 3}, 张丽娜⁴, 刘霞⁴, 赵倩⁴, 胡涛^{1, 2, 3}, 王心悦^{1, 2, 3}, 苏明波^{2, 3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 南通弘焱医药科技有限公司, 江苏 南通 226126; 4. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023)

摘要: **目的** 通过网络药理学和细胞生物行为学实验探究欣力康胶囊 (XLKC) 治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 的主要活性成分及潜在作用机制。**方法** 利用 HERB、Swiss Target Prediction 和 GeneCards 等数据库获取 XLKC 的药物靶点信息和 NSCLC 疾病靶点信息。使用 Cytoscape 软件构建成分-疾病网络和 PPI 网络, 并使用 Metascape 工具进行 GO 和 KEGG 富集分析。分子对接技术评估潜在靶标与生物活性化合物之间的结合亲和力。选择 EGFR 依赖性 NSCLC 细胞 PC9 为研究对象, 利用药物浓度递增法构建奥希替尼耐药 PC9 细胞 (PC9-OR); 使用 MTS 比色法评估 XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞的增殖抑制作用, 采用 Western blot 法开展作用机制研究。**结果** 通过网络药理学方法, 确定了 XLKC 的 777 种活性化合物和 1194 个靶点。在 PPI 网络中, 发现了参与程度较高的靶点, 包括 AKT1 和 MAPK1 等。GO 和 KEGG 富集分析表明, XLKC 主要通过影响 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路、转录调控、复合蛋白磷酸化、激酶活性调控、癌症通路以及 PI3K/Akt 信号通路治疗 NSCLC。分子对接结果表明, 关键靶点与活性成分均具有较好的结合活性。此外, 实验证实 XLKC 可有效抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞的增殖, 促进细胞凋亡; 下调 EGFR 磷酸化水平和蛋白表达水平, 同时可下调 c-MET 蛋白表达水平, 提示其抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞增殖作用可能依赖于 EGFR 和 c-MET 信号通路。**结论** 本研究通过网络药理学确认 XLKC 具有治疗 NSCLC 的潜质, 并利用实验证实 XLKC 可能通过 EGFR 和 c-MET 信号通路, 抑制 EGFR 依赖性 & 奥希替尼耐药性 NSCLC 的细胞增殖, 为探索 XLKC 治疗 NSCLC 的临床应用提供依据。

关键词: 欣力康胶囊; 非小细胞肺癌; 网络药理学; 分子对接; 耐药

中图分类号: R96, R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0129-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.019

Effect of Xinlikang capsules on the proliferation of EGFR-dependent and osimertinib-resistant non-small cell lung cancer and related mechanism based on network pharmacology

YANG Can^{1, 2, 3}, ZHANG Li-na⁴, LIU Xia⁴, ZHAO Qian⁴, HU Tao^{1, 2, 3}, WANG Xin-yue^{1, 2, 3}, SU Ming-bo^{2, 3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Advanced Drug Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Nantong Hongye Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226126; 4. Shanghai Haitian Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Shanghai 200023)

Abstract: Objective To determine the main active ingredients and potential mechanism of Xinlikang capsules (XLKC) in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) through network pharmacology and experimental verification. **Methods** Databases such as HERB, Swiss Target Prediction and GeneCards were used to obtain drug target information and NSCLC disease target information of XLKC. The component-disease network and PPI network were established with Cytoscape software. GO and KEGG analyzes were conducted with Metascape tools. Molecular docking techniques were used to evaluate the binding affinity between potential targets and bioactive

作者简介: 杨灿, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学方面的研究, email: ycccrcrystal@gmail.com * **通信作者:** 苏明波, 男, 正高级工程师, 主要从事中药学、分子生物学方面的研究, email: mbsu@bio-polar.com

compounds. EGFR-dependent NSCLC PC9 cells were selected as the research object, and the drug concentration increasing method was used to establish osimertinib-resistant PC9 cells (PC9-OR). MTS colorimetric assay was used to evaluate the inhibitory effect of XLKC on the proliferation of PC9 and PC9-OR cells. The underlying mechanism of action was explored by Western blot. **Results** Through the network pharmacology, totally 777 active compounds and 1194 targets of XLKC were identified. In the PPI network, targets with high involvement were found, including AKT1 and MAPK1. GO and KEGG analysis showed for XLKC mainly affected the EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance pathway, transcriptional regulation, complex protein phosphorylation, kinase activity regulation, cancer pathways, and PI3K/Akt signaling pathway for treating NSCLC. Molecular docking showed that the key targets and active ingredients had good binding activity. XLKC effectively inhibited the proliferation of PC9 and PC9-OR cells, down-regulated the level of EGFR phosphorylation and the expression levels of EGFR and c-MET proteins in PC9 and PC9-OR cells, indicating that its inhibition on the cell proliferation might depend on the EGFR and c-MET signaling pathways. **Conclusion** XLKC has the potential to treat NSCLC confirmed by network pharmacology. XLKC may inhibit EGFR-dependent and osimertinib-resistant NSCLC through the EGFR and c-MET signaling pathways, providing a basis for further exploring the application of XLKC for NSCLC.

Key words: Xinlikang capsule; non-small cell lung cancer; network pharmacology; molecular docking; drug resistance

根据 GLOBOCAN 2020 的数据显示, 肺癌是全球第二大常见肺癌, 占有新诊断病例的 11.4%^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占所有肺癌发病率的 84%。其侵袭性强和复发性高, 患者五年生存率仅为 15%^[2], 因此, NSCLC 的治疗是亟待解决的难题。目前, 铂类化疗是 NSCLC 患者的主要治疗选择。作为第三代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs), 奥希替尼 (osimertinib) 是带有 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者一线治疗的首选药物^[3]。尽管 EGFR-TKIs 能显著提高患者的总生存率并降低化疗带来的毒性^[4], 但仍有一些问题无法避免, 大多数患者在治疗后仍出现疾病进展, 甚至出现获得性耐药^[5-6]。因此, 发现安全有效的 NSCLC 治疗方法和耐药性解决方案迫在眉睫。

中药医治疗肿瘤已有两千多年的历史, 最早在《黄帝内经》中记载了肿块、积聚、乳石和骨疽等肿瘤相关疾病^[7]。此外, 中医药治疗肿瘤具有多靶点和多途径的特点。欣力康胶囊 (Xinlikang capsule, XLKC) 是一种源于贵州苗族传统经验疗法的中药制剂, 在癌症放化疗的辅助治疗中具有潜在疗效。XLKC 由半枝莲、黄芪、当归、龙葵、郁金、红参、蛇莓、雪莲花、轮环藤根和丹参组成, 具有补气、养血、化痰和解毒的功效, 对实体肿瘤的放疗和化疗有辅助作用, 可提高疗效, 防止肺癌等多种实体肿瘤的复发和转移。已有研究表明, XLKC 可抑制 STAT3 通路和 NF- κ B 通路的激活,

延长肺癌小鼠的生存期, 抑制肿瘤的生长、增殖、迁移和侵袭^[8-9]。然而, XLKC 治疗肺癌的潜在抗肿瘤靶点和机制仍不清楚。

1 材料

1.1 细胞株

PC9 细胞系 (人类 NSCLC) 来自美国模式培养物研究所 (ATCC), 使用添加 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基培养, 细胞置于 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中。

1.2 试剂

XLKC (贵阳新天药业股份有限公司, 批号: 20220601, 规格: 0.45 g/粒); 顺铂 (上海皓元生物医药科技有限公司, 批号: 39445, 规格: 100 mg); 奥希替尼 [阿拉丁试剂 (上海) 有限公司, 批号: G2229048V]; RPMI-1640 (Cytiva 公司); FBS (Sigma 公司); CellTiter 96 Aqueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (MTS, Promega 公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (翌圣生物公司); EGFR 抗体、p-EGFR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 公司); MET 抗体 (Thermo Fisher Scientific 公司); AKT、p-AKT、ERK1/2、p-ERK1/2、GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology 公司)。

1.3 仪器

细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司); 垂直高压电泳系统 (Bio-Rad 公司); 快速湿转仪 (南京金斯瑞生物公司); 水平脱色摇床 (其林贝尔仪器有限公司); 多功能酶标仪 (PerkinElmer 公司); 高速冷冻微型离心机 (Scilogex 公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 XLKC 中的活性化合物和靶标的获取 通过 HERB 数据库^[10]检索 XLKC 药物活性成分, 通过有机小分子生物活性数据库 PubChem^[11]获得活性成分相应的典型 SMILES 结构。其次, 将从 PubChem 获得的 SMILES 结构导入 SwissADME 数据库^[12]中, 对药物结构进行预测, 通过 5 种评估 Drug-likeness 的方法筛选得到合格的 XLKC 活性成分。经数据库检测共得到 XLKC 活性成分 777 个, 其中丹参 166 个, 半枝莲 97 个, 当归 169 个, 红参 36 个, 蛇莓 2 个, 轮环藤 13 个, 郁金 172 个, 雪莲花 9 个, 黄芪 68 个和龙葵 45 个。

将筛选得到的化合物 SMILES 结构导入 Swiss Target Prediction 数据库, 得到所选化合物对应靶标蛋白的 UniProt ID, 利用 Uniport 数据库^[13]的 IDmapping 工具转换成 Gene Symbol, 去除重复项后得到 1194 个活性靶点。

2.1.2 NSCLC 相关靶标的获取 以“non-small cell lung cancer”为检索词, 从 GeneCards^[14] (Score > 50)、Drugbank^[15]、Pharmgkb^[16]、CTD^[17] (Inference Score > 30) 和 Disgenet 数据库收集疾病相关靶点, 删除重复项后, 利用 UniProt 数据库校正, 得到疾病相关靶点 1150 个。借助 Venny 在线分析工具将活性成分靶点与疾病相关靶点取交集, 得到 294 个交集靶点。

2.1.3 蛋白互作 (PPI) 网络的构建与分析 将得到的交集靶点导入 STRING 数据库^[18], 物种限定为“Homo sapiens”, 交互分数限定为 > 0.9, 绘制 PPI。使用 Cytoscape 3.9.1 软件将结果进行可视化分析, 并通过 CytoHubba 插件筛选出关键靶点。PPI 网络图包括 294 个节点, 1443 条边, 平均节点度是 9.82, 平均局部聚类系数是 0.521, PPI 富集 $P < 1.0 \times 10^{-16}$, 提示靶点间相互作用较强。如图 1 所示, 在这些靶点中, 肿瘤蛋白 p53 (TP53)、酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC)、蛋白激酶 B (AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 有相对较高的数值, 可能为 XLKC 治疗 NSCLC 的最主要核心靶点。

2.1.4 GO 功能注释和 KEGG 富集分析 将上述交集靶点导入 Metascape 数据库进行 GO 和 KEGG 通路富集分析限定物种为“Homo sapiens”, 设定参数为默认值, 并利用 R 语言 ggplot2 进行可视化作图。

GO 功能富集分析共得到 3023 个结果, 其中 2585 个结果主要与生物过程 (BP) 中的蛋白磷酸化、激酶活性调控和细胞迁移正调控有关, 148 个结果主要与细胞组分 (CC) 中的受体复合物、黏附位点和细胞基质连接有关, 289 个结果

主要与分子功能 (MF) 中的磷酸转移酶活性、作为受体的醇类和蛋白酪氨酸激酶活性有关。这表明, 蛋白磷酸化、激酶活性的生物学过程和信号通路可能是 XLKC 治疗 NSCLC 的最重要机制之一。如图 2 所示, 按 P 值从高到低的顺序排列前 10 位, 并以条形图显示。

KEGG 通路富集分析表明, 最终得到 209 条通路, 按富集得分从高到低排列, 气泡大小表示通路中基因的数量, 主要涉及癌症通路 (pathways in cancer)、PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、细胞衰老 (cellular senescence)、细胞凋亡 (apoptosis)、肿瘤中的蛋白质聚糖 (proteoglycans in cancer) 等, 结果如图 3 所示。

2.1.5 EGFR-TKIs 耐药途径 - 靶点 - 活性成分网络构建 KEGG 富集结果显示, 富集最大值的信号通路为 EGFR-TKIs 耐药途径, 且 EGFR-TKIs 治疗是目前治疗 EGFR 基因突变的 NSCLC 的一线治疗标准。然而, 几乎所有患者最终都会因对靶向药物产生获得性耐药而导致疾病进展。在此基础上使用 Cytoscape 3.9.1 构建的“EGFR-TKIs 耐药途径 - 靶点 - 活性成分”网络图显示 (见图 4), 共有 91 个节点和 549 条边。通过分析发现, 表 1 中这些有效成分最有可能成为治疗 EGFR TKIs 耐药的核心成分, 而 EGFR、KDR、GSK3B 和 MET 是核心靶点前 4 位, 可以初步认为, XLKC 主要通过有效成分调控这些核心靶点产生作用。

2.1.6 分子对接 使用分子对接来评估已鉴定药物与其靶点之间的结合强度。根据在 PPI 网络中获得的度值 (Degree), 选择前 4 个相关靶点和前 10 个分子进行分子对接。在 TCMSP 数据库下载 4 个化合物的三维结构 mol2 文件, 在 OpenBabel 中将 mol2 文件转换成 pdb 文件格式。以关键靶点为受体, 受体的 pdb 文件在 RCSB Protein Data Bank 数据库中获取。在 Autodock Tools 中获取包含蛋白质残基的蛋白质口袋参数, 采用拉马克遗传算法运行 Autodock Vina 分别将化合物配体与蛋白质口袋进行对接, 统计记录对接分数, 见图 5。结果显示, 化合物与靶点的结合能均小于 $-20.93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明这些蛋白质可能是化合物的潜在结合靶点。

将 EGFR 和 c-MET 对接分数前 3 的结果使用 pymol2.3 绘制 3D 结构, 见图 6。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 PC9 奥希替尼耐药 (PC9-OR) 细胞系的建立 本研究利用药物浓度递增法构建 PC9-OR 细

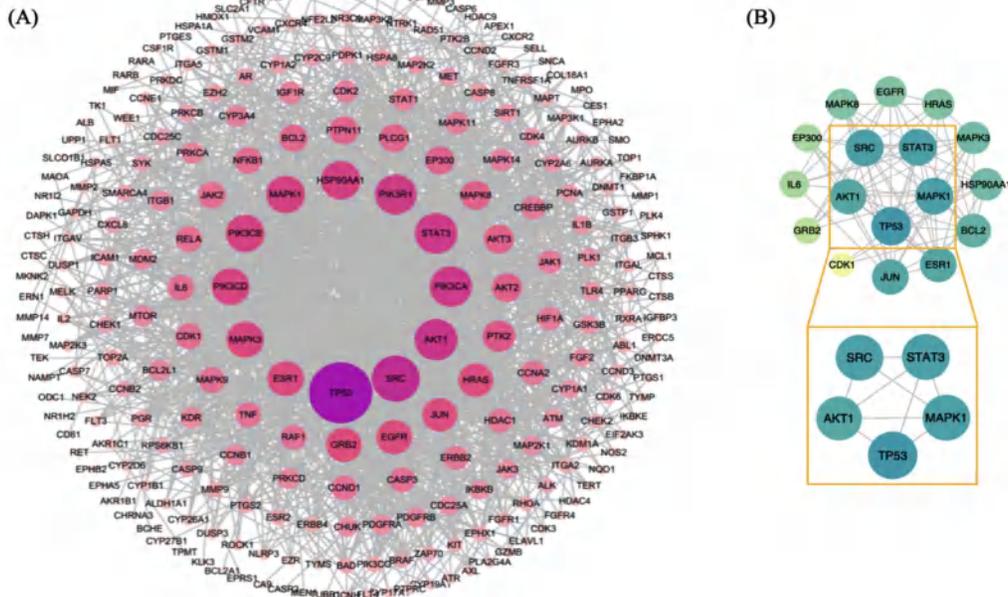


图 1 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的 PPI 网络分析图

Fig 1 PPI network at intersection targets of XLKC for NSCLC

A. XLKC 与 NSCLC 靶点的 PPI 网络 (PPI network of XLKC and NSCLC targets); B. 根据 DC 和 BC 和 Hub 插件筛选出的核心靶点 (core targets analyzed based on DC and BC and Hub plugin)

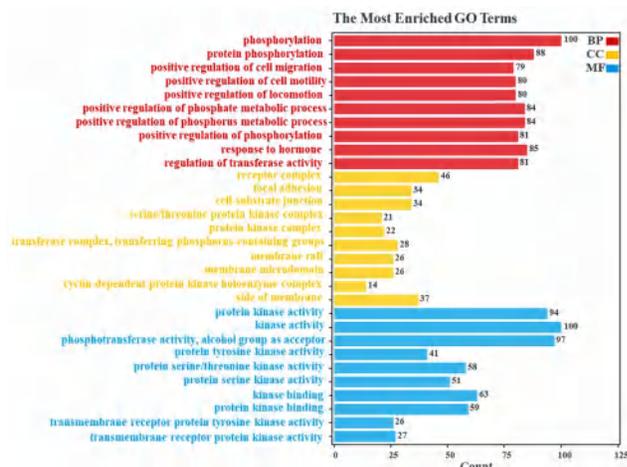


图 2 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的潜在靶点的 GO 富集分析柱状图

Fig 2 GO enrichment analysis of potential targets of XLKC for NSCLC

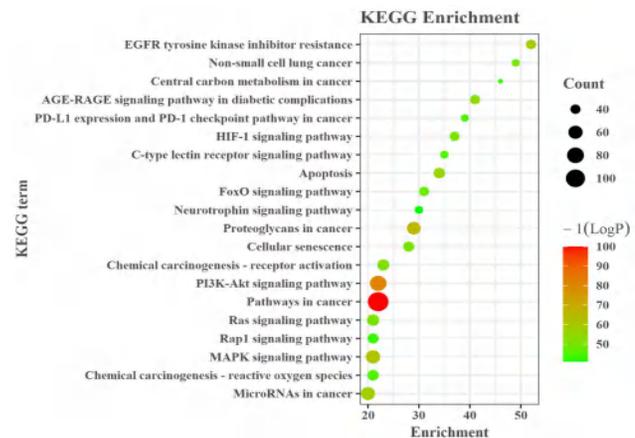


图 3 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的潜在靶点的 KEGG 富集分析状图

Fig 3 KEGG enrichment analysis of potential targets of XLKC for NSCLC

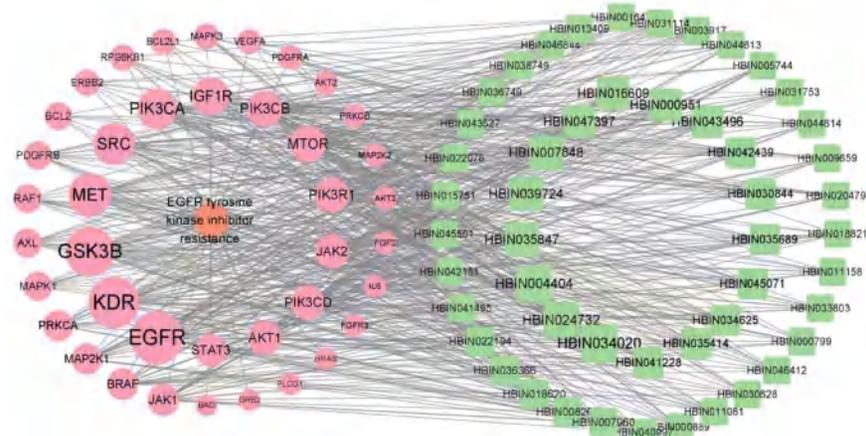


图 4 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的“EGFR-TKI 耐药途径 - 靶标 - 活性成分”相互作用网络构建图

Fig 4 Network of “EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance passway-target-compound” of XLKC for NSCLC

表 1 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的核心化合物信息

Tab 1 Core compound information of XLKC for NSCLC

Ingredient ID	化合物名称	度值
HBIN034020	(+)-南烛木树脂酚 [(+)-lyoniresinol]	50
HBIN024732	5-羟基-7-(4-羟基苯基)-1-苯基-3-庚酮 [(E)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-1-heptene]	45
HBIN004404	2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟基丙基)-7-甲氧基-3-苯并呋喃甲醛 [2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofurancarboxaldehyde]	45
HBIN007848	3,9-二甲氧基紫檀烷 (3,9-di-O-methylisissolin)	40
HBIN035847	消旋微凸剑叶莎酚 (mucronulatol)	40
HBIN039724	叶下珠脂素 (phyllanthin)	40
HBIN043496	半枝莲碱 K (scutabarbatine K)	35
HBIN000951	12-O-烟酰异厚果 (12-O-nicotinoylisolineolone)	35
HBIN016609	牛蒡子苷元 (arctigenin)	35
HBIN047397	turricolol E	35

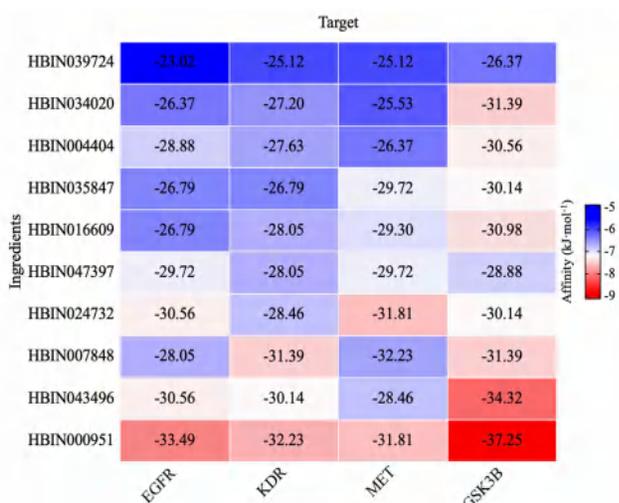


图 5 欣力康胶囊治疗 NSCLC 的靶标与化合物的对接得分热图

Fig 5 Docking score heatmap of the targets and compounds of XLKC for NSCLC

胞株, 使用 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥希替尼 (PC9 细胞的 IC_{50}) 处理 24 h, 收集细胞并更换不含药物的培养基, 恢复生长后测试细胞的 IC_{50} 逐渐增加奥希替尼作用浓度, 如此周期循环最终获得耐药细胞株, 传代时加入 $500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥希替尼维持, 即得 PC9-OR 细胞系。其耐药指数 (RI) 大于 400, 见图 7。

2.2.2 XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞增殖作用的影响 取对数生长期 PC-9 和 PC9-OR 细胞, 以 500 个/孔接种于 96 孔培养板, XLKC 和奥希替尼梯度稀释至适宜浓度加入细胞, 每个浓度设 3 个复孔。在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 72 h 后, 每孔中加入 MTS 试剂 $20 \mu\text{L}$, 37°C 下孵育 2 h, 混匀后用酶标仪测定波长 490 nm 和参比波长 690 nm 处的光密度 (OD) 值, $OD = OD_{490} - OD_{690}$ 。计算细胞存活率 (%) = (加药细胞组 OD - 空白组

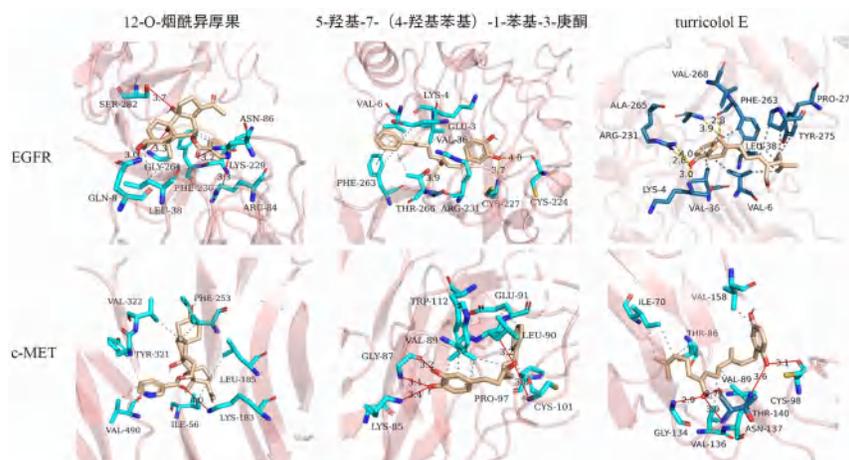


图 6 EGFR 和 c-Met 分子对接细节图

Fig 6 Detailed view of EGFR and c-Met molecular docking

OD) / (对照细胞孔 OD - 空白组 OD) $\times 100\%$, 使用 Graphpad Prism 8 软件拟合曲线并计算 IC_{50} 值。结果显示, XLKC 具有抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞增殖的能力, 其 IC_{50} 分别为 (163.80 ± 4.78) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 (162.43 ± 8.42) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见图 8。

2.2.3 XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞 EGFR/AKT/ERK 蛋白磷酸化的影响 取对数生长期 PC-9 和 PC9-OR 细胞, 接种于 12 孔板中。药物处理 2 h 后, 收集 PC-9 和 PC9-OR 细胞进行 SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5

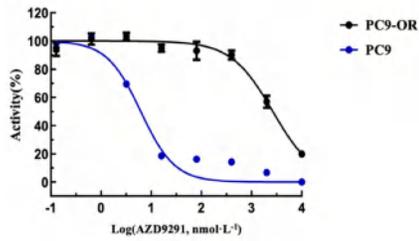


图 7 奥希替尼对 PC9 和 PC9-OR 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 7 Effect of osimertinib on the proliferation of PC9 and PC9-OR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

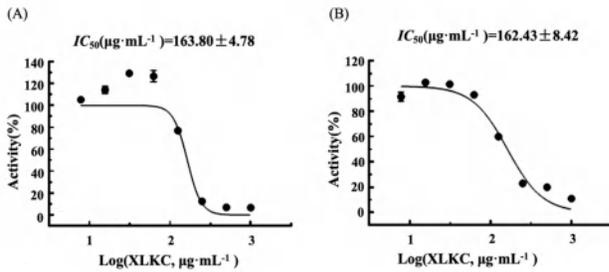


图 8 XLKC 对 PC9 (A) 和 PC9-OR (B) 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 8 Effect of XLKC on the proliferation of PC9 (A) and PC9-OR (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

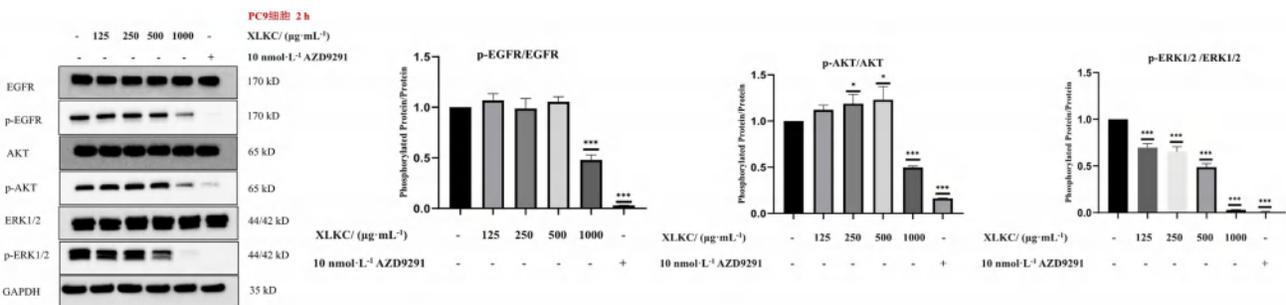


图 9 XLKC 对 PC9 细胞 EGFR、AKT 和 ERK 磷酸化蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 9 Effect of XLKC on EGFR, AKT and ERK phosphorylated protein expression in PC9 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
注: 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。
Note: Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

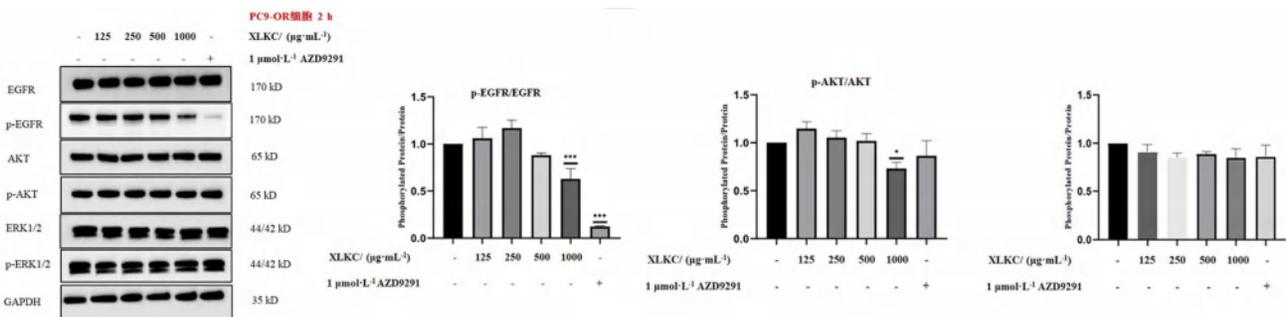


图 10 XLKC 对 PC9-OR 细胞 EGFR、AKT 和 ERK1/2 磷酸化蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 10 Effect of XLKC on EGFR, AKT and ERK1/2 phosphorylated protein expression in PC9-OR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
注: 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。
Note: Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

AKT 和 ERK1/2 的蛋白表达水平, 见图 11。在 PC9-OR 细胞上, 奥希替尼给药组没有显著下调蛋白, 对比 DMSO 组, XLKC 可剂量依赖性下调 EGFR 的蛋白表达水平, 高浓度 XLKC 能显著下调 c-MET、

h, 加入一抗 4℃ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次后加入相应二抗室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次后加入 ECL 显影液, 置于凝胶成像仪进行曝光。

结果显示, 奥希替尼可下调 PC9 细胞中 EGFR、AKT 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平; 与二甲基亚砜 (DMSO) 组相比, 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XLKC 可下调 PC9 细胞中 EGFR 和 AKT, 且 XLKC 剂量依赖性下调 ERK1/2 蛋白磷酸化水平, 见图 9。

1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XLKC 给药组与奥希替尼组一样能够抑制 PC9-OR 细胞 EGFR 磷酸化, 但不能抑制 AKT 和 ERK1/2 蛋白磷酸化, 见图 10。

2.2.4 XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 蛋白表达的影响 采用 Western blot 法检测 PC9、PC9-OR 细胞系经 48 h 药物处理后 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 蛋白的表达。药物处理 48 h 后, 在 PC9 细胞上, 对比 DMSO 组, XLKC 可以剂量依赖性降低 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 的蛋白表达水平; 对比奥希替尼给药组, 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XLKC 可以降低 EGFR、c-MET、

AKT 和 ERK1/2 的蛋白表达水平, 见图 12。提示 XLKC 通过可能参与下调 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 的表达来抑制 PC9-OR 细胞的增殖。

2.2.5 统计学方法 使用 GraphPad Prism 8 软件

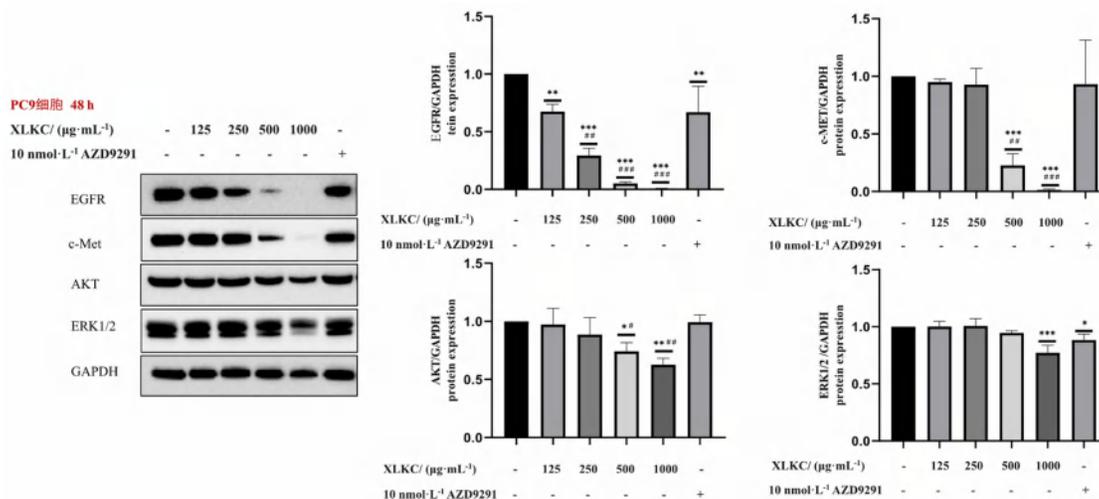


图 11 XLKC 对 PC9 细胞 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 11 Effect of XLKC on EGFR, c-MET, AKT and ERK1/2 protein expression in PC9 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 DMSO 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与奥希替尼组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the osimertinib group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

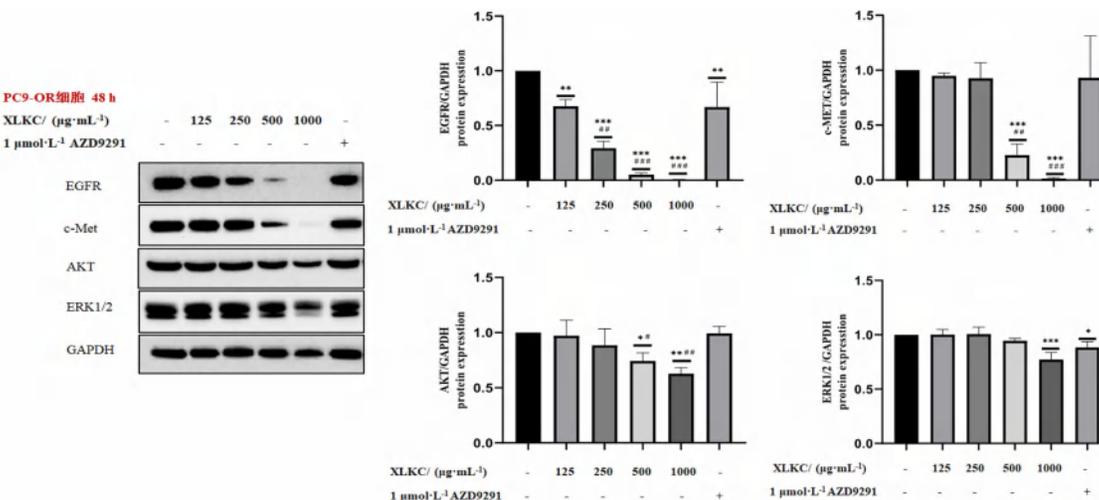


图 12 XLKC 对 PC9-OR 细胞 EGFR、c-MET、AKT 和 ERK1/2 蛋白影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 12 Effect of XLKC on EGFR, c-MET, AKT and ERK1/2 protein expression in PC9-OR cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 DMSO 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与奥希替尼组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the osimertinib group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

进行数据统计分析。实验重复 3 次，结果采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计学描述，多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

XLKC 为源自贵州苗族的传统经验疗法，在肺癌放化疗的辅助治疗中具有一定的疗效，但其潜在的抗肿瘤靶点和作用机制尚不明确，且研究较少 [19-21]。因此，本文采用网络药理学和分子对接的方法，探究 XLKC 治疗 NSCLC 的潜在靶点和作用机制，为其临床应用于 NSCLC 治疗中提供科学理论基础。

3.1 网络药理学分析

网络药理学研究发现，NSCLC 和 XLKC 有 294 个共同靶点。这些靶点被认为是 XLKC 治疗 NSCLC 的潜在靶点。PPI 网络的结果显示，TP53、SRC、AKT1、MAPK1 和 STAT3 是核心靶点。其中 MAPK1、AKT1 与肿瘤细胞的增殖、生长、分化和迁移等生物学过程相关 [22]。

GO 功能注释和 KEGG 富集分析结果表明 XLKC 抑制 NSCLC 的作用靶标主要富集在 EGFR-TKIs 耐药通路、PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、细胞衰老信号通路和癌症信号通路。其中 EGFR-TKIs 耐药通路富集程度最高，该通路中的

重要靶标 EGFR、AKT 和 MAPK 均为 PPI 网络中的核心蛋白。

EGFR 蛋白广泛分布于人体各组织的细胞膜上, 可与细胞表面的生长因子结合, 进行信号传导, 并调节细胞的生长、分裂和修复。EGFR 常在肿瘤细胞中过度激活, 导致细胞周期失调, 与肿瘤细胞增殖和抑制细胞凋亡等有关^[23-24]。EGFR 下游通路包括 MAPK 通路和 PI3K/Akt 通路^[25-26], 其中 PI3K/Akt 通路和 MAPK 信号通路都与细胞增殖、凋亡有关^[27-28]。ERK1/2 是 MAPK 家族的重要成员, 磷酸化的 ERK1/2 进入细胞核, 激活多种转录因子, 调控基因表达, 控制各种生理过程。因此, EGFR-TKIs 耐药通路可能是 XLKC 抑制 NSCLC 及 EGFR-TKIs 耐药的重要通路。

分子对接证明 EGFR-TKIs 耐药信号通路中 EGFR 和 MET 等蛋白与分子之间均有较高的结合能, 其分子间可形成稳定的氢键, 说明 XLKC 中潜在化合物能与 EGFR 和 MET 等蛋白稳定结合, 进一步证实了 XLKC 可能通过 EGFR-TKIs 耐药通路发挥治疗 NSCLC 及 EGFR-TKIs 耐药的作用。

3.2 XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞的作用机制研究

近年来研究发现, EGFR-TKIs 获得性耐药涉及两个关键机制: EGFR 耐药突变和 MET 基因扩增。EGFR 耐药突变通过降低药物对 EGFR 蛋白的活性抑制能力, 而 MET 扩增则通过在 EGFR-TKIs 存在的情况下建立旁路途径来诱导 EGFR-TKIs 的耐药性^[29]。双抗可以解决单靶点药物耐药率高的问题, 选择 EGFR/c-Met 双靶点作双抗, 可以靶向作用于 EGFR 耐药突变、MET 突变和扩增的 NSCLC 细胞, 其应用前景广阔。从 2020 年 6 月美国癌症研究协会 (AACR) 上公开的双抗分子 EMB-01 临床前研究数据来看^[30], EMB-01 同时识别和结合肿瘤细胞表面的 EGFR 和 c-Met, 并诱导各种肿瘤细胞中两个靶标受体的共降解。与单抗相比, EMB-01 显示出对 EGFR 和 c-Met 通路下游信号更广泛的抑制, 以及在各种患者来源肿瘤异种移植 (PDX) 模型中具有更有效和更持久的体内抗肿瘤功效。而中医药在治疗疾病的过程中, 具有多靶点、多通路的特点, 因此, 对于 XLKC 是否能够抑制 EGFR 和 c-MET 两个靶标信号通路激活值得深究。

基于此, 本研究构建了 PC9-OR 细胞系以探究 XLKC 抑制 EGFR-TKIs 耐药 NSCLC 的作用机制。采用 MTS 法验证了 XLKC 能够抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞的增殖。其中奥希替尼对于两种细胞的增殖抑制能力差异明显, 其对于 PC9-OR 细胞抑制能力显著下降, 而 XLKC 对于两种细胞的 IC_{50} 值接近, 说明 XLKC 对于耐药细胞也具有相

同的抑制作用, 提示 XLKC 具有扭转 NSCLC 奥希替尼耐药的潜力。

而蛋白质磷酸化作为调控蛋白功能及活性的关键机制, 可有效影响信号的传导。本研究进一步通过 Western blot 实验表明, XLKC 可以抑制 PC9-OR 和 PC9 细胞的 EGFR 磷酸化, 且抑制 PC9 细胞的 AKT 和 ERK 磷酸化; 但未在 PC9-OR 细胞上观察到 XLKC 抑制下游 AKT 和 ERK 蛋白磷酸化。说明 XLKC 抑制 PC9-OR 细胞增殖可能通过其他方式实现, 因此观察了 XLKC 长时间处理对细胞本底蛋白的表达影响。

由于药物短时间作用后可对细胞的磷酸化水平产生影响, 为了进一步探索 XLKC 作用较长时间后细胞本底蛋白是否会发生变化, 本研究延长药物作用时间至 48 h。通过 Western blot 检测相关蛋白表达水平的变化, XLKC 对 PC9 和 PC9-OR 细胞均表现出对 EGFR、AKT 和 ERK1/2 蛋白水平下调的能力, 同时可下调奥希替尼耐药相关蛋白 MET 的表达水平, 提示 XLKC 可以从 EGFR、AKT、ERK1/2 和 MET 的蛋白及其磷酸化调控实现对 PC9 和 PC9-OR 细胞的增殖抑制。

本研究也存在一些局限性, 因为现有的药物和基因数据库可能并不完整, 降低了预测结果的可信度。此外, XLKC 的确切生物活性成分还需要进一步研究; XLKC 对 NSCLC 的其他影响, 如侵袭和转移, 也需要进一步研究。对于 XLKC 下调 EGFR 和 c-Met 的蛋白水平的具体机制还需要继续探索。尽管如此, 本研究结果初步提供了有关 XLKC 在 NSCLC 治疗中发挥重要作用的重要信息, 并表明 XLKC 可能是治疗 EGFR 敏感性及 EGFR-TKIs 获得性耐药的 NSCLC 的一个有希望的候选药物。

综上所述, 本研究利用网络药理学、分子对接技术和细胞生物行为学实验验证相结合, 探讨了 XLKC 治疗 NSCLC 的潜在靶点和作用机制。细胞实验证实 XLKC 可有效抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞的增殖, 下调 EGFR 磷酸化水平和蛋白表达水平及 c-MET 蛋白表达水平, 提示其抑制 PC9 和 PC9-OR 细胞增殖作用可能依赖于 EGFR 和 c-MET 信号通路。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Yang SR, Schultheis AM, Yu H, et al. Precision medicine in non-small cell lung cancer: current applications and future directions [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 84: 184-198.
- [3] Cheng Y, He Y, Li W, et al. Osimertinib versus comparator

- EGFR TKI as first-line treatment for EGFR-mutated advanced NSCLC: FLAURA China, a randomized study [J]. *Target Oncol*, 2021, 16 (1): 165-176.
- [4] Lee DH. Treatments for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): the road to a success, paved with failures [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 1-21.
- [5] Fu K, Xie FC, Wang F, et al. Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 173.
- [6] Rebuzzi SE, Alfieri R, La Monica S, et al. Combination of EGFR-TKIs and chemotherapy in advanced EGFR mutated NSCLC: review of the literature and future perspectives [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 146: 102820.
- [7] 张传龙, 高梦琦, 姜晓晨, 等. 基于《黄帝内经》“四时五行” 思辨恶性肿瘤扶正培本治则 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38 (3): 960-963.
- [8] 王青, 阙祖俊, 田建辉. 欣力康胶囊对 Lewis 肺癌模型小鼠生存期的影响及作用机制初探 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2019, 25 (2): 182-186.
- [9] 顾红勇, 林鹏修, 胡劲, 等. 欣力康提取物调控 STAT3/NF- κ B 信号通路对膀胱癌细胞增殖、迁移的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (4): 888-891.
- [10] Fang SS, Dong L, Liu L, et al. HERB: a high-throughput experiment-and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (D1): D1197-D206.
- [11] Kim SS, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2023 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51 (D1): D1373-D1380.
- [12] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 42717.
- [13] Coudert E, Gehant S, De Castro E, et al. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI [J]. *Bioinformatics*, 2022, 39 (1): 793.
- [14] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54 (20): 1.30.1-1.30.33.
- [15] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (D1): D1074-D1082.
- [16] Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, et al. An evidence-based framework for evaluating pharmacogenomics knowledge for personalized medicine [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110 (3): 563-572.
- [17] Davis AP, Wieggers TC, Johnson RJ, et al. Comparative toxicogenomics database (CTD): update 2023 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51 (D1): D1257-D1262.
- [18] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 49 (D1): D605-D612.
- [19] 李定祥, 张飞, 张杰. 复方中药欣力康治疗胃癌 30 例 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15 (14): 102-103.
- [20] 李定祥, 张飞, 张杰. 欣力康颗粒联合化疗治疗癌症的 20 例 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15 (16): 106-108.
- [21] 袁一帆, 翟范. 欣力康治疗中晚期癌症 68 例 [J]. *中医杂志*, 2002 (9): 694.
- [22] Papini F, Sundaresan J, Leonetti A, et al. Hype or hope-Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 166: 103454.
- [23] Stock-Martineau S, Shepherd FA. EGFR tyrosine kinase inhibitor monotherapy should remain the standard first-line treatment in advanced EGFR-mutant NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16 (11): 1793-1797.
- [24] Wang QM, Yang S, Wang K, et al. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12 (1): 63.
- [25] Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by mutations: the predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12 (4): 612-623.
- [26] Da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 49-69.
- [27] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer [J]. *Gene*, 2006, 366 (1): 2-16.
- [28] Qian X, Bi QY, Wang ZN, et al. Qingyihuaiji formula promotes apoptosis and autophagy through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on pancreatic cancer in vivo and in vitro [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116198.
- [29] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. *Science*, 2007, 316 (5827): 1039-1043.
- [30] Ren F, Wu X, Yang DD, et al. EMB-01: an innovative bispecific antibody targeting EGFR and cMet on tumor cells mediates a novel mechanism to improve anti-tumor efficacy [J]. *Cancer Res*, 2020, 80: 520-528.

(收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-07-08)

龙藤复方对类风湿关节炎大鼠模型的治疗作用研究

刘皓玲¹, 赵一颖¹, 赵驿歌¹, 高凯瑞¹, 韩冰², 孙文燕^{1*}, 张硕峰^{1*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.黑龙江济仁药业有限公司, 哈尔滨 150025)

摘要: **目的** 观察龙藤复方对佐剂型关节炎(AA)大鼠足跖肿胀度、关节炎指数(AI)、血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6水平和踝关节病理学的影响。**方法** 66只SD大鼠随机分为正常组,模型组,阳性药雷公藤多苷片组($9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),龙藤复方低剂量组($0.435\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),龙藤复方中剂量组($0.87\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)及龙藤复方高剂量组($1.74\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。于大鼠左后足跖皮内注射弗氏完全佐剂(CFA)致炎建立AA模型,致炎后第15日各给药组按剂量灌胃给药。于实验d1、d7、d14、d21、d28对各组大鼠进行AI评分,计算足跖肿胀度。实验d28处死大鼠,腹主动脉取血,离心后得到血清,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清中TNF- α 、IL- 1β 、IL-6水平,取踝关节HE染色观察病理变化。**结果** 给药14d(造模28d)后,与模型组大鼠比较,龙藤复方各剂量组及雷公藤多苷组AI评分,足跖肿胀度,血清TNF- α 、IL-6、IL- 1β 含量明显降低($P < 0.05$ 或 0.01);龙藤复方中、低剂量组和阳性药组均明显改善踝关节病理变化。**结论** 龙藤复方对AA大鼠具有治疗作用,作用机制与其降低血清中TNF- α 、IL- 1β 、IL-6水平,改善踝关节病理损伤有关。

关键词: 龙藤复方; 类风湿关节炎; 弗氏完全佐剂

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0138-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.020

Therapeutic effect of Longteng compound on the rat model of rheumatoid arthritis

LIU Hao-ling¹, ZHAO Yi-ying¹, ZHAO Yi-ge¹, GAO Kai-rui¹, HAN Bing², SUN Wen-yan^{1*}, ZHANG Shuo-feng^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Heilongjiang Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 150025)

Abstract: Objective To determine the effect of Longteng compound on foot-plantar swelling, arthritis index, serum tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukins (IL)- 1β , IL-6 levels and ankle joint pathology in rats with adjuvant arthritis. **Methods** Totally 66 SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a positive drug tripterygium glycosides group ($9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), a low-dose Longteng compound group ($0.435\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), a medium-dose Longteng compound group ($0.87\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a high-dose Longteng compound group ($1.74\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Inflammation was induced by intradermal injection of Freund's complete adjuvant (CFA) into the left hindfoot of the rats, resulting in an adjuvant arthritis model, and the drug was administered by gavage to each group at the corresponding dose on the 15th day of the inflammation period. The arthritis index was scored on d1, d7, d14, d21, and d28, and the swelling of the plantar foot was measured. The rats were sacrificed on d28. Blood was collected from the abdominal aorta and centrifuged to obtain the serum. The levels of TNF- α , IL- 1β , and IL-6 in the serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the ankle joints were taken to observe the pathological changes by HE staining. **Results** After 14 d of drug administration (28 d of modeling), the index scores, foot-plantar swelling, and the serum TNF- α ,

作者简介: 刘皓玲,女,硕士研究生,主要从事中药呼吸药理、中药抗炎药理研究, email: Liuhaoling00@163.com *通信作者: 孙文燕,男,副教授,主要从事中药抗炎与免疫药理、中药毒理研究, email: sunwy@bucm.edu.cn; 张硕峰,男,教授,主要从事中药神经药理学研究, email: shuofengzhang@sina.com

IL-6, and IL-1 β levels were significantly reduced in all dose groups of Longteng compound and tripterygium glycosides when compared with those of the model group ($P < 0.05$ or 0.01). The ankle joint pathology was improved in the medium-dose, and low-dose Longteng compound groups and the positive group. **Conclusion** Longteng compound has therapeutic effect on rats with adjuvant arthritis, and the mechanism may be related to its reduction of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the serum and improvement in the pathological damage of ankle joints.

Key words: Longteng compound; rheumatoid arthritis; Freund's complete adjuvant

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性炎症, 主要涉及滑膜炎和滑膜血管翳的形成^[1], 严重时造成关节和关节软骨破坏。RA 见于各年龄段和各地区, 通常在 30 ~ 35 岁多发。与男性相比, 女性对 RA 的易感性高出 2 ~ 3 倍, 且进展速度更快, 更严重^[2]。目前西医临床常用的治疗 RA 的药物有低剂量的糖皮质激素、非甾体抗炎药、阿片类药物和辅助药物等, 但服用药物后仍有部分 RA 患者的症状无法缓解, 药物减量后病情复发, 且伴随有不良反应产生。中药治疗 RA 具有多靶点、标本兼治、不良作用相对较少的特点。龙藤复方是由青风藤、海风藤、忍冬藤、鸡血藤、穿山龙、地龙、岩白菜、蜂房、蜈蚣九味药组成, 为国医大师卢芳教授治疗 RA 的临床经验方, 临床疗效肯定, 但其作用机制尚不清楚。本研究通过复制佐剂型关节炎 (AA) 模型, 观察龙藤复方对 AA 大鼠的干预作用, 为其进一步临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 66 只, 体重 170 ~ 190 g, 雄性 [北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010, 质量合格证号: 1103242311 02706123]。实验期间保持环境相对湿度约为 42%, 温度为 24 $^{\circ}\text{C}$, 光照/黑暗周期为 12 h, 自由摄食和饮水。本研究获得北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会批准, 批件号: BUCM-1-2024042501-0005。

1.2 试药

龙藤复方 (黑龙江济仁药业有限公司, 粉剂, 批号: 20230301, 1 g 相当于 9.3 g 生药, 成人 1 日服用生药量 80.91 g), 给药时药物以羧甲基纤维素钠充分溶解, 按照人日剂量换算大鼠的等效剂量 (灌胃量 $0.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。雷公藤多苷片 (亿帆药业, 批号: 220504, 给药质量浓度为 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。弗氏完全佐剂 (CFA, 美国 Sigma 公司, 批号: SLCD6299);

肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、白细胞介素 (IL) -6、IL-1 β 试剂盒 (江苏科特生物科技有限公司, 货号分别为 KT2923-A、KT3066-A、KT3056-A); 二甲苯、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司); EDTA 脱钙液 (Servicebio, G1105)。

1.3 仪器

YLS-7B 大鼠足跖容积测量仪 (济南益延科技发展有限公司); 华卫德朗 DR-200BS 酶标分析仪 (无锡华卫德朗仪器有限公司); Thermo Multiskan MK3 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 脱水机 (DIAPATH, 型号: Donatello); JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台 (武汉俊杰电子有限公司); 恒温摇床 (Blabotery, 型号: ZHPW-250); 电子秤 (Electronic, 型号: SF-400)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组、模型组、阳性药雷公藤多苷片组 ($9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、龙藤复方低剂量组 ($0.435 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、龙藤复方中剂量组 ($0.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、龙藤复方高剂量组 ($1.74 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。除正常组外, 其余各组大鼠均于左后足跖皮内注射 CFA 0.1 mL 致炎, 复制佐剂诱导的关节炎大鼠模型。正常组皮内注射等量生理盐水。大鼠致炎后第 15 日各给药组按剂量灌胃给药, 灌胃体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 14 d。正常组及模型组灌胃等体积羧甲基纤维素钠溶液。各组大鼠末次给药后禁食禁水 12 h。

2.2 关节炎指数评分

于实验 d7、d14、d21、d28 对各组大鼠进行关节炎指数 (AI) 评分。评分标准^[3]: 0 分为正常; 1 分为踝关节出现红斑和轻微肿胀; 2 分为踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀; 3 分为踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和中度肿胀; 4 分为踝关节到跖关节出现红斑和重度肿胀。

2.3 足跖肿胀度测定

采用足跖容积测量仪于实验 d1、d7、d14、d21、d28 测量各组大鼠的左后足 (原发侧) 足跖

体积，根据 d1 的足跖体积计算 d7、d14、d21、d28 足跖肿胀度。计算公式为：足跖肿胀度 = 致炎后足跖体积 - 致炎前足跖体积。

2.4 标本采集

于末次给药 24 h 后，用 1.5% 戊巴比妥钠溶液 3.3 mL · kg⁻¹ 腹腔注射麻醉大鼠，腹主动脉取血，4 °C、4000 r · min⁻¹ 离心 10 min，收集血清。

2.5 血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平测定

取各组大鼠血清，按试剂盒说明书，采用 ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量。

2.6 踝关节病理学观察

收集大鼠的原发侧完整踝关节，4% 多聚甲醛固定，脱水，石蜡包埋，切片，苏木素 - 伊红 (HE) 染色，显微镜下观察各组大鼠踝关节组织病理变化。评分标准如下^[3]：

① 滑膜内衬层次变化：单层记 0 分，2 ~ 3 层记 1 分，3 ~ 4 层记 2 分，≥ 4 层记 3 分；② 炎性细胞浸润情况：极少量浸润记 0 分，少量浸润记 1 分，较多量浸润记 2 分，严重程度浸润记 3 分；③ 血管扩张增生情况：极少量闭合血管记 0 分，较少量闭合血管记 1 分，中度闭合血管记 2 分，重度闭合血管记 3 分；④ 软骨细胞表面及排列情

况：光滑、整齐记 0 分，极少量粗糙、排列较不规则记 1 分，中度粗糙、排列无序记 2 分，重度粗糙、排列紊乱记 3 分；⑤ 关节纤维组织中出现增生现象：极少量或者无增生记 0 分，较少量的增生记 1 分，中等量的增生记 2 分，严重的增生记 3 分；⑥ 潮线：清晰且完整记 0 分，不连续记 1 分，较多量不连续记 2 分，出现中断记 3 分。

2.7 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计处理，计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。各组数据呈正态分布且方差齐，采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，组间两两比较用最小显著性差异法 (LSD) 检验；若数据不服从正态分布或方差不齐，则采用非参数性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 龙藤复方对 AA 大鼠关节炎指数的影响

与正常组比较，造模 7 ~ 21 d，模型组大鼠足跖出现明显肿胀 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较，给药 14 d (造模 28 d) 后，龙藤复方各剂量组及雷公藤多苷片组 AI 评分均明显降低 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 龙藤复方对 AA 大鼠 AI 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

Tab 1 Effect of Longteng compound on the arthritis index score of rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	不同造模时间 AA 大鼠 AI 评分			
		d7	d14	d21	d28
正常组	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	—	1.73 ± 0.47 ^{###}	3.36 ± 0.51 ^{###}	3.18 ± 0.75 ^{###}	3.27 ± 0.47 ^{###}
阳性药组	0.009	1.82 ± 0.60	3.55 ± 0.52	3.18 ± 0.54	1.82 ± 0.41 ^{**}
龙藤复方高剂量组	1.74	1.64 ± 0.51	3.45 ± 0.52	2.90 ± 0.45	2.00 ± 0.45 ^{**}
龙藤复方中剂量组	0.87	1.73 ± 0.65	3.36 ± 0.67	3.00 ± 0.67	1.73 ± 0.65 ^{**}
龙藤复方低剂量组	0.435	1.82 ± 0.41	3.18 ± 0.60	3.36 ± 1.30	1.73 ± 0.47 ^{**}

注：与正常组比较，^{###} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ^{###} $P < 0.01$; compared with the model group, ^{**} $P < 0.01$.

3.2 龙藤复方对 AA 大鼠足跖肿胀度的影响

与正常组比较，造模 7 ~ 14 d，大鼠足跖出现明显肿胀 ($P < 0.01$)。与模型组比较，给药 7 d (造模 21 d) 后，龙藤复方低剂量组及雷公藤多苷片组足跖肿胀度明显降低 ($P < 0.01$)；给药 14 d (造模 28 d) 后，龙藤复方各剂量组及雷公藤多苷片组足跖肿胀度均明显降低 ($P < 0.05$ 或 0.01)，结果见表 2。

3.3 龙藤复方对 AA 大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响

与正常组比较，造模 28 d，模型组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量明显升高 ($P < 0.01$)。

与模型组比较，给药 14 d (造模 28 d) 后，龙藤复方各剂量组和阳性药组血清 TNF-α、IL-6 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 0.01)；龙藤复方中剂量、低剂量组和阳性药组血清 IL-1β 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 0.01)，结果见表 3。

3.4 龙藤复方对 AA 大鼠踝关节病理变化的影响

踝关节病理学观察可见：正常组骨组织中关节软骨表面光滑，软骨细胞形态结构正常，潮线完整，两侧滑膜未见明显增生，未见明显炎症。模型组骨组织中关节软骨表面不光滑，部分软骨缺失，潮线结构不清晰；一侧滑膜可见较多结缔组织增生，伴有重度的淋巴细胞、少量巨噬细胞

表 2 龙藤复方对 AA 大鼠足跖肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 2 Effect of Longteng compound on the foot-plantar swelling degree of rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	d7	d14	d21	d28
正常组	—	0.22 ± 0.13	0.36 ± 0.13	0.27 ± 0.18	0.40 ± 0.18
模型组	—	0.91 ± 0.28 ^{###}	1.24 ± 0.28 ^{###}	1.40 ± 0.31 ^{###}	1.44 ± 0.20 ^{###}
阳性药组	0.009	0.97 ± 0.11	1.16 ± 0.14	1.01 ± 0.12 ^{**}	1.07 ± 0.24 ^{**}
龙藤复方高剂量组	1.74	0.91 ± 0.23	1.30 ± 0.15	1.24 ± 0.21	1.24 ± 0.19 [*]
龙藤复方中剂量组	0.87	0.84 ± 0.17	1.25 ± 0.20	1.28 ± 0.25	1.20 ± 0.13 ^{**}
龙藤复方低剂量组	0.435	0.87 ± 0.18	1.09 ± 0.32	1.05 ± 0.25 ^{**}	1.10 ± 0.23 ^{**}

注：与正常组比较，^{###}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: Compared with the normal group, ^{###}*P* < 0.01; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

表 3 龙藤复方对 AA 大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 3 Effect of Longteng compound on the serum TNF-α, IL-1β, and IL-6 level in rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	TNF-α / (ng · L ⁻¹)	IL-1β / (ng · L ⁻¹)	IL-6 / (ng · L ⁻¹)
正常组	—	54.98 ± 3.69	2.48 ± 1.55	9.85 ± 2.18
模型组	—	79.15 ± 19.07 ^{###}	7.60 ± 4.29 ^{###}	23.19 ± 3.93 ^{###}
阳性药组	0.009	61.73 ± 18.62 [*]	3.91 ± 2.92 [*]	11.14 ± 5.72 [*]
龙藤复方高剂量组	1.74	64.97 ± 9.30 [*]	5.08 ± 3.85	17.89 ± 4.10 ^{**}
龙藤复方中剂量组	0.87	66.32 ± 9.03 [*]	4.97 ± 2.04 ^{**}	13.24 ± 4.42 [*]
龙藤复方低剂量组	0.435	65.32 ± 17.16 ^{**}	3.63 ± 3.06 ^{**}	18.30 ± 10.80 ^{**}

注：与正常组比较，^{###}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: Compared with the normal group, ^{###}*P* < 0.01; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

与多核巨细胞浸润。与模型组比较，阳性药组及龙藤复方中剂量组、低剂量组上述病变有明显改善，病理评分明显降低 (*P* < 0.05)，龙藤复方高剂量组则有降低趋势。结果见表 4 及图 1。

表 4 龙藤复方对 AA 大鼠踝关节病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 4 Effect of Longteng compound on the pathological score of ankle joint in rats with adjuvant arthritis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	评分
正常组	—	0.00 ± 0.00
模型组	—	4.00 ± 1.67 ^{###}
阳性药组	0.009	2.00 ± 0.71 [*]
龙藤复方高剂量组	1.74	3.17 ± 1.84
龙藤复方中剂量组	0.87	1.25 ± 0.50 [*]
龙藤复方低剂量组	0.435	1.80 ± 1.30 [*]

注：与正常组比较，^{###}*P* < 0.01；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05。

Note: Compared with the normal group, ^{###}*P* < 0.01; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05.

4 讨论

龙藤复方中青风藤、海风藤、忍冬藤和鸡血藤四味药共为君药，具有舒筋活络、通络引经、搜风剔骨之力，治疗风湿类疾病，可补肝肾，深入骨髓，走表达里，活络中之毒而养血通络止痛。青风藤最早见于《本草图经》，性味苦、辛、平，归肝、脾经；《本草纲目》记载用于治疗“风湿流注，历节鹤膝，麻痹痿痒，损伤疮肿”，现代临床常用于治疗 RA。Lan 等^[4]研究发现，青风藤中重要活性成

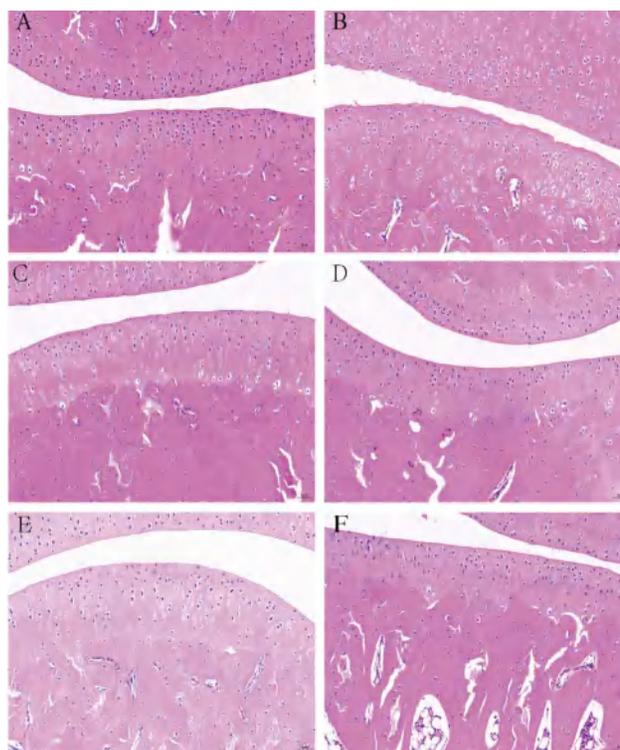


图 1 龙藤复方对 AA 大鼠踝关节病理变化的影响 (HE, ×20)

Fig 1 Effect of Longteng compound on the pathological changes of ankle joints in rats with adjuvant arthritis (HE, ×20)

A. 正常组 (normal group); B. 模型组 (model group); C. 雷公藤多苷组 (tripterygium glycosides group); D. 龙藤复方高剂量组 (Longteng compound high-dose group); E. 龙藤复方中剂量组 (Longteng compound medium-dose group); F. 龙藤复方低剂量组 (Longteng compound low-dose group)

分青风碱 (sinomenine, SIN) 能够减轻 AA 大鼠的足跖肿胀程度, 降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。海风藤味辛、苦, 性微温, 具有祛风湿、通经络、止痹痛功效^[5]。海风藤最早收录于《本草再新》, 书中记录海风藤用于“行经络, 和血脉, 宽中理气, 下湿除风”, 其功效与《中国药典》记录一致。秦晴等^[6]发现海风藤正丁醇提取物对类风湿关节炎有一定的治疗作用, 其机制与调节滑膜组织中 NF- κ B、I κ B 和 I κ K 的表达水平有关。忍冬藤味甘、寒, 归肺、胃经, 具有清热解毒, 疏风通络的功效^[5]。《本草纲目》记载忍冬藤“治一切风湿气及诸肿痛”。鸡血藤始载于《本草纲目拾遗》, 其味苦、微甘, 性温, 归肝、肾经, 具有行血补血、调经、舒筋活络之功效。穿山龙祛风除湿、舒筋通络、活血止痛, 归肝、肾、肺经^[7]。地龙味咸、寒, 归肝、脾、膀胱三经; 性善走窜, 长于通经活络, 既可治气虚血滞之中风, 又可解关节红肿热痛之热痹^[8]。两者相须为用, 共为臣药, 增强透骨通络之力, 淤滞得疏, 则气血条达, 通经活络除痹, 助君药除痹止痛。岩白菜气微、味苦、涩; 清代《分类草药性》首次记载此药^[9], 功效舒筋活络, 主风湿疼痛, 跌打损伤。蜂房味甘性平, 归胃经, 善祛风, 既能祛风止痛, 又能祛风止痒。蜈蚣性温、味辛, 有毒^[5], 善通经络, 性善走串, 通达内外。三者共为佐使, 可祛风通络止痛, 引诸药直达病所。

目前 RA 动物模型主要有 AA、II 型胶原诱导的关节炎 (CIA)、软骨低聚体基质蛋白 (COMP) 诱导的关节炎、朴日斯烷诱导的关节炎 (PIA)、矿物油诱导的关节炎 (OIA)、链球菌诱导的关节炎、蛋白多糖诱导的关节炎、甲醛性关节炎等^[10]。其中, AA 模型、CIA 模型最为常用, 与人 RA 在发病机制、临床表现等方面有相似的特点。AA 模型制备相对简便易行, 造模周期较短, 重复性好, 可同时获得大量模型动物, 适于抗 RA 药物研究。本实验采用 AA 大鼠对龙藤复方的药效进行了初步研究, 在注射 CFA 后大鼠足跖出现明显肿胀, 造模 28 日踝关节出现软骨破坏、结缔组织增生、炎性细胞浸润等病理改变, 提示模型复制成功。龙藤复方 0.435 ~ 1.74 g · kg⁻¹ 可明显减轻模型大鼠足跖肿胀度、降低 AI 评分, 0.435、0.87 g · kg⁻¹ 可明显降低大鼠踝关节病理评分, 明显改善踝关节病理损害。

RA 的发病机制目前尚未明确, 普遍认为是炎症反应。关节炎患者血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水

平偏高。TNF- α 主要由巨噬细胞产生, 是引起炎症反应的关键因子。IL-6 可诱导中性粒细胞在炎症损伤部位聚集, 刺激破骨细胞分化, 最终导致关节肿胀、软骨糜烂等炎症反应^[11]。滑膜中 IL-1 β 的大量表达会激活软骨细胞和破骨细胞, 导致软骨侵蚀和骨脱落^[12]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子已被公认为 RA 炎症及关节损伤的重要介质。本研究结果显示, AA 模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 龙藤复方则可明显降低上述炎性细胞因子表达水平。

综上, 龙藤复方对 CFA 诱导的类风湿关节炎大鼠具有治疗作用, 这与其改善足跖肿胀度、降低炎症细胞因子水平、改善踝关节病理损伤有关。

参考文献

- [1] Zou Y, Hu WF. Investigation of gene expression profiles in a rat adjuvant arthritis model suggests an effective role of triptolide via PI3K-AKT signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17 (5): 3999-4006.
- [2] Zou W, Fang YF, Xu D, et al. Increasing global burden of rheumatoid arthritis: an epidemiological analysis from 1990 to 2019 [J]. *Arch Med Sci*, 2023, 19 (4): 1037-1048.
- [3] 赵一颖. 芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的药效及作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [4] Lan Z, Wei M, Chen LY, et al. Role of sinomenine on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68 (6): 429-435.
- [5] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 306.
- [6] 秦晴, 阙金花, 张玉琴, 等. 海风藤提取物对胶原诱导性关节炎大鼠的影响 [J]. *中国民族民间医药*, 2015, 24 (7): 19-20.
- [7] 卢芳, 蒋鑫, 徐晓敏, 等. 分子对接与体内验证联合探讨穿山龙复方对痛风模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39 (8): 25-31.
- [8] 周祯祥, 唐德才. 临床中医学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 232-233.
- [9] 崔爽, 张明倩, 梁五林, 等. 岩白菜的药理作用研究进展 [J]. *西部中医药*, 2022, 35 (10): 123-128.
- [10] 乌日力嘎, 乌兰其其格, 呼日乐巴根, 等. 类风湿关节炎大小鼠动物模型研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2023, 20 (20): 69-72.
- [11] Zhu ZH, Wan L. Exploration of the molecular mechanism guiding Xinfeng capsule regulatory mechanism for rheumatoid arthritis inflammation [J]. *Am J Transl Res*, 2024, 16 (3): 973-987.
- [12] Zhuang Y, Wang H, Su J, et al. A narrative review of positive regulation of NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10 (12): 12877-12885.

(收稿日期: 2024-05-16; 修回日期: 2024-07-25)

没食子酸改善 CAR-T 诱发的细胞因子风暴研究

罗志强^{1,2}, 史甲儒², 姜其耀², 崔悦², 李婧铭³, 郑静琦³, 于国华^{2*} (1. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 2. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488; 3. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 探讨没食子酸 (GA) 对嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 免疫疗法诱发的细胞因子风暴的改善作用及药效机制。**方法** 通过构建粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 刺激的巨噬细胞炎症反应模型来模拟 CAR-T 诱发的细胞因子风暴, 评估 GA 对巨噬细胞释放的关键炎症因子白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β 的影响; 后运用转录组测序的方法结合分子生物学实验验证, 来预测 GA 对 CAR-T 诱发的细胞因子风暴的药效机制。**结果** GA 作用后巨噬细胞中 IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低, 表明 GA 可以改善 CAR-T 诱发的细胞因子风暴; 转录组测序结合差异基因 KEGG 通路富集分析表明, GA 诱导的关键差异基因主要富集在 NOD 样受体信号通路等 6 条通路上; RT-qPCR 实验验证发现, NOD 样受体信号通路上的 *NLRP12*、*ASC*、*CASP5*、*CASP1* 基因的表达量在模型组中上升, GA 干预后, 表达均下降。**结论** GA 可通过抑制 *NLRP12-ASC-CASP1/CASP5* 通路来抑制 *IL-6* 和 *IL-1 β* 基因的表达, 从而改善 CAR-T 诱发的细胞因子风暴。

关键词: 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法; 没食子酸; 细胞因子风暴; IL-6; IL-1 β

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0143-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.021

Research of gallic acid in improving CAR-T induced cytokine storms

LUO Zhi-qiang^{1,2}, SHI Jia-ru², JIANG Qi-yao², CUI Yue², LI Jing-ming³, ZHENG Jing-qi³, YU Guo-hua^{2*} (1. *State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700*; 2. *School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488*; 3. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488*)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect and underlying mechanism of gallic acid (GA) in mitigating cytokine storm induced by CAR-T cell therapy. **Methods** A macrophage inflammatory response model was established with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) to simulate the cytokine storm caused by CAR-T cell therapy. The impact of GA on the secretion of key inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β), was assessed. Subsequently the transcriptome sequencing was integrated with molecular biology to elucidate the pharmacological mechanism of GA in the context of CAR-T-induced cytokine storm. **Results** After the GA treatment, the mRNA and protein expression levels of IL-6 and IL-1 β in the macrophages were obviously reduced, indicating that GA ameliorated CAR-T-induced cytokine storm. Transcriptome sequencing combined with KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes showed that key genes induced by GA were mainly enriched in six pathways, including the NOD-like receptor signaling pathway. Further validation by RT-qPCR showed that the expression levels of *NLRP12*, *ASC*, *CASP5* and *CASP1* genes in the NOD-like receptor signaling pathway were increased in the model group, but decreased after the GA intervention. **Conclusion** GA can alleviate the cytokine storm induced by CAR-T cell therapy by inhibiting the expression of *IL-6* and *IL-1 β* genes through suppression of *NLRP12-ASC-CASP1/CASP5* signaling pathway.

Key words: CAR-T; gallic acid; cytokine storm; IL-6; IL-1 β

基金项目: 中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才培养专项项目 (No.ZZ16-YQ-044); 中国中医科学院中药资源中心自主选题研究项目 (No.ZZXT202207)。

作者简介: 罗志强, 男, 助理研究员, 主要从事中西医结合抗肿瘤研究, email: luozhiqiang@nrc.ac.cn * **通信作者:** 于国华, 女, 助理研究员, 主要从事中西医结合抗肿瘤及衰老疾病研究, email: ghyu@bucm.edu.cn

嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 免疫疗法是一种新型的肿瘤治疗方法, 首先从患者体内提取 T 细胞, 然后通过基因工程技术将一个嵌合抗原受体 (CAR) 导入这些 T 细胞中。CAR 是由抗原识别结构域和激活信号结构域组成的融合蛋白, 可以使 T 细胞直接识别和攻击肿瘤细胞^[1]。经过体外培养和扩增后, 这些改造后的 CAR-T 细胞被重新注入患者体内, 进入血液循环并定位到肿瘤部位, 从而发挥治疗作用^[2]。CAR-T 免疫疗法的优势在于其高度的特异性和强大的抗肿瘤活性, 可以有效地攻击肿瘤细胞, 已在一些血液系统恶性肿瘤 (如 B 细胞淋巴瘤和急性淋巴细胞白血病) 的治疗中取得了显著的临床效果^[2]。

CAR-T 免疫疗法在临床应用的过程中也会出现一些不良反应, 如细胞因子风暴 (cytokine storm, CS)、神经毒性、归巢障碍、溶瘤综合征及脱靶效应等。CS 是 CAR-T 疗法中最常遇见的问题之一, 总发生率可达 78.3%, 且 50% 患者发展至 3~4 级较严重症状^[3]。CS 是 CAR-T 细胞完成输注后, T 细胞被激活并快速增殖, 引起细胞因子的过度级联释放, 是一种严重的过度免疫应答。这些大量释放的细胞因子会介导多种免疫反应, 患者的临床表现可涉及循环、呼吸、泌尿和消化系统等多方面异常^[4]。近期研究表明, CAR-T 诱发的 CS 主要有两方面因素: 一是 CAR-T 激活状态下释放的细胞因子, 如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF); 二是由这些细胞因子进一步刺激巨噬细胞产生的白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 β 等因子^[1, 5-6]。因此, 降低 CAR-T 释放的 GM-CSF 和巨噬细胞释放的 IL-6 和 IL-1 β 有助于控制 CAR-T 诱发的 CS。

没食子酸 (gallic acid, GA), 又称 3, 4, 5-三羟基苯甲酸, 是一种低分子量的天然多酚类化合物, 广泛存在于多种药用植物、蔬菜、坚果和水果中^[7]。研究表明, GA 主要通过 MAPK 和 NF- κ B 相关信号通路减少炎症细胞因子和趋化因子的释放, 从而发挥抗炎作用^[7], 但其对改善 CAR-T 诱发的 CS 的作用暂无报道。本研究通过构建 GM-CSF 刺激的巨噬细胞炎症反应模型来模拟 CAR-T 诱发的 CS, 后通过分子生物学技术结合转录组测序的方法全面评估 GA 对 CAR-T 诱发的 CS 的改善作用及药效机制。

1 材料

1.1 仪器

细胞恒温培养箱、生物安全柜、Countess 细胞计数室载玻片、Invitrogen Countess II 自动化细胞计数仪 (Thermo Fisher Scientific); 台式冷冻离心机 (Eppendorf); 全系列多功能酶标仪 (Molecular

Devices); 正倒置一体显微镜 (ECHO); 精密电子天平 (Sartorius); NovaSeq 6000 测序系统 (Illumina); Panasonic SIM-F140AY65-PC 雪花状制冰机 (松下三洋); VORTEX-5 涡旋混合器 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); 超低温 -80℃ 冰箱 (Thermo Fisher Scientific); 4℃ 冷藏冰箱 (山东青岛海尔科技有限公司); DYCP-32B 琼脂糖水平电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 生物芯片分析仪 (Agilent 2100)。

1.2 试剂

GA (批号: J011B218870, 纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 改良 RPMI-1640 细胞培养基 (国家实验细胞资源共享平台); 澳洲胎牛血清 (FBS)、磷酸缓冲盐 (PBS) 溶液、青霉素-链霉素 (P/S) 混合双抗溶液、台盼蓝溶液 (Gibco); 佛波酯 (PMA, 北京索莱宝科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (上海凯杰生物技术有限公司); Qiagen RNeasy Mini 试剂盒 (上海优宁维生物科技股份有限公司); Illumina TruSeq RNA sample preparation 试剂盒、Invitrogen SuperScript double-stranded cDNA synthesis 试剂盒 (上海美吉生物医药科技有限公司); 人 IL-1 β ELISA 试剂盒、人 IL-6 ELISA 试剂盒 (Proteintech)。

1.3 细胞株

THP-1 细胞购买于国家实验细胞资源共享平台 (北京协和医学院)。

2 方法

2.1 细胞培养

将冻存的 THP-1 细胞复苏后, 置于含 10%FBS 和 1%P/S 的 RPMI-1640 改良细胞培养基, 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 隔日换液, 维持细胞密度在 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 GA 溶液制备

精密称取 8.5 mg 的 GA 粉末, 用 50 mL 的 PBS 溶液溶解, 得到浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 母液, 分装后置于 -20℃ 冰箱储存。

2.3 CCK-8 法检测 THP-1 细胞增殖/毒性

取对数生长期的 THP-1 细胞, 离心, 加入适量的无血清 RPMI-1640 改良细胞培养基重悬, 向细胞悬液中加入适量的佛波酯, 使其终质量浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 混匀, 按每 200 μL 接种 4×10^4 个细胞于 96 孔板中, 并分为 4 组, 每组 6 个复孔。培养 24 h 细胞贴壁后, 向各组细胞中分别加入 20 μL 不同浓度的 GA 溶液, 使终浓度分别为 $0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (NC), $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。继续培养 24 h 后, 取出 96 孔板, 吸弃各孔细胞培养基, 向各分组的每孔加入 100

μL CCK-8 试剂培养基稀释液 (培养基: CCK-8 试剂 = 9 : 1), 孵育 2 h 后将 96 孔板取出, 放入多功能酶标仪中, 设置紫外检测波长为 450 nm, 检测各分组孔中的 OD 值, 并计算细胞存活率。

2.4 GA 改善 CS 作用研究

取对数生长期的 THP-1 细胞, 离心, 加入适量的无血清 RPMI-1640 改良细胞培养基重悬, 向细胞悬液中加入适量的佛波酯, 使其终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 混匀, 按每 1.5 mL 接种 1×10^6 个细胞于 6 孔板中, 并分为 5 组, 分别为正常对照组 (NC), 模型组 (GM), GA 高、中、低 3 个浓度给药组。培养 24 h 细胞贴壁后, 向各组细胞中分别加入不同浓度的 GA 溶液和 GM-CSF 溶液, 具体为: NC 组加入与 GM-CSF 和 GA 溶液同体积的 PBS 溶液, GM 组加入终质量浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GM-CSF 溶液及与 GA 同体积的 PBS 溶液, 高浓度组 GGH 加入终质量浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GM-CSF 溶液及 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 溶液, 中浓度组加入终质量浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GM-CSF 溶液及 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 溶液, 低浓度组加入终质量浓度为 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ GM-CSF 溶液及 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 溶液。继续培养 24 h 后, 吸取各孔细胞培养基, 离心, 保存上清液进行后续实验, 同时, 将细胞裂解后提取 RNA, 进行 qPCR。

2.5 ELISA 法检测相关蛋白表达

将所有的样本和试剂平衡到室温。将 $100 \mu\text{L}$ 经梯度稀释好的标准品以及样品溶液加入 96 孔板中, 用膜封好, 继续室温孵育 2 h。弃掉溶液, 用 $1 \times$ Wash Buffer ($300 \mu\text{L}$) 清洗 4 次, 最后一次洗涤后, 清除任何残留液。加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ 生物素化 IL-4 检测抗体, 用膜封好, 室温孵育 1 h 后重复上述清洗步骤。加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ 酶标二抗, 室温孵育 40 min, 轻微摇晃, 重复上述清洗步骤。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 底物溶液, 室温下避光孵育 15 ~ 20 min 后, 向每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 终止液, 立即在 450 nm 处读吸光度值。根据 ELISA 试剂盒说明书计算 IL-4 的表达水平。

2.6 THP-1 细胞总 RNA 提取

收取孔板上清液, 用 PBS 将细胞清洗两遍, 严格按照 Qiagen RNeasy Mini 试剂盒的说明书操作流程, 提取 THP-1 细胞中的 RNA, 并测定 RNA 浓度, 计算 OD_{260}/OD_{280} , 评估所提 RNA 纯度是否合格, -80°C 保存所提取的 RNA。

2.7 转录组测序

真核生物样本 mRNA 测序是在第二代测序技术 Illumina Novaseq 6000 测序平台完成的, 该技术平台可以对细胞或特定组织样本在某个时间点转录出来的所有 mRNA 进行测序, 其测序文库

构建采用 Illumina TruSeq RNA sample preparation 试剂盒。主要操作过程包括总 RNA 提取、Oligo (dT) 富集 mRNA、片段化 mRNA、反转合成 cDNA、连接 adaptor 和 Illumina 平台上机测序。

采用 DESeq2^[8]、DEGseq 或 edgeR, 可对多样本 (≥ 2) 项目进行样本间或组间基因 / 转录本差异表达分析, 鉴定出差异表达的基因 / 转录本。设定阈值差异倍数 Fold-change ≥ 2 , P -value < 0.05 筛选差异基因, 得到样本间差异表达的基因 / 转录本, 进而研究差异表达基因 / 转录本的功能。

2.8 统计分析

采用 Prism GraphPad 8 软件进行统计学分析, 结果以 mean (平均值) \pm S.D. (标准差) 表示。两组间比较采用 t 检验, 样本至少重复 3 次 ($n \geq 3$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GA 对 THP-1 细胞的细胞毒性

由图 1 可知, GA 在高、中、低 3 个浓度下均未对 THP-1 细胞表现出明显的细胞毒性, 所用给药浓度可以用于后续实验研究。

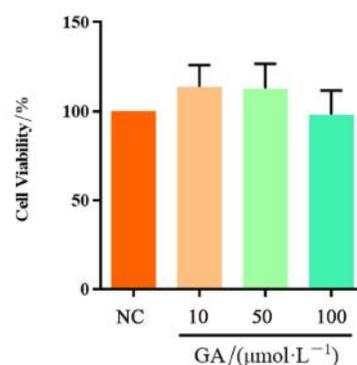


图 1 不同浓度 GA 对 THP-1 细胞存活率的影响

Fig 1 Impact of various concentrations of GA on the cell viability of THP-1 cells

3.2 GA 对 CAR-T 诱发的 CS 的影响

由图 2 可知, 在 GM-CSF 刺激的巨噬细胞炎症反应模型中, GA 可以降低 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ 的 mRNA 表达水平, 同时可以降低细胞培养上清液中 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ 的释放量, 表明 GA 具备降低 CAR-T 诱发的 CS 风险的潜力。

3.3 测序数据质控分析

经过对原始测序数据测序接头序列、低质量读段等因素过滤后, 得到测序数据质控结果, 如表 1 所示。所测样本的误差率仍均低于 0.026%, Q20 仍均高于 97%, Q30 仍均高于 93%, 说明本次测序质量较好, 可以用于后续分析。

3.4 基因表达量结果分析

一般来说, 基因表达量 ($\log_{10}[\text{TPM}]$) 在高于 1 被认为具有较好的表达效果。因此, 设置表达量

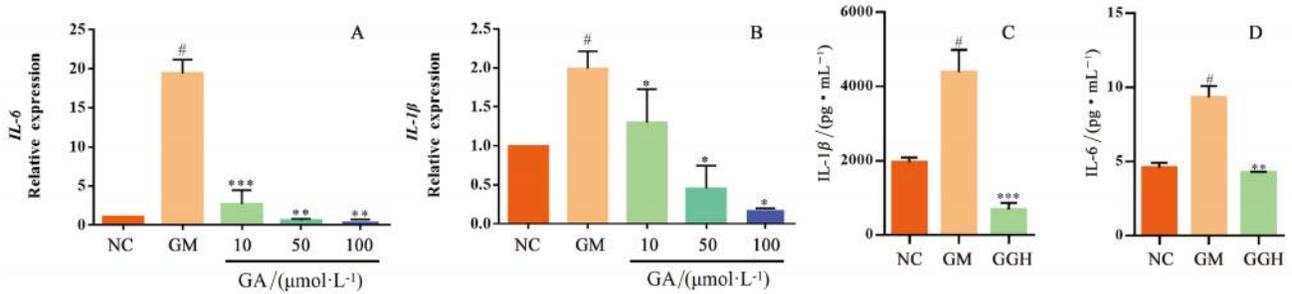


图 2 *IL-1β* (A) 和 *IL-6* (B) mRNA 表达水平及上清液中 *IL-1β* (C) 和 *IL-6* (D) 的释放量

Fig 2 mRNA expression levels of *IL-1β* (A) and *IL-6* (B), and release of *IL-1β* (C) and *IL-6* (D) in the supernatant

注 (Note): 与 NC 组比较, #*P* < 0.05; 与 GM 组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0005 (Compared with the normal control group, #*P* < 0.05; compared with the model group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0005)。

表 1 测序数据质控结果分析

Tab 1 Quality control of sequencing data

样本	预处理后序列数	预处理后碱基数	误差率 /%	Q20/%	Q30/%	GC 含量 /%
NC_1	51150034	7595797908	0.0250	98.04	94.19	50.46
NC_2	63963550	9539669844	0.0249	98.06	94.25	50.04
NC_3	51177246	7604751375	0.0246	98.18	94.54	50.35
GM_1	61898240	9219813113	0.0251	97.98	94.02	50.13
GM_2	49647892	7396746845	0.0254	97.86	93.71	50.43
GM_3	52675318	7849299631	0.0254	97.89	93.76	50.06
GGH_1	50355324	7510784120	0.0254	97.88	93.76	49.85
GGH_2	57431766	8566088810	0.0250	98.05	94.16	49.85
GGH_3	49805730	7430397543	0.0257	97.76	93.48	49.56

参数为 1, 筛选得到 GGH 组表达 13 159 个基因, GM 组表达 13 978 个基因, NC 组表达 14 130 个基因。样本间 Venn 分析展示了各组样本基因 / 转录本的数目, 以及各组样本间基因 / 转录本的重叠关系, 通过 Venn 分析可直观展示基因 / 转录本在各组样本中数目分布, 发现三组交叉基因 12 421 个, 单独在 GGH 组表达的基因数是 410 个, 单独在 GM 组表达的基因数是 349 个, 单独在 NC 组表达的基因数是 505 个。

3.5 差异表达基因结果分析

GM 组与 NC 组相比, 共得到 401 个差异表达基因, 其中上调基因 225 个, 下调基因 176 个; GGH 组与模型 GM 组相比, 共得到 2956 个差异基因, 其中上调基因 1182 个, 下调基因 1774 个, 见图 3 和图 4。

3.6 差异基因的功能富集分析

将差异表达基因分为 up_down 基因集 (GM 组上调, 给药后下调) 和 down_up 基因集 (GM 组下调, 给药后上调), 分别对 up_down 基因集 (65 个差异基因, 见图 5A) 和 down_up 基因集 (19 个差异基因, 见图 5B) 参与的通路进行功能富集分析, 两个基因集富集得到的具有显著性差异 (*P* < 0.05) 的 KEGG 生物学通路结果见图 6 和图 7。

通过 KEGG 通路富集可以看出, 两个基因集中的差异基因分布在多条生物学通路当中, 其中,

up_down 基因集中的差异基因主要富集在病毒蛋白与细胞因子、细胞因子受体相互作用, 细胞因子 - 细胞因子受体相互作用, NOD 样受体信号通路, *IL-17* 信号通路, Toll 样受体信号通路, 趋化因子信号通路等与炎症反应和免疫调控相关的通路上; down_up 基因集中的差异基因则主要富集在矿物质吸收、昼夜节律夹带、长期抑制、肾素分泌这 4 条与机体组织系统相关的通路上。NOD 样受体作为胞内模式识别受体在宿主先天免疫应答的调节中起关键作用, 它们不仅能通过信号传导产生级联反应来刺激不同的效应分子的表达, 在炎症过程和多种疾病的发生发展中也至关重要。这些受体识别相应配体之后激活 NOD1 和 NOD2 信号途径, 活化 *NLRP12*、*Caspase-5*、*Caspase-1* 等促进 *IL-1β* 和 *IL-6* 等炎症因子的表达, 启动组织修复过程并进一步启动适应性免疫。另有研究表明, *NLRP12* 通过巨噬细胞抑制 *IL-12* 的早期产生, 并调节 *Caspase-1* 激活和 *IL-1β* 分泌, 在布鲁氏菌早期炎症反应的负调控中起重要作用^[9-10]。基于此, 本研究把关键通路锁定在排名第三的 NOD 样受体信号通路, 挖掘 GA 对 NOD 样受体通路的调控机制。

3.7 关键通路机制验证

相比于 NC 组, GM-CSF 处理的 GM 组 *NLRP12*、*ASC*、*CASP5*、*CASP1* 相关基因表达量均显著上升, 给予 GA 处理后, 上述 4 个基因表达量均下降 (见图

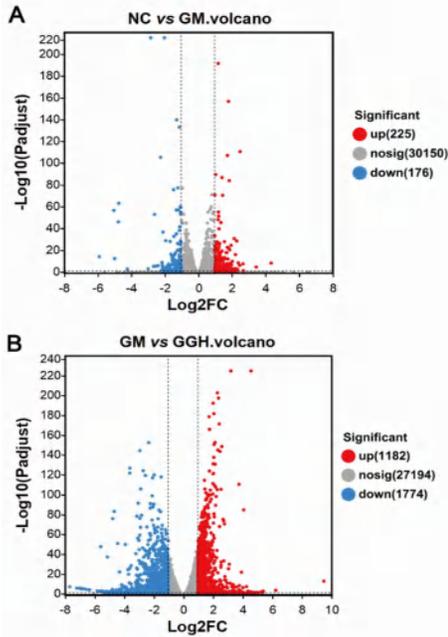


图 3 GA 干预 THP-1 炎症细胞模型后差异表达基因火山图
Fig 3 Volcano plot of differentially expressed genes in the inflammatory THP-1 cell model after the GA intervention
A. NC vs GM; B. GM vs GGH

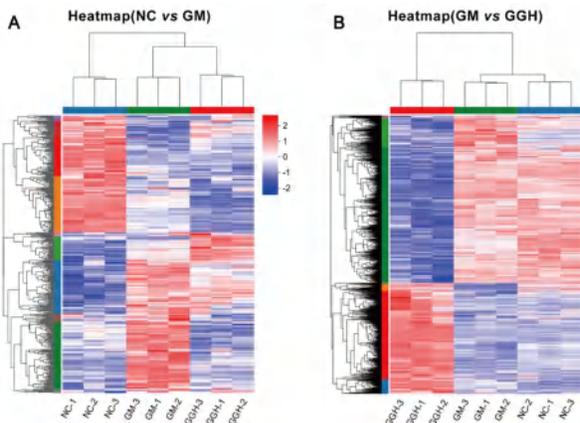


图 4 GA 干预 THP-1 炎症细胞模型后差异表达基因热图
Fig 4 Heatmap of differentially expressed genes in the inflammatory THP-1 cell model after the GA intervention
A. NC vs GM; B. GM vs GGH

8)。结果表明 GA 可以通过抑制 *NLRP12-ASC-CASP1/CASP5* 来抑制 *IL-6* 和 *IL-1β* 基因的表达，从而改善 CAR-T 诱发的 CS。

4 结论与讨论

本研究通过 GM-CSF 刺激的巨噬细胞炎症反应模型证明了 GA 能够降低该模型中 *IL-1β* 和 *IL-6* 的基因表达量和蛋白释放量，说明 GA 具有改善 CAR-T 诱发 CS 的潜力；然后，运用转录组测序的方法结合分子生物学技术研究了 GA 改善 CS 的作用机制，结果表明 GA 主要通过抑制 *NLRP12-ASC-CASP1/CASP5* 来抑制 *IL-6* 和 *IL-1β* 基因的表达，进而抑制 CAR-T 诱发的 CS 反应。该研究不仅为 GA 改善 CAR-T 诱发 CS

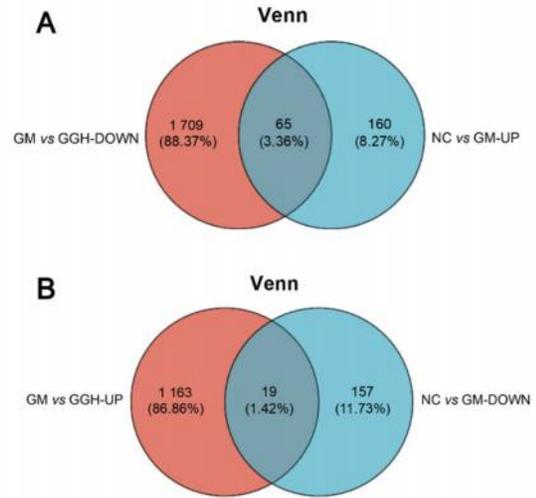


图 5 GA 干预 THP-1 炎症细胞模型后差异表达基因韦恩图
Fig 5 Venn diagram of differentially expressed genes in the inflammatory THP-1 cell model after the GA intervention
A. up_down 基因集 (GM 组上调, 给药后下调) [up_down gene set (upregulated in the model group, but downregulated after the treatment)]; B. down_up 基因集 (GM 组下调, 给药后上调) [down_up gene set (downregulated in the model group, but upregulated after the treatment)]

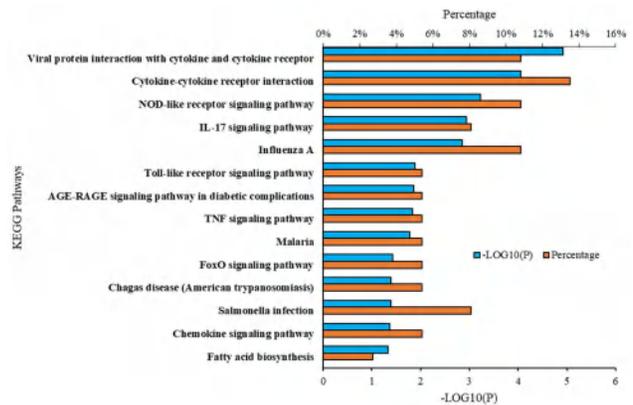


图 6 up_down 基因集 KEGG 生物学通路条目
Fig 6 KEGG biological pathway entries of up_down genes

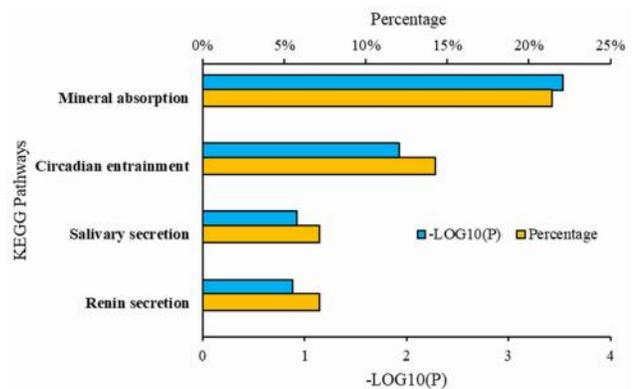


图 7 Down_up 基因集 KEGG 生物学通路条目
Fig 7 KEGG biological pathway entries of down_up genes

的机制提供了理论依据，对“中药小分子+ CAR-T”疗法联合使用也提供了一定的借鉴意义。但上述研究

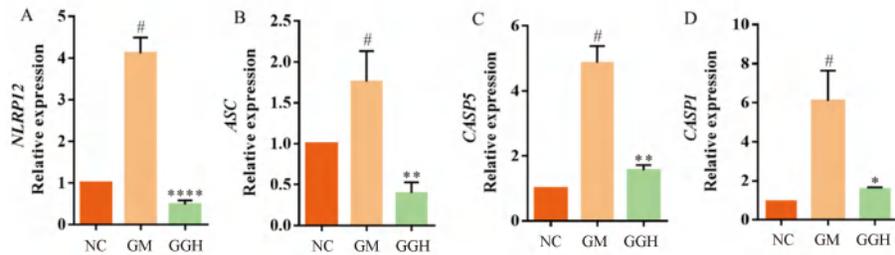


图 8 *NLRP12* (A)、*ASC* (B)、*CASP5* (C)、*CASPI* (D) mRNA 表达水平

Fig 8 mRNA expression levels of *NLRP12* (A), *ASC* (B), *CASP5* (C), and *CASPI* (D)

注 (Note): 与 NC 组比较, # $P < 0.05$; 与 GM 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ (Compared with the control group, # $P < 0.05$; compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)。

仅仅在细胞层面上证明了其抗炎效应及机制, 后续还需在动物层面上进一步验证。

目前, 针对 CAR-T 诱发的 CS 的动物模型目前还处于研究阶段, 主要面临的问题如下^[5, 11]:

① 如何区分炎症反应到底是输入外来 CAR-T 产品诱发的机体免疫排斥还是 CAR-T 杀伤肿瘤时诱发的 CS; ② 为了接种肿瘤细胞, 需要用免疫缺陷型小鼠, 但免疫缺陷型动物体内部分信号通路可能被阻断, 有可能会影响 CS 反应过程; ③ 目前导致 CAR-T 诱发的 CS 的因素还只是初步研究, 其机制有待进一步阐明。

目前, 国内外专家将在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL) 患者中由 CAR-T 诱导的 CS 发生和发展进程分为以下四个阶段^[12]: ① CAR-T 局部扩增; ② CAR-T 溢出和炎性细胞因子激增; ③ CAR-T 的重新分布和器官损伤阶段; ④ 患者恢复阶段。后期, 本课题组将针对 CAR-T 各个临床阶段的特点, 运用相关细胞或动物模型, 评估 GA 在各个阶段的疗效, 以进一步明确 GA 的适应症状, 实现精准治疗。

参考文献

[1] Hu YX, Feng JJ, Gu TN, et al. CAR T-cell therapies in China: rapid evolution and a bright future [J]. *Lancet Haematol*, 2022, 9 (12): E930-E941.
 [2] Westin J, Sehn LH. CAR T cells as a second-line therapy for large B-cell lymphoma: a paradigm shift? [J]. *Blood*, 2022, 139 (18): 2737-2746.
 [3] Gutgarts V, Jain T, Zheng JT, et al. Acute kidney injury after CAR-T cell therapy: low incidence and rapid recovery [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26 (6): 1071-1076.

[4] Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15 (1): 47-62.
 [5] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (6): 739-748.
 [6] Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts [J]. *Blood*, 2019, 133 (7): 697-709.
 [7] Bai JR, Zhang YS, Tang C, et al. Gallic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110985.
 [8] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 2014, 15 (12): p.550.
 [9] Silveira TN, Gomes MT, Oliveira LS, et al. NLRP12 negatively regulates proinflammatory cytokine production and host defense against *Brucella abortus* [J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47 (1): 51-59.
 [10] 李悦, 毛华伟. Nod 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 12 在自身炎症性疾病中的研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2022, 37 (16): 1268-1272.
 [11] Giavridis T, Van Der Stegen SJC, Eyquem J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (6): 731-738.
 [12] Wei JS, Liu Y, Wang CM, et al. The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 134.

(收稿日期: 2024-05-15; 修回日期: 2024-07-31)

猪、牛、羊源依诺肝素钠的制备及结构研究

杜曦^{1,2}, 杨祎¹, 王亮¹, 兰舫¹, 黄栋¹, 李贺¹, 董艳丽^{1,2*} (1. 河北常山生化药业股份有限公司, 石家庄 050800; 2. 河北省多糖类药物技术创新中心, 石家庄 050800)

摘要: **目的** 研究猪、牛、羊源依诺肝素钠的理化性质和结构, 确认牛源和羊源低分子肝素的潜在价值, 以解决肝素供应种源单一的问题。**方法** 分别以猪、牛、羊肠黏膜精制得到的肝素钠为原料, 制备依诺肝素钠, 通过对比不同种源依诺肝素钠的理化性质和结构, 探讨它们之间的相似性。**结果** 牛源与猪源依诺肝素钠分子量及其分布的结果相近, 效价、二糖和单糖的结果差异较大, 而羊源与猪源依诺肝素钠在理化性质和糖结构单元的结果上均表现出了更多的相似性。**结论** 猪、牛、羊源依诺肝素钠表现出的差异多是源于种源肝素的差异。羊源与猪源依诺肝素在结构上相似性较高, 种源差异小, 羊源肝素更有望成为现有肝素产品原料的补充来源。

关键词: 肝素; 依诺肝素钠; 猪源; 牛源; 羊源; 结构研究; 相似性

中图分类号: R914, R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0149-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.022

Preparation and structure of enoxaparin sodium from porcine, bovine and ovine sources

DU Xi^{1,2}, YANG Yi¹, WANG Liang¹, LAN Fang¹, HUANG Dong¹, LI He¹, DONG Yan-li^{1,2*} (1. Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050800; 2. Hebei Polysaccharide Drug Technological Innovation Center, Shijiazhuang 050800)

Abstract: Objective To determine the potential value of low-molecular-weight heparins derived from bovine and ovine by studying their physicochemical properties and structures of enoxaparin sodium from porcine, bovine, and ovine, to avoid a single source of heparin supply. **Methods** Heparin sodium refined from the intestinal mucosa of pigs, cows, and sheep was used as the raw materials to prepare enoxaparin sodium. The similarity in the physicochemical properties and structures between them was compared. **Results** The molecular weight and distribution of enoxaparin sodium from bovine and porcine sources were similar, whereas the potency, disaccharide, and monosaccharide exhibited big difference. However, enoxaparin sodium of ovine source was more similar both in physicochemical properties and saccharide structure to that of porcine source. **Conclusion** The differences in enoxaparin sodium from porcine, bovine and ovine sources are mostly due to those in heparin from respective origins. The high structural similarity between enoxaparin from ovine and porcine suggests a smaller species difference, and ovine heparin is more likely to serve as a supplementary source for existing heparin products.

Key words: heparin; enoxaparin sodium; porcine source; bovine source; ovine source; structure study; similarity

依诺肝素钠是由法国安万特公司研发, 于 1993 年申请专利^[1]的一种低分子量肝素产品, 目前猪肠黏膜是依诺肝素钠原料的唯一合法来源^[2]。2008 年的过硫酸软骨素 (OSCS) 事件和近些年的

猪瘟疫情, 导致全球肝素供给量严重下滑, 此后各国的药监机构开始考虑将其他种源肝素产品引入市场, 使肝素来源多样化, 以降低单一来源带来的供应风险^[3]。2015 年之后, 羊源和牛源低分子肝素

基金项目: 石家庄市多糖类药物技术创新中心项目 (No.237790679A); 石家庄市羊源依诺肝素钠熟化平台项目 (No.234200054A)。

作者简介: 杜曦, 男, 工程师, 主要从事多糖类抗凝药物制备工艺及结构研究, email: duxilzjt@163.com *通信作者: 董艳丽, 女, 高级工程师, 主要从事肝素及低分子肝素抗凝药物研究, email: Lily_dyl@163.com

相关的研究逐渐增多^[4-8],大家使用更多元的分析手段,去分析羊源、牛源肝素产品的结构,以证明羊和牛可作为猪源肝素的补充来源。

由于肝素市场 85% 以上份额是以低分子肝素形式被使用,所以本文重点研究了依诺肝素钠。本研究借鉴已公开的专利和文献^[4-5, 9],制备了猪源、牛源和羊源依诺肝素钠,并对这 3 种依诺肝素钠产品进行理化指标和结构的对比分析,以研究其相似性。若能将牛源或羊源依诺肝素钠引入肝素市场,这不仅可降低单一来源带来的风险,而且可同时满足常规市场和穆斯林市场的需求。

1 材料

1.1 试剂

猪肠肝素钠、牛肠肝素钠、羊肠肝素钠(原料药,河北常山生化药业股份有限公司多糖实验室);依诺肝素钠对照品(R11090,USP,规格:300 mg/支);低分子肝素分子量校准物(F0M224,USP,规格:10.6 mg/支);依诺肝素钠生物测定标准品(F0K265,USP,规格:1 mL/支);三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、氯化钠、磷酸二氢钠(Sigma-Aldrich);抗凝血酶Ⅲ、Factor Xa(Xa因子)、S-2765(发色底物 S-2765)、S-2238(发色底物 S-2238)(CHROMOGENIX);人凝血酶(HYPHEN BioMed);肝素酶 I、II、III(艾德豪克);乙腈(LC-MS,Merck);乙酸铵(LC-MS,Aladdin);重水(Cambridge isotope Laboratories Inc.);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

JB300-D 型电动搅拌机(上海标本模型厂);DK-98-II A 型恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);PB-10 型 pH 计(Sartorius 公司);DZF-6210 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);PL602-L 型电子天平(Mettler Toledo 公司);GM-0.33A 型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);FD-1A-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);E2695 型高效液相色谱仪(美国沃特斯公司);Spectramax 384 plus 型酶标仪(美国谷分子仪器有限公司);U3000 型高效液相色谱仪、Q-Exactive 型高分辨质谱仪、Vanquish F 型超高效液相色谱仪(美国赛默飞公司);Avance III HD 500 MHz 核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司)。

2 方法

2.1 检测方法

2.1.1 凝胶渗透色谱法(GPC) 参照美国药典通则<209>项下方法测定本品的分子量及其分布。

2.1.2 生色底物法 参照美国药典依诺肝素钠个论中效价的检测方法测定本品的效价值。

2.1.3 强阴离子交换高效液相色谱(SAX-HPLC)

参照美国药典通则<207>项下方法测定本品的二糖及特征结构。

2.1.4 亲水相互作用液相色谱-电喷雾-质谱联用(HILIC-ESI-MS) 参考文献建立液质联用方法^[10],对本品的二糖及基本组成单元结构进行分析。

2.1.5 二维-异核单量子相干谱-核磁共振谱(2D-HSQC-NMR) 参考文献建立二维核磁方法^[11],对本品的单糖组成、糖苷键的连接位置及特征末端结构进行分析。

2.2 制备方法

2.2.1 盐化物制备 准确称取肝素钠(猪、牛、羊肠黏膜)80 g 溶解于 800 mL 水中,另将 200 g 苄索氯铵溶解于 800 mL 水中。搅拌状态下,将苄索氯铵水溶液滴加至肝素水溶液中,过滤。滤饼用水洗涤,烘干,得到肝素苄索氯铵盐。

2.2.2 酯化物制备 取“2.2.1”项下肝素苄索氯铵盐 200 g 加入反应瓶中,用 1300 g 二氯甲烷搅拌溶解,加入 220 g 氯化苄,保温 30~40℃,反应 24 h。称量 160 g 乙酸钠,溶解于 1.6 L 的甲醇中,在反应结束后加至反应液中,再加入 3 L 甲醇,静置过夜。去除上清液,剩余下层沉淀。将 20 g 氯化钠溶于 160 mL 水中,用盐水溶解沉淀物,再用 1.6 L 的甲醇醇沉。重复盐水溶解沉淀物再用甲醇醇沉,烘干沉淀,得到肝素苄基酯。

2.2.3 粗品制备 取“2.2.2”项下肝素苄基酯 50 g 溶于 1.25 L 水中,加热至 60℃,保温。另外准确称取 50% 氢氧化钠溶液 6.25 g,加入上述保温的水溶液中,继续搅拌,保温反应 90 min。冷却至室温,用稀盐酸调节 pH 至中性,加入 15% 氯化钠,溶解,过滤,将滤液加入 3 L 甲醇中,析出固体,过滤,于 45~60℃ 干燥,得依诺肝素钠粗品。

2.2.4 精品制备 将“2.2.3”项下依诺肝素钠粗品 30 g 溶解在 300 mL 水中,用氢氧化钠调节溶液的 pH 值至 9~11,加入 21 g 30% 过氧化氢,控制 pH 值在 9~11,氧化脱色 60 min。用稀盐酸调 pH 值至 7.0,过滤反应液。滤液加 105 g 氯化钠,搅拌溶解。加入 3 L 甲醇醇沉,过滤。沉淀溶于 100 mL 水后,进行真空冷冻干燥。得到依诺肝素钠精品,称重后装袋送检。

3 结果与讨论

3.1 依诺肝素钠的分子量和效价对比

由表 1 数据可见,猪源、牛源和羊源依诺肝素钠(即 P-E、B-E 和 O-E)的分子量及其分布符合依诺肝素钠美国药典(USP)标准,且分子量分布较为一致。对比猪源、牛源和羊源肝素钠(即 P-H、B-H 和 O-H),可以看出虽然原料肝素钠的分子量及其分布有所差异,但是通过制备工艺得到的依诺肝素钠的分子量及其分布的差异变小(见表 2)。

由效价数据看出, O-E 和 P-E 表现出相当的生物活性, 抗 Xa 因子范围为 106 ~ 114 IU·mg⁻¹; 而 B-E 略低, 为 68 ~ 74 IU·mg⁻¹。3 种依诺肝素钠的抗 Xa 和抗 II a 的比值相当, 见表 1。

表 1 依诺肝素钠的分子量及其分布、效价

Tab 1 Molecular weight and its distribution, potency of enoxaparin sodium

编号	分子量及其分布 (USP 标准)				效价 (USP 标准)		
	重均分子量 /Da (3800 ~ 5000)	M < 2000/% (12.0 ~ 20.0)	M 2000 ~ 8000/% (68.0 ~ 82.0)	M > 8000/% (≤ 18.0)	抗 Xa/(IU·mg ⁻¹) (90 ~ 125)	抗 II a/(IU·mg ⁻¹) (20.0 ~ 35.0)	抗 Xa/抗 II a (3.3 ~ 5.3)
P-E1	4200	17.5	73.5	9.0	110	29.4	3.7
P-E2	4250	17.0	74.0	9.0	113	30.5	3.7
P-E3	4250	16.5	74.5	9.0	114	30.1	3.8
P-E4	4350	17.0	73.5	9.5	109	30.2	3.6
P-E5	4300	17.0	74.0	9.0	112	30.3	3.7
B-E1	4250	17.0	74.0	9.0	74	20.8	3.6
B-E2	4300	17.5	73.0	9.5	70	20.3	3.5
B-E3	4250	18.0	72.5	9.5	68	20.2	3.4
B-E4	4250	17.5	73.5	9.0	72	20.8	3.5
B-E5	4350	17.0	73.0	10.0	69	21.0	3.3
O-E1	4250	17.0	74.0	9.0	106	29.0	3.7
O-E2	4300	17.0	73.5	9.5	107	30.5	3.5
O-E3	4300	16.5	74.0	9.5	109	30.2	3.6
O-E4	4250	18.0	72.5	9.5	106	30.1	3.5
O-E5	4300	18.0	73.0	9.5	108	30.4	3.6

O-E 的分子量和效价均符合依诺肝素钠 USP 标准, B-E 的分子量符合依诺肝素钠 USP 标准, 但抗 Xa 因子效价不符合 USP 标准, 说明种源差异在低分子肝素中也有体现 (见表 2)。

表 2 肝素钠的分子量及其分布、效价

Tab 2 Molecular weight and its distribution, potency of heparin sodium

编号	分子量及其分布 (USP 标准)			效价 (USP 标准)	
	重均分子量 /Da (15 000 ~ 19 000)	M > 24 000/% (≤ 20)	M8000 ~ 16 000/M16 000 ~ 24 000 (≥ 1.0)	抗 II a/(IU·mg ⁻¹) (≥ 180)	抗 Xa/抗 II a (0.9 ~ 1.1)
P-H1	17 200	14.7	1.4	227	1.0
P-H2	17 250	14.3	1.3	229	1.0
P-H3	17 450	15.1	1.3	231	1.0
P-H4	17 150	14.1	1.3	221	1.0
P-H5	17 300	14.8	1.4	228	1.0
B-H1	15 520	13.5	2.3	148	1.0
B-H2	15 800	13.8	2.4	135	1.0
B-H3	15 250	13.2	2.2	130	1.0
B-H4	15 560	13.6	2.3	142	1.0
B-H5	15 300	13.4	2.2	133	1.0
O-H1	16 020	13.7	1.9	212	1.0
O-H2	15 740	13.1	1.9	214	1.0
O-H3	15 830	13.2	2.0	222	1.0
O-H4	16 050	13.8	1.8	211	1.0
O-H5	15 870	13.5	1.9	220	1.0

3.2 依诺肝素钠的二糖对比

二糖组分分析是肝素产品结构研究的一个基本环节, 其原理主要是利用肝素酶 I、II 和 III 混合液充分降解肝素获得二糖组分, 然后根据二糖的硫酸基、乙酰基的含量、位点等性质的不同进行分离和检测。

3.2.1 依诺肝素钠的 SAX-HPLC 二糖对比 依诺肝素钠的骨架结构包括 8 种主要肝素二糖 (Δ I A ~ Δ I V A 和 Δ I S ~ Δ I V S), 这 8 种二糖反映了初始原料的结构特征。

从表 3 中 SAX-HPLC 二糖数据可以看出, 对比 Δ I S 和 Δ III S 组分, B-E 与 O-E 和 P-E 存在较大差异, 表现为 B-E 的 Δ I S 组分 (平均 47.33%) 远低于 P-E 的 Δ I S 组分 (平均 63.40%) 和 O-E 的 Δ I S 组分 (平均 69.01%), 而 B-E 的 Δ III S 组分 (平均 24.39%) 远高于 P-E 的 Δ III S 组分 (平均 6.28%) 和 O-E 的 Δ III S 组分 (平均 5.93%), 推测原因可能为 B-E 中高硫酸化二糖组分 (Δ I S) 含量较少, 而低硫酸化二糖组分 (Δ III S) 含量较多。此外, Δ I S 到 Δ I V S 和 Δ I A 到 Δ I V A 的总相对含量在 3 种

表 3 依诺肝素钠 SAX-HPLC 糖结构相对含量 (%)

Tab 3 Relative content of SAX-HPLC saccharide structure in enoxaparin sodium (%)

编号	8 种主要二糖								含低分子特征结构糖单元			
	Δ IVS	Δ III S	Δ II S	Δ I S	Δ IV A	Δ III A	Δ II A	Δ I A	Δ I S (1, 6-anhydr)	Δ II A- II Sglu	Δ I S- IdoA2S	Δ I S- I S (1, 6-anhydr)
P-E1	2.19	6.19	10.18	63.80	2.25	1.33	3.44	1.51	1.45	2.39	0.98	1.10
P-E2	2.22	6.21	10.24	63.79	2.22	1.40	3.36	1.56	1.38	2.40	0.93	1.13
P-E3	2.35	6.44	10.61	62.74	2.42	1.58	3.18	1.65	1.35	2.52	0.81	1.09
P-E4	2.24	6.27	10.42	63.64	2.16	1.51	3.09	1.61	1.19	2.66	0.82	1.21
P-E5	2.42	6.29	10.30	63.03	2.33	1.46	3.28	1.53	1.57	2.46	0.84	1.23
P-E 平均值	2.28	6.28	10.35	63.40	2.28	1.46	3.27	1.57	1.39	2.49	0.88	1.15
B-E1	4.05	24.33	8.69	47.90	2.25	2.84	1.77	0.18	0.74	0.77	0.87	1.33
B-E2	4.05	24.31	8.67	47.75	2.24	2.73	1.65	0.18	0.84	0.80	0.92	1.54
B-E3	4.21	24.50	8.72	46.68	2.37	2.82	1.70	0.18	0.90	0.80	1.00	1.54
B-E4	4.09	24.21	8.62	47.76	2.19	2.79	1.79	0.16	0.79	0.78	0.91	1.38
B-E5	4.23	24.60	8.79	46.57	2.33	2.85	1.73	0.17	0.89	0.82	1.02	1.56
B-E 平均值	4.13	24.39	8.70	47.33	2.28	2.81	1.73	0.17	0.83	0.79	0.94	1.47
O-E1	1.25	5.92	10.15	69.19	1.93	0.53	2.48	0.63	1.33	1.72	0.81	1.22
O-E2	1.27	5.90	9.91	69.05	1.96	0.56	2.64	0.62	1.48	1.68	0.93	1.28
O-E3	1.28	5.90	9.92	69.02	1.95	0.55	2.63	0.63	1.49	1.75	0.93	1.29
O-E4	1.26	5.84	10.04	68.81	2.03	0.57	2.45	0.65	1.36	1.84	0.96	1.31
O-E5	1.27	6.10	10.01	68.96	2.04	0.52	2.69	0.60	1.52	1.71	0.81	1.25
O-E 平均值	1.27	5.93	10.01	69.01	1.98	0.55	2.58	0.63	1.44	1.74	0.89	1.27

依诺肝素钠中也存在一定差异，P-E、B-E 和 O-E Δ I S 到 Δ IVS 的总相对含量平均值分别为 82.31%、84.55%、86.22%，3 种依诺肝素钠的硫酸化二糖组分总含量依次增多；P-E、B-E 和 O-E Δ I A 到 Δ IV A 的总含量平均值分别为 8.57%、6.99%、5.74%，3 种依诺肝素钠的乙酰化二糖组分总含量依次减少。这些

二糖的差异主要由原料肝素的 8 种主要二糖 (Δ I S 到 Δ IVS 和 Δ I A 到 Δ IV A) 含量不同引起的，而由制备工艺决定的含低分子特征结构糖单元之间的差异相对较小，如四糖 Δ I S- I S (1, 6-anhydr) 等。SAX-HPLC 基本组成单元信息见表 4。

表 4 SAX-HPLC 基本组成单元信息

Tab 4 Basic building blocks of SAX-HPLC

序号	名称	结构
1	Δ IVS	不饱和糖醛酸-N-硫酸化葡糖胺
2	Δ III S	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-硫酸化葡糖胺
3	Δ II S	不饱和糖醛酸-N-硫酸化 6 位硫酸化葡糖胺
4	Δ I S	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-硫酸化 6 位硫酸化葡糖胺
5	Δ IV A	不饱和糖醛酸-N-乙酰化葡糖胺
6	Δ III A	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-乙酰化葡糖胺
7	Δ II A	不饱和糖醛酸-N-乙酰化 6 位硫酸化葡糖胺
8	Δ I A	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-乙酰化 6 位硫酸化葡糖胺
9	Δ I S (1, 6-anhydr)	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-硫酸化葡糖胺 -1, 6-脱水结构
10	Δ II A- II Sglu	不饱和糖醛酸-N-乙酰化 6 位硫酸化葡糖胺-糖醛酸-N-硫酸化 3 位, 6 位硫酸化葡糖胺
11	Δ I S-IdoA2S	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-硫酸化 6 位硫酸化葡糖胺 -2 位硫酸化艾杜糖醛酸
12	Δ I S- I S (1, 6-anhydr)	不饱和 2 位硫酸化糖醛酸-N-硫酸化 6 位硫酸化葡糖胺 -2 位硫酸化艾杜糖醛酸-N-硫酸化甘露糖胺 -1, 6-脱水结构

3.2.2 依诺肝素钠的亲水作用 HILIC-ESI-MS 二糖对比 3 种依诺肝素钠完全酶解后组分定量的 HILIC-ESI-MS 数据见表 5。从 8 种主要二糖定量结果来看，对比 Δ I S 和 Δ III S 组分，P-E、B-E 和 O-E 之间存在较大差异，B-E 的高硫酸化二糖单元 Δ I S 结构 (平均 44.84%) 远低于 P-E 的 Δ I S 组分 (平均 64.67%) 和 O-E 的 Δ I S 组分 (平均 67.51%)，B-E 的 Δ III S 组分 (平均 33.64%) 远高于 P-E 的 Δ III S 组分 (平均 8.34%) 和 O-E 的 Δ III S 组分 (平均 10.93%)。此外，

Δ I S 到 Δ IVS 和 Δ I A 到 Δ IV A 的总相对含量在 3 种依诺肝素钠中也存在较为显著的差异，P-E、B-E 和 O-E Δ I S 到 Δ IVS 的总相对含量平均值分别为 85.52%、91.16%、92.41%；P-E、B-E 和 O-E Δ I A 到 Δ IV A 的总相对含量平均值分别为 6.63%、2.87% 和 2.80%。这些差异源于肝素的 8 种二糖含量不同，而由制备工艺决定的含低分子特征结构糖单元之间的差异相对较小，与 SAX-HPLC 的结果较为一致。HILIC-ESI-MS 基本组成单元信息见表 6。

表 5 依诺肝素钠 HILIC-ESI-MS 糖结构相对含量 (%)

Tab 5 Relative content of HILIC-ESI-MS saccharide structure of enoxaparin sodium (%)

编号	8 种主要二糖							
	Δ IV S	Δ III S	Δ II S	Δ I S	Δ IV A	Δ III A	Δ II A	Δ I A
P-E1	2.20	8.20	10.26	65.42	1.04	1.03	2.48	1.84
P-E2	2.27	8.26	10.10	64.88	1.10	1.06	2.55	1.91
P-E3	2.40	8.44	10.02	64.29	1.16	1.14	2.63	1.98
P-E4	2.39	8.66	10.35	64.19	1.06	1.05	2.45	1.87
P-E5	2.48	8.15	10.05	64.59	1.13	1.09	2.66	1.92
P-E 平均值	2.35	8.34	10.16	64.67	1.10	1.07	2.55	1.90
B-E1	5.00	34.05	8.01	44.16	1.18	1.03	0.62	0.26
B-E2	4.92	33.56	7.79	44.90	1.20	0.99	0.60	0.30
B-E3	4.55	33.26	7.67	45.64	1.09	0.93	0.52	0.28
B-E4	4.91	34.02	7.89	45.02	0.97	0.93	0.49	0.29
B-E5	4.81	33.31	7.85	44.48	0.91	0.96	0.52	0.29
B-E 平均值	4.84	33.64	7.84	44.84	1.07	0.97	0.55	0.28
O-E1	1.03	11.09	12.80	67.85	0.53	0.25	1.25	0.93
O-E2	0.97	10.46	13.10	68.14	0.47	0.22	1.13	0.87
O-E3	0.96	10.60	13.00	68.35	0.45	0.21	1.09	0.87
O-E4	0.96	12.04	13.11	65.43	0.52	0.29	1.22	0.87
O-E5	0.96	10.44	12.96	67.78	0.51	0.26	1.18	0.84
O-E 平均值	0.98	10.93	12.99	67.51	0.50	0.25	1.17	0.88

编号	含低分子特征结构单元					肝素与蛋白质连接域寡糖			
	Disaccharide (2S), NRE	Disaccharide (3S), NRE	Disaccharide (2S), RE	Tetrasaccharide (5S), RE	Trisaccharide (4S)	Δ II S- II Sglu	Δ II A- II Sglu	Linkageox	Linkage
P-E1	0.19	1.34	0.63	2.47	1.12	0.10	0.19	1.18	0.00
P-E2	0.20	1.32	0.63	2.38	1.46	0.10	0.26	1.22	0.00
P-E3	0.20	1.16	0.64	2.45	1.36	0.08	0.25	1.49	0.00
P-E4	0.22	1.35	0.66	2.45	1.23	0.17	0.38	1.25	0.00
P-E5	0.18	1.19	0.64	2.38	1.33	0.18	0.37	1.49	0.00
P-E 平均值	0.20	1.27	0.64	2.43	1.30	0.13	0.29	1.33	0.00
B-E1	0.15	1.31	0.37	2.12	1.01	0.15	0.06	0.21	0.01
B-E2	0.14	1.36	0.40	2.14	0.98	0.16	0.05	0.16	0.02
B-E3	0.12	1.26	0.35	2.17	1.17	0.21	0.07	0.31	0.00
B-E4	0.11	1.33	0.32	2.00	1.08	0.21	0.05	0.10	0.00
B-E5	0.12	1.43	0.33	2.98	1.18	0.32	0.09	0.10	0.00
B-E 平均值	0.13	1.34	0.35	2.28	1.08	0.21	0.06	0.18	0.01
O-E1	0.05	0.56	0.61	1.34	0.85	0.11	0.19	0.23	0.00
O-E2	0.06	0.64	0.55	1.49	0.95	0.18	0.23	0.25	0.01
O-E3	0.06	0.60	0.55	1.43	0.91	0.16	0.22	0.24	0.00
O-E4	0.08	0.76	0.48	1.84	1.09	0.33	0.38	0.32	0.00
O-E5	0.08	0.57	0.49	1.63	1.02	0.24	0.37	0.33	0.00
O-E 平均值	0.07	0.63	0.54	1.55	0.96	0.20	0.28	0.27	0.00

SAX-HPLC 与 HILIC-ESI-MS 是利用了两种不同原理来分析二糖结构的方法，并互为佐证，两种方法得到的 P-E、B-E、O-E 二糖组分差异基本一致。3 种依诺肝素钠的主要差异源自原料肝素的骨架结构差异，从 SAX-HPLC 与 HILIC-ESI-MS 的二糖结果看，都显示 O-E 和 P-E 的相似性较高，而 B-E 和 P-E 相似性较低。

3.3 依诺肝素钠的 2D-HSQC-NMR 对比

核磁共振谱 (NMR) 对分子的结构变化非常敏感，可用于表征低分子肝素的结构。2D-HSQC-NMR 技术能确定低分子肝素的单糖组成及 N-乙酰基、N-硫酸基和 O-硫酸基的具体位置，在二糖分析的基础上进一步利用该技术对比分析，可获得特

定基团和单糖组成等更精细的结构特征性差异。

由 3 种依诺肝素钠 2D-HSQC-NMR 图谱 (见图 1) 可以看出，P-E1、B-E1 和 O-E1 在整体结构上非常相似，但从含量数据上看仍存在一些较为明显的差异。如 B-E1 中 6OH 和 NS 糖单元的含量分别为 41.32% 和 74.35%，明显高于 P-E1 (6OH: 19.26% 和 NS: 68.89%) 和 O-E1 (6OH: 16.34% 和 NS: 69.08%)，而 B-E1 中 NAc 和 6S 糖单元的含量分别为 3.98% 和 58.68%，明显低于 P-E1 (NAc: 8.21% 和 6S: 80.74%) 和 O-E1 (NAc: 6.21% 和 6S: 83.66%)。从以上单糖的含量数据可以看出，P-E1、B-E1 和 O-E1 之间存在一定差异，整体上 O-E1 与 P-E1 的相似性较高，见表 7。

表 6 HILIC-ESI-MS 基本组成单元信息
Tab 6 Basic building blocks information of HILIC-ESI-MS

序号	名称	结构
1	Δ IV S	不饱和和糖醛酸 -N- 硫酸化葡萄糖胺
2	Δ III S	不饱和和 2 位硫酸化糖醛酸 -N- 硫酸化葡萄糖胺
3	Δ II S	不饱和和糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
4	Δ I S	不饱和和 2 位硫酸化糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
5	Δ IV A	不饱和和糖醛酸 -N- 乙酰化葡萄糖胺
6	Δ III A	不饱和和 2 位硫酸化糖醛酸 -N- 乙酰化葡萄糖胺
7	Δ II A	不饱和和糖醛酸 -N- 乙酰化 6 位硫酸化葡萄糖胺
8	Δ I A	不饱和和 2 位硫酸化糖醛酸 -N- 乙酰化 6 位硫酸化葡萄糖胺
9	disaccharide (2S), NRE	2 位硫酸化艾杜糖醛酸 -N- 硫酸化葡萄糖胺
10	disaccharide (3S), NRE	2 位硫酸化艾杜糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
11	disaccharide (2S), RE	己糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺 -2 位硫酸化己糖醛酸 -N- 硫酸化葡萄糖胺
12	tetrasaccharide (5S), RE	N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺 -2 位硫酸化己糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
13	trisaccharide (4S)	不饱和和 2 位硫酸化糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺 -2 位硫酸化己糖醛酸
14	Δ II S- II Sglu	不饱和和糖醛酸 -N- 硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺 -葡萄糖醛酸 -N- 硫酸化 3 位硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
15	Δ II A- II Sglu	不饱和和糖醛酸 -N- 乙酰化 6 位硫酸化葡萄糖胺 -葡萄糖醛酸 -N- 硫酸化 3 位硫酸化 6 位硫酸化葡萄糖胺
16	Linkageox	不饱和和糖醛酸 -半乳糖 -半乳糖 -木糖 -O- 丝氨酸 ox
17	Linkage	不饱和和糖醛酸 -半乳糖 -半乳糖 -木糖 -O- 丝氨酸

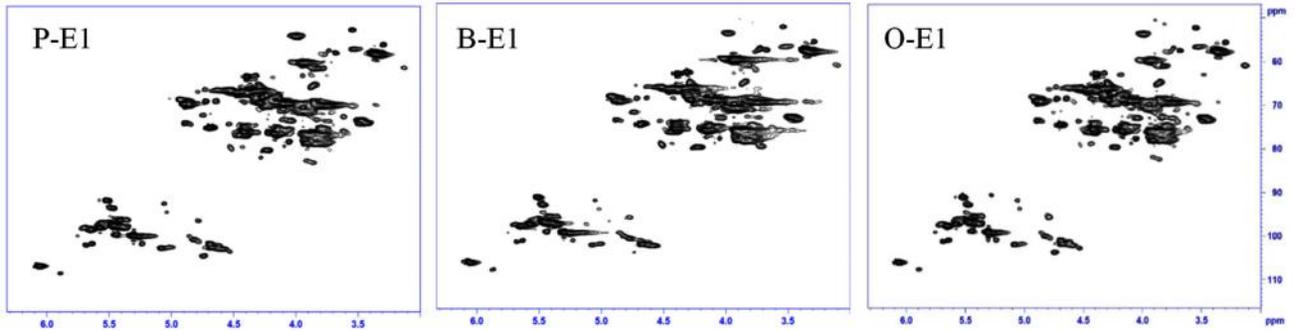


图 1 依诺肝素钠的 2D-HSQC-NMR 图谱

Fig 1 2D-HSQC-NMR spectra of enoxaparin sodium

表 7 依诺肝素钠 2D-HSQC-NMR 单糖结构含量 (%)

Tab 7 Content of 2D-HSQC-NMR monosaccharide structure of enoxaparin sodium (%)

编号	UA2S	UA	IdoA2S	IdoA	GlcA2S	GlcA	GalA	NS	3S	NAc	an.A	an.M
P-E1	17.23	0.91	54.20	6.49	4.11	16.68	0.38	68.89	3.56	8.21	1.69	2.16
B-E1	16.45	0.81	60.20	3.63	6.33	12.38	0.19	74.35	2.68	3.98	0.93	1.24
O-E1	17.91	0.95	55.76	6.57	4.08	14.54	0.19	69.08	3.75	6.21	1.34	2.41

编号	GlcNS-bRed	GlcNS-aRed	ManNS-aRed	GlcNAc-aRed	IdoA2S-bRed	Xyl	Epox	6OH	6S
P-E1	1.05	8.09	3.70	0.21	0.80	0.95	0.71	19.26	80.74
B-E1	1.02	8.17	3.86	0.07	0.42	2.45	0.82	41.32	58.68
O-E1	2.19	7.62	3.59	0.45	0.87	1.18	1.29	16.34	83.66

3 种依诺肝素钠 2D-HSQC-NMR 的 6S 含量排序为 O-E1 > P-E1 > B-E1, 与 SAX-HPLC 和 HILIC-ESI-MS 中 Δ I A、 Δ II A、 Δ I S 和 Δ II S 的总相对含量排序一致。2D-HSQC-NMR 与 SAX-HPLC 和 HILIC-ESI-MS 相比, 还提供了更准确的 1, 6-脱水结构 (an.A 和 an.M) 和还原端结构 (GlcNS-bRed、GlcNS-aRed、ManNS-aRed、GlcNAc-aRed、IdoA2S-bRed), 更有助于人们深入了解依诺肝素钠结构的复杂性。2D-HSQC-NMR 基本组成单元信息见表 8。

4 结论

本文以猪肠、牛肠和羊肠肝素为原料, 采用成

盐、酯化和 β -消除降解等步骤, 制备得到 3 种依诺肝素钠, 通过 GPC 方法检测分子量, 生色底物法检测效价, SAX-HPLC 和 HILIC-ESI-MS 检测二糖组分含量, 2D-HSQC-NMR 检测单糖组分含量。3 种依诺肝素钠的分子量及其分布相当, 而效价有较大差异, 抗 Xa 因子效价排序为 P-E \approx O-E > B-E, 二糖组分上 O-E 的硫酸化程度最高, 其次为 P-E 和 B-E; 而 P-E 的乙酰化程度最高, 其次为 O-E 和 B-E。单糖组分上 6OH 和 NS 糖单元为 B-E 中的含量高于 P-E 和 O-E, 而 NAc 和 6S 糖单元为 B-E 中的含量低于 P-E 和 O-E。研究表明, 受起始原料种

表 8 2D-HSQC-NMR 基本组成单元信息
Tab 8 Basic building blocks information of 2D-HSQC-NMR

序号	名称	结构	序号	名称	结构
1	UA2S	2 位硫酸化糖醛酸	12	an.M	1, 6-脱水甘露糖内醚
2	UA	糖醛酸	13	GlcNS-bRed	还原端 β 型 <i>N</i> -硫酸化葡萄糖胺
3	IdoA2S	2 位硫酸化艾杜糖醛酸	14	GlcNS-aRed	还原端 α 型 <i>N</i> -硫酸化葡萄糖胺
4	IdoA	艾杜糖醛酸	15	ManNS-aRed	还原端 α 型 <i>N</i> -硫酸化甘露糖胺
5	GlcA2S	2 位硫酸化葡萄糖醛酸	16	GlcNAc-aRed	还原端 α 型 <i>N</i> -乙酰化葡萄糖胺
6	GlcA	葡萄糖醛酸	17	IdoA2S-bRed	还原端 β 型 2 位硫酸化艾杜糖醛酸
7	GalA	半乳糖醛酸	18	Xyl	木糖
8	NS	<i>N</i> -硫酸化葡萄糖胺	19	Epox	环氧化物
9	3S	3 位硫酸化葡萄糖胺	20	6OH	6 位羟基葡萄糖胺
10	NAc	<i>N</i> -乙酰化葡萄糖胺	21	6S	6 位硫酸化葡萄糖胺
11	an.A	1, 6-脱水葡萄糖内醚			

源影响, B-E 抗 Xa 的效价低, 不符合 USP 标准, 8 种主要二糖和多种单糖组分与 P-E 差异大, 而 O-E 效价、8 种主要二糖和多种单糖组分与 P-E 较为接近; B-E 和 O-E 分子量及其分布、效价比值可满足 USP 标准, 含低分子特征结构糖单元含量相近。

综上分析, 牛源、羊源依诺肝素钠与猪源依诺肝素钠有一定的相似性, 尤其是羊源依诺肝素钠, 更加具有作为依诺肝素钠品种评估的可行性, 但是否支持成药, 还需对其制剂进行充分的免疫原性研究与活性成分对比研究, 以满足临床用药的安全与有效。牛源依诺肝素钠虽抗 Xa 效价偏低, 不符合依诺肝素钠 USP 标准, 但仍具备抗凝、抗炎等药用价值, 可根据其临床表现, 确定未来的疾病治疗方向和剂量标准, 并尝试作为新的低分子肝素品种进行申报。

我国是牛和羊的主要养殖基地, 目前牛饲养量位列全球第 3 位, 绵羊饲养量居全球首位, 山羊饲养量位列全球第 2 位, 在数量上我国具有天然的养殖优势。尽管牛、羊的朊病毒(痒病)风险依然存在, 但人们已有办法去预防和控制^[12]。如能将结构相似性较高的羊源依诺肝素钠优先引入肝素市场, 可极大地缓解肝素供应种源单一的紧张形势。羊源和牛源作为具有开发潜力的物种, 若能在确保其肝素产品安全与有效的前提下引入市场, 不仅降低了单一种源的风险, 满足常规市场和穆斯林市场的需求, 还能有效利用羊肠和牛肠资源, 使我国畜牧业产业链的市场价值得到进一步开拓。

参考文献

- [1] Rieux R. Mixtures of particular LMWH heparinic polysaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events: US, 5389618 [P]. 1995-02-14.
- [2] Schonberger L. New variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 1998, 12 (1): 111-121.
- [3] Keire D, Mulloy B, Chase C, et al. Diversifying the global heparin supply chain: reintroduction of bovine heparin in the United States? [J]. *Pharm Technol*, 2015, 39 (11): 28-35.
- [4] 金永生, 靳彩娟, 王宁霞. 一种羊依诺肝素钠及其制备方法与应用: 106243246B [P]. 2019-05-24.
- [5] 管玉东. 猪与牛来源肝素制备低分子肝素的比较研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [6] Liu XY, St Ange K, Fareed J, et al. Comparison of low-molecular-weight heparins prepared from bovine heparins with enoxaparin [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, 23 (6): 542-553.
- [7] Chen JL, Yu YL, Fareed J, et al. Comparison of low-molecular-weight heparins prepared from ovine heparins with enoxaparin [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2019, 25: 1-9.
- [8] 刘欣悦. 质谱联用新技术在低分子肝素药物质量控制方面的应用 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [9] 金飞, 徐飞虎, 王彦广. 依诺肝素钠的制备与纯化 [J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39 (1): 15-17.
- [10] Sun XJ, Sheng AR, Liu XY, et al. Comprehensive identification and quantitation of basic building blocks for low molecular weight heparin [J]. *Anal Chem*, 2016, 88 (15): 7738-7744.
- [11] Hakim A, Keire D, Buhse L, et al. Characterization of currently marketed heparin products: composition analysis by 2D-NMR [J]. *Anal Methods*, 2013, 5 (12): 2984-2994.
- [12] 顾静文, 廖冰. 牛、羊典型朊病毒类疾病诊断与防控策略 [J]. *今日畜牧兽医*, 2021, 37 (4): 18.

(收稿日期: 2024-05-09; 修回日期: 2024-08-14)

综述

基于多维谱效关系的中药质量控制与安全性评价的研究进展

廖威, 李文晴, 吕颖, 鲁文飞, 曹建生, 冯宇飞* (黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 中药为宝贵的传统医学资源, 但由于中药发挥药效成分不明确、中药安全性评价体系以及质量控制不够完善限制了其临床应用价值。中药不同于西药, 其成分复杂、作用靶点多, 一种药效的体现往往是多种成分协同作用的结果, 且中药药效易受采收时节、炮制方法、不同产地以及不同配伍等的影响, 所以中药的安全性评价和质量控制一直以来备受关注。本文对基于多维谱效的中药安全性评价以及质量控制进行整理, 为中药安全性评价和质量控制的进一步研究提供理论支持。

关键词: 多维谱效关系; 中药质量控制; 安全性评价

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0156-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.023

Quality control and safety evaluation of traditional Chinese medicine based on multidimensional spectral effect relationship

LIAO Wei, LI Wen-qing, LYU Ying, LU Wen-fei, CAO Jian-sheng, FENG Yu-fei* (*College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Traditional Chinese medicine, a longstanding traditional medical practice holds significant importance in China. Nonetheless, many Chinese medicines face challenges in gaining recognition from modern medicine due to factors such as ambiguous ingredient compositions, inadequate safety evaluation systems, and inadequate quality control measures. In contrast to Western medicines, traditional Chinese remedies are characterized by intricate components and diverse targets, often exerting their medicinal effects through a synergistic interplay of multiple components. The efficacy of traditional Chinese medicines is influenced by factors like harvest time with seasonal variations, preparation methods, various origins, and unique combinations. Consequently, the safety assessment and quality assurance of traditional Chinese medicines have been subjects of considerable scrutiny. This study focused on the multidimensional spectral effect of traditional Chinese medicine, aiming to cast insight on the safety evaluation and quality control of traditional Chinese medicines and offer a basis for future research.

Key words: multidimensional spectral effect relationship; quality control of traditional Chinese medicine; safety evaluation

与化学药物相比, 中药在治疗疾病时是以多成分、多靶点、多环节为特征, 充分体现了中医整体观的思想, 中药的功效取决于多种成分的联合作用, 这与化学药物具有单一活性成分的特点是截然相反的。因此, 寻找符合中医整体观思想的方法来阐明中药的有效成分势在必行, 也是当

务之急。谱效关系是中医药业内人士提出和倡导的处于学术前沿的中药现代化研究思路, 是建立在中药指纹图谱研究基础之上, 将中药指纹图谱与药效学研究结果通过化学计量学模型进行关联, 建立起中药指纹图谱与疗效内在关系的一门学科^[1-2]。谱效关系理论的建立, 从一个全新视角

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82174232); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (No.YQ2019H031)。

作者简介: 廖威, 男, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型和新技术研究, email: 727200242@qq.com *通信作者: 冯宇飞, 女, 教授, 主要从事中药新剂型和新技术研究, email: fuf-002@163.com

解决了中医药研究中存在的有效成分分析与疗效研究相脱离的问题,是被研究人员广泛认可筛选中药活性成分更准确的方法,为从复杂中药成分中挖掘真正的活性成分群提供了有效的研究方法和手段。因此,本文将近年来基于多维谱效关系的中药质量控制和安全性评价进行总结,以期为中药安全性评价、质量控制及中药的现代化发展提供参考。

1 中药多维谱效关系

中药谱效关系的研究不仅为中药材质量标准的提升提供了可行的研究思路,也为中药药效物质基础的研究提供了新的研究模式。中药包含的化合物种类复杂多样,且每一类化合物又由数个甚至数十个化合物组成,不同种类化合物发挥不同的药理作用,每个单体化合物对于药效作用的贡献程度也不尽相同。这就表明每个中药都是一个化学成分多样、药效多样的复杂体系,所以单一的化学指纹图谱和药效指标难以全面满足中药的药效物质信息需求,这也会导致对中药质量的客观评价以及控制出现偏差^[3-5]。

1.1 基于“多维指纹图谱”的中药谱效关系

中药谱效关系的前提条件是获得准确的“谱”和“效”。随着研究的深入,有学者相继提出“多维谱效”的概念,李云飞等^[6]在研究中发现单张 HPLC 谱图无法完整地表征出复方丹参滴丸的化学组成特征,遂提出“多元指纹图谱”(multiple fingerprinting),后基于多元谱效关系研究的延伸,又提出“多源指纹图谱”(multi-resource fingerprinting),两者合并称为“多维指纹图谱”(multi-dimensional fingerprinting)。该课题组认为中药化学成分组成复杂多样,为了得到准确的“谱”,研究人员需综合运用多种分析手段,构建来源各异、信息互补的多维指纹图谱,以全面反映复杂物质体系的整体化学特性。基本思路是利用多个检测器构建指纹图谱,或采用液相和气相结合的方法构建更为完整、准确的多维指纹图谱。有不少学者对多维指纹图谱进行了探索性研究。胡芳等^[7]用 DAD 和 ELSD 检测器建立了补中益气丸的 HPLC-DAD 和 HPLC-ELSD 指纹图谱,运用 ELSD 检测器弥补了 DAD 检测器不能检测紫外吸收峰非特征性物质的不足,同时分析出苷类、酯类、黄酮类化合物,完整地表征出补中益气丸的化学信息。该研究通过两种检测器得出两张指纹图谱并进行对照,得出交集和并集,过程较为烦琐,于是有学者将多种仪器串联,对样品进行更全面、更准确的检测和分析。陈璐等^[8]用 GC-MS 串联分析了波棱瓜子脂肪油中的有机酸、挥发油类成分。汤明杰等^[9]利用 HPLC-MS 串联,分析丹皮、赤芍、白芍中的有机酸、黄

酮类、多酚类物质。

以上所述“多维指纹图谱”研究大多关注于如何获得完整的指纹图谱,但没有涉及其他方面的研究,其核心思想在当时虽具有一定先进性,但其忽略了中药材治疗疾病过程中多环节的作用特点,在中药化学物质与药效的关系方面有一定的局限性。

1.2 基于“多维药效指标”的谱效关系

孙莉琼等^[10]提出与前者不一样的多维谱效的概念。其认为,谱效关系的主题不能脱离“效”,研究者应当结合中药药效及功能主治,尽可能多地选择与疗效密切相关的各种药效活性作为评价指标,探讨各化学成分对不同的药效靶标所发挥的作用,并针对不同的药效指标得出不一样的谱效关系,综合分析中药治疗疾病的物质基础。这样的研究思路更加符合中药材治疗疾病的特点,目前较为普遍的研究方法是将色谱峰与不同的药效活性数据进行分析。罗欢等^[11]通过酚红排泌法等 3 种方法考察了陈皮的化痰、抗炎、健胃作用,并运用数学统计方法将 3 组药效数据和指纹图谱中各色谱峰的峰面积相关联,得出了陈脂溶性成分中分别与化痰、抗炎和健胃作用显著相关的色谱峰。桃核承气汤作为逐瘀泻热的经典名方,对于妇科炎症、慢性肾炎等具有良好的治疗作用,陈淮臣等^[12]在 15 批桃核承气汤的指纹图谱中指出 9 个共有峰,用灰色关联度法(GRA)分别计算各共有峰与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素(IL)-10(IL-10)的关联度,确认桃核承气汤抗炎药效是多种成分协同作用的结果。上述研究均采用数学处理方法将中药或者复方的指纹图谱与多个药效指标相结合建立谱效关系模型,符合中药多靶点的特征,但每种数学处理方法的优缺点各有不同。

偏最小二乘法(PLSR)计算量小、预测精度高、无需剔除样本、易于定性解释,囊括了主成分分析(PCA)、聚类分析(CA)等多种方法的优点,目前已经成为中药谱效关系主要的数据处理方法,通常与 GRA 联用。PLSR 处理多变量间的线性关系,可以降低多重共线性和高维数据的影响,而 GRA 处理序列数据的关联度,可以降低数据的不确定性。两种方法优势互补,不仅可以降低谱效关系模型误差,还可提高解释性^[13]。

以上所述两种关于“多维谱效”的概念,侧重点各有不同,前者侧重于化学信息的完整性,后者侧重于药效信息的全面性。笔者认为,无论是指纹图谱,还是药效指标,都是谱效关系研究中不可缺少的一环,完整的指纹图谱能够反映出中药复杂的化学成分群,中药作用的不同靶标又需多种药效指标才能够体现出来,如果在谱效关

系研究中，能够将多源指纹图谱和多种药效指标通过合适的数学方法相结合，最后得出的中药药效物质基础更加准确、完整，中药的质量控制和安全性评价体系也能更加完善。如图 1 所示，中

药多维谱效关系既要包括多维指纹图谱的获取，又要包括多维药效指标的选定，最后再建立多维谱效关系数学模型。

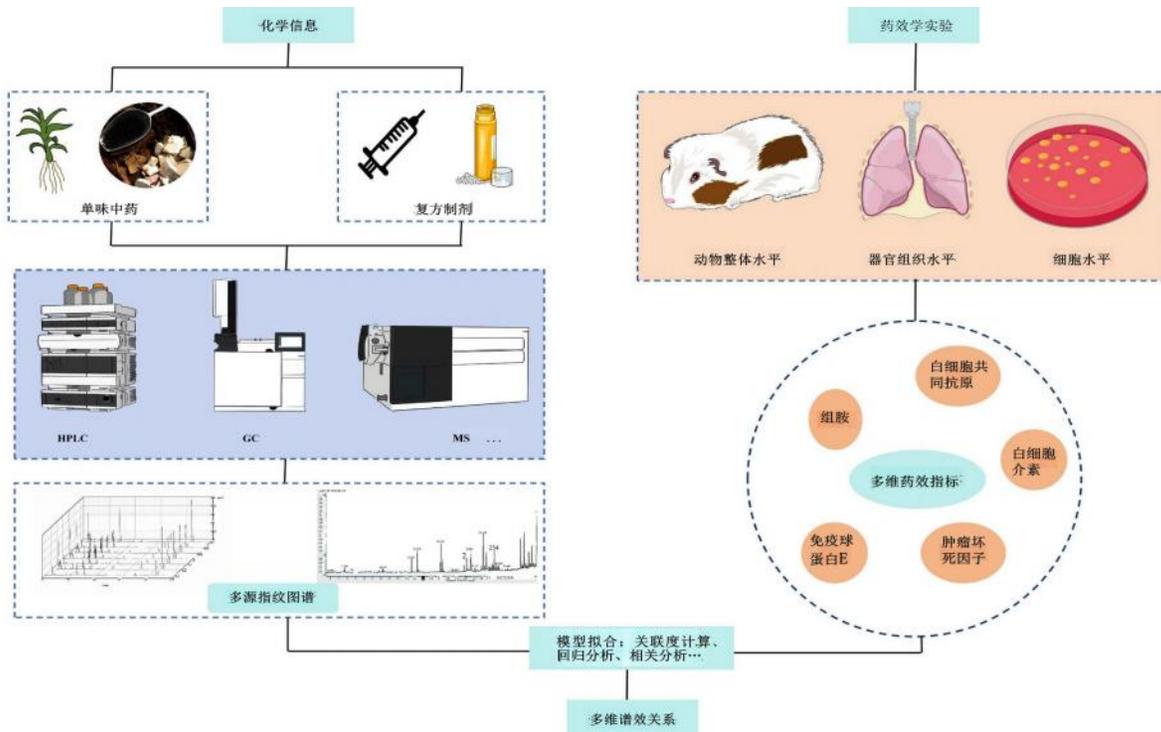


图 1 中药多维谱效关系示意图

Fig 1 Schematic diagram of multidimensional spectrum effect relationship of traditional Chinese medicine

2 中药质量控制

谱效关系研究作为筛选中药作用物质基础的重要方法之一，近年来广泛用于中药质量控制，如图 2 所示。中药材来源广泛（植物、动物以及矿物），种类繁多，且传统中药材讲究道地性^[14]。而目前中药材质量优劣不一，其质量控制在中药临床应用和实践中起着重要的作用^[15]，但通过对单一或某几个成分的含量控制，不足以反映药材的内在质量，因此提升中药材质量控制标准对中药材品质评价、栽培种植及深加工产品研究均具有深远的意义。谱效关系是目前能将化学成分与疗效相结合评价药材质量的方法，可使中药材的质量控制更加严谨。

2.1 多维谱效在中药单味药质量控制中的应用

同一种药材会因为产地不同、极性部位不同，在指标性成分含量上具有一定的差异性，谱效关系说明其在药效上也并不是完全相同。

在中医理论中，存在“同药异效”的概念，即相同的药材在不同的生长环境和气候条件下，可能会产生不同的药效。环境、土壤、气候等因素影响着药材的生长与成分，其品质和功效可能存在差异，因此，了解中药的产地差异对于确保其质量和疗效至关重要^[16]。李秋月^[17]通过对 37 种不同产



图 2 多维谱效在中药质量控制中的应用

Fig 2 Application of multidimensional spectrum effect relationship in quality control of traditional Chinese medicine

地延胡索中所含季铵碱的研究发现，发挥保护心肌细胞避免其缺氧复氧损伤作用的并非单一的某种化学成分，而是 6 种季铵碱协同作用，共同构成了延胡索抗心肌细胞缺血药效物质基础。

中药的不同极性提取部位呈现出明显的化学成分和药效差异。极性较高的提取物可能含有更多的水溶性成分，而极性较低的则可能富含脂溶性成

分。这些差异直接影响中药的药效，因此针对不同极性提取部位进行深入研究，有助于优化中药的提取工艺和提高其疗效^[18]。白关亚^[19]建立了青翘水提取物和不同极性提取物的 HPLC 指纹图谱，同时建立了大鼠急性肺损伤模型，证明青翘抗炎药效物质主要集中在乙酸乙酯提取物中，为青翘的质量控制提供了理论支持。

传统的中药质量控制方法主要依靠对化学成分的定量分析，但这种方法无法完全反映药物的质量特征和药效，通过多维谱效的方法，从化学、生物学等多个维度对药效进行评价，可以更全面地了解中药的药效特性，评价药物的质量，提高质量控制水平，确保中药的安全有效性。多维谱效在中药单味药质量控制中的应用如表 1 所示。

表 1 多维谱效在中药单味药质量控制中的应用

Tab 1 Application of multidimensional spectrum effect relationship in quality control of single traditional Chinese medicine

中药	药理作用	分析方法	药效指标	药效物质	文献
当归	活血、补血	HPLC	红细胞、血红蛋白、血小板	阿魏酸	[20]
鳖甲	抗纤维化	HPLC-DAD	LX-2 肝星状细胞	尿苷、2、4 号峰	[21]
鱼腥草	抗淋巴瘤细胞	GC-MS	肿瘤 B 淋巴细胞	伞花烃、(-)-4- 萘品醇、2, 4, 6- 三甲苯甲醇	[22]
头花蓼	抗炎	UPLC-MS	一氧化氮 (NO)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)	槲皮苷、鞣花酸、金丝桃苷	[23]
肉蔻	镇痛	GC-MS	足趾肿胀程度、辐射热痛觉阈值、第五腰椎背根神经节中神经激肽 1 受体、环氧酶 (COX) -2 的表达	5、6、8、9、12 号峰	[24]
西洋参	增强免疫力	LC-QTOF-MS/MS	中性粒细胞、巨噬细胞、 γ - 干扰素 (IFN- γ)	人参皂苷 F1、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rb ₃ 、Gypeniside X VII、丙二酰基人参皂苷、20 (S) - 人参皂苷 Rg ₃	[25]
茯苓	镇静催眠	UPLC	入睡率、入睡潜伏期、睡眠持续时间	猪苓酸 C、茯苓酸 A、茯苓酸 B 等	[26]
黄精	抗病毒	GC-MS	流感病毒神经氨酸	环阿屯醇、香叶醇等	[27]
丹参	抗氧化	HPLC	总抗氧化能力	1、3、5、6 号峰	[28]
广山楂	活血化痰	HPLC	高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、三酰甘油	3、5、6 号峰	[29]
木香	抗氧化、抗辐射	HPLC、LC-MS	1, 1- 二苯基 -2- 三硝基苯胍 (DPPH) 自由基清除率、脐带间充质干细胞活性	异木香酸甲酯、木香烯内酯、去氢木香内酯	[30]
锦灯笼	抗菌	UPLC-Q-Orbitrap、HRMS	抑菌活性	蔗糖脂肪酸酯类成分	[31]

2.2 多维谱效在中药复方制剂质量控制中的应用

近几年，中药谱效关系在中药复方制剂开发研究领域的应用逐年增多，为中药复方制剂质量控制、物质基础研究等提供了有效手段。中药复方的药效物质基础与作用机制研究是实现中药现代化的关键，应从多成分、多作用、多途径和多靶点的角度进行分析，采用多种方法来研究中药复方，而谱效关系研究正好满足这些需求^[32]。

中药复方的谱效相关性研究中，多以不同配伍或不同提取方法等制备的复方为研究对象，先进行指纹图谱分析，再通过药效学实验得到药效学指标，采用统计学方法进行谱效分析，从而确定中药复方中的主要活性成分。窦志华等^[33-34]对五仁醇胶囊含药血清指纹图谱和保肝作用的关联度进行分析，发现君药五味子所含有的木脂素类成分是其发挥保肝作用的主要药效物质基础。程玲等^[35]研究了六味五灵片的组成中药 20 个不同比例组合提取物对 LX-2 细胞的抑制作用，发现六味五灵片抗肝纤维化作用是多个成分相互作用

和影响的结果。谱效关系研究还能帮助研究者筛选出更好的配伍组合，如李金兵^[36]对逍遥散的抗抑郁作用进行了谱效关系研究，明确了抗抑郁的 11 个活性成分，筛选出道遥散抗抑郁有效部位的最佳配伍比例及最佳给药剂量。

目前，虽然中药复方制剂的质量控制已从单一成分测定逐渐向多成分控制转变，但成分 - 药效之间的有效结合仍有待解决。同时，在采用指纹图谱研究的过程中如何建立稳定性好、重现性好、精确度高、能够全面反映中药复方制剂有效化学成分的指纹图谱方法，快速、准确识别指纹图谱中的化学成分，以及正确地选择分析方法是运用中药谱效关系研究中中药复方制剂的关键所在。近年来，多维谱效在中药复方质量控制中的应用如表 2 所示。

2.3 多维谱效在中药炮制质量控制中的应用

中药炮制作为我国传承已久的制药技术，是中医传统中非常重要的环节。在加工炮制的过程中，中药化学成分存在水解、异构化、氧化、置

表 2 多维谱效在中药复方质量控制中的应用

复方	药理作用	分析方法	药效指标	药效物质	文献
气滞胃痛颗粒	促胃肠动力	HPLC	细胞的增殖率、鸟苷含量和 NO 含量	柚皮苷、新圣草苷、新橙皮苷等	[37]
补中益气丸	补血	HPLC-DAD、 HPLC-ELSD	红细胞比容、肝重指数	橙皮苷、黄芪甲苷、洋川芎内酯 I、毛蕊异黄酮、芒柄花素、藜本内酯	[38]
逍遥散	抗抑郁	1H-NMR	悬尾实验和强迫游泳实验的不动时间	柴胡皂苷	[39]
黑顺片	抗心衰	LC-QTOF-MS/MS	血压、心率	次乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱	[40]
还贝止咳方	止咳	HPLC	IL-4、IL-5、IFN- γ 、免疫球蛋白 (IgE)	13、32 号峰	[41]
葛根汤	抗 RSV	HPLC-Q-TOF-MS	抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 活性	原儿茶酸、没食子酸	[42]
疏风解毒胶囊	疏风解表	LC-MS	M3 受体的激动活性	二氢败酱苷、大黄酸、大黄素等	[43]
芍药甘草汤	脑保护	HPLC	丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、三磷酸腺苷 (ATP) 酶水平	芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷	[44]
金茵利胆胶囊	抗炎	HPLC	NO、TNF- α 、IL-6	柚皮苷、新橙皮苷	[45]
正骨紫金丸	活血化瘀	HPLC	大鼠腿部肿胀度、血液黏度	大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、丹皮酚、1 号峰	[46]
香果健消方	理气止痛	UPLC	小肠推进率、胃排空率	绿原酸、3, 5-O-二咖啡酰奎宁酸、4, 5-O-二咖啡酰奎宁酸	[47]

换、分解等变化^[48]，不仅会改变化学成分的含量，还可能改变成分种类，这给中药质量控制带来了新挑战。从炮制机制划分，中药炮制可分为增效、减毒、调节体内代谢吸收三类。

增效作为中药炮制的主要目的之一，其原则主要有两个。一方面，利用药性相似的辅料来增强药效，这种配伍原则有时被称为“用相似药协同”^[49]，比如醋味酸、苦，性温，入肝经，中药经过醋制后，主入肝经血分，具有收敛散瘀止痛等作用。杜伟锋等^[50]建立不同批次醋延胡索炮制前后的 HPLC 指纹图谱，选择多个药效指标来评价镇痛药效，建立了其指纹图谱和镇痛作用的相关性，结果显示延胡索经过醋炙后，多个峰与镇痛作用的关联度显著提升。另一方面，利用药性相反的辅料来制约中药药性的偏倚，也称为“用相反药调和”或“相峙相掇”，比如在炮制白术时，可以加入黄连作为辅料，以制约其温补性，减少药物对胃肠道的刺激，增加其止泻的效果。

“药以治病，因毒为能”，合理应用有毒中药的药效功能，降低其毒副作用，便可发挥药物的积极作用^[51]，中医药在悠久的发展历史中，积累了许多降低中药毒性的宝贵经验，其中对中药进行特殊加工，使药物毒性降低并保持原有药效，达到“减毒”的目的，是降低中药毒性最有效的方法之一。现代研究表明，钩吻在无成瘾性镇痛和抗肿瘤等方面具有明显的优势，但其毒性较大，且治疗量和中毒量相近。吴水生课题组^[52]开展了 12 种钩吻传统炮制减毒工艺研究，以镇痛药效、急性毒性为评价指标，建立 12 种钩吻炮制品镇痛、毒性谱效关系，结果显示，在保持原有药效的前提下，砂炒钩吻减毒作用最佳。

中药炮制后不仅会改变药理效应和化学成分，还可能引起体内吸收代谢过程等一系列复杂变化。因此有学者从化学成分入手，采取血药浓度测定法、血清药物化学法及药理效应法等药代动力学方法深入观察中药炮制前后活性或毒性成分在体内吸收、代谢的变化规律。姚玲玲等^[53]基于代谢组学方法，研究不同炮制程度的蜜炙甘草的次生代谢化合物差异性标志物，找出了不同炮制程度饮片的差异化合物。

在中药炮制的质量控制中，多维谱效通过结合多种检测技术和分析手段，对中药炮制前后的化学成分进行分析，并结合药效学评价，探究药效与化学成分之间的关系。这有助于明确化学成分的变化与药物“增效减毒”的相关性，从而指导中药炮制过程中的质量控制。多维谱效在中药炮制质量控制中的应用如表 3 所示。

3 中药安全性评价

近年来，中药及其制剂在中外的医疗和保健上的应用愈发广泛，随着大众的医药安全意识增强和监测机制的不断完善，中药安全性问题日渐突显，成为影响中医药国际化、现代化的关键因素之一。中药效果好、不良反应少，具有多成分、多靶点的优势。以往较长的一段时期内，人们普遍更注意中药的有效性，而对其安全性重视不足^[62]。近年来中药安全性问题频发，这不仅降低了大众对中医药的信任，更是阻碍了中医药的弘扬和发展。随着学者对中药的研究不断深入，传统意义上的对中药安全性的认知显露出局限性：中药材自身质量参差不齐，加工贮存过程不规范，尤其是中药及其制剂毒性的临床和实验研究缺乏等。此外，近年来，某些中药品种特别是中

表 3 多维谱效在中药炮制质量控制中的应用

Tab 3 Application of multidimensional spectral effect in quality control of traditional Chinese medicine processing

中药	药理作用	分析方法	药效指标	药效物质	文献
酒女贞子	抗氧化	HPLC	DPPH、ABTS、FRAP 法	红景天苷、木犀草苷等	[54]
干燥当归	补血	LC-MS	乙酰苯肼 (APH) 和环磷酸胺 (CPX)	阿魏酸、洋川芎内酯 A	[55]
麸煨诃子	固肠止泻	HPLC	IL-1 β 、TNF- α 、IL-10	9、21、25 号峰等	[56]
制枳壳	小肠推动作用	HPLC-Q-TOF-MS	小肠推进率	柚皮黄素、伞形花内酯、异牡荆素等	[57]
炒薏苡仁	利水渗湿	HPLC	胃泌素 (GAS)、胃动素 (MTL)、血管活性肠肽 (VIP)、生长抑素 (SS) 水平、体重、胸腺指数	2、4、7 号峰等	[58]
醋制延胡索	镇痛	HPLC	SOD、丙二醛、孕酮、雌二醇、前列腺素 E2 (PGE2)	原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、去氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素	[59]
蒸女贞子	抗氧化	HPLC	DPPH、ABTS	红景天苷、特女贞苷等	[60]
醋五味子	保肝	HPLC	谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、MDA、TNF- α	五味子乙素、五味子醇甲、5-羟甲基糠醛	[61]

药注射剂的过敏反应也越来越得到人们的重视，成为制约中药制剂产业化发展的瓶颈问题。

3.1 多维谱效在中药安全性评价方面的研究

中药的安全性评价和研究包括了三个层面的关键问题：描述性研究、阐述性研究、应用管理性研究^[63]。多维谱效作为阐述中药药效物质基础的一种研究方法，一般在描述性研究层面上对中药安全性评价进行初步探索。中药中的毒性成分主要有生物碱类、萜类、内酯类、毒性蛋白类、毒苷类、动物类和矿物类等^[64]。这些成分包括马钱子碱、砒霜、小檗碱等，过量使用可能导致神经毒性、器官损伤等不良影响。

生物碱作为中药的主要药效成分，通常只需要较低的浓度就有很强的生物活性，使用不当很容易发生毒副作用，因此，相关中药的安全性尤其值得注意。钩吻与马钱子同为胡蔓藤属，其药效物质和毒性物质都为生物碱类，黄美霞等^[65]在以往“马钱子发酵减毒”的研究基础上，猜测钩吻也能同样发酵减毒，将不同药用真菌接种到灭菌的钩吻药性基质上，然后用 HPLC 法对发酵前后菌质中的生物碱含量进行测定，发现其生物碱含量与钩吻生品比较呈下降趋势。

通常单味中药具有毒性，其制剂也会具有毒性，雷公藤具有显著的抗炎和调节免疫的作用，但其可能造成药物性肝损伤，在涉及雷公藤制剂的不良反映报道中，肝毒性发生率高达 40%^[66]，因此，找出雷公藤毒性物质基础，为其安全性评价提供理论支持势在必行。刘雪梅等^[67]建立了 7 个厂家雷公藤制剂高效液相色谱指纹图谱，选取 18 个峰作为研究对象，进行抗炎、免疫抑制药效及毒性的研究，找出了主要药效峰、主要药效兼毒效峰、主要药效次毒效峰，将雷公藤的有效成分对药效和毒效的贡献程度进行了区分。

3.2 多维谱效在中药注射剂安全性评价方面的研究

中药注射剂是临床治疗危急重症疗效显著的速效剂型，因其高疗效、高生物利用度而作为中药现代化的代表性剂型，但中药注射剂工艺水平落后，部分有效成分不清楚，评价体系不完善，导致中药注射剂的质量不稳定，不良反应频发，也使中药注射剂的产业发展处于严重的瓶颈期。冯宇飞课题组^[68]在前期的工作中选择载入《中国药典》及国家药品标准的注射用双黄连、刺五加注射液进行致敏物质基础研究，开创性建立了注射用双黄连全方及各组方药材的体内、体外多维指纹图谱，建立指纹图谱和致敏效应的多维谱效关系，寻找注射用双黄连的致敏物质基础，解决了注射用双黄连在安全性评价中的关键问题；该课题组首次将多维谱效关系手段应用于中药注射剂的研究中，创建了涵盖各组方药材成分的多维度指纹图谱，根据各组方化学成分的差异，运用国际认可的中药指纹图谱技术，建立了双黄连注射液中金银花、黄芩、连翘体内体外多元多维指纹图谱。以上多维度、多手段的表征及质控体系，为多维谱效关系的建立提供了全面的化学信息。以 RBL-2H3 细胞为模型检测类过敏相关指标，并结合体内体外色谱指纹图谱的化学信息，开展注射用双黄连的“指纹图谱与致敏作用相关性”研究，采用强迫引入回归分析、逐步回归分析和双变量相关分析得到与注射用双黄连的类过敏反应相关性最为密切的 5 个化学成分，可能为致敏物质基础^[69-70]。

基于刺五加注射液中间体总蛋白提取物具有免疫原性的特征，有研究以中药指纹图谱的思路为指导，基于 I 型过敏反应多维的药理学指标，建立刺五加总蛋白的多维谱效关系，筛选刺五加注射液的致敏物质基础，并进一步采用蛋白质免疫印记分析技术进行免疫活性蛋白的筛选，采用质谱技术检测免疫印记分析所得的目标条带，寻

找刺五加注射液中的致敏物质基础,结果表明,刺五加蛋白提取液中分子量约为 60 000 的蛋白质可与致敏豚鼠血清免疫球蛋白 E (IgE) 结合,为主要过敏原,该研究成果为含蛋白类杂质的中药注射剂的安全性评价提供了方法学借鉴^[71]。

4 讨论

经过多年的探索,许多新策略被应用到中药多维谱效关系研究中,如基于网络药理学和分子对接的机制探索、基于一测多评(QAMS)法的多组分质量控制等。刘谊民等^[72]建立了淫羊藿抗骨质疏松谱效关系模型,利用网络药理学预测了 5 种成分作用的关键靶点和代谢途径。王茜等^[73]通过分子对接技术对冻干熊胆粉降脂作用谱效关系进行分析,结果表明牛磺熊去氧胆酸、牛黄鹅去氧胆酸与过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、肝 X 受体(LXRs)等靶点结合具有较强的降脂活性。陈志勇等^[74]将多维谱效关系和 QAMS 技术整合,对大果飞蛾藤的质量进行评价,揭示了大果飞蛾藤清除 DPPH 自由基和抑制黄嘌呤氧化酶活性的物质基础,同时以东莨菪素为内标物,建立了大果飞蛾藤的 QAMS 质量控制新模式。

多维谱效关系研究作为中药质量控制和安全性评价的有效途径,需要从“多源”获取指纹图谱,将药效数据拓展到多层次、多指标,同时在数据处理上要将多个指标综合分析,合理甄别并剔除冗余的数据,多角度全面评价中药质量,有效地对中药产品进行全过程的质量控制,弥补中药及其复方制剂相对于化药质量不稳定的缺点。在当前的中药质量控制与安全性评价研究中,虽然多维谱效关系已被广泛应用,但仍有进步空间。

目前临床上基本使用复方制剂进行治疗,实验研究都集中在单一中药上,但单一中药的谱效关系研究容易忽略不同中药之间的相互作用,导致实验与临床脱轨。笔者认为,在后续的多维谱效关系研究中,复方制剂中不同中药的相互作用,如“君臣佐使”应作为一个主要的研究方向,其研究方法是将复方制剂进行拆方或者改变配伍比例,获取不同拆方或配伍的多源指纹图谱,再从多维度、多层次选取药效指标,建立谱效关系,更加准确地找出复方制剂的药效物质基础,为其质量控制提供参考。

现有的多维谱效关系模型仍有待进一步完善,尤其是在数据处理、药效模型和验证方面存在一定局限性,需要更加精准的方法来揭示中药的复杂成分与药效之间的关系。在数据处理方面,对于采用何种数据分析方法进行分析并没有统一的规定,大多数研究只是单一地采用 GRA 和 PLS 建立谱效关

系模型。通过单一方法建立的建模结果可能存在局限性,后续研究应尝试结合多种统计分析方法,从多个角度探索模型中的有效信息。在药效模型方面,中医治疗依赖于整体观点来反映疗效,需要更理想的体内模型来保证谱效关系研究结果的准确性和适应性。在临床上,中医讲究辨证论治,即不同个体、不同症候需要考虑不同的用药,因此如何复现一个具有代表性的疾病模型是谱效关系研究的一大挑战。还有不可忽略的一点,目前大多数研究都没有在建立谱效关系之后对其结果进行验证,笔者认为,使用单体化合物对研究结果进行验证,才符合科学研究的严谨性。

综上,随着现代分析技术的飞速发展,符合中医整体观点的药效学模型和药效指标不断完善,数据处理方式逐步多元化,中药多维谱效关系作为中药质量控制的有效手段,可以实现对中药的全面评价和有效控制,推动中药研究向着更加科学、规范和健康的方向发展。

参考文献

- [1] Shen CH, Liu CT, Song XJ, et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1090: 73-80.
- [2] Xu GL, Xie M, Yang XY, 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.
- [3] 万新军. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10 (10): 52-53.
- [4] 曾令军, 林兵, 宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (8): 1425-1432.
- [5] Zhu CS, Lin ZJ, Xiao ML, et al. The spectrum-effect relationship—a rational approach to screening effective compounds, reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14 (3): 177-184.
- [6] 李云飞, 程翼宇, 范晓辉. 中药多维谱效关系研究思路探讨 [J]. *中国天然药物*, 2010, 8 (3): 167-170.
- [7] 胡芳, 杨英来, 刘小花, 等. 双药效指标评价补中益气丸补血作用的谱效关系 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29 (5): 14-18.
- [8] 陈璐, 张梅, 雷有成, 等. 波棱瓜子脂肪油抗免疫性肝损伤的谱效关系研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (11): 123-126.
- [9] 汤明杰, 叶永山, 张旗, 等. 丹皮抗内毒素急性肺损伤活性的谱效关系研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (22): 4389-4393.
- [10] 孙莉琼, 戚进, 余伯阳. 多维谱效关系在中药研究中的进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44 (6): 487-493.
- [11] 罗欢, 卞海, 韩燕全, 等. 陈皮提取物多种药效作用的谱效关系研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2016, 17 (5): 22-25.
- [12] 陈淮臣, 刘文, 何利, 等. 经典名方桃核承气汤抗炎作用

- 的谱效关系研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 1-5.
- [13] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 680-683.
- [14] 张德伟, 阳文武, 封海霞, 等. 中药质量检测体系建设的思考与对策[J]. 中国药业, 2016, 25(16): 4-6.
- [15] 姜东京, 杜伟锋, 蔡宝昌. 中药谱效关系在中药质量控制方面的应用[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3811-3814.
- [16] 胡翔宇, 鄢梦洁, 赵珊珊, 等. 分析技术在中药产地溯源及真伪鉴别中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(4): 16-20.
- [17] 李秋月. 延胡索生物碱谱-效关系及相互作用研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [18] 王晨曦, 杨敏, 梁红宝, 等. 熊胆粉不同极性部位 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中草药, 2024, 55(3): 770-779.
- [19] 白关亚, 何盼, 李媛媛, 等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 1-6.
- [20] 杨英来, 崔方, 胡芳, 等. 当归补血、活血作用的谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3923-3927.
- [21] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2506-2510.
- [22] 张壮丽, 赵宁, 赵志鸿, 等. 鱼腥草挥发油抗淋巴瘤细胞谱效关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(3): 378-381.
- [23] 薛鑫宇, 刘昌孝, 周英, 等. 基于 UPLC-MS 联用技术的头花蓼抗炎谱效关系初探[J]. 中草药, 2018, 49(21): 5134-5141.
- [24] 肖俊勇, 李力, 从仁怀, 等. 多指标综合评定肉豆蔻挥发油缓解慢性炎性疼痛的谱效关系[J]. 医药导报, 2019, 38(10): 1264-1271.
- [25] 吕婧, 高燕, 赵瀚年. 基于 LC-QTOF-MS/MS 的西洋参皂苷类成分表征及其增强免疫力作用谱效关系研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(5): 2298-2304.
- [26] 王天合, 李慧君, 张丹丹, 等. 茯苓水提物 UPLC 指纹图谱的建立及其镇静催眠作用的谱效关系研究[J]. 中国药房, 2021, 32(5): 564-570.
- [27] 谭小青, 唐红珍, 高红伟, 等. 黄精 GC-MS 指纹图谱及体外抗病毒活性的谱效关系研究[J]. 中药药理学与临床, 2021, 37(1): 116-120.
- [28] 彭丽颖, 梁悦, 施君君, 等. 丹参 HPLC 指纹图谱及总抗氧化活性谱效关系研究[J]. 中药药理学与临床, 2022, 38(3): 110-115.
- [29] 张萌, 邓家刚, 韦玮, 等. 广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化瘀作用谱效关系研究[J]. 中草药, 2023, 54(2): 601-607.
- [30] 李硕, 王志允, 常华杰, 等. 木香 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化、抗辐射作用谱效关系研究[J]. 中草药, 2023, 54(8): 2580-2587.
- [31] 张传洋, 杨璐嘉, 陈翠平, 等. 锦灯笼 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 指纹图谱及抗菌活性的谱效关系[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(10): 1699-1707.
- [32] 王元清, 严建业, 师白梅, 等. 中药复方药效物质基础研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(5): 99-102.
- [33] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 基于方剂配伍含药血清“谱-效关系”的茵陈蒿汤保肝作用药效物质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(22): 1968-1972.
- [34] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 基于含药血清经时谱效关系的茵陈蒿汤保肝作用药效物质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(13): 1232-1237.
- [35] 程玲, 郑娟, 徐平华, 等. 六味五灵片抗肝纤维化作用的谱效关系[J]. 中成药, 2016, 38(4): 820-825.
- [36] 李金兵. 逍遥散抗抑郁有效部位最佳配伍筛选及谱效关系研究[D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [37] 包永睿, 王帅, 孟宪生, 等. 气滞胃痛颗粒促胃肠动力作用谱效关系网络模型的构建[J]. 中药材, 2014, 37(5): 828-832.
- [38] 胡芳, 杨英来, 刘小花, 等. 双药效指标评价补中益气丸补血作用的谱效关系[J]. 中药药理学与临床, 2013, 29(5): 14-18.
- [39] 郑晓芬, 陈磊, 秦雪梅, 等. 基于 ¹H-NMR 指纹图谱研究逍遥散乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物抗抑郁谱效关系[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(3): 563-568.
- [40] 吴环宇, 许妍妍, 卢志强, 等. 黑顺片血浆指纹图谱与抗心衰作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2015, 46(6): 861-865.
- [41] 张雯霞, 苗雨露, 冯敏, 等. 还贝止咳方不同极性部位止咳作用的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 120-127.
- [42] 耿子凯, 李雅群, 孙启慧, 等. 基于 HPLC-QTOF-MS 的葛根汤化学成分表征及其不同极性部位抗 RSV 的谱效关系研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 1944-1950.
- [43] 韩彦琪, 曹勇, 董亚楠, 等. 疏风解毒胶囊疏风解表的谱效关系研究[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3534-3540.
- [44] 王莹, 吴红杰, 管庆霞, 等. 基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠脑保护作用的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 56-62.
- [45] 曹凡, 宋忠兴, 陈琳, 等. 金茵利胆胶囊的体外抗炎活性评价及其谱效关系[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(4): 418-426.
- [46] 孙琪, 赵迪, 刘悦, 等. 正骨紫金丸 HPLC 指纹图谱及活血化瘀作用谱效关系研究[J]. 中药药理学与临床, 2023, 39(11): 18-24.
- [47] 姜婕, 王应萍, 周益, 等. 香果健消方药味配伍及不同极性部位理气止痛作用的谱效关系[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(1): 59-66, 87.
- [48] 吴迪, 董磊. 中药炮制机制的现代研究进展[J]. 河南中医, 2023, 43(8): 1292-1296.
- [49] 游雪娟, 李丽青, 冯珂, 等. 方剂有毒药物配伍“增效减毒”的现代研究进展[J]. 世界中医药, 2024, 19(1): 105-108, 115.
- [50] 杜伟锋, 孙海英, 洪浩, 等. 基于谱效关系的醋延胡索炮制前后特征成分研究[J]. 中草药, 2021, 52(20): 6178-6187.
- [51] 杨丽, 杨冬平, 孙静, 等. 大黄炭炮制过程中“增效”和“减毒”潜在质量标志物的变化规律研究[J]. 中医药导报, 2023, 29(11): 66-73.
- [52] 吴水生, 李德森, 许豪然, 等. 基于谱效关系的钩吻炮

- 制减毒存效的实验研究[J]. 中医药学报, 2017, 45 (5): 80-84.
- [53] 姚玲玲, 柯昌强, 刘佳, 等. 不同炮制程度中药饮片蜜炙甘草的次生代谢化学成分组学研究[J]. 药学学报, 2021, 56 (5): 1444-1452.
- [54] 王金梅, 姚辰, 陆程灿, 等. 酒女贞子抗氧化谱效关系研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51 (22): 1907-1912.
- [55] 刘洁丽, 张瑛, 马霞, 等. 新鲜和干燥当归干预血虚大鼠的补血作用及谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (11): 2308-2316.
- [56] 温聪聪, 鞠成国, 张强, 等. 麸煨诃子不同部位抗溃疡性结肠炎的谱效关系[J]. 中成药, 2019, 41 (8): 1910-1914.
- [57] 王红阳, 钟佩芸, 梁家怡, 等. 制枳壳 HPLC 指纹图谱与小肠推动作用谱效关系[J]. 中成药, 2021, 43 (3): 750-754.
- [58] 孙贝贝, 孙海英, 朱伟豪, 等. 薏苡仁麸炒前后治疗脾虚水湿不化谱效关系研究[J]. 中成药, 2022, 44 (2): 475-481.
- [59] 杜伟锋, 孙海英, 洪浩, 等. 基于谱效关系的醋延胡索炮制前后特征成分研究[J]. 中草药, 2021, 52 (20): 6178-6187.
- [60] 蒋云秀, 东宝花, 敖明月, 等. 黑豆黄酒共蒸女贞子 HPLC 指纹图谱及抗氧化活性的谱效关系[J]. 时珍国医国药, 2023, 34 (6): 1371-1375.
- [61] 葛宏霞, 李思琪, 梅景晨, 等. 基于中药炮制“醋制入肝”理论醋五味子对急性肝损伤作用谱效关系研究[J]. 药物评价研究, 2023, 46 (9): 1897-1907.
- [62] 冯硕, 刘文佳, 胡晶, 等. 药品安全性评价技术及其在中药领域的应用[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17 (1): 28-31.
- [63] 赵梓邯, 张琳, 李文斌, 等. 中药毒性与安全性评价研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (20): 208-216.
- [64] 文喜艳, 周鹏发, 魏秀娟, 等. 中药毒性化学成分及解毒方法[J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42 (2): 34-38.
- [65] 黄美霞, 王英豪, 廖华军, 等. 钩吻发醇减毒的谱效关系[J]. 福建中医药, 2017, 48 (1): 35-36, 39.
- [66] 周国梁, 宿树兰, 华永庆, 等. 雷公藤肝毒性机制及配伍减毒研究进展[J]. 中草药, 2023, 54 (24): 8263-8272.
- [67] 刘雪梅. 基于体内药效毒效雷公藤多苷片谱效关系研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [68] Feng YF, Jing ZX, Li YJ, et al. Screening anaphylactoid components of Shuang Huang Lian Injection by analyzing spectrum-effect relationships coupled with UPLC-TOF-MS [J]. Biomed Chromatogr, 2018, 33 (2): e4376.
- [69] 冯宇飞, 常书源, 张宁宁, 等. 注射用双黄连致敏类过敏作用的谱效关系分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40 (9): 1589-1598.
- [70] Feng YF, Jing ZX, Wang Y, et al. Effect of baicalin on mast cell-dependent anaphylactic reaction [J]. Lat Am J Pharm, 2013, 32 (6): 918-923.
- [71] Feng YF, Jing ZX, Zhang YY, et al. A guinea pig model of Ciwujia injection-induced anaphylaxis for allergic substance screening [J]. Chin Herb Med, 2019, 11 (3): 332-336.
- [72] 刘谊民, 许婷, 张黄琴, 等. 基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (16): 177-184.
- [73] 王茜, 张君会, 郭光鹏, 等. 冻干熊胆粉的降脂作用谱效关系及分子对接研究[J]. 中药与临床, 2023, 14 (2): 33-38.
- [74] Chen ZY, Wang MM, Yang YY, et al. Promotion of a quality standard for *Porana sinensis* Hemsl. based on the efficacy-oriented Effect-Constituent Index [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34 (2): e4726.

(收稿日期: 2024-05-16; 修回日期: 2024-07-10)

细粒剂的制备工艺研究及应用进展

黄倩萌¹, 赵祥程¹, 丁劲松^{1, 2*} (1. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410083; 2. 长沙晶易医药科技股份有限公司, 长沙 410013)

摘要: 以片剂或胶囊剂为代表的口服固体制剂仍然是目前药物治疗的主流形式, 然而, 对于某些特殊患者人群以及疾病状态, 服用片剂或胶囊剂等可能面临吞咽困难、定量不准或适口性较差等问题, 从而造成治疗的复杂性增加和患者服药依从性降低。细粒剂作为一种日本特有的颗粒剂种类, 具有粒径小、生物利用度高、便于分装及服用、适口性更佳等优势, 被广泛应用于化药及汉方制剂的剂型改良, 有助于提高患者用药依从性、准确性和安全性。本文综述了细粒剂的性能特点、制备工艺与应用现状, 并对其未来发展趋势进行展望, 以期对相关领域的研究者提供参考。

关键词: 口服给药系统; 细粒剂; 制粒技术; 包衣技术; 患者依从性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0165-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.024

Preparation and application of fine granules

HUANG Qian-meng¹, ZHAO Xiang-cheng¹, DING Jin-song^{1, 2*} (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410083*; 2. *Changsha King-eagle Medical Science and Technology Co., Ltd., Changsha 410013*)

Abstract: Oral solid dosage forms, represented by tablets or capsules, are still the dominant form of drugs. But for some special patient populations and diseases, the consumption of pills or capsules may trigger problems such as dysphagia, inaccurate dosing or poor palatability, which may lead to increased therapeutic complexity and decreased patient compliance to the medication. As a unique type of granules in Japan, fine granules are widely used in the dosage modification of chemical and Kampo medicine to improve compliance, accuracy, and safety of medication owing to fine particle size, high bioavailability, easy dispensing and administration, and better palatability. This paper reviewed the characteristics, preparation, current application status, and future development of fine granules, to provide references for follow researchers.

Key words: oral drug delivery system; fine granule; granulation technology; coating technology; patient compliance

在现代医疗实践中, 口服给药因其便捷性、无创性和患者接受度高等特点, 已成为药物治疗的主流方式^[1]。然而, 对于某些特定人群, 例如低龄儿童和老年患者, 在服用传统普通固体制剂(如片剂、胶囊剂等)时可能面临吞咽困难等问题^[2-3]; 此外, 某些治疗药物需要根据病情精准调整给药剂量或根据患者体重进行个体化剂量滴定^[4-5]。这些问题无疑降低了患者服药依从性, 增加了治疗的复杂性和不良反应发生的风险。

细粒剂(fine granules)是20世纪80年代在日本迅速发展起来的一种新剂型。根据第十八版日本药典制剂通则, 细粒剂的粒径范围要求为所有颗粒需通过18号(850 μm)筛, 且30号(500 μm)筛上残留的颗粒不超过全部的10%^[6]。由于细粒剂粒径分布介于颗粒剂和散剂之间, 因此其兼顾了两者的优良特性, 例如粒径较小便于分装和服用, 含量均匀度和生物利用度高, 同时飞散性、附着性、团聚性和吸湿性小。细粒剂的这些

作者简介: 黄倩萌, 女, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型及新技术的研究, email: 227211038@csu.edu.cn *通信作者: 丁劲松, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型及新技术的研究, email: dingjs0221@csu.edu.cn

独特优势,使其不仅能方便患者服用,减少吞咽困难,还有助于提高患者用药的灵活性、准确性和顺应性,为患者提供了口服固体制剂的新选择。

近年来,随着医药科技和制药工艺的不断创新发展,细粒剂的制备工艺日益成熟。通过辅料的选择和优化、颗粒尺寸的精确控制和包衣技术的改进,细粒剂已成为一种具有发展潜力的新型药物剂型。因此,本综述旨在全面介绍细粒剂的制备工艺、应用现状及未来发展,以期为相关领域的研究者和从业者提供参考。

1 细粒剂的制备工艺

细粒剂的制备工艺与普通颗粒剂大致相同,是直接采用药物或药物与赋形剂、黏合剂、崩解剂等其他适宜辅料混匀后,再用适当方法制备出来的颗粒状制剂,如有需要也可添加着色剂、芳香剂或矫味剂等;必要时还可在其颗粒表面涂覆聚合物材料形成功能包衣层,根据不同的用药需求可制备成掩味性细粒、缓释性细粒或肠溶性细粒等。此外,与颗粒剂相比,细粒剂不仅整体尺寸更小,粒径分布范围也更窄。这种颗粒尺寸的精确控制以及小粒径包衣颗粒的制备,对制备工艺的选择和仪器设备的优化提出了更高的标准和要求。

1.1 载药丸芯制备技术

1.1.1 喷雾干燥法 喷雾干燥法制粒的主要原理是通过喷嘴将含有药物和辅料的液体雾化成细小液滴,从高压喷雾器进入干燥室内的热气流中,并通过热干燥气体迅速蒸发溶剂以直接制成球形干燥细颗粒。在喷雾干燥过程中,可通过调整工艺参数,例如进料速率、进风温度和雾化器旋转频率,来控制所生产颗粒的特性,例如形状、残余水分含量和粒度分布等。由于物料暴露于热空气的时间极短,这种方法适用于热敏性药物。此外,从工业化角度来看,较快的生产速度且较低的生产成本使其成为一种较为流行的制粒工艺。盐酸头孢他美酯为第三代广谱头孢菌素类抗菌药物,主要应用于呼吸系统和泌尿系统感染。但是此种药物具有很强的苦味,不适宜直接制备成颗粒剂或者溶液剂使用。张正良等^[7]采用喷雾干燥法,以药物与聚丙烯酸树脂IV和糖精钠等辅料混合溶液制得粒径范围为65~180目的细粒剂,聚丙烯酸树脂IV是胃溶性高分子材料,在口腔内不溶而在胃内酸性环境中易溶,可实现口服时掩盖原料药的苦味,适宜儿童服用。

1.1.2 流化床法 流化床法制备含药基质颗粒的主要原理为药物粉末与其他固体辅料通过造粒机底部

向上注入的气流保持流化状态,润湿剂或黏合剂液体通过喷嘴喷洒进入料床,流化床内的初级颗粒经过喷雾区时与雾滴接触,液体在颗粒表面扩散润湿颗粒,同时颗粒之间相互撞击形成液桥,而后流化的热空气使颗粒充分干燥固化。喷洒足够的液体以生产所需尺寸的颗粒,终产物粒径通常在150~600 μm。流化床造粒最大的优点为“一步式制粒”,即颗粒的形成、固结和干燥全部在同一台设备内完成,从而节省了劳动力成本和制备工艺时间,并可减少物料转移损失。然而,流化床造粒机成本较为高昂,并且需要在初始配方、放大和生产过程中进行大量处方工艺优化等开发工作^[8]。此外,流化床法还可以实现层积式制丸,即将药物以溶液、混悬液或干燥粉末的形式沉积在预制成形的丸芯表面。其中,药物从溶液、混悬液中连续层积在丸芯上称为液相层积法,而干燥粉末直接层积在丸核上称为粉末层积法。华仲洪等^[9]将替比培南匹伏酯、蔗糖、微晶纤维素加入流化床中,以羟丙基纤维素溶液作为黏合剂,设置进风温度60.0~70.0℃,进风频率16.0~24.0 Hz,蠕动泵转速15.0~30.0 r·min⁻¹,雾化压力0.10~0.16 MPa,维持物料温度25~30℃,最终得到粒度主要在30~120目的替比培南匹伏酯细粒剂含药核心颗粒。

1.1.3 高剪切法 在高剪切造粒中,物料干粉被放置在一个混合装置中,该结构通常包含一个在水平面上旋转的叶轮和一个在垂直或水平面上旋转的切碎器。当粉末通过容器壁和转子叶片之间的狭窄间隙以及通过高速转子涡流的离心翻滚运动过程产生的机械力,能够实现不同材料之间的混合以及细颗粒的团聚。当物料干粉混合均匀后,将液体黏合剂添加至粉末中使其黏合形成颗粒核,直至达到预定的最佳粒径终点。然后,颗粒通常被转移到另一台设备(例如流化床)进行干燥。高剪切造粒过程虽然可在短时间内完成,但在其工艺中需要更加仔细的控制,以避免过度颗粒化^[10]。Hausman^[11]分别使用Diosna VAC20装置和Glatt GPCG-5装置进行高剪切造粒和流化床造粒,结果高剪切法制得的颗粒比流化床法制得的颗粒尺寸分布更窄。

然而,普通造粒方法中需要添加大量赋形剂和黏合剂等非活性成分,因此将大量药物加载到球形颗粒中在技术上具有挑战性。另外,无溶剂的制粒方法通过消除干燥步骤来降低能源需求,并最大限度地减少有机溶剂对环境造成的不利影响。因此,

药物晶体的直接球化被认为是最大限度地提高药物含量的理想工艺^[12]。Kondo 等^[13]在研究中无需借助溶剂,使用机械粉末处理器直接对茶碱、对乙酰氨基酚、克拉霉素、抗坏血酸和乳糖的晶体进行球化,结果表明,材料的内聚力是决定机械球化成功的重要因素,具有中到高内聚性的材料(如茶碱、对乙酰氨基酚和抗坏血酸)无论强度如何最终都会被球化,而低内聚性的材料(如克拉霉素和乳糖)由于团聚不良而未被球化。

1.2 包衣技术

为进一步拓展细粒剂的功能性,可在颗粒表面涂覆不同聚合物材料形成功能性包衣层。这种包衣层不仅可以改善细粒剂的稳定性,还可以根据不同用药需求制备形成具有特定功能的细粒剂。例如,通过选择适当的包衣材料和涂覆工艺,可以制备出具有掩味功能的细粒剂,减少味蕾与

苦味原料药的接触,进而提高制剂适口性;或者制备出具有缓释功能的细粒剂,以控制药物的释放速率,降低给药频次以及维持平稳的有效血药浓度;此外还可使用肠溶性包衣材料,使得细粒剂仅在肠道内溶解并释放药物,从而减少药物对胃部造成的刺激和损伤^[14]。

微粉包衣技术的出现对细粒剂的发展起到了重大的推动作用。微粉包衣技术是近年来发展出的薄膜包衣技术的一个重要分支。由于粉体本身粒径小且质量轻,由此引起颗粒之间内聚力增强,静电作用明显,极易发生团聚,因此,使用传统流化床难以完成微粉包衣。于是,根据制剂技术发展的需求,研究者对传统流化床进行结构改造及优化,衍生出多种新型流化床包衣装置^[15](见图 1)。而根据包衣过程是否需要借助溶剂系统,可将包衣技术分为湿法包衣技术和干法包衣技术。

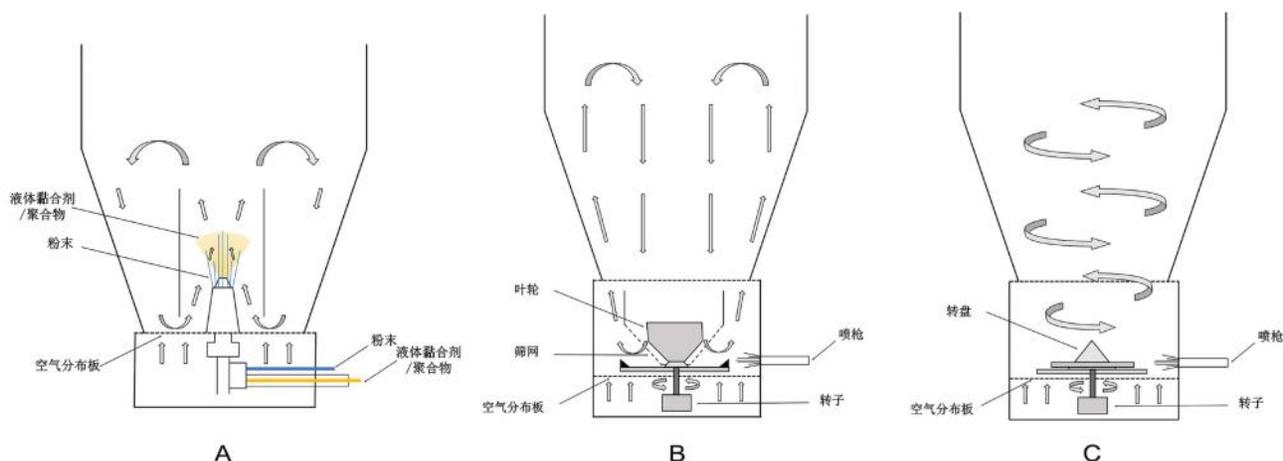


图 1 新型流化床包衣装置示意图

Fig 1 Schematic diagram of new fluidized bed coating device

A. Wurster Accelerator 包衣系统 (Wurster Accelerator coating system); B. SFP 流化床 (super fine processor fluidized bed); C. MP 滚动流化床 (multiplex processor rolling fluidized bed)

1.2.1 湿法包衣技术 根据配制包衣液时使用的分散介质不同,可将湿法包衣技术划分为有机溶剂包衣和水分散体包衣。当药物活性成分在水介质中不稳定时,通常使用有机溶剂包衣。其主要优点为有机溶剂挥发性好,易于成膜,无需包衣后热处理即可达到膜完全愈合,但是使用有机溶剂具有一定的安全隐患。直至 20 世纪 70 年代,水分散体包衣技术兴起,避免了有机溶剂的使用,降低了溶剂残留物对患者的危害以及生产过程对环境的污染和发生爆炸的风险,并且包衣液的高固含量和低黏度大幅缩短了包衣工艺时间。目前水分散体包衣已成为包衣研究使用的主要技术,然而,使用水性聚合物分散体的一个潜在关

键缺点是颗粒长期储存稳定性较差,在相对湿度较高条件下储存期间,水被聚合物膜吸收时,水的塑化作用促进包衣颗粒团聚,可能会改变其药物释放行为^[16]。

罗红霉素为第二代大环内酯类抗菌药物,被广泛应用于儿科细菌感染性疾病。但由于其具有很强的苦味,所以不能直接制备成口服液体制剂,国内许多罗红霉素制剂如混悬剂、分散片和颗粒剂等都未能解决这一问题。为了较好地解决适口性问题,并保证其在体内有良好的吸收,周青华等^[17]采用 Eudragit E 100 和糖精钠乙醇-水溶液对罗红霉素原料药进行包衣处理,当包衣增重提高至 30% 时可成功掩盖罗红霉素的苦味。阿

奇霉素是一种常用于治疗非典型病原菌引起的儿科呼吸系统疾病的抗菌药物,味道极苦,会严重降低患儿服药的依从性。此外,阿奇霉素在碱性 pH 中的溶解度差,使其难以在小肠中吸收。Chen 等^[18]将 Eudragit RL 30D、Eudragit L 30D-55 和柠檬酸三乙酯分散于水中,制得理论增重为 30% 的水性包衣分散体,将负载阿奇霉素的颗粒加入 Glatt GPCG1.1 流化床中,进风温度 35 °C,物料温度 30 ~ 31 °C,进风风量 10 m³ · h⁻¹,喷液速度 3 ~ 4 g · min⁻¹,得到阿奇霉素包衣颗粒,达到掩味和增强吸收的双重效果。苯甲酸钠用于治疗尿素循环障碍,但是因其味道较苦且每日需服药三至四次,导致儿童不愿服药。Combesco 等^[19]分别在聚合物 Kollicoat SR 30D、Aquacoat ECD 30 和 Eudragit RS 30D 中加入丙二醇或柠檬酸三乙酯作为增塑剂,滑石粉作为抗黏剂混合得到水分散体包衣液,使用底喷流化床制备苯甲酸钠缓释颗粒,包衣增重水平为 4 mg · cm⁻²,其中聚合物 Kollicoat SR 30D 包衣颗粒体外释放结果显示,30 min 内几乎无药物释放,6 h 达到溶出平台,展现出较优的缓释效果,在降低服药频次的同时避免了苦味药物在口腔内的停留,有助于提高患儿服药依从性。

1.2.2 干法包衣技术 使用湿法包衣技术在起始粒径小于 100 μm 的芯材颗粒表面涂覆材料十分困难,因为细粉末强大的黏附性和来自液滴的毛细管作用力很容易在制备过程中产生颗粒结块^[20]。因此,无溶剂系统往往更适合细颗粒包衣,干法包衣技术主要可分为液体辅助包衣法和热熔包衣法。由于缺少从液体溶剂中获得毛细管力作用,可通过添加液体增塑剂或将包衣材料加热到玻璃化转变温度(glass transition temperature, T_g)以上软化,从而达到增强聚合物颗粒黏合性的目的^[21]。另外,与湿法包衣技术不同,干法包衣技术对于涂层材料的粒度有着特殊的要求。干法包衣实际过程中,聚合物颗粒的附着力是包衣成功的关键因素。为了确保包衣材料的附着力与功能包衣层的均匀性,需要对包衣材料尺寸进行限制,其直径一般需要小于起始包衣底物直径的十分之一^[22]。

液体辅助包衣法是指在包衣过程中加入一些液体增塑剂,在降低包衣材料 T_g 的同时,液体膜的存在通过毛细管作用确保了包衣材料与起始底物的黏附性,从而实现完整包衣膜的形成。例如, Pearnchob 和 Bodmeier^[23]在研究中使

用液体增塑剂柠檬酸三乙酯,降低了聚合物颗粒 Eudragit RS、乙基纤维素和虫胶软化与聚结所需温度,并采用 Wurster 流化床成功实现缓释包衣。

热熔包衣法则完全无需借助溶剂系统,而是采用低熔点材料并将其加热至熔融,使包衣材料保持在有利于软化和扩散的状态,随着适当的机械混合,包衣材料在起始底物上形成完整包衣。然而,具有强黏合力的软化聚合物在加工过程中会诱导团聚物的形成。此外,热熔包衣法通常使用盘式包衣机或流化床包衣机,这种以相对较低的强度对物料进行分散和混合的方式,难以使细粉团聚物解聚。因此,这些传统的设备不适用于细颗粒的热熔包衣。机械粉末处理器是一种高强度混合器(见图 2),通过来自通过容器壁和转子叶片之间的间隙产生的机械力,以及高速转子产生的涡流中颗粒之间的冲击,防止黏合剂粉末黏聚以实现精确混合。使用这种方法,可以在没有溶剂的情况下生产厚度仅为几微米的涂层颗粒^[24]。Kondo 等^[25]使用喷雾冷冻干燥技术将乙基纤维素水分散体制成微粉,随后使用机械粉末处理器将其与茶碱核心颗粒混合,在包衣锅温度升至 80 °C 高于聚合物的 T_g 时,包衣材料粉末产生塑性形变,成功在小于 100 μm 起始底物表面形成致密完整的缓释包衣层,制备出具有良好缓释效果的颗粒。

2 细粒剂的应用

截至 2024 年,日本上市细粒剂产品共 808 个,其中处方药 537 个,非处方药 271 个^[26]。本节基于日本医药品和医疗器械局(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)数据库中的产品信息,分别从化药和汉方药领域对部分上市产品的处方组成、用法用量等信息进行介绍。

2.1 化药领域

细粒剂在化药领域的应用优势显著,主要体现在其能灵活精确地控制给药剂量,确保药物使用的准确性;同时,它降低了含药颗粒的粒径,增加药物颗粒与胃肠道的接触面积,有助于提升低水溶性药物的口服生物利用度;此外,掩味包衣细粒剂能够掩盖原料药的不良味道,极大地提高患者的用药顺应性,为患者提供了更为舒适和有效的治疗体验。因此,细粒剂在抗菌药物、抗精神病药物以及消化道药物中的应用较多。其中,化药领域部分常见的已上市细粒剂产品如表 1 所示。

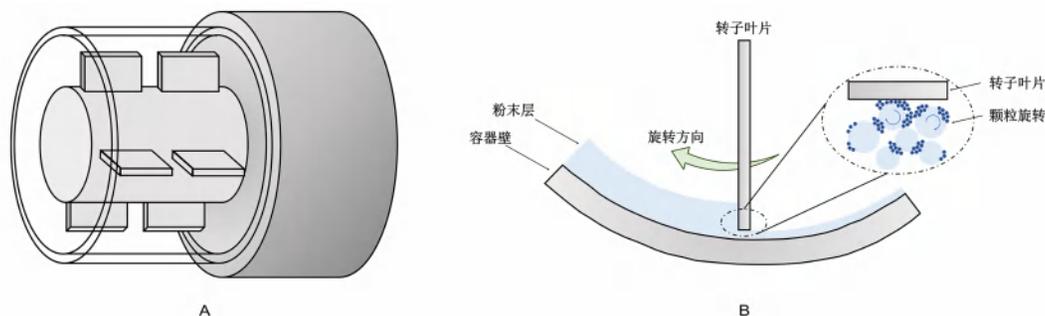


图 2 机械粉末处理器结构示意图

Fig 2 Schematic diagram of mechanical powder processor

A. 侧面 (side); B. 截面 (cross section)

表 1 化药领域部分已上市的细粒剂产品信息

Tab 1 Marketing information of fine granule products in the field of chemical medicine

疾病类型	通用名	药物活性成分	上市时间	适应证
感染性疾病	テビペネム ピホキシル ^[27]	替比培南酯	2009 年	肺炎、中耳炎、鼻窦炎
	レボフロキサシン ^[28]	左氧氟沙星	2014 年	淋巴管和淋巴结炎、肺炎、慢性呼吸道病变的继发性感染、膀胱炎、肾盂肾炎、胆管炎、感染性肠炎、中耳炎、鼻窦炎等
	アジスロマイシン ^[29]	阿奇霉素	2015 年	咽喉炎、扁桃体炎、急性支气管炎、肺炎、肺脓肿、中耳炎
	セフテラム ピホキシル ^[30]	头孢妥仑匹酯	2018 年	咽喉炎、扁桃体炎、急性支气管炎、肺炎、膀胱炎、肾盂肾炎、中耳炎、鼻窦炎、猩红热等
精神类疾病	プロマゼパム ^[31]	硝西泮	1977 年	焦虑、紧张、抑郁、睡眠障碍和麻醉前用药
	エチゾラム ^[32]	依替唑仑	1984 年	焦虑、紧张、神经衰弱和睡眠障碍等
	スルトプリド 塩酸塩 ^[33]	盐酸舒托普利	1991 年	躁狂症、精神分裂症躁动、幻觉和妄想状态
	リスベリドン ^[34]	利培酮	2008 年	成人及青少年精神分裂症、儿童及青少年孤独症相关的易激惹行为等
消化系统疾病	オランザピン ^[35]	奥氮平	2016 年	精神分裂症、双相情感障碍、止吐
	乾燥水酸化アルミニウムゲル ^[36]	氢氧化铝	1986 年	胃及十二指肠溃疡、胃炎、上消化道功能异常
	シメチジン ^[37]	西咪替丁	2006 年	胃溃疡、十二指肠溃疡、反流性食道炎、急性胃炎、慢性胃炎的急性加重期等
	トロキシピド ^[38]	曲昔匹特	1996 年	胃溃疡、急性胃炎、慢性胃炎的急性加重期
神经系统疾病	テプレノン ^[39]	替普瑞酮	1997 年	胃溃疡、急性胃炎、慢性胃炎的急性加重期
	ピロヘプチン 塩酸塩 ^[40]	盐酸吡咯庚汀	1974 年	帕金森病
	アマンタジン 塩酸塩 ^[41]	盐酸金刚烷胺	1981 年	帕金森综合征
	カルバマゼピン ^[42]	卡马西平	2001 年	精神运动性发作、强直阵挛发作、三叉神经痛
循环系统疾病	トピラマート ^[43]	托吡酯	2014 年	部分性癫痫发作
	カプトプリル ^[44]	卡托普利	1983 年	原发性高血压症、肾性高血压、肾血管性高血压、恶性高血压
	デノパミン ^[45]	地诺帕明	1988 年	慢性心力衰竭
	ワルファリンカリウム ^[46]	华法林钾	2009 年	血栓栓塞症的治疗和预防

2.1.1 细粒剂在感染性疾病中的应用 充足的剂量能够确保抗菌药物在体内达到足够的浓度，有效杀灭或抑制细菌的生长，从而防止病情的反复和耐药性的产生。然而，抗菌药物过量则可能导致严重的不良反应，甚至危及患者的生命^[47]。因此，在抗菌药物的使用中，剂量的精确控制显得至关重要。此外，儿童对于药物适口性的要求更高，掩味包衣后的细粒剂能够在实现易于吞服和精准控制剂量的同时还能掩盖许多抗菌药物的强

烈苦味。例如，用于治疗由敏感细菌引起的各种感染的阿奇霉素，该药为大环内酯类抗菌药物，其血浆半衰期为 35 ~ 48 h，而其在组织中的半衰期可达 68 ~ 76 h，即使在给药几日后仍可能出现不良反应^[48-49]。阿奇霉素细粒剂（アジスロマイシン細粒小児用 10%）是由日本東和薬品株式会社生产，于 2015 年在日本上市^[29]，辅料组成为乳糖一水合物、微晶纤维素、低取代度羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、甲基丙烯酸氨烷基酯共

聚物 E 型、滑石粉、三氧化二铁、氧化钛、糖精钠水合物、阿斯巴甜等。该制剂规格为 100 mg/包，每日服用一次，服用剂量可根据儿童体重来确定，共分为 15 ~ 25 kg、26 ~ 35 kg、36 ~ 45 kg、≥ 46 kg 四个区间，分别服用 2、3、4、5 包，其用法相较于 250/500 mg 片剂来说更便于儿童患者服用准确剂量。针对阿奇霉素具有明显苦味的问题，该制剂使用甲基丙烯酸氨烷基酯共聚物 E 型进行包衣掩味，进一步提高了患者顺应性。除了阿奇霉素，其他抗菌药物如替比培南酯^[27]、左氧氟沙星^[28]、头孢妥仑匹酯^[30]等均有相应的细粒剂产品在日本上市。

2.1.2 细粒剂在精神类疾病中的应用 精神类药物剂量的精准控制与抗菌药物同样重要，因其与确保治疗效果和降低药物不良反应直接相关^[50]。由于不同患者的病情严重程度存在差异，采用个体化的剂量控制策略能够更好地满足患者的治疗需求^[51]。此外，考虑到安全性和耐受性，部分药物被应用于儿童时需要根据不同体重区间进行剂量滴定直至达到临床有效治疗剂量^[5, 52-53]。利培酮是一种选择性的单胺能拮抗剂，主要用于治疗精神分裂症和儿童及青少年孤独症相关的易激惹行为等。由高田製薬株式会社生产的利培酮细粒剂（リスペリドン細粒 1%）于 2008 年在日本上市，规格为 10 mg，其处方由水合乳糖、羟丙基纤维素和二氧化硅构成^[34]。利培酮的成人患者用法用量为：从每日一次 1 mg 开始逐渐增加剂量，日维持剂量通常为 2 ~ 6 mg，已上市的 1/2/3 mg 规格片剂可满足剂量滴定的需求。但是对于儿童来说需要根据患者体重进行定量，片剂经过分割难以满足儿童服药时面临的精准定量需求。当患儿体重在 15 ~ 20 kg 区间时初始剂量为每日一次 0.25 mg，第 4 日起每日口服 0.5 mg，可分两次口服给药；当患儿体重超过 20 kg 时初始剂量为每日一次 0.5 mg，第 4 日起每日口服 1 mg，可分两次口服给药。不同于片剂，细粒剂由于具有较小的粒径以及良好的流动性，能够实现给药剂量的灵活精准控制，这对于确保治疗效果和药物安全性具有重要意义。此外，对于吞咽功能尚未发育完全的低龄儿童患者，细粒剂作为多颗粒制剂能够很大程度上避免普通固体制剂带来的吞咽困难问题^[54-55]。其他精神类药品例如溴西洋^[31]、依替唑仑^[32]、舒托普利^[33]和奥氮平^[35]等药物也均有相应的细粒剂产品在日本上市。

2.1.3 细粒剂在消化系统疾病中的应用 细粒剂

在消化系统药物中应用的优势主要体现在提高药物的疗效和患者用药的安全性方面。第一，细粒剂具有较大的比表面积，能使药物迅速在消化道内溶解并提高药物的生物利用度；第二，细粒剂能在消化道广泛分布，使治疗部位得到更全面的覆盖，从而提高药物的疗效；第三，对于一些具有胃部刺激性的药物还可通过特殊的肠溶包衣限制药物胃部的释放，有效提高患者用药的安全性。西咪替丁作为一种组胺 H₂ 受体拮抗剂，能够有效抑制胃酸的过度分泌。藤本製薬株式会社生产的西咪替丁细粒剂（カイロックス細粒 40%）于 1987 年在日本上市，规格为 400 mg，其处方包括 D-甘露醇、乙基纤维素、轻质二氧化硅和蔗糖。相比于已上市片剂，细粒剂将口服生物利用度由 60% 提升至 79.9%^[37, 56]。氢氧化铝作为常用的抗酸药物，主要用于治疗胃酸过多引起的症状，如胃痛、胃灼热感、反酸等。健栄製薬株式会社于 1986 年上市了氢氧化铝细粒剂（乾燥水酸化アルミニウムゲル細粒），其处方仅由氢氧化铝组成，规格为 1 g^[36]，患者可根据病情的发展，分次服用，每日服药剂量为 1 ~ 3 g。相比于片剂，氢氧化铝细粒剂不仅可以显著增加药物与胃酸的接触面积，加快中和反应，迅速缓解病痛症状，还可以形成范围更广的凝胶层覆盖于胃黏膜，防止胃酸和其他刺激性物质对胃黏膜的进一步伤害。其他消化系统药物如曲昔匹特^[38]、替普瑞酮^[39]等也均有细粒剂品种在日本上市。

2.1.4 细粒剂在其他疾病中的应用 除了以上疾病，细粒剂在其他疾病领域中也得到了广泛的应用。例如治疗高血压、水肿性疾病的利尿药呋塞米，该药在水中的溶解度极低，因此其口服生物利用度仅为 52%^[57]。呋塞米细粒剂（フロセミド細粒 4%）由エルメッド株式会社生产，规格为 40 mg，辅料组成为滑石粉、乳糖一水合物、羟丙基纤维素、D-甘露醇等。相比于片剂，细粒剂大幅降低了含药颗粒的粒径，将生物利用度提高至 67.8%^[58]。孟鲁司特钠是一种用于治疗支气管哮喘的白三烯受体拮抗剂，在临床使用时根据不同的年龄阶段选择正确的剂型和剂量能够最大程度地避免不良反应的发生。杏林製薬株式会社于 2007 年上市孟鲁司特钠细粒剂（キプレス細粒 4 mg），适用于 1 ~ 6 岁儿童患者的支气管哮喘，其辅料组成为 D-甘露醇、羟丙基纤维素和硬脂酸镁^[59]。细粒剂作为多颗粒制剂有助于避免患儿服药时可能面临的吞咽困难问题，从而增加患儿

服药的安全性。此外,由于该药对光敏感,因此已上市颗粒剂的说明书中建议患者直接服用或与其他不透光的溶媒混合服用^[60]。相比于颗粒剂来说,细粒剂的粒径更小,直接服用或与食物混合后不会产生异物感,进一步提高了患儿服药的顺应性^[55]。其他如血管扩张药尼麦角林^[61]、过敏介质阻滞剂曲尼司特^[62]、化痰药羧甲司坦^[63]等也有相应的细粒剂品种在日本上市。

2.2 汉方药领域

日本汉方药源自中国的中医药,但日本根据其国内的风土和气候条件,以及日本人的体质和生活方式,对相关医学以及药方进行了不断改进。绝大部分汉方药细粒剂于 1986—1988 年间在日本上市,因独特的疗效优势和使用的便利性,迅速在市场中获得了广泛的认可。例如,用于治疗胃炎、头痛、便秘等疾病的大柴胡汤细粒剂(大柴胡湯エキス細粒),该细粒剂是根据汉方大柴胡汤(处方含柴胡、半夏、生姜、黄芩、芍药、大枣、枳实、大黄)改进而来。值得注意的是,尽管不同厂家生产的大柴胡汤细粒剂的活性成分均源自大柴胡汤药物提取物,但它们在各个药物的配比上可能存在差异,同时辅料的组成也略有不同。例如三和生薬株式会社的大柴胡汤细粒剂的药方比例为柴胡 6 g、半夏 4 g、生姜 2 g、黄芩 3 g、芍药 3 g、大枣 3 g、枳实 2 g、大黄 1 g,辅料组成为乳糖一水合物、玉米淀粉、结晶纤维素、预糊化淀粉、轻质无水硅酸^[64];東洋薬行株式会社的大柴胡汤细粒剂的药方比例为柴胡 6 g、半夏 3 g、生姜 4 g、黄芩 3 g、芍药 3 g、大枣 3 g、枳实 2 g、大黄 1 g,辅料组成仅为玉米淀粉^[65]。对于诸如十全大补汤、半夏泻心汤、十味败毒汤、四君子汤等众多汉方细粒剂,它们大多采用了相似的制剂工艺,即由相应的活性提取物、填充剂以及润滑剂组成,因此含苦涩药材提取物的细粒剂往往味道不佳,仍可能影响患者服用的顺应性。目前,已有部分专利研究采用加入甜味剂或利用粉末包衣等掩味技术改善制剂的味道,可进一步提高患者的服药依从性^[66-67]。

中药细粒剂能够在保持原饮片药效和药性的基础上,免除了传统煎煮的费时以及储存不稳定性问题。目前中医药的传承与发展已提升至国家战略的高度,利用现代科技技术对中药制剂进行探索和创新研发,以满足当前多元化的用药需求,不仅是中医药事业当前的焦点,更是未来的发展趋势。因此,日本汉方药的制剂发展历程对于我国中

药的现代化发展具有重要的参考价值。

3 总结与展望

细粒剂作为一种新兴的药物剂型,在药学领域展现出显著的优势,主要包括易于吞服、灵活划分剂量以及提高药物制剂适口性。然而,细粒剂的研发制备过程也面临着一定的挑战。具体而言,粒度分布的控制是其制备过程中的一大难题,这不仅增加了研制的成本,也对研发者和制备人员提出了更高的专业技能要求。此外,为了实现细粒剂的特定功能,如掩味、缓释以及肠溶等,需要利用微粉包衣技术在其表面涂覆不同聚合物材料,但是目前相关技术的研究和应用仍有待进一步探索。

综上所述,细粒剂作为一种具有广泛应用前景的药物制剂形式,其在药学领域的重要性不容忽视。随着技术的不断创新和应用领域的拓展,细粒剂的研究和应用将迎来更加广阔的发展空间和机遇。

参考文献

- [1] Ouyang J, Zhang ZY, Deng B, et al. Oral drug delivery platforms for biomedical applications [J]. Mater Today, 2023, 62: 296-326.
- [2] Ivanovska V, Rademaker CM, Van Dijk L, et al. Pediatric drug formulations: a review of challenges and progress [J]. Pediatrics, 2014, 134 (2): 361-372.
- [3] Clavé P, Shaker R. Dysphagia: current reality and scope of the problem [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12 (5): 259-270.
- [4] Barbour AM, Fossler MJ, Barrett J. Practical considerations for dose selection in pediatric patients to ensure target exposure requirements [J]. AAPS J, 2014, 16 (4): 749-755.
- [5] Vertessen K, Luman M, Swanson JM, et al. Methylphenidate dose-response in children with ADHD: evidence from a double-blind, randomized placebo-controlled titration trial [J]. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2024, 33 (2): 495-504.
- [6] PMDA. 第十八改正日本薬局方 [DB/OL]. <https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0192.html>
- [7] 张正良,薛春余,王林,等.盐酸头孢他美酯细粒剂的试制 [J].中国医药工业杂志,2004,35(3):32-33.
- [8] Morin G, Briens L. A comparison of granules produced by high-shear and fluidized-bed granulation methods [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2014, 15 (4): 1039-1048.
- [9] 华仲洪,展金祥,尹民,等.替比培南匹伏酯细粒剂的制备及体外评价 [J].生物化工,2023,9(6):34-39.
- [10] Kumar A, Gernaey KV, De Beer T, et al. Model-based analysis of high shear wet granulation from batch to continuous processes in pharmaceutical production—a critical

- review [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85 (3 Pt B): 814-832.
- [11] Hausman DS. Comparison of low shear, high shear, and fluid bed granulation during low dose tablet process development [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, 30 (3): 259-266.
- [12] Kondo K, Ito N, Niwa T, et al. Design of sustained release fine particles using two-step mechanical powder processing: particle shape modification of drug crystals and dry particle coating with polymer nanoparticle agglomerate [J]. *Int J Pharm*, 2013, 453 (2): 523-532.
- [13] Kondo K, Kido K, Niwa T. Spheronization mechanism of pharmaceutical material crystals processed by extremely high shearing force using a mechanical powder processor [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 107: 7-15.
- [14] 徐弋翀, 张艺华, 裴蕊, 等. 儿童微粉包衣制剂技术研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40 (22): 3090-3096.
- [15] 徐晨, 谢俊, 黄春玉, 等. 粉末包衣技术在药物制剂领域的应用研究进展 [J]. *药学进展*, 2013, 37 (12): 635-641.
- [16] Siepmann J, Siepmann F. Stability of aqueous polymeric controlled release film coatings [J]. *Int J Pharm*, 2013, 457 (2): 437-445.
- [17] 周青华, 谭华建, 吴鸿雁. 罗红霉素包衣掩味制备干混悬剂处方和工艺 [J]. *北方药学*, 2015, 12 (3): 107-108.
- [18] Chen YY, Liu Y, Wu CB, et al. Dry suspension containing coated pellets with pH-dependent drug release behavior for the taste-masking of azithromycin [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2022, 24 (1): 1-9.
- [19] Combescot E, Morat G, De Lonlay P, et al. Pediatric drug formulation of sodium benzoate extended-release granules [J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21 (3): 261-267.
- [20] Jono K, Ichikawa H, Miyamoto M, et al. A review of particulate design for pharmaceutical powders and their production by spouted bed coating [J]. *Powder Technol*, 2000, 113 (3): 269-277.
- [21] Sato A, Serris E, Grosseau P, et al. Experiment and simulation of dry particle coating [J]. *Chem Eng Sci*, 2013, 86: 164-172.
- [22] Sauer D, Cerea M, Dinunzio J, et al. Dry powder coating of pharmaceuticals: a review [J]. *Int J Pharm*, 2013, 457 (2): 488-502.
- [23] Pearnchob N, Bodmeier R. Dry polymer powder coating and comparison with conventional liquid-based coatings for Eudragit® RS, ethylcellulose and shellac [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56 (3): 363-369.
- [24] Pfeffer R, Dave RN, Wei DG, et al. Synthesis of engineered particulates with tailored properties using dry particle coating [J]. *Powder Technol*, 2001, 117 (1-2): 40-67.
- [25] Kondo K, Ando C, Niwa T. Mechanical particle coating using ethylcellulose nanoparticle agglomerates for preparing controlled release fine particles; effect of coating temperature on coating performance [J]. *Int J Pharm*, 2019, 554: 387-398.
- [26] Pharmexcloud. 日本上市药品 - 細粒 [DB/OL]. [2024-05-24]. <https://pharma.bcpmdata.com/database/7/table/626?q=%E7%B4%B0%E7%B2%92>.
- [27] ファルマ株式会社 M S. Orapenem Fine Granules For Pediatric [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/780009_6139002C1026_1_12.
- [28] 第一三共エスファ株式会社. Levofloxacin Fine Granules 「DSEP」 [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/430773_6241013C2032_1_13#H-DR_ContraIndications.
- [29] 東和薬品株式会社. Azithromycin Fine Granules For Pediatric 10% [TOWA] [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/480235_6149004C1102_1_10.
- [30] 東和薬品株式会社. Cefditoren Pivoxil Fine Granules For Pediatric 10% [TOWA] [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/480235_6132015C1081_1_12.
- [31] サンド株式会社. Lexotan® Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/112268_1124020C1045_2_05.
- [32] 田辺三菱製薬株式会社. DEPAS® Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/400315_1179025C1054_2_18.
- [33] 共和薬品工業株式会社. Barnetil® Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/672173_1179032C1046_6_03.
- [34] 高田製薬株式会社. Risperidone Fine Granules “TAKATA” [DB/OL]. [2024-07-22]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/400186_1179038C1167_1_23#H-DR_ContraIndications.
- [35] 日本イーライリリー株式会社. Zyprexa® Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/530471_1179044C1022_1_34#H-DR_Warnings.
- [36] 健栄製薬株式会社. Dried Aluminum Hydroxide Gel Fine Granules 「KENEI」 [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/260024_2343005C1025_1_05#HDR_ContraIndications.
- [37] 藤本製薬株式会社. Cylock Fine Granules [DB/OL]. [2024-07-22]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/670142_2325001C2092_1_09#HDR_ContraIndications.
- [38] 大原薬品工業株式会社. Troxipide Fine Granules 20% 「OHARA」 [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/180095_2329015C1127_1_02.
- [39] 沢井製薬株式会社. Teprenone Fine Granules [SAWAI] [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/300119_2329012C1328_1_03.

- [40] 日本ジェネリック株式会社 . Trimol Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/450064_1169003C1035_3_07#HDR_ContraIndications.
- [41] サンファーマ株式会社 . Symmetrel Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/480866_1161001C1089_3_11#HDR_Warnings.
- [42] 共和薬品工業株式会社 . Carbamazepine Fine Granules 「AMEL」[DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/672173_1139002C1066_2_02#HDR_ContraIndications.
- [43] 協和キリン株式会社 . Topina Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/230124_1139008C1020_1_10#HDR_ContraIndications.
- [44] ファーマ株式会社 ア . Captoril Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/530258_2144001C1074_3_05#HDR_ContraIndications.
- [45] 田辺三菱製薬株式会社 . Kalgut Fine Granules [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/400315_2119004C1032_1_07#HDR_SeriousAdverseEvents.
- [46] 日新製薬株式会社 . Warfarin K Fine Granules 0.2% “NS” [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/530113_3332001F1121_1_11#HDR_Warnings.
- [47] Rawson TM, Wilson RC, O’ hare D, et al. Optimizing antimicrobial use: challenges, advances and opportunities [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19 (12): 747-758.
- [48] 于连华 . 阿奇霉素的合理应用 [J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3 (23): 63-64.
- [49] Kong FY, Rupasinghe TW, Simpson JA, et al. Pharmacokinetics of a single 1g dose of azithromycin in rectal tissue in men [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0174372.
- [50] Givens CJ. Adverse drug reactions associated with antipsychotics, antidepressants, mood stabilizers, and stimulants [J]. *Nurs Clin North Am*, 2016, 51 (2): 309-321.
- [51] Eap CB. Personalized prescribing: a new medical model for clinical implementation of psychotropic drugs [J]. *Dialogues Clin Neuro*, 2016, 18 (3): 313-322.
- [52] Tunceturk M, Ermis C, Saglam Y, et al. When to use amisulpride in adolescents: a retrospective chart examination of inpatients [J]. *J Clin Psychopharmacol*, 2022, 42 (3): 247-253.
- [53] Caccia S. Safety and pharmacokinetics of atypical antipsychotics in children and adolescents [J]. *Paediatr Drugs*, 2013, 15 (3): 217-233.
- [54] Stegemann S, Gosch M, Breikreutz J. Swallowing dysfunction and dysphagia is an unrecognized challenge for oral drug therapy [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430 (1-2): 197-206.
- [55] Lopez FL, Bowles A, Gul MO, et al. Effect of formulation variables on oral grittiness and preferences of multi-particulate formulations in adult volunteers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 92: 156-162.
- [56] 沢井製薬株式会社 . Cimetidine Tablets [SAWAI] [DB/OL]. [2024-07-22]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/300119_2325001F1564_1_03#HDR_ContraIndications.
- [57] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会 . 心力衰竭合理用药指南 (第 2 版) [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2019, 11 (7): 1-78.
- [58] 日医工株式会社 . Furosemide Fine Granules [DB/OL]. [2024-07-22]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/170329_2139005C1048_2_17#HDR_ContraIndications.
- [59] 杏林製薬株式会社 . Kipres Fine Granules 4mg [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/231099_4490026C1021_2_03#HDR_ContraIndications.
- [60] Laboratories MR. Singulair Oral Granules [DB/OL]. [2024-07-22]. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=021409>.
- [61] 沢井製薬株式会社 . Nicergoline Fine Granules [SAWAI] [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/300119_2190021C1058_1_04.
- [62] キッセイ薬品工業株式会社 . Rizaben Fine Granules 10% [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/230034_4490002C1123_1_08.
- [63] 日医工株式会社 . Carbocisteine Fine Granules 50% 「TSURUHARA」[DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/460028_2233002C1089_3_02.
- [64] 三和生薬株式会社 . 三和大柴胡湯エキス細粒 [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/300303_5200093C1046_1_10.
- [65] 株式会社東洋薬行 . 大柴胡湯エキス細粒 [DB/OL]. [2024-05-24]. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/480213_5200093C1062_1_07.
- [66] 柯潇, 郑强, 吕静 . 一种中药细粒剂及其制备方法: 中国 . 发明专利 . CN201511015955.5 [P]. 2021-02-19.
- [67] 王冰, 刘晓凯, 郑光明, 等 . 一种黄连素细粒剂及其制备方法: CN201710628044.2 [P]. 2017-10-10.

(收稿日期: 2024-05-28; 修回日期: 2024-09-03)

鞘内 / 脑室内注射抗菌药物治疗中枢神经系统感染的研究进展

赵宗彪, 赵为陈, 何春远, 孙艳艳, 夏一森, 李涛, 袁宏中, 王法财* (安徽医科大学附属六安医院 (六安市人民医院) 药学部, 安徽 六安 237005)

摘要: 中枢神经系统 (CNS) 感染因血脑屏障限制了多种抗菌药物的临床应用, 给临床治疗带来了严峻的挑战, 鞘内 / 脑室内给药方式的提出为 CNS 感染的治疗提供了一项新的策略, 这种给药方式可以绕过血脑屏障, 直接到达 CNS, 从而发挥出抗感染作用。基于此, 本研究对近年来氨基糖苷类、糖肽类、多肽类以及替加环素等抗菌药物鞘内 / 脑室内给药进行总结, 旨在为临床 CNS 感染的治疗提供一定的参考。

关键词: 中枢神经系统感染; 鞘内给药; 脑室内给药; 抗菌药物

中图分类号: R978, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0174-05
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.025

Research progress in intrathecal/intraventricular injection of antibiotics for central nervous system infection

ZHAO Zong-biao, ZHAO Wei-chen, HE Chun-yuan, SUN Yan-yan, XIA Yi-miao, LI Tao, YUAN Hong-zhong, WANG Fa-cai* (Department of Pharmacy, The Lu'an Hospital Affiliated to Anhui Medical University (The Lu'an People's Hospital), Lu'an Anhui 237005)

Abstract: Central nervous system (CNS) infection limits the clinical application of various antimicrobial agents due to the blood-brain barrier, which brings severe challenges to clinical treatment. The proposal of intrathecal/intraventricular drug delivery provides a new strategy for the treatment of CNS infection, which can directly bypass the blood-brain barrier and reach the CNS, thus exerting antibacterial effects. Based on this, this study summarized the intrathecal/intraventricular administration of aminoglycosides, glycopeptides, polypeptides and tigecycline antibiotics in recent years, aiming to provide certain reference for the treatment of CNS infection.

Key words: central nervous system infection; intrathecal administration; intraventricular administration; antibacterial drug

中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 感染, 如脑膜炎、脑室炎以及外科术后颅内感染, 具有高致残率、致死率的特点, 给患者及临床治疗带来严峻挑战, 及时识别和早期适当的抗菌治疗至关重要^[1]。血脑屏障、血脑脊液屏障能够保护 CNS 免受体循环中内源性和外源性化合物的影响, 从而确保 CNS 的正常功能^[2]。然而, 这些保护屏障的存在也限制了很多抗菌药物在 CNS 感染中的临床应用, 使得这些药物在脑脊液中难以达到有效治疗浓度, 不能有效控制 CNS 感染, 尤

其是耐药菌引起的严重感染。鞘内 / 脑室内给药方式的提出为 CNS 感染的治疗提供了一项新的策略, 这种给药方式可以绕过血脑屏障, 直接到达 CNS, 从而发挥出抗感染作用^[3]。目前, 越来越多的临床研究将鞘内 / 脑室内给药方式应用于耐药菌引起的 CNS 感染。本研究通过查阅文献, 总结目前鞘内 / 脑室内给药的研究现状, 旨在为临床应用提供一定的参考。

1 成人鞘内 / 脑室内注射的抗菌药物种类和剂量
当颅内感染在静脉注射控制效果不佳的情况

基金项目: 安徽医科大学科研项目 (No.2023xkj078); 六安市科学技术局基金项目 (No.2023lakj002); 六安市人民医院院级课题项目 (No.2023kykt02)。

作者简介: 赵宗彪, 男, 主管药师, 主要从事临床药学、药理学相关研究, email: 247644853@qq.com * **通信作者:** 王法财, 男, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药事管理、临床药学相关研究, email: wafacai305@163.com

下，可考虑鞘内/脑室内注射抗菌药物提高脑脊液中抗菌药物浓度，达到治疗效果的目的，表 1 是目前临床上鞘内/脑室内给药常见的药物及推荐剂量。

表 1 成人鞘内/脑室内注射的抗菌药物种类和剂量^[4-6]

Tab 1 Types and doses of antimicrobials injected intravenously or intrathecally into adult brains^[4-6]

抗菌药物的种类	推荐剂量	不良反应
阿米卡星	30 (5 ~ 50) mg/24 h	脑脊液嗜酸性粒细胞增多、无菌性脑膜炎、暂时性听力丧失及癫痫
庆大霉素	4 ~ 8 mg/24 h	类似阿米卡星的不良反应
妥布霉素	5 mg/24 h	类似阿米卡星的不良反应
链霉素	1 mg/(kg · 24 ~ 48 h)	脊神经根炎、暂时性听力丧失、截瘫
万古霉素	10 ~ 20 mg/24 h	红人综合征、恶心、头疼、暂时性听力丧失
替考拉宁	5 ~ 20 mg/24 h	脑脊液白细胞短暂性增加、皮疹、头痛
达托霉素	5 ~ 10 mg/24 h	发热
多黏菌素 B	5 mg/24 h	脑膜刺激症状，如脑脊液白细胞计数增加、头痛、发热、颈部僵硬
黏菌素 E 甲磺酸钠	10 (1.6 ~ 40.0) mg/24 h	嗜酸性粒细胞增多、癫痫、水肿、疼痛
美罗培南	10 mg/12 h	高剂量可引起癫痫
替加环素	1 ~ 10 mg/12 h	脊髓蛛网膜炎
卡泊芬净	5 ~ 10 mg/24 h	头疼、恶心
两性霉素 B	0.1 ~ 0.5 mg/24 h	帕金森综合征、耳鸣、颤抖、发热

2 成人鞘内/脑室内注射抗菌药物的临床应用

2.1 氨基糖苷类药物

氨基糖苷类抗菌药物具有抗菌谱广、抗菌活性强等作用特点，对多重耐药菌感染也表现出较强的敏感性，但氨基糖苷类抗菌药物的血脑屏障穿透能力较差，静脉给药难以在 CNS 感染中发挥治疗作用。近年来多项临床研究发现，将氨基糖苷类抗菌药物（包括庆大霉素、阿米卡星）通过鞘内/脑室内注射方式治疗耐药菌引起的颅内感染能够取得满意的治疗效果。Molinaro 等^[7]报道了 1 例女性患者因海绵状血管瘤接受手术后出现多药耐药铜绿假单胞菌（multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA）感染的脑膜炎，初始采用多黏菌素 B 等多种联合治疗方案效果均不佳，然而在调整为阿米卡星静脉+鞘内注射（30 mg · d⁻¹）联合头孢吡肟静脉滴注的治疗方案后，患者颅内感染明显好转，最终治愈，该研究显示阿米卡星鞘内注射在 MDR-PA 感染的脑膜炎中发挥了重要的作用，且治疗期间无明显的不良反应。Gofman 等^[8]探究了 1 例外科术后感染 MDR-PA 和耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌（carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP）引起的脑室炎患者，因病情严重，采用多种抗菌药物联合用药仍难以发挥治疗作用，而调整头孢他啶/阿维巴坦 2.5 g/8 h 静脉滴注联合阿米卡星 30 mg · d⁻¹ 鞘内注射的给药方案后，患者脑脊液培养在 3 d 后转阴，脑脊液生化指标逐步好转，最终治愈。虽然头孢他啶/阿维巴坦能够覆盖 MDR-

PA 和 CRKP，但阿米卡星鞘内注射无疑是本案例中快速发挥治疗作用的增强剂。此外，也有研究在使用头孢哌酮钠舒巴坦钠 3 g/8 h 静脉滴注治疗颅内感染鲍曼不动杆菌效果不佳的情况下，增加鞘内注射阿米卡星 20 mg · d⁻¹ 的治疗方案，患者颅内感染明显好转，并逐步转归^[9]。这些研究表明，在静脉注射治疗颅内感染疗效不佳的情况下，鞘内注射阿米卡星是一项重要的选择。

庆大霉素与阿米卡星作用机制相似，也是目前临床应用较多的抗菌药物。Holyk 等^[10]报道了 1 例脑出血后出现颅内感染 CRKP 的患者，采用头孢他啶/阿维巴坦 2.5 g/8 h 静脉滴注联合庆大霉素 8 mg · d⁻¹ 脑室内注射给药方案后，患者的颅内感染得到有效控制。也有研究指出，对于颅内感染耐药菌的治疗，在常规治疗的基础上给予庆大霉素鞘内注射（8 mg · d⁻¹）联合腰大池持续引流能够较好地控制颅内的感染症状，推荐临床应用^[11]。Kizilates 等^[12]系统评价了成人术后医源性脑膜炎患者鞘内给药的治疗效果，结果显示，由碳青霉烯类耐药菌引起的脑膜炎，在静脉给药治疗有限的情况下，鞘内给药如庆大霉素、阿米卡星和多黏菌素，可增加患者生存率。因此，鞘内/脑室内注射抗菌药物应被视为医源性脑膜炎常规的一部分，但是目前氨基糖苷类抗菌药物鞘内/脑室内给药方案仍缺乏系统的对照研究，其安全性和潜在风险值得进一步关注。

2.2 糖肽类药物

糖肽类抗菌药物主要用于革兰氏阳性菌感染

的治疗,目前临床上应用较为广泛的主要有万古霉素、去甲万古霉素以及替考拉宁等,其中万古霉素用于鞘内注射治疗颅内感染使用频次最高^[13]。孔令文等^[14]对比分析了静脉滴注和鞘内注射万古霉素治疗重型颅脑损伤术后颅内感染的安全性和有效性,结果显示,鞘内注射治疗 7 d 后的总有效率、脑脊液白细胞计数下降速率等指标明显高于静脉滴注组,治愈时间、不良反应发生率低于静脉滴注组,表明鞘内注射万古霉素治疗颅内感染疗效显著,且安全性高。黄开让等^[15]研究也发现,对于神经外科术后颅内感染患者,采用静脉联合鞘内注射万古霉素的治疗方案能够有效缩短治愈时间、改善患者颅内感染症状,临床疗效值得肯定。去甲万古霉素与万古霉素的化学结构相似,抗菌活性强度更强,在鞘内注射给药中也发挥出明显的治疗作用。金辉等^[16]研究发现,采用去甲万古霉素静脉滴注联合鞘内注射治疗外科术后颅内感染患者,能够有效降低患者感染症状,促进患者康复,且不会明显增加不良反应。这些研究表明,万古霉素和去甲万古霉素鞘内注射应用于颅内感染均具有疗效明确、不良反应较少的特点。然而,由于万古霉素和去甲万古霉素对于脑膜炎具有一定血脑屏障通透性,能够在颅内感染中发挥出显著的治疗作用,临床很少推荐鞘内/脑室内注射万古霉素或去甲万古霉素。

替考拉宁,又名太古霉素,其作用机制与万古霉素类似,对需氧和厌氧的革兰氏阳性菌均表现出抗菌活性,但不能透过血脑屏障。胡述平等^[17]对比分析了替考拉宁与万古霉素鞘内注射治疗革兰氏阳性球菌颅内感染的临床疗效,结果显示,两者对革兰氏阳性球菌颅内感染均有较强的活性,相比于万古霉素,替考拉宁表现出更优的细菌清除率,且无明显不良反应,临床应用前景较好。但目前临床上应用替考拉宁鞘内注射并不多见。

2.3 多肽类抗菌药物

目前,临床应用较为广泛的多肽类药物主要有多黏菌素 B 和多黏菌素 E 甲磺酸钠。多黏菌素具有特殊的抗菌作用机制,常用于治疗多重耐药菌的感染,但因其分子量较大,静脉给药难以透过血脑屏障,在颅内耐药菌感染治疗效果不佳的情况下,鞘内/脑室内给药提高脑脊液药物浓度是临床采取的重要方式。多黏菌素 B 在成人中多采用 5 mg/次,前 3~4 日每日一次,之后隔日一次的给药方式。通过引流管进行鞘内/脑室内

注射药物时,往往需要夹管 15~60 min,也有研究指出需夹管 2 h。Xing 等^[18]报道了 1 例 14 岁男性患者在经鼻内窥镜切除颅咽管瘤后因多药耐药鲍曼不动杆菌(multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-AB)而引发的脑膜炎,先后采用了阿米卡星联合替加环素及美罗培南+头孢哌酮舒巴坦钠+米诺环素的三联治疗方案,但均显示治疗效果不佳,将方案调整为多黏菌素 B 45 mg/12 h 静脉滴注+鞘内注射(前 4 日 5 mg,随后隔日一次)联合头孢哌酮舒巴坦 3 g/6 h 静脉滴注的治疗方案治疗一定疗程后,患者脑脊液感染指标明显好转,颅内感染得到控制。该病例表明,对于颅内感染静脉治疗效果不佳的情况,以多黏菌素 B 静脉滴注+鞘内注射为基础的联合治疗方案是治疗 MDR-AB 脑膜炎患者的重要选择。Pan 等^[19]也开展了类似研究,该研究纳入了神经外科术后脑脊液培养 MDR-AB 阳性的病例,结果显示,与静脉治疗组相比,鞘内/脑室内注射多黏菌素 B 治疗的患者 28 d 病死率明显降低,临床有效率和微生物清除率明显升高,差异具有统计学意义。孙晓曼等^[20]探究了长疗程多黏菌素 B 治疗 1 例神经外科术后耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)感染的脑脓肿患者的安全性和有效性,采用多黏菌素 B 静脉注射 3.0 mg/(kg·d)+鞘内注射(5 mg·d⁻¹)联合静脉注射大剂量舒巴坦(8 g·d⁻¹)的抗感染治疗方案,最终,脑脓肿被吸收,患者成功治愈。多黏菌素 B 的总疗程为 69 d,治疗期间无多黏菌素 B 相关肾毒性和神经毒性等并发症,仅皮肤色素沉着,停药后消退,这表明长疗程的多黏菌素 B 治疗 CRAB 所致颅内感染是安全有效的。吕远等^[21]的研究也证实了多黏菌素 B 静脉滴注+鞘内注射治疗颅内感染的有效性。虽然目前仅对多黏菌素等药物敏感的革兰氏阴性菌引起的 CNS 感染较为罕见,但发生率有上升趋势,尤其对于颅内损伤或外科术后的重症患者。因此,对于颅内耐药菌感染且仅对多黏菌素等药物敏感的患者,推荐采用鞘内/脑室内给药途径治疗,但须权衡获益风险。

2.4 替加环素

替加环素是一种新型的甘氨酸四环素类广谱抗菌药物,对大多数革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及厌氧菌均表现出较强的抗菌活性。目前已广泛应用于获得性肺炎、复杂性腹腔感染、皮肤软组织感染等治疗中,但由于其自身的药动学特

点, 血液和脑脊液中药物浓度低, 不推荐用于治疗血流感染和颅内感染^[22]。而鞘内/脑室内给药方案的提出, 拓展了替加环素在治疗颅内感染中的应用范围。Li 等^[23]报告 1 例神经外科术后 MDR-AB 引起的颅内感染, 采用替加环素 (100 mg/12 h) 静脉滴注+鞘内注射 ($5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 联合的给药方案后, 患者脑脊液白细胞计数逐渐下降, 颅内感染明显得到有效控制, 且治疗中未发现明显的不良反应。Wang 等^[24]研究也发现, 在采取静脉滴注替加环素治疗 MDR-AB 引起的脑膜炎效果不佳的情况下, 联合鞘内注射替加环素 10 mg/12 h, 能有效控制患者的颅内感染。Huang 等^[25]的研究也证实了替加环素静脉滴注 ($50 \text{ mg}/12 \text{ h}$) + 鞘内注射 ($5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 联合头孢哌酮舒巴坦 ($3 \text{ g}/12 \text{ h}$) 治疗方案对 MDR-AB 颅内感染的有效性。Li 等^[26]研究发现, 替加环素鞘内注射能够有效控制颅内感染, 但在用药后出现脊髓蛛网膜炎, 且停药后脊髓蛛网膜炎消退, 这也是报道中少见鞘内注射替加环素诱发的不良反应。由此可见, 鞘内注射替加环素应慎重考虑, 因目前其研究主要集中于个案报道, 尚缺乏系统评价, 其临床疗效及不良反应还需进一步探究。

2.5 抗真菌药物

新型隐球菌性脑膜炎是脑膜炎中治疗较困难的一类疾病, 两性霉素 B 具有较好的敏感性, 但静脉给药难以透过血脑屏障发挥治疗作用。多项研究指出, 鞘内注射两性霉素 B 在新型隐球菌性脑膜炎中具有较好的治疗效果。Xie 等^[27]报道了 1 例难治性新型隐球菌脑膜炎患者的治疗, 通过静脉注射两性霉素 B 脂质体, 剂量逐渐增加至 $150 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 并联用氟康唑 ($0.4 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) 和口服氟胞嘧啶片 ($1.5 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$), 治疗 5 个月后, 仍能在脑脊液中检测出隐球菌, 但患者无法耐受两性霉素 B 脂质体进一步增加剂量; 而改用通过腰大池引流管持续鞘内注射两性霉素 B 脂质体 ($0.5 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 的方法治疗 1 个月后, 患者颅内感染痊愈。这项病例表明, 持续鞘内注射两性霉素 B 脂质体在治疗难治性隐球菌脑膜炎中发挥了重要作用。何花等^[28]研究了不同剂量两性霉素 B (0.2、0.3、0.5 mg) 鞘内注射治疗新型隐球菌性脑膜炎的临床疗效, 结果显示, 这三个剂量均能发挥较好的治疗作用, 但剂量过高或输注速度过快都会增加不良反应的风险, 低中剂量鞘内注射患者耐受性更高。Alvarez-Uria 等^[29]也系统评价了鞘内注射两性霉素 B 脂质体治疗隐球菌性

脑膜炎的安全性和耐受性, 结果显示, 其安全性和耐受性较好, 但也有部分患者出现短暂性腰痛。由此可知, 对于难治性隐球菌性脑膜炎, 鞘内注射两性霉素 B 可作为临床考虑的治疗方案, 但需要从给药剂量、疗效及耐受性三方面做好权衡利弊。

3 结论

CNS 感染一直是困扰临床的重要难题, 对于多重耐药菌引起的严重颅内感染, 当静脉治疗效果不佳的情况下, 可考虑选用鞘内/脑室内给药, 但鞘内/脑室内给药属于有创给药, 且给药方法要求较高, 在选用时需权衡其获益/风险。此外, 鞘内/脑室内给药 (如氨基糖苷类、多黏菌素 B、替加环素) 的报道虽然较多, 但多集中于个案报道, 且接受鞘内/脑室内治疗的患者通常病情严重, 药物的不良反应可能被忽视, 其不良反应的真实发生率可能被低估。因此, 未来对于鞘内/脑室内给药的安全性和潜在风险需进行更深入的研究, 探索该给药方式在 CNS 感染治疗中的应用前景和潜在的限制性, 并明确给药时长及药物疗效的量化关系, 以为临床应用提供参考。

参考文献

- Li Z, Bruno VM, Kim KS. Central nervous system-infecting pathogens escherichia coli and cryptococcus neoformans exploit the host Pdlm2 for intracellular traversal and exocytosis in the blood-brain barrier [J]. Infect Immun, 2021, 89 (10): e12821.
- Solomon IH. Molecular and histologic diagnosis of central nervous system infections [J]. Surg Pathol Clin, 2020, 13 (2): 277-289.
- 梁晋, 郭姗姗, 张丹, 等. 鞘内注射万古霉素联合美罗培南治疗重症颅脑创伤术后颅内感染的疗效 [J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31 (6): 881-885.
- 中国医师协会神经外科医师分会神经重症专家委员会, 北京医学会神经外科学分会神经外科危重症学组. 神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识 (2021 版) [J]. 中华神经外科杂志, 2021, 37 (1): 2-15.
- Nau R, Seele J, Djukic M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in central nervous system infections [J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31 (1): 57-68.
- Nau R, Blei C, Eiffert H. Intrathecal antibacterial and antifungal therapies [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33 (3): e0019-19.
- Molinari M, Morelli P, De Gregori M, et al. Efficacy of intraventricular amikacin treatment in pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* postsurgical meningitis [J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 1369-1372.
- Gofman N, To K, Whitman M, et al. Successful treat-

- ment of ventriculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with i.v. ceftazidime-avibactam and intrathecal amikacin [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2018, 75 (13): 953-957.
- [9] 彭艺飞. 临床药师参与 1 例鞘内注射阿米卡星抗感染患者的药学实践 [J]. *基层医学论坛*, 2020, 24 (22): 3231-3233.
- [10] Holyk A, Belden V, Lee JJ, et al. Ceftazidime/avibactam use for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* meningitis: a case report [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73 (1): 254-256.
- [11] 顾生才, 菲翔, 田学丰, 等. 持续腰大池引流联合鞘内注射庆大霉素对脑室出血术后颅内感染的临床效果分析 [J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2021, 7 (2): 100-102.
- [12] Kizilates F, Keskin AS, Onder KD. Clinical features of post-operative nosocomial meningitis in adults and evaluation of efficiency of intrathecal treatment [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2021, 22 (10): 1059-1063.
- [13] 梁晋, 郭姗姗, 张丹, 等. 鞘内注射万古霉素联合美罗培南治疗重症颅脑损伤术后颅内感染的疗效 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31 (6): 881-885.
- [14] 孔令文, 王永, 张海波. 鞘内注射万古霉素在重型颅脑损伤术后颅内感染患者中的应用 [J]. *成都医学院学报*, 2024, 19 (3): 493-497.
- [15] 黄开让, 申隆. 万古霉素鞘内注射用于神经外科术后颅内感染患者治疗的临床效果 [J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15 (11): 89-91.
- [16] 金辉, 王浩, 阮福强. 去甲万古霉素静脉滴注及腰穿鞘内注射双途径给药在重症颅脑损伤术后颅内感染患者中的应用观察 [J]. *中国处方药*, 2021, 19 (9): 96-97.
- [17] 胡述平, 薛南平, 晏怡. 鞘内注射替考拉宁治疗革兰阳性球菌颅内感染 [J]. *重庆医学*, 2009, 38 (19): 2486-2487.
- [18] Xing HY, Cheng CY, Zhang YH, et al. Successful treatment with intrathecal and intravenous polymyxin B-based combination against MDR *Acinetobacter baumannii* meningitis in pediatric patient: a case report [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 564991.
- [19] Pan SJ, Huang XF, Wang YS, et al. Efficacy of intravenous plus intrathecal/intracerebral ventricle injection of polymyxin B for post-neurosurgical intracranial infections due to MDR/XDR *Acinetobacter baumannii*: a retrospective cohort study [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 8.
- [20] 孙晓曼, 张英杰, 张立平, 等. 长疗程多黏菌素 B 治疗耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌脑脓肿 1 例 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (11): 1370-1372.
- [21] 吕远, 成艳兰, 张丙辰, 等. 多黏菌素 B 双途径给药联合腰椎穿刺置管持续引流在颅内动脉瘤术后并发颅内感染患者中的应用 [J]. *中外医学研究*, 2022, 20 (2): 39-42.
- [22] Jo J, Ko KS. Tigecycline heteroresistance and resistance mechanism in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9 (2): e101021.
- [23] Li ZY, An YL, Li LJ, et al. Intrathecal injection of tigecycline and polymyxin b in the treatment of extensively drug-resistant intracranial *Acinetobacter baumannii* infection: a case report and review of the literature [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 1411-1423.
- [24] Wang LJ, Zhang JR, Yu XA, et al. Intrathecal injection of tigecycline in treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis: a case report [J]. *Eur J Hosp Pharm*, 2017, 24 (3): 182-184.
- [25] Huang GL, Lai WT, Wu DX, et al. Two cases report of intrathecal tigecycline therapy for intracranial infection with *Acinetobacter baumannii* and review of literatures [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 2211-2217.
- [26] Li LM, Zheng WJ, Shi SW. Spinal arachnoiditis followed by intrathecal tigecycline therapy for central nervous system infection by extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48 (7): 1220719957.
- [27] Xie HT, Luo P, Li ZL, et al. Continuous intrathecal administration of liposomal amphotericin B for treatment of refractory *Cryptococcus neoformans* encephalitis: a case report [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (1): 780-784.
- [28] 何花, 黄瑛, 张燕玲, 等. 不同剂量两性霉素 B 鞘内注射联合脑脊液持续引流置换治疗新型隐球菌性脑膜炎的对比 [J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41 (12): 112-118.
- [29] Alvarez-Uria G, Midde M, Battula J, et al. Safety and tolerability of intrathecal liposomal amphotericin B (*AmBisome*) for cryptococcal meningitis: a retrospective study in HIV-infected patients [J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2018, 5 (5): 77-81.

(收稿日期: 2024-05-11; 修回日期: 2024-07-25)

抗体药物偶联物相关间质性肺疾病的研究进展

黎红豆, 邢孔浪* (三亚市人民医院药学部, 海南 三亚 572000)

摘要: 抗体药物偶联物 (ADC) 是一类新型抗肿瘤药物, 由单克隆抗体、细胞毒性药物和连接子组成, 利用抗体与靶抗原特异性结合的特点, 实现精准杀伤肿瘤细胞的目的。但随着 ADC 药物的广泛应用, 与其相关的间质性肺疾病 (ILD) 引起了临床医务人员的关注与担忧。本研究对 ADC 药物相关 ILD 的流行病学、临床特点、发病机制、危险因素及全程化管理进行综述, 旨在提高临床医务人员对 ADC 药物相关 ILD 的认识, 为临床 ADC 药物的安全使用提供参考。

关键词: 抗体药物偶联物; 间质性肺疾病; 不良事件; 全程化管理

中图分类号: R749.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0179-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.026

Research progress in antibody-drug conjugate-induced interstitial lung disease

LI Hong-dou, XING Kong-lang* (Department of Pharmacy, People's Hospital of Sanya, Sanya Hainan 572000)

Abstract: Antibody-drug conjugate (ADC) is a new group of antitumor drugs. It consists of monoclonal antibodies, cytotoxic drugs and linkers. Based on the specific binding of antibodies to target antigens, ADC drugs can precisely kill tumor cells. However, with the wide application of ADC drugs, the associated interstitial lung disease (ILD) has attracted the attention of clinicians. This study reviewed the epidemiology, clinical characteristics, pathogenesis, risk factors, and comprehensive management of ADC-related ILD, aiming to enhance the understanding of ADC-related ILD among clinical staff and provide references for the safe use of ADC drugs.

Key words: antibody-drug conjugate; interstitial lung disease; adverse event; comprehensive management

抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC) 是一类通过特定连接子将靶标特异性的单克隆抗体与高杀伤性的细胞毒性药物偶联起来的生物制剂, 具有高特异性靶向能力和高杀伤力两大优点, 可以实现准确、高效杀灭肿瘤细胞的目的, 已经成为肿瘤领域研究和开发的热点药物之一^[1-2]。虽然 ADC 药物在多个瘤种的治疗中取得了傲人的疗效, 但在真实世界的使用中却面临诸多的安全性挑战和制约。药物引起的间质性肺疾病 (drug-induced interstitial lung disease, DILD) 是抗肿瘤药物临床应用中常见的肺部不良反应之一, 不仅会导致肿瘤治疗的延迟或终止, 也会因呼吸困难或呼吸衰竭带来死亡风险。细胞毒性药物对肺泡或气道上皮细胞的直接损伤以及药物通过激活机体免疫细胞引起的免疫性肺损伤被认为

是抗肿瘤药物引起间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD) 的主要机制^[3]。近年来, 关于 ADC 药物引起 ILD 的报道越来越多, 引发了临床对 ADC 药物潜在肺毒性的担忧^[3-6]。为深入认识并积极管理 ADC 药物相关 ILD, 降低临床用药风险, 本文就其流行病学、临床特点、诊断要点、发病机制、危险因素及管理策略等进行综述。

1 ADC 药物安全性概述

ADC 因其独特的作用机制打破了抗肿瘤治疗的瓶颈, 成为目前肿瘤治疗领域的最火热的疗法之一。截至 2024 年 3 月, 全球已有 15 款 ADC 药物获批上市, 其中 2 款药物目前进入撤市流程, 分别是治疗毛细胞白血病的莫塞妥单抗 (Moxetumomab Pasudotox) 以及治疗多发性骨髓瘤的玛贝妥单抗 (Belantamab Mafodotin)。其中莫塞妥单抗撤市的

作者简介: 黎红豆, 女, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 3646977699@qq.com * 通信作者: 邢孔浪, 男, 主管药师, 主要从事临床药学、肿瘤药学工作, email: 394332409@qq.com

主要原因为临床用量低且有替代药物，而玛贝妥单抗则是因为在 DREAMN-3 期试验中未能达到无进展生存期的主要终点。当前国内上市药品有 7 款，治疗领域涉及淋巴瘤、白血病、乳腺癌、尿路上皮癌等^[7]。随着 ADC 药物的广泛使用，其毒副作用也逐渐引起医务人员和患者的关注。最近，一项关于临床试验中 ADC 药物相关不良事件的 Meta 分析结果敲响了安全

用药的警钟。该研究囊括了 169 项临床试验，共涉及 22 492 名肿瘤患者，结果显示 ADC 药物治疗相关不良事件的总发生率为 91.2%，≥ 3 级不良事件发生率高达 46.1%，其中有 153 项报道了 ADC 药物治疗导致的患者死亡，总体发生率为 1.3%，提示 ADC 药物的安全性问题十分严峻^[4]。目前已上市的 13 款 ADC 药物相关不良事件总结见表 1。

表 1 已上市 ADC 药物相关不良事件小结^[8-10]

Tab 1 Summary of adverse events related to marketed ADC drugs^[8-10]

肿瘤	通用名	靶点	上市时间	适应证	常见不良事件	≥ 3 级不良事件
血液系统肿瘤	gemtuzumab	CD-33	2017 年	白血病	血小板减少、疲乏、中性粒细胞减少、发热、恶心、感染、寒战、出血、呕吐、头痛、口腔炎、腹泻和腹痛	中性粒细胞减少、血小板减少、谷草转氨酶 (AST)/谷丙转氨酶 (ALT) 水平升高和脓毒症
	ozogamicin					
	奥加伊妥珠单抗*	CD-22	2017 年	白血病	中性粒细胞减少、血小板减少、感染、贫血、白细胞减少、发热性中性粒细胞减少和恶心	中性粒细胞减少、血小板减少、白细胞减少、发热性中性粒细胞减少、贫血和淋巴细胞减少
	维布妥单抗*	CD-30	2011 年	淋巴瘤	周围感觉神经病变、恶心、疲乏、中性粒细胞减少、腹泻、发热、呕吐、关节痛、瘙痒、肌痛、周围运动神经病变和脱发	中性粒细胞增多、外周感觉神经病、血小板减少和贫血
	维泊妥珠单抗*	CD-79b	2019 年	淋巴瘤	中性粒细胞增多、贫血和周围神经病变	中性粒细胞增多、贫血和周围感觉神经病
实体瘤	loncastuximab	CD-19	2021 年	淋巴瘤	中性粒细胞减少、血小板减少、贫血、疲乏和 γ-谷氨酰转氨酶升高	血小板减少、中性粒细胞减少、贫血、γ-谷氨酰转氨酶升高、白细胞减少、淋巴细胞减少和低磷血症
	tesirine					
	enfortumab	Nectin-4	2019 年	尿路上皮癌	疲乏、脱发、食欲减退、味觉障碍、恶心、周围感觉神经病变、瘙痒、腹泻和斑丘疹	皮疹、中性粒细胞减少症、贫血和疲乏
	vedotin					
	tisotumab	Tissue factor	2021 年	宫颈癌	鼻衄、疲劳、恶心、脱发、结膜炎、食欲减退、便秘、腹泻、呕吐、周围神经病变、干眼和腹痛	疲乏、贫血、腹痛、低钾血症、结膜炎、低钠血症、周围神经病变和呕吐
	vedotin					
	恩美曲妥珠单抗*	Her-2	2013 年	乳腺癌	血小板减少、转氨酶升高、疲乏、贫血和恶心	血小板减少、AST 水平升高和贫血
	mirvetuximab	Folate receptor	2022 年	卵巢癌	恶心、视力模糊、角膜病、腹泻、疲劳、周围神经病变、干眼和视力下降	视力模糊、周围神经病变和腹泻
	soravtansine					
	德曲妥珠单抗*	Her-2	2019 年	乳腺癌、肺癌、胃癌	恶心、疲乏、脱发、呕吐、中性粒细胞减少、便秘、贫血、食欲下降、腹泻、白细胞减少和血小板减少	中性粒细胞减少、贫血、恶心、白细胞减少、淋巴细胞减少和疲乏
戈沙妥珠单抗*	Trop-2	2020 年	乳腺癌、尿路上皮癌	恶心、腹泻、中性粒细胞减少症、疲乏、呕吐、贫血、脱发和便秘	中性粒细胞减少、贫血、腹泻和白细胞减少	
cetuximab	EGFR	2020 年	头颈癌	疲劳、吞咽困难、水肿、便秘、皮疹应用部位疼痛、血压升高、白细胞计数减少、贫血、舌炎、肝功能异常	肺炎、应用部位疼痛、肿瘤出血、局部感染	
saratolacan						
维迪西妥单抗*	Her-2	2021 年	胃癌、尿路上皮癌	周围感觉神经病变、白细胞减少、AST 升高和中性粒细胞减少	周围感觉神经病变和中性粒细胞减少	

注 (Note): * 中国上市药品 (* means marketed drugs in China)。

2 ADC 药物相关 ILD 的流行病学

在所有的 ADC 药物中，德曲妥珠单抗 (trastuzumab deruxtecan, T-DXd) 引起的 ILD 最为突出，已被确定为该药需特别关注的药物相关不良事件。T-DXd 是一种新型靶向人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, Her-2) 的 ADC 药物，由曲妥珠单抗通过可裂解连接器与

伊喜替康衍生物组成，于 2023 年 2 月正式在国内获批上市，用于 Her-2 阳性或低表达乳腺癌患者的治疗。来自 T-DXd 单药治疗的 9 项 I 期和 II 期试验汇总分析结果显示，纳入的 1150 例患者中包括乳腺癌 (44.3%)、胃癌 (25.6%)、肺癌 (17.7%)、结直肠癌 (9.3%) 及其他癌症 (3.0%)，判定的药物相关性 ILD 或肺炎的总发生率为 15.4%，其中 77.4% 为 1 ~ 2 级

事件, 87.0% 的患者在 12 个月内发生首次事件^[11]。另一项包含 1193 例不同类型的晚期实体恶性肿瘤患者的研究结果显示, 122 例患者发生了 T-DXd 诱导的 ILD/肺炎, 其中有 13 例 (10.66%) 死亡, ILD/肺炎发生率最高的患者为子宫癌病 (26.47%) 和非小细胞肺癌 (24.77%)^[12]。在日本人群中 T-DXd 相关 ILD 的发生率似乎更高, 近期一项来自日本的真实世界研究显示, 在 T-DXd 上市后 (2020 年 5 月 25 日至 2022 年 2 月 24 日), 在大约 3000 例接受 T-DXd 治疗的肿瘤患者中, 共 287 例患者被报告为潜在的 ILD/肺炎病例, 其中 130 例与 T-DXd 的治疗相关^[13]。

除 T-DXd 外, 其他 ADC 药物也存在发生 ILD 的风险。恩美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine, T-DM1) 是另一款用于 Her-2 阳性乳腺癌患者治疗的 ADC 药物。Diéras 等^[14]报道的安全性分析结果显示, 在 884 例 T-DM1 暴露的患者中, 约 1.1% ($n = 10$) 的患者发生了与肺毒性相关的不良事件。此外, 靶向 CD30 用于治疗淋巴瘤的 ADC 药物维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin, BV), 也被报道具有潜在的肺毒性。一项来自日本的 BV 上市后监测研究结果显示, 284 例患有恶性淋巴瘤患者使用 BV 后, 肺毒性发生率为 4.6%, 其中最突出的肺部事件为 ILD, 发生率为 3.9%^[15]。国内的一项基于 FDA 不良事件报告的数据挖掘分析显示, 用于治疗淋巴瘤的另一款 ADC 药物维泊妥珠单抗亦被检测出 ILD 的风险信号^[16]。综上所述, 不管是在临床试验还是真实世界使用中, ADC 药物相关 ILD 均是值得重点关注的的核心安全问题。

3 ADC 药物相关 ILD 的临床特点和诊断要点

ADC 药物相关 ILD 包括多种肺部疾病, 例如肺炎、肺泡结构紊乱和弥漫性肺泡纤维化等, 其临床表现通常是非特异且高度可变的。轻症患者可无明显的临床症状 (仅影像学检查发现), 随着疾病的发展, 患者往往会出现呼吸急促、干咳、疲劳和胸部不适等症状, 若得不到及时干预及管理, 最终可能导致危及生命的弥漫性肺泡损伤和急性呼吸窘迫综合征^[17-18]。一项关于 T-DXd 治疗乳腺癌的 2 期临床研究报道了 ILD 发生的中位时间为 193 d (范围: 42 ~ 535 d), 康复的中位时间为 34 d (范围: 3 ~ 179 d)^[19]。另一项在结直肠癌的研究中则发现, T-DXd 相关 ILD 发生的中位时间更短, 为 77 d (范围: 42 ~ 84 d)^[20]。

DILD 的诊断是一个复杂的过程, 由于临床表现的非典型性, 且容易与其他肺部疾病混淆, 因此需要综合考虑患者临床症状、影像学检查、实验室检测及用药史, 并与其他肺部疾病鉴别诊断。尽管如此, 影像学检查仍在诊断 DILD 中仍然扮演着非常重要的角色, 尤其是胸部高分辨率 CT (high-

resolution computed tomography, HRCT), 不仅可以帮助早期发现肺间质是否受累, 而且可帮助鉴别可能的药物相关性肺损伤、肿瘤进展和其他感染性疾病等。DILD 的 CT 通常表现为非特异性间质性改变、机化性肺炎样改变、过敏性肺炎样改变及弥漫性肺泡损伤样改变^[21]。在诊断 DILD 时, 应重点关注患者肺部病变时间与药物治疗情况在时间上的相关性判断。

4 ADC 药物相关 ILD 的发病机制和危险因素

ADC 药物相关 ILD 的发病机制尚未完全明确, 可能与以下因素有关:

① 靶向依赖性摄取: 若正常肺组织也表达 ADC 药物所靶向的抗原, 那么这些组织可能会错误地摄取 ADC 药物, 从而导致肺泡上皮细胞或肺间质细胞的损伤。② 靶向非依赖性摄取: ADC 药物的抗体部分可能与正常细胞非特异性结合, 导致药物在非靶组织的摄取增加, 引起毒性反应。最近的一项研究发现 T-DXd 可呈剂量依赖性地诱导成体猴发生 ILD, 但是单独使用该药的有效荷载 deruxtecan 处理后并没发现肺毒性, T-DXd 的靶点被证明在肺气道位置表达, 而 ILD 发生在肺泡水平, 据此可推测 ADC 引起的 ILD 可能由靶点非依赖性作用所致^[21-22]。③ 旁观者杀伤效应: ADC 药物可通过旁观者效应增加疗效, 但同时也可能增加毒性。当抗原阳性的靶细胞释放有效载荷到局部环境时, 抗原阴性的正常细胞, 例如肺泡上皮细胞, 可能通过被动扩散、转运蛋白介导的摄取或非特异性内吞机制摄取这些有效载荷, 引起肺毒性^[23]。④ 连接子-药物的不稳定性: ADC 药物的连接子与有效荷载之间的结合不稳定, 可能导致循环中的细胞毒性药物过早释放, 增加了对正常细胞的毒性, 这可能影响包括肺在内的多个器官。连接子的选择是 ADC 药物稳定性背后的关键因素之一, 第一代 ADC 药物通常采用可裂解连接子, 此类型连接子在血浆中相对不稳定, 增加了非靶组织的毒性发生风险^[24]。

研究表明, 日本裔已被确认为 T-DXd 相关 ILD 的潜在危险因素, 该种族患者 ILD 的发生率 (24.4%) 明显高于非日本裔患者 (11%)^[25]。研究显示, 人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 与 ILD 的发生密切相关, 而日本人群的 HLA-DRB1*04:05 比例明显高于其他大多数人群^[26]。除种族外, ADC 药物的使用剂量也是 ILD 发生的危险因素之一, 两者成正相关性^[27]。不同肿瘤类型 ADC 药物相关肺损伤的发生率也不同, 其中非小细胞肺癌患者 ILD/肺炎的发生率较高 (24.77%), 这可能与包括吸烟引起的潜在肺部疾病, 如肺气肿和慢性阻塞性肺疾病, 肺部手术史或放疗史有关^[12]。此外, 既往存在 ILD 病史或其他肺部疾病、合并自身免疫性疾病、吸烟史、低氧血症、需要

机械通气、高龄、初始治疗存在中重度肾损伤、联合使用其他 ILD 高风险药物等，均可能增加 ADC 相关 ILD 的发生风险^[11, 28-29]。在临床实践中，需综合考虑上述危险因素，并采取相应的预防和管理措施，以减少 ADC 药物相关 ILD 的风险。对于有高危因素的患者，可能需要更密切的监测和个性化的治疗计划。

5 ADC 药物相关 ILD 的管理策略及建议

为降低 ADC 药物相关 ILD 的发生风险，治疗前全面仔细地评估至关重要，具体包括：

- ① 病史收集：详细了解患者的既往病史，特别是慢性肺部疾病史、吸烟史和肺部手术/放疗史；
- ② 基线肺功能评估：在开始 ADC 药物治疗前，进行肺功能检测及胸部影像学检查，以评估患者的呼吸功能，确定是否存在潜在的肺部疾病；
- ③ 实验室检查：包括全血细胞计数、肝肾功能等，以评估患者的整体健康状况；
- ④ 治疗方案及药物相关作用：评估患者当前使用或准备使用的所有药物，应特别关注可引起 ILD 的高风险药物（包括抗肿瘤药物及辅助用

药），以确定潜在的药物相互作用。充分的用药教育可以提高患者 ILD 上报的意识，特别是呼吸系统的新发症状或恶化症状，有利于患者得到及时治疗。对于存在高风险的患者，应制订个体化的管理方案，并充分沟通 ADC 药物治疗的潜在风险和获益，确保理解 ILD 发生的可能性及后果^[30-31]。

在 ADC 药物使用过程中，ILD 的监测和诊断是全程化管理的关键环节。鉴于 CT 在诊断 ILD 中的重要作用，Wekking 等^[30]建议在临床治疗中每隔 9 ~ 12 周，或者在出现新的呼吸道症状时进行一次 CT 扫描。一旦怀疑或证实患者发生 ADC 药物相关 ILD 时，应立即停止治疗，然后根据美国国家癌症研究所常见不良事件评价标准（CTCAE 5.0）进行分级管理，见表 2。DILD 治疗的核心是及时使用激素，因为肺损伤的潜在机制是炎症和/或免疫反应。总体而言，在临床实践中，大部分 ADC 药物相关 ILD 是低级别的，通过早期诊断、迅速启动激素治疗和密切监测均能有效安全地处理。

表 2 基于常见不良反应评价标准 (CTCAE 5.0) 的 DILD 分级标准及管理策略^[3, 32]

Tab 2 DILD grading criteria and management strategies based on common adverse reaction evaluation criteria (CTCAE 5.0)^[3, 32]

分级	描述	管理建议 / 策略
G1	无症状；仅临床检查或诊断发现；无需治疗	<ul style="list-style-type: none"> • 暂停给药直至完全恢复；若 ≤ 28 d 缓解，维持原剂量给药；若 > 28 d 缓解，将药物剂量降低一级；若发生在疗程第 22 日之后，且在末次给药 49 d 内仍未缓解，则应停药 • 考虑 1 ~ 2 周内（或根据临床指征）复查影像学；考虑开始激素治疗 [如 ≥ 0.5 mg / (kg · d) 泼尼松或等效药物] 直至临床症状和影像学改善，然后在至少 4 周内逐渐减量；如果激素治疗后 ILD 仍加重，则按照 G2 处理
G2	有症状；需要干预；影响工具性日常生活活动	<ul style="list-style-type: none"> • 永久性停药 • 立即开始激素治疗 [如 ≥ 1.0 mg / (kg · d) 泼尼松或等效药物] 至少 14 d，直至临床症状和影像学提示完全缓解，然后在至少 4 周内逐渐减量；同时密切监测症状，如有临床指征，再次影像学检查 • 若 5 d 内临床或影像结果没有改善或加重，考虑增加激素剂量 [如 2.0 mg / (kg · d) 泼尼松或等效药物]，并可改为静脉给药 • 重新考虑其他病因，并完善检查，根据临床症状，逐步升级处理
G3	重度症状；影响自理性日常生活活动；需要吸氧	<ul style="list-style-type: none"> • 永久性停药，住院治疗 • 立即开始经验性大剂量甲泼尼龙静脉滴注治疗（如 500 ~ 1000 mg · d⁻¹，连续 3 d），序贯 ≥ 1.0
G4	危及生命的呼吸障碍；需要紧急治疗（如气管切开或插管）	<ul style="list-style-type: none"> mg / (kg · d) 泼尼松（或等效药物）至少 14 d 或直至临床症状和影像学提示完全缓解，随后在 ≥ 4 周内逐渐减量，如有临床指征，再次影像学检查
G5	死亡	<ul style="list-style-type: none"> • 如 3 ~ 5 d 内临床或影像仍然没有改善，重新考虑其他病因，并完善检查，考虑使用其他免疫抑制剂和 / 或根据本地临床实践进行治疗

6 小结与展望

随着 ADC 药物越来越广泛地使用，真实世界中与其相关的 DILD 病例可能会大幅增加。临床实践表明，尽管少部分 ILD 可能存在危及生命的安全性风险，但如果及时准确诊断、早期适当管理和严格监测，是可以获得理想预后的。此外，ADC 药物治疗中 ILD 的有效管理是建立在多学科互动的基础上，包括肿瘤学家、放射科医师、肺病学家、药学专家和传染病专家等。最后，通过研究 ILD 的潜在机制、生物标志物和诊断方法可以最大限度地降低 ILD 的风险。

参考文献

- [1] Tarantino P, Carmagnani PR, Corti C, et al. Antibody-drug conjugates: smart chemotherapy delivery across tumor histologies [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72 (2): 165-182.
- [2] Wu Q, Qian W, Sun XL, et al. Small-molecule inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and more: FDA-approved novel therapeutic drugs for solid tumors from 1991 to 2021 [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15 (1): 143.
- [3] 抗肿瘤药物相关间质性肺疾病诊治专家共识专家委员会. 抗肿瘤药物相关间质性肺疾病诊治专家共识 [J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44 (7): 693-702.
- [4] Masters JC, Nickens DJ, Xuan DW, et al. Clinical toxicity of antibody drug conjugates: a meta-analysis of payloads [J]. Invest

- New Drugs, 2018, 36 (1): 121-135.
- [5] Li JM, Shen GS, Liu Z, et al. Treatment-related adverse events of antibody-drug conjugates in clinical trials: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Innov*, 2023, 2 (5): 346-375.
- [6] Tarantino P, Modi S, Tolaney SM, et al. Interstitial lung disease induced by anti-ERBB2 antibody-drug conjugates: a review [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7 (12): 1873-1881.
- [7] Kaplon H, Crescioli S, Chenoweth A, et al. Antibodies to watch in 2023 [J]. *MAbs*, 2023, 15 (1): 2153410.
- [8] Nguyen TD, Bordeau BM, Balthasar JP. Mechanisms of ADC toxicity and strategies to increase ADC tolerability [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (3): 713.
- [9] Sheng XN, Wang L, He ZS, et al. Efficacy and safety of disitamab vedotin in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: a combined analysis of two phase II clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42 (12): 1391-1402.
- [10] Tarantino P, Ricciuti B, Pradhan SM, et al. Optimizing the safety of antibody-drug conjugates for patients with solid tumours [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20 (8): 558-576.
- [11] Powell CA, Modi S, Iwata H, et al. Pooled analysis of drug-related interstitial lung disease and/or pneumonitis in nine trastuzumab deruxtecan monotherapy studies [J]. *ESMO Open*, 2022, 7 (4): 100554.
- [12] Abuhelwa Z, Alloghbi A, Alqahtani A, et al. Trastuzumab deruxtecan-induced interstitial lung disease/pneumonitis in ERBB2-positive advanced solid malignancies: a systematic review [J]. *Drugs*, 2022, 82 (9): 979-987.
- [13] Baba T, Kusumoto M, Kato T, et al. Clinical and imaging features of interstitial lung disease in cancer patients treated with trastuzumab deruxtecan [J]. *Int J Clin Oncol*, 2023, 28 (12): 1585-1596.
- [14] Diéras V, Harbeck N, Budd GT, et al. Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: an integrated safety analysis [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32 (25): 2750-2757.
- [15] Izutsu K, Ogura M, Tobinai K, et al. Safety profile of brentuximab vedotin in Japanese patients with relapsed/refractory Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma: a post-marketing surveillance study [J]. *Int J Hematol*, 2021, 113 (3): 404-412.
- [16] Xu ZL, Huang D, Liu QS, et al. A real-world pharmacovigilance analysis of the FDA adverse event reporting system events for polatuzumab vedotin [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2024, 2: 1-9.
- [17] Matsuno O. Drug-induced interstitial lung disease: mechanisms and best diagnostic approaches [J]. *Respir Res*, 2012, 13 (1): 39.
- [18] Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (3): 241-251.
- [19] Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (7): 610-621.
- [20] Siena S, Di Bartolomeo M, Raghav K, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201) in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (DESTINY-CRC01): a multicentre, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22 (6): 779-789.
- [21] Kumagai K, Aida T, Tsuchiya Y, et al. Interstitial pneumonitis related to trastuzumab deruxtecan, a human epidermal growth factor receptor 2-targeting Ab-drug conjugate, in monkeys [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111 (12): 4636-4645.
- [22] Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues [J]. *Oncogene*, 1990, 5 (7): 953-962.
- [23] Mahalingaiah PK, Ciurlionis R, Durbin KR, et al. Potential mechanisms of target-independent uptake and toxicity of antibody-drug conjugates [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 200: 110-125.
- [24] Sheyi R, de la Torre BG, Albericio F. Linkers: an assurance for controlled delivery of antibody-drug conjugate [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (2): 396.
- [25] Ma Z, Zhang Y, Zhu M, et al. Interstitial lung disease associated with anti-HER2 anti-body drug conjugates: results from clinical trials and the WHO's pharmacovigilance database [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2022, 15 (11): 1351-1361.
- [26] Imatoh T, Ushiki A, Ota M, et al. Association of HLA-DRB1*04: 05 allele with drug-induced interstitial lung disease in Japanese population [J]. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20 (6): 823-830.
- [27] Yin O, Iwata H, Lin CC, et al. Exposure-response relationships in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and other solid tumors treated with trastuzumab deruxtecan [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110 (4): 986-996.
- [28] Law JW, Campbell A, Weller C, et al. Epidemiology of interstitial lung disease in patients with metastatic breast cancer at baseline and after treatment with HER2-directed therapy: a real-world data analysis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2022, 196 (3): 603-611.
- [29] Zhu ZJ, Shen GS, Li JM, et al. Incidence of antibody-drug conjugates-related pneumonitis in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2023, 184: 103960.
- [30] Wekking D, Porcu M, Pellegrino B, et al. Multidisciplinary clinical guidelines in proactive monitoring, early diagnosis, and effective management of trastuzumab deruxtecan (T-DXd)-induced interstitial lung disease (ILD) in breast cancer patients [J]. *ESMO Open*, 2023, 8 (6): 102043.
- [31] Yong WP, Teo FS, Teo LL, et al. Clinical best practices in optimal monitoring, early diagnosis, and effective management of antibody-drug conjugate-induced interstitial lung disease or pneumonitis: a multidisciplinary team approach in Singapore [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2022, 18 (12): 805-815.
- [32] US Department of Health and Human Services. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0 [EB/OL]. (2017-11-27) [2024-06-14]. https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf.

(收稿日期: 2024-05-22; 修回日期: 2024-06-21)

托法替布在幼年特发性关节炎中的应用研究进展

周敬强¹, 林穆娜¹, 张亚萍², 韩旭^{2*} (1. 淮南市妇幼保健院药剂科, 安徽 淮南 232000; 2. 全椒县人民医院药剂科, 安徽 滁州 239500)

摘要: 幼年特发性关节炎是一种病因不明的异质性慢性关节炎, 好发于 16 岁以下的儿童, 持续至少 6 周。托法替布是一种新型的口服小分子 Janus 激酶 (主要是 JAK1 和亚型 JAK3) 选择靶向性抑制剂, 具有免疫调节和抗炎特性。2020 年, 托法替布被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于 2 岁及以上儿童的活动性多关节型幼年特发性关节炎, 由于其在儿童中使用的证据有限, 使得国内关于托法替布治疗幼年特发性关节炎的报道较少。本文主要从托法替布治疗幼年特发性关节炎的作用机制、药动学特征、临床应用和安全性 4 个方面总结其相关研究进展, 以期为临床应用带来参考。

关键词: 幼年特发性关节炎; 托法替布; 作用机制; 药动学特征; 临床应用; 安全性

中图分类号: R725.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0184-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.027

Research progress in the application of tofacitinib for juvenile idiopathic arthritis

ZHOU Jing-qiang¹, LIN Mu-na¹, ZHANG Ya-ping², HAN Xu^{2*} (1. Department of Pharmacy, Huainan Maternal and Child Health Care Hospital, Huainan Anhui 232000; 2. Department of Pharmacy, Quanjiao People's Hospital, Chuzhou Anhui 239500)

Abstract: Juvenile idiopathic arthritis is a heterogeneous chronic arthritis of unknown etiology that tends to occur in children under 16 years of age and last for at least 6 weeks. Tofacitinib is a novel oral small-molecule selective targeted inhibitor of Janus kinases (primarily JAK1 and subtype JAK3) with immunomodulatory and anti-inflammatory properties. In 2020, tofacitinib was approved by the U. S. Food and Drug Administration for treating active multiarticular juvenile idiopathic arthritis in children 2 years of age and older. Limited evidence of its use in children resulted in very few reports of tofacitinib for the treatment of juvenile idiopathic arthritis in China. This paper summarized the research progress of tofacitinib in the treatment of juvenile idiopathic arthritis from mechanism of action, pharmacokinetic characteristics, clinical application and safety to provide reference for its clinical application.

Key words: juvenile idiopathic arthritis; tofacitinib; mechanism of action; pharmacokinetic characteristics; clinical application; safety

幼年特发性关节炎 (juvenile idiopathic arthritis, JIA) 是一种多发于儿童期且无法治愈的慢性疾病^[1], 其特征是关节炎持续 6 周以上, 发病年龄在 16 岁以下^[2]。JIA 是最常见的儿童风湿性疾病, 严重可致儿童残疾, 甚至并发致死率较高的巨噬细胞活化综合征。儿童中患病率约为 70/10 万^[3], 根据国际风湿病协会联盟的分类 (International League

of Associations for Rheumatology, ILAR)^[4-5], JIA 可分为全身型 JIA (sJIA)、少关节型 JIA (oJIA)、多关节型 JIA (pJIA) RF 阳性、pJIA RF 阴性、银屑病型 JIA (PsA)、附着点炎/脊柱关节炎相关型 JIA (ERA) 和未分类型 JIA (uJIA) 7 个相互排斥的类别。JIA 的病因和发病机制尚不清楚, 可能与异常的免疫调节和细胞因子的产生、免疫反应的

作者简介: 周敬强, 男, 在读硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: fourson@qq.com *通信作者: 韩旭, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: hxzy0107@163.com

遗传易感性和潜伏的病毒感染有关^[6]。目前, 药物治疗主要包括非甾体抗炎药 (NSAIDs)、皮质类固醇类、非生物抗风湿药 (DMARDs) 以及生物制剂 (包括利妥昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、依那西普等)^[7], 上述药物虽常用于儿科患者, 但目前尚未获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于 JIA^[8], 且往往需要注射给药。然而, 国际上儿童风湿科专家们已经在探索使用口服小分子靶向药物托法替布 (tofacitinib) 治疗 JIA 的可行性, 其口服治疗对于可能倾向于避免注射的儿童和青少年尤其重要。本文就托法替布治疗 JIA 的作用机制、药动学特征、临床应用和安全性进行综述。

1 托法替布治疗 JIA 的作用机制

JAK 家族是一类非受体酪氨酸蛋白激酶, 主要包括 JAK1、JAK2、JAK3 和酪氨酸激酶 2 (TKY2), 该家族是结合 I 型和 II 型细胞因子受体信号传导的组成部分^[9]。信号传导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 是一种负责细胞内信号传导的蛋白质^[10], 家族成员包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6。当多种细胞因子 (干扰素家族、共同 γ 链、糖蛋白 130 家族) 与其相应受体结合时, 激活信号蛋白 JAK 使其磷酸化, 进而使 STAT 磷酸化, 最终激活 JAK-STAT 信号传导通路, 调节细胞的增殖、分化、凋亡等生理病理过程^[11]。JIA 发病的一个重要因素是 JAK-STAT 信号通路异常, 主要表现为影响 Th1 细胞分化及 Th17 细胞的过度产生, 从而上调多种炎症细胞因子如白细胞介素 (IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 -1 和基质金属蛋白酶 2 的转录和产生^[12]。托法替布是一种 JAK 抑制剂, 可阻断 JAK1 与 γ 链的细胞因子 (IL-6、IL-10、IL-13 及 IFN- γ) 结合, 也可阻断 JAK3 与 IL-2R γ 链的细胞因子 (IL-2、IL-4、IL-7、IL-9 等) 结

合, 还可以阻断致病性 Th17 细胞的产生及影响 Th1 细胞的分化^[13-14], 使促炎因子的合成与分泌减少, 同时也减少自然杀伤细胞、树突状细胞、巨噬细胞及 T 细胞等在多种免疫细胞异常激活, 从而减轻 JIA 患者滑膜炎以及延缓已损伤软骨组织的进一步破坏^[15]。

2 托法替布在 JIA 患者中的药动学特征

托法替布是一种口服 JAK 抑制剂, 被批准用于治疗类风湿关节炎 (RA), 在成人患者和健康志愿者中进行的药动学 (PK) 研究表明, 托法替布可以被迅速吸收和消除^[16]。口服托法替布后, 全身暴露量以近似剂量成正比的方式增加, 达到血药浓度峰值的时间为 0.5 ~ 1 h, 终末半衰期 $t_{1/2}$ 约为 3 h, 多次给药后, 在 24 ~ 48 h 达到稳态, 积累最小^[17]。但在儿童中并没有进行 PK 的研究, 为此 Ruperto 等^[18]进行了关于 JIA 患儿一项开放性、多剂量的临床试验 (NCT01513902), 将 26 名患儿按年龄分为 3 组, 分别为 N1 (12 ~ 18 岁)、N2 (6 ~ 12 岁)、N3 (2 ~ 6 岁), 并根据患儿体重给药 (托法替布有两种剂型: 5 mg 片剂和 1 mg · mL⁻¹ 口服溶液, 见表 1), 研究结果表明, 儿童和成人 PK 相似, 但在表观分布容积 (V_d) 和表观全身清除率 (CL/F) 方面, 儿童较成人小, 且 bid 给药后, 在 48 h 之内达到稳态浓度 (见表 2)。在代谢方面, 托法替布与白蛋白结合, 蛋白结合率约为 40%^[20], 在肝脏中约有 70% 托法替布被细胞色素 P450 (CYP 450) 系统代谢, 主要为 CYP 3A4 酶代谢, 也有少量 CYP 2C19 参与^[21], 剩余 30% 经肾脏清除^[22]。因此, 托法替布可能会导致肝毒性, 已有研究发现^[16, 23], 部分患者应用托法替布后出现血清转氨酶升高, 甚至在某些情况下会导致停药。所以治疗过程中, 应常规监测肝功能, 如果怀疑有托法替布引起的肝损伤, 应中断治疗, 不建议严重肝功能损害者使用。

表 1 儿童 (2 岁以上 pJIA) 托法替布推荐用法用量

Tab 1 Recommended usage and dosage of tofacitinib in children (over 2 years pJIA)

体重/kg	FDA 推荐用法用量	体重/kg	中国专家共识推荐用法用量 ^[19]
≥ 10 ~ < 20	片剂每次 3.2 mg, 口服液每次 3.2 mL, bid	5 ~ 7	每次 2.0 mg bid
		> 7 ~ 10	每次 2.5 mg bid
≥ 20 ~ < 40	片剂每次 4.0 mg, 口服液每次 4.0 mL, bid	> 10 ~ 15	每次 3.0 mg bid
		> 15 ~ 25	每次 3.5 mg bid
≥ 40	片剂每次 5.0 mg, 口服液每次 5.0 mL, bid	> 25 ~ 40	每次 4.0 mg bid
		> 40	每次 5.0 mg bid

3 托法替布的临床应用研究

目前, 托法替布在 JIA 患儿中的临床应用实例较少, Huang 等^[24]报告了 1 例 11 岁慢性关节炎

伴有难治性全身性 JIA 患儿 (sJIA), 在改用托法替布 (2.5 mg bid, 2 周后改为 5 mg bid) 合并甲泼尼龙 (4 mg qd) 口服治疗, 3 个月后患者症状逐渐

表 2 各队列血浆托法替布药动学参数值的描述性总结^[18]Tab 2 Descriptive summary of plasma tofacitinib pharmacokinetic parameter values by cohort^[18]

队列	剂量 (mg bid)	AUC_{0-24}^{obs} ($\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C_{max} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	t_{max} /h	C_{trough} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	C_{min} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$t_{1/2}$ /h	CL/F/ ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	V_z /F/L
N1 = 8 (12 ~ 18 岁)	5.0 (3.0 ~ 5.0)	156.6 (25)	47.0 (40)	0.8 (0.5 ~ 6.9)	2.7 (100)	2.5 (86)	2.6 ± 0.5	28.1 (22)	104.9 (35)
N2 = 9 (6 ~ 12 岁)	2.5 (2.0 ~ 5.0)	118.8 (27)	41.7 (29)	1.0 (0.5 ~ 2.1)	0.8 (127)	0.8 (95)	1.9 ± 0.3	25.5 (40)	71.0 (40)
N3 = 9 (2 ~ 6 岁)	3.0 (2.5 ~ 3.5)	142.5 (32)	66.2 (28)	0.5 (0.5 ~ 1.9)	0.8 (119)	0.7 (103)	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	51.4 (34)
所有患者 = 26 (2 ~ 18 岁)	3.0 (2.0 ~ 5.0)	138.6 (30)	50.7 (38)	0.9 (0.5 ~ 6.9)	1.1 (145)	1.1 (123)	2.1 ± 0.5	24.3 (34)	70.5 (47)

好转并得到彻底缓解。周仕海等^[25]报道了 1 例 13 岁 sJIA 患儿, 在加用托法替布 (早: 5 mg, 晚: 2.5 mg po) 治疗 18 周后, 患者幼年关节炎疾病活动度 (DAS) 28 评分由开始治疗时的 5.12 分降低至 3.06 分, 由重度疾病活动度降至轻微疾病活动度, 相关指标也降至正常范围内。Vukic 等^[26]报道了 1 例 16 岁 pJIA 女性患者经多种方案 (糖皮质激素、抗风湿药、生物制剂等) 治疗 10 余年, 疾病频繁复发, 仍不能得到有效控制, 在开始使用托法替布后肌肉骨骼症状、炎症标志物和整体健康状况逐渐改善。以上病例均提示托法替布治疗 sJIA 患者的总体疗效良好, 为临床试验以评估托法替布在 JIA 中的有效性和安全性提供了支持。

然而, sJIA 仅是 JIA 的一个分型, 并不是所有 JIA 患者对托法替布均有效果, 其临床疗效还需要进一步评估。在大样本、多中心的临床研究中, Ruper-to 等^[27]进行了 2 ~ 18 岁 JIA 患儿的随机、双盲、安慰剂对照的 3 期试验 (NCT02592434), 该试验共纳入 225 例儿童关节炎患者, 根据 JIA 美国风湿病学会 30 缓解标准 (JIA ACR 30) 定义 JIA ACR 核心集 6 个变量中至少 3 个改善 $\geq 30\%$ 及至少 1 个核心变量恶化将患者按 1:1 随机分为托法替布组或安慰剂组, 44 周后比较两组的疗效、安全性和耐受性。根据研究结果, 在第 18 周时 76.9% 患儿得到了渐进性、持续性改善; 到第 44 周时托法替布组发病期间疾病活动增加的发生率 (29.2%) 较安慰剂组显著降低 (52.9%), 且发生疾病活动增加时间也显著推迟。就安全性方面而言, 托法替布治疗组与安慰剂组不良事件发生率接近, 分别为 77.3% 和 74.1%, 其中, 严重不良事件发生率分别为 1.1% 和 2.4%。在小样本临床研究中, Rahman 等^[28]采用目的抽样的方法, 选取 30 例难治性多关节期 JIA 儿童患者 [多发性关节炎、延伸性少关节炎、膝炎相关关节炎 (ERA)、无系统性特征的 sJIA]。采用青少年关节炎疾病活动评分 (JADAS) 27 评估疾病活动水平, 对基线及第 6、12、24 周病例进行评估, 从病史、检查结果和实验室报告中检测安全性。依据 JADAS-27 标准, 将随访的第 6、12、24 周的数据与基线进行比较。在前

期使用 NSAIDs、类固醇类激素, ERA 患者使用柳氮磺吡啶辅助治疗 (本研究未使用生物 DMARDs) 后口服托法替布, 改善显著。从基线到随访 6 周和 12 周, 泼尼松龙的剂量显著减少, 随访时红细胞沉降率 (ESR) 和血小板计数明显下降。所有 JIA 患者引入托法替布后 (根据体重推荐剂量), 6 周时疼痛视觉评估量表 (VAS) 总体评估的改善率为 74.38%, 12 周为 91.80%, 24 周为 97.13%; 活动关节计数改善率分别为 85.29%、94.98% 和 97.49%。第 6、12 和 24 周时, JADAS 27 总分的改善率分别为 83.37%、91.25% 和 96.16% ($P < 0.05$)。Kostik 等^[29]开展了回顾性病例研究, 在 24 例病例中 (托法替布治疗中位持续时间约 1.9 年), 4 例 sJIA 患者经托法替布与生物制剂 (托珠单抗、卡那金单抗) 联合治疗显效; 1 例严重 pJIA (RF 阳性) 伴次全秃患儿, 经托法替布治疗后头发生长显著; 仅 1 例 ERA 患者对托法替布无反应。对于分型不同的 JIA, 口服托法替布后, 可获得临床有效性。以上结果表明, 托法替布在 JIA 疾病活动性方面取得了快速和持续的临床改善, 同时也兼具不良反应少、耐受性良好等优点。

4 托法替布治疗 JIA 的安全性

长期使用托法替布治疗自身免疫性炎症会使患者出现许多不良反应, 如头痛、恶心、呕吐、腹泻以及定向障碍等; 另外还可能发生一些罕见不良反应包括足部畸形、髌关节骨关节炎、股骨骨折、心力衰竭、急性粒细胞减少、血小板减少以及贫血等, 这些药物不良反应多为轻至中度, 无需减量或中断治疗^[30-32]。值得注意的是, 高剂量 ($\geq 10 \text{ mg}$) 托法替布往往会因严重不良反应的风险显著增高而导致患者中断治疗。多项研究表明^[33-35], 在服用高剂量托法替布 9 年以上的患者, 超过 25% 的成人患者可出现严重的感染事件, 其中 23.1% 的患者因此停止治疗, 并且各种恶性肿瘤事件 (乳腺、肺和淋巴瘤) 发生频率更高, 且风险在 5 年内保持不变。而在儿童期不良反应的发生率和类型与成人有所不同, 在一项研究中, 服用托法替布超过 24 周的 37% 活动性多关节幼年特发性关节炎 (pcJIA) 患者出现轻度不良反

应, 这些不良反应(头痛、谷丙转氨酶升高等)大多发生在开始治疗的前 6 周, 并在 24 周内逐渐改善, 其中最常见不良反应是呕吐(15%)^[20]。贫血是多项研究中发现的不良反应, 在前 24 周出现的频率更高, 从第 6 周的 3.7% 上升到第 24 周的 7.4%^[20, 36]。与成人相比, 长期使用托法替布的不良反应在儿童中较为普遍和轻微, 而且许多不良反应会随着时间的推移而消退。托法替布可能有许多禁忌证, 由于有增加免疫抑制和增加肝脏代谢的风险, 不建议肝功能损伤患者使用托法替布^[37]。《2021 年 ACR 幼年特发性关节炎治疗指南》^[38]指出, 建议在使用托法替布前 1~2 个月, 治疗后每 3~4 个月对患者全血细胞和肝功能进行 1 次监测, 而淋巴细胞计数低于 $500 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-3}$ 、绝对中性粒细胞计数低于 $1000 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-3}$ 或血红蛋白水平低于 $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的患者应立即停药。

5 结语

过去二十年各类指南不断更新完善 JIA 的治疗方法, 从严重依赖皮质类固醇到早期引入抗 IL-1 和 IL-6 的生物 DMARDS 进行靶向治疗, 再到 JAK 抑制剂, JIA 的治疗前景发生了根本性的变化。托法替布作为首个口服小分子靶向 JAK 抑制剂, 在治疗儿童自身免疫性疾病方面, 已有较好的疗效, 且有耐受性好、不良反应少、不易引起免疫原性等优点。值得注意的是, 该药上市时间较短, 临床经验相对不足, 其确切疗效和安全性仍然需要大量的随机临床试验验证。此外, 当使用托法替布大多联合生物制剂和传统 DMARDs 时, 需要进一步探讨其给药顺序、给药时机及停药时机等细节, 因为它涉及许多药物的安全性等相关问题。

临床医师须更好地掌握 JIA 最新的治疗原则, 熟悉各型的临床表现, 选择更为合理的药物, 采取更为有效的治疗方式。同时由于接受治疗的大部分为儿童, 在对疾病的表述方面不是很确切, 我们也需要同家属更好地沟通交流, 告知治疗时潜在不良影响和严重感染风险, 强调患者在疾病管理中的作用。

总之, 托法替布需积极开展一系列大量的治疗 JIA 的临床试验, 增加与其他治疗药物的对比研究, 以探究其长期在 JIA 儿童中的治疗疗效和安全性, 这也是一项具有相当现实价值的尝试。

参考文献

- Martini A, Lovell DJ, Albani S, et al. Juvenile idiopathic arthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8 (1): 5.
- Webb K, Wedderburn LR. Advances in the treatment of polyarticular juvenile idiopathic arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2015, 27 (5): 505-510.
- Thierry S, Fautrel B, Lemelle I, et al. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: a systematic review [J]. Joint Bone Spine, 2014, 81 (2): 112-117.
- Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International league of associations for rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001 [J]. J Rheumatol, 2004, 31 (2): 390-392.
- Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis [J]. Lancet, 2007, 369 (9563): 767-778.
- Petty RE, Cassidy JT. Chronic arthritis in childhood [M]. Textbook of Pediatric Rheumatology (Sixth Edition), 2011: 211-235.
- Ringold S, Angeles-Han ST, Beukelman T, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: therapeutic approaches for non-systemic polyarthritis, sacroiliitis, and enthesitis [J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2019, 71 (6): 717-734.
- FDA. Cancer Warnings Required for TNF Blockers [EB/OL]. (2009-08-04) [2010-05-01]. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm175803.htm>.
- Cada DJ, Demaris K, Levien TL, et al. Tofacitinib [J]. Hosp Pharm, 2013, 48 (5): 413-424.
- Chaplin S. Janus kinase inhibitors for autoimmune disorders [J]. Prescriber, 2017, 28 (12): 33-37.
- Virtanen AT, Haikarainen T, Raivola J, et al. Selective JAKinibs: prospects in inflammatory and autoimmune diseases [J]. BioDrugs, 2019, 33 (1): 15-32.
- Mauro A, Rigante D, Cimaz R. Investigational drugs for treatment of juvenile idiopathic arthritis [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2017, 26 (4): 381-387.
- Almanzar G, Kienle F, Schmalzing M, et al. Tofacitinib modulates the VZV-specific CD4⁺T cell immune response in vitro in lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis [J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58 (11): 2051-2060.
- Yu R, Li X, DuBois DC, et al. Interactions of tofacitinib and dexamethasone on lymphocyte proliferation [J]. Pharm Res, 2020, 37 (6): 105.
- Zaripova LN, Midgley A, Christmas SE, et al. Juvenile idiopathic arthritis: from aetiopathogenesis to therapeutic approaches [J]. Pediatr Rheumatol Online J, 2021, 19 (1): 135.
- Hutmacher MM, Krishnaswami S, Kowalski KG. Exposure-response modeling using latent variables for the efficacy of a JAK3 inhibitor administered to rheumatoid arthritis patients [J]. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2008, 35 (2): 139-157.
- Lawendy N, Krishnaswami S, Wang R, et al. Effect of CP-690, 550, an orally active janus kinase inhibitor, on renal function in healthy adult volunteers [J]. J Clin Pharmacol, 2009, 49 (4): 423-429.

- [18] Ruperto N, Brunner HI, Zuber Z, et al. Pharmacokinetic and safety profile of tofacitinib in children with polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: results of a phase 1, open-label, multicenter study [J]. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2017, 15 (1): 86.
- [19] 中华医学会儿科学分会风湿病学组, 中国医师协会风湿免疫科医师分会儿科学组, 海峡两岸医药卫生交流协会风湿免疫病学专业委员会儿童学组, 等. 幼年特发性关节炎生物制剂及小分子靶向药物治疗专家共识 (2022 版) [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2022, 37 (14): 1066-1073.
- [20] Yu B, Wang XR, Yang YR, et al. Evaluation of tofacitinib citrate bioequivalence based on pharmacokinetic parameters in healthy Chinese subjects [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2021, 59 (4): 343-352.
- [21] Miyoshi S, Krishnaswami S, Toyozumi S, et al. Phase 1 dose-escalation study to evaluate the pharmacokinetics, safety, and tolerability of tofacitinib in Japanese healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2020, 9 (1): 11-20.
- [22] Dowty ME, Lin J, Ryder TF, et al. The pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanisms of tofacitinib, a janus kinase inhibitor, in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42 (4): 759-773.
- [23] Wollenhaupt J, Silverfield J, Lee EB, et al. Safety and efficacy of tofacitinib, an oral janus kinase inhibitor, for the treatment of rheumatoid arthritis in open-label, longterm extension studies [J]. *J Rheumatol*, 2014, 41 (5): 837-852.
- [24] Huang Z, Lee PY, Yao X, et al. Tofacitinib treatment of refractory systemic juvenile idiopathic arthritis [J]. *Pediatrics*, 2019, 143 (5): e20182845.
- [25] 周仕海, 熊亚群, 陈雅, 等. 托法替布在儿童风湿性疾病中的研究进展 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2022, 24 (4): 447-453.
- [26] Vukic V, Smajo A, Vidovic M, et al. Beyond the guidelines management of juvenile idiopathic arthritis: a case report of a girl with polyarticular disease refractory to multiple treatment options and Leri Weill syndrome [J]. *BMC Pediatr*, 2021, 21 (1): 40.
- [27] Ruperto N, Brunner HI, Synoverska O, et al. Tofacitinib in juvenile idiopathic arthritis: a double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase 3 randomised trial [J]. *Lancet*, 2021, 398 (10315): 1984-1996.
- [28] Rahman MM, Laila K, Rahman SA. Efficacy and safety of tofacitinib in the treatment of refractory cases of polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: a study from Bangladesh [J]. *Int J Rheum Dis*, 2022, 25 (6): 678-684.
- [29] Kostik MM, Raupov RK, Suspitsin EN, et al. The safety and efficacy of tofacitinib in 24 cases of pediatric rheumatic diseases: single centre experience [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10 (820586).
- [30] Fleischmann R, Kremer J, Cush J, et al. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367 (6): 495-507.
- [31] Burmester GR, Blanco R, Charles-Schoeman C, et al. Tofacitinib (CP-690, 550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9865): 451-460.
- [32] van der Heijde D, Tanaka Y, Fleischmann R, et al. Tofacitinib (CP-690, 550) in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate: twelve-month data from a twenty-four-month phase III randomized radiographic study [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65 (3): 559-570.
- [33] Wollenhaupt J, Lee EB, Curtis JR, et al. Safety and efficacy of tofacitinib for up to 9.5 years in the treatment of rheumatoid arthritis: final results of a global, open-label, long-term extension study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21 (1): 89.
- [34] Cohen SB, Tanaka Y, Mariette X, et al. Long-term safety of tofacitinib up to 9.5 years: a comprehensive integrated analysis of the rheumatoid arthritis clinical development programme [J]. *RMD Open*, 2020, 6 (3): e001395.
- [35] Cohen SB, Tanaka Y, Mariette X, et al. Long-term safety of tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis up to 8.5 years: integrated analysis of data from the global clinical trials [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76 (7): 1253-1262.
- [36] Ruperto N, Brunner HI, Tzaribachev N, et al. Absence of association between abatacept exposure and initial infection in patients with juvenile idiopathic arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2021, 48 (7): 1073-1081.
- [37] Lawendy N, Lamba M, Chan G, et al. The effect of mild and moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of tofacitinib, an orally active Janus kinase inhibitor [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2014, 3 (6): 421-427.
- [38] Onel KB, Horton DB, Lovell DJ, et al. 2021 American College of Rheumatology guideline for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: therapeutic approaches for oligoarthritis, temporomandibular joint arthritis, and systemic juvenile idiopathic arthritis [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2022, 74 (4): 521-537.

(收稿日期: 2024-05-13; 修回日期: 2024-07-08)

用于治疗骨关节炎的非甾体抗炎药关节内递送系统研究进展

赵跃萍¹, 徐锁成², 李晓丹¹, 徐瑞娟^{3*}, 杨劲^{1*} (1. 中国药科大学药学院药理系, 南京 210009; 2. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 210009; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008)

摘要: 非甾体抗炎药 (NSAIDs) 是骨关节炎 (OA) 患者缓解疼痛和改善关节功能最常用的药物。但口服和局部外用 NSAIDs 的疗效不佳和不良反应限制了其使用。关节腔注射是临床治疗 OA 的常用给药方法, NSAIDs 以溶液的形式注射时, 药物迅速从关节腔清除。开发关节内缓释药物递送系统 (DDS) 是延长 NSAIDs 在关节腔停留时间和提高疗效的一种有前景的策略。本文对关节腔注射 NSAIDs 溶液在 OA 中的应用进行了概述, 综述了治疗 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的研究进展, 旨在为 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的研发提供参考。

关键词: 非甾体抗炎药; 骨关节炎; 关节腔注射; 药物递送系统

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0189-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.028

Intra-articular delivery system of non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis

ZHAO Yue-ping¹, XU Suo-cheng², LI Xiao-dan¹, XU Rui-juan^{3*}, YANG Jin^{1*} (1. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. School of Basic Medical Sciences and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 3. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008)

Abstract: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are commonly used to alleviate pain and improve joint function in patients with osteoarthritis (OA). However, poor effect and adverse effects severely limit the use of oral and topical NSAIDs. Intra-articular injection stands out as a prevalent method for drug administration in the clinical management of OA. However, when NSAIDs are administered in solution, the drug is swiftly eliminated from the joint cavity. The intra-articular slow-release drug delivery system (DDS) serves as a promising approach to prolonging the presence of NSAIDs in the joint cavity, thereby enhancing their efficacy. This review offered an insight into the use of intra-articular NSAIDs solution injections in OA and explored the advance in intra-articular sustained-release DDS of NSAIDs for OA.

Key words: non-steroidal anti-inflammatory drug; osteoarthritis; intra-articular injection; drug delivery system

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的慢性退行性疾病, 其发生发展与急、慢性关节损伤, 年龄, 肥胖及代谢性骨病等多种因素有关^[1], 临床特征包括疼痛、关节僵硬、关节肥大、运动受限、肌肉无力、局部压痛、畸形和功能丧失, 严重影响老年患者的生活质量, 成为这类人

群致残的主要原因^[2]。世界卫生组织发布的数据显示, 截至 2023 年, 全球 OA 患病人数已超过 5 亿, 膝关节是最常受累的关节, 患病人数达 3.65 亿^[3]。对于早期 OA, 主要通过药物治疗和针灸理疗等方法来缓解关节疼痛并延缓 OA 的进展; 对于晚期 OA, 可通过关节置换术恢复关节功能。

作者简介: 赵跃萍, 女, 硕士研究生, 主要从事药物代谢动力学研究, email: 2843867944@qq.com *通信作者: 杨劲, 男, 博士研究生导师, 主要从事改良型新药的开发研究, email: cpu_yj@163.com; 徐瑞娟, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事骨科临床药学与药物代谢动力学研究, email: jean0129@163.com

目前 OA 的药物治疗主要包括非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、糖皮质激素和糖胺聚糖^[4]。NSAIDs 通过抑制前列腺素的合成和直接作用于伤害性感受器,减少致痛物质的形成和释放,从而发挥抗炎和镇痛作用^[5]。中华医学会骨科学分会发布的《骨关节炎诊疗指南(2021 版)》针对 OA 的镇痛管理指出:① 推荐使用局部外用 NSAIDs 作为 OA 患者减缓疼痛的一线治疗药物;② 推荐疼痛症状持续存在或中重度疼痛的 OA 患者选择口服 NSAIDs,但须警惕药物的胃肠道和心血管不良事件^[6]。

口服和局部外用 NSAIDs 虽然是 OA 镇痛管理的常用药物,但存在疗效不佳的问题,超过一半的 OA 患者使用口服或局部外用 NSAIDs 的疼痛缓解率小于 50%^[7]。另外,随着口服 NSAIDs 使用时间的增加,胃肠道和心血管不良事件的发生率持续上升^[8]。局部外用 NSAIDs 对皮肤的刺激也影响了患者的依从性,从而限制了药物的使用^[9]。对于 OA,有效且安全的镇痛治疗方案尤为重要。关节腔注射是临床治疗 OA 的常用给药方法,关节内缓释药物递送系统(drug delivery systems, DDS)的设计不仅可以使药物靶向至病变关节,还可以延长药物在关节腔的停留时间,以减少全身暴露,增大局部疗效。NSAIDs 关节内缓释 DDS 有潜力成为局部外用 NSAIDs 疗效不足,且对口服 NSAIDs 不耐受的患者的替代治疗手段。基于此,本文首先总结了 OA 的疼痛机制,对用于 OA 的关节腔注射 NSAIDs 进行概述,以阐述关节内缓释 DDS 开发的必要性;其次,综述了用于 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的常用递送材料和研究进展,并总结了 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的设计策略,以期为其研发提供参考。

1 OA 的疼痛机制

关节疼痛是影响 OA 患者生活质量和行动能力最主要的原因,初期为轻度或中度间断性隐痛,休息后好转,活动后加重,晚期可出现持续性疼痛或夜间痛^[10]。OA 疼痛的主要原因是关节中神经末梢增多、炎症介质导致的外周敏化以及增加的外周冲动传入引起的中枢敏化,由关节中滑膜、脂肪垫、软骨、韧带、关节囊和软骨下骨等病变组织诱发^[11-12]。滑膜炎往往发生在软骨退化或损伤后,是 OA 的重要病变,主要表现为以巨噬细胞为主的炎症细胞以及成纤维样滑膜细胞数量急剧增加,产生大量的炎症细胞因子和炎症介质。同时滑膜中痛觉纤维增多,疼痛神经递质的产生增多,以上分子产物导致神经感受阈值改

变,形成痛觉敏化^[13]。正常关节软骨中不存在神经和血管,但在 OA 发生时关节软骨中也可能出现血管生成和感觉神经生长,从而产生 OA 疼痛感觉^[14]。破骨细胞分泌的轴突导向因子可使软骨下骨中感觉神经轴突生长异常增多,可使软骨下骨易产生疼痛刺激^[15]。此外,软骨退化、软骨下骨损伤和关节腔高压均与 OA 疼痛相关^[14]。

2 用于 OA 的关节腔注射 NSAIDs 溶液概述

OA 疼痛主要由关节中病变组织引起,NSAIDs 在关节腔的有效输送是发挥抗炎镇痛作用的前提。大多数 NSAIDs 治疗 OA 的临床疗效与血药浓度几乎没有相关性,研究显示药物在滑液中的浓度与 OA 疼痛的缓解相关^[16-17]。然而,大多数 NSAIDs,尤其是半衰期短的 NSAIDs 口服给药后在滑液中的分布比在血浆中缓慢,在滑液的浓度仅为稳态血浆浓度的 25%~50%^[16, 18-19]。为了增强 NSAIDs 药物在病变组织的有效输送,采用关节腔注射给药是缓解 OA 疼痛的一种新兴策略。有临床研究对关节腔注射 NSAIDs 用于治疗 OA 的有效性和安全性进行了考察,这些研究大多针对水溶性较强的药物,如替诺昔康^[20-22]、帕瑞昔布^[23]和酮咯酸^[24-26]。

2.1 生物利用度

关节腔注射的假定优势是其更小的全身暴露和更大的局部疗效。然而,与静脉注射或肌内注射相比,关节腔注射 NSAIDs 具有相似的全身暴露,注射到大鼠关节腔的生物利用度为 65%~136%^[27]。小分子药物在关节腔的停留时间较短,原因可能有以下两个方面:关节腔中高黏度、复杂的生物组成抑制了药物向关节腔各组织的扩散;小分子药物通过淋巴管或血管被迅速地清除^[28]。

2.2 有效性和安全性

如表 1 所示,在这些临床研究中,对照组包括运动干预、口服 NSAIDs、关节腔注射曲安奈德或透明质酸(hyaluronan, HA),结果表明,关节腔注射 NSAIDs 疗效与口服 NSAIDs、关节腔注射曲安奈德或 HA 相当,且关节腔注射 NSAIDs 联合曲安奈德或 HA 可能具有更好的疗效。

在这些临床研究中,报道的关节腔注射 NSAIDs 的不良反应只有过敏和关节腔注射相关的局部疼痛^[20-26]。与口服或局部外用相比,单次关节腔注射相同剂量的 NSAIDs 可使滑膜中峰值药物浓度增加 2~3 倍^[27]。有研究表明,NSAIDs 可通过抑制环氧合酶-1 来抑制糖胺聚糖和蛋白聚糖的合成,从而破坏软骨基质^[29]。Xie 等^[30]综述了 13 项对健康动物进行的研究,其

中有 6 项研究发现关节腔注射 NSAIDs 会在软骨和滑膜中引起轻度炎症。因此，关节腔注射 NSAIDs 可能存在损伤关节软骨的风险，但在临床试验中没有关注到对关节软骨产生的影响。

表 1 关节腔注射 NSAIDs 用于治疗 OA 的安全性和有效性研究
Tab 1 Safety and efficacy of intra-articular injections of NSAIDs solutions for OA

参考文献	试验设计	人群	治疗组	对照组	疗效终点	结果摘要
Unlu 2005 ^[21]	随机对照研究	KL 分级 2/3 的膝关节 OA 患者	替诺昔康关节腔注射 20 mg, 每周 1 次, 治疗 1~3 周; 替诺昔康口服 (po) 20 mg · d ⁻¹ , 治疗 3 周	运动干预	治疗开始后 1、3、6 个月压痛发生率、西安大略和麦克马斯特大学骨关节炎指数 (WOMAC) 及奎森疼痛指数 (Lequesne) 评分	关节腔注射与 po 疗效相似
Erbas 2015 ^[22]	回顾性队列研究	KL 分级 1/2/3 的膝关节 OA 患者	替诺昔康关节腔注射 20 mg, 每周 1 次, 治疗 3 周	替诺昔康 po 20 mg · d ⁻¹ , 治疗 3 周	治疗开始后 1 周、1 个月和 3 个月视觉模拟评分 (VAS)、WOMAC 评分和 Lequesne 评分	关节腔注射与 po 疗效相似
Lu 2019 ^[23]	回顾性队列研究	KL 分级 0/1/2 的膝关节 OA 患者	帕瑞昔布关节腔注射 40 mg (每 2 周 1 次) + 基础治疗 + 氨基葡萄糖 po; 塞来昔布 po + 基础治疗 + 氨基葡萄糖 po	基础治疗 + 氨基葡萄糖 po	治疗开始后 12 个月 VAS、美国特种外科医院评分 (HSS)、满意度和滑液中炎症细胞因子的水平	所有治疗都有效, 帕瑞昔布组白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 降低, IL-10 升高
Park 2015 ^[25]	回顾性队列研究	KL 分级 2/3 的膝关节 OA 患者	酮咯酸关节腔注射 30 mg	曲安奈德关节腔注射 40 mg	治疗开始后 1、3 和 6 个月 Harris 髌关节评分 (HHS) 和数字评分 (VNS)	酮咯酸组与曲安奈德组无显著差异
Jurgensmeier 2021 ^[26]	随机对照研究	KL 分级 ≥ 2 的髌关节和膝关节 OA 患者	酮咯酸关节腔注射 30 mg	曲安奈德关节腔注射 80 mg	治疗开始后 1 周、1 个月和 3 个月 VAS 评分及膝关节和髌关节骨关节炎结局 (KOOS/HOOS) 评分	酮咯酸组与曲安奈德组无显著差异
Yilmaz 2019 ^[20]	随机对照研究	KL 分级 1/2 的膝关节 OA 患者	替诺昔康关节腔注射 20 mg + 曲安奈德关节腔注射 20 mg; 替诺昔康关节腔注射 20 mg	曲安奈德关节腔注射 20 mg	治疗开始后 1、3 和 6 个月 VAS 和 WOMAC 评分	单独注射和联合用药 1 个月症状均有改善, 但联合用药 6 个月效果更好
Lee 2011 ^[24]	随机对照研究	KL 分级 2/3 的膝关节 OA 患者	HA + 酮咯酸关节腔注射, 每周 3 次, 然后 HA 关节腔注射, 每周 2 次	HA 关节腔注射 每周 5 次	治疗开始后 1、3、5 和 16 周 VAS 和疼痛 (PRS) 评分	在治疗早期, 联合酮咯酸的效果更好

3 用于 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的递送材料

关节腔注射 NSAIDs 面临以下挑战：① 药物易从关节腔中迅速清除，其全身暴露与口服 NSAIDs 相似；② 反复多次注射易造成感染，且依从性差；③ 注射后局部高浓度药物可能存在损伤软骨的风险。为了延长关节腔注射后 NSAIDs 在关节腔的停留时间，减少注射次数和不良反应，需要开发具有良好的生物安全性和靶向性的多功能缓释 DDS。可生物降解的材料已经广泛应用于关节内缓释 DDS 中。这些递送材料有多种特点，包括但不限于增强药物的稳定性、改善药代动力学以及药物靶向性、降低毒性和不良反应。在治疗 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的递送材料研究中，聚合物是最常用的材料。

3.1 天然聚合物

常用的天然聚合物包括 HA、硫酸软骨素和壳聚糖，它们是从天然来源中提取的生物高分子

材料，具有良好的生物降解性和生物相容性。更重要的是，这些天然聚合物还具有生物活性，因此备受关注。HA 是一种阴离子糖胺聚糖，是软骨细胞外间质的主要成分，具有保湿和润滑作用^[31]，关节腔注射 HA 也是临床用于治疗 OA 的一种方法^[32]。另外，HA 还可通过与关节软骨细胞中高度表达的 CD44 受体特异性结合靶向软骨^[31]。硫酸软骨素是共价连接在蛋白质上形成蛋白聚糖的一类糖胺聚糖，临床上也能用于 OA 的治疗。除了减轻疼痛，硫酸软骨素还能将水分吸入蛋白多糖分子内，缓和行动时的冲击和摩擦。壳聚糖具有与软骨糖胺聚糖相似的结构，由于这种相似性，这种聚合物可调节软骨细胞的活性，有利于骨和软骨修复^[33]。

3.2 合成聚合物

天然聚合物的力学性能较差，在生理条件下降解较快。因此，许多可生物降解和生物相容的合成聚合物被广泛开发，比如聚乙二醇 (PEG)、聚己

内酯 (PCL)、聚酯酰胺 (PEA)、聚乙烯醇 (PVA) 和聚 DL-乳酸-共羟基乙酸 (PLGA)^[34]。一般这些聚合物中含有二硫键或酯键, 聚合物可以通过共价键的还原或水解反应发生降解, 也可以被修饰, 从而改变其生物降解性和生物活性^[35]。

4 用于 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的研究进展

不同类型的分子材料通过乳化、包裹等分散技术将药物制备成基于不同载体的缓释 DDS, 从而达到延长药物作用时间、实现药物体内靶向定位以及降低毒副作用等目的。近年来, 关节内缓释 DDS 的研究显示, 水凝胶、纳米粒和微球等载体分别占 35.17%、28.57% 和 14.29%^[36-37]。用于治疗 OA 的各类 NSAIDs 关节内缓释 DDS 研究总结见表 2。

表 2 用于治疗 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 研究

Tab 2 Intra-articular extended-release DDS study of NSAIDs for OA

DDS	参考文献	载体	药物	实验对象	药代动力学	有效性	安全性
水凝胶	Arunkumar 2016 ^[38]	壳聚糖-聚己内酯水凝胶	依托考昔	软骨细胞、健康大鼠	体外持续释放 30 d; 在大鼠关节腔滞留 6 周	/	滑膜最初有轻微的炎症反应, 但几周后炎症反应逐渐消退
	Zhu 2018 ^[39]	壳聚糖/ β -磷酸甘油-聚丙交酯共聚物温敏水凝胶	氯诺昔康	健康大鼠	体外持续释放 13.5 d; 在大鼠关节腔滞留 350 h	/	/
	Li 2020 ^[40]	聚乙二醇和聚酯所组成的三嵌段共聚物 (PCLA-PEG-PCLA) 温敏水凝胶	氟比洛芬	OA 模型大鼠	体外持续释放超过 3 周	具有良好和持久的抗炎和镇痛作用	/
	Yang 2020 ^[41]	聚 N-异丙基丙烯酰胺温敏水凝胶	双氯芬酸钠	软骨细胞、OA 模型大鼠	体外持续释放 250 h	具有保护软骨细胞的作用; 改善 OA 大鼠滑膜炎和增生、抑制软骨退化	对软骨细胞没有毒性; 没有观察到明显不良反应
纳米粒	El-Gogary 2020 ^[42]	HA 纳米囊 [(254±3.06) nm]	塞来昔布	OA 模型大鼠	体外连续释放 7 d	改善 OA 大鼠关节肿胀和抑制软骨退化	/
	Zhang 2020 ^[43]	聚 (N-异丙基丙烯酸酯-2-甲基丙烯酸氧基乙基磷酸胆碱) 温敏纳米球 [(237±97.9) nm]	双氯芬酸钠	软骨细胞	可以实现在人体温度下的温敏释放	具有保护软骨细胞的作用	对软骨细胞没有毒性
微球	Janssen 2016 ^[44]	聚酯酰胺微球 [(10~100) μ m]	塞来昔布	嗜中性粒细胞; OA 模型大鼠	可持续缓慢释放 80 d	未观察到抑制 OA 大鼠软骨退化的作用	未观察到对滑膜或软骨的损伤
	Tellegen 2018 ^[45]	聚酯酰胺微球	塞来昔布	OA 模型大鼠	在体外表现出持续的药物释放	减轻 OA 大鼠滑膜炎、抑制软骨下骨病变; 未观察到抑制软骨退化的作用	未观察到全身和局部不良反应
	Tellegen 2023 ^[46]	聚酯酰胺微球	塞来昔布	OA 模型大鼠; 患有慢性 OA 的犬	在体外表现出持续的药物释放	未减轻 OA 大鼠的急性炎症和疼痛, 但对于患有慢性 OA 的犬是有效的	没有明显的不良反应
	Yang 2020 ^[47]	聚 (多巴胺甲基丙烯酸酯-磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯) 接枝的微流明胶甲基丙烯酸球 [(70~140) μ m]	双氯芬酸钠	软骨细胞; OA 模型大鼠	14 d 释放总载药量的 60%	具有保护软骨细胞的作用; 减轻 OA 大鼠骨赘和软骨退化	/

4.1 水凝胶

水凝胶是一类极为亲水的三维网络结构凝胶, 可在水中迅速溶胀, 其特性很像软组织。受 OA 影响的软骨表面粗糙不平, 暴露出胶原纤维, 为表面黏附提供了条件。水凝胶被认为是通过静电相互作用、共价键和/或物理相互作用在软骨表面形成凝胶层, 通过合适的释放机制, 能在长

时间内维持局部高药物浓度^[37]。温敏水凝胶在低温下表现出低黏度, 在体温下形成不流动的凝胶, 这种状态的变化随温度可逆, 很适用于关节腔注射。

Arunkumar 等^[38]研制的载有依托考昔的壳聚糖-聚己内酯水凝胶在体外可持续释放药物 30 d, 大鼠关节腔注射该水凝胶后, 药物在关节腔滞留

6 周。Zhu 等^[39]研制了载有氯诺昔康的壳聚糖 β -磷酸甘油-聚丙交酯温敏水凝胶, 药物可在大鼠关节腔持续释放 350 h。Li 等^[40]制备了由亲水聚乙二醇和疏水可降解聚酯组成的三嵌段共聚物为载体的氟比洛芬温敏水凝胶, 氟比洛芬从温敏凝胶中持续释放超过 3 周。在 OA 模型大鼠中, 该水凝胶在短期和长期均表现出良好的镇痛和缓解局部炎症作用。Yang 等^[41]研制的载有双氯芬酸钠的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺温敏水凝胶可以根据关节温度调节药物释放, 在体外持续释放双氯芬酸钠 250 h, 可改善 OA 大鼠滑膜炎症和过度增生, 改善关节腔积液, 抑制软骨退化。

4.2 纳米粒

纳米粒是一类将药物分子以溶解、分散、吸附或包裹于适宜的载体材料中制得粒径为 10 ~ 100 nm 的 DDS。其中, 聚合物纳米粒最受关注, 最常见的聚合物纳米粒形式是将药物封装于聚合物涂层内的储库中(纳米囊)和将药物嵌入聚合物基质中(纳米球)。这两种类型的释放动力学可以根据聚合物和药物的配方、化学成分、粒径和表面电荷来调整^[31]。

El-Gogary 等^[42]开发了载有塞来昔布的 HA 纳米囊, 在体外持续释放药物 7 d, 在改善 OA 大鼠的膝关节肿胀、软骨组织病理学评分和激活 NF- κ B 途径方面显示出优于塞来昔布混悬液的功效。Zhang 等^[43]开发了聚(*N*-异丙基丙烯酰胺-2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱)(PNIPAM-PMPC) 双功能纳米球, 载有双氯芬酸钠, 其中, 两性离子 PMPC 赋予纳米球水合/脱水性能, 热敏 PNIPAM 赋予纳米球热塌陷和冷膨胀功能。因此, 该 PNIPAM-PMPC 纳米球不仅可以基于水合机制增强润滑作用, 还可以实现在人体温度下的温敏释放: 体外释放实验表明 10 h 内药物初始快速释放, 之后是相对稳定的平台期; 在 25 °C 下, 72 h 内释放 73.4% 的双氯芬酸钠, 在 37 °C 下增加到 87.5%。

4.3 微球

微球是通过微囊化技术将药物分散或吸附在高分子、聚合物基质中而形成的骨架球形 DDS, 其粒径在 1 ~ 200 μ m。多项研究考察了关节腔注射载有塞来昔布的聚酯酰胺微球治疗 OA 的潜力。Janssen 等^[44]发现, 聚酯酰胺微球在 OA 关节中由于炎症细胞的增多更易被丝氨酸蛋白酶降解, 而载有塞来昔布可以显著抑制其降解, 研究结果表明载有塞来昔布的聚酯酰胺微球是具有自动调节药物释放功能的安全缓释 DDS。Tellegen

等^[45]将载有塞来昔布的聚酯酰胺微球注射到 OA 大鼠关节腔中, 可减轻滑膜炎症, 抑制软骨下骨病变。Tellegen 等^[46]的研究发现, 关节腔注射载有塞来昔布的聚酯酰胺微球并未减轻 OA 大鼠的急性炎症和疼痛, 但对于患有慢性 OA 的犬是安全有效的, 其肢体功能和生活质量得到改善, 两个月内对额外的止痛药使用减少。这些研究结果强调了患者分层的重要性, 以确定从治疗中获益最多且对治疗有反应的目标人群或 OA 表型。

Yang 等^[47]报道了一种具有润滑作用的滚珠轴承启发的聚两性电解质修饰微球, 该微球载有双氯芬酸钠, 能显著增加关节润滑和减缓药物的释放, 14 d 释放总载药量的 60%, 用于 OA 大鼠可减轻骨赘和软骨退化。

4.4 聚合物-药物缀合物

目前已有基于聚合物-NSAIDs 缀合物的产品在国外上市。双氯芬酸透明质酸钠(diclofenac etal-hyaluronate, DF-HA)是一种将双氯芬酸与 HA 共价连接的 HA 衍生物(600 ~ 1200 kDa), 于 2021 年在日本获批上市用于治疗 OA。关节腔注射 DF-HA 后, 双氯芬酸通过酯键的水解在关节腔中持续释放; 一项 III 期临床试验中, OA 患者分别 4 周 1 次接受 DF-HA 或安慰剂关节腔注射, 在治疗第 1 周, 两组间的疗效就差异显著, 直到第 12 周, 这种差异持续存在。在安全性方面, 观察到有 2 例接受 DF-HA 的受试者出现过敏反应^[48]。

5 用于 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的设计策略

关节内缓释 DDS 的设计需要考虑 OA 的关节腔微环境, 以便选择合适的载体和载体性质将药物输送到目标区域。关节腔内的药物清除途径主要包括通过滑膜循环系统或淋巴系统逃逸, 以及通过免疫细胞(包括树突状细胞)的吞噬作用消除。由于滑膜中缺乏基底膜, 小于 5 μ m 的颗粒可以从关节迅速逃离, 微球在关节腔表现出可观的长期持久性^[49]。除了滑膜, 软骨也是 NSAIDs 输送的重要靶组织, 但致密的软骨基质阻碍了药物的渗透。由于软骨中的糖胺聚糖带有负电荷, 带正电荷的递送材料比较适用于 OA 的关节腔内治疗, 不仅可以通过静电相互作用靶向递送药物, 还可以减少递送载体和滑液中蛋白质之间的非特异性疏水和亲水相互作用^[50]。通过设计具有合适大小和电荷的药物载体, 以使药物在关节腔内长期保留和穿透软骨, 这是关节内 NSAIDs 输送需要考虑的。

OA 通常需要长期的药物治疗, 为了减少多次注射导致的全身不良反应, 应尽可能地减少全

身暴露。Xie 等^[30]提出了一种策略,即将软药与缓释 DDS 相结合,先将 NSAIDs 设计和合成为一种可被血浆或肝中的酶代谢的软药化合物,再开发一种缓释 DDS 以封装该软药化合物,注射到关节腔后,缓释 DDS 载体将稳定地释放 NSAIDs 软药化合物,从而持续发挥作用。从关节逃逸出的游离软药化合物将被肝脏和/或肾脏捕获,迅速转化为无活性形式。采用这种设计可能显著减少药物全身暴露并最大限度地减少全身不良反应。

6 总结与展望

在 OA 的治疗中,NSAIDs 通过关节腔注射给药是一种有前景的策略。关节腔注射 NSAIDs 似乎在临床研究中表现出与口服给药相似的疗效,但药物迅速从关节腔清除。基于聚合物的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的开发已经取得了很大的进展。NSAIDs 关节内缓释 DDS 的设计可以实现 NSAIDs 在关节腔的持续释放,使药物在关节的停留时间达数天至数周,用于 OA 动物模型显示出可观的有效性和安全性。但目前的大多研究仅限于体外细胞或动物模型的研究,随着载体材料和技术不断发展,用于治疗 OA 的 NSAIDs 关节内缓释 DDS 的前景值得期待。

参考文献

- [1] Chen D, Shen J, Zhao WW, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism [J]. *Bone Res*, 2017, 5 (1): 16044.
- [2] Hunter DJ, Bierma ZS. Osteoarthritis [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10182): 1745-1759.
- [3] WHO. Osteoarthritis [Z]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>, 2023.
- [4] Richard MJ, Driban JB, Mcalindon TE. Pharmaceutical treatment of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31 (4): 458-466.
- [5] Bannuru RR, Osani MC, Vaysbrot EE, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27 (11): 1578-1589.
- [6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021年版)[J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41 (18): 1291-1314.
- [7] Moore RA, Moore OA, Derry S, et al. Responder analysis for pain relief and numbers needed to treat in a meta-analysis of etoricoxib osteoarthritis trials: bridging a gap between clinical trials and clinical practice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69 (2): 374-379.
- [8] Osani MC, Vaysbrot EE, Zhou M, et al. Duration of symptom relief and early trajectory of adverse events for oral nonsteroidal antiinflammatory drugs in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arthritis Care Res*, 2020, 72 (5): 641-651.
- [9] Rannou F, Pelletier JP, Martel PJ. Efficacy and safety of topical NSAIDs in the management of osteoarthritis: evidence from real-life setting trials and surveys [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2016, 45 (4): S18-S21.
- [10] Belluzzi E, Stocco E, Pozzuoli A, et al. Contribution of infrapatellar fat pad and synovial membrane to knee osteoarthritis pain [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 1-18.
- [11] Torres L, Dunlop DD, Peterfy C, et al. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14 (10): 1033-1040.
- [12] Yu H, Huang TW, Lu WW, et al. Osteoarthritis pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 4642.
- [13] Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19 (1): 18.
- [14] Fu K, Robbins SR, Mcdougall JJ. Osteoarthritis: the genesis of pain [J]. *Rheumatology*, 2018, 57 (suppl_4): iv43-iv50.
- [15] Zhu SA, Zhu JX, Zhen GH, et al. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (3): 1076-1093.
- [16] Lopicque F, Vergne P, Jouzeau, JY, et al. Articular diffusion of meloxicam after a single oral dose: relationship to cyclo-oxygenase inhibition in synovial cells [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 39 (5): 369-382.
- [17] Davies NM, Mclachlan AJ, Day RO, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38 (3): 225-242.
- [18] Theodoridou A, Gika H, Diza E. In vivo study of the synovial membrane penetration index from celecoxib and etoricoxib and their impact on pain control in patients with inflammatory arthritis [J]. *Mediterr J Rheumatol*, 2016, 27 (1): 21-28.
- [19] Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety [J]. *Inflammopharmacology*, 2009, 17 (6): 275-342.
- [20] Yilmaz E. The evaluation of the effectiveness of intra-articular steroid, tenoxicam, and combined steroid-tenoxicam injections in the treatment of patients with knee osteoarthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2019, 38 (11): 3243-3252.
- [21] Unlu Z, Ay K, Tuzun C. Comparison of intra-articular tenoxicam and oral tenoxicam for pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee [J]. *Clin Rheumatol*, 2005, 25 (1): 54-61.
- [22] Erbas M, Simsek T, Kiraz HA, et al. Comparison of the effectivity of oral and intra-articular administration of tenoxicam in patients with knee osteoarthritis [J]. *Braz J Anesthesiol*, 2015, 65 (5): 333-337.
- [23] Lu L, Xie Y, Gan K, et al. Comparison of intra-articular injection of parecoxib vs oral administration of celecoxib for the clinical efficacy in the treatment of early knee osteoarthritis [J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7 (23): 3971-3979.
- [24] Lee SC, Rha DW, Chang WH. Rapid analgesic onset of

- intra-articular hyaluronic acid with ketorolac in osteoarthritis of the knee [J]. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 2011, 24 (1): 31-38.
- [25] Park KD, Kim TK, Bae BW, et al. Ultrasound guided intra-articular ketorolac versus corticosteroid injection in osteoarthritis of the hip: a retrospective comparative study [J]. *Skeletal Radiol*, 2015, 44 (9): 1333-1340.
- [26] Jurgensmeier K, Jurgensmeier D, Kunz DE, et al. Intra-articular injections of the hip and knee with triamcinolone vs ketorolac: a randomized controlled trial [J]. *J Arthroplasty*, 2021, 36 (2): 416-422.
- [27] Selig DJ, Kress AT, Horton IM, et al. Pharmacokinetics, safety and efficacy of intra-articular non-steroidal anti-inflammatory drug injections for the treatment of osteoarthritis: a narrative review [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2022, 47 (8): 1122-1133.
- [28] Zhao TY, Li X, Li H, et al. Advancing drug delivery to articular cartilage: from single to multiple strategies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13 (10): 4127-4148.
- [29] Ding CH. Do NSAIDs affect the progression of osteoarthritis? [J]. *J Inflammation*, 2002, 26 (3): 139-142.
- [30] Xie ZX, Wang L, Chen J, et al. Reduction of systemic exposure and side effects by intra-articular injection of anti-inflammatory agents for osteoarthritis: what is the safer strategy? [J]. *J Drug Target*, 2023, 31 (6): 596-611.
- [31] Pontes AP, Welting TJ, Rip J, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery in osteoarthritis [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (12): 2639.
- [32] Concoff A, Sancheti P, Niazi F, et al. The efficacy of multiple versus single hyaluronic acid injections: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18 (1): 542.
- [33] Scognamiglio F, Travan A, Borgogna M, et al. Development of biodegradable membranes for the delivery of a bioactive chitosan-derivative on cartilage defects: a preliminary investigation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108 (7): 1534-1545.
- [34] Rahimi M, Charimi G, Matyjaszewski K, et al. Recent developments in natural and synthetic polymeric drug delivery systems used for the treatment of osteoarthritis [J]. *Acta Biomater*, 2021, 123: 31-50.
- [35] Janoušková O. Synthetic polymer scaffolds for soft tissue engineering [J]. *Physiol Res*, 2018, 67 (Suppl 2): S335-S348.
- [36] Ma LY, Zheng XY, Lin R, et al. Knee osteoarthritis therapy: recent advances in intra-articular drug delivery systems [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 1311-1347.
- [37] Balakrishnan B, Joshi N, Jayakrishnan A, et al. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10 (8): 3650-3663.
- [38] Arunkumar P, Indulekha S, Vijayalakshmi S, et al. Poly (caprolactone) microparticles and chitosan thermogels based injectable formulation of etoricoxib for the potential treatment of osteoarthritis [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 61: 534-544.
- [39] Zhu SJ, Tian H, Dou MJ, et al. Chitosan temperature-sensitive gels: reduce the burst release of microspheres containing lornoxicam and enhance drug targeting [J]. *MOJ Bioequiv Availab*, 2018, 5 (1): 16-22.
- [40] Li PN, Li HK, Shu XH, et al. Intra-articular delivery of flurbiprofen sustained release thermogel: improved therapeutic outcome of collagenase II-induced rat knee osteoarthritis [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27 (1): 1034-1043.
- [41] Yang L, Liu YX, Shou X, et al. Bio-inspired lubricant drug delivery particles for the treatment of osteoarthritis [J]. *Nanoscale*, 2020, 12 (32): 17093-17102.
- [42] El-Gogary RI, Khattab MA, Abd AH. Intra-articular multifunctional celecoxib loaded hyaluronan nanocapsules for the suppression of inflammation in an osteoarthritic rat model [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119378.
- [43] Zhang K, Yang JL, Sun YL, et al. Thermo-sensitive dual-functional nanospheres with enhanced lubrication and drug delivery for the treatment of osteoarthritis [J]. *Chemistry*, 2020, 26 (46): 10564-10574.
- [44] Janssen M, Timur UT, Woike N, et al. Celecoxib-loaded PEA microspheres as an auto regulatory drug-delivery system after intra-articular injection [J]. *J Control Release*, 2016, 244 (Pt A): 30-40.
- [45] Tellegen AR, Rudnik JI, Pouran B, et al. Controlled release of celecoxib inhibits inflammation, bone cysts and osteophyte formation in a preclinical model of osteoarthritis [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25 (1): 1438-1447.
- [46] Tellegen AR, Rudnik JI, Utomo L, et al. Sustained release of locally delivered celecoxib provides pain relief for osteoarthritis: a proof of concept in dog patients [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2023, 31 (3): 351-362.
- [47] Yang JL, Han Y, Lin JW, et al. Ball-bearing-inspired polyampholyte-modified microspheres as bio-lubricants attenuate osteoarthritis [J]. *Small*, 2020, 16 (44): e2006356.
- [48] Nishida Y, Kano K, Nobuoka Y, et al. Sustained-release diclofenac conjugated to hyaluronate (diclofenac etalhyaluronate) for knee osteoarthritis: a randomized phase 2 study [J]. *Rheumatology*, 2021, 60 (3): 1435-1444.
- [49] Edwards SHR. Intra-articular drug delivery: the challenge to extend drug residence time within the joint [J]. *Vet J*, 2011, 190 (1): 15-21.
- [50] Huang HR, Lou ZJ, Zheng SM, et al. Intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy: shifting from sustained release to enhancing penetration into cartilage [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29 (1): 767-791.

(收稿日期: 2024-05-07; 修回日期: 2024-06-29)

异黄腐酚药理作用及机制的研究进展

王海波, 刘静蕊, 高莹莹, 刘天教, 杨志欣* (黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 异黄腐酚 (IXN) 是一种天然植物提取物, 来源于啤酒花和苦参。研究表明, IXN 具有抗糖尿病、抗肥胖、抗肿瘤、抑制血管生成及调节炎症等药理活性。在抗糖尿病和抗肥胖方面, IXN 不仅可直接作用于细胞, 影响相关细胞因子及通路靶点等抵抗糖尿病和肥胖症, 还可通过影响肠道微生物间接影响这两种疾病的发生。IXN 还具有广泛的抗肿瘤活性, 包括结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤等, 通过阻断细胞周期, 诱导细胞自噬或凋亡等机制抑制肿瘤。此外, IXN 在抗血管生成及调节炎症方面也具有重要意义, 涉及的相关信号通路影响着多种疾病的发展。本文全面梳理了 IXN 在药理方面的研究进展, 以期为深入研究 IXN 提供参考。

关键词: 异黄腐酚; 抗糖尿病; 抗肥胖; 抗肿瘤; 抗血管生成; 抗炎

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)01-0196-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.029

Research progress in the pharmacological effect of isoxanthohumol

WANG Hai-bo, LIU Jing-rui, GAO Ying-ying, LIU Tian-jiao, YANG Zhi-xin* (School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Isoxanthohumol (IXN) is a natural plant extract, derived from hops and sophora flavescens. Studies have shown that IXN has pharmacological activities such as anti-diabetes, anti-obesity, anti-tumor, angiogenesis inhibition and inflammation regulation. Anti-diabetes and anti-obesity effects were discovered in recent years. IXN can directly act on cells, affect related cytokines and pathway targets for diabetes and obesity, among which microorganisms play an important role in the treatment of these diseases. On the other hand, the anti-tumor effect of IXN has been widely studied, including colon cancer, ovarian cancer, breast cancer, prostate cancer, melanoma and other cancer cells. Tumor is suppressed by blocking the cell cycle, inducing cell autophagy or apoptosis and other mechanisms. In addition, IXN also plays a role in anti-angiogenic and anti-inflammatory regulation, and the related signaling pathways involved affect the development of many diseases. This paper comprehensively summarized the research progress in the pharmacology of IXN, to provide reference for further research on IXN.

Key words: isoxanthohumol; anti-diabetes; anti-obesity; anti-tumor; anti-angiogenic; anti-inflammation

异黄腐酚属于戊烯基类黄酮 (IXN, 化学结构式见图 1), 淡黄色固体结晶, 熔点 196 ~ 208 °C, 在水中溶解性差 (50 mg · L⁻¹, 23 °C), 易溶于四氢呋喃、丙酮、二甲基亚砜等溶剂中^[1]。人们发现啤酒花中存在的黄酮化合物有益健康, 其中 IXN 及黄腐酚 (xanthohumol, XN) 是学者最关注的两种物质。这两者在啤酒花中含量均很丰富, XN 属于丙酰化类黄酮^[2], 在

某些方面的药理作用可能强于 IXN, 但在某些条件下并不稳定。例如, 在麦芽汁煮沸过程中, XN 很大程度上转化为异构体黄烷酮, 即 IXN^[3]。此外, 研究报道 XN 可能在人体中某些条件下环化生成 IXN, 包括酸性介质或碱性介质等^[4-5]。因此在关于啤酒花众多黄酮类化合物的研究中, IXN 成为一种不可忽略的活性成分。随着人们对 IXN 的研究深入, 其广泛的药理活性逐渐被发现, 在

基金项目: 黑龙江省科学基金面上项目 (No. H2016057); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (No. 2018)。

作者简介: 王海波, 男, 硕士研究生, 主要从事制剂新剂型的研究, email: 1044680617@qq.com * **通信作者:** 杨志欣, 女, 教授, 主要从事中药新剂型的开发与研究, email: zhixin.y@163.com

多种疾病的治疗中展现出潜在价值。本文根据国内外研究现状对 IXN 的药理作用进行梳理,以期为 IXN 的开发利用提供依据。

1 IXN 抗糖尿病和抗肥胖作用

糖尿病已经成为一种全球的严重慢性病,并发症涉及的组织包括眼、神经、血管、心脏及肾脏等^[6]。肥胖素有“万病之源”之称,心血管、脑卒中、糖尿病甚至某些癌症的发生都与其有关^[7]。近年来,IXN 在治疗这两种疾病中被发现具有潜在价值,其机制如图 2 所示。

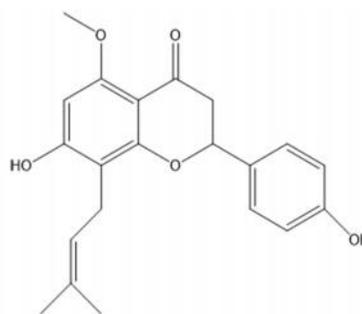


图 1 IXN 的化学结构式
Fig 1 Chemical structure of IXN

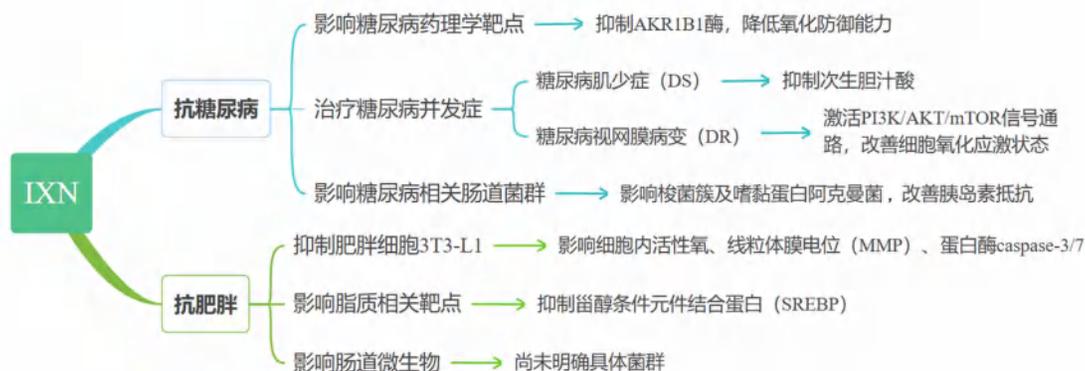


图 2 IXN 抗肥胖及抗糖尿病的机制图
Fig 2 Anti-obesity and anti-diabetic mechanism of IXN

1.1 抗糖尿病

IXN 可通过改善胰岛素抵抗、减少细胞氧化应激等方式治疗糖尿病及其并发症。醛酮还原酶(AKR)超家族中的 AKR1B1 酶是糖尿病并发症治疗中显著的药理学靶点^[8-10]。在高血糖条件下,AKR1B1 促进渗透失衡,改变 NAD⁺ 和 NADP⁺ 氧化还原对的生理比率,降低细胞抗氧化防御能力。Seliger 等^[11]研究了三种黄酮类化合物 IXN、XN 以及 8-pernylnaringenin (8-PN),发现 IXN 对 AKR1B1 酶的抑制作用最强,优于其他黄酮类化合物,为 IXN 抗糖尿病的治疗提供策略。次生胆汁酸是由 7- α -脱氢基酶从初级胆汁酸转化而来的细胞毒性 DNA 损伤代谢物,可干扰糖代谢导致机体产生炎症和干扰胰岛素抵抗等^[12]。最新研究发现 IXN 有治疗糖尿病肌少症(DS)的作用,机制是抑制次生胆汁酸生成从而改善糖代谢引起的 DS^[13]。糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病的严重微血管并发症,Zhao 等^[14]研究发现 IXN 可以改善细胞氧化应激状态,激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,调节自噬失调,从而改善 DR 的症状。

肠道微生物群是影响糖代谢的重要因素,通过代谢合成脂质、氨基酸、维生素、转化胆汁酸和维持免疫功能来维持生物活性的稳态^[15]。其中嗜黏蛋白阿克曼菌和梭菌簇是肠道内两种重要的菌群。Watanabe 等^[16]研究证明 IXN 可增加肠

道内嗜黏蛋白阿克曼菌丰度,增强肠道屏障功能改善胰岛素抵抗。梭菌簇产生代谢产物会与肠道微生物相互作用,使肠道微生物多样性和有益组分下降^[17], Yamashita 等^[18]研究发现 IXN 在增加嗜黏蛋白阿克曼菌的同时,会降低肠道菌群梭菌簇的数量,且这种降低程度与胰岛素抵抗减轻平行。但胰岛素抵抗受到肠道内多种菌群影响,因此相关菌群和作用机制仍需进一步研究。

1.2 抗肥胖

研究表明一些天然产物可诱导脂肪细胞凋亡,影响细胞通路及细胞转录因子等抑制脂肪细胞内脂质积累^[19]。3T3-L1 前脂肪细胞系是建立成熟脂肪细胞模型常用的细胞系^[20]。Yang 等^[21]研究发现 IXN 能够抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖并诱导其凋亡,在探究该抑制机制时发现细胞内活性氧发生变化。活性氧的产生是细胞凋亡变化的重要因素,包括线粒体膜电位(MMP)降低和 caspase-3/7 蛋白的激活^[22-23]。这一发现为 3T3-L1 细胞的凋亡提供依据。甾醇调节元件结合蛋白(SREBP)家族的转录因子,包括 SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2,能调节脂肪酸和胆固醇生物合成途径相关基因的表达,是转录控制脂质合成的核心^[24],与肥胖症的产生有关。Inoue 等^[25]研究显示 IXN 可抑制 SREBP 活性,为治疗肥胖提供一种思路。此外,IXN 与肠道微生物之间的关系在肥胖相关的治疗中

也起到一定的作用。Fukizawa 等^[26]研究表明 IXN 调节肥胖的作用可能与肠道内微生物的变化有关,但具体影响哪种微生物仍需进一步研究。

2 IXN 抗肿瘤作用

近年来,人们通过使用不同的肿瘤细胞系筛选出 IXN 的抗肿瘤活性。目前已知的抗肿瘤机制表明,IXN 可通过阻滞细胞周期、诱导细胞自噬或者凋亡、影响细胞 DNA 合成等抗肿瘤。

2.1 抗结肠癌

Miranda 等^[27]最早发现了 IXN 对肿瘤的抑制作用,通过 IXN 作用于 HT-29 细胞后其细胞活性受到抑制,证明了 IXN 的抗肿瘤潜力。Allsopp 等^[28]选取结肠癌 Caco-2 和 HT115 细胞进行实验,高剂量 IXN 处理后,细胞活力显著下降,提示 IXN 对结肠肿瘤细胞 Caco-2 和 HT115 具有抑制作用。Hudcva 等^[29]测定 IXN 对 HT-29 和 SW620 细胞的 IC_{50} 分别为 $(16.29 \pm 0.9) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(37.3 \pm 2) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,证明 IXN 对这两种细胞均有抑制作用。Ambroz 等^[30]研究发现 IXN 以浓度依赖性方式抑制结直肠癌细胞系 SW480、CaCo-2 和 SW620 细胞的增殖;此外,实验选用抗增殖作用较强的 SW620 细胞探究 IXN 对某些经典化疗药物如奥沙利铂、伊立替康等疗效的影响,结果发现 IXN 可增加细胞内活性氧的形成并诱导蛋白酶 caspases-3/7 激活^[31-32],提示该作用机制与细胞内氧化应激的调节或细胞凋亡的激活有关。

2.2 抗乳腺癌

Miranda 等^[27]研究发现,相较于结肠癌细胞 HT-29, MCF-7 细胞对 IXN 的敏感性更强。雌激素是一种重要的女性生殖激素,和乳腺癌的发生相关。Monteiro 等^[33]研究指出 IXN 可通过抑制芳香化酶活性影响雌激素的合成进而抑制乳腺癌细胞的增殖。在实验中发现 IXN 作用于乳腺癌 Sk-Br-3 细胞后,其体内芳香化酶受到抑制导致雌激素水平降低,细胞内蛋白质及 DNA 合成均减少。为进一步证明细胞增殖减少是由 IXN 抑制芳香化酶导致的雌激素缺失特性引起的,Monteiro 等^[33]在细胞内雌激素水平正常的情况下进行实验,发现 IXN 对 Sk-Br-3 细胞的抑制作用显著降低,为 IXN 抑制 Sk-Br-3 细胞的增殖机制提供依据。此外,IXN 对具有耐药性的乳腺癌细胞也有抑制作用。MCF-7/ADR 是一种耐阿霉素的乳腺癌细胞,Liu 等^[34]发现相较于单独使用阿霉素给药时,在 IXN 存在的情况下,阿霉素的抑制作用更强。进一步分子机制研究证明,异黄酮酚抑制 P-糖蛋白(P-gp)/ABCB1 介导的阿霉素外排,并以浓度依赖性的方式阻断 ABCB1 的外排功能,间接抑制肿瘤细胞的增殖。

2.3 抗前列腺癌

Delmulle 等^[35]评估了 IXN 对前列腺癌 PC-3、DU145 细胞的抗增殖潜力,通过 WST-1 比色法发现肿瘤细胞活性在 IXN 作用下明显降低,证明了 IXN 对前列腺癌的抑制作用。细胞凋亡一般认为由蛋白酶 caspases 激活,但研究发现除 caspases 引起的凋亡外还有 caspases 非依赖性的细胞死亡形式,包括细胞自噬、线粒体途径等^[36]。研究发现 IXN 可能是通过影响 caspases-3 来抑制前列腺癌细胞增殖,然而使用 Z-VAD-FMK 抑制剂排除了 caspases-3 的影响后并未改变细胞活力,且实验中细胞形态学观察未见到细胞特定的凋亡形态特征。在使用 IXN 作用后细胞系中形成了许多液泡,这些液泡的产生表明细胞自噬的发生,提示其机制可能为诱导自噬的非 caspases 依赖性机制导致的细胞死亡^[37]。

2.4 抗黑色素瘤

Krajnović 等^[38]用 IXN 作用于人黑色素瘤细胞 A375,发现细胞分裂受到抑制并出现凋亡现象。实验中发现 IXN 作用后细胞内一氧化氮(NO)含量降低,有研究证明氮物种与人类的肿瘤发生关系密切,NO 是细胞生长的内源性因子,在影响细胞周期和凋亡中起到重要作用^[39],因此推测 IXN 诱导 A375 细胞的凋亡作用可能是降低细胞体内 NO 含量所致,但具体机制仍需要进一步确认。随后 Krajnović 等^[40]继续拓展了黑色素瘤的实验,选取了小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞系测试 IXN 的抑制作用,黑色素瘤细胞活力以剂量依赖性方式减少,实验中发现蛋白酶 caspase 的活性显著激活且细胞自噬体增多,推测其机制可能与自噬和 caspase 依赖性凋亡有关。此外 IXN 作用后细胞的黏附迁移和侵袭能力降低,细胞中整合素 α -6 以及 FAK、黏着斑蛋白和 Rho 激酶的表达显著下调,有证据表明细胞的肿瘤侵袭性和迁移潜力取决于整合素受体的参与和下游信号的传播^[41],推断 IXN 降低该细胞迁移和侵袭能力可能与此有关。

2.5 抗肺癌

近几年来研究发现 IXN 在多药联用治疗肺癌方面具有潜在价值。郭亚楠等^[42]选用肺癌耐药细胞株 A549/DDP 为实验对象,发现 IXN 具有抑制增殖和促凋亡功能且呈浓度依赖性。同年该团队使用 IXN 与抗肺癌药物顺铂深入研究,发现两药联用时在低浓度具有协同作用,两者连用可以阻滞细胞于 G_0/G_1 期,相较于两药单独给药时促细胞凋亡能力更强,诱导细胞凋亡。此外,实验发现细胞耐药蛋白 P-gp、LRP 和 MRP 的表达水平降低,PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平显著下调。这

些信号及通路在肿瘤的发展中起到重要作用，为 IXN 的抑制促凋亡作用提供一种解释^[43]。 IXN 抗肿瘤的主要类型和机制见表 1。

表 1 IXN 抗肿瘤主要类型和机制
Tab 1 Main types and mechanism of IXN anti-tumor effect

癌症类型	癌细胞类型	抑制机制	IC ₅₀ / (μmol · L ⁻¹)	参考文献
结肠癌	Caco-2	影响细胞周期，G ₂ /M 和亚 G ₁ 期细胞比例呈浓度依赖性增加	—	[28]
	SW620	增加细胞内活性氧、诱导 caspases-3/7 蛋白酶激活	40.4	[30]
乳腺癌	MCF-7	抑制细胞内 DNA 合成	15.3	[27]
	Sk-Br-3	降低芳香化酶活性，影响细胞内蛋白质及 DNA 合成	25.4	[33]
	MCF-7/ADR	降低 P-糖蛋白 (ABC1) 介导的药物外排，降低耐药性	16.49±3.12	[34]
前列腺癌	PC-3	诱导细胞自噬的非 caspases 依赖性死亡	45.2±1.1	[35]
	DU145		47.4±1.1	[37]
黑色素瘤	B16-F10	自噬和 caspase 依赖性凋亡	30/42	[40]
	A375	降低细胞内 NO 水平，增强细胞对诱导凋亡敏感性	20.90±0.78	[38]
肺癌	A549/DDP	诱导细胞凋亡降低 P-gp、LRP 和 MRP 等耐药蛋白表达	19.72	[42-43]

2.6 抗其他肿瘤

IXN 药理作用广泛，除对上述肿瘤细胞具有抑制作用外，对卵巢癌 A-2780、MESSA 子宫肉瘤 (MESSA)、耐药人类癌细胞 (MESSA/DX 和 LoVo/DX)、胶质母细胞瘤 (U-118MG) 等多种肿瘤细胞均有抑制作用^[44-46]。

IXN 抗肿瘤的方式具有多样性，许多与肿瘤相关的信号通路和靶点都受 IXN 影响。Kv1.3 型电压门控钾通道在许多类型的细胞中广泛表达，包括正常细胞和肿瘤细胞。对人类 T 淋巴细胞的相关研究表明，阻断 Kv1.3 通道会抑制 G₁ 期的细胞增殖^[47-48]。Gąsiorowska 等^[49] 对白血病 Jurkat T 细胞的 Kv1.3 通道进行研究，证明 IXN 是细胞中 Kv1.3 通道的抑制剂，这可能为白血病的治疗提供策略。SDR21C1 (羧基还原酶 1; CBR1) 是一种不可或缺的还原酶，在人体大多数组织中广泛表达，参与各类细胞的代谢^[50-51]。Seliger 等^[52] 发现 IXN 有助于克服 CBR1 介导的细胞化学耐药性，抑制 CBR1 将化疗药物柔红霉素 (DAUN) 转化为柔红霉素醇 (DAUNol)。作为药物外排转运体的乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2) 控制各种药物的吸收和处置，也是参与肿瘤化疗中多药耐药的主要外排转运体之一，Tan 等^[53] 发现 IXN 对这种转运体具有一定的抑制作用。

3 IXN 抗血管生成和抗炎作用

血管生成在糖尿病、心血管疾病和肿瘤等多种异质性疾病的发病机制中起着重要作用。Bertl 等^[54] 发现 IXN 能够抑制内皮细胞 HMEC-1，揭示 IXN 的抗血管生成潜力。Shiwakoti 等^[55] 的研究结果表明，IXN 可通过降低 NADPH 氧化酶和肾素-血管紧张素系统 (RAS) 介导的氧化应激来预防空气粉尘 (FD) 诱导的内皮细胞过早衰老，提示 IXN 可能在预防 FD 诱导的血管功能障碍方面

发挥重要作用。Negrão 等^[56] 在人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和人主动脉平滑肌细胞 (HASMCs) 的研究中发现，IXN 可以激活细胞程序性死亡并阻断毛细血管样结构的形成。随后该团队选取血管内皮细胞 (ECs) 和血管平滑肌细胞 (VSMCs) 对 IXN 的抗血管作用进一步研究，发现 IXN 能够显著抑制内皮细胞通路中 Akt 和 Erk 的表达进而影响细胞的生长^[57]。最新研究表明，IXN 可降低血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 诱导的血管增生问题，其机制也是 IXN 降低细胞通路中 Akt 磷酸化的表达^[58]。血管成熟和重塑过程中还受到血管生成素 (angiopoietin, Ang) /Tie 轴的影响^[59]。Negrão 等^[57] 的实验发现 Ang/Tie 的整个信号通路受 IXN 影响下调，减少了 Ang/Tie 轴对血管的影响。血管生成和炎症之间关系密切，炎症细胞分泌细胞因子和生长因子，促进血管生成，血管生成通过为炎症部位的细胞代谢需求提供氧气和营养来维持炎症^[60]。Negrão 等^[57] 研究指出 IXN 可以降低血管细胞分泌的促炎因子 TNF-α，同时还可抑制核因子 (nuclear factor kappa-B, NF-κB) 亚基 p50/p65 向细胞核的易位进而影响炎症和血管生成相关基因的表达。TGF-β 是一种多功能细胞因子，其调控的信号通路多种病理过程的发生有关，如血管生成和纤维化等^[61-62]。研究发现 IXN 可阻断 TGF-β 通路中转录因子 Smad 和 DNA 结合诱导的转录反应抑制血管合成等相关蛋白的表达。Jak/Stat 信号通路在血管生成的过程中也起到重要调控作用。Serwe 等^[63] 研究发现 IXN 可降低 Jak/Stat 通路中 Stat3 蛋白的磷酸化从而影响细胞的炎症状态。这些细胞通路及信号因子在炎症及血管生成机制中起到重要的调节作用 (见图 3)。

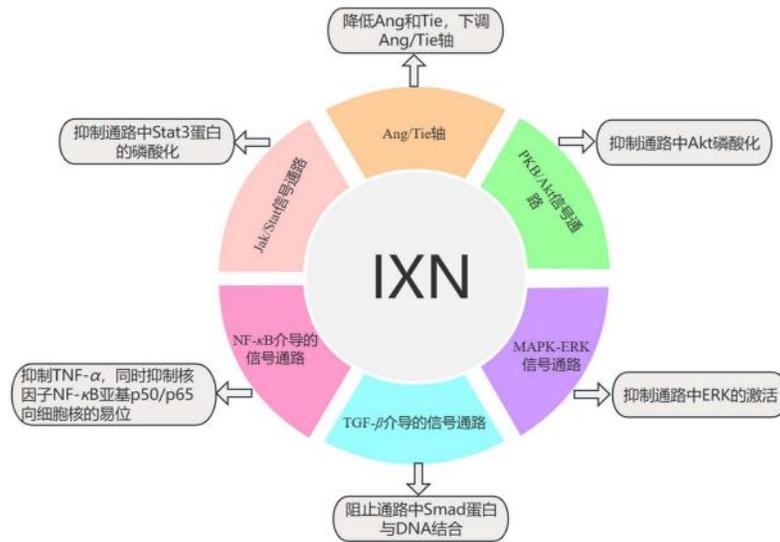


图 3 IXN 抗血管生成及抗炎机制通路

Fig 3 Anti-angiogenic and anti-inflammation pathway of IXN

此外, IXN 对于炎症疾病的治疗可能由多种机制共同调控, Yang 等^[64]对 IXN 治疗溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的研究中发现, IXN 通过三种方式共同治疗 UC, 包括直接降低促炎 Th17/Th1 细胞, 增加抗炎 Treg 细胞以及抑制与 UC 发病相关重要细胞 CD4⁺T 的增殖作用。同时 IXN 具有调节肠道菌群以及调节血清代谢物的功能对 UC 的治疗也起到一定作用。

4 IXN 的其他作用

IXN 除上述研究较为深入的作用药理外, 还涉及很多未引起广泛关注的报道。变形链球菌可以引起口腔龋齿, 杨若琪等^[65]发现 IXN 对变形链球菌具有一定抑制作用, 与未经处理的对照组相比, IXN 在 MIC 浓度下明显抑制了变形链球菌浮游细胞的生长, 为新型抗龋药物的研发和临床应用提供参考。 γ -氨基丁酸 (GABA) 是一种重要的神经递质, Benkherouf 等^[66]发现 IXN 能够调节 GABA 这种递质, 或许能够开发 IXN 在镇静催眠方面的作用。有报道称, IXN 对 30 种疱疹病毒 (HSV1 和 HSV2) 和牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 具有抗病毒活性^[67]。AFB1 是真菌黄曲霉产生的, 它们是食品和饲料中常见的污染物, 经过人体可被代谢为致癌物 AFBO, 研究表明 IXN 可以作为 AFBO 清除剂^[68]。

5 总结与展望

近几年 IXN 在抗糖尿病和抗肥胖症方面的药理作用吸引学者争相报道, 越来越多的细胞因子和信号通路不断被发掘都揭示出 IXN 在治疗这两种疾病方面的潜力。IXN 在抗肿瘤方面作用广泛, 机制复杂。但目前 IXN 的抗肿瘤作用方面多数

研究仅停留在体外细胞实验, 体内相关实验报道和临床研究的数据支持较少。此外, 血管生成及炎症在各类疾病中发挥着重要作用, 进一步探究 IXN 在该方面的作用机制或可为相关疾病的治疗提供新方法。

总之, IXN 作为一种重要的黄酮类化合物, 具有广泛的药理作用和研究潜力, 充分了解其药理作用及机制对于人类某些疾病的治疗以及促进中药临床发展意义重大。

参考文献

- [1] Zolnierczyk AK, Maczka WK, Grabarczyk M, et al. Isoxanthohumol-biologically active hop flavonoid [J]. Fitoterapia, 2015, 103: 71-82.
- [2] Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1999, 832 (1-2): 97-107.
- [3] Stevens JF, Taylor AW, Clawson JE, et al. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47 (6): 2421-2428.
- [4] Anioł M, Żolnierczyk A, Szymańska K. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol with magnesium iodide etherate [J]. Tetrahedron, 2008, 64: 9544-9547.
- [5] Wilhelm H, Wessjohann LA. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process [J]. Tetrahedron, 2006, 62: 6961-6966.
- [6] 王忠利. 糖尿病并发症的药物防治研究进展 [J]. 中国城乡企业卫生, 2023, 38 (6): 39-41.
- [7] 潘浩. 肥胖症的诊断和治疗进展 [J]. 继续医学教育, 2020, 34 (12): 82-84.
- [8] Alexiou P, Pegklidou K, Chatzopoulou M, et al. Aldose

- reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16 (6): 734-752.
- [9] Balestri F, Cappiello M, Moschini R, et al. Modulation of aldose reductase activity by aldose hemiacetals [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850 (11): 2329-2339.
- [10] Ramana KV, Srivastava SK. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42: 17-20.
- [11] Seliger JM, Misuri L, Maser E, et al. The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldose reductases 1B1 and 1B10 [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33 (1): 607-614.
- [12] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47: 241-259.
- [13] Tan YW, Liu XS, Yang YP, et al. Metabolomics analysis reveals serum biomarkers in patients with diabetic sarcopenia [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1119782.
- [14] Zhao KR, Li YD, Qiu YY, et al. Norkurarinone and isoxanthohumol inhibit high glucose and hypoxia-induced angiogenesis via improving oxidative stress and regulating autophagy in human retinal microvascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 634: 20-29.
- [15] Fujisaka S, Watanabe Y, Tobe K. The gut microbiome: a core regulator of metabolism [J]. *J Endocrinol*, 2023, 256 (3): e220111.
- [16] Watanabe Y, Fujisaka S, Morinaga Y, et al. Isoxanthohumol improves obesity and glucose metabolism via inhibiting intestinal lipid absorption with a bloom of *Ak-kermansia muciniphila* in mice [J]. *Mol Metab*, 2023, 77: 101797.
- [17] 查志强, 黄莉萍. 艰难梭菌致病机制研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2024, 3 (5): 1-9.
- [18] Yamashita M, Fukizawa S, Nonaka Y. Hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol suppresses insulin resistance by changing the intestinal microbiota and suppressing chronic inflammation in high fat diet-fed mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (3): 1537-1547.
- [19] 王以撒, 李文兰, 孙加琳, 等. 天然产物抗肥胖活性的研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37 (3): 235-240.
- [20] 高海云, 徐闯, 崔一喆, 等. 中药调控 3T3-L1 脂肪细胞增殖、分化和糖脂代谢的研究进展 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2020, 46 (4): 881-887.
- [21] Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, et al. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12 (11): 1953-1963.
- [22] Chan WH, Wu CC, Yu JS. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90: 327-338.
- [23] Chan WH, Wu HJ. Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92: 200-212.
- [24] Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96 (20): 11041-11048.
- [25] Inoue J, Miyata S. Isoxanthohumol stimulates ubiquitin-proteasome-dependent degradation of precursor forms of sterol regulatory element-binding proteins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82 (9): 1591-1598.
- [26] Fukizawa S, Yamashita M, Wakabayashi KI, et al. Anti-obesity effect of a hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol in a high-fat diet-induced obese mouse model [J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2020, 39 (3): 175-182.
- [27] Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37 (4): 271-285.
- [28] Allsopp P, Possemiers S, Campbell D, et al. A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using in vitro models of colon cancer [J]. *Biofactors*, 2013, 39 (4): 441-447.
- [29] Hudcová T, Bryndová J, Fialová K, et al. Antiproliferative effects of prenylflavonoids from hops on human colon cancer cell lines [J]. *J Inst Brew*, 2014, 120: 225-230.
- [30] Ambroz M, Lnenickova K, Matouskova P, et al. Antiproliferative effects of hop-derived prenylflavonoids and their influence on the efficacy of oxaliplatin, 5-fluorouracil and irinotecan in human colorectal cells [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (4): 879.
- [31] 沈小钢, 郭志义, 张伟, 等. Caspase-7 在结直肠正常黏膜、腺瘤和癌中的表达变化 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29 (3): 361-363.
- [32] 周娟红, 陈凡, 秦天生. Caspase3 在卵巢癌非凋亡进展过程中的治疗作用 [J]. *中国医药导报*, 2023, 20 (32): 56-59.
- [33] Monteiro R, Faria A, Azevedo I, et al. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 105 (1-5): 124-130.
- [34] Liu M, Zhang WY, Zhang W, et al. Prenylflavonoid isoxanthohumol sensitizes MCF-7/ADR cells to doxorubicin cytotoxicity via acting as a substrate of ABCB1 [J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9 (7): 208.
- [35] Delmulle L, Bellahcène A, Dhooge W, et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13 (9-10): 732-734.
- [36] 宋佰芬, 崔玉东, 曹红伟. Caspase 非依赖性细胞死亡的研究进展 [J]. *吉林畜牧兽医*, 2005, 5 (5): 10-13.
- [37] Delmulle L, Vanden Berghe T, Keukeleire D, et al. Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) induces a caspase-independent form of cell death [J]. *Phytother Res*, 2008, 22 (2): 197-203.
- [38] Krajnović T, Kaluđerović GN, Wessjohann LA, et al. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: enhancement of paclitaxel activity in vivo [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 105: 62-73.
- [39] Grimm EA, Ellerhorst J, Tang CH, et al. Constitutive in-

- tracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis [J]. *Nitric Oxide*, 2008, 19 (2): 133-137.
- [40] Krajnović T, Drača D, Kaluđerović GN, et al. The hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol inhibits the formation of lung metastasis in B16-F10 murine melanoma model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 129: 257-268.
- [41] Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, et al. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration [J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2 (2): 310616.
- [42] 郭亚楠, 蒋兵, 郭云红, 等. 黄腐酚和异黄腐酚对逆转耐药细胞株 A549/DDP 凋亡的影响 [J]. *甘肃医药*, 2020, 40 (1): 1-4.
- [43] 郭亚楠, 郭红云, 王涛, 等. 异黄腐酚与顺铂联合用药对肺癌顺铂耐药 A549/DDP 细胞的协同抑制作用 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37 (10): 1429-1434.
- [44] Stompor M, Świtalska M, Podgórski R, et al. Synthesis and biological evaluation of 4'-*O*-acetyl-isoxanthohumol and its analogues as antioxidant and antiproliferative agents [J]. *Acta Biochim Pol*, 2017, 64 (3): 577-583.
- [45] Bartmańska A, Tronina T, Popłoński J, et al. Highly cancer selective antiproliferative activity of natural prenylated flavonoids [J]. *Molecules*, 2018, 23 (11): 2922.
- [46] Tronina T, Bartmańska A, Filip-Psurska B, et al. Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21 (7): 2001-2006.
- [47] Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, et al. International union of pharmacology. LIII. nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57 (4): 473-508.
- [48] Gulbins E, Sassi N, Grassmè H, et al. Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signalling in lymphocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797 (6-7): 1251-1259.
- [49] Gąsiorowska J, Teisseyre A, Uryga A, et al. Inhibition of Kv1.3 channels in human Jurkat T cells by xanthohumol and isoxanthohumol [J]. *J Membr Biol*, 2015, 248 (4): 705-711.
- [50] Persson B, Kallberg Y, Bray JE, et al. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 178 (1-3): 94-98.
- [51] Persson B, Kallberg Y. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202 (1-3): 111-115.
- [52] Seliger JM, Martin HJ, Maser E, et al. Potent inhibition of human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the prenylated chalconoid xanthohumol and its related prenylflavonoids isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 305: 156-162.
- [53] Tan KW, Cooney J, Jensen D, et al. Hop-derived prenylflavonoids are substrates and inhibitors of the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58 (11): 2099-2110.
- [54] Bertl E, Becker H, Eicher T, et al. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325 (1): 287-295.
- [55] Shiwakoti S, Adhikari D, Lee JP, et al. Prevention of fine dust-induced vascular senescence by *Humulus lupulus* extract and its major bioactive compounds [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (12): 1243.
- [56] Negrão R, Costa R, Duarte D, et al. Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111 (5): 1270-1279.
- [57] Negrão R, Duarte D, Costa R, et al. Isoxanthohumol modulates angiogenesis and inflammation via vascular endothelial growth factor receptor, tumor necrosis factor alpha and nuclear factor kappa B pathways [J]. *Biofactors*, 2013, 39 (6): 608-622.
- [58] Chang TY, Lin MS, Chen CC, et al. Isoxanthohumol reduces neointimal hyperplasia through the apelin/AKT pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870 (4): 167099.
- [59] 王蕊, 黄美娟, 许燕艳, 等. Ang-Tie 轴在血管和淋巴系统相关疾病中作用的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2021, 37 (8): 2633-2644.
- [60] Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? [J]. *Angiogenesis*, 2007, 10 (3): 149-166.
- [61] Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (11): 807-821.
- [62] Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 99-146.
- [63] Serwe A, Rudolph K, Anke T, et al. Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30 (3): 898-915.
- [64] Yang YN, Han B, Zhang MQ, et al. Therapeutic effects and mechanisms of isoxanthohumol on DSS-induced colitis: regulating T cell development, restoring gut microbiota, and improving metabolic disorders [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32 (3): 1983-1998.
- [65] 杨若琪, 李泉, 王涛, 等. 黄腐酚与异黄腐酚对变形链球菌致龋毒力因子的抑制作用 [J]. *陕西科技大学学报*, 2021, 39 (5): 62-68.
- [66] Benkherouf AY, Soini SL, Stompor M, et al. Positive allosteric modulation of native and recombinant GABAA receptors by hops prenylflavonoids [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 852: 34-41.
- [67] Buckwold VE, Wilson RJ, Nalca A, et al. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses [J]. *Antivir Res*, 2004, 61: 57-62.
- [68] Štern A, Furlan V, Novak M, et al. Chemoprotective effects of xanthohumol against the carcinogenic mycotoxin aflatoxin B₁ [J]. *Foods*, 2021, 10 (6): 1331.

(收稿日期: 2024-05-20; 修回日期: 2024-07-02)

高海拔缺氧对降糖药体内代谢的影响研究进展

桓芝兰¹, 王鸽², 许贵琴², 吴雪², 王亚峰^{2*} (1.青海大学药学院, 西宁 810001; 2.青海省人民医院, 西宁 810000)

摘要: 高海拔缺氧环境影响机体对众多药物的处置过程, 通过改变药物的药动学参数进而影响药效。影响药动学参数的因素包括药物代谢酶、药物转运体和肠道菌群等, 还可通过一些相关因子、核受体及相关网络信号通路来调控药物代谢酶和药物转运体而间接改变药动学参数。本文总结了高海拔缺氧下降糖药的药动学参数变化的研究进展, 并探讨了引起此种变化的因素及作用机制。

关键词: 高海拔缺氧; 降糖药; 药动学; 药物代谢酶; 药物转运体; 肠道菌群

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0203-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.030

Research progress in the effect of high-altitude hypoxia on the metabolism of hypoglycemic drugs in vivo

HUAN Zhi-lan¹, WANG Ge², XU Gui-qin², WU Xue², WANG Ya-feng^{2*} (1. Department of Pharmacy, Qinghai Provincial University, Xining 810001; 2. Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000)

Abstract: High-altitude hypoxic environment may affect the body's disposal of numerous drugs, change pharmacokinetic parameters, and affect drug efficacy. The factors that affect pharmacokinetic parameters include drug metabolic enzymes, drug transporters, and gut microbiota, which may be indirectly altered by regulating drug metabolic enzymes and drug transporters through related factors, nuclear receptors, and network signaling pathways. This article summarized the research progress in the changes in pharmacokinetic parameters of glucose lowering drugs under high-altitude hypoxia, and explored the factors and mechanism of such changes.

Key words: high-altitude hypoxia; hypoglycemic drug; pharmacokinetics; drug metabolism enzyme; drug transporter; gut microbiota

对于世居或久居高原的人群来说, 由于长期生活在高海拔的环境下, 可能产生相应的适应性基因以适应高原环境, 对藏族高原适应性相关基因研究发现, 内皮 PAS 蛋白 1、脯氨酸羟化酶 2、过氧化物酶体增殖物激活受体 α 等参与了高海拔缺氧适应^[1-4]。但是当平原地区的人群进驻高海拔地区后因体内没有适应性基因的参与而出现高原反应, 使机体出现缺氧症状, 同时导致机体细胞中的氧浓度出现异常^[5-7]。机体在高海拔、低气压等特殊环境下也会产生一系列生理性变化, 这些变化影响药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄, 即高原环境可显著影响药物在机体内的药动学特征^[8-9]。药动学是合理用药的基础, 因此研究药物在高海拔环境下的药动

学变化具有重要意义。糖尿病作为一种慢性疾病, 长期困扰着人们的日常生活, 且糖尿病患者主要使用药物来控制血糖, 但是在药物使用过程中会对机体产生很多不良反应^[10], 选择适当的剂量能够有效避免不良反应的发生。引起药代动力学参数改变的因素包括药物代谢酶、药物转运体和肠道菌群等, 这些都在高海拔缺氧环境下发生了改变, 进而影响药物的药动学参数。本文总结了高海拔缺氧下降糖药的药动学参数变化的研究进展, 并探讨了引起此种变化可能的因素及作用机制。

1 高海拔缺氧环境对降糖药药动学的影响

机体在高海拔环境下产生的一系列生理、生化、病理变化可对药物在体内的药代动力学过程产

基金项目: 2021 年昆仑英才·高端创新培养领军人才。

作者简介: 桓芝兰, 女, 硕士研究生, 主要从事医院药学、药代动力学研究, email: 1229426880@qq.com *通信作者: 王亚峰, 男, 硕士研究生导师, 主要从事医院药学、临床药学及药代动力学研究, email: wyf8289@163.com

生影响。与平原地区相比，高原地区降糖药及辅助降糖药的半衰期 ($t_{1/2}$)、平均滞留时间 (MRT)、清除率 (CL)、峰浓度 (C_{max})、表观分布容积 (V_d)

以及血药浓度 - 时间曲线下面积 (AUC) 等药动学参数的变化趋势如表 1 所示。

表 1 缺氧条件下降糖药及辅助降糖药的药动学参数的变化

Tab 1 Changes in pharmacokinetic parameters of hypoglycemic drugs under hypoxic conditions

药物	实验动物	造模方法	$t_{1/2}$	MRT	CL	C_{max}	AUC	参考文献
二甲双胍	SD 大鼠	低压氧舱模拟海拔 5000 m 饲养 72 h	↑	↑	—	—	—	[11]
		低压氧舱模拟海拔 5000 m 饲养 30 d	↑	↑	—	↓	↑	
格列喹酮	Wistar 大鼠	海拔 400 m 急进海拔 4010 m 后禁食 12 h 进行	↓	↓	—	↑	—	[12]
那格列奈	Wistar 大鼠	海拔 400 m 急进海拔 4010 m 后禁食 12 h 进行	—	—	↓	↑	↑	[13]
藏红花苷 -1	Wistar 大鼠	低压氧舱模拟海拔 7500 m 饲养 72 h	↑	↑	—	↑	↑	[14]
山奈酚	SD 大鼠	暴露于低压氧舱中 72 h, 使氧浓度保持在 (9.0±0.5) %	↑	↑	↓	↑	↑	[15]

注：“—”. 差异无统计学意义或缺少数据；↑. 升高；↓. 降低。

Note: “—”. The difference is not statistically significant or lacks data; ↑. increase; ↓. decrease.

目前采用低压氧舱和高原实地造模的方式，探讨高原低氧环境下药动学参数变化的研究。Zhu 等^[11]研究表明，相较于常氧组，盐酸二甲双胍在急性和慢性缺氧条件下 $t_{1/2}$ 分别升高了 27.8% 和 56.6%， MRT_{0-12} 分别升高了 24.6% 和 53.6%， C_{max} 分别降低了 13.2% 和 25.6%，可知盐酸二甲双胍在高原低氧环境下代谢减慢。研究表明，在高原低氧环境下，格列喹酮吸收减少、代谢加快且在体内的滞留时间缩短^[12]。黄隆基^[13] 研究报道那格列奈在高原低氧环境下 AUC 增加了 93.9%， $CL_{z/F}$ 减小了 43.2%， C_{max} 也增加了 61.4%。王芄等^[14] 研究表明在高原低氧环境下藏红花苷 -1 在大鼠体内的 AUC 是常氧条件的 10 倍，且 MRT 、 $t_{1/2}$ 、 t_{max} 均有显著延长。Li 等^[15] 研究表明，缺氧条件下大鼠 AUC 、 MRT 、 $t_{1/2}$ 和 C_{max} 明显高于正常条件下，缺氧可增强山奈酚的系统暴露，降低其代谢率。综上，高海拔缺氧环境下药动学参数发生改变，在临床用药时需根据变化趋势调整用药剂量。

近年来对高海拔缺氧环境下的药动学研究日益增多，主要聚焦于药动学参数发生改变，目前研究最多的是心血管系统药物，而降糖药仅有部分相关研究。此外，研究还聚焦于引起这些药物药动学参数发生变化的因素，药物在体内需经历机体对其的处置过程，包括吸收、分布、代谢和排泄，每个过程都有机体的某些酶或者转运体参与，高海拔环境对其中任何一个过程产生影响都会使药动学参数发生改变，从而影响药效。

2 高海拔缺氧影响药动学参数变化的因素

高原低氧环境引起药物药代动力学发生改变的因素众多，主要包括药物代谢酶、药物转运体以及肠道菌群等。

2.1 药物代谢酶

药物代谢过程由一系列酶促反应完成，参与的酶包括微粒体酶和非微粒体酶。微粒体药物代谢酶是最主要的混合功能氧化酶，其中细胞色素 P450 (CYP450) 最为重要。CYP450 酶表达的高低可在

一定程度上影响药物的消除，对药物的药代动力学过程产生较大影响。药物在肝脏内的代谢分为两个过程，主要有 I 相和 II 相代谢过程。其中 I 相代谢过程通过氧化、还原、水解等反应完成，CYP450 酶系统是 I 相代谢过程中最主要的代谢酶。

CYP450 酶具有多种亚型，其中 CYP3A4 的底物最为广泛，早期研究表明经 CYP3A4 和 CYP2D6 代谢的药物占比较大，分别占常用药物的 50% 和 25%^[16]。Zhang 等^[17] 研究表明大鼠在急性缺氧条件下血气及生理生化指标发生变化，同时 CYP3A4 蛋白表达下降，其底物西地那非在大鼠体内的吸收、分布、代谢和排泄过程都发生了变化。Yuan 等^[18] 研究表明在缺氧条件下 CYP3A4 表达下降可能受人肝细胞中的过氧化物酶体增殖物受体、孕烷 X 受体 (PXR)、组成型雄烷受体 (CAR) 和糖皮质激素受体等核受体参与调控的影响。Jürgens 等^[19] 研究表明在海拔 4559 m 条件下 CYP2D6 底物司巴丁代谢比 (司巴丁与其代谢产物的比值) 增加，而返回平原后代谢比下降，表明在缺氧时 CYP2D6 活性下降。Huang 等^[12] 研究表明高海拔环境可显著上调大鼠肝组织中 CYP2C9 的蛋白表达水平。李向阳等^[20] 研究表明高海拔急性缺氧时大鼠 CYP2C19 的活性显著升高。

上述研究均表明高海拔缺氧环境可降低 CYP3A4、CYP2D6 的表达及活性，可增加 CYP2C9、CYP2C19 的表达及活性，说明高海拔缺氧环境对不同代谢酶的作用并不一致，阐明高海拔缺氧环境对各种药物代谢酶的影响显得十分重要。此外，众多治疗慢性病的药物为 CYP450 酶的底物，需经 CYP450 酶代谢为活性代谢产物或非活性代谢产物排出体外。降糖药瑞格列奈、那格列奈和吡格列酮等需经 CYP3A4 代谢，另外瑞格列奈还通过 CYP2C8 代谢，而那格列奈代谢还涉及 CYP2C9^[21-24]。因此，高海拔缺氧环境改变 CYP450 酶可能对降糖药的药动学参数产生影响。

2.2 药物转运体

CYP450 酶和药物转运体在体内构成一个相互影

响、相互制约和相互关联的蛋白网络,共同参与药物的体内过程。体内器官和组织都存在不同类型的转运体,主要包括 ABC 和 SLC 家族^[25]。ABC 家族转运体与药物在体内的外排作用相关,主要将药物排出体外,SLC 家族转运体主要将药物吸收进入体内^[26]。小肠的部分转运体会影响药物的吸收过程,从而影响药物进入全身血液的量;肝组织的转运体主要是将药物转运到肝组织,然后被肝组织中的代谢酶系统所代谢;肾组织中存在的转运体主要是将药物排出体外。不同靶器官分布有不同的转运体,分布的数量和种类也各不相同,且在各器官中转运体的活性也会有差异,因此,转运体在药物代谢过程中充当着重要的角色,在药物分布排泄中也发挥着至关重要的作用。

二甲双胍是临床治疗 2 型糖尿病的主要药物之一,从小肠吸收进入血液循环,不被肝脏代谢,其代谢主要受有机阳离子转运体 2 (OCT2) 的影响^[27-28]。Zhu 等^[11]研究表明盐酸二甲双胍在模拟高海拔缺氧暴露后在大鼠体内的药代动力学发生了明显变化,这可能是由 OCT2 的表达显著降低所致。罗冰峰等^[29]研究表明高原缺氧会引起急进高原大鼠小肠、肝脏、肾脏三个组织中 *MDR1*、*MRP2* 基因表达明显升高。研究表明,高海拔缺氧环境可改变 OCT2、*MDR1*、*MRP2*、*P-gp*、*OAT1* 等转运体的表达及活性,进而可能改变对其底物的药代动力学参数^[30-31],提示高海拔缺氧环境对药物转运体的表达及活性发挥了重要的作用。

2.3 肠道菌群

肠道菌群可产生各种各样的酶,这些酶可以影响或者介导机体的物质代谢,例如胆汁酸和多糖的代谢。肠道菌群具有代谢多种药物的能力,它不仅代谢多种化学合成药物,还可以代谢多种天然产物^[32]。此外,肠道菌群还可间接产生其他物质参与药物体内过程,外膜囊泡 (OMVs) 是产生这些物质的重要活性结构,这些物质包括 DNA、RNA、细菌外毒素、细菌内毒素 (如 LPS) 或细菌蛋白衍生物 (如肠菌抗原) 等,可以作用于宿主肠道和免疫细胞,从而引起肠道黏膜损伤及炎症^[33]。高雪姣等^[34]用溃疡性结肠炎大鼠分泌的 OMVs 刺激 Caco-2 细胞后发现 *P-gp* 表达显著下调。已有报道,LPS 作为 OMVs 的主要成分可对 *P-gp* 的表达产生影响。Tomita 等^[35]用 LPS 对大鼠进行腹腔注射后,大鼠回肠和肝脏中 *MDR1* 及回肠中 *P-gp* 的表达水平均显著降低,同时回肠和胆汁对罗丹明 123 的清除能力也显著降低。综上可知,肠道菌群可能通过直接或间接作用影响药物代谢动力学,进而导致药物疗效和毒性产生个体差异。

目前,高海拔缺氧条件下肠道菌群对药动学及药效学的影响方面的研究逐渐进入研究者的视野。肠道菌群在缺氧时影响降糖药的研究暂未见报道,

但已在其他药物中被研究,可能是引起药动参数变化的原因。Staley 等^[36]研究表明,高原缺氧环境导致大鼠粪便中拟杆菌数量显著增加,而棒状杆菌、普雷沃氏菌和粪球菌数量显著下降,使得阿司匹林的代谢活性下降,吸收增加,进入高原的人群服用阿司匹林后可能引起出血等不良反应。Zhang 等^[37]证实了高海拔缺氧环境可引起肠道微生物的数量和组成的变化,这些菌群的变化可能导致硝苯地平在急性缺氧后体内代谢活动减慢,从而提高硝苯地平的生物利用度和治疗效果。Zhang 等^[38]研究表明高海拔缺氧环境引起了肠道微生物的数量和组成的变化,并通过体内和体外实验证明了肠道菌群参与了氯吡格雷的代谢,急性缺氧下肠道菌群改变可能会导致氯吡格雷的吸收前代谢增加,从而导致被吸收至血液的量减少,这可能会影响氯吡格雷的生物利用度和治疗效果。

3 高海拔缺氧影响药物代谢的作用机制

高海拔缺氧影响药物代谢的相关作用机制尚不明了,以往研究表明高海拔缺氧环境下机体的生理生化指标发生变化以及肝肾功能出现异常,并进一步影响药物代谢酶和药物转运体的表达,但这些证据无法与蛋白分子活性之间很好的关联。目前,主要从低氧诱导因子 -1 (HIF-1)、核受体、相关信号通路等几个方面展开研究。

3.1 相关因子

HIF-1 由 α 亚基和 β 亚基组成,这 2 个亚基均属于 bHLH-PAS 家族。HIF- α 有 3 个亚基 (HIF-1 α 、HIF-2 α 以及 HIF-3 α),HIF- β 也有 2 个亚基 [HIF-1 β 和芳烃受体核转座子 2 (ARNT2)]。HIF-1 α 是氧敏感型亚基,而 HIF-1 β 既是基础型亚基,HIF-1 α 和 HIF-2 α 可以与 HIF-1 β 亚基结合,在低氧反应中发挥至关重要的作用。Lee 等^[39]发现低氧同时诱导细胞中 HIF-1 和 *MRP1* 的 mRNA 表达,并用质粒转染方法证实 Hep G2 细胞过表达 HIF-1 后,*MRP1* 的 mRNA 表达显著升高,提示 *MRP1* 的表达可能与 HIF-1 有关。

长链非编码 RNA (lnc RNA) 是一类长度大于 200 个 nt 且不表现蛋白质编码潜能的 RNAs。越来越多的证据显示,lnc RNA 具有复杂的生物学功能,参与基因组印记、X 染色体沉默以及染色质修饰、核内运输、转录干扰、转录激活等多种重要的调控过程。Li 等^[40]筛选了缺氧条件下 lnc RNAs 的差异性表达,研究发现 lnc RNA-H19 是低氧条件下药物转运体发生变化的关键分子。此外,lnc RNA 是 ce RNA 的主要成员,ce RNA 可以竞争性结合 miRNA 来调节基因的表达,研究发现低氧影响药物转运体 *MDR1* 的表达,进而影响药物的体内代谢,其机制是 miRNA-873-5p 通过 PXR 的间接调控作用和靶向 *MDR1* 的直接作用^[41]。此外,另一研究证实缺氧时 *P-gp* 的表达

水平与 lnc RNA-H19 成正相关, 沉默 H19 后可显著抑制 P-gp 的表达, 说明 lnc RNA-H19 是 P-gp 调控网络中的关键分子^[42]。

3.2 核受体

配体调节的转录因子家族, 被称作核受体, 包括许多重要的药物靶分子, 如雌激素受体、糖皮质激素受体、维生素 D 受体 (VDR)、孕烷 X 受体、组成型雄烷受体等。PXR 在所有哺乳动物的肝脏和小肠中都有表达, 在这些组织中 CYP3A 的表达丰富, PXR 和 CAR 对药物代谢酶的转录调控扮演着重要的角色, 研究表明 CYP3A、CYP2B 和 CYP1A 的转录是由 PXR 和 CAR 介导^[43-44]。CYP2B6 的表达主要受肝脏中核受体 CAR 和 PXR 的调控, 除了 CYP2B6 外, 这些受体还介导 CYP3A4 的诱导表达, 以及一些重要的 II 相代谢酶和药物转运体^[45]。Drocourt 等^[46]研究表明 VDR、PXR 和 CAR 通过与同一组响应元件的竞争相互作用, 调控了 CYP3A4、CYP2B6 和 CYP2C9 的表达。以上研究说明核受体可能通过调控药物代谢酶而间接影响药物在体内的代谢。

3.3 相关信号通路

高海拔缺氧环境对药物代谢影响的相关机制尚不清楚, 主要聚焦于一些相关因子、核受体等, 其确切信号通路的揭示仍需广大研究者的努力。众多研究发现, 低氧条件下 HIF-1 α 、P53、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、NF- κ B 通路可上调 MDR1 的表达^[47-49]。

4 结语

相对于平原人群来说, 居住于高原的人群相对较少, 同时从事高海拔缺氧环境对药物体内过程的影响方面的研究人员也相对较少, 导致此类研究不受重视或不为大家所知, 所以目前仅对部分药物在高海拔环境下药代动力学参数变化进行了研究, 仍有大量药物缺乏这方面的研究。目前, 研究最多的药物主要聚焦于心血管系统的药物, 而治疗糖尿病的药物在高海拔环境下的药代动力学参数变化还有待研究者们加以补充完善。

高海拔缺氧影响药物代谢的主要因素研究主要集中在药物代谢酶, 其次是药物转运体, 近几年又有研究者发现药物代谢还与肠道菌群有关。由于目前高原上缺乏满足实验要求且合格的实验室, 再加之研究者们需克服严重的高原反应, 很多研究者选择模拟高海拔环境进行这方面的研究, 但仅能模拟低氧这一条件, 无法模拟低湿度、低温、强紫外线等高原特征, 因此无法反映真实高海拔缺氧环境, 这就导致模拟高海拔环境和高原实地的研究结果不一致, 还需要进一步论证。高海拔缺氧影响药物代谢的作用机制还未被完全揭示, 目前研究发现 HIF-1、lnc RNA、mi RNA-873-5p、

VDR、PXR、CAR 等相关因子参与了药物的体内过程, 但其网络调控机制还有待深入探索。

开展高海拔缺氧环境下降糖药的药代动力学研究是将高原医学与药物代谢动力学相结合, 可为高原地区糖尿病患者合理用药奠定理论基础, 为急进高原人群和久居世居高原人群的个体化用药提供参考意见。

参考文献

- [1] Simonson TS, Yang Y, Huff C D, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Xizang [J]. *Science*, 2010, 329 (5987): 72-75.
- [2] Ravasi T, Wang B, Zhang YB, et al. On the origin of Xizang populations and their genetic basis in adapting high-altitude environments [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (2): 1-10.
- [3] Peng Y, Yang ZH, Zhang H, et al. Genetic variations in Xizang populations and high-altitude adaptation at the himalayas [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28 (2): 1075-1081.
- [4] Bigham A, Bauchet M, Pinto D, et al. Identifying signatures of natural selection in Xizang and andean populations using dense genome scan data [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6 (9): 1-14.
- [5] Stewart GM, Cross TJ, Joyner MJ, et al. Impact of pharmacologically left shifting the oxygen—hemoglobin dissociation curve on arterial blood gases and pulmonary gas exchange during maximal exercise in hypoxia [J]. *High Alt Med Biol*, 2021, 22 (3): 249-262.
- [6] 年永琼, 辛元尧, 周雪姣, 等. 高原低氧环境对人体的生理影响以及人体药物代谢动力学特征的研究进展 [J]. *药学研究*, 2018, 37 (6): 346-351.
- [7] Storz JF. High-altitude adaptation: mechanistic insights from integrated genomics and physiology [J]. *Mol Biol Evol*, 2021, 38 (7): 2677-2691.
- [8] Li WB, Wang R, Xie H, et al. Effects on pharmacokinetics of propranolol and other factors in rats after acute exposure to high altitude at 4, 010 m [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 72 (1): 27-36.
- [9] Lu H, Wang R, Jia ZP, et al. Effects of high altitude exposure on physiology and pharmacokinetics [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17 (6): 559-565.
- [10] Graham GG, Punt J, Arora M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2011, 50 (2): 81-98.
- [11] Zhu JB, Yang JX, Nian YQ, et al. Pharmacokinetics of acetaminophen and metformin hydrochloride in rats after exposure to simulated high altitude hypoxia [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 1-12.
- [12] 黄隆基, 张晓静, 罗林, 等. 高原环境对格列喹酮药代动力学参数的影响 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2022, 51 (4): 389-396.
- [13] 黄隆基. 高原低氧环境下常用降糖药物药代动力学特征及其影响因素的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
- [14] 王芑. 藏红花苷 -1 常氧及缺氧大鼠药代动力学研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2023.
- [15] Li J, Wu Y, Ma Y, et al. A UPLC-MS/MS method reveals

- the pharmacokinetics and metabolism characteristics of kaempferol in rats under hypoxia [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2022, 43: 100440.
- [16] Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data [J]. *Drug Metab Rev*, 2002, 34 (1-2): 83-448.
- [17] Zhang JH, Wang R. Changes in CYP3A4 enzyme expression and biochemical markers under acute hypoxia affect the pharmacokinetics of sildenafil [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1-8.
- [18] Yuan XC, Lu H, Zhao AP, et al. Transcriptional regulation of CYP3A4 by nuclear receptors in human hepatocytes under hypoxia [J]. *Drug Metab Rev*, 2020, 52 (2): 225-234.
- [19] Jürgens G, Christensen HR, Brösen K, et al. Acute hypoxia and cytochrome P450-mediated hepatic drug metabolism in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71 (4): 214-220.
- [20] 李向阳, 刘永年, 袁明, 等. 高原低氧对药物代谢酶 CYP2C9 和 2C19 活性及蛋白表达的影响 [J]. *药学学报*, 2012, 47 (2): 188-193.
- [21] Plosker GL, Figgitt DP. Repaglinide [J]. *Pharmacoeconomics*, 2004, 22 (6): 389-411.
- [22] Culy CR, Jarvis B. Repaglinide [J]. *Drugs*, 2001, 61 (11): 1625-1660.
- [23] Scheen AJ. Drug-drug and food-drug pharmacokinetic interactions with new insulinotropic agents repaglinide and nateglinide [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (2): 93-108.
- [24] Kajosaari LI, Jaakkola T, Neuvonen PJ, et al. Pioglitazone, an in vitro inhibitor of CYP2C8 and CYP3A4, does not increase the plasma concentrations of the CYP2C8 and CYP3A4 substrate repaglinide [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62 (3): 217-223.
- [25] Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade [J]. *Drug Resist Update*, 2015, 18: 1-17.
- [26] 舒焱. 有机阳离子转运体研究进展 (英文) [J]. *长沙: 中南大学学报 (医学版)*, 2011, 36 (10): 913-926.
- [27] Klip A, Leiter LA. Cellular mechanism of action of metformin [J]. *Diabetes Care*, 1990, 13 (6): 696-704.
- [28] Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, et al. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1 [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20 (5): 379-386.
- [29] 罗冰峰, 尹强, 王荣, 等. 缺氧对大鼠药物转运体 MDR1、MRP2 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36 (9): 1169-1174.
- [30] 赵安鹏, 胡琳, 姚菡腾, 等. 高原低氧对大鼠左乙拉西坦药代动力学特征及脑血分布的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2023, 48 (10): 1445-1452.
- [31] Luo B, LI J, Yang T, et al. Evaluation of renal excretion and pharmacokinetics of furosemide in rats after acute exposure to high altitude at 4300 m [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2018, 39 (8): 378-387.
- [32] Kang MJ, Kim HG, Kim JS, et al. The effect of gut microbiota on drug metabolism [J]. *Expert Opin Drug Met*, 2013, 9 (10): 1295-1308.
- [33] Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15 (6): 375-387.
- [34] 高雪皎, 李婷, 魏斌, 等. 肠道菌群介导溃疡性结肠炎大鼠肠 CYP3A 和 P-糖蛋白的变化及机制 [J]. *药学学报*, 2017, 52 (1): 34-43.
- [35] Tomita M, Kanbayashi A, Murata H, et al. Effect of lipopolysaccharide on P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary excretion of rhodamine123 in rats [J]. *Int J Pharm*, 2010, 392 (1-2): 35-41.
- [36] Staley C, Sun Y, Zhang J, et al. Effects of intestinal flora on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aspirin in high-altitude hypoxia [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (3): 1-11.
- [37] Zhang JH, Chen YY, Sun YM, et al. Plateau hypoxia attenuates the metabolic activity of intestinal flora to enhance the bioavailability of nifedipine [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25 (1): 1175-1181.
- [38] Zhang JH, Sun YM, He JX, et al. Comprehensive investigation of the influence of high-altitude hypoxia on clopidogrel metabolism and gut microbiota [J]. *Curr Drug Metab*, 2023, 24 (10): 723-733.
- [39] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36 (1): 1-12.
- [40] Li WB, Li J, Wang R, et al. MDR1 will play a key role in pharmacokinetic changes under hypoxia at high altitude and its potential regulatory networks [J]. *Drug Metab Rev*, 2015, 47 (2): 191-198.
- [41] 段雅彬. 高原低氧对药物转运体功能和表达的影响及 miRNA-873-5p 调控机制 [D]. 西宁: 青海大学, 2023.
- [42] 李文斌. 急性高原缺氧对药代动力学参数的影响及其药物转运体调控机制 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [43] Ratajowski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, et al. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 205 (2): 146-153.
- [44] Park YJ, Lee EK, Lee YK, et al. Opposing regulation of cytochrome P450 expression by CAR and PXR in hypothyroid mice [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2012, 263 (2): 131-137.
- [45] Hedrich WD, Hassan HE, Wang H. Insights into CYP2B6-mediated drug—drug interactions [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6 (5): 413-425.
- [46] Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM, et al. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (28): 25125-25132.
- [47] Xue GM, Xia YZ, Wang ZM, et al. Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* mediated inhibition of P-glycoprotein in MCF-7/ADR cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 121: 238-249.
- [48] 李永金, 杨开勇, 张谊, 等. 低氧诱导因子-1 α 在喹啉酸诱导的 PC12 细胞损伤中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31 (4): 493-499.
- [49] Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, et al. NF-kappa B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (1): 90-97.

(收稿日期: 2024-05-20; 修回日期: 2024-07-25)

药物分析与检验

防风炒炭前后 HPLC 指纹图谱和 4 种色原酮成分含量变化研究

王艾琳¹, 吴周威^{1*}, 谢瑜¹, 匡创富¹, 王青¹, 刘钺志² (1. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005; 2. 湖南新汇医药有限公司, 长沙 410203)

摘要: **目的** 建立防风及防风炭 HPLC 指纹图谱, 考察不同产地防风炒炭前后 4 种色原酮类成分含量, 探究防风炒炭过程中各成分变化规律。**方法** 采用 Venusil C18 Plus (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以水-甲醇梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30℃。建立防风及防风炭 HPLC 指纹图谱, 通过统计学方法对防风炒炭前后指纹图谱进行分析, 并测定升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素和亥茅酚苷的含量。**结果** 不同产地防风及防风炭 HPLC 指纹图谱存在差异。各产地防风炒炭后升麻素苷及 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量均降低, 平均降幅分别为 17.94%, 6.15%; 其中升麻素降低显著, 平均降幅为 21.14%; 亥茅酚苷含量呈上升趋势, 平均增幅为 10.65%。**结论** 防风炮制前后指纹图谱存在差异, 4 种色原酮类成分含量变化, 可能与防风炭偏于止血有关。本研究为防风炭中活性物质及质量控制提供参考。

关键词: 防风炭; 炮制; 色原酮; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0208-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.031

Changes of HPLC fingerprint and contents of 4 chromones components in *Saposhnikovia divaricata* before and after charcoal-frying

WANG Ai-lin¹, WU Zhou-wei^{1*}, XIE Yu¹, KUANG Chuang-fu¹, WANG Qing¹, LIU Yi-zhi² (1. *The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005*; 2. *Hunan Xinhui Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410203*)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* and *Saposhnikovia divaricata* charcoal, and determine the content of 4 chromones in *Saposhnikovia divaricata* charcoal from different origins before and after the charcoal-frying, as well as the changing patterns of various components in the process of charcoal-frying. **Methods** Venusil C18 Plus (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with water-methanol gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, a detection wave length of 254 nm, and a column temperature of 30℃. HPLC fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* and *Saposhnikovia divaricata* charcoal were established, and the fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* before and after the charcoal-frying were analyzed statistically. The content of prim-*O*-glucosylcimifugin, 4'-*O*-β-D-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, cimifugin, and sec-*O*-glucosylhamaudol were determined. **Results** There were differences in the HPLC fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* and *Saposhnikovia divaricata* charcoal from different origins. The content of prim-*O*-glucosylcimifugin and 4'-*O*-β-D-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol in charcoal-fried *Saposhnikovia divaricata* from various origins decreased by 17.94% and 6.15% on average. Cimifugin decreased most, with an average decrease of 21.14%. The content of sec-*O*-glucosylhamaudol

基金项目: 湖南省中医药管理局项目 (No.D2022137); 湖南省中医药管理局重大项目 (No.A2022005)。

作者简介: 王艾琳, 女, 副主任药师, 主要从事中药质量与中药药效物质基础方面的研究, email: wangailin1210@163.com *通信作者:

吴周威, 女, 主管中药师, 主要从事中药炮制与中药药效物质基础方面的研究, email: 1456758334@qq.com

increased, with an average growth of 10.65%. **Conclusion** There are differences in the fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* charcoal before and after the processing. The content of 4 chromones varies, which may be related to the hemostatic effect of *Saposhnikovia divaricata* charcoal. This study provides a reference for the study of active substances and quality control of *Saposhnikovia divaricata* charcoal.

Key words: *Saposhnikovia divaricata* charcoal; processing; chromone; fingerprint; content determination

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根^[1], 为大宗中药材。始载于《神农本草经》:“主大风, 为御风要药”^[2], 善于祛诸风, 主走气分而解表散寒, 可入血分而治崩中、肠风下血^[3]。防风炭由宋《证类本草》“防风炙赤色”演变而来^[4], 临床常与地榆炭、茅根炭、槐花炭配伍, 治疗下焦出血。现代研究发现, 防风中以升麻素苷、亥茅酚苷等为代表的不同类型色原酮成分, 发挥解热、抗凝及镇痛等作用^[5-8]。目前针对防风炭中色原酮类成分研究少, 防风炮制前后色原酮类成分变化的研究尚未见报道。课题组前期已摸索防风的最佳炮制工艺, 并建立 HPLC 同时测定 4 种色原酮类成分的方法学^[9-10]。本研究依据“血见黑则止”观点^[11], 推测防风炒炭后善于止血, 与防风炒炭前后 4 种色原酮成分变化有关, 为防风“生入气分, 炭入血分, 生炭异治”的药性变化研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent-1260 液相色谱仪 (安捷伦仪器设备有限公司); AL204 十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多上海有限公司); KQ-500DE 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); FW177 中草药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

防风对照药材 (中国食品药品检定研究院, 批号: 120947-201810)。亥茅酚苷 (批号: 220071618, 纯度: 98.69%)、5-O-甲基维斯阿米醇苷 (批号: 22072610, 纯度: 99.66%)、升麻素苷 (批号: 22022704, 纯度: 98.42%) 及升麻素 (批号: 22062117, 纯度: 99.33%) (成都曼思特生物科技有限公司); 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。所有药材经湖南中医药大学第一附属医院张裕民主任药师鉴定, 16 批防风饮片样品符合《中国药典》伞形科防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根^[1]。将防风饮片按照优化后砂炒工艺, 使用 12 倍河砂, 230 °C 炒 3.5 min, 得防风炭。样品详细信息见表 1。

表 1 防风样品信息

Tab 1 Information of *Saposhnikovia divaricata* samples

序号	产地	种植方式	防风编号	防风炭编号
1	俄罗斯	野生	FF01	FFT01
2	俄罗斯	野生	FF02	FFT02
3	东北	野生	FF03	FFT03
4	东北	野生	FF04	FFT04
5	甘肃	野生	FF05	FFT05
6	内蒙古海拉尔市新巴尔虎右旗	野生	FF06	FFT06
7	内蒙古海拉尔市巴彦托海镇	野生	FF07	FFT07
8	内蒙古海拉尔市巴彦托海镇	野生	FF08	FFT08
9	内蒙古海拉尔市巴彦托海镇	野生	FF09	FFT09
10	内蒙古赤峰市牛营子镇	仿野生	FF10	FFT10
11	内蒙古赤峰市牛营子镇	仿野生	FF11	FFT11
12	河北张家口	栽培	FF12	FFT12
13	河北安国市	栽培	FF13	FFT13
14	河北安国市	栽培	FF14	FFT14
15	山东	栽培	FF15	FFT15
16	安徽	栽培	FF16	FFT16

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Venusil C18 Plus 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (1 ~ 15 min, 40%B; 15 ~ 30 min, 40% ~ 50%B; 30 ~ 50 min, 50% ~ 90%B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 防风炒炭前后 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 防风对照药材溶液的制备 取防风对照药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 20 mL, 称重; 超声 45 min, 冷却至室温, 用 80% 甲醇补足重量, 摇匀, 滤过^[9]。

2.2.2 防风炭对照药材溶液的制备 取防风对照药材按照优化后砂炒工艺, 炮制成外表面焦黑色, 切面焦褐色^[12]。参照“2.2.1”项下方法制备防风炭对照药材溶液。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 称取升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解定容, 分别得到 0.82、0.86、0.82、0.77 mg · mL⁻¹ 的各成分对照品

储备液。精密移取对照品储备液，用甲醇分别稀释为 64.874、29.752、24.758 和 11.624 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液，备用。

2.2.4 供试品溶液的制备 取防风饮片（编号：FF01）参照“2.2.1”项下方法制备。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.4”项下供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录色谱图。以升麻素苷为参照峰，考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.3%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱的要求。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取“2.2.4”项下供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，常温条件下分别在 0、2、4、8、12、24 h 依次进样。以升麻素苷为参照峰，考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.90%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.2%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱的要求。

2.2.7 重复性试验 精密称取 FF01 细粉 6 份，按照“2.2.4”项下方法制成供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样。以升麻素苷为参照峰，考察各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果表明，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 1.7%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.1%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱的要求。

2.2.8 指纹图谱建立及相似度评价 参照“2.2.4”项下方法制成防风（FF01 ~ FF16）、防风炭（FFT01 ~ FFT16）供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析指纹图谱，见图 1 ~ 2。将检测数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 版），基于中位数法，分别以防风、防风炭对照药材为参照图谱，采用多点校正，全峰谱匹配，明确 4 个色原酮类成分，分别为升麻素苷（1 号峰）、升麻素（2 号峰）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（3 号峰）、亥茅酚苷（5 号峰），见图 3。

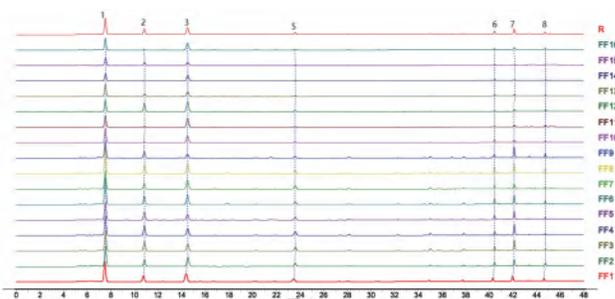


图 1 16 批防风样品 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* samples

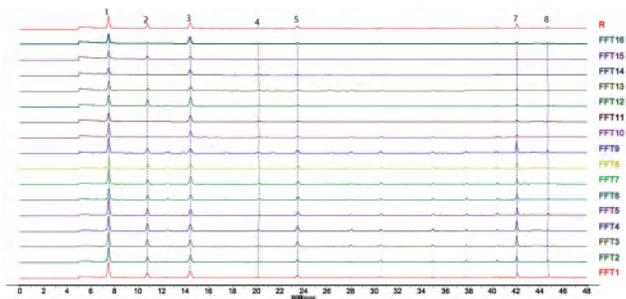


图 2 16 批防风炭样品 HPLC 指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* charcoal samples

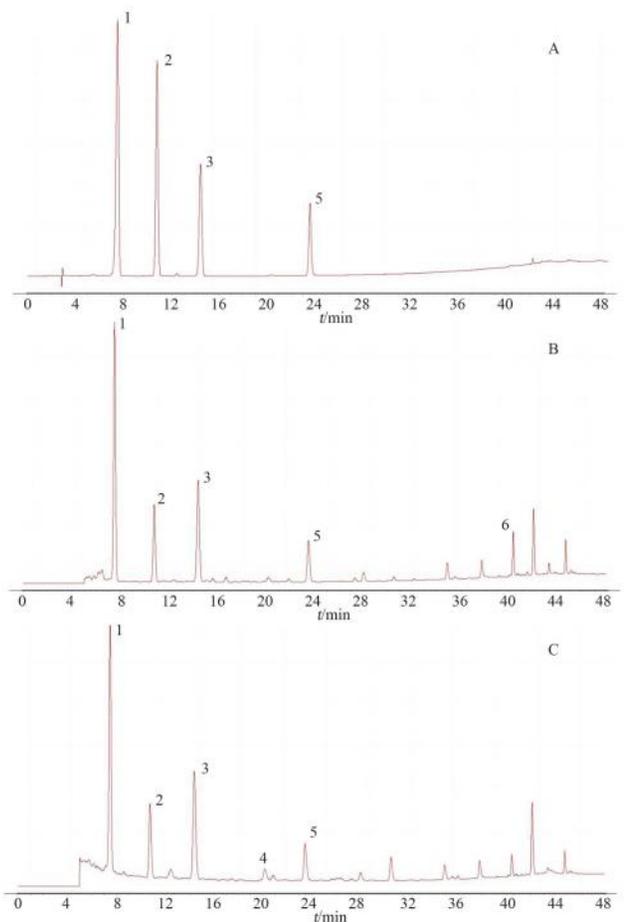


图 3 混合对照品 (A)、防风样品 (B) 及防风炭样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC of mixed control product (A), *Saposhnikovia divaricata* (B) and *Saposhnikovia divaricata* charcoal sample (C)

1. 升麻素苷 (prim-*O*-glucosylcimifugin); 2. 升麻素 (cimifugin); 3. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 (4'-*O*- β -D-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol); 4. 亥茅酚苷 (sec-*O*-glucosylhamaudol)

将防风与防风炭指纹图谱进行比对，确定了 6 个共有峰，分别为 1、2、3、5、7、8 号峰。经炒炭后 1、2、3 号峰面积显著减少，6 号峰减弱甚至消失。另防风炭新产生 4 号峰。导致色原酮类成分及含量发生变化，与其成分本身性质在 230 $^{\circ}\text{C}$ 炒炭过程不稳定，易受热分解或者转化存在关联。

不同产地防风及防风炭相似度评价结果见表 2。结果表明不同产地防风色原酮类成分, 受栽培方式影响较大, 相似度介于 0.799 ~ 0.969; 防风炒炭后相似度提高至 0.917 ~ 0.993。

表 2 16 批防风及防风炭样品 HPLC 相似度评价结果
Tab 2 Relative similarity of HPLC fingerprints of *Saposhnikovia divaricata* and *Saposhnikovia divaricata* charcoal samples

防风编号	相似度	防风炭编号	相似度
FF01	0.935	FFT01	0.983
FF02	0.961	FFT02	0.993
FF03	0.963	FFT03	0.970
FF04	0.947	FFT04	0.969
FF05	0.943	FFT05	0.982
FF06	0.969	FFT06	0.984
FF07	0.960	FFT07	0.993
FF08	0.959	FFT08	0.975
FF09	0.941	FFT09	0.952
FF10	0.891	FFT10	0.953
FF11	0.921	FFT11	0.934
FF12	0.887	FFT12	0.940
FF13	0.933	FFT13	0.971
FF14	0.825	FFT14	0.917
FF15	0.799	FFT15	0.963
FF16	0.867	FFT16	0.925

表 3 防风 4 种色原酮类成分系列浓度

Tab 3 Series concentration of 4 chromones in *Saposhnikovia divaricata*

成分	系列浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)					
	1	2	3	4	5	6
升麻素苷	16.219	48.656	64.874	81.093	121.639	162.185
升麻素	8.926	17.851	29.752	44.628	74.380	89.256
5-O-甲基维斯阿米醇苷	7.427	14.855	24.758	41.346	65.856	82.444
亥茅酚苷	3.487	6.974	11.624	23.248	30.920	38.708

表 4 防风中 4 种色原酮类成分的标准曲线

Tab 4 Standard curves of 4 chromones in *Saposhnikovia divaricata*

成分	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
升麻素苷	$Y = 17.829X - 5.3127$	0.9998	16.219 ~ 162.185
升麻素	$Y = 27.874X + 2.8365$	0.9999	8.926 ~ 89.256
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y = 19.563X + 3.0672$	0.9999	7.427 ~ 82.444
亥茅酚苷	$Y = 25.136X - 2.6701$	0.9996	3.487 ~ 38.708

谱条件分别测定。结果亥茅酚苷、升麻素苷、升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均含量分别为 0.062%、0.348%、0.095% 和 0.125%, *RSD* 值分别为 2.0%、0.83%、1.3% 和 0.82%, 表明本方法重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 称量 FF01 细粉约 0.25 g, 精密称定 6 份, 分别精密加入对照品亥茅酚苷 146.462 μg 、升麻素苷 856.337 μg 、升麻素 255.867 μg 和 5-O-甲基维斯阿米醇苷 326.806 μg , 按“2.2.4”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进行含量测定, 计

2.3 防风炒炭前后 4 种色原酮类含量测定

2.3.1 色谱条件及供试品溶液制备 供试品溶液按“2.2.4”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进样。

2.3.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.3”项下各对照品储备液适量, 分别置于 10 mL 量瓶, 用甲醇逐级稀释, 见表 3。精密吸取 10 μL 进样, 按照“2.1”项下色谱条件, 测定峰面积, 以对照品浓度 ($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 分别得各对照品线性回归方程, 见表 4。

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.2.4”项下供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定并记录峰面积。结果亥茅酚苷、升麻素苷、升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的峰面积 *RSD* 分别为 0.40%、0.47%、0.53% 和 0.83%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取“2.2.4”项下供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 常温条件下分别在 0、2、4、8、12、24 h 依次进样, 测定并记录峰面积。结果亥茅酚苷、升麻素苷、升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的峰面积 *RSD* 分别为 0.74%、0.55%、0.31% 和 0.28%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取 FF01 细粉 6 份, 按“2.2.4”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下色

算亥茅酚苷、升麻素苷、升麻素和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均回收率分别为 100.02%、99.78%、100.28% 和 100.85%, 其 *RSD* 值分别为 1.3%、1.3%、1.4% 和 1.5%, 表明本方法的回收率良好。

2.3.7 样品测定结果 精密称定不同产地防风、防风炭样品, 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 分别测定升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷和升麻素的含量, 结果见表 5。

表 5 不同产地防风炒炭前后 4 种色原酮成分的含量测定 (% , n = 3)

Tab 5 Content of 4 chromones in *Saposhnikovia divaricata* from different origins before and after charcoal-frying (% , n = 3)

防风 / 防风炭	升麻素苷	升麻素	5-O- 甲基维斯阿米醇苷	亥茅酚苷	升麻素苷 + 5-O- 甲基维斯阿米醇苷	色原酮总量
FF01	0.348	0.095	0.125	0.062	0.473	0.630
FFT01	0.215	0.056	0.101	0.054	0.316	0.426
FF02	0.380	0.086	0.188	0.060	0.568	0.714
FFT02	0.292	0.066	0.147	0.048	0.439	0.553
FF03	0.406	0.129	0.144	0.068	0.550	0.747
FFT03	0.281	0.092	0.147	0.09	0.428	0.610
FF04	0.392	0.135	0.192	0.065	0.584	0.784
FFT04	0.314	0.099	0.153	0.071	0.467	0.637
FF05	0.353	0.104	0.116	0.049	0.469	0.622
FFT05	0.322	0.088	0.102	0.061	0.424	0.573
FF06	0.367	0.100	0.130	0.066	0.497	0.663
FFT06	0.261	0.066	0.141	0.075	0.402	0.543
FF07	0.354	0.073	0.183	0.065	0.537	0.675
FFT07	0.293	0.054	0.158	0.056	0.451	0.561
FF08	0.280	0.138	0.114	0.046	0.394	0.578
FFT08	0.276	0.108	0.139	0.059	0.415	0.582
FF09	0.351	0.093	0.087	0.038	0.438	0.569
FFT09	0.312	0.066	0.096	0.057	0.408	0.531
FF10	0.272	0.114	0.152	0.017	0.424	0.555
FFT10	0.262	0.094	0.131	0.020	0.393	0.507
FF11	0.216	0.103	0.187	0.014	0.403	0.520
FFT11	0.157	0.081	0.133	0.018	0.290	0.389
FF12	0.233	0.110	0.217	0.027	0.450	0.587
FFT12	0.203	0.084	0.195	0.026	0.398	0.508
FF13	0.234	0.034	0.096	0.014	0.330	0.378
FFT13	0.175	0.029	0.091	0.013	0.266	0.308
FF14	0.141	0.010	0.118	0.008	0.259	0.277
FFT14	0.124	0.009	0.114	0.008	0.238	0.255
FF15	0.147	0.039	0.061	0.006	0.208	0.253
FFT15	0.138	0.037	0.065	0.007	0.203	0.247
FF16	0.232	0.008	0.156	0.014	0.388	0.410
FFT16	0.185	0.008	0.157	0.015	0.342	0.365

结果显示：不同产地防风炒炭后升麻素苷及 5-O- 甲基维斯阿米醇苷含量呈下降趋势，下降率均值分别为 17.94%、6.15%；其中升麻素降低显著，平均下降为 21.14%；亥茅酚苷含量总体呈上升趋势，平均增长为 10.65%。升麻素苷、升麻素降低幅度依次为野生品 > 仿野生品 > 栽培品；5-O- 甲基维斯阿米醇苷降低幅度依次为仿野生品 > 野生品 > 栽培品；亥茅酚苷的增长幅度依次为仿野生品 > 野生品 > 栽培品。

2.4 统计分析

2.4.1 主成分分析 (PCA) 分别将 16 批防风及防风炭共有峰面积导入 OriginPro2024 软件，进行 PCA。以 PC1 和 PC2 建立坐标，分别获得 16 批防风及防风炭 PCA 得分图，见图 4、5。防风

及防风炭可分为两大类：野生品与非野生品，其中非野生品包括仿野生及栽培品。河北张家口产的防风 FF12 及防风炭 FFT12，与其他产地栽培品存在显著差异。

2.4.2 聚类分析 (CA) 将 16 批防风及防风炭共有峰面积导入 SPSS 27.0 软件，进行 CA，结果见图 6、7。当欧氏距离为 20 时，防风样品可分为两大类：野生品与非野生品；当欧氏距离为 15 时，12 (FF12) 单独一类，说明河北张家口栽培防风与野生品防风存在一定差异。

3 讨论

不同产区防风的含量存在差异，除产地为山东的防风中升麻素苷与 5-O- 甲基维斯阿米醇苷总量为 0.208%，未达到 2020 年版《中国药典》含量

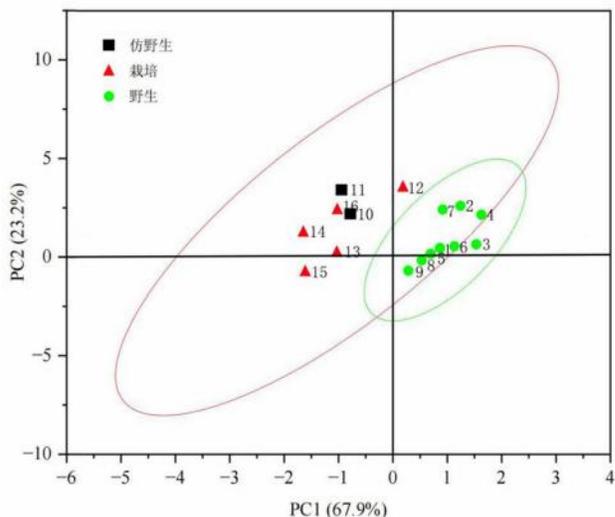


图 4 16 批防风样品 PCA 得分图

Fig 4 PCA score chart of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* samples

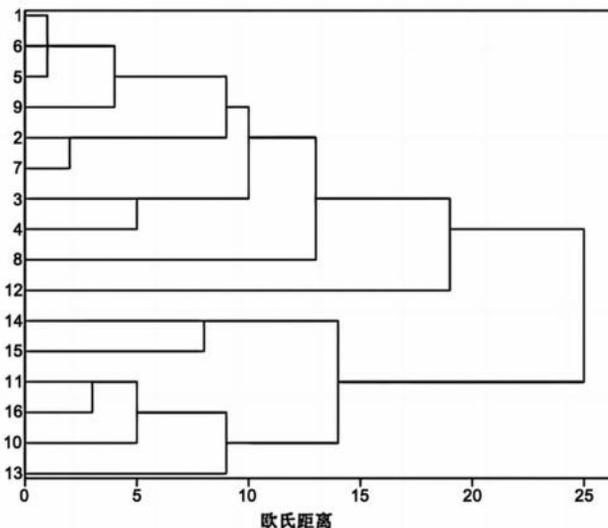


图 6 16 批防风样品聚类树状图

Fig 6 Dendrogram of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* samples

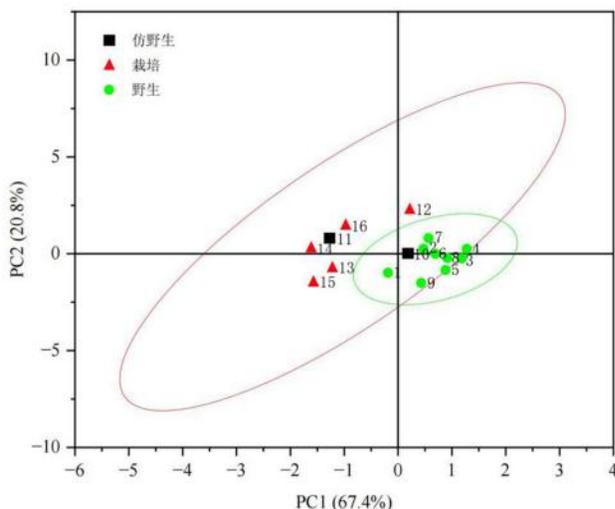


图 5 16 批防风炭样品 PCA 得分图

Fig 5 PCA score chart of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* charcoal samples

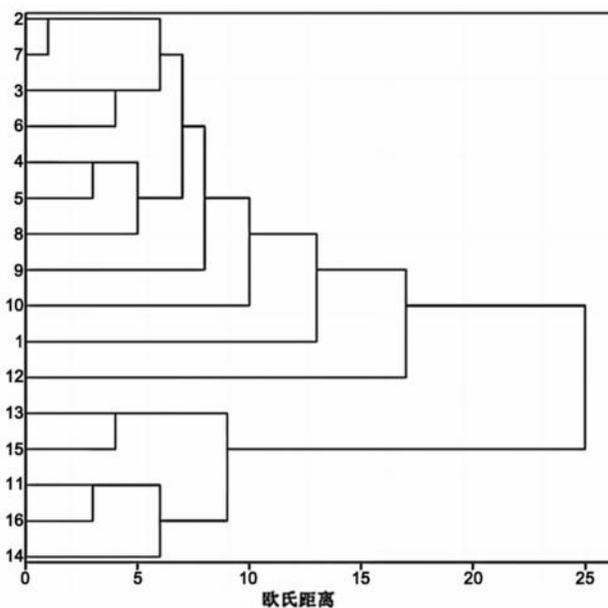


图 7 16 批防风炭样品聚类树状图

Fig 7 Dendrogram of 16 batches of *Saposhnikovia divaricata* charcoal samples

测定 0.24% 的标准^[1]，其余批次均合格，且以产地东北最高为 0.584%。防风在低温干旱环境下，通过累积次生代谢产物色原酮类成分而抵御环境胁迫^[13-14]。故产地为东北的防风中升麻素苷、升麻素、亥茅酚苷及色原酮总量的平均含量最高，分别为 0.399%、0.132%、0.067%、0.766%，为防风的道地产区。与戴锦娜等^[15]研究结果基本一致，与邵留英等^[16]研究推荐内蒙古为首选产区存在差异。由于纬度相近，气候相似，俄罗斯、内蒙古海拉尔市新巴尔虎旗所产的防风 4 种色原酮总含量明显高于河北张家口等其他产区。

由于防风野生资源匮乏，难以满足市场需求，故存在野生、仿野生和人工栽培 3 种植植方式。其中栽培防风断面无“菊花心”^[17]，质坚

实，味甘，与《中国药典》防风性状描述存在差异，该现象本质为缺乏逆境生长环境^[13]。不同栽培方式的防风色原酮类成分也存在显著差异。野生防风中升麻素苷、升麻素、亥茅酚苷及 4 种成分总量明显高于栽培品。以内蒙古赤峰为代表的仿野生防风中升麻素苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量之和、色原酮总含量较野生品平均含量低 0.088%、0.127%，但高于栽培品平均含量 0.087%、0.157%。亥茅酚苷在野生防风中含量波动范围为 0.038% ~ 0.068%，以东北防风最高；栽培品波动范围为 0.006% ~ 0.027%，亥茅酚苷含量高低与栽培方式存在重要关联，故可将亥茅酚苷作为质量

差异标志物区别不同产地及栽培方式的防风^[17-18]。

对比防风炒炭前后含量结果,发现以升麻素为苷元的升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷,其化学结构均为二氢呋喃色原酮,经炒炭后升麻素降幅最大。升麻素苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷因苷键连接位置不同,使其在较高温度下分解或转化程度不同,两者含量均下降。亥茅酚苷结构为二氢吡喃色原酮,化学结构异于前 3 种化合物,炒炭后含量基本呈上升趋势。另发现升麻素苷、升麻素经炒炭后在野生品较栽培品平均降幅增加 4.64%、16.62%,该结果可能与栽培防风积累多糖成分含量较多有关^[19-21]。推测防风炒炭过程中多糖成分减缓了升麻素苷及苷元的分解或转化速率。3 种植方式的防风炭中色原酮类成分变化总趋势及幅度基本一致,但不同产地防风炭中 5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷含量变化不一,可能与多糖等其他成分含量、炒炭时间、温度有关,有待进一步研究。

本试验初步揭示了防风炮制前后 4 种色原酮成分含量的变化规律,为防风及防风炭的质量评价及临床精准用药提供了试验依据,但关于炮制前后功效变化与成分之间的关系尚需后期试验进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 156.
- [2] 吴普. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 96.
- [3] 姜开运, 梁茂新. 防风潜在功用的发掘与利用[J]. 中华中医药志, 2016, 31(2): 376-379.
- [4] 宋·唐慎微. 证类本草[M]. 尚志钧, 等, 校点. 北京: 华夏出版社, 1993: 309.
- [5] 曹思思, 史磊, 孙佳琳, 等. 防风的化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(1): 95-102.
- [6] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2146-2152.
- [7] 辛国, 李鑫, 黄晓巍. 防风化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2018, 38(11): 1323-1325.
- [8] 刘羽, 张月娟, 余毅, 等. 防风解热剂解热镇痛抗炎药理作用的实验研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(9): 1576-1579.
- [9] 王艾琳, 谢瑜, 王青, 等. 多指标综合评价结合层次分析法优化防风炭炮制工艺研究[J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 48-52.
- [10] 王艾琳, 谢瑜, 王青, 等. 多指标综合评价结合层次分析法探讨防风不同炮制工艺[J]. 中医药导报, 2023, 29(4): 30-34.
- [11] 卫聪. 古法炮制姜炭指纹图谱的建立和药理活性的初步研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [12] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范(2011年): 第一册[M]. 广东: 广东科技出版社, 2011: 163.
- [13] 门玉倩. 干旱胁迫对防风幼苗生长、生理及次生代谢产物的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018.
- [14] 杨景明, 姜华, 孟祥才. 基于 Na₂S₂O₄ 胁迫下的防风色原酮生理生态作用研究[J]. 中药材, 2022, 45(5): 1029-1033.
- [15] 戴锦娜, 陈晓辉, 尚红. 防风药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(12): 185-187.
- [16] 邵留英, 喻志斌, 瞿发林. 不同产地防风饮片中有有效成分含量比[J]. 海峡药学, 2013, 25(2): 52-54.
- [17] 王浩, 郭凌阁, 尚兴朴, 等. 基于防风外观性状和内在指标性成分划分防风药材商品规格等级研究[J]. 中草药, 2020, 51(20): 5320-5327.
- [18] 霍金海, 刘亚娟, 任晓蕾, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的防风质量差异标志物初步研究[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 112-118.
- [19] 薛雪, 王浩, 贾天颖, 等. 不同生长方式及年限防风饮片质量的比较研究及对《中国药典》防风饮片标准的思考[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 4034-4042.
- [20] 刘双利. 防风类药材的质量评价研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- [21] 冯贞, 崔宇宏, 李民生, 等. 防风药材及饮片质量控制和评价思路[J]. 中国现代中药, 2021, 23(10): 1686-1691.

(收稿日期: 2024-03-05; 修回日期: 2024-03-20)

“桂十味”道地药材鸡骨草中金属元素的风险评估及相关性分析

田兆红¹, 陈凤^{1*}, 梁韧², 樊文研¹, 刘慧灵³ (1. 玉林市食品药品检验检测中心, 广西 玉林 537000; 2. 玉林制药集团有限责任公司, 广西 玉林 537000; 3. 桂林医学院, 广西 桂林 541199)

摘要: **目的** 建立鸡骨草中 13 种金属元素的电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 检测方法, 并分析评价其重金属含量的安全风险以及元素间的相关性。**方法** 采用 ICP-MS 法同时测定 61 个鸡骨草样品中 13 个元素的含量, 先运用污染指数法对其重金属进行初步评价, 再根据评价结果进一步采用危害指数法进行安全风险评价, 采用 SPSS 26 版统计分析软件对相关元素进行相关性分析。**结果** 经评估鸡骨草样品中有 3 个样品存在重金属污染, 但进一步的风险评估结果表明, 单一重金属及 5 种重金属铅 (Pb)、镉 (Cd)、砷 (As)、汞 (Hg)、铜 (Cu) 累积暴露的健康风险均可以被接受; 13 种金属元素间多种元素存在显著相关性, 被分析的鸡骨草样品的大多数元素存在正相关关系。**结论** 采用的重金属安全风险评价方法合理, 鸡骨草的重金属健康风险相对较小, 人体必需或有益的元素钠 (Na)、镁 (Mg)、钾 (K)、钙 (Ca)、锰 (Mn)、铁 (Fe)、锌 (Zn)、硒 (Se) 与 5 种重金属间存在一定的关系。

关键词: 鸡骨草; ICP-MS; 金属元素; 风险评估; 相关性分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0215-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.032

Risk assessment and correlation of metal elements in “Guishiwei” native herbs *Abrus cantoniensis* Hance

TIAN Zhao-hong¹, CHEN Feng^{1*}, LIANG Ren², FAN Wen-yan¹, LIU Hui-ling³ (1. *Yulin Center for Food and Drug Control, Yulin Guangxi 537000*; 2. *Yulin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Yulin Guangxi 537000*; 3. *Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541199*)

Abstract: Objective To establish an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method to determine 13 metal elements in *Abrus cantoniensis* Hances, the safety risk of heavy metal content, and the correlation between elements. **Methods** The contents of 13 elements in 61 *Abrus cantoniensis* Hance samples were determined by ICP-MS. Firstly, the pollution index method was used to evaluate the heavy metals. According to the evaluation, the hazard index method was further used to evaluate the safety risk. The correlation of related elements was analyzed by SPSS 26 statistical analysis software. **Results** Three samples of *Abrus cantoniensis* Hance were contaminated by heavy metals. However, the further risk assessment showed that the health risks of single heavy metal and cumulative exposure of Pb, Cd, As, Hg and Cu were acceptable. There were obvious correlations among the 13 metal elements and positive correlations between most elements in the *Abrus cantoniensis* Hance sample. **Conclusion** The safety risk assessment of heavy metals adoption is reasonable. The health risk of heavy metals in *Abrus cantoniensis* Hance is fairly small, and a certain relationship exists between the essential or beneficial elements Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Zn and Se and five heavy metals.

Key words: *Abrus cantoniensis* Hance; ICP-MS; metal element; risk assessment; correlation analysis

基金项目: 广西科技重大专项 (No. 桂科 AA23023035-1); 广西中医药管理局项目 (No. GXZY20210116); 玉林市科学技术局项目 (No. 玉市科 202235049)。

作者简介: 田兆红, 女, 副主任药师, 主要从事食品药品分析检测研究, email: 1245315677@qq.com *通信作者: 陈凤, 女, 主任药师, 主要从事食品药品分析检测及质量评估工作, email: 49583278@qq.com

鸡骨草 (Herba Abri) 又被称为广州相思子或大黄草, 是豆科相思子属植物广州相思子 (*Abrus cantoniensis* Hance) 的干燥全株^[1], 是“桂十味”道地药材及广西区域特色药材品种之一^[2]。鸡骨草同属植物毛相思子 (*Aburs mollis* Hance) 亦常被人们当作鸡骨草食用, 俗称毛鸡骨草, 常与鸡骨草混用。鸡骨草习用上既作为药用, 也是民间常用的食用原料, 其味甘性凉, 具有清热解毒、保肝降酶、利湿退黄和活血化瘀等功效, 常作为中成药用于治疗急慢性肝炎、乳痈肿痛、胃脘胀痛、治胃癌前病变等疾病^[3-4], 也作为熬汤、煲凉茶的原料用于解暑祛湿、养肝降脂, 深受“晚睡族”的欢迎^[5]。鸡骨草中富含各种无机元素, 无机元素与中药功效密切相关^[6-8], 如止血类中药普遍含有较丰富的锌 (Zn)、钙 (Ca)、铁 (Fe)。但是铅 (Pb)、镉 (Cd)、砷 (As) 和汞 (Hg) 是国际上公认的有毒元素^[9], 铜 (Cu) 虽然是人体必需的微量元素, 但过量摄入亦会严重危害人体健康^[7]。因此, 测定鸡骨草中的金属元素含量并对 5 类重金属进行健康风险评估, 以及分析金属元素间的相关性具有重要意义^[10-12]。本研究收集了广西种植的 61 份鸡骨草样品, 采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定其多种金属元素的含量, 根据鸡骨草金属元素的含量情况, 结合其药用功效与金属元素间的关联, 选择了钠 (Na)、Mg、钾 (K)、Ca、锰 (Mn)、Fe、Zn、硒 (Se)、Pb、Cd、As、Hg、Cu 13 种金属元素进行分析, 对其中 5 种重金属 (Pb、Cd、As、Hg、Cu) 的含量进行健康风险评估, 并通过 SPSS 26 版统计分析软件的斯皮尔曼相关系数分析方法进行各元素含量之间的相关性分析, 阐述鸡骨草中 13 种元素的特点及规律, 为了解鸡骨草的元素含量水平、重金属含量的风险以及各元素在种植过程中吸收富集关系, 研究道地药材的思路及控制鸡骨草的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Sartoriou GL224i-ISCN 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; DHG-9023A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); EHD-24 培安赶酸器 (北京东航科仪仪器有限公司); CEM MARS6 微波消解仪 (美国培安科技公司); Agilent 7700x 电感耦合等离子体质谱仪 (美国安捷伦公司)。

1.2 试剂

硝酸 (电子 UP 级, 成都市科隆化学品有限公司); 过氧化氢 (优级纯, 国药集团化学试剂有

限公司); 各元素的标准溶液: Na (批号 20071)、Mg (批号 19101)、K (批号 19113)、Ca (批号 20053)、Mn (批号 20012)、Fe (批号 20022)、Zn (批号 20041)、Pb (批号 22114)、Cd (批号 20072)(以上质量浓度均为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), As (批号 19022), Hg (批号 21041), Cu (批号 19101)(以上质量浓度均为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 均由中国计量科学研究院提供; Se (批号 B21090103, 质量浓度 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 坛墨质检-标准物质中心)。内标标准溶液 (Li、Sc、Ge、Y、Rh、In、Tb、Re、Bi)(批号 231226L5, 质量浓度 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 钢研纳克检测技术股份有限公司)。鸡骨草样品共 61 个, 主要来源为广西玉林地区, 收集了不同的农户种植的样品。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

选取各份样品有代表性的约 200 g, 粉碎过三号筛, 精密称取 0.2 g 置微波消解管中, 加 6 mL 硝酸 80°C 预消解 30 min, 待冷却后, 再加入 1 mL 硝酸、1 mL 过氧化氢, 置微波消解仪进行消解 (0 ~ 10 min, 升温至 130°C , 保持 5 min; 15 ~ 20 min, 升温至 150°C , 保持 5 min; 25 ~ 30 min, 升温至 190°C , 保持 30 min; 功率均为 1800 W)。消解完成后, 消解管置于赶酸仪中 120°C 加热 3 h, 将溶液转移并用超纯水定量至 25 mL。空白与样品同法制备后测定。

2.2 样品的水分测定

精密称取样品 (粉碎过三号筛) 约 2 g, 置 105°C 干燥至恒重的称量瓶中, 开启瓶盖在 105°C 干燥 5 h, 将瓶盖盖好, 置干燥器中, 放冷 30 min, 精密称定, 再在 105°C 干燥 1 h, 放冷, 称重, 至连续两次称重的差异不超过 5 mg。根据减失的重量, 计算样品中水分的含量。

2.3 仪器条件

氩气流速 $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流速 $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 等离子体流速 $15.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 射频功率 1.6 kW; 蠕动泵 $0.1 \text{ r} \cdot \text{s}^{-1}$; 雾化室温度 2°C ; 采用在线内标法, Na、Mg、K、Ca、Mn、Fe、Cu 以 Sc (45) 为内标, Zn、Se、As 以 Ge (72) 为内标, Pb、Hg 以 Bi (209) 为内标, Cd 以 In (115) 为内标; 采集时间: 0.3 s; 重复 3 次。

2.4 内标溶液的制备

精密吸取内标标准溶液 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5 mL 用 5% 硝酸溶液定量稀释至 100 mL, 即得质量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标使用溶液。

2.5 标准曲线溶液的配制

精密量取各元素标准溶液适量, 分别用 5%

硝酸溶液配制成系列浓度的混合标准曲线溶液 (Na、Mg、K、Ca: 0.8、4、20、40、60、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Mn、Zn、Cu: 4、20、40、100、300、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; Fe、Se: 0.04、0.1、0.4、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Pb、Cd、As: 2、8、20、40、60、80 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; Hg: 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.6 重金属风险评估方法

鸡骨草中重金属的残留量主要是在种植过程中吸收富积了土壤、水以及所使用的农药、化肥等中的重金属元素。故本研究先采用单项污染指数法、内梅罗综合污染指数法分别评估鸡骨草样品中单个重金属、5 种重金属综合污染情况, 并根据污染评估结果, 对存在重金属污染的样品采用单项危害指数 (HI)、综合危害指数 (HI_C) 进一步分别进行重金属健康风险评估。

2.7 金属元素相关性分析方法

元素间的相关性采用 IBM SPSS Statistics 26 统计学软件进行分析, 分析方法为多变量相关、

斯皮尔曼相关系数法, 显著性检验为双尾。元素间的相关性分析结果以相关系数数值的形式直观表达。

3 结果与分析

3.1 ICP-MS 方法学参数考察

按“2.3”项下方法分别测定 13 种元素, 以元素质量浓度为横坐标 X, 元素与内标计数比值作为纵坐标 Y, 绘制标准曲线, 考察各元素的线性关系。取鸡骨草 23 号样品共 6 份, 按“2.1”项下方法制备样品溶液, 按“2.3”项下方法分别测定, 考察各元素测定的重复性。精密称取已知各元素含量的鸡骨草粉碎均匀样品 (过三号筛) 共 9 份, 每份约 0.2 g, 分别按曲线的低、中、高 3 个浓度加入相应的标准溶液, 每个浓度点平行 3 份, 按“2.1”项下方法制备, 按“2.3”项下方法分别测定, 考察各元素测定的回收率。结果见表 1, 表明方法的线性关系、重复性结果均良好, 各元素的平均加样回收率为 80.4% ~ 106.2%, 方法准确性良好。

表 1 各金属元素线性试验及定量限

Tab 1 Linearity and quantitative limit of each metal element

元素	回归方程	R ²	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Na	$Y = 48.16X + 19.21$	1.0000	0.8 ~ 80.0	2.5
Mg	$Y = 23.53X + 4.42$	1.0000	0.8 ~ 80.0	0.12
K	$Y = 21.49X + 4.65$	1.0000	0.8 ~ 80.0	1.6
Ca	$Y = 1.38X - 1.68$	0.9966	0.8 ~ 80.0	3.6
Mn	$Y = 0.19X - 0.29$	0.9999	0.004 ~ 0.50	0.022
Fe	$Y = 6.20X + 0.078$	1.0000	0.04 ~ 5.0	0.34
Zn	$Y = 0.078X + 0.48$	1.0000	0.004 ~ 0.50	0.25
Se	$Y = 1.32X - 0.0045$	1.0000	0.04 ~ 5.0	0.14
Pb	$Y = 0.072X - 0.054$	0.9990	0.002 ~ 0.080	0.0028
Cd	$Y = 0.012X + 0.0015$	1.0000	0.002 ~ 0.080	0.0016
As	$Y = 0.064X - 0.0094$	1.0000	0.002 ~ 0.080	0.0081
Hg	$Y = 0.0066X - 0.00028$	0.9986	0.0002 ~ 0.0020	0.00035
Cu	$Y = 0.33X - 0.024$	1.0000	0.004 ~ 0.5	0.013

3.2 样品含量测定结果

将收集的 61 批样品按“2.1”项下方法制备样品溶液, 按“2.3”项下方法分别进样测定, 结果见表 2, 鸡骨草中人体必需的 K、Ca、Mg 等常量元素含量均较高, 其次是对人体有益的且与药性、药效存在一定关联的微量元素 Mn、Fe、Zn、Se 的含量也相对较高, 提示鸡骨草是作为药食同源的佳品。而参照《中国药典》2020 年版四部通则重金属及有害元素一致性限量指导值, 61 批鸡骨草样品中 29 号的 Pb、11 号的 Cd 和 Cu 的含量超出限量标准范围, 可能存在一定的风险。

3.3 重金属污染评价

3.3.1 单项污染指数法

采用公式 $P_i = T_i/L_i$ 计算, 其中 P_i 为单项重金属的污染指数, T_i 为单项重金属的实测含量, L_i 为单项重金属的参考限量值 (参照《中国药典》2020 年版四部重金属及有害元素一致性限量指导值^[13]: $\text{Pb} \leq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{Cd} \leq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{As} \leq 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{Hg} \leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{Cu} \leq 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。 $P_i \leq 1$ 为未受污染; $P_i > 1$ 为存在污染; P_i 值越大, 污染越严重^[8]。鸡骨草的单元素污染指数评价结果见图 1, 样品 29 号的 P_i (Pb) 值为 1.18、11 号的 P_i (Cd) 值为 1.61 和 P_i (Cu) 值为 1.42, 污染指数 P_i 均 > 1.0, 存在污染。

3.3.2 内梅罗综合污染指数法 采用公式 $P_c = \sqrt{(P_{\max}^2 + P_{\text{av}}^2)/2}$ 计算, 其中 P_c 为样品的重金属综合污染指数, P_{\max} 为样品的重金属 P_i 的最大

表 2 鸡骨草样品中 13 种元素的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)Tab 2 Determination of 13 elements in *Abrus cantoniensis* Hance ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

编号	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Pb	Cd	As	Hg	Cu
1	73.4	1401.1	13 133.6	6767.0	194.2	458.2	46.5	0.21	0.94	0.35	0.28	0.017	5.98
2	11.4	1266.8	11 268.9	5177.4	274.2	511.1	36.4	0.43	1.47	0.90	0.20	0.012	7.90
3	12.2	1023.4	8321.3	5140.9	249.3	613.7	35.0	0.47	1.77	0.70	0.24	0.007	7.09
4	19.1	1235.3	9155.9	4300.6	187.2	357.3	37.1	0.32	1.38	0.85	0.14	0.006	7.31
5	33.2	1176.5	11 596.4	4740.5	284.2	569.3	36.3	0.32	0.85	0.19	0.27	0.011	6.48
6	13.7	994.3	8896.8	4597.5	220.2	493.0	31.4	0.39	1.42	0.60	0.24	0.008	6.92
7	30.0	968.2	6285.9	4753.8	145.7	523.8	31.1	0.41	1.87	0.79	0.25	0.009	6.18
8	59.6	1026.7	7757.1	3588.3	293.5	548.9	36.0	0.42	1.30	0.26	0.40	0.015	7.35
9	20.0	1025.6	10 570.3	4118.9	141.4	143.9	27.5	0.94	0.65	0.59	0.12	0.011	7.45
10	26.4	916.3	7887.1	5592.4	64.3	184.8	14.3	0.23	0.61	0.15	0.12	0.002	3.62
11	73.9	2016.1	27 625.0	7072.4	275.8	67.1	67.2	1.71	2.38	1.61	0.32	0.036	28.32
12	51.0	853.6	10 429.3	5481.7	70.8	204.4	12.4	0.00	0.28	0.17	0.09	0.004	1.78
13	30.4	731.9	7494.5	3565.6	125.6	46.2	18.5	0.03	1.18	0.42	0.20	0.015	5.09
14	30.8	860.7	10 784.1	2065.6	144.5	207.6	18.1	0.07	0.44	0.13	0.18	0.017	6.33
15	0.9	471.0	5721.5	3964.0	7.4	25.3	7.1	0.00	0.12	0.03	0.02	0.008	1.98
16	24.6	319.9	2555.1	817.6	15.1	911.4	17.0	0.30	4.72	0.24	1.56	0.045	3.85
17	70.2	955.5	9808.5	6584.4	40.6	80.1	13.9	0.00	0.31	0.14	0.14	0.045	3.20
18	41.2	992.2	11 214.6	6241.0	49.8	103.4	14.3	0.00	0.34	0.09	0.13	0.018	3.68
19	34.9	925.9	11 763.0	4667.0	34.7	115.0	12.8	0.02	0.36	0.06	0.13	0.014	3.57
20	39.7	993.8	16 078.8	7155.8	59.5	65.4	14.2	0.00	0.48	0.16	0.05	0.021	2.92
21	59.4	1044.6	16 300.6	7923.8	57.9	276.6	16.1	0.34	0.69	0.17	0.24	0.025	3.50
22	105.6	903.3	8740.3	10 673.3	15.9	135.1	12.4	0.25	0.27	0.09	0.11	0.010	4.88
23	74.1	1204.2	9506.0	3454.5	221.1	1043.3	28.2	0.37	2.96	0.25	0.71	0.114	6.68
24	90.8	1403.8	12 327.0	2128.1	172.2	237.9	49.9	0.36	0.58	0.25	0.22	0.019	5.97
25	69.2	947.2	8680.3	4246.5	251.1	355.5	20.7	0.38	1.60	0.59	0.35	0.019	5.47
26	46.6	730.6	7335.9	4459.6	94.8	141.1	22.7	0.30	1.57	0.23	0.14	0.015	6.15
27	27.3	735.7	8856.9	4505.1	176.7	345.3	25.6	0.31	0.97	0.19	0.23	0.019	6.24
28	53.2	1354.0	11 607.8	2076.5	173.3	258.6	55.4	0.19	0.67	0.23	0.22	0.008	6.45
29	0.0	506.7	4957.4	3122.0	68.6	139.2	31.5	0.25	5.91	0.23	1.35	0.003	5.56
30	4.9	694.4	7877.1	4453.2	117.1	232.6	27.2	0.09	1.30	0.17	0.16	0.000	6.40
31	53.0	1075.6	10 978.3	1678.8	141.9	152.5	46.9	0.10	0.33	0.23	0.17	0.002	5.10
32	61.4	1066.5	13 156.8	1615.2	153.0	140.3	44.9	0.11	0.35	0.26	0.15	0.009	5.14
33	0.5	872.4	10 103.3	4878.0	130.9	122.3	35.0	0.04	0.70	0.18	0.10	0.001	6.52
34	14.8	896.5	8865.8	5342.4	165.2	255.9	30.5	0.07	1.27	0.25	0.18	0.000	6.36
35	89.5	1202.8	13 154.7	1913.1	211.7	229.2	48.9	0.19	0.60	0.23	0.21	0.001	5.31
36	1.5	672.7	8239.6	4866.3	112.3	122.7	29.5	0.03	1.22	0.17	0.10	0.000	6.11
37	92.5	987.3	9900.5	1573.0	142.1	136.5	45.8	0.22	0.43	0.30	0.16	0.000	6.05
38	0.0	867.2	9659.3	3958.6	182.5	127.9	28.7	0.06	0.57	0.15	0.09	0.000	5.86
39	143.8	1231.6	10 299.9	2345.1	165.1	165.5	59.5	0.14	0.43	0.34	0.18	0.002	5.95
40	38.7	806.0	9250.8	4520.5	144.8	136.1	34.5	0.05	0.89	0.18	0.13	0.000	5.92
41	75.3	1269.8	10 418.9	1972.1	137.1	185.1	48.8	0.11	0.41	0.23	0.18	0.001	4.55
42	68.2	1270.7	10 695.3	1886.9	141.7	196.3	48.8	0.15	0.46	0.21	0.18	0.001	5.01
43	0.9	862.7	9135.8	3292.0	168.6	571.5	29.0	0.12	1.16	0.14	0.33	0.003	5.26
44	0.0	996.7	10 626.6	5001.4	257.8	278.7	33.3	0.11	0.64	0.14	0.18	0.001	6.32
45	53.7	1384.2	11 336.4	2391.7	180.3	215.5	48.0	0.15	0.50	0.23	0.21	0.050	5.26
46	0.0	769.5	9756.8	4986.2	172.5	126.0	26.1	0.03	0.28	0.11	0.10	0.001	4.29
47	37.3	1189.7	12 803.8	1668.2	205.0	209.7	39.5	0.14	0.52	0.18	0.20	0.005	4.38
48	20.2	920.0	11 105.8	4648.9	214.6	316.4	31.8	0.16	1.08	0.13	0.23	0.031	8.99
49	83.7	1339.8	13 151.1	1870.0	192.5	260.9	38.9	0.22	0.65	0.24	0.26	0.039	6.15
50	74.5	1283.9	14 196.5	1935.3	202.5	245.0	43.3	0.22	0.68	0.29	0.22	0.038	6.92
51	33.6	1007.9	7906.2	3099.0	220.2	190.3	35.6	1.23	2.32	0.29	1.45	0.056	10.91
52	51.1	909.6	9999.9	3283.6	145.3	311.5	34.6	0.57	0.74	0.26	0.27	0.039	7.47
53	61.9	1495.4	9816.3	3937.3	514.4	950.3	40.3	1.07	1.50	0.31	0.54	0.056	9.66
54	48.8	1476.3	10 559.2	2681.5	64.1	99.9	37.7	0.44	0.28	0.09	0.05	0.079	10.11
55	17.2	1006.5	12 516.2	2265.6	296.0	553.9	54.0	0.71	0.63	0.25	0.49	0.116	5.90

续表 2

编号	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Pb	Cd	As	Hg	Cu
56	25.1	869.0	12 475.8	1863.3	168.3	417.4	57.9	0.82	0.61	0.31	0.41	0.130	6.44
57	297.2	1076.4	12 677.6	3725.0	217.8	165.1	28.8	0.39	0.33	0.14	0.09	0.132	3.96
58	27.5	1363.0	10 517.0	3356.6	229.4	977.3	28.6	0.71	0.96	0.31	0.48	0.008	9.24
59	25.0	1602.1	13 823.3	3174.8	201.7	263.9	33.0	0.52	0.47	0.25	0.16	0.039	8.72
60	58.5	1144.8	13 491.6	4153.4	695.7	589.3	54.9	2.19	2.36	0.44	0.24	0.045	12.52
61	83.3	909.3	11 095.1	2248.4	60.5	202.1	37.6	0.45	0.26	0.08	0.11	0.115	10.02

值, P_{av} 为样品中重金属 P_i 的平均值。 $P_c \leq 0.7$ 为安全级, $0.7 < P_c \leq 1.0$ 为警戒级, $1.0 < P_c \leq 2.0$ 为轻污染, $2.0 < P_c \leq 3.0$ 为中污染, $P_c > 3.0$ 为重污染^[14-15]。鸡骨草的数据见图 1, 结果 16 号样品的 P_c 值为 0.75、29 号的 P_c 值为 0.90, 在警戒线内; 11 号的 P_c 值为 1.26, 在 $1.0 < P_{综} \leq 2.0$ 范围, 存在轻污染。

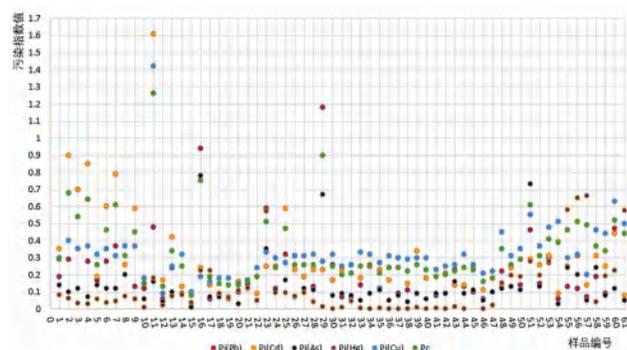


图 1 鸡骨草中重金属元素的污染评价结果

Fig 1 Pollution evaluation of heavy metals in *Abrus cantoniensis* Hance

3.4 重金属风险评估

因重金属在人体内的半衰期较长, 容易蓄积, 通常对重金属的暴露风险评估为长期暴露评估, 故暴露量的计算采用 Exp 值。风险评价方法 HI 对数据要求相对简单, 分析的重金属元素有可供参考的相应的健康指导值, 且该评价方法简便、操作性强, 故本研究采用该方法对鸡骨草中重金属含量进行风险评估。

3.4.1 暴露量的计算 运用公式 (1) $Exp = (EF \times Ed \times IR \times c \times t) / (AT \times W)$ 分别计算重金属 Pb、Cd、As、Hg、Cu 的日暴露量 ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 公式 (1) 中, 根据国家食品安全风险评估中心在我国 11 个省份 20 917 名调查者的有效消费调查数据^[16-17], EF 为每年的暴露频率 (取值为 90 d), Ed 为一生的暴露年限 (取值为 20 年); IR 作为中药材使用的日用量 (参考《中国药典》2020 年版一部中鸡骨草的日用量为 30 g); c 为样品中重金属的测定值 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); t 为中药材经过煎煮等方式的重金属的转移率, Pb、Cd、As、Hg、Cu 的 t 值分别为 14%、14%、35%、24%、14%^[18-19]; AT 为人的平均寿命天数 (取值为 25 550 d); W 为人的平均体

重 (取值为 60 kg)。

3.4.2 单项重金属风险评估 单项重金属风险的由 HI 来描述, 按公式 (2) $HI = (Exp \times 10) / HBGV$ 计算样品中 Pb、Cd、As、Hg、Cu 的 HI 值。公式 (2) 中, 10 为安全因子^[20]; $HBGV$ 为重金属的健康指导值, Pb、Cd、As [采用美国环保署 (US EPA) 所建议的口服参考剂量, 取值分别为 $3.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[21-23]], Hg、Cu (取值分别为 $0.57 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[23])。 $HI \leq 1$, 单项重金属的健康风险较低, 可以被接受; $HI > 1$, 存在风险, 应引起重视, 且 HI 值越大风险越高。依据上述单项污染指数法的评价结果, 发现 11 号鸡骨草样品存在 2 种重金属 (Cd 和 Cu) 污染, 29 号样品存在 1 种重金属 (Pb); 内梅罗综合污染指数法的评估结果显示, 11 号鸡骨草样品中存在轻度污染, 16、29 号样品可能存在一定污染。其他样品重金属污染较轻, 其健康风险相对较小, 故只对上述 3 个样品进行进一步健康风险评估。结果见表 3, HI 值均小于 1, 表明分鸡骨草样品的单一重金属的健康风险可以被接受。

3.4.3 多金属累积风险评估 用 HI_C 进行多金属累积风险评估, 按公式 (3) $HI_C = HI_{Pb} + HI_{Cd} + HI_{As} + HI_{Hg} + HI_{Cu}$, 公式 (3) 中 HI_{Pb} 、 HI_{Cd} 、 HI_{As} 、 HI_{Hg} 、 HI_{Cu} 分别为 Pb、Cd、As、Hg、Cu 的 HI 值。 $HI_C < 1$ 识别为 5 种重金属的累积暴露风险相对较低, 可以被接受^[24]; $HI_C > 1$ 识别为 5 种重金属的累积暴露存在一定的安全风险, 且 HI_C 值越大风险越高。本研究根据上述重金属污染评价结果, 对综合污染指数存在危险的 11、16、29 号样品进行评估, 结果见表 3, HI 值均小于 1, 表明鸡骨草样品的重金属累积暴露风险可以被接受。

表 3 鸡骨草中重金属元素的风险评估结果

Tab 3 Risk assessment of heavy metals in *Abrus cantoniensis* Hance

编号	HI					HI_C
	Pb	Cd	As	Hg	Cu	
11	0.090	0.096	0.0053	0.0031	0.0028	0.20
16	0.18	0.014	0.026	0.0039	0.000 38	0.22
29	0.22	0.014	0.022	0.000 22	0.000 55	0.26

3.5 相关分析

由于拮抗或协同因素不同金属元素之间存

在相互促进或抑制富集作用，采用 IBM SPSS Statistics 26 统计学软件进行相关性分析，因多数金属元素的含量不服从正态分布，采用斯皮尔曼相关系数法分析^[25]，结果见表 4。共 53 对元素含量间存在显著的正相关，只有 5 对元素间存在

显著负相关，说明鸡骨草在生长过程中大多数元素吸收累积的协同作用较好；Na、Mg、Ca 元素与 5 种重金属的总量之间的相关性较弱，存在较小的负相关性；而 Mn、Fe、Zn、Se 元素与 5 种重金属的总量之间存在显著的正相关关系。

表 4 鸡骨草中 13 种金属元素相关性分析结果

Tab 4 Correlation of 13 metal elements in *Abrus cantoniensis* Hance

	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Pb	Cd	As	Hg	Cu	5 种总量
Na	1.000													
Mg	0.504**	1.000												
K	0.395**	0.619**	1.000											
Ca	-0.260*	-0.202	-0.137	1.000										
Mn	0.026	0.510**	0.257*	-0.089	1.000									
Fe	-0.056	0.268*	0.016	-0.129	0.624**	1.000								
Zn	0.327*	0.625**	0.453**	-0.514**	0.508**	0.244	1.000							
Se	0.160	0.426**	0.107	-0.157	0.529**	0.564**	0.380**	1.000						
Pb	-0.273*	-0.040	-0.341**	0.143	0.442**	0.539**	0.071	0.435**	1.000					
Cd	0.098	0.395**	0.012	-0.148	0.538**	0.461**	0.476**	0.569**	0.599**	1.000				
As	0.075	0.243	-0.007	-0.260*	0.553**	0.723**	0.344**	0.559**	0.670**	0.561**	1.000			
Hg	0.351**	0.295*	0.335**	-0.122	0.184	0.251	0.070	0.536**	0.064	0.104	0.362**	1.000		
Cu	-0.078	0.342**	0.054	-0.080	0.560**	0.425**	0.431**	0.675**	0.484**	0.477**	0.361**	0.257*	1.000	
5 种总量	-0.142	0.198	-0.155	-0.095	0.481**	0.507**	0.309*	0.722**	0.718**	0.551**	0.548**	0.307*	0.881**	1.000

注：5 种总量是指 Pb、Cd、As、Hg、Cu 含量的总和；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: The five total amounts refer to the sum of Pb, Cd, As, Hg and Cu contents; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4 讨论与结论

4.1 分析金属元素的选择

《中国药典》2020 年版四部通则中指出重金属及有害元素主要是指 Pb、Hg、Cd、Cu、银 (Ag)、铋 (Bi)、锑 (Ti)、锡 (Sn)、As 等，且对药材及饮片 (植物类) 中重金属及有害元素 (Pb、Cd、As、Hg、Cu) 提出了一致性限量指导值。本研究采用 ICP-MS 法初步测定了鸡骨草中 29 种元素，根据鸡骨草中金属元素含量的特点，并结合鸡骨草的药效及食用用途，在其重金属元素含量的安全风险评估选择了 Pb、Cd、As、Hg、Cu 等元素；61 批鸡骨草样品中人体必需常量元素 K、Ca 含量以及 Na、Mg、Mn、Fe、Zn、Se 等营养元素的含量均较高，且 Na、K 的含量均呈高钾低钠特征。高钾低钠可促使钠盐排泄，调节细胞内钾钠含量的比值，有利于预防中风及高血压^[26]；Mg、K 具有扩张血管等作用、Ca 有止血消肿作用^[6]；Mn 维持人体内脂肪、糖类的正常代谢，具有防癌、抗氧化、抗衰老、预防贫血的功效；Fe 为血红蛋白的主要成分，参与氧的运输和储存，增加对疾病的抵抗力；Zn 有助于生长发育和智力发育；Fe、Mn 在中药四气、五味、归经及功效上都发挥了重要作用；Se 能够增强人体免疫力。故本研究选择上述 13 种

元素进行相应的检测及分析。

4.2 重金属安全风险评估

目前风险评估的方法包括危害指数法、靶器官毒性剂量 (TTD) 法、相对效能因子 (RPF) 法、证据权重 (WOE) 法、生理毒物代谢动力学模型法 (PBTk)^[23]、食品安全指数 (IFS) 法^[27]等，本研究基于鸡骨草的重金属的来源主要是土壤和水源污染，或因施肥不合理造成重金属及有害元素在种植过程中富集，故先采用污染指数法对上述 5 种重金属进行分析，并根据结果进一步采用危害指数法进行安全风险评估，评估方法更科学，被测的鸡骨草样品中有部分重金属的含量相对较大，超出《中国药典》2020 年版四部重金属及有害元素一致性限量指导值范围，但根据评估结果，其重金属健康风险可以被接受，说明健康风险相对不大。

4.3 金属元素的相关性

中药材金属元素存在形态复杂，元素间可形成配位化合物，不同形态及其比例关系与其功效关系密切，既可协同提高药物生理活性，也可产生拮抗作用^[28]，且产生药效或功效的元素与重金属及有害元素间也存在一定的相关性^[29-30]，本研究通过建立 ICP-MS 法同时测定鸡骨草多种元素

的含量,运用 SPSS 26 版统计分析软件对鸡骨草中多种元素的测定结果进行相关性分析,结果表明多种元素间存在显著相关性。药材的金属含量与种植环境、地域、气候,以及不同的种植方式(如化肥或有机肥料、农药的施用)等有密切关系,故各金属元素的含量存在较大差异,元素间的相关性也相应存在差异,本研究运用相关性分析探索鸡骨草中金属元素含量的特点及规律,以期为道地药材的金属元素含量及相关性方面的研究提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 203.
- [2] 自治区中医药局等八部门关于公布“桂十味”道地药材及区域特色药材品种的通知(桂中医药规划发[2021]1号)[EB/OL]. [2021-01-29] (2024-03-25). http://wsjkw.gxzf.gov.cn/xxgk_49493/fdzd/gk/wsjszh/zyzy/t7890419.shtml.
- [3] 陈菊,甄丹丹,甄汉深.壮瑶药鸡骨草近三年研究进展[J].壮瑶药研究, 2023(1): 23-26, 309.
- [4] 李庭树,黄锁义.鸡骨草的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 226-234.
- [5] 覃杏柳.玉林市鸡骨草产业知识产权保护的问题及对策[J].南方农机, 2022, 53(8): 78-81.
- [6] 雷智冬,黄锁义.鸡骨草生物活性成分及其提取方法与产量提升研究进展[J].中华中医药学刊, 2020, 38(10): 210-214.
- [7] 韦小兰,张凤媛,曹科鑫,等.基于广泛靶向代谢组学的鸡骨草和毛鸡骨草藤茎成分差异分析[J/OL].分子植物育种. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220602.1905.020.html>.
- [8] 魏小成,李成义,周瑞娟,等.无机元素与中药关系研究进展[J].中国中医药信息杂志, 2022, 29(7): 140-144.
- [9] Bai RB, Wang YP, Zhang YJ, et al. Analysis and health risk assessment of potentially toxic elements in three codonopsis radix varieties in China [J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200(5): 2475-2485.
- [10] 周德来,马春旭,姚晓玲,等.植物类中药中重金属及有害元素来源及危害的研究进展[J].华西药学杂志, 2023, 38(5): 593-598.
- [11] 石伊凡,方汝波,王未,等.中药重金属元素的安全风险评价及管理策略[J].中国资源综合利用, 2021, 39(11): 65-68, 73.
- [12] 马双成,王莹,魏锋.中药质量控制未来发展方向思考[J].中国药理学杂志, 2021, 56(16): 1273-1281.
- [13] 中国药典 2020 年版.四部[S]. 2020: 522.
- [14] 张众谋,康帅,左甜甜,等.冬虫夏草及其近缘品中铅、镉、砷污染评价及人体健康累积风险评估方法探索[J].中国现代中药, 2024, 26(1): 80-87.
- [15] 万莉,郭娅,向琴,等.夏枯草中 7 种重金属元素的测定及污染等级分析[J].食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3278-3283.
- [16] 左甜甜,王莹,张磊,等.中药中外源性有害残留物安全风险评估技术指导原则[J].药物分析杂志, 2019, 39(10): 1902-1907.
- [17] 王彝白纳,刘爱东,李建文,等.11 省市成年居民中药消费状况调查[J].中国药事, 2017, 31(6): 666-672.
- [18] 左甜甜,申明睿,张磊,等.中药中重金属及有害元素限量标准的制定及有关问题的思考[J].药物分析杂志, 2023, 43(4): 701-711.
- [19] 潘兰,贾新岳,石明辉,等.6 种药材中 5 种重金属转移率的测定[J].中成药, 2017, 39(6): 1315-1317.
- [20] Zuo TT, Qu HR, Jin HY, et al. Innovative health risk assessments of heavy metals based on bioaccessibility due to the consumption of traditional animal medicines [J]. Environ Sci Pollut R, 2020, 27(18): 22593-22603.
- [21] Sanders, Alison P, Claus Henn, et al. Perinatal and childhood exposure to cadmium, manganese, and metal mixtures and effects on cognition and behavior: a review of recent literature [J]. Cur Env Health Rep, 2015, 2(3): 284-294.
- [22] Khan S, Cao Q, Zheng YM, et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China [J]. Env Pollu, 2008, 152(3): 686-692.
- [23] 周广涛,黄蒙蒙,栾永福,等.人参健脾丸中重金属及有害元素的测定、风险评估及最大限量理论值研究[J].中草药, 2023, 54(16): 5225-5232.
- [24] 左甜甜,申明睿,金红宇,等.累积风险评估方法在 5 种植物类中药材中铅和镉联合暴露评估中的应用[J].中国药事, 2020, 34(9): 1020-1027.
- [25] 王子怡,孙开奇,吴国华,等.木耳中 14 种金属元素含量的测定及相关分析[J].职业与健康, 2023, 39(23): 3212-3215.
- [26] 黄彬彬,陈明,施雪敏,等.ICP-MS 结合化学计量法分析牛大力中金属元素含量及健康风险评估[J].中药材, 2022, 45(5): 1168-1172.
- [27] 费毅琴,肖凌,汪波,等.37 种植物类药材中重金属和有害元素残留分析及风险评估[J].药物分析杂志, 2021, 41(6): 1000-1008.
- [28] 马永青,陈佩强,耿韞,等.山药、大枣和三七中 11 种微量元素的含量及健康风险[J].沈阳药科大学学报, 2023, 40(2): 151-157.
- [29] 马杰,丁野,方磊,等.电感耦合等离子体发射光谱法测定土牛膝中 13 种微量元素及相关性分析[J].中国药业, 2020, 29(17): 71-73.
- [30] 白雯静,姬良亮,王月玲.甘草、黄芪、党参中 27 种重金属及微量元素含量变化的研究[J].食品安全质量检测学报, 2021, 12(4): 1448-1455.

(收稿日期: 2024-05-15; 修回日期: 2024-08-20)

不同产地少花龙葵 HPLC 指纹图谱的建立及其不同药用部位 3 种生物碱含量的测定

辛灵怡^{1,2}, 杨洋³, 梅全喜¹, 陈琴华³, 杨光义^{2*} (1.广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518104; 2.深圳市中西医结合医院药剂科, 广东 深圳 518104; 3.深圳市宝安纯中医治疗医院中药临床药学重点实验室, 广东 深圳 518104)

摘要: 目的 建立不同产地少花龙葵 HPLC 指纹图谱, 并比较其澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的含量及不同药用部位(果、茎、叶)之间生物碱的含量差异。方法 采用 XBridge C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 柱温为 (25±1) °C, 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 205 nm, 分析 6 个产地各 3 批次少花龙葵的 HPLC 图谱, 运用中药色谱指纹图谱相似度软件评价, 建立不同产地不同批次少花龙葵特征性成分的 HPLC 指纹图谱; 并对不同产地不同药用部位(果、茎、叶)进行含量测定。结果 建立了 18 批次少花龙葵的指纹图谱, 共标定了 15 个共有峰, 并确定 2 号峰为绿原酸, 6 号峰为木犀草苷, 9 号峰为澳洲茄碱, 10 号峰为澳洲茄边碱, 11 号峰为澳洲茄胺; 建立了少花龙葵中 3 种生物碱的 HPLC 含量测定方法, 结果 6 个产地中少花龙葵生物碱含量最高的为越南地区, 平均值为 4666.39 μg·g⁻¹; 少花龙葵果实、叶、茎中生物碱含量平均值分别为 3472.58、1990.67、856.79 μg·g⁻¹。结论 HPLC 指纹图谱可用于少花龙葵质量控制; 不同产地不同药用部位少花龙葵生物碱含量有所不同, 越南太平省地区的生物碱含量较高; 果实中的生物碱成分较丰富, 叶次之, 茎中的生物碱成分相对较少。

关键词: 少花龙葵; 指纹图谱; 质量评价; 生物碱; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0222-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.033

HPLC fingerprints and content determination of three alkaloids in different medicinal parts of *Solanum americanum* Mill. from different origins

XIN Ling-yi^{1,2}, YANG Yang³, MEI Quan-xi¹, CHEN Qin-hua³, YANG Guang-yi^{2*} (1. The Seventh Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Hospital of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518104; 2. Department of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518104; 3. Key Laboratory of TCM Clinical Pharmacy, Shenzhen Bao'an Authentic TCM Therapy Hospital, Shenzhen Guangdong 518104)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprints and determine the content of solasonine, solamargine, and solasodine in *Solanum americanum* Mill. from different origins; and compare the alkaloid content in different medicinal parts (fruits, stems and leaves). **Methods** The HPLC of 18 batches of *Solanum americanum* Mill. from different origins were analyzed on an XBridge C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.2% aqueous phosphoric acid was used as the mobile phase with a gradient elution at a flow rate of 1 mL·min⁻¹ and a detection wavelength of 205 nm. The HPLC profiles of the 18 batches of *Solanum americanum* Mill. from 6 origins were analyzed, and the similarity was compared. The content of alkaloids in different medicinal parts (fruits, stems and leaves) of different

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82272960); 深圳市科技创新委员基础研究面上项目 (No. JCYJ20210324142012033); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (No. SZZYSM202106004); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (No. SZZYSM202106009); 基于微流控技术对肝癌外泌体脂质解析及其应用 (No. BAYXH2024038)。

作者简介: 辛灵怡, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析及中药质量控制研究, email: xly13314366953@163.com *通信作者: 杨光义, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药质量控制与药代动力学研究, email: 13971908298@163.com

origins were determined. **Results** Totally 15 common peaks were calibrated through the fingerprints: peak 2 was identified as chlorogenic acid, peak 6 as lignoceroside, peak 9 as solasonine, peak 10 as solamargine and peak 11 as solasodine. Fingerprints of the 18 batches of *Solanum americanum* Mill. were established by HPLC. *Solanum americanum* Mill. from Vietnam region had the highest alkaloid content, with a mean value of $4666.39 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; alkaloid content of the fruits, leaves, and stems of *Solanum americanum* Mill. was 3472.58 , 1990.67 and $856.79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The HPLC fingerprints of *Solanum americanum* Mill. from different origins help control its quality control; the alkaloid content varies in different parts and origins, with higher alkaloid content in Taiping area, Vietnam; alkaloid content is high in the fruits, followed by the leaves, and the stems.

Key words: *Solanum americanum* Mill.; fingerprint; quality evaluation; alkaloid; content determination

少花龙葵别名七粒扣、五地茄、五宅草、衣纽扣等，为茄科（Solanaceae）茄属植物少花龙葵 *Solanum americanum* Mill. 的干燥全草^[1]；主要分布在我国福建、广西，以及越南等地。全草可入药，其味微苦，性寒，归肝、肾经，有清热解毒、利湿消肿等功效。少花龙葵始载于《药性论》，曾被《中国药典》1977 年版收载，现载入《广东中药志》《广东地产药材研究》等本草学著作中。生物碱类成分为其主要药效成分。少花龙葵的同源植物龙葵 *Solanum nigrum* Linn. 中的生物碱成分澳洲茄碱、澳洲茄边碱及澳洲茄胺已被证实具有良好的抗肿瘤效果^[2-4]。关于龙葵的活性成分分析目前已有相关的研究^[5-7]，但有关少花龙葵植物不同产地指纹图谱尚未见报道，且不同药用部位中的澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺生物碱成分比较亦未见报道。本研究拟采用 HPLC 建立不同产地少花龙葵指纹图谱，并测定不同产地及不同药用部位澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的含量，为科学使用少花龙葵的不同药用部位提供可靠依据，也为少花龙葵的进一步开发和研究奠定基础^[8-11]。

1 材料

1.1 药材

课题组采集了 6 个产地，每个产地选取 3 个不同药材基地共 18 个批次的少花龙葵。经深圳市中西医结合医院杨光义教授鉴定为茄科植物少花龙葵 *Solanum americanum* Mill. 的干燥全草。各批次药材来源信息见表 1（6 个产地分别用字母 A ~ F 表示）。

1.2 试药

澳洲茄碱（批号：D03GB169981，纯度 $\geq 98\%$ ）、澳洲茄胺（批号：J29GB156317，纯度 $\geq 98\%$ ）（上海源叶生物科技有限公司）；澳洲茄边碱（批号：MUST-22103022，纯度 $\geq 98\%$ ）、绿原酸（批号：MUST-22111711，纯度 $\geq 98\%$ ）、木犀草苷（批号：

MUST-22082211，纯度 $\geq 98\%$ ）（成都曼思特生物科技有限公司）；甲醇和乙腈均为色谱纯，磷酸等其他试剂为分析纯。

1.3 仪器

十万分之一电子分析天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；Sartorius 纯水机 [赛多利斯（上海）贸易有限公司]；Waters e2695-UV [沃特世科技（上海）有限公司]；DA 型数控超声波清洗器（东莞市科桥超声波设备有限公司）；DP-01 无油真空泵（上海安达尔实业有限公司）。

2 方法与结果

2.1 少花龙葵 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称定澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺、绿原酸、木犀草苷对照品适量，分别置于 5 个 10 mL 的量瓶中，以甲醇溶解并定容配制成单一对照品储备液。再精密量取各单一对照品储备液 1 mL 置于 10 mL 的量瓶中，用甲醇定容，制成分别含澳洲茄碱 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、澳洲茄边碱 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、澳洲茄胺 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取不同批次的少花龙葵各 10 g，粉碎，过 2 号筛，精密称取药材粉末各 3 g，分别置于塞具锥形瓶中，加入 70% 乙醇 30 mL，称定重量，超声 30 min，放置室温，用 70% 乙醇补足减失重量， $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液， $0.22 \mu\text{m}$ 有机微孔滤膜滤过，即得供试品溶液^[12-13]。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 XBridge C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)，流动相为 0.2% 磷酸 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 50 min, 95% \rightarrow 67%A; 50 ~ 65 min, 67% \rightarrow 35%A; 65 ~ 75 min, 35% \rightarrow 20%A)，流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，检测波长 205 nm，进样量 10 μL ，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 18 个批次少花龙葵药材来源信息

Tab 1 Origin of 18 batches of *Solanum americanum* Mill.

产地 (编号)	批号	购自
云南昆明市官渡区 (A)	S1	大板桥镇
	S2	小板桥镇
	S3	官渡镇
广西金秀瑶族自治县 (B)	S4	三角乡
	S5	金秀镇
	S6	长桐乡
越南太平省 (C)	S7	农户 1
	S8	农户 2
	S9	农户 3
云南省禄劝彝族苗族自治县 (D)	S10	屏山镇
	S11	翠华镇
	S12	九龙镇
云南省楚雄彝族自治州 (E)	S13	鹿城镇
	S14	吕合镇
	S15	东瓜镇
云南省昭通市 (F)	S16	永丰镇
	S17	五德镇
	S18	鲁甸县

2.1.4 精密度试验 取 S1 样品适量, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 将色谱图导入“中药色谱指纹图

谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.995, 计算得 15 个共有峰相对保留时间 $RSD \leq 1.0\%$, 峰面积 $\leq 5.0\%$, 符合指纹图谱的要求。

2.1.5 稳定性试验 取 S1 样品适量, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24 h, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 将所得数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.996, 计算得 15 个共有峰相对保留时间 $RSD \leq 1.0\%$, 峰面积 $RSD \leq 5.0\%$, 符合指纹图谱的要求。

2.1.6 重复性试验 取 S1 样品适量, 按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 将所得数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 得到各图谱的相似度均大于 0.993, 计算得 15 个共有峰相对保留时间 $RSD \leq 1.0\%$, 峰面积 $RSD \leq 5.0\%$, 符合指纹图谱的要求。

2.1.7 专属性试验 精密吸取按“2.1”项下所制备的供试品溶液、混合对照品溶液、空白溶液 (甲醇), 按“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 各成分分离度良好, 空白溶液对待测成分无明显干扰, 表明方法专属性较好 (见图 1)。

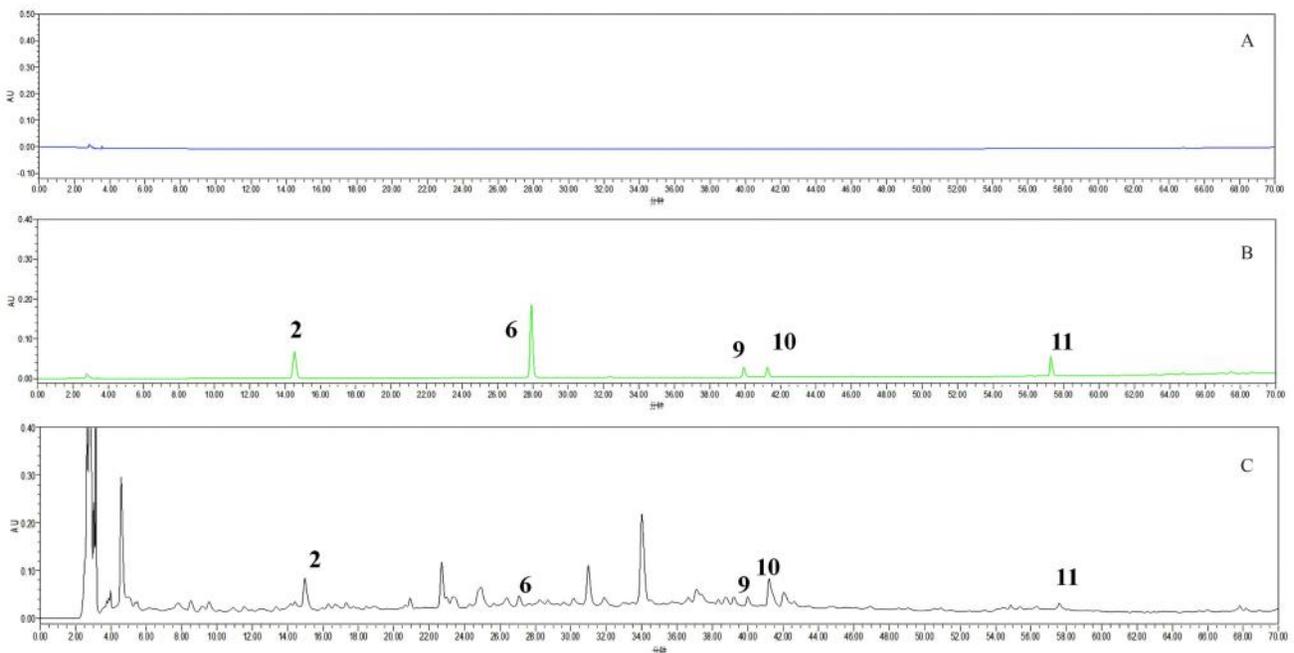


图 1 少花龙葵空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B)、供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of blank solution (A), mixed reference substance (B) and sample (C) of *Solanum americanum* Mill.

2. 绿原酸 (chlorogenic acid); 6. 木犀草苷 (lignoceroside); 9. 澳洲茄碱 (solasosine); 10. 澳洲茄边碱 (solanargine); 11. 澳洲茄胺 (solasodine)

2.1.8 耐用性考察 考察不同色谱柱 [Waters XBridge C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)], 不同流速 (0.9、1 mL·min⁻¹) 以及不同波长 (200、205 nm) 对检测结

果的影响, 结果指纹图谱相似度均 ≥ 0.976 , 说明色谱柱、流速以及检测波长对其检测无显著影响, 表明测定条件的微小变动对测定结果影响较小。

2.1.9 指纹图谱的建立及相似度评价 将 18 个批次

少花龙葵样品 AIA 格式的数据文件导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件,以 S1 作为参照图谱,观察到 1 号峰分离度较好,基线较平,因此选择 1 号峰作为参照峰 S,多点校正生成对照图谱 (R)(见图 2),计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱的相似度,结果 18 个批次样品相似度在 0.901 ~ 0.993 (见表 2),表明这 18 批次样品质量稳定,差异较小,来源于同一品种。

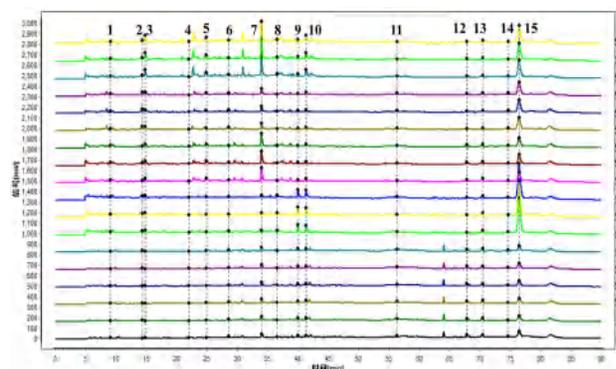


图 2 18 批少花龙葵的标准指纹图谱
Fig 2 Standardized fingerprints of 18 batches of *Solanum americanum* Mill.

特征峰的指认,使用 Mark 峰比对,经过相似度软件分析出 18 个批次少花龙葵药材具有 15 个共有峰。将各峰依次编号为 1 ~ 15,保留时间依次为

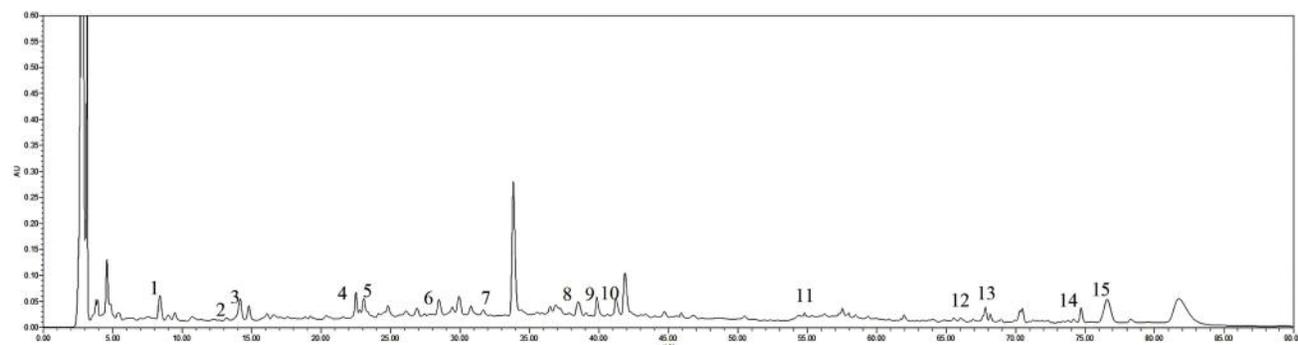


图 3 少花龙葵特征峰的指认
Fig 3 Identification of the characteristic peaks of the *Solanum americanum* Mill.

2. 绿原酸 (chlorogenic acid); 6. 木犀草苷 (lignoceroside); 9. 澳洲茄碱 (solasonine); 10. 澳洲茄边碱 (solamargine); 11. 澳洲茄胺 (solasodine)

2.2 不同产地不同药用部位少花龙葵 3 种生物碱含量测定

2.2.1 混合对照品溶液的制备

量取“2.1.1”项方法混合对照品溶液,加甲醇溶液稀释分别制成含 10、25、50、100、300、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺的混合对照品溶液,储备待用。

2.2.2 线性关系的考察

精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液适量,分别置于进样小瓶中,以进样质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y)

8.719、14.653、14.933、22.268、24.858、28.779、33.989、36.062、39.876、41.206、56.283、67.823、70.507、74.765、76.735 min。检测的少花龙葵共有峰面积占总峰面积的 90% 以上,非共有峰峰面积小于总峰面积的 10%,符合指纹图谱规定,见表 2。通过混合对照品的图谱与共有模式图谱进行比较,根据保留时间指认出共有模式图谱中的 5 个色谱峰: 2 号峰为绿原酸,6 号峰为木犀草苷,9 号峰为澳洲茄碱,10 号峰为澳洲茄边碱,11 号峰为澳洲茄胺,见图 3。

表 2 6 个产地 18 批少花龙葵样品相似度评价结果
Tab 2 Similarity of 18 batches of *Solanum americanum* Mill. from 6 origins

批号	相似度	非共有峰占比 /%	批号	相似度	非共有峰占比 /%
S1	0.975	8.55	S10	0.901	4.32
S2	0.971	8.62	S11	0.906	3.96
S3	0.969	8.70	S12	0.937	3.95
S4	0.978	9.69	S13	0.979	1.31
S5	0.973	8.56	S14	0.991	1.34
S6	0.968	8.66	S15	0.993	1.34
S7	0.948	0.51	S16	0.957	2.15
S8	0.948	0.57	S17	0.937	1.94
S9	0.946	1.97	S18	0.964	0.40

进行线性回归,得到回归方程及线性范围见表 3。

表 3 少花龙葵中 3 种生物碱的标准曲线和线性范围
Tab 3 Standard curves and linear ranges of 3 alkaloids in *Solanum americanum* Mill.

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	R^2
澳洲茄碱	$y = 903.51x + 4554.6$	10 ~ 1000	0.9992
澳洲茄边碱	$y = 963.94x - 847.95$	10 ~ 1000	0.9996
澳洲茄胺	$y = 1799.9x - 2271.8$	10 ~ 1000	0.9998

2.2.3 精密度考察

取同一混合对照品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色

谱图。结果显示, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的峰面积的 *RSD* 分别为 2.8%、1.5%、1.3%, 提示仪器精密度较好。

2.2.4 稳定性考察 按“2.1.2”项下方法制得的 S1 供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果显示, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺含量的 *RSD* 分别为 0.25%、0.11%、0.60%, 提示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性考察 按照“2.1.2”项下方法制备 6 份少花龙葵供试品溶液, 按照“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 计算样品中 3 种生物碱成分含量, 结果显示, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺含量的 *RSD* 分别为 0.85%、1.1%、0.77%, 提示该方法重复性良好。

2.2.6 准确度考察 取已知含量的少花龙葵供试品溶液 9 份, 按照供试品中各成分含量约 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1 设置低、中、高浓度分别加入澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率。结果显示, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺的平均加样回收率范围均在 87.09% ~ 109.79%, *RSD* 在 0.34% ~ 5.8%, 提示该方法的准确度良好。

2.2.7 耐用性考察 取少花龙葵粉末按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别在不同品牌的色谱柱 [Waters XBridge C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)], 不同流速 (0.8、1 mL · min⁻¹), 不同检测波长 (200、205 nm) 条件下, 进样测定, 记录峰面积。结果显示, 不同品牌的色谱柱、流速以及波长等微小的变动不会对这 3 种生物碱成分的含量测定结果产生显著的影响, 表明该方法耐用性良好。

2.2.8 含量测定 把 6 个产地各 3 个批次的药材分别混合, 同时将其果、茎、叶 3 个不同药用部位的药材分别混合均匀, 按照“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液, 按照“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 按照外标法计算 6 个产地及其果、茎、叶 3 个不同药用部位 3 种生物碱成分的含量。

由结果表 4 可知, 6 个产地 3 种生物碱的含量有所差异, 越南太平省的少花龙葵澳洲茄碱含量最高, 云南省楚雄彝族自治州的含量最低; 越南太平省产的少花龙葵澳洲茄边碱的含量最高, 广西金秀瑶族自治县的含量最低; 越南太平省所产的少花龙葵澳洲茄胺的含量最高, 广西金秀瑶族自治县所产的含量最低。整体而言, 少花龙葵的澳洲茄碱含量

较多。但由表 5 可知, 不同产地来源的不同药用部位的生物碱含量各有差异, 澳洲茄碱在少花龙葵的不同部位中均有较高含量, 其次为澳洲茄边碱含量较多, 澳洲茄胺在不同部位中含量较少。

表 4 6 个产地少花龙葵样品中 3 种生物碱成分含量测定结果

Tab 4 Content of 3 alkaloids in *Solanum americanum* Mill. from different origins

产地编号	澳洲茄碱 / (μg · g ⁻¹)	澳洲茄边碱 / (μg · g ⁻¹)	澳洲茄胺 / (μg · g ⁻¹)
A	2818.92	3252.54	438.49
B	2063.77	1922.64	115.34
C	6574.40	6199.46	1225.31
D	1882.33	4672.52	1206.25
E	1876.95	2860.89	188.16
F	5143.26	3333.26	809.83

表 5 不同产地不同药用部位 3 种生物碱的含量测定结果

Tab 5 Content of 3 alkaloids in different parts of *Solanum americanum* Mill. from different origins

产地编号	部位	生物碱含量 / (μg · g ⁻¹)		
		澳洲茄碱	澳洲茄边碱	澳洲茄胺
A	果	9571.93	628.2	407.65
	茎	626.1	0	0
	叶	2774.1	542.7	2476.52
B	果	8802.09	310.2	0
	茎	0	101.57	1050
	叶	819.09	441.59	330
C	果	6426	9973.06	131.13
	茎	1471.8	1401	540
	叶	5487.9	0	723.9
D	果	8021.85	363.3	833.48
	茎	355.5	2976	468.87
	叶	0	635.4	701.1
E	果	9995.42	318.6	536.89
	茎	1078.8	1018.2	0
	叶	2600.1	792.6	0
F	果	4827.6	992.4	366.6
	茎	1579.8	2425.5	329.1
	叶	8672.4	1467	7367.7

3 讨论

3.1 检测波长的选择

根据文献调研表明, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱等生物碱检测波长主要是 203 nm, 因此本研究选择了 200、205、210 nm 波长进行考察, 发现此类生物碱有末端吸收现象, 而且波长越大, 基线噪声越高, 而 200、205 nm 两个波长之间无明显差别。因此结合文献, 本研究选择了 205 nm 作为最终检测波长。

3.1 供试品溶液的提取

分别对提取溶媒如乙醇、甲醇及不同比例的乙醇-水,使用加热回流、超声等提取方式,提取时间(10、20、30 min)几个方面进行考察,最终根据峰的数量、响应、是否操作简便等选择了70%乙醇水超声30 min对供试品溶液进行提取。

4 结语

本研究在建立少花龙葵的指纹图谱同时,利用HPLC技术建立了其3个指标性成分澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的含量测定方法。结果6个产地中3种生物碱含量高低不一致,证实不同地区、不同气候环境,对少花龙葵体内生物碱含量的积累影响较大。药效和药材成分含量息息相关,在不同药用部位的含量测定中,少花龙葵果实中澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的含量相对较高,叶和茎相对较少,预示使用果实入药药效会更好。但在一些地区产的少花龙葵部分药用部位中并未检测到澳洲茄边碱或者澳洲茄胺成分,原因分析有可能为采收时间不同,加上龙葵有效成分一般积累在果实中,茎中有效成分含量较低,在液相色谱中未能有效检测出,建议使用液质联用技术或者更精密的仪器对其进行含量测定。另外,有研究表明龙葵果具有抗氧化能力及抗炎活性^[14-15],提示少花龙葵亦可以开发为天然抗氧化剂和抗炎剂。

本研究建立了少花龙葵HPLC指纹图谱及其有效成分澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺的定量分析方法,该方法稳定可行、结果可靠,适用于少花龙葵的质量评价和控制,可为少花龙葵真伪鉴别提供参考。

参考文献

[1] 严仲铠. 中华食疗本草[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018: 276.

- [2] Luyen BTT, Trang BTT. New solasodine-type glycoalkaloids isolated from *Solanum nigrum* and their cytotoxic activity[J]. *Chem Biodivers*, 2024, 21(7): e202400872.
- [3] Chen J, Ma D, Zeng CC, et al. Solasodine suppress MCF7 breast cancer stem-like cells via targeting Hedgehog/Gli1[J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154448.
- [4] 陈雷, 彭骁, 胡兵. 龙葵抗肿瘤成分及其作用机制研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(2): 101-104.
- [5] 王强, 徐建, 王宏伟. 反相高效液相色谱法测定龙葵果中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量[J]. *长春师范大学学报*, 2020, 39(12): 100-102.
- [6] 张帆, 董鹏鹏, 梅全喜. 不同产地的龙葵果中澳洲茄碱、澳洲茄边碱的含量测定比较研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(12): 2986-2987.
- [7] 张为, 田娜娜, 屈文燕, 等. 龙葵TLC鉴别与HPLC指纹图谱建立[J]. *中成药*, 2017, 39(11): 2421-2424.
- [8] 李本淳, 程焱, 王婧姝. HPLC法测定龙葵果中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量[J]. *中国药物评价*, 2017, 34(5): 355-357.
- [9] 董鹏鹏, 梅全喜, 张帆. 龙葵果HPLC指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2016, 39(6): 1333-1336.
- [10] 周吉芳, 黄越燕. 龙葵生物碱提取及检测方法研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(4): 133-136.
- [11] 徐建东, 沈敏, 李莹, 等. HPLC法测定龙葵银屑片中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量[J]. *中国药房*, 2013, 24(23): 2167-2169.
- [12] 韩子璇, 刘梦, 杨立茹, 等. 蒙药角茴香配方颗粒指纹图谱及含量测定研究[J]. *中南药学*, 2024, 22(2): 291-295.
- [13] 周海琴, 何雨晴, 陈盛君. 基于UPLC指纹图谱和多指标成分定量的野生与栽培贯叶金丝桃的质量评价[J]. *中南药学*, 2023, 21(12): 3274-3280.
- [14] 单会娇, 王冰, 张建逵, 等. 龙葵中澳洲茄碱含量的动态规律[J]. *中国现代中药*, 2015, 17(9): 931-933.
- [15] 郭瑞, 李垚, 王萍. 三种龙葵果提取物的体外抗氧化及抗炎活性评价[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 94-101.

(收稿日期: 2024-06-14; 修回日期: 2024-08-21)

电感耦合等离子体质谱法测定重酒石酸去甲肾上腺素注射液包材相容性中 23 种元素杂质

宋金红^{1,2}, 苏庆斌^{1,2}, 孙国祥^{1*} (1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 北京元延医药科技股份有限公司, 北京 101102)

摘要: 目的 基于电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 技术, 建立重酒石酸去甲肾上腺素注射液包材相容性中 23 种元素杂质分析方法。方法 样品采用一步酸稀释法, 用 10% (V/V) 硝酸水溶液直接溶解, 通过加入内标元素锗、钇、铋、碲来监控和校正分析信号的短期和长期漂移。结果 空白溶液中元素的测得值均小于定量限的 1/3; 各元素在 0.05 ~ 900 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r \geq 0.999$); 各待测元素在不同加标水平的回收率均在 91.50% ~ 107.69%, RSD 均在 0.39% ~ 4.6% ($n = 3$); 6 份重复性溶液中元素测定结果的 RSD 值为 0.38% ~ 2.6%; 12 份溶液中元素测定结果的 RSD 值为 0.38% ~ 4.0%; 各元素对照品溶液在室温 22 h 内稳定, RSD 值在 0.84% ~ 4.9%。结论 该方法操作简单、便捷、重现性良好、准确度较高, 能有效检测出包材相容性中各元素杂质的含量, 确保使用安全性。

关键词: 注射液; 包材相容性; 方法学验证; 元素杂质; 电感耦合等离子体质谱法

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0228-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.034

Determination of the packaging compatibility of 23 elemental impurities in norepinephrine bitartrate injection by ICP-MS

SONG Jin-hong^{1,2}, SU Qing-bin^{1,2}, SUN Guo-xiang^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Beijing Yuanyan Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 101102)

Abstract: Objective To determine the compatibility of 23 elemental impurities in packaging materials for norepinephrine bitartrate injection, base on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) technology. **Methods** The sample was diluted with one-step acid dilution method and dissolved directly in a 10% nitric acid aqueous solution. The short-term and long-term drift of the analysis signals was monitored and corrected by adding the internal standard elements germanium (Ge), yttrium (Y), bismuth (Bi), and tellurium (Te). **Results** The measured values of the elements in the blank solution were all less than one-third of the quantitative limit, the linear relationship of each element was good at 0.05 ~ 900 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r \geq 0.999$). The recovery rates of each tested element at different spiked levels ranged 91.50% ~ 107.69%, with relative standard deviations of 0.39% ~ 4.6% ($n = 3$). The relative standard deviation of element determination in 6 repeated solutions was 0.38% ~ 2.6%. The relative standard deviation was values of element determination in 12 solutions was 0.38% ~ 4.0%. The reference solutions of each element were stable at room temperature for 22 hours, with relative standard deviation at 0.84% ~ 4.9%. **Conclusion** This method is easy to operate, convenient, and has good reproducibility. It has high measurement accuracy and can effectively detect the content of impurities in various elements in the compatibility of packaging materials.

Key words: injection; compatibility of packaging material; methodological verification; elemental impurity; inductively coupled plasma mass spectrometry

作者简介: 宋金红, 女, 主要从事药物分析工作, email: songjinhongmsy@126.com *通信作者: 孙国祥, 男, 教授, 主要从事分析化学教学和药物分析科研工作, email: gxswmwys@163.com

重酒石酸去甲肾上腺素注射液是由重酒石酸去甲肾上腺素、焦亚硫酸钠、氯化钠(供注射用)及注射用水组成的注射液,临床每日最大剂量为 68 mg^[1],注射剂给药后因直接接触人体组织或进入血液系统,被认为是安全风险程度较高的品种^[2],其各元素含量需要严格控制。

电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)属于痕量分析法,具有线性范围宽,灵敏度、准确度高特点,目前已广泛应用于药品行业中元素杂质测定^[3-7]。国家药品监督管理局(NMPA)发布的《化学药品注射剂仿制药一致性评价技术要求》规定,注射剂玻璃包装不建议使用低硼硅玻璃和钠钙玻璃^[8]。本品包装材料分别为中硼硅玻璃管制注射剂瓶、注射液用覆聚四氟乙烯/六氟丙烯的共聚物膜氯化丁基橡胶塞、抗菌药物瓶用铝塑组合盖,对该剂型由包材系统引入至引发安全性风险的浸出物也应进行重点关注。

本研究基于对药液和用药安全的考虑,对重酒石酸去甲肾上腺素注射液及包材中的元素杂质进行研究,中硼硅玻璃中通常含有硅(Si)、硼(B)、铝(Al)、钛(Ti)、铁(Fe)、钴(Co)、锌(Zn)、钡(Ba)等元素。重酒石酸去甲肾上腺素注射液为偏酸性药物(pH值为3.0~4.5),元素杂质在酸性条件下浸出物风险较高,因此灌装后及存储过程中有害元素杂质可能会迁移至药液中,影响药品的安全性^[9-11]。参考《化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究指导原则(试行)》^[12]《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则》^[12]及《ICH Q3D 元素杂质指导原则》^[13]相关要求,经过严格的方法学验证,确立了能够同时检测重酒石酸去甲肾上腺素注射液及包材相容性中元素杂质的方法,拟采用 ICP-MS 法对重酒石酸去甲肾上腺素注射液中 4 种 1 类元素镉(Cd)、铅(Pb)、砷(As)、汞(Hg), 3 种 2A 类元素钒(V)、Co、镍(Ni), 6 种 3 类元素锂(Li)、铬(Cr)、铜(Cu)、钼(Mo)、锑(Sb)、Ba 及 10 种其他元素 B、Al、Si、Ti、锰(Mn)、铁(Fe)、锌(Zn)、锆(Zr)、钨(W)、铂(Pt)共 23 种元素杂质进行研究,考察该注射液与包材系统的相容性,旨在为产品质量控制和包材系统相容性提供参考。

1 材料

1.1 仪器

NexION 1000G 电感耦合等离子体质谱仪(珀金埃尔默仪器有限公司); 7900 电感耦合等离子体质谱仪(安捷伦科技有限公司); Molcell-40D 超纯水

仪(重庆摩尔水处理设备有限公司); SHH-250SD 型药物稳定试验箱(重庆市永生实验仪器厂)。

1.2 试药

重酒石酸去甲肾上腺素注射液(规格: 4 mL/8 mg, 北京元延医药科技股份有限公司, 批号: 202501、200502、200601), 参比制剂(Hospira S.P.A., 规格: 4 mL/8 mg, 批号: 880603A)。

超纯水(自制); 硝酸(质量浓度为 67%~70%, CNW 公司, 批号: G5490507)。

23 种(Hg、Co、V、Pb、As、Cd、Ni、Sb、Mn、Ba、Cu、Cr、Li、Fe、Zn、Si、Pt、B、Al、Mo、W、Ti、Cr) 单元素标准溶液(质量浓度均为 1000 mg·L⁻¹, 国家有色金属及电子材料分析测试中心, 批号分别为 19B019-3、203066-1、19B031-3、199017-7、19C028-1、203006-3、202018-4、202019-4、207019-4、208001-1、202005-8、208022、205027-1、207037-7、20A033-2、208006、199002、206015-2、20A041-1、208015-1、197003、208007、207008); 金(Au)、锗(Ge)、钇(Y)、铋(Bi)、碲(Te) 单元素标准溶液(质量浓度均为 1000 mg·L⁻¹, 国家有色金属及电子材料分析测试中心, 批号分别为 20910-1、20B002、202001、19C031-1、209024)。

2 方法与结果

2.1 待评估元素

根据 ICH Q3D 指导原则规定测定元素杂质, 根据“元素杂质分类”“元素杂质的风险评估和控制”项下“风险评估建议”考虑的元素杂质要求, 非肠道途径给药的制剂必须考察 10 种元素, 分别为 Cd、Hg、Pb、As、Co、V、Ni、Li、Sb、Cu。参考《化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究指导原则(试行)》《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则》, 产品包材和生产过程中接触的工艺组件中, 可能引入的元素有 B、Al、Si、Ti、Cr、Mn、Fe、Zn、Zr、Mo、Ba、W、Pt。重酒石酸去甲肾上腺素注射液每日临床最大用量为 17 瓶, 相当于含去甲肾上腺素 68 mg, 分析评价限值=每日允许暴露量(PDE)÷每日最大用药量, 计算 23 种元素杂质的限值, 详见表 1。

2.2 试验条件

射频功率 1550 W; 载气为氩气, 流量 1.0 L·min⁻¹; 碰撞气为氦气, 流量为 4.0 L·min⁻¹; 等离子气流量为 10 L·min⁻¹; Rpa 为 0 V; Rpq 为 0.25 V; 测量模式为 KED; 数据采集模式为跳峰模式; 内标溶液为单管加入; 重复测定 3 次。

2.3 内标元素的优化选择

ICP-MS 干扰包括质谱干扰及非质谱干扰, 非质谱干扰主要源于样品基质, 一步酸稀释法能减少杂质的引入, 仪器长时间运行, 基线漂移会不断增大, 需要选择内标法加以校正。由于 23 种元素质量数跨度较大, 选择在样品中含量较低, 不受同量异位素重叠或多原子干扰, 且不干扰目标元素的 ^{73}Li 、 ^{89}Y 、 ^{209}Bi 、 ^{127}I 为内标元素, 其中 ^7Li 、 ^{11}B 、 ^{27}Al 、 ^{29}Si 、 ^{47}Ti 、 ^{51}V 、 ^{53}Cr 、 ^{55}Mn 、 ^{57}Fe 、 ^{59}Co 、 ^{60}Ni 、 ^{63}Cu 、 ^{66}Zn 以 ^{72}Ge 为内标; ^{75}As 以 ^{128}Te 为内标; ^{91}Cr 、 ^{95}Mo 、 ^{111}Cd 、 ^{121}Sb 、 ^{137}Ba 以 ^{89}Y 为内标; ^{182}W 、 ^{195}Pt 、 ^{202}Hg 、 ^{207}Pb 以 ^{209}Bi 为内标。通过标准曲线法验证内标的响应值。结果显示, 内标元素响应值的 *RSD* 值 ($n = 10$) 小于 5.0%, 说明内标法能消除干扰, 对目标元素的测定结果进行校正。

2.4 稀释剂浓度的选择

硝酸和盐酸常作为 ICP-MS 分析的浸取液, 本品选择的内标物含有 Ge、Te, 均容易与盐酸生成氯化物, 在高温下易挥发, 导致测定值偏低。所以浸取液选择硝酸, 分别考察 3%、5%、10% 硝酸溶液作为稀释剂, 按照标准曲线溶液配制方法, 配制 100% 浓度溶液, 连续测定 3 次, 计算回收率, 结果显示, 稀释剂中含硝酸浓度越高, 回收效果越好, 10% 硝酸溶液作为稀释剂时, 各元素的测定结果均在 94.9% ~ 105.7% (见图 1), 满足测定要求。

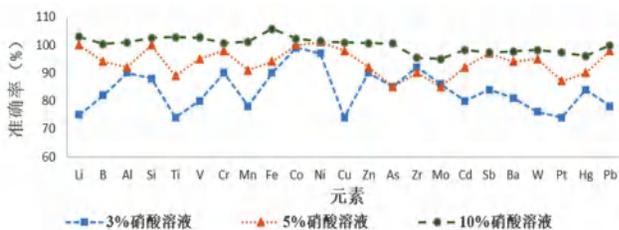


图 1 不同浓度稀释剂的考察

Fig 1 Diluents with different concentrations

2.5 溶液的制备

2.5.1 稀释剂 量取纯化水 900 mL 于聚丙烯塑料试剂瓶中, 向该试剂瓶中缓慢加入硝酸 100 mL, 摇匀, 即得 10% 硝酸溶液。

2.5.2 元素混标溶液的制备 分别取元素杂质标准液适量, 精密量取, 置同一个量瓶中, 加稀释剂稀释至每 1 mL 约含 Li 12.5 μg 、B 75 μg 、Si 75 μg 、Ti 75 μg 、V 0.5 μg 、Cr 55 μg 、Mn 75 μg 、Fe 65 μg 、Co 0.25 μg 、Ni 10 μg 、Cu 15 μg 、Zn 65 μg 、As 0.75 μg 、Zr 75 μg 、Mo 75 μg 、Cd 0.1 μg 、Ti 4.5 μg 、Ba 35 μg 、W 7.5 μg 、Pt 0.5 μg 、Hg 0.15 μg 、Pb 0.25 μg 、Al 12.5 μg 的混标溶液。

2.5.3 元素内标溶液的制备 分别取 Au、Ge、Y、Bi、Te 元素标准液适量, 精密量取, 置同一个量瓶中, 加稀释剂稀释制成每 1 mL 各约含 Au 100 μg 、Ge 10 μg 、Y 10 μg 、Bi 10 μg 、Te 10 μg 的溶液。

2.5.4 供试品溶液的制备 取重酒石酸去甲肾上腺素注射液 5 瓶, 全部转移至 50 mL 离心管中, 摇匀, 作为储备液; 量取储备液 750 μL 置 50 mL 量瓶中, 加入元素内标溶液 100 μL , 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

2.5.5 空白溶液 量取元素内标溶液 100 μL 置 50 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

2.5.6 标准曲线溶液 分别取元素混标溶液、元素内标溶液, 用 10% 硝酸溶液稀释至 0%、12.5%、50%、100%、150%、300% 限度浓度的标准曲线溶液, 各元素标准曲线溶液浓度见表 1。

2.5.7 对照品溶液 量取元素内标溶液 100 μL 置 50 mL 量瓶中, 加入元素混标溶液 200 μL , 用稀释液稀释至刻度, 摇匀。

2.6 方法学考察

2.6.1 系统适用性 量取 100% 限度溶液, 连续测定 3 次, 测定各元素的回收率, 结果为 94.9% ~ 105.7%, 满足系统适用性要求。

2.6.2 专属性 以 12.5% 限度浓度溶液, 作为定量限溶液, 空白溶液中各元素测得值不得大于 1/3 定量限。由表 2 结果可知, 各元素测定结果均满足测定要求, 说明方法专属性较好。

2.6.3 线性和范围 以各元素对照品浓度为横坐标, 以响应值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算各元素的线性回归方程和相关系数, 结果见表 2, 23 种元素相关系数 r 均大于 0.999。

2.6.4 重复性及中间精密度的 取样品储备液 750 μL 置 50 mL 量瓶中, 加入元素混标溶液 200 μL 和元素内标溶液 100 μL , 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀。结果见表 3, 重复性试验 6 份供试品溶液中各元素的 *RSD* 值为 0.38% ~ 2.6%。由不同人员、不同试验时间、不同仪器, 按照重复性试验配制供试品溶液, 与重复性试验一起计算结果, 12 次结果 *RSD* 值为 0.38% ~ 4.0%, 说明方法精密度的良好。

2.6.5 准确度 精密量取供试品 9 份, 按照“2.5.4”项下方法, 按限度 12.5% (定量限浓度)、100%、150% 加入各元素标准溶液, 作为低、中、高 3 个浓度的加标供试品溶液, 每个浓度制备 3 份平行样品, 进行测定。结果见表 3, 各元素的平均回收率为 95.2% ~ 105.8%, *RSD* 值为 0.59% ~ 4.0%。结果表明 23 种元素检测方法准确度良好。

表 1 23 种元素杂质限度和标准曲线溶液浓度

Tab 1 Impurity limit and standard curve solution concentration of 23 elements

元素	PDE/($\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$)	限值/($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	线性浓度范围/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)					
			0%	12.5%	50%	100%	150%	300%
Li	250	14	0	6.25	25.0	50.0	75.0	150.0
B	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
Al	250	14	0	6.25	25.0	50.0	75.0	150.0
Si	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
Ti	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
V	10	0.58	0	0.25	1.00	2.00	3.00	6.00
Cr	1100	64	0	27.5	110.0	220.0	330.0	660.0
Mn	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
Fe	1300	76	0	32.5	130.0	260.0	390.0	780.0
Co	5	0.29	0	0.125	0.5	1.0	1.5	3.0
Ni	20	1.1	0	0.5	2.0	4.0	6.0	12.0
Cu	300	17	0	7.5	30.0	60.0	90.0	180.0
Zn	1300	76	0	32.5	130.0	260.0	390.0	780.0
As	15	0.88	0	0.375	1.5	3.0	4.5	9.0
Zr	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
Mo	1500	88	0	37.5	150.0	300.0	450.0	900.0
Cd	2	0.11	0	0.05	0.2	0.4	0.6	1.2
Sb	90	5.2	0	2.25	9.0	18.0	27.0	54.0
Ba	700	41	0	17.5	70.0	140.0	210.0	420.0
W	1500	88	0	3.75	15.0	30.0	45.0	90.0
Pt	10	0.58	0	0.25	1.0	2.0	3.0	6.0
Hg	3	0.17	0	0.075	0.3	0.6	0.9	1.8
Pb	5	0.29	0	0.125	0.5	1.0	1.5	3.0

表 2 23 种元素的线性试验结果

Tab 2 Linearity of 23 elements

元素	线性回归方程	<i>r</i>	空白溶液测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	1/3 定量限/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Li	$y = 2.0 \times 10^{-2}x + 1.0 \times 10^{-5}$	0.9998	0.03	6.25	2.08
B	$y = 3.0 \times 10^{-3}x + 1.0 \times 10^{-5}$	0.9996	1.07	37.5	12.50
Al	$y = 1.9 \times 10^{-2}x + 1.7 \times 10^{-5}$	0.9998	0.05	6.25	2.08
Si	$y = 9.0 \times 10^{-3}x + 2.5 \times 10^{-5}$	1.0000	1.34	37.5	12.50
Ti	$y = 9.0 \times 10^{-3}x + 4.2 \times 10^{-5}$	1.0000	0.04	37.5	12.50
V	$y = 2.1 \times 10^{-1}x + 1.7 \times 10^{-5}$	0.9999	0.01	0.25	0.08
Cr	$y = 2.9 \times 10^{-2}x + 3.5 \times 10^{-5}$	1.0000	0.02	27.5	9.17
Mn	$y = 0.18x + 1.9 \times 10^{-5}$	0.9999	0.04	37.5	12.50
Fe	$y = 6.0 \times 10^{-3}x + 1.2 \times 10^{-5}$	0.9999	0.49	32.5	10.83
Co	$y = 0.42x + 2.9 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	0.125	0.04
Ni	$y = 0.11x + 8.2 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	0.5	0.17
Cu	$y = 0.26x + 3.1 \times 10^{-5}$	0.9999	0.01	7.5	2.50
Zn	$y = 3.6 \times 10^{-2}x + 1.6 \times 10^{-5}$	0.9999	0.04	32.5	10.83
As	$y = 3.3 \times 10^{-2}x + 6.3 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	0.375	0.13
Zr	$y = 7.0 \times 10^{-3}x + 8.0 \times 10^{-5}$	0.9998	0.26	37.5	12.50
Mo	$y = 7.0 \times 10^{-3}x + 1.8 \times 10^{-5}$	0.9999	0.07	37.5	12.50
Cd	$y = 1.0 \times 10^{-2}x + 2.0 \times 10^{-5}$	0.9994	0.00	0.05	0.02
Sb	$y = 1.4 \times 10^{-2}x + 8.0 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	2.25	0.75
Ba	$y = 8.0 \times 10^{-3}x + 3.0 \times 10^{-5}$	0.9998	0.02	17.5	5.83
W	$y = 1.5 \times 10^{-2}x + 1.3 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	3.75	1.25
Pt	$y = 1.0 \times 10^{-2}x + 4.6 \times 10^{-5}$	0.9998	0.00	0.25	0.08
Hg	$y = 7.0 \times 10^{-3}x + 3.9 \times 10^{-5}$	0.9998	0.00	0.075	0.03
Pb	$y = 3.0 \times 10^{-2}x + 6.4 \times 10^{-5}$	0.9999	0.00	0.125	0.04

表 3 23 种元素的重复性、中间精密度、准确度溶液稳定性试验结果
 Tab 3 Repeatability, intermediate precision, accuracy and solution stability of 23 elements

元素	重复性 RSD/%	中间精密度 RSD/%	回收率范围 /%	回收率 RSD 范围 /%	对照品溶液 稳定性 RSD/%	100% 限度加标溶液 稳定性 RSD/%
Li	2.6	4.0	100.18 ~ 106.83	1.7 ~ 2.7	4.9	3.4
B	2.0	2.9	98.67 ~ 105.65	1.1 ~ 1.8	3.1	4.7
Al	1.8	1.9	98.94 ~ 107.69	2.3 ~ 4.5	2.5	3.0
Si	1.6	1.1	103.00 ~ 107.63	0.7 ~ 2.3	4.0	4.0
Ti	2.3	1.5	101.98 ~ 107.09	1.4 ~ 2.5	3.7	2.2
V	1.5	1.2	101.50 ~ 105.43	0.9 ~ 2.2	2.7	3.4
Cr	1.6	0.72	100.54 ~ 105.68	0.4 ~ 2.2	3.7	2.4
Mn	2.0	1.9	99.94 ~ 103.78	0.6 ~ 1.7	3.2	2.3
Fe	1.8	0.97	100.07 ~ 105.69	0.9 ~ 2.1	3.4	3.0
Co	1.6	0.71	100.90 ~ 105.40	0.4 ~ 2.4	4.2	3.7
Ni	1.8	1.6	98.60 ~ 104.40	0.7 ~ 2.9	4.0	3.3
Cu	2.3	1.7	96.85 ~ 102.77	0.6 ~ 2.8	2.0	1.0
Zn	1.7	1.1	101.01 ~ 104.81	0.7 ~ 1.0	2.1	1.3
As	1.9	2.5	101.21 ~ 106.48	1.9 ~ 2.6	0.97	0.71
Zr	1.5	2.5	93.24 ~ 97.32	1.1 ~ 2.0	0.86	0.85
Mo	1.5	2.3	93.77 ~ 100.15	1.2 ~ 2.4	0.84	1.8
Cd	1.2	2.7	91.50 ~ 100.00	3.2 ~ 4.6	4.3	4.7
Sb	1.2	2.0	97.27 ~ 101.02	0.9 ~ 1.7	1.4	1.6
Ba	1.1	1.9	98.39 ~ 103.26	0.5 ~ 1.5	1.5	1.9
W	1.6	0.92	104.64 ~ 107.28	0.4 ~ 1.3	1.4	2.3
Pt	0.86	0.73	102.65 ~ 106.80	0.8 ~ 1.9	1.7	3.6
Hg	1.2	1.6	98.78 ~ 106.67	1.5 ~ 1.9	4.3	4.4
Pb	0.38	0.70	101.67 ~ 103.50	0.4 ~ 0.7	1.7	3.5

2.6.6 溶液稳定性 取对照品溶液和 100% 限度浓度加标溶液, 分别于 0、0.5、0.8、22、22.4 h 依次测定, 结果见表 3, 各元素不同时间点对照品溶液和 100% 限度浓度加标溶液测得量的 RSD 值均在 0.71% ~ 4.9%, 说明对照品溶液和 100% 限度浓度加标溶液在 22 h 内稳定。

2.6.7 样品中元素杂质的含量测定 取 3 批于 0 月和加速条件下分别放置 3 个月和 6 个月的样品, 制备并测定样品。由表 4 结果可知, Si、Al 元素含量较 0 月略有增加, 各样品中 23 种元素杂质检出量均符合要求。

3 讨论

鉴于原子吸收光谱法存在过程烦琐、引入污染风险高、样品量大、耗时较长等缺点, 本研究建立了 ICP-MS 法同时测定重酒石酸去甲肾上腺素注射液中 23 种元素杂质的含量。质谱法是检测微量元素的金标准, ICP-MS 具有灵敏度高、重现性好、谱线干扰少、动态线性范围宽等优势, 同时其碰撞反应模式可以解决同位素干扰、基体多原子和双电荷干扰等问题。采用一步酸稀释法处理样品, 操作简便、快捷; 以 Ge、Y、Bi、Te 为

内标, 可避免基质效应、电离效应和仪器漂移等因素对测定结果的影响。方法学考察结果显示, 各元素杂质线性关系良好, 重复性、中间精密度、准确度、溶液稳定性均符合 2020 年版《中国药典》四部通则^[14] 要求。

对 3 批重酒石酸去甲肾上腺素注射液放置 0、3、6 个月样品进行分析可知, Si、Al 有略微增长趋势, 结合材质信息推测, Si、Al 元素杂质来源可能为存储过程中从中硼硅西林瓶中迁移至药液中, 两种元素按照 ICH Q3D 中分类要求均归属为其他类, 均为低毒性物质, 0、3、6 个月样品的检出量均小于限值, 说明本品安全性良好。

综上所述, 本文所建方法灵敏、准确、简便, 可用于重酒石酸去甲肾上腺素注射液中 23 种元素杂质的含量测定; 研究结果表明, 包装材料与重酒石酸去甲肾上腺素注射液间有相互作用, 存放加速 6 个月内元素杂质迁移符合要求, 说明样品与中硼硅玻璃西林瓶、注射液用覆聚四氟乙烯/六氟丙烯的共聚物膜氯化丁基橡胶塞、抗菌药物瓶用铝塑组合盖为包材系统的包材相容性及安全性良好。

表 4 0 月及加速样品中 23 种元素杂质含量测定结果 (μg/瓶)

Tab 4 Determination of the impurity content of 23 elements in 0 months and accelerated samples (μg/bottle)

元素	定量限	限值	200501 批			200502 批			200601 批		
			0 月	加速 3 个月	加速 6 个月	0 月	加速 3 个月	加速 6 个月	0 月	加速 3 个月	加速 6 个月
Li	2	14	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
B	10	88	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Al	2	14	< 2	< 2	2.1	< 2	< 2	2.4	< 2	< 2	< 2
Si	10	88	< 10	18	23	< 10	17	27	< 10	15	29
Ti	10	88	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
V	0.07	0.58	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07
Cr	7	64	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7	< 7
Mn	10	88	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Fe	9	76	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
Co	0.03	0.29	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Ni	0.1	1.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Cu	2	17	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Zn	9	76	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
As	0.1	0.88	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Zr	10	88	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Mo	10	88	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Cd	0.01	0.11	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Sb	0.6	5.2	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6
Ba	5	41	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
W	1	88	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Pt	0.07	0.58	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07
Hg	0.02	0.17	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Pb	0.03	0.29	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03

参考文献

[1] 重酒石酸去甲肾上腺素注射液 FDA 说明书 [Z]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/007513Orig1s024lbl.pdf.

[2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂与药用玻璃包装容器相容性研究技术指导原则(试行) [S]. 2015-07-28. <https://www.cde.org.cn>.

[3] 张玉兰, 何超, 陈旭红, 等. ICP-MS 测定罗库溴铵原料药中 11 种元素杂质含量 [J]. 中国测试, 2022, 48 (11): 68-73.

[4] 汤逊尤, 孙辉, 丁野, 等. ICP-MS 测定补肾填精口服液中 30 种无机元素的分析及风险评估 [J]. 药品评价, 2022, 19 (16): 965-969.

[5] 张乃斌, 陈真, 李春焕, 等. ICP-MS 检测脂肪乳注射液及包材中的 18 种元素 [J]. 药学研究, 2021, 40 (7): 441-446.

[6] 张丹, 王留留, 李凯. ICP-MS 法测定柴胡注射液中 18 种重金属及有害元素 [J]. 中医研究, 2020, 33 (8): 60-65.

[7] 黄海, 张耀文, 宋佳璇, 等. 氨甲苯酸注射液中 20 种元素杂质的含量测定及相容性考察 [J]. 中国药房, 2021, 32 (11): 1330-1336.

[8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求 [S]. 2020. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/d9c6f118b773f54e8feba3519bf78a11>.

[9] European Medicines Agency. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000 Guideline on the specification limits for residues of metal catalyst or metal reagents [EB/OL]. (2008-08-01) [2017-04-29]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003586.pdf.

[10] 潘叙恩, 张译方, 张春华, 等. 丙泊酚注射液与中性硼硅玻璃安瓿包材相容性研究 [J]. 中国测试, 2017, 43 (5): 45-48, 70.

[11] 饶艳春, 余永红, 刘涛, 等. ICP-MS 测定门冬氨酸鸟氨酸注射液中多种元素迁移 [J]. 中国药物评价, 2020, 37 (4): 265-268.

[12] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则 [S]. 2018.

[13] 国家药品监督管理局药品审评中心. 元素杂质指导原则 ICH Q3D (R2) [S]. 2022.

[14] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 43-47.

(收稿日期: 2024-06-12; 修回日期: 2024-09-12)

硝苯地平控释片中释放度测定的不确定度评定

郝海光, 许朗晴, 刘晶, 王威* (北京市药品检验研究院<北京市疫苗检验中心>, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 目的 评价高效液相色谱法测定硝苯地平控释片中硝苯地平释放度的不确定度。方法 采用 2020 年版《中国药典》中释放度项下规定的方法进行试验, 并依据《测量不确定度评定与表示》JJF 1059.1—2012 中的相关规定, 建立数学模型, 对硝苯地平测定过程中不确定度的来源进行分析, 计算合成不确定度和扩展不确定度。结果 试验中测得硝苯地平 4、8、12、16、24 h 取样点平均释放度的合成不确定度分别为 0.042 94、0.046 41、0.053 10、0.061 12、0.068 45, 扩展不确定度分别为 $(11.5 \pm 0.98)\%$ 、 $(38.7 \pm 3.60)\%$ 、 $(66.6 \pm 7.08)\%$ 、 $(83.9 \pm 10.26)\%$ 、 $(96.9 \pm 13.26)\%$ ($k = 2$, 置信区间为 95%)。结论 硝苯地平控释片中硝苯地平释放度的不确定度贡献: 4 h 取样点主要来源于供试品测量重复性; 8、12、16、24 h 取样点主要来源于供试品溶液配制, 本试验量化了分析方法的不确定度, 可为控释片释放度的检查提供更加科学的依据。

关键词: 硝苯地平控释片; 不确定度; 释放度; 高效液相色谱

中图分类号: R969.1, R94 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0234-00
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.035

Determination of uncertainty in release of nifedipine in controlled-release tablets

HAO Hai-guang, XU Lang-qing, LIU Jing, WANG Wei* (*Beijing Institute for Drug Control <Beijing Center for Vaccine Control>, NMPA, Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206*)

Abstract: Objective To determine the uncertainty of the release of nifedipine in nifedipine controlled-release tablets by HPLC. **Methods** The test was conducted with the methods specified in the release section in the 2020 Edition of *Chinese Pharmacopoeia*. According to relevant provisions in JJF 1059.1—2012 of *Evaluation and Expression of Measurement Uncertainty*, a mathematical model was established to analyze the source of uncertainty in the determination of nifedipine. The synthetic uncertainty and the extended uncertainty were calculated. **Results** The synthetic uncertainties of nifedipine release at 4, 8, 12, 16 and 24 h were 0.042 94, 0.046 41, 0.053 10, 0.061 12, and 0.068 45, respectively. The extended uncertainties were $(11.5 \pm 0.98)\%$, $(38.7 \pm 3.60)\%$, $(66.6 \pm 7.08)\%$, $(83.9 \pm 10.26)\%$, and $(96.9 \pm 13.26)\%$ ($k = 2$, confidence interval was 95%). **Conclusion** The uncertainty of nifedipine release in nifedipine controlled-release tablets: 4 h sampling point mainly come from the measurement repeatability of test subjects; while the sampling points at 8, 12, 16 and 24 h are mainly derived from the preparation of the test product solution. This experiment quantifies the uncertainty of the analysis method, and provides a scientific basis for the inspection of controlled-release tablets.

Key words: nifedipine controlled-release tablet; uncertainty; release rate; HPLC

硝苯地平是临床常用的二氢吡啶类钙通道阻滞剂, 通过扩张外周和冠状血管以达到治疗高血压、心绞痛及心血管疾病的目^[1-3]。硝苯地平

控释片具有药效持续时间长, 长期控压效果稳定, 不良反应及服药次数少等特点, 在临床广泛应用^[4-5], 因此, 对其药物释放过程的控制对于患

作者简介: 郝海光, 男, 硕士, 药师, 主要从事药物分析与评价研究, email: haiguang_hao@aliyun.com *通信作者: 王威, 男, 副主任药师, 主要从事药物分析与药品质量研究, email: wangwei@bidc.org.cn

者的服药效果及用药安全极其重要。本文依据《测量不确定度评价与表示》JJF1059.1—2012 中的相关规定^[6]，通过建立数学模型，分析试验过程的不确定度来源，计算其合成不确定度和扩展不确定度^[7-8]，并考察其来源，为相关检验提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); ADFC8M 药物溶出度测定仪 (天大天发公司); XS105DU 电子分析天平 (Mettler 公司, 精度: 0.01 mg); 3 mL 单标线移液管 (SCRC 公司, A 类); 10 mL、100 mL 量瓶及 1000 mL 玻璃量筒 (BRAND Germany 公司, A 类)。

1.2 试药

硝苯地平控释片 (厂家 A, 批号: 220411B, 规格: 30 mg/片), 硝苯地平对照品 (批号: 100338-202107; 纯度: 99.8%, 纯度的不确定度未标明; 水分未标明; 中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司); 水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

避光操作, 采用 OSAKA SODA CAPCELL PAK C18 色谱柱 (4.6 mm×25 cm, 5 μm), 加 GL sciences Cartridge Guard Column Ei 保护柱; 流动相为甲醇-水 (60:40); 检测波长为 235 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL, 流速为 0.9 mL·min⁻¹。

2.2 试验条件及溶液制备

避光操作, 精密称取硝苯地平对照品两份 ($M_{R1} = 10.09$ mg, $M_{R2} = 10.17$ mg), 分别置 10

mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 3 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 ($C_{R1} = 0.03021$ mg·mL⁻¹, $C_{R2} = 0.03045$ mg·mL⁻¹)。

避光操作, 取本品 1 片, 置沉降篮中, 照溶出度与释放度测定法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法) 测定, 以 1% 十二烷基硫酸钠的磷酸盐-枸橼酸缓冲液 (pH 6.8) 900 mL 为释放介质, 转速为 100 r·min⁻¹, 依法操作, 分别于 4、8、12、16、24 h 时取溶液 5 mL, 滤过, 作为供试品溶液, 并及时在溶出杯中补充相同温度相同体积的释放介质。

2.3 测定模型

供试品中硝苯地平释放度的测定公式表示为:

$$W(\%) = (A_S \times M_R \times P_R \times V_S) / (A_R \times V_R \times Q) \times 100\%$$

式中, W 为供试品中硝苯地平的释放度 (按标示量计), %; A_S 为供试品溶液中硝苯地平的峰面积; A_R 为对照品溶液中硝苯地平的校正峰面积; M_R 为对照品称样量, mg; V_R 为对照品稀释体积, mL; P_R 为对照品含量, %; V_S 为供试品稀释体积, mL; Q 为样品的标示量, mg/片。

从检测方法和数学模型可知, 硝苯地平控释片释放度测定的不确定度来源主要有: ① 对照品纯度的不确定度 (P_R)、称样量 (M_R)、溶液的制备 (V_R) 和积分峰面积 (A_R); ② 供试品溶液的制备 (V_S) 和重复测量 (S_S); ③ 高效液相色谱仪的不确定度。不确定度来源见图 1。

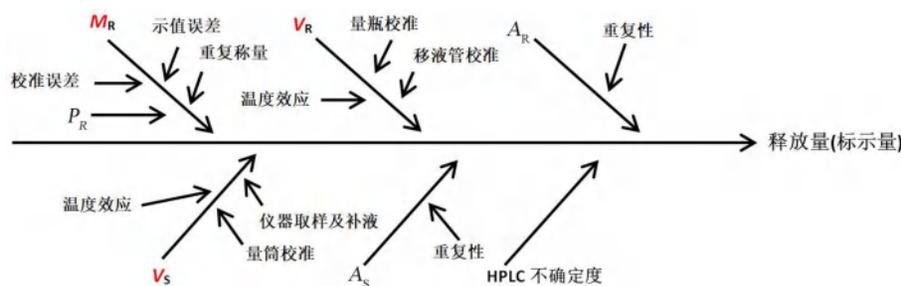


图 1 不确定度来源因果图

Fig 1 Source of uncertainty causal graph

3 不确定度分量的评定

3.1 对照品溶液相对标准不确定度

3.1.1 对照品纯度的相对标准不确定度 $u_{rel}(P_R)$

说明书上标注: 硝苯地平对照品, 供 HPLC 法测定时纯度为 99.8%, 不确定度未标定, 按其置信区间 α 为 $\pm 0.05\%$, P 为 99.8% 计^[9], 视为矩形分布, $u_{rel}(P_R) = 0.05\% \div \sqrt{3} \div 99.8\% = 0.00029$ 。

3.1.2 对照品称量的相对标准不确定度 $u_{rel}(M_R)$

称量值 $M_{R1} = 10.09$ mg, $M_{R2} = 10.17$ mg, 其称

量不确定度来源有三项:

① 天平校准产生的不确定度的分量: 根据天平校准证书得到天平分辨率为 0.01 mg, 检定分度值 $e = 0.1$ mg, 最大允许误差为 $\pm 0.5e$, 即 ± 0.05 mg, 假定为矩形分布 ($k = \sqrt{3}$), 天平校准引入的不确定度 $u(M_1) = 0.05 \div \sqrt{3} = 0.02887$ mg。

② 数字分辨率, 即可读性: 天平最小有效数字为 0.01 mg, 假定为矩形分布 ($k = \sqrt{3}$), 数字分辨率引入的不确定度 $u(M_2) = 0.01 \div 2 \div \sqrt{3} =$

0.002 89 mg。

③ 称量重复性：该天平称量时重复性最大允许误差为 1.5 e，即 0.15 mg，假定为矩形分布，重复性产生的不确定度 $u(M_3) = 0.15 \div \sqrt{3} = 0.086$ 60 mg。一次称量的不确定度为：

$$\sqrt{0.028\ 87^2 + 0.002\ 89^2 + 0.086\ 60^2} = 0.091\ 33\ \text{mg}$$

因天平称量两次（一次称样，一次称皮重），故

$$u(M_4) = \sqrt{2} \times 0.091\ 33^2 = 0.129\ 16\ \text{mg}$$

两份硝苯地平对照品称量的相对标准不确定度分别为：

$$u_{\text{relMR1}} = 0.129\ 16 / 10.09 = 0.012\ 80,$$

$$u_{\text{relMR2}} = 0.129\ 16 / 10.17 = 0.012\ 70.$$

硝苯地平对照品称量的相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(M_R) = \sqrt{0.012\ 80^2 + 0.012\ 70^2} = 0.018\ 03.$$

3.1.3 对照品溶液配制的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_R)$ 由“2.2”项下试验过程可知，对照品溶液制备的不确定度有三项：① $u(V_{R1})$ ，10 mL 和 100 mL 量瓶校准带来的不确定度；② $u_{\text{rel}}(V_{R2})$ ，3 mL 移液管校准带来的不确定度；③ $u(V_{R3})$ ，温差导致溶液膨胀带来的不确定度。

需用到玻璃器具的允许误差^[10-11]见表 1。

表 1 玻璃器具列表

Tab 1 List of glassware

玻璃器具 (A 级)	允许误差 /mL
3 mL 单标线移液管	±0.01
10 mL 量瓶	±0.04
100 mL 量瓶	±0.10

依据 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[6]和 JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》^[12]的要求，视为三角分布，取 $k = \sqrt{6}$ ，估算量瓶、移液管的不确定度。由“2.2”项下试验过程可知，对照品配制所用的稀释剂为：甲醇-水（60：40）；20℃时，甲醇的体积膨胀系数为 $1.19 \times 10^{-3} \cdot \text{℃}^{-1}$ ，水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \cdot \text{℃}^{-1}$ ，溶剂由甲醇和水按比例混合，故采用加权平均的方法计算其膨胀系数，即： $1.19 \times 10^{-3} \times 0.6 + 2.1 \times 10^{-4} \times 0.4 = 7.98 \times 10^{-4} \cdot \text{℃}^{-1}$ ，设实验室的温度在 $\pm 4 \text{℃}$ 范围内变动，取其最大值 4℃，视为矩形分布，取 $k = \sqrt{3}$ ，进而计算溶液膨胀不确定度，结果见表 2。

表 2 量瓶和移液管引入的不确定度

Tab 2 Uncertainty introduced by volumetric flask and pipette

玻璃器具 (A 级)	校准不确定度 $u(V_{R1,2})$ ^①	溶液膨胀不确定度 $u(V_{R3})$ ^②	各分量相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{Ri})$ ^③
3 mL 单标线移液管	0.004 08	0.005 53	0.002 29
10 mL 量瓶	0.016 33	0.018 43	0.002 46
100 mL 量瓶	0.040 82	0.184 29	0.001 89

表 2 中，①的计算公式为： $u(V_{R1,2}) = \text{允许误差} / \sqrt{6}$ ；②的计算公式为： $u(V_{R3}) = \text{玻璃器具规格} \times \text{溶剂膨胀系数} \times 4 \text{℃} / \sqrt{3}$ ；③的计算公式为： $u_{\text{rel}}(V_{Ri}) = \sqrt{u(V_{R1,2})^2 + u(V_{R3})^2} / \text{玻璃器具使用体积}$ 。

对照品溶液制备过程中，3 mL 移液管、10 mL 和 100 mL 量瓶各使用了一次，根据表 2 中各分量结果，一份对照品溶液的相对标准不确定度为： $\sqrt{0.002\ 29^2 + 0.002\ 46^2 + 0.001\ 89^2} = 0.003\ 86$ 。因对照品平行配制两份，故：

$$u_{\text{rel}}(V_R) = \sqrt{2} \times 0.003\ 86^2 = 0.005\ 46.$$

3.1.4 对照品溶液色谱峰面积相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(A_R)$ 在峰面积测定时，高效液相色谱仪引入的不确定度体现在色谱峰面积重复性测量的结果上。本试验中对对照品平行称取两份，第一份进样 5 针，第二份进样 2 针，其中包含了对照品溶液重复配制的不确定度和峰面积测定重复性的不确定度，采用极差法^[9]计算对照品溶液峰面积测定的相对标准不确定度， $u_{\text{rel}}(A_R) = \sqrt{0.000\ 72^2 + 0.000\ 68^2} = 0.000\ 99$ ，结果见表 3。

表 3 对照品溶液峰面积测定的不确定度

Tab 3 Uncertainty in determination of reference peak area

序号	峰面积均值	极差	进样次数	极差系数	$u_{\text{rel}}(A_{Ri})$
1	1 141 059	4263	5	2.33	0.000 72
2	1 240 857	1357	2	1.13	0.000 68

表 3 中，计算公式为： $u_{\text{rel}}(A_{Ri}) = \text{极差} \div \text{极差系数} \div \sqrt{n} \div \text{峰面积均值}$ ，其中 n 为进样次数。

3.1.5 对照品溶液的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$ 对照品溶液的相对标准不确定度由 $u_{\text{rel}}(P_R)$ 、 $u_{\text{rel}}(M_R)$ 、 $u_{\text{rel}}(V_R)$ 、 $u_{\text{rel}}(A_R)$ 合成，即：

$$u_{\text{rel}}(R) = \sqrt{0.000\ 29^2 + 0.018\ 03^2 + 0.005\ 46^2 + 0.000\ 99^2} = 0.018\ 87.$$

3.2 供试品溶液相对标准不确定度

3.2.1 供试品溶液配制的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_S)$ 由“2.2”项下试验过程可知 供试品溶液制备的不确定度来源有三项：① $u(V_{S1})$ 为 1000 mL 量筒校准带来的不确定度；② $u(V_{S2})$ 为温差导致溶液膨胀带来的不确定度；③ $u(V_{S3})$ 为 4、8、12、16、24 h 这 5 个时间点取样及补液体积引入的不确定度。试验所用量筒 (A 级) 的允许误差^[13]为 ± 3.0 mL，取样系统 (10 mL) 的允许误差为 ± 0.2 mL。

依照 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[6]和 JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》^[12]的要求，将量筒校准结果视为三角分布，取 $k = \sqrt{6}$ ，估算其不确定度。1 ~ 100℃ 范围内，水的体积膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} \cdot \text{℃}^{-1}$ ，设实验室的

温度在 $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 范围内变动, 取其最大值 4°C , 视为矩形分布, 取 $k = \sqrt{3}$, 计算溶液膨胀不确定度。由“2.2”项下试验过程可知, 每个取样点分别进行一次取样和补液, 视为矩形分布, 取 $k = \sqrt{3}$, 估算取样及补液引入的不确定度, 结果见表 4, $u(V_{S1}) = \text{允许误差}/\sqrt{6}$, $u(V_{S3}) = \text{允许误差}/\sqrt{3}$; $u(V_{S2}) = \text{玻璃器具使用体积} \times \text{水膨胀系数} \times 4^{\circ}\text{C}/\sqrt{3}$; $u_{\text{rel}}(V_{Si}) = \sqrt{u(V_{S1,3})^2 + u(V_{S2})^2}$ / 玻璃器具使用体积。各取样点的相对标准不确定度见表 5, $u_{\text{rel}}(V_{S3}) = \sqrt{n} \times u_{\text{rel}}(V_{Si})^2$, 其中, $n = \text{取样和补液次}$

数, $u_{\text{rel}}(V_{Si})$ 为取样系统各分量的相对标准不确定度; $u_{\text{rel}}(V_{Sn}) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_{S1})^2 + u_{\text{rel}}(V_{S3})^2}$, 其中, $u_{\text{rel}}(V_{Si})$ 为量筒各分量的相对标准不确定度, 由于取样和补液装置相同, 故一次操作的不确定度相同。

表 4 量筒及取样系统引入的不确定度

Tab 4 Uncertainty induced by cylinder and sampling system

玻璃器具 (A 级)	校准不确定度 $u(V_{S1,3})$	溶液膨胀不确定度 $u(V_{S2})$	各分量相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{Si})$
1000 mL 量筒	1.224 74	0.436 48	0.001 44
取样系统	0.115 47	0.002 42	0.023 10

表 5 各取样点的不确定度

Tab 5 Uncertainty of each sampling point

时间 /h	量筒各分量相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{Si})$	取样和补液系统各分量相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{S3})$	相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{Sn}, n = 4, 8, 12, 16, 24)$	取样和补液次数
4	0.001 44	0	0.001 44	0 (取样 0, 补液 0)
8		0.032 67	0.032 70	2 (取样 1, 补液 1)
12		0.046 20	0.046 22	4 (取样 2, 补液 2)
16		0.056 58	0.056 60	6 (取样 3, 补液 3)
24		0.065 34	0.065 36	8 (取样 4, 补液 4)

3.2.2 供试品溶液平行测定引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(A_S)$ 由“2.2”项下试验过程可知, 释放度测定过程合计 5 个取样点, 每个取样点取 10 份平行制备的供试品溶液进样, 释放度结果见表 6, 根据标准不确定度 A 类评定方法^[14], $u(A_S) = \text{SD}/\sqrt{n}$, 供试品平行测定引入的相对标准不确定度见表 7。

表 6 供试品在不同时间下的释放度平行测定结果

Tab 6 Parallel determination of sample under different times

时间 /h	供试品的释放度 /%									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	12.1	10.6	10.6	10.8	14.2	10.1	13.3	9.9	12.3	11.1
8	41.8	40.6	38.0	38.0	45.7	35.8	37.2	39.3	35.1	35.9
12	70.9	69.5	68.9	70.2	69.5	62.3	60.6	63.4	63.5	66.9
16	87.7	85.8	85.7	87.0	84.7	78.7	85.7	84.6	77.2	82.1
24	99.5	100.6	98.1	96.5	98.8	94.1	95.5	94.3	94.3	97.4

表 7 供试品不同时间下平行测定引入的不确定度

Tab 7 Uncertainty induced by parallel determination under different time spots

时间 /h	不确定度平均值 /%	标准差 SD/%	不确定度 $u(A_{Sn})$	相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(A_{Sn})$
4	11.5	1.4	0.004 43	0.038 52
8	38.7	3.3	0.010 44	0.026 98
12	66.6	3.8	0.012 02	0.018 05
16	83.9	3.5	0.011 07	0.013 19
24	96.9	2.3	0.007 27	0.007 50

3.2.3 供试品溶液的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(S)$ 供试品溶液的相对标准不确定度由 $u_{\text{rel}}(V_S)$ 、 $u_{\text{rel}}(A_S)$ 合成, 即 $u_{\text{rel}}(S) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_S)^2 + u_{\text{rel}}(A_S)^2}$, 结果见表 8。

3.3 高效液相色谱仪不确定度

仪器校准证书显示, 紫外检测器的定量测量重

表 8 供试品不同时间下的相对标准不确定度

Tab 8 Relative standard uncertainty of sample under different times

时间 /h	$u_{\text{rel}}(V_S)$	$u_{\text{rel}}(A_S)$	$u_{\text{rel}}(S)$
4	0.001 44	0.038 52	0.038 55
8	0.032 70	0.026 98	0.042 39
12	0.046 22	0.018 05	0.049 62
16	0.056 60	0.013 19	0.058 12
24	0.065 36	0.007 50	0.065 79

复性实测值为 0.2%, 假定为矩形分布 ($k = \sqrt{3}$), 其不确定度为: $u_{\text{rel}}(I) = 0.2\% \div \sqrt{3} = 0.001 15$ 。

4 合成不确定度及扩展不确定度

各取样点的各分量相对标准不确定度如表 9 ~ 13 所示。不确定度主要贡献见表 14。

表 15 中, ① 的计算公式为: $u_{\text{rel}}(C) = \sqrt{u_{\text{rel}}(R)^2 + u_{\text{rel}}(S)^2 + u_{\text{rel}}(I)^2}$; ② 的计算公式为: $u(C) = u_{\text{rel}}(C) \times \text{各取样点释放度平均值}$; ③ 的计算公式为: $u_{95} = ku(C)$, 其中扩展因子 $k = 2$, 置信区间为 95%。

5 测定结果报告

硝苯地平释放度各取样点测定结果及结果范围见表 16。由表 16 结果可知, 12 h 取样点 1 ~ 5 号平行样品的结果上限分别为 78.0%、76.6%、76.0%、77.3%、76.6%, 超过标准规定 12 h 取样点的限度上限 75.0%, 超出结果的 RSD 分别为 4.0%、2.1%、1.3%、3.1%、2.1%; 16 h 取样点 1 ~ 5、7 ~ 8 和 10 号平行样品的结果上限分别为 98.0%、96.1%、96.0%、97.3%、95.0%、96.0%、94.9%、92.4%, 超过标准规定 16 h 取样点的限度上限 90.0%, 超出结果的 RSD 分别为 8.9%、6.8%、6.7%、8.1%、5.6%、6.7%、5.4%、2.7%; 6 号、9

表 9 4 h 取样点不确定度评定结果

Tab 9 Uncertainty evaluation of 4-hour sampling points

不确定度来源	各分量	结果 1	排序	总分量	结果 2
对照品纯度	$u_{rel}(P_R)$	0.000 29	7	$u_{rel}(R)$	0.018 87
对照品称量	$u_{rel}(M_R)$	0.018 03	2		
对照品溶液配制	$u_{rel}(V_R)$	0.005 46	3		
对照品溶液色谱峰面积	$u_{rel}(A_R)$	0.000 99	6		
供试品溶液配制	$u_{rel}(V_S)$	0.001 44	4	$u_{rel}(S)$	0.038 55
供试品平行测定	$u_{rel}(A_S)$	0.038 52	1		
紫外检测器不确定度	$u_{rel}(I)$	0.001 15	5	$u_{rel}(I)$	0.001 15

表 10 8 h 取样点不确定度评定结果

Tab 10 Uncertainty evaluation of 8-hour sampling points

不确定度来源	各分量	结果 1	排序	总分量	结果 2
对照品纯度	$u_{rel}(P_R)$	0.000 29	7	$u_{rel}(R)$	0.018 87
对照品称量	$u_{rel}(M_R)$	0.018 03	3		
对照品溶液配制	$u_{rel}(V_R)$	0.005 46	4		
对照品溶液色谱峰面积	$u_{rel}(A_R)$	0.000 99	6		
供试品溶液配制	$u_{rel}(V_S)$	0.032 70	1	$u_{rel}(S)$	0.042 39
供试品平行测定	$u_{rel}(A_S)$	0.026 98	2		
紫外检测器不确定度	$u_{rel}(I)$	0.001 15	5	$u_{rel}(I)$	0.001 15

表 11 12 h 取样点不确定度评定结果

Tab 11 Uncertainty evaluation of 12-hour sampling points

不确定度来源	各分量	结果 1	排序	总分量	结果 2
对照品纯度	$u_{rel}(P_R)$	0.000 29	7	$u_{rel}(R)$	0.018 87
对照品称量	$u_{rel}(M_R)$	0.018 03	3		
对照品溶液配制	$u_{rel}(V_R)$	0.005 46	4		
对照品溶液色谱峰面积	$u_{rel}(A_R)$	0.000 99	6		
供试品溶液配制	$u_{rel}(V_S)$	0.046 22	1	$u_{rel}(S)$	0.049 62
供试品平行测定	$u_{rel}(A_S)$	0.018 05	2		
紫外检测器不确定度	$u_{rel}(I)$	0.001 15	5	$u_{rel}(I)$	0.001 15

表 12 16 h 取样点不确定度评定结果

Tab 12 Uncertainty evaluation of 16-hour sampling points

不确定度来源	各分量	结果 1	排序	总分量	结果 2
对照品纯度	$u_{rel}(P_R)$	0.000 29	7	$u_{rel}(R)$	0.018 87
对照品称量	$u_{rel}(M_R)$	0.018 03	2		
对照品溶液配制	$u_{rel}(V_R)$	0.005 46	4		
对照品溶液色谱峰面积	$u_{rel}(A_R)$	0.000 99	6		
供试品溶液配制	$u_{rel}(V_S)$	0.056 60	1	$u_{rel}(S)$	0.058 12
供试品平行测定	$u_{rel}(A_S)$	0.013 19	3		
紫外检测器不确定度	$u_{rel}(I)$	0.001 15	5	$u_{rel}(I)$	0.001 15

表 13 24 h 取样点不确定度评定结果

Tab 13 Uncertainty evaluation of 24-hour sampling points

不确定度来源	各分量	结果 1	排序	总分量	结果 2
对照品纯度	$u_{rel}(P_R)$	0.000 29	7	$u_{rel}(R)$	0.018 87
对照品称量	$u_{rel}(M_R)$	0.018 03	2		
对照品溶液配制	$u_{rel}(V_R)$	0.005 46	4		
对照品溶液色谱峰面积	$u_{rel}(A_R)$	0.000 99	6		
供试品溶液配制	$u_{rel}(V_S)$	0.065 36	1	$u_{rel}(S)$	0.065 79
供试品平行测定	$u_{rel}(A_S)$	0.007 50	3		
紫外检测器不确定度	$u_{rel}(I)$	0.001 15	5	$u_{rel}(I)$	0.001 15

号平行样品的结果下限分别为 68.4%、66.9%，低于标准规定 16 h 取样点的限度下限 70.0%，低于结果的 RSD 分别为 2.3%、4.4%。提示 12 和 16 h 取样点存在释放过快风险；而 16 h 取样点的 6 号、

表 14 各时间点不确定度主要贡献比较表*

Tab 14 Main contribution of uncertainty at each time point*

时间/h	贡献度		
	1	2	3
4	$u_{rel}(A_S)(0.038 52)$	$u_{rel}(M_R)(0.018 03)$	$u_{rel}(V_R)(0.005 46)$
8	$u_{rel}(V_S)(0.032 70)$	$u_{rel}(A_S)(0.026 98)$	$u_{rel}(M_R)(0.018 03)$
12	$u_{rel}(V_S)(0.046 22)$	$u_{rel}(A_S)(0.018 05)$	$u_{rel}(M_R)(0.018 03)$
16	$u_{rel}(V_S)(0.056 60)$	$u_{rel}(M_R)(0.018 03)$	$u_{rel}(A_S)(0.013 19)$
24	$u_{rel}(V_S)(0.065 36)$	$u_{rel}(M_R)(0.018 03)$	$u_{rel}(A_S)(0.007 50)$

注：* 取各时间点贡献度排名前三的不确定度来源进行比较。

Note: The top three sources of uncertainty of contribution at each time point are compared.

表 15 各时间点合成不确定度与扩展不确定度

Tab 15 Synthetic uncertainty and extended uncertainty

时间/h	$u_{rel}(C)$ ①	$u(C)$ ②/%	u_{95} ③/%
4	0.042 94	0.49	0.98
8	0.046 41	1.80	3.60
12	0.053 10	3.54	7.08
16	0.061 12	5.13	10.26
24	0.068 45	6.63	13.26

9 号平行样品存在释放过慢风险。

6 讨论

比较各取样点不确定度评定结果，分析不确定度主要来源。由表 14 结果可知，4 h 取样点中， $u_{rel}(A_S)$ 对硝苯地平控释片中硝苯地平释放度的不确定度贡献最大，其主要原因为：4 h 取样点硝苯地平的释放度较少，而控释制剂释放度的波动相对于其他取样点而言，对结果的影响较大；本试验中，取 10 份平行样品的 5 个取样点数据进行统计，SD 值较大；其与药品制剂工艺的稳定性有关；因此在低溶出量取样点中，会进一步提高 $u_{rel}(A_S)$ 的贡献度。8、12、16 和 24 h 取样点中， $u_{rel}(V_S)$ 对硝苯地平控释片中硝苯地平释放度的不确定度贡献最大；其主要原因有两点：一是取样和补液引入了不确定度，并且累积影响越来越大；而在 4 h 取样点中则未引入；二是硝苯地平的累计释放度逐渐增加，控释制剂释放度的波动影响因素逐渐减弱。

取样或补液引入的不确定度，与自动样品采集系统误差及每次取样和补液量相关；因此，对于控释制剂应尽量选用最新校准的仪器，也可根据情况使用精度更高的样品采集系统；增加每次取样和补液体积也可减少取样和补液引入不确定度的贡献。此外，对照品称量也是不确定度贡献的重要因素，其原因为重复性最大允许误差产生的不确定度和两次称量（一次称样、一次称皮）。因天平称量时重复性最大允许误差由天平本身决定，故可考虑优化称量操作（一是加大称样量或者使用更高精度的天平；二是对适宜的称样量改用称量船进行一次称量），以减小对照品称量贡献的不确定度，提高测量结果的准确度。

表 16 各取样点测定结果及结果范围

Tab 16 measurement results of each sampling point and the range of results

时间/h	供试品的释放度/%				
	1	2	3	4	5
4	12.1 (11.1 ~ 13.1)	10.6 (9.6 ~ 11.6)	10.6 (9.6 ~ 11.6)	10.8 (9.8 ~ 11.8)	14.2 (13.2 ~ 15.2)
8	41.8 (38.2 ~ 45.4)	40.6 (37.0 ~ 44.2)	38.0 (34.4 ~ 41.6)	38.0 (34.4 ~ 41.6)	45.7 (42.1 ~ 49.3)
12	70.9 (63.8 ~ 78.0 [*])	69.5 (62.4 ~ 76.6 [*])	68.9 (61.8 ~ 76.0 [*])	70.2 (63.1 ~ 77.3 [*])	69.5 (62.4 ~ 76.6 [*])
16	87.7 (77.4 ~ 98.0 [*])	85.8 (75.5 ~ 96.1 [*])	85.7 (75.4 ~ 96.0 [*])	87.0 (76.7 ~ 97.3 [*])	84.7 (74.4 ~ 95.0 [*])
24	99.5 (86.2 ~ 111.2.8)	100.6 (87.3 ~ 113.9)	98.1 (84.8 ~ 111.4)	96.5 (83.2 ~ 109.8)	98.8 (85.5 ~ 112.1)

时间/h	供试品的释放度/%				
	6	7	8	9	10
4	10.1 (9.1 ~ 11.1)	13.3 (12.3 ~ 14.3)	9.9 (8.9 ~ 10.9)	12.3 (11.3 ~ 13.3)	11.1 (10.1 ~ 12.1)
8	35.8 (32.2 ~ 39.4)	37.2 (33.6 ~ 40.8)	39.3 (35.7 ~ 42.9)	35.1 (31.5 ~ 38.7)	35.9 (32.3 ~ 39.5)
12	62.3 (55.2 ~ 69.4)	60.6 (53.5 ~ 67.7)	63.4 (56.3 ~ 70.5)	63.5 (56.4 ~ 70.6)	66.9 (59.8 ~ 74.0)
16	78.7 (68.4 ~ 89.0 [*])	85.7 (75.4 ~ 96.0 [*])	84.6 (74.3 ~ 94.9 [*])	77.2 (66.9 ~ 87.5 [*])	82.1 (71.8 ~ 92.4 [*])
24	94.1 (80.8 ~ 107.4)	95.5 (82.2 ~ 108.8)	94.3 (81.0 ~ 107.6)	94.3 (81.0 ~ 107.6)	97.4 (84.1 ~ 110.7)

注：^{*}为超出规定限度的结果。Note: ^{*} Represents the result of exceeding the prescribed limit.

使用 95% 置信区间计算的扩展不确定度, 对各时间点释放度结果进行修正, 得出其结果范围, 从而将试验结果从单一测量结果, 修正为考虑试验过程误差的结果范围, 以更加准确、客观地对结果进行评判^[15], 可更加科学和准确地评定样品的释放度结果, 为其制剂工艺改进的探索提供可能, 为药品质量评价和科学研究提供参考。

参考文献

- 邓国伟. 硝苯地平控释片联合缬沙坦治疗老年 2 型糖尿病肾病合并高血压的临床疗效及安全性探讨[J]. 糖尿病新世界, 2021, 24 (19): 82-84.
- 余丽丹. 硝苯地平控释片联合厄贝沙坦氢氯噻嗪治疗社区中重度高血压的临床疗效研究[J]. 中国医药指南, 2024, 22 (9): 110-124.
- 刘炳. 硝苯地平控释片联合厄贝沙坦治疗 2 型糖尿病合并高血压的效果[J]. 吉林医学, 2024, 45 (2): 408-411.
- 苑州凯, 孙晨, 王路, 等. 硝苯地平控释片制备及其体内研究[J]. 生物化工, 2023, 9 (6): 40-69.
- 苏海. 不同剂型硝苯地平是否都可以含服? 关于不能含服速效的硝苯地平可以含服硝苯地平控释片的争论[J]. 中华高血压杂志, 2024, 32 (3): 217-220.
- 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059.1—2012, 测量不确定度评定与表示[S]. 2012.
- 候海玲, 周刚. 高效液相色谱法测定硝苯地平中杂质 I 的不确定度评定[J]. 药品评价, 2023, 20 (10): 1207-1209.
- 朱晓月, 吴兆伟, 安京焯, 等. 碳酸钙 D₃ 颗粒 (II) 中维生素 D₃ 含量测定的不确定度评定[J]. 中国药业, 2024, 33 (3): 85-88.
- 孙婷, 姜建国, 张菁, 等. HPLC 法测定比沙可啶肠溶片含量的测量不确定度评定[J]. 中国药房, 2016, 27 (24): 3428-3430.
- 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12808—2015, 实验室玻璃仪器单标线吸量管[S]. 2015.
- 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12806—2011, 实验室玻璃仪器单标线容量瓶[S]. 2011.
- 国家质量监督检验检疫总局. JJF1135—2005, 化学分析测量不确定度评定[S]. 2005.
- 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12804—2011, 实验室玻璃仪器量筒[S]. 2011.
- 杨焯, 张孜, 肖桃, 等. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中舒巴坦和氨苄西林浓度的不确定度评价[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (2): 150-154.
- 韩志云, 金鹏, 滕海棠, 等. 奥美拉唑肠溶胶囊溶出度测定的不确定度评定[J]. 海峡药学, 2020, 32 (5): 48-51.

(收稿日期: 2024-05-09; 修回日期: 2024-07-26)

基于高效液相色谱法的达原饮颗粒剂指纹图谱的构建及主要成分含量测定

黄琪^{1,2}, 彭静^{1,2}, 王义坤³, 蒋跃平^{1,2}, 黄雨婷^{1,2}, 李金城⁴, 刘韶^{1,2*} (1.中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2.中南大学湘雅医院国家老年医学临床研究中心, 长沙 410008; 3.中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 4.长沙医学院药学院, 长沙 410429)

摘要: **目的** 建立达原饮颗粒剂的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并测定其中 8 个组分的含量, 为其质量控制与评估提供科学依据。 **方法** 采用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 256 nm, 进样量 10 μL, 对 15 批次达原饮颗粒剂样品进行分析, 通过识别色谱峰并结合相似度评价及主成分分析, 探讨不同批次之间的稳定性。同时, 测定样品中芍药苷、芒果苷、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、和厚朴酚、甘草酸和厚朴酚的含量。 **结果** 达原饮颗粒剂 15 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.96, 共标定了 18 个共有峰, 指认了 6 个主要色谱峰。达原饮颗粒剂含芍药苷 4.88 ~ 5.83 mg·g⁻¹、芒果苷 0.59 ~ 0.99 mg·g⁻¹、黄芩苷 6.39 ~ 7.65 mg·g⁻¹、汉黄芩苷 2.01 ~ 2.56 mg·g⁻¹、汉黄芩素 0.19 ~ 0.30 mg·g⁻¹、和厚朴酚 0.20 ~ 0.38 mg·g⁻¹、甘草酸 1.33 ~ 1.81 mg·g⁻¹ 及厚朴酚 0.05 ~ 0.26 mg·g⁻¹。 **结论** 建立的达原饮颗粒剂 HPLC 指纹图谱分析及含量测定方法简便且重现性良好, 可为达原饮颗粒剂的物质基础研究及质量控制提供参考。

关键词: 达原饮颗粒剂; 指纹图谱; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0240-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.036

Fingerprint and content determination of key components in Dayuanyin granules by high performance liquid chromatography

HUANG Qi^{1,2}, PENG Jing^{1,2}, WANG Yi-kun³, JIANG Yue-ping^{1,2}, HUANG Yu-ting^{1,2}, LI Jin-cheng⁴, LIU Shao^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 2. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 3. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 4. College of Pharmacy, Changsha Medical Institute, Changsha 410429)

Abstract: Objective To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for Dayuanyin granules and determine the content of 8 key components, providing reference for their quality control and evaluation. **Methods** An Agilent ZORBAX SB-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, with acetonitrile (A) and 0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 256 nm, and the injection volume was 10 μL. Totally 15 batches of Dayuanyin granule samples were analyzed. Stability across different batches was assessed by peak identification, similarity evaluation, and key component analysis. The contents of paeoniflorin, mangiferin, baicalin, wogonoside, wogonin, honokiol, glycyrrhizic acid, and magnolol were also determined. **Results** The fingerprint of 15 batches of Dayuanyin granules exhibited a similarity all greater than 0.96 when compared with those of the reference. Totally 18 common peaks were

基金项目: 湖南创新型省份建设专项重点领域研发计划 (No.2022SK2128)。

作者简介: 黄琪, 男, 副主任药师, 主要从事中药制剂质量标准与制剂工艺研究, email: huangqi20021986@163.com * 通信作者: 刘韶, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事药事管理、天然药化和开发研究, email: liushao999@csu.edu.cn

identified, with 6 major recognized chromatographic peaks. The content of key components in 1 g of Dayuanyin granules included: paeoniflorin 4.88 ~ 5.83 mg, mangiferin 0.59 ~ 0.99 mg, baicalin 6.39 ~ 7.65 mg, wogonoside 2.01 ~ 2.56 mg, wogonin 0.19 ~ 0.30 mg, honokiol 0.20 ~ 0.38 mg, glycyrrhizic acid 1.33 ~ 1.81 mg, and magnolol 0.05 ~ 0.26 mg. **Conclusion** The HPLC method for Dayuanyin granules is simple, and repeatable with high precision and stability, providing a reference for the material study and quality control of Dayuanyin granules.

Key words: Dayuanyin granule; HPLC fingerprint; content determination; quality control

达原饮是一种具有悠久历史的传统中药处方,最早见于明代医家吴有性的著作《温疫论》^[1]。该方剂由七种传统中草药组成,包括槟榔、厚朴、砂仁、知母、白芍、黄芩和甘草。这些成分含有多种活性化学成分,如生物碱、黄酮苷、多酚类等化合物,这些化合物在疾病治疗过程中起到协同作用,使达原饮在中医临床中得到了广泛应用,特别是在治疗病毒性发热、癌性发热等症状方面^[2]。该方剂适用于缓解与感染性疾病相关的症状,如畏寒壮热、胸闷、恶心呕吐、头痛和烦躁等^[3]。近年来,达原饮被湖南省中医药管理局推荐为新型冠状病毒感染(COVID-19)治疗方案之一,国内多位中医药学专家对该方剂的疗效给予了充分肯定。然而,尽管达原饮在药理作用和临床应用方面的研究较为丰富^[3-7],但关于其质量控制的研究仍相对薄弱。目前已有文献报道了对达原饮中 1 ~ 2 种成分(如黄芩苷)的含量测定,以此来控制其质量^[8]。但由于中药复方的成分复杂,单一指标成分的含量测定并不能全面控制方剂的质量。因此,有必要结合达原饮的药味特点,建立一套多指标成分的质控方法,以确保不同批次之间制剂的稳定性。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立达原饮颗粒剂的指纹图谱,并结合聚类分析、主成分分析等化学模式识别方法对所得图谱进行分析,以期促进该方剂在中医药领域的进一步研究。

1 材料

Agilent 1260 超高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); CPA225D 十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 对照品槟榔碱、芍药内酯苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草苷、甘草酸、和厚朴酚、芍药苷、芒果苷、汉黄芩素及厚朴酚(批号分别为 S16A11T11356、O31GB166251、N15GB167969、J051B216330、Z07J12X136344、Y02J11L113432、S01002101022、C21M9Y61363、J15GB154492、T28O6B5149、Y27J10C91584, 含量均为 98.0%, 上海源叶生物科技有限公司); 达原饮颗粒剂(批号分别为 220101、220301、220601、220801、221001、221201、230201、230501、

230601、230801、231001、240201、240401、240601、240801, 编号为 SP1 ~ SP15)。乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 磷酸、甲醇(分析纯, 国药集团药业股份有限公司); 水为超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B); 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 4%A; 5 ~ 10 min, 4% ~ 15%A; 10 ~ 20 min, 15% ~ 22%A; 20 ~ 55 min, 22% ~ 35%A; 55 ~ 70 min, 35% ~ 85%A; 70 ~ 80 min, 85% ~ 95%A); 检测波长: 256 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 达原饮颗粒剂制备方法 按《中国药典》2020 年版四部通则颗粒项下各项规定制备达原饮颗粒剂。根据处方信息, 取槟榔、厚朴、草果、知母、白芍、黄芩、甘草 7 味药材, 加水 8 倍量, 浸泡 30 min, 煮沸后微沸 1 h, 过滤, 滤液静置; 药渣再加水 6 倍量, 煮沸后微沸 1 h, 过滤, 合并两次滤液, 70 °C 减压(-0.1 ~ 0.03 MPa) 浓缩至约 50 mL, 离心(4000 r · min⁻¹), 加辅料适量, 真空带式干燥, 加辅料适量混匀, 真空带式干燥, 干法制粒, 制成颗粒, 即得供试品。

2.2.2 对照品溶液的制备 取适量芍药苷(8.50 mg)、芒果苷(5.75 mg)、黄芩苷(11.00 mg)、汉黄芩苷(8.00 mg)、汉黄芩素(8.75 mg)、和厚朴酚(6.50 mg)、甘草酸(8.50 mg)及厚朴酚(6.75 mg)对照品, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇溶液超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 使其完全溶解, 定容, 制成质量浓度分别为 0.34、0.23、0.44、0.32、0.35、0.26、0.34、0.27 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取达原饮颗粒剂内容物研细, 取细粉 1.00 g, 精密称定, 置 20 mL 具塞锥形瓶中, 加入 0.1% 磷酸-乙腈溶液定容至刻度, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷至室温后, 称重, 用 50% 甲醇补足减失的重量,

放置于室温，摇匀，取 1.0 mL 置于 1.5 mL 离心管中，14 500 r · min⁻¹ 离心 10 min 后取上清液，过 0.45 μm 滤膜，即得供试品溶液。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 取达原饮颗粒剂(批号: 220301)，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，结果显示以黄芩苷为参照峰 S，各主要峰的相对保留时间的 RSD 在 0.32% ~ 0.43%，相对峰面积的 RSD 在 0.24% ~ 2.4%，表明仪器具有良好的精密度。

2.3.2 重复性考察 取同一批达原饮颗粒剂(批号: 220301)，按“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果显示以黄芩苷为参照峰 S，各主要峰的相对保留时间的 RSD 在 0.41% ~ 3.4%，相对峰面积的 RSD 在 0.13% ~ 1.5%，表明该方法具有良好的重复性。

2.3.3 稳定性试验 取同一批达原饮颗粒剂(批号: 220301)，按“2.2.3”项下方法制备，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 时进样分析，结果显示以黄芩苷为参照峰 S，各主要峰的相对保留时间的 RSD 在 0.19% ~ 0.66%，相对峰面积的 RSD 在 0.31% ~ 1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的建立 取 15 批次达原饮颗粒剂，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录共有峰的峰面积和保留时间。将 15 批次样品的 HPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A 版)》软件，选择 SP1 为参照图谱，进行多点校正和峰匹配，结果共标识出 18 个共有峰(见图 1)，并生成达原饮颗粒剂对照指纹图谱 R。通过与对照品(见图 2)对比，对其中 6 个指纹峰进行指认，确认 a 峰为槟榔碱($t_R = 3.63$ min)，b 峰为芍药内酯苷($t_R = 17.19$ min)，c 峰为甘草苷($t_R = 20.41$ min)，d 峰为黄芩苷($t_R = 31.57$ min)，e 峰为汉黄芩苷($t_R = 40.50$ min)，f 峰为甘草酸($t_R = 60.67$ min)。其中黄芩苷峰形较好，前后无杂质峰干扰，分离完全，因此被选作参照峰。

2.4.2 相似度评价 将 15 批达原饮颗粒剂(SP1 ~ SP15)供试品溶液，根据“2.1”项下色谱条件进样分析，采集各样品的色谱图，将图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)》软件，计算 15 批次达原饮颗粒剂指纹图谱与对照指纹图谱的相似度，结果见表 1，各批次达原饮颗粒剂指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均在 0.96 以上，表明指纹图谱整体相似度较高，一致性较好^[9]。

2.4.3 聚类分析 将 15 批达原饮颗粒剂供试品的

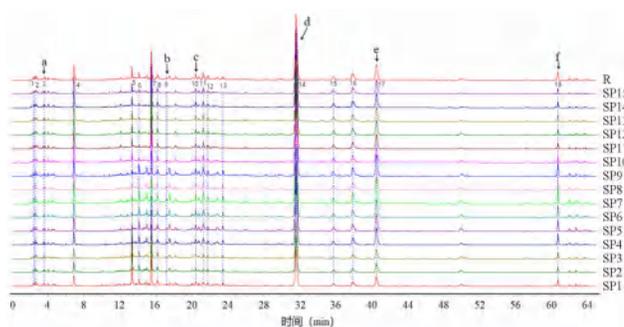


图 1 各批次达原饮颗粒剂指纹图谱叠加图

Fig 1 Fingerprint overlay of each batch of Dayuanyin granules

注 (Note): SP1 ~ SP15 为各批次达原饮颗粒剂样品的指纹图谱 (SP1 to SP15 are fingerprint spectra of various batches of Dayuanyin granules samples); R 为共有模式图谱 (R is a shared pattern graph); 标号 1 ~ 18 分别代表 18 个共有峰，其中 3、9、10、14、17、18 号峰被分别指认为以下化合物 (the numbers 1 to 18 represent 18 common peaks, among which peaks 3, 9, 10, 14, 17, and 18 are respectively referred to as the following compounds): a. 槟榔碱 (arecoline); b. 芍药内酯苷 (paeonionide glycosides); c. 甘草苷 (glycyrrhizin); d. 黄芩苷 (baicalin); e. 汉黄芩苷 (wogonin); f. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)。

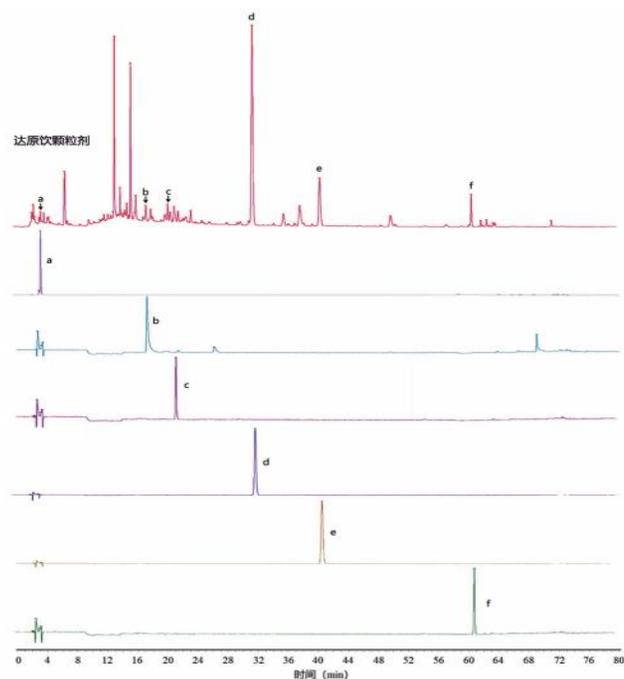


图 2 对照品色图谱

Fig 2 Chromatogram of the reference product

注 (Note): a. 槟榔碱 (arecoline); b. 芍药内酯苷 (paeonionide glycosides); c. 甘草苷 (glycyrrhizin); d. 黄芩苷 (baicalin); e. 汉黄芩苷 (wogonin); f. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)。

各色谱峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中，通过聚类分析得到图 3。各批次达原饮颗粒剂被分为三类: SP1 ~ SP3 为第一类，SP4 ~ SP9 为第二类，SP10 ~ SP15 为第三类。结果见图 3，表明，该方法具有较高的可靠性，能够广泛应用于复方质量评估，反映不同批次产品的质量稳定性。

表 1 15 达原饮颗粒剂的相似度评价结果

样品	相似度	样品	相似度
SP1	0.961	SP9	0.997
SP2	0.962	SP10	0.998
SP3	0.964	SP11	0.998
SP4	0.997	SP12	0.998
SP5	0.997	SP13	0.998
SP6	0.997	SP14	0.999
SP7	0.997	SP15	0.999
SP8	0.997		

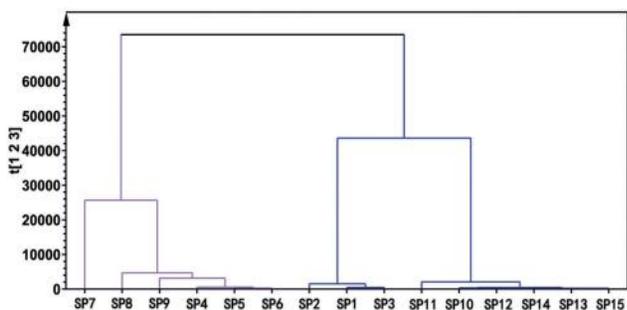


图 3 15 批达原饮颗粒剂样本聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 15 batches of Dayuanyin granules

2.4.4 主成分分析 以达原饮颗粒剂指纹图谱 18 个共有峰的峰面积为变量，导入 SIMCA 14.1 软件，进行主成分分析，共生成两个主成分，累计贡献率为 95%，表明模型对变量解释率较好。 Q^2 为 0.876，证明模型预测性好，并生成主成分分析得分图，见图 4。结果显示，15 批达原饮颗粒剂基本可以分为三类，其中 SP1 ~ SP3 为第一类，SP4 ~ SP9 为第二类，SP10 ~ SP15 归为第三类，与聚类分析的结果基本一致。本研究中，两个主成分的累计贡献率为 95%，表明能够有效地解释样本的主要变异信息^[10]。 Q^2 值为 0.876，远高于 0.5，说明模型具有较好的预测能力，符合该方法的应用要求。

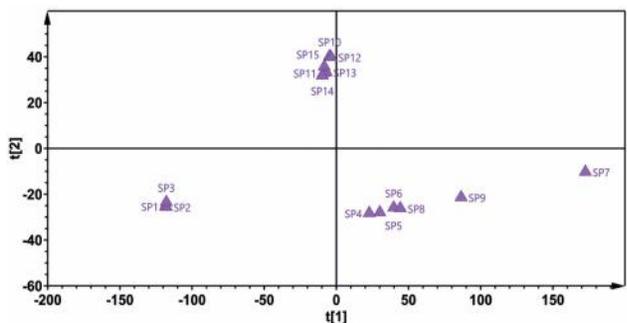


图 4 15 批达原饮颗粒剂 PCA 得分图

Fig 4 PCA scores of 15 batches of Dayuanyin granules

2.5 指标成分含量测定

2.5.1 精密度考察 取“2.2.2”项下对照品溶液，进样测定，记录峰面积。结果芍药苷、芒果苷、

黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、和厚朴酚、甘草酸、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.8%、1.3%、1.3%、1.7%、1.5%、1.5%、1.7% ($n = 6$)，表明仪器精密度良好。

2.5.2 线性关系考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液，加色谱甲醇定量稀释制成芍药苷、芒果苷、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、和厚朴酚、甘草酸、厚朴酚质量浓度分别为 0.285 61、0.030 36、0.369 61、0.102 08、0.01192、0.004 16、0.069 72、0.009 99 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液，逐级稀释成系列浓度的对照品溶液，进样测定，记录峰面积。分别以 8 种待测成分的质量浓度 (X , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归，结果见表 2。

表 2 达原饮颗粒剂中各成分线性关系
Tab 2 Linearity of components in Dayuanyin granules

成分	回归方程	相关系数	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
芍药苷	$Y = 1.543 \times 10^3 X + 1.4807$	0.9999	28.56 ~ 285.61
芒果苷	$Y = 27.969 \times 10^3 X - 4.7346$	0.9992	3.036 ~ 30.36
黄芩苷	$Y = 5.941 \times 10^3 X + 23.324$	0.9989	36.96 ~ 369.61
汉黄芩苷	$Y = 12.716 \times 10^3 X - 9.7300$	0.9999	10.21 ~ 102.08
汉黄芩素	$Y = 15.810 \times 10^3 X - 0.6025$	0.9993	1.19 ~ 11.92
和厚朴酚	$Y = 11.782 \times 10^3 X + 2.6691$	0.9989	0.42 ~ 4.16
甘草酸	$Y = 7.922 \times 10^3 X + 0.8197$	0.9998	6.97 ~ 69.72
厚朴酚	$Y = 11.080 \times 10^3 X - 0.1795$	0.9981	0.99 ~ 9.99

2.5.3 加样回收试验 取 6 份同一批次的达原饮颗粒剂 (编号: SP1) 各 1.0 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液。精密加入适量的芍药苷、芒果苷、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、和厚朴酚、甘草酸、厚朴酚对照品溶液，进样分析，计算 8 种成分的平均回收率分别为 97.05%、96.55%、98.54%、99.55%、96.97%、95.22%、97.38%、96.93%，RSD 分别为 1.1%、0.74%、0.33%、1.6%、1.9%、1.1%、1.4%、1.5%，说明方法回收率良好。

2.5.4 稳定性考察 取达原饮颗粒剂 (编号: SP1) 适量，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算芍药苷、芒果苷、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、和厚朴酚、甘草酸、厚朴酚的色谱峰面积 RSD 值分别为 1.5%、1.6%、0.80%、1.8%、1.2%、0.88%、1.7%、1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 样品含量测定 取“2.2.3”项下方法制备的供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，以外标法计算达原饮颗粒剂中 8 种成分的含量，结果见表 3。

表 3 达原饮颗粒剂主要成分含量测定结果 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)Tab 3 Content of main ingredients in Dayuanyin granules ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

样品编号	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)							
	芍药苷	芒果苷	黄芩苷	汉黄芩苷	汉黄芩素	和厚朴酚	甘草酸	厚朴酚
SP1	5.38	0.67	7.32	2.03	0.25	0.09	1.56	0.25
SP2	5.31	0.66	7.21	2.15	0.22	0.16	1.53	0.22
SP3	5.68	0.68	7.65	2.22	0.21	0.13	1.55	0.29
SP4	5.05	0.75	6.53	2.06	0.29	0.08	1.39	0.20
SP5	5.18	0.78	6.69	2.07	0.28	0.13	1.33	0.21
SP6	4.88	0.74	6.54	2.15	0.28	0.09	1.39	0.23
SP7	4.97	0.62	6.88	2.30	0.30	0.06	1.54	0.23
SP8	5.24	0.59	6.97	2.37	0.25	0.05	1.53	0.29
SP9	5.33	0.64	6.39	2.15	0.26	0.07	1.56	0.30
SP10	5.67	0.79	6.60	2.13	0.28	0.09	1.61	0.31
SP11	5.55	0.71	6.98	2.06	0.19	0.09	1.54	0.33
SP12	5.63	0.80	7.02	2.01	0.24	0.14	1.58	0.31
SP13	5.79	0.99	7.15	2.45	0.23	0.20	1.78	0.38
SP14	5.83	0.91	7.19	2.49	0.22	0.18	1.79	0.29
SP15	5.76	0.89	7.11	2.56	0.22	0.26	1.81	0.28
$\bar{x} \pm SD$	5.42 ± 0.31	0.75 ± 0.11	6.95 ± 0.35	2.21 ± 0.35	0.25 ± 0.03	0.12 ± 0.06	1.57 ± 0.14	0.27 ± 0.05

3 讨论

本试验研究了不同提取溶剂(如甲醇及不同浓度乙醇)、提取方式(回流、超声)和提取时间对色谱峰形及峰面积的影响,结果表明,50%甲醇超声提取 30 min 时,色谱峰信息最丰富,主要成分的峰面积较大,因此选择该方法作为供试品溶液的提取方式。基于文献,本研究选择了 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),它具有良好的分离效率和较宽的适用性,适用于目标化合物的分离^[11]。通过与类似研究对比并多次试验^[12],优化了流动相的选择,采用梯度洗脱以平衡分离效果和分析时间,从而提高目标化合物的分离效率,最终选择流动相体系为乙腈和 0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱。通过 UV 光谱分析,确定了本试验中检测波长为 256 nm,该波长对目标化合物灵敏度高,背景噪声低^[13-16]。

本研究通过分析成分间的相互作用关系,进一步说明各成分在复方中所起的相互支持作用,它们共同影响达原饮的药效和质量控制标准的设定。槟榔碱由于其极性很强,在 C18 柱上几乎无法保留,因此不适合定量分析。本研究将槟榔碱作为定性分析指标,在后续研究中使用适合水溶性化合物的强阳离子交换树脂柱进行分析,能够有效保留槟榔碱成分,更好地控制达原饮制剂的质量。此外,有研究表明,达原饮中的活性成分汉黄芩素与 2019-nCoV 3CL 水解酶具有显著的结合活性,其效果与瑞德西韦和洛匹那韦相似^[17-18]。汉黄芩苷和汉黄芩素作为达原饮的重要质量标志物,因其在体内可相互转化,本研究将两者均作

为主要指标成分进行分析。另外,多个批次的主要成分含量存在波动,可能由以下因素造成:①生产工艺波动,包括原料质量、制备工艺(如温度、时间等)差异;②原料来源差异,不同批次可能来自不同采集时间或地区;③分析方法的灵敏度差异,尤其是对于低浓度成分的检测。为进一步明确这些因素的影响,未来研究将探讨原料来源、采集时间等因素,并分析试验方法对低浓度成分的检测差异,同时优化生产工艺,提高质量稳定性。

本研究建立了达原饮颗粒剂的 HPLC 指纹图谱分析方法,通过化学指纹图谱质控方法,能够快速、直观地辨识其化学组成;共识别了 18 个共有峰,并确定了其中 6 个关键组分。该方法简便且具有良好的重现性,为达原饮颗粒剂的物质基础研究及质量控制提供了有效参考。

参考文献

- [1] (明)吴有性,著.温疫论[M].北京:人民卫生出版社,2007.
- [2] Peng J, Ge CY, Shang KQ, et al. Comprehensive profiling of the chemical constituents in Dayuanyin decoction using UPLC-QTOF-MS combined with molecular networking[J]. Pharm Biol, 2024, 62(1): 480-498.
- [3] 刘爽,晋臻,刘海林,等.达原饮的临床应用与药理作用研究进展[J].中南药学,2021,19(8): 1695-1699.
- [4] 李瑞,孙国同,黄贝,等.达原饮抗病毒肺炎研究进展[J].中药药理与临床,2023,39(6): 117-121.
- [5] 王建美,王冉冉,袁天翔,等.达原饮通过 NF-κB 信号通路预防低氧性肺动脉高压作用及机制研究[J].药学报,2023,58(4): 928-937.

- [6] 孙国同, 李瑞, 黄贝, 等. 达原饮治疗病毒性疾病的化学成分生物活性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (11): 16-23.
- [7] 王浩中, 郭尹玲, 郑秀丽, 等. 基于 VOSviewer 的达原饮抗疫前景分析 [J]. 成都中医药大学学报, 2023, 46 (1): 58-62.
- [8] 宋茹, 迟归兵. 达原饮胶囊的质量标准研究 [J]. 中成药, 2010, 30 (8): 1257-1259.
- [9] 马思文, 车宏伟, 孟雅, 等. 疏清颗粒高效液相色谱指纹图谱的建立及相关性研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (11): 3014-3019.
- [10] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (14): 4185-4192.
- [11] 李敏, 兰花, 左亚妹, 等. 益心胶囊 HPLC 指纹图谱初步研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6 (30): 172-173.
- [12] 张荣华, 靳梓微, 张腾月, 等. 经典名方达原饮基准样品关键质量属性量值传递研究 [J]. 中草药, 2024, 55 (6): 1977-1987.
- [13] 张洋, 周方, 唐璐子, 等. 食品中黄酮类化合物检测技术研究进展 [J]. 粮食与食品工业, 2024, 31 (1): 64-67.
- [14] 任慧, 胡静, 崔小敏, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多酚类成分含量测定的大盘龙七质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54 (19): 6452-6460.
- [15] Csupor D, Borcsa B, Heydel B, et al. Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed Radix aconiti with a titration method of total alkaloids [J]. Pharm Biol, 2011, 49 (10): 1097-1101.
- [16] Soldati F, Sticher O. HPLC separation and quantitative determination of ginsenosides from Panax ginseng, Panax quinquefolium and from ginseng drug preparations. 2nd communication [J]. Planta Med, 1980, 39 (4): 348-357.
- [17] Ruan XF, Du P, Zhao K, et al. Mechanism of Dayuanyin in the treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Med, 2020, 15: 62.
- [18] Zhu ZY, Zhao L, Liu XF, et al. Comparative pharmacokinetics of baicalin and wogonoside by liquid chromatography-mass spectrometry after oral administration of Xiaochaihu Tang and Radix scutellariae extract to rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878 (24): 2184-2190.
- (收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2024-11-23)

通知

《中南药学》期刊 2024 年变更了主管单位和出版单位, 主管单位由湖南省药品监督管理局变更为湖南省科学技术协会, 出版单位由中南药学杂志社变更为《中南药学》编辑部, 主办单位为湖南省药学会。变更完成后, 中南药学杂志社不再保留, 而是作为湖南省药学会的内设机构, 因此原银行账号也不再保留, 而是使用主办单位的账号, 目前《中南药学》编辑部的新账号为:

户名: 湖南省药学会

账号: 52460188000095587

开户行: 中国光大银行股份有限公司长沙人民路支行

中药资源开发与利用

河北小五台山区域药用植物资源调查与分析

陈红艳, 张焕, 李俊雪, 郑路静, 柴天川* (河北省中医院/河北省中药制剂产业技术研究院, 石家庄 050011)

摘要: **目的** 对小五台山区域药用植物资源现状进行调查与分析, 为该区野生药用植物的保护研究与常用中药材的开发利用提供依据。**方法** 采用实地走访、微距拍照、标本采集、查阅文献和种类鉴定等方法, 整理分析小五台山区域药用植物资源种类群组成、生活型、出现频率和药用部位等。**结果** 小五台山区域药用植物资源现有 113 科, 399 属, 722 种; 其中被 2020 年版《中国药典》一部收录的有 59 科, 143 种。**结论** 小五台山区域药用植物野生资源十分丰富, 其中不乏国家重点保护品种, 应在全年全区域封山的前提下, 建立完善的野生药用植物蕴藏量监管制度, 并依据蕴藏量的高低不同采用科学采收利用、就地保护、异地引种及人工培育等不同管理办法, 使该地区中药产业可持续发展。

关键词: 小五台山; 药用植物; 资源调查

中图分类号: S567

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0246-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.037

Medicinal plant resources in Xiaowutai mountain region in Hebei

CHEN Hong-yan, ZHANG Huan, LI Jun-xue, ZHENG Lu-jing, CHAI Tian-chuan* (*Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine/Hebei Industrial Technology Institute for Traditional Chinese Medicine Preparation, Shijiazhuang 050011*)

Abstract: Objective To determine the current status of medicinal plant resources in the Xiaowutai mountain region, to provide reference for the conservation of wild medicinal plants and further development and utilisation of common herbal medicines in this region. **Methods** By field visits, macro-photography, specimen collection, literature review and species identification, we analyzed the compositions of medicinal plant species groups, life types, frequency of occurrence and medicinal parts in this area. **Results** Totally 113 families, 399 genera and 722 species of medicinal plants were found, among which 59 families and 143 species were recorded in the 2020 Edition of the *Chinese Pharmacopoeia* (Part I). **Conclusion** Xiaowutai mountain region has rich wild medicinal plant resources, and many of them are national key protected species. Under the premise of sealing off the whole region throughout the year, a perfect system of regulating the amount of wild medicinal plant reserves should be established. Scientific harvesting and utilisation, in-situ protection, exotic introduction and artificial cultivation should be taken according to different reserves to protect sustainable development of traditional Chinese medicine industry of the region.

Key words: Xiaowutai mountain; medicinal plant; resource survey

小五台山地处太行山脉北端的西麓, 位于燕山 - 太行山 - 恒山的交汇处; 该区域包含东台、南台、西台、北台、中台五座主峰, 为与山西省

五台山相区别, 故得小五台山之名; 行政区域属于河北省蔚县与涿鹿县 (见图 1)。小五台山区域的支柱产业为以核桃树、果树、松树为主的种植

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (No.2021007, No.2022047); 河北省中药制剂产业技术研究院项目 (No.SC2021003)。

作者简介: 陈红艳, 女, 副主任药师, 主要从事中药制剂研发, email: 1024041642@qq.com ***通信作者:** 柴天川, 男, 主任药师, 主要从事中药资源的开发与利用, email: 690903chai@163.com

业、养殖业、旅游业；该地特产有张北大米、张北苹果、张北核桃等；该地有国家级自然保护区，是华北地区重要的植物物种基因库。

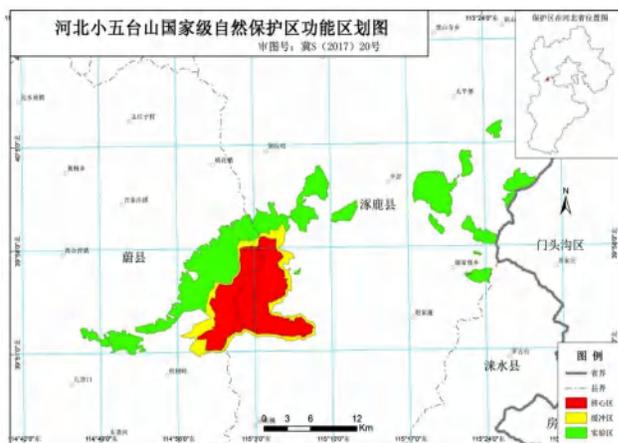


图 1 小五台山功能区划图

Fig 1 Functional zoning map of Xiaowutai mountain

自 19 世纪至今，众多国内外植物学家、农林院所专家、国家科研单位研究人员、高等院校师生等到该地区开展了植物学调查，先后撰写了包括《小五台山植物》《河北小五台山菌物》《小五台山植物志》《小五台山常见植物图鉴》《小五台山植物学野外实习指导》《河北小五台山种子植物检索表》等^[1-6]在内的著作、学术论文或考察报告。但截至目前，尚未见到药用植物方面的专著出版，亦未见针对小五台山药用植物资源的系统研究与报道。近几年，本团队借助全国第四次中药资源普查的机会，对小五台山区域进行了野外走访调查，通过查阅文献对药用植物的科、属、种、入药部位、出现频率等进行统计与分析，为小五台山药用植物资源的保护开发和中药产业的发展提供依据。

1 自然概况

小五台山位于河北省张家口市东南部，东经 114°50' ~ 115°15'，北纬 39°40' ~ 40°10'。山体走向为东北 - 西南转北西 - 南东，山势由南向西北延伸呈弧形，形成南、西、北三面环山的丘陵盆地地貌，东西长约 60 km，南北宽约 28 km，总面积 26 700 hm²。小五台山地质构成主要为沉积岩、火成岩和侵入岩，岩石断裂发育、侵蚀强烈，山势险峻、沟深坡陡、森林茂密、涧流多见。土壤垂直变化较明显，海拔在 800 ~ 2882 m，自低到高依次为栗钙土、褐土、黄土、山地棕壤、亚高山草甸土。小五台山地区属于暖温带大陆季风性山地气候。季节和昼夜温差大，年平均气温 6.4℃。年平均降雨量 400 ~ 700 mm，集中于夏季，无霜期短，冻结期长，阴坡积雪可终年不化。该区水资源丰富，有永

定河和大清河两大水系。基于地势、地质、气候、降水、土壤等因素的影响，小五台山区域植被类型依海拔自高到低为蒿草草甸、亚高山灌丛、针阔叶混交林、次生灌草丛、农作物、沼生植被。

2 方法

2.1 外业调查

基于小五台山区域地势条件，结合《全国中药资源普查技术规范》^[7]的要求，本研究采用实地走访、微距拍照、标本采集的方法，于 2020—2022 年对该区域进行调查。调查过程中记录药用植物的名称、种类、数量、药用部位、生活型分类等信息，拍摄药用植物不同部位的照片，采集药用植物及其不同的药用部位。走访区域内居民和中药产业园员工，调查该地药用植物开发利用情况。

2.2 内业整理

对拍摄的照片进行分类整理并上传。整理采集的中药材及其药用部位，制作标本。查阅《小五台山植物志》《河北植物志》等中药的相关书籍^[8-15]和 PPBC 中国植物图像库 (<http://ppbc.iplant.cn/>)、Iplant 植物智 (<http://www.iplant.cn/>)，确定药用植物的名称、科、属、种，并对药用植物的科、属、种占比，生活型分类，资源组成等进行统计与分析^[16-17]。

3 结果与分析

3.1 小五台山区域药用植物资源物种群的分析

经过对调查数据的统计与分析，小五台山区域有药用植物共 722 种，涉及 113 科，399 属，其中被子植物有 681 种 97 科 377 属，占该区总种数的 94.32%；蕨类植物有 30 种 11 科 14 属；裸子植物有 9 种 3 科 6 属；苔藓植物有 1 种 1 科 1 属；地衣植物有 1 种 1 科 1 属。结果表明，该区物种组成以被子植物为主（见表 1）。

表 1 小五台山区域药用植物种类群统计结果

Tab 1 Medicinal plant species groups in the Xiaowutai mountain region

类别	种数	占总种数 比/%	科数	占总科数 比/%	属数	占总属数 比/%
被子植物	681	94.32	97	85.84	377	94.49
裸子植物	9	1.25	3	2.65	6	1.50
蕨类植物	30	4.15	11	9.73	14	3.51
苔藓植物	1	0.14	1	0.88	1	0.25
地衣植物	1	0.14	1	0.88	1	0.25
合计	722	100.00	113	100.00	399	100.00

3.2 小五台山区域药用植物资源组成的分析

根据品种数量，将小五台山区域药用植物资源分为优势科（≥ 16 种）、大型科（11 ~ 15 种）、中型科（6 ~ 10 种）、小型科（2 ~ 5 种）、单种科

(1 种), 共计 5 类。优势科有 10 个, 分别是菊科 (87)、豆科 (46)、蔷薇科 (39)、毛茛科 (32)、唇形科 (31)、禾本科 (27)、蓼科 (25)、伞形科 (22)、苋科 (19)、十字花科 (18); 大型科有 5 个, 分别为石竹科 (14)、列当科 (13)、夹竹桃科 (11)、旋

花科 (11)、紫草科 (11); 中型科有 21 个; 小型科有 45 个; 单种科有 32 个。由结果可知, 单种科、小型科、中型科合计占比 86.73%, 占该区域药用植物种类构成的主要地位 (见表 2)。

表 2 小五台山区域药用植物组成统计分析表

Tab 2 Statistics of compositions of medicinal plants in Xiaowutai mountain region

类别	科数 / 个	科占比 / %	种数 / 个	种占比 / %	全部科名 (种数)
优势科 (≥ 16 种)	10	8.85	346	47.92	菊科 (87)、豆科 (46)、蔷薇科 (39)、毛茛科 (32)、唇形科 (31)、禾本科 (27)、蓼科 (25)、伞形科 (22)、苋科 (19)、十字花科 (18)
大型科 (11 ~ 15 种)	5	4.42	60	8.31	石竹科 (14)、列当科 (13)、夹竹桃科 (11)、旋花科 (11)、紫草科 (11)
中型科 (6 ~ 10 种)	21	18.58	156	21.61	忍冬科 (10)、天门冬科 (10)、堇菜科 (9)、桔梗科 (9)、杨柳科 (8)、荨麻科 (8)、大戟科 (8)、龙胆科 (8)、茄科 (8)、车前科 (8)、罂粟科 (7)、景天科 (7)、柳叶菜科 (7)、天南星科 (7)、卷柏科 (6)、凤尾蕨科 (6)、无患子科 (6)、葡萄科 (6)、锦葵科 (6)、茜草科 (6)、莎草科 (6)
小型科 (2 ~ 5 种)	45	39.83	128	17.73	桑科 (5)、牻牛儿苗科 (5)、鼠李科 (5)、木樨科 (5)、兰科 (5)、木贼科 (4)、铁角蕨科 (4)、松科 (4)、卫矛科 (4)、报春花科 (4)、石蒜科 (4)、柏科 (3)、桦木科 (3)、壳斗科 (3)、大麻科 (3)、檀香科 (3)、小檗科 (3)、叶下珠科 (3)、葫芦科 (3)、香蒲科 (3)、眼子菜科 (3)、鸢尾科 (3)、蹄盖蕨科 (2)、岩蕨科 (2)、水龙骨科 (2)、麻黄科 (2)、胡桃科 (2)、榆科 (2)、商陆科 (2)、亚麻科 (2)、芸香科 (2)、远志科 (2)、漆树科 (2)、金丝桃科 (2)、怪柳科 (2)、瑞香科 (2)、胡颓子科 (2)、山茱萸科 (2)、杜鹃花科 (2)、苦苣苔科 (2)、五福花科 (2)、泽泻科 (2)、鸭跖草科 (2)、藜芦科 (2)、百合科 (2)
单种科 (1 种)	32	28.32	32	4.43	石耳科 (1)、地钱科 (1)、碗蕨科 (1)、球子蕨科 (1)、鳞毛蕨科 (1)、蕨科 (1)、马齿苋科 (1)、金鱼藻科 (1)、芍药科 (1)、防己科 (1)、五味子科 (1)、虎耳草科 (1)、酢浆草科 (1)、白刺科 (1)、蒺藜科 (1)、苦木科 (1)、凤仙花科 (1)、猕猴桃科 (1)、秋海棠科 (1)、千屈菜科 (1)、五加科 (1)、白花丹科 (1)、花荵科 (1)、玄参科 (1)、紫葳科 (1)、通泉草科 (1)、透骨草科 (1)、菖蒲科 (1)、灯芯草科 (1)、阿福花科 (1)、菝葜科 (1)、薯蓣科 (1)

3.3 小五台山区域药用植物生活型的分析

小五台山区域药用植物资源按生活型分为草本、草质藤本、木质藤本、灌木、乔木 5 类 (见表 3)。其中草本生活型药用植物最多, 占比 79.92%;

草质和木质藤本型占比较少, 合计占比 2.77%。说明该区域分布藤本、灌木、乔木生活型的药用植物资源很少, 应明确禁止开采。

表 3 小五台山区域药用植物资源生活型统计表

Tab 3 Statistics of life type of medicinal plant resources in Xiaowutai mountain region

生活型	种数	种占比 / %	举例
草本	577	79.92	商陆 <i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.、独行菜 <i>Lepidium apetalum</i> Willd.
草质藤本	9	1.25	蝙蝠葛 <i>Menispermum dauricum</i> DC.、党参 <i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.
木质藤本	11	1.52	葎叶蛇葡萄 <i>Ampelopsis humulifolia</i> Bge.、五味子 <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.
灌木	66	9.14	三裂绣线菊 <i>Spiraea trilobata</i> L.、河北木蓝 <i>Indigofera bungeana</i> Walp.
乔木	59	8.17	圆柏 <i>Juniperus chinensis</i> Roxb.、毛白杨 <i>Populus tomentosa</i> Carrière

3.4 小五台山区域重点药用植物的分析

经查阅 2020 年版《中国药典》一部, 小五台山区域药用植物资源中有 59 科, 143 种被收录, 占该区总科数的 52.21%, 占总种类数的 19.81%。其中出现频率较高的有 85 种 (见表 4)。

3.5 小五台山区域珍稀的药用植物

此次调查发现的药用植物均是野生资源, 其中包括珍稀的国家级保护植物: 国家一级保护植物有大花杓兰; 国家二级保护植物有二叶兜被兰、火烧兰、手参、绶草、北重楼、刺五加、五味子;

表 4 小五台山区重点调查药用植物信息

Tab 4 Information of medicinal plants for priority surveys in the Xiaowutai mountain region

序号	基原植物名称	拉丁学名	药材名称 (药用部位)	出现频率 /%
1	卷柏	<i>Selaginella tamariscina</i> (P.Beauv.) Spring	卷柏 (全草)	0.12
2	垫状卷柏	<i>Selaginella pulvinata</i> (Hook.& Grev.) Maxim.	卷柏 (全草)	0.23
3	油松	<i>Pinus tabulaeformis</i> Carriere	松花粉 (花粉)、油松节 (瘤状枝节)	2.33
4	侧柏	<i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	侧柏叶 (枝梢和叶)、柏子仁 (种仁)	0.65
5	草麻黄	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	麻黄 (草质茎)、麻黄根 (根和根茎)	2.47
6	木贼麻黄	<i>Ephedra equisetina</i> Bunge	麻黄 (草质茎)	0.36
7	桑	<i>Morus alba</i> L.	桑叶 (叶)、桑枝 (嫩枝)、桑白皮 (根皮)、桑椹 (果穗)	0.85
8	枸树	<i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) L'Hér. ex Vent.	楮实子 (果实)	1.02
9	杠板归	<i>Polygonum perfoliatum</i> L.	杠板归 (地上部分)	0.31
10	篇蓄	<i>Polygonum aviculare</i> L.	篇蓄 (地上部分)	1.13
11	拳参	<i>Bistorta officinalis</i> Raf.	拳参 (根茎)	1.06
12	何首乌	<i>Pleuropterus multiflorus</i> (Thunb.) Nakai	何首乌 (块根)	0.38
13	地肤	<i>Bassia scoparia</i> (L.) A.J.Scott	地肤子 (果实)	0.54
14	牛膝	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	牛膝 (根)	0.26
15	垂序商陆	<i>Phytolacca americana</i> L.	商陆 (根)	0.32
16	商陆	<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.	商陆 (根)	0.10
17	马齿苋	<i>Portulaca oleracea</i> L.	马齿苋 (地上部分)	0.86
18	瞿麦	<i>Dianthus superbus</i> L.	瞿麦 (地上部分)	0.27
19	石竹	<i>Dianthus chinensis</i> L.	瞿麦 (地上部分)	0.51
20	麦蓝菜	<i>Gypsophila vaccaria</i> Sm.	王不留行 (种子)	0.24
21	兴安升麻	<i>Actaea dahurica</i> Turcz. ex Fisch.& C.A.Mey.	升麻 (根茎)	0.15
22	白头翁	<i>Pulsatilla chinensis</i> (Bge.) Regel	白头翁 (根)	0.43
23	棉团铁线莲	<i>Clematis hexapetala</i> Pall.	威灵仙 (根茎)	0.11
24	蝙蝠葛	<i>Menispermum dauricum</i> DC.	北豆根 (根茎)	0.27
25	五味子	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	五味子 (果实)	0.09
26	白屈菜	<i>Chelidonium majus</i> L.	白屈菜 (地上部分)	0.14
27	小根蒜	<i>Allium macrostemon</i> Bunge	薤白 (鳞茎)	0.19
28	独行菜	<i>Lepidium apetalum</i> Willd.	葶苈子 (种子)	0.08
29	播娘蒿	<i>Descurainia Sophia</i> (L.) Webb ex Prantl	葶苈子 (种子)	0.31
30	瓦松	<i>Orostachys fimbriata</i> (Turcz.) A.Berg.	瓦松 (地上部分)	1.07
31	山楂	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bge.	山楂 (果实)、山楂叶 (叶)	0.19
32	龙牙草	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	仙鹤草 (地上部分)	0.42
33	地榆	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	地榆 (根)	0.21
34	委陵菜	<i>Potentilla chinensis</i> Ser.	委陵菜 (全草)	0.16
35	翻白草	<i>Potentilla discolor</i> Bge.	翻白草 (全草)	0.09
36	山杏	<i>Prunus sibirica</i> L.	苦杏仁 (种仁)	0.38
37	山桃	<i>Prunus davidiana</i> (Carr.) Franch.	桃仁 (种子)	0.49
38	欧李	<i>Prunus humilis</i> Bge.	郁李仁 (种子)	0.10
39	路边青	<i>Geum aleppicum</i> Jacq.	蓝布正 (全草)	0.65
40	苦参	<i>Sophora flavescens</i> Aiton	苦参 (根)	0.21
41	膜荚黄耆	<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge.	黄芪 (根)	0.14
42	背扁黄耆	<i>Astragalus complanatus</i> var. <i>complanatus</i>	沙苑子 (种子)	0.29
43	牻牛儿苗	<i>Erodium stephanianum</i> Willd.	老鹳草 (地上部分)	0.86
44	野老鹳草	<i>Geranium carolinianum</i> L.	老鹳草 (地上部分)	0.15
45	蒺藜	<i>Tribulus terrestris</i> L.	蒺藜 (果实)	0.71
46	黄檗	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	关黄柏 (树皮)	0.06
47	臭椿	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	椿皮 (根皮或干皮)	0.53

续表 4

序号	基原植物名称	拉丁学名	药材名称(药用部位)	出现频率/%
48	远志	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	远志(根)	0.98
49	西伯利亚远志	<i>Polygala sibirica</i> L.	远志(根)	0.13
50	蓖麻	<i>Ricinus communis</i> L.	蓖麻子(种子)	0.14
51	酸枣	<i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> (Bunge) Hu ex H.F.Chow	酸枣仁(种子)	0.23
52	苘麻	<i>Abutilon theophrasti</i> Medikus	苘麻子(种子)	1.06
53	紫花地丁	<i>Viola philippica</i> Cav.	紫花地丁(全草)	2.13
54	刺五加	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr.& Maxim.) Maxim.	刺五加(根和根茎或茎)	0.11
55	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i> Franch.	北柴胡(根)	1.35
56	狭叶柴胡	<i>Bupleurum scorzonerifolium</i> Willd.	南柴胡(根)	0.24
57	防风	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.	防风(根)	0.39
58	蛇床	<i>Cnidium monnieri</i> (L.) Spreng.	蛇床子(果实)	0.28
59	白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.ex Hoffm.) Benth.& Hook .f.ex Franch.& Sav.	白芷(根)	0.13
60	辽藁本	<i>Conioselinum smithii</i> (H.Wolff) Pimenov & Kljuykov	藁本(根和根茎)	0.28
61	白蜡树	<i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	秦皮(枝皮或干皮)	0.05
62	秦艽	<i>Gentiana macrophylla</i> Pall.	秦艽(根)	0.13
63	杠柳	<i>Periploca sepium</i> Bunge	香加皮(根皮)	0.46
64	白薇	<i>Vincetoxicum atratum</i> (Bunge) Morren & Decne.	白薇(根和根茎)	0.05
65	徐长卿	<i>Vincetoxicum pycnostelma</i> Kitag.	徐长卿(根和根茎)	0.11
66	裂叶牵牛	<i>Ipomoea nil</i> (L.) Roth	牵牛子(种子)	1.36
67	圆叶牵牛	<i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	牵牛子(种子)	0.59
68	菟丝子	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	菟丝子(种子)	0.19
69	南方菟丝子	<i>Cuscuta australis</i> R.Br.	菟丝子(种子)	0.04
70	黄芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	黄芩(根)	1.33
71	益母草	<i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	益母草(地上部分)、茺蔚子(果实)	0.88
72	薄荷	<i>Mentha canadensis</i> L.	薄荷(地上部分)	0.31
73	枸杞	<i>Lycium chinense</i> Mill.	地骨皮(根)	0.17
74	玄参	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	玄参(根)	0.06
75	地黄	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. & C.A.Mey.	地黄(块根)	0.93
76	阴行草	<i>Siphonostegia chinensis</i> Benth.	北刘寄奴(全草)	0.13
77	车前	<i>Plantago asiatica</i> L.	车前子(种子)、车前草(全草)	1.14
78	平车前	<i>Plantago depressa</i> Willd.	车前子(种子)、车前草(全草)	0.42
79	茜草	<i>Rubia cordifolia</i> L.	茜草(根和根茎)	0.37
80	桔梗	<i>Platycodon grandifloras</i> (Jacq.) A.DC.	桔梗(根)	0.16
81	紫菀	<i>Aster tataricus</i> L.f.	紫菀(根和根茎)	0.07
82	牛蒡	<i>Arctium lappa</i> L.	牛蒡子(果实)	0.14
83	水烛香蒲	<i>Typha angustifolia</i> L.	蒲黄(花粉)	0.12
84	东方泽泻	<i>Alisma orientale</i> (Samuel) Juz.	泽泻(块茎)	0.13
85	芦苇	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	芦根(根茎)	0.96

濒危的国家三级保护植物有胡桃楸(见图 2)。

4 讨论

在河北省的植物资源分布中,小五台山区域属暖温带落叶阔叶林植被带,受地形、地貌、植被区系形成历史等因素长期的影响,该区域表现为华北、东北、西北、西南等多种区系交汇,相互融合形成的植物区系综合体,同时也特化出一些稀有珍贵的小五台山或河北及华北特有的种

类。小五台山区域属于国家级自然保护区,曾是军事保护基地,实行全年全区域封山,严格的封禁措施有效地保护了区内的野生资源,使得小五台山成为华北地区自然植被保存完整的地区之一,是华北重要的植物基因库。此次调查的药用植物资源均是野生资源,共 722 种,涉及 113 科 399 属,被 2020 年版《中国药典》一部收录的有 59 科 143 种。小五台山区域野生药用植物种类虽

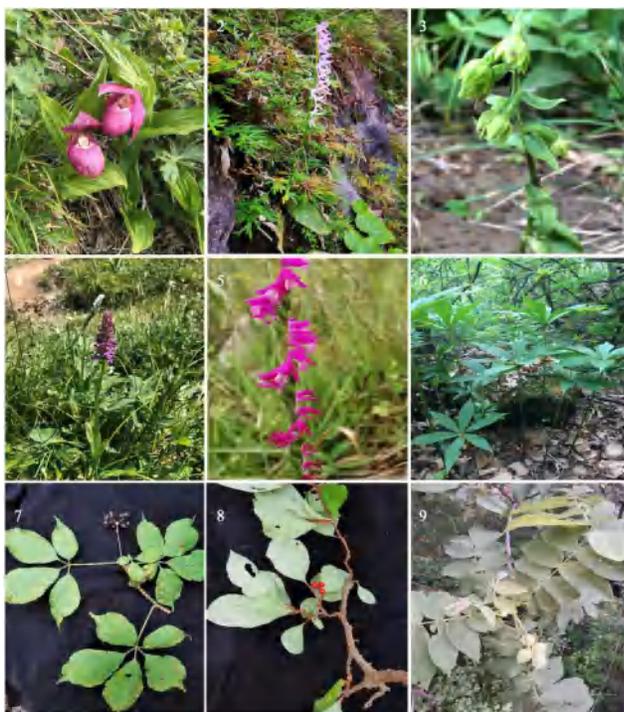


图 2 小五台山区域珍稀药用植物图

Fig 2 Rare medicinal plants in Xiaowutai mountain region

1. 大花杓兰 (*Cypripedium macranthos*); 2. 二叶兜被兰 [*Neottianthe cucullata* (L.) Schltr.]; 3. 火烧兰 [*Epipactis helleborine* (L.) Crantz]; 4. 手参 [*Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br.]; 5. 绶草 [*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames]; 6. 北重楼 (*Paris verticillata* M.Bieb.); 7. 刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*); 8. 五味子 [*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]; 9. 胡桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim.)

然丰富，但蕴藏量不高，从植物生活型看以草本植物为主，占有野生资源的近 80%，这与该区域的降水量低且主要集中在夏季有关。

近年来，市场对中药资源的需求不断提高，相对于小五台山区域严格的封禁保护措施，野生药用植物资源保护与开发的矛盾更加突出。针对此矛盾，提出如下建议：严格监测该区域野生药用植物资源的蕴藏量，对蕴藏量高的药用植物，要着重科学采收及其药用价值充分利用技术的研究；对蕴藏量低的药用植物，要着重就地保护与

异地引种人工栽培技术的研究；对濒危的保护植物如胡桃楸，当地除了施行就地保护的措施，还要重点攻关疗效相同的可替代药用植物的选取及造成该药用植物濒危的自然因素的研究。

参考文献

- [1] 张庆非, 马天贵. 小五台山植物 [M]. 河北: 河北省小五台山自然保护区管理处, 1988.
- [2] 小五台山菌物科学考察队. 河北小五台山菌物 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [3] 李盼威, 李斌, 杜娟. 小五台山常见植物图鉴 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2016.
- [4] 唐宏亮, 赵金莉, 张凤娟. 小五台山植物学野外实习指导 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2017.
- [5] 赵建成, 裴林. 河北小五台山种子植物检索表 [M]. 北京: 科学出版社, 2019.
- [6] 赵建成, 郭书彬, 李盼威. 小五台山植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [7] 黄璐琦, 王永炎. 全国中药资源普查技术规范 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015.
- [8] 河北植物志编辑委员会. 河北植物志 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1991.
- [9] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [10] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020.
- [11] 南京中医药大学编著. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [12] 王国强. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [13] 中华本草编委会. 中华本草 [M]. 全卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [14] 柴天川, 李卓达, 刘瑞连. 南太行本草图谱 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2023.
- [15] 柴天川, 韩克忠, 朱玉娟. 小五台山药用植物图谱 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2024.
- [16] 柴天川, 李俊雪, 张焕, 等. 灵寿县五岳寨区域药用植物资源调查 [J]. 中药材, 2023, 46 (5): 1106-1111.
- [17] 柴天川, 李俊雪, 张焕, 等. 河北省赞皇县药用植物资源调查与分析 [J]. 中南药学, 2023, 21 (3): 752-757.

(收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2024-07-30)

统计过程控制在医疗机构制剂质量回顾分析中的应用

岳凤芹^{1, 2, 3}, 杨思成^{1, 2, 3}, 黄菊^{1, 2, 3}, 陈思迪^{1, 2, 3}, 彭伟^{1, 2, 3}, 陈树和^{2, 3}, 周从辉^{2, 3}, 孙婉瑾^{2, 3}, 段雪云^{2, 3*} (1.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2.湖北中医药大学附属医院/湖北省中医院/湖北省中医药研究院 药事部, 武汉 430061; 3.湖北时珍实验室, 武汉 430061)

摘要: **目的** 以地五养肝胶囊为例, 探讨统计过程控制在医疗机构制剂质量回顾分析中的应用。**方法** 运用 Minitab 18 软件中具有能力分析的功能“Capability Sixpack”, 以地五养肝胶囊中所含有效成分五味子醇甲的含量为评判指标, 判断该制剂在生产过程中是否处于受控状态及配制工艺是否稳定。**结果** 2018 年 12 月至 2021 年 12 月生产的地五养肝胶囊中所有批次产品质量均符合所拟订标准, 但是配制工艺、过程能力尚不稳定, 需采取改进措施。在采取改进措施后, 其生产能力有所提高, 生产状态稳定, 达到控制状态, 可满足生产所需。**结论** 能力六合图在医疗机构制剂生产的质量分析中可以起到很好的警示作用, 在质量控制中发挥重要作用, 及时提醒操作人员对生产过程自查自纠, 有利于医疗机构制剂的持续、稳定发展。

关键词: 质量回顾分析; 医疗机构制剂; 统计过程控制; 质量分析; 地五养肝胶囊

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0252-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.038

Role of statistical process control in retrospective analysis of the quality of preparations in medical institutions

YUE Feng-qin^{1, 2, 3}, YANG Si-cheng^{1, 2, 3}, HUANG Ju^{1, 2, 3}, CHEN Si-di^{1, 2, 3}, PENG Wei^{1, 2, 3}, CHEN Shu-he^{2, 3}, ZHOU Cong-hui^{2, 3}, SUN Wan-jin^{2, 3}, DUAN Xue-yun^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine/Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine/Institute of Chinese Medicine, Hubei Academy of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061)

Abstract: Objective To determine the role of statistical process control in the retrospective analysis of the quality of preparations in medical institutions with Diwu Yanggan capsules as an example. **Methods** The Capability Sixpack function for capability analysis in Minitab 18 software was used. The content of schisandrin A in Diwu Yanggan capsules was used as the evaluation index to determine whether the preparation was under control during the production and whether the configuration was stable. **Results** The quality of all batches of Diwu Yanggan capsules produced from December 2018 to December 2021 met the proposed standards, but the preparation and process capability remained unstable, and improvement was needed. After the improvement, the production capacity was enhanced, the production was stable and met the requirements. **Conclusion** Capability Sixpack plays a warning role in the quality analysis of preparations in medical institutions, also plays an important role in quality control, and can timely remind operators to double-check the production of preparations in medical institutions.

Key words: retrospective quality analysis; preparation in medical institution; statistical process control; quality analysis; Diwu Yanggan capsule

基金项目: 全国中药特色技术传承人才培养项目(国中医药人教函[2023]96号); 国家中医药管理局“十二五”重点专科培育项目(国中医药政发[2012]2号)。

作者简介: 岳凤芹, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新制剂、新剂型、新材料研究, email: yue_fengqin9928@163.com *通信作者: 段雪云, 女, 教授, 主任药师, 主要从事中药新制剂、新剂型研究, email: 1046625326@qq.com

医疗机构制剂生产配制过程中始终存在配制工艺和药品质量的波动,其中包括自然波动和异常波动(由原辅料质量、生产机械故障、操作人员疏失以及环境变化等导致)^[1]。若制剂质量出现异常波动,可能会导致临床药效无法保障,甚至会危及患者生命。《医疗机构制剂配制质量管理规范(试行)》^[2]规定医疗机构制剂的质量管理组织应定期组织自检,要求进行评价并给出改进措施。

统计过程控制(statistical process control,简称SPC)是制剂生产阶段常用的质量管理方法^[3],地五养肝胶囊为湖北省中医院特色制剂,由熟地黄、茵陈、姜黄、五味子、甘草五味药制成,具有补肾养肝、清利湿热、解毒通络之效,用于慢性肝炎、肝损伤出现肝肾虚损、湿热毒结、肝络瘀阻诸症,能够有效改善患者的肝功能,临床上主要用于治疗多种慢性肝病^[4-5]。本文通过应用“能力六合图(以下简称六合图)”^[6-7]对湖北省中医院制剂室配制的地五养肝胶囊中有效成分的含量进行分析、对制剂配制过程的工艺稳定性和过程能力等各个环节进行监控和综合评估,判断配制生产工艺是否处于受控、可接受的状态,预防生产过程产生不良趋势,及时发现并解决出现或可能出现的问题,积极确定制剂改进的方法,从而保证医疗机构制剂符合质量标准要求。

1 资料与方法

1.1 资料来源

搜集我院制剂中心生产过程改进前 2018 年 12 月至 2021 年 12 月及改进后 2022 年 1 月至 2024 年 1 月配制的地五养肝胶囊的配制工艺规程、批生产记录和检验记录等相关生产数据资料,确定所生产的不同批次的医疗机构制剂是在相同配制工艺及相同检验环境下完成,生产记录和检验结果真实可靠。

根据湖北省药监局审定标准中地五养肝胶囊的质量标准,对地五养肝胶囊进行检查,检查项目包括性状、装量、崩解时限、微生物限度及五味子醇甲的含量(每粒含量不得少于 0.40 mg)。

1.2 仪器与试药

1.2.1 仪器 Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ES 225SM-DR 十万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); AS 220.R2 万分之一电子分析天平(波兰 RADWAG 公司); UPT-11-10T 优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司); KQ-500VDE 双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2.2 试药 五味子醇甲(批号:110857-201815)、姜黄素(批号:110823-202107)(供含量测定用,

中国食品药品检定研究院);乙腈、甲醇为色谱纯(默克股份两合公司),其余试剂均为分析纯。

1.3 色谱条件

1.3.1 五味子醇甲含量测定色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);以甲醇-0.05%磷酸溶液(60:40)为流动相;检测波长为 250 nm;流速为 1 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL。理论板数以五味子醇甲峰计算应不低于 2000。

1.3.2 姜黄素含量测定色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-4%冰乙酸(52:48);流速为 1 mL·min⁻¹;柱温为 30℃;检测波长为 430 nm;进样量为 10 μL。

1.4 对照品溶液的制备

1.4.1 五味子醇甲对照品溶液 取五味子醇甲对照品适量,精密称定,加甲醇制成 0.2 mg·mL⁻¹的溶液,即得。

1.4.2 姜黄素对照品溶液 取姜黄素对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇定容后,摇匀,制成 100 μg·mL⁻¹的溶液,即得。

1.5 供试品溶液的制备

取本品内容物,研细,取约 2 g,精密称定,置棕色具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,密塞,称定重量,超声(45 kHz, 250 W) 30 min,取出,冷却至室温,加入甲醇补足失重,摇匀,滤过,即得。

1.6 统计分析

使用 Minitab 18 软件中的“Capability Sixpack”功能进行统计分析、考察,并对生产过程中可能出现的影响质量的因素进行探讨改进。

1.7 判断标准

“六合图”包含单值控制图、极差控制图、正态概率图、最后若干观测值、能力直方图及能力图^[8]等。正态概率图显示有效含量数据的分布规律、特征,判断其是否符合正态分布,在符合正态分布的情况下,再通过控制图及能力图进行判断,若不符合,则需进行数据变换,使其符合正态分布后再进行判断。控制图、能力直方图可评估制剂配制过程是否处于受控状态,依据统计理论的小概率事件原理,检验超出上下控制界限(中心线 3 个标准差)的数量,最后观测值可以显示测量数据变化波动范围、幅度,并进行初步评估。能力图计算制剂过程能力指数 C_{pk} ,是考虑过程均值与目标值偏离时的指数,标示产品满足规格的能力,统计过程理论一般将过程能力分为 5 个等级^[9],如表 1 所示。

表 1 过程能力指数 Cpk 等级

等级	过程能力指数	状态
I	$Cpk \geq 1.67$	生产控制能力优
II	$1.33 < Cpk < 1.67$	生产控制能力良好, 可维持
III	$1 < Cpk \leq 1.33$	生产控制能力尚可, 但有缺陷发生, 可优化
IV	$0.67 < Cpk \leq 1$	生产控制能力不足, 需及时改进
V	$Cpk \leq 0.67$	生产控制能力严重不足, 需积极整改

2 结果与分析

生产条件改进前后所生产的 34 批地五养肝胶囊的性状、装量、崩解时限、微生物限度均符合质量标准规定。另外, 生产工艺改进前按照地五养肝胶囊审定质量标准对其所含五味子醇甲的含量进行测定, 共收集 20 批次五味子醇甲含量测定分析项目, 见表 2。

表 2 不同批次地五养肝胶囊中五味子醇甲含量 (mg/粒)

Diwu Yanggan capsules (mg/粒)					
序号	批号	五味子醇甲	序号	批号	五味子醇甲
1	20181201	0.57	11	20201207	0.48
2	20190401	0.44	12	20210101	0.50
3	20190801	0.53	13	20210102	0.49
4	20191001	0.56	14	20210203	0.49
5	20200601	0.44	15	20210901	0.44
6	20200723	0.41	16	20210902	0.45
7	20200801	0.75	17	20211001	0.49
8	20200802	0.73	18	20211002	0.50
9	20201101	0.50	19	20211201	0.46
10	20201102	0.48	20	20211202	0.43

2.1 数据正态性检验

应用 Minitab 软件对地五养肝胶囊中五味子醇甲的含量数据进行“正态性检验”, 生成概率图, 如图 1 所示。

根据正态性检验结果显示, 地五养肝胶囊中五味子醇甲的含量 $P < 0.005$, 因此该组数据不服从正态分布。根据拟合优度检验结果 (见表 3) 确定, 需对该组数据进行 Johnson 变换^[10], 确定最佳拟合的 P 值为 0.482, Z 为 0.68, 最佳变换类型

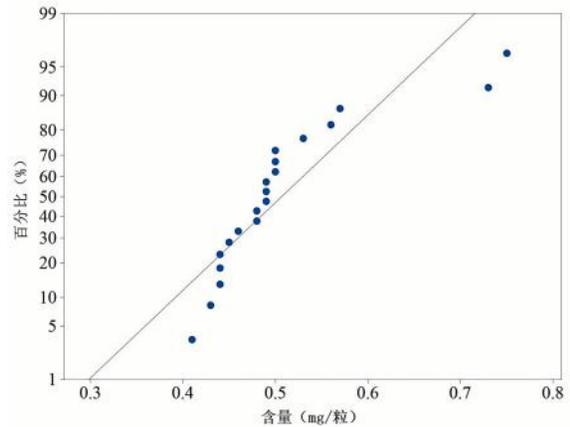


图 1 五味子醇甲含量正态性检验

Fig 1 Test of normality of schisandrin A content

为 SU, 变换函数: $Y = -1.48358 + 1.09205 \times \text{Asinh}[(X - 0.423795) / 0.0259375]$, 结果见图 2。经 Johnson 变换后, 规格下限为 -2.38096。

表 3 拟合优度检验结果

分布	AD	P	极大似然比 P
正态	1.667	< 0.005	
Box-Cox 变换	0.513	0.171	
对数正态	1.174	< 0.005	
3 参数对数正态指数	0.368		0.004
2 参数指数	6.856	< 0.003	
Weibull	0.873	0.096	< 0.001
3 参数 Weibull	2.051	< 0.010	
最小极值	0.571	0.144	< 0.001
最大极值	2.568	< 0.010	
Gamma	0.649	0.083	
3 参数 Gamma	1.332	< 0.005	
Logistic	0.694		0.009
对数 Logistic	1.049	< 0.005	
3 参数对数 Logistic	0.756	0.026	
Johnson 变换	0.317		0.013
	0.332	0.482	

2.2 过程稳定性分析评价

根据地五养肝胶囊五味子醇甲含量测定数据, 制作能力六合图, 见图 3。

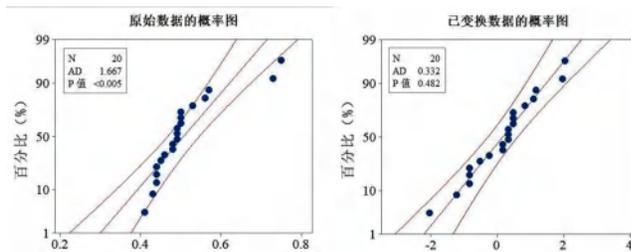
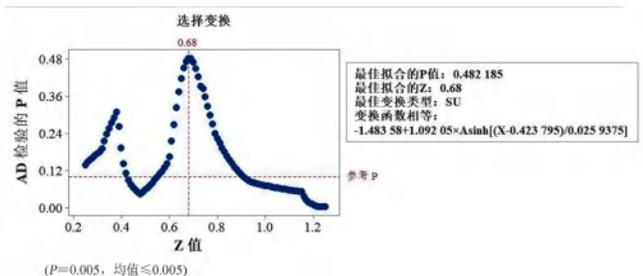


图 2 Johnson 变换结果

Fig 2 Johnson transform



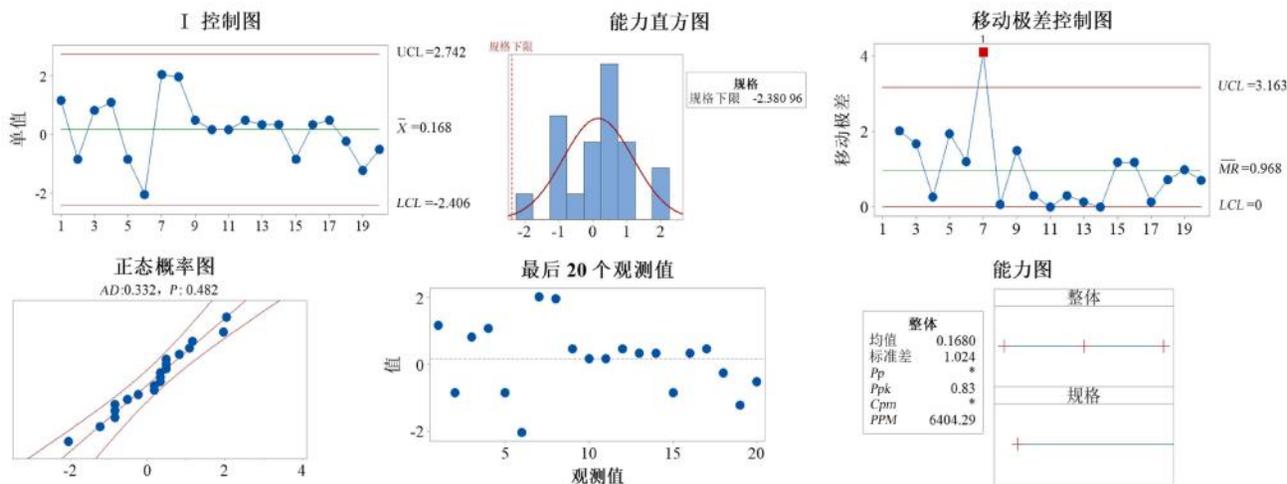


图 3 地五养肝胶囊中五味子醇甲含量的能力六合图
Fig 3 Capability Sixpack of schisandrin A content in Diwu Yanggan capsules

图 3 中正态概率图显示，该组数据在经过 Johnson 变换后 $P = 0.482$ ，符合正态分布，可满足正态能力分析假设，因此可以使用正态能力分析来评估地五养肝胶囊中五味子醇甲的含量；移动极差控制图可评估子组间变异是否受控制，在图 3 的移动极差控制图中，该制剂有一个点超出控制上限，单值 I 控制图评估子组随时间变化的均值的稳定性，根据 I 控制图的判异标准^[10-11]，该制剂 I 控制图中的点均围绕中心线分布，并且均在控制限内，表明近段时间生产的地五养肝胶囊中五味子醇甲的含量处于控制状态，但 I 控制图上的控制限不准确，可能存在配制过程异常、不稳定情况；最后 20 个观测值表明数据不是围绕过程均值呈随机、对称分布，表明数据波动不正常。能力直方图表明，所有产品均在规格下限以上，且该组数据分布呈孤岛型，表明生产过程中存在异常情况，这种情况可能是原料饮片存在问题或操作人员存在失误等；在能力图中，其整体能力指数 $Ppk = 0.83 < 1.33$ ，表明该生产过程的整体能力存在缺陷，需进行积极整改。

2.3 改进措施

影响制剂生产质量的因素通常包括工艺路线、生产人员、机器设备、原辅包材、环境等几个方面。通过应用能力六合图对地五养肝胶囊的分析，显示对地五养肝胶囊的生产控制能力存在不足，成品含量过程的波动较大，需积极整改。车间针对其配制过程不稳定，展开了偏差调查，通过现场调查分析，主要存在以下几种原因：① 五味子的饮片来源差异，导致五味子醇甲含量差异较大；② 原料五味子粉碎未到位，按照审定标准规定，五味子应粉碎为最粗粉；③ 五味子及姜黄提取溶剂的用量及其浓度、提取时间未达到标准规定；④ 减压浓缩温度过

高或过低，未严格按照标准规定在相应温度下进行。根据具体问题进行改进，首先固定原料五味子的来源，并在提取操作前根据《中国药典》2020 年版规定对其进行检验，确保饮片质量优良；另外，在生产过程中严格按照审定标准进行工艺生产，观察其是否受控；并尝试增加与五味子同时醇提的姜黄中姜黄素含量（规定每粒含姜黄素不得少于 0.9 mg）作为检测指标，观察其生产过程是否受控，确保提取操作不存在问题。

2.4 生产过程改进后能力分析

取生产过程改进后 2022 年 1 月至 2024 年 1 月生产的 14 批地五养肝胶囊，为确保提取过程不存在问题而增测姜黄素指标，同时测定 14 批地五养肝胶囊中姜黄素及五味子醇甲的含量，结果见表 4。

表 4 生产过程改进后不同批次地五养肝胶囊中姜黄素及五味子醇甲的含量 (mg/粒)

序号	批号	姜黄素	五味子醇甲
1	20220106	1.23	0.65
2	20220119	1.07	0.65
3	20220212	1.22	0.56
4	20220226	1.12	0.56
5	20220308	1.14	0.57
6	20220325	1.15	0.53
7	20220405	1.20	0.56
8	20220424	1.18	0.73
9	20220501	1.09	0.68
10	20220527	1.11	0.73
11	20220604	1.17	0.75
12	20230101	1.06	0.75
13	20230801	1.22	0.60
14	20240101	1.10	0.76

对测得的结果进行分析，地五养肝胶囊中姜黄素的含量经“正态性检验”后 $P > 0.05$ ，符合正态分布（见表 5 及图 4），因此可直接运用 Minitab 软件中“Capability Sixpack”功能对其进行分析。

能力六合图（见图 5A）结果显示，该制剂中姜黄素含量的 I 控制图及移动极差控制图均处于控制限内且围绕中心线分布，说明生产过程稳定；最后 14 个观测值图中所有点围绕着过程均值随机且对称地分布。能力直方图呈折齿型，过程展开小于规格展开，说明生产过程能力稳定；根据能力图可知，

表 5 生产过程改进后不同批次地五养肝胶囊中姜黄素及五味子醇甲的含量正态性检验结果

Tab 5 Normality of curcumin and schisandrin A in different batches of Diwu Yanggan capsules after the production process improved

化合物	均值	标准差	N	AD	P
姜黄素	1.147	0.057 57	14	0.265	0.638
五味子醇甲	0.6486	0.084 75	14	0.648	0.072

$Cpk = 1.13$ ，表明其过程的潜在能力尚可， $Ppk = 1.43$ ，表明其过程的整体能力良好，可保证生产所需。以上结果表明其提取过程操作良好，可维持。

对上述生产过程改进后生产的 14 批地五养肝

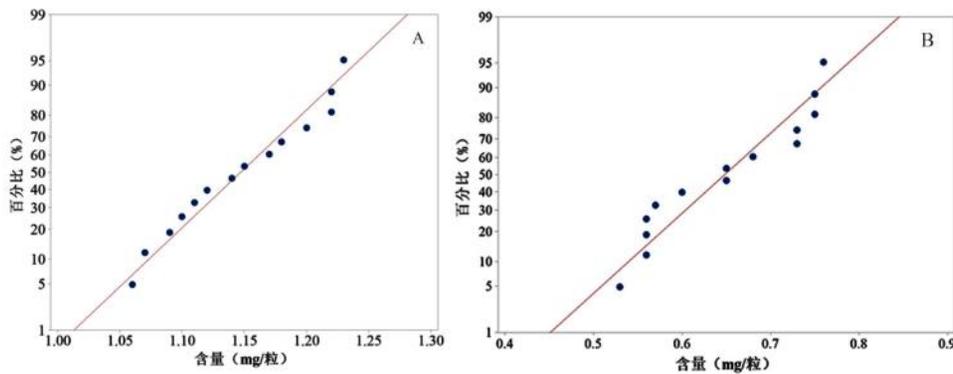


图 4 生产过程改进后不同批次地五养肝胶囊中姜黄素 (A) 及五味子醇甲 (B) 的含量正态性检验结果

Fig 4 Normality test of curcumin (A) and schisandrin A (B) in different batches of Diwu Yanggan capsules after the production process improved

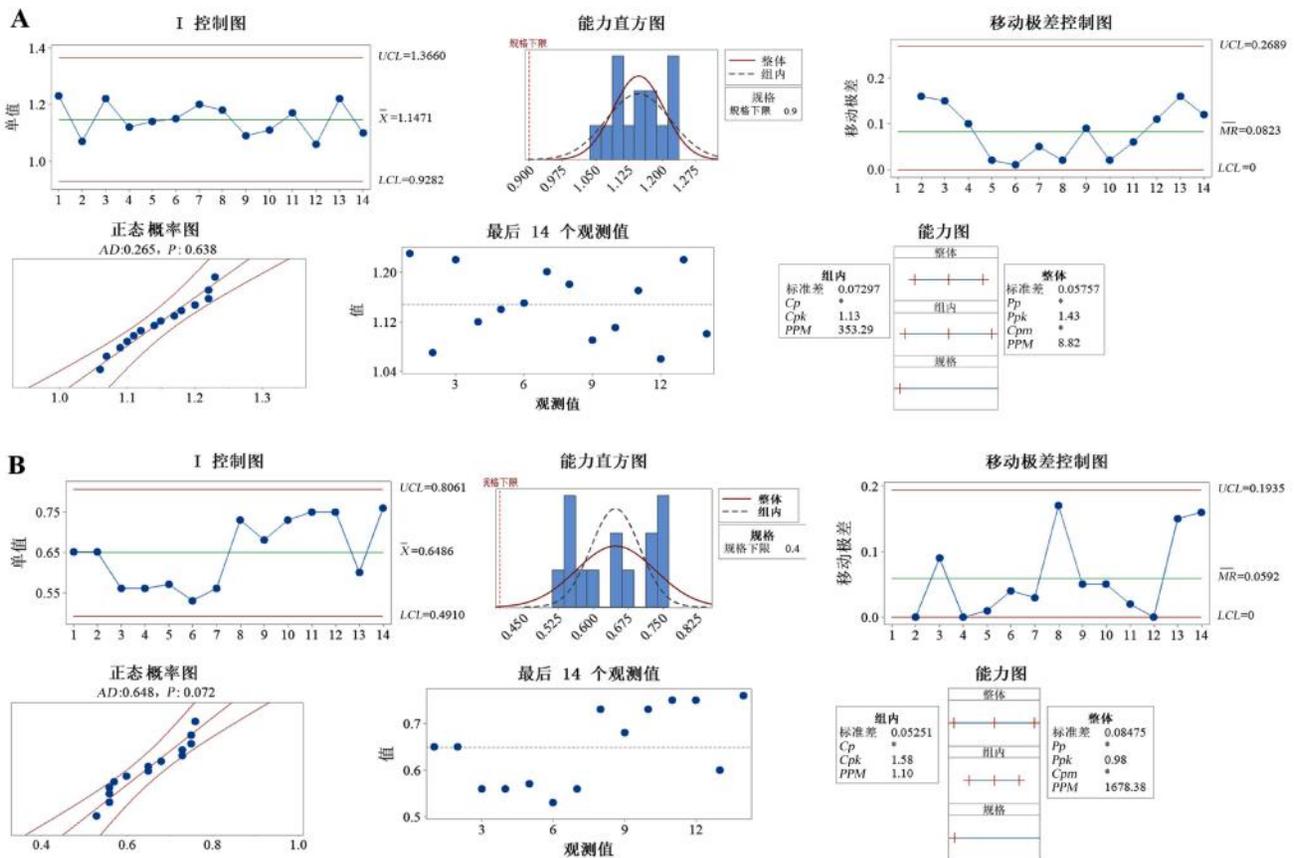


图 5 生产过程改进后不同批次地五养肝胶囊中姜黄素 (A) 及五味子醇甲 (B) 的含量能力六合图

Fig 5 Capability Sixpack of curcumin (A) and schisandrin A (B) in different batches of Diwu Yanggan capsules after the production process improved

胶囊所含五味子醇甲的含量数据进行正态性检验, $P = 0.072$, 呈正态分布。由图 5B 可知, 五味子醇甲在 I 控制图及移动极差控制图中均有在控制限内, 表明该生产过程能够受到良好的控制且处于稳定的状态; 最后 14 个观测值图显示其数据可随机分布在控制限内。能力直方图呈孤岛型, 其整体标准差与子组内标准差分布拟合较好, 数据均分布在规格限内; 能力图显示其 $Cpk = 1.58$, 表明其生产控制能力良好, 可继续保持。

根据以上分析总结, 进一步强化对操作人员进管制剂工艺规程、检验规程及相关操作技能培训、考核, 同时加强对原辅料进行质量抽验, 从生产人员和原材料管理等方面进一步加强管理^[12-13]。经采取相应措施, 2022 年 1 月至今生产的地五养肝胶囊有效成分含量均在合格限度内微小范围波动, $Cpk = 1.58$ 说明影响其质量的潜在因素得到了初步预防和纠正, 对于后续的生产过程仍需严格对制剂原料、操作人员的操作能力等影响制剂质量的因素进行严格的管理及培训, 确保制剂质量的稳定。

3 讨论

地五养肝胶囊是湖北省中医院的特色医疗机构制剂, 本研究创新性运用“能力六合图”对其不同生产批次的相关成分含量进行分析, 进行工艺评价。本研究中该制剂仅采集到生产过程改进前后大约 34 组数据, 数量相对较少, 统计结果可能存在误差。在生产过程改进前五味子醇甲的含量参差不齐, 所生产的各批次产品虽能够符合规定, 但经过 Minitab 18 软件中“Capability Sixpack”功能进行分析后发现生产能力较差, 无法满足长期生产的要求, 在生产过程中可能会出现不符合规定的产品, 怀疑是生产所使用的五味子等饮片来源良莠不齐, 因此固定了质量较高的饮片供应商, 且生产前对各饮片质量进行抽检, 排除因饮片自身原因带来的导致生产不稳定的因素; 姜黄素为饮片姜黄中的主要有效成分, 也是地五养肝胶囊的药效成分之一, 在生产提取时与五味子共同以 75% 乙醇提取, 因此增加姜黄素作为检测指标, 若姜黄素含量符合规定, 则表示在提取操作过程中不存在提取不完全的问题; 在改进生产及含量测定中可能出现的问题后, 结果显示生产过程已经得到较好的改进, 可维持现有操作进行生产, 对于后续生产的地五养肝胶囊的

质量将持续监控, 确保制剂生产质量, 并将其应用于其他制剂的生产过程中, 对生产过程进行监测。

运用“能力六合图”可对医疗机构制剂生产的过程能力起到警示作用, 发现制剂生产过程中出现的异常, 并根据制剂的配制工艺特点采取相应的预防或纠正措施, 有效降低用药风险, 但该方法无法明确造成异常的原因, 需根据实际配制工艺进行自查自纠, 同时也提醒生产人员应按配制工艺规范进行规范操作, 通过调整优化配制工艺后, 及时记录配制生产数据持续监测, 并进行验证分析, 判断采取优化措施后过程能力是否得到提高。只有管理能力不断提高, 潜在风险因素得到有效控制, 才能使医疗机构制剂配制工艺更稳定, 制剂质量更优异, 更好地服务于临床。

参考文献

- [1] 代骏豪, 郑强. 统计学方法在药学研发生产与质量管理中的应用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(9): 1024-1048.
- [2] 国家药品监督管理局. 医疗机构制剂配制质量管理规范(局令第 27 号)[EB/OL]. (2001-03-13) [2024-03-12]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2002/content_61934.htm.
- [3] 范红杰, 周聪. 统计过程控制技术在产品质量控制点中的应用[J]. 林业机械与木工设备, 2014, 42(3): 39-42.
- [4] 陈光亚, 金姝娜, 肖明中, 等. “补肾生髓成肝”治则下的地五养肝胶囊研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(7): 668-672.
- [5] 郑自健, 郑吴殷晓, 胡春玲, 等. 基于“肝藏血”理论运用网络药理学探究地五养肝胶囊抗肝硬化血小板减少的活性成分与生物学基础[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(10): 914-920.
- [6] 曹玲, 吴莉, 王玉, 等. 药品检验中常用的统计学方法及其应用[J]. 中南药学, 2019, 17(9): 1508-1513.
- [7] 王春涛, 唐静, 陈伟. Minitab 软件在药品生产质量控制中的应用[J]. 中国执业药师, 2012, 9(11): 42-46.
- [8] 柯月娇, 张勇, 蔡斌, 等. 医疗机构制剂复方甘草口服溶液质量回顾分析[J]. 安徽医药, 2022, 26(1): 205-208.
- [9] 贾新章, 李京苑. 统计过程控制与评价: Cpk 、 SPC 和 PPM 技术[M]. 北京: 电子工业出版社, 2004: 34-38.
- [10] 王春涛, 黄小琴. 质量回顾中的数据分析[J]. 中国药事, 2013, 27(11): 1166-1172.
- [11] 仲乙, 张俊伟, 沈光海. 制药企业药品质量风险管理体系探讨[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(1): 49-50.
- [12] 田朝勃, 牛月影, 陈营. 药品生产风险管理面临的问题及应对措施[J]. 北方药学, 2015, 12(10): 133-134.
- [13] 李连新, 吴海燕, 付燕霞. 加强医疗机构制剂风险预防的有效措施[J]. 中国药业, 2015, 24(20): 96-98.

(收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-07-05)

114 例医院内鹌鸡肠球菌感染病例的临床分析

刘芳, 周利, 彭懿 (湘潭县中医医院药学部, 湖南 湘潭 411228)

摘要: **目的** 分析我院鹌鸡肠球菌耐药情况, 为临床合理使用抗菌药物提供依据, 减少细菌耐药风险。**方法** 回顾性分析我院 2018—2023 年分离出的 114 株鹌鸡肠球菌的病例特点、耐药分布情况, 并对疗效进行判断。**结果** 鹌鸡肠球菌全部病例均为医院内感染, 尿液标本检出率最高 (88.60%), 感染平均年龄为 (67.26±13.67) 岁, 其中 43.86% 合并冠心病; 在鹌鸡肠球菌感染前 78.07% 的患者留置了导尿管, 13.16% 和 1.75% 的患者曾行气管插管和气管切开, 75.44% 的患者曾使用抗菌药物; 体外药敏试验结果显示鹌鸡肠球菌对利奈唑胺 (96.49%)、替加环素 (93.86%)、万古霉素 (93.86%) 敏感性较好, 对高浓度氨基糖苷类、米诺环素、呋喃妥因敏感率亦可 (≥ 50.00%), 对青霉素、氨苄西林、红霉素、加替沙星、左氧氟沙星耐药率 > 70.00%; 治疗无效组的患者存在年龄稍高 (68.75±18.89) 岁、女性较多、APACHE II 评分 ≥ 20 分、合并 2 种及以上的基础疾病的临床特征, 治疗总体有效率为 96.49% (110/114); 治疗有效组来自非无菌标本 (99.07%, 107/108) 多于无菌标本 (50.00%, 3/6), 使用敏感抗菌药物有效率为 90.91% (30/33), 使用非敏感抗菌药物有效率为 98.77% (80/81), 无菌标本 (100.00%, 6/6) 相对于非无菌标本 (25.00%, 27/108) 临床更倾向于选用敏感的抗菌药物。**结论** 鹌鸡肠球菌感染人群主要为老年人、合并基础疾病、曾行侵袭性操作和使用广谱抗菌药物的患者; 该菌耐药率普遍较高, 抗菌药物选择有限, 应根据药敏试验结果选择合适的抗菌药物; 女性重症患者且合并多种基础疾病治疗难度更大, 无菌标本较非无菌标本临床更倾向选用敏感的抗菌药物, 但非无菌标本治疗有效率高高于无菌标本。

关键词: 鹌鸡肠球菌; 耐药性; 抗菌药物; 合理用药

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0258-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.039

Clinical characteristics in 114 cases of *Enterococcus gallinarum* nosocomial infection

LIU Fang, ZHOU Li, PENG Yi (Department of Pharmacy, Traditional Chinese Medicine Hospital of Xiangtan, Xiangtan Hunan 411228)

Abstract: Objective To determine the drug resistance of *Enterococcus gallinarum* in a hospital and provide evidence for the rational use of antibiotics and reduce the risk of drug resistance. **Methods** The characteristics and drug resistance distribution of 114 strains of *Enterococcus gallinarum* isolated in a hospital from 2018 to 2023 were retrospectively analyzed, and the therapeutic effect was evaluated. **Results** All the cases were nosocomial infection. The urine samples had the highest detection rate (88.60%). The average age of infected patients was (67.26±13.67) years old, 43.86% of whom were complicated with coronary heart disease. Before *Enterococcus gallinarum* infection, 78.07% of the patients had implanted urine catheter, 13.16% and 1.75% had intubation and tracheotomy, 75.44% had antibiotics. In vitro drug sensitivity showed that *Enterococcus gallinarum* quail gallinae was sensitive to linezolid (96.49%), tigacycline (93.86%) and vancomycin (93.86%), and was also sensitive to high concentrations of aminoglycosides, minocycline and furantoin (sensitivity ≥ 50.00%). The drug resistance rate to penicillin, ampicillin, erythromycin, gatifloxacin, and levofloxacin was higher than > 70.00%. Patients in the ineffective treatment group were slightly older (68.75±18.89) years old, more females, APACHE II score ≥ 20, and complicated two or more other diseases. The overall effective rate of the treatment was 96.49% (110/114). The effective treatment group had 99.07% (107/108) from non-sterile samples more than 50.00% (3/6) from sterile samples. The effective rate of using sensitive antibiotics was 90.91% (30/33), while that of non-sensitive antibiotics was 98.77% (80/81). For sterile samples 100% (6/6) sensitive antibiotics were more likely

作者简介: 刘芳, 女, 主要从事临床药学抗感染方面的工作, email: 344367798@qq.com

used use than for non-sterile samples 25.00% (27/108). **Conclusion** *Enterococcus gallinarum* infection mainly occurs in the elderly patients with primary diseases, especially those who undergo invasive operations and use broad-spectrum antibiotics. The drug resistance rate of the bacteria is generally high, the antibiotics selection is limited, so appropriate antibiotics should be selected according to drug sensitivity. Female patients with severe disease complicated with multiple primary diseases have poor prognosis. Clinicians are more preferred to selecting sensitive antibiotics for sterile specimens compared to non-sterile specimens, but the effective rate of non-sterile specimens is higher than sterile specimens.

Key words: *Enterococcus gallinarum*; resistance; antibiotics; rational drug use

鹌鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum* (简称 EG), 肠球菌属, 于 1984 年从临床标本中分离出来^[1], 是人兽肠道中的正常菌群, 一般不会引起人类疾病, 但在宿主免疫力低下、菌群失调等情况下可引起包括尿路感染、颅内感染、腹腔感染、血流感染等在内的多种感染性疾病^[2]。为了解我院鹌鸡肠球菌临床分布、易感因素及耐药现状, 促进抗菌药物合理使用, 本文回顾性分析我院 2018—2023 年分离出的 114 例鹌鸡肠球菌感染的病例, 为抗菌药物合理使用及院感防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 资料来源

调取 2018—2023 年我院电子病历获取患者鹌鸡肠球菌感染的数据库, 包括感染部位、耐药情况、治疗疗效等, 回顾性分析 (伦理委员会批件号: 2024002) 鹌鸡肠球菌的耐药性及抗菌药物的临床合理使用。

1.2 细菌鉴定及药物敏感试验

按照第四版《全国临床检验操作规程》由细菌室工作人员进行分离、培养、鉴定。① 细菌培养: 送检标本用定量接种环接种于血琼脂平板, 35~37℃培养 18~24 h, 进行菌落计数和革兰氏染色; ② 细菌鉴定: 挑选可疑菌落, 分纯后用全自动微生物鉴定仪进行菌株鉴定; ③ 药敏试验: 采用药敏卡, 判断结果参照美国临床实验室标准协会 (CLSI) 2021 版。

1.3 标本定义

依据样本采集部位不同分为非无菌标本和无菌标本, 非无菌标本包括痰、咽拭子、尿液、粪便等; 无菌标本包括血液、骨髓、脑脊液、胸腔积液、腹水、心包积液、关节液、鞘膜积液和胆汁等。

1.4 疗效评估

根据 2015 版《抗菌药物临床应用指导原则》, 对治疗有效或无效进行评估:

1.4.1 有效 ① 用药 48~72 h 后, 患者感染相关症状消失或减轻, 如尿路感染、尿路刺激征减轻, 伤口分泌物感染渗出减少等; ② 体温明显下降; ③ 实验室检查: 白细胞计数 (WBC)、中性粒细胞计

数 (N%)、降钙素原 (PCT)、C 反应蛋白 (CRP) 水平明显下降; ④ 鹌鸡肠球菌培养菌量减少或清除。任何一项或以上指标出现好转认为治疗有效。

1.4.2 无效 用药后 48~72 h 后, 患者以上各项临床指标无改善或恶化。

2 结果

2.1 临床资料

2018—2023 年共收集 114 株鹌鸡肠球菌标本, 来自 114 例患者, 其中男性 57 人, 女性 57 人, 年龄 28~90 岁, 平均年龄 (67.26±13.67) 岁, 主要分布在泌尿外科、ICU、骨科、神经外科等, 平均住院时间 38.60 d。在鹌鸡肠球菌检出前, 38.60% (44/114) 的患者有不同程度的发热, 其中体温在 37.5~38.5℃的有 27 人, 在 38.5~39.5℃的有 10 人, ≥39.5℃的有 7 人。

2.2 基础疾病

114 例鹌鸡肠球菌感染患者, 主要基础疾病为冠心病 [50 (43.86%)]、糖尿病 [41 (35.96%)]、高血压 [29 (25.44%)] 等, 其中合并 1 种基础疾病占 17.54% (20/114), 2 种基础疾病占 42.11% (48/114), ≥3 种基础疾病占 40.35% (46/114)。

2.3 鹌鸡肠球菌感染前侵入性操作、抗菌药物使用情况

在鹌鸡肠球菌检出前, 78.07% (89/114) 的患者实施了留置导尿, 导尿时间在 7~45 d, 平均 22.10 d, 13.16% (15/114) 的患者曾行气管插管, 1.75% (2/114) 的患者曾行气管切开。75.44% (86/114) 的患者感染鹌鸡肠球菌前使用过抗菌药物, 其中使用 1 种 66 人, 使用 2 种及以上 20 人, 抗菌药物主要为酶抑制剂 (头孢哌酮舒巴坦 26 例、哌拉西林他唑巴坦 17 例、哌拉西林舒巴坦 7 例、阿莫西林克拉维酸钾 1 例、美洛西林舒巴坦 2 例) 53 例 (46.50%)、三代头孢 37 例 (32.46%)、头霉素类 17 例 (14.91%)、碳青霉烯类 9 例 (7.89%)、喹诺酮类 7 例 (6.14%) 和氨基糖苷类 3 例 (2.60%)。

2.4 标本来源

114 例鹌鸡肠球菌感染的标本, 分别来自尿液 [101 (88.60%)]、伤口分泌物 [7 (6.14%)]、穿刺物 [3 (2.63%)]、血液 [2 (1.75%)]、腹水 [1 (0.88%)]。

2.5 标本来源科室分布

114 例鹌鸡肠球菌感染的标本，主要来自泌尿外科、ICU、骨科和神经外科，详见表 1。

表 1 114 例鹌鸡肠球菌标本科室分布

Tab 1 Department distribution of 114 patients with *Enterococcus gallinarum*

科室	n (%)	科室	n (%)
泌尿外科	26 (22.81)	泌尿内科	6 (5.26)
ICU	20 (17.54)	呼吸内科	4 (3.51)
骨科	16 (14.04)	针灸科	4 (3.51)
神经外科	15 (13.16)	肿瘤外科	4 (3.51)
神经内科	9 (7.90)	内分泌科	2 (1.75)
心血管内科	6 (5.26)	医养结合中心	2 (1.75)

2.6 药敏试验结果统计

实验室分离的 114 例鹌鸡肠球菌标本对利奈唑胺 (96.49%)、替加环素 (93.86%)、万古霉素 (93.86%) 体外敏感性较好；对高浓度氨基糖苷类 (庆大霉素、链霉素)、米诺环素、呋喃妥因敏感率 $\geq 50.00\%$ ；对青霉素、氨苄西林、红霉素、加替沙星、左氧氟沙星耐药率 $> 70.00\%$ ，见表 2。

表 2 114 株鹌鸡肠球菌的体外药敏试验结果 [n(%)]

Tab 2 In vitro drug sensitivity test of 114 strains of *Enterococcus gallinarum* [n(%)]

抗菌药物	耐药株	中介株	敏感菌
利奈唑胺	1 (0.88)	3 (2.63)	110 (96.49)
替加环素	7 (6.14)		107 (93.86)
万古霉素	7 (6.14)		107 (93.86)
庆大霉素 - 高浓度	29 (25.44)		85 (74.56)
米诺环素	31 (27.19)	6 (5.26)	77 (67.55)
呋喃妥因	18 (15.79)	36 (31.58)	60 (52.63)
链霉素 - 高浓度	—	57 (50.00)	57 (50.00)
达托霉素	9 (7.89)	51 (44.74)	54 (47.37)
加替沙星	83 (72.81)	7 (6.14)	24 (21.05)
利福平	58 (50.88)	33 (28.95)	23 (20.17)
青霉素	95 (83.33)		19 (16.67)
红霉素	88 (77.19)	7 (6.14)	19 (16.67)
氨苄西林	97 (85.09)		17 (14.91)
左氧氟沙星	95 (83.33)	4 (3.51)	15 (13.16)

2.7 疗效分析

114 例鹌鸡肠球菌治疗无效组的患者存在年龄稍高 (68.75 ± 18.89) 岁、女性较多、APACHE II 评分 ≥ 20 分、合并 2 种及以上的基础疾病的临床特征，见表 3。治疗总体有效率为 96.49% (110/114)，治疗有效组来自非无菌标本 (99.07%，107/108) 多于无菌标本 (50.00%，3/6)，使用敏感抗菌药物有效率为 90.91% (30/33)，使用非敏感抗菌药物有效率为 98.77% (80/81)，无菌标本 (100.00%，6/6) 相对于非无菌标本 (25.00%，27/108) 临床更倾向于选用敏感的抗菌药物，见图 1。

表 3 114 例鹌鸡肠球菌感染患者临床特征及疗效分析 [n(%)]

Tab 3 Clinical features and efficacy of 114 patients with *Enterococcus gallinarum* infection [n(%)]

类型	治疗有效组 (n = 110)	治疗无效组 (n = 4)
年龄 / 岁	67.20 \pm 13.91	68.75 \pm 18.89
性别		
男性	57 (51.82)	0 (0.00)
女性	53 (48.18)	4 (100.00)
APACHE II 评分		
< 20 分	106 (96.36)	0 (0.00)
≥ 20 分	4 (3.64)	4 (100.00)
合并基础疾病		
1 种基础疾病	20 (18.18)	0 (0.00)
2 种基础疾病	47 (42.73)	1 (25.00)
3 种及以上基础疾病	43 (39.09)	3 (75.00)

3 讨论

鹌鸡肠球菌是肠球菌属中一种比较少见的细菌，生化特性为兼性厌氧、触酶试验阴性、链状排列的 D 群革兰氏阳性球菌，过去由于条件受限临床很少分离到，以至于低估了它可能带来的风险^[3]。本研究通过收集的 114 例患者的信息，分析出一些共性的问题，几乎所有的病例都为医院内感染，符合 2001 年卫生部颁布的医院感染的诊断标准^[4]，宿主多为存在 1 种或多种基础疾病的老年人，尤其是侵袭性操作和使用广谱抗菌药物的患者，检出的概率更高。感染类型以泌尿系多见，这点也与苏建伟等^[5]和 Choi 等^[6]研究相符。但本研究未发现痰标本出现鹌鸡肠球菌菌

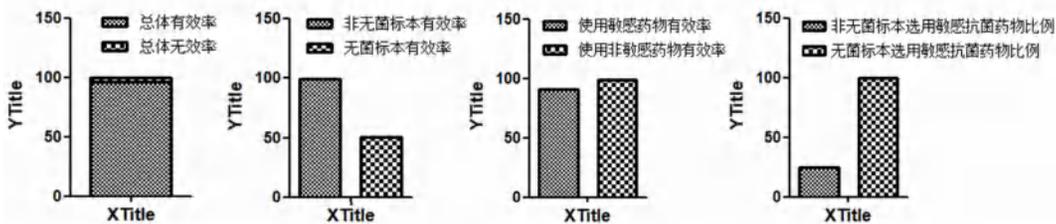


图 1 114 例鹌鸡肠球菌患者治疗有效率和抗菌药物选择

Fig 1 Treatment effective rate and antibiotic selection of 114 patients with *Enterococcus gallinarum*

株，这与国内一些研究痰标本的高分离率存在明显差异^[7-8]，可能与本研究纳入人群机械通气率较低有关。

鹌鸡肠球菌耐药程度高，对头孢菌素、氨基糖苷类、克林霉素、复方磺胺甲噁唑等天然耐药^[9]，导致治疗方案选择有限。本研究药敏试验结果显示，鹌鸡

肠球菌对利奈唑胺 (96.49%)、替加环素 (93.86%)、万古霉素 (93.86%) 体外敏感性较好；对高浓度氨基糖苷类、米诺环素、呋喃妥因也较敏感 (敏感率 $\geq 50.00\%$)；对青霉素、氨苄西林、红霉素、加替沙星、左氧氟沙星耐药率 $> 70.00\%$ ，对于耐药率高

的药物选用需要慎重。虽有文献表明肠球菌对万古霉素天然耐药^[9]，但常见于携带 *vanA* 和 *vanB* 基因的屎肠球菌和粪肠球菌^[10]，鹌鸡肠球菌所固有的是 *vanC* 基因，对万古霉素呈低水平耐药^[11]，这也与国内相关研究一致^[7, 12-13]。理论上体外药敏试验敏感，但临床治疗也可能失败，肾功能不全的患者应改用替考拉宁^[14]，达托霉素对 *vanC* 型肠球菌也表现出杀菌活性^[15]，如果单一药物治疗效果不佳，可与高水平氨基糖苷类药物联用，从而发挥协同抗菌作用，体外敏感性不能类推，如氨苄西林敏感不能类推其他 β -内酰胺类，这可能会导致治疗失败率增加^[16]。

虽然鹌鸡肠球菌耐药率高，但其毒性较低，研究发现感染患者 30 d 死亡率及治疗失败率显著低于屎肠球菌和粪肠球菌^[17]，大部分的文献报道中患者均显示了良好的有效率。本研究分离鹌鸡肠球菌标本显示尿液分离株数最高，其次分别为伤口分泌物、穿刺物、血液、腹水，非无菌标本中仅部分选用敏感的抗菌药物，无菌标本全部选用了敏感的抗菌药物，但非无菌标本治疗有效率高于无菌标本。推测原因可能为：一是鹌鸡肠球菌本身毒性低；二是非无菌标本多为局部感染，无菌标本容易出现全身症状；三是本研究所有患者虽经评估均符合医院内感染鹌鸡肠球菌，但对于定植、污染和感染较难区分。所以，对于非无菌标本需要评估是否需要使用敏感抗菌药物，而无菌标本临床更倾向于积极使用敏感的抗菌药物。

鹌鸡肠球菌病例均为医院内感染，面对日益严峻的细菌耐药问题，医院相关部门应积极应对：① 严格医院感染管理，防止交叉感染；② 对耐药率超过 60% 的抗菌药物、耐药率呈明显上升趋势或近期耐药菌株高度流行的抗菌药物原则上停用 6 个月^[18]，可使其恢复部分敏感性；③ 体外药敏试验与体内临床用药疗效吻合率约为 90%^[19]，合理用药对于提高治疗的成功率至关重要；④ 减少易感因素，避免长期侵入性操作和广谱抗菌药物暴露也可能是减少鹌鸡肠球菌感染的重要措施。

本研究通过回顾性分析 114 例鹌鸡肠球菌感染病例，分析其临床特点、耐药情况等，为临床合理使用抗菌药物提供了依据，对减少细菌耐药风险具有积极意义。但本研究样本量仍不够大，往后需收集更多的鹌鸡肠球菌感染样本进行统计分析，而且临床上对于鹌鸡肠球菌的相关研究较少，未来期待能进一步探究鹌鸡肠球菌的耐药机制，以及针对如此严峻的耐药形势提供更多更精准的临床治疗策略。

参考文献

[1] Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional testscheme [J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27 (4): 731-734.
[2] Monticelli J, Knezevich A, Luzzati R, et al. Clinical manage-

ment of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens* [J]. *J Infect Chemother*, 2018, 24 (4): 237-246.

- [3] Vincent S, Knight RG, Green M, et al. Vancomycin susceptibility and identification of motile *enterococci* [J]. *J Clin Microbiol*, 1991, 29 (10): 2335-2337.
[4] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准 (试行) [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81 (5): 314-320.
[5] 苏建伟, 钟婉平, 王衍洪. 鹌鸡肠球菌感染临床特点及耐药性分析 [J]. *中国处方药*, 2022, 20 (12): 54-56.
[6] Choi SH, Lee SO, Kim TH, et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38 (1): 53-61.
[7] 陈艳清, 贾建, 邝兆威, 等. 鹌鸡肠球菌感染的临床标本分布和耐药性分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11 (15): 1211-1213.
[8] 侯会玲, 聂秀红. 鹌鸡肠球菌感染的临床特点和耐药性分析 (附 35 例) [J]. *临床肺科杂志*, 2010, 15 (3): 308-309.
[9] 周庭银, 章强强. 临床微生物学诊断与图解 [M]. 4 版. 上海: 科学技术出版社, 2017: 215-216.
[10] Watanabe S, Kobayashi N, Quiñones D, et al. Genetic diversity of the low-level vancomycin resistance gene *vanC-2/vanC-3* and identification of a novel *vanC* subtype (*vanC-4*) in *Enterococcus casseliflavus* [J]. *Microb Drug Resist*, 2009, 15 (1): 1-9.
[11] Dodson DS, Dominguez SR, MacBrayne CE, et al. Vancomycin-nonsusceptible enterococci mediated by *vanC* at a large children's hospital: prevalence, susceptibility, and impact on care of enterococcal bacteremia [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2020, 7 (5): 160.
[12] 谢晖, 周万青, 沈瀚. 鹌鸡肠球菌对万古霉素耐药性监测及耐药基因研究 [J]. *东南国防医药*, 2021, 23 (3): 249-252.
[13] 代强, 薛峰, 郑波. *VanC* 型肠球菌与屎肠球菌对常用抗菌药的耐药状况研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31 (1): 14-16.
[14] 尤荣开, 陈秀平, 邵朝朝, 等. 鹌鸡肠球菌对常用 14 种抗菌药物的敏感性 [A]/ 中华医学会急诊医学分会第十三次全国急诊医学学术年会大会论文集 [C]. 出版者不详, 2010.
[15] Jorgensen JH, Crawford SA, Kelly CC, et al. In vitro activity of daptomycin against vancomycin-resistant *enterococci* of various Van types and comparison of susceptibility testing methods [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (12): 3760-3763.
[16] Conceição N, de Oliveira Cda C, da Silva LE, et al. Ampicillin susceptibility can predict in vitro susceptibility of penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* isolates to amoxicillin but not to imipenem and piperacillin [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (11): 3729-3731.
[17] Britt NS, Potter EM. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016, 5: 57-61.
[18] 黄长武, 李兴禄, 陈维贤. 临床主要病原菌耐药谱变化分析 [J]. *中国医院感染学杂志*, 2012, 12 (6): 416.
[19] 殷勤, 盛雪鹤. 某三甲医院药敏试验结果与临床用药结局相关性分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14 (19): 159-161.
(收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-08-09)

临床药师在临床

临床药师通过不同切入点参与肾移植受者围妊娠期药学服务的案例分析

刘露^{1,2}, 朱佳蕾¹, 张芸婷¹, 李荣², 管睿¹, 毕娟^{1*} (1. 海军军医大学第一附属医院, 上海 200433; 2. 泸州市人民医院药学部, 四川 泸州 646000)

摘要: 临床药师从不同切入点为处于不同妊娠阶段的肾移植受者提供药学服务, 包括妊娠早期药物对胎儿的安全性影响评估、妊娠晚期基于药物相互作用及不良反应的治疗方案优化、围术期镇痛方案的个性化选择以及哺乳期药物的安全性评估。医师或患者接受并采纳临床药师的建议, 母体疾病得到有效控制, 胎儿健康分娩。临床药师对肾移植受者提供的围妊娠期药学服务有助于提升该特殊群体的用药安全性、合理性。

关键词: 临床药师; 肾移植受者妊娠; 药学服务; 案例分析

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)01-0262-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.040

Case study of clinical pharmacists' interventions in pharmaceutical care for kidney transplant recipients during periconception at different points

LIU Lu^{1,2}, ZHU Jia-lei¹, ZHANG Yun-ting¹, LI Rong², GUAN Rui¹, BI Juan^{1*} (1. *The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433*; 2. *Department of Pharmacy, Luzhou People's Hospital, Luzhou Sichuan 646000*)

Abstract: Clinical pharmacists offered pharmaceutical care to kidney transplant recipients at different stages of pregnancy at different points, including assessment of the safety impact of medications on the fetus in the first trimester, optimization of therapeutic regimens based on drug interactions and adverse reactions in the third trimester, personalized selection of perioperative analgesic regimens, and assessment of medications during safety lactation. The physicians or patients accepted and adopted the clinical pharmacists' suggestions. Maternal diseases were effectively controlled, and the fetuses were delivered healthily. The pharmaceutical care provided by clinical pharmacists for kidney transplant recipients during their periconceptional helped improve the safety and rationalization of medication in this special group.

Key words: clinical pharmacist; pregnancy in kidney transplant recipient; pharmaceutical service; case study

肾移植是终末期肾病患者的首选治疗方法, 移植后患者生育力通常在数月内得到恢复。目前, 全球肾移植受者中育龄期女性和未成年女性约占 1/6^[1]。1958 年报道了首次肾移植受者成功妊娠的

案例^[2], 此后肾移植受者成功妊娠的案例相继报出, 目前已报道的肾移植受者成功妊娠的例数超过 14 000 例^[3]。肾移植受者妊娠被视为高危妊娠。母体出现妊娠期并发症而使用药物治疗的风险高,

基金项目: 上海市卫生与计划生育委员会科研课题 (No. 201940024)。

作者简介: 刘露, 女, 硕士, 药师, 主要从事妇产临床药学研究, email: liulu2602@163.com *通信作者: 毕娟, 女, 副主任药师, 主要从事妇产临床药学研究, email: bjfclcys@163.com

免疫抑制剂的使用在妊娠前、妊娠期及分娩后均需监测管理以及免疫抑制剂在哺乳期使用的安全性等均是肾移植受者在围妊娠期将面临的问题,因此临床药师提供的药学服务对于该特殊群体具有十分重要的意义。本文中,临床药师从不同切入点参与肾移植受者围妊娠期的药学服务,旨在提高肾移植受者围妊娠期的用药安全性与有效性。

1 典型案例分析

1.1 妊娠早期药物对胎儿的安全性影响评估

1.1.1 案例概况 案例 1,女,38 岁,2010 年诊断为慢性肾功能不全,后发展为尿毒症,2016 年 11 月行肾移植术,术后口服他克莫司胶囊(早 1.0 mg,晚 0.5 mg)、醋酸泼尼松片(2.5 mg qd)、咪唑立宾片(50 mg bid)免疫抑制维持治疗。现孕 8⁺⁶周,门诊咨询目前的免疫抑制剂维持治疗对胎儿的影响。

1.1.2 药师分析与建议 肾移植术后患者常用的免疫抑制维持方案主要以钙调磷酸酶抑制剂(如他克莫司和环孢素)为基础,联合抗细胞增殖类抑制剂(如吗替麦考酚酯、咪唑立宾、硫唑嘌呤等)及糖皮质激素的三联免疫抑制方案^[4]。该患者的免疫抑制维持方案为他克莫司联合咪唑立宾、泼尼松。研究表明,妊娠期使用他克莫司可能会增加低体重儿、宫内生长迟缓、一过性高血钾、肾损伤等新生儿并发症风险,但并未发现与其相关的致畸性^[5]。多个指南认为,整个妊娠期使用最低有效剂量他克莫司相对安全^[4,6-7]。泼尼松可部分透过胎盘屏障,有研究提示宫内暴露泼尼松与新生儿唇腭裂风险升高有关,但不同的队列研究对此结论并不一致^[8]。目前指南建议妊娠各个时期使用剂量 $< 15 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 的泼尼松相对安全^[4],该患者每日服用 2.5 mg 泼尼松,使用剂量较低,相对安全,建议在妊娠期注意监测胎儿口面部发育情况。咪唑立宾的妊娠期动物研究数据提示有致畸作用,有限的人类研究数据未发现与其相关的致畸报道。仅有一篇单中心的经验报道^[9],32 例肾移植受者在妊娠期的免疫抑制维持治疗方案均包含咪唑立宾,使用剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。所有患者均顺利分娩,32 名新生儿平均出生体重为 $(2520 \pm 544) \text{ g}$,其中 14 名新生儿体重 $< 2500 \text{ g}$,所有新生儿 Apgar 评分 ≥ 8 分,无畸形病例,遗传病项目筛查均无异常,随访到的学龄儿童暂未发现学习困难情况。综上,由于人类妊娠期使用咪唑立宾的数据有限,建议该孕妇咨询专科医师,结合自身疾病控制情况综合考

虑是否更换为妊娠期数据更多、相对安全的硫唑嘌呤。

1.1.3 随访结果 该孕妇咨询专科医师后,在孕 16 周时将咪唑立宾更换为硫唑嘌呤,并在孕 37⁺⁶周时顺利分娩一女婴,出生体重 2890 g,出生后 Apgar 评分 1 min 9 分,5 min 10 分,新生儿健康,无畸形。

1.2 妊娠晚期基于药物相互作用及不良反应的治疗方案优化

1.2.1 案例概况 案例 2,女,34 岁,2010 年检查发现肾衰竭,2019 年 1 月行肾移植术,术后两年怀孕,妊娠期免疫抑制维持治疗方案为:环孢素胶囊(85 mg bid)、咪唑立宾片(50 mg qn)、醋酸泼尼松片(5 mg qd)。患者现孕 32⁺⁵周,因高危妊娠入院监护。入院诊断:①肾移植术后;②孕 32⁺⁵周,G1P0,头位,待产;③胎儿宫内生长受限;④妊娠合并脑垂体瘤;⑤风疹病毒感染;⑥中度贫血;⑦孕前低体重。入院第 4 日,患者胎心、胎动正常,胎监反应型,不规律宫缩,予以硝苯地平片 10 mg po q6h 抑制宫缩,患者使用硝苯地平片后出现头晕、心率加快、面色潮红,遂改用醋酸阿托西班注射液治疗。入院第 7 日醋酸阿托西班注射液保胎治疗已满 48 h,故停用,患者胎心监护仍见不规律宫缩,临床拟给予硝苯地平片治疗。

1.2.2 药师分析与建议 患者出现头晕、心率加快、面色潮红,属于硝苯地平的不良反应;并且患者存在硝苯地平与环孢素合用情况,两药均通过肝药酶 CYP3A4 代谢,因此环孢素可使硝苯地平的药浓度增加,导致硝苯地平不良反应发生率增加。保胎治疗至少可能在短期内延长妊娠,从而为胎儿在宫内发育成熟及可能改善婴儿结局的干预预留时间,通常宫缩抑制剂使用疗程不超过 48 h^[10]。该患者在完成 48 h 保胎治疗后,仍有宫缩。2022 年世界卫生组织认为可采用硝苯地平 10 mg po q6h 维持治疗,持续 3~7 d^[11]。临床药师考虑到该患者此前服用硝苯地平后发生不良反应,因此建议降低硝苯地平使用剂量,并密切监测环孢素血药浓度。

1.2.3 跟踪随访 医师采纳该建议,将硝苯地平剂量调整为 10 mg po q8h,患者不良反应有所改善,可耐受。该患者于孕 35⁺²周时剖宫产娩一男活婴,出生体重 2160 g,出生后 Apgar 评分 1 min 9 分,5 min 10 分,新生儿卵圆孔未闭合,未见畸形。6 个月后随访卵圆孔未闭合,一年后随访无异常。

1.3 围术期镇痛方案的个性化选择

1.3.1 案例概况 案例 3, 女, 28 岁, 既往因药物所致肾衰竭于 2019 年 9 月行肾移植术, 术后 4 年怀孕, 妊娠期免疫抑制维持治疗方案为: 他克莫司胶囊 (4.5 mg bid)、咪唑立宾片 (早 50 mg, 晚 75 mg)。患者现孕 35⁺⁶ 周, 入院待产。入院诊断: ① 子痫前期; ② 孕 35⁺⁶ 周, G1P0, 头位, 待产; ③ 肾移植术后。入院查肾功能: 肌酐 82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 尿酸 552 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 尿液生化: 尿蛋白/尿肌酐 664.3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 尿蛋白 917.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。患者于孕 36⁺² 周时行剖宫产术娩一女活婴, 出生体重 2460 g, 出生后 Apgar 评分 1 min 9 分, 5 min 10 分, 新生儿无畸形。术后第一日, 患者使用自控镇痛 (patient controlled analgesia, PCA) 持续镇痛, 但仍诉腹部切口疼痛, 不能忍受。故医师请临床药师会诊, 该患者选择何种口服药物止痛合理。

1.3.2 药师分析与建议 目前剖宫产术后采取多模式镇痛, 即多种镇痛方式、多种药物联合使用, 从而达到理想的镇痛效果, 并减少全身性阿片类药物的使用、降低镇痛药物不良反应的发生率和严重程度^[12]。常用镇痛方案是 PCA 联合口服镇痛药。该患者目前已使用 PCA 镇痛, 但效果不佳, 考虑加用口服镇痛药。目前常用口服镇痛药物包括对乙酰氨基酚和非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)。但由于该患者为肾移植术后状态, 应避免使用 NSAID^[13], 具体原因如下: 一方面, NSAID 可抑制外周前列腺素合成, 导致肾血管收缩、肾脏灌注减少, 甚至可能引起急性肾衰竭, 严重损害移植肾的功能^[14]; 另一方面, 患者正在使用他克莫司, 同时使用 NSAID 会影响他克莫司药效, 而且他克莫司也会放大 NSAID 潜在的毒性^[4]。但对乙酰氨基酚抑制外周前列腺素合成作用弱, 对肾脏灌注影响小, 因此药师建议临床可考虑口服对乙酰氨基酚 100 mg q8h 镇痛。若效果不佳, 可考虑在严密监护下短期使用 NSAID。

1.3.3 跟踪随访 医师采纳该建议, 患者使用对乙酰氨基酚后诉其切口疼痛较前好转, 能忍受。

1.4 哺乳期用药安全分析

1.4.1 案例概况 临床药师对案例 2、案例 3 患者免疫抑制剂维持方案在哺乳期的安全性进行分析, 并对患者宣教。

1.4.2 药师分析与建议 理论上, 分子量 < 800、脂溶性高、弱碱性 ($\text{pKa} > 7.2$)、血浆蛋白结合率低的药物更容易转运到乳汁^[15]。相对婴儿剂

量 (relative infant dose, RID) 是指婴儿从乳汁中摄入的药物剂量占母亲药物摄入量的比例, 一般认为 $\text{RID} < 10\%$ 是安全的^[16]。他克莫司分子量高 (822)、蛋白结合率高 (99%), 且 RID 为 0.1% ~ 0.53%^[17], 因此婴儿从母乳中摄入的药物剂量很少。现有人类哺乳期间服用他克莫司的数据未发现其会导致婴儿出现不良反应。西班牙母乳数据库认为在母乳喂养期间使用他克莫司是安全的^[18]。环孢素与他克莫司相似, 高分子量 (1202.63) 及高蛋白结合率 (90%) 使其在母乳中排泄量很少, 现有循证医学证据表明在母乳喂养期间使用环孢素是安全的^[19]。专家共识认为泼尼松在哺乳期间也可使用, 如果泼尼松剂量大于 20 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$, 应避免在服药 4 h 内哺乳^[4]。咪唑立宾在哺乳期的使用暂无任何数据报道。根据该药说明书: 咪唑立宾的分子量小 (259.22), 动物研究数据显示可在分娩后大鼠的乳汁中检测到, 因此推测咪唑立宾可能会通过乳汁排泄, 但还有待进一步研究验证。该药物半衰期为 2.2 h, 由于数据缺乏, 若选择哺乳, 建议 5 个半衰期, 即 11 h 后再进行哺乳。

1.4.3 跟踪随访 由于咪唑立宾哺乳期使用数据缺乏, 产妇对于该药哺乳期安全性有一定顾虑, 且在服药 11 h 后再哺乳, 实际可操作性不强, 因此案例 2、案例 3 产妇均未哺乳。

2 讨论

2.1 咪唑立宾在妊娠期使用的安全性

目前关于咪唑立宾在妊娠期使用的数据缺乏, 本文中 3 个案例均在妊娠期暴露咪唑立宾, 对补充咪唑立宾在妊娠期的安全性数据有一定的参考价值。案例 1 在孕早期暴露, 暴露剂量为 100 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$, 直至孕 16 周时将咪唑立宾更改为硫唑嘌呤。案例 2、案例 3 在整个孕期使用咪唑立宾, 剂量分别为 50、125 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 。3 名患者均顺利分娩, 2 例新生儿出生为低体重儿 (< 2500 g), 3 名新生儿出生后 Apgar 评分均 ≥ 8 分, 无畸形病例, 遗传病项目筛查均无异常。提示根据目前有限的的数据, 咪唑立宾在妊娠期使用无致畸性, 但还需进一步研究证实。

2.2 女性肾移植受者围妊娠期的药学服务

随着肾移植以及新型免疫抑制剂的不断发展和成熟, 处于育龄期的女性肾移植受者越来越多, 并且该群体的生育需求日渐强烈。然而肾移植受者的妊娠属于高危妊娠, 在妊娠各个阶段均存在药物治疗相关问题, 需要临床药师密切监护。因此, 如何做好肾移植受者的围妊娠期药学

服务, 帮助患者分娩健康的新生儿, 是临床药师值得关注的重要课题。

全程化药学服务是在药学服务的基础上, 为患者提供全方位、治疗全过程的药学支持和指导, 重点强调药学服务需贯穿于整个医疗卫生保健过程中^[20]。目前各医院正逐渐探索实施全程化药学服务, 其中包括以围妊娠期妇女为服务对象的全程化药学服务。例如, 吴越等^[21]对免疫相关性不良妊娠患者实施全程化药学服务, 患者满意度达 100%, 在有效随访且有妊娠结局的患者中, 母体的并发症发生率以及胎儿的出生缺陷率均明显低于平均水平。肾移植受者在妊娠各阶段均存在药物治疗相关问题, 因此亟须临床药师提供全程化药学服务来提升围妊娠用药安全性。此外, 多学科合作也是成功妊娠的关键因素。肾移植受者围妊娠期需要产科、器官移植科、新生儿科等共同协作管理, 临床药师也应积极配合、参与其中, 可通过开展药师门诊或医师-药师联合门诊, 参与查房、会诊、疑难病例讨论等工作协助医师诊疗^[22]。最后, 患者良好的依从性是开展药学服务的前提, 临床药师还应注重关心患者心理健康, 缓解患者心理压力, 提高患者的依从性。

参考文献

- [1] Blume C, Pischke S, Von Versen-Hoynck F, et al. Pregnancies in liver and kidney transplant recipients: a review of the current literature and recommendation [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2014, 28 (8): 1123-1136.
- [2] Murray JE, Reid DE, Harrison JH, et al. Successful pregnancies after human renal transplantation [J]. *N Engl J Med*, 1963, 269: 341-343.
- [3] McKay DB, Josephson MA. Pregnancy after kidney transplantation [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3 (Suppl 2): S117-S125.
- [4] 广东省药学会. 肾移植患者免疫抑制剂长期管理医药专家共识 [J]. *今日药学*, 2022, 32 (11): 801-816.
- [5] Briggs GG, Towers CV, Alicia BF. *Drugs in pregnancy and lactation* [M]. 12 Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2021: 4123-4131.
- [6] Schreiber K, Frishman M, Russell MD, et al. British Society for rheumatology guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding: comorbidity medications used in rheumatology practice [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2023, 62 (4): e89-e104.
- [7] 南京总医院国家肾脏疾病临床医学研究中心. 慢性肾脏病患者妊娠管理指南 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97 (46): 3604-3611.
- [8] 解玥, 宋智慧, 张昭. 肾移植术后妇女妊娠期的药物治疗 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2019, 17 (12): 15-19.
- [9] 艾亮, 张盛, 刘炼, 等. 肾移植术后妊娠受者全程健康管理单中心经验 [J]. *中华移植杂志 (电子版)*, 2021, 15 (2): 105-107.
- [10] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 早临的临床诊断与治疗指南 (2014) [J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49 (7): 9-11.
- [11] World Health Organization. WHO recommendation on tocolytic therapy for improving preterm birth outcomes [EB/OL]. (2022-09-29) [2024-04-28]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240057227>.
- [12] 广东省药学会. 剖宫产术后快速康复药学服务专家共识 [J]. *今日药学*, 2023, 33 (3): 161-171.
- [13] 中华医学会器官移植学分会. 中国肾移植术后高尿酸血症诊疗技术规范 (2019 版) [J]. *器官移植*, 2019, 10 (1): 10-15.
- [14] Baker M, Perazella MA. NSAIDs in CKD: are they safe? [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76 (4): 546-557.
- [15] 郑彩虹. 妊娠期哺乳期用药手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023: 4.
- [16] 杨勇, 梅劼. 妊娠期与哺乳期用药咨询案例详解 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2023: 32.
- [17] 托马斯·W. 黑尔, 希拉里·E. 罗. 药物与母乳喂养 [M]. 17 版. 上海: 上海世界图书出版公司, 2019: 722-723.
- [18] APILAM. e-lactancia [EB/OL]. (2018-03-16) [2024-04-28]. <https://www.e-lactancia.org/breastfeeding/tacrolimus/product>.
- [19] APILAM. e-lactancia [EB/OL]. (2022-08-23) [2024-04-28]. <https://www.e-lactancia.org/breastfeeding/ciclosporin/product>.
- [20] 胡晋红, 蔡溱, 孙华君. 药学服务与全程化药学服务 [J]. *药学服务与研究*, 2008, 8 (3): 161-165.
- [21] 吴越, 童荣生, 龙恩武, 等. 免疫相关性不良妊娠患者临床药学的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (8): 847-850.
- [22] 王晨玉, 黄元楷, 席晓宇. 我国临床药师与医师协作概念的探讨 [J]. *中国药房*, 2023, 34 (4): 487-492.

(收稿日期: 2024-05-24; 修回日期: 2024-07-10)

药事管理

基于演化博弈理论的医疗机构制剂监管研究及仿真分析

杨彦坤, 赵玉绒, 张琪, 潘晶, 孙瑞鸿, 杨斌, 周军红* (陕西省药品和疫苗检查中心, 西安 710065)

摘要: **目的** 探究医疗机构制剂监管的博弈策略, 为后期监管提供决策参考。**方法** 本文构建了药品监管机构与医疗机构的演化博弈模型, 分析了双方的稳定性策略选择, 并运用 Matlab 软件对不同策略进行仿真分析, 同时, 还探究了部分参数的变化对系统演化结果的影响。**结果** 药品监管机构和医疗机构的策略选择是一个动态的过程, 在不同参数条件下, 选择不同的稳定性策略, 其中政府奖惩力度对医疗机构积极负责具有正向激励作用, 产业及地方经济的发展和上级政府的奖惩也会影响药品监管机构的选择。**结论** 建议政府制定合理奖惩机制, 同时药品监管机构需要综合考虑、因地制宜、精准施策, 医疗机构也要转变观念、加强培训、主动创新, 共同助力医疗机构制剂的高质量发展。

关键词: 医疗机构制剂监管; 演化博弈理论; 仿真分析

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0266-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.041

Research and simulation of supervision of medical institution preparations based on evolutionary game theory

YANG Yan-kun, ZHAO Yu-rong, ZHANG Qi, PAN Jing, SUN Rui-hong, YANG Bin, ZHOU Jun-hong* (Shaanxi Center for Drug and Vaccine Inspection, Xi'an 710065)

Abstract: Objective To analyze the game strategy of preparations supervision by medical institutions, and provide decision-making reference for later supervision. **Methods** This article constructed an evolutionary game model between drug regulation agencies and medical institutions, analyzed the stability strategy choices of both parties, and used Matlab software to simulate and analyze different strategies. At the same time, the impact of changes in some parameters on the system evolution was also explored. **Results** The strategic selection of drug regulation agencies and medical institutions was a dynamic process, with different stability strategies being selected under different parameter conditions. The government rewards and punishments had a positive incentive effect on the active responsibility of medical institution. The development of industry and local economy, as well as the rewards and punishments upper level governments, also affected the selection of these drug regulation agencies. **Conclusion** Government should establish a reasonable reward and punishment mechanism to help drug regulation agencies to tailor measures based on local conditions and implement proper policies. Medical institutions should also change their mindset, strengthen training and innovation to support the high-quality development of preparation by medical institutions.

Key words: supervision of preparation by medical institution; evolutionary game theory; simulation

随着我国医药产业的发展, 到 20 世纪 80 年代, 第一部《中华人民共和国药品管理法》的颁布, 医疗机构制剂以合法身份登上了历史舞台。医疗机构制剂作为临床用药的重要组成部分和必不可少的补充, 国

家重视医疗机构制剂的发展, 2001 年, 修订通过的《药品管理法》以及后续出台的《医疗机构制剂配制质量管理规范(试行)》^[1]、《医疗机构制剂配制监督管理办法(试行)》^[2]、《医疗机构制剂注册管理办法

作者简介: 杨彦坤, 女, 硕士, 主要从事药品注册和生产检查研究, email: 792029497@qq.com *通信作者: 周军红, 女, 主任药师, 主要从事药品注册和生产检查研究, email: zjh68910@163.com

(试行)》^[3]等一系列法规文件,逐步规范了医疗机构制剂的配制管理。其中《医疗机构制剂注册管理办法(试行)》^[3]明确定义了医疗机构制剂是指医疗机构根据本单位临床需要,经批准而配制、自用的固定处方制剂。医疗机构配制的制剂,应当是市场上没有供应的品种。2017年施行的《中华人民共和国中医药法》^[4]明确了医疗机构委托中药制剂配制行为,应当向委托方所在地省、自治区、直辖市药品监督管理部门办理备案。2018年发布的《关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告》^[5]对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂采用备案管理,更是进一步推动了医疗机构制剂的发展,有力促进了名医经验传承和医疗机构中药制剂应用。根据国家药监局统计,自实施备案制开始,截至2022年底,全国31个省、自治区、直辖市共有13434个医疗机构中药制剂按传统工艺备案^[6]。

医疗机构制剂法律法规逐渐完善,医疗机构制剂注册和传统工艺备案中药制剂数量逐步增加,国家在此基础上也出台了鼓励中医药传承与创新的政策,特别是传统工艺制备的中药制剂,更是要充分发挥其作为新药“孵化器”的作用,在相关政策的驱使下,越来越多的医疗机构开始发展院内制剂,特别是一些名老中医经方、验方,但因其能力有限,在国家政策的支持下,采用将院内制剂对外委托的方式进行研制和配制,尽管研制单位与配制单位均能按照委托协议完成,但是在药品监管过程中,发现部分医疗机构存在投机心理,仅关注最终结果,无法与研制单位或配制单位进行有效沟通而导致注册或备案失败,更有甚者为了应付监管机构,提交的备案资料存在虚假情况,而医疗机构制剂相关负责人是完全不清楚的。通过前期药品监管发现,随着政策的调整,如何科学监管医疗机构制剂,对于医疗机构和药品监管机构均是一项挑战。

博弈论(game theory),又称为对策论,通常假定参与人是完全理性的,在博弈中总能通过理性决策,实现主体自身的利用最大化。但是在实际活动中,通常很难实现完全理性和完全信息的条件。于是在受到生物进化理论的影响下,演化博弈思想开始出现。演化博弈理论是一种研究群体中个体如何根据自己和其他个体策略选择来调整自己的行为,并最终达到一个动态均衡状态的理论。目前演化博弈理论越来越多地被应用到社会学、经济学、管理学等相关领域。已有不少学者将演化博弈理论应用到药品监管领域^[7-9]。严羽等^[10-11]首先采用博弈理论,构建政府与医疗机构、医疗机构与受托方之间的博弈模型,分析医疗机构中药制剂委托配制行为。后又采用演化博弈理论,探索了药品上市许可持有人(MAH)制度下,医疗机构中药制剂委托配制时利益主体间的行为选择

因素及委托配制行为的可行性。最终得出各利益主体间找到利润均衡点,可促进医疗机构中药制剂的良性循环的结论。谢振雨等^[12]针对药品安全治理中信息不对称和主体行为隐蔽等导致的规制俘获问题,利用演化博弈理论构建了三方演化博弈模型,计算了演化稳定策略(ESS)并进行仿真分析。刘睿^[13]通过建立基本的博弈模型对在药品监管时相关主体会采取何种策略使自身利益最大化,以及何种情况下各方会改变策略等方面进行深入探讨,进而弄清为何我国药品安全问题频发,并根据模型分析得出结论,给出我国解决药品安全监管问题的相关政策性建议。曹剑涛等^[14]从博弈论视角,分析食品药品安全问题上的国家监管与生产企业地方政府、社会监督的博弈关系,进而从加强监管、厘清监管部门与地方关系、推进新技术应用等方面提出相应对策。

医疗机构制剂监管复杂,且由于获知信息的不对称,在各方主体参与下存在较多不确定因素,对于监管部门而言,要最大程度保障人民利益,以及人民用药安全,但监管机构在考虑监管的情况下,受地方政策的限制,也要考虑到当地经济及产业的发展,特别是随着传统中药制剂备案的实施,各地均出台不同的实施细则,备案数量呈现出急剧增加的趋势,而医疗机构为了实现自身利益最大化,追求额外利润,可能会做出无视法律法规、损害社会利益的现象^[15],在实际的监管过程中,监管部门和医疗机构的博弈是一个持续的过程,这需要在监管过程中不断调整策略,尽力寻找平衡点,医疗机构选择投机行为也不是一蹴而就,都是在双方不断博弈过程中,逐渐做出最利于自己的选择。

因此,本文主要聚焦于医疗机构制剂监管行为,以药品监管机构、医疗机构为研究对象,采用演化博弈方法,构建了药品监管机构与医疗机构的演化博弈模型。通过分析博弈模型的均衡点及稳定点,研究了药品监管机构与医疗机构的均衡点及稳定性策略,最后利用Matlab进行仿真分析,验证了不同策略对利益主体的影响,并通过对相关参数进行分析,为完善医疗机构制剂监管提出了建议。

1 模型假设与构建

1.1 模型假设

在现存的医疗机构制剂监管体系中,药品监管部门为了保障用药安全需要付出一定的监管成本,如监管人员素质、监管频次、相关政策的调整等,同时会获得一定的社会效益,如政府公信力、群众的认可等。近年来,尽管政府对医疗机构制剂发展高度重视,但在具体实施上,考虑到当地实际情况,可能会存在实施细则差异,同样可能会存在因不同区域、级别的监管部门或多或少存在宽松监管而导致监管失职的问题,从而引起上级政府的追

责。而监管部门严格监管，在很大程度上可增加医疗机构制剂安全程度，提高政府公信力。

对于医疗机构而言，由于获知信息不对称，医疗机构为了用药安全，付出的成本并不会产生较大的利润，但是部分医疗机构为了额外的经济利益可能会存在投机行为，如在生产时节约利润，采用劣质饮片进行投料、违规销售等，因此产生较多的用药安全隐患，可能会发生一定的用药安全问题。

为构建博弈模型，分析各方策略和均衡点，作出如下假设：

基于上述情况，参与主体为医疗机构、药品监管部门。双方均为有限理性主体，需要通过多次博弈找到优先策略。

① 假设药品监管部门选择的策略为严格监管、宽松监管，其中选择严格监管的概率为 x ($0 \leq x \leq 1$)，宽松监管的概率为 $1 - x$ ；医疗机构选择的策略为投机、不投机，其中选择不投机的概率为 y ($0 \leq y \leq 1$)，投机的概率为 $1 - y$ 。

② 政府严格监管，保证药品安全，产生一定的社会效益为 B_1 ，但是需要一定的人力和日常监督，产生的成本为 C_1 ，但同时会获得上级政府的认可为 S_1 （上级政府对监管情况的考核，对监管机构能力的认可及表扬等）。政府宽松监管获得的社会效益为 B_2 ，需要的成本为 C_2 ，可能会极大促进医

疗机构制剂的发展，推动地方经济，带来潜在的收益 B_4 ，但可能会受到上级政府问责 ($C_1 > C_2$)。

③ 医疗机构如果选择不投机，通过销售产品以及其他获得的利润为 R_1 ，同时患者用药安全得到保证，同时可能会将其逐步开发为药品或其他产品，一方面可能会收到政府对其研发经费资助及补贴 S_2 ，另一方面也会给政府带来潜在的社会效益 B_3 。如果选择投机，投入的成本减少，可以额外获得利润为 ΔR ，也不会有考虑将其开发为新药的意识，但同时会承担一定的风险，如果出现抽检医疗机构制剂不合格或用药安全问题，药品监管机构会根据实际情况给予处罚 P ，同时监管机构也会因监管问题受到上级政府追责 L 。

④ 当医疗机构不投机，药品监管机构严格监管，这是群众最希望出现的状态，假设出现用药安全问题概率为 0。

当医疗机构不投机，药品监管机构宽松监管，出现用药安全问题概率为 k_1 ($0 \leq k_1 \leq 1$)；

当医疗机构投机，药品监管机构严格监管，出现用药安全问题概率为 k_2 ($0 \leq k_2 \leq 1$)；

当医疗机构投机，药品监管机构宽松监管，出现用药安全问题概率为 k_3 ($0 \leq k_3 \leq 1, k_1, k_2 < k_3$)。

1.2 模型构建

基于以上假设，构建出药品监管部门与医疗机构演化博弈的收益矩阵，见表 1。

表 1 博弈收益矩阵

Tab 1 Game benefit matrix

策略组合		药品监管部门	
		严格监管 x	宽松监管 $1 - x$
医疗机构	不投机 y	$B_1 - C_1 + S_1 + B_3 - S_2, R_1 + S_2$	$B_2 - C_2 + B_4 + B_3 - S_2 - k_1L, R_1 + S_2 - k_1P$
	投机 $1 - y$	$B_1 - C_1 - k_2L, R_1 + \Delta R - k_2P$	$B_2 - C_2 + B_4 - k_3L, R_1 + \Delta R - k_3P$

2 模型分析

2.1 收益期望函数及复制动态方程

根据表 1 的模型假设，对于药品监管部门可以计算其不同决策时的期望收益及平均收益：

$$E_x = y(B_1 - C_1 + S_1 + B_3 - S_2) + (1 - y)(B_1 - C_1 - k_2L)$$

$$E_{1-x} = y(B_2 - C_2 + B_4 + B_3 - S_2 - k_1L) + (1 - y)(B_2 - C_2 + B_4 - k_3L)$$

$$\bar{E}_x = xE_x + (1 - x)E_{1-x}$$

根据上述结果，得到复制动态方程为：

$$F(x) = \frac{dx}{dt} = x(E_x - \bar{E}_x) = x(1 - x)[(S_1 + k_1L + k_2L - k_3L)y + (B_1 - C_1 - k_2L - B_2 + C_2 - B_4 + k_3L)]$$

根据表 1 的模型假设，对于医疗机构可以计算其不同决策时的期望收益及平均收益：

2.2 演化博弈策略分析

令复制动态方程 $F(x) = dx/dt = 0, F(y) = dy/dt = 0$ ，得到了 5 个均衡点分别为 A (0, 1)、B (0, 0)、C (1, 0)、D (1, 1)、E (x^*, y^*)。

$$E_y = x(R_1 + S_2) + (1 - x)(R_1 + S_2 - k_1P)$$

$$E_{1-y} = x(R_1 + \Delta R - k_2P) + (1 - x)(R_1 + \Delta R - k_3P)$$

$$\bar{E}_y = yE_y + (1 - y)E_{1-y}$$

$$F(y) = \frac{dy}{dt} = y(E_y - \bar{E}_y)$$

$$= y(1 - y)[(k_1P + k_2P - k_3P)x + (S_2 - k_1P - \Delta R + k_3P)]$$

$$x^* = \frac{k_1P + \Delta R - S_2 - k_3P}{k_1P + k_2P - k_3P}$$

$$y^* = \frac{C_1 + k_2L + B_2 + B_4 - B_1 - C_2 - k_3L}{S_1 + k_1L + k_2L - k_3L}$$

基于 Friedman 所提出的方法，可以用雅可比矩阵和利益矩阵的局部稳定性来验证博弈双方所形成的策略组合是否为稳定性策略，即是否为 ESS，同时分析哪些因素会对双方策略选择进行影响^[15]。

由上述复制动态组求得雅可比矩阵为：

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial F(x)}{\partial x} & \frac{\partial F(x)}{\partial y} \\ \frac{\partial F(y)}{\partial x} & \frac{\partial F(y)}{\partial y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix}$$

$$\begin{aligned} a_{11} &= (1-2x)[(S_1+k_1L+k_2L-k_3L)y+(B_1-C_1-k_2L-B_2+C_2-B_4+k_3L)] \\ a_{12} &= x(1-x)(S_1+k_1L+k_2L-k_3L) \\ a_{21} &= y(1-y)(k_1P+K_2P-K_3P) \\ a_{22} &= (1-2y)[(k_1P+K_2P-K_3P)x+(S_2-k_1P-\Delta R+k_3P)] \end{aligned}$$

表 2 各均衡点行列式和迹的表达式

Tab 2 Expressions for determinant and trace of each equilibrium point

均衡点	det (J)	tr (J)
(0, 0)	$(B_1 - C_1 - k_2L - B_2 + C_2 - B_4 + k_3L)(S_2 - k_1P - \Delta R + k_3P)$	$(B_1 - C_1 - k_2L - B_2 + C_2 - B_4 + k_3L) + (S_2 - k_1P - \Delta R + k_3P)$
(0, 1)	$-(S_1 + k_1L + B_1 - C_1 - B_2 + C_2 - B_4)(S_2 - k_1P - \Delta R + k_3P)$	$(S_1 + k_1L + B_1 - C_1 - B_2 + C_2 - B_4) - (S_2 - k_1P - \Delta R + k_3P)$
(1, 0)	$-(B_1 - C_1 - k_2L - B_2 + C_2 - B_4 + k_3L)(k_2P + S_2 - \Delta R)$	$-(B_1 - C_1 - k_2L - B_2 + C_2 - B_4 + k_3L) + (k_2P + S_2 - \Delta R)$
(1, 1)	$(S_1 + k_1L + B_1 - C_1 - B_2 + C_2 - B_4)(k_2P + S_2 - \Delta R)$	$-(S_1 + k_1L + B_1 - C_1 - B_2 + C_2 - B_4) - (k_2P + S_2 - \Delta R)$

① 系统在均衡点 (0, 0): 当满足条件 $B_1 - C_1 - k_2L < B_2 - C_2 + B_4 - k_3L$, $S_2 - k_1P < \Delta R - k_3P$, 均衡点 (0, 0) 是系统的 ESS, 系统才会逐渐处于稳定状态。结果表明: 当药品监管机构严格监管获得的收益与受到的处罚之差小于宽松监管的收益与受到的处罚之差, 当医疗机构通过投机, 获得的额外利润与受到的处罚之差高于不投机时, 政府的奖励和补贴与受到的处罚之差, 策略组合演化稳定于 (宽松监管, 投机), 监管机构选择宽松监管, 医疗机构则选择投机, 在当前条件下, 医疗机构制剂最容易发生安全问题, 用药安全难以获得保证。

② 系统在均衡点 (0, 1): 当满足条件 $S_1 + B_1 - C_1 < B_2 - C_2 + B_4 - k_1L$, $S_2 - k_1P > \Delta R - k_3P$, 均衡点 (0, 1) 是系统的 ESS, 系统才会逐渐处于稳定状态。结果表明: 当药品监管机构宽松监管的收益与受到的上级处罚之差大于严格监管获得的收益, 医疗机构不投机, 获得政府的奖励和补贴与受到的处罚之差高于投机获得的额外利润与受到的处罚之差, 策略组合演化稳定于 (宽松监管, 不投机), 药品监管机构选择宽松监管, 医疗机构选择不投机, 在此条件下, 医疗机构选择不投机, 在一定程度上保证了用药安全, 但监管机构选择宽松监管可能会存在监管不到位, 引发一定的用药安全问题。

③ 系统在均衡点 (1, 0): 当满足条件 $B_1 - C_1 - k_2L > B_2 - C_2 + B_4 - k_3L$, $S_2 < \Delta R - k_2P$, 均衡点 (1, 0) 是系统的 ESS, 系统才会逐渐处于稳定状态。结果表明: 当药品监管机构严格监管的收益与受到的上级处罚之差大于宽松监管的收益与受到的处罚之差, 当医疗机构积极负责获得政府的奖励和补贴低于不积极负责时获得的额外利润与受到的处罚之差策略组合演化稳定于 (严格监管, 投机), 药品监管机构选择严格监管, 而医疗机构选择投机, 在此条件下, 医疗机构选择投机, 这在很大程度上无法保证医疗机构制剂质量, 且监管机构选择严格监管, 但仍

当满足条件: 行列式的值 $\det(J) = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} > 0$ 以及迹的值 $\text{tr}(J) = a_{11} + a_{22} < 0$, 此时的点即为演化博弈模型所求的演化稳定点, 也就是演化博弈过程中存在的模演化稳定策略。

当 $x = x^*$, $y = y^*$, $\text{tr}(J) = a_{11} + a_{22} = 0$, 不符合稳定点, 因此考虑其余 4 个点的均衡情况, 具体见表 2。

存在药品安全风险。

④ 系统在均衡点 (1, 1): 当满足条件 $S_1 + B_1 - C_1 > B_2 - C_2 + B_4 - k_1L$, $S_2 > \Delta R - k_2P$, 均衡点 (1, 1) 是系统的 ESS, 系统才会逐渐处于稳定状态。结果表明: 当药品监管机构严格监管的收益高于不严格监管的收益与受到的处罚之差, 当医疗机构积极负责获得政府的奖励和补贴高于不积极负责时获得的额外利润与受到的处罚之差策略组合演化稳定于 (严格监管, 不投机), 药品监管机构选择严格监管, 医疗机构选择不投机, 这是在政府严格执法下, 医疗机构不投机, 双方均积极负责, 这是最理想的状态, 可以最大程度地保证用药安全。

3 仿真分析

为验证演化稳定性分析的有效性, 本文将对系统模型参数进行赋值, 利用 Matlab 软件对参与主体的策略演化轨迹进行仿真模拟, 对上文的理论分析进行验证。

3.1 均衡点仿真分析

① 均衡点 (0, 0) 进行仿真分析: 当满足条件 $B_1 - C_1 - k_2L < B_2 - C_2 + B_4 - k_3L$, $S_2 - k_1P < \Delta R - k_3P$, 均衡点 (0, 0) 是系统的 ESS, 基于此进行数值仿真。假设 $k_1 = 0.4$, $k_2 = 0.4$, $k_3 = 0.5$, $L = 5$, $B_1 = 8$, $C_1 = 5$, $B_2 = 7$, $C_2 = 1$, $B_4 = 3$, $P = 10$, $\Delta R = 6$, $S_2 = 4$, $S_1 = 1$ 。药品监管机构采取严格监管的概率 $x = 0.5$, 医疗机构选择不投机的概率 $y = 0.5$, 稳定性策略仿真结果如图 1 所示。由图 1 可知, 当符合上述条件时, 药品监管机构和医疗机构的博弈策略向均衡点 (0, 0) 进行演化, 并且最终达到稳定状态, 这符合上文的理论分析结果。

② 均衡点 (0, 1) 进行仿真分析: 当满足条件 $S_1 + B_1 - C_1 < B_2 - C_2 + B_4 - k_1L$, $S_2 - k_1P > \Delta R - k_3P$, 均衡点 (0, 1) 是系统的演化稳定策略, 基于此进行数值仿真。假设 $k_1 = 0.4$, $k_2 = 0.4$,

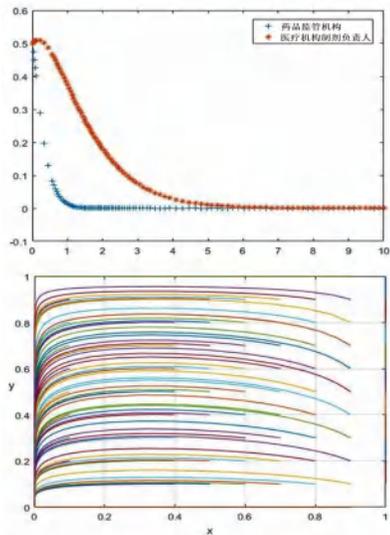


图 1 演化博弈仿真及稳定性策略 (0, 0) 仿真结果

Fig 1 Evolutionary games simulation and stability strategy (0, 0)

$k_3 = 0.5, L = 5, B_1 = 8, C_1 = 5, B_2 = 7, C_2 = 1, B_4 = 1, P = 10, \Delta R = 4, S_2 = 4, S_1 = 1$ 。药品监管机构采取严格监管的概率 $x = 0.5$, 医疗机构选择不投机的概率 $y = 0.5$, 稳定性策略仿真结果如图 2 所示。当符合上述条件时, 药品监管机构和医疗机构的博弈策略向均衡点 (0, 1) 进行演化, 并且最终达到稳定状态, 这符合上文的理论分析结果。

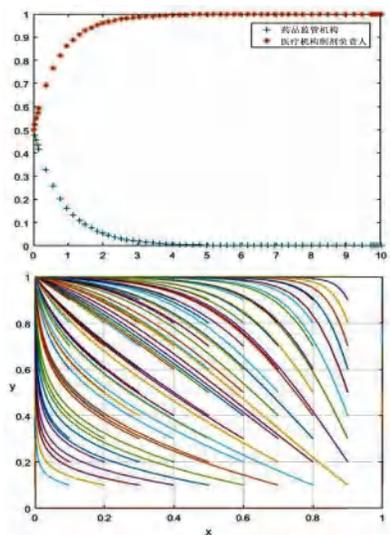


图 2 演化博弈仿真及稳定性策略 (0, 1) 仿真结果

Fig 2 Evolutionary games simulation and stability strategy (0, 1)

③ 均衡点 (1, 0) 进行仿真分析: 当满足条件 $B_1 - C_1 - k_2L > B_2 - C_2 + B_4 - k_3L, S_2 < \Delta R - k_2P$, 均衡点 (1, 0) 是系统的 ESS, 基于此进行数值仿真。假设 $k_1 = 0.4, k_2 = 0.4, k_3 = 0.6, L = 5, B_1 = 8, C_1 = 2, B_2 = 5, C_2 = 1, B_4 = 1, P = 5, \Delta R = 6, S_2 = 2, S_1 = 1$ 。药品监管机构采取严格监管的概率 $x = 0.5$, 医疗机构选择不投机的概率 $y = 0.5$, 稳定性策略仿真结果如图 3 所示。当符合上述条件时, 药品监管机构和医疗机构的博弈策略向均衡

点 (1, 0) 进行演化, 并且最终达到稳定状态, 这符合上文的理论分析结果。

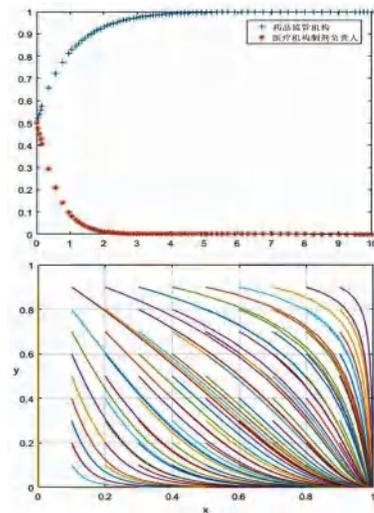


图 3 演化博弈仿真及稳定性策略 (1, 0) 仿真结果

Fig 3 Evolutionary games simulation and stability strategy (1, 0)

④ 均衡点 (1, 1) 进行仿真分析: 当满足条件 $S_1 + B_1 - C_1 > B_2 - C_2 + B_4 - k_1L, S_2 > \Delta R - k_2P$, 均衡点 (1, 1) 是系统的 ESS, 基于此进行数值仿真。假设 $k_1 = 0.4, k_2 = 0.4, k_3 = 0.5, L = 3, B_1 = 8, C_1 = 2, B_2 = 7, C_2 = 1, B_4 = 1, P = 5, \Delta R = 5, S_2 = 4, S_1 = 1$ 。药品监管机构采取严格监管的概率 $x = 0.5$, 医疗机构选择不投机的概率 $y = 0.5$, 稳定性策略仿真结果如图 4 所示。当符合上述条件时, 药品监管机构和医疗机构的博弈策略向均衡点 (1, 1) 进行演化, 并且最终达到稳定状态, 这符合上文的理论分析结果。

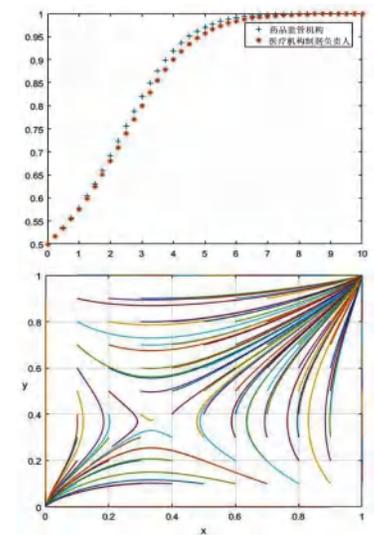


图 4 演化博弈仿真及稳定性策略 (1, 1) 仿真结果

Fig 4 Evolutionary games simulation and stability strategy (1, 1)

3.2 不同参数变化仿真分析

由上文结果可知, 药品监管机构和医疗机构在一定条件下, 在上述 4 个均衡点均能达到稳定

性策略,但在现实生活中,最理想的稳定性策略就是药品监管机构严格监管,医疗机构不投机,最大程度上保证患者的用药安全,故在此基础上,其他参数条件不变的情况下,考虑不同参数对博弈结果的影响,分析其演化过程。

如果均衡点 (1, 1) 是系统的 ESS, 需满足的条件是: $S_1 + B_1 - C_1 > B_2 - C_2 + B_4 - k_1L$, $S_2 > \Delta R - k_2P$ 。假设对各参数的初始赋值是 $k_1 = 0.4$, $k_2 = 0.4$, $k_3 = 0.5$, $L = 3$, $B_1 = 8$, $C_1 = 2$, $B_2 = 7$, $C_2 = 1$, $B_4 = 1$, $\Delta R = 5$, $P = 5$, $S_2 = 4$, $S_1 = 1$, x, y 的初始赋值均为 0.5。

① S_2, P : 在不改变其他参数条件下, 改变 S_2 和 P 的值, 分别设为 $S_2 = 1, 5, 10, P = 1, 5, 10$ 得到演化路径见图 5。当 P 从 1 增加到 5 时, 系统的演化均衡点从 (0, 0) 变化为 (1, 1), 再继续增加到 10 后, 系统的演化稳定状态不变。随着 P 的增大, 医疗机构达到稳定状态的时间变短, 药品监管机构无明显变化。可见, 增加处罚对医疗机构不投机具有正向激励作用。同理, 当 S_2 逐渐增大后, 医疗机构达到稳定状态的时间比 P 值变化的时间更短, 可见加大激励与补贴对医疗机构的正向激励作用略强于处罚力度, 这就需要相关政府出台相关的奖励及补贴政策, 激励医疗机构选择不投机, 来保证医疗机构制剂质量。

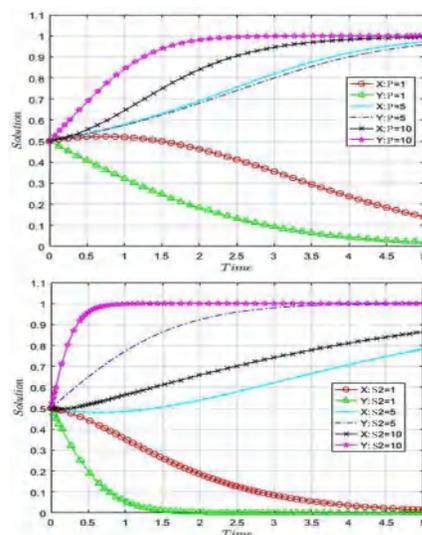


图 5 S_2, P 对医疗机构策略的影响
Fig 5 Impact of S_2 and P on the strategies of medical institutions

② S_1, L, B_4 : 在不改变其他参数条件下, 改变 S_1, L 和 B_4 的值, 分别设为 $S_1 = 1, 5, 10, L = 1, 5, 10, B_4 = 1, 5, 10$, 得到演化路径见图 6。当 S_1 从 1 增加到 5, 再继续增加到 10 后, 系统的演化均衡点逐步稳定为 (1, 1)。随着 S_1 的增大, 药品监管机构达到稳定状态的时间变短, 医疗机构无明显变化。可见, 上级政府加大嘉奖力度对药品监管机构严格监管具有正向激励作用。同理,

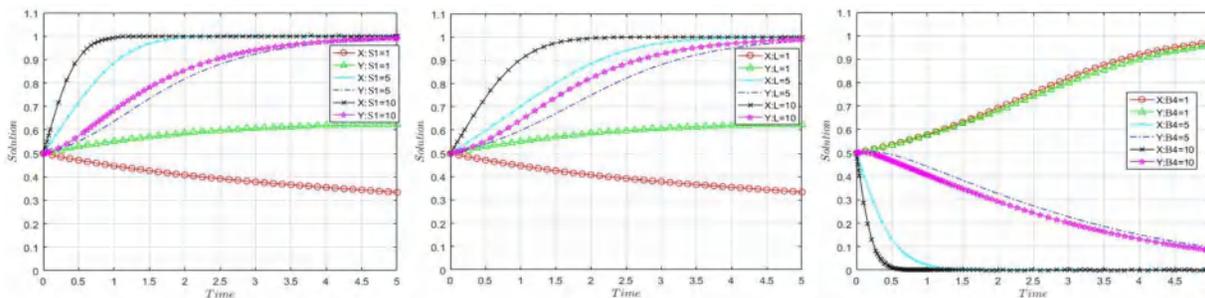


图 6 S_1, L, B_4 对药品监管机构策略的影响
Fig 6 Impact of S_1, L, B_4 on the strategies of drug regulation agencies

当 L 逐渐增大后, 增加处罚力度对药品监管机构严格监管具有正向激励作用。当 B_4 从 1 增加到 5 时, 系统的演化均衡点从 (1, 1) 变化为 (0, 0), 再继续增加到 10 后, 系统的演化稳定状态不变。可见, 当药品监管机构采取不严格监管策略时, 带来潜在的收益 B_4 对药品监管机构采取严格监管具有反向效果, 其原因可能是作为地方监管部门考虑到整体产业以及地方经济的发展, 可能会适当调整监管模式和方法。通过对上述 3 个参数进行比较, 对药品监管部门更快达到稳定状态的影响程度为 $B_4 > S_1 > L$, 因此, 药品监管机构在进行策略选择时, 可能会优先考虑当地产业及经济发展, 其次是上级政府的认可, 最后是上级政府

的问责, 这就需要监管机构能够根据当地实际情况, 综合考虑, 选择合适的监管模式。

4 结语

医疗机构制剂作为我国特有的制剂, 其以名老中医经验方为主, 也是临床治疗的重要补充, 充分体现出医疗机构的医疗水平, 同时也极大程度地推动了中药创新药的发展, 国家非常重视医疗机构制剂的发展, 随着政策的逐步完善, 对于医疗机构和监管机构都是一项挑战, 故本文构建了药品监管机构与医疗机构的演化博弈模型, 求解得出该模型的均衡点, 并进行分析, 运用 Matlab 软件对博弈主体不同策略组合进行数值仿真分析, 并分析了部分参数的变化对系统演化结果的影响, 最终得出以下

结论：① 药品监管机构和医疗机构的策略演化是一个动态的过程，受到多个参数的影响，在不同条件下，选择不同的稳定性策略；② 医疗机构制剂是否选择不投机策略，不仅受到利润的影响，政府的奖惩力度也对其有正向激励作用，且奖励与补贴力度的激励作用略强于处罚力度，这就需要政府设定合理的奖惩机制；③ 药品监管机构是否选择严格监管，不仅与一定的社会效益相关，同时也受产业及地方经济的发展和上级政府的奖惩影响，且产业与地方经济的发展影响较为明显。

经过前期调研不同医疗机构发现，一方面，医疗机构制剂品种数量可作为医院等级评审的一个重要指标，另一方面，医疗机构中药制剂可自主定价并纳入医保。这在很大程度上可以调动医疗机构申报医院制剂的积极性，但是医疗机构制剂不得上市销售，限制了部分商业价值，特别是近年来中药饮片成本增加，导致利润受限^[16]，在现有政策下部分医疗机构可能会存在投机行为，合理适当的奖惩力度可以让医疗机构选择不投机策略。虽然国家出台了大量政策鼓励医疗机构发展^[17-19]，但医疗机构制剂研发为新药的品种少之又少，更多的医疗机构考虑成本或者因自身能力原因，无法将真正有特色的品种进行充分研究。此外，目前尚未有明确的地方政策扶持，均是各省根据当地实际情况出台相关法规细则，建议相关部门要根据上级政府的政策，因地制宜，及时调整，制定符合当地实际情况的实施细则，并做好前期政策宣贯工作，统一监管标准和尺度，利用有限的监管资源，保证当地产业经济的发展，同时对患者用药安全负责。希望监管部门出台切实奖励及补贴政策，鼓励医疗机构积极开发研究医院制剂，并在一定程度上对其给予政策上的帮扶指导，共同助力医疗机构制剂的发展。对于医疗机构而言，既要加强自身培训，又要培养团队力量，要重视医疗机构制剂的申报及研发，既要考虑自身特色，也要重视医疗机构制剂创新，结合自身特色，充分发挥医疗机构制剂作为新药“孵化器”的作用，积极寻求院企合作，开发新品种，助推当地产业经济的发展。

本文是在假设的基础上得到的模型分析结果，医疗机构制剂监管复杂，模型假设仅考虑了有限理性的双方行为选择，仍存在一定的局限性，未能考虑所有的影响因素，可能存在分析不完整的情况，因此，在后续的研究中，我们将持续调研，不断积累数据，以期完善医疗机构制剂监管政策提出创新可行的建议。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局令第 27 号医疗机构制剂配制质量管理规范(试行)[S]. 2001.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局令第 18 号医疗机构制剂配制监督管理办法(试行)[S]. 2005.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局令第 20 号医疗机构制剂注册管理办法(试行)[S]. 2005.
- [4] 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国主席令 59 号中华人民共和国中医药法[S]. 2017.
- [5] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告[EB/OL]. (2018-02-12) [2024-01-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/2018-0212143401381.html>.
- [6] 国家药监局. 关于政协第十四届全国委员会第一次会议第 02046 号(医疗卫生类 172 号)提案答复的函[EB/OL]. (2023-10-16) [2024-01-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/zwjk/jyta/zhxta/20231016105958186.html>.
- [7] 贾泽锋. 基于演化博弈的企业碳减排策略研究[D]. 济南: 山东财经大学, 2023.
- [8] 何聪. 农业数字化发展的演化博弈与仿真研究[D]. 南昌: 江西财经大学, 2023.
- [9] 宋美慧, 王维才. 能源安全背景下企业与政府间双方演化博弈行为研究[J]. 中国软科学, 2022(9): 152-160.
- [10] 严羽, 魏骅, 陶群山. 基于博弈理论的医疗机构中药制剂委托配制行为分析[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2276-2281.
- [11] 严羽, 魏骅, 陶群山. 药品上市许可持有人制度下医疗机构中药制剂委托配制三方演化博弈及仿真分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(12): 1191-1200.
- [12] 谢振雨, 万安霞. 药品安全治理演化博弈及策略研究[J]. 复杂系统与复杂性科学, 2024, 21(2): 129-136, 160.
- [13] 刘睿. 基于演化博弈的药品安全政府监管研究[D]. 长春: 吉林财经大学, 2020.
- [14] 曹剑涛, 高清, 马进. 博弈论视角下的食品药品安全问题与对策研究[J]. 现代管理科学, 2018(11): 115-117.
- [15] 张志颖. 基于前景理论的化工生产监管演化博弈研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2021.
- [16] 马依林, 张虹, 吴晓龙. 医疗机构中药制剂在激励政策下的发展研讨[J]. 中国药事, 2021, 35(7): 792-800.
- [17] 中共中央、国务院关于促进中医药传承创新发展的意见[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2019(31): 6-10.
- [18] 国家药监局. 国家药监局关于促进中药传承创新发展的实施意见[EB/OL]. (2020-12-25) [2024-01-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20201225163906151.html>.
- [19] 国家药监局. 国家药监局关于印发进一步加强中药科学监管促进中药传承创新发展若干措施的通知[EB/OL]. (2023-01-04) [2024-01-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20230103172324162.html>.

(收稿日期: 2024-03-22; 修回日期: 2024-07-05)

《药学创新创业教育与实践》课程的探索和研究

桂玲智¹, 陈俊香², 王昊^{2*}, 张树冰³, 徐康平¹, 吴建平¹, 常实^{4*} (1.中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 2.中南大学湘雅护理学院, 长沙 410013; 3.中南大学生命科学学院, 长沙 410013; 4.中南大学湘雅医学院, 长沙 410008)

摘要: **目的** 研究本校的《药学创新创业教育与实践》课程及实践情况, 发现问题并解决问题。**方法** 对本校药学专业大学生以及教育教学现状进行调研和分析, 根据“因据施策”提出针对性策略。**结果** 在对药学创新创业教育现状进行分析的基础上, 从课外研学实践、双创能力提升、教育教学方法等方面提出详细的应对措施。**结论** 高校应正视自身存在的问题和不足, 探索药学类人才培养模式, 培养出符合社会需求的有创新创业素质的人才, 并为其他专业有关课程的教学改革提供理论依据和实践参考。

关键词: 药学; 创新创业; 教育; 实践

中图分类号: R9-4

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)01-0273-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.042

2021年,《国务院办公厅关于进一步支持大学生创新创业的指导意见》发布。创新创业已成为经济社会发展的新动力, 凸显了提高国民素质、培养人才的重要作用和紧迫性。2024年, 习近平总书记在湖南考察时指出“科技创新是发展新质生产力的核心要素”“要在以科技创新引领产业创新方面下更大功夫”^[1]。

培养大学生的创新意识、提升大学生的创业能力, 将为新质生产力发展提供坚实的人才基础。《中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见》指出“鼓励运用新技术新工艺以及体现临床应用优势的新剂型改进已上市中药品种”^[2-3]。随着药学领域的快速发展, 培养具备创新创业能力的高素质药学人才成为当前教育的重要任务。药学专业大学生通过理论学习、联系实际、服务社会, 在“大健康”“医药中国”等实践过程中既可以锤炼自我, 又可以为国效力。

1 药学专业学生对创新创业认识现状分析

2013年, 习近平总书记向当年全球创业周中国站活动组委会专门致贺信, 特别强调了青年学生在创新创业中的重要作用, 并指出全社会都应当重视和支持青年创新创业^[4]。双创热潮持续高涨, 各种双创赛事、路演、立项活动(创新立项居多)等创新创业活动开展得如火如荼^[5], 但质量如

何呢? 为了解决这个疑问, 我们自编问卷, 面向本校药学专业大学生, 发出问卷 300 份, 回收问卷 300 份, 回收率和有效率均为 100%, 问卷以选择题为主, 辅之以少许主观题。

人在面临新的环境或挑战时, 会进行初步评价, 从而判断“尝新”“创新”的风险。为了探究当前药学专业学生对创新创业的态度(见图 1), 了解他们的心态、他们对形势的判断、他们眼中的政策或保障等, 我们进行调研并获得以下初步结果, 并从中得知本校大多数学生对创新创业持支持态度。

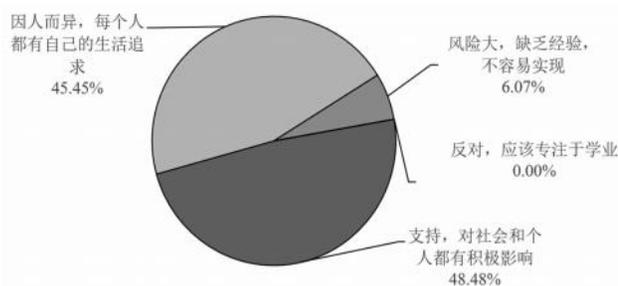


图 1 药学专业大学生对创新创业的看法

在药学专业大学生对当前双创所处形势的调研中, 有学生认为前景较好, 但也有学生认为疫情后经济大环境不好、竞争压力大、时间成本高、经济风险大。

基金项目: 湖南省 2023 年普通高校教学改革研究项目 (No.HNJC-20230079); 湖南省 2023 年学位与研究生教学改革研究项目 (No.2023JGSZ021); 中南大学 2024 年学位与研究生教育教学改革研究项目 (No.2024JGB059); 中南大学 2024 年学位与研究生教育教学改革研究项目 (No.2024JGB070); 中华医学会医学教育分会和全国医学教育发展中心 2023 年医学教育研究立项课题 (No.2023B355); 湖南省 2024 年学位与研究生教学改革研究项目 (No.2024LXBZZ022)。

作者简介: 桂玲智, 女, 助理研究员, 主要从事大学生双创和思政教育工作, email: lingzhigui01@csu.edu.cn *通信作者: 王昊, 男, 助理研究员, 主要从事大学生思想政治教育工作, email: 757141214@qq.com; 常实, 男, 教授, 主要从事临床研究和党建思政工作, email: changshi@csu.edu.cn

药学专业大学生接受创新创业教育存在地域或时空的不平衡,或前期激进,或后期显露疲态。大学生如何在创新创业热潮中迈出步伐,规避可能遭遇的风险,把握住每个机会,已逐渐成为高校注重的方向。从大学生在现实中遇到的困难可以看出(见图 2),53.79% 的学生缺乏经验,撰写创新创业计划书困难;49.24% 的学生不善演讲,缺乏答辩经验;47.73% 的学生受限于没有创新点,起步难;40.91% 的学生缺乏专业的商业知识;36.36% 的团队成员投入不够;另有 11.36% 的学生还面临其他的问题。此外,从调研情况来看,大多数药学专业学生更倾向“技术型”,而非“创新创业型”。

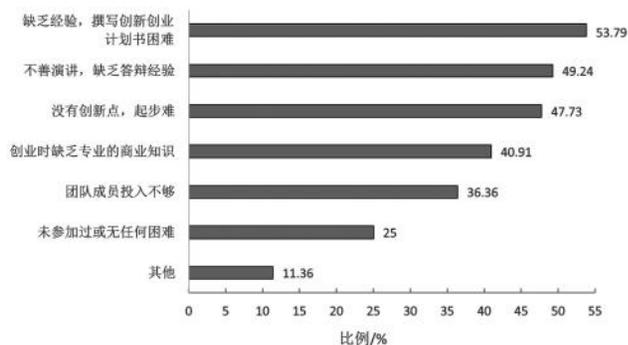


图 2 药学专业大学生认为双创存在的困难

2 创新创业教育目前存在的问题

药学专业人才的培养与行业发展的需求之间存在明显差距。二十多年过去了,作为国内引领创新和人才培养的高校在行业发展大潮中却稍显落后。现今在中国首次申报的临床研究审批新药(Investigational New Drug),几乎都是医药企业的成果,药学专业学生较少完整地策划或参与一个新药研发的流程。国内自主培养的药学专业人才更多地只是提供某个环节的支持或服务,很多药学专业学生在校期间不太关注行业的前沿科技和发展。究其原因,主要是高校没有紧跟国家创新创业战略和行业需求,没有形成相应的创新创业人才培养理念^[6]。

专业教师在担任创新创业教师时,可能已具备一定的实践经验,但在创新创业教育知识体系和实践教学规划方面准备得并不完善。学校虽鼓励教师参加培训、考察,但在将创新创业教育融入日常教学与科研工作中时,与专业教育融合不够,没有达到科教、产教融合以实现协同发展的目标。

学校在聘请校友、企业家和管理人员作为兼职教师的过程中,一定程度上为学生带来了创新创业的新思路和新经验,某些机构还提供了孵化基地资源,但往往“浅尝辄止”或“流于形式”。实践教学基地在创新创业教育中的作用没有得到充分发挥,其功能相对单一,并且缺少多样化的实践活动。

此外,学校没有紧密对接区域经济和医药发展

目标,与政府机构、企业和兄弟高校并未真正建立紧密的合作关系以及跨学科、跨行业的综合性平台。产学研转化能力不足,不能为学生双创训练提供有力支持。

3 基于现状和问题的探索和实践

创新是夯实药学技术基石、实现跨越式发展的本质要求。为适应世界医药产业的发展潮流,药学专业人才应具备合理的知识结构、突出的创新能力^[7]。高校应借助“双一流”发展战略的契机,正视存在的问题和不足,探索药学类人才培养模式,培养出符合社会需求的有创新创业素质的人才^[8]。

3.1 加强课外研学实践

课外研学实践作为学校课堂教育与课外教育的桥梁,为学生亲身体验项目、拓宽视野提供了宝贵机会。其中,大学生创新创业训练计划(双创项目)尤为突出,它不仅构成了课外研学的重要环节,更是一种在导师的悉心指导下,学生可以自主完成从项目设计、实施到总结的项目制训练。这一项目坚持“兴趣为引、实践为路、过程为要”的教育理念,旨在促进教育观念的革新,着重培养大学生独立思考、质疑精神和创新能力,以及他们敢于探索、勇于实践的品格。

在药学专业人才培养体系中,“创新性项目”导向作用突出,其与现实生活、基础研究和医学实践紧密结合。教师们和指导过程中,应充分考虑学生的专业知识,以优化项目、扬长避短。具体而言,教师可结合湖南的地域特色和优势资源,鼓励学生挖掘和利用地方特产与药材,提升农村产品和药物的社会经济价值,服务乡村振兴;引导学生利用国家级、省部级等科研平台及校企合作资源,将创新成果转化为实际创业项目,为国家的科技战略和乡村振兴贡献力量。近年来,本院学生在双创项目中的参与率达到了100%,充分提升了学生的创新创业能力。

3.2 跨界组合

以科研合作为平台围绕前沿交叉领域,跨学科、跨学院组建团队,制订学生个性化培养计划,在科研实践、课程选修、学术讨论等方面进行全方位指导。充分发挥学生学习及研究的主动性、积极性和创造性,挖掘学生的创新潜能,培养复合型创新创业人才。

例如化学药品与生物制品研发及成果转化、中药研发及成果转化、大健康产业实践、“药用辅料与医疗器械”研发及成果转化等。使学生从药学专业角度了解化学药和生物制品、中药、大健康产品、药用辅料与医疗器械等的研发过程、研发周期等特点,了解我国在生物医药产业链中的大政方针,结合市场需求寻找合适的创新创业机会。

3.3 多方结合相互影响

高校可以营造大学生双创的良好氛围,教师带队实践使学生了解企业本质、企业流程、法律问题,

引导学生掌握 4P 原则、5W 理论、SWOT 工具等；通过创业计划书、路演 PPT 等文案撰写和制作技巧等，启发学生了解创业计划书的作用和写作要领等。

多方面、多维度结合促进科研、创新、创业相互影响。将学术科研与“四个自信”相结合，趣味科普与学风建设相结合，开展“药学文化节”“医药知识科普”“暑期国际学术活动周”“用英文讲好中国科学故事”等具有中国文化特色的活动；社会实践与科技创新相结合，把科学普及放在与科技创新同等重要的位置，培养“学思想、强党性、重实践、建新功”的创新创业人才，组织学生到创客空间、科技园等地开展社会实践。

3.4 以赛促学提升能力

以药学技能大赛“挑战杯”“互联网+”等为基础，依托高校学科交叉优势，构建“科研创新+创业实践”模式。高校具备先进的科研平台，有助于学生开阔视野、钻研最新技术。搭建与大学生竞赛相关的研究平台，指导学生参加学科竞赛，进行科研思维素养的训练。设置科研创新课程、学术创新项目，学生自由组队、自行选题、设计（实验）方案、完成（实验）研究、建模、实践和结题答辩。

本院在药学学生双创领域各级各类比赛中深耕多年、收获颇丰。例如《共载雄黄和伊马替尼的白蛋白靶向纳米粒用于慢粒白血病的治理研究》获湖南省首届“大健康”中医药创新创业决赛一等奖，《新型分子态‘植物胰岛素’深耕糖尿病前期》获 2022 年国家级创业训练专项，《传统瑶药现代开发助力神州瑶都乡村振兴》获 2022 年国家级创业训练乡村振兴红旅专项，《‘湘雅创智’药食两用降酸功能食品——深耕现代‘第四高’》获 2022 年国家级创业训练项目，《磁性 PLGA 载药栓塞微球的研发与推广》获第十二届挑战杯中国大学生创业计划竞赛银奖，《湘雅新一代分子态青钱柳——深耕现代“第四高”千亿大蓝海》获第九届中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛银奖等。

3.5 优化教师队伍

组织专题系列讲座，每学期邀请国内外知名的创新创业教育专家、成功创业者来校举办系列讲座，向教师分享他们的经验、见解和成功案例。设立创新创业教育研究小组，定期探讨创新创业教育的最新趋势、教学方法和评估体系，形成研究成果并应用于教学实践中。

实施“双师型”教师培养计划，鼓励教师到企业挂职锻炼或参与企业项目，同时聘请企业高管和技术专家作为兼职教师，实现“校内教师+企业导师”的双师教学模式。开设创新创业导师库，建立包含校内外专家、成功创业者、投资人等多元背景的导师库，学生可根据自身需求选择导师进行一对一指导或参与导师的项目。

建立创新创业教师发展中心，负责设计并实施系统的培训计划，包括在线课程、工作坊、实地考察等多种形式，确保教师能够及时更新知识和技能。实施“教学观摩与互评”制度，定期组织创新创业教育公开课，鼓励教师相互观摩、学习并给出反馈，促进教学方法的持续改进。

签订长期合作协议，与企业家等兼职教师签订明确的合作协议，明确双方的权利和义务，包括教学时间、内容、待遇及考核标准等。设立“创新创业教学贡献奖”，对在创新创业教育中表现突出的兼职教师给予表彰和奖励，包括奖金、荣誉证书及优先合作机会等。建立灵活的教学安排机制，考虑到企业家的时间限制，可以采用灵活的教学安排，如周末授课、网络直播等形式，确保教学质量不受影响。

高校与地方政府、行业协会及企业合作，共建集教学、实训、孵化于一体的创新创业实践基地，为学生提供真实的创业环境和资源。举办创新创业大赛，定期举办校级、区域级乃至国家级的创新创业大赛，邀请投资人、企业家担任评委，为学生提供展示项目、获取资金和资源的机会。实施“项目制”教学，将创新创业课程与具体项目相结合，学生分组参与项目策划、实施和评估全过程，通过实践锻炼提升创新创业能力。

3.6 完善教学方式方法

在双创教育中，小班教学是非常好的模式。例如小班教学中以校园植物为载体，坚持以学生为主体、教师引导的原则，充分发挥学生主观能动性，培养其认真观察、善于总结并能灵活运用所学知识去解决问题的能力^[9]。这种革新不仅可以拓宽学生的学术视野，还可以增强他们在实际操作中发现、深入分析和解决问题的能力，有助于其创新精神、创造能力及创业意识的培养^[10]。

在追求效率与环保的今天，多种创新技术应运而生。例如，超临界流体萃取（如超临界二氧化碳萃取）以其高效、无污染的特点，成为提取茶叶中咖啡因的新兴热门方法。此外，微波辅助提取和超声波辅助提取等技术，也因其能显著缩短提取时间、提高提取率而备受关注。这些新方法的引入，不仅提升了咖啡因的提取效率，还促进了实验室向绿色化学方向的转变。对于咖啡因含量的检测，传统方法如紫外分光光度法虽经典但耗时较长。现代科技则提供了更多快速高效的解决方案，如高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）等，这些技术以其高灵敏度、高分辨率和快速分析的特点，成为检测复杂基质中咖啡因含量的首选^[11]。同时，便携式光谱仪等新型仪器的发展，使得现场快速检测成为可能，进一步拓宽了咖啡因检测的应用场景。

跨学科融合与创新能力培养。面对咖啡因提取与检测领域的技术革新，教师敏锐地捕捉到学生的

创新灵感, 并成功将其转化为科研实践。发挥了教师在教学过程中的引导作用, 同时展示了跨学科融合在创新教育中的重要性, 并且还引导学生掌握专业知识技能、提升团队合作能力、锻炼创新思维。

此外, 还可以借鉴如 BOPPPS 教学模式, 由导入、学习目标、前测、参与式学习、后测和总结六个教学环节构成^[12-13]。例如, 教师在导入时可通过讲述药学领域内的创新创业成功案例, 或引入当前药学领域的热点问题, 以激发学生的学习兴趣; 也可以分享一些新药研发故事, 或探讨药学领域内的技术创新和市场趋势, 以启发学生产生创新理念等。教师在阐述学习目标时, 可以引导学生了解药学创新创业的基本概念和流程; 掌握药学创新创业的关键要素和成功因素; 运用所学知识进行药学创新创业项目的策划和实施等。

3.7 科学制订评价机制

在构建科学的评价机制时, 多元化评价方法的运用显得尤为重要。教师、教学管理人员、学生之间可以互评, 促使教师、教学管理人员不断提升质量, 促使学生不断进步。通过政策层面建立和完善激励机制, 在教师绩效考核、职称评聘等层面强化实践教学权重。

根据课程类型、性质、内容及特点, 确定适合学生的考核内容、考核方式及成绩评定。考核内容重点考核学生获取知识的能力、应用所学知识分析问题和解决问题能力、实践动手能力和创新能力等; 考核方式采用多种形式(笔试、口试、答辩、测验、论文等)、多个阶段(平时测试、作业测评、课外阅读、社会实践、期末考核等)、多种类型(作品、课堂实训、课堂讨论、社会调查、竞赛等)全过程考核; 成绩评定加大过程考核及阶段性考核成绩比例(原则上 $\geq 40\%$), 减少期末成绩的占分比例(见表 1)。

表 1 本课程的学生成绩考核制度的制订情况

考核方式	考核内容	成绩比例/%
课堂讨论	课堂互动与讨论情况	10
调研报告	自己拟订或参加指定的与本专业相关的调研活动	20
创业计划书或路演	撰写创业计划书或项目路演实践	20
创新创业实践	实施自主创业项目; 参加与本专业教师或相关的创新创业项目, 承担和完成相应工作; 参加各级创新创业竞赛	50

综上所述, 通过研究本校《药学创新创业教育

与实践》课程及实践, 初步分析了学生对创新创业的认识情况, 并且从课外研学实践、双创能力提升、师资队伍建设、教育教学方法、考核激励评价等方面提出详细的应对措施。本文阐述的内容有一定的代表性, 且适用范围广, 对促进学生积极参与实践, 增进师生交流和互动, 提高教学质量和教学效果, 以及全方位培养创新型人才和提高大学生综合素质具有重要意义。同时, 本实践研究对学生家国情怀、创新能力、实践能力以及团队协作能力等有积极的促进作用。

参考文献

- [1] 湖南省委常委、长沙市委书记吴桂英发表署名文章: 培育发展新质生产力的新动能[N].《人民日报》(第 05 版). 2024-05-01.
- [2] 国务院公报 2019 年第 31 号. 中共中央、国务院关于促进中医药传承创新发展的意见[EB/OL]. (2019-10-26)[2024-06-08]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content_5449644.htm.
- [3] 孙昱, 孙国祥, 李焕德. FDA 505(b)(2) 改良型新药的申报情况对中药改良型新药的启发思考[J]. 中南药学, 2021, 19(3): 369.
- [4] 习近平致 2013 年全球创业周中国站活动组委会贺信[EB/OL]. (2013-11-08)[2024-06-08]. https://www.gov.cn/ldhd/2013-11/08/content_2524400.htm.
- [5] 蒋直平.《大学生关注的热点问题与解决方案年度报告 2022》[M]. 长沙: 中南大学出版社, 2022: 195.
- [6] 张虹锐, 肖明兴. 自主创新时代下药学专业教育与创新创业融合的探索与实践[J]. 大学化学, 2024, DOI: 10.12461/PKU.DXHX202401040.
- [7] 罗晓燕, 宋恭华, 刘宏伟, 等. 制药工程专业学生创新能力培养的探索[J]. 药学教育, 2020, 36(6): 62-65.
- [8] 王颖莉, 张丽丽, 任蕾, 等. 制药工程专业建设及人才培养模式改革探讨[J]. 中医药管理杂志, 2020, 28(7): 23-25.
- [9] 唐雨, 黄秀凝, 明乾良, 等. 校园植物在药用植物学小班教学中的应用[J]. 中南药学, 2017, 15(4): 543-544.
- [10] 李晨阳, 熊炜, 李颖, 等. 创新创业型药学人才培养模式探究[J]. 药学教育, 2023, 39(4): 5-8.
- [11] 傅春燕, 刘诗薇, 刘永辉, 等. 基于创新创业教育下药学专业有机化学混合式教学的实践与思考[J]. 广东化工, 2024, 51(6): 166-167.
- [12] 曹丹平, 印兴耀. 加拿大 BOPPPS 教学模式及其对高等教育改革的启示[J]. 实验室研究与探索, 2016, 35(2): 196-200.
- [13] 龚慧, 颜苗, 张毕奎, 等. BOPPPS 教学模式在《临床药物治疗学》教学中的设计初探[J]. 中南药学, 2023, 21(8): 2242-2245.

(收稿日期: 2024-06-08; 修回日期: 2024-08-29)

药品不良反应

木糖醇注射液致严重乳酸酸中毒 3 例

徐保平¹, 徐辉², 彭怀文³, 王晓涛^{4*} (1. 广州中医药大学附属中山中医院重症医学科, 广东 中山 528400; 2. 安徽中医药大学第四临床医学院(六安市中医院)消化内科, 安徽 六安 237000; 3. 安徽中医药大学第四临床医学院(六安市中医院)重症医学科, 安徽 六安 237000; 4. 无锡市锡山人民医院鹅湖分院中医科, 江苏 无锡 214116)

关键词: 木糖醇注射液; 乳酸酸中毒; 不良反应; 高乳酸血症

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)01-0277-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.043

木糖醇是一种五羟基糖醇, 干燥状态下呈白色结晶, 具有低热量和调节肠道功能作用, 可降低血糖、三酰甘油和胆固醇水平^[1]。木糖醇目前已被广泛用于各种食品、口腔护理、疾病预防和治疗^[2-3]。同时木糖醇也是一种应用广泛的溶媒, 具有良好的稳定性^[4]。木糖醇常见的不良反应有胸痛、寒战、发热、恶心呕吐、皮疹瘙痒、头晕、心悸、过敏等, 输注过快可引起急性肾损伤和脑损伤^[5]。木糖醇引起严重乳酸酸中毒临床罕见, 病情危重, 若处理不及时可能会危及生命, 国内尚未见相关文献报道。本文报道 3 例输注木糖醇后出现严重乳酸酸中毒患者, 分析 3 例乳酸酸中毒患者临床特点, 并进行文献复习, 以期引起临床对输注木糖醇相关不良反应的重视。

1 病历资料

1.1 病例 1

患者, 女, 87 岁, 2022 年 9 月 28 日因“食欲缺乏、乏力 1 月余, 加重 5 d”住院。患者 1 个月前出现食欲缺乏、乏力, 时有头晕、吞咽不畅, 可进食流质。5 d 前食欲缺乏、乏力加重, 无法进食, 收治我院。既往有高血压病和脑供血不足病史多年。辅助检查, 血气分析: pH 7.49↑、二氧化碳分压 (PaCO₂) 38.3 mmHg、氧分压 (PaO₂) 89.7 mmHg (FiO₂: 30%)、剩余碱 (BE) 5.4 mmol·L⁻¹↑、HCO₃⁻ 28.1 mmol·L⁻¹↑、乳酸 (Lac) 1.1 mmol·L⁻¹。血常规: 白细胞 (WBC) 10.13×10⁹·L⁻¹↑、中性粒细胞百分比 (N%) 60.10%、血红蛋白 (Hb) 86.00 g·L⁻¹↓、血小板 (PLT) 145.00×10⁹·L⁻¹。肝功能: 谷丙转氨酶 (ALT) 121.3 U·L⁻¹↑、谷草转氨酶

(AST) 146.6 U·L⁻¹↑。肾功能: 肌酐 (Scr) 148.74 μmol·L⁻¹↑, 尿酸 (UA) 768.50 μmol·L⁻¹↑。空腹血糖 10.29 mmol·L⁻¹↑, 糖化血红蛋白 (HbA1c) 7.11%↑。头+胸部 CT 示: 头颅未见明显异常, 双肺少许慢性炎症改变; 食管壁不规则增厚, 食管腔不规则狭窄。诊断: ① 食管肿瘤待查; ② 高血压病 2 级高危; ③ 低蛋白血症; ④ 营养不良; ⑤ 急性肾损伤; ⑥ 急性肝损伤。治疗予奥美拉唑抑酸护胃 (60 mg ivgtt qd), 谷胱甘肽 (1.8 g ivgtt qd) + 异甘草酸镁 (200 mg ivgtt qd) 保肝降酶, 10% 木糖醇 (500 mL ivgtt qd, 输注速度 125 mL·h⁻¹) 营养支持以及补液维持内环境稳定等。9 月 28 日 17: 00 查房, 患者深大呼吸, 意识模糊, 氧饱和度 95% (鼻导管吸氧)。血气分析: pH 7.44、PaCO₂ 21.4 mmHg↓、PaO₂ 83.7 mmHg (FiO₂: 30%)、BE - 8.0 mmol·L⁻¹↓、HCO₃⁻ 17.9 mmol·L⁻¹↓、Lac 30.0 mmol·L⁻¹↑。急查血常规: WBC 12.21×10⁹·L⁻¹↑、N% 58.90%、Hb 84.00 g·L⁻¹↓、PLT 123.00×10⁹·L⁻¹。C 反应蛋白 (CRP) 29.45 mg·L⁻¹↑, 降钙素原 (PCT) 0.14 ng·mL⁻¹。肝功能: ALT 78.04 U·L⁻¹↑、AST 81.98 U·L⁻¹↑。肾功能: Scr 118.32 μmol·L⁻¹↑, UA 768.50 μmol·L⁻¹↑。空腹血糖 10.37 mmol·L⁻¹↑。经过我院 ICU 和药学部会诊考虑木糖醇相关乳酸酸中毒, 严重高乳酸血症。予常规补液, 补充白蛋白 (ALB, 20 g), 维持水电解质平衡等治疗, 患者 Lac 逐渐恢复正常。9 月 29 日晨查房, 患者神清, 精神萎靡, 血气分析: pH 7.46、PaCO₂ 32.0 mmHg、PaO₂ 110 mmHg (FiO₂: 30%)、BE 0.5 mmol·L⁻¹、HCO₃⁻ 24 mmol·L⁻¹、Lac

基金项目: 安徽中医药大学临床科研项目 (No. 2021LAYB005, No.2021LAQN010)。

作者简介: 徐保平, 男, 主治医师, 主要从事药物临床研究与评价, email: xu131406@163.com *通信作者: 王晓涛, 男, 主治医师, 主要从事医学方法学研究, email: 568832807@qq.com

15.0 mmol · L⁻¹↑, 继续补液等对症治疗。10 月 1 日复查血气分析提示 Lac 正常, 转消化科继续治疗, 患者拒绝胃镜检查, 10 月 3 日出院, 出院 1 周随访, 无不适。

1.2 病例 2

患者, 男, 65 岁, 因“呕血、黑便 1 d”于 2022 年 9 月 22 日入院, 既往有糖尿病和痛风病史数年。体检: 脉搏 82 · min⁻¹、血压 133/75 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 神清, 面色苍白, 上腹部轻压痛, 无反跳痛, 余无特殊。辅助检查: 血常规: WBC 17.05 × 10⁹ · L⁻¹↑、N% 83.40%、Hb 64.00 g · L⁻¹↓、PLT 132.00 × 10⁹ · L⁻¹。肝功能: ALT 22.18 U · L⁻¹、AST 39.31 U · L⁻¹、ALB 28.23 g · L⁻¹↓。肾功能: Scr 217.40 μmol · L⁻¹↑, UA 578.4 μmol · L⁻¹↑。血糖 16.34 mmol · L⁻¹↑, HbA1c 7.67%↑。血气分析: pH 7.36、PaCO₂ 41.2 mmHg、PaO₂ 145 mmHg (FiO₂: 30%)、BE - 0.3 mmol · L⁻¹、HCO₃⁻ 23.2 mmol · L⁻¹、Lac 0.9 mmol · L⁻¹。电子胃镜: ① 幽门管溃疡 (A1 期); ② 十二指肠溃疡。病理: 黏膜重度慢性炎 (幽门管)。住院诊断: ① 消化道出血; ② 消化道溃疡 (幽门、十二指肠); ③ 贫血; ④ 急性肾损伤; ⑤ 2 型糖尿病; ⑥ 痛风; ⑦ 低蛋白血症。治疗予输血 (1.5 U 红细胞, 17: 30 输血完毕), 10% 木糖醇注射液 1000 mL 静脉滴注 (输注速度 125 mL · h⁻¹) 补充能量, 胰岛素控制血糖, 非布司他 (40 mg qd) 降尿酸、奥美拉唑 (60 mg ivgtt qd) 抑酸护胃, 生长抑素静脉滴注止血, 复方氨基酸 (250 mL ivgtt qd) 营养支持等。9 月 23 日 00: 00 患者突发意识不清, 对答不能切题, 呼吸 20 次 · min⁻¹, 心率 106 次 · min⁻¹, 血压 111/70 mmHg, SpO₂ 99%, 无发热。血气分析: pH 7.37、PaCO₂ 23.5 mmHg↓、PaO₂ 187 mmHg (FiO₂: 30%)、BE - 10.7 mmol · L⁻¹↓、HCO₃⁻ 15.8 mmol · L⁻¹↓、Lac 12.0 mmol · L⁻¹↑、K⁺ 5.5 mmol · L⁻¹↑。血常规: WBC 9.41 × 10⁹ · L⁻¹、Hb 70.00 g · L⁻¹↓、PLT 112.00 × 10⁹ · L⁻¹。尿液分析: pH 5.5, 酮体 (-), 葡萄糖 (++)↑。凝血功能: D-二聚体 0.07 μg · mL⁻¹、凝血酶原时间 16.10 s↑、活化部分凝血活酶时间 54.10 s↑、凝血酶时间 17.10 s↑、纤维蛋白原 1.59 g · L⁻¹↓。肝功能: ALT 26.34 U · L⁻¹、AST 41.45 U · L⁻¹、ALB 26.24 g · L⁻¹↓。肾功能: Scr 180.34 μmol · L⁻¹↑、UA 512.1 μmol · L⁻¹↑。床边心超: 左房轻大, 二、三尖瓣少量反流。急诊头颅 CT 和 CT 血管造影 (CTA) 未见异常。经

过我院 ICU 和药学部会诊考虑木糖醇相关乳酸酸中毒, 严重高乳酸血症、高钾血症。转 ICU 监护治疗, 予输注 ALB 和冰冻血浆 400 mL、抑酸护胃、止血、降钾、胰岛素控制血糖、补液 (0.9% 氯化钠注射液)、维持内环境稳定、营养支持等处理。9 月 23 日晨查房, 患者神清, 对答切题。血气分析: pH 7.43、PaCO₂ 35.0 mmHg、PaO₂ 220 mmHg (FiO₂: 30%)、BE - 1.1 mmol · L⁻¹、HCO₃⁻ 23.6 mmol · L⁻¹、Lac 2.3 mmol · L⁻¹、K⁺ 4.6 mmol · L⁻¹。此后患者复查 Lac 水平渐恢复正常, 9 月 24 日患者转消化科治疗, 9 月 28 日患者经口进食, 10 月 1 日出院。

1.3 病例 3

患者, 女, 71 岁, 系“反复呕吐 1 个月”于 2022 年 9 月 15 日入院。患者 1 个月前出现进食后呕吐, 伴上腹部烧灼样疼痛、反酸、口干口苦、食欲缺乏, 伴心慌、乏力。当地医院治疗无明显好转, 遂来我院就诊。既往有风湿性关节炎病史 30 年, 间断口服雷公藤、激素、中药等治疗, 现已停药。血气分析: pH 7.41、PaCO₂ 41.3 mmHg、PaO₂ 89.8 mmHg (FiO₂: 30%)、BE - 1.1 mmol · L⁻¹、HCO₃⁻ 23.3 mmol · L⁻¹、Lac 0.7 mmol · L⁻¹。血常规: WBC 12.36 × 10⁹ · L⁻¹↑、N% 58.20%、Hb 118.00 g · L⁻¹、PLT 345.00 × 10⁹ · L⁻¹↑。CRP 52.78 mg · L⁻¹↑, 血沉 (ESR) 25.2 mm · h⁻¹↑。肝功能: ALT 29.62 U · L⁻¹、AST 47.56 U · L⁻¹↑、总胆红素 20.59 μmol · L⁻¹↑、直接胆红素 12.30 μmol · L⁻¹↑、ALB 27.64 g · L⁻¹↓。肾功能: Scr 89.40 μmol · L⁻¹、UA 740.3 μmol · L⁻¹↑。空腹血糖 8.28 mmol · L⁻¹↑, 餐后 1 h、2 h 血糖分别为 14.56 mmol · L⁻¹↑、13.14 mmol · L⁻¹↑, HbA1c 7.26%↑。电子胃镜: ① 贲门溃疡; ② 慢性萎缩性胃炎。住院诊断: ① 胃溃疡 (贲门); ② 2 型糖尿病; ③ 类风湿性关节炎; ④ 食管裂孔疝; ⑤ 肺部感染。治疗予复方氨基酸注射液 (250 mL ivgtt qd) 和 10% 木糖醇注射液 (250 mL ivgtt qd, 输注速度 125 mL · h⁻¹) 营养支持, 瑞巴派特保护胃黏膜, 甲氧氯普胺止吐, 泮托拉唑抑酸护胃, 头孢曲松钠抗感染, 氢化可的松琥珀酸钠控制关节炎症以及对症治疗。患者消化道症状渐缓, 仍食欲缺乏, 进食少, 9 月 20 日木糖醇增加至 1000 mL · d⁻¹ (输注速度 125 mL · h⁻¹)。9 月 24 日 15: 00 家属代诉患者神志淡漠、心慌、呼吸喘促, 心电监护示: 呼吸 22 ~ 32 次 · min⁻¹、心率 120 ~ 130 次 · min⁻¹、血压 101/72 mmHg, SpO₂ 80% ~ 85%, 血气分析:

pH 7.28↓、PaCO₂ 8.7 mmHg↓、PaO₂ 193 mmHg (FiO₂: 60%)、BE - 23.7 mmol·L⁻¹↓、HCO₃⁻ 4.1 mmol·L⁻¹↓、Lac 23 mmol·L⁻¹↑、K⁺ 2.7 mmol·L⁻¹↓、Ca²⁺ 0.76 mmol·L⁻¹↓、Ag 24.9 mmol·L⁻¹↑、葡萄糖 (Glu) 19.3 mmol·L⁻¹↑。急查血常规: WBC 27.22×10⁹·L⁻¹↑、N% 84.90%、Hb 114.00 g·L⁻¹、PLT 316.00×10⁹·L⁻¹↑。CRP 58.77 mg·L⁻¹↑, PCT 0.09 ng·mL⁻¹。尿液分析: pH 5.0, 酮体阴性, 葡萄糖阴性, 余正常。肾功能: Scr 63.60 μmol·L⁻¹、UA 557.7 μmol·L⁻¹↑。肝功能: ALT 52.41 U·L⁻¹↑、AST 71.1 U·L⁻¹↑。经过我院 ICU 和药学部会诊考虑木糖醇相关乳酸酸中毒, 电解质代谢紊乱 (低钾、低钙血症), 转 ICU 治疗, 立

即停用木糖醇注射液, 予动态监测血气 Lac 水平、补液纠酸、维持电解质平衡、头孢哌酮钠舒巴坦钠经验性抗感染等处理。患者神志渐转清, 症状缓解, 稍有乏力, 无恶心呕吐和腹痛腹胀, 9 月 25 日复查血气示 Lac 基本恢复正常, 酸中毒纠正。9 月 26 日患者神志清楚, 一般体征稳定, 未诉不适, 转回消化科诊治, 予常规抑酸护胃、补液等对症治疗。9 月 27 日患者自动离院, 出院 2 周随访一般情况可, 无不适。

2 3 例患者临床特征

3 例患者住院期间动脉血气分析 Lac 值、BE 及 pH 值变化情况及临床特征见表 1 和图 1。

表 1 3 例乳酸酸中毒不良反应患者临床特征

病例	性别	年龄 / 岁	疾病	木糖醇剂量 / 疗程	合并用药	pH	BE / (mmol·L ⁻¹)	Lac / (mmol·L ⁻¹)	处理措施	恢复正常时间 / d	预后
1	女	87	食管肿瘤待查; 高血压病 2 级高危; 低蛋白血症; 营养不良; 急性肾损伤; 急性肝损伤	50 g ivgtt qd, 总剂量 50 g, 7 h 出现乳酸酸中毒	奥美拉唑, 谷胱甘肽, 异甘草酸镁, ALB	7.44	- 8.0	30	停药, 对症治疗	4	完全康复
2	男	65	消化道出血; 消化道溃疡 (幽门、十二指肠); 贫血; 急性肾损伤; 2 型糖尿病; 痛风; 低蛋白血症	100 g ivgtt qd, 总剂量 100 g, 6 h 出现乳酸酸中毒	胰岛素, 奥美拉唑, 生长抑素, 复方氨基酸, 非布司他	7.37	- 10.7	12	停药, 对症治疗	2	完全康复
3	女	71	胃溃疡 (贲门); 2 型糖尿病; 类风湿关节炎; 食管裂孔疝; 肺部感染	25 g ivgtt qd (9.15~9.19, 125 g) 100 g ivgtt qd (9.20~9.24, 500 g) 总剂量 625 g, 10 d 出现乳酸酸中毒	复方氨基酸, 瑞巴派特, 甲氧氯普胺, 泮托拉唑, 头孢曲松钠, 氢化可的松	7.28	- 23.7	23	停药, 对症治疗	2	完全康复

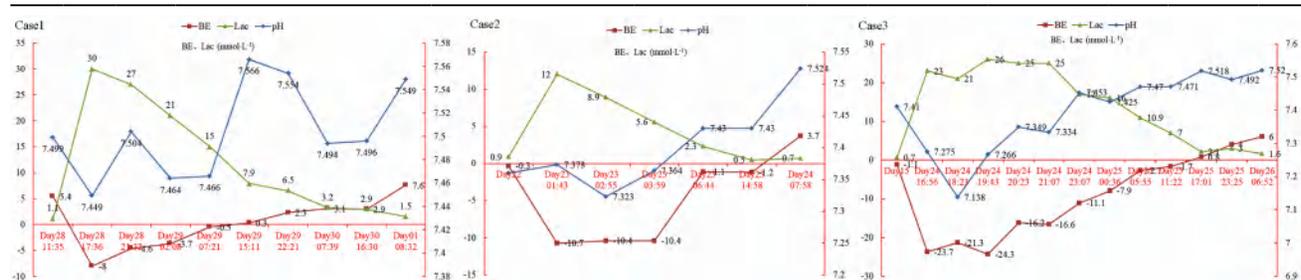


图 1 患者住院期间动脉血气分析 Lac 值、BE 及 pH 值变化情况

3 例患者中 2 例女性, 1 例男性。平均年龄 74 岁, 年龄范围 65 ~ 87 岁。输注木糖醇至发生乳酸酸中毒时间范围 6 h ~ 10 d, 平均时间为 3.5 d, 累计剂量范围 50 ~ 625 g, 2 例患者在 8 h 内发生不良反应, 同时这 2 例都合并急性肾损伤, 提示急性肾损伤患者使用木糖醇须谨慎。3 例患者均表现为意识障碍, 或呼吸异常或心慌不适等。动脉血气 BE 和 pH 变化范围分别为 - 8.0 ~ - 23.7 mmol·L⁻¹ 和 7.28 ~ 7.44, 患者均有不同程度代

偿, 因此动脉血气 pH 下降不明显。3 例患者乳酸峰值范围 12 ~ 30 mmol·L⁻¹, 平均 Lac 峰值水平高达 22 mmol·L⁻¹。停止输注木糖醇后 4 d 内 Lac 恢复正常, 3 例患者全部恢复出院。

3 讨论

3.1 不良反应关联性分析

3 例患者入院时血 Lac 水平正常, 无意识障碍和酸中毒表现, 静脉输注木糖醇注射液后出现神志改变, 或呼吸异常, 或心慌等表现, 复查动脉血气

分析示 Lac 水平明显升高,伴有酸中毒,不良反应与用药具有明显的时间关联性,且客观诊断证据充分。3 例患者停止输注木糖醇后予对症处理血 Lac 水平迅速恢复,酸中毒症状改善。木糖醇说明书虽无乳酸酸中毒不良反应,但是国外文献曾报道 1 例患者输注木糖醇后出现乳酸酸中毒不良反应^[6]。木糖醇说明书提示每日剂量不超过 100 g,输注速度不超过 0.3 g/(kg·h),3 例患者均没有超过每日剂量和输注速度,可以排除超剂量或不合理输注导致的乳酸酸中毒,属于不良反应范畴。病例 3 患者 9 月 15 日木糖醇剂量为 500 mL·d⁻¹(含木糖醇 50 g),未出现明显不良反应。9 月 20 日增加至

1000 mL·d⁻¹(含木糖醇 100 g),9 月 24 日患者出现严重乳酸酸中毒相关症状,不良反应与剂量增加有一定的关系。3 例患者出现严重乳酸酸中毒前后,血压基本正常,监测血糖无剧烈波动,血气分析氧合正常, β -羟丁酸正常范围,复查感染指标基本正常,排除缺氧缺血及其他疾病所致乳酸酸中毒。对 3 例患者住院期间用药分析,排除其他药物导致不良反应。最终考虑木糖醇注射液所致不良反应可能,诊断为 B 型乳酸酸中毒。3 例患者采用诺氏药物不良反应评分均为 7 分(见表 2),关联性评价结果为“很可能相关”,表明该患者乳酸酸中毒“很可能”由输注木糖醇注射液所致。

表 2 3 例患者诺氏药物不良反应评估量表评分情况

相关性问题	问题分值			得分		
	是	否	未知	病例 1	病例 2	病例 3
1. 该不良反应先前是否有结论性报告?	+1	0	0	+1	+1	+1
2. 该不良反应是否是在使用可疑药物后发生的?	+2	-1	0	+2	+2	+2
3. 该不良反应是否在停药或者应用拮抗剂后得到缓解?	+1	0	0	+1	+1	+1
4. 该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+2	-1	0	0	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该不良反应?	-1	+2	0	+2	+2	+2
6. 该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现?	-1	+1	0	0	0	0
7. 药物在血液或者其他体液中是否达到毒性浓度?	+1	0	0	0	0	0
8. 该不良反应是否随剂量增加而加重,或者随剂量减少而得到缓解?	+1	0	0	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或者同类药物并出现类似反应?	+1	0	0	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	+1	0	0	+1	+1	+1
总分值				7	7	7

注:总分 ≥ 9 分,肯定;5~8分,很可能;1~4分,可能; ≤ 0 分,可疑。

3.2 木糖醇临床应用和相关不良反应

木糖醇是一种常用的葡萄糖替代品,其进入机体后直接进入细胞内,在三磷酸腺苷(ATP)和适当的酶作用下变为 D-5-磷酸木酮糖,最后代谢物为水和二氧化碳,并释放能量供机体利用^[1]。木糖醇注射液作为一种肠外营养能量补充物,对患者血糖及 C 肽水平无明显影响,可减少危重患者蛋白质分解代谢并增强肝脏糖异生,广泛地应用于围手术期、应激、合并感染、消化系统疾病、急危重疾病等^[3]。木糖醇还具有抗炎和抗糖尿病作用,尤其适用于超重、肥胖和糖尿病患者,可减少葡萄糖等碳水摄入^[7-8]。有研究显示,重症患者静脉输注木糖醇进行营养支持,未发现 Lac 蓄积及肝毒性表现,认为静脉输注木糖醇对重症患者是安全的^[9]。

木糖醇注射液说明书提示常见不良反应有皮疹、瘙痒、斑丘疹、恶心、头晕、面色潮红、食欲缺乏、腹胀等。相关文献报道静脉输注木糖醇可引起血尿酸升高、代谢性酸中毒、急性肝肾损

伤、脑损伤及多器官功能障碍^[10-14]。可能机制为大剂量或过快输注木糖醇在体内代谢产生草酸与钙离子结合形成草酸钙结晶,沉积于肾脏、脑、肺、肝和心脏等组织器官,造成多器官功能损伤,组织病理活检可见草酸钙晶体沉积^[12, 15]。检索中国知网、万方、维普、中国生物医学文献数据库,目前国内尚无输注木糖醇致乳酸酸中毒报道。

3.3 木糖醇致乳酸酸中毒文献复习和相关机制

木糖醇注射液致乳酸酸中毒临床罕见,国外曾报道 1 例输注木糖醇注射液致乳酸酸中毒案例^[6],该患者在 6 h 输注 250 g 木糖醇,远超每日输注总剂量和输注速度。木糖醇相关乳酸酸中毒与总剂量和输注速度有关,随着木糖醇大量或者快速输注,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)大量积累,NADH/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)比例失衡,引起乳酸代谢障碍^[15]。主要表现为代谢性酸中毒,包括乳酸酸中毒和高尿酸血症,在停止用药后,这些不良反应是可逆的^[12]。此外,木糖醇体内代谢可产生草酸,而草

酸会干扰线粒体代谢,致血 Lac 水平升高,这可能是木糖醇致乳酸酸中毒的另一个机制^[11, 16-17]。

木糖醇相关乳酸酸中毒严重者常伴有草酸盐蓄积及急性肾损伤,可能需要血液透析尽快清除草酸,纠正酸中毒,防止肾功能继续恶化^[11, 18]。本研究 3 例患者虽然 Lac 水平严重升高并伴有 BE 明显下降,但是肾功能未影响,尿量正常,予纠酸、补液、维持电解质平衡等治疗后 Lac 水平迅速下降,酸中毒纠正,并未进行血液透析,均完全康复。病例 1 和病例 2 入院时均存在急性肾损伤,木糖醇说明书提示肝肾功能不全慎用;病例 3 入院后输注木糖醇注射液 10 d 发生乳酸酸中毒,期间未监测血 Lac 变化情况。对木糖醇相关乳酸酸中毒认识不足和不规范用药可能是 3 例患者发生乳酸酸中毒的一个重要原因,因此必须加强临床医师对静脉输注木糖醇相关不良反应的认识。

4 总结

综上所述,木糖醇注射液可引起乳酸酸中毒,神志改变可能是乳酸酸中毒重要的临床表现,临床医师需提高对木糖醇注射液相关不良反应的认识。使用木糖醇注射液时应按照说明书合理规范使用,减少不良反应发生。对于老年、慢性基础疾病和肝肾功能不全患者,需加强用药过程中不良反应监测,建议用药期间定期复查肝肾功能、血气分析等指标,及时发现各种异常反应并积极处理,改善预后。

参考文献

- [1] Ur-Rehman S, Mushtaq Z, Zahoor T, et al. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2015, 55 (11): 1514-1528.
- [2] Ahuja V, Macho M, Ewe D, et al. Biological and pharmacological potential of xylitol: a molecular insight of unique metabolism [J]. *Foods*, 2020, 9 (11): 1592.
- [3] Wlnerhanssen BK, Meyer-Gerspach AC, Beglinger C, et al. Metabolic effects of the natural sweeteners xylitol and erythritol: a comprehensive review [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2020, 60 (12): 1986-1998.
- [4] 谢静, 邓曼静. 注射用兰索拉唑在木糖醇和果糖注射液中的配伍稳定性研究 [J]. *中南药学*, 2014, 12 (10): 976-978.
- [5] 张慧, 谭惠丰, 汤颖, 等. 糖尿病合并草酸性肾病致急性肾损伤 1 例报告 [J]. *中国实用内科杂志*, 2018, 38 (6): 585-588.
- [6] Thomas DW, Gilligan JE, Edwards JB, et al. Lactic acidosis and osmotic diuresis produced by xylitol infusion [J]. *Med J Australia*, 1972, 1 (24): 1246-1248.
- [7] Park E, Park MH, Na HS, et al. Xylitol induces cell death in lung cancer A549 cells by autophagy [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37 (5): 983-990.
- [8] Rahman MA, Islam MS. Xylitol improves pancreatic islets morphology to ameliorate type 2 diabetes in rats: a dose response study [J]. *J Food Sci*, 2014, 79 (7): H1436-1442.
- [9] Schneider AS, Schettler A, Markowski A, et al. Assessment of xylitol serum levels during the course of parenteral nutrition including xylitol in intensive care patients: a case control study [J]. *Clin Nutr*, 2014, 33 (3): 483-488.
- [10] 许先兴, 杨静文, 吴桂芝, 等. 含木糖醇注射剂临床应用现状及潜在风险分析 [J]. *中国药物警戒*, 2017, 14 (11): 680-682.
- [11] Takayasu S, Kamba A, Yoshida K, et al. Secondary oxalosis induced by xylitol concurrent with lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: a case report [J]. *BMC Nephrol*, 2020, 21 (1): 157.
- [12] 杨柳, 赵聪, 姚默, 等. 木糖醇应用及毒副作用研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (34): 21355-21356.
- [13] Wolyniec W, Szwarc A, Kasproicz K, et al. Impact of hydration with beverages containing free sugars or xylitol on metabolic and acute kidney injury markers after physical exercise [J]. *Front Physiol*, 2022, 13 (20): 841056.
- [14] Frdl V. Cerebrorenal oxalate formation—a metabolic abnormality following parenteral infusions of carbohydrate exchange substances [J]. *Zentralbl Allg Pathol*, 1987, 133 (4): 369-376.
- [15] Thomas DW, Edwards JB, Gilligan JE, et al. Complications following intravenous administration of solutions containing xylitol [J]. *Med J Australia*, 1972, 1 (24): 1238-1246.
- [16] 沈丽津, 孙丽荣. 木糖醇与肾损害 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2007, 27 (3): 187-189.
- [17] Jonassen JA, Cao LC, Honeyman T, et al. Mechanisms mediating oxalate-induced alterations in renal cell functions [J]. *Crit Rev Eukar Gene*, 2003, 13 (1): 55-72.
- [18] Meier M, Nitschke M, Perras B, et al. Ethylene glycol intoxication and xylitol infusion—metabolic steps of oxalate-induced acute renal failure [J]. *Clin Nephrol*, 2005, 63 (3): 225-228.

(收稿日期: 2024-06-05; 修回日期: 2024-07-25)

艾司西酞普兰致 QTc 间期延长 1 例分析

刘苏瑶, 张慧* (南京医科大学附属脑科医院药学部, 南京 210029)

关键词: 艾司西酞普兰; QTc 间期; 低钾血症; 坦度螺酮; 药品不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)01-0282-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.044

艾司西酞普兰属于一种消旋体西酞普兰 *S*-异构体构成的活性药物^[1], 是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI) 类的新型抗抑郁药。因其起效快、药物相互作用少、安全性高等特点, 常用于伴有多种疾病的老年人^[2]。临床中主要用来治疗抑郁症和焦虑症^[3]。2011 年美国食品药品监督管理局 (FDA) 发表警示, 艾司西酞普兰/西酞普兰可导致 QTc 间期延长, 诱发心律失常, 增加尖端扭转型室性心动过速 (TdP) 的风险, 导致心源性猝死。艾司西酞普兰药品说明书对该药 QTc 间期延长不良反应发生率介绍是“未知”。本文对我院上报的 1 例抗抑郁药艾司西酞普兰导致 QTc 间期延长的报告进行详细分析, 进而给出临床用药相关建议, 现报道如下。

1 病历资料

患者, 女, 53 岁, 体重 68 kg。于 2022 年 10 月 22 日入院。诊断为: ① 脑器质性精神障碍; ② 高血压; ③ 脑梗死; ④ 冠状动脉粥样硬化性心脏病; ⑤ 低钾血症。患者为中年女性, 首次起病脑器质性精神障碍, 亚急性病程 3 周余。现病史: 患者于 2022 年 9 月 14 日诊断为脑干梗死, 9 月底出现烦躁、担心多, 经常哭泣, 认为自己好不了, 伴有心慌、盗汗、乏力症状, 对日常生活兴趣一般, 否认自杀计划, 在当地医院就诊曾服用度洛西汀治疗, 服用 4~5 d 停用。家人觉其病情严重, 要求住院系统治疗。入院体格检查如下: 一般生命体征平稳、心律齐、无杂音、一般检查无异常, 个人史、家族史无特殊。

10 月 23 日患者情绪低、易疲乏、烦躁, 对日常事务提不起兴趣, 否认自杀意念, 躯体周身不适, 社会功能严重受损。查体: 心肺腹及神经系统未见明显异常。治疗上, 予艾司西酞普兰片 (湖南洞庭药业, 规格: 10 mg, 批号: B2205056) 10 mg 早改善低落情绪, 坦度螺酮片 10 mg 早中晚改善焦虑情绪。

10 月 24 日谷氨酰转氨酶 $69 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 钾 $3.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 予氯化钾颗粒对症治疗, 垂体催乳素 $1172 \text{ mIU} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 予鞍区平扫排除器质性问题, 10 月 27 日患者查体心肺腹及神经系统未见明显异常。治疗上维持现有方案, 逐渐将艾司西酞普兰加至足量 15 mg 改善情绪。

10 月 31 日复查心电图, 提示 QTc 492 ms, 上周 (10 月 25 日) 复查心电图情况回报病房, QTc 571 ms, 当下查体未见明显异常, 患者否认胸闷、心慌不适感, 将艾司西酞普兰减量至 5 mg 早, 11 月 1 日复查心电图提示 QTc 恢复至近正常 432 ms, 血钾为 $3.56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ 。治疗方面, 因患者使用艾司西酞普兰后 QTc 异常, 拟逐渐减停, 予艾司西酞普兰 $5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 联合米氮平 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 改善患者情绪, 11 月 4 日因患者在住院期间 QTc 间期较长达 571 ms, 已停用可导致 QTc 间期延长的艾司西酞普兰。

11 月 20 日患者病情评估基本稳定, 在外界因素影响下稍有波动, 波动幅度较小, 持续时间短。治疗上予米氮平片改善情绪, 坦度螺酮片抗焦虑, 劳拉西泮片抗焦虑的同时改善睡眠, 继续观察患者病情变化。患者于 11 月 23 日病情稳定出院, 辅助检查: 血细胞、肝功能、电解质、心电图均未见明显异常。

2 讨论

2.1 药品不良反应关联性评价

患者入院查心电图没有明显异常, 10 月 23 日予口服艾司西酞普兰改善焦虑情绪抗抑郁。患者 10 月 25 日检查心电图已出现 QTc 间期延长明显, 为 571 ms, 临床医师对医嘱做了调整, 10 月 31 日晨将艾司西酞普兰药量减至 $5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 10 月 31 日傍晚复查心电图, QTc 降至 492 ms, 明显降低, 但仍处于较高水平。艾司西酞普兰 $5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量用至 11 月 4 日, 后复查心电图, 11 月 15 日 QTc 为 467 ms, 11 月 21 日为 356 ms, 已在正常值范围。

作者简介: 刘苏瑶, 女, 主管药师, 主要从事医院药学及药学信息方面的研究, email: liusuyao8510@163.com * 通信作者: 张慧, 女, 主管药师, 主要从事医院药学方面的研究, email: 240222967@qq.com

从使用艾司西酞普兰起止时间结合 QTc 间期延长不良反应发生到好转到痊愈，有着明显的时间关联性，且指标随剂量减少而好转，分析该病例 QTc 间期延长与使用艾司西酞普兰相关。

合并用药为坦度螺酮片，该药是一个抗焦虑药，常用于治疗广泛性焦虑症。笔者查阅药品说明

书和相关文献，未发现坦度螺酮片有导致 QTc 间期延长的案例，未发现坦度螺酮片对艾司西酞普兰导致 QTc 间期延长有影响，因此分析此病例导致的 QTc 间期明显延长仍是艾司西酞普兰导致。

使用诺氏评估量表^[4]评分为 6 分，判定艾司西酞普兰与 QTc 间期延长的相关性为很可能（见表 1）。

表 1 诺氏评估量表

相关问题	问题分值			评分 / 分
	是	否	未知	
该不良反应先前是否有结论性报告?	+1	0	0	1
该不良反应是否在使用可疑药物后发生?	+2	-1	0	2
该不良反应是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?	+1	0	0	1
该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+2	-1	0	0
是否存在其他原因能单独引起该不良反应?	-1	+2	0	0
该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现?	-1	+1	0	0
药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	+1	0	0	0
该不良反应是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解?	+1	0	0	1
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应?	+1	0	0	0
是否存在任何客观证据证实该反应?	+1	0	0	1
总分值				6

注：总分 ≥ 9 分为肯定；5 ~ 8 分为很可能；1 ~ 4 分为可能；≤ 0 分为可疑。

2.2 文献检索资料及结果

以艾司西酞普兰、QTc 间期延长、escitalopram、QTc interval prolongation 等中英文关键词检索 PubMed、中国知网、万方数据库，检索时间从建库至 2024 年 6 月 30 日。共计报道使用艾司西酞普兰导致 QTc 间期延长患者 2 例^[5-6]，2 例患者均为女性，年龄 60 岁以上，其中 1 例患者血钾浓度偏低，1 例患者有心脏基础疾病。

有研究报告显示，西酞普兰与 QTc 间期延长存在剂量依赖性，高于 60 岁的老人即使服用较低剂量（10 ~ 20 mg · d⁻¹）也会发生 QTc 间期延长^[7]。2016 年《室性心律失常中国专家共识》将 QTc > 500 ms 的长 QT 间期综合征患者列为易发生心律失常的高危人群^[8]。

2.3 QTc 间期延长的介绍及危险因素

2.3.1 QTc 间期延长

QT 间期为心电图上 Q 波到 T 波结束的时间间隔，代表心脏复极的过程。心脏复极与心率之间有着密切的关系，为了消除 QT 间期受到心率的影响，临床上往往使用校正后的 QTc 代替 QT 间期^[9]。

临床实践发现抗抑郁药和抗精神病药可延长心电图 QTc 间期，而 QTc 间期延长与 TdP 显著相关。TdP 特征是：心室率为 160 ~ 280 次 · min⁻¹，比一般室速快，每次发作持续数秒至 10 余秒，发作可自行终止，但呈反复发作的特点，如果不

及时采取措施，将演变为心室颤动，以致猝死。QTc 间期是一个可量化的指标，可用来确定潜在心律失常的风险并引起致命性 TdP 的可能性。

2.3.2 QTc 间期正常值

通常情况，QTc 间期成年男性为 410 ~ 430 ms，成年女性为 420 ~ 430 ms。在药物临床试验中，正常健康人由于药物治疗导致的平均 QTc 延长 ≥ 5 ms 就必须引起临床关注。QTc 间期 > 500 ms 与 2 ~ 3 倍的 TdP 发生风险相关。因此，在临床上，无论是男性患者还是女性患者，一旦 QTc 间期 > 500 ms 都必须立即停药或者换药^[10]。

2.3.3 QTc 间期延长的影响因素

静息危险因素：先天性长 QT 综合征、一级亲属心源性猝死家族史、年龄 ≥ 65 岁、女性、结构性心脏病（如冠状动脉疾病、充血性心力衰竭）等。

动态危险因素：急性全身性疾病、低钾血症、低镁血症、两种或两种以上可能引起 QTc 间期延长的潜在原因。

2.4 QTc 间期延长的原因分析

2.4.1 电解质紊乱

电解质紊乱是导致 QTc 间期延长的重要危险因素，患者 10 月 24 日检验报告中钾 3.27 mmol · L⁻¹，血钾正常值是 3.5 ~ 5.5 mmol · L⁻¹，患者血钾偏低，而低钾血症会导致药源性 QTc 间期延长。

获得性 QTc 间期延长的最常见原因就是药物

阻滞了 K^+ 电压门控通道 hERG。hERG 通道对低钾血症特别敏感，一方面，在低钾血症时 hERG 通道通过改变其自身构象，导致 K^+ 电流减少，从而导致 QTc 间期延长；另一方面，在低钾血症时 hERG 通道上的药物结合位点更容易与药物结合而导致 hERG 通道的阻滞^[10]。

患者 11 月 1 日检验报告单示血钾为 $3.56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，已在正常范围，结合 10 月 31 日将艾司西酞普兰减量至 5 mg 后患者心电图 QTc 间期有所下降，分析患者之前 QTc 间期延长明显与初始低钾血症有相关性。患者在出院前复查了血钾，为 $3.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，在正常范围内。

2.4.2 性别因素 该病例为女性患者，女性平均 QTc 间期较男性长：一方面，由于女性雌激素对心肌细胞延迟整流钾通道以及 L 型钙通道的抑制作用，使得 QTc 间期延长^[11]；另一方面，男性生理浓度的睾酮水平能增强延迟整流钾通道并抑制 L 型钙通道，使心肌动作电位时间缩短而减小 QTc 间期，可被认为是一种保护因素^[12]。

2.4.3 心血管基础疾病 艾司西酞普兰说明书中提到由于临床经验有限，建议冠状动脉心脏疾病患者慎用。该患者入院时诊断有冠状动脉粥样硬化，应慎用艾司西酞普兰。

3 小结

艾司西酞普兰可导致 QTc 间期延长进而会对心脏造成严重影响，若患者同时存在多种危险因素时更应引起临床高度关注，结合对本例患者使用艾司西酞普兰后出现明显 QTc 间期延长的分析，给出临床合理用药相关建议：① 若患者电解质紊乱，应在使用艾司西酞普兰治疗前予以纠正；② 已知患者有 QT 间期延长或先天性 QT 综合征禁止使用本品，建议冠状动脉心脏疾病患者慎用；③ 如有不稳定的心脏疾病患者接受治疗，在开始治疗前应进行心电图复查；④ 在使用艾司西酞普兰期间出现心律失常的迹象，应撤销治疗并进行心电图检查；⑤ 无论男性或女性患者，QTc 间期延长 $> 500 \text{ ms}$ ，则立即停止引起 QTc 间期延长的药物^[13]；⑥ 与同样会引起 QTc 间期延长的药物联合用药要引起注意，例如抗精神分裂症药、抗菌药物、促胃肠动力药、抗组胺药等；⑦ 临床可结合血药浓度、基因分型、临床诊疗效果及药物经济学优化给药方案，提高药物疗效及

患者依从性^[14]；⑧ 新型抗抑郁药的使用逐渐增加，现有数据并不完善，使用期间应密切关注。

参考文献

- [1] 周文全, 白晶, 田新桥, 等. 艾司西酞普兰对静脉溶栓患者状态情绪状态及心功能的影响[J]. 国际精神病学杂志, 2022, 49 (4): 710-712, 723.
- [2] 董晓雯, 杨明, 韩英, 等. 艾司西酞普兰引起老年心尖肥厚型心肌病患者 PR 间期延长 1 例[J]. 中华高血压杂志, 2021, 29 (2): 195-197.
- [3] 周爱军, 尹红蕾, 王洁. 艾司西酞普兰与帕罗西汀对伴抑郁的老年慢性心力衰竭患者疗效的比较[J]. 国际精神病学杂志, 2024, 51 (1): 204-207.
- [4] 袁立, 张顺芝, 何鹏飞, 等. 诺氏评估量表评价氯氮平诱导的免疫性溶血性贫血[J]. 中南药学, 2017, 15 (11): 1658-1661.
- [5] 华先平, 吴瑞霞. 西酞普兰诱发 QT 间期延长并尖端扭转性室性心动过速一例[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2011, 13 (4): 373-374.
- [6] 唐文诚, 罗文, 王继生, 等. 临床药师参与 1 例西酞普兰致 QT 间期延长的实践与分析[J]. 中国药物应用与监测, 2018, 15 (5): 280-283.
- [7] McClelland J, Mathys M. Evaluation of QTc prolongation and dosage effect with citalopram [J]. Ment Health Clin, 2016, 6 (4): 165-170.
- [8] 中华医学会心电生理和起搏分会, 中国医师协会心律学专业委员会. 室性心律失常中国专家共识[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2016, 30 (4): 283-325.
- [9] 何路遥, 于文娟, 黄晶晶, 等. 第 2 代抗精神病药引起 QTc 间期延长的研究进展[J]. 中华精神科杂志, 2021, 54 (1): 50-56.
- [10] 曹海燕, 白凤凤, 仇玉莹, 等. 抗精神病药物导致 QTc 间期延长影响因素的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2021, 21 (10): 745-750.
- [11] Carnethon MR, Anthony MS, Cascio WE, et al. A prospective evaluation of the risk of QT prolongation with hormone replacement therapy: the atherosclerosis risk in communities study [J]. Ann Epidemiol, 2003, 13 (7): 530-536.
- [12] Zhang Y, Ouyang P, Post WS, et al. Sex-steroid hormones and electrocardiographic QT-interval duration: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey and the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. Am J Epidemiol, 2011; 174 (4): 403-411.
- [13] 陈子木, 袁勇贵, 徐治. 艾司西酞普兰所致 QTc 间期延长的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54 (24): 2043-2046.
- [14] 钱璐莲, 陈政, 郭媛媛, 等. 艾司西酞普兰血药浓度/剂量比的影响因素研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22 (6): 668-671.

(收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2024-07-30)

正常谷浓度伏立康唑致肾移植患者精神异常、幻视及幻听 1 例

王琴¹, 廖贵益^{2, 3, 4}, 丁汉东^{2, 3, 4*} (1. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 国家中医药管理局中药化学三级实验室, 合肥 230031; 2. 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230031; 3. 安徽医科大学泌尿外科研究所, 合肥 230031; 4. 泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室, 合肥 230031)

关键词: 伏立康唑; 精神异常; 幻视; 幻听

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)01-0285-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.045

1 病历资料

患者, 女, 35 岁, 体重 46 kg, 身高 160 cm, 因“发热伴尿频 1 周”于 2023 年 3 月 30 日入住我院肾移植病区, 1 周前因发热服用头孢地尼胶囊, 未见好转, 体温波动于 38.0 ~ 38.9 °C, 考虑肺部感染和尿路感染, 收入我院。入院诊断为: 肺部感染、贫血、泌尿系统感染、移植肾功能不全、肾移植状态。患者否认中枢神经相关病史, 否认食物、药物过敏史。

辅助检查: 白细胞 (WBC) $9.54 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, 中性粒细胞比例 (NEUT%) 95.6% \uparrow , 血小板 (PLT) $118 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$, 红细胞 (RBC) $2.05 \times 10^{12} \cdot L^{-1}$, 血红蛋白 (Hb) $57 g \cdot L^{-1} \downarrow$; 超敏 C 反应蛋白 (hsCRP) $34.31 mg \cdot L^{-1} \uparrow$; 降钙素原 (PCT) $0.918 ng \cdot mL^{-1} \uparrow$; 谷丙转氨酶 (ALT) $3 U \cdot L^{-1}$, 谷草转氨酶 (AST) $18 U \cdot L^{-1}$, 血肌酐 (Scr) $437.4 \mu mol \cdot L^{-1} \uparrow$ 。

2 诊疗过程

入院第 1 日 (2023 年 3 月 30 日) 经验性感染治疗: 予以卡泊芬净 50 mg qd ivgtt (首剂 70 mg) + 比阿培南 0.3 g q12h ivgtt + 莫西沙星 0.4 g qd ivgtt + 更昔洛韦 50 mg qd ivgtt + 复方磺胺甲噁唑 3 片 q6h po。治疗过程中患者胸闷、气喘加重, 伴全身乏力。入院第 6 日 (4 月 4 日), 胸部 CT 示: 肺部炎症较之前明显加重。行纤维支气管镜肺泡灌洗, 肺泡灌洗液送二代测序, 病原微生物检出结果: 耶氏肺孢子菌序列数 2063、烟曲霉序列数 274、热带念珠菌序列数 55、人巨细胞病毒序列数 105、EB 病毒序列数 15、人疱疹病毒 1 序列数 3。依据肺泡灌洗液结果, 停用卡泊芬净, 加用伏立康唑 (辉瑞) 0.2 g q12h ivgtt (前两剂 0.4 g q12h) 行抗曲霉治疗。4 月 5 日晚间患者自觉意识不清、烦躁、幻视 (床下有血手伸过来)、幻

听 (听见亲人在呼唤)、失眠。考虑伏立康唑引起的精神异常及视觉异常, 但由于药物可能未达到治疗浓度, 未停药。患者第 2 日 (4 月 6 日) 意识模糊、烦躁、幻视、幻听等症状加重。4 月 7 日早晨停用伏立康唑, 清晨血药浓度监测伏立康唑谷浓度为 $2.13 mg \cdot L^{-1}$ (治疗浓度范围 1.0 ~ 5.5 $mg \cdot L^{-1}$)。停用伏立康唑后上述症状明显减轻。4 月 10 日晨测伏立康唑血药浓度为 $0.55 mg \cdot L^{-1}$, 症状基本消失, 患者需继续抗真菌治疗, 考虑伏立康唑浓度较低, 重新予以伏立康唑 0.2 g q12h ivgtt, 随后患者诉意识模糊、幻视、烦躁不适, 难以耐受, 停用伏立康唑。更换为泊沙康唑肠溶片 300 mg qd po (首日负荷 300 mg bid), 患者症状逐渐减轻, 3 d 后未诉精神及幻觉症状, 一般情况尚可, 继续泊沙康唑肠溶片治疗。

3 讨论

3.1 伏立康唑不良反应相关性分析

本例患者既往无耳相关、眼相关、精神相关疾病史, 入院给予伏立康唑治疗, 当晚出现意识不清、烦躁、幻视、幻听、失眠, 使用 Naranjo 评估量表对患者所使用药物进行不良反应关联性评价, 结果表明伏立康唑评分为 8 分, 其他药物的评分均 ≤ 2 分。提示该患者出现的幻视、幻听和精神障碍很可能与伏立康唑有关。上述症状是伏立康唑已知的不良反应; 患者使用伏立康唑后立即出现幻视, 与已有报道的发生时间 (1 ~ 10 d) 基本一致^[1-2]; 停用伏立康唑后精神障碍、幻视和幻听逐渐好转; 3 d 后又开始静脉滴注伏立康唑, 随后上述不良反应立即出现。且该不良反应与患者合并用药、病情变化、其他治疗不相关。依据我国《药品不良反应报告和监测管理办法》中的药品不良反应关联性评定标准, 该患者出现精神障碍、幻视和幻听与伏立康唑的关联性评价为肯定相关。

作者简介: 王琴, 女, 硕士, 主要从事临床药学方面的工作, email: 20080611wangqin@163.com * 通信作者: 丁汉东, 男, 硕士, 主要从事肾移植、器官捐献、肾脏缺血-再灌注损伤方面的工作, email: 1005150148@qq.com

3.2 伏立康唑发生精神障碍、幻视机制

3.2.1 精神障碍 伏立康唑致中枢神经系统不良反应的具体机制目前尚不明确,多数研究表明与伏立康唑体内血药浓度有关,多数中枢神经系统不良事件发生在血药浓度较高时^[3]。Meta分析结果显示,伏立康唑血药谷浓度 $> 5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现精神障碍的风险约为谷浓度 $< 5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的2.7倍,而谷浓度 $> 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 出现精神障碍的风险约为谷浓度 $< 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的5倍^[4]。另有研究表明,伏立康唑血药谷浓度 $< 5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $> 5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现精神症状的概率分别为0%和31%^[5]。发生精神障碍的机制可能是:伏立康唑能够穿透血脑屏障进入脑脊液,高血药浓度易引起精神症状。本例患者在使用伏立康唑2 d后测得血药谷浓度为 $2.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而患者第1日上午服用,晚上即出现精神异常等症状,表明该患者发生不良反应的浓度更低。该患者在正常伏立康唑血药浓度下发生不良反应,考虑原因可能是:①该患者血脑屏障通透性增加导致;②患者肾移植状态,体内有害物质无法及时代谢,与伏立康唑相互作用下导致不良反应;③中枢神经系统与伏立康唑结合的受体表达有差异。

3.2.2 幻视 一项在猴子身上的研究结果表明,在接受伏立康唑治疗时可诱导视网膜上双极细胞的杆状和锥状通路视网膜双极细胞功能,从而选择性和可逆性地影响到视神经功能,这种可逆性影响与伏立康唑瞬时引起人类视觉障碍是相对应的^[6]。目前有研究进一步证明影响该通路的深入机制,比如伏立康唑阻断了视网膜双极细胞中mGluR6和TRPM1通道^[7]。不同患者该通道表达可能有差异。Tan等^[8]发现视觉不良反应的发生率随伏立康唑谷浓度的升高而增加。有meta分析认为发生视觉障碍组与未发生组之间无差异^[4]。Jiang等^[9]对我国汉族人群的研究,未能确定伏立康唑谷浓度水平与视觉不良事件之间的相关性。肖云峰等^[10]也报道了1例患者伏立康唑稳态谷浓度在 $0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仅发生了视觉障碍,未见精神障碍。对于视觉障碍与血药浓度是否相关,目前存在争议。

3.3 伏立康唑导致药品不良反应处理措施

伏立康唑发生不良反应后,首先须监测血药浓度,血药浓度较高的患者可依据《伏立康唑个体化用药指南》调整剂量。精神障碍临床表现主要是谵妄、语无伦次、情感亢奋等,精神障碍平均在用药后 $(3 \pm 2) \text{ d}$ 出现,一般不需要特殊

治疗,在停药后可迅速好转且无后遗症^[1]。研究认为血药浓度与中枢神经系统毒性有直接相关性^[11],因此认为伏立康唑血药浓度控制在 $1 \sim 5.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可降低患者中枢神经系统不良反应。本例患者停药后不良反应逐渐消失且无后遗症。实际在临床上面对患者需继续抗真菌治疗的矛盾,有研究认为可以将给药途径由静脉改为口服,中枢神经系统不良反应通常也会消失^[12],这可能是由于静脉药物无吸收过程导致血药浓度瞬时升高。因此,对于某些危重患者,可以尝试将静脉制剂换为口服制剂。对于血药浓度正常或偏低仍发生不能耐受的不良反应时,建议换药。依据国内外抗曲霉菌病指南《器官移植受者侵袭性真菌病临床诊疗技术规范(2019版)》及《实体器官移植受者曲霉菌病:美国器官移植学会感染病小组实践指南(2019)》,除伏立康唑外,艾沙康唑或者泊沙康唑肠溶片/针剂也可用于抗曲霉菌病,该患者即使血药浓度正常或偏低也无法耐受伏立康唑相关不良反应,最终换用泊沙康唑肠溶片后未出现不良反应。

伏立康唑血药浓度与幻视、幻听之间相关性存在争议,因此无法根据血药浓度预测。视觉损害通过减量、改变给药途径、停药后,大部分患者视觉损害症状消失。伏立康唑引起的视觉损害大多为一过性的,可以完全恢复,导致停药的情况罕见。而本案例患者视觉损害较严重,无法耐受,与说明书描述具有一定差异。视觉对人体至关重要,在用药的任何时间段内需严密监护视觉状况,出现非一过性视觉异常,应及时请眼科会诊,完善眼科检查,及时评估是否需停药,并进行随访,以免造成视力永久性损伤。

4 小结

伏立康唑致精神障碍、幻视、幻听不良反应在临床较常见,通常应先依据血药浓度调整剂量,但目前血药浓度与这些不良反应是否相关仍然存在争议,血药浓度在预测不良反应中的作用有限。尤其是对于肾移植患者,可能药物不良反应发生率更高,在使用中应注意用药监护,依据其严重程度,及时采取措施。

参考文献

- [1] Eiden C, Peyrière H, Cociglio M, et al. Adverse effects of voriconazole: analysis of the French Pharmacovigilance Database [J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41 (5): 755-763.
- [2] 陈月华,董烈,李静远.伏立康唑致精神异常的症状特点与相关因素探讨[J].*中国医院用药评价与分析*, 2020,

- 20 (2): 246-248, 251.
- [3] Dolton MJ, Ray JE, Chen SCA, et al. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (9): 4793-4799.
- [4] Jin H, Wang T, Falcione BA, et al. Trough concentration of voriconazole and its relationship with efficacy and safety: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71 (7): 1772-1785.
- [5] Pascual A, Calandra T, Bolay S, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46 (2): 201-211.
- [6] Kinoshita J, Iwata N, Ohba M, et al. Mechanism of voriconazole-induced transient visual disturbance: reversible dysfunction of retinal ON-bipolar cells in monkeys [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (8): 5058-5063.
- [7] Xiong WH, Brown RL, Reed B, et al. Voriconazole, an antifungal triazol that causes visual side effects, is an inhibitor of TRPM1 and TRPM3 channels [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (2): 1367-1373.
- [8] Tan K, Brayshaw N, Tomaszewski K, et al. Investigation of the potential relationships between plasma voriconazole concentrations and visual adverse events or liver function test abnormalities [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46 (2): 235-243.
- [9] Jiang YK, Wang RY, Wang X, et al. Genetic polymorphisms of transient receptor potential melastatin 1 correlate with voriconazole-related visual adverse events [J]. *Mycoses*, 2020, 63 (6): 579-587.
- [10] 肖云峰, 刘凌之, 孙涛, 等. 低伏立康唑谷浓度致幻视 1 例 [J]. *药物流行病学杂志*, 2022, 31 (12): 863-865.
- [11] Levine MT, Chandrasekar PH. Adverse effects of voriconazole: over a decade of use [J]. *Clinical Transplant*, 2016, 30 (11): 1377-1386.
- [12] Zonios DI, Banacloche JG, Childs R, et al. Hallucinations during voriconazole therapy [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47 (1): e7-e10.

(收稿日期: 2023-09-16; 修回日期: 2023-12-06)

碘帕醇致晚迟发性弥漫性红斑 1 例并文献分析

受国徽¹, 杨全石¹, 夏浩¹, 李波霞^{2*} (1. 天水市中西医结合医院, 甘肃 天水 741020; 2. 兰州大学第一医院, 兰州 730000)

关键词: 碘帕醇; 超敏反应; 不良反应; 迟发性; 经导管动脉化疗栓塞

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)01-0287-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.01.046

碘帕醇是一种非离子型含碘对比剂, 因其安全性高、不良反应少而广泛应用于临床诊断和介入治疗。碘对比剂的不良反应主要包括皮肤过敏反应、肾功能损伤、凝血异常、胃肠道反应等, 指南根据不良反应发生时间分为急性 (1 h 内)、迟发性 (1 h ~ 7 d) 和晚迟发性 (≥ 7 d)^[1]。近年来, 碘对比剂所致迟发性不良反应的报道有所增加, 总体发生率在 0.03% ~ 2.60%^[2]。研究发现碘对比剂引起迟发性不良反应的时间一般发生在 48 h 内^[3], 超过 48 h 的报道较为罕见。本文报道 1 例碘帕醇致晚迟发性不良反应, 并进行文献分析, 现报道如下。

1 病历介绍

患者, 男, 47 岁, 因发现无痛性肉眼血尿

两周, 于 2023 年 7 月 11 日收入我院 (天水市中西医结合医院) 泌尿外科。入院体检: 体温 (T) 36.5 °C, 脉率 (P) 98 次 \cdot min⁻¹, 呼吸 (R) 19 次 \cdot min⁻¹, 血压 (BP) 130/96 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。全身皮肤黏膜正常, 无过敏史。专科检查: 右肾区叩击痛阳性, 余无异常。实验室检查: 红细胞 $3.46 \times 10^{12} \cdot L^{-1}$ 、血红蛋白 87 g $\cdot L^{-1}$ 。泌尿系 CT 检查提示右肾区占位性病变, 考虑恶性肿瘤 (T4N1MX)。诊断为: ① 右肾肿瘤 (T4N1M0); ② 贫血。患者入院后因恶心、腹胀, 对症予以四磨汤口服液 20 mL po tid、莫沙必利片 5 mg po tid, 法莫替丁注射液 20 mg ivgtt bid, 因贫血予维生素 B₁₂ 片 25 μ g po tid。入院第 13 日行穿刺活检术, 明确为肾透明细胞癌, 同时合并肾

作者简介: 受国徽, 男, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 549813436@qq.com * **通信作者:** 李波霞, 女, 副主任药师, 副教授, 主要从事药事管理和临床药学工作, email: 18693578418@163.com

门、腹主动脉旁、腔静脉淋巴结转移，肾周筋膜、右侧肾上腺侵犯，分期为 T4 期，经专家会诊及征求患者及家属意见后，决定暂行介入栓塞减瘤。遂于入院第 17 日（7 月 28 日）行经导管动脉化疗栓塞术（TACE），术中使用卡铂 300 mg、表柔比星 40 mg、碘帕醇 60 mL（批号：03230916，北京北陆药业）。手术顺利，术后因发热（考虑为肿瘤液化坏死所致的吸收热）使用布洛芬混悬液（100 mL/2 g）15 mL po prn，余继续予以法莫替丁抑酸，葡萄糖氯化钠补液对症支持治疗。术后第 8 日（8 月 5 日）早上，患者双侧上肢前臂出现数个散发的红斑，较大的面积约 1 cm×1.5 cm，较小的面积约 1 cm×1 cm，伴瘙痒、发热，测体温 38.3℃。红斑进而融合并迅速蔓延至全身，胸腹部呈红斑、风团状，颜色较浅，背部呈弥漫性红斑状，颜色较深，四肢呈紫红色，受累皮肤约占 85% 以上，皮疹间隙可见正常皮肤。查血常规：白细胞 $14.43 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，中性粒细胞百分比 96.8%。临床考虑为药物过敏反应，遂停用除法莫替丁外的所有药物，并予以马来酸氯苯那敏片 4 mg po q8h，20% 维生素 C 注射液 5 mL + 10% 葡萄糖酸钙注射液 10 mL ivgtt qd 治疗，效果不佳，会诊后于 8 月 8 日予以注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg ivgtt q12h，8 月 10 日，上身及四肢远端红斑消退，发热症状消失，8 月 13 日，全身红斑消退，尚有轻微色素沉着，详见图 1。复查血常规：中性粒细胞百分比 90.4%，余无异常。从 8 月 13 日始，甲泼

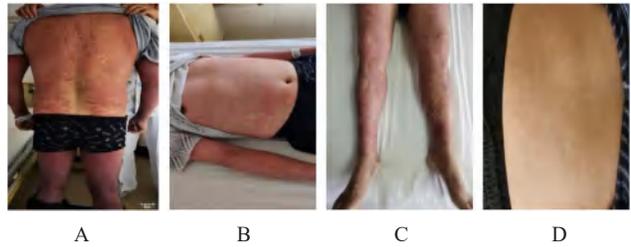


图 1 碘帕醇致全身红斑的表现

A. 8 月 5 日背部、四肢红斑；B. 8 月 5 日胸腹部红斑；C. 8 月 10 日上半身消退后下肢表现；D. 8 月 13 日红斑消退后色素沉着

尼龙琥珀酸钠按每周减量 10 mg 逐渐减量至停药，患者一般情况稳定，于 9 月 4 日出院。

2 国内外文献报道

笔者以“碘对比剂、碘帕醇、碘海醇、碘克沙醇、碘普罗胺、碘美普尔、迟发性、不良反应”及其英文为检索词检索了 PubMed、中国知网、万方等数据库，共发现 6 例碘对比剂致超过 48 h 的迟发性不良反应的报道（见表 1）。临床表现均为皮肤过敏反应，以全身性红斑多见，发生年龄在 46 ~ 76 岁，未发现有性别等方面的差异，其中有 3 例发生在用药 7 d 后，占比为 50%。另外，笔者以“碘帕醇、不良反应”及其英文为检索词检索了 PubMed、中国知网、万方等数据库，对公开发表的 117 例碘帕醇致不良反应的报道（见表 2）进行分析。结果发现，有 29 例报道了不良反应发生的时间，其中急性发生的共 21 例，迟发性的共 8 例，迟发时间在用药后 1 ~ 48 h 的共 6 例，迟发时间在 48 h 后的共 2 例，均发生在 7 d 后，且均表现为全身红斑。

表 1 碘对比剂致超过 48 h 的迟发性不良反应个案报道

怀疑药品	作者	性别	年龄 / 岁	发生时间	表现	处理及预后	关联性评价
碘海醇	Christiansen 等 (2002) ^[5]	女	54	颈部血管 CT 检查后 5 d	全身红斑丘疹	使用抗组胺药 7 d 后痊愈	肯定
碘海醇	关嘉良等 (2020) ^[6]	男	46	冠脉造影后 7 d	红色斑丘疹伴瘙痒	使用地塞米松 10 mg qd，奥洛他定 5 mg bid，2 d 后症状消失	肯定
碘克沙醇	张明等 (2024) ^[7]	男	76	头颈部血管造影后 5 d	过敏性紫癜	使用地塞米松注射液 5 mg，2 d 后好转	很可能
碘克沙醇	韩毅等 (2016) ^[8]	女	74	冠脉造影后 4 d	剥脱性皮炎	使用地塞米松注射液 10 mg，炉甘石洗剂，4 d 后好转	很可能
碘帕醇	Courvoisier 等 (2010) ^[9]	男	61	经皮冠状动脉腔内成形术 (PTCA) 术后 7 d	全身性红斑丘疹伴瘙痒	使用泼尼松 50 mg qd，西替利嗪 20 mg qd，数日后消退	肯定
碘帕醇	Mizuta 等 (2020) ^[10]	女	56	甲状腺下动脉造影后 7 d	全身红斑疹	局部类固醇和抗组胺药物治疗后好转	肯定

3 讨论

3.1 药物不良反应关联性分析及评价

本例患者行 TACE，治疗方案符合专家共识^[11]，手术顺利，未出现药液外渗，而发生部位也未从穿刺点开始，因此可基本排除手术所致可能。回顾患者入院后的用药情况：四磨汤口服液、莫沙必利片、维生素 B₁₂ 片在术前已停药，布洛

芬在术后第 1 日仅使用一次。查阅文献及说明书，上述药物无引发迟发性过敏反应的报道。法莫替丁注射液在治疗期间未停用，故以上药物引发的可能性较低。抗肿瘤药物有引起迟发性过敏反应的报道，患者术中使用了卡铂和表柔比星。查阅文献（PubMed、中国知网、万方）及说明书，卡铂引起的迟发性过敏反应通常在多个疗程后发

表 2 117 例碘帕醇致不良反应的临床表现

累及的器官系统	临床表现 (例)	合计 / 例	构成比 / %
神经系统	头痛 (14)、脑缺血 (9)、癫痫发作 (1)、感音神经性耳聋 (1)、部分记忆丧失 (1)、	26	22.22
泌尿系统	肾功能异常 (17)、造影剂肾病 (6)、尿潴留 (1)、尿失禁及尿潴留 (1)	25	21.37
皮肤及其附件	皮疹、瘙痒、红斑丘疹、皮肤黏膜水肿、大疱性表皮松解型药疹、浸润性红斑等	24	20.51
全身性	过敏性休克 (9 例, 其中 1 例死亡)、头晕伴心悸 (3)、心律失常伴过敏 (1)、皮疹伴头晕 胸闷 (1)、皮疹伴面部麻木 (1)、肌肉酸痛+全身乏力及精神亢奋 (1)、血管炎 (1)	17	14.53
消化系统	恶心、呕吐、胃不适、腹泻等	13	11.11
血液系统	凝血异常	5	4.27
循环系统	严重低血压 (1)、低钠血症 (3)、高血压急诊 (1)、心律失常 (1)	6	5.13
其他	关节炎 (1)	1	0.85

生,是由铂特异性免疫球蛋白介导的即时超敏反应^[12-13]。文献报道了 2 例卡铂联合紫杉醇^[14], 1 例卡铂联合依托泊苷^[15]化疗致迟发性皮疹的病例, 但均排除了卡铂引发的可能性。Okumura 等^[16]报道了 1 例 58 岁男性膀胱癌患者接受膀胱内灌注表柔比星治疗, 术后第 2 日出现全身性红斑, 7 d 后再次灌注后第 2 日又出现全身性红斑。尽管表柔比星有以上报道, 但给药方式(膀胱灌注)和迟发时间(用药后 24 h)与本例相差较大, 且无其他证据的支持。依 Naranjo 药物不良反应概率评估量表评分标准^[17], 卡铂评分为 3 分, 评价为可能。表柔比星评分为 4 分, 评价为可能(见表 3)。

碘对比剂首次接触即可引起迟发性过敏反应已被明确, 患者在术中使用了碘帕醇造影。说明书指出其可能引起迟发性皮肤过敏反应, 包括皮疹、弥

漫性红斑、瘙痒等。Courvoisier 等^[9]报道了 1 例 61 岁的患者行经皮冠状动脉成形术(PTCA), 术中使用了碘帕醇造影, 7 d 后出现全身性红斑丘疹, 斑贴试验阳性; 3 个月后再行 PTCA 术, 再次使用碘帕醇造影, 1 d 后又出现红斑丘疹。Mizuta 等^[10]报道了 1 例 56 岁的女性患者因反复咯血行动脉栓塞术, 术中使用了碘帕醇造影, 术后 7 d 腹部出现散发红斑伴白细胞增多, 斑贴试验阳性。局部使用糖皮质激素治疗 5 d 后红斑消失, 随后在泼尼松龙预处理后使用碘克沙醇代替碘帕醇再次造影, 腹部、四肢又出现瘙痒性红斑。本例不良反应发生于 TACE 术后 7 d, 表现为全身性红斑伴瘙痒, 发生后伴粒细胞增多和发热, 按照 Naranjo 不良反应概率评估量表评分标准, 评分为 7 分, 评价为很可能(见表 3)。因此, 本例不良反应很可能为碘帕醇引起的晚迟发性过敏反应。

表 3 Naranjo 不良反应评估量表

相关性问题	问题分值			得分		
	是	否	未知	卡铂	表柔比星	碘帕醇
1. 该不良反应先前是否有结论性报告?	+1	0	0	0	+1	+1
2. 该不良反应是否是在使用可疑药物后发生的?	+2	-1	0	+2	+2	+2
3. 该不良反应是否在停药或者应用拮抗剂后得到缓解?	+1	0	0	+1	+1	+1
4. 该不良反应是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+2	-1	0	0	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该不良反应?	-1	+2	0	-1	-1	+2
6. 该不良反应是否在应用安慰剂后重复出现?	-1	+1	0	0	0	0
7. 药物在血液或者其他体液中是否达到毒性浓度?	+1	0	0	0	0	0
8. 是否随剂量增加而加重, 或者随剂量减少而得到缓解?	+1	0	0	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或者同类药物并出现类似反应?	+1	0	0	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	+1	0	0	+1	+1	+1
总分				3	4	7

注: 总分≥9分, 肯定; 5~8分, 很可能; 1~4分, 可能; ≤0分, 可疑。

3.2 发生机制及风险因素分析

碘对比剂所致迟发性不良反应的机制可能为 T 细胞介导的过敏反应, 有造影剂反应史和接受白细胞介素-2 治疗的患者的风险增加^[18]。也有文献报道, 其中一些反应可能是晚期免疫球蛋白 E

(IgE) 反应或免疫复合物介导的反应^[19]。另外, 碘对比剂的给药方式可分为动脉注射和静脉注射, 本例患者行 TACE 术, 通过股动脉给药。有研究显示, 与静脉注射相比, 动脉注射会导致碘对比剂的迟发性不良反应发生率大幅度增加, 动脉注

射致速发性不良反应的发生率为 2.7%~3.6%^[20-21]，而迟发性发生率为 15.1%~24.8%^[21-22]，迟发性发生率是速发性的 4.2~9.2 倍。通过对碘对比剂致超过 48 h 的迟发性不良反应报道和本例分析可知，给药方式也以动脉注射为主，这与文献报道相符。这可能与动脉有较厚的平滑肌细胞层、成纤维细胞和血管干细胞，通过与白细胞和肥大细胞的结构相互作用增加了免疫激活的可能性有关^[21]。另外，TACE 术是在注入造影剂和化疗药物后立即栓塞供血动脉，从而达到增加药物作用时间的效果，这同时也可能使造影剂在血管内的停留时间延长而导致不良反应发生率增加、迟发时间延长。

4 小结

碘对比剂致迟发性不良反应的发生时间一般在用药后的 1~48 h，超过 48 h 甚至 7 d 后的报道罕见，其发生机制尚未完全阐明，且具有一定的隐蔽性，不易被临床发现。通过本文病例报道和文献分析可知，碘帕醇所致超过 48 h 的迟发性/晚迟发性不良反应通常表现为皮肤反应，以全身性红斑多见，伴或不伴瘙痒、粒细胞增多、发热等症状，似乎更易发生于动脉介入操作/手术后。有专家共识指出，在使用碘对比剂前应对患者的过敏风险进行评估，采用“水化”、术前药物预防、加热至 37℃ 等方式以降低发生风险^[23]。对于已经发生的过敏反应，应尽早正确识别，积极应对和处理。轻度不良反应可给予对症处理，中重度的不良反应应随时做好急救准备，并根据具体病情适当给予肾上腺素、升压药、肾上腺糖皮质激素、抗过敏药等治疗。

参考文献

- [1] 中华医学会放射学分会对比剂安全使用工作组. 碘对比剂使用指南(第 2 版)[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(43): 3363-3369.
- [2] 曹建勋, 姚国立, 张康燕, 等. 20418 例 CT 检查非离子型碘对比剂不良反应分析[J]. 中国医学影像学杂志, 2017, 25(11): 876-880.
- [3] 李晓丹, 张阳鑫, 刘琛, 等. 我院 2011—2018 年 6 种造影剂的不良反应发生及预后回顾性分析[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(7): 436-441.
- [4] 操银针, 石锋. 108 例碘帕醇不良反应文献分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(13): 1240-1242.
- [5] Christiansen C, Dreborg S, Pichler WJ, et al. Macular exanthema appearing 5 days after X-ray contrast medium administration[J]. Eur Radiol, 2002, 12(3): S94-S97.
- [6] 关嘉良, 刘贺萍, 季波. 一例碘海醇致迟发性过敏反应的病例分析[J]. 药学服务与研究, 2020, 20(5): 396-399.
- [7] 张明, 何忠芳, 李波霞. 碘克沙醇致迟发性过敏性紫癜 1 例[J]. 医药导报, 2024, 43(3): 143-144.
- [8] 韩毅, 靳迫诗, 牟燕. 碘克沙醇致迟发性剥脱性皮炎[J]. 药物不良反应杂志, 2016, 18(2): 140-141.
- [9] Courvoisier S, Bircher AJ. Delayed-type hypersensitivity to a nonionic, radiopaque contrast medium[J]. Allergy, 2010, 53(12): 1221-1224.
- [10] Mizuta T, Kasami S, Shigehara Y, et al. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by iopamidol with recurrence on rechallenge with iopromide[J]. JAAD Case Rep, 2020, 6(10): 964-966.
- [11] 中国抗癌协会肿瘤介入专家委员会. 经导管动脉灌注化疗药物应用原则——中国肿瘤介入专家共识[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26(11): 963-970.
- [12] Heidary N, Naik H, Burgin S. Chemotherapeutic agents and the skin: an update[J]. J Am Acad Dermatol, 2008, 58(4): 545-570.
- [13] Markman M, Kennedy A, Webster K, et al. Clinical features of hypersensitivity reactions to carboplatin[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(4): 1141-1141.
- [14] Tamai M, Kawai K, Kanekura T. Late-onset papular eruption after the initial course of combination chemotherapy consisting of paclitaxel and carboplatin: report of two cases[J]. J Dermatol, 2012, 39(12): 1081-1083.
- [15] Yoshioka H, Kamohara R, Ikari H, et al. A patient with small cell lung cancer who developed a drug eruption due to concomitant therapy with carboplatin and etoposide[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2008, 35(3): 487-490.
- [16] Okumura A, Oishi N, Kaji K, et al. Drug eruption due to intravesical instillations of both epirubicin and mitomycin C[J]. J Dermatol, 2010, 36(7): 419-422.
- [17] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions[J]. Clin Pharmacol Ther, 1981, 30(2): 239-245.
- [18] Christiansen C, Pichler WJ, Skotland T. Delayed allergy-like reactions to X-ray contrast media: mechanistic considerations[J]. Eur Radiol, 2000, 10(12): 1965-1975.
- [19] Webb JA, Stacul F, Thomsen HS, et al. Late adverse reactions to intravascular iodinated contrast media[J]. Eur Radiol, 2003, 13(1): 181-184.
- [20] Flinck A, Gottfridsson B. Experiences with iohexol and iodixanol during cardioangiography in an unselected patient population[J]. Int J Cardiol, 2001, 80(2-3): 143-151.
- [21] Sohn KH, Kim GW, Lee SY, et al. Immediate and delayed hypersensitivity after intra-arterial injection of iodinated contrast media: a prospective study in patients with coronary angiography[J]. Eur Radiol, 2019, 29(10): 5314-5321.
- [22] Sutton AG, Finn P, Grech ED, et al. Early and late reactions after the use of iopamidol 340, ioxaglate 320, and iodixanol 320 in cardiac catheterization[J]. Am Heart J, 2001, 141(4): 677-683.
- [23] 海峡两岸医药卫生交流协会护理分会心血管护技专业学组. 心血管介入碘对比剂使用管理护理专家共识[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(7): 625-633.

(收稿日期: 2024-05-20; 修回日期: 2024-07-05)



中南药学审稿专家

(排名不分先后)

丁 骁	丁莉坤	丁惠萍	于世慧	于海洋	于琛琛	马恩龙	马健雄	王 月	王 玉
王 刚	王 玮	王 赵	王 洪	王 颖	王风超	王立辉	王永军	王丽明	王启斌
王明仲	王春江	王莉宁	王淑梅	王朝辉	方平飞	方伟进	尹 桃	孔令提	孔维军
邓 晟	邓远雄	邓桂明	古艳婷	厉彦翔	龙勤强	卢海儒	叶喜德	申月明	田雪松
史志华	丘 岳	付 慧	冯 星	冯宇飞	冯素香	兰丽丽	边 原	吕永宁	朱运贵
朱志红	朱荣华	伍参荣	刘 畅	刘 娜	刘 检	刘 敏	刘 斌	刘艺平	刘文虎
刘心如	刘玉峰	刘芳群	刘丽华	刘应蛟	刘茂柏	刘剑敏	刘艳芳	刘晓慧	刘高峰
刘梦扬	刘塔斯	刘雁鸣	刘新义	江俊麟	汤海峰	许 喆	孙 进	孙 逸	孙万阳
孙丙军	孙国祥	孙铁民	严建业	劳海燕	苏 丹	苏薇薇	杜恩明	李 丹	李 芬
李 芬	李 娟	李 爽	李文龙	李语玲	李健和	李湘平	李新刚	杨 波	杨 琳
杨永玉	杨志平	杨建波	杨树龙	杨淑贤	杨献文	肖 雪	肖轶雯	肖贵南	肖朝江
吴 昊	吴成军	吴昊妹	邱玉玲	何 丹	何 艳	何江江	余克富	谷福根	邹振兴
宋艺君	张 弘	张 岗	张 凭	张 俐	张 峻	张 倩	张 基	张 薇	张永杰
张毕奎	张妙红	张纯刚	张葵之	张程亮	阿卜杜拉·玉苏普	陈 力	陈 平	陈 凯	
陈 倩	陈 娟	陈 琦	陈 鹏	陈 璐	陈卫东	陈国宁	陈治军	陈勇川	陈富超
奉建芳	武善超	范国荣	林小伟	杭永付	呼庆勋	罗 兰	罗 聪	罗开忠	金 锐
金鹏飞	周 权	周志旭	周灿灿	郑杭生	郑爱萍	郑稳生	屈 建	屈 赵	孟宪生
赵 亮	赵 娣	赵龙山	赵立波	赵志刚	赵春杰	赵剑锋	赵家宏	赵瑞芝	胡 楠
胡彦武	柳 芳	柳鹏程	段现来	侯 卫	姜 茹	姜 敏	姜 雷	姜志平	姜德建
娄月芬	宫 建	贺 敏	秦 超	秦红岩	秦绪军	袁 成	袁志翔	贾王平	贾素洁
贾海永	夏彬彬	夏道宗	原永芳	柴 琴	倪 赞	倪建成	徐 珽	徐 硕	徐文峰
徐华丽	高会乐	高利臣	高德民	郭 韧	郭 智	郭代红	郭怀忠	郭建军	郭思瑞
陶小妹	黄 芳	黄 勋	黄 琪	黄云峰	黄亚辉	黄壮壮	黄胜阳	黄振鹏	梅升辉
曹 玲	龚力民	常福厚	麻兵继	章超凡	梁光平	寇龙发	隋 峰	巢志茂	彭 亮
彭文兴	彭再梅	彭孟凡	彭海文	董亚琳	董得时	董德刚	蒋利和	蒋学华	蒋孟良
蒋跃平	蒋德旗	韩立峰	韩晓芳	韩晓鹏	覃 丽	程 军	程忠哲	傅 强	舒 畅
鲁 琼	曾贵荣	温金华	谢 诚	谢奕丹	蒲位凌	蒙光义	睢大笈	蔡 宇	蔡天革
蔡洪鲲	廖文婷	廖德华	谭红胜	谭国欣	谭喜莹	肇丽梅	樊启猛	黎 苏	黎 敏
黎 赛	潘宏春	薛春苗	薄 涛	魏 博	魏高文				



DMT 7500 二维液相色谱微型质谱仪

血药浓度利器 门诊化床旁化质谱系统

可移动至临床科室

反应速度快，工作曲线长期稳定

极简样品处理

湖南德米特仪器有限公司成立于2014年12月，是一家致力于自动化色谱与质谱生产、二维色谱柱体系研制、生物测定方法提供以及临床药物检测整体化方案设计的高新技术企业。公司历经数年研发，掌握色谱与质谱控制性技术，持续进行尖端临床色谱质谱技术研制。

DMT 7500 拥有高稳定的质谱分析能力，测定种类包括 250 多种药物；并具备仪器、色谱柱、试剂、质控完整的医械与 IVD 资质，符合我国 2018 年颁布的《医疗器械分类目录》中的要求。

DMT 7500 微型化机身对实验室占地更加友好，移动式机身让床旁化快速测定成为可能；DMT 7500 具备 30min 冷开机发放首报告的快速反应能力，是门急诊 TDM 项目开展的首选利器！

- ||| 关键流动相产品标准化
- ||| 质量体系：质控校准品溯源体系标准化
- ||| 高端自动化技术
- ||| 高效能测定能力
- ||| 床旁化测定技术
- ||| 专利核心技术
- ||| 全面合规产品系统



Demeter 德米特®

湘械广审(文)第260202-23163号

官方网站: <https://www.hndemeter.com>

服务热线: 4000-176-898 董经理: 137-8718-7146

电子邮箱: market@anax.com.cn

版本号: 2024.05.06



德米特公众号