

- ◆ 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2月 第23卷 第2期

Volume 23 Number 2 February 2025

CENTRAL

SOUTH

PHARMACY

- ◆ 现代分析技术在中药研究中的应用研究专题
- ◆ 欣力康胶囊抗结肠癌及增强机体免疫功能的作用研究
- ◆ *miRNA-29b* 对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的作用机制研究
- ◆ 组学技术在免疫检查点抑制剂疗效预测模型中的应用进展

ISSN 1672-2981



9 771672 298255

2

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2期(总第229期) 2025年2月20日出版

目 次

现代分析技术在中药研究中的应用研究专题

- (291) 基于UHPLC-Q-Orbitrap MS的补骨脂化学成分表征研究
..... 闫毅, 张乐乐, 张紫鑫, 等
- (298) 基于UHPLC-Q-Orbitrap MS的丝瓜络化学成分鉴定及其防治高脂血症网络药理学研究 王影, 亓柯鑫, 张玲雨, 等
- (305) 中药乌梅组分的制备及其药效物质研究
..... 姜其宝, 张庆瑞, 李晓格, 等

研究论文

- (312) 欣力康胶囊抗结肠癌及增强机体免疫功能的作用研究
..... 皇苏州, 张旭哲, 吕高虹, 等
- (319) 基于UPR/GRP78/IL-6信号通路探讨温通活血乳膏治疗糖尿病周围神经病变的作用机制
..... 严琦, 刘珊珊, 古丽逊·买买提朱玛, 等
- (328) 基于UPLC-Q-Orbitrap-MS技术对茯神不同部位的化学成分分析
..... 陈妍, 张越, 王妍妍, 等
- (337) 血管紧张素转化酶制备工艺优化研究
..... 褚辉程, 陈海英, 张文静, 等
- (343) 华中五味子根皮联苯环辛烯型木脂素化学成分研究
..... 李昕卓, 徐浩南, 吴莹, 等
- (349) 瑞格列奈-阿卡波糖速缓释双层片的制备与体内外评价
..... 梁家文, 马博乐, 李士壮, 等
- (356) 载美罗培南细菌外膜囊泡的制备及其对抗耐药细菌的作用研究
..... 邱晓涵, 徐文杰, 胡雄彬, 等
- (362) 氟非尼酮通过SLC7A11/GPX4通路抑制氧化应激和铁死亡减轻百草枯诱导的肺纤维化 陈韬, 颜笑, 施远香, 等
- (371) 基于脂质组学研究南五味子油与北五味子油的脂质组成特征
..... 白璐, 陈强, 史鑫波, 等
- (377) 玫瑰中药复方对紫外线诱导HaCaT细胞损伤的修复作用
..... 沈秋雨, 杨珏, 李莉, 等
- (385) 基于指纹图谱结合化学模式识别以及网络药理学筛选经典名方旋覆代赭汤的质量标志物 汪怡, 郭曼曼, 徐倩菲, 等
- (392) 珠子参叶化学成分研究 唐家美, 但林蔚, 吴莹, 等

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

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

《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
何鹤飞 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 娄月芬
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 章越凡
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

- (397) 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析竹叶饮的化学成分
..... 叶婉婷, 于泳, 刘力莉, 等
- (404) 银杏叶提取物冻干舌下片的制备
..... 宋嘉佳, 李寒冰, 李敏枫, 等
- (409) 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析利胆消痛方的化学成分
..... 杨琰, 李万红, 程峰, 等
- (417) 淫羊藿苷通过 PI3K/AKT 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞的增殖分化
..... 范凯健, 钮艾雯, 吴辉辉
- (423) 基于网络药理学、分子对接技术及实验验证探讨血府逐瘀汤治疗
脑胶质瘤的作用机制 王天翔, 陈坤, 陶浩军, 等
- (430) 伊曲康唑甘草酸纳米胶束的构建及抗白念珠菌作用研究
..... 彭澳, 刘雪, 刘洋, 等
- (436) *miRNA-29b* 对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的作用机制研究
..... 刘萌萌, 杜文涛
- (442) 冷冻干燥技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外质量评价
..... 左盼盼, 陈晶晶, 王晓飞
- (448) 熵权法结合响应面法优化沙枣叶水提取工艺及其体内外抗氧化活
性研究 苏伟航, 王东东, 刘俊昌, 等
- (455) 冬菟止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通
路的影响 张静文, 李颖萌, 熊艳霞, 等
- (460) 盐酸青藤碱紫苏油乳膏制备工艺优化及体外透皮研究
..... 王阳, 李佳慧, 田闵元, 等

综述

- (468) 独脚金内酯在植物应对非生物胁迫中的作用及其在药用植物中的
应用展望 邢路, 和爽, 牛昱婷, 等
- (478) 组学技术在免疫检查点抑制剂疗效预测模型中的应用进展
..... 谷铮, 邓而乐, 余俊先
- (484) 咖啡酸及其衍生物在糖尿病及其并发症中作用的研究进展
..... 盘昌杰, 石雨彤, 罗晓艳, 等
- (489) 黄芪多糖在肺动脉高压治疗中的作用及机制研究进展
..... 周怡博, 于森, 马丽娟, 等

药物分析与检验

- (495) 强肝消脂颗粒制备工艺优化及其物理指纹图谱建立
..... 谭培姚, 张蓓, 王莉, 等
- (501) 不同产地 2~6 年栽培人参中 9 种人参皂苷含量赋存规律研究
..... 高海云, 綦峥
- (507) 不同品种水蛭中无机元素的测定及统计分析
..... 茹意, 张美皖, 张玲, 等

青年编委 (排名不分先后)

丁 晓 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。

- (514) UPLC-MS/MS 法同时测定银黄胶囊中 10 种成分的含量
 何泉宇,孔虎林,赵平华,等
- (519) HPLC-DAD 法检测保健品中非法添加的 10 种精神类药物
 徐硕,邝咏梅,徐文峰,等
- (525) 磷酸川芎嗪中有关物质的研究
 林凤强,苏新海,郑辽豫,等
- (530) 妇科白凤口服液 HPLC 双波长指纹图谱研究
 许志,郭元满,曾祥素,等
- (535) 高效液相色谱法测定磷酸特地唑胺中有关物质的含量
 何亮,孙国祥
- (540) 高效液相色谱法同时测定艾地骨化醇和阿法骨化醇的含量
 郭思瑞,徐硕,王晶,等
- (545) 气相色谱法同时测定口腔抑菌液中 4 种挥发性成分的含量
 李笑琳,张佳瑞,张雨萌,等
- (548) 高效液相色谱指纹图谱联合一测多评法评价尿毒清颗粒的质量
 赵晓强,袁波,张雨萌,等

中药与临床

- (556) 基于 FangNet 平台挖掘古籍中痛风病的用药规律
 刘泽宇,王雨,殷晓阳,等
- (563) 中药临床药师参与 1 例肾上腺危象患者的中西联合药学监护实践
 罗春梅,郭晓龙,吴立旗,等

医院药学

- (569) 基于电子病历文本的运动障碍监测模块构建与应用
 崔利强,郭代红,朱曼,等

药品不良反应

- (576) 不同局部麻醉对左心耳封堵术中经食管超声心动图相关口咽部并发症的影响 徐佶佶,周静,范虞琪,等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*290*zh*P*30.0*700*45*2025-2

本期责任编辑: 陆窈窈, 彭金飞, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 2 February 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

Postal code

42-290

Publish

Editorial Department of Central
South Pharmacy

CONTENTS IN BRIEF

- (291) **Characterization of chemical composition from *Psoralea corylifolia* L. based on UHPLC-Q-Orbitrap MS**
..... YAN Yi, ZHANG Le-le, ZHANG Zi-xin, et al
- (298) **Identification of chemical compositions of *Luffae Fructus Retinerus* based on UHPLC-Q-Orbitrap MS and its network pharmacology for hyperlipidemia**
..... WANG Ying, QI Ke-xin, ZHANG Ling-yu, et al
- (305) **Preparation of Chinese medicine *Fructus Mume* components and related pharmacodynamic substances**
..... JIANG Qi-bao, ZHANG Qing-rui, LI Xiao-ge, et al
- (312) **Effect of Xinlikang capsules on anti-colon cancer and enhancing immune function**
..... HUANG Su-zhou, ZHANG Xu-zhe, LYU Gao-hong, et al
- (319) **Mechanism of Wentong Huoxue cream for diabetic peripheral neuropathy via UPR/GRP78/IL-6 signal pathway**
..... YAN Qi, LIU Shan-shan, Gulixun • Maimaitizhuma, et al
- (328) **Chemical compositions of different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fushen) based on UPLC-Q-Orbitrap-MS**
..... CHEN Yan, ZHANG Yue, WANG Yan-yan, et al
- (337) **Preparation optimization of angiotensin I converting enzyme**
..... CHU Hui-cheng, CHEN Hai-ying, ZHANG Wen-jing, et al
- (343) **Chemical composition of dibenzocyclooctene lignans from root bark of *Schisandra sphenanthera***
..... LI Xin-zhuo, XU Hao-nan, WU Ying, et al
- (349) **Preparation and in vitro/in vivo evaluation of repaglinide-acarbose immediate-sustained-release bilayer tablets**
..... LIANG Jia-wen, MA Bo-le, LI Shi-zhuang, et al
- (356) **Preparation of meropenem-loaded bacterial outer membrane vesicles and their anti-drug-resistant bacteria property**
..... QIU Xiao-han, XU Wen-jie, HU Xiong-bin, et al
- (362) **Fluorofenidone mitigates paraquat-induced pulmonary fibrosis by attenuating oxidative stress and ferroptosis via SLC7A11/GPX4 pathway**
..... CHEN Tao, YAN Xiao, SHI Yuan-xiang, et al
- (371) **Lipid profiles of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil based on lipidomics**
..... BAI Lu, CHEN Qiang, SHI Xin-bo, et al
- (377) **Repair effect of rose herbal compound on ultraviolet-induced HaCaT cell damage**
..... SHEN Qiu-yu, YANG Jue, LI Li, et al

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.

- (385) Screening of quality markers of Xuanfu Daizhe decoction based on fingerprint, chemical pattern recognition and network pharmacology
..... WANG Yi, GUO Man-man, XU Qian-fei, et al
- (392) Chemical constituents in the leaves of *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng.
..... TANG Jia-mei, DAN Lin-wei, WU Ying, et al
- (397) Chemical components of Zhuyeyin by UPLC-Q-exactive-orbitrap-MS
..... YE Wan-ting, YU Yong, LIU Li-li, et al
- (404) Preparation of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract
..... SONG Jia-jia, LI Han-bing, LI Min-feng, et al
- (409) Chemical constituents of Lidian Xiaotong formula based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technique
..... YANG Yan, LI Wan-hong, CHENG Feng, et al
- (417) Effect of icariin on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via PI3K/AKT signalling pathway
..... FAN Kai-jian, NIU Ai-wen, WU Hui-hui
- (423) Mechanism of active ingredients of Xuefu Zhuyu decoction for glioma based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation
..... WANG Tian-xiang, CHEN Kun, TAO Hao-jun, et al
- (430) Glycyrrhizic acid nanomicelles loaded with itraconazole and its anti-Candida albicans effect PENG Ao, LIU Xue, LIU Yang, et al
- (436) Effect of *miRNA-29b* on myocardial fibrosis after myocardial infarction in rats and related mechanism LIU Meng-meng, DU Wen-tao
- (442) Preparation of budesonide inhalation aerosol by freeze-drying and its in vitro quality evaluation
..... ZUO Pan-pan, CHEN Jing-jing, WANG Xiao-fei
- (448) Optimization of the water extraction of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves by entropy weight method combined with response surface method and its antioxidant activity in vivo and in vitro
..... SU Wei-hang, WANG Dong-dong, LIU Jun-chang, et al
- (455) Effect of Dongwan Zhike granules on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rats with cough variant asthma
..... ZHANG Jing-wen, LI Ying-meng, XIONG Yan-xia, et al
- (461) Preparation optimization and in vitro transdermal study of sinomenine hydrochloride perilla oil cream
..... WANG Yang, LI Jia-hui, TIAN Min-yuan, et al
- (468) Role of strigolactones in plant responses to abiotic stress and their prospects in medicinal plants
..... XING Lu, HE Shuang, NIU Yu-ting, et al
- (478) Advances in omics in efficacy predictive modeling of immune checkpoint inhibitors..... GU Zheng, DENG Er-le, YU Jun-xian
- (484) Research progress in the effects of caffeic acid and its derivatives on diabetes mellitus and related complications
..... PAN Chang-jie, SHI Yu-tong, LUO Xiao-yan, et al
- (489) Research progress in the effect and mechanism of astragalus polysaccharide for pulmonary hypertension
..... ZHOU Yi-bo, YU Miao, MA Li-juan, et al

- (495) Preparation optimization and physical fingerprints of Qianggan Xiaozhi granules *TAN Pei-yao, ZHANG Bei, WANG Li, et al*
- (501) Occurrence of 9 ginsenosides in 2 to 6 years *Panax ginseng* from different growth areas *GAO Hai-yun, QI Zheng*
- (507) Determination of inorganic elements in different species of *Hirudos* *RU Yi, ZHANG Mei-wan, ZHANG Ling, et al*
- (514) Simultaneous determination of 10 components in Yinhuang capsules by UPLC-MS/MS *HE Xiao-yu, KONG Hu-lin, ZHAO Ping-hua, et al*
- (519) Determination of ten psychotropic drugs illegally added in health foods by HPLC-DAD *XU Shuo, KUANG Yong-mei, XU Wen-feng, et al*
- (525) Related substances in ligustrazine phosphate *LIN Feng-qiang, SU Xin-hai, ZHENG Liao-yu, et al*
- (530) Multi-component fingerprint chromatogram of Fuke Baifeng oral liquid by HPLC dual wavelength *XU Zhi, GUO Yuan-man, ZENG Xiang-su, et al*
- (535) Determination of related substances in tedizolid phosphate by high performance liquid chromatography *HE Liang, SUN Guo-xiang*
- (540) Simultaneous determination of eldecalcitol and alfacalcidol content by high-performance liquid chromatography *GUO Si-rui, XU Shuo, WANG Jing, et al*
- (545) Simultaneous determination of 4 volatile components in oral antibacterial solution by gas chromatography *LI Xiao-lin, ZHANG Jia-rui, ZHANG Yu-meng, et al*
- (548) Quality evaluation of Niaoduqing granules with HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-components by single-marker method *ZHAO Xiao-qiang, YUAN Bo, ZHANG Yu-meng, et al*
- (556) Medication patterns for gout in ancient formulas based on FangNet platform *LIU Ze-yu, WANG Yu, YIN Xiao-yang, et al*
- (569) Establishment and application of a module for automatic monitoring of movement disorders based on electronic medical records *CUI Li-qiang, GUO Dai-hong, ZHU Man, et al*
- (576) Effect of different strategies of regional anesthesia on transesophageal echocardiography-related complications in atrial fibrillation patients undergoing left atrial appendage closure *XU Ji-ji, ZHOU Jing, FAN Yu-qi, et al*

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。随着科技的进步，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奖一等奖、二等奖各 1 项，中华中医药学会一等奖 1 项，天津市科技进步奖二等奖 2 项、三等奖 1 项，天津市教学成果特等奖 1 项。

基于 UHPLC-Q-Orbitrap MS 的补骨脂化学成分表征研究

闫毅¹，张乐乐²，张紫鑫²，王凤超²，米未^{1*} (1. 天津市胸科医院，天津 300051；2. 天津中医药大学，天津 301617)

摘要：目的 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱（UHPLC-Q-Orbitrap MS）技术对补骨脂的化学成分进行快速表征，进一步开发利用补骨脂药用资源。方法 采用 UHPLC-Q-Orbitrap MS 法于正、负离子模式下进行一级母离子和二级子离子扫描，通过检索数据库、与对照品比对、质谱裂解规律分析等方法，快速鉴定补骨脂所含化合物的结构。结果 从补骨脂中共鉴定出 83 个化合物，包括 24 个黄酮类成分，15 个有机酸类成分，6 个香豆素类成分，5 个萜类成分，4 个酚萜类成分，3 个氨基酸类成分，2 个多糖类成分，1 个生物碱类以及 23 个其他类成分等。结论 了解补骨脂的物质基础，为后续的使用以及药理作用研究奠定基础。

关键词：补骨脂；化学成分；超高效液相色谱串联静电场轨道阱质谱；裂解途径

中图分类号：R284.1，R283 文献标识码：A 文章编号：1672-2981(2025)02-0291-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.001

Characterization of chemical composition from *Psoralea corylifolia* L. based on UHPLC-Q-Orbitrap MS

YAN Yi¹, ZHANG Le-le², ZHANG Zi-xin², WANG Feng-chao², MI Wei^{1*} (1. Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

基金项目：天津市卫健委中医中西医结合科研课题（No.20212261）。

作者简介：闫毅，女，药师，主要从事临床药学工作，email: cyx690724@163.com *通信作者：米未，男，副主任药师，主要从事临床药学工作，email: 120971269@qq.com

Abstract: Objective To rapidly characterize the chemical composition of *Psoralea corylifolia* L. by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap MS) for the further development and utilization of medicinal resources of *Psoralea corylifolia*. **Methods** The parent ions and fragment ions were scanned out in positive and negative ion modes by UHPLC-Q-Orbitrap MS. The structures of the compounds in *Psoralea corylifolia* L. were rapidly identified via database searching, comparison with reference substances, and analysis of mass-spectral fragmentation rules. **Results** Totally 83 compounds were identified from *Psoralea corylifolia* L., including 24 flavonoids, 15 organic acids, 6 coumarins, 5 terpenoids, 4 phenol terpenoids, 3 amino acids, 2 polysaccharides, 1 alkaloid, and 23 other components. **Conclusion** Understanding the material basis of *Psoralea corylifolia* L. lays a foundation for its subsequent use and pharmacological research.

Key words: *Psoralea corylifolia* L.; chemical composition; UHPLC-Q-Orbitrap MS; fragmentation pathway

补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 又名破故纸, 是豆科植物补骨脂的干燥成熟果实, 主要产于云南西双版纳和四川金沙江流域, 具有补肾壮阳、温脾止泻、纳气平喘的功效, 临床上主要用于白癜风和骨质疏松等疾病的治疗^[1]。中药化学成分种类繁多、结构多样, 研究表明补骨脂主要含有香豆素类、黄酮类、萜酚类等化学成分, 其中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定、补骨脂乙素、新补骨脂异黄酮、补骨脂酚和 3-羟基补骨脂酚等均具有多种药理活性^[2-5]。而高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 技术具有良好的色谱分离效率和较高的质谱分辨率, 可以得到化合物的保留时间、分子量及特征结构碎片等丰富的信息, 可在很短时间内快速完成样品中化学成分的表征^[6-13], 是复杂样品和微量样品分离分析的重要工具^[11-13]。近年来国内外学者对补骨脂进行了广泛的研究, 但对其化学成分的探索仍较为缺乏, 为了进一步开发药物的物质基础, 本研究采用 HPLC-MS 技术对补骨脂中的化学成分进行快速表征, 以期对中药资源的开发提供参考。

1 材料

1.1 试药

补骨脂购自北京同仁堂, 经张丽娟教授鉴定为豆科植物补骨脂 (*Psoralea corylifolia* L.) 的干燥成熟果实。LC-MS 级甲醇、乙腈 (Fisher); 乙酸 (ACS); 对照品补骨脂二氢黄酮甲醚 (纯度: 99.8%; 批号: 20190621)、黄豆苷元 (纯度: 99.8%; 批号: wkq6062704)、水杨酸 (纯度: 99.8%; 批号: H31A10B96366)、补骨脂素 (纯度: 99.8%; 批号: RP190515)、补骨脂酚 (纯度: 99.8%; 批号: YM0316SB13)、芦丁 (纯度: 99.8%; 批号: Y05M6S1)、木犀草素 (纯度: 99.8%; 批号: YA0408YA14)、补骨脂次素 (纯度: 99.8%)、补骨脂苷 (纯度: 99.8%; 批号: YY91239)、黄豆苷 (纯度: 99.8%; 批号: YY90005)、补骨脂异黄酮 A (纯度: 99.8%; 批号:

520052-201401)(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), Thermo Fisher Q-Orbitrap MS 高分辨质谱仪 (德国 Thermo Fisher 公司), BP121S 万分之一天平 (德国 Sartorius 公司), AX205 十万分之一天平 (德国 Mettler Toledo 公司), Milli-Q 超纯水制备仪 (Millipore 公司), KQ-250E 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司), XW-80A 涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂), 5424R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 样品处理

精密称取补骨脂药材粉末 (过三号筛) 约 2 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 30% 甲醇 (V/V) 溶液, 超声提取 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 12 000 r · min⁻¹ 下离心 20 min, 取上清液进样分析。

2.2 色谱条件

分析柱为 ACQUITY UPLC HSS T₃ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm, Waters, 配置在线过滤器); 进样量 2 μL, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 样品室温度 4 °C, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 洗脱梯度 (0 ~ 10 min, 5% ~ 100%B; 10 ~ 12 min, 100%B; 12 ~ 12.5 min, 100% ~ 5%B; 12.5 ~ 15 min, 5%B)。

2.3 质谱条件

离子源为高能电喷雾离子源, 扫描模式为 Full MS/dd-MS² (Top N), 正、负离子模式下采集, 设定主要源参数如下: 正、负离子源喷雾电压分别为 2.8 kV 和 3 kV, 毛细管温度为 320 °C, 辅助器温度为 350 °C, 鞘气为 35 psi, Full MS 扫描范围 *m/z* 为 100 ~ 1500, 分辨率为 70 000; MS² 质谱扫描为动态质量范围, 分辨率为 17 500。MS/MS 实验通高能碰撞诱导解离在归一化碰撞能量 20/40/60 V 下进行, 隔离宽度设置为 4 Da。

2.4 数据分析与处理

UHPLC/Q-Orbitrap-MS 高分辨质谱得到的原始数据用 Xcailbur 4.0 软件处理, 根据软件提供的元素组成, 将准分子离子控制在 $\pm 5 \text{ ppm}$ ($\times 10^{-6}$), 进行成分鉴定。此外, 还可通过对照品、相关文献、Compound discoverer 3.1 软件 (ThermoFisher Scientific)、Metlin 代谢物个人化合物数据库和谱库 (PCDL, Agilent Technologies)、人类代谢组数据库 (HMDB, <https://hmdb.ca/>) 和 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等进行化合物的鉴定。

3 结果

3.1 化学成分分析

共分离检测到 83 个化合物, 包括 24 个黄酮类成分, 15 个有机酸类成分, 6 个香豆素类成分, 5 个萜类成分, 4 个酚萜类成分, 3 个氨基酸类成分, 2 个多糖类成分, 1 个生物碱类以及 23 个其他类成分等。其中有 10 个化合物是与对照品进行比对 (包括保留时间、准分子离子质量数和二级碎片信息), 73 个化合物是根据数据库和相关文献进行鉴定的^[14-16] (包括准分子离子质量数和二级碎片信息)。总离子流图见图 1, 化合物的详细信息见表 1。

3.2 裂解规律分析

3.2.1 黄酮类化合物的鉴定

黄酮类化合物是补骨脂的主要成分, 具有抗肿瘤、保护心血管系统、抗菌等作用, 主要分为黄酮醇类、二氢黄酮类、异黄酮类和查耳酮类等。以表 1 中化合物 66 为例, MS 一级谱图给出其母离子为 m/z 391.1903 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{25}H_{26}O_4$, 碎片离子 m/z 267.0650 $[M + H - C_9H_{16}]^+$ 、 m/z 239.0702 $[M + H - C_9H_{16} - CO]^+$ 、 m/z 137.0234 $[M + H - C_{18}H_{22}O]^+$ 、 m/z 335.1273 $[M + H - C_4H_8]^+$ 与对照品比对, 鉴定该化合物为 corylifol A, 其二级质谱图与推测的裂解途径见图 2。用类似的方式, 化合物 18、20、25、26、29、30、36、37、42、47、48、49、52、53、55、59、65、66、67、70、71、73、74 等分别鉴定为山柰酚-3-O-芸香糖苷、大豆苷、大豆苷元、鹰嘴豆芽素 A、槲皮素、kievitone、木犀草素、伪芒刺柄花素、异新补骨脂异黄酮、黄腐酚、异补骨脂查耳酮、corylin、8-异戊烯基柚皮素、corylifol B、补骨脂二氢黄酮、异补骨脂二氢黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、corylifol A、补骨脂色烯、异补骨脂色烯、4'-O-甲基异补骨脂查耳酮、xambioona、kazonol E 等。

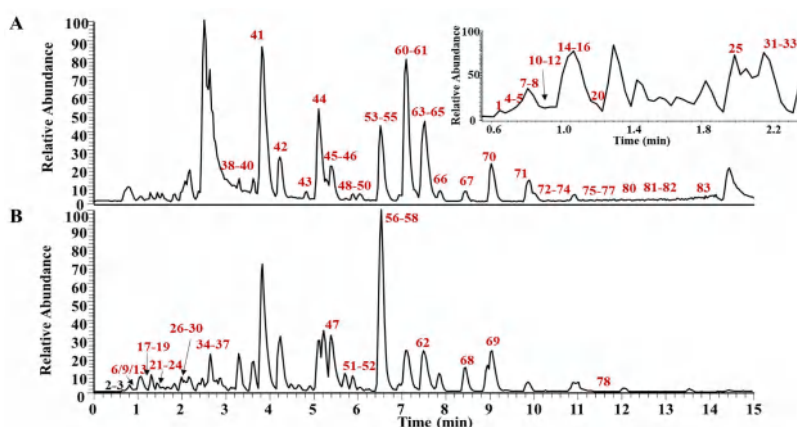


图 1 补骨脂化学成分正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 基峰色谱图

Fig 1 Base peak chromatogram of chemical composition in the positive ion mode (A) and negative ion mode (B) of *Psoralea corylifolia* L.

表 1 补骨脂鉴定化合物

Tab 1 Compounds identified by *Psoralea corylifolia* L.

编号	推测成分	分子式	t_R /min	理论值	检测值	质量误差 / $\times 10^{-6}$	类型	MS/MS 碎片	参考文献
1	DL-精氨酸	$C_6H_{14}N_4O_2$	0.63	175.1189	175.119	0.3	氨基酸	175.1190, 130.0975, 116.0708, 72.0814, 70.0658, 60.0564	[10]
2	D-棉子糖	$C_{18}H_{32}O_{16}$	0.71	503.1617	503.1625	4.1	多糖	503.1625, 341.1092, 323.0982, 179.0552	[10]
3	D-(+)-麦芽糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0.71	341.1089	341.1087	2.5	多糖	341.1087, 119.0337, 101.0230, 89.0230, 71.0124, 59.0125	[2]
4	葫芦巴碱	$C_7H_7NO_2$	0.73	138.0549	138.0549	-0.4	生物碱	138.0549, 110.0603, 94.0654, 92.0499, 78.0343	[17]
5	缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	0.73	118.0862	118.0865	2.1	氨基酸	118.0865, 72.0814	[2]

续表 1

编号	推测成分	分子式	t_R/min	理论值	检测值	质量误差 / $\times 10^{-6}$	类型	MS/MS 碎片	参考文献
6	葡萄糖酸	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	0.74	195.0510	195.0503	1.9	有机酸	195.0503, 129.0180, 99.0074, 75.0074, 59.0125	[2]
7	4- 胍基丁酸	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$	0.76	146.0924	146.094	3.9	氨基酸	146.0940, 129.0665, 128.0818, 111.0555, 104.0710, 87.0446	[2]
8	乙酰胆碱	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2$	0.76	146.1175	146.1174	- 1.1	其他	146.1174, 87.0446, 88.0478	[2]
9	L- 艾杜糖醇	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	0.78	181.0717	181.0709	1.3	其他	181.0709, 101.0231, 89.0230, 73.0282, 71.0125	[2]
10	N- 乙基马来酰亚胺	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$	0.82	126.0549	126.055	0.4	其他	126.055, 108.0447, 98.0604	[2]
11	腺苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	0.85	268.1040	268.104	- 0.1	其他	268.1040, 137.0659, 136.0617, 73.0293, 85.0289	[16]
12	氨基烯酸	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$	0.86	130.0862	130.0864	1.1	其他	130.0864, 71.0498, 67.0548	[2]
13	糖二酸	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$	0.87	209.0302	209.0301	3.3	有机酸	209.0301, 191.0190, 133.0130, 85.0281, 71.0125	[16]
14	对乙酰氨基酚	$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$	1.36	152.0706	152.0704	- 1.3	有机化合物	152.0704, 110.0603, 92.0499, 65.0392	[2]
15	腺嘌呤	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5$	1.37	136.0617	136.0618	0.2	其他	137.0458, 136.0618, 119.0353	[2]
16	6- 羟基烟酸	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$	1.40	140.0342	140.0341	- 0.9	有机酸	140.0341, 122.0238, 112.0395, 94.029	[16]
17 [*]	补骨脂苷	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_9$	1.49	365.0878	365.0869	0.5	香豆素	130.0411, 102.0462	[17]
18	山奈酚 -3-O- 芸香糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	1.53	563.1406	563.1409	2.4	黄酮类	563.1409, 473.1079, 383.0772, 353.0669, 297.0767	[17]
19	2- 异丙基苹果酸	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_5$	1.55	175.0611	175.0603	1.1	有机酸	175.0603, 157.0498, 131.0702, 115.0388, 113.0596, 85.0645	[2]
20 [*]	大豆苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	1.57	417.1180	417.1178	- 0.5	黄酮类	417.1178, 255.065, 256.0684	[17]
21	3- 羟基苯甲酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	1.59	137.0244	137.0232	- 0.9	有机酸	137.0232, 138.0266, 93.0332, 65.0382	[2]
22 [*]	水杨酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	1.59	137.0244	137.0232	- 0.9	有机酸	137.0232, 93.0332, 65.0382	[2]
23	龙胆酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	1.75	153.0193	153.0182	- 0.2	有机酸	153.0182, 109.0282, 108.0203	[2]
24	壬二酸	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	1.79	187.0975	187.0968	1.7	有机酸	188.1002, 187.0968, 143.1062, 125.0959	[2]
25 [*]	大豆苷元	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	2.01	255.0651	255.0651	- 0.3	黄酮类	255.0651, 256.0684, 227.0696, 199.0754	[16]
26	鹰嘴豆芽素 A	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	2.07	283.0611	283.0611	3.5	黄酮类	283.0611, 268.0377, 267.0295, 239.0347, 211.0394	[16]
27	黄麻酸 F	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$	2.10	327.2176	327.2176	3.1	有机酸	327.2176, 291.1964, 229.1439, 171.1017	[2]
28	苹果酸	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	2.10	133.0142	133.013	- 1.1	有机酸	133.0130, 115.0023, 89.0230, 72.9917, 71.0124	[2]
29	槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	2.13	301.0353	301.0353	3.4	黄酮类	301.0353, 151.0026, 121.0282, 107.0126	[9]
30	kievitone	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$	2.19	355.1187	355.1187	3.1	黄酮类	355.1187, 219.0657, 135.0439	[10]
31	12-oxophytodienoic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$	2.21	293.2111	293.2115	1.3	有机酸	293.2115, 275.2006, 219.1754	[2]
32	12, 13- 二醇补骨脂酚	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$	2.21	293.2111	293.2106	- 1.8	酚蒽类	293.0433, 161.1324, 137.0959	[2]
33	12, 13- 环氧补骨脂酚	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_2$	2.22	275.2005	275.2004	- 0.6	酚蒽类	275.2004, 91.0546	[2]
34	橄榄醇	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$	2.23	179.1077	179.1069	1.4	多酚类	179.1069, 151.0391	[17]
35	芝麻素	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	2.39	353.1030	353.103	2.9	木脂素	353.1030, 354.1068, 335.0924	[2]
36 [*]	木犀草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	2.64	285.0404	285.0404	3.6	黄酮类	285.0406, 151.0026, 133.0274, 107.0126	[9]
37	伪刺芒柄花素	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$	2.73	281.0455	281.0456	4.1	黄酮类	281.0456, 253.0505, 251.0349, 223.0398	[9]
38	psoracorylifol A	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$	2.92	289.1798	289.1797	- 0.4	蒽类	289.1797, 107.0494, 77.0393	[2]

续表 1

编号	推测成分	分子式	t_R/min	理论值	检测值	质量误差 / $\times 10^{-6}$	类型	MS/MS 碎片	参考文献
39 [†]	补骨脂素	C ₁₁ H ₆ O ₃	3.19	187.0389	187.0389	- 0.4	香豆素	187.0389, 131.0492, 103.0545, 115.0544	[16]
40	bavacoumestan A	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	3.26	353.1019	353.102	0.1	香豆素	353.1020, 281.0444, 253.0494, 209.0597	[16]
41	异蛇床子素 A	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	3.94	325.1434	325.1429	- 1.6	萜类	167.0339, 149.0233, 121.0287	[2]
42	异新补骨脂异黄酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	4.22	323.1277	323.1277	- 0.3	黄酮类	267.0648, 239.0701, 195.0450, 165.0700, 137.0230	[9]
43	蛇床子素 A	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	4.67	325.1434	325.1434	0.1	萜类	167.0338, 147.0439, 121.0285	[17]
44	psoracorylifol B	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	5.05	289.1798	289.1789	- 3.2	萜类	289.1789, 107.0494, 91.0547	[17]
45	雌三醇	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	5.22	289.1798	289.1797	- 0.4	其他	289.1797, 271.1692, 107.0494	[2]
46	2-羟基雌二醇	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	5.22	289.1798	289.1797	- 0.4	其他	289.1797, 174.0674, 131.0490, 123.0442	[2]
47	黄腐酚	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	5.41	353.1394	353.1395	3.3	黄酮类	353.1395, 354.1426, 223.0754, 119.0489	[16]
48	异补骨脂查耳酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	5.70	325.1434	325.1434	- 0.1	黄酮类	149.0233, 121.0285	[16]
49	corylin	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	5.70	321.1121	321.1119	- 0.7	黄酮类	321.1119, 279.0649, 137.0233	[16]
50	seputhecarpan A	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	5.77	323.1277	323.1267	- 3.4	香豆素	323.1267, 267.0648, 255.0648	[2]
51 [†]	补骨脂定	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	6.02	335.0924	335.0926	3.8	香豆素	335.0926, 312.0275, 280.0375	[2]
52	8-异戊烯基柚皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	6.24	339.1237	339.1238	3.2	黄酮类	339.1238, 245.0821, 219.0658, 119.0490	[9]
53	corylifol B	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	6.29	341.1383	341.1386	0.7	黄酮类	341.1386, 165.0182, 137.0237	[2]
54	雌酮	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	6.46	271.1692	271.1693	0.2	其他	271.1693, 272.1720, 253.1595, 157.0646	[2]
55	补骨脂二氢黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	6.50	325.1434	325.1434	- 0.1	黄酮类	181.0639, 147.0439, 137.0233, 121.0285	[9]
56	十二烷基硫酸盐	C ₁₂ H ₂₆ O ₄ S	6.55	265.1479	265.1479	4.1	其他	265.1479, 266.1512	[2]
57	13-羟基十八碳三烯酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	6.76	293.2122	293.2121	3.3	有机酸	293.2121, 275.2016, 236.1734, 221.1531	[2]
58	13-羟基十八碳三烯酸异构体	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	6.76	293.2122	293.2121	3.3	有机酸	293.2121, 236.1734, 221.1531	[2]
59	异补骨脂二氢黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	6.99	325.1434	325.1429	- 1.6	黄酮类	325.1429, 149.0233, 121.0286	[9]
60	邻苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	7.02	167.0338	167.0338	0.5	有机酸	167.0338, 149.0233, 121.0284,	[2]
61	psoracorylifol E	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	7.12	273.1849	273.1849	0.0	萜类	171.0798, 157.0648, 107.0494, 91.0546	[2]
62	16-羟基十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	7.42	271.2278	271.2279	4.2	有机酸	271.2279, 253.2173, 225.2219	[16]
63	α -雌二醇	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	7.61	273.1849	273.1846	- 1.1	其他	273.1846, 274.1874, 255.1792	[2]
64	3-羟基补骨脂酚	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	7.61	273.1849	273.1846	- 1.1	酚萜类	273.1846, 107.0494, 91.0548	[2]
65 [†]	补骨脂二氢黄酮甲醚	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	7.62	325.1434	339.1588	- 0.8	黄酮类	339.1588, 271.0961, 219.1013, 147.0438, 119.0493	[17]
66 [†]	corylifol A	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	7.99	391.1903	391.1903	- 0.2	黄酮类	391.1903, 355.1273, 267.0650, 239.0702, 137.0234	[17]
67	补骨脂色烯	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	8.42	323.1277	323.1277	- 0.3	黄酮类	203.0701, 175.0754, 147.0440, 119.0493	[9]
68	藏红花酸	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	8.52	327.1601	327.1607	4.9	其他	327.1607, 283.1706	[2]
69	联苯三醇	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	9.02	201.0557	201.0584	4.8	其他	201.0584, 157.0648	[2]
70	异补骨脂色烯	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	9.07	323.1277	323.1277	- 0.3	黄酮类	203.0702, 161.0233, 119.0489	[10]
71	4'-O-甲基异补骨脂查耳酮	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	9.57	325.1434	339.1586	- 1.4	黄酮类	219.1015, 147.0440, 119.0493, 69.0706	[10]
72	亚油酰乙醇胺	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	10.44	324.2897	324.29	0.9	其他	324.2900, 325.2935, 306.2802, 307.2614, 263.2376	[16]
73	xambioona	C ₂₅ H ₂₄ O ₄	10.44	389.1747	389.1744	- 0.9	黄酮类	267.0651, 239.0701, 137.0233	[2]

续表 1

编号	推测成分	分子式	t_R/min	理论值	检测值	质量误差 / $\times 10^{-6}$	类型	MS/MS 碎片	参考文献
74	kanzonol E	C ₂₅ H ₂₄ O ₄	10.65	389.1747	389.1744	-0.9	黄酮类	239.0701, 137.0234	[2]
75	亚苄基丙酮	C ₁₀ H ₁₀ O	11.38	147.0804	147.0804	-0.3	其他	147.0804, 129.0698, 119.0857, 91.0547	[2]
76	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	11.39	107.0491	107.0491	-0.4	其他	107.0494, 91.0549, 79.0548	[2]
77	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	11.42	133.0647	133.0648	0.1	其他	134.0648, 133.0648, 105.0702, 91.0547	[16]
78	肉豆蔻基硫酸盐	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ S	11.50	293.1792	293.1792	3.7	其他	293.1793, 294, 1826	[16]
79*	补骨脂酚	C ₁₈ H ₂₄ O	11.52	257.1899	257.1899	-0.4	萘酚类	257.1899, 201.1278, 187.1116, 107.0494	[2]
80	棕榈酰乙醇胺	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	11.70	300.2897	300.2897	0.0	其他	300.2895, 283.2629, 85.1017, 62.0608	[10]
81	油酰乙醇胺	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	12.51	326.3053	326.3053	-0.2	其他	326.3053, 310.2834, 309.2793, 308, 2952, 62.0608	[10]
82	doxepin	C ₁₉ H ₂₁ NO	12.79	280.1695	280.1695	-0.3	其他	280.1695, 181.0881	[16]
83	4-羟基-3-甲氧基肉桂醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	13.68	179.0702	179.0702	-0.4	其他	179.0706, 161.0597, 133.0649	[16]

注 (Note): * 为对照品指认化合物 (* Refers to the compound designated by the standard)。

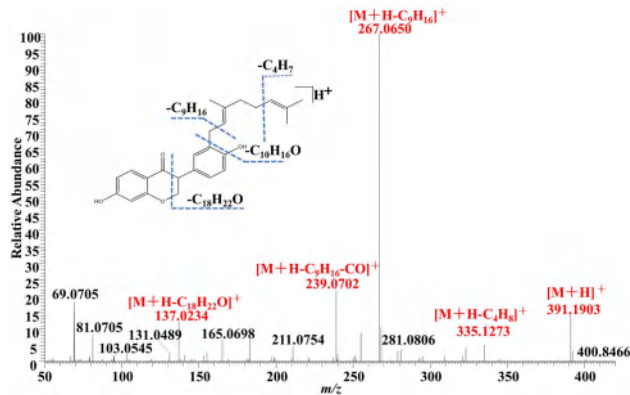


图 2 Corylifol A 的质谱图和裂解途径
Fig 2 Mass spectrogram and cleavage pathway of corylifol A

3.2.2 香豆素化合物的鉴定 香豆素类化合物以表 1 中化合物 39 为例, MS 一级谱图给出分子离子峰 m/z 187.0389 $[M + H]^+$, 推断其分子式为 C₁₁H₆O₃。母离子失去 2 分子的 CO, 得到特征碎片离子 m/z 131.0492 $[M + H-2CO]^+$, 再失去一分子 CO, 可得到碎片离子 m/z 103.0545 $[M + H-3CO]^+$; 母离子通过丢失一分子 CO 和一分子 CO₂, 可得特征碎片离子 m/z 115.0544 $[M + H-CO-CO_2]^+$, 与对照品比对, 鉴定该化合物为补骨脂素, 其二级质谱图与推测的裂解途径见图 3。以类似的方式, 化合物 17、39、40、50、51 分别鉴定为补骨脂苷、补骨脂素、bavacoumestan A、seputhecarpan A、补骨脂定。

3.2.3 萘酚类化合物的鉴定 以表 1 中化合物 79 为例, MS 一级谱图给出分子离子峰 m/z 257.1899 $[M + H]^+$, 推断其分子式为 C₁₈H₂₄O。母离子失去一分子 C₄H₇ 得到碎片离子 m/z 201.1278 $[M + H-C_4H_8]^+$, 失去一分子 C₅H₈ 得到 m/z 187.1116 $[M + H-C_5H_8]^+$, 再在其所连烃基上断裂失去一分子 C₆H₁₀ 产生 m/z

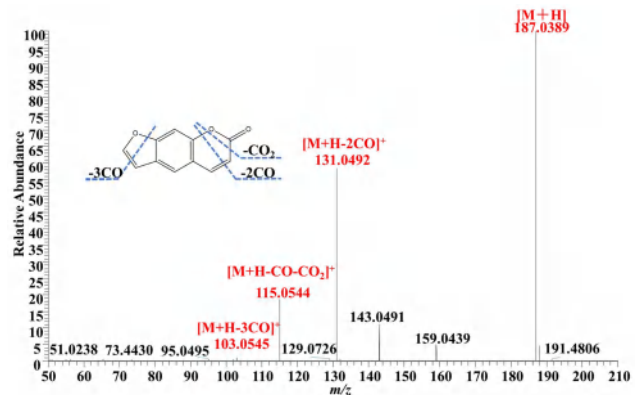


图 3 补骨脂素的质谱图和裂解途径
Fig 3 Mass spectrum and cleavage pathway of psoralen

107.0494 $[M + H-C_5H_8-CH_2-2CH-C_3H_4]^+$ 。通过与对照品比对, 鉴定该化合物为补骨脂酚, 其二级质谱图与推测的裂解途径见图 4。用类似的方式, 化合物 32、33、64 分别鉴定为 12, 13- 环氧补骨脂酚、12, 13- 二醇补骨脂酚、3- 羟基补骨脂酚。

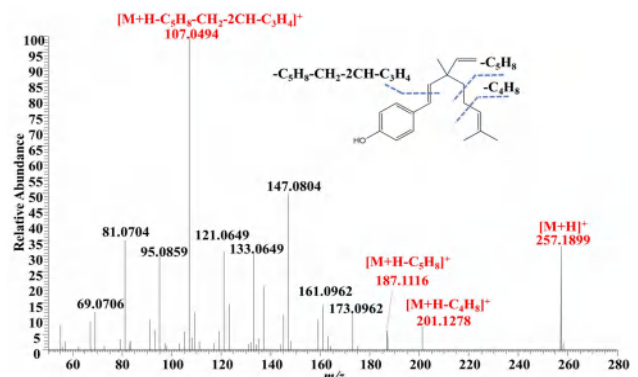


图 4 补骨脂酚的质谱图和裂解途径
Fig 4 Mass spectrum and cleavage pathway of bakuchiol

4 讨论与结论

本文采用 UHPLC-Q-Orbitrap 技术对补骨脂中主要的化学成分进行快速表征, 首先优化了补骨脂的提取条件, 结果表明使用 100% 甲醇超声提取 30 min 所得的提取物色谱峰较多, 分离度较好。其次优化了补骨脂的色谱条件, 根据色谱峰数量、峰形以及分离度, 最终选择了 HSS T₃ 为最佳的色谱柱, 0.1% 乙酸水-乙腈为最佳的流动相, 25 °C 为最佳的色谱柱温度。随后优化了质谱参数, 选取 4 种补骨脂中的主要化合物(补骨脂二氢黄酮、大豆苷、补骨脂素、corylifol A), 通过比较二级碎片的数量与信号强度, 选择 20/40/60 V 作为最佳的碰撞能量。在正、负离子模式下对补骨脂提取物进行一级母离子和二级子离子扫描, 通过与数据库和文献比对, 共得到 83 个化合物, 包括 23 个黄酮类成分, 补骨脂中的黄酮类成分可能与其温肾助阳、抗氧化等药理作用相关; 5 个香豆素类成分, 香豆素类成分具有抗凝血、抗菌、抗炎等作用, 这可能是补骨脂在传统医学中用于治疗一些炎症相关疾病的物质基础; 还有有机酸、萜类、脂肪酸、酚类等成分, 这些成分各自具有不同的生物活性, 共同发挥补骨脂的药理功效。

本研究鉴定出的多种成分可以作为补骨脂质量控制的潜在标志物。例如, 黄酮类成分含量的高低可能影响补骨脂药材的质量和药效, 通过建立针对黄酮类成分的定量分析方法, 可以更好地控制补骨脂药材的质量。同样, 香豆素类、有机酸类等成分也可以作为质量控制的参考指标, 确保补骨脂药材及其相关制剂的质量稳定性和安全性。尽管本研究采用 LC-MS 技术对补骨脂中的化学成分进行了较为全面的表征, 但仍存在一定的局限性。首先, 本研究虽然鉴定出了 83 个化合物, 但还有许多化合物未得到准确鉴定, 需要进一步结合更多的技术手段(如核磁共振等)进行深入研究。其次, 仅对补骨脂中的主要化学成分进行了定性分析, 对于各成分的含量测定以及在不同产地、不同生长环境下补骨脂化学成分的变化尚未进行研究。未来可以进一步深入分析补骨脂中化学成分的含量变化规律, 探讨化学成分与药理作用之间的量效关系, 为补骨脂的开发利用提供更全面、更深入的理论依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 195.

[2] Chen YY, Tang LH, Wu MR, et al. A practical method for rapid discrimination of constituents in *Psoraleae Fructus* by UPLC-Q-Orbitrap MS [J]. Mass Spectrom, 2023, 58 (8): e4966.

- [3] Wang Y, Xu G, Wang ZL, et al. Psoralidin, a major component of *Psoraleae Fructus*, induces inflammasome activation and idiosyncratic liver injury [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 92: 107352.
- [4] Zhou YT, Zhu L, Yuan Y, et al. Effects and mechanisms of Five *Psoralea* Prenylflavonoids on aging-related diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 2128513.
- [5] Zhao L, Yu YL, Li L, et al. Isobavachalcone disrupts mitochondrial respiration and induces cytotoxicity through ROS accumulation and Akt suppression [J]. Toxicol, 2022, 216: 28-36.
- [6] Wang HZ, Chen KY, Xue R, et al. Identification of the chemical composition in *Cullen corylifolium* ethanolic extract by LC-MS/MS and GC-MS [J]. Nat Prod Res, 2023, 37 (8): 1392-1396.
- [7] Jæger D, Simpson BS, Ndi CP, et al. Biological activity and LC-MS/MS profiling of extracts from the Australian medicinal plant *Acacia ligulata* (Fabaceae) [J]. Nat Prod Res, 2018, 32 (5): 576-581.
- [8] Kuwada K, Kawase S, Nakata K, et al. LC-MS analysis of saponins of *Achyranthes* root in the Japanese market [J]. J Nat Med, 2020, 74 (1): 135-141.
- [9] 何婷, 王银洁, 詹莹莹, 等. 补骨脂醇提取物 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析及促黑色素生成作用机制初探 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36 (6): 968-981, 953.
- [10] 郑燕, 江媛, 缪雨静, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的补骨脂炮制机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (3): 600-604.
- [11] Tiller PR, Romanyshyn LA, Neue UD. Fast LC/MS in the analysis of small molecules [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377 (5): 788-802.
- [12] Wu W, Jiao CX, Li H, et al. LC-MS based metabolic and metabolomic studies of *Panax ginseng* [J]. Phytochem Anal, 2018, 29 (4): 331-340.
- [13] Kafle B, Baak J, Brede C. Quantification by LC-MS/MS of astragaloside IV and isoflavones in *Astragali radix* can be more accurate by using standard addition [J]. Phytochem Anal, 2021, 32 (4): 466-473.
- [14] He ZC, Xu QX, Yang XW, et al. The benzofuran glycosides from the fruits of *Psoralea corylifolia* L [J]. Fitoterapia, 2021, 155: 105057.
- [15] Xu QX, Zhang BY, He ZC, et al. Constituents promoting osteogenesis from the fruits of *Psoralea corylifolia* and their structure-activity relationship study [J]. Phytochemistry, 2022, 196: 113085.
- [16] 胡万弟, 王诗雨, 徐翱昌, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术的中药补骨脂化学成分表征与鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (11): 2989-2999.
- [17] 蒋本贵, 陈思越, 钱文秀, 等. 亲和超滤-液质联用技术筛选补骨脂治疗子宫内膜癌的有效成分 [J]. 中草药, 2024, 55 (14): 4663-4669.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-10-05)

基于 UHPLC-Q-Orbitrap MS 的丝瓜络化学成分鉴定及其防治高脂血症网络药理学研究

王影^{1,2}, 亓柯鑫², 张玲雨², 郭勤卫³, 付志飞², 韩立峰^{1,2*} (1. 天津中医药大学测试中心, 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. 衢州市农业林业科学研究院, 浙江 衢州 324000)

摘要: **目的** 探索丝瓜络的化学成分及其防治高脂血症的作用机制。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap MS) 技术对丝瓜络化学成分进行分析及鉴定, 利用网络药理学预测丝瓜络防治高脂血症作用机制。**结果** 利用 Compound Discoverer 软件、PubChem 数据库并参考文献, 共鉴定出 67 个化学成分, 结合网络药理学分析, 预测小檗碱为丝瓜络防治高脂血症的核心成分, 通过作用于前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL-6) 等关键靶点调控过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路以及高级糖基化终末产物-受体 (AGE-RAGE) 信号通路等来发挥治疗高脂血症的作用。**结论** 通过 UHPLC-Q-Orbitrap MS 结合网络药理学, 初步阐释了丝瓜络防治高脂血症的潜在通路及机制, 为丝瓜络的深入开发及应用提供了理论基础。

关键词: 丝瓜络; 网络药理学; UHPLC-Q-Orbitrap MS; 化学成分; 高脂血症; 信号通路
中图分类号: R284.1, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0298-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.002

Identification of chemical compositions of Luffae Fructus Retinerus based on UHPLC-Q-Orbitrap MS and its network pharmacology for hyperlipidemia

WANG Ying^{1,2}, QI Ke-xin², ZHANG Ling-yu², GUO Qin-wei³, FU Zhi-fei², HAN Li-feng^{1,2*} (1. Instrumental Analysis and Research Center, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. Quzhou Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Quzhou Zhejiang 324000)

Abstract: Objective To determine the chemical compositions of Luffae Fructus Retinerus and elucidate its mechanism for hyperlipidemia. **Methods** The chemical compositions of Luffae Fructus Retinerus were identified by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap MS). Network pharmacology was used to predict the mechanisms of Luffae Fructus Retinerus in the treatment of hyperlipidemia. **Results** Totally 67 chemical compositions were identified with Compound Discoverer software, the PubChem database, and literature references. Based on network pharmacology, berberine was predicted to be the core composition in Luffae Fructus Retinerus for hyperlipidemia. It exerted effect on hyperlipidemia by acting on the key targets such as prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α), tumor necrosis factor (TNF), and interleukin-6 (IL-6), etc., and regulating the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) signaling pathway and advanced glycation endproduct receptor (AGE-RAGE) signaling pathway. **Conclusion** This study preliminarily elucidates the pathways and mechanism by which Luffae Fructus Retinerus prevents and treats hyperlipidemia, with UHPLC-

基金项目: 天津市科技计划项目 (No.24ZYJDS00310)。

作者简介: 王影, 女, 硕士, 主要从事中药药效物质基础研究, email: wangying_qtj@163.com ***通信作者:** 韩立峰, 男, 正高级实验师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: hanlifeng@tjutc.edu.cn

Q-Orbitrap MS and network pharmacology, laying a theoretical foundation for further development of *Luffae Fructus Retinerus*.

Key words: *Luffae Fructus Retinerus*; network pharmacology; UHPLC-Q-Orbitrap MS; chemical composition; hyperlipidemia; signaling pathway

丝瓜络 (*Luffae Fructus Retinerus*), 又名丝瓜瓢、丝瓜网、丝瓜筋等, 是葫芦科植物丝瓜 *Luffa cylindrica* (L.) Roem. 干燥成熟果实的维管束, 多呈长棱形或长圆筒形, 表面呈白色或黄白色, 其粉末为灰白色, 属于常用中药, 有祛风通络、活血下乳、利尿消肿作用, 主治痹痛痿挛、胸胁胀痛、乳汁不通、乳痈肿痛等^[1]。现代药理学研究表明, 丝瓜络具有降脂、抗氧化、抗炎等多种功效^[2-4], 但药效物质基础及作用机制尚不明确。

高脂血症 (hyperlipidemia, HLP) 是一种以脂质代谢紊乱为主要特征的疾病, 可由多种原因导致, 例如遗传、营养、全身性疾病等^[5]。随着人们生活水平的提高, HLP 的发病率逐年上升。HLP 是高血压、糖尿病、冠心病、脑卒中和动脉粥样硬化等心脑血管疾病的重要危险因素^[6]。

液相色谱-质谱联用技术具有灵敏度高、准确度高、分析速度快等优点, 在中药化学成分表征中广泛应用。网络药理学是一门系统性研究药物与疾病作用机制的新兴学科, 它从靶点与疾病关系的角度, 对中药的复杂作用机制进行阐释^[7]。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap MS) 对丝瓜络化学成分进行快速表征, 并结合网络药理学探讨丝瓜络防治 HLP 的潜在作用机制, 以期对丝瓜络的开发和利用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

UHPLC-Q-Orbitrap MS 高分辨质谱仪 (Exploris 120, 美国 Thermo Fisher 公司), 十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), 多管涡旋混合仪 (美国 SCILOGEX 公司), 5804r 多功能台式离心机 (德国 Eppendorf 公司), Alpha 2-4 LSCbasic 冷冻干燥机 (德国 Martin Christ 公司)。

1.2 试药

丝瓜 [衢州市农业林业科学研究院, 经衢州市农业林业科学研究院郭勤卫研究员鉴定为葫芦科植物丝瓜 *Luffa cylindrica* (L.) Roem. 干燥成熟果实], 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 异亮氨酸 (批号: H23M9H56575)、苯丙氨酸 (批号: S31D7P27851)、色氨酸 (批号: H16J11S108420)、吡啶-3-丙烯酸 (批号: H15O9B72294)、3-羟基喹啉 (批

号: N07IS231314)、小檗碱 (批号: M06M10K87560) (上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均 > 99.0%)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

成熟丝瓜洗净切开, 取出丝瓜络部分, 切小块, 冻干, 粉碎, 得丝瓜络样本。称取丝瓜络粉末 1 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 75% 甲醇 40 mL, 超声提取 50 min, 于 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 200 μL, 加入 600 μL 75% 甲醇稀释后过 0.22 μm 滤膜, 作为丝瓜络供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别称取吡啶-3-丙烯酸、3-羟基喹啉对照品约 1 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 75% 甲醇溶解; 分别称取异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、小檗碱对照品约 1 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入超纯水溶解, 各配制成质量浓度约为 2 μg · mL⁻¹ 的溶液, 备用。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters HSS T₃ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 洗脱梯度: 0 ~ 20 min, 5% ~ 100%B; 20 ~ 21 min, 100%B; 21 ~ 21.5 min, 100% ~ 5%B; 21.5 ~ 24 min, 5%B, 流速: 0.3 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C。

2.3.2 质谱条件 离子源: 高能电喷雾离子源 (HESI 源), 扫描模式: Full MS/dd-MS² (Top 5), 正负离子模式下采集, 喷雾电压: 2.8 kV (负) 和 3 kV (正), 毛细管温度: 320 °C, 辅助气温度: 350 °C, Full MS 扫描范围 *m/z*: 100 ~ 1500, 分辨率: 70 000; MS² 质谱扫描为动态质量范围, 分辨率: 17 500, 归一化碰撞能量: 20/40/60 V。

2.4 丝瓜络化学成分鉴定

基于 UHPLC-Q-Orbitrap MS 高分辨质谱技术并结合 Compound Discoverer 软件、PubChem 数据库、对照品及参考文献比对进行鉴定, 共获得 67 个丝瓜络主要化学成分, 包括氨基酸类 4 个、脂肪酸类 12 个、有机酸类 11 个、糖类 5 个、苷类 5 个、萜类 8 个、黄酮类 2 个、异黄酮类 1 个、维生素类 1 个、其他类 18 个, 并首次在丝瓜络中发现小檗碱的存在, 结果如表 1 所示。丝瓜络正离子、负离子总离子流图见图 1。

表 1 丝瓜络化学成分的质谱数据及鉴定结果

Tab 1 Mass data and identification results of the chemical compositions of LFR

No.	t_R /min	分子式	理论值	实测值	检测模式	质量偏差 / ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物
1	1.76	C ₉ H ₈ O ₃	165.0546	165.0540	[M+H] ⁺	- 3.64	165.0540, 147.0443, 119.0493, 91.0544	对香豆酸
2	1.83	C ₆ H ₁₃ N ₂ O ₂	132.1019	132.1021	[M+H] ⁺	1.51	132.1021, 86.0965, 69.0701	异亮氨酸*
3	2.87	C ₉ H ₁₁ N ₂ O	166.0862	166.0863	[M+H] ⁺	0.60	166.0863, 149.0598, 120.0808, 103.0543	苯丙氨酸*
4	3.29	C ₉ H ₁₇ NO ₃	218.1033	218.1038	[M-H] ⁻	2.29	218.1038, 146.0825, 129.0564, 116.0721	泛酸
5	3.82	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	299.0772	299.0777	[M-H] ⁻	1.67	299.0777, 121.0296, 93.0347, 71.0140	4-methylcatechol-2-glucuronide
6	3.83	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	299.0772	299.0777	[M-H] ⁻	1.67	299.0777, 179.0354, 151.0405, 137.0247	水杨酸-β-D-葡萄糖苷
7	4.10	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	298.0968	298.0974	[M+H] ⁺	2.01	298.0974, 163.0423, 136.0619, 103.0212	(2R, 5S)-2-(6-aminopurin-9-yl)-5-(methylsulfanylmethyl) oxolane-3, 4-diol
8	4.18	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.0878	341.0873	[M-H] ⁻	- 1.47	341.0873, 221.0459, 179.0354, 161.0247	1-咖啡酰-β-D-葡萄糖
9	4.22	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339.0721	339.0727	[M-H] ⁻	1.77	203.0354, 161.0247, 133.0298, 101.0248	秦皮甲素
10	4.24	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339.0721	339.0716	[M-H] ⁻	- 1.47	339.0716, 175.0250, 163.0403, 119.0504, 87.0089, 72.9932, 59.0139	对香豆酸葡萄糖苷
11	4.32	C ₁₁ H ₉ NO ₂	188.0706	188.0708	[M+H] ⁺	1.06	188.0708, 170.0603, 146.0602, 142.0653, 118.0653	吡啶-3-丙烯酸*
12	4.35	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0971	205.0977	[M+H] ⁺	2.93	205.0977, 132.0809, 117.0699, 160.0762	色氨酸*
13	4.38	C ₉ H ₇ NO	146.0600	146.0602	[M+H] ⁺	1.37	146.0602, 118.0653, 91.0543	3-羟基喹啉*
14	4.67	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	137.0356	137.0360	[M-H] ⁻	2.92	137.0360, 93.0459, 67.0304	5-methylpyrazine-2-carboxylic acid
15	4.91	C ₇ H ₁₂ O ₅	175.0611	175.0615	[M-H] ⁻	2.28	175.0615, 157.0509, 131.0717, 129.0562	2-异丙基苹果酸
16	5.00	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0928	325.0934	[M-H] ⁻	1.85	325.0934, 307.0829, 145.0297, 177.0564, 163.0403, 119.0504	草木樨苷
17	5.21	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	363.1449	363.1456	[M-H] ⁻	1.93	363.1456, 319.1555, 275.1662, 257.1555, 71.0140	赤霉素 A8
18	5.51	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355.1034	355.1044	[M-H] ⁻	2.82	355.1044, 265.0695, 193.0510, 175.0404, 135.0452	1-O-阿魏酰-β-D-葡萄糖
19	5.64	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209.1536	209.1539	[M+H] ⁺	1.43	209.1539, 191.1430, 173.1318, 151.1119	3-羟基-β-紫罗兰酮
20	5.66	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0928	325.0939	[M-H] ⁻	3.38	325.0939, 205.0511, 163.0404, 145.0298, 119.0298	cis-草木樨苷
21	5.88	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	281.1394	281.1400	[M-H] ⁻	2.13	281.1399, 237.1500, 219.1397, 169.0875, 153.0921, 111.0450	二氢红花菜豆酸
22	6.21	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.1074	325.1065	[M-H] ⁻	- 2.77	265.0728, 235.0616, 205.0507, 163.0403, 145.0298, 119.0504	1-O-p-香豆酰-β-D-葡萄糖
23	6.52	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₅	289.0829	289.0835	[M-H] ⁻	2.08	199.0872, 156.0459, 128.0509	L-N-(1H-吡啶-3-乙酰基)天冬氨酸
24	6.77	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	361.1292	361.1299	[M-H] ⁻	1.94	361.1292, 317.1399, 273.1501, 71.0140	gibberellin A8-catabolite
25	6.80	C ₈ H ₁₄ O ₄	173.0819	173.0823	[M-H] ⁻	2.31	173.0823, 129.0925, 111.0817, 109.0662	辛二酸
26	6.81	C ₉ H ₈ O ₃	163.0400	163.0403	[M-H] ⁻	1.84	163.0403, 119.0504, 117.0348, 93.0347	苯丙酮酸
27	6.99	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.0725	461.0733	[M-H] ⁻	1.74	461.0733, 327.0512, 285.0410, 117.0193	木犀草素-7-葡萄糖苷
28	7.20	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	245.0931	245.0938	[M-H] ⁻	2.86	245.0938, 203.0833, 74.0250, 58.0301	N-乙酰-D-色氨酸
29	7.65	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	269.0459	[M-H] ⁻	1.49	269.0459, 201.0558, 183.0455, 159.0452, 107.0139	染料木素
30	7.67	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.0776	445.0775	[M-H] ⁻	- 0.22	445.0775, 269.0460, 175.0252, 87.0089	黄芩苷
31	7.71	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	229.1445	229.1448	[M-H] ⁻	1.31	229.1448, 211.1342, 167.1444, 59.0139	十二烷二酸
32	8.03	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.0975	187.0979	[M-H] ⁻	2.14	187.0979, 169.0874, 125.0974	壬二酸
33	8.09	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	347.1500	347.1504	[M-H] ⁻	1.15	347.1504, 303.1602, 259.1707	3-表赤霉素 A1
34	8.26	C ₂₀ H ₂₆ O ₇	377.1605	377.1614	[M-H] ⁻	2.39	377.1614, 333.1715, 289.1811	赤霉素 A7
35	9.08	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	336.1230	336.1235	[M] ⁺	1.19	336.1235, 320.0921, 304.0980, 292.0974	小檗碱*
36	9.96	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	363.1813	363.1816	[M-H] ⁻	0.83	363.1816, 319.1919, 301.1802, 273.1853	赤霉素 A74
37	10.09	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	809.4328	809.4337	[M-H] ⁻	1.11	809.4337, 179.0562, 101.0245, 89.0246	lucyoside J
38	10.19	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327.2176	327.2182	[M-H] ⁻	1.83	327.2182, 309.2058, 291.1974, 229.1449	黄麻脂肪酸 F
39	10.20	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	293.2111	293.2113	[M+H] ⁺	0.68	275.2008, 257.1907, 151.1119, 149.0964	12-氧代植物二烯酸
40	10.70	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	313.2373	313.2384	[M+H] ⁺	3.51	295.2271, 277.2166, 175.1485, 161.1328	13-L-hydroperoxylinoic acid
41	10.72	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2333	329.2338	[M-H] ⁻	1.52	329.2338, 311.2237, 293.2137, 229.1450	9, 12, 13-三羟基-10-十八碳烯酸

续表 1

No.	t_R /min	分子式	理论值	实测值	检测模式	质量偏差 / ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物
42	10.73	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	213.1485	213.1488	[M+H] ⁺	1.41	153.0914, 127.0756, 123.0806, 121.1015	traumatin
43	10.90	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	357.0615	357.062	[M-H] ⁻	1.40	357.0620, 313.0717, 121.0297, 77.0398	琥珀酰水杨酸
44	11.50	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.1550	331.1555	[M-H] ⁻	1.51	331.1555, 313.1451, 287.1657, 269.1551	赤霉素 A4
45	11.83	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309.2071	309.2077	[M-H] ⁻	1.94	309.2077, 291.1970, 197.1186, 181.1232	9(S)-HpOTrE
46	11.98	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	363.1813	363.1821	[M-H] ⁻	2.20	363.1821, 345.1713, 319.1924, 301.1814	赤霉烷-1, 10-二羧酸
47	12.02	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	318.3002	318.3006	[M+H] ⁺	1.26	318.3006, 300.2916, 256.2638, 57.0700	植物鞘胺醇
48	13.49	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	298.2740	298.2745	[M+H] ⁺	1.68	298.2745, 280.2640, 262.2535, 121.1014	(4E, 14Z)-2-aminooctadeca-4, 14-diene-1, 3-diol
49	13.56	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	302.3053	302.3058	[M+H] ⁺	1.65	302.3058, 284.2958, 57.0700	safingol
50	13.77	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309.2071	309.2075	[M-H] ⁻	1.29	309.2075, 291.1968, 263.2021, 197.1180, 171.1029, 137.0977, 111.0819	12(13) Ep-9-KODE
51	14.17	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	281.1383	281.1393	[M-H] ⁻	3.56	281.1393, 111.0442, 87.0443, 55.0179	红花菜豆酸
52	14.42	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313.2384	313.2388	[M-H] ⁻	1.28	313.2388, 295.2283, 277.2180, 183.1393	12, 13-dihydroxyoctadec-9-enoic acid
53	14.64	C ₁₈ H ₃₆ O ₄	315.2540	315.2545	[M-H] ⁻	1.59	201.1136, 171.1033, 155.1082, 127.1131	9, 10-二羟基硬脂酸
54	14.69	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	311.2227	311.2232	[M-H] ⁻	1.61	311.2232, 293.2126, 201.1138, 169.1235	(+/-)9-HpODE
55	15.22	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	520.3397	520.3400	[M+H] ⁺	0.58	502.3292, 258.1105, 184.0736, 104.1071	LysoPC (0: 0/18: 2 (9Z, 12Z))
56	15.48	C ₂₇ H ₄₉ O ₁₂ P	595.2888	595.2894	[M-H] ⁻	1.01	595.2894, 415.2265, 279.2333, 241.0122	LysoPI (18: 2 (9Z, 12Z) /0: 0)
57	15.91	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	496.3397	496.3401	[M+H] ⁺	0.81	496.3401, 478.3294, 313.2733, 258.1108	LysoPC (0: 0/16: 0)
58	16.26	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	478.2939	478.2944	[M-H] ⁻	1.05	478.2944, 281.2490, 214.0490, 196.0384	LysoPE (18: 1 (11Z) /0: 0)
59	16.38	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.2318	279.2323	[M+H] ⁺	1.79	279.2323, 261.2214, 243.2103, 161.1328	桐酸
60	16.41	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313.2384	313.2379	[M-H] ⁻	-1.60	295.2282, 277.2177, 171.1028, 155.1079	9, 10-DHOME
61	16.90	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.2122	293.2126	[M-H] ⁻	1.36	293.2126, 275.2020, 249.2218, 195.1393	(9Z, 11E, 13S, 15Z)-13-hydroxyoctadeca-9, 11, 15-trienoic acid
62	18.24	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	324.2897	324.2900	[M+H] ⁺	0.93	306.2793, 263.2371, 137.1330, 123.1169	亚油醇乙醇胺
63	19.15	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	300.2897	300.2900	[M+H] ⁺	1.00	239.2377, 71.0857, 62.0602	棕榈酰乙醇酰胺
64	19.31	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ S	293.1792	293.1794	[M-H] ⁻	0.68	293.1794, 96.9602, 79.9574	myristyl sulfate
65	20.09	C ₁₆ H ₃₃ NO	256.2634	256.2639	[M+H] ⁺	1.95	256.2639, 130.1226, 97.1014, 95.0856	十六碳酰胺
66	20.55	C ₁₈ H ₃₅ NO	282.2791	282.2796	[M+H] ⁺	1.77	282.2796, 265.2527, 247.2422, 135.1172	油酸酰胺
67	20.75	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2329	279.2334	[M-H] ⁻	1.79	279.2334, 261.2217, 59.0137	亚油酸

注 (Note): * 为对照品指认化合物 (* Refers to the compound designated by the standard)。

2.5 代表化合物的质谱裂解规律

2.5.1 异喹啉生物碱类

异喹啉生物碱构成了生物碱中的一大类, 以异喹啉或四氢异喹啉作为核心结构, 生物合成上源自苯丙氨酸或酪氨酸。以小檗碱 (化合物 35) 为例, 对其质谱裂解规律进行解析。小檗碱在正离子模式下显示 m/z 336.1235 [M]⁺ 的分子离子峰, 其质谱裂解特征主要围绕其母核的 CH₃、-OCH₃ 等中性小分子丢失^[8]。其母核上 RO-CH₂-OR 形成稳定的三元环结构产生 m/z 306.0765 [M-CH₂O]⁺ 子离子, m/z 304.0980 [M-OCH₃-H]⁺ 为亚基二氧基丢失一分子甲氧基和一个氢形成的侧环; 此外, m/z 336.1235 脱去一分子 CH₃ 产生 m/z 321.1001 [M-CH₃]⁺ 碎片离子; -OCH₃ 取代基中 -CH₃ 的去除及 N 原子相连的 C 上 H 的脱去产生 m/z 320.0921 [M-CH₃-H]⁺, 随后再脱去一分子 CO (28 Da) 产生 m/z 292.0974 [M-CH₃-H-CO]⁺, m/z 292.0974 继续丢失 -CH₂ (14 Da) 产生 m/z 278.0810 [M-CH₃-H-CO-CH₂]⁺ 碎片离

子。根据文献报道及对对照品比对指认^[9], 化合物 35 鉴定为小檗碱, 其二级质谱及裂解规律见图 2。

2.5.2 氨基酸类

在丝瓜络中共鉴定出 3 种氨基酸及 1 种氨基酸衍生物, 氨基酸类化合物在正离子模式下信号响应较高, 常以准分子离子脱去 NH₃ 或 COOH 的方式发生裂解^[10]。以化合物 3 为例, 在正离子模式下得到准分子离子峰 m/z 166.0863 [M + H]⁺, 在高碰撞能量下接连丢失一分子 NH₃ 和 HCOOH, 二级质谱图中产生 m/z 103.0543 [M + H-HCOOH-NH₃]⁺ 碎片离子, 以及 m/z 149.0598 [M + H-NH₃]⁺、 m/z 120.0808 [M + H-HCOOH]⁺ 等特征碎片离子^[11], 经对照品对比该化合物鉴定为苯丙氨酸, 其质谱裂解途径见图 3。依据上述氨基酸类裂解规律, 结合 Compound Discover 3.0 平台筛查结果及 PubChem 数据库质谱信息指认化合物 2 和 12 分别为异亮氨酸、色氨酸。

2.5.3 有机酸类

有机酸类化合物裂解规律一般是脱去 H₂O (18 Da)、CO₂ (44 Da) 和 CH₃ (15 Da)

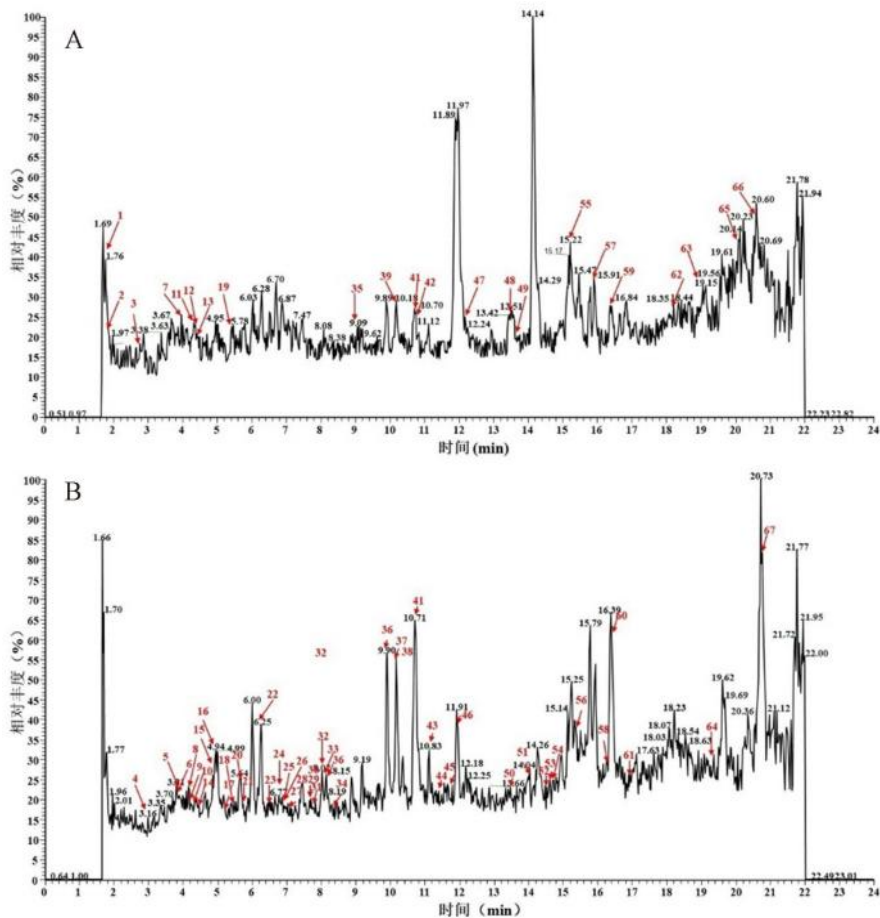


图 1 丝瓜络样品正离子 (A)、负离子 (B) 模式下总离子流色谱图

Fig 1 Total ion chromatograms of Luffae Fructus Retinerus sample in positive (A) and negative (B) ion modes

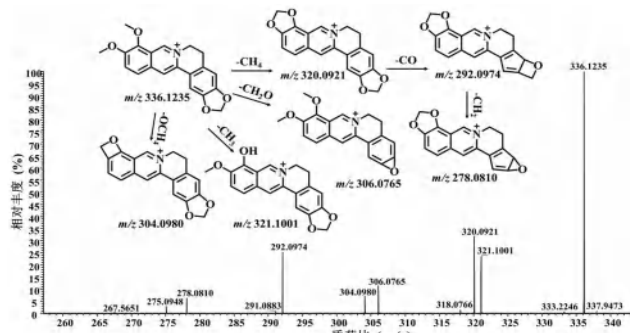


图 2 小檗碱在正离子模式下的质谱图及裂解途径

Fig 2 Mass spectrum and fragmentation pathway of berberine in positive mode

等小分子基团^[12]。负离子模式下化合物 **32** 的准分子离子为 m/z 187.0979 $[M-H]^-$ ，脱去一分子 H_2O 产生 m/z 169.0874 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子，继续脱去一分子 CO_2 产生 m/z 125.0974 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 碎片离子，符合上述裂解规律，推测该化合物为壬二酸，其裂解途径见图 4。依据有机酸类裂解规律及 PubChem 数据库质谱信息指认化合物 **25**、**53** 和 **67** 分别为辛二酸、9, 10-二羟硬脂酸、亚油酸等。

2.6 网络药理学分析

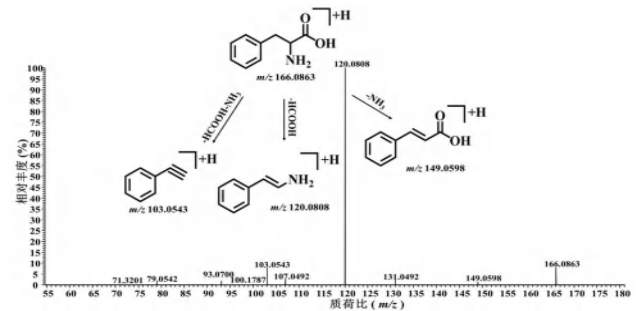


图 3 苯丙氨酸在正离子模式下的质谱图及裂解途径

Fig 3 Mass spectrum and fragmentation pathway of phenylalanine in positive mode

通过 SwissTargetPrediction 数据库对丝瓜络中 67 个化学成分进行预测得到 706 个靶点基因，结合 GeneCards 和 DisGeNET 数据库获取 1711 个 HLP 相关疾病靶点基因，将丝瓜络与 HLP 疾病共有靶点基因导入 STRING 数据库分析后，使用 Cytoscape 3.10.0 软件生成蛋白互作 (PPI) 网络图，结果显示肿瘤抑制因子 TP53 (TP53)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、表皮因子生长受体 (EGFR)、白细胞介素 -6 (IL-6)、丝氨酸 / 苏氨酸激酶 1 (Akt1)、Toll 样受体 4 (TLR4)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等靶点在丝

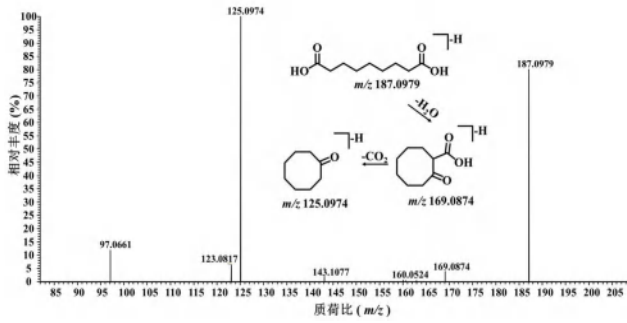


图 4 壬二酸在负离子模式下的质谱图及裂解途径
Fig 4 Mass spectrum and fragmentation pathway of azelaic acid in negative mode



图 5 丝瓜络治疗高脂血症的“成分-通路-靶点”网络图
Fig 5 “Component-pathway-target” network diagram of Luffae Fructus Retinerus for signaling pathway

(LDL-R)的转录水平从而促进 LDL-R 蛋白质的合成来降低血清 LDL-C 水平,从而达到降脂作用^[14]。本文利用 UHPLC-Q-Orbitrap MS 高分辨质谱技术明确了丝瓜络中 67 个化学成分,结合网络药理学探究丝瓜络防治 HLP 的作用机制,发现丝瓜络治疗 HLP 的核心成分为小檗碱。目前已有研究表明,小檗碱具有治疗胰岛素抵抗、肥胖、糖尿病、HLP 和脂肪肝等疾病的多种药理作用^[15]。有研究报道,小檗碱可直接结合并激活去乙酰化酶 Sirtuin 3 (SIRT3),抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和核因子 (NF)- κ B 信号通路的激活,减轻脂肪组织炎症和纤维化改善脂肪组织重塑,进而抑制巨噬细胞分泌 microRNA-155-5p,减轻肥胖小鼠的肥胖、胰岛素抵抗和肝损伤,为小檗碱通过激活 SIRT3 调节脂肪组织重塑发挥抗 HLP 和抗高血糖作用提供了证据^[16]。

3.1 丝瓜络治疗 HLP 的重要靶点

本研究中丝瓜络防治 HLP 的核心靶点包括 PTGS2、PPAR α 、TNF、IL-6、TP53 等。由于哺乳动物合成胆固醇的唯一途径是甲羟戊酸途径^[17],并且 TP53 又可以抑制甲羟戊酸通路的基因表达^[18],表明 TP53 可以抑制胆固醇合成,对 HLP

的治疗起到一定的影响。PPAR 包括 PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ 3 种亚型,其中 PPAR α 可以通过抑制 HMG-CoA 还原酶的表达,从而降低胆固醇的含量^[19]。炎症反应与 HLP 同样相关联,其可加速肝脏细胞对脂肪的蓄积,而脂肪的大量堆积又可加重炎症反应,激活和增强炎症因子的表达^[20]。机体内重要的炎症因子如 TNF、PTGS2、IL-6 也是导致动脉粥样硬化的一个因素,与 HLP 密切相关,有研究表明高血脂水平会加重血管内壁损伤,引起炎症反应^[21-22]。

3 讨论

HLP 是人类常见的病理学症状之一,其特征是低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) 的增加及高密度脂蛋白胆固醇 (HLD-C) 水平的降低^[13]。有研究表明丝瓜络不仅有抗炎镇痛功效,也可以通过提高低密度脂蛋白受体

的治疗起到一定的影响。PPAR 包括 PPAR $\alpha/\delta/\gamma$ 3 种亚型,其中 PPAR α 可以通过抑制 HMG-CoA 还原酶的表达,从而降低胆固醇的含量^[19]。炎症反应与 HLP 同样相关联,其可加速肝脏细胞对脂肪的蓄积,而脂肪的大量堆积又可加重炎症反应,激活和增强炎症因子的表达^[20]。机体内重要的炎症因子如 TNF、PTGS2、IL-6 也是导致动脉粥样硬化的一个因素,与 HLP 密切相关,有研究表明高血脂水平会加重血管内壁损伤,引起炎症反应^[21-22]。

3.2 丝瓜络治疗 HLP 潜在的分子机制

HLP 的主要病因之一是体内脂质代谢紊乱,导致血清中 TC 和 TG 水平的升高。同时,HLP 又是引起动脉粥样硬化与心血管疾病的原因之一,因此大量靶点富集于脂质与动脉粥样硬化通路。糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路已被证实在 HLP 和血栓形成的发病机制中起关键作用^[23-24]。既往研究表明,高脂肪饮食增加了晚期糖基化终产物 (AGE) 的产生和积累,从而导致氧化应激和脂肪储存的激活^[25]。AGE-RAGE 信号通路在调节巨噬细胞和诱导氧化应激中起关键作用;血糖的升高可刺激 AGE-RAGE 信号通路,增加糖和蛋白质在体内合成 AGE,

通过改变基质与细胞的相互作用,影响血管壁的完整性,促进血管和神经病变的发生发展^[26]。胰岛素抵抗与HLP密切相关,发生胰岛素抵抗时,由于胰岛素靶细胞对胰岛素的敏感性下降,会导致血浆中的血糖升高,而未被机体吸收的多余葡萄糖会被转变成脂肪储存于靶细胞,导致HLP^[27-28]。研究发现小檗碱能明显增加BALB/c小鼠及HIT-T15细胞、3T3-L1细胞和NIT-1细胞的胰岛素分泌^[29],而小檗碱是丝瓜络中的主要活性化合物。

综上所述,本研究结果提示,丝瓜络治疗HLP主要作用于PTGS2、PPAR α 、TNF、IL-6、TP53等核心靶点,通过脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE信号通路及PPAR信号通路等通路协同起到了治疗高脂血症的作用。本研究仅对丝瓜络治疗HLP做了理论分析,存在一定的局限性,如KEGG富集分析结果显示与癌症中的蛋白聚糖、癌症的发病途径等通路具有相关性,缺乏研究支撑,仍需日后进一步验证。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 126-127.
- [2] 关颖, 李菁, 朱伟杰, 等. 丝瓜络对小鼠心肌缺血性损伤的预防效应 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (1): 68-71.
- [3] 潘永勤, 李菁, 朱伟杰, 等. 丝瓜降血脂及抗氧化作用的实验研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24 (5): 873-877.
- [4] 李小玲, 李菁, 朱伟杰, 等. 丝瓜络对高脂血症小鼠 LDL-R 基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25 (6): 1156-1159.
- [5] 田时秋, 李依林, 裴海鸾, 等. 高脂血症发病机制及药物治疗 [J]. 生命的化学, 2022, 42 (12): 2237-2247.
- [6] 叶静, 陆春晖, 沈静, 等. 新疆鼠李果实提取物对高脂血症大鼠调脂及抗氧化作用的研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2053-2058.
- [7] 黄建萍, 井亚江, 王七龙, 等. 基于 LC/GC-MS 和网络药理学探讨大黄-桃仁药对逐瘀泻热的作用机制 [J]. 中南药学, 2024, 22 (4): 892-901.
- [8] 马嘉仪, 杨琰, 张竞研, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析香连丸的化学成分与小鼠体内的入血成分及代谢产物 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40 (5): 510-520.
- [9] 权建野, 杨琳, 邓欣祺, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 和分子网络技术快速鉴定清心解瘀颗粒化学成分 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38 (12): 5709-5722.
- [10] 吴小渊, 俞年军, 邢丽花, 等. UPLC-ESI-QTOF/MS 快速表征鉴定九华黄精的化学成分 [J]. 中南药学, 2024, 22 (5): 1238-1244.
- [11] 刘明娟, 李凯琳, 张敏, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的复方一枝蒿颗粒化学成分快速鉴定 [J]. 中国现代中药, 2024, 26 (3): 507-517.
- [12] 黄梦文, 吴欢, 于伟, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速识别芫玉三龙汤化学成分 [J]. 色谱, 2021, 39 (7): 730-743.
- [13] El-Tantawy WH, Temraz A. Natural products for controlling hyperlipidemia: review [J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125 (2): 128-135.
- [14] 李菁, 付咏梅, 朱伟杰, 等. 丝瓜络对实验性高脂血症小鼠的降血脂效应 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20 (7): 147-149.
- [15] Kong WJ, Vernieri C, Foiani M, et al. Berberine in the treatment of metabolism-related chronic diseases: a drug cloud (dCloud) effect to target multifactorial disorders [J]. Pharmacol Ther, 2020, 209: 107496.
- [16] Li D, Yang C, Zhu JZ, et al. Berberine remodels adipose tissue to attenuate metabolic disorders by activating sirtuin 3 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43 (5): 1285-1298.
- [17] 杨军, 翁若航. 甲羟戊酸激酶缺乏症 [J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33 (1): 18-22.
- [18] Moon SH, Huang CH, Houlihan SL, et al. p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression [J]. Cell, 2019, 176 (3): 564-580.
- [19] 裴帅, 曹宁宁, 李晓璇, 等. 中药干预高脂血症相关信号通路的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45 (1): 177-185.
- [20] 王小刚, 赵娴, 李悦, 等. 高脂血症发病机制及治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22 (12): 196-200.
- [21] Ge ZW, Zhu XL, Wang BC, et al. MicroRNA-26b relieves inflammatory response and myocardial remodeling of mice with myocardial infarction by suppression of MAPK pathway through binding to PTGS2 [J]. Int J Cardiol, 2019, 280: 152-159.
- [22] Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6 [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8 (9): 1237-1247.
- [23] Litwinoff EMS, Del Pozo CH, Ramasamy R, et al. Emerging targets for therapeutic development in diabetes and its complications: the RAGE signaling pathway [J]. Clin Pharmacol Ther, 2015, 98 (2): 135-144.
- [24] Wu XZ, Pan JX, Yu JJ, et al. DiDang decoction improves mitochondrial function and lipid metabolism via the HIF-1 signaling pathway to treat atherosclerosis and hyperlipidemia [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 308: 116289.
- [25] Wu BX, Li CR, Kan H, et al. Hypolipidemic and anti-thrombotic effect of 6'-O-caffeoylarbutin from *Vaccinium dunalianum* based on zebrafish model, network pharmacology, and molecular docking [J]. Molecules, 2024, 29 (4): 780.
- [26] 张栏译, 沈子涵, 齐月, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨血府逐瘀汤加减治疗糖尿病周围神经病变的机制 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (6): 19-26.
- [27] Chang WC, Wu JS, Chen CW, et al. Protective Effect of vanillic acid against hyperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia via alleviating hepatic insulin resistance and inflammation in high-fat diet (HFD) -fed rats [J]. Nutrients, 2015, 7 (12): 9946-9959.
- [28] Zhang SX, Zhang S, Zhang Y, et al. Activation of NRF2 by epiberberine improves oxidative stress and insulin resistance in T2DM mice and IR-HepG2 cells in an AMPK dependent manner [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 327: 117931.
- [29] Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25 (4): 496-502.

(收稿日期: 2024-10-28; 修回日期: 2024-11-29)

中药乌梅组分的制备及其药效物质研究

姜其宝¹, 张庆瑞¹, 李晓格¹, 张晓晓¹, 王浩^{1, 3*}, 姜苗苗^{1, 2*} (1. 天津中医药大学, 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 现代中医药海河实验室, 天津 301617; 3. 天津大学, 天津市脑科学与神经工程重点实验室, 医学工程与转化医学研究院, 天津 300072)

摘要: **目的** 制备乌梅不同组分并进行化学成分鉴定, 评价乌梅不同组分的药效物质基础。**方法** 采用中药提取与制备色谱技术, 制备得到乌梅的特征组分、类组分和精细组分, 结合超高效液相色谱-质谱技术鉴定乌梅不同组分的化学成分, 采用偏最小二乘法分析乌梅不同组分的差异性。**结果** 乌梅制备得到 1 个特征组分、2 个类组分和 20 个精细组分。质谱鉴定得到 38 个化学成分, 其中乙酸乙酯类组分及其精细组分主要包含黄酮类化合物; 正丁醇类组分及其精细组分主要包含有机酸类化合物。偏最小二乘法验证其制备方法使乙酸乙酯类组分、精细组分与正丁醇类组分、精细组分的化学成分得到有效分离。**结论** 所制备的乌梅不同组分存在差异性, 乙酸乙酯类组分及其精细组分主要富集黄酮类化合物; 正丁醇类组分及其精细组分主要富集有机酸类化合物, 为乌梅组分的深入研究和药效评价奠定了基础。

关键词: 乌梅; 组分中药; 有效成分; 超高效液相色谱-质谱技术

中图分类号: R284.1, R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0305-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.003

Preparation of Chinese medicine Fructus Mume components and related pharmacodynamic substances

JIANG Qi-bao¹, ZHANG Qing-rui¹, LI Xiao-ge¹, ZHANG Xiao-xiao¹, WANG Hao^{1, 3*}, JIANG Miao-miao^{1, 2*} (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Component Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 3. *Tianjin University, Tianjin Key Laboratory of Brain Science and Neuroengineering, Institute of Medical Engineering and Translational Medicine, Tianjin 300072*)

Abstract: Objective To prepare and identify the chemical substances of different components of Fructus Mume, and to evaluate the pharmacodynamic material basis of different components of Fructus Mume. **Methods** The characteristic components, class components and fine components of Fructus Mume were prepared by traditional Chinese medicine extraction and preparative chromatography. The chemical components of different components of Fructus Mume were identified by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, and analyzed by partial least squares method. **Results** One characteristic component, two class components and 20 fine components were obtained. Totally 38 chemical components were identified by mass spectrometry, among which the ethyl acetate components and their fine components mainly contained flavonoids. The *n*-butanol components and their fine components mainly contained organic acid compounds. The partial least squares method was used to verify that the preparation method effectively separated the chemical components of ethyl acetate components, fine components and *n*-butanol components, fine components. **Conclusion** Components of the prepared Fructus Mume vary. The ethyl acetate components and their fine components mainly contain flavonoids, while the *n*-butanol components

基金项目: 天津市科技计划项目 (No. 24ZYJDS00300; No. 24ZYJDS00310)。

作者简介: 姜其宝, 男, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物药效基础研究, email: jiangqibao123@163.com *通信作者: 王浩, 男, 研究员, 主要从事小分子药物及超小团簇分子的设计及其在疾病的诊断与治疗中的应用研究, email: hao_wang@tju.edu.cn; 姜苗苗, 女, 研究员, 主要从事中药药效物质和质量控制研究, email: miaomiaojiang@126.com

and their fine components mainly contain organic acid compounds, which lays a foundation for further study and efficacy evaluation of components of Fructus Mume.

Key words: Fructus Mume; Chinese herbal medicine; effective component; ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry

乌梅是经典的药食同源的中药,是蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实。夏季果实近成熟时采收,低温烘干后闷至色变黑。乌梅味酸、涩,性平,归肝、脾、肺、大肠经,能敛肺、涩肠、生津、安蛔,用于肺虚久咳,久泻久痢,虚热消渴,蛔厥呕吐腹痛。乌梅主要化学成分类型为有机酸类、黄酮类和甾醇类,具有抗氧化、抗菌以及抗肿瘤活性^[1-2]。乌梅的药理作用涉及呼吸系统、消化系统、心脑血管系统、骨科系统等,在临床上对溃疡性结肠炎、贫血、支气管哮喘、糖尿病等疾病的治疗发挥了独特的优势和防治作用^[1, 3]。

组分中药是以中医药理论为指导,吸收现代药物研制方法和技术,由有效组分配伍而成的现代中药,是创新中药研究的一种途径。它的核心特征是物质基础和作用机制相对清楚。系统制备得到的中药组分,简化了传统中药的复杂性,系统表征使其物质基础相对清楚。物质基础相对清楚则为进一步探索作用机制提供了重要依据^[4-5]。

本研究通过闪式中压硅胶制备色谱的方式,制备乌梅中药组分;以超高效液相色谱-质谱技术分析中药组分的物质基础,以明确中药的药效物质基础,提高中药的质量可控性;再结合活性成分的药理活性分析,以揭示乌梅不同组分治疗病症的药效物质基础。

1 材料

1.1 试药

乌梅饮片(安徽省泽华国药饮片有限公司,产地浙江,生产日期为2022年2月15日,批号为220201,其执行标准符合《中国药典》2020年版的规定);乙腈和甲醇(色谱纯)、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇(分析纯,天津市康科德科技有限公司);超纯水(Milli-Q纯水器制备)。

1.2 仪器

电热套、CCA-1112A 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),ISO-1SVBiotage 闪式色谱(科技有限公司),SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),高分辨质谱仪 Orbitrap Exploris 120 MS(美国 Thermo Fisher Scientific),

Vortex-2 旋涡混匀仪(上海沪析实业有限公司)、Eppendorf 高速离心机(艾本德中国有限公司),十万分之一天平、万分之一天平(Mettler Toledo, Switzerland),Milli-Q Integral 5 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 乌梅饮片的提取与萃取

将3 kg 乌梅饮片加入10倍量的70%乙醇,回流提取2 h,重复提取2次^[6-8],通过300目滤布过滤,将滤液浓缩,得特征组分(WM)。浓缩后的液体分3次与等体积的乙酸乙酯及水饱和正丁醇分别连续萃取3次,分别获得乙酸乙酯类组分(YSYZ)和正丁醇部位类组分(ZDC),将这些组分冻干处理以备后续分析。

2.2 中药乌梅组分的分离制备

利用闪式中压硅胶制备色谱对乙酸乙酯类组分和正丁醇类组分分段处理。具体步骤如下:每次称取30 g的乙酸乙酯类组分或正丁醇类组分,加入少量甲醇,超声溶解后,与硅胶(100~200目)按1:1比例研磨混匀,用于上样。使用以二氯甲烷溶液充分浸泡的硅胶(200~300目)作为填料。采用梯度洗脱法,流速设定为50 mL·min⁻¹。洗脱系统使用A相(甲醇)和B相(二氯甲烷)混合,流速设定为50 mL·min⁻¹。梯度范围从0%~100%(A相)梯度增加。每30 min 收集一次流分,得到10个精细组分。乙酸乙酯精细组分标记为YSYZ-1至YSYZ-10,正丁醇精细组分标记为ZDC-1至ZDC-10。将收集到的洗脱液浓缩,冻干处理,得精细分离的组分用于后续分析。具体流程见图1。

2.3 乌梅组分的成分鉴定

2.3.1 供试品溶液制备 精密称取70%乙醇提取物的特征组分、乙酸乙酯类组分、正丁醇类组分、乙酸乙酯精细组分和正丁醇精细组分,分别用甲醇配制成质量浓度为1 mg·mL⁻¹的溶液。精密吸取500 μL各溶液,离心,过0.22 μm 滤膜,过滤液即为供试品溶液。

2.3.2 色谱与质谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, Waters);流动

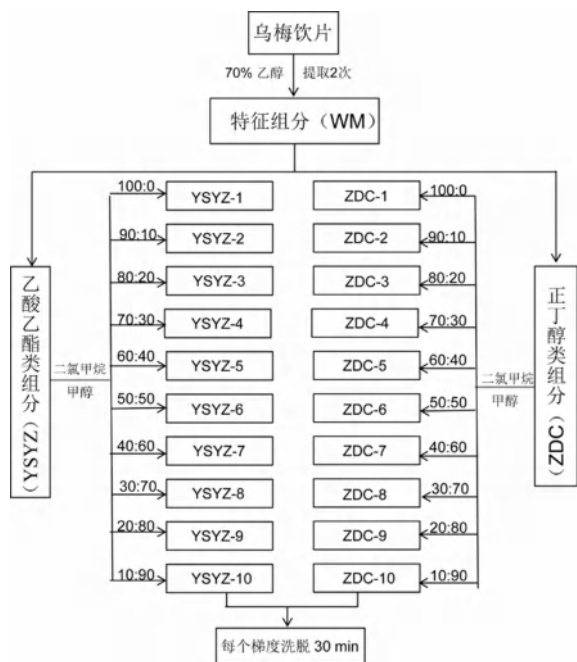


图 1 乌梅特征组分、类组分、精细组分的制备方法
Fig 1 Preparation methods of characteristic components, class components and fine components of Fructus Mume

相: 0.1% 甲酸 - 水溶液 (A), 纯乙腈 (B); 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 95%A; 3 ~ 21 min, 95% ~ 50%A; 21 ~ 25 min, 50% ~ 5%A; 25 ~ 27 min, 5%A); 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积 $2 \mu\text{L}$; 柱温 40°C 。

UHPLC-ESI-Orbitrap-Exploris 系统采用电喷雾离子源正、负离子检测模式。雾化气为氮气; 喷雾电压: 3.5 kV ; 鞘气流量: $35 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 辅助气 (N_2): $10 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 毛细管温度: 320°C ; 辅助器加热温度: 350°C 。一级精确质量数获取采用正负离子全扫描模式, 质量扫描范围: m/z $150 \sim 1500$, 全扫描分辨率 $70\,000 \text{ FWHM}$; 二级碎片图谱获取采用目标离子检测模式, 分辨率 $17\,500 \text{ FWHM}$; 碰撞诱导解离 (HCD) 能量梯度设置为 30 V 、 40 V 、 50 V 。

3 结果

3.1 中药乌梅组分鉴定结果

检索记录单味药材的化学成分信息, 建立以化合物名称、精确分子量、分子式、准分子离子、碎片离子和来源为信息的数据库, 采用 Thermo Scientific Xcalibur 系统分析质谱数据, 根据正、负离子模式下准分子离子峰的精确分子量, 使误差在 $\pm 10 \text{ ppm}$ ($\times 10^{-6}$) 的范围内, 预测可能存在的分子式, 与自建数据库信息匹配进行化合物归属。乌梅中初步鉴定和推导出 38 个成分, 其中包括 18 个有机酸类化合物, 7 个黄酮类化合物以及 13 个其他类化合物, 各组分的总离子流图见图 2、3, 鉴定结果见表 1。

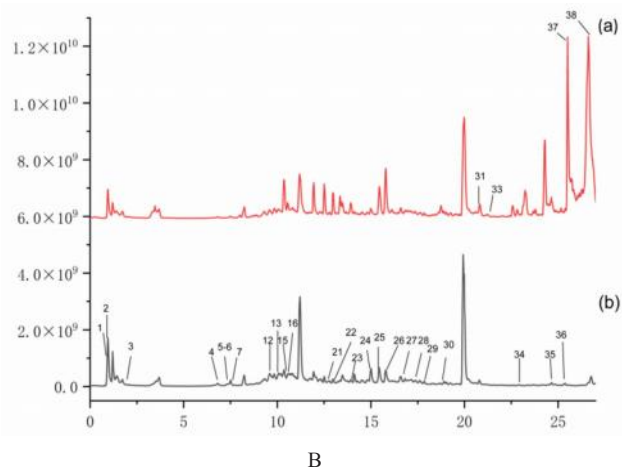
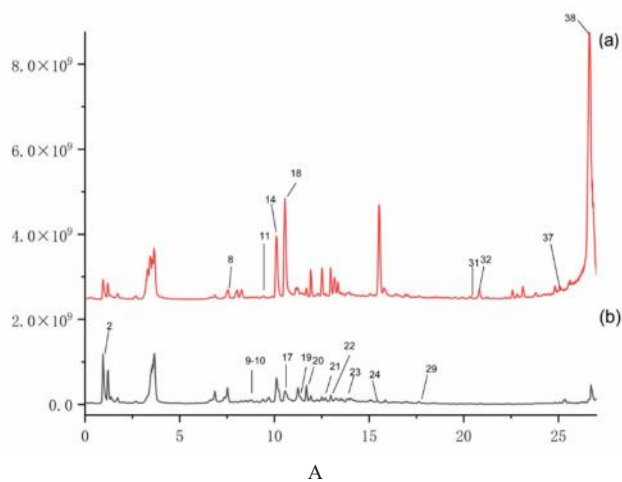


图 2 乌梅乙酸乙酯类组分 (YSYZ)(A) 和正丁醇类组分 (ZDC) (B) 在正 (a)、负 (b) 离子模式下的总离子流图

Fig 2 Total ion current diagram of ethyl acetate fraction (YSYZ)(A) and *n*-butanol fraction (ZDC)(B) of Fructus Mume under positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

通过对乌梅组分在正负离子通道下的总离子流图进行对比, 发现乙酸乙酯类组分 (YSYZ) 中主要含有黄酮类化合物和少量的有机酸类化合物, 而正丁醇类组分 (ZDC) 则以有机酸类化合物和少量的糖苷化合物为主。该结果表明, 不同溶剂的萃取导致了化学组成的差异。通过闪式硅胶制备色谱分离后, 乙酸乙酯精细组分 (YSYZ-1 至 YSYZ-10) 与正丁醇精细组分 (ZDC-1 至 ZDC-10) 之间表现出明显差异。YSYZ-1 ~ YSYZ-6 组分以黄酮类化合物为主, 而 YSYZ-7 ~ YSYZ-10 组分则以黄酮苷类和少量有机酸类化合物为主, 并且这些组分中的化合物种类明显减少。在正丁醇精细组分中, 除了 ZDC-1 组分外, ZDC-2 ~ ZDC-10 含有较丰富的有机酸类化合物, 且随着流动相极性的增加, 有机酸类化合物的种类逐渐减少。

3.2 中药乌梅化合物解析

3.2.1 有机酸类化合物裂解规律 有机酸类化合

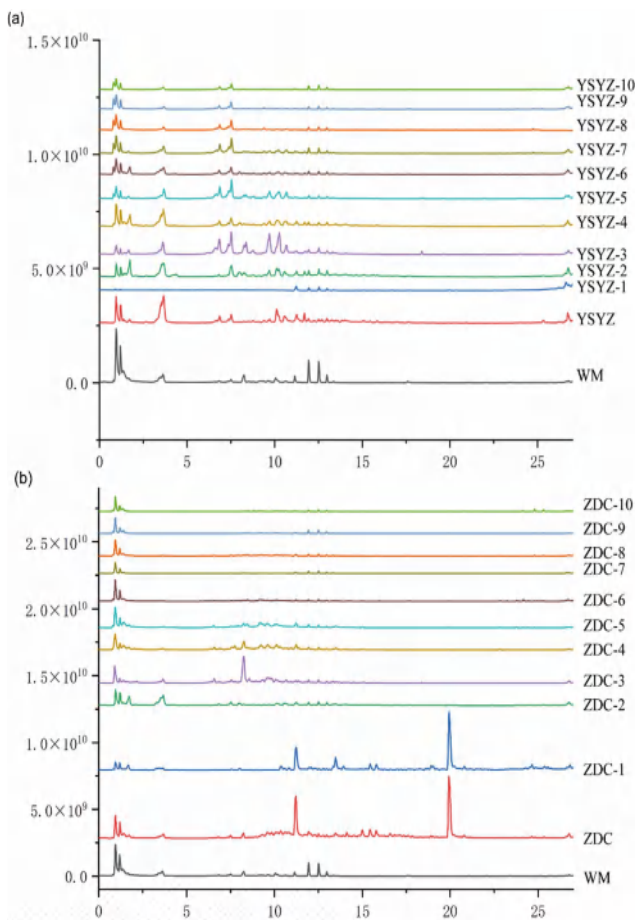


图 3 乌梅乙酸乙酯精细组分 (a) 和正丁醇精细组分 (b) 在负离子模式下的总离子流图

Fig 3 Total ion current diagram of fine component of ethyl acetate layer (a) and of *n*-butanol layer fine components (b) of Fructus Mume in negative ion mode

物的质谱裂解规律通常表现为丢失 H_2O ，以及羰基断裂失去 CO 或 CO_2 。以绿原酸 (化合物 **5**) 为例，在负离子模式下，绿原酸的准分子离子峰为 m/z 353.0889 $[M-H]^-$ ，保留时间为 7.43 min。通过 Xcalibur 软件拟合，其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。串联质谱分析显示， m/z 191.0577 为其特征离子，对应于中性丢失咖啡酰基后产生的奎宁酸分子离子。在二级质谱图中，绿原酸失去奎宁酸部分后产生碎片离子 m/z 191.0577 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ ，进一步丢失一分子 H_2O 得到 m/z 173.0463 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$ ；或者失去咖啡酸部分后，进一步丢失 CO_2 得到碎片离子 m/z 135.0457 $[M-H-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$ 。该化合物的裂解途径与文献报道一致^[9]，鉴定该化合物 **5** 为绿原酸，可能的裂解途径如图 4 所示。

3.2.2 黄酮类化合物裂解规律 乌梅中含有黄酮类成分，其存在方式包括含糖基的黄酮苷和黄酮苷元。其主要质谱裂解途径为糖基的中性丢失形成苷元离子以及苷元离子丢失 CO 和发生 C 环的 RDA 裂解。

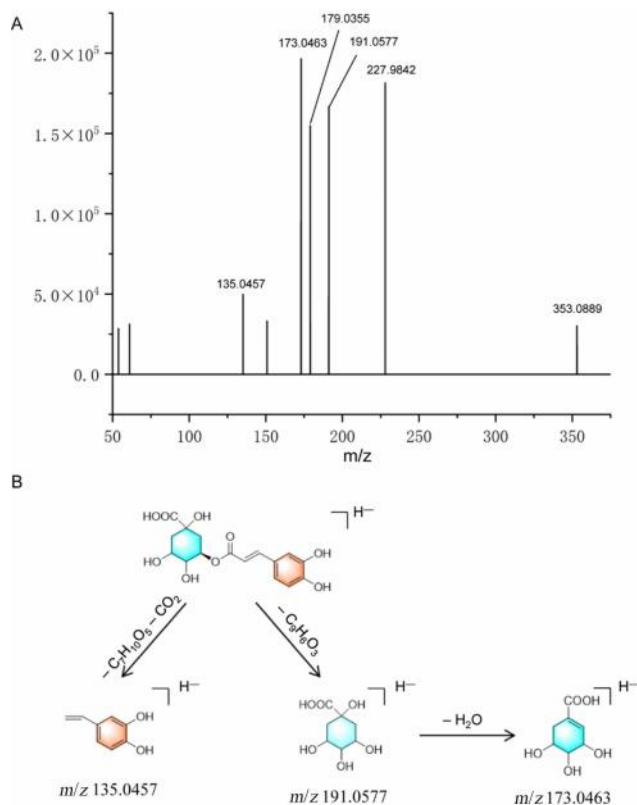


图 4 绿原酸的质谱裂解途径

Fig 4 Fragmentation pathway of chlorogenic acid by mass spectrometry

以芦丁 (化合物 **22**) 裂解过程为例说明，芦丁在负离子模式下可见 m/z 609.1502 $[M-H]^-$ 准分子离子峰，保留时间 12.85 min，通过 Xcalibur 软件拟合，其分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ ，在负离子模式下，芦丁的准分子离子峰可能产生 m/z 301.0359 $[M-C_{12}H_{20}O_9-H]^-$ 碎片离子峰，进一步的碎片裂解途径主要为 RDA 裂解，从而产生 m/z 178.9998 $[C_8H_3O_5]^-$ 、 m/z 151.0049 $[C_7H_3O_4]^-$ 、 m/z 107.0146 $[C_6H_3O_2]^-$ 碎片。结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息以及文献报道^[10]，确定化合物 **22** 为芦丁，可能的裂解途径见图 5。

3.3 基于偏最小二乘法分析乌梅不同组分的差异性

将乌梅组分的化学成分的正负离子峰面积数据分别归一化处理，导入 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA 分析。结果显示，正离子模式下模型的参数为 $R^2X = 0.553$ ， $R^2Y = 0.975$ ， $Q^2 = 0.659$ ，负离子模式下模型的参数为 $R^2X = 0.591$ ， $R^2Y = 0.956$ ， $Q^2 = 0.727$ ，表明该模型拟合效果良好。由图 6 可见，在正负离子模式下，22 个乌梅组分样品被分为两类：乙酸乙酯组分 (YSYZ) 及其精细组分 (YSYZ-1 ~ YSYZ-10) 集中在 X 轴下方和 Y 轴左方，与其他组分有显著区别，结合质谱鉴定结果，表明通过乙酸乙酯萃取可以有效分离出黄酮类化合物；而正丁醇组分 (ZDC) 及其精

表 1 乌梅化合物鉴定结果

Tab 1 Identification of compounds in Fructus Mume

No.	t_R/min	准离子峰 m/z	离子模式	分子式	质量偏差 / $\times 10^{-6}$	鉴定结果	化合物名称	来源
1	0.88	190.0497	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₁ O ₆	7.25	85.0282	奎尼酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-10
2	0.93	191.0201	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	1.95	191.0201, 111.0079	柠檬酸	YSYZ, YSYZ-5 ~ YSYZ-10 ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-10
3	2.08	167.0357	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₄	4.29	167.0357, 80.2747	香草酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-10
4	6.67	353.0889	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.10	353.0889, 191.0577	新绿原酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-9
5	7.43	353.0889	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.10	353.0889, 191.0577, 173.0355, 135.0457	绿原酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-9
6	7.44	179.0359	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	5.13	179.0359, 135.0437	咖啡酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-10
7	7.52	163.0405	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	2.65	163.0405, 147.0439	顺式对香豆酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-8
8	7.62	195.0643	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	- 4.54	195.0643, 163.0381	咖啡酸甲酯	YSYZ, YSYZ-1 ~ YSYZ-10
9	8.62	233.0666	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₄ O ₇	- 0.33	233.0666, 73.0296, 87.0452, 169.0143	柠檬酸三甲酯	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-8
10	8.67	529.1559	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₄	- 0.72	529.1559, 163.0408	3'-O-乙酰基-3-O-对香豆酰基蔗糖	YSYZ, YSYZ-1 ~ YSYZ-5
11	9.67	369.1188	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	2.14	369.1188, 111.0442	5-O-咖啡酰奎宁酸甲酯	YSYZ, YSYZ-3 ~ YSYZ-10
12	9.76	163.0390	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	0.03	163.0390	反式对香豆酸	ZDC, ZDC-3 ~ ZDC-8
13	10.18	269.1029	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₈ O ₆	- 0.60	269.1029, 101.0246, 71.0139	苯甲醇-β-D-吡喃葡萄糖甙	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-4
14	10.32	369.1176	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	- 1.03	369.1176, 163.0392	4-O-咖啡酰奎宁酸甲酯	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-8
15	10.47	341.1090	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.19	341.1090	蔗糖	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-4
16	10.57	175.0616	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₂ O ₃	2.30	175.0616, 157.0511, 133.0508	2-异丙基苹果酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-6
17	10.91	529.1556	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₄	- 1.28	529.1556, 163.0405	6'-O-乙酰基-3-O-对香豆酰基蔗糖	YSYZ, YSYZ-3 ~ YSYZ-6
18	10.94	287.0550	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₀ O ₆	- 0.09	287.0550, 228.0575	山柰酚	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-9
19	11.31	294.0984	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	0.30	294.0984, 214.6985	野黑樱苷	YSYZ, YSYZ-1 ~ YSYZ-6
20	11.42	271.0616	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	1.49	271.0616, 118.0422, 145.0292	柚皮素	YSYZ, YSYZ-1 ~ YSYZ-6
21	12.70	193.0517	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	5.54	193.0517, 149.0602	阿魏酸	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-8 ZDC, ZDC-4 ~ ZDC-6
22	12.85	609.1502	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	5.57	609.1502, 301.0359, 151.0049	芦丁	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-8 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-4
23	13.89	463.0886	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.89	463.0886, 271.0243	异槲皮苷	YSYZ, YSYZ-3 ~ YSYZ-6 ZDC, ZDC-3 ~ ZDC-8
24	14.97	163.0405	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	2.65	163.0405, 118.0424	3-羟基肉桂酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-6
25	15.32	471.3487	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	- 2.51	471.3487	科罗索酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-8
26	15.57	279.2319	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	1.04	279.2319, 146.3327, 96.9598	亚油酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-6
27	16.53	255.2328	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	- 0.60	255.2328, 219.8448	棕榈酸	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-5
28	17.41	289.0721	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₄ O ₆	1.17	289.0721, 179.0358, 125.0240	表儿茶素	YSYZ, YSYZ-1 ~ YSYZ-7 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-6
29	17.68	559.1253	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₁	1.89	559.1253, 449.0881, 191.0559	2β, 3β-环氧-5, 7, 4'-三羟基黄 烷-(4α→8)-表儿茶素	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-5 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-7
30	18.71	857.7394	[M-H] ⁻	C ₅₈ H ₉₈ O ₄	0.19	857.7394, 265.1476,	1, 2-双(γ-生育酚-5-基)乙烷	ZDC, ZDC-4 ~ ZDC-10
31	20.59	153.1286	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O	7.89	153.1286, 135.1180	樟脑	YSYZ, YSYZ-3 ~ YSYZ-7 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-5
32	20.66	301.0375	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₀ O ₇	7.06	301.0375, 151.0023	槲皮素	YSYZ, YSYZ-5 ~ YSYZ-9
33	21.59	209.1190	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	8.51	209.1190, 153.0562, 125.0610	β-细辛脑	ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-6

续表 1

No.	t_R/min	准离子峰 m/z	离子模式	分子式	质量偏差 / $\times 10^{-6}$	鉴定结果	化合物名称	来源
34	21.82	487.3456	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{48}O_5$	5.13	277.9836	积雪草酸	ZDC, ZDC-3 ~ ZDC-5
35	24.89	469.3337	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_4$	2.91	469.3337, 407.3109	甘草次酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-6
36	25.13	455.3557	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{48}O_3$	5.78	455.3557, 290.2343	熊果酸	ZDC, ZDC-1 ~ ZDC-5
37	25.24	457.3703	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{48}O_3$	5.86	411.3657, 457.3703	齐墩果酸	YSYZ, YSYZ-4 ~ YSYZ-8 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-8
38	26.80	277.1780	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{24}O_3$	-6.57	277.1780, 137.0600	6-姜烯酚	YSYZ, YSYZ-2 ~ YSYZ-8 ZDC, ZDC-2 ~ ZDC-6

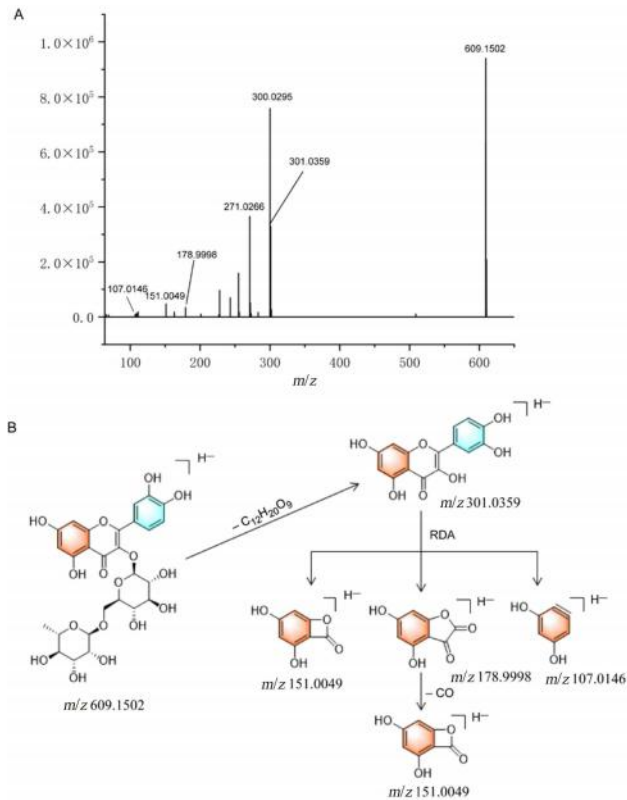


图 5 芦丁质谱裂解途径

Fig 5 Fragmentation pathway of rutin by mass spectrometry

细组分 (ZDC-1 ~ ZDC-10) 集中在 X 轴上方和 Y 轴右方, 结合质谱鉴定结果, 显示这些组分中主要积聚了有机酸类成分。

4 讨论

中药原料的提取、分离、纯化, 以及组分的筛选、获得与表征, 都是中药发展中的关键环节。中药多成分、多环节、多靶点的特点决定了中药的发展必须以整体观为基础, 以组分结构理论的研究为切入点^[11]。结合已报道的有效成分的药理活性分析, 可以阐明中药治疗病症的药效物质基础。

目前, 已经通过体外实验、体内实验和基因组学等手段对乌梅活性成分和药用潜力评估方面取得了一定进展^[12-14]。研究表明, 乌梅有显著的抗炎、神经保护、抗氧化和抗肿瘤活性^[15-16]。有

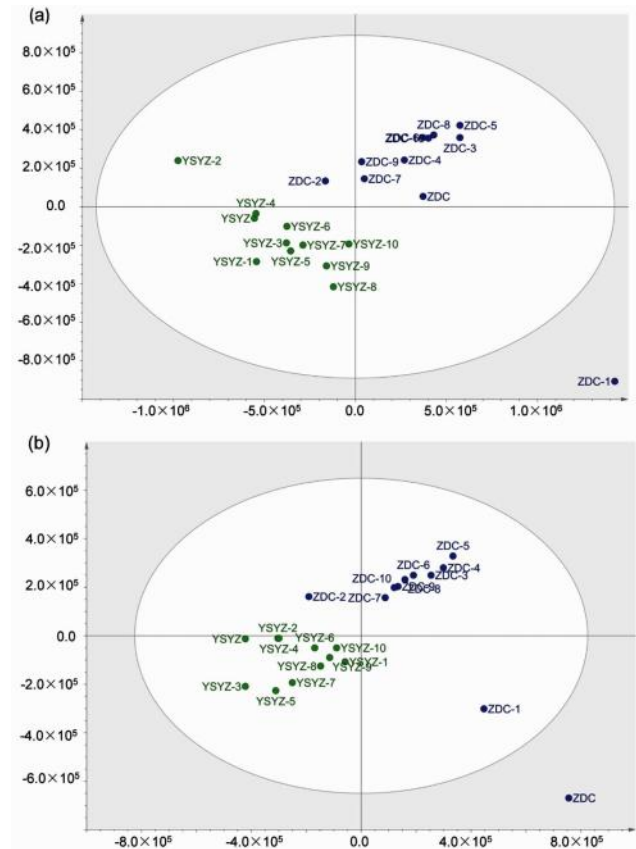


图 6 正离子模式 (a) 和负离子模式 (b) 下乌梅不同组分的 PLS-DA 图

Fig 6 PLS-DA diagram of different components of Fructus Mume under positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

机酸类化合物表现出显著的抗炎活性, 熊果酸被认为是其中的关键活性成分^[17]。此外, 研究发现, 乌梅的提取物中的总有机酸表现出显著的抗氧化能力, 其通过调控 Nrf2/ARE 信号通路, 抑制过量 ROS 的生成, 保护心肌细胞免受损伤^[18-20]。乌梅中的齐墩果酸和熊果酸是天然的抗肿瘤活性成分, 其中齐墩果酸通过提高荷瘤小鼠的 P21 蛋白表达、降低 Ki-67 蛋白表达, 抑制肿瘤细胞的增殖^[20]; 熊果酸则对胃癌细胞 SGC7901 和肺癌细胞 A-549 有明显抑制作用^[21]。潘雨烟等^[22]发现, 乌梅中的槲皮素等成分可通过调

节 TP53、AKT 等靶点, 以及 p53、HIF-1、TNF 等信号通路, 发挥抗直肠癌作用。其他研究表明^[23-24], 乌梅中总黄酮具有神经保护作用, 这种作用主要通过调控线粒体凋亡途径中的相关蛋白表达来实现。

本试验采用闪式中压硅胶制备色谱的方法快速制备乌梅组分, 共制得 1 个特征组分, 2 个类组分和 20 个精细组分。结合液质联用技术鉴定每个组分的化合物组成, 共鉴定出 38 个化合物。通过对乌梅不同组分进行偏最小二乘回归分析法, 结果显示, 特征组分 (WM) 通过组分制备后, 与乙酸乙酯类组分 (YSYZ) 和正丁醇类组分 (ZDC) 能有效地分离, 同时发现, 正丁醇类组分 (ZDC) 及其正丁醇精细组分 (ZDC-1 ~ ZDC-10) 中主要富集有机酸类化合物, 而乙酸乙酯类组分及其精细组分中主要含有黄酮类化合物。通过中药组分制备, 可以实现乌梅药效成分的有效分离。

本研究通过闪式中压硅胶制备色谱, 实现乌梅不同类别的化学成分的有效分离, 利用超高效液相色谱-质谱技术鉴定乌梅各类组分的化学成分, 最后结合乌梅有效成分活性分析, 为乌梅组分的深入研究和药效评价奠定了基础。

参考文献

- [1] 朱月, 袁静, 孙文波, 等. 乌梅药理作用及临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24 (7): 155-159.
- [2] 张文文, 向施, 陈慧, 等. β -谷甾醇对肿瘤的防治作用及其机制研究进展 [J]. 医药导报, 2024, 43 (5): 757-761.
- [3] 代天, 杨萍, 邹勇, 等. 乌梅有机酸对缺氧/复氧心肌细胞氧化应激损伤的影响及其机制 [J]. 现代医学, 2021, 49 (1): 28-33.
- [4] 张俊华, 樊官伟, 张哈, 等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (21): 4054-4058.
- [5] Wang Y, Fan XH, Qu HB, et al. Strategies and techniques for multi-component drug design from medicinal herbs and traditional Chinese medicine [J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12 (12): 1356-1362.
- [6] 韩立峰. 中药组分库构建关键技术的建立 [M]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [7] 薄晓玮, 杨志萍, 綦国红. 乌梅有机酸提取条件优化及其对生物膜形成的抑制作用 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59 (13): 118-122.
- [8] 陈志良, 刘聪, 廖自文, 等. 紫花地丁总黄酮的提取工艺及抗炎作用研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (11): 5051-5063.
- [9] 李冉, 齐芪, 李赟, 等. HPLC-MS/MS 检测杜仲中绿原酸等 4 种活性成分的分析方法 [J]. 北京林业大学学报, 2016, 38 (6): 123-129.
- [10] 王常麟, 高明周, 郭英慧, 等. 芦丁在大鼠体内的代谢产物鉴定与代谢途径分析 [J]. 山东科学, 2023, 36 (5): 9-18.
- [11] 张紫叶, 任晓亮, 王萌. 组分中药生物药剂分类学研究进展 [J]. 中成药, 2024, 46 (6): 1914-1921.
- [12] 管志伟. 加味人参乌梅汤调控腹泻大鼠肠道菌群结构和功能的宏基因组学研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [13] 赵慧芳. 基于 PD-L1/PD-1 通路乌梅丸治疗结直肠癌的作用机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [14] 潘海敏, 许洪玲, 陈哈, 等. 黄连乌梅提取物联合使用抑制脂多糖诱导的细胞炎症反应及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40 (3): 42-48.
- [15] 杨亚焱, 王瑞, 钱程程, 等. 乌梅化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中成药, 2023, 45 (5): 1583-1588.
- [16] 张君成, 梁华, 王燕, 等. 乌梅药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23 (8): 122-126.
- [17] Sheng QS, Li F, Chen GP, et al. Ursolic acid regulates intestinal microbiota and inflammatory cell infiltration to prevent ulcerative colitis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 6679316.
- [18] 邓婉婷, 管淑玉, 李瑶, 等. 乌梅总有机酸的提取优化工艺及其抗氧化活性研究 [J]. 广东药学院学报, 2015, 31 (2): 171-175.
- [19] 杨莹菲, 胡汉昆, 刘萍, 等. 乌梅化学成分、临床应用及现代药理研究进展 [J]. 中国药师, 2012, 15 (3): 415-418.
- [20] 曾文彬, 李铭杰, 朱秋花, 等. 齐墩果酸对荷淋巴瘤小鼠的抑瘤作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (18): 2865-2868.
- [21] 陈伟妍, 刘春英. 熊果酸对胃癌细胞株 MGC-803 凋亡和自噬的调控及其作用机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26 (6): 638-643.
- [22] 潘雨烟, 罗梦雪, 方霜霜, 等. 基于网络药理学的乌梅抗结直肠癌机制研究 [J]. 海南医学院学报, 2021, 27 (14): 1084-1090.
- [23] 文晓东, 王春玲, 罗宁, 等. 乌梅总黄酮对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 miR-145-3p/CREB5 轴的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2024, 41 (7): 922-928.
- [24] 文晓东, 王春玲, 蒋媛静, 等. 乌梅总黄酮调控 miR-145-3p 表达对 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2023, 49 (6): 1415-1423.

(收稿日期: 2024-10-07; 修回日期: 2024-11-07)

研究论文

欣力康胶囊抗结肠癌及增强机体免疫功能的作用研究

皇苏州¹, 张旭哲¹, 吕高虹¹, 吴丽¹, 陈志鹏¹, 张丽娜², 赵倩², 刘馨^{3*} (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200000; 3. 苏州市立医院药学部, 江苏 苏州 215002)

摘要: **目的** 探讨欣力康胶囊抗结肠癌及增强机体免疫功能的作用。**方法** CCK-8 法检测欣力康胶囊含药血清对结肠癌 MC-38 细胞活力的影响。采用皮下接种 MC-38 细胞的方法建立结肠癌皮下荷瘤小鼠模型, 治疗组在造模后给予不同剂量欣力康胶囊 (0.675、1.35、2.7 g · kg⁻¹) 或阳性对照药物 PD-1 抑制剂 (10 mg · kg⁻¹) 进行干预, 连续 17 d。动态观察不同组别荷瘤小鼠皮下瘤体积变化情况; HE 染色法观察肿瘤的组织病变情况; ELISA 法测定各组小鼠血清中干扰素 (IFN) - γ 、白细胞介素 (IL) -10、转化生长因子 (TGF- β) 水平; 流式细胞术检测外周血中 CD4⁺T、CD8⁺T 和 Treg 细胞的比例。**结果** 在体外细胞实验中, 与空白对照组比较, 20% 欣力康胶囊含药血清能显著抑制 MC-38 细胞活力 ($P < 0.05$)。在整体动物实验中, 与模型组比较, 欣力康低、中、高剂量组均能显著降低肿瘤体积 ($P < 0.05$); 病理检测结果显示, 欣力康能增加肿瘤组织中的细胞坏死面积, 减少细胞核分裂, 其中以欣力康中剂量组效果最好; 此外, 欣力康中、高剂量组能显著降低小鼠血清中 TGF- β 水平 ($P < 0.05$)、升高 IFN- γ 水平 ($P < 0.01$); 中剂量组还能降低 IL-10 水平 ($P < 0.01$); 流式细胞术结果显示, 欣力康中、高剂量组能降低小鼠外周血 CD8⁺T、Treg 细胞水平, 升高 CD4⁺T 细胞水平 ($P < 0.05$)。**结论** 欣力康胶囊能够发挥抗结肠癌作用以及调节免疫细胞比例, 增强机体免疫功能。

关键词: MC-38; 欣力康胶囊; CD4⁺/CD8⁺; Treg 细胞; 细胞因子

中图分类号: R967, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0305-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.004

Effect of Xinlikang capsules on anti-colon cancer and enhancing immune function

HUANG Su-zhou¹, ZHANG Xu-zhe¹, LYU Gao-hong¹, WU Li¹, CHEN Zhi-peng¹, ZHANG Li-na², ZHAO Qian², LIU Xin^{3*} (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. Shanghai Haitian Medical Technology, Shanghai 200000; 3. Department of Pharmacy, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou Jiangsu 215002)

Abstract: Objective To determine the anti-colon cancer mechanism of Xinlikang capsules in regulating the immune function. **Methods** CCK-8 assay was used to detect the effect of XLK capsule-containing serum on MC-38 cell viability. Subcutaneous inoculation of MC-38 cells was used to establish a tumor-bearing mouse model of colon cancer. The treatment group was given different doses of Xinlikang capsule (0.675, 1.35 and 2.7 g · kg⁻¹) or positive control drug PD-1 inhibitor (10 mg · kg⁻¹) after the modelling, the drugs being administered for 17 consecutive days. We dynamically observed the subcutaneous tumor volume changes in different groups of mice. HE staining was used to observe the histopathology of tumors; while ELISA to determine the serum levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10) and

基金项目: 国家自然科学基金 (No.81873287); 江苏省中医药科技发展计划重点项目 (No.ZD202306); 南京中医药大学校级课题 (No.012009230092)。

作者简介: 皇苏州, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: huangsuzhou0414@163.com ***通信作者:** 刘馨, 男, 主任药师, 主要从事医院药学和静脉用药调配管理方面的研究, email: arron_liu@163.com

transforming growth factor- β (TGF- β), in each group. Flow CytoMetry detected the ratio of CD4⁺ T, CD8⁺ T and Treg cells in the peripheral blood. **Results** In the in vitro cellular assay, the viability of MC-38 cells was significantly inhibited by 20% Xinlikang-containing serum compared with that of the blank control group ($P < 0.01$). In the whole-animal assay, compared with the model group, Xinlikang low-dose, medium-dose, and high-dose groups greatly reduced the volume of tumors ($P < 0.05$). Pathology showed that Xinlikang increased the necrotic area of cells in the tumor tissues and reduced the division of cell nuclei, among which the Xinlikang middle-dose group had the best effect. In addition, the middle-dose and high-dose groups of Xinlikang significantly reduced the serum level of TGF- β in the mice ($P < 0.05$), and elevated the level of IFN- γ ($P < 0.01$); the middle-dose group also reduced the level of IL-10 ($P < 0.01$). The Flow CytoMetry showed that the middle-dose and high-dose groups of Xinlikang both reduced the levels of peripheral blood CD8⁺ T and Treg cells and increased the level of CD4⁺ T cells in the mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Xinlikang capsules play an anti-colon cancer role and enhance the body's immune function by regulating the proportion of immune cells.

Key words: MC-38; Xinlikang capsule; CD4⁺/CD8⁺; Treg cell; cytokine

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤，每年新发病例高达 120 万，死亡病例约为 60 万人，分别占全球恶性肿瘤发病率、死亡率的第 3 位、第 5 位^[1-2]。

免疫系统在肿瘤的发生和发展中扮演着重要角色，同样，结肠癌的发生发展与肿瘤免疫微环境密切相关，抑制性的免疫微环境给肿瘤细胞提供了合适的生存环境，助其生长和转移。辅助性 T 细胞是机体免疫反应和免疫调节的中心细胞，参与了结肠癌发生发展的所有阶段，包括抑制肿瘤生长的免疫细胞（CD8⁺ T 细胞）和促进肿瘤生长和转移的免疫细胞（Treg 细胞），其中 Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞中重要的组成部分^[3]。此外，细胞因子白细胞介素（IL）-10 和转化生长因子（TGF）- β 的表达能够促进辅助性 Treg 细胞聚集，发挥免疫抑制功能；而干扰素（IFN）- γ 能够激活 NK 和巨噬细胞等免疫细胞，诱导肿瘤细胞凋亡^[4-5]。值得注意的是，常用的化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时亦致机体免疫力降低，且毒副作用较大^[6]。因此，寻找低毒有效的药物来调节机体免疫功能是防治结肠癌的重要策略。

中医药是结肠癌综合治疗的重要组成部分，其在抑制肿瘤生长、调节机体免疫功能、减少放化疗毒性、提高患者生活质量等方面均发挥着重要的作用^[7-9]。欣力康胶囊（Xinlikang capsule）是由半枝莲、黄芪、当归、龙葵、郁金、红参、蛇莓、雪莲花、轮环藤根、丹参等 10 味中药组成的中成药，具有补气养血、化瘀解毒等功效，临床主要用于癌症放化疗的辅助治疗。多项研究表明，方中黄芪、当归、红参、丹参等的免疫调节功效明确^[10-11]，但是否是欣力康胶囊辅助抗肿瘤的关键机制，目前尚不明确。本研究通过体内外

实验研究欣力康颗粒能否发挥抗结肠癌的作用以及是否可以增强癌症患者机体免疫功能。

1 材料

1.1 仪器

ECLIPSE Ts2 型光学显微镜（中国尼康映像仪器销售有限公司）；BB150 型二氧化碳培养箱、Micro CL21R 型高速冷冻离心机（中国赛默飞世尔科技有限公司）；30002 型电子天平（十万分之一，杭州友恒称重设备有限公司）；Synergy HI 型多功能微孔板检测仪（美国伯腾仪器有限公司）。

1.2 试药

欣力康胶囊 [每粒装 0.45 g（相当于饮片 3.03 g），批号：Z20080623，贵阳新天药业股份有限公司]；Cell Counting Kit-8（上海碧云天生物技术股份有限公司）；PD-1 抑制剂（RMP1-14）（批号：312299，美国 Med Chem Express 生物科技公司）；IL-10、TGF- β 、IFN- γ 酶联免疫检测试剂盒（上海源桔生物科技中心）；PE 标记的抗小鼠 Foxp3 抗体（批号：12-5773-82）、EF780 可固定活性染料（批号：2752776）（美国 eBioscience 公司）；APC 标记的抗小鼠 CD3 抗体（批号：B402451）、PE 标记的抗小鼠 CD8a 抗体（批号：B373965）、APC 标记的抗小鼠 CD25 抗体（批号：B412136）、FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体（批号：B390602）（美国 BioLegend 公司）。

1.3 细胞与动物

小鼠结肠癌 MC-38 细胞（批号：BC-C-MI-001，南京生航生物技术有限公司），于含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养，培养条件为 5%CO₂、37℃ 恒温培养箱。细胞长至对数生长期时传代。

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只, 体重 (200 ± 20) g [江苏青龙山生物科技有限公司, 生产许可证编号: SCXK (苏) 2024-0001]。所有动物饲养在南京中医药大学 SPF 级实验动物中心。实验方案及规程符合南京中医药大学动物实验伦理委员会审查标准, 批准编号: 202404A037。

6 周龄 SPF 雄性 C57BL/6 小鼠 60 只 [北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006]。在 SPF 级动物房饲养, 温度 22 ~ 24 °C, 湿度 45% ~ 80%, 开展实验前适应性喂养 7 d。实验方案及规程符合南京中医药大学动物实验伦理委员会审查标准, 批准编号: 202309A073。

2 方法

2.1 欣力康含药血清制备

SD 大鼠按随机数字表将大鼠分为欣力康组与空白组。欣力康组大鼠灌胃给予 1.42 g · kg⁻¹ 欣力康胶囊内容物混悬液 (此剂量相当于成人临床等效剂量的 2 倍, 成人按 60 kg 体重计), 正常对照组大鼠灌胃给予等体积生理盐水。每日 1 次, 连续 7 d^[9]。大鼠末次给药 2 h 后, 2% 戊巴比妥钠溶液 (45 mL · kg⁻¹) 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取尽全血。室温放置 1 h, 3500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清后, 置于 56 °C 水浴锅中灭活 30 min, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 于 -80 °C 冻存备用。

2.2 CCK-8 法检测欣力康含药血清对 MC-38 细胞活力的影响

精密吸取欣力康含药血清, 用 DMEM 高糖培养液以及空白血清充分稀释, 制备欣力康含药血清体积分数为 2.5%、5%、10%、20% 的含药血清溶液, 0.22 μm 滤膜过滤后使用。

取对数生长期 MC-38 细胞, 以 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹ 浓度接种于 96 孔板, 每孔约 100 μL。待细胞贴壁 6 h 后, 分别加入不同体积分数的含药血清, 培养 24 h 后每孔中加 CCK-8 试剂 10 μL; 空白组为无细胞组, 只有空白培养基作为对照; 空白对照组为未进行给药的细胞组, 为细胞活力的对照组。孵育 1 h 后于 450 nm 波长处检测 OD 值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 (%) = (给药组 OD - 空白组 OD) / (空白对照组 OD - 空白组 OD) × 100%

2.3 整体动物分组、造模及给药

采用随机数字法将小鼠分为空白组, 模型组, 欣力康低、中、高剂量组, 阳性给药组, 共 6 组, 每组 10 只。除空白组外, 其他组小鼠右前肢皮下接种 MC-38 细胞悬液 (浓度为 1 × 10⁷ 个 · mL⁻¹), 接种体积 0.15 mL, 制备结肠癌荷瘤小鼠模型; 空白组小鼠在同样部位皮下注射等

量的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液。

造模成功后, 空白组小鼠和模型组荷瘤小鼠每日灌胃给予生理盐水; 给药组每日灌胃给予欣力康胶囊内容物的混悬液 (0.675、1.35、2.7 g · kg⁻¹), 连续给药 17 d; 阳性给药组腹腔注射给予 PD-1 抑制剂 (10 mg · kg⁻¹)^[12], 每周 2 次, 现配现用。

2.4 小鼠生长状况与皮下成瘤情况

观察各组小鼠饮食情况和精神活动状态, 记录各组荷瘤小鼠体重并测量其肿瘤体积, 绘制体重变化曲线与瘤体积变化曲线。在实验结束后, 处死各组小鼠并解剖, 检测瘤体积和瘤重。肿瘤体积: $V = 0.5 \times \text{肿瘤长径} \times (\text{与长径垂直的短径})^2$ 。

2.5 伊红 - 苏木素染色法 (HE) 检测肿瘤组织病理变化

实验结束后, 分离肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定, 24 h 后, 行脱水透明、包埋、修整、切片。待切片干燥后, 石蜡切片脱蜡至水, 苏木素染色, 伊红染色, 脱水封片后, 显微镜镜检, 采集图像进行分析。

2.6 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测各组小鼠血清中 IL-10、TGF-β、IFN-γ 水平

按 ELISA 试剂盒说明书操作, 设置对照品孔和样品孔, 检测各组小鼠血清中 IL-10、TGF-β、IFN-γ 水平。

2.7 流式细胞术检测小鼠外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 和 Treg 细胞水平

获得外周血全血样本, 使用红细胞裂解液进行裂解, 按照说明书操作。检测小鼠外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞水平时, 制备全血样本后进行 fvd-ef 780 死活染色和分别加入适量体积的细胞表面标记物偶联抗体 CD3-APC、CD4-FITC、CD8-PE 进行表面抗原染色, 以适当体积的缓冲液重悬细胞后, 流式细胞仪分析样本。检测外周血中 Treg 细胞水平, 进行死活染色后, 依次加入适量体积的细胞表面标记物偶联抗体 CD4-FITC、CD25-APC 进行表面抗原染色, 再加入 Foxp3 固定破膜液进行破膜, 加入抗体 Foxp3-PE 进行染色。

2.8 数据处理及统计分析

使用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 9 软件进行数据处理和统计图的制作, 统计的数据均采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据间的比较使用 *t* 检验, 多组间数据的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 欣力康含药血清对 MC-38 细胞活力的影响

CCK-8 法检测细胞活力, 结果显示, 与空白对照组比较, 20% 欣力康含药血清能显著抑制 MC-38 细胞活力 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 CCK-8 法检测各组 MC-38 细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 The viability of MC-38 cells in each group detected by CCK-8 method ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD 值	抑制率/%
空白对照组	1.020 ± 0.013	—
2.5% 欣力康含药血清	1.004 ± 0.037	2.57
5% 欣力康含药血清	0.949 ± 0.073	5.46
10% 欣力康含药血清	0.942 ± 0.102	6.98
20% 欣力康含药血清	0.831 ± 0.089*	16.58

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

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

表 2 第 17 日时欣力康胶囊对荷瘤小鼠瘤体积及瘤重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 2 Effect of Xinlikang capsules on tumor volume and tumor weight in of tumor-bearing mice on day 17 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	瘤体积 / mm^3	瘤体积抑制率 / %	瘤重 / g	瘤重抑制率 / %
模型组		1313.59 ± 58.06		1.460 ± 0.241	
欣力康低剂量组	0.675	1094.63 ± 53.12	16.67*	0.488 ± 0.076	66.58*
欣力康中剂量组	1.35	844.65 ± 46.82	35.70*	0.410 ± 0.043	71.92*
欣力康高剂量组	2.7	1023.79 ± 65.05	22.99*	0.752 ± 0.078	48.49*
阳性给药组	0.01	522.27 ± 25.73	60.24*	0.232 ± 0.046	84.11*

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

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

3.3 HE 染色观察肿瘤组织的病变情况

HE 染色组织病理变化如图 2 所示, 模型组小鼠肿瘤细胞排列紧密, 胞核深染, 细胞大小参差不齐且形态不规则, 细胞核分裂较常见, 提示肿瘤细胞处于快速增殖阶段。与模型组比较, 各给药组肿瘤组织内坏死面积增多, 细胞排列变稀疏, 细胞核分裂象减少, 亦有空泡坏死, 其中中剂量组效果最好, 疗效与阳性给药组类似, 表明欣力康胶囊对 MC-38 荷瘤小鼠皮下瘤的生长具有抑制作用。

3.4 欣力康胶囊对结肠癌荷瘤小鼠血清中 IFN- γ 、TGF- β 、IL-10 水平的影响

细胞因子水平结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清中 IFN- γ 水平显著降低, IL-10、TGF- β 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 欣力康低、中、高剂量组均能显著降低 TGF- β 水平 ($P < 0.05$)、升高 IFN- γ 水平 ($P < 0.01$); 中剂量组还能显著降低 IL-10 水平 ($P < 0.01$); 阳性给药组均能降低 TGF- β 、IL-10 水平以及升高 IFN- γ 水平 ($P < 0.01$), 见图 3。

3.5 欣力康胶囊对结肠癌荷瘤小鼠外周血中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞水平的影响

实验结束后取血, 肝素抗凝, 获得外周血全血样本, 检测 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞水平。结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠外周血中的 CD4⁺T 细胞水平、CD4⁺/CD8⁺ 的比例显著降低,

3.2 欣力康胶囊对结肠癌小鼠肿瘤生长情况的影响

在实验过程中, 动态观察肿瘤的生长情况, 结果显示, 与模型组比较, 欣力康中剂量组在给药第 7 日时能显著抑制 MC-38 皮下瘤长势 (见图 1A, $P < 0.05$); 欣力康低、高剂量组在第 11 日能显著抑制肿瘤生长 (见图 1A, $P < 0.05$), 抑制效果一直延续到实验结束。实验结束后取瘤组织, 拍照称重 (见图 1B), 结果提示, 与模型组比较, 低、中、高剂量组及阳性给药组的肿瘤质量均显著减少 (见表 2, $P < 0.05$)。值得注意的是, 分别由肿瘤体积和肿瘤质量计算的肿瘤抑制率, 其中欣力康中剂量组的抑瘤效果均最好 (见表 2)。

CD8⁺T 细胞水平显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 欣力康中、高剂量组和阳性给药组小鼠外周血中 CD4⁺T 细胞水平、CD4⁺/CD8⁺ 的比例显著提高, CD8⁺T 细胞水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 4。

3.6 欣力康胶囊对结肠癌荷瘤小鼠外周血中 Treg 细胞水平的影响

结果如图 5 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠外周血中 Treg 细胞水平显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 欣力康低、中、高剂量组小鼠外周血中 Treg 细胞水平显著降低 ($P < 0.05$), 阳性给药组小鼠外周血中 Treg 细胞水平也显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

结肠癌归属于中医学“积聚”“肠积”“锁肛痔”等病症范畴, 正气不足、脾肾功能失调为主要病机, 并常伴有湿热、瘀毒等证候, 故治疗以补益脾气、滋阴生津、清热为主^[13]。本研究的体内外实验结果均显示, 欣力康能显著抑制 MC-38 细胞增殖以及抑制荷瘤小鼠肿瘤组织的生长, 同时能降低血清中 IL-10、TGF- β 水平和升高 IFN- γ 水平, 对结肠癌具有较好的疗效。

欣力康辅助治疗肿瘤已有多年临床经验, 在前期临床研究中也发现, 欣力康给药后, 肿瘤患者在 NK、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺

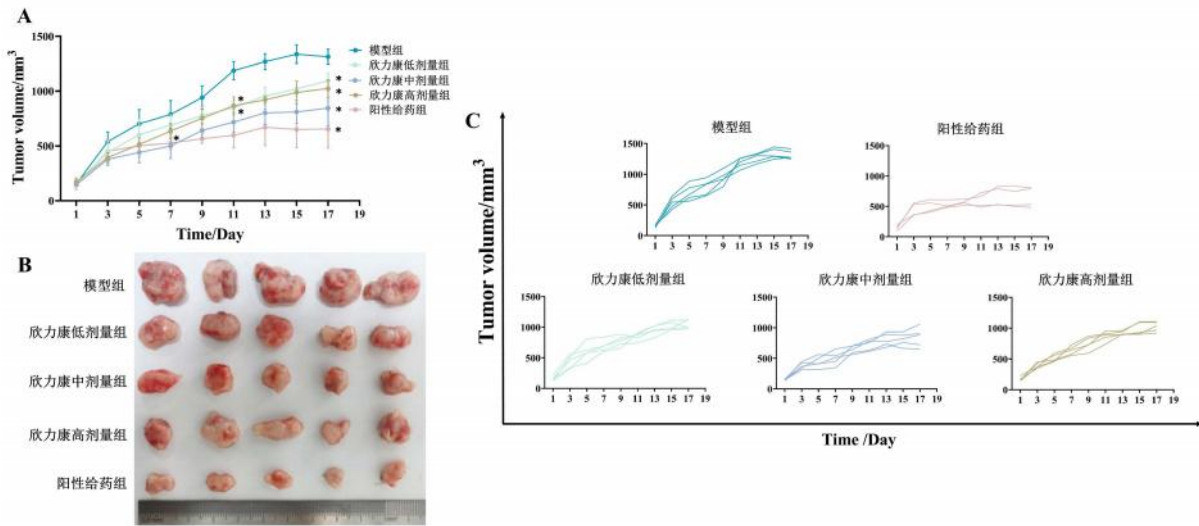


图 1 欣力康胶囊对荷瘤小鼠肿瘤生长情况 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig 1 Effect of Xinlikang capsule on the tumor growth in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A. 各组荷瘤小鼠肿瘤生长情况 (tumour growth in various groups of tumor-bearing mice); B. MC-38 肿瘤标本 (tumour tissue mass in tumor-bearing mice); C. 各组单只荷瘤小鼠肿瘤生长情况 (tumour growth in single tumor-bearing mice in each group)

注: 与模型组比较, $^*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the model group, $^*P < 0.05$.

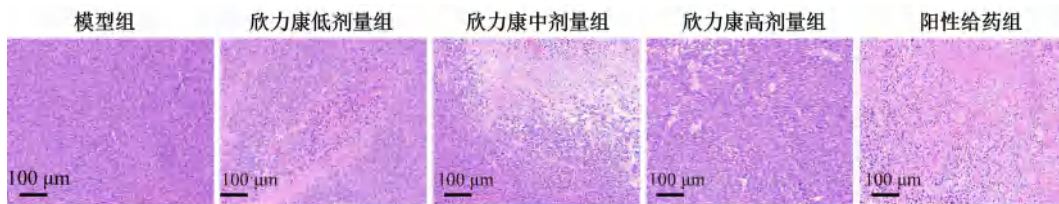


图 2 欣力康胶囊对各组荷瘤小鼠肿瘤的组织病理变化 ($\times 40$)

Fig 2 Effect of Xinlikang capsule on the histopathological changes of tumours in various groups of tumor-bearing mice ($\times 40$)

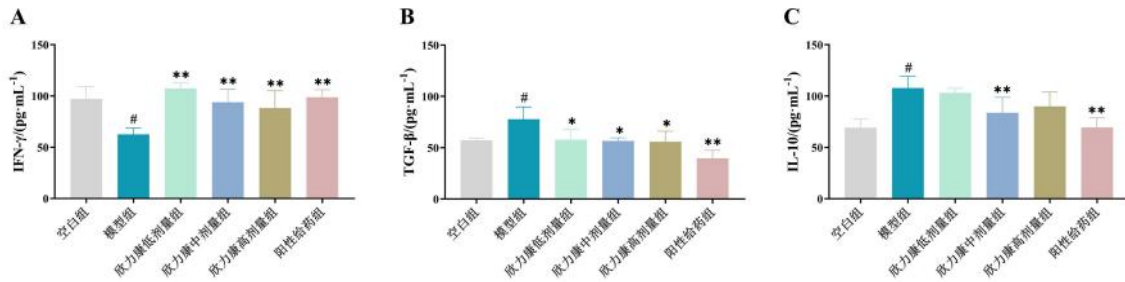


图 3 欣力康胶囊对各组小鼠血清中 IFN- γ 、TGF- β 和 IL-10 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig 3 Effect of Xinlikang capsule on the serum levels of IFN- γ , TGF- β and IL-10 in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注: 与空白组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

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

各方面均比治疗前显著提高, 提示欣力康可以显著改善和稳定肿瘤患者的免疫功能^[14-15]。复方具有多成分多靶点的特性, 因此在本研究中, 主要关注体内环境。淋巴细胞是抗肿瘤免疫的重要组成部分, 影响多种癌症的生长或转移^[16-17]。其中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞是结肠癌患者预后良好的主要指标。CD4⁺T 细胞的表达水平降低时, 机体抗肿瘤能力降低^[18]。Treg 细胞是 CD4⁺T 细胞的重要亚型, 主要通过分泌抑制性细胞因

子 TGF- β 和 IL-10, 抑制多种免疫细胞活性, 是结肠癌患者体内促肿瘤免疫状态的一个效应指标^[19]。CD8⁺T 细胞是抗肿瘤免疫的重要效应细胞, 当 CD4⁺/CD8⁺ 比值较低时, 机体的免疫系统的功能会受到抑制, 为肿瘤的迅速生长、转移以及继发感染等病理过程创造了条件^[20]。本研究发现, 欣力康在升高 CD4⁺/CD8⁺ 同时, 降低 Treg 细胞水平。提示欣力康胶囊可以改善体内免疫细胞因子的比例, 抑制促肿瘤的 T 调节细胞、

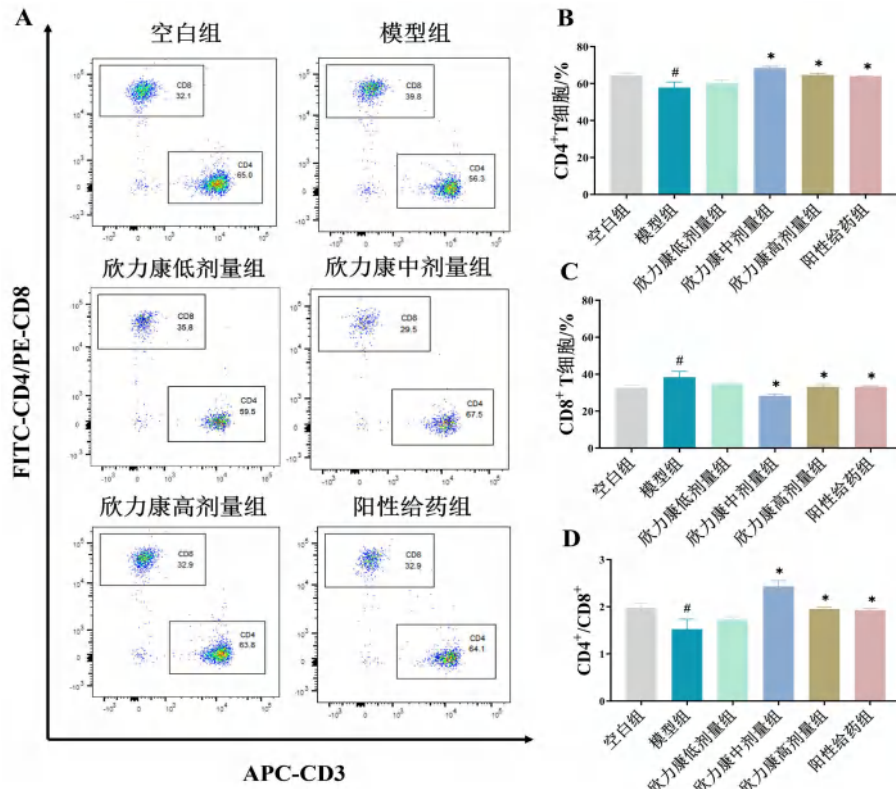


图 4 欣力康胶囊对各组小鼠外周血中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 4 Effect of Xinlikang capsule on the levels of CD4⁺T and CD8⁺T cells in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与空白组比较，[#]*P* < 0.05；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05。

Note: Compared with the blank group, [#]*P* < 0.05; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05.

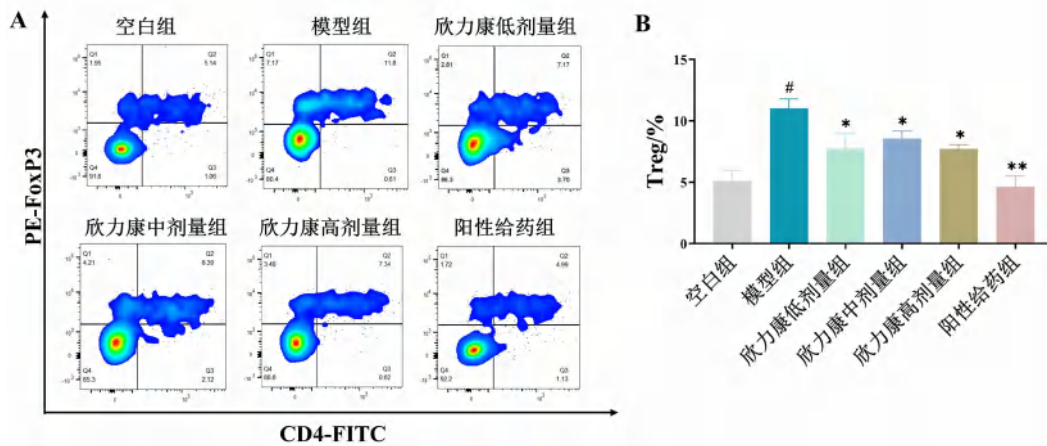


图 5 欣力康胶囊对各组小鼠外周血中 Treg 细胞水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 5 Effect of Xinlikang capsule on the Treg cell levels in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与空白组比较，[#]*P* < 0.05；与模型组比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

Note: Compared with the blank group, [#]*P* < 0.05; compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

调节机体免疫稳态，抑制肿瘤的生长。此外，本研究中结肠癌小鼠中的 CD8⁺T 细胞的表达水平升高，这与侯爱图等^[21]以及蒋星^[22]的研究一致，但也有研究表明 CD8⁺T 细胞的存在可以限制肿瘤的生长和扩散，通过杀死肿瘤细胞和释放细胞因子来抑制肿瘤细胞的增殖和转移^[23-24]。这与前期开展的临床回顾性研究的结果基本一致^[14-15]。

前期研究表明欣力康胶囊可以通过抑制 NF-κB 信号通路抑制血液肿瘤细胞的增殖能力^[25]，但是否也通过此信号通路发挥抗结肠癌的作用还未可知。大量文献证明，天然黄酮类化合物可通过影响免疫细胞的活性参与肿瘤等相关疾病的发生与进展，如黄芪多糖以及当归多糖成分可以下调炎症因子 IL-6 等的表达，减轻炎症反应^[26-27]。结合本研究结果，

推测欣力康胶囊可能通过增强机体免疫功能发挥抗肿瘤作用。在后续的研究中,本课题组将继续深入探讨欣力康胶囊对免疫系统的调节以及抗癌效果,以期提供更强有力的证据来支持现有的结论。

综上所述,欣力康胶囊可抑制结肠癌细胞的增殖以及肿瘤的生长,并且可以通过调节机体免疫功能,影响肿瘤免疫微环境,研究结果可为其治疗结肠癌的临床应用提供理论基础。

参考文献

- [1] Samodien S, Kock M, Joubert E, et al. Differential cytotoxicity of rooibos and green tea extracts against primary rat hepatocytes and human liver and colon cancer cells-causal role of major flavonoids [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73 (10): 2050-2064.
- [2] Tanaka H, Gunasekaran S, Saleh DM, et al. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99 (1): 159-165.
- [3] Le Menn G, Jabłońska A, Chen Z. The effects of post-translational modifications on Th17/Treg cell differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2022, 1869 (6): 119223.
- [4] Kong FM, Chen TQ, Li XJ, et al. The current application and future prospects of astragalus polysaccharide combined with cancer immunotherapy: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 737674.
- [5] 孙舒玉, 何小鹏, 柴旺, 等. 黄芪多糖对黑色素瘤小鼠调节性 T 细胞的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (12): 176-178.
- [6] Karthika C, Sureshkumar R, Sajini DV, et al. 5-fluorouracil and curcumin with pectin coating as a treatment regimen for titanium dioxide with dimethylhydrazine-induced colon cancer model [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29 (42): 63202-63215.
- [7] Fan WH, Wang FC, Jin Z, et al. Curcumin synergizes with cisplatin to inhibit colon cancer through targeting the microRNA-137-glutaminase axis [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42 (1): 108-117.
- [8] 白姣姣, 阿丽亚·依拉木, 阿布都艾则孜·艾尔肯, 等. 中药复方及单体治疗结肠癌药效与机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (4): 246-252.
- [9] Zhang MT, Wu WH, Huang CX, et al. Shuxie-1 decoction alleviated CUMS-induced liver injury via IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 848355.
- [10] 付远虹, 吴敏. 黄芪多糖通过 ANXA3 诱导人结肠癌 HT-29 细胞凋亡 [J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43 (2): 202-207.
- [11] Hu S, Zhu Y, Xia XY, et al. Ginsenoside Rg₃ prolongs survival of the orthotopic hepatocellular carcinoma model by inducing apoptosis and inhibiting angiogenesis [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 2019: 3815786.
- [12] Ghonim MA, Ibba SV, Tarhuni AF, et al. Targeting PARP-1 with metronomic therapy modulates MDSC suppressive function and enhances anti-PD-1 immunotherapy in colon cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9 (1): e001643.
- [13] 杨欣, 黄聪, 姚血明. 类风湿关节炎免疫特征基因及其与土茯苓黄酮类化合物的关系研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59 (3): 484-490.
- [14] 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.
- [15] 罗金红, 李定祥, 张飞, 等. 中药欣力康治疗恶性肿瘤的临床疗效观察 [J]. *内蒙古中医药*, 2018, 37 (1): 16-17.
- [16] Conejo-Garcia JR, Biswas S, Chaurio R, et al. Neglected no more: B cell-mediated anti-tumor immunity [J]. *Semin Immunol*, 2023, 65: 101707.
- [17] Wang Y, Ma L, Chen Y, et al. Prognostic effect of TCF1⁺ CD8⁺ T cell and TOX⁺ CD8⁺ T cell infiltration in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2024, 41 (8090): 265-268.
- [18] 胡想金, 高耀, 阎军. 恒定的自然杀伤 T 淋巴细胞在肝脏抗肿瘤免疫中的作用与机制 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37 (1): 188-191.
- [19] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441 (7090): 235-238.
- [20] Derakhshani A, Hashemzadeh S, Asadzadeh Z, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 in colorectal cancer: another therapeutic side of capecitabine [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (10): 2414.
- [21] 侯爱画, 戴玲玲, 孟鹏, 等. 益肠散结颗粒对结肠癌小鼠肠道菌群及免疫功能的调节作用及机制研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41 (3): 719-728.
- [22] 蒋星. 参山颗粒工艺优化及对 CT26. WT 结肠癌荷瘤小鼠抑瘤和免疫作用的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [23] Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW. CD8⁺ T cell metabolism in infection and cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21 (11): 718-738.
- [24] Huang YJ, Jia AN, Wang YF, et al. CD8⁺ T cell exhaustion in anti-tumor immunity: the new insights for cancer immunotherapy [J]. *Immunology*, 2023, 168 (1): 30-48.
- [25] 唐欣欣, 胡小蓓, 苏明波, 等. 欣力康胶囊对血液性肿瘤细胞的增殖抑制作用研究 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (6): 1558-1565.
- [26] 王渝, 张恒, 王华庆, 等. 中药活性成分抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39 (5): 1337-1342.
- [27] 李付平, 靳子明, 刘成松, 等. 黄芪活性成分抗结肠癌作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55 (10): 3549-3557.

(收稿日期: 2024-09-10; 修回日期: 2024-11-20)

基于 UPR/GRP78/IL-6 信号通路探讨温通活血乳膏治疗糖尿病周围神经病变的作用机制

严琦¹, 刘珊珊¹, 古丽逊·买买提朱玛¹, 徐利娟², 马静², 刘新³, 李惠², 王晶⁴, 王先敏², 马丽^{2*} (1. 新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054; 4. 新疆医科大学附属中医医院呼吸病研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 探讨中药复方温通活血乳膏调控糖尿病周围神经病变 (DPN) 在施万细胞中内质网应激的分子机制。**方法** 选取雄性 SD 大鼠建立 DPN 模型。分为空白组、模型组、温通活血乳膏组, 连续给药 28 d 后评价治疗效果; 并基于全转录组测序技术, 鉴定各组间差异表达基因。然后在高糖环境下培养大鼠施万细胞 (RSC96), 采用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖情况, Western blot 法检测 UPR 通路下的 3 种重要跨膜蛋白 [蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)、激活转录因子 6 (ATF6)、肌醇需求酶 1 (IRE1)] 以及葡萄糖调节蛋白 (GRP78)、凋亡蛋白 C/EBP 同源蛋白 (CHOP)、白细胞介素 (IL)-6 的表达。**结果** 与模型组相比, 温通活血乳膏组可明显改善大鼠的热痛觉。透射电镜结果显示温通活血乳膏处理改善了坐骨神经的神经纤维、内质网及髓鞘的形态。此外通过全转录组测序技术发现了 379 个共有的差异表达基因 (DEGs), 共有 DEGs 的富集分析和蛋白-蛋白相互作用网络 (PPI) 显示 IL-6 作为核心枢纽基因在细胞因子-细胞因子受体通路上富集。CCK-8 法检测结果显示 25 mg·mL⁻¹ 温通活血乳膏能明显抑制细胞增殖 ($P < 0.01$)。Western blot 实验结果表明温通活血乳膏显著降低了内质网应激通路蛋白 PERK、ATF6、IRE1、GRP78 和凋亡蛋白 CHOP 及炎症因子 IL-6 的表达。**结论** 温通活血乳膏可能通过抑制 UPR/GRP78/IL-6 信号通路的激活, 减轻施万细胞中内质网应激、细胞凋亡和炎症反应, 保护 DPN 大鼠的坐骨神经的形态和功能, 以预防及改善 DPN。

关键词: 糖尿病周围神经病变; 内质网应激; UPR 信号通路; 全转录组测序; 差异表达基因
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0319-09
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.005

Mechanism of Wentong Huoxue cream for diabetic peripheral neuropathy via UPR/GRP78/IL-6 signal pathway

YAN Qi¹, LIU Shan-shan¹, Gulixun · Maimaitizhuma¹, XU Li-juan², MA Jing², LIU Xin³, LI Hui², WANG Jing⁴, WANG Xian-min², MA Li^{2*} (1. *The Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000*; 2. *Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000*; 3. *Xinjiang Medical University, Urumqi 830054*; 4. *Key Laboratory of Respiratory Diseases Research, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000*)

Abstract: Objective To determine the molecular mechanism through which Wentong Huoxue cream modulates endoplasmic reticulum (ER) stress in Schwann cells associated with diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Methods** Male Sprague-Dawley rats were selected to establish a DPN model. The rats were divided into three groups: a control group, a model group, and a Wentong Huoxue cream group. After 28 days of continuous treatment, the effects were evaluated. Differentially expressed genes (DEGs) among the groups were identified with whole transcriptome sequencing technology. In addition, rat Schwann cells (RSC96) were cultured in a high-glucose environment, and CCK-8 method was used to assess cell proliferation at

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82060842); 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (No.2023B03002)。

作者简介: 严琦, 男, 硕士研究生, 主要从事糖尿病周围神经病变中西医结合基础与临床研究, email: 6347401@qq.com

***通信作者:** 马丽, 女, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事内分泌相关疾病研究, email: malixj322122@163.com

various drug concentrations. The expression of three key transmembrane proteins in the unfolded protein response (UPR) pathway [protein kinase R-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6), and inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)], along with glucose-regulated protein 78 (GRP78/Bip), C/EBP homologous protein (CHOP), and interleukin-6 (IL-6) was measured by Western blot. **Results** Compared with the model group, the Wentong Huoxue cream group obviously improved the thermal pain sensitivity. Transmission electron microscopy revealed that Wentong Huoxue cream enhanced the morphology of nerve fibers, ER, and myelin in the sciatic nerve. Whole transcriptome sequencing identified 379 shared DEGs. Enrichment analysis and protein-protein interaction network indicated that IL-6 served as a central hub gene and enriched in the cytokine-cytokine receptor pathway. CCK-8 showed that Wentong Huoxue cream at $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ inhibited the cell proliferation ($P < 0.01$). Western blot showed that Wentong Huoxue cream reduced the expressions of ER stress pathway proteins PERK, ATF6, IRE1, GRP78, apoptotic protein CHOP and inflammatory factor IL-6. **Conclusion** Wentong Huoxue cream may alleviate ER stress, apoptosis, and inflammation in Schwann cells by inhibiting the activation of the UPR/GRP78/IL-6 signaling pathway, which helps protect the morphology and function of the sciatic nerve in rats with DPN and ultimately prevent DPN.

Key words: diabetic peripheral neuropathy; endoplasmic reticulum stress; UPR signaling pathway; whole transcriptome sequencing; differentially expressed gene

糖尿病是世界分布最广泛的慢性疾病之一，截至 2021 年全球患病人数已达 5.37 亿人^[1]。糖尿病周围神经病变 (DPN) 为糖尿病最常见最严重的并发症，50% 的糖尿病患者会进展为 DPN，且病程多在 10 年以上^[2]。

DPN 的发病机制复杂，涉及多个因素，机体血糖、血脂的异常，加上胰岛素信号传导的改变，使神经元、神经胶质细胞和血管细胞的病理改变，最终导致神经病变^[3]，其中内质网应激 (ERS) 和炎症因子是两个重要方面，ERS 是一种细胞应激反应，当细胞面临各种外界刺激时，会使内质网 (ER) 内错误折叠蛋白聚集，引发 ERS，之后便会启动未折叠蛋白质反应 (UPR) 的信号传导途径，以纠正这种情况。UPR 由内质网膜表面 3 种重要的跨膜信号蛋白启动，分别是蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)、激活转录因子 6 (ATF6)、肌醇需求酶 1 (IRE1)^[4]，由于这些跨膜蛋白与 GRP78 的结合，正常情况下这些信号分子处于未激活状态，而未折叠蛋白的错误积累会使 GRP78 解离，从而激活 UPR 信号和下游凋亡因子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP)^[5]。随着 UPR 的激活，其与胞质肽聚糖受体 NOD1 和 NOD2 相互作用，诱导了促炎细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 的产生^[6]。越来越多的研究表明，炎症因子与 DPN 密切相关。临床中的溃疡、感染、坏疽等不良预后的发生，炎症因子均起着重要媒介作用^[7]。近期的一项 Meta 研究显示，IL-6 水平的升高与 DPN 进展成显著正相关^[8]。

温通活血乳膏临床应用多年，主要用于改善 DPN 患者症状，早期研究证实其具有良好的消炎、

止痛、延缓疾病进展等功效^[9]，因此本课题组观察了温通活血乳膏对 ERS 中 UPR/GRP78/IL-6 信号通路的调节作用，以期温通活血乳膏通过调节 ERS 防治 DPN 的作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

RSC96 细胞传至第 3 代 (中国科学院上海细胞库)。

8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠，体重 $200 \sim 250 \text{ g}$ [新疆医科大学动物实验中心，生产许可证号 SCXK (新)-2003-0001]，5 只/笼，恒温 (20 ± 2) °C 饲养室，自然光线，自由饮水，适应性喂养 1 周。饲料由新疆实验动物研究中心提供标准颗粒饲料。本研究得到了新疆医科大学伦理委员会的批准，伦理审查编号：IACUC-20210805-5。

1.2 试药

温通活血乳膏中药饮片川芎、红花、桂枝、细辛、白芷、地龙、辣椒片 (新疆医科大学第四附属医院，经马丽教授鉴定药品均为正品)。温通活血乳膏，由新疆医科大学第四附属医院药剂科提供。

一抗 PERK、ATF6、GRP78 (美国 Abcam 公司，批号：ab229912、ab37149、ab21685)；一抗 IRE1 (美国 CST 公司，批号：3294T)；一抗 IL-6 (爱博泰克生物公司，批号：a16288)；一抗 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) (美国赛默飞公司，批号：PA5-104528)；一抗 β -actin、山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗 (武汉三鹰生化科技公司，批号分别为 66009-1-ig、SA00001-2、SA00001-1)；二甲亚砜 (DMSO) (索莱宝公司，批号：D8371)；青链

霉素双抗、胎牛血清 (FBS) (赛默飞科技公司, 批号: 15070063、A5669701); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (塞维尔生物公司, 批号: G4202); DMEM 培养基 (普诺赛生命科技有限公司, 批号: CM-0199); RIPA 裂解液 (白鲨生物, 批号: 70096436); 内质网应激抑制剂 (4-PBA) (美国 MCE 公司, 批号: HY-A0281)。

1.3 仪器

Heracell 150i CO₂ 培养箱、多功能酶标仪 (美国赛默飞科技公司); 生物显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司); 超净工作台 (上海智城公司); ST-234 万分之一天平 [丹佛仪器 (北京) 有限公司]; 全自动化学发光凝胶成像系统 (广州光仪生物科技有限公司); TDZ5-WS 低速台式离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 旋转蒸发器 (欧意生物医疗科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

2.1.1 温通活血乳膏的制备 处方饮片, 加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 滤过, 滤液回收乙醇, 浓缩至约 600 mL, 备用; 另取硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂、十六醇等化合物混匀, 搅拌加热至 85 ~ 90 °C, 使成油相; 取三乙醇胺及上述浓缩液及适量水, 混匀, 加热至 90 °C, 缓缓加入上述油相中, 在 80 °C 下搅拌 30 min, 加水至规定量, 搅匀, 分装, 即得。

2.1.2 温通活血乳膏冻干粉的制备 按照处方称取药材, 第 1 次加 10 倍量水, 浸泡 1 h, 煮沸后煎煮 0.5 h, 第 2 次加 8 倍量水, 煮沸后煎煮 0.5 h, 合并两次药液, 药液经旋转蒸发器浓缩后, 于 -80 °C 冷冻 12 h, 置于冷冻干燥机中 48 h, 即得温通活血乳膏冻干粉, 细胞给药时将冻干粉以既定浓度溶于培养基后, 将得到的上清液经 0.22 μm 细胞筛过滤, 滤液待用。

2.2 动物的分组及造模

所有大鼠称重后采用随机数字表法分为对照组、模型组、温通活血乳膏组, 每组 10 只。依据课题组前期 DPN 大鼠成模方法^[10], 大鼠在 SPF 级环境中饲养, 隔天更换垫料, 对照组给予普通饲料 ($n = 15$), 其余均给予高糖高脂饲料 (70% 的常规饲料 + 20% 蔗糖 + 10% 猪油) ($n = 20$), 饮用水为高压灭菌水。喂饲 4 周, 诱发胰岛素抵抗, 继以小剂量链脲佐菌素 (STZ) 35 mg · kg⁻¹ (STZ 溶于 0.1 mol · L⁻¹ 的柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液, 配制为 1% 的溶液) 于大鼠禁食 14 h 后腹腔注射, 而正常组仅给予柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液, 72 h 后从尾部采血检测血糖, DPN 大鼠成模

标准: 血糖 ≥ 11.1 mmol · L⁻¹ 可判定糖尿病大鼠造模成功, 之后继续高糖高脂饲养 8 周, 每组各取 1 只大鼠坐骨神经进行 HE 染色, 病理结构发生相应改变, 可确定为 DPN 大鼠模型建立成功。

2.3 动物给药剂量与方法

给药剂量根据药品说明书成人药量 14 g / (kg · d) 换算大鼠给药剂量: 1.26 g / (kg · d)^[11], 给药方法参照课题组既往研究进行给药^[12], 待血糖稳定后, 于实验前用动物剃毛器剔除大鼠后肢部的毛, 24 h 后挑选皮肤无损伤大鼠开始皮肤给药, 双后肢皮肤均匀而全面地涂抹乳膏, 每只大鼠双后肢涂抹面积 6 ~ 7 cm², 对照组与模型组给予空白乳膏 (由制备温通活血乳膏中的多种基质制成: 羊毛脂、十六醇、十八醇等) 涂抹, 温通活血乳膏组涂抹生药量 1.26 g · kg⁻¹, 连续 28 d, 用药期间所有大鼠标准饲料喂养, 自由进食进水。

2.4 热甩尾实验

末次给药后, 在大鼠尾部距尾尖 5 cm 处做一标记, 将鼠尾迅速置入 52 °C 的恒温热水中至标记处, 记录动物出现甩尾的时间。

2.5 光镜观察大鼠坐骨神经病理变化

给药完成后, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠 (350 mg · kg⁻¹), 颈部脱臼处死大鼠, 每组随机选取 1 只大鼠取一侧坐骨神经后, 使用甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 脱水, 清洗, 染色, 封片, 光学显微镜观察并拍照。

2.6 透射电镜观察大鼠坐骨神经形态变化情况

取出经 3% 戊二醛固定的坐骨神经, 在 1% 四氧化锇中再次固定 1 h 后进行丙酮逐级脱水, 并用环氧丙烷洗涤组织, 然后用环氧树脂将组织包埋, 使用超薄切片机将组织切成 60 nm 横切片。用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 随后用透射电子显微镜拍片。

2.7 生物信息学分析

实验结束后, 对照组、模型组、温通活血乳膏组各取 3 只大鼠左侧坐骨神经用于全转录组测序, 采用核糖体 RNA 去除法构建文库, 测定文库的插入物大小。采用 Illumina PE150 测序, 然后对原始数据进行过滤, 最后通过 EdgeR 软件, $P < 0.05$, 识别不同组之间共有差异基因 (DEGs) [PMID: 19910380]。利用 Goseq 和 KOBAS (2.0 版) 对 DEGs 进行生物功能富集分析。通过 STRING 数据库创建 DEGs 的 PPI 网络, 最后采用 STRING 算法鉴定 PPI 网络中前 10 个枢纽基因。

2.8 实时定量 PCR 检测大鼠坐骨神经中核心基因的 mRNA 的转录水平

使用 Trizol 试剂裂解神经组织, 加入氯仿、异丙醇提取总 RNA。按照厂家推荐步骤进行 RNA

反转录, 进行实时 PCR。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 为内参, 分析 PPI 网络中 *IL-6*、*Cr2*、*Ptprc*、*Cd22*、*Cd19* 的 mRNA 转录水平。实验引物购自北京擎科生物科技股份有限公司 (西安), 序列见表 1。

表 1 *IL-6*、*Cr2*、*Ptprc*、*Cd22*、*Cd19* mRNA 引物序列

基因	物种	3'→5'	长度 /bp
<i>IL-6</i>	大鼠	F: GCCTTCTTGGGACTGATGTTGTTG	94
		R: GTCTGTTGTGGGTGGTATCCTCTG	
<i>Cr2</i>	大鼠	F: TCGGTTTGGGACTACTGTGACTC	111
		R: CAGATAGCCAGCGGAGGGTTC	
<i>Ptprc</i>	大鼠	F: ACGATGGTGTGCCGAAGAG	117
		R: CTGTGGTGTGACATTGGAAGTG	
<i>Cd22</i>	大鼠	F: GTCACCTCTTCCATCACCTCCTC	91
		R: TGCTCTTCCGTGGTCTGTCC	
<i>Cd19</i>	大鼠	F: AAGAGCCAGACAGCGAGGAG	96
		R: GGTTCATAGCCACTGCCATC	
<i>GAPDH</i>	大鼠	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
		R: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	

2.9 细胞的培养

培养条件为 DMEM[葡萄糖 25 mmol·L⁻¹ + 10%FBS + 1%青链霉素]。细胞复苏后, 以 1000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 1 mL 培养基重悬, 接种到细胞培养瓶中, 置于 37℃ 细胞培养箱中培养, 次日换液, 观察细胞贴壁情况。

2.10 CCK-8 法检测药物对细胞增殖的影响

取对数生长期的 RSC96 细胞, 用完全培养基稀释成 5×10⁵ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液, 按 90 μL/孔接种于 96 孔板中, 部分孔加入 10 μL 不同浓度的温通活血乳膏冻干粉 (DMSO 溶解) 干预, 使其终浓度为 0.5、1、2、4、8、16、25 mg·mL⁻¹, 部分孔加入 10 μL 4-PBA 溶液 (DMSO 溶解), 使其终质量浓度为 1、5、10、20 mg·mL⁻¹。同组样本设置 6 个重复孔。分别于培养 24 h 后, 向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (*A*), 计算各分组细胞存活率。以培养基为空白孔, 不加药物的细胞为对照孔。计算公式: 细胞存活率 (%) = [(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%。

2.11 温通活血乳膏与 4-PBA 的浓度选择

依据 CCK-8 最适浓度范围和课题组发表的最新研究中药物浓度的剂量选择^[13], 后续实验选择 8 mg·mL⁻¹ 温通活血乳膏干预; 4-PBA 在 20 mg·mL⁻¹ 时细胞活力增强且更接近对照组, 但组间差异无统计学意义, 根据生产商针对细胞实验剂量推荐, 后续实验选择 20 mg·mL⁻¹ 进行干预。

2.12 细胞的分组建模

按 5000 个/孔的细胞数接种到 96 孔板, 对细胞进行随机分组, 对照组 (K) [DMEM 培养基 (25

mmol·L⁻¹); 模型组 (M) [DMEM 培养基 (100 mmol·L⁻¹); 温通活血乳膏组 (WT) [DMEM 培养基 (100 mmol·L⁻¹) + 药物冻干粉 8 mg·mL⁻¹]; 抑制剂组 (Y) [DMEM 培养基 (100 mmol·L⁻¹) + 4-PBA 20 mg·mL⁻¹]; 抑制剂 + 温通活血乳膏组 (Y + WT) [DMEM 培养基 (100 mmol·L⁻¹) + 4-PBA 20 mg·mL⁻¹ + 药物冻干粉 8 mg·mL⁻¹。用 25 mmol·L⁻¹ DMEM 培养基培养细胞 48 h 后, 分别用不同组对应含药浓度高糖培养基干预细胞 48 h 后, 提取蛋白。

2.13 Western blot 检测 RSC96 细胞蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解液, 裂解 RSC96 细胞, 通过 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度, 进行蛋白定量。按计算的裂解液和 5×Loading buffer 的体积加入蛋白上清液中, 混匀后放入热循环仪, 进行蛋白变性。在 SDS-PAGE 凝胶上分离等量的蛋白质, 并转移到聚偏二氟乙烯膜上, 在室温下用无蛋白快速封闭液封闭 40 min 后, 将膜与一抗 [一抗浓度: PERK (1:1000)、IRE1 (1:1000)、ATF6 (1:1000)、GRP78 (1:2000)、CHOP (1:1000)、IL-6 (1:1000)、β-actin (1:50 000)], 4℃ 孵育 12 h, 洗膜 5 次后加入兔二抗 (1:20 000), 鼠二抗 (1:20 000) 室温轻摇 1 h 后洗膜 3 次, 使用增强化学发光试剂 ECL 和 Tanon 图像系统可视化条带。β-actin 用作对照。Western blot、免疫荧光图片均由 Photoshop 2020 处理, Western blot 灰度值由 Image J (Ver 1.8.0) 软件测量, 条形图由 Graphpad Prism (Ver 7.0.4) 软件制作。

2.14 统计学方法

采用 SPSS 26.00 统计软件。计量资料采用 *S-W* 法检验正态性, 符合正态性以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态性以 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示。若满足正态性及方差齐, 两组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较采用 ANOVA 检验, 组间比较采用 *LSD* 法, 重复测量数据采用重复测量的方差分析; 不满足正态性及方差齐, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 组间比较采用 Bonfferoni 校正法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温通活血乳膏对大鼠生理状态的影响

与对照组比较, 模型组大鼠给药前后体重、血糖表达升高; 与模型组比较, 温通活血乳膏组给药前后体重、血糖表达无差异; 与对照组比较, 模型组大鼠热甩尾时间延长; 与模型组比较, 温通活血乳膏组大鼠热甩尾实验时间缩短, 见表 2 及表 3。

3.2 温通活血乳膏对 DPN 大鼠坐骨神经病理结构的影响

光镜下可见对照组神经纤维排列紧密整齐,

表 2 温通活血乳膏对 SD 大鼠体重及血糖变化的影响 (n = 8)

Tab 2 Effect of Wentong Huoxue cream on body weight and blood glucose in SD rats (n = 8)

组别	体重 /g		血糖 / (mmol · L ⁻¹)	
	给药前	给药后	给药前	给药后
对照组	517.0 (498.1, 548.5)	593.3 (569.6, 616.5)	5.30 (4.95, 5.38)	5.40 (5.13, 5.73)
模型组	396.6 (322.9, 491.5) [*]	397.1 (325.8, 466.8) ^{**}	29.20 (25.43, 32.68) ^{**}	33.30 (31.60, 33.30) ^{**}
温通活血乳膏组	345.2 (314.3, 429.8)	335.8 (281.1, 420.0)	31.45 (24.55, 33.3)	30.00 (25.63, 33.30)
H 值	12.48	16.34	15.671	16.741
P 值	0.002	< 0.001	< 0.001	0.003

注: 与对照组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

Note: Compared with the control group, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01.

表 3 温通活血乳膏对 SD 大鼠热甩尾时间影响 (n = 8)

Tab 3 Effect of Wentong Huoxue cream on heat tail flick time in SD rats (n = 8)

组别	热甩尾时间 /s
对照组	3.91 (3.39, 5.34)
模型组	6.77 (5.94, 12.42) ^{**}
温通活血乳膏组	5.31 (3.85, 6.84) [#]
H 值	11.564
P 值	0.003

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

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

髓鞘着色均匀, 像网状样包绕轴突。模型组坐骨神经排列稀疏紊乱, 大部分神经纤维变形或断裂, 脱髓鞘明显。与模型组相比, 温通活血乳膏组坐骨神经纤维排列明显紧密均匀, 神经纤维饱满, 髓鞘着色均匀, 少量神经纤维扭曲或断裂, 数量较模型组显著减少, 见图 1。

电镜图显示正常大鼠坐骨神经横断面中的细胞质基质分布均匀, 细胞器结构基本正常, 髓鞘结构均匀致密。模型组坐骨神经的细胞质基质出现水肿和局部的溶解, 髓鞘被显著破坏, 出现明显的板层分离, 线粒体形态轻微肿大。与模型组相比, 温通活血乳膏组的髓鞘结构中板层分离现象明显改善, 组织病理学形态得到改善, 见图 2。

3.3 温通活血乳膏干预后差异基因的表达

全转录组测序结果显示, DPN 组与对照组共鉴定出差异表达 mRNA 590 个, 其中上调 362 个, 下调 228 个。温通活血乳膏组与 DPN 组共鉴定出差异表达 mRNA 1325 个, 其中上调 965 个, 下调 360 个。将获得的差异 mRNA 通过韦恩图取交集, 得到共有差异 mRNA 379 个, 对共有差异 mRNA 进行 PPI 网络构建, 结果显示网络中 Top10 核心枢纽基因有 *IL-6*、*Cd40lg*、*Cd79b*、*Ms4a1*、*Cd22*、*Cd27*、*Cd19*、*Ccr7*、*Ptprc*、*Cr2*, 接着对 PPI 网络中的基因进行 KEGG 通路富集得到 10 个显著富集 ($P < 0.05$) 的信号通路, 可以发现炎症因子 *IL-6* 在核心枢纽基因中确切存在, 且在细胞因子-细胞因子受体相互作用通路中被富集, 这一结果提示炎

症因子在温通活血乳膏治疗机制中或许有着重要作用, 见图 3。

3.4 温通活血乳膏对核心 mRNA 转录水平的影响

运用实时定量 PCR 法, 检测各组大鼠坐骨神经中核心 mRNA 转录水平, 选取前 5 个核心基因 (*IL-6*、*Cr2*、*Ptprc*、*Cd22*、*Cd19*) 进行 PCR, 结果显示: 与对照组相比, 模型组 *IL-6*、*Cd22*、*Cd19* 的表达升高 ($P < 0.01$), *Ptprc*、*Cr2* 差异无统计学意义; 温通活血乳膏干预后, 与模型组相比仅有 *IL-6* 表达降低 ($P < 0.01$), *Cd22*、*Cd19*、*Ptprc*、*Cr2* 差异无统计学意义, 见图 4。

3.5 温通活血乳膏及 4-PBA 对 RSC96 细胞增殖活力的影响

与模型组比较, 温通活血乳膏从 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 细胞增殖差异无统计学意义, 药物浓度到达 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对细胞活力有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。4-PBA 在 $1 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对细胞增殖活力均无影响 ($P > 0.05$), 见表 4、5。

表 4 不同浓度温通活血乳膏处理后 RSC96 细胞的活力 (n = 6)

Tab 4 Cell viability of RSC96 treated with different concentrations of Wentong Huoxue cream (n = 6)

组别	细胞活力	t/Z 值	P 值
模型组	1.01 ± 0.12	—	—
$0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	1.20 ± 0.19	- 1.705	0.132
$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	1.20 ± 0.20	- 1.66	0.148
$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	1.19 ± 0.26	- 1.319	0.229
$4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	1.19 ± 0.17	- 1.823	0.111
$8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	1.17 ± 0.14	- 1.761	0.129
$16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	0.97 (0.84, 1.12)	< 0.001	1.000
$25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 温通活血乳膏	0.10 (0.04, 0.15) [#]	- 2.558	0.011

注: 与模型组相比, [#]P < 0.05。

Note: Compared with the model group, [#]P < 0.05.

表 5 不同浓度 4-PBA 处理后 RSC96 细胞的活力 (n = 6)

Tab 5 Cell viability of RSC96 treated with different concentrations of 4-PBA (n = 6)

组别	细胞活力	t/Z 值	P 值
模型组	0.91 ± 0.06	—	—
$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-PBA 组	0.90 ± 0.07	0.212	0.838
$5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-PBA 组	0.85 ± 0.04	1.275	0.243
$10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-PBA 组	0.86 ± 0.14	0.686	0.512
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4-PBA 组	0.85 (0.70, 1.06)	< 0.001	1.000

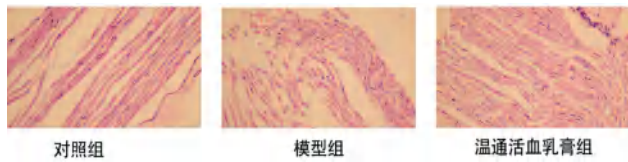


图 1 温通活血乳膏对各组大鼠坐骨神经光镜图的影响 (×400)
Fig 1 Effect of Wentong Huoxue cream on light microscope images of sciatic nerve in rats of each group (×400)

3.6 温通活血乳膏与 4-PBA 对 ERS 及炎症因子 IL-6 的影响

与对照组比较, 模型组 RSC96 细胞中 PERK、ATF6、IRE1、GRP78 (UPR 信号途径)、CHOP (ERS 相关凋亡信号分子) 以及 IL-6 (细胞炎症因子) 中的蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 温通活血乳膏组 RSC96 细胞中 PERK、ATF6、IRE1、GRP78、CHOP、IL-6 中的蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

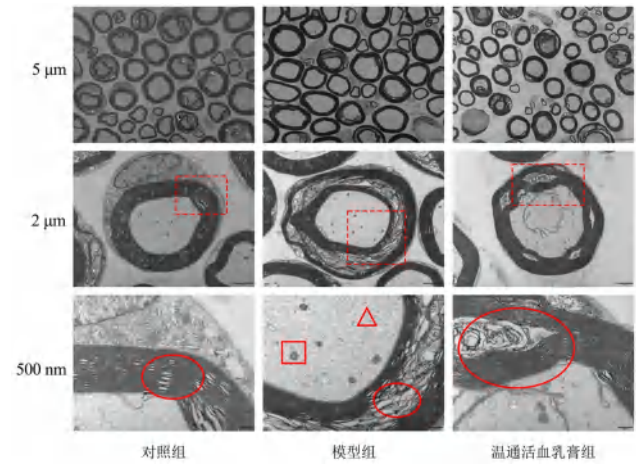


图 2 温通活血乳膏对各组大鼠坐骨神经电镜图的影响
Fig 2 Effect of Wentong Huoxue cream on electron microscope images of sciatic nerve in rats of each group

注: 髓鞘(椭圆形)(myelin sheath); 细胞质基质(三角形)(cytoplasmic matrix); 线粒体(方形)(mitochondrion)。

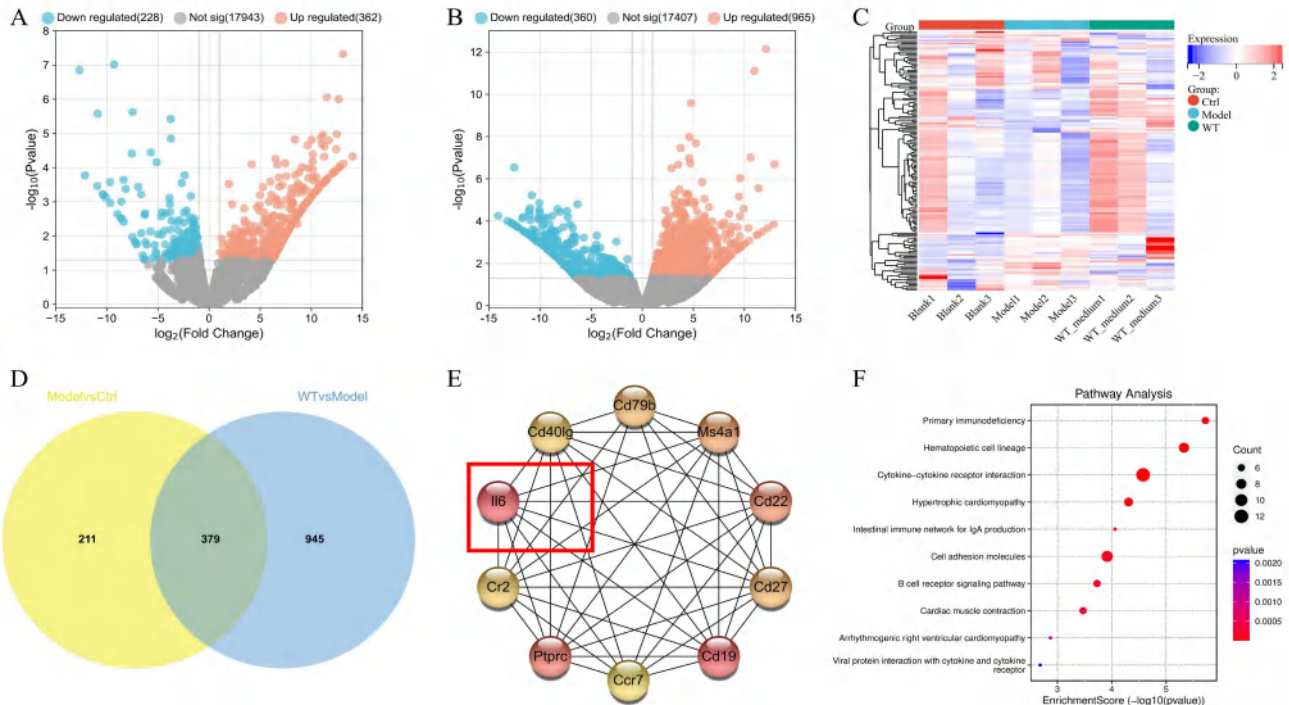


图 3 各组大鼠坐骨神经间的差异表达基因的鉴别分析

Fig 3 Differentially expressed genes between sciatic nerves of rats in each group

注 (Note): A. DPN 组与对照组之间差异表达基因的火山图 (volcano plot of differentially expressed genes between the DPN group and the normal control group); B. 温通活血乳膏干预后与 DPN 组之间差异表达基因的火山图, 红色为上调, 绿色为下调 (volcano plot of differentially expressed genes between the group after intervention with Wentong Huoxue cream and the DPN group. Red indicates up-regulation and green indicates down-regulation); C. 对照组、模型组和温通活血乳膏组中相交基因的热图, 红色为上调, 蓝色为下调 (heat map of intersecting genes in the control group, model group and Wentong Huoxue cream group. Red indicates up-regulation and blue indicates down-regulation); D. 两组差异表达基因的交叉分析 (cross-analysis of differentially expressed genes between the two groups); E. 各组大鼠坐骨神经中差异表达基因的 PPI 网络 (Top 10) [The PPI network (Top 10) of differentially expressed genes in the sciatic nerves of rats in each group]; F. 差异基因 KEGG 通路富集图 (前 10 个) (KEGG pathway enrichment of differential genes) (Top 10)。

与对照组比较, 模型组 RSC96 细胞各指标蛋白表达同上 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 4-PBA 组和 4-PBA + 温通活血乳膏组 RSC96 细胞 PERK、

ATF6、IRE1、GRP78、CHOP、IL-6 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与 4-PBA 组比较, 4-PBA 组 + 温通活血乳膏组 RSC96 细胞 PERK 蛋白表达进一步降低

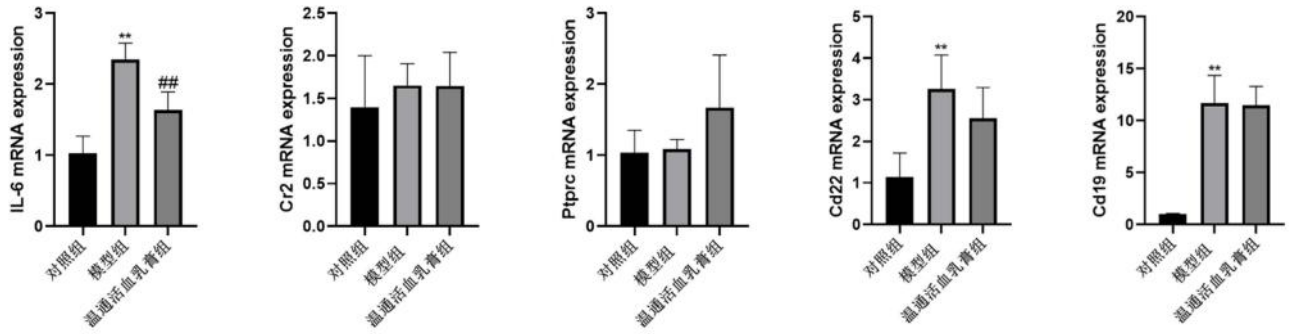


图 4 温通活血乳膏对 IL-6、Cr2、Ptpcr、Cd22、Cd19 mRNA 转录水平表达的影响 (n = 6)

Fig 4 Effect of Wentong Huoxue cream on transcriptional level expression of IL-6, Cr2, Ptpcr, Cd22, and Cd19 mRNA (n = 6)

注: 与对照组相比, **P < 0.01; 与模型组相比, ##P < 0.01。

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

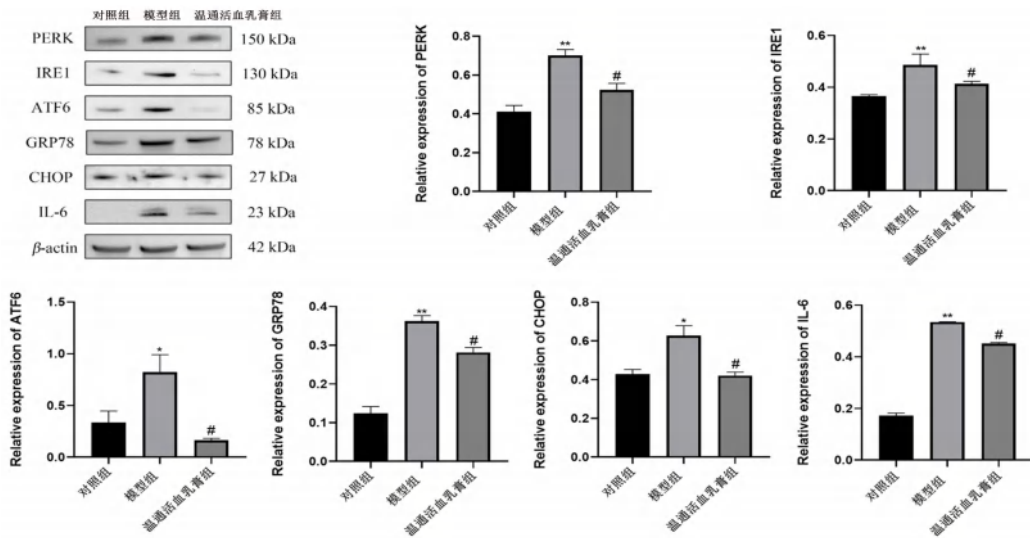


图 5 温通活血乳膏对各组大鼠 RSC96 细胞中 PERK、IRE1、ATF6、GRP78、CHOP、IL-6 蛋白表达水平的影响 (n = 3)

Fig 5 Effect of Wentong Huoxue cream on protein expression levels of PERK, IRE1, ATF6, GRP78, CHOP and IL-6 in RSC96 cells of each group of rats (n = 3)

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

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

(P < 0.05), ATF6、IRE1、GRP78、CHOP、IL-6 有降低趋势, 但差异无统计学意义 (P > 0.05), 见图 6。

4 讨论

DPN 的发病机制复杂, 临床上治疗手段相对匮乏, 寻找改善 DPN 的药物显得尤为重要。近年来随着中医药的发展, 中药被广泛应用在治疗 DPN 中。中医将 DPN 归于“麻木、血痹、痿证”范畴, 临床中多称为“消渴病痹病”。医家叶天士认为:“经主气, 络主血”“初为气结在经, 久则血伤入络”, 首次提出“络病”一词, 认为消渴日久, 损伤经脉, 痰湿邪气乘虚而入致瘀血阻滞脉络, 而出现手足麻木、疼痛等症状。故可认为痰浊瘀血痹阻经络是 DPN 发生发展的主要病机, 活血通络止痛应是核心治则。本课题组自研自拟的温通活血乳膏在改善 DPN 症状如麻木、疼痛方面有显著疗

效^[14-15]。最新研究显示减轻施万细胞迁移和损伤对于神经功能的修复起着关键作用^[16]。

施万细胞是周围神经中最重要的髓鞘细胞, 它维持着神经的功能和结构^[17]。当因各种刺激引起细胞中 ER 积累大量错误折叠的蛋白质, 细胞便会启动 UPR, 以维持体内平衡^[18]。越来越多的研究证实了细胞在各种损伤下引起的 ERS 会影响中枢神经系统的免疫抑制环境^[19-20], 表明在施万细胞中 ERS 与炎症之间存在着异质性。研究发现, 神经系统中异常的炎症信号会导致神经元功能障碍^[21], 虽然炎症因子也被认为是一种有益的生理反应, 可以促进组织的修复, 有害产物的清除, 但持续的炎症信号传导依旧会破坏周围神经系统的修复能力, 引起 DPN 的发生^[22], 其中炎症因子对施万细胞的损伤, 被认为是导致 DPN 的重要原因^[23]。此外, 课题组既往研究发现温通活血乳膏能有效地抑制 RAW264.7 巨噬

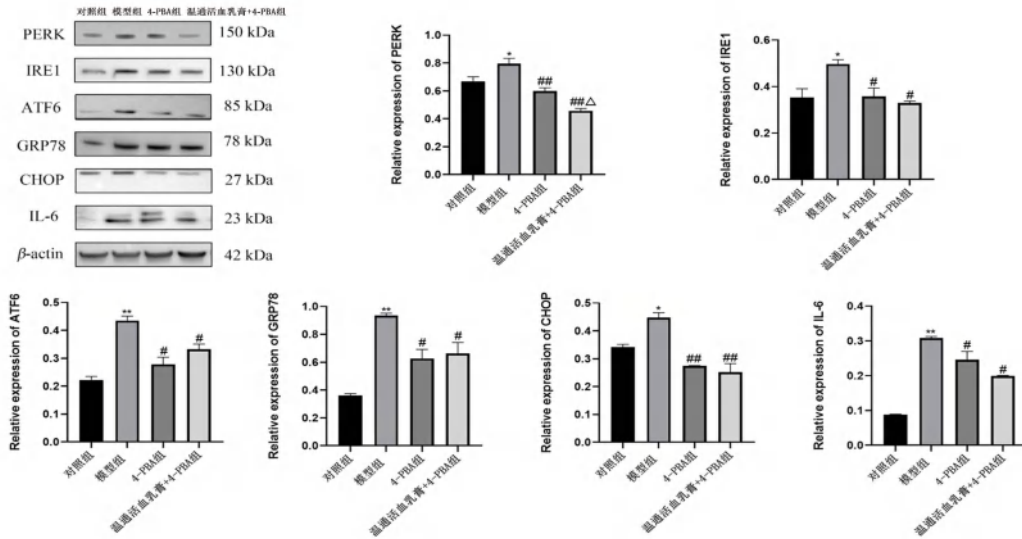


图 6 4-PBA 干预对各组大鼠 RSC96 细胞中 PERK、IRE1、ATF6、GRP78、CHOP、IL-6 蛋白表达水平的影响 (n = 3)

Fig 6 Effect of 4-PBA on the protein expression levels of PERK, IRE1, ATF6, GRP78, CHOP and IL-6 in RSC96 cells of each group of rats intervention (n = 3)

注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与模型组比较，#P < 0.05，###P < 0.01；与 4-PBA 组比较，ΔP < 0.05。

Note: Compared with the control group, *P < 0.05, **P < 0.01; compared with the model group, #P < 0.05, ###P < 0.01; compared with the 4-PBA group, ΔP < 0.05.

细胞的炎症反应^[24]以及降低 DPN 大鼠血清中的炎症水平^[25]，但有关温通活血乳膏作用于施万细胞的具体机制，还需进一步研究。

本次实验旨在说明温通活血乳膏的作用机制是否是调控施万细胞中 UPR 信号通路和炎症的反应。髓鞘与坐骨神经紧密关联，我们首先观察了电镜下大鼠坐骨神经的形态结构，其中髓鞘的形态与线粒体的水肿情况在用药前后有显著差异，并且热甩尾实验中用药前后大鼠热刺激阈值显著降低，均证明了温通活血乳膏在提升坐骨神经损伤的有效性。基于这些结果，为了探索温通活血乳膏治疗后坐骨神经中基因表达的改变，我们进行了全转录组测序实验，通过对筛选出的共有差异基因进行 PPI 网络分析，结果发现炎症因子 IL-6 与药物作用机制密切相关，富集分析显示 IL-6 作为核心枢纽基因，在细胞因子-细胞因子受体通路上富集，该通路在参与 DPN 的免疫和炎症反应中发挥重要作用^[26]。研究显示，UPR 调节免疫应答的方式是通过调节细胞因子的产生而实现的^[27]，这与我们的测序结果相吻合，UPR 通过细胞因子调节的作用将肿瘤坏死因子 (TNF)-α、干扰素 (IFN)-γ 和 IL-6 等炎症因子交织在一起，最终激活了下游炎症信号通路^[28]。其中 UPR 的三个途径也成为影响炎症因子激活的重要组成部分，当因各种外界刺激 GRP78 与它们发生解离时，标志着 ERS 途径的激活^[4]，其中 IRE1 通过调节糖原合酶激酶 3 间接促进 IL-6 的激活^[29]，ATF6 则通过涉及哺乳动物的雷帕霉素信号传导靶标和蛋白激酶 B (Akt) 去磷酸化的通路影响 IL-6 的

激活^[30]，而 PERK 则是通过优先影响抑制因子 κB (IκB) 的表达水平激活 IL-6^[31]，在 PERK 通路的下游，CHOP 还通过转录抑制负调节因子过氧化物酶体增殖物激活受体来增强 IL-6 的信号传导^[32]。所以抑制 ERS 来改善细胞凋亡和炎症反应可能是预防和改善 DPN 的有效策略，为此我们建立了细胞模型，结果表明温通活血乳膏可显著降低高糖培养的 RSC96 细胞中 PERK、IRE1、ATF6、GRP78、CHOP 和 IL-6 的蛋白表达，减轻了 UPR 通路下所发生的 ERS 以及凋亡和炎症反应。这与上述研究结果一致。此外在加用 4-PBA 干预后，得到了与单用温通活血乳膏干预施万细胞相同的蛋白表达结果，进一步证实 ERS 是细胞炎症反应和细胞凋亡的原因，更加佐证了温通活血乳膏对施万细胞的保护作用。

综上所述，本研究初次探讨了温通活血乳膏减轻施万细胞损伤的分子机制，证实了其可调控 UPR/GRP78/IL-6 信号通路改善 ERS，减轻凋亡和炎症反应是改善坐骨神经病理结构、减轻施万细胞损伤、改善患者症状的重要机制。但本实验仍有不足之处，本课题组是首次在细胞层面上以大鼠施万细胞为基础进行药物作用机制的探讨，且乳膏基质成分复杂，定量分析存在困难，故药物未进行成分定量，后续我们会进一步完善研究，为临床治疗 DPN 提供帮助。

参考文献

[1] 赵能江, 杨叔禹, 孙文杰, 等.《国家基层糖尿病防治管理指南 (2022)》中医药内容解读与比较 [J]. 中国中西医结合

- 合杂志, 2023, 43 (2): 232-235.
- [2] Zhu JX, Hu ZY, Luo YF, et al. Diabetic peripheral neuropathy: pathogenetic mechanisms and treatment [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1265372.
- [3] Feldman EL, Callaghan BC, Pop-busui R, et al. Diabetic neuropathy [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5 (1): 42.
- [4] Kong DW, Guo ZL, Yang WQ, et al. Tanshinone II a affects diabetic peripheral neuropathic pain via spinal dorsal horn neuronal circuitry by modulating endoplasmic reticulum stress pathways [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2020, 128 (1): 59-65.
- [5] Kawanaka R, Jin H, Aoe T. Unraveling the connection: pain and endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (9): 4995.
- [6] Xu Y, Lin F, Liao GL, et al. Ripks and neuroinflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61 (9): 6771-6787.
- [7] Gu HB, Wang CY, Li JJ, et al. High mobility group box-1-toll-like receptor 4-phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-mediated generation of matrix metalloproteinase-9 in the dorsal root ganglion promotes chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146 (10): 2810-2821.
- [8] Jin ZS, Zhang QQ, Liu K, et al. The association between interleukin family and diabetes mellitus and its complications: an overview of systematic reviews and meta-analyses [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2024, 210: 111615.
- [9] 陈茜, 王卫群, 李凯利. 温通活血乳膏的抗炎消肿、镇痛及改善微循环作用实验研究 [J]. *中国民康医学*, 2006, (13): 565-566.
- [10] 马丽, 胡晓灵. 络必通颗粒对 DPN 大鼠神经电生理及 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的影响 [J]. *中成药*, 2010, 32 (9): 1587-1589.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, (9): 1069-1072.
- [12] 叶婷, 李晶, 徐利娟, 等. 温通活血乳膏皮肤给药可减轻糖尿病周围神经病变模型大鼠的炎症反应 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26 (32): 5091-5096.
- [13] 刘珊珊, 王先敏, 严琦, 等. 温通活血乳膏通过 GRP78-PERK 通路对糖尿病周围神经病变大鼠施万细胞的保护机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 1-18. (待出版)
- [14] 马丽, 李凯利, 陈茜, 等. 温通活血乳膏治疗糖尿病痛性神经病变 49 例 [A]// 全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病论坛论文集 [C]. 2012: 454-456.
- [15] 沈玉国, 冯程程, 马静. 温通活血乳膏治疗早期糖尿病下肢血管病变的疗效观察 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3 (58): 11653-11654, 11656.
- [16] Hu R, Dun XP, Singh L, et al. Runx2 regulates peripheral nerve regeneration to promote schwann cell migration and re-myelination [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19 (7): 1575-1583.
- [17] Wei CQ, Guo YX, Ci Z, et al. Advances of schwann cells in peripheral nerve regeneration: From mechanism to cell therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 175: 116645.
- [18] Patel S, Pangarkar A, Mahajan S, et al. Therapeutic potential of endoplasmic reticulum stress inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38 (6): 1841-1856.
- [19] Esser PR, Huber M, Martin SF. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory response in allergic contact dermatitis [J]. *Eur J Immunol*, 2023, 53 (7): e2249984.
- [20] Di Conza G, Ho PC. ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity [J]. *Cells*, 2020, 9 (3): 695.
- [21] Wang ZX, Zhang L, Lu B, et al. Causal relationships between circulating inflammatory cytokines and diabetic neuropathy: a mendelian randomization study [J]. *Cytokine*, 2024, 177: 156548.
- [22] Cheng YF, Chen YN, Li KZ, et al. How inflammation dictates diabetic peripheral neuropathy: an enlightening review [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30 (4): e14477.
- [23] Liu YP, Shao SJ, Guo HD. Schwann cells apoptosis is induced by high glucose in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Life Sci*, 2020, 248: 117459.
- [24] 马丽, 冯程程, 徐利娟, 等. 温通活血乳膏对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、NF- κ B 表达的影响 [J]. *中成药*, 2018, 40 (9): 2058-2062.
- [25] 陈茜, 冯程程, 李凯利. 温通活血乳膏对 STZ 诱导的 DPN 大鼠炎症因子的影响 [J]. *新疆中医药*, 2017, 35 (3): 1-4.
- [26] Hui Z, Chen YM, Gong WK, et al. Shared and specific biological signalling pathways for diabetic retinopathy, peripheral neuropathy and nephropathy by high-throughput sequencing analysis [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2022, 19 (4): 14791641221122918.
- [27] Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, et al. The unfolded protein response in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16 (8): 469-484.
- [28] Smith JA. Regulation of cytokine production by the unfolded protein response; implications for infection and autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 422.
- [29] Rahman MK, Umashankar B, Choucair H, et al. The inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) endoplasmic reticulum stress pathway promotes MDA-MB-231 cell survival and renewal in response to the aryl-ureido fatty acid CTU [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2024, 171: 106571.
- [30] Huang CY, Deng JS, Huang WC, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice, through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways, and suppressing oxidative stress-mediated ER stress-induced apoptosis and autophagy [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (6): 1742.
- [31] Jiao B, Zhang WC, Zhang CX, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B contributes to neuropathic pain by aggravating NF- κ B and glial cells activation-mediated neuroinflammation via promoting endoplasmic reticulum stress [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30 (2): e14609.
- [32] He MZ, Guo XJ, Jia J, et al. Regulatory mechanisms underlying endoplasmic reticulum stress involvement in the development of gestational diabetes mellitus entail the CHOP-PPAR α -NF- κ B pathway [J]. *Placenta*, 2023, 142: 46-55.

(收稿日期: 2024-10-11; 修回日期: 2024-11-13)

基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术对茯神不同部位的化学成分分析

陈妍¹, 张越^{1,2}, 王妍妍^{1,2}, 杜方平^{1,2,3}, 王凤玲^{1,4}, 彭代银^{1,2}, 俞年军^{1,2}, 陈卫东^{1,2}, 王雷^{1,2*} (1. 安徽中医药大学药学院, 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. 金寨县金山寨食(药)用菌种植专业合作社, 安徽 六安 237300; 4. 安徽医科大学附属合肥医院, 合肥 230022)

摘要: **目的** 应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱技术(UPLC-Q-Orbitrap-MS)比较茯神不同部位(茯神皮、白茯神、茯神木)的化学成分差异。**方法** 采用 Hypersil GOLD aQ C18 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱; 流速为 0.2 mL·min⁻¹; 进样体积为 2 μL; 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱; 采用电喷雾离子源, 正、负离子模式扫描, 根据精确质荷比和二级质谱碎片离子信息, 结合相关文献及质谱数据库鉴定茯神不同部位的化学成分。此外, 对各样品质谱数据进行归一化处理, 再利用聚类热图、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)对茯神皮、白茯神、茯神木的差异成分进行分析。**结果** 在正、负离子模式下, 从茯神乙醇提取物中共鉴定出 74 个化合物, 包括茯神皮 53 个、白茯神 59 个、茯神木 62 个, 其中茯神皮特有成分 2 个, 白茯神特有成分 7 个, 茯神木特有成分 10 个, 三个部位共有成分有 45 个(包括茯苓酸、松苓新酸、茯苓新酸 B、多孔菌酸 C、去氢土莫酸等)。按种类可分为萜类、有机酸类、氨基酸类、脂肪酸类、挥发油类、糖类和甾醇类等。聚类热图、PCA 及 OPLS-DA 结果表明茯神不同部位化学成分含量存在差异, 根据 VIP 值 > 1 共筛选得到 18 个主要差异成分。**结论** UPLC-Q-Orbitrap-MS 可以对茯神不同部位化学成分进行快速分析鉴定, 三个部位的含量存在部分差异。本研究可为茯神的质量控制及药效物质研究提供参考。

关键词: 茯神; UPLC-Q-Orbitrap-MS; 化学成分; 定性分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0328-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.006

Chemical compositions of different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fushen) based on UPLC-Q-Orbitrap-MS

CHEN Yan¹, ZHANG Yue^{1,2}, WANG Yan-yan^{1,2}, DU Fang-ping^{1,2,3}, WANG Feng-ling^{1,4}, PENG Dai-yin^{1,2}, YU Nian-jun^{1,2}, CHEN Wei-dong^{1,2}, WANG Lei^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Ministry of Education-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Medicinal Materials, Hefei 230012; 3. Jinzhai County Jinshanzhai Food (Medicinal) Mushroom Cultivation Specialized Co-operation Group, Lu'an Anhui 237300; 4. Hefei Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract: Objective To compare the differences in chemical compositions of different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fushen) (Fushen skin, white Fushen, and Fushen wood) with ultra-performance liquid chromatography-linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS). **Methods** An Hypersil GOLD aQ C18 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) column was used. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. The injection volume was 2 μL. The mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid in water with gradient elution. The electrospray ionization (ESI) source was used in the

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 82204748); 中华中医药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重点项目 (No.2022AH050512); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科中药资源学(药用植物学)建设项目 (No. zyyzdxk-2023095)。

作者简介: 陈妍, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: 1262383510@qq.com * **通信作者:** 王雷, 男, 副教授, 主要从事药物体内过程、道地药材品质提升、药物分析新技术与新方法研究, email: wanglei@ahtcm.edu.cn

positive and negative ion scanning modes to identify Fushen based on the precise mass-to-charge ratio and the information of the fragmented ions from the secondary mass spectra in conjunction with relevant literature and mass spectral database. Based on the precise mass-to-charge ratio and secondary mass spectrometry fragment ion information, the chemical compositions of different parts of Fushen were identified by combining relevant literature and mass spectrometry database. In addition, the mass spectral data were normalized before using clustering heat map, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) to analyze the differential compositions of Fushen skin, white Fushen and Fushen wood. **Results** Totally 74 compounds of Fushen were identified in positive and negative ionization modes, including 53 compounds from Fushen skin, 59 compounds from white Fushen, and 62 compounds from Fushen wood, among which there were 2 specific compounds in Fushen skin, 7 in white Fushen, and 10 in Fushen wood. There were 45 common components in the three parts, including pachymic acid, dehydrotrametenolic acid, pachymic acid B, pachymic acid C, dehydrotuberlic acid and so on. Those compounds were classified as triterpenoids, organic acids, amino acids, fatty acids, volatile oils, sugars and sterols, etc. The clustering heat map, PCA, and OPLS-DA showed differences in the chemical compositions in different parts of Fushen and totally 18 main differential components were screened according to $VIP > 1$. **Conclusion** UPLC-Q-Orbitrap-MS can quickly analyze and identify the chemical compositions of different parts of Fushen. The differences in the content of the three parts vary, providing an experimental and theoretical basis for the quality control and pharmacodynamic substance of Fushen.

Key words: Fushen; UPLC-Q-Orbitrap-MS; chemical composition; qualitative analysis

茯苓为多孔菌科植物真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核，是寄生在松树上的一种真菌，为我国的传统中药材^[1]。茯神为茯苓块中穿有坚实细松根者，松根即为松木，似朽木状，质松体轻。外周带有残留的白质部分，呈白色或灰白色，内部呈木质状，称之为茯神木。《本草经疏》^[2]云：“茯神抱木心而生，以此别于茯苓。”可见，茯神与茯苓的区别主要在于茯神中间的茯神木。传统中医认为茯神具有宁心安神、健脾利水等功效，多用于治疗失眠、惊悸、健忘、焦虑、小便不利等症^[3-4]。茯神含有多糖类、三萜类、蛋白质、挥发油以及多种微量元素，具有广泛的药理活性^[5-7]。《中国药典》1963 年版^[8]曾收录“茯神”，后来历版药典均未再收录，但其仍旧被广泛使用^[9]。

近年来，随着现代分析技术手段的发展，茯神活性成分的相关研究已有较大进展，但尚缺乏全面、系统的研究。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱技术 (UPLC-Q-Orbitrap-MS) 是目前进行多成分鉴定的常用方法，具有分析速度快、选择性好、灵敏度和准确度高的优点，可以同时应对不同中药的复杂基质^[10-11]。因此，本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 对茯神不同部位的乙醇提取物进行化学成分定性表征，并结合化学模式识别方法对茯神不同部位化学成分进行比较分析，以期为茯神的质量控制、资源开发和临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo Scientific Q-Extractive Orbitrap 高分辨率质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); AB135-S 十万分之一电子分析天平 (德国 METTLER TOLEDO 公司); LGJ-18S 冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); TG16-WS 台式高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); CR-060S 超声波清洗机 (深圳市春霖清洗设备有限公司)。

1.2 试剂

水为屈臣氏蒸馏水; 色谱级甲醇、乙腈, 质谱级甲醇、乙腈 (美国 Thermo Fisher 公司); 其余试剂均为分析纯; 对照品茯苓酸 A (纯度: 99.8%, 批号: AFCC0151)、茯苓酸 B (纯度: 99.8%, 批号: AFCI0601)、多孔菌酸 C (纯度: 99.8%, 批号: AZCI2114)、松苓新酸 (纯度: 99.8%, 批号: P24J10S80630)、去氢土莫酸 (纯度: 99.8%, 批号: AFCJ3001) (成都艾博克生物科技有限公司)。茯神来自安徽省六安市金寨县, 由安徽中医药大学俞年军教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓中间抱有松根的菌核, 即为茯神。褐色的外皮部分称为茯神皮 (FSP), 白质部分称为白茯神 (BFS), 中心抱有松根的白色部分称为茯神木 (FSM), 如图 1 所示。茯神按三个部位分离, 烘干, 粉碎备用。



图1 茯神剖面图

Fig 1 Section of Fushen

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品茯苓酸 A、茯苓酸 B、多孔菌酸 C、松苓新酸、去氢土莫酸，分别用色谱级甲醇溶解，制成质量浓度在 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量，加甲醇稀释成一定浓度，混匀，用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，即得。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定茯神皮、白茯神、茯神木粉末各 1 g ，分别置具塞锥形瓶中，精密加入 40 mL 无水乙醇，称定质量， $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下超声提取 60 min 。将样品进行摇匀和过滤，取滤液减压浓缩，冷冻干燥后溶于 5 mL 甲醇，通过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

2.3 色谱条件

Hypersil GOLD aQ C18 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$) 色谱柱；流动相：乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B)；梯度洗脱 ($0 \sim 2 \text{ min}$, $40\% \sim 55\% \text{ A}$ ； $2 \sim 4 \text{ min}$, $55\% \sim 47\% \text{ A}$ ； $4 \sim 13 \text{ min}$, $47\% \sim 59\% \text{ A}$ ； $13 \sim 29 \text{ min}$, $59\% \sim 90\% \text{ A}$ ； $29 \sim 30 \text{ min}$, $90\% \text{ A}$ ； $30 \sim 37 \text{ min}$, $90\% \sim 40\% \text{ A}$)；检测波长为 245 nm ；流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ；进样体积为 $2 \mu\text{L}$ 。

2.4 质谱条件

加热电喷雾离子源 (HESI 源)，正、负离子模式扫描。扫描模式：Small Molecule；屏蔽气流速： 40 arb ；辅助气流速： 7 arb ；正离子模式喷雾电压： 3.5 kV ；负离子模式喷雾电压： 2.5 kV ；离子传输管温度： $320 \text{ }^\circ\text{C}$ ；雾化温度： $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ；干燥气温度： $400 \text{ }^\circ\text{C}$ ；扫描范围 m/z ： $50 \sim 1200$ ；分辨率：一级 60 000 ，二级 30 000 ；归一化碰撞能： 20% 、 40% 、 60% ；自动增益控制目标为标准模式；注入时间模式：自动。

2.5 数据处理

通过检索中国知网 (CNKI)、美国生物医学文献数据库 (PubMed) 和中国天然产物化学成分库 (CNPD) 等文献数据库，收集文献中茯神有关

的化学成分相关信息，包括化学成分名称、类别、分子式、精确分子量和离子碎片等^[12-19]。最后，将数据导入 Compound Discoverer 3.3 软件，建立茯神化学成分数据库。使用 Compound Discoverer 3.3 分析软件对质谱原始文件进行特征峰提取，同时将化合物的质谱信息与 mzCloud、ChemSpider、mzVault 等数据库以及茯神自建数据库进行比对，根据一级质谱提供的相对分子质量，采用 Xcalibur 4.0 (美国 Thermo Fisher 公司) 收集原始数据，导入 CD 软件创建未知化合物鉴定模板，对数据进行峰归一化和峰提取。该软件通过推测化合物的元素组成，推断出化合物的结构式。将其与同条件下对照品的裂解规律进行对比，结合相关文献报道的化合物裂解规律，完成未知化合物的识别鉴定。

3 结果

3.1 茯神不同部位的乙醇提取物

利用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 在正、负离子模式下对三个部位进行分析，茯神皮、白茯神、茯神木的正、负离子模式总离子流图见图 2~4。在正、负离子模式下，三个部位组分均可采集到丰富的代谢物信息。相比较之下，正离子模式采集的信息比负离子模式少，茯神皮、白茯神、茯神木的负离子模式的提取离子色谱图见图 5。扣除空白背景，设置质量偏差范围在 $1/100 \text{ 000}$ 内，排除二级质谱为空白的质谱信号。在正、负离子模式下，茯神乙醇提取物中共识别出化合物 74 个，茯神皮含 53 个、白茯神含 59 个、茯神木含 62 个，其中萜类 40 个、有机酸类 4 个、氨基酸类 4 个、脂肪酸类 15 个、挥发油类 4 个、糖类 6 个以及 1 个甾醇类， 74 个化合物的具体信息见表 1。

3.2 茯神中主要化学成分的质谱裂解规律

3.2.1 三萜类化合物的结构鉴定 三萜类为茯神中主要存在的化合物，本次从茯神乙醇提取物中鉴定出三萜类化合物 39 个。以化合物 **32** 茯苓新酸 B 为例，该化合物分子量为 484.3191 ，分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$ ，其结构为 3, 4-开环-羊毛甾-7, 9(11)-二烯型三萜。在负离子模式下其准分子离子峰为 m/z 483.3118 ，脱去一个 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 为碎片 m/z 409.2748 ，脱去一个 CO_2 产生特征碎片离子 m/z 365.2836 ，再脱去一个 CH_2 为碎片 m/z 349.2510 ，具体裂解过程见图 6。

3.2.2 脂肪酸类的结构鉴定 本次从茯神乙醇提取物中鉴定出脂肪酸类共 15 个，包括 3-叔丁基己二酸、辛二酸、壬二酸、8-异-15-酮-PGE2、12-氧代植物二烯酸、12, 13-二羟基十八烷-9-烯酸等。此类化合物在正负离子模式下均有响应，但在负离子模式下响应更好，绝大多数化合物是从负离子模式下检测出，结合质谱信息可以看出此类化合物裂

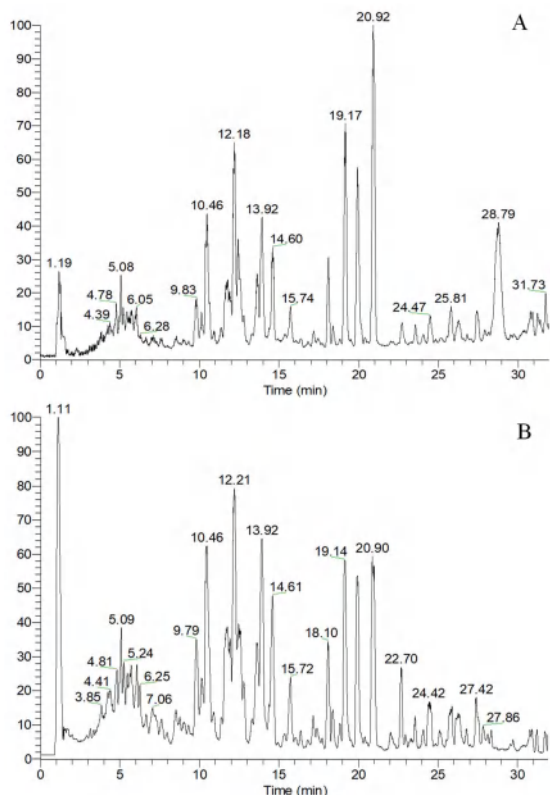


图 2 茯神皮醇提物正离子(A)和负离子(B)模式总离子流图
Fig 2 Total ion flow diagrams of positive (A) and negative (B) ion modes of Fushen skin alcoholic extracts

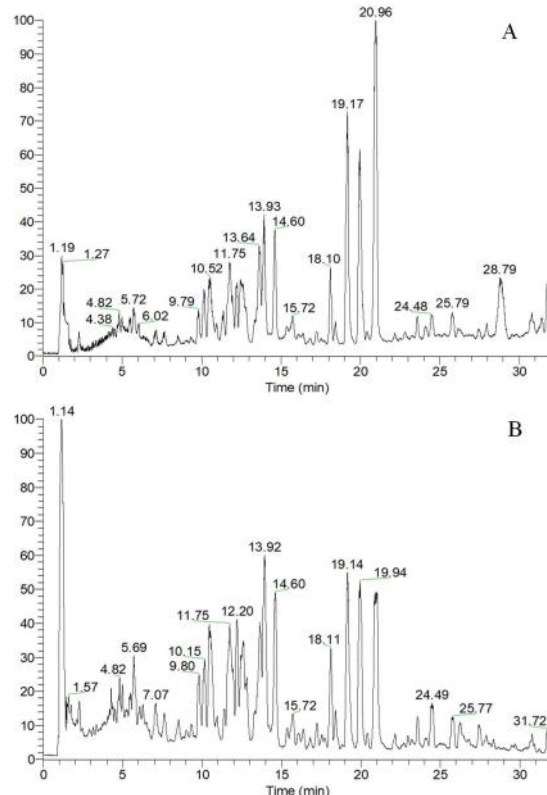


图 4 茯神木醇提物正离子(A)和负离子(B)模式总离子流图
Fig 4 Total ion flow diagrams of positive (A) and negative (B) ion modes of Fushen wood alcoholic extracts

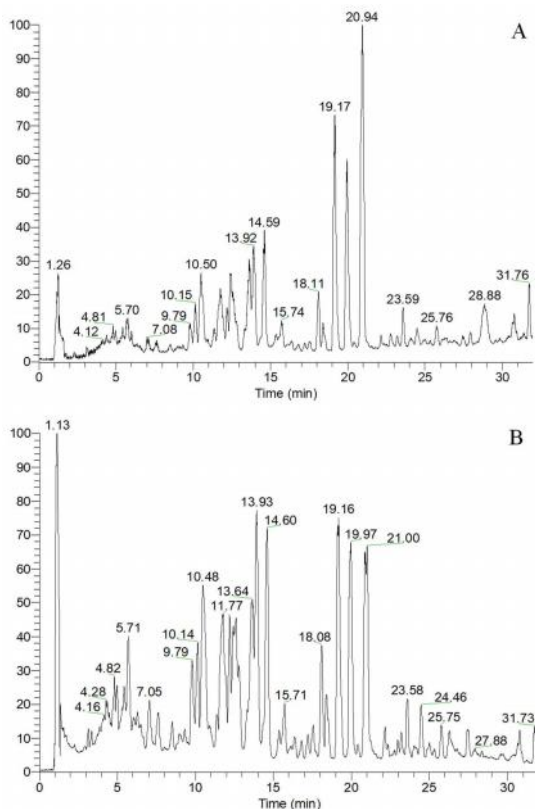


图 3 白茯神醇提物正离子(A)和负离子(B)模式总离子流图
Fig 3 Total ion flow diagrams of positive (A) and negative (B) ion modes of white Fushen alcoholic extracts

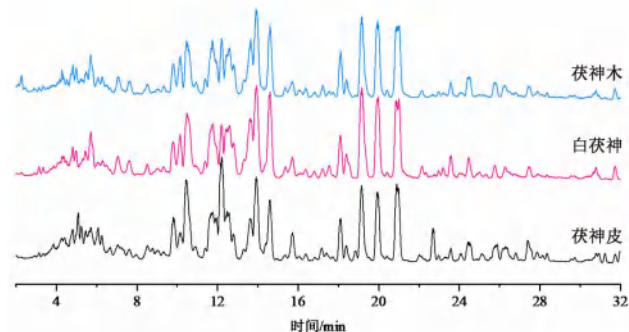


图 5 茯神皮、白茯神、茯神木负离子模式的提取离子色谱图
Fig 5 Extracted ion chromatograms of negative ion patterns of Fushen skin, white Fushen and Fushen wood

解规律主要是 H_2O 、 CO 、 CO_2 等中性离子的丢失。以化合物 **23** 8-异-15-酮-PGE₂ 为例, 该化合物分子量为 350.2091, 分子式为 $C_{20}H_{30}O_5$ 。在负离子模式下其准分子离子峰为 m/z 357.2378, 脱去一个 CO_2 为碎片 m/z 313.1823, 一个 C_2H_2 消失后出现 m/z 287.2018, 继而脱去一个 H_2O 分子, 出现 m/z 269.1917, 而离子碎片 m/z 287.2018 脱去一个 C_2H_2 后出现 m/z 261.1498, 具体裂解过程见图 7。

3.2.3 糖类的结构鉴定 从样本中共鉴定出糖类化合物糖类共 6 个, 包括 L-阿拉伯糖醇、N-乙酰基-D-氨基葡萄糖、D-甘露醇、1, 5-脱氢山梨糖醇等。以化合物 **5** D-甘露醇为例, 该化合物

表 1 茯神正、负离子模式下的化学成分鉴定

Tab 1 Identification of the chemical composition of Fushen in positive and negative ion mode

No.	化合物	分子式	质量		t_R/min	二级离子碎片	加和离子	类型	来源	
			偏差 / $\times 10^{-6}$	理论值 (m/z)						实测值 (m/z)
1	5-羟基-4-甲氧基-5,6-二氢-2H-吡喃-2-酮	$C_6H_8O_4$	1.24	144.0424	145.0497	1.09	128.0706、127.0392、121.9660	$[M+H]^+$	挥发油类	BFS
2	α 、 α -海藻糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-0.71	342.1160	387.1141	1.10	179.1563、161.0455、149.0455	$[M+FA-H]^-$	糖类	FSP、BFS、FSM
3	L-阿拉伯糖醇	$C_5H_{12}O_5$	-0.07	152.0685	151.0612	1.13	149.0457、133.0508、131.0348	$[M-H]^-$	糖类	FSP、FSM
4	N-乙酰基-D-氨基葡萄糖	$C_8H_{15}NO_6$	0.62	221.0901	222.0974	1.13	204.0867、186.0760、180.0867	$[M+H]^+$	糖类	FSM
5	D-甘露醇	$C_6H_{14}O_6$	0.00	182.0790	181.0719	1.14	163.0611、149.0459、131.0349	$[M-H]^-$	糖类	FSM
6	1,5-脱氢山梨糖醇	$C_6H_{12}O_5$	0.04	164.0685	163.0612	1.15	145.0508、133.0505、131.0352	$[M-H]^-$	糖类	FSM
7	D-(一)-奎宁酸	$C_7H_{12}O_6$	-0.63	192.0633	191.0560	1.18	173.0458、129.0562、129.0197	$[M-H]^-$	有机酸类	FSM
8	D-泛醇	$C_9H_{19}NO_4$	0.23	205.1315	206.1387	1.20	188.1275、170.1173、103.0752	$[M+H]^+$	有机酸类	FSP、BFS
9	L-焦谷氨酸	$C_5H_7NO_3$	0.69	129.0427	130.0500	1.20	102.0550、84.0443、56.0494	$[M+H]^+$	氨基酸类	FSM
10	DL-苹果酸	$C_4H_6O_5$	0.36	134.0216	133.0143	1.22	115.0037、89.0245、87.0090	$[M-H]^-$	有机酸类	FSP、BFS
11	L-天冬氨酸	$C_4H_7NO_4$	0.23	133.0375	134.0448	1.28	16.0341、88.0392、74.0236	$[M+H]^+$	氨基酸类	BFS
12	胞壁酸	$C_9H_{17}NO_7$	0.19	251.1006	252.1078	1.28	234.0972、216.0866、198.0755	$[M+H]^+$	糖类	BFS
13	L-酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	2.40	181.0743	182.0816	1.45	165.0550、147.0439、119.0490	$[M+H]^+$	氨基酸类	FSM
14	L-异亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	0.68	131.0947	132.1020	1.55	87.0997、86.0962、69.0698	$[M+H]^+$	氨基酸类	BFS
15	辛二酸	$C_8H_{14}O_4$	0.13	174.0892	173.0820	1.58	129.0929、111.0817、83.0504	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSM
16	壬二酸	$C_9H_{16}O_4$	0.23	188.1049	187.0976	1.76	169.0870、143.1075、125.0972	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
17	3,8,9-三羟基-10-丙基-3,4,5,8,9,10-六氢-2H-氧杂环丁-2-酮	$C_{12}H_{20}O_5$	0.18	244.1311	243.1238	1.85	243.1241、225.1134、207.1028	$[M-H]^-$	挥发油类	FSP
18	3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸	$C_{12}H_{16}O_5$	0.07	240.0998	239.0925	2.02	195.1029、177.0923、151.1129	$[M-H]^-$	有机酸类	FSP、BFS、FSM
19	3-叔丁基己二酸	$C_{10}H_{18}O_4$	0.36	202.1206	201.1133	2.09	183.1027、157.1241、137.0973	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
20	1,4a-二甲基-9-氧代-7-丙-2-基-3,4,10,10a-四氢-2H-菲-1-羧酸	$C_{20}H_{26}O_3$	-0.02	314.1882	315.1955	2.26	297.1843、269.1897、251.1794	$[M+H]^+$	二萜类	BFS、FSM
21	(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_5$	-0.03	330.2406	329.2333	2.88	293.2122、229.1445、211.1389	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
22	corchorifatty acid F	$C_{18}H_{32}O_5$	0.88	328.2253	327.2180	3.61	309.2082、291.1969、227.1285	$[M-H]^-$	脂肪酸类	BFS
23	8-异-15-酮-PGE ₂	$C_{20}H_{30}O_5$	-0.38	350.2091	357.2378	4.179	313.1823、287.2018、269.1917	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSM
24	12-氧代植物二烯酸	$C_{18}H_{28}O_3$	0.65	292.2040	293.2113	4.87	275.2007、257.1899、247.2066	$[M+H]^+$	脂肪酸类	FSM
25	arjungenin	$C_{30}H_{48}O_6$	0.09	504.3451	503.3379	4.99	485.3271、473.3250、471.3128	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
26	12,13-二羟基十八烷-9-烯酸	$C_{18}H_{34}O_4$	0.59	314.2459	313.2386	6.16	311.2216、296.2282、227.2173	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP、BFS
27	(+/-)9-HpODE	$C_{18}H_{32}O_4$	0.77	312.2303	311.2230	6.94	311.1731、293.2122、275.2012	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
28	茯苓新酸 D	$C_{31}H_{46}O_6$	0.32	514.3296	513.3223	7.06	483.3107、465.3016、441.3017	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
29	茯苓新酸 E	$C_{30}H_{44}O_6$	1.48	500.3145	499.3073	7.30	469.3288、455.3547、453.3376	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
30	β ,16 α -二羟基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸	$C_{30}H_{46}O_4$	0.14	470.3397	469.3324	9.81	425.3445、423.3266、409.3109	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
31	6 α -羟基去氢茯苓酸	$C_{33}H_{50}O_6$	0.44	542.3610	541.3537	10.09	498.3725、497.3638、479.3540	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
32	茯苓新酸 B	$C_{30}H_{44}O_5$	0.42	484.3191	483.3118	10.45	409.2748、365.2836、349.2510	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
33	3-乙酰氧基-16 α ,26-二羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸	$C_{32}H_{50}O_6$	0.15	530.3608	529.3535	10.55	483.3541、467.3167、463.3371	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM
34	3-O-阿拉伯吡喃基墩墩酸	$C_5H_{56}O_7$	0.83	588.4031	587.3958	10.97	543.3559、541.3549、525.3628	$[M-H]^-$	三萜类	BFS
35	9,10-环氧-12Z-十八碳烯酸	$C_{18}H_{32}O_3$	0.85	296.2354	295.2281	11.40	227.2175、183.1028、171.0291	$[M-H]^-$	脂肪酸类	FSP
36	α -亚麻酸	$C_{18}H_{30}O_2$	0.72	278.2248	279.2321	11.41	261.2209、243.2109、209.1541	$[M+H]^+$	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
37	16 α -acetoxypolyporenic acid CS ₂	$C_{33}H_{48}O_6$	0.53	540.3454	539.3381	11.48	557.3850、540.3403、539.3384	$[M-H]^-$	三萜类	FSP、BFS、FSM

续表 1

No.	化合物	分子式	质量		t_R/min	二级离子碎片	加和离子	类型	来源
			偏差 / $\times 10^{-6}$	理论值 (m/z)					
38	25-羟基茯苓酸	C ₃₃ H ₅₂ O ₆	0.63	544.3767	543.3695	12.08 543.3695、481.3341、467.3532	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
39	茯苓新酸 G	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	3.81	486.3364	485.3292	12.35 485.3400、467.3168、441.3367	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
40	茯苓新酸 DM	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	0.84	528.3455	527.3383	12.69 481.2962、467.3176、431.2810	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
41	13S-羟基-9Z, 11E, 15Z-十八碳三烯酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	1.26	294.2199	295.2271	13.34 227.2165、259.2062、241.1951	[M+H] ⁺	脂肪酸类	FSP、FSM
42	16-氧-乙酰茯苓酸	C ₃₃ H ₅₄ O ₆	0.08	570.3921	569.3847	13.37 525.3534、483.3479、466.3367	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
43	16 α -羟基松苓新酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	1.14	472.3558	471.3485	14.23 427.3565、409.3110、339.2705	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
44	去氢土莫酸	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	0.14	484.3553	483.3481	14.61 439.2595、439.3432、423.3266	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
45	茯苓新酸 K	C ₃₁ H ₄₈ O ₇	1.67	532.3409	531.3336	14.88 513.3631、495.3108、485.2908	[M-H] ⁻	三萜类	BFS、FSM
46	O-乙酰基茯苓酸甲酯	C ₃₃ H ₅₆ O ₆	0.69	584.4081	583.4005	15.42 545.3758、541.3547、465.3384	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
47	16-去氧茯苓酸 B	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	1.30	468.3246	467.3173	15.68 423.3280、421.3108、407.2963	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
48	土莫酸	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	0.62	486.3712	485.3639	15.72 486.3687、421.3491、413.2966	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
49	16 α 、25-二羟基依布利酸	C ₃₁ H ₄₈ O ₅	0.95	500.3507	499.3433	16.13 455.3532、456.3476、359.2583	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
50	integracin C	C ₃₃ H ₅₂ O ₆	1.55	568.3773	567.3700	17.08 567.3689、507.3475、228.5374	[M-H] ⁻	挥发油类	FSP、BFS、FSM
51	茯苓新酸 A	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	0.61	498.3348	497.3276	17.81 497.1103、479.3189、453.3376	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
52	茯苓新酸 AM	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	0.40	512.3504	511.3431	18.10 465.3045、455.0188、451.3219	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
53	16 α -羟基-3, 4-开环羊毛甾-4(28), 7, 9(11), 24(31), 25(27)-五烯-3, 21-二酸	C ₃₃ H ₄₈ O ₅	0.68	524.3505	523.3433	18.39 523.3432、508.3217、463.3219	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
54	茯苓新酸 HM	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	0.30	514.3660	513.3587	19.18 453.3376、59.0139	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
55	去氢茯苓酸	C ₃₃ H ₅₀ O ₅	0.00	526.3658	525.3585	19.37 526.3632、465.3366、451.3199	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
56	茯苓酸	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	0.16	528.3816	527.3743	20.42 483.3819、467.3529、365.3399	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
57	多孔菌酸 C	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	0.89	482.3400	481.3328	21.44 481.3326、453.3377、453.2560	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
58	25-羟基茯苓新酸 H	C ₃₃ H ₄₈ O ₆	1.45	516.3458	515.3386	21.73 497.3279、425.3072、423.2905	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
59	(3 β , 16 α)-3-乙酰氧基-16-羟基-24-亚甲基羊毛甾-5, 7(9), 11-四烯-21-酸	C ₃₂ H ₄₆ O ₅	1.06	510.3351	509.3278	24.31 497.3252、466.3377、211.6104	[M-H] ⁻	三萜类	BFS、FSM
60	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.71	280.2404	279.2332	25.27 83.0505、59.0139	[M-H] ⁻	脂肪酸类	FSM
61	齐墩果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	0.55	456.3606	455.3532	25.75 455.3533	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
62	去氢齿孔酸	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	-0.34	468.3602	467.3529	26.24 467.3531、371.2591、339.2688	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
63	松苓新酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	0.13	454.3448	453.3375	26.80 371.2257、339.2692、97.0669	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
64	5, 8-过氧化麦角甾醇	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	1.31	428.3296	429.3309	27.04 393.3113、387.3270、369.3147	[M+H] ⁺	甾醇类	BFS、FSM
65	齿孔酸	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	-0.27	470.3759	469.3686	27.46 470.3716、373.2737、330.2699	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
66	顺式-9-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.74	282.2561	281.2488	27.76 227.8616、146.0896、65.9098	[M-H] ⁻	脂肪酸类	FSP、BFS、FSM
67	2-[(1S, 3R) -3-羟基环己基]-5-(8-羟基-2-甲基辛烷-2-基)苯酚	C ₂₁ H ₃₄ O ₃	0.68	334.2510	333.2437	28.14 289.2542、263.2293、249.2216	[M-H] ⁻	挥发油类	FSP、BFS、FSM
68	硬脂酰乙醇酰胺	C ₂₀ H ₄₁ NO ₂	0.86	327.3140	328.3213	29.44 311.2947、310.3109、123.1173	[M+H] ⁺	脂肪酸类	BFS
69	茯苓新酸 CM	C ₃₃ H ₄₈ O ₄	1.01	496.3558	497.3630	30.65 437.3412、419.3312、395.3013	[M+H] ⁺	三萜类	FSP、BFS、FSM
70	β -acetoxy-lanosta-7, 9(11), 24(31)-trien-21-oic acid	C ₃₃ H ₄₈ O ₄	0.14	508.3553	507.3480	30.78 463.3583、447.3257、432.3049	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
71	(3 α , 15 α , 24Z)-3, 15-di-acetoxy-lanosta-7, 9(11), 24-trien-26-oic acid	C ₃₄ H ₅₀ O ₆	1.09	554.3613	553.3541	30.79 493.3324、493.2400、433.3085	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
72	茯苓新酸 CE	C ₃₃ H ₅₀ O ₄	0.51	510.3712	509.3639	30.93 510.3578、449.3437、413.2732	[M-H] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM
73	白桦脂	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	1.25	442.3816	425.3784	31.14 425.3791、407.3687、361.3011	[M+H-H ₂ O] ⁺	三萜类	FSP、FSM
74	乙酰依布利酸	C ₃₃ H ₅₂ O ₄	-0.27	512.3864	511.3793	31.79 465.3407、451.3248、415.2881	[M-H-H ₂ O] ⁻	三萜类	FSP、BFS、FSM

注: FSP. 茯神皮; BFS. 白茯神; FSM. 茯神木。

Note: FSP. Fushen skin; BFS. white Fushen; FSM. Fushen wood.

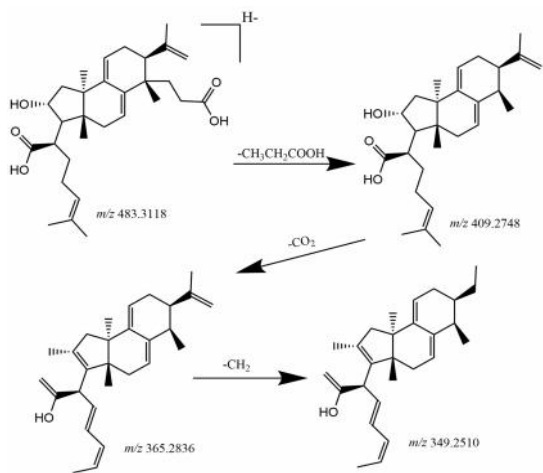


图 6 茯苓新酸 B 的裂解规律

Fig 6 Cleavage pattern of poricoic acid B

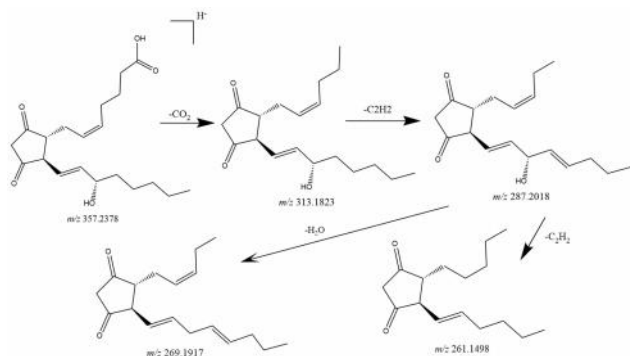


图 7 8-异-15-酮-PGE₂ 的裂解规律

Fig 7 Cleavage pattern of 8-iso-15-keto-PGE₂

分子量为 182.0790, 分子式为 C₆H₁₄O₆。在负离子模式下其准分子离子峰为 *m/z* 181.0719, 脱去一个 H₂O 为碎片 *m/z* 163.0611, 脱去一个 CH₂ 产生碎片 *m/z* 149.0459, 继而再脱去一个 H₂O 生成碎片 *m/z* 131.0349, 具体裂解过程见图 8。

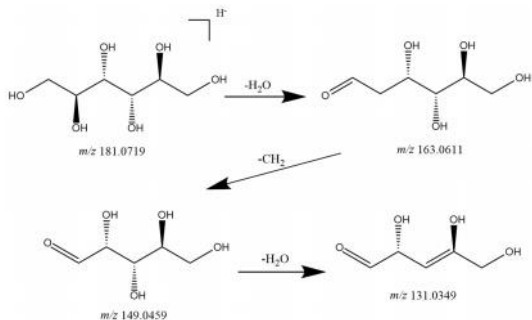


图 8 D-甘露醇的裂解规律

Fig 8 Cleavage pattern of D-mannitol

3.2.4 氨基酸类的结构鉴定 本次从茯神乙醇提取物中鉴定出氨基酸类共 4 个, 包括 L-焦谷氨酸、L-天冬氨酸、L-酪氨酸、L-异亮氨酸等, 绝大多数化合物是在正离子模式下检出。以化合物 13 L-酪氨酸为例, 该化合物分子量为 181.0743, 分子式为 C₉H₁₁NO₃。在正离子模式下其准分子离子峰为

m/z 182.0802, 脱去一个 NH₃ 为碎片 *m/z* 165.0550, 脱去一个 H₂O 产生碎片 *m/z* 147.0439, 再脱去一个 CO 为碎片 *m/z* 119.0490, 继而脱去一个 C₂H₄ 出现碎片 *m/z* 91.0545, 具体裂解过程见图 9。

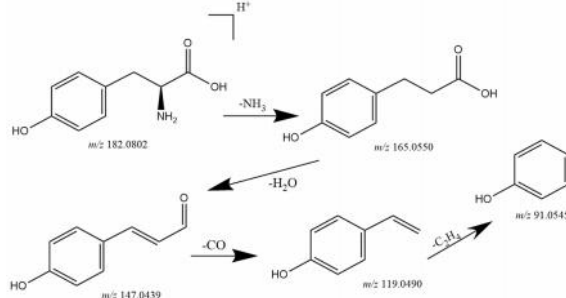


图 9 L-酪氨酸的裂解规律

Fig 9 Cleavage pattern of L-tyrosine

3.2.5 其他类型结构鉴定 从茯神乙醇提取物中鉴定出 5, 8-过氧化麦角甾醇 (化合物 64) 为甾醇类化合物, 分子量为 428.3296, 分子式为 C₂₈H₄₄O₃, 在正离子模式下其准分子离子峰为 *m/z* 429.3309, 脱去两个 H₂O 分子为碎片 *m/z* 393.3113, 脱去六个 H 离子出现碎片 *m/z* 387.3270, 再脱去一个 H₂O 分子, 产生特征离子碎片 *m/z* 369.3147, 具体裂解过程见图 10。除此之外, 还鉴定出 5-羟基-4-甲氧基-5, 6-二氢-2H-吡喃-2-酮、3, 8, 9-三羟基-10-丙基-3, 4, 5, 8, 9, 10-六氢-2H-氧杂环丁-2-酮等挥发油类化合物。化合物 17 的分子式为 C₁₂H₂₀O₅, 在负离子模式下的准分子离子峰为 *m/z* 244.1311 [M-H]⁻, 二级质谱图中主要的碎片离子峰有 *m/z* 243.1241、225.1134、207.1028, 通过与文献^[19] 比对, 可以准确鉴定为 3, 8, 9-三羟基-10-丙基-3, 4, 5, 8, 9, 10-六氢-2H-氧杂环丁-2-酮。化合物 1 的分子式为 C₆H₈O₄, 在正离子模式下的准分子离子峰为 *m/z* 144.0424 [M + H]⁺, 二级质谱图中主要的碎片离子峰有 *m/z* 128.0706、127.0392、121.9660, 通过与文献^[20] 比对, 可以准确鉴定为化合物 1 为 5-羟基-4-甲氧基-5, 6-二氢-2H-吡喃-2-酮。

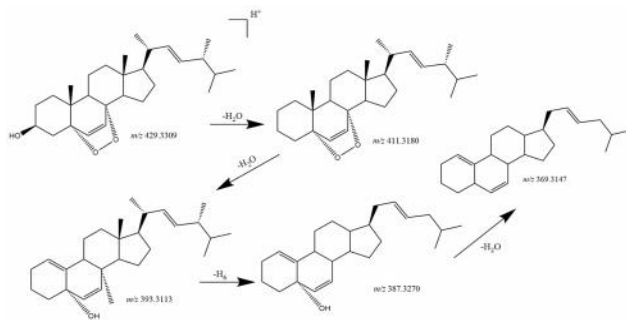


图 10 5, 8-过氧化麦角甾醇的裂解规律

Fig 10 Cleavage pattern of 5, 8-peroxyergosterol

3.3 化学模式识别分析

3.3.1 聚类分析 将各样品 45 种成分的峰面积进行聚类热图的绘制,如图 11A。从图中可以看出,茯神皮(FSP)和白茯神(BFS)聚为一类,茯神木(FSM)聚为一类,且都具有明显的上调、下调区域。

3.3.2 Venn 图 如图 11B 所示,茯神皮、白茯神、茯神木三个部位共有成分 45 个,包括茯苓酸、松苓新酸、茯苓新酸 B、多孔菌酸 C、去氢土莫酸等。茯神皮特有成分 2 个,包括 3, 8, 9-三羟基-10-丙基-3, 4, 5, 8, 9, 10-六氢-2H-氧杂环丁-2-酮、9, 10-环氧-12Z-十八碳烯酸;白茯神特有成分 7 个,包括 5-羟基-4-甲氧基-5, 6-二氢-2H-吡喃-2-酮、L-天冬氨酸、L-异亮氨酸等;N-乙酰基-D-氨基葡萄糖、D-甘露醇、1, 5-脱氢山梨糖醇、L-焦谷氨酸、辛二酸等 10 个成分在茯神木部分鉴定得到。

3.3.3 PCA 与 OPLS-DA 分析 将各样品 45 种成分特征峰的峰面积进行 PCA,从图 11C 中可以看出,不同部位的茯神样本中各组间存在一定的差异,组间有较明显的区分,组内有较明显的相互聚集,并且 QC 样本聚集明显,表明仪器有较好

的稳定性和准确性,模型的区分度和可靠性良好。为了进一步分析不同部位茯神样品间的差异,建立 OPLS-DA 模型(见图 11D),得出的模型解释率参数 R^2X 为 0.698、 R^2Y 为 0.991,模型预测能力参数 Q^2 为 0.933,说明本模型预测能力较好,可靠性较好。OPLS-DA 模型结果中茯神皮、白茯神、茯神木三个部位样品间有着很好的分离和聚类效果,进一步证实了分析结果的可靠性。通过变量重要性投影得到 VIP 值,筛选出不同部位茯神的差异性成分,以 VIP 值 > 1 为标准,得出了 α 、 α -海藻糖、3-叔丁基己二酸、(15Z)-9, 12, 13-三羟基-15-十八碳烯酸、茯苓新酸 B、16 α -acetoxypolyporenic acid CS₂、茯苓新酸 DM、16 α -羟基松苓新酸、去氢土莫酸、松苓新酸、16 α , 25-二羟基依布里酸、O-乙酰基茯苓酸甲酯、integracin C、去氢茯苓酸、去氢齿孔酸、齿孔酸、顺式-9-十八碳烯酸、2-[(1S, 3R) -3-羟基环己基]-5-(8-羟基-2-甲基辛烷-2-基)苯酚、(3 α , 15 α , 24Z)-3, 15-diacetoxylanosta-7, 9 (11), 24-trien-26-oic acid 等 18 个活性成分,具体见图 11E,说明这 18 个共有成分可能是导致三个部位差异的主要物质。

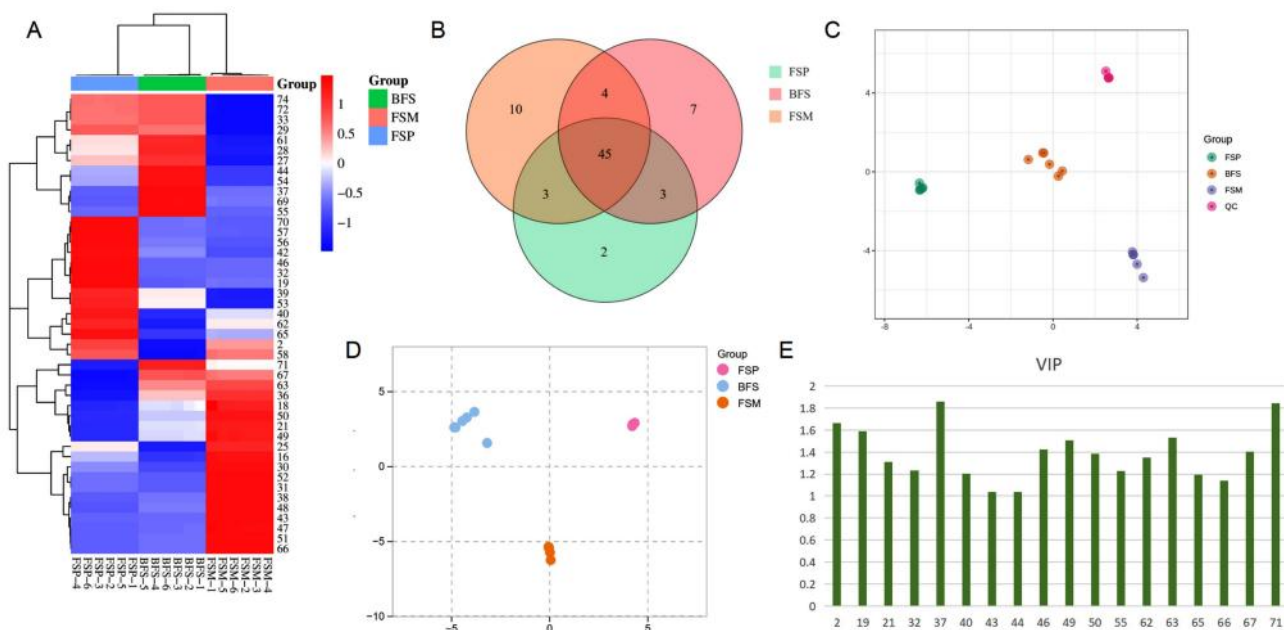


图 11 化学模式识别分析

Fig 11 Chemical pattern recognition analysis

A. 热图 (Heatmap); B. 韦恩图 (Venn); C. PCA; D. OPLS-DA 得分图 (OPLS-DA score plot); E. OPLS-DA 的 VIP 值 (VIP value of OPLS-DA)

4 讨论

本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术,通过 Xcalibur 4.0 软件,在正负离子两种模式下收集样本信息,结合在线成分信息库和自建数据库、离子碎片信息以及相关文献,从茯神乙醇提

取物中获取了 74 个化合物,并对三萜类、脂肪酸类、有机酸类、挥发油类、甾醇类、糖类和氨基酸等 7 种典型化合物类型的裂解规律进行描述,其中以三萜类化合物为主。三萜类化合物是茯神的主要化合物类型^[21-24],具有免疫调节、抗炎及

抗肿瘤等多种生物功效^[23]。

对比茯神皮、白茯神、茯神木三个部位的乙醇提取物鉴定结果发现,不同部位茯神在成分上有较大差异。茯神皮鉴定出 53 个化合物,其中 3, 8, 9-三羟基-10-丙基-3, 4, 5, 8, 9, 10-六氢-2H-氧杂环丁-2-酮和 9, 10-环氧-12Z-十八碳烯酸为特有成分;白茯神鉴定出 59 个化合物,其中 L-天冬氨酸、L-异亮氨酸、5-羟基-4-甲氧基-5, 6-二氢-2H-吡喃-2-酮等 7 个化合物仅在白茯神中存在;茯神木鉴定出 62 个化合物,其中亚油酸、8-异-15-酮-PGE2、L-酪氨酸等 10 个化合物仅在茯神木中发现。通过对茯神不同部位化学成分的分析 and 比较可知,三个部位在化学成分的种类上趋于一致,而在化合物含量上却有一定差异。通过化学模式识别分析筛选得到 3-叔丁基己二酸、松苓新酸、16 α , 25-二羟基依布里酸等 18 个主要差异成分。

本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术对茯神三个部位(茯神皮、白茯神、茯神木)乙醇提取物的化学成分进行成分快速鉴定和比较,首次系统性地揭示了茯神不同部位中物质基础,丰富其成分信息,为进一步探索药效物质基础和临床应用提供部分依据,也为茯神今后的开发利用提供科学依据。

参考文献

[1] 何鹏飞,高敏,文继红,等.茯苓药理作用研究进展[J].云南中医中药杂志,2024,45(8):83-87.
 [2] 陈倩清.缪希雍临证经验及制方特点研究[D].天津:天津中医药大学,2023.
 [3] 胡云飞,王玺,刘晴,等.中药茯神相关研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(1):115-121.
 [4] 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.
 [5] 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.
 [6] 张雪,向瑞平,刘长河.茯神的化学成分和药理作用研究进展[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2009,29(4):19-21.
 [7] 戴慧,覃欣怡,端木彦涛,等.茯神的化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].江西中医药,2022,53(10):68-72.
 [8] 中国药典 1963 年版.一部[S].1963:192.
 [9] 彭华胜,关雪玲,金艳,等.清宫茯神与茯神木药材文物性状鉴定及史料分析[J].中华医史杂志,2022,52

(2):95-99.
 [10] Poltash ML, McCabe JW, Shirzadeh M, et al. Native IM-Orbitrap MS: resolving what was hidden [J]. Trends Analyt Chem, 2020, 124: 115533.
 [11] Luo GL, Lin JH, Cheng WQ, et al. UHPLC-Q-Orbitrap-MS-based metabolomics reveals chemical variations of two types of rhizomes of *Polygonatum sibiricum* [J]. Molecules, 2022, 27(15):4685.
 [12] Zhu LX, Xu J, Zhang SJ, et al. Qualitatively and quantitatively comparing secondary metabolites in three medicinal parts derived from *Poria cocos* (Schw.) Wolf using UHPLC-QTOF-MS/MS-based chemical profiling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 150: 278-286.
 [13] Chen BS, Zhang JJ, Han JJ, et al. Lanostane triterpenoids with glucose-uptake-stimulatory activity from peels of the cultivated edible mushroom *Wolfiporia cocos* [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(26):7348-7364.
 [14] Zou YT, Long F, Wu CY, et al. A dereplication strategy for identifying triterpene acid analogues in *Poria cocos* by comparing predicted and acquired UPLC-ESI-QTOF-MS/MS data [J]. Phytochem Anal, 2019, 30(3):292-310.
 [15] 陈兴龙,张敏,杨琪瑶,等.茯苓 95%乙醇提取物三萜类化学成分的 UPLC-IT-TOF/MS 分析[J].昆明医科大学学报,2021,42(11):1-8.
 [16] Zheng Y, Yang XW. Poriacosones A and B: two new lanostane triterpenoids from *Poria cocos* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(7-8):645-651.
 [17] 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,2016.
 [18] Akihisa T, Nakamura Y, Tokuda H, et al. Triterpene acids from *Poria cocos* and their anti-tumor-promoting effects [J]. J Nat Prod, 2007; 70(6):948-953.
 [19] 王坤凤.茯苓化学成分及质量控制方法研究[D].北京:北京中医药大学,2014.
 [20] Yang M, Zhao YJ, Qin YJ, et al. Untargeted metabolomics and targeted quantitative analysis of temporal and spatial variations in specialized metabolites accumulation in *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fushen) [J]. Front Plant Sci, 2021; 12: 713490.
 [21] 邓桃妹,彭代银,俞年军,等.茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2020,51(10):2703-2717.
 [22] 林琳,崔业波,包海鹰.茯神化学成分及其复方药效学研究[J].中国食用菌,2013,32(3):34-37.
 [23] 王娜,程璐,王浩,等.茯神指纹图谱结合化学模式识别和多指标成分定量研究[J].中草药,2024,55(1):279-286.
 [24] 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.

(收稿日期:2024-09-12;修回日期:2024-10-18)

血管紧张素转化酶制备工艺优化研究

褚辉程¹, 陈海英¹, 张文静¹, 郭嵩然¹, 陈祖君^{2*}, 王灵芝^{1*} (1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102400; 2. 中国医学科学院阜外医院, 北京 100037)

摘要: 目的 对猪肺中血管紧张素转化酶 (ACE) 进行制备工艺优化研究。方法 以猪肺为原料, 采用硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析、超滤及 Superdex 200 凝胶过滤层析等手段, 分离纯化 ACE, 并对酶粗提缓冲液、离子交换层析洗脱液进行优化。采用 SDS-PAGE 进行 ACE 样品纯度鉴定。采用反相高效液相色谱法测定卡托普利对 ACE 的抑制活性, 等温滴定量热法测定两者结合的热力学特征。结果 ACE 最佳制备工艺为: 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS (pH 8.3) 作为 ACE 粗提缓冲液, 离子交换层析中以 $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-BBS 作为洗脱液, 进而采用分子筛层析可获得电泳纯 ACE, 其比活为 $0.3020 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 纯化倍数为 223.54 倍, 总酶活为 0.43 U, 酶活回收率为 2.71%。卡托普利 ($2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 ACE 的抑制率为 85.65%, 两者的结合位点数为 0.194, 结合常数 (K_a) 为 $7.685 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。结论 本工艺获得了高纯度高活性的 ACE, 为心血管类新药研发提供高质量的工具酶。

关键词: 猪肺; 血管紧张素转化酶; 分离纯化; 工艺优化; 等温滴定量热法

中图分类号: R977.3, Q814.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0337-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.007

Preparation optimization of angiotensin I converting enzyme

CHU Hui-cheng¹, CHEN Hai-ying¹, ZHANG Wen-jing¹, GUO Song-ran¹, CHEN Zu-jun^{2*}, WANG Ling-zhi^{1*} (1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400; 2. Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037)

Abstract: Objective To optimize the preparation of angiotensin I converting enzyme (ACE) in pig lungs. **Methods** ACE was isolated and purified from pig lungs by combining ammonium sulfate salting out, DEAE-Sepharose FF anion exchange chromatography, ultrafiltration and Superdex 200 gel filtration chromatography. The purity of ACE samples was assayed by SDS-PAGE. The inhibitory activity of captopril on ACE was determined by reversed phase high performance liquid chromatography, and the thermodynamic characteristics of captopril binding with ACE were evaluated by isothermal titration calorimetry. **Results** The optimal preparation of ACE was as follows: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS (pH 8.3) as the crude extraction buffer, $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-BBS as the ion exchange chromatography eluent, followed by molecular sieve chromatography to obtain ACE with electrophoretic purity. The enzyme specific activity, purification fold, total enzyme activity and enzyme activity recovery rate were $0.3020 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 223.54, 0.43 U and 2.71%, respectively. The inhibitory rate of captopril ($2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on ACE was 85.65% with the binding site of 0.194 and the binding constant (K_a) of $7.685 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. **Conclusion** ACE with high-purity and high-activity is obtained from pig lungs, which can provide high-quality reagent enzymes for the development of new cardiovascular drugs.

Key words: pig lung; angiotensin I converting enzyme; separation and purification; process optimization; isothermal titration calorimetry

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82474111); 北京中医药大学纵向发展基金 (No.2023-ZXFZJJ-064)。

作者简介: 褚辉程, 男, 硕士, 主要从事中药活性蛋白与多肽方面的研究, email: 2918542423@qq.com *通信作者: 陈祖君, 男, 主任医师、教授, 主要从事心血管疾病重症医学方面的研究, email: chenzujun@fuwai.pumc.edu.cn; 王灵芝, 女, 教授, 主要从事中药活性蛋白与多肽方面的研究, email: wanglz@bucm.edu.cn

血管紧张素转化酶 (angiotensin I converting enzyme, ACE) 是一种 I 型跨膜糖蛋白, 又名激肽酶 II, 作为肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 和激肽释放酶-激肽系统的关键成员, 在血压及心血管功能调控等方面起着至关重要的作用^[1]。人类 ACE 基因位于 17 号染色体长臂端 2 区 3 带, 包含 26 个外显子和 25 个内含子^[2]。ACE 基因选择性剪接产生多种转录变体, 分别编码体细胞型 ACE (somatic ACE, sACE) 和睾丸型 ACE (testic ACE, tACE) 亚型。sACE 中 N 端和 C 端的两个同源结构域共同发挥血压调节作用, 而 tACE 只有一个 C 端活性结构域, 主要与男性生育有关^[3-4]。sACE 通过疏水性 C 端锚定在细胞膜上, 在哺乳动物肺、肾、脑、小肠和血浆中均有分布, 其中肺血管内皮细胞中含量丰富且活性高, 锚定位点处断裂后以可溶性形式释放到血浆中, 不同物种及不同组织来源的 sACE 分子量因氨基酸组成及糖基化程度差异而不同 (130 ~ 180 kDa)^[5-7]。人 sACE 由 1306 个氨基酸组成, 等电点约为 5.1, 无规卷曲和 α -螺旋为其主要结构元件^[8-10]。作为一种 Zn^{2+} 和 Cl^{-} 依赖性的二肽基羧肽酶, ACE 可水解底物肽链 C 端二肽残基^[11], 在 RAS 系统中可将无升压活性的血管紧张素 I 水解为具有强烈升压活性的血管紧张素 II; 同时, 在激肽释放酶-激肽系统中将有降压活性的缓激肽降解为无活性的片段^[12]。此外, ACE 还可水解多种底物如促性腺激素释放激素、神经肽 P 物质、脑啡肽、神经降压素等, 因而, ACE 与高血压、炎症、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病以及糖尿病肾病密切相关^[7, 13-14]。酶学研究和药物研发需要大量高纯度的 ACE, 目前 ACE 的分离纯化方法主要有离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析和高效液相色谱法^[5, 15-17]等; 组织来源有猪肺^[17]、兔肺^[18]、猪肾^[19]和大鼠血清^[20]等。然而 ACE 制备工艺烦琐, 分离纯化难度高; 且商品化 ACE 制品价格昂贵, 有时供货周期较长, 严重影响了医药研发进度。猪肺作为生猪加工副产品, 来源便捷, 价格低廉, 故本研究以猪肺为材料, 对 ACE 提取纯化工艺进行优化, 为 ACE 酶学研究、心血管类新药研发提供高纯度、经济实惠的酶制品。

1 材料

1.1 试药

新鲜猪肺 (当地农贸市场); 马尿酸 (HA, 批号: BCKK8243, 纯度: HPLC \geq 98%)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (HHL, 批号: SLBW5368, HPLC \geq 98%)、考马斯亮蓝 R250、超滤管 (截留分子量 100 kDa) (美国 Sigma Aldrich 公司); 卡托

普利 (批号: ZO1015YE13, 纯度: HPLC \geq 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 三氟乙酸 (TFA, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 一步法 PAGE 快捷制备试剂盒 (上海积福生命科学有限公司); DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析填料 (美国 GE Healthcare 公司); Superdex 200 Increase 10/300 GL (美国 Cytiva 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

IKA T10 组织匀浆机 (德国 IKA 公司); HD-5 电脑紫外检测仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); YZ1513 恒流泵 (保定芯之恒流泵有限公司); QuickDrop 超微量分光光度计 (美国 Molecular Devices 公司); DKZ-3 电热恒温振荡水槽 (上海一恒科学仪器有限公司); Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); PowerPac Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); SK-L330-Pro 低速轨道式摇床 (大龙兴创实验仪器股份公司); ÄKTA pure M 蛋白纯化仪 (美国 GE Healthcare 公司); Nano ITC (美国 TA 仪器公司)。

2 方法与结果

2.1 ACE 粗酶液的制备

新鲜猪肺冲洗干净并除去表面薄膜和气管, 切成小块后称取 200 g 组织块加入 1 L 预冷的含 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液 (BBS, pH 8.3) 进行组织匀浆。匀浆液经纱布过滤后收集滤液, 4°C 静置 5 h 后, 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min, 收集匀浆上清液。

匀浆上清液中缓慢加入硫酸铵使其终浓度为 $1.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4°C 静置 4 h, 在 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min, 收集一级盐析上清液。一级盐析上清液中缓慢加入硫酸铵至其终浓度为 $2.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4°C 静置过夜, 于 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min, 收集二级沉淀, 采用适量 BBS 溶解得到二级盐析酶液。将酶液透析 (截留分子量 12 ~ 14 kDa) 24 h, 直至使用 5% BaCl_2 溶液检测透析液无沉淀产生, 截留液于 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 40 min, 取上清液获得 BBS-ACE 粗酶液。使用超微量分光光度计测定各样品中蛋白含量, 紫外检测波长 280 nm ^[21]。

将上述方法中 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS 更换为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 制备 Tris-HCl-ACE 粗酶液。

2.2 ACE 酶活力测定

2.2.1 高效液相色谱条件 色谱柱为 C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 柱温 30°C , 流动相为乙腈: 0.05% 三氟乙酸水 = 25 : 75, 等度洗脱, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $5 \mu\text{L}$, 检测波长 228 nm 。

2.2.2 溶液的制备 精密称取 HHL 及 HA 适量, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS (含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 缓冲液分别配制成 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HHL 标准溶液以及 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HA 标准溶液。

2.2.3 ACE 酶促反应检测方法 反应体系 $40 \mu\text{L}$: $20 \mu\text{L}$ 酶样品 37°C 水浴活化 10 min , 加入 $20 \mu\text{L}$ $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HHL 于 37°C 水浴振荡反应 30 min , 加入 $110 \mu\text{L}$ 乙腈终止反应, 4°C 、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 取上清液测定 HA 含量。

2.2.4 HA 标准曲线绘制 取 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HA 标准母液, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS (含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 缓冲液稀释为 0.02 、 0.06 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.7 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HA 标准溶液。采用 RP-HPLC 法测定 HA 峰面积, 以 HA 的量 (nmol) 为横坐标, 以 HA 峰面积为纵坐标, 绘制 HA 标准曲线: $Y = 6.097 \times 10^5 X - 8.740 \times 10^2$, $R^2 = 0.9951$ 。

2.2.5 ACE 酶活力测定结果 1 个酶活力单位 (U) 定义为在特定条件下每分钟催化 HHL 生成 $1 \mu\text{mol}$ HA 所需的酶量; 酶比活力 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) 定义为每毫克蛋白质所具有的酶活力。

结果表明, 猪肺经组织匀浆、硫酸铵二级盐析和透析后, 提取物酶比活均逐步提升。BBS-ACE 粗酶液比活、总酶活、酶活回收率和纯化倍数分别为 $0.0299 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 2.35 U 、 14.69% 和 22.16 。而 Tris-HCl-ACE 粗酶液比活为 $0.0147 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 总酶活力为 2.00 U , 仅为 BBS-ACE 的 49.16% 和 85.11% (见表 1)。综合考虑, 后续选取 BBS 进行 ACE 粗酶液的制备。

表 1 不同缓冲液对 ACE 提取效率的影响

Tab 1 Effect of different buffer solutions on ACE extraction efficiency

样品	缓冲液	比活 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	总酶活 / U	酶活回收率 / %	纯化倍数
匀浆上清	BBS	0.0014	16.00	100.00	1.00
	Tris-HCl	0.0009	10.03	100.00	1.00
二级盐析酶液	BBS	0.0116	3.13	19.58	8.56
	Tris-HCl	0.0067	2.77	27.63	7.17
ACE 粗酶液	BBS	0.0299	2.35	14.69	22.16
	Tris-HCl	0.0147	2.00	19.94	15.69

2.3 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析分离

2.3.1 不同缓冲液分离效果的比较 将 DEAE-Sepharose FF 填料装柱后, 连接 HD-5 紫外检测仪, 检测波长 280 nm , 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS 平衡柱子, 流速为 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 待基线平稳后上样, 依次用含 0 、 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 BBS 阶梯式梯度洗脱, 收集各洗脱峰, 将洗脱液转移至超滤管 (截留分子量为 100 kDa) 中进行超滤, 收集截留酶液, 并进行酶活力测定。其样品分离谱图如图 1A 所示, 共获得 6 个组分 (A0 ~ A5),

其酶活如表 2 所示, 各组分间酶活存在着明显差异, 其中峰 A2 (洗脱液: $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-BBS) 比活最高, 为 $0.2728 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

将 BBS 更换为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 操作步骤同上, 进行阶梯式梯度洗脱, 超滤后获得截留酶液。其样品分离结果如图 1B 和表 2 所示, 经梯度洗脱共获得 6 个组分 (B0 ~ B5), 洗脱峰 B2 比活最高, 为 $0.0477 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 然而仅为组分 A2 的 17.49% , 表明 BBS 分离效果较好。

表 2 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析纯化结果

Tab 2 Purification of ACE by DEAE-Sepharose FF ion exchange chromatography

样品	比活 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	样品	比活 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
峰 A0	0.0103	峰 B0	0.0123
峰 A1	0.0097	峰 B1	0.0047
峰 A2	0.2728	峰 B2	0.0477
峰 A3	0.0032	峰 B3	0.0058
峰 A4	0.0051	峰 B4	0.0017
峰 A5	0.0029	峰 B5	0.0008

2.3.2 缓冲液盐离子浓度的优化 进一步对 BBS 洗脱体系进行离子浓度优化, 操作步骤同上, 采用含 $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 BBS 进行阶梯式梯度洗脱, 收集各洗脱峰。其图谱如图 1C 所示, C1 和 C2 两峰分离度 (R) 为 1.526 , 其中 $0.17 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-BBS 对应的洗脱峰 C2 比活最高, 为 $0.2793 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较上一步 (BBS-ACE 粗酶) 相比纯化倍数提高了 9.33 倍, 酶活回收率为 60.17% , 如表 3 所示。

表 3 不同离子浓度对 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析纯化的影响

Tab 3 Effect of different ion concentrations on ACE purification by DEAE-Sepharose FF ion exchange chromatography

样品	NaCl 浓度 / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	比活 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	总酶活 / U	酶活回收率 / %	纯化倍数
BBS-ACE 粗酶液	—	0.0299	2.35	100.00	1.00
峰 C1	0.12	0.0101	—	—	—
峰 C2	0.17	0.2793	1.41	60.17	9.33

注: “—” 表示未检测到。

Note: “—” Indicates undetectable.

2.4 Superdex 200 凝胶过滤层析分离

将 Superdex 200 凝胶过滤层析连接蛋白纯化仪, 对上一步得到的高酶活组分进一步纯化, 用 BBS (含 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 洗脱, 流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 280 nm 。经凝胶过滤层析, 组分 C2 进一步分离得到 5 个峰 (D1 ~ D5) (见图 2 和表 4)。洗脱峰 D2 比活最高, 为 $0.3020 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较上一步 (C2) 相比纯化倍数为 1.08 倍, 酶活回收率为 30.68% 。

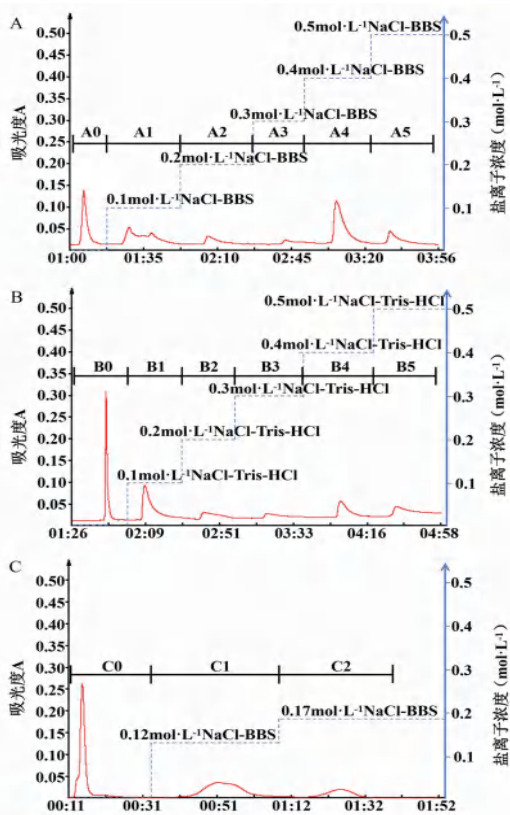


图 1 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱图
Fig 1 DEAE-Sepharose FF ion exchange chromatogram
A. 0.1 mol · L⁻¹ BBS 洗脱峰 (elution peak of 0.1 mol · L⁻¹ BBS); B. 0.02 mol · L⁻¹ Tris-HCl 洗脱峰 (elution peak of 0.02 mol · L⁻¹ Tris-HCl); C. 离子浓度优化洗脱峰 (elution peak by the optimized ionic concentration)

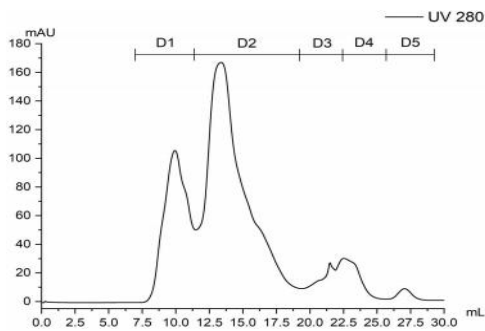


图 2 Superdex 200 凝胶过滤色谱图
Fig 2 Superdex 200 gel filtration chromatogram

表 4 Superdex 200 凝胶过滤纯化结果
Tab 4 Purification of ACE by Superdex 200 gel filtration chromatography

样品	比活 / (U · mg ⁻¹)	总酶活 / U	酶活回收率 / %	纯化倍数
峰 C2	0.2793	1.41	100.00	1.00
峰 D1	0.0264	—	—	—
峰 D2	0.3020	0.43	30.68	1.08
峰 D3	0.0011	—	—	—
峰 D4	0.0031	—	—	—
峰 D5	0.0059	—	—	—

注：“—”表示未检测到。
Note: “—” Indicates undetectable.

2.5 样品分子量与纯度测定

使用 SDS-PAGE 凝胶电泳测定各级样品的分子量和纯度，样本经 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳 120 V 条件下分离，电泳结束后用 1% 考马斯亮蓝 R250 染色，脱色后对条带拍照分析。样品的 SDS-PAGE 电泳图如图 3 所示，粗酶液蛋白电泳条带较多，但 180 kDa 左右的目的条带清晰可见，与文献的报道相近^[22-24]，阴离子交换层析分离后 C2 峰的杂带明显减少，凝胶过滤层析分离后 D2 峰为单一条带。

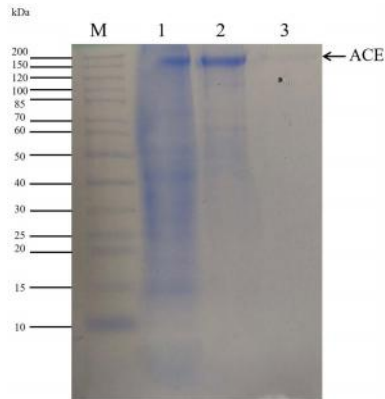


图 3 猪肺 ACE SDS-PAGE 电泳图
Fig 3 SDS-PAGE electrophoretogram of pig lung ACE
M. 蛋白 Marker (protein Marker); 1. BBS-ACE 粗酶液 (BBS-ACE crude enzyme); 2. 峰 C2 (peak C2); 3. 峰 D2 (peak D2)

2.6 卡托普利与 ACE 的作用机制评价

2.6.1 卡托普利对 ACE 抑制活性测定 参考陈佩瑶等^[22]采用 RP-HPLC 法测定卡托普利对 ACE 的抑制活性。反应体系 50 μL: 20 μL ACE 与 10 μL 样品 (卡托普利终浓度 2 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹) 充分混匀后 37 °C 水浴 10 min, 再加入 20 μL HHL (2 mmol · L⁻¹) 于 37 °C 水浴振荡反应 60 min, 加入 100 μL 乙腈终止反应, 4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液测定 HA 峰面积; 上述过程以 BBS 代替卡托普利, 作为空白对照溶液。

$$\text{ACE 抑制率} (\%) = (A - B) / A \times 100\%$$

式中: A 为空白对照组 HA 峰面积; B 为卡托普利组 HA 峰面积。

由图 4 可知, 卡托普利 (2 × 10⁻⁸ mol · L⁻¹) 对 ACE 具有明显抑制作用, HA 的生成量显著降低, ACE 的抑制率为 85.65%, 与文献报道相近^[25]。

2.6.2 卡托普利与 ACE 结合的热力学参数分析 用 50 mmol · L⁻¹ HEPES 缓冲液 (含 0.3 mol · L⁻¹ NaCl, pH 7.0) 配制 ACE 酶液和卡托普利。样品脱气后, 将超纯水置于参比池, 300 μL ACE (1 μmol · L⁻¹) 置于量热池中, 卡托普利 (10 μmol · L⁻¹) 注入滴定针。搅拌速度为 125 r · min⁻¹, 在 25 °C 下量热仪自动平衡至基线稳定后, 自动滴加卡托普利, 每滴 1 μL,

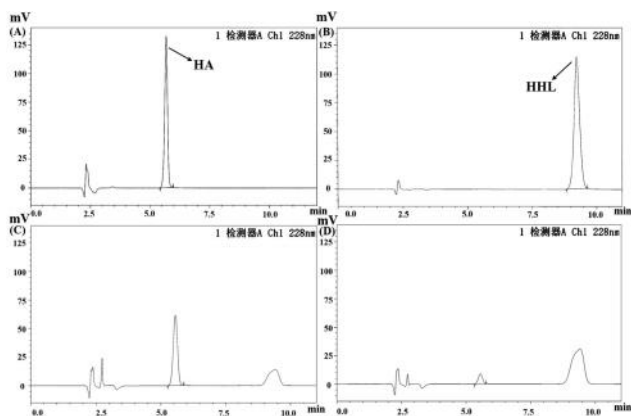


图 4 样品高效液相色谱图

Fig 4 High performance liquid chromatography of samples

A. HA 对照品 (HA reference); B. HHL 对照品 (HHL reference); C. 空白对照组 (blank control group); D. 卡托普利组 (captopril group)

间隔 180 s, 记录量热曲线。操作步骤同上, 以卡托普利滴定 HEPES 缓冲液作为空白滴定, 记录量热曲线, 采用 NanoAnalyze 软件对热量变化进行分析。卡托普利与 ACE 结合的等温滴定量热曲线如图 5 所示, $\Delta G = -45.01 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明反应为自发进行, 化学计量比 (n) 表明卡托普利与 ACE 的结合位点数为 0.194, 结合常数 (K_a) 为 $7.685 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 两者为强结合, 与文献报道一致^[26-27]。

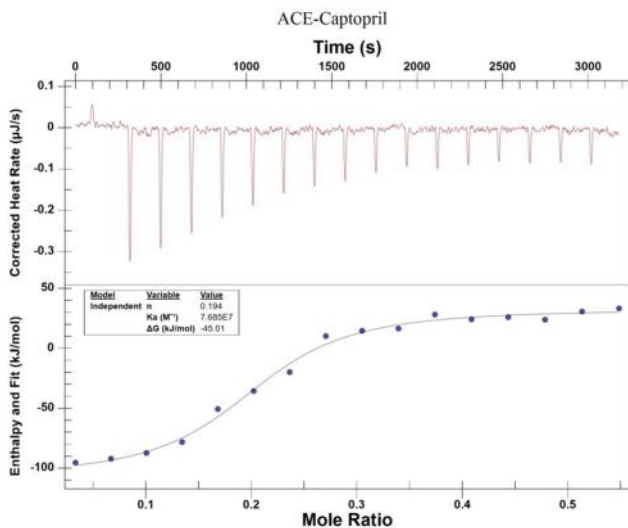


图 5 卡托普利与 ACE 结合的等温滴定量热曲线

Fig 5 Isothermal titration calorimetry curve of captopril combining with ACE

3 讨论

目前, 从动物组织中分离纯化酶的方法较为成熟, 常见的有亲和层析、离子交换层析、凝胶过滤层析等, 每种技术都有其独特的优势和局限性。近年来, 研究者先后采用不同的方法从动物组织中提取纯化 ACE。Andujar-Sánchez 等^[28]利用 Concanavalin A Sepharose 4B 和 赖诺普利 Sepharose 6B 两步亲和层析从猪肺中分离纯化获

得电泳纯 ACE; Hooper 等^[29]采用赖诺普利亲和层析方法从猪脑和猪肾中制备电泳纯 ACE 制品。亲和层析利用生物大分子与配基的专一性可逆吸附进行纯化, 具有特异性强及纯化效率高的优点, 然而亲和介质的选择及间隔臂的设计复杂且成本高的缺点使得其在大规模生产中面临一定的挑战。耿秀芳等^[30]采用 Sephadex G-200 凝胶过滤层析、DEAE-Sephacel 阴离子交换层析及羟基磷灰石柱层析相结合的方法从猪肺中制备 ACE, 纯化倍数为 233.5 倍。离子交换层析因流动相中的组离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时结合力不同而进行分离, 其优势在于分辨率和交换容量高, 适合实验室和工业规模应用, 但高盐浓度洗脱会影响蛋白质的稳定性。羟基磷灰石柱层析主要通过阳离子交换和金属亲和两种机制进行纯化, 具有良好的生物兼容性和化学稳定性, 但纯化后的 ACE 酶较易失活。郝记明^[31]采用 Sephadex G-200 凝胶过滤层析从猪肺中分离获得 ACE, 其纯化倍数为 16.5 倍。凝胶过滤层析利用多孔网状结构的分子筛作用, 根据被分离样品中各组分相对分子质量大小的差异进行洗脱分离, 不需要使用有机溶剂, 可最大限度地保持蛋白的生物活性, 但局限在于分辨率中等, 单独用于纯化 ACE 时效率低且纯化周期长。

本研究以猪肺为原料, 对 ACE 制备工艺进行了优化, 得到最佳工艺条件: 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBS (pH 8.3) 作为 ACE 粗提缓冲液, 依次经硫酸铵二级盐析、DEAE-Sephacel 阴离子交换层析和 Superdex 200 凝胶过滤层析获得电泳纯 ACE, 比活为 $0.3020 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 纯化倍数为 223.54 倍。文献采用 DEAE-Sephacel 阴离子交换层析获得 ACE 比活 $0.1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、纯化倍数 29 ~ 40 倍^[32-33]; 要文婷^[34]通过 DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析及 G-200 凝胶过滤层析获得 ACE 纯化倍数 45.2 倍; 相比之下, 本研究的 ACE 酶比活力提高近 3 倍, 纯化倍数提升 5 倍以上。因而, 本工艺操作简单, 纯化效率高, 有望为基于 ACE 靶点的医药研发提供产业化酶制品。

参考文献

- [1] 张靖, 苏琳, 要铎, 等. 肉源血管紧张素转化酶抑制肽研究进展 [J]. 食品科技, 2020, 45 (10): 241-247.
- [2] Kumari N, Ahirwar R, Yadav A, et al. ACE gene I/D polymorphism and cardiometabolic risk factors: a cross sectional study of rural population [J]. Biochem Genet, 2024, 62 (2): 1008-1020.
- [3] Pencheva M, Rashev P, Koeva Y, et al. The testicular form of angiotensin converting enzyme as a marker for human sperm quality assessment [J]. Folia Med (Plovdiv), 2023,

- 65 (6): 933-939.
- [4] Gregory KS, Cozier GE, Schwager SLU, et al. Structural insights into the inhibitory mechanism of angiotensin-I-converting enzyme by the lactotripeptides IPP and VPP [J]. FEBS Lett, 2024, 598 (2): 242-251.
- [5] Fatih A, Vedat T, Zehra B. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep lung [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48 (5): 4191-4199.
- [6] Oppong SY, Hooper NM. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane [J]. Biochem J, 1993, 292 (Pt 2): 597-603.
- [7] Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WL, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme [J]. Pharmacol Rev, 2013, 65 (1): 1-46.
- [8] Meng QC, Oparil S. Purification and assay methods for angiotensin-converting enzyme [J]. J Chromatogr A, 1996, 743 (1): 105-122.
- [9] 谢晓明, 邱芝青, 谢丽明, 等. 血管紧张素转化酶结构与功能的生物信息学分析 [J]. 中国医药指南, 2014, 12 (34): 3-4, 10.
- [10] Kryukova OV, Tikhomirova VE, Golukhova EZ, et al. Tissue specificity of human angiotensin I -converting enzyme [J]. PLoS One, 2015, 10 (11): e0143455.
- [11] Masuyer G, Yates CJ, Sturrock ED, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence [J]. Bio Chem, 2014, 395 (10): 1135-1149.
- [12] 赵越, 张孚嘉, 吴楠, 等. ACE 抑制肽的研究进展 [J]. 中国酿造, 2020, 39 (1): 6-11.
- [13] 黄妙恩, 罗辉, 吕应年. 血管紧张素转化酶与相关疾病的关联机制 [J]. 广东医科大学学报, 2023, 41 (3): 335-339.
- [14] Mudersbach T, Siuda D, Kohlstedt K, et al. Epigenetic control of the angiotensin-converting enzyme in endothelial cells during inflammation [J]. PLoS One, 2019, 14 (5): e0216218.
- [15] Abdulazeez MA, Kurfi BG. Isolation, partial purification and characterization of angiotensin converting enzyme from rat (*Rattus norvegicus*) lungs [J]. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 2017, 9 (2): 24-29.
- [16] Grönhagen-Riska C, Fyhrquist F. Purification of human lung angiotensin-converting enzyme [J]. Scand J Clin Lab Invest, 1980, 40 (8): 711-719.
- [17] Baudin B, Tahraoui A, Baumann FC, et al. Purification and analysis of lung and plasma angiotensin I -converting enzyme by high-performance liquid chromatography [J]. Protein Expr Purif, 1991, 2 (5-6): 412-419.
- [18] Pantoliano MW, Holmquist B, Riordan JF. Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme [J]. Biochemistry, 1984, 23 (5): 1037-1042.
- [19] Hooper NM, Keen J, Pappin DJ, et al. Pig kidney angiotensin converting enzyme. Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane [J]. Biochem J, 1987, 247 (1): 85-93.
- [20] 巩颖, 王灵芝, 史新元, 等. 血管紧张素转化酶中药抑制剂的筛选模型研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (10): 1366-1369.
- [21] 刘维维, 张凌晶, 纪梦雅, 等. 猪血管紧张素转换酶 2 的分离纯化及性质研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (18): 89-96.
- [22] 陈佩瑶, 张月圆, 王惠芸, 等. 炒决明子主成分分析及其多肽降压活性 [J]. 中国现代中药, 2019, 21 (3): 365-369, 379.
- [23] 廖丹葵, 熊珍爱, 周利琴, 等. 猪肺血管紧张素转化酶纯化工艺中试放大研究 [J]. 食品工业科技, 2018, 39 (12): 185-188.
- [24] 吴琼英, 马海乐, 崔恒林, 等. 猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究 [J]. 食品科学, 2004, 25 (9): 71-74.
- [25] 田青青, 曾伟秀, 赵昕, 等. 溶剂诱导相变萃取-分光光度法测定血管紧张素转化酶活性 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33 (11): 2417-2421.
- [26] Andújar-Sánchez M, Cámara-Artigas A, Jara-Pérez V. A calorimetric study of the binding of lisinopril, enalaprilat and captopril to angiotensin-converting enzyme [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 111 (2): 183-189.
- [27] Andújar-Sánchez M, Jara-Pérez V, Cámara-Artigas A. Thermodynamic determination of the binding constants of angiotensin-converting enzyme inhibitors by a displacement method [J]. FEBS Lett, 2007, 581 (18): 3449-3454.
- [28] Andujar-Sánchez M, Cámara-Artigas A, Jara-Pérez V. Purification of angiotensin I converting enzyme from pig lung using concanavalin-A sepharose chromatography [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 783 (1): 247-252.
- [29] Hooper NM, Turner AJ. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism [J]. Biochem J, 1987, 241 (3): 625-633.
- [30] 耿秀芳, 李耀辉, 李桂芝, 等. 猪肺血管紧张素转换酶的提纯 [J]. 医学研究生学报, 2001, 14 (5): 428-431.
- [31] 郝记明. 酶法水解马氏珠母贝肉制备血管紧张素转换酶抑制肽的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [32] 涂振兴, 陈锡鸿, 廖丹葵, 等. 猪肺血管紧张素转化酶分离纯化的工艺优化 [J]. 广西大学学报 (自然科学版), 2014, 39 (6): 1371-1377.
- [33] 陈锡鸿. 猪肺血管紧张素转化酶分离纯化及抑制机理研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- [34] 要文婷. 猪肺血管紧张素转化酶的分离纯化及性质研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2007.

(收稿日期: 2024-09-15; 修回日期: 2024-11-07)

华中五味子根皮联苯环辛烯型木脂素化学成分研究

李昕卓, 徐浩南, 吴莹, 马叶子, 李玉泽, 邓翀, 宋小妹, 王薇*, 张东东* (陕西中医药大学药学院, 陕西省太白七药研究与应用重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 研究华中五味子 (*Schisandra sphenanthera*) 根皮中联苯环辛烯型木脂素类化学成分。**方法** 运用硅胶色谱法、凝胶色谱法以及半制备高效液相色谱等方法, 对华中五味子根皮的石油醚部位进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定分离得到的化合物的结构。**结果** 从华中五味子根皮的石油醚部位分离并鉴定了 15 个化合物, 分别为当归戈米辛 O (1)、schizanrin M (2)、顺苳戈米辛 P (3)、methygomisin O (4)、鹤庆五味子午素 (5)、gomosin G (6)、interiotherin B (7)、schizandrin (8)、schisanwilsonin J (9)、schisanwilsonin I (10)、schisantherin D (11)、gomisin O (12)、gomisin B (13)、methygomisin R (14)、schisanwilsonin P (15)。**结论** 化合物 2、5、8~10、15 为首次从该植物中分离鉴定。

关键词: 华中五味子; 提取分离; 化学成分; 结构鉴定; 联苯环辛烯类木脂素

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0343-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.008

Chemical composition of dibenzocyclooctene lignans from root bark of *Schisandra sphenanthera*

LI Xin-zhuo, XU Hao-nan, WU Ying, MA Ye-zi, LI Yu-ze, DENG Chong, SONG Xiao-mei, WANG Wei*, ZHANG Dong-dong* (School of Pharmacy, Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of "Taibai Qi Yao", Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of dibenzocyclooctene lignans from the root bark of *Schisandra sphenanthera*. **Methods** The petroleum ether parts of *Schisandra sphenanthera* were separated and purified by silica gel column chromatography, gel column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography. Their structures were characterized with spectroscopic techniques according to their physicochemical properties. **Results** Totally 15 compounds were separated from the petroleum ether parts of *Schisandra sphenanthera* and identified as angeloylgomisin O (1), schizanrin M (2), tigloylgomisin P (3), methygomisin O (4), schisanwilsonin Q (5), gomosin G (6), interiotherin B (7), schizandrin (8), schisanwilsonin J (9), schisanwilsonin I (10), schisantherin D (11), gomisin O (12), gomisin B (13), methygomisin R (14), and schisanwilsonin P (15). **Conclusion** Compounds 2, 5, 8~10, and 15 have been isolated from *Schisandra sphenanthera* for the first time.

Key words: *Schisandra sphenanthera*; extraction and separation; chemical composition; structure detection; dibenzocyclooctene lignans

华中五味子 (*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.) 为五味子属药用植物, 具有收敛、固涩、益气生津、补肾、养心的功效^[1], 其根皮入药后用于消化不良, 肺虚咳嗽, 健忘失眠, 遗精盗汗

等症^[2-3]。华中五味子中主要化学成分为木脂素类、三萜类、黄酮类及酚酸类等^[4-10], 其中木脂素类化学成分对肿瘤细胞具有良好的抑制作用。现代药理学研究发现, 华中五味子具有丰富的生

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82174111); 陕西中医药大学创新团队项目 (No.2023-CXTD-05)。

作者简介: 李昕卓, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: 2395746339@qq.com *通信作者: 王薇, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中草药药效物质基础及炮制机制研究, email: 2051003@sntcm.edu.cn; 张东东, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: zhangnatprod@163.com

物活性, 不仅能抗炎、保肝, 还具有抗肿瘤、抗氧化及抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 等作用^[11-13]。近年来, 多数生物活性研究集中于果实和茎叶部位, 而对根部活性的研究较少^[14-16]。因此, 本试验对华中五味子根皮石油醚部位进行系统性研究, 为进一步明确华中五味子根皮化学成分提供依据。

1 材料

1.1 仪器

HH-2 恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司); N-1100 旋转蒸发仪 (上海 EYELA 仪器有限公司); DLSB series 低温冷凝循环泵 (郑州长城科工贸有限公司); KQ-250E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); BT-125D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); LC-6AD 半制备液相色谱仪 (日本岛津公司); C-18 MGII 半制备色谱柱 (资生堂投资有限公司); 质谱仪 (美国 Agilent Technologies 公司); 核磁共振波谱仪 (瑞士布鲁克公司); 傅里叶红外变换光谱仪 (美国 Thermo Nicolet 公司); Waters 2695 分析液相 (美国 Waters 公司); 自动旋光仪 (上海精密仪器仪表有限公司)。

1.2 试药

色谱甲醇、乙腈 (天津市大茂化学试剂); 薄层色谱硅胶 (G254)、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱 (青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 填料 (美国 Pharmacia 公司); 纯净水 (娃哈哈集团有限公司)。

1.3 药材

华中五味子根皮采自于秦岭太白山, 经陕西中医药大学王薇教授鉴定为五味子科五味子属华中五味子 (*Schisandra sphenanthera*) 的根皮, 样本 (No. 20190901) 保存于陕西中医药大学植物标本馆。

2 提取分离

称取华中五味子根皮药材 15 kg, 采用 80% 乙醇加热回流提取 3 次 (每次投料 5 kg, 80% 乙醇 30 L, 每次提取 1.5 h)。浓缩回收乙醇得到粗浸膏, 依次采用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 得石油醚部位 227 g。

石油醚部位 (227 g) 经硅胶柱色谱分离, 采用石油醚-乙酸乙酯 (50:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 5 个组分 (X1~X5), 采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、半制备液相色谱等技术进行分离纯化。

X1 组分经硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯 (50:1~0:1) 梯度洗脱, 得到组分 X1-1~X1-3 组分, X1-1 经半制备液相色谱, 甲醇-水 (95:5) 洗脱得到化合物 1 ($t_R = 15.3$ min, 13 mg)。X1-3 经半制备液相色谱, 甲醇-水 (80:20)

洗脱得到化合物 2 ($t_R = 18.3$ min, 10 mg)、3 ($t_R = 25.1$ min, 9 mg)、4 ($t_R = 29.5$ min, 8 mg) 和 5 ($t_R = 37.6$ min, 5 mg)。X2 组分经石油醚-乙酸乙酯 (30:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 X2-1~X2-3 组分, X2-1 与 X2-2 合并后经半制备液相色谱, 甲醇-水 (85:15) 洗脱得到化合物 7 ($t_R = 20.1$ min, 9 mg) 和 6 ($t_R = 28.2$ min, 7 mg)。X3 组分经石油醚-乙酸乙酯 (20:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 X3-1~X3-5 组分, X3-1 经半制备液相色谱, 甲醇-水 (80:20) 洗脱得到化合物 9 ($t_R = 16.0$ min, 7 mg)。X3-2 经凝胶柱色谱, 甲醇洗脱得 X3-2-1~X3-2-3 三个组分, 再由半制备液相色谱, 甲醇-水 (75:25) 洗脱, 从 X3-2-1 分离得到化合物 10 ($t_R = 22.1$ min, 15 mg)、11 ($t_R = 28.6$ min, 6.5 mg)。从 X3-2-2 分离得到化合物 12 ($t_R = 37.6$ min, 10.5 mg) 和 13 ($t_R = 40.0$ min, 12 mg), X3-4 与 X3-5 合并, 经半制备液相色谱, 甲醇-水 (70:30) 洗脱得到化合物 14 ($t_R = 33.8$ min, 9 mg)。X4 组分经石油醚-乙酸乙酯 (10:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 X4-1~X4-4 组分, X4-2 与 X4-3 合并, 经半制备液相色谱, 甲醇-水 (70:30) 洗脱得到化合物 15 ($t_R = 48.2$ min, 6 mg) 和 8 ($t_R = 51.9$ min, 7 mg)。化合物结构如图 1 所示。

3 结构鉴定

化合物 1, 白色粉末, ESI-MS m/z 499.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{28}H_{34}O_8$ 。¹H-NMR 显示了两个芳香质子信号 δ 6.59 (1H, s) 和 6.66 (1H, s), 四个甲氧基信号 δ 3.44, 3.71, 3.76 和 3.85, 及一个亚甲二氧基信号 δ 5.97 (2H, d, $J = 1.6$ Hz)。¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.69 (1H, s), 5.60 (1H, s), 1.26 (3H, s), 1.15 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.76 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.29 (3H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 151.8 (C-1), 141.4 (C-2), 151.4 (C-3), 112.4 (C-4), 131.7 (C-5), 85.9 (C-6), 73.7 (C-7), 43.5 (C-8), 34.7 (C-9), 135.2 (C-10), 108.1 (C-11), 149.1 (C-12), 138.0 (C-13), 140.8 (C-14), 122.9 (C-15), 123.6 (C-16), 20.2 (C-17), 19.2 (C-18), 102.5 (-OCH₂O-), 60.7、60.1、60.0、56.0 (-OCH₃), 167.3 (C-1'), 18.4 (C-2'), 138.8 (C-3'), 15.8 (C-4'), 11.3 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[17], 化合物 1 确定为当归戈米辛 O。

化合物 2, 白色固体, $[\alpha]_D^{25}$: -190° (MeOH, c 0.1), ESI-MS m/z 401.1 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{22}H_{24}O_7$ 。¹H-NMR 显示了两个芳香质子信号 δ 6.54 (1H, s) 和 7.31 (1H, s), 三个甲氧基信号 δ

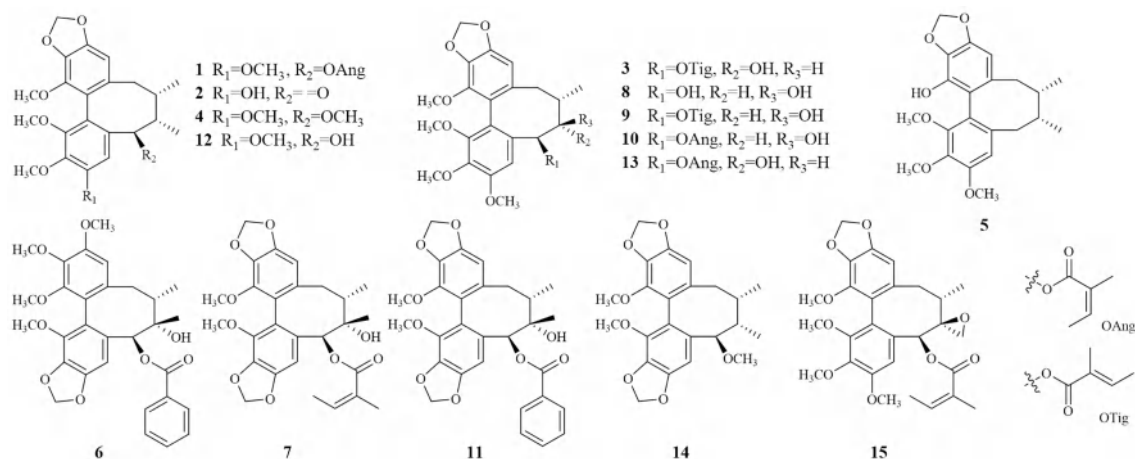


图 1 化合物 1 ~ 15 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 15

3.54, 3.70 和 3.86, 及一个亚甲二氧基信号 δ 6.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) 和 6.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 0.77 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.96 (3H, d, $J = 6.9$ Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 153.2 (C-1), 145.0 (C-2), 150.3 (C-3), 111.4 (C-4), 135.3 (C-5), 202.5 (C-6), 46.7 (C-7), 42.3 (C-8), 40.6 (C-9), 137.3 (C-10), 104.1 (C-11), 152.8 (C-12), 137.6 (C-13), 142.9 (C-14), 121.3 (C-15), 128.0 (C-16), 15.5 (C-17), 15.6 (C-18), 102.6 (-OCH₂O-), 61.2、61.0、60.2 (-OCH₃)。综合以上数据并结合文献^[18], 化合物 2 确定为 schizanzrin M。

化合物 3, 白色粉末, ESI-MS m/z 515.2 ([M + H]⁺), 分子式为 C₂₈H₃₄O₉。¹H-NMR 显示了两个芳香质子信号 δ 6.94 (1H, s) 和 6.57 (1H, s), 四个甲氧基信号 δ 3.53, 3.76, 3.85 和 3.86, 及一个亚甲二氧基信号 δ 5.97 (2H, d, $J = 2.0$ Hz)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.48 (1H, s), 1.82 (1H, dd, $J = 7.1, 1, 3$ Hz), 2.24 (1H, m), 2.06 (1H, dd, $J = 13.9, 10.0$ Hz), 1.12 (3H, s), 1.10 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.86 (3H, t, $J = 1.3$ Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 152.1 (C-1), 142.7 (C-2), 153.8 (C-3), 107.8 (C-4), 135.3 (C-5), 78.5 (C-6), 75.8 (C-7), 47.9 (C-8), 37.3 (C-9), 138.4 (C-10), 107.8 (C-11), 150.9 (C-12), 136.9 (C-13), 142.4 (C-14), 121.1 (C-15), 124.2 (C-16), 17.3 (C-17), 19.0 (C-18), 102.4 (-OCH₂O-), 61.3、60.5、60.2、56.5 (-OCH₃), 168.1 (C-1'), 130.0 (C-2'), 138.7 (C-3'), 12.2 (C-4')。综合以上数据并结合文献^[19], 化合物 3 确定为顺芷戈米辛 P。

化合物 4, 白色粉末, $[\alpha]_D^{25}$: + 9.62° (CHCl₃,

c 0.156), ESI-MS m/z 431.2 ([M + H]⁺), 分子式为 C₂₄H₃₀O₇。¹H-NMR 显示了两个芳香质子信号 δ 7.31 (1H, s) 和 6.55 (1H, s), 五个甲氧基信号 δ 3.86, 3.71, 3.53, 3.35 和 3.35, 及一个亚甲二氧基信号 δ 6.08 (2H, d, $J = 1.3$ Hz)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 0.96 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.78 (3H, d, $J = 6.9$ Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 151.2 (C-1), 141.5 (C-2), 151.8 (C-3), 109.9 (C-4), 131.4 (C-5), 89.7 (C-6), 39.2 (C-7), 37.9 (C-8), 38.1 (C-9), 133.1 (C-10), 102.7 (C-11), 148.9 (C-12), 134.7 (C-13), 146.5 (C-14), 120.8 (C-15), 124.3 (C-16), 16.8 (C-17), 16.9 (C-18), 102.1 (-OCH₂O-), 59.8、59.6、58.5、56.0、56.0 (-OCH₃)。综合以上数据并结合文献^[20], 化合物 4 确定为 methygomisin O。

化合物 5, 白色粉末, ESI-MS m/z : 387.2 ([M + H]⁺), 分子式为 C₂₂H₂₆O₆。¹H-NMR 显示了两个芳香质子信号 δ 6.68 (1H, s) 和 6.37 (1H, s), 三个甲氧基信号 δ 3.52, 3.83 和 3.88, 及一个亚甲二氧基信号 δ 5.97 (2H, d, $J = 0.9$ Hz)。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 2.27 (2H, m), 1.79 (1H, m), 1.89 (1H, s), 2.52 (2H, m), 1.01 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.74 (3H, d, $J = 6.9$ Hz); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 152.5 (C-1), 141.6 (C-2), 154.4 (C-3), 109.0 (C-4), 140.9 (C-5), 36.2 (C-6), 42.4 (C-7), 35.3 (C-8), 39.9 (C-9), 134.2 (C-10), 104.8 (C-11), 148.4 (C-12), 133.6 (C-13), 139.2 (C-14), 123.1 (C-15), 121.6 (C-16), 12.7 (C-17), 22.2 (C-18), 102.1 (-OCH₂O-), 61.3、61.1、56.4 (-OCH₃)。综合以上数据并结合文献^[21], 化合物 5 确定为鹤庆五味子午素。

化合物 6, 白色粉末, $[\alpha]_D^{25}$: - 126° (CHCl₃,

ESI-MS m/z : 537.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{30}H_{32}O_9$ 。 1H -NMR 显示了四个甲氧基信号 δ 3.27, 3.45, 3.83 和 3.94, 两个亚甲二氧基信号 δ 5.79 (1H, d, $J = 1.3$ Hz) 和 5.70 (1H, d, $J = 1.3$ Hz)。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.90 (1H, s), 5.75 (1H, s), 2.07 (1H, m), 2.58 (1H, dd, $J = 13.9, 9.7$ Hz, H-9a), 2.17 (1H, d, $J = 13.8$ Hz, H-9b), 6.60 (1H, s), 1.19 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.34 (3H, s), 7.59~7.31 (5H, m); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 142.1 (C-1), 141.4 (C-2), 150.3 (C-3), 112.9 (C-4), 134.3 (C-5), 86.7 (C-6), 73.3 (C-7), 44.1 (C-8), 37.3 (C-9), 137.2 (C-10), 103.4 (C-11), 152.8 (C-12), 135.5 (C-13), 152.7 (C-14), 122.6 (C-15), 123.4 (C-16), 19.2 (C-17), 29.0 (C-18), 101.8 ($-OCH_2O-$), 61.2, 61.0, 58.9, 56.5 ($-OCH_3$), 166.3 (C-1'), 130.5 (C-2'), 133.2 (C-3'), 129.1 (C-4'), 130.7 (C-5'), 129.1 (C-6'), 133.2 (C-7')。综合以上数据并结合文献^[22], 化合物 **6** 确定为 gomosin G。

化合物 **7**, 白色粉末, $[\alpha]_D^{25}$: +50.8° ($CHCl_3$, c 4.25), ESI-MS m/z : 499.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{27}H_{30}O_9$ 。 1H -NMR 显示了两个甲氧基信号 δ 3.73 和 3.73, 两个亚甲二氧基信号 δ 5.96 (2H, s) 和 5.85 (2H, dd, $J = 12.2, 1.1$ Hz)。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.66 (1H, s), 6.44 (1H, s), 1.11 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.27 (3H, s), 1.79 (3H, dd, $J = 7.3, 1.6$ Hz), 1.38 (3H, s, H-5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 142.2 (C-1), 137.7 (C-2), 149.0 (C-3), 103.5 (C-4), 122.4 (C-5), 86.3 (C-6), 73.2 (C-7), 44.0 (C-8), 37.2 (C-9), 122.7 (C-10), 107.8 (C-11), 150.3 (C-12), 135.3 (C-13), 141.8 (C-14), 137.3 (C-15), 132.0 (C-16), 19.1 (C-17), 29.0 (C-18), 102.4, 101.8 ($-OCH_2O-$), 60.0, 59.4 ($-OCH_3$), 167.3 (C-1'), 140.6 (C-2'), 128.6 (C-3'), 15.9 (C-4'), 20.2 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[23], 化合物 **7** 确定为 interiotherin B。

化合物 **8**, 无色晶体, $[\alpha]_D^{25}$: +88.7° ($CHCl_3$), ESI-MS m/z : 433.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{24}H_{32}O_7$ 。 1H -NMR 显示了一个双峰甲基信号 δ 0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 一个单峰甲基信号 δ 1.21 (3H, s), 六个甲氧基信号 δ 3.45, 3.46, 3.83, 3.83, 3.87 和 3.90。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.74 (1H, s), 2.85 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-6a), 2.57 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-6b), 6.69 (1H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 151.1 (C-1), 140.2 (C-2), 152.0 (C-3), 110.7 (C-4), 133.5 (C-5), 40.8 (C-6), 72.1 (C-7), 41.2 (C-8), 36.4 (C-9), 134.8 (C-10),

110.9 (C-11), 151.9 (C-12), 137.8 (C-13), 140.1 (C-14), 123.1 (C-15), 123.4 (C-16), 14.9 (C-17), 28.3 (C-18), 60.0, 59.9, 59.6, 59.6, 55.1, 55.0 ($-OCH_3$)。综合以上数据并结合文献^[21], 化合物 **8** 确定为 schizandrin。

化合物 **9**, 白色粉末, ESI-MS m/z : 515.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{28}H_{34}O_9$ 。 1H -NMR 显示了两个双峰甲基信号 δ 1.11 和 1.87 及两个芳香质子信号 δ 6.57 和 6.94, 四个甲氧基信号 δ 3.86, 3.85, 3.77 和 3.53, 一个亚甲二氧基 δ 5.97 (2H, q, $J = 1.2$ Hz)。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.49 (1H, s), 1.12 (3H, s), 1.84 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 153.8 (C-1), 142.7 (C-2), 152.1 (C-3), 107.8 (C-4), 135.3 (C-5), 78.5 (C-6), 75.8 (C-7), 47.8 (C-8), 37.3 (C-9), 138.4 (C-10), 103.9 (C-11), 150.9 (C-12), 136.9 (C-13), 142.2 (C-14), 121.0 (C-15), 124.2 (C-16), 19.0 (C-17), 17.3 (C-18), 100.4 ($-OCH_2O-$), 61.2, 61.0, 60.2, 56.5 ($-OCH_3$), 168.1 (C-1'), 130.3 (C-2'), 138.7 (C-3'), 14.4 (C-4'), 12.5 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[21], 化合物 **9** 确定为 schisanwilsonin J。

化合物 **10**, 白色粉末, ESI-MS m/z : 515.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{28}H_{34}O_9$ 。 1H -NMR 显示了两个双峰甲基信号 δ 1.12 和 1.85, 四个甲氧基信号 δ 3.82, 3.82, 3.76 和 3.76, 一个亚甲二氧基 δ 5.88 (1H, d, $J = 1.4$ Hz) 和 5.85 (1H, d, $J = 1.4$ Hz) 及两个芳香质子信号 δ 6.45 和 6.71。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.31 (3H, s), 1.40 (3H, s); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 152.7 (C-1), 141.3 (C-2), 150.5 (C-3), 109.5 (C-4), 132.1 (C-5), 85.5 (C-6), 75.1 (C-7), 42.6 (C-8), 37.8 (C-9), 134.1 (C-10), 103.6 (C-11), 147.2 (C-12), 134.4 (C-13), 141.2 (C-14), 120.9 (C-15), 121.2 (C-16), 20.4 (C-17), 18.2 (C-18), 101.5 ($-OCH_2O-$), 60.9, 60.1, 59.5, 55.9 ($-OCH_3$), 165.8 (C-1'), 126.9 (C-2'), 138.2 (C-3'), 14.6 (C-4'), 19.6 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[19], 化合物 **10** 确定为 schisanwilsonin I。

化合物 **11**, 白色粉末, ESI-MS m/z : 515.2 ($[M + H]^+$), 分子式为 $C_{29}H_{28}O_9$ 。 1H -NMR 显示了联苯环上有两个芳香质子信号 δ 6.45 和 6.76, 两个甲氧基信号 δ 3.80 和 3.36。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.70 (1H, s), 1.36 (3H, s), 1.17 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 5.97 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 5.74 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 5.58 (1H, d,

$J = 1.6 \text{ Hz}$), 7.52-7.29 (5H, m), 1.76 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 1.29 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 142.7 (C-1), 137.3 (C-2), 148.5 (C-3), 106.5 (C-4), 133.7 (C-5), 84.0 (C-6), 72.7 (C-7), 36.2 (C-8), 43.8 (C-9), 133.1 (C-10), 103.6 (C-11), 147.2 (C-12), 134.4 (C-13), 141.2 (C-14), 120.9 (C-15), 121.6 (C-16), 26.4 (C-17), 18.2 (C-18), 101.5/101.9 (-OCH₂O-), 59.1、57.9 (-OCH₃), 164.8 (C-1'), 128.2 (C-2'), 129.6 (C-3'), 126.9 (C-4'), 128.6 (C-5'), 126.9 (C-6'), 129.6 (C-7')。综合以上数据并结合文献^[24], 化合物 **11** 确定为 schisantherin D。

化合物 **12**, 白色粉末, $[\alpha]_D^{25}$: -36.4° (MeOH, c 0.05), ESI-MS m/z : 417.2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 显示了联苯环上有两个芳香质子信号 δ 6.45 和 6.83, 四个甲氧基信号 δ 3.88, 3.81, 3.70 和 3.70, 一个亚甲二氧基信号 δ 5.96 (2H, m)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 0.65 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 1.01 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 5.96 (2H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 150.3 (C-1), 136.8 (C-2), 150.6 (C-3), 107.1 (C-4), 135.9 (C-5), 74.1 (C-6), 44.1 (C-7), 40.8 (C-8), 35.3 (C-9), 139.3 (C-10), 103.2 (C-11), 149.5 (C-12), 136.5 (C-13), 141.8 (C-14), 121.1 (C-15), 121.7 (C-16), 8.2 (C-17), 22.2 (C-18), 102.5 (-OCH₂O-), 59.9、59.9、59.8、57.3 (-OCH₃)。综合以上数据并结合文献^[21], 化合物 **12** 确定为 gomisin O。

化合物 **13**, 白色粉末, $[\alpha]_D^{25}$: -26.6° (CHCl_3 , c 0.022), ESI-MS m/z : 515.2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 显示了联苯环上有两个芳香质子信号 δ 6.44 和 6.66, 四个甲氧基信号 δ 3.73, 3.73, 3.34 和 3.34, 一个亚甲二氧基信号 δ 5.85 (2H, d, $J = 1.4 \text{ Hz}$)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.46 (1H, s), 1.27 (3H, s), 1.11 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 1.79 (3H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$), 1.38 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 149.1 (C-1), 141.8 (C-2), 150.3 (C-3), 107.8 (C-4), 130.5 (C-5), 83.6 (C-6), 73.2 (C-7), 44.0 (C-8), 37.2 (C-9), 137.3 (C-10), 102.4 (C-11), 149.0 (C-12), 132.0 (C-13), 142.2 (C-14), 128.6 (C-15), 122.4 (C-16), 29.0 (C-17), 20.2 (C-18), 101.8 (-OCH₂O-), 60.1、60.1、60.1、58.9 (-OCH₃), 167.3 (C-1'), 129.1 (C-2'), 140.4 (C-3'), 15.9 (C-4'), 19.1 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[22], 化合物 **13** 确定为 gomisin B。

化合物 **14**, 白色粉末, ESI-MS m/z : 415.1

($[\text{M} + \text{H}]^+$), 分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_7$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 显示了联苯环上有两个芳香质子信号 δ 6.46 和 6.29, 三个甲氧基信号 δ 3.78, 3.65 和 2.91, 两个亚甲二氧基信号 δ 5.84 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 5.81 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$) 与 δ 5.91 (2H, s)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 3.70 (1H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$), 1.48 (1H, s), 1.72 (1H, m), 2.26 (m, H-9a), 1.86 (m, H-9b), 0.78 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 0.82 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 5.91 (2H, s), 5.84 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$), 5.81 (1H, d, $J = 1.6 \text{ Hz}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 141.4 (C-1), 136.6 (C-2), 147.6 (C-3), 106.4 (C-4), 132.3 (C-5), 90.1 (C-6), 38.3 (C-7), 36.6 (C-8), 37.7 (C-9), 134.8 (C-10), 101.5 (C-11), 149.1 (C-12), 134.2 (C-13), 141.2 (C-14), 121.3 (C-15), 123.1 (C-16), 15.5 (C-17), 15.9 (C-18), 101.1 100.3 (-OCH₂O-), 59.6、59.4、55.8 (-OCH₃)。综合以上数据并结合文献^[25], 化合物 **14** 确定为 methygomisin R。

化合物 **15**, 白色粉末, ESI-MS m/z : 513.2 ($[\text{M} + \text{H}]^+$), 分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_9$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 显示了联苯环上有两个芳香质子信号 δ 6.50 和 6.58, 四个甲氧基信号 δ 3.89, 3.88, 3.71 和 3.56, 一个亚甲二氧基信号 δ 5.91, 5.88。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中 δ 100.8 为典型的亚甲二氧基的碳信号。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.23 (1H, s), 0.88 (3H, d, $J = 6.9 \text{ Hz}$), 2.89 (1H, d, $J = 3.5 \text{ Hz}$, H-18a), 2.78 (1H, d, $J = 3.5 \text{ Hz}$, H-18b), 1.87 (3H, m), 1.44 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 152.4 (C-1), 141.9 (C-2), 152.6 (C-3), 108.4 (C-4), 132.6 (C-5), 83.7 (C-6), 62.4 (C-7), 39.4 (C-8), 38.9 (C-9), 134.4 (C-10), 103.0 (C-11), 148.9 (C-12), 134.9 (C-13), 141.0 (C-14), 121.3 (C-15), 123.8 (C-16), 17.4 (C-17), 47.3 (C-18), 100.8 (-OCH₂O-), 60.9、60.8、59.2、56.0 (-OCH₃), 165.8 (C-1'), 127.3 (C-2'), 140.1 (C-3'), 15.8 (C-4'), 19.7 (C-5')。综合以上数据并结合文献^[21], 化合物 **15** 确定为 schisanwilsonin P。

4 结论

通过多种色谱分离技术及波谱学手段对华中五味子根皮的化学成分进行系统性研究, 共分离鉴定了 15 个化合物, 从该植物中首次分离得到 7 个化合物, 分别是化合物 **2**、**5**、**6**、**8**~**10**、**15**, 丰富了华中五味子药材的化学库。本试验分离得到的化合物, 均为带有联苯结构联苯环辛烯型木脂素, 且石油醚部位中分离得到的化合物以联苯环辛烯型木脂素为主, 而大极性部位 (正丁醇部位) 未有联苯环辛烯型木脂素的报道, 提示

该类型木脂素可能存在于低极性试剂萃取的浸膏中。通常情况下联苯结构上的位置多被亚甲二氧基、羟基和甲氧基取代,八元环上的 6 位多被甲氧基、当归酰基或顺芷酰基取代。通过结构分析,发现联苯环为 S 构型的木脂素都具有细胞毒活性,如化合物 **11**,提示其可能具有潜在的抗肿瘤作用^[26]。因此,后续可继续深入研究华中五味子根皮的木脂素类成分研究,进一步探索其构效关系,以期进行更全面的分析。

参考文献

- [1] 刘媛媛,黄仕其,李玉泽,等.五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2022,53(6):1903-1918.
- [2] 徐浩南,李昕卓,王雨轩,等.五味子科简单苯丙素及黄酮类化学成分研究进展[J].陕西中医药大学学报,2024,47(6):18-23.
- [3] 郭豪杰,齐耀东,李西文,等.五味子科植物的传统应用与系统学研究进展[J].世界中医药,2015,10(8):1133-1138.
- [4] Huang SQ, Zhang DD, Li YZ et al. *Schisandra sphenanthera*: a comprehensive review of its botany, phytochemistry, pharmacology, and clinical applications [J]. Am J Chin Med, 2021, 49 (7): 1577-1622.
- [5] Xu HN, Wang W, Sun Y, et al. A systematic review on triterpenoids from genus *Schisandra*: botany, traditional use, pharmacology and modern application [J]. Arab J Chem, 2023, 16: 105178.
- [6] 刘媛媛,李睿,徐浩南,等.长胜七中酚类成分研究[J].中国中药杂志,2023,48(12):3287-3293.
- [7] 刘媛媛,田煦莹,周益刚,等.长胜七中简单苯丙素类化学成分研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(4):27-31.
- [8] 赵利琴.五味子属萜类成分及其生物活性[J].时珍国医国药,2008,19(1):228-230.
- [9] 张东东,黄仕其,刘媛媛,等.华中五味子根皮中 1 个新的萜类倍半萜[J].中草药,2022,53(14):4270-4275.
- [10] 李睿,黄仕其,张子龙,等.华中五味子根皮乙酸乙酯部位化学成分研究[J].中南药学,2023,21(9):2288-2292.
- [11] Xu HN, Wang W, Li XZ, et al. Traditional use, pharmacology and toxicology of the lignans in Genus *Kadsura*: a systematic review [J]. Rec Nat Prod, 2023, 17 (5): 793-844.
- [12] Xu HN, Liu YY, Liu CW, et al. Triterpenoids and pharmacological activities from *Kadsura* (Schisandraceae) were gathered from 1987 to 2022 [J]. Rec Nat Prod, 2023, 17 (3): 388-418.
- [13] 李世兴,刘媛媛,张化为,等.五味子属植物抗肿瘤活性及机制研究进展[J].中国野生植物资源,2023,42(9):61-69.
- [14] 杨连玉.五味子的保健作用及在畜牧生产中的应用展望[J].吉林畜牧兽医,2006,1(11):28-29.
- [15] 刘俊霞,侯微,窦凤鸣,等.五味子藤茎正丁醇部位化学成分研究[J].中草药,2015,46(13):1878-1882.
- [16] Xu HN, Wang W, Li XZ, et al. A review of extraction and purification, biological properties, structure-activity relationships and future prospects of schisandrin C: a major active constituent of *Schisandra Chinensis* [J]. Chem Biodivers, 2023, 20, e202301298.
- [17] Cheng YB, Chang MT, Lo YW, et al. Oxygenated lignans from the fruits of *Schisandra arisanensis* [J]. J Nat Prod, 2009, 72 (9), 1663-1668.
- [18] Kuo YH, Wu MD, Huang RL, et al. Antihepatitis activity (anti-HBsAg and anti-HBeAg) of C19 homolignans and six novel C18 dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura japonica* [J]. Planta Med, 2005, 71 (7): 646-653.
- [19] 徐秀梅,廖志华,陈敏.滇藏五味子化学成分研究[J].中国药学杂志,2009,44(23):1769-1773.
- [20] Ren R, Ci XX, Li HZ, et al. New dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra sphenanthera* and their proinflammatory cytokine inhibitory activities [J]. Zeitschrift für Naturforschung B, 2010, 65 (2): 1-8.
- [21] 马文辉.毛南五味子和鹤庆五味子的化学成分及其抗病毒活性[D].上海:复旦大学,2007.
- [22] Ikeya Y, Taguchi H, Yosioka I, et al. The constituents of *Schizandra chinensis* Baill. I. Isolation and structure determination of five new lignans, gomisin A, B, C, F and G, and the absolute structure of schizandrin [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1979, 27 (6): 1383-1394.
- [23] Chen DF, Zhang SX, Chen K, et al. Two new lignans, interiotherins A and B, as anti-HIV principles from *Kadsura interior* [J]. J Nat Prod, 1996, 59 (11): 1066-1068.
- [24] 王艳美.南五味子果实化学成分研究[D].武汉:华中科技大学,2016.
- [25] 李洪梅.两种五味子属药用植物的化学成分和生物活性研究[D].昆明:昆明理工大学,2008.
- [26] 胡荻.五味子中抗阿尔茨海默症活性木脂素的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2012.

(收稿日期:2024-06-21;修回日期:2024-08-22)

瑞格列奈 - 阿卡波糖速缓释双层片的制备与体内外评价

梁家文¹, 马博乐², 李士壮¹, 杨登雪¹, 衣琪昆¹, 袁辉¹, 阎雪莹^{1*} (1.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2.天津医科大学朱宪彝纪念医院, 天津 300000)

摘要: **目的** 研制瑞格列奈 - 阿卡波糖速缓释双层片, 提高降糖药物的疗效, 以实现速效和长效的互补。**方法** 采用两次压片法以交联羧甲基纤维素钠 (CCMC-Na) 作为超级崩解剂及羟丙基甲基纤维素 K4M (HPMC K4M) 作为骨架材料制备速缓释双层片。在单因素考察的基础上, 采用星点设计 - 效应面法优化处方, 结合综合评分法确定速释层与缓释层的最佳工艺并进行验证。对按最优处方所制双层片的体外释药行为进行考察, 并采用兔模型进行体内药效学和药代动力学研究。**结果** 最优处方为速释层中葡甲胺用量为 1.57 mg, CCMC-Na 为 5.10 mg, 乳糖为 39.83 mg; 缓释层中 HPMC K4M 用量为 60.27 mg, 微晶纤维素 (MCC) 用量为 30.61 mg, 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP K30) 浓度为 28.57%。在体外释放实验中, 双层片中瑞格列奈可在 30 min 达到累计释放最大值, 释放量达 95.34%, 阿卡波糖可缓释释放长达 12 h; 瑞格列奈的释放符合一级释放的简单扩散特征, 阿卡波糖的释放是扩散与溶蚀协同作用的过程。在体内药效学实验中, 2 型糖尿病兔模型连续给药 3 周后, 双层片组 8 h 随机血糖水平与两单药组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在体内药代动力学研究中, 双层片中瑞格列奈 $t_{1/2z}$ 明显缩短, 在 0.583 h 迅速达到 C_{max} , 且 C_{max} 明显升高, 约为普通片的 1.28 倍; 阿卡波糖的 $t_{1/2z}$ 与 t_{max} 延长, 分别约为普通片的 1.75 倍和 2.7 倍, C_{max} 显著降低, 血药浓度波动小, 达到了缓释的目的。**结论** 制备的瑞格列奈 - 阿卡波糖速缓释双层片具有联合用药与双相释药的双重效果, 可为糖尿病等慢性疾病剂型的开发提供思路。

关键词: 瑞格列奈; 阿卡波糖; 双层片; Box-Behnken 设计; 2 型糖尿病

中图分类号: R943, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0349-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.009

Preparation and in vitro/in vivo evaluation of repaglinide-acarbose immediate-sustained-release bilayer tablets

LIANG Jia-wen¹, MA Bo-le², LI Shi-zhuang¹, YANG Deng-xue¹, YI Qi-kun¹, YUAN Hui¹, YAN Xue-ying^{1*} (1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin 300000)

Abstract: Objective To optimize the formulation of repaglinide-acarbose immediate-sustained-release bilayer tablets, to improve drug the efficacy and balance the rapid effect and long-term effect. **Methods** Immediate-sustained-release bilayer tablets were prepared by two-time tableting method with croscarmellose sodium (CCMC-Na) as the super disintegrant and hydroxypropyl methyl cellulose K4M (HPMC K4M) as the backbone material. Based on single factor analysis, the Box-behnken response surface design was used to determine the optimal parameters of the immediate-release layer and the sustained-release layer by combining the comprehensive scoring method and verification. The in vitro release characteristics of bilayer tablets according to the optimal formula were systematically studied, while the pharmacodynamics and pharmacokinetics were assessed with a rabbit model. **Results** The optimal formula was 1.57 mg meglumine, 5.10 mg CCMC-Na and 39.83 mg lactose in the immediate-release layer, while 60.27 mg HPMC K4M, 30.61 mg microcrystalline cellulose and 28.57% polyvinylpyrrolidone (PVP) K30 in the sustained-release layer. In the in vitro release experiment,

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (No.LH2021H102); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目 (No.2018YJSCX060); 黑龙江省卫生健康委科研课题 (No.20241313020534)。

作者简介: 梁家文, 女, 硕士研究生, 主要从事缓控释靶向制剂的研究, email: 253656591@qq.com * **通信作者:** 阎雪莹, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事缓控释靶向制剂的研究, email: yanxueyingwzyx@sina.com

repaglinide in the bilayer tablets reached the maximum cumulative release at 30 min, the release reached 95.34%, and the release of acarbose was sustained up to 12 h. The release of repaglinide conformed to the simple diffusion characteristics of primary release, and the release of acarbose was a synergistic process of diffusion and dissolution. In the in vivo pharmacodynamic experiment, after 3 weeks of continuous administration in type 2 diabetes rabbit model, the 8-hour random blood glucose level of the bilayer tablets group was significantly different from that of the two monotherapy groups ($P < 0.01$). In the in vivo pharmacokinetic study, repaglinide $t_{1/2z}$ was significantly shortened and C_{max} rapidly occurred at 0.583 h, while C_{max} was also significantly increased, about 1.28 times that of ordinary tablets. The $t_{1/2z}$ and t_{max} of acarbose were prolonged, about 1.75 times and 2.7 times of that of ordinary tablets, respectively. The C_{max} was much reduced, and the fluctuation of blood concentration was small, achieving slow release.

Conclusion The prepared repaglinide-acarbose immediate-sustained-release bilayer tablets exhibit a dual mechanism of combined administration and biphasic release, offering valuable insights for the development of chronic disease formulations, particularly in diabetes management.

Key words: repaglinide; acarbose; bilayer tablet; Box-behnken design; type 2 diabetes

2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 是一种需要长期用药的慢性疾病, 目前无根治手段, 是亟待解决的全球性健康问题^[1]。临床多采用多种降糖药联合治疗 T2DM^[2-3]。瑞格列奈为治疗 T2DM 的一线口服降糖药, 其半衰期短 (约为 1 h), 快速且短效的降血糖作用 (瑞格列奈 (诺和龙) 的降糖作用是格列本脲的 10 倍), 是控制餐后血糖峰值的最合适治疗药物之一^[4-5]。阿卡波糖作为第一个用于临床治疗 T2DM 的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 是首次诊断为 T2DM 患者的最佳治疗药物之一, 可通过延迟肠道内碳水化合物的吸收, 降低餐后血糖, 具有不良反应少、降糖疗效安全平稳的特点^[6]。有研究表明, 瑞格列奈和阿卡波糖联合使用可产生额外的降糖效果, 可显著降低 T2DM 患者餐后血糖水平的平均增幅^[7]。然而, 联合用药通常会造患者的依从性差以及漏服率增加等问题^[8-9]。为减少药物服用次数, 提高药物生物利用度, 有研究者制备了以二甲双胍为缓释层, 阿托伐他汀为速释层且只需日服一次的胃漂浮双层片, 提高了药物疗效并改善了患者的依从性^[10]。

双层片 (bilayer tablet) 作为一种含有双层结构的新双相释药系统, 具有调节药物释放顺序及速率, 降低漏服率和改善患者顺应性等功能, 在口服缓控释给药系统中受到广泛关注^[11-12]。与普通的单层片相比, 双层片不仅可以实现联合用药, 降低单药成分的毒副作用, 还能将药物以不同释放模式组合, 达到理想的药动学行为^[13-14]。本研究选择安全性高、临床常联合使用的瑞格列奈和阿卡波糖作为模型药物, 通过两次压片法制备了包含瑞格列奈速释层和阿卡波糖缓释层的双层片, 速释层中的瑞格列奈迅速释放, 达到初始治疗剂量, 有效缓解高血糖症状; 缓释层中的阿

卡波糖持续缓慢释放, 作为维持剂量, 在较长时间内保持有效的血药浓度, 达到联合用药与双相释药的双重效果。

1 材料

1.1 仪器

A2010 型岛津液相色谱仪 (日本岛津公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Sartorius BT25S 型分析天平 (德国 Sartorius 公司, 十万分之一); DELTA320 型 pH 计 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); HZS-HA 型恒温水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); ZPJ-4 型片剂四用测试仪 (天津盛达三合光学仪器有限公司); TDP-3 型单冲式压片机 (扬州诺亚机械有限公司); Labonce-150TPS 型药品强光稳定性试验箱 (北京兰贝石恒温技术有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); Unique R-20 型超纯水机 (锐思捷科学仪器有限公司); HSC-14-028 型氮吹仪 (天津恒奥科技有限公司); TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); QL-901 型涡旋仪 (其林贝尔仪器制造公司)。

1.2 试药

瑞格列奈原料药、阿卡波糖原料药 (武汉远成共创科技有限公司); 瑞格列奈对照品 (纯度: 98%, 批号: 100753, 深圳卓越科技有限公司); 阿卡波糖对照品 (纯度: 98%, 批号: 100808, 北京北纳创联生物技术研究院); 甲醇、乙腈 (DIKMA 公司); 磷酸 (科密欧化学试剂有限公司); 四丁基氢氧化铵 (常州市西南化工研究所); 磷酸二氢钾 (江阴澄星实业集团公司); 无水磷酸氢二钠 (帅源化工有限公司); 盐酸 (天津市天力化学试剂有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP

K30, 天津市致远化学试剂有限公司); 羧甲基淀粉钠 (CCMC-Na)、硬脂酸镁、羟丙基甲基纤维素 K4M (HPMC K4M)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 氧化铁红、微晶纤维素 (MCC) (天津富宇精细化工有限公司), 所有采购的试剂均未进一步净化, 超纯水采用水净化系统 PALL Cascade III 制备。

1.3 动物

新西兰兔 37 只, 雄性, 体重 (2.5 ± 0.5) kg [黑龙江中医药大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK (辽) 2015-0001], 动物实验获得黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (批准编号: 2018091223)。

2 方法与结果

2.1 双层片的制备

根据前期预实验, 确定了双层片的基础处方。以瑞格列奈为药物活性成分的速释层的处方组成包括瑞格列奈 2 g、葡甲胺 2 g、CCMC-Na 5 g、乳糖 40 g、MCC 50 g、1% 硬脂酸镁、20% PVP K30 95% 醇溶液和少量氧化铁红。以阿卡波糖为药物活性成分的缓释层的处方组成包括阿卡波糖 100 g、HPMC K4M 60 g、MCC 30 g、30% PVP K30 醇溶液和 1% 硬脂酸镁。

首先, 将缓释层的原料药和辅料过 100 目筛, 按处方量混合均匀, 30% PVP K30 醇溶液制软材, 24 目筛制粒, 40°C 鼓风干燥, 颗粒干燥后, 20 目筛整粒, 加入处方量的硬脂酸镁, 混匀, 按照缓释层处方量放入压片机凹槽处, 轻轻预压一次, 备用。然后, 将速释层的原料药和辅料过 100 目筛, 按处方量置于研钵中充分研磨, 混合均匀, 加入适量的 20% PVP K30 的 95% 醇溶液制软材, 24 目筛制粒, 40°C 鼓风干燥, 颗粒干燥后, 20 目筛整粒, 加入处方量的硬脂酸镁, 混匀, 按处方量填充于压片机中的预压层之上, 压片, 最终得到双层片。

2.2 释放度的测定

① 以《中国药典》2020 年版为指导原则, 采用浆法测定瑞格列奈的释放度, 以 100 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液为溶出介质, 转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 。依法操作, 分别在 5、10、15、20 和 30 min 时取溶液 5 mL (并在溶出杯中补充相同温度下的溶出介质 5 mL), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜滤过, 取续滤液, 照高效液相色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0512) 测定释放度, 并计算累计释放百分率。测定瑞格列奈的色谱条件: 色谱柱为 Dikma Diamonsil (ODS, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱, 流动相为磷酸盐缓冲溶液 (磷酸二氢铵 2 g 溶于 1000 mL 水中, 加磷酸调节 pH 至 2.5) -

甲醇 = 30 : 70, 检测波长为 245 nm, 进样量为 20 μL , 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 30°C 。

② 以《中国药典》2020 年版为指导原则, 采用浆法测定阿卡波糖的释放度, 以 900 mL 经脱气处理的水为溶出介质, 转速为 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 。依法操作, 分别在 0.5、1、2、4、6、8 和 12 h, 取出溶液 5 mL (并在溶出杯中补充相同温度下的溶出介质 5 mL), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜滤过, 取续滤液, 照高效液相色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0512) 测定释放度, 并计算累计释放百分率。测定阿卡波糖的色谱条件: 色谱柱为 Dikma Diamonsil (ODS, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱, 流动相为缓冲盐溶液 (磷酸二氢钾 600 mg, 无水磷酸氢二钠 279 mg 溶于 1000 mL 水中) - 离子对试剂 (1.6 mL 四丁基氢氧化铵溶于 100 mL 水中) - 乙腈 = 81.8 : 10.2 : 8, 检测波长为 210 nm, 进样量为 20 μL , 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 35°C 。

2.3 处方优化试验设计

2.3.1 速释层处方优化 根据单因素实验结果, 采用 Box-Behnken 设计, 速释层选择对瑞格列奈体外累计释放率影响较大的 3 个主要因素 [葡甲胺的用量 (A)、CCMC-Na 的用量 (B) 以及乳糖的用量 (C)] 设计一个三因素三水平实验。采用综合评分法, 记录各组实验中瑞格列奈速释层在 0.5 h ($Q_{0.5}$) 的累计释放量, 指标为 100%, 用于检验 0.5 h 释放是否完全, 权重为 1, r 用于检验 $Q_{0.5}$ 是否为释放最大点, 避免药物释放过快, 权重为 2, 以归一值 Y_1 作为响应值, Y_1 值越小, 实验结果越符合预期, 计算公式如下:

$$Y_1 = |Q_{0.5} - 100\%| \times 1 \times 100 + |r - 1| \times 2$$

2.3.2 缓释层处方优化 缓释层选择对阿卡波糖体外累计释放率影响较大的 3 个主要因素 [HPMC K4M (D) 的用量、MCC (E) 的用量以及 PVP K30 (F) 的浓度], 采用综合评分法记录各组实验中阿卡波糖缓释层在 1 h (Q_1)、4 h (Q_4)、8 h (Q_8)、12 h (Q_{12}) 的累计释放量, 各点累计释放量的权重均为 1, 以归一值 Y_2 作为响应值, 且 Y_2 值越小, 结果越符合预期, 计算公式如下:

$$Y_2 = |Q_1 - 20\%| \times 1 \times 100 + |Q_4 - 50\%| \times 1 \times 100 + |Q_8 - 80\%| \times 1 \times 100 + |Q_{12} - 100\%| \times 1 \times 100$$

使用 Design Expert 13 软件进行安排, 具体因素与水平见表 1, 实验设计与结果见表 2。

采用 Design-Expert13 软件对表 2 数据进行统计分析, 结果显示多元二次方程为最佳拟合模型, 二次多项回归模型为: $Y_1 = 4.64 + 0.83A + 0.14B + 0.23C + 2.14AB + 1.16AC + 1.35BC + 2.14A^2 +$

表 1 星点设计 - 效应面法中使用的因素和水平

Tab 1 Factors and levels of Box-Behnken design

药物层	因素	水平		
		低 (-1)	中 (0)	高 (+1)
速释层	A/mg	0	2	4
	B/mg	3	5	7
	C/mg	20	40	60
缓释层	D/mg	55	60	65
	E/mg	25	30	35
	F/%	25	30	35

$3.37B^2 + 2.58C^2 (P = 0.000\ 02)$; $Y_2 = 7.50 - 2.11D - 1.10E + 2.86F - 0.088DE - 3.02DF + 2.47DE + 11.55D^2 + 7.44E^2 + 5.23F^2 (P = 0.000\ 02)$ 。 Y_1 、 Y_2 的二项式拟合方程的 P 均小于 0.05, 提示其能较好地反映因素对响应值的影响, 表 3 中的方差分析和显著性检验结果表明, 模型 P 值 < 0.01 , 该拟合模型显著, 失拟项 P 值为大于 0.05, 不显著, 表明该模型拟合度较高。

表 2 星点设计 - 效应面法的实验安排及结果

Tab 2 Experimental arrangement and results of Box-Behnken

No.	速释层						缓释层						Y_2	
	A/mg	B/mg	C/mg	$Q_{0.5}/\%$	r	Y_1	D/mg	E/mg	F/%	$Q_1/\%$	$Q_4/\%$	$Q_8/\%$		$Q_{12}/\%$
1	2.00	5.00	40.00	95.34	1	4.66	65.00	35.00	30.00	26.48	55.32	83.28	92.10	22.98
2	0.00	7.00	40.00	94.67	0	7.33	60.00	35.00	25.00	22.50	52.92	83.55	96.32	12.65
3	2.00	5.00	40.00	95.38	1	4.62	60.00	30.00	30.00	21.32	52.28	79.96	96.29	7.35
4	0.00	5.00	60.00	92.35	0	7.65	55.00	25.00	30.00	22.57	59.63	84.26	86.73	29.84
5	2.00	5.00	40.00	94.66	1	5.34	65.00	30.00	25.00	21.23	51.31	70.65	88.26	23.63
6	0.00	5.00	20.00	91.83	0	10.17	60.00	25.00	25.00	24.79	55.50	83.25	91.50	22.04
7	2.00	5.00	40.00	95.21	1	4.79	65.00	25.00	30.00	17.96	47.32	72.80	88.82	23.10
8	2.00	7.00	20.00	91.59	1	8.41	60.00	35.00	35.00	19.36	54.55	76.04	85.91	23.24
9	4.00	5.00	20.00	93.27	0	8.73	55.00	35.00	30.00	23.51	61.35	85.87	90.67	30.06
10	2.00	5.00	40.00	96.23	1	3.77	55.00	30.00	35.00	21.03	58.47	73.06	85.47	30.97
11	2.00	3.00	60.00	89.96	1	10.04	60.00	25.00	35.00	21.40	57.95	84.94	91.53	22.70
12	4.00	5.00	60.00	91.14	0	10.86	60.00	30.00	30.00	21.28	51.92	80.41	96.93	6.68
13	4.00	3.00	40.00	93.32	0	8.68	60.00	30.00	30.00	23.55	52.48	80.59	95.82	10.80
14	0.00	3.00	40.00	91.47	0	10.53	60.00	30.00	30.00	21.04	51.16	80.38	96.03	6.55
15	2.00	7.00	60.00	89.78	1	12.22	65.00	30.00	35.00	22.63	56.11	84.85	90.22	23.37
16	2.00	3.00	20.00	90.36	0	11.64	60.00	30.00	30.00	20.67	51.82	79.86	96.49	6.14
17	4.00	7.00	40.00	87.97	0	14.03	55.00	30.00	25.00	23.26	56.42	82.18	92.72	19.14

表 3 星点设计 - 效应面法的 Y_1 、 Y_2 方差分析结果

Tab 3 Y_1 and Y_2 variance analysis of Box-Behnken

Y_1 方差分析结果						Y_2 方差分析结果					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
回归模型	142.59	9	15.84	24.21	0.0002	回归模型	1173.90	9	130.43	23.52	0.0002
A	5.48	1	5.48	8.37	0.0232	D	35.79	1	35.79	6.45	0.0387
B	0.15	1	0.15	0.23	0.6454	E	9.68	1	9.68	1.75	0.2280
C	0.41	1	0.41	0.63	0.4525	F	65.44	1	65.44	11.80	0.0109
AB	18.28	1	18.28	27.93	0.0011	DE	0.031	1	0.031	5.521×10^{-3}	0.9428
AC	5.41	1	5.41	8.26	0.0239	DF	36.54	1	36.54	6.59	0.0372
BC	7.32	1	7.32	11.18	0.0124	EF	24.35	1	24.35	4.39	0.0744
A^2	19.30	1	19.30	29.49	0.0010	D^2	561.38	1	561.38	101.21	< 0.0001
B^2	40.70	1	40.70	72.89	< 0.0001	E^2	233.18	1	233.18	42.04	0.0003
C^2	27.93	1	27.93	42.69	0.0003	F^2	115.03	1	115.03	20.74	0.0026
残差	4.58	7	0.65			残差	38.83	7	5.55		
失拟项	3.31	3	1.10	3.48	0.1300	失拟项	24.49	3	8.16	2.28	0.2216
纯误差	1.27	4	0.32			纯误差	14.34	4	3.58		
总离差	147.17	16				总离差	1212.73	16			

采用 Design-Expert13 软件绘制三维响应面图 (见图 1), 将每个模型得到的最优条件范围进行叠加, 得到速释层的最优工艺参数 (葡甲胺 1.57 mg, 交联羧甲基纤维素钠 5.10 mg, 乳糖 39.83 mg); 缓释层的最优工艺参数 (HPMC K4M 60.27 mg, MCC 30.61 mg, PVP K30 浓度为 28.57%)。根据模拟方程的预测, Y_1 为 4.55, Y_2 为 6.03。根据上

述最佳工艺条件制备 3 批双层片进行验证。结果表明, Y_1 实测值的平均值为 4.56 ($RSD = 0.91\%$, $n = 3$), 与预测值的偏差值仅为 0.22%; Y_2 实测值的平均值为 6.08 ($RSD = 0.44\%$, $n = 3$), 与预测值的偏差值仅为 0.8%, 表明该条件下制得的双层片实测值与预测值吻合良好, 所建模型具有良好的预测效果 (见表 4)。

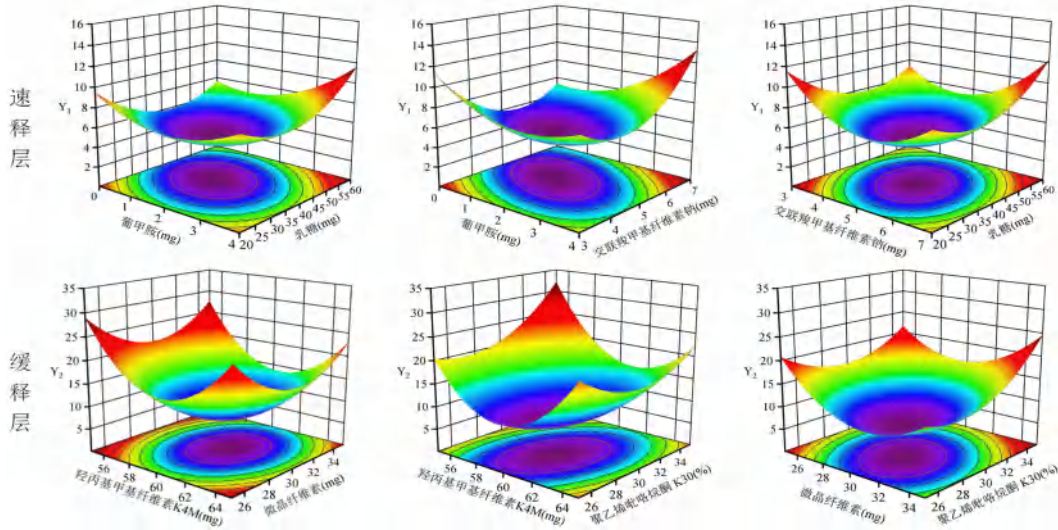


图 1 各因素交互对 Y_1 和 Y_2 的三维响应面图
Fig 1 Three-dimensional response surface diagram of interaction of each factor of Y_1 and Y_2

表 4 最佳制备工艺验证结果

Tab 4 Verification results of the optimal preparation process

No.	速释层					缓释层				
	A/mg	B/mg	C/mg	Y_1 预测值	Y_1 实测值	D/mg	E/mg	F/%	Y_2 预测值	Y_2 实测值
1	1.57	5.10	39.83	4.55	4.56	60.27	30.61	28.57	6.03	6.09
2	1.57	5.10	39.83	4.55	4.53	60.27	30.61	28.57	6.03	6.05
3	1.57	5.10	39.83	4.55	4.59	60.27	30.61	28.57	6.03	6.10

2.4 释药曲线方程拟合及释药机制研究

按照上述最优工艺条件结果，制备瑞格列奈 - 阿卡波糖速缓释双层片，分别计算两种药物的累计释放率 Q (%)，绘制药物体外释放曲线。结果表明，速缓释双层片中的瑞格列奈能在 30 min 内迅速释放，30 min 时的累计释放量达到 95.34%，而阿卡波糖在体外释放长达 12 h，实现了速释和缓释的双相释药的效果 (见图 2)。

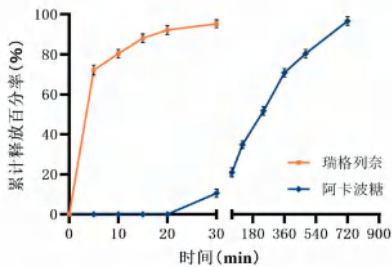


图 2 瑞格列奈 - 阿卡波糖速缓释双层片体外释放曲线 ($n = 6$)
Fig 2 Release curve of repaglinide-acarbose immediate-sustained-release bilayer tablets in vitro ($n = 6$)

对双层片中瑞格列奈和阿卡波糖在各时间点的累计释药率进行方程拟合。结果显示，瑞格列奈的释放为符合一级动力学的简单扩散过程，阿卡波糖的释放应为扩散与溶蚀协同作用过程 (见表 5)。

2.6 双层片对糖尿病兔的血糖影响

随机选取 5 只新西兰兔作为空白组，每日给予普通饲料，其余新西兰兔给予高脂高糖饲料 (37%

表 5 瑞格列奈和阿卡波糖体外释放的拟合结果

Tab 5 Release fitting of repaglinide and acarbose in vitro

方程	组分	拟合方程	拟合系数 (R^2)
Zero-order	瑞格列奈	$Q = 55.143t + 70.945$	0.8811
	阿卡波糖	$Q = 7.4313t + 16.746$	0.9447
First-order	瑞格列奈	$\ln(100 - Q) = -4.4115t + 3.6489$	0.9815
	阿卡波糖	$\ln(100 - Q) = -0.2696t + 4.7826$	0.9528
Higuchi	瑞格列奈	$Q = 57.531t_{1/2} + 57.099$	0.9507
	阿卡波糖	$Q = 31.793t_{1/2} - 10.654$	0.9959
Ritger-Peppas	瑞格列奈	$\ln Q = 0.1637\ln t + 4.6894$	0.9818
	阿卡波糖	$\ln Q = 0.6886\ln t + 2.9696$	0.9868

蔗糖，10% 猪油，53% 基础饲料)。喂养 6 周后，经耳缘静脉注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的四氧嘧啶溶液，1 周后，再次经耳缘静脉注射 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的四氧嘧啶溶液。每次注射后的 24 h 内，在前爪涂抹糖浆，将饮水替换为 20% 的葡萄糖溶液，避免低血糖性休克。观察 3 d 后，连续监测空腹血糖 5 d，空腹血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并出现多饮、多食、多尿情况视为造模成功。将造模成功的 20 只糖尿病兔，随机分为 5 组：空白组、糖尿病模型组、瑞格列奈组、阿卡波糖组、双层片组。空白组及糖尿病模型组给予空白片，瑞格列奈片组中瑞格列奈 $0.093 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ，阿卡波糖片组中阿卡波糖 $4.671 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ，双层片组中瑞格列奈 $0.093 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ + 阿卡波糖 $4.671 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。各组

动物均连续给药 3 周，每日一次，并在给药前后测定空腹血糖值、餐后 0.5 h 血糖值、餐后 2 h 血糖值及给药后随机 8 h 血糖值。结果显示，双层片能够较好地控制血糖在正常值范围内（见图 3）。与模型组相比，瑞格列奈、阿卡波糖以及双层片均能明显使血糖降低，治疗效果明显 ($P < 0.01$)，且双层片组的降血糖效果优于瑞格列奈和阿卡波糖单独给药组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明该两药联用的复方制剂比单药具有更良好的降血糖作用，且双层片组 8 h 随机血糖值较两单药组低，表明其良好的缓释作用。

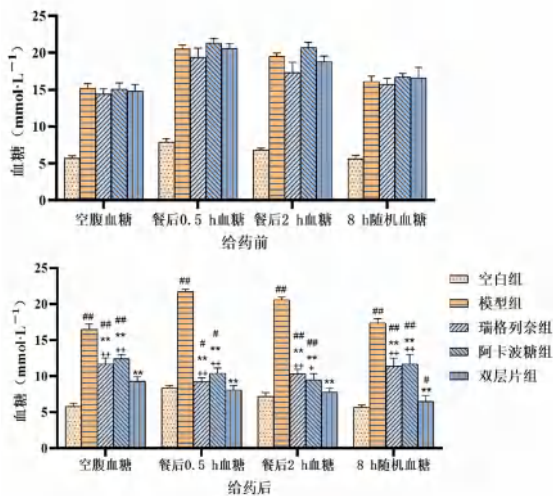


图 3 各组连续给药 3 周后对糖尿病兔血糖的影响 ($n = 5$)

Fig 3 Effects of continuous administration on blood glucose of diabetic rabbits in each group for 3 weeks ($n = 5$)

注：与空白组比较， $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ ，与模型组比较， $^{**}P < 0.01$ ，与双层片组比较， $^{+}P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ 。

Note: Compared to blank group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; compared with the model group, $^{**}P < 0.01$; compared with the bilayer tablets group, $^{+}P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$.

2.5 双层片的体内药代动力学研究

12 只新西兰兔随机分为双层片组和瑞格列奈 - 阿卡波糖普通片组（自制），自制的普通片符合《中国药典》中对片剂的质量要求。

每组新西兰兔 6 只，给药前 12 h 禁食禁水。称重后，各给一片双层片 / 普通片，在给药前及给药后 0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、24 h，经耳郭静脉取血 2.5 mL，置于肝素钠浸润过的离心管中， $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，分离血浆，保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

采用 HPLC 法分别对瑞格列奈和阿卡波糖的含量进行测定，根据每个时间点血液样本中的药物浓度绘制平均血药浓度 - 时间曲线（见图 4 和图 5）。由于瑞格列奈在体内存在肝肠循环，部分血药浓度出现了双峰的情况，因此应进行非房室模型的拟

合^[15]，采用矩量法进行血药浓度参数的求算。根据最小赤池信息准则（AIC）值的原则和最佳拟合的原则，结合 F 检验，阿卡波糖较好地符合了二室模型，得到的药动学参数结果见表 6 及表 7。与口服普通片相比，双层片中瑞格列奈的 $t_{1/2z}$ 、 AUC 差异有统计学意义， $t_{1/2z}$ 明显缩短，并可在 0.583 h 迅速达到 C_{max} ，同时 C_{max} 也明显升高，约为普通片的 1.28 倍，说明双层片中的瑞格列奈可在更短的时间内快速吸收达到有效浓度，有效提高了瑞格列奈的生物利用度。与普通片相比，双层片中阿卡波糖的 $t_{1/2z}$ （约为普通片的 1.75 倍）及 t_{max} 显著延长（约为普通片的 2.7 倍）， C_{max} 降低达到了缓释的效果，避免了血药浓度过大波动， MRT 及 AUC 显著升高，说明在体内平均滞留时间长，被吸收利用的程度较好。以上结果表明，瑞格列奈 - 阿卡波糖双层片中的瑞格列奈能以更短的时间达到 C_{max} ，阿卡波糖的 $t_{1/2z}$ 与 t_{max} 延长、 C_{max} 显著降低，达到了缓释的目的，符合实验预期的结果。

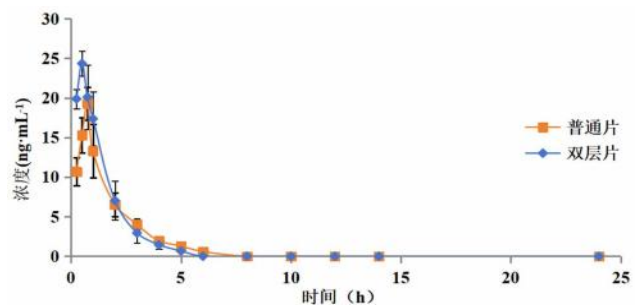


图 4 双层片与普通片中瑞格列奈的血药浓度 - 时间曲线

Fig 4 Blood concentration-time curve of repaglinide in bilayer tablets and ordinary tablets

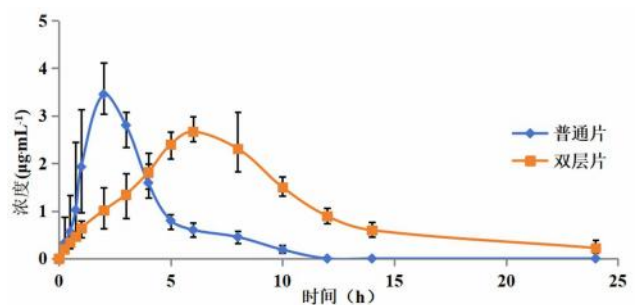


图 5 双层片与普通片中阿卡波糖的血药浓度 - 时间曲线

Fig 5 Blood concentration-time curve of acarbose between bilayer tablets and ordinary tablet

3 讨论

T2DM 为非胰岛素依赖型糖尿病，在成年糖尿病患者中占比超过 95%^[16]。T2DM 可引起心血管疾病、糖尿病肾病和神经病变等多种危及生命的并发症^[17-18]。多项研究表明，糖尿病并发症与血糖异常的程度直接相关^[19]。T2DM 患者长期血糖控制

表 6 单次给药双层片和普通片中瑞格列奈的药动学参数 (n = 6)

Tab 6 Pharmacokinetic parameters of repaglinide between single-dose bilayer tablets and ordinary tablet (n = 6)

参数	普通片	双层片
$AUC_{0 \sim t} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	33.856 ± 3.096	39.869 ± 7.767 ⁺
$t_{1/2} / \text{h}$	1.152 ± 0.127	0.821 ± 0.108 ⁺⁺
$C_{\text{max}} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	19.637 ± 1.789	25.045 ± 1.131 ⁺⁺
$t_{\text{max}} / \text{h}$	0.792 ± 0.102	0.583 ± 0.129 ⁺⁺

注: 与普通片相比, ⁺P < 0.05, ⁺⁺P < 0.01。

Note: Compared with the ordinary tablets, ⁺P < 0.05, ⁺⁺P < 0.01.

表 7 单次给药双层片和普通片中阿卡波糖的药动学参数 (n = 6)

Tab 7 Pharmacokinetic parameters of acarbose between single-dose bilayer tablets and ordinary tablet (n = 6)

参数	普通片	双层片
$AUC_{0 \sim t} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	12.324 ± 1.108	25.311 ± 2.201 ⁺⁺
$AUC_{0 \sim \infty} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	13.310 ± 2.039	26.504 ± 2.378 ⁺⁺
$MRT_{0 \sim t} / \text{h}$	3.389 ± 0.087	8.463 ± 0.554 ⁺⁺
$MRT_{0 \sim \infty} / \text{h}$	4.066 ± 0.569	9.834 ± 1.179 ⁺⁺
$t_{1/2} / \text{h}$	2.701 ± 1.364	4.714 ± 1.667 ⁺⁺
$C_{\text{max}} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	3.500 ± 0.398	2.681 ± 0.217 ⁺
$t_{\text{max}} / \text{h}$	2.333 ± 0.516	6.333 ± 0.816 ⁺⁺

注: 与普通片相比, ⁺P < 0.05, ⁺⁺P < 0.01。

Notes: Compared with the ordinary tablets, ⁺P < 0.05, ⁺⁺P < 0.01.

未达标会导致糖尿病并发症的风险增加, 尽管目前已经研发了多种降糖药物用于治疗 T2DM, 但仍有许多患者未能达到理想的血糖控制目标。目前, 在临床治疗中多采用多种类型的降糖药联合治疗 T2DM^[3]。本实验以瑞格列奈和阿卡波糖作为模型药物, 成功制备了瑞格列奈-阿卡波糖速缓释型双层片, 通过 Box-behnken 法进行处方优化, 得到的双层片具有显著的双相释药效果, 体外累计释放度重现性良好, 联合给药能快速缓解高血糖症状, 延长药物作用时间, 实现速效和长效的互补, 从而提高了降糖药物的疗效, 为瑞格列奈和阿卡波糖协同作用的复方制剂研究提供了一种策略。

参考文献

[1] Tinajero MG, Malik VG. An update on the epidemiology of type 2 diabetes: a global perspective [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2021, 50 (3): 337-355.

[2] Goldenberg RM, Ahooja V, Clemens KK, et al. Practical considerations and rationale for glucagon-like peptide-1 receptor agonist plus sodium-dependent glucose cotransporter-2 inhibitor combination therapy in type 2 diabetes [J]. *Can J Diabete*, 2021, 45 (3): 291-302.

[3] Wang B, Sun Y, Sang YQ, et al. Comparison of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and pioglitazone combination therapy versus pioglitazone monotherapy in type 2 diabetes: a system review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97 (46): e12633.

[4] Elling R, Spehl MS, Wohlfarth A, et al. Prolonged hypoglycemia after a suicidal ingestion of repaglinide with unex-

pected slow plasma elimination [J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2016, 54 (2): 158-160.

[5] Wolffenbittel BH. Repaglinide—a new compound for the treatment of patients with type2diabetes [J]. *Neth J Med*, 1999, 55 (5): 229-234.

[6] Zhang R, Zhao QX, Li R. Predictors of acarbose therapeutic efficacy in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients in China [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2022, 23 (1): 79.

[7] Rosak C, Hofmann U, Paulwitz O. Modification of beta-cell response to different postprandial blood glucose concentrations by prandial repaglinide and combined acarbose/repaglinide application [J]. *Diabetes Nutr Metab*, 2004, 17 (3): 137-142.

[8] Cersosimo E, Johnson EL, Chovanes C, et al. Initiating therapy in patients newly diagnosed with type 2 diabetes: combination therapy vs a stepwise approach [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20 (3): 497-507.

[9] Padhi S, Nayak AK, Behera A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110708.

[10] Oha JH, 王盈. 用于治疗糖尿病的胃内滞留双层片的制备 [J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47 (3): 287.

[11] Simão J, Chaudhary SA, Ribeiro AJ. Implementation of quality by design (QbD) for development of bilayer tablets [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 184: 106412.

[12] Abebe A, Akseli I, Sprockel O, et al. Review of bilayer tablet technology [J]. *Int J Pharm*, 2014, 461 (1-2): 549-58.

[13] Lee HG, Park YS, Jeong JH, et al. Physicochemical properties and drug-release mechanisms of dual-release bilayer tablet containing mirabegron and fesoterodine fumarate [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2459-2474.

[14] Ishitsubo N, Oguro S, Shimahashi H, et al. Development, Physicochemical characteristics and pharmacokinetics of a new sustained-release bilayer tablet formulation of tramadol with an immediate-release component for twice-daily administration [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2024, 49 (1): 87-100.

[15] 梁晓荣. 人血浆中瑞格列奈和二甲基双胍的定量分析及制剂生物等效性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.

[16] Unnikrishnan R, Anjana RM, Mohan V. Diabetes mellitus and its complications in India [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016 Jun, 12 (6): 357-370.

[17] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14 (2): 88-98.

[18] Galiero R, Caturano A, Vetrano E, et al. Peripheral neuropathy in diabetes mellitus: pathogenetic mechanisms and diagnostic options [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (4): 3554.

[19] Yapanis M, James S, Craig ME, et al. Complications of diabetes and metrics of glycemic management derived from continuous glucose monitoring [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107 (6): e2221-e2236.

(收稿日期: 2024-09-03; 修回日期: 2024-11-03)

载美罗培南细菌外膜囊泡的制备及其对抗耐药细菌的作用研究

邱晓涵¹, 徐文杰², 胡雄彬², 吴军勇^{2*}, 向大雄^{2*} (1.湖南医药学院第一附属医院, 湖南 怀化 418000; 2.中南大学湘雅二医院, 长沙 410000)

摘要: 目的 以大肠埃希菌来源细菌外膜囊泡 (OMVs) 为载体, 包载美罗培南 (MEM), 制备载药细菌外膜囊泡 (MEM@OMVs) 并用于抗耐药细菌作用研究。方法 培养大肠埃希菌 DH5 α , 采用超滤和超速离心相结合的方法分离纯化 OMVs, 利用动态光散射技术 (DLS)、纳米粒子跟踪分析 (NTA)、透射电镜 (TEM) 和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对 OMVs 进行粒径分布、电势、粒子数、形态和标志蛋白鉴定。采用孵育法制备 MEM@OMVs, 并对其粒径表征和载药量测定。采用微量肉汤稀释法、结晶紫染色半定量法以及荧光分析法对 MEM@OMVs 体外抗耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌 (CRAB)、耐碳青霉烯类的铜绿假单胞菌 (CRPA) 的作用进行研究。结果 成功提取分离 OMVs, 粒径峰值分布在 92 nm 左右, TEM 下呈球形囊泡结构, OMVs 标志蛋白 OmpA、OmpF 与 OmpC 均有表达。孵育法制备的 MEM@OMVs 载药量可达 2 mg/10¹² 个粒子, 且对粒径分布的影响不大。MEM@OMVs 在体外能够抑制 CRAB、CRPA 的生长, 且与浓度成正相关, 浓度越高, 抑制作用越强。MEM@OMVs 能够抑制 CRAB、CRPA 生物膜的形成, 清除成熟的生物膜。当 MEM@OMVs 质量浓度大于 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, CRAB 的相对生物膜含量在 40% 以下; CRPA 的相对生物膜含量在 15% 以下。结论 制备的 MEM@OMVs 提高了 CRAB、CAPA 对 MEM 的敏感性, 抑制了 CRAB、CRPA 的生长及生物膜的形成, 清除成熟生物膜, 为抗耐药细菌的研究提供了新的策略。

关键词: 细菌外膜囊泡; 美罗培南; 抗感染; 药物递送

中图分类号: R94, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0356-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.010

Preparation of meropenem-loaded bacterial outer membrane vesicles and their anti-drug-resistant bacteria property

QIU Xiao-han¹, XU Wen-jie², HU Xiong-bin², WU Jun-yong^{2*}, XIANG Da-xiong^{2*} (1. The First Affiliated Hospital of Hunan Medical Institute, Huaihua Hunan 418000; 2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000)

Abstract: Objective To prepare meropenem (MEM)-loaded *Escherichia coli* DH5 α outer membrane vesicles (MEM@OMVs) and determine the anti-drug-resistant bacterial activity. **Methods** *Escherichia coli* DH5 α was cultured and OMVs were extracted and purified by ultrafiltration and ultracentrifugation. The particle size, zeta potential, particle amount, morphology and biomarker proteins of OMVs were characterized and determined by dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). MEM@OMVs were prepared by co-incubating MEM with OMVs. The size distribution was determined and drug loading efficiency was evaluated. Then antibacterial effects of MEM@OMVs against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) and carbapenem-resistant *Pseudomonas*

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (No.22C1185); 湖南省卫健委科研项目 (No.W20243128)。

作者简介: 邱晓涵, 女, 硕士研究生, 主要从事仿生纳米递药系统研究, email: 517329738@qq.com *通信作者: 吴军勇, 男, 助理研究员, 主要从事仿生纳米递药系统开发及肿瘤靶向治疗方面的研究, email: wujunyong@csu.edu.cn; 向大雄, 男, 教授, 主要从事创新药物与新制剂、仿生纳米医药技术及靶向治疗、中药与民族药物研究开发, email: xiangdaxiong@csu.edu.cn

aeruginosa (CRPA) were assessed by broth microdilution method, crystal violet staining, and fluorescence analysis. **Results** The successfully extracted OMVs displayed a peak size distribution around 92 nm and a spherical structure under TEM, with the expression of biomarkers including OmpA, OmpF, and OmpC. MEM@OMVs prepared by co-incubation exhibited a drug loading capacity of 2 mg per 10^{12} particles with minimal change on the particle size. MEM@OMVs showed dose-dependent inhibition of CRAB and CRPA growth in vitro. The inhibitory effect was positively correlated with the concentration of MEM, meaning higher concentration of MEM@OMVs leading to better antibacterial effect. MEM@OMVs also prevented biofilm formation and eradicated mature biofilms in both strains. For CRAB, MEM@OMVs above $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduced the relative content of biofilm to less than 40%. For CRPA, when the concentration of MEM@OMVs exceeded $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the relative content of biofilm was below 15%. **Conclusion** MEM@OMVs are successfully prepared and can enhance CRAB and CRPA sensitivity to MEM, inhibiting the bacteria growth and biofilm formation in vitro, thereby providing a promising strategy for combating drug-resistant bacteria.

Key words: outer membrane vesicle; meropenem; antibacterial activity; drug delivery

随着抗菌药物在临床上的滥用以及不合理使用,细菌的耐药性和毒力不断增强,出现多重耐药菌(multi-drug resistant organisms, MDRO),如耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)和耐碳青霉烯类的铜绿假单胞菌(carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, CRPA)等^[1]。近年来,全球范围耐碳青霉烯类菌株临床分离率、感染率、耐药性均呈现上升趋势,在世界范围内流行^[2]。耐碳青霉烯类菌株的出现,使临床预防和控制难度增大,重度感染患者的病死率显著上升,成为患者院内死亡的重要危险因素。目前临床治疗手段局限,且单药治疗效果不佳,多为抗菌药物联合治疗,但联合用药会进一步导致细菌多药耐药,给临床抗感染治疗带来极大的困难和挑战。新药的研究开发周期长、成本高,新型抗菌药物的研发往往滞后于细菌耐药性的发展,无法解决全球日益上升的高水平耐药问题^[3]。日益突出的多重耐药菌问题给世界公共卫生和临床抗感染治疗带来了巨大的困难和挑战。

美罗培南(meropenem, MEM)是人工合成的广谱碳青霉烯类抗菌药物,通过抑制细菌细胞壁的合成而产生抗菌作用。MEM容易穿透大多数革兰氏阳性菌和阴性菌的细胞壁,到达其作用靶点——青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs)^[4]。MEM是目前临床上治疗MDRO所致严重感染的最后防线之一,但CRAB以及CRPA突破了这道防线,细菌生物膜的存在,外排泵过度表达,膜孔蛋白的结构改变或表达异常以及碳青霉烯酶的产生等,使其对MEM也耐药,限

制了MEM在临床上的应用。

近年来,利用新型纳米载体递送药物,可以提高药物对细胞的渗透,促进药物在感染部位积累,作为一种新的治疗方法具有很大的潜力^[5]。细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)作为一种新型纳米递送载体在生物医学领域被广泛研究与应用。OMVs是一种新型纳米递送载体,由革兰氏阴性菌释放的具有脂质双分子层的球形纳米囊泡,粒径为20~250 nm,主要由脂质、蛋白质、多种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)等组成,PAMPs包括脂多糖、肽聚糖、甘露糖、DNA、RNA等^[6-7]。OMVs来源于亲本细菌,细菌通过分泌OMVs向宿主细胞递送活性物质调节细胞功能,是细菌与宿主细胞间的一种交流方式^[8-9]。相比于脂质体等传统纳米药物递送载体,OMVs具有与细菌细胞壁同源的跨膜、穿膜蛋白等,更容易被细菌摄取从而释放内含物^[10-11],提高药物进入细菌的能力。利用这一特点,本研究以低毒性的大肠埃希菌DH5 α 来源的OMVs为载体,包载MEM构建纳米药物递送平台,提高MEM的传递效率和对耐药细菌的敏感性。本研究通过对包载MEM的OMVs进行理化性质表征及体外药效学考察,评价其对耐碳青霉烯类细菌的疗效,以期对耐碳青霉烯类细菌感染的药物治疗提供参

1 仪器与试剂

1.1 试剂

哥伦比亚血琼脂培养基(郑州贝瑞特);LB肉

汤培养基 (杭州微生物); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (Hyclone); BCA 蛋白试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Boster)。

1.2 仪器

生化培养箱 (上海跃进); 高速冷冻离心机 Neofuge 15R (Heal Force); 低温超速离心机 L-100XP (Beckman Coulter); 纳米粒径跟踪分析仪 (NanoSight NS300, Malvern); 动态光散射粒度仪 (Zetasizer Nano series, Malvern); 场发射高分辨透射电镜 (JEM-2100F, JEOL); ChemiDoc 自动化学发光凝胶成像分析仪 (BIO-RAD); 荧光显微镜 IX73 (Olympus)。

1.3 细菌株

大肠埃希菌 DH5 α (丰晖生物); CRAB 及 CRPA 来自中南大学湘雅二医院检验科。

2 方法与结果

2.1 大肠埃希菌 DH5 α 的培养

将 -80 °C 冻存的大肠埃希菌 DH5 α 甘油菌株接种于哥伦比亚血琼脂培养基, 于 37 °C 生化培养箱中倒置培养 24 h, 得到单克隆菌落。挑取 1~3 个单克隆菌落接种到 20 mL 已高压蒸汽灭菌的 LB 肉汤培养基中, 37 °C 摇床培养 12 h, 用 LB 肉汤培养基以 1:100 稀释, 37 °C 继续培养, 直到

OD₆₀₀ 为 1。

2.2 OMVs 的提取和表征

采用超滤和超速离心相结合的方法提取 OMVs。将 OD₆₀₀ 为 1 的大肠埃希菌 DH5 α 菌液分装至 50 mL 高速圆底离心管中, 4 °C、10 000 g 离心 10 min 除去绝大部分细菌以及细胞碎片。将上清液通过 0.22 μ m 滤膜过滤, 除去残留的细菌。再将收集到的滤液通过 100 kDa 滤膜超滤浓缩, 除去大部分非 OMVs 蛋白质组分。最后将浓缩后的超滤液 4 °C、200 000 g 超速离心 4 h, 弃去上清液, 加入 PBS 将 OMVs 重悬, 置于 -80 °C 冰箱中冻存备用。

采用 DLS 激光粒度仪测定提取的大肠埃希菌 DH5 α 来源 OMVs 的纳米粒径和电位。OMVs 粒径峰值分布在 92 nm 左右, PDI 为 0.185, Zeta 电势为 (-30.32 \pm 1.36) mV。采用 NTA 示踪技术测定 OMVs 的粒子数, 测得 OMVs (稀释 10 000 倍) 的粒子数为 4.72 \times 10⁸ 个。采用 TEM 观察 OMVs 的形态学, OMVs 呈球形囊泡结构, 并且可以看出明显的脂质双分子层结构。BCA 测定 OMVs 蛋白量, 结果蛋白质量浓度为 679.55 μ g \cdot mL⁻¹。SDS-PAGE 鉴定 OMVs 标志蛋白, OMVs 在 35、38 kDa 等处条带显色清晰, 与文献报道的大肠埃希菌 OMVs 蛋白条带分布一致^[12] (见图 1)。

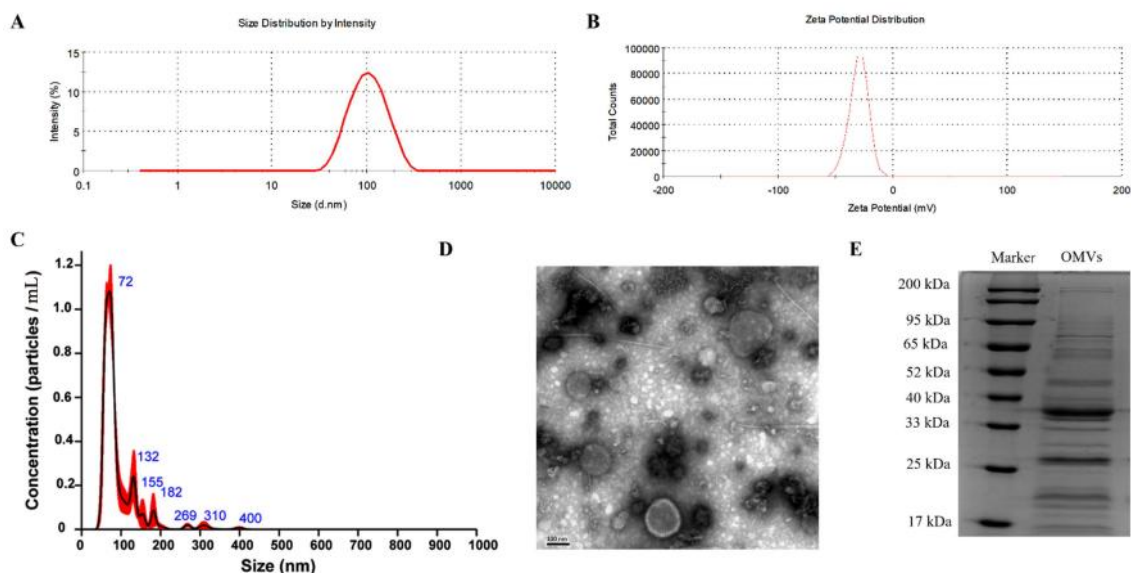


图 1 OMVs 的表征

Fig 1 Characterization of OMVs

A. 粒径分布 (particle size distribution); B. Zeta 电势 (Zeta potential); C. 粒径分布 (particle size distribution); D. 形态 (morphology); E. 蛋白分布 (protein distribution)

2.3 MEM@OMVs 的制备和表征

将 1 \times 10¹² 个 OMVs 粒子与不同摩尔质量的 MEM 在 PBS 体系中混合, 37 °C 孵育 2 h, 100 kDa 滤膜多次超滤, 除去游离的 MEM。通过 DLS 激光

粒度仪测定 MEM@OMVs 的粒径分布与大小, 孵育载药前与载药后的 OMVs 粒径分布一致, 没有明显变化 (见图 2)。

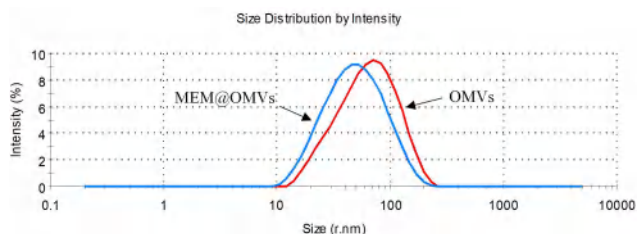


图 2 孵育载药后 OMVs 和 MEM@OMVs 的粒径分布
Fig 2 Size distribution of OMVs and MEM@OMVs obtained by incubation

2.4 MEM@OMVs 的载药量测定

取 MEM@OMVs 纳米溶液 100 μL ，加入甲醇破乳后通过 HPLC 测定 MEM 含量。按照 $W_{\text{MEM}}/N_{\text{OMVs}}$ 计算载药量，其中， W_{MEM} 为包载的 MEM 药物量， N_{OMVs} 为载药纳米粒子总个数。随着 MEM 用量的增加，载药量也在不断提高。当 1×10^{12} 个 OMVs 粒子与 0.1 mmol MEM 孵育后，载药量可达 2524.02 μg (见图 3)。

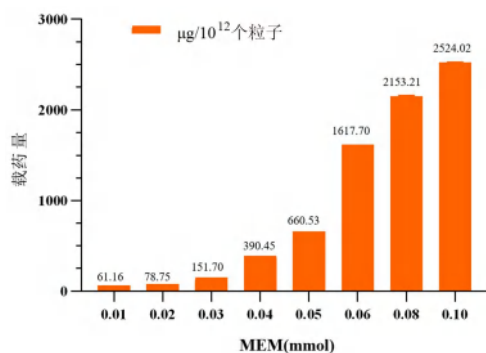


图 3 不同剂量 MEM 对载药量的影响
Fig 3 Effect of different dosage of MEM on drug loading

2.5 MEM@OMVs 对耐碳青霉烯类菌株生长的影响

CRAB、CRPA 于血琼脂平板培养基过夜培养后，分别用接种环挑取形态相似的 CRAB、CRPA 单克隆菌落 2~4 个，接种于 20 mL 的 LB 肉汤培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中摇床培养 12 h，用生理盐水将菌悬液浓度调为 0.5 麦氏浊度，含 $(1 \sim 2) \times 10^8$ $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 96 孔板中各加入菌液 100 μL 后，加入 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MEM 和 MEM@OMVs 溶液各 100 μL ，药物溶液与菌液混合均匀后，放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养，在固定时间点 0、2、3.5、6、8、10、13、24 h 用酶标仪检测细菌培养液的 OD_{600} 值，记录细菌 24 h 动态生长曲线，观察 MEM 与 MEM@OMVs 对 CRAB、CRPA 的生长影响，见图 4。MEM 组、OMVs 组细菌在 4~24 h 快速生长，生长曲线呈现显著上升趋势，而 MEM@OMVs 组的细菌在 4~24 h 生长缓慢。

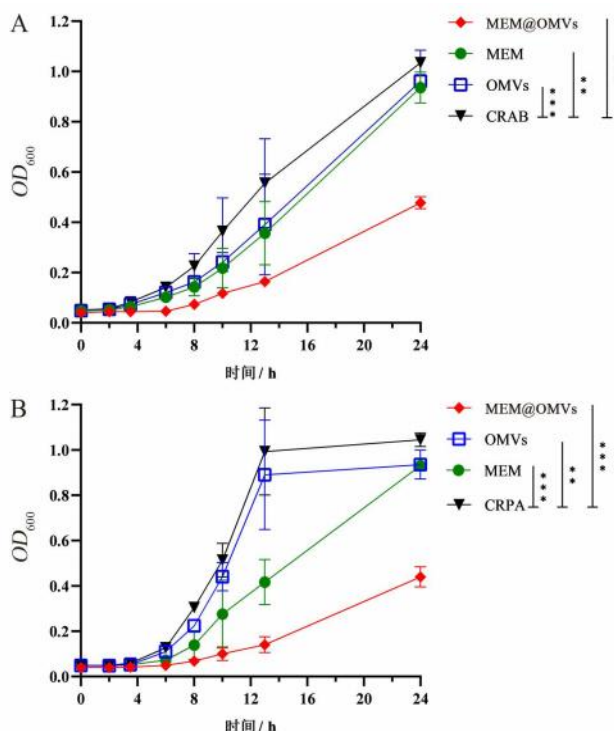


图 4 MEM@OMVs 对细菌 CRAB (A) 和 CRPA (B) 生长的影响 ($n = 6$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)
Fig 4 Effect of MEM@OMVs on the growth of CRAB (A) and CRPA (B) ($n = 6$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

2.6 不同浓度 MEM@OMVs 对耐碳青霉烯类菌株生长情况的对比

将 CRAB、CRPA 按照“2.5”项下方法处理，96 孔板中各加入菌液 100 μL 后，分别加入 64、32、16、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MEM 和 MEM@OMVs 溶液各 100 μL 。在不同时间段内观察不同浓度的 MEM@OMVs 对 CRAB、CRPA 生长的影响，结果见图 5。在给定剂量下 (64、32、16、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，对于 CRAB 以及 CRPA，MEM@OMVs 的浓度越高，细菌生长曲线越平缓，细菌生长越缓慢，对细菌的抑制作用越强。

2.7 MEM@OMVs 对细菌生物膜的影响

2.7.1 生物膜形成抑制实验

CRAB、CRPA 于血琼脂平板培养基培养过夜后，分别用接种环挑取形态相似的 CRAB、CRPA 单克隆菌落 2~4 个，接种于 20 mL 的 LB 肉汤培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中摇床培养 12 h，用生理盐水将菌悬液浓度调为 1 麦氏浊度。在 96 孔板中分别加入 128、64、32、16、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MEM 和 MEM@OMVs 溶液各 195 μL ，再分别加入 5 μL 菌液，药物溶液与菌液混合均匀后，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养 24 h，弃去浮游菌，用无菌 PBS 轻柔洗涤 2 次，再各加入 200 μL 0.1% 结晶紫溶液，室温静

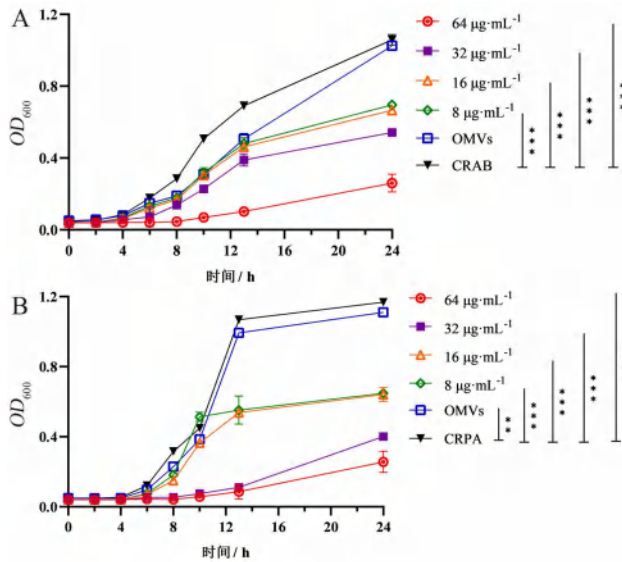


图 5 不同浓度 MEM@OMVs 对细菌 CRAB (A) 和 CRPA (B) 生长的影响 ($n = 3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig 5 Effect of different concentrations of MEM@OMVs on the growth of CRAB (A) and CRPA (B) ($n = 3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

置染色 15 min, 弃去结晶紫染色液, 用无菌 PBS 轻柔洗涤 3 次, 分别加入 200 μL 无水乙醇溶解与细菌结合的结晶紫, 用酶标仪测定 OD₅₆₀ 值, 计算相对生物膜含量, 结果见表 1。在给定剂量下, 当 MEM@OMVs 浓度大于 16 μg · mL⁻¹, CRAB 的相对生物膜含量在 40% 以下; CRPA 的相对生物膜含量在 15% 以下。

表 1 不同浓度 MEM@OMVs 对相对生物膜含量的影响
Tab 1 Effect of MEM@OMVs on the relative content of biofilms

MEM@OMVs/ (μg · mL ⁻¹)	相对生物膜含量 / %	
	CRAB	CRPA
128	27.33 ± 1.32	10.79 ± 1.86
64	31.66 ± 1.65	9.91 ± 0.95
32	28.19 ± 5.45	12.54 ± 1.54
16	38.84 ± 3.79	11.65 ± 2.34
8	86.15 ± 23.08	98.36 ± 3.43
Blank (0)	100.00 ± 5.59	100.00 ± 4.38

MEM@OMVs 与 MEM 对 CRAB、CRPA 生物膜形成的抑制作用见图 6, 在给定剂量下 (128、64、32、16、8 μg · mL⁻¹), MEM@OMVs 组的相对生物膜含量较 MEM 组更少。

2.7.2 清除成熟生物膜实验 将 CRAB、CRPA 按照“2.7.1”项下方法进行处理, 将无菌盖玻片放入装有 LB 肉汤培养基的 6 孔板中, 接种浓度为 0.5 麦氏浊度的菌悬液, 37℃、100 r · min⁻¹ 培养 24 h, 待盖玻片上生物膜成熟后移除菌悬液, 用 PBS 轻柔洗 3 次, 加入 32 μg · mL⁻¹ 的 MEM 和 MEM@OMVs 溶液各 100 μL, 置于 37℃ 生化培养箱中孵育 4 h 后用

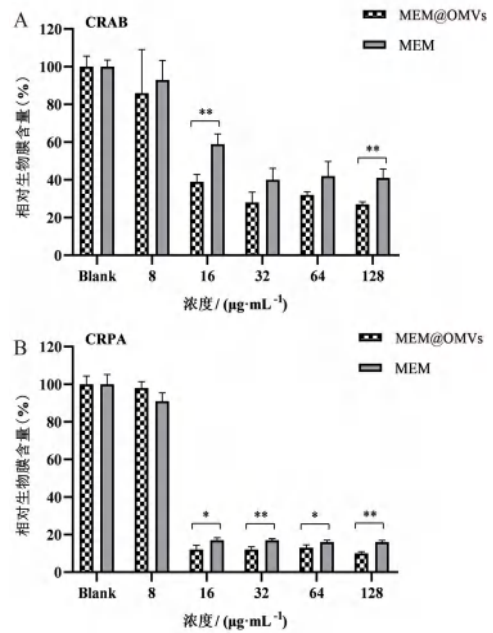


图 6 MEM-OMVs 与 MEM 对相对生物膜含量的影响 ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 6 Effect of MEM@OMVs and MEM on the relative content of biofilms ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

PI 染液染色, 在荧光显微镜下观察对成熟生物膜的影响, 见图 7。对于 CRAB、CRPA, 对照组无红色荧光, MEM 组有少量红色荧光, OMVs 组红色荧光较 MEM 组少量增加, MEM@OMVs 组有大量红色荧光, MEM@OMVs 清除的成熟生物膜最多。

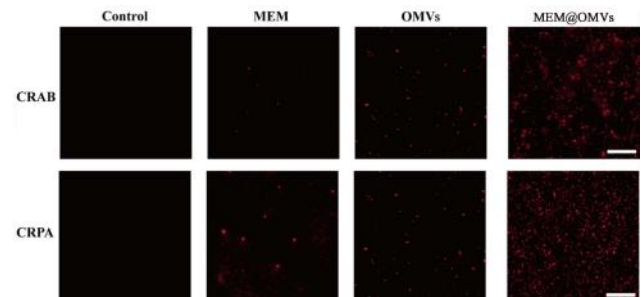


图 7 MEM@OMVs 与 MEM 对成熟生物膜的影响

Fig 7 Effect of MEM@OMVs and MEM on the mature biofilms

2.8 统计学方法

计量数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 GraphPad Prism 8.0.2 对数据进行处理, 使用 EXCEL 对数据进行统计分析, 两组均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 讨论

鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌被 WHO 列为亟需新药开发以控制感染的细菌。随着大量广谱抗菌药物在临床的应用, 耐碳青霉烯类菌株日益增多, 对几乎所有抗菌药物的敏感性降低。采用脂质体纳米技术传递抗菌药物可以有效增加感染

部位抗菌药物的局部浓度,降低全身药物剂量,并且可以降低药物潜在的毒副作用^[13]。但脂质体的合成需要复杂的包封和纯化过程,还引入了残留的毒性有机溶剂,限制了抗菌药物脂质体的大规模生产和临床应用。而本研究采用来源于革兰氏阴性菌的新型纳米载体 OMVs,利用其与细菌细胞壁同源的跨膜、穿膜蛋白等,携带药物进入细菌细胞,提高药物传递效率,增加感染部位药物的量,进而提高耐药细菌对药物的敏感性。

本研究选择免疫原性低,毒力弱的大肠埃希菌 DH5 α 来源的 OMVs 作为载体,并采用孵育法制备 MEM@OMVs。理化性质表征结果表明,本研究通过将超滤与超速离心法结合成功提取了大肠埃希菌 DH5 α 来源的 OMVs,与 MEM 共孵育成功制备了 MEM@OMVs。体外抗菌作用实验结果表明 MEM@OMVs 能够在体外有效抑制 CRAB、CRPA 的生长,且抑制耐药细菌的生长具有剂量依赖效应。生物膜形成抑制实验以及清除生物膜实验结果表明, MEM@OMVs 能够抑制生物膜形成、清除成熟生物膜。

本研究主要在体外水平上研究了 MEM@OMVs 的抗耐药细菌疗效,证明了 OMVs 能够提高 CRAB、CAPA 对 MEM 的敏感性,不仅能够有效抑制 CRAB、CAPA 的生长,还能够抑制 CRAB、CAPA 生物膜的形成,清除成熟生物膜。OMVs 包载 MEM 在体外成功达到了增敏的作用,为抗耐药细菌的研究提供了新的策略。

参 考 文 献

- [1] Ibrahim K, Thwood D, ELgheriani H, et al. Prevalence of multi-drug resistant bacteria in intensive care units at Tripoli University Hospital, Tripoli, Libya [J]. *Libyan J Med*, 2024, 19 (1): 2348235.
- [2] Shen HW, Xiao DL, Zhang QM, et al. The features of multidrug-resistant organisms between 2016 and March 2023 and its change after the end of Zero-COVID-19 policy in a teaching hospital in Shenzhen, China [J]. *J Glob Anti-microb Re*, 2024: 3791-3792.
- [3] Wang HF, Yang YY, Wang SM, et al. Antimicrobial sensitizers: gatekeepers to avoid the development of multi-drug-resistant bacteria [J]. *J Control Release*, 2024, 369: 25-38.
- [4] Kitzis MD, Acar JF, Gutmann L. Antibacterial activity of meropenem against gram-negative bacteria with a permeability defect and against Staphylococci [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1989, 24 (Suppl A): 125-132.
- [5] Elhassan E, Devnarain N, Mohammed M, et al. Engineering hybrid nanosystems for efficient and targeted delivery against bacterial infections [J]. *J Control Release*, 2022, 351: 598-622.
- [6] Masanori T, Nobuhiko N, Leo E. Types and origins of bacterial membrane vesicles [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17 (1): 13-24.
- [7] Avila-Calderón ED, Ruiz-Palma MDS, Aguilera-Arreola MG, et al. Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 557902.
- [8] Cai W, Kesavan DK, Chen JJ, et al. Vesicle-mediated dendritic cell activation in *Acinetobacter baumannii* clinical isolate, which contributes to Th2 response [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 2835256.
- [9] Zingl GF, Kohl P, Cakar F, et al. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and in vivo adaptation of vibrio cholerae [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27 (2): 225-237. e8.
- [10] Christian R, Martina B. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles [J]. *Front Cell Infect Mi*, 2020, 10: 91.
- [11] Sartorio MG, Pardue EJ, Feldman MF, et al. Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2021, 75: 609-630.
- [12] Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (17): 12489-12496.
- [13] Matteo B, Antonio V, Alessandro R, et al. Inhaled liposomal antimicrobial delivery in lung infections [J]. *Drugs*, 2020, 80 (13): 1309-1318.

(收稿日期: 2024-06-16; 修回日期: 2024-09-05)

氟非尼酮通过 SLC7A11/GPX4 通路抑制氧化应激和铁死亡减轻百草枯诱导的肺纤维化

陈韬¹, 颜笑¹, 施远香², 张晨彬¹, 尹馨¹, 刘文^{1*} (1. 湖南师范大学第一附属医院 (湖南省人民医院) 药学部, 长沙 410000; 2. 湖南省人民医院临床医学研究所, 湖南师范大学第一附属医院, 长沙 410005)

摘要: **目的** 基于铁死亡和脂质过氧化探讨氟非尼酮 (FD) 对百草枯 (PQ) 中毒引起的肺纤维化的保护作用及其机制。**方法** 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法和 Masson 染色检测大鼠肺组织的病理变化, Western blot 法检测肺纤维化和铁死亡相关指标, CCK-8 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞内活性氧 (ROS) 水平和亚铁离子 (Fe^{2+}) 含量, 比色法检测谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 水平。**结果** 染色结果显示, FD 能显著减轻 PQ 中毒引起的肺损伤。与对照组相比, FD 通过降低 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的表达, 以及提高 E-cadherin 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 显著抑制肺纤维化。FD 还显著降低了白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量 ($P < 0.05$), 减轻 PQ 引起的炎症反应。此外, FD 还可降低 MDA 和羟脯氨酸 (HYP) 水平 ($P < 0.05$) 增加 GSH 含量, 从而降低肺组织氧化应激的作用。体外实验显示, 与对照组相比, PQ 处理组细胞活力和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$), 而脂质 ROS、MDA 和 Fe^{2+} 水平显著升高 ($P < 0.05$)。然而, 使用坏死细胞凋亡抑制剂 Necrostatin-1 (Nec-1) 和焦亡抑制剂 Z-VAD-FMK 处理后, 这些指标并未逆转。使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 和 FD 预处理细胞, 可以显著提高细胞活力和 GSH 含量, 降低 MDA、ROS 和 Fe^{2+} 水平 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, FD 预处理后, Ferritin、铁泵蛋白 (SLC40A1)、胱氨酸谷氨酸逆向转运蛋白 (SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的表达均显著升高 ($P < 0.05$)。SLC7A11 的上调增强了 GPX4 蛋白的表达, 减少了 GSH 的消耗和脂质过氧化物的积累 ($P < 0.05$)。**结论** FD 通过 SLC7A11/GPX4 途径抑制铁死亡, 从而改善肺纤维化和细胞损伤。

关键词: 铁死亡; 肺纤维化; 氟非尼酮; 百草枯; GPX4; SLC7A11

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0362-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.011

Fluorofenidone mitigates paraquat-induced pulmonary fibrosis by attenuating oxidative stress and ferroptosis via SLC7A11/GPX4 pathway

CHEN Tao¹, YAN Xiao¹, SHI Yuan-xiang², ZHANG Chen-bin¹, YIN Xin¹, LIU Wen^{1*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University (Hunan People's Hospital), Changsha 410000; 2. Institute of Clinical Medicine, People's Hospital of Hunan Province, The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005)

Abstract: Objective To determine the protective effect and mechanism of fluorofenidone (FD) on pulmonary fibrosis induced by paraquat (PQ) poisoning based on ferroptosis and lipid peroxidation. **Methods** Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to detect the pathological changes of rat lung tissues. Western blot was used to detect pulmonary fibrosis and ferroptosis. CCK-8 was used to detect the cell viability. Flow cytometry was used to determine the content of ROS and Fe^{2+} . Colorimetry was used to detect glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. **Results**

基金项目: 湖南省卫生健康委员会科研项目基金 (No. B202313016310); 国家自然科学基金项目 (No. 82104304); 湖南省卫生健康委高层次人才项目 (No. 20230609-1014)。

作者简介: 陈韬, 男, 硕士, 主要从事药物作用机制研究, email: man.you@foxmail.com * **通信作者:** 刘文, 男, 主任药师, 主要从事临床药学、毒物分析与代谢组学研究, email: liuwen@hunnu.edu.cn

HE staining and Masson staining showed that FD significantly attenuated the lung injury induced by PQ poisoning ($P < 0.05$). FD significantly inhibited pulmonary fibrosis by reducing the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and increasing the expression of E-cadherin protein ($P < 0.05$). FD significantly reduced the levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05$), thus reducing the PQ caused by inflammation. In addition, the decrease in MDA and hydroxyproline (HYP) levels and the increase in GSH content indicated that FD reduced oxidative stress in the lung tissue ($P < 0.05$). In vitro, cell viability and GSH levels were much decreased and lipid reactive oxygen species (ROS), MDA, and ferrous ion levels were significantly increased in the PQ group as compared with those of the control group ($P < 0.05$). However, these indexes did not reverse after treatment with necrosis apoptosis inhibitor-1 (Nec-1) and pyroptosis inhibitor Z-VAD-FMK. Pretreatment of cells with ferroptosis inhibitors and FD effectively increased the cell viability and GSH content and decreased the levels of MDA, ROS and ferrous ion levels. Western blot showed that the protein expression of ferritin, ferroportin (SLC40A1), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) increased after pretreatment with ferrostatin-1 (Fer-1) and FD ($P < 0.05$). Upregulation of SLC7A11 enhanced GPX4 protein expression and reduced GSH depletion and lipid peroxidation accumulation. **Conclusion** FD can improve pulmonary fibrosis and cell damage by inhibiting ferroptosis via the SLC7A11/GPX4 pathway.

Key words: ferroptosis; pulmonary fibrosis; fluorofenidone; paraquat; GPX4; SLC7A11

百草枯 (paraquat, PQ), 化学名称为 1, 1'-二甲基-4, 4'-二氯化联吡啶, 是一种高效的吡啶类除草剂, 但对人和动物都有剧毒, 肺部是中毒的主要器官^[1]。PQ 在肺中的选择性蓄积会导致严重的肺损伤, 表现为水肿、肺泡上皮细胞损伤、渗出和间质细胞增生, 并在中毒后的几周内, 发生炎症细胞浸润、胶原沉积和成纤维细胞分化, 最终导致患者呼吸衰竭和死亡^[2]。肺纤维化是 PQ 中毒最典型的病理特征, 然而 PQ 中毒导致纤维化的具体机制尚未完全阐明。

氟非尼酮 (fluorofenidone, FD), 是一种小分子吡啶酮类化合物, 具有广泛且明确的抗纤维化作用, 包括抗肝纤维化、肺纤维化和肾纤维化^[3]。FD 治疗肺纤维化机制主要是抗氧化应激反应、减少炎症因子表达、抑制细胞增殖等, 有研究表明, 在转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 刺激下, FD 显著降低了胶原蛋白含量和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 蛋白表达^[4]。课题组前期研究表明, FD 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 减少促纤维化蛋白的表达, 阻止上皮-间质转化 (EMT) 及促进细胞外基质 (ECM) 沉积, 从而有效抑制纤维化进程^[5]。

肺纤维化是一种主要涉及炎症、细胞增殖和纤维组织增生的肺部疾病, 在肺纤维化的早期阶段, 炎症细胞损伤并释放炎症因子, 引发炎症反应^[6]。随着炎症的持续, 成纤维细胞被激活, 导致其增殖和胶原纤维的合成, 最终导致肺间质纤维化。其中肌成纤维细胞的表现在于使 α -SMA

表达增加和 ECM 的沉积, 进而促进胶原蛋白形成^[7]。但是, 目前 FD 对 PQ 中毒所致肺纤维化的作用及其可能机制尚不完全清楚。

铁死亡是一种受调控的细胞死亡形式, 主要由铁超载和脂质过氧化物的积累引起, 并且由活性氧 (ROS) 驱动, 而 ROS 能调节 TGF- β 1 诱导的肺肌成纤维细胞的分化^[8]。铁死亡的主要特征包括铁积累、氧化还原系统的干扰和脂质过氧化。研究表明, Fer-1 可以减轻肺纤维化, 提示肺纤维化与铁死亡之间存在潜在联系^[9]。SLC7A11/GPX4 通路是主要的抗氧化系统, 能减轻铁死亡引起的细胞死亡^[10], SLC7A11 在半胱氨酸/谷氨酸交换系统 Xc- 中起关键作用, 促进谷氨酸进入细胞和半胱氨酸流出细胞, 在细胞内, 半胱氨酸被转化并用于谷胱甘肽的合成^[11]。GPX4 利用还原性谷胱甘肽抑制脂质过氧化和铁沉积, 这是细胞死亡的关键过程^[12]。抑制 SLC7A11 导致谷胱甘肽耗竭, 随后下调 GPX4, 并因铁依赖性脂质过氧化物的积累导致细胞/亚细胞膜损伤^[13-14]。因此, SLC7A11/GPX4 信号通路是一个重要的抗氧化防御系统, 对于治疗铁中毒相关疾病有重大意义。然而, FD 通过铁死亡治疗纤维化疾病的作用机制尚不清楚。

铁的过度累积、ROS、脂质过氧化和谷胱甘肽是导致肺纤维化和铁死亡的重要因素, 铁死亡与肺纤维化的病理生理过程有着复杂的联系, 研究其机制可为临床干预提供新的靶点和策略。本研究旨在探讨 FD 对 PQ 诱导的铁死亡和肺纤维化的影响, 并阐明其潜在机制。

1 材料

1.1 仪器

3111 型 CO₂ 培养箱、Heraeus Fresco 17 型高速离心机、902ULTS 型超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司); DMI3000B 型荧光显微镜、CM1869 型冷冻切片机 (德国徕卡公司); EPOCH 型酶标检测仪 (美国 BioTek 公司); Neofuge 15R 型高速冷冻离心机 (上海 Heal force 公司); AUW120D 型万分之一分析天平 (日本岛津公司); MX-F 型旋涡混合仪 (美国赛洛捷克公司)。

1.2 试剂

PQ 溶液 (上海农药研究有限公司, 批号: 1806410)。FD 由中南大学湘雅药学院提供。DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) (美国 Gibco 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (北京 SEVEN BIOTECH 公司); CCK-8 试剂盒 (美国 APEXBIO 公司); GPX4 抗体、SLC7A11 抗体 (美国 CST 公司); 二价铁离子检测探针 (日本 Dojindo 公司); 丙二醛 (MDA) 比色法测试盒、谷胱甘肽 (GSH) 比色法测试盒、ROS 荧光法测试盒 (武汉伊莱瑞特公司); Ferritin 抗体、SLC40A1 抗体、TGF- β 1 抗体、 α -SMA 抗体、E-Cadherin 抗体 (英国 Abcam 公司); BCA 蛋白定量试剂盒、羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒、白细胞介素 (IL) -1 β ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (北京索莱宝公司); Lipo 6000 转染试剂 (上海碧云天公司, C0526-1.5 mL); Necrostatin-1、Z-VAD-FMK (美国 CSNpharm 公司); SLC7A11 过表达质粒 (GeneChem)。

1.3 实验动物

80 只 SPF 级 SD 雄性大鼠 (湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 180 ~ 200 g, 6 ~ 8 周龄) 饲养在温度为 (20 \pm 2) °C 的标准笼中, 自由饮食。动物许可证编号为 SCKK (湘) 2018-0002, 实验经湖南省人民医院 (湖南师范大学附属第一医院) 动物实验委员会批准 (批准文号: HP2019010793)。大鼠在实验前适应环境 1 周。

2 方法

2.1 动物分组及实验步骤

将大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只: 对照组、PQ 组、PQ + FD 组和 FD 组。PQ 组和 FD 组大鼠分别给予灌胃单剂量 PQ (40 mg \cdot kg⁻¹)。24 h 后, FD 组大鼠灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解的 FD (125 mg \cdot kg⁻¹), 对照组和 PQ 组大鼠灌胃等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠。14 d 后采集肺组织, 染色法观察肺组织炎症细胞浸润情况, 定量测定肺组织 GSH、MDA 和 HYP 含量, 评价肺纤维化程度。

2.2 细胞培养和处理

将 A549 细胞培养在含有 10%FBS 和 1% 青霉

素-链霉素混合溶液的 DMEM 培养基中, 培养箱温度设定为 37 °C, 5%CO₂。将 A549 细胞以 5 \times 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每组实验设置 5 个重复孔。药物处理包括 PQ (50 ~ 800 μ mol \cdot L⁻¹)、Fer-1 (6.25、12.5 和 25 nmol \cdot L⁻¹)、Nec-1 和 Z-VAD-FMK (5、10 和 20 μ mol \cdot L⁻¹), 处理时间为 24 h。A549 细胞分别用 12.5 nmol \cdot L⁻¹ 的 Fer-1 预处理 1 h, 用 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的 Nec-1 和 Z-VAD-FMK 预处理 1 h, 再用 300 μ mol \cdot L⁻¹ 的 PQ 预处理 24 h, 最后用 CCK-8 试剂盒分析细胞活力。使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度, 并将细胞存活率归一化为对照的百分比。

在确定 A549 细胞的 IC₅₀ 值后, 将细胞分为 7 组: 对照组, PQ 组, PQ + Fer-1 组, PQ + FD 组, Fer-1 组, FD 组与 PQ + N + Z 组。

2.3 组织病理学分析

肺标本首先用 10% 甲醛固定, 然后进行石蜡包埋。将石蜡包埋的标本切成 4 μ m 厚的切片, 并使用二甲苯溶液进行脱蜡, 随后使用梯度乙醇水化。切片经过 HE 染色和 Masson 染色后, 用于标准形态学检查和胶原沉积评估。

2.4 肺组织氧化应激的测定

在 PQ 处理后第 14 日, 处死大鼠并采集肺组织标本进行氧化应激分析。将肺标本在 4 °C 下用 RIPA 缓冲液匀浆, 并以 13 000 g 离心 15 min, 取上清液进行测定。根据生化试剂盒说明书测定 MDA、GSH 和 HYP 水平。

2.5 炎症因子的测定

采集肺组织标本后, 加入适量 PBS 缓冲液, 并使用组织匀浆器进行匀浆处理。然后以 5000 g 离心 10 min, 取上清液用于后续检测。根据生化试剂盒说明书测定 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平。

2.6 铁橙荧光探针检测细胞内 Fe²⁺ 水平

将对数生长期的细胞以 1 \times 10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 并培养至细胞密度约为 50%。处理 24 h 后, 弃旧培养基, 用无 FBS 培养基洗涤细胞 2 次, 然后加入用无 FBS 培养基配制的 1 μ mol \cdot L⁻¹ FerroOrange 荧光探针工作液, 并在细胞培养箱中 37 °C 避光孵育 30 min。使用荧光显微镜观察细胞的荧光强度, 每组随机选取一个视场并拍照。

2.7 ROS 测定

将 A549 细胞 (1 \times 10⁵ 个/孔) 接种于 6 孔板, 并用 300 μ mol \cdot L⁻¹ PQ 处理细胞 24 h, 用不含 FBS 的培养基洗涤 3 次。然后, 将细胞与 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的 DCFHDA 探针孵育 60 min, 再次用无 FBS 的培养基洗涤细胞, 并使用荧光微孔板读取仪或流式细胞仪检测细胞。激发波长为 500 nm, 发射波长为 525 nm。

2.8 Western blot 分析

Western blot 实验按照文献^[14]步骤进行。首先, 用 RIPA 裂解缓冲液均质 A549 细胞, 使用蛋白测定试剂盒测量样品中的总蛋白含量。取 10 μg 蛋白样品, 使用 10% SDS-PAGE 进行分离, 并将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 1 h, 分别与下列一抗在 4 °C 下孵育过夜: 抗 GPX4 (1 : 1000)、抗 SLC7A11 (1 : 1000)、抗 Ferritin (1 : 1000)、抗 SLC40A1 (1 : 1000)、抗 GAPDH (1 : 1000)、抗 TGF-β1 (1 : 1000)、抗 α-SMA (1 : 1000) 和抗 E-cadherin (1 : 1000), 用相应的二抗孵育膜 1 h, 使用化学发光法进行检测。

2.9 瞬时转染

将 A549 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔板中。当细胞达到约 80% 的汇合度时, 使用 Lipo 6000 转染试剂将 SLC7A11 过表达质粒和阴性对照质粒分别转染入 A549 细胞, 孵育 4 h。随后, 将细胞暴露于 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PQ 中 24 h, 检测细胞内 GSH 和 ROS 水平以及 GPX4 蛋白的表达。

2.10 统计分析

数据使用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 21.0 软件进行统计分析。所有实验均至少重复 3 次, 结果以平均值 ± 标准差表示。两组间比较采用非配对 Student's *t*-test, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠生存率和死亡率

经过 14 d 的 PQ 灌胃处理后, 对各组大鼠的存活率进行统计分析。结果如图 1 所示, 从 PQ 处理的第 2 日开始, PQ 组和 PQ + FD 组的大鼠开始出现死亡, 而对照组和 FD 组无死亡记录。PQ 组大鼠的存活率仅为 45% ($P < 0.05$), 而 PQ + FD 组的大鼠存活率为 75% ($P < 0.05$), 表明 FD 能够显著提高 PQ 中毒大鼠的生存率。

3.2 大鼠的肺组织病理观察及评分

HE 染色结果显示, 对照组和 FD 组的大鼠肺组织结构完好, 无明显炎性物质分泌, 也未见纤维化表现。与对照组和 FD 组相比, PQ 组的大鼠肺组织结构受到损伤, 表现为炎性物质的渗出、肺泡壁增厚以及局部肺泡结构的消失。相对 PQ 组, PQ + FD 组的大鼠肺部病变有所减轻, 见图 2。

Masson 染色结果显示, PQ 组的肺组织胶原沉积增加, 而 FD 治疗组显著减少了肺间质中的胶原积聚。对各组大鼠肺组织的病变程度进行了形态学分级, 结果表明, 与对照组相比, PQ 组大鼠的肺泡炎症和间质纤维化程度的病理评分显

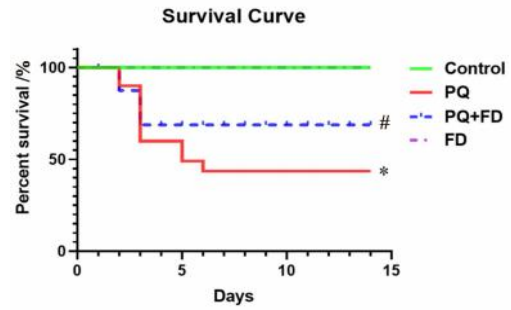


图 1 大鼠的生存曲线图

Fig 1 Survival curve of rats

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, # $P < 0.05$ 。

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

著升高 ($P < 0.05$); 而 PQ + FD 组的大鼠在肺泡炎症和间质纤维化程度上的病理评分则显著低于 PQ 组 ($P < 0.05$), 且 FD 组与对照组之间无显著差异。这些结果表明, FD 能够有效减轻 PQ 中毒引起的大鼠肺组织损伤, 见图 2。

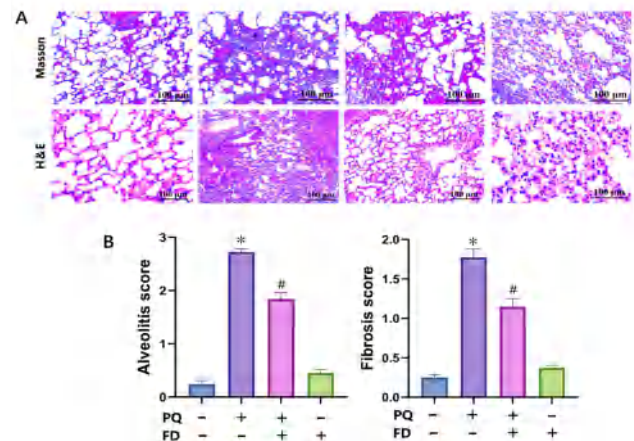


图 2 大鼠的肺组织病理观察及评分

Fig 2 Pathological observation and score of lung tissue in rats

A. HE 染色与 Masson 染色 (HE staining and Masson staining, $\times 100$); B. 肺泡炎症和间质纤维化的评分 (scores of alveolar inflammation and fibrosis)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PQ 组比较, # $P < 0.05$ 。

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

3.3 FD 减轻 PQ 诱导的肺纤维化程度

如图 3 所示, 与对照组相比, PQ 处理组的 α-SMA 和 TGF-β1 蛋白表达显著增加, 同时 E-cadherin 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。与 PQ 组比较, PQ + FD 组 α-SMA 和 TGF-β1 的蛋白表达显著降低, 而 E-cadherin 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。这些结果表明, FD 能够显著改善 PQ 诱导的肺纤维化, 可能通过抑制成纤维细胞和肌成纤维细胞的标志物表达, 促进肺纤维化的逆转。

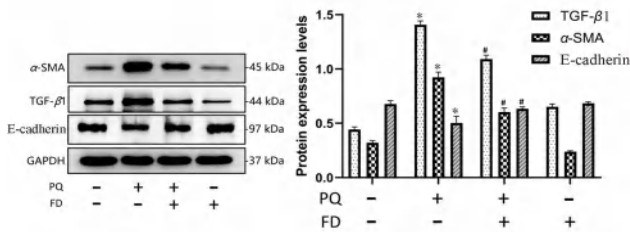


图 3 FD 对 PQ 中毒大鼠肺组织中肺纤维化蛋白表达的影响
Fig 3 Effect of FD on the expression of pulmonary fibrotic protein in the lung tissues of PQ-poisoned rats

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 PQ 组比较，# $P < 0.05$ 。

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

3.4 FD 逆转 PQ 诱导的炎症反应

如图 4 所示，与对照组相比，PQ 组的 IL-1 β 、

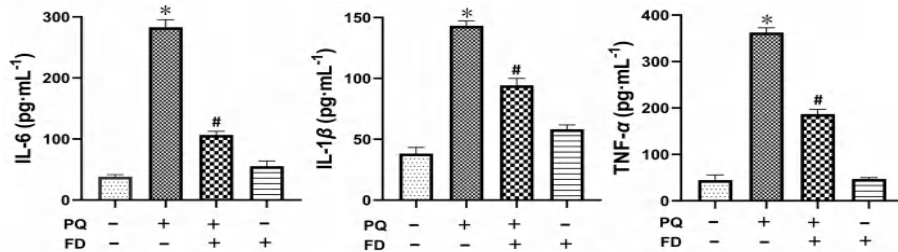


图 4 FD 对 PQ 中毒大鼠炎症因子表达含量的影响
Fig 4 Effect of FD on the expression of inflammatory factors of PQ-poisoned rats

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 PQ 组比较，# $P < 0.05$ 。

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

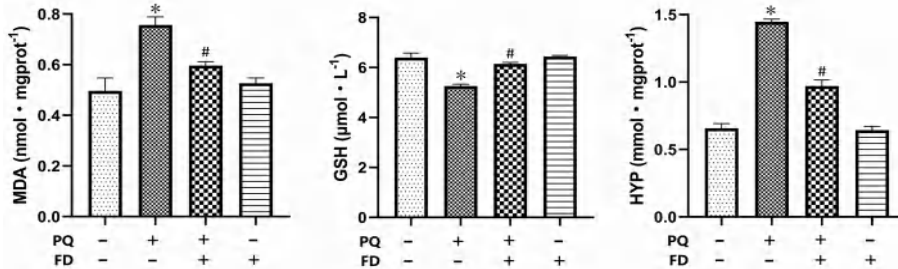


图 5 FD 对 PQ 中毒大鼠氧化应激参数及胶原蛋白含量的影响
Fig 5 Effect of FD on the oxidative stress parameters and collagen content in PQ-poisoned rats

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 PQ 组比较，# $P < 0.05$ 。

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

3.6 PQ 导致 A549 细胞脂质过氧化损伤

PQ 的结构示意图如图 6A 所示。使用 CCK-8 法评估 PQ 对 A549 细胞的毒性。在 50 ~ 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内，使用 PQ 处理 A549 细胞后，细胞活力呈剂量依赖性下降 (见图 6B)， IC_{50} 为 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。进一步通过流式细胞术检测 PQ 处理后细胞内的 ROS 水平，结果显示，与对照组相比，300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PQ 处理后可显著诱导 ROS 积累 ($P < 0.05$) (见图 6C)。

此外，使用 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PQ 处理后，细胞内 MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$) (见图 6D)。过

量的 ROS 可通过损伤 DNA、RNA、蛋白质和脂质引发氧化损伤。GSH 的耗竭促进了脂质过氧化反应的发生，从而诱导铁死亡。与对照组相比，PQ 处理后细胞内 GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$) (见图 6E)，提示 PQ 可引起细胞脂质过氧化损伤。

3.5 FD 可逆转 PQ 诱导的肺组织脂质过氧化损伤

结果如图 5 所示，与对照组相比，PQ 组的 MDA 和 HYP 含量显著增加，而 GSH 活性显著降低 ($P < 0.05$)。与 PQ 组相比，PQ + FD 组的 GSH 活性显著增强，MDA 和 HYP 水平显著下降 ($P < 0.05$)。FD 组的 MDA、GSH 和 HYP 含量与对照组之间的差异无统计学意义。结果表明，FD 能有效降低 PQ 诱导的氧化应激水平和胶原蛋白含量。

IL-6 和 TNF- α 表达显著升高 ($P < 0.05$)。然而，经过 FD 处理后，PQ + FD 组中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 蛋白的表达显著减少 ($P < 0.05$)。FD 组的这些炎症因子水平与对照组的差异无统计学意义，表明 FD 具有显著的抗炎作用。

3.7 FD 可逆转 PQ 诱导的游离铁含量升高

FD 的结构示意图如图 7A 所示。铁是人体不可或缺的元素，在代谢过程中发挥着多种作用，如氧传递、电子传递、DNA 的合成等，然而，铁的过度累积可能引发氧化损伤，甚至导致细胞死亡^[15]。对 A549 细胞进行 100 ~ 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PQ 处理 24 h

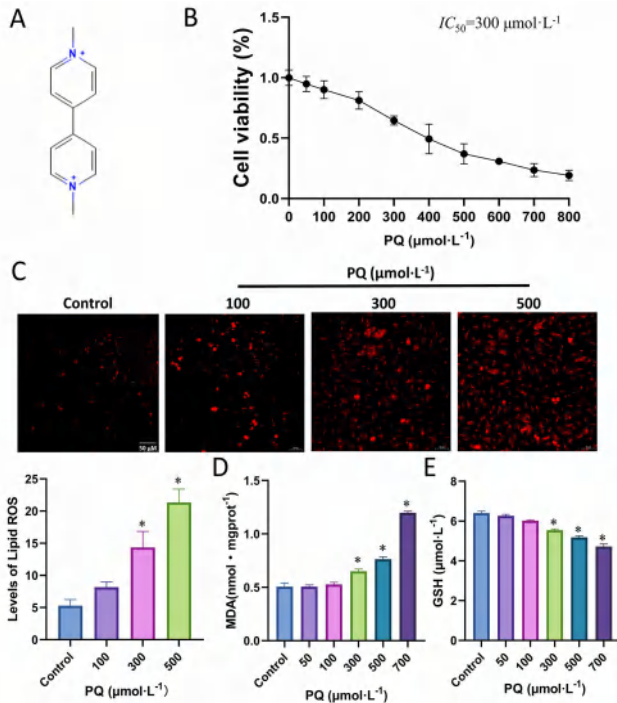


图 6 PQ 对 A549 细胞脂质过氧化损伤的影响

Fig 6 Effect of PQ on lipid peroxidation in A549 cells

注：与对照组比较，**P* < 0.05。

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

后，结果显示细胞内 Fe²⁺ 含量显著增加 (*P* < 0.05) (见图 7B)。SLC40A1 和 Ferritin 的蛋白表达量随着 PQ 浓度的增加而降低 (*P* < 0.05) (见图 7C)。

与对照组相比，PQ 组的 SLC40A1 和 Ferritin 蛋白表达受到显著抑制 (见图 7D, 8E)，而在加入 FD 预处理后，这些蛋白的表达显著上调 (*P* < 0.05)。结果表明，PQ 能够诱导铁的累积，从而影响 A549 细胞的铁稳态，而 FD 能有效逆转 PQ 诱导的游离铁含量增加。

3.8 FD 逆转 PQ 诱导的铁死亡

Nec-1 和 Z-VAD-FMK 常用来抑制细胞坏死和凋亡 [16]。与 PQ 组相比，PQ + N + Z 组的 GPX4 表达的差异无统计学意义，GPX4 蛋白表达未被逆转 (见图 8A, 8B)。此外，流式细胞术结果显示，PQ + N + Z 组的 ROS 含量与 PQ 组的差异无统计学意义，ROS 的增加未被 Nec-1 和 Z-VAD-FMK 所逆转 (见图 8C, 8D)。这些结果表明 PQ 诱导的脂质过氧化损伤与细胞坏死和凋亡无关。

实验进一步研究了铁死亡在 PQ 诱导的细胞死亡中的作用。CCK-8 结果显示，与 PQ 组相比，PQ + Fer-1 组和 PQ + FD 组的细胞活性显著提高，Fer-1 和 FD 预处理 1 h 可显著降低 PQ 诱导的细胞

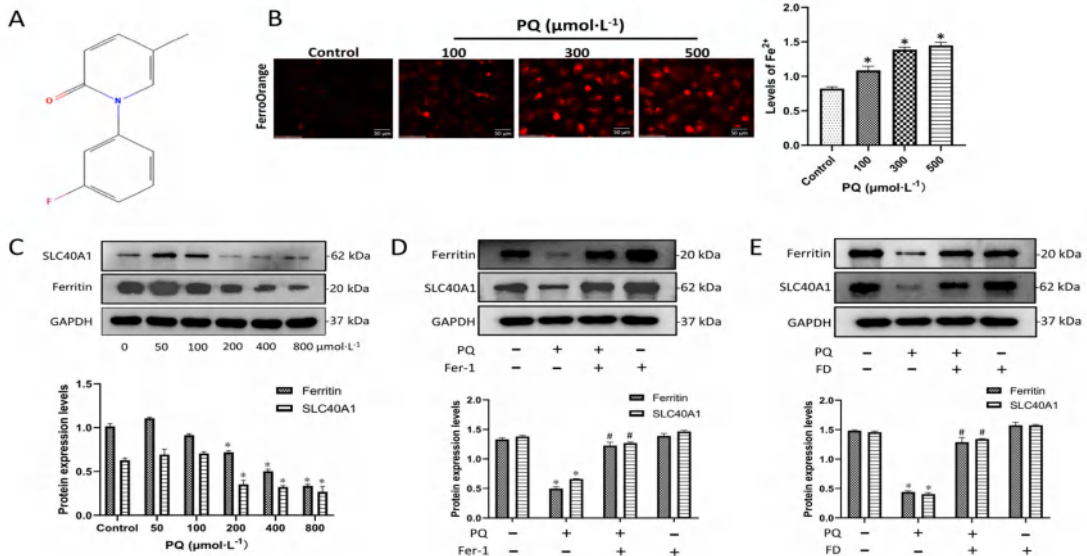


图 7 FD 对 PQ 诱导的游离铁含量的影响

Fig 7 Effect of FD on the content of free iron induced by PQ

注：与对照组比较，**P* < 0.05；与 PQ 组相比，#*P* < 0.05。

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

毒性 (见图 8E)。与 PQ 组相比，PQ + Fer-1 组和 PQ + FD 组 ROS、MDA 和 GSH 水平得到逆转，Fer-1 和 FD 能有效逆转 PQ 诱导的 ROS 和 MDA 水平升高以及 GSH 水平降低 (见图 8F ~ 8I)。结果表明，PQ 可诱导细胞发生铁死亡。

3.9 FD 逆转 PQ 对 SLC7A11/GPX4 信号通路的抑制作用

研究结果显示，GPX4 和 SLC7A11 蛋白在 PQ 处理后呈剂量依赖性下调 (*P* < 0.05) (见图 9A)。此外，Fer-1 和 FD 的预处理显著逆转了 PQ 单独处理引起的 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达下降 (*P* < 0.05) (见图 9B, 9C)。这些结果进一步表明，PQ 通过抑制 SLC7A11/GPX4 信号通路诱导铁死亡，而 Fer-1 和 FD 预处理能够在体外有效恢复这一通路。

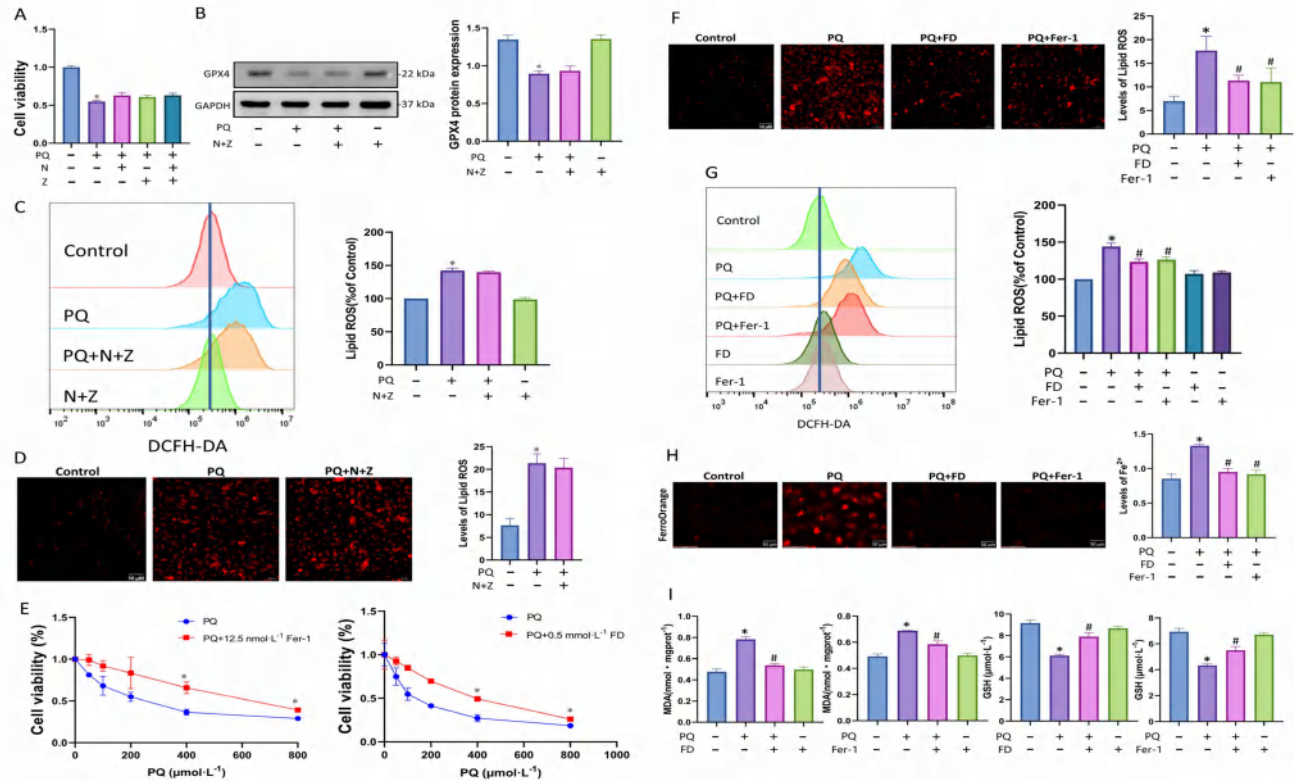


图 8 FD 对 PQ 诱导的铁死亡的影 响

Fig 8 Effect of FD on ferroptosis induced by PQ

注：与对照组比较，**P* < 0.05；与 PQ 组相比，#*P* < 0.05。

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

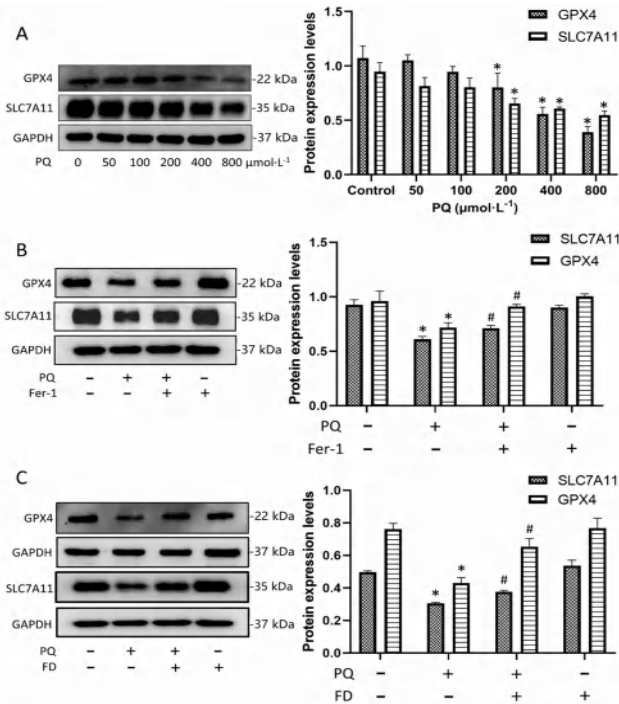


图 9 FD 逆转 PQ 对 SLC7A11/GPX4 信号通路的作用

Fig 9 FD reverses the effect of PQ on the SLC7A11/GPX4 signaling pathway

注：与对照组比较，**P* < 0.05；与 PQ 组相比，#*P* < 0.05。

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

3.10 过表达 SLC7A11 可逆转 PQ 诱导的 A549 细胞铁死亡

在本实验中，首先通过瞬时转染 SLC7A11 过表达质粒到野生型细胞中，成功建立了 SLC7A11 过表达细胞系 (*P* < 0.05)。经过 PQ 处理后，SLC7A11 过表达细胞中 GPX4 蛋白的表达显著高于对照组 (*P* < 0.05)。此外，SLC7A11 过表达有效抑制了 PQ 诱导的 ROS 水平增加和 GSH 水平降低 (*P* < 0.05)。这些结果表明，SLC7A11 过表达能够保护 A549 细胞免受 PQ 诱导的铁死亡 (见图 10)。

4 讨论

PQ 中毒可引发一系列并发症，如急性肺损伤、急性肾损伤、白细胞增多、代谢性酸中毒和血糖升高等，其主要通过主动转运和多胺转运体在肺内蓄积，肺内 PQ 浓度比血浆高 10 倍^[17]。铁死亡在肺纤维化中发挥关键作用，Fer-1 能够有效预防纤维化。研究表明，由 TGF-β1 和 Erastin 诱导的肺纤维化的所有表型特征均可被铁死亡抑制剂逆转^[18]。

PQ 诱导细胞内 ROS 合成，并通过脂质过氧化、NF-κB 活化、线粒体损伤等途径介导细胞损伤，PQ 诱导的组织损伤与细胞氧化应激失衡密切相关^[19]。PQ 进入细胞后，被 NADPH 还原为

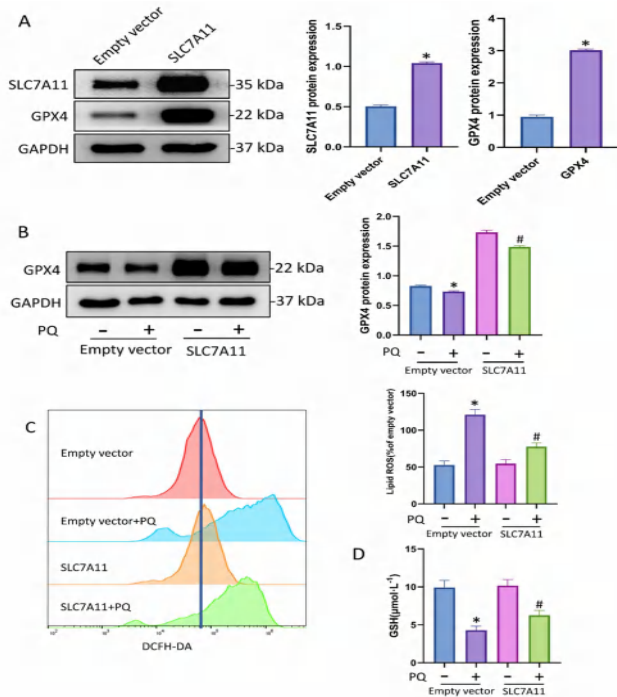


图 10 过表达 SLC7A11 对 PQ 诱导的 A549 细胞铁死亡的影响
Fig 10 Effect of SLC7A11 overexpression on the ferroptosis induced by PQ in A549 cells

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 PQ 组相比，# $P < 0.05$ 。

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

PQ^{2+} ，生成 PQ^+ ，随后 PQ^+ 在氧的作用下氧化，再生 PQ^{2+} 并产生超氧自由基^[20]。虽然这一反应的速度较慢，但铁等金属螯合离子的存在能够催化这一反应（Fenton 反应）^[21]。病理分析显示，PQ 中毒的肺组织存在炎症细胞因子释放和肺纤维化诱导。在体外实验中，PQ 处理导致 A549 细胞活力下降，GSH 水平降低，同时细胞内 Fe^{2+} 含量、ROS 和 MDA 表达显著升高。此外，PQ 处理还显著降低了铁蛋白、SLC40A1、SLC7A11 和 GPX4 的表达。

脂质过氧化物积累诱导铁死亡的机制是一个积极研究的领域。抑制半胱氨酸摄取或 GPX4 活性已被证明可促进铁死亡^[22]。此外，抑制 SLC7A11 会导致 ROS 积累增加^[23]。GPX4 活性的抑制、GSH 的消耗和脂氧合酶（lipoxygenase, LOXs）活性的增强导致多不饱和脂肪酸（PUFA）氢过氧化物的积累增加，进而产生脂质过氧化产物如 MDA 和 4-羟基壬烯醛（4-HNE），在病理状态下有效地引发铁死亡^[24]。此外，Dixon 等^[25]研究表明，Fer-1 能够特异性阻断癌细胞的铁死亡并防止谷氨酸诱导的大鼠脑神经元毒性。在体内实验中，FD 显著降低了 PQ 中毒大鼠体内的 MDA 和 HYP 水平，并提升了 GSH 水平，同时，FD 处

理可降低细胞内 MDA 和 ROS 水平，提升 GSH 水平，表明 FD 能够抑制 PQ 中毒诱导的脂质过氧化损伤。

铁死亡是一种铁依赖性的细胞死亡形式，由脂质过氧化驱动，并受氧化和抗氧化系统之间复杂相互作用的调节^[26]。博来霉素水解酶是一种半胱氨酸水解酶，可使博来霉素脱氨使其失活，这种酶在肺组织中的表达和活性通常较低，特别是在肺泡 II 型细胞中^[27]。此外，氧化应激有助于特发性肺纤维化（idiopathic pulmonary fibrosis, IPF）的肺泡损伤和纤维化。许多参与氧化还原反应的蛋白质与过渡金属离子，特别是与铁离子有关^[28]。Ali 等^[29]证明，内源性肺铁水平升高是肺部疾病，特别是纤维化的一个突出特征，可能由铁诱导的肺成纤维细胞活化所致。本研究发现，FD 可逆转 PQ 中毒引起的肺纤维化和脂质过氧化。Fer-1 和 FD 能显著提高 A549 细胞活力和 GSH 表达，ROS、MDA、胞内 Fe^{2+} 水平显著降低，铁蛋白、SLC40A1 蛋白表达显著升高。细胞抗氧化系统失活，特别是依赖于 Xc-GSH-GPX4 的抗氧化防御系统，脂质氢过氧化物积累导致铁死亡。系统 Xc- 通过输入胱氨酸在维持氧化还原稳态中起着至关重要的作用，胱氨酸随后被还原为半胱氨酸并用于合成主要抗氧化剂谷胱甘肽。此外，谷胱甘肽作为 GPX4 正常运作的必要辅助因子，对细胞凋亡和坏死具有抑制作用，表明脂质过氧化可能是诱导调节性细胞死亡（regulated cell death, RCD）的信号^[30]。

本研究表明，用 Nec-1 和 Z-VAD-FMK 预处理 A549 细胞并没有减弱 PQ 诱导的细胞活力下降、GPX4 减少或脂质过氧化增加。因此，本研究假设 PQ 诱导的细胞死亡可能不同于细胞凋亡和坏死，而是与铁死亡有关。已有研究表明，Fer-1 通过抑制 SLC7A11 和 GPX4 的下调，显著减轻肺损伤^[31]。Fer-1 和 FD 能够有效上调 SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达。而 SLC7A11 过表达增加了 GPX4 的表达，减轻了 PQ 诱导的 A549 细胞的脂质过氧化。因此，本研究表明，PQ 通过抑制 SLC7A11 和 GPX4 的表达诱导铁死亡，而 Fer-1 和 FD 可以逆转 PQ 诱导的铁死亡。

综上所述，PQ 诱导的铁死亡主要表现为脂质过氧化损伤、亚铁离子蓄积以及 SLC7A11/GPX4 信号通路的抑制或失活。本研究阐明了铁死亡与肺纤维化之间的关系，并确定了抗纤维化药物 FD 能够逆转 PQ 诱导的铁死亡，为肺纤维化的治疗提供了新的潜在策略。

参考文献

- [1] Feng MX, Li YN, Ruan WS, et al. Predictive value of the maximum serum creatinine value and growth rate in acute paraquat poisoning patients [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 11587.
- [2] Bullivant CM. Accidental poisoning by paraquat: report of two cases in man [J]. *BMJ-BRIT Med J*, 1996, 1 (5498): 1272-1273.
- [3] Liao XH, Jiang YP, Dai Q, et al. Fluorofenidone attenuates renal fibrosis by inhibiting the mtROS-NLRP3 pathway in a murine model of folic acid nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 694-701.
- [4] Liu JJ, Song C, Xiao QM, et al. Fluorofenidone attenuates TGF- β 1-induced lung fibroblast activation via restoring the expression of caveolin-1 [J]. *Shock*, 2015, 43 (2): 201-207.
- [5] Jiang FY, Li S, Jiang Y, et al. Fluorofenidone attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23 (6): 405.
- [6] Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, et al. Involvement of GPx4-regulated lipid peroxidation in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis [J]. *J Immunol*, 2019, 203 (8): 2076-2087.
- [7] Thannickal VJ, Toews GB, White ES, et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 395-417.
- [8] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171 (2): 273-285.
- [9] Song XH, Long DX. Nrf2 and ferroptosis: a new research direction for neurodegenerative diseases [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 267.
- [10] Liu M, Kong XY, Yao Y, et al. The critical role and molecular mechanisms of ferroptosis in antioxidant systems: a narrative review [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (6): 368.
- [11] Jiang L, Kon N, Li TY, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520 (7545): 57-62.
- [12] Imai H, Matsuoka M, Kumagai T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 403: 143-170.
- [13] Wu XG, Li Y, Zhang SC, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (7): 3052-3059.
- [14] Aarsund M, Nyman TA, Stensland ME, et al. Isolation of a cytolytic subpopulation of extracellular vesicles derived from NK cells containing NKG7 and cytolytic proteins [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 977353.
- [15] Shao X, Li M, Luo C, et al. Effects of rapamycin against paraquat-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Zhejiang Univ Sc B*, 2015, 16 (1): 52-61.
- [16] Latunde-Dada GO. Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861 (8): 1893-1900.
- [17] Delirrad M, Majidi M, Boushehri B. Clinical features and prognosis of paraquat poisoning: a review of 41 cases [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (5): 8122-8128.
- [18] Gong Y, Wang N, Liu NG, et al. Lipid peroxidation and GPX4 inhibition are common causes for myofibroblast differentiation and ferroptosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38 (7): 725-733.
- [19] Rashidipour N, Karami-Mohajeri S, Mandegary A, et al. Where ferroptosis inhibitors and paraquat detoxification mechanisms intersect, exploring possible treatment strategies [J]. *Toxicology*, 2020, 433-434: 152407.
- [20] Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38 (1): 13-71.
- [21] Lipinski B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2011, 2011: 809696.
- [22] Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis [J]. *Proteomics*, 2019, 19 (18): e1800311.
- [23] Deng F, Zhao BC, Yang X, et al. The gut microbiota metabolite capsiate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13 (1): 1-21.
- [24] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.
- [25] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [26] Chen X, Li JB, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (9): 2054-2081.
- [27] Chen JG, Chen Y, He QY. Action of bleomycin is affected by bleomycin hydrolase but not by caveolin-1 [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41 (6): 2245-2252.
- [28] Bargagli E, Lavorini F, Pistolesi M, et al. Trace metals in fluids lining the respiratory system of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse lung diseases [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 42: 39-44.
- [29] Ali MK, Kim RY, Brown AC, et al. Critical role for iron accumulation in the pathogenesis of fibrotic lung disease [J]. *J Pathol*, 2020, 251 (1): 49-62.
- [30] Guan X, Li ZH, Zhu S, et al. Galangin attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of ferroptosis through activating the SLC7A11/GPX4 axis in gerbils [J]. *Life Sci*, 2021, 264: 118660.
- [31] Chen H, Lin XP, Yi XH, et al. SIRT1-mediated p53 deacetylation inhibits ferroptosis and alleviates heat stress-induced lung epithelial cells injury [J]. *Int J Hyperthermia*, 2022, 39 (1): 977-986.

(收稿日期: 2024-06-05; 修回日期: 2024-09-04)

基于脂质组学研究南五味子油与北五味子油的脂质组成特征

白璐¹, 陈强², 史鑫波², 李国龙^{2*} (1. 西安市第一医院, 西安 710002; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 采用脂质组学比较南五味子油与北五味子油的脂质组成差异。**方法** 通过石油醚超声提取南五味子油与北五味子油, 基于超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 脂质组学分析其脂质特征, 利用 Analyst 1.6.3 处理质谱数据, 并通过主成分分析和正交偏最小二乘判别分析进行差异脂质分析。**结果** 南五味子油中获得了 25 个亚类共 415 个脂质成分, 北五味子油中获得了 24 个亚类共 384 个脂质成分。南五味子油与北五味子油在脂质个数、脂质含量、脂肪酸含量、脂质链长、不饱和度方面存在差异。南五味子油与北五味子油中共鉴定出 187 种差异脂质, 共 4 大类和 16 亚类。**结论** 本研究全面地比较了南五味子油与北五味子油的脂质组成差异, 与北五味子油相比, 南五味子油所含的脂质个数多且含量相对较高。这可为南五味子油与北五味子油的质量评价及相关研究提供依据。

关键词: 南五味子油; 北五味子油; 脂质组学; 差异脂质

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0371-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.012

Lipid profiles of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil based on lipidomics

BAI Lu¹, CHEN Qiang², SHI Xin-bo², LI Guo-long^{2*} (1. Xi'an No.1 Hospital, Xi'an 710002; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the characteristics of lipid compositions in *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil. **Methods** *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil were extracted by ultrasonic-assisted petroleum ether. Lipid characteristics were analyzed based on lipidomics by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the mass spectrometry data were processed with Analyst 1.6.3. Principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis was used for the differential lipids. **Results** Totally 415 lipid components in 25 subclasses were identified from *Schisandra sphenantherae* oil, and 384 lipid components in 24 subclasses from *Schisandra chinensis* oil. There were obvious differences between *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil in lipid number, lipid content, fatty acid content, lipid chain length and unsaturation. Totally 187 differential lipids were identified from *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil, covering 16 subclasses in 4 categories. **Conclusion** The difference in lipid compositions between *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil has been compared comprehensively. *Schisandra chinensis* oil, *Schisandra sphenantherae* oil contains more lipids and relatively higher content, which provides a basis for quality evaluation and related research of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil.

Key words: *Schisandra sphenantherae* oil; *Schisandra chinensis* oil; lipidomics; differential lipid

五味子首载于《尔雅》, 被《神农本草经》列为上品, 为原卫生部颁布的可用于保健食品的品种。在 2020 年版《中国药典》中五味子被分为南五味子与北五味子, 分别为木兰科植物华中五味子

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (No.2016KTTSSF02-01)。

作者简介: 白璐, 男, 主管中药师, 主要从事中药临床与制剂研究, email: blblue20@163.com * 通信作者: 李国龙, 男, 讲师, 主要从事中药资源研究与开发, email: 1501033@sntcm.edu.cn

Schisandra sphenanthera Rehd.et Wils. 的干燥成熟果实和木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 所记载功效相同^[1]。现代研究表明南五味子与北五味子均含有木脂素、多糖、氨基酸、挥发油及脂肪酸等化学成分^[2-6], 其药理活性主要以保肝为主, 此外还具有调节中枢神经系统、免疫系统及消化系统等生物活性作用^[7-10]。据报道, 五味子种子的出油率为 24.03%, 其中含量高的是亚油酸和油酸, 不饱和脂肪酸含量为 92.86%, 表明五味子含有多种脂溶性成分^[11]。目前对五味子油的研究主要集中在脂肪酸等成分分析^[12-15]和生物活性研究^[16-18], 而对南五味子油与北五味子油的脂质组成特征与轮廓尚未见报道。

超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术具有高灵敏度、高分辨率且能够高效率捕获脂质碎片离子从而全面表征脂质组成等优势, 使得脂质组学被广泛地应用在食品科学、营养科学、中医药研究等领域^[19-22]。在脂质组学研究中, 脂质可被分为脂肪酰类 (fatty acyls, FA)、甘油脂类 (glycerolipids, GL)、甘油磷脂类 (glycerophospholipids, GP)、鞘脂类 (sphingolipids, SP)、甾醇脂类 (sterol lipids, ST)、孕烯醇酮脂类 (prenol lipids, PR)、糖脂类 (saccharolipids, SL) 和聚酮类 (polyketides, PK) 共八大类。近年来, 脂质组学广泛地应用于中药药效及作用机制研究、药性理论、毒性作用机制等方面^[22-26], 但对于药食两用物质中植物油的脂质组成研究报道较少^[27]。因此, 本研究通过脂质组学比较南五味子油与北五味子油的脂质组成特征, 以期在南五味子油与北五味子油在功能性食品等领域的开发与应用提供理论基础, 同时为丰富药食两用的功能性油脂数据库提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

QTRAP 6500⁺ 质谱仪、ExionLC AD 超高效液相色谱仪 (美国 Sciex 公司), 5424R 离心机 (德国 Eppendorf 公司), AS 60/220.R2 电子天平 (波兰 RADWAG 公司), MIX-200 多管涡旋振荡器 (上海净信实业发展有限公司), KQ-200TDE 型高频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

南五味子、北五味子购于西安市第一医院, 经陕西中医药大学刘红波副教授鉴定。甲醇、乙腈、甲酸、异丙醇和甲基叔丁基醚均为色谱级; 甲酸铵为质谱级; 石油醚为分析级; 脂质对照品 (纯度 > 99%, Avanti/zzstandard)。

1.2 样本处理

分别将南五味子与北五味子干燥粉碎过筛, 经石油醚超声提取得到南五味子油和北五味子油, 3 个生物学重复。参照文献^[26], 分别称取 10 mg 南五味子油和北五味子油样品加入 2 mL 离心管中, 加入 1.0 mL 脂质复溶液 (乙醇-异丙醇 = 3:1, V/V), 振荡 1 min, 备用。然后精密吸取 10 μ L, 加入 20 μ L 内标工作液和 970 μ L 脂质复溶液, 振荡 1 min, 在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 3 min, 备用。

1.3 色谱条件

采用 Sciex ExionLC AD Thermo Accucore C30 (2.1 mm \times 100 mm, 2.6 μ m) 色谱柱, 流动相: A 相为含 0.1% 甲酸与 10 mmol \cdot L⁻¹ 甲酸铵的乙腈-水 (60:40) 溶液; B 相为含 0.1% 甲酸与 10 mmol \cdot L⁻¹ 甲酸铵的乙腈-异丙醇 (10:90) 溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 80% ~ 70%A; 2 ~ 4 min, 70% ~ 40%A; 4 ~ 9 min, 40% ~ 15%A; 9 ~ 14 min, 10%A; 14 ~ 15.5 min, 10% ~ 5%A; 15.5 ~ 17.3 min, 5%A; 17.3 ~ 17.5 min, 80%A; 17.5 ~ 20 min, 80%A), 流速 0.35 mL \cdot min⁻¹, 洗脱温度 45 $^{\circ}$ C, 进样体积 2 μ L。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式, 温度 500 $^{\circ}$ C, 正离子模式下质谱电压 5500 V, 负离子模式下质谱电压 -4500 V, 离子源 gas 1 (GS1) 45 psi, gas 2 (GS2) 55 psi, 气帘气 (CUR) 35 psi。

1.5 数据处理与分析

通过 MRM 模式对南五味子油与北五味子油的脂质进行定量分析, 获取脂质的质谱数据后, 利用 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。根据脂质结构数据库 MWDB 对原始数据进行注释, 并通过主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 进行评估。变量投影重要度 (VIP) 值大于 1 和 $P < 0.05$ 的脂质被认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 脂质组成分析

基于脂质组学技术分别在南五味子油与北五味子油中获得 25 个亚类共 415 个和 24 个亚类 384 个脂质成分 (见图 1)。不同亚类的脂质的个数和含量相差较大, 其中南五味子油中 GL 检测到 319 个, 其中以三酰甘油为主, 有 258 种, 占比为 62.17%; 北五味子油中 GL 检测到 291 个, 其中以三酰甘油为主, 有 235 种, 占比为 61.2%。GP 在南五味子油中检测到 54 种, 在北五味子油中检测

到 51 种。而 PR 与 ST 在南五味子油和北五味子油中均只检测到 1 种，占比分别为 0.72% 和 0.78%。

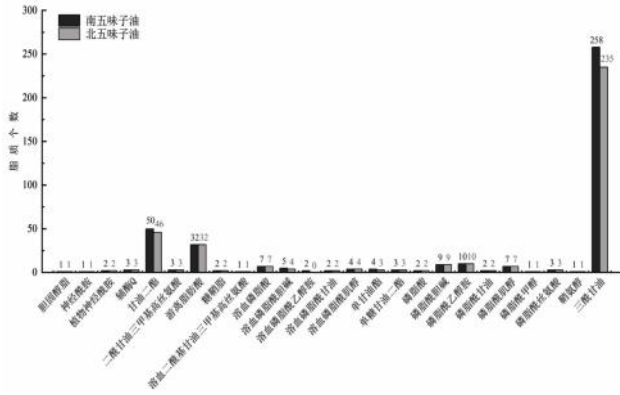


图 1 南五味子油与北五味子油的脂质亚类个数
Fig 1 Number of lipid subclasses in *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil

2.2 脂质种类含量

结果如表 1 所示，6 大类脂质在南五味子油与北五味子油中呈现相同的分布趋势，即 GL 含量最高，分别为 $(234\ 063.51 \pm 11\ 007.84)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $(224\ 424.25 \pm 19\ 143.53)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而 PR 含量最低，分别为 $(128.17 \pm 12.62)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $(165.02 \pm 2.93)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，表明南五味子油和北五味子油中主要脂质大类为 GL。从脂质亚类的含量来看，南五味子油与北五味子油中的亚类脂质中三酰甘油含量最高，分别为 $(203\ 087.50 \pm 11\ 170.62)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $(190\ 704.54 \pm 11\ 250.24)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。南五味子油中含量最低的亚类脂质为单糖甘油二酯，其含量为 $(0.91 \pm 0.23)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，而北五味子油中含量最低的亚类脂质为磷脂酰甲醇，其含量为 $(1.77 \pm 0.19)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，表明南五味子油和北五味子油中 25 个亚类脂质含量差异很大，其相差分别约为 22 万倍和 11 万倍。

2.3 脂肪酸含量分析

南五味子油和北五味子油中含有大量的 TG 亚类成分，因此基于 UPLC-MS/MS 进一步分析它们的脂肪酸组成情况，结果见表 2。由表 2 可知，在南五味子油和北五味子油中一共检测到 32 种脂肪酸。由表 1 可知，南五味子油的脂肪酸总含量为 $(290\ 082.26 \pm 14\ 722.61)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，北五味子油的脂肪酸总含量为 $(57\ 584.42 \pm 2919.62)\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，其不饱和脂肪酸所占百分比分别为 88.43% 和 56.57%。尽管南五味子油和北五味子油中不同脂肪酸的含量不同，但它们中含量最高的脂肪酸均是亚油酸，所占百分比分别为 69.25% 和 41.88%。

2.4 脂质链长和不饱和度分析

脂质的功能特性与其分子的链长 (length, L) 和不饱和度 (unsaturation, U) 密切相关。为进

表 1 南五味子油和北五味子油中脂质含量 ($n = 3, \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 1 Lipid content of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil ($n = 3, \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)

种类	脂质亚类	南五味子油	北五味子油	
GL	单硬脂酸甘油酯	19 010.63 ± 3327.86	27 364.95 ± 8052.76	
	甘油二酯	11 918.60 ± 663.18	6349.04 ± 507.51	
	三酰甘油	203 087.50 ± 11 170.62	190 704.54 ± 11 250.24	
	单糖甘油二酯	0.91 ± 0.23	2.69 ± 0.56	
	二酰甘油三甲基高丝氨酸	24.61 ± 2.91	3.55 ± 1.25	
	溶血二酰基甘油三甲基高丝氨酸	1.27 ± 0.28	24.61 ± 2.91	
	溶血磷脂酸	437.52 ± 56.73	484.16 ± 31.93	
	溶血磷脂酰胆碱	156.90 ± 20.94	52.53 ± 4.02	
	溶血磷脂酰乙醇胺	151.05 ± 51.89	—	
	溶血磷脂酰甘油	7.34 ± 0.83	5.98 ± 0.18	
GP	溶血磷脂酰肌醇	37.79 ± 2.03	15.62 ± 0.95	
	磷脂酸	3.96 ± 0.55	3.87 ± 0.35	
	磷脂酰胆碱	1464.67 ± 95.51	1420.45 ± 57.30	
	磷脂酰乙醇胺	186.33 ± 8.61	120.54 ± 7.57	
	磷脂酰甘油	658.44 ± 43.41	697.60 ± 24.13	
	磷脂酰肌醇	488.71 ± 9.61	453.66 ± 27.52	
	磷脂酰丝氨酸	5572.65 ± 32.78	5449.29 ± 438.93	
	磷脂酰甲醇	1.69 ± 0.14	1.77 ± 0.19	
	FA	游离脂肪酸	290 082.26 ± 14 722.61	57 584.42 ± 2919.62
		SP 神经酰胺	自主神经酰胺	5.92 ± 0.63
鞘氨醇			26.32 ± 2.59	8.77 ± 3.02
糖鞘脂			12.97 ± 0.86	13.32 ± 1.58
ST	鞘氨醇	69.58 ± 6.73	31.07 ± 3.03	
	胆固醇酯	197.38 ± 18.25	170.12 ± 15.35	
PR	辅酶 Q	128.17 ± 12.62	165.02 ± 2.93	

注 (Note): “—” 表示未检测到 (indicates not detected)。

一步分析南五味子油和北五味子油脂质的组成特点，对它们各碳链长度及不饱和度下的脂质含量进行了统计分析。图 2 结果表明，南五味子油中的脂质分子中碳链长度区间主要为 L16 ~ L20 和 L51 ~ L55，分别占南五味子油脂质的总含量 50.74% 和 36.32%；而北五味子油中脂质分子中碳链长度区间主要为 L16 ~ L20 和 L51 ~ L55，分别占北五味子油脂质的总含量 25.94% 和 59.48%。虽然南五味子油与北五味子油链长的主要分布区间相同，但含量占比顺序是相反的。由图 3 可知，南五味子油中的饱和脂质 (饱和度为 0) 的含量为 $54\ 831.74\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，占脂质总量的 10.30%，表明南五味子油的脂质主要以不饱和脂质为主，其中不饱和度为 U2 的脂质含量最高，约占其脂质总量的 41.45%，而不饱和度为 U7 ~ U10 的脂质含量仅占总量的 1.22%。北五味子油中的饱和脂质 (饱和度为 0) 的含量为 $55\ 365.15\ \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，占脂质总量的 18.98%，表明北五味子油的脂质中含

表 2 南五味子油和北五味子油中脂肪酸含量 ($n = 3, \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 2 Fatty acids content of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil ($n = 3, \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)

脂肪酸	南五味子	北五味子
十烷酸	5132.87±66.22	5433.41±714.72
二十九烷酸	175.13±16.82	190.87±16.76
三十一烷酸	21.45±4.62	52.91±6.76
二十二碳五烯酸	95.76±20.50	54.31±2.46
二十四碳四烯酸	72.00±11.60	65.80±5.15
二十二碳三烯酸	44.62±8.62	84.47±7.30
亚麻酸	1240.25±0.28	2019.63±102.07
二十二碳二烯酸	66.58±11.08	51.37±19.82
二十碳二烯酸	508.82±51.43	140.27±7.45
二十碳烯酸	2399.98±360.34	776.27±163.29
亚油酸	200 885.32±6858.24	24 116.92±1547.96
三十三烷酸	153.44±2.79	201.48±7.49
三十四烷酸	175.26±6.47	226.08±3.31
三十五烷酸	149.38±0.83	191.77±6.88
三十六烷酸	85.07±11.91	86.15±6.71
十七烯酸	111.12±12.04	117.74±9.94
油酸	49 637.02±4485.41	4005.61±273.14
十九碳一烯酸	174.71±41.42	201.43±50.88
三十二烷酸	67.16±7.58	291.26±16.41
十五烷酸	193.33±14.99	118.86±6.97
三十烷酸	1301.22±197.58	1983.14±110.24
二十八烷酸	5506.14±402.41	1973.85±241.75
二十一烷酸	2229.43±29.92	2918.81±210.91
二十四碳六烯酸	631.92±109.04	789.72±41.65
硬脂酸	5275.02±1383.26	4592.62±1852.56
十七烷酸	470.91±39.04	370.11±21.16
棕榈酸	10 438.13±778.93	5939.89±471.43
二十四碳五烯酸	63.33±19.91	55.75±11.88
肉豆蔻酸	246.15±11.25	226.51±28.15
芥酸	599.35±61.16	97.60±32.94
二十四烷酸	237.61±41.78	158.90±21.69
二十六烷酸	1693.74±169.67	350.86±43.28

有一部分饱和脂质，而北五味子油中不饱和度为 U4 ~ U6 的脂质占总量的 55.62%，不饱和度为 U8 ~ U10 时的脂质含量仅占其脂质总量的 3.59%。

2.5 差异脂质筛选

通过 PCA 和 OPLS-DA 模型比较南五味子油和北五味子油之间存在的脂质差异，PCA 结果表明南五味子油和北五味子油可以明显被区分开（见图 4）。为检测 OPLS-DA 模型的可靠性，本次试验进行了 200 次排列验证，所建模型参数为 $R^2X = 0.779$ 、 $R^2Y = 1$ 、 $Q^2 = 0.987$ 。如图 5 所示，表明 OPLS-DA 模型具有较高的可靠性和预测能力，具有良好的鉴别和预测能力，后续根据 VIP 值分析筛选其差异脂质。当 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 时，该脂质被认为差异具有统计学意义。总的来说，共鉴定出 187 种差异脂质，共 4 大类和 16 亚类。包括 GL 中 162 个脂质（21 个甘油二酯，2 个二酰甘油三甲基高丝氨酸，2 个单硬脂酸甘油酯，2 个单糖甘油

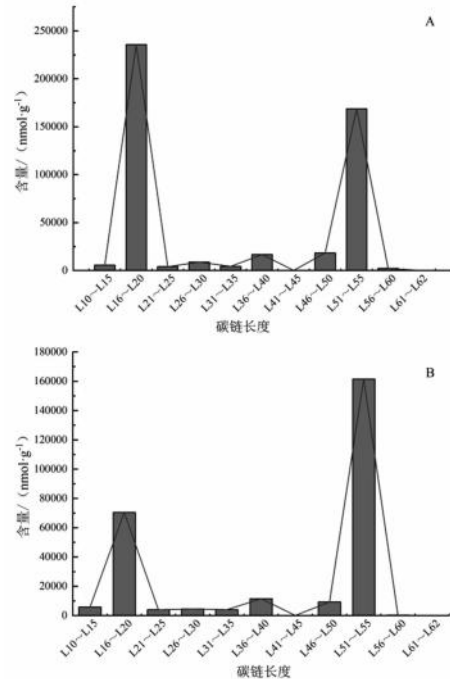


图 2 不同碳链长度下南五味子油 (A) 与北五味子油 (B) 脂质含量
Fig 2 Lipid content of *Schisandra sphenantherae* oil (A) and *Schisandra chinensis* oil (B) under different length of carbon chain

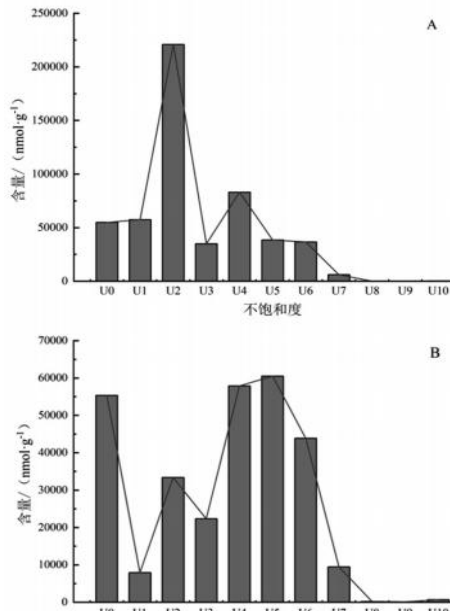


图 3 不同饱和度下南五味子油 (A) 与北五味子油 (B) 脂质含量
Fig 3 Lipid content of *Schisandra sphenantherae* oil (A) and *Schisandra chinensis* oil (B) under different degree of unsaturation

二酯和 135 个三酰甘油)，GP 中 13 个脂质（2 个溶血磷脂酸，2 个溶血磷脂酰胆碱，2 个溶血磷脂酰乙醇胺，1 个溶血磷脂酰甘油，2 个溶血磷脂酰肌醇，1 个磷脂酰胆碱，3 个磷脂酰乙醇胺），FA 中 9 个脂质（9 个脂肪酸）和 SP 中 3 个脂质（1 个神经酰胺，1 个植物神经酰胺和 1 个鞘氨醇）。表明南五味子油与北五味子油中存在的差异脂质主要以三酰甘油类为主，约占其脂质总数的三分之一。

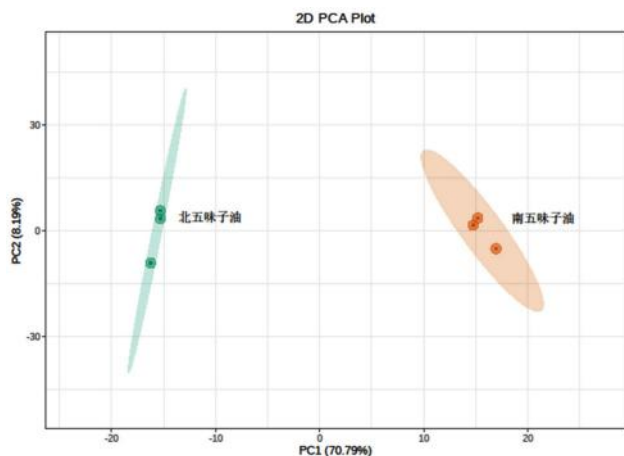


图 4 南五味子油与北五味子油 PCA 得分图

Fig 4 PCA score of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil

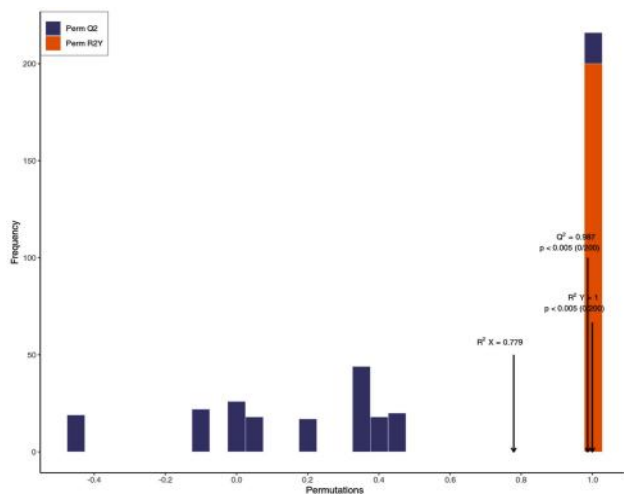


图 5 南五味子油与北五味子油 OPLS-DA 模型验证图

Fig 5 OPLS-DA model validation of *Schisandra sphenantherae* oil and *Schisandra chinensis* oil

3 讨论

油脂一直被认为是植物油或者食品中的营养成分，但在一些药食同源的种子类中药材中油脂也具有调血脂、润肠通便、抗肿瘤等多种生物活性。近年来，脂质组学研究表明油脂由脂质组成，而油脂也是药食同源类中药材的重要组成部分，如酸枣仁和火麻仁含油量均在 30% 以上^[28-29]。因此，对药食同源种子类药材进行脂质组学研究对其发挥药理活性具有重要的意义。

本研究采用脂质组学策略测定南、北五味子油脂类成分的脂质组成含量。从南五味子油、北五味子油中分别得到 415 个、384 个脂质成分。分析其碳链长度与饱和度，南五味子油中脂质分子碳链长度主要在 L16 ~ L55，占总含量 98.80%，不饱和脂质约占 89.70%；北五味子油中脂质分子碳链长度主要在 L16 ~ L55，占总含量 97.72%，不饱和脂质约占 81.02%。中长链脂质可降体重、体脂、促能

量消耗，不饱和脂肪能调节血脂、抗血栓、改善视疲劳等。南五味子油中 L16 ~ L20 中长链脂质含量为 235 753.61 nmol · g⁻¹，不饱和脂肪为 477 987.55 nmol · g⁻¹；北五味子油中 L16 ~ L20 中长链脂质含量为 70 444.71 nmol · g⁻¹，不饱和脂肪为 236 358.25 nmol · g⁻¹。所以，南五味子油在保健食品和心脑血管系统药物应用方面可能潜力更佳。

脂肪酸成分不仅是植物油脂的重要组成部分，也是药食同源种子或果实类物质的重要活性成分。目前对于五味子油中脂肪酸的含量测定大多是通过衍生化处理并结合 GC-MS 法，而本研究通过 LC-MS/MS 法分别从南五味子油与北五味子油中各分离得到 32 种脂肪酸。与文献已报道的通过 GC-MS 法测定的南五味子油中 8 种和北五味子油中 10 种脂肪酸相比，种类均有显著增加^[13]，首次从南五味子油和北五味子油鉴定出三十一烷酸等 9 种含量低于 0.05% 的脂肪酸。结果表明，与 GC-MS 法相比，LC-MS/MS 法能够更加全面地反映南五味子油与北五味子油中脂肪酸的组成成分。尽管南五味子油和北五味子油中不同脂肪酸的含量不同，但它们中含量最高的脂肪酸均是亚油酸，而南五味子油中的不饱和脂肪酸含量占比为 88.43%，高于北五味子油的 56.57%，表明南五味子油是一种高亚油酸含量和高不饱和油脂。

GL 是油茶籽油、榛子油和酸枣仁油等天然油脂的重要组成部分，而不同来源的植物油其 GL 含量不同会对其功能特性产生影响。南五味子油和北五味子油中 GL 含量占比分别为 43.85% 和 77.08%。与酸枣仁油^[27] (292 种) 相比，南五味子油与北五味子油中在 GL 亚类分别含有 319 种和 291 种，表明南五味子油与北五味子油脂质差别主要集中在 GL 亚类脂质。南五味子油与北五味子油中三酰甘油与甘油二酯的含量比值分别为 17.04 和 30.03，远高于酸枣仁油^[27] (0.83) 与油茶籽油^[30] (0.91)，但低于榛子油 (68.67)^[31]，花生油 (51.27)^[32]，以及棕榈油 (53.26)^[33]。DG 具有减少体内脂肪堆积、降低餐后血脂的作用，因此南五味子油具有成为肥胖或高血脂人群功能性食品的潜力。

4 结论

本文基于脂质组学对南五味子油与北五味子油的脂质轮廓进行了全面系统的表征，尽管南五味子油与北五味子油均含有六大类脂质，但它们的脂质数量、脂肪酸含量、脂质链长、不饱和度存在差异。与北五味子油相比，南五味子油所含脂质数量多且含量相对高。本研究可为后续南五味子油与北五味子油的功能特性及其物质基础研究提供借鉴与参考，有助于南五味子油与北五味子油在保健食品及药物研发等领域的开发与应用。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 68, 255.
- [2] 邸同莲, 刘小清, 吴楠, 等. 五味子中 1 个新的联苯环辛烯类木脂素[J]. 中草药, 2023, 54 (12): 3759-3770.
- [3] Xu YL, Wang YJ, Jiang SP, et al. Chemical constituents from the fruit of *Schisandra Chinensis* [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2020, 29 (7): 480-486.
- [4] 武天元. 南北五味子多糖含量及成分比较[J]. 中国中医药科技, 2023, 30 (6): 1081-1084.
- [5] 司洲, 陈昊翔, 樊梓鸾. 五味子多糖提取、结构特征及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45 (3): 1-9.
- [6] 杨洁, 段金殿, 李国龙, 等. 不同产地南五味子中木脂素分析研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (23): 4647-4652.
- [7] 于纯森, 陈小倩, 廖贤, 等. 五味子药理作用研究进展及在保健食品中的应用[J]. 食品工业, 2022, 43 (11): 221-227.
- [8] 张明晓, 黄国英, 白羽琦, 等. 南、北五味子的化学成分及其保肝作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (5): 1017-1025.
- [9] 刘杰, 徐剑, 郭江涛. 五味子活性成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (11): 206-215.
- [10] 张旻昱, 吴宏伟, 许利平, 等. 五味子及其活性成分治疗心脑血管疾病药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (8): 1536-1546.
- [11] 刘长姣, 张守勤, 孟宪梅. 五味子种子油脂和挥发油的成分分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35 (16): 52-56.
- [12] 庄红卫, 陈建华, 王森, 等. 不同种源五味子油化学组分的差异性分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14 (11): 237-251.
- [13] 张天坤, 姜波, 徐维波, 等. GC-MS 测定五味子油中脂肪酸组成[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2012, 21 (2): 29-31.
- [14] Gao Y, Wu SM, Feng L. Rapid and direct determination of fatty acids and glycerides profiles in *Schisandra chinensis* oil by using UPLC-Q/TOF-MS^E[J]. J Chromatogr B, 2019, 1104: 157-167.
- [15] An LP, Wang YP, Wang CM, et al. Protective effect of *Schisandrae chinensis* oil on pancreatic β -cells in diabetic rats[J]. Endocrine, 2015, 48 (3): 818-825.
- [16] Du JL, Pei XL, Zhao HY, et al. Identification of fatty acids and triacylglycerols in *Schisandrae chinensis fructus* oil[J]. J Anal Chem, 2020, 75: 1024-1032.
- [17] Yang Y, Ge FL, Zhan XY, et al. *Schisandra chinensis* oil attenuates aristolochic acid I-induced nephrotoxicity in vivo and in vitro[J]. Chin J Integr Med, 2022, 28 (7): 603-611.
- [18] 黄九林, 刘文文, 韩柯妹, 等. 南北五味子油的成分分析及其生物活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50 (13): 263-269.
- [19] Shi CP, Guo H, Wu TT, et al. Effect of three types of thermal processing methods on the lipidomics profile of tilapia fillets by UPLC-Q-Extractive Orbitrap mass spectrometry[J]. Food Chem, 201, 298: 125029.
- [20] Yang F, Zhou L, Zhang MJ, et al. Exploration of natural phosphatidylcholine sources from six beans by UHPLC-Q-HRMS[J]. J Food Sci, 2020, 85 (10): 3202-3213.
- [21] Yang F, Zhao MJ, Zhou L, et al. Identification and differentiation of wide edible mushrooms based on lipidomics profiling combined with principal component analysis[J]. J Agri Food Chem, 2021, 69 (34): 9991-10001.
- [22] 吴丹, 孟永海, 杨炳友, 等. 脂质组学在中药研究中的应用[J]. 中草药, 2020, 51 (21): 5405-5413.
- [23] 程璇, 萧闵, 曾祥法, 等. 基于 LC-MS 脂质组学方法探究化痰活血通络方对动脉粥样硬化脂质生物标志物的作用及生物学效应[J]. 时珍国医国药, 2024, 35 (2): 323-330.
- [24] 郭慧. 基于代谢组学的中药药性理论研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [25] Yang JL, Zhu A, Xiao S, et al. Anthraquinones in the aqueous extract of *Cassiae semen* cause liver injury in rats through lipid metabolism disorder[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153059.
- [26] 李国龙, 陈佳昕, 史鑫波, 等. 酸枣仁油的脂质组成与功能特性初步分析[J]. 中国粮油学报, 2024, 39 (6): 141-145.
- [27] Ma Y, Yao JX, Zhou L, et al. Comprehensive untargeted lipidomic analysis of sea buckthorn using UHPLC-HR-AM/MS/MS combined with principal component analysis[J]. Food Chem, 2024, 430: 136964.
- [28] 赵凯, 王一飞, 李新, 等. 酸枣仁油研究应用进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37 (12): 311-320.
- [29] 张际庆, 夏从龙, 段宝忠, 等. 火麻仁的药理作用研究进展及开发应用策略[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23 (3): 750-757.
- [30] 李庆杨, 沈丹玉, 莫润宏, 等. 基于脂质组学的油茶籽油脂质轮廓与功能特性分析[J]. 中国粮油学报, 2023, 38 (7): 133-139.
- [31] Ranallia A, Pollastri L, Contento S, et al. Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics[J]. J Agri Food Chem, 2002, 50 (13): 3775-3779.
- [32] Zhang D, Li XJ, Duan XL, et al. Investigation on lipid profile of peanut oil and changes during roasting by lipidomic approach[J]. LWT-Food Sci Technol, 2022, 154: 1-9.
- [33] Cheong WF, Wenk MR, Shui GH. Comprehensive analysis of lipid composition in crude palm oil using multiple lipidomic approaches[J]. J Genet Genomics, 2014, 41 (5): 293-304.

(收稿日期: 2024-06-12; 修回日期: 2024-08-12)

玫瑰中药复方对紫外线诱导 HaCaT 细胞损伤的修复作用

沈秋雨¹, 杨珏², 李莉³, 李兴美³, 李晓飞³, 杨恩虎⁴, 周旭红^{3*} (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650000; 2. 云南中医药大学汇贤中医医院, 昆明 650000; 3. 云南中医药大学科学技术处, 昆明 650000; 4. 云南阿昌中医中药研究院有限公司, 昆明 650000)

摘要: **目的** 研究玫瑰中药复方对紫外线 (UV) 诱导 HaCaT 细胞损伤的修复作用。**方法** 用 UV 诱导 HaCaT 细胞损伤模型; 采用 CCK8 法检测玫瑰中药复方对 HaCaT 正常细胞和损伤细胞的影响; DPPH 法和 ABTS⁺ 法检测玫瑰中药复方的自由基清除能力; β -半乳糖苷酶染色法检测玫瑰中药复方对 UV 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用; 流式细胞术检测玫瑰中药复方对细胞凋亡的影响; 采用试剂盒检测细胞内丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性; 采用试剂盒检测玫瑰中药复方处理后细胞内活性氧 (ROS) 的水平变化; RT-qPCR 检测细胞中 *p16* 和 *p21* 基因的表达水平。**结果** 结果显示玫瑰中药复方具有体外抗氧化能力, 同时对 UV 诱导的 HaCaT 损伤细胞具有抑制细胞凋亡和促增殖的作用, 并通过增强抗氧化酶 (CAT、SOD、GPx) 活性来降低细胞内 ROS 水平, 降低氧化产物 MDA 水平, 增强损伤细胞 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除能力, 以及显著降低损伤细胞内氧化损伤标志基因 *p16* 和 *p21* mRNA 水平。**结论** 玫瑰中药复方对 UV 损伤的细胞具有修复作用。

关键词: 玫瑰中药复方; HaCaT; 抗氧化; 修复作用

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0377-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.013

Repair effect of rose herbal compound on ultraviolet-induced HaCaT cell damage

SHEN Qiu-yu¹, YANG Jue², LI Li³, LI Xing-mei³, LI Xiao-fei³, YANG En-hu⁴, ZHOU Xu-hong^{3*} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000; 2. Huixian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000; 3. Department of Science and Technology, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000; 4. Yunnan Achang Academy of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000)

Abstract: Objective To determine the repair effect of a rose herbal compound on ultraviolet (UV)-induced damage in HaCaT cells. **Methods** The UV-induced HaCaT cell damage model was established. The effect of the rose herbal compound on both normal and damaged HaCaT cells was assessed with CCK8 method. The DPPH and ABTS⁺ assays were used to evaluate the compound free radical scavenging capabilities. β -galactosidase staining was used to examine the protective effect of rose herbal compound against UV-induced HaCaT cell damage. Flow cytometry was used to assess the rose herbal compound impact on the cell apoptosis. Commercial kits were used to measure intracellular malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) levels after the treatment with rose herbal compound. Changes in reactive oxygen species (ROS) levels inside the cells after the treatment were also evaluated with the commercial kit. RT-qPCR was performed to analyze the expression levels of the *p16* and *p21* genes in the cells. **Results** Rose herbal compound displayed obvious in vitro antioxidant capabilities. It not only

基金项目: 云南省科技厅项目 (No.202207AB110015); 云南省教育厅项目 (No.2020YGC01)。

作者简介: 沈秋雨, 女, 在读硕士研究生, 主要从事抗衰老作用的药理研究工作, email: 3100128650@qq.com *通信作者: 周旭红, 女, 研究员, 主要从事药用食用花卉研究工作, email: zhouxuhong7801@126.com

inhibited the apoptosis and promoted the proliferation in UV-induced damaged HaCaT cells, but also reduced intracellular ROS levels by enhancing the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD, and GPx). Furthermore, it decreased MDA levels, enhanced the ability to clear ABTS⁺ and DPPH free radicals in damaged cells, and significantly lowered the mRNA levels of oxidative damage markers *p16* and *p21*. **Conclusion** Rose herbal compound helps repair UV-damaged cells.

Key words: rose herbal compound; HaCaT; anti-oxidation; repair effect

紫外线 (UV) 是一种强烈的致突变剂, 主要通过破坏 DNA 对生物体产生危害。UV 辐射直接损害 DNA, 增加活性氧 (ROS) 和一氧化氮 (NO) 释放, 并促进炎症导致基因组不稳定和细胞死亡^[1]。众所周知, UV 暴露与外在光老化和多种皮肤状况的恶化有关。UV 引起皮肤损伤从而导致肿瘤, 是由于皮肤层吸收了强烈有害的射线, 出现氧化应激^[2]。虽然皮肤具有复杂的抗氧化系统^[3], 但当皮肤长期暴露于 UV 时, 就会导致氧化剂和抗氧化剂之间的平衡向氧化方向转变, 从而导致皮肤防御系统的损耗^[4-6]。考虑到 UV 照射对皮肤的有害影响和对皮肤防御系统造成的压力, 改善皮肤保护成为待解决的优先事项。

玫瑰中药复方由冻干滇红玫瑰花瓣 6 g, 党参 30 g, 白术 15 g, 茯苓 30 g, 生地黄 20 g, 白芍 15 g, 当归 15 g, 大枣 20 g, 甘草 6 g 组成。此方具有安神益志、滋阴养血的功效, 主治心绪不宁、阴虚血亏。本方用滇红花瓣养颜美容, 镇定心神, 党参健脾益肺, 重镇安神, 两药共为君药以达滋阴补血而安神之用。臣药为生地黄, 入心能养血, 入肾能滋阴, 达滋阴养血之功, “血中气药” 当归, 润燥养血、活而不滞, 心血易生。佐助药茯苓宁心安神, 总奏安神益志之效; 大枣以补脾气、养心血, 上药共用以补敛心神而不郁。甘草、白术和白芍调和诸药。整方以滋养安神为主, 结合清心安神、镇心安神。

玫瑰是最重要的观赏植物之一^[7], 滇红玫瑰为云南特色花卉之一, 具有可食用特性。玫瑰具有丰富的有益成分, 如黄酮类化合物 (如黄酮, 黄酮醇, 花青素), 芳香成分 (精油, 单萜烯, 倍半萜烯)^[8-12]。科学研究表明, 玫瑰提取物具有广泛的药理活性, 包括抗氧化、抗炎、抗肥胖、抗肿瘤、抗衰老、抗幽门螺杆菌、神经保护和镇痛作用等^[13-14]。Sim 等^[15] 研究发现口服玫瑰提取物可以抑制 UV 诱导的人真皮成纤维细胞中透明质酸酶和胶原酶, 同时可抑制紫外线 B (UVB) 照射引起的胶原破坏和透明质酸的减少。提示玫瑰提取物中的花青素在体内通过血液循环, 对皮肤起抗衰老作用。Madhavaram 等^[16] 研究表明玫瑰

花提取物在抑制超广谱 β -内酰胺酶 (ESBL) 耐药菌生物被膜形成的同时, 也强烈抑制了 ESBL 耐药菌的生长, 同时玫瑰提取物还引起肺癌细胞凋亡和坏死细胞死亡。以上研究表明, 玫瑰具有丰富的药理作用, 而滇红玫瑰作为云南特色可食用玫瑰, 对其研究鲜有报道。

本研究以玫瑰中药复方为实验材料, 以 HaCaT 细胞为研究对象, 对玫瑰中药复方 UV 诱导 HaCaT 细胞损伤的修复作用进行初步探究, 为药食两用花卉与中药复方的联合用药提供实验支撑。

1 材料

1.1 试药

玫瑰品种: 滇红 (采摘于云南中医药大学植物园, 经周旭红研究员鉴定为滇红玫瑰); 党参, 白术, 茯苓, 生地, 白芍, 当归, 大枣, 甘草 (云南中医药大学汇贤中医医院); 人永生角质细胞 (HaCaT) (普诺赛生命科技有限公司细胞库); β -半乳糖苷酶染色试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性检测试剂盒 (碧云天公司); 胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒、Annexin V CoraLite 488/PI 双染细胞凋亡试剂盒 (Proteintech 公司); ROS 试剂盒、丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒、总超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒、DMEM 培养基、PBS 缓冲液 (索莱宝公司); 胎牛血清 (FBS) (Cyagen 公司)。逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒 (Yeasen Biotechnology 公司)。

1.2 仪器

超净实验台 (苏州净化设备有限公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CellMate 二氧化碳培养箱 (新加坡 Esco 公司); Axio Obser 倒置荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司); FlexA-200 酶标仪 (杭州奥盛仪器有限公司); PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

2 方法与结果

2.1 样品制备

玫瑰中药复方中加入蒸馏水没过药材, 浸泡 30 min 后, 煎煮 3 次, 将 3 次煎煮的汤汁合并过滤, 将过滤的药汤用旋转蒸发器浓缩后进行冷冻干燥处理。将冷冻干燥后的玫瑰中药复方配制成不同质量

浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2 细胞培养及组别

HaCaT 细胞株在含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养^[17]。将细胞分为空白组 (Control)、模型组 (Model) 以及不同质量浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 样品组, 进行后续实验。

2.3 UA 照射时间对 HaCaT 细胞的影响

将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 96 板孔内培养 24 h 后, 随机分为空白组和样品组, 弃去每孔培养液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 润洗 3 遍, 每孔加入 100 μL PBS, 细胞与 UV 灯距离 15 cm, UV 辐射剂量为 84 $\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$, 分别照射 0、5、15、30、45 s, 空白组用铝箔盖住, UV 照射后, 弃去 PBS, 每孔加入 100 μL 新鲜的培养液, 每组设置 6 个复孔, 继续培养 24 h, 于酶标仪 450 nm 处测定吸光度值^[18]。

采用 5 个不同 UV 照射时间来诱导模型, 由图 1 可知, 照射 30 s 后, 细胞损伤率达到 50%, 细胞损伤效果明显, 且差异有统计学意义, 因此最终选取照射 30 s 进行后续实验。

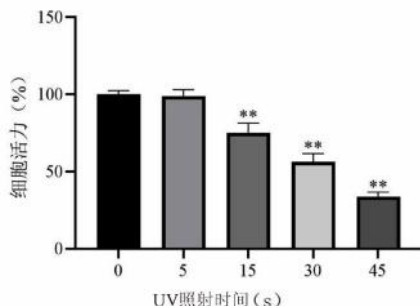


图 1 UV 照射时间对 HaCaT 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 1 Effect of UV irradiation time on the cell viability of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与 0 s 比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with 0 s, ** $P < 0.01$.

2.4 玫瑰中药复方对 HaCaT 细胞活性的影响

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化, 调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞覆盖率达到 60% 时, 加入不同质量浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的玫瑰中药复方干预 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 每组设置 6 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h, 于酶标仪 450 nm 处测定吸光度值, 计算样品组细胞活力^[17]。

经 CCK-8 测定结果显示 (见图 2), 各给药组细胞活力不低于 90%, 并且在 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 玫瑰中药复方作用下, 细胞活力升高 16%, 差异有统计

学意义。由此说明, 玫瑰中药复方对细胞无毒性。

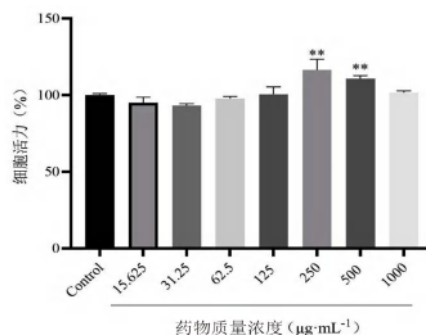


图 2 玫瑰中药复方对 HaCaT 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 2 Effect of rose herbal compound on the cell viability of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the Control group, ** $P < 0.01$.

2.5 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞活性的影响

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化, 调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞覆盖率达到 80% 时, 通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h, 弃掉培养基后加入不同质量浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的玫瑰中药复方干预 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 处测定吸光度值, 计算并对比各组细胞活力^[18]。

经 CCK-8 测定结果显示 (见图 3), 与空白组比较, 模型组细胞活力降低 50%, 说明模型诱导成功; 与模型组比较, 随着药物浓度的提高, 细胞活力不断提高, 在 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上浓度时, 细胞活力差异有统计学意义。并且在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 玫瑰中药复方作用下, 细胞存活率提高 26%。由此说明, 玫瑰中药复方对 HaCaT 损伤细胞具有保护作用。

2.6 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力

用 DPPH 溶液 (0.15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为底物, 分为 3 个组: 空白组 (160 μL 甲醇和 40 μL DPPH 溶液)、样品组 (160 μL 样品和 40 μL DPPH 溶液)、样品对照组 (160 μL 样品和 40 μL 甲醇), 配制好溶液后, 依次加入 96 孔板中, 避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光度值。DPPH 清除率 (%) = $[A - (B - C)] / A \times 100\%$, A 为空白组的吸光度; B 为样品组的吸光度; C 为样品对照组的吸光度^[19]。ABTS⁺储备液用乙醇稀释, 分为 3 个组: 空白组 (100 μL 乙醇和 100 μL ABTS⁺溶液)、样品组 (100 μL 样品和 100 μL ABTS⁺溶液)、样品

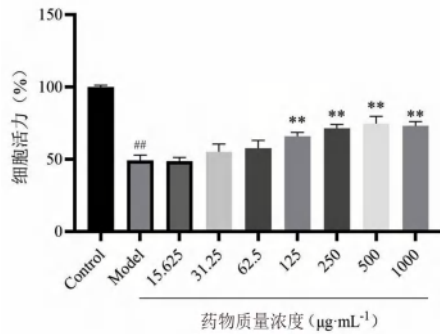


图3 玫瑰中药复方对 HaCaT 损伤细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 3 Effect of rose herbal compound on the viability of HaCaT-damaged cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与空白组比较，[#] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Control group, [#] $P < 0.01$; compared with the Model group, ^{**} $P < 0.01$.

对照组 (100 μL 样品和 100 μL 乙醇)，依次加入 96 孔板中。避光 30 min 使其充分反应后于 734 nm 测定吸光值。ABTS⁺清除率 (%) = $[A - (B - C)] / A \times 100\%$ ，A 为空白组的吸光度值；B 为待测样品的吸光度值；C 为样品对照组的吸光度值^[20]。

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化，调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中，待细胞覆盖率达到 80% 时，通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h，培养结束后，弃掉培养基后加入不同质量浓度 (1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 μg · mL⁻¹) 的玫瑰中药复方干预 24 h 后，收集细胞，加入 PBS 超声破碎 10 min，离心后收集上清液，按上述方法测定并计算 ABTS⁺ 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率。

由图 4 可知，细胞给药后，模型组 (Model) 细胞 ABTS⁺ 自由基清除率与空白组 (Control) 细胞对比下降 10%，DPPH 自由基清除率降低 20%，随着细胞给予玫瑰中药复方浓度的提高，细胞的 ABTS⁺ 自由基清除率提高，细胞的 DPPH 自由基清除率提高，且当给药浓度达到 250 μg · mL⁻¹，ABTS⁺ 自由基清除率达到 99.85% (见图 4)，说明玫瑰中药复方具有较强的清除自由基能力。

2.7 玫瑰中药复方对 HaCaT 损伤细胞的修复作用

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化，调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中，待细胞覆盖率达到 80% 时，通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h，弃掉培养基后加入 500 μg · mL⁻¹ 的玫瑰中药复方干预 24 h，弃去上清液，每孔加入 1 mL 固定液，固定 15 min 后用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min，最后每孔加入 1 mL β-半乳糖苷酶染色液，于 37 °C 染色过夜，显微镜下观察，蓝色为

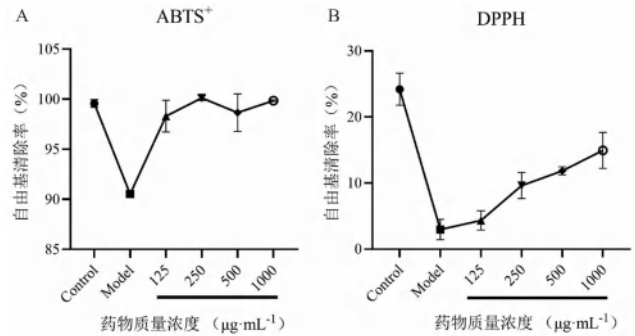


图4 玫瑰中药复方的自由基清除率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 4 Free radical clearance rate of rose herbal compound ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

β-半乳糖苷酶阳性染色，即为损伤细胞^[21]。

由图 5 可知，与空白组对比，模型组细胞被染为蓝色，明显变大变圆，且漂浮大量死细胞；与模型组对比，给药组死细胞数量明显减少。说明玫瑰中药复方对 HaCaT 细胞具有一定的修复作用。



图5 玫瑰中药复方对 HaCaT 损伤细胞的修复作用
Fig 5 Repair effect of rose herbal compound on HaCaT damaged cells
A. 空白组 (Control group); B. 模型组 (Model group); C. 给药组 (treatment group, 500 μg · mL⁻¹ rose herbal compound)

2.8 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞凋亡的影响

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化，调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，待细胞覆盖率达到 80% 时，通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h，弃掉培养基后加入 125、500 μg · mL⁻¹ 的玫瑰中药复方干预 24 h。培养结束后，收集细胞，使用 Annexin V-488/PI 双染，运用流式细胞仪检测细胞凋亡情况^[22]。

流式细胞术检测玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞凋亡的结果见图 6。与空白组对比，模型组的细胞凋亡率上升。与模型组对比，给药组 (125、500 μg · mL⁻¹) 的细胞凋亡率下降，差异有统计学意义。提示玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞具有修复作用。

2.9 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞内 MDA 含量和 SOD、GPx、CAT 活性的影响

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化，调整其密度为 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，待细胞覆盖率达到 80% 时，通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h，弃掉培养基后加入 125、500 μg · mL⁻¹ 的玫瑰中药复方干预 24 h。培养结束后，收集细胞，加入预冷

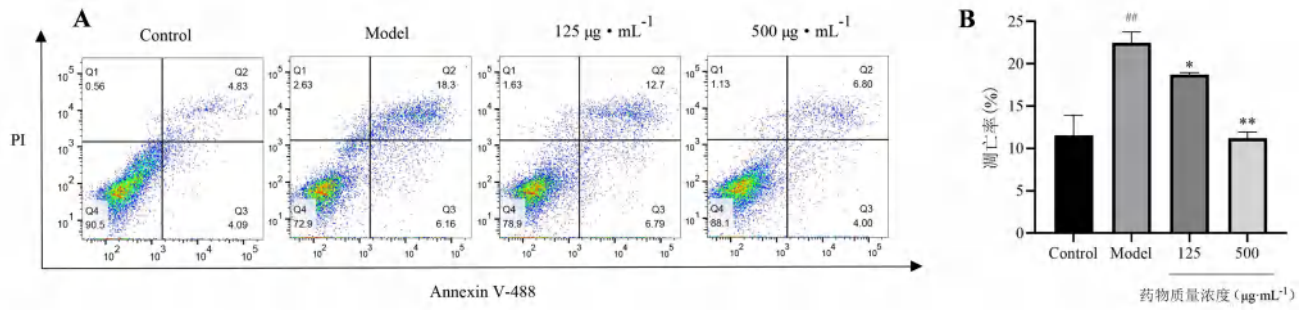


图 6 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig 6 Effect of rose herbal compound on the apoptosis of UV-damaged HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与空白组比较，^{###} $P < 0.01$ ；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, ^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

的 PBS 洗涤 3 遍，加入细胞裂解液，于 4℃ 裂解后离心，取上清液待测，根据试剂盒说明书进行检测，检测 MDA 含量以及 CAT、SOD 和 GPx 活性^[23]。

结果如图 7 所示，与空白组比较，模型组 HaCaT 细胞内 MDA 含量显著升高，CAT、SOD 和 GPx 活性显著降低。随着药物浓度的升高，MDA

含量显著降低，CAT、SOD 和 GPx 活性显著升高，且与模型组比较，差异有统计学意义。当药物质量浓度达到 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，CAT 活性趋近于正常细胞，而 SOD 活性高于正常细胞。表明在 HaCaT 细胞中，玫瑰中药复方能够显著增强 UV 诱导 HaCaT 细胞的抗氧化能力。

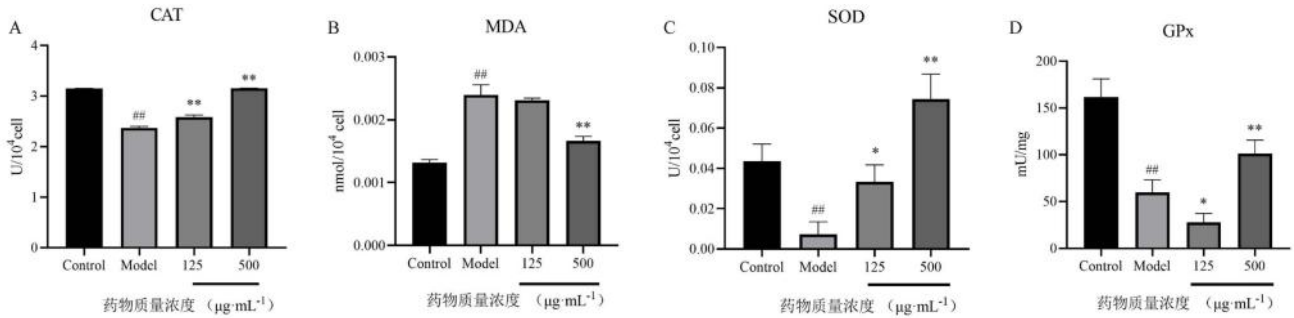


图 7 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 内 MDA 含量和 CAT、SOD、GPx 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig 7 Effect of rose herbal compound on MDA content and CAT, SOD and GPx activities in UV-damaged HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与空白组比较，^{###} $P < 0.01$ ；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, ^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

2.10 玫瑰中药复方对 UV 损伤细胞内 ROS 水平变化的影响

取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化，调整其密度为 1×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，待细胞覆盖率达到 80% 时，通过 UV 照射 30 s 造模后培养 24 h，培养结束后，弃掉培养基后加入 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的玫瑰中药复方干预 24 h。培养结束，收集细胞，加入预冷的 PBS 洗涤 3 遍后，按照试剂盒说明书进行操作，加入荧光染料后于细胞培养箱中孵育 20 min，采用荧光倒置显微镜观察不同组别细胞内 ROS 的水平变化^[24]。

由图 8 可知，模型组细胞内荧光强度增强，且与空白组比较，差异具有统计学意义，说明模型组细胞内 ROS 水平显著提高。当给予 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 玫瑰中药复方治疗后，细胞内荧光强度降低，且与模型组比较，差异有统计学意义，表明给药组细胞

内 ROS 水平显著下降，说明玫瑰中药复方能减少机体内 ROS 的生成，具有一定的抗氧化能力。

2.11 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 细胞内 p16 和 p21 表达的影响

取各组培养后细胞，根据 Trizol 法提取细胞总 RNA，并进行浓度检测，再根据试剂盒要求进行逆转录得到 cDNA，并以 GAPDH 作为内参基因，引物序列见表 1。根据 qPCR 试剂盒要求配制好体系，每孔 20 μL 体系，并设置 3 个复孔。离心后，按照说明书设置程序，上机检测，PCR 扩增条件为：95℃ 预变性 30 s，95℃ 变性 5 s，60℃ 退火 30 s，共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算 p16 和 p21 的 mRNA 表达量^[25]。

由图 9A 可知，模型组 p16 呈现高表达状态，给药组随着药物浓度的增加抑制 p16 表达的能力增强。同样，由图 9B 可知，模型组 (Model)

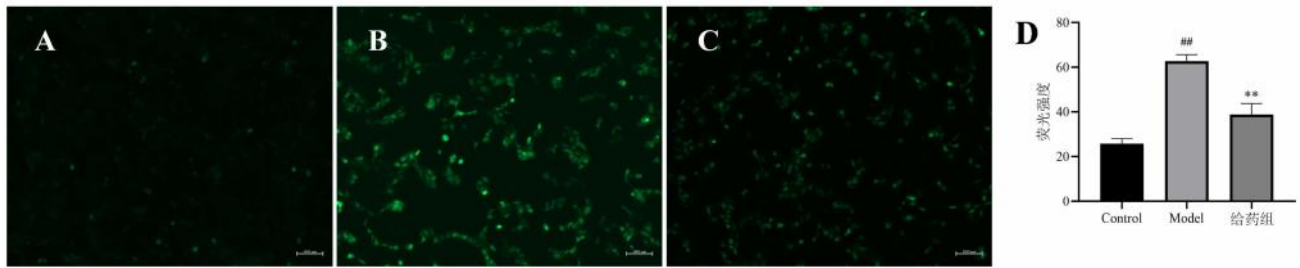


图 8 玫瑰中药复方对 UV 损伤的 HaCaT 内 ROS 活性水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 8 Effect of rose herbal compound on ROS activity level in UV-damaged HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A. 空白组 (Control group); B. 模型组 (Model group); C. 给药组 (treatment group, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rose herbal compound); D. 不同组别 HaCaT 细胞内 ROS 荧光强度统计图 (statistical chart of ROS fluorescence intensity in HaCaT cells from different groups)。

注 (Note): 与空白组比较, $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the Control group, $^{###}P < 0.01$; compared with the Model group, $^{**}P < 0.01$)。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5' → 3')
<i>GAPDH</i>	GTCTTACCACCATGGAGAAGGC TTGTTGTCATGGATGACCTTGGCC
<i>p16</i>	GGGTTTTCGTGGTTCACATCC CTAGACGCTGGCTCCTCAGTA
<i>p21</i>	TGTCGTCAGAACCCATGC AAAGTCGAAGTCCATCGCTC

p21 呈现高表达状态, 给药组随着药物浓度的增加, 抑制 *p21* 表达的能力增强, 且差异有统计学意义。由此可知, 玫瑰中药复方抑制了 DNA 损伤相关基因 *p16* 和 *p21* 的表达。

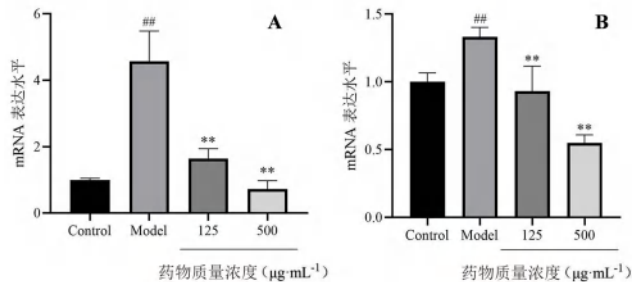


图 9 玫瑰中药复方对 *p16* (A) 和 *p21* (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 9 Effect of rose herbal compound on the expression of *p16* (A) and *p21* (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注 (Note): 与空白组比较, $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the Control group, $^{###}P < 0.01$; compared with the Model group, $^{**}P < 0.01$)。

2.12 统计分析

采用 Graph Pad Prism 8 软件进行统计处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 SPSS 进行单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

UV 是一种强烈的致突变剂, 主要通过破坏 DNA 对生物体产生危害^[26]。*p16* 在细胞增殖中

起负调控作用, 调节细胞凋亡来控制细胞的生长。*p21* 是一种抑制 DNA 合成、抑制细胞分裂的核蛋白^[27-28]。长期的 *p16* 表达促使细胞进入衰老, 这是一种不可逆转的细胞周期阻滞, 阻止了潜在肿瘤细胞的生长, 但也有助于抗细胞衰老。精确调控 *p16* 对组织稳态至关重要, 维持肿瘤抑制和衰老之间的协调平衡^[29]。*p21* 的主要功能是通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶的活性来阻止细胞周期进程。此外, *p21* 参与调控转录、细胞凋亡、DNA 修复以及细胞运动^[30]。*p21* 和 *p16* 已被证明可作为肿瘤抑制蛋白, 这种功能超出了细胞周期控制的范围, 包括在调节氧化应激方面的重要作用。因此, 这些重要的相互作用表明肿瘤抑制基因在细胞对氧化应激的反应中具有关键的潜在作用, 这些基因可能是氧化损伤相关疾病的治疗靶点^[31]。有研究表明, UV 照射会导致线粒体等膜结合细胞器的氧化损伤, 最终导致细胞死亡^[32-34]。在这项研究中, Wataru 等^[35]研究了藏红花素对紫外线 A (UVA) 诱导的角膜上皮细胞损伤的影响, 最后发现藏红花素对 UVA 照射诱导的角膜上皮细胞线粒体损伤具有保护作用。在 Erika 等^[36]研究中, 发现阿拉斯加蓝成熟浆果提取物 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 200 mJ UVA/UVB 辐射引起的皮肤氧化、炎症和结构损伤的有益保护作用。因此本实验最终选用 UV 诱导细胞来研究玫瑰中药复方对损伤细胞的保护作用。

研究表明 UV 照射会导致细胞中 ROS 产生过多, 同时使机体抗氧化能力减弱^[37]。多项研究证明玫瑰对机体的氧化损伤具有保护作用, 岳华岭等^[38]发现墨红玫瑰提取物在对 ABTS⁺ 自由基、DPPH 自由基清除及铁离子还原实验中均表现出良好的抗氧化性能。Nowshin 等^[39]将 RAW 264.7 细胞暴露于脂多糖 (LPS) 中, 构建炎症免

疫细胞模型。通过生化分析、RT-PCR 和 Western blot 等一系列实验,研究玫瑰提取物的抗炎和抗氧化作用。结果显示玫瑰提取物处理显著降低了 NO、ROS、MDA 等炎症和氧化生物标志物含量,并保持了 SOD 和 CAT 活性。Petricevich 等^[40]用玫瑰提取物处理后的细胞可以防止过氧化氢引起的细胞形态变化。表明玫瑰提取物对过氧化氢诱导的 L929 细胞氧化应激具有抗氧化和保护作用。Hamza 等^[41]研究发现大马士革玫瑰提取物可抵消氯化镉 (CdCl₂) 诱导的氧化应激引起的肝脏和心脏组织损伤和组织病理学改变,同时显著提高了谷胱甘肽、SOD 和 CAT 水平,显著降低了脂质过氧化脂质 (LPO)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平以及 TNF- α 和 IL-6 mRNA 水平。

基于以上的研究,我们推测玫瑰中药复方也具有抗氧化作用以及对损伤细胞的保护作用。本研究中,我们采用 CCK-8 法、 β -半乳糖苷酶染色法、流式细胞术法检测出玫瑰中药复方对 UV 诱导的 HaCaT 损伤细胞具有修复作用,同时抑制细胞凋亡。同时,我们通过 DPPH 和 ABTS⁺法检测了玫瑰中药复方粗提物以及损伤给药后细胞的清除自由基能力,还检测了损伤给药后细胞内 MDA 含量变化, CAT、SOD 和 GPx 活性变化以及 ROS 活性水平变化,结果显示玫瑰中药复方具有清除自由基效果,同时增强抗氧化酶的活性,降低活性氧水平。最后采用 qRT-PCR 技术,发现与 DNA 损伤相关的 *p16* 和 *p21* 基因在 UV 损伤后水平显著增加,经玫瑰中药复方治疗后, *p16* 和 *p21* 水平显著降低,说明玫瑰中药复方对 UV 损伤的细胞具有修复作用。

综上所述,玫瑰中药复方具有体内外抗氧化能力,同时中药组合物对损伤细胞具有抑制细胞凋亡和促增殖的作用,并通过增强抗氧化酶 (CAT、SOD、GPx) 活性来降低细胞内 ROS 水平,降低氧化产物 MDA 水平,增强损伤细胞 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力,以及显著降低损伤细胞内衰老标志基因 *p16* 和 *p21* mRNA 水平,说明玫瑰中药复方对 UV 损伤的细胞具有修复作用。该研究可为药食花卉与中药复方的联合用药以及药食同源对 UV 诱导细胞的修复作用的研究提供参考价值,同时为开发对皮肤具有修复作用的玫瑰中药复方奠定研究基础。

参考文献

[1] Camillo L, Gironi LC, Zavattaro E, et al. Nicotinamide attenuates UV-induced stress damage in human primary keratinocytes from cancerization fields [J]. *J Invest Dermatol*, 2022, 142 (5): 1466-1477.

[2] de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB radiation [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2002, 15 (5): 316-320.

[3] Woodby B, Penta K, Pecorelli A, et al. Skin health from the inside out [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2020, 11 (1): 235-254.

[4] Lester P, Giuseppe V. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2002, 15 (5): 282-290.

[5] Young RA, Claveau J, Rossi BA. Ultraviolet radiation and the skin: photobiology and sunscreen photoprotection [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2016, 76 (3S1): S100-S109.

[6] Yuka JF, Miliani RM, Lucía AJM, et al. Skin impacts from exposure to ultraviolet, visible, infrared, and artificial lights-a review [J]. *J Cosmet Laser Ther*, 2021, 23 (1-2): 1-7.

[7] Liu XT, Wu J, Ji FF, et al. Transcriptomic profiling of rose flower under treatment of various phytohormones and plant growth regulators [J]. *Sci Data*, 2022, 9 (1): 669-669.

[8] Ng TB, He JS, Niu SM, et al. A gallic acid derivative and polysaccharides with antioxidative activity from rose (*Rosa rugosa*) flowers [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 56 (4): 537-545.

[9] Pal KP. Evaluation, genetic diversity, recent development of distillation method, challenges and opportunities of rosa damascena: a review [J]. *J Essent Oil Bear PL*, 2013, 16 (1): 1-10.

[10] Johannes N, Dieter BW. Medicinal, aromatic and stimulant plants [M]. Springer, Cham, 2020.

[11] Bashir KM, Awan FS, Khan IA, et al. Identification and authentication of rosa species through development of species-specific SCAR marker (s) [J]. *GMR*, 2014, 13 (2): 4130-4139.

[12] Mileva M, Ilieva Y, Jovtchev G, et al. Rose flowers-a delicate perfume or a natural healer [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (1): 127.

[13] Ayati Z, Amiri MS, Ramezani M, et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacological profile of rose hip: a review [J]. *Curr Pharm Design*, 2018, 24 (35): 4101-4124.

[14] Gürbüz I, Ustün O, Yesilada E, et al. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 88 (1): 93-97.

[15] Sim JW, Lee E, Lee G, et al. Inhibition of photoaging by anthocyanin metabolites derived from rose petal extract [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2024, 68 (5): e2300611-e2300611.

[16] Madhavaram KK, Sivakumar S, Pujithaa S, et al. Anti-microbial and anti-cancer efficacy of acetone extract of *Rosa chinensis* against resistant strain and lung cancer cell line [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23 (1): 406-406.

[17] 刘海倩, 梁雁翔, 鲁东昊, 等. 川续断皂苷 VI 对 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用 [J]. *广东化工*, 2022, 49 (24): 46-48.

[18] 高源. 菊花提取物抗衰老作用研究 [D]. 开封: 河南大学, 2020.

[19] Minghao Z, Naiyu Z, Minhao X, et al. Antioxidant prop-

- erties of polyphenols from snow chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria*) and the modulation on intestinal microflora in vitro [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60 (1): 1771-1780.
- [20] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53 (6): 1841-1856.
- [21] 蒋智文, 陈维春, 郑慧玲, 等. siRNA 沉默 COMMD1 后对 HEK293 细胞衰老相关 β -半乳糖苷酶活性的影响 [J]. *广东医学院学报*, 2015, 33 (4): 367-371.
- [22] Tang S, Hou YY, Hu RY, et al. Argininy-fructosyl-glucose (AFG) antagonizes D-galactose-induced cellular senescence of neuro-2a via inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *J Funct*, 2024, 115: 106102.
- [23] Yilmaz N, Hudaykulyeva J, Gul S. Phoenixin-14 may ameliorate testicular damage caused by torsion-detorsion by reducing oxidative stress and inflammation in prepubertal rats [J]. *Tissue Cell*, 2024, 88: 102405.
- [24] 余星, 刘文焯, 肖婧雯, 等. 二甲双胍通过 AMPK/Sirt1 信号通路延缓心肌细胞衰老 [J]. *中国医药科学*, 2023, 13 (23): 17-20.
- [25] 周巧, 刘健, 朱艳, 等. 黄芩清热除痹胶囊调控 p53/p21 信号通路延缓骨关节炎大鼠软骨细胞衰老的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49 (12): 3330-3339.
- [26] Camillo L, Gironi LC, Zavattaro E, et al. Nicotinamide attenuates UV-induced stress damage in human primary keratinocytes from cancerization fields [J]. *J Invest Dermatol*, 2022, 142 (5): 1466-1477.
- [27] Balbina G, Anna-Laura K, Jan-Philipp R, et al. The emerging role of cyclin-dependent kinases (CDKs) in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (10): 3219-3219.
- [28] LeAW, Li QF, Zheng XC, et al. P16 and P21 are involved in the pathogenesis of endometrial thinning: a cross-sectional study [J]. *Medicine*, 2022, 101 (40): e30987-e30987.
- [29] LaPak KM, Burd CE. The molecular balancing act of p16 (INK4a) in cancer and aging [J]. *MCR*, 2014, 12 (2): 167-183.
- [30] Ilaria D, Micol T, Ornella C, et al. Biology of the cell cycle inhibitor p21 (CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89 (2): 155-178.
- [31] Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions [J]. *Free Radical Biol Med*, 2012, 52 (1): 7-18.
- [32] Duan X, Wu T, Liu T, et al. Vicenin-2 ameliorates oxidative damage and photoaging via modulation of MAPKs and MMPs signaling in UVB radiation exposed human skin cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2019, 190: 76-85.
- [33] Huang CC, Wu WB, Fang JY, et al. (-)-Epicatechin-3-gallate, a green tea polyphenol is a potent agent against UVB-induced damage in HaCaT keratinocytes [J]. *Molecules*, 2007, 12 (8): 1845-1858.
- [34] Cha JW, Piao MJ, Kim KC, et al. The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes [J]. *Biomol Ther*, 2014, 22 (2): 136-142.
- [35] Wataru O, Tomohiro Y, Emi S, et al. Crocetin protects against mitochondrial damage induced by UV-A irradiation in corneal epithelial cell line HCE-T cells [J]. *J Pharmacol*, 2022, 150 (4): 279-288.
- [36] Erika P, Zachary H, Alessandra P, et al. Alaskan bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) extract as an innovative topical approach to prevent UV-induced skin damage [J]. *Cosmetics*, 2021, 8 (4): 112-112.
- [37] 董丽红, 罗牡康, 张名位, 等. 荔枝果壳原花青素对中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *食品科学*, 2022, 43 (21): 233-240.
- [38] 岳华岭, 廖红梅. 食用玫瑰多酚提取物的稳定性及抗氧化能力评价 [J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50 (8): 130-137.
- [39] Nowshin RR, Ding Z, Yuan Y, et al. Pingyin rose essential oil alleviates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells via the NF- κ B pathway: an integrated in vitro and network pharmacology analysis [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22 (1): 272-272.
- [40] Petricevich VL, Mayra C, Rodolfo A. Chemical composition, antioxidant activity, cytoprotective and in silico study of ethanolic extracts of *bougainvillea × buttiana* (var. orange and rose) [J]. *Molecules*, 2022, 27 (19): 6555-6555.
- [41] Hamza RZ, Al-Malki NA, Alharthi S, et al. Chemical characterization of taif rose (*Rosa damascena*) methanolic extract and its physiological effect on liver functions, blood indices, antioxidant capacity, and heart vitality against cadmium chloride toxicity [J]. *Antioxidants*, 2022, 11 (7): 1229-1229.

(收稿日期: 2024-06-07; 修回日期: 2024-08-10)

基于指纹图谱结合化学模式识别以及网络药理学筛选经典名方旋覆代赭汤的质量标志物

汪怡, 郭曼曼, 徐倩菲, 徐韞妍, 张泽鹏, 刘菊* (昆山市中医医院, 江苏 昆山 215300)

摘要: **目的** 通过指纹图谱结合化学模式识别以及网络药理学筛选旋覆代赭汤的质量标志物。**方法** 用不同方法制备 15 批旋覆代赭汤供试品, 建立 UPLC 指纹图谱并进行共有峰指认和相似度评价。运用聚类分析及正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法对指纹图谱进行研究, 寻找造成差异的标志成分, 再运用网络药理学预测标志成分的作用靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 并进行细胞实验验证, 从而筛选出旋覆代赭汤的质量标志物。**结果** 15 批旋覆代赭汤中共有 23 个共有峰, 指认出其中 16 个成分并对其进行归属, 化学模式识别分析寻找出 4 个差异标志成分。通过网络药理学筛选出这 4 个成分的 20 个关键靶点和 20 条关键信号通路, 通过细胞实验, 发现旋覆代赭汤可显著抑制脂多糖诱导的巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型中 STAT3 和 JAK2 磷酸化, 结果表明绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸、1-O-乙酰旋覆花内酯、人参皂苷 Rb₁ 这 4 个成分可作为旋覆代赭汤潜在的质量标志物。**结论** 该方法筛选出 4 个可作为旋覆代赭汤潜在质量标志物的化学成分, 为旋覆代赭汤质量标准的建立提供了基础和借鉴, 同时也为旋覆代赭汤相关制剂的开发提供参考。

关键词: 旋覆代赭汤; 指纹图谱; 化学模式识别; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R283.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0385-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.014

Screening of quality markers of Xuanfu Daizhe decoction based on fingerprint, chemical pattern recognition and network pharmacology

WANG Yi, GUO Man-man, XU Qian-fei, XU Yun-yan, ZHANG Ze-peng, LIU Ju* (*Kunshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunshan Jiangsu 215300*)

Abstract: Objective To screen the quality markers of Xuanfu Daizhe decoction by fingerprint, chemical pattern recognition and network pharmacology. **Methods** Totally 15 batches of Xuanfu Daizhe decoction were prepared by different methods. UPLC fingerprint was established, and common peak identified and similarity evaluated. Chemical pattern recognition methods such as cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to determine the components for the differences, and then network pharmacology was used to predict the target and pathway of the signature components. A component-target-pathway network map was established and verified by cell experiments. The quality markers of Xuanfu Daizhe decoction were selected. **Results** Totally 23 common peaks were found in 15 batches of decoction, and 16 components were identified and attributed. Chemical pattern recognition found 4 landmark components. By network pharmacology, 20 key targets and 20 key pathways of these 4 components were screened out. In the experiments, Xuanfu Daizhe decoction greatly inhibited the phosphorylation of STAT3 and JAK2 in the LPS-induced macrophage RAW264.7 inflammatory model. Chlorogenic acid, 1, 5-dicaffeoyl quinic acid, 1-O-acetyl uncinolactone and ginsenoside Rb₁ could be potential quality markers for

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目 (No.BK20180265); 江苏省中药骨干人才高级研修项目; 苏州科技计划项目 (No. SKY2022076); 南京中医药大学自然科学基金项目 (No.XZR2021076); 昆山市社会发展项目 (No.KS2234)。

作者简介: 汪怡, 女, 主任中药师, 主要从事中药复方及医院制剂基础研究, email: yitcm@163.com ***通信作者:** 刘菊, 女, 副主任中医师, 主要从事中医药治疗胃食管反流病的临床及基础研究, email: liujupopo@126.com

Xuanfu Daizhe decoction. **Conclusion** The method screened out 4 potential quality markers for Xuanfu Daizhe decoction, providing reference for the establishment of quality standard of Xuanfu Daizhe decoction, and development of other preparations.

Key words: Xuanfu Daizhe decoction; fingerprint; chemical pattern recognition; network pharmacology; quality marker

经典名方旋覆代赭汤首见于张仲景《伤寒论》^[1], 全方由旋覆花、代赭石、半夏、生姜、人参、甘草、大枣组成, 具有益气补虚、和胃降逆功效, 是国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》100 首经典名方之一。本课题组长期从事旋覆代赭汤治疗反流性食管炎的临床及实验研究工作, 临床研究显示旋覆代赭汤可以有效改善反流症状, 减少复发, 前期对旋覆代赭汤治疗反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)的抗炎机制进行了深入研究^[2-3], 但对旋覆代赭汤的药剂物质基础及质量控制研究甚少。中药复方具有多成分、多靶点等特点, 但成分复杂, 质量难以控制, 基于此, 刘昌孝院士基于中药生物属性、制备过程和配伍理论等中医药自身体系特点提出中药质量标志物(Q-Marker)的新概念^[4], Q-Marker 是存在于中药材和中药产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂)中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质, 作为反映中药安全性和有效性的标志物质进行质量控制, 中药 Q-Marker 的提出为中药质量研究指明了方向, 从而提升中药及其产品的质量 and 质控水平, 完善质量标准体系, 对中药的质量研究具有深远意义^[5-7]。

本研究通过建立不同制备条件下旋覆代赭汤 UPLC 指纹图谱, 结合聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等化学模式识别方法^[8-10]筛选质量差异标志性成分, 结合网络药理学分析预测旋覆代赭汤的 Q-Marker, 为旋覆代赭汤建立更系统、全面的质量评价体系提供参考。

1 材料

1.1 药材

旋覆花(产地: 江苏, 批号: 230314)、代赭石(产地: 四川, 批号: 220723)、清半夏(产地: 湖北, 批号: 230417)、人参(产地: 吉林, 批号: 230307)、大枣(产地: 山东, 批号: 230419)、炙甘草(产地: 内蒙古, 批号: 230414)(苏州市天灵中药饮片公司), 生姜购自本地农贸市场, 所有饮片均由我院药学部李青松主任中药师按照《中国药典》2020 年版一部鉴定为合格饮片。

1.2 试药与仪器

绿原酸(批号: MUST-22070918)、隐绿原酸(批号: MUST-22082601)、咖啡酸(批号: MUST-22062118)、1, 3-二咖啡酰奎宁酸(批号: MUST-23010807)、甘草苷(批号: MUST-20052110)、异槲皮苷(批号: MUST-20042613)、异绿原酸 B(批号: MUST-22010705)、1, 5-二咖啡酰奎宁酸(批号: MUST-22072012)、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号: MUST-20082802)、异绿原酸 C(批号: MUST-22081001)、异甘草苷(批号: MUST-22050507)、槲皮素(批号: MUST-22042012)、人参皂苷 Rb₁(批号: MUST-21060101)、甘草酸(批号: MUST-20042407)、6-姜酚(批号: MUST-20081311)(成都曼斯特生物科技有限公司, 纯度均大于 98%); 1-氧-乙酰旋覆花内酯(批号: P19A10S86191, 上海源叶生物科技有限公司); 乙腈(HPLC 级, 美国默克公司); 脂多糖(LPS, 美国默克公司 Sigma-Aldrich); 胎牛血清(批号: 2306018, 德国赛多利斯公司); DMEM 高糖培养基(批号: 8123401, 美国赛默飞公司); p-JAK2 抗体(江苏亲科公司); p-STAT3 抗体(美国 CST 公司); GAPDH(英国 Abcam 公司)。

Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪(PDA 检测器、四元梯度泵、Empower3 色谱工作站, 美国沃特世公司); 二氧化碳培养箱(美国赛默飞公司); CKX41 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司); Mini-PROTEAN 小型垂直电泳转印系统、ChemiDoc MP 凝胶成像分析仪、iMark 酶标仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.3 细胞株

小鼠巨噬细胞 RAW264.7(中国科学院干细胞库)。

2 方法和结果

2.1 旋覆代赭汤药液的制备

2.1.1 不同旋覆代赭汤药液的制备 旋覆代赭汤处方为旋覆花 15 g, 代赭石 5 g, 生姜 25 g, 清半夏 15 g, 人参 10 g, 大枣 10 g, 炙甘草 15 g。称取相应剂量的药材饮片, 按以下方法进行制备, 每种制备方法重复 3 次:

制备方法 A(编号 A1 ~ A3): 加水 1000 mL, 浸泡 30 min, 加热回流提取 30 min, 趁热滤出药液, 药渣再加入 1000 mL 水, 回流提取 30 min, 趁热过滤, 合并两次滤液。

制备方法 B (编号 B1 ~ B3): 加水 1000 mL, 浸泡 30 min, 加热回流提取 30 min, 趁热滤出药液。

制备方法 C (编号 C1 ~ C3): 加水 1000 mL, 浸泡 30 min, 加热回流提取 2 h, 趁热滤出药液; 药渣再加入 1000 mL 水, 回流提取 2 h, 趁热过滤, 合并两次滤液。

制备方法 D (编号 D1 ~ D3): 加水 2000 mL, 浸泡 30 min, 煎煮至 1200 mL, 去滓, 趁热滤出药液。

制备方法 E (编号 E1 ~ E3): 加水 2000 mL, 浸泡 30 min, 全自动煎药机中密闭煎煮 30 min, 趁热抽出药液。

以上药液, 分别浓缩至约 400 mL, 放冷后, 4500 r · min⁻¹ 离心 20 min, 上清液转移至 500 mL 量瓶中, 纯水定容。得到 15 批旋覆代赭汤药液, 备用。

2.1.2 单味药药液的制备 分别称取相应剂量的各单味药, 按制备方法 A 提取后浓缩, 离心, 上清液转移至 500 mL 量瓶中, 纯水定容, 备用。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1”项下各药液 9 mL, 加入无水乙醇 21 mL, 静置 24 h, 4500 r · min⁻¹ 离心 20 min, 精密吸取上清液 25 mL, 挥去乙醇, 蒸干, 加适量纯水溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 纯水定容至刻度, 摇匀, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 256.60 μg、隐绿原酸 176.20 μg、咖啡酸 121.80 μg、1, 3-二咖啡酰奎宁酸 575.00 μg、甘草苷 431.00 μg、异槲皮苷 44.40 μg、异绿原酸 B 118.00 μg、1, 5-二咖啡酰奎宁酸 324.00 μg、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 37.50 μg、异绿原酸 C 65.20 μg、异甘草苷 53.80 μg、槲皮素 25.85 μg、1-*O*-乙酰旋覆花内酯 92.80 μg、人参皂苷 Rb₁ 181.80 μg、甘草酸 237.20 μg、6-姜酚 45.90 μg 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.3 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 10%A; 5 ~ 10 min, 10% ~ 14%A; 10 ~ 15 min, 14%A; 15 ~ 30 min, 14% ~ 16%A; 30 ~ 32 min, 16% ~ 20%A; 32 ~ 35 min, 20%A; 35 ~ 45 min, 20% ~ 25%A; 45 ~ 50 min, 25%A; 50 ~ 60 min, 25% ~ 30%A; 60 ~ 62 min, 30%A; 62 ~ 65 min, 30% ~ 40%A; 65 ~ 70 min,

40%A; 70 ~ 75 min, 40% ~ 50%A; 75 ~ 80 min, 50%A; 80 ~ 85 min, 50% ~ 60%A; 85 ~ 90 min, 60%A); 流速 0.1 mL · min⁻¹; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL; 全波长扫描 200 ~ 400 nm, 提取二维图谱波长 203 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (A1), 按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以 5 号峰 (1, 3-二咖啡酰奎宁酸) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 并计算其 RSD 值。结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 均 ≤ 0.23%, 相对峰面积 RSD 均 ≤ 1.4%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一供试品溶液 (A1), 按“2.3”项下色谱条件分别进样, 记录色谱峰。以 5 号峰 (1, 3-二咖啡酰奎宁酸) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 并计算其 RSD 值。各共有峰的相对保留时间 RSD 均 ≤ 0.10%, 相对峰面积 RSD 均 ≤ 3.1%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (A1), 按“2.3”项下色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 分别进样, 记录色谱峰。以 5 号峰 (1, 3-二咖啡酰奎宁酸) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积, 并计算其 RSD 值。各共有峰的相对保留时间 RSD 值均 ≤ 0.24%, 相对峰面积 RSD 值均 ≤ 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立与共有峰的归属

取 15 批旋覆代赭汤药液和各单味药液, 按“2.2.1”项下方法制备后, 按“2.3”项下色谱条件进样测定。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版) 软件进行分析。以样品 A1 的指纹图谱作为参照图谱进行指纹匹配 (中位数法, 时间窗 0.1 min), 生成对照指纹图谱 R, 确定 23 个共有峰, 见图 1、2。15 批旋覆代赭汤指纹图谱与对照图谱的相似度分别为 0.986、0.989、0.988、0.927、0.960、0.960、0.983、0.987、0.987、0.981、0.988、0.982、0.940、0.940、0.926, 对照图谱间相似度大于 0.920, 表明所建立的指纹图谱稳定。比较对照品色谱图和紫外吸收光谱图, 指认出 16 个共有峰, 分别为绿原酸 (峰 1)、隐绿原酸 (峰 3)、咖啡酸 (峰 4)、1, 3-二咖啡酰奎宁酸 (峰 5)、甘草苷 (峰 7)、异槲皮苷 (峰 8)、异绿原酸 B (峰 11)、1, 5-二咖啡酰奎宁酸 (峰 12)、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 (峰 13)、异绿原酸 C (峰 15)、异甘草苷 (峰 16)、槲皮素 (峰 18)、1-*O*-乙酰旋覆花内酯 (峰 20)、人

参皂苷 Rb₁ (峰 21)、甘草酸 (峰 22)、6-姜酚 (峰 23)。共有峰归属如图 3 所示, 其中, 1、3、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20 号峰来自旋覆花; 2、6、7、16、22 号峰来自甘草; 17、21 号峰来自人参; 23 号峰来自生姜 (见图 3)。

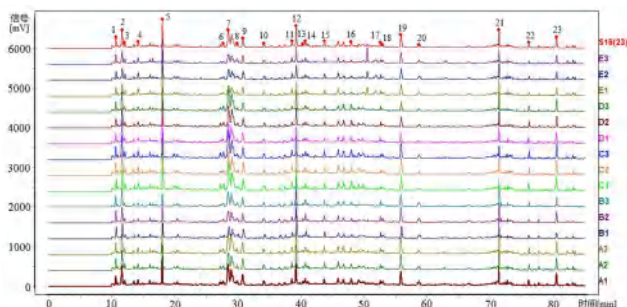


图 1 15 批旋覆代赭汤供试品 UPLC 指纹图谱及对照图谱 (R)
Fig 1 UPLC fingerprints and control fringerprint (R) of 15 batches of Xuanfu Daizhe decoction

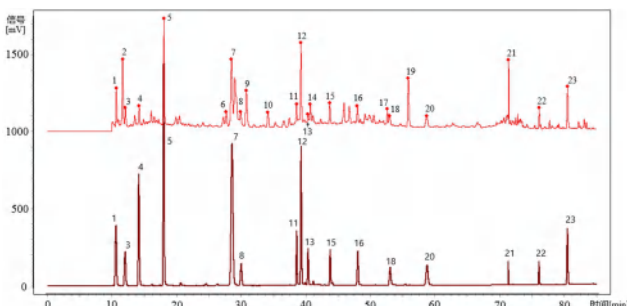


图 2 15 批旋覆代赭汤对照图谱 (A) 与混合对照品图谱 (B)
Fig 2 Control digram of 15 batches of Xuanfu Daizhe decoction (A) and mixed control (B)

注 (Note): 1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 4. 咖啡酸 (caffeic acid); 5. 1, 3-二咖啡酰奎宁酸 (1, 3-dicaffeoyl quinic acid); 7. 甘草苷 (liquiritin); 8. 异槲皮苷 (isoquercitrin); 11. 异绿原酸 B (isochlorogenic acid B); 12. 1, 5-二咖啡酰奎宁酸 (1, 5-dicaffeoyl quinic acid); 13. 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 (isorhamnein-3-O-glucoside); 15. 异绿原酸 C (isochlorogenic acid C); 16. 异甘草苷 (isoliquiritin); 18. 槲皮素 (quercetin); 20. 1-O-乙酰旋覆花内酯 (1-O-acetylinalactone); 21. 人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁); 22. 甘草酸 (glycyrrhizin); 23. 6-姜酚 (6-gingerol)。

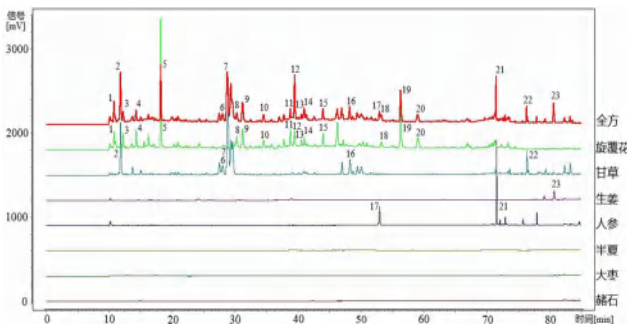


图 3 旋覆代赭汤全方与各单味药指纹图谱叠加图
Fig 3 Superposition of fingerprint of Xuanfu Daizhe decoction and each single medicine

2.6 化学识别模式

2.6.1 CA 将 15 批旋覆代赭汤供试品的共有峰面积录入 SPSS 26.0 软件, 并以此为变量, 进行标准化处理, 区间选择平方欧氏距离作为测量标准, 以组间连接方法进行系统聚类分析, 谱系图见图 4, 从图 4 中可以看出, 当平方欧氏距离为 5 时, 每种制备方法可聚为一类; 当平方欧氏距离为 15 时, 可根据提取次数聚为两类, 其中制备方法 B、D 和 E 均提取 1 次, 聚为一类, 方法 A 和 C 提取 2 次聚为一类, 说明提取次数可能对旋覆代赭汤质量的影响较大。

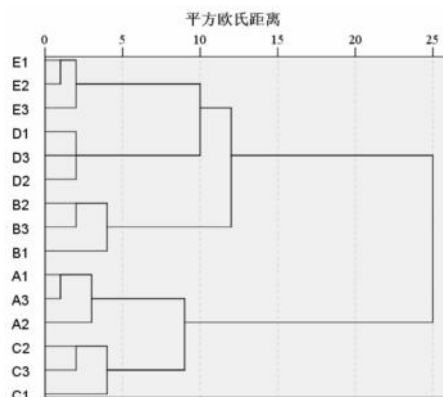


图 4 15 批旋覆代赭汤系统聚类谱系图
Fig 4 Clustering spectrum of 15 batches of Xuanfu Daizhe decoction system

2.6.2 OPLS-DA 为了进一步比较 15 批旋覆代赭汤样品的差异, 并寻找各批次间的差异性质量标志物, 利用 SIMCA 14.1 进行 OPLS-DA 建模分析。OPLS-DA 模型中, R^2X 为 0.955, R^2Y 为 0.882, Q^2 为 0.752, 说明所建立的模型有良好的预测性。得分图见图 5, 制备方法 B、D 和 E 在中线左侧, 制备方法 A 和 C 在中线右侧, 聚类结果与 CA 一致。变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 值可直观反映出有统计学意义的差异性质量标志物, 结果见图 6, 一般以 VIP 值 > 1 作为筛选标准, 则由大到小为峰 20、17、21、12、1、19, 其中, 通过对照品指认出的有 4 个成分, 为 1-O-乙酰旋覆花内酯 (峰 20)、人参皂苷 Rb₁ (峰 21)、1, 5-二咖啡酰奎宁酸 (峰 12)、绿原酸 (峰 1), 这些成分是影响旋覆代赭汤样品分类的主要原因, 具有标志性作用。

2.7 网络药理学对旋覆代赭汤质量标志物成分作用靶点通路预测分析

2.7.1 标志性成分作用靶点预测 将上述 4 个成分在 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中查询其化学结构, 下载 SDF 格式的化学结构图或 Smiles 格式, 将其导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>), 选择物种

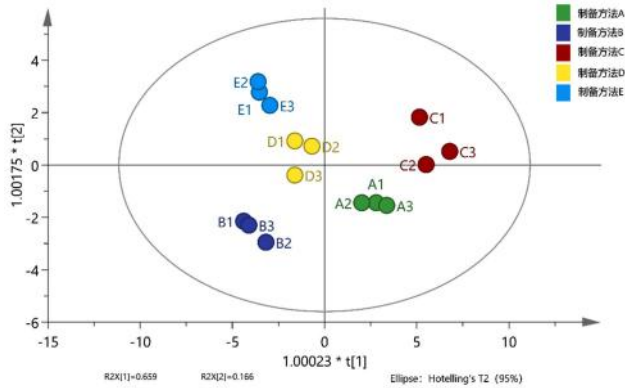


图 5 15 批旋覆代赭汤样品 OPLS-DA 得分图
Fig 5 Scores of 15 batches of Xuanfu Daizhe decoction samples by orthogonal partial least square method and discriminant analysis

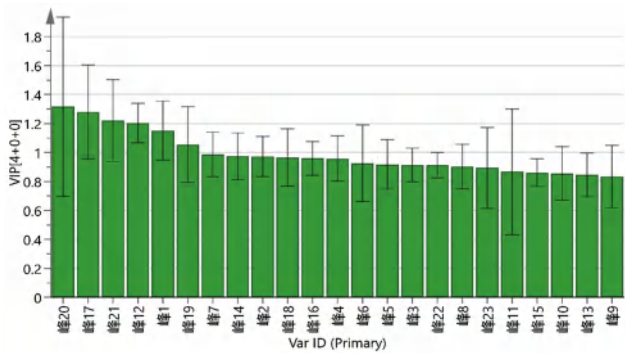


图 6 15 批旋覆代赭汤各成分 VIP 值图
Fig 6 VIP value of each component of Xuanfu Daizhe decoction in 15 batches

为 *Homo sapiens*, 筛选排名前 100 且 Probability > 0 的作用靶点作为这些成分的潜在靶点, 将各成分所有潜在靶点合并, 删除重复值, 共得到 152 个成分作用靶点。

以“reflux esophagitis”为关键词, 在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中搜索获得疾病靶点 3348 个。利用在线韦恩图网站 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), 将旋覆代赭汤成分作用靶点和疾病靶点取交集, 获得 72 个交集。

2.7.2 PPI 网络的构建 将上述 72 个交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 选择“high confidence (0.400)”, 导出文件。随后导入 Cytoscape 软件进行可视化并分析其拓扑属性参数, 网络中各节点的 Degree 值中位数为 10, 筛选 Degree 值排名前 20 的靶点, 见表 1, 作为旋覆代赭汤起效的关键靶点。

2.7.3 “成分-靶点-通路”网络构建 利用 R 语言对关键靶点进行 KEGG 通路富集分析并进行可视化, 以 $P < 0.05$ 进行筛选, 共获得 129 条通路。按 P 值从小到大排序, 取前 20 条通路作为关键信号通路。随后将 4 个成分(绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸、1-*O*-乙酰旋覆花内酯、人参皂

表 1 旋覆代赭汤的关键作用靶点

靶点	连接度	中介中心性	节点紧密度
EGFR	40	0.147	0.687
STAT3	38	0.072	0.667
PTGS2	35	0.115	0.642
HSP90AA1	34	0.071	0.624
GSK3B	30	0.066	0.618
PARP1	27	0.047	0.576
BCL2L1	27	0.012	0.581
FGF2	27	0.027	0.576
MMP2	26	0.038	0.581
MAPK1	26	0.042	0.581
IL2	23	0.019	0.553
APP	22	0.054	0.571
AR	22	0.039	0.562
MAPK14	22	0.024	0.562
MAP2K1	21	0.005	0.535
HMOX1	20	0.014	0.548
PGR	20	0.015	0.553
CDK1	19	0.008	0.531
MAPK8	19	0.004	0.544
JAK2	19	0.005	0.523

苷 Rb₁)、20 个关键靶点及 20 条关键信号通路导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 绘制“成分-靶点-通路网络”, 见图 7。该网络包含 43 个节点, 158 条边, 从图 7 中可以看出, 4 个成分可分别作用于 20 个关键靶点, 通过 20 条关键信号通路发挥共同作用, 说明这 4 个活性成分在旋覆代赭汤中通过多靶点多通路发挥治疗作用。

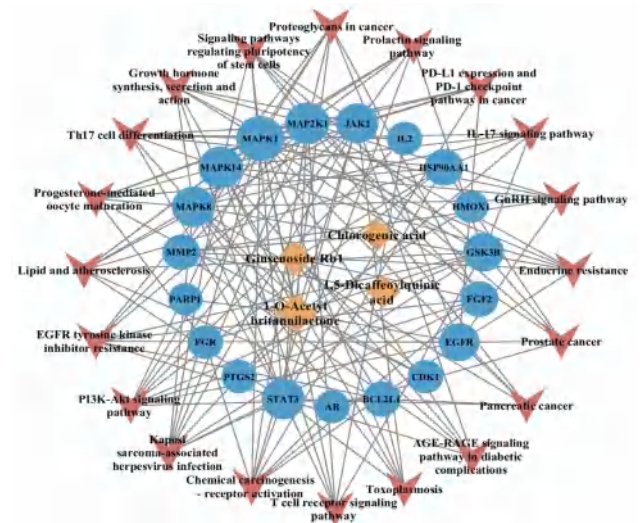


图 7 “成分-靶点-通路”网络图
Fig 7 Network diagram of “component-target-pathway”

2.8 细胞实验验证

2.8.1 细胞培养^[11] 小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(简称“完全培养基”), 于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.8.2 Western blot 法检测关键靶点蛋白表达 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 过夜培养后分为对照组、模型组、给药组, 对照组加入完全培养基 2 mL, 模型组加入完全培养基 2 mL 和含 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的完全培养基溶液 2 mL, 各给药组分别加入含旋覆代赭汤药液的完全培养基稀释液(按制备方法 A 制备, 按全方生药量计, 9500、4750、950 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2 mL 和含 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的完全培养基溶液 2 mL, 培养 24 h 后, 弃掉培养基, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入适量蛋白裂解液, 裂解 30 min 后, 4°C 、12 000 g 离心 30 min, 取上清液, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 加入适量细胞裂解液调整蛋白浓度, 再加入 $6 \times \text{SDS-PAGE}$ Loading buffer, 于 97°C 金属浴中煮沸 10 min 使蛋白变性, 8% SDS-PAGE 凝胶电泳并转于

PVDF 膜上, 快速封闭液封闭 1 h 后, 分别使用 p-JAK2 (1 : 1000)、p-STAT3 (1 : 1000)、GAPDH (1 : 4000) 的抗体, 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 5 次, 二抗在室温下孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次, ECL 显影。

结果通过 Image J 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理, 各组数据均进行正态性检验, 符合正态分布, 组间比较采用单因素 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 表示两组之间差异具有统计学意义。结果见图 8, 结果表明, 与对照组相比, 模型组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 9500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 4750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), 950 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组蛋白表达有所下降但差异无统计学意义。

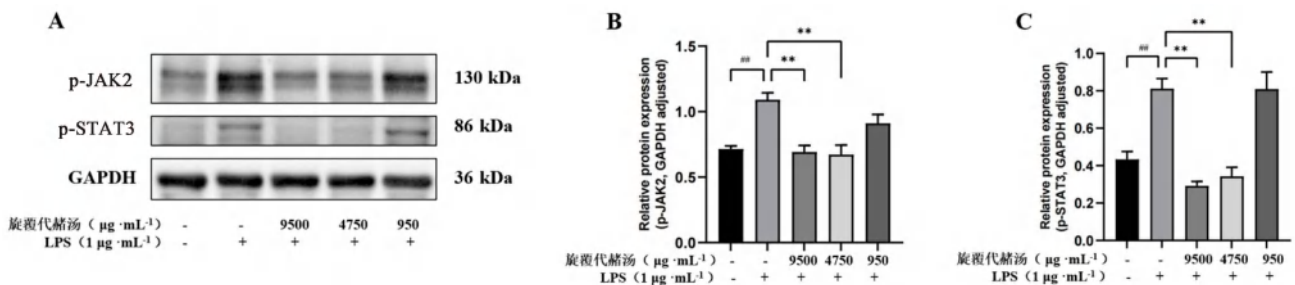


图 8 旋覆代赭汤对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 p-JAK2 及 p-STAT3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 8 Effect of Xuanfu Daizhe decoction on p-JAK2 and p-STAT3 expression in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注 (Note): 与对照组相比, $^{###}P < 0.01$; 与模型组相比, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the control group, $^{###}P < 0.01$; compared with the model group, $^{**}P < 0.01$).

3 讨论

本研究建立了 15 批不同制备方法下旋覆代赭汤的 UPLC 指纹图谱。人参皂苷类成分和 1-O-乙酰旋覆花内酯仅在 210 nm 以下有较强紫外吸收, 故选择 203 nm 提取二维图谱, 同时选择乙腈-磷酸水溶液系统作为流动相以消除流动相紫外末端吸收的影响。23 个共有峰中 15 个峰来源于旋覆花, 说明君药旋覆花对全方的质量控制较为重要, 其中 11 个指认出的成分分别为酚酸类、黄酮类以及倍半萜类成分; 5 个峰来源于甘草, 指认出 3 个成分, 分别为黄酮类和三萜皂苷类成分; 2 个峰来源于人参, 指认出 1 个皂苷类成分; 还有 1 个峰来源于生姜, 为姜酚类成分。

本研究通过指纹图谱与化学模式识别相结合, 挖掘出不同制备方法下 4 个质量差异标志性成分, 其中, 绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸是咖啡酰奎宁酸类成分, 具有抗氧化、抗菌消炎、抗肿瘤、抗病毒等多种明确的生物活性, 但这类成分不稳定, 在提取过程中会发生异构化^[12], 在质量控制中需加以关注; 1-O-乙酰旋覆花内酯

为倍半萜类化合物, 是旋覆花中代表性成分, 也是体现旋覆花药理价值的重要成分, 具有抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等生物活性作用^[13-14]。人参皂苷 Rb₁ 是人参的标志性成分, 对中枢神经系统、心血管系统、免疫系统等方面均有较好的作用^[15]。

随后, 通过构建 4 个质量标志性成分治疗 RE 的潜在作用靶点 PPI 网络, 得到 EGFR、STAT3、MAPK1、MAPK14、JAK2 等关键靶点, 可能在旋覆代赭汤对 RE 的治疗中起重要作用。EGFR 属于酪氨酸激酶受体, 广泛存在于人及哺乳动物的胃肠黏膜, 可促进胃肠黏膜增殖、发育及修复, 减少胃酸分泌等, 汪涛等^[16]发现 EGFR mRNA 在 RE 病程中逐渐增强, 其强度与病变的严重程度一致。STAT3、JAK2 是 JAK/STAT 信号通路的重要靶点, JAK/STAT 信号通路是一种广泛表达的细胞内信号传导通路, 可将来自细胞外的化学信号传递给细胞核, 导致与细胞增殖、分化、损伤、凋亡、氧化应激、炎症反应及免疫调节等许多相关重要基因 DNA 的转录和生物学表达^[17-18]。MAPK1 (ERK)、

MAPK14 (p38 MAPK) 属于 MAP 激酶家族, 参与细胞凋亡、炎症和转录调节等各种过程, 有研究表明, 抑制 p38 MAPK 通路可以减轻 RE 模型大鼠的食道黏膜损伤^[19]。通过以上分析推测, 旋覆代赭汤可能通过多靶点干预炎症反应、氧化应激、黏膜修复、细胞凋亡等机制来治疗 RE。本研究进一步通过细胞实验在 LPS 对巨噬细胞 RAW264.7 的经典炎症模型中初步验证旋覆代赭汤对 STAT3 和 JAK2 靶点的作用, 结果显示旋覆代赭汤可显著抑制 STAT3 及 JAK2 蛋白的磷酸化。

中药 Q-Marker 基于中药生物属性、制备过程和配伍理论等中医药自身体系特点, 以“中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分”为核心理论, 包括中药有效性、特有性、定性定量可测、质量传递溯源、遵循中医理论 5 个原则。本研究应用 UPLC 指纹图谱指出不同制备方法下旋覆代赭汤的共有峰并确定其来源, 结合化学模式识别预测其 Q-Marker, 体现出五原则的可测性、特有性、可溯源性, 应用网络药理学预测 Q-Marker 的关键靶点和关键信号通路, 并用细胞实验进行了简单的验证, 从而体现了五原则的有效性。因此, 本研究筛选出的绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸、1-O-乙酰旋覆花内酯和人参皂苷 Rb₁, 可初步预测为旋覆代赭汤的 Q-Marker 进行后续实验。

参考文献

- [1] 李莎莎, 侯酉娟, 张磊, 等. 经典名方旋覆代赭汤历史沿革探析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (15): 4033-4041.
- [2] 柳媛, 刘菊, 刘亚婷, 等. 旋覆代赭汤对 RE 模型大鼠 NLRP3/Caspase-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (20): 13-18.
- [3] 刘亚婷, 刘菊, 苗嘉萌, 等. 旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠模型 TLR4/NF- κ B 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 25 (20): 80-84.
- [4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47 (9): 1443-1457.
- [5] 徐园园, 王明慧, 魏永利, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 的科学计量分析[J]. 中草药, 2024, 55 (4): 1297-1308.
- [6] 阳长明, 杨平, 刘乐环, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究进展及对中药质量研究的思考[J]. 中草药, 2021, 52 (9): 2519-2526.
- [7] 薛蓉, 张倩, 陈鹏, 等. 中药饮片质量标志物 (Q-Marker) 研究策略[J]. 中草药, 2022, 53 (5): 1285-1293.
- [8] 胡云莉, 陈桢, 慎凯峰, 等. 不同产地济川煎 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究[J]. 中国现代中药, 2023, 25 (12): 2612-2618.
- [9] 李君, 张谦, 王跃武, 等. 基于 HPLC-MS/MS 和化学模式识别分析的蒙药那如-3 味丸质量评价[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44 (11): 1277-1284.
- [10] 冯月, 段飞鹏, 李一圣, 等. 不同产地金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究[J]. 中国药房, 2021, 32 (15): 1825-1830.
- [11] 李思媛, 崔玉顺, 李新星, 等. 黄精皂苷对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 中成药, 2021, 43 (10): 2659-2665.
- [12] 张雪, 郭东晓, 崔伟亮, 等. 金银花炮制前后咖啡酰奎宁酸类成分变化[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57 (16): 1337-1343.
- [13] 杨振. 欧亚旋覆花活性成分的纯化及其对肝损伤的保护作用机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [14] 西鹏华, 饶堃睿, 林静, 等. 一氧乙酰旋覆花内酯对缺氧心肌细胞的作用研究[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45 (1): 48-53.
- [15] 杨秋娅, 李晓宇, 刘皋林. 人参皂苷 Rb₁ 的药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48 (15): 1233-1237.
- [16] 汪涛, 马海琳, 王鸿雁, 等. 反流食管炎组织 EGFR 与 ODC 及 CDH mRNA 表达与食管癌变相关性探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19 (18): 1365-1367, 1371.
- [17] You XL, Jiang XY, Zhang CM, et al. Dihydroartemisinin attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in rats by suppressing JAK2/STAT3 signaling[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14 (3): 1110-1127.
- [18] Bousoik E, Montazeri HA. "Do We Know Jack" about JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway[J]. Front Oncol, 2018, 8: 287.
- [19] 柳刚. p38MAPK 在 GERD 发生发展过程中的作用和机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2015.

(收稿日期: 2024-06-02; 修回日期: 2024-07-22)

珠子参叶化学成分研究

唐家美, 但林蔚, 吴莹, 刘亚斌, 姜祎, 王薇, 李玉泽, 张东东*, 宋小妹* (陕西中医药大学药学院, 陕西省太白七药研究与应用重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 研究五加科人参属植物珠子参 (*Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng.) 叶的化学成分。**方法** 采用大孔树脂、MCI、硅胶柱色谱、半制备液相等手段对珠子参叶 70% 乙醇部位进行了精细的分离与纯化。然后, 利用 1D/2D-NMR、高分辨质谱等多种波谱技术, 依据其理化特性, 来确认该化合物的结构。**结果** 分离鉴定得到 10 个化合物, 分别为 20 (*R*)-原人参三醇 (1)、20 (*R*)-人参三醇 (2)、20 (*R*)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-戊醇 (3)、达玛-20 (22) *E*, 24-二烯-3 β , 6 α , 12 β -三醇 (4)、达玛-20 (22) *Z*, 24-二烯-3 β , 6 α , 12 β -三醇 (5)、27-demethyl- (*E, E*)-20 (22), 23-dien-3 β , 6 α , 12 β -trihydroxydammar-25-one (6)、3 β , 6 α , 12 β -triol-22, 23, 24, 25, 26, 27-hexanordammaran-20-one (7)、山柰酚 (8)、5-羟甲基-2-呋喃甲醛 (9)、4-甲氧基苯酚 (10)。**结论** 化合物 2、3、6 ~ 10 为首次从珠子参中分离鉴定。

关键词: 珠子参叶; 分离纯化; 三萜

中图分类号: R282, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0385-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.015

Chemical constituents in the leaves of *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng.

TANG Jia-mei, DAN Lin-wei, WU Ying, LIU Ya-xiao, JIANG Yi, WANG Wei, LI Yu-ze, ZHANG Dong-dong*, SONG Xiao-mei* (School of Pharmacy, Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of "Taibai Qi Yao", Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents in the leaves of *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng of *ginseng* genus *Panax* in the family Wujiaceae. **Methods** The isolation and purification of 70% ethanol part were conducted with macroporous resin, MCI, silica gel column chromatography, and semi-preparative liquid chromatography. The structures were identified according to the physicochemical properties and the spectroscopic techniques, such as 1D/2D-NMR, mass spectrometry and so on. **Results** Totally 10 compounds were obtained and identified as 20 (*R*)-protopanaxatriol (1), 20 (*R*)-panaxatriol (2), 20 (*R*)-dammarane-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-pentanol (3), dammar-20 (22) *E*, 24-diene-3 β , 6 α , 12 β -triol (4), dammar-20 (22)*Z*, 24-diene-3 β , 6 α , 12 β -triol (5), 27-dimethyl- (*E, E*)-20 (22), 23-dien-3 β , 6 α , 12 β -trihydroxydammar-25-one (6), 3 β , 6 α , 12 β -triol-22, 23, 24, 25, 26, 27-hexanordammaran-20-one (7), kaempferol (8), 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (9), and 4-methoxyphenol (10). **Conclusion** Compounds 2, 3 and 6 ~ 10 have been isolated for the first time from *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng.

Key words: *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng; separation and purification; triterpene

基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目 (No.2018ZDXM-SF-007); 陕西中医药大学创新团队项目 (No.2023-CXTD-05)。

作者简介: 唐家美, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药提取分离分析技术与应用方面的研究, email: 1514205292@qq.com

*通信作者: 张东东, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础方面的研究, email: zhangnatprod@163.com; 宋小妹, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中草药药效物质基础及炮制机理方面的研究, email: songxiaom@126.com

珠子参叶为五加科植物珠子参 [*Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng] 或羽叶三七 [*Panax pseudoginseng* Wall. var. *bipinnatifidus* (Seem.) Li] 的干燥带茎叶^[1], 性凉, 味微甘, 其原植物珠子参为“太白七药”中的重要品种, 俗称“扣子七”“钮子七”等, 植物分布于陕西、四川、云南等地, 并被收录于《中国药典》。珠子参叶, 又名汉中参叶, 民间常泡茶饮用, 具有清肺润燥、生津止渴、润喉防暑、滋补强身等功效^[2-3]。珠子参叶主要包含达玛烷型三萜皂苷类化合物, 珠子参的地上部分研究较少, 开发和利用价值较高^[4-8]。近代药理学研究表明, 珠子参中的皂苷类化合物和提取物具有良好的活性, 包括护肝、抗肿瘤、降血脂、保护心脏、抗缺血性脑损伤、抗氧化、抗炎镇痛及抗凝血作用等^[9-10]。

目前已从珠子参叶中陆续分离出一系列达玛烷型三萜^[7, 11-12], 秦巴山区珠子参叶资源丰富, 为更合理地开发利用, 本研究对珠子参叶乙醇提取物进行系统分离, 探索 70% 乙醇部位小极性成分的化合物类型, 丰富其化合物库, 共有 10 个单体化合物从中分离鉴定出, 其中化合物 2、3、6~10 为从珠子参植物中首次分离鉴定。

1 材料

LC-6AD 型半制备液相色谱仪 (岛津公司); 柱色谱硅胶 (青岛海湾精细化工有限公司); 薄层硅胶板 (烟台江友硅胶发展有限公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia 精细化工有限公司); YMC-Pack Pro C₁₈ 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm); AVANCE 型核磁共振波谱仪 (Burker 公司); DLSB series 型低温冷凝循环泵 (郑州长城科工贸公司); 超声波清洗器 KQ-250E (昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平 BT-125D (德国 Sartorius 公司); 电热恒温水浴锅 DK-824 (上海精宏实验设备); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

珠子参叶药材于 2021 年 9 月采自陕西宝鸡太白山地区, 经陕西中医药大学王薇教授鉴定为五加科人参属植物珠子参 [*Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng] 的干燥带茎叶, 标本 (编号: 20210901) 保存于陕西中医药大学植物标本馆。

2 提取与分离

珠子参叶药材 3.5 kg 经 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 减压回收溶剂, 用大孔树脂 (水、30% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇) 洗脱纯化得到 70% 乙醇部位 (190 g), 将 70% 乙醇部位用硅胶

柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (1:0→0:1) 梯度洗脱, 经 TLC 检识, 合并相同组分, 得到 4 个组分 (Fr.1~4)。Fr.1 (12.5 g) 采用 Sephadex-LH-20 凝胶柱色谱除掉色素, 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (80:1→5:1) 梯度洗脱, 合并相同组分得 Fr.1-1~Fr.1-4。Fr.1-1 (3.31 g) 经凝胶柱色谱纯化、甲醇反复结晶得化合物 1 (2.3 g) 和 2 (600 mg), 结晶后母液经半制备液相分离, 乙腈-水 (65:35) 洗脱, 得化合物 6 ($t_R = 42$ min, 10.4 mg); Fr.1-3 (3.65 g) 经凝胶柱色谱纯化、甲醇反复结晶得化合物 3 (302 mg), 结晶后母液经半制备液相分离, 乙腈-水 (65:35) 洗脱, 得化合物 7 ($t_R = 55$ min, 30.5 mg); Fr.1-4 (1.2 g) 经凝胶柱色谱纯化、甲醇反复结晶得化合物 8 (8.3 mg), 结晶后母液经半制备液相分离, 乙腈-水 (55:45) 洗脱, 得化合物 9 ($t_R = 40$ min, 6.6 mg)。Fr.2 (35.14 g) 采用硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (60:1→3:1) 梯度洗脱, 合并相同组分得 Fr.2-1 和 Fr.2-2。Fr.2-1 (15.03 g) 经半制备液相分离, 乙腈-水 (65:35) 洗脱, 得化合物 4 ($t_R = 35$ min, 14 mg) 和化合物 5 ($t_R = 38$ min, 7.2 mg)。Fr.4 (16.01 g) 采用硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (40:1→3:1) 梯度洗脱, 合并相同组分得 Fr.4-1~Fr.4-4。Fr.4-1 (1.66 g) 经半制备液相分离, 乙腈-水 (50:50) 洗脱, 得化合物 10 ($t_R = 18$ min, 6.6 mg)。分离所得化合物结构见图 1。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 477.4 ($[M + H]^+$), ¹H-NMR (400 MHz, C₃D₅N) δ : 1.42 (2H, m, H-1), 1.71 (2H, m, H-2), 3.55 (1H, m, H-3), 0.94 (1H, m, H-5), 4.46 (1H, m, H-6), 1.47 (2H, m, H-7), 0.94 (1H, m, H-9), 1.57 (2H, m, H-11), 3.99 (1H, m, H-12), 1.04 (1H, m, H-13), 1.38 (2H, m, H-15), 1.78 (2H, m, H-16), 1.23 (1H, m, H-17), 1.42 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 1.71 (3H, s, H-21), 1.40 (2H, m, H-22), 1.94 (2H, m, H-23), 5.32 (1H, m, H-24), 1.66 (3H, s, H-26), 1.48 (3H, s, H-27), 2.03 (3H, s, H-28), 1.18 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-30); ¹³C-NMR (100 MHz, C₃D₅N) δ : 39.7 (C-1), 28.5 (C-2), 78.8 (C-3), 40.8 (C-4), 62.1 (C-5), 68.1 (C-6), 48.0 (C-7), 41.6 (C-8), 50.5 (C-9), 39.7 (C-10), 32.6 (C-11), 71.3 (C-12), 49.3 (C-13), 52.0 (C-14), 31.8 (C-15), 27.0 (C-16), 51.0 (C-17), 17.8 (C-18), 17.9 (C-19), 3.4 (C-20),

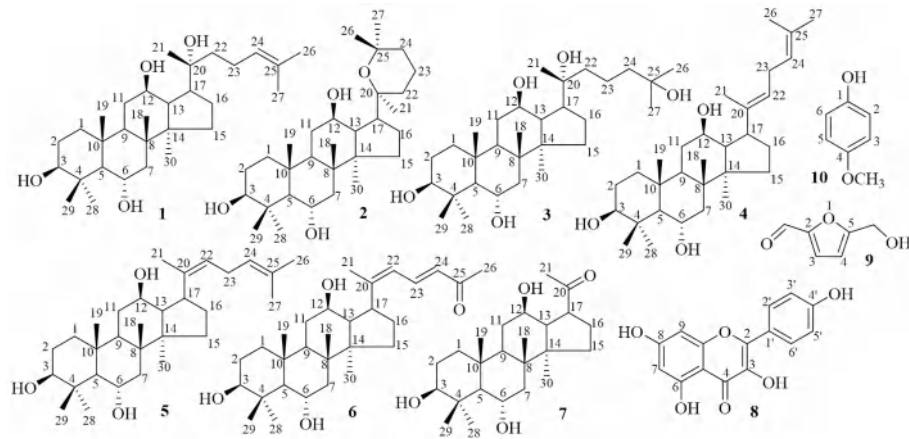


图 1 珠子参叶中化合物 1~10 化学结构

Fig 1 Structures of compounds 1~10 isolated from *Panax japonicus*

23.1 (C-21), 43.6 (C-22), 23.1 (C-23), 126.4 (C-24), 131.1 (C-25), 26.2 (C-26), 18.0 (C-27), 32.3 (C-28), 16.9 (C-29), 17.7 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 因此鉴定化合物 1 为 20(R)-原人参三醇。

化合物 2: 白色针晶(甲醇), ESI-MS m/z : 477.5 ($[M+H]^+$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.58 (1H, m, H-1a), 1.32 (1H, m, H-1b), 1.73 (1H, m, H-2a), 1.47 (1H, m, H-2b), 3.55 (1H, m, H-3), 0.94 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-5), 4.44 (1H, m, H-6), 1.59 (1H, m, H-7a), 1.34 (1H, m, H-7b), 1.56 (1H, m, H-9), 1.59 (2H, m, H-11), 3.77 (1H, m, H-12), 1.04 (1H, s, H-13), 1.37 (2H, m, H-15), 1.83 (2H, m, H-16), 1.41 (1H, s, H-17), 1.26 (3H, s, H-18), 1.04 (3H, s, H-19), 1.47 (3H, s, H-21), 1.57 (2H, m, H-22), 1.72 (2H, m, H-23), 1.60 (1H, m, H-24a), 1.37 (1H, m, H-24b), 1.38 (3H, s, H-26), 1.27 (3H, s, H-27), 2.01 (3H, s, H-28), 1.15 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 39.3 (C-1), 28.2 (C-2), 78.4 (C-3), 39.4 (C-4), 61.9 (C-5), 67.8 (C-6), 47.5 (C-7), 41.2 (C-8), 50.1 (C-9), 40.4 (C-10), 32.2 (C-11), 70.6 (C-12), 48.9 (C-13), 52.2 (C-14), 32.0 (C-15), 26.6 (C-16), 52.5 (C-17), 7.7 (C-18), 17.3 (C-19), 78.2 (C-20), 18.0 (C-21), 36.7 (C-22), 16.5 (C-23), 36.7 (C-24), 74.0 (C-25), 32.8 (C-26), 27.3 (C-27), 32.0 (C-28), 16.5 (C-29), 16.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 因此鉴定化合物 2 为 20(R)-人参三醇。

化合物 3: 白色粉末, ESI-MS m/z : 493.6 ($[M-H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.43 (2H, m, H-1), 1.60 (2H, m, H-2), 3.53 (1H, m,

H-3), 0.97 (1H, m, H-5), 4.44 (1H, m, H-6), 1.48 (2H, m, H-7), 0.91 (1H, m, H-9), 1.53 (2H, m, H-11), 3.96 (1H, m, H-12), 1.14 (1H, m, H-13), 1.39 (2H, m, H-15), 1.81 (2H, m, H-16), 1.28 (1H, m, H-17), 1.43 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 1.47 (3H, s, H-21), 1.47 (2H, m, H-22), 1.37 (2H, m, H-23), 1.39 (2H, m, H-24), 1.43 (3H, s, H-26), 1.43 (3H, s, H-27), 2.00 (3H, s, H-28), 1.18 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 39.3 (C-1), 28.1 (C-2), 78.4 (C-3), 40.3 (C-4), 61.8 (C-5), 67.7 (C-6), 47.5 (C-7), 41.2 (C-8), 50.1 (C-9), 39.3 (C-10), 32.0 (C-11), 70.9 (C-12), 48.9 (C-13), 51.7 (C-14), 31.4 (C-15), 26.7 (C-16), 50.8 (C-17), 17.5 (C-18), 17.4 (C-19), 73.4 (C-20), 22.8 (C-21), 44.0 (C-22), 18.7 (C-23), 45.6 (C-24), 69.7 (C-25), 29.9 (C-26), 30.4 (C-27), 32.1 (C-28), 16.5 (C-29), 17.8 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 3 为 20(R)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-戊醇。

化合物 4: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 457.4 ($[M-H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.43 (2H, m, H-1), 1.56 (2H, m, H-2), 3.54 (1H, m, H-3), 1.03 (1H, m, H-5), 4.43 (1H, m, H-6), 1.47 (2H, m, H-7), 1.02 (1H, m, H-9), 1.62 (2H, m, H-11), 3.96 (1H, m, H-12), 1.25 (1H, m, H-13), 1.44 (2H, m, H-15), 1.62 (2H, m, H-16), 2.11 (1H, m, H-17), 1.18 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, s, H-19), 1.84 (3H, s, H-21), 5.24 (1H, t, $J=6.7$ Hz, H-22), 2.71 (2H, m, H-23), 5.50 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-24), 1.64 (3H, s, H-26), 1.59 (3H, s, H-27), 1.47 (3H, s, H-28), 2.01 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR

(100 MHz, C_5D_5N) δ : 39.5 (C-1), 28.2 (C-2), 78.4 (C-3), 40.0 (C-4), 61.9 (C-5), 67.7 (C-6), 47.7 (C-7), 41.5 (C-8), 50.4 (C-9), 40.4 (C-10), 32.7 (C-11), 72.6 (C-12), 50.7 (C-13), 50.9 (C-14), 32.3 (C-15), 28.9 (C-16), 50.5 (C-17), 17.7 (C-18), 17.1 (C-19), 140.1 (C-20), 13.2 (C-21), 123.1 (C-22), 27.5 (C-23), 123.5 (C-24), 131.3 (C-25), 26.1 (C-26), 17.5 (C-27), 32.0 (C-28), 17.7 (C-29), 16.5 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 因此鉴定化合物 **4** 为达玛-20 (22) *E*, 24-二烯-3 β , 6 α , 12 β -三醇。

化合物 **5**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 457.4 ($[M - H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.53 (2H, m, H-1), 2.01 (2H, m, H-2), 3.53 (1H, m, H-3), 1.19 (1H, m, H-5), 4.44 (1H, m, H-6), 1.76 (2H, m, H-7), 1.07 (1H, m, H-9), 1.74 (2H, m, H-11), 3.96 (1H, m, H-12), 1.45 (1H, m, H-13), 1.51 (2H, m, H-15), 1.49 (2H, m, H-16), 2.31 (1H, m, H-17), 1.18 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, s, H-19), 1.94 (3H, s, H-21), 5.26 (1H, t, H-22), 2.77 (2H, m, H-23), 5.73 (1H, brs, H-24), 1.67 (3H, s, H-26), 1.65 (3H, s, H-27), 2.00 (3H, s, H-28), 1.47 (3H, s, H-29), 1.00 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 39.5 (C-1), 28.2 (C-2), 78.4 (C-3), 40.2 (C-4), 61.9 (C-5), 67.7 (C-6), 47.7 (C-7), 41.5 (C-8), 50.4 (C-9), 40.4 (C-10), 32, 7 (C-11), 72.6 (C-12), 51.0 (C-13), 51.1 (C-14), 32.3 (C-15), 28.6 (C-16), 50.9 (C-17), 17.7 (C-18), 17.1 (C-19), 140.0 (C-20), 19.4 (C-21), 123.8 (C-22), 27.5 (C-23), 124.6 (C-24), 130.9 (C-25), 25.8 (C-26), 17.5 (C-27), 32.0 (C-28), 16.5 (C-29), 17.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 因此鉴定化合物 **5** 为达玛-20 (22) *Z*, 24-二烯-3 β , 6 α , 12 β -三醇。

化合物 **6**: 白色非晶粉末, ESI-MS m/z : 481.3 ($[M + Na]^+$), 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.65 (1H, m, H-1a), 1.01 (1H, m, H-1b), 1.94 (1H, m, H-2a), 1.90 (1H, m, H-2b), 3.55 (1H, dd, $J = 10.6, 5.2$ Hz, H-3), 1.26 (1H, m, H-5), 4.43 (1H, m, H-6), 2.02 (1H, m, H-7a), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.61 (1H, m, H-9), 2.11 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-11b), 4.03 (1H, m, H-12), 1.22 (1H, m, H-13), 1.46 (1H, m, H-15a), 1.06 (1H, m, H-15b), 1.73 (1H, m,

H-16a), 1.23 (1H, m, H-16b), 2.73 (1H, m, H-17), 0.96 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19), 1.95 (3H, s, H-21), 6.14 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-22), 7.57 (1H, dd, $J = 15.3, 11.5$ Hz, H-23), 6.04 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-24), 2.26 (3H, s, H-26), 1.29 (3H, s, H-28), 1.13 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 40.2 (C-1), 27.8 (C-2), 79.5 (C-3), 42.3 (C-4), 62.2 (C-5), 68.9 (C-6), 47.5 (C-7), 40.5 (C-8), 51.4 (C-9), 40.2 (C-10), 33.6 (C-11), 73.1 (C-12), 52.0 (C-13), 52.5 (C-14), 32.9 (C-15), 30.3 (C-16), 52.2 (C-17), 17.2 (C-18), 17.8 (C-19), 158.2 (C-20), 14.8 (C-21), 124.7 (C-22), 142.9 (C-23), 128.7 (C-24), 202.0 (C-25), 27.1 (C-26), 31.5 (C-28), 16.1 (C-29), 17.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为 27-demethyl- (*E, E*)-20 (22), 23-dien-3 β , 6 α , 12 β -trihydroxydammar-25-one。

化合物 **7**: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 415.3 ($[M + Na]^+$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 1.57 (2H, m, H-1), 1.62 (2H, m, H-2), 3.56 (1H, m, H-3), 1.24 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-5), 4.41 (1H, m, H-6), 1.54 (2H, m, H-7), 1.02 (1H, m, H-9), 1.62 (2H, m, H-11), 3.87 (1H, m, H-12), 1.39 (1H, m, H-13), 1.47 (2H, m, H-15), 1.69 (2H, m, H-16), 2.29 (1H, m, H-17), 1.46 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19), 2.42 (3H, s, H-21), 2.02 (3H, s, H-28), 1.12 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-30); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 39.4 (C-1), 28.2 (C-2), 78.4 (C-3), 39.5 (C-4), 61.8 (C-5), 67.6 (C-6), 47.9 (C-7), 41.3 (C-8), 50.8 (C-9), 40.4 (C-10), 33.0 (C-11), 71.3 (C-12), 54.6 (C-13), 51.5 (C-14), 32.9 (C-15), 27.7 (C-16), 52.8 (C-17), 17.4 (C-18), 17.7 (C-19), 213.4 (C-20), 30.6 (C-21), 32.0 (C-28), 16.5 (C-29), 17.0 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **7** 为 3 β , 6 α , 12 β -triol-22, 23, 24, 25, 26, 27-hexanordammaran-20-one。

化合物 **8**: 黄色粉末, ESI-MS m/z : 285.0 ($[M - H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.18 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 8.09 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 148.1 (C-2), 137.2 (C-3), 177.5 (C-4), 158.3 (C-5), 99.3 (C-6), 165.7 (C-7), 94.5 (C-8), 162.6 (C-9), 104.6 (C-10),

123.8 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 116.4 (C-3', 5'), 160.6 (C-4')。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为山柰酚。

化合物 **9**: 浅黄色油状物, ESI-MS m/z : 125.0 ($[M - H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 7.32 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3), 6.64 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-4), 9.72 (1H, s, H-CHO), 4.88 (2H, s, H-CH₂); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 152.6 (C-2), 124.4 (C-3), 109.4 (C-4), 163.0 (C-5), 177.5 (C-CHO), 56.9 (C-CH₂)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **9** 为 5-羟甲基-2-呋喃甲醛。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 123.1 ($[M - H]^-$), 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ : 8.20 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 7.21 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 3.03 (3H, s, H-1-OMe); ^{13}C -NMR (100 MHz, C_5D_5N) δ : 128.4 (C-1), 129.8 (C-2, 6), 115.9 (C-3, 5), 156.8 (C-4), 57.7 (C-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **10** 为 4-甲氧基苯酚。

4 讨论

珠子参分布范围广泛, 国内分布在陕西、云南等省份, 国外分布于日本、尼泊尔等亚洲国家, 由于资源稀缺、药用价值高, 人们过度采挖和利用造成珠子参生态受损, 产量急剧下降。珠子参作为“太白七药”之一, 民间应用历史广泛。珠子参皂苷抗肿瘤活性良好, 且含珠子参的各种制剂已被运用在癌症治疗中。珠子参叶在民间也已被广泛应用在日常保健中, 然而珠子参叶的药效物质基础研究薄弱, 未能系统分离阐述其化合物结构组成; 其次, 珠子参叶作为非药用部位往往被废弃, 造成资源浪费。

因此, 为扩大珠子参叶的开发利用, 本文经硅胶柱色谱、半制备型高效液相色谱等分离方法, 结合理化性质、ESI-MS 及 1D/2D-NMR 等现代波谱技术对珠子参叶 70% 乙醇部位进行化学成分研究, 从中分离鉴定出 7 个达玛烷型皂苷、1 个黄酮类、1 个酚类和 1 个醛类化合物, 其中化合物 **2**、**3**、**6** ~ **10** 为从珠子参植物中首次分离鉴定, 丰富了珠子参叶的化学成分, 尤其是达玛烷型皂苷。研究发现, 达玛烷型皂苷对多种肿瘤细胞有抑制作用, 抗肿瘤活性显著^[20]。化合物 **1** 可以抑制肿瘤细胞转移和迁移, 促进细胞凋亡^[21]。此外, 黄酮类化合物表现出显著的神经炎症抑制能力和抗氧化活性^[22-23]。因此, 后续应继续深入研究珠子参药材, 进一步挖掘其药用价值, 为药材后续研究提供物质基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 283.
- [2] 宋小妹, 刘海静, 王薇, 等. 太白七药研究与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 101-111.
- [3] 姜祎. 珠子参叶化学成分及药理研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2008.
- [4] 杨崇仁, 伍明珠, 周俊, 等. 珠子参叶的三萜皂苷成分[J]. 云南植物研究, 1984, 6(1): 118-120.
- [5] 冯宝树, 汪夕彬, 王答祺, 等. 秦岭产珠子参叶的达玛烷型皂苷研究(1)[J]. 云南植物研究, 1987, 9(4): 477-484.
- [6] 王答祺, 冯宝树, 汪夕彬, 等. 秦岭珠子参叶的达玛烷型皂苷的进一步研究[J]. 药学学报, 1989, 24(8): 633-636.
- [7] 赵东东, 宋小妹, 汤海峰, 等. 珠子参叶的皂苷成分研究[J]. 中南药学, 2013, 11(2): 85-88.
- [8] Dan LW, Gao TH, Zhang YY, et al. *Panax Majoris* Rhizoma: a comprehensive review of phytochemistry, pharmacology and clinical applications[J]. Rec Nat Prod, 2024, 18(1): 53-94.
- [9] 刘琪琪, 李晔, 宗时宇, 等. 太白七药珠子参的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(6): 53-58.
- [10] 张丽, 梁卓菲, 张化为, 等. 珠子参总皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的影响[J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44(3): 75-79.
- [11] 张化为, 姜祎, 黄文丽, 等. 珠子参叶中 1 个新的三萜皂苷[J]. 中草药, 2020, 51(1): 26-30.
- [12] 何瑞, 刘琦, 刘银环, 等. 珠子参叶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1635-1638.
- [13] 马丽媛, 杨秀伟. 人参茎叶总皂苷酸水解产物化学成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2522-2533.
- [14] 曹家庆, 符鹏, 赵余庆. 三七茎叶皂苷酸水解产物中一个新化合物的分离和鉴定[J]. 中草药, 2013, 44(2): 137-140.
- [15] Tran TL, Kim YR, Yang JL, et al. Dammarane triterpenes from the leaves of *Panax ginseng* enhance cellular immunity[J]. Bioorgan Med Chem, 2014, 22(1): 499-504.
- [16] Wu LJ, Wang LB, Gao HY, et al. A new compound from the leaves of *Panax ginseng*[J]. Fitoterapia, 2007, 78(7-8): 556-560.
- [17] 吴云秋, 闫炳雄, 阮丽君, 等. 广金钱草中黄酮及黄酮苷类化学成分研究[J]. 中草药, 2023, 54(15): 4780-4788.
- [18] 艾凤伟, 张嵩, 李艳凤, 等. 白附子的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 201-203.
- [19] 邱路雅, 杨刚, 金琼, 等. 石菖蒲根茎化学成分及抗炎活性研究[J]. 中草药, 2022, 53(15): 4617-4624.
- [20] 赵升铭, 周旋, 袁松竹, 等. 达玛烷型人参皂苷羧酸衍生物结构与抗肿瘤机制研究进展[J/OL]. 中成药, 1-9 [2025-01-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240227.0948.004.html>.
- [21] 童卫芳. 原人参三醇 20S-PPT 抗鼻咽癌作用及机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [22] 陈鑫, 郑晓梅, 舒艺璇, 等. 山柰酚腹腔注射后脑出血大鼠脑组织神经炎症反应及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达观察[J]. 山东医药, 2024, 64(15): 19-24.
- [23] 张震, 朱天宇. 山柰酚抗运动性疲劳的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(9): 1306-1310.

(收稿日期: 2024-06-12; 修回日期: 2024-08-23)

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析 竹叶饮的化学成分

叶婉婷¹, 于泳², 刘力莉², 王鹏¹, 白阳¹, 张诗芸¹, 陶欧^{1*}, 孙毅坤^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 数源汇通(北京)医药科技有限公司, 北京 100089)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术对竹叶饮中的化学成分进行研究。**方法** 采用 Waters HSS T3 UPLC C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×150 mm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 柱温 40 °C, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μL。质谱采用 ESI 源, 在正、负离子两种模式下采集数据。结合相关文献及化合物裂解规律, 对比各化合物的色谱保留时间、母离子质荷比和特征碎片等信息, 鉴定竹叶饮的主要化学成分。**结果** 利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术, 从竹叶饮中分离鉴定了 92 个化学成分, 包括黄酮类 26 个, 有机酸类 23 个, 三萜类 10 个, 倍半萜类 13 个, 香豆素类 8 个, 生物碱类 4 个, 氨基酸类 2 个, 蒽醌类 1 个, 其他类 5 个。**结论** 首次采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术研究竹叶饮中的化学成分, 该结果为其质量控制以及进一步的药效物质基础研究奠定了基础。

关键词: 竹叶饮; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱法; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0397-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.016

Chemical components of Zhuyeyin by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

YE Wan-ting¹, YU Yong², LIU Li-li², WANG Peng¹, BAI Yang¹, ZHANG Shi-yun¹, TAO Ou^{1*}, SUN Yi-kun^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Shuyuan Huitong (Beijing) Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 100089)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical components of Zhuyeyin by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** Waters HSS T3 UPLC C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm) was used, with gradient elution. Acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution was used as the mobile phase. The column temperature was 40 °C, the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the injection volume was 5 μL. ESI sources were used to collect data in both positive and negative ion modes. Based on relevant literatures and compound fragmentation patterns, the chromatographic retention time, parent ion mass to charge ratio, and characteristic fragment information of each compound were compared to identify the main chemical components of Zhuyeyin. **Results** Totally 92 chemical components were identified, including 26 flavonoids, 23 organic acids, 10 triterpenes, 13 sesquiterpenes, 8 coumarins, 4 alkaloids, 2 amino acids, 1 anthraquinone, and 5 others. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS technology for the first time has identified the chemical components in Zhuyeyin, laying the foundation for its quality control and therapeutic material basis.

Key words: Zhuyeyin; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; chemical component

作者简介: 叶婉婷, 女, 硕士研究生, 主要从事中药学研究, email: yewanting0620@163.com ***通信作者:** 陶欧, 女, 副教授, 主要从事信息技术在中药质量控制中的应用研究, email: 602213@bucm.edu.cn; 孙毅坤, 男, 教授, 主要从事中药药效物质及质量控制研究, email: sunyk@bucm.edu.cn

湿热体质是指由先天禀赋、久居湿地、喜食肥甘、嗜酒等因素引起的以湿热内蕴为主要特征的体质状态^[1],是常见的体质类型之一。湿热体质与某些疾病的发生与预后息息相关,对体质进行科学干预,有利于疾病的预防和根治^[2]。现多用方药、针灸等进行干预,标本兼治,干预方法具有个体性^[3],但因其治疗方式受人为因素、时间因素影响较大,患者的依从性较差。竹叶饮由蒲公英、淡竹叶、白扁豆、薏苡仁、藿香、茯苓、鲜芦根 7 味药组成,不仅饮用方便,还可用于调理湿热体质。

目前对于竹叶饮的化学成分尚缺少全面、整体的分析表征,其所含药味较多,成分较为复杂。为对其进行全面系统的成分分析,本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术,利用其高通量、高灵敏度的特性^[4]对竹叶饮中复杂中药体系成分进行快速、全面的筛选、分析与鉴定,为其质量控制及进一步的药理作用研究奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

EPS-202 型电子天平(精度:0.01 g,长沙湘平科技发展有限公司);磁力搅拌水浴锅(上海力辰邦西仪器科技有限公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(北京五洲东方科技有限公司);U3000 型超高效液相色谱、Q-Exactive 型质谱仪[美国 Thermo Fisher Scientific 公司,配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 3.0 数据处理系统]。

1.2 试药

竹叶饮(批号:202308172),山西亚宝九合医药科技有限公司;超纯水(Milli-Q Advantage A10 超纯水系统制得);甲醇、乙腈、甲酸(质谱级,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

称取竹叶饮颗粒 2.00 g 置于 100 mL 具塞锥形瓶中,按照料液比 1:10 精密加入 20 mL 水,摇匀,水浴加热回流 1 h,取出静置放冷,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:Waters HSS T3 UPLC C₁₈ 柱(1.7 μm, 2.1 mm×150 mm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B);洗脱梯度:0~2 min, 5%B;2~17 min, 5%~95%B;17~20 min, 95%B;20~23 min, 95%~5%B;23~25 min, 5%B;柱温:40℃;进样量:5 μL;流速:0.3 mL·min⁻¹。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源(HESI);正、负离子模式分别扫描,扫描模式为 Full scan/dd MS²,质量扫描范围为 m/z 100~1300 Da;毛细管温度为 350℃,喷针加热温度为 300℃。负离子模式下喷雾电压为 3200 V,正离子模式下喷雾电压为 3800 V;鞘气流速为 35 arb;辅助气流速为 15 arb。采用低、中、高(25 V、35 V、45 V)的 3 种碰撞能量对母离子进行二级破裂。一级质谱分辨率为 Full Scan 70 000 FWHM(Full Width at Half Maximum),二级质谱分辨率为 MS/MS 17 500 FWHM。

2.4 化学成分检测与分析

取“2.1”项下供试品溶液 5 μL,按照“2.2”“2.3”项下的色谱条件及质谱条件进样测定,得到竹叶饮在正、负离子模式下的基峰离子流(BPI)色谱图,见图 1~2。采用 Xcalibur 3.2 软件进行质谱数据处理分析,并结合相关文献及化合物裂解规律鉴定化学成分,保证结果的准确性。

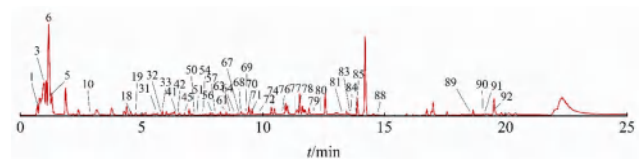


图 1 ESI⁺模式下竹叶饮的 BPI 图

Fig 1 BPI diagram of Zhuyeyin in ESI⁺ mode

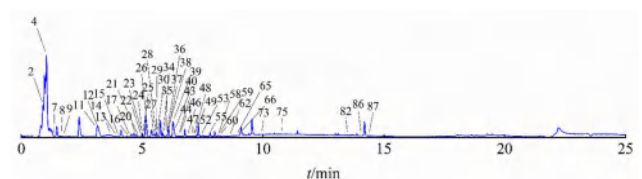


图 2 ESI⁻模式下竹叶饮的 BPI 图

Fig 2 BPI diagram of Zhuyeyin in ESI⁻ mode

3 结果与分析

3.1 竹叶饮的化学成分分析

查找相关文献整理竹叶饮中 7 味药材的质谱信息,建立化学成分数据库,包括所含成分的色谱保留时间、母离子质荷比和二级质谱特征碎片离子信息,与本文通过 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 检测到的竹叶饮化学成分信息进行对比,并结合化学物的质谱裂解规律,共推测和鉴定出 92 种化学成分,见表 1^[5-22]。

3.2 质谱裂解规律

3.2.1 黄酮类成分质谱解析 从竹叶饮中共鉴定出 26 个黄酮类化合物,该类化合物主要存在于白扁豆、淡竹叶和藿香中。黄酮类化合物泛指两个苯环通过 3 个碳原连接而成具有 C₆-C₃-C₆ 基本骨架的化合物,大部分与糖结合成苷类,少部分

表 1 竹叶饮中化学成分鉴定

Tab 1 Identification of chemical components in Zhuyeyin

No.	t_R / min	m/z		误差 / ($\times 10^{-6}$)	加合 离子	分子式	m/z	化合物	归属
		测定值	理论值						
1	0.76	175.1187	175.1190	- 1.71	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	157.1084, 130.0979, 70.0654, 60.0561	L- 精氨酸 ^[5]	蒲公英
2	0.91	133.0145	133.0142	2.26	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₅	115.0039, 89.0245, 71.0139	苹果酸 ^[5]	蒲公英
3	0.99	144.1019	144.1019	0.00	[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₃ NO ₂	84.0810, 58.0656	水苏碱 ^[6]	蒲公英
4	1.04	243.0624	243.0623	0.41	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0567, 140.0356, 110.0249, 82.0299	尿苷 ^[6]	蒲公英
5	1.09	147.0440	147.0441	- 0.68	[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₂	147.0446, 103.0546, 91.0545	香豆素 ^[6]	蒲公英
6	1.16	182.0811	182.0812	- 0.55	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃	136.0761, 123.0444, 91.0546	L- 酪氨酸 ^[6]	蒲公英
7	1.35	169.0147	169.0143	2.37	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	125.0246, 123.0454, 95.0140, 71.0139, 69.0346	没食子酸 ^[7]	白扁豆, 蒲公英
8	1.64	197.0459	197.0456	1.52	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	125.0246, 97.0296, 95.0141, 81.0346	丁香酸 ^[8]	薏苡仁
9	1.72	173.0459	173.0455	2.31	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₀ O ₅	137.0244, 131.0825, 93.0347, 73.0293	莽草酸 ^[6]	蒲公英
10	2.88	169.0495	169.0495	0.00	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₄	151.0361, 125.0600, 93.0702	异香草酸 ^[6]	蒲公英
11	3.12	353.0884	353.0878	1.70	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0564, 179.0352, 173.0456, 135.0454	新绿原酸 ^[9]	淡竹叶, 蒲公英
12	3.21	311.0411	311.0409	0.64	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	179.0352, 149.0094, 135.0454	单咖啡酰酒石酸 ^[5]	蒲公英
13	3.72	167.0353	167.0350	1.80	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₄	152.0117, 123.0454, 108.0218	苔色酸 ^[6]	蒲公英
14	3.96	339.0729	339.0722	2.06	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	177.0196, 133.0298	秦皮甲素 ^[10]	蒲公英
15	4.04	216.0668	216.0666	0.93	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₁ NO ₃	216.0877, 199.8514, 155.1081, 112.1789	薏苡- 螺内酰胺 C ^[8]	薏苡仁
16	4.46	193.0510	193.0506	2.07	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₀ O ₄	193.0508, 178.0273, 149.0610, 134.0375	阿魏酸 ^[11]	淡竹叶, 蒲公英
17	4.52	337.0936	337.0929	2.08	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0564, 173.0456, 163.0403, 119.0504	3-O- 对香豆酰奎尼酸 ^[9]	淡竹叶
18	4.59	231.1379	231.1380	- 0.43	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	213.1281, 185.1331, 105.0703, 95.0859	白术内酯 I ^[6]	蒲公英
19	4.75	327.1336	327.1339	- 0.92	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄	327.1783, 201.1029	依靛蓝酮 ^[5]	蒲公英
20	4.75	353.0884	353.0878	1.70	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0563, 179.0353, 173.0458, 135.0454	隐绿原酸 ^[9]	淡竹叶
21	4.87	167.0353	167.0350	1.80	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₄	123.0453, 152.0116, 108.0219	香荚兰酸 ^[10]	蒲公英
22	4.97	353.0885	353.0878	1.98	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0563, 179.0352, 173.0457, 163.0403, 135.0454	绿原酸 ^[9]	淡竹叶, 蒲公英
23	5.00	177.0196	177.0193	1.69	[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	149.0245, 133.0297, 105.0346	秦皮乙素 ^[5]	蒲公英
24	5.01	367.1041	367.1035	1.63	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	193.0507, 173.0457, 149.0610, 134.0375	阿魏酰奎尼酸 ^[9]	淡竹叶
25	5.03	179.0351	179.0350	0.56	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	135.0453, 121.0285	咖啡酸 ^[9]	淡竹叶, 蒲公英
26	5.26	153.0197	153.0193	2.61	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	109.0296, 108.0217, 91.0189	原儿茶酸 ^[12]	鲜芦根, 蒲公英
27	5.48	593.1522	593.1512	1.69	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	473.1097, 383.0777, 353.0672	维采宁-2 ^[5]	蒲公英, 藿香
28	5.58	337.0935	337.0929	1.78	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0564, 173.0457, 163.0403, 119.0504	4-O- 对香豆酰奎尼酸 ^[9]	淡竹叶
29	5.59	423.1799	423.1813	- 3.31	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	229.4154, 193.0874, 174.0493	甘草宁 E ^[13]	藿香
30	5.62	563.1424	563.1406	3.20	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	473.1093, 383.0776, 353.0671	夏佛塔苷 ^[7]	白扁豆
31	5.63	207.0653	207.0652	0.48	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	175.0394, 147.0445, 107.0490, 91.0545	滨蒿内酯蒿 ^[6]	蒲公英
32	5.82	219.1128	219.1128	0.00	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	160.0762, 132.0813, 115.0702	L- 红豆碱 ^[6]	蒲公英
33	5.84	177.0545	177.0546	- 0.56	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₅	145.0289, 134.0367, 117.0339, 89.0389	7- 甲氧基香豆素 ^[6]	蒲公英
34	5.87	447.0938	447.0933	1.12	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	357.0620, 327.0512, 298.0487, 285.0405	木犀草苷 ^[11]	淡竹叶
35	5.97	461.1097	461.1089	1.74	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	341.0668, 313.0354, 298.0483, 285.0405	日当药黄素 ^[9]	淡竹叶
36	6.00	609.1472	609.1461	1.81	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	447.0947, 299.4732, 151.0036	芦丁 ^[10]	蒲公英
37	6.04	447.0941	447.0933	1.79	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0941, 357.0619, 327.0512, 299.0561, 284.0320	荭草苷 ^[9]	淡竹叶
38	6.08	593.1163	593.1148	2.53	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₆	417.0835, 399.0728, 357.0624, 327.0512	木犀草素 6-C-β-D- 六碳糖醛酸基 (1 → 2) -α-L- 阿拉伯糖苷 ^[14]	淡竹叶
39	6.27	473.0729	473.0725	0.85	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	293.1040, 179.0353, 149.0093, 145.0453	菊苣酸 ^[10]	蒲公英
40	6.33	431.0991	431.0984	1.62	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	341.0670, 311.0562, 283.0613	异牡荆素 ^[7]	白扁豆, 淡竹叶
41	6.46	193.0497	193.0495	1.04	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₈ O ₄	178.0266, 133.0289, 107.0496	6, 7- 二羟基-4- 甲基香豆素 ^[6]	蒲公英
42	6.48	595.1660	595.1658	0.34	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	287.0555, 153.0184, 137.0241	山柰酚-3-O- 芸香糖苷 ^[15]	白扁豆
43	6.49	417.1202	417.1191	2.64	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	255.0666, 135.0447	甘草苷 ^[13]	藿香
44	6.53	461.0733	461.0725	1.74	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	285.0406, 133.0292	野黄芩苷 ^[12]	鲜芦根
45	6.75	325.0912	325.0918	- 1.85	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	163.0395, 107.0494	茵芋苷 ^[6]	蒲公英
46	6.86	515.1201	515.1195	1.17	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.0883, 191.0564, 179.0352, 173.0459, 161.0247, 135.0454	异绿原酸 A ^[10, 16]	蒲公英
47	7.09	515.1201	515.1195	1.17	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.0882, 179.0352, 173.0459, 135.0454	异绿原酸 B ^[10]	蒲公英

续表 1

No.	t_R / min	m/z		误差 / ($\times 10^{-6}$)	加合 离子	分子式	m/z			化合物	归属			
		测定值	理论值											
48	7.12	515.1202	515.1195	1.36	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.0847,	191.0566,	179.0353,	135.0453	异绿原酸 C ^[6]	蒲公英		
49	7.13	445.0785	445.0776	2.02	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269.0456,	175.0250,	113.0246,	85.0296	黄芩苷 ^[8]	白扁豆, 鲜芦根		
50	7.17	179.0339	179.0339	0.00	[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₄	135.0445,	133.0221,	123.0447		七叶内酯 ^[6]	蒲公英		
51	7.29	225.1120	225.1121	- 0.44	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	189.0919,	161.0968,	109.0287		广藜香酮 ^[6]	蒲公英		
52	7.32	187.0978	187.0976	1.07	[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	143.1080,	125.0973,	97.0650		杜鹃花酸 ^[6]	蒲公英		
53	7.40	435.1305	435.1297	1.84	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	273.0769,	229.0866,	123.0453		根皮苷 ^[7]	白扁豆		
54	7.52	261.1118	261.1121	- 1.15	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	215.1062,	187.1124,	159.0803		乌药醚内酯 ^[6]	蒲公英		
55	7.72	263.1291	263.1289	0.76	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	219.1391,	204.1156,	135.0451		脱落酸 ^[6]	蒲公英		
56	7.92	296.1638	296.1645	- 2.36	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	265.1227,	250.0993,	235.0759		荷叶碱 ^[7]	未知		
57	8.04	283.1535	283.1540	- 1.77	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	237.1481,	219.1388,	173.1332,	159.1177	青蒿素 ^[6]	蒲公英		
58	8.12	285.0407	285.0405	0.70	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0406,	239.0345,	151.0039,	133.0297,	121.0296	山柰酚 ^[7]	白扁豆	
59	8.14	285.0407	285.0405	0.70	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	257.0457,	241.0506,	151.0039,	133.0297	木犀草素 ^[10]	蒲公英		
60	8.18	301.0359	301.0354	1.66	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0356,	178.9989,	151.0039,	121.0297,	107.0140	槲皮素 ^[7]	白扁豆	
61	8.48	237.1843	237.1849	- 2.53	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	219.1745,	201.1641,	135.1173,	107.0858	双氢青蒿酸 ^[6]	蒲公英		
62	8.62	267.0665	267.0663	0.75	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0664,	209.0620			芒柄花黄素 ^[8]	薏苡仁		
63	8.67	251.1637	251.1642	- 1.99	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	233.1541,	175.1123,	95.0857		甘松新酮 ^[6]	蒲公英		
64	8.86	271.0595	271.0601	- 2.21	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0606,	243.0654,	153.0187		芹菜素 ^[17]	藜香		
65	8.89	269.0457	269.0456	0.37	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	241.0523,	225.0562,	197.0602,	181.0664	大黄素 ^[7]	白扁豆		
66	8.94	329.0672	329.0667	1.52	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.0669,	314.0433,	299.0198,	271.0248,	227.0351,	161.0249	苜蓿素 ^[18]	淡竹叶
67	9.03	301.0700	301.0707	- 2.33	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0712,	286.0476,	258.0527,	153.0175,	135.0801	香叶木素 ^[17]	藜香	
68	9.09	249.1480	249.1485	- 2.01	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	231.1386,	203.1437,	189.1282,	175.1128	白木内酯 III ^[6]	蒲公英		
69	9.28	249.1481	249.1485	- 1.61	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	203.1438,	175.1125,	157.1017,	105.4664	含笑内酯愈 ^[6]	蒲公英		
70	9.35	245.1167	245.1172	- 2.04	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	227.1072,	199.1123,	173.0966,	128.0624,	115.0548	林丹内酯 ^[6]	蒲公英	
71	9.48	233.1532	233.1536	- 1.72	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	187.1488,	159.1171,	131.0860,	105.0703,	91.0545	白木内酯 II ^[6]	蒲公英	
72	9.76	249.1481	249.1485	- 1.61	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	231.1385,	203.1436,	185.1333,	135.0806,	119.0858,	105.0703	小白菊内酯 ^[6]	蒲公英
73	9.94	301.0722	301.0718	1.33	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	135.0454,	134.0376,	121.0296		橙皮素 ^[8]	薏苡仁		
74	10.39	235.1688	235.1693	- 2.13	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	217.1592,	93.0702,	91.0544,	79.0544	青蒿酸 ^[6]	蒲公英		
75	10.77	283.0615	283.0612	1.06	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0615,	268.0377,	240.0431		樱黄素 ^[8]	薏苡仁		
76	10.78	285.0750	285.0758	- 2.81	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.0762,	270.0528,	242.0585		刺槐素 ^[17]	藜香		
77	11.34	315.0856	315.0863	- 2.22	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.0856,	300.0632,	285.0396		滨藜黄素 ^[17]	藜香		
78	11.43	345.0960	345.0969	- 2.61	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	330.0738,	315.0503,	302.0781,	167.0342	3', 4', 7-三甲氧基槲皮素 ^[13]	藜香		
79	12.10	279.2310	279.2319	- 3.23	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	137.1328,	123.1172,	109.1015,	95.0858	亚油酸 ^[6]	蒲公英		
80	12.39	231.1379	231.1380	- 0.43	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	185.1328,	143.0862,	105.0700		去氢木香内酯 ^[6]	蒲公英		
81	13.28	237.1848	237.1849	- 0.42	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	219.2114,	135.1173,	121.1017		姜黄酮 ^[6]	蒲公英		
82	13.50	483.3122	483.3116	1.24	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	465.2287,	439.3636,	409.2896		茯苓酸 B ^[19]	茯苓		
83	13.60	485.3267	485.3262	1.03	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	467.3565,	449.3421,	311.2375,	293.2273	茯苓新酸 B ^[20]	茯苓		
84	13.62	485.3625	485.3625	0.00	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	485.2813,	467.3586,	311.2370		3-表去氢土莫酸 ^[20]	茯苓		
85	13.81	487.3784	487.3782	0.41	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	469.3694,	451.3571,	343.2620,	313.2538,	295.2427	土莫酸 ^[20]	茯苓	
86	14.08	485.3278	485.3272	1.24	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	441.0192,	423.1712,	353.2009		茯苓酸 G ^[19]	茯苓		
87	14.37	481.3329	481.3323	1.25	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	437.3426,	311.1996,	293.1905		猪苓酸 C ^[21]	茯苓		
88	14.71	485.3625	485.3625	0.00	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	467.3538,	449.3418,	311.2374,	293.2270	去氢土莫酸 ^[20]	茯苓		
89	18.60	457.3658	457.3676	- 3.94	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	203.1793,	191.1066,	95.0859		乌苏酸 ^[6]	蒲公英		
90	19.07	427.3921	427.3934	- 3.04	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₀ O	409.3089,	137.1330,	121.1013,	95.0858	羽扇豆醇 ^[6]	蒲公英		
91	19.11	425.3757	425.3778	- 4.94	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O	121.1015,	109.1015,	95.0858,	81.0701	羽扇豆酮 ^[6]	蒲公英		
92	19.48	338.3404	338.3417	- 3.85	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₃ NO	338.3421,	321.3155,	303.3052,	97.1015,	83.0858	芥酸酰胺 ^[22]	藜香	

以游离形式存在。黄酮苷类主要丢失糖基团而形成黄酮苷元，苷元常丢失自由基、中性小分子及发生 RDA 裂解而形成一系列特征碎片离子。以化合物 **37** 和 **77** 为例说明解析过程。

化合物 **37** 的保留时间为 6.04 min，可观察到准分子离子峰 m/z 447.0941 $[M-H]^-$ ，推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ ；二级质谱图中母离子分别失去 $C_3H_6O_3$ 和 $C_4H_8O_4$ 的中性分子，得到 m/z 357.0619 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$ 和 m/z 327.0512 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ ，再进一步失去 CO 和 C_2H_3O ，得到 m/z 299.0561 $[M-H-C_4H_8O_4-CO]^-$ 和 m/z 284.0320 $[M-H-C_4H_8O_4-C_2H_3O]^-$ 。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律，比对相关文献^[9]，可确定该化合物为荭草苷，其二级质谱图及特征裂解规律见图 3。

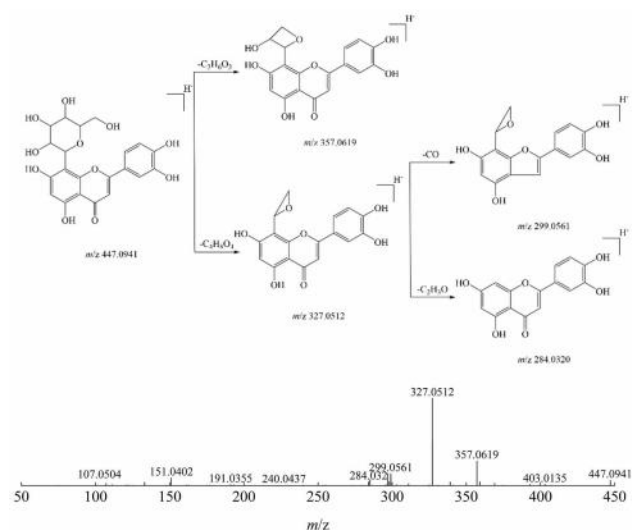


图 3 荭草苷的二级质谱图及裂解途径
Fig 3 Secondary mass spectrum and fragmentation pathway of orientin

化合物 **77** 的保留时间为 11.34 min，可观察到准分子离子峰 m/z 315.0856 $[M+H]^+$ ，推断其分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$ ；二级质谱图中母离子连续失去一分子 CH_3 ，得到碎片离子 m/z 300.0632 $[M+H-CH_3]^+$ 和碎片离子 m/z 285.0396 $[M+H-CH_3-CH_3]^+$ 。结合正离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律，比对相关文献^[17]，可确定该化合物为滨藜黄素，其二级质谱图及特征裂解规律见图 4。

3.2.2 有机酸类成分质谱解析 从竹叶饮中共鉴定出 23 个有机酸类化合物，该类化合物主要存在于淡竹叶和蒲公英中。有机酸类化合物因含有 $-COOH$ 官能团，容易丢失 $COOH$ 、 H_2O 、 CO_2 、 CO 等小分子碎片。以化合物 **28** 和 **46** 为例说明解析过程。

化合物 **28** 的保留时间为 5.58 min，可观察到准分子离子峰 m/z 337.0935 $[M-H]^-$ ，推断其分子式为 $C_{16}H_{18}O_8$ ；二级质谱图中母离子酯键断裂得到奎尼酸 m/z 191.0564 和对香豆酸 m/z 163.0403，

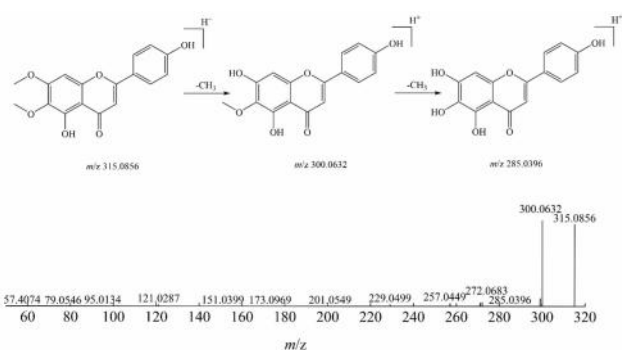


图 4 滨藜黄素的二级质谱图及裂解途径
Fig 4 Secondary mass spectrum and fragmentation pathway of cirsimaritin

奎尼酸再脱去一分子 H_2O 得到 m/z 173.0457，对香豆酸再脱去一分子 CO_2 得到 m/z 119.0504。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律，比对相关文献^[9]，可确定该化合物为 4-O-对香豆酰奎尼酸，其二级质谱图及特征裂解规律见图 5。

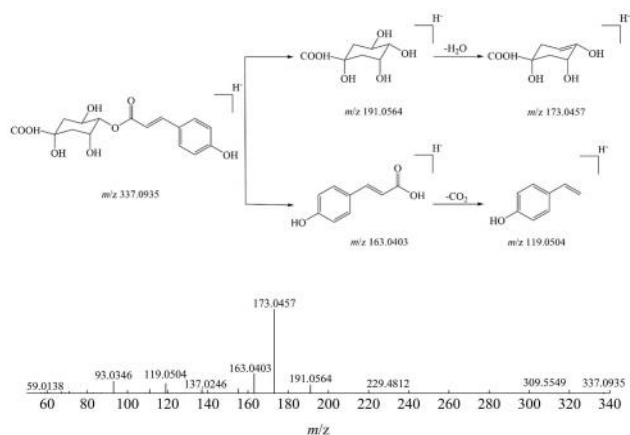


图 5 4-O-对香豆酰奎尼酸的二级质谱图及裂解途径
Fig 5 Secondary mass spectrum and fragmentation pathway of 4-O-coumaroylquinic acid

化合物 **46** 的保留时间为 6.86 min，可观察到准分子离子峰 m/z 515.1201 $[M-H]^-$ ，推断其分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$ ；二级质谱图中母离子酯键断裂失去一分子芳香基团得到 m/z 353.0883 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ ，随后酯键断裂，得到 m/z 191.0564 $[M-H-2C_9H_6O_3]^-$ 、 m/z 179.0352 $[M-H-C_9H_6O_3-C_7H_{10}O_5]^-$ 等特征碎片，两者再进一步失去一分子 H_2O ，分别得到 m/z 173.0459 $[M-H-2C_9H_6O_3-H_2O]^-$ 和 m/z 161.0247 $[M-H-C_9H_6O_3-C_7H_{10}O_5-H_2O]^-$ ，以及 m/z 135.0454 $[M-H-C_9H_6O_3-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$ 。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律，比对相关文献^[10, 16]，可确定该化合物为异绿原酸 A，其二级质谱图及特征裂解规律见图 6。

3.2.3 三萜类成分质谱解析 从竹叶饮中共鉴定出 10 个三萜类化合物，该类化合物主要存在于茯苓中。茯苓中的三萜类成分主要为四环三萜酸，

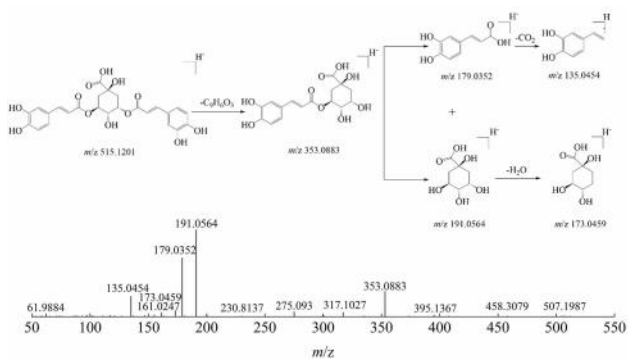


图 6 异绿原酸 A 的二级质谱图及裂解途径

Fig 6 Secondary mass spectrum and fragmentation pathway of isochlorogenic acid A

在质谱中容易丢失水分子、烷基酸及 17 位的长链烯烴而形成一系列特征碎片离子^[23]。以化合物 87 为例说明解析过程。

化合物 87 的保留时间为 14.37 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 481.3329 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{31}H_{46}O_4$; 二级质谱图中母离子失去一分子 CO_2 得到 m/z 437.3426 $[M-H-CO_2]^-$, 母离子通过同时失去 $C_9H_{15}O_2$ 和 CH_3 得到 m/z 311.1996 $[M-H-CH_3-C_9H_{15}O_2]^-$, 该碎片离子进一步丢失一分子 H_2O 得到 m/z 293.1905 $[M-H-CH_3-C_9H_{15}O_2-H_2O]^-$ 。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律, 比对相关文献^[21], 可确定该化合物为猪苓酸 C, 其二级质谱图及特征裂解规律见图 7。

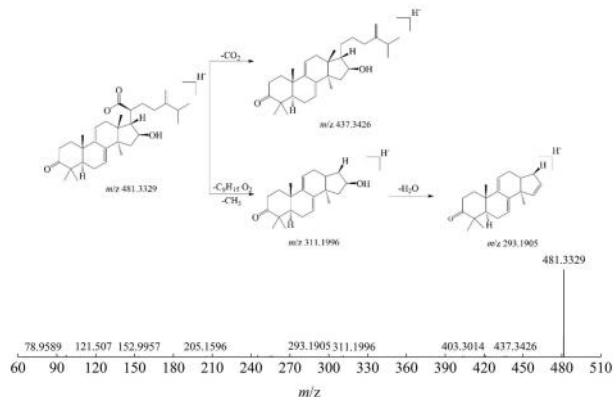


图 7 猪苓酸 C 的二级质谱图及裂解途径

Fig 7 Secondary mass spectrum and fragmentation pathway of poryporen acid C

4 讨论

本研究前期对竹叶饮的提取方法进行了优化, 比较了不同提取溶剂(水、甲醇、75%乙醇)、不同稀释倍数(5、10、15 倍)和不同提取方法(超声 30 min、加热回流 1 h), 结果表明, 采用 1:10 水加热回流 1 h 提取, 得到的色谱峰较多且响应强度较好。

对于竹叶饮中各味药材的成分研究已比较深

入, 但对竹叶饮的成分研究现较少, 中药组方的成分不能看作各味药材成分的简单加和, 而是需将其作为一个整体去研究。本研究采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对竹叶饮的化学成分进行系统分析, 共鉴定出化合物 92 个, 包括黄酮类 26 个, 有机酸类 23 个, 三萜类 10 个, 倍半萜类 13 个, 香豆素类 8 个, 生物碱类 4 个, 氨基酸类 2 个, 蒽醌类 1 个, 其他类 5 个, 并对部分化合物的裂解规律进行了详细描述。

湿热体质存在湿和热的病理因素, 以湿热内蕴为主要特征, 所以调理湿热体质需分解湿热, 清热祛湿为其主要治疗原则^[1]。现代药理研究发现, “清热”多与抗炎、免疫调节、抗氧化相关, “祛湿”多与保护肠道功能、降血脂、降血糖相关^[24]。

在竹叶饮的药味组成中, 蒲公英、淡竹叶、鲜芦根均具有清热的功效, 现代药理研究表明, 蒲公英的黄酮类成分具有明显的抗炎抗氧化活性^[25-26], 主要通过抑制 NF- κ B 和 PI3K/Akt 通路发挥抗炎作用^[27-28]。NF- κ B 作为重要的核转录因子, 其过度活化会促进炎症因子的释放和炎症介质的合成, 在炎症的发生、发展过程中发挥重要作用^[29]; PI3K/Akt 通路是细胞中重要的信号传导途径, 该通路可能由激活 NF- κ B 通路来参与炎症反应^[30]。淡竹叶的黄酮类、酚酸类成分均具有良好的抗氧化活性^[14, 31], 鲜芦根也具有显著的抗炎抗氧化作用^[32]。

竹叶饮药味中的薏苡仁、茯苓、白扁豆、藿香均具有祛湿的功效。薏苡仁的多酚类成分可以降低高胆固醇饮食大鼠血清中的总胆固醇水平, 抑制脂质过氧化产物的形成, 具有抗氧化活性^[33], 并对其肠道菌群失衡具有调节作用^[34]。茯苓的三萜类成分可以竞争性抑制肠道顶端钠依赖性胆汁酸转运蛋白(ASBT)和肝脏钠/牛磺胆酸共转运多肽(NTCP), 使胆固醇向胆汁酸的转化增加, 从而达到降低血脂的作用^[35]; 其三萜类成分还可以通过促进胃肠道黏膜的修复及对脑肠肽的调节来改善小鼠功能性消化不良^[36]。白扁豆具有降血糖的药理作用^[37], 藿香的挥发油类成分可促进小肠对营养物质的消化吸收^[38], 因这类成分具有挥发性, 后续需采用 GC-MS 法进一步对挥发性成分进行检测与分析。

参考文献

- 王晓翠. 基于温病湿热理论的代谢综合征相关性研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- 韩经丹. 中医隐症阶段原发性血脂异常症与中医体质的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- 黄麟琅, 章莹, 王飞, 等. 中医湿热体质研究进展[J]. 中

- 国中医药现代远程教育, 2023, 21 (1): 190-193.
- [4] 覃翔, 廖强. 静电场轨道阱高分辨质谱技术在中药分析中的应用进展 [J]. 中国药师, 2022, 25 (7): 1240-1245.
- [5] 石松安, 张璜, 韩静, 等. 高效液相色谱串联傅里叶变换离子回旋共振质谱法鉴定二丁颗粒的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38 (1): 83-92.
- [6] 孔佳琦. 青胶蒲公英中药用成分的质谱分析技术研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
- [7] 林慧敏, 任强强, 许文, 等. 基于 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱分析八珍方化学成分 [J]. 福建中医药, 2021, 52 (9): 31-38.
- [8] 任铭诚. 八珍方药效物质及其质量控制研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2020.
- [9] 潘智然, 王腾华, 朱首伦, 等. 基于超高压液相色谱-高分辨多级质谱联用技术的中药淡竹叶化学成分分析 [J]. 广东药学院学报, 2016, 32 (3): 300-306.
- [10] 张松保, 孔令婕, 谷巍, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的蒲公英化学成分分析及其抗癌机制的网络药理学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (2): 305-314.
- [11] 葛威. 经典名方竹叶石膏汤颗粒剂研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [12] 夏玉英, 李菁, 李楚源, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析感冒清热颗粒化学成分 [J]. 中药材, 2022, 45 (2): 359-367.
- [13] 潘玄玄, 宋粉云, 李华. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的沉香化气丸化学成分分析 [J]. 中草药, 2018, 49 (13): 2984-2992.
- [14] Liu XK, Wang Y, Ge W, et al. Spectrum-effect relationship between ultra-high-performance liquid chromatography fingerprints and antioxidant activities of *Lophatherum gracile* Brongn [J]. Food Sci Nutr, 2022, 10 (5): 1592-1601.
- [15] 谢雨宸, 邹雪梅, 李红颖, 等. 基于 UPLC-Q-Executive Orbitrap MS 技术的藏药细叶亚菊的化学成分分析 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31 (20): 22-28.
- [16] 康雨, 胡军华, 章晨峰, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析紫辛鼻胤颗粒化学成分及入血成分 [J]. 中成药, 2024, 46 (4): 1093-1102.
- [17] 贾瑞芳. 苏藿香化学成分研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [18] 宋丹丹. 藏药蚤缀化学成分及质量标准研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [19] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30 (6): 561-565.
- [20] 陈兴龙, 张敏, 杨琪瑶, 等. 茯苓 95% 乙醇提取物三萜类化学成分的 UPLC-IT-TOF/MS 分析 [J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42 (11): 1-8.
- [21] 刘佳星, 魏洁, 武锦春, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (12): 1-12.
- [22] 梁咏倩. 陈皮-广藿香药对非挥发性成分的体外指纹谱和体内代谢谱的研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
- [23] 李浩然, 董萍萍, 李华健, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 快速分析开心散物质基准中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (4): 938-950.
- [24] 李沁媚, 李铮, 司红彬. 中药防治湿热证的药效作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (14): 208-216.
- [25] 侯京玲, 周霄楠, 冯沙沙, 等. 蒲公英不同提取物抗炎效果研究 [J]. 中国兽医杂志, 2017, 53 (3): 64-66.
- [26] 刘佳慧, 刘阳, 王冬梅. 蒲公英根提取物的体内抗氧化活性 [J]. 西北民族大学学报 (自然科学版), 2018, 39 (2): 53-56.
- [27] Park CM, Park JY, Noh KH, et al. Taraxacum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133 (2): 834-842.
- [28] Park CM, Cho CW, Song YS. TOP 1 and 2, polysaccharides from Taraxacum officinale, inhibit NF- κ B mediated inflammation and accelerate Nrf2-induced antioxidative potential through the modulation of PI3K-Akt signaling pathway in RAW 264.7 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 66: 56-64.
- [29] 苗雨露, 张雯霞, 王玉娥, 等. 清热解毒类中药抗炎机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (9): 228-234.
- [30] 宋天然, 陈芳, 董泉明, 等. 牛蒡子苷对 ARDS 细胞模型的抗炎作用及 PI3K-AKT-NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2022, 46 (6): 623-628.
- [31] 李志洲. 淡竹叶总黄酮最佳萃取工艺及其抗氧化性的研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29 (11): 42-45.
- [32] 孙淑玲. 中药芦根的药理作用及临床应用 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4 (36): 165.
- [33] Wang LF, Sun J, Yi QD, et al. Protective effect of polyphenols extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) on hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats [J]. Molecules, 2012, 17 (8): 8886-8897.
- [34] Wang QY, Du ZY, Zhang H, et al. Modulation of gut microbiota by polyphenols from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf.) in rats fed a high-cholesterol diet [J]. Int J Food Sci Nutr, 2015, 66 (7): 783-789.
- [35] Cai H, Cheng YJ, Zhu QN, et al. Identification of triterpene acids in *Poria cocos* extract as bile acid uptake transporter inhibitors [J]. Drug Metab Dispos, 2021, 49 (5): 353-360.
- [36] Tu YJ, Luo XY, Liu D, et al. Extracts of *Poria cocos* improve functional dyspepsia via regulating brain-gut peptides, immunity and repairing of gastrointestinal mucosa [J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153875.
- [37] 卢金清, 蔡君龙, 戴艺, 等. 白扁豆的研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2013, 35 (12): 77-79.
- [38] 宋小珍, 杨秀江, 王恬, 等. 4 种中药提取物对大鼠小肠上皮细胞 IEC-6 增殖及其葡萄糖吸收的影响 [J]. 中草药, 2009, 40 (8): 1263-1266.

(收稿日期: 2024-06-28; 修回日期: 2024-08-13)

银杏叶提取物冻干舌下片的制备

宋嘉佳, 李寒冰, 李敏枫, 檀世祖, 王天舒, 张昊然, 蒋巧萍, 宇泉霖, 蔡程科* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 建立银杏叶提取物冻干舌下片的制备方法及其质量评价标准。**方法** 通过星点设计-效应面法筛选银杏叶提取物冻干舌下片最优处方制备工艺。**结果** 银杏叶提取物冻干舌下片最优处方为银杏叶提取物 40 mg/片、普鲁兰多糖 8.6 mg/片、氢氧化钠 0.9 mg/片、黄原胶 0.2 mg/片。**结论** 银杏叶提取物冻干舌下片制备工艺稳定可靠, 有效成分含量测定合格, 可用于大规模生产。

关键词: 银杏叶提取物; 冷冻干燥法; 星点设计-效应面法

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0404-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.017

Preparation of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract

SONG Jia-jia, LI Han-bing, LI Min-feng, TAN Shi-zu, WANG Tian-shu, ZHANG Hao-ran, JIANG Qiao-ping, YU Quan-lin, CAI Cheng-ke* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To prepare and evaluate the quality of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract. **Methods** The optimal prescription of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract was screened by central composite design-response surface methodology. **Results** The optimal prescription for lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract included ginkgo biloba extract 40 mg/tablet, pullulan polysaccharide 8.6 mg/tablet, sodium hydroxide 0.9 mg/tablet, and xanthan gum 0.2 mg/tablet. **Conclusion** The preparation of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract is stable and reliable, and the content of active components is qualified for large-scale production.

Key words: ginkgo biloba extract; freeze-drying method; central composite design-response surface methodology

银杏是银杏科银杏属唯一存活的物种, 在地球上存活了 2 亿年, 自古生代晚期起源至今, 经历了漫长的演化历史, 因此被誉为植物界的“活化石”^[1]。银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 是从银杏叶中提取纯化富集得到的有效提取物, 含有丰富的银杏黄酮、银杏内酯、银杏酸等有效成分, 具有抗炎、抗氧化、保护神经等多种作用^[2]。现代研究表明, 银杏叶提取物具有多种药理活性, 其中主要对心脑血管疾病及中枢神经系统具有较好的治疗效果^[3-4]。《中国药典》2020 年版中以银杏叶提取物作为主药的成剂有银杏叶片、银杏叶口服液、银杏叶软胶囊、银杏叶滴丸等多种剂型^[5]。然而, 银杏叶提取物水溶性

和脂溶性较差, 口服具有首过消除效应且不易跨过血脑屏障, 因此银杏叶普通制剂口服生物利用度低, 在脑部分布少, 临床疗效大大降低^[6]。且随着我国人口老龄化的加速, 银杏叶制剂的应用大幅提高, 但患者常伴有吞咽困难等疾病。目前, 全世界吞咽困难患者已经达到了 5.904 亿人, 约占世界人口的 8%^[7], 极大地降低了患者的服药依从性。为了提高银杏叶提取物的治疗效果, 采用新制剂新方法改善其水溶性、生物利用度及依从性的研究尤为重要。

真空冷冻干燥技术能够最大程度地保留药品的生物活性, 将晶型药物转变为无定型药物, 增加药物的溶解度^[8], 在中药材的加工和保鲜中均

作者简介: 宋嘉佳, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新制剂研究, email: jiajia1.song@foxmail.com * 通信作者: 蔡程科, 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究, email: cck98@126.com

有十分广泛的应用^[9-11], 冻干舌下片的处方组成简单, 辅料用量低, 制备过程快速、工艺简单, 且服用无须用水, 仅需少量唾液就可在口中崩解, 具有携带服用方便, 操作简单的优点。故本研究拟采用此法制备银杏叶提取物冻干舌下片, 减轻患者用药痛苦, 增加用药的安全性和依从性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AL204 电子天平 [精度: 0.01 mg, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; BS2202S 电子天平 (精度: 0.01 g, 北京赛多利斯仪器系统有限公司); 84-1 磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); BME100L 高剪切混合乳化机 (上海威字机电有限公司); DJL-QF 低温食品速冻机 (深圳市德捷力冷冻科技有限公司); GZL-1.7 真空冷冻干燥机 [奥特佳美科技 (北京) 有限公司]; KQ-400DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); RE-501 旋转蒸发器 (北京神泰伟业仪器设备有限公司); Shimadzu HPLC DGM-20A5 [岛津 (上海) 试验器材有限公司]; 安捷伦 1260 高效液相色谱仪 (ELSD 6100 检测器)。

1.2 试药

银杏叶提取物 (批号: G20230706, 杨凌萃健生物工程技术有限公司, 银杏叶提取物原料药含量: 总黄酮醇苷为 25.7%; 萜类内酯为 7.1%。槲皮素峰面积: 山柰酚峰面积 = 1.1; 异鼠李素峰面积: 槲皮素峰面积 = 0.32, 符合《中国药典》2020 年版相关规定); 普鲁兰多糖 (批号: 2022121505, 山东康纳馨生物科技股份有限公司); 黄原胶 (批号: F-201C220901, 湖北葛店人福药用辅料有限责任公司); 氢氧化钠 (批号: 220802, 四川金山制药有限公司); 山柰酚 (纯度: 97.4%, 批号: 110861-202214)、槲皮素 (纯度: 99.1%, 批号: 100081-201610)、异鼠李素 (纯度: 99.1%, 批号: 110860-202012)、白果内酯 (纯度: 99.8%, 批号: 110865-202108)、银杏内酯 A (纯度: 94.7%, 批号: 110862-202213)、银杏内酯 B (纯度: 96.6%, 批号: 110863-202312) (中国食品药品检定研究院); 银杏内酯 C (纯度: 98%, 批号: D05IB234318, 上海源叶生物科技有限公司)。乙酸钠三水合物、磷酸 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 三氟乙酸 (北京百灵威科技有限公司); 二甲基亚砜 (上海吉至生化科技有限公司); 盐酸 (北京化工厂); 甲醇 (Fisher, 色谱纯)。

2 方法与结果

2.1 银杏叶提取物冻干舌下片的制备

① 配液: 分别称取处方量普鲁兰多糖、黄

原胶、氢氧化钠、银杏叶提取物逐一加入烧杯 A 中, 加入少量的纯净水搅拌至完全溶解。黄原胶需提前溶胀, 最后加纯净水定容至处方量。② 剪切: 采用高剪切混合乳化机进行剪切, 转速: $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 5 min。③ 过滤: 采用 100 目绢布过滤。④ 灌装 (灌装过程中保持搅拌): 灌注量 400 mg/片, 校准灌装体积, 灌装至 0.4 mL 的铝窝中, 共灌装 100 片。⑤ 预冻: 液氮预冻, 室温至 -45°C 降温 8 min, -45°C 保持 2 min; -45°C 至 -60°C 降温 3 min, -60°C 保持 3 min。预冻完成后进冻干机。⑥ 冻干: 冻干曲线, -25°C 进箱, 维持 10 min; -25°C 抽真空使箱内真空达到 200 μbar 以下, 维持 60 min; 以 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率由 -25°C 升至 -15°C , 维持 60 min; 以 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率由 -15°C 升至 -10°C , 维持 60 min; 以 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率由 -10°C 升至 -5°C , 维持 60 min; 以 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率由 -5°C 升至 25°C , 维持 120 min; 以 $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率由 25°C 升至 30°C , 维持 60 min; 总计: 485 min。压升试验合格后出箱。⑦ 密封: 密封温度为 162.5°C , 密封速度为 20 冲 $\cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2 银杏叶提取物冻干舌下片的质量评价标准

冻干舌下片的质量评价标准包括外观、崩解时限两部分。取出舌下片, 在光照充足处观察, 每个指标分为 5 个等级, 分数为 1~5 分, 具体评价指标见表 1。

共 8 项评价指标, 满分 40 分, 以综合评分最高者为最优处方。

2.3 黄酮醇苷含量测定

2.3.1 对照品溶液配制 取适量槲皮素、山柰酚、异鼠李素加甲醇配制成质量浓度为 1、1、0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。取上述储备液适量, 加甲醇稀释成槲皮素为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山柰酚为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异鼠李素为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 现用现配。

2.3.2 供试品溶液配制 取银杏叶提取物冻干舌下片研细, 精密称取约相当于总黄酮醇苷 9.6 mg 的粉末放入圆底烧瓶中, 加入 25 mL 甲醇-25% 盐酸溶液 (4:1), 在 85°C 水浴锅内水解 30 min, 迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 的量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜 ($0.45 \mu\text{m}$) 过滤, 即得供试品溶液。平行制备 3 份。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 InertSustain C18 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为甲醇: 0.4% 磷酸水 (50:50); 检测波长为 360 nm; 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 35°C ; 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下混

表 1 银杏叶提取物冻干舌下片质量评价标准

Tab 1 Quality evaluation criteria for lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract

评价指标	分数
颜色	片剂表面与横截面颜色均匀一致, 得 5 分 片剂中色泽一致占比 80% ~ 90%, 得 4 分 片剂中色泽一致占比 70% ~ 80%, 得 3 分 片剂中色泽一致占比 50% ~ 70%, 得 2 分 片剂中色泽一致占比 < 50%, 得 1 分
饱满度	片型饱满无塌陷, 向边缘逐渐降低, 得 5 分 片型中心略高于边缘, 得 4 分 片型中心略低于边缘, 得 3 分 片剂略有塌陷, 得 2 分 片剂塌陷严重, 得 1 分
光洁度	片剂表面光滑平整, 无麻点, 得 5 分 片剂表面麻点占比 0 ~ 10%, 得 4 分 片剂表面麻点占比 10% ~ 20%, 得 3 分 片剂表面麻点占比 20% ~ 30%, 得 2 分 片剂表面凹凸不平, 有较多麻点, 得 1 分
黏壁情况	片剂易取出, 无黏壁情况, 得 5 分 片剂黏壁情况占比 0 ~ 5%, 得 4 分 片剂黏壁情况占比 5% ~ 10%, 得 3 分 片剂黏壁情况占比 10% ~ 20%, 得 2 分 片剂黏壁情况占比 > 20%, 得 1 分
裂片程度	片剂表面无裂纹, 得 5 分 片剂表面裂纹占比 0 ~ 5%, 得 4 分 片剂表面裂纹占比 5% ~ 10%, 得 3 分 片剂表面裂纹占比 10% ~ 20%, 得 2 分 片剂表面裂纹占比 > 20%, 得 1 分
底融	片剂底部无融化现象, 得 5 分 片剂底部融化现象占比 0 ~ 10%, 得 4 分 片剂底部融化现象占比 10% ~ 20%, 得 3 分 片剂底部融化现象占比 20% ~ 30%, 得 2 分 片剂底部融化现象占比 > 30%, 得 1 分
芯融	片剂断面孔隙均匀, 得 5 分 片剂断面孔隙不均匀占比 0 ~ 10%, 得 4 分 片剂断面孔隙不均匀占比 10% ~ 20%, 得 3 分 片剂断面孔隙不均匀占比 20% ~ 30%, 得 2 分 片剂断面孔隙不均匀占比 > 30%, 得 1 分
崩解时限	崩解时间 < 30 s, 得 5 分 崩解时间为 30 ~ 40 s, 得 4 分 崩解时间为 40 ~ 50 s, 得 3 分 崩解时间为 50 ~ 60 s, 得 2 分 崩解时间 > 60 s, 得 1 分

合对照品溶液适量, 加甲醇稀释成槲皮素、山柰酚系列质量浓度均为 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 异鼠李素质量浓度为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 分别进样 10 μL , 测定并记录峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得槲皮素回归方程为 $Y = 34.60X - 30.77$ ($R^2 = 0.9999$); 山柰酚回归方程为 $Y = 39.17X - 35.39$ ($R^2 = 1.000$); 异鼠李素回归方程为 $Y = 29.50X - 13.05$ ($R^2 = 0.9999$)。表明槲皮素质量浓度在 3.03 ~ 97.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、山柰酚质量浓度在 3.15 ~ 100.81 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异鼠李素质量浓度在

1.62 ~ 51.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。该方法学考察合格。

2.4 萜类内酯含量测定

2.4.1 对照品溶液配制 取适量银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯加甲醇配制成质量浓度均为 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。取上述储备液适量, 加甲醇稀释成银杏内酯 A 为 0.62 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、银杏内酯 B 为 0.39 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、银杏内酯 C 为 0.33 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白果内酯为 1.01 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 现用现配。

2.4.2 供试品溶液配制 取银杏叶提取物冻干舌下片 20 片研细, 精密称取相当于萜类内酯 19.2 mg 即相当于 320 mg 银杏叶提取物的粉末, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 45 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min 后放冷, 加 110 μL 5% 盐酸, 再超声处理 5 min 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 20 mL, 回收甲醇至干, 残渣加水 10 mL, 置水浴中温热使溶散, 加 2% 盐酸溶液 0.1 mL, 分别用 15、10、10、10 mL 的乙酸乙酯振摇萃取 4 次, 合并后的提取液先后用 20 mL 5% 乙酸钠溶液、10 mL 乙酸乙酯溶液萃取, 再用 20 mL 纯净水萃取 2 次, 水层再用 10 mL 乙酸乙酯溶液萃取, 回收乙酸乙酯溶液, 残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 即得供试样品。

2.4.3 色谱条件 色谱柱为 InertSustain C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 0.05% 三氟乙酸水 (30 : 70); 漂移管温度: 120 $^{\circ}\text{C}$; 吹扫速度: 1.2 L \cdot min $^{-1}$; 流速: 1 mL \cdot min $^{-1}$; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下混合对照品溶液适量, 加甲醇逐级稀释, 进样后测定并记录峰面积, 进行计算, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得银杏内酯 A 回归方程为 $Y = 1.201X + 0.3980$ ($R^2 = 0.9941$); 银杏内酯 B 回归方程为 $Y = 1.205X + 0.2935$ ($R^2 = 0.9904$); 银杏内酯 C 回归方程为 $Y = 1.095X + 0.6330$ ($R^2 = 0.9904$); 白果内酯回归方程为 $Y = 1.076X + 0.7856$ ($R^2 = 0.9986$)。表明银杏内酯 A 质量浓度在 185.56 ~ 1237.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、银杏内酯 B 质量浓度在 116.41 ~ 776.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、银杏内酯 C 质量浓度在 100.09 ~ 667.29 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白果内酯质量浓度在 303.16 ~ 2021.09 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。该方法学考察合格。

2.5 星点设计 - 效应面法优化处方工艺

2.5.1 试验设计 根据课题组前期单因素试验, 确定了本次试验的骨架剂为普鲁兰多糖; pH 调节剂为氢氧化钠; 助悬剂为黄原胶。采用 Design

Experts 13 软件, 以影响舌下片质量的普鲁兰多糖 (4 ~ 12 mg/片)、氢氧化钠 (0.4 ~ 1.2 mg/片)、黄原胶 (0 ~ 0.3 mg/片) 的用量进行三因素三水平的星点设计, 并以综合评分 (Y) 为考察指标进行响应面分析, 星点设计因素及水平见表 2, 星点设计结果见表 3。

表 2 星点设计因素及水平

因素	水平		
	- 1	0	1
A	4	8	12
B	0.4	0.8	1.2
C	0	0.15	0.3

表 3 星点设计试验结果

No.	普鲁兰多糖 /mg	氢氧化钠 /mg	黄原胶 /mg	综合评分 (Y)
1	4	0.4	0.15	28.0
2	12	0.4	0.15	30.4
3	4	1.2	0.15	30.8
4	12	1.2	0.15	32.0
5	4	0.8	0	30.2
6	12	0.8	0	31.5
7	4	0.8	0.3	31.7
8	12	0.8	0.3	34.5
9	8	0.4	0	31.0
10	8	1.2	0	31.3
11	8	0.4	0.3	31.5
12	8	1.2	0.3	36.2
13	8	0.8	0.15	36.5
14	8	0.8	0.15	37.0
15	8	0.8	0.15	36.7
16	8	0.8	0.15	38.0
17	8	0.8	0.15	39.0

2.5.2 模型拟合 应用 Design Experts 13 软件对试验数据进行分析。以综合评分 (Y) 对普鲁兰多糖 (A)、氢氧化钠 (B)、黄原胶 (C) 进行方程拟合。采用 ANOVA 分析回归参数。由表 4 可知普鲁兰多糖 (A)、氢氧化钠 (B)、黄原胶 (C) 用量对综合评分 (Y) 影响显著 ($P < 0.05$), 得出方程: $Y = 32.44 + 0.9625A + 1.18B + 1.24C - 0.3AB + 0.375AC + 1.1BC - 3.83A^2 - 3.31B^2 - 1.63C^2$, 多元相关系数 $R^2 = 0.9736$, 模型 F 值为 28.68 ($P = 0.0001$), 且模型的失拟项不显著 ($P = 0.9812 > 0.05$), 表明该模型效果良好。根据回归方程, 得出三因素对综合评分的三维响应面图与等高线图, 如图 1 所示。

2.5.3 处方优化与预测 根据星点设计 - 效应面法优化的结果确定最优结果: 普鲁兰多糖 8.6 mg/片、氢氧化钠 0.9 mg/片、黄原胶 0.2 mg/片, 预计综合评分为 37.95 分。

2.5.4 工艺验证 根据“2.5.3”项下结果平行 3 次试验, 计算综合评分与 RSD 值。结果, 银杏叶提

表 4 ANOVA 分析回归参数

方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	167.75	9	18.64	28.68	0.0001
A	7.41	1	7.41	11.40	0.0118
B	11.04	1	11.04	16.99	0.0044
C	12.25	1	12.25	18.85	0.0034
AB	0.3600	1	0.3600	0.5539	0.4810
AC	0.5625	1	0.5625	0.8655	0.3832
BC	4.84	1	4.84	7.45	0.0294
A ²	61.84	1	61.84	95.16	< 0.0001
B ²	46.06	1	46.06	70.87	< 0.0001
C ²	11.22	1	11.22	17.27	0.0043
残差	4.55	7	0.6499		
失拟项	0.1775	3	0.0592	0.0541	0.9812
误差	4.37	4	1.09		
总离差	172.30	16			

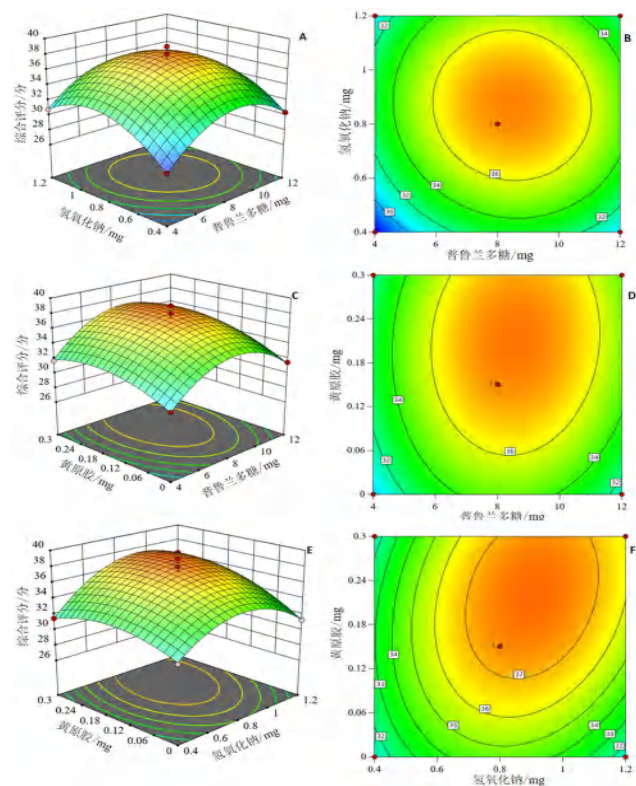


图 1 普鲁兰多糖、氢氧化钠与黄原胶交互作用的响应面分析
Fig 1 Response surface analysis of the interaction of pullulan polysaccharide, sodium hydroxide and xanthan gum

取物冻干舌下片的外观图见图 2, 综合评分分别为 37.1 分, 36.8 分, 37.3 分, 平均值为 37.07 分, 与预计综合评分接近, RSD 为 0.68%, 说明该结果稳定可靠。故银杏叶提取物冻干舌下片的最优处方为银杏叶提取物 40 mg/片、普鲁兰多糖 8.6 mg/片、氢氧化钠 0.9 mg/片、黄原胶 0.2 mg/片。

2.6 中试放大

根据工艺验证的最优结果进行中试放大生产, 计算综合评分, 进行有效成分含量测定。进行中试放大生产 7 万片, 所得银杏叶提取物冻干



图 2 银杏叶提取物冻干舌下片的外观图

Fig 2 Appearance of lyophilized sublingual tablets of ginkgo biloba extract

舌下片片型良好，颜色均匀，有效成分含量测定合格，符合要求。

2.7 银杏叶提取物冻干舌下片加速稳定性试验

将“2.6”项下中试放大生产银杏叶提取物冻干舌下片模拟市售包装，放置在温度 40℃、相对湿度 75% 的条件下，分别于 0、1、2、3、6 个月取样（由于试验时间有限，本阶段数据仅收集到第 1 个月），观察冻干片外观性状，并对药物含量进行测定。

《中国药典》2020 年版规定银杏叶片含总黄酮醇苷不得少于 24.0%，含萜类内酯不得少于 6.0%；槲皮素与山柰酚的峰面积比应为 0.8 ~ 1.2，异鼠李素与槲皮素的峰面积比应大于 0.15。由表 5 ~ 6 可知，银杏叶提取物冻干舌下片在 1 个月内稳定。

表 5 银杏叶提取物中黄酮类成分的含量 (n = 3)

Tab 5 Content of flavonoid in ginkgo biloba extract (n = 3)

时间 / 月	含量 / (mg / 片)		总黄酮			黄酮醇苷元峰面积比	
	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	醇苷比	RSD / %	槲皮素: 山柰酚	异鼠李素: 槲皮素
0	1.82	1.84	0.88	28.53	1.77	0.87	0.41
1	1.69	1.77	0.84	26.95	0.76	0.87	0.41

表 6 银杏叶提取物中萜类内酯成分的含量 (n = 3)

Tab 6 Content of terpene lactone in ginkgo biloba extract (n = 3)

时间 / 月	含量 / (mg / 片)				萜类内酯比例 / %	RSD / %
	白果内酯	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C		
0	1.37	0.64	0.51	0.36	7.22	1.6
1	1.45	0.65	0.50	0.38	7.47	3.3

3 讨论

本文以综合评分为指标，采用星点设计 - 效应面法优化银杏叶提取物冻干舌下片处方，所得银杏叶提取物冻干舌下片最优处方为：银杏叶提取物 40 mg / 片、普鲁兰多糖 8.6 mg / 片、氢氧化钠 0.9 mg / 片、黄原胶 0.2 mg / 片。所得结果稳定可靠，重复性良好，且经中试放大生产所得产品合格，可用于后续新药申报研究。

银杏叶提取物已上市片剂（含银杏叶提取物 40 mg）片重在 0.15 ~ 0.25 g，其最大占比辅料为乳糖。乳糖吸收不良发生率通常随着年龄的增长而增加，全球患病率约为 68%^[12]。与银杏叶提取物片剂相比，银杏叶提取物冻干舌下片片重仅为 49.7 mg，处方组成简单，辅料均为药品制剂常用辅料，处方量无安全性风险，冻干舌下片处方中不含乳糖，降低了乳糖不耐受患者的用药风险。进一步增加了用药的安全性。

试验发现加适量碱可调节银杏叶提取物的 pH 值，改善银杏叶提取物冻干舌下片的片型。后续可通过添加不同类型的碱来进行专门的考察试验以改善银杏叶提取物冻干舌下片的片型，为其他种类的冻干舌下片制备提供参考。由于时间问题，加速稳定性试验只进行到第一个月，后续将继续进行 6 个月的加速稳定性试验研究，完善试验数据。

参考文献

- Van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis and quality control of ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216 (11): 2002-2032.
- 姚建标. 银杏叶提取物中有机酸成分分析及其抗脑缺血损伤保护作用的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- Chong PZ, Ng HY, Tai JT, et al. Efficacy and safety of ginkgo biloba in patients with acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis [J]. Am J Chinese Med, 2020, 48 (3): 513-534.
- Li X, Huang LL, Liu G, et al. Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF-κB pathway in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112365.
- 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1612-1616.
- 郑彬. 银杏叶提取物前体脂质体的构建、评价及其肠吸收机理的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- 李佳馨, 沈喆安, 王曼, 等. 吞咽困难的老年患者治疗: 如何用创伤最小的方式来解决营养不良 [C]. Abstract Book of the 14th Asian Congress of Nutrition—Clinical Nutrition, 2023: 206.
- 孙军娣, 张自强, 何淑旺, 等. 儿童口服给药固体新剂型研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2019, 50 (6): 631-640.
- 刘彦昌, 于辛, 尹晓旭. 真空冷冻干燥技术在制药中的应用 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7 (41): 194.
- 任红兵. 真空冷冻干燥技术及其在中药领域的应用 [J]. 机电信息, 2016 (20): 12-21.
- 王新珂, 杨锡洪, 吴帆, 等. 果蔬冷冻干燥节能新技术研究进展 [J]. 食品与机械, 2020, 36 (6): 226-232.
- Storhaug CL, Fosse SK, Fadnes LT. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2 (10): 738-746.

(收稿日期: 2024-09-25; 修回日期: 2024-11-05)

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析利胆消痛方的化学成分

杨琰^{1,2}, 李万红¹, 程峰¹, 李堃¹, 葛飞^{1*} (1. 南京中医药大学翰林学院附属海安市中医院, 江苏 南通 226600; 2. 安徽医科大学药学院, 合肥 230032)

摘要: **目的** 利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对利胆消痛方水煎液成分进行定性分析。**方法** 采用 Accucore C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 柱温为 40 °C, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱。流速为 0.4 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μL。采用电喷雾离子源, 在正、负离子模式下, 精确分子质量和二级质谱裂解规律对检测到的化学成分进行鉴定, 通过与对照品比对, 结合文献报道, 确定化学成分。**结果** 在利胆消痛方中共鉴定出 103 个化学成分, 包括 48 个黄酮类化合物, 29 个萜类化合物, 8 个有机酸类化合物, 5 个氨基酸类化合物, 4 个生物碱类化合物, 4 个香豆素类化合物和 5 个其他类化合物。**结论** 本实验阐明利胆消痛方水煎液中的组成成分, 为其药效物质基础、质量控制和作用机制研究提供了依据。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS/MS; 利胆消痛方; 成分分析

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0409-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.018

Chemical constituents of Lidan Xiaotong formula based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technique

YANG Yan^{1,2}, LI Wan-hong¹, CHENG Feng¹, LI Kun¹, GE Fei^{1*} (1. Hai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Hanlin College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong Jiangsu 226600; 2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the constituents of the aqueous decoction of Lidan Xiaotong formula with UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, and to provide a basis for its quality control. **Methods** An Accucore C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) was used with 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase in a gradient elution mode. The column temperature was 40 °C, and the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹ with the injection volume of 5 μL. The electrospray ionization source was used to identify the detected chemical constituents by precise molecular mass and secondary mass spectrometry cleavage patterns in both positive and negative ion modes. The chemical constituents were determined by comparison with the controls and literature reports. **Results** Totally 103 chemical constituents, including 48 flavonoids, 29 terpenoids, 8 organic acids, 5 amino acids, 4 alkaloids, 4 coumarins and 5 other compounds, were identified in Lidan Xiaotong formula. **Conclusion** This experiment elucidates the constituents in the aqueous decoction of Lidan Xiaotong formula, providing a reference for the study of its material basis, efficacy, quality control and mechanism of action.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; Lidan Xiaotong formula; component analysis

胆囊炎 (cholecystitis) 是一种临床常见的消化系统疾病, 根据发病急缓程度, 可分为急性胆囊炎和慢性胆囊炎两种类型^[1]。急性胆囊炎常表

现为右上腹阵发性绞痛, 触痛明显和腹肌强直等, 具有起病急、进展快等特点^[2]; 慢性胆囊炎的症状包括右上腹部反复出现胀痛、不适感、腹

基金项目: 南通市中医医疗联盟课题 (No.TZYK202317); 江苏省中医药学会课题 (PDJH2024054)。

作者简介: 杨琰, 女, 在读硕士研究生, 主要从事医院中药制剂开发研究, email: yangyan_ym@163.com * **通信作者:** 葛飞, 男, 主任医师, 主要从事脾胃病的中医药防治研究, email: ha9099@163.com

胀、发热、恶心和呕吐，是一种持续性、反复发作的慢性炎症过程^[3]。多发生在中青年人中，女性患病率高于男性。随着生活方式的改变和年龄的增长，其患病率逐年增加^[4]。

中医学认为胆囊炎与肝、脾、胃脏器密切相关，肝、脾、胃连通于经脉，互为表里，临床以肝胆湿热证最为常见，治疗上应以疏肝利胆、清热利湿、行气通腑为主^[5]。四逆散出自《伤寒论》，是和解少阳、调和肝脾的基础方，然而四逆散单方在临床实际应用治疗慢性胆囊炎中效果并不理想。为此，在传统经方基础上，结合临床实践开发疗效更确切的中药复方成为临床迫切需求。

利胆消痛方是根据长期临床经验，在经典名方四逆散的基础上进行加味而成的中药复方，由醋北柴胡、白芍、茵陈、金钱草、麸炒枳壳、醋延胡索、炒川楝子、川芎、郁金、白花蛇舌草、野菊花、土茯苓、茯苓、炒鸡内金、甘草 15 味中药组成。方中将四逆散中枳实改为枳壳，行气止痛效果更佳；柴胡为君药，疏达肝气，升脾胃清阳之气^[6]；臣以白芍敛阴养血、柔肝止痛^[7]；茵陈、金钱草利胆退黄^[8]；佐以枳壳、川楝子、延胡索行气止痛^[9]，川芎活血止痛^[10]，郁金凉血止痛^[11]，白花蛇舌草、野菊花清热解毒，土茯苓清热利湿，茯苓、鸡内金健脾渗湿，甘草调和诸药，组方兼顾疏肝行气及清利湿热。中药复方利胆消痛方在临床应用于治疗慢性胆囊炎，在改善胁痛、压痛方面疗效颇佳，但其主要化学成分仍不明确，因此，本研究利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS/MS）技术对利胆消痛方中的成分进行了定性鉴别，为利胆消痛方的质量控制研究、药效物质基础研究、作用机制研究及进一步的制剂开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AB SCIEX Zeno TOF 7600 质谱仪、ExionLC 2.0 液相色谱仪（美国 AB Sciex 公司），Speed Vac 离心浓缩仪（美国 Thermo Scientific 公司），ER-2000A 旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）。

1.2 试药

乙腈、甲醇（色谱纯，德国默克公司），甲酸（色谱纯，阿拉丁试剂有限公司），纯水（实验室自制）。对照品柴胡皂苷 a（批号：MUST-1812031，成都曼思特生物科技有限公司）；绿原酸（批号：JOT-10032）、新橙皮苷（批号：JOT-10143）（成都普菲德生物科技有限公司）；甘草酸（批号：G-004-

181219）、阿魏酸（批号：RFS-A00211812016）、落新妇苷（批号：RFS-L00211812017）（成都瑞芬思生物科技有限公司）；甘草次酸（批号：201005，四川省维克奇生物技术有限公司）；槲皮素（批号：10081-9905，中国食品药品检定研究院）；山柰酚（批号：120428，北京世纪奥科生物技术有限公司）；橙皮苷（批号：M05M8S35241，上海源叶生物技术有限公司）；以上对照品质量分数均大于 98.0%。

1.3 饮片

土茯苓（批号：240313）、炒川楝子（批号：231213）（江苏鑫鑫中药饮片有限公司）；醋北柴胡（批号：230201）、郁金（批号：230501）（江苏紫石中药饮片有限公司）；白芍（批号：240130）、金钱草（批号：240306）、野菊花（批号：240106）、炒鸡内金（批号：240403）、醋延胡索（批号：240228）、川芎（批号：240408）、甘草片（批号：240131）（南通三越中药饮片有限公司）；白花蛇舌草（批号：HL-240301，重庆万力药业有限公司）；茵陈（批号：240111）、茯苓（批号：240319）、麸炒枳壳（批号：240305）（苏州市天灵中药饮片有限公司）。以上中药饮片由海安市中医院药学部李万红主任中药师鉴定分别为百合科植物光叶菝葜 *Smila glabra* Roxb. 的干燥根茎、楝科植物川楝 *Melia ioosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实、伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥块根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草、菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序、雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson. 的干燥沙囊内壁、罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang 的干燥块茎、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanciong* Hort. 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草的加工炮制品、菊科植物茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

称取醋北柴胡 10 g，白芍 15 g，茵陈 20 g，金钱草 20 g，麸炒枳壳 10 g，醋延胡索 10 g，炒川楝子 10 g，川芎 10 g，郁金 20 g，白花蛇舌草 15 g，野菊花 20 g，土茯苓 15 g，茯苓 15 g，炒

鸡内金 15 g, 甘草 6 g, 加入 10 倍量的水浸泡 30 min, 煎煮 2 h, 过滤后在残渣中加入 8 倍量的水再次煎煮 2 h, 合并两次滤液, 并于旋转蒸发器中浓缩至 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生药浓度。精密量取 200 μL 浓缩液, 加入 3 倍体积甲醇, 振荡混匀后置于 4°C 醇沉过夜, 于 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 下离心 10 min, 吸取上清液置于真空浓缩仪中挥干, 加入 500 μL 甲醇复溶, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定各对照品约 5.0 mg, 溶于甲醇中配成质量浓度为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品母液, 分别取适量各对照品母液混合, 稀释配成质量浓度范围为 $10.0 \sim 20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Accucore C_{18} 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μm), 柱温: 40°C , 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 5 μL 。梯度洗脱程序: 0 ~ 1 min, 10%B; 1 ~ 14 min, 10% ~ 60%B; 14 ~ 15 min, 60%B; 16 ~ 16.5 min, 60% ~ 10%B; 16.5 ~ 18 min, 10%B。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 离子源温度 (TEM)

550°C , 气帘气 (CUR) 35 psi, 雾化气 (GS1) 55 psi, 辅助加热气 (GS2) 55 psi, 离子源喷雾电压 (IS) 5500 V/ - 5500 V, 碰撞电压 (CE) 10 V/ - 10 V, 去簇电压 (DP) 80 V/ - 80 V, 扫描范围为 m/z 80 ~ 1250。

2.5 数据处理

通过查阅国内外关于利胆消痛方中 15 味中药的文献及 TCMSPP 数据库建立利胆消痛方化学成分数据库, 使用 PeakView Software (AB Sciex) 进行数据分析, 并与文献提供的化合物相应的保留时间及裂解规律等信息进行比对, 确认化学成分, 推导化合物的质谱裂解规律及结构。

3 结果

3.1 利胆消痛方水煎液中化学成分质谱鉴定

利胆消痛方供试品溶液及混合对照品溶液在正、负离子模式下的基峰离子流色谱图见图 1。结果显示, 在利胆消痛方中共鉴定出 103 个化学成分, 包括 48 个黄酮类化合物, 29 个萜类化合物, 8 个有机酸类化合物, 5 个氨基酸类化合物, 4 个生物碱类化合物, 4 个香豆素类化合物和 5 个其他类化合物。其中, 有 10 个化合物通过与对照品的保留时间及裂解碎片比对得到进一步确认, 质谱信息如表 1 所示。

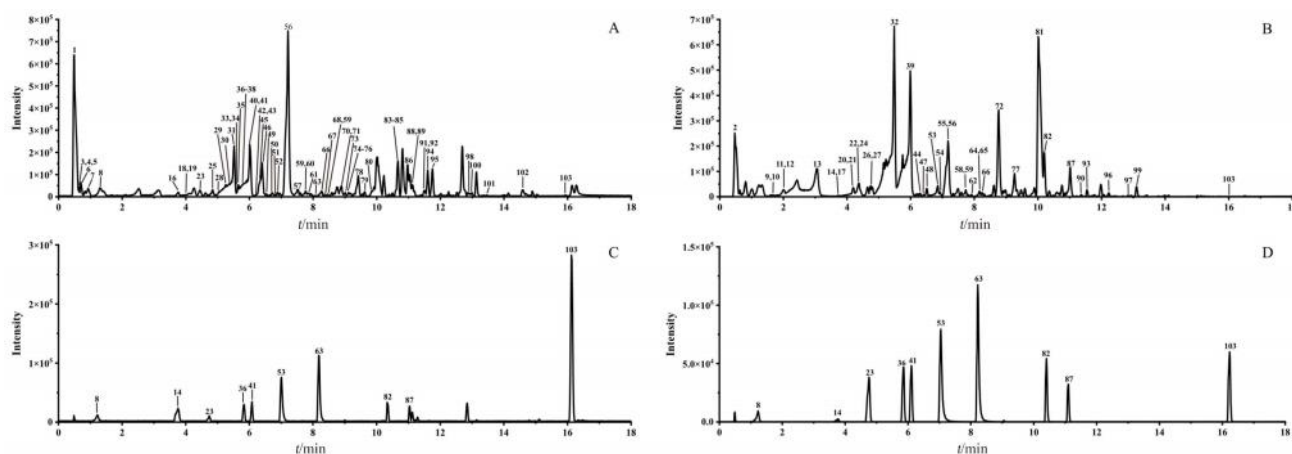


图 1 利胆消痛方 (上) 与混合对照品溶液 (下) 在正离子 (A、C) 和负离子 (B、D) 模式下的基峰离子流色谱图

Fig 1 Base peak chromatograms of Lidan Xiaotong formula (up) and the mixed control solution (down) in both positive (A and C) and negative (B and D) ion modes

3.2 主要类别化合物解析

3.2.1 黄酮类化合物的鉴定

在利胆消痛方水煎液中中共鉴定出 48 个黄酮类化合物, 其中大多数为黄酮苷元和黄酮苷类化合物。化合物 36 ($t_r = 5.76 \text{ min}$), 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 611.1958 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 二级质谱 (MS^2) 中主要碎片离子分别为 m/z 465.1401 $[\text{M} + \text{H-Rha}]^+$,

m/z 303.0946 $[\text{M} + \text{H-Rha-Glc}]^+$, 和诊断离子 m/z 153.0179 $[\text{M} + \text{H-Rha-Glc-C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$ 。结合文献报道^[12], 并通过对照品比对, 推测化合物 36 为橙皮苷, 其 MS/MS 图谱及裂解规律如图 2 所示。

3.2.2 萜类化合物的鉴定 在利胆消痛方水煎液中中共鉴定出 29 个萜类化合物, 主要为萜苷类, 且主要来源于中药郁金、柴胡、甘草。

表 1 利胆消痛方水煎液中的化学成分鉴定

Tab 1 Identification of chemical constituents in the aqueous decoction of Lidan Xiaotong formula

序号	t_R /min	成分	化学式	离子模式	实际 分子量	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片	来源
1	0.45	L-精氨酸	$C_6H_{14}N_4O_2$	[M+H] ⁺	175.1190	0.3	130.1010, 116.0786	鸡内金
2	0.50	帕拉金糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	[M-H] ⁻	341.1083	-1.9	119.0356, 113.0248, 89.0247, 85.0302	白花蛇舌草
3	0.54	腺嘌呤	$C_5H_5N_5$	[M+H] ⁺	136.0619	0.9	119.0391, 109.0510	鸡内金
4	0.63	酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	[M+H] ⁺	182.0811	-0.7	136.0759, 123.0440, 119.0491, 91.0548	鸡内金
5	0.64	亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	[M+H] ⁺	132.1017	-1.8	86.1022	鸡内金
6	0.70	苯丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	[M+H] ⁺	166.0863	0.1	149.0584, 120.0894, 103.0623	鸡内金
7	0.93	色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	[M+H] ⁺	205.0966	-2.9	188.0726, 146.0629, 118.0652	鸡内金
8	1.30	绿原酸*	$C_{16}H_{18}O_9$	[M+H] ⁺	355.1021	-0.7	163.0489, 135.0449	茵陈
9	1.60	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	[M-H] ⁻	179.0346	-2.2	135.0479, 107.0508, 89.0402	金钱草
10	1.70	香草酸	$C_8H_8O_4$	[M-H] ⁻	167.0346	-2.4	152.0121, 108.0215	川楝子
11	2.39	维采宁-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[M-H] ⁻	593.1500	-2.1	503.1194, 473.1092, 383.0775, 353.0672	金钱草
12	2.77	4-乙烯基苯酚	C_8H_8O	[M-H] ⁻	119.0500	-1.7	117.0344, 93.0348, 91.0552	白花蛇舌草
13	3.04	芍药苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	[M-H] ⁻	479.1549	-2.0	449.1473, 327.1087, 121.0297	白芍
14	3.69	阿魏酸*	$C_{10}H_{10}O_4$	[M-H] ⁻	193.0501	-2.7	178.0280, 149.0608, 134.0379	川芎
15	3.70	异夏佛塔苷	$C_{26}H_{28}O_{14}$	[M-H] ⁻	563.1398	-1.5	473.1097, 443.0992, 383.0775, 353.0670	金钱草
16	3.79	芸香柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	[M+H] ⁺	581.1862	-0.5	273.0754, 153.0178	枳壳
17	3.85	3-阿拉伯糖葡萄糖基 槲皮素	$C_{26}H_{28}O_{16}$	[M-H] ⁻	595.1327	3.7	301.0268, 300.0270, 255.0689	白花蛇舌草
18	4.14	圣草次苷	$C_{27}H_{32}O_{15}$	[M+H] ⁺	597.1801	-2.2	451.1222, 289.0700	枳壳
19	4.15	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	[M+H] ⁺	287.0549	-0.4	185.0645, 153.0178	枳壳
20	4.20	甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	[M-H] ⁻	417.1187	-1.0	255.0697, 135.0100, 119.0509	甘草
21	4.21	夏佛塔苷	$C_{26}H_{28}O_{14}$	[M-H] ⁻	563.1390	-2.9	473.1069, 443.0980, 383.0778, 353.0669	金钱草
22	4.42	金丝桃苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[M-H] ⁻	463.0876	-1.3	271.0252, 255.0297, 151.0039	柴胡
23	4.43	落新妇苷*	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[M+H] ⁺	451.1232	-0.6	305.0648, 287.0559, 153.0180	土茯苓
24	4.47	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[M-H] ⁻	609.1458	-0.5	394.9048, 300.0282	川楝子
25	4.78	新北美圣草苷	$C_{27}H_{32}O_{15}$	[M+H] ⁺	597.1802	-2.0	451.1202, 289.0707	枳壳
26	4.80	6'-O-没食子酰白 芍苷	$C_{30}H_{32}O_{15}$	[M-H] ⁻	631.1655	-2.1	613.1570, 313.0567, 169.0143	白芍
27	4.80	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M-H] ⁻	447.0926	-1.5	285.0423	金钱草
28	5.01	α -葡萄糖糖基橙皮苷	$C_{34}H_{44}O_{20}$	[M+H] ⁺	773.2491	-1.1	465.1415, 303.0856, 147.0650	枳壳
29	5.24	忍冬苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[M+H] ⁺	595.1649	-1.4	449.1102, 287.0549	枳壳
30	5.38	橙皮素 5-O-葡萄 糖苷	$C_{22}H_{24}O_{11}$	[M+H] ⁺	465.1390	-0.3	177.0552, 145.0290	枳壳
31	5.51	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	[M+H] ⁺	581.1860	-0.8	435.1304, 273.0872, 153.0244, 147.0457	枳壳
32	5.54	染料木苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	[M-H] ⁻	431.0976	-1.9	431.0998, 269.0456	鸡内金
33	5.56	牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	[M+H] ⁺	433.1125	-0.9	271.0718	甘草
34	5.57	异鼠李素	$C_{16}H_{12}O_7$	[M+H] ⁺	317.0653	-1.0	257.0438, 245.0440, 217.0592, 153.0177	甘草
35	5.65	异野漆树苷	$C_{27}H_{30}O_{14}$	[M+H] ⁺	579.1702	-1.0	310.4255, 271.0714	枳壳
36	5.76	橙皮苷*	$C_{28}H_{34}O_{15}$	[M+H] ⁺	611.1958	-2.0	465.1401, 303.0946, 153.0179	枳壳
37	5.77	黄连碱	$C_{19}H_{14}NO_4$	[M] ⁺	320.0919	-1.3	292.0970, 262.0866, 234.0914	土茯苓
38	5.79	延胡索乙素	$C_{21}H_{25}NO_4$	[M+H] ⁺	356.1853	-1.0	294.1247, 251.1061, 192.1031, 165.0904	延胡索
39	5.85	牡丹皮苷 D	$C_{24}H_{30}O_{12}$	[M-H] ⁻	509.1654	-2.0	121.0302	白芍
40	6.00	香叶木素-7-O-葡 萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{11}$	[M+H] ⁺	463.1231	-0.9	286.0485, 301.0721	野菊花
41	6.02	新橙皮苷*	$C_{28}H_{34}O_{15}$	[M+H] ⁺	611.1964	-1.1	465.1411, 303.0953, 153.0203	枳壳
42	6.19	芹糖异甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	[M+H] ⁺	551.1763	0.7	419.1327, 257.0807, 147.0439, 137.0237	甘草
43	6.26	芒柄花苷	$C_{22}H_{22}O_9$	[M+H] ⁺	431.1333	-0.8	213.0912, 237.0559, 269.085	甘草

续表 1

序号	t_R/min	成分	化学式	离子模式	实际分子量	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片	来源
44	6.30	异甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.1183	- 1.9	255.0671, 135.0092	甘草
45	6.32	延胡索甲素	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	370.2009	- 1.1	192.1018, 165.0905	延胡索
46	6.40	水合橙皮内酯	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺	279.1225	- 0.8	189.0550, 159.0434, 131.0494, 103.05540	枳壳
47	6.41	灯盏花甲素	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.0766	- 2.4	269.0459, 113.0243, 85.0296	白花蛇舌草
48	6.44	甘草素	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.0655	- 3.2	135.0088, 119.0505, 91.0193	甘草
49	6.50	甘草查耳酮 B	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.0915	0.3	245.0804, 193.0492, 147.0441, 121.0286, 107.0492	甘草
50	6.71	小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	[M] ⁺	336.1227	- 2.6	304.0978, 292.0965, 278.0806	延胡索
51	6.77	异紫花前胡内酯	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	247.0965	0.0	187.0397, 175.0387, 147.0440	枳壳
52	6.79	茯苓新酸 B	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	[M+H] ⁺	485.3257	- 0.9	469.3145, 449.2772, 325.2202	茯苓
53	6.89	槲皮素*	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.0346	- 2.7	151.0042, 107.0144	金钱草、白花蛇舌草
54	6.92	2'-羟基异黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.0399	- 2.0	217.0510, 199.0406, 175.0402, 133.0301	金钱草
55	7.17	刺槐素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.0603	- 3.3	211.0404, 151.0040, 83.0136	金钱草
56	7.17	蒙花苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	591.1706	- 2.3	283.0606, 207.2946, 195.2436	野菊花
	7.21			[M+H] ⁺	593.1860	- 0.9	447.1301, 285.0782	
57	7.52	异樱花亭	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.0912	- 0.8	161.0595, 153.0219, 133.0649	枳壳
58	7.72	柴胡皂苷 q	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	[M+HCOO] ⁻	1003.5080	- 2.8	957.5044, 487.3502	柴胡
59	7.73	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.0601	- 4.1	151.0044, 119.0512, 93.0349	金钱草、枳壳
	7.77			[M+H] ⁺	273.0756	- 0.5	153.0205, 147.0444, 119.0492	
60	7.78	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	303.0867	1.3	177.0541, 153.0183	枳壳
61	7.81	原菝葜醇	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	235.1692	- 0.3	217.1593, 175.1121, 135.1160, 95.0849	郁金
62	7.91	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.0448	- 2.7	225.0564, 159.0453, 117.0351, 107.0143	金钱草
63	8.08	山柰酚*	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.0552	0.7	165.0177, 153.0179, 121.0282	金钱草、白花蛇舌草
64	8.16	苯甲酰氧化芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	583.1801	- 3.4	165.0527, 121.0291	白芍
65	8.16	牡丹皮苷 B	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	629.1860	- 2.5	553.1728, 431.1342, 165.0558, 121.0299	白芍
66	8.24	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.0549	- 4.0	283.1191, 189.0118, 157.0302	金钱草、枳壳
	8.28			[M+H] ⁺	301.0705	- 0.4	286.0464, 258.0523	
67	8.46	棕矢车菊素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	331.0810	- 0.6	316.0587	枳壳
68	8.58	甘草皂苷 A ₃	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	[M+H] ⁺	985.4623	- 1.6	809.4288, 647.3777, 615.3890, 71.3458	甘草
69	8.59	Zedoarofuran	C ₁₃ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺	265.1431	- 1.4	229.1232, 121.1010	郁金
70	8.81	佛手柑内酯	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.0494	- 0.8	202.0271, 174.0315, 118.0418	枳壳
71	8.89	青蒿酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	235.1690	- 1.1	217.1597, 177.1271, 161.0966, 133.1010, 107.0853	郁金
72	8.90	川楝素	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	573.2321	- 3.6	531.2229, 428.7715	川楝子
73	9.02	5-hydroxy-6, 7, 8, 4'-tetrahydroxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	359.1122	- 1.0	329.0645, 311.0546	枳壳
74	9.12	藜本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1065	- 0.8	173.0959, 149.0593, 91.0544	川芎
75	9.14	滨蒿内酯	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	207.0651	- 0.5	164.0466, 148.0528, 121.0281	茵陈
76	9.18	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.0807	- 0.6	253.0490, 225.0546, 213.0907, 137.0231	甘草
77	9.26	半夏酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	329.2324	- 2.8	229.1461, 211.1358, 171.1030	柴胡
78	9.50	新菝葜二酮	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	[M+H] ⁺	237.1841	- 3.4	219.1693, 163.1149, 121.1018	郁金
79	9.62	甘草皂苷 G ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	839.4050	- 1.2	627.3516, 469.3340, 451.3209	甘草
80	9.87	甘草内酯	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	[M+H] ⁺	469.3305	- 1.6	451.3202, 439.3214	甘草
81	9.91	柴胡皂苷 c	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M+HCOO] ⁻	971.5180	- 3.1	925.5163, 779.4559, 617.5656	柴胡
82	10.20	甘草酸*	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.3941	- 2.9	351.0575	甘草
83	10.60	芫花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.0755	- 0.9	270.0529, 153.0185	茵陈

续表 1

序号	t_R/min	成分	化学式	离子模式	实际分子量	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片	来源
84	10.66	莪术二酮异构体	$C_{15}H_{24}O_2$	$[M+H]^+$	237.1849	0.0	219.1735, 135.1161, 107.0855, 95.0852	郁金
85	10.70	齐墩果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M+H]^+$	457.3673	-0.8	303.2335, 221.1881, 191.1807	甘草
86	10.90	莪术烯醇	$C_{15}H_{22}O_2$	$[M+H]^+$	235.1690	-1.1	217.0957, 189.1637, 161.0957, 133.1009, 105.0697	郁金
87	10.96	柴胡皂苷 a*	$C_{42}H_{68}O_{13}$	$[M+HCOO]^-$	825.4615	-2.0	779.4603, 617.4069	柴胡
88	11.13	莪术烯	$C_{15}H_{20}O$	$[M+H]^+$	217.1585	-0.7	175.1124, 147.0801, 95.0854	郁金
89	11.16	洋川芎内酯 A	$C_{12}H_{16}O_2$	$[M+H]^+$	193.1221	-1.1	175.1115, 147.1179, 137.0611, 105.0702, 91.0567	川芎
90	11.37	柴胡皂苷 b ₂	$C_{42}H_{68}O_{13}$	$[M+HCOO]^-$	825.4612	-2.3	779.4586, 617.4042	柴胡
91	11.52	莪术二酮	$C_{15}H_{24}O_2$	$[M+H]^+$	237.1843	-2.6	219.1745, 191.1100, 135.1178, 95.0855	郁金
92	11.53	姜黄素	$C_{21}H_{20}O_6$	$[M+H]^+$	369.1329	-0.9	177.0904, 161.0595	郁金
93	11.54	柴胡皂苷 b ₁	$C_{42}H_{68}O_{13}$	$[M+HCOO]^-$	825.4613	-2.2	779.4603, 617.14069	柴胡
94	11.60	橘皮素	$C_{20}H_{20}O_7$	$[M+H]^+$	373.1279	-0.8	343.0918, 325.0707	枳壳
95	11.81	莪术酮	$C_{15}H_{18}O_2$	$[M+H]^+$	231.1376	-1.6	213.0934, 149.1333, 83.0473	郁金
96	12.23	<i>O</i> -acetyl-saikosaponin a	$C_{44}H_{70}O_{14}$	$[M+HCOO]^-$	867.4715	-2.5	821.4684, 779.4557, 617.4039	柴胡
97	12.86	<i>O</i> -acetyl-saikosaponin b ₂	$C_{44}H_{70}O_{14}$	$[M+HCOO]^-$	867.4714	-2.6	821.4688, 779.4562, 617.4059	柴胡
98	12.91	芳姜黄烯	$C_{15}H_{22}$	$[M+H]^+$	203.1803	4.3	147.1168, 105.0697, 93.0697	郁金
99	13.04	光甘草定	$C_{20}H_{20}O_4$	$[M-H]^-$	323.1273	-5.1	213.0912, 201.0919, 147.0448, 135.0452, 121.0294	甘草
100	13.07	补骨脂二氢黄酮	$C_{20}H_{20}O_4$	$[M+H]^+$	325.1431	-1.0	189.0907, 149.0593, 147.0800, 123.0441, 121.0647	甘草
101	13.45	甘草异黄酮 B	$C_{20}H_{16}O_6$	$[M+H]^+$	353.1016	-1.0	335.0915, 283.0606, 217.0489, 153.0814	甘草
102	14.49	吉玛酮	$C_{15}H_{22}O$	$[M+H]^+$	219.1744	0.3	201.1647, 121.1009, 95.0859	郁金
103	15.90	甘草次酸*	$C_{30}H_{46}O_4$	$[M-H]^-$	469.3301	-4.7	425.3415, 409.2995	甘草
	15.93			$[M+H]^+$	471.3465	-0.8	317.2111, 235.1694	

注: *表示经过对照品确认。

Note: *Refers to the comparison of the reference substance.

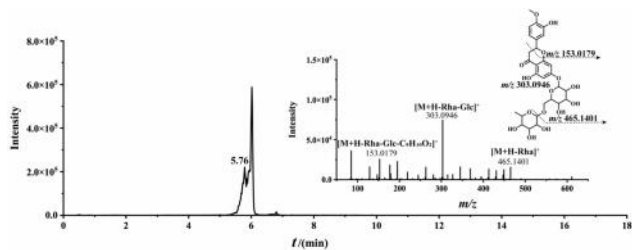


图 2 橙皮苷的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 2 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of hesperidin

五环三萜类化合物 **81** ($t_R = 9.91 \text{ min}$), 在负离子模式下其加合离子峰为 m/z 971.5180 $[M + HCOO]^-$, 进一步裂解形成准分子离子峰 m/z 925.5163 $[M-H]^-$ 。在二级质谱 (MS^2) 中出现 m/z 779.4559 $[M-H-Fuc]$ 离子碎片, 推测为准分子离子丢失一分子岩藻糖而形成。继续丢失一分子葡萄糖得到 m/z 617.5656 $[M-H-Fuc-Glc]$ 离子碎片, 结合文献报道^[13], 化合物 **81** 被鉴定为柴胡皂苷 c, 其

MS/MS 图谱及裂解规律如图 3 所示。

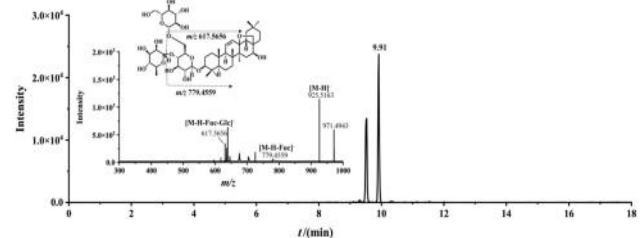


图 3 柴胡皂苷 c 的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 3 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of saikosaponin c

3.2.3 有机酸类化合物的鉴定 本实验在利胆泻痛方水煎液中共鉴定出 8 个有机酸类化合物, 这类化合物在 ESI^- 模式下更容易检出分子离子峰, 且主要发生小分子碎片丢失。

化合物 **14** ($t_R = 3.69 \text{ min}$), 在负离子模式下出现 m/z 193.0501 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, MS^2 质谱图显示了碎片离子 m/z 178.0280 $[M-H-CH_3]^-$ 为准分

子离子失去一个甲基所形成，紧接着发生羧基的断裂形成 m/z 134.0379 $[M-H-CH_3-CO_2]^-$ 碎片离子。同时还发现了特征碎片离子 m/z 149.0608 $[M-H-CO_2]^-$ ，根据其裂解方式并结合文献^[14]，鉴定化合物 **14** 为阿魏酸，并通过与对照品比对得到确认，其 MS/MS 图谱及裂解规律如图 4 所示。

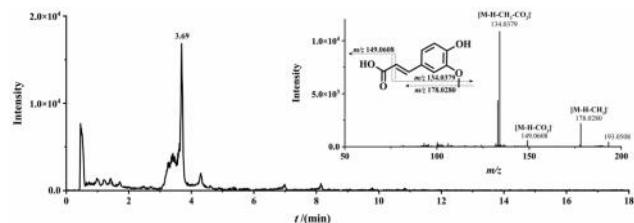


图 4 阿魏酸的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 4 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of ferulic acid

3.2.4 氨基酸类化合物的鉴定 在利胆消痛方水煎液中共鉴定出 5 个氨基酸类化合物，主要来源于中药鸡内金。氨基酸是一类具有氨基和羧基的化合物，其裂解过程中容易丢失 NH_3 、 H_2O 、 CO 、 $HCOOH$ 等碎片^[15]。以化合物 **6** ($t_R = 0.70$ min) 为例，在正离子模式下，其准分子离子峰为 m/z 166.0863 $[M + H]^+$ ， MS^2 质谱中母离子裂解失去一分子羧基产生 m/z 120.0894 $[M + H-COOH]^+$ 特征离子碎片，裂解失去一分子氨基产生 m/z 149.0584 $[M + H-NH_3]^+$ 特征离子碎片，在此基础上再失去一分子羧基产生 m/z 103.0623 $[M + H-NH_3-COOH]^+$ 特征离子碎片。根据其裂解方式并结合文献^[16]，鉴定化合物 **6** 为苯丙氨酸，并通过与对照品比对得到确认，其 MS/MS 图谱及裂解规律如图 5 所示。

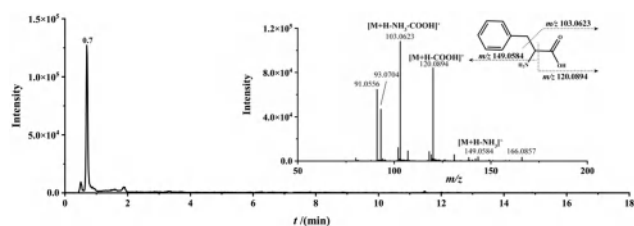


图 5 苯丙氨酸的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 5 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of phenylalanine

3.2.5 生物碱类化合物的鉴定 本实验在利胆消痛方水煎液中共鉴定出 4 个生物碱类化合物，且主要来源于中药延胡索、土茯苓。生物碱类的化合物更容易加合 H^+ ，在 ESI^+ 模式下更容易检出准分子离子峰。以化合物 **50** ($t_R = 6.71$ min) 为例，在正离子模式下，其准分子离子峰为 m/z 336.1227 $[M]^+$ ，在二级质谱 (MS^2) 中主要碎片离子分别为 m/z 321.0986 $[M-CH_3]^+$ 、 m/z 320.0913 $[M-CH_3-H]^+$ 、 m/z

$306.0761 [M-2CH_3]^+$ 、 m/z 292.0965 $[M-CH_3-H-CO]^+$ 、 m/z 278.0806 $[M-2CH_3-CO]^+$ ，此外碎片离子 m/z 304.0978 $[M-OCH_4]^+$ 为亚基二氧基丢失一分子甲氧基和一个氢形成的侧环。根据其裂解方式并结合参考文献^[17]，鉴定化合物 **50** 为小檗碱，并通过对照品得以确认，其 MS/MS 图谱及裂解规律如图 6 所示。

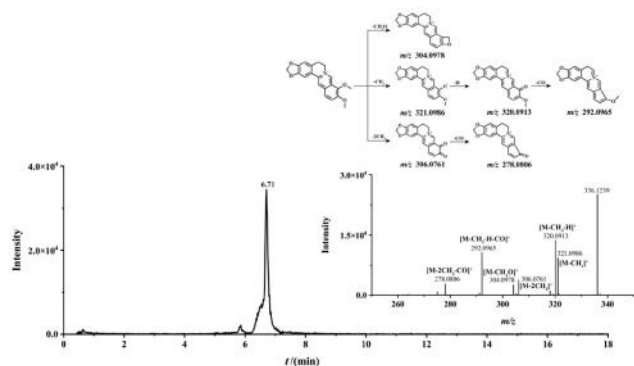


图 6 小檗碱的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 6 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of berberine

3.2.6 香豆素类化合物的鉴定 本实验在利胆消痛方水煎液中共鉴定出 4 个香豆素类化合物，主要来源于中药枳壳和茵陈。香豆素类成分一般可以通过脱去吡喃环上的 CO 或苯环侧链上的 CH_3 形成碎片，碰撞能量较高时内酯环也可能直接断裂而脱落^[18]。化合物 **75** ($t_R = 9.14$ min)，在正离子模式下，出现准分子离子峰 m/z 207.0651 $[M + H]^+$ ， MS^2 质谱中母离子脱去侧链上的 CH_3 ，产生离子碎片 m/z 192.0416 $[M + H-CH_3]^+$ ，继续丢失吡喃环上的 CO 产生碎片离子 m/z 164.0466 $[M + H-CH_3-CO]^+$ 。内酯环断裂后碳链重排，产生离子碎片 m/z 151.0350 $[M + H-2CO]^+$ ，再脱去两分子甲基产生离子碎片 m/z 121.0281 $[M + H-2CO-2CH_3]^+$ 。此外，还在二级质谱中发现了特征碎片离子 m/z 163.0388 $[M + H-CO_2]^+$ 、 m/z 148.0528 $[M + H-CO_2-CH_3]^+$ 。结合文献报道^[19]，鉴定化合物 **75** 为滨蒿内酯，其 MS/MS 图谱及裂解规律如图 7 所示。

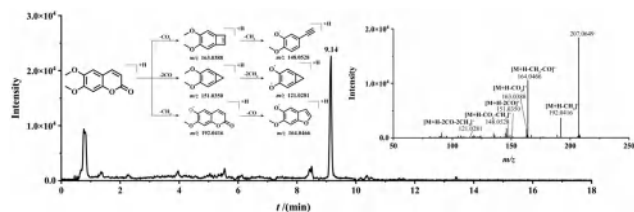


图 7 滨蒿内酯的 MS/MS 谱及裂解规律

Fig 7 MS/MS spectrum and fragmentation pattern of scoparone

4 讨论

四逆散具有透邪解郁、疏肝理脾的功效，在临床上能够疏解肝气，调节患者的情绪，缓解患

者的疼痛,减轻患者的痛苦,从而治疗慢性胆囊炎^[20]。郭戎等^[21]鉴定出四逆散中的 17 个化合物,主要为甘草苷、芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸等。利胆消痛方是在经典名方四逆散的基础上进行加味而成的中药复方,因此在四逆散成分分析研究的基础上对利胆消痛方进行进一步的化学成分鉴定,比四逆散多鉴定出 86 种化合物,如落新妇苷、藁本内酯、木犀草素等。

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对利胆消痛方的化学成分进行了分析,共鉴定出 103 个化学成分,多数成分来源于枳壳、郁金、金钱草、柴胡,这些成分中包括 48 个黄酮类化合物,29 个萜类化合物,8 个有机酸类化合物,5 个氨基酸类化合物,4 个生物碱类化合物,4 个香豆素类化合物和 5 个其他类化合物,因此黄酮类和萜类成分可作为其代表性的成分进行质量控制。本研究为筛选药效成分奠定了基础,也为利胆消痛方的质量标准建立及进一步的制剂开发提供了依据。但本研究仅鉴定了利胆消痛方中的化学成分,尚需对代谢产物及其分布进行进一步定性分析。

参考文献

- [1] Yeo DM, Jung SE. Differentiation of acute cholecystitis from chronic cholecystitis: determination of useful multi-detector computed tomography findings [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97 (33): e11851.
- [2] 周书. 疏肝清热利胆汤在急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术后的应用 [J]. *中国中医药科技*, 2023, 30 (6): 1200-1202.
- [3] Liu F, Li FY, Zhou RX. Unusual case of gallstones with chronic cholecystitis revealing a metachronous gallbladder metastasis from renal clear cell carcinoma [J]. *ANZ J Surg*, 2020, 90 (4): E87-E88.
- [4] 吉春阳, 马海丽. 清中汤联合熊胆胶囊治疗慢性胆囊炎反复发作的疗效及对胆囊修复的研究 [J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37 (12): 130-133.
- [5] 吕迎春, 蔡翠珠, 马贞. 四逆散合复方茵陈蒿汤加减治疗老年慢性胆固醇结石性胆囊炎急性发作(肝胆湿热证)的临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31 (3): 503-506.
- [6] 刘扬, 樊凯芳, 李雯, 等. 基于“调气机, 解六郁”论柴胡运用 [J]. *中医临床研究*, 2024, 16 (16): 127-130.
- [7] Kim WJ, Noh S, Choi G, et al. Rapid identification of *Paeoniae Radix* and *moutan radicis cortex* using a SCAR marker-based conventional PCR assay [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11 (21): 2870.
- [8] 苏静, 王亚亚, 梁轩, 等. 金钱草的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2024, 39 (3): 357-363.
- [9] Petruczynik A, Plech T, Tuzimski T, et al. Determination of selected isoquinoline alkaloids from *mahonia aquifolia*; *meconopsis cambrica*; *corydalis lutea*; *dicentra spectabilis*; *fumaria officinalis*; *macleaya cordata* extracts by HPLC-DAD and comparison of their cytotoxic activity [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11 (10): 575.
- [10] Gao J, Wang TS, Wang C, et al. Effects of Tianshu capsule on spontaneously hypertensive rats as revealed by (1)H-NMR-based metabolic profiling [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 989.
- [11] Chen ZM, Hu L, Liao YJ, et al. Different processed products of *Curcumae Radix* regulate pain-related substances in a rat model of Qi Stagnation and blood stasis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 242.
- [12] 李骄, 刘蒙蒙, 王志, 等. 基于 HPLC-FT-ICR-MS 技术分析中药复方大柴胡汤中的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40 (11): 1417-1431.
- [13] 王雅静, 周思倩, 冯敏, 等. 基于 UPLC-Q-TOF HRMS 技术建立逍遥丸指纹图谱及化学成分鉴定 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (10): 2597-2601.
- [14] 曾宇骄, 罗玉婷, 张琨, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术的藏药八味小檗皮胶囊化学成分分析研究 [J]. *成都中医药大学学报*, 2023, 46 (1): 32-40.
- [15] 龚春霞, 蒋叶珂, 潘凌宇, 等. 基于 UPLC-QE-MS 技术分析甘姜苓术配方颗粒的化学成分 [J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37 (6): 44-50.
- [16] 蒋淼, 彭伟, 吴纯洁, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的大建中汤血清药物化学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54 (16): 5154-5164.
- [17] 程硕涵, 雷小英, 康雯, 等. 基于 LC-MS/MS 分析壮药龙钻通痹颗粒的化学成分 [J]. *中国药学杂志*, 2024, 59 (9): 818-826.
- [18] 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.
- [19] 邓放, 刘欣, 郑振兴, 等. 5, 7-二甲氧基香豆素和 6, 7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢产物鉴定与代谢途径分析 [J]. *中草药*, 2023, 54 (17): 5629-5639.
- [20] 柳力夫, 张文兴. 四逆散加减治疗慢性胆囊炎的临床疗效观察 [J]. *北方药学*, 2021, 18 (2): 24-25.
- [21] 郭戎, 束艳, 张丽, 等. 四逆散化学成分的 UPLC-ESI/MS 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (22): 3114-3118.

(收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-07-20)

淫羊藿苷通过 PI3K/AKT 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞的增殖分化

范凯健¹, 钮艾雯¹, 吴辉辉^{2*} (1. 上海市崇明区精神卫生中心药剂科, 上海 202150; 2. 上海中医药大学附属曙光医院风湿科, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响。**方法** 采用 CCK-8 法检测淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖活性的影响, 筛选合适浓度的淫羊藿苷用于后续实验。将 MC3T3-E1 细胞随机分为对照组和淫羊藿苷组, 于成骨细胞诱导的第 7 日, 采用碱性磷酸酶染色法检测细胞碱性磷酸酶活性; 成骨细胞诱导第 21 日, 采用茜素红染色检测各组 MC3T3-E1 细胞中钙化结节形成情况; 划痕愈合和 Transwell 细胞迁移实验检测 MC3T3-E1 细胞的迁移能力; Western blot 技术检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白与成骨相关蛋白的表达情况, 以验证淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞分化的作用机制。并结合分子对接方法计算淫羊藿苷与 PI3K、AKT 的结合能力。**结果** 淫羊藿苷能显著升高 MC3T3-E1 细胞内碱性磷酸酶的表达水平, 增加钙盐沉积和钙化结节的数量, 促进 MC3T3-E1 细胞的钙化; 与对照组比较, 0.1、0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷处理组促进细胞迁移。与对照组比较, 0.1、0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷组的 SMAD4、BMP-2、TGF- β 的蛋白表达水平明显上调, PI3K、AKT、SMAD2 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$)。分子对接结果显示, 淫羊藿苷与 PI3K、AKT1 蛋白结合稳定。**结论** 淫羊藿苷可能是通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 增强 PI3K、AKT1 蛋白的表达从而发挥促进成骨分化作用。

关键词: 淫羊藿苷; 成骨细胞; 增殖; 分化; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0417-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.019

Effect of icariin on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells via PI3K/AKT signalling pathway

FAN Kai-jian¹, NIU Ai-wen¹, WU Hui-hui^{2*} (1. Department of Pharmacy, Mental Health Center, Chongming District, Shanghai 202150; 2. Department of Rheumatology, Shuguang Hospital Attached to Shanghai University of Traditional Chinese Medical, Shanghai 201203)

Abstract: Objective To determine the effect of icariin on the proliferation and differentiation of osteoblasts. **Methods** The proliferation of MC3T3-E1 cells in each group was detected by CCK-8 assay, and the appropriate concentration of icariin was screened for later use in the experiments. MC3T3-E1 cells were randomly divided into a control group and an icariin group. The alkaline phosphatase activity of the cells was detected by alkaline phosphatase staining on the 7th day of osteoblast induction. On the 21st day of osteoblast induction, alizarin red staining was used to detect the formation of mineralised nodules in the MC3T3-E1 cells in each group. The migration capacity of MC3T3-E1 cells was detected by scratch healing and Transwell cell migration assay. Western blot was used to detect the expression of PI3K/AKT signalling pathway related proteins and osteogenesis related proteins to verify the mechanism of action of icariin on the differentiation of MC3T3-E1 cells. The binding capacity of icariin with PI3K and AKT was measured by molecular docking. **Results** Icariin significantly increased the expression level of alkaline phosphatase within MC3T3-E1, increased the number of calcium salt deposition and

基金项目: 上海市崇明区科委科技项目 (No.CKY2020-15, No.CKY2024-63)。

作者简介: 范凯健, 男, 硕士, 主要从事免疫药理学研究, email: fankaijian2017@163.com *通信作者: 吴辉辉, 男, 硕士, 主要从事中西医结合治疗风湿免疫疾病研究, email: wood-0107@163.com

calcified nodules, and promoted the calcification of MC3T3-E1. Compared with the control group, the 0.1 and 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ icariin-treated groups promoted cell migration. Compared with the control group, the protein expression levels of SMAD4, BMP-2, and TGF- β were obviously up-regulated in the 0.1 and 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of icariin; the levels of phosphorylation of PI3K, AKT, and SMAD2 were significantly elevated ($P < 0.01$). The molecular docking showed that the binding of icariin with PI3K and AKT1 proteins was stable. **Conclusion** Icariin plays a role in promoting osteogenic differentiation by activating the PI3K/AKT signalling pathway and enhancing the expression of PI3K and AKT1 proteins.

Key words: icariin; osteoblast; proliferation; differentiation; molecular docking

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种慢性、代谢性、全身性骨病, 其发病机制包括过度的骨吸收、骨形成不足和血管化不足, 传统的治疗方法有限。目前, 国内外治疗骨质疏松依然以激素类、钙剂等西药为主, 很难完全解决且不足之处众多, 如费用高昂、可能产生过敏反应等^[1]。研究报道, 年龄在 50 岁以上的人群中约 50% 的女性和 30% 的男性易发生骨折和骨丢失^[2]。特别是绝经后女性由于衰老和雌激素对机体的保护作用减弱, 雌激素缺乏破坏骨重塑, 增强破骨细胞活性, 因此, 其代谢综合征和骨质疏松的发生风险显著增加。随着对骨质疏松研究的不断深入, 其相关治疗药物已从早期的补充骨矿物质的基础药物进展到目前的刺激骨形成药物^[3]。目前骨质疏松的治疗药物作用主要是抑制骨吸收, 无法促进骨形成, 且药物治疗后增加了心脏疾病等的发生风险, 限制了临床使用。因此, 开发治疗骨质疏松的有效药物显得尤为重要。

淫羊藿是一种传统中药, 性味辛甘温, 归肝肾二经, 为补肾阳, 强筋骨, 祛风湿之要药。淫羊藿在中国古代用于治疗骨科疾病已有数千年的历史, 包括骨质疏松、骨关节炎和骨折。淫羊藿苷 (icariin, ICA), 为 8-异戊烯基黄酮苷类化合物, 是中药淫羊藿的有效成分之一, 具有广泛的药理作用, 如改善心血管功能、促进造血功能、保护神经元、抗骨质疏松和增强性功能等^[4]。研究证明, 淫羊藿苷的抗骨质疏松特性表现在多种途径, 如促进成骨分化、抑制破骨细胞生成和骨吸收等^[5]。淫羊藿苷可通过 EphB4/Ephrin-B2 轴缓解糖皮质激素诱导的骨质疏松^[6]。研究还发现淫羊藿苷可促进大鼠骨髓间充质干细胞向骨细胞方向分化^[7]。淫羊藿苷是淫羊藿中最主要的活性成分, 但其治疗骨质疏松的具体作用机制仍不明确, 因此, 本研究从细胞层面探索淫羊藿苷对成骨细胞增殖分化的影响。

1 材料

1.1 实验细胞

MC3T3-E1 细胞购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

1.2 试剂

淫羊藿苷 (曼思特生物科技有限公司, 规格: 50 mg/瓶, 批号: A0145); 细胞计数试剂盒 (CCK-8, 东仁化学科技有限公司); 茜素红染料 (批号: G8550)、碱性磷酸酶染料 (批号: G1480)、磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K, 批号: K009329M)、磷酸化磷酸肌醇 3-激酶 (p-PI3K, 批号: K009756P)、蛋白激酶 B (AKT, 批号: K000186M)、磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT, 批号: K009354P)、Smad 同源物 4 (SMAD4, 批号: K004113P)、骨成型蛋白 2 (BMP-2, 批号: K000320P)、转化生长因子- β (TGF- β , 批号: K003950P)、Smad 同源物 2 (SMAD-2, 批号: K000096M) (Solarbio 公司); 骨钙素 (OCN, 批号: ab133612)、runt 相关转录因子 2 (RUNX2, 批号: ab192256) (Abcam 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 [万类生物科技 (上海) 有限公司, 货号: WLA004b-500T]; Western 及 IP 细胞裂解液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) 二抗 (上海碧云天生物技术有限公司); ECL 发光液 (广州捷倍斯生物科技有限公司, 货号: G3308)。

1.3 仪器

微孔板分光光度计 (BioTek Instruments); 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司); 电泳仪 EPS-300 (上海天能科技有限公司); 化学发光成像仪 (德国 Analytik Jena 有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 MC3T3-E1 细胞加入含有 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液细胞培养皿中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。待细胞生长于皿底 80% ~ 90% 时进行常规传代。

2.2 CCK-8 法检测各组 MC3T3-E1 增殖活性

将 10 mg 淫羊藿苷粉末溶解于 10 μL 二甲基亚

砒 (DMSO) 中, 用 α -MEM 培养基稀释至 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验时再将药物用 α -MEM 培养基稀释为 0.04、0.08、0.1、0.2、0.4、0.8 和 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 7 个浓度供实验组用。对照组细胞不加淫羊藿苷, 进行常规培养。取对数生长期细胞, 以每孔 5×10^3 个的密度 ($200 \mu\text{L}$) 接种于 96 孔细胞培养板中, 按照上述方法分别加入用 α -MEM 培养基稀释的不同浓度淫羊藿苷药物, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 1、3、5 和 7 d。后续每孔按照 10% 溶液比例加入 CCK-8 ($20 \mu\text{L}$), 继续培养 30 min, 采用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度。并对培养第 7 日的细胞活力进行量化分析。每组进行 3 次重复实验。

2.3 碱性磷酸酶染色法检测细胞碱性磷酸酶活性

取对数生长期细胞接种于 24 孔板中, 1 d 后分别给予含不同浓度淫羊藿苷溶液的培养基 (0 、 0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养。每 3 日更换 1 次含药培养基, 7 d 后严格按照碱性磷酸酶显色试剂盒说明书操作步骤染色, 用含 4% 多聚甲醛的细胞固定液固定细胞, 室温条件下固定 30 min 后去除残留液体, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加染色工作液, 37°C 下孵育 30 min 后去除染色液, 用 PBS 清洗 2 次, 终止反应。最后置于蔡司显微镜下观察并拍照。颜色越深, 分布范围越广, 说明细胞碱性磷酸酶活性越高。

2.4 茜素红染色法检测细胞钙化结节

选取对数生长期细胞接种于 24 孔板中, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 1 d 后分别加入含不同浓度淫羊藿苷溶液 (0 、 0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的成骨诱导液进行干预。每 3 日更换 1 次培养基, 14 d 后使用成骨细胞钙化结节染色试剂盒进行染色。首先吸出残余培养基, 以 PBS 清洗 2 次, 再使用含 4% 多聚甲醛的细胞固定液固定细胞, 室温条件下固定 30 min 后去除残留液体, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。然后加入茜素红染色液, 37°C 恒温孵育 30 min, 每 5 min 查看 1 次, 显色达到预期深浅即终止。去除染色液, 用 PBS 清洗 2 次, 终止反应。最后置于扫描仪下观察显色深度并拍照。以茜素红染色后孔板中红色深度及分布范围为评价标准, 颜色越深, 分布范围越广, 说明钙盐沉积越多, 钙化结节数量越多。

2.5 划痕愈合和 Transwell 细胞迁移实验检测细胞迁移能力

2.5.1 细胞划痕实验 按 2×10^5 个/孔将 MC3T3-E1 细胞均匀接种在 6 孔培养板上。待细胞贴壁并长满

皿底后, 使用 $10 \mu\text{L}$ 枪头对单层细胞进行垂直划痕。使用相差显微镜采集划痕后 0、12 h 的图像。

2.5.2 Transwell 细胞迁移实验 按 2×10^5 个/孔将 MC3T3-E1 细胞种植在迁移小室内, 小室下方添加含 5% 胎牛血清培养基。小室上方添加不同浓度的含药培养基。培养 12 h 后, 对小室细胞进行多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 擦去小室上层细胞干扰, 使用显微镜观察小室下方细胞迁移情况。

2.6 免疫荧光染色检测 RUNX2 和 OCN 表达

细胞成骨诱导第 7 日, 弃去旧培养基, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 多聚甲醛固定, BSA 溶液封闭。将细胞与 RUNX2 和 OCN 一抗 4°C 孵育过夜, 用 PBST 溶液洗涤 3 次后分别与 Alexa Fluor 488 标记抗兔二抗孵育 1 h。采用 DAPI 染色, 洗涤 3 次后用荧光显微镜观察各组 MC3T3-E1 中 RUNX2 和 OCN 表达的荧光强度。

2.7 Western blot 检测 PI3K/AKT 蛋白表达

采用 Western blot 法, 将 MC3T3-E1 接种到 6 孔板中, 给予含不同浓度淫羊藿苷溶液 (0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的成骨诱导液连续培养 7 d。加入适当体积的细胞总蛋白裂解液裂解; 同时, 用细胞刮刀刮下细胞和试剂, 转到 1.5 mL EP 管中。 4°C 以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 收集上清总蛋白溶液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定其蛋白浓度, 随后将蛋白在 6% SDS 电泳凝胶上电泳分离, 并通过电印迹转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜在室温于封闭液中封闭 45 min, 然后在 4°C 与 AKT1 抗体、PI3K 抗体 (稀释度均为 1:1000) 一起孵育过夜。次日取出, PBST 溶液洗涤 3 次后, 加入二抗 (稀释度为 1:5000) 室温下孵育 1 h。加入显影液后进行目的蛋白显影。

2.8 分子对接技术检测淫羊藿苷与 PI3K、AKT1 结合力

从 PubChem 数据库得到淫羊藿苷的分子结构, 将其导入 Chem 3D 软件进行能量最小化, 得到小分子的 pdb 文件; 在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中搜索核心靶点蛋白的结构, 利用 PyMOL 软件删除水分子和小分子配体; 最后利用 AutoDock Tool 1.5.7 软件将处理得到的淫羊藿苷小分子和核心靶点进行分子对接, 以验证结果的可靠性。若结合能 $< -5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明具有结合亲和力, 且结合能的数值越低, 说明结合亲和力越强, 结合越稳定。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对本实验数据进行分析,

实验结果用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 One-way ANOVA 的方法对各组间数据进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对细胞增殖活性的影响

第 7 日检测结果显示, 与对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 比较, 0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷处理的细胞增殖活性升高 ($P < 0.01$), 而 0.8 、 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷处理的细胞活性降低 ($P < 0.01$), 见图 1。因此, 后续细胞实验选择 0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿苷进行处理。

3.2 淫羊藿苷对细胞迁移能力的影响

相比对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 淫羊藿苷处理组细胞具有较强的迁移愈合能力, 见图 2。

Transwell 迁移小室结果显示, 空白培养基细胞迁移能力较弱, 结晶紫染色后仅有少量细胞存在于小室下方。不同浓度的淫羊藿苷可以诱导细胞向小室下方进行迁移。结晶紫染色后显示出紫色斑点。斑点越多, 代表细胞迁移数目越多, 见图 3。

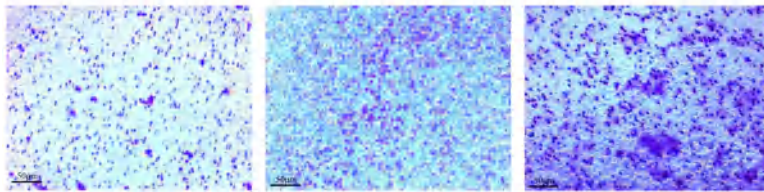


图 3 Transwell 细胞迁移实验检测淫羊藿苷对细胞迁移能力的影响 (** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$)

Fig 3 Effect of icariin on cell migration ability detected by Transwell cell migration assay (** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$)

3.3 淫羊藿苷对成骨细胞分化的影响

茜素红染色、碱性磷酸酶染色结果显示淫羊藿苷组钙盐沉积和钙化结节明显增加, 见图 4。

3.4 淫羊藿苷对 RUNX2 和 OCN 表达的影响

RUNX2 和 OCN 免疫荧光染色结果显示: 与对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 比较, 淫羊藿苷组 MC3T3-E1 中 RUNX2 和 OCN 表达荧光强度极显著增强, 淫羊藿苷高剂量组 ($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的荧光强度显著高于低剂量组 ($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 证明淫羊藿苷成骨诱导具有明显的量效关系 (见图 5A 和 5B)。

3.5 淫羊藿苷对 PI3K/AKT 和成骨相关信号通路的影响

与对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 比较, 淫羊藿苷组中的 SMAD4、BMP-2、TGF- β 表达水平上调 ($P < 0.01$), 经淫羊藿苷 (0.1 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 干预后 MC3T3-E1 的 PI3K、AKT、SMAD2 表达水平差异未见统计学意义, p-SMAD2、p-PI3K、p-AKT 表达升高 ($P < 0.01$)。淫羊藿苷可能通过促进 PI3K/AKT 信号通路的磷酸

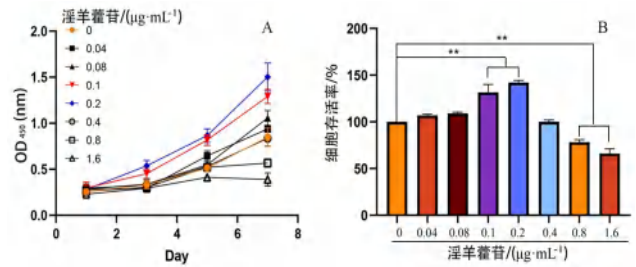


图 1 淫羊藿苷对细胞增殖活性的影响 (** $P < 0.01$)

Fig 1 Effect of icariin on the proliferative activity of cells (** $P < 0.01$)

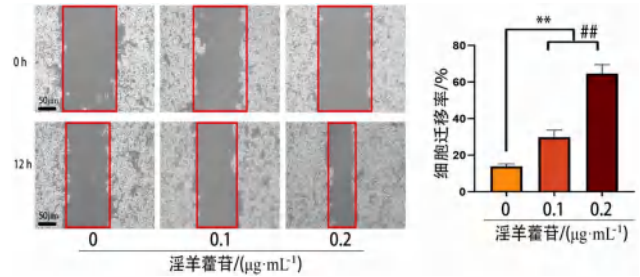
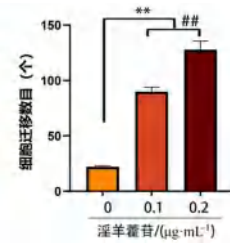


图 2 细胞划痕实验检测淫羊藿苷对细胞迁移能力的影响 (** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$)

Fig 2 Effect of icariin on the cell migration by cell scratch healing (** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$)



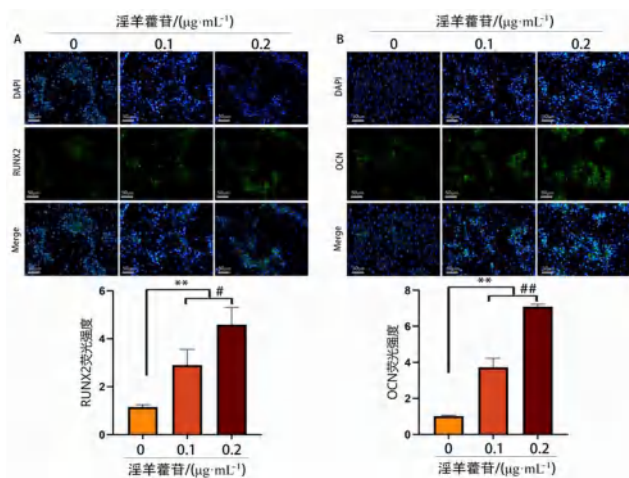


图 5 淫羊藿苷对成骨相关蛋白 RUNX2 (A) 和 OCN (B) 表达的影响 (×200) (***P* < 0.01, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01)

Fig 5 Effect of icariin on the expression of osteogenesis-related proteins RUNX2 (A) and OCN (B) (×200) (***P* < 0.01, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01)

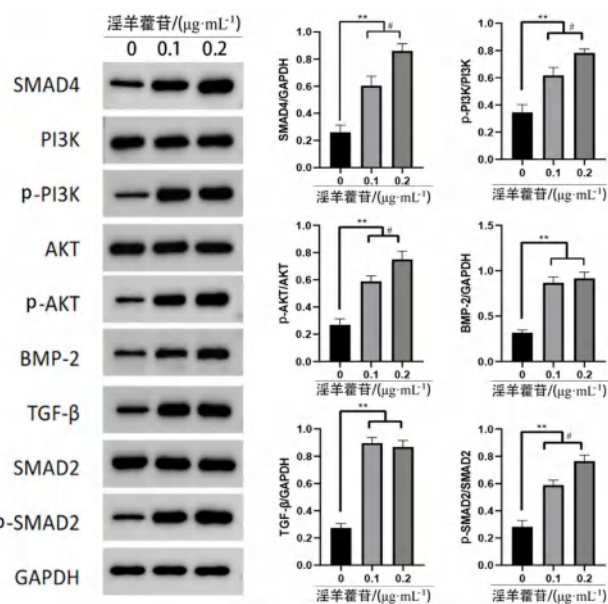


图 6 淫羊藿苷对 PI3K/AKT 和成骨相关信号通路的影响 (***P* < 0.01, #*P* < 0.05)

Fig 6 Effect of icariin on PI3K/AKT and osteogenesis-related signaling pathway (***P* < 0.01, #*P* < 0.05)

AKT1 的结合能均为 $-7.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明均具有较强的结合力。作用关系见图 7。淫羊藿苷与 AKT1 的氨基酸残基 ASN-53、GLN-79、LEU-110 形成氢键相互作用, 与 PI3K 的氨基酸残基 SER-171、ASP-166、LYS-134 形成氢键相互作用。

4 讨论

骨质疏松在老龄化社会日益普遍, 但其治疗仍然是一个难题。中医药在治疗骨质疏松方面有着悠久的历史, 并且受到越来越多的关注, 中医学认为骨质疏松基本病机为肾精亏虚, 精髓不足

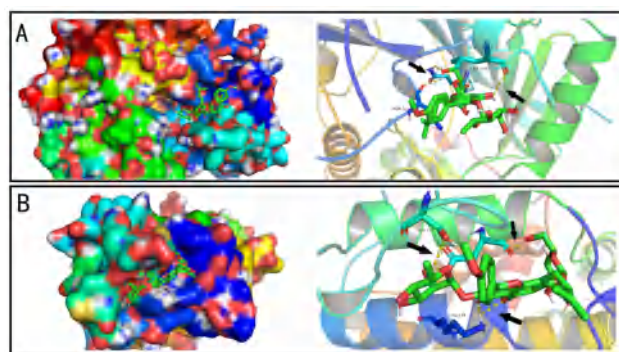


图 7 淫羊藿苷与 AKT1 (A) 和 PI3K (B) 对接结果

Fig 7 The docking results of icariin with AKT1 (A) and PI3K (B)

而致骨枯萎。所以补益肾精是治疗骨质疏松的重要原则。中医药因其不良反应少、疗效高而越来越受欢迎。同时, 中药中含有丰富的天然成分, 可以为新药的筛选和研究提供有创新性的思路^[8]。近年来, 人们对天然产品越来越感兴趣, 中医正成为补充和替代医学的共同选择^[9]。由于不良反应相对较少, 多种中药中的有效成分被用于研究治疗骨质疏松。

淫羊藿又名仙灵脾, 是一种传统的中药, 药理作用多样, 活性成分丰富。它可以有效缓解肾阳虚的症状, 加强肌肉和肌腱的功能, 并减弱风湿病症状^[10]。淫羊藿作为替代药物可调节骨质疏松症患者的骨代谢, 中医已将淫羊藿作为治疗骨质疏松症的植物药之一^[11]。淫羊藿苷作为淫羊藿的主要生物活性物质之一, 具有调节内分泌、改善心脑血管功能、抗肿瘤等多重药理作用。近来研究发现, 淫羊藿苷类药物可促进细胞代谢, 且在成骨细胞增殖和分化中具有重要意义^[12]。有研究发现, ICA 可以通过 AMPK 信号通路促进成骨分化, 从而缓解骨质疏松的进展^[13]。黎海霞等^[14]发现 AKT 基因是影响破骨细胞和成骨细胞的功能的最大枢纽基因, 故 AKT 被认为是骨质疏松症的治疗靶点。另一项研究发现, PI3K/AKT 信号通路参与促进钛种植体表面的成骨分化过程^[15]。成骨细胞能够调节并影响骨的形成和重建过程, 且成骨分化对人体骨骼成长中的重要环节。RUNX2 和 OCN 在成骨细胞分化中起着重要作用^[16]。RUNX2 是参与成骨分化进程的重要转录因子^[17]。Pang 等^[18]发现通过 BMP-2/RUNX2 信号通路可促进人成骨细胞的分化。Lee 等^[19]发现声波振动通过 p-ERK/RUNX2 通路影响人牙髓干细胞的成骨分化。OCN 的分泌是成骨分化的重要指标^[20]。Quan 等^[21]发现木犀草素通过调控人牙周膜细胞中 OCN、RUNX2 的表达促进成骨分化。Liu 等^[22]发现小檗碱可上调 RUNX2、OCN

等蛋白的表达促进成骨细胞分化。

在本研究中,我们发现给予 MC3T3-E1 细胞不同浓度的淫羊藿苷干预,可以促进其钙沉积,诱导其高度表达碱性磷酸酶活性,并能明显促进细胞增殖与迁移。免疫荧光染色发现,淫羊藿苷组 MC3T3-E1 中 RUNX2 和 OCN 表达的荧光强度明显增强。通过 Western blot 实验和分子对接实验,初步验证了淫羊藿苷可通过调控 PI3K/AKT 信号通路来促进成骨分化作用。

综上,本次研究证明淫羊藿苷可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路,增强 PI3K、AKT1 蛋白的表达来发挥促进成骨分化,这为淫羊藿苷作为骨质疏松的潜在药物提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Ruiz-Esteves KN, Jimmitti T, Daria S, et al. Disparities in osteoporosis care among postmenopausal women in the United States [J]. *Maturitas*, 2022, 156: 25-29.
- [2] Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, et al. Immunology of osteoporosis: a mini-review [J]. *Gerontology*, 2016, 62 (2): 128-137.
- [3] Moser M, Albertini Sanchez L, Adl Amini D, et al. Correlation between MRI-based spinal muscle parameters and the vertebral bone quality score in lumbar fusion patients [J]. *Brain Spine*, 2023, 3: 102684.
- [4] Sun JB, Wang Z, An WJ. Protection of icariin against hydrogen peroxide induced MC3T3-E1 cell oxidative damage [J]. *Orthop Surg*, 2021, 13 (2): 632-640.
- [5] Huang M, Wang Y, Peng R. Icariin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through EphB4/Ephrin-B2 axis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2982480.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 155-168.
- [7] Huang M, Wang Y, Peng R. Icariin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through EphB4/Ephrin-B2 axis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2982480.
- [8] Xu WF, Jiang YP, Wang NN, et al. Traditional chinese medicine as a promising strategy for the treatment of Alzheimer's disease complicated with osteoporosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 842101.
- [9] Wang YC, Chiang JH, Hsu HC, et al. Decreased fracture incidence with traditional Chinese medicine therapy in patients with osteoporosis: a nationwide population-based cohort study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19 (1): 42.
- [10] Liu Y, Bi YN, Chai LJ, et al. Development of epimediniol A complex drugs for treating the osteoporosis [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2021, 32 (1): 17.
- [11] 李志文, 刘元禄, 杨永菊, 等. 补肾阳中药有效成分治疗骨质疏松症作用机制研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25 (10): 135-141.
- [12] Wang Z, Wang D, Yang D. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29 (3): 535-544.
- [13] Wang N, Wang LY, Yang JH, et al. Quercetin promotes osteogenic differentiation and antioxidant responses of mouse bone mesenchymal stem cells through activation of the AMPK/SIRT1 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (5): 2639-2650.
- [14] 黎海霞, 许阳, 邓凯丽, 等. GWGS 芯片整合分析识别外周血细胞中与骨质疏松症相关的枢纽基因 [J]. *生命科学研究*, 2020, 24 (2): 102-108.
- [15] Zheng Z, He YJ, Long L, et al. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in promoting osteogenesis on titanium implant surfaces modified with novel non-thermal atmospheric plasma [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 975840.
- [16] Schroeder ME, Rodriguez AG, Speckl KF, et al. Collagen networks within 3D PEG hydrogels support valvular interstitial cell matrix mineralization [J]. *Acta Biomater*, 2021, 119: 197-210.
- [17] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (7): 1694.
- [18] Pang Y, Liu LL, Mu H, et al. Nobiletin promotes osteogenic differentiation of human osteoblastic cell line (MG-63) through activating the BMP-2/RUNX-2 signaling pathway [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28 (9): 4916-4920.
- [19] Lee W, Eo SR, Choi JH, et al. The osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through G₀/G₁ arrest and the p-ERK/RUNX2 pathway by sonic vibration [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (18): 10167.
- [20] Klingelhöffer C, Reck A, Morszeck C. The extracellular concentration of osteocalcin decreased in dental follicle cell cultures during biomineralization [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68 (5): 2171-2176.
- [21] Quan H, Dai XP, Liu MY, et al. Luteolin supports osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells [J]. *BMC Oral Health*, 2019, 19 (1): 229.
- [22] Liu M, Xu ZM. Berberine promotes the proliferation and osteogenic differentiation of alveolar osteoblasts through regulating the expression of miR-214 [J]. *Pharmacology*, 2021, 106 (1-2): 70-78.

(收稿日期: 2024-05-28; 修回日期: 2024-08-08)

基于网络药理学、分子对接技术及实验验证探讨 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的作用机制

王天翔^{1,2}, 陈坤^{1,2}, 陶浩军^{1,2}, 何侠^{1,2,3}, 尹丽^{1,2,3*} (1. 南京医科大学附属肿瘤医院&江苏省肿瘤医院&江苏省肿瘤防治研究所, 南京 210009; 2. 南京医科大学第四临床医学院, 南京 211166; 3. 南京医科大学肿瘤个体化医学协同创新中心, 南京 211166)

摘要: **目的** 联合使用网络药理学、分子对接技术和体外细胞实验探讨血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的活性成分及潜在作用机制。**方法** 通过 TCMSP、GeneCards 等数据库预测血府逐瘀汤的作用靶点及脑胶质瘤的差异表达基因; STRING 数据库构建血府逐瘀汤-脑胶质瘤蛋白互作 (PPI) 网络; 关键靶基因进行 GO 及 KEGG 通路富集分析; Cytoscape 软件构建药物-成分-靶点、药物-靶点-疾病网络; Discovery Studio 软件进行分子对接验证及可视化; CCK8、EdU 等生长增殖功能实验对上述生物信息学分析进行细胞实验验证。**结果** “药物-成分-靶点”网络表明血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的主要活性成分为黄芩素、汉黄芩素、 β -胡萝卜素、 β -谷甾醇、豆甾醇; 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤涉及的 GO 生物过程包括细胞凋亡、磷酸化修饰等, 涉及的 KEGG 通路包括高级糖基化终产物受体信号通路、致癌信号通路等; “活性成分-作用靶点-通路”网络显示血府逐瘀汤防治脑胶质瘤的核心作用靶点为 *PTGS2*、*ESR1*、*NOS2*、*GSK3 β* 、*MAPK14*; 分子对接结果证实主要活性成分黄芩素与核心靶点 ESR1 蛋白的相互作用能力较强; CCK8 及 EdU 体外细胞实验结果表明黄芩素能够抑制胶质瘤细胞生长增殖, 呈现出剂量依赖性, 并在黄芩素 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时抑制效率最为显著; 蛋白水平抑制 ESR1 的表达能够挽救黄芩素对胶质瘤细胞生长增殖的抑制 ($P < 0.01$)。**结论** 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤具备多成分、多靶点、多通路的特点, 其治疗机制可能通过黄芩素-ESR1 发挥肿瘤抑制作用。

关键词: 血府逐瘀汤; 脑胶质瘤; 网络药理学; 分子对接; 体外实验

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0423-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.020

Mechanism of active ingredients of Xuefu Zhuyu decoction for glioma based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation

WANG Tian-xiang^{1,2}, CHEN Kun^{1,2}, TAO Hao-jun^{1,2}, HE Xia^{1,2,3}, YIN Li^{1,2,3*} (1. *The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University & Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009*; 2. *The Fourth Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 211166*; 3. *The Collaborative Innovation Center for Cancer Personalized Medicine of Nanjing Medical University, Nanjing 211166*)

Abstract: Objective To analyze the active ingredients and potential mechanism of Xuefu Zhuyu decoction for glioma by network pharmacology, molecular docking and in vitro cell experiment. **Methods** TCMSP and GeneCards databases were used to predict therapeutic targets in Xuefu Zhuyu decoction and differentially expressed genes in glioma. STRING database was used to construct the protein-protein interaction network of Xuefu Zhuyu decoction and glioma. GO and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the target genes. The drug-ingredient-target and drug-target-

基金项目: 南京医科大学肿瘤个体化医学省部共建协同创新中心基金 (No. JZ21449020210616)。

作者简介: 王天翔, 男, 硕士, 主要从事肿瘤代谢与机制研究, email: dscsdcs@outlook.com *通信作者: 尹丽, 女, 副教授, 主要从事放射肿瘤学及肿瘤免疫治疗研究, email: yinli_2012@126.com

disease networks were established by Cytoscape. Molecular docking and visualization were performed by Discovery Studio software. The above bioinformatics analysis was verified by cell experiments with CCK8 and EdU functional experiments. **Results** The drug-ingredient-target network indicated that the main active components of Xuefu Zhuyu decoction in treating glioma included baicalin, wogonoside, beta-carotene, beta-sitosterol and daucosterol. The main biological processes in Xuefu Zhuyu decoction for glioma involved apoptosis and phosphorylation modification. The involved KEGG pathways included AGE-RAGE and carcinogenesis signaling pathways. The active ingredients-target-pathway network showed that the hub targets of Xuefu Zhuyu decoction in the prevention and treatment of glioma included *PTGS2*, *ESR1*, *NOS2*, *GSK3 β* and *MAPK14*. Molecular docking confirmed the binding potential of the main active ingredient baicalein to the hub target ESR1. CCK8 and EdU in vitro experiments showed that baicalin inhibited the growth and proliferation of glioma cells, in a dose-dependent manner. The most effective inhibition appeared at a baicalin concentration of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Inhibiting the expression of ESR1 at the protein level saved baicalein from inhibiting the growth and proliferation of glioma cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Xuefu Zhuyu decoction has multi-components, multi-targets and multi-pathways in the treatment of glioma, whose therapeutic mechanism may be tumor inhibition through baicalein-ESR1.

Key words: Xuefu Zhuyu decoction; glioma; network pharmacology; molecular docking; in vitro experiment

脑胶质瘤 (glioma) 是人类中枢神经系统中最常见且高度侵袭的原发性恶性肿瘤, 具备高发病率、高复发率、高病死率和低治愈率的“三高一低”特点。其异常活化和浸润的生物学特性令手术完全切除难度极大; 细胞耐药性及放射抗性使放化疗效果严重受限; 认知功能损害、情绪变化等不良反应导致胶质瘤至今仍是全身肿瘤中预后最差的肿瘤之一^[1]。因此, 明确其发病机制并寻求有效的治疗手段是临床治疗的当务之急。在手术切除、放疗和化疗等常规治疗的基础上, 应用中药汤剂进行抗肿瘤治疗, 对于肿瘤复发的防止、毒副作用的减少以及生存期的延长具有显著的优势。

我国传统医学近年来成为综合癌症治疗的选择之一。血府逐瘀汤是五逐瘀汤中的一首方剂, 由桃仁、红花、当归、生地黄、牛膝、川芎、桔梗、赤芍、枳壳、甘草、柴胡等 11 味药组成。目前主要用于脑梗死、高血压等心血管疾病及多种手术术后治疗等, 起活血化瘀、行气止痛作用^[2]。血瘀证与肿瘤的发生及转移密切相关, 气滞血瘀贯穿于肿瘤的各个病理阶段及其整个发病过程。《灵枢百病始生篇》云: 凝血蕴里不散, 津液涩渗, 著而不去, 而积成也。刘建民等^[3]研究发现血府逐瘀汤含药血清能够降低胶质瘤干细胞侵袭率, 下调基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 表达并抑制 *JAK-STAT* 信号通路, 为活血化瘀中药治疗脑肿瘤的临床应用提供了体外实验依据。在体内动物模型水平, 血府逐瘀汤联合替莫唑胺

能够抑制 *ERK-MAPK* 信号通路遏制脑胶质瘤大鼠肿瘤进展^[4]。而在临床治疗中已有研究结果证实血府逐瘀汤与六味地黄汤的合用具备更优的胶质瘤术后情感障碍治疗效果, 并在延长患者生存时间、提高患者免疫机能、改善患者血瘀状态等方面具备显著疗效^[5-6]。

传统中药具备多成分、多靶点协同的特点, 因此系统性、整体性解析中药治疗恶性肿瘤多靶点联合机制的网络药理学在预测中药潜在治疗靶点方面具备显著成效^[7-9]。分子对接技术利用其高通量筛选能力, 通过拟合已知结构的受体和配体, 达到预测亲和力和结合模式的目的, 近年来成为网络药理学研究领域的关键技术。基于此, 本研究利用网络药理学及分子对接技术, 多层次阐述血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的药效成分及关键作用靶点, 并通过体外细胞实验进行验证, 为血府逐瘀汤的功效研究与开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

超净工作台 (中国博科公司); 荧光倒置显微镜 (德国 Zeiss 蔡司公司); 超低温冰箱 (日本 Phcbi 公司); 涡旋振荡仪 (中国沪西分析仪器有限公司); 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 化学发光图像分析系统 (天能生命科学有限公司); 脱色摇床 (普阳科学仪器研究所); 细胞计数仪 (美国 Nexcelom 公司); Western blot 电泳仪、转膜仪 (美

国 Bio-Rad 公司); 细胞培养箱、胎牛血清、超声破碎仪、磷酸盐缓冲液 (PBS)、Lipofectamine 3000、台盼蓝染色液、二甲基亚砜 (DMSO, 纯度: 99.5%)(美国 Thermo Scientific 公司); RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、RIPA 裂解液、ECL 检测试剂盒 (中国凯基生物有限公司); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (雅酶生物医药有限公司); 脱脂奶粉 (德国 Biofrox); 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (美国 Proteintech Group); 异丙醇、甲醇 (国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇 (西陇科学股份有限公司); Cell-Light EdU 试剂盒 (锐博生物技术有限公司); ESR1 单克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); CCK8 检测试剂盒、黄芩素 (MedChemexpress 公司)。

1.2 实验细胞与引物序列

人胶质瘤细胞株 U87 (上海中科院细胞库, 保存在江苏省肿瘤医院放疗实验室), 培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基中, 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中常规培养, 细胞汇合度达到约 80% 时传代培养。

SiRNA 转染: ESR1, GGAUUUGACCCUC-CAUGAUTT; 引物: β -actin, F: 5'-GTCATTC-CAAATATGAGATGCGTTG-3', R: 5'-TGTG-GACTTGGGAGAGGACT-3'; ESR1, ESR1, F: 5'-GCTTACTGACCAACCTGGCAGA-3', R: 5'-GGATCTCTAGCCAGGCACATTC-3'。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 脑胶质瘤相关疾病靶点筛选 以“Glioma”为关键词, 从数据库 Genecards (<http://www.genecards.org/>)、DisGenet (<http://www.disgenet.org/web/DisGenet/menu>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 中检索脑胶质瘤的潜在作用靶点, 种属选择“Homo sapiens”, 分别获得 1269、1452、477 个脑胶质瘤相关靶基因, 合并、去重后, 得到胶质瘤相关靶基因 2591 个。

2.1.2 血府逐瘀汤活性成分筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>), 根据 TCMSP 参数信息和标准设置, 筛选血府逐瘀汤方剂中柴胡、生地黄、赤芍、川芎等 11 味中药的活性成分^[10]。因血府逐瘀汤通常采用口服用药, 因此以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 肠上皮通透性 (Caco-2) > 0.4 和药物相似性 (DL) ≥ 0.18 (Drugbank 中的平均值) 为限定条件筛选血府逐瘀汤活性成分。筛选出血府逐瘀汤活性成分并下载保存为 Mol2 格式, 结合 DrugBank 数据库检索化合物的详细信

息并通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索结构, 共筛选出活性成分 107 种, 其中桃仁 5 种、红花 13 种、当归 2 种、生地黄 2 种、赤芍 8 种、川芎 6 种、柴胡 9 种、枳壳 2 种、桔梗 2 种、牛膝 14 种以及甘草 72 种。剔除重复的化合物和缺乏靶点的信息成分共获得活性成分 99 种, 对应药物靶点 1036 个。将结果导入 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行靶基因匹配并去重, 获得 103 个药物活性成分潜在靶基因。通过 Cytoscape 软件构建药物-成分-靶点网络, 拓扑结果显示, 度值 (Degree) 值较高的成分是黄芩素 (baicalein, MOL002714)、汉黄芩素 (wogonin, MOL000173)、 β -胡萝卜素 (beta-carotene, MOL002773)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol, MOL000358)、豆甾醇 (stigmaterol, MOL000449)、芒柄花黄素 (formononetin, MOL000392) 及甘草查耳酮 A (licochalcone A, MOL000497) 等 (见图 1)。以上结果提示: 血府逐瘀汤主要通过黄芩素、汉黄芩素等活性成分作用于前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase 2, NOS2) 等潜在靶点, 充分说明了血府逐瘀汤“多成分-多靶点”的作用特点。

2.1.3 血府逐瘀汤防治脑胶质瘤潜在靶点预测及 PPI 网络分析 将筛选后的脑胶质瘤相关靶点与血府逐瘀汤活性成分潜在靶点, 利用 Venny 2.1 绘图 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 平台取交集靶点, 得到 67 个交集基因^[11]。将交集靶点导入 STRING 平台^[12] (<https://cn.string-db.org/>), 置信度 > 0.9 作为筛选条件并隐藏没有相互作用联系的节点, 依次构建蛋白互作 (PPI) 网络, 该网络共 67 个节点、154 条边, 平均 Degree 值为 4.6。将分析保存为 TSV 格式并导入 Cytoscape v.3.7.2 进行网络绘制, 经拓扑分析后依据“Betweenness”将其分为三层, 圆圈由外向内, Degree 值逐渐增大 (见图 2)。分析得“TP53”“MAPK1”“STAT3”“ESR1”“CASP3”“AKT1”为血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的关键作用靶点, 在网络中 Degree 值和 Betweenness 见表 1。

表 1 关键交集靶点

Tab 1 Key intersection targets

关键靶点	蛋白名	Degree	Betweenness
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	25.0	578.0
MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	15.0	346.0
STAT3	信号传导转录激活因子 3	17.0	310.6
ESR1	雌激素受体 1	15.0	249.1
CASP3	胱天蛋白酶 3	13.0	180.2
AKT1	丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶	17.0	213.5

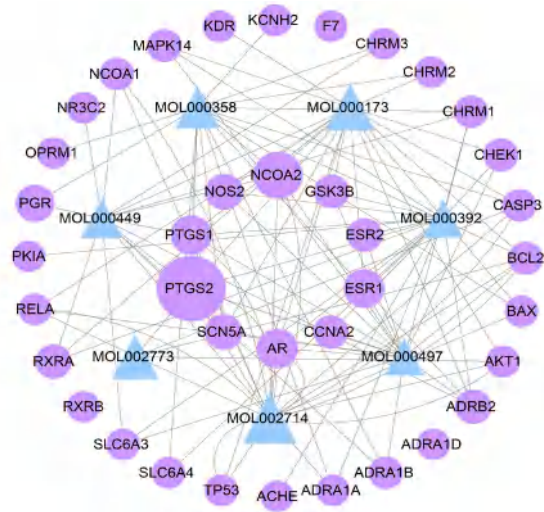


图 1 血府逐瘀汤的药物-成分-靶点网络
Fig 1 Drug-ingredient-target network of Xuefu Zhuyu decoction

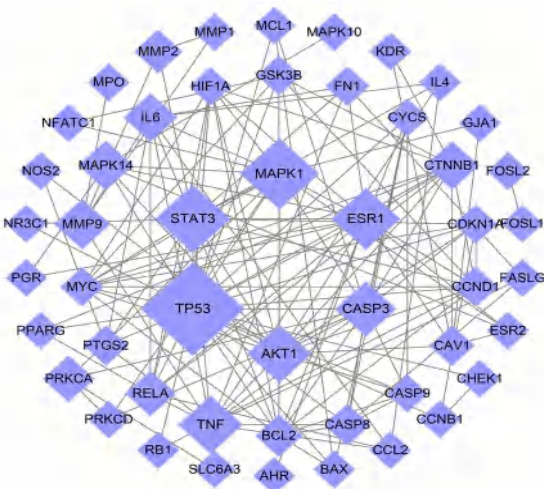


图 2 潜在靶点的 PPI 网络图
Fig 2 PPI interaction network of potential targets

2.1.4 交集靶点的生物功能预测和信号通路分析
利用 DAVID 6.8 平台 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 进行基因本体功能 (GO) 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析^[13]。对 GO [包括生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF)]、KEGG 分别通过 *P* 值筛选排名前 15 的通路, 并将分析结果导入生物信息分析平台 Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘图, 并进行通路可视化分析 (见图 3)。BP 中交集靶点主要与凋亡进程、衰老、基因表达等生物过程有关; CC 富集结果显示靶点主要分布于胞质、胞核、线粒体等部位; MF 富集结果显示靶点主要影响酶、蛋白质、蛋白激酶结合和活性; KEGG 关键通路包括癌症信号通路、AGE-RAGE 信号通路、凋亡信号通路等, 表明血府逐瘀汤有效成分通过调节多种生物通路治疗脑胶质瘤。

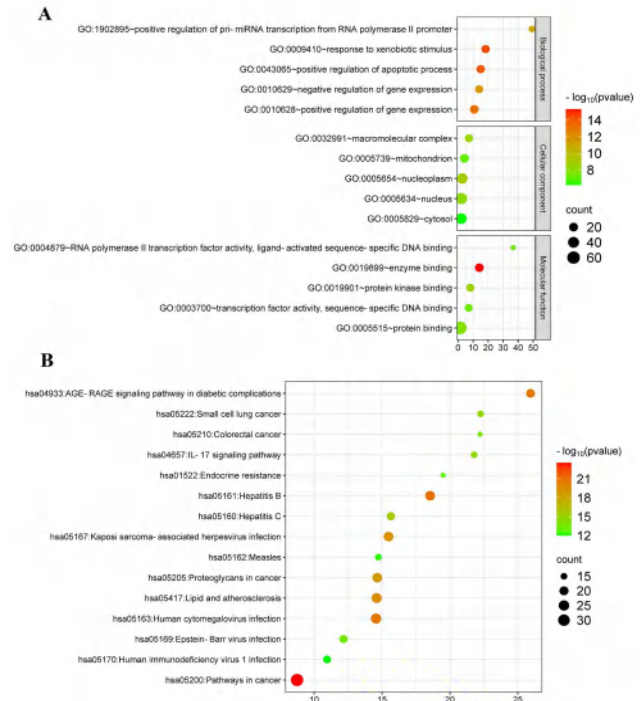


图 3 核心靶点的 GO (A) 及 KEGG (B) 富集分析
Fig 3 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of hub targets

2.1.5 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤“活性成分-作用靶点-通路”网络 将交集基因的 KEGG 通路富集数据、活性成分及靶点数据导入 Cytoscape v.3.7.2 构建“活性成分-作用靶点-通路”网络, 用 Cytoscape 内置插件分析血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的靶点网络拓扑学参数, 筛选得到核心成分与核心靶点 (见图 4)。如图 4 所示, 血府逐瘀汤的多种活性成分连接同一靶点, 多个靶点连接同种成分, 提示血府逐瘀汤可能通过多种成分与多个靶点协同作用防治脑胶质瘤。其中, 黄芩素、汉黄芩素、β-胡萝卜素是血府逐瘀汤防治脑胶质瘤最主要的核心成分。PTGS2、ESR1、NOS2、糖原合酶激酶 3β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3β)、丝裂原激活蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14) 则是血府逐瘀汤防治脑胶质瘤最主要的核心靶点。癌症信号通路 (hsa05200) 被预测为血府逐瘀汤防治脑胶质瘤最主要的核心信号通路。

2.2 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的分子对接验证
采用 Discovery Studio 2019 软件进行分子对接, 计算受体和其原配体对接结果, 所得 RMSD 值小于 2.0 Å, 说明既定数值能够较好地体现原配体与蛋白的结合模式^[14]。将 PPI 网络中的关键靶基因进行分子对接分析, 从 PubChem 数据库下载与核心靶点对应的核心成分结构并用 Chem3D 20.0 软件转换为 mol2 格式。从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶基因对应蛋白 3D 结构, 利用 Discovery Studio 2019 软件对蛋白

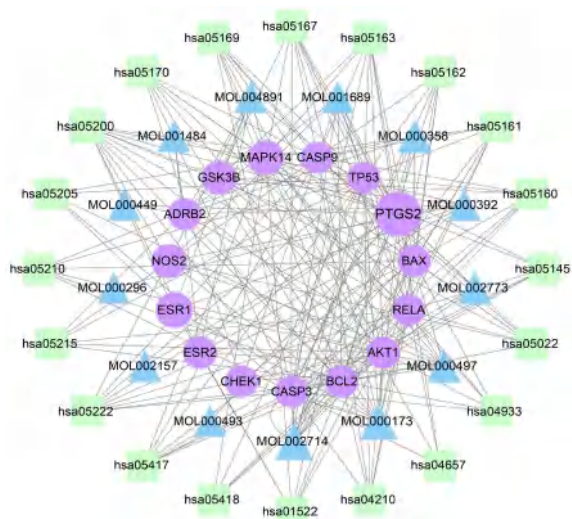


图 4 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤“活性成分-作用靶点-通路”网络
Fig 4 Active ingredient-target-pathway network of the intervention of Xuefu Zhuyu decoction for glioma

质进行去除结晶水、加氢等预处理，将预处理后的蛋白结构和活性成分结构进行分子对接并统计结合能。在 PPI 网络中，连接度排名前 5 的关键

靶蛋白为 TP53 (PDB ID: 8E7A)、MAPK1 (PDB ID: 8AOJ)、STAT3 (PDB ID: 4ZIA)、ESR1 (PDB ID: 6V8T)、AKT1 (PDB ID: 2UZR)，将其与 5 种核心活性成分进行分子对接 (见表 2)。分子对接结果显示，黄芩素等核心活性成分均与 ESR1 对接分值最高，并且活性成分与 ESR1 的结合主要是发生氢键作用和疏水作用 ($\pi-\pi$ 、烷基)，对黄芩素-ESR1、 β -谷甾醇-ESR1 等进行分子对接 (见图 5)。拟合结果进一步证实网络药理学筛选出的潜在靶点可能是血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的关键作用靶点。

表 2 活性成分与关键靶点对接的 CDOCKER 得分

Tab 2 CDOCKER scores for active ingredient and key target docking

药物活性成分	靶点			
	ESR1	TP53	MAPK1	STAT3
黄芩素	41.44	/	30.75	18.29
汉黄芩素	40.29	-187.27	27.99	/
β -谷甾醇	51.31	/	48.06	/
甘草查耳酮 A	44.30	/	41.19	/
芒柄花黄素	40.29	-107.07	37.70	/

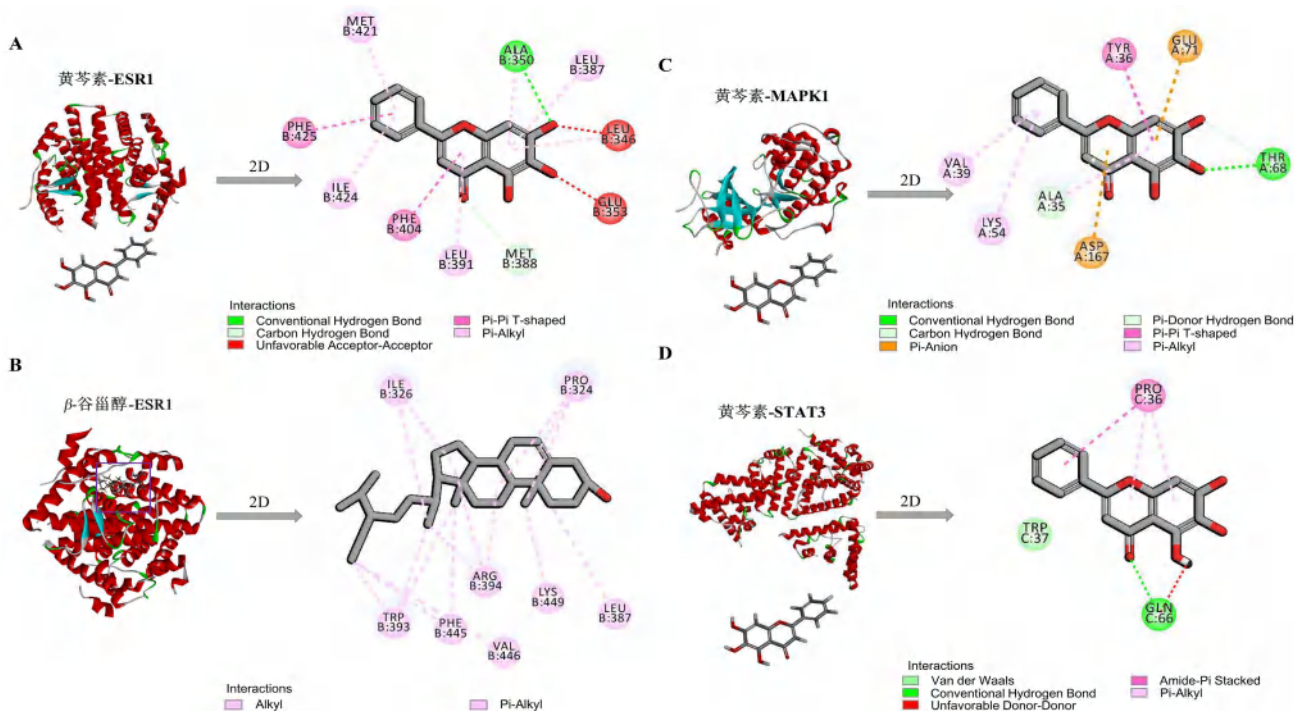


图 5 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤核心活性成分和关键靶点的分子对接结果

Fig 5 Molecular docking of core active ingredient and key targets of Xuefu Zhuyu decoction for glioma

2.3 体外细胞实验验证

通过上述网络药理学分析可知，黄芩素是血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤最重要的活性成分，ESR1 不仅是血府逐瘀汤干预脑胶质瘤 PPI 网络的关键作用靶点，还是“活性成分-作用靶点-通路”核心靶点，分子对接进一步说明了黄芩素与 ESR1 的结合能力良好。因此我们通过体外细胞实验进一步分析

黄芩素-ESR1 对胶质瘤细胞生长增殖的影响。

2.3.1 蛋白质印迹法 (WB) 检测靶点敲低效率

裂解转染 siNC、siESR1 后的胶质瘤细胞提取蛋白质，采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度，取 30 μ g 蛋白质样品电泳，转膜，5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h，Tris 盐吐温缓冲液 (TBST) 洗膜 3 次，每次 15 min，与一抗 (β -actin 1 : 5000, ESR1

1 : 2000) 共同孵育于 4℃ 过夜。接着使用相应种属二抗封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min 后使用电化学发光 (ECL) 曝光液曝光。Image J 软件扫描各条带灰度值, 以 β -actin 作为内参, 分析蛋白表达水平。结果如图 6A 所示, 与对照组相比, siESR1 组 ESR1 表达明显降低, 证明转染试剂 siESR1 在胶质瘤细胞中可降低 ESR1 表达。

2.3.2 细胞增殖及毒性检测实验 (CCK8) 检测细胞活力 将转染 siNC、siESR1 并处于对数生长期的 U87 细胞用胰酶消化并计数, 以 3×10^3 个每孔的密度接种在 96 孔板中, 培养 24 h 后, 弃培养基, 更换含黄芩素培养基 (浓度 5、10、15、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 二甲基亚砜 (DMSO) 作为对照, 分别设 5 个复孔。继续培养 24、48 h 后, 弃含药培养基, 每孔加入含有 CCK-8 检测液的培养基 100 μL , 在培养箱中继续孵育 1 h 后, 用酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值。结果如图 6B 所示, 与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比, 与黄芩素共同孵育的胶质瘤 U87 细胞活性呈剂量依赖性下调; 与转染对照组相比, 敲低 ESR1 能够逆转黄芩素孵育导致的胶质瘤细胞活性下调, 并在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素孵育下逆转效果最优 ($P < 0.001$)。

2.3.3 细胞增殖成像分析实验 (EdU) 检测细胞增殖能力 将转染 siNC、siESR1 并处于对数生长期的 U87 细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度培养到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 更换含 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素培养基继续培养 24 h, 在 37℃ 下用 100 μL 含 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EdU 的培养基处理 2 h。然后将细胞用 4% 甲醛固定 0.5 h, 并用 0.1% Triton X-100 透化 20 min。根据 EdU 细胞增殖检测试剂盒的说明, 用 Apollo 荧光染料对细胞进行染色后置于荧光显微镜下成像。结果如图 6C 所示, 与 DMSO 对照组相比, 黄芩素能够降低胶质瘤 U87 细胞的生长增殖能力, 差异具有统计学意义; 而 ESR1 的抑制则能挽救黄芩素对胶质瘤细胞生长增殖的抑制作用, 提示 ESR1 可能是黄芩素靶向胶质瘤细胞的主要蛋白 ($P < 0.01$)。

2.4 数据统计及分析

所有统计分析均采用 SPSS 20.0 软件和 Graph-Pad Prism 8.0 软件进行。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用非配对 Student *t* 检验进行两组比较。卡方检验用于探索分类变量之间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

网络药理学是通过分析大数据以进行药物活性成分挖掘与研究的新模式, 将网络药理学与传统中医药有机结合是研究中药复方作用机制的新思路。胶质瘤是中枢神经系统最常见、恶性程度

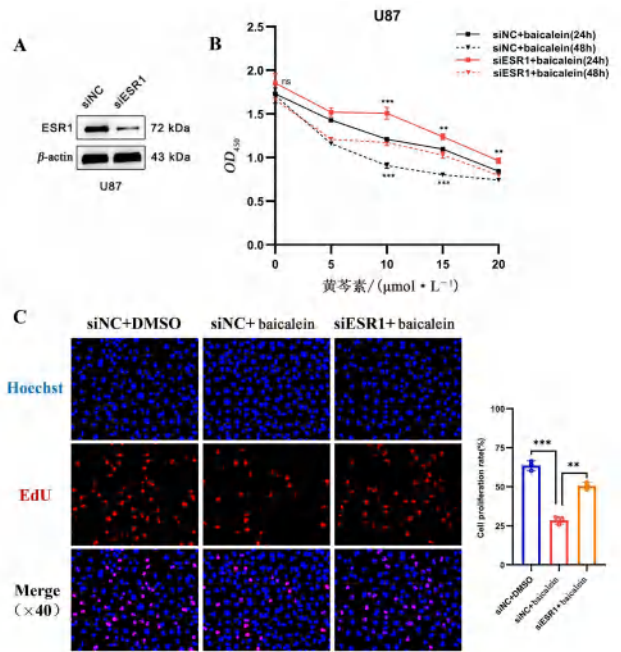


图 6 黄芩素通过 ESR1 调控胶质瘤细胞生长增殖
Fig 6 Baicalein regulates the growth and proliferation of glioma cells through ESR1

注: 与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

最高、预后最差的恶性肿瘤, 目前的治疗方案包括手术切除、化疗和辅助放射治疗, 这些方法一定程度上延缓了肿瘤的进展, 但不良反应、耐药性的发生及患者生活质量的降低仍然阻碍抗胶质瘤治疗的效果。血府逐瘀汤的抗肿瘤机制相关研究较少, 部分药理学及临床研究表明血府逐瘀汤有一定的抗肿瘤作用, 但活性成分及具体的分子机制尚未完全阐明。本研究基于网络药理学, 利用计算机模拟和多种数据库, 筛选活性成分作用靶点, 构建“有效成分-疾病-靶点药物”网络, 为揭示多组分、多靶点药物作用机制提供了新思路和新途径。

筛选的交集靶基因包括 *TP53*、*ESR1*、*MAPK1*、*STAT3* 等, 对核心靶基因进行 GO 功能和 KEGG 富集分析显示, 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤的机制多集中于蛋白磷酸化、细胞凋亡等信号传导通路。分子对接结果发现, ESR1 与黄芩素等核心活性成分的结合能均高于其他核心靶点, 提示 ESR1 是血府逐瘀汤作用于脑胶质瘤的重要靶点之一。通过体外细胞实验进一步验证了网络药理学和分子对接的筛选结果。实验结果显示黄芩素具有抑制胶质瘤细胞增殖能力及活力的作用, 且抑制 ESR1 表达有效逆转了黄芩素对胶质瘤细胞的生长抑制作用, 提示 ESR1 有可能是血府逐瘀汤治疗胶质瘤的关键靶蛋白。值得注意的是, 除了已验证的 ESR1 靶点外,

我们预测的其他靶点如 TP53、MAPK1 等, 以及它们所涉及的信号通路, 同样在血府逐瘀汤治疗胶质瘤过程中发挥着重要作用, 这些靶点和通路可能通过复杂的相互作用网络, 共同调节胶质瘤细胞的生长与凋亡。例如, TP53 为肿瘤抑制基因, 其在细胞周期调控和凋亡诱导中的关键作用已被广泛研究; MAPK1 则参与多条细胞信号传导通路, 对细胞的增殖与分化具有深远影响。既往研究发现, 多种炎症因子、非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)、编码基因可通过 TP53-MDM2、JAK-STAT、MAPK1-GSK3 β 等多种信号轴影响胶质瘤细胞的增殖、侵袭、辐射敏感性等癌特性^[15-18]。

血府逐瘀汤与胶质瘤的相互作用是多成分-多靶点的, 但活性成分与靶点的结合可能受到多种因素的影响。由于靶点分子内能高、对接评分低等原因, 甘草查耳酮 A 与 TP53、MAPK1 等靶点的相互结合并不稳定, 实验验证意义不大, 出于严谨的科学考虑, 本文仅提供了黄芩素-ESR1 的实验结果。ESR1 在乳腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌等多种肿瘤中具有明确的致癌作用。同时, 研究表明, 女性胶质瘤患者通常对术后化疗和放疗等标准治疗方法表现出更显著的疗效。性别差异不仅影响胶质瘤患者的药物治疗反应, 还显著关联其预后^[19-20]。因此, 血府逐瘀汤通过靶向胶质瘤细胞中的 ESR1 的作用机制, 可能为基于性别优势的胶质瘤治疗提供重要的核心靶点, 为个性化治疗策略带来新的启示。为了更全面地揭示血府逐瘀汤的抗肿瘤机制, 我们计划对这些预测得到的靶点和通路进行更深入的实验验证和功能分析。

综上所述, 本研究不仅为血府逐瘀汤的药理疗效提供了坚实的理论依据, 也为中药复方作用机制的深入研究开辟了新的途径。相信随着研究的深入进行, 血府逐瘀汤在脑胶质瘤治疗中的潜力将得到更充分的挖掘和应用。

参考文献

- [1] Yang KY, Wu ZJ, Zhang H, et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches [J]. Mol Cancer, 2022, 21 (1): 39.
- [2] 傅春燕, 刘永辉, 曾立, 等. 血府逐瘀汤化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20 (5): 232-237.
- [3] 刘建民, 黄良文, 朱旭红, 等. 3 种活血化瘀中药复方含药血清对神经胶质瘤 U251 细胞 JAK/STAT 信号通路的影响 [J]. 中国药房, 2017, 28 (16): 2176-2179.
- [4] 陈燕伟, 马善波, 张蕊. 血府逐瘀汤联合替莫唑胺对脑胶质瘤大鼠 ERK/MAPK 信号通路的调节作用 [J]. 西部医学, 2021, 33 (9): 1258-1263.
- [5] 陈周昌. 六味地黄汤合血府逐瘀汤治疗胶质瘤术后情感障碍 16 例 [J]. 中国中医急症, 2008, 17 (11): 1609-1610.
- [6] 王松鹤. 血府逐瘀汤治疗脑胶质瘤临床疗效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [7] Hopkins AL. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25 (10): 1110-1111.
- [8] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4 (11): 682-690.
- [9] Wang X, Wang ZY, Zheng JH, et al. TCM network pharmacology: a new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19 (1): 1-11.
- [10] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [11] Bardou P, Mariette J, Escudie F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15 (1): 293.
- [12] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (D1): D362-D368.
- [13] Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (W1): W216-W221.
- [14] 魏静, 王宇, 董英, 等. 基于色谱-质谱联用技术和网络药理学、分子对接分析彭祖寿柑桔果皮化学成分和抗氧化活性 [J]. 中国食品学报, 2023, 23 (4): 305-323.
- [15] Pratt D, Abdullaev Z, Papanicolau-Sengos A, et al. High-grade glioma with pleomorphic and pseudopapillary features (HPAP): a proposed type of circumscribed glioma in adults harboring frequent TP53 mutations and recurrent monosomy 13 [J]. Acta Neuropathol, 2022, 143 (3): 403-414.
- [16] Li H, Chen L, Li JJ, et al. miR-519a enhances chemosensitivity and promotes autophagy in glioblastoma by targeting STAT3/Bcl2 signaling pathway [J]. J Hematol Oncol, 2018, 11 (1): 70.
- [17] Tong LQ, Li JB, Li QY, et al. ACT001 reduces the expression of PD-L1 by inhibiting the phosphorylation of STAT3 in glioblastoma [J]. Theranostics, 2020, 10 (13): 5943-5956.
- [18] Shi HZ, Wang DN, Ma LN, et al. MicroRNA-362 inhibits cell growth and metastasis in glioblastoma by targeting MAPK1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24 (17): 8931-8939.
- [19] Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2016, 34 (25): 2961-2968.
- [20] Knoedler JR, Inoue S, Bayless DW, et al. A functional cellular framework for sex and estrous cycle-dependent gene expression and behavior [J]. Cell, 2022, 185 (4): 654-671. e22.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-08-20)

伊曲康唑甘草酸纳米胶束的构建及抗白念珠菌作用研究

彭澳, 刘雪, 刘洋, 曾甜, 闫文浩, 于慧, 田宝成* (滨州医学院, 山东 烟台 264003)

摘要: **目的** 构建负载伊曲康唑的甘草酸纳米胶束 (ICZ-NMs), 并对其表征及眼部应用的细胞学与体外抗白念珠菌作用评价。**方法** 采用注入法制备 ICZ-NMs, 测定其粒径、Zeta 电位、包封率、载药量、药物的物相状态和初步稳定性, 并观察其微观形貌。采用 CCK-8 法考察其对永生角膜上皮细胞 (HCE-T) 的毒性。采用流式细胞术考察纳米胶束的入胞能力和摄取途径。采用体外抑菌率和纸片琼脂板抑菌圈评价 ICZ-NMs 对白念珠菌株 *Candida albicans* SC5314 的体外抗菌作用。**结果** 所制 ICZ-NMs 的纳米胶束粒径为 (152.4 ± 4.2) nm, Zeta 电位为 (-25.1 ± 0.9) mV, 包封率为 66.2%, 载药量为 11.0%。透射电子显微镜显示微观形态圆整。在 4 °C 下存放 7 d 的稳定性良好。差示扫描量热图谱确证 ICZ-NMs 中 ICZ 以无定形形态存在。细胞毒性考察结果显示, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的空白胶束 (NMs) 和载药浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ICZ-NMs 胶束对 HCE-T 细胞无毒。纳米胶束可提高药物的入胞效率, 其主要的细胞摄取机制为巨胞饮作用。在体外抑菌率和纸片琼脂板抑菌圈评价中, ICZ-NMs 均显示出比游离 ICZ 更强的抗菌作用。**结论** 成功构建了 ICZ-NMs 纳米胶束, 增加了 HCE-T 细胞内的药物递送, 提高了 ICZ 的体外抗白念珠菌作用, 且所制的 ICZ-NMs 眼部应用时生物相容性好。**关键词:** 伊曲康唑; 甘草酸; 纳米胶束; 白念珠菌

中图分类号: R944, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0430-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.021

Glycyrrhizic acid nanomicelles loaded with itraconazole and its anti-*Candida albicans* effect

PENG Ao, LIU Xue, LIU Yang, ZENG Tian, YAN Wen-hao, YU Hui, TIAN Bao-cheng* (Binzhou Medical University, Yantai Shandong 264003)

Abstract: Objective To construct glycyrrhizic acid nanomicelles loaded with itraconazole (ICZ-NMs), characterize their pharmaceutical properties and evaluate its cytology and in vitro anti-*Candida albicans* effects for ophthalmic use. **Methods** ICZ-NMs were prepared with the injection method, and its particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading, phase state and preliminary stability were determined. The micromorphology was also observed. The cytotoxicity to human immortalized corneal epithelial cells (HCE-T) was determined by CCK-8 assay. The endocytosis and uptake pathway of nanomicelles were investigated by flow cytometry. The in vitro antibacterial effect of ICZ-NMs against *Candida albicans* SC5314 was evaluated by antibacterial rate and agar diffusion from paper discs. **Results** The prepared ICZ-NMs had a particle size of (152.4 ± 4.2) nm, Zeta potential of (-25.1 ± 0.9) mV, an encapsulation efficiency of 66.2% and a drug loading of 11.0%. Transmission electron microscopy showed spherical and intact morphology. The stability was good after 7 d of storage at 4 °C. Differential scanning calorimetry confirmed the presence of ICZ in ICZ-NMs amorphously. The cell experiments showed that neither blank micelles (NMs, $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) nor ICZ-NMs loaded with ICZ ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) showed toxicity to HCE-T cells. Nanomicelles improved the efficiency of drug entry into the cell, and the major entry mechanism was macropinocytosis. In evaluation of both the in vitro antibacterial rate and the agar diffusion from paper discs assays, ICZ-NMs showed stronger antibacterial

作者简介: 彭澳, 男, 硕士研究生, 主要从事眼用纳米载体研究, email: paemail2000@163.com *通信作者: 田宝成, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事新型眼用递送系统设计与评价研究, email: tianzhongmin 2001@163.com

effect than that of free ICZ. **Conclusion** ICZ-NMs nanomicelles are successfully constructed, which increases drug delivery into HCE-T cells, improves the in vitro anti-*Candida albicans* effect of ICZ, and demonstrates good biocompatibility for ophthalmic use.

Key words: itraconazole; glycyrrhizic acid; nanomicelle; *Candida albicans*

伊曲康唑 (itraconazole, ICZ) 是一种三唑类广谱抗真菌药^[1], 通过抑制真菌细胞膜的主要成分之一麦角甾醇的合成发挥抗真菌作用^[2]。临床上主要用于曲霉菌和白念珠菌等深部真菌的感染^[3]。目前我国市面上销售的伊曲康唑剂型主要是片剂、口服液、胶囊和注射液。但在治疗真菌性角膜炎时, 用于全身用药而眼部难以达到有效治疗浓度, 且存在严重肝肾功能损害和严重皮肤反应等不良反应^[4]。并且伊曲康唑是极难溶于水的药物, 在水中的溶解度为 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[5]。为解决其难溶性, 常添加化学表面活性剂, 但因表面活性剂有较大的毒性等局限性^[6], 限制了伊曲康唑的使用。因此, 研究出安全有效的伊曲康唑新制剂是亟待解决的问题。

为提高药物的生物利用度, 纳米药物递送系统成为局部给药到眼前部研究的热点之一^[7]。纳米胶束是由两亲性物质在溶液中自组装形成的纳米级大小的核-壳形胶束, 疏水基团向内聚集为内核, 亲水端则为外壳。纳米胶束是提高疏水性药物生物利用度最有效的载体之一, 具有提高载药量、提高药物稳定性、减少不良反应等优点^[8], 这些优点使纳米胶束作为载体为难溶性药物给药提供可行的方案。

甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 是中药甘草的重要活性成分之一, 具有抗菌抗炎等药理作用^[9], 由两分子葡糖醛酸和一分子甘草次酸链接而成, 是天然的表面活性剂, 具有两亲性, 能在水溶液中自组装形成胶束^[10]。近年来已有较多研究证实甘草酸自组装胶束可增加难溶性药物的溶解度, 还可以提高生物利用度^[11-13]。鉴于此, 查阅文献并无采用 GA 提高伊曲康唑溶解度的报道, 本研究拟构建负载伊曲康唑的甘草酸纳米胶束 (ICZ-NMs), 并考察其制剂学性质、体外递送性能及抗真菌作用, 为 ICZ 新制剂的研发提供重要借鉴。

1 材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano ZS 型激光纳米粒度仪 (英国 Malvern 公司), JEM-1400 型透射电子显微镜 (日

本电子株式会社), TU-1901 型紫外分光光度仪 (北京普析通用仪器责任有限公司), TGA/DSC 3 + 型热重及同步热分析仪 (梅特勒托利多国际贸易有限公司), Synergy H12 型酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司), BD Canto II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 试药

GA (天津希恩思生化科技有限公司, 批号: G17475BKV0, 纯度: 95%); 伊曲康唑 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: 20210510, 纯度: 98%); CCK-8 试剂 (上海碧云天生物技术有限公司); DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (武汉普诺赛生物科技有限公司); 盐酸氯丙嗪 (北京百灵威科技有限公司); 阿米洛利 (大连美仑生物技术有限公司); 2% 磷钨酸、甲基- β -环糊精 (北京索莱宝科技有限公司); 叠氮化钠 (天津凯信化学工业有限公司); 酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂 (YPD) 培养基、YPD 液体培养基 (青岛海博生物技术有限公司), 其余试剂为分析纯。

1.3 细胞

人永生角膜上皮细胞 (HCE-T, BNCC341100) 购自北纳创联生物技术研究院。

1.4 菌株

白念珠菌野生型菌株 *Candida albicans* SC5314 由东北大学生命科学与健康学院丁辰教授惠赠。

2 方法与结果

2.1 ICZ-NMs 纳米胶束的制备

称取 GA 5.0 mg, 加适量蒸馏水于热水浴中超声 5 min 使其溶解, 得 GA 水溶液。精密称取一定量的 ICZ 原料药, 加入适量丙酮并超声, 得 ICZ 有机溶液。将 ICZ 有机溶液缓慢滴入 GA 水溶液中, 室温下磁力搅拌 8 min, 随后转移至圆底烧瓶中, 置旋转蒸发器于 70°C 下除有机相后, 即得 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 伊曲康唑纳米胶束 (ICZ-NMs)。

2.2 ICZ-NMs 纳米胶束的表征

2.2.1 粒径、Zeta 电位和微观形态 取适量样品稀释后, 采用马尔文激光粒度仪测定纳米胶束 Zeta 电位、粒径分布与多分散性指数 (polydispersity index, PDI)。样品进行 3 次重复测定。结果如图 1

所示, ICZ-NMs 平均粒径为 (152.4 ± 4.2) nm, PDI 为 0.15 ± 0.02 , 说明所制备纳米胶束的粒子大小分布较为均匀。其 Zeta 电位为 (-25.1 ± 0.9) mV, 较高的电位值有利于粒子的储存稳定。

将样品经 10 倍稀释后滴加到铜网上, 使用 2% 磷钨酸负染色液对样品进行负染, 用滤纸吸干多余试剂, 自然干燥后, 用透射电子显微镜观察纳米胶束的形态。结果见图 2, 显示所制备的胶束形态完整, 呈近球形粒子, 相互之间未见黏附。

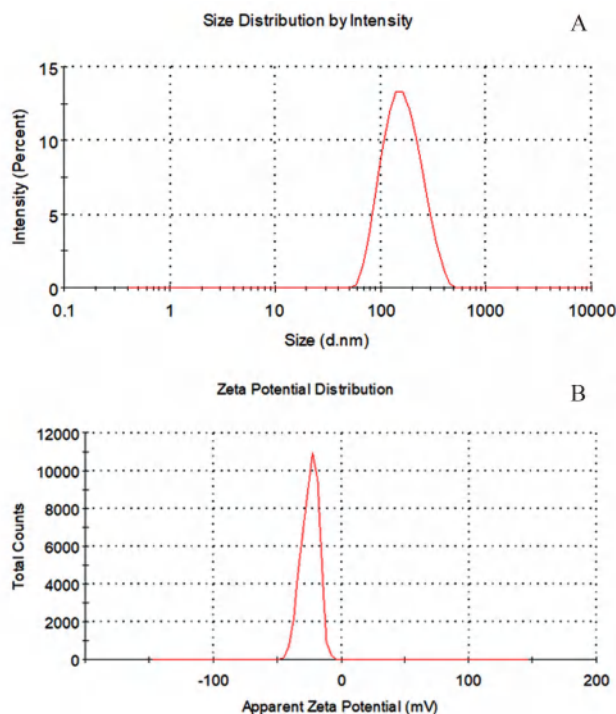


图 1 ICZ-NMs 的粒径分布 (A) 与 Zeta 电位 (B) 图

Fig 1 Plot of particle size (A) and Zeta potential (B) of ICZ-NMs

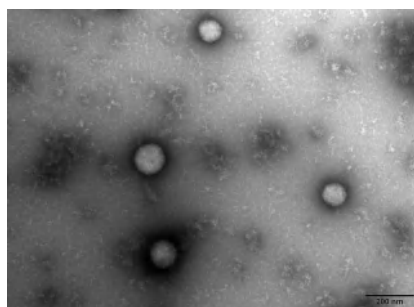


图 2 ICZ-NMs 的透射电镜图 (标尺: 200 nm)

Fig 2 TEM images of ICZ-NMs (scale bar: 200 nm)

2.2.2 初步稳定性考察 将 ICZ-NMs 样品置于 4°C 冰箱中保存, 在第 0、1、3、5、7 日观察样品是否有凝聚沉淀现象, 并测定其粒径分布与 Zeta 电位, 考察纳米胶束的储存稳定性, 结果见图 3。在 4°C 条件下放置 7 d 后, 制剂从外观上未见沉淀产生, 粒径、Zeta 电位值亦无显著改变, 说明该纳米胶束具有良好的储存稳定性。

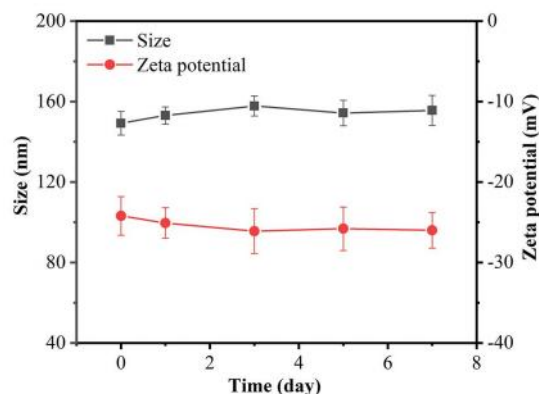


图 3 ICZ-NMs 的稳定性测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 3 Stability test of ICZ-NMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.3 包封率和载药量 通过超滤离心法结合紫外分光光度法测定胶束中 ICZ 的包封率和载药量。精密称取 ICZ 2.5 mg, 溶于 10 mL 乙醇中, 制备得到 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ICZ 储备液, 通过稀释制备 1、5、10、20、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列 ICZ 溶液, 以乙醇为空白, 在 262 nm 处测定其吸光度值 (A)^[14]。以 ICZ 浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 进行线性回归得到线性回归方程 $A = 0.0453C + 0.0363$ ($r = 0.9997$), 线性范围为 $1 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

将适量 ICZ-NMs 加入超滤管 (MWCO 3 kD) 中, 以 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后滤液加入乙醇稀释 10 倍, 通过紫外分光光度计测定胶束中的未包封的药物含量。按公式 1 和公式 2 分别计算包封率 (entrapment efficiency, EE) 及载药量 (drug loading, DL):

$$EE (\%) = (W - W_{\text{free}}) / W \times 100\% \quad (\text{公式 } 1)$$

$$DL (\%) = (W - W_{\text{free}}) / (W - W_{\text{free}} + W_{\text{material}}) \times 100\% \quad (\text{公式 } 2)$$

式中: W 为制剂中 ICZ 的总含量; W_{free} 为制剂中未包封 ICZ 的含量; W_{material} 为制剂中载体 GA 的含量。

测得 ICZ-NMs 中药物包封率及载药量分别为 66.2%、11.0%。说明制备的纳米胶束对 ICZ 包封和载药能力均较好。

2.3 ICZ-NMs 纳米胶束的物相鉴定

分别取适量 GA、ICZ、GA 与 ICZ 的物理混合物、ICZ-NMs 胶束的冻干样品进行差示扫描量热分析 (differential scanning calorimeter, DSC)。仪器参数为: 扫描范围从 $30 \sim 200^{\circ}\text{C}$, 升温速率为 $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, N_2 流速为 $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。ICZ-NMs 的冻干制剂的 DSC 扫描图谱结果见图 4。DSC 曲线中 ICZ 在 170°C 左右处出现了一个明显的吸热峰, 这是对应的 ICZ 的熔点。GA 在 $70 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 可见一

一个较宽的吸热峰，可能是 GA 中所含水分的蒸发所产生，在设定的扫描温度范围内未见 GA 的吸热峰，文献报道 GA 的吸热峰在 225 °C 左右^[15]。ICZ 和 GA 物理混合物在 170 °C 与 70 ~ 120 °C 处有明显的吸热峰，显示出 ICZ 和 GA 吸热峰简单叠加的特征。ICZ-NMs 胶束的 DSC 图谱中仅在 50 ~ 100 °C 处显示了类似 GA 载体材料自身的一个的吸热峰，而 ICZ 的 170 °C 左右尖锐特征峰完全消失，证实了 ICZ 在 ICZ-NMs 纳米胶束中晶态的消失，说明是以无定形形态存在。这将有利于提高 ICZ 的溶解度及溶出速度，从而促进其向细胞内的转运及提高药效。

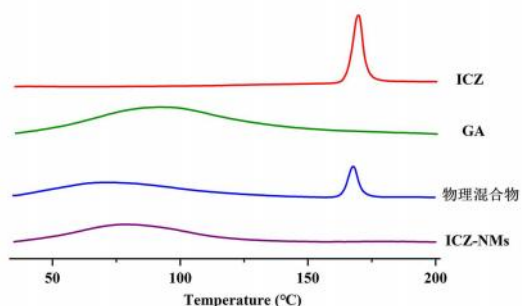


图 4 ICZ-NMs 的差示扫描量热图

Fig 4 Differential scanning calorimetry thermogram of ICZ-NMs

2.4 ICZ-NMs 纳米胶束的细胞毒性考察

取对数生长的 HCE-T 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中，放入细胞培养箱培养 48 h 使细胞贴壁。分别加入不同浓度 GA 所制备的空白胶束 (NMs) 和负载不同浓度 ICZ 的 ICZ-NMs 胶束制剂，每组设置 4 个复孔，继续培养 24 h 后，除去旧培养基，每孔加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CCK-8 孵育 1 h，于 450 nm 处测定吸光度值，计算细胞存活率，结果见图 5。HCE-T 细胞与 $25 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的空白胶束和 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 载药 ICZ-NMs 胶束共孵育后，细胞存活率分别在 90% 及 83% 以上，这说明 GA 材料自身及其载药胶束对 HCE-T 细胞无明显的细胞毒性，在眼部应用中具有良好的生物相容性。

2.5 ICZ-NMs 纳米胶束的细胞摄取能力考察

将香豆素 6 (C6) 代替 ICZ，其余步骤同“2.1”项下方法制备载 C6 的纳米胶束 (C6-NMs)。同法制得 C6 溶液 (C6-SOL)，作为对照组。将 HCE-T 细胞按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，放入细胞培养箱培养 48 h 使细胞贴壁。除去旧培养基，将两组制剂以每孔 200 μL 加入培养皿中，然后与细胞共培养 2.5 h 后，用胰蛋白酶消化细胞，并用 PBS 多次离心洗涤细胞，用流式细胞仪测定细胞荧光强度，结果见图 6。GA 纳米胶束组的细胞内平均荧光强度值为溶液组的 2.65 倍 ($P < 0.001$)，说明

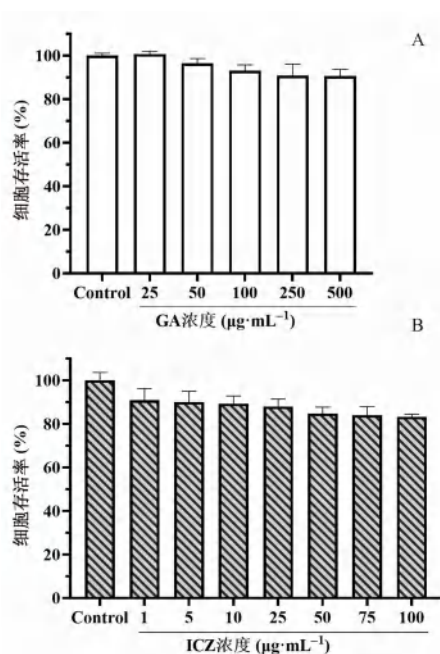


图 5 NMs (A) 与 ICZ-NMs (B) 的细胞毒性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig 5 Cytotoxicity of NMs (A) and ICZ-NMs (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

GA 纳米胶束能促进药物的跨细胞转运，从而增加细胞内的药物浓度，这将为提高 ICZ 的抗菌作用奠定基础。

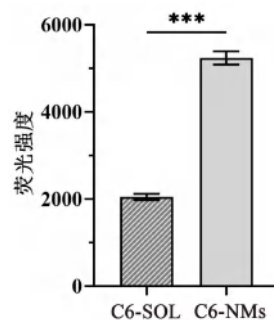


图 6 HCE-T 细胞与 GA 纳米胶束孵育后细胞内荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 4, ***P < 0.001$)

Fig 6 Fluorescence intensity in HCE-T cells after the incubation with NMs ($\bar{x} \pm s, n = 4, ***P < 0.001$)

2.6 ICZ-NMs 纳米胶束的细胞摄取途径考察

按照“2.5”项下方法培养细胞，每孔中分别加入甲基- β -环糊精、盐酸氯丙嗪、阿米洛利、叠氮化钠 200 μL 培养 1 h，并以 DMEM 作为空白对照组。除去含有抑制剂的培养基，然后向每孔加 200 μL C6-NMs，继续培养 2.5 h 后，用胰蛋白酶消化细胞，并用 PBS 多次离心洗涤细胞，用流式细胞仪测定细胞荧光强度，结果见图 7。由图 7 可知，与空白对照组相比，叠氮化钠预处理组细胞内相对荧光强度下降了 20.23% ($P < 0.001$)，这表明 HCE-T 细胞对纳米胶束的摄取受到了明显的抑制，即存在一定程度的主动转运过程。氯丙嗪及甲基- β -环糊精预处理组的相对荧

光强度均在 92.5% 以上, 说明 HCE-T 对纳米胶束的摄取未受到显著影响 ($P > 0.05$)。作为巨胞饮抑制剂^[16], 阿米洛利预处理的细胞内相对荧光强度下降了 17.75% ($P < 0.001$), 这进一步说明 HCE-T 细胞对 GA 纳米胶束的主动转运方式以巨胞饮作用为主。

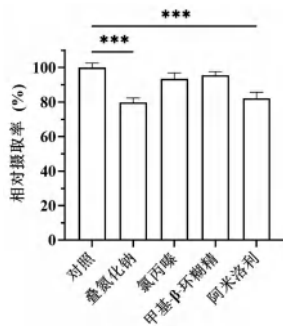


图 7 不同摄取抑制剂孵育后 HCE-T 细胞的相对摄取率 ($\bar{x} \pm s, n = 3, ***P < 0.001$)

Fig 7 Relative uptake rate of HCE-T cells after the incubation with different endocytosis inhibitors ($\bar{x} \pm s, n = 3, ***P < 0.001$)

2.7 ICZ-NMs 纳米胶束的体外抗白念珠菌作用考察

2.7.1 体外抑菌率考察 以 0.2% 吐温-80 溶液代替 GA 溶液, 制备 ICZ 溶液 (ICZ-SOL) 作为对照组。将白念珠菌接种到 5 mL YDD 培养基中, 在摇床 30 °C、200 r · min⁻¹ 下培养 12 h。将白念珠菌稀释至 1 × 10⁵ CFU · mL⁻¹, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。分别加入不同药物浓度的 ICZ-SOL 和 ICZ-NMs, 继续培养 12 h, 振荡均匀后于 600 nm 处测定吸光度值, 计算抑菌率, 结果见图 8。ICZ-NMs 纳米胶束在 0.2 ~ 3.2 μg · mL⁻¹ 药物质量浓度范围内, 经与白念珠菌培养 12 h 后其抑菌率均大于 80%; ICZ-SOL 对照组在 0.2 ~ 3.2 μg · mL⁻¹ 药物质量浓度范围的抑菌率为 21.95% ~ 73.80%, 且任一考察浓度两制剂抑菌率差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。值得注意的是, 随着药物浓度的降低, ICZ-NMs 胶束组与 ICZ-SOL 组的抑菌率差距越大, 特别是在 0.025 ~ 0.05 μg · mL⁻¹ 时 ICZ-SOL 组已基本不显示抑菌作用的情况下, ICZ-NMs 组的抑菌率仍大于 60%, 这意味着在低浓度时 ICZ-NMs 胶束的优势更为明显。以上结果表明, ICZ-NMs 比 ICZ-SOL 展示了更为优异的抗真菌作用。一方面是 ICZ 和 GA 均具有抗菌作用^[17], 可能产生了一定的协同效应; 另一方面, 制备的纳米胶束通过白念珠菌的主动转运作用提高了 ICZ 的胞内浓度。

2.7.2 纸片琼脂板抑菌圈考察 按“2.7.1”项下方法培养白念珠菌, 将白念珠菌稀释至 5 × 10³ CFU · mL⁻¹, 然后将 100 μL 菌液接种于含 YPD 液

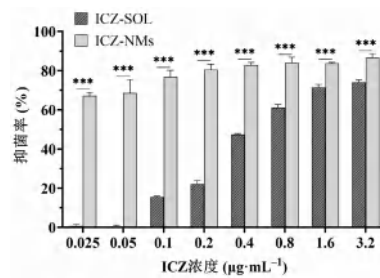


图 8 ICZ-SOL 和 ICZ-NMs 的抑菌率考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4, ***P < 0.001$)

Fig 8 Antibacterial rate of ICZ-SOL and ICZ-NMs ($\bar{x} \pm s, n = 4, ***P < 0.001$)

体培养基的皿中, 将 3 块小圆滤纸片均匀间隔放在培养皿中, 每片滤纸片上滴加 10 μL 的 ICZ-SOL 或 ICZ-NMs, 分别对不同药物浓度的 ICZ-SOL 和 ICZ-NMs 进行实验, 在 30 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 观察并测量抑菌圈的直径。结果见表 1 和图 9。可见, 随着药物浓度的增加, 两组的抑菌圈直径都呈增加趋势, 在 60、120、160 μg · mL⁻¹ 三个相同的药物浓度下, ICZ-NMs 组的抑菌环直径均明显大于 ICZ-SOL 组 ($P < 0.001$), 这表明 ICZ 纳米胶束组比溶液组具有更强的抗白念珠菌作用。显而易见的是, 60 μg · mL⁻¹ 的 ICZ-NMs 的抑菌圈直径大于 160 μg · mL⁻¹ ICZ-SOL 的抑菌圈直径。以上现象表明 ICZ-NMs 增加了白念珠菌对 ICZ 的摄取效率和生物利用度。此外, GA 也具有抑菌作用^[9], 可能与 ICZ 产生协同作用, 增强了抑菌作用。

表 1 ICZ-NMs 纳米胶束在琼脂板模型中的抑菌作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Bacteriostasis in agar plate model of ICZ-NMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	抑菌圈直径 /mm		
	60 μg · mL ⁻¹	120 μg · mL ⁻¹	160 μg · mL ⁻¹
ICZ-NMs	18.67 ± 0.58*	20.67 ± 0.58*	21.33 ± 0.58*
ICZ-SOL	13.67 ± 1.15	14.67 ± 0.58	15.33 ± 0.58

注: 与相同浓度的 ICZ-SOL 组比较, * $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the same concentration of ICZ-SOL group, $P < 0.001$.

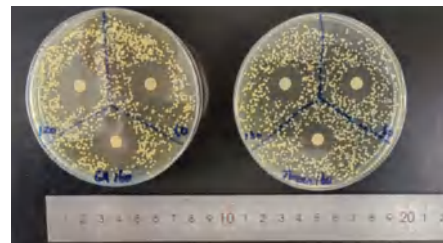


图 9 ICZ-NMs (左) 和 ICZ-SOL (右) 抑菌圈测试的代表性平板图
Fig 9 Representative plate plot of the inhibition zone test for ICZ-NMs (left) and ICZ-SOL (right)

2.8 统计学方法

使用 SPSS (Version 26) 软件对有关数据进

行统计学分析,采用单因素方差分析对组间数据进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

ICZ 在治疗真菌性角膜炎等真菌疾病时,受到药物剂型等因素的影响限制了其药效的发挥。由于 ICZ 水溶性差,生物利用度低,常加入表面活性剂改善其缺点,但会有刺激性和毒性。纳米制剂成为眼表局部给药的重要递送系统之一。本研究发现 GA 能在水溶液中形成胶束,本实验采用 GA 将其制备成纳米胶束。本文制备的 ICZ-NMs 粒径分布均匀,呈正态分布,平均粒径为 (152.4 ± 4.2) nm, PDI 为 0.15 ± 0.02 , Zeta 电位为 (-25.1 ± 0.9) mV,电镜观察发现该纳米胶束为大小均一分布均匀的粒子。以外观和粒径电位为评价指标,考察纳米胶束稳定性,结果发现在 7 d 考察期内外观和粒径电位无明显变化,表明其性质较稳定。包封率高,细胞存活率高,表明 ICZ-NMs 在眼部应用中有较好的生物相容性。摄取实验结果表明,纳米胶束能够增加 HCE-T 细胞对 ICZ 的摄取效率,将有利于增加生物利用度。相比于游离 ICZ, ICZ-NMs 有较好的体外抗菌效果。综上所述,本研究成功制备了 ICZ-NMs 纳米胶束,该纳米胶束具有稳定性和安全性,较好的抑菌性效果,可以用于真菌性角膜炎更进一步的研究。

参考文献

- [1] Wang YM, Zhang CH, Wu ZL, et al. In vivo and in vitro evaluation of pulmonary administration of itraconazole nanostructured lipid carriers for pulmonary aspergillosis [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2023, 49 (2): 232-239.
- [2] Ghannoum M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action [J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2016, 106 (1): 79-86.
- [3] Maccallum DM, Odds FC. Efficacy of parenteral itraconazole against disseminated *Candida albicans* infection in two mouse strains [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50 (2): 225-229.
- [4] Benitez LL, Carver PL. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents [J]. Drugs, 2019, 79 (8): 833-853.
- [5] Jagdale SK, Nawale RB. Experimental measurement-correlation of solubility and dissolution thermodynamics study of itraconazole in pure monosolvents at various temperatures [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2021, 47 (7): 1038-1051.
- [6] Ibrahim SS. The role of surface active agents in ophthalmic drug delivery: a comprehensive review [J]. J Pharm Sci, 2019, 108 (6): 1923-1933.
- [7] Qamar Z, Qizilbash FF, Iqbal MK, et al. Nano-based drug delivery system: recent strategies for the treatment of ocular disease and future perspective [J]. Recent Pat Drug Deliv Formul, 2019, 13 (4): 246-254.
- [8] Vaneev A, Tikhomirova V, Chesnokova N, et al. Nanotechnology for topical drug delivery to the anterior segment of the eye [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (22): 12368.
- [9] Chen K, Yang R, Shen FQ, et al. Advances in pharmacological activities and mechanisms of glycyrrhizic acid [J]. Curr Med Chem, 2020, 27 (36): 6219-6243.
- [10] Tucker IM, Burley A, Petkova RE, et al. Adsorption and self-assembly properties of the plant based biosurfactant, glycyrrhizic acid [J]. J Colloid Interface Sci, 2021, 598: 444-454.
- [11] You GJ, Feng T, Zhang GQ, et al. Preparation, optimization, characterization and in vitro release of baicalein-solubilizing glycyrrhizic acid nano-micelles [J]. Int J Pharm, 2021, 601: 120546.
- [12] Shen CY, Shen BD, Zhu JJ, et al. Glycyrrhizic acid-based self-assembled micelles for improving oral bioavailability of paeoniflorin [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2021, 47 (2): 207-214.
- [13] 邓英光, 银雪艳, 郭秀彩, 等. 静脉注射吴茱萸碱-甘草酸纳米胶束后吴茱萸碱在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (1): 141-144.
- [14] 高瑞, 欧阳五庆. 伊曲康唑纳米乳的制备及含量测定 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2014, 42 (8): 34-39.
- [15] Ramos JJM, Diogo HP. The slow relaxation dynamics in active pharmaceutical ingredients studied by DSC and TSDC: voriconazole, miconazole and itraconazole [J]. Int J Pharm, 2016, 501 (1-2): 39-48.
- [16] Qin B, Chen ZJ, Jin W, et al. Development of cholesteryl peptide micelles for siRNA delivery [J]. J Control Release, 2013, 172 (1): 159-168.
- [17] Messier C, Grenier D. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans* [J]. Mycoses, 2011, 54 (6): 801-806.

(收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-07-05)

miRNA-29b 对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的作用机制研究

刘萌萌¹, 杜文涛^{2*} (1.河北工程大学, 河北 邯郸 056000; 2.河北工程大学附属医院, 河北 邯郸 056000)

摘要: **目的** 探究 miRNA-29b 在大鼠心肌梗死后心肌纤维化过程中的作用机制。**方法** 采用左冠脉前降支结扎法制备心肌梗死动物模型, 共 24 只 SD 雄性大鼠造模成功, 将其随机分为 MI 组、MI + NC miRNA 组、MI + miRNA-29b 组, 每组 8 只; 另取 8 只大鼠只穿线不结扎冠状动脉作为假手术 (Sham) 组。构建携带大鼠 miRNA-29b 基因的慢病毒载体。MI + NC miRNA 组及 MI + miRNA-29b 组大鼠尾静脉分别单次注射 NC 慢病毒、miRNA-29b 慢病毒各 100 μ L 进行干预, Sham 组和 MI 组分别尾静脉注射等体积的生理盐水。28 d 后超声心动图检测心功能相关指标; Masson 染色观察心肌胶原容积分数 (CVF); 免疫组化法检测 I、III 型胶原表达; 实时荧光 PCR 及蛋白印迹法检测心肌转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Smad3、I 型胶原 α 1 链基因 (COL1A1) 及平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 和蛋白表达变化。**结果** 影像学结果显示, MI + miRNA-29b 组大鼠心功能改善。病理学及分子生物学结果显示, 与 MI 组、MI + NC miRNA 组比较, MI + miRNA-29b 组大鼠心肌组织 I、III 胶原和 CVF、COL1A1 及 α -SMA 的 mRNA 及蛋白表达水平降低; 心肌组织 TGF- β 1、Smad3 mRNA 及蛋白表达水平降低。**结论** miRNA-29b 通过靶向抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路抑制心肌梗死后纤维化的发生发展, 从而改善心功能。

关键词: miRNA-29b; 心肌梗死; 纤维化; TGF- β 1/Smad3 信号通路

中图分类号: R542, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0436-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.022

Effect of miRNA-29b on myocardial fibrosis after myocardial infarction in rats and related mechanism

LIU Meng-meng¹, DU Wen-tao^{2*} (1. Hebei University of Engineering, Handan Hebei 056000; 2. Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan Hebei 056000)

Abstract: Objective To determine the effect of miRNA-29b on myocardial fibrosis after myocardial infarction in rats and related mechanism. **Methods** Models of infarction were prepared in SD male rats by ligation of the anterior descending branch of the left coronary artery. After the successful modelling, 24 male SD rats were randomly divided into an MI, an MI+NC miRNA, and an MI+miRNA-29b groups (with 8 rats in each group). Another 8 rats were taken as the Sham group, whose coronary arteries were threaded but not ligated. Lentiviral vectors carrying rat miRNA-29b gene were constructed. The intervention included a single injection of 100 μ L NC lentivirus and miRNA-29b lentivirus each into the tail vein of rats in the MI+NC miRNA group and MI+miRNA-29b group, respectively. Equal volumes of saline were injected caudally in the Sham and MI groups respectively. Echocardiography was used to detect the cardiac function-related indexes after 28 d. Masson staining was used to observe myocardial collagen volume fraction (CVF), and immunohistochemistry was used to detect the expression of collagen I and III. The mRNA and protein expression levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Smad3, type I alpha 1 chain collagen gene (COL1A1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by real-time PCR and Western blot. **Results** Compared with MI and MI+NC miRNA groups, the cardiac function was much improved, myocardial tissue I, collagen III, CVF, COL1A1 and α -SMA expression levels were obviously reduced, and myocardial tissue TGF- β 1 and Smad3 mRNA and protein expression levels were reduced in the MI + miRNA-29b group. **Conclusion** miRNA-29b inhibits the occurrence and development of

作者简介: 刘萌萌, 女, 硕士, 主要从事临床医学心内科工作, email: 2843056055@qq.com *通信作者: 杜文涛, 男, 副主任医师, 主要从事临床医学心内科工作, email: 1961147104@qq.com

fibrosis after myocardial infarction through targeted inhibition of TGF- β 1/Smad3 signaling pathway, thereby improving the cardiac function.

Key words: *miRNA-29b*; myocardial infarction; fibrosis; TGF- β 1/Smad3 signal pathway

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是因冠脉急性、持续性缺血缺氧所致的心肌坏死。在临床上, 患者通常表现为急性、持续性的压榨性胸骨后或心前区的剧烈疼痛, 这种疼痛通常无法通过休息或口服硝酸酯类药物缓解。近年来, MI 的发病率不断升高, 严重危害人民群众的生命健康^[1]。研究显示 MI 是冠状动脉粥样硬化的斑块破裂, 继发血栓形成, 造成冠状动脉持续、完全闭塞, 最终发生心肌缺血、坏死^[2]。此外, 心肌耗氧量急剧增加或冠状动脉痉挛也是急性 MI 的诱发因素。

MI 是心力衰竭的主要原因, MI 发生后梗死部位的瘢痕形成和相邻心肌的间质纤维化阻止心肌正常修复, 导致心室重塑^[3]。研究显示心肌纤维化不仅是 MI 发生的重要诱因^[4], 还对 MI 的预后有着重要影响。因此, 抑制心肌纤维化对 MI 的诊治具有重要意义。

微小 RNA (miRNA) 是一类重要的内源性非编码小分子 RNA, 参与心脏的细胞增殖、分化、代谢、衰老和凋亡多个生理病理过程^[5], 是疾病治疗的分子靶点^[6]。越来越多的证据表明, miRNA 与 MI 后的纤维化过程密切相关, 是潜在的治疗靶点^[7]。既往研究显示 *miRNA-29b* 可以通过抑制胶原蛋白和其他细胞外基质蛋白的表达来减轻心血管系统的纤维化, 但其具体机制尚不清楚。本研究旨在分析 *miRNA-29b* 在 MI 引起的心肌纤维化过程的作用及其潜在机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体重 (220±20) g [北京华阜康生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0008]。动物使用符合动物管理委员会管理条例, 并经康泰医学检验服务河北有限公司实验动物伦理委员会批准 (伦理批件号: MDL2023-08-30-02)。

1.2 试剂

I 型胶原 (Collagen I)、III 型胶原 (Collagen III) (博奥森公司, 批号: bs-10423R); Masson 染色试剂盒 (批号: MD7056)、蛋白提取液 (批号: MDL91201)、蛋白酶抑制剂 (批号: MD912893) (MDL); HRP 标记抗大鼠免疫球蛋白 G (IgG) 抗体 (CST, 批号: 7076); 转化生长因子 (TGF)- β 1 抗体 (批号: 21898-1-AP)、Smad3 抗体 (批号: 66516-1-Ig) (武汉三鹰); I 型胶原 α 1 链基因 (COL1A1) 抗体 (博奥森公司, 批号: bs-

10423R); 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (艾菲, 批号: AF1032); 盐酸盐缓冲溶液 (PBS) (Sangon Biotech, 批号: E607008); Superscript III 试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号: 11752050); pSPAX2、pMD2G (上海吉凯基因科技有限公司); miR-29b-3p-mimics (病毒载体)、miR-29b-3p-mimics-NC (阴性对照) (上海吉凯基因科技有限公司)。293T 细胞 (上海吉凯基因科技有限公司)。

1.3 仪器

LEGEND MICRO 21R 台式高速冷冻离心机 (THERMO); StepOne Software 荧光定量 PCR 仪 (Applied biosystems); EPS 300 电泳仪、2500 凝胶成像仪 (Biorad)。

2 方法

2.1 慢病毒包装

对慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒 (包含 pSPAX2、pMD2G, miR-29b-3p-mimics 和 miR-29b-3p-mimics-NC), 分别进行高纯度无内毒素抽提, 共转染至 293T 细胞, 转染后 6 h 更换为完全培养基, 培养 48 h 及 72 h 后, 取含慢病毒粒子的上清液, 于 4℃、2000×g 离心 10 min 除去细胞碎片, 然后收集病毒上清液, 4℃、82 700×g 超速离心 120 min, 最后得到高滴度的慢病毒超离液。

2.2 大鼠 MI 模型的制备^[8]

所有动物在无病原体条件下进行 12 h 的明暗循环饲养一周, 温度维持在 22~24℃, 湿度 45%~55%, 动物分笼饲养, 每笼 2 只, 饲以标准的饲料, 自由饮水, 每周换垫料、消毒笼具 2 次。适应性饲养 1 周后, 体重约 250 g, 用 3% 的异氟烷吸入诱导麻醉, 用 1.5% 的异氟烷维持麻醉, 将大鼠置于手术台上, 用橡皮圈固定, 气管插管, 连接呼吸机; 沿胸骨左缘 0.5~1.0 cm 处剪开皮肤、暴露心脏, 剪开心包, 在肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部 3~4 mm 处, 结扎大鼠左冠状动脉前降支, 结扎后心脏局部心肌活动慢慢减弱或者彻底不见, 局部心肌由红色变为白色, 提示造模成功。Sham 组大鼠接受同样的手术步骤, 但是环绕前降支的线不结扎; 术后常规给予抗菌药物腹腔注射预防感染。

2.3 实验分组与干预

将造模成功的 24 只大鼠随机分为 MI 组、MI + NC miRNA 组、MI + *miRNA-29b* 组, 每组 8 只; 另取 8 只大鼠只穿线不结扎冠状动脉作为假手术

(Sham) 组。对上述各组大鼠进行超声检查, 确认造模成功后, 对 MI + NC miRNA 组、MI + *miRNA-29b* 组大鼠即刻分别单次尾静脉注射 NC 慢病毒 100 μ L、*miRNA-29b* 慢病毒 100 μ L; 同时, Sham 组、MI 组大鼠均经尾静脉注射等体积的生理盐水。

2.4 超声心电图检测

28 d 后, 各组大鼠进行心脏超声观察干预效果。在麻醉状态下, 使用超声对大鼠进行心脏功能测定, 分别测定左室射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS)、左室舒张末期内径 (LVEDD) 及左室收缩末期内径 (LVESD)。测量 3 个连续心动周期, 取平均值。同时, 记录胸骨旁左心室长轴切面图像。

2.5 组织切片制备

MI 造模后 28 d, 处死大鼠, 使用 0.9% 氯化钠液进行心脏灌注。心脏取材后于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后脱水包埋于石蜡包块中, 于 -20 $^{\circ}$ C 冻台冷却, 蜡凝固后将蜡块取出, 4 μ m 切片, 切片脱蜡前置于电化黏附载玻片上, 将组织切片置于二甲苯中脱蜡两次, 依次用无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇浸泡, 最后用蒸馏水浸泡。

2.6 形态学检测

MI 造模后 28 d, 取出大鼠心脏并进行病理

取材, 取心脏组织做冰冻切片, 采用免疫组化染色^[9]、Masson 染色^[10]检测 I、III 型胶原在心肌组织中的沉积, 采用 Image pro plus6.0 软件进行图像分析计算胶原容积分数 (CVF), 以评估大鼠心肌组织的纤维化情况。

2.7 实时荧光 PCR 检测 *miRNA-29b*、*TGF- β 1*、*Smad3*、*COL1A1* 及 α -*SMA* mRNA 表达水平^[11]

RNA 提取按 Trizol 试剂盒操作说明书进行。取大鼠梗死心肌组织放入匀浆器研磨, 使用 Nano-drop2000 检测 RNA 的浓度以及 A_{260}/A_{280} 的比例。用 Superscript III (Invitrogen Inc.) 试剂盒对 mRNA 进行反转录, 并添加 2 μ L cDNA、10 μ L SYBR Green PCR Master Mix、6 μ L ddH₂O 以及 1 μ L 的上下游引物, 混合均匀。对 20 μ L 的总反应液进行实时荧光定量 PCR, 首先在 95 $^{\circ}$ C 10 min 进行预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 60 s 进行 40 次循环, 设置溶解曲线从 60 $^{\circ}$ C 开始每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C, 最后升高至 95 $^{\circ}$ C。利用 Bio-RadiQ5 荧光定量 PCR 技术, 通过对溶解曲线的分析, 得到了可信的 CT 值曲线。引物序列如表 1 所示。目标基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示; 对每种样品进行三次单独的重复测定。分别检测心肌组织 *miRNA-29b*、*TGF- β 1*、*Smad3*、*COL1A1* 和 α -*SMA* mRNA 的表达水平。

表 1 引物信息

Tab 1 Related information of the primers

引物名称	上游序列	下游序列
<i>miRNA-29b</i>	CTCAACTGGTGTCTCGTG	TCGGCAGGTAGCACCATCTGAAATC
<i>U6</i>	AAATATGGAACGCTTCACGA	AAATATGGAACGCTTCACGA
<i>TGF-β1</i>	ACTCTCCACCTGCAAGACC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGGAC
<i>Smad3</i>	GTGCTCCATCTCCTACTACGA	AGTGAAGCCATCTACTGTCA
<i>COL1A1</i>	GCAGATTGAGAACATCCGCAGCC	GTCGATCCAGTACTCTCCGCTCT
α - <i>SMA</i>	AAAAGACAGCTACGTGGGTGA	CCATGTTCTATCGGGTACTTC
β - <i>actin</i>	ACCCAGATCATGTTTGAGACCT	GACCAGAGGCATACAGGGACAAC

2.8 蛋白印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠心脏 *TGF- β 1*、*Smad3*、*COL1A1* 及 α -*SMA* 的蛋白表达水平^[12]

大鼠梗死心肌组织加液氮进行匀浆, 应用常规蛋白提纯法提取细胞总蛋白。将各组心肌组织提取的蛋白进行变性处理, 经上样、电泳、转膜、孵育一抗、二抗, 然后进行显影、成像、分析, 对 ECL 免疫印迹法小分子化学发光试剂盒使用 Image J 分析软件 (Thermo 公司) 实施化学增强荧光成像, 以确定累积光密度值 (integrated optical density, IOD)。

2.9 统计学处理

结果通过 GraphPad Prism 软件进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较利用单因素方差分析, 以秩和检

验进行组间偏分配, 计数资料组间比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心功能比较

心肌梗死造模 28 d 后, 对各组大鼠进行超声检测, 结果如图 1 所示: Sham 组大鼠心功能正常, 各项心功能指标处于正常范围, 与 Sham 组相比, MI 组、MI + NC miRNA 大鼠的 LVESD 和 LVEDD 明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), FS 和 EF 明显下降 ($P < 0.01$); 与 MI 组相比, MI + *miRNA-29b* 组大鼠的 LVESD 和 LVEDD 下降, FS 和 EF 升高 ($P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠心肌组织病理学的影响

3.2.1 各组大鼠心肌组织 Masson 染色 Masson 染

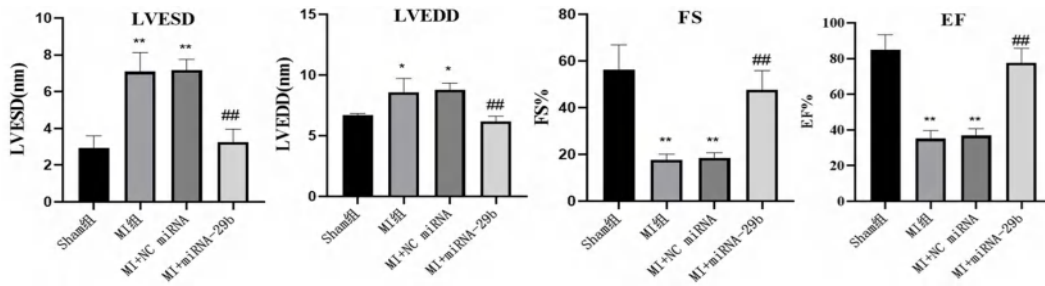


图 1 各组大鼠心功能相关指标的检测

Fig 1 Detection of cardiac function-related indexes in each group of rats

注: 与 Sham 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MI 组比较, ### $P < 0.01$ 。

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

色结果显示, 正常心肌呈鲜红色, 胶原纤维呈蓝白色, Sham 组心肌细胞排列整齐, 肌束结构完整, 未见出血及明显的胶原沉积; MI 组及 MI + NC 组心肌细胞间见较多的胶原纤维增殖并伴有胶原沉积, MI + *miRNA-29b* 组大鼠心肌组织胶原沉积明显降低 (见图 2)。计算 CVF, 结果显示, MI 组和 MI + NC miRNA 组 CVF 较 Sham 组明显增加 ($P < 0.01$); *miRNA-29b* 组 CVF 较 MI 组明显降低 ($P < 0.01$)。

III 型胶原的沉积, 以评估大鼠心肌梗死后心肌纤维化发生的情况。图 3 免疫组化结果显示, Sham 组大鼠心肌组织未见明显的 I、III 型胶原沉积; 与 Sham 组比较, MI 组与 MI + NC miRNA 组大鼠心肌组织中 I、III 型胶原的沉积明显增加 ($P < 0.01$); 与 MI 组对比, MI + *miRNA-29b* 可明显降低大鼠心肌组织 I、III 型胶原含量 ($P < 0.01$)。

3.3 各组大鼠心肌组织 *miRNA-29b*、*TGF-β1*、*Smad3*、*COL1A1* 和 α -SMA mRNA 表达结果

图 4 显示, 与 Sham 组比较, MI 组、MI + NC miRNA 组大鼠心肌组织中 *miRNA-29b* mRNA 的表达水平明显降低, 而 *TGF-β1*、*Smad3*、*COL1A1*、 α -SMA mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.01$); 与 MI 组相比, MI + *miRNA-29b* 组大鼠心肌组织中 *miRNA-29b* mRNA 的表达水平相对升高, 而 *TGF-β1*、*Smad3*、*COL1A1*、 α -SMA mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.4 各组大鼠心肌组织 *Smad3*、*COL1A1* 和 α -SMA、*TGF-β1* 的蛋白表达水平

图 5 结果显示, 与 Sham 组比较, MI 组大鼠心肌组织 *Smad3*、*COL1A1*、 α -SMA 与 *TGF-β1* 的表达水平显著增高 ($P < 0.01$); 与 MI 组比较, MI + *miRNA-29b* 组大鼠 *Smad3*、*COL1A1* 与 α -SMA、*TGF-β1* 的蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

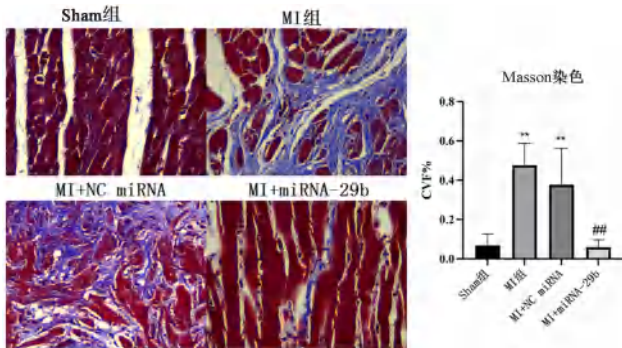


图 2 各组大鼠心肌组织 Masson 染色结果及 CVF ($\times 400$)

Fig 2 Masson staining and CVF of myocardial tissues in each group of rats ($\times 400$)

注: 与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 MI 组比较, ### $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$; compared with the MI group, ### $P < 0.01$.

3.2.2 各组大鼠心肌组织免疫组化染色 心肌梗死后 28 d, 采用免疫组化法检测各组大鼠心肌组织 I、

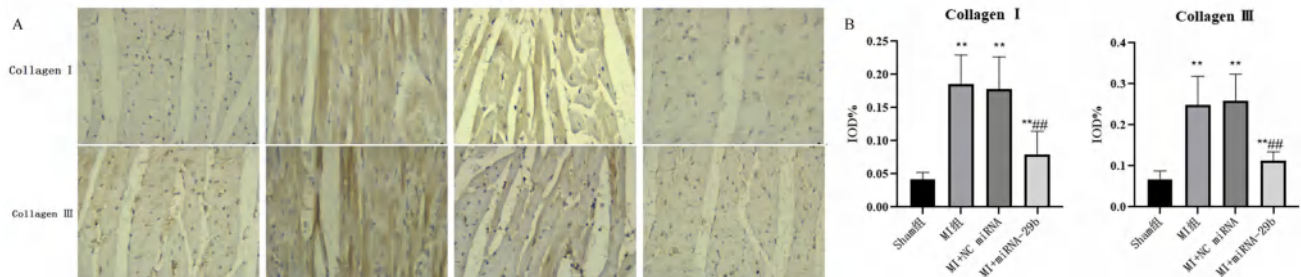


图 3 各组大鼠心肌组织免疫组化染色 ($\times 400$)

Fig 3 Immunohistochemical staining of myocardial tissue in each group of rats ($\times 400$)

注: 与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 MI 组比较, ### $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$; compared with the MI group, ### $P < 0.01$.

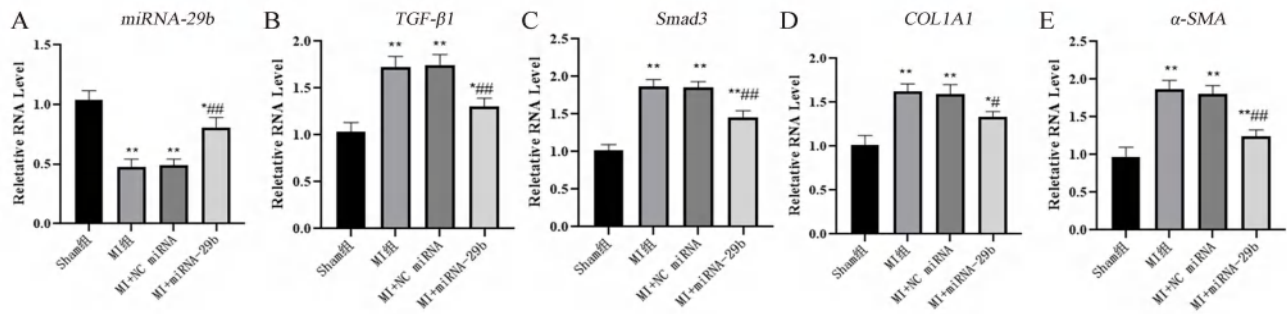


图4 各组大鼠心肌组织中 *miRNA-29b*、*TGF-β1*、*Smad3*、*COL1A1* 和 *α-SMA* mRNA 的表达

Fig 4 Expression of *miRNA-29b*, *TGF-β1*, *Smad3*, *COL1A1* and *α-SMA* mRNA of myocardial tissues in each group of rats

注：与 Sham 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 MI 组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

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

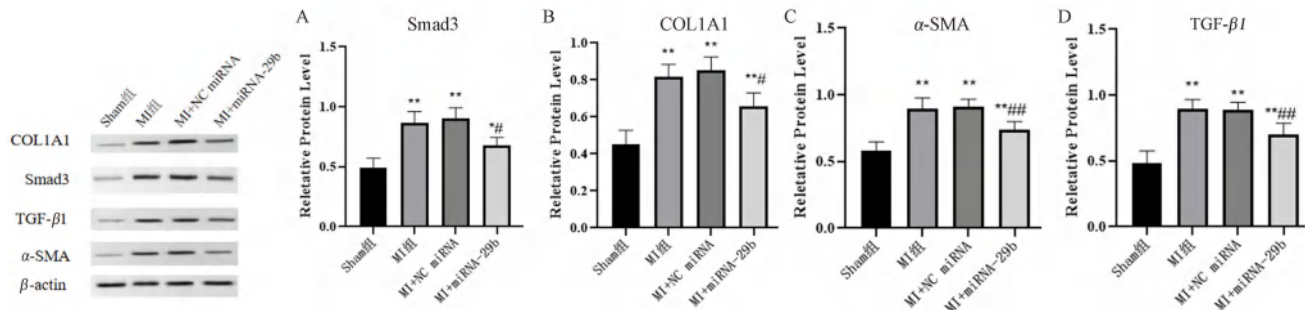


图5 各组大鼠心肌组织中 *Smad3*、*COL1A1*、*α-SMA*、*TGF-β1* 的蛋白表达水平

Fig 5 Expression of *Smad3*, *COL1A1*, *α-SMA*, and *TGF-β1* of myocardial tissues in each group of rats

注：与 Sham 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 MI 组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

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

4 讨论与结论

MI 是临床常见的心血管疾病，往往预后不良，病死率极高^[13]。MI 通常伴发心室重塑，不仅会影响心脏的舒缩功能，严重时甚至会发生心力衰竭。研究显示心室重塑是心力衰竭的重要病理基础，是决定心力衰竭病死率及预后的主要因素^[14]。既往研究显示心肌纤维化是心肌梗死后发生心室重塑的重要诱因，*miRNA-29b* 可以通过抑制胶原蛋白和其他细胞外基质蛋白的表达来减轻心血管系统的纤维化^[15-18]，但其具体机制尚不清楚。本研究通过检测 *miRNA-29b* 对 MI 大鼠的心功能及分子指标的变化，证实了 *miRNA-29b* 通过靶向抑制 *TGF-β1*/*Smad3* 信号通路抑制心肌梗死后纤维化的发生发展，从而改善心功能。

既往研究显示 *miRNA-29b* 在心血管的发生发展中发挥重要作用^[15-18]。在心肌缺血再灌注时，*miRNA-29b* 可以靶向调控 Akt 信号通路抑制心肌细胞凋亡^[19]；心肌梗死后主要通过 TGF 信号通路抑制 *miRNA-29b* 表达^[20]；最近的研究显示 *miRNA-29b* 通过与 *CPXM2* mRNA 的 3'UTR 结合，在转录后水平直接调节 *CPXM2* 表达，从而抑制高血压诱导的左心室心肌肥厚^[21]。本研究中通过对大鼠尾静脉注射慢病毒，调控动物模型中 *miRNA-29b* 表达水平，

发现 *miRNA-29b* 干预不仅能显著改善 MI 大鼠心功能，还能显著改善 MI 大鼠的心肌纤维化。

TGF-β1 是转化生长因子的亚型之一，是心肌纤维化的重要调节因子^[22]，表达升高会促进胶原的生成和沉积，诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[23]。*TGF-β1* 通过与其受体结合，激活下游的 *Smad3* 转录因子，激活的 *Smad3* 转录因子转移到细胞核调控促纤维化基因的合成^[24-25]。研究显示^[26]，*miRNA-29b* 可通过靶向抑制 *TGF-β*/*Smad* 信号通路抑制肝星状细胞的活化抑制肝纤维化发生，但 MI 后心肌纤维化是否通过 *TGF-β*/*Smad* 信号通路尚不可知。本研究显示 MI 发生后，心肌组织中 *TGF-β1*、*Smad3*、纤维化标志物 *COL1A1*、*α-SMA* 在 mRNA 及蛋白水平表达均明显增加，组织病理学显示心肌发生明显纤维化。经 *miRNA-29b* 干预后，上述指标均明显下降，组织病理学显示心肌纤维化明显改善。推测其原因可能系 MI 发生后，*miRNA-29b* 表达水平降低，*miRNA-29b* 对其下游靶基因 *TGF-β1* 抑制作用减弱，导致 *TGF-β*/*Smad* 通路激活，促进了心肌纤维化的发生；经 *miRNA-29b* 干预后，*miRNA-29b* 表达水平增高，*miRNA-29b* 恢复了对 *TGF-β*/*Smad* 信号通路的抑制，从而抑制了心肌纤维化的发生发展。

综上所述, *miRNA-29b* 可以靶向调控 TGF- β 1/Smad3 通路及多种纤维化指标, 减轻 MI 后心脏纤维化, 从而改善 MI 后心功能, 预防心力衰竭的发生。虽然本研究仅在基因、蛋白水平初步探讨了 *miRNA-29b* 对 MI 后大鼠心肌纤维化的作用机制, 未能进一步调控相关分子及信号通路来进一步探究其背后的机制, 也未能在 MI 患者人群队列进行验证, 但本研究揭示了 *miRNA-29b* 在 MI 心肌纤维化的重要作用, 提示 *miRNA-29b* 可能作为治疗 MI 的新靶点, 为未来心血管药物的研发提供了新思路。

参考文献

- [1] Tran HV, Ash AS, Gore JM, et al. Twenty-five year trends (1986—2011) in hospital incidence and case-fatality rates of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation complicating acute myocardial infarction [J]. *Am Heart J*, 2019, 208: 1-10.
- [2] Gulati R, Behfar A, Narula J, et al. Acute myocardial infarction in young individuals [J]. *Mayo Clin Proc*, 2020, 95 (1): 136-156.
- [3] van Berlo JH, Mailliet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (1): 37-45.
- [4] Chen C, Li RX, Ross RS, et al. Integrins and integrin-related proteins in cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 93: 162-174.
- [5] Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, et al. A microRNA-29 mimic (Remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139 (5): 1073-1081.
- [6] Deng ZJ, He YJ, Yang XJ, et al. MicroRNA-29: a crucial player in fibrotic disease [J]. *Mol Diagn Ther*, 2017, 21 (3): 1-10.
- [7] Kalayinia S, Arjmand F, Maleki M, et al. MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2021, 50: 107296.
- [8] 史艳霞, 马微. 基于 Nrf2/HO-1 及 NF- κ B 途径探讨积雪草酸对急性心肌梗死大鼠的影响及其作用机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26 (11): 1133-1139.
- [9] Chen JB, Huang CX, Zhang B, et al. The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: the role of endogenous nitric oxide in the activity of carvedilol [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7 (4): 1155-1158.
- [10] Abdel-Hamid AAM, Fargany AE-DL. Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by suppressing apoptosis and oxidative stress [J]. *J Mol Histol*, 2015, 46 (4-5): 337-345.
- [11] Du WJ, Liang HH, Gao X, et al. MicroRNA-328, a potential anti-fibrotic target in cardiac interstitial fibrosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39 (3): 827-836.
- [12] 高成山, 余海彬, 法宪恩, 等. 低能激光照射对大鼠心肌梗死后微小 RNA-214 表达的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34 (12): 2177-2179.
- [13] Harati H, Shamsi A, Firouzkouhi MM, et al. The mortality rate of myocardial infarction patients with and without opium dependences [J]. *Int J High Risk Behav Addict*, 2015, 4 (3): e22576.
- [14] Bandaru S, Grönros J, Redfors B, et al. Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 105 (2): 151-159.
- [15] Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2007, 9 (7): 546-550.
- [16] Anderson JL, Morrow DA. Acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376 (21): 2053-2064.
- [17] Fernandes V, Sharma D, Vaidya S, et al. Cellular and molecular mechanisms driving neuropathic pain: recent advancements and challenges [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22 (2): 131-142.
- [18] McDonald K. Diastolic heart failure in the elderly: underlying mechanisms and clinical relevance [J]. *Int J Cardiol*, 2008, 125 (2): 197-202.
- [19] Parikh SM, Yang Y, He L, et al. Mitochondrial function and disturbances in the septic kidney [J]. *Semin Nephrol*, 2015, 35 (1): 108-119.
- [20] Song WH, Wang XM. The role of TGF β 1 and LRG1 in cardiac remodelling and heart failure [J]. *Biophys Rev*, 2015, 7 (1): 91-104.
- [21] Subrova J, Böhme K, Gillespie A, et al. MiRNA-29b and miRNA-497 modulate the expression of carboxypeptidase X member 2, a candidate gene associated with left ventricular hypertrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (4): 2263.
- [22] Gao L, Wang LY, Liu ZQ, et al. TNAP inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through deactivating TGF- β 1/Smads and activating P53 signaling pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (1): 44.
- [23] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331 (19): 1286.
- [24] Rooij EV, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (35): 13027-13032.
- [25] Laudisi F, Stolfi C, Monteleone MG. TGF- β 1 signaling and Smad7 control T-cell responses in health and immune-mediated disorders [J]. *Eur J Immunol*, 2023, 53 (11): e2350460.
- [26] 谭洁, 田霞, 韩峥, 等. miR-29b 介导的 TGF- β /Smad 信号通路对大鼠肝纤维化进程的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35 (1): 168-173.

(收稿日期: 2024-09-10; 修回日期: 2024-11-16)

冷冻干燥技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外质量评价

左盼盼^{1, 2, 3}, 陈晶晶³, 王晓飞^{3*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 上海欧米尼医药科技有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 采用冷冻干燥技术, 制备混悬型布地奈德吸入气雾剂, 对该气雾剂进行体外质量评价。**方法** 冷冻干燥质量浓度为 1% 和 5% 的布地奈德混悬液, 通过气流粉碎处理冻干粉得到布地奈德微粉颗粒, 而后对其粒径分布、结构、晶型、相变温度以及形貌进行分析并制备吸入气雾剂。观察该微粉颗粒制备的气雾剂的混悬状态, 并考察微粉颗粒的粒径对气雾剂空气动力学粒径分布 (APSD) 的影响。同时考察温度循环试验对该气雾剂的关键质量特性的影响。**结果** 混悬液质量浓度由 1% 增大至 5% 时, 冻干粉粒径明显增大。因此, 对冻干粉进行气流粉碎处理, 粒径减小至 $X_{10} = 0.47 \mu\text{m}$, $X_{50} = 1.41 \mu\text{m}$, $X_{90} = 3.09 \mu\text{m}$, 气雾剂微细粒子分数 (FPF) 提高至 47.16%, 递送剂量均在平均值的 95% ~ 110%, 混悬状态良好。在振摇 5 s 后, 静置 1 min 内, 无絮凝沉降现象。温度循环试验对其关键质量特性并无显著影响。**结论** 冷冻干燥技术结合气流粉碎技术可制备处理量大、混悬状态好、递送剂量均一以及肺部沉积率高的混悬型布地奈德吸入气雾剂。

关键词: 布地奈德; 吸入气雾剂; 冷冻干燥; 气流粉碎

中图分类号: R94, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0442-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.023

Preparation of budesonide inhalation aerosol by freeze-drying and its in vitro quality evaluation

ZUO Pan-pan^{1, 2, 3}, CHEN Jing-jing³, WANG Xiao-fei^{3*} (1. *Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012*; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133*; 3. *Shanghai Omni Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203*)

Abstract: Objective To prepare a suspended budesonide inhalation aerosol by freeze-drying, and evaluate its in vitro quality. **Methods** The suspension of 1% and 5% budesonide was freeze-dried, and the lyophilized powder was crushed by air jet milling to obtain budesonide microparticles. The particle size distribution, structure, crystal type, phase transition temperature, and morphology of the powder particles were analyzed. The inhaled aerosol was prepared by the powder particles. The suspension effect of the suspension aerosol prepared with the microparticles was observed. The effect of particle size on the aerodynamic particle size distribution of the inhalation aerosol was determined. At the same time, the influence of temperature cycling test on the key quality characteristics of the aerosol was also investigated. **Results** When the mass concentration of the suspension increased from 1% to 5%, the particle size of the lyophilized powder increased obviously. Therefore, the particle size of the lyophilized powder was reduced to $X_{10} = 0.47 \mu\text{m}$, $X_{50} = 1.41 \mu\text{m}$, $X_{90} = 3.09 \mu\text{m}$, the fine particle fraction of the inhalation aerosol increased to 47.16%. The delivery dose ranged 95% ~ 110% of the average value, with good suspension effect. No sedimentation or flocculation occurred within 1 min after shaking for 5 s. The temperature cycling test did not substantially affect the key quality characteristics. **Conclusion** Freeze-drying combined with air jet milling can prepare budesonide inhalation aerosol with large processing capacity, good suspension, uniform delivery dose and high pulmonary deposition.

Key words: budesonide; inhalation aerosol; freeze-drying; air jet milling

作者简介: 左盼盼, 女, 在读硕士研究生, 主要从事吸入制剂研究, email: zuopanpan0823@126.com * **通信作者:** 王晓飞, 男, 高级工程师, 主要从事吸入制剂等复杂制剂的研究与开发, email: fen8129@sina.com

布地奈德 (budesonide, BUD) 是一种具有高效局部抗炎作用的糖皮质激素, 常用于吸入给药, 用于治疗支气管哮喘和哮喘性支气管炎^[1-2], 通常制成吸入溶液型气雾剂、混悬型气雾剂、吸入用混悬型溶液和吸入粉雾剂。吸入混悬型气雾剂的装置简单, 具有经济、携带方便、易于保存及操作简单等优点。与此同时, 由于其装置可主动释放药物, 相对于吸入粉雾剂而言对吸气速率要求较低, 更适合慢性阻塞性肺疾病的患者^[3]。

为了开发更适宜于布地奈德吸入混悬型气雾剂产业化的技术, 节约成本, 减少生产过程中的损耗, 本研究采用回收率高、处理量大的冷冻干燥技术结合气流粉碎技术制备出了粒径可控的微粉颗粒, 进一步制备吸入气雾剂, 评价混悬状态、肺部沉积率以及递送剂量均一性。冷冻干燥和气流粉碎工艺处理后可能会产生不稳定晶型^[4-5], 导致颗粒不受控制的生长, 进而影响气雾剂的空气动力学粒径分布 (aerodynamic particle size distribution, APSD) 和递送剂量均一性 (delivered dose uniformity, DDU) 等关键质量特性, 而温度和相对湿度的急剧变化会加速晶体的生长^[6-8]。因此, 本研究拟考察温度循环试验对该气雾剂 APSD 和 DDU 的影响。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010M 高效液相色谱仪 (岛津国际贸易有限公司); HELOS/BF 激光粒度仪 (德国 Sympatec 公司); Model 0964 新一代药用撞击器 (NGI) (英国 Copley Scientific); T10 高速分散机 (艾卡仪器设备有限公司); SCIENTZ-10ND 冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); J-20 气流粉碎机 (意大利 Tecnologia); 2016 手动气雾剂灌装机 (瑞士 PAMASOL); BA900 显微镜 (上海新振仪器设备有限公司); Nicolet IS50 红外光谱仪、Phenom Pharos 扫描电镜 (赛默飞世尔科技公司); DSC 3 + 差示扫描量热仪 (METTLER, B403219221); D8 ADVANCE X 射线衍射仪 [布鲁克 (北京) 科技有限公司]。气雾剂混悬状态观察时, 选用聚对苯二甲酸类材料制成的透明 PET 瓶 (香港 MERXIN); APSD 和 DDU 试验所用的气雾剂, 选用 14 mL 铝罐 (上海英何医药包装技术有限公司, 批号: PC21F091), 阀门 (英国 Bepak, 批号: BK0707990)。

1.2 试药

布地奈德原料药 (湖北葛店人福药业有限责任公司, 批号: BD190301, 纯度 > 99%); 抛射剂 HFA134a (中化近代环保化工有限公司, 批号: YY-0221011); 无水氯化钙 (CaCl₂, 上海泰坦科技股份有限公司, 批号: P2494742, 纯度 > 96%);

氢化大豆卵磷脂 [HSPC, 艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司, 批号: C11001, 纯度 > 98%]; 乙腈、甲醇 (色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司); 本实验中所用水皆为去离子水。

2 方法与结果

2.1 冻干粉和气雾剂的制备

2.1.1 混悬液 1 和 2 的冻干粉的制备 根据胡慧等^[9]的研究方法, CaCl₂ 和 HSPC 的摩尔比为 1 : 2, 加入纯化水中, 经高速分散, 与布地奈德原料药分别配制了质量浓度为 1% 和 5% 的混悬液 (混悬液 1 和 2), 待冷却至室温, 分别进行冷冻干燥处理。

2.1.2 混悬液 2 的冻干粉的粉碎 将混悬液 2 的冻干粉进行气流粉碎处理, 粉碎压力为 6.0 bar, 进料压力为 5.0 bar。

2.1.3 布地奈德吸入气雾剂的制备 以 HFA 13 4a 为抛射剂, 采用两步法灌装方式对各微粉进行灌装, 标示量分别为 200 μg/ 揆、100 揆/ 瓶。试验中各样品编号如表 1 所示。

表 1 样品编号信息

Tab 1 Sample number information

样品编号	样品名称
气雾剂 A	1% 质量浓度混悬液冻干粉制备的气雾剂
气雾剂 B	5% 质量浓度混悬液冻干粉制备的气雾剂
气雾剂 C	5% 质量浓度混悬液冻干 + 粉碎微粉制备的气雾剂
微粉 a	1% 质量浓度混悬液冻干粉
微粉 b	5% 质量浓度混悬液冻干粉
微粉 c	5% 质量浓度混悬液冻干 + 粉碎微粉

2.2 微粉的粒径分布

为了解不同质量浓度混悬液的冻干粉以及不同工艺处理的微粉粒径分布情况。采用激光粒度仪对微粉 a、b 和 c 进行粒径分布检测。如图 1 所示, 在相同的冷冻干燥工艺下, 随着质量浓度的增大, 冻干粉粒径显著增大。混悬液 1 的冻干粉 a 的粒径分布明显小于混悬液 2 的冻干粉 b, 微粉 b 的 X₉₀ 增加至 35.55 μm, 将其粉碎制成微粉 c。经过气流粉碎后微粉 c 的 X₉₀ 显著减小至 3.09 μm; 并且气流粉碎工艺在减小微粉粒径的同时, 明显改善了冻干粉颗粒一致性的问题 (见图 2)。

2.3 粉碎工艺对布地奈德含量的影响

由“2.2”项下结果可知, 气流粉碎前、后微粉粒径大小差异显著, 对于大粒径混合粉末颗粒的微粉化, 有必要考察粉碎工艺对其主药含量的影响。因此, 对气流粉碎前、后微粉 (即微粉 b 和 c) 进行布地奈德含量检测。

称取微粉 26.00 mg, 加入 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解完全并定容至刻度, 摇匀备用。用移液管移取 5 mL 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻

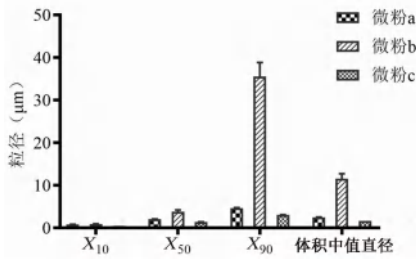


图1 微粉 a、b 和 c 的粒径分布 ($n = 3$)

Fig 1 Particle size distribution of microparticles a, b and c ($n = 3$)

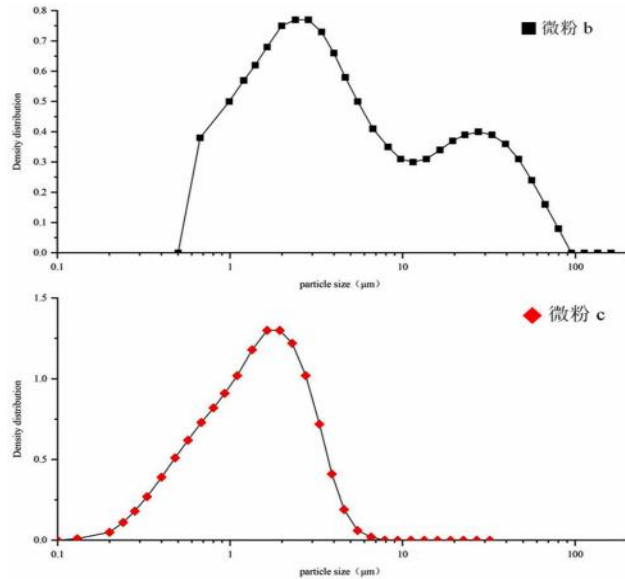


图2 微粉 b 和 c (气流粉碎前、后) 的粒径微分分布图

Fig 2 Differential size distribution of microparticles b and c (before and after air jet milling)

度, 摇匀取样, 平行测 3 次。采用 HPLC 法对布地奈德含量进行检测^[9]。检测结果如图 3 所示, 粉碎前后微粉中布地奈德含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明粉碎工艺不影响微粉的主药含量。

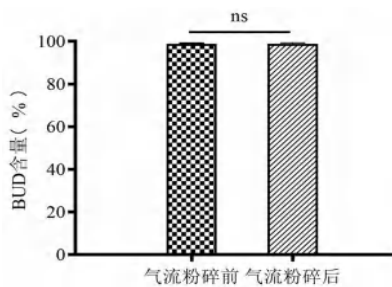


图3 气流粉碎前、后布地奈德含量检测结果 ($n = 3$)

Fig 3 Budesonide content before and after air jet milling ($n = 3$)

2.4 微粉的表征

2.4.1 结构 为测定不同的工艺处理对微粉中原辅料结构的影响, 利用傅里叶变换红外光谱 (FT-IR), 采集波数 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内各样品的图谱。如图 4 所示, 布地奈德原料药在波数为 1097 cm^{-1} 、 1624 cm^{-1} 、 1668 cm^{-1} 、 1721 cm^{-1} 、 2872 cm^{-1} 、 2946 cm^{-1} 、 3483 cm^{-1} 处出现特征

峰。微粉 a、b 和 c 的检测结果中, 与原料药的特征峰位保持一致。由此可见, 不同的工艺处理并未改变混合微粉中布地奈德的结构。

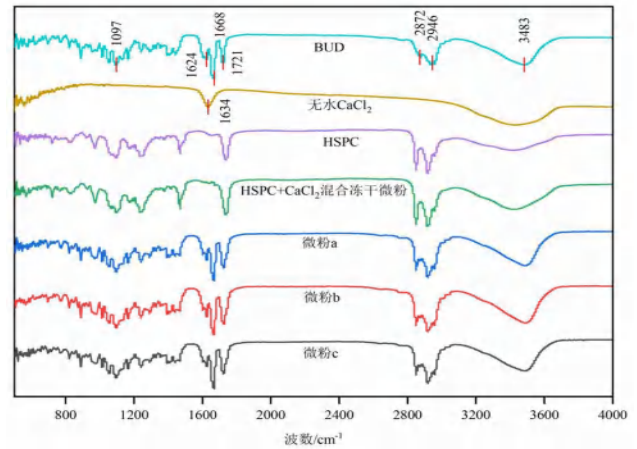


图4 不同微粉颗粒的 FT-IR 光谱图

Fig 4 FT-IR spectra of different microparticles

与此同时, HSPC 与 CaCl_2 组成的体系, 在经过冷冻干燥处理后, HSPC 的结构保持不变。而 CaCl_2 的特征峰消失, 这是因为 CaCl_2 可以与 HSPC 形成复合物^[10]。

2.4.2 晶型 利用 X 射线衍射技术 (XRD) 探究不同微粉的晶型变化情况。XRD 的测试条件: 铜靶, 辐射管电压 40 kV , 辐射管电流 40 mA , 扫描范围 (2θ) 为 $3^\circ \sim 50^\circ$, 步长 0.1 s , 衍射角为 $12 (^\circ) \cdot \text{min}^{-1}$ 。如图 5 所示, 微粉 a、b 和 c 的晶体衍射峰均与原料药相似, 说明冻干和粉碎工艺未使药物的晶型发生实质性的改变。这可能是布地奈德原料药在混悬液体系中的溶解度极低, 因此处理前后的晶型并未发生变化。

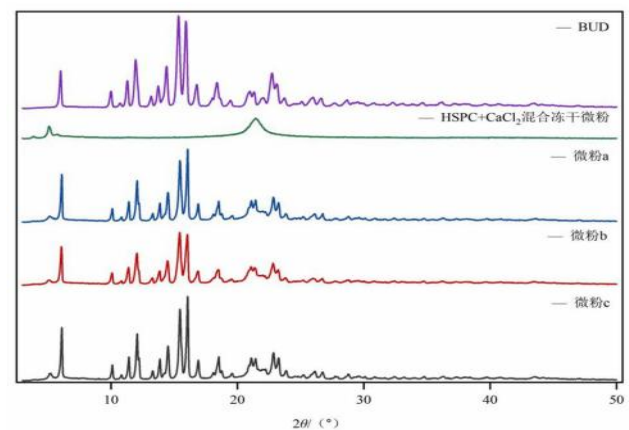


图5 不同微粉的 XRD 图谱

Fig 5 XRD patterns of different microparticles

2.4.3 相变温度 为了解添加磷脂和 CaCl_2 对混合微粉的相变温度的影响, 利用差示扫描量热仪 (DSC) 对不同微粉进行相变温度检测。DSC 检测参数: 以纯铝坩埚盛放样品, 在氮气环境下,

温度在 40 ~ 290 °C 内, 以 20 °C · min⁻¹ 的速率逐步升温。DSC 检测结果如图 6 所示, HSPC 在 125 °C 处出现明显的吸热相变峰, 加入 CaCl₂ 后, 两者混合冻干微粉的吸热相变峰提高至 250 °C。布地奈德原料药的吸热峰在 265 °C, 而微粉 a、b 和 c 的吸热峰约在 250 °C, 可能是磷脂对布地奈德有助熔的作用^[9]。由此可见, CaCl₂ 的加入可提高磷脂的相变温度, 而这又决定着由其制成的混合微粉的稳定性, 并且冻干和粉碎工艺对微粉的吸热峰位无影响, 这与 FT-IR 检测结果一致。

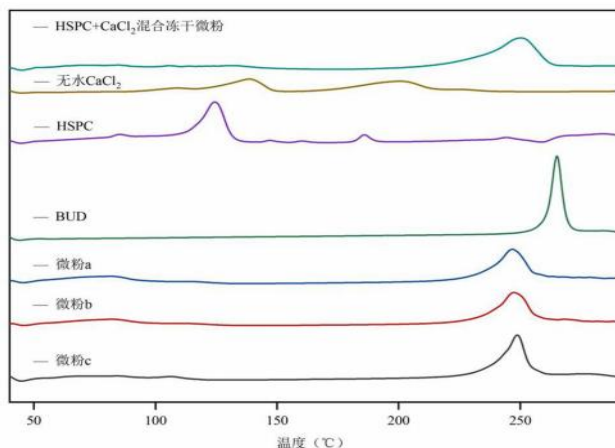


图 6 不同微粉的 DSC 图谱

Fig 6 DSC patterns of different microparticles

2.4.4 形貌 为了解冻干和粉碎工艺处理后微粉颗粒的形貌变化情况, 采用扫描电镜 (SEM) 对各微粉进行观察。如图 7 所示, 经过冻干后的微粉 a 和微粉 b 颗粒形状均不规则, 呈聚集状态, 微粉 b 的聚集更为严重, 这也与粒径分布检测结果一致。分析可能是因为混悬液在由外而内的缓慢的冻实过程中, 过冷度较低, 形成大而少的冰晶^[11]。在自然缓慢的冻实过程中, 冰晶生长的大小形状不受控制, 这也是导致冻干微粉颗粒一致性差、形貌多样的原因。

在冷冻干燥过程中, 水分的升华是由上而下, 由外而内。随着水分的逐渐升华, 冰晶的表面自由水在干燥阶段最先升华, 留下孔隙和孔径。颗粒形状大小受多种因素的影响, 如冷冻速率、溶液浓度等^[12], 情况较为复杂。

微粉 b 经过粉碎后得到微粉 c, 其与微粉化布地奈德原料药均呈现不规则细小颗粒状, 表面较为平滑。这也符合机械粉碎颗粒的形貌特征。

2.5 微粉粒径对气雾剂 APSD 的影响

采用 NGI 分别对气雾剂 A、B 和 C 的 APSD 进行检测。用甲醇对各层级以及 L 型连接管、驱动器和吸嘴适配器分别清洗回收至量瓶中, 定容, 摇匀, 作为供试品溶液备用。而后, 采用 HPLC

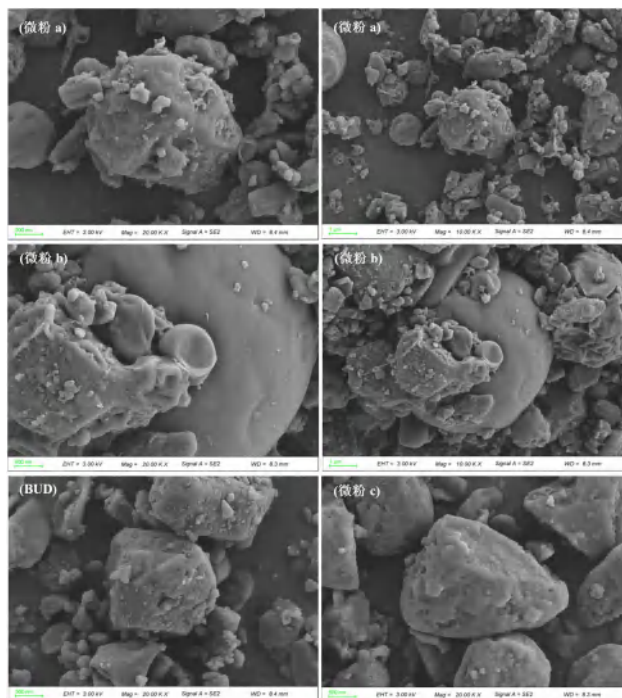


图 7 不同微粉颗粒的 SEM 图 (×10 000 和 ×20 000)

Fig 7 SEM of different microparticles (×10 000 and ×20 000)

法进行含量检测^[9], 采用外标法以峰面积来计算药物在各个部位的沉积量, 最终获得 APSD 的关键参数, 如微细粒子分数 (FPF)、几何标准偏差 (GSD) 和质量中位空气动力学直径 (MMAD)。

各气雾剂的 APSD 检测结果如表 2 所示, 随着布地奈德质量浓度增大, 冻干粉粒径增大, 继而导致制成的气雾剂 FPF 降低。气雾剂 B 的 FPF 降低至 10.70%。而经过气流粉碎减小粒径后, 气雾剂 C 的 FPF 增大至 47.16%。并且气流粉碎后药物在喉管处沉积量明显减少, 在 3 ~ 7 层级药物沉积量明显增加 ($P < 0.05$) (见图 8)。

表 2 气雾剂 A、B 和 C 的空气动力学粒径分布检测结果 (n = 3)

Tab 2 Aerodynamic particle size distribution of aerosol A, B and C (n = 3)

样品编号	FPF/%	MMAD/μm	GSD
气雾剂 A	35.08 ± 0.73	3.82 ± 0.00	1.75 ± 0.09
气雾剂 B	10.70 ± 0.90	10.59 ± 0.57	3.63 ± 0.19
气雾剂 C	47.16 ± 0.77	2.93 ± 0.01	1.66 ± 0.03

2.6 气雾剂混悬状态的观察

3 种不同粒径大小的微粉, 其制成的气雾剂 A、B 和 C 的混悬状态均良好。如图 9 所示, 振荡 5 s 后, 静置 1 min 内均无明显的絮凝沉降现象。

2.7 温度循环试验对气雾剂 C 的关键质量特性的影响

为了考察温度和湿度的循环往复地急剧变化对气雾剂 C 的关键质量特性的影响。参照 FDA 2018 年 MDI 指南^[13], 将气雾剂 C 同批次

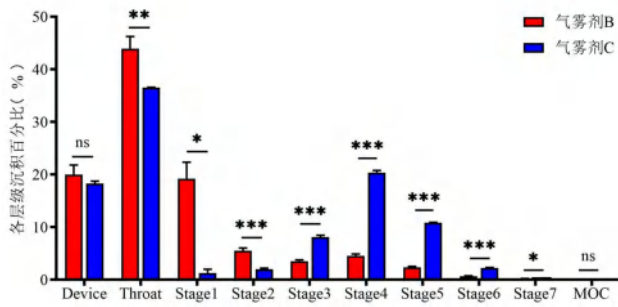


图 8 气雾剂 B 和 C 的各层级药物沉积分布 (n = 3)
Fig 8 Drug deposition distribution at different levels of aerosol B and C (n = 3)

注: 与气雾剂 B 相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

Note: Compared with the aerosol B, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

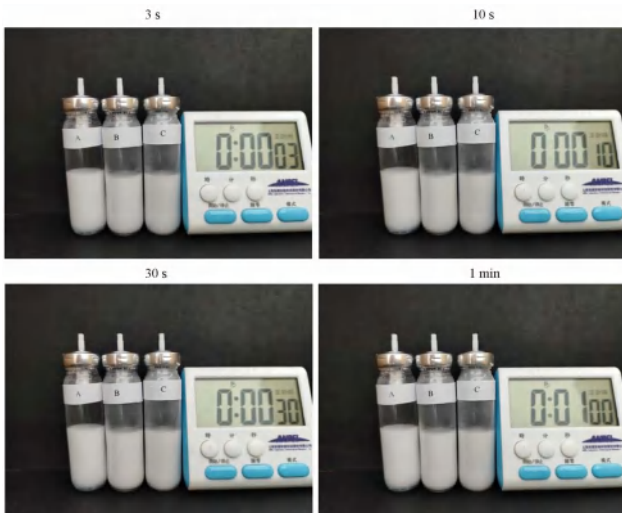


图 9 气雾剂 A、B 和 C 的混悬状态观察图
Fig 9 Suspension effect of aerosol A, B and C

样品置于两种不同的储存条件进行 30 d 的温度循环试验 (在下文中简称为“TC 30D”), 一种储存环境是 -10 ~ -20 °C, 另一种储存环境是 (40 ± 2) °C、(75 ± 5) %RH。两个条件每 12 h 循环一次。将其关键质量特性结果同长期条件 (25 ± 2) °C、(60 ± 10) %RH 放置 30 d (在下文中简称为“CRT 30D”) 的样品进行比较。

2.7.1 APSD 分别对长期条件和温度循环条件下放置 30 d 的气雾剂进行 APSD 检测。检测结果如表 3 所示, 相较于长期条件, 气雾剂 C 在经过温度循环试验后, FPF 值略有增长, MMAD 和 GSD 稍有降低。如图 10 所示, 布地奈德在各层级的药物沉积百分比无明显差异。因此, 温度循环条件下样品的 APSD 检测结果稍有变化, 分析可能与 NGI 检测误差较大有关。

2.7.2 DDU 在 CRT 30D 和 TC 30D 条件下各取 1 罐气雾剂 C, 用剂量单位取样器 (DUSA) 收集管来测量气雾剂的 DDU。每次检测振摇 5 s 后弃

表 3 气雾剂 C 在 CRT 30D 和 TC 30D 条件下的 APSD 检测结果 (n = 3)

条件	FPF/%	MMAD/μm	GSD
CRT 30D	47.08 ± 0.49	2.98 ± 0.03	1.68 ± 0.05
TC 30D	48.79 ± 0.64	2.88 ± 0.03	1.65 ± 0.05

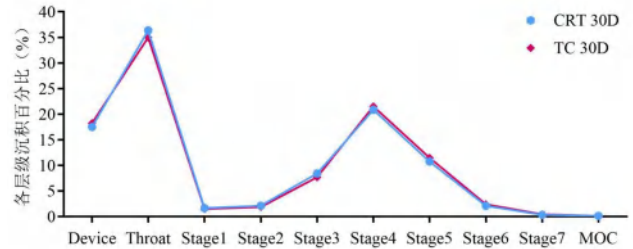


图 10 气雾剂 C 在 CRT 30D 和 TC 30D 条件下的层级分布 (n = 3)
Fig 10 Level distribution of aerosol C in CRT 30D and TC 30D (n = 3)

去前 5 掀, 依次完成第 1、2、3、50、51、52、53、98、99、100 掀的掀射, 分别用甲醇清洗上述掀次对应的适配器、滤纸和 DUSA 管, 将清洗液回收至量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm PTFE 膜过滤得到的续滤液作为供试品溶液。用 HPLC 法对各掀次的供试品溶液进行含量检测, 采用外标法以峰面积来计算各掀次所含药物量。

结果如图 11 所示, 两种储存条件下气雾剂 10 掀药物含量均在《中国药典》2020 年版四部通则 < 0111 > 所规定的平均值的 75% ~ 125%, RSD 在 6.5% ~ 8.5%, 体现出良好的 DDU。由此可见, 温度循环试验并未对气雾剂 C 的 DDU 产生负向影响。

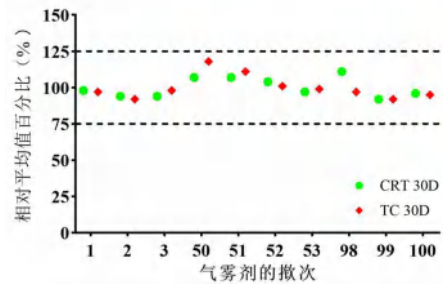


图 11 气雾剂 C 在 CRT 30D 和 TC 30D 条件下的 DDU 检测结果
Fig 11 DDU of aerosol C in CRT 30D and TC 30D

2.8 统计学方法

采用 t 检验 (TTEST) 对两组实验对象的均值进行比较, 判断是否存在显著差异, 显著性水平为 0.05, 当 P 值小于该水平时, 则认为差异有统计学意义。

3 讨论

吸入混悬型气雾剂需要在较长的时间内维持良好的混悬状态, 保证药物递送的稳定性, 从而保证安全性和治疗效果。为了保证良好的混悬状态, 传统做法是在抛射剂中加入助悬剂, 为解决油酸等助悬剂在抛射剂中不溶解的问题, 在处方

中还需添加乙醇等助溶剂^[13-14]。尽管如此,采用传统技术的气雾剂均一混悬状态也仅能维持 10 s 左右,对患者实际使用有很大挑战。新的技术如 Aerosphere 共悬浮递送技术制备上市的吸入气雾剂解决了混悬状态的问题,能够长时间维持均一的混悬状态。Aerosphere 是以 CaCl₂、1, 2-二硬脂酰磷脂酰胆碱和全氟溴辛烷(PFOB)为辅料,采用高压均质以及喷雾干燥技术制备的多孔微球^[15]。但该项技术工艺复杂且耗能高,高度依赖制孔剂 PFOB,其价格昂贵,在进行喷雾干燥处理时,需要专门的溶剂回收系统进行回收,工艺控制难度很大,工业化生产成本很高。胡慧等^[9]在不添加 PFOB 的前提下,以 HSPC 和 CaCl₂ 为辅料,采用高压均质和喷雾干燥技术制备出了一种磷脂包覆的多波纹状球状团块,成功制备出了混悬型布地奈德吸入气雾剂,在保证混悬效果的基础上简化了工艺。但该气雾剂的制备方式同 Aerosphere 技术一样,为了控制喷雾干燥获得的微粉粒径,喷雾干燥时固含量较低,生产耗高、耗时长,应用于产业化仍存在改进的空间。

研究发现,随着混悬液质量浓度的增加,冻干粉颗粒的粒径明显增大,虽然气雾剂的混悬状态依旧良好,但是粒径的增大导致 FPF 值明显降低。而后结合气流粉碎技术,在减小微粉颗粒粒径的同时,改善了冻干粉形貌差异大及颗粒一致性差的问题,并且粉碎工艺对布地奈德含量并无明显影响。

气流粉碎后微粉表面平滑,这也说明,由 HSPC 和 CaCl₂ 体系制成的微粉,其形貌无论是多孔球状、多波纹状又或是平滑颗粒,制备的气雾剂混悬状态均很好。如果能同时保证微粉粒径较小,可以进一步提高肺部沉积率。

本研究利用冷冻干燥结合气流粉碎技术得到的细小微粉颗粒,由其制备的气雾剂同样具有肺部沉积率高和递送剂量均一的优势。相对于 Aerosphere 技术以及磷脂包覆技术而言,本文采用冷冻干燥工艺,在增大混悬液质量浓度的同时,不使用价格昂贵且需要回收的溶剂 PFOB,不需要经过高压、多次数的高压均质处理,节约了成本,简化了工艺,并且该工艺对混悬液浓度限制低,回收率接近 100%,对于易吸湿样品的收样环境没有严格要求,而气流粉碎技术又可以很好的控制冻干粉的粒径大小,从而使得将其推向工业化可调控地空间更大,更有益于实现工业化生产。

参考文献

- [1] 邓伟吾. 糖皮质激素治疗支气管哮喘[J]. 世界临床药物, 2009, 30(1): 6-11.
- [2] 申昆玲, 邓力, 李云珠, 等. 糖皮质激素雾化吸入疗法在儿科应用的专家共识(2018年修订版)[J]. 临床儿科杂志, 2018, 36(2): 95-106.
- [3] 中国医学装备协会呼吸病学专委会吸入治疗与呼吸康复学组. 稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识(2023版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2023, 46(11): 1055-1067.
- [4] Macfhionnghaile P, Hu Y, Gniado K, et al. Effects of ball-milling and cryomilling on sulfamerazine polymorphs: a quantitative study[J]. J Pharm Sci, 2014, 103(6): 1766-1778.
- [5] Kauppinen A, Toiviainen M, Aaltonen J, et al. Microscale freeze-drying with Raman spectroscopy as a tool for process development[J]. Anal Chem, 2013, 85(4): 2109-2116.
- [6] Gui Y, Huang CB, Shi CY, et al. Polymorphic selectivity in crystal nucleation[J]. J Chem Phys, 2022, 156: 144504.
- [7] Huang CB, Chen ZX, Gui Y, et al. Crystal nucleation rates in glass-forming molecular liquids: D-sorbitol, D-arabitol, dxylylitol, and glycerol[J]. J Chem Phys, 2018, 149: 054503.
- [8] Mehta M, Kothari K, Ragoonanan V, et al. Effect of water on molecular mobility and physical stability of amorphous pharmaceuticals[J]. Mol Pharm, 2016, 13: 1339-1346.
- [9] 胡慧, 陈晶晶, 王琴, 等. 磷脂包覆技术制备布地奈德吸入气雾剂及体外性质评价[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1459-1464.
- [10] Novartis AG, Dellamary LA, Riess JEAN, et al. Stable metal ion-lipid powdered pharmaceutical compositions for drug delivery and methods of use: US20100967482 [P]. 2013-01-08.
- [11] Assegehegn G, Brito-de la Fuente E, Franco JM, et al. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance[J]. J Pharm Sci, 2019, 108(4): 1378-1395.
- [12] Chung NO, Lee MK, Lee J. Mechanism of freeze-drying drug nanosuspensions[J]. Int J Pharm, 2012, 437(1-2): 42-50.
- [13] FDA. Metered dose inhaler (MDI) and dry powder inhaler (DPI) drug products-quality considerations [EB/OL]. (2018-04-01) [2019-10-20]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/metered-dose-inhaler-mdi-and-dry-powder-inhaler-dpi-drug-products-quality-considerations>.
- [14] 廖永红, 曾宪明. 以氢氟烷为抛射剂的定量吸入气雾剂研究进展[J]. 药学学报, 2006, 41(3): 197-202.
- [15] Vehring, Reinhard, Hartman, et al. Compositions for pulmonary delivery of long-acting muscarinic antagonists and long-acting B2 adrenergic receptor agonists and associated methods and systems: AU2020203531 [P]. 2023-04-27.

(收稿日期: 2024-09-11; 修回日期: 2024-10-10)

熵权法结合响应面法优化沙枣叶水提取工艺及其体内外抗氧化活性研究

苏伟航, 王东东, 刘俊昌, 孙芸* (新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 优化沙枣叶水提取工艺, 检测并评价沙枣叶水提物的体内外抗氧化活性。 **方法** 基于单因素实验, 以提取时间、提取次数、料液比为影响因素, 采用响应面法, 以沙枣叶浸膏得率、没食子酸含量和鞣花酸含量为评价指标, 结合熵权法计算综合评分, 优化沙枣叶水提取工艺; 采用体外实验研究沙枣叶水提物对二苯基硝基苯肼 (DPPH) 自由基的清除能力; 将 60 只小鼠随机分为空白组, 模型组, 阳性药组, 沙枣叶水提物低、中、高剂量组, 连续灌胃 15 d 后用乙醇氧化损伤的方法建立小鼠模型, 测定小鼠脏器指数、血清中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性、总抗氧化能力 (T-AOC) 和丙二醛 (MDA) 的水平。 **结果** 沙枣叶水提物最佳提取工艺参数为回流提取 3 次, 提取时间 90 min, 料液比 1:25 (g/mL); 当沙枣叶水提物浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其对 DPPH 自由基的清除率为 88.97%; 与模型组相比, 沙枣叶水提物高剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$); 沙枣叶水提物各剂量组的 T-AOC 和 GSH-Px 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 沙枣叶水提取工艺稳定、可行, 且沙枣叶水提物具有较好的抗氧化活性。

关键词: 沙枣叶; 熵权法; 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0448-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.024

Optimization of the water extraction of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves by entropy weight method combined with response surface method and its antioxidant activity in vivo and in vitro

SU Wei-hang, WANG Dong-dong, LIU Jun-chang, SUN Yun* (College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves, and to detect and evaluate the antioxidant activity of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves in vitro and in vivo. **Methods** Based on the single factor test, the extraction time, the number of extraction times and the ratio of solid-liquid were taken as the influencing factors, the response surface method was used, the yield of *Elaeagnus angustifolia* L. extract, gallic acid content and ellagic acid content were used as evaluation indexes, and the comprehensive score was calculated by entropy weight method, and the extraction process of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves was optimized. The scavenging ability of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves to diphenylpicryl phenylhydrazide (DPPH) free radical was studied by in vitro experiments. Sixty mice were randomly divided into blank control group, model control group, positive control group, and low-, medium-, and high-dose aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves groups, and the mouse model was established by ethanol oxidative damage after 15 days of continuous gavage, and the levels of organ index, serum glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) were measured. **Results** The optimal

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (No.2022D01C196); 国家自然科学基金地区项目 (No.81860772); 新疆维吾尔自治区科技创新团队项目 (No.2022TSYCTD0008)。

作者简介: 苏伟航, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药分析及制剂质量标准研究, email: 2467016558@qq.com * **通信作者:** 孙芸, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药分析及制剂质量标准研究, email: 286660963@qq.com

extraction process parameters of water extraction process of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves were reflux extraction for 3 times, extraction time 90 min, and solid-liquid ratio 1 : 25 (g/mL). When the concentration of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves was $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the scavenging rate of DPPH free radical was 88.97%. Compared with the model group, the levels of MDA in the high-dose group were significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of T-AOC and GSH-Px in the all dose groups of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The water extraction process of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves is stable and feasible, and the aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves has good antioxidant activity.

Key words: *Elaeagnus angustifolia* L.; entropy weight law; response surface method; antioxidant activity

沙枣叶为胡颓子科胡颓子属植物沙枣 (*Elaeagnus angustifolia* L.) 的干燥叶^[1]。沙枣树在新疆作为防风林植物, 具有抗旱、耐盐的优良特性, 主要分布于塔克拉玛干沙漠及各河流沿岸, 资源储量丰富, 自然资源丰富^[2]。《中草药大典》记载沙枣叶味辛涩, 性凉。有清热解毒, 抗菌消炎, 活血止血的功能^[3]。目前, 沙枣叶作为沙枣产业的副产物, 除了作为饲料以外, 多数作为“废料”丢弃, 造成了严重的资源浪费^[4]。因此, 进一步挖掘沙枣叶的价值对加快沙枣产业化发展具有重要意义。

本课题组前期研究发现沙枣叶中含有多肽、蛋白质、有机酸、酚类、鞣质类、微量元素等成分, 其水提部位含有没食子酸和鞣花酸, 并采用 HPLC 法测定不同产地沙枣叶中没食子酸和鞣花酸含量^[5-7]。沙枣叶水提物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、白念珠菌均具有不同程度的抑制作用, 能够破坏致病菌细胞壁、细胞膜的通透性和完整性, 抑制其生长、代谢^[8]。

熵权法是一种客观赋权法, 相对于主观赋权法, 精确度高, 客观性强^[9]。它通过样本数据计算直接得出权重, 不受人为主观因素的影响, 已经广泛应用于各类药材、植物品质评价中^[10-11]。目前, 关于沙枣叶水提取工艺的优化及其最佳工艺提取物的体内外抗氧化活性的研究尚未见报道。因此, 本研究采用响应面法, 以沙枣叶浸膏得率、没食子酸含量和鞣花酸含量为评价指标, 结合熵权法计算综合评分, 并采用响应面法对沙枣叶水提取工艺进行优化, 同时考察沙枣叶水提物体内外抗氧化活性, 以期对沙枣产业化发展提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

维生素 C 咀嚼片 (吉林恒金药业股份有限公司, 批号: 23061901); 乙腈 (色谱纯, 美国 Scientific Fisher 公司); 甲酸 (色谱纯, 成都市科

隆化学品有限公司); 没食子酸 (纯度 $\geq 98\%$, 批号: HR14726S1)、鞣花酸 (纯度 $\geq 98\%$, 批号: wkq23011306) (四川维克奇生物科技有限公司); 丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等试剂盒 (南京建成生物工程研究所); SPF 级昆明小鼠 [新疆医科大学动物实验中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (新) 2023-0001, 使用许可证号: SYXK (新) 2023-0004]。

沙枣叶于夏秋两季采自新疆乌鲁木齐, 阴干储存, 经新疆维吾尔自治区中医医院田红林主任鉴定为胡颓子科胡颓子属 (*Elaeagnus angustifolia* L.) 植物沙枣的干燥叶。

1.2 仪器

HPLC1200 型安捷伦高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Diamonsil C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) (迪马公司); AB135-S 分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ500DE 超声波清洗仪器 (昆山市超声仪器有限公司); UV2700 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); 艾柯超纯水仪 (成都艾柯环保设备有限公司); 全波长酶标仪 [赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司]。

2 方法与结果

2.1 沙枣叶供试品溶液的制备

将干燥沙枣叶粉碎, 过 2 号筛, 精密称取 1.0000 g 沙枣叶粉末于圆底烧瓶, 加入 30 mL 蒸馏水 (料液比 1 : 30, g/mL), 1500 W 煮至沸腾后, 调整功率保持微沸状态, 冷凝回流提取 2 次, 每次 30 min, 抽滤, 合并滤液后浓缩干燥成浸膏。精密称取 0.0100 g 浸膏, 纯水定容于 10 mL 量瓶中, 过 0.22 μm 滤膜得供试品溶液。

2.2 浸膏得率

采用减重法测定沙枣叶水提物浸膏得率^[12]。将蒸发皿洗净晾干后置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重, 记录恒重的蒸发皿重量 (m_1), 备用; 将沙枣

叶提取物 (m_0) 倒入恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 称重 (m_2)。按公式 (1) 计算浸膏得率:

$$\text{浸膏得率}(\%) = (m_2 - m_1) / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

2.3 数据处理

采用 Origin 2021、SPSS 21.0 软件进行绘图和数据统计分析, 运用 Design Expert 12 软件进行响应面优化分析, 采用 ANOVA 法进行显著性检验。其中 SPSS 分析结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异

有统计学意义。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈 (A) 及 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 6 min, 4%A; 6 ~ 8 min, 4% ~ 20%A; 8 ~ 15 min, 20% ~ 15%A; 15 ~ 25 min, 15%A), 流速: 1 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 275 nm, 进样量 20 μ L。样品与对照品的色谱图见图 1。

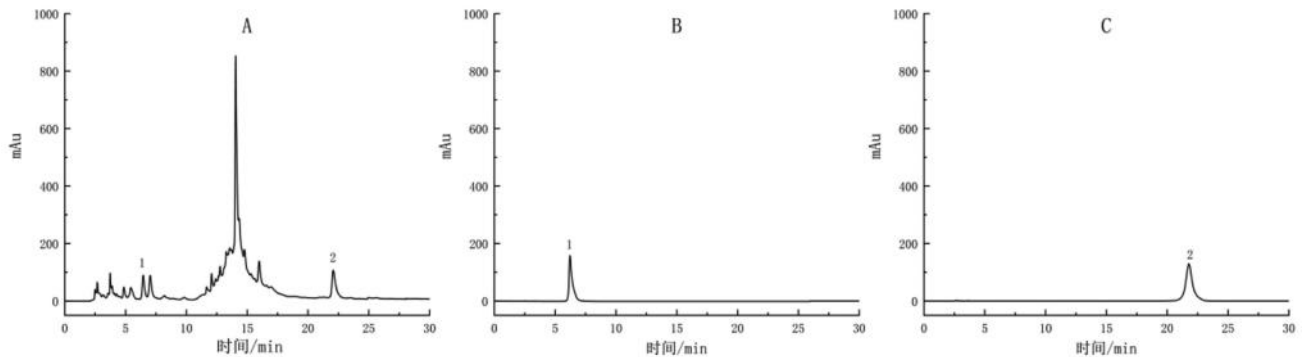


图 1 供试品 (A)、没食子酸对照品 (B) 及鞣花酸对照品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of test substance (A), Gallic acid reference (B), and Ellagic acid reference (C)

1. 没食子酸 (gallic acid); 2. 鞣花酸 (ellagic acid)

2.5 熵权法对各个指标的赋值

信息熵是系统不确定性和无序程度的度量, 除了度量数据包含的信息量, 还在多指标评价系统中用来确定各指标权重^[9-10]。该法是将每个评价指标作为 1 个随机变量, 计算该指标的熵权系数^[11-12], 其取值变异程度越大、越无序、提供的信息量越多, 该指标就越重要; 反之该指标就越不重要。用熵权法确定权重的计算步骤如下。原始数据矩阵归一化, 建立原始评价指标矩阵: 设 m 个评价指标、 n 个评价对象的原始数据矩阵为 $A = (a_{ij})_{mn}$, 对其归一化后得到 $R = (X_{ij})_{mn}$, 对大者为优的指标而言, 按公式 (2) 进行归一化。

$$X_{ij} = (a_{ij} - \min\{a_{1j}, \dots, a_{mj}\}) / (\max\{a_{1j}, \dots, a_{mj}\} - \min\{a_{1j}, \dots, a_{mj}\}) \quad (2)$$

式中 X_{ij} 表示第 i 次实验时第 j 个评价指标的取值, $i = 1, 2, 3, \dots, m; j = 1, 2, 3, \dots, n$ 。将原始数据阵 (X_{ij})_{mn} 转换为概率矩阵 (P_{ij})_{mn}。在公式 (3) 中 P_i 为某个信息的概率, 满足 $0 \leq P_i \leq 1$, 因此必须先对矩阵 (X_{ij})_{mn} 做归一化处理, 经处理后的矩阵可视为指标的概率矩阵。

$$P_{ij} = X_{ij} \sum_{j=1}^n X_{ij} \quad (3)$$

式中 P_{ij} 表示第 j 次实验在第 i 个评价指标下的概率。

按公式 (4) 计算指标的熵值, 确定第 i 个评

价指标的信息熵 (H_i)

$$H_i = -k P_{ij} \ln P_{ij}, \quad k = 1/1n \quad (4)$$

按公式 (5) 计算指标 W_i 。

$$W_j = 1 - H_i / \sum_{i=1}^m (1 - H_i) \quad 0 \leq W_j \leq 1 \quad \sum_{i=1}^m W_j = 1 \quad (5)$$

由此公式 (5) 可知, 当 H_i 越小, 熵权系数越大, 即当 X_{ij} 值相差越大, 表明该指标传递的信息量越多, 作用越大, 其权重值越大。采用上述方法对单因素实验得到的数据进行计算, 得到浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量的权重见表 1。进行赋权后计算得到综合评分 = 浸膏得率 \times 0.291 691 279 + 没食子酸含量 \times 0.305 195 372 + 鞣花酸含量 \times 0.403 113 349。

表 1 指标权重计算结果

指标	信息熵 H_i	熵权系数 W_i
浸膏得率	0.825 932 522	0.291 691 279
没食子酸含量	0.817 873 922	0.305 195 372
鞣花酸含量	0.759 441 132	0.403 113 349

2.6 单因素实验

2.6.1 提取次数 精密称取沙枣叶粉末 1.0000 g, 固定料液比 1 : 25, 提取 30 min, 考察回流提取 1 次、2 次、3 次、4 次对浸膏得率、没食子酸含量和鞣花酸含量的影响。结果如图 2 所示, 随着

提取次数的增加, 浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量、综合评分均呈递增趋势, 但在第 2 次提取之后各个指标增加量均减少。综合考虑, 选择 2 次为响应面实验提取次数的中心点。

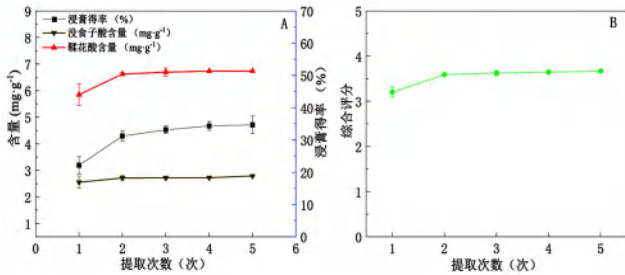


图 2 提取次数对沙枣叶浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量及综合评分的影响

Fig 2 Effect of extraction times on the yield, gallic acid content, ellagic acid content and overall scoring of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves

2.6.2 提取时间 精密称取沙枣叶粉末 1.0000 g, 固定料液比 1 : 25, 回流提取 2 次, 考察回流提取 30、60、90、120 min 对浸膏得率、没食子酸含量和鞣花酸含量的影响。结果如图 3 所示, 随着提取时间的延长, 浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量和综合评分均呈递增趋势。当提取时间达到 60 min 时, 没食子酸含量、鞣花酸含量综合评分达到最大值, 浸膏得率则随着提取时间的延长持续升高。可能是因为回流提取时间过长, 沙枣叶中其他成分溶出, 造成没食子酸含量、鞣花酸含量降低, 同时提高了浸膏得率^[13]。综合考虑, 选择 60 min 作为响应面实验超声时间的中心点。

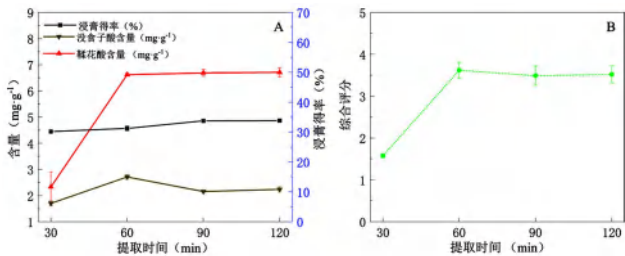


图 3 提取时间对沙枣叶浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量及综合评分的影响

Fig 3 Effect of extraction time on the yield, gallic acid content, ellagic acid content and overall scoring of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves

2.6.3 料液比 精密称取沙枣叶粉末 1.0000 g, 提取 30 min, 提取 2 次, 考察料液比 1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40 对浸膏得率、没食子酸含量和鞣花酸含量的影响。结果如图 4 所示, 随着料液比的增加, 浸膏得率基本持平, 而综合评分、没食子酸含量、鞣花酸含量均在料液比为 1 : 30 时出现最大值, 之后下降, 这种情况可能是由于当沙枣叶粉末的量一定时, 提取溶剂的用量越大, 粉末与溶剂的接触面内外浓度差越大, 提取速度和溶出度越大,

越容易提取; 当溶剂用量达到一定值时, 由于沙枣叶水提取物中主要成分含量逐渐降低, 溶出度也会降低^[14], 同时导致综合评分降低。从工艺扩大的角度考虑溶剂用量越少越好, 因此, 沙枣叶水提取物提取工艺的料液比在 1 : 30 左右为宜。

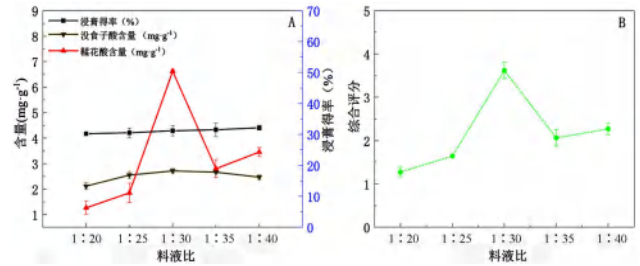


图 4 料液比对沙枣叶浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量及综合评分的影响

Fig 4 Effect of solid-liquid ratio on the yield, gallic acid content, ellagic acid content and overall scoring of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves

2.7 Box-Behnken 响应面实验结果与分析

结合单因素实验结果, 对沙枣叶提取工艺进行优化, 以提取次数 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C) 为考察因素, 以浸膏得率、没食子酸和鞣花酸含量为评价指标, 再结合赋权比重得到的综合评分, 进行实验设计, 得到响应面实验设计水平因素表, 见表 2。

表 2 Box-Behnken 响应面实验设计水平因素表
Tab 2 Levels and factor of Box-Behnken design

水平	因素		
	提取次数 / 次	提取时间 / min	料液比
- 1	1	30	25
0	2	60	30
1	3	90	35

实验结果如表 3、4 所示, 用 Design Expert 12 软件进行三因素三水平的实验设计, 再通过对实验数据进行多元回归拟合分析和方差分析得到: 综合评分 = 3.13 + 0.0423A + 0.1776B - 0.2895C + 0.1571AB - 0.00244C - 0.1181BC - 0.3750A² - 0.3443B² - 0.0016C²。最后结果表明各因素对综合评分影响顺序为 C > B > A, 即料液比 > 提取时间 > 提取次数。由 Design Expert 12 软件绘制的 3D 响应曲面图和等高线图, 见图 5, 可以充分反映各因素间相互作用对综合评分的影响。通过 3D 响应曲面图和等高线图分析发现, 三种因素之间存在着一定的交互作用, 3D 响应曲面图坡度越陡峭, 表明两因素交互作用对响应值的影响越显著, 越平缓则表示两因素交互作用不显著; 等高线图越呈椭圆形或马鞍形则表示两因素之间交互作用显著, 反之越呈圆形表示两因素之间交互作用不显著。由表

4 及图 5 可知, 交互作用强弱顺序为 $BC > AB > AC$ 。其中提取时间 (B) 与料液比 (C) 交互产生的 3D 响应曲面图弯曲曲面较大, 且等高线图中心颜色较深, 说明两者之间的交互作用显著, 对综合评分的影响较大。其他因素交互产生的 3D 响应曲面图, 曲面弯曲程度基本一致, 等高线图中心颜色较浅, 对综合评分的影响较小, 交互作用不显著, 与之前的方差分析结果一致。

表 3 响应面实验设计方案及结果

Tab 3 Design and results of response surface experiment

No.	因素			浸膏得率 / %	没食子酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	鞣花酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	综合评分
	A	B	C				
1	1	1	0	0.2416	2.6759	3.6084	2.3417
2	1	1	0	0.3332	2.1202	2.8394	1.8889
3	1	1	0	0.2108	2.8839	4.1621	2.6194
4	1	1	0	0.3026	3.3661	4.1667	2.7952
5	1	0	1	0.2490	2.5567	4.8201	2.7960
6	1	0	0	0.3096	2.9593	5.2471	3.1086
7	1	0	1	0.2675	2.5370	3.8494	2.4041
8	1	0	1	0.3287	2.4653	4.6110	2.7070
9	0	1	1	0.2665	2.4683	5.1942	2.9249
10	0	1	1	0.3299	3.1069	5.8569	3.4054
11	0	1	1	0.3185	2.0214	4.5056	2.5261
12	0	1	1	0.2554	2.5219	2.5526	2.2821
13	0	0	0	0.3387	2.3650	5.6369	3.0929
14	0	0	0	0.3226	2.4058	5.9958	3.2453
15	0	0	0	0.3394	2.2132	5.2853	2.9050
16	0	0	0	0.3145	2.3557	5.7512	3.1291
17	0	0	0	0.3226	2.4058	6.0826	3.2803

表 4 方差分析及结果

Tab 4 ANOVA and results

来源	平方和	自由度 d_f	均方	F	P
模型	2.33	9	0.2584	4.94	0.0234
A	0.0143	1	0.0143	0.2739	0.6169
B	0.2522	1	0.2522	4.82	0.0641
C	0.6703	1	0.6703	12.82	0.0090
AB	0.0988	1	0.0988	1.89	0.2117
AC	0.0000	1	0.0000	0.0004	0.9837
BC	0.1312	1	0.1312	2.51	0.1572
A ²	0.5920	1	0.5920	11.32	0.0120
B ²	0.4990	1	0.4990	9.54	0.0176
C ²	0.0000	1	0.0000	0.0002	0.9887
残差	0.3660	7	0.0523		
失拟相	0.2781	3	0.0927	4.22	0.0990
纯误差	0.0879	4	0.0220		
总离差	2.69	16			
R ²	0.8640				
R ² _{adj}	0.6892				

2.8 模型验证

利用 Design-Expert 12 软件得沙枣叶水提取的最优工艺参数是: 料液比为 1 : 25、提取时间为 87.079 min、回流提取 2.636 次, 预测沙枣叶

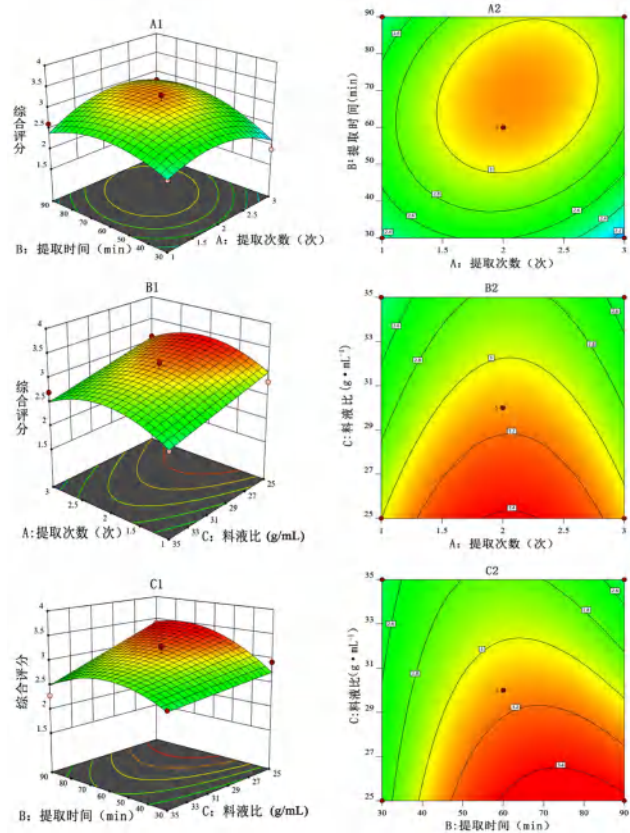


图 5 不同因素交互作用对综合评分影响的 3D 响应曲面图及等高线图

Fig 5 Response surface plots and contour plots for effect of interaction between various factors on comprehensive score

中没食子酸含量为 $3.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 鞣花酸含量为 $5.72 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。考虑实际情况, 将沙枣叶水提取物的最佳工艺技术参数确定为: 料液比 1 : 25、提取时间 90 min、回流提取 3 次, 进行 3 次平行验证实验, 结果如表 5 所示, 实际得到的综合评分 3.323, 与模型预测值 3.25 的标准偏差为 0.08%, 表明建立的模型具有较好的预测性, 优化的提取工艺稳定、可行。

表 5 验证实验结果

Tab 5 Validate test

实验号	浸膏得率 / %	没食子酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	鞣花酸含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	综合评分
1	31.75	3.15	5.60	3.31
2	33.15	3.19	5.60	3.23
3	32.60	3.18	5.59	3.22
平均值	32.50	3.17	5.60	3.25
RSD / %	2.12	0.66	0.10	1.5

2.9 体外 DPPH 自由基清除率测定方法^[15-16]与结果

精密称取 4.00 mg DPPH, 将其转移至 100 mL 棕色量瓶中并用无水乙醇定容, 制备成质量浓度为 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPPH 储备溶液, 低温储存备用。将最优工艺提取物加纯水溶解, 分

别配制成质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。将 1.0 mL 样品溶液与 1.0 mL DPPH 溶液混合均匀，避光反应 30 min 后，使用全波长酶标仪于 517 nm 下测定吸光度为 A_1 ；1.0 mL 样品与 1.0 mL 无水乙醇混合均匀，避光反应 30 min 后测定吸光度为 A_2 ；1.0 mL 蒸馏水与 1.0 mL DPPH 溶液混合均匀，避光反应 30 min 后测定吸光度为 A_0 。以维生素 C 作阳性对照，每个样品测定 3 次，取平均值。按照公式 (6) 计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 清除率} (\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (6)$$

由图 6 可以看出，在 0.1 ~ 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度范围内，随着样品溶液浓度的增大其对 DPPH 自由基清除也逐渐增强，具有一定的剂量效应关系。当沙枣叶水提取物质量浓度达到 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，其对 DPPH 自由基的清除率达到 88.97%，表明沙枣叶水提取物具有较强的 DPPH 自由基清除能力。

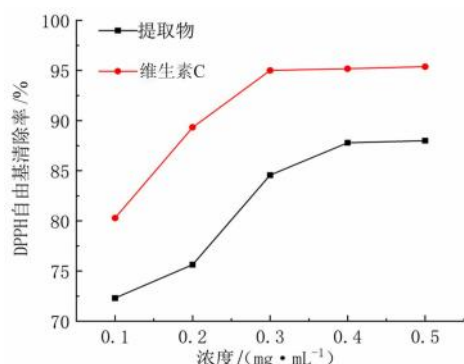


图 6 沙枣叶水提取物对 DPPH 自由基的清除率

Fig 6 Scavenging rate of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves on DPPH radical

2.10 体内抗氧化活性测定

2.10.1 体内抗氧化活性检测方法

参考文献^[17-18]，取 60 只健康 SPF 级雄性昆明小鼠，体重 25 ~ 30 g，按随机数字表法将其分为 6 组，每组 10 只，适应性喂养后分为空白组、模型组、阳性药组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、沙枣叶水提取物低剂量组 ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、沙枣叶水提取物中剂量组 ($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、沙枣叶水提取物高剂量组 ($1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。给药组每日灌胃，连续灌胃 15 d，灌胃量 0.1 mL/10 g，空白组和模型组灌胃等体积生理盐水。最后一次给药灌胃后，除空白组外，将各剂量组禁食不禁水过夜，次日灌胃 50% 乙醇 1.2 mL/10 g 造模，6 h 后眼球取血，取血后处死，并迅速摘取肝脏、脾脏和肾脏，洗净并称重；4500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心取血清备用。计算各组小鼠脏器系数，

脏器系数按公式 (7) 进行计算；检测各组小鼠血清中 T-AOC、T-SOD、MDA、GSH-Px 水平。

$$\text{脏器系数} (\%) = \text{脏器重量} (\text{g}) / \text{小鼠体重} (\text{g}) \times 100\% \quad (7)$$

2.10.2 对脏器系数的影响

由表 6 可知，6 组小鼠的脾脏系数无显著差异。但与空白组相比，模型组的肝脏系数、肾脏系数均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明小鼠灌胃乙醇后，对其内脏造成了一定的损伤。与模型组比较，沙枣叶水提取物高剂量组肝脏系数显著降低 ($P < 0.05$)，且低、中剂量组肾脏系数显著降低 ($P < 0.01$)，说明沙枣叶水提取物在一定程度上可以降低由乙醇诱导的氧化损伤。

表 6 沙枣叶水提取物对脏器系数的影响 ($n = 10$)

Tab 6 Effect of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves on the organ coefficient ($n = 10$)

组别	肝脏系数 / %	脾脏系数 / %	肾脏系数 / %
空白组	6.18 ± 0.25	0.29 ± 0.01	1.75 ± 0.07
模型组	5.61 ± 0.26 [#]	0.27 ± 0.03	1.50 ± 0.16 ^{##}
阳性药组	5.64 ± 0.31	0.30 ± 0.03	1.35 ± 0.09
沙枣叶水提取物低剂量组	5.16 ± 0.22	0.29 ± 0.05	1.24 ± 0.08 ^{**}
沙枣叶水提取物中剂量组	5.38 ± 0.20	0.30 ± 0.04	1.21 ± 0.11 ^{**}
沙枣叶水提取物高剂量组	5.12 ± 0.22 [*]	0.34 ± 0.04	1.37 ± 0.05

注：与空白组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

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

2.10.3 小鼠血清中指标测定结果

如表 7 所示，与空白组相比，模型组小鼠血清中 T-AOC、T-SOD、GSH-Px 水平降低，MDA 水平上升 ($P < 0.05$)，说明由乙醇诱导的氧化损伤模型造模成功。与模型组相比，沙枣叶水提取物各剂量组 GSH-Px 和 T-AOC 明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，高剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明沙枣叶水提取物可以增强小鼠机体的总抗氧化能力，能显著提高小鼠血清中的 T-AOC、GSH-Px 活力，并降低 MDA 含量，发挥清除自由基、修复氧化损伤的细胞、减少过氧化产物积累的作用，从而在一定程度上缓解氧化损伤。

3 结果与讨论

迄今为止，关于沙枣叶水提取物的生物活性研究已有大量报道，唐莎莎等^[8]研究结果表明沙枣叶水提取物对多种细菌均有不同程度的抑制作用。于浩楠等^[19]研究结果表明沙枣叶水提取物具有一定的体内外抗肿瘤活性。沙枣叶水提取物对心肌缺血再灌注 (I/R) 损伤有明显的保护作用^[20]。但目前关于沙枣叶水提取物的工艺优化尚未见报道，因此

表 7 沙枣叶水提物对小鼠血清中抗氧化参数的影响 ($n = 10$)Tab 7 Effect of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* L. leaves on the antioxidant parameters in mice serum ($n = 10$)

组别	T-AOC/ ($U \cdot mL^{-1}$)	T-SOD/ ($U \cdot mL^{-1}$)	MDA/ ($nmol \cdot mL^{-1}$)	GSH-Px/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
空白组	1.46±0.09	60.03±1.34	4.76±1.04	606.85±11.23
模型组	1.03±0.11 ^{##}	49.37±2.12 ^{##}	6.01±0.54 [#]	512.33±9.25 ^{##}
阳性药组	1.45±0.06 ^{**}	57.96±2.19 ^{**}	4.51±0.75 ^{**}	609.59±8.22 ^{**}
沙枣叶水提物低剂量组	1.32±0.05 ^{**}	51.84±1.59	5.26±0.50	545.21±8.49 [*]
沙枣叶水提物中剂量组	1.42±0.07 ^{**}	62.38±5.48	4.88±0.49	565.07±4.31 ^{**}
沙枣叶水提物高剂量组	1.50±0.06 ^{**}	62.69±3.42	4.48±0.81 [*]	603.42±9.87 ^{**}

注：与空白组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

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

本文以沙枣叶为研究对象，采用熵权法结合响应曲面法设计的方法，以水为提取溶剂，以浸膏得率、没食子酸含量、鞣花酸含量为指标，确定沙枣水提物的最佳工艺参数，并通过建立小鼠氧化损伤的模型，检测沙枣叶水提物低、中、高剂量组对小鼠血清中 T-AOC、T-SOD、MDA、GSH-Px 水平及沙枣叶水提物对 DPPH 自由基清除率的影响，结果表明沙枣叶水提物可以在一定程度上缓解氧化损伤。本实验为沙枣叶水提物的开发利用提供了一定的理论依据，同时也为高效率提取沙枣叶中没食子酸、鞣花酸含量奠定了基础。

参考文献

- 江苏新医学院编. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1997: 11621.
- 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志·第 52 卷·第 2 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 41.
- 陈士林, 林余霖. 中草药大典 [M]. 北京: 军事医学科学院出版社, 2006: 226.
- 苏亚拉图, 哈斯巴根. 沙枣落叶的饲用营养价值 [J]. 饲料研究, 2004, (11): 26-27.
- 夏米斯巴奴·艾则孜, 巴依尔太, 孙芸. 新疆沙枣叶的鉴别与化学成分初步研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42 (4): 529-532, 540.
- Sun Y, Liu JJ, Bayerta I, et al. Analysis of gallic acid and ellagic acid in leaves of *Elaeagnus angustifolia* L. from different habitats and times in Xinjiang by HPLC with cluster analysis [J]. Acta Chromatogr, 2020, 33: 195-201.
- 巴依尔太, 余志银, 郭童童, 等. 新疆不同产地沙枣叶微量元素测定及主成分分析 [J]. 化学试剂, 2017, 39 (3): 271-275.
- 唐莎莎, 宫海燕, 于浩楠, 等. 沙枣叶水提物的体外抗菌活性机制研究 [J]. 饲料研究, 2024 (7): 88-93.
- 张桂梅, 岳珠珠, 王慧楠, 等. 基于 AHP-熵权法结合色差原理评价不同辅料大米对米炒党参饮片的影响 [J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7447-7454.
- 程中琴, 王姗姗, 刘小妹, 等. 基于 AHP-熵权法结合指纹图谱优选盐黄柏炮制用盐 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (9): 4298-4302.
- 吴乙庚, 祝婧, 姚东, 等. 层次分析-熵权法联合星点设计-响应面法优选胆汁制陈皮炮制工艺及饮片色度与成分相关性分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31 (5): 118-124.
- 律梦伟, 刘鑫榕, 兰卫, 等. 响应面法优化毛菊苣总黄酮和总多酚的超声提取工艺 [J]. 化学与生物工程, 2023, 40 (8): 20-25.
- 迟玉霞. 多指标优化提取地榆有效成分工艺研究 [J]. 中国林副特产, 2012 (1): 26-28.
- 郑佳欣, 李怡婧, 汪晨阳, 等. 板栗壳鞣质提取及其对 DPPH 自由基清除活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (3): 211-215.
- 纪璐璐, 张丽, 张思访, 等. DPPH 法测定典型植物油的抗氧化活性 [J]. 广东化工, 2022, 49 (22): 220-222.
- 戴万生, 杨丽, 邱斌, 等. DPPH 法评价黄精及炮制品抗氧化活性方法的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51 (5): 152-154.
- Retraction: in vivo antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats [J]. PLoS One, 2023, 18 (11): e0294012-e0294012.
- 郭敬宇, 苏伟航, 王忠, 等. 熵权法结合响应面法优化新疆沙枣花黄酮类成分的提取工艺及其体内外抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2024, 35 (2): 67-78.
- 于浩楠, 王忠, 郭泳辉, 等. 新疆沙枣叶提取物体内外抗肿瘤活性研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (10): 1653-1657.
- Wang BS, Qu HY, Ma J, et al. Protective effects of *Elaeagnus angustifolia* leaf extract against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart [J]. J Chem, 2014, doi.org/10.1155/2014/693573.

(收稿日期: 2024-08-30; 修回日期: 2024-10-11)

冬菀止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响

张静文^{1,2}, 李颖萌^{1,2}, 熊艳霞^{1,2}, 王丽华³, 吴样明^{1,2}, 詹扬^{1,2*} (1.经典名方现代中药创制全国重点实验室, 南昌 330103; 2.江中药业股份有限公司, 南昌 330103; 3.江西中医药大学附属医院肺病科, 南昌 330103)

摘要: **目的** 通过建立咳嗽变异性哮喘 (CVA) 模型, 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路考察冬菀止咳颗粒对该哮喘模型的改善作用及初步的作用机制。**方法** 给药 14 d 后测定各组动物呼吸功能指标、咳嗽次数及血清 IL-4、IgE 含量, 计算肺脏系数, 检测肺泡灌洗液中白细胞总数和炎性细胞分类数, 观察各组肺脏组织病理学切片, Western blot 法检测大鼠肺组织中 TLR4、MyD88、p-p65 的蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比, 给药第 14 日后模型组动物呼吸功能指标吸气时间 (TI)、潮气量 (TV)、松弛时间 (RT)、每分钟吸气量 (MV)、呼吸频率 (F) 均显著降低, 气道狭窄指数 (Penh) 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 模型组动物咳嗽次数、肺脏系数、白细胞 (WBC)、单核细胞 (MONO)、淋巴细胞 (LYMPH)、嗜酸性粒细胞 (EO)、免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素 4 (IL-4) 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 冬菀止咳颗粒可改善呼吸功能指标, 降低咳嗽次数、肺脏系数、肺泡灌洗液中白细胞总数和细胞分类数及血清中 IgE、IL-4 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Western blot 结果表明, 与空白组相比, 模型组中 TLR4、MyD88、p-p65 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 冬菀止咳颗粒组及醋酸地塞米松片组 TLR4、MyD88、p-p65 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 冬菀止咳颗粒在 1.35、2.70、5.40 g·kg⁻¹ 剂量下对 CVA 大鼠模型具有一定的改善作用, 可能与调控、降低气道炎症、TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路; 改善呼吸功能有关。**关键词:** 咳嗽变异性哮喘; 冬菀止咳颗粒; 咳嗽; 呼吸功能; 气道炎症

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0455-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.025

Effect of Dongwan Zhike granules on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rats with cough variant asthma

ZHANG Jing-wen^{1,2}, LI Ying-meng^{1,2}, XIONG Yan-xia^{1,2}, WANG Li-hua³, WU Yang-ming^{1,2}, ZHAN Yang^{1,2*} (1. State Key Laboratory for the Modernization of Classical Prescriptions of Chinese Medicine, Nanchang 330103; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330103; 3. Department of Pulmonary Diseases, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330103)

Abstract: Objective To determine the effect of Dongwan Zhike granules on rats model with cough variant asthma (CVA) and its related mechanism based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. **Methods** At 14 days after the administration, the respiratory function indexes, the serum IL-4 and IgE levels, the lung coefficient, white blood cells and inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid were measured, and the pathological sections observed. The protein expression levels of TLR4, MyD88 and p-p65 in the lung tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank group, the respiratory function indicators of the model group were significantly decreased in inspiratory time, tidal volume, relaxation time, inspiratory volume per minute, and respiratory rate, white airway stenosis

基金项目: 经典名方研发与国际拓展研究项目 (No.20232BBH80009); 冬菀止咳颗粒工艺改进和标准提升研究 (No.2019A161); 江西省重点研发计划项目 (No.20243BBI91016)。

作者简介: 张静文, 女, 硕士, 研究员, 主要从事药理学研究, email: 1754355103@qq.com *通信作者: 詹扬, 女, 硕士, 中级工程师, 主要从事中药药效评价及机制研究, email: zhany@crjz.com

index (Penh) was obviously increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The lung coefficient, white blood cells, monocytes, lymphocytes, eosinophils, immunoglobulin E and interleukin-4 levels in model rats were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, Dongwan Zhike granule improved the respiratory function index, reduced the lung coefficient, the total number of white blood cells and cell types in the bronchoalveolar lavage fluid, and the levels of IgE and IL-4 in the serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Western blot showed that the protein expression of TLR4, MyD88 and p-p65 in the model group was much higher than that in the blank group ($P < 0.01$). The protein expression of TLR4, MyD88, and p-p65 protein expression decreased in Dongwan Zhike granules and dexamethasone acetate groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Dongwan Zhike granules at 1.35, 2.70 and 5.40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ can improve the CVA in the rat model, which may be related to the regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway to reduce the airway inflammation and improve the respiratory function.

Key words: cough variant asthma; Dongwan Zhike granule; cough; respiratory function; airway inflammation; TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

咳嗽变异性哮喘 (CVA) 是哮喘的一种特殊类型, 主要表现为慢性咳嗽, 不伴有呼吸困难、胸闷等其他典型哮喘症状。这种哮喘类型的确切机制尚不完全清楚, 目前认为可能与可逆性气道阻塞、气道高反应性、气道炎症等有关^[1-2]。近年来受环境、季节变化等因素的影响, CVA 的发病率逐年升高, 成为慢性咳嗽最主要的病因^[3]。目前临床上多用糖皮质激素、白三烯受体拮抗剂及支气管扩张剂等治疗 CVA, 但停药后症状易反复, 长期用药副作用明显^[4-6]。而传统中医药因其副作用少、远期疗效佳等优势, 已越来越多地被用作治疗 CVA^[7-9]。冬菀止咳颗粒由麻黄、生姜、细辛、紫菀、款冬花、法半夏、辛夷、苍耳子组成, 具有祛风散寒、宣肺止咳之功效^[10]。本研究首次基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探究了冬菀止咳颗粒改善 CVA 的作用机制, 为冬菀止咳颗粒的进一步研究提供思路, 为临床应用提供理论参考。

1 材料

1.1 动物

5~6 周龄雄性 SD 大鼠 66 只, 体重 (180±20) g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004]。本实验经过广东省实验动物伦理委员会批准同意, 批准编号为: IA-PD2023019-01。实验动物饲养于 SPF 级动物环境, 自由摄食饮水。

1.2 试药

冬菀止咳颗粒 (规格: 5 g/袋, 江中药业股份有限公司, 批号: 23010003); 醋酸地塞米松片 (浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: LB2370); 卵清蛋白 (OVA) (Sigma 公司, 批号: SLCH2414); 氢氧化铝 (广东光华科技股份有限公司, 批号: 20220811); 免疫球蛋白 E (IgE)、白细胞介素 (IL)-4 (R&D, 批号: E20230901A); TLR4、MyD88、NF- κ B p65、

磷酸化 NF- κ B p65 抗体 (CST 公司, 货号: 8467、3609、6988、6870); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司, 批号: P0017)。

1.3 仪器

全自动血液体液分析仪 (希森美康医用电子有限公司, 型号: XN-1000[B3]); 酶标分析仪 (美国伯腾仪器有限公司, 型号: ELx808); 超声雾化器 (欧姆龙健康医疗有限公司, 型号: NB-150U); 大鼠肺功能监测系统 (法国 EMKA 公司, 型号: EMKA WBP)。

2 方法与结果

2.1 药物配制

分别称取 6.75、13.5、27.0 g 的冬菀止咳颗粒置于研钵中, 加入适量的 0.5% CMC-Na 溶液, 研磨均匀后, 转移至量筒加至 50 mL, 分别配制成质量浓度为 0.135、0.27、0.54 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。醋酸地塞米松片 7 片 (5.25 mg), 加适量 0.5% CMC-Na 溶液, 研磨搅拌均匀后, 转移至量筒加至 48.6 mL, 配成质量浓度为 0.108 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 现配现用。

2.2 CVA 模型建立及分组给药^[11]

适应性喂养一周后按体重均衡随机分为 6 个组, 分别为空白组、模型组、醋酸地塞米松片组、冬菀止咳颗粒低剂量组、冬菀止咳颗粒中剂量组、冬菀止咳颗粒高剂量组, 每组 11 只动物。

① 致敏: 于第 1 日、第 8 日对模型组, 醋酸地塞米松片组, 冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物足跖、腹股沟、腰、背、颈部等 10 处不同位置皮下注射 1% OVA 溶液 + 氢氧化铝 (10 mg) 混悬液致敏, 每处注射 0.05 mL, 然后每只动物再腹腔注射 0.5 mL 混悬液, 空白组动物皮下 / 腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠注射液; ② 激发: 于第 16 日将各组大鼠置于约 4 L 的密闭容器内, 然后采用超声雾化器以约 400 mmHg 恒压向容器内

吸入 1% OVA + 氢氧化铝 (10 mg) 混悬液, 每日 1 次, 20 min/次, 连续 21 d, 空白组每日吸入 20 min 的 0.9% 氯化钠注射液。于第 23 ~ 36 日雾化激发后 30 min 进行灌胃给药, 醋酸地塞米松片给药剂量为 $1.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 冬菀止咳颗粒给药剂量为 1.35、2.70、5.40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每日 1 次, 连续 14 d, 空白组、模型组给予等剂量的 0.5% CMC-Na 溶液。大鼠出现咳嗽、竖毛、喷嚏、极度烦躁等现象判定为造模成功。

2.3 大鼠肺功能呼吸功能指标及咳嗽监测

给药结束后采用 WBP 大鼠肺功能监测系统测定各组动物气道反应性指标吸气时间 (TI)、潮气量 (TV)、松弛时间 (RT)、每分钟吸氧量 (MV)、呼吸频率 (F)、气道狭窄指数 (Penh); 观察各组

动物 2 min 内咳嗽次数。给药第 14 日后呼吸功能指标测定结果表明, 与空白组相比, 模型组动物 TI、TV、RT、MV、F 均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Penh 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 醋酸地塞米松片组及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物 TI、RT 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Penh 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物 TV、MV 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 其余各组动物呼吸功能指标均未见明显差异 ($P > 0.05$)。给药第 14 日后咳嗽指标测定结果表明, 与空白组相比, 模型组咳嗽次数显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 醋酸地塞米松片组及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物咳嗽次数显著降低 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠呼吸功能及咳嗽指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 1 Effect of Dongwan Zhike granules on the respiratory function and cough indexes in CVA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	吸气时间 (TI)/ms	潮气量 (TV)/mL	松弛时间 (RT)/ms	每分钟吸氧量 (MV)/mL	呼吸频率 (F)/(次·min ⁻¹)	气道狭窄指数 (Penh)	咳嗽次数/次
空白组	139.5±44.6	1.70±0.47	151.6±46.0	417.1±164.2	310.0±68.7	0.51±0.15	0.85±0.20
模型组	97.8±24.6 [#]	1.22±0.33 [#]	85.7±30.5 ^{##}	264.2±91.1 [#]	216.4±66.6 ^{##}	1.55±0.77 ^{##}	8.40±0.73 ^{##}
醋酸地塞米松片组	122.9±20.0 [*]	1.43±0.47	138.1±22.9 ^{**}	310.0±74.4	252.7±47.1	0.58±0.46 ^{**}	3.09±0.16 ^{**}
冬菀止咳颗粒低剂量组	119.8±19.6 [*]	1.68±0.32 ^{**}	119.7±26.6 [*]	387.1±72.8 ^{**}	264.5±50.0	0.88±0.59 [*]	3.55±0.27 ^{**}
冬菀止咳颗粒中剂量组	122.9±22.4 [*]	1.72±0.53 [*]	127.3±31.1 ^{**}	395.3±113.6 ^{**}	255.9±50.3	0.90±0.53 [*]	3.49±0.66 ^{**}
冬菀止咳颗粒高剂量组	141.3±23.0 ^{**}	1.76±0.45 ^{**}	133.1±27.3 ^{**}	405.8±137.8 [*]	222.5±55.7	0.85±0.25 ^{**}	3.12±0.44 ^{**}

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

2.4 对 CVA 模型大鼠肺脏系数的影响

给药 14 d 后称量各组动物体重, 采用异氟烷麻醉结合腹主动脉采血法对动物进行安乐死, 结扎支气管后剖取动物肺脏称取重量计算肺脏系数, 肺脏系数 = 肺脏重量 / 体重。结果表明, 与空白组相比, 模型组动物肺脏重量及肺脏系数显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物肺脏系数显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 醋酸地塞米松片组动物体重、肺脏重量显著降低 ($P < 0.01$), 冬菀止咳颗粒中剂量组动物肺脏重量显著降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 白细胞总数及炎性细胞分类数的检测

称取肺脏重量后, 结扎支气管及左肺进行灌洗, 取肺泡灌洗液采用全自动血液分析仪检测白细胞总数及细胞分类数, 结果表明, 与空白组相比, 模型组动物肺泡灌洗液中白细胞 (WBC)、单核细胞 (MONO)、淋巴细胞 (LYMPH)、嗜酸性粒细胞 (EO) 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 醋酸地塞米松片组及冬菀止咳颗粒中、高剂量组动物肺泡灌洗液中 WBC、MONO 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 醋酸地塞米松

表 2 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠肺脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 2 Effect of Dongwan Zhike granules on lung coefficients in CVA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	体重/g	肺脏重量/g	肺脏系数
空白组	405±19	2.40±0.19	0.59±0.06
模型组	412±30	2.74±0.39 [#]	0.66±0.06 [#]
醋酸地塞米松片组	289±25 ^{**}	1.92±0.26 ^{**}	0.67±0.09
冬菀止咳颗粒低剂量组	432±27	2.47±0.24	0.57±0.05 ^{**}
冬菀止咳颗粒中剂量组	408±29	2.46±0.16 [*]	0.61±0.06 [*]
冬菀止咳颗粒高剂量组	414±24	2.53±0.22	0.61±0.05 [*]

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

片组及冬菀止咳颗粒高剂量组动物肺泡灌洗液中 LYMPH、EO 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 嗜碱性粒细胞 (BASO) 在各组之间无显著差异, 见表 3。

2.6 ELISA 法检测血清中 IL-4、IgE 的含量

实验结束后对动物进行安乐死, 采血后分离血清, -20℃ 条件下保存, 根据试剂盒要求测定 IL-4、IgE 含量。结果表明, 与空白组相比, 模型组动物血清内 IgE、IL-4 含量均显著升高 ($P < 0.05$

表 3 冬菀颗粒对 CVA 模型大鼠肺泡灌洗液中白细胞总数及细胞分类数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 3 Effect of Dongwan Zhike granules on the total number of white blood cells and the number of sorted cells in the alveolar lavage fluid of CVA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	WBC/ ($1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LYMPH/ ($1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$)	MONO/ ($1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$)	EO/ ($1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$)	BASO/ ($1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$)
空白组	6.14 ± 2.71	3.02 ± 3.12	0.51 ± 0.18	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.05
模型组	13.75 ± 9.08 [#]	8.90 ± 7.70 [#]	1.67 ± 1.04 ^{##}	0.22 ± 0.05 ^{##}	0.22 ± 0.18
醋酸地塞米松片组	6.44 ± 4.09 [*]	0.59 ± 1.08 ^{**}	0.44 ± 0.26 ^{**}	0.09 ± 0.02 ^{**}	0.66 ± 0.74
冬菀止咳颗粒低剂量组	13.50 ± 8.71	7.96 ± 7.50	1.75 ± 1.40	0.20 ± 0.02	0.42 ± 0.41
冬菀止咳颗粒中剂量组	7.21 ± 3.43 [*]	5.01 ± 3.20	0.76 ± 0.36 [*]	0.19 ± 0.04	0.15 ± 0.09
冬菀止咳颗粒高剂量组	7.38 ± 2.84 [*]	3.52 ± 1.99 [*]	0.83 ± 0.38 [*]	0.18 ± 0.02 [*]	0.13 ± 0.08

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 醋酸地塞米松片组及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物血清内 IgE 含量均显著降低 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠血清中 IgE、IL-4 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Tab 4 Effect of Dongwan Zhike granules on the levels of IgE and IL-4 in the serum of CVA model rats ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	IgE/ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	IL-4/ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)
空白组	10.92 ± 0.57	53.33 ± 2.48
模型组	11.76 ± 0.37 ^{##}	57.55 ± 5.61 [#]
醋酸地塞米松片组	11.03 ± 0.61 ^{**}	58.06 ± 11.21
冬菀止咳颗粒低剂量组	10.96 ± 0.46 ^{**}	56.57 ± 3.68
冬菀止咳颗粒中剂量组	10.99 ± 0.46 ^{**}	54.59 ± 2.69
冬菀止咳颗粒高剂量组	10.76 ± 0.80 ^{**}	55.81 ± 3.84

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

2.7 HE 染色进行肺组织病理学检查

取右肺用 10% 甲醛固定后, 进行组织病理学检查。病理结果显示, 空白组肺内各级支气管结构正常, 肺泡腔无扩张或缩小及未见炎细胞。间

质血管未见扩张或狭窄, 亦未见炎细胞浸润; 模型组支气管黏膜轻度坏死脱落, 支气管黏膜中度增厚, 支气管(细支气管)周围轻度炎细胞浸润; 醋酸地塞米松片组支气管黏膜轻微坏死脱落, 支气管黏膜轻度增厚; 冬菀止咳颗粒低剂量组支气管黏膜轻微坏死脱落, 支气管黏膜轻度增厚, 支气管(细支气管)周围轻度炎细胞浸润; 冬菀止咳颗粒中剂量组支气管黏膜轻度增厚; 冬菀止咳颗粒高剂量组支气管黏膜轻微坏死脱落, 支气管(细支气管)周围轻度炎细胞浸润, 见图 1 及表 5。

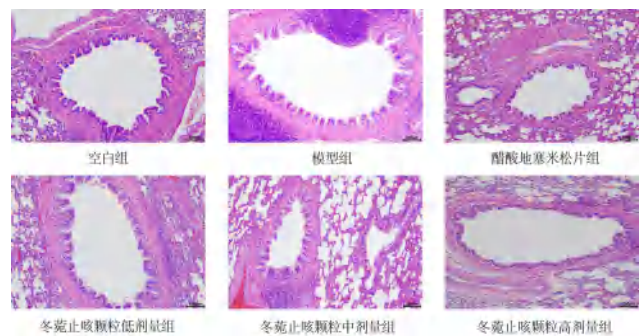


图 1 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠肺组织病理结果的影响 ($\times 100$)
Fig 1 Effect of Dongwan Zhike granules on the pathological results of lung tissue in CVA model rats ($\times 100$)

表 5 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠肺脏组织病变程度评分结果影响 ($n = 11$)

Tab 5 Effect of Dongwan Zhike granules on the pathological degree of the lung tissue in CVA model rats ($n = 11$)

组别	支气管黏膜坏死脱落病变评分					支气管黏膜增厚病变评分					支气管周围炎细胞浸润病变评分					总分
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
空白组	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0
模型组	5	0	5	1	0	1	2	4	4	0	0	4	5	2	0	55
醋酸地塞米松片组	7	3	1	0	0	6	2	2	1	0	10	1	0	0	0	13
冬菀止咳颗粒低剂量组	2	6	2	1	0	1	1	5	4	0	2	3	5	1	0	52
冬菀止咳颗粒中剂量组	3	2	6	0	0	3	0	5	3	0	3	4	4	0	0	45
冬菀止咳颗粒高剂量组	5	1	1	0	0	1	3	3	4	0	4	2	5	0	0	40

注: 病变程度用 0、1、2、3、4 表示正常、轻微、轻度、中度和重度。

Note: The degree of lesion is denoted by 0, 1, 2, 3, and 4 as normal, slight, mild, moderate, and severe.

2.8 Western blot 检测肺组织相关蛋白表达

根据前期实验, 冬菀止咳颗粒高剂量组的整体效果最好, 因此只选择高剂量进行 Western blot 实验。定量称取大鼠肺组织, 加入 1 mL 蛋白裂解液

充分匀浆提取总蛋白, 离心取上清 BCA 进行蛋白定量, 通过 SDS-PAGE 分离蛋白后转移到 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭后, 一抗孵育过夜, 次日洗涤后室温下与二抗孵育 1 h 后通过化学发光试剂盒

和成像系统显示特定蛋白条带，蛋白表达水平用目的蛋白与内参蛋白灰度值比值表示，Image J 软件分析计算蛋白条带灰度值。与空白组相比，模型组中 TLR4、MyD88、p-p65 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)，与模型组相比，冬菀止咳颗粒组及醋酸地塞米松片组 TLR4、MyD88、p-p65 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，见图 2。

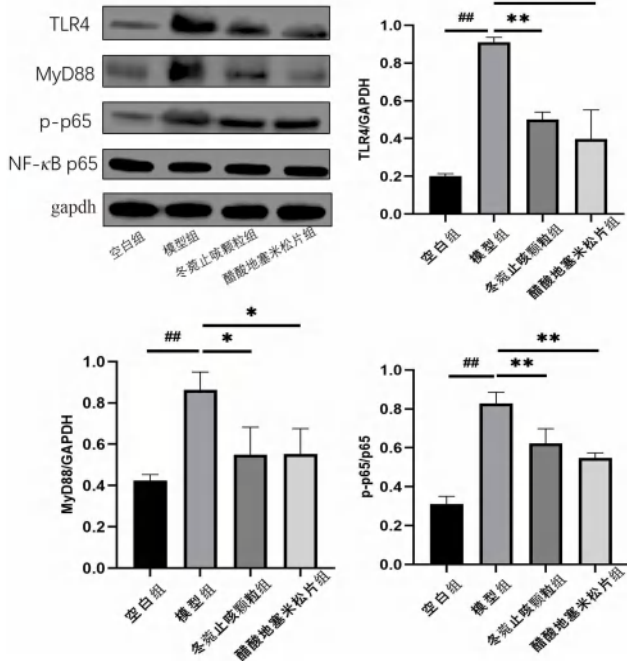


图 2 冬菀止咳颗粒对 CVA 模型大鼠 TLR4、MyD88、p-p65 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

Fig 2 Effect of Dongwan Zhike granules on the expression of TLR4, MyD88 and p-p65 protein in CVA model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

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

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

2.9 数据处理及统计分析

采用 GraphPad Prism8.3.0 作图，Excel 进行统计分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，方差分析用来比较各组差异，两组间比较采用 t 检验进行分析， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

CVA 在中医上属“咳嗽”“风咳”等范畴^[12]，治疗当以祛风散寒、宣肺止咳。冬菀止咳颗粒全方相互配合具有祛风散寒、宣肺止咳之功效。CVA 的发病机制较为复杂，其中气道炎症在 CVA 发病的整个进程中起重要作用，IL-4 是促进 B 细胞增殖活化及 IgE 产生所必需的，当其分泌异常时会导致 IgE 过量产生，IgE 与炎性细胞结合，可能引发气道炎症导致哮喘发作^[13]，目前研究认为

TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路与哮喘气道炎症的形成与发展密切相关，作为 Toll 样受体的家族成员，TLR4 在识别病原体和激活先天免疫中起着重要作用，NF- κ B 位于 TLRs 下游信号通路，TLR4 可通过启动 MyD88 进行信号传递进而激活 NF- κ B 介导气道炎症反应的发生^[14-17]。

本研究采用 OVA 溶液对动物进行多次腹腔注射致敏以及雾化激发进行造模，于给药第 14 日，检测药物对 CVA 模型大鼠呼吸功能指标的影响结果表明，醋酸地塞米松片组及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量组动物在给药 14 d 后，气道阻力（由 RT、Penh 判断）和通气量（由 TV、MV 判断）可明显提升，提示 CVA 模型大鼠的呼吸系统功能明显改善。药物对 CVA 模型大鼠咳嗽次数、肺脏系数、白细胞总数及细胞分类数、血清 IgE 含量的影响结果表明，给予醋酸地塞米松片及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量 14 d 后可显著降低模型动物的咳嗽次数、肺脏系数及肺泡灌洗液中 MONO、LYMPH、血清 IgE 水平，冬菀止咳颗粒高剂量组能显著降低 EO 数量，减轻模型动物的部分水肿及气道免疫炎症反应，并显著降低 CVA 模型大鼠咳嗽次数。组织病理学检查结果表明，在本实验条件下，醋酸地塞米松片及冬菀止咳颗粒低、中、高剂量对 CVA 模型大鼠的支气管黏膜坏死脱落、支气管黏膜增厚及支气管（细支气管）周围炎细胞浸润均具有一定的改善作用，并且冬菀止咳颗粒的改善作用表现出量效关系。Western blot 实验结果显示冬菀止咳颗粒可显著降低模型动物 TLR4、MyD88、p-p65 蛋白的表达，降低咳嗽变异性哮喘模型动物炎症反应，抑制咳嗽变异性哮喘发作。

综上所述，在此研究中，不同剂量的冬菀止咳颗粒对 OVA 复合氢氧化铝混悬液诱发的 CVA 大鼠模型均具有一定的改善作用，其作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路有关，这为冬菀止咳颗粒在 CVA 防治中的应用提供了重要依据。

参考文献

- [1] Padem N, Saltoun C. Classification of asthma [J]. Allergy Asthma Proc, 2019, 40 (6): 385-388.
- [2] Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children [J]. Eur Respir J, 2020, 55 (1): 1901136-1901136.
- [3] Diab N, Patel M, O' Byrne P, et al. Narrative review of the mechanisms and treatment of cough in asthma, cough variant asthma, and non-asthmatic eosinophilic bronchitis [J]. Lung, 2022, 200 (6): 707-716.

- [4] 肖亚男. 吸入性糖皮质激素治疗儿童支气管哮喘的局部不良反应分析[J]. 国际医药卫生导报, 2021, 27(22): 3536-3538.
- [5] Gu C, Peng WP, Wang ZC, et al. Suhuang Zhike capsules for the treatment of cough variant asthma: a meta-analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9485746.
- [6] Chen YB, Shergis JL, Wu ZH, et al. Herbal medicine for adult patients with cough variant asthma: a systematic review and meta-analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 5853137.
- [7] 陈家卫, 蔡穗珍. 基于胸腺基质淋巴细胞生成素/蛋白酶激活受体 2/瞬时电位受体香草酸受体 1/活化 T 细胞的核因子信号通路探讨麻荆止咳颗粒治疗咳嗽变异性哮喘的作用机制[J]. 中医临床研究, 2023, 15(28): 69-74.
- [8] 金东升. 健脾补肺汤对小儿咳嗽变异性哮喘炎症因子、免疫功能的影响[J]. 中国医药科学, 2023, 13(20): 66-69.
- [9] 付智慧, 周霖, 聂安政. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 与 p38 MAPK 信号通路研究麻杏石甘汤减轻咳嗽变异性哮喘大鼠炎症反应的作用及机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 1000-1006.
- [10] 王敏, 张涛, 孙英浩, 等. 冬菟止咳颗粒联合头孢克洛治疗小儿急性支气管炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(9): 1773-1776.
- [11] 陈婷婷, 易桂生. 咳嗽变异性哮喘病理机制及造模方法的研究进展[J]. 实验动物科学, 2021, 38(2): 74-78.
- [12] 邵智愚, 郭金依, 路雪晴, 等. 改良无痛麦粒化脓灸治疗风邪犯肺型咳嗽变异性哮喘: 随机对照试验[J]. 中国针灸, 2024, 44(3): 261-265.
- [13] 刘斐, 王羽, 潘玮, 等. 通络平喘方治疗儿童咳嗽变异性哮喘的临床应用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2024, 48(5): 590-596.
- [14] 陈良, 徐晓琴, 郭文辉, 等. 意大利牛舌草对咳嗽变异性哮喘大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(5): 698-702.
- [15] 罗惠娥, 范亚国, 何军, 等. 基于 TLR4 信号通路探讨宣肺化湿止咳汤干预 CVA 豚鼠气道重塑机制研究[J]. 江西中医药, 2024, 55(4): 63-67.
- [16] Crespo-Lessmann A, Bernal S, Del RE, et al. Association of the CFTR gene with asthma and airway mucus hypersecretion[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e251881.
- [17] 叶超雄, 何晓亮, 张色华, 等. 五苓益肺汤对哮喘模型大鼠的免疫调节作用及对 TLR4/NF- κ B 通路的影响[J]. 中南药学, 2023, 21(11): 2893-2900.

(收稿日期: 2024-06-28; 修回日期: 2024-09-19)

盐酸青藤碱紫苏油乳膏制备工艺优化及体外透皮研究

王阳¹, 李佳慧¹, 田闰元¹, 谢超¹, 胡恒¹, 张纯刚^{1, 2, 3*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药理学系, 山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司, 内蒙古 赤峰 024330)

摘要: 目的 制备盐酸青藤碱紫苏油乳膏, 并对其制备工艺进行优化。方法 采用转相法制备盐酸青藤碱紫苏油水包油型乳膏, 以十八醇占比、复合乳化剂 PEG-40 氢化蓖麻油 (CO-40) 占比及主乳化剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 占比作为处方考察因素, 以乳膏离心前后所得的离心稳定常数 (K_c)、青藤碱和紫苏醛的 24 h 单位面积累计透过量 (Q_n) 为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法优化盐酸青藤碱紫苏油乳膏的制备工艺。结果 优选的乳膏制备工艺为十八醇占比 9%, CO-40 占比 3%, SDS 占比 3%, 青藤碱和紫苏醛的 24 h 单位面积累计透过量分别为 497.77、55.91 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。结论 所得的乳膏外观质地均匀细腻, 24 h 单位面积累计透过量较高, 流变学指标符合预期标准, 可为盐酸青藤碱紫苏油外用抗炎制剂的临床应用提供参考。

关键词: 盐酸青藤碱; 紫苏油; 乳膏; 制备工艺; Box-Behnken 响应面法; 体外透皮

中图分类号: R283, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0460-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.026

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 国家重点研发计划 (No.2018YFC1706903); 辽宁省科技计划联合计划 - 应用基础研究项目 (No.2023JH2/101700206); 辽宁中医药大学校级自然科学重点项目 (No.2021LZY047); 辽宁省教育厅高等学校基本科研项目储备项目 (No.2024-JYTCB-023)。

作者简介: 王阳, 女, 硕士, 主要从事中药新剂型、新技术研究, email: wangy991016@163.com *通信作者: 张纯刚, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究, email: gaogaonii123@163.com

Preparation optimization and in vitro transdermal study of sinomenine hydrochloride perilla oil cream

WANG Yang¹, LI Jia-hui¹, TIAN Min-yuan¹, XIE Chao¹, HU Heng¹, ZHANG Chun-gang^{1,2,3*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

Abstract: Objective To prepare sinomenine hydrochloride perilla oil cream and optimize its preparation. **Methods** Sinomenine hydrochloride and perilla oil-in-water cream were prepared by the transfer phase method. The ratio of the octadecanol, complex emulsifier PEG-40 hydrogenated castor oil (CO-40), and the ratio of the main emulsifier sodium dodecyl sulfate (SDS) were used as the factors of the prescription assessment. The centrifugal stability constants (K_c) before and after the centrifugation of the cream, and the cumulative transmittance of (Q_n) sinomenine and perillaldehyde for 24 h were used as evaluation indexes. Box-Behnken response surface method was used to optimize the preparation of sinomenine hydrochloride perilla oil cream. **Results** The optimized cream was prepared with 9% of octadecanol, 3% of CO-40 and 3% of SDS, and the cumulative transmittance per unit area for 24 h of sinomenine and perillaldehyde were $497.77 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ and $55.91 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively. **Conclusion** The appearance of the cream prepared is homogeneous and delicate in texture, with high cumulative transmittance per unit area for 24 h. The rheological indexes meet the expected standards, which provides reference for application of the topical anti-inflammatory preparation of sinomenine hydrochloride perilla oil cream.

Key words: sinomenine hydrochloride; perilla oil; cream; preparation process; Box-Behnken response surface method; in vitro transdermal

青藤碱 ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$), 来源于中药青风藤的干燥藤茎, 具有优良的抗炎作用, 临床上常用于治疗类风湿关节炎等疾病。常温状态下为类白色或浅黄色结晶性粉末, 气微, 味苦, 溶于乙醇、丙酮、氯仿和稀碱, 微溶于水、乙醚和苯, 但其稳定性较差, 对光、热敏感, 因此药用时多用盐酸青藤碱来代替^[1]。目前盐酸青藤碱普通制剂存在生物利用度较低、具有胃肠道刺激性、在体内半衰期短^[2]和肝脏首过效应^[3]等问题, 这限制了其在临床上的应用^[4]。研究表明, 盐酸青藤碱缓释微丸在不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中释放含量不同, 说明盐酸青藤碱易受 pH 的影响^[5]。紫苏油是从紫苏叶中提取而得的挥发油, 其主要成分紫苏醛具有明显的抗炎、抗氧化、调节免疫等药理作用^[6], 与盐酸青藤碱联用不仅可以增加抗炎效果, 还可以当作天然的促透剂, 增加药物的体外透过率。

经皮给药系统作为第三大给药系统, 可避免肝脏的首过效应及胃肠道刺激和 pH 对药物有效成分的影响^[7], 不仅提高药物的生物利用度, 还可以实现持续、稳定的药物释放, 有利于维持血药浓度在治疗范围内, 减少副作用和提高疗效,

具有一定的缓控释及靶向治疗作用^[8]。

本研究将盐酸青藤碱和紫苏油相结合制备成外用乳膏制剂, 旨在发挥两者协同抗炎作用的同时, 避免盐酸青藤碱的胃肠道刺激性, 提高患者依从性, 也为盐酸青藤碱、紫苏油相关制剂的开发和应用提供参考。

1 材料

1.1 试药

盐酸青藤碱原料药 (湖南正清制药集团股份有限公司, 批号: Y202106044, 纯度: 99.9%), 紫苏醛对照品 (萃园生物科技, 批号: CR2023003, 纯度 $\geq 90\%$), 紫苏叶油 (江西鑫森天然植物油有限公司, 批号: 68153-388, 纯度 $\geq 20\%$), 甲醇、无水乙醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯), 甲醇 (瑞典欧森巴克化学公司, 色谱纯), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 磷酸 (上海市麦克林生化科技股份有限公司, 分析纯), 氢氧化钠、磷酸二氢钾 (上海润捷化学试剂有限公司, 批号: 20190110JN), 氯化钠 (天津市登科化学试剂有限公司, 分析纯), 白凡士林 [汉圣化工 (抚顺) 有限公司, 批号: 1531879], PEG-40 氢化蓖麻油 (山东优索化工科技有限公司), 十八醇、单硬脂

酸甘油酯 (GMS, 北京凤礼精求医药股份有限公司), 十二烷基硫酸钠 (SDS, 天津市大茂化学试剂厂, 分析纯), 丙三醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯), 九水合硫化钠 (西陇科学股份有限公司, 分析纯)。

1.2 仪器

LC-2010A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), CP225D 十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司], FA1004 精密电子天平 (天津天马衡基仪器有限公司), SG3300H 超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、SHZ-D III 循环水真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司), Franz 扩散池、TP-6 智能透皮试验仪 (天津市鑫洲科技有限公司), UV1600 紫外分光光度计 (上海美普达仪器有限公司), PHS-3C (PHS-25) 实验室 pH 计 (上海浦春计量仪器有限公司), CT3 质构仪 (美国博勒飞公司)。

1.3 实验动物

SPF 级健康 SD 雄性大鼠 6 只, 体重 180 ~ 200 g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 动物许可证号为 SCXK (辽) 2020-0001。

2 方法与结果

2.1 盐酸青藤碱紫苏油乳膏的制备

称取处方量盐酸青藤碱原料药, 加适量纯化水溶解, 用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调节 pH 至 8.0 备用。称取处方量 SDS、甘油、纯化水作为水相基质, 另外称取处方量十八醇、凡士林、GMS、CO-40 作为油相基质。

将上述盐酸青藤碱药液加入称量好的水相基质中, 与油相基质分别同时加热熔融 10 min, 待两相基质融化完全, 将水相以细流状缓慢加入油相中, 混合好的两相基质继续乳化 10 min, 停止加热, 继续搅拌冷却至室温后加入处方量的紫苏叶油, 即得 (含药量以青藤碱计 10 mg·g⁻¹、以紫苏醛计 10 mg·g⁻¹)。

2.2 单因素实验

以离心稳定常数 (K_c) 为单因素实验考察指标。用比色法测定 230 nm 处离心后制剂稀释液的吸光度 A , 同法测定原制剂稀释液吸光度 A_0 , 代入公式计算, K_c 值越小, 乳膏越稳定, 正、负值分别代表离心前后乳膏中有效成分上浮或者下沉^[9]。

$$K_c (\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

固定其他辅料占比不变, 考察十八醇、CO-40、SDS、凡士林、GMS、甘油占比对乳膏外观性状及 K_c 值的影响, 结果见图 1。

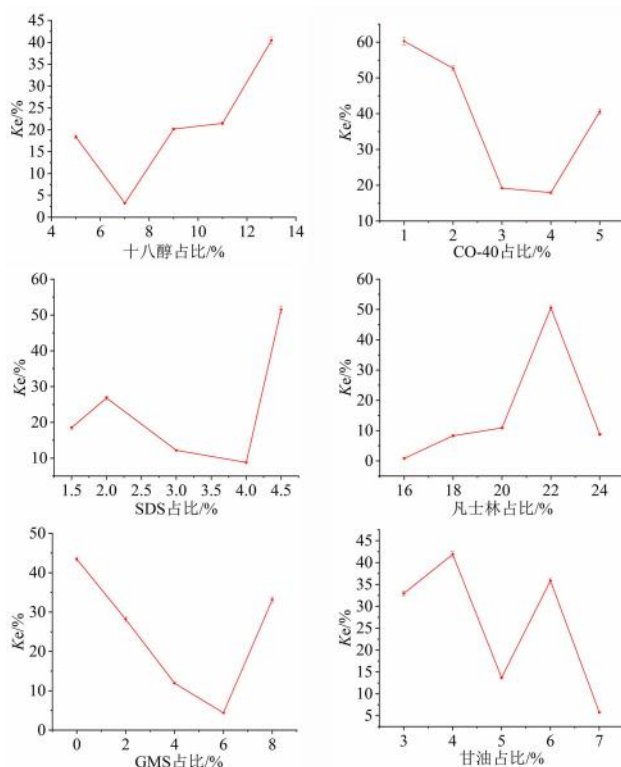


图 1 辅料占比单因素考察图 ($n=3$)

Fig 1 Single factor investigation plot of auxiliary material proportion ($n=3$)

综合外观性状及 K_c 值大小, 选择凡士林处方占比为 20%, GMS 占比为 4%, 甘油占比为 5%, 十八醇占比为 7%~11%, CO-40 占比为 2%~4%, SDS 占比为 2%~4% 进行后续响应面考察。

2.3 盐酸青藤碱含量测定方法学考察

2.3.1 色谱条件 色谱柱: HPLCONE-5C18A (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水 (12:88, V/V); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸青藤碱原料药适量, 加 pH 6.8 PBS 超声溶解, 放冷定容至刻度, 配制成质量浓度为 112.88 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液 (以青藤碱计), 4 °C 备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取乳膏适量, 加入 pH 6.8 PBS 配制成质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的母液, 过滤后取续滤液用 pH 6.8 PBS 稀释 10 倍后备用, 进样测定前过 0.2 μm 有机滤膜。

2.3.4 专属性考察 分别取 pH 6.8 PBS、盐酸青藤碱对照品和供试品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样, 色谱图见图 2, 盐酸青藤碱色谱峰能与其他组分峰基线分离, 供试品溶液与盐酸青藤碱对照品在相同时间点出现相同色谱峰, 表明此方法专属性良好^[10]。

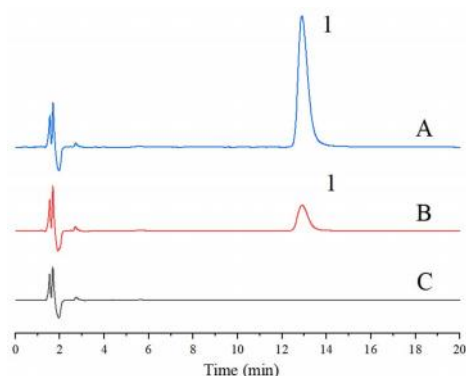


图 2 盐酸青藤碱对照品 (A)、供试品溶液 (B) 及 pH 6.8 PBS (C) 的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of sinomenine hydrochloride control product (A), sample solution (B) and pH 6.8 PBS (C)

1. 青藤碱 (sinomenine)

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.2”项下盐酸青藤碱对照品储备液适量, 用 pH 6.8 PBS 逐级稀释至质量浓度为 112.88、56.44、28.22、14.11、7.06、3.53、1.77 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 (以青藤碱计), 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 以质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制线性回归曲线, 得到线性方程为 $Y = 1.042 \times 10^4 X + 1.335 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9994$), 表明青藤碱在 1.77 ~ 112.88 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.3.6 精密度、重复性、稳定性、加样回收率考察 取同一份供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录青藤碱峰面积, 计算得峰面积 RSD 值为 0.13% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 进样测定, 计算得峰面积 RSD 值为 1.6% ($n = 6$), 表明该方法重复性良好。取同一份供试品溶液, 在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 记录青藤碱峰面积, 计算得峰面积 RSD 值为 1.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。取 6 份已知含量的供试品, 按照供试品中指标成分含量与加入对照品量 1:1 原则, 分别在每份供试品中加入适量的盐酸青藤碱对照品 (以青藤碱计), 进样测定, 得平均加样回收率为 99.63%, RSD 值为 2.5% ($n = 6$), 符合方法学要求。

2.4 紫苏醛含量测定方法学考察

2.4.1 色谱条件 色谱柱: HPLCONE-5C18A (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水 (75:25, V/V); 流速: 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取适量紫苏醛对照品置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 超声,

放冷后定容至刻度, 配制成质量浓度为 93.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用^[11]。

2.4.3 供试品溶液的制备 同“2.3.3”项下方法操作。

2.4.4 专属性考察 分别取空白基质 (缺紫苏油的乳膏) 溶液、紫苏醛对照品溶液、供试品溶液, 进样测定, 色谱图见图 3。

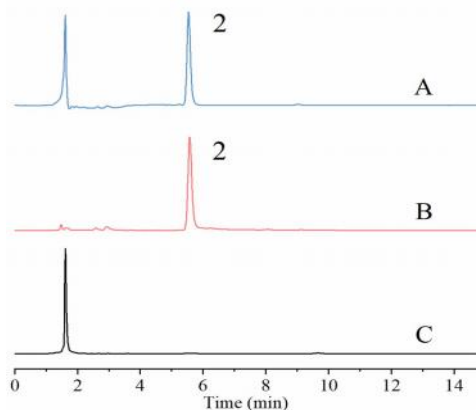


图 3 供试品溶液 (A)、紫苏醛对照品 (B)、空白基质 (C) 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of sample solution (A), perillaldehyde control (B), and blank matrix (C)

2. 紫苏醛 (perillaldehyde)

2.4.5 线性关系考察 取“2.4.2”项下紫苏醛对照品储备液适量, 用甲醇逐级稀释为 93.67、46.84、23.42、11.71、2.93、1.46、0.73、0.18 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 对照品质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制线性回归曲线, 得到线性方程为 $Y = 4.271 \times 10^4 X + 2.655 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9990$), 表明紫苏醛在 0.18 ~ 93.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.4.6 精密度、重复性、稳定性、加样回收率考察 参考“2.3.6”项下方法操作, 进行方法学考察, 结果表明紫苏醛精密度 RSD 值为 2.2% ($n = 6$), 重复性 RSD 值为 1.8% ($n = 6$), 24 h 内含量 RSD 值为 1.7% ($n = 7$), 平均加样回收率为 102.02% ($RSD = 0.83\%$, $n = 6$), 表明仪器精密度、方法重复性、溶液稳定性及方法回收率均符合方法学要求。

2.5 体外经皮吸收

2.5.1 离体鼠皮的制备 取体重 180 ~ 200 g 的雄性健康 SD 大鼠, 脱颈处死后用含有 8% 的硫化钠脱毛^[12], 剥离腹部皮肤后去除皮下脂肪组织和血管, 生理盐水漂洗干净, -20 $^{\circ}\text{C}$ 中保存, 备用^[13]。

2.5.2 接收液的选择 透皮接收液应该具有透过皮肤药物的能力以及合适的酸碱值和渗透压, 不宜过酸过碱且应符合人体的生理环境。根据预实

验饱和和溶解度的测定结果，本实验采用 pH 6.8 的 PBS 作为透皮接收液。

2.5.3 体外透皮实验 将处理好的离体大鼠皮肤固定于改良的 Franz 扩散池的供给池与接收池（容积为 15 mL，有效渗透面积为 1.54 cm²）之间。将 pH 6.8 PBS 注入接收池中作为接收液，排出空气，使真皮一侧与接收液之间无气泡^[14]。用夹板将体系固定好，设定系统温度为（37±0.2）℃，在温度恒定后，取盐酸青藤碱紫苏油乳膏 0.10 g，均匀平铺于大鼠皮肤上，恒速搅拌并开始计时，分别在开始后 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h，从接收池取接收液 1.0 mL 同时补加 1.0 mL 37℃ 已预热好的 pH 6.8 PBS。按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，分别计算青藤碱、紫苏醛的 24 h 单位面积累积透过量 Q_n （ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ）。

$$Q_n = [C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i \times V_i)] / S$$

C_n 为第 n 个取样点测得的质量浓度（ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）， C_i 为第 i 个取样点测得的质量浓度（ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）， S

为 Franz 扩散池有效扩散面积（cm²）， V 为扩散池的接收池的体积（mL）， V_i 为取样量（mL）。

2.6 响应面优化实验设计

2.6.1 因素与水平的建立 根据 Design-Expert 13 软件的 Box-Behnken 实验设计原理，综合单因素实验结果，以十八醇占比 /%（A）、CO-40 占比 /%（B）、SDS 占比 /%（C）为考察因素，以 K_c 、青藤碱和紫苏醛的 24 h 单位面积累积透过量（ Q_n 青藤碱、 Q_n 紫苏醛）为考察指标，并以外观性状为辅助评价指标进行三因素三水平实验，因素与水平见表 1，响应面实验设计及结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 设计水平与因素表
Tab 1 Level and factor of Box-Behnken design

水平	因素		
	A. 十八醇 /%	B. CO-40/%	C. SDS/%
-1	7	2	2
0	9	3	3
1	11	4	4

表 2 响应面实验设计及结果

Tab 2 Response surface test design and results

序号	十八醇 /%	CO-40/%	SDS/%	K_c /%	Q_n 青藤碱/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Q_n 紫苏醛/ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	外观性状
1	7	2	3	23.70	214.88	32.78	质地稀
2	11	2	3	7.86	194.16	29.10	质地黏稠，不易涂抹
3	7	4	3	75.22	304.49	41.45	质地偏稀
4	11	4	3	36.72	205.76	34.77	质地过于黏稠，搅拌困难
5	7	3	2	44.29	255.23	52.74	乳化不完全，色泽不均匀
6	11	3	2	17.53	221.02	48.50	质地黏稠，光泽度差
7	7	3	4	38.09	275.45	52.59	质地太稀，流动性过强
8	11	3	4	17.46	206.75	45.26	质地黏稠，不易搅拌均匀
9	9	2	2	-4.74	419.38	45.27	乳化不完全，色泽不均一
10	9	4	2	57.1	448.97	43.76	质地微稀
11	9	2	4	14.96	412.33	40.72	质地稀
12	9	4	4	31.12	460.97	49.31	质地稀，不易滞留在皮肤上
13	9	3	3	5.26	487.76	56.14	色泽均匀，质地光滑细腻；黏稠度均一，有亮白色光泽
14	9	3	3	3.76	504.64	56.63	色泽均匀，质地光滑细腻；黏稠度均一，有亮白色光泽
15	9	3	3	5.13	500.92	54.96	色泽均匀，质地光滑细腻；黏稠度均一，有亮白色光泽
16	9	3	3	5.04	489.76	57.08	色泽均匀，质地光滑细腻；黏稠度均一，有亮白色光泽
17	9	3	3	4.39	500.76	55.45	色泽均匀，质地光滑细腻；黏稠度均一，有亮白色光泽

2.6.2 回归模型的建立与方差分析 以 K_c 值为响应值，得到多元二次回归方程为 $K_c = 4.72 - 12.72A + 19.80B - 1.57C - 5.67AB + 1.53AC - 11.42BC + 17.95A^2 + 13.21B^2 + 6.68C^2$ 。

由表 3 方差分析表可知，一次项 A、B、C，交互项 AB、BC 及二次项 A²、B²、C² 对 K_c 值影响极显著，交互项 AC 对 K_c 值影响显著。对乳膏 K_c 值影响大小的顺序为：B > A > C（即 CO-40 > 十八醇 > SDS）。此模型的 $P < 0.0001$ ，达到极显著水平。

以 Q_n 青藤碱 值为响应值，得到多元二次回归方

程式 Q_n 青藤碱 = 496.77 - 27.80A + 22.43B + 1.36C - 19.50AB - 8.62AC + 4.76BC - 231.37A² - 35.57B² - 25.78C²。

由表 4 方差分析表可知，一次项 A、B，交互项 AB，二次项 A²、B²、C² 对 Q_n 青藤碱 影响极显著，交互项 AC 对 Q_n 青藤碱 影响显著，一次项 C、交互项 BC 对 Q_n 青藤碱 影响不显著。对乳膏 Q_n 青藤碱 影响大小的顺序为：A > B > C（即十八醇 > CO-40 > SDS）。此模型的 $P < 0.0001$ ，达到极显著水平。

表 3 K_c 回归模型方差分析

Tab 3 Variance analysis for the established K_c regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.610×10^3	9	8.450×10^2	7.099×10^2	< 0.0001
A	1.293×10^3	1	1.293×10^3	1.086×10^3	< 0.0001
B	3.135×10^3	1	1.350×10^2	2.632×10^3	< 0.0001
C	19.690	1	19.690	16.530	0.0048
AB	1.280×10^2	1	1.280×10^2	1.078×10^2	< 0.0001
AC	9.390	1	9.390	7.890	0.0262
BC	5.216×10^2	1	5.216×10^2	4.380×10^2	< 0.0001
A^2	1.356×10^3	1	1.356×10^3	1.138×10^3	< 0.0001
B^2	7.350×10^2	1	7.350×10^2	6.170×10^2	< 0.0001
C^2	1.870×10^2	1	1.870×10^2	1.580×10^2	< 0.0001
残差	8.340	7	1.190	—	—
失拟项	6.750	3	2.250	5.650	0.0639
纯误差	1.590	4	0.398	—	—
总和	7.619×10^3	16	—	—	—

表 4 Q_n 青藤碱 回归模型方差分析

Tab 4 Variance analysis for the established Q_n sinomenine regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.541×10^5	9	2.824×10^4	6.070×10^2	< 0.0001
A	6.180×10^3	1	6.180×10^3	1.330×10^2	< 0.0001
B	4.025×10^3	1	4.025×10^3	86.490	< 0.0001
C	14.850	1	14.850	0.3190	0.5898
AB	1.521×10^3	1	1.521×10^3	32.690	0.0007
AC	2.970×10^2	1	2.970×10^2	6.390	0.0393
BC	90.730	1	90.730	1.950	0.2053
A^2	2.254×10^5	1	2.254×10^5	4.844×10^3	< 0.0001
B^2	5.328×10^3	1	5.328×10^3	1.140×10^2	< 0.0001
C^2	2.798×10^3	1	2.798×10^3	60.150	0.0001
残差	3.250×10^2	7	46.530	—	—
失拟项	1.000×10^2	3	33.440	0.594	0.6516
纯误差	2.250×10^2	4	56.350	—	—
总和	2.545×10^5	16	—	—	—

以 Q_n 紫苏醛 值为响应值, 得到多元二次回归方程式 Q_n 紫苏醛 = $56.05 - 2.74A + 2.68B - 0.2988C - 0.75AB - 0.7725AC + 2.53BC - 8.26A^2 - 13.27B^2 + 1.98C^2$ 。

由表 5 方差分析表可知, 一次项 A、B, 交互项 BC, 二次项 A^2 、 B^2 对 Q_n 紫苏醛 影响极显著, 二次项 C^2 对 Q_n 紫苏醛 影响显著, 一次项 C, 交互项 AB、AC 对 Q_n 紫苏醛 影响不显著。对乳膏 Q_n 紫苏醛 影响大小的顺序为: A > B > C (即十八醇 > CO-40 > SDS)。此模型的 $P < 0.0001$, 达到极显著水平。

2.6.3 各因素交互作用 在回归模型方差分析结果的基础上, 运用 Design-Expert 13 软件依据回归方程绘制等高线图及响应面图。响应面图曲面越陡, 等高线越密集, 表示对考察指标的影响越显著^[11, 15]。

分析十八醇、CO-40、SDS 对乳膏离心稳定性常数 K_c 的影响, 结果见图 4。综合方差分析表中 F 值可知各因素交互作用对 K_c 值的影响大小为 BC > AB > AC。

表 5 Q_n 紫苏醛 回归模型方差分析

Tab 5 Variance analysis for the established Q_n perillaldehyde regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.231×10^3	9	1.370×10^2	78.900	< 0.0001
A	60.120	1	60.120	34.680	0.0006
B	57.350	1	57.350	33.090	0.0007
C	0.714	1	0.714	1.000	0.5414
AB	2.250	1	2.250	1.300	0.2921
AC	2.390	1	2.390	1.380	0.2790
BC	25.500	1	25.500	14.710	0.0064
A^2	2.870×10^2	1	2.870×10^2	1.657×10^2	< 0.0001
B^2	7.410×10^2	1	7.410×10^2	4.280×10^2	< 0.0001
C^2	16.510	1	16.510	9.530	0.0177
残差	12.130	7	1.730	—	—
失拟项	9.180	3	3.060	4.140	0.1016
纯误差	2.950	4	0.738	—	—
总和	1.244×10^3	16	—	—	—

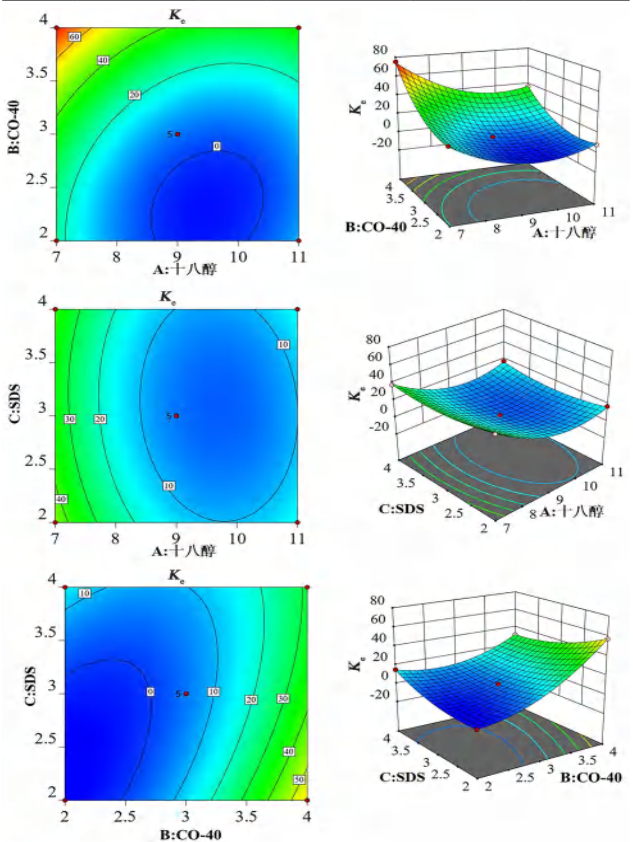


图 4 各因素交互作用对 K_c 值的影响

Fig 4 Influence of interaction of various factors on K_c value

分析十八醇、CO-40、SDS 对乳膏 Q_n 青藤碱 的影响, 结果见图 5。综合方差分析表中 F 值可知各因素交互作用对 Q_n 青藤碱 的影响大小为 AB > AC > BC。

分析十八醇、CO-40、SDS 对乳膏 Q_n 紫苏醛 的影响, 结果见图 6。综合方差分析表中 F 值可知各因素交互作用对 Q_n 紫苏醛 的影响大小为 BC > AC > AB。

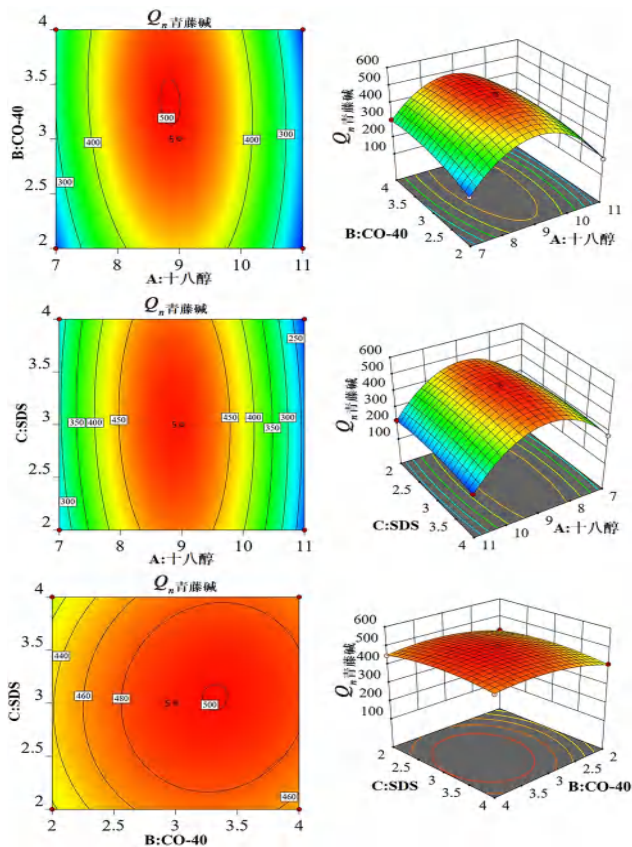


图 5 各因素交互作用对 Q_n 青藤碱的影响
Fig 5 Influence of interaction of various factors on Q_n sinomenine

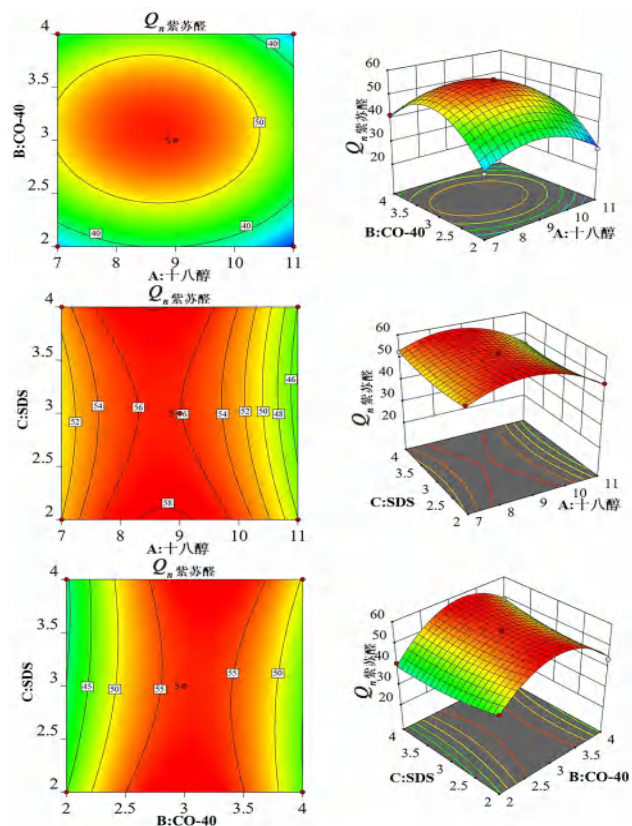


图 6 各因素交互作用对 Q_n 紫苏醛的影响
Fig 6 Influence of interaction of various factors on Q_n perillaldehyde

2.6.4 工艺验证及体外释放拟合 根据响应面分析软件所得到的理论最佳制备工艺为：十八醇占比 8.987%，CO-40 占比为 2.934%，SDS 占比为 2.990%。此条件下预测所得的乳膏 K_c 为 3.560%，24 h Q_n 青藤碱 为 $495.288 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ， Q_n 紫苏醛 为 $55.840 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

结合实际操作可行性，确定最佳制备工艺条件为：十八醇占比 9%，CO-40 占比为 3%，SDS 占比为 3%，在此条件下平行进行 3 次实验，得到平均 K_c 为 2.74%，平均 24 h Q_n 青藤碱 为 $497.77 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，平均 24 h Q_n 紫苏醛 为 $55.91 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，与预测值基本一致。

以青藤碱、紫苏醛单位面积累计透过量 Q_n 对时间 t 作图，采用零级、一级、Higuchi、Ritger-peppas 进行动力学模型拟合。其释药机制模型见表 6。结果表明青藤碱的释放机制为 Higuchi，释药机制以扩散为主；紫苏醛的释放机制为 Ritger-Peppas，其中扩散系数为 1.6331，大于 0.89，表示药物主要以溶蚀方式进行释放。

表 6 释药机制拟合

Tab 6 Drug release mechanism fitting			
药物	模型	拟合方程	R^2
青藤碱	零级	$Q = 18.569t + 83.873$	0.9344
	一级	$Q = 5.316 \times 10^2 (1 - e^{-0.0955t})$	0.9874
	Higuchi	$Q = 1.08 \times 10^2 t^{1/2} - 36.092$	0.9976
	Ritger-Peppas	$Q = 79.890t^{0.5758}$	0.9942
紫苏醛	零级	$Q = 2.097t - 1.614$	0.8742
	一级	$Q = 1.173 \times 10^5 [1 - e^{(-1.159 \times 10^{-5}t)}]$	0.8475
	Higuchi	$Q = 10.637t^{1/2} - 11.492$	0.6614
	Ritger-Peppas	$Q = 0.3069t^{1.6331}$	0.9337

2.7 最优处方流变学评价

根据实验研究表明，乳膏剂流变学参数硬度应控制在 12 ~ 15 g 为宜，黏度应控制在 200 ~ 280 $\text{g} \cdot \text{s}$ 为宜，黏性指数（绝对值）应控制在 120 ~ 180 $\text{g} \cdot \text{s}$ 为宜，黏聚性（绝对值）应控制在 7 ~ 10 g 为宜。本乳膏上述各项指标均达到乳膏剂的要求，流变学评价结果见表 7。

表 7 最优处方流变学评价 ($n = 3$)

Tab 7 Rheological evaluation of optimal prescriptions ($n = 3$)	
流变学指标	平均值 \pm SD
硬度 /g	16.3 ± 1.04
黏聚性 /g	7 ± 0.5
涂布性 / ($\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$)	0.34 ± 0.005
黏度 / ($\text{g} \cdot \text{s}$)	231.41 ± 17.07
黏性指数 / ($\text{g} \cdot \text{s}$)	130.52 ± 11.87

2.8 体外透皮对比实验

为了评估紫苏油对盐酸青藤碱体外释放的影响,按最优处方比例制备两种乳膏制剂。一种乳膏将紫苏油作为添加剂,将另一种不含紫苏油的乳膏作为对照组。平行进行 3 组实验。结果表明未添加紫苏油的乳膏中 Q_n 青藤碱 仅为 $(381.6 \pm 5.10) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 而添加了紫苏油的乳膏中 Q_n 青藤碱 高达 $(497.77 \pm 6.88) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

3 讨论

盐酸青藤碱显酸性,会与碱性辅料如主乳化剂 SDS 反应,使乳膏不稳定,故本研究采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠将盐酸青藤碱药液调节 pH 为弱碱性,以此提高乳膏的稳定性。但氢氧化钠为强电解质,会降低乳化效果以及黏稠度,CO-40 作为一种优良的非离子型增溶剂及乳化剂,乳化时间迅速^[16],并具有较宽的 pH 值稳定性,因此本研究选择复合乳化剂 CO-40、主乳化剂 SDS 及助乳化剂 GMS,以上三者联用有较好的乳化效果。其中 GMS 还可增加油相基质的稠度,与凡士林和十八醇调配比例,共同使乳膏具有良好的乳化效果及黏稠度。

体外透皮对比实验结果显示,紫苏油能够作为一种天然的促透剂,提升盐酸青藤碱透过皮肤的能力,在没有添加紫苏油的情况下,盐酸青藤碱的 24 h 单位面积累计透过量仅为 $381.6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,这表明紫苏油与盐酸青藤碱共同使用时,能发挥“药辅协同”的效果^[17-18],有效提高药物的透皮吸收效率。

4 结论

本研究建立了盐酸青藤碱紫苏油乳膏中有效成分青藤碱、紫苏醛含量的高效液相色谱检测方法,具有较高的分离度和优良的稳定性。采用转相法制备水包油型乳膏,在单因素考察实验的基础上运用响应面法优化最佳制备工艺,此法制备所得的基质其内相被分散得很均匀细腻,所制备的乳膏外观光滑细腻有光泽^[19],具有良好的离心稳定性及较理想的体外透过性,并且其流变学指标达到了预期的标准。研究表明紫苏醛的释放机制为 Ritger-Peppas,青藤碱的释放机制为 Higuchi,可为后续工业化生产奠定基础。

参考文献

[1] 程亮,韩腾飞,李莎莎,等.盐酸青藤碱微囊的制备及其质量评价[J].中草药,2012,43(5):880-884.
[2] 王玺,张智勇,仇萍,等.青风藤、青藤碱及其相关制

剂的研究进展[J].中国药学杂志,2021,56(2):85-93.
[3] 李晓杰,范博,任雷,等.盐酸青藤碱传递体关节贴剂的制备与性能评价[J].广东化工,2023,50(20):38-40,14.
[4] 张二兵,刘文亮,胡胜涛,等.盐酸青藤碱治疗类风湿关节炎新剂型研究进展[J].中成药,2022,44(4):1214-1218.
[5] 邓艳平,肖衍宇,平其能,等.盐酸青藤碱缓释组合微丸系统的研究[J].中国药科大学学报,2009,40(3):222-226.
[6] 张良琦,李文姣,肖美凤.紫苏不同部位活性成分比较及其药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2023,48(24):6551-6571.
[7] 刘锦萍,罗西亚,徐剑,等.12个生物碱类化合物的经皮渗透定量结构-性质关系研究[J].中药材,2024,47(6):1499-1504.
[8] 徐莹莹,周珊珊,温乐,等.中华眼镜蛇神经毒素可溶性微针的制备、表征及其离子皮肤渗透研究[J].中草药,2024,55(12):3966-3976.
[9] 张璐,李兆玉,蔡文腾,等.星点设计-效应面法优化黄玉膏成型工艺研究[J].中国现代应用药学,2022,39(4):467-474.
[10] 李佳,韩子璇,杨立茹,等.院内制剂(协方)骨痹合剂纯化工艺研究[J].亚太传统医药,2024,20(4):58-62.
[11] 陶晓倩,张强,付慧敏,等.基于 Box-Behnken 响应面法优化紫苏叶挥发油提取工艺的研究[J].中南药学,2023,21(2):369-374.
[12] 彭丽华,袁铁军,高进,等.麝香舒活灵水凝胶剂的制备与体外评价[J].中草药,2023,54(1):92-99.
[13] 曲彤,康希,郝慧汇,等.D-最优混料设计制备姜黄疗癣乳膏及其体外透皮特性研究[J].中药材,2020,43(6):1434-1440.
[14] 张咏,王庆伟,赵欢欢,等.复方根皮素乳膏中根皮素、藁本内酯体外透皮吸收研究[J].中国药师,2017,20(6):1038-1041.
[15] 付慧敏,乔子桐,张纯刚,等.响应面法优化改性明胶软胶囊囊壳制备工艺[J].中南药学,2022,20(4):793-799.
[16] 陈欣悦,贺文娟,邹会林,等.杏香兔耳风乳膏处方的优化及质量评价[J].中成药,2023,45(5):1610-1615.
[17] 郭雪,陈金素,许蕊蕊,等.基于“药辅合一”的桉叶油乳膏的制备及药效研究[J].中国现代中药,2022,24(4):576-582.
[18] 许蕊蕊,陈金素,李越,等.基于“药辅合一”制备艾天羊肌肉关节通络膏 II 并评价药效[J].中国现代中药,2021,23(10):1803-1808.
[19] 王森,任翔,朱卫丰,等.基于凝胶网状结构的中药提取物与乳膏基质相容性研究——中药提取物对司盘 60-吐温 80 复配乳化剂乳膏的凝胶网络结构性能的影响[J].世界科学技术(中医药现代化),2011,13(6):1043-1047.

(收稿日期:2024-10-11;修回日期:2024-12-09)

综述

独脚金内酯在植物应对非生物胁迫中的作用 及其在药用植物中的应用展望

邢路¹, 和爽¹, 牛昱婷², 周静^{1,4}, 薛超³, 张正阳¹, 辛乔艺¹, 张东东^{1,4}, 李玉泽^{1,4}, 张化为^{1,4}, 姜祎^{1,4}, 邓翀^{1,4}, 王薇^{1,4}, 宋小妹^{1,4}, 黄文丽^{1,4*} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 西安近代化学研究所, 西安 710065; 4. 陕西省太白七药研究与应用重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 独脚金内酯是由类胡萝卜素衍生的倍半萜内酯分子, 作为一种新型植物激素, 可调节植物的生长发育, 提高植物的抗逆性。现如今, 干旱、土地营养匮乏、极端天气、重金属含量超标、土地盐碱化等, 严重影响药用植物的生长发育、药材有效成分的积累和药材的外观品质等。因此, 针对我国地理环境、气候特点和药材各自生理特点, 培育出具有抗性的优良品种或利用植物生长激素调节以更好地适应各种非生物胁迫, 已成为解决中药材资源短缺, 挽救濒危药用植物的重要战略措施。独脚金内酯的生物学功能及其在促进植物应对非生物胁迫中的重要调节作用, 为培育高产、“优形优质”的药用植物提供了全新的思路, 使其在药用植物种植栽培育种及提高药用植物的抗逆性方面具有巨大的应用潜力。基于此, 本文综述了独脚金内酯的生物学功能及其在植物受到非生物胁迫时的调节作用, 并展望了独脚金内酯定向调控药用植物生长发育的应用前景, 以期独脚金内酯在药用植物领域的应用研究提供思路 and 方向。

关键词: 独脚金内酯; 非生物胁迫; 抗逆性; 药用植物

中图分类号: R283, S567 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0468-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.027

Role of strigolactones in plant responses to abiotic stress and their prospects in medicinal plants

XING Lu¹, HE Shuang¹, NIU Yu-ting², ZHOU Jing^{1,4}, XUE Chao³, ZHANG Zheng-yang¹, XIN Qiao-yi¹, ZHANG Dong-dong^{1,4}, LI Yu-ze^{1,4}, ZHANG Hua-wei^{1,4}, JIANG Yi^{1,4}, DENG Chong^{1,4}, WANG Wei^{1,4}, SONG Xiao-mei^{1,4}, HUANG Wen-li^{1,4*} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an Shaanxi 712046; 3. Xi'an Modern Chemistry Research Institute, Xi'an 710065; 4. Shaanxi Key Laboratory of Research and Application of "Taibai Qi Yao", Xi'an Shaanxi 712046)

Abstract: Strigolactones (SLs), which are sesquiterpene lactone molecules derived from carotenoids, act as a new type of plant hormones that regulate the growth and development of plants and enhance their stress resistance. Currently, factors such as drought, nutrient deficiency in the soil, extreme weather conditions, excessive heavy metal content, and soil salinization can all affect the growth and development of medicinal plants, the accumulation of active ingredients in medicinal materials,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81903751); 陕西省科技厅社发重点项目 (No.2024SF-GJHX-05); 陕西省大学生创新创业训练计划项目 (No.S202310716045, No.202410716038); 陕西中医药大学科研项目 (No.2023GP26); 陕西中医药大学科技创新人才体系建设计划 (No.2023-CXTD-05)。

作者简介: 邢路, 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物中重金属元素吸收转运及积累机制研究, email: lux1ng@126.com *通信作者: 黄文丽, 女, 副教授, 主要从事药用植物中重金属元素吸收转运及积累机制研究, email: heng_long531@163.com

and the appearance of medicinal herbs. Thus, in light of China's geographical environment, climatic characteristics, and the physiological traits of each medicinal herb, cultivating varieties with resistance or regulating plant growth hormones to better adapt to abiotic stresses becomes a crucial strategic measure to address the shortage of traditional Chinese medicine resources and rescue endangered medicinal plants. The biological functions of SLs and their regulatory roles in facilitating plants' responses to abiotic stress offer a novel approach for cultivating high-yield, medicinal plants with superior in shape and quality, and demonstrate vast application potential in the cultivation, breeding, and improvement of stress resistance of medicinal plants. This article reviewed the biological functions of SLs and their regulatory roles when plants are subjected to abiotic stress, and application prospects of the directional regulation of the growth and development of medicinal plants by SLs.

Key words: strigolactone; abiotic stress; stress resistance; medicinal plant

在自然界中，植物不断受到来自气候、地理环境等非生物因素引起的对其生存不利的各种挑战，如高温、寒冷、干旱、营养缺乏、盐碱以及重金属毒害等^[1]。随着现代化社会的快速发展，极端天气事件的频发，植物在生长过程中所遭受的非生物胁迫越来越频繁，严重影响农作物的质量与产量，不仅对全球粮食安全造成威胁，而且干扰药用植物的生长发育及其有效成分的积累，影响药材质量的安全性、有效性及可控性。为了应对外界环境的挑战，植物进化出各种各样的生存策略，如合成保护物质、调节水分、传递激素信号、抗氧化防御和调控转录等。其中，植物激素对于增强植物对环境挑战的抵抗力至关重要。植物激素是由植物自身代谢产生的，在低浓度下具有明显调节自身生理过程（促进或抑制）的一类微量有机物质^[2]。传统的植物激素包括生长素类、赤霉素类、细胞分裂素类、乙烯、脱落酸和油菜素甾醇类、多胺、茉莉酸、水杨酸类等，研究表明，这些激素在植物茎生长、叶片形成^[3]、茎枝分枝、开花^[4-7]、结果^[8]、根发育、维管分化^[9]和衰老^[10-12]等方面扮演了重要作用^[13]。除此之外，一种被称为“生物信号”的新型植物激素——独脚金内酯（SLs），也在植物生长过程中显现出潜在作用，引起了研究者的广泛关注。

独脚金内酯是独脚金醇类化合物及人工合成类似物的总称。研究者最初从棉花的根系分泌物中发现独脚金内酯类物质可诱导独脚金的种子萌发^[14]。随后，Akiyama 等^[15]发现并证实了独脚金内酯是植物-丛枝菌根真菌（AMF）共生形成的信号物质，可诱导 AMF 菌丝分枝和趋向性生长。近几年研究发现，独脚金内酯能够抑制植物的枝条分枝^[16-19]、调节腋芽的生长^[20]、参与植物的根系发育^[21]，故将其定义为一种新型植物激素。随着对该类植物激素研究的不断深

入，科学家们对独脚金内酯的生物合成、运输和信号传导途径等有了更全面的认识。独脚金内酯作为一种抗逆的调控因子，具有分子信号作用，能够帮助植物迅速适应环境的变化，参与多种非生物胁迫过程。本文主要综述独脚金内酯在植物受到非生物胁迫时的调节作用，围绕其生物活性、作用机制进行简要分析，以期该类植物激素在参与药用植物非生物胁迫时的作用机制及应用研究提供思路 and 方向。

1 独脚金内酯的结构

独脚金内酯是一种由类胡萝卜素衍生出的倍半萜内酯，目前已分离鉴定出 30 多种天然的独脚金内酯化合物，还有部分化合物的结构有待进一步确定^[22]。独脚金内酯是 ABC 三环内酯结构，由烯醇醚键与 D 环（ α, β - 不饱和呋喃酮部分）连接。根据 BC 两环的立体结构，将独脚金内酯分为典型和非典型两类，又因为醇羟基在 BC 环的差异，典型独脚金内酯可分为 Orobanchol 型和 Strigol 型（见图 1）。由于天然的独脚金内酯结构复杂且自然产量低，而且通过分离提取得到该类化合物难度大、成本高，所以化学合成成为目前获取独脚金内酯的主要手段，其中以 GR24 为代表的合成类似物成为植物科学研究中使用最广泛的代表性独脚金内酯衍生物（见图 1）。

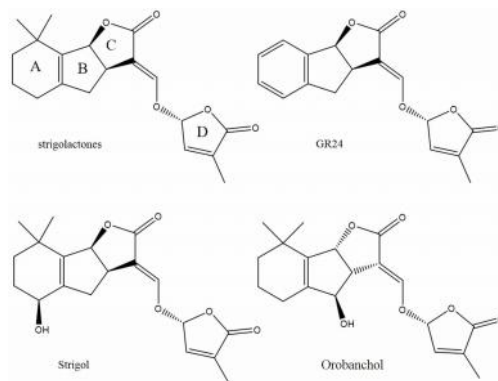


图 1 独脚金内酯及其衍生物的化学结构

Fig 1 Chemical structure of SLs and their derivatives

2 独脚金内酯在植物生长发育中的作用

2.1 独脚金内酯与 AMF 共生促进植物生长

独脚金内酯和 AMF 之间的协同作用是经过数百万年植物和真菌之间的共同进化形成的, 随着时间的推移, 植物和真菌发展出复杂的机制进行资源和营养的交换, 建立了共生关系。植物释放独脚金内酯吸引 AMF, 独脚金内酯作为根际信号分子, 刺激 AMF 中的菌丝分枝和根系寄生植物的种子萌发, 促进 AMF 的孢子发育、菌丝的分化和扩大等^[23]。同样, AMF 也给寄主带来了各种益处, 包括增加养分吸收, 特别是对磷 (P) 元素的吸收, 诱导植物产生对病原体、害虫和非生物胁迫更强的抵抗力^[24]。同时, AMF 的共生也可以显著提高寄主植物中独脚金内酯的含量, 增强独脚金内酯感知和信号传导, AMF 的存在可能通过产生特定的酶或信号分子, 如菌根化 (Myc) 成分, 直接或间接影响独脚金内酯受体的表达或活性, 从而使植物对独脚金内酯信号更敏感^[25]。因此, 独脚金内酯促进了植物与 AMF 之间的共生关系, AMF 和独脚金内酯的协同调控促进了植物的生长发育, 提高了对养分的利用率及抗逆性。

2.2 调控植物根系生长

根系是植物汲取营养物质和水分的主要器官。越来越多的研究发现独脚金内酯在初生根 (PR) 的形成、侧根 (LR) 和不定根 (AR) 的发育以及根毛的伸长中起重要作用。独脚金内酯促进 PR 和根毛的伸长, 抑制 LR 和 AR 的形成。例如, 在拟南芥中, 施加外源 GR24 使得 PR 根长增加, 过渡区和分生组织区的细胞数量增加^[26]。外源性 GR24 的应用抑制拟南芥和豌豆 AR 的形成^[27]。在番茄根系研究中发现, 经 GR24 处理后, 野生型 (WT)、*max3-11* 和 *max4-1* 突变体中显示出 LR 数量减少、根毛长度增加, 而 *max2-1* 突变体对 GR24 不敏感, LR 和根毛没有明显变化, 因此, 独脚金内酯对 LR 和根毛的影响可能由 *MAX2* 基因介导^[28]。

2.3 调节植物分枝生长

枝条分枝依赖于叶腋中腋生分生组织的形成以及通过遗传、激素和环境调节的信号精确调控侧枝的生长。独脚金内酯可以直接或间接地抑制腋芽的生长。在拟南芥中, 独脚金内酯通过 *MAX* 依赖的途径抑制枝条分枝^[18], 也通过 *SMXLs* (*MAX2* 抑制因子) 与生长素协同调节枝条分枝^[29]。*BRC1* (*BRANCHED1*) 是一种抑制腋芽的因子, *SMXL* 可以抑制 *BRC1* 表达并促进分枝^[30], 独脚金内酯对

SMXL 的靶向降解改变了其促进作用, 从而抑制了植物分枝, 目前, 已经在豌豆、拟南芥、玉米和水稻中独脚金内酯途径下游中发现存在 *BRC1*^[31]。

2.4 诱导根寄生植物种子萌发

1966 年, Cook 等^[14]首次发现独脚金内酯类物质可以促进根寄生 *Striga* 种子的萌发。当独脚金内酯从根部释放到土壤中时, 其在根际中作为宿主衍生的信号促进寄生植物种子萌发^[32]。人工合成的 GR24 能显著提高抗氧化酶的活性和抗胁迫物质的积累, 通过调节脱落酸和赤霉素合成信号通路来促进种子萌发^[33]。而且, 独脚金内酯对于处在胁迫下的种子萌发同样具有促进作用, 独脚金内酯通过增强抗氧化能力来减轻盐胁迫对黄瓜种子萌发的不利影响, 从而促进种子萌发^[34]。

2.5 调节叶片衰老

叶片衰老是一个复杂的过程, 经过叶绿体降解、核酮糖二磷酸羧化酶 (*Rubisco*) 和叶绿素 a/b 结合蛋白 (CAB) 变性等一系列变化由绿色变为黄色^[35]。独脚金内酯缺陷和独脚金内酯不敏感的突变体表现出迟缓的叶片衰老过程, 外源性应用 GR24 后恢复了水稻独脚金内酯缺乏突变体的叶色、叶绿素含量和电解质渗漏率, 但不能恢复独脚金内酯不敏感突变体的衰老进程, 此外磷酸盐缺乏的植物内源性独脚金内酯水平增加, 通过抑制腋芽生长并加速叶片衰老, 以此充分利用有限的养分来适应环境^[36]。

2.6 促进色素积累

独脚金内酯通过多种机制影响植物的色素积累, 如促进花青素的合成与积累, 调节叶绿素和类胡萝卜素的含量, 以及影响光合色素的积累和光合能力等。独脚金内酯通过激活 *PAP1*、*PAP2*、*MYB113* 和 *MYB114* 的表达, 上调花青素合成基因 *DFR*、*ANS* 和 *TT7* 的表达, 从而促进花青素的合成与积累^[37]。在番茄中, 独脚金内酯受体基因 *SID14* 不仅调节根、枝、叶的发育, 还起到调节光合色素积累的作用。*sld14* 突变植物叶片呈浅绿色, 叶绿素和类胡萝卜素含量降低, 叶绿体结构异常, 光合能力降低。转录组学分析表明, *sld14* 植物中叶绿素生物合成基因、类胡萝卜素生物合成基因和叶绿素 a/b 结合蛋白基因的转录水平降低^[38]。独脚金内酯通过其信号传导机制, 影响光合色素的积累和植物的光合能力, 对于植物的生长发育以及对逆境的适应都至关重要。

3 独脚金内酯在植物应对非生物胁迫中的作用

3.1 矿质营养元素匮乏

氮 (N) 和磷是植物生长和发育所需的重要营养元素。氮元素是植物体内蛋白质和核酸的重要组成成分, 促进细胞分裂和植物生长; 磷元素是植物体内三磷酸腺苷 (ATP) 和 DNA 的重要组成成分, 能够促进植物的根系生长、分枝以及根毛生长。在低磷条件下会出现 PR 受到抑制和 LR 的形成增加^[39], 这可以提高植物从富含磷的表土层中增加吸收磷的能力^[40]。与低磷相比, 氮的缺少会刺激 PR 特别是 LR 伸长, 但不会刺激 LR 的形成^[41], 在严重的氮短缺下, LR 几乎不形成^[42], 这表明植物需要一定量的氮来维持从地下吸取营养。独脚金内酯是植物根系生长的重要调节剂, 通过调节植物根系和地上部分结构适应磷、氮的缺乏。在低磷条件下, 独脚金内酯正向刺激番茄 PR 和 LR 的长度^[43]。同样, 拟南芥经 GR24 处理后, LR 的长度增加^[26], 伸长的 PR 和 LR 有助于植物向下汲取养分。进一步的研究发现, 磷、氮的缺乏诱导植物中独脚金内酯的形成增加, 并通过 D3 途径调节根系生长适应环境。在低磷、低氮条件下, 水稻中独脚金内酯的生成增加, 独脚金内酯生物合成基因 *D10*、*D17* 和 *D27* 的表达升高, 在施用 GR24 后可恢复野生型、*d10* 和 *d27* 突变体的种子根长度和 LR 密度, 但不能恢复 *d3* 突变体^[44]。此外, 一氧化氮 (NO) 被认为也参与了植物的根系生长, 有研究表明在磷和氮缺乏的情况下, 独脚金内酯与 NO 共同调节根系伸长, 而且 NO 触发了 D53 蛋白水平降低从而促进植物体内独脚金内酯的生成^[45]。独脚金内酯在营养胁迫中的作用, 对于在营养缺乏的土壤中促进植物生长具有很大的应用潜力。

3.2 干旱胁迫

干旱是影响植物生长发育的重要环境影响因素。植物在长期的进化过程中形成了各种防御和自我保护机制, 以应对干旱胁迫的影响, 包括调节叶片的光合作用, 清除多余的活性氧 (ROS), 关闭叶片气孔, 激活抗氧化系统, 增加渗透物质, 维持细胞中一定的膨压, 最终维持植物在干旱胁迫下的持续生长。独脚金内酯已被证明直接参与调节植物对干旱的适应, 缓解植物受到的损伤。紫花苜蓿在应用 GR24 后可以通过增强叶片的光合作用, 调控气孔关闭以减少水分蒸发, 缓解干旱对其造成的损伤; 还可以增强根系呼吸和清除过量 ROS 提高根系的活力^[46]。在葡萄幼苗中, GR24 处理能较好地诱导气孔闭合, 调节叶绿素成分, 抑制干旱引起的光合作用减少, 触发 ROS 清除机制, 此外, 还

可提高 ABA 水平^[47]。ABA 是调节水分状态和气孔运动的关键激素, 干旱条件下的植物在保卫细胞中产生并积累更多的 ABA, 使气孔闭合得以保存水分^[48]。独脚金内酯可以通过间接调节 ABA 来改变气孔关闭, 适应干旱。在水稻研究中发现, 干旱条件下独脚金内酯生物合成水稻突变体 *d10* 和 *d17* 的地上部分 ABA 浓度高于野生型植物, 而 *d27* 中叶子的 ABA 含量降低。*OsD27* 的过表达使得 ABA 水平升高, 因此独脚金内酯和 ABA 途径可能通过 *D27* 相互连接^[49]。此外, 独脚金内酯还可以缓解干旱胁迫对植物种子萌发的抑制作用^[50]。

3.3 重金属胁迫

随着社会工业化现代化进程的加快, 大量的重金属元素被释放到大气、水以及土壤中, 威胁植物的生长发育。重金属元素与必需的营养元素竞争进入植物体内, 干扰锌、铁、钙、锰、镁、硅、铜和钾等矿物质营养吸收, 阻碍植物正常生长或对植物产生毒害, 主要表现在以下几个方面: ①抑制植物光合作用的速率, 改变叶绿体的超微结构, 导致气孔关闭, 叶片会出现发育迟缓、失绿、干燥和坏死等中毒性症状^[51]; ②形成氧化应激, 增加植物的 ROS 产生, 导致蛋白质、脂质和核酸结构及功能的改变和丧失, 从而导致脂质过氧化、酶失活、DNA 断裂和突变, 影响植物生殖功能, 对植物产生遗传毒性^[52]; ③抑制植物呼吸作用与氮代谢^[53]; ④阻碍植物一般代谢, 干扰种子萌发^[54]等。独脚金内酯能够通过调节光合作用效率、叶片衰老、细胞壁固定、气孔关闭、抗氧化防御和营养动态平衡等各种生理生化过程, 缓解重金属对植物的毒害作用, 提高植物对重金属的耐受性。研究表明, GR24 抑制了柳树对镉 (Cd) 的吸收, 增加了必需元素如铁、锌、锰、铜的吸收, 降低了镉在枝条中的吸收和积累^[55]。独脚金内酯通过增强抗氧化酶的活性、降低 ROS 的产生来缓解植物受到的重金属胁迫。在大麦中, 镉胁迫显著降低了大麦根部和地上部分一氧化氮合酶 (NOS) 的活性, GR24 的加入使 NOS 活性增加, 有效地缓解了镉对超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性的抑制, 增强了细胞的抗氧化能力, 并作为一个长距离信号, 触发防御反应, 同时, 也增加了还原型谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸 (AsA) 和 AsA-GSH 循环中各种还原酶的活性, 降低了体内镉含量^[56]。AsA-GSH 循环在植物受到重金属胁迫时也发挥了巨大作用, 其主要途径是 AsA 在抗坏血酸过氧化物酶 (APX)

的作用下与过氧化氢 (H_2O_2) 反应生成水, 从而清除受胁迫所产生的 H_2O_2 。谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 和谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 参与植物对重金属耐受与解毒的过程, GPX 以 GSH 为底物催化 H_2O_2 、羟基过氧化物和脂过氧化物等还原, GST 通过与 GSH 结合清除内源产生的有毒亲电物质^[57]。研究表明, 褪黑素 (MT) 和独脚金内酯的使用有助于维持 AsA 和 GSH 的含量, 增强抗氧化酶、AsA 和 GSH 的调节以及基因转录的调节来诱导植物增强防御系统。经 MT 和独脚金内酯共同处理铬 (Cr) 胁迫下的番茄植株, 缓解了铬对番茄植株生长的毒害效应, 而且与抗氧化剂、胁迫反应机制和金属转运蛋白相关的基因表达也表现出上调的趋势^[58]。独脚金内酯也可以作为一种重要的生长调节剂来增强砷 (As) 的解毒机制, 刺激细胞抗氧化防御系统并促使水稻幼苗中砷的液泡隔离, 从而在细胞水平上缓解砷对水稻的不良影响^[59]。独脚金内酯在缓解重金属胁迫中的多方面作用为提高植物重金属的耐受性提供了全新的途径。因此, 研究独脚金内酯介导的重金属胁迫反应的特定分子机制及其与其他植物激素的相互作用, 有助于提高植物在重金属污染环境中的适应能力。

3.4 盐胁迫

盐胁迫通常伴随着氧化应激, 由于 ROS 的过量产生, 引起膜脂过氧化, 影响细胞的正常生理过程, 从而抑制植物的生长和发育, 还会干扰植物的光合作用和呼吸作用, 破坏离子平衡, 并降低酶、蛋白质和核酸的合成以及植物生长发育过程中有机物质的积累^[60]。独脚金内酯是植物对盐胁迫反应的正调节因子, 独脚金内酯缺陷和独脚金内酯信号突变体均表现出对盐胁迫的超敏反应^[61]。研究表明, 在盐胁迫下应用独脚金内酯可以提高其对 ROS 的清除反应, 减轻细胞损伤。对盐胁迫的油菜施加 GR24 后缓解了光合作用的降低, 并提高了 POD 和 SOD 的活性, 减少了脂质的过氧化^[62]。此外, ABA 可以诱导植物中独脚金内酯的积累, 提高植物盐胁迫的耐受性^[63]。

3.5 高温胁迫

高温会对植物造成毁灭性的伤害, 在植物发育的早期阶段, 高温会导致种子发芽率降低, 光合速率下降, 使植物生长受限, 如果环境温度达到极端水平, 植物会直接丧失活力^[64]。为了应对高温胁迫, 植物已经进化出一系列的生化策略, 如热休克因子和热休克蛋白的合成^[65], 激素如 ABA^[66]、乙

烯^[67]等介导的耐热性, 诱导抗氧化相关酶活性的增加^[68]以及渗透物质的积累等。独脚金内酯可以通过参与上述途径来提高植物的耐热性。GR24 可以提高窄叶羽扇豆种子萌发和幼苗发育过程的耐热性, 使高温下种子的发芽率升高, 脯氨酸含量增加, 脂质过氧化减少, 还可以缓解热应激引起的析氧复合物的损伤, 保证光合作用系统的耐热性^[69]。独脚金内酯还可以通过调节其他植物激素来提高植物的耐热性。独脚金内酯能正向调节番茄中 ABA 依赖性的耐热性, 通过诱导热休克蛋白 70 (HSP70) 积累、C-重复结合因子 1 (*CBF1*) 转录和抗氧化酶活性实现^[70]。同样, 在拟南芥中 GR24 通过调节两种植物激素 GA 和 ABA 的水平来缓解高温对种子萌发的抑制^[71]。MYB 转录因子 *AtMYBS1/AtMYBL* 基因表达受到热应激的抑制, 并通过直接抑制独脚金内酯生物合成基因 *MAX1* 的表达, 在植物耐热性中起负调控作用, 为独脚金内酯生物合成的相关基因调控网络提供了新思路^[72]。

3.6 低温胁迫

低温胁迫影响植物对营养成分的吸收、光合效率以及细胞膜功能, 进而影响植物的生长发育^[73]。而植物的防御机制是可塑的, 使其能在恶劣的环境下生存。植物通过调整其细胞膜组成的变化、ROS 清除系统的激活、基因表达的变化以及影响光合作用等途径来抵御低温^[74]。研究证明, 外源 GR24 显著缓解了低温胁迫对油菜幼苗的影响, 是通过提高幼苗的细胞存活率、增强抗氧化酶活性并改善光合作用途径来实现, 而且 GR24 还上调了相关基因的表达, 包括抗氧化酶基因、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶基因、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 基因和冷调节基因, 提高植物的耐冷性^[75]。C-重复结合因子/DRE 结合因子 1 (*CBF/DREB1*) 转录调控级联在调节植物的寒冷耐受性中也起到关键作用, 在研究拟南芥耐冷性的分子机制中发现, GR24 的应用可通过 *CBF* 依赖性途径正向调节拟南芥冷冻耐受性。其中, 转录因子 *WRKY41* 可作为 F-box E3 连接酶 MAX2 的底物, *WRKY41* 直接与 *CBF* 基因启动子的 W-box 结合并抑制 *CBF* 基因表达, 负调节耐冷性。*MAX2* 与 *WRKY41* 相互作用并泛素化介导 *WRKY41* 降解, 从而减轻 *WRKY41* 对 *CBF* 表达的抑制。此外, 独脚金内酯介导的 *SMXLs* 降解也有助于通过促进花青素的生物合成来增强植物的耐冻性^[76]。独脚金内酯还可以通过正向调节番茄中 ABA 依赖性的抗氧化反应来提高耐寒性^[70]。

3.7 光胁迫

光是植物生长发育的重要调节剂,可以调节植物的各种生理过程和信号级联,从而在细胞水平对植物产生影响。弱光胁迫会导致植物叶片过早衰老^[77],其引起的生长抑制与多种生理功能障碍有关,包括光合作用效率降低、生物固碳抑制、ROS 积累和膜脂过氧化^[78]。研究表明,独脚金内酯是植物光捕获的正调节因子,能使光捕获相关基因的表达增加^[79]。关于黄瓜^[80]和番茄^[81]中的研究均表明,GR24 能有效缓解光胁迫引起的植物生长的抑制作用,通过增加叶绿素含量,促进植物对光能的利用,提高光合作用效率,并提高植物抗氧化酶的活性和基因表达,从而提高植物对弱光的耐受性。

4 独脚金内酯在药用植物中的应用展望

中药疗效独特,作用显著,资源丰富,是中华民族独有的传统瑰宝。第四次全国中药资源普查结果显示,我国中药资源有 18 817 种,其中药用植物 15 321 种,占中药资源的 81.42%^[82],是支撑中医药产业的基础。随着近年来市场对中药需求量的增加,野生中药资源已难以满足人们的需要,人工栽培成为必然趋势。但在常用的 600 ~ 800 种药用植物中,可进行人工种植的药材只有 200 ~ 400 种^[83],大部分的药用植物仍然不可避免地要面对各种各样的环境问题,如干旱、土地营养匮乏、极端天气、重金属含量超标、土地盐碱化等,严重影响药用植物的生长发育、药材有效成分的积累和药材的外观品质等。因此,针对我国地理环境、气候特点和药材各自生理特点培育出具有抗性的优良品种或利用植物生长激素调节以更好地适应各种非生物胁迫,已成为解决中药材资源短缺,挽救濒危药用植物的重要战略措施,对于中药产业发展具有重要意义。独脚金内酯的生物学功能及其在促进植物适应非生物胁迫中的重要调节作用,使其在药用植物种植栽培及育种方面具有巨大的应用潜力。

4.1 独脚金内酯促进药用植物的种子萌发

据统计,中药材生产中用种子繁殖的种类约占 65%^[84],其中许多种类新采收的种子难以萌发,如人参、刺五加、羌活、黄连、五味子、北沙参和芍药等。独脚金内酯作为促进种子萌发的激素,适量使用可以诱导根寄生植物种子的萌发以及解除种子休眠,在种子萌发率低的药用植物中具有极大的应用前景。独脚金属 *Striga* spp.、列当属 *Orobanch* spp. 等种子萌发率低、寄生率低,独脚金内酯可

以诱导独脚金种子的萌发^[14],经 GR24 处理的分枝列当的种子萌发率达到了 70%^[85]。肉苁蓉为列当科肉苁蓉属 (*Cistanche*) 的多年生专性根寄生植物,种子萌发率低使得肉苁蓉产量不高。研究发现 GR24 可显著促进肉苁蓉种子萌发^[86],对肉苁蓉种植产业产量的增加具有重要意义,也为中药种植中种子休眠和萌发的调控提供新的策略。

4.2 独脚金内酯促进药用植物与 AMF 的共生

药用植物内生菌、根际微生物等中药微生态以各种不同的方式直接或间接地影响着药材品质^[87]。已有研究证明 AMF 可促进药用植物中有效成分的积累,经 AMF 适度侵染的三七中皂苷含量明显增加^[88]。大多数中药药效物质来源于次生代谢产物,AMF 可以促进中药次生代谢产物如酚酸类、黄酮类、生物碱类和萜类等的积累^[89]。独脚金内酯作为促进菌根共生的信号分子,能够促进 AMF 与药用植物的共生,且 AMF 和独脚金内酯的协同调控又进一步促进了药用植物的生长发育,提高有效成分的积累及植物抗逆性,提高药材品质,为药用植物的种植栽培提供了新思路。

此外,有研究表明,AMF 与药用植物共生在缓解连作障碍中具有极大的应用潜力。药用植物栽培的过程中普遍存在连作障碍的现象,约有 70% 的根茎类药用植物受到连作障碍的影响,如地黄、人参、西洋参、当归、黄连、三七等^[90]。连作障碍影响药用植物生长发育和次生代谢过程,降低药材品质及产量,还会破坏生态环境。缓解连作障碍主要有合理轮作与间套种、喷施药物、选用抗病品种、土壤消毒、接种有益微生物等,其中生物防治是连作障碍防控的主要途径。AMF 与植物形成共生关系,可以有效缓解连作对根际土壤、土壤微生物群落及植物生长的胁迫作用^[91]。独脚金内酯作为促进菌根共生的信号分子,促进 AMF 与药用植物的共生,增强植物对氮、磷的吸收及植物的抗逆性,从而间接缓解连作障碍的危害。

4.3 独脚金内酯调控药用植物“优形优质”的形成

“优形优质”是指中药材不仅外观性状特征达到了高标准,体内也含有更高比例的有效成分和活性物质。独脚金内酯具有调节植物根系的生长和抑制分枝的作用,可用于调控药用植物的药用部位的生长,从而达到“优形”的目的。此外,独脚金内酯还可以通过多种机制影响植物的色素积累,如促进花青素的合成与积累,调节叶绿素和类胡萝卜素的含量等,对于药用部位为花类、

叶类及地上部分的药材而言,可以通过独脚金内酯调节色素的积累从而调控药材的颜色,同样可以达到“优形”的目的。有研究表明,独脚金内酯能促进黄芪幼苗主根的生长,抑制 LR 的发生^[92],为培育“优形优质”的黄芪提供了全新方法。独脚金内酯在中药有效成分的研究中可能也有直接或间接的作用,如独脚金内酯与 AMF 之间的协同促进作用,可以提高药用植物中有效成分的积累,促进“优质”药材的培育。独脚金内酯能够促进拟南芥体内花青素的积累^[37]。GR24 可以不同程度地抑制雷公藤悬浮细胞中雷公藤甲素、雷公藤福啉、雷酚内酯和雷公藤宁 B 的积累,为后续利用独脚金内酯针对性地调控目标次生代谢产物,探究其分子机制提供了基础^[93]。此外,独脚金内酯还具有保鲜的作用,且无毒无害,GR24 抑制天麻花茎芽的生长发育,增加其抗氧化能力,发挥保鲜作用,延长存储时间,为今后药用植物贮藏保鲜提供全新且安全有效的方法和思路^[94]。

4.4 独脚金内酯提高药用植物的抗逆性

环境胁迫使药用植物最适宜的生长环境发生迁移,分布面积逐渐缩小,药用植物资源减少,药材产量和质量下降。因此,培育出具有抗性的优良品种或施用植物生长激素以更好地适应各种非生物胁迫是目前亟须解决的问题。独脚金内酯在植物适应非生物胁迫中发挥积极的作用,使其在药用植物抗逆境方面具有巨大的应用前景。氮、磷对药用植物的生长发育和有效成分形成有显著的影响,缺氮会降低三七植株根、茎、叶的生物量^[95],降低菘蓝根中总黄酮的含量^[96]。缺磷降低三七根冠比^[97],减少虎杖主要有效成分的生成^[98]。独脚金内酯与氮、磷之间的相互协调,可以为药用植物应对营养匮乏、促进对营养元素的调控和利用提供新方法。

土壤盐碱化严重制约了药用植物的产量和可持续发展,在盐碱条件下黄芩的生长受到抑制^[99]。增强药材的耐盐碱性,不仅可以获得较高的产量和良好的品质,在一定程度上还可以吸收土壤盐分改良盐碱土壤,获得良好的生态效益^[100]。独脚金内酯能显著提高盐胁迫下黄芪种子的发芽率,并增强幼苗抗氧化能力,增加黄芪幼苗的存活率^[101]。独脚金内酯作为植物应对盐胁迫的正调节因子,为优选、培育耐盐碱药用植物提供了全新的依据,还对土地的可持续利用和生态平衡产生了积极影响。

干旱是所有自然灾害中对于药用植物危害最大的一种,影响其品质与资源。干旱条件下紫苏、多花黄精等药用植物地上部分的生物量显著下降,生长受到抑制^[102-103]。而独脚金内酯的抗逆性作用有助于药用植物适应干旱,提高植物的存活率。GR24 能够促进干旱条件下紫花苜蓿植株生长及根系的伸长,通过增强叶片光合作用能力、调控气孔关闭、增强根系呼吸以及清除 ROS 来提高植物的抗逆能力^[104]。因此独脚金内酯可以通过提高药用植物光合作用能力、体内水分含量和抗氧化能力,从而缓解干旱对药用植物的伤害,为培育耐旱的药用植物提供了新的方法。

重金属污染是影响中药安全性的主要问题之一。柴胡、菊花、川芎、沉香、白附子、板蓝根、独活和广藿香等药用植物均检测出重金属含量超标现象^[105]。如黄芪中积累了铜、汞、砷、镉和铅等重金属元素,影响种子萌发、幼苗的生长发育、营养成分吸收转运以及功能性代谢产物的积累^[106]。独脚金内酯通过调节抗氧化系统、促进根际微生物共生以及抗逆基因表达等机制,有助于药用植物减轻重金属毒害,从而保证药材的生长。这一领域的研究尚处于初步阶段,其潜在的应用价值为培育优质药用植物提供了新的思路和方法。

独脚金内酯在药用植物中的合理应用有望成为提高药用植物产量及改善品质的有效途径,可加快抗逆、高产、高品质的中药优良品种的选育进程。

5 总结

独脚金内酯是类胡萝卜素衍生的植物次生代谢物,因其在植物适应干旱、盐碱、营养缺乏、低温和重金属污染等非生物胁迫及其在植物生长过程中的一系列调控的重要作用而引起了人们的极大兴趣。独脚金内酯的作用对于农业及现代中药种植产业的发展具有极大的参考价值,是农业科学和植物保护领域极具开发价值和应用潜力的新型植物激素。但是逆境对于独脚金内酯的生物合成、信号传递以及与其他植物激素的串扰造成影响仍在探索之中,而且独脚金内酯的最佳施用剂量和方法还需进一步研究,以确保其在实际应用中的有效性和安全性。目前大多数研究集中在少数几种药用植物上,未来需要扩展到更多种类的药用植物,以验证独脚金内酯的普遍适用性,为培育“优形优质”中药材,挽救濒危药用植物提供绿色且切实可行的方法。

参考文献

- [1] 刘丰娇, 杨冉, 蓝晶晶. 植物非生物胁迫研究的知识图谱分析[J]. 农业与技术, 2024, 44 (5): 157-164.
- [2] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49 (10): 1227-1281.
- [3] Dubois M, Van den Broeck L, Inzé D. The pivotal role of ethylene in plant growth [J]. Trends Plant Sci, 2018, 23 (4): 311-323.
- [4] 喻梓轩, 刘新勇, 张健, 等. 生长素调控水稻生长发育的研究进展[J]. 中国稻米, 2024, 30 (1): 1-9, 25.
- [5] 李巧峡, 张丽, 王玉, 等. 赤霉素调控植物开花及花器官发育的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41 (4): 746-758.
- [6] Luo X, Liu ZC. Plant development: unveiling cytokinin's role in the end of flowering [J]. Curr Biol, 2022, 32 (4): R168-R170.
- [7] Guo PR, Wu LL, Wang Y, et al. Effects of drought stress on the morphological structure and flower organ physiological characteristics of *Camellia oleifera* flower buds [J]. Plants (Basel), 2023, 12 (13): 2585.
- [8] 孙雨桐, 刘德帅, 齐迅, 等. 茉莉酸调控植物生长发育和胁迫的研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39 (11): 99-109.
- [9] Zhao YD. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development [J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11 (1): 16-22.
- [10] Chen K, Li GJ, Bressan RA, et al. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants [J]. J Integr Plant Biol, 2020, 62 (1): 25-54.
- [11] Yang HS, Fang YY, Liang ZM, et al. Polyamines: pleiotropic molecules regulating plant development and enhancing crop yield and quality [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22 (11): 3194-3201.
- [12] Sood M. Jasmonates: "The Master Switch" for regulation of developmental and stress responses in plants [J]. J Plant Growth Regul, 2023, 42 (8): 5247-5265.
- [13] Castorina G, Consonni G. The role of brassinosteroids in controlling plant height in *Poaceae*: a genetic perspective [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (4): 1191.
- [14] Cook CE, Whichard LP, Turner B, et al. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant [J]. Science, 1966, 154 (3753): 1189-1190.
- [15] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Nature, 2005, 435 (7043): 824-827.
- [16] Mouchel CF, Leyser O. Novel phytohormones involved in long-range signaling [J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10 (5): 473-476.
- [17] Leyser O. Strigolactones and shoot branching: a new trick for a young dog [J]. Dev Cell, 2008, 15 (3): 337-338.
- [18] Umehara M, Hanada A, Yoshida S, et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones [J]. Nature, 2008, 455 (7210): 195-200.
- [19] Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching [J]. Nature, 2008, 455 (7210): 189-194.
- [20] Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, et al. Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2009, 150 (1): 482-493.
- [21] Koltai H. Strigolactones are regulators of root development [J]. New Phytol, 2011, 190 (3): 545-549.
- [22] Yoneyama K, Brewer PB. Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development? [J]. Curr Opin Plant Biol, 2021, 63: 102072.
- [23] Mitra D, Sierra BEG, Bahman K, et al. Impacts of arbuscular mycorrhizal fungi on rice growth, development, and stress management with a particular emphasis on strigolactone effects on root development [J]. Commun Soil Sci Plan, 2021, 52 (14): 1591-1621.
- [24] Kalamulla R, Karunarathna SC, Tibpromma S, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture [J]. Sustainability, 2022, 14 (19): 12250.
- [25] Boyno G, Rezaee DY, Demir S, et al. The complex interplay between arbuscular mycorrhizal fungi and strigolactone: mechanisms, synergies, applications and future directions [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (23): 16774.
- [26] Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, et al. Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? [J]. Plant Physiol, 2011, 155 (2): 721-734.
- [27] Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C, et al. Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea [J]. Plant Physiol, 2012, 158 (4): 1976-1987.
- [28] Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, et al. Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2011, 233 (1): 209-216.
- [29] Soundappan I, Bennett T, Morffy N, et al. SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2015, 27 (11): 3143-3159.
- [30] Hu J, Ji YY, Hu XT, et al. BES1 functions as the co-regulator of D53-like SMXLs to inhibit *BRC1* expression in strigolactone-regulated shoot branching in *Arabidopsis* [J]. Plant Commun, 2020, 1 (3): 100014.
- [31] Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, et al. The pea TCP transcription factor *PsBRC1* acts downstream of strigolactones to control shoot branching [J]. Plant Physiol, 2012, 158 (1): 225-238.
- [32] Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Nature, 2005, 435 (7043): 824-827.
- [33] 祝四, 邓凤玲, 赵光, 等. 独脚金内酯对甘蓝型油菜种子的引发作用及其机制研究[J]. 湖北农业科学, 2023, 62 (9): 6-13.
- [34] Li CX, Lu XF, Liu YZ, et al. Strigolactone alleviates the adverse effects of salt stress on seed germination in cucumber by enhancing antioxidant capacity [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12 (5): 1043.
- [35] Yamada Y, Umehara M. Possible roles of strigolactones during leaf senescence [J]. Plants (Basel), 2015, 4 (3): 664-677.
- [36] Yamada Y, Furusawa S, Nagasaka S, et al. Strigolactone sig-

- naling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency [J]. *Planta*, 2014, 240 (2): 399-408.
- [37] Wang L, Wang B, Yu H, et al. Transcriptional regulation of strigolactone signalling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2020, 583 (7815): 277-281.
- [38] Li ZF, Pi Y, Zhai CS, et al. The strigolactone receptor SIDWARF14 plays a role in photosynthetic pigment accumulation and photosynthesis in tomato [J]. *Plant Cell Rep*, 2022, 41 (10): 2089-2105.
- [39] Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, et al. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor [J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (12): 3258-3272.
- [40] Zhu J, Kaeppler SM, Lynch JP. Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*) [J]. *Funct Plant Biol*, 2005, 32 (8): 749-762.
- [41] Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, et al. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2002, 29 (6): 751-760.
- [42] Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants [J]. *Dev Cell*, 2010, 18 (6): 927-937.
- [43] Santoro V, Schiavon M, Gresta F, et al. Strigolactones control root system architecture and tip anatomy in *Solanum Lycopersicum* L. plants under P starvation [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9 (5): 612.
- [44] Sun HW, Tao JY, Liu SJ, et al. Strigolactones are involved in phosphate-and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65 (22): 6735-6746.
- [45] Sun HW, Bi Y, Tao JY, et al. Strigolactones are required for nitric oxide to induce root elongation in response to nitrogen and phosphate deficiencies in rice [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39 (7): 1473-1484.
- [46] 杨雨薇. 独脚金内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿生长特性的影响及机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2024.
- [47] Min Z, Li RY, Chen L, et al. Alleviation of drought stress in grapevine by foliar-applied strigolactones [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2019, 135: 99-110.
- [48] Lim CW, Baek W, Jung J, et al. Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (7): 15251-15270.
- [49] Haider I, Andreo-Jimenez B, Bruno M, et al. The interaction of strigolactones with abscisic acid during the drought response in rice [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69 (9): 2403-2414.
- [50] 刘淑兰, 李进, 马永慧, 等. 独脚金内酯对干旱胁迫下黑果枸杞种子萌发和幼苗生理变化的影响 [J]. *草地学报*, 2023, 31 (1): 130-139.
- [51] Ismael MA, Elyamine AM, Moussa MG, et al. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers [J]. *Metallomics*, 2019, 11 (2): 255-277.
- [52] Andresen E, Küpper H. Cadmium toxicity in plants [J]. *Met Ions Life Sci*, 2013, 11: 95-413.
- [53] Deckert J. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? [J]. *Biometals*, 2005, 18 (5): 475-481.
- [54] Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, et al. Cadmium: toxicity and tolerance in plants [J]. *J Environ Biol*, 2009, 30 (2): 165-174.
- [55] Tai ZL, Yin XQ, Fang ZG, et al. Exogenous GR24 alleviates cadmium toxicity by reducing cadmium uptake in Switchgrass (*Panicum virgatum*) seedlings [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14 (8): 852.
- [56] Qiu CW, Zhang C, Wang NH, et al. Strigolactone GR24 improves cadmium tolerance by regulating cadmium uptake, nitric oxide signaling and antioxidant metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Environ Pollut*, 2021, 273: 116486.
- [57] 杨卫东, 李廷强, 丁哲利, 等. 旱柳幼苗抗坏血酸-谷胱甘肽循环及谷胱甘肽代谢对镉胁迫的响应 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2014, 40 (5): 551-558.
- [58] Raja V, Qadir SU, Kumar N, et al. Melatonin and strigolactone mitigate chromium toxicity through modulation of ascorbate-glutathione pathway and gene expression in tomato [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2023, 201: 107872.
- [59] Mostofa MG, Ha CV, Rahman MM, et al. Strigolactones modulate cellular antioxidant defense mechanisms to mitigate arsenate toxicity in rice shoots [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (11): 1815.
- [60] van Zelm E, Zhang YX, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 403-433.
- [61] Ha CV, Leyva-González MA, Osakabe Y, et al. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (2): 851-856.
- [62] Ma N, Hu C, Wan L, et al. Strigolactones improve plant growth, photosynthesis, and alleviate oxidative stress under salinity in rapeseed (*Brassica napus* L.) by regulating gene expression [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1671.
- [63] Ren CG, Kong CC, Xie ZH. Role of abscisic acid in strigolactone-induced salt stress tolerance in arbuscular mycorrhizal *Sesbania cannabina* seedlings [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18 (1): 74.
- [64] Reed RC, Bradford KJ, Khanday I. Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate [J]. *Heredity (Edinb)*, 2022, 128 (6): 450-459.
- [65] Park CJ, Seo YS. Heat shock proteins: a review of the molecular *Chaperones for Plant Immunity* [J]. *Plant Pathol J*, 2015, 31 (4): 323-333.
- [66] Huang YC, Niu CY, Yang CR, et al. The heat stress factor HSFA6b connects ABA signaling and ABA-mediated heat responses [J]. *Plant Physiol*, 2016, 172 (2): 1182-1199.
- [67] Pan CZ, Zhang H, Ma QM, et al. Role of ethylene biosynthesis and signaling in elevated CO₂-induced heat stress response in tomato [J]. *Planta*, 2019, 250 (2): 563-572.
- [68] Caverzan A, Casassola A, Brammer SP. Antioxidant responses of wheat plants under stress [J]. *Genet Mol Biol*, 2016, 39 (1): 1-6.
- [69] Omoarelojie LO, Kulkarni MG, Finnie JF, et al. Synthetic strigolactone (rac-GR24) alleviates the adverse effects of heat stress on seed germination and photosystem II function in lupine

- seedlings [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 155: 965-979.
- [70] Chi C, Xu XC, Wang MQ, et al. Strigolactones positively regulate abscisic acid-dependent heat and cold tolerance in tomato [J]. *Hortic Res*, 2021, 8 (1): 237.
- [71] Toh S, Kamiya Y, Kawakami N, et al. Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in Arabidopsis seed germination [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53 (1): 107-117.
- [72] Li X, Lu JH, Zhu XL, et al. AtMYBS1 negatively regulates heat tolerance by directly repressing the expression of *MAX1* required for strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Commun*, 2023, 4 (6): 100675.
- [73] Pu YY, Liu LJ, Wu JY, et al. Transcriptome profile analysis of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) in response to freezing stress, reveal potentially connected events to freezing stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (11): 2771.
- [74] Theocharis A, Clément C, Barka EA. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures [J]. *Planta*, 2012, 235 (6): 1091-1105.
- [75] Zhang XH, Zhang L, Sun YP, et al. Hydrogen peroxide is involved in strigolactone induced low temperature stress tolerance in rape seedlings (*Brassica rapa* L.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 157: 402-415.
- [76] Wang X, Li ZY, Shi YT, et al. Strigolactones promote plant freezing tolerance by releasing the WRKY41-mediated inhibition of *CBF/DREB1* expression [J]. *EMBO J*, 2023, 42 (19): e112999.
- [77] Gad AG, Habiba, Zheng XZ, et al. Low light/darkness as stressors of multifactor-induced senescence in rice plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 3936.
- [78] Shu S, Tang YY, Yuan YH, et al. The role of 24-epibrassinolide in the regulation of photosynthetic characteristics and nitrogen metabolism of tomato seedlings under a combined low temperature and weak light stress [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 107: 344-353.
- [79] Mayzlish-Gati E, LekKala SP, Resnick N, et al. Strigolactones are positive regulators of light-harvesting genes in tomato [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61 (11): 3129-3136.
- [80] Zhou XP, Tan ZM, Zhou YG, et al. Physiological mechanism of strigolactone enhancing tolerance to low light stress in cucumber seedlings [J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22 (1): 30.
- [81] Lu T, Yu HJ, Li Q, et al. Improving plant growth and alleviating photosynthetic inhibition and oxidative stress from low-light stress with exogenous GR24 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 490.
- [82] 黄璐琦, 郭兰萍, 张小波, 等. 基于第四次全国中药资源普查的中国中药资源种类研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49 (13): 3409-3413.
- [83] 杨泽敏, 高旦, 王业, 等. 多组学技术揭示药用植物逆境响应及次生代谢调控机制的研究进展 [J]. *中药材*, 2024, 47 (4): 1062-1070.
- [84] 贾彩凤, 房慧勇. 药用植物种子休眠及萌发调控的研究进展 [J]. *医学研究与教育*, 2011, 28 (2): 72-76.
- [85] González-Verdejo CI, Barandiaran X, Moreno MT, et al. An improved axenic system for studying pre-infection development of the parasitic plant *Orobancha ramosa* [J]. *Ann Bot*, 2005, 96 (6): 1121-1127.
- [86] 陈虞超, 李苗, 陈晓军, 等. 外源信号物质对肉苁蓉种子萌发与吸器形成的影响 [J]. *植物生理学报*, 2012, 48 (3): 260-264.
- [87] 何冬梅, 王海, 陈金龙, 等. 中药微生态与中药道地性 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (2): 290-302.
- [88] 曾燕, 郭兰萍, 王继永, 等. 丛枝菌根侵染强度与二年生三七生物量和药效成分含量的相关性研究 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17 (12): 1253-1257.
- [89] Ran Z, Ding W, Cao S, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi: effects on secondary metabolite accumulation of traditional Chinese medicines [J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2022, 24 (6): 932-938.
- [90] 顾艳, 梅瑜, 徐世强, 等. 药用植物连作障碍研究进展 [J]. *广东农业科学*, 2021, 48 (12): 162-173.
- [91] 陈睿, 崔泽远, 李志, 等. AM 真菌对连作土壤上作物生长影响的研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2024, 40 (6): 1-8.
- [92] 赵玉欢, 黄晓宇, 关环, 等. 独脚金内酯对黄芪幼苗根系发育的影响 [J]. *植物生理学报*, 2023, 59 (3): 505-514.
- [93] 吴晓毅, 张睿, 马允, 等. 独脚金内酯类似物 GR24 对雷公藤悬浮细胞中二萜类次生代谢产物累积的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (16): 3582-3587.
- [94] 曹艺颖, 陈虞超, 刘天睿, 等. 独脚金内酯类似物在天麻贮藏保鲜中的应用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (12): 3149-3155.
- [95] 韦美丽, 陈中坚, 孙玉琴, 等. 低氮胁迫对三七养分积累及分配的影响 [J]. *人参研究*, 2015, 27 (4): 20-22.
- [96] 施晟璐, 唐晓清, 聂鹏卿, 等. 缺氮和复氮对苗期菘蓝营养和活性成分的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38 (5): 780-786.
- [97] 韦美丽, 向桂林, 黄天卫, 等. 磷胁迫对三七生长及干物质积累的影响 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32 (34): 97-102.
- [98] Sun RT, Zhang ZZ, Liu MY, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus supply accelerate main medicinal component production of *Polygonum cuspidatum* [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1006140.
- [99] 吕玲霞. 干旱胁迫及盐胁迫对黄芩成分合成及积累的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [100] 孙良丹. 盐碱地特色中药农业新理念思考与实践 [J]. *华北理工大学学报 (自然科学版)*, 2024, 46 (1): 1-7.
- [101] 梁泰帅, 郑淑涵, 赵肖琼. 独脚金内酯 (SLs) 对盐碱胁迫下恒山黄芪种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. *种子*, 2023, 42 (12): 90-95, 102.
- [102] 易家宁. 干旱及盐胁迫对紫苏光合特性、生理及品质的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [103] 张博伦. 干旱胁迫对多花黄精生长及光合生理特性的影响 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022.
- [104] 杨雨薇. 独脚金内酯对干旱胁迫下紫花苜蓿生长特性的影响及机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [105] 闫研, 秦斌, 梁雪, 等. 17 种中药材中重金属污染分析与健康风险评估 [J]. *药学研究*, 2023, 42 (11): 902-908.
- [106] 张旭丽, 闫海生, 李洪. 黄芪重金属污染研究进展 [J]. *中南农业科技*, 2024, 45 (4): 234-237, 253.

(收稿日期: 2024-10-10; 修回日期: 2024-11-14)

组学技术在免疫检查点抑制剂疗效预测模型中的应用进展

谷铮, 邓而乐, 余俊先* (首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050)

摘要: 以程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) / 程序性细胞死亡蛋白 1 配体 (PD-L1) 抑制剂等为代表的免疫疗法在肿瘤治疗中起到了重要的作用, 然而也引发一些不良反应, 因此需精准医学支持个体化用药。近年来, 高通量测序技术的发展推动了肿瘤免疫治疗进入多组学、多维度和人工智能时代。基因组、转录组和代谢组等技术显著改变了肿瘤治疗格局; 新兴技术如空间转录组和时空组学为预测模型带来新前景。多组学联合分析可系统优化模型。本文总结了免疫检查点抑制剂疗效在组学预测模型的应用进展, 研究现状、现存挑战及未来展望, 助力临床个体化治疗和新药研发。

关键词: 组学; 生物信息学; 免疫治疗预测

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0478-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.028

Advances in omics in efficacy predictive modeling of immune checkpoint inhibitors

GU Zheng, DENG Er-le, YU Jun-xian* (*Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050*)

Abstract: PD-1/PD-L1 inhibitors and other immunotherapies are helpful for tumor patients, but they also cause side effects, so precision medicine is needed to promote individualized drug use. Recently, high-throughput sequencing technology has brought multi-omics, multi-dimensionality, and artificial intelligence to tumor immunotherapy. Genomic, transcriptomic, and metabolomic technologies have changed oncology treatment, and spatial transcriptomics and spatiotemporal genomics have expanded predictive modeling. Combining multiple omics can optimize the model and become more systematic. This paper reviewed efficacy of immune checkpoint inhibitors in omics prediction models, current research, obstacles, and future implications for clinical individualized treatment and novel drug development.

Key words: omics; bioinformatics; immunotherapy prediction

近年来, 以程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) / 程序性细胞死亡蛋白 1 配体 (PD-L1) 为代表的免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 在肿瘤免疫治疗中取得了显著的效果。但对于某些肿瘤治疗几乎无效, 即使在有效的肿瘤治疗中, 响应患者也仅占少数。研究显示以肺癌为例, PD-L1 高表达患者中 ICIs 单药有效率 33% ~ 46%, 但仍有超过一半患者无法获益^[1], PD-L1 中低表达或无选择人群有效率仅 14% ~ 34%。对于携带表皮生长因子受体 (EGFR)、间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 等驱动基因者免疫治疗有效率还会进一步降低, 并可能出

现适应性耐药和严重的毒副反应。目前肿瘤生物标志物是美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的可以辅助肿瘤诊断、预测免疫治疗疗效和筛选敏感人群^[2]的指标, 包括 PD-L1、肿瘤突变负荷 (TMB) 及微卫星不稳定性 / 错配修复缺陷 (MSI/dMMR)^[3]。然而单一生物标志物难以准确预测免疫治疗的疗效, 且会受肿瘤类型、样本量以及检测方法等因素的影响。为提高生物标志物的有效性和普适性, 临床应探索客观的疗效预测模型, 以实现精准医疗, 筛选免疫获益人群, 提高免疫治疗有效率。

随着测序技术的发展, 新型组学工具不断涌

作者简介: 谷铮, 女, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学和机器学习相关研究, email: 13466548501@163.com *通信作者: 余俊先, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤药理学相关研究, email: junxianyu@ccmu.edu.cn

现。自 Illumina 高通量测序平台推出后，2010 年发展了第三代单分子实时测序技术，如 PacBio SMRT 测序和 Nanopore 测序，既提升了准确度又降低了成本。2020 年代，单细胞测序和多组学技术进一步发展，在单细胞测序的基础上，空间转录组学和时空组学相继出现，为临床药物研究与应用带来新机遇。多组学方法有助于理解个体药物反应差异，识别快速进展和无反应患者，实现个体化用药。在免疫治疗预测方面，帮助识别快速疾病进展和无反应患者筛选获益人群，从而提高免疫治疗的应答率。

1 组学技术

组学被定义为在特定水平上探测和分析大量数据，这些数据代表了给定生物系统的整个组成的结构和功能。目前广泛用于基础研究、临床诊断和药物研发^[4]。整合基因组学、转录组学和蛋白质组学数据，可以深入研究肿瘤相关病理机制以及免疫景观，发现相关生物标志物，分析相关易感基因及致病机制，并进一步探讨肿瘤的转移及异质性问题。组学研究还有助于发现新药靶点，进行药物敏感性测试和疗效预测，以满足个体化用药需求。单一组学建立的模型性能有限，多维组学联合分析能系统分析免疫治疗状态能显著提高预测准确率^[4]。组学作用关联图见图 1，表观组学通过 DNA 甲基化和组蛋白修饰调控基因组学的表达，蛋白质组学则作为转录因子和信号分子影响转录组的表达。此外，代谢物可以作为信号分子影响特定基因的表达，从而影响转录组学和表观组学。同时，氨基酸水平直接影响蛋白质的合成，进而影响蛋白质组学的组成。微生物组学通过产生短链脂肪酸和维生素影响代谢组学，而代谢组学产生的代谢物又会反过来影响微生物组学^[5]。这些相互作用构成了一个复杂的调控网络。

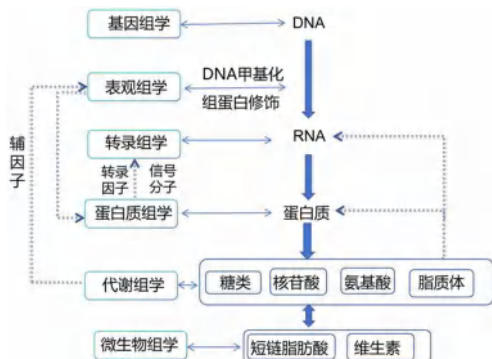


图 1 组学作用关联图
Fig 1 Diagram of omics interaction

1.1 基因组学用于预测

基因组学通过确定某个体的全部 DNA 序列

(如全基因组测序 WGS 或全外显子组测序 WES)，分析核苷酸的基因表达与功能。免疫治疗相关通路中的基因组变异影响新抗原产生、免疫逃逸机制、免疫微环境和信号通路等多方面^[6]，这些因素可以建立特征评分或预测模型，如单核苷酸变异 (SNP)、插入缺失 (InDel)、结构变异 (SV) 及拷贝数变异 (CNV)。免疫相关通路基因集反映了肿瘤微环境中免疫系统的状态，可帮助识别免疫逃逸机制、评估免疫细胞的状态从而预测免疫疗效^[7]。Cheng 等^[8]通过识别 mTOR 通路中 8 个基因位点 *FGFR2*、*PIK3C3*、*FGFR4*、*FGFR1*、*FGF3*、*AKT1*、*mTOR* 和 *RPTOR*，建立模型预测多种肿瘤在 ICIs 治疗后的生存率和免疫治疗反应。基于突变的基因集可以作为免疫治疗后的独立预后因素，探究亚组患者中外源性和内源性免疫景观与治疗反应的相互作用，指导肿瘤免疫治疗决策^[9]。CNV 与治疗失败、疾病复发、较短的无进展生存期和总生存期相关，并可能导致多药耐药性。因此，CNV 的变化可以预测 ICIs 的疗效^[10]。

综合来看，基因组学对于免疫治疗的预测模型涵盖了突变基因位点和基因组变异特征、甲基化特征、*HLA* 基因型特征、免疫原性新抗原等标志物，可为用于临床提供治疗决策。

1.2 转录组学用于预测

转录组学包括全转录组测序和基因表达谱芯片。全转录组涵盖所有类型的 RNA，包括 mRNA 和非编码 RNA (ncRNA)。目前，研究重点集中在 miRNA、lncRNA 和 circRNA，研究热点集中在 ncRNA 转录调控中的 ceRNA 机制。miRNA、lncRNA 和 mRNA 的作用机制见图 2，lncRNA 可以与蛋白质结合，参与基因调控，还可以通过与 miRNA 结合来调节 miRNA 的功能。miRNA 从 miRNA 基因转录为初级 miRNA (pri-miRNA)，经过加工形成成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 可以与目标 mRNA 结合，形成 mRNA-miRNA 复合物，从而阻止翻译或导致 mRNA 降解。mRNA 的转录过程包括启动 (initiation)、延伸 (elongation) 和终止 (termination)，其中 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II) 在启动子处结合 DNA 以合成 mRNA。基因表达谱芯片也称为基因芯片或微阵列，是一种用于同时测量大量基因表达水平的技术，其应用领域包括单细胞转录组学和空间转录组学。10× Genomics 平台的微流控技术获取单细胞表达数据和 TCR/BCR 序列信息，从而提供更准确的预测。在空间转录组中，CytAssist 和 Xenium 提供高通量和

多模态的空间及细胞分辨率数据。目前，华大时空组学 (stereo-seq) 技术通过时空芯片捕获组织样

本中的 mRNA，并进一步采用时空条形码还原组织样本的空间位置信息，实现组织原位测序^[11]。

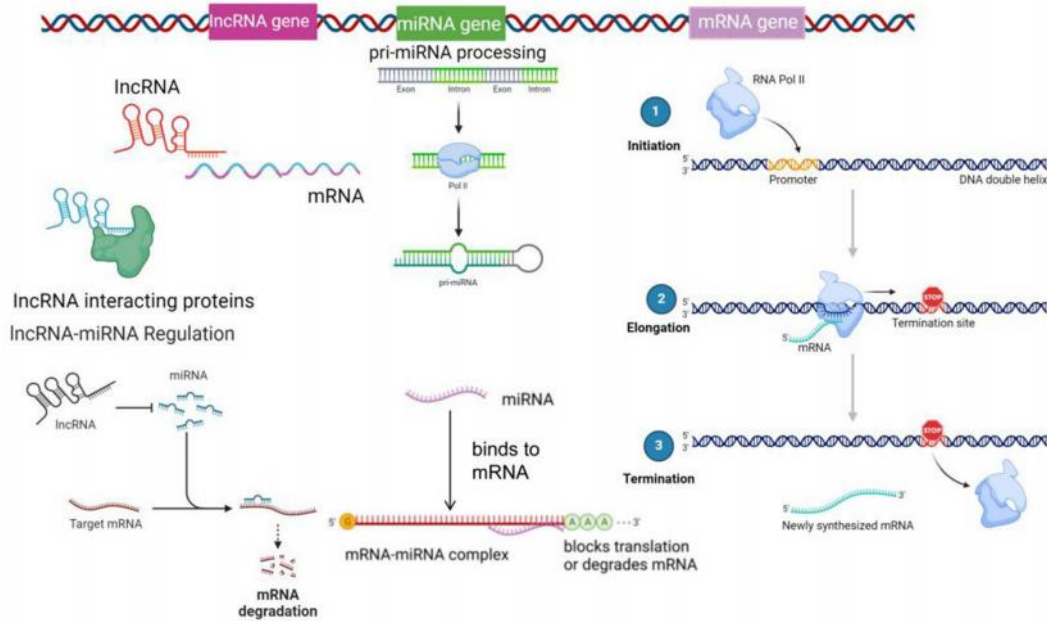


图 2 miRNA, lncRNA 和 mRNA 的作用机制图
Fig 2 Mechanism of action diagram of miRNA, lncRNA and mRNA

通过分析转录组中特定 RNA 序列和免疫浸润水平，可以预测免疫治疗的反应。高水平的免疫浸润，尤其是肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 的高表达，表明免疫系统已经识别并开始对抗肿瘤，这也意味着肿瘤对免疫治疗更为敏感^[12]。Zhang 等^[13]通过分析单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 数据和批量 RNA 测序数据开发了肿瘤浸润免疫细胞 (TIIC) 相关特征评分，用于预测基因组变化、化疗药物敏感性及其免疫治疗反应。Zhang 等^[14]开发了基于机器学习的免疫细胞相关 lncRNA (TIIClnc) 作为免疫浸润水平的指标，用于预测胶质母细胞瘤患者的预后和免疫治疗反应。Chi 等^[15]基于 scRNA-seq 技术，评估 T 细胞耗竭的特征，以预测肝细胞癌 (HCC) 患者的预后和免疫治疗反应，显示出良好的预测性能。

同时分析肿瘤微环境 (TME) 中 T 细胞特征、细胞-细胞通信机制、抗原呈递机制及空间分布等可预测免疫治疗疗效。活化的 T 细胞表明免疫系统已被激活，通常对免疫治疗更敏感^[12]。T 细胞的功能状态很重要，功能性 T 细胞 (非耗竭状态) 和细胞活性相关基因 (如 *GZMB*、*IFNG*) 的表达水平有助于预测疗效^[12]，这些指标可结合 TCR、T 细胞标志物、耗竭特征和代谢状态等指标预测。在肿瘤早期阶段，CD20⁺ B 细胞及三级淋巴结构与肿瘤面积的比例是肿瘤免疫治疗疗效的新预测指标^[16]。基于神经网络的模型可对 TME

的细胞组成和空间分布进行准确描述^[17]。Lai 等^[18]计算转录稳定性指数 (mRNAsi) 构建干性亚型分类器可作为预后和治疗预测因子。

通过转录组探究 TME、T 细胞相关特征、干性细胞特征、抗原呈递机制、免疫细胞浸润等建立特征评分和预测模型对免疫治疗疗效进行预测，有利于了解通路调控关系并为临床提供决策。

1.3 代谢组学用于预测

代谢组学通过分析细胞、组织或体液中的代谢物，揭示代谢网络和途径变化，提供生物系统的功能和状态信息。在肿瘤免疫反应中，代谢通路与免疫治疗反应密切相关，糖酵解水平影响 T 细胞的分化方向，高水平的糖酵解倾向于促进效应性 T 细胞的生成^[19]。肿瘤细胞通过有氧糖酵解 (Warburg 效应) 产生能量，代谢重编程使 TME 酸化，抑制 T 细胞功能，降低免疫治疗效果^[20]。氧化磷酸化调控记忆性和调节性 T 细胞的代谢状态，影响抗肿瘤免疫反应^[21]。研究表明气相色谱-质谱分析血清样本可识别预测免疫治疗与化疗联合疗效的代谢标志物和血清代谢谱^[22]，潜在代谢标志物包括丙酮酸、苏氨酸、丙氨酸、尿素、草酸、油酸和谷氨酸^[22]。有研究通过超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-TOF-MS) 分析，识别出与胃食管癌进展相关的差异代谢物在不同阶段的变化，用于早期筛查和风险评估^[23]。同时循环肿瘤

DNA (ctDNA) 有助于个体化辅助治疗预测^[24]。

药物代谢组学也可进行相关预测。耐药的代谢途径包括糖酵解、三羧酸循环 (TCA) 循环和磷酸戊糖途径等, 监测代谢特征识别药物反应和治疗抵抗 (耐药) 的代谢标志物^[25], 可根据个体自身的代谢物模式和相关代谢途径来预测药物反应。耐药患者通常表现出氨基酸水平的增加及胆碱水平的变化, 这种变化可能与 Warburg 效应相反^[23], 这种代谢重编程可能影响免疫细胞的功能和免疫治疗的效果。使用 LC-MS 分析治疗 4 周和 8 周肾细胞癌 (RCC) 患者的血清样本, 发现犬血清代谢物中尿酸 / 色氨酸比值增加与适应性耐药机制有关^[26]。

代谢特征与患者的免疫状态和 TME 密切相关, 采用时间方式定量分析疾病不同时期的代谢物^[25], 并比较不同样品的代谢谱, 可以通过代谢途径结合代谢生物标志物预测免疫治疗效果, 有助于简化治疗决策, 制订个体化治疗方案。

1.4 蛋白质组学用于预测

蛋白质组学研究生物体内所有蛋白质的结构、功能和相互作用, 旨在全面理解它们在生物系统和疾病机制中的作用。目前蛋白质组学测定方式包括 TMT 标记定量、Labelfree、DIA 和修饰蛋白质组学。基于 Proximity Extension Assay (PEA) 技术的 Olink 蛋白质组学, 具有高通量和靶向性, 并支持多组学分析^[27], 可用于发现和验证药物靶点, 通过分析特定蛋白质表达谱评估免疫治疗效果制订个体化治疗方案, 通过分析通路的蛋白质表达和修饰状态例如 mTOR、MAPK 等信号通路, 可以预测免疫治疗的效果。Zhang 等^[28] 使用 Olink 蛋白质组学技术研究分析了接受免疫治疗的患者血浆中的 92 种肿瘤相关蛋白能有效预测治疗效果。Huo 等^[29] 将小细胞肺癌分为三种蛋白质组学亚型预测临床结果和化疗反应, 其中 S- II 亚型的特征表明免疫疗法的潜在益处。Shi 等^[30] 通过 RNA 测序 (RNA-seq) 和同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 分析曲妥珠单抗敏感 (TS) 和耐药 (TR) 细胞的差异表达, 筛选出生物标志物作为耐药患者的诊断和治疗靶点。

蛋白质组学对免疫治疗预测主要通过筛选患者血液中的血浆蛋白生物标志物、免疫反应相关的信号通路的蛋白质表达和修饰状态作为预测指标建立风险模型而预测免疫治疗疗效。

1.5 表观组学用于预测

表观组学研究基因组上表观遗传修饰及调控机制, 如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑

和非编码 RNA。这些修饰能够调控基因表达而不改变 DNA 序列^[31]。组蛋白修饰可能影响免疫逃逸相关基因的表达, 染色质重塑则可能影响 TME 中的免疫细胞浸润和活性从而影响免疫治疗的效果。目前的技术包括 m⁶A 甲基化测序、DNA 甲基化测序、CHIP-seq/ATAC-seq/CUT&Tag 和 RIP-seq 等。Hoang 等^[32] 通过识别甲基化位点或组蛋白修饰等与免疫治疗相关的特征并结合组织病理学图像开发了 DEPLOY 深度学习模型, 可准确预测甲基化 beta 值。一项研究表明, *LRR3B* 基因及其启动子低甲基化可预测抗 PD-1 治疗响应^[33]。目前表观组学在免疫治疗预测中的研究仍存在不足, 未来需加深甲基化位点和模式的研究, 并加强组蛋白修饰等研究以更好地表征其预测作用。

1.6 微生物组学用于预测

微生物组是指特定环境或宿主体内的所有微生物及其基因, 包括细菌、古菌、真菌和病毒。目前的技术包括了全长 16S rRNA 测序、宏基因组测序和宏转录组测序等, 基于 PacBio 的全长 16S rRNA 测序可实现细菌多样性分析。宿主免疫通过调节细菌信号影响微生物组进而影响肿瘤监测, 同时微生物组还会影响肿瘤免疫疗法。肠道微生物的多样性和代谢产物 (如短链脂肪酸) 的水平可以调节免疫系统的功能, 提高免疫治疗的效果^[31]。Gopalakrishnan 等^[34] 通过宏基因组学研究发现免疫治疗应答组肠道细菌的功能差异, 粪便分析显示瘤胃球菌科细菌的相对丰度。Routy 等^[35] 研究对 ICIs 有反应的肿瘤患者的粪便微生物群移植到无菌或抗菌药物治疗的小鼠中改善了 PD-1 阻断的抗肿瘤作用。

研究微生物群对肿瘤免疫治疗的影响有助于实现个体化治疗和改善患者预后, 微生物群的调节为提高抗肿瘤治疗效果和降低毒性提供了新的策略。未来的研究应探索如何通过微生物群调节来预测和优化免疫治疗效果。

2 现状及挑战

当前研究主要集中在发现生物标志物和构建模型的特征标签, 通过分析基因表达、信号通路及蛋白质修饰以识别 TME 变化和免疫逃逸机制并建立预测模型。多维组学分析提供了对免疫系统和 TME 中作用机制的全面理解, 阐明不同组学的调控关系, 解释了免疫治疗的机制变化以及产生耐药性的原因。

在临床建立免疫治疗预测模型时存在技术和实际应用等多种挑战。在多机构合作和数据共享

的情况下, 确保所有参与方都遵循相同的隐私保护标准, 创建良好的伦理环境以促进大数据共享, 并明确各个部门的责任。还需要大量高质量数据来开发预测技术和工具, 进行训练和验证并对模型持续更新和优化, 需要大量的人力和资金成本。克服数据采集、处理和分析中的技术障碍, 以确保数据的准确性和可靠性。收集、存储和管理大规模生物学数据需要强大的计算资源, 验证生物标志物和预测技术的有效性和可靠性需要进行实验验证和大规模临床试验, 这可能因成本过高在一定程度上限制了其在临床实践中的广泛应用。此外, 科研人员、临床和企业要建立相关数据库和行业标准, 开发新的算法和模型精确识别免疫治疗目标人群、准确预测疗效和预后, 构建透明且可解释的临床辅助系统, 以赢得患者的信任。这些挑战需要各方协作和持续努力, 以推动免疫治疗的精准医学发展, 最终改善患者的治疗效果和预后。

3 展望

在免疫疗法的应用中, 单细胞技术的临床转化尚未深入^[36]。目前数据稀缺零散、结构化不足、多组学结合欠缺、成本高、批次效应和误差等阻碍了免疫治疗反应预测。未来应聚焦如何最大化应用测序和组学技术于临床。多组学数据联合分析揭示出更全面的生物学机制, 构建免疫调控网络系统评估; 共享高质量的数据集以系统地比较预测准确性; 规范化数据采集流程, 建立较为系统的预测流程和标准化、稳健的分层系统, 通过可视化技术帮助制订更好的治疗决策。

组学技术为免疫治疗预测带来了新的方向和前景, 通过探究 TME 的差异和生物标志物可以准确对免疫治疗疗效进行预测, 有望实现个体化治疗。然而也带来一系列挑战, 随着数据和测序及模型标准化的实施, 未来对免疫治疗预测的探究也会更好地服务于临床, 筛选出更为准确、经济和有效的模型。

参考文献

- [1] Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20 (1): 25-39.
- [2] Nisar S, Bhat AA, Hashem S, et al. Non-invasive biomarkers for monitoring the immunotherapeutic response to cancer [J]. *J Transl Med*, 2020, 18: 1-11.
- [3] Ahn S, Chung YR, Seo AN, et al. Changes and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocyte subsets after primary systemic therapy in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (5): e0233037.
- [4] Han YY, Wang D, Peng LS, et al. Single-cell sequencing: a promising approach for uncovering the mechanisms of tumor metastasis [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 59.
- [5] Zhang Y, Chen R, Zhang DD, et al. Metabolite interactions between host and microbiota during health and disease: which feeds the other? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114295.
- [6] Daver N, Alotaibi AS, Bücklein V, et al. T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments [J]. *Leukemia*, 2021, 35 (7): 1843-1863.
- [7] Botticelli A, Cirillo A, d' Amati G, et al. The role of CD73 in predicting the response to immunotherapy in head and neck cancer patients [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 260: 155415.
- [8] Cheng L, Wang YN, Qiu LX, et al. mTOR pathway gene mutations predict response to immune checkpoint inhibitors in multiple cancers [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 247.
- [9] Long JY, Wang DX, Wang AQ, et al. A mutation-based gene set predicts survival benefit after immunotherapy across multiple cancers and reveals the immune response landscape [J]. *Genome Med*, 2022, 14 (1): 20.
- [10] Zhang XC, Wang YN, Xiang JJ, et al. Association between plasma somatic copy number variations and response to immunotherapy in patients with programmed death-ligand 1-negative non-small cell lung cancer [J]. *J Int Med Res*, 2022, 50 (4): 3000605221093222.
- [11] Gong C, Li SK, Wang LY, et al. SAW: an efficient and accurate data analysis workflow for Stereo-seq spatial transcriptomics [J]. *GigaByte*, 2024, 2024: 111.
- [12] Zhong FM, Yao FY, Jiang JY, et al. CD8⁺T cell-based molecular subtypes with heterogeneous immune landscapes and clinical significance in acute myeloid leukemia [J]. *Inflamm Res*, 2024, 73 (3): 329-344.
- [13] Zhang N, Zhang H, Liu ZQ, et al. An artificial intelligence network-guided signature for predicting outcome and immunotherapy response in lung adenocarcinoma patients based on 26 machine learning algorithms [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56 (4): e13409.
- [14] Zhang N, Zhang H, Wu WT, et al. Machine learning-based identification of tumor-infiltrating immune cell-associated lncRNAs for improving outcomes and immunotherapy responses in patients with low-grade glioma [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (13): 5931.
- [15] Chi H, Zhao SY, Yang JY, et al. T-cell exhaustion signatures characterize the immune landscape and predict HCC prognosis via integrating single-cell RNA-seq and bulk RNA-sequencing [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1137025.

- [16] Helmink BA, Reddy SM, Gao JJ, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response [J]. *Nature*, 2020, 577 (7791): 549-555.
- [17] Ding XB, Zhang L, Fan M, et al. TME-NET: an interpretable deep neural network for predicting pan-cancer immune checkpoint inhibitor responses [J]. *Brief Bioinform*, 2024, 25 (5): bbae410.
- [18] Lai JZ, Lin XY, Zheng HN, et al. Characterization of stemness features and construction of a stemness subtype classifier to predict survival and treatment responses in lung squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23 (1): 525.
- [19] Liu SY, Liao S, Liang L, et al. The relationship between CD4⁺ T cell glycolysis and their functions [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34 (6): 345-360.
- [20] Kawano I, Bazila B, Ježek P, et al. Mitochondrial dynamics and cristae shape changes during metabolic reprogramming [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 39 (10-12): 684-707.
- [21] Raynor JL, Chapman NM, Chi HB. Metabolic control of memory T-cell generation and stemness [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2021, 13 (6): a037770.
- [22] Mei LH, Zhang ZH, Li XS, et al. Metabolomics profiling in prediction of chemo-immunotherapy efficiency in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1025046.
- [23] Zheng H, Zhu YJ, Shao XG, et al. Distinct metabolic signatures of hormone-sensitive and castration-resistant prostate cancer revealed by a ¹H NMR-based metabolomics of biopsy tissue [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19 (9): 3741-3749.
- [24] Tian XR, Liu XS, Wang K, et al. Postoperative ctDNA in indicating the recurrence risk and monitoring the effect of adjuvant therapy in surgical non-small cell lung cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2024, 15 (10): 797-807.
- [25] Amaro F, Carvalho M, Bastos ML, et al. Pharmacometabolomics applied to personalized medicine in urological cancers [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15 (3): 295.
- [26] Li HX, Bullock K, Gurjao C, et al. Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1-6.
- [27] Petrera A, von Toerne C, Behler J, et al. Multiplatform approach for plasma proteomics: complementarity of olink proximity extension assay technology to mass spectrometry-based protein profiling [J]. *J Proteome Res*, 2020, 20 (1): 751-762.
- [28] Zhang X, Li J, Yang LK, et al. Targeted proteomics-determined multi-biomarker profiles developed classifier for prognosis and immunotherapy responses of advanced cervical cancer [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1391524.
- [29] Huo ZT, Duan YQ, Zhan DD, et al. Proteomic stratification of prognosis and treatment options for small cell lung cancer [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2024, 22 (2): qzae033.
- [30] Shi X, Sheng Y, Fei HR, et al. Combined transcriptome and proteome analysis reveals MSN and ARFIP2 as biomarkers for trastuzumab resistance of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2024, 207 (1): 187-201.
- [31] Kim C. Complex regulatory effects of gut microbial short-chain fatty acids on immune tolerance and autoimmunity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20 (4): 341-350.
- [32] Hoang DT, Shulman ED, Turakulov R, et al. Prediction of DNA methylation-based tumor types from histopathology in central nervous system tumors with deep learning [J]. *Nat Med*, 2024, 30 (7): 1952-1961.
- [33] Luo LF, Fu S, Du W, et al. LRR3B and its promoter hypomethylation status predicts response to anti-PD-1 based immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 959868.
- [34] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359 (6371): 97-103.
- [35] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359 (6371): 91-97.
- [36] Liu ZQ, Li HY, Dang Q, et al. Integrative insights and clinical applications of single-cell sequencing in cancer immunotherapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79 (11): 577.

(收稿日期: 2024-09-17; 修回日期: 2024-11-17)

咖啡酸及其衍生物在糖尿病及其并发症中作用的研究进展

盘昌杰, 石雨彤, 罗晓艳, 叶涛生, 黄静莹, 姜涛* (江西中医药大学药学院, 南昌 330000)

摘要: 糖尿病及其并发症是全球重大公共健康问题之一, 迫切需要开发新型多靶点治疗策略和药物。咖啡酸及其衍生物通过减轻氧化应激、促进葡萄糖摄取、改善炎症状态、调节脂质代谢、调控胆碱能和嘌呤能系统、增强细胞自噬和促进肠道微生物群平衡等作用, 展现出防治糖尿病及其并发症的潜力。本文综述咖啡酸及其衍生物在糖尿病及其并发症中作用的研究进展。

关键词: 咖啡酸; 衍生物; 糖尿病; 并发症

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0484-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.029

Research progress in the effect of caffeic acid and its derivatives on diabetes mellitus and related complications

PAN Chang-jie, SHI Yu-tong, LUO Xiao-yan, YE Tao-sheng, HUANG Jing-ying, JIANG Tao* (School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000)

Abstract: Diabetes mellitus and its complications are a major global health concern, which require the requires development of novel multi-target therapeutic drugs and strategies. Caffeic acid and its derivatives have shown therapeutic potential by alleviating oxidative stress, promoting glucose uptake, improving inflammatory status, regulating lipid metabolism, modulating cholinergic and purinergic systems, enhancing cellular autophagy, and promoting gut microbiota balance. This review summarized the research progress in the effect of caffeic acid and its derivatives on diabetes mellitus and its complications.

Key words: caffeic acid; derivative; diabetes mellitus; complication

国际糖尿病联盟最新流行病学数据显示, 中国 20~79 岁人群中糖尿病患病人数已达 1.74 亿, 年龄标化患病率为 12.5%^[1]。糖尿病及其相关并发症, 包括糖尿病肾病、视网膜病变、神经病变和心血管疾病等, 仍是全球主要致死致残因素之一^[2]。目前糖尿病及其并发症的治疗主要依赖胰岛素及口服降糖药物 (如双胍类、磺脲类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等), 但鉴于疾病发病机制复杂, 以天然活性物质为代表的多靶点治疗策略日益成为糖尿病及其并发症防治研究的重要方向^[3-4]。咖啡酸 (CA) 是一种广泛存在于植物界的酚酸类化合物, 不仅存在于咖啡豆、常见水果和蔬菜中, 在杜仲、蒲公英和金银花等中国传统药用植物中含量也很丰富^[5]。近年来, 学者们发现 CA 及其衍生物, 如咖啡酸苯乙酯 (CAPE)、咖啡酸甲酯

和阿魏酸 (FA) 等, 不仅可改善高血糖状态, 还可通过多重机制缓解糖尿病并发症的进展^[6]。CA 及其衍生物已有片剂等制剂和蜂胶类保健品上市, 临床研究显示此类物质在改善血糖控制、糖尿病足溃疡及牙周炎等方面具有潜在疗效, 但仍需更多临床试验数据验证其在糖尿病治疗中的确切价值^[7]。本文综述 CA 及其衍生物在糖尿病及其并发症中作用的最新研究进展, 拟为开发新型天然抗糖尿病药物提供理论依据。

1 糖尿病及其并发症的发病机制

糖尿病及其并发症的发病机制涉及多个病理过程: ① 氧化应激导致晚期糖基化终产物 (AGEs) 形成增加、活性氧簇过量产生, 同时超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 和过氧化氢酶等抗氧化酶活性降低, 是糖尿病、糖尿病

基金项目: 江西中医药大学博士科研启动基金 (No. 2019BSZR003); 江西省 2023 年度研究生创新专项资金项目 (No. YC2023-S792)。

作者简介: 盘昌杰, 男, 在读硕士研究生, 主要从事咖啡酸及其衍生物的合成研究, email: 736068070@qq.com * **通信作者:** 姜涛, 男, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究, email: chjiangtao@jxutcm.edu.cn

视网膜病变等多种疾病的致病因素^[8]；② 葡萄糖代谢紊乱表现为腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）通路活性下降导致葡萄糖摄取和葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）转位受阻、胰岛素敏感性降低，引起葡萄糖跨膜转运与细胞内利用障碍，在糖尿病及其多种并发症的发生发展中发挥核心作用^[9]；③ 慢性炎症的特征是还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）氧化酶 4/核因子 κ B（NOX4/NF- κ B）和晚期糖基化终产物 / 晚期糖基化终产物受体 / 核因子 κ B/NOD 样受体蛋白 3（AGE/RAGE/NF- κ B/NLRP3）等炎症通路异常激活，导致肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）、白细胞介素（IL）-1 β （IL-1 β ）等促炎细胞因子水平升高和离子钙结合适配器分子 1（Iba-1）阳性小胶质细胞等免疫细胞异常活化，与糖尿病、糖尿病肾病等多种疾病密切相关^[10]；④ 脂质代谢失衡引起 miR-122 表达异常和三磷酸腺苷（ATP）柠檬酸裂解酶、脂肪酸合酶、羧基甲基戊二酰辅酶 A 还原酶等代谢酶

活性改变，导致血脂代谢异常和组织脂质异位沉积，是糖尿病、糖尿病高血脂症等并发症的重要病理基础^[11]；⑤ 胆碱能和嘌呤能系统紊乱表现为乙酰胆碱酯酶（AChE）、腺苷脱氨酶（ADA）等代谢酶活性异常升高，以及 M1R、 α 7nAChR、A1R、P2X7R 等受体表达下降，引起神经递质传导异常，与糖尿病、糖尿病神经病变等神经系统并发症密切相关^[12]；⑥ 细胞自噬功能障碍影响 *RBICCI*、*MAP1LC3B*、*ATG-12* 等自噬相关基因表达，*miR-133b*、*miR-342*、*miR-30a* 等 miRNA 水平异常和核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）等信号通路活性失调，影响损伤修复和代谢产物清除，在糖尿病、糖尿病肾病等并发症的发病过程中起关键作用^[13]；⑦ 肠道菌群失调表现为类杆菌、透热杆菌等有害菌群增多，泽泻菌、杜波希氏菌等有益菌群减少，损伤宿主代谢稳态和免疫功能，参与糖尿病、糖尿病结肠炎等疾病的发生发展^[14]。糖尿病及其并发症的发病机制见图 1。

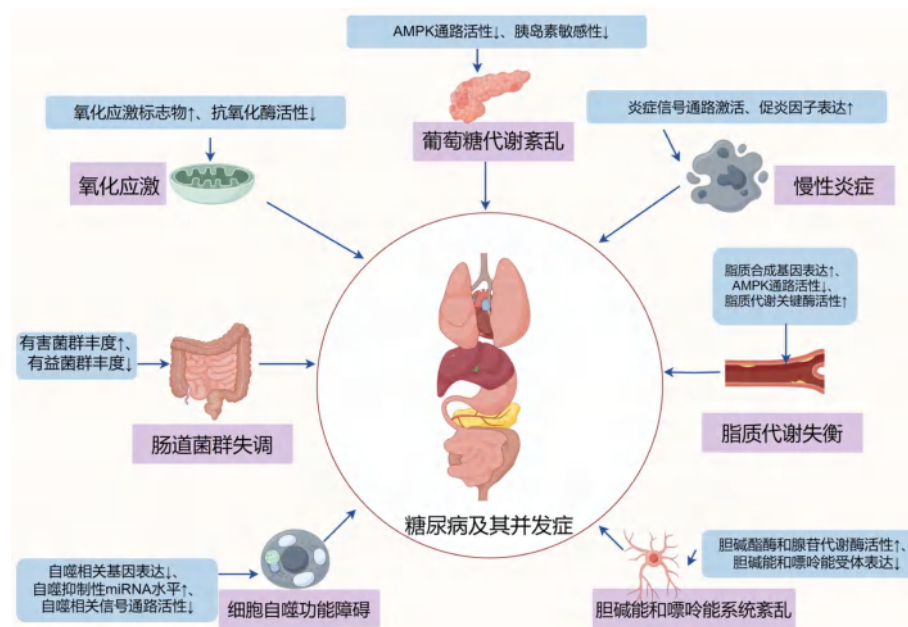


图 1 糖尿病及其并发症的发病机制

Fig 1 Pathogenesis of diabetes mellitus and its complications

2 CA 及其衍生物的结构特征与构效关系

CA 分子由 C6-C3 单元构建，形成特征性的苯环 - 丙烯酸侧链骨架，其关键结构单元包括苯环 3, 4 位的邻位二酚结构（儿茶酚基团）、丙烯酸侧链的 α , β - 不饱和体系以及末端羧基^[15]。儿茶酚基团具有较强的电子供体性质，是 CA 抗氧化活性的重要基础； α , β - 不饱和体系通过共轭效应增强分子电子离域，提高了分子的稳定性；末端羧基则提供了重要的氢键作用位点^[16]。

CA 衍生物的生物活性与其结构特征具有明确的构效关系。其中，CAPE 的苯乙基酯结构赋予其

较高的膜通透性和血脑屏障穿透能力；咖啡酸对硝基苯乙酯（CAPE-*p*NO₂）的对硝基呈现特定的电子空间和空间效应；咖啡酸甲酯与乙酯的低碳链酯类结构具有较好的疏水性和膜转运特性；咖啡酸己基与十二烷基酰胺衍生物的长链结构表现出显著的脂溶性；*N*-辛基咖啡酰胺（36M）中的非极性 *N*-辛基侧链增强了其穿膜能力，有助于发挥细胞内靶向作用；FA 分子中酚基和甲氧基的电子分布特征是其多重药理活性的结构基础；阿魏酸哌嗪（PF）中的哌嗪环不仅可提供碱性胺基团，其 N1、N4 位点还可通过氢键作用和疏水相互作用增强受体选择性^[17-21]。

上述构效关系阐明了 CA 及其衍生物的药代动力学特性和靶向性, 为其改善糖尿病及并发症的药理作用奠定了分子生物学基础。

3 CA 及其衍生物在糖尿病及其并发症中的作用

3.1 减轻氧化应激

持续高血糖状态导致的氧化应激是糖尿病及其并发症发展的关键因素。在高糖环境下, 人脐静脉内皮细胞中 CA 可显著抑制 AGEs 的形成, 降低 AGEs 诱导的自由基水平, 增加抗氧化酶活性, 有效缓解氧化应激状态^[22]。在糖尿病视网膜病变大鼠模型中, 咖啡酸己基和十二烷基酰胺衍生物的应用显著提高了 SOD 活性, 同时降低了脂质过氧化标志物水平^[23]。而 CAPE 处理显著降低了糖尿病大鼠视网膜的总氧化状态水平和氧化应激指数^[24]。作为另一种重要的 CA 衍生物, FA 处理导致 GSH、SOD 和过氧化氢酶活性显著升高, 同时抑制了丙二醛 (MDA) 等氧化应激标志物的水平^[25]。这些研究结果表明, CA 及其衍生物通过促进抗氧化酶活性和抑制氧化应激标志物产生, 在糖尿病及其视网膜病变等并发症的氧化应激状态的改善中发挥作用。

3.2 促进葡萄糖摄取

促进葡萄糖摄取是维持血糖稳态的关键, 涉及多条信号通路的调控。离体大鼠脑模型研究显示, CA 可能通过增强中枢神经系统的葡萄糖摄取来改善脑组织的能量代谢^[26]。在培养的鼠胰岛素敏感细胞模型中, 咖啡酸甲酯和乙酯能显著促进葡萄糖摄取和 GLUT4 转位^[27], 这一作用可能与 AMPK 的激活有关, 提示 CA 衍生物可能通过 AMPK 通路调节葡萄糖代谢。非胰岛素依赖型糖尿病小鼠模型研究发现, CAPE 可改善胰岛素敏感性, 间接促进葡萄糖摄取^[28]。这些研究揭示, CA 及其衍生物通过激活 AMPK 通路改善胰岛素敏感性, 促进葡萄糖摄取, 从而改善糖尿病及其并发症。

3.3 改善炎症状态

慢性炎症是糖尿病及其并发症的重要发病机制, 其特征是促炎细胞因子水平升高和免疫细胞活化异常, 导致器官功能障碍。在糖尿病神经病变小鼠模型中, CA 能显著降低脊髓内 Iba-1 阳性小胶质细胞的数量, 抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 和蛋白表达, 并通过激活 IGF-1/IGF-1R 信号通路来抑制炎症反应和神经元凋亡^[29]。糖尿病心肌病小鼠模型研究表明, CAPE-pNO₂ 能显著降低心肌组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的蛋白表达水平, 抑制 NOX4 的表达和 NF- κ B 的磷酸化, 说明 CAPE-pNO₂ 通过调控 NOX4/NF- κ B 信号通路发挥抗炎作用^[30]。在糖尿病肾病研究中, PF 能显著降低糖尿病小鼠肾脏组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 的表达, 抑制 RAGE、NF- κ B p65 和 NLRP3 的表达, 证明 PF 可通过抑制

AGE/RAGE/NF- κ B/NLRP3 通路来减少炎症反应^[31]。现有研究证据表明, CA 及其衍生物通过抑制多条炎症信号通路、降低促炎因子表达, 改善糖尿病及其并发症中的炎症状态。

3.4 改善脂质代谢

糖尿病患者常伴有脂质代谢紊乱, 表现为血浆三酰甘油升高、高密度脂蛋白胆固醇降低和低密度脂蛋白胆固醇颗粒小而密集。在糖尿病高脂血症大鼠模型中, CA 能显著抑制 *miR-122* 的表达和 ATP 柠檬酸裂解酶活性, 同时降低脂肪酸合酶和羟基甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性^[32]。CAPE 能显著降低糖尿病大鼠的血糖和血脂水平, 表明 CAPE 可能通过协同调节糖脂代谢, 在改善糖尿病及其代谢并发症方面具有优势^[33]。CA 衍生物 36M 通过增加 AMPK 磷酸化和抑制 PTP1B 表达, 预防了糖尿病的进展并减少了肝脏脂肪储存, 说明 36M 在调节能量代谢和预防糖尿病肝脏并发症方面具有潜力^[34]。综上, CA 及其衍生物通过抑制脂质合成相关基因表达、激活 AMPK 信号通路、降低脂质代谢关键酶活性, 改善糖尿病及其代谢性并发症中的脂质代谢紊乱。

3.5 调节胆碱能和嘌呤能系统

胆碱能和嘌呤能系统在神经传递和能量代谢调节中扮演关键角色, 其失衡与糖尿病的多种并发症密切相关。在 2 型糖尿病大鼠模型中, CA 显著降低了三磷酸腺苷酶、三磷酸核苷二磷酸水解酶、5-核苷酸酶和 AChE 的活性^[35]。基于糖尿病大鼠模型的研究表明, CA 逆转了 AChE 和 ADA 活性的增加, 同时增加了胆碱能受体 (M1R、 α 7nAChR 和 A1R) 的密度, 并逆转了嘌呤能受体 (P2X7R 和 A2AR) 密度的降低, 揭示了 CA 可能通过调节胆碱能和嘌呤能系统来改善糖尿病相关的认知功能障碍^[36]。CAPE 也对 AChE 和丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 具有强效抑制作用, 提示 CAPE 也在改善糖尿病相关神经病变方面具有潜在治疗效果^[37]。综上, CA 及其衍生物通过抑制胆碱酯酶和腺苷代谢酶活性、促进胆碱能和嘌呤能受体的表达, 调节胆碱能和嘌呤能系统, 从而改善糖尿病及其并发症。

3.6 增强细胞自噬

细胞自噬是一种重要的细胞内降解和循环利用机制, 在维持细胞稳态、应对应激和调节代谢等方面发挥关键作用。在糖尿病肾病大鼠模型研究中, CA 上调了自噬相关基因 (*RBICCI*、*MAP1LC3B*、*ATG-12*) 的表达, 下调了自噬调控 miRNA (*miR-133b*、*miR-342*、*miR-30a*) 的表达, 揭示 CA 可能通过调节 miRNA-自噬轴来改善糖尿病肾病^[38]。CAPE-pNO₂ 通过 Nrf2 依赖途径调节自噬, 同时降低了与阿尔茨海默病相关的 β -淀粉样蛋白和磷酸化 tau 蛋白

(S396) 的表达^[39]。而 FA 能显著促进肾组织中自噬相关基因 LC3 的表达, 延缓糖尿病肾病的进展^[40]。相关研究阐明, CA 及其衍生物通过促进自噬相关基因表达、抑制自噬抑制性 miRNA 水平、激活自噬相关信号通路, 增强细胞自噬, 从而改善糖尿病及其并发症。

3.7 促进肠道微生物群平衡

近年来研究发现, 肠道微生物群的失衡与糖尿病及其并发症的发生发展密切相关。在结肠炎小鼠模型中, CA 的补充降低了类杆菌和透热杆菌的相对丰度, 同时提高了泽泻菌和杜波希氏菌的

相对丰度, 提示 CA 具有调节肠道微生物群的作用^[41]。糖尿病大鼠模型中的研究显示, FA 降低了乳杆菌和瘤胃球菌的比例, 同时促进了类杆菌、布鲁氏菌、链球菌等的生长, 提示 FA 不仅能选择性地促进或抑制特定菌群的生长, 还能影响微生物代谢产物的产生, 从而影响宿主的代谢和免疫功能^[42]。可见, CA 及其衍生物通过降低有害菌群丰度、增加有益菌群丰度, 促进肠道微生物群平衡, 从而改善糖尿病及其并发症。

CA 及其衍生物在糖尿病及其并发症中的作用汇总情况见表 1。

表 1 CA 及其衍生物在糖尿病及其并发症中的作用

Tab 1 Effect of CA and its derivatives on diabetes and its complications

作用机制	药理作用	化合物	主要发现	文献
减轻氧化应激	促进抗氧化酶活性、抑制氧化应激标志物产生	CA	抑制 AGEs 形成, 降低自由基水平, 增加抗氧化酶活性	[22]
		咖啡酸己基和十二烷基酰胺衍生物	提高 SOD 活性, 降低脂质过氧化标志物水平	[23]
		CAPE	降低总氧化状态水平和氧化应激指数	[24]
		FA	提高 GSH、SOD 和过氧化氢酶活性, 抑制 MDA 等氧化应激标志物	[25]
促进葡萄糖摄取	激活 AMPK 通路、改善胰岛素敏感性	CA	增强中枢神经系统的葡萄糖摄取	[26]
		咖啡酸甲酯和乙酯	激活 AMPK 通路、促进 GLUT4 转位	[27]
		CAPE	改善胰岛素敏感性, 间接促进葡萄糖摄取	[28]
改善炎症状态	抑制多条炎症信号通路、降低促炎因子表达	CA	降低小胶质细胞数量, 抑制促炎因子表达, 激活胰岛素样生长因子 1/ 胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-1/IGF-1R) 通路	[29]
		CAPE-pNO ₂	降低促炎因子表达, 抑制 NOX4/NF-κB 通路	[30]
		PF	抑制 AGE/RAGE/NF-κB/NLRP3 通路, 减少炎症反应	[31]
改善脂质代谢	抑制脂质合成相关基因表达、激活 AMPK 信号通路、降低脂质代谢关键酶活性	CA	抑制 miR-122 表达和多种脂质合成酶活性	[32]
		CAPE	降低血糖和血脂水平	[33]
		36M	增加 AMPK 磷酸化, 抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 表达, 预防肝脏脂肪储存	[34]
调节胆碱能和嘌呤能系统	抑制胆碱酯酶和腺苷代谢酶活性、促进胆碱能和嘌呤能受体的表达	CA	降低 ATP 酶、三磷酸核苷二磷酸水解酶、5- 核苷酸酶、AChE 和 ADA 活性, 促进 M1R、α7nAChR、A1R、P2X7R、A2AR 等受体的表达	[35-36]
		CAPE	抑制 AChE 和 BuChE 活性	[37]
增强细胞自噬	促进自噬相关基因表达、抑制自噬抑制性 miRNA 水平、激活自噬相关信号通路	CA	上调自噬相关基因表达, 下调自噬调控 miRNA 表达	[38]
		CAPE-pNO ₂	通过 Nrf2 依赖途径调节自噬, 降低 β- 淀粉样蛋白和磷酸化 tau 蛋白表达	[39]
		FA	促进自噬相关基因 LC3 表达	[40]
促进肠道微生物群平衡	降低有害菌群丰度、增加有益菌群丰度	CA	降低类杆菌和透热杆菌丰度, 提高泽泻菌和杜波希氏菌丰度	[41]
		FA	调节乳杆菌、瘤胃球菌、类杆菌、布鲁氏菌、链球菌等多种菌群丰度	[42]

4 小结

综上所述, CA 及其衍生物通过以下机制改善糖尿病及其并发症的病理状态: ① 促进抗氧化酶活性和抑制氧化应激标志物产生, 减轻氧化应激状态, 改善血管病变; ② 激活代谢相关信号通路和改善胰岛素敏感性, 促进葡萄糖摄取, 降低血糖; ③ 抑制炎症信号通路和降低促炎因子表达, 改善炎症状态, 减轻血管内皮及组织损伤;

④ 调控脂质合成基因和代谢酶活性, 改善脂质代谢, 减轻脂质沉积; ⑤ 抑制代谢酶活性和促进受体表达, 调节胆碱能和嘌呤能系统, 改善神经病变; ⑥ 调控自噬相关基因和信号通路, 增强细胞自噬, 促进损伤修复; ⑦ 调节肠道菌群组成, 促进肠道微生物群平衡, 维持代谢稳态。因此, CA 及其衍生物有望为糖尿病及其并发症的防治提供新的解决方案。

参考文献

- [1] Magliano DJ, Boyko EJ, IDF Diabetes Atlas 10th edition Scientific Committee. IDF diabetes atlas [M]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.
- [2] 莫子鑫, 何玲, 孙逸. 2 型糖尿病脑内糖代谢改变与神经退行性变性疾病的关系 [J]. 中南药学, 2023, 21 (4): 984-992.
- [3] Marx N, Federici M, Schütt K, et al. 2023 ESC guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes [J]. Eur Heart J, 2023, 44 (39): 4043-4140.
- [4] Blahova J, Martiniakova M, Babikova M, et al. Pharmaceutical drugs and natural therapeutic products for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. Pharm, 2021, 14 (8): 806.
- [5] 苏斌, 张宝喜, 毕研才, 等. 咖啡酸国家一级纯度标准物质的研制 [J]. 医药导报, 2023, 42 (8): 1192-1198.
- [6] Silva H, Lopes NMF. Cardiovascular effects of caffeic acid and its derivatives: a comprehensive review [J]. Front Physiol, 2020, 11: 595516.
- [7] Ganguly R, Singh SV, Jaiswal K, et al. Modulatory effect of caffeic acid in alleviating diabetes and associated complications [J]. World J Diabetes, 2023, 14 (2): 62-75.
- [8] Kang QZ, Yang CX. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101799.
- [9] van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance [J]. Biochem Soc Trans, 2023, 51 (3): 1057-1069.
- [10] Rico-Fontalvo J, Aroca G, Cabrales J, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (15): 8668.
- [11] Lu X, Xie QX, Pan XH, et al. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9 (1): 262.
- [12] Zilliox LA. Diabetes and peripheral nerve disease [J]. Clin Geriatr Med, 2021, 37 (2): 253-267.
- [13] Erekat NS. Programmed cell death in diabetic nephropathy: a review of apoptosis, autophagy, and necroptosis [J]. Med Sci Monit, 2022, 28: e937766.
- [14] Zhai L, Wu J, Lam YY, et al. Gut-microbial metabolites, probiotics and their roles in type 2 diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (23): 12846.
- [15] Espíndola KMM, Ferreira RG, Narvaez LEM, et al. Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma [J]. Front Oncol, 2019, 9: 541.
- [16] Zhao X, Liu ZW, Liu H, et al. Hybrid molecules based on caffeic acid as potential therapeutics: a focused review [J]. Eur J Med Chem, 2022, 243: 114745.
- [17] Araujo MO, Freire Pessoa HL, Lira AB, et al. Synthesis, antibacterial evaluation, and QSAR of caffeic acid derivatives [J]. J Chem, 2019, 2019 (1): 3408315.
- [18] Lee YL, Hsu LH, Kuo YH, et al. Caffeic amide derivatives inhibit allergen-induced bone marrow-derived dendritic cell maturation [J]. Pharmacol Rep, 2019, 71 (1): 194-200.
- [19] Wu BL, Hao YM, Chen Y, et al. Studies on the structure-activity relationship of caffeate derivatives as neuro-protective agents [J]. J Chin Pharm Sci, 2019, 28 (9): 601-608.
- [20] Kaur R, Sood A, Lang DK, et al. Natural products as sources of multitarget compounds: advances in the development of ferulic acid as multitarget therapeutic [J]. Curr Top Med Chem, 2022, 22 (5): 347-365.
- [21] Zhang RH, Guo HY, Deng H, et al. Piperazine skeleton in the structural modification of natural products: a review [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2021, 36 (1): 1165-1197.
- [22] Cao XY, Xia Y, Zeng M, et al. Caffeic acid inhibits the formation of advanced glycation end products (AGEs) and mitigates the AGEs-induced oxidative stress and inflammation reaction in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. Chem Biodivers, 2019, 16 (10): e1900174.
- [23] Fathalipour M, Eghtedari M, Borges F, et al. Caffeic acid alkyl amide derivatives ameliorate oxidative stress and modulate ERK1/2 and AKT signaling pathways in a rat model of diabetic retinopathy [J]. Chem Biodivers, 2019, 16 (12): e1900405.
- [24] Şahin A, Kaya S, Baylan M. The effects of caffeic acid phenethyl ester on retina in a diabetic rat model [J]. Cutan Ocul Toxicol, 2021, 40 (3): 268-273.
- [25] Salau VF, Erukainure OL, Olofinisan KO, et al. Ferulic acid improves glucose homeostasis by modulation of key diabetogenic activities and restoration of pancreatic architecture in diabetic rats [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2023, 37 (2): 324-339.
- [26] Salau VF, Erukainure OL, Bharuth V, et al. Caffeic acid improves glucose utilization and maintains tissue ultrastructural morphology while modulating metabolic activities implicated in neurodegenerative disorders in isolated rat brains [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35 (1): e22610.
- [27] Eid HM, Thong F, Nachar A, et al. Caffeic acid methyl and ethyl esters exert potential antidiabetic effects on glucose and lipid metabolism in cultured murine insulin-sensitive cells through mechanisms implicating activation of AMPK [J]. Pharm Biol, 2017, 55 (1): 2026-2034.
- [28] Nie JR, Chang YN, Li YJ, et al. Caffeic acid phenethyl ester (propolis extract) ameliorates insulin resistance by inhibiting JNK and NF- κ B inflammatory pathways in diabetic mice and HepG2 cell models [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65 (41): 9041-9053.
- [29] Hou LN, Ma JQ, Feng XG, et al. Caffeic acid and diabetic neuropathy: investigating protective effects and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-related antioxidative and anti-inflammatory mechanisms in mice [J]. Heliyon, 2024, 10 (12): e32623.
- [30] Fan L, Xiao QH, Zhang LW, et al. CAPE- p NO₂ attenuates diabetic cardiomyopathy through the NOX4/NF- κ B pathway in STZ-induced diabetic mice [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 1640-1650.
- [31] Zhang XM, Min XR, Xie HX, et al. Piperazine ferulate inhibits diabetic nephropathy by suppressing AGE/RAGE-mediated inflammatory signaling in rats and podocytes [J]. Front

- Pharmacol, 2024, 15: 1394369.
- [32] Elseweidy MM, Elawadi AS, Sobh MS, et al. Potential of caffeic acid and 10-dehydrogingerone as lipid regulators relevant to their inhibitory effect on miR-122 and ATP citrate lyase activity in diabetic hyperlipidemic rats [J]. Biomedicines, 2023, 11 (3): 726.
- [33] Wu MY, Liu CC, Lee SC, et al. N-octyl caffeamide, a caffeic acid amide derivative, prevents progression of diabetes and hepatic steatosis in high-fat diet induced obese mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (16): 8948.
- [34] Oršolić N, Sirovina D, Odeh D, et al. Efficacy of caffeic acid on diabetes and its complications in the mouse [J]. Molecules, 2021, 26 (11): 3262.
- [35] 龚频, 文和, 王兰, 等. 咖啡酸苯乙酯对糖尿病大鼠肾的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32 (11): 1021-1023, 1030.
- [36] Castro MFV, Assmann CE, Stefanello N, et al. Caffeic acid attenuates neuroinflammation and cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetic rats: pivotal role of the cholinergic and purinergic signaling pathways [J]. J Nutr Biochem, 2023, 115: 109280.
- [37] Salau VF, Erukainure OL, Ijomone OM, et al. Caffeic acid regulates glucose homeostasis and inhibits purinergic and cholinergic activities while abating oxidative stress and dyslipidaemia in fructose-streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2022, 74 (7): 973-984.
- [38] Matboli M, Eissa S, Ibrahim D, et al. Caffeic acid attenuates diabetic kidney disease via modulation of autophagy in a high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rat [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 2263.
- [39] Luo ZX, Wan Q, Han YM, et al. CAPE-*p*NO₂ ameliorates diabetic brain injury through modulating Alzheimer's disease key proteins, oxidation, inflammation and autophagy via a Nrf2-dependent pathway [J]. Life Sci, 2021, 287: 119929.
- [40] Ma RY, He YH, Fang Q, et al. Ferulic acid ameliorates renal injury via improving autophagy to inhibit inflammation in diabetic nephropathy mice [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113424.
- [41] Wan F, Zhong RQ, Wang MY, et al. Caffeic acid supplement alleviates colonic inflammation and oxidative stress potentially through improved gut microbiota community in mice [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 784211.
- [42] Song Y, Wu MS, Tao G, et al. Feruloylated oligosaccharides and ferulic acid alter gut microbiome to alleviate diabetic syndrome [J]. Food Res Int, 2020, 137: 109410.
- (收稿日期: 2024-09-30; 修回日期: 2024-01-10)

黄芪多糖在肺动脉高压治疗中的作用及机制研究进展

周怡博, 于淼, 马丽娟, 祝田田* (新乡医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 肺动脉高压是一种慢性进行性疾病, 病死率高, 具有肺血管阻力增加、肺血管重构、肺动脉压力升高的临床特点, 可导致右心衰竭和死亡。黄芪多糖是黄芪发挥作用的主要成分, 对多种疾病具有治疗作用, 目前已有多项研究证明黄芪多糖对肺动脉高压具有保护作用, 其作用机制与 NO/sGC/cGMP、Calpain-1 信号通路、KLF5/HIF-1 α 等多种通路有关。本文综述了黄芪多糖在肺动脉高压治疗中的作用及机制研究进展, 以期对肺动脉高压的治疗提供参考。

关键词: 肺动脉高压; 黄芪多糖; 抗炎; 抗血栓

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0489-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.030

Research progress in the effect and mechanism of astragalus polysaccharide for pulmonary hypertension

ZHOU Yi-bo, YU Miao, MA Li-juan, ZHU Tian-tian* (Xinxiang Medical Institute, Xinxiang Henan 453003)

Abstract: Pulmonary hypertension (PH) is a chronic disease, with a high mortality. PH is characterized by increased pulmonary vascular resistance and pulmonary artery pressure, and

基金项目: 河南省自然科学基金面上项目 (No.242300421305); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (No.2024GGJS089)。

作者简介: 周怡博, 男, 主要从事心血管药理学方面的研究, email: 3379997423@qq.com ***通信作者:** 祝田田, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管药理学方面的研究, email: zhutt@xxmu.edu.cn

pulmonary vascular reconstruction, which may lead to right heart failure and death. Astragalus polysaccharide (APS) is the main component of astragalus, and has treatment effect on many diseases. At present, many studies have proved that APS has a protective effect on PH, whose mechanism of action is related to various pathways, including NO/sGC/cGMP, Calpain-1 signaling pathway, and KLF5/HIF-1 α . This article summarized the research progress in the effect and mechanism of APS for PH to provide reference for the treatment of PH.

Key words: pulmonary hypertension; astragalus polysaccharide; anti-inflammation; anti-thrombosis

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是指肺动脉压力超过一定阈值的一种血流动力学异常状态, 导致右心负荷增大和右心功能不全, 从而引发一系列临床症状。根据血流动力学的定义, 在海平面、静息状态下, 右心导管检查测得的平均肺动脉压若超过 20 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 即可诊断为 PH^[1]。PH 的标志性病理特征是肺远端小动脉增生、纤维化和增生性重构^[2]。PH 的确切病因尚不完全清楚, 导致疾病发生发展的病理生理学原因较为复杂, 其致病机制涉及多方面, 如一氧化氮 (nitric oxide, NO)、前列环素、内皮素 1、低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 等血管活性物质失衡引起肺动脉平滑肌细胞增殖, 最终导致血管重构^[3]; 成纤维细胞激活巨噬细胞后增强多条信号通路促进 PH 血管重构^[4] 和长链非编码 RNA^[5] 等。PH 根据其发病机制、病理生理特点可分为五类^[6]: 动脉性肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH)、左心疾病相关的 PH、肺部疾病/缺氧相关的 PH、慢性肺动脉阻塞相关的 PH、原因不明或多因素引起的 PH。在这些分类中, 左心疾病为 PH 最常见的病因, 而我国动脉性 PH 最常见病因则是先天性心脏病^[7]。有研究显示全球约 1% 的人存在患 PH 的风险, 而在 65 岁以上的老年人群中, 这一风险高达 10%^[8], 值得注意的是, 近 80% 的 PH 患者生活在发展中国家。目前临床治疗 PH 的药物主要有前列环素类似物、前列环素受体激动剂、内皮素受体拮抗剂等, 但其多以控制病情为主要作用, 且具有损伤肝、肾等器官的不良反应, 其疗效也会随时间的延长而降低^[9], 此外还具有降主动脉-左肺动脉吻合术、肺动脉去神经术、肺动脉球囊成形术等非药物治疗手段, 但存在风险高、适应证和远期疗效尚不明确、并发症较为常见等弊端^[10], 因此目前 PH 的治疗尚没有非常有效安全的手段, 仍是需要研究的重要问题。

黄芪中含有多糖类、皂苷类、黄酮类等多种

活性成分^[11], 近年来, 黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 和黄芪甲苷对 PH 作用的相关研究较为深入。作为黄芪中含量最多、免疫活性最强的一类物质^[12], APS 已经应用于 PH 治疗并取得了良好的治疗效果, 在四味黄芪散^[13]、人参养荣汤^[14]、益气活血利水方^[15] 等多种治疗 PH 的药物中作为有效成分发挥重要作用, 本综述旨在探讨 APS 在 PH 治疗中的作用及机制, 以期为 PH 的临床治疗提供科学依据, 并拓展 APS 的应用范围, 为 PH 的治疗提供新的视角和参考。

1 黄芪及 APS

黄芪属于豆科植物, 是蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根, 又名黄耆, 主要栽培于内蒙古、甘肃、山西和东北等地区^[16]。黄芪药用历史悠久, 中国最早的《神农本草经》就将黄芪列为“上品”。黄芪主要活性成分包括多糖、黄酮类和皂苷类化合物^[17], 这些成分赋予了黄芪调节免疫、抗肿瘤、降血糖、抗衰老和抗炎等药理作用^[18], 此外, 黄芪对心肺脑、胃肠道、肝肾等重要器官以及神经系统都具有保护作用^[19]。

APS 是黄芪发挥作用的主要成分, 其分子式为 C₁₀H₇ClN₂O₂S, APS 主要分为葡聚糖和杂多糖两大类。葡聚糖依据其水溶性, 又可分为水溶性葡聚糖和水不溶性葡聚糖^[20]; 杂多糖则主要为半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和阿拉伯糖组成的水溶性酸性杂多糖, 少量为半乳糖醛酸和葡糖醛酸组成的糖醛酸, 还有一小部分杂多糖仅由葡萄糖和阿拉伯糖组成^[21]。APS 不仅具有降血压、降血脂、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗应激、保肝护肾等功效^[22], 而且多项研究已经证实, 注射、灌胃或口服 APS 可以有效减缓 PH, 以治疗 PAH、低氧肺动脉高压 (HPH) 和慢性血栓栓塞性肺动脉高压 (CTEPH) 效果更佳。这些研究成果为 APS 在 PH 治疗中的应用提供了科学依据, 有望为 PH 患者带来新的治疗选择和希望。

2 APS 对 PH 的应用及机制

2.1 NO/sGC/cGMP 通路

NO 是一种生物信使分子，广泛分布于生物体的各个组织与器官，参与机体多种生理和病理反应，在心血管系统、神经系统、消化系统、免疫系统、泌尿系统等多个方面发挥着关键作用^[23]。NO 的生成依赖于氧化氮合酶 (NOS)，NOS 将 L-精氨酸转化为 L-瓜氨酸和 NO^[24]。NO 作为一种重要的血管舒张因子，具有调节血管平滑肌舒张、减少血小板的聚集与血栓形成、抑制血管平滑肌细胞增殖等多种功能，这些功能使得 NO 在 PH 的发生发展中扮演着重要角色，并有助于改善 PH^[25]。在血管平滑肌细胞中，NO 能够激活可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC)，催化鸟苷三磷酸 (GTP) 转为第二信使环磷酸鸟苷 (cGMP)，cGMP 可激活 cGMP 依赖的蛋白激酶 G (PKG) 使血管舒张，并抑制血管平滑肌细胞增殖和血小板的聚集^[26]。因此，NO/sGC/cGMP 信号通路的完整性对于维持血管健康至关重要，其破坏是 PH 病理生物学中的主要因素。Yuan 等^[27]研究发现，APS 可以促进内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和 NO 的合成，从而促进血管扩张，抑制肺血管重塑，改善 PAH (见图 1，本图由 Figdraw 绘制)。这一发现表明 APS 可能成为一种有效的治疗手段，有助于缓解 PH 患者的病情，改善其生活质量。

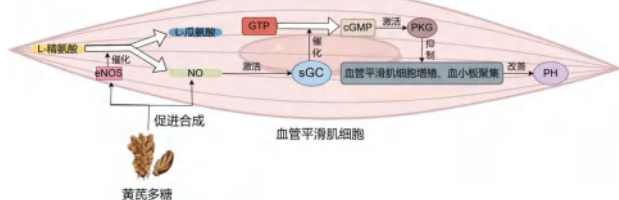


图 1 APS 通过 NO/sGC/cGMP 通路改善 PH
Fig 1 APS improves PH through NO/sGC/cGMP pathway

2.2 钙蛋白酶 1 (Calpain-1) 信号通路

炎症是 PH 明显病理特征之一，PH 患者肺组织促炎细胞因子增多^[28]。钙蛋白酶 (Calpain) 是钙依赖性非溶酶体的中性半胱氨酸内肽酶家族，其参与心血管疾病、神经系统疾病和癌症等多种生理过程，而 Calpain-1 和钙蛋白酶 2 (Calpain-2) 是两种主要的钙蛋白酶，其中 Calpain-1 在炎症过程中发挥了重要作用^[29]。

NOD 样受体家族蛋白 3 (NLRP3) 参与组成炎症小体^[30]，Pasqua 等^[31]研究显示 NLRP3 炎症小体参与 PH 的进展。Yu 等^[32]研究显示 Calpain-1 参与 NLRP3 炎症小体的激活。有研究显示，APS 可以减少 PAH 大鼠肺组织中的 Calpain-1 的表达并降低 Calpain 的活性，从而改善肺动脉中的血管增厚

程度和阻塞程度^[33]。李聪等^[34]研究发现，APS 可使肺组织中 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 蛋白表达水平和血清中白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 水平降低，提示 APS 可抑制 Calpain-1 介导的 NLRP3 活化诱导的炎症，缓解肺动脉血管阻塞程度，从而改善 PAH。

NF- κ B 是炎症的中枢调节因子^[35]。经典 NF- κ B 通路的激活诱导各种编码促炎细胞因子和趋化因子的基因的表达，如 IL-6^[36]，因此 NF- κ B 可以通过白细胞的趋化性促进血管炎症。NF- κ B 被激活后，可调节细胞生长、炎症和免疫功能，进而促进肺血管重塑，引起 PH 在内的多种疾病^[37]。Zhao 等^[38]研究发现，低氧缺血状态下，细胞内 Ca²⁺ 过多可激活 Calpain-1。激活的 Calpain-1 又可以激活 NF- κ B^[39]，进而促进其下游因子表达，如 IL-6、IL-1 β 、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和肿瘤坏死因子 α 等产生炎症反应和纤维化反应^[40]，加剧 PH 的发展。Dong 等^[41]研究发现，APS 可以通过 NF- κ B/MAPK 通路减轻脂多糖诱导的炎症，有明显的抗炎作用；而 Zhang 等^[42]研究发现，APS 可以显著降低肺组织羟脯氨酸水平，并抑制转化生长因子 β 1 表达，减轻肺组织纤维化。刘欢等^[43]研究发现，APS 可缓解 PH 肺组织中胶原纤维沉积面积增大、MMP-9 和转化生长因子 β 1 蛋白表达上调及肺组织中羟脯氨酸水平升高等，可能是通过抑制 Calpain-1/NF- κ B 信号通路的激活改善 PAH。袁琳波^[44]发现，APS 通过抑制 NF- κ B 信号通路，降低了各种炎症标志物和炎症因子的表达，抑制肺血管重构，从而减轻 PAH (见图 2，本图由 Figdraw 绘制)。

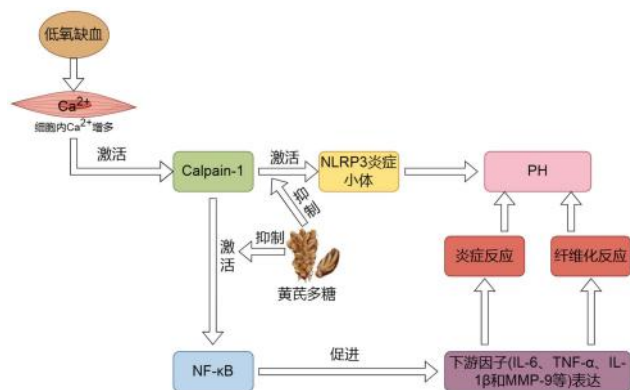


图 2 APS 通过 Calpain-1 信号通路改善 PH
Fig 2 APS improves PH through Calpain-1 signal pathway

2.3 KLF5/HIF-1 α 信号通路

Krüppel 样因子 5 (KLF5) 是锌指蛋白转录因子，在细胞发育、增殖、凋亡和致癌过程等方面都具有重要的生物学功能，可诱导血管平滑肌细

胞、心血管细胞和肌纤维细胞等增殖^[45]。HIF-1 α 是一种氧调节的转录因子，在氧气存在的情况下，HIF-1 α 泛素化，缺氧时HIF-1 α 的泛素化受阻，从而导致HIF-1 α 在细胞质中积累^[46]，并与低氧诱导因子1 β 形成二聚体，进一步激活参与能量代谢、细胞增殖和细胞外基质重组的基因，介导血管重构^[47]。目前，研究显示KLF5可激活HIF-1 α 转录，提高HIF-1 α 的水平^[48]，进而抑制缺氧条件下的非小细胞肺癌细胞凋亡，促进其存活^[49]。Li等^[50]研究发现，KLF5/HIF-1 α 信号通路通过调节细胞周期调节因子Cyclin B1和Cyclin D1以及凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2等的表达介导肺血管重构和HPH。邓海艳等^[51]研究发现，APS降低HPH小鼠肺组织中KLF5和HIF-1 α 的蛋白水平，降低HPH小鼠肺组织中血管内皮生长因子、Cyclin B1和Cyclin D1的蛋白水平，减少HPH小鼠肺组织胶原沉积面积，抑制其肺血管细胞增殖和肺组织纤维化，提示APS缓解HPH与KLF5/HIF-1 α 信号通路有关。

2.4 IL-17 相关作用

IL-17可分泌自CD4⁺T淋巴细胞^[52]，在PH的发生与发展中扮演着重要的角色：PH患者肺组织中有IL-17高表达^[53]；IL-17表达下调可改善肺血管的重塑，缓解PH的发展^[54]。研究显示，APS可缓解肺部炎症，降低Th17细胞因子IL-17A、IL-25水平^[55]。申冬冬等^[56]研究发现，APS可以提高CD4⁺和CD8⁺T细胞的比值，使得CD4⁺T细胞比例显著升高，CD8⁺T细胞比例明显下降，说明APS可以通过调节T细胞亚群水平增强其免疫杀伤功能进而提高机体免疫能力。张玉坤等^[57]研究发现，APS可

改善肺动脉、心肌细胞重塑，缓解PAH，其机制可能与下调肺组织中IL-17 mRNA及蛋白的表达有关。

2.5 其他

血小板是循环血液中的一种无核细胞，在形成血栓的过程中起重要作用^[58]，其释放的活性因子维持体内凝血因子的动态平衡^[59]。白旭东等^[60]研究发现APS能够抑制血小板聚集，降低血小板的聚集率。谢雯等^[61]研究发现APS具有抗血栓作用，能在一定程度上减少血栓的生成，改善高凝状态，从而对CTEPH有保护作用。同时一些研究表明APS还有其他作用，如APS可能通过调节超氧化物歧化酶、乳酸脱氢酶和NO等氧化应激指标的表达而减轻细胞氧化作用，调节氧化应激反应^[62]；APS可以上调自噬相关蛋白III型磷脂酰肌醇3-激酶、自噬相关基因Beclin-1蛋白、雷帕霉素靶蛋白复合物的表达水平，调节自噬^[63]；APS可以使中性粒细胞浸润以及肺间质水肿减少，保护肺血管内皮损伤，改善肺血管重塑^[64]。这些作用都与PH的发生有着密切关系，但是目前尚没有研究说明APS可以通过这些机制进而改善PH，有待进一步研究。

综上所述，APS目前可以通过NO/sGC/cGMP、Calpain-1、KLF5/HIF-1 α 等多条通路及IL-17相关作用、抗血栓等多种作用在一定程度上治疗PAH、HPH、CTEPH等多种类型的PH（见表1），而且在目前的研究中，尚未发现APS的不良反应，但是可能会因为个人体质原因和遗传因素出现特异质反应，患者在服用APS时应该注意。这些特性使得APS在PH的治疗中显示出效果强、给药方便、经济方便等多种优势。

表 1 APS 治疗 PH 的相关机制通路

Tab 1 Related mechanism pathway of APS for PH

机制通路	关键调节因子	药理作用	PH 类型
NO/sGC/cGMP 通路	NOS、NO、sGC、cGMP、PKG 等	促进血管扩张，抑制肺血管重塑	PAH
Calpain-1 信号通路	Calpain-1、NLRP3、IL-1 β 、IL-18；NF- κ B、IL-6、IL-1 β 、MMP-9 等	抑制炎症，缓解肺动脉血管阻塞；肺组织纤维化和肺血管重塑	PAH
KLF5/HIF-1 α 信号通路	Cyclin B1、Cyclin D1、Bax、Bcl-2 等	抑制肺血管细胞增殖和肺组织纤维化	HPH
IL-17 相关作用	IL-17A、IL-25 等	调节 T 细胞亚群水平，提高机体免疫力	PAH
其他	纤溶酶原激活物抑制剂-1、血栓素等	抑制血小板聚集，抗血栓	CTEPH

3 结论

随着生物技术的飞速发展以及对中药作用机制的深入探索，应用于PH的治疗药物和治疗策略日益增多并取得显著进展。然而，PH发病因素复杂，确诊过程缓慢，死亡率相对较高，且目前的治疗手段主要集中在延缓病情的发展，尚无法实现完全治愈。APS作为一种具有多种药理

活性的中药成分，在心脑血管疾病的防治中展现出了良好的治疗效果，特别是其抗炎、抗氧化、抗应激等作用，为PH的治疗提供了新的希望。APS的这些特性使其在PH治疗中显示出极大的潜力，能够有效地改善病情，提高患者的生活质量。尽管APS在PH治疗中的应用已经取得了一些进展，但是其机制尚不完全清楚，存在许多挑

战,为了更好地利用 APS 在 PH 治疗中的优势,未来的研究需要深入探究其作用机制,解决现有问题和挑战。

参考文献

- [1] 罗勤. 中国肺动脉高压诊治临床路径[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(7): 691-703.
- [2] Johnson S, Sommer N, Cox-Flaherty K, et al. Pulmonary hypertension: a contemporary review[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2023, 208(5): 528-548.
- [3] 胡盼盼, 孙增先, 姜艳娇, 等. 肺动脉高压发病机制的最新研究进展[J]. 重庆医学, 2022, 51(4): 678-682.
- [4] Prins KW, Archer SL, Pritzker M, et al. Interleukin-6 is independently associated with right ventricular function in pulmonary arterial hypertension[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2018, 37(3): 376-384.
- [5] 刘云, 孙增先, 任斐. 长链非编码 RNA 在肺动脉高压中的作用[J]. 生理科学进展, 2020, 51(5): 332-336.
- [6] Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(38): 3618-3731.
- [7] 殷嘉晨, 徐媛, 俞砚喆, 等. 各类型肺动脉高压的靶向药物治疗[J]. 世界临床药物, 2023, 44(12): 1330-1334, 1338.
- [8] Hoeper MM, Humbert M, Souza R, et al. A global view of pulmonary hypertension[J]. *Lancet Respir Med*, 2016, 4(4): 306-322.
- [9] 梁宇, 杜冠华. 抗肺动脉高压药物研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(7): 902-906.
- [10] 滕菲, 南景龙. 肺动脉高压的非药物治疗[J]. 心血管病学进展, 2024, 45(1): 31-34.
- [11] 黄国顺, 雍晨, 祝一叶, 等. 黄芪及其主要活性成分抗阿霉素肾脏毒性药理作用研究进展[J]. 中药材, 2024, 47(5): 1315-1319.
- [12] 闫智杰, 贾宝辉, 陈军喜, 等. 黄芪多糖对脓毒症大鼠核因子- κ B 和 Th1/Th2 型细胞因子及 CD4⁺/CD8⁺ 比值的影响[J]. 江西医药, 2011, 46(8): 703-705.
- [13] 李安平, 李怡, 许海艳, 等. 藏药治疗低氧性肺动脉高压的基础研究进展[J]. 医药导报, 2024, 43(4): 545-549.
- [14] 王建美. 人参养荣汤治疗低氧性肺动脉高压作用及机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2023.
- [15] 郭杜鹃. 益气活血利水方治疗左心疾病所致肺动脉高压(气虚血瘀证)临床疗效观察[D]. 济南: 山东中医药大学, 2023.
- [16] 何嘉郡, 秦晨, 贺廉清, 等. 黄芪黄酮类成分及其药理作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(1): 112-119.
- [17] 吴娇, 仝芳超. 黄芪的化学成分、药理作用及临床应用[J]. 滨州医学院学报, 2024, 47(1): 68-75.
- [18] 杨乾方, 王帆, 叶婷, 等. 黄芪多糖提取工艺、化学结构及药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(12): 4069-4081.
- [19] 寇梦佳, 焦扬, 曹芳. 黄芪及其化学成分用于肺系疾病的研究进展[J]. 环球中医药, 2024, 17(8): 1662-1668.
- [20] 张施僮, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及 Q-marker 预测分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410-419.
- [21] 李博, 耿刚. 黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2022, 14(4): 262-264.
- [22] 李明泽, 李国锋, 黄玉龙, 等. 黄芪活性成分生理功能及在食品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(13): 398-407.
- [23] 郑洋滨, 刘宁, 艾力奇, 等. 一氧化氮在各生理系统中的作用[J]. 药品评价, 2022, 19(4): 251-253.
- [24] Gross R, Roye M, Manteghetti M, et al. Mechanisms involved in the effect of nitric oxide synthase inhibition on L-arginine-induced insulin secretion[J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 120(3): 495-501.
- [25] 刘赛利, 艾可龙, 胡长平. 一氧化氮与肺动脉高压及基于一氧化氮信号通路的肺动脉高压治疗药物研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(10): 792-797.
- [26] Tonelli AR, Haserodt S, Aytakin M, et al. Nitric oxide deficiency in pulmonary hypertension: pathobiology and implications for therapy[J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(1): 20-30.
- [27] Yuan LB, Hua CY, Gao S, et al. Astragalus polysaccharides attenuate monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(4): 773-789.
- [28] Hu Y, Chi L, Kuebler WM, et al. Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension[J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2338.
- [29] 孙洋. 黄芪甲苷通过 calpain-1/NLRP-3 信号通路改善肺动脉高压大鼠炎症和血管重构[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2021.
- [30] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [31] Pasqua T, Pagliaro P, Rocca C, et al. Role of NLRP-3 inflammasome in hypertension: a potential therapeutic target[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(9): 708-714.
- [32] Yu Y, Shi H, Yu Y, et al. Inhibition of calpain alleviates coxsackievirus B3-induced myocarditis through suppressing the canonical NLRP3 inflammasome/caspase-1-mediated and noncanonical caspase-11-mediated pyroptosis pathways[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1954-1964.
- [33] 李聪. 黄芪多糖通过减轻 calpain-1 诱导的炎症改善大鼠肺动脉高压[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2021.
- [34] 李聪, 赵坤, 张景良, 等. 黄芪多糖对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠肺动脉血管的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(6): 1371-1379.
- [35] 张芸. 促炎因子通过 NF- κ B 信号通路以及新的前馈调节

- 机制诱导 RIP2 激酶产生 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26 (9): 1727.
- [36] 田小雪, 鲁美丽, 王洪新. 黄芪甲苷通过 calpain-1/NF- κ B 信号通路对低氧诱导的肺动脉高压小鼠的保护作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (13): 1293-1298.
- [37] Farkas D, Alhussaini AA, Kraskauskas D, et al. Nuclear factor κ B inhibition reduces lung vascular lumen obliteration in severe pulmonary hypertension in rats [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 51 (3): 413-425.
- [38] Zhao H, Xu M, Chu GL. Association between myocardial cell apoptosis and calpain-1/caspase-3 expression in rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15 (5): 2727-2731.
- [39] Han QQ, Liu QQ, Zhang H, et al. Simvastatin improves cardiac hypertrophy in diabetic rats by attenuation of oxidative stress and inflammation induced by calpain-1-mediated activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1232-1241.
- [40] Sun LH, Xu Q, Zhang WX, et al. The involvement of spinal annexin A10/NF- κ B/MMP-9 pathway in the development of neuropathic pain in rats [J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20 (1): 1-9.
- [41] Dong N, Li XR, Xue CY, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (7-8): 5525-5540.
- [42] Zhang R, Xu LM, An XX, et al. Astragalus polysaccharides attenuate pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B pathway activation [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46 (1): 331-339.
- [43] 刘欢, 邓海艳, 田小雪, 等. 黄芪多糖通过抑制钙蛋白酶 1/NF- κ B 信号通路减轻低氧诱导的肺动脉高压小鼠肺炎症反应和纤维化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36 (2): 98-107.
- [44] 袁琳波. 内皮微颗粒在大鼠肺动脉高压中的作用以及黄芪多糖的治疗作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [45] 余嘉彬, 吴青青, 唐其柱. Krüppel 样因子 5 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2023, 25 (1): 96-98.
- [46] Fallah J, Rini BI. HIF inhibitors: status of current clinical development [J]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21 (1): 6.
- [47] Lei W, He Y, Shui XR, et al. Expression and analyses of the HIF-1 pathway in the lungs of humans with pulmonary arterial hypertension [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (5): 4383-4390.
- [48] 毛梦婷, 许尤琪, 董孟佳, 等. 中药抑制缺氧诱导因子 -1 α 相关信号通路的抗肿瘤作用研究进展 [J]. 世界中医药, 2024, 19 (4): 600-605.
- [49] Li XC, Liu XS, Xu YJ, et al. KLF5 promotes hypoxia-induced survival and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer cells via HIF-1 α [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45 (4): 1507-1514.
- [50] Li XC, He YZ, Xu YJ, et al. KLF5 mediates vascular remodeling via HIF-1 α in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310 (4): L299-L310.
- [51] 邓海艳, 鲁美丽, 王洪新. 黄芪多糖对低氧诱导肺动脉高压小鼠肺血管重构的保护作用 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44 (11): 1112-1118.
- [52] 徐炜, 舒俊华, 干意, 等. Th17/Treg 细胞免疫平衡的相关调控机制研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33 (24): 48-54.
- [53] 王宏飞, 张安臣, 李飞飞, 等. IL-17 在低氧诱导肺动脉高压过程中的作用 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2013, 42 (3): 273-277.
- [54] Batah SS, Alda MA, Rodrigues Lopes Roslindo Figueira R, et al. In situ evidence of collagen V and interleukin-6/interleukin-17 activation in vascular remodeling of experimental pulmonary hypertension [J]. *Pathobiology*, 2020, 87 (6): 356-366.
- [55] 李承德, 周文宾, 孙艳, 等. 黄芪多糖对哮喘大鼠 Th17/Treg 细胞因子及肺部炎症的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29 (9): 1275-1278.
- [56] 申冬冬, 袁飞, 侯江红. 黄芪多糖对幼鼠肠缺血再灌注损伤肠组织 TNF- α 、ICAM-1、IL-6 及免疫功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (6): 1528-1532.
- [57] 张玉坤, 何东平. 黄芪多糖对野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的减缓作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (1): 64-68.
- [58] 赵小霞. 血小板线粒体功能研究进展 [J]. 检验医学, 2021, 36 (12): 1283-1286.
- [59] Linden MD. Platelet physiology [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 992: 13-30.
- [60] 白旭东, 许琳, 杜瑞卿, 等. 赤芍总苷与黄芪多糖配伍抑制血小板聚集的药效优化 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31 (16): 1321-1325.
- [61] 谢雯, 吴健鸿. 黄芪多糖对慢性血栓栓塞性肺动脉高压大鼠的抗血栓保护作用 [J]. 今日药学, 2023, 33 (8): 586-591.
- [62] 秦劭晨, 王爱梅, 万晓波. 黄芪多糖对脂多糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用及相关机制的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2023, 30 (1): 37-41.
- [63] 李成军, 沈光辉. 黄芪多糖通过诱导自噬作用促进结肠癌干细胞凋亡的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (4): 2274-2279.
- [64] 寇梦佳, 焦扬, 曹芳. 黄芪及其化学成分用于肺系疾病的研究进展 [J]. 环球中医药, 2024, 17 (8): 1662-1668.

(收稿日期: 2024-07-23; 修回日期: 2024-09-04)

药物分析与检验

强肝消脂颗粒制备工艺优化及其物理指纹图谱建立

谭培姚^{1, 2, 3}, 张蓓^{1, 2, 3*}, 王莉^{1, 2, 3}, 张紫诺^{1, 2, 3}, 冯佳欣^{1, 2, 3} (1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院)药学部, 广西 柳州 545026; 3. 柳州市中药(壮瑶药)制剂研发重点实验室, 柳州市中药(壮瑶药)制剂开发工程技术研究中心, 广西 柳州 545026)

摘要: **目的** 优化强肝消脂颗粒的制备工艺, 并对其物理指纹图谱进行分析。**方法** 以强肝消脂浸膏为主药, 以颗粒的成型率(%)、休止角(°)、吸湿率(%)、溶化率(%)作为评价指标, 基于 Box-Behnken 响应面法优化工艺参数, 并进行工艺验证。采用二级物理指标创建 17 批样品的物理指纹图谱, 并对强肝消脂颗粒的物理质量进行一致性评价。**结果** 强肝消脂颗粒最佳制备工艺为 4 倍量乳糖、0.2 倍量糊精、93% 乙醇。17 批样品物理指纹图谱的相似度均大于 0.99。**结论** 强肝消脂颗粒成型工艺稳定可行, 颗粒物理性状稳定可控, 可用于强肝消脂颗粒的制备。

关键词: 强肝消脂颗粒; 制备工艺; 物理指纹图谱; Box-Behnken 响应面法; 物理指标

中图分类号: R283.6, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0495-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.031

Preparation optimization and physical fingerprints of Qianggan Xiaozhi granules

TAN Pei-yao^{1, 2, 3}, ZHANG Bei^{1, 2, 3*}, WANG Li^{1, 2, 3}, ZHANG Zi-nuo^{1, 2, 3}, FENG Jia-xin^{1, 2, 3} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Pharmaceuticals Department of Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital (Liujcouh Si Ywcuengh Yihyen), Liuzhou Guangxi 545026; 3. Key Laboratory of Research and Development of Traditional Chinese Medicine (Zhuang Yao Medicine) Preparations in Liuzhou, Liuzhou Traditional Chinese Medicine (Zhuang Yao Medicine) Preparation Development Engineering Technology Research Center, Liuzhou Guangxi 545026)

Abstract: Objective To optimize the preparation of Qianggan Xiaozhi granules and analyze the physical fingerprints. **Methods** Qianggan Xiaozhi extract was used as the main drug, and the molding rate (%), angle of repose (°), moisture absorption rate (%) and dissolution rate (%) of the granules were used as evaluation indexes. The process parameters were optimized based on Box-Behnken response surface, and the process was verified. The physical fingerprints of 17 batches of samples were established by secondary physical indexes, and the consistency of physical quality of Qianggan Xiaozhi granules was evaluated. **Results** The best preparation process of Qianggan Xiaozhi granules included: 4 times of lactose, 0.2 times of dextrin, and 93% ethanol. The similarity of physical fingerprints of 17 batches of samples were more than 0.99. **Conclusion** The formation of Qianggan Xiaozhi granules is stable and feasible, with controllable physical properties.

Key words: Qianggan Xiaozhi granule; preparation technology; physical fingerprint; Box-Behnken response surface method; physical index

基金项目: 全国中药特色技术传承人才培养项目 (No. 国中医药人教函[2023]96 号); 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题申报书 (No.GXZYB20230470); 柳州市科技计划项目 (No.2022CAC0217)。

作者简介: 谭培姚, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效评价与应用研究, email: tpy053862@163.com *通信作者: 张蓓, 女, 副主任药师, 主要从事中药药效评价与应用研究, email: zhangbei8402@126.com

随着全球性肥胖的发展,非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 已成为全球公认的健康问题之一,其在欧美等发达国家及我国已发展为慢性肝病的主要病因之一,给患者的健康带来了极大的危害^[1]。近年来,中医药治疗 NAFLD 的效果明显。中药强肝消脂方具有健脾化湿、疏肝解郁、行滞化痰等功效,可用于治疗 NAFLD。然而,强肝消脂方大多被制成汤剂或胶囊剂,相较于颗粒剂来说缺少了快速起效、容易制备的优点,故本课题组对强肝消脂方的成型工艺进行优化。

强肝消脂颗粒的处方来源于柳州市中医医院 (柳州市壮医医院) 名中医周晓玲院长根据临床实践总结的经验方,周院长擅长六经辨证,以经络和脉象学相结合以探疾病虚实,治病以求本,从根源上治疗疾病。周院长根据十余年来诊治的单纯性肥胖、NAFLD 等相关疾病,总结了疾病大多为湿邪中阻、肝郁气滞、肝郁脾虚所致。用经方六君子汤及平胃散的处方架构,结合患者中医体质而进行拟方,经患者反馈,处方疗效明显,未见明显不良反应。

通过结合 Box-Behnken 响应面设计优选强肝消脂颗粒的成型工艺并联合物理指纹图谱对强肝消脂颗粒的物理特性进行评价^[2]。物理指纹图谱是指一种用于中药质量控制和评价的技术,它通过综合分析制剂的多个物理参数来构建一个反映其物理特性的图谱,这种图谱不仅可以用于评价制剂的质量真实性、优良性和稳定性,还有助于阐明制剂的作用机制,促进中药现代化^[3]。本研究通过二级物理指标对颗粒的一级物理指标进行综合表征,评价颗粒质量,并采用 SPSS 27.0 软件对创建的物理指纹图谱进行相似度分析,对比 17 批样品间的相似度,评价其物理特性确保颗粒质量,以期对强肝消脂颗粒的工艺研究提供参考^[4]。

1 材料

1.1 仪器

HK-22 电磁炉 (中山市超展电器有限公司); DZTW 型调温电热套 (北京市永光明医疗仪器有限公司); DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); DZF-6094 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); BL-3000 电子天平 (厦门佰伦斯电子科技有限公司); MB23 水分分析仪 (奥豪斯仪器上海有限公司); KB 型 (80-2) 离心沉淀器 (常州市康仁医疗器械有限公司); 药典筛 (浙江上虞市龙翔精密仪器厂); HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

1.2 试药

大黄、党参、茯苓、干姜、葛花、泽泻、炙甘草、姜厚朴购于广西仙荣中药科技有限公司,丹参购于江西彭氏国药堂饮片有限公司,山楂购于安徽旭松中药饮片有限公司,红曲、垂盆草购于安徽康和中药科技有限公司,白术、麸炒苍术购于安徽嘉佑中药饮片有限公司,荷叶、五味子购于国药乐仁堂河北药业有限公司,鸡骨草购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,陈皮、桂枝购于广西百草堂中药饮片厂有限公司,所有药材均符合《中国药典》(2020 年版)一部各项规定;糊精 (批号: 210404, 汉申秦发糊精有限责任公司); 乳糖 (批号: 20230209, 上海华茂药业有限公司); 乙醇 (批号: 20240222, 成都市科隆化学品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 强肝消脂颗粒的制备

按处方称取药材 628.8 g (党参、净山楂各 48 g; 白术、鸡骨草、麸炒苍术、陈皮、姜厚朴、泽泻、茯苓、丹参、葛花、桂枝、荷叶、垂盆草各 36 g; 干姜、红曲、大黄各 19.2 g; 炙甘草 14.4 g; 五味子 28.8 g), 加 8 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 高温浓缩至相对密度 1.26 (80 °C)。浓缩液与辅料 (乳糖、糊精) 混合均匀, 加入润湿剂 (乙醇) 制软材, 过 10 目筛制粒, 干燥, 整粒, 制得强肝消脂颗粒。

2.2 指标测定方法

2.2.1 成型率测定 称定每批颗粒质量 M_1 , 将能过 10 目筛且不过 80 目筛的颗粒记为合格颗粒, 称定质量 M_2 。计算成型率, 成型率 (%) = $(M_2/M_1) \times 100\%$ 。

2.2.2 水分测定 将 5 g 合格颗粒放入水分测定仪中, 在 105 °C 下加热 10 min, 记录水分。

2.2.3 松密度 取 50 mL 量筒, 缓慢倒入 10 g (M_3) 合格颗粒, 记录颗粒体积 V_1 。计算松密度, 松密度 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) = M_3/V_1 。

2.2.4 振实密度 取 50 mL 量筒, 缓慢倒入 10 g (M_4) 合格颗粒, 上下振动至体积不变时记录待测颗粒体积 V_2 。计算振实密度, 振实密度 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) = M_4/V_2 。

2.2.5 豪斯纳比 豪斯纳比 = 振实密度 / 松密度。

2.2.6 休止角测定 利用固定漏斗法^[5], 把 3 个漏斗串联于铁架台上, 距水平面高度 H 。缓慢倒入粉末, 直到粉末所形成的圆锥体尖端碰到漏斗口时停止加入粉末, 记录锥体底部半径 R 。计算休止角, 休止角 ($^\circ$) = $\arctan(H/R)$ 。

2.2.7 吸湿率 取干燥称量瓶放入底部盛有氯化

钠过饱和溶液的干燥器中平衡 24 h, 精密称取 2 g (M_5) 合格颗粒平铺于称量瓶中, 厚度约 1 mm, 精密称重 M_6 , 称量瓶开盖置于恒温恒湿条件下, 24 h 后精密称定质量 M_7 。计算吸湿率, 吸湿率 (%) = $[(M_7 - M_6) / M_5] \times 100\%$ 。

2.2.8 溶化率测定 称取 5 g (M_8) 合格颗粒, 加 100 mL 热水搅拌 5 min, 4000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 精密吸取上清液 20 mL, 置于干燥蒸发皿中, 精密称重 (M_9), 水浴蒸干, 60 °C 下残渣干燥至恒重, 称定质量 (M_{10})。计算溶化率, 溶化率 (%) = $[(M_8 - M_{10} + M_9) / M_8] \times 100\%$ 。

2.2.9 相对均齐度指数 参考文献^[6]报道, 把待测粉末依次过 24、50、65、120、150、200 目筛, 振荡 5 min, 记录每个筛网所拦截的粉末质量, 取平均孔径为 603、303、188、108、83 μm 筛网拦截的颗粒。计算相对均齐度指数, 相对均齐度指数 = $F_m / [100 + (d_m - d_{m-1}) F_{m-1} + (d_{m+1} - d_m) F_{m+1} + (d_m - d_{m-2}) F_{m-2} + \dots + (d_{m+n} - d_m) F_{m+n}]$ 。

2.3 Box-Behnken 响应面法优化强肝消脂颗粒的成型工艺

2.3.1 实验设计 选择 Design-Expert 10.0.1 软件中的 Box-Behnken 响应面设计, 以乳糖倍数 (A)、糊精倍数 (B)、乙醇体积分数 (C) 为关键影响因素, 以成型率 (D)、休止角 (E)、吸湿率 (F)、溶化率 (G) 为评价指标, 优化强肝消脂颗粒的成型工艺。具体因素与水平见表 1, 实验设计及结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 响应面法水平因素表

水平	因素		
	A 乳糖倍数 / 倍	B 糊精倍数 / 倍	C 乙醇体积分数 / %
-1	3	0.2	85
0	4	0.3	90
1	5	0.4	95

对 4 个评价指标 (D、E、F、G) 进行归一化处理, 计算归一值的几何平均数, 得到总归一值 (OD 值)^[7]。OD 值 = $(d_1 d_2 \dots d_k)^{1/k}$, d_i : 首次归一化后的数值, k : 指标个数。在颗粒剂成型工艺中, 成型率与溶化率值越大越好, 休止角与吸湿率值越小越好。利用 Hassan 法^[8], 对 D、E、F、G 进行数学转换, 计算颗粒 d_{\min} 、 d_{\max} 值: $d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$, $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 。结果见表 3。

2.3.2 实验设计结果分析 用 Design-Expert 10.0 软件对 OD 值进行效应面分析, 得到拟合方程: $OD \text{ 值} = 0.73 + 0.027A + 0.058B + 0.06C - 0.13AC - 0.2BC - 0.32A^2 - 0.14B^2 - 0.28C^2$, $R^2 = 0.9336$ 有较高拟合

表 2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

No.	A/倍	B/倍	C/%	D/%	E/(°)	F/%	G/%
1	3	0.2	90	67.03	34.84	7.28	47.66
2	5	0.2	90	74.04	33.55	7.45	50.65
3	3	0.4	90	77.06	33.75	7.85	46.83
4	5	0.4	90	75.95	33.46	7.58	48.73
5	3	0.3	85	67.75	34.38	8.18	45.88
6	5	0.3	85	68.04	33.96	7.67	47.06
7	3	0.3	95	68.99	33.56	8.44	47.85
8	5	0.3	95	73.03	32.94	8.43	47.54
9	4	0.2	85	68.03	32.94	7.49	50.01
10	4	0.4	85	75.11	34.04	8.27	46.96
11	4	0.2	95	75.13	34.04	8.45	48.58
12	4	0.4	95	77.08	32.96	8.17	49.54
13	4	0.3	90	76.47	36.46	8.38	49.38
14	4	0.3	90	74.49	36.66	8.55	48.05
15	4	0.3	90	69.91	36.94	8.27	49.85
16	4	0.3	90	74.82	36.56	8.53	46.74
17	4	0.3	90	75.43	36.87	8.56	48.37

表 3 Box-Behnken 实验转换后数值

No.	A/倍	B/倍	C/%	d_1	d_2	d_3	d_4	OD 值
1	3	0.2	90	0	0.4750	0	0.3732	0
2	5	0.2	90	0.6975	0.1525	0.1328	1	0.3448
3	3	0.4	90	0.9980	0.2025	0.4453	0.1992	0.3659
4	5	0.4	90	0.8876	0.1300	0.2344	0.5975	0.3565
5	3	0.3	85	0.0716	0.3600	0.7031	0	0
6	5	0.3	85	0.1005	0.2550	0.3047	0.2474	0.2096
7	3	0.3	95	0.1950	0.1550	0.9063	0.4130	0.3261
8	5	0.3	95	0.5970	0	0.8984	0.3480	0
9	4	0.2	85	0.0995	0	0.1641	0.8658	0
10	4	0.4	85	0.8039	0.2750	0.7734	0.2264	0.4436
11	4	0.2	95	0.8060	0.2750	0.9141	0.5660	0.5819
12	4	0.4	95	1	0.0050	0.6953	0.7673	0.2273
13	4	0.3	90	0.9393	0.8800	0.8594	0.7338	0.8497
14	4	0.3	90	0.7423	0.9300	0.9922	0.4549	0.7471
15	4	0.3	90	0.2866	1	0.7734	0.8323	0.6554
16	4	0.3	90	0.7751	0.9050	0.9766	0.1800	0.5928
17	4	0.3	90	0.8358	0.9825	1	0.5220	0.8092

度。方差分析结果见表 4, 结果显示, 所建立模型 ($P < 0.01$) 达到极显著水平, 失拟项 ($P > 0.05$) 不显著。因素 BC、 A^2 、 C^2 有显著影响 ($P < 0.01$), 3 个因素对 OD 值的影响程度依次为 $A^2 > C^2 > BC$ 。

利用 Design-Expert 10.0.1 软件作相应的三维响应面曲线图与等高线图, 如图 1 所示。通过二次回归方程可得最佳工艺参数为 3.74 倍量乳糖, 0.24 倍量糊精, 92.83% 乙醇, OD 值为 0.6293。结合实际情况, 最终确定最佳成型工艺为 4 倍量

表 4 Box-Behnken 实验设计方差分析

Tab 4 Variance of Box-Behnken experimental design

来源	离差平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
模型	1.25	9	0.14	10.94	0.0023
A	5.989×10^{-3}	1	5.989×10^{-3}	0.47	0.5145
B	0.027	1	0.027	2.14	0.1868
C	0.029	1	0.029	2.29	0.1743
AB	0.031	1	0.031	2.47	0.1603
AC	0.072	1	0.072	5.65	0.0492
BC	0.16	1	0.16	12.53	0.0095
A ²	0.44	1	0.44	34.27	0.0006
B ²	0.085	1	0.085	6.72	0.0359
C ²	0.32	1	0.32	25.10	0.0015
残差	0.089	7	0.013		
失拟项	0.044	3	0.015	1.29	0.3930
纯误差	0.045	4	0.011		
总误差	1.34	16			

乳糖, 0.2 倍量糊精, 93% 乙醇。

2.3.3 验证优化工艺实验 按照“2.3.2”项下所得最佳优化工艺, 取强肝消脂浸膏, 加入 4 倍量乳糖、0.2 倍量糊精及 93% 乙醇, 制备软材, 挤压过 10 目筛制粒, 干燥, 整粒, 即得。根据上述优化工艺进行 3 次平行验证实验, 验证结果见表 5。平均 OD 值为 0.5363, RSD 为 2.0%, 表明创建的模型能用于优化强肝消脂颗粒的制备工艺。

2.4 强肝消脂颗粒的物理指纹图谱

2.4.1 物理指标的确定 根据颗粒物理性质^[9-10], 选取堆积性、均一性、流动性、稳定性作为强肝消脂颗粒物理指纹图谱的一级物理指标, 松密度、振实密度、相对均齐度指数、豪斯纳比、休止角、水分、吸湿率作为二级物理指标^[11]。

2.4.2 物理指标的测定 按“2.1”项下方法制备

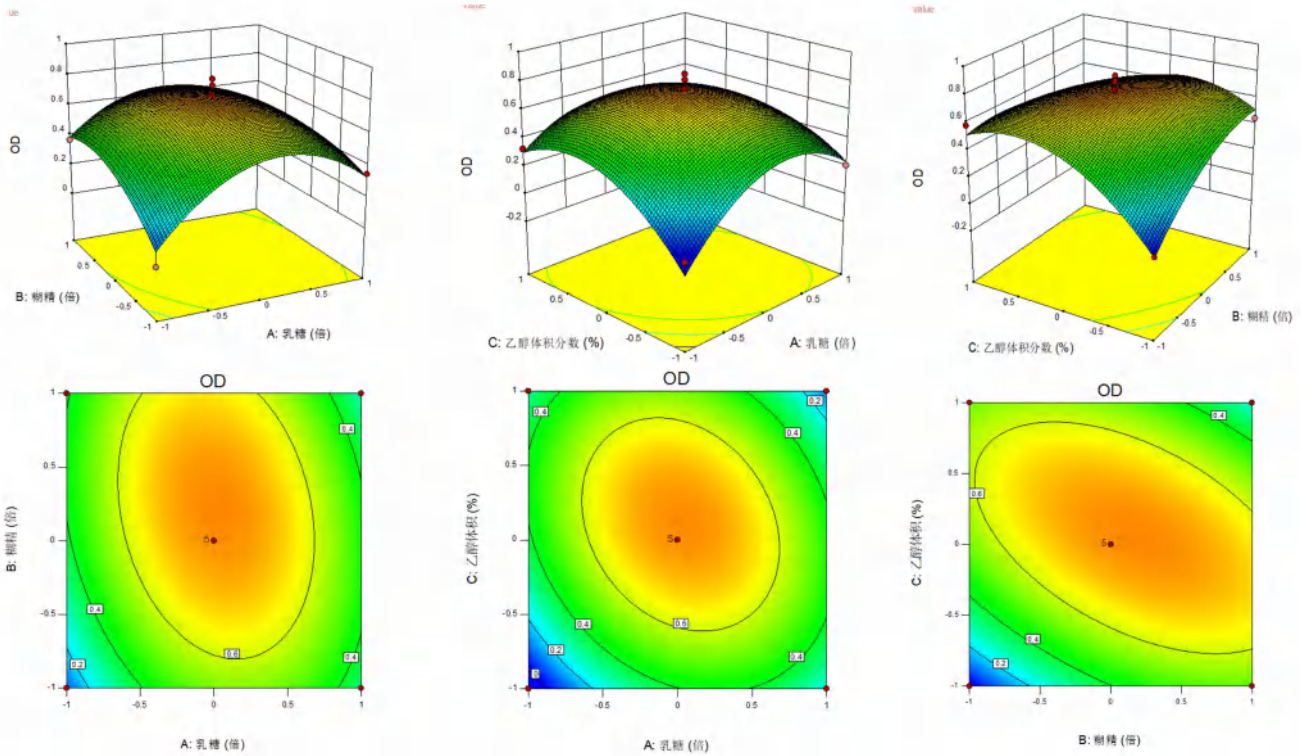


图 1 关键因素的响应面与等高线图

Fig 1 Response surface and contour map of key factors

表 5 优化后实验设计验证结果

Tab 5 Experimental design verification after the optimization

试验号	D/%	E/(°)	F/%	G/%	d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	OD
1	76.87	33.39	8.36	49.84	0.9791	0.1125	0.8438	0.8302	0.5270
2	76.93	33.43	8.41	49.93	0.9851	0.1225	0.8828	0.8491	0.5484
3	76.88	33.41	8.39	49.75	0.9801	0.1175	0.8672	0.8113	0.5335

17 批强肝消脂颗粒, 编号 P1 ~ P17, 按“2.2”项下方法测定各二级物理指标, 结果见表 6。

2.4.3 标准化转换 二级物理指标的量纲不同影响评

价结果的准确度, 为消除量纲影响, 参考文献^[12-13]报道, 将 17 批样品二级物理指标实测值转换成同一尺度 0 ~ 10, 转换公式见表 7, 转换结果见表 8。

表 6 二级物理指标测定结果

Tab 6 Secondary physical indexes

批号	相对均齐度指数 / ($\times 10^{-3}$)	松密度 / ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	振实密度 / ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	吸湿率 / %	水分 / %	休止角 / ($^{\circ}$)	豪斯纳比
P1	1.5036	0.3571	0.4166	7.28	3.8	34.84	1.1666
P2	1.5104	0.3433	0.4046	7.45	3.6	33.55	1.1786
P3	1.4970	0.3448	0.3946	7.85	3.4	33.75	1.1444
P4	1.4876	0.3371	0.3821	7.58	3.2	33.46	1.1335
P5	1.4510	0.3571	0.4166	8.18	3.2	34.38	1.1666
P6	1.6346	0.3325	0.3864	7.67	4.0	33.96	1.1621
P7	1.6270	0.3471	0.4347	8.44	3.4	33.56	1.2524
P8	1.4930	0.3233	0.4075	8.43	4.3	32.94	1.2604
P9	1.5670	0.3571	0.4347	7.49	3.5	32.94	1.2173
P10	1.5170	0.3348	0.3747	8.27	3.6	34.04	1.1192
P11	1.5150	0.3425	0.3921	8.45	4.1	34.04	1.1448
P12	1.5710	0.3403	0.4245	8.18	3.8	32.94	1.2474
P13	1.6190	0.3333	0.4156	8.38	4.0	36.46	1.2469
P14	1.6570	0.3425	0.4046	8.55	4.1	36.66	1.1813
P15	1.6310	0.3448	0.4245	8.27	4.1	36.44	1.2311
P16	1.6190	0.3448	0.4166	8.53	4.1	36.56	1.2082
P17	1.6330	0.3433	0.4046	8.56	4.1	36.87	1.1786

表 7 二级物理指标的转换方法

Tab 7 Conversion method of secondary physical indexes

一级物理指标	二级物理指标	单位	取值范围	转换公式
流动性	休止角	$^{\circ}$	0 ~ 50	$10 - X/5$
	豪斯纳比	—	1 ~ 3	$(30 - 10X) / 2$
稳定性	水分	%	0 ~ 10	$10 - X$
	吸湿率	%	0 ~ 20	$10 - X/2$
堆积性	松密度	$\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0 ~ 1	$10X$
	振实密度	$\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0 ~ 1	$10X$
均一性	相对均齐度指数		0 ~ 0.2	$500X$

2.4.4 物理指纹图谱的构建 雷达图能定量直观展现出各二级物理指标之间的关系，即可可视化的物理指纹图谱^[14]。因此，利用上述标准化转换后的数值绘制出 17 批颗粒的雷达图，建立其物理指纹图谱，并以 17 批颗粒的平均值绘制对照指纹图谱，结果见图 2。

2.4.5 相似度分析 采用 SPSS 27.0 软件中夹角余弦法比较 17 批强肝消脂颗粒 (P1 ~ P17) 物理指纹图谱的相似度，并比较各批样品与对照物理指纹图谱的相似度，值越接近 1 则颗粒物理性质越相似，颗粒质量越稳定。结果 P1 ~ P17 样品间的相似数值均大于 0.99，且与对照物理指纹图谱比较相似度也在 0.99 以上，表明样品间的质量差异不大，制备工艺稳定性良好。

3 讨论

强肝消脂方是中药复方，目前多以汤剂的形式用于临床，但汤剂不利于储藏、运输，且口感

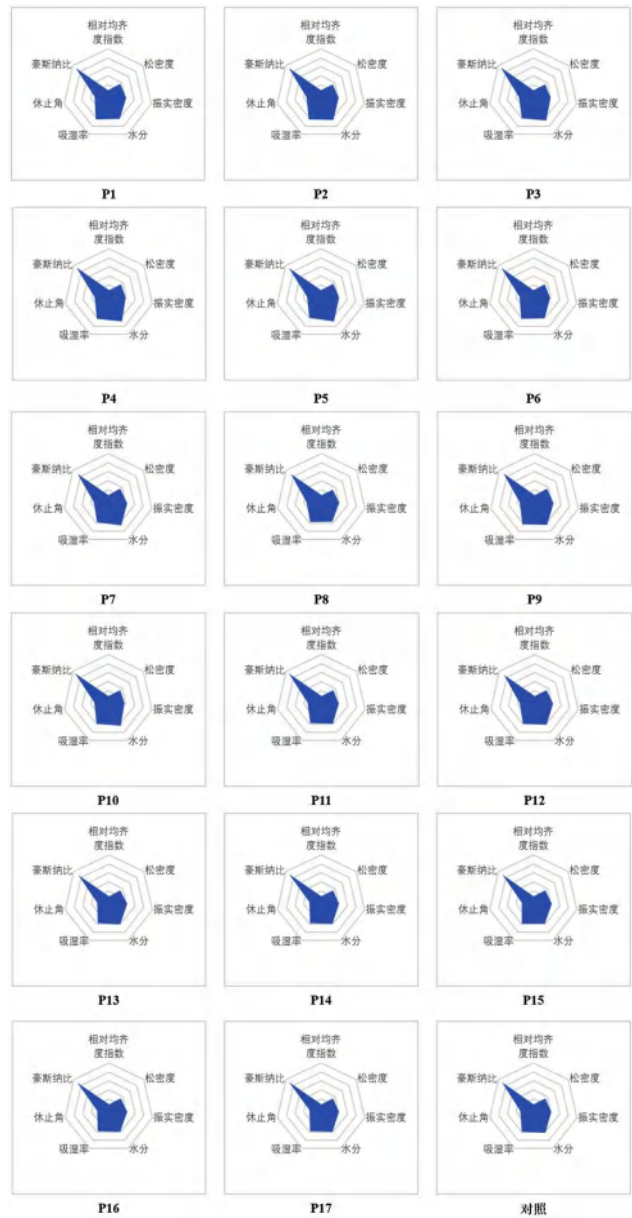


图 2 17 批强肝消脂颗粒物理指纹图谱

Fig 2 Physical fingerprint of 17 batches of Qianggan Xiaozhi granule

不佳、患者顺应性差。因此，考虑到上述问题把汤剂改为颗粒剂，颗粒剂易于吸收、便于携带和服用、生物利用度高、载药量大，且与原有汤剂物质基础一致，疗效也相同，满足临床需要。既保证了原有物质基础又减少了服用剂量，故选用颗粒剂作为考察对象，并优化工艺参数。

本研究以乳糖倍数、糊精倍数、乙醇体积分数为关键影响因素，用 4 个评价指标结合 Box-Behnken 响应面实验设计优选成型工艺。结果结合实际情况将制备工艺调整为 4 倍量乳糖、0.2 倍量糊精和 93% 乙醇。经过验证改良后的实验，得到平均 OD 值为 0.5363，RSD 为 2.0%，说明该模型能用于优化强肝消脂颗粒制备工艺参数。

表 8 二级物理指标转换后数值

Tab 8 Secondary physical indexes after conversion value

序号	水分/%	吸湿率/%	松密度/ (g·mL ⁻¹)	振实密度/ (g·mL ⁻¹)	休止角/°	豪斯纳比	相对均匀度指数
P1	6.2	6.360	3.571	4.166	3.032	9.1669	0.7518
P2	6.4	6.275	3.433	4.046	3.290	9.1072	0.7552
P3	6.6	6.075	3.448	3.946	3.250	9.2778	0.7485
P4	6.8	6.210	3.371	3.821	3.308	9.3325	0.7438
P5	6.8	5.910	3.571	4.166	3.124	9.1669	0.7255
P6	6.0	6.165	3.325	3.864	3.208	9.1895	0.8173
P7	6.6	5.780	3.471	4.347	3.288	8.7381	0.8135
P8	5.7	5.785	3.233	4.075	3.412	8.6978	0.7465
P9	6.5	6.255	3.571	4.347	3.412	8.9135	0.7835
P10	6.4	5.865	3.348	3.747	3.192	9.4041	0.7585
P11	5.9	5.775	3.425	3.921	3.192	9.2759	0.7575
P12	6.2	5.912	3.403	4.245	3.412	8.7629	0.7855
P13	6.0	5.810	3.333	4.156	2.708	8.7654	0.8095
P14	5.9	5.725	3.425	4.046	2.668	9.0934	0.8285
P15	5.9	5.865	3.448	4.245	2.712	8.8443	0.8155
P16	5.9	5.735	3.448	4.166	2.688	8.9588	0.8095
P17	5.9	5.720	3.433	4.046	2.626	9.1072	0.8165
对照	6.2	5.954	3.427	4.079	3.090	9.0472	0.7804

中药颗粒成分复杂，影响质量的因素很多，颗粒的形状、大小、均匀度、流动性、黏附性等^[15]。因此，通过构建颗粒物理指纹图谱对其质量进行一致性评价，全方位理解颗粒剂的成型工艺，增加对颗粒整体性质的理解^[6]，给强肝消脂颗粒制备工艺提供一些参考，也能为中药颗粒质量控制提供数据支持^[16]。

参考文献

[1] 张璐, 王红, 王雷, 等. 解析非酒精性脂肪肝中医药治疗进展[J]. 内蒙古中医药, 2024, 43(3): 148-150.
 [2] 刘竹, 陈涛, 邹纯才, 等. 基于 QbD 理念的油菜花粉颗粒制备工艺及物理指纹图谱研究[J]. 山东第一医科大学

(山东省医学科学院)学报, 2024, 45(3): 129-134.
 [3] 滕凯旋, 傅豪, 王中昌, 等. 基于物理指纹图谱的养胃颗粒浸膏质量一致性评价方法[J]. 中草药, 2022, 53(3): 712-719.
 [4] 沈丹丹, 顾志荣, 马天翔, 等. 扶正救肺颗粒成型工艺的均匀设计优选[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1122-1124.
 [5] 闫治攀, 王雪梅, 毕映燕, 等. 消肿止痛颗粒的制备[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1692-1697.
 [6] 陈霞, 阳长明, 陈浩, 等. 基于中药复方制剂特点的中药复方制剂生产工艺研究[J]. 中草药, 2021, 52(19): 5807-5813.
 [7] 陈琪, 王晓丽, 郭勇, 等. 黄连汤颗粒成型工艺优化及其质量一致性评价[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1313-1318.
 [8] 李晓霞, 王志萍, 蒋雅娴, 等. 金母颗粒提取工艺的优化[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2561-2565.
 [9] 唐茜, 韩云凤, 石懿, 等. 视力舒颗粒制备工艺优化及其物理指纹图谱建立[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3729-3735.
 [10] 刘毅, 刘均正, 金晨, 等. 保元汤颗粒剂制备工艺和质量控制[J]. 医药导报, 2023, 42(2): 235-242.
 [11] 李素丽, 玄敏, 杨涛, 等. 鹿红方颗粒制备工艺优化及其质量评价[J]. 中成药, 2023, 45(8): 2477-2483.
 [12] 王永洁, 陈桢, 邓莉莉, 等. 基于质量源于设计理念的红花颗粒制备工艺及物理指纹图谱研究[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4123-4130.
 [13] 毕映燕, 李俊江, 李季文, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的祛寒逐风颗粒制备工艺及其物理指纹图谱研究[J]. 中草药, 2021, 52(19): 5891-5898.
 [14] 张煜皓, 王雅雯, 宿军慧, 等. 中药粉体物理指纹图谱研究进展[J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 139-148.
 [15] 江涛, 周颐, 王璐璐. 养心颗粒的制备及成型工艺的优化[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(4): 366-370.
 [16] 吴玉琼, 金永新, 张红梅, 等. 健脾通气无糖颗粒制备工艺的优化及质量控制[J]. 中成药, 2021, 43(10): 2788-2793.

(收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-07-20)

不同产地 2 ~ 6 年栽培人参中 9 种人参皂苷含量赋存规律研究

高海云, 綦崢* (哈尔滨商业大学国家教育部药物工程技术研究中心, 哈尔滨 150076)

摘要: **目的** 明确不同产地人参中 9 种人参皂苷含量随生长年限变化的规律, 以期为从源头挑选适合的人参质量药材。**方法** 分别取黑龙江、吉林和辽宁三个省份中 2 ~ 6 年生人参样品共 15 批, 每批采集 20 份。采用超高效液相色谱法 (UPLC), Atlantis T3 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.25 mL · min⁻¹, 进样体积为 10 μL, 柱温为 40 °C, 波长为 203 nm, 对 9 种人参皂苷 Re、Rg₁、Rf、Rg₂、Rc、Rb₁、Rb₂、Rb₃ 和 Rd 含量进行测定。**结果** 各产地 2 ~ 4 年人参中 9 种皂苷含量均呈上升趋势, 而 5 ~ 6 年人参中各皂苷趋势差异化, 其中, 人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 和 Rb₃ 基本呈上升趋势 (除吉林省人参皂苷 Rb₁ 和 Rb₃), 以 6 年参为优; 而人参皂苷 Rc、Rb₂、Rd、Rf 和 Rg₂ 则呈下降趋势, 以 4 年或 5 年参为优。人参皂苷 Re (4997 ~ 18 959 μg · g⁻¹) 是各产地人参的首要优势皂苷, 人参皂苷 Rg₁ (3933 ~ 5452 μg · g⁻¹) 为 4 ~ 6 年黑龙江参的优势皂苷, 人参皂苷 Rd (2723 ~ 3953 μg · g⁻¹) 和 Rf (1426 ~ 2321 μg · g⁻¹) 为 4 ~ 6 年辽宁参的优势皂苷, 而吉林省人参样本中人参皂苷 Re、Rb₁、Rc、Rb₃ 和 Rb₂ 优于两省。**结论** 不同产地不同生长年限的人参中 9 种人参皂苷含量在人参生长期变化规律不同, 优势皂苷各有不同, 皂苷含量均在 4 ~ 6 年生阶段达到积累峰值。

关键词: 人参; 人参皂苷; 生长年限; 质量控制; 超高效液相色谱

中图分类号: R931.2, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0501-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.032

Occurrence of 9 ginsenosides in 2 ~ 6 years *Panax ginseng* from different growth areas

GAO Hai-yun, QI Zheng* (*Engineering Research Center for Medicine, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076*)

Abstract: Objective To elucidate the content variation patterns of 9 ginsenosides in *Panax ginseng* with its growth years and to select suitable quality medicinal materials right from the source. **Methods** Totally 15 batches of 2 ~ 6 years ginseng samples were collected from Heilongjiang, Jilin and Liaoning provinces, and 20 samples in each batch. Then, the contents of 9 ginsenosides, including Re, Rg₁, Rf, Rg₂, Rc, Rb₁, Rb₂, Rb₃ and Rd, were determined by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). The UPLC was performed on Atlantis T3 column (2.1 mm × 150 mm, 3 μm), with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 0.25 mL · min⁻¹; the column temperature was 40 °C and the detection wavelength was 203 nm with injection volume at 10 μL. **Results** The content of ginsenosides all increased at years 2 ~ 4 and then varied at years 5 ~ 6. Among them, the content of ginsenosides Re, Rb₁, Rg₁ and Rb₃ basically rose (except ginsenosides Rb₁ and Rb₃ from Jilin), with the best quality in the 6 year samples. While the content of ginsenosides Rc, Rb₂, Rd, Rf and Rg₂ decreased, the best being 4 or 5 year samples. Ginsenoside Re (4997 ~ 18 959 μg · g⁻¹) was the primary ginsenoside in all three provinces. Ginsenoside Rg₁ (3933 ~ 5452 μg · g⁻¹) was the dominant ginsenoside in 4 ~ 6 years samples from Heilongjiang. Ginsenosides Rd (2723 ~ 3953 μg · g⁻¹) and Rf (1426 ~ 2321 μg · g⁻¹) were the main ginsenoside in 4 ~ 6 year samples from Liaoning. The quality of ginseng samples from Jilin

基金项目: 黑龙江省重点研发计划 (No.2022ZX02C07); 2023 年度哈尔滨商业大学“青年科研创新人才”培育计划 (No.2023-KYYWF-1032)。
作者简介: 高海云, 女, 硕士研究生, 主要从事中药安全性评价方面的研究, email: 1486124478@qq.com *通信作者: 綦崢, 女, 研究员, 主要从事中药安全性评价方面的研究, email: 18645039597@163.com

was the best. **Conclusion** The content of 9 ginsenosides varies diversely with the growth year, the quality of ginsenoside peaking at 4 ~ 6 years.

Key words: ginseng; ginsenoside; growth age; quality control; UPLC

人参系五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智的功效^[1]。作为“百草之王”, 人参已有五千年的药用历史, 全球新鲜人参的总产量约为 79 769 吨, 人参市场贸易价值约为 20.84 亿美元^[2]。自 2012 年人参被批准为新资源食品, 2014 年被列入中华人民共和国国家卫生健康委员会(卫健委)公示的“药食同源”名单之列后, 人参在食品、保健品和化妆品等非药用领域也表现出广阔的前景^[3]。近二十年, 人参作为一种膳食补充剂在美国、加拿大和欧盟等也被广泛使用^[4], 同时人参市场发展也迈入“电商时代”^[5-6]。据预测, 到 2027 年, 中国和欧洲人参市场规模均将达 43 亿美元, 在 2020—2027 年期间, 中国、日本、加拿大、德国人参市场分别将以 13.1%、7.9%、9.3% 和 9% 的复合年均增长率增长^[7]。

中国以约 70% 的人参产量位列世界第一。然而, 由于我国人参贸易以原料为主, 产品附加值较低, 品牌影响力较弱, 产值仅约为全球市场的 30%^[8]。2007—2015 年中国人参出口均价为 42.77 美元·kg⁻¹, 韩国人参出口均价为 215.49 美元·kg⁻¹, 韩国人参均价约为我国人参的 5 倍^[9]。我国人参质量受气候条件、栽培方式等因素影响, 不同产地人参质量参差不齐, 参农分散种植, 自产自销, 交易市场呈现“大而不强”的态势, 且没有系统的质量评估体系, 市场价格与产量需求挂钩, 未完全体现出人参的实际价值^[10]。吉林省通过人参的标准化示范种植, 将单产(每平方米)从 0.8 kg 提高到 2 kg, 优良率在 75% 以上, 预计到 2025 年将达到 85%, 而其市价也比其他产地人参高 2 ~ 4 元·kg⁻¹^[11]。“长白山人参”的脱颖而出, 也带动了其他人参产地市场的相继发展, 而这也使人参质量的评估越发引起关注。

人参含有多种活性成分, 其中, 人参皂苷已被公认为人参的主要药理活性成分之一。人参皂苷在 20 世纪 60 年代首次被分离出来, 目前已报道的人参皂苷约有 200 种^[12]。然而, 人参有效部位中的主要皂苷类成分却不到 20 个, 微量皂苷成分居多^[13]。一般原人参二醇型(protopanaxadiol, PPD)人参皂苷含量为 45% ~ 60%, 原人参三醇型(protopanaxa-

triol, PPT)次之, 为 12% ~ 20%, 而齐墩果酸型仅为 7% ~ 10%^[14]。其中, 人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 为《中国药典》2020 年版所规定的人参药材含量检测指标^[1]。本研究将拓宽人参皂苷研究范围, 基于中国东北人参三大主产区中 2 ~ 6 年生人参中 PPD 型(人参皂苷 Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃ 和 Rd) 和 PPT 型(人参皂苷 Rg₁、Re、Rf 和 Rg₂) 共 9 种人参皂苷的含量变化规律, 分析各产地各年份人参中的优势皂苷, 以期为从源头挑选适合的人参质量药材。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC (美国 Waters 公司; TUV 检测器); 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); PL602-L 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司); MS3 BS25 涡旋仪、RV-10 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司)。

1.2 试药

乙腈(批号: R142623, 色谱纯, DiKMA 公司); 磷酸(批号: 20210120, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲醇(批号: R142436, 色谱纯, DiKMA 公司); 正丁醇(批号: 20220401, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司)。人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rd、Re、Rg₁ 对照品均购自中国食品药品检定研究院, 人参皂苷 Rc、Rf、Rg₂ 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。对照品信息见表 1。

表 1 对照品信息

Tab 1 Information of control

对照品	批号	质量分数/%
人参皂苷 Rb ₁	110704-202331	93.8
人参皂苷 Rb ₂	111715-202104	95.0
人参皂苷 Rb ₃	111686-202306	98.4
人参皂苷 Rd	111818-202104	97.3
人参皂苷 Re	110754-202330	96.9
人参皂苷 Rg ₁	110703-202235	98.5
人参皂苷 Rc	MFCD00133368	98.0
人参皂苷 Rf	MFCD00210509	98.0
人参皂苷 Rg ₂	MFCD00210511	98.0

1.3 人参样品采集

分别于 9 月人参收获期采集吉林省、黑龙江省和辽宁省种植基地种植的 2 ~ 6 年生人参样品共 15 批, 每批人参分别采集 20 份, 共计 300 个人参样品。样品信息见表 2, 2 ~ 6 年人参样品图片见图 1。所有

样品经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定, 均为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. (园参) 的干燥根和根茎。



图 1 2 ~ 6 年人参样品图

Fig 1 Pictures of 2 ~ 6 years ginseng samples

2 方法与结果

2.1 分析条件

色谱柱: Atlantis T3 (2.1 mm×150 mm, 3 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 19% ~ 20%A; 25 ~ 60 min, 20% ~ 40%A; 60 ~ 90 min, 40% ~ 55%A; 90 ~ 100 min, 55% ~ 60%A; 100 ~ 120 min, 60% ~ 19%A); 柱温: 40 °C; 流速: 0.25 mL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 203 nm; 色谱图见图 2。

表 2 15 批人参样品采集信息

Tab 2 Information of 15 batches of ginseng samples

批次	产地	经度 (E) /°	纬度 (N) /°	生长年限 / 年
1	黑龙江鸡西市鸡东县良种场	131.183 029	45.418 159	2
2	黑龙江鸡西市鸡东县良种场	131.183 029	45.418 159	3
3	黑龙江鸡西市鸡东县良种场	131.183 029	45.418 159	4
4	黑龙江宝清县龙头镇宝山林场	132.106 964	45.973 412	5
5	黑龙江宝清县龙头镇宝山林场	132.106 964	45.973 412	6
6	吉林安图县新河村园地 (田地或温室)	128.517 975	42.958 172	2
7	吉林安图县新河村园地 (田地或温室)	128.517 975	42.958 172	3
8	吉林集安市青石镇石湖村园地 (田地或温室)	126.199 514	41.274 783	4
9	吉林集安市青石镇石湖村园地 (田地或温室)	126.199 514	41.274 783	5
10	吉林抚松县北岗镇五里山参场	127.537 132	42.420 181	6
11	辽宁桓仁祥云药业有限公司参场	125.221 811	41.153 671	2
12	辽宁桓仁祥云药业有限公司参场	125.221 811	41.153 671	3
13	辽宁桓仁祥云药业有限公司参场	125.221 811	41.153 671	4
14	辽宁宽甸满族自治县光太药业有限公司参场	124.480 131	40.441 166	5
15	辽宁宽甸满族自治县光太药业有限公司参场	124.480 131	40.441 166	6

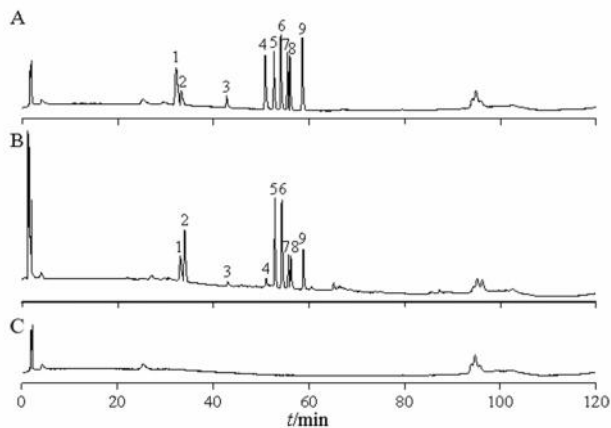


图 2 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和空白溶液 (C) 的 UPLC 色谱图

Fig 2 UPLC chromatogram of mixed standard solution (A), sample solution (B) and blank solution (C)

1. 人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁); 2. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re);
3. 人参皂苷 Rf (ginsenoside Rf); 4. 人参皂苷 Rg₂ (ginsenoside Rg₂);
5. 人参皂苷 Rb₁ (ginsenoside Rb₁); 6. 人参皂苷 Rc (ginsenoside Rc);
7. 人参皂苷 Rb₂ (ginsenoside Rb₂); 8. 人参皂苷 Rb₃ (ginsenoside Rb₃);
9. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取 9 种人参皂苷对照品适量, 置同一个量瓶中, 用甲醇逐级稀释制成每一对照品每 1 mL 分别含 20.0、40.0、50.0、80.0、100.0 μg 的混合对照品溶液, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 用封口膜封口并置于 4 °C 冰箱内保存, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 将各地区人参编号标记, 分别取各批人参样品。依据《中国药典》2020 年版方法, 取全参切成 6 mm 厚的小片, 放入 133 Pa 真空压 35 °C 环境的冷冻干燥机 FD-550 中进行干燥, 48 h 后取出。将干燥完全的人参放入粉碎机进行粉碎, 粉碎后放入冰箱冷冻备用。依据四分法, 分别称取适量人参样品粉末, 过四号筛 (60 目), 取 100 mL 圆底烧瓶, 准确称取过筛样品粉末约 2 g, 加水饱和正丁醇 50 mL, 冷凝回流 1.5 h 后冷却至室温, 补重, 滤过, 弃去初滤液, 准确量取续滤液 25 mL 至鸡心瓶中, 使用

旋转蒸发器蒸干,用甲醇-水(1:1)溶解并稀释定容至 10 mL,涡旋至混合均匀,用 0.22 μm 滤膜滤过,待测定($n=3$)。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取人参皂苷混合对照品溶

液,按照“2.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积。分别以 9 种人参皂苷对照品质量浓度作为横坐标(X),其峰面积作为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算线性回归方程。各人参皂苷标准曲线的相关系数(r)均大于 0.995,结果见表 3。

表 3 9 种人参皂苷的线性关系考察结果

Tab 3 Linear relationship results of 9 ginsenosides

化合物	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 Rg ₁	$Y = 1.0 \times 10^4 X - 1.9 \times 10^4$	0.9994	19.6044 ~ 100.6980
人参皂苷 Re	$Y = 4.0 \times 10^3 X + 1.3 \times 10^4$	0.9976	20.1936 ~ 102.4446
人参皂苷 Rf	$Y = 3.1 \times 10^3 X - 2.5 \times 10^4$	0.9991	21.6566 ~ 100.2433
人参皂苷 Rg ₂	$Y = 1.3 \times 10^4 X - 4.1 \times 10^4$	0.9979	22.2265 ~ 102.2737
人参皂苷 Rb ₁	$Y = 1.4 \times 10^4 X - 5.0 \times 10^4$	0.9985	21.7090 ~ 101.7900
人参皂苷 Rc	$Y = 1.6 \times 10^4 X - 4.1 \times 10^4$	0.9979	21.5016 ~ 98.7999
人参皂苷 Rb ₂	$Y = 1.2 \times 10^4 X + 6.4 \times 10^3$	0.9999	20.5079 ~ 99.9668
人参皂苷 Rb ₃	$Y = 1.0 \times 10^4 X - 2.9 \times 10^4$	0.9983	22.2716 ~ 101.3388
人参皂苷 Rd	$Y = 1.4 \times 10^4 X - 2.1 \times 10^4$	0.9994	20.0464 ~ 100.6801

2.3.2 精密度试验 取 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,计算得各人参皂苷峰面积的 RSD 值不超过 1.0%,符合要求。表明仪器的精密度良好。

2.3.3 重复性试验 分别取第一批人参样品粉末 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液并进行测定,记录峰面积。计算得 6 份样品中各人参皂苷含量 RSD 值在 0.31% ~ 1.0%,表明方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.3.3”项下人参样品粉末 1 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定,记录峰面积。计算得各时间点样品中各人参皂苷含量(外标法)的 RSD 值在 1.2% ~ 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收试验 精密称取已测定含量的同一批人参样品粉末,约 2 g,共 6 份,分别精密加入相当于样品中各人参皂苷含量 100% 的混合对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果显示,9 种人参皂苷的回收率分别为 101.03%、98.52%、101.32%、99.35%、100.63%、99.81%、100.82%、98.47%、98.84%, RSD 分别为 0.65%、1.0%、1.6%、1.2%、0.93%、1.7%、1.9%、1.1%、1.6%,表明方法的准确度良好。

2.3.6 耐用性试验 精密吸取同一供试品溶液,考察不同规格的色谱柱(Shim-pack XR-ODS II 型色谱柱、Thermo Synchronis C18 色谱柱)、不同厂家超高效液相色谱仪(Waters ACQUITY 超

效液相色谱仪、岛津 LC-20A 型超高效液相色谱仪)、不同柱温(35、40、45 $^{\circ}\text{C}$)及不同流速(0.22、0.25、0.28 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)对检测结果的影响。结果显示,9 种人参皂苷相对保留时间的 RSD 均小于 1.9%,相对峰面积的 RSD 为 1.0% ~ 1.7%,表明该方法的耐用性良好。

2.4 人参样品含量测定结果

各产地 2 ~ 4 年人参样品中 9 种人参皂苷含量均呈上升趋势,而 5 ~ 6 年人参样品中各皂苷趋势差异化,其中,人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 和 Rb₃ 基本呈上升趋势(除吉林省 Rb₁ 和 Rb₃),因而 6 年人参优于其他年份人参;而人参皂苷 Rc、Rb₂、Rd、Rf 和 Rg₂ 则呈下降趋势,分别以 4 年或 5 年人参为优,见图 3。

人参皂苷 Re 是各产地首要的优势人参皂苷,含量为 4997 ~ 18 959 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;人参皂苷 Rg₁ 为 4 ~ 6 年黑龙江参的优势皂苷,含量为 3933 ~ 5452 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;人参皂苷 Rd 和 Rf 为 4 ~ 6 年辽宁参的优势皂苷,含量分别为 2723 ~ 3953 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 1426 ~ 2321 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;而吉林省人参样品中人参皂苷 Re、Rb₁、Rc、Rb₃ 和 Rb₂ 优于其他两省。

各产地 4 ~ 6 年人参样本中皂苷含量如下:吉林省,4 年参富含人参皂苷 Rd (1857 ~ 3518 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 Rf (988 ~ 1840 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),5 年参富含人参皂苷 Rb₁ (3123 ~ 7781 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、Rc (3125 ~ 7850 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、Rb₃ (2133 ~ 5143 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)、Rb₂ (2320 ~ 4875 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 和 Rg₂ (365 ~ 1087 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),6 年参富含人参皂苷 Re (8026 ~ 18959 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

和 Rg₁ (1542 ~ 4826 μg · g⁻¹); 黑龙江省, 4 年参富含人参皂苷 Rd (1471 ~ 3483 μg · g⁻¹) 和 Rf (810 ~ 2077 μg · g⁻¹), 5 年参富含人参皂苷 Rc (2641 ~ 7307 μg · g⁻¹)、Rb₂ (1671 ~ 3912 μg · g⁻¹) 和 Rg₂ (300 ~ 1072 μg · g⁻¹), 6 年参富含人参皂苷 Re (6512 ~ 17623 μg · g⁻¹)、Rb₁ (2531 ~ 7029 μg · g⁻¹)、Rg₁ (1358 ~ 5452 μg · g⁻¹) 和 Rb₃ (1602 ~ 4668 μg · g⁻¹); 辽宁省, 4 年参富含人参

皂苷 Rb₂ (1022 ~ 3069 μg · g⁻¹)、Rd (1471 ~ 3953 μg · g⁻¹) 和 Rf (700 ~ 2321 μg · g⁻¹), 5 年参富含人参皂苷 Rc (2157 ~ 6880 μg · g⁻¹) 和 Rg₂ (237 ~ 1056 μg · g⁻¹), 6 年参富含人参皂苷 Re (4997 ~ 16287 μg · g⁻¹)、Rb₁ (1938 ~ 6988 μg · g⁻¹)、Rg₁ (1174 ~ 5139 μg · g⁻¹) 和 Rb₃ (1071 ~ 4776 μg · g⁻¹)。

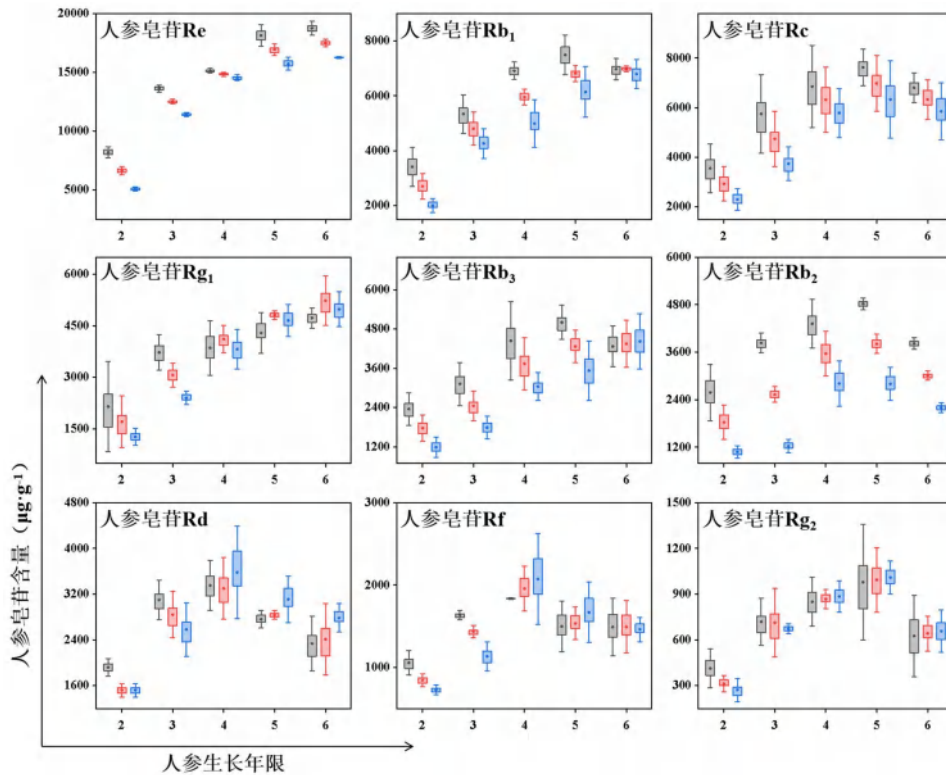


图 3 人参样品中人参皂苷含量随年限变化图

Fig 3 Change in ginsenoside content of ginseng samples with growth year

注: 灰色代表吉林省, 红色代表黑龙江省, 蓝色代表辽宁省。

Note: Gray represents Jilin, red represents Heilongjiang, and blue represents Liaoning.

3 讨论

我国约 90% 的人参为园参, 基于其药理活性和经济价值, 园参一般在 4 ~ 6 年采收^[15], 因此选取 4 ~ 6 年园参具有代表性。测定结果表明, 人参皂苷 Re 是各产地的首要优势成分, 含量为 4997 ~ 18 959 μg · g⁻¹, 尤其在吉林参中占据明显优势; 黑龙江参以人参皂苷 Rg₁ 为主要优势皂苷, 含量为 3933 ~ 5452 μg · g⁻¹; 辽宁参则以人参皂苷 Rd (2723 ~ 3953 μg · g⁻¹) 和 Rf (1426 ~ 2321 μg · g⁻¹) 为主。研究发现, 各产地人参生长的前 4 年是皂苷快速合成的黄金期, 5 ~ 6 年后部分皂苷呈现不同趋势: 人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 和 Rb₃ 大多持续增长 (吉林省 Rb₁ 和 Rb₃ 除外), 而人参皂苷 Rc、Rb₂、Rd、Rf 和 Rg₂ 则在 5 年后下降。叶片是人参

皂苷的主要合成场所, 3 ~ 5 年间合成速率较幼年期明显减慢^[16]。Dai 等^[17] 研究发现, 三大主产区的 2 ~ 4 年参样本中, 人参皂苷 Re、Rc、Rg₁、Rg₃ 和 Rf 含量增加, 吉林参中人参皂苷 Re 占据优势, 而黑龙江和辽宁参中人参皂苷 Rb₁ 和 Rg₁ 较丰富。本研究与 Xiao 等^[18] 的结论部分一致, 该研究表明吉林省 3 ~ 6 年参中, 人参皂苷 Re 和 Rg₁ 增加, 而人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rd 在 5 年后下降。

中国人参产量约占全球市场的 70%, 但产值仅为 30%, 这一反差反映出其潜在的提升空间。作为冷依赖型多年生植物, 我国东北地区得天独厚的地理和黑土资源使人参的有效利用价值更加突出^[19]。韩国红参以人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rb₂、Re 和 Rc 为主要优势成分, 占据亚太地区市场约 65%; 美国

人参则以人参皂苷 Rb₁、Re、Rg₁ 和 Rd 为主, 占全球市场的 5.5%。黑参在抗肿瘤、抗脂、抗氧化等方面表现出优于红参的药理活性, 稀有人参皂苷含量达 1.560%, 显著高于红参的 0.243%^[20]。目前, 中国已批准的多款以人参皂苷 Rg₃ 和 Rh₂ 为主要成分的药物在抗肿瘤等领域取得了显著疗效^[21]。因此, 根据皂苷的峰值年限选择各产地、各年份的人参进行加工, 通过高水平的原皂苷(如人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rd 等)转化为高活性的稀有人参皂苷(如人参皂苷 Rg₃、Rh₂、Rg₅、Rk₁ 等), 有助于提升药效。同时, 可通过开发食品、保健品、膳食补充剂等人参“周边”产品, 提高其附加值, 扩大国际市场。人参在中国的消费占全球的 42%, 主产地人参中以人参皂苷 Re 为优势成分, 在糖尿病、化疗、神经、心脏、免疫等领域具有显著的药理活性^[22]。通过规范栽培条件, 科学调控人参中皂苷的赋存, 从源头提升质量, 是推动人参产业化发展的关键。有研究显示, 通过优化栽培方式, 如温室和盆栽种植, 可以提高人参中皂苷的含量和抗氧化活性^[23-24], 从而为人参的质量提升和市场扩展奠定坚实基础。

本研究首次全面聚焦于我国东北三大人参主产区 2~6 年生人参中 9 种人参皂苷的含量变化规律。依据皂苷的赋存规律进行源头药材的选择, 从而在药品、保健品及其他衍生品领域获得更广泛的应用空间。本研究结果为推动中国人参的高质量发展、提升其在国际市场的竞争力提供了科学依据, 助力人参产业迈向更高的发展阶段。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 8.
- [2] Ratan ZA, Haidere MF, Hong YH, et al. Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. J Ginseng Res, 2021, 45 (2): 199-210.
- [3] 李宇. 鲜参茸冻干口崩片的制备及其质量评价研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [4] Liu XX, Wang LW, Li H, et al. Investigation of the presence of 22 organochlorine pesticide residues in ginseng from jilin province, China [J]. J Food Prot, 2019, 82 (9): 1625-1629.
- [5] 周玉环, 张慧玲, 袁国梁, 等. 人参特色饮品市场推广研究[J]. 现代商业, 2022 (26): 9-11.
- [6] 周长庆, 王晓林. 人参市场发展迈入“电商时代”[N]. 经济参考报, 2022-09-14 (6).
- [7] Global Industry Analysts, 2023. https://www.reportlinker.com/p05899577/Global-Ginseng-Industry.html?utm_source=GNW.
- [8] 张乃晏, 陈延国, 李俊萍, 等. 中国人参产品开发和品牌建设现状及发展对策[J]. 农业展望, 2020, 16 (5): 44-47.
- [9] El-Nahhal I, El-Nahhal Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options [J]. J Environ Manage, 2021, 299: 113611.
- [10] 潘肃, 王欣华, 丁洪伟. 关于人参产业的调研与思考[J]. 人参研究, 2019, 31 (2): 55-58.
- [11] 张志财, 陈晓林, 张恺新, 等. 吉林省人参产业现状及发展对策研究[J]. 吉林农业大学学报, 2023, 45 (6): 649-655.
- [12] Park SK, Hyun SH, In G, et al. The antioxidant activities of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and ginsenosides: a systemic review through in vivo and clinical trials [J]. J Ginseng Res, 2021, 45 (1): 41-47.
- [13] 单艳玲, 赵丹丹, 吴宿慧, 等. 20 (S)-原人参二醇的荧光示踪及体内活性探析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (12): 186-190, 306-307.
- [14] 李冰, 张传波, 宋凯, 等. 生物合成稀有人参皂苷的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41 (6): 71-88.
- [15] Anastassakis, K. *Panax Ginseng* (Korean or Asian Ginseng) [J]. Springer, 2022, 2, 485-493.
- [16] Goodwin PH, Best MA. Ginsenosides and biotic stress responses of ginseng [J]. Plants (Basel), 2023, 12 (5): 1091-1108.
- [17] Dai YL, Qiao MD, Yu P, et al. Comparing eight types of ginsenosides in ginseng of different plant ages and regions using RRLC-Q-TOF MS/MS [J]. J Ginseng Res, 2020, 44 (2): 205-214.
- [18] Xiao D, Yue H, Xiu Y, et al. Accumulation characteristics and correlation analysis of five ginsenosides with different cultivation ages from different regions [J]. J Ginseng Res, 2015, 39 (4): 338-344.
- [19] Kim J. 韩国人参出口竞争力及影响因素研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
- [20] Huang L, Li HJ, Wu YC. Processing technologies, phytochemistry, bioactivities and applications of black ginseng—a novel manufactured ginseng product: a comprehensive review [J]. Food Chem, 2023, 407: 134714.
- [21] Mohanan P, Subramaniam S, Mathiyalagan R, et al. Molecular signaling of ginsenosides Rb₁, Rg₁, and Rg₃ and their mode of actions [J]. J Ginseng Res, 2018, 42 (2): 123-132.
- [22] 袁松竹, 王斌, 周旋, 等. 稀有人参皂苷生物转化的研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44 (12): 480-489.
- [23] Hwang KH, Kim HG, Jang K, et al. Novel cultivation of six-year-old Korean Ginseng (*Panax ginseng*) in pot: from non-agrochemical management to increased ginsenoside [J]. J Ginseng Res, 2021, 45 (1): 141-145.
- [24] Jang IB, Lee DY, Yu J, et al. Photosynthesis rates, growth, and ginsenoside contents of 2-year-old *Panax ginseng* grown at different light transmission rates in a greenhouse [J]. J Ginseng Res, 2015, 39 (4): 345-353.

(收稿日期: 2024-09-09; 修回日期: 2024-10-21)

不同品种水蛭中无机元素的测定及统计分析

茹意, 张美皖, 张玲, 薛璇* (安徽中医药大学, 合肥 230012)

摘要: **目的** 测定药典收载的 3 种水蛭 (柳叶蚂蟥、蚂蟥、水蛭) 和菲牛蛭中 36 种无机元素, 探究不同品种水蛭多元素分布特征、差异性, 并进行质量评估。**方法** 采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 和电感耦合等离子体光学发射光谱法 (ICP-OES) 法测定水蛭药材中 36 种无机元素含量。运用 Origin 2023 软件、TBtools 软件和 SIMCA 14.1 软件对水蛭药材中无机元素进行统计分析。**结果** 4 个品种中 6 种常量元素平均含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$): $\text{Na} > \text{K} > \text{P} > \text{S} > \text{Ca} > \text{Mg}$, 11 种必需微量元素平均含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$): $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Se} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{I} > \text{Co} > \text{V} > \text{Mo}$, 19 种非必需微量元素平均含量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$): $\text{Pb} > \text{Al} > \text{Ba} > \text{Br} > \text{Sr} > \text{Ti} > \text{As} > \text{Rb} > \text{Sb} > \text{Li} > \text{Cd} > \text{Bi} > \text{Y} > \text{Sc} > \text{Hg} > \text{Cs} > \text{Be} > \text{Tl} > \text{Ge}$ 。菲牛蛭中 Fe 含量显著高于柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭, 但柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭中 80% 以上的元素含量高于菲牛蛭。**结论** 不同品种水蛭的无机元素分布特征存在差异, 可以在一定程度上区分 4 种水蛭, 菲牛蛭和其他 3 种水蛭元素分布差异性较大, 柳叶蚂蟥和蚂蟥元素分布特征较为相似。从元素分析结果看, 菲牛蛭不能作为药用水蛭的替代品种。

关键词: 水蛭; 无机元素; 分布特征; 电感耦合等离子体-质谱法; 电感耦合等离子体光学发射光谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0507-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.033

Determination of inorganic elements in different species of Hirudos

RU Yi, ZHANG Mei-wan, ZHANG Ling, XUE Xuan* (Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine 36 inorganic elements in 3 Hirudos (*Whitmania acranulata* Whitman, *Whitmania pigra* Whitman, and *Hirudo nipponica* Whitman) and *Poecilobdella manillensis* Lesson, to characterize the multi-element distribution and difference in varieties of Hirudos, and evaluate the quality. **Methods** The content of 36 inorganic elements in the Hirudo was determined by ICP-MS and ICP-OES. Origin 2023, TBtool, and SIMCA 14.1 were used to analyze the inorganic elements in the Hirudo. **Results** Among the average content of 6 major elements ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Na had the highest content, followed by K, P, S, Ca and Mg; among the average content of 11 essential trace elements ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Fe had the highest content, followed by Zn, Mn, Cu, Se, Ni, Cr, I, Co, V and Mo; among the average content of 19 non-essential trace elements ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Pb had the highest content, followed by Al, Ba, Br, Sr, Ti, As, Rb, Sb, Li, Cd, Bi, Y, Sc, Hg, Cs, Be, Tl and Ge. The content of Fe in *Poecilobdella manillensis* Lesson was much higher than that in *Whitmania acranulata* Whitman, *Whitmania pigra* Whitman and *Hirudo nipponica* Whitman, but more than 80% of the above elements in *Whitmania acranulata* Whitman, *Whitmania pigra* Whitman and *Hirudo nipponica* were higher than those in *Poecilobdella manillensis* Lesson. **Conclusion** The distribution characteristics of inorganic elements in different Hirudos vary. The 4 Hirudos can be distinguished to a certain extent. The elements in *Poecilobdella manillensis* Lesson and other 3 Hirudos also vary, but the characteristics of elements in *Whitmania acranulata* Whitman and *Whitmania pigra* Whitman are similar. From element analysis, *Poecilobdella manillensis* Lesson may not be used as an alternative species of medicinal Hirudo.

Key words: Hirudo; inorganic element; distribution characteristics; ICP-MS; ICP-OES

基金项目: 安徽中医药大学人才支持计划项目 (No. 2023reyb029); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (No. 2023AH050737)。

作者简介: 茹意, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药质量控制与评价研究, email: 1968423536@qq.com *通信作者: 薛璇, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药质量控制与评价研究, email: xuefen@ahtcm.edu.cn

水蛭为传统动物类中药,始载于《神农本草经》^[1],被列为下品。2020年版《中国药典》记载的水蛭为水蛭科动物柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman、蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 或水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体,具有破血通经、逐瘀消癥的功效,在临床上用于治疗血瘀经闭、癥瘕痞块、中风偏瘫、跌扑损伤等症^[2]。近年来随着中药文化理念的普及和对水蛭医疗潜能的深入探索,水蛭在心脑血管疾病治疗中的独特药效逐渐被认可,以水蛭为原料的中成药及保健品日渐增多,其在临床治疗中的应用量也在增长^[3]。现有药用水蛭资源已无法满足市场的需求。我国水蛭养殖品种主要为水蛭、蚂蟥和菲牛蛭,尽管国内关于药用水蛭的养殖和研究均取得了突破性进展,但药用水蛭的产量依然存在巨大缺口^[4]。市场上水蛭药材每千克的价格已由原来的一百元上升到一千元左右^[5]。当今国内外中药材市场上水蛭来源不一、品质参差不齐^[6],水蛭的质量安全应该受到人们的重视。

目前,国内外学者对水蛭药材的研究主要集中在化学成分^[7]、药理作用^[8-9]、抗凝血物质的提取纯化^[10-14]、抗凝机制^[15]、炮制方法^[16-17]、分子鉴定方法^[18]等方面,而对水蛭无机元素方面研究较少。菲牛蛭虽未被2020年版《中国药典》收录,但其抗凝活性较高^[19-23],在我国产量相对丰富,菲牛蛭与药典收录的3种水蛭(柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭)之间无机元素有无明显差异,能否作为水蛭的补充替代品种尚未见相关报道。因此,有必要对水蛭中的无机元素进行系统研究和分析,本文采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)和电感耦合等离子体光学发射光谱法(ICP-OES)测定不同水蛭药材中36种无机元素的含量,分析不同水蛭无机元素分布特征及差异性,以区别水蛭种类、保证水蛭的品质和药用安全。

1 材料

1.1 仪器

ICS900-iCAP Q型电感耦合等离子体质谱仪、iCAP-6300-Duo型电感耦合等离子体发射光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);EH20B型电热板(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);FA2004型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);Cascada III型超纯水机(美国颇尔公司)。

1.2 试药

铝(Al)、砷(As)、钡(Ba)、铍(Be)、铋(Bi)、溴(Br)、镉(Cd)、钴(Co)、铬(Cr)、

铯(Cs)、铜(Cu)、铁(Fe)、锂(Li)、镁(Mg)、锰(Mn)、镍(Ni)、磷(P)、铅(Pb)、铷(Rb)、硫(S)、锑(Sb)、锶(Sr)、钛(Ti)、铊(Tl)、钒(V)、钇(Y)、锌(Zn)多元素混标溶液(1000 mg·L⁻¹),钙(Ca)、钾(K)、钠(Na)混标溶液(5000 mg·L⁻¹),汞(Hg)、钼(Mo)单标溶液(100 mg·L⁻¹),锗(Ge)、碘(I)、硒(Se)、钪(Sc)单标溶液(1000 mg·L⁻¹),铑(Rh)内标溶液(1000 mg·L⁻¹)(国家有色金属及电子材料分析测试中心);猪肉成分分析标准物质(GBW 08552,中国科学院上海原子核研究所);贻贝成分分析标准物质(SRM 2976,美国国家标准与技术研究所);硝酸(HNO₃)、过氧化氢(H₂O₂)(GR,国药集团化学试剂有限公司)。24批水蛭样品来源于中药材市场,柳叶蚂蟥6批(编号LY1~LY6),蚂蟥10批(编号MH1~MH10),水蛭3批(编号SZ1~SZ3),菲牛蛭5批(编号FN1~FN5),经安徽中医药大学杨青山副教授鉴定,确认所研究样品为水蛭科动物干燥全体。

2 方法和结果

2.1 仪器条件

2.1.1 ICP-MS工作条件及参数 射频功率1550 W,雾化气流量1.2 L·min⁻¹,辅助气流量0.8 L·min⁻¹,冷却气流量14 L·min⁻¹,蠕动泵转速40 r·min⁻¹,雾化室温度2.7℃,采样深度5 mm。

2.1.2 ICP-OES工作条件及参数 射频功率1200 W,雾化气流量0.6 L·min⁻¹,辅助气流量0.5 L·min⁻¹,冷却气流量12 L·min⁻¹,蠕动泵转速50 r·min⁻¹,雾化气压力0.24 MPa,积分时间5 s。

2.2 溶液制备

2.2.1 元素标准溶液的制备 精密量取各元素标准溶液适量,以2% HNO₃溶液作为溶剂,采用逐级稀释法配制一系列不同浓度的元素标准待测液,精密量取Rh内标溶液适量,配制内标待测液10 ng·mL⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取水蛭粉末0.2 g,置聚四氟乙烯烧杯中,加入2 mL H₂O₂和6 mL HNO₃,冷消12 h。置于电热板上,按照如下程序升温消化:120℃ 1 h,150℃ 2 h,180℃ 15 h,待溶液呈澄清透明状态时,120℃赶酸至1~2 mL,转移至100 mL量瓶中,用2% HNO₃溶液定容,摇匀,过膜,即得供试品溶液。同法制备贻贝和猪肉标准物质溶液、试剂空白溶液,各平行3份。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 分别取各元素标准溶液，以 2% HNO_3 作溶剂，采用逐级稀释法配制成系列浓度的标准待测液。按“2.1”项下条件，测定不同浓度的标准待测液。结果见表 1，36 种元素的相关系数 (r) 均在 0.9988 ~ 1.000，表明各元素在各自线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.2 检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 按“2.1”项下条件，连续测定 11 份空白样品溶液，以响应值的 3 倍标准偏差 (3SD) 对应的待测元素浓度作为检测限；以响应值的 10 倍标准偏差 (10SD) 所对应的待测元素浓度作为定量限。各元素的检测限与定量限结果见表 1。

表 1 各元素标准曲线，线性范围，相关系数，检测限和定量限

Tab 1 Equation, linear range, correlation coefficient (r), LOD and LOQ of each element

元素	线性方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	相关系数	检测限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Al	$Y = 385.36X + 30.071$	$0 \sim 5 \times 10^3$	0.9999	27.2	90.7
Fe	$Y = 1.183 \times 10^4 X + 528.15$	$0 \sim 5 \times 10^3$	0.9998	59.4	198
Mn	$Y = 7.328 \times 10^4 X + 3.774 \times 10^3$	$0 \sim 5 \times 10^3$	0.9997	0.473	1.58
Ti	$Y = 1.418 \times 10^3 X + 30.779$	$0 \sim 5 \times 10^3$	0.9999	0.384	1.28
P	$Y = 888.13X + 35.048$	$0 \sim 10 \times 10^3$	0.9999	57.1	190
S	$Y = 491.83X + 23.7$	$0 \sim 10 \times 10^3$	1.000	81.3	271
K	$Y = 542.59X - 19.828$	$0 \sim 30 \times 10^3$	0.9999	66.4	221
Mg	$Y = 967.77X + 30.489$	$0 \sim 30 \times 10^3$	1.000	58.5	195
Ca	$Y = 533.23X + 273.66$	$0 \sim 90 \times 10^3$	0.9999	19.7	65.7
Na	$Y = 1.434 \times 10^3 X + 958.03$	$0 \sim 90 \times 10^3$	0.9998	32.2	107
Hg	$Y = 7.447 \times 10^3 X - 54.499$	$0 \sim 1$	0.9998	0.172	0.573
Ge	$Y = 7.498 \times 10^3 X - 257.15$	$0 \sim 10$	0.9999	5.91×10^{-3}	1.97×10^{-2}
Mo	$Y = 6.719 \times 10^3 X + 72.19$	$0 \sim 10$	0.9999	6.89×10^{-3}	0.023
Se	$Y = 77.828X - 48.119$	$0 \sim 100$	0.9999	7.88×10^{-2}	0.263
As	$Y = 3.134 \times 10^3 X + 243.7$	$0 \sim 100$	1.000	1.75×10^{-2}	5.87×10^{-2}
Ba	$Y = 8.189 \times 10^3 X + 162.51$	$0 \sim 100$	0.9999	4.65×10^{-3}	1.55×10^{-2}
Be	$Y = 3.083 \times 10^3 X - 233.55$	$0 \sim 100$	1.000	1.44×10^{-3}	4.80×10^{-3}
Bi	$Y = 7.504 \times 10^4 X - 4.468 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	1.04×10^{-4}	3.47×10^{-4}
Br	$Y = 647.34X + 224.93$	$0 \sim 100$	0.9992	0.202	0.673
Cd	$Y = 1.430 \times 10^4 X - 505.4$	$0 \sim 100$	1.000	3.07×10^{-4}	1.02×10^{-3}
Co	$Y = 1.992 \times 10^4 X + 20.087$	$0 \sim 100$	1.000	5.12×10^{-4}	1.71×10^{-3}
Cr	$Y = 1.646 \times 10^4 X + 6.776 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9988	2.74×10^{-2}	9.13×10^{-2}
Cs	$Y = 5.675 \times 10^4 X + 4.201 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9995	4.29×10^{-4}	1.43×10^{-3}
Cu	$Y = 1.018 \times 10^4 X + 1.279 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	5.80×10^{-3}	1.93×10^{-2}
I	$Y = 1.299 \times 10^4 X - 1.859 \times 10^3$	$0 \sim 100$	0.9999	4.01×10^{-2}	0.134
Li	$Y = 1.134 \times 10^4 X - 861.19$	$0 \sim 100$	1.000	1.15×10^{-3}	3.83×10^{-3}
Ni	$Y = 4.174 \times 10^3 X + 3.917 \times 10^3$	$0 \sim 100$	0.9999	2.27×10^{-3}	7.57×10^{-3}
Pb	$Y = 4.820 \times 10^4 X + 1.183 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	2.13×10^{-3}	7.10×10^{-3}
Rb	$Y = 2.976 \times 10^4 X - 1.892 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9999	1.45×10^{-3}	4.83×10^{-3}
Sb	$Y = 1.804 \times 10^4 X + 1.718 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9999	1.85×10^{-3}	6.17×10^{-3}
Sc	$Y = 2.250 \times 10^4 X + 4.831 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	7.32×10^{-3}	2.44×10^{-2}
Sr	$Y = 3.905 \times 10^4 X + 2.118 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9992	2.59×10^{-4}	8.63×10^{-4}
Tl	$Y = 6.714 \times 10^4 X - 875.09$	$0 \sim 100$	1.000	3.36×10^{-2}	0.112
V	$Y = 1.837 \times 10^4 X + 7.582 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	6.50×10^{-2}	0.217
Y	$Y = 4.627 \times 10^4 X + 1.684 \times 10^4$	$0 \sim 100$	0.9995	1.26×10^{-3}	4.20×10^{-3}
Zn	$Y = 3.866 \times 10^3 X + 2.176 \times 10^3$	$0 \sim 100$	1.000	5.69×10^{-2}	0.190

2.3.3 重复性试验 精密称取 6 份水蛭样品 (MH5) 粉末 0.2 g，按“2.2.2”项下方法处理样品。经 ICP-MS 和 ICP-OES 测定，除 Pb 元素未检出外，其余各元素含量的 RSD 值在 0.44% ~ 5.4%，表明方法的重复性良好。

2.3.4 准确度试验 采用 SRM 2976 贻贝和 GBW 08552 猪肉成分分析标准物质检验方法的准确度。

取 SRM 2976 贻贝和 GBW 08552 猪肉适量于 70℃ 干燥 4 h 后，按“2.2.2”项下方法处理，平行制备 6 份标准物质待测溶液。按“2.1”项下条件测定。结果表明，上述标准物质所测元素含量接近标准参考值，且各元素含量的 RSD 均在 0.29% ~ 3.5%。除了 Hg 的回收率为 87.0% 以外，其余元素的回收率均在 90.0% ~ 106%。表明该方法准确度较好，

符合痕量分析的要求，可用于水蛭样品中无机元素的含量测定。

2.4 含量测定

24 批水蛭样品中 36 种元素 [6 种常量元素 (Na、K、P、S、Ca、Mg)、11 种必需微量元素

(Fe、Zn、Mn、Cu、Se、Ni、Cr、I、Co、V、Mo) 和 19 种非必需微量元素 (Al、Pb、Ba、Br、Sr、Ti、As、Rb、Sb、Li、Cd、Bi、Y、Sc、Cs、Hg、Be、Tl、Ge)] 的含量测定结果如表 2 所示。

表 2 水蛭药材中多元素含量的分析结果 (n = 72)
Tab 2 Content of multi-element in Hirudo medicinal materials (n = 72)

元素	含量 / (mg · kg ⁻¹)				平均值	RSD/%
	蚂蟥	柳叶蚂蟥	水蛭	菲牛蛭		
Na	11 274±9236	10 826±8964	5941±775	4548±1097	9094	37
K	4620±2118	5348±2651	8604±1560	2090±968	4773	56
P	4304±936	4913±1470	7162±787	1597±263	4250	54
S	3378±3458	2345±426	2895±181	2318±389	2839	18
Ca	2429±951	2759±1337	4428±1125	1105±482	2485	55
Mg	4072±9373	1132±370	2288±405	339±84	2336	69
Fe	536±297	1168±423	1331±201	1908±227	1079	52
Al	165±144	696±376	933±29	175±278	396	97
Zn	211±69	242±92	178±56	56±36	172	45
Mn	18.940±3.534	46.083±25.990	47.167±4.450	3.000±1.910	25.900	83
Cu	27.460±8.614	27.250±14.536	24.433±13.530	9.896±4.181	23.400	36
Ni	5.383±7.364	21.442±27.628	2.907±0.766	15.700±3.008	11.200	78
Se	2.502±1.184	42.603±95.253	75.480±20.868	1.786±1.058	21.500	165
Cr	3.998±3.232	13.983±6.041	34.367±1.650	1.191±0.539	9.710	155
I	3.313±2.128	3.392±1.467	1.773±0.133	0.683±0.335	2.590	50
Co	0.823±0.608	1.523±0.641	2.717±0.484	2.455±1.758	1.570	55
V	0.523±0.301	2.346±3.179	2.120±0.159	0.048±0.022	1.080	106
Mo	0.267±0.101	0.249±0.107	0.619±0.050	0.086±0.097	0.269	83
Pb	13.30±27.627	5578±13627	3421±5922	7.930±12.144	1830	150
Ba	3.924±3.787	227.187±542.227	12.567±1.361	1.154±1.317	60.200	184
Br	23.330±9.295	19.352±8.085	9.253±5.204	10.090±9.803	17.800	39
Sr	5.789±4.303	11.087±11.465	19.267±3.980	1.252±0.479	7.850	99
Ti	4.265±3.995	10.788±5.636	6.577±4.352	0.444±0.534	5.390	80
As	4.317±1.381	7.858±3.423	6.707±0.732	0.188±0.038	4.640	73
Rb	1.553±1.620	1.433±0.249	7.817±2.414	4.389±5.512	2.900	104
Sb	0.086±0.047	1.443±3.330	2.634±2.321	0.021±0.019	0.730	171
Li	0.268±0.198	0.824±0.323	1.178±0.206	0.055±0.031	0.477	108
Cd	0.117±0.137	0.610±0.332	1.000±0.149	0.046±0.059	0.336	133
Bi	0.117±0.088	0.390±0.794	0.340±0.293	0.007±0.008	0.190	96
Y	0.083±0.062	0.223±0.064	0.479±0.071	0.021±0.010	0.155	131
Sc	0.049±0.024	0.115±0.034	0.169±0.005	0.019±0.008	0.074	91
Cs	0.037±0.031	0.098±0.036	0.202±0.053	0.013±0.010	0.068	125
Hg	0.042±0.032	0.102±0.085	0.189±0.227	0.018±0.027	0.070	108
Be	0.009±0.007	0.024±0.008	0.046±0.004	0.005±0.002	0.017	111
Tl	0.009±0.007	0.016±0.012	0.034±0.006	0.008±0.003	0.014	85
Ge	0.010±0.003	0.014±0.005	0.015±0.003	0.007±0.000	0.011	34

2.5 聚类热图分析

使用 TBtools 软件，对 24 批水蛭样品中 36 种无机元素含量进行聚类热图分析，结果见图 1。图中颜色代表元素含量水平，含量由低到高用蓝色向红色转变表示，颜色越红即含量越高。

从图 1 中可看出，5 批菲牛蛭、10 批蚂蟥和 3 批水蛭均能各自聚成一类；柳叶蚂蟥除 LY1 外，其

余 5 批也能聚成一类。LY1 中 Al、Se、Pb、Ba、Sr、Sb、Cd、Bi、Tl 这 9 种元素的含量明显高于另外 5 批柳叶蚂蟥，导致其未能聚成一类。2020 年版《中国药典》收录的柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭中有 80% 以上的元素含量要高于菲牛蛭，而菲牛蛭中 Fe 的含量明显高于这 3 种水蛭。

2.6 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)

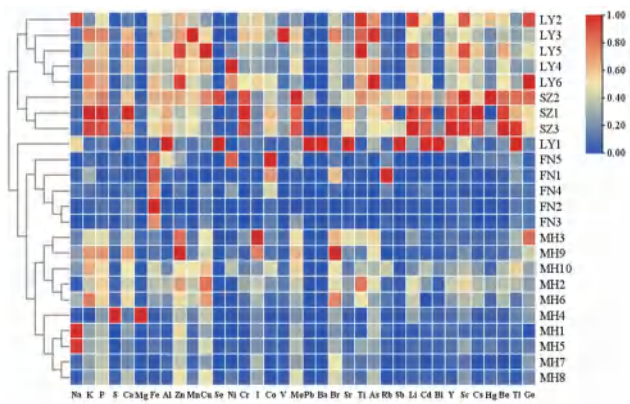


图 1 不同品种水蛭无机元素聚类热图
Fig 1 Cluster heat map of inorganic elements for different species of Hirudo

使用 SIMCA 14.1 软件以 36 种无机元素含量为变量建立 PLS-DA 模型，经 PLS-DA 分析后生成的得分图、变量重要性投影图 (VIP 图) 如图 2 和图 3 所示。

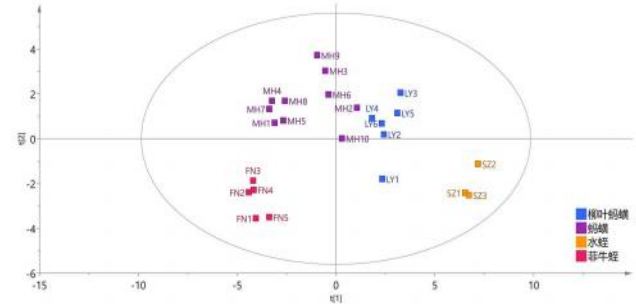


图 2 不同品种水蛭 PLS-DA 得分图
Fig 2 PLS-DA score plot for different species of Hirudo

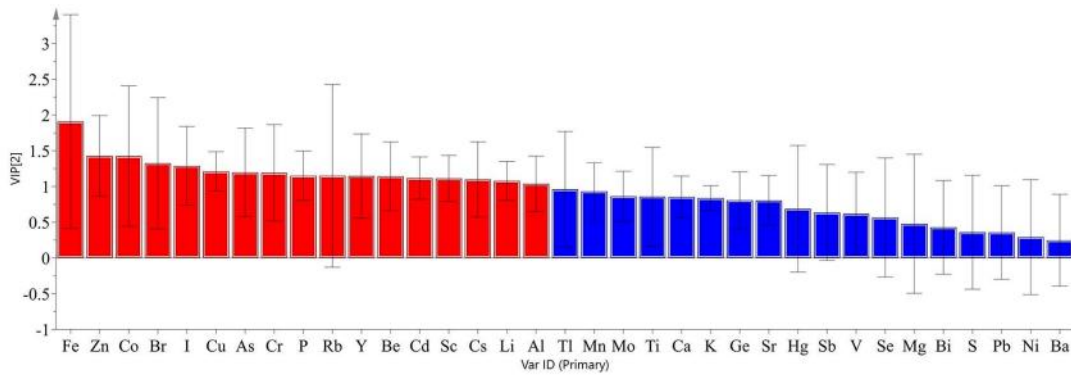


图 3 不同品种水蛭 PLS-DA VIP 图
Fig 3 PLS-DA VIP plot for different species of Hirudo

从图 2 中可看出，24 批水蛭样品均在 95% 置信区间内，水蛭与菲牛蛭可较好地各自聚为一类；柳叶蚂蟥和蚂蟥也可各自聚成一类，但两类样品间聚类距离较近。

从图 3 可看出，Fe、Zn、Co、Br、I、Cu、As、Cr、P、Rb、Y、Be、Cd、Sc、Cs、Li、Al 的 VIP 值大于 1，表明这 17 种元素对分类的贡献较大，为 4 种水蛭分类的特征差异性元素。水蛭和菲牛蛭的聚类距离与柳叶蚂蟥和蚂蟥的聚类距离较远，柳叶蚂蟥和蚂蟥的聚类距离较近，说明 4 种不同水蛭品种样品的元素含量存在一定的差异，而同一品种的样品相似性较高，这与聚类热图分析的结果一致。

2.7 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

对柳叶蚂蟥和蚂蟥进行 OPLS-DA 分析，OPLS-DA 模型的得分图、VIP 图如图 4、5 所示。

从图 4 中可看出，除 LY1 偏离 95% 置信区间外，5 批柳叶蚂蟥与 10 批蚂蟥均在 95% 置信区间内，且能较好地聚成两类。VIP 图表明 Cr、Cd、Al、Y、Li、Sc、Be、Fe、Cs、As、Ti、Mn、Co 这 13 种元素为柳叶蚂蟥与蚂蟥之间的差异性元素。

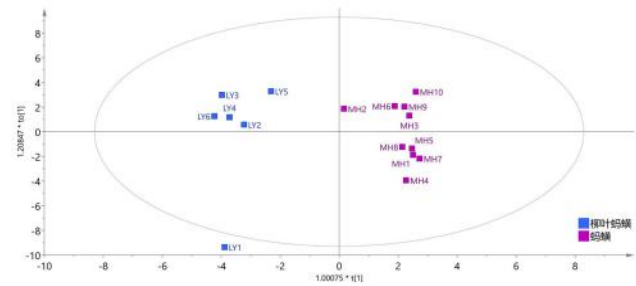


图 4 柳叶蚂蟥和蚂蟥 OPLS-DA 得分图
Fig 4 OPLS-DA score plot for *Whitmania acranulata* Whitman and *Whitmania pigra* Whitman

2.8 水蛭无机元素指纹图谱

运用 Origin 2023 软件根据水蛭中无机元素平均值含量绘制指纹图谱。为方便 36 种元素绘制于同一图谱中进行比较，将部分含量差异大的元素同时缩小或放大相同倍数至同一数量级。从图 6 可以看出，菲牛蛭的指纹图谱与药典收录的另外 3 种水蛭的指纹图谱差异较大，柳叶蚂蟥和蚂蟥的指纹特征相似。

3 讨论

3.1 4 种水蛭样品常量元素的比较

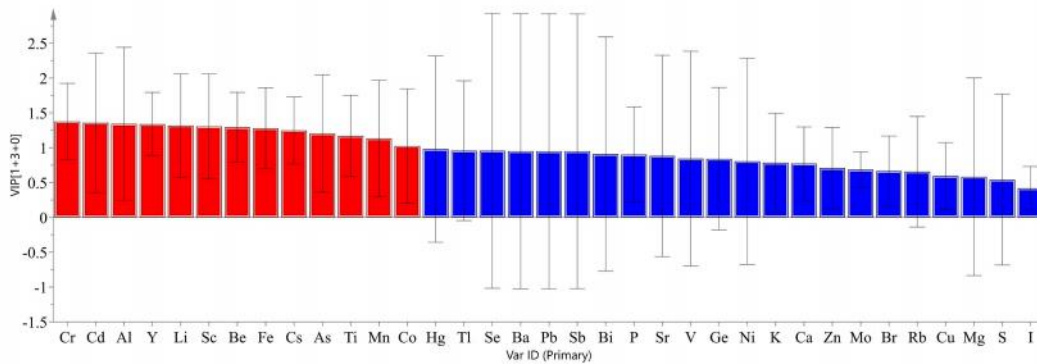


图 5 柳叶蚂蟥和蚂蟥 OPLS-DA VIP 图

Fig 5 OPLS-DA VIP plot of *Whitmania acranulata* Whitman and *Whitmania pigra* Whitman

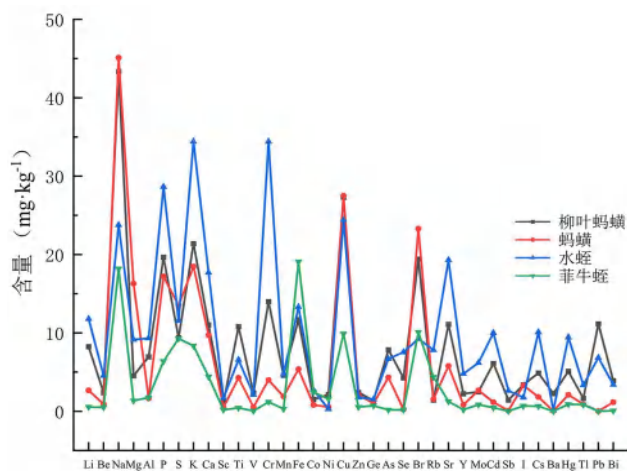


图 6 不同品种水蛭无机元素指纹谱图

Fig 6 Fingerprint spectra of inorganic elements in different species of Hirudo

注：Pb 含量缩放至原来的 1/500，Na、K、P、S、Ca、Mg 含量缩放至原来的 1/250，Fe、Al、Zn、Ba 含量缩放至原来的 1/100，Mn、Se、Ni 含量缩放至原来的 1/10；Mo、Li、Cd、Bi、Y、Sc 含量放大至原来的 10 倍，Cs、Hg 含量放大至原来的 50 倍，Be、Tl、Ge 含量放大至原来的 100 倍；Cu、Cr、I、Co、V、Br、Sr、Ti、As、Rb、Sb 含量不变。

Note: Pb content is scaled to 1/500 of the original; Na, K, P, S, Ca, Mg content is scaled to 1/250 of the original; Fe, Al, Zn, Ba content is scaled to 1/100 of the original; Mn, Se, Ni content is scaled to 1/10 of the original. Mo, Li, Cd, Bi, Y and Sc content is increased to 10 times of the original, Cs and Hg content is increased to 50 times of the original, Be, Tl and Ge content is increased to 100 times of the original. Cu, Cr, I, Co, V, Br, Sr, Ti, As, Rb and Sb content remains unchanged.

4 种水蛭样品中 6 种常量元素平均含量大小顺序为：Na > K > P > S > Ca > Mg。6 种常量元素在 4 种水蛭中含量非常丰富，平均值均超过 2000 mg · kg⁻¹。Na 平均含量最高 (9094 mg · kg⁻¹)，Mg 平均含量最低 (2336 mg · kg⁻¹)。柳叶蚂蟥和蚂蟥均以 Na、K、P 含量最高，且 Na > K > P。柳叶蚂蟥和蚂蟥中 Na 含量约为水蛭和菲牛蛭的 2 倍；水蛭中 K 含量最高，为 8604

mg · kg⁻¹，约为柳叶蚂蟥和蚂蟥的 2 倍，菲牛蛭的 4 倍；柳叶蚂蟥和水蛭中 Ca、S、Mg 含量最低，且 Ca > S > Mg。菲牛蛭中 Na 含量最高，Mg 含量最低，分别为 4548 mg · kg⁻¹ 和 339 mg · kg⁻¹。P 和 S 是两种非金属元素，水蛭中 P 约为蚂蟥和柳叶蚂蟥的 1.5 倍，菲牛蛭的 4.5 倍，S 的含量范围为 3378 ~ 2318 mg · kg⁻¹。与 2020 年版《中国药典》收录的 3 种水蛭（柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭）相比，菲牛蛭中 6 种常量元素含量均最低。除 S 外，该常量元素的品种间差异较大，RSD 均大于 30%。

3.2 4 种水蛭样品中必需微量元素的比较

4 种水蛭样品中 11 种必需微量元素平均含量大小顺序为：Fe > Zn > Mn > Cu > Se > Ni > Cr > I > Co > V > Mo。Fe 是含量最丰富的元素，为 1079 mg · kg⁻¹；Zn 平均含量次之，为 182 mg · kg⁻¹；Mo 平均含量最低，为 0.269 mg · kg⁻¹。其余 8 种必需微量元素的平均含量均较低。

对于 11 种必需微量元素，在柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭 3 个品种中，Fe、Zn 含量最高，Mo 含量最低；在菲牛蛭中也以 Fe、Zn 含量最高，但 V 含量最低。菲牛蛭和水蛭为吸血性水蛭，主要以动物血液为食，因此与非吸血性水蛭相比，菲牛蛭和水蛭的 Fe 含量更为丰富。与柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭相比，菲牛蛭中 Fe 含量最高 (1908 mg · kg⁻¹)，分别为柳叶蚂蟥、蚂蟥和水蛭中 Fe 的 1.63 倍、3.56 倍、1.43 倍；而 Zn、Mn、Cu、Se、Cr、I、V、Mo 的含量均最低。除 Cu 和 Zn 外，其余元素在 4 种水蛭中含量的 RSD 均大于 50%，品种间差异较大。

3.3 4 种水蛭样品中非必需微量元素的比较

4 种水蛭样品中 19 种非必需元素的平均含量大小为：Pb > Al > Ba > Br > Sr > Ti > As > Rb > Sb > Li > Cd > Bi > Y > Sc > Hg > Cs > Be > Tl > Ge。Sr、Ti、As、Rb 的平均含量相对较低，Sb、Li、Cd、Bi、Y、Sc、Hg、

Cs、Be、Tl 的平均含量均低于 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

柳叶蚂蟥和水蛭中均以 Pb、Al 含量最高, Be、Tl、Ge 含量最低; 蚂蟥和菲牛蛭均以 Al、Br 含量最高。柳叶蚂蟥和水蛭中 Pb 含量分别高达 $5579 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $3421 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 超过《中国药典》^[2] 规定的 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 主要是由于 LY1 ($33\ 395 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 SZ2 ($10\ 260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 中超高的 Pb 含量造成的, 其原因可能是这批水蛭生长在 Pb 含量较高的水域或是不法商人用含铅溶液浸泡水蛭, 以增加重量并获取利润。除 Ge 和 Br 外, 其他非必需元素的 RSD 值均大于 50%, 不同种类中的含量差异很大。

3.4 小结

本文采用 ICP-MS 和 ICP-OES 测定了 4 个品种水蛭中 36 种无机元素含量, 在所研究的元素中, 常量元素中 Na 含量最高, Mg 含量最低; 必需元素中 Fe 含量最高, Mo 含量最低; 非必需元素中 Pb 含量最高, Ge 含量最低。菲牛蛭中 Fe 含量明显高于蚂蟥、柳叶蚂蟥和水蛭, 对比菲牛蛭, 蚂蟥、柳叶蚂蟥和水蛭中有超过 80% 的元素含量更高。本文建立了 4 种水蛭无机元素指纹图谱, 其中柳叶蚂蟥和蚂蟥指纹图谱特征较为相似, 菲牛蛭指纹图谱与其他 3 种水蛭差异较大。聚类热图、PLS-DA 和 OPLS-DA 分析结果显示, 不同品种水蛭无机元素含量均存在一定差异, 依据无机元素分布特征, 可区分 4 种水蛭, 菲牛蛭在无机元素分布上与另外 3 种水蛭存在明显差异。因此, 从无机元素角度来看, 即使在药用水蛭资源短缺的情况下, 菲牛蛭也不能作为药用水蛭的补充替代品种。

参考文献

- [1] 吴普编著. 神农本草经[M]. 顾瞻点校. 上海: 第二军医大学出版社, 2012: 258.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 85-86.
- [3] 王文祎, 杨瑶珺, 吕晓娜, 等. 关于水蛭药材重金属元素富集原因的研究[J]. 西部中医药, 2016, 29(8): 29-32.
- [4] 余米, 周梦, 曹敏, 等. 药用水蛭研究进展[J]. 水产养殖, 2021, 42(6): 39-43.
- [5] 朱茂初. 水蛭的掺假[J]. 医学信息, 2013, 26(6): 325.
- [6] 王文祎, 吕晓娜, 李梦, 等. 基于电感耦合等离子质谱技术对水蛭药材重金属残留的安全评价[A]. 北京: 第四届中国中药商品学术大会暨中医药学科教学改革教材建设研讨会论文集[C]. 2015: 129-132.
- [7] 姜秋, 王玲娜, 刘谦, 等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(21): 5806-5816.
- [8] 郭晓庆, 孙佳明, 张辉. 水蛭的化学成分与药理作用[J]. 吉林中医药, 2015, 35(1): 47-50.
- [9] 杨洪雁, 杜智恒, 白秀娟. 水蛭药理作用的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 128-133.
- [10] Jiang Q, Wang LN, Liu Q, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Whitmania pigra* Whitman[J]. Protein Expr Purif, 2020, 174: 105680.
- [11] 涂乾, 刘义梅, 陈科力, 等. 宽体金钱蛭抗凝血有效成分分离研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1086-1088.
- [12] 王少平, 孟莹, 李亚男, 等. 宽体金钱蛭有效成分分子量分布和纯化工艺考察[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(12): 2596-2598.
- [13] 尹娜, 林小清, 杨月伟, 等. 宽体金钱蛭抗氧化活性肽的分离纯化及体外活性研究[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(3): 348-353.
- [14] 杨秀娟, 邓斌, 曹志勇, 等. 水蛭活性成分提取分离纯化方法的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2017(13): 66-68, 77.
- [15] 丁月珠, 段天璇, 单宇, 等. 宽体金钱蛭与菲牛蛭抗凝血酶活性及抗凝机制比较研究[J]. 中国药师, 2016, 19(9): 1621-1624.
- [16] 王雨林, 王实强, 刘玉琴, 等. 不同炮制方法对水蛭中氨基酸及抗凝血酶活性的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(11): 42-45.
- [17] 贾良栋. 水蛭炮制研究进展[J]. 江苏中医药, 2007, 39(10): 80-81.
- [18] 卢富华, 李明玥, 魏妙洁, 等. 水蛭分子鉴定方法的研究进展[J]. 世界中医药, 2020, 15(5): 670-676.
- [19] 袁红霞, 张莉芹, 马瑾, 等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展[J]. 甘肃医药, 2013, 32(4): 270-273.
- [20] Ebrahim AM, Eltayeb MH, Khalid H, et al. Study on selected trace elements and heavy metals in some popular medicinal plants from Sudan[J]. J Nat Med, 2012, 66(4): 671-679.
- [21] Garnier JM, Ciffroy P, Benyahya L. Implications of short and long term (30 days) sorption on the desorption kinetic of trace metals (Cd, Zn, Co, Mn, Fe, Ag, Cs) associated with river suspended matter[J]. Sci Total Environ, 2016, 366(1): 350-360.
- [22] 张彬, 汪波, 龚元, 等. 几种水蛭抗凝血物质提取及活性分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(4): 92-96.
- [23] 韦桂丽, 王硕, 周小雷, 等. 菲牛蛭的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(10): 1496-1498.

(收稿日期: 2024-08-31; 修回日期: 2024-10-07)

UPLC-MS/MS 法同时测定银黄胶囊中 10 种成分的含量

何泉宇¹, 孔虎林², 赵平华¹, 陈洁¹, 方静¹, 王启砚^{1*} (1. 荆门市食品药品质量检验所, 湖北 荆门 448000; 2. 湖北亨迪药业股份有限公司, 湖北 荆门 448000)

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定银黄胶囊中 6 个有机酸类 (绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸) 和 4 个黄酮类 (黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素) 成分的含量。**方法** 采用 Hypersil GOLD VANQUISH C₁₈ 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm), 以乙腈-0.2% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 质谱采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行定量分析。**结果** 10 种成分在一定浓度范围内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.9990$); 平均加样回收率 ($n = 3$) 均在 97.35% ~ 99.26%, *RSD* 在 0.36% ~ 0.83%。6 批银黄胶囊中上述 10 种成分含量分别为 6.981 ~ 12.56、0.8929 ~ 2.084、1.407 ~ 3.454、0.5611 ~ 0.9415、0.8823 ~ 1.647、1.984 ~ 3.465、94.16 ~ 135.2、1.768 ~ 3.214、7.985 ~ 10.06、6.487 ~ 10.11 mg·g⁻¹。**结论** 该方法快速准确, 稳定灵敏, 可用于银黄胶囊的质量控制。

关键词: 银黄胶囊; 有机酸类; 黄酮类; 含量测定; UPLC-MS/MS

中图分类号: R917, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0514-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.034

Simultaneous determination of 10 components in Yinhuang capsules by UPLC-MS/MS

HE Xiao-yu¹, KONG Hu-lin², ZHAO Ping-hua¹, CHEN-Jie¹, FANG-Jing¹, WANG Qi-yan^{1*} (1. Jingmen Food and Drug Quality Inspection Institute, Jingmen Hubei 448000; 2. Hubei Biocause Heilen Pharmaceutical Co., Ltd., Jingmen Hubei 448000)

Abstract: Objective To simultaneously determine 6 organic acids (chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3, 5-*O*-dicaffeoyl quinic acid, 3, 4-*O*-dicaffeoyl quinic acid and 4, 5-*O*-dicaffeoyl quinic acid) and 4 flavonoids (baicalin, baicalein, wogonoside and wogonin) in Yinhuang capsules by UPLC-MS/MS. **Methods** The separation was performed on an Hypersil GOLD VANQUISH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% formic acid by gradient elution at the column temperature of 35 °C. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. Electrospray ionization source was used for the quantitative analysis in multiple reaction monitoring modes. **Results** Ten components showed good linearity with all correlation coefficients > 0.9990. The average recoveries ($n = 3$) ranged from 97.35% to 99.26% with *RSD* from 0.36% to 0.83%. The contents of the above 10 components in the 6 batches of Yinhuang capsules were within 6.981 ~ 12.56, 0.8929 ~ 2.084, 1.407 ~ 3.454, 0.5611 ~ 0.9415, 0.8823 ~ 1.647, 1.984 ~ 3.465, 94.16 ~ 135.2, 1.768 ~ 3.214, 7.985 ~ 10.06 and 6.487 ~ 10.11 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, reliable and sensitive for the quality control of Yinhuang capsules.

Key words: Yinhuang capsule; organic acid; flavonoid; content determination; UPLC-MS/MS

基金项目: 湖北省药品监督管理局 2020—2021 年度科研项目 (No.20200115)。

作者简介: 何泉宇, 男, 中级工程师, 主要从事中药活性成分与质量标准研究, email: 197309250@qq.com *通信作者: 王启砚, 男, 高级工程师, 主要从事中药新药的开发, email: 984326560@qq.com

银黄胶囊为金银花提取物和黄芩提取物组成的中药复方制剂,具有清热疏风、利咽解毒的功效,用于急慢性扁桃体炎、急慢性咽炎、上呼吸道感染,现行标准为国家食品药品监督管理局标准 WS3-B-3692-98-41^[1]。现代研究表明,金银花提取物和黄芩提取物的抗菌、抗炎、抗病毒活性^[2-4]是其所含有的酚类成分和黄酮类成分共同作用的结果,然而该标准仅对黄芩苷和绿原酸进行含量测定,缺少对方中其他活性成分的质控指标,不能全面评价银黄胶囊的整体质量。此外,该标准特征图谱项下,绿原酸与隐绿原酸的相对保留时间仅为 1.05,缺乏一定的耐用性。

依据相关文献的报道,金银花提取物的指标成分为绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸^[5-6];黄芩提取物的指标成分为黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素^[7-8]。本试验拟采用 UPLC-MS/MS 法同时测定银黄胶囊中 10 种有效成分的含量,结合该法灵敏度高、准确性好、专属性强的特点,能有效解决原标准质控指标单一,方法耐用性欠缺的问题,为提升银黄胶囊质量控制标准提供科学依据^[9-12]。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MCA3.6P-2CCN-M 百万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-250DA 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸、黄芩苷、黄芩素(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-200413、110715-202122、111595-201306;含量分别为 99.8%、94.2%、97.8%);新绿原酸、隐绿原酸、汉黄芩苷(天津阿尔塔科技有限公司,批号分别为 FS1632647、FS1623751、ALT600405,含量分别为 99.9%、99.4%、99.9%);3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(上海安谱瑞世标准技术服务有限公司,批号分别为 2250580、2203553、2203711;含量分别为 98.1%、97.5%、97.8%);汉黄芩素(上海源叶生物科技有限公司,批号:J15GB154492,含量:98.0%);甲醇、乙腈、甲酸均为质谱纯(Merck 公司);水为超纯水。6 批银黄胶囊来自不同生产企业,见表 1。

表 1 6 批银黄胶囊样品信息

编号	生产企业	批号
YHJN1	云南通大生物药业有限公司	220336
YHJN2	重庆陪都药业股份有限公司	220603
YHJN3	陕西君碧莎制药有限公司	20220401
YHJN4	通化久铭药业有限公司	201102
YHJN5	中山市恒生药业有限公司	22Y05012
YHJN6	四川泰华堂制药有限公司	220602

2 方法与结果

2.1 液相色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD-VANQUISH C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm);流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~6 min, 5%→10%A; 6~12 min, 10%→50%A; 12~15 min, 50%→80%A);柱温:35℃;流速:0.3 mL·min⁻¹;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;负离子扫描模式;辅助气温度:350℃;离子传输管温度:320℃;喷雾电压:3.0 kV;鞘气流速:35 L·min⁻¹;辅助气流速:10 L·min⁻¹;为提高检测灵敏度,采用分时间段的多反应监测模式,保留时间、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 10 种成分的保留时间、定量离子对、碰撞能量和传输透镜

成分	保留时间/min	定量离子对	碰撞能量/V	TLens
绿原酸	6.35	352.78 → 191.10	21	40
新绿原酸	3.84	352.88 → 191.10	21	51
隐绿原酸	6.98	352.90 → 173.10	19	47
3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	10.65	514.89 → 353.00	18	52
3, 4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	10.53	514.93 → 353.00	22	71
4, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	10.91	515.00 → 352.90	21	65
黄芩苷	11.44	444.80 → 269.00	25	53
黄芩素	13.11	268.90 → 223.00	26	73
汉黄芩苷	12.25	458.80 → 283.00	19	56
汉黄芩素	14.18	282.90 → 268.00	21	47

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷对照品 5.83、14.01、13.82、10.10、8.75、8.96、11.35、7.54、9.79、10.56 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得各对照品储备液;分别精密吸取新绿原酸、隐

绿原酸、黄芩苷和汉黄芩苷对照品储备液各 1 mL, 绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、汉黄芩素对照品储备液各 2 mL 及黄芩素对照品储备液 4 mL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷的质量浓度分别为 46.64、56.04、55.28、55.28、70.00、71.68、181.60、30.16、78.32、42.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (临用现配)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取银黄胶囊内容物适量, 研细, 取粉末约 0.2 g, 精密称定, 置于 50

mL 量瓶中, 加 80% 甲醇约 40 mL, 超声提取 (300 W, 35 kHz) 30 min, 放冷, 用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得 (临用现配)。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按银黄胶囊处方工艺, 制得缺金银花提取物和黄芩提取物的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 1 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样检测, 记录质谱图。结果供试品溶液显示与混合对照品溶液保留时间相同的质谱峰, 阴性样品溶液在此保留时间无质谱峰, 且供试品中 10 个目标峰均达到较为理想的分离效果, 表明该方法专属性好, 见图 1 和图 2。

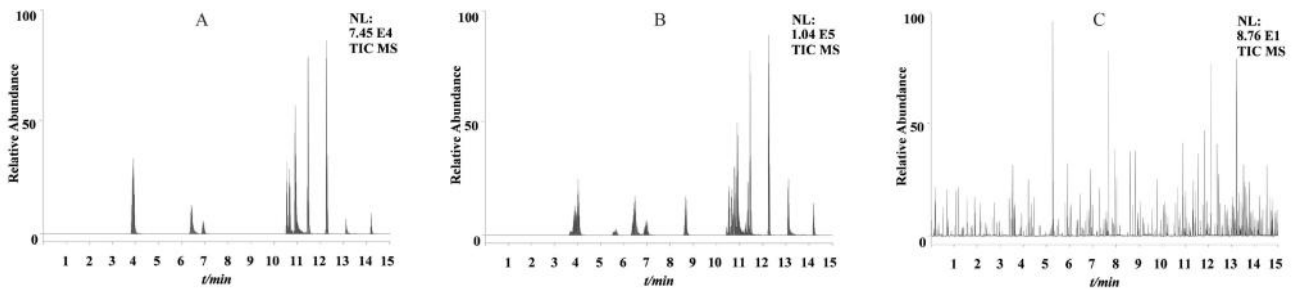


图 1 银黄胶囊中 10 种成分的总离子流图

Fig 1 Total ions chromatogram of 10 components in Yinhuang capsules

A. 混合对照品 (mixed reference substance); B. 供试品 (sample); C. 阴性样品 (negative sample)

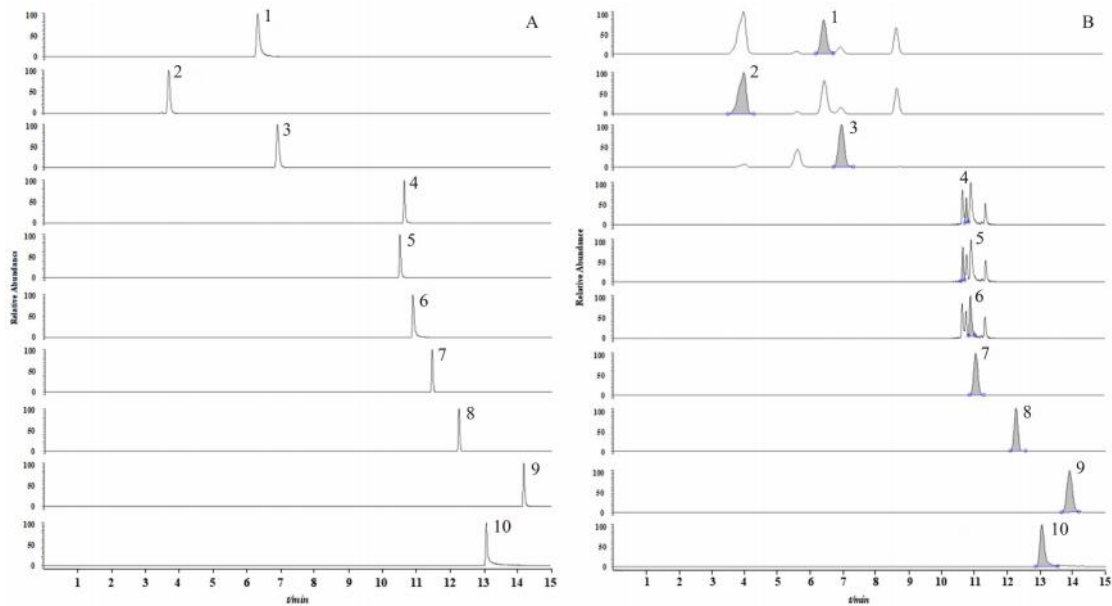


图 2 银黄胶囊中 10 种成分的提取离子流图

Fig 2 Extracting ions chromatogram of 10 components in Yinhuang capsules

A. 混合对照品 (mixed references); B. 供试品 (sample); 1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 4. 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (3, 5-*O*-dicafeoyl quinic acid); 5. 3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (3, 4-*O*-dicafeoyl quinic acid); 6. 4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (4, 5-*O*-dicafeoyl quinic acid); 7. 黄芩苷 (baicalin); 8. 汉黄芩苷 (wogonoside); 9. 汉黄芩素 (wogonin); 10. 黄芩素 (baicalein)

2.3.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1 mL, 分别置于 2、5、10、25、50、100 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得系列混合对照品溶液。按“2.1”项下条件分别进样分析, 以质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标

(Y), 绘制标准曲线, 计算得线性方程, 结果见表 3。

2.3.3 定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD) 取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 逐级稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以信噪比 10:1 和 3:1 对应的浓度为 LOQ 和 LOD, 结果见表 3。

表 3 10 种成分的回归方程、线性范围、定量限和检测限

Tab 3 Regression equation, linearity, LOQ and LOD of 10 components

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	LOQ / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y = 4.868 \times 10^3 X + 1.173 \times 10^3$	0.47 ~ 23.32	0.9996	1.17	0.33
新绿原酸	$Y = 3.276 \times 10^3 X + 3.038 \times 10^2$	0.56 ~ 28.02	0.9995	1.48	0.52
隐绿原酸	$Y = 4.173 \times 10^3 X + 6.820 \times 10^2$	0.55 ~ 27.64	0.9994	1.39	0.44
3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 6.419 \times 10^3 X + 5.451 \times 10^2$	0.81 ~ 40.40	0.9994	2.37	0.79
3, 4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 9.133 \times 10^3 X + 5.052 \times 10^2$	0.70 ~ 35.00	0.9996	2.69	0.87
4, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 9.351 \times 10^3 X + 4.126 \times 10^2$	0.72 ~ 35.84	0.9997	2.18	0.77
黄芩苷	$Y = 2.396 \times 10^4 X + 2.866 \times 10^3$	0.30 ~ 15.08	0.9997	0.48	0.19
黄芩素	$Y = 1.201 \times 10^3 X + 6.498 \times 10^2$	1.82 ~ 90.80	0.9991	3.44	1.30
汉黄芩苷	$Y = 8.949 \times 10^3 X + 1.703 \times 10^3$	0.42 ~ 21.12	0.9993	2.01	0.70
汉黄芩素	$Y = 2.058 \times 10^3 X + 1.233 \times 10^3$	0.78 ~ 39.16	0.9992	2.85	0.92

2.3.4 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1 μL , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定各成分峰面积, 计算 RSD 。结果绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷的峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 0.48%、0.52%、0.42%、0.63%、0.70%、0.76%、1.8%、0.68%、1.5%、0.70%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取 6 份同一银黄胶囊内容物 (批号: 20220401), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定并计算 RSD , 结果绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷的峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 0.58%、0.64%、0.44%、0.81%、0.67%、0.90%、1.8%、0.85%、1.7%、0.68%, 表明方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 分别精密吸取同一供试品溶液 (批号: 20220401) 1 μL , 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、1、2、4、8、12 h 进样, 结果绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷的峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 0.78%、0.81%、0.65%、1.1%、0.86%、1.2%、2.0%、1.2%、1.8%、0.90%, 表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.7 加样回收试验 取 9 份银黄胶囊内容物 (批号: 20220401), 每份约 0.1 g, 精密称定, 分别置于 50 mL 量瓶中, 每 3 份为一组, 分别加入相当于样品含量 50%、100%、150% 的对照品, 以“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定并计算各成分的回收率和 RSD , 结果各成分低、中、高浓度的平均加样回收率分别在 97.21% ~ 99.09%、96.27% ~ 98.45%、97.23% ~ 99.27%、96.03% ~ 98.13%、97.00% ~ 98.98%、97.22% ~ 99.06%、98.51% ~ 100.09%、97.00% ~ 99.44%、98.63% ~ 100.21%、96.86% ~ 97.84%, RSD 均小于 2.0%, 表明该方法回收率良好。

2.4 含量测定

取 6 批样品内容物各约 0.2 g, 同批次平行测定 2 份, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备, 精密吸取供试品溶液 1 μL , 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算各成分含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

在银黄胶囊局颁标准特征图谱项下, 绿原酸和隐绿原酸的相对保留时间为 1.05, 在实际检测中, 受色谱柱效能的影响, 其分离度 (R) 可能低于 1.5, 故本试验采用分离效能更高的 UPLC 法进行分离, 考察了 Hypersil GOLD VANQUISH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm) 色谱柱和 Agilent Porshell 120 PFP (2.1 mm \times 100 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 结果供试品中绿原酸和隐绿原酸的相对保留时间均能

表 4 银黄胶囊中 10 种成分的含量测定结果 ($n = 2, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
 Tab 4 Content of 10 components in Yinhuang capsules ($n = 2, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	3, 4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	4, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩苷	汉黄芩素
220336	11.28	1.437	2.561	0.6127	1.072	2.442	128.5	3.214	9.841	7.584
220603	9.473	1.085	2.078	0.7241	1.288	2.783	119.4	2.872	8.757	6.956
20220401	12.56	1.602	3.454	0.9415	1.647	3.465	135.2	2.530	10.06	8.177
201102	7.504	0.8929	1.890	0.6320	1.109	2.122	104.5	1.768	7.985	7.145
22Y05012	6.981	2.084	1.407	0.5611	0.8823	1.984	95.68	1.982	8.113	10.11
220602	9.624	1.145	3.083	0.6132	1.075	2.356	94.16	2.304	9.307	6.487

达到 1.10 以上, 分离度均大于 2.0。同时考察了乙腈 -0.5% 乙酸、乙腈 -0.2% 甲酸及甲醇 - 乙酸铵 3 种流动相的梯度洗脱程序, 最终确定在乙腈 -0.2% 甲酸梯度洗脱体系中, 各成分分离度及峰形最佳, 各色谱峰相对保留时间均有较好的重现性。

3.2 稳定性试验考察时间的选择

从化学结构式的角度出发, 绿原酸和新绿原酸为一组非对映异构体, 3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为另一组非对映异构体。本研究前期预试验表明, 这两组非对映异构体的 80% 甲醇溶液在放置 12 h 后, 构型转换现象明显, 因此确定稳定性考察时间为 0 ~ 12 h, 供试品溶液及对照品溶液均需临用现配。

3.3 样品含量测定的分析

分析表 4 结果可知, 6 批银黄胶囊中绿原酸、新绿原酸和 3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量范围分别为 6.981 ~ 12.56 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.8929 ~ 2.084 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.8823 ~ 1.647 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其含量相差近 2 倍, 原因分析如下: 不同厂家制剂工艺不同, 绿原酸类成分的含量在溶剂、光、热、pH 值等诱发条件下呈下降趋势^[13]; 绿原酸和新绿原酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 4, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸在溶液中的相互转化性为含量差异的又一因素。因此, 科学完善的金银花提取物的制备工艺, 对该制剂质量的稳定性至关重要。

本研究采用 UPLC-MS/MS 法对银黄胶囊中 10 种成分进行含量测定, 该方法简便、快速、灵敏, 专属性强, 可以为银黄胶囊质量标准的提升提供重要参考。同时, 该方法学考察研究也可对制剂工艺的优化提供一定科学依据。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局. 银黄胶囊质量标准[S].

WS3-B-3692-98-41.2016.

[2] 周凯艺, 胡悦, 杨敏, 等. 黄芩苷通过延缓衰老和调节自噬改善 Tau 转基因小鼠的认知损伤[J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (1): 65-72.

[3] 刘勇永, 芦晔, 楚立, 等. 黄芩苷对抑郁症模型小鼠海马钙结合蛋白 D28K 表达的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38 (2): 107-111.

[4] 程敏, 梁芷韵, 张文莉, 等. 金银花提取物的质量评价研究[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35 (3): 511-516.

[5] 郭志俊, 侯梦梦, 高旦, 等. 银花新型颗粒饮片的质量评价及解热抗炎作用研究[J]. 药理学, 2024, 59 (6): 1108-1112.

[6] 贾金浩, 陈小菲, 李寒冰, 等. 基于抗炎效应成分指数的金银花配方颗粒质量评价研究[J]. 中草药, 2024, 55 (8): 579-584.

[7] 刘雨然, 郭梦佳, 杨立新, 等. 不同道地产区黄芩的主要成分和抗氧化活性的比较研究[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36 (6): 732-736.

[8] 张晴, 王云, 贾哲, 等. 基于热分析技术、指纹图谱及含量测定的不同产地酒黄芩质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (14): 495-500.

[9] Wong TL, An YQ, Yan BC, et al. Comprehensive quantitative analysis of Chinese patent drug YinHuang drop pill by ultra high-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, (125): 415-426.

[10] He Y, Hu XX. UPLC characteristic chromatogram and content determination of six components for Yinhuang capsules[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 11 (37): 1314-1319.

[11] 谭金桃, 周思倩, 方艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术建立银花抗病毒口服液的指纹图谱及多指标含量测定[J]. 中南药学, 2024, 22 (3): 760-766.

[12] 崔小丽, 孙宁, 赵瑞, 等. 高效液相色谱法同时测定桂芍镇痫片中 13 种成分的含量[J]. 中南药学, 2023, 21 (11): 3024-3029.

[13] 吴娟娟, 王子璇, 连运河, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS/MS 技术研究甜叶菊绿原酸类成分的降解机制[J]. 质谱学报. <https://link.cnki.net/urlid/11.2979.TH.20240701.1355.002>.

(收稿日期: 2024-07-08; 修回日期: 2024-08-28)

HPLC-DAD 法检测保健品中非法添加的 10 种精神类药物

徐硕, 邝咏梅, 徐文峰, 王晶, 金鹏飞* (北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室(北京医院), 北京 100730)

摘要: **目的** 应用高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)技术,建立保健品中可能添加的吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛等 10 种精神类药物的检查方法。**方法** 采用的色谱条件为: Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵水溶液(用磷酸调 pH 至 3.0), 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 检测波长为 220、240、260 nm。**结果** 10 种化学成分在各自质量浓度范围内与峰面积的线性关系良好(*r* 均为 1.000); 对于固体样品, 低、中、高 3 个浓度的平均回收率(*n* = 3) 分别在 98.51% ~ 100.9%、98.93% ~ 99.82%、99.08% ~ 100.9%, 相对标准偏差(RSD) 分别在 0.21% ~ 0.66%、0.22% ~ 1.1%、0.28% ~ 1.2%; 对于液体样品, 低、中、高 3 个浓度的平均回收率(*n* = 3) 分别在 98.06% ~ 100.6%、98.06% ~ 100.2%、98.10% ~ 100.9%, RSD 分别在 0.17% ~ 0.90%、0.24% ~ 1.1%、0.28% ~ 1.4%。该方法精密度、重复性和稳定性良好, RSD 均小于 2.0%; 检测限为 0.063 ~ 0.40 μg·mL⁻¹; 定量限为 0.20 ~ 1.32 μg·mL⁻¹。**结论** 该方法简便、准确, 能够用作检测保健品中可能非法添加的 10 种精神类药物。**关键词:** 高效液相色谱-二极管阵列检测; 保健品; 非法添加; 精神类药物

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0519-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.035

Determination of ten psychotropic drugs illegally added in health foods by HPLC-DAD

XU Shuo, KUANG Yong-mei, XU Wen-feng, WANG Jing, JIN Peng-fei* (*Department of Pharmacy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drug Risks and Individualized Application (Beijing Hospital), Beijing 100730*)

Abstract: Objective To determine ten psychotropic drugs (moclobemide, mirtazapine, risperidone, clozapine, escitalopram oxalate, paroxetine hydrochloride, fluvoxamine maleate, duloxetine hydrochloride, sertraline hydrochloride and melitracen hydrochloride) in health foods by high-performance liquid chromatography (HPLC) method with diode array detector (DAD). **Methods** An Agilent Zorbax C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, with gradient elution of acetonitrile and ammonium dihydrogen phosphate aqueous solution (adjusting pH to 3.0 with phosphoric acid) as the mobile phase at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 220, 240 and 260 nm. **Results** All ten chemical constituents demonstrated good linearity within certain concentration ranges (*r* = 1.000). For solid samples, the average recoveries (*n* = 3) of low, middle and high concentrations were 98.51% ~ 100.9%, 98.93% ~ 99.82%, and 99.08% ~ 100.9%, respectively. The relative standard deviations (RSDs) were 0.21% ~ 0.66%, 0.22% ~ 1.1%, and 0.28% ~ 1.2%, respectively. For liquid samples,

基金项目: 中关村精准医学基金会医健公益行药学科专项(No. ZGC-YXKY-43)。

作者简介: 徐硕, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: jessica06250917@126.com *通信作者: 金鹏飞, 男, 主任药师, 主要从事药物分析及医院药学研究, email: j790101@163.com

the average recoveries ($n = 3$) of low, middle and high concentrations were 98.06% ~ 100.6%, 98.06% ~ 100.2%, and 98.10% ~ 100.9%. The *RSDs* were 0.17% ~ 0.90%, 0.24% ~ 1.1%, and 0.28% ~ 1.4%. The precisions, repeatabilities and stabilities were all satisfactory with all *RSDs* lower than 2.0%. The limits of detection and limit of quantity were 0.063 ~ 0.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.20 ~ 1.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate, it is suitable for the detection of ten psychotropic drugs possible illegally added in health foods.

Key words: HPLC-DAD; health food; illegally addition; psychotropic drug

随着社会竞争压力的日趋增大及生活节奏的日益加快,失眠症已成为困扰不少人的病症之一,市面上有助于改善睡眠的保健品种类繁多,一些不法商家为达到产品宣称的疗效,向保健品中随意加入具有增强疗效的西药成分,消费者购买服用之后会引发不良反应,危害身体健康^[1-4]。随着分析检测技术的不断发展,保健品中非法添加化学药物的检测技术日益增多,包括薄层色谱(TLC)法、高效液相色谱(HPLC)法、液相色谱-质谱联用(LC-MS)法、薄层色谱-表面增强拉曼光谱(TLC-SERS)法、离子迁移谱(IMS)法、分子印迹固相萃取-液相色谱法等^[5],每种技术都有各自的优势和不足。HPLC法^[6-10]和LC-MS法^[11-15]在保健品中非法添加化学药物的检测中应用相对较多,其中HPLC法具有分离性能高、分析速度快以及能够准确定量的优势,而且价格不贵,具有良好的重复性,与LC-MS法相比,HPLC法操作简便,更加适合推广应用^[16]。DAD作为HPLC法常用的检测器,其特点是可以进行不同波长切换,同一色谱法同时分析多种成分,选择待测成分的最大吸收波长,从而获得较高的灵敏度和较低的检测限。对于不能实现基线分离或紫外吸收谱图有较明显差异的成分,在不改变色谱分离条件的情况下将杂质的干扰排除,并且可以对色谱峰进行纯度检测^[17]。

近年来,保健品中非法添加化学药物的隐蔽性增强,有助于改善睡眠的保健品中非法添加的化学药物,除镇静催眠类药物以外,一些精神类药物也因具备辅助睡眠功能,也可能被添加至保健品中。例如研究表明氟伏沙明、舍曲林、帕罗西汀和艾司西酞普兰等5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂具有改善睡眠的作用^[18];米氮平是去甲肾上腺素能和特异性5-羟色胺能抗抑郁药的代表性药物,其对5-HT₂受体的阻断作用有利于睡眠,用安眠药治疗无效的患者可改为用米氮平^[18-19]。失眠与焦虑、抑郁情绪之间通常可相互影响,失

眠会产生焦虑、抑郁情绪,而不良情绪会加重失眠^[20]。近年来研究表明部分抗抑郁药物有望应用于治疗失眠^[19],这些精神类药物需要在医师指导下使用,否则极易引起不良反应,其不良反应可累及心脑血管系统、消化系统、神经系统、呼吸系统、内分泌系统等多个系统^[21-22]。已有报道从改善睡眠类保健品中检出佐匹克隆^[23]、艾司唑仑^[24-26]、氯氮平^[25]、氯硝西泮^[26]和地西泮^[25, 27]等药物。目前改善睡眠类保健品中非法添加抗抑郁等精神类药物的HPLC筛查方法报道较为有限。因此,有必要对该类药物的筛查方法进行补充和完善,增加可检测成分的种类。本研究通过HPLC-DAD技术,建立了保健品中可能添加的吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛等10种精神类药物的检查方法,可作为改善睡眠类保健品中非法添加西药成分筛查方法的补充。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪和 LC OpenLAB 色谱工作站(美国 Agilent Technologies 有限公司); XP-205 型十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司); KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品:吗氯贝胺(批号:100583-200401,纯度:100%)、利培酮(批号:100570-201704,纯度:99.9%)、氯氮平(批号:100323-201703,纯度:99.7%)、草酸艾司西酞普兰(批号:100885-201802,纯度:99.4%)、盐酸帕罗西汀(批号:100357-201804,纯度:97.4%)、马来酸氟伏沙明(批号:100792-201902,纯度:99.9%)、盐酸度洛西汀(批号:510144-201701,纯度:99.5%)、盐酸舍曲林(批号:100702-201602,纯度:99.8%)和盐酸美利曲辛(批号:100912-201802,纯度:99.9%)(中国食品药品检

定研究院), 米氮平 (批号: H02D10Y104684, 纯度: 99%, 上海源叶生物科技有限公司)。市售具有改善睡眠作用的保健品 8 批, 包括胶囊剂 6 批, 口服液 2 批。乙腈 (色谱纯, 批号: F22MA7201)、磷酸 (色谱纯, 批号: 218128) [Thermo Fisher Scientific (中国) 有限公司]; 磷酸二氢铵、甲醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为二级实验用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选择 Agilent Zorbax C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵水溶液 (用磷酸调 pH 至 3.0)(B), 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm (检测米氮平、盐酸帕罗西汀、盐酸度洛西汀和盐酸舍曲林), 240 nm (检测吗氯贝胺、利培酮、氯氮平和草酸艾司西酞普兰), 260 nm (检测马来酸氟伏沙明和盐酸美利曲辛); 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间 /min	乙腈 /%	磷酸二氢铵水溶液 /%
0	10	90
10	20	80
15	23	77
35	35	65
60	35	65

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 ① 混合对照品储备液: 取 10 种化合物对照品, 分别精密称定各对照品适量, 以甲醇为溶剂, 超声使其溶解, 将其

配制成吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛的质量浓度各约为 600 μg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液。② 线性关系考察系列溶液: 分别精密量取上述混合对照品储备液 1、1.25、2.5、5、10、20、25 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 制得 7 个不同浓度的混合对照品溶液, 即为线性关系考察系列溶液。当用作方法的系统适用性研究以及试验样品的筛查时, 采用 10 种成分的浓度各约为 30 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 当样品为胶囊剂时, 将内容物倒出, 放置于乳钵中研细, 并剪碎胶囊壳, 与内容物混合均匀; 当样品为口服液时, 则直接量取。精密称取或量取以上样品适量 (相当于药品的 1 次服用量), 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 30 mL, 超声 (功率为 350 W, 频率为 40 kHz) 30 min, 冷却至室温后, 加入甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 的滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的配制 分别取某品牌保健品胶囊剂以及口服液 (经检测不含有上述 10 种化学药物), 精密称定或量取适量 (1 次服用量), 按照“2.2.2”项下方法操作, 即得阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

将混合对照品溶液以及阴性样品溶液按照“2.1”项下色谱条件, 分别进样 10 μL, 结果显示阴性样品中的其他成分不会干扰 10 种待筛查成分的检测, 色谱图见图 1。10 种化学成分的 DAD 扫描叠加图见图 2。

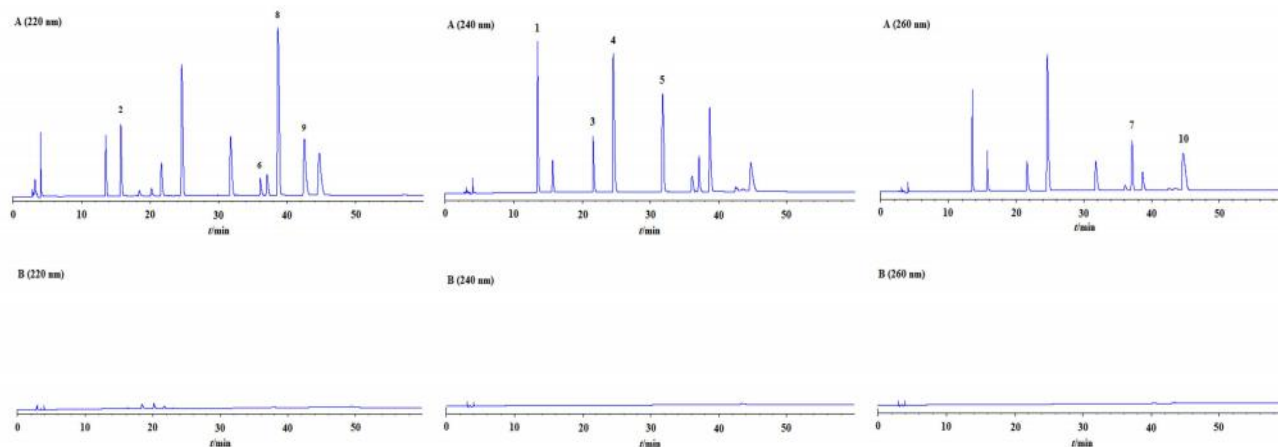


图 1 混合对照品溶液 (A) 和阴性样品溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference solution (A) and negative sample solution (B)

1. 吗氯贝胺 (moclobemide); 2. 米氮平 (mirtazapine); 3. 利培酮 (risperidone); 4. 氯氮平 (clozapine); 5. 草酸艾司西酞普兰 (escitalopram oxalate); 6. 盐酸帕罗西汀 (paroxetine hydrochloride); 7. 马来酸氟伏沙明 (fluvoxamine maleate); 8. 盐酸度洛西汀 (duloxetine hydrochloride); 9. 盐酸舍曲林 (sertraline hydrochloride); 10. 盐酸美利曲辛 (melitracen hydrochloride)

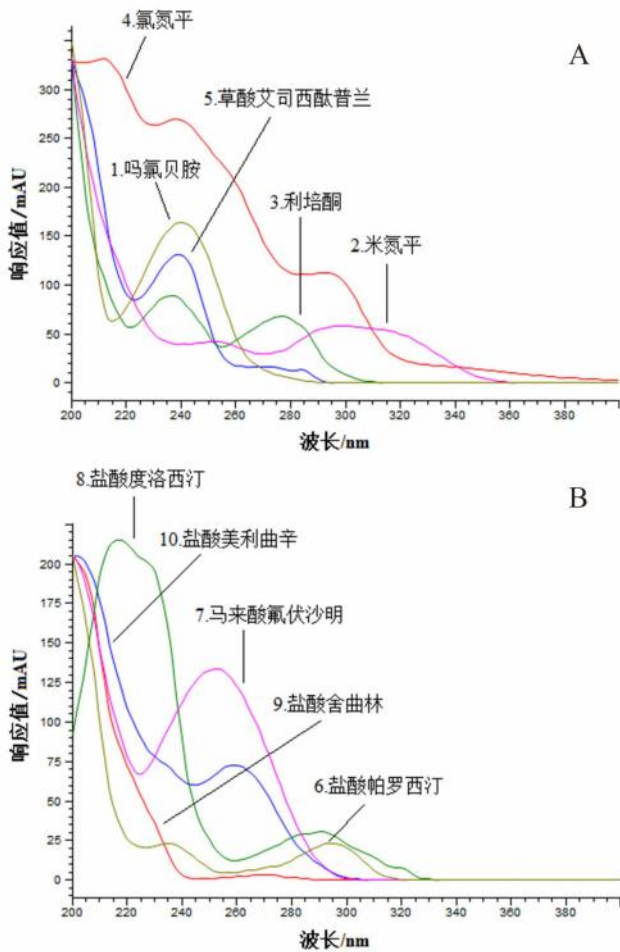


图 2 10 种精神类药物的 DAD 扫描叠加图
Fig 2 DAD scanning overlay of ten psychotropic drug

2.4 系统适用性、线性关系、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

混合对照品溶液依照“2.1”项下色谱条件进样检测, 结果显示 10 种化学成分的理论塔板数均大于 50 000, 与相邻峰之间能够达到良好的分离, 分离度均大于 1.5。分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 浓度由低至高进样测定, 将横坐标设定为各溶液质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 纵坐标设定为峰面积, 进行线性回归, 得到回归方程以及线性相关系数 (r)。取质量浓度约为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液用甲醇逐级稀释, 进样测定, 10 种成分的 LOD 以及 LOQ 分别为信噪比 (S/N) 约为 3.0、10.0 时的浓度, 结果见表 2。

2.5 回收试验

取某品牌保健品胶囊剂 (为阴性样品, 经检测不含有上述 10 种化学成分), 精密称取 9 份, 每份约为 2 粒内容物的量; 同时精密量取某品牌保健品口服液 9 份, 每份 10 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 胶囊和口服液样品均分成 3 组, 每组 3 份。分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液 1.25、2.5、5 mL, 加入阴性样品中, 照“2.2.2”项下方法制备, 即得到低、中、高回收率溶液 (质量浓度约为 15、30、 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 再依照“2.1”项下色谱条件依次进样分析, 计算回收率及 RSD 值。结果显示: 对于固体样品, 10 种化学成分低、中、高 3 个质量浓

表 2 回归方程、线性范围、LOD 和 LOQ

Tab 2 Regression equations, linear ranges, LODs and LOQs

化学成分	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
吗氯贝胺	$Y = 47.95X - 2.341$	1.0000	6.058 ~ 151.5	0.065	0.21
米氮平	$Y = 30.60X - 5.501$	1.0000	6.218 ~ 155.5	0.15	0.48
利培酮	$Y = 24.20X - 2.273$	1.0000	6.092 ~ 152.3	0.16	0.51
氯氮平	$Y = 69.09X - 1.294$	1.0000	6.164 ~ 154.1	0.073	0.24
草酸艾司西酞普兰	$Y = 56.06X - 2.166$	1.0000	6.232 ~ 155.8	0.12	0.37
盐酸帕罗西汀	$Y = 10.43X - 2.284$	1.0000	6.318 ~ 158.0	0.40	1.32
马来酸氟伏沙明	$Y = 21.76X - 2.211$	1.0000	5.994 ~ 149.9	0.19	0.63
盐酸度洛西汀	$Y = 118.54X - 2.629$	1.0000	6.242 ~ 156.0	0.063	0.20
盐酸舍曲林	$Y = 57.16X - 2.422$	1.0000	6.102 ~ 152.6	0.18	0.54
盐酸美利曲辛	$Y = 32.66X - 2.270$	1.0000	5.926 ~ 147.8	0.21	0.65

度的平均回收率 ($n = 3$) 分别在 98.51% ~ 100.9%、98.93% ~ 99.82%、99.08% ~ 100.9%, RSD 分别在 0.21% ~ 0.66%、0.22% ~ 1.1%、0.28% ~ 1.2%; 对于液体样品, 10 种化学成分低、中、高 3 个浓度的平均回收率 ($n = 3$) 分别在 98.06% ~ 100.6%、98.06% ~ 100.2%、98.10% ~ 100.9%, RSD 分别在 0.17% ~ 0.90%、0.24% ~ 1.1%、0.28% ~ 1.4%。

2.6 精密度试验

取 10 种化学成分质量浓度分别约为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的同一份固体样品回收试验溶液, 按照“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 针, 记录峰面积, 计算 10 种化学成分色谱峰峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.19% (吗氯贝胺)、0.76% (米氮平)、0.27% (利培酮)、0.16% (氯氮平)、0.18% (草酸艾司西酞普兰)、0.52% (盐酸帕罗西汀)、0.35% (马来酸氟伏沙明)、0.21% (盐酸度洛西汀)、0.29% (盐酸

舍曲林)和 0.13% (盐酸美利曲辛), 表明仪器精密度良好。取 10 种化学成分的混合对照品溶液, 低、中、高浓度 (质量浓度分别约为 6、30、150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 各一份, 每隔 4 h 进样一次, 进行日内精密度试验; 将样品溶液每隔 12 h 进样一次, 连续测定 3 d, 计算日间精密度。结果 10 种化学成分低、中、高 3 个浓度日内精密度的 RSD ($n = 6$) 分别在 0.52% ~ 1.1%、0.16% ~ 1.2%、0.048% ~ 0.60%, 日间精密度的 RSD ($n = 6$) 分别在 0.68% ~ 1.6%、0.27% ~ 1.4%、0.073% ~ 0.59%, 表明日内和日间精密度良好。

2.7 重复性试验

取某品牌保健品胶囊剂 (阴性样品), 精密称取 6 份, 每份称取约 2 粒内容物的量, 置于 50 mL 量瓶中, 向其中分别精密加入混合对照品储备液 (其中吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛的质量浓度分别为 607.3、619.5、608.1、613.8、621.4、628.2、603.3、626.7、608.5 和 597.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.5 mL, 按照“2.2.2”项下方法操作, 制得各供试液, 之后分别进样 10 μL 。结果吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛的平均含量分别为 0.7573、0.7845、0.7749、0.7826、0.7712、0.7839、0.7670、0.7609、0.7867 和 0.7489 mg/粒, RSD 分别为 0.56%、1.1%、1.2%、1.4%、0.91%、0.76%、1.3%、1.0%、0.83% 和 1.7%, 说明方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

取溶液中 10 种化学成分的质量浓度分别约为 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的同一份回收试验样品溶液, 置于自动进样器中, 在室温条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 测得峰面积, 计算得到 24 h 内吗氯贝胺、米氮平、利培酮、氯氮平、草酸艾司西酞普兰、盐酸帕罗西汀、马来酸氟伏沙明、盐酸度洛西汀、盐酸舍曲林和盐酸美利曲辛峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.12%、0.42%、0.25%、0.16%、0.15%、0.60%、0.52%、0.26%、0.25% 和 0.13%, 说明样品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.9 样品分析

对 8 批改善睡眠的保健品进行检测, 结果显示样品中均未发现保留时间或紫外谱图与上述 10 种化学成分一致的色谱峰, 未检出以上成分。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

米氮平、盐酸帕罗西汀、盐酸度洛西汀和盐酸舍曲林的最大吸收波长靠近末端吸收, 选择 220 nm 作为检测波长; 吗氯贝胺、利培酮、氯氮平和草酸艾司西酞普兰在 240 nm 波长处有最大吸收; 马来酸氟伏沙明和盐酸美利曲辛分别在 254、260 nm 波长处有最大吸收, 马来酸氟伏沙明在 260 nm 也有较强吸收, 选择 260 nm 作为马来酸氟伏沙明和盐酸美利曲辛的检测波长。

3.2 色谱条件的确定

对于精神类药物的检测, 文献采用 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵缓冲液 - 甲醇 - 水 (100 : 150 : 750) (A) - 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵缓冲液 - 甲醇 - 水 (100 : 850 : 50) (B) [28]、磷酸二氢钾水溶液 - 甲醇 (75 : 25) (A) - 磷酸二氢钾水溶液 - 甲醇 (15 : 85) (B) [29]、0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液 - 乙腈 - 甲醇 [30]、0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钠缓冲液 - 甲醇 [31] 等作为流动相。有些流动相溶液配制较为复杂, 且使用高浓度缓冲盐不利于色谱柱和液相系统的长时间运行。在方法建立过程中, 本试验考察了乙腈 - 水、甲醇 - 水、乙腈 - 乙酸钾缓冲液、乙腈 - 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠水溶液 (用磷酸调 pH 为 6.0)、乙腈 - 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵水溶液 (用磷酸调 pH 为 3.0 或 2.7)、乙腈 - 甲醇 - 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液, 对 10 种待筛查成分分离效果、峰形的影响, 结果显示当选择流动相是乙腈 - 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵水溶液 (用磷酸调 pH 为 3.0) 时各成分峰形良好, 保留时间较为合适, 故确定为本文方法流动相。流动相配制简便, 并且用较低的缓冲盐浓度, 避免了对色谱柱和液相系统的损害, 有利于其长时间运行。本试验考察了不同品牌色谱柱 (Agilent Zorbax C_{18} 、Alltima C_{18} 、Shimadzu C_{18} 柱), 不同柱温 (25、30、35 $^{\circ}\text{C}$), 不同流速 (0.5、0.8、1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 对分离效果的影响, 结果表明当采用 Agilent Zorbax C_{18} 柱, 流速为 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 各成分之间分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 50 000, 柱温对于各成分峰形、分离度无明显影响。

3.3 样品的筛查

保健品中非法添加化学成分的隐蔽性日益增加, 若样品的剂型为胶囊剂, 某些化学药物可能会被非法添加至胶囊壳中, 使其被检测出来的难度增加。所以在制备胶囊剂的供试液时, 需剪碎胶囊壳, 将其与内容物均匀混合, 一起进行处理。

参考文献

- [1] 王超众, 王萌萌, 刘信奎, 等. UHPLC-MS/MS 法检测中成药及保健食品中非法添加文拉法辛的研究 [J]. 中国实用医药, 2021, 16 (10): 207-209.
- [2] 徐硕, 金鹏飞, 何笑荣, 等. 检测抗风湿类中成药和保健品非法添加化学药物的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33 (1): 133-136.
- [3] 张艳萍, 张敏, 周宗洲, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定中药软膏中非法添加的 28 种抗真菌类和糖皮质激素类化学成分 [J]. 轻工科技, 2021, 37 (2): 39-41.
- [4] 郭常川, 邢晟, 许嘉平, 等. 中成药和保健食品中非法添加 38 种激素的快速筛查 [J]. 中成药, 2020, 42 (4): 949-954.
- [5] 徐硕, 徐文峰, 金鹏飞, 等. 止咳平喘类中成药和保健品中非法添加化学药物检测技术的研究进展 [J]. 中南药学, 2017, 15 (6): 798-803.
- [6] Viana C, Zemolin GM, Molin TRD, et al. Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS [J]. J Pharm Anal, 2018, 8 (6): 366-372.
- [7] 童杨, 孙蓓, 罗欣杰, 等. 高效液相色谱法检测中成药中非法添加的布洛芬 [J]. 化工技术与开发, 2020, 49 (4): 48-50.
- [8] 陈国权, 黄文静, 蔡霞, 等. 高效液相色谱法测定降压类健康产品中非法添加的 4 种化学成分 [J]. 中南药学, 2018, 16 (1): 107-110.
- [9] Jin PF, Liang XL, Wu XJ, et al. Screening and quantification of 18 glucocorticoid adulterants from herbal pharmaceuticals and health foods by HPLC and confirmed by LC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2018, 35 (1): 10-19.
- [10] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 高效液相色谱检测中成药及保健品中非法添加 14 个降血脂类化学药物的研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40 (12): 2209-2220.
- [11] 张崇生, 倪赞, 叶建晨, 等. 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法测定中成药及保健食品中非法添加的 15 种抗组胺类化学成分 [J]. 中南药学, 2021, 19 (5): 954-957.
- [12] 刘静, 董宇, 姜鑫, 等. LC-MS 测定止咳平喘类中成药中非法添加的 8 种化学药物 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (7): 851-855.
- [13] 孙夏荣, 史达, 曹玉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定外用贴膏剂中非法添加 48 个化合物 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40 (3): 502-512.
- [14] 罗伟, 杜俊威, 林秋凤, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定凉茶中 20 种非法添加化学药物 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16 (6): 43-47.
- [15] 刘静, 姜鑫, 曲绪楷, 等. 高效液相色谱-质谱联用法快速检测中成药和保健食品中非法添加的 12 种减肥类药物 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (8): 2518-2523.
- [16] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 中药和食品中大豆异黄酮分析方法的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36 (1): 166-169.
- [17] 王骏, 胡梅, 张卉, 等. 二极管阵列检测器在食品分析中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2008, 34 (8): 154-157.
- [18] 李超群, 李秀玉, 李静. 常用安眠药物临床应用进展——从理论到实践 [J]. 中国医刊, 2016, 51 (1): 43-48.
- [19] 黄旭雯, 黄俏庭, 潘集阳. 抗抑郁药治疗失眠临床应用进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13 (11): 971-975.
- [20] 王智康, 王飞. 失眠患者的焦虑、抑郁情绪及其与认知功能的相关性分析 [J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8 (5): 24-27.
- [21] 罗骞, 廖丹, 占海燕. 精神科药品不良反应 938 例分析 [J]. 药品评价, 2022, 19 (1): 1-5.
- [22] 韩宁, 王渭华, 马雅菊. 长期服用精神类药物患者罹患心脑血管疾病的风险 [J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6 (8): 32-34, 37.
- [23] 林凤屏, 翁嘉, 李惠敏, 等. HPLC 测定安神类中成药和保健食品中非法添加佐匹克隆的研究 [J]. 食品与药品, 2022, 24 (5): 460-462.
- [24] 肖丽和, 关潇滢, 刘吉金, 等. 镇静安神类中成药及保健食品中非法添加艾司唑仑的 GC-MS/MS 检测方法研究 [J]. 中国当代医药, 2013, 20 (13): 53-54.
- [25] 申兰慧, 彭耀文, 杨敏智. 睡眠宝胶囊中非法掺入化学药品的检测方法研究 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32 (6): 724-727.
- [26] 倪赞, 谢循策, 刘萌. HPLC 法测定保健食品中非法添加的 12 种镇静安神类化学药物 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24 (17): 2491-2493, 2497.
- [27] 田兰, 张继春, 陈睿, 等. 超高效液相色谱-串联四级杆质谱法检测镇静安神类中药制剂及保健品中非法添加的 9 种化学药品 [J]. 中国药业, 2013, 22 (6): 66-68.
- [28] 轩涛. 梯度洗脱 HPLC 法测定利培酮的含量 [J]. 福建分析测试, 2013, 22 (4): 47-49.
- [29] 梁伟, 伍忆, 郭杰, 等. 高效液相色谱法测定氯氮平片含量 [J]. 广东化工, 2022, 49 (24): 231-233.
- [30] 陈福. 高效液相色谱法测定盐酸舍曲林片的含量 [J]. 海峡药学, 2008, 20 (8): 29-31.
- [31] 叶显撑, 王洪泉, 吴涓, 等. RP-HPLC 法测定盐酸帕罗西汀片的含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18 (3): 233-234.

(收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-05-25)

磷酸川芎嗪中有关物质的研究

林凤强¹, 苏新海², 郑辽豫², 王方¹, 李磊², 文霞¹, 徐东^{1, 3*} (1. 淄博高新技术产业开发区生物医药研究院 (山东大学淄博生物医药研究院), 山东 淄博 255035; 2. 双鹤药业(商丘)有限责任公司, 河南 商丘 476200; 3. 山东大学药学院, 济南 250012)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法检测磷酸川芎嗪原料药中有关物质的含量。**方法** 采用 YMC-Triart C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以纯化水作为流动相 A, 乙腈作为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 295 nm, 进样量 20 μL。**结果** 3 种有关物质线性关系良好, 范围分别为杂质 A 0.0452 ~ 0.9040 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、杂质 B 0.0529 ~ 1.0587 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、杂质 C 0.0504 ~ 1.0088 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 其中杂质 A、B、C 平均回收率分别为 102.50%、100.98% 和 104.03%, RSD 分别为 1.8%、2.3% 和 3.1%。**结论** 该方法准确可靠、重现性好、精密度高, 可用于磷酸川芎嗪原料药的质量控制。

关键词: 磷酸川芎嗪; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0525-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.036

Related substances in ligustrazine phosphate

LIN Feng-qiang¹, SU Xin-hai², ZHENG Liao-yu², WANG Fang¹, LI Lei², WEN Xia¹, XU Dong^{1,3*} (1. SDU-ZB Biomedical Research & Development Institute, Zibo Shandong 255035; 2. Double-Crane Pharmaceutical (SHANGQIU) CO., LTD., Shangqiu Henan 476200; 3. School of Pharmaceutical Sciences Shandong University, Jinan 250012)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to detect the content of related substances in the active pharmaceutical ingredients (API) of ligustrazine phosphate. **Methods** A YMC-Triart C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of purified water (A)-acetonitrile (B) by gradient elution. The detection wavelength was 295 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30℃. The injection volume was 20 μL. **Results** The calibration curves of 3 related substances showed good linearity: 0.0452 ~ 0.9040 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$) for impurity A, 0.0529 ~ 1.0587 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$) for impurity B, 0.0504 ~ 1.0088 μg·mL⁻¹ for impurity C ($r = 0.9999$). The average recoveries for the impurity A, B and C were 102.50%, 100.98% and 104.03%, with RSD of 1.8%, 2.3%, and 3.1%. **Conclusion** This method is accurate and reliable, with good precision and reproducibility, and can be used for the quality control of API in ligustrazine phosphate.

Key words: ligustrazine phosphate; related substance; HPLC

磷酸川芎嗪 (ligustrazine phosphate), 化学名称为 2, 3, 5, 6-四甲基吡嗪磷酸盐一水合物, 临床用于治疗缺血性心脑血管疾病^[1-3], 如脑梗死、阿尔茨海默病、缺血性脑血管病、脑供血不足、脑血栓的形成、脑栓塞、冠状动脉粥样硬化性心脏病等心脑血管疾病^[4-5]。作为一种新型的钙通道

阻滞剂^[6-8], 磷酸川芎嗪有活血化瘀、扩张小动脉、疏通微循环^[9-10]、促进炎症吸收等作用^[11-12], 对慢性静脉疾病、糖尿病并发症^[13-15]、酒精引起的肝损伤有一定的预防作用^[16]。现代研究表明, 川芎嗪有解痉、降低血管阻力和强烈抑制血小板聚集的作用, 对已聚集的血小板有解聚作用, 能明显

作者简介: 林凤强, 男, 工程师, 主要从事药物质量研究, email: linfengqiang@126.com *通信作者: 徐东, 男, 硕士研究生导师, 主要从事医药园区管理、企业孵化研究, email: xudong82016@126.com

降低全血黏度；还能增加冠脉流量、改善心肌供氧、降低心肌耗氧的作用，治疗缺血性脑血管及冠心病效果良好，还可以治疗偏头痛和重症肺心病^[17-19]。磷酸川芎嗪仅收录于 2020 年版《中国药典》(ChP2020)二部，其他国家药典暂未见收录。

原料药磷酸川芎嗪有关物质的研究报道较少，结合合成工艺，本课题组对杂质谱进行梳理，对其有关物质进行研究。通过对合成工艺、杂质传递及除杂效果分析，确定了(3, 5, 6-三甲基吡嗪-2-基)甲醇(A)、2, 3, 5-三甲基吡嗪(B)、2-乙基-3, 5, 6-三甲基吡嗪(C)3种工艺杂质，根据 ICH 指导原则，各杂质的限度不得过 0.1%。ChP2020 二部中只收录了系统适用性杂质邻苯二甲酸二甲酯(D)(中国食品药品检定研究院规定杂质 D 仅用于系统适用性试验)，因此将杂质 D 定为系统适用性杂质。本文建立 HPLC 法对磷酸川芎嗪中 3 种有关物质(结构式见图 1)进行检测，以期为全面控制磷酸川芎嗪的质量提供技术方法。

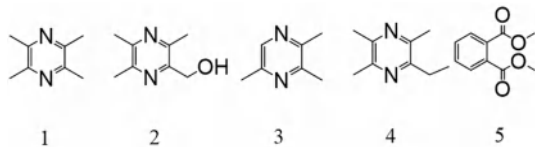


图 1 磷酸川芎嗪及各杂质的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of ligustrazine phosphate and its impurities
1. 磷酸川芎嗪 (ligustrazine phosphate); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D)

对 ChP2020 及文献^[20]中的方法进行研究及实验，发现有关物质检测方法不能很好地将 4 种杂质有效分离，且主物质及各杂质峰峰形拖尾。因此本研究根据 ChP2020 四部通则 9101 分析方法验证指导原则，建立了 HPLC 法测定磷酸川芎嗪中有关物质的检测方法，并确定原料药磷酸川芎嗪中有关物质的检测标准。

1 材料

2030C PLUS 型高效液相色谱仪 (LabSolution 工作站, 日本岛津公司); BT125D 电子分析天平 (瑞士梅特勒公司, 精度为十万分之一)。

磷酸川芎嗪对照品 (批号: 100845-202104, 含量: 92.5%, 中国食品药品检定研究院), 杂质 A 对照品 (批号: D2103007, 含量: 88.71%, 实验室定量核磁数据, 阿拉丁生化科技公司), 杂质 B 对照品 (批号: CDRQC-PQ, 含量: 99.97%, TCI), 杂质 C 对照品 (批号: C14102137, 含量: 95.02%, 实验室定量核磁数据, 上海麦克林科技有限公司), 杂质 D 对照品 (批号: 101421-201601, 系统适用

性杂质, 中国食品药品检定研究院); 磷酸川芎嗪的 3 批原料药 [批号: 40261220401、40261220401、LSCXQ-3-220302, 双鹤药业 (商丘) 有限责任公司], 乙腈 (Merck, HPLC 级), 自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为十八烷基键合硅胶 YMC-Triart C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 柱, 流动相 A 为纯化水, B 为乙腈, 线性梯度洗脱, 程序见表 1; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 进样量 20 μL, 检测波长 295 nm。

表 1 线性梯度洗脱程序

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	80	20
2	80	20
25	25	75
30	25	75
31	80	20
40	80	20

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液 取磷酸川芎嗪原料药 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中加入纯化水溶解, 定容, 摇匀滤过, 制得质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液 取磷酸川芎嗪对照品约 50.53 mg、杂质 A 对照品 10.19 mg、杂质 B 对照品 10.59 mg、杂质 C 对照品 10.70 mg、杂质 D 对照品 10.13 mg, 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 用纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得质量浓度分别为 0.5053、0.010 19、0.010 59、0.010 70、0.013 34 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。于 50 mL 量瓶中分别加入杂质 A、B、C 储备液各 250 μL, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得混合对照品溶液。

2.2.3 系统适用性试验溶液 (加标供试品溶液) 取磷酸川芎嗪对照品 25.05 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入杂质 A、B 和 C 对照品储备液各 250 μL、杂质 D 对照品储备液 1000 μL, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得系统适用性试验溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下系统适用性试验溶液、供试品溶液与空白溶剂 (纯化水), 进样测定, 记录色谱图 (见图 2)。结果显示, 在该色谱条件下, 各色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 各色谱峰理论板数均大于 6000, 各色谱峰拖尾因子均小于 1.5。

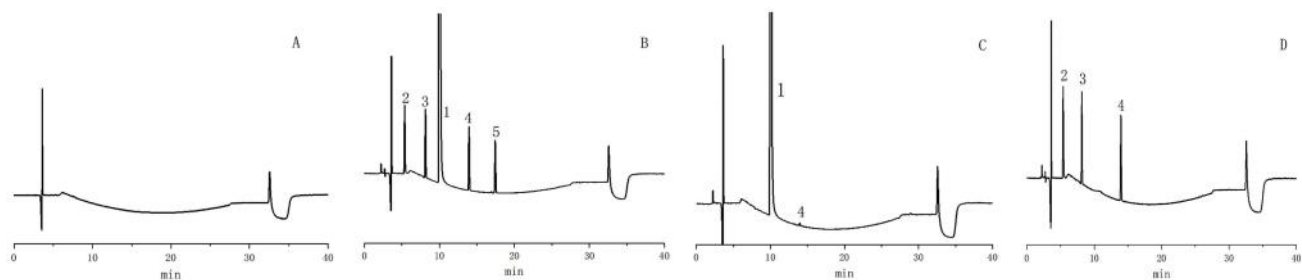


图 2 磷酸川芎嗪高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of ligustrazine phosphate

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 系统适用性试验溶液 (system suitability test solution); C. 供试品溶液 (sample solution); D. 对照品溶液 (reference solution); 1. 磷酸川芎嗪 (ligustrazine phosphate); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C); 5. 杂质 D (impurity D)

2.4 专属性试验

称取磷酸川芎嗪原料药 5 份, 各约 25 mg, 分别置 20 mL 顶空瓶中, 进行以下破坏性试验。① 酸破坏试验: 精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 使溶解并密封, 在 80°C 水浴下放置 24 h, 放至室温, 将溶液全部转移至 50 mL 量瓶中, 再用纯化水稀释至刻度, 摇匀; ② 碱破坏试验: 精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 在 80°C 水浴下放置 24 h, 放至室温, 将溶液全部转移至 50 mL 量瓶中, 再用纯化水稀释至刻度, 摇匀; ③ 氧化破坏试验: 精密加入 10% 过氧化氢溶液 1 mL, 在 80°C 水浴下放置 24 h, 放至室温, 将溶液全部转移至 50 mL 量瓶中, 再用纯化水稀释至刻度, 摇匀;

④ 高温破坏试验: 将样品用 5 mL 纯化水溶解, 于 80°C 水浴加热 24 h, 放至室温, 将溶液全部转移至 50 mL 量瓶中, 再用纯化水稀释至刻度, 摇匀; ⑤ 光照破坏试验: 将样品用 10 mL 纯化水溶解密封后于温度 25°C 、照度 4500 lx 下放置 12 d, 将溶液全部转移至 50 mL 量瓶中, 再用纯化水稀释至刻度, 摇匀。各破坏性溶液按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图 (见图 3)。结果显示, 磷酸川芎嗪在酸、碱、光照和高温破坏条件下相对稳定; 在氧化条件下, 产生一个杂质, 经过定位确定为杂质 A, 破坏试验结果表明, 磷酸川芎嗪在氧化条件下稳定性较差, 提示磷酸川芎嗪在长期放置过程中应密闭保存, 避免与空气长期接触。

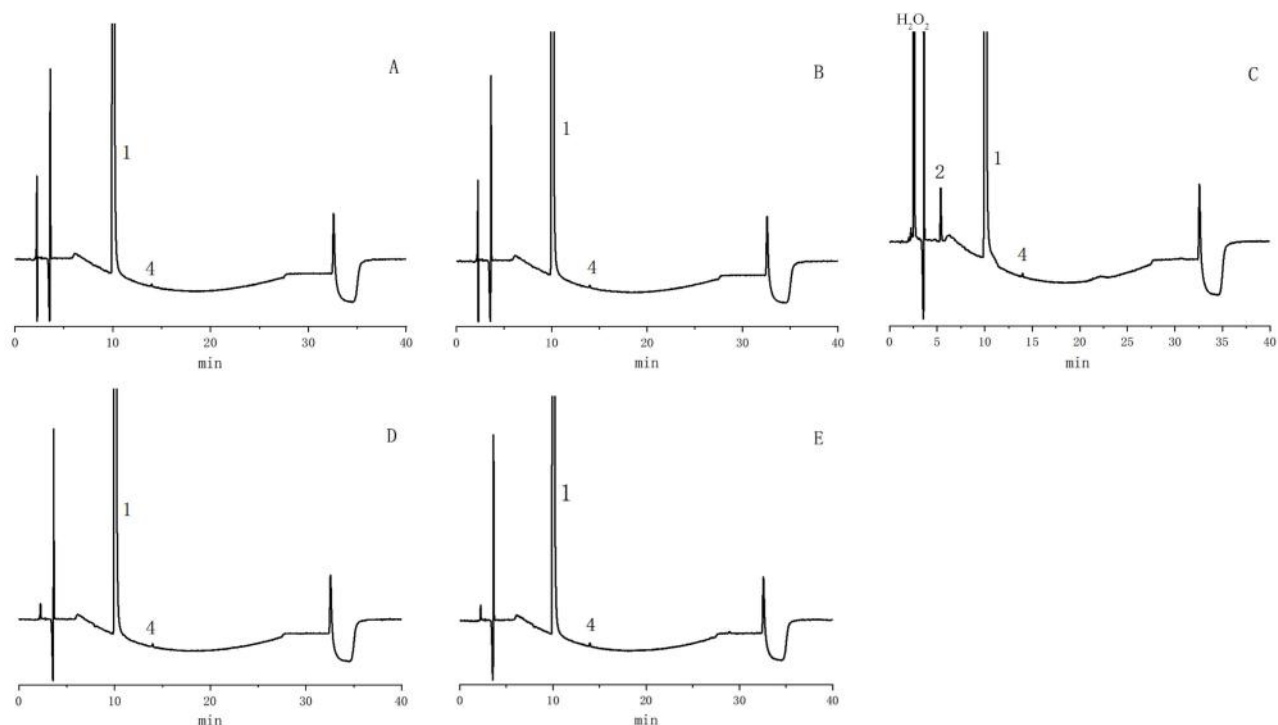


图 3 磷酸川芎嗪破坏试验色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of destruction test of ligustrazine phosphate

A. 酸破坏试验 (acid degradation); B. 碱破坏试验 (alkali degradation); C. 氧化破坏试验 (oxidative degradation); D. 高温破坏试验 (heat degradation); E. 光照破坏试验 (light degradation); 1. 磷酸川芎嗪 (ligustrazine phosphate); 2. 杂质 A (impurity A); 4. 杂质 C (impurity C)

2.5 线性关系考察

精密量取对照品储备液 0.2、0.4、0.8、1、1.5、2 mL, 分别置 200 mL 量瓶中, 用纯化水稀释至刻度, 摇匀, 制得标准系列溶液, 进样检测, 记

录色谱图。以磷酸川芎嗪和各杂质溶液质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 以峰面积 Y 为纵坐标, 采用偏最小二乘法进行线性回归, 得线性方程, 结果见表 2。

表 2 磷酸川芎嗪与各杂质线性关系、检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 结果
Tab 2 Linearity, LOD and LOQ of ligustrazine phosphate and related substance

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
杂质 A	$Y = 5.0167 \times 10^4 X - 149.241$	0.9997	0.0452 ~ 0.9040	25	51
杂质 B	$Y = 4.1506 \times 10^4 X - 54.1294$	0.9999	0.0529 ~ 1.0587	26	53
杂质 C	$Y = 4.8202 \times 10^4 X + 88.8469$	0.9999	0.0504 ~ 1.0088	26	54
磷酸川芎嗪	$Y = 3.4332 \times 10^4 X + 6.0177$	0.9999	0.0490 ~ 0.9801	27	53

2.6 LOD 与 LOQ

取混合对照品溶液用溶剂逐步稀释, 以各成分色谱峰信噪比 (S/N) 约等于 10 时测得磷酸川芎嗪与各杂质的 LOQ, 以 S/N 约等于 3 时测得磷酸川芎嗪与各杂质的 LOD, 结果见表 2。

2.7 精密度试验

精密量取“2.2.3”项下系统适用性溶液, 连续进样 6 次, 记录磷酸川芎嗪与各杂质色谱峰的峰面积, 结果磷酸川芎嗪与杂质 A ~ D 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.61%、0.43%、0.51%、0.32% 和 0.31%, 结果表明仪器的精密度良好。

2.8 重复性试验

取磷酸川芎嗪原料药 (批号: 20221101), 按“2.2”项下方法制备加标供试品溶液, 共 6 份, 分别进样检测, 记录 3 种杂质峰面积并计算平均含量。结果杂质 A ~ C 含量的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.42%、0.24%、0.41%, 表明方法的重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号: 40261220401) 和 4 个杂质对照品溶液, 于室温放置 0、3、6、9、12、15、18、24、48 和 72 h 进样检测, 记录 4 种杂质色谱峰面积。结果杂质 A ~ D 和磷酸川芎嗪峰面积的 RSD 分别为 0.32%、1.7%、0.76%、0.82% 和 1.3%, 表明供试品及杂质对照品溶液在室温放置 72 h 内稳定。

2.10 加样回收试验

精密称取同一批磷酸川芎嗪原料药 (批号: 40261220401) 约 25 mg, 共 6 份, 置 50 mL 量瓶中, 精密加入杂质 A、B、C 对照品储备液 0.25 mL, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各杂质的回收率。结果杂质 A ~ C 的平均回收率分别为 102.50%、100.98% 和 104.03%, RSD 分别为 1.8%、2.3% 和 3.1%。

2.11 样品中杂质的含量测定

取磷酸川芎嗪原料药, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定, 3 种杂质 A ~ C 的含量测定结果见表 3, 供试品中杂质 A、B 均未检出, 杂质 C 有检出, 均小于 0.1% 限度。

表 3 杂质含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 3 Content of impurities ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C
40261220401	—	—	0.038
40261220402	—	—	0.032
LSCXQ-3-220302	—	—	0.043

注 (Note): “—” 未检出 (Not detected)。

3 讨论

采用已报道的检测方法 (均采用十八烷基键合硅胶为填料的色谱柱) 进行检测, 发现磷酸川芎嗪及各杂质峰峰形拖尾, 对称因子偏低; 对多个品牌十八烷基键合硅胶为填料的色谱柱进行筛选, 结果显示填料具有杂化性质的 YMC 色谱柱对磷酸川芎嗪有关物质研究具有较好的色谱分离行为, 且各峰的对称因子符合要求。

磷酸川芎嗪及 4 个杂质除了杂质 D 均有吡嗪结构, 吡嗪分子结构中含有氮原子, 其在纯化水中易水解形成碱性离子, 易与填料中的羟基作用造成峰形拖尾, 对色谱柱填料造成一定的损伤; 杂质 A 分子结构含有羟基, 分子极性大, 保留弱; 通过降低被检测物质与填料表面裸露的硅羟基作用力, 一般会向流动相中添加缓冲盐、酸碱等添加剂, 无形增加了色谱柱的负担, 普通色谱柱的耐酸碱能力较差, 而杂化填料的色谱柱既能有效降低分子与羟基间的作用力, 又具备耐酸碱的双重作用^[21-23]且机械强度高, 弥补了普通色谱柱的一些缺陷。

在已经报道的磷酸川芎嗪有关物质检测方法中, 均为采用等度洗脱方法, 重现试验发现出峰较快, 主峰及各杂质峰峰形差、拖尾因子较大,

而且采用等度方法强保留杂质无法保证洗脱完全;采用梯度洗脱方式,可以有效提高分离度,且能将强保留杂质洗脱完全。主物质及杂质结构中含有氮原子或者羟基,试验时曾尝试添加助剂,例如磷酸盐、磷酸等用以调整峰形,结果发现添加助剂后,分离度、拖尾因子等没有太大改观,因此采用了最容易获取的纯化水作为流动相 A。同时采用普通的 C18 色谱柱相同条件做对比试验,发现无论是否添加助剂,分离度、拖尾因子等均不如 YMC 色谱柱。

磷酸川芎嗪原料药中存在一些工艺杂质和降解杂质,其本身稳定性较好,在氧化条件下容易降解,产生的杂质 A 严重影响其纯度;提高氧化条件,吡嗪环上的 N 原子可能会接受 O 原子生成具有警示结构的吡嗪环氮氧化物,因此原料药在长期储存中需要密闭保存与空气隔绝。

本文在《中国药典》基础上,对液相色谱条件进行优化,建立同时检测其中的 3 种有关物质的方法,该方法准确、可靠、灵敏度高,为磷酸川芎嗪的质量控制提供方法参考。

参考文献

- [1] 翟建. 腔隙性脑梗死患者应用天麻素注射液联合磷酸川芎嗪治疗的效果分析[J]. 北方药学, 2021, 8(3): 81-82.
- [2] 许景超. 磷酸川芎嗪联合尼莫地平治疗老年颅内动脉瘤夹闭术后早期脑缺血患者的效果[J]. 中国民康医学, 2021, 33(13): 4-6.
- [3] 苏青, 赵重博, 吴纯洁, 等. 盐酸川芎嗪凝胶膏剂在大鼠体内的药动学及体内外相关性[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(11): 1213-1217.
- [4] Gao C, Liu XZ, Liu W, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethyl pyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Auton Neurosci-basic, 2008, 141(1-2) 22-30.
- [5] Gao TL, Shi TS, Li T, et al. Sinomenine facilitates the efficacy of gabapentin or ligustrazine hydrochloride in animal models of neuropathic pain [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854(5): 101-108.
- [6] Lo TK, So CH, Yeung SW, et al. Comparison of selective and non-selective internal iliac artery embolization for abnormal placentation with major postpartum hemorrhage [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2016, 13(7): 103-104.
- [7] 刘立群, 崔晓兰, 曲韵智. 磷酸川芎嗪制剂研究概况[J]. 北方药学, 2013, 10(1): 40-41.
- [8] 肖衍宇, 陈志鹏, 平其能, 等. 磷酸川芎嗪理化性质及生物学性质的考察[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(21): 1810-1814.
- [9] 孟薇. 磷酸川芎嗪滴丸溶出度测定方法的研究[J]. 中国医药指南, 2020, 18(19): 36-37.
- [10] 刘剑敏, 董俊丽, 唐静宜, 等. 磷酸川芎嗪通过激活 AMPK 对 HT22 细胞在氧糖剥夺损伤中的保护作用[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2173-2176.
- [11] 吕秀莲. 磷酸川芎嗪临床应用概述[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(1): 112-113.
- [12] 张会利, 鲁广秀. 磷酸川芎嗪、复方丹参治疗缺血性脑血管病 120 例疗效观察[J]. 实用神经疾病杂志, 2004, 7(6): 48.
- [13] Jun S, Liu QF, Wang YM, et al. Coadministration of huperzine A and ligustrazine phosphate effectively reverses scopolamine-induced amnesia in rats [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 96: 449-453.
- [14] Barney OJ, Haughney RV, Bilollikar A. A case of pulmonary oedema secondary to carboprost [J]. Obstetric Case Reports, 2012, 32(6), 597-599.
- [15] Gao J, Ren JG, Ma X, et al. Ligustrazine prevents coronary microcirculation dysfunction in rats via suppression of miR-34a-5p and promotion of Sirt1 [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 929(8): 175150-175160.
- [16] Lu CF, Xu WX, Zhang F, et al. Ligustrazine prevents alcohol-induced liver injury by attenuating hepatic steatosis and oxidative stress [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 613-621.
- [17] 梁爱群. 川芎嗪的药理及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 532-533.
- [18] 窦义之, 滕虎, 汪晴, 等. 盐酸川芎嗪经皮给药系统的制备及体外释放和透皮研究[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(10): 745-749.
- [19] 安佃云, 贺亚静, 张建芳, 等. 磷酸川芎嗪透皮贴含量均匀度及释放度测定[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2087-2090.
- [20] 郑建勇, 田慧, 王正斌, 等. 注射剂中磷酸川芎嗪有关物质的分析[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(12): 236-237.
- [21] 张磊. 高效液相色谱法测定孟鲁司特钠中有关物质的含量[J]. 中南药学, 2023, 21(12): 3288-3292.
- [22] 刘相革, 韦奇, 丁元利, 等. 十三氟辛基修饰的疏纯化水有机-无机杂化二氧化硅膜孔结构、氢气分离及纯化水热稳定性[J]. 无机化学学报, 2014, 30(5): 1111-1118.
- [23] Fiorilli S, Tallia F, Pontiroli L, et al. Spay-dried mesoporous silica spheres functionalized with carboxylic groups [J]. Mater Lett, 2013, 108(108): 118-121.

(收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-08-16)

妇科白凤口服液 HPLC 双波长指纹图谱研究

许志, 郭元满*, 曾祥素, 刘雪辉, 黄昆, 李欣, 陈亚祥, 龙顺东 (湖南天劲制药有限责任公司, 长沙 410000)

摘要: **目的** 建立妇科白凤口服液的多成分 HPLC 双波长指纹图谱, 对其进行定性分析, 整体把控妇科白凤口服液的质量。**方法** 使用 Thermo Synchronis-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 260 nm 与 300 nm; 分析时间 70 min。**结果** 同时测得妇科白凤口服液中烟酰胺、马钱苷酸、绿原酸、龙胆苦苷、阿魏酸与山梨酸钾等 19 个共有色谱峰成分, 其中, 260 nm 波长下 7 个共有峰, 指认出烟酰胺、马钱苷酸、龙胆苦苷 3 种成分, 300 nm 波长下 12 个共有峰, 指认出绿原酸、龙胆苦苷、阿魏酸、山梨酸钾 4 种成分, 方法学考察结果较好, 15 批次样品指纹图谱的相似度均 > 0.90。**结论** 该方法简便、重复性好, 可为妇科白凤口服液的整体质量评价提供科学依据。

关键词: 妇科白凤口服液; 指纹图谱; HPLC; 龙胆苦苷; 烟酰胺

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0530-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.037

Multi-component fingerprint chromatogram of Fuke Baifeng oral liquid by HPLC dual wavelength

XU Zhi, GUO Yuan-man*, ZENG Xiang-su, LIU Xue-hui, HUANG Kun, LI Xin, CHEN Ya-xiang, LONG Shun-dong (*Hunan Tianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410000*)

Abstract: Objective To establish multi-component fingerprint chromatogram of Fuke Baifeng oral liquid by HPLC dual wavelength, to conduct a qualitative analysis for its quality to control the quality. **Methods** Thermo Synchronis-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used at 30 ℃, with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase in a gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 260 nm and 300 nm, and analysis time was 70 min. **Results** Under the same chromatogram condition, 19 peaks were identified, 3 components (nicotinamide, loganic acid and gentiopicroside) among the 7 peaks were identified at 260 nm, 4 components (chlorogenic acid, gentiopicroside, ferulic acid and potassium sorbate) among the 12 peaks were identified at 300 nm. The methodological results were satisfactory. The similarity of the 15 batches of Fuke Baifeng oral liquid was above 0.90. **Conclusion** The method is simple and highly repeatable, and can provide scientific basis for the quality control of Fuke Baifeng oral liquid.

Key words: Fuke Baifeng oral liquid; fingerprint; HPLC; gentiopicroside; nicotinamide

妇科白凤口服液由乌鸡、艾叶、牛膝 (盐制)、柴胡、干姜、白芍 (酒炒) 等二十味药材组成。该方具有补气养血之功效, 主要用于妇女体弱血虚, 月经不调, 经期腹痛^[1], 其药效是多种活性成分共同作用的结果。方中, 乌鸡补气养血, 调经止痛, 为君药; 地黄、当归、白芍、香附、延胡索大补营

血, 养肝调经, 调气和血, 并可治经行腹痛, 而达气血相调, 共为臣药; 丹皮、知母、秦艽、青蒿、贝母、黄连、地骨皮、干姜、艾叶、黄芪、茯苓清泄虚热, 使虚热退而经血宁, 并可治虚热灼津之咽干口渴, 共为佐药; 柴胡、牛膝调肝肾, 共为使药。

妇科白凤口服液现有质量标准来源于国家中

作者简介: 许志, 男, 高级工程师, 主要从事新药开发研究, email: 490669373@qq.com ***通信作者:** 郭元满, 女, 高级工程师, 主要从事新药开发研究, email: 412144150@qq.com

成药标准汇编外科妇科分册^[2], 现行质量标准建立了牛膝对照药材、干姜对照药材、延胡索对照药材、丹皮酚对照品、盐酸小檗碱对照品和盐酸巴马汀对照品的 5 个定性薄层鉴别方法与芍药苷 1 个成分含量测定方法。夏晶等^[3]对妇科白凤口服液质量标准进行研究, 建立了牛膝(对照药材)、干姜(对照药材)、延胡索(对照药材)、牡丹皮(丹皮酚对照品)、黄柏(盐酸小檗碱对照品和盐酸巴马汀对照品)的 5 个定性薄层鉴别方法与芍药苷、龙胆苦苷 2 个成分含量测定方法。宋桂萍等^[4]采用 HPLC 法测定妇科白凤口服液中芍药苷 1 个成分的含量。

中成药成分复杂, 单一的指标质量控制较为局限, 不能全面控制产品的质量, 且操作较为复杂, 对君药乌鸡未建立监控指标及方法, 不能全面反映妇科白凤口服液的质量水平。中药指纹图谱能表征中药的整体信息, 在中药质量评价方面受到广泛认可^[5-6]。本文根据国家药典委员会颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[7]进行了妇科白凤口服液多成分指纹图谱的研究, 对烟酰胺、马钱苷酸、龙胆苦苷、绿原酸、龙胆苦苷、阿魏酸、山梨酸钾多个成分及多个特征峰进行监控, 其中烟酰胺为君药乌鸡的营养成分, 并采用其推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版本)进行相似度评价, 为进一步提高妇科白凤口服液的质量标准、整体控制产品质量奠定基础。

1 材料

妇科白凤口服液(编号 S1 ~ S15, 批号分别为 1901001、1902001、1902002、2011001、2101001、2101002、2103001、2103002、2103003、2103004、2104001、2104002、2104003、2104005、2104007, 规格: 10 mL/支, 湖南天劲制药有限责任公司); 烟酰胺对照品(纯度: 99.9%, 批号: 100115-202005)、马钱苷酸对照品(纯度: 97.5%, 批号: 111865-202005)、绿原酸对照品(纯度: 96.3%, 110753-202119)、龙胆苦苷对照品(纯度: 98.1%, 批号: 110770-202219)、阿魏酸对照品(纯度: 99.4%, 批号: 110773-201915)、山梨酸钾对照品(纯度: 99.7%, 批号: 101075-202203)(中国食品药品检定研究院)。乙腈、磷酸为色谱纯, 水为超纯水。

e2695 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司); XSE105 十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Synchronis-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 70 min, 0% ~ 25%A); 总流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长为 260 nm 与 300 nm; 进样体积为 10 μL; 分析时间为 70 min。

2.2 供试品溶液的制备

取妇科白凤口服液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取对照品烟酰胺、马钱苷酸、绿原酸、龙胆苦苷、阿魏酸与山梨酸钾适量, 于量瓶中, 加水适量溶解并稀释制成每 1 mL 含烟酰胺 0.05 mg、马钱苷酸 0.1 mg、绿原酸 0.03 mg、龙胆苦苷 0.2 mg、阿魏酸 0.02 mg 及山梨酸钾 0.5 mg 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

取 2104007 批妇科白凤口服液进行方法学考察。

2.4.1 专属性试验 按“2.2”项下方法制备妇科白凤口服液供试品溶液, 按妇科白凤口服液制备工艺与“2.2”项下方法制备各批次药材溶液阴性样品溶液、单味药材及辅料供试品溶液共计 46 个样品溶液, 分别进样, 记录色谱图, 确定各特征峰的归属^[6-7]。结果见图 1 ~ 2。

在 260 nm 波长下样品溶液的 7 个特征峰中, 其中 1 号峰为烟酰胺, 归属于乌鸡; 6 号峰为马钱苷酸, 归属于秦艽; 7 号峰为龙胆苦苷, 归属于秦艽; 其他特征峰均未明确成分, 其中 2 号峰归属于乌鸡, 3 号峰归属于白芍、牡丹皮, 4 号峰归属于熟地黄, 5 号峰归属于牡丹皮、香附。

在 300 nm 波长下样品溶液的 12 个特征峰中, 其中 3 号峰为绿原酸, 归属于艾叶、青蒿; 6 号峰为龙胆苦苷, 归属于秦艽; 8 号峰为阿魏酸, 归属于香附、当归; 9 号峰为山梨酸钾, 归属于山梨酸钾; 其他特征峰均未明确成分, 其中 1 号峰归属于熟地黄、蜂蜜, 2、5、10、11、12 号峰均归属于艾叶、青蒿, 4 号峰归属于黄连, 7 号峰归属于香附。

2.4.2 精密度试验 按“2.2”项下方法制备一份供试品溶液, 重复进样 6 次, 每次进样 10 μL, 结果共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.092% ~ 0.17%, 相对峰面积的 RSD 为 0.076% ~ 1.4%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品, 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 结果共有色

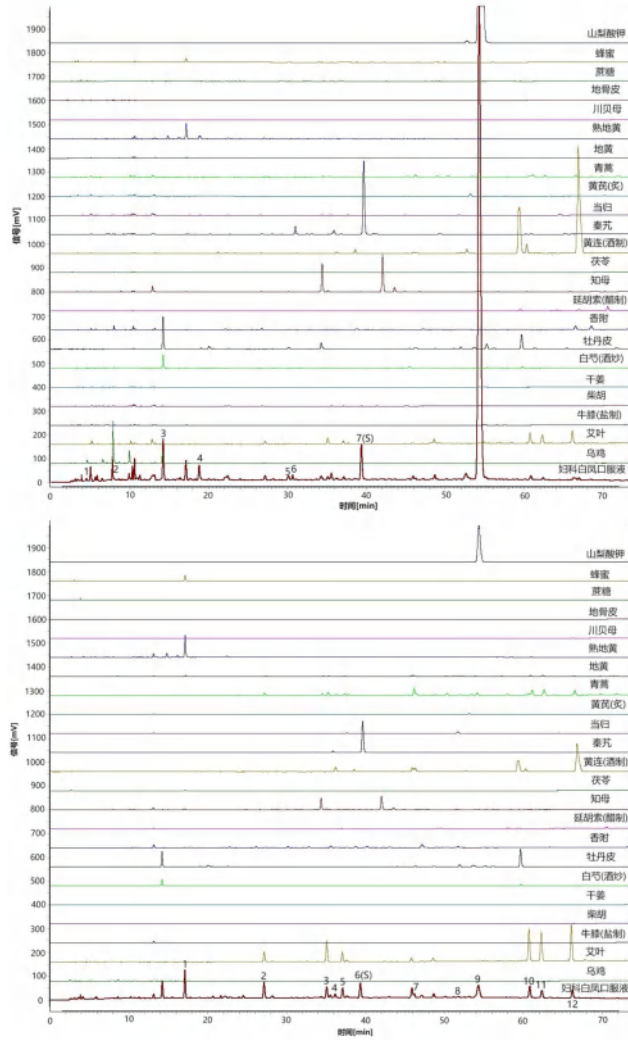


图 1 妇科白凤口服液中各单味药材溶液与样品溶液在 260 nm (A) 和 300 nm (B) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC fingerprint of each single medicinal solution and sample solution oral liquid at 260 nm (A) and 300 nm (B)

谱峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.063% ~ 0.12%，相对峰面积的 *RSD* 为 0.12% ~ 2.5%，表明该方法重复性好。

2.4.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、4、8、16、32、48、64、80、96 h 进行检测，每次进样 10 μL，结果共有色谱峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.10% ~ 0.25%，相对峰面积的 *RSD* 为 0.45% ~ 2.6%，表明供试品溶液在 96 h 内较稳定^[8]。

2.5 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 指纹图谱的建立和相似度分析^[9] 按“2.2”项下方法制备 15 批次妇科白凤口服液供试品溶液，进样分析，应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012.0 版）软件，生成对照图谱 R。260 nm 波长下确定了 7 个共有色谱峰，通过与对照品保留时间、紫外光谱以及质谱对比，确定 1 号峰为烟酰

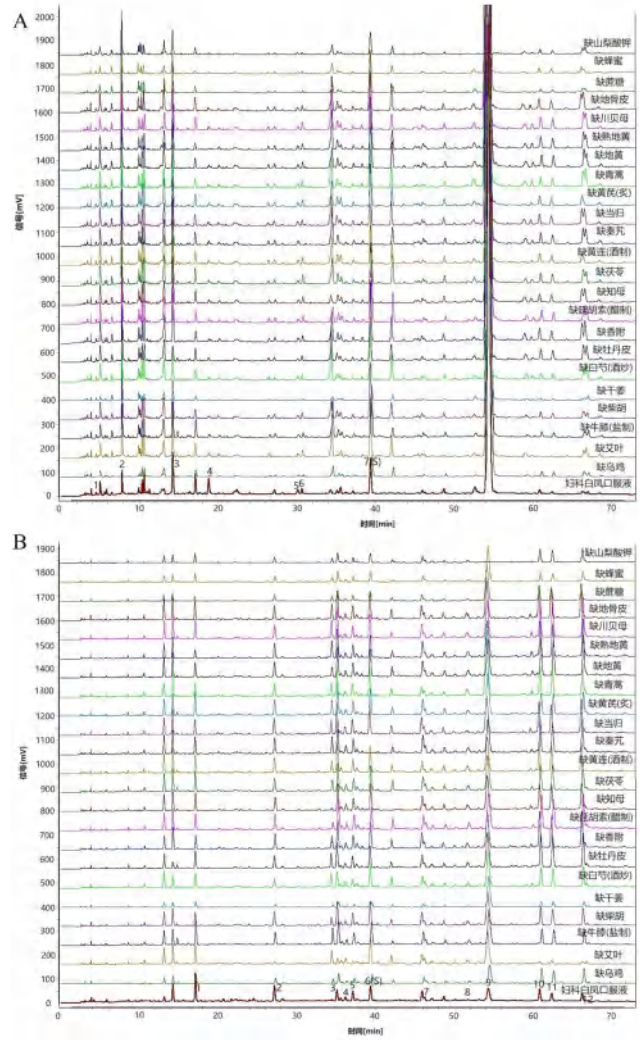


图 2 妇科白凤口服液中各药材阴性样品溶液与样品溶液在 260 nm (A) 和 300 nm (B) 的 HPLC 图

Fig 2 HPLC fingerprint of each medicinal negative sample solution and sample solution oral liquid at 260 nm (A) and 300 nm (B)

胺，6 号峰为马钱苷酸，7 号峰为龙胆苦苷，选择分离度较好、保留时间适中、峰面积较大的 7 号龙胆苦苷为参照峰。300 nm 波长下确定了 12 个共有色谱峰，通过与对照品保留时间、紫外光谱以及质谱对比，确定 3 号峰为绿原酸，6 号峰为龙胆苦苷，8 号峰为阿魏酸，9 号峰为山梨酸钾，选择分离度较好、保留时间适中、峰面积较大的 6 号峰龙胆苦苷为参照峰。见图 3 ~ 5。

2.5.2 相似度结果^[10] 260 nm 波长下 15 批妇科白凤口服液的相似度分别为 0.988、0.993、0.992、0.998、0.990、0.986、0.989、0.996、0.998、0.998、0.996、0.996、0.995、0.996、0.999，结果见表 1。

300 nm 波长下 15 批妇科白凤口服液的相似度分别为 0.957、0.979、0.997、0.997、0.954、0.992、0.962、0.994、0.994、0.994、0.963、0.947、0.982、0.992、0.995，结果见表 2。

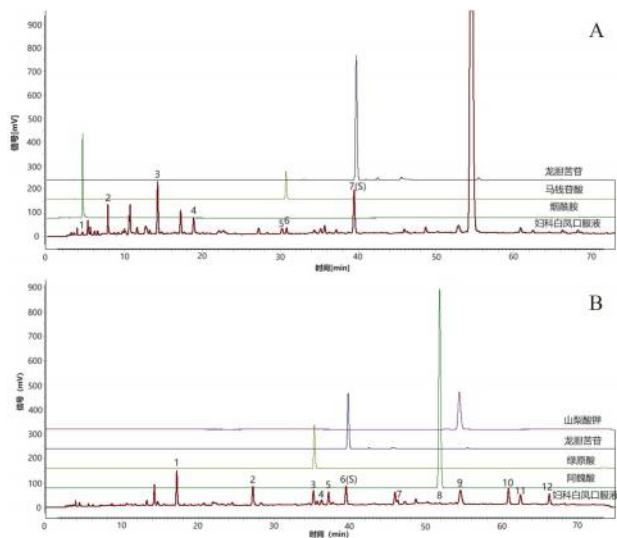


图 3 妇科白凤口服液在 260 nm (A) 和 300 nm (B) 的 HPLC 图
Fig 3 HPLC chromatographic of Fuke Baifeng oral liquid under 260 nm (A) and 300 nm (B)

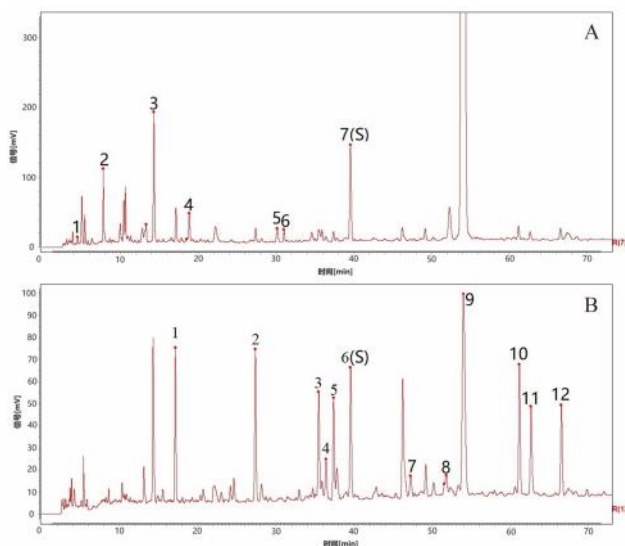


图 4 妇科白凤口服液在 260 nm (A) 和 300 nm (B) 的 HPLC 对照指纹图谱
Fig 4 HPLC reference fingerprint of Fuke Baifeng oral liquid at 260 nm (A) and 300 nm (B)

3 小结与讨论

本文建立了在同一色谱条件下双波长检测妇科白凤口服液龙胆苦苷、烟酰胺、马钱苷酸等多指标成分的 HPLC 指纹图谱方法，采用多指标成分指纹图谱来表征其质量，不仅在一定程度上反映其原药材的质量，同时多成分指标分离测定还可以反映复方中药的配伍状况，此外，对君药乌鸡营养成分烟酰胺进行了监控，结果准确可靠，方法简单，可以全面反映妇科白凤口服液的质量水平，适用于该制剂的质量控制。

本试验对色谱条件进行优化^[11-12]，以使龙胆

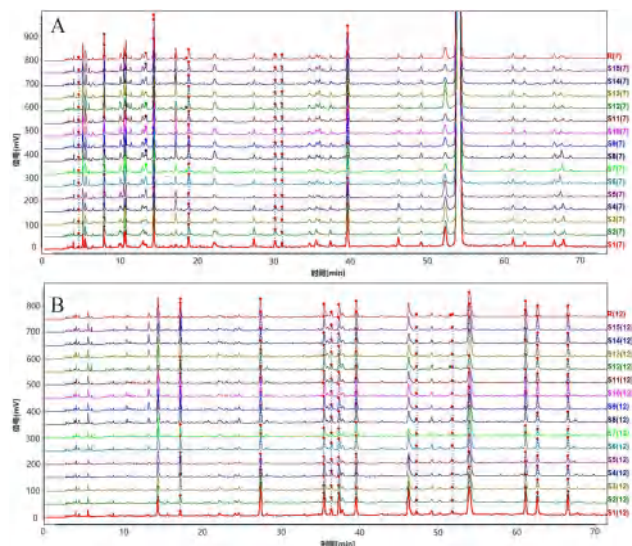


图 5 15 批妇科白凤口服液在 260 nm (A) 和 300 nm (B) 的 HPLC 指纹图谱
Fig 5 HPLC fingerprint of 15 batches of Fuke Baifeng oral liquid under 260 nm (A) and 300 nm (B)

苦苷参照峰与相邻色谱峰及其余各峰达到最佳分离。本研究前期应用 DAD 检测器对供试品溶液进行了全波长测定比较，结果 300 nm 下基线较为平稳、峰的数目较多且各峰吸收较大，各峰的大小适中，此外部分峰在 260 nm 吸收较大，综合确定波长为 260 nm 与 300 nm 双波长。考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.3% 磷酸溶液、乙腈-0.5% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 乙酸溶液、甲醇-0.1% 磷酸溶液等不同流动相组成及梯度，结果表明乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相时，色谱峰的峰形好，各峰分离较完全，故选用乙腈-0.1% 磷酸溶液作为最佳流动相。考察了不同柱温 20、30、40、50 °C 对同一样品的分离效果，结果表明，以 30 °C 时分离效果较理想。在其他色谱条件不变的情况下，分别考察流速为 0.9、1.0、1.1 mL · min⁻¹ 对同一样品色谱峰分离的影响，结果表明，当流速为 1.0 mL · min⁻¹ 时，色谱峰保留时间适中，分离度和重复性最好。试验还比较了 Agilent Eclipse XDB-C18 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、岛津 SHIMADZU Shim-pack GISS C18 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、GL Sciences Inertsil ODS-3 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 个不同品牌的色谱柱对色谱峰分离的影响，结果表明，以上 3 个品牌的色谱柱均可达到保留时间适中，峰数目较多，分离度好的较理想的色谱效果，表明色谱柱的耐用性良好。

表 1 15 批妇科白凤口服液 HPLC 指纹图谱相似度评价结果 (260 nm)

Tab 1 Similarity evaluation of HPLC fingerprint for 15 batches of Fuke Baifeng oral liquid (260 nm)

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指 纹图谱
S1	1.000	0.995	0.999	0.995	0.961	0.959	0.965	0.976	0.984	0.984	0.989	0.979	0.992	0.978	0.985	0.988
S2	0.995	1.000	0.998	0.998	0.974	0.980	0.977	0.989	0.986	0.986	0.990	0.983	0.989	0.984	0.991	0.993
S3	0.999	0.998	1.000	0.998	0.969	0.969	0.972	0.983	0.987	0.986	0.992	0.983	0.993	0.982	0.990	0.992
S4	0.995	0.998	0.998	1.000	0.983	0.982	0.981	0.992	0.993	0.993	0.994	0.990	0.995	0.991	0.996	0.998
S5	0.961	0.974	0.969	0.983	1.000	0.993	0.983	0.992	0.989	0.989	0.977	0.988	0.979	0.995	0.992	0.990
S6	0.959	0.980	0.969	0.982	0.993	1.000	0.984	0.994	0.977	0.977	0.973	0.977	0.967	0.984	0.989	0.986
S7	0.965	0.977	0.972	0.981	0.983	0.984	1.000	0.995	0.986	0.986	0.990	0.983	0.973	0.982	0.993	0.989
S8	0.976	0.989	0.983	0.992	0.992	0.994	0.995	1.000	0.991	0.991	0.991	0.989	0.983	0.991	0.998	0.996
S9	0.984	0.986	0.987	0.993	0.989	0.977	0.986	0.991	1.000	1.000	0.995	0.999	0.997	0.998	0.996	0.998
S10	0.984	0.986	0.986	0.993	0.989	0.977	0.986	0.991	1.000	1.000	0.995	0.999	0.996	0.998	0.996	0.998
S11	0.989	0.990	0.992	0.994	0.977	0.973	0.990	0.991	0.995	0.995	1.000	0.992	0.992	0.988	0.995	0.996
S12	0.979	0.983	0.983	0.990	0.988	0.977	0.983	0.989	0.999	0.999	0.992	1.000	0.995	0.998	0.994	0.996
S13	0.992	0.989	0.993	0.995	0.979	0.967	0.973	0.983	0.997	0.996	0.992	0.995	1.000	0.994	0.991	0.995
S14	0.978	0.984	0.982	0.991	0.995	0.984	0.982	0.991	0.998	0.998	0.988	0.998	0.994	1.000	0.995	0.996
S15	0.985	0.991	0.990	0.996	0.992	0.989	0.993	0.998	0.996	0.996	0.995	0.994	0.991	0.995	1.000	0.999
对照指纹图谱	0.988	0.993	0.992	0.998	0.990	0.986	0.989	0.996	0.998	0.998	0.996	0.996	0.995	0.996	0.999	1.000

表 2 15 批妇科白凤口服液 HPLC 指纹图谱相似度评价结果 (300 nm)

Tab 2 Similarity evaluation of HPLC fingerprint for 15 batches of Fuke Baifeng oral liquid (300 nm)

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指 纹图谱
S1	1.000	0.980	0.967	0.943	0.876	0.947	0.884	0.922	0.950	0.951	0.922	0.960	0.896	0.917	0.941	0.957
S2	0.980	1.000	0.987	0.976	0.937	0.978	0.947	0.960	0.958	0.960	0.920	0.939	0.927	0.953	0.957	0.979
S3	0.967	0.987	1.000	0.992	0.939	0.985	0.951	0.988	0.990	0.991	0.966	0.960	0.973	0.983	0.989	0.997
S4	0.943	0.976	0.992	1.000	0.969	0.994	0.973	0.994	0.984	0.986	0.945	0.922	0.982	0.995	0.991	0.997
S5	0.876	0.937	0.939	0.969	1.000	0.980	0.997	0.962	0.923	0.927	0.846	0.814	0.933	0.966	0.940	0.954
S6	0.947	0.978	0.985	0.994	0.980	1.000	0.983	0.988	0.974	0.976	0.922	0.908	0.964	0.987	0.981	0.992
S7	0.884	0.947	0.951	0.973	0.997	0.983	1.000	0.972	0.932	0.935	0.864	0.835	0.939	0.971	0.946	0.962
S8	0.922	0.960	0.988	0.994	0.962	0.988	0.972	1.000	0.986	0.987	0.956	0.924	0.989	0.997	0.992	0.994
S9	0.950	0.958	0.990	0.984	0.923	0.974	0.932	0.986	1.000	1.000	0.982	0.962	0.987	0.986	0.997	0.994
S10	0.951	0.960	0.991	0.986	0.927	0.976	0.935	0.987	1.000	1.000	0.981	0.961	0.987	0.987	0.998	0.994
S11	0.922	0.920	0.966	0.945	0.846	0.922	0.864	0.956	0.982	0.981	1.000	0.980	0.967	0.949	0.972	0.963
S12	0.960	0.939	0.960	0.922	0.814	0.908	0.835	0.924	0.962	0.961	0.980	1.000	0.917	0.911	0.944	0.947
S13	0.896	0.927	0.973	0.982	0.933	0.964	0.939	0.989	0.987	0.987	0.967	0.917	1.000	0.993	0.992	0.982
S14	0.917	0.953	0.983	0.995	0.966	0.987	0.971	0.997	0.986	0.987	0.949	0.911	0.993	1.000	0.994	0.992
S15	0.941	0.957	0.989	0.991	0.940	0.981	0.946	0.992	0.997	0.998	0.972	0.944	0.992	0.994	1.000	0.995
对照指纹图谱	0.957	0.979	0.997	0.997	0.954	0.992	0.962	0.994	0.994	0.994	0.963	0.947	0.982	0.992	0.995	1.000

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第十四册 [S]. 1997: 52.

[2] 《国家中成药标准汇编》外科妇科分册 [S]. 2002: 518.

[3] 夏晶, 盛莉玲, 季申. 妇科白凤口服液质量标准的研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40 (19): 1506-1509.

[4] 宋桂萍, 肖敏, 陈俊, 等. HPLC 法测定妇科白凤口服液中芍药苷的含量 [J]. 江西中医药, 2009, 40 (7): 65.

[5] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26 (10): 653-655.

[6] 孙国祥, 雒翠霞, 任培培, 等. 中药指纹图谱学体系的构建 [J]. 中南药学, 2007, 5 (1): 69-73.

[7] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行) [J]. 中成药, 2000, 22 (10): 671.

[8] 易小兰, 杨华, 张飞飞, 等. 生血宝合剂的多成分 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (1): 57-60.

[9] 黄杰英, 郭元满, 高慧娟, 等. 愈伤灵胶囊高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2018, 16 (7): 913-916.

[10] 刘爱华, 杨华, 郭元满, 等. 参苏口服液高效液相指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2018, 16 (5): 577-580.

[11] 周志强, 刘桂凤, 洪挺, 等. 妇康宝口服液的液相指纹图谱研究 [J]. 药品评价, 2023, 20 (9): 1078-1081.

[12] 刘敏, 余乐, 陈张金, 等. 麦味地黄口服液特征图谱的建立 [J]. 中国药师, 2021, 24 (2): 359-362.

(收稿日期: 2024-06-06; 修回日期: 2024-07-31)

高效液相色谱法测定磷酸特地唑胺中有关物质的含量

何亮^{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** 建立高效液相色谱法定量测定磷酸特地唑胺中有关物质的含量。**方法** 采用加校正因子的主成分外标法, 对磷酸特地唑胺中的有关物质进行定量分析, 并对该方法进行了方法验证。**结果** 各组分能够有效分离; 磷酸特地唑胺及杂质 1~杂质 11 的定量限均小于 0.5 ng, 检测限均小于 0.2 ng; 各组分的浓度与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.999$); 样品低、中、高三个水平的回收率在 90.0%~108.0% 内, RSD 均 $< 5.0\%$; 6 份供试品中检出的杂质个数和含量一致; 当色谱条件发生微小变化时, 各条件下的检测结果一致。**结论** 本方法结果专属性强, 灵敏度和准确度高, 重复性和耐用性良好, 可用于测定磷酸特地唑胺中有关物质。

关键词: 高效液相色谱法; 磷酸特地唑胺; 有关物质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0535-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.038

Determination of related substances in tedizolid phosphate by high performance liquid chromatography

HE Liang^{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 related substances in tedizolid phosphate by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The principal component external standard method and correction factor method were established to determine the related substances in tedizolid phosphate simultaneously. The methods was validated. **Results** Each component was effectively separated. The quantification limits of tedizolid phosphate and impurities 1 to 11 were all less than 0.5 ng, and the detection limits were all less than 0.2 ng. The concentration of each component had a good linear relationship with the peak area ($r \geq 0.999$). The recovery ranged from 90.0% to 108.0%, with RSD all less than 5.0%. The number of impurities in the 6 test samples was consistent with that of the content. When the chromatographic conditions changed slightly, the test results under all conditions remained consistent. **Conclusion** The method has good specificity, sensitivity, accuracy, repeatability and good durability, and can be used to determine the related substances in tedizolid phosphate.

Key words: high performance liquid chromatography; tedizolid phosphate; related substance

磷酸特地唑胺化学名为 { (5R) - (3-{3-氟 -4-[6- (2- 甲基 -2H- 四唑 -5- 基) - 吡啶 -3- 基] 苯基 } -2- 氧代噁唑烷 -5- 基) } 甲基二氢磷酸酯, 化学结构式^[1] 见图 1, 是近年来发现的广谱菌的抑制剂, 对包括革兰氏阳性菌如葡萄球菌、肠道球菌和链球菌, 厌氧微生物 (如类菌体和梭菌体) 以及耐酸微生物 (如结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌) 在内的人和动物病原体有抗菌活性^[2-5]。本研究根据合成工艺和降解机制, 选择了 11 种主

要的杂质 1~11^[2-5], 其化学结构式见图 1, 建立了磷酸特地唑胺有关物质检测方法, 并对方法进行系统的方法验证^[6-12], 为磷酸特地唑胺原料的质量控制提供依据。

1 材料

高效液相色谱仪 (型号: 2487/e2695, Waters), 高效液相色谱仪 (型号: 20A, DAD 检测器, 岛津), 电子天平 (型号: MS105DU, 十万分之一, 梅特勒), 电热鼓风干燥箱 (型号: DHG-9245A, 上海

作者简介: 何亮, 男, 工程师, 主要从事药物质量控制研究, email: 1178607709@qq.com * 通信作者: 孙国祥, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药指纹学研究和药物质量控制研究, email: gxswmwys@163.com

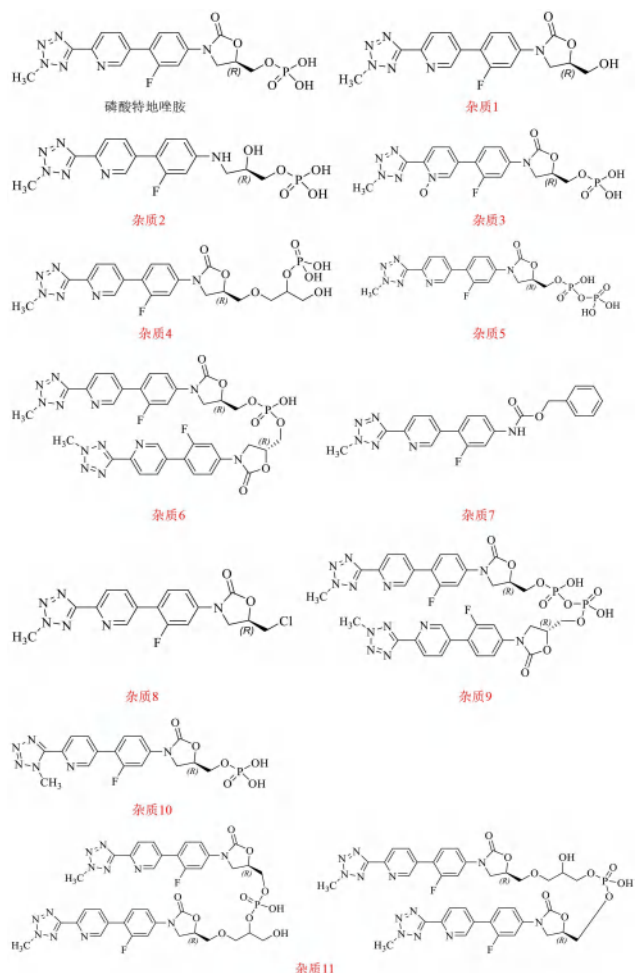


图 1 磷酸特地唑胺及有关物质的化学结构式
Fig 1 Chemical structures of tedizolid phosphate and its related substances

一恒科学仪器有限公司); 药品光照试验箱 (型号: LS-4000UV, 北京天星科仪科技有限公司)。乙腈 (色谱纯, Fisher), 碳酸氢铵 (色谱纯, MREDA), 氢氧化钠 (分析纯, 北京化工厂), 盐酸和 30% 过氧化氢 (分析纯, 天津市光复科技发展有限公司)。

磷酸特地唑胺样品 (北京元延医药科技股份有限公司, 11404002 批, 含量: 100.0%; 11405001 批, 含量: 100.2%; 11405002 批, 含量: 99.7%); 杂质 1 (批号: TED3-00, 质量分数 99.9%)、杂质 2 (批号: TED4-01A, 质量分数 99.5%)、杂质 3 (批号: TED4-01B, 质量分数 97.5%)、杂质 4 (批号: TED4-01C, 质量分数 97.6%)、杂质 5 (批号: TED4-01D, 质量分数 97.1%)、杂质 6 (批号: TED4-01E, 质量分数 98.4%)、杂质 7 (批号: TED1-00, 质量分数 99.6%)、杂质 8 (批号: TED4-01F, 质量分数 97.2%)、杂质 9 (批号: TED4-01G, 质量分数 98.8%)、杂质 10 (批号: TED4-01H, 质量分数 98.3%)、杂质 11 (批号: TED4-01I, 质量

分数 83.8%)(北京元延医药科技股份有限公司); 磷酸特地唑胺对照品 (批号: TED4-00, 质量分数: 99.7%, 北京元延医药科技股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

用十八烷基键合硅胶为填充剂 [色谱柱为 Waters XBridge (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)], 以 0.025 mol · L⁻¹ 碳酸氢铵溶液 - 乙腈 (90 : 10) 为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 35 min, 100% ~ 65%A; 35 ~ 50 min, 65% ~ 25%A; 50 ~ 51 min, 25% ~ 100%A; 51 ~ 60 min, 100%A); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 40 °C; 检测波长为 300 nm。

2.2 溶液的配制

2.2.1 稀释剂 (空白溶剂) 0.025 mol · L⁻¹ 的碳酸氢铵 (取无水碳酸氢铵约 1.98 g, 加水溶解并稀释至 1000 mL) - 乙腈 (90 : 10)。

2.2.2 系统适用性溶液 分别取杂质 1 ~ 杂质 11 及磷酸特地唑胺各适量, 精密称定, 置不同量瓶中, 加稀释剂适量, 超声溶解并稀释至每 1 mL 分别含有 100 μg 的溶液, 作为储备液; 另取磷酸特地唑胺 100 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加稀释剂适量, 超声使溶解, 再精密加入各杂质储备液 1 mL, 加稀释剂制成每 1 mL 中约含磷酸特地唑胺 2 mg 及各杂质为 2 μg 的溶液, 作为系统适用性溶液。

2.2.3 对照品溶液 取磷酸特地唑胺对照品约 20 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂适量, 超声使溶解, 放冷, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 定量方法

采用加校正因子的主成分外标法计算供试品中各杂质的含量, 计算公式:

$$\text{杂质含量} (\%) = (W_r \times A_s \times S_s) / (W_s \times A_r \times S_r) \times P \times f \times 100\%$$

式中: A_s 供试品溶液中杂质峰的峰面积 (杂质 11 按照 2 个峰的峰面积之和计算); W_r 磷酸特地唑胺对照品溶液的称样量, mg; A_r 磷酸特地唑胺对照品溶液的峰面积; W_s 供试品的称样量, mg; S_r 磷酸特地唑胺对照品溶液的稀释倍数; S_s 供试品的稀释倍数; P 磷酸特地唑胺对照品的含

量; f 杂质的校正因子; 总杂 (%) = \sum 杂质 %。

2.4 专属性试验

2.4.1 分离度试验 取“2.2.2”项下各组分储备液作为定位溶液; 分别精密量取稀释剂、各定位溶液、供试品溶液、系统适用性溶液进样分析。结果见表 1, 稀释剂和系统适用性的图谱见图 2。结果表明, 空白溶剂不干扰各组分的测定, 各组分之间的分离度均符合要求(杂质 11 有 2 个色谱峰, 计算时合并峰面积进行计算)。

表 1 分离度试验结果
Tab 1 Resolution test

峰号	化合物	定位溶液		系统适用性溶液	
		保留时间 /min	保留时间 /min	保留时间 /min	分离度
1	杂质 3	3.688	3.667	—	
2	杂质 5	8.157	8.162	22.67	
3	杂质 2	8.862	8.846	2.94	
4	磷酸特地唑胺	9.718	9.693	1.91	
5	杂质 10	11.660	11.643	3.80	
6	杂质 4	13.203	13.185	6.02	
7	杂质 9	20.230	20.241	30.94	
8	杂质 1	22.432	22.416	10.13	
9	杂质 6	24.354	24.340	9.58	
10	杂质 11	25.589	25.572	6.83	
11	杂质 11	25.840	25.827	1.34	
12	杂质 8	34.274	34.275	23.99	
13	杂质 7	44.819	44.791	45.65	

2.4.2 强制降解试验

① 酸降解供试品: 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 于室温下放置 2 h, 加 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL 中和, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 再加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。② 碱降解供试品: 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 于室温下放置 2 h 后, 加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 中和, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 再加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。③ 氧化降解供试品: 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 2 mL, 置室温下放置 5 h 后, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 再加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。④ 高温降解供试品: 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 置于 80 °C 烘箱内 24 h 后, 取出, 放冷, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 再加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。⑤ 光照降解供试品: 取磷酸特地唑胺约 20 mg, 精密称定, 置 10 mL 量

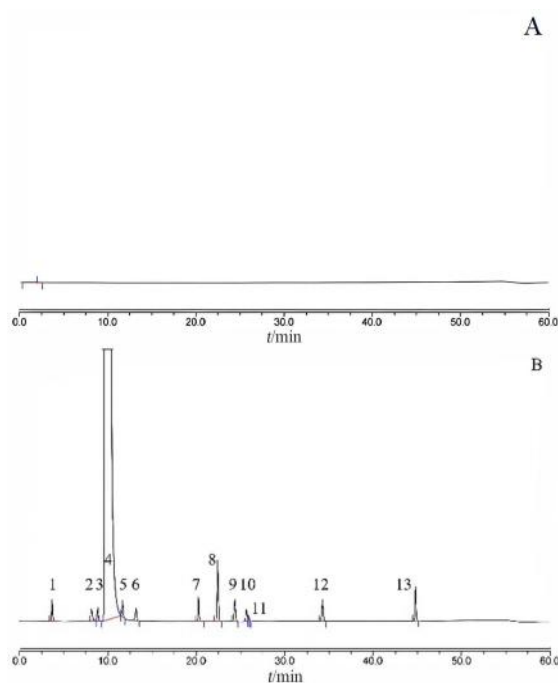


图 2 空白溶剂 (A) 和系统适用性溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of blank solvent (A) and system suitability solvent (B)

1. 杂质 3 (impurity 3); 2. 杂质 5 (impurity 5); 3. 杂质 2 (impurity 2); 4. 磷酸特地唑胺 (tedizolid phosphate); 5. 杂质 10 (impurity 10); 6. 杂质 4 (impurity 4); 7. 杂质 9 (impurity 9); 8. 杂质 1 (impurity 1); 9. 杂质 6 (impurity 6); 10. 杂质 11 (impurity 11); 11. 杂质 11 (impurity 11); 12. 杂质 8 (impurity 8); 13. 杂质 7 (impurity 7)

瓶中, 于 5000 lx 光照条件下放置 24 h, 取出, 加稀释剂适量超声使溶解, 放冷, 再加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

上述强制降解方法均平行配制空白对照溶液。将上述降解后的样品溶液和空白溶液分别按“2.1”项下色谱条件进样, 磷酸特地唑胺在酸降解、碱降解、氧化降解、高温降解和光照降解下所产生的降解产物均与主峰能有效分离, 空白无干扰, 说明该方法专属性良好。

各降解条件下, 平衡指数均在 0.9 ~ 1.1 范围内, 物料平衡符合要求。其中平衡指数的计算公式如下:

平衡指数 = (降解供试品的称样量 × 未降解供试品校正后总峰面积) / (降解供试品校正后总峰面积 × 未降解供试品的称样量)。

2.5 检测限和定量限试验

将“2.2.2”项下各组分储备液逐级稀释, 分别按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。将信噪比 (S/N) 约为 10 时的浓度, 作为定量限浓度; 将 S/N 约为 3 时的浓度, 作为检测限浓度。结果见表 2。

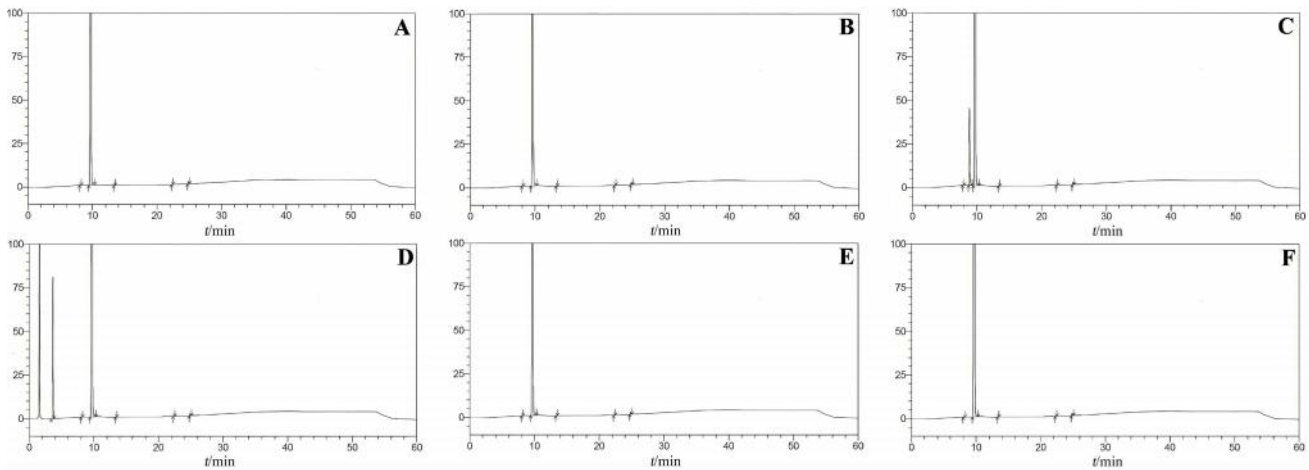


图 3 磷酸特地唑胺专属性强降解试验 HPLC 图

Fig 3 HPLC of tedizolid phosphate destruction of specificity test

A. 未破坏样品 (sample undestroyed); B. 酸破坏 (destroyed by acid); C. 碱破坏 (destroyed by alkali); D. 氧化破坏 (destroyed by oxidation); E. 高温破坏 (destroyed by high temperature); F. 光照破坏 (destroyed by light)

表 2 磷酸特地唑胺及有关物质检测限和定量限

Tab 2 Limit of detection and limit of quantitation of tedizolid phosphate and its related substance

化合物	检测限 / (ng · mL ⁻¹)	定量限 / (ng · mL ⁻¹)
杂质 1	10.01	28.60
杂质 2	22.16	66.47
杂质 3	13.05	39.16
杂质 4	22.08	66.24
杂质 5	22.10	66.29
杂质 6	13.04	39.12
杂质 7	10.30	29.42
杂质 8	13.35	40.05
杂质 9	13.20	39.60
杂质 10	13.42	40.26
杂质 11	19.29	57.88
磷酸特地唑胺	10.03	28.66

2.6 线性范围与校正因子

2.6.1 线性范围 分别精密量取“2.2.2”项下各组分储备液 2 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为线性储备液。精密量取线性储备液 0.5、1、2、3、4、5、6、8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为线性系列溶液 (1) ~ (8); 另取线性储备液, 作为线性溶液 (9)。

将线性溶液 (1) ~ (9) 分别按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。以磷酸特地唑胺及各杂质的质量浓度 (ρ , mg · L⁻¹) 为横坐标, 以色谱峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归运算, 得回归方程、相关系数及线性范围, 结果见表 3。

2.6.2 校正因子 根据磷酸特地唑胺与各已知杂质标准曲线的斜率之比计算校正因子, 测得杂质 1 ~ 杂质 11 的校正因子分别为 0.8、2.3、1.5、1.5、

1.7、1.1、1.0、1.0、1.3、1.1、2.6; 杂质 1 ~ 5、9、11 的校正因子不在 0.9 ~ 1.1, 因而采用校正因子加以校正; 杂质 6 ~ 8、10 的校正因子在 0.9 ~ 1.1, 采用主成分外标法计算。

2.7 仪器精密度

取“2.6”项下线性溶液 (6), 连续进样 6 次, 计算得各组峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 保留时间的 RSD 均小于 2.0%, 说明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称定同一批磷酸特地唑胺原料药 6 份 (批号: 11404001), 每份约 20 mg, 按“2.2.4”项下方法操作, 平行制备 6 份供试品溶液。供试品溶液中均检出 4 个杂质, 分别为杂质 1、4、5 和 6; 按加校正因子的主成分外标法计算各杂质的含量, 6 份样品中杂质 1、4、5 和 6 的检出量平均值为 0.017%、0.047%、0.020%、0.065%; 各杂质含量的 RSD 均 < 5.0%, 说明方法的重复性良好。

2.9 回收试验

取“2.2.2”项下各杂质储备液 5 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质混合储备液。

取磷酸特地唑胺原料药 9 份, 每份约 20 mg, 精密称定, 平均分成 3 组, 分别置于 10 mL 量瓶中, 每组分别加入杂质混合储备液 2、4、6 mL, 用稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成相当于有关物质限度浓度 50%、100% 和 150% 的溶液。取“2.8”项下计算的各杂质含量的平均值作为本底, 按加校正因子的主成分外标法计算回收率, 杂质 1 ~ 杂质 11 的回收率均在 90.0% ~ 108.0% 内, 且 RSD 均 < 5.0%; 表明本方法测定磷酸特地唑胺有关物质准确度良好。

表 3 有关物质的回归方程、相关系数和线性范围结果

Tab 3 Regression equation, correlation coefficient and linear range of related substances

化合物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg · L ⁻¹)
杂质 1	$A = 2.439 \times 10^4 p + 858.623$	0.9999	0.200 ~ 4.004
杂质 2	$A = 0.880 \times 10^4 p + 40.834$	0.9999	0.199 ~ 3.988
杂质 3	$A = 1.355 \times 10^4 p + 129.686$	0.9999	0.196 ~ 3.916
杂质 4	$A = 1.404 \times 10^4 p + 53.549$	1.0000	0.199 ~ 3.974
杂质 5	$A = 1.186 \times 10^4 p - 50.048$	0.9999	0.199 ~ 3.977
杂质 6	$A = 1.916 \times 10^4 p + 125.819$	1.0000	0.196 ~ 3.912
杂质 7	$A = 2.162 \times 10^4 p - 258.273$	0.9996	0.206 ~ 4.119
杂质 8	$A = 1.978 \times 10^4 p + 295.400$	1.0000	0.200 ~ 4.005
杂质 9	$A = 1.634 \times 10^4 p + 208.456$	0.9999	0.198 ~ 3.960
杂质 10	$A = 1.700 \times 10^4 p - 37.007$	1.0000	0.201 ~ 4.026
杂质 11	$A = 0.807 \times 10^4 p + 117.822$	0.9998	0.174 ~ 3.473
磷酸特地唑胺	$A = 2.060 \times 10^4 p + 662.656$	0.9994	0.201 ~ 4.012

2.10 溶液稳定性试验

取系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液，分别于室温下放置 0、4、8、12、16、20、24 h 进样。结果表明：系统适用性溶液各组分的峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，说明系统适用性溶液在室温下放置 24 h 稳定；对照品溶液的峰面积 *RSD* 小于 5.0%，说明对照品溶液在室温下放置 24 h 稳定；供试品溶液中检出杂质 5、4、1、6，各杂质检出量基本一致，其他已知杂质均未检出，单个未知杂质检出量基本一致，杂质个数一致，说明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.11 耐用性考察

分别在柱温 ±5 °C，流速 ±0.2 mL · min⁻¹，流动相 A 比例 ±2%，盐浓度 ±0.002 mol · L⁻¹，不同色谱柱，不同高效液相色谱仪等微小色谱条件发生变化时，系统适用性溶液中最小分离度为 1.516，说明各组分均能有效分离；供试品中测得的杂质个数均为 4 个，分别为杂质 1、4、5 和 6；按加校正因子的主成分外标法计算，杂质 1、4、5 和 6 的检出量平均值分别为 0.022%、0.045%、0.016%、0.068%，各杂质检出量的极差均不超过 0.01%；表明方法的耐用性良好。

2.12 样品中杂质含量测定

取各批原料药，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，进行测定，结果检出杂质 5、4、1、6，其他已知杂质均未检出，各杂质检出量均不超过 0.10%，杂质总量不超过 0.5%，符合拟订的标准要求（见表 4）。

表 4 3 批样品的检测结果 (%)

Tab 4 Content of 3 batches of samples (%)

批号	杂质 5	杂质 4	杂质 1	杂质 6	总杂
11404002	0.031	0.037	0.011	0.061	0.140
11405001	0.020	0.031	0.007	0.054	0.112
11405002	0.025	0.033	0.013	0.065	0.136

3 讨论

3.1 分析方法的开发

磷酸特地唑胺的已知杂质较多，经 DAD 检测器对各组分的紫外吸收进行提取，均在 300 nm 处有较大吸收，故选择 300 nm 作为检测波长。

作者曾采用专利^[13-14]中的检测方法，发现部分杂质与主峰的分离度 < 1.5，不能有效分离。在进行方法优化过程中，发现梯度变化速率过快，容易产生较大的梯度峰，且干扰杂质的测定；专利中的方法有机相最高达到了 95%，盐相的浓度亦较高，有可能导致盐析出，使仪器发生故障，故降低有机相的比例至 80%，并同时减缓梯度变化速率，延长了梯度洗脱时间，使各组分达到了有效分离。

3.2 杂质限度的制订

杂质 1 为合成磷酸特地唑胺过程中的中间体，在合成杂质 1 的过程中，可能产生工艺杂质，其中一个杂质含两个羟基，可分别与反应试剂三氯氧磷发生取代反应，生成两种中间态物质；两种中间态物质上的二氯磷酸酯基可分别与杂质 1 上的两个羟基发生取代反应，产生两个杂质；这两个杂质互为同分异构体，结构和极性极为相近，无法加以纯化，在色谱图中亦无法完全分离，故将两者合并控制为杂质 11，其限度相对更加严格。

根据说明书，磷酸特地唑胺片的最大日服用剂量为 200 mg，参考 ICH Q3A^[15]，报告限度制订为 0.05%，鉴定限度为 0.10%，质控限度为 0.15%；根据 3 批样品的检测结果，结合稳定性结果，将磷酸特地唑胺的杂质限度制订为单个杂质检出量均不超过 0.10%，杂质总量不超过 0.5%。

参考文献

[1] Cubist Pharmaceuticals U.S. FDA 磷酸特地唑胺说明书 [EB/OL]. (2014-06-20) [2020-05-15]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/014121Orig1s01.pdf

- fd. gov/drugsatfda_docs/label/ 2014/ 205436s000lbl. pdf.
- [2] 李志杰, 任元彬, 曹宗焕, 等. 新型噁唑烷酮衍生物: 1894242A [P]. 2007-01-10.
- [3] 李志杰, 任元彬, 曹宗焕, 等. 噁唑烷酮衍生物以及含有该衍生物的药物组合物: 101982468 [P]. 2011-03-02.
- [4] 李志杰, 任元彬, 曹宗焕, 等. 新型噁唑烷酮衍生物: 102516238 [P]. 2012-06-27.
- [5] 李志杰, 任元彬, 曹宗焕, 等. 新型噁唑烷酮衍生物: 102702184 [P]. 2012-10-03.
- [6] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 480-483.
- [7] 赵慧玲. 关于原料药有关物质检查方法建立的思考 [EB/OL]. (2006-11-30) [2024-05-15]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=1533>.
- [8] 黄晓龙. 有关物质分析方法验证的可接受标准简介 [EB/OL]. (2006-02-08) [2024-05-15]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=1463>.
- [9] 张哲峰. HPLC 法校正因子研究中的几个问题 [EB/OL]. (2011-12-07) [2024-05-15]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=312552>.
- [10] 张磊, 苑艳飞, 林小晖, 等. 高效液相色谱法测定替戈拉生中有关物质的研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (7): 1899-1902.
- [11] 李丽霞, 王旭东, 马树芝, 等. 高效液相色谱法测定新型促性腺激素释放激素拮抗剂 LPM7100328 原料药中的有关物质 [J]. 中南药学, 2024, 22 (2): 504-508.
- [12] 姜金生, 石笑弋, 刘轶, 等. 高效液相色谱法测定拉莫三嗪片中的有关物质 [J]. 中南药学, 2021, 19 (8): 1637-1643.
- [13] 卡丽·A·科斯特洛, 杰克莱恩·A·西姆森, 罗伯特·J·杜吉德, 等. 制备噁唑烷酮类的方法及含有噁唑烷酮类的组合物: 102177156 [P]. 2011-09-07.
- [14] D·基思·赫斯特, 罗伯特·J·杜吉德, 约翰·芬恩. 含有噁唑烷酮的二聚体化合物、组合物以及制备方法和用途: 102497866 [P]. 2012-06-13.
- [15] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Impurities In New Drug Substances, Q3A (R2) [S]. 2006.

(收稿日期: 2024-07-02; 修回日期: 2024-09-05)

高效液相色谱法同时测定艾地骨化醇和阿法骨化醇的含量

郭思瑞, 徐硕, 王晶, 徐文峰*, 金鹏飞* (北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究院, 北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室(北京医院), 北京 100730)

摘要: 目的 建立同时测定两种维生素 D₃ 类药物艾地骨化醇软胶囊及阿法骨化醇软胶囊含量的高效液相色谱法, 为建立其质量标准提供参考。方法 采用 InertSustain C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (90:10) 为流动相; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃。结果 艾地骨化醇和阿法骨化醇分别在 0.6574~10.52 μg·mL⁻¹ 和 0.3840~6.144 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好, *r* 为 0.9999; 方法重复性、精密度及稳定性的 *RSD* 均小于 1.3%; 平均加样回收率均在 98%~102%。含量测定结果显示艾地骨化醇含量分别为标示量的 101.26%、101.00%、100.34%、99.94% 和 98.33%; 阿法骨化醇含量分别为标示量的 100.18%、100.12%、99.77%、96.66% 和 95.26%。结论 该方法准确、快速、简便, 可用于艾地骨化醇软胶囊及阿法骨化醇软胶囊的含量测定。

关键词: 艾地骨化醇软胶囊; 阿法骨化醇软胶囊; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0540-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.039

Simultaneous determination of eldecalcitol and alfacalcidol content by high-performance liquid chromatography

GUO Si-rui, XU Shuo, WANG Jing, XU Wen-feng*, JIN Peng-fei* (Department of Pharmacy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drug Risks and Individual Application (Beijing Hospital), Beijing 100730)

基金项目: 中央高水平医院临床科研业务费资助 (No.BJ-2021-211); 国家自然科学基金资助项目 (No.81803715)。

作者简介: 郭思瑞, 女, 主管药师, 主要从事医院药学和药物分析工作, email: siruiguo@126.com *通信作者: 徐文峰, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学和药物分析工作, email: xuwenfenghill@126.com; 金鹏飞, 男, 主任药师, 主要从事医院药学和药物分析工作, email: j790101@163.com

Abstract: Objective To determine the content of 2 vitamin D₃ drugs, namely eldecalcitol soft capsules and alfacalcidol soft capsules by high-performance liquid chromatography (HPLC) to establish their quality standards. **Methods** An InertSustain C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for the separation, with methanol-water (90 : 10) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C. **Results** The linearity of eldecalcitol and alfacalcidol was 0.6574 ~ 10.52 μg · mL⁻¹ and 0.3840 ~ 6.144 μg · mL⁻¹, respectively. Both correction coefficients (*r*) were 0.9999. The *RSDs* of repeatability, precision, and stability were all less than 1.3%. The average recovery was all within 98% ~ 102%. The content determination showed that the eldecalcitol content in 3 sample batches was 101.26%, 101.00%, 100.34%, 99.94% and 98.33% of the labeled amounts, while the alfacalcidol content was 100.18%, 100.12%, 99.77%, 96.66% and 95.26% of the labeled amounts respectively. **Conclusion** The method is accurate, rapid and simple, and can be used for the content determination of eldecalcitol soft capsules and alfacalcidol soft capsules.

Key words: eldecalcitol soft capsule; alfacalcidol soft capsule; HPLC

骨质疏松是一种以骨量减低、骨组织微结构损坏,导致骨脆性增加,易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。根据2018年国家卫生健康委公布的数据,在我国65岁以上老年人中骨质疏松患病率高达32%,其中女性为51.6%,男性为10.7%^[2]。而维生素D的缺乏会导致骨质疏松患病风险增加。研究发现,维生素D可以调节骨骼生长,促进骨骼构建与矿化,补充维生素D是骨质疏松药物治疗的重要辅助手段^[3-5]。艾地骨化醇和阿法骨化醇作为活性维生素D₃衍生物,临床广泛应用于骨质疏松的防治,在原发性骨质疏松症诊疗指南(2022年版)、骨质疏松性骨折二级预防中国专家共识、骨质疏松性椎体压缩骨折诊治专家共识(2021版)等多个骨质疏松诊疗指南和专家共识中均有提及^[1, 6-7]。艾地骨化醇是由日本中外制药株式会社开发研究,2020年12月在我国上市,商品名为“艾地罗”(规格包括0.5 μg和0.75 μg),用于治疗绝经后女性骨质疏松^[8]。由于在我国使用时间较短,且制剂主成分含量极低,查阅文献尚未见其含量测定相关的研究,且未收载于《中国药典》。阿法骨化醇软胶囊原研企业为丹麦利奥制药有限公司,于2003年5月进口中国,商品名为“依安凡”,原研制剂为软胶囊制剂(规格包括0.25 μg和1 μg)。阿法骨化醇软胶囊收载于《中国药典》2020年版,但其含量测定采用了正相高效液相色谱法,流动相为石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯-四氢呋喃(2:1:1)。关于阿法骨化醇的研究主要集中在疗效分析,在含量测定方面仅有较早的两篇文献,是关于药典中含量均匀度计算方法的改进,且仍采用正相色

谱法^[9-10]。针对上述存在的问题,本试验拟建立一种简单、便捷、可靠的反相高效液相色谱法,同时测定艾地骨化醇软胶囊及阿法骨化醇软胶囊的含量,对于补充其药品质量标准具有一定参考意义,保证临床用药安全。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity II型高效液相色谱仪、Mettler Toledo XP205型电子天平、药物稳定试验箱(北京兰贝石恒温技术有限公司);KQ-300DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。甲醇为色谱纯(Thermo Fisher Scientific有限公司);水为二级试验用水。对照品艾地骨化醇(批号:ELL046,纯度:99%,上海源叶生物科技有限公司);阿法骨化醇(批号:100378-202205,纯度:99.9%,中国食品药品检定研究院)。艾地骨化醇软胶囊(0.75 μg/粒,Fujieda Plant of Chugai Pharma Manufacturing Co., Ltd.,批号分别为21G012D、21L090D、22H100D;四川国为制药有限公司,批号:03230401;河南泰丰生物科技有限公司,批号:02230206);阿法骨化醇软胶囊(0.25 μg/粒,LEOPharmaA/S公司,批号分别为D06136、D08515、D08516;南通华山制药有限公司,批号:20231007;华润双鹤药业股份有限公司,批号:2311206)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选择InertSustain C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(90:10);检测波长为265 nm;流速为1.0 mL · min⁻¹;进样量为30 μL;柱温为30 °C;经过0.22 μm孔径滤膜滤过后进样。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取艾地骨化醇和阿法骨化醇适量，置于 500 mL 量瓶中，加甲醇超声 10 min，稀释并定容，制成对照品储备液（分别约为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）备用。分别精密量取对照品储备液 1.25、2.5、5、10、20 mL 置于 100 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得系列线性标准曲线溶液。选择中间浓度的标准曲线溶液作为标准工作液，用于系统适用性及精密度考察。

2.3 供试品溶液的制备

分别取 20 粒艾地骨化醇软胶囊和阿法骨化醇软胶囊，剪开囊壳，取出内容物，囊壳用乙醚清洗干净，精密称重，计算软胶囊平均装量。再将取出的内容物置于 10 mL 量瓶中，精密称定，加入甲醇适量，涡旋混合 3 min，超声提取 30 min，再加入甲醇定容至刻度，摇匀，于 -20°C 静置 2 h 后， 4°C 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液， $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

2.4 专属性

2.4.1 基质干扰试验

分别取对照品溶液和供试品溶液按照“2.1”项下色谱条件进样测定，结果显示，样品中其他成分对待测成分阿法骨化醇和艾地骨化醇无干扰（见图 1）。

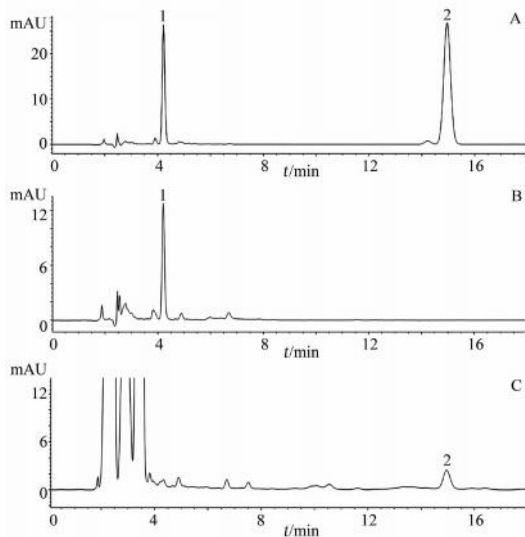


图 1 对照品溶液 (A)、艾地骨化醇软胶囊供试品溶液 (B) 和阿法骨化醇软胶囊供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference solution (A), test solution of eldecalcitol soft capsules (B), and test solution of alfacalcidol soft capsules (C)

1. 艾地骨化醇 (eldecalcitol); 2. 阿法骨化醇 (alfacalcidol)

2.4.2 强制降解试验

为进一步考察降解产物对试验分析是否存在干扰，参照人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) 方法学原则，对供试品进行特殊条

件下的强制降解^[11-12]。取约 20 粒供试品软胶囊内容物，置于 10 mL 量瓶中，按“2.3”项下方法进行样品处理。分别经过高温破坏处理 (60°C 水浴加热，暗处静置 6 h)、光照破坏处理 (10 000 lx 光照，静置 6 h)、氧化破坏处理 (加入 0.1 mL 30% 过氧化氢溶液，暗处静置 6 h)、酸化破坏处理 (加入 0.1 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液，暗处静置 6 h，后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和) 和碱化破坏处理 (加入 0.1 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液，暗处静置 6 h，后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和) 等条件处理后，按“2.1”项下色谱条件进行分析。强制降解试验结果表明：艾地骨化醇和阿法骨化醇供试品在 5 种强制降解条件下，均有一定程度的降解破坏，且在酸破坏和碱破坏条件下的降解产物产生了明显的色谱峰，但分离度满足测定要求，不干扰测定，结果见图 2 和图 3。

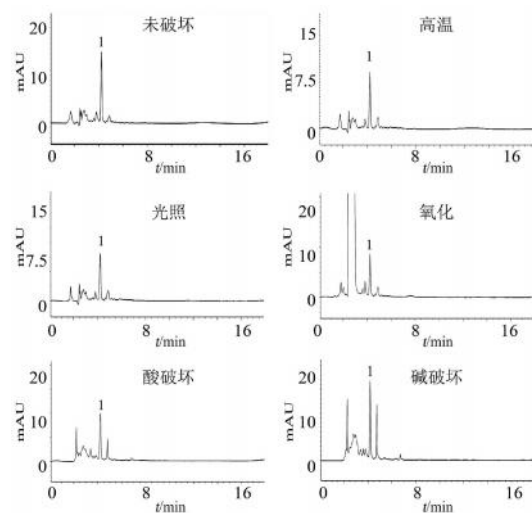


图 2 艾地骨化醇软胶囊强制降解产物色谱图

Fig 2 Chromatograms of forcedly degraded samples of eldecalcitol soft capsules

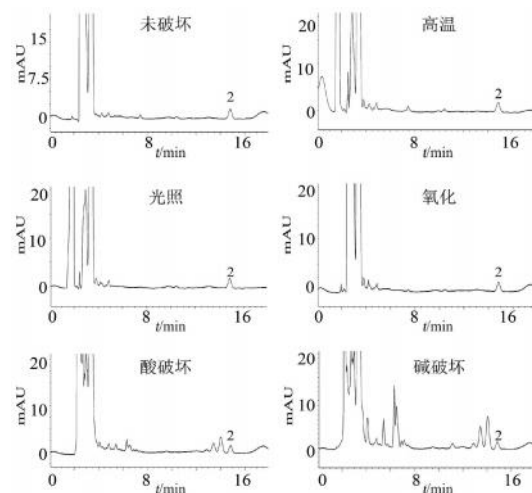


图 3 阿法骨化醇软胶囊强制降解产物色谱图

Fig 3 Chromatograms of forcedly degraded samples of alfacalcidol soft capsules

2.5 系统适用性、灵敏度和线性关系考察

取“2.2”项下标准工作液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录艾地骨化醇和阿法骨化醇的平均理论塔板数，分别为 7963 和 14 677（理论塔板数均 > 5000）。将对照品储备液以甲醇逐级稀释后进样分析，测得艾地骨化醇和阿法骨化醇检测限分别为 $16.43 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $19.19 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ （信噪比约为 3）；定量限分别为 $32.87 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $38.40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ （信噪比约为 10）。

取“2.2”项下系列线性标准曲线溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱峰面积，以对照品溶液质量浓度（ x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）为横坐标，对应的色谱峰面积（ y ）为纵坐标进行线性回归并绘制标准曲线，分别得回归方程 $y = 60.41x + 4.635$ （ $r = 0.9999$ ）和 $y = 69.54x + 3.263$ （ $r = 0.9999$ ）。结果显示艾地骨化醇和阿法骨化醇分别在 $0.6574 \sim 10.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.3840 \sim 6.144 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下标准工作液，按照“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 针，记录色谱峰面积，代入线性回归方程计算含量。结果显示 6 份对照品溶液中艾地骨化醇和阿法骨化醇含量的 RSD 分别为 0.40% 和 0.50%，说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

按照“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱峰面积，代入线性回归方程计算含量。结果显示 6 份供试品溶液中艾地骨化醇和阿法骨化醇含量的 RSD 分别为 0.20% 和 0.30%，说明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液分别于 0、12、24、36 h 进样测定。结果显示艾地骨化醇和阿法骨化醇含量的 RSD 分别为 0.90% 和 1.3%，说明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.9 加样回收试验

分别取艾地骨化醇软胶囊（批号：21G012D）和阿法骨化醇软胶囊（批号：D06136），精密称取内容物 9 份，置于 25 mL 量瓶中，分别精密加入“2.2”项下标准工作液 1.2、2.6、3.5 mL，按“2.3”项下方法处理样品，作为加样回收液，进样测定，记录色谱峰面积，计算加样回收率和 RSD ，结果艾地骨化醇和阿法骨化醇高、中、低浓度水平的平均回收率均在 98% ~ 102%， RSD 均小于 2%。

2.10 耐用性

将色谱柱改为 Alltima C₁₈ 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm ）和 XBridge C₁₈ 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm ），其他色谱条件同“2.1”项下不变，将供试品溶液进样，采集色谱图。结果显示色谱柱为 Alltima C₁₈ 时，艾地骨化醇和阿法骨化醇的理论塔板数分别为 8644 和 17 760（应不低于 5000），峰形良好，供试品溶液连续进样 6 针， RSD 分别为 0.3% 和 0.2%，符合规定；色谱柱为 XBridge C₁₈ 柱时，艾地骨化醇和阿法骨化醇的理论塔板数分别为 7556 和 14 786（应不低于 5000），峰形良好，供试品溶液连续进样 6 针， RSD 分别为 0.3% 和 0.2%，符合规定。

改变色谱条件中的柱温，分别设为 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ ，其他色谱条件不变，将供试品溶液连续进样 6 针，采集色谱图。结果显示 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，艾地骨化醇的理论塔板数分别为 7322、7748，峰面积 RSD 分别为 0.10%、0.30%；阿法骨化醇的理论塔板数分别为 13 081、13 831，峰面积 RSD 分别为 0.10%、0.10%，符合规定。

2.11 样品含量测定

应用建立的检测方法分别对 5 批艾地骨化醇软胶囊和阿法骨化醇软胶囊样品，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，每个样品制备 3 份，取平均值，结果见表 2。

表 2 5 批次样品含量测定结果（ $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ ）

Tab 2 Content of 5 batches of samples ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

化合物	批号	相对标示量 /%
艾地骨化醇	21G012D	101.26 ± 0.21
	21L090D	101.00 ± 0.63
	22H100D	100.34 ± 1.25
	03230401	99.94 ± 0.11
	02230206	98.33 ± 0.21
阿法骨化醇	D06136	100.18 ± 0.34
	D08515	100.12 ± 0.89
	D08516	99.77 ± 0.91
	20231007	96.66 ± 0.95
	2311206	95.26 ± 0.04

3 讨论

艾地骨化醇和阿法骨化醇的相关研究多集中于药效学评价，艾地骨化醇尚无质量标准相关研究，阿法骨化醇也仅有药典收录的正相高效液相色谱法^[13-14]。但正相高效液相色谱法存在一些明显的缺点，如流动相选择受限、固定相要求高、稳定性差、检测灵敏度受限以及适用范围较窄等。而艾地骨化醇和阿法骨化醇在含量测定方面，均存在制剂中主成分含量极低的问题，因此要求检

测方法具有较高的精密度和准确度。针对以上问题,本研究采用反相高效液相色谱法同时测定艾地骨化醇和阿法骨化醇,以甲醇-水为流动相,于 265 nm 进行检测,可满足《中国药典》及 ICH 方法学验证原则的要求,较《中国药典》采用的石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-四氢呋喃为流动相的正相色谱法具有更好的普适性,且操作简单,易于推广,可以优化现有的阿法骨化醇的检测方法,还能填补艾地骨化醇含量测定相关研究的空白。

艾地骨化醇和阿法骨化醇均在甲醇、乙腈等有机溶剂中有较好的溶解性,考虑到可能与胶丸材质存在相容,最终选择甲醇作为提取溶剂^[15]。两种软胶囊样品中均含有大量油性基质,为减少基质干扰,避免堵塞色谱柱及管路,在样品前处理过程中采用低温冷冻的方式,除去绝大部分油性基质。试验过程中考察了-20℃条件下,不同冷冻时间(0.5、1、2 h)对色谱峰的影响,发现冷冻 1 h 后的样品,可减少基线漂移、压力增大等问题,待测成分的专属性可满足检测要求,提取完全,测定结果稳定。艾地骨化醇软胶囊存在囊壳材质较硬及样品装量较低等问题,称取内容物较为困难,可在取样前将软胶囊浸泡在纯化水中 3~5 min 后,再用注射器吸取内容物。

艾地骨化醇在流动相系统中的最大紫外吸收为 214 nm 和 265 nm,阿法骨化醇的最大紫外吸收为 213 nm 和 265 nm,两种成分均在 265 nm 有较强吸收,且杂质干扰较小,因此选择 265 nm 为检测波长。考察有机相和水相的比例(70:30、90:10 和 100:0),以及不同流速(0.8、1.0 和 1.2 mL·min⁻¹)对待测成分峰形和保留时间的影响,结果发现当甲醇和水的比例为 90:10,流速为 1.0 mL·min⁻¹时,两种待测成分的峰形较好,理论塔板数均大于 5000,保留时间较为合适。

综上所述,本试验建立了快速、可靠、易于推广的 HPLC 检测方法,适合艾地骨化醇软胶囊和阿法骨化醇软胶囊的含量测定,为艾地骨化醇软胶囊和阿法骨化醇软胶囊的质控提供参考,有效保障临床用药安全。

参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J].中国全科医学,2023,26(14):1671-1691.
- [2] 王青青.原发性骨质疏松症药物治疗进展[J].浙江医学,2024,46(7):673-681.
- [3] Muñoz M, Robinson K, Shibli-Rahhal A. Bone health and osteoporosis prevention and treatment [J]. Clin Obstet Gynecol, 2020, 63(4): 770-787.
- [4] Capozzi A, Scambia G, Lello S. Calcium, vitamin D, vitamin K₂, and magnesium supplementation and skeletal health [J]. Maturitas, 2020, 140: 55-63.
- [5] Romano F, Serpico D, Cantelli M, et al. Osteoporosis and dermatoporosis: a review on the role of vitamin D [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1231580.
- [6] 中国康复医学会骨质疏松预防与康复专业委员会.骨质疏松性骨折二级预防中国专家共识[J].中华医学杂志,2022,102(45):581-3591.
- [7] 中国康复医学会骨质疏松预防与康复专业委员会.骨质疏松性椎体压缩骨折诊治专家共识(2021版)[J].中华医学杂志,2021,101(41):3371-3379.
- [8] 姜艳,岳华,李梅,等.艾地骨化醇治疗绝经后骨质疏松症中国专家建议[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2023,16(3):189-196.
- [9] 陈唯真,牛剑钊,张启明.对《中国药典》2010年版第二增补本收录的阿法骨化醇软胶囊含量均匀度检测项目和方法的商榷[J].中国药事,2015,29(8):831-833.
- [10] 郭丹,张叶,陈阳,等.关于修订阿法骨化醇软胶囊含量均匀度检测方法的建议[J].中国药事,2015,29(8):826-830.
- [11] 徐硕,邝咏梅,徐文峰,等.高效液相色谱法测定醋酸氟卡尼片的含量[J].中南药学,2024,22(1):204-208.
- [12] 徐硕,王月,邝咏梅,等.高效液相色谱法测定 α -硫辛酸绿茶片中 α -硫辛酸的含量[J].中南药学,2024,22(4):1065-1069.
- [13] 王思瑶,曹杰男,刘菜芬.阿法骨化醇软胶囊联合阿仑膦酸钠维 D₃片治疗老年骨质疏松症的临床效果分析[J].系统医学,2024,9(3):185-187,195.
- [14] 寇雨莹.艾地骨化醇通过调控氧化应激改善绝经后骨质疏松症的机制研究[D].济南:山东大学,2023.
- [15] 郝晶晶,潘学强,王松伟,等.RP-HPLC测定骨化三醇胶丸中的骨化三醇及反式骨化三醇[J].中国药学杂志,2016,51(21):1871-1876.

(收稿日期:2024-06-17;修回日期:2024-07-22)

气相色谱法同时测定口腔抑菌液中 4 种挥发性成分的含量

李笑琳^{1,2}, 张佳瑞¹, 张雨萌¹, 赵旻¹, 赵春杰^{1*} (1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 珠海亿胜生物制药有限公司, 广东 珠海 519000)

摘要: **目的** 建立气相色谱法测定口腔抑菌液中麝香草酚、薄荷脑、水杨酸甲酯、桉叶油素 4 种挥发性成分的含量。**方法** 采用安捷伦 CP-1301 毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm), 载气为高纯氮气 (99.999%), 进样口和检测器 (FID) 温度为 250 °C, 分流比 30:1, 载气流速 1.0 mL·min⁻¹。采用程序升温, 起始温度为 80 °C, 保持 1 min, 再以 10 °C·min⁻¹ 的速率升温至 220 °C, 保持 5 min。**结果** 麝香草酚、薄荷脑、水杨酸甲酯和桉叶油素的线性范围分别为 0.0658 ~ 0.3289 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9978$), 0.0437 ~ 0.2185 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9979$), 0.0582 ~ 0.2910 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9979$) 和 0.1065 ~ 0.5323 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9976$); 4 种挥发性成分的回收率均在 98% ~ 104%, RSD 均小于 3.0%。**结论** 该方法操作简便, 准确, 重复性好, 可用于该口腔抑菌液中 4 种挥发性成分的同时测定。

关键词: 口腔抑菌液; 气相色谱; 麝香草酚; 薄荷脑; 水杨酸甲酯; 桉叶油素; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0545-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.040

Simultaneous determination of 4 volatile components in oral antibacterial solution by gas chromatography

LI Xiao-lin^{1,2}, ZHANG Jia-rui¹, ZHANG Yu-meng¹, ZHAO Min¹, ZHAO Chun-jie^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Zhuhai Essex Biopharmaceutical Company Limited, Zhuhai Guangdong 519000)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography to simultaneously determine thymol, menthol, methyl salicylate, and eucalyptol in oral antibacterial solution. **Methods** Agilent CP-1301 (30 m×0.32 mm×0.25 μm) was used as the capillary column. Nitrogen (99.999%) was used as the carrier gas, and FID as the detector. The inlet temperature and FID detector temperature was 250 °C. The split ratio was 30:1 and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature program was initially 80 °C (holding for 1 min) and then increased at the rate of 10 °C·min⁻¹ to 220 °C (holding for 5 min). **Results** The linearity of thymol, menthol, methyl salicylate, and eucalyptol were 0.0658 ~ 0.3289 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9978$), 0.0437 ~ 0.2185 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9979$), 0.0582 ~ 0.2910 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9979$) and 0.1065 ~ 0.5323 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9976$). The recoveries were between 98% and 104%, with the RSDs all less than 3.0%. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, which can simultaneously determine 4 volatile components in oral antibacterial solution.

Key words: oral antibacterial solution; gas chromatography; thymol; menthol; methyl salicylate; eucalyptol; content determination

口腔抑菌液是清洁口腔健康的方式之一, 因使用方便、容易掌握, 实际可行, 所以成为家中进行日常口腔护理和工作出差时的首选。口腔抑菌液可在短时间内达到杀菌抑菌效果, 在刷牙破

坏细菌斑生物膜特性后使用, 效果更佳, 具有清新口气、清洁口腔、预防口腔疾病的功效^[1-3]。

本次检测的口腔抑菌液配方温和, 零酒精, 其主要有效成分是植物精油, 有薄荷脑、麝香草酚、

作者简介: 李笑琳, 女, 硕士研究生, 主要从事药品研发与质量研究, email: 2290321765@qq.com *通信作者: 赵春杰, 男, 博士研究生导师, 主要从事体内药物分析及新药开发研究, email: zcjlj@sina.com

水杨酸甲酯和桉叶油素,这4种成分具有亲水结构与亲油结构的特性,亲油结构作用于细胞壁(磷脂部分),对细胞壁进行拉伸与破坏,同时分子量小便于侵入细胞内,作用于其他细胞器,进一步杀死细胞^[4-6]。由于这4种有效成分均为挥发性成分,在产生疗效的同时,也显著影响制剂质量的稳定性,因此如何控制好上述挥发性成分的含量非常关键。现行标准中HPLC不能对薄荷脑和麝香草酚进行含量测定,且目前较少有文献报道采用气相色谱法同时检测这4种活性成分,所以参考《中国药典》2020年版第二部“薄荷麝香草酚搽剂”品种项下薄荷脑、麝香草酚的含量测定方法,本文采用气相色谱法,可同时测定这款口腔抑菌液中薄荷脑、麝香草酚、水杨酸甲酯、桉叶油素的含量,从而更好地控制该产品的质量^[7-12]。

1 材料

1.1 仪器

GC-7890B型气相色谱仪(配FID检测器,美国Agilent公司);BT125D型十万分之一电子天平(德国赛多利斯集团)。

1.2 试药

对照品桉叶油素(批号:110788-201707,纯度:100%)、薄荷脑(批号:110728-200506,纯度:100%)、水杨酸甲酯(批号:10707-201614,纯度:100%)、麝香草酚(批号:100508-201603,纯度:99.9%)(中国食品药品检定研究院);桉叶油素原料(江西环球天然香料有限公司,批号:20170816),薄荷脑原料(江西雪松天然药用油有限公司,批号:170726),水杨酸甲酯原料(华阴市锦前程药业有限公司,批号:J1703002),麝香草酚原料(南京文森宝国际贸易有限公司,批号:10300505),十二烷基硫酸钠、枸橼酸(湖南尔康制药股份有限公司),枸橼酸钠(新绿方药业),三氯蔗糖(盐城捷康三氯蔗糖制造有限公司);其他所用试剂均为分析纯,水为超纯水。口腔抑菌液(批号:181101、181103、181128、181205、181206,规格:500 mL/瓶,珠海亿胜生物制药有限公司),正十六烷(批号:I1807132,阿拉丁)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:安捷伦CP-1301毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);检测器:FID;检测器温度:250℃;进样口温度:250℃;载气:氮气;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量:1 μL;分流比为30:1;升温程序:80℃初始温度,保持1 min,再以10℃·min⁻¹升温至220℃,保持5 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密移取口腔抑菌液4 mL置于20 mL量瓶中,精密加入1.0 mL内标溶液母液,加95%乙醇稀释,定容,摇匀,即得。

2.2.2 混合对照品母液 精密称定桉叶油素约57 mg、薄荷脑约42 mg、水杨酸甲酯约37 mg以及麝香草酚约64 mg,置于10 mL量瓶中,用95%乙醇溶解,稀释,定容,摇匀,即得。

2.2.3 内标溶液母液 精密称取正十六烷10 mg置于20 mL量瓶中,加95%乙醇溶解,稀释,定容,摇匀。

2.2.4 混合对照品溶液 精密移取混合对照品母液0.4 mL置于10 mL量瓶中,并精密加入1 mL内标溶液母液,用95%甲醇稀释,定容,摇匀。

2.2.5 阴性样品溶液 按口腔抑菌液的处方制备不含桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯和麝香草酚的阴性样品,并按“2.2.1”项下方法制得阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下供试品溶液(批号:181128)1 μL注入气相色谱仪,连续进样6针,记录色谱图。结果显示所得图谱中4个主要成分峰面积RSD≤5.0%,保留时间RSD≤1.0%,理论塔板数≥100 000,对称因子≤2.0。

2.4 专属性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液(批号:181101)及阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,色谱图见图1。结果显示对照品溶液、供试品溶液色谱图中各成分的色谱峰保留时间一致,各成分峰完全分离,阴性样品对4种挥发性成分的测定无干扰,该方法专属性良好。

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品母液,用乙醇逐级稀释后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以对照品溶液的质量浓度为横坐标,以相应峰面积与内标物的峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯、麝香草酚4种成分在一定质量浓度内与峰面积线性关系良好,结果见表1。

2.6 稳定性试验

取同一批次的样品(批号:181128),按“2.2.1”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件分别于0、2、5、8、15、24 h进样分析,记录24 h内峰面积,计算RSD。结果桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯、麝香草酚峰面积RSD分别为0.71%、0.69%、0.57%、0.77%。表明样品在24 h内的稳定性良好。

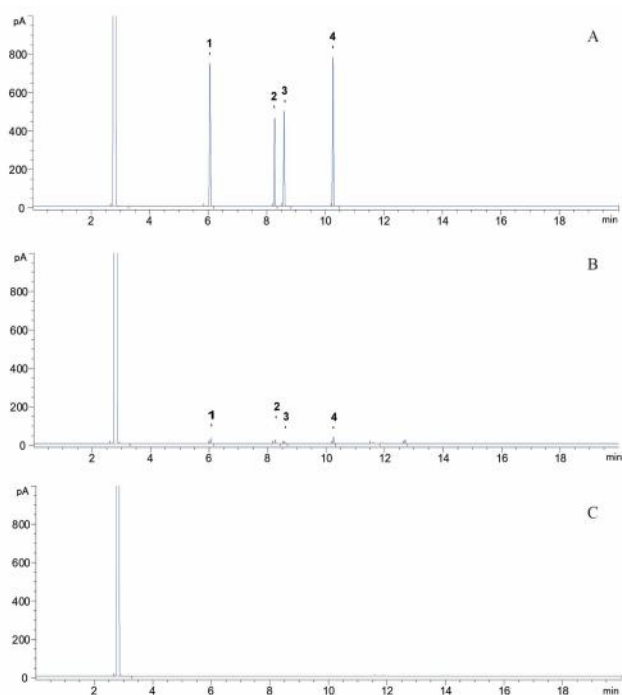


图 1 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B)、阴性样品溶液 (C) 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms of mixed control solution (A), sample solution (B) and negative sample solution (C)

1. 桉叶油素 (eucalyptol); 2. 薄荷脑 (menthol); 3. 水杨酸甲酯 (methyl salicylate); 4. 麝香草酚 (thymol)

表 1 4 种成分线性关系
Tab 1 Linearity of the 4 components

成分	回归方程	r	线性范围 / (mg · mL ⁻¹)
桉叶油素	y = 9.7947x + 0.1442	0.9976	0.1065 ~ 0.5323
薄荷脑	y = 10.175x + 0.0545	0.9979	0.0437 ~ 0.2185
水杨酸甲酯	y = 6.7482x + 0.039	0.9979	0.0582 ~ 0.2910
麝香草酚	y = 11.339x + 0.0922	0.9978	0.0658 ~ 0.3289

2.7 重复性试验

取同一批次的样品 6 份 (批号: 181103), 按“2.2.1”项下方法制备, 进样测定, 计算峰面积的 RSD, 结果桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯、麝香草酚、内标正十六烷峰面积 RSD 分别为 1.1%、0.33%、0.39%、0.31%、0.33%, 表明方法重复性良好。

2.8 中间精密度试验

取同一批次的样品 6 份 (批号: 181103), 由另外一人按“2.2.1”项下方法制备, 进样测定, 计算峰面积的 RSD, 结果桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯、麝香草酚、内标正十六烷峰面积 RSD 分别为 0.54%、0.44%、0.23%、0.28%、0.15%, 表明方法中间精密度良好。

2.9 加样回收试验

在处方量不含桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯、麝香草酚的空白溶液中分别加入处方量 80%、100%、

120% 的对照品 (n = 3), 按“2.2”项下方法制备溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 考察方法的准确度。结果桉叶油素、薄荷脑、水杨酸甲酯和麝香草酚 4 种成分低、中、高浓度的平均加样回收率分别在 98.39% ~ 101.63%、98.87% ~ 102.95%、99.11% ~ 103.34%、99.62% ~ 103.93%, RSD 均小于 3.0%, 结果表明该方法回收率良好。

2.10 耐用性试验

改变“2.1”项下色谱条件, 包括进样口温度 (245、255 °C)、流速 (0.9、1.1 mL · min⁻¹)、检测器温度 (245、255 °C)、分流比 (28 : 1、32 : 1), 取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液进样测定。计算供试品溶液中 4 种挥发性成分的含量。所有条件下测得的 4 种挥发性成分含量 RSD 均 ≤ 5.0%, 说明方法耐用性良好。

2.11 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 平行测定 2 次, 记录峰面积并计算样品含量, 结果见表 2。

表 2 3 批口腔抑菌液样品含量测定结果 (mg · mL⁻¹)

Tab 2 Content of 3 batches of oral antibacterial solution samples (mg · mL⁻¹)

样品批号	含量			
	桉叶油素	薄荷脑	水杨酸甲酯	麝香草酚
181205	0.088 85	0.390 62	0.551 50	0.650 57
181206	0.753 37	0.421 72	0.578 19	0.655 46
181128	0.792 32	0.398 33	0.506 15	0.615 06

3 讨论

口腔抑菌液中 4 种主要成分的沸点相差较大。故采用程序升温, 可缩短分析时间。经试验采用 80 °C 维持 1 min, 再以 10 °C · min⁻¹ 升温至 220 °C 维持 5 min 可使所测定的成分及杂质成分峰在 20 min 内全部出峰, 且待测峰分离度均大于 1.5。

口腔抑菌液中起关键作用的薄荷脑、麝香草酚、水杨酸甲酯和桉叶油素都具有挥发性, 容易在加工和贮存过程中损失, 所以对它们进行含量控制十分必要。本试验在同一色谱条件下同步测定了 4 种挥发性成分的含量, 减少了操作次数和试验误差, 提高了检测效率。试验结果显示, 本方法操作简单, 稳定可靠, 重复性、耐用性良好, 值得在含有相同挥发性成分的其他产品中推广应用^[13]。

参考文献

- [1] 徐春生. 中国口腔清洁护理用品技术发展的现状与趋势 [J]. 日用化学品科学, 2019, 42 (8): 11-16.
- [2] 刘彦宏. 中国口腔清洁护理用品行业发展概况 [J]. 日用化学品科学, 2022, 45 (9): 7-9.

- [3] Braga PC, Alfieri M, Culici M, et al. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae [J]. *Mycoses*, 2007, 50 (6): 502-506.
- [4] Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49 (6): 2474-2478.
- [5] Ahmad A, Khan A, Akhtar F, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30 (1): 41-50.
- [6] Pina Vaz C, Pinto E, Tavares C, et al. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds [J]. *J Eur Acad Dermatol*, 2004, 18 (1): 73-78.
- [7] 陈伟, 杨珺, 杨谨成, 等. HPLC 法同时测定复方麝香草酚溶液中 3 种有效成分的含量 [J]. *中国药房*, 2016, 27 (15): 2119-2121.
- [8] 林冬杰, 梁慧敏, 李澄, 等. 气相色谱法测定李施德林漱口水中桉油精、薄荷脑的含量 [J]. *医药前沿*, 2017, 7 (26): 387-388.
- [9] 钱敏, 宋冬梅, 乐健. 复方水杨酸甲酯苯海拉明喷雾剂中 5 个活性成分的含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43 (1): 70-76.
- [10] 聂红梅, 熊维政, 武惠斌. 气相色谱法同时测定消炎镇痛膏中 5 种组分含量 [J]. *中医学报*, 2015, 30 (5): 711-713.
- [11] 徐方方, 赵晶晶, 韩晓东, 等. 气相色谱-质谱-选择离子监测法测定漱口水中挥发性成分的含量 [J]. *分析试验室*, 2015, 34 (2): 139-142.
- [12] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 1833.
- [13] 黄传俊, 陈云, 曾博程, 等. 气相色谱法同时测定麝香追风止痛膏中 5 种挥发性成分的含量 [J]. *中国药房*, 2018, 29 (14): 1931-1935.
- (收稿日期: 2024-04-05; 修回日期: 2024-07-06)

高效液相色谱指纹图谱联合一测多评法评价 尿毒清颗粒的质量

赵晓强^{1, 2}, 袁波¹, 张雨萌¹, 王淼¹, 赵旻^{1*} (1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 深圳市康哲药业有限公司, 广东 深圳 518057)

摘要: **目的** 建立尿毒清颗粒高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并采用一测多评法测定其中 5 种成分的含量。**方法** 以高效液相色谱法建立尿毒清颗粒的指纹图谱; 以芍药苷为内标, 确定原儿茶酸、咖啡酸、甘草素、芦荟大黄素的相对校正因子并进行含量计算; 同时采用外标法测定 5 种成分的含量, 比较计算值和实测值的差异。**结果** 指认了 26 个共有峰, 10 批样品相似度均在 0.99 以上。一测多评法和外标法计算的 5 种化合物的含量无显著差异, 相对误差小于 5.0%。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱和一测多评法可用于尿毒清颗粒的质量评价。

关键词: 尿毒清颗粒; 高效液相色谱指纹图谱; 一测多评法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0548-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.041

Quality evaluation of Niaoduqing granules with HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-components by single-marker method

ZHAO Xiao-qiang^{1, 2}, YUAN Bo¹, ZHANG Yu-meng¹, WANG Miao¹, ZHAO Min^{1*} (1. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016*; 2. *China Medical System Holdings Limited, Shenzhen Guangdong 518057*)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Niaoduqing granules, and determine the content of 5 components by quantitative analysis of multi-components by single-marker method (QAMS). **Methods** The fingerprint of Niaoduqing granules was established by HPLC. The relative correction factors of protocatechuic acid, caffeic acid, liquiritigenin, and aloe emodin were determined

作者简介: 赵晓强, 男, 硕士, 主要从事基于组学技术的中药现代化研究, email: 409782265@qq.com *通信作者: 赵旻, 女, 硕士研究生导师, 主要从事基于组学技术的中药现代化研究与中药辅助化疗药物的减毒增效作用研究, email: zm19871224@sina.com

with paeoniflorin as the internal standard and the content of the 5 components were determined by the external standard method. We compared the differences between the calculated and measured values.

Results Totally 26 common peaks were identified. The similarity of 10 samples was above 0.99. The content of the 5 components calculated by the multiple evaluation method was not significantly different, and the relative error was less than 5.0%. **Conclusion** The HPLC fingerprint and QAMS method can be used for the quality evaluation of Niaoduqing granules.

Key words: Niaoduqing granule; HPLC fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single-marker method

尿毒清颗粒是一种中药复方,由大黄、黄芪、白术、白芍、车前草、丹参、苦参、苍术、茯苓和甘草等十味药组成,其中大黄、黄芪和丹参为君药,具有利水消肿、活血祛瘀、补气养血的功效;白术、党参和茯苓共为臣药,具有调和脾胃、增强体质和补益精血的功效;白芍与车前草为佐药,养血止痛;甘草为使药,用于辅助治疗心气不足。尿毒清颗粒可减少蛋白尿,稳定肾功能,对肾病综合征等肾脏疾病有疗效^[1]。临床上常用于治疗肠道失调、炎症、高血压和早期肾病等^[2-3]。尿毒清颗粒作为康臣药业的核心产品,是中国第一个批准治疗慢性肾脏病的中成药,是中药治疗肾病的龙头品种,大量研究表明,尿毒清颗粒辅助治疗慢性肾功能衰竭临床疗效显著,可有效改善患者肾功能,且安全性高。但其有效成分对质量控制及药理研究的影响尚未见相关研究^[1, 3-5]。

中药复方具有多方面的协同作用,因此确定中药的化学成分成为物质基础研究的前提^[6]。物质基础是质量控制的关键^[7]。目前对尿毒清颗粒物质基础的研究仅限于指标成分的含量检测或单一的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱方法,不能充分反映尿毒清颗粒的质量。

与单一指纹图谱相比,指纹图谱与多组分含量测定相结合解决了中药含量测定的完整性与特殊性、准确性与歧义性等问题。一测多评法(QAMS)最早由王志民教授提出^[8],可对中药中多种成分进行高效、准确的定量分析。

本研究对康臣药业所提供的10批尿毒清颗粒进行研究,将液相指纹图谱和QAMS相结合,建立尿毒清颗粒HPLC指纹图谱,开展化学成分归属研究,全面评价其质量,以确保制剂质量均一、有效、安全。

1 仪器与试药

1.1 仪器

十万分之一 Sartorius BT 125D 型精密电子天平(德国 Sartorius 公司); Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); KQ-100DE 超声波

清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

纯化水(杭州娃哈哈集团有限公司); 乙腈、甲醇、无水乙醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司); 甲酸(色谱纯,成都市科龙化工试剂厂)。

原儿茶酸(批号:110809-201906)、咖啡酸(批号:110885-201703)、芍药苷(批号:110736-201943)、甘草苷(批号:111610-202209)(纯度均 $\geq 98.0\%$,上海源叶生物科技有限公司),甘草素(HPLC $\geq 98.0\%$,批号:100927,上海融禾医药科技有限公司),芦荟大黄素(HPLC $\geq 98.0\%$,批号: MUST-22090914,成都曼思特生物科技有限公司)。

尿毒清颗粒[规格:5 g/袋,批号分别为20210625、20210746、20211038、20211029、20211159、20210624、20211267、20211233、20211213、20211202,编号为s1~s10,内蒙古康臣药业(霍尔果斯)有限公司]。大黄(批号:211101CP010,产地:四川),黄芪(批号:21112001,产地:甘肃),桑白皮(批号:2109067,产地:四川),苦参(批号:13017,产地:河北),车前草(批号:2109009,产地:江西),茯苓(批号:221208CP212,产地:安徽),甘草(批号:170701,产地:甘肃),丹参(批号:21120301,产地:山东),苍术(批号:181214,产地:亳州),白术(批号:A211116,产地:安徽)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Spherisorb XB-C18 色谱柱(4.0 mm \times 250 mm, 5 μ m, Waters); 流动相为乙腈(A)和0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~10%A; 10~45 min, 10%~30%A; 45~55 min, 30%~50%A; 55~65 min, 50%~80%A; 65~70 min, 80%~100%A; 70~73 min, 100%~5%A);柱温:35 $^{\circ}$ C,进样量:10 μ L,流速:1 mL \cdot min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

① 混合对照品溶液 1:精密称取原儿茶酸、

咖啡酸、芍药苷、甘草苷、甘草素和芦荟大黄素对照品适量，置于 5 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，振荡摇匀，得质量浓度约为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。取各储备液适量，稀释成质量浓度约 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 1。

② 混合对照品溶液 2：分别精密量取原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素和芦荟大黄素对照品储备液适量，稀释成原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷和甘草素质量浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，芦荟大黄素质量浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 2。

③ 混合对照品溶液 3：分别量取原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素和芦荟大黄素对照品储备液 160、180、120、200、60 μL 于离心管中，混合均匀，得混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 5 袋尿毒清颗粒置于研钵中，磨成粉末，过 80 目筛，并精密称取 2.03 g 置于 10 mL 量瓶中，加入适量 50% 乙醇，超声 30 min，用 50% 乙醇定容至刻度，室温静置，取上层清液， $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上层清液，过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜，即得。

2.2.3 单味药材的制备 精密称取大黄、黄芪、白术、白芍、车前草、丹参、苦参、苍术、茯苓和甘草药材各 2 g，分别置于 10 mL 量瓶中加入适量 50% 乙醇，超声 30 min，用 50% 乙醇定容至刻度，室温静置，取上层清液， $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上层清液，过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜，进高效液相色谱仪分析。

2.3 指纹图谱和化学计量学分析

2.3.1 精密度试验 取尿毒清颗粒（批号为 20210625），按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，测得共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 分别在 $0.50\% \sim 1.0\%$ 和 $1.3\% \sim 5.0\%$ ，表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取尿毒清颗粒样品（批号为 20210625），按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样分析，测得共有峰的相对保留时间的 *RSD* 在 $0.30\% \sim 0.70\%$ ，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0% ，表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取尿毒清颗粒样品（批号为 20210625），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、16、24 h 分别进样分析，测得各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.40% ，相对峰面积的 *RSD* 在 $1.3\% \sim 1.8\%$ ，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立 取混合对照品溶液 1 和 10 批供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行分析。

共选取 26 个共有峰，选择 8 号峰为参比峰，采用中位数法生成对照图，见图 1A，并采用多点校正使色谱图中各批次的峰的保留时间一致。将 26 个共有峰的保留时间与混合对照品溶液 1 的保留时间进行比较，峰 8、12、13、15、21 和 25 分别被鉴定为原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草苷、甘草素和芦荟大黄素。混合对照品溶液 1 的色谱图如图 1B 所示。10 批尿毒清颗粒的指纹图谱如图 2 所示。

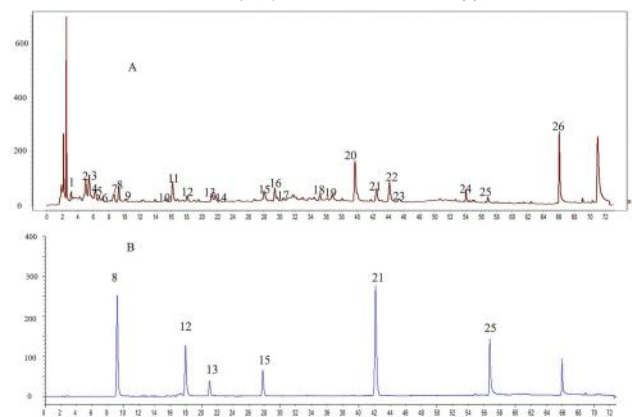


图 1 10 批尿毒清颗粒的对照图 (A) 和混合对照品色谱图 (B)

Fig 1 Control (A) and mixed control (B) chromatograms of 10 batches of Niaoduqing granules

8. 原儿茶酸 (protocatechin acid); 12. 咖啡酸 (caffeic acid); 13. 芍药苷 (paeoniidin); 15. 甘草苷 (liquiritin); 21. 甘草素 (liquiritigenin); 25. 芦荟大黄素 (aloe emodin)

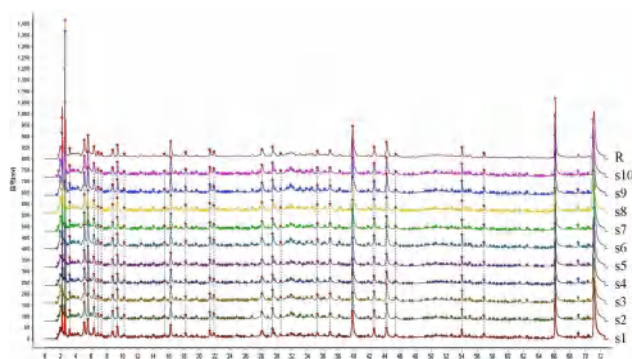


图 2 10 批尿毒清颗粒的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint of 10 batches of Niaoduqing granules

2.3.5 共有峰的归属 取“2.2.3”项下单味药材的供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，通过保留时间对比分析得知指纹图谱中 26 个共有峰的归属。其中 1 号色谱峰来源于白术、车前草、苦参和茯苓，2 号色谱峰来源于大黄，3 号色谱峰来源于黄芪，4、7 号色谱峰来源于苦参，5 号色谱峰来源于大黄和白芍，6 号色谱峰来源于白术和车前草，8 号色谱峰来源于大黄和苦参，9 号色谱峰来源于黄芪、车前草和苦参，10 号色谱峰来源于车前草，11、13 号色谱峰来源于白芍，12 号色谱峰来源于大黄、黄芪、车前草和苦参，14 号色谱峰来源于白术、苍术、苦参和甘草，15 号色谱峰

来源于大黄、白芍和苦参，16 号色谱峰来源于白芍和苦参，17 号色谱峰来源于大黄、黄芪、白芍、车前草和苦参，18、20 号色谱峰来源于大黄、黄芪和苦参，19 号色谱峰来源于白术和苦参，21 号色谱峰来源于大黄、黄芪、苦参、丹参和甘草，22 号色谱峰来源于车前草和甘草，23 号色谱峰来源于苦参、丹参和甘草，24 号色谱峰来源于大黄、

黄芪、车前草、苦参和甘草，25 号色谱峰来源于黄芪、苦参和甘草，26 号色谱峰来源于白术、车前草、丹参和甘草。具体见图 3。通过对制剂与原药材的指纹图谱进行比对，发现制剂与原药材的成分存在显著差异，可能是因为中药的化学成分都非常复杂，包含各种类型的有机和无机化合物，其组成复方中药时各成分之间发生反应和转化所致。

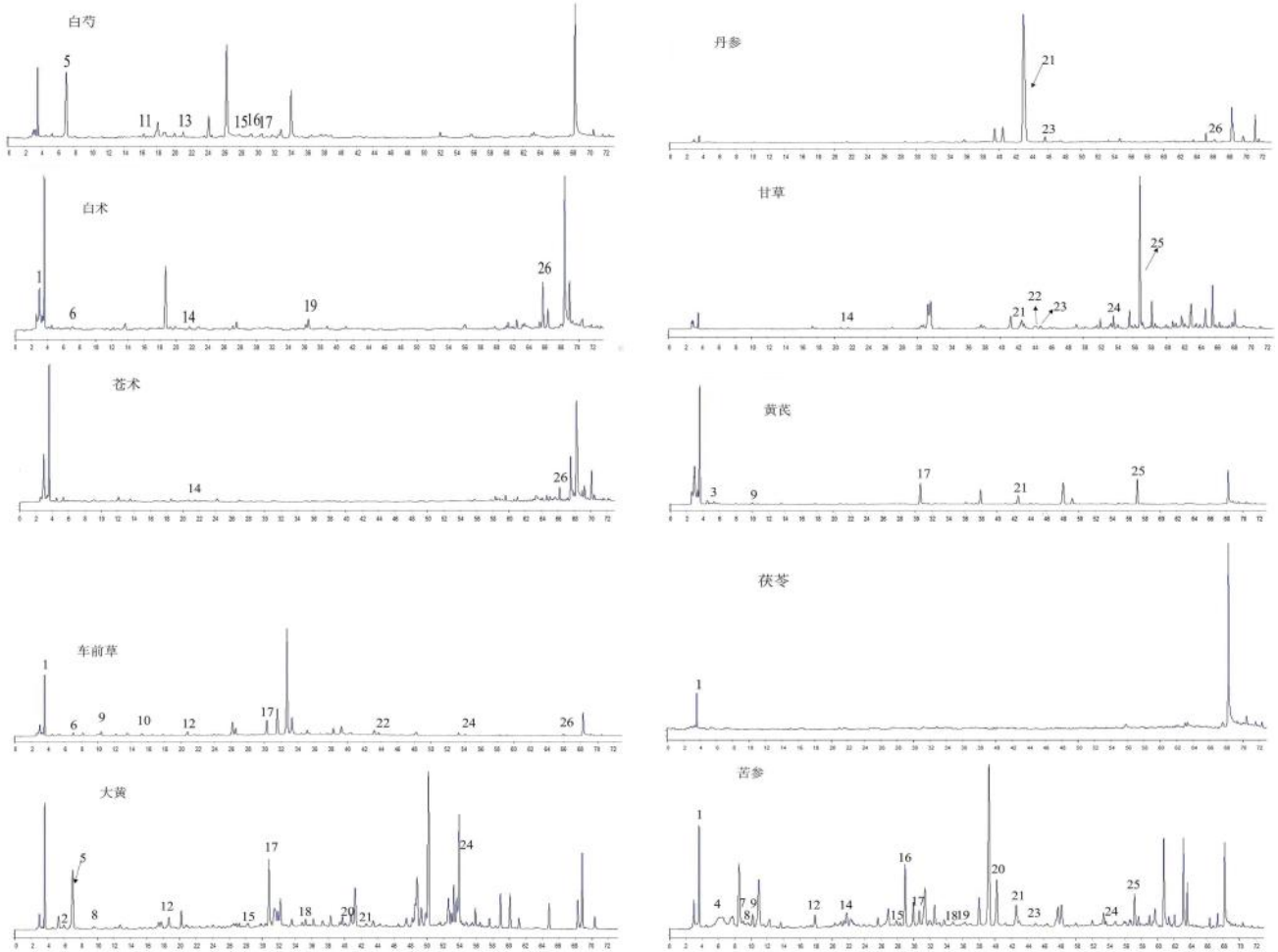


图 3 尿毒清颗粒指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig 3 Chromatograms of common peaks in the fingerprint of Niaoduqing granules

8. 原儿茶酸 (protocatechin acid); 12. 咖啡酸 (caffeic acid); 13. 芍药苷 (paeoniidin); 15. 甘草苷 (liquiritin); 21. 甘草素 (liquiritigenin); 25. 芦荟大黄素 (aloe emodin)

2.3.6 相似度评价 对 10 批样品生成的指纹图谱进行相似度评价，相似度计算为 > 0.99 ，相似度良好，结果见表 1。各共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 2~3。结果表明，10 批尿毒清颗粒的特征图谱均呈现出 26 个共有峰，图谱相似度评价结果均大于 0.99，说明尿毒清颗粒不同批次之间相似度较好，成分差异较小，现行生产工艺能够保证生产得到的尿毒清颗粒的一致性。

2.3.7 层次聚类分析 采用 Origin 21 对 10 批尿毒清颗粒进行层次聚类分析，以 26 个共有峰的峰面积为变量，结果以热图的形式呈现，如图 4 所示。

表 1 10 批尿毒清颗粒的相似度

Tab 1 Similarity of 10 batches of Niaoduqing granules

编号	相似度	编号	相似度
s1	0.993	s6	0.995
s2	0.994	s7	0.998
s3	0.997	s8	0.998
s4	0.992	s9	0.996
s5	0.993	s10	0.995

不同批次的尿毒清颗粒的相似程度取决于热图，结果显示，热图将 10 个批次的样品溶液分成两个类别，类别 1 包括 s1、s2、s3、s4、s5、s7、s8，类别 2 包括 s6、s9、s10。

表 2 10 批尿毒清颗粒中各共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention times of each common peak in the 10 batches of Niaoduoqing granules

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
s1	0.342	0.543	0.593	0.675	0.731	0.778	0.933	1	1.093	1.645	1.726	1.935	2.274
s2	0.341	0.539	0.590	0.673	0.729	0.775	0.933	1	1.093	1.649	1.731	1.941	2.279
s3	0.343	0.540	0.591	0.674	0.729	0.777	0.933	1	1.094	1.649	1.734	1.943	2.278
s4	0.342	0.543	0.593	0.675	0.730	0.777	0.933	1	1.093	1.648	1.732	1.939	2.270
s5	0.342	0.542	0.592	0.674	0.729	0.777	0.931	1	1.093	1.648	1.732	1.937	2.272
s6	0.340	0.539	0.593	0.673	0.726	0.777	0.927	1	1.092	1.641	1.723	1.931	2.253
s7	0.342	0.542	0.593	0.675	0.731	0.778	0.932	1	1.093	1.647	1.735	1.940	2.276
s8	0.343	0.541	0.592	0.674	0.728	0.778	0.931	1	1.093	1.643	1.731	1.934	2.269
s9	0.345	0.542	0.593	0.676	0.738	0.777	0.934	1	1.094	1.653	1.742	1.946	2.286
s10	0.345	0.542	0.593	0.676	0.730	0.777	0.933	1	1.095	1.651	1.741	1.942	2.281

No.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
s1	2.329	2.991	3.140	3.252	3.752	3.928	4.237	4.539	4.711	4.831	5.743	6.050	7.030
s2	2.338	3.000	3.145	3.254	3.759	3.934	4.244	4.545	4.714	4.839	5.749	6.059	7.037
s3	2.335	2.995	3.141	3.252	3.762	3.937	4.249	4.548	4.716	4.840	5.750	6.059	7.037
s4	2.326	2.988	3.133	3.243	3.746	3.920	4.231	4.530	4.705	4.827	5.736	6.044	7.018
s5	2.328	2.990	3.140	3.251	3.757	3.936	4.248	4.546	4.715	4.836	5.739	6.051	7.022
s6	2.316	2.970	3.114	3.220	3.715	3.883	4.190	4.487	4.655	4.777	5.679	5.981	6.948
s7	2.332	2.993	3.140	3.252	3.758	3.931	4.243	4.539	4.715	4.840	5.758	6.061	7.041
s8	2.323	2.984	3.131	3.244	3.748	3.921	4.232	4.527	4.704	4.829	5.752	6.053	7.033
s9	2.340	3.011	3.157	3.272	3.780	3.951	4.265	4.562	4.740	4.868	5.795	6.099	7.085
s10	2.333	3.003	3.150	3.266	3.772	3.943	4.256	4.552	4.730	4.857	5.785	6.087	7.073

表 3 10 批尿毒清颗粒中各共有峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of each common peak in the 10 batches of Niaoduoqing granules

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
s1	0.470	1.621	1.352	1.084	0.478	0.490	0.841	1	0.575	0.477	1.322	0.738	0.915
s2	0.492	1.771	1.556	1.248	0.520	0.659	0.969	1	0.652	0.564	1.467	0.759	0.884
s3	0.458	1.767	1.894	1.054	0.540	0.523	0.857	1	0.613	0.560	1.357	0.750	0.894
s4	0.527	1.747	1.512	1.217	0.521	0.594	0.865	1	0.613	0.543	1.414	0.709	0.907
s5	0.491	1.693	1.388	1.097	0.511	0.544	0.874	1	0.710	0.516	1.324	0.754	0.867
s6	0.427	1.635	1.787	0.952	0.504	0.531	0.799	1	0.624	0.476	1.230	0.598	0.866
s7	0.464	1.632	1.407	1.064	0.481	0.582	0.842	1	0.605	0.510	1.328	0.768	0.907
s8	0.538	1.524	1.666	0.931	0.466	0.480	0.783	1	0.624	0.462	1.196	0.709	0.714
s9	0.581	1.693	1.955	1.029	0.539	0.548	0.921	1	0.612	0.809	1.339	0.751	0.872
s10	0.577	1.638	1.880	1.025	0.517	0.530	0.846	1	0.644	0.797	1.302	0.732	0.820

No.	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
s1	0.701	1.812	0.875	0.720	0.883	1.391	3.162	1.312	1.668	0.938	0.698	0.707	4.040
s2	0.822	2.041	1.596	0.698	0.887	1.698	3.028	1.110	2.014	1.041	0.678	0.626	3.514
s3	0.771	1.739	1.485	0.697	0.962	1.687	3.471	1.254	2.065	1.046	0.774	0.635	3.238
s4	0.759	1.365	0.957	0.663	0.827	1.588	3.051	1.166	1.871	0.944	0.714	0.672	4.366
s5	0.707	1.282	0.961	0.703	0.951	1.588	3.305	1.302	1.980	1.022	0.708	0.688	4.270
s6	0.694	1.510	1.338	0.667	0.812	1.472	2.846	1.118	1.856	0.669	0.666	0.560	2.720
s7	0.712	1.287	0.919	0.669	0.799	1.318	3.176	1.228	1.861	0.986	0.727	0.710	3.542
s8	0.557	1.163	0.810	0.607	0.713	1.256	2.850	1.120	1.552	0.709	0.583	0.617	2.928
s9	0.770	1.310	0.944	0.644	0.800	1.613	3.040	1.262	2.013	0.952	0.740	0.652	2.979
s10	0.741	1.239	0.893	0.626	0.799	1.625	3.129	1.240	1.898	0.964	0.707	0.631	2.861

2.3.8 主成分分析 (PCA) 采用 SIMCA14.1 对 10 批尿毒清颗粒中进行 PCA。PCA 得分图如图 5 所示。批次 s1、s2、s3、s4、s5、s7、s8 可以归为一类，s6、s9、s10 归为一类。分类结果与层次聚类分析的结果一致。

2.3.9 正交偏最小-二乘判别分析 (OPLS-DA) 为了显示不同批次之间的异同，使用 SIMCA

14.1 软件进行 OPLS-DA。结果如图 6 所示， R^2X (0.853)、 R^2Y (0.848) 和 Q^2Y (0.531) 均大于 0.5，表明所建立的数学模型具有准确的预测性。经过 200 次响应排序检验，如图 7 所示，由于 Q^2Y 回归线与纵轴相交的点小于 0，没有出现过拟合现象，证实了模型的有效性，该结果可用于尿毒清颗粒的差异成分鉴别分析。选取 $VIP > 1$ 的峰值，

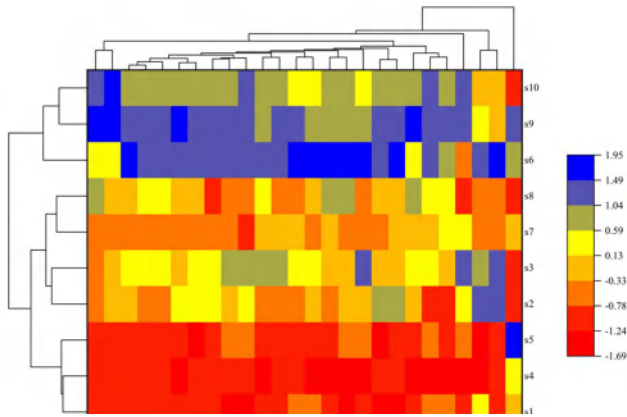


图 4 10 批尿毒清颗粒的聚类分析热图
Fig 4 Heat map of 10 batches of Niaoduoqing granules

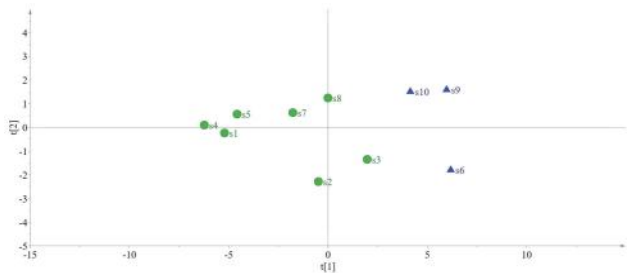


图 5 10 批尿毒清颗粒的 PCA 得分图
Fig 5 PCA scores of 10 batches of Niaoduoqing granules

筛选出 22 个影响样品批次质量差异的主要变量；贡献率：峰 5 > 峰 21 (甘草素) > 峰 3 > 峰 24 > 峰 7 > 峰 2 > 峰 22 > 峰 11 > 峰 8 (原儿茶酸) > 峰 25 (芦荟大黄素) > 峰 20 > 峰 13 (芍药苷) > 峰 19 > 峰 9 > 峰 14 > 峰 10 > 峰 1 > 峰 17 > 峰 12 (咖啡酸) > 峰 4 > 峰 6 (见图 8)。结合对照品比对结果，选取峰 8、峰 12、峰 13、峰 21、峰 25 作为评价尿毒清颗粒质量控制的依据。

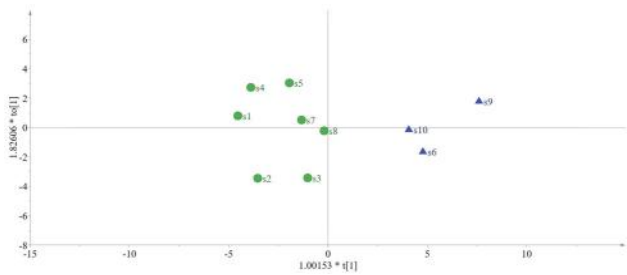


图 6 10 批尿毒清颗粒的 OPLS-DA 得分图
Fig 6 OPLS-DA scores of 10 batches of Niaoduoqing granules

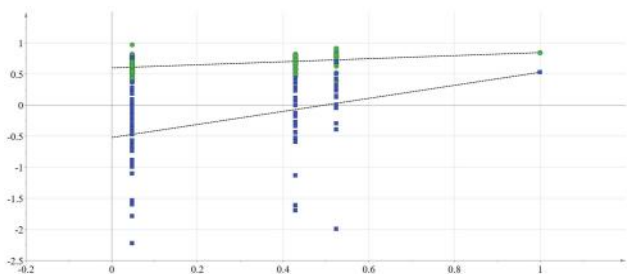


图 7 OPLS-DA 模型的 200 次响应排序检验
Fig 7 200 response sequencing tests of the OPLS-DA model

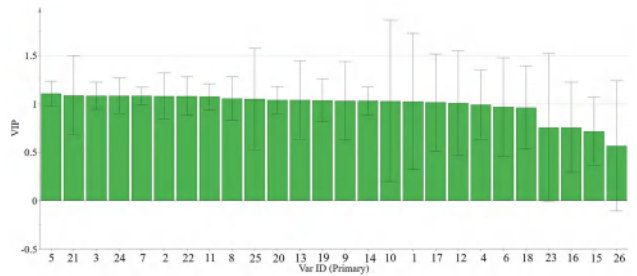


图 8 10 批尿毒清颗粒的 OPLS-DA 的 VIP 值图
Fig 8 VIP values of OPLS-DA of 10 batches of Niaoduoqing granules

2.4 含量测定

研究显示，原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素和芦荟大黄素在肾衰竭中都具有潜在的治疗作用^[9-10]。结合指纹图谱分析结果，本研究选择这 5 种成分进行定量。

2.4.1 线性关系考察 从混合对照品溶液 2 中量取 20、40、100、200、400、800、1000 μL 置于 1 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，制得系列质量浓度的标准曲线溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。以对照品溶液的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，进行线性回归分析，结果见表 4。

表 4 原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素和芦荟大黄素的线性关系和范围

Tab 4 Linearity and ranges of protocatechuic acid, caffeic acid, paeoniidin, liquiritigenin and aloe emodin

成分	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸	$y = 15.10x + 468.5$	0.9999	10.00 ~ 500.0
咖啡酸	$y = 13.09x + 391.1$	0.9997	10.00 ~ 500.0
芍药苷	$y = 10.18x + 528.9$	0.9999	10.00 ~ 500.0
甘草素	$y = 6.423x + 919.9$	0.9999	10.00 ~ 500.0
芦荟大黄素	$y = 14.53x + 123.3$	0.9997	5.000 ~ 250.0

2.4.2 精密度考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液 2，用甲醇稀释成一定浓度，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，结果显示原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素峰面积的 *RSD* 均小于 1.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性考察 取尿毒清颗粒样品 (批号为 20210625)，按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，结果显示原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性考察 取尿毒清颗粒样品 (批号为 20210625)，按照“2.2.2”项下方法制备，于 0、2、4、8、16、24 h 分别进样分析，结果显示原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率考察 精密称取已知含量的尿

毒清颗粒(批号为 20210625) 6 份, 每份约 1.0 g, 精密称定, 分别精密加入相当于原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素含量 100% 的混合对照品溶液 3, 每个浓度平行制备 3 份, 按照“2.2.2”项下方法制备, 进样测定, 结果表明, 原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素低、中、高浓度的回收率均在 97.70% ~ 99.71%, *RSD* 均小于 1.0%, 表明样品回收率良好。

2.5 QAMS

2.5.1 相对校正因子(RCF)的计算 目前常用的计算和校正 RCF 的方法有多点校正法和斜率校正法^[11-12]。多点校正法对被测物体的浓度有严格的要求, 即使一两个点的微小偏差也会显著影响整体平均值。斜率校正法可以使用几个不同浓度的点来获得准确的结果。故本研究采用斜率校正法, 以芍药苷为内标, 计算其含量。

2.5.2 RCF 的影响因素考察 采用不同的仪器(Agilent 1260, Agilent 1100), 不同的色谱柱[包括 Universl XB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), Spherisorb XB-C18 (4.0 mm×250 mm, 5 μm) 和 Venusil ASB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)], 测得的 RCF 的 *RSD* 值为 1.3% ~ 2.0%, 表明仪器或色谱柱之间没有观察到显著差异。考察不同柱温和进样量对 RCF 的影响, 测得的相对校正因子的 *RSD* 值分别在

0.11% ~ 0.34% 和 0.16% ~ 1.3%, 表明柱温和进样量对 RCF 的影响可以忽略不计。表 5 显示的结果表明, 仪器或色谱柱之间没有观察到显著差异。

2.5.3 色谱峰的定位 采用相对保留时间法来定位色谱峰, 以芍药苷为参照峰对待测组分进行峰定位, 结果如表 5 所示, 各成分的相对保留时间的 *RSD* 均小于 2.0%, 表明采用相对保留时间法对待测成分进行峰定位是可行的。

表 5 仪器和色谱柱对尿毒清颗粒中 5 种成分相对保留时间的影响
Tab 5 Effect of instruments and columns on the relative retention time of 5 components in Niaoduqing granules

仪器及色谱柱		原儿茶酸	咖啡酸	甘草素	芦荟大黄素
Agilent 1260	Universl XB-C18	0.440	0.851	1.996	2.660
	Spherisorb XB-C18	0.439	0.859	1.985	2.641
	Venusil ASB-C18	0.431	0.866	2.015	2.652
Agilent 1100	Universl XB-C18	0.448	0.842	1.978	2.667
	Spherisorb XB-C18	0.432	0.834	2.003	2.664
	Venusil ASB-C18	0.424	0.838	1.992	2.655
平均值		0.436	0.848	1.995	2.657
<i>RSD</i> /%		1.9	1.5	0.66	0.36

2.5.4 样品含量测定 采用 QAMS 和外标法测定 5 种化合物的浓度, 用相对误差 (*RE*) 计算两者之间的偏差。表 6 显示了两种方法计算的 10 个样品批次中这 5 种化合物的含量。*RE* 值均小于 5.0%, 说明两种方法的化合物含量差异不显著。

表 6 尿毒清颗粒中 5 种成分含量测定结果 (mg · g⁻¹)
Tab 6 Content of 5 components in Niaoduqing granules (mg · g⁻¹)

No.	芍药苷		原儿茶酸		咖啡酸			甘草素			芦荟大黄素		
	ESM	ESM	QAMS	<i>RE</i> /%	ESM	QAMS	<i>RE</i> /%	ESM	QAMS	<i>RE</i> /%	ESM	QAMS	<i>RE</i> /%
s1	0.1351	0.136	0.1397	2.74	0.0985	0.0962	- 2.4	0.1818	0.1767	- 2.81	0.0515	0.0538	4.53
s2	0.1623	0.1669	0.1737	4.1	0.1227	0.123	0.27	0.1842	0.1859	0.91	0.066	0.0634	- 3.91
s3	0.1598	0.1946	0.189	- 2.86	0.1366	0.1322	- 3.26	0.237	0.2286	- 3.56	0.0671	0.0648	- 3.44
s4	0.1555	0.147	0.1429	- 2.76	0.1226	0.1273	3.89	0.1854	0.1942	4.72	0.0561	0.0581	3.42
s5	0.1609	0.149	0.1551	4.11	0.1049	0.109	3.84	0.1888	0.1947	3.13	0.0622	0.0606	- 2.53
s6	0.1657	0.2286	0.2238	- 2.09	0.1383	0.1358	- 1.75	0.2126	0.2103	- 1.1	0.0723	0.0709	- 1.9
s7	0.1853	0.186	0.1934	3.98	0.144	0.1385	- 3.84	0.2402	0.229	- 4.63	0.0684	0.0703	2.81
s8	0.1539	0.2055	0.2039	- 0.79	0.1399	0.1347	- 3.74	0.2125	0.2201	3.61	0.0625	0.0648	3.64
s9	0.1695	0.2327	0.2259	- 2.92	0.1641	0.1582	- 3.56	0.2306	0.2219	- 3.8	0.0672	0.0699	3.97
s10	0.1725	0.2308	0.2216	- 3.97	0.1551	0.1514	- 2.44	0.2326	0.2293	- 1.43	0.0689	0.0711	3.16
平均	0.1621	0.1877	0.1869	- 0.05	0.1327	0.1306	- 1.30	0.2106	0.2091	- 0.50	0.0642	0.0648	0.98

3 讨论

3.1 前处理方法和色谱条件的考察

在供试品制备方法中, 采用单因素考察方法分别考察了不同提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇), 不同提取方式(加热、回流), 不同提取时间(20、30、40 min) 和不同提取溶媒用量(15、25、40 mL) 对色谱峰峰形及峰面积的影响, 结果采用 50% 乙醇溶液, 超声时间为 30 min 时, 各色谱峰峰形及分离度较好, 特征峰响应值较高。样

品检测时采用 UVD 检测器对尿毒清颗粒供试品溶液进行了扫描, 发现在 245 nm 下色谱峰数较多且各峰之间的分离度较好。对不同流动相(甲醇-水、乙腈-0.1% 甲酸和乙腈-0.1% 磷酸)、不同柱温(20、25、30 和 35 °C) 进行考察, 结果表明, 色谱柱温度为 35 °C, 流动相由乙腈和 0.1% 甲酸组成时, 各色谱峰的分离效果较好, 基线稳定。HPLC 特征图谱和 QAMS 方法为在相同色谱条件下制备同一供试品溶液, 一次进样即可同时测定特征图谱

和 QAMS 检测 5 种成分含量, 方法整合后, 缩短了样品制备和检测时间, 提高了试验效率。

3.2 指标成分的考察

本研究选取的指标成分, 与尿毒清颗粒的有效性相关联, 原儿茶酸、咖啡酸、芍药苷、甘草素、芦荟大黄素这 5 种成分在肾衰竭中都具有潜在的治疗作用^[11-12], 因此同时测定这 5 种成分含量对尿毒清颗粒的质量控制具有重要意义。

尿毒清颗粒中 QAMS 定量检测参照成分选择的芍药苷是 2020 年版《中国药典》控制尿毒清颗粒质量评价的主要指标性成分, 高纯度的对照品易得到, 且计算其他成分的准确度又高, 故本试验首选芍药苷作为尿毒清颗粒中 QAMS 定量检测的参照成分。在缺少其他对照品的情况下, 采用 RCF 及定位方法可以很好地利用一个对照品完成多个成分的含量测定。

3.3 批次差异的考察

聚类分析及 PCA 可将 10 批尿毒清颗粒分成两类。由聚类分析结果可看出, 虽然不同批次尿毒清颗粒存在差异, 但没有明显地进行内部分类, 说明尿毒清颗粒批次之间差异较小, 制备工艺较为稳定。批次之间的药物差异可能与多种因素有关, 如原料药生长年份和采收季节的不同及生产流程的细微影响都可能导致差异, 另外药物粉碎细度不够、纤维性或富有弹性药物而混合不均, 也有可能各批次之间的称量产生误差。

4 结论

本研究采用颗粒剂特征图谱、聚类分析和 PCA、指标成分含量测定等方法, 整体地评价尿毒清颗粒的质量, 并对 10 批配方颗粒一致性进行评价, 多维度评价不同批次尿毒清颗粒的质量, 并为其他颗粒研究提供思路。

参考文献

[1] Wang YL, Feng Y, Li MM, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of chronic kidney diseases: theories, ap-

plications, and mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 917975.

[2] Lu PH, Yu MC, Wei MJ, et al. The therapeutic strategies for uremic toxins control in chronic kidney disease [J]. *Toxins*, 2021, 13 (8): 573.

[3] Bai YF, Wang CL, Xu MZ, et al. The clinical effectiveness and safety of traditional Chinese medicine uremic clearance granule combined with high-flux hemodialysis in the treatment of uremic pruritus: a protocol for systematic review and meta analysis [J]. *Medicine*, 2021, 100 (25): e26423.

[4] Wang Y, Xie CL, Fu DL, et al. Clinical efficacy and safety of Chinese herbal medicine for Wilson's disease: a systematic review of 9 randomized controlled trials [J]. *Complement Ther Med*, 2012, 20 (3): 143-154.

[5] Zhao J, Ai J, Mo C, et al. Comparative efficacy of seven Chinese patent medicines for early diabetic kidney disease: a bayesian network meta-analysis [J]. *Complement Ther Med*, 2022, 67: 102831.

[6] Tu YJ, Li LN, Wang ZT, et al. Advances in analytical techniques and quality control of traditional Chinese medicine injections [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2021, 206 (30): 114353.

[7] Lin AX, Chan G, Hu Y, et al. Internationalization of traditional Chinese medicine: current international market, internationalization challenges and prospective suggestions [J]. *Chin Med*, 2018, 13 (9): 1-6.

[8] Gao HM, Song ZH, Wang ZM, et al. Overview on quantitative analysis of multi-components by single-marker [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2012, 37 (4): 405-416.

[9] Wang X, Zhao Y, Qi X, et al. Quantitative analysis of metabolites in the aflatoxin biosynthesis pathway for early warning of aflatoxin contamination by UHPLC-HRMS combined with QAMS [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 431: 128531.

[10] Mai JN, Liang J, Liu XF, et al. Simultaneous determination of 5 components in the leaves of *Dimocarpus longan* by quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS) based on UPLC and HPLC [J]. *J Anal Methods Chem*, 2020, 2020: 3950609.

[11] Lin CY, Tsai SJ, Huang CS, et al. Antiglycative effects of protocatechuic acid in the kidneys of diabetic mice [J]. *Agric Food Chem*, 2011, 59 (5): 5117-5124.

[12] Huang CW, Lee SY, Wei TT, et al. A novel caffeic acid derivative prevents renal remodeling after ischemia/reperfusion injury [J]. *J Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 112028.

(收稿日期: 2024-04-17; 修回日期: 2024-10-27)

中药与临床

基于 FangNet 平台挖掘古籍中痛风病的用药规律

刘泽宇, 王雨, 殷晓阳, 胥亦, 黄锦坚, 刘亚迪, 林志健, 张冰* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 通过 FangNet 平台分析中医药 200 余本古籍中有关痛风病治疗的用药规律。**方法** 采用中医笈成网站检索并筛选痛风病的治疗用药, 使用 Microsoft Excel 建立方剂数据库, 分析所用中药频次、药物性味归经及功效分类, 应用 FangNet 平台, 开展核心药物分析、药物协同性分析及聚类分析。**结果** 本研究共纳入痛风病三个阶段方剂 410 首, 中药 547 味, 提取各阶段药性、药味及归经特征; 共统计核心药物 55 味; 分析得到多个核心药对如茯苓-人参、羌活-防风、乳香-没药等; 聚类分析结果主要分为 30 种类别。**结论** 结果提示在痛风病治疗上应以健脾补肾、祛湿化浊为基本原则, 并根据痛风病不同阶段采取略有侧重的治疗方法。在无症状高尿酸血症期应重视健脾补气、祛湿化浊; 在尿酸盐沉积期, 应重视活血化瘀、通络散结、利尿消肿等措施, 多使用具有消痰软坚和散结作用的药物; 在痛风急性炎症发作期, 应重视止痛, 以清热解毒、除痹止痛的药物为主。

关键词: 数据挖掘; 痛风病; FangNet; 用药规律; 中药; 古籍; 方剂

中图分类号: R971.1, R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0556-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.042

Medication patterns for gout in ancient formulas based on FangNet platform

LIU Ze-yu, WANG Yu, YIN Xiao-yang, XU Yi, HUANG Jin-jian, LIU Ya-di, LIN Zhi-jian, ZHANG Bing* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To elucidate the medication patterns for gout in more than 200 ancient Chinese medical texts, via the FangNet platform. **Methods** Data on gout treatments were collected and screened from the Zhongyi Jicheng database. A comprehensive formula database was established with Microsoft Excel to analyze the frequency and characteristics of traditional Chinese medicine (TCM) usage. Medications were categorized by properties, tastes, and functions. Core drugs, drug synergy, and clustering effect were analyzed with FangNet platform. **Results** Totally 410 gout-related prescriptions, involving 547 TCMS, were analyzed across the three clinical stages. The key characteristics, including properties, tastes, and functions, were identified for each stage. Fifty-five core drugs were obtained, with notable combinations such as *Poria cocos* and *Ginseng*, *Notopterygium incisum* and *Saposhnikovia divaricate*, and *Frankincense* and *Myrrh*. TCMS were divided into 30 principal categories by clustering analysis. **Conclusion** The treatment for gout should follow the principles of tonifying the spleen, nourishing the kidneys, dispelling dampness, and resolving turbidity, with stage-specific adjustments. In the asymptomatic hyperuricemia stage, we should focus on tonifying the spleen and qi while dispelling dampness and resolving turbidity. During the urate deposition stage, therapies promoting the blood circulation, resolving stasis, enhancing the

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目 (No.U20A20406); 国家中医药领军人才支持计划“岐黄学者”项目 (No.1040063320004); 张冰全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国家中医药人教函「2022」75)。

作者简介: 刘泽宇, 男, 硕士, 主要从事中药防治代谢性疾病研究, email: lzy00361@163.com * **通信作者:** 张冰, 女, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中药防治代谢性疾病研究, email: zhangbing6@263.net

vessel flow and diuresis, with a preference for expectorant and dispersing agents should be adopted. In acute gout inflammation, pain relief is prioritized agents to clear the heat rid the toxicity.

Key words: data mining; gout; FangNet; medication pattern; traditional Chinese medicine; ancient text; formula

痛风病是与高尿酸血症、尿酸盐沉积密切相关的慢性、进展性和致残性代谢性疾病，包括无症状高尿酸血症期、尿酸盐沉积期及痛风急性炎症发作期三个时期^[1-4]。中医药作为中华民族的传统瑰宝，具有整体观念的理论优势，而中药具有多成分、多靶点、多途径的作用优势，故在防治代谢性疾病方面具有不可替代的作用^[5-7]。早在先秦时期，中医药就有对痛风病的认识，如《素问·痹论篇》中提到“风寒湿三气杂至，合而为痹也”，并强调“饮食居处，为其病本”。随着历代医家对痛风病认识的不断完善，相应地涌现出许多治疗方剂。目前虽有学者对痛风病相关的古代文献进行研究，但尚未有学者对痛风病这一进展性疾病不同时期的用药经验进行系统性的挖掘和整理。

FangNet 平台 (<http://fangnet.org>) 利用结构网络算法，可以挖掘中医药方剂中的隐藏知识，分析治疗疾病的核心药物群，展示药物的互作关系和聚类关系^[8]。因此，本研究通过挖掘中医药古籍并运用 FangNet 平台分析古代医家对痛风病的用药情况，系统总结古代医家的用药特点和规律，为现代痛风病的治疗提供启示。

1 资料与方法

1.1 资料来源

书籍资料来源于中医电子古籍网站——中医笈成 (<https://www.jicheng.tw/>)，选择秦朝至清朝的相关医书、方书等共计 245 本，如《千金翼方》《肘后备急书》《景岳全书》《太平圣惠方》《圣济总录》《普济方》等。

1.2 检索策略

高尿酸血症在中医药古籍中并没有明确的病名，现代中医医家基于中医传统理论及现代医学理论给予高尿酸血症新的见解与认识，提出高尿酸血症属于中医“血浊”“膏浊”“浊瘀痹”范畴^[9]。高尿酸血症患者多有脾虚或兼湿兼热之证，临床表现为痞满纳呆、倦怠无力、嗜睡、肢体困重、腹胀便溏等，患者多形体肥腴，且嗜食肥甘厚腻，易壅滞脾胃，脾虚失运，以致水湿不化、湿浊内生，称为脾虚湿浊内蕴。《脾胃论》云：“脾病，体重即痛，为痛痹，为寒痹，为诸湿痹。”书中提出

脾胃虚弱、气血不足是痹病发病之根本^[10-11]。

《景岳全书》中记载：“然则诸痹者，皆在阴分，亦总由真阴衰弱，精血亏损，故三气得以乘之而为此诸证。”肾气不足时，不能蒸津化气，又因脾虚失运，则易生湿化痰成瘀。当尿酸饱和形成尿酸盐沉积于肾脏，导致肾脏损伤，临床表现为水肿、蛋白尿、腰痛、小便不利或小腹胀满等。故尿酸盐沉积可归属于“肾病”“肾痹”“疔痹”“顽痹”“水肿”“石淋”等范畴^[3, 11-18]。

古代中医对痛风的认识相对成熟丰富，其病名包括“痹”“历节”“痛风”“白虎”等^[19-23]。本研究结合以上观点，制订痛风病不同时期的检索策略，如表 1 所示。

表 1 痛风病不同时期检索策略

Tab 1 Retrieval strategies for gout at different stages

时期	检索词
无症状高尿酸血症期	湿浊、血浊、膏浊、浊瘀痹、脾虚
尿酸盐沉积期	疔痹、顽痹、水肿、石淋、肾病
痛风急性炎症发作期	痹、白虎风、历节、痛风、脚气

1.3 纳入标准

① 方书中归属于“脾虚”“痹”“白虎风”“历节”“白虎历节风”“脚气”“肾病”等类别下的方剂。② 脾虚及肾病因其所致疾病较多，故纳入具有明确相关临床表现的方剂，如脾虚纳入其临床表现为痞满纳呆、倦怠无力、嗜睡、肢体困重、腹胀便溏等症状的方剂；肾病纳入治疗临床表现为小便不利、尿血、水肿、腰痛等症状的方剂。③ 纳入的方剂必须有明确的药物组成。

1.4 排除标准

① 与痛风病无关的方剂予以剔除，如脾虚呕吐、喉痹等；② 方名不同而药物组成相同的方剂予以合并；③ 有关针灸、养生功法等其他方面的古籍证据。

1.5 数据的规范与数据库的建立

1.5.1 数据库的建立 通过人工录入，将筛选后符合条件的古方名称、药物组成录入 Excel 表中，在录入过程中参考 2020 年版《中国药典》和《中华本草》等书籍规范中药名称，并同时录入中药的药味、药性、归经和功效，对于复合药味归经的中药，

如茯苓味淡、平，归心、肺、脾、肾经，在统计时将多个药味及归经同时统计。为保证数据的完整性以及准确性，数据录入由两位研究者独立完成，第三位研究者进行两次核对，并建立数据库。

1.5.2 数据库的规范 通过参考文献和相关工具书籍等对古籍中药物的名称进行规范化处理，以便于后续的分析。

1.6 数据分析

首先，对方剂中的药物频次、剂量、药味、药性和归经等因素进行分析。然后，运用 FangNet 平台对方剂中的中药计算其网络拓扑中心分数 (TH 值)，以筛选核心药物。通过 Fisher 检验及药物间的相互作用的边缘权重计算 P 值来确定中药间的协同与互斥水平 (Co_level)，其中置信度反映两种中药在同一处方中同时出现的比例，数值越大说明相关性越高。最后，将方剂中药与 TH 值关联，并通过条形图展示聚类分析结果。

2 结果

2.1 中药频次统计

痛风病三个时期共纳入药物 547 味，其中无症状高尿酸血症时期中药 210 味，频次排行较高的有茯苓、白术、人参等，如表 2 所示；痛风急性炎症发作期的中药 299 味，频次排行较高的有当归、防风、甘草、肉桂等，如表 3 所示；尿酸盐沉积期的中药 108 味，频次排行较高的中药有茯苓、甘草、桑白皮、白术等，如表 4 所示。

表 2 无症状高尿酸血症期药物频次统计

Tab 2 Frequency of medications during the asymptomatic hyperuricemia stage

药物	频次	占比 /%
茯苓	13	6.19
白术	12	5.71
人参	12	5.71
甘草	10	4.76
肉桂	9	4.29
黄芪	7	3.33
神曲	6	2.86
陈皮	5	2.38
川芎	5	2.38
黄芩	5	2.38

2.2 中药药味、药性、归经及功效分类统计

如图 1、2 统计显示，在无症状高尿酸血症期，药味甘、辛、苦位居前三位，累计频率为 76.29%；药性温、寒、微温占主要地位，累计频率为 73.21%；药物归经于脾、肺、胃占前三位，累计频率为 51.20%。在尿酸盐沉积期药味甘、苦、辛位

表 3 痛风急性炎症发作期药物频次统计

Tab 3 Frequency of medications during acute acute gout inflammation

药物	频次	占比 /%	药物	频次	占比 /%
当归	12	4.13	麻黄	5	1.58
甘草	11	3.75	白芍	5	1.51
防风	11	3.68	酒	4	1.34
肉桂	10	3.44	虎骨	4	1.27
附子	9	3.17	黄芪	3	1.17
川芎	9	3.13	细辛	3	1.17
羌活	8	2.51	防己	3	1.14
茯苓	7	2.38	干姜	3	1.14
牛膝	7	2.31	苍术	3	1.10
人参	6	1.93	天麻	3	1.07
独活	6	1.86	白芷	3	1.00
白术	5	1.69	草薢	3	1.00
川乌	5	1.65	黄芩	3	1.00

表 4 尿酸盐沉积期药物频次统计

Tab 4 Frequency of medications during urate deposition stage

药物	频次	占比 %
茯苓	7	6.05
甘草	5	4.78
桑白皮	5	4.78
白术	4	3.82
陈皮	4	3.82
槟榔	4	3.50
木香	4	3.50
肉桂	4	3.50
滑石	3	3.18
泽泻	3	3.18
木通	3	2.55

居前三位，累计频率为 95.54%；药性温、寒、平占主要地位，累计频率为 76.25%；药物归经于脾、肝、肾经占前三位。在痛风急性炎症发作期，药味辛、苦、甘位居前三位，累计频率为 76.29%；药性温、微温、寒占主要地位，累计频率为 73.21%；药物归经于脾、肝、肾占前三位，累计频率为 51.20%。

2.3 核心药物分析

运用 FangNet 平台中的 Herb Rank 模块，根据 PageRank 算法将药物分为 Driver Herb 和 Passenger Herb 两类，其中 Driver Herb 即驱动药，为治疗痛风病的核心药物；Passenger Herb 即从动药，为随证加减药物^[8]。

结果显示，无症状高尿酸血症期驱动药 15 味，从动药 107 味；痛风急性炎症发作期驱动药 22 味，从动药 261 味；尿酸盐沉积期驱动药 17 味，从动药 82 味。以 TH 值从高至低排序驱动药 (核心药)。绘制网状关系图，结果见图 3。

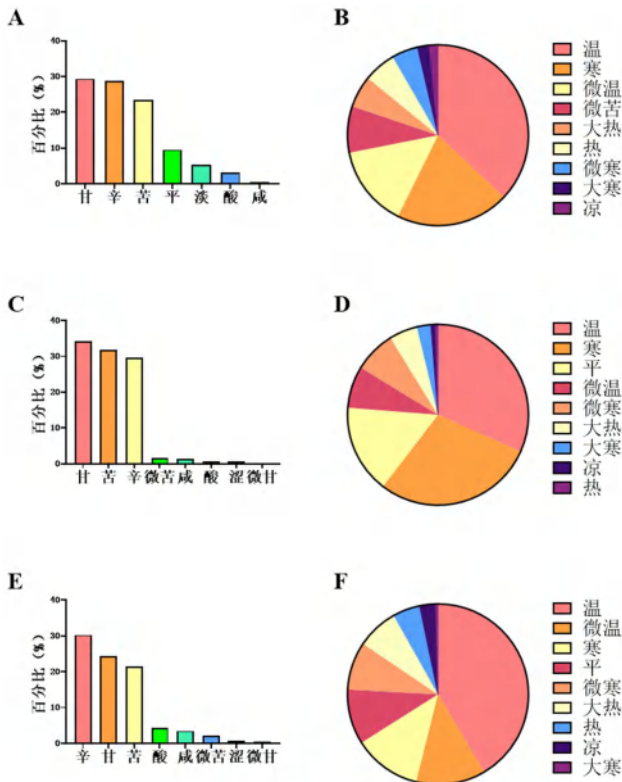


图 1 无症状高尿酸血症期 (A, B)、尿酸盐沉积期 (C, D) 及痛风急性炎症发作期 (E, F) 药物药味、药性占比图

Fig 1 Proportions of drug properties and actions during asymptomatic hyperuricemia stage (A, B), urate deposition stage (C, D), and acute gout inflammation (E, F)

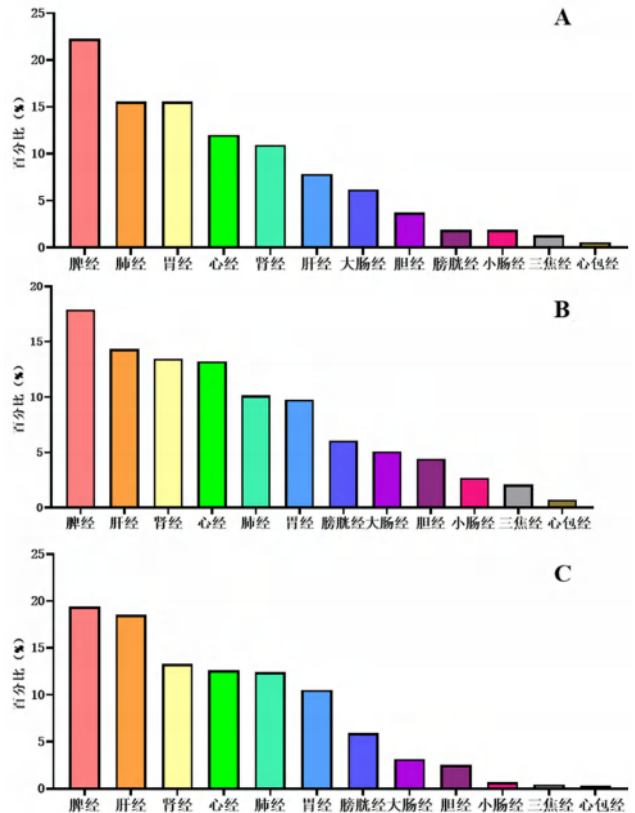


图 2 无症状高尿酸血症期 (A)、尿酸盐沉积期 (B) 及痛风急性炎症发作期 (C) 药物归经占比图

Fig 2 Proportions of drug meridians in asymptomatic hyperuricemia stage (A), urate deposition stage (B), and acute gout inflammation (C)

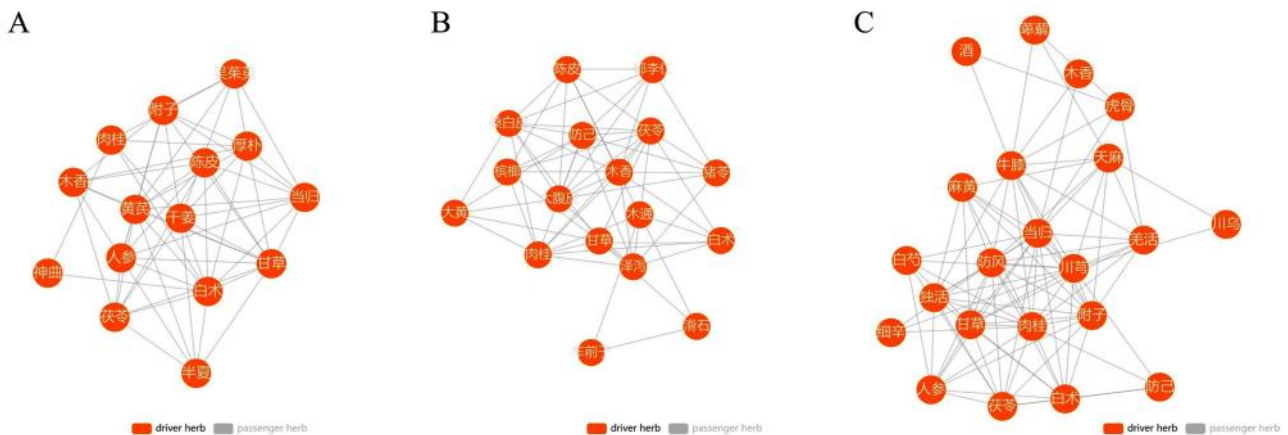


图 3 无症状高尿酸血症期 (A)、尿酸盐沉积期 (B) 及痛风急性炎症发作期 (C) 驱动药网图

Fig 3 Driver drug diagrams in the asymptomatic hyperuricemia stage (A), urate deposition stage (B), and acute gout inflammation (C)

2.4 药物协同性分析

利用 FangNet 平台的药物共现性/互斥性模块, 分析中药之间的协同与互斥水平。来表示两种药物同时出现的概率。共设置 9 个级别 (-4 到 4)。其中 0 表示无相关性, 1 至 4 级为蓝色, 表示共现水平高; -1 至 -4 级为红色, 表示互斥水平大。最终结果生成了古代痛风病治疗中常用药物的共现及互斥性图。结果见图 4~6。

2.5 药物聚类分析

应用平台对方剂中药进行聚类分析, 设置共现率为 0.2, 共现事件为 5, 模块数量为 10, 得到痛风病各个时期的 10 组药物组合, 如图 7 所示。

3 讨论

痛风病根据发病特点分为无症状高尿酸血症期、尿酸盐沉积期和痛风急性炎症发作期。临床观察发现, 血尿酸升高多见于肥胖、偏好肥甘厚

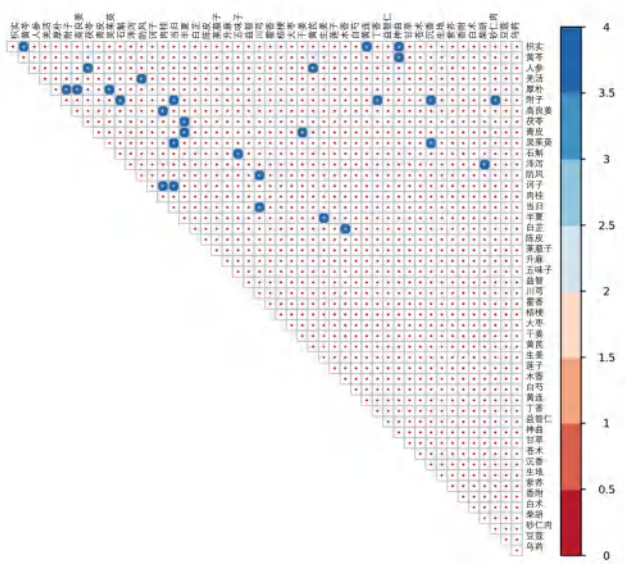


图 4 无症状高尿酸血症期药物-药物共现性与互斥性热图
Fig 4 Heatmap of drug-drug co-occurrence and exclusivity during the asymptomatic hyperuricemia stage

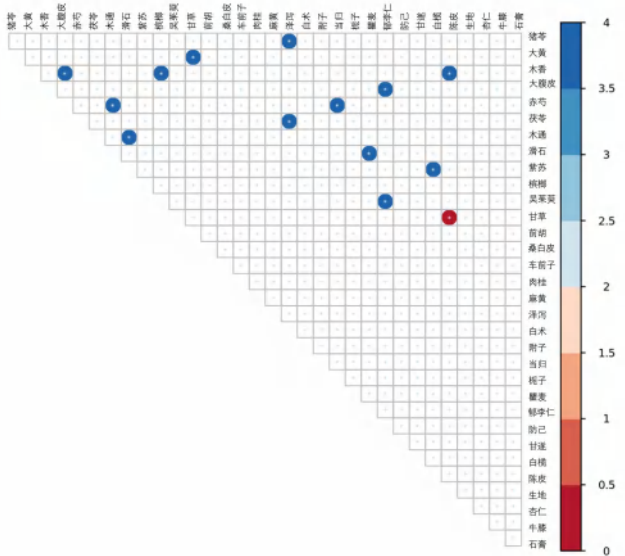


图 5 尿酸盐沉积期药物-药物共现性与互斥性热图
Fig 5 Heatmap of drug-drug co-occurrence and exclusivity during the urate deposition stage

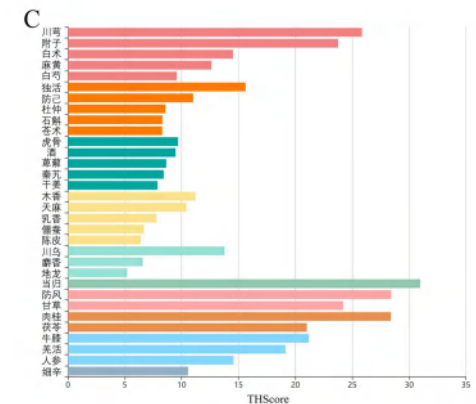
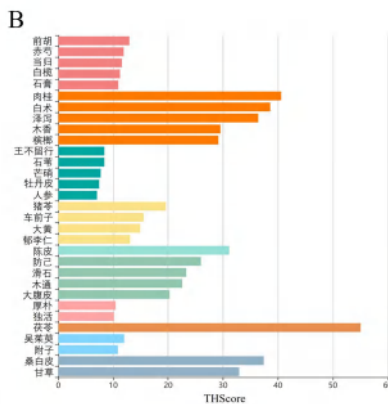
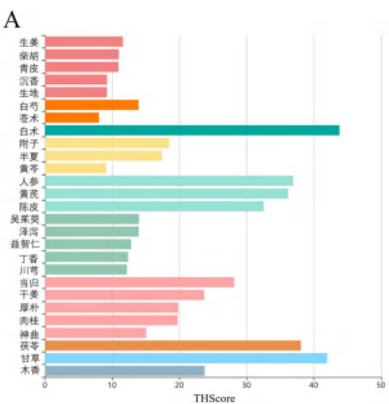


图 7 无症状高尿酸血症期 (A)、尿酸盐沉积期 (B) 及痛风急性炎症发作期 (C) 聚类分析图
Fig 7 Clustering analysis diagrams for asymptomatic hyperuricemia stage (A), uratedeposition stage (B), and acute gout inflammation (C)

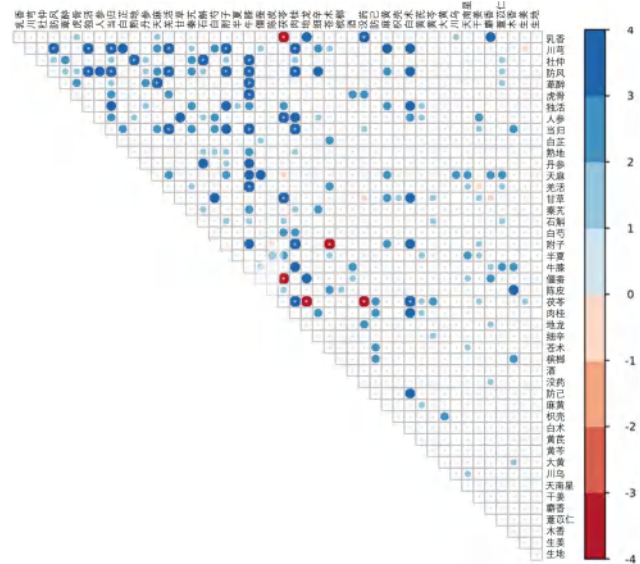


图 6 痛风急性炎症发作期药物-药物共现性与互斥性热图
Fig 6 Heatmap of drug-drug co-occurrence and exclusivity during acute gout inflammation

味者，中医称之为“血浊”或“膏浊病”。《灵枢集注》指出，过食膏粱厚味损伤脾胃，脾失健运导致痰湿内生，进而引发尿酸升高。肾气不足时，尿酸盐沉积在肾脏，临床表现为水肿、蛋白尿、腰痛、小便不利等。尿酸盐沉积于关节可引发痛风，古称“痛痹”或“白虎历节风”^[24-26]。尽管现代研究已探讨痛风性关节炎和高尿酸血症，但多集中于单一疾病的处方挖掘，对无症状高尿酸期及尿酸盐沉积期的古方挖掘仍较为缺乏，系统性的分析更是不足。

FangNet 平台通过算法对中药的重要性进行排名，并通过分析中药间的连接程度评估其核心性。本研究利用 FangNet 平台对痛风各时期的治疗处方进行系统分析，以整合古代医家的治疗经验。

3.1 药物分析

分析结果显示，在治疗无症状高尿酸期时，核

心药物主要包括白术、甘草、茯苓、人参、黄芪等 15 味，其中排名前四的药物为四君子汤的组成药物。四君子汤是治疗脾胃气虚的基础方，现代研究表明其对高尿酸血症有显著降尿酸效果^[27]。通过核心药物和从动药物的综合分析，发现古代治疗无症状高尿酸血症的组方规律多以健脾祛湿类药物为基础，依据患者的临床症状进行配伍调整。

在治疗尿酸盐沉积期时，核心药物以利水渗湿药、补气理气药、温里药为主。其中，茯苓和白术作为利水渗湿药，茯苓入脾肾经，既补脾虚，又能祛湿；白术健脾益胃，祛除燥湿。茯苓水提取物可提高肾脏相关转运体的表达，促进尿酸排泄^[28]。

在治疗痛风急性炎症发作期时，核心药物主要为清热解毒药、健脾补气药和活血化瘀药。清热解毒药如防风、细辛等，补气药多用甘草、人参、白术。综上，健脾祛湿降尿酸是痛风病各时期治疗的共同目标。

3.2 性味归经结果分析

3.2.1 药味分析 治疗无症状高尿酸血症期的中药性味以甘、辛、苦为主。甘味药具有补益和中的作用，契合高尿酸血症的本虚标实及与脾胃功能失调的关联。

治疗痛风急性炎症发作期和尿酸盐沉积期的中药性味以辛、苦、甘为主。中医认为辛味可发散行气血，苦味能燥湿，甘味则补和缓。痛风急性炎症发作期，古代医家药味频次依次为辛>甘>苦，反映出以解热镇痛为主的“急则治其标”原则。尿酸盐沉积期则以甘味药居多，药味频次为甘>苦>辛，体现出增强免疫力的“缓则治其本”治疗思路。

3.2.2 药性及归经分析 在无症状高尿酸血症期，药物以温性药为主，具有温经通络、温阳利尿等功效，如木瓜入肝经，舒筋活络，祛湿除痹。平性药物如党参、甘草等多用于补益。尿酸盐沉积期和痛风急性炎症发作期则以温性、寒性和微温药为主，治疗上常配伍寒凉药和温热药，以寒凉药清热利湿，兼以养阴；温热药则温通经络，祛除湿痹，同时避免寒凉药的凝滞作用^[29-30]。

药物归经分析显示，无症状高尿酸血症期药物多入脾、肺、胃经，常用利水渗湿药和补气药。尿酸盐沉积期和痛风急性炎症发作期药物多入脾、肝、肾经。尽管各期临床表现和治疗侧重不同，其根本在于脾失健运、肾失开阖、肝失疏泄，导致湿邪内生并积聚于脏器及四肢筋脉，阻碍气血运行，导致疼痛。因此，古代医家在治疗痛风

病各期时，多使用入脾、肾、肝经的中药。

3.3 关联药对及聚类分析结果分析

在无症状高尿酸血症期的药对分析中，关联性强的药对有茯苓-人参、人参-黄芪、茯苓-半夏，主要用于补脾益气、泄浊祛湿。

尿酸盐沉积期和痛风急性炎症发作期的关联药对及聚类分析显示，尿酸盐沉积期的药物大致分为两类：健脾补肾祛浊类，如猪苓-泽泻、石苇-王不留行；补脾活血通络类，如牡丹皮-当归。猪苓-泽泻联用可增强利水消肿功效；牡丹皮与当归联用则强化活血祛瘀效果，现代研究支持其散结消肿的作用^[31]。

在痛风急性炎症发作期，关联分析结果分为三类：通络散结止痛类，如羌活-防风、乳香-没药；健脾补肾祛浊类，如牛膝-萆薢、人参-茯苓；补脾活血通络类，如当归-川芎、白术-川芎。乳香-没药是经典活血行气止痛药对，现代研究发现乳香和没药含有抗炎活性成分，如挥发油等^[32-33]。

药物聚类分析直观地体现了古代医家治疗痛风病的用药思路。在无症状高尿酸血症期，药物主要聚类为生姜-柴胡-青皮-沉香-生地、白芍-苍术、附子-半夏-黄芩，多属健脾益气、化浊利湿类药物。尿酸盐沉积期的高频聚类药物包括肉桂-白术-泽泻-木香-槟榔、陈皮-滑石-防己-木通-大腹皮、前胡-赤芍-当归-白榄-石膏，主要配伍补脾、行气、利水渗湿药。在痛风急性炎症发作期，高频药物有川芎-附子-白术-麻黄-白芍-独活-防己-杜仲-石斛-苍术-虎骨-酒-萆薢-秦艽-干姜，主要用于除痹止痛，辅以活血舒筋、补肾健脾祛湿。

4 总结

综上所述，在痛风病的处方挖掘中发现，“湿浊”是贯穿三个时期的核心病机，三个时期的治疗应以祛湿化浊为基本原则，关注脾、肾、肝的调养。在尿酸盐沉积期，需配合散结通络、利水渗湿的药物，以防止病情加重；在痛风急性炎症发作期，则应首先除痹止痛，再结合其他药物进行全面治疗。

本研究为临床痛风治疗提供了重要参考，特别是在不同时期采用中医药特色治疗策略方面。例如，在无症状高尿酸血症期，建议以健脾祛湿化浊为主，辅以滋补肝肾和活血止痛药物。这一策略不仅有助于降低尿酸、保护肝肾，还能预防痛风发作。本研究挖掘了痛风各病程时期的处方信息，强调临床治疗需兼顾缓解症状、祛除病源，并突出中医药防治结合、全程干预和整体调节的特色。

参考文献

- [1] 李文静, 张晓滕, 林志健, 等. “整合论治”策略下张冰教授标本兼治痛风病临床实践[J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 8-12.
- [2] Lamb KL, Barker ME, Lynn A, et al. A content analysis of online videos containing dietary recommendations for gout and their alignment with evidence-based dietary guidelines[J]. *Public Health Nutr*, 2023, 26(10): 2014-2025.
- [3] Lee JJ, Lee JS, Chung MK, et al. Korean guidelines for the management of gout[J]. *J Rheum Dis*, 2023, 30(3): 141-150.
- [4] 黄晶, 杨婷, 王雨, 等. 痛风病的国内外认识及治疗进展与思考[J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 1-7.
- [5] 谢维, 余宗明, 叶海燕. 基于标准化代谢性疾病中医药管理平台服务模式的构想[J]. 中医药通报, 2023, 22(2): 41-43, 62.
- [6] 赵梦男, 潘燕, 潘婷, 等. 中医药特色理论在慢性病健康管理中的应用与发展趋势[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(17): 78-80.
- [7] 曹慧雅, 李凯文, 李阁, 等. 健脾祛湿中药治疗高尿酸血症的作用机制研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2110-2116.
- [8] Bu DC, Xia Y, Zhang JY, et al. FangNet: mining herb hidden knowledge from TCM clinical effective formulas using structure network algorithm[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 62-71.
- [9] 陈玥颖, 薛鸾. 高尿酸血症中医认识与治疗概述[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(6): 881-884.
- [10] 王聪慧, 娄锡恩, 卞兆祥. 基于肠道菌群失调探析中医从脾论治高尿酸血症的科学内涵[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(4): 729-734.
- [11] 张冰, 胥亦, 林志健, 等. 痛风病中医认识源流考[J]. 世界中医药, 2024, 19(13): 1875-1880.
- [12] 杨瑞宇, 吴晶晶, 彭江云, 等. 利用红外热成像技术探究高尿酸血症的病因病机[J]. 红外, 2019, 40(4): 35-38.
- [13] 吴深涛, 王斌, 章清华, 等. 论糖尿病从“脾不散精”到“浊毒内蕴”之病机观[J]. 中医杂志, 2018, 59(22): 1920-1924.
- [14] 张秋平, 庞新颖, 陈雨辉, 等. 从中医阴火角度论治高尿酸血症[J]. 河南中医, 2018, 38(7): 1047-1049.
- [15] 周道成, 赵恒侠, 李惠林, 等. 王孟庸教授治疗尿酸性肾病临床经验总结[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(10): 99-101.
- [16] 周冬梅, 杨倩, 李明权. 李明权治疗高尿酸血症经验[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(3): 23-24.
- [17] 田佳星, 李君玲, 张宸, 等. 全小林辨治高尿酸血症思路探析[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(2): 215-217.
- [18] 朱婉华, 顾冬梅, 蒋恬, 等. 浊瘀痹——痛风中医病名探讨[J]. 中医杂志, 2011, 52(17): 1521-1522.
- [19] 范黎明, 卞华, 刘涛, 等. 从“浊、瘀”谈对痛风的认识[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1179-1181.
- [20] 邹耀武. 从痰浊瘀毒辨治痛风性关节炎[J]. 光明中医, 2021, 36(15): 2608-2609.
- [21] 张拓, 于梅, 冯晓轩. 高尿酸血症的中医治疗进展[J]. 黑龙江中医药, 2016, 45(6): 74-75.
- [22] 冯少华, 张影, 刘颖新. 高尿酸血症与痛风的现代中医认识及展望[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2018, 18(84): 158, 173.
- [23] 世界中医药学会联合会. 国际中医临床实践指南痛风(2024-03-14)[J]. 世界中医药, 2024, 19(9): 1223-1229.
- [24] 陈玥颖, 薛鸾. 高尿酸血症中医认识与治疗概述[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(6): 881-884.
- [25] 倪青. 代谢疾病与高尿酸血症——中医认识与治疗[A]//中国中西医结合学会内分泌专业委员会. 第九次全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病高峰论坛专家演讲集[C] 2016: 7.
- [26] 王雨, 林志健, 张冰. 尿酸代谢紊乱相关疾病的现代认知及中医药防治进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(12): 3160-3167.
- [27] 朱明敏, 孙维峰. 高尿酸血症尿酸合成异常机制及其中医药研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(3): 484-488.
- [28] 赵梓童, 年四辉, 孙绪强, 等. 茯苓皮提取物对高尿酸血症小鼠的尿酸水平和肾脏的影响[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(3): 168-174.
- [29] 李晓春, 闻辉. 寒温并用为要则桂芍知母每化裁——胡建华治疗痹证经验[J]. 中国社区医师, 2007, 23(11): 34.
- [30] 任学彬. 寒温并用治疗痹证之探析[J]. 中国社区医师, 2016, 32(27): 15-16.
- [31] 朱立, 赵进喜, 贾海忠, 等. 当归川芎活血通经, 桃仁牡丹皮凉血散瘀[J]. 环球中医药, 2019, 12(8): 1197-1200.
- [32] Cao B, Wei XC, Xu XR, et al. Seeing the unseen of the combination of two natural resins, frankincense and myrrh: changes in chemical constituents and pharmacological activities[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3076.
- [33] Ljaljević Grbić M, Unković N, Dimkić I, et al. Frankincense and myrrh essential oils and burn incense fume against micro-inhabitants of sacral ambients. Wisdom of the ancients?[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 1-14.

(收稿日期: 2024-06-25; 修回日期: 2024-09-18)

中药临床药师参与 1 例肾上腺危象患者的中西联合药学监护实践

罗春梅¹, 郭晓龙², 吴立旗^{3*}, 金锐^{2*} (1. 陆军军医大学第二附属医院药剂科, 重庆 400037; 2. 中国中医科学院西苑医院药学部, 北京 100091; 3. 中国中医科学院西苑医院综合内科, 北京 100091)

摘要:“汤液经法图”辨证论治体系能用于中药处方分析, 可在中西联合药学监护中提供个体化用药建议。本文以 1 例肾上腺危象患者为例, 探讨中药临床药师运用“汤液经法图”在个体化药物治疗和中西联合药学监护中的作用。临床药师运用“汤液经法图”对中药处方进行分析, 判断患者以肺肾两虚合并脾虚为主, 处方应以酸、苦、甘味药为主, 提出中药组方用药思路; 对患者的糖皮质激素替代治疗方案进行分析, 建议应清晨给予糖皮质激素全日剂量的 2/3, 14:00 服剩余的 1/3; 利用药物相互作用原理, 进行西药重整, 协同医师调整并优化药物治疗方案。医师采纳药师建议并实施, 患者经治疗后病情得到控制, 达到预期治疗目标。中药临床药师运用“汤液经法图”所示的辨证论治体系, 可为医师提供中药用药参考指导意见, 同时利用药物相互作用原理对西药进行分析, 协助医师优化西药治疗方案, 为患者提供高质量的药学服务。

关键词: 汤液经法图; 肾上腺危象; 中药临床药师; 药学监护; 药物重整

中图分类号: R96, R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)02-0563-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.043

肾上腺皮质功能不全 (AI) 是由原发性肾上腺皮质功能减退, 或是下丘脑-垂体轴受损而引起的继发性肾上腺疾病, 临床表现以糖皮质激素 (GC) 产生或作用缺陷为主, 伴或不伴盐皮质激素和性激素缺乏。肾上腺危象则是由于皮质醇急性缺乏引起, 是一种潜在的致命性疾病, 疾病进展隐匿, 诊断经常被延误或误诊。肾上腺危象最主要的临床特点为低血压和低血容量, 常伴有非特异性的临床症状, 如厌食、恶心、呕吐、腹痛、疲劳、体位性眩晕、发热及意识改变, 实验室检查通常表现为低钠血症、伴或不伴高钾血症、低血糖、贫血^[1-2]。“汤液经法图”原载于《辅行诀五脏用药法要》(简称《辅行诀》)^[3], 该图展示了一个完整的辨证论治体系, 以五脏虚实认识疾病, 以五味补泻治疗疾病, 见图 1。在脏腑虚实辨证框架下, 辛、咸、甘、酸、苦五味分别对应五脏疾病的补泻 (用体), 这与传统一对一的五脏五味配属关系不同, “汤液经法图”是“多对一”的五脏五味配属关系, 表现为补味、泻味和化味三对一的对应关系, 全图结构工整对称, 搭配巧妙, 具有很强的严谨性和逻辑性^[4-6]。本课题组前期采用“汤液经法图”开展了识方、解方的研究, 运用其所示的辨证论治体系解析经方、时方、验方等各种方剂^[7-9], 并用于临床药学监护^[10-11]。本文就 1 例肾上腺危象患者的诊疗方案进行分析, 从药物特点、用法用量、相互作用等

方面提出药学建议。同时, 运用“汤液经法图”辨证论治理论体系, 对患者中药处方进行解析, 为临床提供中药组方建议。

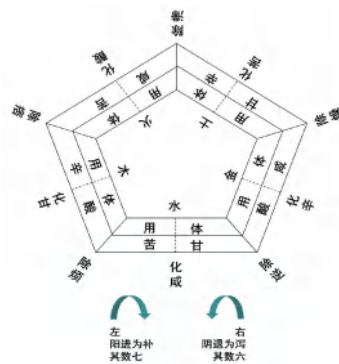


图 1 汤液经法图

1 病历概况

患者, 男, 74 岁, 平车推入病房。因“乏力自汗半年余, 加重伴纳差腹痛 1 周”于 2023 年 7 月 10 日入院。患者从 2022 年 11 月出现乏力, 大汗出, 重度贫血, 近半年输血 3 次, 抢救 2 次, 予输血对症治疗后好转。近 1 周食欲明显下降, 不欲进食, 自诉腹痛, 自行服用药物效果不佳。2023 年 7 月 9 日夜间断发热, 体温 37.3℃, 查血色素 60 g·L⁻¹, 入院症见如下, 问: 胸闷气短、乏力, 阵发大汗出, 不欲进食, 平卧, 低热, 腰痛、关节痛活动受限, 腹痛, 眠可, 大便 3~5 日一行, 不干。望: 患者精神萎靡,

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 (No.CI2021A03805, No.CI2021A00101)。

作者简介: 罗春梅, 女, 主管药师, 主要从事中药临床药学与中药药理学研究, email: luochunmei345@tmmu.edu.cn *通信作者: 吴立旗, 女, 主治医师, 主要从事中西医结合心血管临床研究, email: liqi0101372@163.com; 金锐, 男, 副主任药师, 博士, 主要从事中药临床药学和中医药基本理论研究, email: jinrui9862@126.com

神志清楚，两目乏神，动作迟缓，面色萎黄，呼吸平稳，舌淡，少苔。嫩舌，舌体正常。闻：语音清晰，无咳痰，无呃逆，无特殊气味。切：脉细弱。

既往史：①冠心病、风湿性心脏病、主动脉关闭不全病史 7 年余，2016 年行冠脉搭桥及主动脉换瓣术，曾予以华法林口服抗凝半年致消化道出血，行胃镜下止血治疗；②慢性胃炎、胃溃疡、反流性食管炎 20 余年；③甲状腺功能减退（以下简称甲减）5 年；④慢性心力衰竭 2 年，高尿酸血症 2 年；⑤高脂血症、慢性支气管炎、重度骨质疏松；⑥胆结石术后 6 年，胆囊萎缩；⑦类风湿关节炎多年，垂体瘤病史。

患者入院前用药情况为阿托伐他汀钙片 20 mg qn 降血脂；华法林钠片 3 mg qd 抗凝；托伐普坦片 15 mg qd 利尿；骨化三醇软胶囊 0.25 μg qd + 碳酸钙 D₃ 片 0.6 g qd 抗骨质疏松；螺内酯片 20 mg qd 逆转心室重塑；非布司他片 40 mg qd 降尿酸；左甲

状腺素钠片 100 μg、75 μg qod 治疗甲减；醋酸地塞米松片 0.75 mg qd 抗炎。

入院查体：体温 37.3 °C，脉率 68 次·min⁻¹，呼吸频率 18 次·min⁻¹，血压 76/47 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa）。神清，精神差，平车推入病房，面色萎黄，双眼睑水肿，双上肢肘关节重度水肿。双肺呼吸音粗，右下肺可闻及湿性啰音。腹部平坦，上腹正中可见腹腔镜手术瘢痕，腹软，全腹轻压痛，无反跳痛。

生化检查、血常规及后期随访等检查结果见表 1。游离三碘甲腺原氨酸（FT₃）2.12 pmol·L⁻¹↓、游离甲状腺素（FT₄）22.00 pmol·L⁻¹、促甲状腺激素（TSH）0.04 uIU·mL⁻¹↓、三碘甲状腺原氨酸（T₃）0.69 nmol·L⁻¹↓；促肾上腺皮质激素 2.12 pg·mL⁻¹↓、人皮质醇激素 0.59 μg·dL⁻¹↓；游离睾酮 0.101 pg·mL⁻¹↓、雄烯二酮 0.087 ng·mL⁻¹↓，血清催乳素 874 uIU·mL⁻¹↑；肝肾功能无异常。

表 1 患者 2023 年入院后实验室指标检查结果

时间	血压/ mmHg	血红蛋白/ (g·L ⁻¹)	白细胞计数/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	中性粒细胞计数/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	白蛋白/ (g·L ⁻¹)	钾/ (mmol·L ⁻¹)	钠/ (mmol·L ⁻¹)	葡萄糖/ (mmol·L ⁻¹)	超敏 C 反应蛋白/ (mg·L ⁻¹)
7 月 10 日	76/47	54	4.35	77.2	32.44	4.59	124.64	6.85 (非空腹)	79.13
7 月 13 日	82/56	70	3.52	70.4	27.72	3.24	136.12	3.65	
7 月 17 日	83/53	80	4.22	60.6	34.70	4.36	135.50	3.89	
7 月 20 日	91/56	70	3.64	70.1	38.80	4.32	131.76	4.67	
7 月 24 日	96/60	73	4.75	73.4	37.80	4.59	135.94	5.38	1.49
9 月 4 日	106/71	92	5.90	68.1	34.60	4.65	137.74	4.10	
参考范围	< 130/80	130 ~ 175	3.5 ~ 9.5	40 ~ 75	40 ~ 55	3.5 ~ 5.3	137 ~ 147	3.9 ~ 6.1	/

入院诊断：虚劳类病，脾肾阳虚证。西医主要诊断：肾上腺危象？慢性心功能不全急性加重；肺部感染；冠状动脉粥样硬化性心脏病（风湿性心脏病、主动脉瓣生物瓣置换状态、心脏搭桥术后）；低蛋白血症；类风湿关节炎；重度骨关节病；甲减；低血压；低钠血症；反流性食管炎。

2 主要诊治过程

患者入院后西医初始治疗主要以输血、抗感染、解痉平喘祛痰、利尿及其他基础疾病对症支持治疗，住院期间患者主要的西药治疗药物见表 2。中医治以温阳利水，补气健脾为主，予桂枝汤合茯苓四逆汤化裁。

医师分析患者近半年因重度贫血反复输血治疗，伴有大汗出，血压低、不明原因腹痛、纳差、顽固性低钠血症（嗜盐）、低血糖、乏力、低热等症状（与肾上腺危象的临床表现高度一致），结合患者既往甲减病史多年，垂体瘤病史多年，请内分泌科会诊，考虑患者为肾上腺皮质醇功能减退（继发性可能较大），予以注射用氢化可的松琥珀酸钠 100 mg qd 补充外源性糖皮质激素（GC）冲击治疗 3 d；予以参附注射液益气回阳。

入院治疗 3 d 后，患者时有头晕，乏力明显，腹痛减轻，但仍汗出，眠可；舌淡红、苔薄、脉沉

细弱；血压 82/56 mmHg。药师采用“汤液经法图”对患者病情进行分析，提出中药组方建议，建议在原方桂枝汤合茯苓四逆汤化裁基础上去大枣、薏苡仁及炒山楂等健脾消食药，加防己、泽泻、北沙参、山药、麦冬、醋五味子、酒萸肉等药，养阴润肺、利水消肿。患者服药 3 d 后症状较前改善，腹痛减轻，食欲较好，但仍觉乏力，出汗好转，舌淡红、苔薄、脉沉细。血压升高至 83/53 mmHg。

入院治疗 10 d 后，患者精神可，仍时有汗出，出汗量明显较前减少，食欲较前增加，胃痛腹痛减轻，仍觉乏力，坐起困难，双上肢水肿减轻，舌淡红、苔薄、脉沉细。再次调整中药处方，在原方基础上去泽泻，加黄芪、党参、当归，附片、熟地黄、红参、酒萸肉适量，增强补肾升阳的作用。

入院治疗 16 d 后，患者精神可，出汗不明显，无口干、口渴，食欲增加，无胃痛、腹痛，乏力好转，双上肢水肿明显减轻，舌淡红、苔薄、脉沉细。血压和血红蛋白明显上升，血压升至 104/60 mmHg，血红蛋白 73 g·L⁻¹。患者现病情好转且平稳，准予出院调养。1 个月之后随访，患者未出现贫血、大汗出、腹痛等肾上腺皮质功能不全的症状，根据患者症状将醋酸泼尼松片减量至 8：00 7.5 mg，14：00 2.5 mg，血红蛋白升至 92 g·L⁻¹。

表 2 患者 2023 年住院期间主要的西药治疗药物

药物	剂量	给药途径	给药频率	时间
托伐普坦片	15 mg	po	qd	7 月 10 日—7 月 26 日
呋塞米片	20 mg	po	qd	7 月 10 日—7 月 26 日
螺内酯片	20 mg	po	qd	7 月 15 日—7 月 26 日
骨化三醇软胶囊	0.25 μg	po	bid	7 月 10 日—7 月 26 日
碳酸钙 D ₃ 片	0.5 g	po	qd	7 月 11 日—7 月 26 日
碳酸氢钠片	0.5 g	po	qd	7 月 10 日—7 月 21 日
非布司他片	40 mg	po	qd	7 月 10 日—7 月 26 日
注射用艾司奥美拉唑钠	40 mg	ivgtt	qd	7 月 10 日—7 月 14 日
雷贝拉唑肠溶胶囊	20 mg	po	qd	7 月 14 日—7 月 26 日
枸橼酸铋钾胶囊	0.3 g	po	qid	7 月 12 日—7 月 21 日
注射用哌拉西林舒巴坦钠	5 g	ivgtt	q12h	7 月 10 日—7 月 15 日
吸入用异丙托溴铵溶液	0.5 mg	inh	bid	7 月 11 日—7 月 26 日
吸入用乙酰半胱氨酸溶液	0.3 g	inh	bid	7 月 11 日—7 月 26 日
左甲状腺素钠	75 μg、100 μg	po	qod	7 月 10 日—7 月 26 日
注射用氢化可的松琥珀酸钠	100 mg	ivgtt	qd	7 月 11 日—7 月 13 日
醋酸泼尼松片	10 mg	po	bid	7 月 13 日—7 月 17 日
醋酸泼尼松片	10 mg、5 mg	po	8: 00 10 mg; 16: 00 5 mg	7 月 17 日—7 月 26 日
阿托伐他汀钙片	20 mg	po	qd	7 月 11 日—7 月 26 日
参附注射液	60 mL	ivgtt	qd	7 月 11 日—7 月 13 日
依诺肝素注射液	4000 IU	ih	qd	7 月 14 日—7 月 20 日
琥珀酸亚铁片	0.1 g	po	qd	7 月 20 日—7 月 26 日

3 药物治疗方案分析及药学监护

3.1 患者西药治疗方案分析

3.1.1 肾上腺皮质功能不全（肾上腺危象）用药方案分析 对于肾上腺危象患者，根据欧洲内分泌协会、美国内分泌协会的实践指南和共识《肾上腺皮质功能不全及肾上腺危象的治疗（2021）》和相关文献^[12-13]，需给予外源性的 GC 进行替代治疗，而对于怀疑有肾上腺危象患者的患者，延误治疗有死亡风险，应立即给予氢化可的松冲击治疗。临床上替代治疗常用的 GC 种类有短效（如氢化可的松）、中效（如泼尼松、泼尼松龙）、长效（如地塞米松）和新型缓释氢化可的松制剂，应首选短效 GC。长效 GC 的盐皮质激素作用低，生物半衰期较长，可能会使夜间皮质醇水平增高，影响睡眠和降低胰岛素敏感性。此外，皮质醇的分泌具有昼夜节律性，生理状态下，8: 00 左右皮质醇分泌最高，8: 00 ~ 12: 00 骤然降低，14: 00 左右达到平台期，此后逐渐降低，0: 00 最低。因此，应在清晨醒后给予 GC 全日剂量剂量的 2/3，14: 00 服剩余的 1/3。本例患者用注射用氢化可的松琥珀酸钠 100 mg qd 冲击治疗 3 d 后，改醋酸泼尼松片 10 mg bid po。为了能更好地模拟正常人体皮质醇的昼夜分泌规律，减少药物的不良反应，临床药师向医师建议更改 GC 服药方法，医师采纳药师意见，患者出院后改为 8: 00 服用 10 mg，14: 00 服用 5 mg。

3.1.2 西药用药重整 患者基础疾病较多，在院治疗期间，服药种类较多，包括利尿药、抑酸护胃药、GC、补钙剂、补血药、左甲状腺素钠片等，易发生药物相互作用，降低临床治疗效果。左甲状腺素钠片会加速 GC 的清除，可能会引发肾上腺危

象，而 GC 也会抑制左甲状腺素发挥药效，其机制为抑制甲状腺素转化成 T₃^[14]。因此，两药服药间隔时间应在 6 h 以上，但患者 GC 服药时间固定，8: 00 需服用 GC，与左甲状腺素钠片服药时间存在冲突。有文献报道，晚上胃排空减慢，左甲状腺素与胃壁充分接触，有利于其吸收，与早餐前 30 min 服左甲状腺素钠片相比，睡前服药能更好地改善甲状腺功能，且用药安全性良好^[15]。另有文献报道在早餐前 30 min 服用左甲状腺素钠片和睡前服药疗效无差异，且睡前服用依从性会更好^[16]。因此，建议患者晚餐后 4 h（睡前空腹）服用左甲状腺素钠片，同时与碳酸钙片、琥珀酸亚铁片和阿托伐他汀钙片间隔 4 h 服用。

此外，患者贫血严重，服用琥珀酸亚铁片补充造血原料；患者上次住院代谢性酸中毒，服用碳酸氢钠片；胃溃疡病史 20 多年，服用雷贝拉唑肠溶胶囊（PPI）抑酸护胃、枸橼酸铋钾胶囊保护胃黏膜，预防消化道出血，这些药物之间有相互作用，同时服用会导致药效降低。研究表明，铁剂以亚铁离子的形式主要在十二指肠及空肠近端吸收，胃酸可增加铁剂的溶解度，有助于吸收，碳酸氢钠片和 PPI 能减少胃酸的分泌而影响铁的吸收，两者合用将降低治疗效果^[17]。同时，碳酸氢钠中和胃酸时产生的二氧化碳可引起嗝气，继发引起胃酸分泌增加，患者此次住院代谢性酸中毒状态改善，建议医师停用碳酸氢钠，医师采纳药师建议。枸橼酸铋钾需在酸性环境下形成保护膜，促进黏膜再生和溃疡愈合，而 PPI 会使胃内 pH 值升高，降低枸橼酸铋钾的疗效，故两类药物不应同时使用。此外，枸橼酸铋钾口服后会出现黑便，影响对

出血风险的评价。因此，建议医师停用枸橼酸铋钾胶囊，医师采纳药师建议。

3.1.3 患者用药教育和随访 患者服药种类较多，药师嘱其按时服药，尤其是 GC，8:00 和 14:00 服用醋酸泼尼松片，不能随意更改服药时间和剂量，任意停药或减量可能引发肾上腺危象。如出现早晨疲劳、恶心或头疼等症状，表明皮质醇水平可能低，引起夜间血糖水平低，可能是 GC 给药剂量过低引起；若出现体重增加、烦躁易怒、外周水肿、出汗，则表明可能是 GC 给药剂量过高导致。出现这些症状应告知医师，调整 GC 剂量。此外，患者应警惕药物间相互作用，不要随意增减药物，药师为患者制订出院用药指导单，详细标明患者出院后需继续使用的药物名称、用法用量、注意事项等，嘱咐患者出院两周后复诊等。后期随访可知，患者 2023 年 9 月复查生化、血常规、血压，无异常，血红蛋白升至 $92\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明 GC 替代治疗方案有效。

3.2 基于“汤液经法图”理论体系的中药处方分析

3.2.1 分析病因病机 采用“收集患者症状信息—确定脏腑虚实—制订治法治则—选定药味配伍组

方”确定该患者的治疗思路。本例患者以胸闷气短、乏力，阵发大汗出，面色萎黄，纳差，低热，腰痛腹痛、关节痛活动受限，双上肢肘关节重度水肿，大便 3~5 日一行，不干等为主要症状。从藏象学说看，肺主气，司呼吸，在体合皮毛，与大肠相表里，且“诸气贖郁，皆属于肺”。根据《辅行诀》中记载，患者胸闷乏力、发热、大便干、阵发大汗出等症，属于肺金虚病症；患者乏力、纳差等症，属于脾土虚病症；患者腰痛、腹痛、身重、关节痛活动受限等症，属于肾水虚病症^[6]。因此，本患者以肺肾两虚合并脾虚为主，应以补肺补肾补脾为主。

3.2.2 确定治法治则 从“汤液经法图”五味补泻用药角度看，五脏虚则补之，实则泻之^[4]。本例患者肺肾两虚合并脾虚，以补肺补肾补脾为主，中药处方应以酸、苦、甘味药为主。“汤液经法图”体系对中药五味的定性源自中药的五行属性，与中药的功效特点契合^[6]。从“汤液经法图”角度看，部分中药的药味与现行中药学教材和《中国药典》中记载的药味不完全相同，应在解方时予以调整，以“汤液经法图”药味为准。本文所涉及的调整的药味属性见表 3。

表 3 调整的药味属性

中药	《中国药典》2020 年版记载的药味	“汤液经法图”体系所示主导药味	说明
麸神曲		辛	辛能泻脾，故能用于饮食停滞，消化不良，脘腹胀满，食欲不振
防己	苦	甘	甘能泻肾，故能用于风湿痹痛，水肿脚气，小便不利，湿疹疮毒
黄芪	甘	甘、辛	辛补肝，故能用于半身不遂、痹痛麻木；甘补脾，故能用于食少便溏、久泄脱肛
白术	甘、苦	苦	苦能燥脾，能补肾，故能用于脾虚食少，腹胀泄泻，痰饮眩悸，水肿，自汗，胎动不安
附片	辛、甘	苦、辛	苦能补肾、辛能补肝，故能用于肾阳虚衰，阳痿宫冷，阴寒水肿，阳虚外感，寒湿痹痛
熟地	甘	苦	苦能补肾，故能用于虚劳精亏，腰膝酸痛
麦冬	甘、微苦	酸	麦冬为《辅行诀》所载“土中金”；酸补肺，故能用于肺燥津伤
北沙参	甘、微苦	酸	酸补肺，故能用于肺燥津伤、咽干口渴
鸡血藤	苦、甘	辛、咸	辛能补肝，故能用于风湿痹痛，麻木瘫痪；咸能补心润肾，故能用于月经不调，痛经，经闭
泽泻	甘	咸、甘	泽泻为《辅行诀》所载“火中土”，甘泻肾，咸能润肾，故能用于小便不利，水肿胀满，泄泻尿少

3.2.3 中药汤剂处方分析 该患者入院后中医诊断为虚劳类病，脾肾阳虚证。中医治以温阳利水，补气健脾为主，第一次处方（2023 年 7 月 10 日，3 剂）予桂枝汤合茯苓四逆汤化裁，考虑患者纳差，加用炒麦芽、麸神曲、炒山楂健脾消食，处方组成为桂枝 15 g、白芍 30 g、生姜 12 g、大枣 15 g、炙甘草 15 g、茯苓 30 g、白术 20 g、附片 9 g、红参片 10 g、炒麦芽 10 g、麸神曲 10 g、炒山楂 10 g、薏苡仁 30 g。从“汤液经法图”角度看，第一次处方配伍结构为“6 甘 2 苦 2 酸 3 辛”（见图 2），主导药味为甘味。其中，红参味甘补脾，大补元气，复脉固脱，益气补血；茯苓和薏苡仁味甘补脾泻肾，利水渗湿、健脾止泻；炒麦芽味甘健脾消食；大枣味甘补脾，补中益气、养血安神；炙甘草味甘补脾和胃，益气复脉；白术味苦燥脾，健脾益气、燥湿利水，附片味苦补火助阳，散寒止痛；白芍味酸补

肺敛阴止汗；炒山楂味酸补肺，行气消食通便；麸神曲味辛，泻脾消胀；桂枝和生姜味辛，温通经脉，助阳化气。该患者的治则治法应以酸、苦、甘味为主，而该处方为“6 甘 2 苦 2 酸 3 辛”，主导药味以甘味为主，而酸、苦药味较少，故药证不相符。患者服药后，纳差改善明显，腰痛、腹痛减轻，而乏力、多汗、头晕、关节痛活动受限、双上肢水肿等症未改善。

第二次处方（2023 年 7 月 14 日，5 剂），患者自述口干，舌淡红，苔少，脉沉细。医师总结经验，调整治疗思路，考虑加入滋阴养血药，同时向临床药师咨询用药建议。临床药师运用“汤液经法图”理论分析后，建议医师加入五味子、麦冬、北沙参、山茱萸养阴润肺，提高酸味药的比例，医师采纳。同时，在原方基础上去掉大枣、炒麦芽、麸神曲等药，再加入熟地、鸡血藤补血滋阴、活血止痛；防

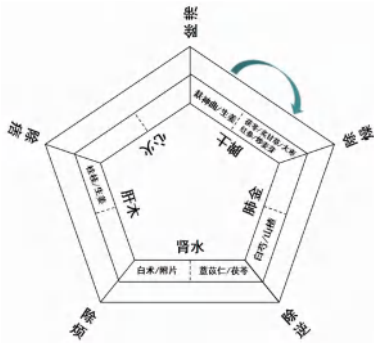


图 2 第一次处方五味补泻原理示意图(箭头方向代表主导功效方向: 补脾)

己、泽泻利水消肿; 山药补脾养胃, 生津益肺。调整后的处方为茯苓 40 g、炙甘草 12 g、红参片 10 g、防己 10 g、山药 20 g、白术 15 g、附片 10 g、熟地 20 g、白芍 20 g、麦冬 30 g、醋五味子 6 g、醋鸡内金 6 g、北沙参 20 g、酒萸肉 20 g、干姜 10 g、鸡血藤 30 g、泽泻 20 g。全方功效以温阳利水、养阴润肺为主, 处方配伍结构为“5 甘 6 酸 3 苦 2 辛 1 咸”(见图 3), 酸味药较第一次处方明显增加, 全方以酸味、甘味药为主, 苦味药为辅, 补肺补脾补肾, 药证相符。患者服用 3 d 后, 口干、汗出症状明显好转, 乏力、腰痛、腹痛、双上肢水肿明显减轻。

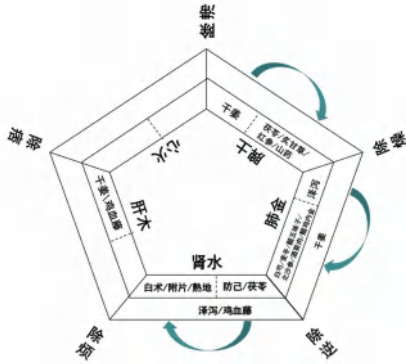


图 3 第二次处方五味补泻原理示意图(箭头方向代表主导功效方向: 补肺+补脾+补肾)

第三次处方(2023 年 7 月 19 日, 7 剂), 考虑到患者双上肢水肿明显减轻, 目前症状以乏力、关节活动受限为主, 故在第二次处方基础上去泽泻, 加黄芪 40 g、党参 30 g、当归 20 g; 附片、熟地、红参、酒萸肉均加量 10 g, 增强补肾滋阴、补气养血之功。调整后的处方为: 附片 20 g、当归 20 g、黄芪 40 g、党参 30 g、红参 20 g、白术 15 g、茯苓 40 g、炙甘草 12 g、干姜 10 g、白芍 20 g、醋鸡内金 6 g、山药 20 g、熟地黄 30 g、酒萸肉 30 g、醋五味子 6 g、麦冬 30 g、北沙参 20 g、鸡血藤 30 g、防己 10 g。全方以益气温阳、滋阴养血为主, 处方配伍结构为“7 甘 6 酸 3 苦 3 辛”(见图 4), 患者服用 7 d 后, 乏力明显改善, 无腰痛腹痛, 汗出、口干不明显, 纳眠可, 舌淡红、少苔、脉弦细弱。

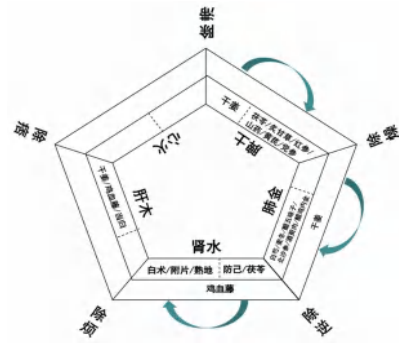


图 4 第三次处方五味补泻原理示意图(箭头方向代表主导功效方向: 补肺+补脾+补肾)

4 讨论

4.1 肾上腺皮质功能不全患者 GC 替代方案的选择及药学监护

肾上腺危象一种危及生命的疾病, 需要终身服用 GC 替代治疗, 而小剂量、短效 GC 的不合理使用可能导致肾上腺危象发病率增加。合理的 GC 剂量及一种能够模拟人体正常生理皮质醇分泌的替代疗法对于患者的治疗非常重要。研究表明, 第一剂和最大剂量 GC 建议在清晨醒来后服用, 第二剂 GC 在午餐后服用, 如果是第三剂方案, 最后一剂和最小剂量 GC 不晚于睡前 4 ~ 6 h, 避免在晚上服用高剂量, 这种给药时间能更好地模拟皮质醇生理性分泌^[13]。同时, 较高剂量的 GC 替代会引起库欣综合征、失眠、高血压、骨质疏松、糖耐量受损, 导致心血管疾病的风险增加, 而 GC 替代不足则会引起乏力、嗜睡、低血糖, 甚至引发肾上腺危象。

为了评估 GC 剂量的合理性, 调整 GC 剂量, 应询问患者服药后的反应。若患者早晨疲劳、恶心或头疼等, 表明皮质醇水平低, 引起夜间血糖水平低, 则要求患者在起床前 30 ~ 60 min 服用晨剂量, 可获得一定的临床症状缓解, 或晚上小剂量给药。若患者失眠, 则表明最后一剂服用得太晚或剂量太高。若患者体重增加、烦躁易怒、外周水肿、出汗, 则表明 GC 给药剂量过高。目前为止, 尚无预测肾上腺危象发病率和死亡率的生物活性标志物, 血浆皮质醇和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 浓度通常不能用于指导 GC 剂量调整, 因替代治疗患者的 ACTH 和皮质醇分泌之间的正负反馈关系已经紊乱, 通常表现为 ACTH 水平升高^[18]。因此, 建议医师应根据患者的临床症状来调整 GC 剂量。

4.2 “汤液经法图”可为中药临床药师开展药学监护提供理论指导

“汤液经法图”与现有辨证论治体系不同, 是通过五脏的虚实认识疾病, 采用五味补泻及化合来治疗疾病, 展示了五脏虚实辨证思维, 是一种

严谨的中药复方与适应证的关联关系，对于中药组方配伍有重要的、独特的参考价值。然而，“汤液经法图”中对五味的界定与现行中药学教材不完全一致，是根据中药的五行属性和功效进行判定的。因此，运用“汤液经法图”视角下的五味来理解和认识中药，从而进行中医组方配伍，可能接近中药组方配伍原理。这也为中药临床药师判断中药组方与患者病证特点是否相符这一问题的客观评价提供了可能。首先根据患者四诊信息确定脏腑虚实，然后确定治法治则，再确定中药处方的主导药味。通过主导药味，分析中药处方的选药配伍与适应证是否相符，并给出合理化用药建议。例如，本例患者辨证是以肺虚为主，合并脾肾两虚，应以酸味药为主，合并甘、苦药味中药组方治疗。第一次处方以甘味为主，酸味药极少（2个），用药与证型不符，故患者汗出、口干、乏力症状改善不理想。第二次，调整处方后酸味药明显增加（6个），使得全方的主导药味变成酸、甘味，用药与证型相符，患者汗出、口干、症状明显改善，但乏力症状改善不明显。第三次处方，医师加大了苦味药和甘味药的用量，全方的主导药味变成酸、甘、苦味，患者诸症明显改善。

4.3 中西联合药学监护

中药与西药是治疗疾病的两个不同体系，但临床上患者多采用中西药联合治疗，只有中西药药学监护并重，才能更好地达到临床治疗效果。肾上腺危象的西医治疗原则以补充激素、抗休克、抗感染等治疗为主，采用外源性 GC 补充内源性激素，但 GC 辛温大热，易耗散阳气。中医认为，肾上腺危象的临床症状与肾阳虚证高度相似，肾阳虚是本病的关键，肺阴虚贯穿其中，应以温阳滋阴为法^[19]。本例患者药师采用“汤液经法图”分析，建议医师第二次处方调整后，处方组成以补肾滋阴药为主，患者服药后症状明显好转。GC 冲击治疗期间未发生胃肠道出血、二次感染等症状，临床症状也逐步减轻。由此可见，中药临床药师作为临床治疗参与者，需运用中西药学知识，提出合理的药物治疗方案。另一方面，中药与西药相比，少有现成的国内外指南参考可指导临床合理用药，中药临床药师开展药监护工作难度较高，难以开展中药处方合理性评价，而“汤液经法图”则为解决这一难题提供了契机，可根据“汤液经法图”辨证论治体系，提出中药组方建议，开展药学监护。中药临床药师通过西循证医学结合“汤液经法图”模式开展中西药联合药学监护实践值得进一步探索，可为进一步促进临床安全、合理用药提供参考。

参考文献

- [1] Husebye ES, Pearce SH, Krone NP, et al. Adrenal insufficiency[J]. Lancet, 2021, 397(10274): 613-629.
- [2] Martin-Grace J, Dineen R, Sherlock M, et al. Adrenal insufficiency: physiology, clinical presentation and diagnostic challenges[J]. Clin Chim Acta, 2020, 505: 78-91.
- [3] 金锐, 李凡.《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 479-483.
- [4] 金锐, 方子寒, 朱贺, 等. “汤液经法图”五味化合理论的数学模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 191-199.
- [5] 金锐, 韩晟. “汤液经法图”系列研究之四: 五味化合规律的数理分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1036-1041.
- [6] 梁·陶弘景撰; 张大昌, 钱超尘主编.《辅行诀五脏用药法要》传承集[M]. 北京: 学苑出版社, 2008.
- [7] 金锐, 王静, 齐明月, 等. 从“汤液经法图”角度探讨陈无择天干十方的组方用药规律[J]. 中南药学, 2024, 22(8): 2090-2094.
- [8] 张爽, 郭红叶, 金锐. 从《辅行诀》所载“汤液经法图”角度论证半夏泻心汤类方的泻脾功效[J]. 中南药学, 2024, 22(3): 580-585.
- [9] 郭红叶, 田佳鑫, 张爽, 等. 基于《辅行诀》所载“汤液经法图”解析心病治疗的经方时方与医案[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 472-478.
- [10] 于琪, 郭红叶, 高婷婷, 等. 运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药治疗痹证的药学监护及干预 1 例[J]. 中南药学, 2024, 22(3): 592-597.
- [11] 杨寿圆, 龚宗玉, 王华阳, 等. 运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药汤剂治疗消渴病的药学监护 1 例[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 496-502.
- [12] Nowotny H, Ahmed SF, Bensing S, et al. Therapy options for adrenal insufficiency and recommendations for the management of adrenal crisis[J]. Endocrine, 2021, 71(3): 586-594.
- [13] Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, et al. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101(2): 364-389.
- [14] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 698-700.
- [15] Pang X, Pu T, Xu L, et al. Effect of l-thyroxine administration before breakfast vs at bedtime on hypothyroidism: a meta-analysis[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2020, 92(5): 475-481.
- [16] de Mello RB, Giassi K, Stahl G, et al. Evaluation of bedtime vs. morning levothyroxine intake to control hypothyroidism in older patients: a pragmatic crossover randomized clinical trial[J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 828762.
- [17] 田月, 徐蓓, 余克富, 等. 铁剂的药学特性与药学监护[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(12): 13-18.
- [18] Gruber LM, Bancos I. Secondary adrenal insufficiency: recent updates and new directions for diagnosis and management[J]. Endocr Pract, 2022, 28(1): 110-117.
- [19] 范锐, 王雅芸, 张伟. 从肺肾相关探讨滋阴温阳法治疗原发性慢性肾上腺皮质功能减退症[J]. 山东中医杂志, 2023, 42(6): 549-553.

(收稿日期: 2024-08-09; 修回日期: 2024-10-10)

基于电子病历文本的运动障碍监测模块构建与应用

崔利强^{1, 2, 3}, 郭代红^{2, 3*}, 朱曼^{2, 3}, 王天琳², 高奥^{2, 3}, 赵安琪^{1, 2, 3}, 伏安^{1, 2, 3}, 肖静^{2, 3, 4}
(1.解放军医学院, 北京 100853; 2.中国人民解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100853; 3.解放军ADR监测中心, 北京 100853; 4.重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要: **目的** 基于电子病历文本和临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统 - II (ADE-ASAS- II), 构建住院人群运动障碍 (MDs) 自动监测模块, 并开展小样本研究, 为药源性运动障碍 (DIMDs) 研究提供辅助工具。**方法** 整理文献指南、自发报告和电子病历资料形成关键词集, 基于系统构造和文本分类技术构建并优化 MDs 自动监测模块, 另选时间段运行模块得到 DIMDs 病例, 对其人群特征、表现和关联药品等统计分析。**结果** 选取 2022 年 10 月 10 日—16 日的 4918 例次住院患者, 经过反复机器学习、模块调试, 确定最佳设置条件。监测 2022 年 3 月 14 日—20 日 4438 例次住院患者, 得到 DIMDs 病例 52 例次, 发生率为 1.17%, 属于常见药品不良反应 (ADR), 年龄分布以 65 岁以上为主。排名前 5 位表现是震颤、张力亢进、张力障碍、肌肉不自主收缩、运动障碍。药物品种排序靠前的是抗生素、抗癫痫药、抗抑郁药、抗心律失常药、抗焦虑药、化学合成的抗菌药。相关药物排名靠前的是丙戊酸钠、艾司唑仑、亚胺培南-西司他丁钠、左氧氟沙星、利多卡因、布地奈德。**结论** 基于 ADE-ASAS- II 构建 MDs 自动监测模块, 可实现快速定位目标病例开展统计分析。DIMDs 在临床发生常见, 有必要在临床工作中加以关注。

关键词: 药源性运动障碍; 文本分类; 自动监测; 电子病历

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)02-0569-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.044

Establishment and application of a module for automatic monitoring of movement disorders based on electronic medical records

CUI Li-qiang^{1, 2, 3}, GUO Dai-hong^{2, 3*}, ZHU Man^{2, 3}, WANG Tian-lin², GAO Ao^{2, 3}, ZHAO An-qi^{1, 2, 3}, FU An^{1, 2, 3}, XIAO Jing^{2, 3, 4} (1. *Medical School of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853*; 2. *Department of Pharmacy, Medical Supplies Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853*; 3. *Adverse Drug Reaction Monitoring Center of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853*; 4. *College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016*)

Abstract: Objective To develop an automatic monitoring module for movement disorders (MDs) in the adverse drug event active surveillance and assessment system- II (ADE-ASAS- II) with text data from electronic medical records, and provide an auxiliary tool for identifying drug-induced movement disorders (DIMDs) from hospital information system (HIS). **Methods** The set of keywords was collected from literature guidelines, spontaneous reports, and electronic medical records. Based on the system structure and text classification technology, the automatic monitoring module for MDs was constructed, optimized, and subsequently used to identify DIMDs. The module was run for an alternative period to obtain cases of DIMDs, which were statistically analyzed for characteristics, manifestations, and associated drugs. **Results** Totally 4918 hospitalized patients were selected from October 10 to 16, 2022. After repeated machine

基金项目: 中国研究型医院学会专项项目 (No.Y2023FH-YWPJ03); 2017 年医学创新工程重点项目 (No.17CXZ010)。

作者简介: 崔利强, 男, 硕士研究生, 药师, 主要从事临床药理学和药物警戒研究, email: cui_liqiang9882022@163.com * 通信作者: 郭代红, 女, 教授, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学和药物警戒研究, email: guodh301@163.com

learning iterations and module debugging, the optimal settings were established. Totally 4438 hospitalized patients were monitored from March 14 to 20, 2022, and 52 DIMDs cases were collected, with an incidence rate of 1.17%, common ADR, mainly among over 65 years old. The top 5 manifestations included tremors, hypertonia, dystonia, involuntary muscle contractions, and dyskinesia. The top 5 drug categories included antibiotics, antiseizure drugs, antidepressants, antiarrhythmic drugs, and anxiolytic drugs, while sodium valproate, estazolam, imipenem-cilastatin sodium, levofloxacin, lidocaine, and budesonide were the top associated drugs. **Conclusion** The automatic monitoring module, based on the ADE-ASAS- II may quickly locate target cases. DIMDs are common in clinical practice and require attention.

Key words: drug-induced movement disorders; text classification; automatic monitoring; electronic medical record

医院信息系统 (hospital information system, HIS) 数据中蕴含丰富真实世界数据, 包括量化检验指标和非结构化电子病历文本信息, 真实世界研究基于此获得真实临床证据来评估药品安全性等问题^[1]。运动障碍性疾病是一类以随意运动迟缓、不自主运动、肌张力异常、姿势步态障碍等运动症状为主要表现的神经系统疾病^[2], 药源性运动障碍 (drug-induced movement disorders, DIMDs) 是其中一种亚型, 早期发现后及时停药多可恢复^[3]。国内外相关研究多针对单一药品不良反应 (adverse drug reaction, ADR) 或疾病, 因此, 不同亚型的发生率因研究对象和目的不同而略有差异。药源性帕金森综合征是主要研究目标 ADR 之一, 作为帕金森病的第二大常见原因, 发生率在 2% ~ 50%^[4]。美国食品药品监督管理局于 2020 年对孟鲁司特钠药品进行黑框警告, 提示其可导致震颤、抽搐等不良反应^[5]。近年信息技术发展促进 ADR 主动监测工作进展, 本团队自主研发的“临床 ADE 主动监测与智能评估警示系统 - II” (ADE-ASAS- II) 经过多年运行完善, 已逐步实现基于病历数据对重点药品或 ADR 开展主动监测工作^[6]。因此, 本研究借助系统和文本分类技术构建运动障碍 (movement disorders, MDs) 自动监测模块, 并开展 DIMDs 主动监测分析, 以期为临床提供借鉴。

1 资料和方法

1.1 数据资料

基于某三甲医院 (以下简称“某院”) HIS 病历数据, 对其病历资料 (患者人口学信息、诊断记录、病程记录、医嘱信息、住院时长等信息) 进行统计分析。

1.2 MDs 自动监测模块构建流程

1.2.1 选取关键词集 依据《药品不良反应术语指南》《WHO 药品不良反应术语集》、MedDRA 26.0、

《常见不良事件评价标准 (CTCAE) 5.0》和国内外文献指南, 结合 DIMDs 自发报告和某院电子病历文本描述, 整理建立关键词集。示意图见图 1。

1.2.2 确定评价指标 选择阳性预测值 (PPV, 又称灵敏度)、召回率 (R)、F 值和约登指数 (Youden 指数)。其中, $PPV = \text{真阳性例数} / (\text{真阳性例数} + \text{假阳性例数}) = TP / (TP + FP)$; $R = \text{真阳性例数} / (\text{真阳性例数} + \text{假阴性例数}) = TP / (TP + FN)$; F 值是 PPV 和 R 的调和平均值; Youden 指数是 PPV 和 R 之和减去基数 (1 或 100%)^[7]。

1.2.3 反复系统运行和验证分析 基于系统和文本分类技术识别提取电子病历中的关键词, 选取小样本反复机器学习并优化、检验报警规则设置。

1.3 纳入与排除标准

纳入标准: ① 住院期间发生 MDs 相关表现; ② 会诊记录或病程记录中明确记录考虑 MDs; ③ 住院诊断 MDs 相关疾病 (重点选取帕金森综合征、肌张力障碍、震颤), 符合任何一条即可。

排除标准: ① 24 h 出入院患者; ② 电子病历信息不全; ③ 入院病程记录中即有 MDs 表现。

1.4 阳性病例评价标准

阳性病例: 住院期间出现任一 MDs 表现患者。

ADR 关联性评价标准: 系统报警所得疑似阳性病例, 依据纳排标准及 Naranjo 因果关联评价标准评估^[8], 评分 ≥ 1 的认定为 MDs 表现的发生与药物之间具有关联性, 即 DIMDs。

1.5 数据处理和统计分析

根据《国际疾病分类》第 11 版 (ICD-11) 对疾病诊断进行分类; 根据《新编药理学》(第 18 版) 和《WHO 不良反应术语集 (WHO-ART)》中首选术语 (PT) 分别对药物类别和 ADR 名称进行整理。当同一报告累及多种 MDs 表现时, 分别计算例次。

运用 SPSS 26.0、Excel 2021, 对病例基本信息、药物类别和名称等信息进行统计分析。计量资



图 1 初始关键词选取示意图

Fig 1 Diagram of initial keywords selecting

料采用 K-S 检验判断是否符合正态分布，符合正态分布的计量资料用平均值和方差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，使用独立样本 t 检验、方差分析进行组间比较。非正态分布资料用中位数和四分位数 [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示，非参数检验进行组间比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 模块构建、优化和验证

基于文献阅读和病历学习，整理合并后得到 35 个初始关键词（见表 1）。回顾性提取 2022 年 10 月 10 日—16 日共计 4918 例次住院患者病历。人工逐例翻阅病历，依据纳排标准确定阳性病例，共计 146 例次。系统中运行初始关键词集得

到报警病例。

整理分析假阴性病历（即阳性未报警病历），假阳性病历（即阴性报警病历）优化关键词集，从排除诊断、忽略文本和忽略文档标题三方面优化排除标准，见图 2。再综合各优化方案形成方案 B，PPV 和 R 值均较前明显提升（见表 2）。

3 52 例 DIMDs 特征分析

自动监测某院 2022 年 3 月 14 日—20 日的住院患者共计 4438 例次，系统报警 738 例次，经过人工甄别得到 MDs 432 例次，发生率为 9.73%；得到 52 例次 DIMDs，发生率为 1.17%，属常见 ADR。

表 1 模块条件优化设置方案

Tab 1 Optimizing setting scheme of module condition

方案	症状体征关键词	诊断	排除诊断	忽略文本	忽略文档标题
A	迟发性运动障碍, 动眼神经危象, 痉挛, 舞蹈症, 肌肉不自主收缩, 角弓反张, 帕金森, 扑翼样震颤, 手足搐搦, 图雷特综合征, 手足徐动, 斜颈, 运动功能减退, 运动过度, 运动徐缓, 运动障碍, 张力减退, 张力亢进, 张力障碍, 震颤, 锥体外系, 左旋多巴, 肌阵挛, 反射亢进, 颤抖, 抖动, 不自主运动, 舞蹈样运动, 四处走动, 踱步, 面部扭曲, 僵硬, 齿轮样, 铅管样, 持续肌肉收缩	无	无	无	无
B	迟发性运动障碍, 动眼神经危象, 痉挛, 舞蹈症, 肌肉不自主收缩, 角弓反张, 帕金森, 扑翼样震颤, 手足搐搦, 图雷特综合征, 手足徐动, 斜颈, 运动功能减退, 运动过度, 运动徐缓, 运动障碍, 张力减退, 张力亢进, 张力障碍, 震颤, 锥体外系, 左旋多巴, 肌阵挛, 反射亢进, 颤抖, 抖动, 不自主运动, 舞蹈样运动, 四处走动, 踱步, 面部扭曲, 僵硬, 齿轮样, 铅管样, 持续肌肉收缩, 功能性运动障碍, 抽动, 折刀样, 肌张力增高, 肌张力减弱, 不安腿, 不宁腿, 活动受限	震颤, 帕金森, 肌张力障碍	无	室壁运动障碍、伸舌无震颤、虹膜震颤、冠脉痉挛、血管痉挛、眼震颤、动脉痉挛、未触及心前区震颤、未及震颤、未触及震颤、液波震颤	住院告知书, 入院宣教, 同意书, 志愿书, 术前小结, 术前讨论, 病情介绍, 病危病重通知书, 其他记录, 取血单, 检查报告粘贴单, 转出记录, 通知书, 告知书, 审批表, 手术记录, 阶段小结, 死亡报告表, 出院介绍信及证明书, 接班记录

表 2 模块条件优化结果

Tab 2 Optimization of module condition

方案	真阳性 / 例	假阳性 / 例	假阴性 / 例	真阴性 / 例	PPV/%	R/%	F/%	Youden 指数
A	130	1194	16	3563	9.82	89.04	0.18	-0.01
B	138	578	8	4179	19.27	94.52	0.32	0.14

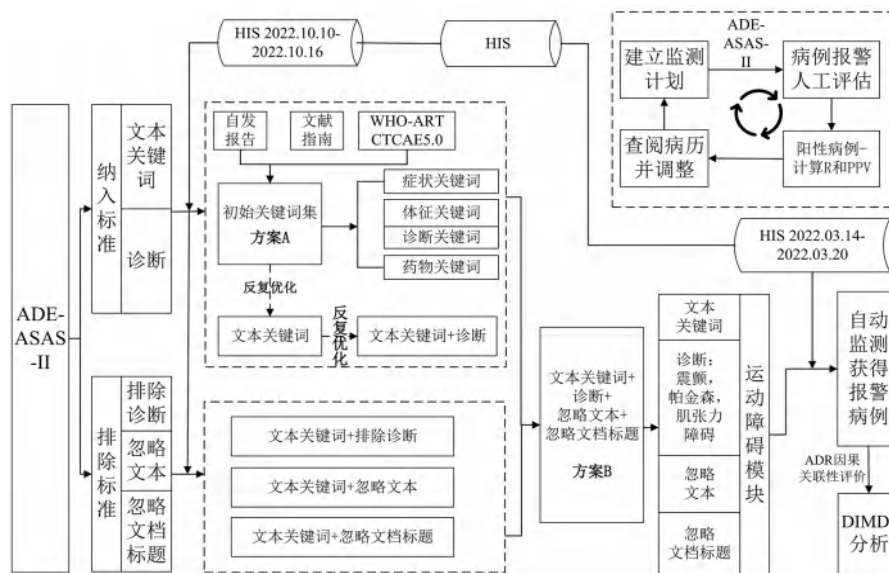


图 2 自动监测模块构建应用运行图

Fig 2 Establishment and application of automatic monitoring module

3.1 DIMDs 人群特征分析

DIMDs 病例关联性评价结果为“很可能”的有 3 例 (5.77%), “可能” 49 例 (94.23%)。病例中男女比为 1.6 : 1。年龄最大为 97 岁, 最小为 3 岁, 平均 (62.5 ± 26.37) 岁, 不同性别的年龄构成差异无统计学意义 ($t = 1.51, P > 0.05$)。对年龄进行分组统计, 不同性别的年龄分组构成无明显差异 ($\bar{x} = 3.87, P > 0.05$)。详见表 3。住院科室和住院时长分析结果见表 4。

表 3 DIMDs 患者基本情况

Tab 3 Basic information of DIMDs cases

年龄 / 岁	女性		男性		合计	
	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %
< 18	4	7.69	2	3.85	6	11.54
18 ~ 44	3	5.77	7	13.46	10	19.23
45 ~ 64	6	11.54	6	11.54	12	23.08
≥ 65	7	13.46	17	32.69	24	46.15
合计	20	38.46	32	61.54	52	100.00

表 4 DIMDs 患者住院科室和时间

Tab 4 Department and stay time of DIMDs cases

类别	阳性病例 [n (%)]
住院科室	
神经内科	15 (28.85)
神经外科	3 (5.77)
大于 1 例 的其他 科室	儿科 [5 (9.62)], 呼吸科 [4 (7.69)], 老年医学科 [4 (7.69)], 针灸科 [3 (5.77)], 肾脏病科 [2 (3.85)], 心血管内科 [2 (3.85)], 血液科 [2 (3.85)], 肿瘤内科 [2 (3.85)], 重症医学科 [2 (3.85)]
住院时间 /d	
≤ 14	10 (19.23)
15 ~ 30	18 (34.62)
30 ~ 90	15 (28.85)
> 90	9 (17.30)

表 5 DIMDs 症状表现及相应药物分布

Tab 5 Symptoms and manifestations of DIMDs and drug distribution

ADR 表现 (PT)	例次	构成比 /%	大于 1 例的相关药物类别
震颤	22	32.35	主要作用于中枢神经系统的药物 (9), 抗感染药物 (5), 主要作用于心血管系统的药物 (4), 维生素、营养类药物、酶抑制药物及调节水、电解质和酸碱平衡用药物 (2)
张力亢进	11	16.18	主要作用于中枢神经系统的药物 (5), 主要作用于心血管系统的药物 (2)
张力障碍	10	14.71	主要作用于中枢神经系统的药物 (5), 抗感染药物 (2), 主要作用于心血管系统的药物 (2)
肌肉不自主收缩	9	13.24	主要作用于中枢神经系统的药物 (4), 抗感染药物 (2)
运动障碍	8	11.76	主要作用于中枢神经系统的药物 (3)
反射亢进	3	4.41	/
运动过度	2	2.94	/
共济失调	1	1.47	/
肌无力	1	1.47	/
张力减退	1	1.47	/
合计	68	100.00	/

注: ADR 表现按照 WHO-ART 进行整理, 有多种表现的分别计算出现例次。

Note: ADR manifestation is classified by WHO-ART. Cases with multiple manifestations were counted separately.

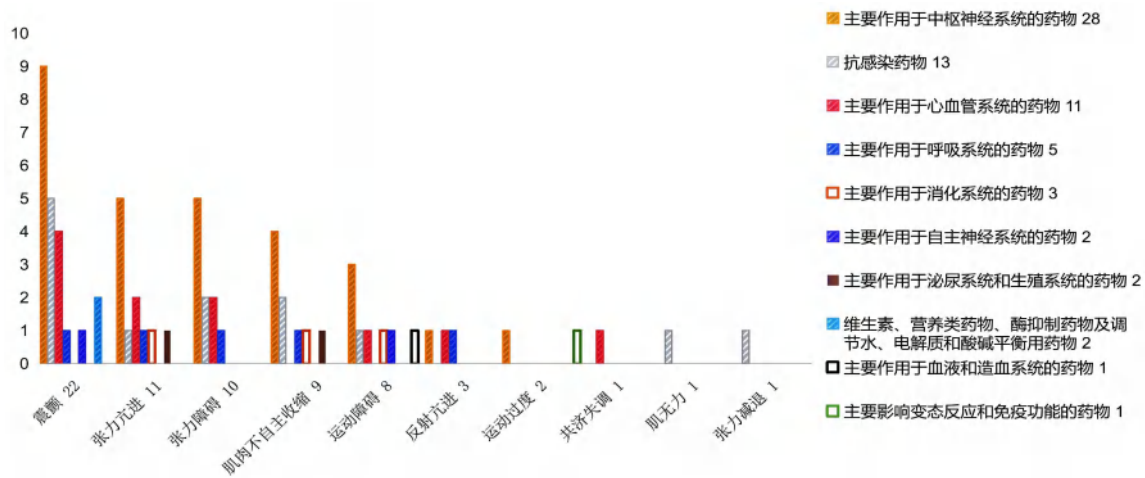


图 3 DIMDs 症状表现及关联药物类别分布情况

Fig 3 Drugs categories distribution involving symptoms and manifestations of DIMDs cases

HIS 数据是产生真实世界证据用于药物评价工作的重要基础^[9], 而文本分类是将文本自动归入预先定义好的主题类别中, 是有监督的机器学习方法, 可应用于自动索引、文本过滤、词义消歧和 Web 文档分类等^[10]。国内外 ADR 自动监测主要借助人

3.2 DIMDs 表现、发生时间分析

按照 WHO 不良反应术语集对 52 例 DIMDs 病例表现进行整理, 以 PT 表现计算例次, 详见表 5 及图 3。ADR 发生时间以 7 d 以上居多, 占比 59.61%。

3.3 DIMDs 相关药物分布

按照《新编药理学》(第 18 版), 对其药物类别、品种和名称进行规范整理。相关药物主要是丙戊酸钠、艾司唑仑、亚胺培南 - 西司他丁钠、左氧氟沙星、利多卡因、布地奈德, 结果见表 6。

4 讨论

4.1 文本分类技术辅助实现住院患者 ADR 主动监测

能技术设计系统对接病历系统获取信息, 工作形式包括指定目标 ADR 监测或利用全面触发工具实现全面监测^[11-12]。国内现有“中国医院药物警戒系统”和多个全面触发主动监测系统^[13-14], 本研究所用系统已实现对多种药物甚至全部在用药物对应同一种或

表 6 前 5 位 DIMDs 相关药物分布
Tab 6 Top 5 drug distribution of DIMDs cases

序号	相关药物类别 / 例次	相关药物品种 / 例次	大于 1 例的药物名称 / 例次
1	主要作用于中枢神经系统的药物 (21)	抗癫痫药 (7), 抗抑郁药 (4), 抗焦虑药 (3), 抗精神病药 (2), 镇静药、催眠药和抗惊厥药 (1), 抗老年痴呆药和脑代谢改善药 (1), 抗脑血管病药 (1), 镇痛药 (1), 其他 (1)	丙戊酸钠 (3), 艾司唑仑 (3), 度洛西汀 (2)
2	抗感染药物 (11)	抗生素 (8), 化学合成的抗菌药 (3)	亚胺培南 - 西司他丁钠 (3), 左氧氟沙星 (3), 头孢哌酮钠 (2)
3	主要作用于心血管系统的药物 (6)	抗心律失常药 (4), 调节血脂药及抗动脉粥样硬化药 (2)	利多卡因 (3), 阿托伐他汀 (2)
4	主要作用于呼吸系统的药物 (3)	平喘药 (3)	布地奈德 (3)
5	主要作用于自主神经系统的药物 (2)	抗肾上腺素药 (2)	/

多种 ADR 的自动监测和智能警示分析, 可挖掘更多信息供临床参考^[6]。本研究从电子病历非结构化文本资料入手, “积木”式构建模块并应用于 DIMDs 主动监测, 可筛除 81.73% 的假阳性病例。同时, 模块构建过程可灵活迁移应用于其他相关 ADR 监测设计, 为系统功能拓展和后续研究提供更多可能^[15]。不同地域、不同医院的病历文本书写各有特色。模块构建考虑这一特性, 针对性结合特定医疗结构病历对模块优化调整, 使模块性能兼具全面性与特异性, 并有待后续应用中提升召回率^[6]。

4.2 DIMDs 表现处置和住院时长

本研究指出, MDs 发生率为 9.73%, DIMDs 发生率为 1.17%。既往研究提示 MDs 患病率为 28.0%, 较本研究高, 可能与文献所选年龄段目标人群为高发人群 (50 ~ 89 岁) 有关^[16]。

既往有多个分类系统用于 DIMDs 表现分类, 但缺少单一系统包含全部异常运动表现^[17]。文献报道病例以 65 岁以上老年人为主, 可能与其多重合并用药、并发神经系统基础疾病、住院原发危重症有关^[18-19]。DIMDs 表现和发生部位多种多样, 与具体关联药物有关^[20]。如震颤可表现为双手上肢静止性震颤、下肢运动性震颤等, 可发生于口面部、上肢或下肢, 可能由原发疾病、药物、电解质紊乱等原因引起^[21]。肌张力障碍为骨骼肌的异常运动, 可表现在身体任何肌肉群, 其中颈部、面部和四肢是最常受累部位^[22]。ADR 因果关联性评价主要通过排除诊断明确^[20], 给 ADR 识别诊断带来难度。

DIMDs 发生时间较长, 提示拓展时间追溯范围为 7 d 甚至更早时间。本研究纳入病例原患疾病较多、住院时长较长, 且多为多重用药危重症老年患者, 干扰 ADR 识别诊断^[23]。

4.3 DIMDs 关联药物和可能机制

关联药物中, 主要作用于中枢神经系统的

药物占比最高^[24]。抗癫痫药物所致 DIMDs 表现为剂量依赖性, 可能与个体基因或药物代谢有关^[25]。一项基于 FAERS 数据库的研究指出, DIMDs 已成为癫痫治疗中不可忽视的不良反应, 最多的是震颤、MDs、精神运动性多动^[26]。抗癫痫药物左乙拉西坦和普瑞巴林与 MDs 的早期发病有关^[27]。艾司唑仑广泛应用于住院期间睡眠障碍, 其大剂量可导致震颤, 属常见范围, 文献报道对此提及甚少。新型抗精神病药的研制基于传统抗精神病药, 减少了其锥体外系不良反应^[28-29]。本研究仅报告 2 例新型抗精神病药相关病例 (奥氮平、喹硫平), 提示信息有限。

抗感染药物占比排名第二, 主要是亚胺培南 - 西司他丁钠、左氧氟沙星和头孢哌酮钠^[30-31]。亚胺培南 - 西司他丁钠的中枢神经系统毒性多表现为肌阵挛、抽搐、震颤、癫痫发作, 需重点关注老年人、肾功能不全、中枢神经系统疾病史患者^[32]。左氧氟沙星的中枢神经系统毒性可表现为震颤、感觉异常等, 可能与透过血脑屏障特性相关^[19]。另有研究提示, 胺碘酮引起 MDs 是剂量相关的, 其发生率可在 5% ~ 70% 波动, 多为可逆性表现, 停药后 3 d ~ 3 个月可恢复^[20]。

不同类型 DIMDs 关联药物略有区别。肌张力障碍相关药物主要有左旋多巴、多巴胺受体激动剂 / 阻断剂、抗惊厥药、钙通道阻滞剂^[22]。本研究基于 52 例 DIMDs 病例, 样本量有限, 有待扩大样本量展开研究。

5 结论

综上, 本研究基于 ADE-ASAS-II, 运用文本分类技术构建自动监测模块, 初步探索真实世界 DIMDs 发生情况及后续进行大样本研究的可行性。住院人群中 DIMDs 发生属于常见范围, 关联药物多以主要作用于中枢神经系统药物、抗感染药物和主要作用于心血管系统药物为主, 有必要加以关

注。基于系统开展 ADR 自动监测,可协助临床工作人员更快定位目标病例,提升科研和工作效率。

参考文献

- [1] 薛雪, 金信妍, 鲁春丽, 等. 真实世界研究设计在上市后药品安全性评价的应用[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(11): 1025-1028.
- [2] 贾建平, 陈生地. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 328-348.
- [3] Factor SA, Burkhard PR, Caroff S, et al. Recent developments in drug-induced movement disorders: a mixed picture[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(9): 880-890.
- [4] de Gernay S, Montastruc F, Carvajal A, et al. Drug-induced parkinsonism: revisiting the epidemiology using the WHO pharmacovigilance database[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, 70: 55-59.
- [5] 惠红岩, 周祥, 郭晓鹤, 等. 孟鲁司特致神经精神不良反应文献分析[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1450-1454.
- [6] 郭代红, 于承暄. 基于医院信息系统数据的临床用药风险自动监测评价专家共识[J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18(5): 277-287.
- [7] 熊宇韬, 钟程澜, 曾维, 等. 基于机器学习的诊断试验准确性研究(二): 测量指标[J]. 中国循证医学杂志, 2023, 23(8): 963-969.
- [8] 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.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 真实世界证据支持药物研发与审评的指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-04-15) [2024-09-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypqgtg/ypqgtg/20200107151901190.html>.
- [10] 吕婷, 姜友好. 文本挖掘在生物医学领域中的应用及其系统工具[J]. 中华医学图书情报杂志, 2010, 19(4): 56-64.
- [11] 熊代琴, 马雪英, 滕亮, 等. 利用全面触发工具建立住院患儿头孢菌素类药物不良反应主动监测预警模型[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(7): 663-668.
- [12] Ekici Z, Kurutkan MN, Ekici MA. Application of global trigger tools in university hospital and comparison to volunteer adverse events reporting system[J]. *Clin Lab*, 2024, 70(2): 311-319.
- [13] Nezu M, Sakuma M, Nakamura T, et al. Monitoring for adverse drug events of high-risk medications with a computerized clinical decision support system: a prospective cohort study[J]. *Int J Qual Health Care*, 2023, 35(4): mzad095.
- [14] 舒婷, 陈文戈, 侯永芳, 等. 基于 HIS 的哨点医院药物警戒系统的应用[J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3468-3471.
- [15] 姚翀, 刘东杰, 郭代红, 等. 临床药物不良事件主动监测与智能评估警示系统 II 的研发[J]. 中国药物应用与监测, 2020, 17(6): 387-391.
- [16] Wenning GK, Kiechl S, Seppi K, et al. Prevalence of movement disorders in men and women aged 50—89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study[J]. *Lancet Neurol*, 2005, 4(12): 815-820.
- [17] Rissardo JP, Caprara ALF. Parkinson's disease rating scales: a literature review[J]. *Ann Mov Disord*, 2020(3): 3-22.
- [18] 中华医学会临床药学分会. 老年人心血管疾病合并神经精神疾病多重用药风险防控专家共识[J]. 中国药房, 2022, 33(23): 2817-2825.
- [19] 温爱萍, 李丹丹, 鲍晓龙. 亚胺培南/西司他丁致成人危重症患者中枢神经系统不良反应发生情况及其危险因素分析[J]. 中国药物应用与监测, 2019, 16(2): 89-92.
- [20] Baizabal-Carvalho JF, Morgan JC. Drug-induced tremor, clinical features, diagnostic approach and management[J]. *J Neurol Sci*, 2022, 435: 120192.
- [21] 周鹏, 孟杨. 1 例老年 COPD 急性加重患者多药联用致震颤的诊治分析[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1063-1066.
- [22] Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, et al. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update[J]. *Mov Disord*, 2013, 28(7): 863-873.
- [23] Sato K, Niimi Y, Mano T, et al. Time to onset of drug-induced parkinsonism: analysis using a large Japanese adverse event self-reporting database[J]. *Biosci Trends*, 2022, 16(2): 151-157.
- [24] Zhou DJ, Pavuluri S, Snehal I, et al. Movement disorders associated with antiseizure medications: a systematic review[J]. *Epilepsy Behav*, 2022, 131(Pt A): 108693.
- [25] 李聃, 秦利芬, 李惠英. 抗癫痫药物所致不良反应的研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(24): 175-176.
- [26] Zhou JX, Wei ZP, Chen SY, et al. Movement disorders associated with antiseizure medications: a real-world disproportionality analysis of the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2023, 89(11): 3389-3400.
- [27] 赵明, 梁良, 朱愿超, 等. 度洛西汀致不良反应文献分析[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(22): 2701-2704.
- [28] Divac N, Prostran M, Jakovcevski I, et al. Second-generation antipsychotics and extrapyramidal adverse effects[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 656370.
- [29] 翁加俊, 于文娟, 李华芳. 药物治疗抗精神病药所致锥体外系反应的进展[J]. 中国临床药学杂志, 2019, 28(1): 73-76.
- [30] Deshayes S, Coquerel A, Verdon R. Neurological adverse effects attributable to β -lactam antibiotics: a literature review[J]. *Drug Saf*, 2017, 40(12): 1171-1198.
- [31] 操银针, 祝亚文. 抗感染药物致中枢神经系统不良反应 503 例国内文献分析[J]. 药物流行病学杂志, 2018, 27(5): 345-349.
- [32] 倪文骐, 熊琪, 袁凤仪, 等. 亚胺培南/西司他丁致中枢神经系统不良反应的文献分析[J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(1): 91-94.

(收稿日期: 2024-09-12; 修回日期: 2024-12-16)

药品不良反应

不同局部麻醉对左心耳封堵术中经食管超声心动图相关口咽部并发症的影响

徐佳佳^{1, 2}, 周静², 范虞琪², 张俊峰², 李磊¹, 张宗荣^{2*} (1. 同济大学附属上海市宝山区淞南镇社区卫生服务中心, 上海 200441; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200011)

摘要: **目的** 探讨在左心耳封堵术中患者不同咽部局部麻醉方法对经食管超声心动图 (TEE) 相关咽部并发症的影响。**方法** 回顾性分析 118 例行左心耳封堵术的房颤患者, 分为利多卡因胶浆组 ($n = 41$)、利多卡因气雾剂组 ($n = 38$)、联合给药组 ($n = 39$), 观察各组术后口咽部并发症 (吞咽痛、声音嘶哑、口咽部出血) 和次要指标 (插镜次数、插镜痛苦程度、消化道出血)。**结果** ① 三组人群在年龄及性别构成, 白蛋白、血小板计数、血红蛋白、肾小球滤过率、术前抗凝药使用差异均无统计学意义。② 与利多卡因胶浆组或利多卡因气雾剂组相比, 联合给药组能明显减少声音嘶哑 ($P = 0.049$), 但对口咽部出血 ($P = 0.657$)、吞咽痛 ($P = 0.861$) 无明显改善; 联合给药组能明显减少总口咽部并发症的发生 ($P = 0.041$)。③ 与利多卡因胶浆组或利多卡因气雾剂组相比, 联合给药组明显减少插镜次数 ($P < 0.01$)、减轻插镜痛苦表情评分 ($P < 0.01$), 但对消化道出血无明显影响。**结论** 利多卡因胶浆和利多卡因喷雾剂联合给药能够明显减少左心耳封堵患者 TEE 相关口咽部总体并发症的发生, 这可能与充分进行咽部麻醉能减少 TEE 时插镜次数及患者痛苦相关。

关键词: 利多卡因; 经食管超声心动图; 并发症

中图分类号: R76, R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)02-0576-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.02.045

Effect of different strategies of regional anesthesia on transesophageal echocardiography-related complications in atrial fibrillation patients undergoing left atrial appendage closure

XU Ji-ji^{1, 2}, ZHOU Jing², FAN Yu-qi², ZHANG Jun-feng², LI Lei¹, ZHANG Zong-qi^{2*} (1. Shanghai Baoshan District Songnan Town Community Health Service Center Affiliated to Tongji University, Shanghai 200441; 2. Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011)

Abstract: Objective To determine the impact of various regional anesthesia strategies on the complications associated with transesophageal echocardiography (TEE) in patients with atrial fibrillation undergoing left atrial appendage closure. **Methods** We retrospectively analyzed patients with atrial fibrillation undergoing left atrial appendage closure. Totally 118 patients included in the study were divided into 3 groups: a lidocaine hydrochloride mucilage treatment group (group 1, $n = 41$), a compound lidocaine hydrochloride spray treatment group (group 2, $n = 38$), and a combination treatment group with lidocaine hydrochloride mucilage and compound lidocaine hydrochloride spray (group 3, $n = 39$). The pharyngeal complications (dysphagia, hoarseness, and minor pharyngeal

基金项目: 上海市宝山区基层卫生品牌培育项目 (No.BSZK-2023-T04)。

作者简介: 徐佳佳, 女, 副主任医师, 主要从事心血管病诊治工作, email: 13916799696@139.com * 通信作者: 张宗荣, 男, 副主任医师, 主要从事心血管病诊治工作, email: zqzhangdoctor@126.com

bleeding) and other markers (number of TEE probe placement trials, face rating scale, and gastrointestinal bleeding) were evaluated. **Results** ① There were no obvious differences in the three groups, with respect to demographic characteristics (age or gender) and biochemical markers (albumin, platelets, hemoglobin and glomerular filtration rate). ② Compared with the lidocaine hydrochloride mucilage treatment group or the compound lidocaine hydrochloride spray treatment group, combined administration significantly reduced the hoarseness ($P = 0.049$), but did not significantly improve the oropharyngeal hemorrhage ($P = 0.657$) or swallowing pain ($P = 0.861$). Combined administration significantly reduced the incidence of total oropharyngeal complications ($P = 0.041$). ③ Compared with the other groups, there was a notable decrease in number of TEE probe placement trials or face rating scales in the combination group ($P < 0.01$), neither of the rate of gastrointestinal bleeding. **Conclusion** Combined administration of lidocaine hydrochloride mucilage and compound lidocaine hydrochloride spray can greatly reduce the incidence of overall TEE related oropharyngeal complications in patients with left atrial appendage closure, which may be related to the reduction of times of endoscopy and patient pain during TEE after adequate pharyngeal anesthesia.

Key words: lidocaine hydrochloride; transesophageal echocardiography; complication

经食管超声心动图 (transesophageal echocardiography, TEE) 是临床重要的超声诊断技术, 相对于经胸心脏超声, 它是经食道位于左房后壁探测心脏, 超声衰减较少, 不受肥胖、胸廓畸形以及肺气肿等因素影响, 图像清晰, 明显提升超声图像分辨率, 能更加清晰地观察心脏瓣膜、房室缺损、左房血栓^[1-3]。尤其在房颤左心耳封堵术中, TEE 能引导房间隔穿刺、评估左心耳封堵器位置, 是不可或缺的重要组成部分^[1, 4]。相对于经胸心脏超声有很多优点, 但作为一种侵入性操作, 检查过程中患者往往会感觉咽部不适、疼痛、恶心, 甚至会出现出血等并发症^[5]。即使在 TEE 检查前患者含服利多卡因胶浆进行咽部的局部麻醉减少痛苦, 但仍有不少并发症发生, 尤其最为常见的口咽部并发症^[5]。且左心耳封堵术中, 需要进行肝素化, TEE 插镜过程中咽部抵抗增加, 会增加出血风险。因此, 如何减少患者 TEE 检查过程中疼痛感及相关并发症的发生具有重要的临床意义。本研究拟对我院在 TEE 检查中如何减少患者痛苦及口咽部并发症经验进行总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择上海第九人民医院心内科 2020 年 11 月至 2022 年 2 月非瓣膜性房颤患者行左心耳封堵术 (包括房颤消融+左心耳封堵一站式) 共 118 例患者为回顾性分析对象, 男 72 例, 女 46 例, 年龄 58 ~ 88 岁。术前通过 TEE 排除了左心房血栓。所有入选非瓣膜性房颤患者均符合临床左心耳封堵手

术适应证^[6]: 患者卒中评分 (CHA₂DS₂-VASC) ≥ 2 分, 同时具有下列情况之一: ① 不适合或不愿意长期口服抗凝药的患者; ② 服用抗凝药基础上仍发生卒中或栓塞事件患者。记录患者的人口学资料 (性别、年龄、身高、体重), 临床生化指标 [血红蛋白 (Hb)、肾小球滤过率 (eGFR)、谷丙转氨酶 (ALT)、凝血酶原时间 (PT)、白蛋白 (ALB)、血小板计数 (PLT)], CHA₂DS₂-VASC 及出血评分 (HAS-BLED)。患者术前常规接受抗凝治疗 (低分子肝素、达比加群酯、利伐沙班), 择期进行左心耳封堵术, 所有左心耳封堵术均在麻醉科配合、TEE 指导下完成。相关的技术操作和器械使用由术者根据指南和诊疗常规进行。

1.2 相关定义

依据国内外房颤治疗管理各大指南与专家共识^[7-9]统一推荐的用于指导抗凝治疗的 CHA₂DS₂-VASC 和 HAS-BLED 评分:

① 根据患者存在卒中的危险因素计算 CHA₂DS₂-VASC 评分, 共 9 分, 得分越高代表发生卒中风险越大, 具体评分: 心力衰竭史、高血压史、糖尿病史、周围血管疾病史、女性 (各 1 分), 年龄 (≥ 75 岁, 2 分; 65 ~ 74 岁, 1 分), 缺血性脑卒中/短暂性脑缺血发作史 (2 分)。

② 根据患者存在出血的危险因素计算 HAS-BLED 评分, 共 9 分, 得分越高代表出血风险越大, 具体评分: 高血压控制不良收缩压 > 160 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)、脑卒中史、肾功能不全、肝功能不全、国际标准化比值 (INR) 不稳定、出血

史或出血倾向、年龄 > 65 岁、使用可导致出血的药物、酗酒 (各 1 分)。

1.3 TEE 检查方法及分组

符合《经食管超声心动图临床应用中国专家共识》中 TEE 检查的具体操作流程,术前患者空腹 6~8 h, TEE 检查前,麻醉师采用咪达唑仑镇静,患者平卧位,插镜前根据不同咽部局部麻醉方法进行分组:

① 利多卡因胶浆组 ($n = 41$): 采用利多卡因胶浆 20 mL 含服,一次 6~7 mL,在咽部含 1 min 后吞服;② 利多卡因气雾剂组 ($n = 38$): 采用利多卡因气雾剂,在助手配合下,气雾剂在患者咽部深部喷洒,共喷 3 次,一次间隔 30 s;③ 联合给药组 ($n = 39$): 采用利多卡因胶浆联合利多卡因气雾剂局部麻醉,操作同前。局部麻醉后行 TEE 检查。

1.4 观察终点

主要观察终点口咽部并发症,包括:① 吞咽痛,术后饮水或进食咽部疼痛;② 声音嘶哑,术后住院期间出现发声嘶哑;③ 口咽部出血,术后住院期间表现为患者术后咳痰带血或血块。

次要观察终点:① 插镜次数,尝试通过患者咽部插镜动作记录为 1 次插镜;② 插镜痛苦程度,插镜成功后,采用面部表情分级评分法 (face rating scale, FRS) 对患者插镜过程进行疼痛评估;③ 消化道出血,患者发生呕血或黑便等。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。一般资料的计量指标采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;组间比较采用 ANOVA 方差分析,事后检验多重组间比较采用 LSD (方差齐性) 或 Dunnett T3 检验 (方差不齐性);计量资料用例数表示,组间比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般资料比较

各组在年龄、性别构成、Hb、eGFR、ALT、凝血酶原时间、ALB、PLT 等方面差异均无统计学意义;各组 CHA₂DS₂-VASC 及 HAS-BLED 评分差异亦无统计学意义 (见表 1)。患者术前抗凝方式分别采用低分子肝素、达比加群酯、利伐沙班,各组抗凝方式构成差异无统计学意义 (见表 2)。

表 1 各组基线资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Baseline data of patients in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	性别 (男)	年龄 / 岁	Hb/ ($g \cdot L^{-1}$)	ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	PT/s	eGFR/[mL/ ($min \cdot 1.73 m^2$)]	ALB/ ($g \cdot L^{-1}$)	PLT/ ($10^9 \cdot L^{-1}$)	CHA ₂ DS ₂ - VASC/分	HAS- BLED/分
利多卡因胶浆组	41	22	74.4 ± 7.7	119.2 ± 13.0	45.5 ± 20.9	15.9 ± 2.6	54.8 ± 19.7	37.0 ± 5.6	209.8 ± 59.3	4.7 ± 1.7	3.0 ± 1.2
利多卡因气雾剂组	38	22	74.8 ± 9.6	114.2 ± 14.1	43.8 ± 16.1	16.2 ± 2.9	54.4 ± 24.3	39.2 ± 7.0	202.6 ± 50.9	4.6 ± 1.8	3.5 ± 1.1
联合给药组	39	28	72.5 ± 9.0	117.1 ± 13.5	42.6 ± 21.3	16.1 ± 2.4	60.5 ± 19.8	38.2 ± 6.8	193.7 ± 59.5	4.4 ± 1.7	3.5 ± 1.0

表 2 各组患者术前抗凝药比较 [*n*(%)]

Tab 2 Preoperative anticoagulant drugs in each group [*n*(%)]

组别	<i>n</i>	低分子肝素	达比加群酯	利伐沙班
利多卡因胶浆组	41	11 (26.8)	12 (29.3)	18 (43.9)
利多卡因气雾剂组	38	16 (42.1)	12 (31.6)	10 (26.3)
联合给药组	39	14 (35.9)	13 (33.3)	12 (30.8)

2.2 不同局部麻醉方式对 TEE 指导左心耳封堵术后口咽部并发症的影响

联合给药组的口咽出血 (10.3%) 较利多卡因胶浆组 (17.1%) 或利多卡因气雾剂组 (15.8%) 有减少趋势,但差异无统计学意义 ($P = 0.657$)。三组在改善吞咽痛方面差异无统计学意义 ($P = 0.861$)。联合给药组的声音嘶哑并发症 (2.6%) 较利多卡因胶浆组 (19.5%) 或利多卡因气雾剂组 (18.4%) 明显减少 ($P = 0.049$)。联合给药组 (20.5%) 总口咽部并发症明显少于利多卡因胶浆组 (43.9%) 或利多卡因气雾剂组 (44.7%) ($P = 0.041$) (见表 3)。

表 3 各组患者口咽部并发症比较 [*n*(%)]

Tab 3 Oropharyngeal complications in each group [*n*(%)]

组别	<i>n</i>	口咽出血	吞咽痛	声音嘶哑	总口咽部 并发症
利多卡因胶浆组	41	7 (17.1)	3 (7.3)	8 (19.5)	18 (43.9)
利多卡因气雾剂组	38	6 (15.8)	4 (10.5)	7 (18.4)	17 (44.7)
联合给药组	39	4 (10.3)	3 (7.7)	1 (2.6)	8 (20.5)
χ^2		0.840	0.298	6.029	6.387
<i>P</i>		0.657	0.861	0.049	0.041

2.3 不同局部麻醉方式对 TEE 操作的影响

联合给药组的 TEE 插镜次数 (1.6 ± 0.6) 明显低于利多卡因胶浆组 (2.2 ± 0.8) 或利多卡因气雾剂组 (2.3 ± 0.8) ($P < 0.01$)。联合给药组的 TEE 插镜痛苦表情评分 (3.6 ± 1.8) 明显低于利多卡因胶浆组 (6.5 ± 1.3) 或利多卡因气雾剂组 (5.7 ± 2.0) ($P < 0.01$)。但三组在消化道出血方面的差异无统计学意义 (见表 4)。

3 讨论

表 4 不同局部麻醉方式 TEE 插镜次数比较

Tab 4 Local anesthesia TEE insertion times

组别	n	插镜次数 / 次	痛苦表情评分 / 分	消化道出血 / [n (%)]
利多卡因胶浆组	41	2.2±0.8	6.5±1.3	1 (2.4)
利多卡因气雾剂组	38	2.3±0.8	5.7±2.0	1 (2.6)
联合给药组	39	1.6±0.6 ^{###}	3.6±1.8 ^{###}	1 (2.6)

注：与利多卡因胶浆组比较，** $P < 0.01$ ；与利多卡因气雾剂组比较，^{###} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the lidocaine hydrochloride mucilage treatment group, ** $P < 0.01$; compared with the compound lidocaine hydrochloride spray treatment group, ^{###} $P < 0.01$.

TEE 较传统经胸心脏超声相比，具有更高精确定度的优点。然而，作为一种侵入性检查，存在口咽部及消化道并发症的发生概率。同时操作过程中的不适感，可能会让患者产生恐惧、抵触等心理，对 TEE 操作和效果带来影响。本研究发现 TEE 检查时，采用利多卡因胶浆联合气雾剂喷洒咽部深处黏膜麻醉，可有效降低口咽部并发症、插镜次数和患者痛苦程度。

多项研究发现，口咽部并发症在 TEE 中最为常见，包括口咽部出血、声音嘶哑、吞咽困难或疼痛等^[10-12]，其中声音嘶哑最为多见，发生率在 12% ~ 25%，持续时间可达数周以上^[13-15]。本研究发现利多卡因胶浆组或利多卡因喷剂组，TEE 检查后声音嘶哑发生率较高，与既往研究类似，但是发生率要高于既往研究^[13]，这可能与本研究样本量偏少相关。另外，可能与研究人群不一致有关系，本研究纳入行左心耳封堵术的房颤患者，部分患者也接受房颤导管消融，手术暴露时间较长，不能排除术后上呼吸道感染加重声音嘶哑的因素。在本研究中采用利多卡因胶浆与利多卡因喷剂联合给药后，声音嘶哑发生率明显减少，提示咽部充分麻醉能减少声音嘶哑发生，但机制仍不明了，可能与充分麻醉减少咽部张力，减少探头对咽部压力有关^[8]。

本研究在口咽部出血情况比较中，排除三组抗凝药的偏倚前提下的研究结果显示，尽管出血降低效果不显著，但相对于其他两组，联合用药组出血有减少趋势。降低效果不显著可能与本研究样本量偏少，以及本研究有部分接受导管消融联合心耳封堵的“一站式”治疗患者，可能同时存在食管损伤，扩大了吞咽不适病例患者，有待今后扩大样本量进一步分层研究。尽管联合用药不能减少口咽部出血、吞咽困难的发生率，但是联合用药能够明显减少 TEE 在左心耳封堵中总口

咽部并发症的发生。口咽部并发症的显著减少可能与不同给药方式，使局部药物浓度不同有关。仅用胶浆或喷雾，药物在口咽深处停留时间短，局部药物浓度不够，麻醉效果不显著。而在利多卡因胶浆使用基础上联合喷雾剂给药方式时，细小喷管可以在更深口咽部的局部药物浓度增加，达到更深度麻醉效果。

TEE 检查中由于探头转向锁定、探头前曲过度、操作时间过长等原因，会造成消化道出血或血肿^[16-19]，尤其在左心耳封堵抗凝条件下，消化道出血风险可能进一步增加，本研究消化道出血发生率与既往研究结果（2.0% ~ 3.4%）类似^[19-20]。同时也有研究显示，通过适当的患者准备和细致的探头操作，即使是血小板减少的患者 TEE 仍可安全进行^[21]。本研究中，TEE 检查者充分避免上述操作原因，但由于左心耳封堵需要实时 TEE 引导，操作时间较常规 TEE 检查时间延长，所以无法完全避免长时间对食管黏膜的压迫损伤。故可以推断，口咽部的局部麻醉，对 TEE 引起的消化道出血并发症无明显影响。在本研究中，也得到了进一步证实，各组局部麻醉对消化道出血并发症无明显影响。

利多卡因等酰胺类局麻药已广泛运用于内镜等操作中，利于内镜进入食管^[22]。胶浆或凝胶制剂可进一步提高药物在给药局部的浓度，延长药物的扩散或释放速率，提高生物利用度以及药物的稳定性，减少不适感^[23-24]。本研究中联合给药组能明显减少 TEE 的插镜次数，即提高了一次插镜成功率，减少反复插镜对口咽部的摩擦机械损伤，这可能是联合用药能减少口咽部并发症的原因。同时，研究结果发现联合给药能够明显减少 TEE 患者痛苦表情评分。这可能是在利多卡因胶浆使用基础上，喷雾剂能更深度麻醉，使咽部肌肉更松弛，探头更容易顺利通过咽部，减少探头插入的疼痛感。

本研究发现联合使用利多卡因胶浆和利多卡因喷雾剂能够明显减少 TEE 患者总口咽部并发症的发生，这可能与充分进行咽部麻醉能减少 TEE 时插镜次数及患者痛苦相关。

参考文献

[1] Thamilarasan M, Klein AL. Transesophageal echocardiography (TEE) in atrial fibrillation [J]. *Cardiol Clin*, 2000, 18 (4): 819-831.
 [2] Bleakley C, Monaghan M. 3D transesophageal echocardiography in TAVR [J]. *Echocardiography*, 2020, 37 (10):

- 1654-1664.
- [3] 刘爽爽, 宋亚男, 李民. 经食管超声心动图在微创心脏手术中的应用进展 [J]. 中国微创外科杂志, 2023, 23 (10): 759-763.
- [4] 刘婷婷, 刘海兰, 邹文, 等. 经食管超声心动图在房颤患者左心耳封堵术中的应用价值 [J]. 江西医药, 2022, 57 (8): 847-849.
- [5] Main ML, Mayer SA, Rahko PS, et al. Interventional transesophageal echocardiography: background and coding review: a publication from the ASE advocacy committee [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2021, 34 (8): A14-A16.
- [6] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国左心耳封堵预防心房颤动卒中专家共识 (2019) [J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47 (12): 937-955.
- [7] January CT, Wann LS, Calkins H, et al. 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society in Collaboration With the Society of Thoracic Surgeons [J]. *Circulation*, 2019, 140 (2): e125-e151.
- [8] Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. Corrigendum to: 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): the task force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (40): 4194.
- [9] 中华医学会心血管病学分会, 中国老年学学会心脑血管病专业委员会, 中国生物医学工程学心律分会, 等. 心房颤动抗凝治疗中国专家共识 [J]. 中华内科杂志, 2012, 51 (11): 916-921.
- [10] 杨柳, 李红莲. 不同方式的超声心动图检查在卵圆孔未闭封堵术中的应用价值分析 [J]. 心血管病防治知识, 2023, 13 (31): 3-6.
- [11] Patel KM, Desai RG, Trivedi K, et al. Complications of transesophageal echocardiography: a review of injuries, risk factors, and management [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2022, 36 (8 Pt B): 3292-3302.
- [12] Borde DCK, Jasapara A, Shetty V, et al. Use of a video laryngoscope to reduce complications of transesophageal echocardiography probe insertion: a multicenter randomized study [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2022, 36 (12): 4289-4295.
- [13] Freitas-Ferraz AB, Bernier M, Vaillancourt R, et al. Safety of transesophageal echocardiography to guide structural cardiac interventions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75 (25): 3164-3173.
- [14] Practice guidelines for perioperative transesophageal echocardiography. An updated report by the American Society of Anesthesiologists and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Task Force on Transesophageal Echocardiography Anesthesiology [J]. 2010, 112 (5): 1084-1096.
- [15] 李响, 岳子勇. 气管导管套囊压术中管理的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2021, 41 (4): 955-959.
- [16] Owall A, Stahl L, Settergren G. Incidence of sore throat and patient complaints after intraoperative transesophageal echocardiography during cardiac surgery [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 1992, 6 (1): 15-16.
- [17] Orihashi K, Sueda T, Matsuura Y, et al. Buckling of transesophageal echocardiography probe: a pitfall at insertion in an anesthetized patient [J]. *Hiroshima J Med Sci*, 1993, 42 (4): 155-157.
- [18] Kallmeyer I, Morse DS, Body SC, et al. Case 2-2000. Transesophageal echocardiography-associated gastrointestinal trauma [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2000, 14 (2): 212-216.
- [19] Wray TC, Schmid K, Braude D, et al. Safety of transesophageal echocardiography performed by intensivists and emergency physicians in critically ill patients with coagulopathy and thrombocytopenia: a single-center experience [J]. *J Intensive Care Med*, 2021, 36 (1): 123-130.
- [20] Sack JS, Li M, Zucker SD. Bleeding outcomes following transesophageal echocardiography in patients with cirrhosis and esophageal varices [J]. *Hepatol Commun*, 2020, 5 (2): 283-292.
- [21] Kitkungvan D, Kalluru D, Lunagariya A, et al. Safety of transesophageal echocardiography in patients with thrombocytopenia [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2019, 32 (8): 1010-1015.
- [22] 陈燕, 赵刚, 王鹏宇, 等. 复合利多卡因胶浆时瑞马唑仑用于成人胃镜检查的半数有效剂量 [J]. 浙江医学, 2022, 44 (16): 1784-1787.
- [23] 秦鹏, 赵鹏, 刘新霞, 等. 含漱利多卡因复合小剂量咪达唑仑在肥胖患者无痛胃镜中的应用 [J]. 中国内镜杂志, 2023, 29 (2): 55-63.
- [24] 刘向荣, 宋少波, 柳胜安, 等. 利多卡因气雾剂在老年患者无痛胃镜诊疗中的应用 [J]. 实用老年医学, 2024, 38 (3): 265-269.

(收稿日期: 2024-06-22; 修回日期: 2024-07-28)



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	杜丽娜	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	张奕之	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	官 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	蒋兴华
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