



# 中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第21卷 第3期(总第206期) 2023年3月20日出版

## 目 次

### 顾问

周宏灏

### 主编

李焕德

### 社长

张毕奎

### 编辑部主任

邬志娟

### 主管单位

湖南省食品药品监督管理局

### 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 学杂志社

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 25.00 元, 全年 300.00 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](mailto:znyxzz2003@vip.163.com)

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2023 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

### 研究论文

- (557) 巴马汀通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路改善 CLP 诱导的脓毒症  
..... 贾鑫航, 李晓玲, 董方昕, 等
- (562) CTHRC1 基因在胃癌中的表达及其与预后和免疫细胞浸润的相关性  
分析 ..... 霍婷, 刘铁, 石军飞, 等
- (568) 瘀血痹胶囊对阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞损伤保护作用的药效物  
质筛选研究 ..... 田心宇, 王帅, 李天娇, 等
- (574) 狼毒大戟化学成分及抗肿瘤活性研究  
..... 张洲, 朱朋艳, 马金蓉, 等
- (582) 醋酸阿比特龙缓释微球的制备及其体内外释药特性的考察  
..... 刘茹, 杜丽平, 张丽, 等
- (589) 二氢杨梅素纳米粒的制备及其体外抗肿瘤研究  
..... 潘真真, 吴春梅, 林亚, 等
- (594) 毛蕊花糖苷防晒霜对紫外线辐射诱导大鼠皮肤损伤的保护作用  
研究 ..... 李晓琳, 王芃, 李茂星, 等
- (600) 基于漂浮和膨胀的盐酸二甲双胍胃滞留型缓释片研究  
..... 潘阳, 李伟, 黄侃, 等
- (607) 基于在体单向肠灌流模型探究去氢骆驼蓬碱衍生物 HM-Y-A 的肠  
吸收特性 ..... 高惠静, 王鑫, 李玉玲, 等
- (612) 阳离子化白及多糖作为非病毒基因载体的初步研究  
..... 王小旭, 杜昊洋, 姜美如, 等
- (618) 基于微流控芯片技术的瘀血痹胶囊治疗类风湿关节炎处方分析  
..... 唐颖, 包永睿, 王帅, 等
- (625) 高效治疗性抗体 CHO 细胞株的构建方法及其评价  
..... 刘治影, 罗顺, 吕芊锐
- (631) 大豆提取物对光甘草定的增溶及其抗氧化活性研究  
..... 张明欣, 张余, 张秀君, 等
- (637) 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析黄花菜的化学成分  
..... 权佳, 孙国栋, 张韵琦, 等
- (647) 国产复方克霉唑乳膏体外透皮吸收研究  
..... 褚信信, 谢子立, 李显庆, 等
- (652) 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对急性药物性肝损伤的作用研究  
..... 张婷, 冯石卜, 姜祎, 等

## 《中南药学》杂志第五届编委会

### 主编

李焕德

### 副主编 (按姓氏笔画排列)

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 (按姓氏笔画排列)

丁劲松 于海洋 马恩龙 王 玉  
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 向大雄 刘 韶 刘芳群  
刘茂柏 刘建平 刘高峰 刘塔斯  
刘雁鸣 汤海峰 孙 进 孙平华  
孙国祥 孙铁民 劳海燕 苏薇薇  
李 昕 李 勇 李文龙 李文莉  
李顺祥 李晓宇 李健和 李湘平  
杨志平 杨星钢 杨献文 肖 雪  
肖贵南 何 丹 何江江 何鸽飞  
余自成 谷福根 张 俐 张 峻  
张毕奎 张洪文 陈 力 陈 琦  
陈 碧 陈卫东 陈西敬 陈勇川  
武新安 范国荣 金鹏飞 周 权  
屈 建 孟宪生 赵立波 赵志刚  
姜德建 姜月芬 宫 建 祝德秋  
秦红岩 袁 成 袁 易 贾素洁  
夏道宗 原永芳 徐 珽 徐 萍  
徐必学 高利臣 郭 韧 郭怀忠  
郭建军 唐 芳 曹 玲 常福厚  
巢志茂 彭文兴 董亚琳 董得时  
蒋孟良 傅 强 温金华 谢 诚  
谢奕丹 睢大箕 肇丽梅 翟 青  
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

- (657) 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup> 技术的红曲茯苓组方物质基础分析  
..... 李婷婷, 梅凯, 李鑫, 等
- (666) 蒙药材白花龙胆的化学成分研究  
..... 宝钢, 图诺木拉, 敖敦格日乐, 等
- (670) 基于“优势成分导向”策略的甘草抗心悸作用质量标志物的快速  
筛选 ..... 刘长乐, 刘妍如, 唐志书, 等
- (678) 不同炮制时间地榆炭化学成分与粉末色度值的相关性分析  
..... 何荣荣, 钟志奎, 王瑜婷, 等
- (685) 紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌的网络药理学研究  
..... 邹强, 李丹琦, 刘学贵, 等
- (692) 基于网络药理学与实验验证方法探讨脑疏宁治疗脑梗死的分子机制  
..... 刘伟, 张梅奎, 宋发萍
- (700) 固肾止遗双子颗粒的制备工艺研究  
..... 李国玉, 梁昊都, 管彤, 等

## 居家慢性病药物治疗管理研究专题

- (706) 中国“三高”慢性病患者药物治疗依从性差异与分布情况  
..... 殷雪梅, 赵志刚, 闫宇佳, 等
- (714) 居家药学研究现状与热点文献计量学分析  
..... 武明芬, 朱斌, 刘腾, 等

## 综述

- (721) 基于纳米材料的光学治疗在动脉粥样硬化性疾病中的应用与研究  
进展 ..... 席洋, 张雷, 郭鹏程, 等
- (726) 沙库巴曲缬沙坦在心律失常治疗中的研究进展  
..... 曹馨瑞, 严思敏, 姚惠敏, 等
- (731) 决奈达隆和直接口服抗凝血药相互作用的研究进展  
..... 姚云娟, 张峻, 吴迪
- (735) 胃癌靶向治疗的研究进展 ..... 潘旭红, 马未节, 邵香香, 等
- (742) 颗粒酶 B 在肿瘤诊治中的研究进展 ..... 徐尚尚, 刘天奇

## 中药资源开发与利用

- (746) 不同干旱梯度胁迫对欧李果肉品质的影响  
..... 张冉昊, 李卫东, 陈家雯, 等
- (752) 河北省赞皇县药用植物资源调查与分析  
..... 柴天川, 李俊雪, 张焕, 等

## 药物分析与检验

- (758) 深绿卷柏的显微鉴别和高效液相色谱特征图谱研究  
..... 王新桂, 朱田密
- (763) 莱博雷生片中莱博雷生的含量测定 ..... 郭思瑞, 徐文峰, 徐硕, 等

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 骁 于世慧 王 刚 王 洪  
王春江 方伟进 孔维军 朱志红  
刘 宏 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 娟  
李语玲 李新刚 肖朝江 吴成军  
邱玉玲 何 艳 邹振兴 张 凭  
张妙红 张纯刚 张程亮 陈 倩  
陈 璐 陈国宁 陈富超 罗 聪  
金 锐 周志旭 赵 亮 赵 娣  
胡 楠 姜 雷 贾王平 徐 硕  
徐文峰 郭海彪 黄 芳 梅升辉  
龚力民 梁光平 寇龙发 蒋跃平  
蒋德旗 韩立峰 韩晓芳 韩晓鹏  
程汝滨 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。

- (767) HPLC 测定枳实导滞丸中枳实所含 6 种成分及其药材基原分析  
..... 刘永富,熊英,赵香玉,等
- (771) 基于全时段多波长融合特征定量指纹图谱的满药仙灵脾颗粒质量控制方法研究 ..... 于洋,王帅,李天娇,等
- (777) 不同产地党参的总硒、蛋白质、多糖含量及土壤总硒含量的相关性分析 ..... 段耿婷,刘付松,张澜,等
- (784) 基于高效液相色谱指纹图谱与一测多评法的大黄碳酸氢钠片质量评价 ..... 吴勇,刘燕,王雷,等
- (790) 基于指纹图谱结合化学模式识别的前胡和紫花前胡分类模型的建立  
..... 刘英慧,刘海涛,付小艳
- (796) 不同产地红芪指纹图谱的构建及 6 种活性成分的测定  
..... 焦洁,郑旭,胡萌萌
- (800) 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定 N-乙酰氨基葡萄糖中的葡萄糖和氨基葡萄糖的含量 ..... 齐雯依,郑枫

## 医院药学

- (804) 替加环素群体药代动力学模型的外部验证  
..... 郑昕昕,王静,吴轩宇,等
- (811) 非甾体抗炎药酮咯酸氨丁三醇注射液合理应用评价标准的建议及应用 ..... 王德平,魏海明
- (814) 儿童伏立康唑治疗药物监测及临床应用 ... 胡林,黄师琼,黄琪
- (819) 注射用生长抑素致低血糖风险的影响因素研究  
..... 陈雷,张红,王琦,等

## 药物与临床

- (823) 分次立体定向放疗同步化疗联合贝伐珠单抗治疗肺癌脑转移的疗效及安全性 ..... 梁丹,张又红,苏天海,等

## 药品不良反应

- (828) 奥氮平致 1 例青少年转氨酶升高的药学监护  
..... 陈诗芸,杨嫦,吴泽幼,等
- (832) 决奈达隆致不良反应的文献分析  
..... 林贤桂,林杰茹,陈巧燕,等
- (837) 1 例甲泼尼龙琥珀酸钠致迟发性超敏反应  
..... 王双英,周菊香,李艳飞,等

[本刊基本参数] CN43-1408/R\*2003\*b\*A4\*282\*zh\*P\*25.0\*49\*2023-3

本期责任编辑: 邬志娟, 彭金飞, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

---

---

# CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 3 March 20 2023

---

## Consultant

ZHOU Hong-hao

## Editor-in-Chief

LI Huan-de

## Chief of Editorial Office

ZHANG Bi-kui

## Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

## Directed by

Food and Drug Administration of  
Hunan Province

## 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](mailto:znyxzz2003@vip.163.com)

## Published by

Central South Pharmacy  
Publishing House

## Advertisement Publishing Certification

4300004000764

## CONTENTS IN BRIEF

- (557) **Palmitine ameliorates CLP-induced sepsis via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway**  
..... *JIA Xin-hang, LI Xiao-ling, DONG Fang-xin, et al*
- (562) **Expression of *CTHRC1* gene in gastric cancer and its correlation with prognosis and infiltration of immune cells**  
..... *HUO Ting, LIU Tie, SHI Jun-fei, et al*
- (568) **Protective effect of pharmacodynamic substances in Yuxuebi capsules on adriamycin-induced H9c2 myocardial cell damages**  
..... *TIAN Xin-yu, WANG Shuai, LI Tian-jiao, et al*
- (574) **Chemical constituents and antitumor activity of *Euphorbia fischeriana* Steud** ..... *ZHANG Zhou, ZHU Peng-yan, MA Jin-rong, et al*
- (582) **Preparation of abiraterone acetate microspheres and their drug release characteristics in vitro and in vivo**  
..... *LIU Ru, DU Li-ping, ZHANG Li, et al*
- (589) **Preparation and in vitro anti-tumor evaluation of dihydromyricetin-loaded nanoparticles** ..... *PAN Zhen-zhen, WU Chun-mei, LIN Ya, et al*
- (594) **Protective effect of verbascoside sunscreen cream against ultraviolet irradiation induced photodamage to skin damage in rats**  
..... *LI Xiao-lin, WANG Peng, LI Mao-xing, et al*
- (600) **Gastric retentive metformin hydrochloride sustained release tablets based on floatation and expansion** ... *PAN Yang, LI Wei, HUANG Kan, et al*
- (607) **Intestinal absorption of harmine derivative HM-Y-A by in situ single pass intestinal perfusion model in rats**  
..... *GAO Hui-jing, WANG Xin, LI Yu-ling, et al*
- (612) **Preliminary study on cationic *Bletilla striata* polysaccharide as a non viral gene vector** ..... *WANG Xiao-xu, DU Hao-yang, JIANG Mei-ru, et al*
- (618) **Prescription analysis of Yuxuebi capsules for rheumatoid arthritis based on microfluidic chip technology**  
..... *TANG Ying, BAO Yong-rui, WANG Shuai, et al*
- (625) **Construction and evaluation of Chinese hamster ovary cell lines with a high therapeutic antibody**  
..... *LIU Zhi-ying, LUO Shun, LYU Qian-rui*
- (631) **Solubilization and antioxidation activity of soybean extract to glabridin**  
..... *ZHANG Ming-xin, ZHANG Yu, ZHANG Xiu-jun, et al*

**Postal code**

42-290

**Publish**Editorial Office of Central South  
Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for  
subscription please contact the  
Publishing House of our journal**Price**

¥ 25.00 an issue

¥ 300.00 a year

**CSSN**

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2023 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.

- (637) **Chemical constituents in *Hemerocallis citrina* Borani by UPLC-Q-TOF-MS/MS** ..... *QUAN Jia, SUN Guo-dong, ZHANG Yun-qi, et al*
- (647) **In vitro transdermal absorption of domestic compound clotrimazole cream** ..... *CHU Xin-xin, XIE Zi-li, LI Xian-qing, et al*
- (652) **Effect of different elution sites of macropore resin from extract of seeds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. on acute drug-related liver injury** ..... *ZHANG Ting, FENG Shi-bo, JIANG Yi, et al*
- (657) **Chemical constituents in Hongqu Fuling prescription based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>** ..... *LI Ting-ting, MEI Kai, LI Xin, et al*
- (666) **Chemical constituents in Mongolian medicinal material *Gentiana algida* Pall.** ..... *BAO Gang, Tunuomula, Aodungerile, et al*
- (670) **Rapid screening of Q-markers for licorice anti-palpitation based on dominance components guidance strategy** ..... *LIU Chang-le, LIU Yan-ru, TANG Zhi-shu, et al*
- (678) **Correlation of chemical compositions and powder chromaticity values of carbonized sanguisorba root with different processing time** ..... *HE Rong-rong, ZHONG Zhi-kui, WANG Yu-ting, et al*
- (685) **Network pharmacology on flavonoids in *Medicago Sativa* L. for anti-hepatoma** ..... *ZOU Qiang, LI Dan-qi, LIU Xue-gui, et al*
- (692) **Molecular mechanism of Naoshuning for cerebral infarction based on network pharmacology and experiment verification** ..... *LIU Wei, ZHANG Mei-kui, SONG Fa-ping*
- (701) **Preparation technology of Gushen Zhiyi double seeds granules** ..... *LI Guo-yu, LIANG Hao-du, GUAN Tong, et al*
- (707) **Differences and distribution of medication adherence among patients with chronic diseases in China** ..... *YIN Xue-mei, ZHAO Zhi-gang, YAN Yu-jia, et al*
- (714) **Bibliometrics analysis of research status and hotspots of home pharmacy** ..... *WU Ming-fen, ZHU Bin, LIU Teng, et al*
- (721) **Current status and prospect of photo-therapy with nanomaterials for cardiovascular stenosis/obliterans disease induced by atherosclerosis** ..... *XI Yang, ZHANG Lei, GUO Peng-cheng, et al*
- (726) **Advances in the treatment of arrhythmias with sacubitril/valsartan** ..... *CAO Xin-rui, YAN Si-min, YAO Hui-min, et al*
- (731) **Updates on drug-drug interactions between dronedarone and direct oral anticoagulants** ..... *YAO Yun-juan, ZHANG Jun, WU Di*
- (735) **Research progress in targeted therapy for gastric cancer** ..... *PAN Xu-hong, MA Wei-jie, SHAO Xiang-xiang, et al*
- (742) **Research progress of granzyme B in the diagnosis and treatment of tumor** ..... *XU Shang-shang, LIU Tian-qi*
- (746) **Effect of drought stress on pulp quality of *Cerasus humilis*** ..... *ZHANG Ran-hao, LI Wei-dong, CHEN Jia-wen, et al*



- (752) Investigation and analysis of medicinal plant resources in Zanhuang county, Hebei province ... CHAI Tian-chuan, LI Jun-xue, ZHANG Huan, et al
- (758) Microscopic identification and HPLC characteristic chromatogram of *Selaginella doederleinii* Hieron ..... WANG Xin-gui, ZHU Tian-mi
- (763) Determination of lemborexant content in lemborexant tablets ..... GUO Si-rui, XU Wen-feng, XU Shuo, et al
- (767) HPLC determination of 6 component of Aurantii Fructus Immaturus in Zhishi Daozhi pills and genetic analysis of medicinal materials ..... LIU Yong-fu, XIONG Ying, ZHAO Xiang-yu, et al
- (772) Quality control of Manchu medicine Xianlingpi granules by characteristic quantitative fingerprint based on full-time multi-wavelength fusion ..... YU Yang, WANG Shuai, LI Tian-jiao, et al
- (777) Correlation between total selenium, protein and polysaccharide content of *Codonopsis Radix* and soil selenium content in different areas ..... DUAN Geng-ting, LIU Fu-song, ZHANG Lan, et al
- (784) Quality evaluation of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets based on HPLC fingerprints and quantitative analysis of multi-components with single markers ..... WU Yong, LIU Yan, WANG Lei, et al
- (790) Classification and recognition model for *Peucedanum praeruptorum* Dunn and *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. based on fingerprints combined with chemical patterns ..... LIU Ying-hui, LIU Hai-tao, FU Xiao-yan
- (796) Construction of fingerprints of *Hedysari Radix* from different areas and determination of 6 active components ..... JIAO Jie, ZHENG Xu, HU Meng-meng
- (800) Determination of glucose and glucosamine in *N*-acetylglucosamine by HPLC-ELSD ..... QI Wen-yi, ZHENG Feng
- (804) External validation of population pharmacokinetics model of tigecycline ..... ZHENG Xin-xin, WANG Jing, WU Xuan-yu, et al
- (814) Therapeutic drug monitoring and clinical application of voriconazole in children ..... HU Lin, HUANG Shi-qiong, HUANG Qi
- (819) Risk factor for hypoglycemia caused by somatostatin for injection ..... CHEN Lei, ZHANG Hong, WANG Qi, et al
- (823) Efficacy and safety of fractionated stereotactic radiotherapy concurrent chemotherapy combined with bevacizumab in the treatment of brain metastasis of lung cancer ..... LIANG Dan, ZHANG You-hong, SU Tian-hai, et al
- (832) Literature analysis of adverse reactions induced by dronedarone ..... LIN Xian-gui, LIN Jie-ru, CHEN Qiao-yan, et al

## 研究论文

巴马汀通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路改善 CLP 诱导的脓毒症

贾鑫航, 李晓玲, 董方昕, 毛浩洋, 邹翔, 季宇彬, 李思明\* (哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

**摘要:** **目的** 探究巴马汀 (PAL) 对盲肠结扎穿刺法 (CLP) 诱导的脓毒症的干预作用及机制。**方法** 构建 CLP 诱导的脓毒症模型小鼠, HE 染色观察 CLP 小鼠肺组织形态, ELISA 法检测 CLP 小鼠血清和脾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平, Q-PCR 检测 CLP 小鼠脾脏 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达, Western blot 法检测 CLP 小鼠脾脏组织细胞核 NF- $\kappa$ B 蛋白表达。**结果** PAL 能提高 CLP 脓毒症小鼠的生存率, 明显改善小鼠肺损伤, 显著降低 CLP 小鼠血清和脾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平 ( $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示, PAL 各剂量组小鼠脾脏中细胞核 NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显下调且呈一定的剂量依赖性。**结论** PAL 可以抑制 CLP 诱导的促炎因子释放, 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路起到改善 CLP 诱导的脓毒症的作用。

**关键词:** 巴马汀; 脓毒症; 盲肠结扎穿刺法; NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0557-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.001

## Palmitine ameliorates CLP-induced sepsis via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway

JIA Xin-hang, LI Xiao-ling, DONG Fang-xin, MAO Hao-yang, ZOU Xiang, JI Yu-bin, LI Si-ming\* (School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076)

**Abstract: Objective** To determine the intervention and mechanism of palmitine (PAL) on cecal ligation and perforation (CLP)-induced sepsis. **Methods** CLP-induced sepsis mouse model was constructed. The lung morphology of CLP mice was observed by HE staining. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the serum and the spleen of CLP mice were detected by ELISA. The mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the spleen of CLP mice were detected by Q-PCR. Western blot was used to detect the expression of nuclear NF- $\kappa$ B protein in the spleen tissues of CLP mice. **Results** PAL improved the survival rate of mice with CLP sepsis, significantly improved the lung injury of the mice, and reduced the expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the serum and the spleen of CLP mice. Western blot showed that the expression of nuclear NF- $\kappa$ B protein in the spleens of the PAL groups was significantly down-regulated in a dose-dependent manner. **Conclusion** PAL can inhibit the release of proinflammatory factors induced by CLP, and plays a role in improving CLP-induced sepsis by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** palmitine; sepsis; cecal ligation and perforation; NF- $\kappa$ B signaling pathway

脓毒症是一种由感染引起全身性炎症反应综合征, 可累及体内多个器官功能的改变, 发病急促、死亡率高, 是临床危重患者的重要死亡原因之一<sup>[1-2]</sup>。

脓毒症的发病机制涉及机体多个系统, 其中失衡的炎症反应贯穿其整个进程<sup>[3]</sup>。抗菌药物和糖皮质激素为临床上脓毒症早期治疗的主要药物, 但容易使机

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金 (No.81903787); 黑龙江省自然科学基金优秀青年基金 (No.YQ2021H002); 黑龙江省重点研发计划指导类项目 (No.GZ20210110)。

**作者简介:** 贾鑫航, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 841145574@qq.com \* **通信作者:** 李思明, 女, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 1456382154@qq.com

体产生耐药性,还会造成机体免疫力降低等问题<sup>[4]</sup>。因此寻找新型控制感染及炎症的药物十分重要。

巴马汀(palmatine, PAL)是一种天然的双喹啉类生物碱,具有抗炎<sup>[5]</sup>、提高机体免疫力<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、降血糖<sup>[8]</sup>等药理活性。研究显示,巴马汀可以抑制骨关节炎的发展<sup>[9]</sup>、抑制干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )诱导的HaCaT细胞凋亡,影响炎症因子分泌<sup>[10]</sup>、抑制脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞中白细胞介素6(IL-6)生成等<sup>[11]</sup>。

基于巴马汀的抗炎效果和脓毒症发病机制<sup>[12]</sup>,巴马汀对于脓毒症的炎症反应可能有潜在治疗作用。但目前巴马汀对盲肠结扎穿孔法(cecal ligation and perforation, CLP)诱导的脓毒症小鼠保护作用的研究鲜有报道,作用机制也尚不明确。本研究旨在探究巴马汀对CLP诱导的脓毒症小鼠的治疗效果及作用机制,为巴马汀代替传统治疗方法治疗脓毒症提供理论依据。

## 1 材料

巴马汀(纯度 $\geq 98\%$ ,四川省维克奇生物科技有限公司);HE染色试剂盒(索莱宝科技有限公司);IL-6、白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(Abcam公司);NF- $\kappa$ B抗体、Lamin B抗体(万类生物科技有限公司);Trizol试剂、二抗(美国Thermo公司);cDNA逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);Quant SYBR Green PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究);9620荧光定量PCR仪(Gene Line);EnSight多功能成像酶标仪(美国PerkinElmer公司);垂直蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。SPF级6~8周龄雌性C57BL/6小鼠,体质量20~25g[长春亿斯实验动物公司,许可证号:SCXK(吉)2020-0002,饲养于室温20~25℃,相对湿度40%~60%,12h昼夜交替的环境中自由进食、饮水]。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

按文献方法建立CLP小鼠模型<sup>[13]</sup>。小鼠禁食过夜后,随机选择9只作为假手术组(Sham),将小鼠用戊巴比妥钠麻醉,于腹部正中切口约1.5cm,露出盲肠,选择同一位置进行结扎处理,并用2mL注射器针头刺穿盲肠肠壁,使内容物少量溢出后将盲肠放回腹腔进行缝合,术后用碘伏和红霉素软膏处理伤口,恢复饮水,12h后恢复饮食。Sham组小鼠除结扎和穿孔外,进行同样的处理。建模后随机分为4组:模型组(CLP组)、巴马汀低剂量组(PAL-L组,5mg·kg<sup>-1</sup>)、巴马汀中剂

量组(PAL-M组,10mg·kg<sup>-1</sup>)、巴马汀高剂量组(PAL-H组,20mg·kg<sup>-1</sup>)。每日一次腹腔注射给药,连续给药7d,Sham组和CLP组腹腔注射同体积生理盐水,观察并记录各组小鼠的生存率。末次给药后处死,按需取组织及血液样本等检测指标。

### 2.2 肺组织 HE 染色

剖开腹腔摘取肺组织,固定在4%多聚甲醛溶液中24h,用清水冲洗,再进行脱水至透明,用石蜡包埋并切成约4 $\mu$ m厚的蜡片,再脱蜡,使用HE试剂染色后脱水、封胶,置于显微镜下观察病理变化并拍摄图像。

### 2.3 ELISA 实验

小鼠末次给药后,取眼球血于4℃、4000r·min<sup>-1</sup>离心10min后取上清液。根据试剂盒说明书测定血清中IL-6、IL- $1\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的含量。

### 2.4 实时荧光定量 PCR

取小鼠脾脏加液氮研磨成粉末,使用Trizol试剂提取小鼠脾脏总RNA,并逆转录为cDNA,按表1进行荧光定量PCR,检测IL-6、IL- $1\beta$ 、TNF- $\alpha$ mRNA,并以 $\beta$ -actin作为内参。每个样品重复检测3次,通过2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>计算目的基因相对表达量。

表1 Q-PCR引物扩增序列  
Tab 1 Primer amplification sequence of Q-PCR

基因	序列
IL-6	Forward 5'-GAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTT-3'
	Reverse 5'-CAAAAGACCAGTGATGATTTTACCAGG-3'
IL-1 $\beta$	Forward 5'-CCATGGCACATTCTGTTCAAA-3'
	Reverse 5'-GCCCATCAGAGGCAAGGA-3'
TNF- $\alpha$	Forward 5'-GGAAACCCAGAGGCATTGAC-3'
	Reverse 5'-TCAGGATCTGGCCCTTGAAC-3'
$\beta$ -actin	Forward 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'
	Reverse 5'-GGTACCACCATGTACCCAGG-3'

### 2.5 Western blot

取小鼠脾脏加液氮研磨成粉末,加入裂解液,根据说明书提取蛋白并测定蛋白浓度,加入loading buffer后于100℃5min条件下使蛋白变性,再通过SDS-PAGE凝胶电泳并转印到PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭1h,在4℃条件下孵育一抗轻摇过夜。一抗完成后,TBST洗膜6次,每次5min,室温下与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1h。再次洗膜后滴加ECL发光液于膜上,获取蛋白条带。使用Image J软件分析灰度值, $\beta$ -actin作参比,计算目的蛋白与 $\beta$ -actin的比值。

### 2.6 统计学处理

实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ),组间比较采用单因素方差分析,运用GraphPad Prism 8.0软件进行图片绘制, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。



### 3 结果与分析

#### 3.1 巴马汀对 CLP 模型小鼠生存率的影响

造模成功后观察 PAL 对 CLP 模型小鼠 7 d 生存率的影响, 结果见图 1。Sham 组小鼠 7 d 内无死亡, 生存率为 100%; 而 CLP 组小鼠 7 d 的生存率为 33.3%, 与 Sham 组相比明显降低; 巴马汀治疗后的小鼠生存率明显升高, 且呈剂量依赖性, PAL-H 组生存率达到 88.9%。说明巴马汀能有效降低 CLP 诱导的脓毒症小鼠的死亡率。

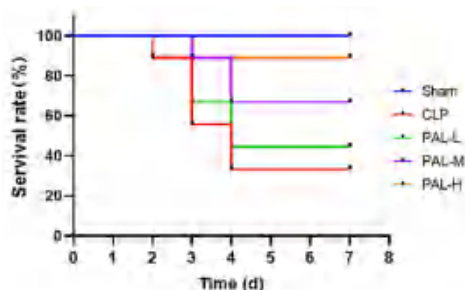


图 1 巴马汀对 CLP 模型小鼠生存率的影响  
Fig 1 Effect of palmatine on the survival rate of CLP mice

#### 3.2 巴马汀对 CLP 模型小鼠肺组织病理变化的影响

肺部炎症细胞浸润是脓毒症患者最主要的病变之一, 本研究通过病理切片 HE 染色观察不同处理组小鼠肺组织病理变化, 结果见图 2。Sham 组小鼠肺泡结构清晰完整, 肺泡腔内无明显渗出及炎性细胞浸润; CLP 组小鼠肺部出现明显炎症, 可见大量炎性

细胞浸润, 肺部组织结构紊乱, 肺泡大小不一; PAL 处理后各剂量组均能减轻上述病理损伤, 特别是高剂量组, 肺泡水肿明显改善, 炎性浸润显著减少。因此, PAL 可以有效改善脓毒症小鼠肺组织的损伤。



图 2 巴马汀对 CLP 模型小鼠肺组织的影响 (HE, ×800)  
Fig 2 Effect of palmatine on the lung tissue in CLP mice (HE, ×800)

#### 3.3 巴马汀对 CLP 模型小鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 含量的影响

利用 ELISA 试剂盒分别检测巴马汀对小鼠血清中炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量,

结果如图 3 所示。结果显示: 与 CLP 模型组相比, PAL 各剂量组小鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平均明显降低且呈一定的剂量依赖性, 说明 PAL 可以抑制 CLP 诱导的脓毒症小鼠的炎症反应。

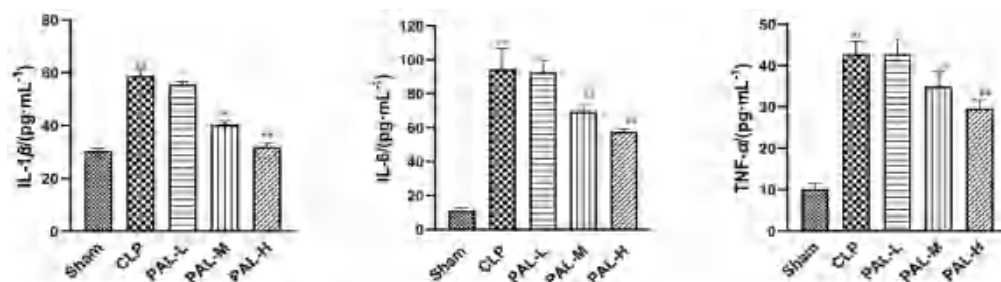


图 3 巴马汀对 CLP 小鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响  
Fig 3 Effect of palmatine on the serum IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  contents in CLP mice

注: 与 Sham 组比较, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与 CLP 组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the Sham group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; compared with the CLP group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

#### 3.4 巴马汀对 CLP 模型小鼠脾脏 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

利用荧光定量 PCR 技术检测巴马汀对小鼠脾脏中的炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平, 结果见图 4。与 CLP 模型组相比, 巴马汀各剂量组小鼠脾脏中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平均明显降低且呈一定的剂量依赖性, 说明巴马汀可以抑制 CLP 诱导的脓毒症小鼠的炎症反应。

#### 3.5 巴马汀对 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

通过 Western blot 检测巴马汀处理组小鼠脾脏组织细胞胞浆内和核内 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平, 结果见图 5。与 CLP 模型组相比, 巴马汀各剂量组胞浆中 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平显著上升, 中、高剂量组核内 NF- $\kappa$ B 水平显著降低。说明巴马汀可以显著抑制 NF- $\kappa$ B 从细胞浆向细胞核内转运激活, 改善 CLP 诱导的脓毒症的炎症作用。

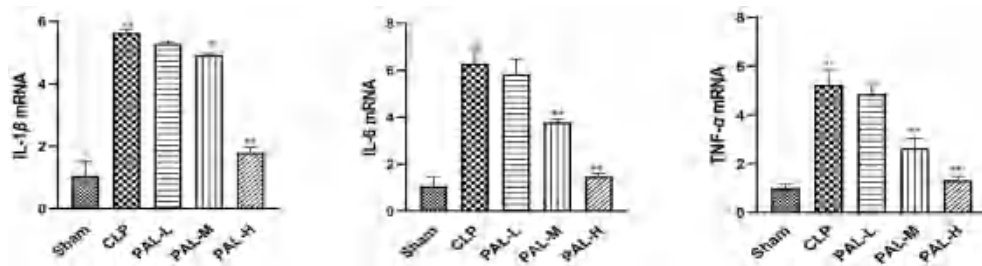


图 4 巴马汀对 CLP 小鼠脾脏 IL-1β、IL-6 和 TNF-α mRNA 表达的影响  
 Fig 4 Effect of palmatine on mRNA expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α in spleen of CLP mice  
 注: 与 Sham 组比较, <sup>###</sup>*P* < 0.01; 与 CLP 组比较, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the Sham group, <sup>###</sup>*P* < 0.01; compared with the CLP group, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01.

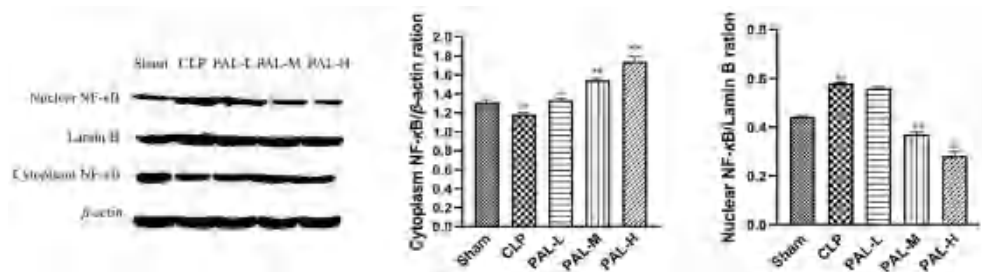


图 5 巴马汀对小鼠脾脏组织细胞核、浆 NF-κB 蛋白表达的影响  
 Fig 5 Effect of palmatine on the expression of NF-κB protein in the nucleus and plasma of mouse spleen  
 注: 与 Sham 组比较, <sup>###</sup>*P* < 0.01; 与 CLP 组比较, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the Sham group, <sup>###</sup>*P* < 0.01; compared with the CLP group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01.

#### 4 讨论

脓毒症发病急促, 发病率高, 可造成机体多组织、器官继发性损伤的临床症候群<sup>[14]</sup>, 是临床危重症患者的主要死亡原因之一。在脓毒症早期, 病原微生物会刺激机体过度释放促炎因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α, 而过度的炎症反应会导致机体内皮功能障碍、凝血系统紊乱、免疫功能紊乱等病理现象<sup>[15]</sup>, 因此, 抑制过度炎症反应是治疗脓毒症的有效措施。脓毒症最常见的感染部位是肺、腹部、血液、肾脏和泌尿系统<sup>[16-17]</sup>, 肺组织是受影响最严重的器官之一, 在严重的脓毒症患者中, 约一半的患者会发展为急性肺损伤<sup>[18]</sup>。

巴马汀在炎症治疗方面具有良好的表现, 其对兔体内骨关节炎模型和兔 IL-1β 刺激的体外软骨细胞模型都具有保护作用<sup>[19]</sup>; 在葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠结肠炎模型中, 给予 PAL 治疗后, 显著改善了 DSS 小鼠体重降低和结肠缩短的现象, 并降低了疾病活性指数和组织病理学评分<sup>[20]</sup>。巴马汀还可以降低 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞样细胞和 BALB/c 小鼠中炎症因子水平<sup>[21]</sup>, 抑制 LPS 诱导的山羊子宫内膜上皮细胞炎症反应, 减少促炎因子的产生和增加抗炎因子的产生<sup>[22]</sup>。提示巴马汀对于以炎症为主要特征的脓毒症具有潜在的治疗效果。

CLP 是一种经典的脓毒症小鼠模型, 首先在回盲瓣下方进行盲肠结扎, 随后穿孔, 粪便物质即会

泄漏到正常无菌的腹腔中。随后引起动物典型脓毒症症状<sup>[23]</sup>。相比于其他脓毒症动物模型, CLP 诱导脓毒症的病理过程与临床症状贴近, 可引起与人类脓毒症相似的早期高动力型及晚期低动力型的血流动力学变化, 而且简单易复制, 因此被称为脓毒症模型的“金标准”<sup>[24]</sup>。本研究构建了 CLP 小鼠模型, 给予不同剂量 PAL 处理, 观察巴马汀对脓毒症小鼠的保护效果。结果表明, 巴马汀处理后 CLP 模型小鼠的死亡率明显降低, 肺部损伤明显缓解。

脾脏是人体最大的外周免疫器官, 含有多种免疫活性细胞, 在应激状态下释放大量炎症因子, 引起全身炎症反应综合征。其中 TNF-α 是促使炎症发生的关键因子, 能够诱导 IL-1β 的生成, 而高度的 TNF-α 和 IL-1β 共同作用会刺激 IL-6 的产生, 从而形成炎症级联反应<sup>[25-26]</sup>, 导致脓毒症的发生。本研究结果表明, PAL 处理各剂量组小鼠脾脏和血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达水平均明显降低且呈一定的剂量依赖性, 说明 PAL 可以缓解脓毒症小鼠的炎症反应。

Chen 等<sup>[27]</sup>研究发现, 在脓毒症小鼠中 NF-κB 的表达显著升高, 通过抑制 NF-κB 可以减轻脓毒症小鼠的肺损伤<sup>[28]</sup>。NF-κB 是一种与活化 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链增强子元件结合的核因子, NF-κB 家族由 p50 (NF-εB1)、p52 (NF-κB2)、p65 (RelA)、RelB 和 c-Rel 蛋白组成<sup>[29]</sup>。NF-κB 炎症反应过程中可介导多种炎症细胞因子活化与释放, NF-κB 未被激活时与核因子 κB 抑制蛋白 α (IκB-α) 形成复合



物,分布在细胞浆中。在炎症的情况下, NF- $\kappa$ B 将能够转移到细胞核中并激活参与促炎症反应的靶基因的转录,引起炎症级联反应。炎症反应中,不同的信号通路被激活并协调在一起。作为其中最重要的通路之一, NF- $\kappa$ B 在急性和慢性炎症发病机制中起着不可或缺的作用。

因此,为进一步探讨巴马汀改善脓毒症的作用机制,检测了巴马汀对炎症关键信号通路 NF- $\kappa$ B 的影响。结果显示,与 CLP 模型组相比,巴马汀各剂量组组织细胞浆中 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平显著上升,核内 NF- $\kappa$ B 水平显著降低,可见 PAL 可以通过调节 NF- $\kappa$ B 信号途径抑制机体炎症反应,进而缓解脓毒症的病情发展。

综上,本研究发现巴马汀能够通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路减少促炎因子的释放发挥抗脓毒症作用,可为巴马汀的研究及脓毒症的治疗提供参考,但脓毒症的发病机制十分复杂,巴马汀调节 NF- $\kappa$ B 信号通路详细机制还需要进一步深入研究。

## 参考文献

- Minasyan H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient [J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2019, 27 (1): 19.
- 黄瑞峰,唐奇,吕波.基于网络药理学研究保肾排毒汤治疗脓毒症合并急性肾损伤的治疗机制[J].*中国现代应用药学*, 2019, 36 (21): 2657-2665.
- 朱晴,张逸雪,刘洋,等.脓毒症的病理生理机制研究进展[J].*中华医院感染学杂志*, 2022, 32 (16): 2551-2555.
- 王帆,文力,温伟.分子生物学时代脓毒症病原诊断的现状和挑战[J].*中国临床医生杂志*, 2021, 49 (8): 911-913.
- Ma H, Zhang Y, Wang J, et al. Palmatine attenuates LPS-induced inflammatory response in mouse mammary epithelial cells through inhibiting ERK1/2, P38 and Akt/NF- $\kappa$ B signalling pathways [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2021, 105 (1): 183-190.
- 于浩飞,周敏,吕小波,等.合成黄藤素与天然黄藤素对正常小鼠碳粒廓清速率的影响[J].*中国民族民间医药*, 2012, 21 (8): 62.
- Liu B, Piao X, Niu W, et al. Kuijieyuan decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 29 (11): 1036.
- 马伯艳,李寒,李云凤,等.黄连及其有效成分降糖作用的研究进展及量效关系[J].*中成药*, 2019, 41 (12): 2970-2973.
- 周鑫叠.巴马汀抗骨关节炎作用的实验研究[D].杭州:浙江大学, 2014.
- 王首帆,徐爱琴,徐宜厚,等.巴马汀对干扰素 $\gamma$ 诱导的HaCaT细胞凋亡和炎症因子影响[J].*中国临床药理学杂志*, 2020, 36 (3): 327-331.
- 张海,李佳川,胡泊杨,等.巴马汀对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞IL-6表达的影响[J].*西南民族大学学报(自然科学版)*, 2014, 40 (4): 527-530.
- 宁海慧,郭娜,邢博民,等.炎症相关信号通路在脓毒症中的研究现状[J].*中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (7): 744-747.
- 张益维,王珏,朱浩,等.川芎嗪对脓毒症小鼠肝脏的保护作用研究[J].*现代实用医学*, 2021, 33 (7): 855-856, 836.
- 范宏刚,栾莉,关伟,等.脓毒血症致急性肾损伤及右美托咪定保护作用机制研究进展[J].*东北农业大学学报*, 2017, 48 (6): 91-96.
- 李建龙,闫中博,郭亚雄.人参皂苷在脓毒症治疗中的研究进展[J].*微循环学杂志*, 2021, 31 (3): 76-80, 85.
- Minasyan H. Sepsis and septic shock: pathogenesis and treatment perspectives [J]. *J Crit Care*, 2017, 40: 229-242.
- Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16045.
- Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1685-1693.
- Mai CT, Wu MM, Wang CL, et al. Palmatine attenuated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. *Mol Immunol*, 2019, 105: 76-85.
- Chen GR, Xu YB, Jing J, et al. The anti-sepsis activity of the components of Huanglian Jiedu Decoction with high lipid A-binding affinity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 87-96.
- Patel MB, Mishra S. Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia* [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18 (12): 1045-1052.
- Yan B, Wang D, Dong S, et al. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- $\kappa$ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45: 194-200.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? [J]. *Trends Microbiol*, 2011, 19 (4): 198-208.
- 彭凤辉,邓晓彬,吕立文.脓毒症动物模型的研究进展[J].*广西医科大学学报*, 2020, 37: 1577-1581.
- Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66 (2): 105-143.
- Zhang J, Xia J, Zhang Y, et al. HMGB1-TLR4 signaling participates in renal ischemia reperfusion injury and could be attenuated by dexamethasone-mediated inhibition of the ERK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (10): 4054-4067.
- Chen W, Ma L, Li R, et al. DC-SIGN expression in intestinal epithelial cells regulates sepsis-associated acute intestinal injury via activating ERK1/2-NF- $\kappa$ B/P65 signaling [J]. *Shock*, 2019, 52: 434-442.
- Cai X, Chen Y, Xie X, et al. Astaxanthin prevents against lipopolysaccharide-induced acute lung injury and sepsis via inhibiting activation of MAPK/NF- $\kappa$ B [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11: 1884-1894.
- Kanso F, Khalil A, Nouredine H, et al. Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: a summary of in vitro/in vivo studies [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107778.

(收稿日期: 2022-10-18; 修回日期: 2022-11-29)

# CTHRC1 基因在胃癌中的表达及其与预后和免疫细胞浸润的相关性分析

霍婷<sup>1,2</sup>, 刘铁<sup>2</sup>, 石军飞<sup>2</sup>, 莎日娜<sup>2</sup>, 范蕾<sup>1\*</sup> (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学第二附属医院, 呼和浩特 010090)

**摘要:** **目的** 通过生物信息学方法研究胶原三股螺旋重复蛋白 1 (CTHRC1) 基因在胃癌组织与正常组织中的表达差异, 并分析其与胃癌患者预后和免疫细胞浸润水平的关系。 **方法** 通过 GEPIA、UALCAN 数据库探讨 CTHRC1 基因在胃癌组织中的表达水平及其与胃癌患者病理分期的关系; Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 CTHRC1 基因表达水平与胃癌患者预后的关系; STRING 数据库分析 CTHRC1 相关蛋白网络并用 Metascape 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析; TIMER 数据库分析 CTHRC1 基因表达与胃癌微环境中不同类型免疫细胞的相关性。 **结果** CTHRC1 基因在多种癌症中呈现高表达, 在胃癌组织中的表达水平显著高于正常组织, 与胃癌病理分期密切相关 ( $P < 0.05$ ); CTHRC1 基因高表达与胃癌患者不良预后成显著相关性 ( $P < 0.05$ )。蛋白质互作网络分析揭示了 CTHRC1 与 DVL1、DVL2、DVL3、FZD3、FZD5、FZD6、ROR2 等蛋白具有明显相互作用, 富集分析结果显示上述蛋白与 Wnt/PCP 信号通路相关。CTHRC1 基因表达与胃癌微环境中 B 细胞的浸润水平成负相关, 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞的浸润水平成正相关 ( $P < 0.05$ )。 **结论** CTHRC1 基因在胃癌组织中高表达, 与胃癌的发生、发展及预后密切相关, 其影响胃癌发生、发展的分子机制可能与调节 Wnt/PCP 信号通路及影响免疫细胞浸润水平相关。

**关键词:** CTHRC1 基因; 胃癌; 表达; 预后; 免疫细胞浸润

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0562-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.002

## Expression of CTHRC1 gene in gastric cancer and its correlation with prognosis and infiltration of immune cells

HUO Ting<sup>1,2</sup>, LIU Tie<sup>2</sup>, SHI Jun-fei<sup>2</sup>, SHA Ri-na<sup>2</sup>, FAN Lei<sup>1\*</sup> (1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 2. The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010090)

**Abstract: Objective** To analyze the differential expression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) gene in gastric cancer tissues and normal tissues by bioinformatics analysis, and to determine its relationship with gastric cancer prognosis and immune cells infiltration level. **Methods** GEPIA and UALCAN databases were used to determine the expression level of CTHRC1 gene in gastric cancer tissues and its relationship with pathological stage of patients with gastric cancer. Kaplan-Meier Plotter database was used to analyze the relationship between CTHRC1 gene expression level and prognosis of patients with gastric cancer. The CTHRC1-related protein networks were analyzed by STRING database. Gene Ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were enriched by Metascape database. TIMER database was used to analyze the correlation between CTHRC1 gene expression and different types of immune cells in gastric cancer microenvironment. **Results** CTHRC1 gene was highly expressed in most cancers, and its expression level in gastric cancer tissues was much

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No. 2021MS08155); 内蒙古医科大学联合项目 (No. YKD2021LH022)。

作者简介: 霍婷, 女, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤方面中蒙药药理研究, email: 997974320@qq.com \*通信作者: 范蕾, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中蒙药药理研究, email: 826368267@qq.com



higher than that in normal tissues, which was closely related to pathological stage of gastric cancer ( $P < 0.05$ ). High expression of *CTHRC1* gene was also significantly correlated with the poor prognosis of patients with gastric cancer ( $P < 0.05$ ). Protein interaction network analysis revealed that *CTHRC1* had significant interaction with DVL1, DVL2, DVL3, FZD3, FZD5, FZD6, ROR2 and other proteins. GO and KEGG enrichment analysis were performed for these proteins. The expression of *CTHRC1* gene was negatively correlated with the infiltration level of B cells in gastric cancer microenvironment, but positively correlated with the infiltration level of CD8<sup>+</sup> T cells, macrophages, neutrophils and dendritic cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High expression of *CTHRC1* gene in gastric cancer tissues is closely related to its occurrence, development and prognosis. The molecular mechanism affecting its development may be related to the regulation of Wnt/PCP signaling pathway and the infiltration level of immune cells. *CTHRC1* gene can be used as a prognostic indicator and a potential therapeutic target for gastric cancer.

**Key words:** *CTHRC1* gene; gastric cancer; express; prognosis; immune cell infiltration

胃癌 (gastric cancer, GC) 是最常见的消化道恶性肿瘤之一。我国是胃癌高发国家, 发病率和死亡率在恶性肿瘤中均位列第三, 严重威胁着人们的生命和健康<sup>[1]</sup>。近年来, 虽然外科手术切除、免疫治疗和靶向治疗帮助胃癌患者获得了更长的生存期, 但由于胃癌早期症状不明显, 许多患者确诊时已进入晚期并伴有广泛转移, 5 年总生存率仍较低<sup>[2]</sup>。因此, 寻求新的胃癌诊断和评估预后的生物标志物十分重要。

胶原三股螺旋重叠蛋白 1 (collagen triple helix repeat containing 1, *CTHRC1*) 是一种细胞外基质糖蛋白, 最初在球囊损伤与正常大鼠动脉中发现, 参与多种肿瘤的生理和病理过程<sup>[3]</sup>。研究发现 *CTHRC1* 基因在胰腺癌、肝细胞癌、乳腺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤中异常表达, 通过对肿瘤增殖、侵袭、迁移的调控促进肿瘤的发生和发展, 并且与肿瘤的不良预后密切相关<sup>[4]</sup>。但目前 *CTHRC1* 基因在胃癌中的表达、预后及其潜在的作用机制尚不清楚。

本研究基于生物信息学方法, 通过多种数据库分析 *CTHRC1* 基因在胃癌中的表达差异以及与胃癌病理分期和预后的关系, 同时阐明了 *CTHRC1* 基因影响胃癌的作用机制可能与调节 Wnt/PCP 信号通路、影响肿瘤微环境免疫细胞浸润水平相关, 为进一步研究 *CTHRC1* 基因在胃癌发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库分析

本研究通过 GEPIA 数据库 (<https://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)<sup>[5]</sup> 分析不同类型癌症中 *CTHRC1* 基因的表达情况, 以及 *CTHRC1* 基因表达水平与胃癌病理分期的相关性。

利用 UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>) 数据库<sup>[6]</sup> 验证了 GEPIA 数据库的分析结果, 进一步确定了 *CTHRC1* 基因在胃癌组织与正常组织中的表达水平。

通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<https://kmplot.com/analysis/>)<sup>[7]</sup> 分析了 *CTHRC1* 基因表达水平与胃癌患者预后之间的相关性。

在这项研究中, 首先使用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)<sup>[8]</sup> 分析与 *CTHRC1* 有密切相互作用的蛋白质, 参数设定为“*CTHRC1*”, 物种设置为人类, 置信度选择“Medium 0.400”。

使用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>)<sup>[9]</sup> 对 *CTHRC1* 基因及其相关蛋白进行功能注释和通路富集分析。参数设置: 最小计数 > 3, 富集因子 > 1.5。

通过 TIMER 数据库 (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)<sup>[10]</sup> 分析了 *CTHRC1* 基因表达与胃癌免疫细胞浸润水平的相关性。

### 1.2 统计学方法

所有数据均来自在线公开数据库, 采用各分析工具默认的统计学方法, 按照  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。使用 Spearman's 相关性检验来评估 *CTHRC1* 基因表达与胃癌肿瘤组织中 6 种免疫浸润性细胞之间的相关性。

## 2 结果

### 2.1 *CTHRC1* 基因在不同肿瘤组织中的表达

通过 GEPIA 数据库分析 *CTHRC1* 基因在不同癌症类型中的表达情况, 结果显示 *CTHRC1* 基因在多种恶性肿瘤中表达上调 (见图 1)。*CTHRC1* 基因在乳腺浸润癌 (BRCA)、腺癌 (CESC)、结肠癌 (COAD)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBC)、

食管癌 (ESCA)、胶质细胞瘤 (GBM)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSC)、肾透明细胞癌 (KIRC)、细胞肝癌 (LIHC)、肺腺癌 (LUAD)、肺鳞癌 (LUSC)、卵巢浆液性囊腺癌 (OV)、胰腺癌 (PAAD)、直肠腺癌 (READ)、皮肤黑色素瘤 (SKCM)、胃癌 (STAD)、睾丸癌 (TGCT)、胸腺癌 (THYM)、子宫内膜癌 (UCEC)、子宫肉瘤 (UCS) 表达高于正常癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。

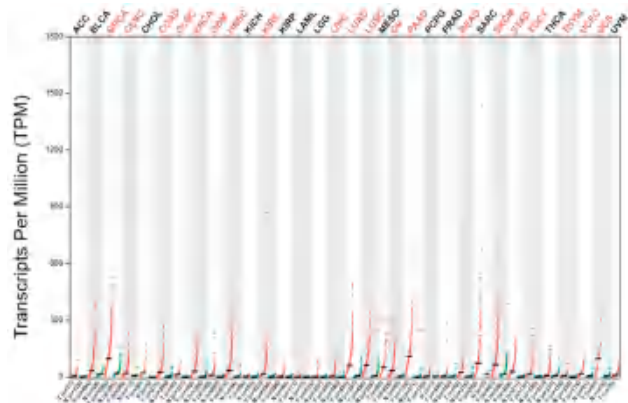


图 1 GEPIA 数据库中 *CTHRC1* 基因在不同肿瘤组织 (T) 与正常组织 (N) 中的表达水平 (红色代表高表达, 绿色代表低表达)

Fig 1 Expression of *CTHRC1* gene in different tumor tissues (T) and normal tissues (N) in GEPIA database (Red for high expression and green for low expression)

## 2.2 *CTHRC1* 基因在胃癌组织与正常组织间的表达差异

通过 GEPIA 数据库分析 *CTHRC1* 基因在胃癌组织和正常组织中的表达差异。结果表明, 与正常组织相比, 胃癌组织中 *CTHRC1* 基因的转录水平显著升高 ( $P < 0.05$ ) (见图 2A)。同时我们还使用 UALCAN 数据库进一步验证了 *CTHRC1* 基因在胃癌组织中的表达水平, 结果证实 *CTHRC1* 基因在胃癌组织中的表达水平显著高于正常组织 ( $P < 0.05$ ) (见图 2B)。

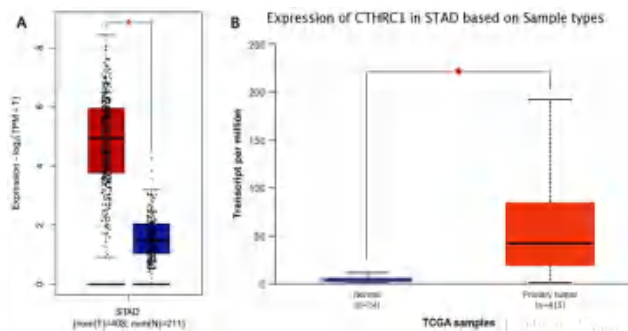


图 2 *CTHRC1* 基因在胃癌组织与正常组织中的表达差异 ( $*P < 0.05$ )

Fig 2 Expression difference of *CTHRC1* gene in gastric cancer tissues and normal tissues ( $*P < 0.05$ )

A. GEPIA 数据库 (GEPIA database); B. UALCAN 数据库 (UALCAN database)

## 2.3 *CTHRC1* 基因表达水平与胃癌患者病理分期的关系

肿瘤病理分期 I、II、III 和 IV 分别代表高、中、低和未分化状态, 该分期越高, 肿瘤恶性程度越高、进展越快。通过 GEPIA 数据库研究 *CTHRC1* 基因表达与胃癌病理分期的相关性, 结果发现 *CTHRC1* 基因表达差异与不同的胃癌病理分期存在显著相关性 ( $F = 3.65, P < 0.05$ ) (见图 3), 说明 *CTHRC1* 基因可能参与促进胃癌的生长和转移。

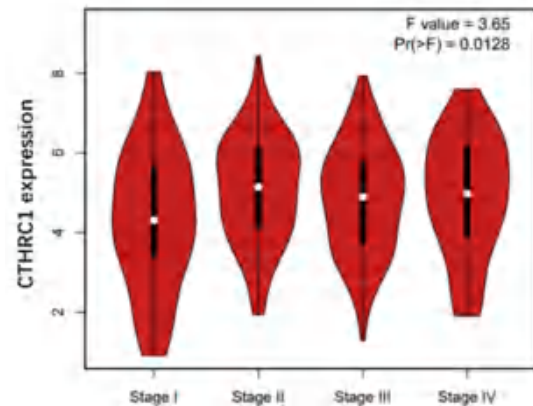


图 3 GEPIA 数据库中 *CTHRC1* 基因表达与胃癌患者病理分期的相关性

Fig 3 Correlation between *CTHRC1* gene expression in GEPIA database and pathological stage of patients with gastric cancer

## 2.4 *CTHRC1* 基因表达水平与胃癌患者预后的关系

利用 Kaplan-Meier plotter 生存曲线分析了 *CTHRC1* 基因表达与胃癌患者预后的相关性。结果显示 *CTHRC1* 基因高表达与胃癌患者更短的总生存期 (OS) ( $HR = 1.55, \text{logrank } P < 0.05$ )、首次进展生存期 (FP) ( $HR = 1.75, \text{logrank } P < 0.05$ ) 及再次进展生存期 (PPS) ( $HR = 1.61, \text{logrank } P < 0.05$ ) 显著相关 (见图 4)。也就是说 *CTHRC1* 基因高表达胃癌患者预后更差。

## 2.5 *CTHRC1* 蛋白相互作用网络及富集分析

通过 STRING 数据库分析得到 *CTHRC1* 与 DVL1、DVL2、DVL3、FZD3、FZD5、FZD6、ROR2、VANGL2、WNT3A、NTN4 等蛋白具有明显相互作用, 蛋白网络图富集  $P$  值为  $1.55 \times 10^{-15}$  (见图 5)。然后, 使用 Metascape 数据库对上述蛋白进行富集分析 (见图 6), 颜色越深表明富集程度越好。结果显示, *CTHRC1* 基因及其相关蛋白主要富集在非经典 Wnt 信号通路、动物器官形态发生的调控、Wnt 信号通路, Wnt/PCP 信号通路、PID 非经典 Wnt 信号通路、肝细胞癌中参与 Wnt 信号通路的 ncRNA、PID Wnt 信号通路、PCP 蛋白的不对称定位、突触组装。

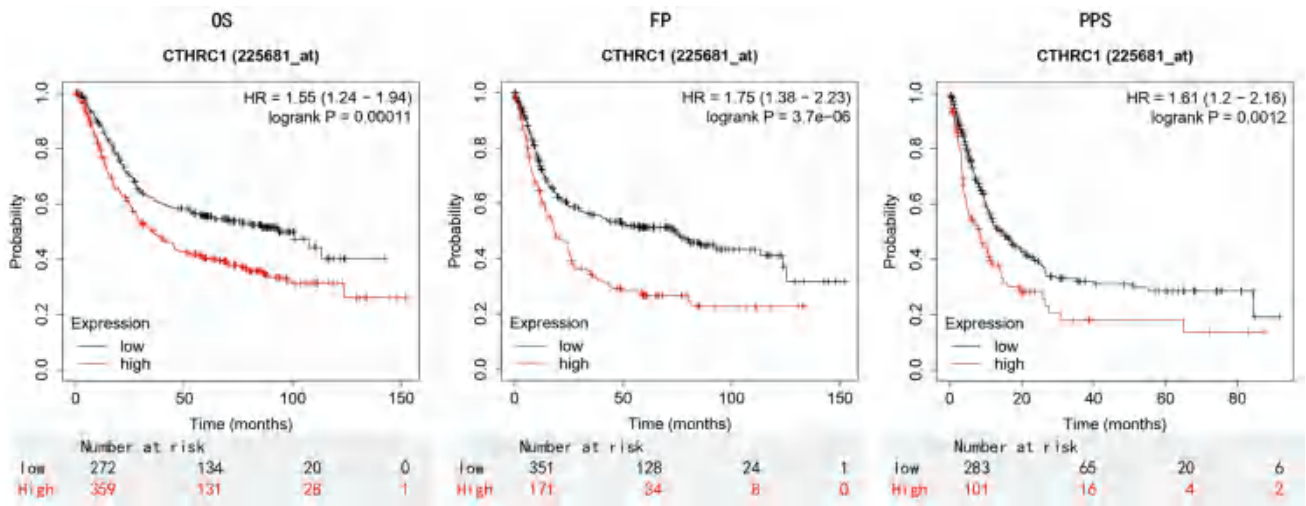


图 4 Kaplan-Meier plotter 数据库中 *CTHRC1* 基因表达与胃癌患者预后的关系

Fig 4 Relationship between *CTHRC1* gene expression and prognosis of patients with gastric cancer in Kaplan-Meier plotter database

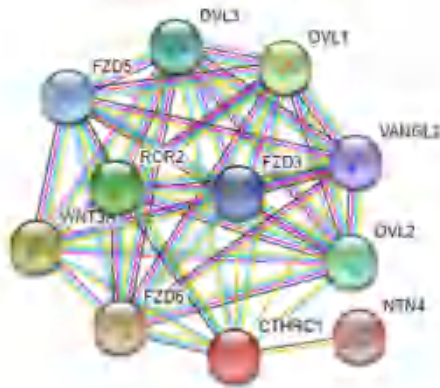


图 5 STRING 数据库中与 *CTHRC1* 蛋白相互作用的网络图

Fig 5 Protein network interacting with *CTHRC1* protein in STRING database

2.6 *CTHRC1* 基因与免疫细胞浸润性的相关性

研究表明，肿瘤免疫细胞浸润水平与癌症的增殖和转移密切相关，是癌症患者生存预后的重要预测指标<sup>[11]</sup>。因此，本文利用 TIMER 在线分析工具研究 *CTHRC1* 基因表达与胃癌微环境中不同类型免疫细胞浸润水平的关系。通过纯度校正后，胃癌中 *CTHRC1* 基因表达水平与 B 细胞的浸润水平成显著负相关 ( $Cor = -0.241, P < 0.01$ )，与  $CD8^+$  T 细胞 ( $Cor = 0.12, P < 0.05$ )、巨噬细胞 ( $Cor = 0.424, P < 0.01$ )、中性粒细胞 ( $Cor = 0.255, P < 0.01$ )、树突状细胞 ( $Cor = 0.331, P < 0.01$ ) 的肿瘤免疫浸润水平成显著正相关 (见图 7)。这表明 *CTHRC1* 基因可能是胃癌的一种肿瘤免疫浸润调节剂，在增加胃癌微环境中免疫细胞浸润方面发挥了重要作用。

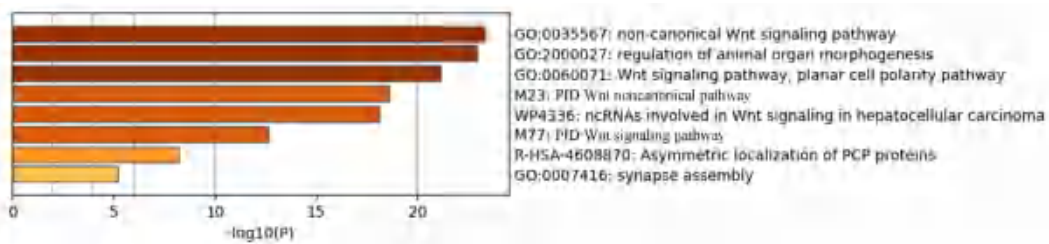


图 6 Metascape 数据库中 *CTHRC1* 基因及其相关蛋白富集分析

Fig 6 Enrichment of *CTHRC1* gene and its related proteins in Metascape database

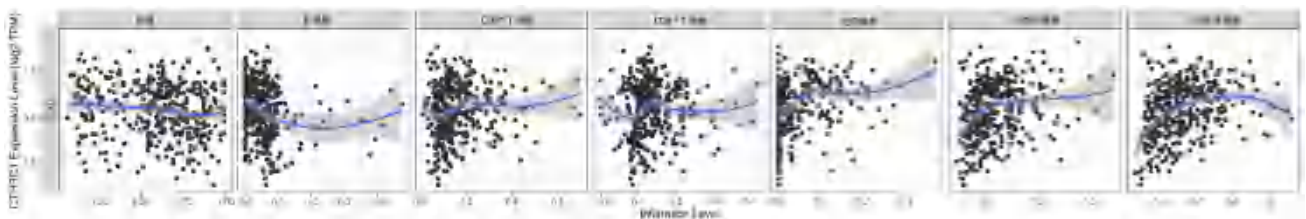


图 7 TIMER 数据库中 *CTHRC1* 基因表达与不同免疫细胞浸润水平的关系

Fig 7 Relationship between *CTHRC1* gene expression and different infiltration levels of immune cells in TIMER database



### 3 讨论

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康。胃癌早期症状不具有特异性,早期诊断率较低,患者若不能及时接受治疗,易导致预后不良<sup>[12]</sup>。到目前为止,还没有用于早期诊断胃癌的特异性标志物<sup>[13]</sup>。因此,深入探索胃癌发生、发展的潜在分子机制、寻找新的药物靶点及分子标志物对胃癌的诊断和评估非常重要。

CTHRC1 是组织修复过程中分泌的一种糖基化蛋白,可参与组织修复、血管重塑,影响成骨细胞形成,是肿瘤发生、发展、转移和侵袭的关键调节因子<sup>[14]</sup>。文献报道,CTHRC1 基因在黑色素瘤、乳腺癌、肝细胞癌、结肠癌、食道癌和胰腺癌等多种肿瘤中异常表达,通过多种信号通路促进上皮间充质转化,诱导肿瘤新生血管生成,促进肿瘤细胞侵袭能力来影响肿瘤的发生和转移<sup>[15-19]</sup>。本研究通过生物信息学方法分析发现,CTHRC1 基因在包括胃癌在内的 20 种常见恶性肿瘤中表达上调。进一步通过 UALCAN 数据库研究发现 CTHRC1 基因在胃癌组织中的表达水平显著高于正常组织。

在肾细胞癌、前列腺癌中,CTHRC1 基因与肿瘤的淋巴结转移、TNM 分期、疾病预后等成正相关,是预测肿瘤复发或转移的有效预后生物标志物<sup>[20-21]</sup>。Gu 等<sup>[22]</sup>发现 CTHRC1 基因在胃癌组织中过表达与胃癌病理分期、淋巴结转移、淋巴血管间隙受累和复发成正相关,是影响胃癌患者总生存期和无病生存期的独立预后因素。本研究结果也发现 CTHRC1 基因表达水平与胃癌病理分期显著相关及胃癌患者的预后显著相关。以上结果表明,CTHRC1 基因在胃癌的发生、发展和转移过程中发挥着重要作用,可作为胃癌患者预后相关的潜在生物学标志物。

本文分析了 CTHRC1 基因促进胃癌发生、发展的潜在分子机制,蛋白相互作用网络图显示,CTHRC1 与 FZD 家族、DVL 家族等 10 种蛋白具有明显相互作用。有文献报道,CTHRC1 基因及其相关蛋白可直接或间接的通过 Wnt/PCP 信号通路参与人类实体瘤的进程,其中 FZD3、FZD5、FZD6、ROR2 都是 WNT 蛋白的受体;DVL1、DVL2、DVL3 通过与 FZD 家族成员的细胞质 C 端结合,并将 Wnt 信号转导至下游效应器,参与 Wnt 信号的传递<sup>[23]</sup>。CTHRC1 是一种 Wnt 辅助因子蛋白,可与 WNT 蛋白、FZD 蛋白、ROR2 蛋白结合形成 CTHRC1-Wnt-Fzd/ROR2 复合物,通过稳定配体-受体相互作用而选择性地激活 Wnt/

PCP 通路,同时抑制经典的 Wnt 信号通路,从而对肿瘤细胞的生长、分化等生物过程产生影响<sup>[24]</sup>。Zhang 等<sup>[25]</sup>研究显示,在宫颈癌中,CTHRC1 蛋白与 E6/E7 人瘤病毒(HPV)结合激活 Wnt/PCP 通路,加重肿瘤的恶性程度。Ma 等<sup>[26]</sup>在胃肠道间质瘤的研究中发现,CTHRC1 蛋白通过激活 Wnt/PCP-Rho 信号通路促进胃肠道间质瘤细胞的迁移和侵袭。有项研究表明,CTHRC1 蛋白在胃肠道间质瘤中可以通过激活 Wnt/PCP 信号通路,增加人脐静脉内皮细胞中的 ERK 和 JNK 磷酸化,促进肿瘤血管生成<sup>[27]</sup>。CTHRC1 还可通过激活 Wnt/PCP 信号通路,促使上皮间充质转化,进而诱导肿瘤的发生和发展<sup>[28]</sup>。综上所述,推测 CTHRC1 参与胃癌发生、发展的潜在机制可能与激活 Wnt/PCP 信号通路有关。

目前肿瘤微环境是一个越来越热门的话题,可能会影响肿瘤的进展和复发。肿瘤微环境中的免疫细胞具有促肿瘤或抗肿瘤活性,被认为是肿瘤免疫治疗的重要因素<sup>[29]</sup>。Li 等<sup>[30]</sup>研究发现,CTHRC1 通过调节肿瘤微环境中 M2 样巨噬细胞的极化作用而导致患者预后不良。Lee 等<sup>[31]</sup>研究显示,CTHRC1 将表达 Tie2 的单核细胞募集到肿瘤中来促进血管生成,而且 CTHRC1 抗体的使用降低了异种移植小鼠模型中肿瘤负荷和免疫细胞浸润。本研究分析了 CTHRC1 基因表达与胃癌免疫微环境的关系,结果显示,CTHRC1 基因表达水平与 B 细胞的浸润水平成显著负相关,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞的肿瘤免疫浸润水平成显著正相关,这表明 CTHRC1 基因可能参与胃癌免疫细胞的调节,从而促进胃癌的发展和复发。

综上所述,CTHRC1 基因在胃癌组织中高表达,与胃癌的发生、发展及预后密切相关,其影响胃癌发生、发展的分子机制可能与调节 Wnt/PCP 信号通路及影响肿瘤微环境免疫细胞浸润水平相关。本文为 CTHRC1 基因作为胃癌的潜在分子诊断和预后评估生物标志物提供参考依据。后续将通过基础实验及临床试验更深入地研究 CTHRC1 基因在胃癌发生发展过程中的作用和分子机制,为胃癌的发病机制、早期诊断、预后评估提供更多有价值的内容。

### 参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.



- [2] Charalampakis N, Economopoulou P, Kotsantis I, et al. Medical management of gastric cancer: a 2017 update [J]. *Cancer Med*, 2018, 7 (1): 123-133.
- [3] Kim JH, Baek TH, Yim HS, et al. Collagen triple helix repeat containing-1 (CTHRC1) expression in invasive ductal carcinoma of the breast: the impact on prognosis and correlation to clinicopathologic features [J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19 (4): 731-737.
- [4] Mei D, Zhu Y, Zhang L, et al. The role of CTHRC1 in regulation of multiple signaling and tumor progression and metastasis [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 9578701.
- [5] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (W1): W98-W102.
- [6] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya S, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. *Neoplasia*, 2017, 19 (8): 649-658.
- [7] Lanczky A, Gyorffy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation [J]. *J Med Internet Res*, 2021, 23 (7): e27633.
- [8] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (D1): D605-D612.
- [9] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1523.
- [10] Li T, Fan J, Wang B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (21): e108-e110.
- [11] Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 344: 1-24.
- [12] Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, et al. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 239-248.
- [13] Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, et al. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134 (11): 2513-2522.
- [14] Lai YH, Chen J, Wang XP, et al. Collagen triple helix repeat containing-1 negatively regulated by microRNA-30c promotes cell proliferation and metastasis and indicates poor prognosis in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36 (1): 92.
- [15] Liu W, Fu XL, Yang JY, et al. Elevated expression of CTHRC1 predicts unfavorable prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6 (8): 1820-1827.
- [16] Ip W, Wellman-Labadie O, Tang L, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 promotes melanoma cell adhesion and survival [J]. *J Cutan Med Surg*, 2011, 15 (2): 103-110.
- [17] Tang L, Dai DL, Su M, et al. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (12): 3716-3722.
- [18] 虞俊波. miR-9、let-7b 和 let-7g 调控 Cthrc1 基因影响胃癌增殖转移的实验研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2013.
- [19] Wang P, Wang YC, Chen XY, et al. CTHRC1 is upregulated by promoter demethylation and transforming growth factor- $\beta$ 1 and may be associated with metastasis in human gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103 (7): 1327-1333.
- [20] Zhou F, Shen D, Xiong Y, et al. CTHRC1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in kidney renal papillary cell carcinoma and kidney renal clear cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 570819.
- [21] Zhou Q, Xiong W, Zhou X, et al. CTHRC1 and PD-1/PD-L1 expression predicts tumor recurrence in prostate cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (5): 4244-4252.
- [22] Gu L, Liu L, Zhong L, et al. Cthrc1 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45 (5): 1031-1038.
- [23] Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46 (6): 863-877.
- [24] Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, et al. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex [J]. *Dev Cell*, 2008, 15 (1): 23-36.
- [25] Zhang R, Lu H, Lyu YY, et al. E6/E7-P53-POU2F1-CTHRC1 axis promotes cervical cancer metastasis and activates Wnt/PCP pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44744.
- [26] Ma MZ, Zhuang C, Yang XM, et al. CTHRC1 acts as a prognostic factor and promotes invasiveness of gastrointestinal stromal tumors by activating Wnt/PCP-Rho signaling [J]. *Neoplasia*, 2014, 16 (3): 265-278, 278.e1-13.
- [27] Fu SW, Chen HY, Lin XL, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 promotes tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14 (6): 7499-7505.
- [28] 孙兰, 王翠彦, 李艳秋, 等. 胶原三螺旋重复蛋白 1、 $\beta$  联蛋白和 Wnt5a 在黑素瘤不同阶段的表达及相关性研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2013, 46 (7): 501-504.
- [29] Lei X, Lei Y, Li JK, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 126-133.
- [30] Li LY, Yin KM, Bai YH, et al. CTHRC1 promotes M2-like macrophage recruitment and myometrial invasion in endometrial carcinoma by integrin-Akt signaling pathway [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2019, 36 (4): 351-363.
- [31] Lee J, Song J, Kwon ES, et al. CTHRC1 promotes angiogenesis by recruiting Tie2-expressing monocytes to pancreatic tumors [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48 (9): e261.

(收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2023-01-10)

# 瘀血痹胶囊对阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞损伤保护作用的药效物质筛选研究

田心宇<sup>1</sup>, 王帅<sup>1, 2, 3</sup>, 李天娇<sup>1, 2, 3</sup>, 包永睿<sup>1, 2, 3\*</sup>, 赵琳<sup>1\*</sup>, 孟宪生<sup>1, 2, 3</sup>, 于睿<sup>4</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省中药多维分析专业创新技术中心, 辽宁 大连 116600; 3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600; 4. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**摘要:** **目的** 筛选瘀血痹胶囊中保护心肌细胞损伤的药效物质。**方法** 采用 HPLC 法建立瘀血痹胶囊 7 个不同极性部位指纹图谱, 共获得 41 个共有峰; 以阿霉素建立 H9c2 心肌细胞损伤的体外药效模型, 将心肌细胞存活率作为药效指标, 开展不同极性的瘀血痹胶囊体外药效学评价; 应用灰色关联度分析结合偏最小二乘回归分析, 将指纹图谱共有峰相对峰面积与保护心肌细胞药效作用进行关联, 筛选瘀血痹胶囊中保护心肌细胞损伤的药效物质; 并对药效物质的心肌保护作用进行验证。**结果** 筛选出瘀血痹胶囊保护心肌细胞损伤的 5 个药效物质, 其中指认出的主要药效物质为槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A 和阿魏酸。**结论** 瘀血痹胶囊具有心肌细胞损伤保护作用, 通过建立 H9c2 心肌细胞损伤模型进行药效物质筛选, 初步明确了瘀血痹胶囊保护心肌细胞损伤的主要药效物质。

**关键词:** 瘀血痹胶囊; 指纹图谱; 心肌细胞损伤; 谱效关系; 药效物质

中图分类号: R285, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0568-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.003

## Protective effect of pharmacodynamic substances in Yuxuebi capsules on adriamycin-induced H9c2 myocardial cell damages

TIAN Xin-yu<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1, 2, 3</sup>, LI Tian-jiao<sup>1, 2, 3</sup>, BAO Yong-rui<sup>1, 2, 3\*</sup>, ZHAO Lin<sup>1\*</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1, 2, 3</sup>, YU Rui<sup>4</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Liaoning Multi-dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine Technical Innovation Center, Dalian Liaoning 116600; 3. Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian Liaoning 116600; 4. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

**Abstract: Objective** To determine the protective effect of pharmacodynamic substances in Yuxuebi capsules on myocardial cell damage. **Methods** The HPLC fingerprints of the 7 polar parts of Yuxuebi capsules were established, and 41 common peaks were obtained. In vitro pharmacodynamic model of H9c2 myocardial cell damage was established with adriamycin, and the vitro pharmacodynamic evaluation of Yuxuebi capsules of different polarities was conducted with the survival rate of cardiomyocytes as a pharmacodynamic index. Grey correlation analysis combined with mathematical methods of partial least squares regression analysis were used. The relative peak area of the total peak of fingerprints correlated with the pharmacodynamic effect of protecting cardiomyocytes, and the pharmacodynamic substances in Yuxuebi capsules to protect the myocardial cell damage were screened. The myocardial protective effect of the medicinal agent was verified. **Results** Five pharmacodynamic substances were screened out with protection against

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目工业重大专项 (No.2020JH1/10100022)。

作者简介: 田心宇, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析与药物制剂研究, email: 1010550576@qq.com \*通信作者: 赵琳, 男, 硕士, 副教授, 主要从事中药制剂及质量控制研究, email: zhao3lin@126.com; 包永睿, 男, 博士, 高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: byr1026@163.com

myocardial cell damage in Yuxuebi capsules, the main pharmacologically active substances being quercetin, cryptotanshinone, tanshinone II A and ferulic acid. **Conclusion** Yuxuebi capsules can protect against myocardial cell damage, and the main pharmacodynamic substances are preliminarily established by H9c2 myocardial cell damage model.

**Key words:** Yuxuebi capsule; fingerprint; myocardial cell damage; spectrum-effect relationship; pharmacodynamic substance

瘀血痹胶囊由红花、当归、丹参、川芎、炙黄芪等 11 味中药组成, 具有活血化瘀、通络定痛的作用, 适用于瘀血阻络痹证, 症见肌肉关节剧痛, 痛处拒按, 固定不移, 可有硬节或瘀斑。以往关于瘀血痹胶囊的研究多见于临床应用、作用机制及含量测定研究等方面<sup>[1-3]</sup>, 对药效物质研究报道较少。因此, 本实验采用 HPLC 法建立瘀血痹胶囊不同极性部位的指纹图谱, 并采用阿霉素建立 H9c2 心肌细胞损伤模型对其进行体外药理学评价, 运用灰色关联度分析结合偏最小二乘回归分析方法<sup>[3-7]</sup>, 将指纹图谱与药效相关联, 筛选出瘀血痹胶囊保护心肌细胞损伤的药效物质, 以心肌细胞存活率为药效指标, 对单体药效及协同配伍组方后的药效进行验证, 为后期瘀血痹胶囊进一步研发和临床应用提供实验依据。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (NUAIRETM 公司); SpectraMax Plus<sup>384</sup> 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Agilent 1260 型快速高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); 恒温水浴锅 (常州智博瑞仪器制造有限公司); 电热套 (巩义市予华仪器有限责任公司); 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。

### 1.2 试药

瘀血痹胶囊 (辽宁上药好护士药业有限公司, 规格: 0.4 g/粒, 批号: 220504), 大鼠心肌细胞株 H9c2 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 阿魏酸 (批号: 17120702)、槲皮素 (批号: 17121531) (成都普菲德生物技术有限公司), 隐丹参酮 (四川维克奇生物科技有限公司, 批号: wkq22011809), 丹参酮 II A (中国食品药品检定研究院, 批号: 110766-200518) (对照品, 纯度均大于 98%)。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 供试品溶液的制备** 取瘀血痹胶囊内容物, 研细, 取约 15 g, 置具塞锥形瓶内, 分别加

入乙酸乙酯、水、石油醚、正丁醇、甲醇、二氯甲烷、乙醇溶液 150 mL, 加热回流提取 2 h, 放冷, 抽滤, 挥干, 即得。分别精密称取不同极性部位的瘀血痹胶囊适量, 置 5 mL 量瓶内, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得指纹图谱供试品溶液。

**2.1.2 含药培养液的制备** 分别称取不同极性部位的瘀血痹胶囊适量, 加培养液 (0.5% 的 DMSO 助溶) 配制成质量浓度为 5 mg (生药) · mL<sup>-1</sup> 的溶液。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 取阿魏酸、槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A 对照品适量, 精密称定, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 分别含 0.2530、0.0740、1.4940、1.2550 mg 的混合对照品溶液, 即得。

### 2.2 HPLC 色谱条件

色谱柱 Agilent poroshell SB-C18 (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% ~ 21%B; 10 ~ 15 min, 21% ~ 26%B; 15 ~ 22 min, 26% ~ 37%B; 22 ~ 32 min, 37% ~ 55%B; 32 ~ 36 min, 55% ~ 56%B; 36 ~ 41 min, 56% ~ 71%B; 41 ~ 55 min, 71% ~ 94%B); 流速 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 5 μL。

### 2.3 瘀血痹胶囊对阿霉素诱导的心肌细胞损伤保护体外药效研究

前期考察了阿霉素最佳造模浓度为 30 μmol · L<sup>-1</sup>。取对数生长期的 H9c2 细胞, PBS 清洗, 胰酶消化后, 按每孔 5000 个细胞接种至 96 孔板, 分别设置给药组、阿霉素模型组和空白对照组, 每组设 3 个复孔, 待细胞生长 24 h 后, 各给药组加入不同极性部位的瘀血痹胶囊, 预处理 24 h 后, 给药组及模型组加入 30 μmol · L<sup>-1</sup> 的阿霉素溶液, 共同培养 24 h, 弃去培养液, 避光加入 10% CCK-8 溶液, 摇匀, 于培养箱内培养 2 h 后置于酶标仪内检测, 波长为 450 nm, 记录每孔吸光度 (A)。

### 2.4 灰色关联度分析

本研究将不同极性部位的瘀血痹胶囊联合阿



霉素作用于 H9c2 细胞的存活率作为母序列，将经过归一化法处理后的共有峰峰面积作为子序列，采用灰色关联度分析软件 (Grey Modeling\_V3.0) 进行分析，得出瘀血痹胶囊不同极性部位色谱峰与体外药效学评价指标之间的关联系数。

### 2.5 偏最小二乘回归分析

采用 SIMCA 14.1 统计软件，以灰色关联度分析中的主要色谱峰峰面积为自变量 (X)，药效数据为因变量 (Y)，进行偏最小二乘回归分析。

### 2.6 有效成分鉴定

取“2.1.2”项下混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，通过保留时间进行指认。

### 2.7 有效成分药效验证

分别称取槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A、阿魏酸对照品适量加培养液配制药液，按照“2.3”项下方法进行单体验证。再将槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A、阿魏酸按照 0.3 : 6 : 5 : 1 比例 (4 种单体在乙酸乙酯部位中的实际含量) 进行配伍验证。

## 3 结果

### 3.1 瘀血痹胶囊不同极性部位指纹图谱的建立

取供试品溶液按“2.2”项下色谱条件进样测定，得到瘀血痹胶囊 7 个不同极性部位的指纹图谱，将图谱信息导入中药指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)，结果见图 1。从指纹图谱信息中看出不同极性部位下峰面积以及峰数量存在明显差异，表明各化学成分之间有一定的差异性，其中乙酸乙酯部位的峰数量最多，水部位的峰数量最少。

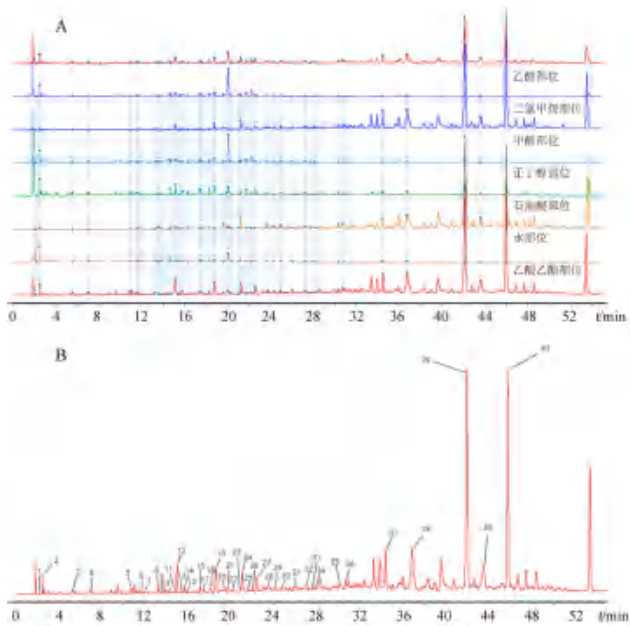


图 1 瘀血痹胶囊不同极性部位 (A) 和乙酸乙酯部位 (B) 指纹图谱  
Fig 1 Fingerprints of different polar parts (A) and ethyl acetate extract (B) of Yuxuebi capsules

### 3.2 瘀血痹胶囊对阿霉素诱导的心肌细胞损伤保护体外药效研究

实验结果显示，瘀血痹胶囊不同极性部位给药组相比阿霉素模型组细胞存活率均明显升高 ( $P < 0.05$ )。说明瘀血痹胶囊的 7 个不同极性部位对于由阿霉素诱导的心肌细胞损伤均具有一定的保护作用，其中乙酸乙酯部位药效最好，水部位药效最差，结果见表 1。

表 1 瘀血痹胶囊不同极性部位对阿霉素诱导 H9c2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 1 Effect of different polar parts of Yuxuebi capsules on the survival rate of adriamycin-induced H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )	分组	OD 值	存活率 / %
空白对照组	1.19 ± 0.04	100.00	
阿霉素模型组	0.50 ± 0.02	43.80	
乙酸乙酯部位组	1.00 ± 0.06 <sup>#</sup>	87.83 <sup>#</sup>	
石油醚部位组	0.65 ± 0.05 <sup>#</sup>	56.53 <sup>#</sup>	
正丁醇部位组	0.91 ± 0.04 <sup>#</sup>	79.33 <sup>#</sup>	
二氯甲烷部位组	0.71 ± 0.03 <sup>#</sup>	69.68 <sup>#</sup>	
水部位组	0.55 ± 0.03 <sup>#</sup>	48.24 <sup>#</sup>	
乙醇部位组	0.80 ± 0.04 <sup>#</sup>	68.40 <sup>#</sup>	
甲醇部位组	0.77 ± 0.02 <sup>#</sup>	67.37 <sup>#</sup>	

注：与阿霉素模型组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the adriamycin model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

### 3.3 灰色关联度分析

灰色关联度分析结果见表 2。基于表中数据结合谱效关系研究方面文献报道<sup>[8-10]</sup>，41 个共有峰中相关系数大于 0.7 的色谱峰有 16 个，说明这 16 个色谱峰所代表的化学成分对心肌细胞损伤保护作用中有协同作用，因此接下来对这 16 个色谱峰进行偏最小二乘回归分析。

### 3.4 偏最小二乘回归分析

PLSR 模型中  $R^2X = 0.971$ ，模型预测参数  $Q^2 = 0.86$ ，均大于 0.5，表明建立的模型稳定，预测能力好。回归系数和 VIP 值见图 2。由图可知，16 个峰与药效均成正相关。VIP 是反映自变量对因变量解释能力的重要指标，其值越大说明该自变量对因变量的解释能力越强，一般认为当  $VIP > 1$  的化合物发挥了重要作用。由图可知，VIP 值大于 1 的峰有 28 号、39 号、41 号、12 号、38 号，说明这些峰所对应的成分与药效活性的关联性较强。

### 3.5 有效成分指认

经过与对照品比对，确定了 12 号峰为阿魏酸，28 号峰为槲皮素，39 号峰为隐丹参酮，41 号峰为丹参酮 II A，结果见图 3。

### 3.6 有效成分验证



表 2 瘀血痹胶囊不同极性部位的色谱峰峰面积以及关联系数

Tab 2 Peak area and correlation coefficient of Yuxuebi capsules from different polar parts

序号	乙酸乙酯	水	石油醚	正丁醇	甲醇	二氯甲烷	乙醇	相关系数
1	0.0009	0.0122	0.0004	0.0017	0.0000	0.0003	0.0330	0.5325
2	0.0130	0.7499	0.0003	0.2108	0.1358	0.0017	0.8298	0.5087
3	0.0117	0.2676	0.0002	0.1398	0.0263	0.0008	0.0216	0.5294
4	0.0112	0.0563	0.0001	0.0883	0.0161	0.0002	0.0154	0.5974
5	0.0146	0.0131	0.0012	0.1046	0.0184	0.0020	0.0210	0.6866
6	0.0067	0.0016	0.0000	0.0747	0.0153	0.0007	0.0143	0.5985
7	0.0119	0.0242	0.0010	0.0507	0.0106	0.0036	0.0107	0.8166
8	0.0139	0.0171	0.0014	0.0226	0.0145	0.0082	0.0041	0.8158
9	0.0011	0.0075	0.0089	0.0104	0.0060	0.0001	0.0036	0.5369
10	0.0006	0.0002	0.0001	0.0108	0.0219	0.0008	0.0083	0.5165
11	0.0023	0.0819	0.0004	0.1760	0.0631	0.0006	0.0595	0.5065
12	0.0780	0.0098	0.0108	0.4984	0.1209	0.0254	0.1045	0.7325
13	0.0025	0.0244	0.0004	0.0147	0.0008	0.0002	0.0026	0.5824
14	0.0172	0.1224	0.0021	0.1599	0.0295	0.0046	0.0296	0.5679
15	0.0004	0.0623	0.0001	0.0449	0.0110	0.0000	0.0117	0.5031
16	0.0161	0.1441	0.0012	0.2568	0.0931	0.0048	0.0856	0.5340
17	0.0068	0.0000	0.0004	0.0336	0.0074	0.0021	0.0101	0.9551
18	0.0007	0.0317	0.0010	0.0101	0.0030	0.0006	0.0057	0.5150
19	0.0131	0.1107	0.0005	0.2240	0.1006	0.0030	0.0949	0.5303
20	0.0769	0.2900	0.0373	0.4814	0.1973	0.0461	0.1818	0.5990
21	0.0121	0.0292	0.0097	0.2091	0.0568	0.0101	0.0514	0.5422
22	0.0282	1.0000	0.0173	0.3195	1.0000	0.0011	1.0000	0.5102
23	0.0052	0.0717	0.0032	0.0302	0.0259	0.0030	0.0279	0.5419
24	0.0019	0.0203	0.0020	0.0077	0.0295	0.0009	0.0308	0.5278
25	0.0671	0.0635	0.0754	0.1775	0.0591	0.0655	0.0541	0.9941
26	0.0090	0.0142	0.0069	0.1881	0.0888	0.0097	0.0935	0.5284
27	0.0060	0.0206	0.0004	0.0092	0.0226	0.0013	0.0207	0.6691
28	0.0481	0.0110	0.0021	0.0350	0.1912	0.0157	0.1703	0.9703
29	0.0220	0.0281	0.0275	0.0000	0.0097	0.0210	0.0165	0.9363
30	0.0224	0.0154	0.0195	0.0566	0.0133	0.0181	0.0190	0.7325
31	0.0181	0.0426	0.0185	0.0073	0.0207	0.0140	0.0000	0.6784
32	0.0156	0.0002	0.0121	0.0072	0.0059	0.0121	0.0046	0.7826
33	0.0000	0.0048	0.0001	0.0033	0.0032	0.0248	0.0158	0.6456
34	0.0030	0.0103	0.0012	0.0020	0.0164	0.0058	0.0058	0.6217
35	0.0260	0.0095	0.0310	0.0964	0.0091	0.0319	0.0113	0.9760
36	0.0393	0.0106	0.0384	0.0474	0.0035	0.0302	0.0178	0.8969
37	0.1287	0.0190	0.0850	0.1437	0.0188	0.1313	0.0259	0.8477
38	0.2937	0.0240	0.2576	0.3019	0.0998	0.3141	0.0920	0.8994
39	1.0000	0.0140	1.0000	1.0000	0.1651	1.0000	0.1521	0.8560
40	0.1519	0.0053	0.1292	0.1328	0.0191	0.1423	0.0199	0.8140
41	0.8171	0.0168	0.7501	0.9392	0.1178	0.9868	0.1207	0.8930

与阿霉素模型组相比,各给药组细胞存活率均有明显升高 ( $P < 0.05$ ),结果见表 3。表明 4 种单体均具有明确的保护心肌细胞损伤的药效作用。

根据上述结果,将槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A、阿魏酸按照 0.3 : 6 : 5 : 1 比例混合进行配伍验证,结果细胞存活率为 74.79%,占乙酸乙酯部位药效的 85.15%。可知,以上 4 种单体的药

效均低于配伍后的药效,而配伍组方后的药效低于乙酸乙酯部位的药效,说明 4 种单体之间有良好的协同作用,这 4 种单体是瘀血痹胶囊保护心肌细胞损伤的主要药效物质。

#### 4 讨论

瘀血痹胶囊目前主要用于瘀血痹阻型的类风湿关节炎,在前期临床观察中发现该药对类风湿

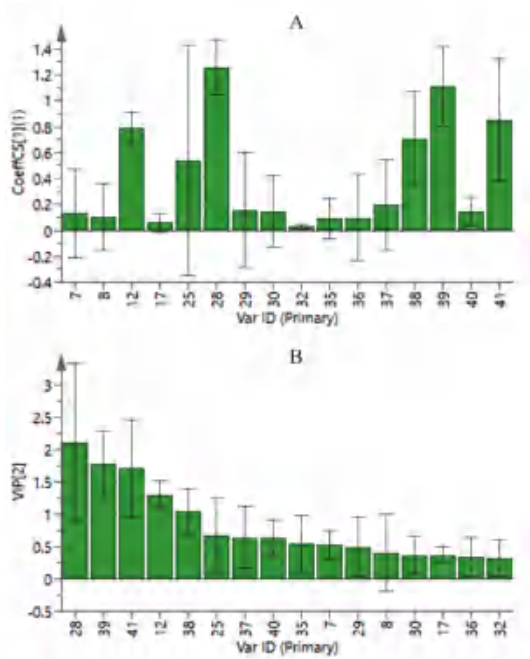


图 2 回归系数 (A) 和 VIP 值 (B) 分析结果  
Fig 2 Regression coefficient (A) and VIP value (B)

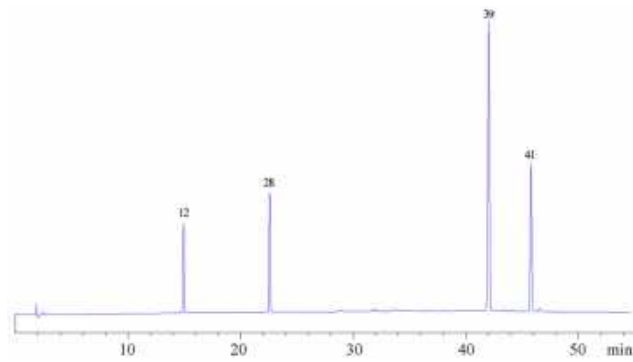


图 3 混合对照品 HPLC 图  
Fig 3 HPLC chromatogram of mixed reference substances  
12. 阿魏酸 (ferulic acid); 28. 槲皮素 (quercetin); 39. 隐丹参酮 (cryptotanshinone); 41. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

表 3 瘀血痹胶囊乙酸乙酯部位及有效成分单体验证 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Tab 3 Verification of ethyl acetate extract of Yuxuebi capsules and active ingredient monomers ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	A 值	存活率 / %
阿霉素模型组	0.50 ± 0.02	43.80
乙酸乙酯部位组	1.00 ± 0.06	87.83*
槲皮素组	0.84 ± 0.01 <sup>#</sup>	72.79 <sup>#</sup>
隐丹参酮组	0.78 ± 0.02 <sup>#</sup>	67.56 <sup>#</sup>
丹参酮 II A 组	0.71 ± 0.02 <sup>#</sup>	70.61 <sup>#</sup>
阿魏酸组	0.65 ± 0.02 <sup>#</sup>	65.48 <sup>#</sup>

注: 与阿霉素模型组比较, \* $P < 0.05$ ; 与乙酸乙酯部位组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the adriamycin model group, \* $P < 0.05$ ; compared with the ethyl acetate site group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

关节炎合并心血管病具有很好的疗效<sup>[11]</sup>, 瘀血痹胶囊能减少心肌细胞损伤<sup>[12]</sup>。阿霉素与心肌组织

亲和力较高, 极容易出现心脏毒性作用, 引起心律失常、心功能损害、心肌病及慢性心力衰竭等心血管疾病<sup>[13]</sup>, 心肌细胞损伤是心脏功能受损的主要表现形式<sup>[14]</sup>。本实验采用阿霉素建立心肌细胞损伤体外模型, 发现瘀血痹胶囊可以提高阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞的存活率, 减轻心肌损伤, 具有一定的心肌保护作用。因此, 本研究建立阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞损伤模型, 筛选瘀血痹胶囊保护心肌细胞的药效物质。

灰色关联度分析以各种影响因素的相似关系来判断它们的关联程度。相比其他的统计学分析方法, 主要有样本量小和可以系统地对事物的动态过程进行研究这两个优点<sup>[16]</sup>。但灰色关联度分析只能给出与药效关联的强弱, 不能判定是促进还是抑制作用<sup>[17]</sup>。偏最小二乘回归分析是综合了多因变量对多自变量的回归建模分析和主成分分析在内的多元数据降维分析方法<sup>[18]</sup>, 可以表示色谱峰与药效指标之间相关的程度大小及方向<sup>[19]</sup>。因此, 本实验采用灰色关联度分析结合偏最小二乘回归分析的方法, 对瘀血痹胶囊不同极性部位指纹图谱及药效进行谱效分析。

本研究基于谱效关系, 建立瘀血痹胶囊 7 个不同极性部位的指纹图谱, 考察瘀血痹胶囊不同极性部位对心肌细胞损伤的保护作用, 采用灰色关联度分析法, 获得了保护心肌细胞损伤作用较强的 16 个色谱峰, 在此基础上, 采用偏最小二乘回归分析方法, 获得了保护心肌细胞损伤作用较强的 5 个色谱峰, 经对照品比对, 指认出发挥药效的 4 个色谱峰分别为槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A 和阿魏酸。槲皮素具有抗氧化、清除自由基、降血压、扩张冠状动脉等心血管药理活性, 可不同程度地拮抗阿霉素的心脏毒性<sup>[20-21]</sup>。隐丹参酮具有心肌保护及抗氧化等作用<sup>[22-23]</sup>。丹参酮 II A 广泛用于治疗心血管疾病, 能够减轻阿霉素诱导的心肌损伤<sup>[24-26]</sup>。阿魏酸具有抗炎、抗脂质过氧化、心脏保护等作用, 可以清除自由基, 减少心肌细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。此外, 本实验通过体外药效验证了这些单体成分对心肌细胞损伤有保护作用。由于瘀血痹胶囊乙酸乙酯部位是发挥药效最好的部位, 根据 HPLC 法测得 4 种单体成分在乙酸乙酯部位中的实际含量, 将 4 种单体成分按照实际比例配伍, 进行体外药效验证, 所得到的药效占乙酸乙酯部位药效的 85.15%, 说明 4 种单体成分之间有较好的协同作用, 从而证明了筛选出的 4 种单体成分可以作为瘀血痹胶囊保护心肌细

胞的主要药效物质。

综上所述,确定了槲皮素、隐丹参酮、丹参酮 II A、阿魏酸为瘀血痹胶囊对心肌细胞损伤保护作用的主要药效物质,该研究可为瘀血痹胶囊建立基于药效的质控体系提供科学依据。

## 参考文献

- [1] 贾永廉,高增峰.疏血通注射液联合瘀血痹胶囊治疗急性软组织损伤的临床效果[J].临床医学研究与实践,2021,6(8):130-132.
- [2] 杨志城,孙彩虹,房庆伟,等.运用网络药理学和分子对接技术探究瘀血痹胶囊抗神经病理性疼痛的活性成分与作用机制[J].上海医药,2022,43(15):58-64.
- [3] 曹杰,李阳,任强,等.HPLC-QAMS同时检测瘀血痹胶囊中10种成分含量[J].中国药师,2022,25(2):355-359,368.
- [4] 邓书鸿,聂磊.中药谱效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J].中药材,2010,33(11):1819-1823.
- [5] Xu GL, Xie M, Yang XY, et al. Spectrum-effect relationships as a systematic approach to traditional Chinese medicine research: current status and future perspectives[J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 17897-17925.
- [6] 李力,潘倩雯,刘宏.灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J].中国药房,2018,29(11):1581-1584.
- [7] 瞿领航,曹国胜,涂济源,等.基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的苍术挥发油燥性谱效关系研究[J].中草药,2019,50(1):150-156.
- [8] 王文旭,覃晓祎,麻秀萍,等.地苾止血作用的谱效关系研究及体外凝血活性初探[J].中药材,2022,45(1):130-136.
- [9] 杨莹,康显杰,杜伟锋,等.续断“发汗”前后 HPLC 指纹图谱与细胞增殖分化药效的谱效关系研究[J].中草药,2019,50(16):3909-3916.
- [10] 王钰乐,刘文,杨道斌,等.黄芩的谱效关系研究[J].中华中医药学刊,2017,35(12):3110-3113.
- [11] 于游,张欢,郭鹤,等.基于 IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨瘀血痹胶囊对动脉粥样硬化免疫与炎症作用机制研究[J].中华中医药学刊,2022,40(5):85-87.
- [12] 黄国威,于游,张欢,等.瘀血痹含药血清通过 DJ-1/GPX4 抑制心肌细胞铁死亡的作用机制[J].中华中医药学刊,2022,40(6):126-129,285.
- [13] 蔺莉霞.黄芪甲苷对阿霉素诱导大鼠 H9C2 心肌细胞凋亡影响的实验研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [14] 李鑫,律广富,韩冬,等.鹿茸多肽对阿霉素诱导 H9c2 细胞损伤保护作用的研究[J].中国医院药学杂志,2020,40(10):1089-1093.
- [15] 张新慰,李丽,王岩,等.姜黄素对阿霉素诱导 H9C2 心肌细胞损伤保护机制的研究[J].牡丹江医学院学报,2017,38(2):25-27.
- [16] 赵越.中医药谱效关系的研究[D].太原:山西大学,2014.
- [17] 杨欣欣,张云坤,王帅,等.基于相关性分析的中药路路通抗肝肿瘤谱效关系研究[J].辽宁中医杂志,2022,49(6):159-163.
- [18] 张沛,李毅,商艳玲.偏最小二乘回归方法提取土壤质量单项评价指标初探[J].灌溉排水学报,2015,34(5):72-78.
- [19] 张小艺,刘久石,高石曼,等.中药谱效关系的研究方法及应用进展[J].中国中药杂志,2019,44(20):4405-4411.
- [20] 裴天仙,徐长庆,于靖,等.槲皮素抗阿霉素诱导的培养心肌细胞的凋亡[J].中国药理学通报,2008,24(4):534-538.
- [21] Patel RV, Mistry BM, Shinde SK, et al. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 889-904.
- [22] 孟方凤,周佳慧,程鑫涛,等.隐丹参酮衍生物的设计、合成及心肌保护作用(英文)[J].有机化学,2022,42(6):1735-1746.
- [23] 许佳慧.隐丹参酮与丹参酚酸类化合物的心肌保护作用及对 eNOS/GRK2 的调节作用[D].郑州:郑州大学,2019.
- [24] 袁李礼,肖慧琼,李贺,等.丹参酮 II A 通过自噬减轻阿霉素诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J].中国临床药理学杂志,2019,35(19):2289-2291.
- [25] Chen R, Chen W, Huang X, et al. Tanshinone II A attenuates heart failure via inhibiting oxidative stress in myocardial infarction rats[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 404.
- [26] Chen YF, Day CH, Lee NH, et al. Tanshinone II A inhibits  $\beta$ -catenin nuclear translocation and IGF-2R activation via estrogen receptors to suppress angiotensin II-induced H9c2 cardiomyoblast cell apoptosis[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(12): 1284-1291.
- [27] 李玲,谢峥,万有才.阿魏酸对晚期糖基化终末产物诱导 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1446-1448.
- [28] 吴枝娟,余靖,王瑞幸,等.阿魏酸预处理对阿霉素诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2014,30(8):1059-1065.

(收稿日期:2022-10-14;修回日期:2022-11-16)



## 狼毒大戟化学成分及抗肿瘤活性研究

张洲<sup>1,2</sup>, 朱朋艳<sup>2,3</sup>, 马金蓉<sup>1,2</sup>, 张蔓<sup>3</sup>, 钱敏<sup>3</sup>, 李兴玉<sup>2,3\*</sup>, 袁文娟<sup>2,3\*</sup> (1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 普洱茶教育部重点实验室, 昆明 650201; 3. 云南农业大学 理学院, 昆明 650201)

**摘要:** **目的** 研究狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana* Steud) 根部中的化学成分及抗肿瘤活性。**方法** 采用柱层析法、反相色谱法、凝胶色谱法等多种分离手段对中药狼毒根部的乙醇提取部分进行分离, 根据波谱数据确定其结构, 再根据 MTT 法对二萜类化合物进行活性筛选, 采用流式细胞术分析其促肿瘤细胞的凋亡情况。**结果** 共分离得到 16 个化合物, 包括 13 个二萜类化合物、2 个脂肪酸以及 1 个简单化合物, 分别为 3*R*-ent-1 (10), 15-rosadien-3-ol (1)、euphebracteolatin B (2)、ent-11 $\alpha$ -hydroxyabieta-8 (14), 13 (15)-dien-16, 12-olide (3)、fischeriolid B (4)、ebractenoid F (5)、ebraphenol C (6)、fischeria A (7)、euphorin A (8)、ebractenoid S (9)、ent-3, 14-dioxo-16-atrisene (10)、jolkinolide E (11)、yuexiandajisu F (12)、bisebracteolatin B (13)、(R)- $\alpha$ -(7'Z, 10'Z, 13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (14)、2, 4-二羟基-6-甲氧基-3-醛基苯乙酮 (15)、1-O-(9Z, 12Z-octadecadienoyl) glycerol (16), 其中化合物 2 和 9 为首次从该种分离得到。化合物 1、13 对 A549 细胞活性显著, 化合物 1 对 HCT116、A549 细胞株的  $IC_{50}$  分别为 25.97、19.82  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 化合物 13 对 HCT116、A549、HepG-2、SW620 细胞株的  $IC_{50}$  分别为 12.29、6.73、15.53、18.29  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。流式细胞术检测结果表明, 随着化合物 1 浓度的增加, A549 细胞系的凋亡率也增加, 表明化合物 1 能够明显促进 A549 细胞的凋亡。**结论** 狼毒大戟化学成分多样, 其中二萜化合物能显著抑制肿瘤细胞的生长。化合物 1 能以浓度依赖的方式显著诱导肿瘤细胞凋亡且能够明显促进 A549 细胞的凋亡。

**关键词:** 狼毒大戟; 二萜; 化学成分; 抗肿瘤活性

**中图分类号:** R284.1, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)03-0574-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.004

### Chemical constituents and antitumor activity of *Euphorbia fischeriana* Steud

ZHANG Zhou<sup>1,2</sup>, ZHU Peng-yan<sup>2,3</sup>, MA Jin-rong<sup>1,2</sup>, ZHANG Man<sup>3</sup>, QIAN Min<sup>3</sup>, LI Xing-yu<sup>2,3\*</sup>, YUAN Wen-juan<sup>2,3\*</sup> (1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 2. Key Laboratory of Pu'er Tea, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 3. College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**Abstract: Objective** To determine the chemical constituents and antitumor activity in the roots of *Euphorbia fischeriana* Steud. **Methods** Column chromatography, reverse phase chromatography, gel chromatography and other separation methods were used to separate and purify the ethanol extract from the roots of *Euphorbia fischeriana* Steud. Then the structure was determined by the spectral data of the compound. The activity of diterpenoids was screened by MTT assay, and the apoptosis of tumor cells induced by the active compounds was detected by flow cytometry. **Results** Totally 16 compounds were isolated, including 13 diterpenoids, 2 aliphatic acids and 1 simple compound, namely 3*R*-ent-1 (10), 15-rosadien-3-ol (1), euphebracteolatin B (2), ent-11 $\alpha$ -hydroxyabieta-8 (14),

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.32060084); 云南省科技厅应用基础面上项目 (No.2019FB119); 国家大学生创新创业训练计划支持项目 (No.202010676050)。

**作者简介:** 张洲, 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物化学及生物活性研究, email: zhangtzhou@163.com \*通信作者: 袁文娟, 女, 副主任药师, 主要从事药用植物化学及生物活性研究, email: 1435648569@qq.com; 李兴玉, 男, 教授, 主要从事天然产物研究与开发研究, email: lixingyu@ynau.edu.cn



13 (15)-dien-16, 12-olide (3), fischeriolid B (4), ebractenoid F (5), ebraphenol C (6), fischeria A (7), euphorin A (8), ebractenoid S (9), *ent*-3, 14-dioxo-16-atise (10), jolkinolide E (11), yuexiandajisu F (12), bisebracteolasin B (13), (*R*)- $\alpha$ - (7'Z, 10'Z, 13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (14), 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-aldehyde acetophenone (15), and 1-*O*-(9Z, 12Z-octadecadienoyl) glycerol (16). Compounds 2 and 9 were isolated from this species for the first time. Compounds 1 and 13 showed significant activity against A549 cells by MTT activity test. The  $IC_{50}$  of compound 1 against HCT116 and A549 cell lines was 25.97 and 19.82  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The  $IC_{50}$  of compound 13 against HCT116, A549, HepG-2 and SW620 cell lines was 12.29, 6.73, 15.53 and 18.29  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Flow cytometry showed that the apoptosis rate of A549 cell line increased with the increase of compound 1 concentration, indicating that compound 1 could significantly promote the apoptosis of A549 cells. **Conclusion** The chemical composition in *Euphorbia fischeriana* Steud is diverse, the diterpenoids in *Euphorbia fischeriana* Steud can significantly inhibit the growth of tumor cells. Active compound 1 can significantly induce tumor cell apoptosis in a concentration-dependent manner and promote apoptosis of A549 cells.

**Key words:** *Euphorbia fischeriana* Steud; diterpenoid; chemical composition; antitumor activity

狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana* Steud) 为大戟科大戟属 (*Euphorbia*) 植物, 收载于《中国药典》2020 年版一部, 具有散结、杀虫之功效<sup>[1]</sup>。主产于内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁、河南及河北等地区<sup>[2]</sup>。现代药理学研究证明, 狼毒大戟具有显著的抗炎、抗肿瘤作用<sup>[3-4]</sup>。其活性物质基础为二萜类物质, 迄今为止, 科学家已从狼毒大戟中分离得到近百种二萜类化合物<sup>[5]</sup>。狼毒大戟中的二萜类化合物按照骨架类型大致可以分为: 三环二萜 (Rosane 型、Pimarane 型), 四环二萜类 (Abietane、Kaurane、Atisane 型), 大环二萜类 (Tigliane 型、Ingenane 型以及 Cembrane 型等)(见图 1)<sup>[6]</sup>, 其中 Rosane 型和 Abietane 型二萜较为常见, 也是研究的重点<sup>[7]</sup>。为进一步明确狼毒大戟的药用价值, 课题组对狼毒大戟干燥根的成分进行了系统的研究, 并对化合物的抗肿瘤活性进行筛选, 现报道如下。

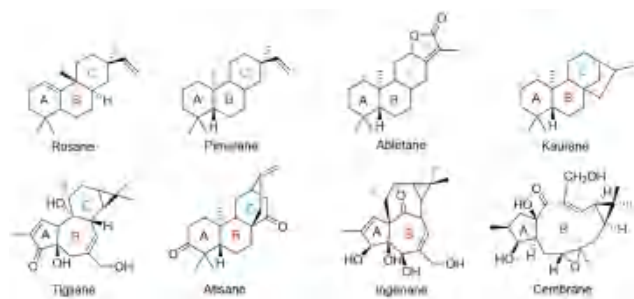


图 1 二萜化合物主要骨架类型

Fig 1 Main skeleton types of the diterpenoids

## 1 材料

### 1.1 试药

本研究所用材料为狼毒大戟的根, 于 2020

年 11 月购自云南省昆明市螺蛳湾国际中药材商贸城。并由云南省食品药品检验所高文分副主任医师鉴定, 标本 (编号: 2020-DB-07) 保存于云南农业大学普洱茶教育部重点实验室。

本次实验过程中所使用的化学试剂均由天津大茂化学试剂厂提供。胰蛋白酶-EDTA 消化液 (索莱宝生物科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (Meilunbio); 6 孔板、96 孔板 (Titan); 二甲基亚砜 (DMSO, VWR LIFE SCIENCE); MTT、缓冲液 (索莱宝生物科技有限公司)。

### 1.2 细胞

人结肠癌细胞 (HCT116)、人肺癌细胞 (A549)、人肝癌细胞 (HepG-2)、宫颈癌细胞 (HeLa)、人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和人直肠腺癌细胞 (SW620) 由云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室细胞库提供。

### 1.3 仪器

DLSB-5/25 型循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); EYELA 旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); AVANCE III 500 MHz 核磁共振波谱仪、AVANCE III 600 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Agilent 1290/6538 Q-TOF 液质联用色谱仪和 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×9.4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); FlexStation 多功能微孔读板机 (Molecular Devices); BD FACSJazz 流式细胞仪 (碧迪医疗器械有限公司)。

硅胶 (100 ~ 200 目、200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (2.0 cm×180 cm, 40 ~ 70  $\mu\text{m}$ , Amersham Pharmacia Biotech AB,

乌普萨拉, 瑞典); MCI-gel CHP20P (75 ~ 100  $\mu\text{m}$ , Mitsubishi Chemical Co., Ltd.); Rp-C<sub>18</sub> (40 ~ 60  $\mu\text{m}$ , Merck); 薄层层析用预制硅胶 GF-254 (青岛海浪硅胶干燥剂厂)。

## 2 方法

### 2.1 提取分离

狼毒大戟干燥根 (19.5 kg), 粉碎, 用 95% 乙醇 (3×50 L) 回流提取 3 次, 提取时间分别为 4 h、3 h、3 h。将乙醇提取部分减压浓缩得浸膏 3.5 kg, 用适量的水分散后用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩得乙酸乙酯部分 1.0 kg, 再经硅胶柱层析 (i.d 15 cm×80 cm, 100 ~ 200 目), 石油醚 (PE)-乙酸乙酯 (EA) (1:0→0:1), 分离成流份 Fr.A ~ Fr.C。

Fr.A 经反相 RP-C<sub>18</sub> 柱 (甲醇-水, 50:50→100:0) 梯度洗脱, 得到 3 个流份 Fr.A I ~ Fr.A III。Fr.A I 经 Sephadex LH-20 凝胶柱, 甲醇洗脱得流份 Fr.A I 1 ~ Fr.A I 5。Fr.A I 1 ~ Fr.A I 5 进一步用半制备液相色谱仪洗脱分离得化合物 1 (3.9 mg, Fr.A I 1, 乙腈-水=80:20), 化合物 2 (66.5 mg, Fr.A I 2, 乙腈-水=50:50), 化合物 3 (103.4 mg, Fr.A I 3, 乙腈-水=70:30), 化合物 4 (23.7 mg, Fr.A I 3, 乙腈-水=70:30), 化合物 5 (15.9 mg, Fr.A I 5, 乙腈-水=55:45), 化合物 6 (21.2 mg, Fr.A I 4, 乙腈-水=70:30)。Fr.A II 经 Sephadex LH-20 凝胶柱甲醇洗脱, 得流份 Fr.A II 1 ~ Fr.A II 2。Fr.A II 1 进一步用半制备液相色谱仪 (65% ~ 85% 乙腈) 洗脱分离得化合物 10 (9.6 mg), 化合物 12 (5.5 mg)。Fr.A II 2 进一步用半制备液相色谱仪 (95% 乙腈) 洗脱分离得化合物 13 (2.6 mg)。

Fr.B 经反相 RP-C<sub>18</sub> 柱 (甲醇-水, 50:50→90:10) 梯度洗脱, 得到 2 个流份 Fr.B I ~ Fr.B II。Fr.B I 经 Sephadex LH-20 凝胶柱, 甲醇洗脱得流份 Fr.B I 1 ~ Fr.B I 3。Fr.B I 1 与 Fr.B I 2 进一步经硅胶柱 (200 ~ 300 目) PE-EA 洗脱, 分离得化合物 7 (5.45 mg, Fr.B I 1, PE-EA = 45:1), 化合物 8 (18.9 mg, Fr.B I 2, PE-EA = 70:1)。Fr.B II 经 Sephadex LH-20 凝胶柱, 甲醇洗脱得流份 Fr.B II 1 ~ Fr.B II 2。Fr.B II 1 与 Fr.B II 2 进一步经硅胶柱 (200 ~ 300 目), PE-EA 洗脱分离得化合物 9 (4.3 mg, Fr.B II 1, PE-EA = 60:1), 化合物 11 (7.3 mg, Fr.B II 2, PE-EA = 60:1), 化合物 16 (3.3 mg, Fr.B II 2, PE-EA = 60:1)。

Fr.C 经反相 RP-C<sub>18</sub> 柱 (甲醇-水, 50:50→90:10) 梯度洗脱, 得到 2 个流份 Fr.C I ~ Fr.C II。Fr.C I 经 Sephadex LH-20 凝胶柱甲醇洗脱, 得流份 Fr.C I 1 ~ Fr.C I 3。Fr.C I 1 与 Fr.C I 2 进一步经半制备液相色谱仪洗脱, 分离得化合物 12 (3.6

mg, Fr.C I 1, 乙腈-水=70:30), 化合物 14 (4.4 mg, Fr.C I 2, 乙腈-水=70:30), 化合物 15 (3.48 mg, Fr.C I 2, 乙腈-水=70:30)。

### 2.2 结构鉴定

利用其理化性质、现代波谱技术、<sup>1</sup>D NMR (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR)、ESIMS 和对比文献数据确定此次分离得到的化合物的化学结构。

### 2.3 MTT 检测

使用以下人类肿瘤细胞系 A549、HCT116、HepG-2、SW620、HeLa 和 MCF-7 进行 MTT 检测。在 100  $\mu\text{L}$  的培养液中, 细胞以  $1 \times 10^5$  个每孔的密度接种到 96 孔培养皿中。培养 24 h 后, 用浓度为 2 ~ 40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (DMSO 为载体, 最大浓度为 0.1%) 的化合物处理细胞。在不同浓度的培养基中孵育 24 h 后, 更换含 10% 胎牛血清和 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 的 200  $\mu\text{L}$  新鲜培养基。细胞孵育 4 h 后再次更换培养基为 200  $\mu\text{L}$  的 DMSO。在 570 nm 处用微量滴定板读取器测量每孔的吸光度, 并计算  $IC_{50}$  值。

### 2.4 流式细胞术检测

取对数期生长期的 A549 细胞, 以  $1 \times 10^4$  个每孔的细胞密度接种于 6 孔板, 贴壁过夜后, 用不同浓度 (10、20、30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的化合物 1 孵育 24 h, 胰酶消化、收集细胞后, 用 100  $\mu\text{L}$  的缓冲液重悬, 先后加入 FITC-Annexin V 和 PI 各 5  $\mu\text{L}$ , 室温避光孵育 15 min, 在 488 nm 处用流式细胞仪检测其凋亡率。

## 3 结果

### 3.1 化合物结构鉴定

共从狼毒大戟中分离得到了 16 个化合物, 包括 13 个已知二萜类化合物、2 个脂肪酸以及 1 个简单化合物, 其结构如图 2 所示。

化合物 1: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  289 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 5.80 (1H, dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.55 Hz, H-15), 5.38 (1H, t,  $J = 2.7$  Hz, H-1), 4.91 (1H, dd,  $J = 1.2$  Hz, 17.55 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 4.84 (1H, dd,  $J = 1.2$  Hz, 10.7 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 3.50 (1H, dd,  $J = 5.94$  Hz, 10.45 Hz, H-3), 1.67 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.98 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 115.2 (C-1), 31.8 (C-2), 75.0 (C-3), 36.9 (C-4), 43.6 (C-5), 18.5 (C-6), 25.7 (C-7), 31.4 (C-8), 37.0 (C-9), 148.9 (C-10), 35.3 (C-11), 32.8 (C-12), 36.3 (C-13), 39.8 (C-14), 151.3 (C-15), 108.7 (C-16), 22.3 (17-CH<sub>3</sub>), 23.8 (18-CH<sub>3</sub>), 12.8 (19-CH<sub>3</sub>), 20.8 (20-CH<sub>3</sub>)。

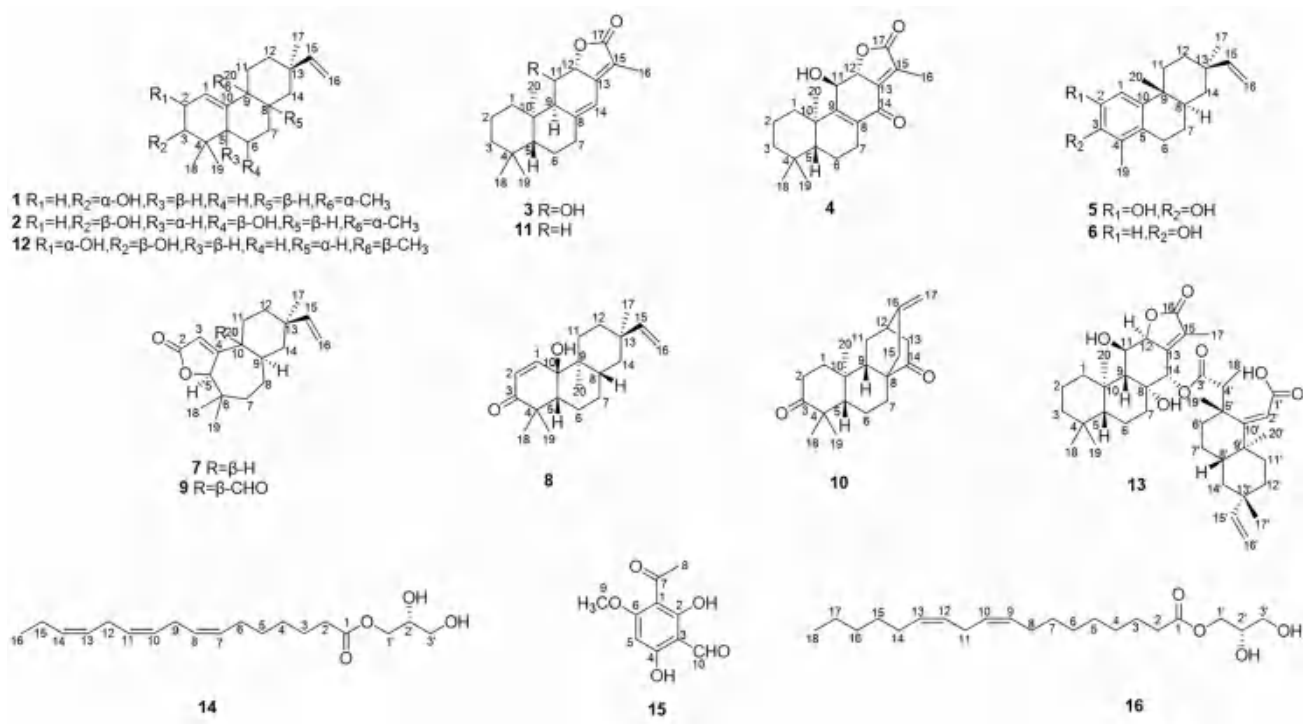


图 2 化合物 1 ~ 16 基本结构

Fig 2 Structures of compounds 1 ~ 16

以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道基本一致,故确定该化合物为 3*R-ent-1* (10), 15-rosadien-3-ol。

化合物 2: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  305  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{20}H_{32}O_2$ ,  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 5.83 (1H, dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.4 Hz, H-15), 5.39 (1H, s, H-1), 4.94 (1H, d,  $J = 17.5$  Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 4.85 (1H, d,  $J = 10.65$  Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 3.97 (1H, s, H-6), 3.47 (1H, dd,  $J = 5.95$  Hz, 10.05 Hz, H-3), 1.10 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 1.00 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 1.04 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.70 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 116.2 (C-1), 31.8 (C-2), 74.8 (C-3), 36.7 (C-4), 42.1 (C-5), 70.5 (C-6), 30.6 (C-7), 37.7 (C-8), 36.6 (C-9), 148.0 (C-10), 36.5 (C-11), 32.6 (C-12), 36.3 (C-13), 34.0 (C-14), 151.0 (C-15), 109.1 (C-16), 22.1 (17-CH<sub>3</sub>), 23.7 (18-CH<sub>3</sub>), 12.85 (19-CH<sub>3</sub>), 23.9 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致,故确定该化合物为 euphebracteolatin B。

化合物 3: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  317  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{20}H_{28}O_3$ ,  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 6.24 (1H, s, H-14), 4.83 (1H, s, H-12), 4.43 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-11), 1.87 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.92 (6H, s, 20-CH<sub>3</sub>, 19-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$  NMR (125

MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 39.2 (C-1), 18.8 (C-2), 41.5 (C-3), 33.3 (C-4), 55.1 (C-5), 23.5 (C-6), 36.8 (C-7), 152.6 (C-8), 60.9 (C-9), 40.0 (C-10), 64.1 (C-11), 79.4 (C-12), 149.9 (C-13), 113.2 (C-14), 117.8 (C-15), 175.5 (C-16), 8.2 (17-CH<sub>3</sub>), 33.7 (18-CH<sub>3</sub>), 21.6 (19-CH<sub>3</sub>), 17.1 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致,故确定该化合物为 *ent-11 $\alpha$ -hydroxyabieta-8* (14), 13 (15)-dien-16, 12-olide。

化合物 4: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  331  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{20}H_{26}O_4$ ,  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 4.96 (1H, d,  $J = 2.16$  Hz, H-12), 4.18 (1H, d,  $J = 2.88$  Hz, H-11), 2.16 (3H, d,  $J = 1.92$  Hz, 17-CH<sub>3</sub>), 1.11 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 34.9 (C-1), 18.4 (C-2), 41.0 (C-3), 33.4 (C-4), 50.3 (C-5), 17.5 (C-6), 24.5 (C-7), 136.5 (C-8), 161.1 (C-9), 39.7 (C-10), 63.7 (C-11), 80.8 (C-12), 146.3 (C-13), 185.2 (C-14), 133.4 (C-15), 174.0 (C-16), 9.8 (17-CH<sub>3</sub>), 21.6 (18-CH<sub>3</sub>), 32.9 (19-CH<sub>3</sub>), 20.2 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致,故确定该化合物为 fischeriolide B。

化合物 5: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  287  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{19}H_{26}O_2$ ,  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $J/Hz$ )  $\delta$ : 6.71 (1H, s, H-1), 5.86 (1H,



dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.5 Hz, H-15), 4.96 (1H, dd,  $J = 1.3$  Hz, 17.55 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 4.88 (1H, dd,  $J = 1.35$  Hz, 10.75 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 1.96 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.99 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 108.8 (C-1), 140.8 (C-2), 140.3 (C-3), 122.6 (C-4), 127.0 (C-5), 26.9 (C-6), 25.6 (C-7), 34.1 (C-8), 36.4 (C-9), 139.9 (C-10), 32.9 (C-11), 29.7 (C-12), 36.4 (C-13), 39.6 (C-14), 151.1 (C-15), 109.4 (C-16), 21.8 (17-CH<sub>3</sub>), 21.3 (18-CH<sub>3</sub>), 11.4 (19-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 ebractenoid F。

化合物 6: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  271 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 7.05 (1H, d,  $J = 8.45$  Hz, H-1), 6.64 (1H, d,  $J = 8.45$  Hz, H-2), 5.86 (1H, dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.5 Hz, H-15), 4.96 (1H, dd,  $J = 17.5$  Hz, 1.5 Hz, H-16), 4.88 (1H, dd,  $J = 1.25$  Hz, 10.7 Hz, H-16), 2.11 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 122.6 (C-1), 112.5 (C-2), 151.0 (C-3), 121.9 (C-4), 135.7 (C-5), 27.4 (C-6), 25.6 (C-7), 36.3 (C-8), 36.4 (C-9), 140.8 (C-10), 34.1 (C-11), 32.9 (C-12), 36.4 (C-13), 39.6 (C-14), 151.1 (C-15), 108.8 (C-16), 22.7 (17-CH<sub>3</sub>), 11.1 (18-CH<sub>3</sub>), 21.4 (19-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 ebraphenol C。

化合物 7: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  289 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 5.89 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, H-3), 5.77 (1H, dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.5 Hz, H-15), 4.95 (1H, d,  $J = 0.85$  Hz, H-5), 4.92 (1H, dd,  $J = 1.25$  Hz, 5.15 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 4.92 (1H, dd,  $J = 0.9$  Hz, 10.75 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 1.22 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.21 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 1.03 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.70 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 183.9 (C-2), 117.3 (C-3), 173.3 (C-4), 89.9 (C-5), 39.1 (C-6), 43.2 (C-7), 39.3 (C-8), 39.1 (C-9), 39.6 (C-10), 28.4 (C-11), 31.6 (C-12), 35.9 (C-13), 40.9 (C-14), 150.0 (C-15), 109.5 (C-16), 22.5 (17-CH<sub>3</sub>), 18.7 (18-CH<sub>3</sub>), 18.8 (19-CH<sub>3</sub>), 30.0 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 fischeria A。

化合物 8: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  303 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 6.57 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz, H-1), 5.98 (1H, d,  $J = 10.35$  Hz, H-2), 5.79 (1H, dd,  $J = 10.7$  Hz, 17.5 Hz, H-15), 4.88 (2H, dd,  $J = 17.5$  Hz, 35.75 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 1.31 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.18 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1.04 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 147.1 (C-1), 127.1 (C-2), 204.9 (C-3), 45.1 (C-4), 51.1 (C-5), 20.9 (C-6), 26.7 (C-7), 29.6 (C-8), 74.6 (C-9), 40.9 (C-10), 28.0 (C-11), 31.8 (C-12), 36.2 (C-13), 39.9 (C-14), 150.7 (C-15), 109.0 (C-16), 22.4 (17-CH<sub>3</sub>), 32.3 (18-CH<sub>3</sub>), 22.7 (19-CH<sub>3</sub>), 15.9 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 euphorin A。

化合物 9: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  303 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 9.77 (1H, s, 18-CHO), 6.08 (1H, d,  $J = 1.60$  Hz, H-3), 5.74 (1H, dd,  $J = 10.75$  Hz, 17.00 Hz, H-15), 4.95 (1H, d,  $J = 0.60$  Hz, H-5), 4.90 (2H, dt,  $J = 9.05$  Hz, 0.8 Hz, 17-CH<sub>2</sub>), 1.06 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 1.22 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.59 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 172.2 (C-2), 120.3 (C-3), 171.8 (C-4), 90.0 (C-5), 39.1 (C-6), 42.7 (C-7), 28.7 (C-8), 37.6 (C-9), 54.4 (C-10), 35.3 (C-11), 32.4 (C-12), 35.7 (C-13), 42.0 (C-14), 149.0 (C-15), 110.1 (C-16), 21.8 (17-CH<sub>3</sub>), 199.7 (C-18), 29.7 (19-CH<sub>3</sub>), 18.2 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 ebractenoid S。

化合物 10: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  301 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 4.87 (1H, s, 17-CH<sub>2</sub>), 4.66 (1H, s, 17-CH<sub>2</sub>), 1.06 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.99 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 37.4 (C-1), 34.3 (C-2), 216.7 (C-3), 47.8 (C-4), 55.6 (C-5), 20.3 (C-6), 31.4 (C-7), 47.9 (C-8), 52.1 (C-9), 37.9 (C-10), 28.1 (C-11), 38.6 (C-12), 44.8 (C-13), 216.8 (C-14), 42.8 (C-15), 147.3 (C-16), 107.4 (C-17), 26.2 (18-CH<sub>3</sub>), 22.1 (19-CH<sub>3</sub>), 13.0 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 ent-3, 14-dioxo-16-atisene。

化合物 11: 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  301 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $J/\text{Hz}$ )  $\delta$ : 6.25 (1H, s, H-14), 4.87 (1H, dd,  $J = 5.95$  Hz, 13.25 Hz, H-12), 1.84 (3H,



s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.93 (6H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 39.6 (C-1), 19.0 (C-2), 41.9 (C-3), 33.5 (C-4), 55.3 (C-5), 37.1 (C-7), 156.3 (C-8), 51.9 (C-9), 41.6 (C-10), 27.5 (C-11), 76.0 (C-12), 152.3 (C-13), 113.9 (C-14), 116.2 (C-15), 175.4 (C-16), 8.2 (17-CH<sub>3</sub>), 33.8 (18-CH<sub>3</sub>), 21.7 (19-CH<sub>3</sub>), 16.8 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 jolkinolide E。

化合物 12: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 305 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 5.79 (1H, dd, *J* = 10.75 Hz, 17.55 Hz, H-15), 5.43 (1H, t, *J* = 21.5 Hz, H-1), 4.88 (2H, dd, *J* = 37.25 Hz, 17.5 Hz, 16-CH<sub>2</sub>), 4.02 (1H, t, *J* = 5.85 Hz, H-2), 3.26 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3), 2.21 (1H, dd, *J* = 3.3 Hz, 13.55 Hz, H-5), 4.83 (1H, s, H-12), 4.43 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-11), 1.87 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 0.90 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 0.87 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 118.8 (C-1), 72.2 (C-2), 81.1 (C-3), 38.4 (C-4), 43.9 (C-5), 18.1 (C-6), 25.4 (C-7), 31.2 (C-8), 37.0 (C-9), 151.8 (C-10), 34.9 (C-11), 32.8 (C-12), 36.3 (C-13), 39.7 (C-14), 151.0 (C-15), 108.8 (C-16), 22.3 (17-CH<sub>3</sub>), 23.9 (18-CH<sub>3</sub>), 13.9 (19-CH<sub>3</sub>), 20.7 (20-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 yuexiandajisu F。

化合物 13: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 667 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 5.65 (1H, s, H-14), 5.13 (1H, s, H-12), 4.55 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-11), 4.37 (1H, s, H-11), 3.61 (1H, s, H-8), 2.09 (1H, s, H-9), 2.02 (3H, d, *J* = 1.8 Hz, 17-CH<sub>3</sub>), 1.21 (3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.83 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 5.93 (1H, s, H-1'), 5.78 (1H, dd, *J* = 10.7 Hz, 17.5 Hz, H-15'), 4.92 (1H, d, *J* = 17.5 Hz, H-16'), 4.86 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-16'), 1.32 (3H, s, 19'-CH<sub>3</sub>), 1.30 (3H, s, 18'-CH<sub>3</sub>), 1.01 (3H, s, 17'-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, 20'-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 39.3 (C-1), 20.1 (C-2), 41.5 (C-3), 33.3 (C-4), 54.8 (C-5), 18.7 (C-6), 41.5 (C-7), 74.3 (C-8), 62.0 (C-9), 37.8 (C-10), 68.6 (C-11), 78.9 (C-12), 151.5 (C-13), 74.1 (C-14), 130.1 (C-15), 174.2 (C-16), 9.1 (17-CH<sub>3</sub>), 34.1 (18-CH<sub>3</sub>), 22.0 (19-CH<sub>3</sub>), 18.2

(20-CH<sub>3</sub>), 116.7 (C-1'), 170.0 (C-2'), 177.3 (C-3'), 45.9 (C-4'), 41.5 (C-5'), 26.3 (C-6'), 27.6 (C-7'), 40.5 (C-8'), 41.0 (C-9'), 172.0 (C-10'), 33.8 (C-11'), 32.5 (C-12'), 36.1 (C-13'), 39.3 (C-14'), 150.4 (C-15'), 109.2 (C-16'), 22.8 (17'-CH<sub>3</sub>), 24.6 (18'-CH<sub>3</sub>), 27.2 (19'-CH<sub>3</sub>), 15.9 (20'-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物 13 为 bisebracteolasin B。

化合物 14: 黄色油状; ESI-MS: *m/z* 325 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 5.37 (6H, m), 4.20 (1H, dd, *J* = 4.55 Hz, 11.65 Hz, H-1'a), 4.15 (1H, dd, *J* = 6.1 Hz, 11.6 Hz, H-1'b), 3.93 (1H, tt, *J* = 4.75 Hz, 9.75 Hz, H-2'), 3.69 (1H, dd, *J* = 3.75 Hz, 11.4 Hz, H-3'), 3.60 (1H, dd, *J* = 5.7 Hz, 11.35 Hz, H-3'), 2.81 (4H, m), 2.35 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2), 2.08 (4H, m), 0.97 (3H, s, 16-CH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, *J*/Hz): 174.3 (C-1), 34.1 (C-2), 24.9 (C-3), 29.2 (C-4), 29.6 (C-5), 27.2 (C-6), 130.2 (C-7), 127.1 (C-8), 25.6 (C-9), 128.3 (C-10), 128.2 (C-11), 25.5 (C-12), 127.8 (C-13), 132.0 (C-14), 20.6 (C-15), 14.3 (16-CH<sub>3</sub>), 65.2 (C-1'), 70.3 (C-2'), 63.3 (C-3')。以上波谱数据与文献报道一致<sup>[21]</sup>, 故鉴定化合物 14 为 (*R*)- $\alpha$ -(7'Z, 10'Z, 13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride。

化合物 15: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 211 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 15.38 (1H, s, 2-OH), 12.98 (1H, s, 3-CHO), 10.17 (1H, s, 4-OH), 5.88 (1H, s, H-5), 3.93 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 2.60 (3H, s, 1-COCH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 104.4 (C-1), 168.9 (C-2), 105.5 (C-3), 171.3 (C-4), 90.8 (C-5), 170.2 (C-6), 203.4 (7-COCH<sub>3</sub>), 192.3 (8-CHO), 55.5 (9-OCH<sub>3</sub>), 32.6 (10-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[22]</sup>报道一致, 故确定该化合物为 2, 4-二羟基-6-甲氧基-3-醛基苯乙酮。

化合物 16: 黄色油状; ESI-MS: *m/z* 356 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 5.34 (4H, m), 4.15 (2H, m), 3.9 (1H, t, *J* = 4.55 Hz, H-2'), 3.68 (1H, dd, *J* = 3.85 Hz, 9.0 Hz, H-3'), 3.58 (1H, dd, *J* = 5.9 Hz, 6.3 Hz, H-3'), 2.75 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-11), 2.33 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2'), 2.03 (4H, dd, *J* = 6.8 Hz, 13.75 Hz, H-8, H-14), 1.63 (2H, m), 0.91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)。

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, *J*/Hz) δ: 174.4 (C-1), 34.1 (C-2), 31.5 (C-3), 29.3 (C-4), 29.6 (C-5), 29.2 (C-6), 29.1 (C-7), 29.0 (C-8), 130.2 (C-9), 130.0 (C-10), 27.2 (C-11), 128.0 (C-12), 127.9 (C-13), 27.2 (C-14), 25.6 (C-15), 24.9 (C-16), 22.6 (C-17), 14.1 (18-CH<sub>3</sub>), 65.1 (C-1'), 70.3 (C-2'), 63.4 (C-3'). 以上数据与文献<sup>[23]</sup>报道基本一致, 故确定该化合物为 1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadecadienoyl) glycerol.

### 3.2 MTT 法检测二萜类化合物对 6 种肿瘤细胞的生长抑制作用

采用“2.3”项下 MTT 活性筛选方法, 对化合物 1~13 进行肿瘤细胞毒活性检测。对化合物 1~13 进行肿瘤细胞毒活性检测, 结果浓度为 40 μmol·L<sup>-1</sup>时, 化合物 1、13 对 HCT116、A549、HeLa、MCF-7、HepG-2、SW620 这 6 种肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 而其余化合物效果不显著。化合物 1 对 HCT116、A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值分别为 25.97、19.82 μmol·L<sup>-1</sup> (见表 1 及图 3), 化合物

13 对 HCT116、A549、HepG-2、SW620 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 12.29、6.73、15.53、18.29 μmol·L<sup>-1</sup> (见表 1 及图 4)。

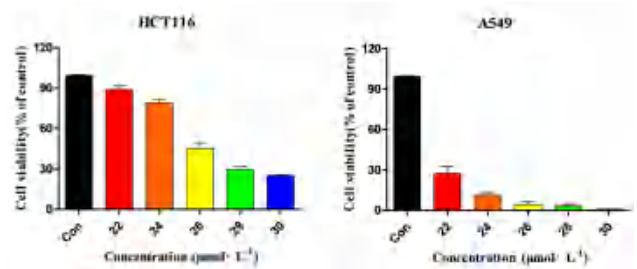


图 3 化合物 1 对 HCT116 及 A549 细胞的生长抑制活性  
Fig 3 Growth inhibitory activity of compound 1 on HCT116 and A549 cells

表 1 化合物 1 和 13 的细胞毒性 (IC<sub>50</sub>, μmol·L<sup>-1</sup>)

化合物	HCT116	A549	HepG-2	SW620
1	25.97	19.82	> 40	> 40
13	12.29	6.73	15.53	18.29
紫杉醇	< 0.008	< 0.008	< 0.008	< 0.008

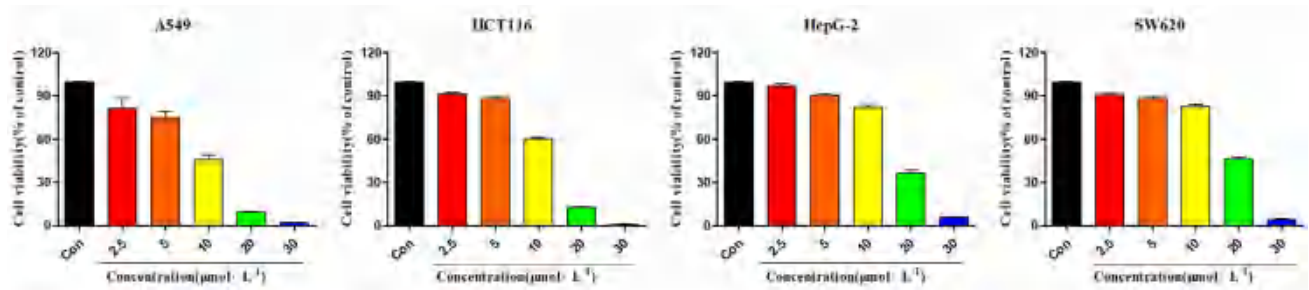


图 4 化合物 13 对 A549、HCT116、HepG-2 及 SW620 细胞的生长抑制活性  
Fig 4 Growth inhibitory activity of compound 13 on A549, HCT116, HepG-2, and SW620 cells

### 3.3 流式细胞仪检测结果

采用流式细胞术检测化合物 1 对 A549 细胞的凋亡情况。结果表明, 与空白对照组相比, 不

同浓度的样品处理组明显促进了 A549 细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ ), 并呈浓度依赖性 (见图 5)。

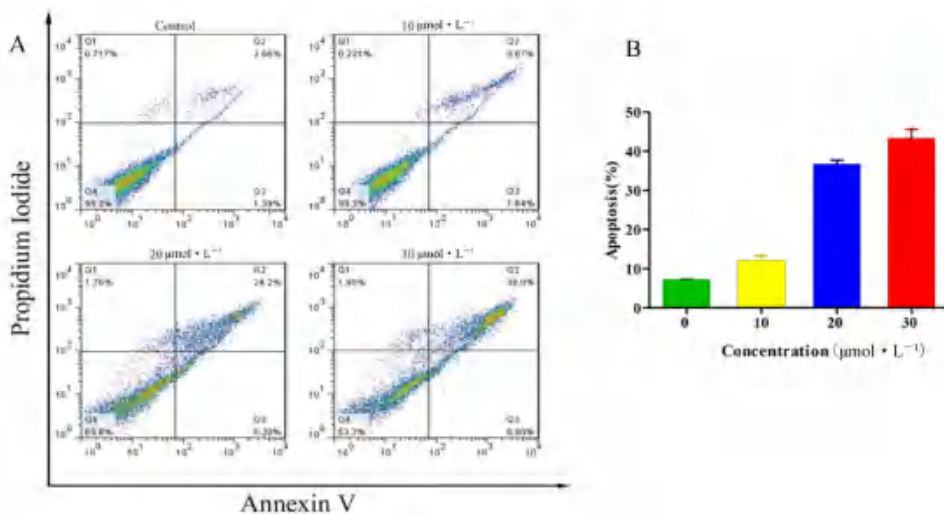


图 5 不同浓度化合物 1 对细胞凋亡的影响  
Fig 5 Effect of different concentrations of compound 1 on apoptosis

#### 4 讨论

狼毒大戟为大戟属植物,在我国多地均有分布,化学成分丰富多样,目前对其中萜类化合物的研究报道相对较多,为该植物的研究热点。现代药理学研究表明狼毒中二萜类化合物较强的抗肿瘤作用。迄今为止,已从大戟属植物中分离出近千种二萜类化合物。狼毒大戟化学成分多样,其中所含有的不同骨架的二萜类化合物种类相对较多,本文对狼毒大戟的根部乙醇提取部分进行了深入的研究,共得到了 16 个化合物,包括 13 个不同骨架类型的二萜类化合物、2 个长链化合物以及 1 个简单化合物。其中化合物 2 和 9 为首次从狼毒大戟中分离得到,化合物 1、2、5、6、8、12 均为 Rosane 型二萜生物碱,化合物 3、4、11 为 Abietane 型二萜,化合物 7、9 为结构较为新颖的 Tiglane 型二萜内酯,而化合物 10 为 Atisane 型二萜、化合物 13 为结构非常新颖的二萜二聚体。通过 MTT 法对分离得到的二萜化合物进行活性筛选,发现化合物 1、13 对 HCT-116、A549、HeLa、MCF-7、HepG-2、SW620 的细胞活性均具有显著的抑制作用,因此可以作为治疗肿瘤的先导化合物对其药用价值进行深入研究 and 开发利用。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 1088.
- [2] 葛继芸,周艳卿,邱彦,等.狼毒大戟的化学成分及细胞毒活性研究[J].中南药学,2022,20(6): 1226-1231.
- [3] 李盛建,王莹,王强,等.月腺大戟素 A 抗乳腺癌活性[J].第二军医大学学报,2018,39(7): 765-769.
- [4] 潘丽丽.狼毒大戟化学成分及其生物活性研究[D].长春:吉林农业大学,2011.
- [5] 王倩.大戟属千金子中化学成分的研究[D].成都:西南交通大学,2019.
- [6] 李娟,濮社班.大戟属二萜类化学成分和生物活性研究进展[J].中国野生植物资源,2017,36(6): 36-44.
- [7] 袁恩.质谱分子网络技术在三种中药成分差异分析中的应用研究[D].南昌:江西中医药大学,2020.
- [8] Fumihiko N, Takashi S, Shigeru T, et al. Terpenoids and aromatic compounds from the New Zealand liverworts *Plagiochila*, *Schistochila*, and *Heteroscyphus* Species [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2004, 52: 556-560.
- [9] Shu ZM, Chun RJ, Tao H, et al. Two new rosane-type diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata* Hayata [J]. Helvetica Chimica Acta, 2013, 96: 2299-2303.
- [10] Allick RL, Richard CC, Peter S, et al. Woodgate, ent-pimarane and ent-abietane diterpenes from *Euphorbia fidjiana* [J]. Phytochemistry, 1990, 29(7): 2239-2246.
- [11] Lee JW, Lee C, Qing HJ, et al. Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia fischeriana* with inhibitory effects on nitric oxide production [J]. J Nat Prod, 2016, 79(1): 126-131.
- [12] Liu ZG, Li ZL, Bai J, et al. Anti-inflammatory diterpenoids from the Roots of *Euphorbia ebracteolata* [J]. J Nat Prod, 2014, 77(4): 792-799.
- [13] Li L, Li DW, Wang CR, et al. Aromatic rosane diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata* and their inhibitory effects against lipase [J]. Bioorganic Chem, 2020, 94: 103360.
- [14] Pei YH, Koike K, Han B, et al. Fischeria A, a novel norditerpene lactone from *Euphorbia fischeriana* [J]. Tetrahedron Lett, 1999, 40(5): 951-952.
- [15] Kuang XZ, Li W, Yuichiro K. Euphorins A-H: bioactive diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* [J]. J Nat Med, 2016, 70: 412-422.
- [16] Yu ZL, Wei YL, Tian XG. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata* and their anti-tuberculosis effects [J]. Bioorg Chem, 2018, 77: 471-477.
- [17] Lal AR, Cambie RC, Rutledge PS, et al. New oxidized ent-atisene diterpenes from *Euphorbia fidjiana* [J]. Tetrahedron Lett, 1989; 30(24), 3205-3208.
- [18] Lal AR, Cambie RC, Rutledge PS, et al. Woodgate, ent-pimarane and ent-abietane diterpenes from *Euphorbia fidjiana* [J]. Phytochemistry, 1990, 29(7): 2239-2246.
- [19] Shi HM, Williams ID, Sung HH, et al. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata* [J]. Planta Med, 2005, 71(4): 349-354.
- [20] Yuan WJ, Ding X, Wang Z, et al. Two novel diterpenoid heterodimers, Bisebracteolasins A and B, from *Euphorbia ebracteolata* Hayata, and the cancer chemotherapeutic potential of Bisebracteolasin A [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14507.
- [21] 闫洪玲,陈瑶,唐飞,等.川芎茎叶中一个新的脂肪酸单甘油酯[J].药学学报,2021,56(9): 2573-2576.
- [22] 孙增玉,张秋梅.狼毒大戟的化学成分研究[J].辽宁中医药杂志,2014,41(1): 141-143.
- [23] Kim DG, Kang MJ, Hong SS, et al. Anti-inflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic [J]. Phytother Res, 2017, 31: 53-61.

(收稿日期: 2022-10-27; 修回日期: 2022-12-06)



# 醋酸阿比特龙缓释微球的制备及其体内外释药特性的考察

刘茹<sup>1</sup>, 杜丽平<sup>2</sup>, 张丽<sup>2</sup>, 郝贵周<sup>2\*</sup>, 孙勇<sup>1\*</sup> (1. 青岛大学, 山东 青岛 266071; 2. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 273400)

**摘要:** **目的** 制备一种具有较好缓释效果的醋酸阿比特龙微球, 并确定其最佳处方与工艺。 **方法** 以可生物降解的聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 为载体材料, 二氯甲烷 (DCM) 为有机溶剂, 采用 O/W 型乳化-溶剂挥发法制备醋酸阿比特龙微球, 扫描电子显微镜观察其外观形态, 激光粒度仪测定其粒径, 高效液相色谱法测定其载药量和包封率, 气相色谱法测定 DCM 残留量, 摇床法考察载药微球的体外释药特性, SD 大鼠肌内注射考察微球的体内缓释效果。 **结果** 醋酸阿比特龙微球呈圆整的球形粒子, 平均粒径 43.7 μm, 载药量 39.27%, 包封率 98.15%, DCM 残留量 0.054%。体外加速释放结果表明药物释放以扩散机制为主, 释药周期可稳定维持 11 d, 累积释药度为 80.86%; 体内释药周期可维持 16 d。 **结论** 制备的醋酸阿比特龙微球能够克服由于食物摄入引起的药物暴露量增加、血药浓度不稳定的问题, 减少给药次数, 实现了较好的缓释效果, 为其后续的产业化提供了一定的数据支持, 对其他小分子药物微球的研发具有一定的参考价值。

**关键词:** 醋酸阿比特龙; 缓释微球; 乳化溶剂挥发法; 体外释药; 体内释药

中图分类号: R94, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0582-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.005

## Preparation of abiraterone acetate microspheres and their drug release characteristics in vitro and in vivo

LIU Ru<sup>1</sup>, DU Li-ping<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, HAO Gui-zhou<sup>2\*</sup>, SUN Yong<sup>1\*</sup> (1. *Qingdao University, Qingdao Shandong 266071*; 2. *Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong 273400*)

**Abstract: Objective** To prepare abiraterone acetate microspheres with good sustained release and determine its optimal prescription and process. **Methods** Abiraterone acetate microspheres were prepared by O/W emulsion-solvent evaporation method using biodegradable polylactic acid-glycolic acid (PLGA) as the carrier material and dichloromethane (DCM) as the organic solvent. The appearance was observed by SEM. The particle size was measured by laser particle size analyzer. The drug loading and encapsulation efficiency were determined by HPLC. The DCM residue was determined by GC. The in vitro release characteristics were investigated by shaking table method and the sustained release effect in vivo by intramuscular injection in SD rats. **Results** Abiraterone acetate microspheres were spherical particles with an average particle size of 43.7 μm, drug loading of 39.27%, encapsulation efficiency of 98.15%, and DCM residue of 0.054%. The accelerated in vitro release showed that the drug release was mainly due to the diffusion, with the release cycle stably maintaining for 11 days, and a cumulative release of 80.86%. The drug release cycle in vivo might last 16 days. **Conclusion** Abiraterone acetate microspheres can overcome the problems of increased drug exposure and unstable blood concentration caused by food intake. Good sustained release may be achieved by reducing the number of administrations, providing reference for the development of other small molecule drug microspheres.

**Key words:** abiraterone acetate; sustained-release microsphere; emulsion solvent evaporation method; in vitro drug release; in vivo drug release

作者简介: 刘茹, 女, 硕士研究生, 主要从事微球药物研发, email: liuru987567@163.com \*通信作者: 郝贵周, 男, 高级工程师, 主要从事药物研发与工程化研究, email: haoguizhouhgz@163.com; 孙勇, 男, 教授, 主要从事靶向药物制剂研究, email: sunyongqdu@163.com

前列腺癌是男性泌尿系统中发病率最高的一种恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。据统计,美国前列腺癌新发病例位居男性恶性肿瘤的第一位,死亡病例位居第二位<sup>[2]</sup>。雄激素剥夺疗法是前列腺癌的常用疗法,该疗法通过降低睾丸产生的雄激素阻碍肿瘤细胞生长,但不影响肿瘤和肾上腺中雄激素的合成<sup>[3]</sup>,导致治疗后产生抗性,患者病情加重,引起死亡<sup>[4]</sup>。与雄激素剥夺疗法不同,阿比特龙是雄激素合成过程中细胞色素氧化酶 P45017A1 (CYP17A1) 的不可逆抑制剂,可直接阻断雄激素的合成,有效治疗前列腺癌<sup>[5]</sup>。

阿比特龙上市产品为醋酸阿比特龙片(商品名: Zytiga, JANSSEN BIOTECH 公司),于 2011 年被 FDA 批准使用<sup>[5]</sup>。阿比特龙作为 BCS IV 类药物,其渗透性差,水溶性差 ( $< 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),口服生物利用度低 ( $< 10\%$ ),每日服用 1000 mg,且需长期服用、频繁给药。因脂溶性高 ( $\log P$  5.12),阿比特龙必须在禁食状态下服用以防止暴露量 5 ~ 10 倍的增加,血药浓度不稳定,个体差异大,给患者带来不便<sup>[6]</sup>。因此开发一种新的剂型是有必要的。

注射用缓释微球是药物溶解或分散于高分子载体材料中形成的微小球状实体。微球的载体材料为生物可降解聚合物,包括天然生物可降解聚合物和合成生物可降解聚合物,天然生物可降解聚合物如淀粉、葡聚糖、海藻酸、甲壳素等多糖,合成生物可降解聚合物如聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 和聚乳酸 (PLA)<sup>[7]</sup>, PLGA 被认为是小分子化合物和核苷酸等药物分子的有效载体,同时具有良好的生物降解性和相容性,已被 FDA 批准使用<sup>[8]</sup>;微球的制备方法主要有乳化-溶剂挥发法、喷雾干燥法、超临界萃取法、相分离法、静电喷涂法、膜乳化法等<sup>[9]</sup>,乳化-溶剂挥发法适用于脂溶性药物和水溶性较好的药物,更易得到较高载药量与包封率的微球,同时技术成熟可控,制备过程简单,易于放大生产等,已被广泛应用<sup>[10]</sup>。

故本课题采用 PLGA 作为载体材料, O/W 型乳化-溶剂挥发法制备注射用醋酸阿比特龙缓释微球,并考察其理化参数及体内外释药特性。

## 1 材料

### 1.1 试药

醋酸阿比特龙(印度熙德隆制药公司,批号: AJ19100019,纯度: 100.8%), PLGA (德国赢创公司, 75/25, 羧基封端, Mr 13800, 批号: D170800540), 聚乙烯醇 (PVA, 型号 18-88 型, 批号: K50976755022), 二氯甲烷 (DCM, 德国默

克公司), 乙腈 (新蓝景); 其他试剂均为分析纯, 水为自制纯化水。

### 1.2 仪器

L5M 型高剪切乳化机 (英国 Silverson 机器制造有限公司), BT900-2J 型流量蠕动泵 (兰格恒流泵有限公司), ZNCL-G310\*150 型智能磁力搅拌机、SHZ-D (III) 型循环水式多用真空泵 (郑州予华仪器制造有限公司), LD 85S2 型冷冻干燥机 (美国 Millrock 公司), EM-30Plus + 型扫描电镜 (韩国 COXEM 公司), Mastersizer 3000 型激光粒度分析仪 (英国马尔文仪器有限公司), SHZ-88 型水浴恒温振荡器 (江苏金怡仪器科技有限公司), e2695 高效液相色谱仪、H-Class 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 7890B 型气相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), TSQ Endura 三重四极杆液相质谱仪 (美国 Thermo 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 微球的制备

称取 800 mg 醋酸阿比特龙和 1200 mg PLGA 溶于 6 mL DCM, 超声至完全溶解, 得到油相; 称取 PVA 6 g 于 400 mL 纯化水中, 80 °C 搅拌溶解, 冷却后补加纯化水至 500 g, 配成 1.2% PVA 溶液, 作为水相。利用蠕动泵将油相以  $36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度缓慢注入到水相中, 同时开启剪切机, 转速为  $1800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 乳化 15 s。所得微球混悬液转移至三口烧瓶中, 在  $-0.095 \text{ MPa}$  真空、45 °C 加热条件下  $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  磁力搅拌 60 min, 后降温至 25 °C 并维持 30 min, 挥发去除 DCM 残留。固化结束后过 90 目和 600 目筛网收集 20 ~ 160  $\mu\text{m}$  的微球, 纯化水洗涤 3 次, 冷冻干燥。冻干后过 60 目筛网收集微球样品。

### 2.2 微球处方的确定

单因素实验考察了投料比 (原料药与 PLGA 的比值)、PVA 浓度、PLGA 质量浓度、油水比、油相温度和水相温度对包封率的影响, 结果见表 1。

综合单因素实验, 选择投料比 3 : 7、4 : 6 和 5 : 5, PVA 浓度 1.2%、2.4% 和 3.6%, PLGA 质量浓度 120、160、200  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为考察对象 (见表 2), 设置 D 列为空白列, 使用  $L_9 (3^4)$  正交表, 设计三因素三水平的正交实验<sup>[11]</sup>, 以微球包封率 ( $H_1$ ) 和突释程度 ( $H_2$ ) 作为评价指标, 采用综合加权评分法对实验结果进行评价:  $H = H_1 - H_2$ ,  $H$  值越高表明实验结果越好。根据表 3 结果可知, 在其他条件不变的情况下, 3 个因素对微球性质的影响程度顺序为  $A > C > B$ , 最佳制备处方是  $A_2B_1C_3$ , 即投料比 4 : 6, PVA 浓度 1.2%, PLGA 质量浓度 200  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 单因素实验结果

Tab 1 Single factor test				
因素	变量	包封率 /%	收率 /%	平均粒径 / $\mu\text{m}$
投料比	2 : 8	96.14	66.44	42.2
	3 : 7	96.31	74.72	43.2
	4 : 6	96.60	67.85	46.4
	5 : 5	96.79	70.80	45.3
	6 : 4	93.98	70.31	51.0
PVA 浓度 /%	1.2	96.60	67.85	46.4
	1.8	98.18	61.71	44.1
	2.4	97.75	53.46	40.2
	3.0	96.85	46.53	35.9
	3.6	97.46	40.04	36.2
PLGA 质量浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	120	98.33	68.86	40.8
	160	97.62	69.89	45.6
	200	96.60	67.85	46.4
	240	94.80	68.67	47.3
	280	93.51	68.18	49.3
油水比	1/20	95.93	72.09	41.2
	1/30	97.55	67.16	42.0
	1/40	96.60	67.85	46.4
	1/50	97.76	74.65	48.7
	1/60	96.73	69.51	48.2
油相温度 / $^{\circ}\text{C}$	5	96.74	75.49	44.3
	10	97.10	73.76	42.0
	15	96.69	74.73	45.4
	20	96.94	73.93	44.0
	25	96.60	67.85	46.4
水相温度 / $^{\circ}\text{C}$	5	96.60	67.85	46.4
	10	97.11	68.46	42.9
	15	96.29	71.49	42.5

表 2 正交实验因素水平

Tab 2 Factor and level of orthogonal test			
水平	因素		
	A. $m_{\text{药物}} : m_{\text{PLGA}}$	B. PVA 浓度 /%	C. PLGA 浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	3 : 7	1.2	120
2	4 : 6	2.4	160
3	5 : 5	3.6	200

表 3 正交实验结果

Tab 3 Orthogonal test							
序号	A	B	C	D	$H_1$	$H_2$	H
1	1	1	1	1	95.29	11.18	84.11
2	1	2	2	2	97.61	10.74	86.87
3	1	3	3	3	95.73	9.97	85.76
4	2	1	3	2	97.26	8.47	88.79
5	2	2	1	3	96.42	11.55	84.87
6	2	3	2	1	98.87	11.90	86.97
7	3	1	2	3	95.21	10.60	84.61
8	3	2	3	1	95.02	10.13	84.89
9	3	3	1	2	96.59	12.92	83.67
$K_1$	256.74	257.51	252.65	255.97			
$K_2$	260.63	256.63	258.45	259.33			
$K_3$	253.17	256.40	259.44	255.24			
R	2.49	0.37	2.26	1.36			

2.3 微球工艺的确定

2.3.1 剪切转速的考察 结合文献, 考察了 1000、1800、2600  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  不同转速, 控制剪切时间 15 s, 收集 20 ~ 160  $\mu\text{m}$  内的微球<sup>[12]</sup>。以粒径、径距、收率和体外释放作为评价指标, 结果显示剪切转速为 1000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 微球收率高但粒径较大不利于注射器推入; 剪切转速为 2600  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 微球收率低, 粒径太小, 体外释放过快。综合考虑, 剪切转速为 1800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 微球粒径合适, 收率较高, 体外释放效果好 (见表 4 及图 1A)。

表 4 剪切转速考察结果

Tab 4 Shearing speed					
剪切转速 / ( $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	径距	收率 /%
1000	40.8	77.9	137	1.231	70.37
1800	28.6	46.4	75	1.001	67.85
2600	23.0	33.2	49.7	0.795	45.36

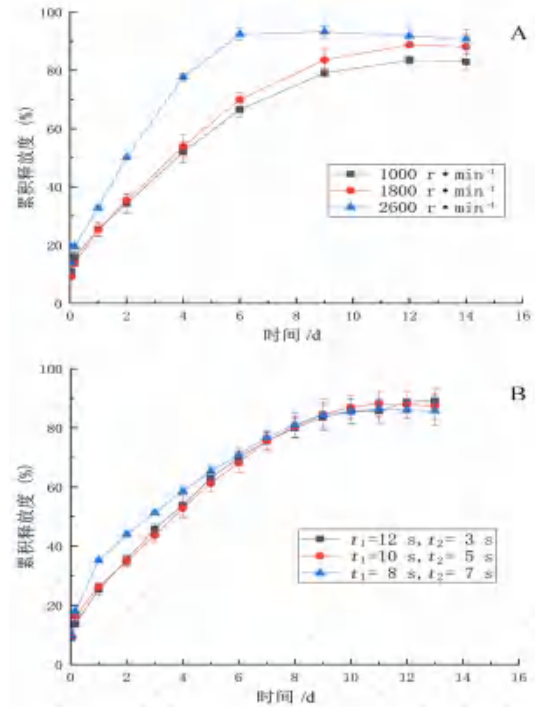


图 1 不同剪切转速 (A) 和剪切时间 (B) 对微球体外药物释放的影响 ( $n = 3$ )

Fig 1 Effect of shearing speed (A) and shearing time (B) on drug release in vitro of microspheres ( $n = 3$ )

2.3.2 剪切时间的考察 由于剪切机不可空转, 油相加入水相前已开启剪切机并调整好剪切转速, 认为剪切时间 ( $t$ ) 由油相加入水相过程中的时间 ( $t_1$ ) 和油相完全加入水相后剪切机继续转动的的时间 ( $t_2$ ) 组成。

固定总剪切时长 15 s, 考察蠕动泵流量对微球的影响。鉴于蠕动泵最大流量 ( $45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 的限制, 考察了如图 1B 所示的三种剪切时间的



组合,发现蠕动泵流量越大、 $t_1$ 越短,微球粒径越小、越均一,收率越高;蠕动泵流量越小、 $t_2$ 越短,微球粒径越大、均一性越差,收率越低(见表5)。结合体外加速释放曲线,最后确定蠕动泵流量为  $36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,即采用油相注入 10 s,后续剪切 5 s 的剪切时间组合。

表 5 剪切时间考察结果

**Tab 5 Shearing time**

蠕动泵流量 / ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$t_1/\text{s}$	$t_2/\text{s}$	$t/\text{s}$	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	径距	收率 / %
30	12	3	15	28.6	46.4	75	1.001	67.85
36	10	5	15	27.9	43.9	68.8	0.933	69.34
45	8	7	15	26.6	40.6	61.2	0.852	72.56

**2.3.3 固化方式的考察** 国际人用药品注册技术协调会(ICH)规定,DCM的残留量不得高于0.06%,而影响DCM残留量的主要因素是固化方式。本研究通过控制温度、真空度和时间(只考虑高温维持时间,降温阶段均采用  $25^\circ\text{C}$  维持 30 min),采取几种不同的固化方式进行探究,温度选择 35、40、 $45^\circ\text{C}$ (固

化方式 A、B、C),时间选择 60、120、180 min(固化方式 B、D、E),真空度以实验条件能实现的最大值  $-0.095 \text{ MPa}$  为起始,选择  $-0.095$ 、 $-0.075$ 、 $-0.055 \text{ MPa}$ (固化方式 B、F、G)进行考察,以微球的外观状态、载药量、包封率、DCM 残留量和体外加速释放作为评价指标进行考察(见表 6 及图 2)。

表 6 固化方式对微球外观状态、包封率和溶剂残留的影响

**Tab 6 Effect of curing methods on appearance, encapsulation efficiency and solvent residues of microspheres**

固化方式	温度 / $^\circ\text{C}$	时间 / min	真空度 / MPa	外观状态	实际载药量 / %	包封率 / %	DCM 残留量 / %
A	35	60	$-0.095$	松散	38.64	96.60	0.321
B	40	60	$-0.095$	松散	38.55	96.36	0.067
C	45	60	$-0.095$	松散	39.27	98.15	0.054
D	40	120	$-0.095$	粘连	39.30	98.23	0.017
E	40	180	$-0.095$	粘连	38.83	97.09	0.009
F	40	60	$-0.075$	松散	38.86	97.17	0.077
G	40	60	$-0.055$	松散	38.91	97.24	0.114

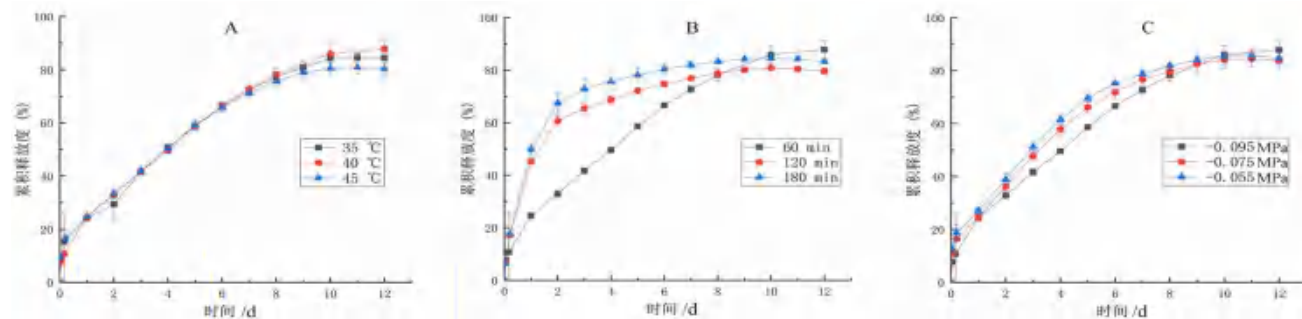


图 2 固化方式对微球体外药物释放的影响 ( $n = 3$ )

Fig 2 Effect of solidification method on drug release in vitro of microspheres ( $n = 3$ )

A. 固化温度 (solidification temperature); B. 固化时间 (solidification time); C. 固化真空度 (solidification vacuum degree)

升高温度(固化方式 A、B、C)、延长固化时间(固化方式 B、D、E)和增加真空度(固化方式 G、F、B)都可降低 DCM 残留量,但延长固化时间会导致前期释放加快,释放周期缩短,释放效果变差,同时微球粘连,不利于实验操作和产品生产;升高温度至  $45^\circ\text{C}$  时,虽然累积释放度略有降低,但仍在 80% 以上;增加真空度使中期释放略有减慢,有利于微球均匀释放。综合各参数,确定以方式 C 作为醋酸阿比特龙微球的固化工艺。

**2.4 微球处方工艺的验证**

研究通过对处方、剪切和固化方式的逐步确定,认为最佳制备处方为投料比 4 : 6, PVA 浓度

$1.2\%$ , PLGA 质量浓度  $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 最优剪切方式为剪切转速  $1800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 油相注入 10 s, 后续剪切 5 s; 最优固化方式为温度  $45^\circ\text{C}$ , 时间 60 min, 真空度  $-0.095 \text{ MPa}$ 。最终在固化方式筛选阶段得到一批性能较好的微球, 平均粒径  $43.7 \mu\text{m}$ , 载药量 39.27%, 包封率 98.15%, DCM 残留量 0.054%。按照最优处方和最佳工艺平行制备 3 批醋酸阿比特龙微球, 测得粒径、收率、载药量、包封率、DCM 残留量和体外加速释放数据见表 7 及图 3。整体来看, 3 批微球收率均在 66% 以上、包封率均在 96% 以上, DCM 残留量均小于 0.06%, 且释放良好, 表明批间重复性好,

处方工艺稳定可行。

表 7 处方工艺验证实验结果

Tab 7 Prescription and process validation tests

批次	$D_{50}/\mu\text{m}$	径距	收率 /%	实际载药量 /%	包封率 /%	DCM 残留量 /%
1	46.70	0.997	68.85	38.76	96.92	0.013
2	46.60	0.991	66.08	38.79	96.95	0.021
3	49.70	1.140	66.25	38.47	96.16	0.021
平均值	47.67	1.040	67.06	38.67	96.68	0.018

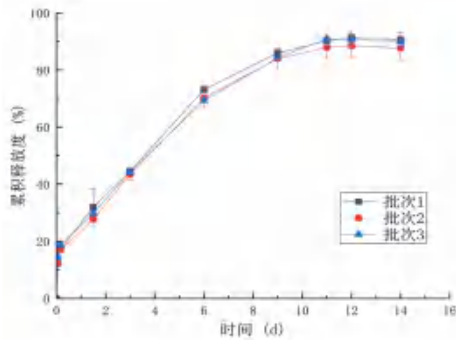


图 3 处方工艺验证试验的体外加速释放曲线 ( $n=3$ )

Fig 3 In vitro accelerated release curve of prescription and process validation test ( $n=3$ )

## 2.5 微球形态及粒径分布

SEM 观察微球形态和表面特征, 将微球样品均匀涂布于附着导电胶的铜板上, 开启离子溅射仪, 设定电流 10 mA, 时间 90 s, 对微球表面喷金, 后置检测器中在 10 kV 电压下观测, 显示微球表面密布小凹槽, 但不是贯穿球体的孔隙, 如截面显示其内部结构紧密 (见图 4), 推测可能是由于 DCM 挥发速度快导致的; 马尔文激光粒度仪测定微球粒径, 取适量微球样品置于少量纯化水中, 搅拌分散, 使其混悬, 设定折射率 1.584、吸收率 0、搅拌速度  $1800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、测定时间红光 10 s、蓝光 10 s, 测得微球粒径的  $D_{50}$  为  $43.7 \mu\text{m}$ , 径距为 0.973。

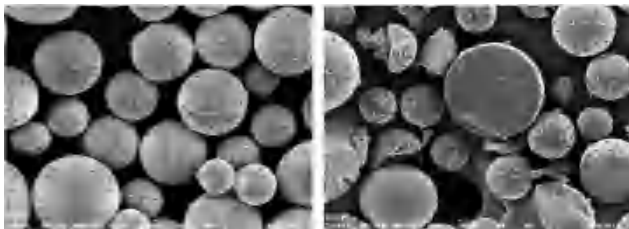


图 4 微球扫描电镜图

Fig 4 Scanning electron microscope of microspheres

## 2.6 微球载药量和包封率

微球的载药量和包封率采用 HPLC 法测定 (参照《中国药典》2015 年版四部通则 0512)。色谱柱: Ultimate XB-C18 ( $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈- $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢铵溶液 (80:20); 检测波长: 254 nm; 柱温:  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 流速:

$1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样体积:  $10 \mu\text{L}$ 。

取醋酸阿比特龙约 5 mg, 精密称定, 加乙腈-水 (80:20) 溶解并稀释成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 作为对照品溶液。取微球样品约 12.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 40 mL 乙腈, 超声破球, 纯化水定容, 摇匀取样, 于  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 6 min, 取上清液作为供试品溶液进样测定, 计算载药量和包封率, 测得微球实际载药量为 39.27%, 包封率为 98.15%。计算公式如下:

理论载药量 (%) = 处方药物质量 / 处方总质量  $\times 100\%$

实际载药量 (%) = 微球中药物质量 / 微球总质量  $\times 100\%$

包封率 (%) = 实际载药量 / 理论载药量  $\times 100\%$

## 2.7 DCM 残留量的测定

微球中 DCM 的残留量采用 GC 法检测 (参照《中国药典》2020 年版四部通则 0861 第二法)。色谱柱: Agilent DB-624 ( $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ ) 毛细管柱; 起始温度  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 维持 5 min, 以  $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升温至  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ , 维持 10 min; 进样口温度:  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测器温度:  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测器: 氢火焰离子化检测器; 载气: 氮气; 流速:  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 分流比: 10:1; 顶空瓶平衡温度:  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , 平衡时间: 30 min。

取微球样品约 40 mg, 精密称定, 置顶空瓶中, 精密加  $N, N$ -二甲基甲酰胺 2 mL, 密封, 作为供试品溶液; 取 DCM 适量, 精密称定, 加  $N, N$ -二甲基甲酰胺溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 DCM  $12 \mu\text{g}$  的溶液, 精密量取 2 mL, 置顶空瓶中, 密封, 作为对照品溶液。取供试品溶液与对照品溶液分别顶空进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算 DCM 含量, 测得微球样品中 DCM 的残留量为 0.054%。

## 2.8 微球体外释放及释药方程拟合

取微球样品约 7.5 mg, 精密称定, 置于 50 mL 离心管中, 加 30 mL 溶出介质 (含 3% 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油、0.1% 叠氮化钠), 混合后固定于  $(45 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$  水浴恒温振荡器, 振摇频率  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 在振摇后的不同时间点离心, 精密量取 1.5 mL 释放溶液再补充 1.5 mL 溶出介质, 所得样品再次离心, 取上清液作为供试品溶液。采用“2.5”项下色谱条件, 测定药物浓度, 根据公式计算微球累积释放度, 绘制体外释放曲线 (见图 5)。微球样品的累积释放度为 80.86%, 在初始 1 h 内的突释程度为 9.36%。

累积释放度 (%) = 累积释放的药物质量 / 微球中药物质量  $\times 100\%$

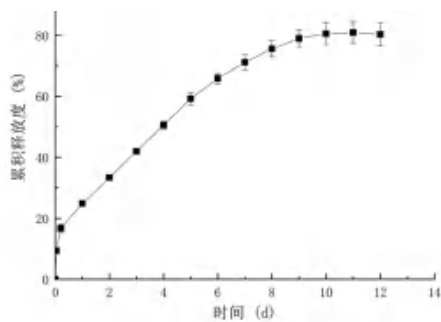


图 5 醋酸阿比特龙微球体外加速释药曲线 ( $n = 3$ )  
Fig 5 In vitro accelerated release curve of abiraterone acetate microspheres ( $n = 3$ )

表 8 醋酸阿比特龙微球释药模型拟合结果

Tab 8 Fitting results of drug release model of abiraterone acetate microspheres

释药模型	模型方程	回归方程	$r^2$
零级方程	$Q = kt$	$Q = 6.0508t + 21.108$	0.9194
一级方程	$\ln(100 - Q) = -kt$	$\ln(100 - Q) = -0.1416t + 4.4461$	0.9742
Higuchi 方程	$Q = kt^{1/2}$	$Q = 24.079t^{1/2} + 3.4847$	0.9824
Ritger-Peppas 指数	$Q = kt^n$	$Q = 30.089t^{0.4042}$	0.9792

## 2.9 体内释药行为考察

采用 8 只雄性 SD 大鼠 [动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006], 自由进食饮水, 饲养温度 22 °C, 相对湿度 60%, 适应环境 1 周后开始实验, 给药前禁食 12 h, 实验开始 4 h 后方可进食。

采用 1.8% 羧甲基纤维素钠的生理盐水混悬醋酸阿比特龙原料药和微球样品, 两种混悬液均含主药 28 mg · mL<sup>-1</sup>, 大鼠随机分为两组 ( $n = 4$ ), 一组注射原料药混悬液 0.2 mL, 另一组注射微球样品混悬液 0.2 mL, 均为右后腿肌内注射。分别于给药前 0 h 以及给药后 1 h、3 h、6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d、16 d、20 d、24 d 于大鼠锁骨下静脉取血 0.2 mL, 置 0.5 mL 肝素化离心管内, 4000 g 离心 10 min 后取上层血浆, -80 °C 冻存, 待测。

取血浆样品 50 μL 加入 5 μL 盐酸多奈哌齐内标工作液 (迪嘉药业, 批号: DE211091A, 纯度 101.5%, 70% 甲醇溶液配制)、200 μL 乙腈沉淀液, 涡旋, 9100 g 离心 10 min, 取上清液 120 μL, 进样 5 μL。

采用自建 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中阿比特龙的浓度。色谱条件: 色谱柱为 Hypersil GOLD (50 mm × 2.1 mm, 3.0 μm); 流动相 A 为 5 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸铵 -0.1% 甲酸水, B 为甲醇; 流速 0.25 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 5 μL。质谱条件: 电离源为电喷雾离子源 (ESI); 检测方式为多反应监测 (MRM); 扫描方式为正离子检测; 鞘气 30 Arb; 辅助气 5 Arb; 喷雾电压 4000 V; 测定离子对为  $m/z$  350.183 → 156.111, 内标为  $m/z$

动力学模型分析药物释放机制, 采用零级、一级、Higuchi 方程和 Ritger-Peppas 指数模型分别对微球体外加速释药曲线进行拟合<sup>[13]</sup>, 结果见表 8。本研究中, Higuchi 方程  $r^2$  值为 0.9824, 拟合度较好, 表明微球中醋酸阿比特龙的释放为扩散机制, Ritger-Peppas 指数模型中  $n = 0.4042 < 0.45$ , 也验证了这一点。因此, 经微球孔隙进入微球内部的释放介质先将醋酸阿比特龙溶解, 醋酸阿比特龙再扩散到介质中实现释放, 释放主要受醋酸阿比特龙在微球中分布的影响<sup>[14]</sup>。

380 → 91.054。

根据测定结果, 绘制各时间点平均血药浓度 - 时间曲线 (见图 6), DAS 2.0 软件非房室模型计算药动学参数 (见表 9)。醋酸阿比特龙原料药在血浆中达峰时间  $t_{max}$  为 3.125 d, 达峰浓度  $C_{max}$  为 8.718 μg · L<sup>-1</sup>, 释药时间短, 8 d 后平均血药浓度在 1 ng · mL<sup>-1</sup> 以下, 10 d 后几乎检测不到药物; 醋酸阿比特龙微球在血浆中达峰时间  $t_{max}$  为 2.156 d, 达峰浓度  $C_{max}$  为 8.018 μg · L<sup>-1</sup>, 前期有突释, 给药 16 d 内平均血药浓度在 1.9 ng · mL<sup>-1</sup> 以上, 缓释效果良好。

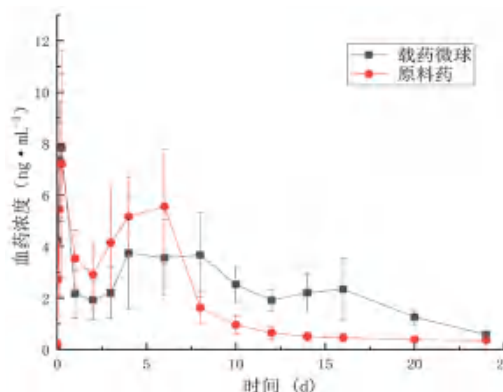


图 6 平均血药浓度 - 时间曲线 ( $n = 4$ )  
Fig 6 Plasma drug concentration-time curve ( $n = 4$ )

表 9 醋酸阿比特龙原料药及微球在大鼠体内的药代动力学参数

Tab 9 Pharmacokinetic parameters of abiraterone microsphere and raw material in rats

剂型	$AUC_{0-∞} / (\mu\text{g} \cdot \text{d} \cdot \text{L}^{-1})$	$t_{max} / \text{d}$	$C_{max} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
微球	53.532	2.156	8.018
原料药	38.751	3.125	8.718



### 3 讨论

采用乳化-溶剂挥发法制备醋酸阿比特龙微球, 为保证包封率、收率和粒径要求, 实现较低的 DCM 残留和良好的体外释放效果, 本研究在单因素实验的基础上进行正交实验确定了微球最优处方, 并分别对剪切方式和固化方式进行了考察, 确定了微球最佳制备工艺。

释放动力学模型拟合确定醋酸阿比特龙微球主要以扩散机制释药, 药物分布是影响药物释放的主要因素, 而药物分布受固化过程中 DCM 挥发速度影响。本研究中, 真空度增加使 DCM 挥发速度加快, 微球内药物来不及随 DCM 的挥发到达微球表面而更多地留存在微球内部, 体外释放减慢; 而随着固化时间的延长, 药物有足够的时间继续向外移动, 慢慢迁移到微球表面, 导致释放速度加快<sup>[15]</sup>, 也验证醋酸阿比特龙微球释放动力学符合扩散机制。

大鼠体内实验数据显示, 与一次性注射相同剂量的原料药相比, 醋酸阿比特龙微球具有明显的缓释效果, 可以解决口服制剂频繁给药的问题, 单次注射可维持 16 d 体内释药, 考虑到治疗过程中需每两周测定血清转氨酶及胆红素水平<sup>[16]</sup>, 若设计一种每两周注射一次的醋酸阿比特龙微球, 可保证患者的依从性; 肌肉注射给药使药物不经过胃肠道吸收而被利用, 可以消除食物效应引起的血药浓度不稳定、个体差异大的问题。

国内外研究中未见有阿比特龙做成微球产品的先例, 有关文献报道的醋酸阿比特龙口服脂质制剂<sup>[17]</sup>、口服无定形固体分散体制剂<sup>[18]</sup>和口服纳米无定形制剂<sup>[19]</sup>等, 虽在一定程度上提高了阿比特龙的生物利用度, 但仍需要长期、频繁给药, 同时由于食物的影响是高度不可控的, 口服过程中药物暴露量增加的风险仍然是存在的。本研究制备的醋酸阿比特龙微球具有良好的理化性质和体内外缓释效果, 制备工艺稳定可行, 为开发一种缓释两周的醋酸阿比特龙微球给药系统提供了可行策略, 有望开发出一种可用于临床并投入生产的醋酸阿比特龙缓释微球, 具有较高的应用价值。但如何降低醋酸阿比特龙微球体内初始突释效应, 更平稳地释药, 仍值得进一步探索。

### 参考文献

[1] Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, et al. The epidemiology of prostate cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8 (12): a030361.  
[2] Talkar SS, Patravale VB. Gene therapy for prostate cancer: a review [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21 (3): 385-396.

[3] Bouhajib M, Tayab Z. Evaluation of the pharmacokinetics of abiraterone acetate and abiraterone following single-dose administration of abiraterone acetate to healthy subjects [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39 (3): 309-317.  
[4] Kim TJ, Lee YH, Koo KC. Current status and future perspectives of androgen receptor inhibition therapy for prostate cancer: a comprehensive review [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (4): 492.  
[5] Christopher J. Abiraterone acetate [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10 (8): 573-574.  
[6] Schultz HB, Meola TR, Thomas N, et al. Oral formulation strategies to improve the bioavailability and mitigate the food effect of abiraterone acetate [J]. *Int J Pharm*, 2020, 577: 119069.  
[7] D' Souza S, Faraj J, DeLuca P. Microsphere delivery of risperidone as an alternative to combination therapy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85 (3): 631-639.  
[8] Wang Q, Shen M, Li W, et al. Controlled-release of fluzinam from biodegradable PLGA-based microspheres [J]. *J Environ Sci Health B*, 2019, 54 (10): 810-816.  
[9] 邱晓明, 甄平, 李松凯. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药微球制备工艺研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22 (10): 1599-1604.  
[10] 郝贵周, 杜丽平, 周苗苗, 等. 不同盐型对加兰他敏缓释微球性能影响的初步考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51 (8): 1017-1023.  
[11] 秦国正, 余正芝, 张明芮, 等. 正交试验数据快速分析 Excel 模块的建立和应用 [J]. *广州化工*, 2014, 42 (11): 12-14, 41.  
[12] Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage [J]. *Biomaterials*, 1988, 9 (4): 356-362.  
[13] 王福坚, 陈红英, 陈新阳, 等. 酒石酸美托洛尔骨架片的制备和释药机理研究 [J]. *广东化工*, 2021, 48 (22): 1-2.  
[14] 叶向阳, 孙湘, 贾会文, 等. 利福平/聚乳酸-聚羟基乙酸缓释微球的制备及特性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15 (51): 9608-9612.  
[15] 李勋. 局麻药罗哌卡因缓释微球的制备和应用研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.  
[16] 任桐, 林锦彬, 刁勇. 阿比特龙在治疗前列腺癌方面的新进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36 (7): 205-208, 212.  
[17] Schultz HB, Wignall AD, Thomas N, et al. Enhancement of abiraterone acetate oral bioavailability by supersaturated-silica lipid hybrids [J]. *Int J Pharm*, 2020, 582: 119264.  
[18] Boleslavská T, Světlík S, Žvátora P, et al. Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 151: 81-90.  
[19] Solymosi T, Ötvös Z, Angi R, et al. Development of an abiraterone acetate formulation with improved oral bioavailability guided by absorption modeling based on in vitro dissolution and permeability measurements [J]. *Int J Pharm*, 2017, 532 (1): 427-434.

(收稿日期: 2022-10-31; 修回日期: 2023-01-10)

## 二氢杨梅素纳米粒的制备及其体外抗肿瘤研究

潘真真<sup>1,2</sup>, 吴春梅<sup>3</sup>, 林亚<sup>3</sup>, 李芳婵<sup>1,2</sup>, 刘雯<sup>2,3</sup>, 罗小莉<sup>1,2</sup>, 潘翠柳<sup>2,3</sup>, 吴秀彩<sup>2,3</sup>, 李耀华<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西中医药大学教学实验实训中心, 南宁 530200; 2. 广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室, 南宁 530200; 3. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

**摘要:** **目的** 制备并表征二氢杨梅素聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸纳米粒 (DMY NPs)。 **方法** 采用乳化溶剂挥发法制备 DMY NPs, 透射电镜观察纳米粒的外观形态; 纳米粒度分析仪分析其粒径大小及分布; 高效液相色谱法测定其包封率及载药量; 考察其稳定性和体外释药特性; MTT 法和 Annexin V/PI 双染法分别考察纳米粒对人膀胱癌 EJ 细胞的抑制及促凋亡作用。 **结果** 制备的 DMY NPs 平均粒径为 214 nm, TEM 结果显示纳米粒呈圆整球形或类球形, 且分布均匀, 包封率为 83.36%, 载药量为 4.04%。 DMY NPs 具有良好的稳定性和缓释能力。 体外细胞实验结果显示, DMY NPs 能有效地抑制人膀胱癌 EJ 细胞的增殖并诱导细胞凋亡。 **结论** 构建的二氢杨梅素纳米粒具有良好的缓释特性, 能有效增强药物的体外抗肿瘤活性。

**关键词:** 二氢杨梅素; 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物; 纳米粒; 乳化溶剂挥发法

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0589-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.006

### Preparation and in vitro anti-tumor evaluation of dihydromyricetin-loaded nanoparticles

PAN Zhen-zhen<sup>1,2</sup>, WU Chun-mei<sup>3</sup>, LIN Ya<sup>3</sup>, LI Fang-chan<sup>1,2</sup>, LIU Wen<sup>2,3</sup>, LUO Xiao-li<sup>1,2</sup>, PAN Cui-liu<sup>2,3</sup>, WU Xiu-cai<sup>2,3</sup>, LI Yao-hua<sup>1,2\*</sup> (1. *Experimental Teaching Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200*; 2. *Key Laboratory of TCM Extraction and Purification and Quality Analysis, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200*; 3. *College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200*)

**Abstract: Objective** To prepare and characterize the dihydromyricetin-loaded methoxy polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid) nanoparticles (DMY NPs). **Methods** DMY NPs were prepared by emulsification-solvent evaporation method. The morphology imaging was determined by transmission electron microscopy. The particle size was measured by a nanoparticle analyzer. The drug-loading rate and encapsulation efficiency were determined by HPLC. The stability and drug release characteristics in vitro were determined. The cytotoxicity was determined by MTT and cell apoptosis by flow cytometry. **Results** The optimal DMY NPs were around 214 nm in size. The TEM showed uniform spherical morphology. The encapsulation efficiency and drug loading of DMY NPs were 83.36% and 4.04%, respectively. In addition, the nanoparticles exhibited good stability and sustained release feature. MTT and flow cytometry indicated that DMY NPs enhanced the cytotoxicity and increased the apoptotic level in the EJ cells effectively. **Conclusion** DMY NPs display good drug sustained-release capacity in vitro, and significantly enhance the antitumor activity.

**Key words:** dihydromyricetin; mPEG-PLGA; nanoparticle; emulsification-solvent evaporation method

二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DMY) 是蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W.T.Wang 中的主要活性成分。现代研究发现, DMY 具有广泛的药理作用, 包括抗氧

**基金项目:** 广西中医药大学校级课题 (No.2019QN006); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (No.2019KY0333); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (No.2020KY07037)。

**作者简介:** 潘真真, 女, 硕士, 实验师, 主要从事中药民族药的质量控制、新剂型研发及抗肿瘤作用研究, email: zhenzhenpan1991@163.com

\***通信作者:** 李耀华, 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事中药民族药的质量控制及医院制剂开发研究, email: yaohuali@163.com

化<sup>[1]</sup>、护肝<sup>[2-3]</sup>、抗菌消炎<sup>[4]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6-10]</sup>等。然而,DMY 稳定性差、溶解度低和吸收代谢快等缺陷使其生物利用度低,成药性较差,限制了其临床应用。因此,改善 DMY 的溶解性和生物利用度,是 DMY 开发的重要方向之一。

纳米生物技术是国际生物技术领域和纳米技术领域的前沿和热点,近年来在利用纳米技术提高肿瘤靶向给药效率、改善成药性及提高药物疗效等方面有着突破性进展。聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)是由亲水 PEG 端和亲脂 PLGA 端形成的双亲性嵌段共聚物,用其制备的纳米粒具有良好的缓释效果,能有效提高药物的生物利用度<sup>[11-12]</sup>。因此,本研究为改善 DMY 的溶解性和稳定性,以双亲性嵌段共聚物聚 mPEG-PLGA 为载体,采用乳化溶剂挥发法构建二氢杨梅素-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸纳米粒(DMY NPs),并对所制备的纳米粒进行表征,研究纳米粒的药物体外释放行为及体外抗肿瘤活性,为 DMY 新剂型的开发应用研究提供参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);EM10 透射电子显微镜(德国蔡司公司);纳米粒度分析仪(美国麦奇克有限公司);旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);FreeZone 2.5 冷冻干燥仪(美国 Labconco 公司);CT 15RE 冷冻离心机(日本日立公司);Multiskan Sky 型酶标仪(赛默飞世尔科技公司);LSR Fortessa 流式细胞仪(BD 公司)。

### 1.2 材料

二氢杨梅素原料药(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y26D10K106736);二氢杨梅素对照品(纯度:99.69%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-21031710);mPEG-PLGA(山东岱罡生物科技有限公司,相对分子质量为 10 000,其中 mPEG 嵌段相对分子质量为 5000);聚乙烯醇(PVA,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲基偶氮唑盐(MTT,北京索莱宝科技有限公司);人膀胱癌细胞 EJ(中国科学院上海细胞生物研究所);胎牛血清(美国 Gemini);1640 培养基(赛默飞世尔科技有限公司);磷酸缓冲盐(江苏凯基生物技术股份有限公司);Annexin V/PI 凋亡试剂盒(BD 生物科学);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 DMY NPs 的制备

根据前期单因素考察结果,确定 DMY NPs 的

制备方法如下:称取处方量的 DMY 和 mPEG-PLGA(固定药物与载体质量比为 1:10),溶于丙酮溶剂中作为有机相,DMY 质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,mPEG-PLGA 质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;另取 0.5% PVA 水溶液作为水相;在磁力搅拌下( $700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),将有机相逐滴滴加到水相中(有机相与水相比比例为 1:6),继续磁力搅拌 10 min 后旋转蒸发除去丙酮,剩余溶液离心 10 min ( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 除去大颗粒沉淀,取上清液,将上清液于低温下高速离心 30 min ( $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $25\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),收集沉淀,沉淀加超纯水洗涤 3 次除去游离的 DMY,即得 DMY NPs 混悬液。同法制备不含 DMY 的空白纳米粒。

### 2.2 DMY 的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸 (30:70); 检测波长: 292 nm; 柱温: 40 °C; 流速:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量: 10 μL。

**2.2.2 供试品制备** 取一定体积的 DMY NPs 混悬液,加 5 倍量甲醇破乳后,离心 10 min ( $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),取上清液,即得供试品溶液。

**2.2.3 专属性考察** 取“2.2.4”项下 DMY 对照品溶液 ( $81.92 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、空白纳米粒、DMY NPs 混悬液和 PBS 缓冲液进行 HPLC 分析,结果见图 1。结果表明,DMY 色谱峰专一性良好,载体 mPEG-PLGA 和 PBS 缓冲液对其测定无干扰。

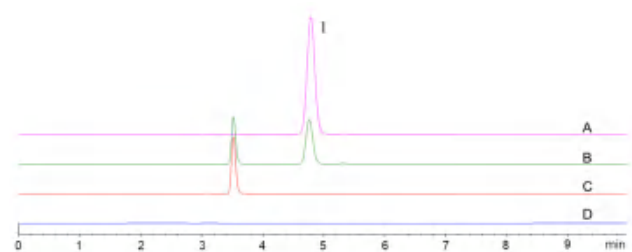


图 1 DMY 对照品溶液(A)、DMY NPs(B)、空白纳米粒(C)和 PBS 缓冲液(D)的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of dihydromyricetin (A), DMY NPs (B), blank NPs (C) and PBS buffer (D)

1. 二氢杨梅素(dihydromyricetin)

**2.2.4 线性和范围** 精密称取 DMY 对照品适量,甲醇定容得 DMY 对照品储备液,分别用甲醇稀释配制系列质量浓度为 10.24、20.48、40.96、81.92、102.40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,  $Y = 13.42X - 3.75$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 5$ ),结果表明 DMY 在  $10.24 \sim 102.40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与峰面积线性关系良好。

**2.2.5 精密度** 取二氢杨梅素对照品溶液,于 1 d 内测定 6 次,考察其日内精密度,经计算,日内精密度 RSD 为 1.0%,表明仪器精密度良好。



**2.2.6 重复性** 取不同批次制备的 DMY NPs 混悬液 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算其 RSD 为 2.7% ( $n = 6$ )。

**2.2.7 加样回收试验** 精密称取处方量 80%、100%、120% 的 DMY 对照品, 分别加入处方比例的 mPEG-PLGA 和 PVA, 甲醇定容, 进样测定, 计算回收率分别为 99.91%、98.94%、99.27%, RSD 分别为 1.4%、0.99%、0.36%, 满足方法学要求。

**2.3 DMY NPs 的表征**

通过纳米粒粒度仪分别测定 DMY NPs 和空白纳米粒的粒径、多分散系数 (PDI)。采用透射电镜 (TEM) 观察 DMY NPs 的形态特征, 取少量 DMY NPs 混悬液滴至铜网上, 静置 10 min 后用滤纸吸干, 再滴加 2% 的磷钨酸溶液负染色 5 min, 自然挥干, 测定。粒径测定结果表明制成的空白纳米粒粒径为 206 nm (PDI = 0.07), 载药纳米粒粒径为 214 nm (PDI = 0.08), 且重复性良好。TEM 结果显示, DMY NPs 呈圆整球形或类球形, 结果见图 2。从 PDI 值及 TEM 结果可以看出 DMY NPs 分散性好且无团聚现象。

**2.4 载药量及包封率的测定**

按“2.1”项下方法平行制备 3 批混悬液, 测定其粒径大小及 PDI, 并进行冷冻干燥。冻干后, 取一定量冷冻干燥的载药纳米粒用去离子水

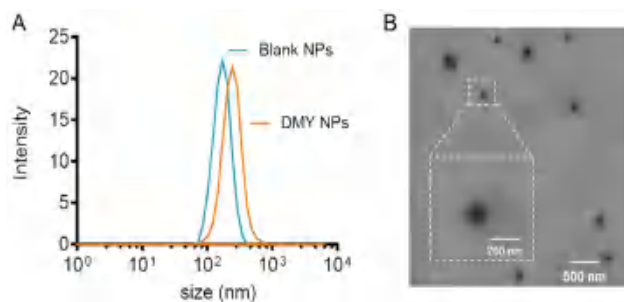


图 2 DMY NPs 粒径分布 (A) 及 TEM 结果 (B)

Fig 2 Distribution of particle size (A) and TEM (B) of DMY NPs (B)

复溶, 测定其粒径大小及 PDI, 与冷冻干燥前进行比较。采用高速离心法测定其载药量及包封率, 精密称取一定量冷冻干燥的载药纳米粒 (载药纳米粒总重计为  $W_{NP}$ ), 加入一定量甲醇超声 10 min, 超高速离心 10 min ( $30\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ ), 取上清液按“2.2.1”项下色谱条件测定 DMY 含量, 计为  $W$ , 投药量记为  $W_{total}$ 。载药量及包封率计算公式如下, 结果见表 1。根据结果可知, 冷冻干燥前后 DMY NPs 的粒径差异不大, 表明冷冻干燥对纳米粒的粒径影响较小, DMY NPs 的载药量为 4.04%, 包封率为 83.36%。

$$\text{载药量} (\%) = W/W_{NP} \times 100\%$$

$$\text{包封率} (\%) = W/W_{total} \times 100\%$$

表 1 DMY NPs 的粒径、载药量及包封率测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Particle size, encapsulation efficiency and drug loading of DMY NPs ( $n = 3$ )

序号	冻干前粒径 /nm	冻干前 PDI	冻干后粒径 /nm	冻干后 PDI	包封率 /%	载药量 /%
1	214.1	0.0865	213.9	0.0362	82.56	3.96
2	213.1	0.0935	214.5	0.0768	83.12	4.01
3	214.3	0.0638	215.3	0.0439	84.41	4.16
$\bar{x} \pm s$	$213.8 \pm 0.71$	$0.0813 \pm 0.02$	$214.6 \pm 0.70$	$0.0523 \pm 0.02$	$83.36 \pm 0.95$	$4.04 \pm 0.10$

**2.5 DMY NPs 稳定性的考察**

制备一批 DMY NPs, 按体积比 1 : 1 分别分散在去离子水和含 10% 胎牛血清的水溶液中, 于 0、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h 分别测定其粒径, 考察纳米粒的稳定性, 见图 3。结果显示在水溶液中纳米粒的粒径稳定在 ( $214.92 \pm 1.78$ ) nm, 72 h 内粒径 RSD 为 0.82%; 在含 10% 胎牛血清的水溶液中, DMY NPs 粒径稳定在 ( $215.5 \pm 1.15$ ) nm, 72 h 内粒径 RSD 为 0.53%, 表明 DMY NPs 在水溶液及含 10% 胎牛血清的水溶液中均具有较好的稳定性, 纳米粒的形态保持完好。

**2.6 DMY NPs 的体外释药行为**

采用透析法研究 DMY NPs 体外释药行为, 为了模拟正常体液环境, 结合参考文献<sup>[13-14]</sup>, 选择 PBS 作为释放介质。分别取一定量 DMY NPs 的混悬液 (含 2 mg DMY, 2 mL) 和等量的游离 DMY

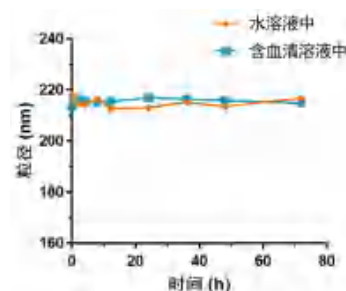


图 3 DMY NPs 的稳定性 ( $n = 3$ )

Fig 3 Stability of DMY NPs ( $n = 3$ )

(甲醇溶解, 含 2 mg DMY, 2 mL) 置于预处理的透析袋中 (相对分子质量 3500), 两端密封, 浸于装有 30 mL PBS 的装置中, 将装置放在摇床里 ( $37\ ^\circ\text{C}$ ,  $120\ r \cdot \min^{-1}$ )。在预设时间点 (1、2、4、8、10、12、24、36、48、72 h) 取样 1 mL, 同时补加 1 mL PBS。样品经  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜过滤, 取续滤液进样测定, 每组平行 3 份, 计算累积释放率。

以时间为横坐标, 累积释放率为纵坐标, 绘制体外释药曲线, 结果见图 4A。游离 DMY 在释放介质中因符合漏槽条件释放速度较快, 在 8 h 内几乎完全释放, 12 h 累积释放率为 93.22%, 而 DMY NPs 在 8 h 累积释放率仅为 36.62%, 在 72 h 累积释放率达到 82.68%, 具有明显的缓释特征。

### 2.7 肿瘤细胞的增殖抑制实验

取对数生长期的 EJ 细胞, 消化并收集, 以  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔板, 置于细胞培养箱中于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  孵育 24 h。实验设置空白对照组、游离 DMY 组、空白纳米粒组和 DMY NPs 组, DMY 组和 DMY NPs 组先配制成相应浓度的母液, 再用含血清培养液进行稀释, 最终质量浓度分别为 0、20、30、40、50、60、70、80、100、125  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 空白纳米粒组采用与 DMY NPs 组相同比例进行稀释, 每个浓度设 6 个复孔。继续培养 48 h 后, 加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 ( $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 震荡 1 min 后酶标仪 490 nm 下测定吸光值 (OD), 计算细胞存活率:

细胞存活率 (%) = (实验组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值)  $\times 100\%$

结果见图 4B, 空白纳米粒组在相应的 mPEG-PLGA 浓度下对 EJ 细胞的生长无明显毒性及抑制作用, 由此表明, 载体 mPEG-PLGA 具有良好的生物相容性。在 DMY 组和 DMY NPs 组中, 不同浓度的游离 DMY 及 DMY NPs 能明显抑制 EJ 细胞生长, 并且随着 DMY 浓度升高抑制作用更为明显, 呈明显的量效关系。经计算 DMY 和 DMY NPs 对 EJ 细胞的  $IC_{50}$  分别为  $64.97 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $51.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 表明 DMY NPs 的体外抗肿瘤活性强于 DMY ( $P < 0.05$ )。

### 2.8 细胞凋亡

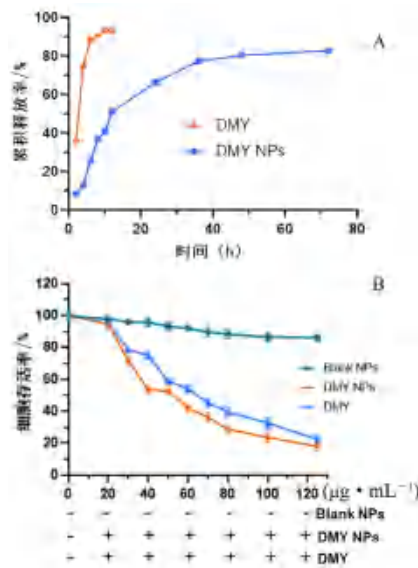


图 4 体外释药曲线 (A) 及细胞存活率结果 (B)  
Fig 4 Release profile in vitro (A) and cell survival rate (B)

取对数生长期的 EJ 细胞以  $2 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中, 继续培养 24 h 后进行实验。实验设置游离 DMY 组和 DMY NPs 组, DMY 质量浓度为  $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 另设空白对照组, 每组 3 个复孔。加药继续培养 24 h 后, 离心收集细胞, 在冰上分别加入 Annexin V/PI 进行荧光染色处理, 30 min 内进行流式细胞仪检测。

正常的活细胞 (Q4 区) 不能被 Annexin V/PI 染色, 凋亡晚期细胞 (Q2 区) 可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色, 而凋亡早期细胞 (Q3 区) 仅能被 Annexin V-FITC 染色 (见图 5)。当 DMY 质量浓度为  $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 游离 DMY 组凋亡为 32.24%, DMY NPs 组为 43.36%, 表明 DMY NPs 能显著引起细胞凋亡, 并且相较于游离 DMY 组, DMY NPs 组的晚期凋亡率更高。

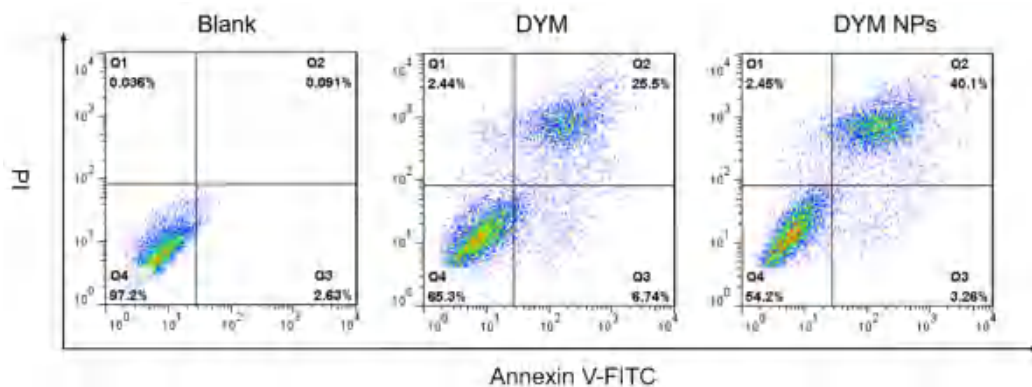


图 5 DMY NPs 对细胞凋亡的影响  
Fig 5 Effect of DMY NPs on cell apoptosis

### 2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 统计软件分析, 计量数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用

单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 讨论

DMY 药理活性广泛, 安全性好, 极具开发价

值,但由于本身稳定性差、溶解度低和吸收代谢快等缺陷使其生物利用度低,限制了其临床应用。近年来采用各种制剂新技术与新剂型提高 DMY 稳定性、溶解性和生物利用度的研究成为了热点<sup>[15-17]</sup>。纳米制剂的主要优势在于其能够包裹溶解性差、稳定性差的药物并将药物传输至体内不同部位,降低药物的毒性,改善药代动力学参数及生物相容性,同时提高药物在靶器官的局部浓度<sup>[18-19]</sup>。

本研究以双亲性嵌段共聚物 mPEG-PLGA 为载体材料,乳化溶剂挥发法制备 DMY NPs。制得的 DMY NPs 平均粒径为 214 nm,呈圆整球形或类球形,分散性良好,无团聚现象。体外释放和稳定性实验结果表明,DMY NPs 具有缓释能力,且在水溶液及含血清溶液中稳定性良好。体外抗肿瘤实验结果表明,空白纳米粒组对 EJ 细胞的生长无明显毒性及抑制作用,DMY 及 DMY NPs 对人膀胱癌 EJ 细胞生长有明显的抑制作用,且呈量效关系,相同药物剂量下 DMY NPs 比游离 DMY 具有更显著的细胞增殖抑制作用。通过 Annexin V/PI 双染法考察 DMY NPs 对肿瘤细胞的促凋亡作用,结果显示在相同 DMY 浓度下,DMY NPs 组的细胞凋亡率高于 DMY 组,表明 DMY 纳米粒能显著提高其诱导凋亡能力。相关研究表明 DMY 通过诱导肿瘤细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用,且表现出剂量依赖性<sup>[20-22]</sup>。在后续的工作中,将进一步探究 DMY 纳米粒的抗肿瘤活性、机制及其肿瘤靶向性,为 DMY 的开发研究奠定基础。

## 参考文献

- [1] Zhang YS, Ning ZX, Yang SZ, et al. Antioxidation properties and mechanism of action of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 38 (4): 241-244.
- [2] Murakami T, Miyakoshi M, Araho D, et al. Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of ampelopsis grossedentata, and ampelopsin [J]. Biofactors, 2004, 21 (1-4): 175-178.
- [3] Zhou X, Yu L, Zhou M, et al. Dihydromyricetin ameliorates liver fibrosis via inhibition of hepatic stellate cells by inducing autophagy and natural killer cell-mediated killing effect [J]. Nutr Metab, 2021, 18 (1): 64.
- [4] 屠梦珏, 魏进歌, 陈鑫, 等. 二氢杨梅素对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34 (12): 1707-1712.
- [5] 萧力争, 银霞, 刘素纯, 等. 二氢杨梅素抗菌活性研究 [J]. 食品科技, 2008 (4): 140-143.
- [6] Yang DF, Yang ZS, Chen L, et al. Dihydromyricetin increases endothelial nitric oxide production and inhibits atherosclerosis through microRNA-21 in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Mol Med, 2020, 24 (10): 5911-5925.
- [7] Ye L, Yin GD, Jiang MH, et al. Dihydromyricetin exhibits antitumor activity in nasopharyngeal cancer cell through antagonizing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. Integr Cancer Ther, 2021, 20: 1534.
- [8] Tan MD, Jiang B, Wang HH, et al. Dihydromyricetin induced lncRNA MALAT1-TFEB-dependent autophagic cell death in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. J Cancer, 2019, 10 (18): 4245-4255.
- [9] 周防震, 张新芳. 二氢杨梅素对 4T1 小鼠乳腺癌肺转移的抑制作用 [J]. 中华临床医师杂志, 2014, 8 (9): 1674-1678.
- [10] 常徽, 陈军丽, 顾业芸, 等. 二氢杨梅素通过抑制 mTOR 信号通路抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭 [J]. 第三军医大学学报, 2018, 40 (18): 1624-1629.
- [11] 吴钰珺, 刘文雅, 王曙东. 壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的制备及体外释放特性 [J]. 东南国防医药, 2019, 21 (3): 267-272.
- [12] Akram H, Fariba E, Hossein H, et al. Use of mPEG-PLGA nanoparticles to improve bioactivity and hemocompatibility of streptokinase: in-vitro and in-vivo studies [J]. Mat Sci Eng C-Mater, 2021, 118: 111427.
- [13] Huang XG, Jiang XL, Yang QZ, et al. Triplestimuli (pH/thermo/reduction) sensitive copolymers for intracellular drug delivery [J]. J Mater Chem B, 2013, 1 (13): 1860-1868.
- [14] 王松, 汪茂胜, 周定荣, 等. 丹参酮 II-A 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药, 2020, 51 (8): 2141-2150.
- [15] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药理学研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (17): 4060-4067.
- [16] 吴晓琼, 崔晓钰, 王强, 等. 二氢杨梅素纳米乳液的制备及性能评价 [J]. 食品工业, 2020, 41 (4): 44-47.
- [17] Luo F, Zeng DD, Chen RX, et al. PEGylated dihydromyricetin-loaded nanoliposomes coated with tea saponin inhibit bacterial oxidative respiration and energy metabolism [J]. Food Funct, 2021, 12 (19): 9007-9017.
- [18] 张喜武, 徐坐帝, 李永吉, 等. 丁香苦苷固体脂质纳米粒的药物动力学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (12): 5646-5649.
- [19] Rao W, Wang H, Han JF, et al. Chitosan-decorated doxorubicin-encapsulated nanoparticle targets and eliminates tumor reinitiating cancer stem-like cells [J]. ACS Nano, 2015, 9 (6): 5725-4740.
- [20] Lu CJ, He YF, Yuan WZ, et al. Dihydromyricetin-mediated inhibition of the Notch1 pathway induces apoptosis in QGY7701 and HepG2 hepatoma cells [J]. World J Gastroentero, 2017, 23 (34): 6242-6251.
- [21] Zuo YZ, Xu Q, Lu YJ, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis in a human choriocarcinoma cell line [J]. Oncol Lett, 2018, 16 (4): 4229-4234.
- [22] Li CH, Shi JL, Huang B, et al. Dihydromyricetin promotes apoptosis, suppresses proliferation and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated nuclear factor kappa-B activation in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 41 (3): 367-375.

(收稿日期: 2022-07-26; 修回日期: 2022-09-06)



# 毛蕊花糖苷防晒霜对紫外线辐射诱导大鼠皮肤损伤的保护作用研究

李晓琳<sup>1, 2</sup>, 王芃<sup>1, 2</sup>, 李茂星<sup>2, 4\*</sup>, 姜疆<sup>3\*</sup> (1. 联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 兰州 730050; 2. 甘肃省高原药  
学行业技术中心, 兰州 730050; 3. 联勤保障部队第九四〇医院烧伤整形科, 兰州 730050; 4. 军事科学院军事医学研究院辐射  
医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** **目的** 建立 UVB 辐射诱导大鼠皮肤损伤模型, 探讨毛蕊花糖苷防晒霜抗紫外线辐射的作用及机制。**方法** 选取背部皮肤恢复成光滑、无损伤的大鼠建立紫外损伤模型。照射条件为紫外线 (320 nm) 照射, 照射强度为  $1.8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 每日照射 3 min, 连续 3 d。49 只大鼠随机分为空白组 (无紫外线照射)、模型组 (紫外线照射)、基质组 (紫外线照射+空白基质), 高剂量组 (紫外线照射+6% 毛蕊花糖苷防晒霜)、中剂量组 (紫外线照射+4% 毛蕊花糖苷防晒霜)、低剂量组 (紫外线照射+2% 毛蕊花糖苷防晒霜) 及阳性对照组 (市售防晒霜)。大鼠照射期间, 每日观察背部皮肤损伤情况。末次背部照射后, 取照射区皮肤组织进行苏木精-伊红染色和天狼猩红染色观察皮肤组织形态及胶原纤维的变化, Tunel 染色检测细胞凋亡情况, 检测皮肤抗氧化能力 [超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、羟脯氨酸 (Hyp)], 免疫组化检测 cleaved caspase-3 的变化。**结果** 大鼠背部紫外照射后, 皮肤呈现粗糙增厚、红肿溃烂等不同程度的损伤, 胶原纤维变性紊乱。与模型组比较, 毛蕊花糖苷不同剂量组皮肤损伤程度明显减轻, 皮肤组织 SOD 活性、GSH 含量和 GST 活力均升高, 而  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、Hyp 含量下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中毛蕊花糖苷高剂量组效果最好。同时, 凋亡细胞及 cleaved caspase-3 的阳性细胞率减少, 显示毛蕊花糖苷防晒霜处理后可减轻细胞凋亡。**结论** 毛蕊花糖苷防晒霜可提高皮肤抗氧化应激活性, 降低氧化产物含量, 抑制细胞凋亡, 达到抗紫外线辐射损伤作用。

**关键词:** 毛蕊花糖苷; 抗紫外线辐射; 抗氧化; 细胞凋亡

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0594-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.007

## Protective effect of verbascoside sunscreen cream against ultraviolet irradiation induced photodamage to skin damage in rats

LI Xiao-lin<sup>1, 2</sup>, WANG Peng<sup>1, 2</sup>, LI Mao-xing<sup>2, 4\*</sup>, JIANG Jiang<sup>3\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050; 2. Gansu Plateau Pharmaceutical Technology Center, Lanzhou 730050; 3. Department of Burns and Plastic Surgery, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050; 4. Institute of Radiation Medicine Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

**Abstract: Objective** To establish a rat skin damage model by ultraviolet irradiation, and determine the anti-ultraviolet radiation mechanism of verbascoside sunscreen cream. **Methods** Rats with smooth and undamaged back skin were selected to establish the ultraviolet irradiation damage model. The irradiation conditions included ultraviolet irradiation at 320 nm, irradiation intensity at  $1.8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ , and irradiation for 3 min for three consecutive days. Totally 49 Wistar rats were randomly divided into 7 groups: a blank group (no irradiation), a model group (ultraviolet irradiation), a matrix group (ultraviolet irradiation + blank substrate), a high dose group (ultraviolet irradiation + 6% verbascoside sunscreen

基金项目: 940 医院基础和临床培育项目 (No. 2021yxky047)。

作者简介: 李晓琳, 女, 主管药师, 主要从事中药物质基础与质量标准研究, email: lxltcdqgbtj2019@163.com \*通信作者: 姜疆, 女, 副主任医师, 主要从事烧伤整形研究, email: jj19751213@163.com; 李茂星, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事天然药物化学研究与开发, email: limaox2020@aliyun.com

cream), a medium dose group (ultraviolet irradiation + 4% verbascoside sunscreen cream), a low-dose group (ultraviolet irradiation + 2% verbascoside sunscreen cream) and a control group (commercially available sunscreen cream). During the irradiation, pictures were taken every day to observe the skin damage on the rat back. After the last irradiation, skin tissues were taken from the irradiated area for hematoxylin-eosin staining and sirius red staining to observe the skin tissue morphology and the changes in the collagen fibers. Tunel staining detected cell apoptosis. Oxidative stress of the skin was detected [superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione *S*-transferase (GST), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyproline (Hyp)]; cleaved caspase-3 change was detected by immunohistochemical technique. **Results** After the irradiation, the skin became rough and thickened, red and swollen, fester with different degrees. The collagen fibers were degenerated and disordered. Compared with the model group, the degree of skin damage in different doses of verbascoside was significantly reduced, SOD activity, GSH content and GST activity in the skin tissues were increased, while the content of  $H_2O_2$  and Hyp decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), with better effect in the high-dose group. At the same time, the decrease of apoptotic cells and cleaved caspase-3 positive cells indicated that verbascoside sunscreen cream alleviated the cell apoptosis. **Conclusion** Verbascoside sunscreen cream can improve the anti-oxidative stress activity of the skin, reduce the oxidative products, and inhibit the cell apoptosis, thus the effect of anti-ultraviolet irradiation damage.

**Key words:** verbascoside; anti-ultraviolet; anti-oxidation; cell apoptosis

甘肃省地处黄土高原、青藏高原和内蒙古高原三大高原的交汇地带,紫外线辐射强度大,皮肤易暴露在紫外线照射下而引发急性慢性紫外线辐射损伤(光老化损伤),导致皮肤出现红斑、干燥、皱纹和色斑等<sup>[1]</sup>。随着西部地区旅游和经济的不断发展,人们越来越多的进入高海拔地区生活和工作,不同程度地受到紫外线辐射损伤,防晒剂也被广泛应用于日常生活中。目前常用的防晒剂以物理屏蔽剂和化学吸收剂为主,但有涂抹痕迹明显、易堵塞毛孔,引发接触性皮炎、瘙痒或灼热等过敏反应。由于消费者对其副作用认识的深入以及对天然安全化妆品强烈诉求等因素,使得开发安全有效的天然防晒剂成为国内外研究的热门课题<sup>[2]</sup>。

天然产物在防紫外线辐射损伤方面具有独特的优势,有防晒、紫外吸收、抗炎、抗敏、晒后修复舒缓等多重效果,安全性高且刺激性小。许多植物如绞股蓝、花椒、葛根、甘草等都富含抗紫外活性成分,主要为黄酮类化合物和酚类化合物等<sup>[3-4]</sup>。课题组前期研究发现苯乙醇苷类化合物抗紫外线辐射损伤功能显著,并发现甘肃马先蒿主要成分毛蕊花糖苷(属苯乙醇苷类化合物)有显著的抗缺氧、抗氧化应激、抗紫外线辐射损伤等作用<sup>[5-7]</sup>,且其药用植物来源丰富,提取分离技术成熟,是防治高原紫外线辐射损伤的潜在药物。同时,藏药马先蒿、螃蟹甲及肉苁蓉等甘肃特色药材中毛蕊花糖苷含量丰富,且规范化种植颇具规模,不仅可以产生巨大的经济效益,还可

以推动地域发展,增加当地就业率和财政收入。因此,本课题组研制了一款具有防晒、晒后修复、保湿、防皴裂等多重效果的毛蕊花糖苷防晒霜,并初步探讨其抗紫外线辐射作用机制,为毛蕊花糖苷防晒霜产品的开发应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级雄性健康Wistar大鼠49只,体质量( $200 \pm 20$ )g,采购并饲养于联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室动物房[生产许可证号:SCXK(军)2017-0023,使用许可证号:SYXK(军)2017-0047]。动物于恒温( $20 \sim 25^\circ\text{C}$ )、恒湿( $40\% \sim 50\%$ )条件下自由摄食进水。本实验经联勤保障部队第九四〇医院科研伦理委员会批准,审批编号为2021KYLL120。

### 1.2 仪器

SS-06B-24紫外线光疗仪(上海希格玛);DDG-S02型宠物专用修剪器(温州卓创电器有限公司);Tissuelyser-24全自动样品快速研磨仪(上海净信);AF-80制冰机(意大利斯科茨曼);3K15高速冷冻离心机(德国Sigma);SpectraMax® i3全自动荧光酶标仪(美国Molecular)。

### 1.3 试剂

毛蕊花糖苷防晒霜为实验室自制。硫化钠九水合物(上海麦克林生化科技有限公司);75%乙醇(山东利尔康医疗科技股份有限公司);多聚甲醛固定液(中性)(武汉赛维尔生物科技有限

公司);某水润多效防护防晒霜[科丝美诗(中国)化妆品有限公司];超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转移酶(GSH-ST)、过氧化氢( $H_2O_2$ )、羟脯氨酸(Hyp)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);甘油(莱阳市双双化工有限公司);cleaved caspase-3 抗体、免疫组化专用山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司)。白凡士林(山东德新康医疗科技有限公司);硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、司盘(天津市光复精细化工研究所);液体石蜡(成都市科龙化工试剂厂);吐温(天津市化学试剂三厂)。

## 2 方法

### 2.1 毛蕊花糖苷防晒霜的制备

分别称取硬脂酸 3 g、白凡士林 3 g、司盘 -60 0.8 g、液体石蜡 4.5 g 和单硬脂酸甘油酯 1 g 为油相;将不同剂量的毛蕊花糖苷用 40 mL 蒸馏水充分溶解,加热至 80 °C,随后加入尼泊金 0.1 g、吐温 -80 2.5 g 和甘油 5 g,过程中不停搅拌至溶液清澈透明,作为水相;同温下将油相加入水相并缓慢研磨至乳化,冷却后即得 O/W 型毛蕊花糖苷防晒霜。

### 2.2 大鼠急性紫外损伤模型建立

大鼠进行麻醉后,用剃须刀剃除长毛,再使用 8% 硫化钠(取硫化钠 8 g,倒入 75% 乙醇 40 mL 和温水 60 mL 的混合溶液中,搅拌至完全融化,即得)脱掉大鼠背部绒毛,恢复 3 d 后进行下一步实验。

选取背部皮肤恢复成光滑、无损伤的大鼠继续建立紫外损伤模型。照射条件为紫外线照射,波长 320 nm,照射强度为  $1.8 J \cdot cm^{-2}$ ,每日照射时间为 3 min,连续 3 d。随机分组为空白组(无紫外线照射)、模型组(紫外线照射)、基质组(紫外线照射+空白基质)、高剂量组(紫外线照射+6% 霜剂)、中剂量组(紫外线照射+4% 霜剂)、低剂量组(紫外线照射+2% 霜剂)及阳性对照组(市售防晒霜),每组 7 只。除空白组和模型组外大鼠在每日照射前 0.5 h 于背部脱毛区域均匀涂抹相应种类的霜剂  $10 mg \cdot cm^{-2}$ 。照射期间,每日观察大鼠体质量以及皮肤状态的改变情况(如红肿、褶皱,结痂,毛发等)并拍照记录。

### 2.3 大鼠组织形态学检测

大鼠末次照射结束后次日处死,取大鼠照射区  $1 cm \times 1 cm$  皮肤组织,10% 多聚甲醛固定液固定 24 h 以上,脱水浸蜡,包埋,制成切片后分别进行 HE 染色及胶原纤维天狼猩红染色。天狼猩红染色结果判读标准是光学显微镜下胶原纤维红色,背景黄色;偏振光下,I 型胶原呈橘黄色或亮红色的粗纤维,III 型胶原呈绿色的细纤维。

### 2.4 Tunel 染色检测细胞凋亡情况及免疫组化检测 cleaved caspase-3 表达情况

切片后进行 Tunel 染色,放大倍率为  $\times 400$ ,随机选取 5 个视野。细胞核在紫外的激发下为蓝色,以绿色荧光细胞核为阳性凋亡细胞,用阳性细胞百分比(阳性细胞百分比=给定视场内染色阳性的细胞核数目/细胞总数)记录凋亡情况。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

将固定好的皮肤组织石蜡切片脱蜡至水,随后进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加 PBS,按一定比例配好的一抗,切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。随后玻片置于 PBS (pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织,室温孵育 50 min。最后 DAB 显色,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。苏木精复染细胞核 3 min 左右,自来水洗,苏木精分化液分化数秒,自来水冲洗,苏木精返蓝液返蓝,流水冲洗。脱水封片后显微镜镜检,图像采集分析。结果判读为苏木精染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。

### 2.5 抗氧化应激能力检测

去除大鼠皮肤皮下脂肪并称重,制备 10% 组织匀浆,  $2500 r \cdot min^{-1}$  离心 10 min 取上清液进行 SOD、GSH、GSH-ST、 $H_2O_2$ 、Hyp 抗氧化能力检测。

### 2.6 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间差异采用单因素方差分析和 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 毛蕊花糖苷防晒霜保护紫外线辐射诱导的大鼠皮肤损伤

从外观结果可知,空白组小鼠背部皮肤细腻光滑,皮肤色泽正常,富有弹性;照射紫外线后出现不同程度的皮肤粗糙增厚,褶皱明显,红肿溃烂,大片结痂,呈革质样。涂抹霜剂后高剂量组恢复效果最好,中剂量次之。低剂量组与基质组比较仍有保护效果,说明毛蕊花糖苷霜剂具有抗紫外线辐射的功效。高剂量霜剂效果较阳性组效果略差。与模型组比较,基质组几乎无保护作用(见图 1)。

从 HE 染色结果可知,正常组表皮增厚,有少量糜烂,血管周围有淋巴细胞,真皮层致密。模型组表皮不规则增厚,伴有角化过度,部分脱落有渗出,糜烂,真皮浅层染色变淡,有水肿,血管周围中性粒细胞增多,炎症明显,且有毛细



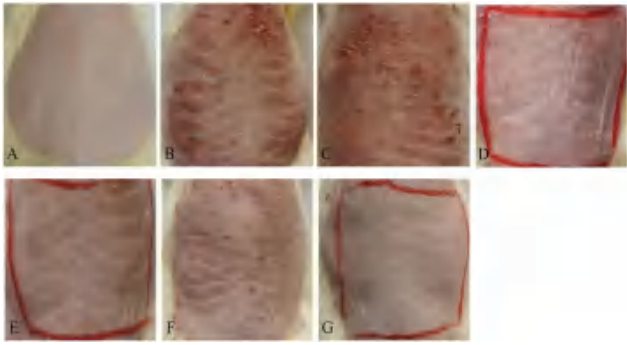


图 1 各组大鼠经紫外线照射后皮肤外观表现  
Fig 1 Skin appearance of rats in each group after the ultraviolet irradiation  
A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 基质组 (matrix group); D. 高剂量组 (high-dose group); E. 中剂量组 (middle-dose group); F. 低剂量组 (low-dose group); G. 阳性对照组 (positive control group)

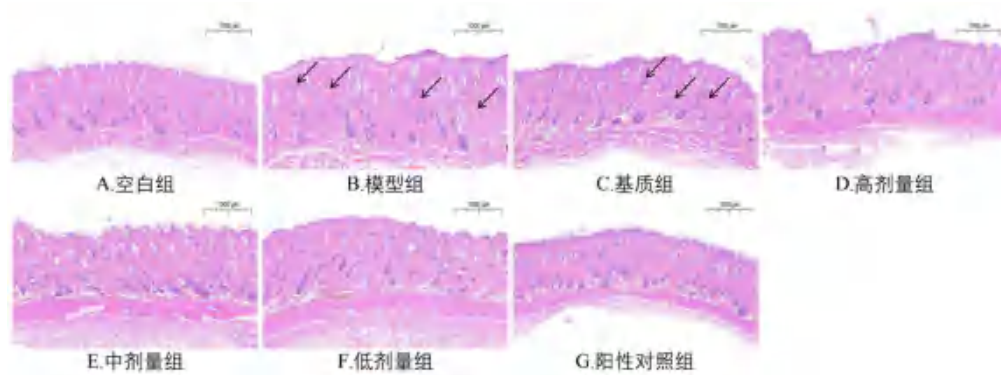


图 2 各组大鼠经紫外线照射后皮肤组织形态学变化 (×100)  
Fig 2 Change of skin histomorphology of rats in each group after the ultraviolet irradiation (×100)

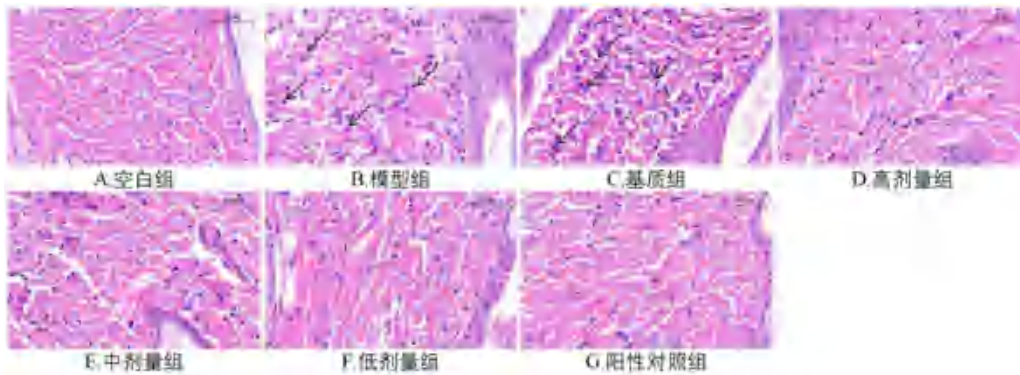


图 3 各组大鼠经紫外线照射后皮肤组织形态学变化 (×200)  
Fig 3 Change of skin histomorphology of rats in each group after the ultraviolet irradiation (×200)

**3.2 毛蕊花糖苷防晒霜抑制紫外线辐射引起的大鼠皮肤细胞凋亡**

与空白组比较, 模型组大鼠细胞凋亡率为 (36.76±3.71)%, 显著升高 4.1 倍 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 基质组基本无变化, 说明基本无保护作用, 毛蕊花糖苷高、中、低剂量组及阳性组分别为 (9.33±1.11)%, (9.70±0.54)%, (12.40±1.43)%, (8.99±1.16)%, 凋亡程度显著降低 ( $P < 0.01$ ),

血管扩张现象。高剂量组治疗后大鼠皮肤表皮糜烂减少, 真皮层组织的紊乱变形现象减少, 有效改善了表皮层角化过度现象, 中低剂量组也有保护作用, 但效果较高剂量组差。基质组无改善作用。阳性组保护作用显著 (见图 2 及图 3)。

从胶原纤维天狼猩红染色结果可知, 胶原纤维紧密排列, 整齐有序, 分布均匀, 胶原束的走向大多与皮面平行。皮肤结构、层次清晰, 毛囊汗腺等完整可见, 与空白组相比, 真皮胶原纤维排列紊乱, I 型胶原及 III 型胶原减少, 同时胶原束散开, 弹力纤维增多、扭曲, 以毛囊周围增多较明显; 与模型组比较, 涂抹霜剂后真皮胶原纤维变性程度轻, 排列呈现不同程度的紊乱减少。其中以高剂量组组织病变程度最轻, 胶原纤维排列更加整齐, 形态更加完整 (见图 4)。

说明毛蕊花糖苷可减轻紫外线辐射引起的大鼠皮肤细胞凋亡 (见图 5)。同时, 如图 6 所示, 与模型组 (44.68±2.34)% 相比, 毛蕊花糖苷高、中、低剂量组 cleaved caspase-3 分别为 (20.72±1.80)%, (24.22±1.33)%, (29.94±2.02)%, 表达量降低 ( $P < 0.01$ )。提示毛蕊花糖苷防晒霜抑制紫外线辐射引起的大鼠皮肤细胞凋亡过程, 发挥保护作用。

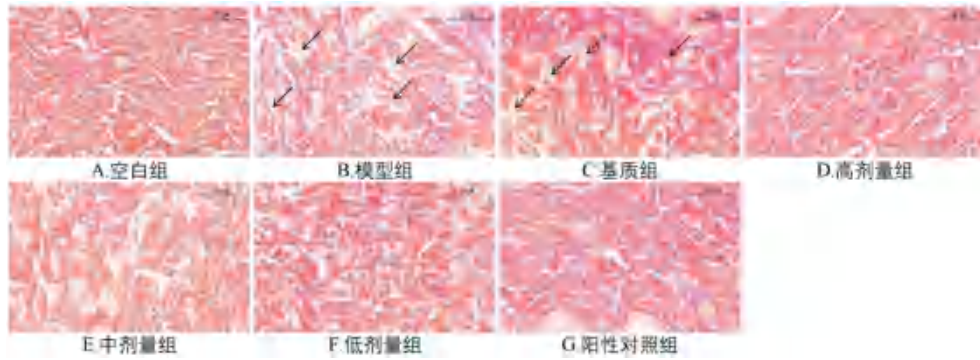


图 4 各组大鼠经紫外线照射后皮肤胶原纤维变化 (×200)

Fig 4 Change of skin collagenous fiber of rats in each group after the ultraviolet irradiation (×200)

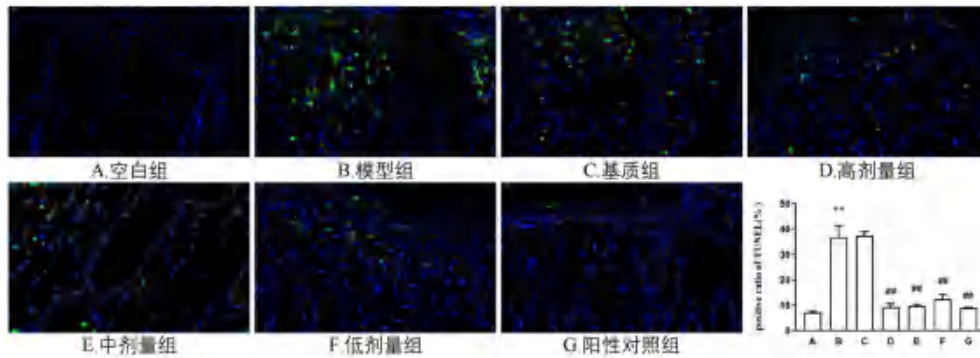


图 5 各组大鼠经紫外线照射后皮肤组织凋亡情况 (×400,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Fig 5 Apoptosis in skin tissue of rats in each group after the ultraviolet irradiation (×400,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

注: 与空白组比较,  $**P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $###P < 0.01$ 。

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

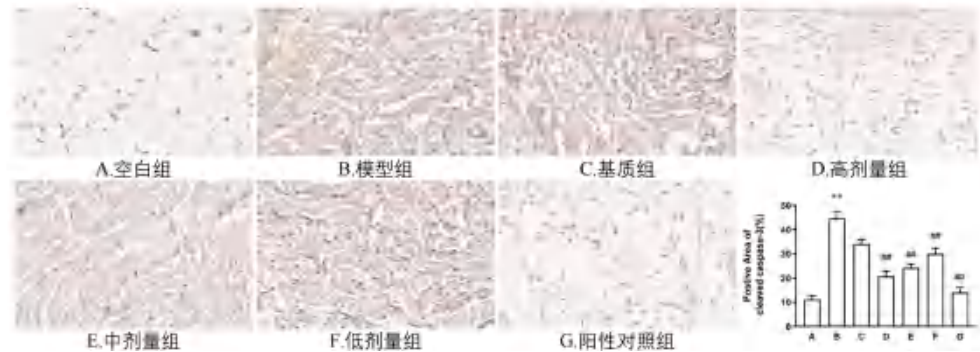


图 6 各组大鼠经紫外线照射后皮肤组织 cleaved caspase-3 表达情况变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

Fig 6 Expression of cleaved caspase-3 in skin tissue of rats in each group after the ultraviolet irradiation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

注: 与空白组比较,  $**P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $###P < 0.01$ 。

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

### 3.3 毛蕊花糖苷防晒霜提高紫外线辐射大鼠皮肤的抗氧化能力

与空白组比较, 模型组大鼠皮肤的  $H_2O_2$ 、Hyp 含量均显著增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 毛蕊花糖苷防晒霜各剂量组以及阳性组, 皮肤组织内  $H_2O_2$ 、Hyp 含量显著降低, 基质组基本无变化, 其中高剂量组及阳性组效果最显著 (见图 7)。基质组与模型组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与空白组比较, 模型组大鼠皮肤的 SOD 酶活力、GST 酶活力、GSH 含量明显被消耗 ( $P < 0.01$ ,

$P < 0.05$ )。与模型组比较, 高剂量组及阳性组 SOD 酶活力、GST 酶活力、GSH 含量均显著增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

### 4 讨论

本研究建立大鼠紫外线辐射损伤模型, 通过皮肤组织病理学变化、细胞凋亡情况以及皮肤组织氧化应激指标等考察其防紫外线辐射的效果。研究表明, 给予不同剂量毛蕊花糖苷防晒霜后, 皮肤损伤程度明显减轻, 皮肤组织 SOD 活性、GSH 含量和 GST 活力均升高, 而  $H_2O_2$ 、



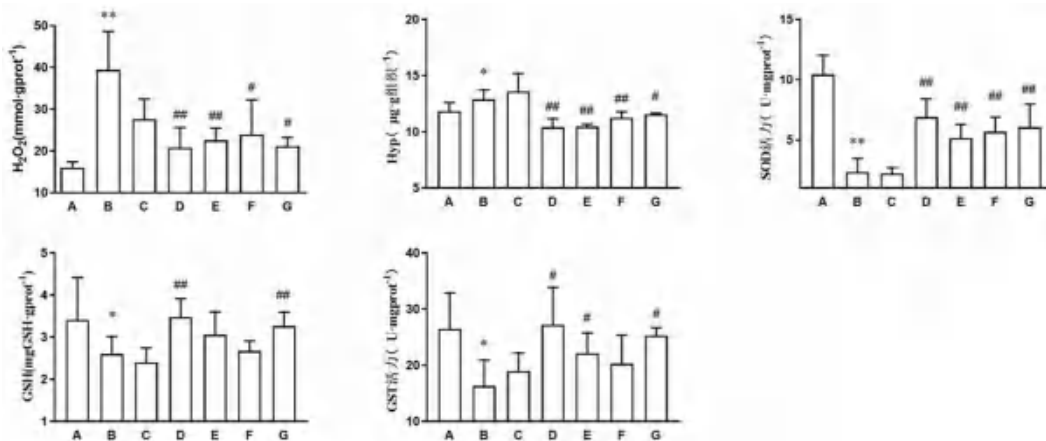


图 7 各组大鼠经紫外线照射后表现皮肤组织氧化应激相关因子的表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig 7 Expression of oxidative stress-related factors in skin tissue of rats in each group after the ultraviolet irradiation ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 基质组 (matrix group); D. 高剂量组 (high-dose group); E. 中剂量组 (middle-dose group); F. 低剂量组 (low-dose group); G. 阳性对照组 (positive control group)

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, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

Hyp 含量下降, 其中毛蕊花糖苷高剂量组效果最好。同时, 凋亡细胞及 cleaved caspase-3 的阳性细胞率减少, 显示毛蕊花糖苷防晒霜处理后可减轻细胞凋亡。说明毛蕊花糖苷防晒霜可清除皮肤自由基, 降低氧化产物含量, 抑制细胞凋亡, 达到抗紫外线辐射损伤作用。

毛蕊花糖苷是常见的苯乙醇苷类化合物之一, 具有抗缺氧、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗凋亡等多种药理作用<sup>[6, 8]</sup>。研究表明, 毛蕊花糖苷是具有抗紫外线辐射损伤的潜在开发价值的多酚类水溶性化合物, 其分子结构中多个共轭体系其发挥抗紫外线辐射活性的结构基础。Kostyuk 等<sup>[9]</sup>在细胞模型基础上研究发现毛蕊花糖苷可以减轻紫外线对人角质形成细胞的损伤, 并认为毛蕊花糖苷可能是预防紫外线的潜在天然产物。Yang 等<sup>[10]</sup>将人皮肤成纤维细胞于  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  毛蕊花糖苷中预孵育 2 h, 发现毛蕊花糖苷可通过增强活性氧清除活性、降低 Bax/Bcl-2 比值、下调 caspase-3 活性、调节丝裂原活化蛋白激酶信号通路来保护细胞免受射线诱导的损伤。

$\text{H}_2\text{O}_2$  是细胞中活性氧的重要来源, 过氧化物酶体氧化可以产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  通过细胞膜, 生成  $\text{OH} \cdot$ 。同时 SOD 酶及 GST 酶保护机体免受损伤, 其活力间接反映了机体清除自由基的能力。而 GSH 可清除氧自由基, 维持氧化还原系统稳态。毛蕊花糖苷防晒霜组  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{OH} \cdot$  减少、SOD 酶活力升高、GST 酶活力升高、GSH 含量升高, 提示其可通过抵抗自由基损伤来发挥保护皮肤免受紫外线辐射损伤的作用。Hyp 的量能反映结缔组织疾病的胶原代谢情况。由胶原纤维天

狼猩红染色结果及 Hyp 试剂盒检测结果可知, 毛蕊花糖苷防晒霜可保护真皮胶原纤维, 使紫外线辐射的大鼠皮肤组织 I 型胶原及 III 型胶原增加。毛蕊花糖苷防晒的原因可能与其结构中的酚羟基有关, 其分子中的多个酚羟基可以作为 H 供体, 具有清除皮肤中的自由基、避免自由基对细胞的损伤、抗氧化等作用, 从而达到显著的抗紫外线辐射的效果。

细胞的增殖和凋亡过程复杂, 是多种调控因子共同作用的结果。Caspase 是一个成员较多的蛋白酶家族, 目前研究发现人体内的 caspase 蛋白家族成员至少有 11 种, 其中 caspase-3 在细胞凋亡过程中发挥凋亡执行因子的作用<sup>[11-12]</sup>。Caspase-3 在正常情况下以酶原的形式存在, 当细胞发生凋亡时, caspase-3 被活化成为 cleaved caspase-3, 发挥促进细胞凋亡的作用<sup>[13]</sup>。本实验通过免疫组化法检测了皮肤组织中 cleaved caspase-3 的表达量, 发现毛蕊花糖苷各剂量组 cleaved caspase-3 的表达量降低; 同时 Tunel 检测结果也发现细胞凋亡数降低, 表明毛蕊花糖苷通过发挥抗凋亡作用来实现其抗紫外线辐射的效果。

综上, 毛蕊花糖苷防晒霜主要通过抗氧化、清除自由基、抗细胞凋亡、保护机体免受损伤, 达到显著的抗紫外线辐射的效果。

### 参考文献

[1] 罗洋, 杜华, 杨桂兰, 等. 喀喇昆仑高原官兵皮肤病流行病学调查研究[J]. 西北国防医学杂志, 2014, 35 (3): 218-220.  
 [2] 张凯, 王聪聪, 李雅潇, 等. 天然产物抗紫外线辐射研



- 究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2018, 27(12): 1043-1048.
- [3] Raková L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12641.
- [4] Domaszewska-Szostek A, Puzianowska-Kunicka M, Kuryowicz A. Flavonoids in skin senescence prevention and treatment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6814.
- [5] Tian XY, Li MX, Lin T, et al. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides[J]. Eur J Med Chem, 2021, 209: 112563.
- [6] Li MX, Zhu YT, Li J, et al. Effect and mechanism of verbascoside on hypoxic memory injury in plateau[J]. Phytother Res, 2019, 33(10): 2692-2701.
- [7] Fazly BB, Khameneh B, Zahedian MO, et al. In vitro evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drugresistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates[J]. Avicenna J Phytomed, 2018, 8(3): 246-253.
- [8] Nigro O, Tuzi A, Tartaro T, et al. Biological effects of verbascoside and its anti-inflammatory activity on oral mucositis: a review of the literature[J]. Anticancer Drug, 2020, 31(1): 1-5.
- [9] Kostyuk VA, Potapovich AI, Lulli D, et al. Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(7): 869-879.
- [10] Yang JH, Yan Y, Liu HB, et al. Protective effects of acteoside against xrayinduced damage in human skin fibroblasts[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2301-2306.
- [11] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(4): 526-539.
- [12] 陈虹颖, 陈旭, 李莉, 等. 白藜芦醇对中波紫外线照射的人角质形成细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(5): 408-413.
- [13] Opdenbosch NV, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. Immunity, 2019, 50(6): 1352-1364.
- (收稿日期: 2022-08-01; 修回日期: 2022-08-28)

## 基于漂浮和膨胀的盐酸二甲双胍胃滞留型缓释片研究

潘阳<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 黄侃<sup>2</sup>, 童伟勤<sup>1\*</sup> (1. 广州坡思韬控释药业有限公司, 广州 510530; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

**摘要:** 目的 设计一种基于漂浮和膨胀的盐酸二甲双胍胃滞留型缓释片, 以期获得胃滞留特性。方法 通过片芯厚度控制本品的漂浮性能, 片芯内填充高膨胀性辅料, 以实现其膨胀性能; 片芯外包具有高度延展性的缓释衣, 使其能承受片芯的膨胀。以成品的密度、膨胀性能和药物溶出行为作为评价指标, 与已上市的胃滞留制剂(胃漂浮型) 1 g 盐酸二甲双胍缓释片(商品名: Glumetza) 进行对比, 评估本品在体内的胃滞留能力。结果 本品密度小于  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 可立即起漂; 在 pH 1.2 HCl 介质中, 2 h 内最小两个维度的尺寸均大于 12 mm, 能膨胀至与 Glumetza 一致的尺寸; 溶出曲线与 Glumetza 相似, 均为一级释放模型。结论 本品具有良好的漂浮和膨胀性能, 在不大幅度增加片尺寸的前提下, 成为一种兼顾良好吞咽性和胃滞留潜能的新型缓释片。

**关键词:** 漂浮; 膨胀; 胃滞留; 盐酸二甲双胍缓释片

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0600-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.008

## Gastric retentive metformin hydrochloride sustained release tablets based on floatation and expansion

PAN Yang<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, HUANG Kan<sup>2</sup>, TONG Wei-qin<sup>1\*</sup> (1. Bostal Drug Delivery Co., Ltd., Guangzhou 510530; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**基金项目:** 广东省重点领域研发计划项目-新药创制核心技术研发及应用(No.2019B020201011)。

**作者简介:** 潘阳, 男, 博士, 主要从事药物制剂研究和制剂产品开发研究, email: yang.pan@bostaldrug.com \* **通信作者:** 童伟勤, 男, 博士, 主要从事药物制剂研究和制剂产品开发研究, email: tony.tong@bostaldrug.com

**Abstract: Objective** To obtain an floatable and expandable sustained release tablets with good gastric retentive capacity. **Methods** The floatation and expansion were respectively controlled by the thickness of tablet core and the high expandable excipients. The flexibility of sustained release film was strong enough to support the expansion of the tablet core. The gastric retention of the final product was evaluated by comparing with the marketed gastric product Glumetza on density, expansion and in vitro dissolution. **Results** The tablets floated immediately as the density was lower than  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The minor and minimum dimension were both higher than 12 mm at 2 h. The dissolution profile between self-developed formulation and Glumetza were extremely similar, both obeying the first-order dynamic equation. **Conclusion** The floatation and expansion of gastric retentive tablets are strong. Without greatly increasing the size of tablets, they can be a novel sustained release tablets with easy swallowing and gastric retention.

**Key words:** floatation; expansion; gastric retention; metformin hydrochloride sustained release tablet

盐酸二甲双胍为 BCS III 类药物, 体内吸收较差, 吸收窗窄, 最佳吸收部位位于十二指肠<sup>[1]</sup>。据报道, 采用胃滞留技术能使药物滞留于胃部, 缓慢通过十二指肠, 有利于药物被十二指肠充分吸收, 提高生物利用度<sup>[2-3]</sup>, 使其能够更平稳地控制患者的血糖水平。

已上市的胃滞留型盐酸二甲双胍缓释片商品名为 Glumetza, 包括 0.5 g 和 1 g 两种规格, 均未在国内上市。1 g 规格 Glumetza 为膜控型缓释片, 基于尺寸和漂浮实现胃滞留, 但药片具有较大的尺寸, 患者吞咽相对较为困难, 同时, 只适用于用药剂量为 1 g 或 2 g 的患者。0.5 g 规格 Glumetza 为亲水凝胶骨架片, 亲水凝胶材料由羟丙甲纤维素和聚氧乙烯组成, 在体内能水化膨胀至胃滞留尺寸<sup>[4]</sup>。由于处方中含有大量亲水凝胶缓释材料, 尤其是聚氧乙烯, 会显著增加生产成本, 从而增加患者用药的经济负担。

为了满足国内患者服用胃滞留型盐酸二甲双胍缓释片的需求, 同时改善吞咽性, 降低生产成本, 本研究开发了一种膜控型的、具有漂浮和膨胀双重作用的 0.5 g 规格盐酸二甲双胍缓释片, 该产品具有立即漂浮的特点, 在 2 h 内两个最小维度的尺寸能膨胀至与已上市的 1 g 规格胃滞留型盐酸二甲双胍缓释片(商品名: Glumetza) 相同的胃滞留尺寸, 并与 Glumetza 进行了对比研究, 评估其胃滞留潜能。本品作为胃滞留制剂, 有助于平稳控制血糖, 并兼顾良好的吞咽性, 为国内首个 0.5 g 规格胃滞留型盐酸二甲双胍缓释片, 具有很好的临床应用前景。现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

DPL-2 多功能制粒包衣机(重庆精工制药机械有限责任公司); Quadro<sup>®</sup> Comil<sup>®</sup> U5 型锥式

整粒机(美国 IDEX 公司); 3850-7 型压片机(美国 Carver 公司); BGB-5F 型高效包衣锅(浙江小伦制药机械有限公司); UV 2600 型紫外分光光度计(Shimadzu 公司); A7-Xtend 溶出仪(瑞士 Sotax 公司); S3700 扫描电子显微镜[日立(中国)有限公司]。

### 1.2 试药

盐酸二甲双胍缓释片(商品名: Glumetza, Salix Pharmaceuticals, 批号: 18B073P, 规格: 1 g); 盐酸二甲双胍(寿光富康制药有限公司, 批号: A-32611703081, 含量: 99.9%); 胶态二氧化硅(Evonik Operations GmbH); 聚乙烯醇(三菱化学株式会社); 交联聚维酮(PVPP, BASF SE); 交联羧甲基纤维素钠(CCMC-Na, DuPont); 羧甲淀粉钠(SSG, Roquette Freres); 山嵛酸甘油酯(法国嘉法师); 聚乙烯醇-聚乙二醇接枝共聚物(BASF SE); 丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯共聚物水分散体(Evonik Operations GmbH); 聚醋酸乙烯酯共聚物水分散体(BASF SE); 聚乙二醇 8000(The Dow Chemical Company); 滑石粉(Imerys S.A. 公司); 二氧化钛(Merck KGaA); 二甲硅油(DDP Specialty Electronic Materials US 9, LLC); 聚山梨酯 80(Croda Inc); 枸橼酸三乙酯(凡特鲁斯有限责任公司); 胃溶型薄膜包衣预混剂(上海卡乐康包衣技术有限公司); 其他化学试剂均为分析纯; 水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 制备工艺

以聚乙烯醇为黏合剂, 胶态二氧化硅(Aerosil 200) 为助流剂, 采用顶喷制粒工艺, 对盐酸二甲双胍进行制粒, 然后整粒, 再外混胶态二氧化硅、膨胀辅料、亲水性辅料聚乙烯醇-聚乙二醇接枝共聚物(Kollicoat IR) 和润滑剂山嵛酸甘油酯

(Compritrol 888 ATO), 压片即得片芯, 最后依次外包缓释衣和外包隔离衣。

2.2 影响制剂膨胀、漂浮和溶出的关键因素分析

本品在处方设计时, 基于质量源于设计的理念, 分别对影响制剂膨胀和漂浮的因素进行分析, 并对关键因素进行考察。其中影响膨胀的因素来源于片芯和缓释衣, 影响漂浮的因素主要来源于片芯, 具体的处方和工艺因素见表 1。

表 1 影响制剂膨胀、漂浮和溶出的关键因素

Tab 1 Critical factors for expansion, floatation and dissolution

因素来源	因素分类	膨胀	漂浮	溶出
片芯	处方因素	膨胀辅料种类	膨胀辅料种类	/
		膨胀辅料用量	膨胀辅料用量	/
	工艺因素	/	压片压力	/
缓释衣	处方因素	缓释材料比例	/	缓释材料比例
		包衣增重	/	包衣增重
	工艺因素	熟化温度	/	熟化温度

2.3 片芯膨胀剂种类的筛选

片芯膨胀剂辅料的筛选是影响片膨胀的关键, PVPP 同时具有低密度和膨胀的物理属性, 作为本品的漂浮和膨胀功能性辅料, 但膨胀能力相对较弱, 故再考察引入膨胀性能更优的 SSG 或 CCMC-Na 对本品膨胀性能的影响。

膨胀试验过程中, 以 1000 mL 的 pH 1.2 HCl 为介质, 将缓释片置于溶出杯中, 采用篮法, 以 100 r·min<sup>-1</sup> 速度运行, 在不同时间点取出, 片呈椭圆形, 测试其长径、短径和厚度, 按椭球形计算其体积。

$$V = \pi lmn/6 \quad (\text{公式 1})$$

式中 *l*、*m*、*n* 分别为测试片的长径、短径和厚度。

膨胀率 (%) = (V<sub>t</sub> - V<sub>0</sub>) / V<sub>0</sub> × 100% (公式 2)  
 式中 V<sub>t</sub> 表示片膨胀 *t* 时的体积, V<sub>0</sub> 表示片膨胀前的体积。

片芯处方中分别以 14.74% 的 SSG 和 CCMC-Na 为膨胀剂时, 2 h 的膨胀率分别为 74.39% 和 99.15%, 故选择 CCMC-Na 作为片芯的膨胀剂。

2.4 片芯膨胀剂用量的筛选

据文献报道, 亲水性聚合物可以促进片芯的水化<sup>[5]</sup>, 对膨胀具有一定的辅助作用, 故在筛选出最佳的膨胀剂种类的基础上, 本试验还在处方中引入亲水性聚合物 Kollicoat IR, 分析其是否有利于膨胀处方筛选。

根据膨胀剂种类的筛选结果, 选择以 CCMC-Na 为膨胀剂, 对方中 Kollicoat IR、PVPP 和 CCMC-Na 处方量进行优化。为了分析加入 Kollicoat IR 是否有利于膨胀, 将该因素的低水平设置为 0。本试验通过全析因设计考察 Kollicoat IR (A)、PVPP (B) 和 CCMC-Na (C) 处方量对膨胀的影响, 每个因素考察 2 个水平, 并设置 2 个中心点。

因素水平和不同试验的处方组成分别见表 2 和表 3。将制备的成品置于转篮中, 以 1000 mL 的 pH 1.2 HCl 为介质, 于 37 °C、100 r·min<sup>-1</sup> 条件下搅拌, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0 和 4.0 h 时取出并测试其体积, 并与初始体积对比, 计算其 2 h 膨胀率。

表 2 因素水平

Tab 2 Factor and level

水平	因素 /mg		
	A. Kollicoat IR	B. PVPP	C. CCMC-Na
+ 1	22.00	60.00	87.00
0	11.00	49.00	76.00
- 1	0	38.00	65.00

表 3 处方设计

Tab 3 Formulation design

试验序列	处方组成 /mg						
	盐酸二甲双胍颗粒	胶态二氧化硅	Kollicoat IR	PVPP	CCMC-Na	山嵛酸甘油酯	合计
F4	525.72	3.28	22.00	38.00	65.00	12.00	666.00
F5	525.72	3.28	11.00	49.00	76.00	12.00	677.00
F6	525.72	3.28	22.00	60.00	87.00	12.00	710.00
F7	525.72	3.28	0.00	38.00	87.00	12.00	666.00
F8	525.72	3.28	0.00	60.00	65.00	12.00	666.00
F9	525.72	3.28	22.00	60.00	65.00	12.00	688.00
F10	525.72	3.28	22.00	38.00	87.00	12.00	688.00
F11	525.72	3.28	11.00	49.00	76.00	12.00	677.00
F12	525.72	3.28	11.00	60.00	87.00	12.00	688.00
F13	525.72	3.28	0.00	38.00	65.00	12.00	644.00

以 2 h 膨胀率为评价指标。由图 1 结果可知, F6 具有最好的膨胀性能, 即三者均为高水平时膨胀性能最佳。根据图 1B 显著性分析结果可知: Kollicoat IR 和 PVPP 的处方量对片芯的膨胀均未表

现出显著性影响, CCMC-Na 的处方量对片芯的膨胀具有显著性的影响, 说明 CCMC-Na 的处方量对膨胀性能影响的风险和贡献最大, 片芯内 CCMC-Na 的处方量必须达到一定水平, 以确保片的膨胀能



力。同时,考虑片初始片重过多增加会增加片的尺寸,从而影响患者的吞咽性,故本试验未继续增加辅料的处方量,选择 CCMC-Na 处方用量为 87 mg。

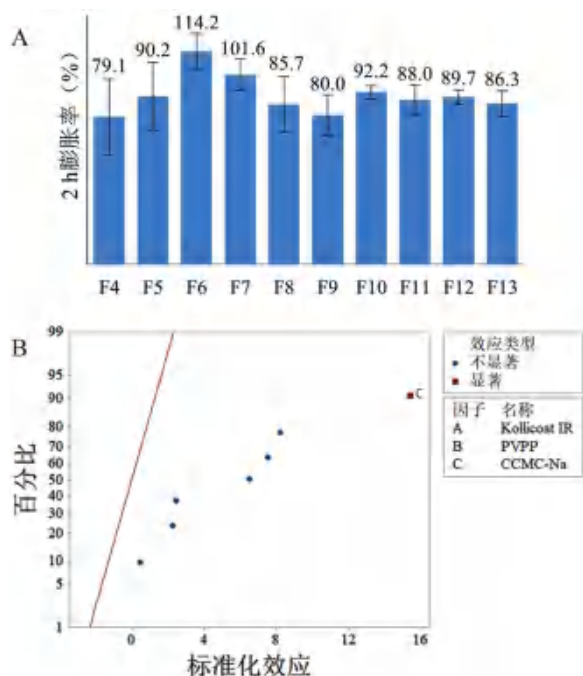


图1 不同外加膨胀剂处方量对片芯膨胀率的影响  
Fig 1 Effect of quantity of expandable excipients on expansion rate of tablet chart  
A. 2 h 膨胀率 (expansion rate at 2 h); B. 显著性分析图 (significance analysis chart)

### 2.5 片芯厚度的筛选

片芯厚度与片的体积相关,片重恒定,片芯越厚,片体积越大,密度越小。采用排开体积法

测试成品的密度,分析片芯厚度对漂浮性能的影响。同时检测不同厚度片芯的脆碎度,以免出现片芯过厚导致脆碎度不合格问题。

由表 4 结果可知:当片芯厚度在 6.80 ~ 7.20 mm 时,成品的密度小于  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,说明可以漂浮,且脆碎度均小于 1.0%,有利于包衣工艺的进行。故生产工艺控制片芯厚度目标值为 7.00 mm,范围为 6.80 ~ 7.20 mm。

表 4 片芯厚度与片芯物理性质关系

Tab 4 Relationship between thickness and physical properties of tablet core

片芯厚度/mm	密度 / ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	脆碎度 / %
6.70	1.051	0.086
6.80	0.999	0.043
7.00	0.982	0.072
7.20	0.924	0.110

### 2.6 缓释层处方工艺的筛选

根据缓释成膜材料的物理性质,选择具有较好柔韧性的高分子材料作为缓释衣的成膜材料,常用于缓释包衣的、具有较好柔韧性的材料主要为丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯共聚物水分散体 (Eudragit NE 30D) 和聚醋酸乙烯酯共聚物水分散体 (Kollicoat SR 30D),缓释衣处方中加入与 Kollicoat SR 30D 具有良好相容性的水溶性聚合物 Kollicoat IR<sup>[10]</sup>,以便形成致密均匀的缓释衣膜。另外再加入缓释包衣处方常用的聚乙二醇 8000、滑石粉、二氧化钛、二甲硅油、聚山梨酯 80 和枸橼酸三乙酯,分别作为致孔剂、抗黏剂、抗黏剂、消泡剂、乳化剂和增塑剂,其处方量参考常规处方用量,详见表 5。

表 5 缓释衣处方组成 (mg)

Tab 5 Formulation of sustained release part (mg)

试验序列	Eudragit NE 30D	Kollicoat SR 30D	Kollicoat IR	聚乙二醇 8000	滑石粉	二氧化钛	二甲硅油	聚山梨酯 80	枸橼酸三乙酯	合计
F1' (1 : 3)	9.228	27.683	14.885	9.300	12.664	3.654	1.017	0.457	4.152	416.333
F2' (1 : 4)	7.38	29.529	14.885	9.300	12.664	3.654	1.017	0.457	4.152	416.333
F3' (1 : 6)	5.273	31.638	14.885	9.300	12.664	3.654	1.017	0.457	4.152	416.333
F4' (1 : 8)	4.101	32.810	14.885	9.300	12.664	3.654	1.017	0.457	4.152	416.333
F5' (1 : 16)	2.171	34.740	14.885	9.300	12.664	3.654	1.017	0.457	4.152	416.333

注: Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 均为 30% 的水分散体,处方中的处方量均为两者的固含量。

Note: Eudragit NE 30D and Kollicoat SR 30D were both 30% dispersion in water, the quantities in formulation were calculated according to the solid content.

### 2.7 缓释材料 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例的筛选

以片芯厚度为 7.0 mm 的片芯制备成品后,采用体外溶出和缓释衣膜微观结构表征的方法,考察 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例对体外溶出和衣膜微观结构的影响,筛选的比例包括 1 : 3、1 : 4、1 : 6、1 : 8 和 1 : 16。溶出方法

为篮法,介质为 1000 mL 的 pH 1.2 HCl,于  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下搅拌,以提高溶出的区分力,有利于分析衣膜微观结构差异对溶出行为的影响。结合扫描电镜 (SEM),观察溶出样品缓释衣在膨胀后物理结构的特征。

本产品开发过程中,以 Glumetza 的溶出曲线为目标曲线,以期获得自制产品最佳的溶出曲线。

由图 2 溶出结果可知, 当 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例为 1:3 和 1:16 时, 溶出速度显著快于目标曲线溶出速度, 尤其以 1:3 最为显著, 当两者比例为 1:4~1:8 时, 不同样品之间溶出速度一致, 且与目标曲线溶出一致。说明两者的比例宜为 1:4~1:8。

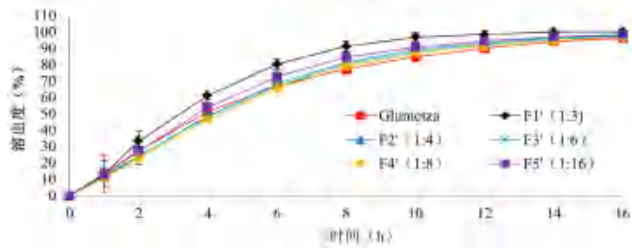


图 2 缓释材料 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 的比例对溶出的影响  
Fig 2 Effect of ratio between Eudragit NE 30D and Kollicoat SR 30D on dissolution

由图 3 可知, Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例为 1:3 和 1:16 时, 缓释衣膜上出现明显的孔洞, 以 1:3 最为严重; 当比例为 1:8



图 3 不同 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例缓释衣膜膨胀后 SEM 图  
Fig 3 SEM graphic of sustained release layer after expanded with different ratio between Eudragit NE 30D and Kollicoat SR 30D

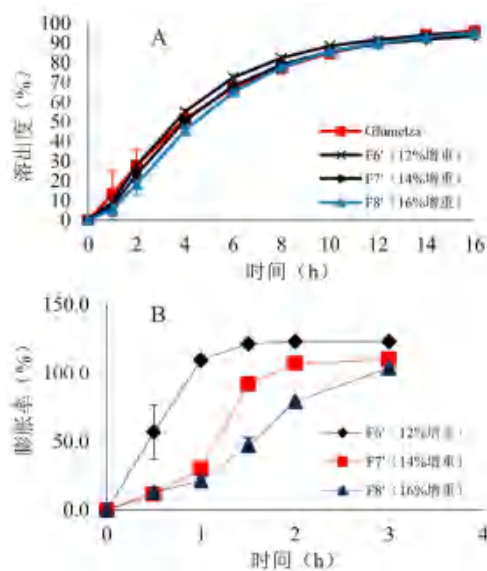


图 4 包衣增重对药物溶出 (A) 和膨胀率 (B) 的影响  
Fig 4 Effect of gained weight during coating on drug dissolution (A) and expansion rate (B)

### 2.9 熟化温度的考察

缓释材料在包衣过程中, 有可能存在分布不均

时, 有少量孔洞, 而当比例为 1:4 和 1:6 时, 衣膜则较为均匀致密, 与体外溶出行为也一致。说明 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 比例宜为 1:4~1:8, 其中比例为 1:6 时, 制备的衣膜在致密的同时最为平滑, 故选择 Eudragit NE 30D 和 Kollicoat SR 30D 最优比例为 1:6。

由于缓释材料比例筛选为初步的筛选过程, 通过溶出曲线和 SEM 即可达到筛选的目的, 故无需再测试成品的膨胀率。

### 2.8 缓释层包衣增重的筛选

包衣增重会直接影响缓释衣膜的厚度, 从而影响药物的溶出速度和膨胀速度, 因此, 本试验考察缓释层包衣增重对溶出和片膨胀率的影响。当包衣增重为 12%~16% 时, 溶出与目标溶出速度较为一致,  $f_2$  分别为 71、72 和 64。包衣增重为 14% 时, 与目标溶出速度最为接近; 当包衣增重为 16% 时, 缓释片的膨胀速度下降较为明显; 包衣增重为 12% 和 14% 时, 2 h 的膨胀率较为接近。综合溶出和膨胀结果, 优选包衣增重为 14% (见图 4)。

匀的情况, 因而膜致密性较差, 需要通过熟化使膜进一步延展, 提高致密性, 从而获得更好的控释效果。膜是否能够很好地延展直接与熟化温度相关, 结合实际生产过程, 在包完外隔离层欧巴代后再继续在包衣锅内进行熟化, 欧巴代喷液结束并干燥后, 片床温度已接近 50℃, 故在熟化时, 采取梯度升温的方法。缓释衣中聚乙二醇 8000 熔点为 52℃左右, 故先于 55℃熟化 2 h, 再于 65℃熟化 2 h, 测试其溶出曲线, 发现溶出速度较目标溶出速度快, 故又将温度提高至 70℃, 继续熟化 2 h (见图 5)。由图 5A 可知: 在 55℃熟化 2 h、65℃熟化 2 h 后的基础上, 于 70℃再熟化 2 h 后, 成品的溶出曲线与目标溶出曲线高度一致,  $f_2$  由 61 提高至 79, 说明熟化温度对药物溶出行为影响很大, 可选择分别于 55℃、65℃和 70℃熟化 2 h 的工艺条件。由图 5B 可知: 在 70℃再额外熟化 2 h 后, 膨胀速率有所降低, 但 1.5 h 膨胀率仍达到近 100%。

### 2.10 稳定性试验

盐酸二甲双胍化学稳定性好<sup>[6]</sup>, 本品为膜控型缓释片, 为了分析本品在放置过程中缓释衣膜

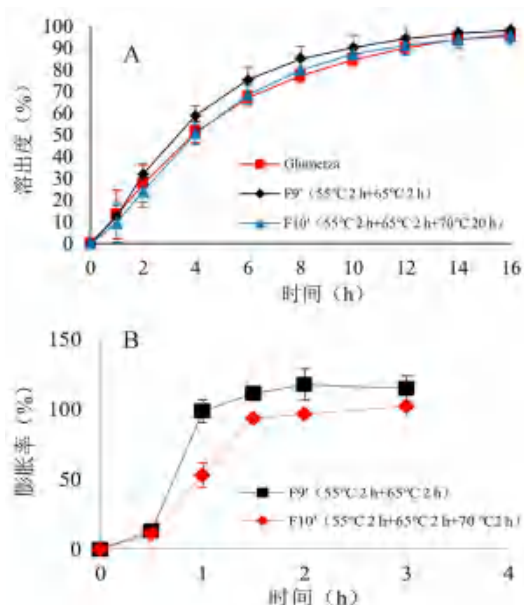


图 5 熟化工艺对药物溶出 (A) 和膨胀率 (B) 的影响  
Fig 5 Effect of curing on drug dissolution (A) and expansion rate (B)

物理性质是否发生变化而影响溶出, 研究将小试处方样品经高密度聚乙烯瓶包装后, 放置在加速条件下, 测试其放置 3 个月后的溶出曲线, 并与 0 月样品进行比较, 分析其稳定性变化趋势。结果如图 6 所示, 加速 3 个月与 0 月样品相比, 溶出变化很小, 且与 Glumetza 一致 ( $f_2 = 76$ ), 说明本品稳定性较好, 工艺切实可行。

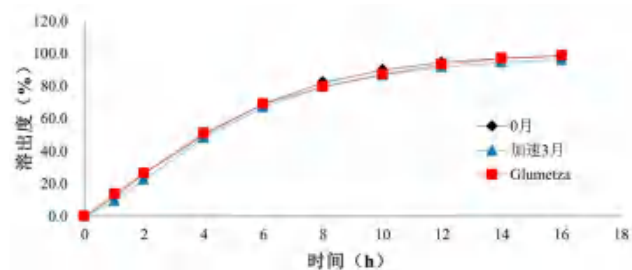


图 6 稳定性样品溶出曲线  
Fig 6 Dissolution profiles of stability samples

### 2.11 最优处方与 Glumetza 对比研究

经处方工艺筛选, 筛选出最优处方见表 6, 分别对比本品和 Glumetza 的漂浮性能、膨胀性能和药物溶出行为, 以此评估本品的胃滞留性能。

测试本品和 Glumetza 的密度, 结果分别为  $0.96 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.94 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 两者密度均小于  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在溶出试验过程中观察两者的漂浮行为, 发现两者在整个溶出试验过程中, 始终保持漂浮状态, 说明两者漂浮性能一致。

在筛选处方工艺因素对片膨胀率影响的基础上, 测试自制制剂最优处方成品的膨胀尺寸, 分析其尺寸是否满足大于幽门尺寸和 2 h 大于 12 mm 的要求, 并与 Glumetza 对比, 评估其胃滞留性能。

表 6 最优处方

Tab 6 Maximum optimized formulation

处方组成	处方量 /mg	处方百分比 /%
顶喷制粒部分		
盐酸二甲双胍	500.000	60.606
胶态二氧化硅	8.725	1.058
聚乙烯醇	17.000	2.061
片芯外加辅料部分		
胶态二氧化硅	3.275	0.397
聚乙烯醇-聚乙二醇接枝共聚物	22.000	2.667
交联聚维酮	60.000	7.273
交联羧甲基纤维素钠	87.000	10.545
山嵛酸甘油酯	12.000	1.455
缓释衣部分		
Eudragit NE 30D	6.312	0.765
Kollocoat SR 30D	37.871	4.590
Kollocoat IR	17.820	2.160
聚乙二醇 8000	11.133	1.349
滑石粉	15.159	1.837
二氧化钛	4.374	0.530
二甲基硅油	1.220	0.148
聚山梨酯 80	0.547	0.066
枸橼酸三乙酯	4.970	0.602
外隔离衣部分		
薄膜包衣预混剂-胃溶型 (欧巴代)	15.600	1.891
总计	825.00	100.00

结果见图 7, 0.5 h 时片厚即可膨胀至 9 mm 以上, 2 h 时片最小两个维度 (短径和片厚) 尺寸均膨胀至 12 mm 以上, 且与 Glumetza 的短径和片厚一致, 证明本品具有优越的膨胀性能。

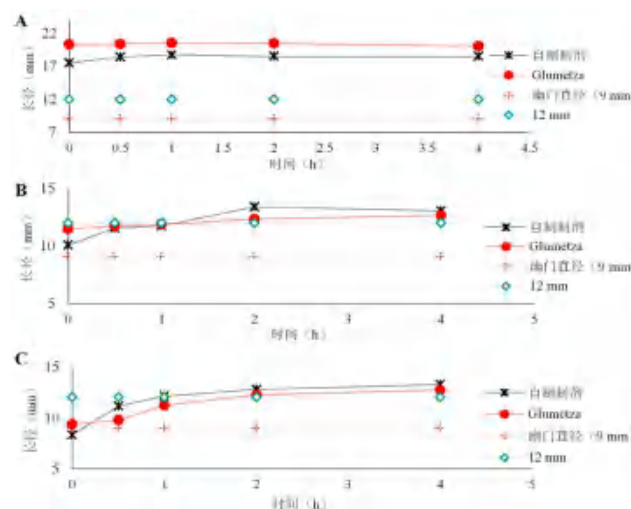


图 7 不同长径 (A)、短径 (B)、片厚 (C) 的膨胀趋势图  
Fig 7 Expanded trends of long radius (A), minor radius (B) and thickness (C)

分别测试自制制剂和 Glumetza 在 pH 1.2 HCl 介质中的溶出曲线, 结果见图 8,  $f_2$  为 85, 证明自制制剂溶出行为与 Glumetza 相似。分别对自制制剂和 Glumetza 释放曲线进行释药模型拟合, 结果见表 7, 两者均与一级释放模型相关系数最高, 为典型的经扩散机制释放的膜控型缓释制剂。



表 7 自制制剂与 Glumetza 体外释放模型拟合的方程和相关系数

Tab 7 Fitting equation and correlation coefficient for in vitro release of self-developed formulation and Glumetza

模型	自制制剂		Glumetza	
	拟合方程	相关系数	拟合方程	相关系数
零级	$M_t/M_\infty = 6.27t$	0.8714	$M_t/M_\infty = 6.33t$	0.9097
一级	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.16t$	0.9946	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.13t$	0.9981
Higuchi	$M_t/M_\infty = 28.39t^{1/2}$	0.9614	$M_t/M_\infty = 28.39t^{1/2}$	0.9741

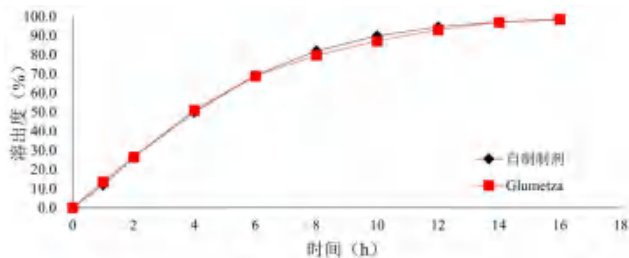


图 8 自制制剂和 Glumetza 的溶出曲线对比

Fig 8 Dissolution profiles of self-developed formulation and Glumetza

综合漂浮、膨胀和溶出曲线测试结果,可知本品具有与 Glumetza 相似的漂浮、膨胀和溶出行为,释药机制相同,因 Glumetza 是已上市的胃滞留制剂,故可以推测本品在体内也具有良好的胃滞留效果。

### 3 讨论

体内吸收较差的药物,如果快速通过十二指肠,不能被充分吸收,则其体内生物利用度会大大降低,并易导致患者的血药浓度波动大、血糖水平控制不稳。本研究基于漂浮和膨胀的原理,设计一种胃滞留型缓释片,使药物滞留于胃部,缓慢通过十二指肠,可以很好地解决上述问题。

人的胃幽门尺寸为 9 mm 左右<sup>[7-8]</sup>,因此,片的尺寸需满足最小两个维度的尺寸大于 9 mm。根据文献报道,当片的最小尺寸大于 12 mm 时,在体内可以获得良好的胃滞留效果<sup>[9-11]</sup>。盐酸二甲双胍缓释片服用方式为餐后服用,餐后胃排空时间为 2 h,故本品在设计时,制剂最小两个维度的尺寸需满足在 2 h 内膨胀至 12 mm 以上,以实现其良好的胃滞留效果。

本品开发时,根据加速 3 个月溶出变化趋势,说明本品溶出行为稳定性较好,后续将继续监测本品各关键质量属性随时间的变化趋势。另外,关于胃滞留性能的评价,主要基于体外的表征,其体内真实的胃滞留时间,还有待进一步开展体内的胃滞留性能评价。如采用同位素跟踪技术<sup>[12]</sup>、成像技术<sup>[13-14]</sup>等进行观察。

### 参考文献

- [1] Garry GG, Jeroren P, Manit A, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin [J]. Clin Pharmacokinet, 2011, 50 (2): 81-98.
- [2] Uttam KM, Bappaditya C, Faria G. Gastro-retentive drug delivery systems and their in vivo success: a recent update [J]. Asian J Pharm Sci, 2016, 11 (5): 575-584.
- [3] Li QG, Huang WH, Yang J, et al. Gastric retention pellets of edaravone with enhanced oral bioavailability: absorption mechanism, development, and in vitro/in vivo evaluation [J]. Eur J Pharm Sci, 2018, 119 (1): 62-69.
- [4] [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/021748s025lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/021748s025lbl.pdf).
- [5] Nidhal KM, Zeina DS, Nora ZY. Design and characterization of oroslippery buoyant tablets for ranitidine hydrochloride [J]. Asian J Pharm Clin Res, 2018, 11 (1): 143-149.
- [6] 蒲道俊, 徐洁, 罗娟, 等. 熔融法制备盐酸二甲双胍缓释片及其稳定性考察 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2012, 37 (7): 65-69.
- [7] Keet AD. The pyloric sphincter cylinder in health and disease [M]. 11.1. Springer Science & Business Media, 1993: 91-97.
- [8] Ishida S, Miyagawa T, O'Grady G, et al. Quantification of gastric emptying caused by impaired coordination of pyloric closure with antral contraction: a simulation study [J]. J R Soc Interface, 2019, 16 (157): 20190266.
- [9] Davis SS, Hardy JG, Fara JW. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine [J]. Gut, 1986, 27 (8): 886-892.
- [10] Davis SS, Norring-Chrestensen F, Khosla R, et al. Gastric emptying of large single unit dosage forms [J]. J Pharm Pharmacol, 1988, 40 (3): 205-207.
- [11] Hou SY, Cowles VE, Berner B, et al. Gastric retentive dosage forms: a review [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2003, 20 (6): 461-497.
- [12] Andrei D, Abid RA, Motal J, et al. Effect of water-soluble polymers on the physical stability of aqueous polymeric dispersions and their implications on the drug release from coated pellets [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36 (2): 152-160.
- [13] Chad JC, Sarmad S, Jorge B, et al. Rapid or normal gastric emptying as new supportive criteria for diagnosing cyclic vomiting syndrome in adults [J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 1491-1495.
- [14] Ankush S, Amit KG, Goutam R. Development and characterization of gastroretentive high density pellets lodged with zero valent iron nanoparticles [J]. J Pharm Sci, 2018, 107 (10): 2663-2673.

(收稿日期: 2022-06-02; 修回日期: 2022-07-02)

# 基于在体单向肠灌注模型探究去氢骆驼蓬碱衍生物 HM-Y-A 的肠吸收特性

高惠静<sup>1</sup>, 王鑫<sup>2</sup>, 李玉玲<sup>3</sup>, 卡地尔亚·库尔班<sup>2</sup>, 赵军<sup>1\*</sup>, 陈蓓<sup>1\*</sup> (1. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆第二医学院, 新疆 克拉玛依 834000)

**摘要:** 目的 考察去氢骆驼蓬碱衍生物 (HM-Y-A) 在小肠不同肠段、不同条件下的吸收特性, 探究 HM-Y-A 的吸收机制。方法 采用大鼠在体单向肠灌注模型结合 HPLC 测定法, 考察不同肠段、不同药物浓度、不同 pH 值及 P-糖蛋白抑制剂对 HM-Y-A 吸收参数 ( $K_a$  和  $P_{app}$ ) 的影响。结果 HM-Y-A 在小肠各段均有吸收, 最佳吸收肠段是十二指肠和空肠; 随着药物浓度升高, 吸收参数  $K_a$  和  $P_{app}$  不断降低, 低浓度与中、高浓度间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在 pH 6.4 和 7.4 时  $K_a$  和  $P_{app}$  显著增高 ( $P < 0.05$ ); 加入 P-糖蛋白抑制剂前后, 吸收参数差异无统计学意义。结论 HM-Y-A 在小肠全段均有吸收, 在十二指肠和空肠吸收较好; 吸收机制可能以主动吸收或促进扩散为主; 药物在偏碱性条件下吸收较好; HM-Y-A 可能不是 P-gp 的底物。

**关键词:** 去氢骆驼蓬碱衍生物; 在体单向肠灌注; 吸收特性

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0607-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.009

## Intestinal absorption of harmine derivative HM-Y-A by in situ single pass intestinal perfusion model in rats

GAO Hui-jing<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>, LI Yu-ling<sup>3</sup>, Cartiera Kurban<sup>2</sup>, ZHAO Jun<sup>1\*</sup>, CHEN Bei<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 3. The Second Medical College of Xinjiang, Karamay Xinjiang 834000)

**Abstract: Objective** To determine the absorption characteristics of harmine derivative HM-Y-A in different intestinal segments and under different conditions. **Methods** The rat single pass intestinal perfusion model combined with HPLC assay was used to determine the effect of different intestinal segments, different drug concentrations, pH values and P-glycoprotein (P-gp) inhibitors on the absorption of HM-Y-A. **Results** HM-Y-A was absorbed in the entire intestine, with the best absorption in the duodenum and the jejunum. With the increase of drug concentration, the absorption parameters  $K_a$  and  $P_{app}$  decreased continuously, with a significant difference between low concentration and medium and high concentration ( $P < 0.05$ ).  $K_a$  and  $P_{app}$  increased significantly at pH 6.4 and 7.4 ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the absorption parameters before and after adding the inhibitor. **Conclusion** HM-Y-A is absorbed in all intestinal segments, and better absorbed in the duodenum and the jejunum. The absorption mechanism may be active absorption or promotion of diffusion with better absorption in the alkaline conditions. HM-Y-A may not be a substrate for P-gp.

**Key words:** harmine derivative; in situ single pass intestinal perfusion; absorption characteristics

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No.2020D01C245)。

作者简介: 高惠静, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药/天然药物的 ADME 研究, email: gaohuijing1380@163.com

\*通信作者: 赵军, 女, 主任药师, 主要从事新药及新剂型研究, email: zhaojun700326@163.com; 陈蓓, 女, 副主任药师, 主要从事中药天然药物药理毒理研究, email: 344675962@qq.com

去氢骆驼蓬碱 (harmine, HM) 是一种三环  $\beta$ - 咪啉类生物碱, 于 1847 年首次从蒺藜科骆驼蓬属多年生草本植物骆驼蓬 (*Peganum harmala*) 的种子和根中分离出来, 现已发现广泛分布于自然界<sup>[1]</sup>。现代药理研究发现, HM 具有广泛的药理作用, 如抗肿瘤、抑菌、抗帕金森、杀虫等<sup>[2-3]</sup>, 但也具有明显的神经毒性<sup>[4-5]</sup>。本研究团队对 HM 母核 1, 3, 9 位进行结构改造合成了衍生物 HM-Y-A, 具有减毒增效的作用。

药物吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 研究是新药开发和评价的重要环节, 而吸收是其中的首要环节, 直接影响药物口服生物利用度的高低<sup>[6]</sup>。小肠是药物吸收的主要场所, 药物的吸收好坏除与自身的理化性质有关外, 还与肠道环境及分布的转运体有关<sup>[7-8]</sup>。

因此, 本研究采用经典且较为理想的大鼠在体单向肠灌流模型研究 HM-Y-A 在大鼠不同肠段的吸收情况, 同时考察药物浓度、灌流液 pH、P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂对药物吸收的影响, 以阐明 HM-Y-A 的吸收特性, 为后续口服给药系统的设计提供依据。

## 1 材料

### 1.1 试药

HM-Y-A 对照品 (新疆华世丹药业股份有限公司, 纯度 > 95%, 批号: 180813); 替硝唑对照品 (批号: 100336-201704)、盐酸维拉帕米对照品 (批号: 823A024)、环孢素 A 对照品 (批号: 045K403) (纯度  $\geq$  98%, 中国食品药品检定研究院); 无水甲酸 (天津光复精细化工研究所, 批号: 20110329); 吐温 80 (批号: 20100801, 湖南尔康制药有限公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯。

### 1.2 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), BP-211D 电子天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司), HH-S4 数显恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂), BT100-1L-A 型蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司)。

### 1.3 实验动物

健康 SD 大鼠, 雌雄各半, 8 周龄, 体质量 (200  $\pm$  20) g [新疆医科大学实验动物中心, 动物许可证号: SYXK (新) 2016-0002]。大鼠饲养于室温 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 相对湿度 (55  $\pm$  5) % 环境中。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 对照品溶液的配制** 精密称取 HM-Y-A 对照品适量, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇适量溶解, 定容至刻度, 摇匀配制成 1.00 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的

储备液, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

**2.1.2 内标溶液的配制** 精密称取替硝唑对照品 20.40 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀后, 得质量浓度为 2.04 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的替硝唑储备液, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

**2.1.3 Krebs-Ringer's (K-R) 溶液的配制** 称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、CaCl<sub>2</sub> 0.37 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.32 g、NaHCO<sub>3</sub> 1.37 g、MgCl<sub>2</sub> 0.02 g、葡萄糖 1.4 g, 加入超纯水溶解并定容至 1000 mL。其中需将 CaCl<sub>2</sub> 单独充分溶解后加入, 避免产生沉淀。用稀盐酸调节 pH 至 6.8, 即得。

**2.1.4 空白肠灌流液的配制** 用 37  $^{\circ}$ C 生理盐水将肠内容物冲洗干净后, 用不含药物的 K-R 液迅速充盈肠段, 以 0.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 的速度连续泵入肠段, 在出口处收集流出液, 作为空白肠灌流液。

**2.1.5 HM-Y-A 灌流液的制备** 称取 HM-Y-A 适量, 先加入 0.5 mL 吐温 80 (10%) 溶解, 后用 K-R 液稀释定容至 100 mL, 配制成质量浓度分别为 20、40、80  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的肠灌流液。

### 2.2 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-SP C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水 (30 : 70); 进样量 10  $\mu$ L; 流速 0.8 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 柱温 35  $^{\circ}$ C; 检测波长 302 nm。

### 2.3 样品的预处理

分别精密移取 HM-Y-A 肠灌流液 100  $\mu$ L, 加入 50  $\mu$ L 甲醇, 加入替硝唑内标溶液 50  $\mu$ L, 涡旋, 加入流动相 100  $\mu$ L, 涡旋 60 s, 于 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min (4  $^{\circ}$ C), 取上清液进样分析。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性考察** 分别取空白肠灌流液、对照品 (14.30  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) + 空白肠灌流液、含药肠灌流液, 按“2.3”项下方法处理, 进样测定, 结果见图 1。HM-Y-A 的保留时间为 11.10 min, 内标的保留时间为 8.00 min, 峰形良好, 分离完全, 肠灌流液中内源性物质对目标物质的含量测定无干扰。

**2.4.2 线性关系考察** 精密吸取 HM-Y-A 对照品溶液适量, 用空白肠灌流液稀释成质量浓度分别为 0.36、1.79、3.58、7.15、14.30、28.61、57.22、114.43  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液, 按“2.3”项下的方法处理后进样测定, 记录峰面积。以 HM-Y-A 和替硝唑峰面积之比 (Y) 对质量浓度 (X,  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 进行线性回归, 得回归方程:  $Y = 0.1381X + 0.1566$  ( $r = 0.9994$ )。结果表明, HM-Y-A 在 0.36 ~ 114.43  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 内与峰面积呈良



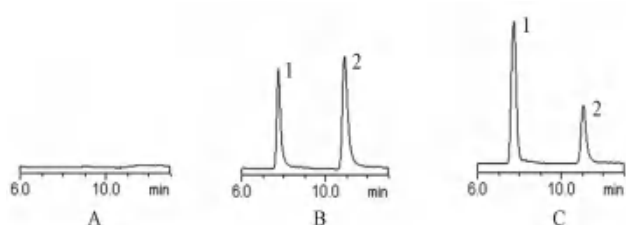


图 1 空白肠灌流液 (A)、对照品 (14.30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + 空白肠灌流液 (B)、含药肠灌流液 (C) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of blank enema (A), control (14.30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + blank enema (B), and enema with drug (C)

1. 替硝唑 (tinidazole); 2. HM-Y-A

表 1 肠灌流液中 HM-Y-A 的精密度和准确度 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab 1 Precision and accuracy of HM-Y-A in intestinal perfusion fluid ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

理论浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	日内			日间		
	测得浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD/%	准确度 / %	测得浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD/%	准确度 / %
1.00	1.01 $\pm$ 0.020	1.9	100.55	0.99 $\pm$ 0.040	4.3	98.99
8.00	7.17 $\pm$ 0.10	1.5	89.66	7.02 $\pm$ 0.14	2.0	87.72
40.00	42.91 $\pm$ 0.40	0.93	107.27	43.49 $\pm$ 0.78	1.8	108.72

**2.4.4 提取回收率考察** 按照“2.4.3”项下方法配制成低、中、高 3 个质量浓度的肠灌流液，处理后进样分析；另取空白肠灌流液，加入流动相 100  $\mu\text{L}$ ，离心处理后，再加入 HM-Y-A 标准溶液及内标，配制成低、中、高浓度肠灌流液，进样分析，根据两组测得比值计算提取回收率，得低、中、高浓度的提取回收率分别为 98.33%、95.96%、100.06%，RSD 分别为 6.8%、1.5%、2.3%。

**2.4.5 稳定性考察** 配制成低、中、高 3 个质量浓度的肠灌流液，每个浓度样品均平行 5 份，将样品分别在室温下放置 6 h，4  $^{\circ}\text{C}$  下放置 24 h 及处理后自动进样器放置 12 h，取样，处理后进样分析，记录峰面积并计算 RSD 值，结果见表 2，HM-Y-A 在肠灌流液中的稳定性良好。

表 2 肠灌流液中 HM-Y-A 的稳定性 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab 2 Stability of HM-Y-A in intestinal perfusion fluid ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

条件	理论浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	测得浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD/%
室温放置 6 h	1.90	2.05 $\pm$ 0.090	4.3
	10	10.28 $\pm$ 0.17	1.7
	50	52.51 $\pm$ 1.05	2.0
4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h	1.90	2.07 $\pm$ 0.14	6.6
	10	10.71 $\pm$ 0.11	1.1
	50	53.10 $\pm$ 0.74	1.4
自动进样器放置 12 h	1.90	2.01 $\pm$ 0.14	7.0
	10	10.18 $\pm$ 0.27	2.6
	50	52.46 $\pm$ 0.98	1.9

**2.5 肠壁吸附性考察**

好的线性关系，定量限为 0.36  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.4.3 精密度和准确度试验** 取空白肠灌流液 100  $\mu\text{L}$ ，加入 HM-Y-A 对照品溶液，配制成低、中、高 3 个质量浓度的肠灌流液 (1、8、40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，每个浓度平行 5 份，处理后连续测定 3 d。根据当天随行标准曲线测定质控样品浓度，以日内和日间相对标准差 (RSD) 考察方法精密度，以实测浓度与理论浓度的比值计算相对回收率，考察方法准确度。结果见表 1。由结果可知，方法精密度和准确度符合生物样品的分析方法要求。

剪取清洗后的大鼠十二指肠、空肠、回肠及结肠各 10 cm，用玻璃棒将黏膜层翻出，分别置于 10 mL 含药灌流液中，在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中恒温孵育，于 2 h 时测定灌流液浓度，考察大鼠肠壁对药物吸附的影响。结果见表 3，小肠各肠段的肠壁对药物基本无吸附。

表 3 肠壁物理吸附性结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 3 Physical adsorption of HM-Y-A on intestinal wall ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

肠段	理论浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	测得浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD/%	药物剩余率 / %
十二指肠	35	33.69 $\pm$ 1.04	3.1	99.09 $\pm$ 0.03
空肠	35	33.86 $\pm$ 0.65	1.9	99.59 $\pm$ 0.02
回肠	35	33.61 $\pm$ 1.00	3.0	98.86 $\pm$ 0.03
盲肠	35	34.16 $\pm$ 0.72	2.1	100.47 $\pm$ 0.02

**2.6 管路吸附性考察**

平行制备中浓度含药肠灌流液 3 份，以 0.2  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速通过蠕动泵，于 2 h 后取样，按“2.3”项下方法处理各样品，进样分析。结果蠕动泵管路对药物基本无吸附。

**2.7 大鼠在体单向灌流实验**

**2.7.1 操作方法**<sup>[9]</sup> 取禁食过夜的大鼠 (自由饮水)，腹腔注射 20% 水合氯醛溶液麻醉。背位固定，沿腹中线打开腹腔，分离出待考察肠段 (十二指肠、空肠、回肠、结肠)，取 8 ~ 10 cm 于两端切口，插管并结扎，伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿，红外灯下保温。用预热至 37  $^{\circ}\text{C}$  的生理盐水将肠内容物冲洗干净，K-R 液灌流 15 min，再用一定质量浓度的含药灌流液 (预热 37  $^{\circ}\text{C}$ ) 先

以  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌流 10 min, 再将流速调为约  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 平衡 30 min 后, 每隔 15 min 迅速更换一次已知质量的供试液小瓶和收集液小瓶, 直至 120 min, 称重, 计算灌入和收集的供试液质量。实验结束后, 剪下被考察肠段, 测量其长度 ( $L$ ) 和横截面半径 ( $r$ )。

**2.7.2 统计学处理** 按下式计算药物吸收速率常数 ( $K_a$ )、药物表观渗透系数 ( $P_{app}$ ) 和药物累积吸收量 ( $Q$ ), 式中  $V_{in}$  和  $V_{out}$  分别为灌入和收集的供试液体积;  $C_{in}$  和  $C_{out}$  分别为进口和出口处灌流液中的药物质量浓度;  $L$  和  $r$  分别为被考察肠段的长度和半径;  $t$  为灌流时间;  $Q_{in}$  为灌流速度。用 SPSS 20.0 对数据进行分析, 各组间数据比较用单因素方差分析 (ANOVA), 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

$$K_a = (1 - C_{out}/C_{in} \cdot V_{out}/V_{in}) \cdot Q_{in}/\pi r^2 L$$

$$P_{app} = -Q_{in}/2\pi r L \cdot \ln(C_{out}/C_{in} \cdot V_{out}/V_{in})$$

**2.8 不同影响因素对药物吸收的影响**

**2.8.1 不同肠段对 HM-Y-A 吸收的影响** 配制  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  HM-Y-A 肠灌流液, 对大鼠的十二指肠、空肠、回肠及结肠进行灌流, 考察同一浓度药物在不同肠段的吸收情况。灌流液在各肠段的  $P_{app}$  及  $K_a$  值结果见表 4。HM-Y-A 在各肠段均有吸收, 其中十二指肠和空肠的  $K_a$ 、 $P_{app}$  显著高于回肠和结肠 ( $P < 0.05$ ), 提示十二指肠和空肠可能为 HM-Y-A 的主要吸收部位。

表 4 HM-Y-A 同一浓度在不同肠段的吸收参数 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab 4 Absorption parameters of HM-Y-A with same concentration in different intestinal segments ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

肠段	$P_{app}/(\times 10^{-2} \cdot \text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a/(\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	$2.96 \pm 0.73^{\# \Delta}$	$14.10 \pm 1.17^{\# \Delta}$
空肠	$3.08 \pm 0.74^{\# \Delta}$	$14.35 \pm 1.14^{\# \Delta}$
回肠	$1.69 \pm 0.58$	$6.89 \pm 2.67$
结肠	$1.55 \pm 0.43$	$7.17 \pm 0.54$

注: 与回肠比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与结肠比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ileum,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the colon,  $^{\Delta}P < 0.05$ .

**2.8.2 不同 HM-Y-A 质量浓度对 HM-Y-A 吸收的影响** 选择十二指肠和空肠作为目标肠段, 分别采用低 ( $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 ( $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 质量浓度的肠灌流液对目标肠段进行灌流, 结果见表 5。随给药浓度的增加,  $K_a$ 、 $P_{app}$  均呈下降趋势, 低浓度与中、高浓度之间差异均存在统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明药物质量浓度影响 HM-Y-A 的吸收, 吸收中有高浓度饱和现象, 说明 HM-Y-A 的吸收存在自身浓度抑制, 可能有主动转运或促进扩散等转运机制参与。

表 5 HM-Y-A 不同浓度在各肠段的吸收参数 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab 5 Absorption parameters of HM-Y-A with different concentrations in different intestinal segments ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

肠段	质量浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$P_{app}/(\times 10^{-2} \cdot \text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a/(\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	20	$4.82 \pm 1.071^{\# \Delta}$	$16.33 \pm 0.77^{\# \Delta}$
	40	$2.96 \pm 0.73$	$14.10 \pm 1.17$
	80	$2.87 \pm 0.24$	$14.14 \pm 0.48$
空肠	20	$4.67 \pm 1.04^{\# \Delta}$	$16.18 \pm 0.75^{\# \Delta}$
	40	$3.08 \pm 0.74$	$14.35 \pm 1.14$
	80	$2.69 \pm 0.25$	$13.59 \pm 0.81$

注: 与中浓度比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与高浓度比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the medium concentration,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the high concentration,  $^{\Delta}P < 0.05$ .

**2.8.3 不同 pH 对 HM-Y-A 吸收的影响** 采用中浓度 ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) HM-Y-A 肠灌流液对大鼠十二指肠和空肠进行灌流, 每组 6 只大鼠。考察不同 pH 值对药物吸收的影响, 结果见表 6。吸收参数在 pH 6.4 时最大, pH 7.4 时次之, pH 5.4 时最小; pH 6.4 和 pH 7.4 时的  $K_a$ 、 $P_{app}$  比 pH 5.4 时显著增大 ( $P < 0.05$ ), 而 pH 6.4 和 pH 7.4 时的  $K_a$ 、 $P_{app}$  无显著差异。

表 6 pH 值对 HM-Y-A 吸收的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab 6 Effect of pH on intestinal absorption of HM-Y-A ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

肠段	pH	$P_{app}/(\times 10^{-2} \cdot \text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a/(\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	5.4	$1.23 \pm 0.22$	$8.74 \pm 1.06$
	6.4	$2.96 \pm 0.73^{\#}$	$14.10 \pm 1.17^{\#}$
	7.4	$2.72 \pm 0.44^{\#}$	$13.73 \pm 1.02^{\#}$
空肠	5.4	$1.20 \pm 0.25$	$8.55 \pm 1.32$
	6.4	$3.08 \pm 0.74^{\#}$	$14.35 \pm 1.14^{\#}$
	7.4	$2.83 \pm 0.60^{\#}$	$13.88 \pm 1.38^{\#}$

注: 与 pH 5.4 比,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the pH 5.4,  $^{\#}P < 0.05$ .

**2.8.4 不同 P-gp 抑制剂对 HM-Y-A 吸收的影响** 采用含有盐酸维拉帕米 / 环孢素和不含盐酸维拉帕米 / 环孢素的中浓度 HM-Y-A 肠灌流液对大鼠十二指肠进行灌流, 比较盐酸维拉帕米 / 环孢素加入前后 HM-Y-A 在空肠的吸收情况, 结果见表 7。含抑制剂的 HM-Y-A 组与不含抑制剂的组比较, 含维拉帕米组吸收参数均有下降趋势, 但差异不存在统计学意义, 推测 HM-Y-A 可能不是 P-gp 的底物。

表 7 P-gp 抑制剂对 HM-Y-A 吸收的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab 7 Effect of P-gp inhibitor on intestinal absorption of HM-Y-A ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

P-gp 抑制剂	$P_{app}/(\times 10^{-2} \cdot \text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a/(\times 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1})$
HM-Y-A	$2.41 \pm 0.19$	$13.09 \pm 0.46$
HM-Y-A + 维拉帕米	$2.23 \pm 0.11$	$12.60 \pm 0.31$
HM-Y-A + 环孢素	$1.95 \pm 0.20$	$15.47 \pm 0.97$

### 3 讨论

口服给药是慢性疾病最主要的给药方式,对于口服药物,肠道吸收是影响其药效及生物利用度的重要因素<sup>[10]</sup>。因此,考察药物口服后的吸收情况及吸收部位非常有必要。在体单向肠灌注法作为一种在体药物吸收模型,操作简单、快捷,不切断血管及神经,既保证了肠道神经及内分泌系统的完好无损,又保证了血液及淋巴液的供应,提高了生物活性,更接近药物机体的真实吸收情况<sup>[11]</sup>。

由于小肠的吸收和分泌能力非常强,在肠灌注过程中,各肠段不仅吸收药物,也会吸收和分泌水分,造成灌流液浓度的变化,因此需要通过测定水分的变化来校正药物的浓度<sup>[12]</sup>。测定水分变化常用的方法为酚红法和重量法,但酚红存在一定程度的吸收,会干扰药物的吸收和分析。因此本研究采用重量校正法,提高实验数据的准确性<sup>[13]</sup>。

药物吸收性能按  $P_{app}$  分为 3 类:当  $P_{app} < 0.18 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 显示吸收差;  $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 显示吸收完全;介于两者之间为中等吸收<sup>[14]</sup>。本研究发现, HM-Y-A 的  $P_{app}$  大于  $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 表明 HM-Y-A 在小肠易吸收。胃肠道 pH 可能会影响药物的吸收,本实验考察了 pH 对 HM-Y-A 吸收的影响,结果显示,在 pH 6.4 和 pH 7.4 时吸收显著,原因可能为: HM-Y-A 的 pKa 为 6.5 左右(课题组前期实验测得的结果),当溶液的 pH 值接近或大于 pKa 时, HM-Y-A 主要以分子形式存在,易于药物的吸收。

本实验考察不同浓度 HM-Y-A 的吸收情况,结果显示  $K_a$ 、 $P_{app}$  随浓度升高而递减,因此推测其可能的吸收机制以主动吸收或促进扩散为主;此外,还考察了 P-gp 抑制剂对 HM-Y-A 吸收的影响,结果发现其吸收不受抑制剂的影响,推测 HM-Y-A 可能不是 P-gp 的底物,但其是否为其他转运蛋白的底物,还需进一步实验研究来确定。

本研究采用在体药物吸收模型探讨了 HM-Y-A 的吸收特性,但由于药物吸收受许多复杂因素的影响,很难用单一模型或方法来准确预测药物的体内吸收过程,应该采用多种体外模型并结合体内法综合评价结果才更可靠,笔者也将进一

步采用细胞模型和血药浓度法研究 HM-Y-A 的吸收特性及机制,为 HM-Y-A 的剂型设计和临床应用提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 吕杨. 去氢骆驼蓬碱小鼠体内毒性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [2] 尹琪楠, 陈晓玲, 肖洪涛. 去氢骆驼蓬碱药理作用研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(6): 594-596, 600.
- [3] 陶婷婷. 去氢骆驼蓬碱通过 PTEN/Akt/MDM2 信号通路抑制胃癌细胞 COX-2 表达[D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- [4] 张建强. 骆驼蓬有效成分两种给药途径的毒性比较分析[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(6): 75-77, 82.
- [5] Khan H, Patel S, Kamal MA. Pharmacological and toxicological profile of harmaline- $\beta$ -carboline alkaloid: friend or foe[J]. Curr Drug Metab, 2017, 18(9): 853-857.
- [6] 李树威. 喜树碱衍生物 CZ48 肠吸收特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- [7] 戴志浩, 朱裕林, 陈卫东. 在体单向肠灌注法研究 - 蜕皮甾醇在体肠吸收特性[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 687-691.
- [8] 刘婉霞, 陈瑞, 班玉娟, 等. 基于在体单向肠灌注法探究刺囊酸的大鼠肠吸收特性[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(10): 998-1002.
- [9] 王丽峰, 国大亮, 黄富强, 等. 大鼠在体单向肠灌注法对核黄素肠吸收的研究[J]. 药学研究, 2016, 35(3): 136-138.
- [10] 罗莉, 张玉珊, 刘谢英, 等. 两色金鸡菊总黄酮化学成分肠道吸收特性研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1490-1497.
- [11] 张燕. 在体单向肠灌注与 Caco-2 细胞模型研究黄连解毒汤主要指标成分及其在复方配伍环境中的肠吸收机理[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [12] 于绍华, 朱立俏, 李传厚, 等. 在体单向肠灌注模型研究萝卜苷的肠吸收特性[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3273-3276.
- [13] Yang XD, Wang C, Zhou P, et al. Absorption characteristic of paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate (CP-25) in situ single-pass intestinal perfusion in rats[J]. Xenobiotica, 2016, 46(9): 775-783.
- [14] 胡强. 基于在体单向肠灌注与 Caco-2 细胞模型的四制香附主成分的肠吸收机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.

(收稿日期: 2022-06-08; 修回日期: 2022-08-10)



## 阳离子化白及多糖作为非病毒基因载体的初步研究

王小旭, 杜昊洋, 姜美如, 林锋\* (哈尔滨医科大学药学院有机化学教研室, 哈尔滨 150081)

**摘要:** 目的 构建高效低毒的非病毒基因载体, 负载组成型光形态发生因子 9 信号复合体 (CSN) 的第六亚基 CSN6 的 siRNA 干扰片段, 考察其对人肝癌细胞的生物学作用。方法 利用白及多糖和聚乙烯亚胺合成阳离子聚合物, 其结构经红外光谱、核磁共振、Zeta 电位和粒径进一步表征确证; 利用其负载 DNA 及 siRNA 进行凝胶阻滞实验检测其对上述分子的结合和保护能力; 利用 MTT 法检测其在不同细胞中的细胞毒性; 利用阳离子聚合物将荧光标记的 siRNA 转染至人肝癌细胞中, 荧光显微镜下观察; 将聚合物与 CSN6 siRNA 干扰片段的复合物转染至人肝癌细胞, 并利用 Western blot 法进一步对 CSN6 siRNA 的干扰效率进行检测; 抑制 CSN6 基因的表达, 采用 MTT 法和克隆形成实验对人肝癌细胞增殖作用的影响进行检测。结果 红外光谱、核磁共振氢谱、Zeta 电位和粒径检测结果显示, 白及多糖接枝聚乙烯亚胺载体构建成功; 凝胶阻滞结果显示, 载体能够成功与核酸分子相结合; Western blot 结果显示, 将 CSN6 siRNA 干扰片段转染至人肝癌细胞后, 能够有效下调细胞中 CSN6 基因的蛋白表达水平; MTT 和克隆形成实验结果显示, 抑制 CSN6 基因的表达能够抑制人肝癌细胞增殖。结论 利用白及多糖接枝聚乙烯亚胺构建了一种高效低毒的非病毒基因载体, 利用其负载 CSN6 siRNA 干扰片段能够有效抑制人肝癌细胞的增殖作用。

**关键词:** 白及多糖; 聚乙烯亚胺; CSN6 siRNA; 基因载体

中图分类号: R285, TQ460.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0612-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.010

### Preliminary study on cationic *Bletilla striata* polysaccharide as a non viral gene vector

WANG Xiao-xu, DU Hao-yang, JIANG Mei-ru, LIN Feng\* (*Department of Organic Chemistry, College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081*)

**Abstract: Objective** To construct a non viral gene vector with high efficiency and low toxicity, load the siRNA interference fragment of CSN6, the sixth subunit of the constitutive light morphogenetic factor 9 signal complex (CSN), and determine its biological effect on human hepatoma cells. **Methods** The cationic polymer was synthesized from polysaccharides and polyethyleneimine, whose structure was further characterized by IR, NMR, Zeta potential and particle size. Gel retardation experiments were conducted with DNA and siRNA loaded on it to test its binding and protective ability against the above molecules. MTT assay was used to detect its cytotoxicity in different cells. Fluorescently labeled siRNA was transfected into human hepatoma cells with cationic polymers and observed with a fluorescence microscope. The complex of the polymer and CSN6 siRNA interference fragments was transfected into human hepatoma cells, and the interference efficiency of CSN6 siRNA was further detected by Western blot. The expression of CSN6 gene was inhibited and the effect on the proliferation of human hepatoma cells was detected by MTT assay and clonogenic assay. **Results** The IR, <sup>1</sup>H NMR, Zeta potential and particle size showed that the polyvinylimine grafted with polysaccharide was successfully constructed. The gel retardation showed that the carrier successfully

基金项目: 黑龙江省科学基金项目 (No.LH2020H026); 2021 年哈尔滨医科大学大学生创新创业训练计划项目 (No.202110226159)。

作者简介: 王小旭, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学、肿瘤学研究, email: 747350634@qq.com \*通信作者: 林锋, 女, 副教授, 主要从事天然高分子化合物的修饰及肿瘤分子生物学研究, email: xiaolin\_linfeng@126.com

combined with nucleic acid molecules. Western blot showed that the CSN6 siRNA interference fragment transfected into human hepatoma cells effectively knocked down the protein expression level of CSN6 gene in the cells. MTT assay and clonogenic assay showed that inhibiting the expression of CSN6 also inhibited the proliferation of human hepatoma cells. **Conclusion** A non viral gene vector with high efficiency and low toxicity is constructed by grafting polyvinylimine onto leucorrhea polysaccharides. CSN6 siRNA interference fragments can effectively inhibit the proliferation of human hepatoma cells.

**Key words:** Bletilla striata polysaccharide; polyethyleneimine; CSN6 siRNA; gene vector

目前, 癌症的治疗方法以手术为主, 还有激素治疗、骨髓移植、化疗、放疗和免疫治疗等方法, 但由于这些治疗手段缺少靶向性, 所以不良反应较大。研究表明, 恶性肿瘤的发生与原癌基因和抑癌基因的异常表达密切相关<sup>[1]</sup>, 随着基因治疗概念的提出, 因其具有较强的靶向性<sup>[2]</sup>, 受到广泛关注。RNA 干扰技术是基因治疗中的一种常用技术, 它可以利用 21 ~ 23 bp 双链的小 RNA 来诱导与其同源序列的 mRNA 的降解, 进而特异性、高效性地阻断癌基因的表达, 最终达到抑制肿瘤细胞生长的目的<sup>[3]</sup>。癌基因 CSN6 在胰腺癌<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>、肝癌等多种肿瘤细胞中高表达<sup>[7]</sup>。利用 RNA 干扰技术, 在肝癌细胞中转染 CSN6 siRNA 干扰片段, 抑制 CSN6 基因的表达, 进而观察其对肝癌细胞生物学功能的影响的研究具有重要意义。基因治疗过程复杂, 其中, 核酸分子成功被递送进入细胞是关键步骤之一。那么, 寻找一种免疫原性低、来源广泛、制备方便并且转染效率高的基因载体非常必要。

基因载体分为病毒基因载体和非病毒基因载体两大类, 病毒基因载体的安全性较低, 且费用较高<sup>[8]</sup>; 非病毒基因载体制备方便、转染效率高、毒性低, 由此在基因递送领域受到广泛关注。聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 是近年来最受青睐的非病毒基因载体, 每三个原子就有一个可质子化的氨基氮原子, 使其几乎在任何 pH 条件下都可以体现“质子海绵”的特性<sup>[9]</sup>, 在基因传递方面具有重要作用。与常见的基因载体——脂质体相比, PEI 转染效率高, 细胞毒性低<sup>[10]</sup>。但 PEI 仍具有一定的局限性。高分子质量 PEI 转染效率高, 但毒性大; 低分子质量 PEI 毒性低, 但基因转染能力较差<sup>[11]</sup>。研究发现可以对特定分子量的 PEI 进行修饰, 以保证安全低毒的条件下尽可能提高其转染率。

白及多糖 (Bletilla striata polysaccharide, BSPs) 具有天然大分子骨架结构, 并且具有无毒无害、生

物兼容性、生物可降解性等优点。BSPs 是由葡萄糖和甘露糖以  $\beta$ -糖苷键聚合而成<sup>[12]</sup>, 其结构中含有大量羟基, 可通过化学修饰, 与 PEI 中的氨基结合。目前, 利用 BSPs 大分子骨架结构接枝低分子量 PEI 作为基因载体, 以构建高效低毒性非病毒基因载体的研究尚未见报道。本研究利用 BSPs 接枝低分子量 PEI 合成阳离子聚合物 (BSPs-PEI) 作为基因载体, 将 CSN6 siRNA 高效递送到肝癌细胞中, 并对其抗肿瘤作用进行初步探索。

## 1 材料

人肝癌细胞 (HepG2)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、白及多糖 (西安泽朗生物科技有限公司), *N,N*-羰基二咪唑 (萨恩化学技术有限公司), 聚乙烯亚胺 (阿拉丁), 无水乙醇、三乙胺 (天津富宇精密化工有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 德国 Biofrox 公司), RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (北京赛奥美细胞技术有限公司), 链霉素-青霉素 (北京碧云天生物技术有限公司), Lipofectamine 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司), siRNA 序列 (苏州吉玛基因股份有限公司), 噻唑蓝 (MTT, 德国 Biofrox 公司), CSN6 抗体 (美国 Enzo 公司), TUBULIN (美国 Proteintech Group 公司)。

## 2 方法

### 2.1 BSPs-PEI 聚合物的合成及表征

将 BSPs 溶于 DMSO, *N,N*-羰基二咪唑溶于 DMSO 后缓慢滴加到 BSPs 溶液中, 加入少量三乙胺, 匀速搅拌, 在氮气保护的条件下避光反应 3 h, 得到活化液。低分子量的聚乙烯亚胺 (分子量 600) 溶于 DMSO, 缓慢滴加到活化液中, 再滴加 0.1 mL 三乙胺, 充分反应 24 h 后, 醇沉洗涤, 即得, 合成示意图见图 1。利用傅里叶红外光谱 (波数范围是 4000 ~ 500  $\text{cm}^{-1}$ )、核磁共振氢谱 ( $\text{D}_2\text{O}$  为溶剂, TMS 为内标)、马尔文激光粒度仪 (温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ) 和透射电镜对 BSPs-PEI 进行表征。

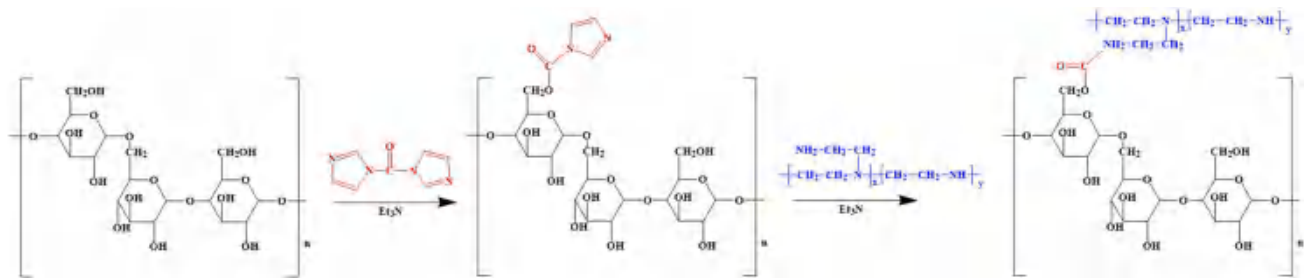


图 1 BSPs-PEI 聚合物的合成示意图

Fig 1 Composite diagram of BSPs-PEI polymer

## 2.2 凝胶阻滞实验

分别将 BSPs-PEI 溶液 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 加入到含 DNA 或 siRNA 溶液的 EP 管中, 配成质量比为 0.5 : 1、1 : 1、2 : 1、4 : 1、8 : 1、16 : 1、32 : 1 的复合物溶液, 室温静置 30 min, 将 BSPs-PEI 与 DNA 或 siRNA 的复合物与 Loading buffer 混合, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳。其中电压 110 V, 电泳时间为 30 min。

## 2.3 细胞培养

复苏后的 MCF-7、HepG2、HUVEC 细胞用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素) 培养, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温孵箱中, 隔日换液, 待细胞融合至 80% 后传代, 继续在孵箱中培养。

## 2.4 细胞毒性实验

培养 MCF-7、HepG2、HUVEC 细胞至对数生长期, 利用胰酶消化细胞, 血球计数板计数, 每孔细胞接种密度为 3000 个, 接种于 96 孔培养板中, 培养 16 h 加入 BSPs-PEI 或 BSPs-PEI/DNA 复合物, 继续培养 48 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 放置培养箱中 4 h, 用移液枪吸去上清液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶液, 摇床缓慢震荡 10 min, 结晶充分溶解后, 用酶标仪测定 490 nm 波长处各孔的吸光度 ( $A$ )。计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) =  $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

## 2.5 克隆形成实验

取转染干扰片段 48 h 后生长状态良好的 HepG2 细胞, 经胰蛋白酶消化后, 按照 300 个 / 孔的密度将细胞接种在 6 孔板中, 每 3 日更换培养基, 培养 10 d。弃去原始培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 固定免疫染色溶液 15 min, PBS 洗涤 2 次, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗, 干燥后拍照。

## 2.6 细胞转染实验

将细胞用胰酶消化, 不完全培养基 (不含双抗) 轻轻吹打, 并接种到 60 mm 培养皿中, 细胞

密度为 60%。OPTI-MEM 培养基稀释转染试剂, 与样品混合获得转染复合物, 室温静置 20 min。用 RPMI 1640 培养基洗涤细胞 2 次, 并向培养皿中加入 3 mL RPMI 1640 培养基, 将已在室温稳定 20 min 的转染复合物滴加到培养皿中, 轻轻摇匀。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 4 h, 弃去转染复合物, 并加入 4 mL 完全培养基, 继续培养。

## 2.7 Western blot

按照实验设计将干扰片段转染到细胞中, 培养 72 h 后, 分别加入 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液、1  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂和 1  $\mu\text{L}$  磷酸酶抑制剂, 裂解细胞, 提取蛋白。将收集的蛋白煮沸 5 min, 冷却至室温后置于低温超速离心机  $4^\circ\text{C}$ 、12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 吸取上清液测定浓度, 与蛋白上样缓冲液混匀。按照计算好的蛋白浓度上样, 凝胶电泳, 电压为 80 V, 30 min 后电压调至 120 V, 继续电泳 2 h。将凝胶取出, 设置电流 200 mA, 时间 1.5 h, 转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 孵育一抗,  $4^\circ\text{C}$  过夜, PBST 洗涤 4 次, 每次 15 min, 避光孵育二抗 2 h, PBST 洗涤 4 次, 每次 15 min, 扫膜。

## 2.8 统计学方法

所有实验重复 3 次, 实验数据均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 条带结果利用 Quantity one 软件进行密度扫描并将其灰度值用于统计, 用 SPSS 统计分析软件中 ANOVA 单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 BSPs-PEI 聚合物的合成及结构表征

BSPs 和 BSPs-PEI 的红外光谱图所示, BSPs-PEI 在  $3259.69 \text{ cm}^{-1}$  的羟基 (-OH) 吸收峰减弱,  $2831.50 \text{ cm}^{-1}$  处亚甲基 (- $\text{CH}_2$ -) 伸缩振动峰宽增宽,  $1745.57 \text{ cm}^{-1}$  和  $1575.84 \text{ cm}^{-1}$  处出现新的特征峰, 分别为酯羰基和酰胺键上的 N-H 弯曲振动峰 (见图 2A); BSPs 和 BSPs-PEI 的核磁共振氢谱图所示, 与 BSPs 相比, BSPs-PEI 在  $\delta 2.5 \sim 3.0$



处出现新的特征峰,为 PEI 中  $-\text{CH}_2\text{NH}-$  中的氢质子峰(见图 2B), FT-IR 和  $^1\text{H-NMR}$  的结果说明 PEI 已经成功接枝在 BSPs 骨架上。分别对 BSPs

和 BSPs-PEI 的 Zeta 电位进行检测,结果显示,与 BSPs 相比,修饰后的 BSPs-PEI 电位由负变正(见图 2C),进一步证实 BSPs-PEI 聚合物合成成功。

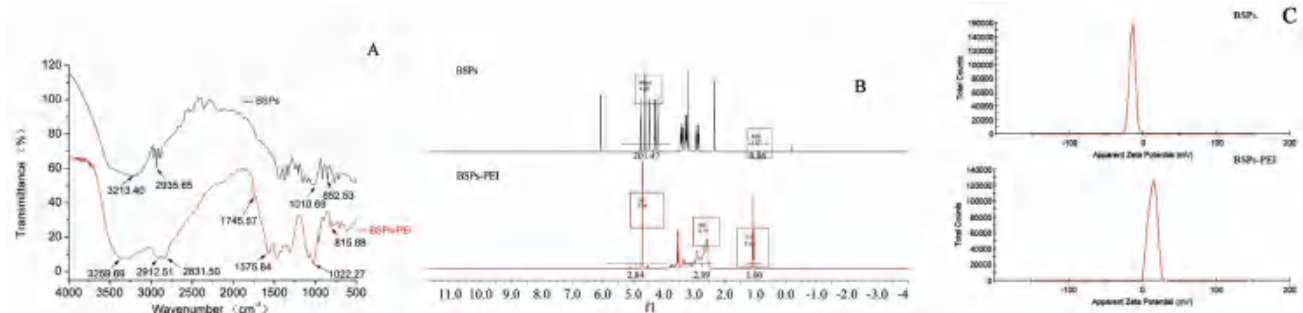


图 2 BSPs 和 BSPs-PEI 聚合物的结构表征

Fig 2 Structural characterization of BSPs and BSPs-PEI polymers

A. 红外光谱 (FT-IR spectrum); B. 核磁共振氢谱 ( $^1\text{H-NMR}$  spectra); C. Zeta 电位图谱 (Zeta potential spectra)

### 3.2 BSPs-PEI 聚合物及其负载 DNA 的电位与粒径

BSPs-PEI 聚合物的外观为淡黄色黏稠固体;从透射电镜图像可以看出,其粒径在 200 nm 以内,大小适宜,边界清晰,呈圆形或类圆形致密颗粒;动态光散射结果显示其粒径为 151.9 nm,与透射电镜下观察结果一致(见图 3A)。BSPs-PEI 结构中含有大量氨基显正电性, DNA 或 siRNA 自身呈现负电性,两者在溶液中可自发结合形成致密的带电纳米微粒;BSPs-PEI 聚合物与 DNA 结合形成的复合物的质量比从 0.5 : 1 到 16 : 1 均显示为正电性(见图 3B),能够通过静电作用的原理,与细胞膜表面负电荷相互吸引,将基因片段递送到细胞中;BSPs-PEI 聚合物与 DNA 结合形成的复合物粒径从质量比为 4 : 1 也开始趋于稳定,而在质量比为 8 : 1 时其粒径最小,最易进入细胞(见图 3C)。

### 3.3 BSPs-PEI 聚合物与基因的结合能力及安全性评价

不同质量比下的 BSPs-PEI 与基因结合的复合物电泳结果见图 4A,泳道 1~7 为 BSPs-PEI 与 DNA/siRNA 结合的复合物,质量比依次为 0.5 : 1、1 : 1、2 : 1、4 : 1、8 : 1、16 : 1、32 : 1,其质量比从 1 : 1 增加到 32 : 1,基因均可被完全阻滞在胶孔内部, BSPs-PEI 具有较强的基因结合与保护能力。MTT 法对 BSPs-PEI 的安全性进行评价,检测 BSPs-PEI 以及 BSPs-PEI/DNA 复合物在肿瘤细胞以及正常细胞中的细胞毒性, BSPs-PEI 的质量浓度从  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  增加到  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 3 种细胞的存活率均在 80% 以上;随着 BSPs-PEI 聚合物与 DNA 的质量比增加至 8 : 1, 3 种细胞存活率依然均在 80% 以上(见图 4B), BSPs-PEI 是一种安

全性较高的聚合物。因此,选择 BSPs-PEI 聚合物与基因的质量比为 8 : 1 进行后续实验。

### 3.4 靶向 CSN6 基因 siRNA 序列的筛选

在 HepG2 细胞中分别以 Lipofectamine 2000 试剂转染阴性对照 siRNA (NC siRNA)、CSN6 siRNA<sub>1</sub>、CSN6 siRNA<sub>2</sub> 和 CSN6 siRNA<sub>3</sub>, 72 h 后收集蛋白。通过 Western blot 实验对各组 CSN6 蛋白表达量进行检测,结果表明,与转染 NC siRNA 细胞组相比,转染 CSN6 siRNA<sub>1</sub> 或 CSN6 siRNA<sub>2</sub> 细胞组中,CSN6 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ , 见图 5),因此,后续实验选择 CSN6 siRNA<sub>1</sub>。

### 3.5 BSPs-PEI 聚合物负载 siRNA 干扰片段转染效率及干扰效率的检测

利用 BSPs-PEI 将 CSN6 siRNA 转染到 HepG2 细胞中,以 Lipofectamine 2000 试剂转染 CSN6 siRNA 作为对照组,质量比为 8 : 1、16 : 1 和 32 : 1 时 BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物的转染效果见图 6A,在 3 种不同质量比下, BSPs-PEI 均能将 CSN6 siRNA 转染到细胞中,且转染效率均高于对照组;BSPs-PEI 递送 CSN6 siRNA 至 HepG2 细胞中,与对照组相比,72 h 后 CSN6 蛋白表达水平显著下调 ( $P < 0.001$ )(见图 6B),可见 BSPs-PEI 能够更有效地将 CSN6 siRNA 递送到细胞中。

### 3.6 BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物对 HepG2 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示, BSPs-PEI 组细胞存活率高于 Lipo 2000 组; Lipo 2000/CSN6 siRNA 组细胞存活率高于 Lipo 2000/NC 组,但差异无统计学意义,而 BSPs-PEI/CSN6 siRNA 组细胞存活率高于 BSPs-PEI/NC 组 ( $P < 0.05$ )(见图 7A)。克隆形成实验结果显示,与 BSPs-PEI/NC siRNA 组相比, BSPs-PEI/

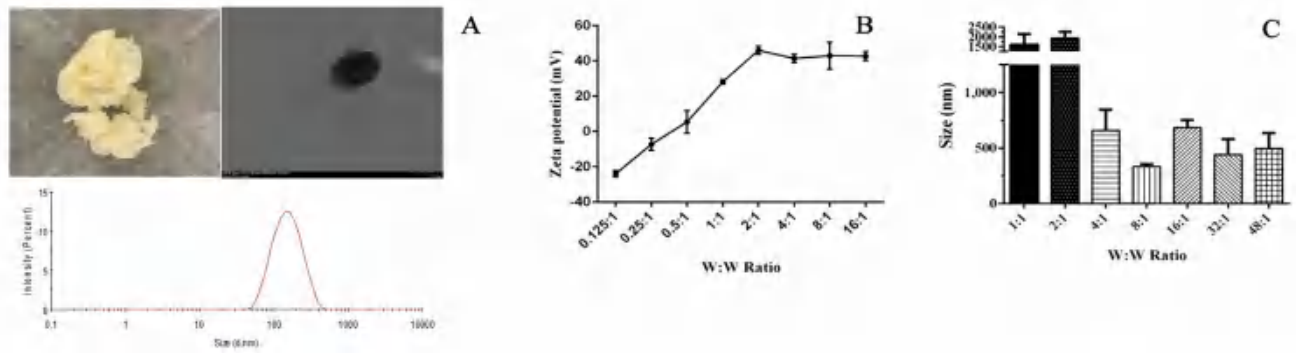


图3 BSPs-PEI 聚合物 (A) 及其与 DNA 结合的电位 (B) 及粒径 (C) 变化

Fig 3 Binding potential and particle size of BSPs-PEI polymer and BSPs-PEI polymer to DNA

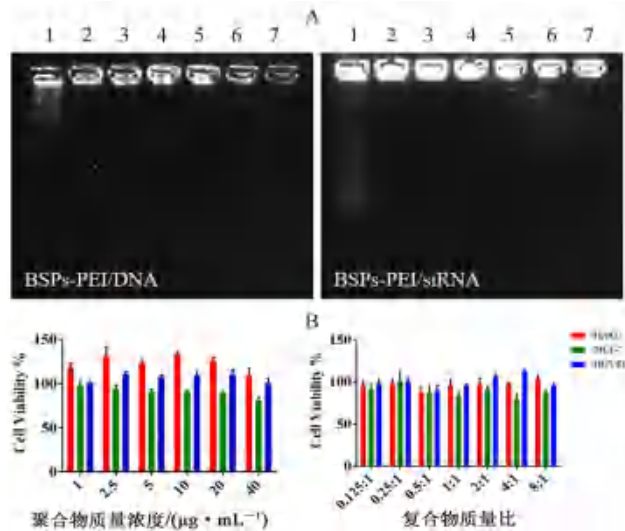


图4 BSPs-PEI 聚合物与基因的结合能力 (A) 及细胞毒性 (B)

Fig 4 Binding ability and cytotoxicity of BSPs-PEI polymers to genes

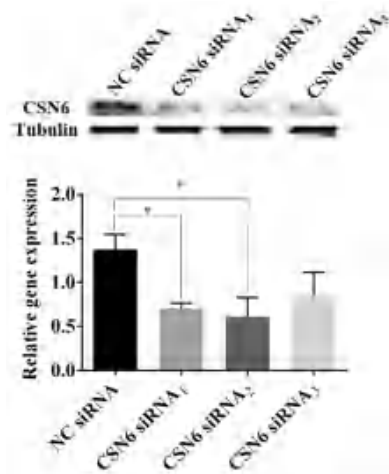


图5 抑制 CSN6 表达及干扰效率鉴定 (\*P < 0.05)

Fig 5 Inhibition of CSN6 expression and identification of interference efficiency (\*P < 0.05)

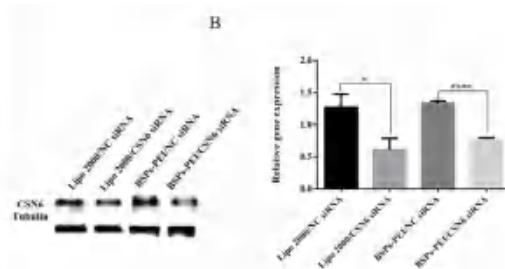
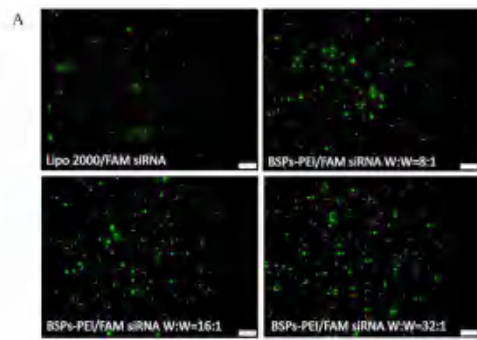


图6 BSPs-PEI/siRNA 复合物的转染效率 (A) 及干扰效率检测 (B) (\*P < 0.05, \*\*\*\*P < 0.001)

Fig 6 Detection of transfection efficiency and interference efficiency of BSPs-PEI/siRNA complex (\*P < 0.05, \*\*\*\*P < 0.001)

CSN6 siRNA 进入细胞, 抑制 CSN6 基因表达时, 克隆形成能力明显降低 (见图 7B)。

#### 4 讨论

基因治疗的关键在于选择高效的基因载体, 将基因安全、靶向地导入到细胞中。本研究成功构建了一种高效低毒的非病毒基因载体, 通过红外光谱、核磁共振氢谱、Zeta 电位和粒径检测等方法对其结构进行表征; 利用 MTT 实验对其安全性进行评价, 实验结果表明该载体具有良好的

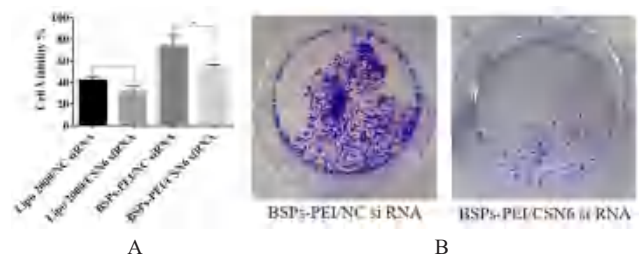


图7 BSPs-PEI/CSN6 siRNA 对 HepG2 细胞增殖的影响 (\*P < 0.05)

Fig 7 Effect of BSPs-PEI/CSN6 siRNA on HepG2 cell proliferation (\*P < 0.05)

生物相容性, 在正常细胞和肿瘤细胞中细胞存活率均达到 80% 以上。阳离子聚合物在溶液中可与基因自发结合形成纳米微球<sup>[13]</sup>, 通过检测复合物的 Zeta 电位和粒径以及凝胶阻滞实验, 均可证实该聚合物能够有效地与基因相结合。

BSPs-PEI 结构中含有大量氨基, 显正电性, 通过检测 Zeta 电位发现 BSPs-PEI 与基因结合后, 仍显示出正电性, 而由于细胞膜的主要成分是磷脂双分子层, 磷酸基团靠外侧且带有负电荷, 能够通过静电吸引作用与细胞结合<sup>[14]</sup>, 由于 BSPs 是由葡萄糖和甘露糖聚合而成的, 可以通过细胞表面甘露糖受体识别进入细胞, 双重机制促使 BSPs-PEI 具有较高的转染效率。本研究 Western blot 结果显示, BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物能够抑制 HepG2 细胞中 CSN6 基因的表达, 并且对于 CSN6 基因的抑制率优于对照组, 这说明 BSPs-PEI 有望成为新型非病毒转染载体。MTT 和克隆形成实验结果表明, BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物能够抑制 HepG2 细胞增殖, 与 Lipo 2000/CSN6 siRNA 组相比, BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物在转染 48 h 后, 即可显著抑制 HepG2 细胞增殖, 可以推测出 BSPs-PEI/CSN6 siRNA 复合物在转染 48 h 后, 即可较强地抑制 CSN6 基因的表达。

综上所述, BSPs-PEI 是一种高效、生物安全性高的非病毒基因载体, 利用 BSPs-PEI 负载 CSN6 干扰片段导入 HepG2 细胞中, 能够通过抑制细胞增殖发挥抗肿瘤作用。

### 参考文献

- [1] Sager R. Genetic suppression of tumor formation: a new frontier in cancer research [J]. *Cancer Res*, 1986, 46 (4 Pt 1): 1573-1580.
- [2] Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 273-288.
- [3] Xin Y, Huang M, Guo WW, et al. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16 (1): 134.
- [4] Shi J, Guan X, Zhan F, et al. CSN6 expression is associated with pancreatic cancer progression and predicts poor prognosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20 (9): 1290-1299.
- [5] 卓长华, 阮强, 林瑞榕, 等. 胃癌组织中 CSN6 的表达及临床意义 [J]. *吉林医学*, 2021, 42 (6): 1294-1298.
- [6] Mou J, Wei L, Liang J, et al. CSN6 promotes the cell migration of breast cancer cells by positively regulating Snail1 stability [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17 (17): 2809-2818.
- [7] 曲雁飞, 刘超, 王勃军, 等. CSN6 基因在肝细胞癌组织中的表达及临床意义 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33 (4): 328-333.
- [8] Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80 (1): 35-47.
- [9] Boussif O, Lezoualc HF, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (16): 7297-7301.
- [10] Demeneix B, Behr JP. Polyethylenimine (PEI) [J]. *Adv Genet*, 2005, 53: 217-230.
- [11] Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, et al. Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver [J]. *Mol Ther*, 2003, 7 (2): 254-261.
- [12] 王博, 徐莎, 黄琳娟, 等. 白芨多糖 BSPI-A 的分离纯化及结构研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31 (17): 120-123.
- [13] Cherstvy AG. Electrostatic interactions in biological DNA-related systems [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13 (21): 9942-9968.
- [14] Palermo EF, Lee DK, Ramamoorthy A, et al. Role of cationic group structure in membrane binding and disruption by amphiphilic copolymers [J]. *J Phys Chem B*, 2011, 115 (2): 366-375.

(收稿日期: 2022-07-25; 修回日期: 2022-09-14)



# 基于微流控芯片技术的瘀血痹胶囊治疗类风湿关节炎处方分析

唐颖<sup>1</sup>, 包永睿<sup>1, 2, 3</sup>, 王帅<sup>1, 2, 3</sup>, 李天娇<sup>1, 2, 3</sup>, 孟宪生<sup>1, 2, 3\*</sup>, 于睿<sup>4</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心, 辽宁大连 116600; 3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600; 4. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**摘要:** **目的** 基于微流控芯片技术, 进行瘀血痹胶囊治疗类风湿关节炎处方分析, 为瘀血痹胶囊的物质基础研究提供实验依据。 **方法** 以瘀血痹胶囊 11 味中药为研究对象, 基于微流控芯片技术设计并制作治疗类风湿关节炎的药效筛选芯片, 按均匀设计方法所得 22 个不同配伍组进行给药干预, 以细胞凋亡率为评价指标, 建立回归方程得到瘀血痹胶囊药效最佳的药物组合及其最优配比, 并与原方进行药效差异性分析。 **结果** 与空白对照组比较, 瘀血痹胶囊各配伍组均能诱导 RA-FLSs 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )。根据逐步回归分析结果, 乳香、没药、姜黄、丹参药物组合诱导 RA-FLSs 细胞凋亡效果最佳, 最佳配比为乳香 ( $X_1$ ):没药 ( $X_2$ ):姜黄 ( $X_{10}$ ):丹参 ( $X_{11}$ ) = 2.628 : 2.946 : 4.208 : 6.852。将筛选出的复方与瘀血痹胶囊进行药效差异性对比, 在相同剂量时, 4 味中药按最优配比得到的复方 (简称最优配伍方), 与按原方比例仅含 4 味中药配伍的复方 (简称筛选方) 诱导细胞凋亡作用相当, 且筛选方能够达到瘀血痹胶囊作用的 77% 左右。 **结论** 本研究基于微流控芯片技术, 得到乳香、没药、姜黄、丹参的药物组合是瘀血痹胶囊处方中发挥治疗类风湿关节炎作用的主要组成。

**关键词:** 瘀血痹胶囊; 均匀设计; 类风湿关节炎; 微流控芯片

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0618-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.011

## Prescription analysis of Yuxuebi capsules for rheumatoid arthritis based on microfluidic chip technology

TANG Ying<sup>1</sup>, BAO Yong-rui<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Shuai<sup>1, 2, 3</sup>, LI Tian-jiao<sup>1, 2, 3</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1, 2, 3\*</sup>, YU Rui<sup>4</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Liaoning Multi-Dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine Technical Innovation Center, Dalian Liaoning 116600; 3. Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian Liaoning 116600; 4. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

**Abstract: Objective** To analyze the prescription of Yuxuebi capsules for rheumatoid arthritis to provide material basis for research by microfluidic chip technology. **Methods** Totally 11 traditional Chinese medicines in Yuxuebi capsules were selected as the research object. A pharmacodynamic screening chip for rheumatoid arthritis was designed and produced based on microfluidic chip technology, and 22 matching groups were intervened with uniform design method. The apoptosis rate was taken as the evaluation index, the regression equation was established to determine the best efficacy of Yuxuebi capsules for drug combinations and their optimal ratios, and the efficacy difference was analyzed with the original formula. **Results** Compared with the blank control group, all compatible groups of Yuxuebi capsules induced the apoptosis of RA-FLSs cells ( $P < 0.01$ ). According to stepwise regression analysis, the combination with the best effect on inducing the apoptosis of RA-FLSs cells consisted of olibanum, myrrha, curcumae longae and salvia miltiorrhiza, and the optimal ratio was olibanum ( $X_1$ ) : myrrha

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目 - 工业重大专项 (No.2020JH1/10100022)。

作者简介: 唐颖, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: 1472453274@qq.com \*通信作者: 孟宪生, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质组学及作用机制整合研究, email: mxsvvv@126.com

( $X_2$ ) : curcuma longae ( $X_{10}$ ) : salvia miltiorrhiza ( $X_{11}$ ) = 2.628 : 2.946 : 4.208 : 6.852. The efficacy difference between the screened compound and Yuxuebi capsules was compared: at the same dose, the compound obtained according to the optimal ratio of the 4 traditional Chinese medicines (referred to as the optimal compatible formula) showed similar apoptosis induction with the compound containing only 4 traditional Chinese medicines in the original ratio (referred to as the screened formula); and the screened formula reached about 77% of the effect of Yuxuebi capsules. **Conclusion** Drug combination of olibanum, myrrh, curcuma longae and salvia miltiorrhiza based on microfluidic chip technology, proves to be the main components in Yuxuebi capsules prescription for rheumatoid arthritis.

**Key words:** Yuxuebi capsule; uniform design; rheumatoid arthritis; microfluidic chip

微流控芯片 (microfluidic chip) 又称芯片实验室 (Lab on a chip), 是一种能够实现微流体界面精确操作的技术平台<sup>[1]</sup>。目前, 微流控芯片技术广泛应用于细胞分析、药物筛选、基因蛋白检测、生化分析以及化学合成等领域, 实现集成化和自动化发展, 已成为备受关注的前沿分析技术之一<sup>[2]</sup>。

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性自身免疫性疾病, 主要表现为侵蚀性关节炎, 严重的可出现关节畸形和功能丧失, 致残率较高。我国 0.2% ~ 0.4% 的人口患有 RA, 多在中老年女性中发生<sup>[3]</sup>。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLSs) 的异常增生、迁移和血管化会导致局部关节的破坏, 是 RA 持续性滑膜炎和骨破坏形成过程中的重要因素<sup>[4-6]</sup>。因此, 抑制成纤维样滑膜细胞增殖, 促进其凋亡尤为重要。RA 中医属“痹病”范畴, 病机以正虚为本, 风寒湿热等外邪侵袭为标。历代医家认为“瘀”存在于 RA 发生发展的整个过程, 活血化瘀类药能够改善 RA 症状<sup>[7-9]</sup>。

瘀血痹胶囊是由乳香、没药、红花、川芎、香附、当归、炙黄芪、威灵仙、川牛膝、姜黄、丹参 11 味中药组成的复方制剂, 主要成分有槲皮素、木犀草素、姜黄素、鞣花酸等, 具有活血化瘀、通络止痛之功<sup>[10]</sup>, 主要用于治疗瘀血阻络所致的痹病, 对关节炎治疗效果显著<sup>[11]</sup>, 但其中发挥抗 RA 作用的物质基础尚不明确。故本研究基于微流控芯片技术设计并制作细胞凋亡特征的药效筛选芯片, 给予不同中药配伍组对人类类风湿关节炎滑膜成纤维 (RA-FLSs) 永生细胞 (后文简称 RA-FLSs 细胞) 进行干预, 通过测定细胞凋亡情况, 开展该方不同剂量配伍组对治疗 RA 的药效学研究, 并将筛选得到的新配伍复方与瘀血痹胶囊进行药效差异性分析, 进一步分析瘀血痹胶囊处方对治疗 RA 的作用, 为该方的临床使用提供科学的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); NIKON ECLIPSE 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); LSP04-1A 型精密注射泵 (保定兰格公司); TG-2U 型光刻机 (北京中科同志科技有限公司); HPDC-32G-2 型等离子清洗机 (美国 Harrick Plasma 公司); SpectraMax Plus<sup>384</sup> 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

### 1.2 试药

RA-FLSs 细胞 [赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司]; 乳香 (制)、没药 (制)、红花、威灵仙、川牛膝、香附 (制)、姜黄、当归、丹参、川芎、炙黄芪 (辽宁上药好护士药业有限公司), 经辽宁中医药大学许亮教授鉴定合格。细胞增殖及毒性检测试剂盒 (美仑生物技术有限公司); 胰蛋白酶、细胞冻存液 (赛文创新生物科技有限公司); 肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附测定 ELISA 试剂盒 (上海科兴生物科技有限公司); 细胞凋亡与坏死检测试剂盒 (碧云天生物技术研究); AO/EB 双荧光染色试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 均匀设计实验分组

参考 2020 年版《中国药典》一部<sup>[12]</sup> 载瘀血痹胶囊处方, 以方中乳香、没药、红花、川芎、香附、当归、炙黄芪、威灵仙、川牛膝、姜黄、丹参 11 味中药作为考察因素, 分别以  $X_1 \sim X_{11}$  表示, 每个因素初始量设置为 0 g, 参照瘀血痹胶囊处方原剂量配比分别设计 22 个水平, 则各药材剂量水平见表 1。根据均匀设计  $U_{22}^*$  ( $22^{11}$ ) 表能够得到瘀血痹胶囊的 22 个配伍组, 为了排除量效关系对药效结果的影响, 在保持各组药材配比关系不变的条件下, 将 22 个配伍组药材总重调节至相同, 调整后各配伍组最终药量见表 2。

表 1 各药材剂量水平 (g)

Tab 1 Dosage level of each medicinal herb (g)

水平	乳香	没药	红花	川芎	香附	当归	炙黄芪	威灵仙	川牛膝	姜黄	丹参
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.105	0.105	0.175	0.262	0.210	0.175	0.262	0.262	0.262	0.175	0.349
3	0.210	0.210	0.349	0.524	0.419	0.349	0.524	0.524	0.524	0.349	0.699
4	0.314	0.314	0.524	0.786	0.629	0.524	0.786	0.786	0.786	0.524	1.048
5	0.419	0.419	0.699	1.048	0.838	0.699	1.048	1.048	1.048	0.699	1.397
6	0.524	0.524	0.873	1.310	1.048	0.873	1.310	1.310	1.310	0.873	1.746
7	0.629	0.629	1.048	1.572	1.257	1.048	1.572	1.572	1.572	1.048	2.096
8	0.733	0.733	1.222	1.834	1.467	1.222	1.834	1.834	1.834	1.222	2.445
9	0.838	0.838	1.397	2.096	1.676	1.397	2.096	2.096	2.096	1.397	2.794
10	0.943	0.943	1.572	2.357	1.886	1.572	2.357	2.357	2.357	1.572	3.143
11	1.048	1.048	1.746	2.619	2.096	1.746	2.619	2.619	2.619	1.746	3.493
12	1.153	1.153	1.921	2.881	2.305	1.921	2.881	2.881	2.881	1.921	3.842
13	1.257	1.257	2.096	3.143	2.515	2.096	3.143	3.143	3.143	2.096	4.191
14	1.362	1.362	2.270	3.405	2.724	2.270	3.405	3.405	3.405	2.270	4.540
15	1.467	1.467	2.445	3.667	2.934	2.445	3.667	3.667	3.667	2.445	4.890
16	1.572	1.572	2.619	3.929	3.143	2.619	3.929	3.929	3.929	2.619	5.239
17	1.676	1.676	2.794	4.191	3.353	2.794	4.191	4.191	4.191	2.794	5.588
18	1.781	1.781	2.969	4.453	3.562	2.969	4.453	4.453	4.453	2.969	5.937
19	1.886	1.886	3.143	4.715	3.772	3.143	4.715	4.715	4.715	3.143	6.287
20	1.991	1.991	3.318	4.977	3.981	3.318	4.977	4.977	4.977	3.318	6.636
21	2.096	2.096	3.493	5.239	4.191	3.493	5.239	5.239	5.239	3.493	6.985
22	2.200	2.200	3.667	5.501	4.401	3.667	5.501	5.501	5.501	3.667	7.334

表 2 调整后各配伍组药量 (g)

Tab 2 Adjusted drug scale by compatibility group (g)

组别	乳香	没药	红花	川芎	香附	当归	炙黄芪	威灵仙	川牛膝	姜黄	丹参
1	0.000	0.391	0.815	1.711	1.564	1.629	2.932	3.177	3.910	3.095	6.516
2	0.098	0.886	1.805	3.691	3.347	3.445	0.492	0.984	2.461	2.625	5.906
3	0.221	1.548	3.132	0.000	0.663	1.658	4.146	4.975	1.106	2.395	5.896
4	0.309	1.955	0.000	2.058	2.469	3.430	1.286	2.315	5.402	1.715	4.802
5	0.421	0.105	1.053	4.211	4.422	1.404	4.737	0.000	3.948	1.228	4.211
6	0.654	0.785	2.618	0.327	1.832	4.145	2.618	4.581	2.945	0.873	4.363
7	0.722	1.323	3.608	2.706	3.849	1.403	6.315	1.504	0.902	0.200	3.207
8	0.641	1.465	0.153	3.891	0.366	2.746	2.518	4.348	4.577	3.204	1.831
9	1.122	2.946	1.637	0.701	3.086	1.403	0.351	3.507	4.910	4.208	1.870
10	1.072	0.357	2.580	2.977	4.763	3.374	4.168	0.298	2.381	2.977	0.794
11	1.373	1.098	4.347	6.178	1.647	1.144	1.373	5.148	0.686	2.746	0.000
12	1.006	1.189	0.305	0.686	2.743	2.438	3.886	1.372	4.343	1.372	6.401
13	1.222	1.833	1.357	2.800	0.204	0.679	1.782	5.090	3.309	1.018	6.448
14	1.172	0.000	2.104	4.282	1.803	2.254	4.508	2.479	1.578	0.451	5.109
15	1.919	0.685	4.568	1.370	5.207	0.685	3.426	0.685	0.343	0.000	6.852
16	1.514	1.009	0.505	3.028	1.009	2.355	0.000	4.038	4.542	3.365	4.374
17	1.512	1.418	1.418	4.726	2.646	0.315	3.072	1.654	2.835	2.678	3.466
18	1.949	2.293	2.866	1.433	0.000	2.484	0.860	6.019	1.720	2.675	3.440
19	2.117	0.235	4.117	3.823	2.117	0.196	4.705	3.529	0.000	2.156	2.745
20	2.071	0.763	0.727	5.722	3.924	2.180	1.635	0.817	4.632	1.453	1.817
21	2.481	1.489	2.067	1.861	0.992	0.000	5.892	5.272	3.411	1.034	1.240
22	2.628	2.128	3.337	4.380	3.254	2.294	2.816	2.503	1.564	0.417	0.417

2.2 药物制备

将各药材按均匀设计方案配比, 按照《中国药典》制备方法, 每组取川牛膝和半量的丹参、

炙黄芪粉碎, 过 100 目筛备用; 取丹参、炙黄芪各半量及其余药材加水煎煮两次, 第一次 2 h, 第二次 1.5 h, 合并药液, 滤过, 静置 12 h, 取上



清液浓缩至相对密度为 1.25 ~ 1.30 (50 °C) 的稠膏备用; 将稠膏与川牛膝和半量的丹参、炙黄芪药材粉末混匀, 即得。

### 2.3 瘀血痹胶囊体外抗 RA 药效研究

**2.3.1 微流控芯片的设计与制作** 本实验构建一种基于细胞凋亡特征的高通量药效筛选芯片, 由 PDMS 流体通道层和玻璃基底层两部分组成。该芯片采用实验室微流控芯片技术, 运用 CorelDRAW 绘制软件设计结构, 结合软光刻、模塑法及氧等离子键合技术共同制作完成<sup>[13-14]</sup>。芯片示意图和实物图如图 1A、B 所示, 包括 24 个细胞及药物入口, 6 个废液出口, 细胞培养区由 6×4 列细胞培养腔组成, 每列设置 5 个复孔, 每个培养腔尺寸为 1.0 mm×1.2 mm 的椭圆形, 每列细胞培养腔入口及出口设有宽约 100 μm 的弯曲管道, 以达到缓冲效果。

**2.3.2 芯片适用性实验** 取处于对数生长期的 RA-FLSs 细胞, 调整密度为  $3 \times 10^6$  个·mL<sup>-1</sup> 接种于芯片中, 待细胞贴壁后将完全培养基以 0.2 μL·min<sup>-1</sup> 的流速经微量注射泵注入芯片中进行动态培养。细胞在芯片上分别培养 24、36、48 h 后观察并拍照, 使用 1:100 稀释倍数的 AO/EB 混合染色液进行染色, 并使用荧光倒置显微镜进行拍照。在显微镜下拍摄明场及 AO/EB 混合液染色后的细胞状态图。如图 1C 所示, 培养 24、36、48 h 时, 细胞均被染成绿色或黄绿色, 细胞形态和结构正常, 未见细胞核着橘红色荧光的凋亡细胞或死亡细胞, 说明细胞在芯片中的生长状态良好。

**2.3.3 瘀血痹胶囊对 RA-FLSs 细胞活力的影响** 取对数期细胞, 随机分为生药质量浓度为 0 (空白对照)、0.375、0.75、1.5、3、6 mg·mL<sup>-1</sup> 的瘀血痹胶囊组 (用无血清培养液配制), 每组 5 个复孔, 待其贴壁后, 加入不同浓度的瘀血痹胶囊, 分别培养 24、48 h, 用 CCK-8 法检测各组细胞的存活率情况。如图 2 所示, 与空白对照组比较, 给药后随着药物剂量和作用时间的增加, RA-FLSs 的存活率均降低 ( $P < 0.01$ ), 瘀血痹胶囊 3 mg·mL<sup>-1</sup> 组作用 48 h 的细胞存活率接近于 50%, 可有效抑制 RA-FLSs 的增殖。故选择 3 mg·mL<sup>-1</sup> 的给药剂量作用 48 h 进行后续研究。

**2.3.4 体外抗 RA 药效学评价** 待芯片中细胞密度在 80% 左右时, 将 22 个配伍组由无血清培养液分别配制成生药量为 3.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的药液, 经蠕动泵灌注入芯片, 作用 48 h 后停止给药。采

用 Hoechst33342 和 PI 染液进行双染, 荧光倒置显微镜下拍照, 通过 Image J 软件计算其凋亡情况。结果如图 3 ~ 4 所示, 与空白对照组比较, 22 个配伍组的 RA-FLSs 细胞凋亡水平平均升高 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 均匀设计结果分析

采用 SPSS 25.0 软件对“2.3.4”项下得到的 22 个配伍组数据结果进行分析。均匀设计实验以细胞凋亡率建立逐步回归方程, 得到的回归方程为:  $Y = 39.539 + 3.998X_1^2 + 3.356X_1X_{10} + 1.857X_2X_{11} - 2.397X_3$  ( $P < 0.05$ )。其余各因素川芎 ( $X_4$ )、香附 ( $X_5$ )、当归 ( $X_6$ )、炙黄芪 ( $X_7$ )、威灵仙 ( $X_8$ )、川牛膝 ( $X_9$ ) 对 RA-FLSs 细胞凋亡情况 ( $Y$ ) 影响在此方程中不显著 ( $P > 0.05$ ), 作剔除处理。由回归方程可知, 乳香 ( $X_1$ ) 可明显诱导 RA-FLSs 细胞凋亡, 相反红花 ( $X_3$ ) 对 RA-FLSs 细胞凋亡有抑制作用。从交互作用程度来看, 交互项乳香姜黄 ( $X_1X_{10}$ ) 和没药丹参 ( $X_2X_{11}$ ) 均能诱导 RA-FLSs 细胞凋亡, 说明乳香和姜黄、没药和丹参联用后能够进一步诱导 RA-FLSs 细胞凋亡。结合回归方程, 在均匀设计取值范围内的全局寻优比较, 乳香、没药、姜黄和丹参取实验应用范围最大值, 负相关或无显著差异的其余中药取实验应用范围最小值 0 g。优化的瘀血痹胶囊最佳配比为乳香 ( $X_1$ ):没药 ( $X_2$ ):姜黄 ( $X_{10}$ ):丹参 ( $X_{11}$ ) = 2.628 : 2.946 : 4.208 : 6.852。

### 2.5 新配伍复方与瘀血痹胶囊药效差异性实验

**2.5.1 基于微流控芯片技术药效差异性分析** 按最佳配比精密称取乳香 1.275 g、没药 1.429 g、姜黄 2.041 g、丹参 3.324 g 得到瘀血痹胶囊最优配伍方, 按 4 味中药原方比例精密称取乳香 1.153 g、没药 1.153 g、姜黄 1.921 g、丹参 3.842 g 得到仅含 4 味中药的瘀血痹胶囊筛选方。将瘀血痹胶囊、最优配伍方和筛选方用无血清培养液配制成所含 4 味中药总生药量浓度相同的含药培养液, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后通入芯片中, 作用 48 h 后, 采用 Hoechst33342/PI 对细胞进行荧光染色, 经 Image J 分析计算出各组的凋亡率。结果如图 5 和图 6 所示, 与空白对照组比较, 各组均诱导细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ); 与瘀血痹胶囊组比较, 最优配伍方组和筛选方组凋亡率降低 ( $P < 0.05$ ); 最优配伍方组与筛选方组总体差异不大 ( $P > 0.05$ )。根据实验结果, 瘀血痹胶囊组凋亡率为 (51.46±1.38)%, 筛选方组凋亡率为 (39.47±0.49)%, 说明筛选方治疗 RA 药效作用

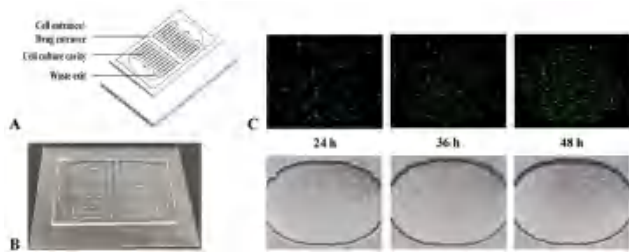


图 1 微流控芯片结构与 RA-FLSs 细胞生长状态图  
Fig 1 Microfluidic chip structure diagram and RA-FLSs cell growth status diagram  
A. 示意图 (schematic diagram); B. 实物图 (physical diagram); C. 不同时间点细胞生长状态图 (diagram of the cell growth status at different time points)

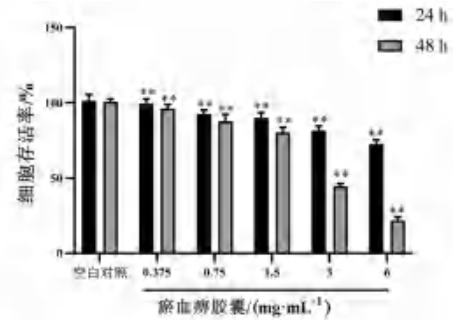


图 2 瘀血痹胶囊对 RA-FLSs 细胞存活率的影响  
Fig 2 Effect of Yuxuebi capsules on survival of RA-FLSs cells  
注: 与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ .

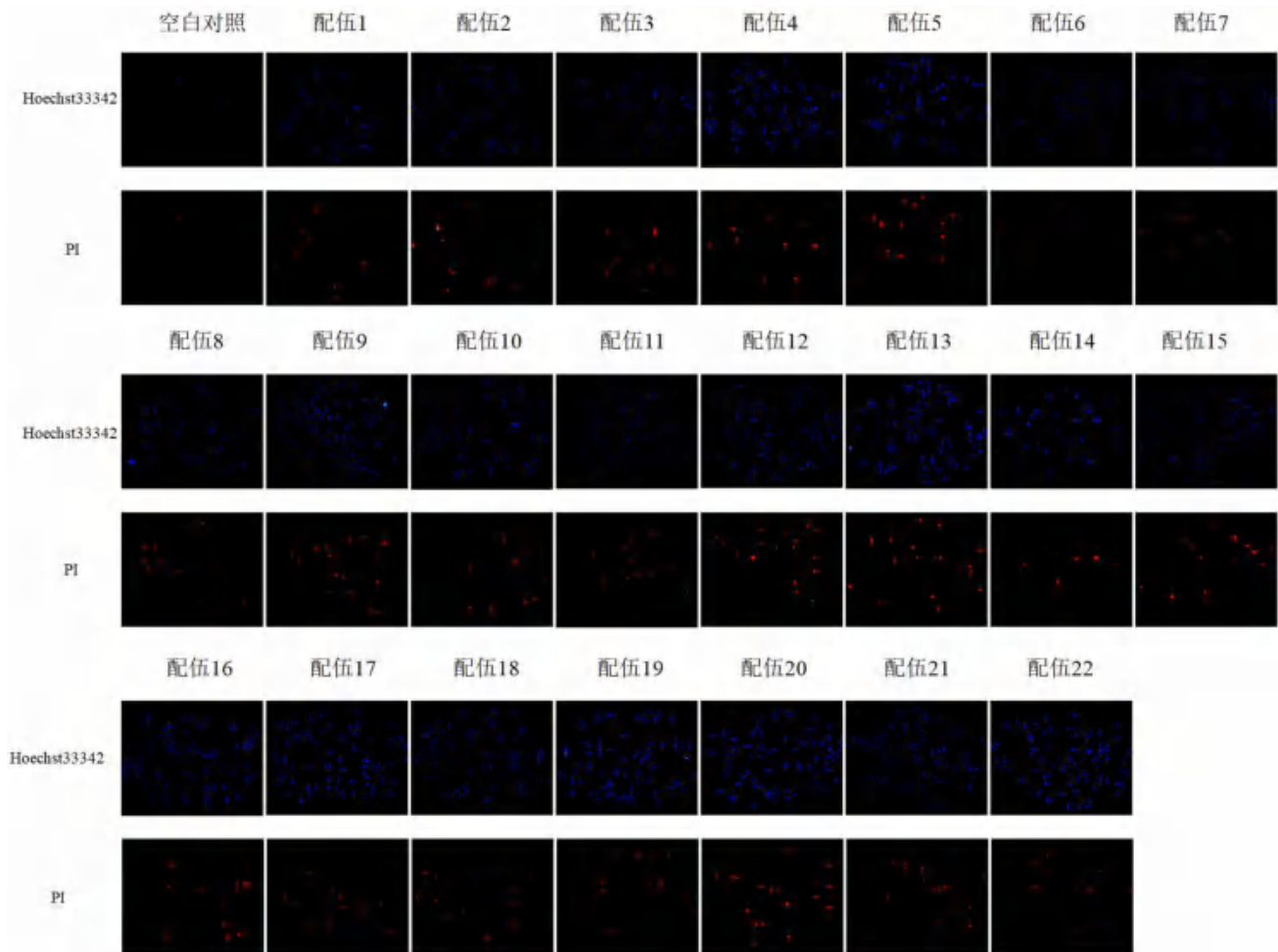


图 3 不同配伍组对 RA-FLSs 细胞凋亡的 Hoechst33342/PI 染色荧光图  
Fig 3 Hoechst33342/PI staining fluorescence of different compatibility groups on apoptosis of RA-FLSs cells

能够达到瘀血痹胶囊药效的 77% 左右。

**2.5.2 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$  水平** 收集各组细胞培养液, 采用 ELISA 法检测各组细胞培养液上清液中 TNF- $\alpha$  水平, 检测步骤严格根据试剂盒说明进行。如图 7 所示, 与空白对照组比较, 各组细胞培养液上清液中的 TNF- $\alpha$  表达水平均降低 ( $P < 0.01$ ), 提示各组均可有效降低 RA-FLSs 细胞分泌炎症因

子 TNF- $\alpha$  的能力。与瘀血痹胶囊组比较, 筛选方组和最优化配伍方组降低 RA-FLSs 细胞分泌炎症因子 TNF- $\alpha$  的能力较小 ( $P < 0.05$ ); 最优化配伍方组与筛选方组降低 RA-FLSs 细胞分泌炎症因子 TNF- $\alpha$  的能力相近 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

中医认为包括 RA 在内的风湿病, 基本病机

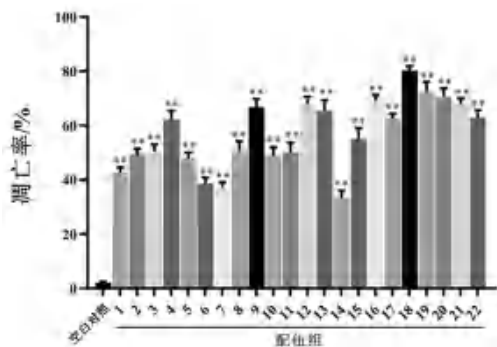


图 4 各组对 RA-FLSs 细胞凋亡水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig 4 Effect of each group on the apoptosis level of RA-FLSs cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与空白对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ .

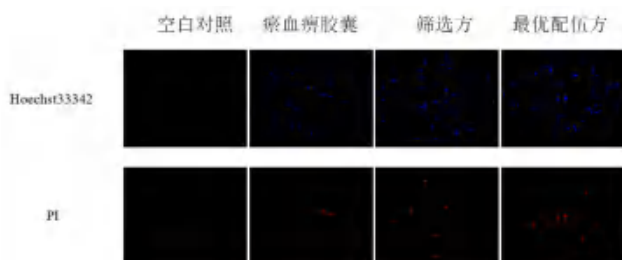


图 5 各组对 RA-FLSs 细胞凋亡的 Hoechst33342/PI 染色荧光图  
Fig 5 Fluorescence of Hoechst33342/PI staining of each group on apoptosis of RA-FLSs cells

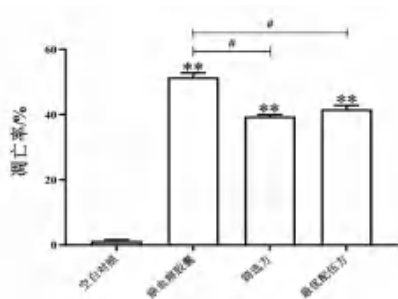


图 6 各组对 RA-FLSs 细胞凋亡率影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig 6 Effect of each group on the apoptosis rate of RA-FLSs cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与空白对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ，与瘀血痹胶囊组比较， $\#P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ , compared with the Yuxuebi capsules group,  $\#P < 0.05$ .

为邪气痹阻经络，血气运行不畅，因此用于治疗瘀血阻络所致痹病的瘀血痹胶囊成为首选治疗药物。大量临床应用也证实了瘀血痹胶囊在治疗 RA 疾病方面具有疗效确切、服用安全，且不良反应小等优点<sup>[15-16]</sup>。瘀血痹胶囊由乳香、没药、丹参等 11 味中药组成，药理成分极其复杂，对瘀血痹处方治疗 RA 药效物质基础缺乏深入研究，导致临床用药起效慢、疗程长。

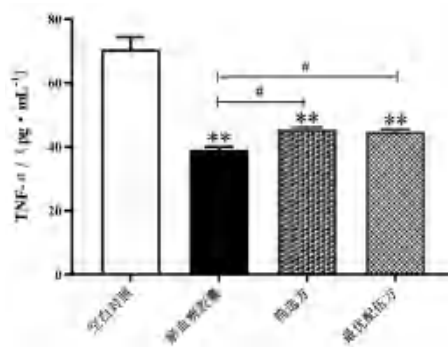


图 7 各组对 RA-FLSs 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$  释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig 7 Effect of each group on the release of RA-FLSs cell inflammatory factor TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与空白对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与瘀血痹胶囊组比较， $\#P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the Yuxuebi capsules group,  $\#P < 0.05$ .

本研究首次采用均匀设计法对瘀血痹胶囊组成中药不同剂量配比治疗 RA 进行药效学研究，并将经过均匀设计优化得到的最优配伍方与筛选方进行药效对比，两者在相同剂量时药效无显著性差异，且筛选方能够发挥瘀血痹胶囊原方疗效的 77% 左右。TNF- $\alpha$  是参与滑膜炎反应的重要细胞因子，能够触发 RA 炎症反应和关节破坏，贯穿 RA 的整个病程。本研究通过给药干预能够降低 TNF- $\alpha$  分泌，从而减少成纤维样滑膜细胞炎症损伤，阻止发生 RA 的风险。

瘀血痹方中，乳香、没药活血化瘀，通络止痛，两者常配伍使用，共为君药；姜黄破血行气，通络止痛，为佐药；与丹参合用，共奏活血化瘀，通络止痛之功。通过文献查阅，于游等<sup>[17]</sup>分析发现瘀血痹组方是由经典名方活络效灵丹与身痛逐瘀汤化裁而成。当归、丹参、乳香、没药组成活络效灵丹，该方加减对骨性关节炎具有抗炎镇痛作用<sup>[18]</sup>。乳香和没药两味药气血同治，能够增强活血止痛的功效，广泛应用于治疗跌打损伤、痈疽疮疡、风湿病的中药复方中<sup>[19-20]</sup>。姜黄具有调节自身免疫、抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等药理活性<sup>[21]</sup>，因其安全性高、不良反应少的特点，成为治疗 RA 的热点药物<sup>[22]</sup>。现代研究表明，丹参具有增强免疫力、抑制脂质过氧化、抗凝、抗血栓的作用，同时能够抑制 RA 成纤维样滑膜细胞增殖，对治疗 RA 有良好的效应<sup>[23-28]</sup>。综上所述，乳香、没药、姜黄、丹参药物组合是瘀血痹胶囊处方发挥治疗 RA 的药效物质基础。

本研究采用实验室微流控芯片技术考察药效指标，相比于传统实验室操作，该技术具有微型



化、样品消耗少、易于集成等优点,更有利于细胞动态培养和实时监测<sup>[29]</sup>,并且能够在芯片中构建一种更接近于人体内部环境的微环境<sup>[30]</sup>。

综上所述,本研究基于微流控芯片技术设计并制作具有 RA-FLSs 细胞凋亡特征的芯片,开展瘀血痹胶囊体外药效筛选研究,对瘀血痹胶囊治疗 RA 进行处方分析,得到发挥抗 RA 作用的最佳药物组合及最优配伍比例,明确瘀血痹胶囊配伍规律;通过与瘀血痹胶囊药效差异性比较,阐明其治疗 RA 的药效物质基础。

## 参考文献

- [1] Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics [J]. Nature, 2006, 442 (7101): 368-373.
- [2] Mao SF, Li WW, Zhang Q, et al. Cell analysis on chip-mass spectrometry [J]. Trends Anal Chem, 2018, 107: 43-59.
- [3] 帅波, 沈霖, 马陈, 等. 祛痹片联合甲氨蝶呤片对类风湿性关节炎患者血清 DKK-1 及关节滑膜侵蚀的影响 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28 (6): 16-20.
- [4] Frey O, Hüchel M, Gajda M, et al. Induction of chronic destructive arthritis in SCID mice by arthritogenic fibroblast-like synoviocytes derived from mice with antigen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20 (1): 261.
- [5] 孟庆良, 孟婉婷, 卞华, 等. 大黄素对 TNF- $\alpha$  诱导的类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响 [J]. 中成药, 2021, 43 (2): 480-484.
- [6] 章敏, 高梅, 陈镜宇, 等. 类风湿性关节炎血管增生的机制研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53 (4): 649-652.
- [7] 曹玉举. 姜多峰“虚、邪、瘀”理论论治类风湿性关节炎 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (2): 569-571.
- [8] 阿古达木, 陈薇薇, 耿利娜, 等. 从瘀论治类风湿关节炎进展 [J]. 中医学报, 2021, 36 (3): 533-540.
- [9] 罗运凤, 高洁, 柴艺汇, 等. 基于“虚、毒、瘀”病机论治疑难疾病 [J]. 湖北民族大学学报 (医学版), 2021, 38 (1): 59-62.
- [10] 王玉琴. 瘀血痹颗粒的药理研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2012, 16 (11): 52.
- [11] 方志远, 李华, 柏立群, 等. 瘀血痹片联合甲氨蝶呤治疗对类风湿性关节炎患者 Lysholm、VAS 和 ADL 评分及血清 IL-1、TNF- $\alpha$ 、ICMAM-1 水平影响 [J]. 中国药师, 2019, 22 (11): 2062-2065.
- [12] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1809.
- [13] 徐为峰, 王帅, 孟宪生, 等. 用于肿瘤细胞三维培养的
- 微流控芯片构建及培养条件研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32 (4): 581-585.
- [14] 庞磊, 包永睿, 孟宪生, 等. 药物筛选微流控芯片的构建及其在花蕊石抗肝癌研究中的应用 [J]. 中南药学, 2015, 13 (3): 241-245.
- [15] 郭亚军, 沈杰, 张之澧. 瘀血痹胶囊治疗类风湿性关节炎临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9 (2): 13-14.
- [16] 索德全, 潘文军, 于大海, 等. 瘀血痹冲剂治疗类风湿性关节炎的药理研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 45 (6): 431-435.
- [17] 于游, 张欢, 郭鹤, 等. 基于 IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨瘀血痹胶囊对动脉粥样硬化免疫与炎症作用机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (5): 85-87.
- [18] 朱军璇, 王敏智, 刘彪, 等. 活络效灵丹加减方治疗骨性关节炎的药效研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18 (4): 389-391.
- [19] 周述华. 常用相须药对应用探讨 [J]. 云南中医学院学报, 1998 (S1): 54-57.
- [20] 王安慧, 张慧杰, 王彬, 等. 含乳香-没药药对中成药的临床应用及配伍分析 [J]. 中成药, 2020, 42 (11): 3014-3018.
- [21] 刘伟, 顾秀竹, 吴筱霓, 等. 姜黄素药理作用的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2021, 36 (3): 336-340.
- [22] 孙焱, 于慧敏. 姜黄素治疗类风湿关节炎作用机制研究进展 [J]. 中医药学报, 2015, 43 (6): 113-116.
- [23] 夏正远, 余金甫, 史昕云, 等. 失血性休克中丹参和超氧化物歧化酶抑制脂质过氧化反应的研究 [J]. 中华麻醉学杂志, 1994 (4): 275-277.
- [24] 张伟伟, 陆茵. 丹参抗肿瘤活性成分研究新进展 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (3): 389-392.
- [25] 陈立江, 张胜, 缪家林, 等. 注射用复方丹参的药效学研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24 (3): 93-95.
- [26] 吴宏伟, 陈建新, 杨洪军, 等. 丹参成分组合与抗氧化活性相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (8): 68-71.
- [27] 刘青松, 蒋红, 唐中. 丹参对类风湿关节炎患者滑膜细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达的影响 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2009, 3 (8): 1354-1358.
- [28] 王慧莲, 展俊平, 苗喜云, 等. 丹酚酸 B 对人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖与凋亡的影响及其作用机制 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47 (4): 334-339.
- [29] 王文甲, 彭钊, 吕雪飞, 等. 微流控芯片细胞灌注培养技术及其应用研究进展 [J]. 载人航天, 2021, 27 (5): 646-654.
- [30] 梁怡萧, 潘建章, 方群. 基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统的研究进展 [J]. 色谱, 2021, 39 (6): 567-577.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-20)

# 高效治疗性抗体 CHO 细胞株的构建方法及其评价

刘治影<sup>1, 2</sup>, 罗顺<sup>2, 3\*</sup>, 吕芊锐<sup>3</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 澳斯康生物(南通)股份有限公司, 江苏 南通 221600)

**摘要:** **目的** 采用一种高效的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞株构建方法获得稳定高表达治疗性重组蛋白的 CHO 细胞株。**方法** 利用自主研发载体构建含目的基因的真核表达质粒, 经电击转染转入 CHO 细胞中, 经抗性压力筛选后使用细胞池至单克隆的一步筛选策略, 配合一种新型的细胞成像系统, 高效、快速地筛选出高表达单克隆株。**结果** 成功构建多株稳定的高表达单克隆细胞株, 其产量最高可至  $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 实验通过毛细管等电聚焦电泳法进一步验证了细胞株产物关键质量特性, 等电点均为 9.2, 所得抗体等电点较好。**结论** 相比传统的构建方法需 6~8 个月, 本研究筛选得到的高表达单克隆细胞株周期缩短了 2 个月。

**关键词:** 中国仓鼠卵巢细胞; 细胞株构建; 高效; 筛选策略

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0625-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.012

## Construction and evaluation of Chinese hamster ovary cell lines with a high therapeutic antibody

LIU Zhi-ying<sup>1, 2</sup>, LUO Shun<sup>2, 3\*</sup>, LYU Qian-rui<sup>3</sup> (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Drug Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133; 3. Thousand Oaks Biopharma, Nantong Jiangsu 221600)

**Abstract: Objective** To obtain stable Chinese hamster ovary (CHO) cell lines with a high expression of single-type therapeutic recombinant proteins by a high-efficiency cell line development method. **Methods** Electroporation was used to transfect CHO cells with a self-developed vector to construct the eukaryotic expression plasmid containing the target genes. After the drug resistance screening of the CHO cell pool, a one-step screening strategy was used to rapidly filter the high-expression monoclonal strains, with support from a new cell imaging system. **Results** Several stable high-expression monoclonal cell lines were successfully constructed, and the highest output reached  $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The characteristics of the cell line products were further verified via capillary isoelectric focusing electrophoresis. The isoelectric point of clones was 9.2, which was satisfactory. **Conclusion** In comparison with the 6~8 months by traditional construction method, the entire experiment of the high-expression monoclonal cell lines is shortened by 2 months.

**Key words:** Chinese hamster ovary; cell line development; high efficiency; screening strategy

目前, 大部分治疗性重组蛋白药物由哺乳动物细胞表达, 哺乳动物细胞表达系统主要包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、幼仓鼠胚肾细胞(BHK)、小鼠骨髓瘤细胞(SP0/2)、非洲绿猴肾细胞(Vero)以及人胚肾脏 293 细胞(HEK 293)等<sup>[1-2]</sup>。其中 70% 的治疗性抗体表达系统为 CHO 细胞, CHO 细胞具有与人类相似的蛋白翻译后

修饰能力, 表达的蛋白生物活性更加接近天然蛋白<sup>[3-4]</sup>, 其中较少的分泌内源性蛋白且利于下游纯化<sup>[5]</sup>。此外, CHO 具有清晰的历史背景和监管机构的认可, 适合悬浮培养, 能满足大规模工业化生产的需求等一系列优势而倍受人们关注<sup>[6]</sup>。工业化生产中, 细胞株构建是抗体药物开发过程中的起点和基础, 药物上市后该细胞株将伴随产

作者简介: 刘治影, 女, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究, email: zhiyingliu2020@163.com \*通信作者: 罗顺, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事分子生物学研究, email: shun.luo@tobiopharm.com

品的整个生命周期,其好坏直接决定抗体药物的生产成本和产品质量。为了获得稳定的高表达细胞株,研究人员会在细胞株构建阶段采用不同的构建策略和优化方法,而其关键之一在于构建中的筛选方法,高效的筛选方法可以决定优质单克隆细胞株的形成<sup>[7]</sup>。

传统的细胞株构建方法是外源基因通过随机整合的方式整合到宿主细胞 CHO 基因组中,通过微型细胞池筛选 (Minipool) 和单克隆筛选两阶段筛选<sup>[8]</sup>,其中 Minipool 方法需在转染后把细胞分到 384/96 孔板里进行培养,减少孔板里高表达、慢生长的细胞与低表达、快生长的细胞共存于一孔的比率<sup>[9-10]</sup>,提高高表达细胞生长比率。但该过程工作量大,筛选周期长达 2 个月。部分研究机构使用此方法构建得到产量大于  $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  细胞株的时间周期为 6~8 个月 (见图 1a)。相比于本研究构建所用时间 (见图 1b),传统的重组 CHO 细胞株构建方法周期冗长,极大地增加了工业细胞株的开发成本及生产的不确定性<sup>[11]</sup>,不利于后期进行新药临床试验申请 (investigational new drug, IND)。因此,开发出一种高效的 CHO 细胞株构建方法,规避传统构建方法由于构建周期过长而导致细胞株的不稳定性问题,以及减少人力成本、资源浪费和降低人为操作失误的可能性,是细胞株构建领域发展的热门方向。

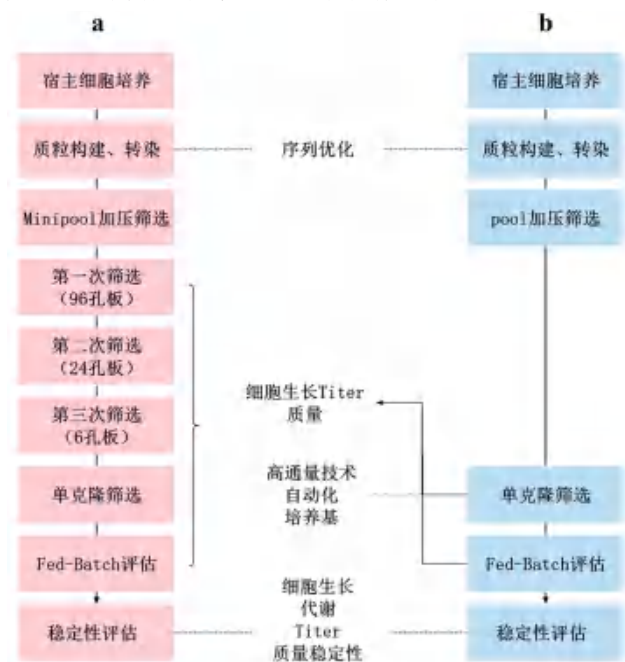


图 1 细胞株构建流程图

Fig 1 Cell line development

Piwil2 是 Piwi 蛋白家族的成员,主要表达在正常的睾丸组织或胚胎细胞中,在癌前干细胞和癌症干细胞中也有异常表达,并且可调节多种

细胞信号转导通路抑制癌细胞凋亡和促进增殖。Piwil2 在不同类型的癌症中所起的作用不同,具体机制尚未完全阐明。本研究基于文献研究和课题组前期的研究结论和成果,以 CHO K1 细胞为研究材料,制备人 Piwi 家族中 Piwil2 蛋白的特异性抗体,经转染、筛选、建立混合细胞池 (pool) 后,在细胞恢复期中监测细胞活率达到 90% 时进行单克隆筛选,配合一种新型细胞成像系统和高通量筛选设备进行单克隆成像,短时间内构建得到高表达治疗性 Piwil2 单克隆抗体 CHO 细胞株。

## 1 材料

### 1.1 质粒、菌株、细胞和培养基

含有目的基因 GOI-pUC57-Simple 模板质粒 (金斯瑞公司); pTOB2.1 空载 [澳斯康生物 (南通) 股份有限公司]; Top10 感受态细胞 (生工生物公司); 宿主细胞 GS Null CHO K1 (Horizon 公司); CD CHO 基础培养基、补料培养基、EX-CELL CHO Cloning 培养基、Dynamis 培养基 (GIBCO 公司)。

### 1.2 试剂与仪器

氨苄青霉素 (顺禹生物科技有限公司); 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒 (生工生物公司); T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 EcoRI、Hind III、XbaI、PacI、DNA 聚合酶等 (Thermo Fisher 公司); 蛋氨酸亚胺基代砒 (MSX) [西格玛奥德里奇 (上海) 有限公司]。

PCR 仪 (Bio-Rad 公司); 电转仪 (瑞士 Lonza 公司); 细胞活力分析仪 (上海睿钰生物科技有限公司); 生物安全柜 (上海智城公司); 二氧化碳培养箱 (Heal Force 公司); 二氧化碳摇床 (Kuhner 公司); 细胞生化分析仪 (广州艾贝泰生物科技有限公司); VIPS 单克隆成像仪 (Solentim 公司); 分子相互作用仪 (Fortebio Octec) (德国 Satorius 公司); 高效液相色谱仪 (Waters 公司)。

## 2 方法

### 2.1 宿主细胞培养

悬浮 CHO K1 细胞培养于添加了  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  谷氨酰胺的 CD CHO 培养基中,使用细胞活力分析仪监测细胞生长和活力。细胞在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ ,  $125\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  和 80% 湿度条件下培养。

### 2.2 构建表达质粒

提取含有目的基因重链序列的 GOI-HC-pUC57-Simple 及轻链序列的 GOI-LC-pUC57-Simple 质粒 DNA。质粒 DNA 与载体 pTOB2.1 分别用限制性内切酶 EcoRI/Hind III、XbaI/PacI 进行双酶切,胶回收酶切后的目的条带及载体条带,后使用 T4 DNA 连接酶进行酶连,将酶连产物转化于 Top10 感受态细胞。将转化后的细胞涂布于含氨苄青霉素的 LB 培



养板上, 37 °C 过夜培养。次日, 从平板上挑取单菌落, 进行菌液 PCR 反应, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆。PCR 反应条件为: 98 °C 2 min, 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 5 min。PCR 引物序列信息见表 1。提取对应的阳性克隆质粒后进行双酶切鉴定及 DNA 测序确认, 将测序正确的质粒命名为 pTOB2.1-s3-v2-HC-LC。

表 1 PCR 引物序列  
Tab 1 Primers in PCR

引物名称	序列信息 5'-3'
2.1LC-F	TGCAGTCACCGTCCTTGACACG
2.1LC-R	GGTATGGCTGATTATGATCAAT
2.1HC-F	AGTCACCGTCCTTGACACGAAG
2.1HC-R	ACAAATGTGGTATGGCTGATTA

### 2.3 转染

采用 Nucleofector 电转染系统制造商推荐的电穿孔方法将获得的重组表达质粒转染于处于指数生长期的 CHO K1 细胞中。取 8 μg 重组表达质粒用电转 buffer 稀释, 与  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  细胞轻轻混合后放入无菌电转杯, 随后将其置于电转染系统中进行电击。电转完成后将细胞培养于含有 50% 的 EX-CELL CHO Cloning 培养基的 6 孔板中, 相同电转条件下未转染的细胞作为空白对照。转染后细胞于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>, 80% 湿度的恒温培养箱静置孵育 48 h。之后使用分子相互作用仪检测细胞培养上清滴度 (Titer)。

### 2.4 pool 抗性筛选

将转染 48 h 后的细胞行持续的抗性筛选 (以下称为加压筛选)。取 pool 细胞于离心机中 200 g 离心 5 min, 轻轻拍散细胞后用含有  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MSX 的 CD CHO 培养基重悬。后将 pool 细胞置于 T25 培养瓶中培养。于第 7、9、12 日监测细胞密度、细胞活率, 待第 13 日起开始每日监测细胞活率, 当细胞活率达到 90% 时进行单克隆铺板。

### 2.5 单克隆筛选

通过有限稀释将 0.4 个细胞接种到含有 200 μL EX-CELL CHO Cloning 培养基的 96 孔培养板。于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中静置培养。静置 2 h (第 0 日) 后使用 VIPS 单克隆成像仪拍摄整个孔的图像, 之后分别在第 1、2、7、14 日, 与第 0 日同样的时间点同法拍照, 确保细胞系的单克隆性。静置培养 2 ~ 3 周后, 根据 96 孔板中细胞成像结果并结合细胞生长情况, 取汇合度大于 20% 的单克隆细胞上清液, 用分子相互作用仪进行高通量检测。经 24 孔板和 6 孔板滴度筛选, 最终挑选出滴度相对较高和生长状态良好的克隆株, 用于后续的补料批培养 (Fed-Batch) 评估。

### 2.6 Fed-Batch 评估

取 6 孔板细胞以  $0.5 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于含有 25 mL Dynamis 培养基的 50 mL 摇管中, 于 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>, 80% 湿度和  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床 (@50 mm orbital) 中培养。根据前期研究, 设置补料培养基为 Cell Boost 7a 及 Cell Boost 7b。在培养的第 3、5、7、9、11、13 日添加补料, 补料量分别为初始培养体积的 4% 及 0.4%。隔日定时取细胞悬液检测活细胞密度、细胞活率和滴度。同时采用细胞生化分析仪检测葡萄糖浓度、乳酸浓度、渗透压等细胞生化参数。当葡萄糖质量浓度低于  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 补加葡萄糖, 在第 14 日或细胞活率低于 70% 后收获所有培养物上清检测表达量。选择高表达和生长状态良好的单克隆株用 Protein A 亲和层析柱小量纯化样品, 并用高效液相色谱仪检测蛋白产量及质量 [11]。

### 2.7 抗体电荷异质性鉴定

采用毛细管等电聚焦电泳法 (capillary isoelectric focusing, cIEF) 检测抗体电荷异质性。首先将 1% 甲基纤维素 70 μL、pH 3 ~ 10 的两性载体 8 μL、PI Marker (5.85) 2 μL、PI Marker (9.99) 2 μL、超纯水 78 μL 与样品 40 μL  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  涡旋振荡, 充分混匀后以 13 000 g 离心 5 min 去除可能存在的气泡和沉淀, 转移上清液至 96 孔板或加入到含内插管的样品瓶中, 再将 96 孔板或内插管以 1000 g 离心 10 min, 除去气泡后放入仪器的 Maurice 金属适配器上检测。电泳程序: 聚焦时间 1 为 1500 V、1 min; 聚焦时间 2 为 3000 V、4.5 min; 样品加载持续时间为 55.0 s。采用峰面积归一化法对结果进行定量分析。

### 2.8 抗体纯度鉴定

用体积排阻色谱法鉴定单克隆抗体纯度。应用 TSK gel G3000SWXL (5 μm, 7.8 mm × 300 mm) 色谱柱, 样品用超纯水稀释至  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 流动相为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲基纤维素,  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, pH 为 (6.8 ± 0.1); 等度洗脱; 检测波长 280 nm; 流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温室温; 进样量 100 μg。按照面积归一化法计算样品纯度。

### 2.9 统计分析

采用软件 GraphPad Prism 9.0, 使用方差分析 (ANOVA) 进行统计分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 表达质粒构建

将成功构建的 pTOB2.1-s3-v2-HC-LC 重组表达质粒经 XbaI & PacI、HindIII & EcoRI 双酶切后鉴定胶谱图, 理论空载大小约为 10 300 bp, 目的

基因理论大小分别为 1580 bp (H)、776 bp (L)，如图 2 所示，条带 2 和 3 与理论条带相符。DNA 测序结果表明重组表达质粒中插入的目的基因 H 链及 L 链序列正确（涉及核心技术，测序结果不予公开）。

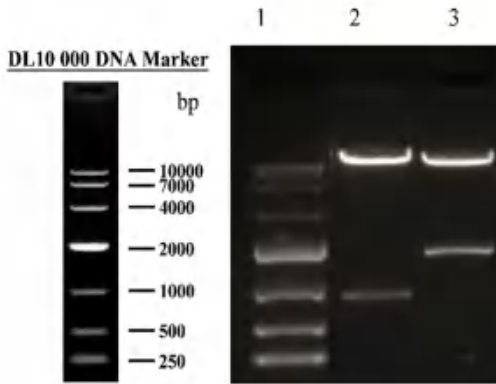


图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定  
Fig 2 Identification of recombinant expression plasmid by double digestion  
1. DNA Maker; 2. 质粒经 XbaI & PacI 酶切 (plasmid digested by XbaI & PacI enzyme); 3. 质粒经 HindIII & EcoRI 酶切 (plasmid digested by Hind III & EcoRI enzyme)

### 3.2 转染 48 h 结果

转染 48 h 后细胞的活细胞密度在  $0.8 \sim 1.3 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ，细胞活率下降至 52% ~ 61%，转染重组质粒后，相比于空白对照组，转染重组质粒组中目的蛋白表达量增高，实验证明转染 pTOB2.1-s3-v2-HC-LC 质粒后目的蛋白过表达，结果见表 2。

表 2 转染 48 h 后细胞生长状态  
Tab 2 Cell growth status 48 h after transfection

样品名称	活细胞密度 / ( $\times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ )	细胞活 率 / %	平均直径 / $\mu\text{m}$	蛋白产量 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
C6-ET-control	3.47	94.48	15.76	1.53
C6-ET-1	0.99	52.91	14.64	12.10
C6-ET-2	1.23	60.91	14.70	15.60
C6-ET-3	1.02	55.90	14.72	14.90
C6-ET-4	0.97	53.36	14.65	21.60
C6-ET-5	0.84	54.94	14.55	17.90
C6-ET-6	1.05	55.90	14.69	19.30

### 3.3 pool 细胞加压筛选结果

哺乳动物细胞中质粒不能进行复制，未整合到基因组中的质粒随着细胞分裂逐渐丢失。经 MSX 在一段时间的选择压力后，所有存活下来的细胞基因组中都整合了外源质粒。pool 细胞生长曲线见图 3，转染后的细胞在第 9 日活率下降至最低点，进入细胞恢复期后活率逐步上升，活细胞密度随之处于上升期。

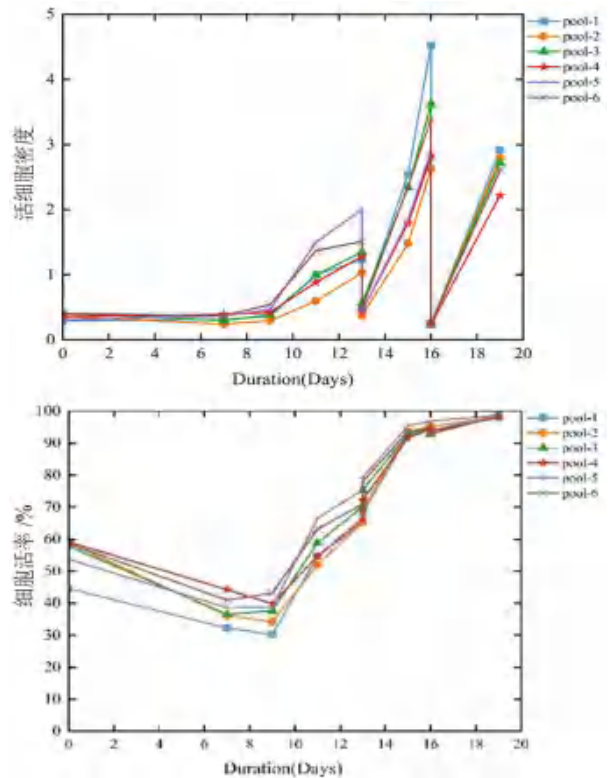


图 3 pool 细胞在含有  $10 \mu\text{m}$  MSX 下的细胞活力曲线  
Fig 3 Viability curves of pool cells containing  $10 \mu\text{m}$  MSX  
A. 活细胞密度 (viable cell density); B. 细胞活率 (viability)

### 3.4 单克隆源性证明

根据 ICH 指导原则，生产用细胞株必须来自单个细胞。实验中共铺 18 块 96 孔板，其中 309 个单克隆长成群落，代表性图片如图 4 所示。在监测克隆成像的图片中，接种第 0 日仅观察到 1 个细胞，第 1 日观察到 2 个细胞，第 2 日观察到 4 个细胞，第 7 日观察到一个细胞群，证明了单克隆源性。检测 Titer 扩增到 24 孔板和 6 孔板后选取优势单克隆进行 14 日的 Fed-Batch 实验，对筛选得到的 Top12 阳性克隆进行评估。

### 3.5 生长特性的评价

如图 5 所示，不同细胞株表现出相似的生长特性，14 日周期内维持较好的生长且进行了蛋白表达，说明本方法成功构建出了表达单克隆抗体 CHO 细胞株。

### 3.6 蛋白表达量的检测

收集筛选得到的 Top12 株单克隆细胞株在第 14 日 Fed-Batch 评估实验中的上清液，使用 HPLC 定量分析蛋白表达量，结果见图 6。Top12 细胞株的蛋白表达量在  $3.2 \sim 5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，其中 Top1 细胞株的蛋白表达量为  $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，结果见图 7。两者蛋白表达量相当，说明本研究在较短时间内同样可筛选出表达量高的细胞株。

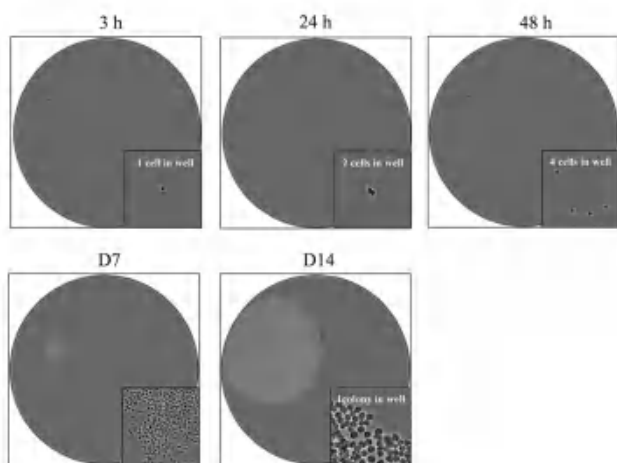


图 4 VIPS 成像仪中证明单克隆源性图

Fig 4 Monoclonal source map verified in VIPS imager

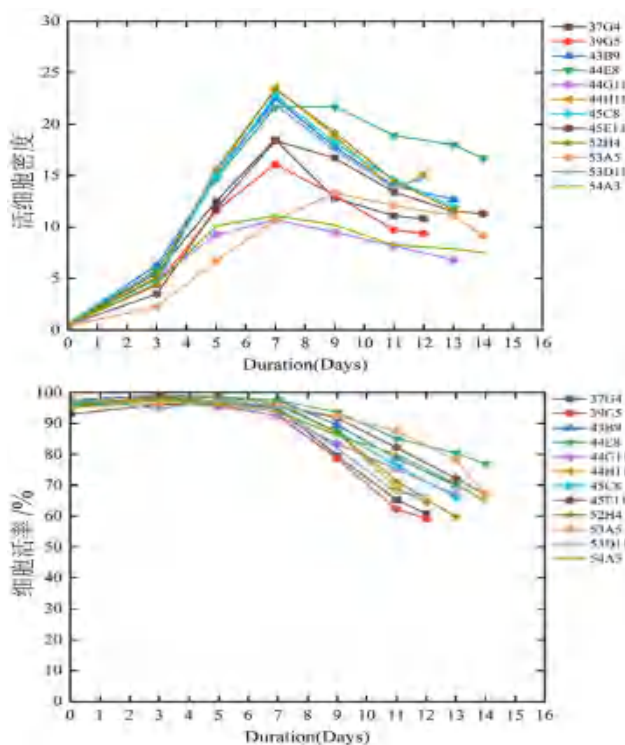


图 5 Top12 克隆在 Fed-Batch 培养过程中的细胞活力曲线

Fig 5 Viability curve of Top12 cell in Fed-Batch culture

### 3.7 抗体电荷异质性的检测

cIEF 结果如图 8 所示, 单克隆株 43B9、8H3 表达得到的单克隆抗体 A 的 PI 均为 9.2。由于抗体分子修饰的复杂性, 多种因素均可影响蛋白的表观 PI, 例如糖基化、磷酸化等会使表观 PI 变小, 而图 8 中主峰代表的表观 PI 比根据氨基酸相对分子质量得到的预测值 (PI 8.4) 高 0.8, 这种差异可能与蛋白的翻译后修饰及分泌方式有关, 为正常现象。值得一提的是, 本研究构建得到的单克隆株 43B9 与对照实验所得单克隆株 8H3 具有相似的生长特性和产量水平, 且两者所表达的抗体具有相同

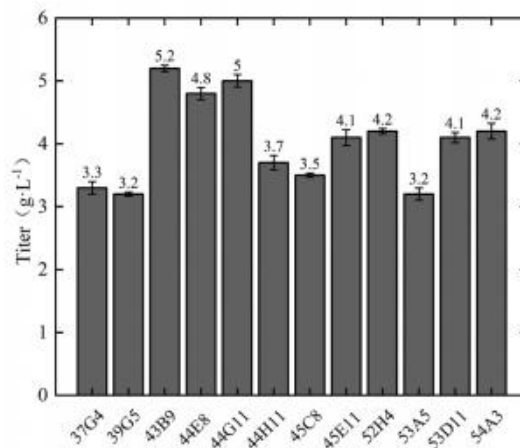


图 6 Top12 的克隆蛋白表达量

Fig 6 Clone protein expression of Top 12

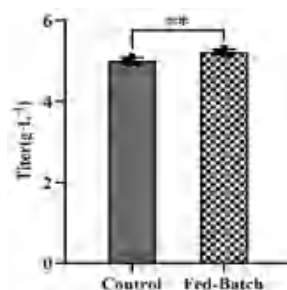


图 7 Top1 的克隆蛋白表达量

Fig 7 Clone protein expression of Top 1

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.05$ 。

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

的电荷异质性, 证实用混合细胞池细胞进行单克隆铺板和后续的筛选得到的细胞株一致性较高, 证明了本方法具有可短时间获得治疗性抗体药 CHO 细胞株的优势。

### 3.8 抗体纯度的检测

体积排阻色谱法分析此次构建得到的单克隆抗体样品, 结果见图 9。计算 43B9 (E)、44G11 (EE) 与 8H3 (NC) 单体含量分别为 98.1%、97.9%、97.5%, 多聚体含量分别为 1.8%、2.1%、2.5%。所得抗体纯度较好, 说明该方法可以获得质量高度一致的工程细胞株。

### 4 讨论

细胞株的产量及质量对生产成本、药物的安全性和有效性有着重大的影响, 细胞株开发过程的速度直接影响药物开发的进程<sup>[12-13]</sup>。由于市场对重组蛋白药物的高需求以及筛选方法的差异等导致 CHO 工程细胞株基因异质性<sup>[14]</sup>, 由此需要开展大规模的克隆筛选才能获得理想的工程 CHO 细胞株<sup>[15]</sup>。传统的 CHO 细胞株构建耗时长, 生产成本高<sup>[16]</sup>, 因此优化 CHO 细胞株构建方法仍是生物药物发展的关键之一。



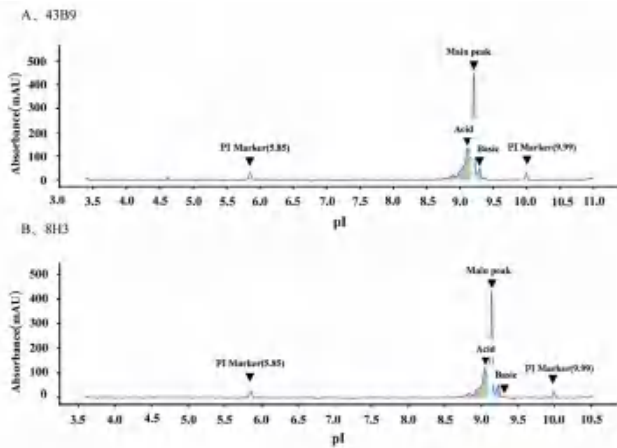


图 8 细胞株产生的 ProA 洗脱液的 cIEF 色谱图  
Fig 8 cIEF chromatogram of ProA elution produced by cell line

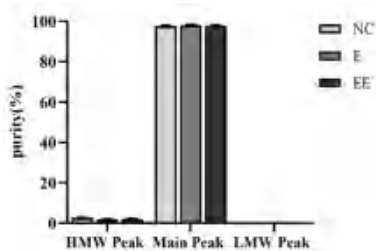


图 9 体积排阻色谱法所测抗体纯度结果  
Fig 9 Antibody purity measured by size exclusion chromatography

本研究介绍了一种缩短 CHO 细胞株构建周期的方法，将目的基因克隆到 pTOB2.1 真核表达载体上，通过电击转染方式进入处于指数生长期的宿主细胞中获得 pool 细胞。使用终浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MSX 进行细胞池加压筛选，待 pool 细胞活率恢复到 90% 时进行单克隆筛选，使用 VIPS 影像学拍照证明单克隆源性<sup>[16-17]</sup>，最终获得了 12 株蛋白表达量最高可至  $5.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的细胞株。使用 Protein A 预装柱进行分离纯化，cIEF 等对重组蛋白进行质量评价，证实该方法可以获得质量高度一致性的工程细胞株。且细胞株构建周期可在 3 ~ 4 个月内实现重组蛋白表达，与传统筛选方法需 6 ~ 8 个月相比，时间缩短，且得到目的蛋白的产量、质量与传统构建得到的细胞株相当。证明了本研究所用的筛选策略能够快速高效地获得高表达 CHO 细胞株。

此外，有研究表明其他的基因筛选方法如基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术<sup>[18]</sup>，能够将转基因定点整合到细胞基因组内的稳定表达区域，可以进一步缩短治疗性抗体工程细胞株的构建周期<sup>[19-21]</sup>。目前已经有许多文献报道了利用该技术寻找到这些位点的具体思路，这对于今后进一步缩短 CHO 定点整合表达细胞株的构建周期上有一定的帮助。

综上所述，本研究最终可在短时间内成功构建得到产量高、质量好的单克隆 CHO 细胞株，证明了本研究运用 pool 进行单克隆细胞筛选是细胞株开发的一种有效方法，为后续项目加速 IND 申报、加快药物进行临床研究提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] 李浩强, 蔡洁行, 张玉彬. 治疗性抗体高表达 CHO 细胞株构建策略 [J]. 中国生物医药技术, 2013, 8 (3): 220-224.
- [2] Alves CS, Gilbert A, Dalvi S, et al. Integration of cell line and process development to overcome the challenge of a difficult to express protein [J]. Biotechnol Prog, 2015, 31 (5): 1201-1211.
- [3] Chen C, Le K, Le H, et al. Methods for estimating the probability of clonality in cell line development [J]. Biotechnol J, 2020, 15 (2): 511-517.
- [4] 缪仕伟. 基于质量源于设计理念的 CHO 细胞无血清培养工艺开发与优化 [D]. 上海: 华东理工大学, 2021.
- [5] 张银川, 刘萌萌, 张雅婷, 等. 表达全人源抗人 IgE 单抗的细胞株构建及筛选 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35 (3): 66-74.
- [6] Ding MJ, Shen L, Xiao L, et al. A cell line development strategy to improve a bispecific antibody expression purity in CHO cells [J]. Biochem Eng J, 2021, 166: 107-857.
- [7] 黄德林, 陈雅慧, 凡志婷, 等. 敲低、过表达 NCOA4 慢性病毒包装及稳转 HFL1 细胞株构建 [J]. 生物化工, 2022, 8 (4): 1-5.
- [8] 张晶晶, 刘克东, 钱凯, 等. 稳定表达 GLP-1 类似物的 CHO 细胞株的构建及培养工艺研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37 (5): 52-58.
- [9] 刘苏, 田浚, 王驰, 等. 弱化抗性标记筛选高表达 CHO 细胞株的方法建立 [J]. 中国药科大学学报, 2015, 46 (5): 617-622.
- [10] 赵梦琳, 刘继东, 朱祥平, 等. CHO-S 高产量细胞株的新型构建方法及其评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50 (2): 194-209.
- [11] Doolan P, Clarke C, Kinsella P, et al. Transcriptomic analysis of clonal growth rate variation during CHO cell line development [J]. J Biotechnol, 2013, 166 (3): 105-113.
- [12] Zhao ML, Wang JX, Luo MY, et al. Rapid development of stable transgene CHO cell lines by CRISPR/Cas9-mediated site-specific integration into C12orf35 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102 (14): 6105-6117.
- [13] Chen C, Le H, Goudar CT. Integration of systems biology in cell line and process development for biopharmaceutical manufacturing [J]. Biochem Eng J, 2016, 107 (4): 11-17.
- [14] Evans K, Albanetti T, Venkat R, et al. Assurance of monoclonality in one round of cloning through cell sorting for single cell deposition coupled with high resolution cell

- imaging [J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31 (95): 1172-1788.
- [15] Misaghi S, Shaw D, Louie S, et al. Slashing the timelines: opting to generate high-titer clonal lines faster via viability-based single cell sorting [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32 (1): 198-207.
- [16] 江一帆, 董静, 魏敬双. 工程细胞单克隆筛选及单克隆源性验证 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39 (4): 101-105.
- [17] Quiroz J, Tsao YS. Statistical analysis of data from limiting dilution cloning to assess monoclonality in generating manufacturing cell lines [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32 (4): 1061-1068.
- [18] 陈汉宗, 梁颂, 黎新月, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲除 anxa6 基因的 Caco-2 细胞株 [J]. *微生物学报*, 2022, 3 (4): 1-17.
- [19] 蔡俊立, 胡泽斌, 沈毅珺. 基因编辑技术在 CHO 工程细胞株改造中的应用研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39 (4): 52-59.
- [20] 周松涛, 陈蕴, 龚笑海, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建稳定表达人白蛋白基因的中国仓鼠卵巢细胞系 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39 (4): 52-59.
- [21] Le K, Tan C, Gupta S, et al. A novel mammalian cell line development platform utilizing nanofluidics and opto-electro positioning technology [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34 (6): 1438-1446.
- (收稿日期: 2022-11-03; 修回日期: 2022-12-28)

## 大豆提取物对光甘草定的增溶及其抗氧化活性研究

张明欣<sup>1, 5</sup>, 张余<sup>1, 5</sup>, 张秀君<sup>2</sup>, 王鹏<sup>3</sup>, 杨珍<sup>1</sup>, 张蕾<sup>3</sup>, 李雪<sup>4</sup>, 王艳<sup>1, 5\*</sup> (1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120; 3. 天津尚美化妆品有限公司, 天津 300381; 4. 天津医科大学总医院, 天津 300052; 5. 现代中医药海河实验室, 天津 301600)

**摘要:** **目的** 探究大豆提取物对光甘草定的增溶作用, 并对效果最佳的增溶体系进行表征及体外抗氧化活性考察。**方法** 利用摇瓶-高效液相色谱法测定大豆提取物-光甘草定增溶体系中光甘草定的溶解度, 通过单因素实验优化大豆提取物-光甘草定增溶体系的制备条件; 并在最优条件下制备的大豆提取物-光甘草定增溶体系进行物理表征评价。同时采用 DPPH 和 ABTS 自由基清除法测定不同浓度大豆提取物-光甘草定增溶体系体外抗氧化活性。**结果** 最佳制备条件为振荡温度 60 °C、转速 280 r · min<sup>-1</sup>、振摇 12 h, 所得的大豆提取物-光甘草定增溶体系中光甘草定溶解度为 9011.467 μg · mL<sup>-1</sup>, 约为水中饱和溶解度 (2.855 μg · mL<sup>-1</sup>) 的 3156 倍。大豆提取物-光甘草定增溶体系粒径为 (1.217 ± 0.021) nm, 粒径小且分布均一, FTIR 结果显示, 光甘草定化学结构未发生改变。大豆提取物-光甘草定增溶体系的抗氧化能力强于同浓度的光甘草定。**结论** 大豆提取物大幅提高了光甘草定的溶解度, 同时保持了光甘草定优异的抗氧化性能。

**关键词:** 大豆提取物; 光甘草定; 增溶; 抗氧化

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0631-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.013

### Solubilization and antioxidation activity of soybean extract to glabridin

ZHANG Ming-xin<sup>1, 5</sup>, ZHANG Yu<sup>1, 5</sup>, ZHANG Xiu-jun<sup>2</sup>, WANG Peng<sup>3</sup>, YANG Zhen<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>3</sup>, LI Xue<sup>4</sup>, WANG Yan<sup>1, 5\*</sup> (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120*; 3. *Tianjin Shang Mei Cosmetics Co., Ltd., Tianjin 300381*; 4. *Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052*; 5. *Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301600*)

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.81602773)。

**作者简介:** 张明欣, 女, 主要从事中药产品开发研究, email: zmx19981201@163.com \* **通信作者:** 王艳, 女, 教授, 主要从事中药产品开发研究, email: paozhijiaoxue@126.com

**Abstract: Objective** To determine the solubilization of soybean components to glabridin and determine the antioxidant activity in vitro and to characterize the system with the best solubilization.

**Methods** Glabridin was determined in the solubilization system of soybean extract and glabridin by shake flask high performance liquid chromatography. The preparation conditions of soybean extract and glabridin solubilization system were optimized by single factor experiment. The physical characterization of the solubilization system of soybean extract and glabridin under the optimal conditions was evaluated. At the same time, DPPH and ABTS radical scavenging methods were used to determine the antioxidation activity of different concentrations of soybean extract and glabridin solubilization system in vitro. **Results** The optimum preparation conditions were as follows: shaking temperature at 60 °C, rotating speed 280 r · min<sup>-1</sup> and shaking for 12 h. The solubility of glabridin was 9011.467 μg · mL<sup>-1</sup>, and the saturation solubility was about 3156 times of that in water (2.855 μg · mL<sup>-1</sup>). The particle size of the solubilization system of soybean extract and glabridin was (1.217 ± 0.021) nm, which was small but uniformly distributed. FTIR showed no changes in its chemical structure. The antioxidation capacity of the solubilization system of soybean extract and glabridin was stronger than that of glabridin alone at the same concentration. **Conclusion** Soybean extract greatly improves the solubility of glabridin, while maintaining the excellent antioxidation property of glabridin.

**Key words:** soybean extract; glabridin; solubilization; antioxidation

光甘草定 (glabridin) 是来源于光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 中的异黄酮类化合物, 具有广泛的生物学活性, 如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑制黑色素生成等<sup>[1]</sup>, 在食品、药品和化妆品领域具有广阔的应用前景。但光甘草定水溶性差、口服给药后在胃肠道吸收少、经皮给药后在皮肤的滞留量少, 生物利用度低, 药理作用不能充分发挥, 极大地限制了其在临床中的应用<sup>[2-3]</sup>。因此, 改善光甘草定溶解性、提高其生物利用度是目前亟待解决的问题。

近年来研究发现磷脂、多糖、蛋白质等可作为表面活性剂<sup>[4-6]</sup>, 并有报道论证了中药复方中发挥作用不仅只有单个成分, 更主要为活性成分之间复配形成的超分子结构, 该结构可增加中药活性成分的溶解度, 改善其体内吸收, 提高生理活性<sup>[7-9]</sup>。大豆富含磷脂、多糖、蛋白质、异黄酮等<sup>[10-11]</sup>, 推测大豆中的成分可能具有与中药活性成分复配后形成超分子结构而增加其溶解度的作用。因此本研究大豆各组分对光甘草定的增溶作用, 对增溶体系进行表征分析, 并评价光甘草定在大豆提取物增溶体系中体外抗氧化活性, 为扩大光甘草定在食品、药品和化妆品等领域的应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 试药

大豆提取物 (含大豆异黄酮 8%, 寿阳县浩源生物科技有限公司, 批号: HY20211220), 大豆多糖 (纯度 ≥ 99%, 西安凌丰生物科技有限公司, 批号: LF20220623), 大豆磷脂 [纯度 ≥ 95%, 艾伟拓 (上海) 医药科技有限公司, 批号: SY-SO-220602], 大豆皂苷 (纯度 ≥ 80%, 陕西赫博尔生物科技有限公司, 批号: HBRWS-Z00774), 大豆异黄酮 [纯度 ≥ 90%, 肽爱生物科技 (西安) 有限公司, 批号: TA-2021080425]。光甘草定 (纯度 ≥ 90%, 南京普怡生物科技有限公司, 批号: PY220612DDCD)。光甘草定对照品 (纯度 ≥ 98%, 上海源叶生物有限公司, 批号: M07HB177033)。甲醇、乙腈 (色谱纯, 赛默飞世尔科技公司); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯胍 (DPPH, 东京化成工业株式会社); 2, 2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS, 赛默飞世尔科技公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

### 1.2 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司), AB135-S 型十万分之一天平 (梅特勒-托利多有限公司), ZWF-200 型气浴恒温振荡器 (上海智城分析仪器有限公司), DK-98-II 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司), XW-18D 型涡旋混合器 (绍兴市苏珀仪器有限公司),



SB-5200 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), H1650R 型高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), EYELA 冷冻干燥机 (东京理化器械), PHSJ-5 型 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司), BT-90 + 型动态光散射粒径分析仪 (丹东百特仪器公司), Perkin-Elmer 型傅里叶变换红外光谱仪 (珀金埃尔默仪器有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 溶剂制备** 取大豆多糖、大豆磷脂、大豆皂苷、大豆异黄酮和大豆提取物粉末适量, 精密称定, 加超纯水配制得  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大豆多糖、大豆磷脂、大豆皂苷、大豆异黄酮和大豆提取物溶液, 作为溶剂备用。

**2.1.2 各增溶体系** 将过量光甘草定溶于上述各溶剂中, 采用摇瓶法, 于一定条件下制备各增溶体系。

**2.1.3 DPPH 溶液** 精密称定 DPPH 粉末  $2 \text{ mg}$ , 用无水乙醇定容至  $50 \text{ mL}$  的量瓶中, 避光,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 备用。

**2.1.4 ABTS 工作液** 将等体积比的  $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABTS 溶液与  $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  过硫酸钾溶液混合均匀, 放置黑暗处反应  $12 \text{ h}$ , 制备 ABTS 储备液。用 50% 的乙醇稀释储备液, 在  $734 \text{ nm}$  的波长下检测, 让其最终的吸光度值达到  $(0.700 \pm 0.002)$ , 即得 ABTS 工作液。

### 2.2 光甘草定含量测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[12]</sup> 色谱柱: kromasil C18 柱 ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流速:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量:  $10 \mu\text{L}$ ; 流动相: 乙腈 - 水 ( $60 : 40$ ); 柱温:  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长:  $280 \text{ nm}$ ; 洗脱时间:  $15 \text{ min}$ 。

**2.2.2 标准曲线的建立** 精密称定光甘草定对照品  $12.0852 \text{ mg}$ , 置于  $100 \text{ mL}$  量瓶中, 以乙腈溶解并定容, 得质量浓度为  $120.852 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。将对照品储备液稀释, 得到一系列质量浓度的光甘草定溶液, 按照“2.2.1”项下条件测定峰面积。以光甘草定质量浓度 ( $x$ ) 为横坐标, 峰面积 ( $y$ ) 为纵坐标, 计算线性回归方程为  $y = 21.36x - 26.39$ ,  $r = 0.999$ 。说明光甘草定在  $20.142 \sim 120.852 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与峰面积线性关系良好。

**2.2.3 专属性考察** 取光甘草定对照品溶液、大豆提取物与光甘草定混合溶液、大豆提取物溶液进样测定, 并记录色谱图, 结果见图 1。光甘草定对照品溶液在  $t = 9.7 \text{ min}$  有一尖锐色谱峰, 且

基线平滑, 谱图对称, 大豆提取物在光甘草定出峰处没有干扰, 表明该方法专属性良好。

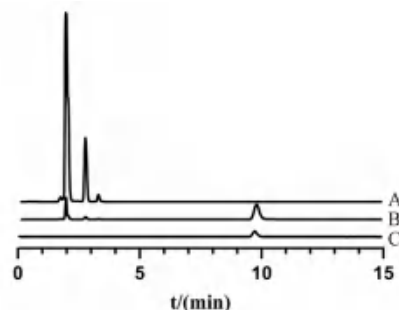


图 1 大豆提取物溶液 (A)、大豆提取物与光甘草定混合溶液 (B)、光甘草定对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of soybean extract (A), mixture of soybean extract and glabridin (B), glabridin reference substance (C)

**2.2.4 精密度考察** 取光甘草定对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 结果测得峰面积  $RSD$  为  $0.82\%$ , 表明仪器精密度良好。

**2.2.5 稳定性考察** 取光甘草定对照品溶液, 在放置  $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $12$  和  $24 \text{ h}$  时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果测得峰面积  $RSD$  值为  $1.4\%$ , 表明光甘草定标准溶液在  $24 \text{ h}$  内稳定。

### 2.3 单因素实验优化增溶条件

**2.3.1 光甘草定在不同增溶液中的浓度测定** 称取过量的光甘草定于  $5 \text{ mL}$  离心管中, 分别向管中加入  $3 \text{ mL } 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  大豆多糖溶液、大豆皂苷溶液、大豆磷脂溶液、大豆异黄酮溶液或大豆提取物溶液<sup>[13]</sup>。置于  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  气浴恒温振荡器中 ( $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 振摇过夜,  $10\,000 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清液过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜。取滤液用流动相稀释适当倍数, 取上清液过有机系  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜, 得到续滤液, 超声  $2 \text{ min}$ , 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算光甘草定的溶解度, 取平均值 ( $n = 3$ )。结果见表 1, 大豆多糖、大豆磷脂无增溶作用, 大豆异黄酮、大豆皂苷水溶性差, 同等增溶液浓度下, 大豆提取物溶液增溶光甘草定效果最好, 光甘草定的溶解度为  $885.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此选择大豆提取物进行后续研究。

表 1 光甘草定在不同溶剂中的溶解度  
Tab 1 Solubility of glabridin in different solvents

溶剂	溶解度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆多糖溶液	/
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆皂苷溶液	183.727
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆磷脂溶液	/
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆异黄酮溶液	77.160
$20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大豆提取物溶液	885.224
水溶液	2.855

### 2.3.2 大豆提取物浓度对光甘草定增溶的影响

分别配制大豆提取物溶液浓度在 75 ~ 200 mg · mL<sup>-1</sup> 的大豆提取物 - 光甘草定增溶体系, 于 40 °C 气浴恒温振荡器中 (200 r · min<sup>-1</sup>), 振摇 4 h, 其余操作同上, 测定并计算光甘草定的溶解度, 结果见图 2a, 光甘草定的溶解度随着大豆提取物溶解度的增加而增加, 在质量浓度为 100 mg · mL<sup>-1</sup> 时光甘草定溶解度的增幅较大, 达到 7692.335 μg · mL<sup>-1</sup>, 增溶效果明显, 因此选择 100 mg · mL<sup>-1</sup> 的大豆提取物溶液进行后续实验。

### 2.3.3 振荡温度对大豆提取物增溶光甘草定的影响

将大豆提取物 - 光甘草定增溶体系置于气浴恒温振荡器中 (200 r · min<sup>-1</sup>), 振摇 4 h, 选择振摇温度 30 ~ 60 °C 进行实验, 测定并计算光甘草定的溶解度, 结果见图 2b, 光甘草定的溶解度随温度的升高而增加。当温度为 60 °C 时, 光甘草定溶解度达到 8302.908 μg · mL<sup>-1</sup>, 因此选择 60 °C 为大豆提取物 - 光甘草定增溶体系的最佳制备温度。

### 2.3.4 振荡时间对大豆提取物增溶光甘草定的影响

将大豆提取物 - 光甘草定增溶体系置于气浴恒温振荡器中 (200 r · min<sup>-1</sup>), 选择振摇 4 ~ 16 h 进行实验, 测定并计算光甘草定的溶解度, 结果见图 2c, 光甘草定溶解度随振荡时间的增加而缓慢提高。当振荡时间为 12 h 时, 其对光甘草定溶解度的增幅较大, 当振荡时间延长至 12 h 以上时, 光甘草定溶解度变化趋缓, 因此选择 12 h 为大豆提取物 - 光甘草定增溶体系的最佳制备时间。

### 2.3.5 振荡转速对大豆提取物增溶光甘草定的影响

选取 100 mg · mL<sup>-1</sup> 的大豆提取物溶液、温度为 40 °C、振荡时间为 6 h 研究振荡转速对大豆提取物增溶光甘草定的影响。选择 100 ~ 280 r · min<sup>-1</sup> 进行实验研究, 测定并计算光甘草定的溶解度, 结果见图 2d, 当振荡转速为 280 r · min<sup>-1</sup> 时, 光甘草定溶解度最大, 因此选择 280 r · min<sup>-1</sup> 为大豆提取物 - 光甘草定增溶体系的最佳制备转速。

### 2.3.6 单因素考察验证

大豆提取物溶液浓度、温度、时间以及转速均对光甘草定溶解度有一定影响。大豆提取物 - 光甘草定增溶体系最佳制备条件: 100 mg · mL<sup>-1</sup> 大豆提取物溶液, 温度 60 °C, 转速 280 r · min<sup>-1</sup>, 振摇 12 h。在此条件下, 制备所得的大豆提取物 - 光甘草定增溶体系中光甘草定溶解度为 9011.467 μg · mL<sup>-1</sup>, 约是其在 水中饱和溶解度 (2.855 μg · mL<sup>-1</sup>) 的 3156 倍。

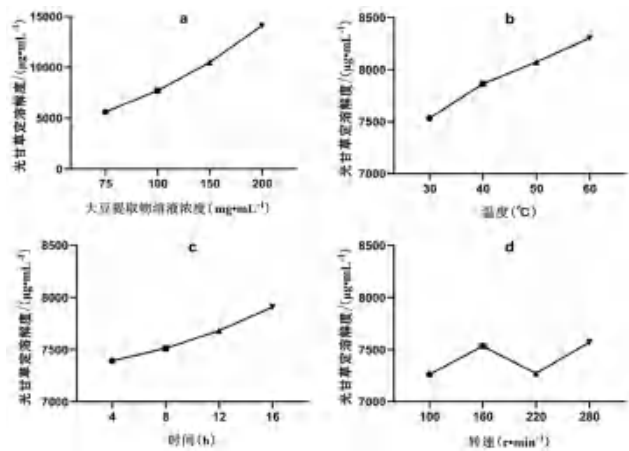


图 2 不同因素对光甘草定在大豆提取物中溶解度的影响

Fig 2 Effect of different factors on the solubility of glabridin in soybean extract

### 2.4 大豆提取物 - 光甘草定增溶体系表征分析

#### 2.4.1 粒径分布测定

将最佳条件下制备的大豆提取物 - 光甘草定增溶体系以及相同质量浓度的大豆提取物溶液适当稀释后注入比色皿中, 用激光粒度分析仪测量样品的粒径、多分布指数 (PDI), 并测定 pH 值。结果见图 3a, 大豆提取物 - 光甘草定增溶体系平均粒径 (1.217 ± 0.021) nm, PDI 为 (0.358 ± 0.009), pH 为 5.01。大豆提取物溶液与大豆提取物 - 光甘草定增溶体系的粒径大小无明显不同, 均位于 1 nm 左右, 且两者粒径均呈正态分布, 说明该增溶体系稳定性良好<sup>[14]</sup>。

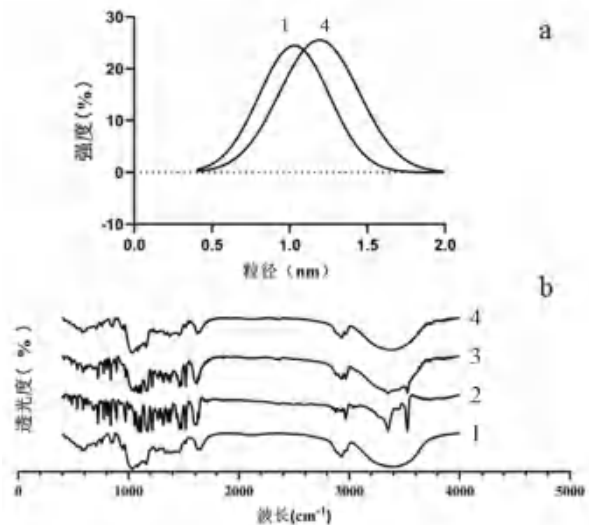


图 3 大豆提取物 - 光甘草定增溶体系粒径分布 (a) 及 FTIR 光谱 (b) 变化

Fig 3 Change of solubilization system of soybean extract and glabridin particle size distribution (a) and FTIR spectrum (b)

1. 大豆提取物 (soybean extract); 2. 光甘草定 (glabridin); 3. 大豆提取物 - 光甘草定混合物 (mixture of soybean extract and glabridin); 4. 大豆提取物 - 光甘草定增溶体系 (solubilization system of soybean extract and glabridin)

**2.4.2 红外光谱 (FTIR) 分析** 采用 KBr 压片法<sup>[15]</sup>, 将大豆提取物、光甘草定、大豆提取物-光甘草定增溶体系以及相同质量浓度的大豆提取物溶液冷冻干燥后的粉末与光甘草定混合物分别与干燥的 KBr 细粉研磨混合均匀后用压片机制成均匀的薄片, 在  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$  波长范围测定其红外吸收光谱, 结果见图 3b, 各样品的红外光谱特征如下: 光甘草定在  $3340 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1520 \text{ cm}^{-1}$  和  $1480 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1270 \text{ cm}^{-1}$  处有特征吸收峰, 由文献<sup>[16-17]</sup>可知,  $3340 \text{ cm}^{-1}$  处为 -OH 伸缩振动峰,  $1520 \text{ cm}^{-1}$  为芳香环中的 C=C 骨架伸缩振动,  $2970 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2920 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1370 \text{ cm}^{-1}$  为 -CH<sub>3</sub> 基团,  $1270 \text{ cm}^{-1}$  为 C-O-C 伸缩振动峰。大豆提取物在  $2363.58 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1907.57 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1867.92 \text{ cm}^{-1}$  处有明显吸收; 大豆提取物-光甘草定增溶体系吸收峰为  $3997.84 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3893.04 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2387.66 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2280.031 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1984.05 \text{ cm}^{-1}$ ; 基本与大豆发酵液的红外特征吸收一致, 大豆提取物-光甘草定增溶体系在  $3490.88 \text{ cm}^{-1}$  处峰形较宽, 可能为宽阔的 -OH 伸缩峰, 而物理混合物并没有出现此类峰, 表明大豆提取物-光甘草定增溶体系中羟基基团存在分子内或分子间氢键缔合, 且在扫描范围内没有出现新的吸收峰, 说明在此增溶体系没有新的化学键产生。

## 2.5 大豆提取物-光甘草定增溶体系体外活性测定

**2.5.1 DPPH 自由基清除能力测定** 参考相关文献<sup>[18-19]</sup>的方法, 取 96 孔板, 加入  $100 \mu\text{L}$  DPPH 溶液, 再加入不同浓度待测样品溶液  $100 \mu\text{L}$ 。避光放置摇床上反应 30 min, 使用酶标仪测  $517 \text{ nm}$  处吸光度, 记为  $A_1$ 。以无水乙醇代替样品溶液作为空白对照 ( $A_0$ ), 以无水乙醇代替 DPPH 溶液记为  $A_2$ , 按照公式计算 DPPH 自由基清除率:  $\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件计算  $IC_{50}$ , 得到光甘草定  $IC_{50}$  为  $169.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 大豆提取物-光甘草定增溶体系  $IC_{50}$  为  $133.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果如图 4a 所示, 随着样品浓度的增加, 其对 DPPH 自由基的清除率呈上升趋势。

**2.5.2 ABTS 自由基清除能力测定** 参考相关文献<sup>[20]</sup>测定 ABTS 自由基清除能力。取 96 孔板, 加入  $100 \mu\text{L}$  ABTS 工作液, 再加入不同浓度待测样品溶液  $100 \mu\text{L}$ 。避光反应 10 min, 使用多功能微孔板检测仪测  $734 \text{ nm}$  处的吸光度, 记为  $A_1$ 。以无水乙醇代替样品溶液作为空白对照 ( $A_0$ ), 以无水乙醇代替 ABTS 溶液记为  $A_2$ , 按照

公式计算 ABTS 自由基清除率:  $\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件计算  $IC_{50}$ , 得到光甘草定  $IC_{50}$  为  $10.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 大豆提取物-光甘草定增溶体系  $IC_{50}$  为  $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果如图 4b 所示, 随着样品浓度的增加, 其对 ABTS 自由基的清除率呈上升趋势。

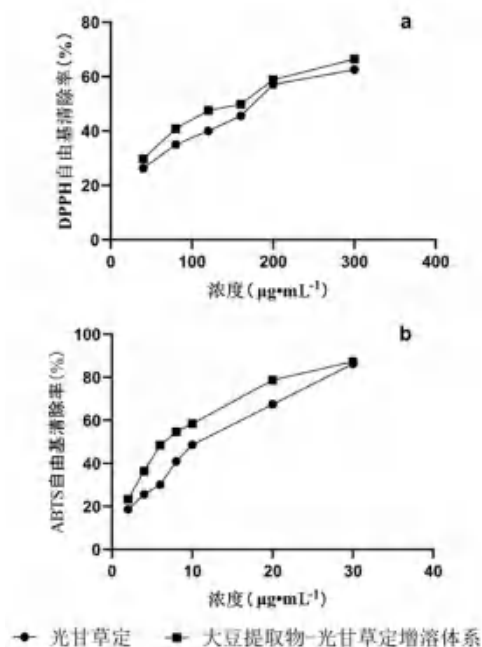


图 4 大豆提取物光甘草定增溶体系对 DPPH 自由基 (a) 和 ABTS 自由基 (b) 的清除作用

Fig 4 Scavenging effect of solubilization system of soybean extract and glabridin on DPPH radical (a) and ABTS radical (b)

## 3 结论

光甘草定具有多方面的药理活性, 但难溶于水、生物利用度低, 阻碍了其在制剂研发和临床应用等方面的发展。为了提高光甘草定的溶解度, 常用方法包括将其制备成脂质体、胶束、自微乳等<sup>[21]</sup>, 但是通常制备过程烦琐且有机溶剂难以完全消除, 无法保障其安全性<sup>[7]</sup>。

根据文献报道及本实验室现有条件, 前期预实验考察了多种增溶物质对光甘草定增溶效果的影响, 如黄芪多糖、甘草酸、甜菊糖苷、大豆提取物等, 结果表明大豆提取物对光甘草定的增溶效果最好<sup>[22-24]</sup>。大豆提取物安全稳定, 廉价易得, 富含多糖、皂苷、磷脂、异黄酮等活性成分<sup>[25]</sup>。大豆各组分溶液对光甘草定的增溶结果表明大豆提取物溶液对光甘草定增溶效果最好, 据报道活性成分之间复配形成的超分子结构可增加中药活性成分的溶解度、改善其体内吸收, 提高生理活性<sup>[7, 22]</sup>, 结合物理表征结果推测大豆提取物增



溶光甘草定的原理是大豆提取物的各种成分与光甘草定形成了超分子结构,从而提高了光甘草定的溶解度。大豆提取物-光甘草定增溶体系的 DPPH 自由基清除能力比同浓度的光甘草定清除能力更高。这一方面可能是作为增溶剂的大豆提取物本身对 DPPH、ABTS 自由基有一定清除能力(前期实验测得  $IC_{50}$  分别为  $27.064 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.303 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),另一方面也可能是难溶活性物质与大豆提取物之间发生相互作用,能更好地分散在反应液中,从而促进难溶活性物与自由基的动力学反应<sup>[26]</sup>。

通过构建大豆提取物-光甘草定增溶体系及优化其制备条件后,开展物理表征与体外抗氧化活性研究,表明大豆提取物大幅提高光甘草定的溶解度,大豆提取物-光甘草定增溶体系稳定且具有较强的抗氧化能力,为扩大光甘草定在食品、药品和化妆品中的应用奠定基础,为拓宽难溶性化合物的应用提供思路和借鉴。

## 参考文献

- [1] 罗祖良,李倩,覃洁萍,等.光果甘草的研究进展[J].中草药,2011,42(10):2154-2158.
- [2] 冯倩茹,叶柳青,刘园园,等.光甘草定平衡溶解度和油水分配系数的测定[J].天津中医药大学学报,2017,36(1):54-56.
- [3] 韦永琴.天然黄酮类活性小分子与羟丙基- $\beta$ -环糊精及蛋白相互作用机理研究[D].北京:北京化工大学,2018.
- [4] 王善勇,项舟洋,祁海松.基于天然多糖的绿色表面活性剂[J].精细化工,2020,37(10):1965-1976.
- [5] 叶亮,熊志伟,孙娥,等.中药液体制剂的剂型设计关键技术:组分的溶解性质与增溶技术应用[J].中国中药杂志,2022,47(12):3166-3174.
- [6] 陈兴.榭皮素-食品乳液体系的构建及其生物可利用性[D].南昌:南昌大学,2020.
- [7] 李锐,张倩,孙良,等.青稞可溶性膳食纤维与姜黄素复配后增溶及促吸收作用研究[J].中草药,2021,52(2):349-356.
- [8] 姜华,李军.新橙皮苷对柚皮苷增溶作用及其机制的初步考察[J].中国药学杂志,2021,56(6):484-488.
- [9] 李畅,陈菲菲,贾晓斌,等.淫羊藿多糖对淫羊藿苷和宝藿苷 I 溶解的影响及机制研究[J].中国中药杂志,2021,46(22):5825-5831.
- [10] 郑振佳,初玉圣,迟炳海,等.快速分离液相-四级杆飞行时间串联质谱分析大豆中的异黄酮成分[J].食品科学,2011,32(6):233-236.
- [11] 罗舒蕾,张树冰.大豆的有效成分及其作用[J].湖南农业科学,2019(12):103-107.
- [12] 杜茹芸,陆志芸,虞成华.高效液相色谱法测定化妆品中光甘草定的含量[J].香料香精化妆品,2014(4):35-37.
- [13] 李慧敏,马具森,王淑萍,等.木香提取物中木香烃内酯和去氢木香内酯的平衡溶解度和油水分配系数的测定[J].药物评价研究,2020,43(2):242-247.
- [14] 陈胡玲,辛怡霖,侯佳琪,等.氟苯尼考纳米晶的研制及表征[J].中国兽医学报,2022,42(8):1647-1653.
- [15] 赵梦,刘卓雅,于嘉敏,等.生姜细胞外囊泡样纳米粒载吴茱萸碱的处方工艺及体外释药研究[J].南京中医药大学学报,2022,38(6):527-533.
- [16] 阮湘梅,杨子明,李普旺,等.水杨酸/季磷盐双改性壳聚糖抗菌保鲜剂的制备及表征[J].现代食品科技,2022,38(6):145-151,115.
- [17] 任海伟,邢雪晔,周启芬,等.中药渣制备微晶纤维素工艺优化及其结构表征[J].太阳能学报,2022,43(1):196-204.
- [18] 史鑫波,唐志书,雷莉妍,等.珠子参提取物抗氧化活性及其对乳腺癌细胞的抑制作用研究[J].中南药学,2019,17(12):2073-2076.
- [19] 张金荣,卢士玲,罗瑞峰,等.富硒葡萄中硒多糖的分离纯化及抗氧化活性[J/OL].食品工业科技:1-14[2022-11-28].<https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070170>.
- [20] 冯倩茹,叶柳青,刘园园,等.鹅掌楸苷和光甘草定协同抗氧化作用研究[J].天津中医药,2016,33(10):624-628.
- [21] 王旭东,孙朝晖,周龙,等.光甘草定的应用、提取分离及制剂方式的研究进展[J].精细化工中间体,2020,50(6):10-15.
- [22] Liu F, Sun L, You G, et al. Effects of Astragalus polysaccharide on the solubility and stability of 15 flavonoids[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 143: 873-880.
- [23] 刘晓微,卓虹伊,徐霞,等.基于甘草酸增溶作用的葛根素分散片研究[J].中国中药杂志,2019,44(7):1350-1356.
- [24] 刘悦珍.甜菊糖苷三叶苷复合体系的构建及对酪氨酸酶的影响[D].南昌:南昌大学,2021.
- [25] 田赛赛,何金城,韩燕,等.大豆及其发酵品的活性成分研究进展[J].药学服务与研究,2016,16(1):15-18.
- [26] 解晓芬,吕永博,葛黎明,等.氧化直链淀粉对姜黄素的增溶作用[J].生物加工过程,2020,18(3):332-339.

(收稿日期:2022-11-07;修回日期:2022-12-08)

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析黄花菜的化学成分

权佳<sup>1, 2, 3</sup>, 孙国栋<sup>4</sup>, 张韵琦<sup>1, 2, 3</sup>, 王少男<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 河北中医学院药学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中药炮制技术创新中心, 石家庄 050200; 3. 河北省中药资源利用与质量评价国际联合研究中心, 石家庄 050200; 4. 河北睿济堂中药股份有限公司, 石家庄 050200)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术对黄花菜的化学成分进行分析。**方法** 在负离子模式下, 采用 Waters Atlantis T3 色谱柱 (4.6 mm×50 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 进样量为 2 μL。采用非靶点 (NT)、精确靶点 (AT) 和广泛靶点 (ET) 法相互结合, 全面系统地筛选化合物, 进而通过精确的 *m/z* 值、特征 MS/MS 数据、MassBank 数据库、PubChem 数据库和文献中的裂解途径等对所筛选的化合物进行鉴定。**结果** 共筛选并鉴定出 77 个化合物, 包括 39 个黄酮类、10 个生物碱类、14 个多酚类、6 个羧酸和 8 个其他类的化合物, 其中 27 个化合物为首次在萱草属植物中发现。**结论** 本方法可系统、全面、快速地筛选并鉴别黄花菜中的化合物, 为黄花菜的产品开发和深入研究提供基础。

**关键词:** 黄花菜; 裂解途径; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0637-10

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.014

## Chemical constituents in *Hemerocallis citrina* Borani by UPLC-Q-TOF-MS/MS

QUAN Jia<sup>1, 2, 3</sup>, SUN Guo-dong<sup>4</sup>, ZHANG Yun-qi<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Shao-nan<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200; 2. Innovation Center for Chinese Medicine Preparation Technology, Shijiazhuang 050200; 3. International Joint Research Centre for Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources and Quality Evaluation in Hebei Province, Shijiazhuang 050200; 4. Hebei Ruijitang Traditional Chinese Medicine Co. Ltd, Shijiazhuang 050200)

**Abstract: Objective** To analyze the chemical constituents in *Hemerocallis citrina* Borani by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). **Methods** Chromatographic separation was conducted on Waters Atlantis T3 column (4.6 mm×50 mm, 5 μm) with the mobile phase of 0.1% formic acid-water (A)-acetonitrile (B) in gradient elution at the flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 °C, and the sample size was 2 μL. Non-target, accurate-target and extensive-target methods were combined to the screen compounds systematically and comprehensively, and then the screened compounds were identified by accurate *m/z* value, characteristic MS/MS data, MassBank database, PubChem database and the fragmentation pathway shown in the references. **Results** Totally 77 compounds were identified, including 39 flavonoids, 10 alkaloids, 14 polyphenols, 6 carboxylic acids and 8 other compounds, 27 of which were found in *Hemerocallis* for the first time. **Conclusion** This method can rapidly and comprehensively identify the compounds in *Hemerocallis citrina* Borani, and provide a basis for the product development and in-depth research.

**Key words:** *Hemerocallis citrina* Borani; fragmentation pathway; ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry

**基金项目:** 河北省自然科学基金资助项目 (No.H2019423126); 河北省中医药管理局中药药类科研项目 (No.2020125); 河北中医学院省属高校基本科研业务项目 (No.JCYJ2022004); 河北省现代农业技术体系中药材创新团队项目 (No.7000120081)。

**作者简介:** 权佳, 女, email: 1877455842@qq.com \***通信作者:** 王少男, 女, 博士, 主要从事中药药效物质基础研究, email: wangshaonanzz@163.com

黄花菜 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 为百合科萱草属的多年生草本植物, 又名金针菜, 含有蛋白质、维生素、多糖类等成分<sup>[1]</sup>。目前黄花菜已成为誉满中华的干制蔬菜, 被列为四大素山珍之一, 其国内市场需求量一直较为稳定, 在国际市场上也有一定地位, 被欧洲人称为 21 世纪生活的新潮食品<sup>[2]</sup>。同时黄花菜作为中药萱草的来源之一, 也是应用历史悠久的民间药<sup>[3]</sup>。中医认为黄花菜可以散瘀消肿, 祛风止痛, 生肌疗疮<sup>[4]</sup>。现代研究表明, 黄花菜中含有蒽醌、多酚、生物碱、多糖等多种活性成分, 具有抗抑郁、抗氧化、神经保护、抗炎、抗癌等生物活性<sup>[5]</sup>。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术能够获得化合物的准确分子量、同位素峰等信息, 从而可以快速地实现中药复杂化学成分的表征。近两年 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术在食品及中药的化学成分分析工作中应用广泛<sup>[6]</sup>。

课题组前期采用 5 种溶剂体系和洗脱模式, 以色谱峰数量、响应值和峰形为指标进行综合评价, 最终获得以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相的理想梯度洗脱条件。继而采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 结合参考文献和相关资料, 采用系统的分析方法对黄花菜中的化学成分进行分离鉴定, 为黄花菜的后续研究提供基础。

## 1 材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、6545 型四极杆-飞行时间质谱仪 (Agilent Technologies Co., Ltd., USA); KQ-300VDE 双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Eppendorf Centrifuge 5418 离心机 (德国 Eppendorf AG 公司); Milli-Q 系列超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

芦丁 (批号 wkq20030203)、槲皮素 (批号 wkq20061112)、山柰酚 (批号 wkq20042613)、异鼠李素 (批号 wkq20051106) (纯度  $\geq 98\%$ , 四川省维克奇生物科技有限公司); 异槲皮苷 (批号 PS010672, 纯度  $\geq 98.5\%$ )、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号 PS012599, 纯度  $\geq 98.5\%$ )、4-羟基肉桂酸 (批号 PS010356, 纯度  $\geq 98\%$ ) (成都普思生物科技股份有限公司)。

黄花菜购自安国药材市场 (编号: XCH2020014, 产地: 四川), 经河北中医学院药学院侯芳洁教授鉴定为百合科植物黄花菜 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 的干燥花蕾, 于 4℃ 冷藏; 甲酸、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取黄花菜适量, 粉碎, 过 40 目筛。精密称取粉末 2.0 g, 加入甲醇 20 mL, 超声 (功率 360 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 吸取 2 mL 上清液于 10 mL 量瓶中, 定容, 滤过即得。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素、异鼠李素、山柰酚、4-羟基肉桂酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、芦丁对照品各 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液定容, 得各单一对照品母液。临用前取适量配制成相应质量浓度的混合对照品溶液 (槲皮素 0.02 mg·mL<sup>-1</sup>; 异鼠李素 0.02 mg·mL<sup>-1</sup>; 山柰酚 0.04 mg·mL<sup>-1</sup>; 4-羟基肉桂酸 0.04 mg·mL<sup>-1</sup>; 山柰酚-3-O-芸香糖苷 0.04 mg·mL<sup>-1</sup>; 异槲皮苷 0.04 mg·mL<sup>-1</sup>; 芦丁 0.01 mg·mL<sup>-1</sup>), 冷藏备用。

### 2.3 UPLC-Q-TOF-MS/MS 条件

采用 Waters Atlantis T3 色谱柱 (4.6 mm×50 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0~4 min, 5%B; 4~28 min, 5%~20%B; 28~40 min, 20%~90%B); 柱温为 30℃; 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 2 μL。

6545 系列四极杆飞行时间质谱仪, 配有电喷雾离子源 (ESI), 负离子扫描模式, 雾化气和干燥气均为 N<sub>2</sub>, 碰撞气为 He; 毛细管电压 4000 V, 碎裂电压 135 V, 干燥器温度 320℃, 干燥器流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 鞘气温度 350℃, 鞘气流速 11 L·min<sup>-1</sup>, 扫描范围 *m/z* 100~1000。

### 2.4 数据处理

液质联用技术结合了液相色谱的高分离性和质谱的高灵敏度、高选择性, 能够提供丰富的化学信息, 从而可以广泛、高效地进行定性分析<sup>[6]</sup>。植物中所含的化合物成分复杂, 代谢物含量高或质谱反应明显的化合物容易被检测到, 而含量低或质谱反应不明显的化合物在总离子流离转徙中没有明显的峰, 很难被检测到, 从而制约了对样本化学成分的系統分析。对此, 本研究参考 Liu 等<sup>[7]</sup>的研究采用了一种系统性的筛选方法, 如图 1 所示。

本研究采用非靶点法 (non-target, NT)、精确靶点法 (accurate-target, AT) 和广泛靶点法 (extensive-target, ET) 相结合来系统地筛选黄花菜中的化合物。其中, NT 法旨在筛选在总离子流图 (TIC) 中表现为明显峰的化合物, 并对其二级碎片离子进行化合物归属; AT 法用于筛选萱草属中已报道的化合物, 利用候选化合物的精



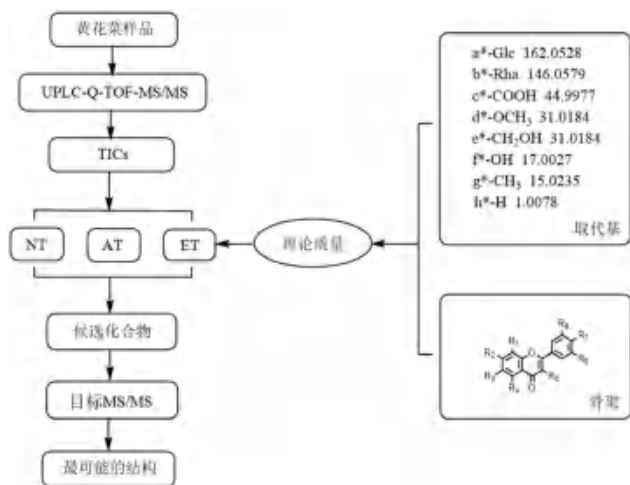


图1 系统性的筛选方法

Fig 1 Systematic screening method

NT. 非靶点法 (non-target method); AT. 精确靶点法 (accurate-target method); ET. 广泛靶点法 (extensive-target method)

确相对分子质量在黄花菜的 TIC 中进行提取离子流图 (EIC), 通过二级碎片离子确认化合物; ET 法用于筛选黄花菜中已知化合物的可能类似物。通过将已知的基本骨架与不同取代基结合, 形成一系列的理论质量。最后通过检索知网 (CNKI)、美国化学文摘数据库 (SciFinder)、MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等工具对黄花菜中化合物进行定性分析。黄花菜化学成分的 TIC、混合对照品溶液的 TIC 见图 2。

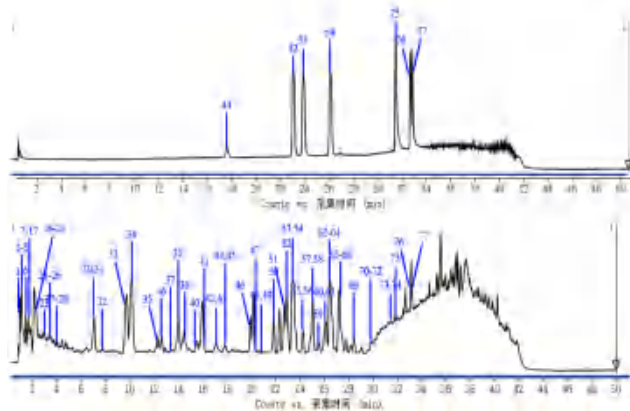


图2 混合对照品溶液与黄花菜化学成分的 TIC

Fig 2 TIC of mixed reference solution and *Hemerocallis citrina* Borani  
44. 4-羟基肉桂酸 (4-hydroxycinnamic acid); 52. 芦丁 (rutin); 53. 异槲皮苷 (isoquercetin); 58. 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (kaempferol 3-O-rutinoside); 75. 槲皮素 (quercetin); 76. 山柰酚 (kaempferol); 77. 异鼠李素 (isorhamnetin)

## 2.5 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析条件优化

取“2.1”项下供试品溶液, 采用“2.3”项下方法进行测定, 记录色谱图, 色谱图见图 3。

## 2.6 黄酮类化合物的筛选与鉴定

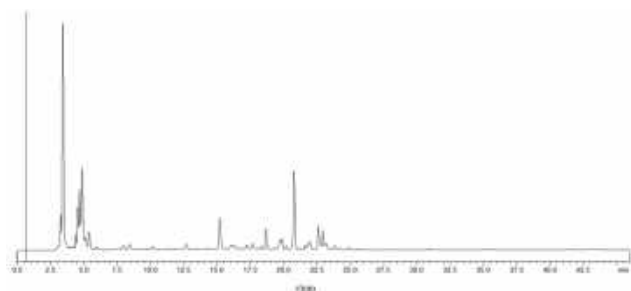


图3 黄花菜液相色谱图 (280 nm)

Fig 3 Liquid chromatogram at 280 nm of *Hemerocallis citrina* Borani (280 nm)

黄酮类化合物普遍具有相同的基本骨架, 因此通常表现出相似的质谱裂解途径<sup>[8-9]</sup>, 概括如下: ① 去质子化黄酮苷中性丢失糖基, 形成基本的去质子骨架; ② C 环断裂, 形成一系列  $m/z$  相对较低的碎片, 在黄酮类的质谱中,  $m/z$  151.00 处的片段离子是通过逆狄尔斯-阿德尔反应 (RDA) (裂解 C 环的 j 键和 k 键) 产生的, 可将其视为该类化合物的诊断离子; ③ 从脱质子的骨架中失去 CO、H<sub>2</sub>O 等小分子。上述裂解行为和碎片离子可作为鉴定黄花菜中黄酮类化合物的诊断途径和诊断离子。本研究共鉴定或推断出黄酮类化合物 39 个 (见表 1), 并对代表性化合物 (化合物 52、53、58、70、72、75、77) 的裂解途径进行举例分析。

化合物 52 的分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>。在其二级质谱中, 前体离子中性丢失一分子芸香糖得到  $m/z$  301.0347 处的高丰度去质子骨架,  $m/z$  300.0286 失去一分子 CHO 得到  $m/z$  271.0252,  $m/z$  151.0038 为黄酮苷类化合物 C 环裂解的诊断离子。根据参考文献<sup>[10]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 4) 对比, 鉴定化合物 52 为芦丁。

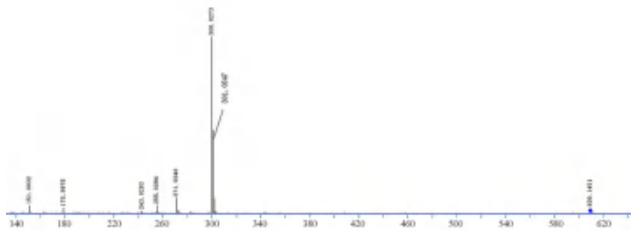


图4 芦丁对照品的质谱图

Fig 4 Mass spectrum of rutin reference substance

化合物 53 的分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>。在其二级质谱中, 前体离子  $m/z$  463.0887 失去一分子葡萄糖形成  $m/z$  301.0343, 然后断裂 3-O 苷键产生  $m/z$  300.0276, 继续失去一分子 CHO 得到  $m/z$  271.0252,  $m/z$  151.0042 为黄酮类化合物 C 环裂解产生的特征离子。根据参考文献<sup>[11]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 5) 对比, 鉴定化合物 53 为异槲皮苷。

化合物 58 的分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>。在其二级质

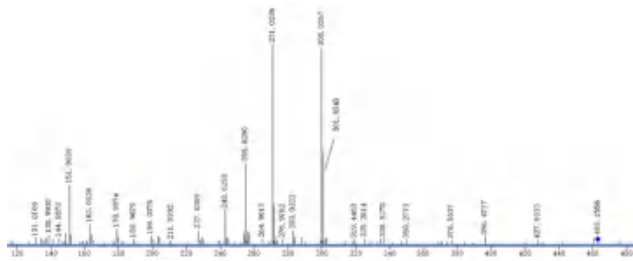


图 5 异槲皮苷对照品的质谱图

Fig 5 Mass spectrum of isoquercetin reference substance

谱中, 前体离子  $m/z$  593.1521 失去一分子芸香糖形成  $m/z$  285.0393, 然后碎片离子  $m/z$  284.0325 失去一分子 CO 得到  $m/z$  256.0354。根据参考文献<sup>[11-12]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 6) 对比, 鉴定化合物 **58** 为山柰酚-3-*O*-芸香糖苷。

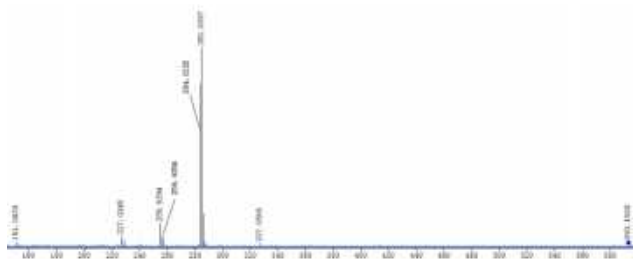


图 6 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对照品的质谱图

Fig 6 Mass spectrum of kaempferol 3-*O*-rutinoside reference substance

化合物 **70** 未见文献报道, 根据准分子离子峰的精确质量数, 推断该化合物的分子式为  $C_{43}H_{48}O_{24}$ 。在其二级质谱中, 母离子失去一分子阿魏酰和葡萄糖得到  $m/z$  609.1448, 继续失去一分子葡萄糖和鼠李糖得到  $m/z$  301.0345。 $m/z$  301.0345 和  $m/z$  151.0019 处的特征碎片离子表明该化合物的基本骨架为槲皮素。因质谱方法的局限性, 不能确定各部分取代基的连接位点, 推断化合物 **70** 可能为 Quercetin 3-*O*-feruloyl-rutinoside 7-*O*-glucoside, 下一步计划通过其他技术手段继续研究。

化合物 **72** 尚未在萱草属的研究中报道, 并且在 TIC 中呈低丰度, 因此, 采用 NT 和 AT 方法很难找到该化合物。该化合物的理论精确质量 ( $m/z$  583.1089) 由槲皮素骨架 ( $m/z$  301.0339) 与取代基 (-Glc、-OH 和苯甲酰基) 在 ET 方法中结合形成。通过理论精确质量筛选, 从黄花菜中检测到化合物 **72**。在其二级质谱 (见图 7) 中, 碎片离子  $m/z$  463.0890 和脱质子骨架  $m/z$  301.0343 分别由  $m/z$  583.1089 失去一个羟基苯甲酰基部分和继续失去一分子葡萄糖部分得到。在  $m/z$  300.0277 和  $m/z$  271.0243 处的特征碎片离子表明该化合物的基本骨架为槲皮素。根据该化合物产生很强的  $m/z$  300.0277  $[Y_0-H]^-$  离子判断它是苷元上 3-OH 被取代<sup>[11]</sup>, 因此推断化合物 **72** 为 quercetin 3- (6"-*p*-hydroxybenzoyl)galactoside)。

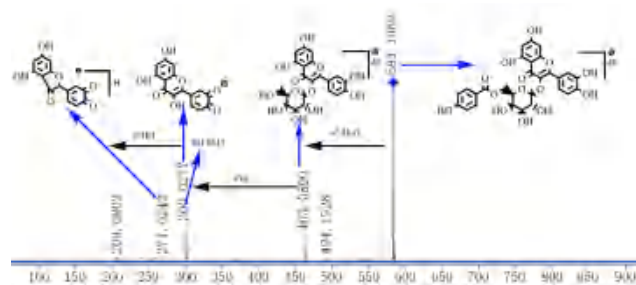


图 7 化合物 **72** 的 MS/MS 谱图及裂解行为

Fig 7 MS/MS spectra and fragmentation behaviors of compound **72**

化合物 **75** 在黄花菜的 TIC 中存在明显峰。根据准分子离子峰的精确质量数, 判断该化合物的分子式为  $C_{15}H_{10}O_7$ 。在其二级质谱中, 前体离子  $m/z$  301.0359 失去 C 环羰基得到  $m/z$  273.0402, 继续失去一分子 CO 得到  $m/z$  245.0451,  $m/z$  151.0038 处的诊断离子是 C 环发生 RDA 反应而生成。根据参考文献<sup>[13]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 8) 对比, 鉴定化合物 **75** 为槲皮素。

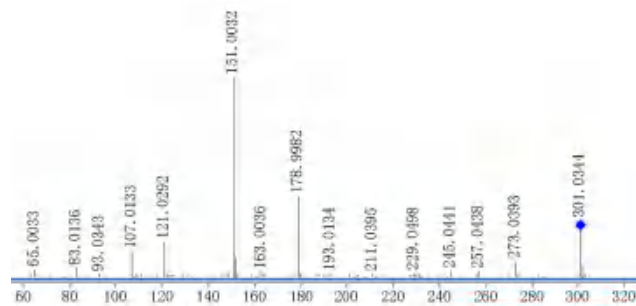


图 8 槲皮素对照品的质谱图

Fig 8 Mass spectrum of quercetin reference substance

化合物 **76** 在黄花菜的 TIC 中存在明显峰。根据准分子离子峰的精确质量数, 判断该化合物的分子式为  $C_{15}H_{10}O_6$ 。其二级质谱的碎片离子包括  $m/z$  257.0453、185.0601、151.0032。其中, 碎片离子  $m/z$  257.0453、 $m/z$ 185.0601 分别为准分子离子峰丢失一分子 CO、 $C_4H_4O_3$  产生,  $m/z$  151.0032 为准分子离子峰同时丢失一分子  $C_4H_4O_4$  和一分子  $H_2O$  产生。根据参考文献<sup>[12]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 9) 对比, 鉴定化合物 **76** 为山柰酚。

化合物 **77** 在黄花菜的 TIC 中存在明显峰。根据准分子离子峰的精确质量数, 判断该化合物的分子式为  $C_{27}H_{30}O_{15}$ 。在其二级质谱中, 前体离子  $m/z$  315.0510 失去一分子  $CH_3$  得到  $m/z$  300.0266, 继续失去一分子 CHO 得到  $m/z$  271.0251,  $m/z$  151.0042 为黄酮类化合物 C 环裂解产生的特征离子。根据参考文献<sup>[14]</sup>, 并与对照品图谱 (见图 10) 对比, 鉴定化合物 **77** 为异鼠李素。

## 2.7 生物碱类化合物的筛选与鉴定

已报道的萱草属中生物碱类化合物不多<sup>[3, 26]</sup>,

表 1 黄花菜中的黄酮类化合物信息

Tab 1 Information of flavonoids in *Hemerocallis citrina* Borani

No.	保留时 间/min	测量值 ( <i>m/z</i> )	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	筛选方法	主要二级质谱碎片信息	化合物名称
37	13.419	625.1409	0.41	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	NT, ET	583.2755, 506.0966, 463.0881, 377.0825, 301.0325, 151.0049	quercetin 3, 7-diglucoside <sup>[15]</sup>
39	14.600	771.1984	- 0.61	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	NT, ET	609.1458, 462.0814, 301.0350	quercetin 3-rutinoside-7-glucoside <sup>[7]</sup>
40	15.182	645.1223	- 0.52	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> ClO <sub>16</sub>	ET	609.1464, 447.0926, 285.0391	cyanidin 3, 5-diglucoside (chloride) <sup>[16]</sup>
41	16.296	681.1303	- 0.41	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>19</sub>	ET	637.1409, 329.0301, 301.0339, 245.4251, 178.9986, 151.0026, 127.0511	tricin 7-diglucuronoside <sup>[17]</sup>
42	16.945	791.1806	- 0.35	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> ClO <sub>20</sub>	NT, ET	755.2039, 593.1518, 447.0930, 285.0404	cyanidin 3-rutinoside-5-glucoside <sup>[18]</sup>
43	17.194	689.1024	- 0.95	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>19</sub> S	NT, ET	380.9920, 301.0354, 151.0042	[5-[5, 7-dihydroxy-4-oxo-3-[3, 4, 5-trihydroxy-6-[ (3, 4, 5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl) oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-2-yl]-2-hydroxy-phenyl] hydrogen sulfate
45	17.876	479.1194	0.15	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	ET	317.0661, 300.1817, 289.0715	noidesol B <sup>[19]</sup>
46	19.872	755.2047	0.74	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	NT, ET	300.0283, 271.0251, 178.9987, 151.0042	manghaslin <sup>[20]</sup>
47	20.504	917.2569	- 0.26	C <sub>39</sub> H <sub>50</sub> O <sub>25</sub>	AT	755.2057, 609.1434, 300.0279, 271.0254, 178.9985	quercetin- <i>O</i> -rutinoseide- <i>O</i> '-rutinoseide <sup>[7]</sup>
48	20.753	931.2712	- 1.62	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>25</sub>	AT	717.7441, 587.0052, 314.0453	isorhamnetin- <i>O</i> -rutinoseide- <i>O</i> '-rutinoseide <sup>[7]</sup>
49	20.870	595.1301	- 0.52	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	ET	463.0881, 433.0780, 301.0335	peltatoside
50	21.718	739.2099	0.82	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	NT, AT	575.1406, 393.0615, 284.0329, 255.0301, 178.9986, 151.0035	kaempferol 3-rutinoside 7-rhamnoside <sup>[7]</sup>
51	22.633	667.1511	- 0.86	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>18</sub>	ET	623.1606, 505.1319, 315.0502, 167.0346	2-[2- (3, 4-dihydroxyphenyl) -5-hydroxy-4-oxo-3-[(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> )-3, 4, 5-trihydroxy-6-[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-3, 4, 5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-7-yl]oxyacetic acid
52	22.749	609.1464	0.45	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	NT, AT	301.0347, 300.0286, 271.0252, 151.0038	rutin <sup>[10]</sup>
53	23.547	463.0887	1.09	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	NT, AT	301.0343, 300.0276, 271.0252, 151.0042	isoquercetin <sup>[11]</sup>
54	23.614	499.0647	- 0.58	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClO <sub>12</sub>	NT, ET	463.0886, 301.0351, 151.0023	myrtillin/delphinidin 3-galactoside <sup>[21]</sup>
55	24.113	463.0884	0.49	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	NT, AT	300.0274, 271.0249, 255.0291, 178.9990, 151.0040	myricetin- <i>O</i> -rhamnoside <sup>[7]</sup>
56	24.312	463.0885	0.60	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	NT, AT	301.0349, 300.0276, 271.0244, 178.9989	hyperoside <sup>[7]</sup>
57	24.678	579.1357	0.15	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	NT, AT	300.0276, 271.0244, 255.0294, 243.0287, 178.9978, 151.0038	quercetin- <i>O</i> -arabinose- <i>O</i> '-rhamnoside <sup>[7]</sup>
58	24.928	593.1521	1.28	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	NT, AT	285.0393, 284.0325, 256.0354	kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside <sup>[11-12]</sup>
59	25.393	497.0863	0.71	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClO <sub>11</sub>	NT, ET	461.1096, 299.0561, 284.0323	peonidin 3-monoglucoside <sup>[22]</sup>
60	25.892	433.0780	0.82	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	NT, AT	301.0336, 300.0278, 271.0246, 255.0297, 243.0298	quercetin- <i>O</i> -arabinose <sup>[7]</sup>
61	25.926	469.0545	- 0.52	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClO <sub>11</sub>	NT, ET	300.0276, 271.0249, 151.0028	delphinidin 3- <i>O</i> -arabinoside <sup>[23]</sup>
62	26.291	593.1520	1.22	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	NT, AT	327.0512, 285.0403, 255.0295, 151.0039	quercetin- <i>O</i> -rhamnoside- <i>O</i> '-rhamnoside <sup>[7]</sup>
63	26.325	629.1279	- 0.36	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> ClO <sub>15</sub>	NT, ET	593.1511, 327.0580, 285.0403, 255.0296, 151.0041	keracyanin (chloride) <sup>[24]</sup>
64	26.591	527.0959	- 0.38	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>12</sub>	NT, AT	491.1203, 329.0664, 314.0430, 255.0291, 193.0494	malvidin-3-galactoside/malvidin-3-glucoside <sup>[25]</sup>
65	27.056	623.1602	0.61	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	NT, AT	357.0608, 315.0506, 314.0429, 271.0251, 151.0033	isorhamnetin-rutinoseide <sup>[7]</sup>
66	27.422	477.1043	0.90	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	NT, AT	441.3077, 357.0595, 314.0428, 299.0169, 285.0397, 151.0026	isorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside <sup>[7]</sup>
67	27.555	615.1488	0.09	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> ClO <sub>14</sub>	NT, ET	579.1719, 459.1146, 271.0606, 151.0037	5-hydroxy-2- (4-hydroxyphenyl) -7-[(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> )-3, 4, 5-trihydroxy-6-[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-3, 4, 5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2, 3-dihydrochromen-4-one; hydrochloride



续表 1

No.	保留时间 /min	测量值 (m/z)	误差 / ×10 <sup>-6</sup>	分子式	筛选方法	主要二级质谱碎片信息	化合物名称
68	27.722	563.1410	0.59	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	AT	285.0384, 284.0325, 255.0295, 227.0343, 151.0039	kaempferol-O-rhamnoside-O'-arabinose <sup>[7]</sup>
69	28.271	417.0832	0.74	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	NT, AT	284.0323, 255.0289, 227.0342, 151.0046	kaempferol 3-O-arabinose <sup>[7]</sup>
70	29.599	947.2453	-0.50	C <sub>43</sub> H <sub>48</sub> O <sub>24</sub>	NT, ET	609.1448, 301.0345, 151.0019	quercetin 3-O-feruloyl-rutinoside 7-O-glucoside
71	29.717	447.0933	0.04	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	AT	357.0621, 314.0429, 286.0467, 243.0297, 151.0043	kaempferol-O-glucoside <sup>[7]</sup>
72	30.067	583.1089	0.11	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	ET	463.0890, 300.0277, 271.0243	quercetin 3-(6''-p-hydroxybenzoylgalactoside) <sup>[8]</sup>
73	31.115	567.1146	0.14	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	ET	447.0948, 327.0501, 284.0323, 255.0293, 227.0350, 151.0034, 137.0245	perfoliatumin A
74	31.214	639.1354	-0.20	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	ET	463.0882, 300, 0273, 271.0249, 255.0291, 151, 0035, 92.9278	quercetin 3-(6''-ferulylglucoside)
75	31.763	301.0359	1.59	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	NT, AT	273.0402, 245.0451, 151.0038	quercetin <sup>[13]</sup>
76	32.994	285.0409	1.18	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	NT, AT	285.0409, 257.0453, 229.0505, 151.0032	kaempferol <sup>[12]</sup>
77	33.243	315.0510	-0.48	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	NT, AT	300.0266, 271.0251, 151.0042	isorhamnetin <sup>[14]</sup>

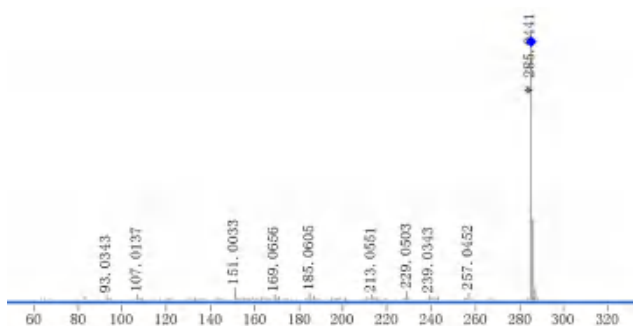


图9 山柰酚对照品的质谱图

Fig 9 Mass spectrum of kaempferol reference substance

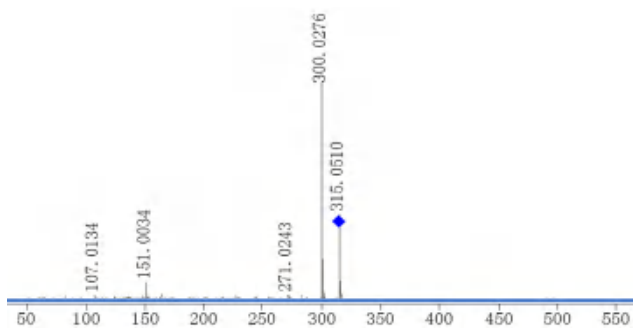


图10 异鼠李素对照品的质谱图

Fig 10 Mass spectrum of isorhamnetin reference substance

因此该类化合物主要采用 AT 法查找，辅以 NT 法。

以化合物 32 为例对其裂解规律进行分析。根据准分子离子峰的精确质量数推断化合物 32 的分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>。通过目标 MS/MS 法，发现其二级碎片离子包括 m/z 213.1252、185.1294、168.1029 和 141.1032，分别为 m/z 231.1349、213.1252、185.1294 处的离子中性丢失 H<sub>2</sub>O、CO、NH<sub>3</sub> 和 CO<sub>2</sub> 产生。根据参考文献<sup>[7, 27]</sup>，推断化合物 32 为 1', 2', 3', 4'-tetrahydro-5'-deoxy-pinnatanine。按照上述思路，共筛选得到 10 个化合物。其中，化合物 20 为首次在萱草属植物中发现（见表 2）。

## 2.8 多酚和羧酸类化合物的筛选与鉴定

萱草属中多酚类化合物相关参考文献<sup>[3, 7, 28, 30-34]</sup>较少，因此本类化合物主要以 AT 和 NT 法进行筛选。

根据准分子离子峰的精确质量数，判断该化合物 30 的分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>。通过目标 MS/MS 法进一步获得质谱（见图 11），其中，前体离子失去一分子 CO<sub>2</sub> 得到 m/z 135.0450，继续丢失一分子 H<sub>2</sub>O 形成 m/z 117.0345。并且，其碎片离子 m/z 107.0500 与 MassBank 中咖啡酸的数据相符，结合参考文献<sup>[7, 32]</sup>，推断化合物 30 是咖啡酸。

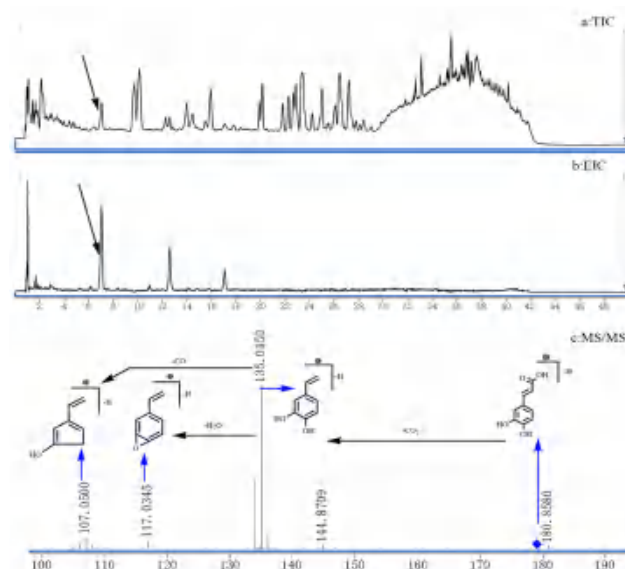


图 11 化合物 30 的筛选及鉴定过程

Fig 11 Screening and identification process of compound 30

采用上述研究方法，共筛选得到 14 个多酚类化合物，包括化合物 24 ~ 31、33 ~ 36、38 和 44。其中化合物 26 为首次在萱草属中发现，且存在异构体，其具体结构还需进一步通过对

比分析多级质谱碎片离子种类或对照品进行确定。共筛选得到 6 个羧酸类化合物, 包括化合物 2、4、5、8、13 和 16。其中化合物 4、8 和 16 是首次在萱草属植物中发现, 虽已对它们进行

了解析数据分析和 MassBank 数据库信息比对, 但下一步还应进行对照品比对以供确认。详细信息可见表 3。

表 2 黄花菜中生物碱类化合物信息

Tab 2 Information of alkaloid compounds in *Hemerocallis citrina* Borani.

No.	保留时 间 /min	测量值 ( <i>m/z</i> )	误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	筛选 方法	主要二级质谱碎片信息	化合物名称
3	1.045	421.1468	1.00	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub>	NT, AT	331.1147, 313.1040, 259.0935, 241.0830, 197.0926, 144.0300	kwansonine A <sup>[28]</sup>
9	1.494	243.0988	0.55	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	NT, AT	225.0878, 181.0969, 144.0299, 100.0402	oxypinnatanine A <sup>[7]</sup>
10	1.544	405.1516	0.49	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	NT, AT	315.1159, 243.0990, 225.0878, 186.0409, 144.0299	kwansonine C <sup>[28]</sup>
17	1.927	247.1299	-0.01	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	AT	229.1197, 201.1236, 184.0975, 173.8904, 157.0972, 98.0249	tetrahydro-longitubanines A <sup>[7]</sup>
18	2.043	243.0992	2.21	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	NT, AT	225.0881, 208.0615, 197.0927, 181.0983, 164.0718, 144.0301	pinnatanine <sup>[28]</sup>
19	2.093	405.1520	1.19	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	NT, AT	315.1194, 243.0987, 225.0882, 181.0982, 144.0301	kwansonine B <sup>[28]</sup>
20	2.193	315.1197	-0.38	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	NT	297.1071, 243.0981, 225.0876, 144.0299	mycosporine glutamine <sup>[29]</sup>
21	2.243	227.1034	-1.19	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	NT, AT	209.0925, 181.0987, 128.0349, 82.0302	longitubanine B <sup>[7]</sup>
23	4.588	259.1299	0.28	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	AT	241.1201, 197.1294, 171.1501, 130.0871	methyl-dihydro-oxypinnatanine A <sup>[7]</sup>
32	7.781	231.1349	-0.60	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	AT	213.1252, 185.1294, 168.1029, 141.1032	1', 2', 3', 4'-tetrahydro-5'-deoxy-pinnatanine <sup>[7, 27]</sup>

表 3 黄花菜中的多酚和羧酸类化合物信息

Tab 3 Information of polyphenols and carboxylic acids in *Hemerocallis citrina* Borani

No.	保留时 间 /min	测量值 ( <i>m/z</i> )	误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	筛选 方法	主要二级质谱碎片信息	化合物名称
2	0.979	191.0564	1.26	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	NT, AT	173.0450, 171.0298, 127.0398, 111.0451, 85.0295	quinic acid <sup>[28]</sup>
4	1.062	133.0146	2.78	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	NT	115.0033, 89.0246, 71.0141	malic acid <sup>[33]</sup>
5	1.261	111.0088	1.62	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	NT, AT	79.9583, 67.0190	3-furoic acid <sup>[31]</sup>
8	1.478	147.0300	1.37	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	NT	129.0185, 103.0391, 85.0292, 72.9931, 57.0346	citramalic acid <sup>[33]</sup>
13	1.760	117.0193	-0.05	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	NT, AT	117.0186, 99.0087, 73.0279	succinic acid <sup>[31]</sup>
16	1.927	129.0194	0.36	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	NT	109.5483, 85.0279, 55.0194	citraconic acid <sup>[35]</sup>
24	4.638	167.0345	-2.78	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	NT, AT	152.0113, 108.0212, 80.0265	vanillic acid <sup>[7]</sup>
25	4.704	329.0879	0.33	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	167.0345, 152.0115, 123.0448, 74.0243	vanillic acid- <i>O</i> -glucoside <sup>[7]</sup>
26	4.754	329.0880	0.47	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	NT	258.1454, 167.0345, 152.0115, 132.0448	woodorien/1- <i>O</i> -vanilloyl-beta- <i>D</i> -glucose <sup>[36]</sup>
27	5.153	299.0774	0.55	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	AT	179.0343, 151.0400, 137.0241, 101.0241, 89.0241, 59.0140	4- ( beta- <i>D</i> -glucosyloxy ) benzoic acid <sup>[37]</sup>
28	5.769	475.1454	-0.65	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	AT	387.1857, 313.1408, 243.0982, 167.0348, 109.0290	3-ethoxy-vanillic acid- <i>O</i> -arabinose- <i>O</i> -glucoside <sup>[7]</sup>
29	6.118	353.0878	1.83	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	191.0559, 179.0344, 135.0449	5-caffeoylquinic acid <sup>[7]</sup>
30	6.816	180.8580	-3.25	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	NT, AT	135.0450, 117.0345, 107.0500	caffeic acid <sup>[7, 32]</sup>
31	6.866	353.0880	0.43	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	191.0560, 179.0348, 156.0668, 135.0449, 110.0246	chlorogenic acid <sup>[7]</sup>
33	9.527	337.0934	1.43	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	NT, AT	191.0560, 163.0399, 119.0503	p-coumaroylquinic acid <sup>[28]</sup>
34	17.760	367.1037	0.44	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	331.1730, 225.0083, 193.0503, 173.0453, 155.0353, 93.0342	cryptochlorogenic acid methyl ester <sup>[38]</sup>
35	12.005	367.1035	-0.03	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	193.0504, 191.0561, 173.0460, 155.0352, 134.0372, 112.0400	methyl-chlorogenic acid <sup>[7]</sup>
36	12.521	353.0880	0.52	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	NT, AT	191.0564, 179.0350, 135.0449	4-caffeoylquinic acid <sup>[7]</sup>
38	14.134	337.0933	2.18	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	NT, AT	191.0557, 173.0453, 119.0499, 71.0145	dehydroxy chlorogenic acid <sup>[7]</sup>
44	10.176	163.0400	-0.57	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	NT, AT	162.8387, 119.0501, 93.0343, 68.9971	4-hydroxycinnamic acid <sup>[32]</sup>

### 2.9 其他类化合物的筛选与鉴定

本研究采用 NT 法对峰进行化合物归属时发现了 8 个其他类的化合物 (见表 4)。根据准分子离子峰的精确质量数, 推断该化合物 **6** 的分子式为  $C_{11}H_{17}NO_8$ 。在其二级质谱中, 母离子  $m/z$  290.0885

失去一分子果糖得到 pyroglutamate 的高丰度母核离子  $m/z$  128.0352, 并且其余碎片离子与 Mass-Bank 数据库中的信息吻合, 结合参考文献<sup>[36]</sup>, 推断化合物 **6** 为 *N*-fructosyl pyroglutamate。

所有化合物的结构见图 12。

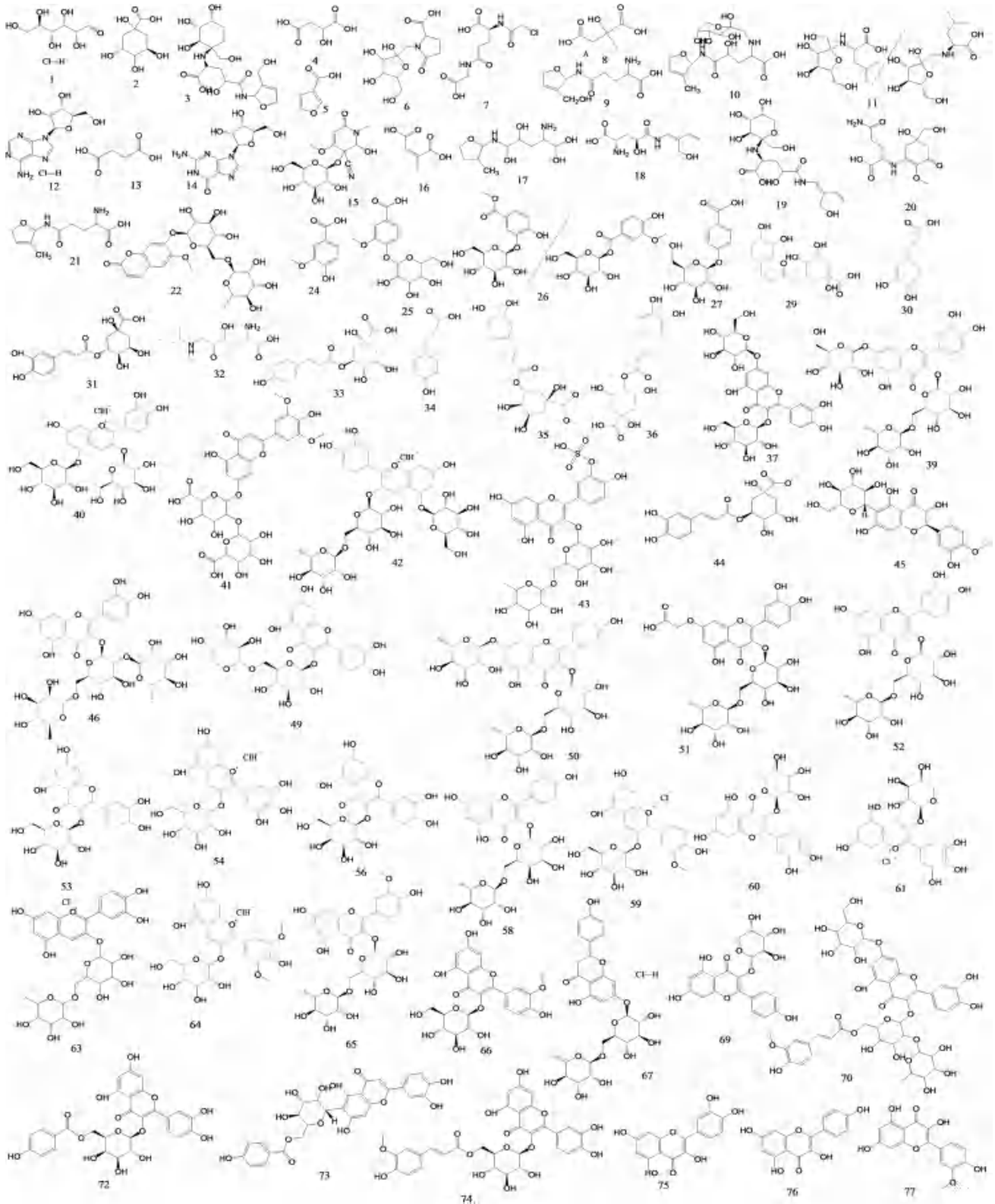


图 12 黄花菜中的化合物结构图

Fig 12 Structure of compounds in *Hemerocallis citrina* Borani



表 4 黄花菜中的其他类化合物信息

Tab 4 Information on other compounds in *Hemerocallis citrina* Borani

No.	保留时 间/min	测量值 ( <i>m/z</i> )	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	筛选 方法	主要二级质谱碎片信息	化合物名称
1	0.912	215.0328	0.54	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> ClO <sub>6</sub>	NT	181.0718, 144.0310, 59.0143	hcl-glucose
6	1.395	290.0885	1.02	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub>	NT	200.0561, 170.0453, 154.0512, 128.0352, 101.0240	<i>N</i> -fructosyl pyroglutamate <sup>[39]</sup>
7	1.478	279.0393	0.98	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	NT	243.0620, 200.0561, 152.0349, 110.0248	chloroacetyl-gamma-glutamylglycine
11	1.577	292.1406	1.36	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	NT	172.0972, 130.0873, 101.0242, 73.0296	fructosyl leucine/ <i>N</i> -(1-deoxy-1-fructosyl) leucine <sup>[40]</sup>
12	1.644	302.0664	0.96	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	NT	267.5089, 187.1081, 134.0470, 105.0190	adenosine hydrochloride <sup>[41]</sup>
14	1.810	282.0845	0.50	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	NT, AT	150.0420, 133.0155, 108.0204, 80.0250	guanosine <sup>[7]</sup>
15	1.860	359.1099	0.60	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	NT	197.0915, 180.0660, 148.0512, 116.0354, 98.0247	acalyphin <sup>[42]</sup>
22	4.397	499.1459	1.11	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	NT	325.0929, 163.0398, 119.0498	haploperoside

### 3 讨论

本研究采用 NT、AT、ET 三种方法, 系统筛选解析了黄花菜中的化合物。通过精确的 *m/z* 值、特征 MS/MS 数据、MassBank 数据库和文献中的裂解途径等对所筛选的化合物进行鉴定。共筛选和鉴定出 77 个化合物, 包括 39 个黄酮类、10 个生物碱类、14 个多酚类、6 个羧酸类和 8 个其他类的化合物, 其中 27 个化合物(化合物 1、4、6~8、11、12、15、16、20、22、26、40~43、45、49、51、59、61、64、67、70、72~74)为首次在萱草属中发现。本研究发现了 1 个可能的化合物(化合物 70), 下一步计划通过其他技术手段进行验证。

本研究首次在萱草属植物中发现了两个 C 苷(化合物 45 和 73) 和一个含 S 的化合物(化合物 43); 发现了 11 个含 Cl 的化合物, 8 个黄酮类化合物, 其中 7 个化合物的苷元为花色苷。但因关于萱草属植物中此类化合物的相关报道数量有限<sup>[43]</sup>, 且不排除是植物生长过程中出现的农药污染现象, 所以, 还需进一步的对照品验证或重复性实验研究。

质谱提供的信息量很大, 但也具有一些限制性。比如, 文献<sup>[3]</sup>报道萱草属植物中存在芦丁和橙皮苷, 但因两者的分子量和结构相似, 裂解数据也十分接近, 相同到小数点后两位, 仅通过质谱无法进行细致的区分, 因此还需要进一步的研究。研究中还发现多个因质谱局限性而不能准确进行归属的化合物, 希望进一步的研究可以填补这些空缺。

本方法可系统、全面、快速地筛选、鉴定黄花菜中的化学成分, 为黄花菜的产品开发和深入研究提供基础。

### 参考文献

- [1] 秦喜悦, 张雷, 温艳斌, 等. 黄花菜营养活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(5): 204-209.
- [2] 段九菊, 宋卓琴, 贾民隆, 等. 大同市黄花菜产业发展历程、现状及对策[J]. 中国种业, 2021(1): 17-19.
- [3] 王艳, 黄璐璐, 王东晖, 等. 萱草属植物化学成分与功能研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(1): 79-86.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.《中华本草》[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 102-105.
- [5] 李明玥, 刘宏艳, 肖静, 等. 黄花菜的活性成分、生物活性及加工技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 427-435.
- [6] 许晓辉, 邱国玉, 景武堂, 等. 液质联用技术在新药研发中的应用[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(11): 90-94.
- [7] Liu JH, Zhong XH, Jiang YY, et al. Systematic identification metabolites of *Hemerocallis citrina* Borani by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 186: 113314.
- [8] Liu M, Jiang YP, Liu R, et al. Structural features guided "fishing" strategy to identification of flavonoids from lotus plumule in a self-built data "pool" by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2019, 1124: 122-134.
- [9] 秦伟瀚, 阳勇, 李卿, 等. 基于高分辨质谱法的淫羊藿特征药效黄酮质谱裂解规律及新化合物鉴定研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1478-1490.
- [10] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析试验室, 2015, 34(2): 186-189.
- [11] 阿布拉江·克依木. 黄酮苷类天然产物的质谱分析方法研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [12] 梁艳, 于世锋, 陈卫军, 等. 山柰酚的电喷雾质谱裂解途径[J]. 应用化学, 2009, 26(10): 1250-1252.
- [13] 李宇航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- [14] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. 牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷的电喷雾飞行时间质谱研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 180-184.

- [15] Zheng W, Wang FX, Zhao Y, et al. Rapid characterization of constituents in tribulus terrestris from different habitats by UHPLC/Q-TOF MS [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28 (11): 2302-2318.
- [16] 付全娟. 石榴花的主要次生代谢物及生物活性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [17] 曹晶晶. 高分辨质谱在植物代谢物分析中的应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [18] Inigo A, Ortiz J, Hermosgutierrez I, et al. Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60 (30): 7463-7473.
- [19] Shimokawa Y, Akao Y, Hirasawa Y, et al. Gneyulins A and B, stilbene trimers, and noidesols A and B, dihydroflavonol-C-glucosides, from the bark of *Gnetum gnetonoides* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73 (4): 763-767.
- [20] 龚爽. 华紫珠和钩藤抗炎化学成分的研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2021.
- [21] Gonzalez-Dominguez R, Sayago A, Santos-Martin M, et al. High-throughput method for wide-coverage and quantitative phenolic fingerprinting in plant-origin foods and urine samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (25): 7796-7804.
- [22] 刘晓, 孙戡平, 秦昆明, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术研究炮制对白术芍药散中化学成分的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53 (13): 3920-3928.
- [23] 周银颖, 薛莹, 王乾龙, 等. UPLC-ESI-Q-TOF/MS 法筛查蓝莓中 77 种功能活性成分 [J]. *食品科技*, 2018, 43 (2): 286-292.
- [24] Sheng F, Wang YN, Zhao XC, et al. Separation and identification of anthocyanin extracted from mulberry fruit and the pigment binding properties toward human serum albumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62 (28): 6813-6819.
- [25] Delgado de la Torre MP, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Characterization and comparison of wine lees by liquid chromatography-mass spectrometry in high-resolution mode [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63 (4): 1116-1125.
- [26] Matsumoto T, Nakamura S, Nakashima S, et al.  $\gamma$ -lactam alkaloids from the flower buds of daylily [J]. *J Nat Med*, 2016, 70 (3): 376-383.
- [27] Zhang YJ, Cichewicz RH, Nair MG. Lipid peroxidation inhibitory compounds from daylily (*Hemerocallis fulva*) leaves [J]. *Life Sci*, 2004, 75 (6): 753-763.
- [28] Liu W, Zhao Y, Sun J, et al. Study the effects of drying processes on chemical compositions in daylily flowers using flow injection mass spectrometric fingerprinting method and chemometrics [J]. *Food Res Int*, 2017, 102: 493-503.
- [29] Righi V, Parenti F, Schenetti L, et al. Mycosporine-like amino acids and other phytochemicals directly detected by high-resolution nmr on klamath (*Aphanizomenon flos-aquae*) blue-green algae [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64 (35): 6708-6715.
- [30] 郭冷秋, 张颖, 张博, 等. 萱草根及萱草花的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31 (1): 74-76.
- [31] 潘红, 郝丽静, 黄建梅, 等. 黄花菜化学成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23 (9): 2186-2187.
- [32] Szewczyk K, Miazga-karska M, Pietrzak W, et al. Phenolic composition and skin-related properties of the aerial parts extract of different *hemerocallis* cultivars [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (8): 690-693.
- [33] 胡志刚, 周文忠, 张怀辉, 等. PY-GC/MS 技术研究烟草中苹果酸和柠檬酸的热裂解产物 [J]. *云南化工*, 2017, 44 (7): 31-35.
- [34] 王天山, 何春刚, 文俏慧, 等. 苯甲酸型芳香小分子的电喷雾多级质谱裂解规律 [J]. *海南师范大学学报 (自然科学版)*, 2020, 33 (1): 36-43.
- [35] Hoffmann JF, Carvalho IR, Barbieri RL, et al. *Butia* spp. (arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65 (2): 523-532.
- [36] Ma XQ, Leung AK, Chan CL, et al. UHPLC UHD Q-TOF MS/MS analysis of the impact of sulfur fumigation on the chemical profile of *Codonopsis Radix* (Dangshen) [J]. *Analyst*, 2014, 139 (2): 505-516.
- [37] Baderschneider B, Winterhalter P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (6): 2788-2798.
- [38] Zhao Y, Geng CA, Ma YB, et al. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 156: 147-154.
- [39] Tsugawa H, Nakabayashi R, Mori T, et al. A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms [J]. *Nat Methods*, 2019, 16 (4): 295-298.
- [40] Davidek T, Kraehenbuehl K, Devaud S, et al. Analysis of Amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2005, 77 (1): 140-147.
- [41] 陶兴宝. 法半夏炮制解毒机制、化痰效应及相关物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [42] 詹济华, 谭洋, 张雨林, 等. 铁苋菜属植物化学成分及其药理活性研究进展 [J]. *中南药学*, 2017, 15 (8): 1092-1099.
- [43] Sam A, Arisumi T. Anthocyanins for *hemerocallis* [C]. *Proc Am Soc Hort Sci*, 1968, 92: 641-645.

(收稿日期: 2022-10-06; 修回日期: 2022-12-19)

## 国产复方克霉唑乳膏体外透皮吸收研究

褚信信<sup>1, 2</sup>, 谢子立<sup>1, 2\*</sup>, 李显庆<sup>2</sup>, 张治军<sup>2</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

**摘要:** **目的** 建立复方克霉唑乳膏体外透皮吸收测定方法, 并以进口克霉唑乳膏作为参比, 分析国产乳膏体外透皮差异情况。**方法** 采用离体猪耳背皮肤作为透皮试验材料、30% 乙醇-生理盐水为接收液, 改良 Franz 扩散池法考察乳膏在 32 °C 环境下透皮吸收规律, 分别以 LC-MS/MS 法测定接收液中克霉唑吸收量随时间的变化、HPLC 法测定试验结束后离体皮肤内克霉唑滞留量。**结果** 3 批国产乳膏与进口乳膏透皮量的比值分别为: 1.32、1.75、1.62, 皮内滞留量的比值分别为: 1.19、1.57、1.32, 4 批乳膏皮内滞留量与透皮吸收总量的比例为 88.03% ~ 90.19%, 皮内滞留量远高于透过量, 符合该类药物临床用药特性, 但国产制剂的平均粒径远高于进口制剂。**结论** 国产复方制剂体外透皮性能均高于进口制剂, 但不同企业制剂间存在差距, 有待进一步优化; 新建方法适用于复方克霉唑乳膏体外透皮吸收测定, 可为半固体制剂质量评价提供依据, 同时为其他复方制剂品种的研发和处方工艺优化提供借鉴。

**关键词:** 克霉唑; 外用半固体制剂; 体外透皮试验; Franz 扩散池

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0647-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.015

### In vitro transdermal absorption of domestic compound clotrimazole cream

CHU Xin-xin<sup>1, 2</sup>, XIE Zi-li<sup>1, 2\*</sup>, LI Xian-qing<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-jun<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Anhui Institute of Food and Drug Control, Hefei 230051)

**Abstract: Objective** To determine in vitro transdermal absorption of compound clotrimazole cream, and to analyze the difference of in vitro transdermal absorption of domestic cream with imported clotrimazole cream as reference. **Methods** The in vitro porcine ear skin was used as the transdermal experimental material, and 30% ethanol-saline was used as the receiving solution. The modified Franz diffusion cell method was used to investigate the transdermal absorption of the cream at 32 °C. The changes of drug absorption in receiving liquid with time were determined by LC-MS/MS method, and the drug retention in isolated skin after the experiment was determined by HPLC method. **Results** The ratio of transdermal amount of three batches of domestic cream to imported cream was 1.32, 1.75 and 1.62, respectively, and the ratio of intradermal retention was 1.19, 1.57 and 1.32, respectively. The ratio of intradermal retention to total transdermal absorption of four batches of cream was 88.03% ~ 90.19%. The intradermal retention was much higher than the total transdermal absorption, which was in line with the clinical characteristics of these drugs, but the average particle size of domestic preparations was much higher than that of imported preparations. **Conclusion** The in vitro transdermal performance of domestic compound preparations is higher than that of imported preparations, but there is a gap between different enterprise preparations, which needs to be further optimized. The new method is suitable for the determination of transdermal absorption of compound clotrimazole cream in vitro, which provides a basis for the quality evaluation of semi-solid preparations, and provides reference for the development of other compound preparations and the

基金项目: 2021 年国家药品抽检计划 (国药监药管 [2021]1 号)。

作者简介: 褚信信, 女, 硕士研究生, 主要从事药物质量控制与研究, email: 806838520@qq.com \* 通信作者: 谢子立, 男, 主任药师, 主要从事药物质量控制与评价研究, email: 1536838165@qq.com



optimization of prescription process.

**Key words:** clotrimazole; external semi-solid preparation transdermal; in vitro permeation test; Franz diffusion cell

近年来,随着抗菌药物以及激素类药物的大量使用,真菌类疾病的发病率逐渐上升,严重影响着患者的生活质量。外用抗真菌药物有疗效好、安全性高、毒副作用少、起效快等优点,广泛应用于浅部真菌感染的治疗。克霉唑是由拜耳于 20 世纪 60 年代末研发的咪唑类广谱抗真菌药物<sup>[1]</sup>,对多种真菌尤其是白念珠菌具有良好的抗菌作用,是目前临床上常用的外用抗真菌药物之一<sup>[2-3]</sup>,因其吸收差且不良反应多,很少用于内服,多制成外用制剂,以乳膏剂为主。根据 FDA 橙皮书数据库查询,克霉唑乳膏参比制剂规格包括 1% 和 2% 两种,2022 年 9 月国家药监局发布的仿制药参比制剂目录(第五十九批)中收录了拜耳生产的克霉唑乳膏(规格:1.0%)。为提高药物疗效,复方克霉唑乳膏增加了主药含量(规格:1.5%),同时加入 15% 尿素能增进角质层的水合作用,使皮肤柔软并具有抗菌止痒作用,两者配合有协同作用<sup>[4]</sup>,提高疗效。

经皮给药是一种能避免肝脏首过效应及肠胃灭活、维持血药浓度、提高生物利用度的给药途径<sup>[5]</sup>。近年来, FDA 推荐采用体外试验代替体内试验,2012 年《阿昔洛韦乳膏研究草案》<sup>[6]</sup>首次指出有体外和体内两种方案可证明生物等效性,并相继发布甲硝唑乳膏、克林霉素凝胶等更多的半固体制剂开发指导原则,通过体外释放试验、体外透皮试验(in vitro permeation test, IVPT)等研究验证仿制药与参比制剂的生物等效性。体外透皮试验与传统药物动力学方法相似,其设计目的是模拟外用药物在生理条件下的透皮过程,以反映外用制剂的质量<sup>[7]</sup>。测定角质层中的药物含量能够评价药物药效,透皮接收液中的药物含量则可评价药物安全<sup>[8]</sup>。皮肤外用制剂体外透皮吸收试验一般基于开放扩散池系统<sup>[9-10]</sup>。查阅文献资料,未见复方克霉唑乳膏的透皮吸收报道。本研究采用 Franz 扩散池法,以离体猪耳背皮肤为模型,分别通过液相色谱和液相质谱测定不同厂家乳膏剂皮内滞留及体外透皮量,分析其透皮效果差异的原因,为复方克霉唑乳膏处方工艺的改进提供依据。

## 1 材料

918-12 型干加热自动透皮扩散仪(美国 Logan 仪器有限公司); Waters Xevo TQ-S 型高效液相色谱-串联四极杆质谱仪、Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Malvern mastersizer 3000 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司); XS-105 十万分之一电子分析天平、梅特勒 Seven Multi 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公司)。

乙腈、甲醇(色谱级,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),氯化钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、乙醇、磷酸、氨水(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。

克霉唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100037-202008,纯度:100%),克霉唑进口制剂(Bayer Inc,批号:GP01XG8);国内 3 家不同企业市售制剂(厂家 1,批号:201003;厂家 2,批号:200902;厂家 3,批号:200901)。离体猪耳背皮肤[光圈生物科技(山东)有限公司,批号:20210924]。

## 2 方法与结果

### 2.1 体外透皮试验

采用全自动透皮扩散仪进行体外透皮扩散试验。为减少皮肤差异,每次试验时一批进口制剂与一批国产制剂同时进行。将裁减后的离体皮肤固定于供给池与接收池连接处,表皮层朝上,真皮层与接收池相接。接收池内加入 30% 乙醇-生理盐水作为接收液,排净气泡,将适量乳膏量均匀涂抹于垫圈垫片,除去多余乳膏后放置在皮肤上方,并用旋钮固定。接收池体积为 12 mL,在  $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  和  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  下恒速恒温搅拌,分别于试验开始的 2、4、8、12、16、20、24 h 取样 5 mL,及时补充相等体积的新鲜接收液,过滤,取续滤液注入液质联用仪。20 h 续滤液精密稀释 2 倍、24 h 续滤液精密稀释 5 倍注入液质联用仪。

试验结束时将离体皮肤完整取下,用生理盐水将皮肤表面乳膏冲洗干净,晾干,将其剪碎后加入甲醇 5 mL,超声提取,每次 20 min,重复 3 次,合并提取液置 20 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液注入液相色谱仪。

### 2.2 质谱和色谱条件

#### 2.2.1 HPLC-MS/MS 测定透皮量

① 质谱条件：采用电喷雾正离子化 MS/MS 法测定克霉唑，喷雾电压为 3.5 kV，离子源温度为 150 °C，脱溶剂温度为 350 °C，扫描模式为多反应监测 (MRM)，选择质荷比 ( $m/z$ ) 为 277.1/165.1 的离子对进行定量检测，锥孔电压 54 V，碰撞电压 38 V。

② 色谱条件：采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 50 mm) 色谱柱，流动相为乙腈-水-甲酸 (45 : 55 : 0.1) (用 10% 氨水调 pH 至 4.0)，流速为 0.3 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ，柱温为 30 °C，进样体积为 0.5  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 HPLC 测定皮内滞留量** 色谱条件同《中国药典》2020 年版二部复方克霉唑乳膏含量测定。采用 Eclipse Plus C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱，流动相为甲醇-0.05 mol $\cdot$ L $^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 (7 : 3) (用 10% 磷酸调节 pH 至 5.7 ~ 5.8)，检测波长为 215 nm，流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ，柱温 30 °C，进样体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 透皮接收液测定方法学考察

① 线性关系：精密称取克霉唑对照品适量，加甲醇溶解并稀释至 1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$  作为对照品储备液，用 30% 乙醇生理盐水分别稀释制成 5、10、20、50、100 ng $\cdot$ mL $^{-1}$  系列对照品溶液，精密量取上述溶液各 0.5  $\mu\text{L}$  注入质谱仪中，以质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标，峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标，得回归方程为  $A = 3757.9C + 907.64$  ( $r = 0.9998$ )。取上述 5 ng $\cdot$ mL $^{-1}$  对照品溶液逐级稀释后依次进样，检测限按信噪比 3 : 1 计，为 0.08 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ，定量限按信噪比 10 : 1 计，为 0.25 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

② 精密度：取上述 20 ng $\cdot$ mL $^{-1}$  线性溶液 0.5  $\mu\text{L}$ ，重复进样 6 次，记录峰面积，结果峰面积的 RSD 为 1.1%，表明仪器精密度良好。

③ 稳定性：取厂家 2 接收液室温放置，分别于 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定，结果峰面积的 RSD 为 1.6%，说明接收液在 24 h 内稳定。

④ 回收率：取厂家 2 透皮接收液进样测定，质量浓度为 36.58 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ，精密量取接收液 1 mL，准确加入 36.81 ng $\cdot$ mL $^{-1}$  对照品溶液 1 mL，摇匀并过滤，取续滤液进样测定，平均加样回收率为 98.1%，RSD 为 1.7% ( $n = 6$ )。20 ng $\cdot$ mL $^{-1}$  对照品溶液与厂家 2 制剂 24 h 透皮接收液测定 MRM 谱图如图 1 所示。

### 2.3.2 皮内滞留量测定方法学考察

① 线性关系：精密量取“2.3.1”项下对照品

储备液，用甲醇分别稀释为 2、5、10、15、20、50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列对照品溶液，各精密量取 20  $\mu\text{L}$  注入色谱仪中，以质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标，峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标，得回归方程为  $A = 26853C - 14032$  ( $r = 0.9999$ )。取上述 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液逐级稀释后依次进样，检测限按信噪比 3 : 1 计，为 0.21  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，定量限按信噪比 10 : 1 计，为 0.73  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

② 精密度：取上述 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  线性溶液 20  $\mu\text{L}$ ，重复进样 6 次，记录峰面积，结果峰面积 RSD 为 1.3%。

③ 稳定性：取厂家 2 进行透皮试验的皮肤样液室温放置，分别于 0、2、4、8、12、24 h 后进样测定，记录峰面积，结果峰面积 RSD 为 1.1%。

④ 回收率：精密量取对照品储备液，用空白乳膏进行透皮试验的皮肤样液分别稀释成 5、10、20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液，进样测定，结果显示低、中、高质量浓度的回收率分别为 98.0%、98.1%、97.9%，RSD 分别为 1.7%、2.3%、1.2%。进口乳膏与厂家 2 制剂 24 h 皮内滞留量测定谱图如图 1 所示。

## 2.4 体外透皮量和皮内滞留量的测定结果

照“2.2.1”项下方法及下式计算各点的单位面积累积透皮量  $Q$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )：

$$Q = (C_n \times V + \sum C_i \times V_0) / A$$

(20 h、24 h 样液  $Q$  值分别以 2 倍、5 倍计算)

照“2.2.2”项下方法及下式计算试验结束时的皮内滞留量  $X$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )： $X = C_n \times 20/A$ 。

式中， $C_n$  为第  $n$  个取样点测得的克霉唑质量浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )， $V$  为接收液的体积 (mL)， $C_i$  为第  $i$  ( $n - 1$ ) 个点测得的克霉唑质量浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )， $V_0$  为取样体积 (mL)， $A$  为有效释药面积 (1.766  $\text{cm}^2$ )，20 为稀释倍数，以  $Q$  对时间  $t$  进行线性回归。进口及 3 批国产制剂的体外透皮结果见表 1，单位面积累积透皮量-时间曲线见图 2。

采用激光粒度分析仪对不同批次克霉唑乳膏粒径进行测定，体积平均粒径由高到低依次为： $d_1$  (15.5  $\mu\text{m}$ ) >  $d_3$  (10.3  $\mu\text{m}$ ) >  $d_2$  (7.7  $\mu\text{m}$ ) >  $d_{\text{进口}}$  (4.7  $\mu\text{m}$ )，即国产乳膏中粒度大小排序为：厂家 1 > 厂家 3 > 厂家 2，国产制剂的平均粒径远高于进口制剂。粒度越小透皮吸收效果越好<sup>[11]</sup>，唐开锋等<sup>[12]</sup>在研究药物粒径对吴茱萸次碱混悬凝胶透皮吸收的影响时发现粒径减小可以促进凝胶中药透皮吸收、增大透过量等。

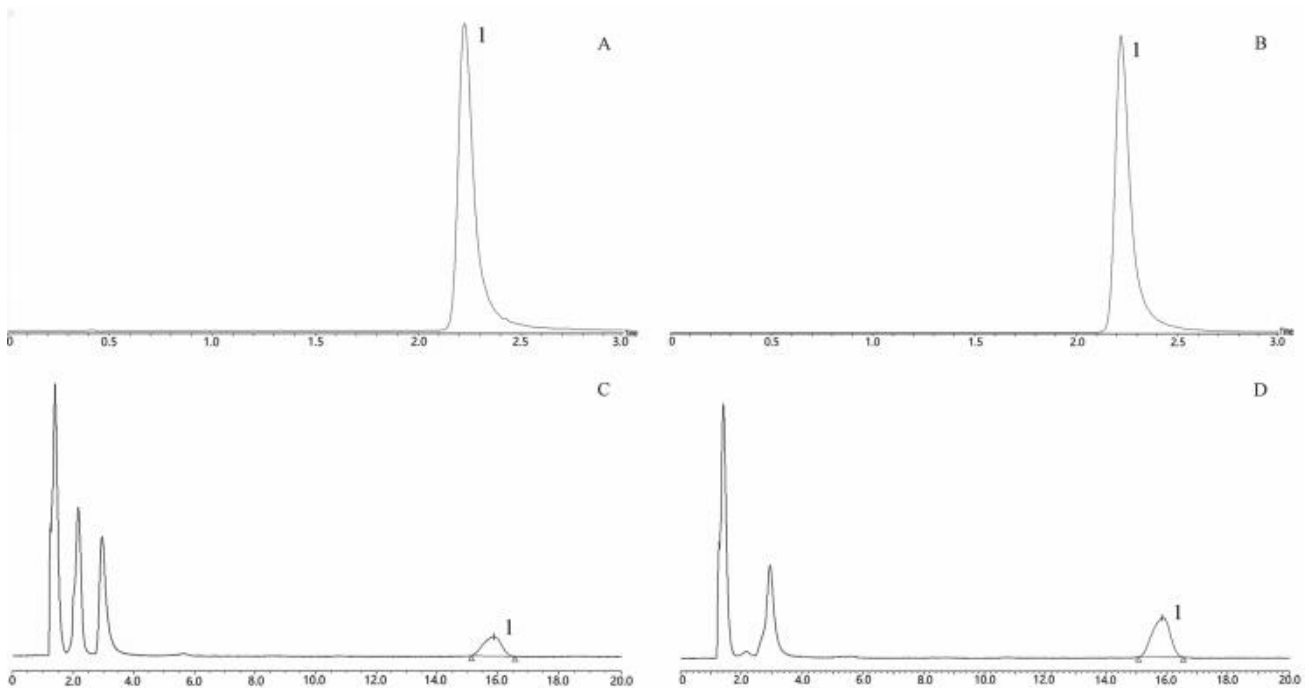


图 1 透皮接收液和皮内滞留测定谱图

Fig 1 Determination chromatogram of transdermal receiving solution and intradermal retention

A. 对照品溶液定量离子对 MRM 图 (MRM chromatogram of quantitative ion pair of reference solution); B. 厂家 2 乳膏透皮液定量离子对 MRM 图 (MRM chromatogram of quantitative ion pair transdermal solution of manufacturer 2); C. 进口乳膏皮内滞留测定 HPLC 谱图 (HPLC chromatogram for determination of retention in imported cream); D. 厂家 2 乳膏皮内滞留测定 HPLC 谱图 (HPLC chromatogram for determination of retention in cream of manufacturer 2); 1. 克霉唑 (clotrimazole)

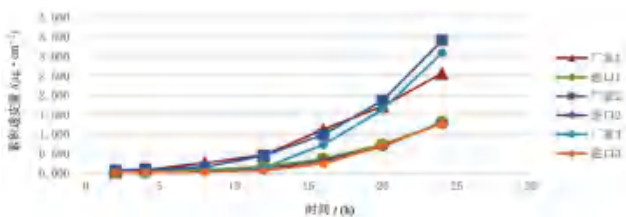


图 2 克霉唑乳膏累积透皮量-时间曲线

Fig 2 Cumulative transdermal dose-time curve of clotrimazole cream

由图 2 可知,透皮接收液测定结果显示各厂家累积透皮量由高到低依次为:厂家 2 > 厂家 3 > 厂家 1 > 进口;由表 1 可知,各厂家皮内滞留量由高到低依次为:厂家 2 > 厂家 3 > 厂家 1 > 进口,与透皮量结果趋势基本一致。不论是透皮量还是皮内滞留量,国产复方制剂均高于进口制剂,这不仅与复方制剂规格提高有关,也与其中均含有较高浓度的尿素以及具有促透作用的辅料(如丙二醇、二甲基亚砜、聚山梨酯、PEG6000 等)有关。4 批乳膏皮内滞留与透皮吸收总量(皮内滞留+透过量)的比例为 88.03% ~ 90.19%,大部分均滞留在皮肤内,符合外用抗真菌制剂仅于局部吸收而非作用于全身的特点,对于临床用药具有一定的安全性。

### 3 讨论

#### 3.1 透皮接收液的选择

理想的接收液应在满足漏槽条件的基础上尽可能地接近人体皮肤微环境<sup>[10]</sup>,即与皮肤真皮层有相近的组成、pH 和渗透压。对于亲水性化合物,一般选择生理盐水或缓冲溶液,对于亲脂性化合物,可在接收介质中加入适量增溶剂,如乙醇、PEG400、吐温等。有研究者在体外透皮试验中选择不同浓度乙醇-生理盐水(20%<sup>[13]</sup>、30%<sup>[14]</sup>、50%<sup>[15-16]</sup>等)作为接收介质。预试验中通过对比生理盐水、磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、含不同浓度乙醇生理盐水、不同浓度的乙醇磷酸盐缓冲液的区别,发现克霉唑在生理盐水、磷酸盐缓冲液中几乎不能检出,在 30%乙醇-生理盐水接收液中效果较好,故选择 30%乙醇-生理盐水作为接收介质。

#### 3.2 给药量的选择

本试验使用 3 种不同厚度硅胶垫圈作为给药工具(相应乳膏的质量分别约为 0.35 g、0.18 g、0.08 g)考察接触面积相同时,给药量对皮内滞留量和透皮量的影响,结果皮肤表层均残存较多乳膏,在一定范围内给药量对皮内滞留量及透皮量均无明显影响,最终选择适中尺寸的垫圈作为给药工具。



表 1 克霉唑乳膏体外透皮试验结果  
Tab 1 In vitro permeation test of clotrimazole cream

厂家	回归方程	<i>r</i>	$Q_{24h}/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	$X_{24h}/$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	$Q_{\text{国产}}/$ ( $1.5 \times Q_{\text{进口}}$ )	$X_{\text{国产}}/$ ( $1.5 \times X_{\text{进口}}$ )	$X/$ ( $Q + X$ ) / %
厂家 1	$Q = 0.0053t^2 - 0.0242t + 0.0663$	0.9986	2.56	21.21	1.32	1.19	89.23
进口 1	$Q = 0.0038t^2 - 0.0438t + 0.1323$	0.9963	1.29	11.86			90.19
厂家 2	$Q = 0.01t^2 - 0.116t + 0.3495$	0.9968	3.41	27.51	1.75	1.57	88.97
进口 2	$Q = 0.0043t^2 - 0.0583t + 0.164$	0.9954	1.30	11.68			89.98
厂家 3	$Q = 0.0106t^2 - 0.1445t + 0.3682$	0.9968	3.09	22.73	1.62	1.32	88.03
进口 3	$Q = 0.0045t^2 - 0.0631t + 0.17$	0.9950	1.27	11.44			90.01

注：进口乳膏克霉唑标示量为 1.0%，国产三厂家克霉唑标示量为 1.5%。

Note: The labeled content of clotrimazole of imported preparation is 1.0%, and that of three domestic manufacturers is 1.5%.

#### 4 结论

本次研究的 4 批乳膏制剂均表现出相同的高滞留、低透过特性，但不同厂家乳膏的粒度控制存在一定差距，提示国产乳膏的粒度控制尚有进步空间，在促渗剂及尿素的影响下，国产 3 个厂家的乳膏透皮性能均高于进口乳膏，影响因素的交互作用有待进一步探究。本试验采用液质联用和液相色谱法分别测定复方克霉唑乳膏体外透皮量及皮内滞留量，方法灵敏准确，可用于复方克霉唑乳膏体外透皮吸收研究；目前尚无已上市的 1.5% 规格克霉唑乳膏参比制剂，因此选择 1.0% 克霉唑乳膏作为参比，为其他无参比制剂的复方制剂在体外评价方面提供参考。

#### 参考文献

[1] 颜玲玲, 何保就, 冯韬, 等. 克霉唑乳膏成分检测及稳定性分析 [J]. 北方药学, 2017, 14 (12): 6.  
 [2] 杨晓梅, 毕开顺, 梁勇坤, 等. 克霉唑乳膏中有关物质的定性与定量分析 [J]. 药学学报, 2018, 53 (12): 2093-2098.  
 [3] 陈雪雯, 陈裕充, 温海. 部分新型外用唑类抗真菌药物治疗浅部真菌病的研究进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2022, 17 (1): 55-58.  
 [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知. 化学药和生物制品卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 1377.  
 [5] 何星击, 王晖. 药物经皮吸收数学模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31 (5): 596-600.  
 [6] FDA. Product-specific guidances, for generic drug development. Draft guidance on acyclovir [EB/OL]. (2012-03) [2021-12-30]. <https://www.fda.gov/drugs/>

guidance-compliance-regulatory-information/ gu-idances. dxugslluom296732. pdf.

[7] 国家药品监督管理局药品审评中心. 《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则 (试行)》[BB/OL]. (2021-03-16) [2021-07-21]. <https://www.cde.org.cn/main/news/view-InfoCommon/4e790f4ad1cb21091e5a8bf4a107c535>.  
 [8] 马欢, 赵静, 葛庆华. 皮肤用制剂体外透皮试验概述及应用实例 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52 (8): 1010-1036.  
 [9] 田洁. 皮肤外用半固体制剂体外透皮吸收对比试验常见问题分析 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (18): 2113-2115.  
 [10] 田璐, 张蜀, 林华庆, 等. 经皮给药制剂体外透皮扩散试验方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23 (29): 2761-2763.  
 [11] 狄天云, 高原雨, 朱捷, 等. 激光粒度测定仪测定醋酸肤轻松乳膏粒度的方法学研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (1): 181-184.  
 [12] 唐开锋, 欧水平, 王玉和, 等. 粒径对吴茱萸次碱混悬凝胶透皮吸收的影响 [J]. 遵义医科大学学报, 2021, 44 (3): 302-307.  
 [13] 李晔, 张昆, 蔡俊飞, 等. 青风藤碱透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29 (22): 2610-2616.  
 [14] 于倩, 张荣榕, 沈颖昕, 等. 黄连膏体外透皮吸收及抗炎活性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (16): 1625-1630.  
 [15] Montenegro L, Turnaturi R, Parenti C, et al. In vitro evaluation of sunscreen safety: effects of the vehicle and repeated applications on skin permeation from topical formulations [J]. Pharmaceutics, 2018, 10 (1): 27.  
 [16] 杨树芳, 吴智敏, 郭淑娟, 等. 广藿香酮传递体透皮效能评价及传递体透皮机制研究 [J]. 中南药学, 2018, 16 (2): 187-191.

(收稿日期: 2022-11-17; 修回日期: 2022-12-26)

# 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对急性药物性肝损伤的作用研究

张婷<sup>1</sup>, 冯石卜<sup>1</sup>, 姜祎<sup>1,2</sup>, 张化为<sup>1,2</sup>, 宋小妹<sup>1,2,3,4</sup>, 张东东<sup>1,2</sup>, 李玉泽<sup>1,2</sup>, 黄文丽<sup>1,2</sup>, 邓翀<sup>1,2,3,4\*</sup> (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 研究山茱萸果核提取物大孔树脂不同洗脱部位对对乙酰氨基酚 (APAP) 所致小鼠急性肝损伤 (ALI) 的保护作用。**方法** 通过大孔吸附树脂将山茱萸果核提取物分别用 0%、30%、60% 和 90% 乙醇进行洗脱, 得到 4 个洗脱部位 (ESCOA、ESCOB、ESCOC、ESCOD)。再以生化检测和组织病理学结果, 评价山茱萸果核不同洗脱部位的低、高剂量组 (以生药量计为  $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $12.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 对 APAP 所致小鼠 ALI 的保护作用。**结果** 组织病理学观察结果表明, 模型组小鼠的肝组织可见炎性细胞浸润, 伴有肝细胞变性、片状坏死, 而山茱萸果核 ESCOA 高剂量组、ESCOB 低剂量组及 ESCOC 各剂量组对这些病变均有不同程度的改善; 生化检测结果表明, 与模型组相比, 各组小鼠血清中谷丙转氨酶水平均显著降低, ESCOA 低剂量组和 ESCOC 各剂量组小鼠血清中谷草转氨酶水平显著降低, 各组小鼠肝脏组织中 SOD 水平均显著升高, ESCOA 低剂量组、ESCOB 高剂量组、ESCOC 各剂量组小鼠肝脏组织中 GSH-Px 显著升高, ESCOA 低剂量组及 ESCOC、ESCOD 各剂量组小鼠血清中 MDA 水平显著降低。**结论** 山茱萸果核提取物的不同洗脱部位均对 APAP 所致小鼠 ALI 有一定的保护作用, 其机制可能与抗氧化应激反应有关。

**关键词:** 急性肝损伤; 大孔吸附树脂; 山茱萸果核

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0652-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.016

## Effect of different elution sites of macropore resin from extract of seeds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. on acute drug-related liver injury

ZHANG Ting<sup>1</sup>, FENG Shi-bo<sup>1</sup>, JIANG Yi<sup>1,2</sup>, ZHANG Hua-wei<sup>1,2</sup>, SONG Xiao-mei<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Dong-dong<sup>1,2</sup>, LI Yu-ze<sup>1,2</sup>, HUANG Wen-li<sup>1,2</sup>, DENG Chong<sup>1,2,3,4\*</sup> (1. *College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046*; 2. *Shaanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Fundamentals and New Drugs Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046*; 3. *College of Pharmacy, Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine of Shaanxi, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046*; 4. *Key Laboratory for Research and Development of Qin Medicine, Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046*)

**Abstract: Objective** To determine the protective effect of different ethanol elution parts of macroporous resin (MR) from the extract of seeds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. (ESCO) on acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury (ALI) in mice. **Methods** The ESCO extract was isolated and further purified by the MR into four elution fractions (ESCOA, ESCOB, ESCOC, and ESCOD). Then, the hepatoprotective effect of different elution parts of ESCO extract in low-dose and high-dose groups (4.16

基金项目: 陕西省科技厅重点科研计划项目 (No. 2021SF-367); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (No. 2019-YL12)。

作者简介: 张婷, 女, 硕士研究生, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: zttingya@163.com \* 通信作者: 邓翀, 男, 博士, 教授, 主要从事中草药药效物质基础研究, email: 2051079@sntcm.edu.cn

and  $12.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , calculated by crude drug) on APAP-induced ALI mice model was evaluated by the serum index and histopathological examination. **Results** The histopathological examination showed that inflammatory cell infiltration was observed in the liver tissue of the model group, accompanied by hepatocyte degeneration and flaky necrosis. While the lesions of the liver tissue were relieved in each groups. The biochemical test showed that compared with the model group, the serum levels of glutamic-pyruvic in each group were decreased significantly; the serum levels of glutamic-oxaloacetic transaminase in ESCOA and ESCOC low-dose group and ESCOC high-dose group were decreased significantly; the liver levels of SOD in all groups were increased significantly; the liver levels of GSH-Px in ESCOA low-dose group, ESCOB high-dose group, and both ESCOC groups were increased; and the serum levels of MDA in ESCOA low-dose group, and both ESCOC and ESCOD groups were decreased. **Conclusion** Different elution parts of ESOC extract have protective effect against APAP-induced ALI in mouse model, whose mechanism may be related to the anti-oxidative stress reaction.

**Key words:** acute liver injury; macroporous resin; seed of *Cornus officinalis*

药物性肝损伤是指由药物本身或其代谢产物所引起的肝损伤, 与人们的生活密切相关<sup>[1]</sup>。随着制药业的迅速发展, 防治药物性肝损伤已经成为一个全球性的科学难题。中药因其多成分和多靶点的作用特点在预防和治疗肝损伤方面有明显的疗效, 已经成为相关领域的研究热点<sup>[2-6]</sup>。山茱萸为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb.et Zucc.) 的干燥成熟果肉, 味酸、涩, 性微温, 具有补益肝肾、涩精固脱的功效<sup>[7]</sup>。山茱萸果核约占其全果的三分之二, 临床应用多以山茱萸果肉入药, 而果核长期以来被当作废弃物丢弃, 造成资源的极大浪费。大量研究表明山茱萸果核具备良好的抗氧化、抗衰老、消炎等药理作用<sup>[8]</sup>, 且课题组前期已通过对比山茱萸果核全果、果肉及果核对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 所致急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 模型的保肝活性, 发现山茱萸果核提取物的效果优于山茱萸全果、果肉提取物<sup>[9]</sup>。因此, 本实验通过大孔吸附树脂对山茱萸果核提取物进行分离, 并对不同洗脱部位进行保肝药效评价, 以期筛选出具有保肝活性的部位。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2550 型紫外可见分光光度仪 (日本岛津); AL204 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度: 0.1 mg); HZQ-X100A 型恒温振荡器 (上海沪粤明科学仪器有限公司); ELX808 型酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); TDL-60B 型低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); E200 型光学显微镜 (尼康仪器有限公司)。

### 1.2 试药

山茱萸果核采集于陕西省汉中市镇巴县 (经陕西中医药大学王薇教授鉴定为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb.et Zucc. 的干燥成熟果核); AB-8、NKA-9、DM130、S-8、D201、HPD100、D101 型大孔吸附树脂 (陕西西安乐博生化科技有限公司); APAP 对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: S31044, 纯度: 99.0%); 联苯双酯滴丸 (万邦德制药集团股份有限公司, 批号: A02J161203, 规格: 1.5 mg/丸); 谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量  $18 \sim 22 \text{ g}$  [四川成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证编号: SCXK (川) 2015-30], 饲养于温度为  $18 \sim 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 45% ~ 65% 的动物房内。

## 2 方法

### 2.1 山茱萸果核提取物的制备

取干燥后的山茱萸果核粉碎, 过筛 (60 目), 取约 1.2 kg, 按 1:8 的料液比用石油醚脱脂 7 h, 滤过, 再按 1:12 的料液比加入 60% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 90 min, 合并提取液, 减压回收溶剂, 得到山茱萸果核乙醇提取物, 得率为 36.13%; 残渣按 1:10 的料液比加入纯净水煎煮 2 次, 每次 60 min, 过滤, 浓缩, 得到山茱萸果



核水提取物, 得率为 4.17%。

按比例称取一定量的山茱萸果核乙醇提取物和水提取物, 加入蒸馏水, 超声溶解, 制备得山茱萸果核提取物上样液。

## 2.2 不同类型大孔吸附树脂的筛选

分别称取 7 种型号的大孔吸附树脂 (AB-8、NKA-9、DM130、S-8、D201、HPD100、D101) 适量, 用 95% 乙醇浸泡 24 h 之后, 用纯化水洗至无醇味, 再用滤纸吸干树脂表层的水, 即得预处理后的大孔吸附树脂, 备用。

将以上 7 种型号的大孔吸附树脂加入一定质量浓度的山茱萸果核提取物上样液 40 mL, 通过静态吸附实验和静态解吸实验, 筛选出适宜的大孔吸附树脂<sup>[10-11]</sup>。

## 2.3 大孔吸附树脂不同洗脱部位的制备

采用“2.2”项下筛选出的适宜大孔吸附树脂进行上样和洗脱, 先后以水、30% 乙醇、60% 乙醇、90% 乙醇等进行洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩至膏状, 称重, 得到不同浓度的乙醇洗脱物, 分别命名为 ESCOA、ESCOB、ESCOC、ESCOD, 浸膏得率分别为 22.96%、63.15%、4.54% 和 3.61%。

## 2.4 山茱萸果核提取物不同洗脱部位的保肝作用

**2.4.1 动物分组及给药** SPF 级昆明种小鼠 110 只, 适应性饲养 5 d, 随机分为正常组, 模型组, 阳性组, ESCOA 低、高剂量组, ESCOB 低、高剂量组, ESCOC 低、高剂量组, ESCOD 低、高剂量组。共 11 组, 每组小鼠 10 只。山茱萸果核不同洗脱部位的低、高剂量组的给药剂量按生药量计算, 分别为  $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $12.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $12.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  为课题组前期研究筛选出来的最佳剂量<sup>[9]</sup>, 而根据中药材饮片临床常用剂量折合下来约是该剂量的 2.7 倍, 即  $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 其中 ESCOA 对应的浸膏低、高剂量  $0.433$ 、 $1.155 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; ESCOB 对应的浸膏低、高剂量  $1.191$ 、 $3.176 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; ESCOC 对应的浸膏低、高剂量  $0.086$ 、 $0.228 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; ESCOD 对应的浸膏低、高剂量  $0.068$ 、 $0.182 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成混悬液; 模型组和正常组分别给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液, 阳性组给予联苯双酯  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[12]</sup>, 按照此给药模式灌胃给药, 每日 1 次, 连续 7 d。

**2.4.2 造模** 将 APAP 溶于 PBS 中, 质量浓度为  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 除正常组外, 其余各组于末次给药后 6 h 腹腔注射  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  APAP 复制肝损伤模型<sup>[13]</sup>, 正常组于末次给药后 6 h 腹腔注射生

理盐水。

**2.4.3 样本采集** 造模后 16 h 后摘除小鼠眼球取血, 离心  $10 \text{ min}$  ( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 取上清液, 用于血清 ALT、AST、MDA 水平的检测; 取血后, 迅速剪开小鼠腹腔取出新鲜肝脏, 用生理盐水清洗并用滤纸吸干水分, 一部分肝脏用 10% 的多聚甲醛溶液固定, 用于组织病理学观察。剩余一部分肝脏直接液氮速冻,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 用于肝组织 GSH-Px、SOD 水平检测。均严格按照试剂盒的说明书实施。

**2.4.4 肝组织的病理切片观察** 将甲醛溶液固定的小鼠肝脏组织石蜡包埋, 切片 (厚度  $4 \text{ } \mu\text{m}$ ), 苏木素-伊红 (HE) 染色, 在光学显微镜下观察不同组小鼠的肝组织切片的病理变化。

## 2.5 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件对生化指标数据进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用独立  $t$  检验, 多组比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大孔吸附树脂的筛选结果

以大孔吸附树脂的吸附量、吸附率、解吸量和解吸率为评价指标, 对 7 种树脂进行了比较, 结果见表 1。从表 1 中可以看出, DM130 树脂有最高的吸附率, 但解吸率为 63.31%。AB-8、HPD100 和 D101 的吸附能力相近, 但 AB-8 的解吸率高于后两者, 综合分析, 最终确定选用 AB-8 大孔吸附树脂。

表 1 不同型号大孔吸附树脂吸附和解吸性能的比较

Tab 1 Adsorption and desorption property of different types of macroporous resin

树脂型号	吸附量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	吸附率 / %	解吸量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	解吸率 / %
NKA-9	22.44	84.94	19.73	87.90
DM130	25.12	94.17	15.91	63.31
S-8	22.14	83.22	14.96	67.56
D201	20.85	78.27	6.13	29.41
AB-8	25.00	93.98	24.70	98.79
HPD100	23.91	89.70	20.86	87.23
D101	23.55	88.86	23.25	98.75

### 3.2 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对小鼠血清中 ALT 和 AST 水平的影响

如表 2 所示, 与正常组相比, 模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平显著升高。与模型组相比, 各给药组小鼠血清中 ALT 水平显著降低, 阳性组、ESCOA 低剂量组和 ESCOC 各剂量组小鼠血清中 AST 水平显著降低。

### 3.3 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对小鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 水平和血清 MDA 水平的影响

如表 2 所示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝脏组织中 SOD 和 MDA 水平显著降低, 血清中 MDA 水平显著升高。与模型组比较, 各给药组小鼠肝脏

组织中 SOD 水平显著升高, 阳性组、ESCOA 低剂量组、ESCOB 高剂量组、ESCOC 各剂量组小鼠肝脏组织中 GSH-Px 显著升高, 阳性组、ESCOA 低剂量组、ESCOC 各剂量组和 ESCOD 各剂量组小鼠血清中 MDA 水平显著降低。

表 2 小鼠血清中 ALT、AST、MDA 水平和肝组织中 SOD、GSH-Px 水平测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Tab 2 Level of ALT, AST, MDA in serum and SOD, GSH-Px in liver tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	血清			肝脏	
	ALT/(U·L <sup>-1</sup> )	AST/(U·L <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U·L <sup>-1</sup> )
正常组	21.555±6.265	19.754±8.620	4.178±2.260	238.064±8.280	1025.149±543.660
模型组	41.915±11.072**	39.406±13.841**	10.294±6.193*	198.400±4.288**	402.813±242.191*
阳性组	15.765±6.165###	21.738±6.612###	4.525±1.028#	235.837±9.709##	954.817±533.214#
ESCOA 低剂量组	23.223±9.630##	22.052±11.776#	4.967±0.752#	231.982±10.755##	807.758±260.969##
ESCOA 高剂量组	24.438±12.652#	23.210±13.104#	5.702±0.682	229.669±8.162##	745.951±664.415
ESCOB 低剂量组	24.784±16.650#	25.473±21.693	6.210±1.842	230.697±7.648##	792.839±560.700
ESCOB 高剂量组	24.279±7.368##	24.994±13.040	5.889±1.864	222.546±9.323##	871.697±550.191##
ESCOC 低剂量组	23.063±13.751###	22.054±10.015#	4.960±0.706#	230.354±4.712##	978.261±203.369##
ESCOC 高剂量组	22.355±7.366##	20.935±17.421#	4.164±0.776#	232.410±12.035##	924.979±285.561##
ESCOD 低剂量组	25.501±8.522###	31.499±10.659	5.334±0.785#	227.613±6.178##	735.294±683.559
ESCOD 高剂量组	23.498±6.997##	27.100±20.370	5.160±1.566#	221.873±6.178##	675.618±349.420

注: 与正常组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与模型组比较, #P < 0.05, ###P < 0.01。

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

### 3.4 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对肝脏病理组织形态学的影响

正常组小鼠肝组织有清晰的肝小叶结构, 细胞核大而圆, 肝细胞整齐排列; 模型组小鼠肝组织结构紊乱, 肝小叶结构不清晰, 肝细胞大面积变性、肿胀, 片状坏死, 局灶性炎细胞浸润及出血; 与模型组比较, 阳性组、山茱萸果核 ESCOA 高剂量组、ESCOB 低剂量组及 ESCOC 各剂量组均能够改善肝损伤小鼠的肝组织病变程度, 肝细胞坏死明显减轻(见图 1)。

### 4 讨论

APAP 作为常见的一种解热镇痛类药物, 过量使用会对肝脏产生毒性, 进而导致机体肝组织发生急性损伤、功能障碍、肝衰竭, 甚至死亡<sup>[14-15]</sup>。AST 和 ALI 是反映肝功能的重要指标, 当肝脏遭受急性损伤时, 会引起血液中 AST、ALI 的含量急剧升高<sup>[16-17]</sup>。本研究通过建立 APAP 引起的 ALI 模型, 对山茱萸果核提取物大孔树脂不同洗脱部位进行药效学评价, 以筛选出山茱萸果核治疗药源性肝损伤的有效部位。

实验结果表明, 与正常组相比, 模型组小鼠血清中 AST 和 ALT 水平显著升高, 且 HE 染色结果显示小鼠肝组织发生明显的病变, 表明模型建立成功。与模型组相比, 山茱萸果核 ESCOA

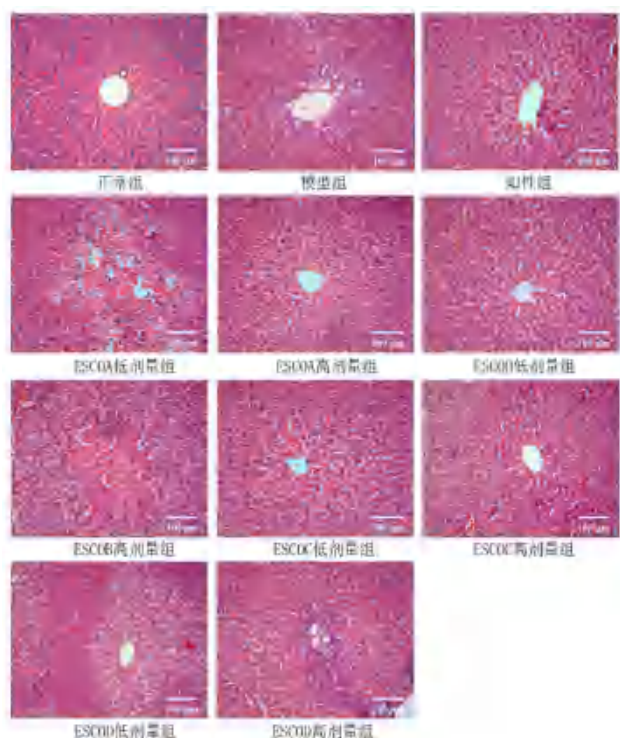


图 1 各组小鼠肝组织病理学观察结果 (HE 染色, ×200)

Fig 1 Pathological observation of liver tissue in mice of each group (HE staining, ×200)

高剂量组、ESCOB 低剂量组及 ESCOC 高、低剂量组小鼠血清中 ALT、AST 水平均显著降低, 肝脏组织病变程度均有明显的改善。

研究表明, 氧化应激与 ALI 的发生和发展密切相关。当肝细胞损伤后, 会分泌大量 MDA, 进而破坏细胞膜和功能, 使肝细胞变性、坏死, 因此 MDA 的含量与肝细胞损伤程度成正比。同时 SOD 和 GSH-Px 可以通过清除自由基, 来保持自由基的产生与清除的动态平衡, 从而改善肝细胞的异常功能<sup>[18-21]</sup>。在本研究中, 山茱萸果核提取物不同洗脱部位均可不同程度地抑制模型小鼠血清中 MDA 水平和肝脏中 SOD 和 GSH-Px 水平的异常升高, 这些数据提示山茱萸果核提取物不同洗脱部位对 APAP 所致小鼠 ALI 的保护作用可能与抗氧化应激有关。

本实验以相同的生药量, 按照不同的洗脱方式获得的浸膏量有明显的差异, 从小到大依次是 ESCOD > ESCOC > ESCOA > ESCOB。在保肝作用的评价中, 发现 ESCOC 的浸膏量虽然低, 却仍然具有良好的保肝活性, 由此推测山茱萸果核的 60% 乙醇部位可能包含更多的保肝活性成分, 而这一推测有待进一步研究和阐明。

此外, 在药效评价的过程中, 发现存在高剂量不如低剂量的现象, 导致该现象的原因可能是药物在低浓度时即可达到其治疗作用的峰值, 在此值以下能够很好地反映出量效关系, 而超过这个值则可能导致药物疗效降低、消失甚至产生毒副作用。

综上所述, 山茱萸果核提取物不同洗脱部位对 APAP 所致小鼠 ALI 有一定的保护作用, 且作用机制可能与抗氧化应激反应有关。然而山茱萸果核中具体发挥药效的物质基础及作用机制尚未明确, 有待进一步研究。

## 参考文献

[1] 钟巨贤, 常岸芷, 陈博, 等. 药物性肝损伤的研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7 (24): 195-198.

[2] 于乐成, 陈成伟. 药物性肝损伤的发生机制: 当前认识和未来需求 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 37 (11): 2515-2524.

[3] Zhang HY, Wang HL, Zhong GY, et al. Molecular mechanism and research progress on pharmacology of traditional Chinese medicine in liver injury [J]. Pharm Biol, 2018, 56 (1): 594-611.

[4] 匡子禹, 江锋, 吴佳栩, 等. 中医药治疗药物性肝损伤

的网状 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (19): 4746-4754.

[5] 卢伟, 潘梦, 方亦可, 等. 中药治疗急性肝损伤作用机制研究进展 [J]. 中南药学, 2019, 17 (9): 1504-1507.

[6] 王惠, 冯玛莉, 张越, 等. 醋制藏柴胡对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中南药学, 2019, 17 (10): 1637-1641.

[7] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 28-29.

[8] 南美娟, 唐凯, 崔银萍, 等. 山茱萸果核的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41 (5): 149-155.

[9] 南美娟, 唐凯, 张化为, 等. 山茱萸不同部位提取物对急性肝损伤模型小鼠的保肝作用研究 [J]. 中国药房, 2018, 29 (17): 2385-2389.

[10] 杨婉, 葛学惠, 赵晨伟, 等. 大孔树脂纯化美藤果壳酚类物质的研究 [J]. 中国油脂, 2018, 43 (2): 120-123.

[11] 王世鹏, 王岩, 范龙一. 紫薯花青素大孔吸附树脂的筛选 [J]. 农产品加工, 2022 (13): 9-12.

[12] 徐博, 沈楠, 安英, 等. 汉防己多糖对急性酒精性肝损伤小鼠氧化应激及肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国药房, 2017, 28 (7): 885-888.

[13] 徐秀卉, 杨波, 陆振宇. 黑木耳多糖和五味子醇提取物对对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 黑龙江医药, 2011, 24 (3): 384-386.

[14] 刘淑霞, 陈玉娟, 李琳, 等. 葛根保肝茶对对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 吉林大学学报, 2013, 39 (1): 25-28.

[15] 徐乐千, 周艳莹, 姜伊鸣, 等. 五酯片不同给药间隔抵抗扑热息痛所致肝损伤的作用及机制研究 [J]. 药学学报, 2021, 56 (4): 1147-1154.

[16] 史会连, 方南元, 陈沁磊, 等. 化滞柔肝颗粒治疗高脂非酒精性脂肪肝炎模型鼠的疗效观察 [J]. 世界中医药, 2020, 15 (22): 3396-3400, 3405.

[17] 赵慧, 王洪礼, 吕佳, 等. 益甘宁颗粒对对乙酰氨基酚诱导小鼠肝损伤模型的保护作用 [J]. 中南药学, 2017, 15 (5): 587-590.

[18] 韦敏, 李波, 王跃峰, 等. 龙胆苦苷通过抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻小鼠急性肝损伤的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (22): 76-82.

[19] 高雅, 王刚, 杜沛霖, 等. 白马骨水提取物对急性肝损伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (21): 135-140.

[20] Abdulazeez SS, Thiruvengadam D. Effect of lycopene on oxidative stress induced during-galactosamine/lipopolysaccharide-sensitized liver injury in rats [J]. Pharm Biol, 2013, 51 (12): 1592-1599.

[21] 刘军, 蔡霏, 蔡光明, 等. 巴马火麻仁总木脂素酰胺类提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中南药学, 2014, 12 (3): 228-230.

(收稿日期: 2022-11-07; 修回日期: 2023-02-03)



# 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup> 技术的 红曲茯苓组方物质基础分析

李婷婷<sup>1</sup>, 梅凯<sup>1</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 王灵敏<sup>1</sup>, 王昕怡<sup>1</sup>, 郝逗逗<sup>1</sup>, 张丽梅<sup>2</sup>, 宋建刚<sup>2</sup>, 刘葭<sup>1</sup>, 吴清<sup>1\*</sup> (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京北大维信生物科技有限公司, 北京 100080)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱联用 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>) 技术对红曲茯苓组方中的化学成分进行定性鉴别, 为其确定功效相关质量控制指标提供依据。 **方法** 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 正、负离子模式进行扫描获得高分辨质谱信息。通过与对照品的保留时间及质谱数据信息对比, 并结合相关文献报道对相应化合物的相对分子质量、质谱裂解规律进行匹配, 对红曲茯苓组方中所含的成分群进行定性分析归类。 **结果** 共鉴定了 84 个化学成分, 包括 41 个黄酮类、11 个莫那可林类、10 个红曲色素类、8 个倍半萜类、4 个氨基酸类、2 个三萜类、3 个多糖类以及 5 个有机酸类成分, 并明确了各化学成分的来源归属以及结合文献报道确定功效相关成分。 **结论** 该研究准确地识别了红曲茯苓组方中的化学成分, 可为其进一步开发及质量控制提供参考。

**关键词:** 红曲茯苓组方; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>; 化学成分

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0657-10

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.017

## Chemical constituents in Hongqu Fuling prescription based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>

LI Ting-ting<sup>1</sup>, MEI Kai<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, WANG Ling-min<sup>1</sup>, WANG Xin-yi<sup>1</sup>, HAO Dou-dou<sup>1</sup>, ZHANG Li-mei<sup>2</sup>, SONG Jian-gang<sup>2</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, WU Qing<sup>1\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Peking University WBL Biotech Co., Ltd., Beijing 100080)

**Abstract: Objective** To identify the chemical components in Hongqu Fuling prescription and provide a basis for the efficacy related quality control indexes based on ultra-performance liquid chromatography linear ion trap/electrostatic field orbital trap combined high resolution mass spectrometry (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>). **Methods** The gradient elution was performed on Waters ACQUITY BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid as the mobile phase. The column temperature was 35 °C, and the flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The scanning was performed in both positive and negative ion modes to obtain high-resolution mass spectrometry information. By comparing the retention time and mass spectrum data with those of the reference substance, and combining with the relevant literature reports, the relative molecular weight and mass spectrum fragmentation law of the corresponding compounds were matched. The component groups in Hongqu Fuling prescription were qualitatively analyzed and verified. **Results** Totally 84 chemical constituents were identified, including 41 flavonoids, 11 monacolins, 10 monascus pigments, 8 sesquiterpenoids, 4 amino acids, 2 triterpenoids, 3 polysaccharides and 5 organic acids. The source attribution of each component was clear and the efficacy related components were determined based

**基金项目:** 国家重点研发计划中医药现代化重点专项 (No.2018YFC1706800)。

**作者简介:** 李婷婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: 18340077731@163.com \*通信作者: 吴清, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: qwu@vip.sina.com

on literature reports. **Conclusion** The method can identify the chemical components in Hongqu Fuling prescription systematically and accurately, which provide the experimental basis for its further development and quality control.

**Key words:** Hongqu Fuling prescription; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>; chemical composition

红曲茯苓组方是在辨证保健理论指导下, 结合中医证候研究进展和中医“治未病”的养生理念, 针对血脂异常亚健康状态中脾虚湿盛证型提出的组方, 由红曲、白术、茯苓、山楂、葛根 5 味中药组成, 具有健脾除湿、化浊降脂的功效<sup>[1-2]</sup>。方中红曲可健脾消食、活血化瘀、化浊降脂, 多用于脾虚失运、痰浊阻滞、血瘀阻络的血脂异常, 是辅助降血脂类保健品的常用中药。白术健脾益气、燥湿利水, 茯苓可渗湿健脾, 山楂消食健胃, 行气散瘀, 葛根可生发脾胃清阳之气, 全方标本兼治, 对脾虚湿盛型血脂异常有较好的保健功效。

课题组前期已对红曲茯苓组方在维持血脂健康方面的保健作用进行了验证<sup>[3]</sup>, 证明其能改善脾虚湿盛型高脂血症大鼠血脂水平, 具有开发成为维持血脂健康水平的保健品的潜力, 但其整体组方中化学成分尚未明确。LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup> 是将线性离子阱质谱和高分辨质谱结合的杂交型质谱仪, 同时具有离子阱质谱的多级碎裂和 Orbitrap 的高分辨性能, 已广泛应用于中药复杂体系中化学成分的鉴定分析<sup>[4-5]</sup>。因此, 本研究拟采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup> 法对红曲茯苓组方所含的化学成分进行定性分析, 并结合文献阐明其功效成分, 为其进一步开发及质量控制提供参考。

## 1 材料

Dionex Ultimate 3000 RS 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); LTQ-Orbitrap XL 线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱仪, 配有热喷雾离子源 (HESI); SB-5200 DTD 超声波清洗器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Heraeus Fresco 21 冷冻型微量台式离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); BSA224S 型电子天平、BT125D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

红曲茯苓制剂 (自制, 批号: 210103, 其中洛伐他汀和葛根素含量分别为 1.16、15.04 mg·g<sup>-1</sup>)。对照品洛伐他汀 (批号: Y23D6C7375)、染料木素 (批号: H30A9Z69019)、白术内酯 III (批号: J16GB155127)、白术内酯 I (批号: P08J9F50979)、葛根素 (批号: S02M9B54875)、大豆素 (批号: C06N6Y5504)、金丝桃苷 (批号: M28GB143378) 和芦丁 (批号: A05GB144263) (上海源叶生物科技

有限公司, 质量分数均大于 98%)。质谱级乙腈、甲酸、甲醇 (美国 Fisher Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BHEC18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水, 梯度洗脱 (0~5 min, 5%~13%B; 5~10 min, 13%~25%B; 10~20 min, 25%~45%B; 20~22 min, 45%~80%B; 22~25 min, 80%B; 25~26 min, 80%~5%B; 26~30 min, 5%B); 柱温 35℃; 进样量 2 μL; 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>。

### 2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源 (ESI), 离子源温度 350℃, 正离子模式下: 电离源电压 4 kV, 毛细管电压 35 V, 管透镜电压 110 V; 负离子模式下: 电离源电压 -3 kV, 毛细管电压 -35 V, 管透镜电压 -110 V; 鞘气流速 40 arb, 辅助气流速 20 arb; 数据采用傅里叶变换高分辨全扫方式 (FT, Full scan, Resolution 30000), 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (纯度 > 99.99%)。质谱多级碎片离子检测采用数据依赖性扫描 (DDS, data dependent scan), 碎裂方式为 CID 碰撞诱导裂解, 归一化裂解能量为 35%。质谱一级扫描范围 100~1500 m/z。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品洛伐他汀、染料木素、白术内酯 III、白术内酯 I、葛根素、大豆素、金丝桃苷、芦丁适量, 用甲醇溶解并定容制备成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的单标储备液。精密吸取每种单标储备液 300 μL, 用甲醇配制为 30 μg·mL<sup>-1</sup> 混合对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 进样分析。

### 2.4 供试品溶液的制备

取红曲茯苓制剂粉末, 精密称定 0.5 g, 溶于 50 mL 50% 甲醇, 超声处理 45 min, 放冷至室温, 补足失重, 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 进样分析。

### 2.5 数据处理与分析

通过文献检索建立红曲茯苓组方的化学成分数据库, 包括化合物名称、分子式、相对分子质量、化学结构、分子离子、碎片离子信息以及来

源。进样分析后采用 Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific) 工作站进行质谱数据处理分析, 设置质量误差为  $\pm 5 \times 10^{-6}$ , 提取分析一、二级谱图和碎片信息, 根据对照品和参考文献的二级图谱、裂解规律推测并鉴定相应的化合物。

### 3 结果

红曲茯苓组方正、负离子模式下的总离子流图见图 1。结合对照品与相关文献的质谱裂解规律, 从红曲茯苓组方中鉴定出 84 个化学成分, 包括 41 个黄酮类、11 个莫那可林类、10 个红曲色素类、8 个倍半萜类、4 个氨基酸类、2 个三萜类、3 个多糖类以及 5 个有机酸类成分, 结果见表 1。

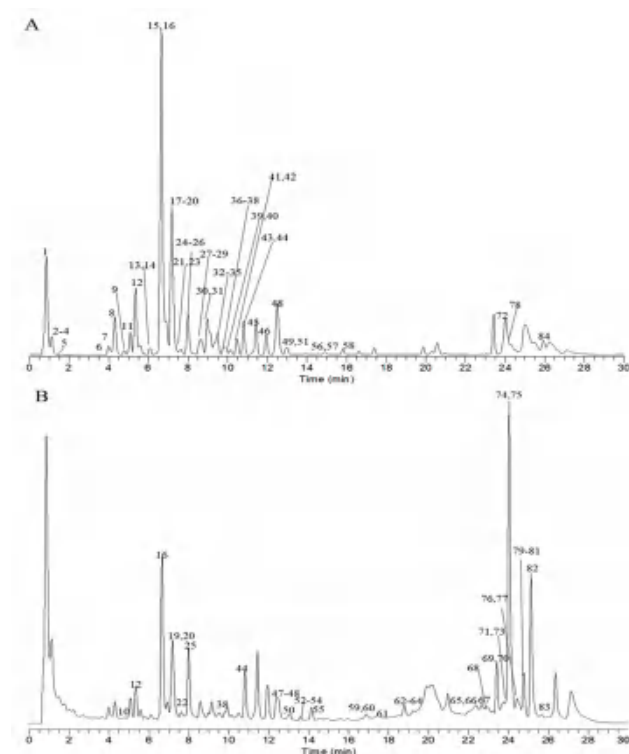


图 1 红曲茯苓组方负 (A)、正 (B) 离子模式下的总离子流图  
Fig 1 Total ion-flow chromatogram of Hongqu Fuling prescription in negative (A) and positive (B) ion mode

#### 3.1 黄酮类成分的结构鉴定

红曲茯苓组方中的黄酮类成分主要来源于葛根, 红曲和山楂中也有检出, 包括黄酮、黄酮醇、异黄酮及其苷类等多个类别。黄酮类成分在正、负离子模式下响应均较好, 其质谱裂解方式多为部分糖基的丢失、糖基键的断裂、 $H_2O$ 、 $CO$ 、 $CH_3$  的中性丢失以及 C 环的 RDA 裂解等<sup>[6]</sup>。比如化合物 16 的准分子离子峰为  $m/z$  415.1033  $[M-H]^-$ , 保留时间为 6.74 min, 推测其分子式为  $C_{21}H_{20}O_9$ 。以  $m/z$  415.1033  $[M-H]^-$  为母离子进行二级质谱分析, 推测  $m/z$  295.0946  $[M-H-C_4H_8O_4]^-$  为糖环的交叉环切除裂解形成的碎片离子,  $m/z$  267.1736

$[M-H-C_4H_8O_4-CO]^-$  和  $m/z$  277.2231  $[M-H-C_4H_8O_4-H_2O]^-$  是继而丢失 1 个  $CO$  分子或  $H_2O$  分子形成的碎片离子, 与葛根素对照品以及相关文献中的裂解规律一致<sup>[7-9]</sup>, 确定其为葛根素。化合物 49 在负离子模式下产生准分子离子峰  $m/z$  253.0503  $[M-H]^-$ , 保留时间为 12.62 min, 推测其分子式为  $C_{15}H_{10}O_4$ 。其二级质谱图给出  $m/z$  223.9656  $[M-H-CHO]^-$ , 继而丢失 1 个  $CO$  得到  $m/z$  196.2970  $[M-H-CHO-CO]^-$ , 推测  $m/z$  209.0207  $[M-H-CO_2]^-$  为母离子丢失 1 个  $CO_2$  形成的碎片离子,  $m/z$  133.0105 是由母离子 C 环上发生 RDA 裂解所形成的, 这与大豆素对照品及相关文献的报道一致<sup>[7, 10]</sup>, 推测裂解途径见图 2。

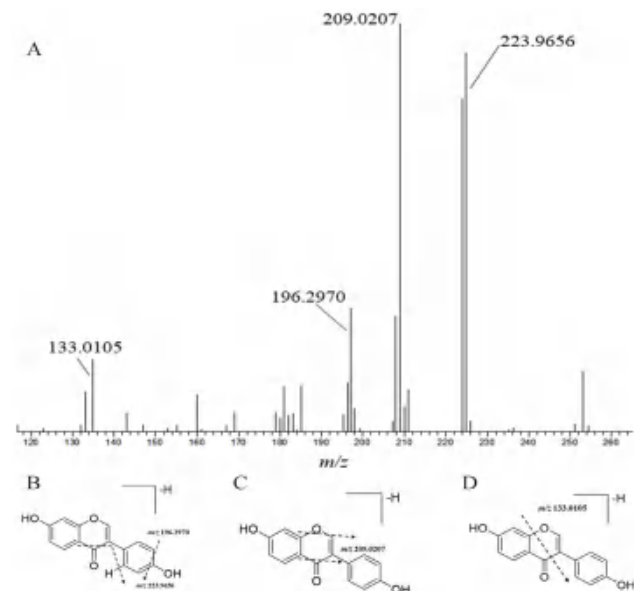


图 2 大豆素在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B、C、D)

Fig 2 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B, C, and D) of daidzein in the negative ion mode

#### 3.2 莫那可林类成分的结构鉴定

红曲茯苓组方中的莫那可林类成分来源于红曲, 均在正离子模式下响应较好, 裂解方式多为  $H_2O$ 、 $C_2H_2$  和  $C_2H_4O$  的中性丢失<sup>[11-12]</sup>。如化合物 77 在正离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  427.2444  $[M + Na]^+$ 、 $m/z$  405.2641  $[M + H]^+$ , 保留时间为 24.17 min, 推测其分子式为  $C_{24}H_{36}O_5$ 。二级质谱图中有明显的  $m/z$  303.1428  $[M + H-C_5H_9O-H_2O]^+$ 、 $m/z$  285.0729  $[M + H-C_5H_9O-2H_2O]^+$ 、 $m/z$  267.2527  $[M + H-C_5H_9O-3H_2O]^+$ 、 $m/z$  225.1508  $[M + H-C_5H_9O-CH_3COOH-2H_2O]^+$ 、 $m/z$  199.1516  $[M + H-C_5H_9O-2H_2O-CH_3COOH-C_2H_2]^+$ , 推测为内酯环断裂以及取代基、 $H_2O$  的丢失后的离子碎片, 这与对照品洛伐他汀以及文献报道<sup>[11, 13]</sup>中的裂解规律一致, 确定其为洛伐他汀, 推测裂解途径见图 3。



表 1 红曲茯苓组方化学成分鉴定结果

Tab 1 Identification of compounds in Hongqu Fuling prescription

No.	$t_R$ / min	分子式	理论值 ( $m/z$ )	离子类型	误差 / $\times 10^{-6}$	实测值 ( $m/z$ )	离子碎片 ( $m/z$ )	成分鉴定	来源
1	0.92	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	191.0550	[M-H] <sup>-</sup>	0.6	191.0551	172.9633, 86.8488, 84.7708	奎宁酸	1
2	1.07	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0186	[M-H] <sup>-</sup>	0.3	191.0187	172.9949, 110.8115, 86.8771	柠檬酸	2, 1
3	1.20	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	353.0715	[M-H] <sup>-</sup>	- 3.5	353.0702	191.0326, 172.8540, 110.8980	枸橼酸葡萄糖	5
4	1.27	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	515.1243	[M-H] <sup>-</sup>	1.3	515.1230	353.1675, 335.0782, 317.1261, 172.9134	枸橼酸二聚葡萄糖	5
5	1.46	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	309.1180	[M-H] <sup>-</sup>	2.2	309.1187	178.9214, 146.7362, 128.8500	(2S)-hex-2-ulofuranosyl 4, 6-dideoxyhexopyranoside	1
6	3.64	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0867	[M-H] <sup>-</sup>	- 3.2	353.0856	190.9664, 178.9053, 172.9528	绿原酸	1
7	4.02	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1501	[M-H] <sup>-</sup>	- 2.3	593.1149	473.2327, 431.1894, 311.1793	牡荆素 -4"-O- 葡萄糖苷	1
8	4.36	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577.1552	[M-H] <sup>-</sup>	1.4	577.1560	457.2295	葛根素 -4'-O-β-D- 葡萄糖苷	2
9	4.60	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593.1501	[M-H] <sup>-</sup>	1.1	593.1508	431.1693, 311.0875	8-β-D-glucopyranosyl-3-[4-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-hydroxyphenyl]-7-hydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	2
10	4.69	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	471.2201	[M+Na] <sup>+</sup>	2.6	471.2213	453.3412, 291.1530, 202.9558	苍术苷 A	3
11	5.07	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	709.1974	[M-H] <sup>-</sup>	0.7	709.1979	487.3002, 457.2136, 367.2130	芹糖葛根素苷 -4'-O-D- 葡萄糖苷	2
12	5.42	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0972	[M-H] <sup>-</sup>	2.4	431.0983	311.0728, 283.1352,	牡荆素或异牡荆素	1
			433.1129	[M+H] <sup>+</sup>	2.3	433.1139	415.2111, 367.1801, 313.1334, 283.1752		
13	6.18	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1395	[M-H] <sup>-</sup>	1.5	563.1404	311.0806, 283.0598, 255.1714	染料木素 -8-C- 芹糖 - (1 → 6) - 吡喃葡萄糖苷或 3'-羟基葛根素 -2"-β-D- 木糖苷	2
14	6.22	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	607.1657	[M-H] <sup>-</sup>	0.8	607.1663	325.0714, 310.2216, 282.0504	(1S)-1, 5-anhydro-6-O-D-glucopyranosyl-1-[7-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-D-glucitol	2
15	6.59	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577.1552	[M-H] <sup>-</sup>	0.5	577.1555	397.2315, 295.0389, 267.0380	6"-O-α-D- 吡喃葡萄糖基葛根素	2
16	6.74	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	415.1024	[M-H] <sup>-</sup>	1.2	415.1033	295.0946, 267.1736, 277.2231	葛根素*	2
17	7.01	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	547.1446	[M-H] <sup>-</sup>	0.8	547.1451	325.1802, 295.0702, 267.0745	葛根素 -6"-O- 木糖苷或葛根素 -7- 木糖苷	2
18	7.09	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	595.1657	[M-H] <sup>-</sup>	1.3	595.1665	286.9189, 269.0679	柚皮素 -5, 7- 双 - 葡萄糖苷	1
19	7.25	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	445.1129	[M-H] <sup>-</sup>	1.2	445.1135	325.1512, 297.1971,	3'- 甲氧基葛根素	2
			447.1286	[M+H] <sup>+</sup>	2.3	447.1296	268.1845, 429.2643, 381.1406, 351.1273, 327.1272		
20	7.31	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	547.1446	[M-H] <sup>-</sup>	0.6	547.1450	325.1552, 295.0504,	葛根素芹菜糖苷	2
			549.1603	[M+H] <sup>+</sup>	3.0	549.1619	267.0313, 417.2171, 399.1531, 297.1250		
21	7.70	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577.1552	[M-H] <sup>-</sup>	1.0	577.1558	355.1927, 325.0543, 282.0791	4H-1-benzopyran-4-one, 8-(6-O-D-apio-β-D-furanosyl-β-D-glucopyranosyl)-7-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-ethoxyphenyl)-或其异构体	2
22	7.72	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	216.1230	[M+H] <sup>+</sup>	0.6	216.1232	198.0844, 169.9382, 152.0337	(±)-monascumic acids	4
23	7.83	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0973	[M-H] <sup>-</sup>	1.9	431.0981	311.0833, 283.0815, 242.8640	3'- 羟基葛根素或染料木苷	2

续表 1

No.	$t_R$ / min	分子式	理论值 ( $m/z$ )	离子类型	误差 / $\times 10^{-6}$	实测值 ( $m/z$ )	离子碎片 ( $m/z$ )	成分鉴定	来源
24	8.08	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	415.1024	[M-H] <sup>-</sup>	2.7	415.1032	295.0050, 252.9560	大豆苷或大豆素 -4'- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷	2
25	8.11	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	253.0495	[M-H] <sup>-</sup>	3.3	253.0504	224.2163, 209.0287, 196.9431, 134.9387	3', 2-二羟基黄酮	2, 4
26	8.18	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	461.2686	[M-H] <sup>-</sup>	0.6	461.2689	415.1387, 253.0120, 207.0486	双白术内酯	3
27	8.65	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.0601	[M-H] <sup>-</sup>	3.2	283.0610	267.9801, 255.1003, 194.9684	黄豆黄素	2
28	8.70	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.0973	[M-H] <sup>-</sup>	2.2	431.0982	311.1044, 283.0362	3'-羟基葛根素或染料木苷	2
29	8.82	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563.1395	[M-H] <sup>-</sup>	0.7	563.1400	545.2737, 341.1630, 283.1195, 225.1066	染料木素 -8-C-芹糖 - (1 $\rightarrow$ 6) -吡喃葡萄糖苷或 3'- 羟基葛根素 -2'' $\beta$ -D-木糖苷	2
30	9.06	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	415.1024	[M-H] <sup>-</sup>	2.5	415.1034	295.0556, 267.0708	新葛根素 A/B	2
31	9.25	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	605.1865	[M-H] <sup>-</sup>	0.6	605.1868	297.1121, 253.0281	葛苷 A	2
32	9.32	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.1450	[M-H] <sup>-</sup>	-1.4	609.1441	590.6147, 447.1737, 301.0318	芦丁 <sup>*</sup>	1
33	9.41	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	445.1129	[M-H] <sup>-</sup>	2.2	445.1139	325.1991, 297.1531, 195.1030	3'-甲氧基大豆苷	2
34	9.45	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.0871	[M-H] <sup>-</sup>	0.5	463.0873	300.0406	金丝桃苷 <sup>*</sup>	1
35	9.49	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	547.1446	[M-H] <sup>-</sup>	1.1	547.1452	295.0243, 267.0653	葛根素 -6''-O-木糖苷或葛根素 -7-木糖苷	2
36	9.58	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	415.1024	[M-H] <sup>-</sup>	2.0	415.1033	295.0842, 267.1702	新葛根素 A/B	2
37	9.72	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.0871	[M-H] <sup>-</sup>	-3.7	463.0854	300.9742	异槲皮苷	1
38	9.89	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.0601	[M+H] <sup>+</sup>	1.1	271.0604	252.9566, 243.1222, 214.9648, 152.9269	3'-羟基大豆苷元	2
39	10.04	C <sub>30</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	564.4119	[M-H] <sup>-</sup>	1.4	564.4127	547.5274, 450.3890, 338.3906	环五(异)亮氨酸	3
40	10.12	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	473.1078	[M-H] <sup>-</sup>	-3.4	473.1062	311.0724, 293.0292	8-C- $\beta$ -D-(2''-O-acetyl)-furanose apigenin	1
41	10.29	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	473.1442	[M-H] <sup>-</sup>	1.9	473.1451	427.1105, 353.1608, 267.1917	葛苷 C 或其同分异构体	2
42	10.32	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	561.1602	[M-H] <sup>-</sup>	1.1	561.1609	309.0822, 281.0178, 265.9749	formononetin-8-C-[xylosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-glucoside or 4H-1-benzopyran-4-one, 8-(6-O-D-apio- $\beta$ -D-furano- syl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-	2
43	10.54	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	561.1603	[M-H] <sup>-</sup>	1.1	561.1609	309.0729, 281.0695, 266.0432	formononetin-8-C-[xylosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-glucoside or 4H-1 -benzopyran-4-one, 8-(6-O-D-apio- $\beta$ -D-furanosyl- $\beta$ - D-glucopyranosyl)-7-hydroxy-3-(4-methoxy-phenyl)-	2
44	10.63	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	429.1180	[M-H] <sup>-</sup>	2.1	429.1189	309.1653, 281.1807, 431.1337	4'-甲氧基葛根素	2
			431.1337	[M+H] <sup>+</sup>	2.7	431.1348	266.0836, 413.2221, 365.1887, 335.1751		
45	11.45	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	457.1129	[M-H] <sup>-</sup>	2.2	457.1140	295.0734, 252.9613	大豆苷 -6''-O-醋酸酯	2
46	11.61	C <sub>42</sub> H <sub>77</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	790.5801	[M-H] <sup>-</sup>	0.2	790.5809	773.9371, 678.6989, 546.6684, 433.4289	环七(异)亮氨酸	3
47	12.50	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	431.1337	[M+H] <sup>+</sup>	2.8	431.1349	269.0676	芒柄花苷	2
48	12.52	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	269.0808	[M+H] <sup>+</sup>	3.4	269.0810	269.2200, 236.9963, 213.0362, 136.9510	芒柄花素	2
49	12.62	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	253.0495	[M-H] <sup>-</sup>	2.9	253.0503	223.9656, 209.0207, 196.2970, 133.0105	大豆素 <sup>*</sup>	2, 4
50	12.75	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	257.0808	[M+H] <sup>+</sup>	1.1	257.0811	239.0724, 228.8674, 198.9954	monascodilone	4
51	13.09	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	283.0601	[M-H] <sup>-</sup>	3.5	283.0611	268.0085, 187.0509	鹰嘴豆芽素 A	2
52	13.19	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	203.1794	[M+H] <sup>+</sup>	0.8	203.1796	160.9259, 147.0209, 133.0220	脱氢香橙烯	3

续表 1

No.	$t_R$ / min	分子式	理论值 ( $m/z$ )	离子类型	误差 / $\times 10^{-6}$	实测值 ( $m/z$ )	离子碎片 ( $m/z$ )	成分鉴定	来源
53	13.55	$C_9H_{13}NO$	152.1070	$[M+H]^+$	1.4	152.1072	152.0144, 136.8230, 109.8900	(±)-monascumic acids derivative	4
54	13.73	$C_{24}H_{36}O_6$	421.2585	$[M+H-H_2O]^+$	1.0	421.2589	319.1797, 283.2706	hydroxy-monacolin K hydroxy acid	4
55	14.30	$C_{24}H_{36}O_6$	421.2584	$[M+H-H_2O]^+$	-1.4	421.2579	319.1899, 301.2249, 283.0887	hydroxy-monacolin K hydroxy acid isomer	4
56	14.98	$C_{16}H_{12}O_5$	283.0601	$[M-H]^-$	3.4	283.0611	268.0101, 238.1532, 182.0334	3'-甲氧基大豆素	2
57	15.06	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0444	$[M-H]^-$	3.1	269.0453	241.0546, 225.0932, 213.1214, 200.9678	染料木素*	2, 4
58	16.05	$C_{20}H_{36}O_7$	387.2377	$[M-H]^-$	-2.8	387.2366	343.1289, 315.1614, 275.0858, 229.1125	teradecylcitric acid	3
59	16.68	$C_{19}H_{28}O_3$	305.2111	$[M+H]^+$	1.3	305.2115	287.1661, 251.0485, 202.9785	dihydromonacolin J hydroxy acid	4
60	16.75	$C_{19}H_{30}O_4$	323.2217	$[M+H]^+$	1.1	323.2220	287.2744, 269.5220	3 $\alpha$ -hydroxy-3, 5-dihydromonacolin L	4
61	17.25	$C_{15}H_{16}O_4$	261.1121	$[M+H]^+$	1.9	261.1126	252.9993, 204.9432	1, 2, 15-十五烷三醇	3
62	18.90	$C_{21}H_{28}O_4$	345.2060	$[M+H]^+$	-1.8	345.2043	327.2310, 257.0206	dehydromonacolin N	4
63	18.99	$C_{19}H_{28}O_3$	305.2111	$[M+H]^+$	-1.1	305.2108	287.2390, 269.0905, 245.1349	monacolin L	4
64	19.56	$C_{23}H_{27}NO_5$	398.1962	$[M+H]^+$	1.7	398.1969	355.5265, 298.1155	new red pigment	4
65	21.55	$C_{15}H_{20}O_3$	249.1485	$[M+H]^+$	1.1	249.1488	231.0253, 213.2428, 189.0874	白术内酯 III*	3
66	21.65	$C_{15}H_{18}O_2$	231.1380	$[M+H]^+$	0.4	231.1380	213.0855, 203.0081, 184.9979, 175.0191	白术内酯 I*	3
67	22.50	$C_{15}H_{19}NO$	230.1539	$[M+H]^+$	0.0	230.1549	196.1136	白术内酰胺	3
68	22.92	$C_{22}H_{30}O_4$	359.2217	$[M+H]^+$	-4.0	359.2203	340.4055, 261.0793, 243.1045	rubropunctin	4
69	23.48	$C_{15}H_{20}O_2$	233.1536	$[M+H]^+$	-0.1	233.1536	215.0647, 187.0036, 177.0258	白术内酯 II	3
70	23.50	$C_{21}H_{28}O_5$	361.2010	$[M+H]^+$	2.2	361.2018	315.2943, 271.2603, 233.0786	new yellow pigment	4
71	23.68	$C_{21}H_{24}O_5$	357.1670	$[M+H]^+$	2.0	357.1704	285.1591, 259.1069, 241.1259	monasfluore A	4
72	23.87	$C_{31}H_{48}O_4$	483.3469	$[M-H]^-$	-3.2	483.3453	465.2402, 405.5068, 337.2473	去氢土莫酸	5
73	23.91	$C_{23}H_{26}O_5$	383.1853	$[M+H]^+$	-3.0	383.1842	355.2291, 327.1048	monascorubrin	4
74	24.00	$C_{21}H_{26}O_5$	359.1853	$[M+H]^+$	2.5	359.1862	287.1575, 261.1543, 243.0964, 215.0097	红斑红素 (monascin)	4
75	24.02	$C_{20}H_{28}O_4$	333.2060	$[M+H]^+$	-1.1	333.2057	217.1175, 201.0344	monaphilone B	4
76	24.15	$C_{19}H_{26}O_3$	303.1955	$[M+H]^+$	-0.4	303.1953	285.1727, 267.1420, 225.0566	dehydromonacolin J	4
77	24.17	$C_{24}H_{36}O_5$	405.2636	$[M+H]^+$	1.4	405.2641	303.1428, 285.0729, 427.2455	洛伐他汀*	4
78	24.31	$C_{31}H_{46}O_4$	481.3312	$[M-H]^-$	-1.6	481.3305	413.1592, 345.0803, 277.0699	茯苓新酸 C	5
79	24.72	$C_{26}H_{42}O_6$	451.3054	$[M+H]^+$	-2.6	451.3043	313.1393, 267.0803	ethyl ester of monacolin K	4
80	24.85	$C_{24}H_{38}O_5$	429.2611	$[M+Na]^+$	-2.6	429.2600	305.1691, 287.1047	dihydromonacolin K	4
81	24.92	$C_{23}H_{30}O_5$	387.2166	$[M+H]^+$	-1.6	387.2160	242.9905, 215.0286	ankaflavin	4
82	25.22	$C_{24}H_{34}O_4$	387.2530	$[M+H]^+$	-2.6	387.2520	267.1215, 249.2121, 225.1629	dehydromonacolin K	4
83	25.63	$C_{30}H_{46}O_3$	455.3520	$[M+H]^+$	0.9	455.3524	395.3756, 223.0432	松苓新酸	5



续表 1

No.	$t_R$ / min	分子式	理论值 ( $m/z$ )	离子类型	误差 / 实测值 $\times 10^{-6}$ ( $m/z$ )	离子碎片 ( $m/z$ )	成分鉴定	来源
84	25.99	$C_{33}H_{52}O_5$	527.3731	$[M-H]^-$	- 3.9	527.3710, 509.5546, 465.4455, 431.3975, 405.1588	茯苓酸	5

注: \* 结构由对照品确证; 1. 山楂, 2. 葛根, 3. 白术, 4. 红曲, 5. 茯苓。

Note: \* means confirmed by standard substance; 1. Crataegi fructus, 2. Puerariae lobatae radix, 3. Atractylodis macrocephalae rhizoma, 4. Red Yeast Rice, 5. Poria cocos.

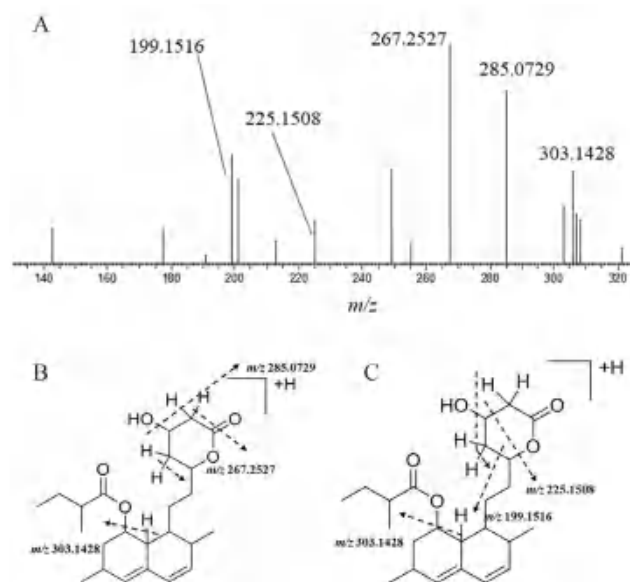


图 3 洛伐他汀在正离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B、C)

Fig 3 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B and C) of lovastatin in the positive ion mode

### 3.3 红曲色素类成分的结构鉴定

红曲茯苓组方中的色素类成分来源于红曲, 红曲色素在正离子模式下响应较好, 多为取代基、CO、CO<sub>2</sub> 以及 H<sub>2</sub>O 的丢失。比如化合物 **74** 在正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  359.1862  $[M + H]^+$ , 保留时间为 24.00 min, 推测其分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>。化合物 **74** 在质谱中失去取代基 C<sub>5</sub>H<sub>10</sub> 和 1 分子 CO 形成特征离子 261.1543  $[M + H - C_5H_{10} - CO]^+$ , 然后连续脱去 1 分子 H<sub>2</sub>O 生成碎片离子  $m/z$  243.0964  $[M + H - C_5H_{10} - CO - H_2O]^+$  和  $m/z$  215.0097  $[M + H - C_5H_{10} - CO - 2H_2O]^+$ , 或者推测其首先失去 C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> 产生特征离子  $m/z$  287.1575  $[M + H - C_5H_{12}]^+$ , 然后继续脱去 1 分子 CO<sub>2</sub> 和 1 分子 H<sub>2</sub>O 生成碎片离子  $m/z$  243.0964  $[M + H - C_5H_{12} - CO_2]^+$  和  $m/z$  215.0097  $[M + H - C_5H_{12} - CO_2 - H_2O]^+$ , 这与文献报道<sup>[11, 14]</sup>的红斑红曲素 (monascin) 裂解规律一致, 推测其为红斑红曲素, 其裂解途径见图 4。

### 3.4 倍半萜内酯类成分的结构鉴定

红曲茯苓组方中的倍半萜内酯类成分主要来源于白术, 白术内酯 I、II、III 是白术的代表性成

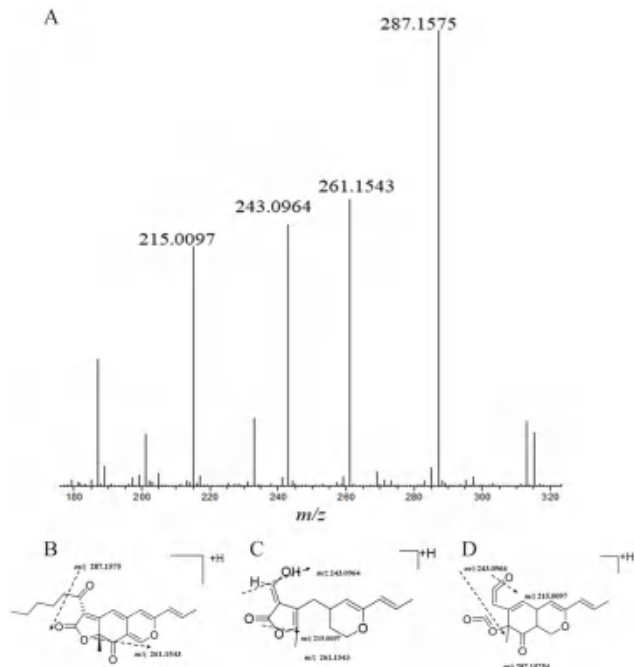


图 4 红斑红曲素在正离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B、C、D)

Fig 4 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B, C, and D) of monascin in the positive ion mode

分。总离子流图显示该类成分在正离子模式下响应均较好, 裂解方式多为 C 环 (内酯环) 的断裂和 A 环的重排反应以及 H<sub>2</sub>O、CO、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 等分子的丢失<sup>[15-16]</sup>。比如化合物 **66** 的准分子离子峰为  $m/z$  231.1380  $[M + H]^+$ , 保留时间为 21.65 min, 推测其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>, 其二级质谱图给出明显的  $m/z$  213.0855,  $m/z$  203.0081,  $m/z$  184.9979,  $m/z$  175.0191 等碎片离子信息, 推测  $m/z$  213.0855  $[M + H - H_2O]^+$  为丢失 1 分子 H<sub>2</sub>O, 继而在 C 环丢失 1 分子 CO 形成  $m/z$  184.9979  $[M + H - H_2O - CO]^+$  碎片离子, 推测  $m/z$  203.0081  $[M + H - C_2H_4]^+$  为涵盖内酯的 3 个环重排后 A 环上乙烯分子的丢失, 继而丢失 1 分子 CO 形成  $m/z$  175.0191  $[M + H - C_2H_4 - CO]^+$  碎片离子, 这与对照品白术内酯 I 以及相关文献报道<sup>[17-18]</sup>一致, 确定其为白术内酯 I, 推测裂解途径见图 5。

### 3.5 三萜酸类成分的结构鉴定

红曲茯苓组方中的三萜类成分主要来源于茯苓, 茯苓中化合物主要为羊毛脂烷型四环三萜, 该类成

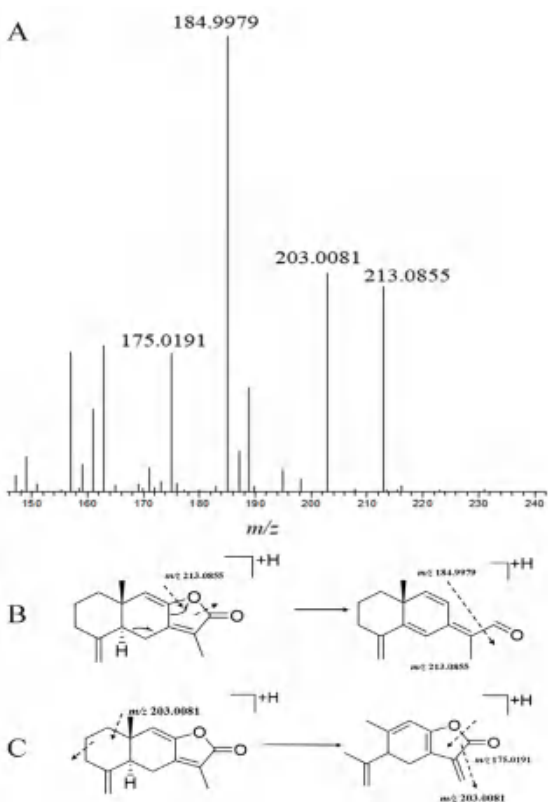


图 5 白术内酯 I 在正离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B、C)

Fig 5 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B and C) of atractylenolide I in the positive ion mode

分在负离子模式下响应较好, 常伴随脱水、脱烷基酸等裂解方式<sup>[19-20]</sup>。比如化合物 **84** 在负离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  527.3710  $[M-H]^-$ , 保留时间为 25.99 min, 推测其分子式为  $C_{33}H_{52}O_5$ 。推测其在二级质谱中首先脱去 1 分子  $H_2O$  生成碎片离子  $m/z$  509.5546  $[M-H-H_2O]^-$ , 继续脱去 1 分子  $CO_2$  得到  $m/z$  465.4455  $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ , 后继续脱去  $H_2O$ 、 $CO_2$ 、 $CH_3COOH$  等分子得到碎片离子  $m/z$  431.3975  $[M-H-2H_2O-CH_3COOH]^-$  和  $m/z$  405.1588  $[M-H-H_2O-CO_2-CH_3COOH]^-$ , 这与茯苓酸的相关文献报道<sup>[19, 21-22]</sup>一致, 推测其为茯苓酸, 裂解过程见图 6。

### 3.6 其他类成分的结构鉴定

从红曲茯苓组方中还鉴定出了一系列其他类化合物, 如有机酸类、多糖、氨基酸类等。多糖主要来源于茯苓, 常与酸类化合物结合成苷, 在负离子模式下响应较好, 裂解方式多为糖苷键的断裂和  $H_2O$  的丢失<sup>[23]</sup>, 比如化合物 **3** 在负离子模式下以  $m/z$  353.0702  $[M-H]^-$  的形式存在, 保留时间为 1.20 min, 推测其分子式为  $C_{12}H_{18}O_{12}$ , 后在二级质谱中又连续脱去 1 分子葡萄糖残基和 1 分子水得到碎片离子  $m/z$  191.0326  $[M-H-Glc]^-$  和  $m/z$  172.8540  $[M-H-Glc-H_2O]^-$ , 后进一步脱

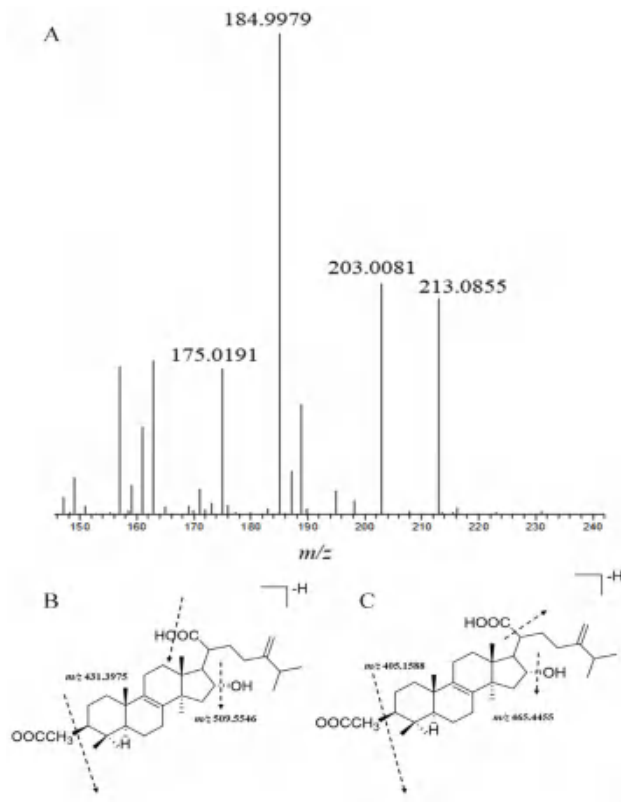


图 6 茯苓酸在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B、C)

Fig 6 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B and C) of pachymic acid in the negative ion mode

羧、脱羟产生  $m/z$  110.8980  $[M-H-Glc-H_2O-OH-COOH]^-$ , 这与文献报道<sup>[23]</sup>的枸橼酸葡萄糖的裂解规律一致, 推测其为枸橼酸葡萄糖。有机酸类化合物主要在山楂中检出, 在负离子模式下响应较好, 以化合物 **6** 为例, 根据其一级质谱数据, 在负离子模式下得到  $m/z$  353.0856  $[M-H]^-$ , 保留时间为 3.64 min, 推测其分子式为  $C_{16}H_{18}O_9$ , 根据二级质谱的裂解碎片峰,  $m/z$  190.9664  $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ ,  $m/z$  178.9053  $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$  以及  $m/z$  172.9528  $[M-H-C_9H_8O_4]^-$ , 这与绿原酸相关文献报道<sup>[24-25]</sup>一致, 推测其具体裂解途径见图 7。

## 4 讨论

本研究利用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup> 技术对红曲茯苓组方中的化学成分进行初步定性分析, 根据对照品和相关参考文献中化合物的裂解规律, 借助 Xcalibur 2.2 软件, 对红曲茯苓组方的正、负离子模式下的总离子流图分别进行了色谱峰的鉴定归属, 发现红曲茯苓组方中的黄酮类、三萜类以及有机酸类成分在负离子模式下响应更好, 而莫那可林类、红曲色素类以及倍半萜类的鉴定分析更适合在正离子模式下进行, 共鉴定出了 84 个化学成分, 较为全面地表征了红曲茯苓组方中的

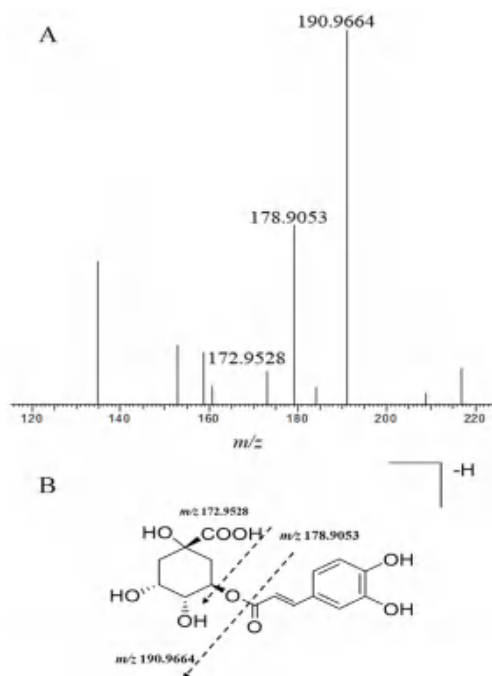


图 7 绿原酸在负离子模式下的二级质谱图 (A) 及可能的裂解途径 (B)

Fig 7 MS<sup>2</sup> mass spectrum (A) and the proposed fragmentation pathway (B) of chlorogenic acid in the negative ion mode

成分信息。但是红曲茯苓组方中所含中药成分复杂, 在正、负离子模式下的总离子流图仍有部分峰未确定其成分, 后续可根据对照品以及相关文献、数据库等裂解信息进一步明确。

本研究鉴定出的化学成分从来源归属看, 有 35 个成分来源于葛根, 24 个成分来源于红曲, 11 个成分来源于白术, 11 个成分来源于山楂, 6 个成分来源于茯苓, 其中有化学成分归属未确定, 比如染料木素可能来源于红曲或者葛根。有文献报道称, 红曲中的莫那可林类成分可通过抑制 HMG-CoA 还原酶而具有良好的降胆固醇作用, 是红曲的主要生物活性成分<sup>[11]</sup>, 莫那可林 K (洛伐他汀) 是其代表性成分。红曲色素类成分是红曲霉的次级代谢产物, 具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等生物活性, 主要由红、橙、黄三类色素组成, 已有文献报道黄色色素对高脂血症小鼠有调节血脂的作用<sup>[12, 26]</sup>。另外茯苓中的三萜类成分具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等生物活性, 有研究表明其在降血脂和肝脏保护方面有一定作用, 茯苓酸是其代表性成分<sup>[27-28]</sup>。白术内酯 I、II、III 是白术的代表性成分, 是白术健脾利水、抗炎降糖的有效成分<sup>[29]</sup>。葛根是降血脂药食同源中的常用药, 其主要成分葛根素可通过调节胆固醇含量以起到辅助降血脂的作用<sup>[30-31]</sup>。本研究中上述功效成分都有鉴定出, 提示洛伐他汀、红曲色素类成分、茯苓酸、白术内酯类成分以及葛根素等成分可以作为红曲茯苓制剂功效相关质量控制指标。

综上, 本文分析了红曲茯苓组方的化学成分, 可为其质量标准控制、后续入血成分分析、作用机制探究提供参考。

### 参考文献

- [1] 高学敏, 张建军, 王景霞, 等. 论我国保健食品的优势及其法律定位 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (2): 121-123.
- [2] 王林元, 王淳, 张睿, 等. 中医辨证保健概念的提出及理论探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (3): 1056-1061.
- [3] 刘金莲, 张建军, 刘曦, 等. 基于辨证保健理论探讨红曲茯苓片对脾虚湿盛型高脂血症大鼠的影响 [J]. 环球中医药, 2020, 13 (11): 1837-1845.
- [4] 王迪, 张宁, 陈雪, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 和网络药理学探讨六味地黄丸治疗 AD 潜在作用机制 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (4): 580-589.
- [5] 张艳, 周严严, 高文雅, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术的小儿豉翘清热颗粒化学成分鉴定及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (23): 6163-6177.
- [6] 王倩, 许霞, 张珂, 等. 利用 UPLC-IT-TOF-MS 定性分析芪胶升白胶囊化学成分组 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (18): 4938-4949.
- [7] 俞洪华, 孟晓伟, 李家荣, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的葛根、粉葛大鼠血清药物化学比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (2): 528-536.
- [8] 陈俊, 陈聪, 彭小芝, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS/MS 的葛根黄芩黄连汤主要成分分析及鉴定 [J]. 中药材, 2019, 42 (9): 2074-2078.
- [9] 周永刚, 吴思, 毛飞, 等. 葛根中黄酮类化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31 (2): 116-119.
- [10] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析 [J]. 中草药, 2015, 46 (7): 970-976.
- [11] Liang JX, Zhang QQ, Huang YF, et al. Comprehensive chemical profiling of monascus-fermented rice product and screening of lipid-lowering compounds other than monacolins [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111879.
- [12] 蒋沅岐, 董玉洁, 周福军, 等. 红曲的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52 (23): 7379-7388.
- [13] Zhang Z, Ali Z, Khan SI, et al. Cytotoxic monacolins from red yeast rice, a Chinese medicine and food [J]. Food Chem, 2016, 202: 262-268.
- [14] Zhu B, Qi F, Wu J, et al. Red yeast rice: a systematic review of the traditional uses, chemistry, pharmacology, and quality control of an important Chinese folk medicine [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1449.
- [15] 张艺轩. 基于液质联用技术的温络方药效物质基础研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [16] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于 UPLC/Q-TOFMS 技术的白术药材化学成分快速识别研究 [J]. 质谱学报, 2015, 36 (1): 72-77.
- [17] 陈静静. 助孕丸中健脾组方提取物的药效学与药代动力学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.



- [18] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (18): 5496-5513.
- [19] 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.
- [20] Zhu L, Xu J, Zhang S, 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.
- [21] 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.
- [22] 冯桂芳. 基于质谱技术的定志小丸治疗阿尔兹海默症的体内外化学物质组研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2019.
- [23] 龙红萍, 李欣, 王婷婷, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的小儿扶脾颗粒的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (23): 5522-5531.
- [24] 周茗. 基于 UHPLC-Q-TOF/MS 技术的淫羊藿和山楂叶质量研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [25] 乔晓莉, 吴士杰, 祁向争, 等. 山楂中化学成分 UPLC/ESI-TOF/MS 分析 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29 (2): 120-124.
- [26] 李雪梅, 沈兴海, 段震文, 等. 红曲霉代谢产物的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42 (5): 1018-1025.
- [27] 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.
- [28] 谭芳. 药膳应用现状及痰湿体质的药膳组方与应用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [29] 严林, 李新健, 张冰冰, 等. 泽泻汤的研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (16): 191-197.
- [30] 孙川喻, 郝超宝, 王宏伟. 葛根和绞股蓝提取物与红曲配伍制剂的降血脂作用研究 [J]. 中西医结合研究, 2021, 13 (3): 174-177.
- [31] 周遵明, 谭梅傲, 彭冲, 等. 黄芪葛根汤对高脂血症大鼠的降血脂作用机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (7): 945-951.

(收稿日期: 2022-07-22; 修回日期: 2022-09-26)

## 蒙药材白花龙胆的化学成分研究

宝钢<sup>1</sup>, 图诺木拉<sup>1</sup>, 敖敦格日乐<sup>1</sup>, 其日格尔<sup>1</sup>, 小岩<sup>1</sup>, 胡和珠拉<sup>1</sup>, 拉喜那木吉拉<sup>1, 2</sup>, 宝龙<sup>1, 2\*</sup>  
(1. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 国家药监局中药(蒙药)质量控制重点实验室, 内蒙古 通辽 028000; 2. 蒙医药研发工程教育部重点实验室, 内蒙古 通辽 028000)

**摘要:** 目的 研究蒙药材白花龙胆的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及制备型高效液相色谱等手段进行分离纯化, 并通过波谱数据及质谱数据鉴定化合物结构。结果 从白花龙胆花中分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 L-焦谷氨酸(1)、焦谷氨酸乙酯(2)、芹菜素(3)、β-谷甾醇(4)、熊果酸(5)、獐牙菜苷(6)、落干酸(7)、3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-1-羟基-7-甲氧基吡啶酮(8)。结论 化合物 1、2 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 1、2、3、8 均为首次从该植物中分离得到。

**关键词:** 蒙药材; 白花龙胆; 查干-珠勒根-其木格; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0666-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.018

## Chemical constituents in Mongolian medicinal material *Gentiana algida* Pall.

BAO Gang<sup>1</sup>, Tunuomula<sup>1</sup>, Aodungerile<sup>1</sup>, Qirigeer<sup>1</sup>, XIAO Yan<sup>1</sup>, Huhezhula<sup>1</sup>, Laxinamujila<sup>1, 2</sup>, BAO Long<sup>1, 2\*</sup> (1. College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Minzu University, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Mongolian Medicine, Tongliao Inner Mongolia 028000; 2. Key Laboratory of Research and Development Engineering of Mongolian Medicine, Ministry of Education, Tongliao Inner Mongolia 028000)

**基金项目:** 内蒙古自治区 2021 年草原英才项目 (No.CYYC21003); 2021 年内蒙古民族大学研究生科研创新资助项目 (No.NMDSS2111)。  
**作者简介:** 宝钢, 男, 硕士研究生, 主要从事蒙药鉴定与品种资源研究, email: bbaogang@126.com \*通信作者: 宝龙, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蒙药基础理论与临床疗效评价研究, email: 13847515759@163.com

**Abstract: Objective** To determine the chemical constituents of Mongolian medicinal material *Gentiana algida* Pall.. **Methods** The chemical components were separated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and preparative high performance liquid chromatography. The structure of the compound was identified by spectroscopic and mass spectrometry data. **Results** Totally 8 compounds were isolated from the flowers of *Gentiana algida* Pall., and identified as: *L*-pyroglutamic acid (1), pyroglutamic acid ethyl ester (2), apigenin (3),  $\beta$ -sitosterol (4), ursolic acid (5), sweroside (6), loganic acid (7), and 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-hydroxy-7-methoxyxanthone (8). **Conclusion** Compounds 1 and 2 have been isolated from this genus for the first time, and compounds 1, 2, 3 and 8 from this plant for the first time.

**Key words:** Mongolian medicinal material; *Gentiana algida* Pall.; Chagan-Zhulegen-Qimuge; chemical constituent

蒙药材白花龙胆为龙胆科 *Gentianaceae* 多年生草本植物白花龙胆 *Gentiana algida* Pall. 的干燥花, 又名查干-珠勒根-其木格, 查干-邦占。生长于山坡草地、河滩草地、高山冻原, 海拔 1200 ~ 5300 m<sup>[1]</sup>, 分布于吉林、甘肃、新疆、四川和西藏等地<sup>[2]</sup>。味涩、苦, 性寒, 效、柔、软、稀, 具有清热, 解毒, 止咳, 利咽喉的功效。主治咽喉肿痛, 暗哑, 肺热, 毒热<sup>[3]</sup>。文献研究发现, 该植物中主要含有萜类、黄酮类、吡啶类、有机酸类、甾体类及香豆素类等化学成分<sup>[4-6]</sup>。药理研究多集中于粗提取物, 具有良好的抗炎作用<sup>[7]</sup>。目前, 蒙药材白花龙胆多局限于民族用药, 药效物质基础及作用机制的研究不够深入, 单体成分的药理作用研究极少。因此, 为了进一步丰富白花龙胆的化学结构类型, 探索活性较好的化合物, 本试验对白花龙胆花 95% 乙醇提取物进行化学成分研究, 从中分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 *L*-焦谷氨酸 (1)、焦谷氨酸乙酯 (2)、芹菜素 (3)、 $\beta$ -谷甾醇 (4)、熊果酸 (5)、獐牙菜苷 (6)、落干酸 (7)、3-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-1-羟基-7-甲氧基吡啶酮 (8)。其中, 化合物 1、2 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 1、2、3、8 均为首次从该植物中分离得到。化合物 1 ~ 8 的化学结构见图 1。

## 1 材料

Bruker AVAIVCE III-500 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); LC-20AT 型制备液相色谱仪 C<sub>18</sub> (21.2 mm×250 mm, 10  $\mu$ m) (日本岛津); AB SCIEX X500r 高分辨质谱 C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.6  $\mu$ m) (百瑞科技有限公司); 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目, 青岛海浪硅胶干燥剂有限公司); 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, 瑞典 Pharmacia 公司); 硅胶预制板 (GF254, 100 mm×200 mm, 青岛永海硅胶有限公司)。色谱甲醇及其他试剂均

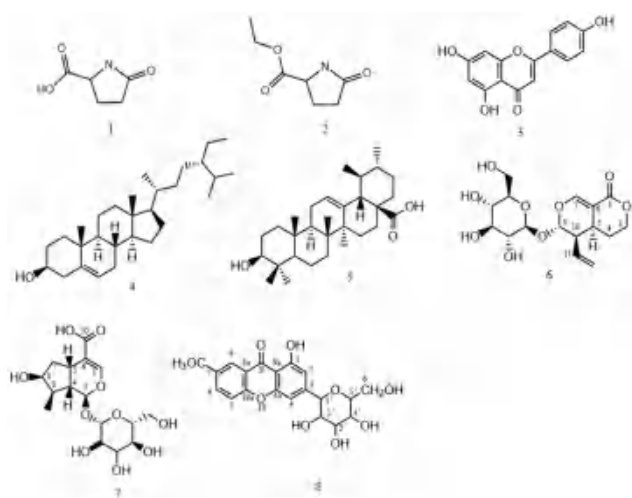


图 1 化合物 1 ~ 8 的结构图

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 8

为分析纯 (天津市大茂化学试剂厂)。

白花龙胆 *Gentiana algida* Pall. 花于 2020 年 10 月份采于青海省玉树县。经内蒙古民族大学曹乌吉斯古楞副教授鉴定为龙胆科 *Gentianaceae* 龙胆属 *Gentiana* 植物白花龙胆干燥花, 标本 (20201009) 存放于内蒙古民族大学蒙医药学院 205 实验室。

## 2 提取与分离

取白花龙胆干燥花 1 kg, 用 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液并减压浓缩得到总浸膏 426.5 g。取 30 g 浸膏, 加去离子水 150 mL 进行溶解, 再依次用石油醚、二氯甲烷、正丁醇萃取, 减压浓缩后分别得到石油醚部位 (5.3 g)、二氯甲烷部位 (1.64 g)、正丁醇部位 (14.6 g)。将二氯甲烷萃取物经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进行分离, 以甲醇-二氯甲烷 (3:2) 为洗脱剂进行等度洗脱, 经 TLC 进行检识后合并得到 7 个组分 Fr.BE-A ~ Fr.BE-G。Fr.BE-E 经半制备型液相色谱仪 (LD-20AT) 进行制备分离, 以甲

醇-水 (55:45) 为流动相, 检测波长 242 nm, 柱温 35 °C, 进样量 0.5 mL, 流速 4 mL · min<sup>-1</sup>, 得到化合物 1 (5.4 mg,  $t_R = 14.5$  min) 和化合物 2 (7.3 mg,  $t_R = 15.7$  min)。将石油醚萃取物经硅胶柱 (200 ~ 300 目) 色谱进行分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (10:0 ~ 0:10) 进行梯度洗脱, 共得到 Fr.BS-1 ~ Fr.BS-14 个组分。将组分 Fr.BS-4 经硅胶柱 (200 ~ 300 目) 色谱进行分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (8:2) 为洗脱剂进行洗脱, 重结晶, 得到化合物 3 (16 mg)、化合物 4 (9 mg)。将组分 Fr.BS-11 经硅胶柱 (200 ~ 300 目) 色谱进行分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (8:2) 为洗脱剂进行洗脱, 得到化合物 5 (18 mg)。将正丁醇萃取物, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱进行分离, 以甲醇-二氯甲烷 (3:2) 为洗脱剂进行等度洗脱, 经 TLC 进行检识后合并得到 15 个组分 Fr.BZ-1 ~ Fr.BZ-15。将 Fr.BZ-7 部分, 经半制备型液相色谱仪 (LD-20AT) 进行制备分离, 以甲醇-水 (60:40) 为流动相, 检测波长 242 nm, 柱温 35 °C, 进样量 0.5 mL, 流速 4 mL · min<sup>-1</sup>, 得到化合物 6 (18 mg,  $t_R = 88.5$  min)。将 Fr.BZ-8 部分, 经半制备型液相色谱仪 (LD-20AT) 进行制备分离, 以甲醇-水 (60:40) 为流动相, 检测波长 242 nm, 柱温 35 °C, 进样量 0.5 mL, 流速 4 mL · min<sup>-1</sup>, 得到化合物 7 (9.5 mg,  $t_R = 112.7$  min), 8 (6.4 mg,  $t_R = 116.7$  min)。

### 3 结构鉴定

化合物 1: 无色油状物 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 128 [M - H]<sup>-</sup>; 分子式为 C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 4.24 (1H, dd,  $J = 9.0, 4.4$  Hz, H-2), 2.44 ~ 2.40 (1H, m, H-3a), 2.33 ~ 2.29 (1H, m, H-4), 2.13 ~ 2.09 (1H, m, H-3b); <sup>13</sup>C NMR (MeOD-*d*<sub>4</sub>, 126 MHz)  $\delta$ : 181.27 (C-5), 174.20 (C-6), 57.16 (-OCH<sub>3</sub>), 30.45 (C-3), 25.98 (C-4)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[8]</sup>, 故鉴定化合物 1 为 *L*-焦谷氨酸。

化合物 2: 无色油状物 (三氯甲烷); ESI-MS  $m/z$ : 158.1 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.11 (1H, brs, NH), 4.27 (1H, dt,  $J = 11.8, 4.4$  Hz, H-5), 4.26 ~ 4.21 (2H, m, H-2'), 2.55 ~ 2.47 (1H, m, H-4a), 2.43 ~ 2.36 (2H, m, H-3), 2.29 ~ 2.22 (1H, m, H-4b), 1.31 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-3'); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz)  $\delta$ : 178.17 (C-2), 172.05 (C-1'), 61.98 (C-2'), 55.63 (C-5), 29.40 (C-3), 24.97 (C-4), 14.35 (C-3')。以上数据与文献对照基本一致<sup>[9]</sup>, 故鉴定化合物 2

为焦谷氨酸乙酯。

化合物 3: 黄色粉末 (三氯甲烷); ESI-MS  $m/z$ : 269.0 [M - H]<sup>-</sup>; 分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.87 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2', 6'), 7.04 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.39 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[10]</sup>, 故鉴定化合物 3 为芹菜素。

化合物 4: 白色粉末 (三氯甲烷); ESI-MS  $m/z$ : 415.4 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 5.40 ~ 5.33 (1H, m, H-6), 3.54 (1H, ddd,  $J = 15.9, 11.0, 4.6$  Hz, H-3a), 1.02 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-26), 0.85 (3H, s, H-21), 0.83 (3H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-29), 0.82 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-27), 0.69 (3H, s, H-21); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz)  $\delta$ : 140.96 (C-5), 121.95 (C-6), 72.03 (C-3), 56.97 (C-14), 56.24 (C-17), 50.32 (C-9), 46.02 (C-24), 42.51 (C-13), 39.97 (C-12), 37.45 (C-1), 36.71 (C-10), 36.36 (C-20), 34.14 (C-22), 32.10 (C-7, 8), 31.87 (C-2), 29.32 (C-23), 28.47 (C-16), 26.23 (C-25), 24.52 (C-15), 23.26 (C-28), 21.29 (C-11), 20.05 (C-27), 19.62 (C-19), 19.23 (C-21), 18.99 (C-26), 12.20 (C-18), 12.07 (C-29)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物 4 为  $\beta$ -谷甾醇。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 457.4 [M + H]<sup>+</sup>; 分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 5.12 (1H, s, H-12), 4.31 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-3), 1.03 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-30), 0.89 (3H, s, H-25), 0.86 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-29), 0.74 (3H, s, H-23), 0.67 (3H, s, H-24); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 126 MHz)  $\delta$ : 178.28 (C-28), 138.19 (C-13), 124.56 (C-12), 76.81 (C-3), 54.76 (C-5), 52.36 (C-18), 47.00 (C-9), 46.82 (C-17), 41.64 (C-14), 39.09 (C-10), 38.49 (C-8), 38.42 (C-19), 38.37 (C-20), 38.21 (C-4), 36.52 (C-1), 36.31 (C-22), 32.69 (C-7), 30.17 (C-21), 28.250 (C-15), 27.53 (C-23), 26.98 (C-2), 23.79 (C-16), 23.26 (C-27), 22.84 (C-11), 21.08 (C-30), 17.99 (C-6), 17.02 (C-29), 16.92 (C-26), 16.08 (C-25), 15.22 (C-24)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物 5 为熊果酸。



化合物 6: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 359.1  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{16}H_{22}O_9$ 。 $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7.48 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 5.51 ~ 5.45 (1H, m, H-8), 5.43 (1H, s, H-1), 5.31 (1H, dd,  $J = 17.1, 1.9$  Hz, H-10b), 5.25 (1H, dd,  $J = 10.2, 2.0$  Hz, H-10a), 4.50 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-1'), 4.39 ~ 4.33 (1H, m, H-7b), 4.28 (1H, t,  $J = 10.8$  Hz, H-7a), 2.99 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5), 2.66 (1H, dd,  $J = 8.9, 6.3$  Hz, H-9), 1.78 ~ 1.71 (1H, m, H-6b), 1.51 (1H, ddd,  $J = 26.1, 13.0, 4.3$  Hz, H-6a);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$ : 164.69 (C-11), 151.46 (C-3), 132.38 (C-8), 120.33 (C-10), 104.84 (C-4), 98.09 (C-1'), 95.56 (C-1), 77.37 (C-3'), 76.38 (C-5'), 73.13 (C-2'), 70.04 (C-4'), 67.70 (C-7), 61.04 (C-6'), 41.52 (C-9), 26.77 (C-5), 24.28 (C-6)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物 6 为獐牙菜苷。

化合物 7: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS  $m/z$ : 377.1  $[M + H]^+$ ; 分子式为  $C_{16}H_{24}O_{10}$ 。 $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7.27 (1H, s, H-3), 5.08 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-1), 4.48 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-1'), 3.43 (1H, dd,  $J = 11.8, 6.3$  Hz, H-7), 2.97 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5), 2.11 ~ 2.03 (1H, m, H-9), 1.84 ~ 1.77 (1H, m, H-6a), 1.75 ~ 1.67 (1H, m, H-6b), 1.45 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-8), 0.98 (1H, s, H-10);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$ : 168.55 (C-0), 149.77 (C-3), 113.06 (C-4), 98.59 (C-1'), 96.06 (C-1), 77.27 (C-5'), 76.84 (C-3'), 73.22 (C-2'), 72.24 (C-7), 70.16 (C-4'), 61.20 (C-6'), 44.86 (C-9), 41.84 (C-6), 40.58 (C-8), 31.03 (C-5), 13.63 (C-10)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 7 为落干酸。

化合物 8: 黄色油状物 (甲醇);  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$ : 13.56 (1H, s, -OH), 7.58 ~ 7.56 (1H, m, H-6), 7.55 (1H, s, H-8), 6.93 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 6.89 (1H, s, H-2), 6.52 (1H, s, H-4), 4.59 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-1'), 3.89 (3H, s, H-2', 6');  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz)  $\delta$ : 181.89 (C-9), 163.34 (C-3), 160.59 (C-1), 156.24 (C-4a), 150.76 (C-10a), 148.02 (C-7), 121.40 (C-8a), 120.31 (C-6), 115.77 (C-5), 110.18 (C-8), 108.86 (C-9a), 103.10 (C-2), 93.74 (C-4), 81.48 (C-5'),

78.90 (C-3'), 73.08 (C-1'), 70.55 (C-2'), 70.25 (C-4'), 61.41 (C-6'), 55.94 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献对照基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 8 为 3-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-1-羟基-7-甲氧基吡啶酮。

#### 4 讨论

本试验对白花龙胆花 95% 乙醇提取物进行化学成分研究, 共分离得到 8 个化合物, 包括 2 个酚酸类化合物、1 个黄酮类化合物、1 个吡啶酮类化合物、2 个三萜类化合物、2 个环烯醚萜苷类化合物。其中, 化合物 1、2、3、8 均为首次从该植物中分离得到。之前关于白花龙胆化学成分的报道多集中于三萜类化合物, 本研究丰富了白花龙胆的化合物种类, 为白花龙胆的药效物质基础和质控研究奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 62-109.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (蒙药卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 168.
- [3] 罗布桑. 蒙药学 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1986: 476.
- [4] 杨爱梅, 韩晗, 孙静, 等. 藏药高山龙胆的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (19): 121-124.
- [5] Yang AM, Han H, Li JY, et al. Triterpenoids from *Gentiana algida* [J]. Chem Nat Compd, 2015, 51 (2): 381-382.
- [6] 宝钢, 图诺木拉, 希古日干, 等. 珠勒根-其木格化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44 (8): 2587-2594.
- [7] 杨芳, 王洪伦, 李春婷, 等. 白花龙胆花抗炎作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22 (2): 330-333.
- [8] 陈辉, 顾念念, 郝志友, 等. 黄精乙酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40 (6): 1345-1347.
- [9] 段小娟, 李晓明, 王斌贵. 海洋红藻鸭毛藻化学成分研究 [J]. 海洋科学, 2007 (5): 17-19.
- [10] 薛靖怡, 吴莹莹, 马雪, 等. 毛大丁草的化学成分研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (8): 1870-1874.
- [11] 雷军, 肖云川, 刘森, 等. 糯米藤化学成分研究 [J]. 中成药, 2013, 35 (7): 1489-1493.
- [12] 白丽明, 高鸿悦, 马玉坤, 等. 鼠曲草化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47 (4): 549-553.
- [13] 王丹, 耿岩玲, 陈燕平, 等. 忍冬根的正丁醇萃取物化学成分研究 [J]. 化学与生物工程, 2018, 35 (4): 65-68.
- [14] 李玉林, 丁晨旭, 刘健全, 等. 红直獐牙菜的苷类成分 [J]. 中草药, 2002, 33 (2): 10-12.
- [15] Tian X, Xu X, Zhan H, et al. Two new *O*- and *C*-glycosylxanthones from *Gentiana tizuensis* Franch [J]. India J Chem, 2003 (4): 950-952.

(收稿日期: 2022-09-23; 修回日期: 2023-01-10)

## 基于“优势成分导向”策略的甘草抗心悸作用 质量标志物的快速筛选

刘长乐<sup>1</sup>, 刘妍如<sup>1\*</sup>, 唐志书<sup>1, 2\*</sup>, 宋忠兴<sup>1</sup>, 常百金<sup>3</sup>, 杨兴晶<sup>1</sup>, 赵艳婷<sup>1</sup> (1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西中药产业技术研究院, 陕西 咸阳 712083; 2. 中国中医科学院, 北京 100700; 3. 长春中医药大学, 长春 130117)

**摘要:** **目的** 基于“以效论质”的中药质量控制研究思路, 联合网络药理学方法与蛋白亲和实验, 建立快速筛选甘草抗心悸质量标志物和特异性蛋白的方法。**方法** 首先使用 UPLC-TOF/MS 技术对甘草的化学成分进行表征, 其次基于网络药理学和分子对接探讨甘草抗心悸的主要有效成分及作用机制, 最后通过蛋白亲和实验验证不同产地甘草提取物对关键蛋白的亲和力, 筛选出与甘草抗心悸质量相关的特异性蛋白。**结果** 共鉴定出甘草 30 个化学成分, 网络药理学分析得到甘草素、甘草苷、异甘草苷、异甘草素、甘草酸等 7 个核心成分和 AKT1、ESR1、MAPK3 等 6 个关键靶点。生物信息富集分析得到 PI3K-Akt 信号通路、雌激素信号通路、松弛素信号通路等关键通路。分子对接结果表明甘草素、甘草苷、异甘草素、异甘草苷和刺甘草查尔酮与关键靶点有良好的结合能力且结合主要以氢键为主。蛋白亲和力实验表明, PTGS2 蛋白可作为甘草抗心悸质量评价的特异性蛋白, 且野生甘草的抗心悸作用强于种植甘草。**结论** 建立了甘草抗心悸质量标志物的筛选方法, 并筛选出了与甘草抗心悸质量相关的特异性蛋白, 为提升其质量控制标准奠定了基础。

**关键词:** 心悸; 甘草; 网络药理学; 分子对接; 蛋白亲和力

**中图分类号:** R285, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)03-0670-08  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.019

### Rapid screening of Q-markers for licorice anti-palpitation based on dominance components guidance strategy

LIU Chang-le<sup>1</sup>, LIU Yan-ru<sup>1\*</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1, 2\*</sup>, SONG Zhong-xing<sup>1</sup>, CHANG Bai-jin<sup>3</sup>, YANG Xing-jing<sup>1</sup>, ZHAO Yan-ting<sup>1</sup> (1. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center for Industrialization of Chinese Medicinal Resources/State Key Laboratory of Research, Development of Characteristic Qin Medicinal Resources (Cultivation)/Shaanxi Institute for Chinese Medicine Industry Technology, Xianyang Shaanxi 712083; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 3. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

**Abstract: Objective** To rapidly screen Q-markers and specific proteins of licorice anti-palpitation based on the quality control idea of drug quality evaluated by efficacy, network pharmacology and protein affinity experiments. **Methods** The main chemical components in licorice were detected by UPLC-TOF/MS. Then the mechanism and active ingredients of licorice anti-palpitation were analyzed based on network pharmacology and molecular docking technology. Last, protein binding affinity of licorice different habitats by proteins affinity experiments. **Results** Totally 30 main chemical components of licorice were obtained. The 7 core components included liquiritin, isoliquiritigenin and liquiritigenin, etc. and the key 6 targets included AKT1, ESR1, and MAPK3,

**基金项目:** 2019 年内蒙古自治区重大科技专项“高品质蒙药材中药材规模化种植技术体系研究与示范 (No.2019ZD005); 中央本级重大增减持项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(No.2060302); 国家现代农业产业技术体系资助 (No.CARS-21)。

**作者简介:** 刘长乐, 男, 硕士研究生, 主要从事中药资源开发与中药质量分析, email: lcl0821@163.com \* **通信作者:** 刘妍如, 女, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中药质量控制及物质基础研究, email: yanzi\_2203@aliyun.com; 唐志书, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药制剂新技术与中药质量分析研究, email: tzs6565@163.com

etc. were obtained. Important pathways like PI3K-Akt signaling pathway, estrogen signaling pathway and relaxin signaling pathway were obtained. Molecular docking indicated that liquiritigenin, isoliquiritigenin, isoliquiritin, liquiritin and echinatin with key targets had excellent binding affinity by hydrogen-bonding interactions mainly. Proteins affinity experiments showed that PTGS2 could be used as a specific protein to evaluate the quality of licorice anti-palpitation, with the anti-palpitation effect of wild licorice stronger than that of cultivated one. **Conclusion** Rapid screening method of Q-markers for licorice anti-palpitation established based on dominance components guidance strategy. Specific proteins related to the anti-palpitation quality of licorice are screened, laying the foundation for improving its quality control standards.

**Key words:** palpitation; licorice; network pharmacology; molecular docking; protein affinity

心悸是一种复杂的疾病,由多种遗传和环境因素之间的相互作用引起。中医理论体系认为心为君主之官,主行血脉而藏神明,心病则气血逆行,神明不安,发为惊悸、怔忡<sup>[1]</sup>。在中医临床上,甘草味甘、性平,归心、肺、脾、胃经,在缓解心悸、胸闷气短、心烦失眠等心律失常症状上应用广泛,且与其他方药联用治疗心悸疗效显著<sup>[2]</sup>。在《伤寒杂病论》治疗悸症中,张仲景用药五味之中甘居于前列,重心阳与脾肺关系,因此喜用甘草单味中药治疗心悸,并位单味方药用药之首<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明甘草酸、人参总皂苷和麦冬总皂苷合用能缩短动作电位时程,延长不应期,降低心房肌自律性和兴奋性,有效防治心律失常的发生<sup>[4]</sup>。甘草次酸对乌头碱所致的大鼠心律失常具有较为明显的减毒作用<sup>[5]</sup>。

甘草药理作用复杂,化学成分的种类多样,主要有三萜类、黄酮类、多糖类、香豆素类、生物碱类、挥发油类和微量元素等化合物<sup>[6]</sup>。目前,甘草的质量控制主要参考 2020 年版《中国药典》,以甘草苷和甘草酸含量作为主要质控指标。而中药的临床疗效取决于其所含化学成分(群)的特征,即以“药效论质”中药质量控制研究思路<sup>[7]</sup>。因此,要建立与甘草抗心悸相关的质量评价体系,应注重“成分-活性-功效”的联系,对影响甘草质量的药效成分群及其功效相关的生物效应进行多维度、多层次、全方位的评价,挖掘其内在的规律,找到关系药材质量的质量标志物(Q-marker)<sup>[8]</sup>。本研究结合 UPLC-TOF/MS 技术和网络药理学方法构建“成分-靶点-通路”关联网络,从化学和生物信息角度预测甘草抗心悸的潜在活性成分及分子机制,并通过分子对接技术筛选出潜在功效的 Q-marker。最后通过蛋白亲和实验筛选出与甘草抗心悸质量相关的特异性靶点蛋白,为甘草的质量控制及后续研究开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱(Waters 公司)串联 Triple TOFTM 5600 三重四极杆飞行时间质谱仪(AB SCIEX 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Thermo Micro17R 微量低温冷冻离心机、Thermo1510 型全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific 有限公司)。

### 1.2 试剂

无水乙醇(分析级,天津市天力化学试剂有限公司);乙腈(色谱级,Merck 公司);甲醇(色谱级)、甲酸(批号:H158A)(Sigma-Aldrich 公司);水为超纯水(密理博 Milli-Q Integral 5 型超纯水机制备);AKT1、ESR1、MAPK3、PIK3CA、PIK3CB 人源靶点试剂盒(江苏酶免实业有限公司)。

样品经陕西中医药大学药学院王继涛高级实验员鉴定为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)和光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)的干燥根(见表 1)。

## 2 甘草化学成分研究

### 2.1 供试品溶液的制备

取甘草粉末(过三号筛)样品约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 100 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用 70%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,即得<sup>[9]</sup>。

### 2.2 待测样品的制备

取“2.1”下甘草供试品溶液低温浓缩干燥后用双蒸水溶解,与蛋白标准液 37 °C 下等体积反应 30 min 制得待测样品。

### 2.3 色谱条件

**2.3.1 质谱条件** 离子源为电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式采集数据,源喷射电压(IVF)分别为 5500、-4500 V,裂解电压(DP)为 ±80



表 1 各批次甘草信息

Tab 1 licorice information for each batch

编号	产地	生长方式	品种	编号	产地	生长方式	品种
S1	内蒙古通辽市庆和镇	种植	乌拉尔甘草	S22	新疆库尔勒市西尼尔镇	野生	乌拉尔甘草
S2	宁夏吴忠市红寺堡区	野生	胀果甘草	S23	宁夏盐池县	野生	胀果甘草
S3	内蒙古杭锦旗浩绕柴登	种植	乌拉尔甘草	S24	新疆北屯市	种植	光果甘草
S4	内蒙古达拉特旗	野生	乌拉尔甘草	S25	新疆图木舒克市 50 团	种植	胀果甘草
S5	内蒙古通辽市庆和镇	野生	乌拉尔甘草	S26	新疆呼图壁县二十里店镇	种植	乌拉尔甘草
S6	宁夏吴忠市红寺堡区	种植	乌拉尔甘草	S27	内蒙古独贵塔拉镇沙日昭	种植	乌拉尔甘草
S7	陕西省榆林市清涧县	野生	乌拉尔甘草	S28	内蒙古包头市土默特右旗	种植	乌拉尔甘草
S8	陕西省延安市子长县	野生	乌拉尔甘草	S29	新疆焉耆县王家庄牧场	种植	乌拉尔甘草
S9	宁夏吴忠市盐池县高沙窝镇	种植	乌拉尔甘草	S30	新疆莎车县恰热克镇	野生	胀果甘草
S10	陕西省延安市延川县	野生	乌拉尔甘草	S31	新疆哈巴河县齐巴尔镇	野生	乌拉尔甘草
S11	内蒙古鄂尔多斯杭锦旗巴拉贡镇	种植	乌拉尔甘草	S32	甘肃省白银市会宁县	野生	乌拉尔甘草
S12	宁夏吴忠市盐池县	种植	胀果甘草	S33	内蒙古乌海市海勃湾巴音乌素村	种植	乌拉尔甘草
S13	新疆伊犁伊宁县	野生	乌拉尔甘草	S34	新疆图木舒克 50 团	种植	乌拉尔甘草
S14	内蒙古赤峰市松山区	野生	乌拉尔甘草	S35	新疆博湖胀果	种植	光果甘草
S15	甘肃兰州市榆中县	野生	乌拉尔甘草	S36	内蒙古鄂尔多斯准格尔旗	种植	乌拉尔甘草
S16	新疆喀什市浩罕乡	野生	乌拉尔甘草	S37	宁夏盐池县高沙窝镇	野生	乌拉尔甘草
S17	宁夏盐池县王乐井乡	野生	胀果甘草	S38	内蒙古鄂尔多斯杭锦旗陈红湾	种植	乌拉尔甘草
S18	新疆和田县	野生	乌拉尔甘草	S39	新疆博湖胀果	野生	光果甘草
S19	宁夏盐池县王乐井乡	种植	胀果甘草	S40	陕西省咸阳市永寿县	种植	乌拉尔甘草
S20	内蒙古杭锦旗独贵特镇	种植	乌拉尔甘草	S41	陕西省咸阳市永寿县	种植	光果甘草
S21	甘肃定西市	种植	乌拉尔甘草				

V, 碰撞能量 (CE) 为  $\pm 10$  eV, 雾化气 (GS1) 和辅助气 (GS2) 为氮气, 均为 344.74 kPa (50 psi), 气帘气 (CUR) 241.32 kPa (35 psi), 雾化温度 (TEM) 500 °C, 采用信息依赖采集 (IDA), 动态背景扣除 (DBS) 和高灵敏度模式采集数据, 母离子 (TOF-MS) 扫描范围  $m/z$  100 ~ 2000, 子离子扫描范围为  $m/z$  100 ~ 2000。

**2.3.2 液相条件** 采用 5600 型质谱仪进行成分表征, 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8  $\mu$ m), 流动相为 0.1% 甲酸-水溶液 (A)-乙腈溶液 (B), 梯度洗脱程序 (0 ~ 6 min, 10% ~ 20%B; 6 ~ 14 min, 20% ~ 25%B; 14 ~ 18 min, 25% ~ 27%B; 18 ~ 26 min, 27% ~ 31%B; 26 ~ 39 min, 31% ~ 50%B; 39 ~ 47 min, 50% ~ 75%B; 47 ~ 53 min, 75% ~ 10%B; 53 ~ 55 min, 10%B); 柱温 40 °C; 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 5  $\mu$ L。

## 2.4 蛋白活性亲和力

将纯化的蛋白抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 往包被单抗微孔中加入“2.2”项下待测样品, 再与酶标抗体结合, 形成“抗体-样品-酶标抗体”复合物, 经彻底洗涤后加底物 TMB 显色。采用 Adobe Illustrator 2021 和 R 4.1.2 软件进行数据分析及绘图。

蛋白亲和力 (%) =  $[1 - A_1 / (A_2 + A_3)] \times 100\%$ <sup>[10]</sup>

$A_1$  为药材与蛋白等体积孵育吸光度值,  $A_2$  为蛋白与双蒸水吸光度值,  $A_3$  为药材与双蒸水孵育吸光度值。

## 2.5 成分表征

甘草化学成分表征 IDA 二级质谱总离子流图 (见图 1)。通过 Peakview 2.2 查看采集数据, 以 AB SCIEX master view 1.1.0.0 中药成分数据库 (TCM library 1.0) 作为甘草成分匹配库。通过比对精确质量数、同位素峰度比以及碎片离子裂解规律等信息, 结合文献报道鉴定出甘草 30 个化学成分 (见表 2)。

## 3 甘草治疗心律失常网络药理学研究

### 3.1 靶点网络拓扑分析

甘草 30 个活性化合物在 ETCM、TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库中筛选得到 432 相关“成分-靶点”。从 GeneCards、CTD 和 DisGeNET 数据库得到 38 795 个与心律失常的相关靶点; 分析 GEO 数据集 GSE2240 (GPL96) 芯片得到 366 个差异基因 ( $\text{adj.}P < 0.05$ ,  $|\log\text{FC}| \geq 1$ ), 联合疾病靶点, 得到“疾病-靶点”集合。将得到的“成分-靶点”和“疾病-靶点”集合以 Venny 工具 2.1.0 得到交集靶点 404 个, 再导入 STRING 11.5, 利用 Cytoscape 3.8.2 构建蛋白互作网络 (见图 2), 其中 SRC、HSP90AA1、MAPK1、MAPK3、EP300、RXRA、PI3KCA 等高分蛋白在该网络的调控中发挥重要作用。将成分、靶点和 PPI 网络生成的互作表导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建甘草的“药材-化合

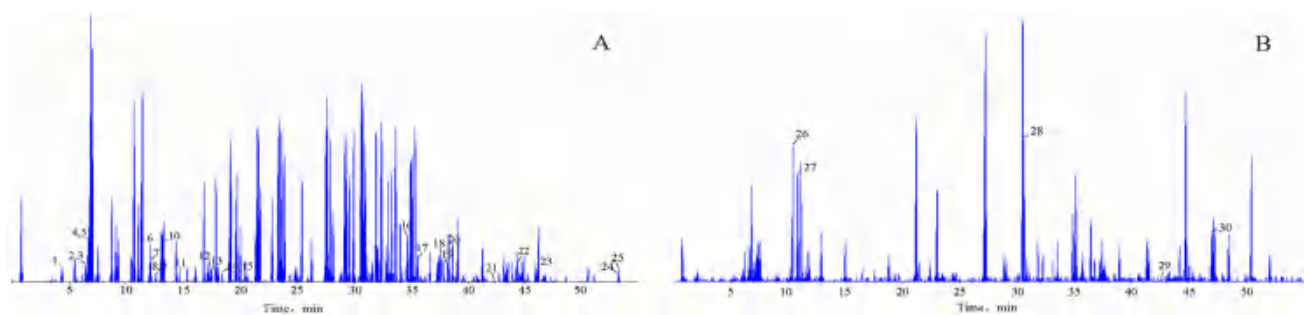


图 1 甘草化学成分表征正 (A) 负 (B) 离子模式 IDA 二级质谱总离子流图

Fig 1 UPLC/Q-TOF-MS ion current IDA extraction spectrum of licorice in positive (A) and negative (B) ion mode

1. 夏佛塔苷; 2. 蔗糖甘草苷; 3. 蔗糖异甘草苷; 4. 甘草苷; 5. 新甘草苷; 6. 甘草素; 7, 7, 4'-二羟基黄酮; 8. 异甘草素; 9. 乔松素; 10. 毛蕊异黄酮; 11. 芒柄花苷; 12. 柚皮素; 13. 刺甘草查尔酮; 14. 芹菜素; 15. 染料木素; 16. 半甘草异黄酮 B; 17. 甘草黄酮 A; 18. 甘草黄酮醇; 19. 甘草黄酮 C; 20. 甘草酚; 21. 光果甘草酮; 22. 甘草西定; 23. 粗毛甘草素 A; 24. 白桦脂酸; 25. 齐墩果酸; 26. 异甘草苷; 27. 新异甘草苷; 28. 甘草酸; 29. 甘草黄酮 B; 30. 甘草次酸 (1. schaftoside; 2. liquiritin apioside; 3. isoliquiritin apioside; 4. liquiritin; 5. neoliquiritin; 6. liquiritigenin; 7, 7, 4'-dihydroxyflavone; 8. isoliquiritigenin; 9. pinocembrin; 10. calycosin; 11. ononin; 12. naringenin; 13. echinatin; 14. apigenin; 15. genistein; 16. semilicoisoflavone B; 17. licoflavone A; 18. licoflavonol; 19. licoflavone C; 20. glycyrol; 21. glabrone; 22. licoricidin B; 23. glyasperin A; 24. betulinic acid; 25. oleanolic acid; 26. isoliquiritin; 27. neoisoliquiritin; 28. glycyrrhizic acid; 29. licoflavone B; 30. glycyrrhetic acid)

表 2 TOF 成分表征结果

Tab 2 Characterization of TOF composition

序号	化合物名称	化学式	相对分子质量	$t_R/min$	母离子 ( $m/z$ )	碎片离子 ( $m/z$ )	文献
1	夏佛塔苷	$C_{26}H_{28}O_{14}$	564.1479	4.99	563.1	503.1, 473.1, 353.1	[13]
2	蔗糖甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.1686	6.54	549.1	255.0	[11]
3	蔗糖异甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.1686	6.54	549.1	255.1	[11]
4	甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.1263	6.62	417.1	255.1, 135.0	[11]
5	新甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.1263	6.62	417.1	255.1	[12]
6	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	256.0735	11.92	255.1	135.0, 119.1	[11]
7	7, 4'-二羟基黄酮	$C_{15}H_{10}O_4$	254.0579	11.98	253.1	135.0, 117.0	[13]
8	异甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	256.0735	12.44	255.1	135.0, 119.1	[12]
9	乔松素	$C_{15}H_{12}O_4$	256.0735	12.44	255.1	211.1, 171.0, 151.0	[13]
10	毛蕊异黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	284.0684	13.75	283.1	268.0, 211.0	[15]
11	芒柄花苷	$C_{22}H_{22}O_9$	430.1263	14.75	429.1	267.1	[15]
12	柚皮素	$C_{15}H_{12}O_5$	272.0684	17.47	271.1	151.0, 119.1, 107.1	[12]
13	刺甘草查尔酮	$C_{16}H_{14}O_4$	270.0892	17.59	269.0	237.1, 161.0	[13]
14	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	270.0528	18.4	269.0	151.0, 117.0	[12]
15	染料木素	$C_{15}H_{10}O_5$	270.0528	18.4	269.0	133.0, 117.0	[15]
16	半甘草异黄酮 B	$C_{20}H_{16}O_6$	352.0946	34.57	351.1	336.1, 183.0	[16]
17	甘草黄酮 A	$C_{20}H_{18}O_4$	322.1205	35.73	321.1	278.1, 199.0	[14]
18	甘草黄酮醇	$C_{20}H_{18}O_6$	354.1103	37.74	353.1	309.0, 268.0	[15]
19	甘草黄酮 C	$C_{20}H_{18}O_5$	338.1154	38.17	337.1	281.0, 268.0, 219.0	[12]
20	甘草酚	$C_{21}H_{18}O_6$	366.1103	38.64	365.1	307.0, 295.0	[12]
21	光果甘草酮	$C_{20}H_{16}O_5$	336.0997	42.28	335.1	320.1, 291.9	[17]
22	甘草西定	$C_{26}H_{32}O_5$	424.2249	44.54	423.2	233.1, 207.1, 203.1	[16]
23	粗毛甘草素 A	$C_{25}H_{26}O_6$	422.1729	45.85	421.1	378.1, 297.0	[13]
24	白桦脂酸	$C_{30}H_{48}O_3$	456.3603	52.79	455.4	407.4, 325.2	[13]
25	齐墩果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	456.3603	52.79	455.3	407.3	[13]
26	异甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.1263	10.68	417.1	255.1, 135.0	[7]
27	新异甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.1263	10.74	417.1	255.1	[8]
28	甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{16}$	822.4037	30.53	823.4	454.4, 647.3	[19]
29	甘草黄酮 B	$C_{25}H_{26}O_4$	390.1831	42.41	391.1	335.1, 279.1	[18]
30	甘草次酸	$C_{30}H_{46}O_4$	470.3396	46.79	471.3	427.5, 357.5	[13]

物-靶点”关联网。如图 3 所示, 所构建的关联网包括 140 个节点和 758 条边。该网络中成分值

相当大、近中心度也较高的主要有甘草素、甘草苷、异甘草苷、异甘草素、甘草酸等化合物和 AKT1、



图2 靶点 PPI 图 (Degree 排名前 7 个蛋白质用红色圆形表示)  
Fig 2 Screening target PPI map (the top 7 proteins in Degree are shown in red circles)

ESR1、MAPK3、PIK3CA、PIK3CB、PTGS2 等靶点。

### 3.2 生物过程注释及代谢通路分析

为了探讨甘草治疗心律失常的潜在分子机制，将“成分-疾病”对应的 92 个关键靶点通过 Cluster profiler 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释。GO 富集分析结果表明，甘草抗心悸主要与膜区、膜筏、多肽-丝氨酸改性、肽基-丝氨酸磷酸化、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、核糖核酸聚合酶 II-特异性-结合转录因子结合等存在密切联系。KEGG 富集分析结果表明，当  $P < 0.05$  时，共有 165 条 KEGG 通路，从前 50 条通路中筛选出可能与甘草治疗心律失常密切相关的途径，其主要的调控代谢通路为 PI3K-Akt 信号通路、雌激素信号通路、松弛素信号通路、C 型凝集素受体通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等 (见图 4)。

### 3.3 分子对接

为了验证甘草有效成分与其治疗心律失常

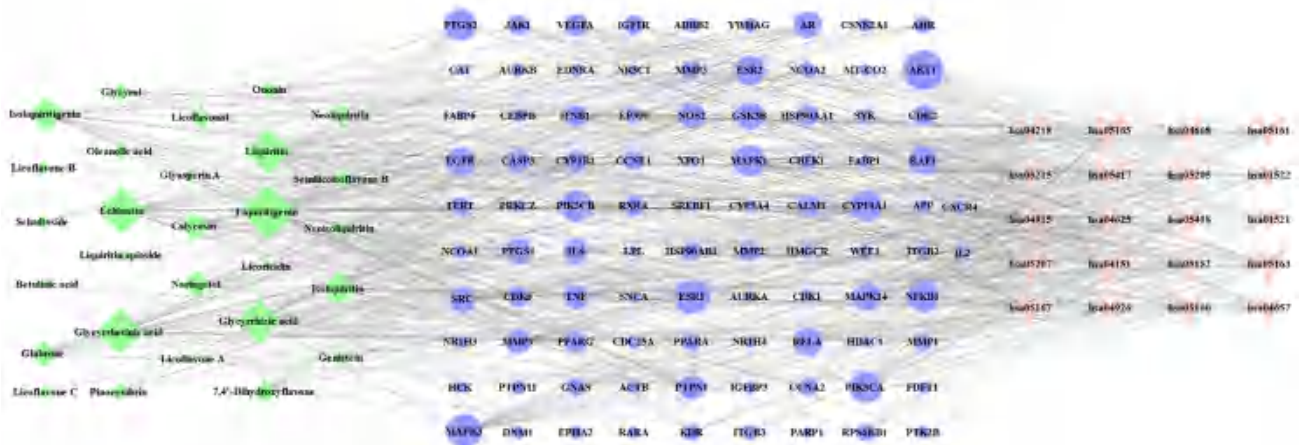


图3 “成分-靶点-通路”网络的构建分析  
Fig 3 Construction and analysis of “ingredient-target-pathway” network

的相关靶点之间的构效关系的合理性，采用分子对接对其进行验证。从 PDB 数据库下载 7 关键蛋白的晶体结构 (AKT1, ID: 4KEL; ESR1, ID: 6CHZ; MAPK3, ID: 4QTB; MAPK1, ID: 6SLG; PIK3CA, ID: 7JIU; PIK3CB, ID: 4BFR; PTGS2, ID: 5F19)，PubChem 数据库下载核心成分的 SDF 文件，使用 Schrödinger2020 软件中的 Glide 模块进行对接。结果表明甘草素、甘草苷、异甘草素、异甘草苷和刺甘草查尔酮与关键蛋白有良好的结合能力，见表 3。选取对接结果中结合能较低、构象较好的对接结果进行可视化展示，如图 5 所示大部分化合物和受体结合以发生氢键作用为主 (紫色箭头)，其结合位点主要为精氨酸 (ARG)、谷氨酸 (GLU)、天冬氨酸 (ASP)、缬氨酸 (VAL) 等氨基酸，表明不同成分与不同核心靶点之间有不同程度的潜在作用。

### 3.4 蛋白活性亲和力

测定了 41 个批次甘草药材对 AKT1、ESR1、MAPK3、PIK3CA、PIK3CB 和 PTGS2 6 个关键蛋白的活性亲和力，结果表明甘草药材提取物对关键蛋白活性有明显抑制作用且不同产地的甘草药材表现出了不同亲和活性，其中分别有 27 批、30 批、9 批、28 批、28 批和 32 批对 AKT1、ESR1、MAPK3、PIK3CA、PIK3CB 和 PTGS2 蛋白活性的亲和力大于 50%，且不同产地甘草提取物对 MAPK3 和 PTGS2 蛋白的亲和力存在明显差异 (见图 6A)。同时，由聚类分析可知甘草药材提取物对 AKT1、PIK3CA、PIK3CB、PTGS2 和 ESR1 蛋白的亲和力强于对 MAPK3 蛋白的亲和力 (见图 6B)。因此选择 PTGS2 作为特异性蛋白，对野生和种植甘草抗心悸质量进行评价，结果表明野生甘草抗心悸优于种植甘草 (见图 6C)。



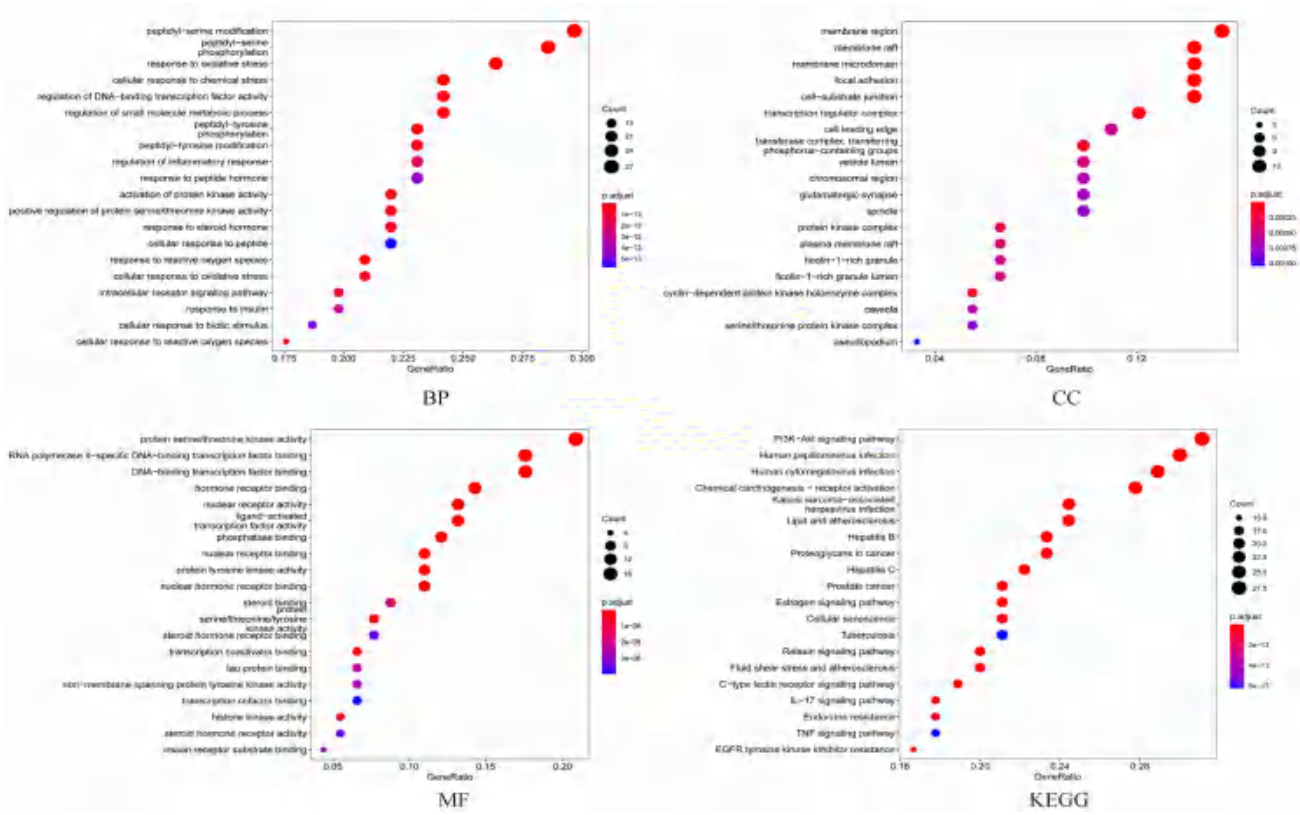


图 4 GO 富集及 KEGG 富集分析  
Fig 4 Enrichment analysis for GO and KEGG

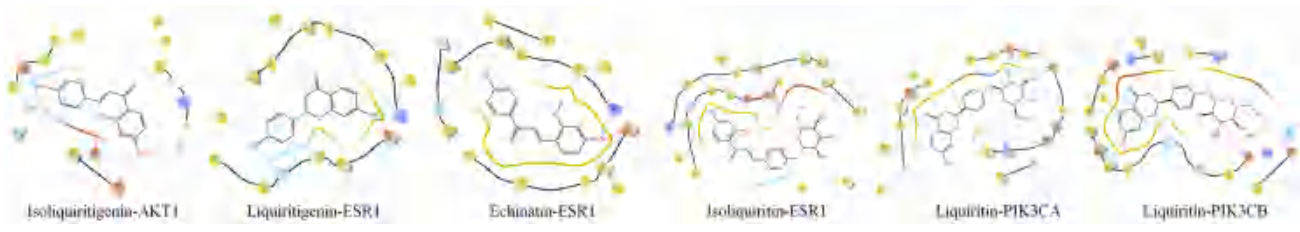


图 5 分子对接图  
Fig 5 Map of molecular docking

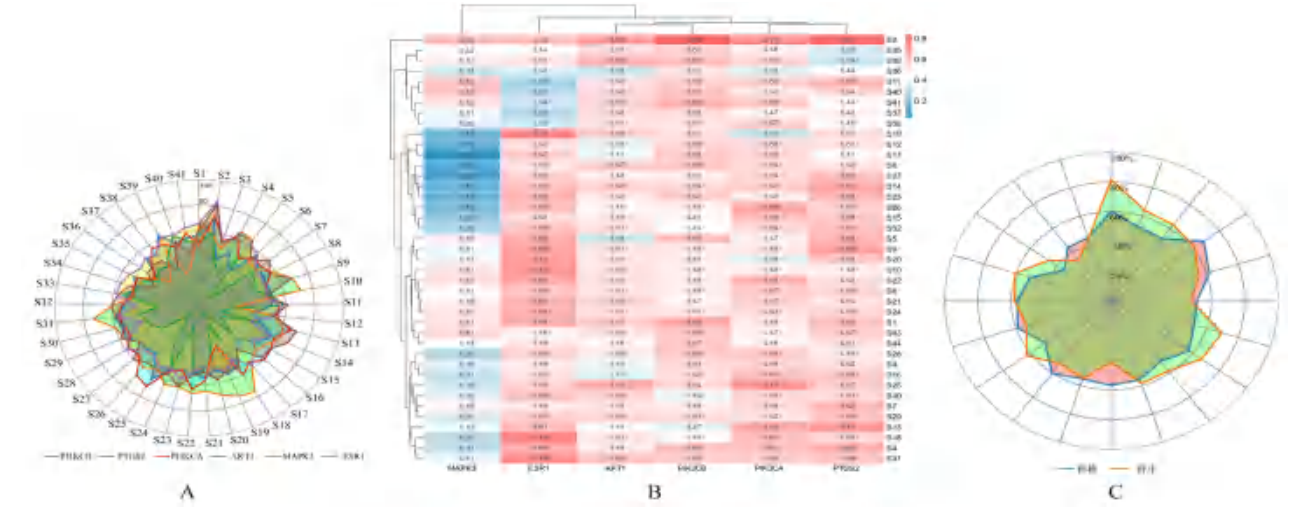


图 6 甘草药材与关键蛋白亲和力  
Fig 6 Affinity of licorice and core protein  
A. 药材亲和力雷达图 (medicinal material affinity radar chart); B. 甘草药材提取蛋白亲和力聚类分析 (licorice extract protein affinity cluster analysis); C. 野生和种植甘草 PTGS2 蛋白亲和力雷达图 (radar map of wild and planted licorice PTGS2 protein affinity)

表 3 Glide 对接分数  
Tab 3 Glide docking scores

成分	蛋白					
	AKT1	ESR1	MAPK3	PIK3CA	PIK3CB	PTGS2
甘草素	-6.389	-9.048	-7.806	-7.717	-8.049	-7.407
刺甘草查尔酮	-7.373	-8.228	-6.501	-6.797	-7.11	-6.689
甘草苷	-6.413	-7.621	-6.871	-9.08	-9.36	-6.901
甘草次酸	-1.865	-4.285	-2.22	-3.474	-2.694	-3.177
甘草酸	-1.799	-4.702	-1.713	-3.143	-3.284	-4.119
异甘草素	-8.325	-8.435	-5.772	-6.935	-7.478	-5.872
异甘草苷	-6.724	-7.633	-7.062	-6.424	-7.364	-5.061

#### 4 讨论

中医治疗心悸病的方药运用主要以补虚健、脾化痰涤饮，益气活血祛瘀为主。甘草味甘，平，主五脏六腑寒热邪气，多用于心气虚、心悸怔忡、脉结代、咳嗽痰等。为了阐明甘草抗心悸的作用，本研究基于甘草成分多、作用靶点多的研究思路，采用网络药理学、分子对接及实验验证等方法对甘草活性成分和潜在作用机制进行了系统分析。

网络药理学结果表明，甘草能够调节蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、核糖核酸聚合酶 II - 特异性 - 结合转录因子结合、DNA 结合转录因子结合等，并通过 PI3K-Akt 信号通路、雌激素信号通路、松弛素信号通路、C 型凝集素受体通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等对发挥抗心悸作用。现代药理研究表明，抑制 PI3K-Akt 信号通路，能够抑制心律失常并减弱心肌梗死后大鼠的交感神经重塑，减轻炎症反应，改善心功能并抵抗纤维化、调节心肌细胞凋亡等<sup>[20-21]</sup>；雌激素可以通过调节抗氧化能力来保护心脏功能途径<sup>[22]</sup>；临床研究证明，松弛素可以通过促进血管舒张和生成调节急性心肌梗死和抑制心律失常<sup>[23]</sup>。

网络药理学富集出的关键靶点有 AKT1、ESR1、MAPK3、MAPK1、PIK3CA、PIK3CB 等。PI3K 是一种由催化亚基 (p110) 和调节亚基 (p85) 构成的胞内磷脂酰肌醇激酶，与下游 AKT1 蛋白结合，在多种细胞信号转导过程中发挥重要作用，如糖代谢、细胞生长、增殖、凋亡等。ESR1 是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子，它与 DNA 结合并作为配体激活的转录因子发挥作用，对心血管系统的作用具有多效性<sup>[24]</sup>。MAPK3 和 MAPK1 作为 MAP 激酶家族的成员，是多种生化信号的整合点，参与多种细胞过程，如增殖、分化、转录调控和发育。通过上游激酶的磷酸化激活，然后转移到受刺激细胞的细胞核，继而磷酸化核靶。研究表明 ESR1 可

通过 MAPK 和磷脂酰肌醇激酶 /Akt (PI3/Akt) 途径双相活化内皮细胞中的一氧化氮合酶，从而参与调节血管张力，止血、血压和血管重塑<sup>[25]</sup>。研究进一步通过分子对接对甘草中的活性成分与心律失常之间的结合活性进行了验证，发现甘草素、甘草苷、刺甘草查尔酮、异甘草苷与异甘草素与关键蛋白结构分数均小于一 5，表示甘草与关键靶点均能产生较好的结合活性。有研究表明甘草素、甘草苷、异甘草、甘草次酸和甘草酸等可通过多种离子通道调节，保护心脏免受损伤，抑制心肌细胞凋亡，改善糖脂代谢等<sup>[26-28]</sup>。分子对接结果中甘草酸与甘草次酸对接分数大于一 5，这可能与甘草次酸和甘草酸分子量较大，其空间位阻较大有关。

Q-marker 的研究一般从成分传递与溯源、成分特有性、复方配伍、成分有效性和可测性 5 个方面进行综合辨析<sup>[29]</sup>。中药 Q-marker 作为反映中药安全性和有效性的标志性物质，提高了中药有效性 - 物质基础 - 质量控制标志性成分的关联度，建立了质量溯源及全程控制中药质量体系<sup>[30-31]</sup>。本研究基于“五原则”中的特有性、有效性和可测性原则，利用 UPLC-TOF/MS 技术，结合含量评价各指标成分的可测性；通过生物信息学方法和体外生物活性实验，明确甘草抗心悸的作用机制，筛选出甘草抗心悸中的特有性指标成分和与质量相关的关键蛋白；最后采用蛋白亲和技术综合评价甘草质量等级，建立了一种快速筛选 Q-marker 和实现甘草药材质量等级评价的方法。

#### 参考文献

- [1] 朱贤慧, 陈晓虎教授辨治心律失常临床经验 [J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32 (6): 592-594.
- [2] 连文静, 李洪峥, 刘金奎, 等. 国医大师治疗心悸病辨治用药规律分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20 (5): 820-825, 830.
- [3] 高艺嘉, 阚俊明. 基于《伤寒杂病论》探析悸证研究进

- 展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24 (9): 194-199.
- [4] 李君依, 张真. 杜廷海教授运用炙甘草汤治疗心悸经验总结[J]. 中医临床研究, 2020, 12 (12): 1-2.
- [5] 蒋森, 刘德明, 陈薇, 等. 甘草次酸对乌头碱致大鼠心律失常的拮抗作用[J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (4): 132-137.
- [6] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7680-7692.
- [7] 常百金, 唐志书, 邱智东, 等. 基于“药效论质”评价柴胡质量及其等级预测插件开发[J]. 中草药, 2022, 53 (2): 424-431.
- [8] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 以药效成分群-活性-功效关联作用筛选当归质量标志物[J]. 中草药, 2021, 52 (9): 2626-2637.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 88-89.
- [10] Xue TT, Yang YG, Tang ZS, et al. Evaluation of antioxidant, enzyme inhibition, nitric oxide production inhibitory activities and chemical profiles of the active extracts from the medicinal and edible plant: *althaea officinalis* [J]. Food Res Int, 2022, 156: 111166.
- [11] 郭敏群, 严曾豪, 吴灏, 等. 基于 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术的白虎加桂枝汤化学物质基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (10): 134-141.
- [12] 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.
- [13] 续艳丽, 李晨曦, 杨飞霞, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (6): 938-948.
- [14] 崔园园, 周永峰, 马艳芹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析生、炙甘草中化学成分的差异性[J]. 中国药房, 2020, 31 (9): 1049-1053.
- [15] 王永丽, 张聪聪, 张凤, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HR-MS 分析荆防颗粒的化学成分及其组织分布特征[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (22): 5537-5554.
- [16] 杜琳, 常波, 张琦, 等. 光果甘草根中黄酮类化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49 (20): 4780-4784.
- [17] 梁红宝, 姜宇, 袁晓梅, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究[J]. 中草药, 2022, 53 (6): 1697-1708.
- [18] 黄卫星, 姚铁, 丁丽琴, 等. 杜仲皮化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50 (14): 3279-3283.
- [19] 崔美娜, 钟凌云, 兰泽伦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析多物料多流程炮制对半夏化学成分的影响[J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7428-7437.
- [20] Li SS, Kang N, Li XL, et al. LianXia Formula granule attenuates cardiac sympathetic remodeling in rats with myocardial infarction via the NGF/TrKA/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Evid-Based Compl Alt, 2021, 2021: 5536406.
- [21] 黄家喜, 鲍翠玉, 李晶. PI3K/Akt 通路在糖尿病心脏病中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35 (9): 1202-1205.
- [22] Qian X, Wang J, Cai M, et al. Estradiol valerate enhances cardiac function via the Nrf2 signaling pathway to protect against oxidative stress by the Nrf2 signaling pathway in an ovariectomized rat model [J]. Curr Pharm Design, 2021, 27 (46): 4716-4725.
- [23] Devarakonda T, Salloum FN. Heart disease and relaxin: new actions for an old hormone [J]. Trends Endocrin Met, 2018, 29 (5): 338-348.
- [24] Murphy E. Estrogen signaling and cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2011, 109 (6): 687-696.
- [25] Paech K, Webb P, Kuiper G, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at API sites [J]. Science, 1997, 277 (5331): 1508-1510.
- [26] Zhang Y, Yu L, Jin W, et al. Reducing toxicity and increasing efficiency: aconitine with liquiritin and glycyrrhetic acid regulate calcium regulatory proteins in rat myocardial cell [J]. Afr J Tradit Complem, 2017, 14 (4): 69-79.
- [27] Wang T, Streeter H, Wang X, et al. A network pharmacology study of the multi-targeting profile of an antiarrhythmic Chinese medicine xin su ning [J]. Front Pharmacol, 2019: 1138.
- [28] Ren J, Wang R, Fan W, et al. Qualitative and quantitative analysis of multi-components in Xing-Su-Ning Capsules for quality improvement [J]. Arab J Chem, 2022, 15 (6): 103825.
- [29] 张亚, 唐建飞, 田清华, 等. 基于“五原则”结合蛛网模型辨析舒筋活血胶囊中的质量标志物[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (9): 2440-2448.
- [30] 冯群, 姚景春, 范玉兰, 等. 基于“五原则”的开心散质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53 (11): 3550-3556.
- [31] 赵森, 包永睿, 王帅, 等. 基于指纹图谱和网络药理学的木蝴蝶质量标志物预测分析[J]. 中中药学, 2022, 20 (2): 239-246.

(收稿日期: 2022-12-21; 修回日期: 2023-02-19)



# 不同炮制时间地榆炭化学成分与粉末色度值的相关性分析

何荣荣, 钟志奎, 王瑜婷, 汪凯东, 余欣彤, 曹焱, 严玉晶\* (广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

**摘要:** **目的** 分析地榆炭炮制过程中饮片粉末色度值与化学成分的关联性。**方法** 采用高效液相色谱法, 建立地榆及不同炮制时间地榆炭饮片的特征图谱, 采用分光测色仪测定地榆及不同炮制时间地榆炭饮片粉末的色度值 [明暗度值 ( $L^*$ )、红绿色度值 ( $a^*$ )、黄蓝色度值 ( $b^*$ )、总色度值 ( $E^*ab$ )], 分析外观色泽指标与特征图谱的相关性。**结果** 随着炮制时间的延长, 地榆炭较地榆饮片特征图谱的相似度呈降低趋势;  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*ab$  呈减小趋势; HPLC 特征图谱 13 个特征峰中峰 5 ~ 10、12 (阿魏酸) 7 个色谱峰单位峰面积逐渐减小, 均与色度值  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*ab$  成显著正相关; 峰 2、3、11、13 (鞣花酸) 单位峰面积先增大后减小, 除峰 2 外, 单位峰面积均与色度值  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*ab$  成显著负相关; 逐步回归分析结果显示, 可通过色度值预测峰 3、5 ~ 10、12 (阿魏酸)、13 (鞣花酸) 9 个色谱峰单位峰面积大小; 聚类分析将 16 个样品分为 2 类; 正交偏最小二乘法判别分析筛选出 3 个 VIP 值大于 1 的差异性成分。**结论** 地榆炭饮片粉末的色度值与其化学成分的含量变化具有相关性, 可作为地榆炭炮制过程中监测饮片质量的依据, 以提高地榆炭饮片的质量水平及一致性, 建议地榆炭饮片炮制终点为 6 ~ 8 min (260 ~ 280 °C)。**关键词:** 地榆炭; 色度值; 炮制时间; 特征图谱; 相关性

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0678-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.020

## Correlation of chemical compositions and powder chromaticity values of carbonized sanguisorba root with different processing time

HE Rong-rong, ZHONG Zhi-kui, WANG Yu-ting, WANG Kai-dong, YU Xin-tong, CAO Qian, YAN Yu-jing\* (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244)

**Abstract: Objective** To determine the correlation between the chromaticity values and chemical composition of the powder in the processing of carbonized sanguisorba root. **Methods** The characteristic chromatograms of *Sanguisorba officinalis* and carbonized sanguisorba root pieces with different processing time obtained by high performance liquid chromatography. The chromaticity values [lightness value ( $L^*$ ), red and green color value ( $a^*$ ), yellow and blue color value ( $b^*$ ), total chromaticity value ( $E^*ab$ )] of *Sanguisorba officinalis* and carbonized sanguisorba root pieces with different processing time were determined by spectrophotometer. The correlation between the appearance color indexes and characteristic chromatograms was analyzed. **Results** With the extension of processing time, the similarity of characteristic chromatograms of carbonized sanguisorba root was lower than that of *Sanguisorba officinalis* L. pieces; with  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $E^*ab$  showed a decreasing trend. The peak area of peak 5 ~ 10 and peak 12 (ferulic acid) in the 13 characteristic peaks of HPLC characteristic chromatogram decreased gradually, which was positively correlated with the chromaticity values  $L^*$ ,  $b^*$  and  $E^*ab$ . The peak area of peak 2, 3, 11 and 13 (ellagic acid) increased first and then decreased. Except for peak 2, they were negatively correlated with  $L^*$ ,  $b^*$  and  $E^*ab$ . The stepwise regression analysis showed that the area of peak 3, 5 ~ 10, 12 (ferulic acid) and peak 13 (ellagic acid) could be predicted by chromaticity values. The

基金项目: 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目 (No.2019-00902-1-2)。

作者简介: 何荣荣, 女, 主要从事中药制剂工艺与质量标准研究, email: 2049899614@qq.com \*通信作者: 严玉晶, 女, 主要从事中药制剂工艺与质量标准研究, email: 1945603837@qq.com

cluster analysis divided 16 samples into 2 groups. Three differential components with VIP value greater than 1 were screened out by orthogonal partial least squares discriminant analysis. **Conclusion** The chromaticity value of the powder of carbonized sanguisorba root correlates with the content change of its chemical components, which can be used to monitor the quality of the powder of carbonized sanguisorba root during the processing to improve its quality level and consistency. The terminal time of carbonized sanguisorba root pieces is recommended to be 6 ~ 8 min (260 ~ 280 °C).

**Key words:** carbonized sanguisorba root; chromaticity value; processing time; characteristic chromatogram; correlation

地榆为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *Sanguisorba officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li. 的干燥根, 具有凉血止血, 解毒敛疮的功效<sup>[1]</sup>。地榆炭为地榆照炒炭法所得炮制品, 地榆生品可用于各种出血、水火烫伤、痈肿疮毒、骨髓抑制等症, 炒炭后止血、抗菌作用显著增强<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究表明, 地榆含有鞣质、皂苷、黄酮、多酚和甾体等多种化合物, 具有广谱抑菌性、抗氧化性、抗癌性和抗过敏性等<sup>[4-8]</sup>。

传统中药材质量评价方式为“辨状论质”, 通过药材的色泽、形态、气味等性状特点来判断优劣。2020年版《中国药典》一部地榆饮片项下规定地榆炭性状为“表面焦黑色, 内部棕褐色, 具焦香气”, 《伤寒杂病论》提出“烧灰存性、勿令太过”, 炭制后某些物理、化学性质发生了改变, 同时要留存生药的固有特性<sup>[3]</sup>。颜色变化是炒炭过程中最直接的性状变化, 在一定程度上伴随着内在成分的变化, 但仅凭肉眼判断是否达到炮制终点, 较为主观、模糊、局限, 难以保证饮片质量的均一稳定性。色度检测技术可将外观颜色量化为具体数值, 有利于大规模生产中对饮片质量的控制。目前, 有关地榆炭炮制工艺及单类成分的药理作用研究较多, 但缺乏对炭制过程中饮片质量全面、整体的把控<sup>[9-10]</sup>。本研究采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定特征图谱, 明确地榆炭炒制过程中各成分的变化趋势, 结合粉末色度值数据进行化学计量学分析, 以期地为地榆炭炮制过程的质量监控及评价提供依据。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Arc 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); TS7600 型分光测色仪 (深圳市三恩时科技有限公司); XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q Direct 型超纯水系统 (德国默克公司); 111B 型二两装高速中药粉碎机 (浙江瑞安市永历制药机械有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆

山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

没食子酸 (批号: 110831-201906, 纯度: 91.5%)、原儿茶酸 (批号: 110809-201906, 纯度: 97.7%)、儿茶素 (批号: 110877-202005, 纯度: 95.1%)、绿原酸 (批号: 110753-202119, 纯度: 96.3%)、咖啡酸 (批号: 110885-201703, 纯度: 99.7%)、阿魏酸 (批号: 110773-201915, 纯度: 99.4%)、鞣花酸 (批号: 111959-201903, 纯度: 88.8%) (中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇为色谱纯 (德国默克公司), 磷酸为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司), 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。11 批地榆饮片经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定为蔷薇科植物地榆, 均符合药典要求 (见表 1)。

表 1 样品信息

Tab 1 Sample information

编号	产地	编号	产地
S1	河北省	S7	安徽省
S2	河北省	S8	浙江省
S3	河北省	S9	浙江省
S4	河北省	S10	浙江省
S5	安徽省	S11	甘肃省
S6	安徽省		

## 2 方法与结果

### 2.1 地榆炭样品的制备

取地榆饮片 (S1), 按药典四部通则 0213 项下炒炭法进行炮制, 置热锅内, 用武火 (实用温度为 260 ~ 280 °C) 炒制 30 min, 从炮制 2 min 起, 每隔 2 min 进行取样, 放凉, 即得地榆炭饮片, 依次编号为 T1 ~ T15。

### 2.2 HPLC 特征图谱的建立

**2.2.1 色谱条件<sup>[11]</sup>** 色谱柱: Waters Xselect HSS T3 Column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 0% → 2%A; 5 ~ 18 min, 2% → 7%A; 18 ~ 30 min, 7% → 12%A; 30 ~ 60 min, 12% → 17%A);

流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长:  $274 \text{ nm}$ ; 进样量:  $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、鞣花酸对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为  $30.535$ 、 $18.143$ 、 $26.305$ 、 $6.385$ 、 $27.852$ 、 $25.675$ 、 $47.579 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称定样品粉末(过四号筛)  $0.2 \text{ g}$ , 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇  $25 \text{ mL}$ , 称定重量, 超声处理(功率  $300 \text{ W}$ , 频率  $40 \text{ kHz}$ )  $30 \text{ min}$ , 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.4 专属性试验** 分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液(T1)进样测定, 结果表明空白溶剂对测定无干扰, 方法专属性良好(见图1)。

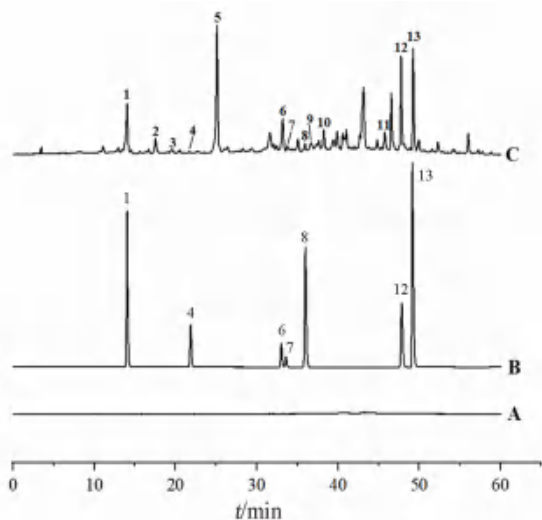


图1 地榆炭专属性试验 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of specificity test for carbonized sanguisorba root

A. 空白溶液 (blank solution); B. 对照品溶液 (reference solution); C. 地榆炭饮片 (T1) (carbonized sanguisorba root) (T1); 1. 没食子酸 (gallic acid); 4. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 6. 儿茶素 (catechin); 7. 绿原酸 (chlorogenic acid); 8. 咖啡酸 (caffeic acid); 12. 阿魏酸 (ferulic acid); 13. 鞣花酸 (ellagic acid)

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取“2.2.2”项下的混合对照品溶液, 连续进样6次, 记录色谱图。计算得各色谱峰峰面积的  $RSD$  均小于  $5\%$ , 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取地榆饮片粉末(S1), 平行制备6份供试品溶液, 记录色谱图。以峰6儿茶素作为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的  $RSD$  均小于  $5\%$ , 表明该方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 取地榆供试品溶液(S1), 分别于制备0、4、6、8、12、24 h后进样测定, 记录色谱图。以峰6儿茶素作为参照峰, 计算得

各共有峰相对保留时间和相对峰面积的  $RSD$  均小于  $5\%$ , 表明供试品溶液在  $24 \text{ h}$  内稳定。

**2.2.8 HPLC 特征图谱的建立** 取地榆饮片(S1~S11)和不同炮制时间地榆炭饮片(T1~T15), 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。将色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版), 分别以S1和T1的色谱图为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度  $0.1 \text{ min}$ , 多点校正后进行Mark峰匹配, 建立地榆和地榆炭饮片的HPLC叠加特征图谱(见图2、3)。地榆饮片特征图谱标定12个共有峰, 地榆炭饮片特征图谱标定13个共有峰, 峰3为炒炭后新增色谱峰。通过与对照品图谱比对, 指认峰1为没食子酸、峰4为原儿茶酸、峰6为儿茶素、峰7为绿原酸、峰8为咖啡酸、峰12为阿魏酸、峰13为鞣花酸。

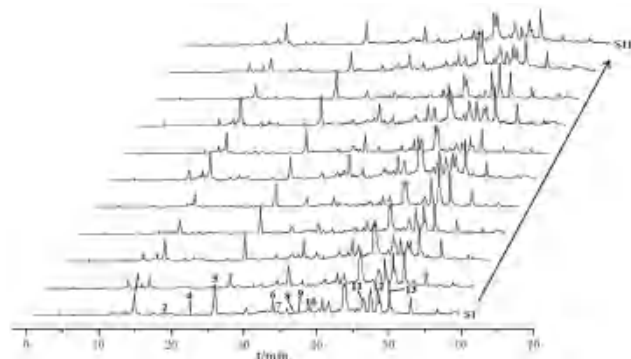


图2 11批地榆饮片的HPLC叠加图谱

Fig 2 HPLC overlay maps of 11 batches of *Sanguisorba officinalis* pieces

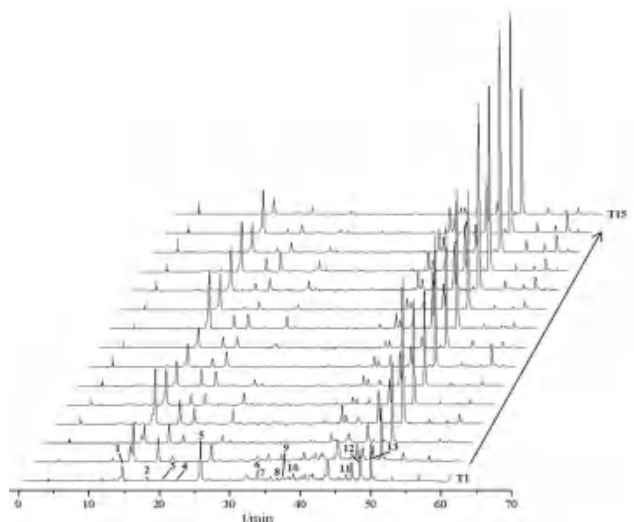


图3 不同炮制时间地榆炭饮片的HPLC叠加图谱

Fig 3 HPLC overlay maps of carbonized sanguisorba root pieces with different processing time

**2.2.9 地榆炭 HPLC 特征图谱动态变化分析** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版), 计算不同批次地榆饮片、不同炮制时间地榆



炭饮片与 S1 色谱图的相似度，结果见表 2。11 批地榆饮片的相似度均大于 0.8，不同批次间地榆饮片存在一定差异，可能与其产地、年限不同有关。随着炮制时间的延长，地榆炭饮片与 S1 色谱图的相似度呈降低趋势，炒制 6 min (T3) 时相似度降至 0.639，之后相似度无明显变化。分别以各色谱峰单位峰面积为纵坐标，炮制时间为横坐标，进行回归分析 (见图 4)。随着炮制时间的延长，峰 5、峰 6 (儿茶素)、峰 7 (绿原酸)、峰 8 (咖啡酸)、峰 9、峰 10、峰 12 (阿魏酸) 共 7 个峰单位峰面积逐渐降低；峰 2、峰 3、峰 11、峰 13 (鞣花酸) 单位峰面积先升高后降低；峰 1 (没食子酸)、峰 4 (原儿茶酸) 单位峰面积变化不显著。

表 2 相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation

编号	相似度	编号	炮制时间/min	相似度
S1	1.000	S1	0	1.000
S2	0.968	T1	2	0.908
S3	0.806	T2	4	0.803
S4	0.989	T3	6	0.639
S5	0.916	T4	8	0.676
S6	0.989	T5	10	0.686
S7	0.838	T6	12	0.639
S8	0.907	T7	14	0.577
S9	0.992	T8	16	0.570
S10	0.874	T9	18	0.690
S11	0.939	T10	20	0.650
		T11	22	0.624
		T12	24	0.629
		T13	26	0.555
		T14	28	0.592
		T15	30	0.548

2.3 地榆炭饮片粉末色度值测定

2.3.1 色度值测定方法 取地榆饮片 (S1) 及不同炮制时间地榆炭饮片 (T1 ~ T15) 粉末适量 (见图

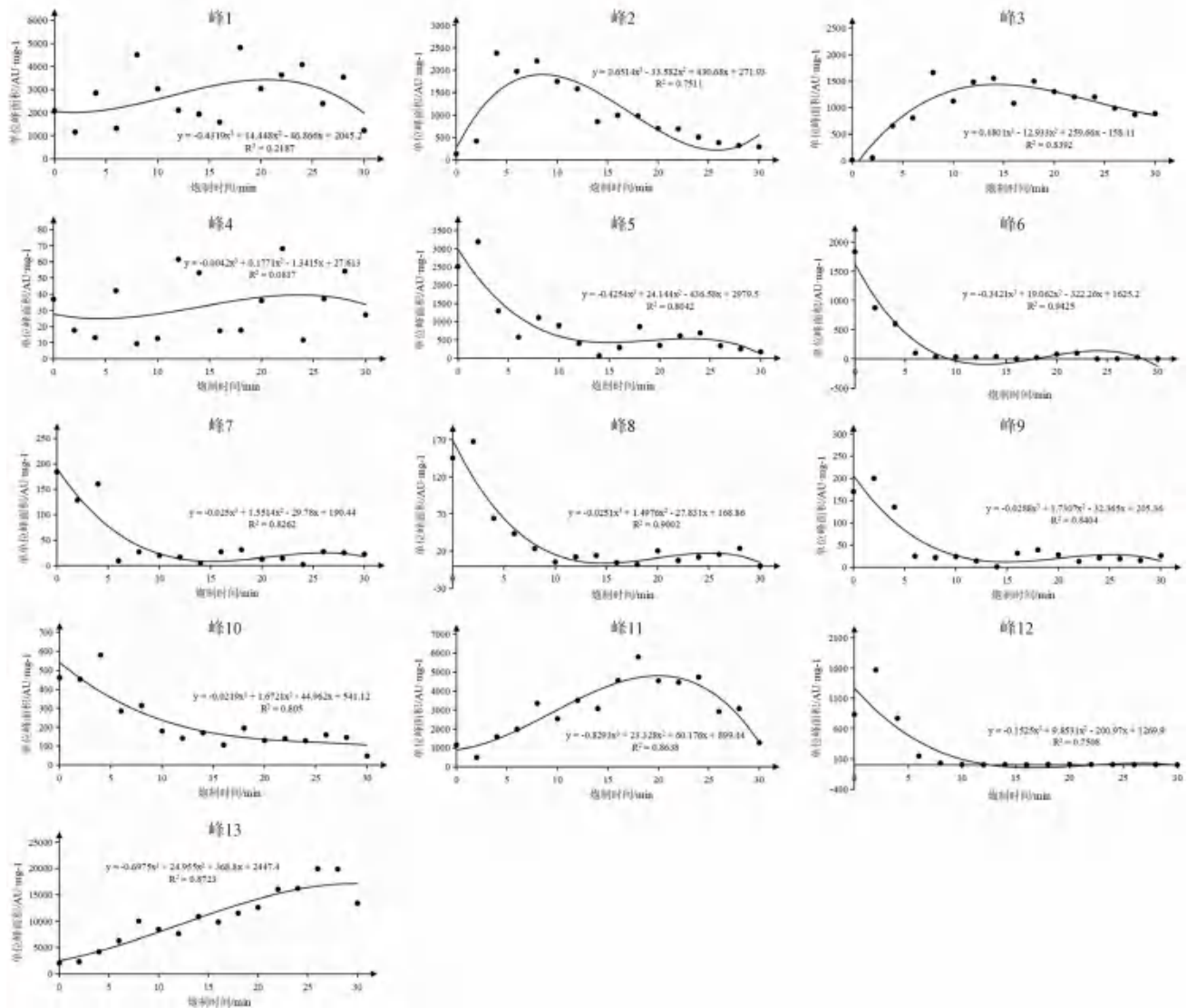


图 4 地榆中各峰单位峰面积随炮制时间变化图

Fig 4 Variation of unit peak area in *Sanguisorba officinalis* with processing time

5), 于载玻片上压至厚度约为 1 mm, 使用分光测色仪, 在  $D_{65}$  观测光源、观测角度  $10^\circ$ 、测量口径 8 cm 条件下进行黑白校正, 以 S1 为标准, 分别

对地榆炭饮片粉末进行色度值 ( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ ) 测定, 平行 3 次, 取平均值。并通过公式  $E^*ab = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , 计算各样品总色度值  $E^*ab^{[12]}$ 。



图 5 地榆及不同炮制时间地榆炭饮片粉末图

Fig 5 Powder diagram of *Sanguisorba officinalis* and carbonized sanguisorba root pieces of different processing time

**2.3.2 地榆炭色度值动态变化分析** 分光测色仪基于三色原理, 即任何一个颜色都能用线性无关系的 3 个原色适当混合得到。在  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  均色空间系统中,  $L^*$  表示明暗度值, 数值越大, 颜色越偏白;  $a^*$  表示红绿色度值,  $+a^*$  指示红色,  $-a^*$  指示绿色;  $b^*$  表示黄蓝色度值,  $+b^*$  指示黄色,  $-b^*$  指示蓝色<sup>[13]</sup>。测定结果显示, 随着炮制时间的延长, 饮片粉末色度值 ( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ ) 和

总色度值 ( $E^*ab$ ) 均呈降低趋势, 表明炭制品颜色由明向暗, 由红黄向蓝绿转变 (见表 3)。当色差值  $\Delta E^*ab$  相差 6 ~ 12 时, 其色差可被人眼识别<sup>[12, 14]</sup>; 当  $\Delta E^*ab \geq 18$  时, 地榆炭饮片性状符合《中国药典》的要求<sup>[1]</sup>。自炮制 6 min 后, 地榆炭饮片的  $\Delta E^*ab$  均大于 18; 且  $\Delta L^*$ 、 $\Delta a^*$ 、 $\Delta b^*$ 、 $\Delta E^*ab$  均随炮制时间的延长呈升高趋势。

表 3 色度值测定结果

Tab 3 Chroma measurement

编号	炮制时间 /min	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*ab$	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta E^*ab$
S1	0	57.08	9.72	24.58	62.90	/	/	/	/
T1	2	52.79	12.34	23.66	59.15	- 4.29	2.62	- 0.92	5.11
T2	4	49.29	10.35	22.12	55.01	- 7.79	0.63	- 2.46	8.19
T3	6	38.87	9.81	17.05	43.56	- 18.21	0.09	- 7.53	19.71
T4	8	35.82	8.10	14.08	39.34	- 21.26	- 1.62	- 10.49	23.76
T5	10	33.05	6.03	10.23	35.12	- 24.03	- 3.69	- 14.34	28.22
T6	12	31.63	5.91	10.03	33.70	- 25.45	- 3.81	- 14.55	29.56
T7	14	31.03	6.03	8.91	32.84	- 26.05	- 3.69	- 15.67	30.62
T8	16	29.00	5.55	9.51	31.02	- 28.08	- 4.17	- 15.07	32.14
T9	18	32.25	6.27	10.19	34.40	- 24.83	- 3.45	- 14.38	28.90
T10	20	31.92	5.51	8.12	33.39	- 25.16	- 4.21	- 16.46	30.36
T11	22	31.96	6.81	9.46	34.02	- 25.12	- 2.91	- 15.12	29.47
T12	24	33.07	6.26	10.16	35.16	- 24.01	- 3.46	- 14.42	28.22
T13	26	31.61	5.93	9.23	33.46	- 25.47	- 3.79	- 15.34	29.97
T14	28	29.49	5.14	7.15	30.78	- 27.59	- 4.58	- 17.43	32.95
T15	30	28.74	4.13	6.06	29.66	- 28.34	- 5.59	- 18.52	34.31

注 (Note):  $\Delta L^* = L^*_{t_n} - L^*_{t_0}$ 、 $\Delta a^* = a^*_{t_n} - a^*_{t_0}$ 、 $\Delta b^* = b^*_{t_n} - b^*_{t_0}$ 、 $\Delta E^*ab = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ ,  $t_n$  为炮制时间点 ( $t_n$  is processing time)。

**2.4 地榆炭饮片化学成分与粉末颜色关联性分析**  
**2.4.1 皮尔逊相关性分析** 采用 SPSS 26.0 软件, 以不同炮制时间地榆炭饮片 (T1 ~ T15) HPLC 特征图谱的单位峰面积和色度值 ( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*ab$ ) 为变量进行皮尔逊相关性分析 (见表 4)。由结果可知, 峰 5、峰 6 (儿茶素)、峰 8 (咖啡酸)、峰 9、峰 10、峰 12 (阿魏酸) 与色度值  $E^*ab$ 、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  成显著正相关, 峰 7 (绿原酸) 与色度值  $E^*ab$ 、 $L^*$ 、 $b^*$  成显著正相关, 表明样

品颜色较暗者含以上 7 种成分含量较低; 峰 3、峰 13 (鞣花酸) 与色度值  $E^*ab$ 、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  成显著负相关, 峰 11 与色度值  $E^*ab$ 、 $L^*$ 、 $b^*$  成显著负相关, 表明样品颜色较暗者含以上 3 种成分含量较高。因此, 运用分光测色仪可大致判断炮制过程中饮片各成分含量的高低。  
**2.4.2 逐步回归分析** 由表 4 可知, 炭制品中除峰 1 (没食子酸)、峰 2、峰 4 (原儿茶酸) 外, 其余 10 个色谱峰与色度值均具有显著相关性, 故

表 4 相关性分析

Tab 4 Correlation analysis

峰号	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*ab$
峰 1 (没食子酸)	-0.248	-0.222	-0.250	-0.252
峰 2	0.052	0.278	0.214	0.089
峰 3	-0.706**	-0.563*	-0.641**	-0.697**
峰 4 (原儿茶酸)	-0.239	-0.238	-0.280	-0.247
峰 5	0.894**	0.842**	0.868**	0.893**
峰 6 (儿茶素)	0.913**	0.671**	0.835**	0.895**
峰 7 (绿原酸)	0.644**	0.458	0.576*	0.630**
峰 8 (咖啡酸)	0.927**	0.833**	0.880**	0.921**
峰 9	0.705**	0.765**	0.707**	0.714**
峰 10	0.868**	0.825**	0.867**	0.871**
峰 11	-0.506*	-0.440	-0.509*	-0.510*
峰 12 (阿魏酸)	0.887**	0.856**	0.862**	0.889**
峰 13 (鞣花酸)	-0.723**	-0.658**	-0.739**	-0.729**

注 (Note): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

以不同炮制时间地榆炭饮片粉末色度值为自变量, 以此 10 个色谱峰的单位峰面积为因变量, 用 SPSS 26.0 软件进行逐步回归分析, 结果除峰 11 外, 其余 9 个色谱峰的判定系数  $R^2$  均大于 0.4, 回归模型拟合度较好 (见表 5、6)。

表 5 回归分析结果

Tab 5 Regression analysis

因变量	$R$	$R^2$	调整后的 $R^2$	标准估算的错误
峰 3	0.710	0.505	0.469	25.348
峰 5	0.894	0.799	0.785	0.165
峰 6 (儿茶素)	0.912	0.831	0.819	0.114
峰 7 (绿原酸)	0.646	0.417	0.375	0.296
峰 8 (咖啡酸)	0.926	0.858	0.847	0.134
峰 9	0.765	0.585	0.555	0.893
峰 10	0.875	0.765	0.748	0.162
峰 11	0.512	0.262	0.209	1.215
峰 12 (阿魏酸)	0.889	0.790	0.775	0.267
峰 13 (鞣花酸)	0.739	0.546	0.513	1.873

由  $R^2$  值结合回归系数可知,  $L^*$  值可以分别在 50.5%、79.9%、41.7%、85.8% 的程度上反映峰 3、峰 5、峰 7 (绿原酸)、峰 8 (咖啡酸) 的单位峰面积,  $L^*$  和  $a^*$  值可以在 83.1% 的程度上反映峰 6 (儿茶素) 的单位峰面积,  $a^*$  值可以在 58.5% 的程度上反映峰 9 的单位峰面积,  $E^*ab$  值可以分别在 76.5%、79.0% 的程度上反映峰 10、峰 12 (阿魏酸) 的单位峰面积,  $b^*$  值可以在 54.6% 的程度上反映峰 13 (鞣花酸) 的单位峰面积。从非标准化系数可知, 峰 5、峰 7 (绿原酸)、峰 8 (咖啡酸) 单位峰面积与  $L^*$  值成正相关, 峰 3 单位峰面积与  $L^*$  值成正相关, 峰 6 (儿茶素) 单位峰面积与  $L^*$  值成正相关、与  $a^*$  值成负相关, 峰 9 单位峰面积与  $a^*$  值成正相关, 峰 10、峰 12 (阿魏酸) 单位峰面积与  $E^*ab$  值成正相关, 峰 13 (鞣花酸) 单位峰面积与  $b^*$  值成负相关, 均与皮

表 6 回归方程拟合参数

Tab 6 Fitting parameter of regression equation

因变量	回归系数	非标准化系数	标准化系数	$t$	$P$
峰 3	(常量)	167.905	-	6.138	< 0.001
	$L^*$	-2.784	-0.710	-3.777	0.002
峰 5	(常量)	-0.939	-	-5.263	< 0.001
	$L^*$	0.036	0.894	7.466	< 0.001
峰 6 (儿茶素)	(常量)	-0.968	-	-12.712	< 0.001
	$L^*$	0.048	1.592	10.751	< 0.001
	$a^*$	-0.089	-0.759	-5.124	< 0.001
峰 7 (绿原酸)	(常量)	-0.683	-	-2.14	0.050
	$L^*$	0.027	0.646	3.163	0.007
峰 8 (咖啡酸)	(常量)	-1.048	-	-7.234	< 0.001
	$L^*$	0.036	0.926	9.183	< 0.001
峰 9	(常量)	-2.257	-	-2.985	0.010
	$a^*$	0.450	0.765	4.439	0.001
峰 10	(常量)	-0.530	-	-3.321	0.005
	$E^*ab$	0.027	0.875	6.753	< 0.001
峰 11	(常量)	4.986	-	4.171	0.001
	$E^*ab$	-0.066	-0.512	-2.228	0.043
峰 12 (阿魏酸)	(常量)	-1.582	-	-6.028	< 0.001
	$E^*ab$	0.047	0.889	7.255	< 0.001
峰 13 (鞣花酸)	(常量)	9.228	-	8.285	< 0.001
	$b^*$	-0.331	-0.739	-4.101	0.001

尔逊相关性分析结果一致。

**2.4.3 聚类分析 (CA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)** 采用 SIMCA 14.1 软件对地榆饮片 (S1) 及不同炮制时间地榆炭饮片 (T1 ~ T15) 粉末的色度值 ( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*ab$ ) 进行 CA。以 CA 的分组结果为依据, 对样品共有成分的单位峰面积进行 OPLS-DA, 筛选导致地榆炭饮片炮制过程中色度值差异的指标成分 (见图 6、7)。CA 将地榆炭炮制过程中的样品分成了 2 类, 炮制时间 0 ~ 4 min 归为第 1 类, 6 ~ 30 min 归为第 2 类。建立的 OPLS-DA 模型  $R^2X$  为 0.874,  $R^2Y$  为 0.921,  $Q^2$  为 0.825, 均大于 0.5, 表明模型较稳定。此模型筛选出 3 个变量重要性投影 (VIP) 值大于 1 的变量, 表明峰 13 (鞣花酸)、峰 11、峰 5 这 3 种成分为地榆炭炮制过程中变化显著且与颜色动态相关的成分。

### 3 讨论

地榆为凉血止血类中药, 常用于治疗吐血、上消化道出血、溃疡病大出血、便血、痔血、崩漏等出血性疾病<sup>[1]</sup>。地榆炒炭后止血作用增强, 主要源于两方面, 其一为药材表面炭化, 形成止血效果良好的炭素, 这也是中药炭制的主要目的; 其二地榆中的鞣质包括可水解鞣质、缩合鞣质两类, 可水解鞣质水解后得到酚酸, 缩合鞣质由儿茶素或其衍生物聚合而成。相关文献报道地



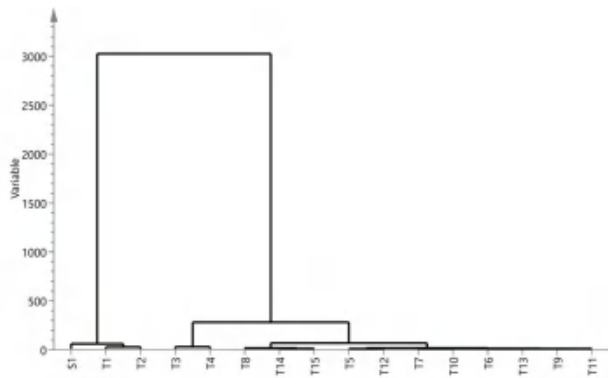


图 6 色度值 CA 结果  
Fig 6 CA of chromaticity

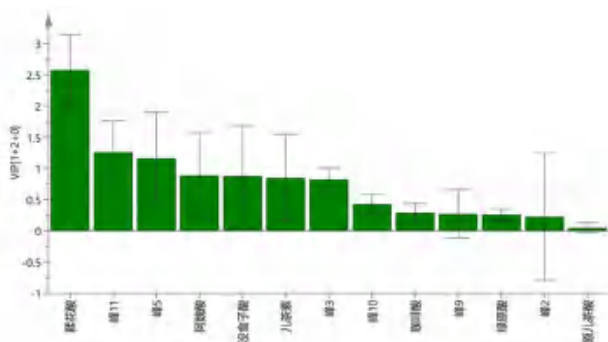


图 7 特征图谱 VIP 值  
Fig 7 VIP value of characteristic map

榆中总鞣质含量随炮制程度加深逐渐降低，鞣花酸含量逐渐升高，总鞣质含量与止血效果基本成正比<sup>[15-16]</sup>，与本文研究结果一致。随着炮制时间延长，鞣花酸（峰 13）含量呈升高趋势，没食子酸（峰 1）、原儿茶酸（峰 4）含量无明显变化；含量逐渐降低的 7 个成分，在炒制 6~8 min 时趋于稳定；含量先升高后降低的成分中，峰 2、炭制后新增色谱峰峰 3 在炒制 6~8 min 时峰面积较大。地榆炭炮制 6 min 时，外观已符合药典要求，炮制时间延长，9 种成分（峰 2、3、5~10、12）含量逐渐减少，故确定地榆炭炮制终点为 6~8 min (260~280℃)。

本研究通过色度原理，将地榆及其炭制品饮片粉末的色泽信息数据化，并将色度值与特征图谱关联进行统计学分析，对地榆炒炭全过程进行监测。皮尔逊相关性分析、逐步回归分析结果显示，不同炮制时间地榆炭饮片的色度值与 9 种化学成分有显著相关性，故可采用分光测色仪辅助炮制终点的判断。CA 将不同炮制时间地榆炭饮片的色度值大致分为两类，以 6 min 为界，这与

相似度评价结果、色谱峰单位峰面积突变时间一致，表明色度值能准确地反映地榆在炒炭中内在成分变化。OPLS-DA 显示鞣花酸、峰 11 和峰 5 是导致色度值差异的主要成分，在炒炭中这 3 种成分的含量变化与饮片颜色不断加深密切相关。

### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 280-281.
- [2] 曹娅, 杨馨, 陈旺. 地榆水煎液对辐照所致血小板减少症的治疗作用[J]. 中成药, 2022. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220325.1750.010.html>.
- [3] 顾薇, 姚俊宏, 陆梦梦, 等. 基于“炒炭存性”理论研究炮制工艺对地榆抑菌功效的影响[J]. 中草药, 2022, 53(4): 1042-1050.
- [4] 段丽云, 连凤梅. 地榆的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(4): 749-752.
- [5] 裴玉琼, 徐坠成, 王艳天, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF/MS 的地榆化学成分分析及大鼠体内代谢研究[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 897-907.
- [6] 陈丽, 谢丽君, 郭思薇, 等. 骆杰伟“止血修络”论与地榆应用临证经验[J]. 中医药通报, 2021, 20(5): 23-25.
- [7] 吴龙龙, 徐昊阳, 张刘强, 等. 地榆化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 360-378.
- [8] Wang N, Muhetaer G, Zhang X, et al. Corrigendum: *Sanguisorba officinalis* L. suppresses triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting late-phase autophagy via Hif-1 $\alpha$ /Caveolin-1 signaling. [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 810621.
- [9] 朱前恒, 廖梅香, 丁芸, 等. HPLC 同时测定地榆中没食子酸和金丝桃苷的含量[J]. 广东化工, 2021, 48(19): 179-180.
- [10] 李永生, 张春玲, 蒋凯. 高效液相色谱法同时测定地榆炭中 8 种成分的含量[J]. 中南药学, 2019, 17(12): 2154-2157.
- [11] 陈晓文, 廖明娟. 正交试验优选地榆方中地榆的提取工艺[J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(4): 45-48.
- [12] 王靖越, 张语凡, 柴冲冲, 等. 何首乌饮片的颜色与蒽醌类和二苯乙烯苷含量的相关性研究[J]. 中南药学, 2020, 18(4): 635-640.
- [13] 王杨, 甄臻, 隆毅, 等. 基于颜色变化的酒白芍质量标准及炮制工艺研究[J]. 中药材, 2020, 43(9): 2141-2145.
- [14] 干丽, 钟如帆, 魏梅, 等. 狗脊炮制工艺优选及色度值测定[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2382-2388.
- [15] 赵慧, 张学顺, 戴衍朋, 等. 炮制对地榆中鞣质类成分含量及凝血作用的影响[J]. 山东农业科学, 2018, 50(12): 127-131.
- [16] 陈红宇, 沈洪. 地榆活性成分及抗炎作用研究进展[J]. 中医药导报, 2017, 23(17): 110-112.

(收稿日期: 2022-08-06; 修回日期: 2022-09-26)

# 紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌的网络药理学研究

邹强<sup>1,2</sup>, 李丹琦<sup>1\*</sup>, 刘学贵<sup>1\*</sup>, 黄明远<sup>3</sup> (1. 沈阳化工大学 功能分子研究所, 沈阳 110142; 2. 沈阳化工大学 生物与制药工程学院, 沈阳 110142; 3. 沈阳科技学院 化学工程系, 沈阳 110167)

**摘要:** **目的** 采用网络药理学方法, 初步预测紫花苜蓿中黄酮类抗肝癌的有效化合物、潜在肝癌作用靶点及蛋白通路。**方法** 通过建立紫花苜蓿中黄酮类化合物集、肝癌疾病靶点数据集、疾病蛋白通路数据集, 构建紫花苜蓿抗肝癌的“黄酮类化合物成分-肝癌靶点-疾病蛋白通路”网络图。**结果** 预测到紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌潜在的 10 个有效成分、4 个关键蛋白靶点及 4 个最优蛋白通路。**结论** 本文运用网络药理学的研究方法, 阐释了紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌的作用蛋白靶点及蛋白通路, 并预测筛选出抗肝癌活性较强的黄酮类化合物, 分析靶点蛋白的活性位点与黄酮类化合物结合性, 为深入阐明紫花苜蓿黄酮类成分抗肝癌作用机制提供科学依据。

**关键词:** 紫花苜蓿; 网络药理学; 黄酮类化合物; 肝癌

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0685-07

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.021

## Network pharmacology on flavonoids in *Medicago Sativa* L. for anti-hepatoma

ZOU Qiang<sup>1,2</sup>, LI Dan-qi<sup>1\*</sup>, LIU Xue-gui<sup>1\*</sup>, HUANG Ming-yuan<sup>3</sup> (1. *Institute of Functional Molecules, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142*; 2. *College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142*; 3. *Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Science and Technology, Shenyang 110167*)

**Abstract: Objective** To predict the effective compounds, and protein pathways of flavonoids in *Medicago sativa* L. and potential targets of hepatoma with network pharmacology. **Methods** By establishing the data sets of flavonoids, hepatoma targets and disease protein pathways in *Medicago sativa* L., we constructed the network map of flavonoids-hepatoma targets and disease protein pathways. **Results** Totally 10 potential key active components, 4 key protein targets and 4 optimal protein pathways of flavonoids in *Medicago sativa* L. were predicted. **Conclusion** The protein targets and protein pathways of flavonoids in *Medicago sativa* L. are explained by network pharmacology, and flavonoids with strong anti-hepatoma activity are screened. The binding of the active sites of the target proteins in flavonoids is analyzed, which provides scientific basis for further elucidating the anti-hepatoma mechanism of flavonoids in *Medicago sativa* L..

**Key words:** *Medicago sativa* L.; network pharmacology; flavonoids; hepatoma

目前肝癌的主要治疗手段是外科手术切除, 但由于肝癌具有病程早期检查不易被发现、易转移、预后差等特性, 单独化疗和局部治疗往往无

法达到有效的治疗目的<sup>[1]</sup>。随着对肝癌病因、病理及临床症状的深入了解, 寻找治疗肝癌的药物, 引起研究人员的广泛关注。中药治疗肝癌具

**基金项目:** 辽宁省教育厅一般项目 (No.LQ2017016)。

**作者简介:** 邹强, 男, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物的物质基础与作用机制研究, email: zq82106643@qq.com \***通信作者:** 刘学贵, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药食同源天然产物活性物质研究, email: liuxuegui@syuct.edu.cn; 李丹琦, 女, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物的物质基础与作用机制研究, email: lidanqi@yeah.net

有一定的疗效,但多为复方制剂,其成分复杂,有效化合物成分并不清晰明确<sup>[2-3]</sup>。找到对肝癌药效活性较高的化合物,一直是相关研究的难题。网络药理学是基于系统生物学、计算机生物学、药理学范畴,运用可视化软件构建网络图,通过构建药物、靶标、疾病等之间的相互作用网络,对构建所得的网络图进行分析、探讨药物的药效关系<sup>[4-5]</sup>。同时,应用复杂的网络模型来指导和分析研究对象的药理学相关特性,系统地研究药物对疾病的干预和影响。因此,利用网络药理分析可以发现高效、低毒、多靶点的高活性化合物。

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 是豆科蝶形花亚科车轴草族苜蓿属植物,目前为世界分布面积最大、应用范围最广的栽培牧草之一,在我国的栽培种植历史已有两千多年<sup>[6]</sup>。近年来,许多研究者认识到紫花苜蓿在畜牧饲养、食品保健开发和医药领域应用蕴藏着重要价值,开始对紫花苜蓿进行深入研究。研究发现紫花苜蓿富含多种化学成分,包括三萜皂苷、黄酮、生物碱、香豆

素以及多糖等。其中,黄酮类化合物有着广泛的生物活性<sup>[7-8]</sup>。相关文献报道中,黄酮类化合物具有一定的肝细胞保护活性及抗癌活性<sup>[8-9]</sup>。因此,本研究利用网络药理学的方法,来预测紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌的具体药效成分及疾病蛋白靶点,现报道如下。

## 1 方法与结果

### 1.1 紫花苜蓿化合物收集与结构处理

根据紫花苜蓿中的黄酮类化合物含量、生物活性以及课题组前期对分离黄酮类化合物的研究基础,结合紫花苜蓿中化合物提取分离的相关文献<sup>[9-11]</sup>,收集了 54 种具有活性的黄酮类化合物,从而建立紫花苜蓿黄酮类化合物数据库<sup>[12]</sup>。然后使用 ChemBiodraw Ultra 12.0 软件绘制化合物三维结构图, Sybyl-X (版本 2.0, TRIPOS, Inc.) 软件进行结构优化,保存为 mol2 格式。并利用 ChemicalBook (<http://www.chemicalbook.com/>) 对其分子结构进行确证。化合物信息如表 1 所示。

表 1 54 种黄酮类化合物的命名与编码

Tab 1 54 flavonoid compounds and serial number

编号	化合物
F1	apigenin7-O-[β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-O-β-D-glucurono-pyranoside
F2	apigenin4'-O-β-D-glucuronopyranoside
F3	apigenin7-O-[β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]
F4	luteolin 7-O-β-D-glucuronopyranoside
F5	apigenin7-O-[2-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-O-β-D-glucuronopyranoside
F6	apigenin7-O-[2-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 3) ]-O-β-D-glucuro-nopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside}
F7	apigenin7-O-[2-O-p-coumaroyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 3) ]-O-β-D-glucuro-nopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside}
F8	apigenin7-O-β-D-glucuronopyranoside
F9	luteolin7-O-[2-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-O-β-D-glucuronopyranoside
F10	7-O-β-D-glucuronopyranosidetricin
F11	7-O-β-D-glucuronopyranosyl-3'-O-methyltricetin
F12	7-O-β-D-glucuronopyranosyl-4'-O-β-D-glucuronopyranosidechrysoeriol
F13	7-O-[β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]tricin
F14	7-O-[2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]chrysoeriol
F15	7-O-[2'-O-sinapoyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]tricin
F16	7-O-[2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1 → 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]tricin
F17	7-O-[2'-O-p-coumaroyl-β-D-glucuronopyranosyl (1, 2) -O-β-D-glucuronopyranoside]tricin
F18	7-O-[2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1, 3) ]-O-β-D-glucuronopyranosyl (1, 2) -O-β-D-glucuronopyranoside}tricin
F19	7-O-[2'-O-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl (1, 3) ]-O-β-D-glucuronopyranosyl (1, 2) -O-β-D-glucuronopyranoside}chrysoerio
F20	6, 8-dihydroxy-flavone-7-O-β-D-glucuronide
F21	6-methoxy-8-hydroxy-flavone-7-O-β-D-glucuronide
F22	7-hydroxy-2- ( p-hydroxyphenyl ) -2, 3-dihydro-4H-1-benzopyran-3-one ( + / - ) -
F23	3-phenyl-4H-chromen-4-one
F24	daidzein
F25	glycitein
F26	genistein
F27	formononetin
F28	( + ) - ( 2, 3, 4-trimethoxy-5-hydroxyphenyl ) -2, 3-dihydro-7-hydroxy-4H-1-benzopyran



续表 1

编号	化合物
F29	(+)-(2, 3, 4-trimethoxyphenyl)-2, 3-dihydro-7-hydroxy-4H-1-benzopyran
F30	5'-methoxysativan
F31	sativan
F32	(E)-1-[6-(3''-methylbut-2''-enyl)-8-isopent-2''-enyl]-3-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-propenone
F33	(E)-1-[6-(3''-methylbut-2''-enyl)-8-isopent-2''-enyl]-3-(4'-hydroxyphenyl) propenone
F34	(E)-1-[6-(3''-methylbut-2''-enyl)-7-hydroxy-8-isopent-2''-enyl]-3-(4'-hydroxyphenyl) propenone
F35	(E)-1-[6-(3''-methylbut-2''-enyl)-7-hydroxy-8-isopent-2''-enyl]-3-(4'-hydroxy-3', 5'-dimethoxyphenyl) propenone
F36	(E)-3-(benzo-[1, 3]dioxol-5'-yl)-1-(5, 7-dihydroxy-6-isopentenyl-benzo[1, 3]dioxol-4-yl) propenone
F37	(E)-3-(benzo[1, 3]dioxol-5'-yl)-1-(5-methoxy-7-hydroxy-6-isopentenylbenzo[1, 3]dioxol-4-yl)-proenone
F38	(E)-3-(7'-methoxybenzo[1, 3]dioxol-5'-yl)-1-(6-isopentenylbenzo[1, 3]dioxol-4-yl) propenone
F39	(E)-3-(7'-methoxybenzo[1, 3]dioxol-5'-yl)-1-(5, 7-dimethoxy-6-isopentenylbenzo[1, 3]dioxol-4-yl) propenone
F40	broussocalcone A
F41	broussocalcone B
F42	7, 9, 2', 4'-tetrahydroxy-8-isopentenyl-5-methoxychalcon
F43	xanthohumol
F44	desmethylxanthohumol
F45	6'-hydroxy-2', 3', 4'-trimethoxy-chalcone
F46	flavokawin B
F47	2, 4, 4'-trihydroxychalcone
F48	2'-hydroxy-4', 6'-dimethoxychalcone
F49	litseaone B
F50	xanthohumol M
F51	flemiculisin
F52	medicarpin
F53	(-)-6aR, 11aR-dihydro-3-hydroxy-9, 10-dimethoxy-6H-benzofuro-[3, 2c][1]-benzopyran
F54	4-methoxy medicarpin

## 1.2 疾病靶点蛋白的筛选及处理

将肝癌 (Hepatoma) 作为关键词从 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>) 数据库和 Therapeutic Target Database (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库中筛选人源目标靶点蛋白<sup>[13-14]</sup>。所有被筛选

的靶蛋白都具有原始配体, 蛋白-配体复合物分辨率小于 0.25 nm<sup>[14]</sup>。最终从数据库中筛选出了 15 个靶点蛋白 (如表 2 所示)。并利用 PDB 数据库下载具有原始配体的靶蛋白晶体结构, 然后使用 Sybyl-X 进行蛋白优化及修饰靶蛋白, 修饰的过程中需要去除水分子、加氢、修补氨基酸残基。

表 2 肝癌疾病相关靶点蛋白名称

Tab 2 Selected target protein of hepatoma

蛋白质编码	蛋白质名称	蛋白质编码	蛋白质名称
3V2W	Sphingosine 1-phosphate receptor 1	1QPC	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK)
3HNG	Vascular endothelial growth factor receptor 1	5JEB	Epidermal growth factor receptor (EGFR)
5EYD	Hepatocyte growth factor receptor	4TUH	B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)
5G4O	Cellular tumor antigen p53	4JT6	Serine/threonine-protein kinase mTOR
1D3G	Dihydroorotate dehydrogenase	3O96	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
1BID	Thymidylate synthetase	4REW	AMPK
2OJW	Glutamine synthetase	5IHC	Maternal embryonic leucine zipper kinase
3QQU	Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-IR)		

## 1.3 蛋白通路的筛选

利用 KEGG 数据库检索<sup>[15]</sup>, 收集整理并筛选好靶点蛋白相关的信号通路。

## 1.4 分子对接

在药物先导化合物的筛选中, 化合物活性成分与疾病的靶点蛋白准确且紧密相互作用, 是极

为重要的。在数据库中筛选出目标蛋白, 我们使用 Sybyl-X 进行半柔性分子对接。靶点蛋白与其原始配体的亲和力被作为苜蓿黄酮类化合物与肝癌靶点蛋白之间亲和力的参考值<sup>[16]</sup>。分子对接的分数显示了化合物和靶蛋白之间的结合程度, 分数越高则准确度越高。之后使用 Discovery Studio

2017 R2 Client 分析分子对接结果, 如图 1 所示。

将对接分数阈值设置为 5.0, 把对接结果进行仔细的整理和分析, 并对化合物和目标靶点蛋白进行了排名。结果表明 F32、F33 等为紫花苜蓿黄酮抗肝癌潜在关键化合物, 靶点蛋白 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) 为关键靶点蛋白。基于分子对接结果, 可以清晰地看到化合物 F32 和 F33 具有良好的潜在抗肝癌活性, has04151 (PI3K-Akt signaling pathway) 是最关键的潜在蛋白通路。图 1 表明化合物 F32 和 F33 与靶点蛋白 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) 以分子间氢键相互作用。其中, 化合物 F32 与氨基酸残基 (PHA: 55、ILEA: 88、TYRA: 326、ASP: 292、THRA: 82、ASP: 274) 形成了 8 个分子间氢键, 化合物 F32 与 ASP292、ILE84、PHE55、TRY326、ASP274、ARC273 氨基酸残基之间以分子间氢键相互作用。其中, 氨基酸残基 (ASP292、ILE84、TRY326 和 PHE55) 与化合物 F32 和化合物 F33 均产生了分子间氢键, 说明氨基酸残基 ASP292、ILE84、TRY326 和 PHE55 在紫花苜蓿黄酮抗肝癌活性中起到了关键作用。

### 1.5 分子网络的构建

将上述对接结果进行归纳整理, 之后选择分子对接计算结果  $\geq 5.0$  的对接分数, 运用 Cytoscape 3.2.1 网络分析软件构建, 选择疾病靶点蛋白与黄酮类化合物构建化合物-靶点网络图 (见图 2), 然后根据靶点蛋白与蛋白信号通路的相关联系建立靶点-通路网络图 (见图 3), 最后建立起黄酮类化合物-肝癌靶点蛋白-信号通路网络图 (见图 4)。在构建的网络图中, 黄酮类化合物、肝癌靶点蛋白、信号通路用 node 代表。其相互作用与关联用 edge 来连接。运用 Cytoscape 3.2.1 软件中 Network analyzer 进行网络特征分析。

图 2~4 中, 菱形图代表肝癌靶点蛋白, 三角形代表蛋白通路, 圆形代表黄酮类相关化合物, 从图中观察到三种网络相互关联的程度, 初步预测出紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌疾病的物质基础。从 Cytoscape 3.2.1 软件中的 Network analyzer 进行详细分析, 以度与介数来推测紫花苜蓿中抗肝癌的黄酮类化合物和作用的主要蛋白靶点; 共得出 7 个化合物在对抗肝癌疾病中可能具有重要的作用, 分别为 F32、F33、F34、F38、F40、F41、F42。与之相关的关键靶点可能为 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)、5JEB [Epidermal growth factor receptor (EGFR)]、4JT6 (Serine/threonine-protein kinase mTOR)、

5G40 (Cellular tumor antigen p53)、4TUH [B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)]。与其作用的关键蛋白靶点通路为 PI3K-Akt signaling pathway (has04151)、Hepatocellular carcinoma (has05225)、Pathways in cancer (has05200)、Acute myeloid leukemia (has05212)。

## 2 结论与讨论

本文结合网络药理学, 通过分子对接, 初步预测了紫花苜蓿中黄酮类化合物抗肝癌的作用机制。首先通过文献数据挖掘, 归纳整理与分析, 发现了紫花苜蓿 54 种黄酮类化合物, 15 个潜在的肝癌靶点蛋白及 159 个相关蛋白通路, 构建了黄酮类化合物-蛋白靶点-蛋白通路网络图。结果可知在治疗肝癌疾病中, 发挥作用的黄酮类化合物为 F32、F33、F34、F38、F40、F41、F42。

其有效的作用蛋白靶点 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)、5JEB [Epidermal growth factor receptor (EGFR)]、4JT6 (Serine/threonine-protein kinase mTOR)、5G40 (Cellular tumor antigen p53)、4TUH [B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)]、最优的蛋白信号通路 PI3K-Akt signaling pathway (has04151)、Hepatocellular carcinoma (has05225)、Pathways in cancer (has05200)、Acute myeloid leukemia (has05212)。肝脏中肝细胞生长离不开血管细胞的生长, 肝脏癌变细胞也离不开肝内癌变血管细胞的生长。随着对疾病的不断深入研究, 科研人员发现信号通路参与靶点蛋白结合酶受体, 并从细胞外传导细胞核内, 参与多种细胞的生长、分化等。PI3K-Akt 信号通路是肝细胞内重要的传导途径之一, 大量文献研究表明<sup>[17-19]</sup>, 在该通路中可使靶点蛋白 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) 激活, 信号传递功能增强, 放大, 并能促进细胞生长增殖与代谢, 在抗癌细胞凋亡方面起到了重要作用。还有其他相关研究表明, 5JEB (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是含有细胞内酪氨酸激酶结构域<sup>[20]</sup>, 通过 PI3K-Akt 信号通路触发传导信号, 促进肿瘤细胞生长。因此, 找到疾病靶点蛋白, 以及靶点蛋白中可以结合的氨基酸残基以及活性的化合物, 是干预信号通路的关键因素。

本研究通过 Discovery Studio017 R2 Client 对接图, 发现了在紫花苜蓿中黄酮类化合物在抗肝癌活性中起关键作用的氨基酸残基在 3O96 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) 中与化合物 F32、F33 均产生了分子间氢键, 并说明氨基酸残基 ASP292、ILE84、TRY326 和 PHE55 在抗肝癌

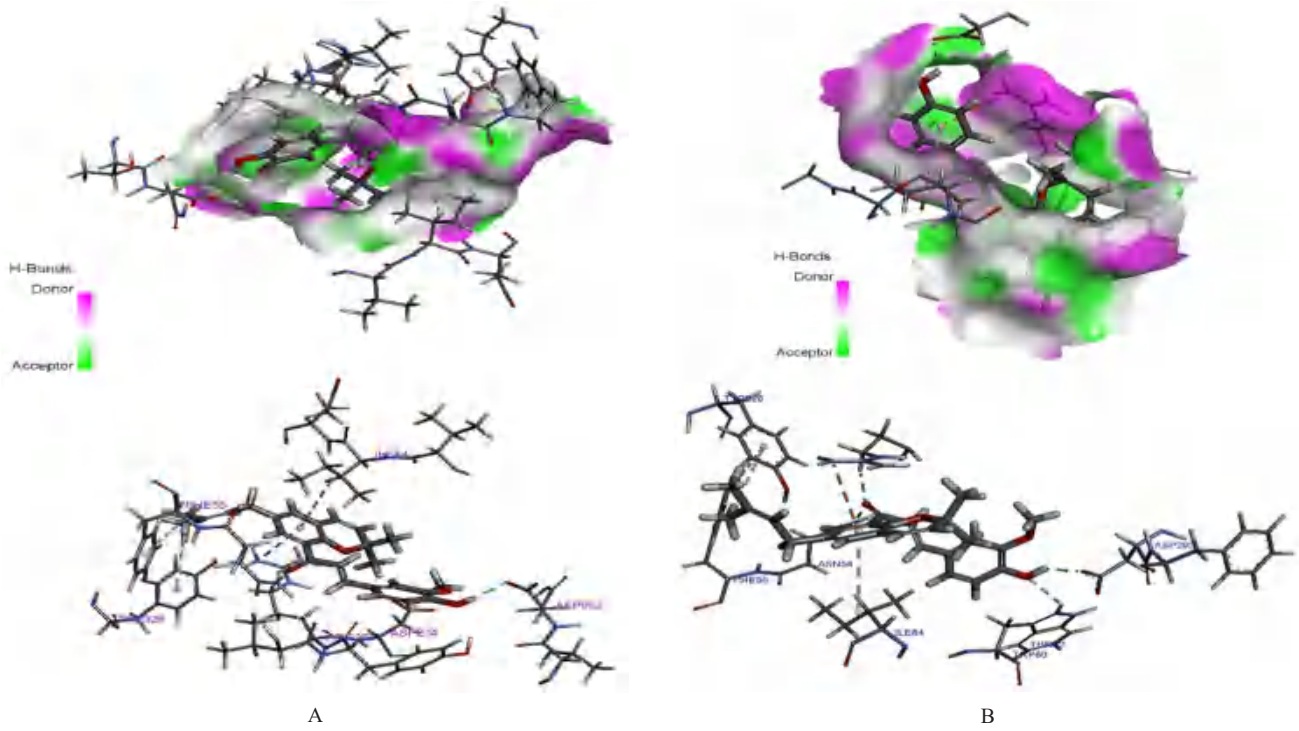


图 1 化合物 F32 (A) 及 F33 (B) 与靶点蛋白 3O96 计算机模拟分子对接

Fig 1 In silico docking simulation of compounds F32 (A) and F33 (B) to cholinesterase (PDB code: 3O96)

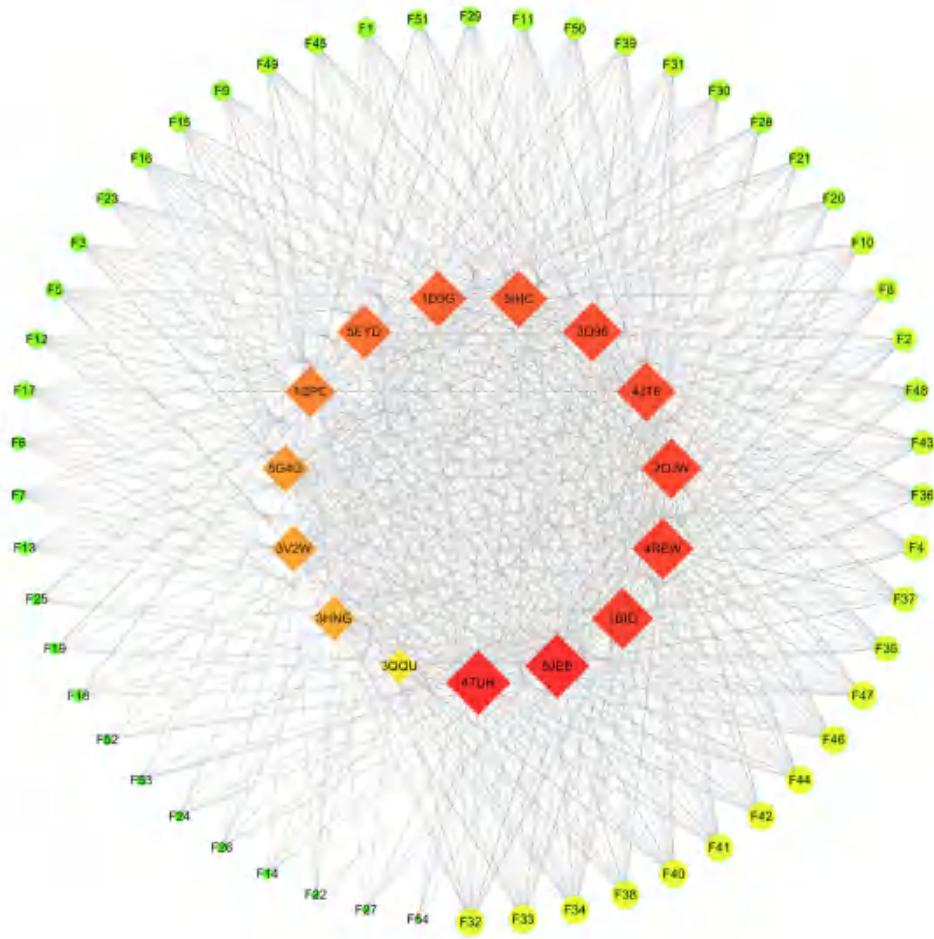


图 2 黄酮类化合物 - 蛋白靶点网络图

Fig 2 Flavonoids-target network



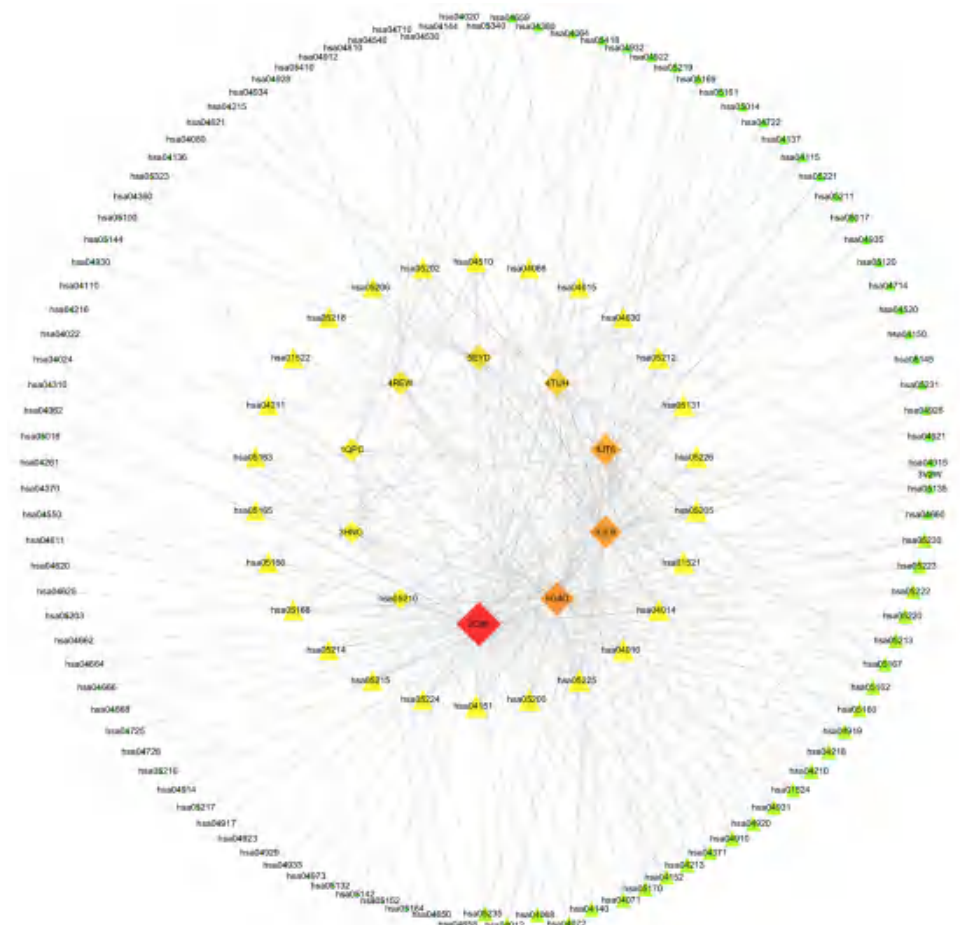


图 3 蛋白靶点 - 蛋白通路网络图  
Fig 3 Target-signal pathway network



图 4 黄酮类化合物 - 蛋白靶点 - 蛋白通路的网络分析图  
Fig 4 Flavonoids-target-signal pathway network

活性中起到了关键作用。

以上结果可说明紫花苜蓿中黄酮类化合物多组分,多靶点,协同发挥的作用特点。本研究在黄酮类化合物-疾病靶点蛋白-信号通路的多种关联中,通过分子对接,预测分析出肝癌靶点蛋白中可能与氨基酸残基相结合的黄酮类化合物,为干预与抑制相关蛋白与蛋白通路提供了可靠的依据,特别是对天然产物黄酮类化合物潜在抗肝癌研究,为进一步筛选先导化合物奠定了坚实的基础,为深入阐明紫花苜蓿黄酮类成分抗肝癌作用机制提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] 杨婉婷, 侯恩存. 原发性肝癌治疗的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24 (21): 3495-3499.
- [2] Yong KL, Kim SU, Kim DY, et al. Prognostic value of  $\alpha$ -fetoprotein and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin responses in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization [J]. BMC Cancer, 2013, 13 (5): 2-10.
- [3] Gao L, Wang XD, Niu YY, et al. Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology [J]. Sci Rep, 2016, 6: 24944.
- [4] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4 (11): 682-690.
- [5] 邢心睿, 吕狄亚, 柴逸峰, 等. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2018, 36 (2): 97-99.
- [6] 杨青川, 康俊梅, 张铁军, 等. 苜蓿种质资源的分布、育种与利用 [J]. 科学通报, 2016, 61 (2): 261-270.
- [7] 陈立强, 师尚礼. 42 份紫花苜蓿种质资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 草业科学, 2015, 32 (3): 372-381.
- [8] 赵娅敏, 马好文, 孟淑娟. 紫花苜蓿中黄酮类化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44 (22): 3245-3252.
- [9] Nam TG, Lee SM, Park JH, et al. Flavonoid analysis of buckwheat sprouts [J]. Food Chem, 2015, 170 (4): 97-101.
- [10] Stochmal A, Piacente S, Pizza C, et al. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (2): 753-758.
- [11] Stochmal A, Simonet AM, Macias FA, et al. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (11): 5310-5314.
- [12] 刘学贵, 黄明远, 吕梦超, 等. 紫花苜蓿化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39 (11): 346-352.
- [13] Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (1): D901-D906.
- [14] Zhu F, Shi Z, Qin C, et al. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (D1): D1137-D1143.
- [15] Zhuang YS, Qin KM, Yang B, et al. Prediction of the targets of the main components in blood after oral administration of *Xanthii Fructus*: a network pharmacology study [J]. RSC Adv, 2018, 16 (8): 8870-8877.
- [16] Gogoi B, Gogoi D, Silla Y, et al. Network pharmacology-based virtual screening of natural products from *Clerodendrum* species for identification of novel anti-cancer therapeutics [J]. Molecular BioSystems, 2017, 13 (2): 406-416.
- [17] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13 (11): 2498-2504.
- [18] Li ZP, Xu JY, Zheng PY, et al. Hawthorn leaf flavonoids alleviate nonalcoholic fatty liver disease by enhancing the adiponectin/AMPK pathway [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (10): 17295-17307.
- [19] Li HX, Zeng JF, Shen K. PI3K-AKT-mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer [J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 290 (10): 1067-1078.
- [20] Karin B, Laurien DCH, Mark O, et al. PI3K-AKT-mTOR pathway activation in primary and corresponding metastatic breast tumors after adjuvant endocrine therapy [J]. Int J Cancer, 2014, 135 (56): 75-88.

(收稿日期: 2022-04-01; 修回日期: 2022-12-27)

# 基于网络药理学与实验验证方法探讨脑疏宁治疗 脑梗死的分子机制

刘伟<sup>1,3</sup>, 张梅奎<sup>2\*</sup>, 宋发萍<sup>1</sup> (1. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 中国人民解放军总医院, 北京 100853; 3. 西安石油大学医院, 西安 710065)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学与实验验证方法探究脑疏宁治疗脑梗死的分子机制。**方法** 利用网络药理学方法获取脑疏宁组方中药物活性成分、潜在靶点和脑梗死疾病相关靶点, 并进行数据统计分析, 利用 GEO 数据库、分子对接技术验证核心靶点; 利用 Zea-Longa 线栓法建立 Mcao 脑缺血卒中大鼠模型进行动物实验验证。**结果** 网络药理学分析发现, 脑疏宁核心活性成分主要包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、汉黄芩素、 $\beta$ -谷甾醇等, 涉及核心靶点包括 MMP9、HSP90AA1、COX2、RELA、PPARG 等, 可能通过 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、MAKP 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路等发挥治疗脑梗死的作用; GEO 数据库验证核心基因表明, 对比正常组, 脑梗死组 13 个基因表达具有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 分子对接结果显示脑疏宁核心成分与脑梗死核心靶点具有很高的对接活性。动物实验显示脑疏宁可以改善大鼠缺血半暗带区组织的病理结构, 通过下调其 MMP9、COX2 蛋白的表达治疗脑梗死。**结论** 本研究从不同角度探究了脑疏宁治疗脑梗死的作用机制, 并验证了脑疏宁可以通过多基因、多通路发挥抗脑梗死作用。

**关键词:** 网络药理学; 脑疏宁; 脑梗死; 实验验证

中图分类号: R54, R966 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0692-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.022

## Molecular mechanism of Naoshuning for cerebral infarction based on network pharmacology and experiment verification

LIU Wei<sup>1,3</sup>, ZHANG Mei-kui<sup>2\*</sup>, SONG Fa-ping<sup>1</sup> (1. The First Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853; 3. Hospital of Xi'an Petroleum University, Xi'an 710065)

**Abstract: Objective** To determine the molecular mechanism of Naoshuning for cerebral infarction based on network pharmacology and experiment verification. **Methods** Network pharmacology was used to obtain the active ingredients, potential targets and cerebral infarction related targets in the Naosuning formula group, and the data were statistically analyzed. GEO database was used to verify the differential gene expression and molecular docking of the core targets. The cerebral infarction model of the middle cerebral artery embolization in rats was prepared by modified thread embolization method. **Results** The main active components for cerebral infarction included quercetin, kaempferol and luteolin. Totally 18 core genes for treating cerebral infarction, including MMP9, HSP90AA1, COX2, RELA, and PPARG were obtained. PI3K-Akt, AGE-RAGE, IL-17, TNF, MAKP, NF- $\kappa$ B signaling pathway and other core pathways were involved in the treatment of cerebral infarction. GEO database samples verified 13 core gene expression differences between the normal group and the cerebral infarction group. Molecular docking showed that the key active components of Naoshuning pre-prescription group had high docking activity with the key gene targets of cerebral infarction. Naoshuning improved the pathological

基金项目: 北京市自然科学基金 (No.7182156)。

作者简介: 刘伟, 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事中西医结合脑血管病, email: 357539659@qq.com \*通信作者: 张梅奎, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合脑血管病, email: ZMK301@126.com



structure of the ischemic penumbra tissue in rats, and improved cerebral infarction by down-regulating the expression of MMP9 and COX2 proteins. **Conclusion** The mechanism of Naoshuning for cerebral infarction is explored from different angles. That Naoshuning has anti-cerebral infarction effect via multiple genes and multiple pathways is verified.

**Key words:** network pharmacology; Naoshuning; cerebral infarction; experimental verification

脑梗死又称为缺血性脑卒中,是由于各种脑血管病变引发脑血管血流突然中断,导致脑组织处于缺血缺氧状态下而引起损伤,进而出现一系列神经功能缺损的综合征<sup>[1]</sup>。脑梗死是临床上的常见病,多发病,其引起的神经功能损伤会严重影响患者的生活水平,且漫长的恢复期也是对患者及其家属的长期折磨。西医对脑梗死发病及其神经功能障碍的恢复干预手段有限,而中医药脑梗死治疗的经验方在改善神经功能障碍方面具有较好疗效,因此,探寻一些安全、可靠有效的中医药方意义重大。

脑梗死在中医学上属于中风的范畴,脑疏宁是在防治中风多年临床实践的经验基础上,抓住中风病颅脑气机逆乱、瘀水交互为患的病理特点,利用气、血、水三者生理和病理上的密切关联,针对不同病理环节,将祛瘀、利水、通腑、调气四法有机结合,本着多调节、综合辨治的指导思想立法组方,通过大量临床观察筛选出的有效经验方<sup>[2]</sup>。脑疏宁由益母草、川牛膝、水蛭、三七、石菖蒲、白茅根、连翘、生大黄 8 味中药组成。方中益母草活血祛瘀、利水消肿,川牛膝活血化瘀、引血下行,与益母草共为君药;三七化瘀消肿,水蛭逐瘀通经,白茅根清热凉血止血、活血利尿,生大黄通腑泻热、逐瘀通经,连翘清热解毒,石菖蒲化豁痰开窍、化湿开胃。全方有活血利水、通腑调气之效,进而达到瘀去水消、脑脉自通、脑窍自聪之目的。

脑疏宁在临床上能有效改善脑梗死患者的神经功能症状,但关于其药理学分子作用机制基础研究相对较少,脑疏宁药物组成较多,成分复杂,靶点与通路相互关系复杂,传统的药理学研究工作量大,靶向性不强。本文将运用网络药理学和实验验证方法,从药物单一活性成分、靶点到多活性、多靶点、多途径进行研究。运用新的技术,从不同角度探究脑疏宁治疗脑梗死的分子机制,为脑疏宁的临床应用和进一步研究提供新的思路和方向。

## 1 材料

### 1.1 试药

脑疏宁方:益母草 30 g、川牛膝 15 g、水蛭 6

g、三七 3 g、石菖蒲 12 g、白茅根 15 g、连翘 20 g、生大黄 6 g (陕西中医药大学附属医院药剂科),由陕西中医药大学药理实验室代煎煮至 200 mL,然后自行进行煎煮浓缩至  $1.07 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。尼莫地平片(规格:0.02 g/片,亚宝药业集团股份有限公司,批号:H14022821)。苏木精(Sigma,货号:H9627),伊红染液(国药集团,货号:71014544),4%多聚甲醛(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号:G1101),SDS-PAGE 凝胶试剂盒(上海奥康,货号:G2013),GAPDH 抗体(Biosharp,货号:BL006B),MMP9 抗体(Abcam,货号:AB31412),COX-2 抗体(货号:BM0627)、RIPA 裂解液(货号:AR0102-100)(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.2 动物

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠,体质量为  $(200 \pm 10) \text{ g}$ ,40 只[成都达硕生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2020-030,使用许可证号:SYXK(川)2019-189]。于陕西中医药大学药理实验室动物房喂养,动物房条件,空调温度调节为  $(23 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ ,湿度保持 55%~65%,光照为自然光。

### 1.3 仪器

GN61M/LS-2055A 病理切片机(金华科迪),HG10-HK-4 组织摊烤片机(北京佳源兴业),TD-L790A 显微镜(上海仪圆光学),离心机(Thermo Fisher,型号 Micro 17R),凝胶电泳系统(伯乐,型号:PowerPac Basic),成像系统(伯乐,型号:GelDoc XR+),恒温箱(上海启前电子科技有限公司,型号:QQMK-10)。

## 2 方法

### 2.1 药物活性成分收集和相关靶点筛选

通过中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP, <https://tcmssp.com/>),检索脑疏宁方各单味药物(大黄、三七、连翘、石菖蒲、益母草、川牛膝、白茅根、水蛭),以口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$  和类药性(DL)  $\geq 0.18\%$  进行筛选,获得药物的活性成分<sup>[3]</sup>。利用 Batman-Tcm 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)和文献,对 TCMSP 平台不完善的药物成分进行更新补充,最终获得脑疏宁方的活性成分。在 Swis-

sTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstar-getprediction.ch/>) 预测获取脑疏宁活性成分相应靶点, 利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对基因靶点名转换及矫正去重。

**2.2** 获取脑疏宁治疗脑梗死的共同靶点并构建核心蛋白互作网络 (PPI)

利用 Genecards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 等数据库, 以“Cerebral Infarction”为关键词进行检索, 获取相关靶点。利用 R 语言获取脑疏宁成分-脑梗死共同靶点, 将生成的共同靶点导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建 PPI。将获取的 PPI 图导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 利用 CytoNCA 插件, 设置度中心性 (degree centrality, DC)、介数中心性 (betweenness centrality, BC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 的中位值为筛选条件, 筛选富集度高的蛋白互作关系, 绘制核心 PPI 图。

**2.3** 构建“药物-成分-作用靶点”网络关系图

首先分别建立单味药活性成分、成分活性靶点及疾病作用靶点, 利用 Perl 语言工具生成相应的关系文件, 导入 Cytoscape 3.8.0 软件中, 绘制脑疏宁治疗脑梗死的网络关系图。

**2.4** GO 功能与 KEGG 富集通路分析

将药物-疾病共同靶点导入 DAVID 数据库, GO 富集分析研究脑疏宁治疗脑梗死生物功能。进行 KEGG 富集通路分析, 研究治疗脑疏宁治疗脑梗死的主要通路。利用 R 语言绘制 GO 富集分析和 KEGG 富集通路气泡图。

**2.5** GEO 数据库对核心靶点进行验证

利用 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 查找健康人与脑梗死患者表达差异基因, 与核心靶点进行匹配验证。GEO 数据库下载缺血性脑卒中后外周全血 RNA 基因表达数据集 (GSE16561) [4-5], 注解平台为 GLP1883, 该数据集包括健康正常样本 24 个, 脑梗死样本 39 个。利用 R 语言, 对比正常样本与脑梗死样本基因的表达, 设置  $P < 0.05$ ,  $\log_{2}FC \geq 1.5$  进行筛选, 获取表达差异基因。与获取的核心靶点进行匹配验证, 并制作箱线图。

**2.6** 分子对接验证

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的 2D 结构并利用 Chem 3D 软件进行结构处置。在 UniProt 数据库筛选配体蛋白, 筛选蛋白结构原则是: ① 选择具有配体

分子的结构蛋白; ② 选择分辨率较高的蛋白结构; ③ 选择 X-ray 来源结构。最后选择 SYBYL-X2.0 完成配体、配子的对接 [6]。

**2.7** 动物实验验证

**2.7.1** 大鼠 Mcao 模型的制备及给药 将 40 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为空白组 (control)、模型组 (Mcao)、尼莫地平组 (Nimo)、脑疏宁 (Nsn) 组。于饲养第 8 日开始给药, 空白组、模型组: 给予 5% 氯化钠溶液,  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃; 尼莫地平组: 给予尼莫地平溶解液,  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃; 脑疏宁组: 给予脑疏宁煎煮液,  $11.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃, 每日一次。饲养第 11 日, 除空白组外, 其余各组均依据 Zea-Longa 线栓法的操作步骤建立 Mcao 脑缺血卒中大鼠模型 [7], 待大鼠清醒后, 按 Zea-Longa 5 分法 [8] 进行神经功能缺损评分, 1~3 分者证明造模成功, 剔除各组 0、4 分大鼠。术后 48 h (饲养第 13 日) 进行神经功能学评分后, 采用 2% 戊巴比妥钠 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 腹腔注射, 麻醉处死后, 每组 3 只大鼠断头取脑, 利用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规包蜡块, 制片, 待 HE 染色; 每组 5 只大鼠同法取右侧大脑组织置液氮中速冻固定,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存, 供 Western blot 检测用。

**2.7.2** 大鼠神经功能缺损评分 分别于造模后、取材前对各组大鼠进行神经功能缺损评分, Zea-Longa 5 分法评分标准: 无神经功能缺损, 正常, 0 分; 神经功能轻度缺损, 病灶对侧前爪舒展不完全, 1 分; 神经功能中度缺损, 右前肢障碍活动, 行走向对侧转圈, 2 分; 神经功能重度缺损, 行走向肢体偏瘫侧倾斜, 3 分; 无意识, 丧失自发行走能力, 4 分。

**2.7.3** HE 染色检测 取 4% 多聚甲醛固定的大鼠脑组织, 进行常规的脱水、透明、包埋和切片, 进行 HE 染色, 在光镜下观察组织的病理变化。

**2.7.4** Western blot 法检测 MMP9、COX2 蛋白表达 取冻存组织, 冰上裂解 30 min 提取蛋白, 测定蛋白浓度, 蛋白于沸水浴中变性, 设置 80 V、30 min, 110 V、120 min 进行电泳, 转膜后  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂奶粉封闭 80 min, 用 TBST 稀释一抗 (MMP9, 1:1000; COX-2, 1:2000),  $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, 3 次 10 min 洗膜后加二抗 (1:5000) 室温孵育 80 min, 3 次 10 min 洗膜后, 使用 ECL 发光系统显像。使用 Image J 软件进行灰度值 (DPI) 分析。

**2.7.5** 统计学处理 利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析、作图。数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组之间采用单因素方差分析, 两两之间采用 LSD-*t* 检验进行比较, 以  $P < 0.05$



为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 药物活性成分收集和相关靶点筛选

最终获取脑疏宁方有效活性成分 55 个，潜在靶点 168 个。

#### 3.2 脑疏宁治疗脑梗死的作用靶点和核心基因

共获取脑梗死潜在作用靶点 2694 个，脑疏宁方中有效活性成分靶点共 168 个，脑梗死作用靶点共 2694 个，共同靶点共 127 个。将共同靶点导入 String 网站，构建 PPI 图，利用 CytoNCA 插件筛选共同靶点，获得 18 个核心基因，Degree 值排名前 5 的核心基因是 *MMP9*、*HSP90AA1*、*COX2*、*RELA*、*PPARG*。这些基因在网络关系中起着决定性作用，是脑疏宁治疗脑梗死的核心靶点（见图 1）。

#### 3.3 “药物-活性成分-作用靶点”网络关系图分析结果

运用 Cytoscape 3.8.0 软件绘制网络关系图，见图 2。脑疏宁治疗脑梗死药物活性成分节点排名靠前的是槲皮素、山柰酚、木犀草素、汉黄芩素、 $\beta$ -谷甾醇，这些关键活性成分对治疗脑梗死具有重要的意义。

#### 3.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析结果

GO 富集共募集了 2347 个条目，涉及细胞成分 59 条，主要包括膜筏、膜微区和神经元细胞体等，涉及的核心基因包括 *CASP3*、*EGFR*、*MMP9*、*COX2*、*CCND1* 等（见图 3A ~ B）；有 2098 个条目涉及脑梗死的发生过程，主要包括药物反应过程、细胞对化学刺激反应、对细胞外刺激的反应，涉及的核心基因包括 *AKT1*、*FOS*、*JUN*、*CASP3*、*EGFR* 等（见图 3C ~ D）；分子功能涉及条目 190 个，其中 DNA 结合转录因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、泛素-像蛋白质连接酶结合等分子功能排名比较前，涉及核心基因包括 *HIF1A*、*JUN*、*RELA*、*CASP8*、*TP53* 等（见图 3E ~ F）。

KEGG 通路富集分析共募集了 169 条通路，脑疏宁治疗脑梗死作用机制主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、MAKP 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路等。涉及的核心基因包括 *RELA*、*MMP9*、*AKT1*、*CASP3*、*IL1B*、*JUN*、*COX2*、*MAPK14* 等（见图 3G ~ H）。脑疏宁治疗脑梗死等具有多靶点、多通路，通过调节神经细胞炎症反应、抑制凋亡及促进细胞再生等多途径来发挥作用。

#### 3.5 利用 GEO 数据库验证核心靶点

PPI 获取 16 个核心靶点，*AKT1*、*TP53*、*MYC*、

*PPARG*、*HIF1A*、*MMP9*、*CASP3*、*HSP90AA1*、*RELA*、*CCND1*、*COX2*、*JUN*、*FOS*、*IL1B*、*HMOX1*、*EGFR*。GSE16561 数据集包含 39 个脑梗死样本和 24 个健康正常样本。与 GEO 数据库差异基因进行验证对比，16 个核心基因中，13 个基因具有差异性 ( $P < 0.05$ )，其中 *MMP9*、*FOS*、*COX2*、*RELA*、*HIF1A* 差异更明显 ( $P < 0.001$ )，核心靶点差异基因表达详见图 4。

#### 3.6 分子对接验证结果

选取“药物-活性成分-作用靶点”网络关系图 Degree 值靠前的活性成分槲皮素、木犀草素、汉黄芩素和核心靶点 PPI 网络中 Degree 值较高的靶点基因 *MMP9*、*HSP90AA1*、*COX2*、*RELA*、*PPARG* 进行对接验证。分子对接以综合得分、核心得分 (C score) 值进行评价，综合得分  $> 5$  分说明分子具有超高活性；核心得分  $> 3$  分代表分子活性高，见表 1<sup>[6]</sup>。选择槲皮素与 *PPARG* 基因进行可视化对接示范，见图 5。

表 1 关键活性成分与关键靶点蛋白对接结果

Tab 1 Docking of key active components and key target proteins

成分	靶点	靶点蛋白	综合得分	核心得分
槲皮素	<i>HSP90AA1</i>	1BYQ	6.34	5
	<i>COX2</i>	5F19	6.14	4
	<i>PPARG</i>	3B1M	7.73	5
	<i>RELA</i>	4KV1	7.35	5
	<i>MMP9</i>	6ESM	5.45	4
木犀草素	<i>HSP90AA1</i>	1BYQ	6.23	4
	<i>COX2</i>	5F19	6.12	4
	<i>PPARG</i>	3B1M	5.18	3
	<i>RELA</i>	4KV1	7.31	4
	<i>MMP9</i>	6ESM	6.51	5
汉黄芩素	<i>HSP90AA1</i>	1BYQ	5.30	5
	<i>COX2</i>	5F19	6.35	5
	<i>PPARG</i>	3B1M	5.18	3
	<i>RELA</i>	4KV1	5.88	4
	<i>MMP9</i>	6ESM	5.32	4

#### 3.7 动物实验验证结果

**3.7.1 大鼠神经功能缺损评分** 根据神经功能评分，各组大鼠造模后剩余情况如下：空白组 10 只，模型组 7 只，尼莫地平组 8 只，脑疏宁组 8 只。

**3.7.2 HE 染色观察大鼠脑组织病理形态** 观察大鼠脑组织 HE 染色病理组织照片，空白组大鼠脑组织结构完整，无明显病理改变，细胞核清晰完整，神经细胞形态正常，排列规律整齐，未见组织水肿及细胞坏死。模型组脑组织结构严重破坏，间隙明显增大，组织间隙可见炎性细胞浸润，细胞排列紊乱，神经细胞水肿变性，可见细胞坏死，间质水肿。与模型组对比，尼莫地平组神经细胞形态、排列较好，可见少量炎性细胞浸



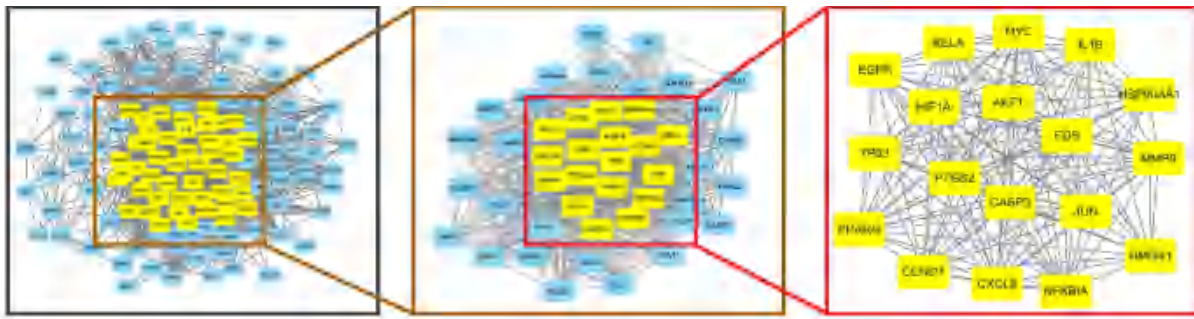


图 1 PPI 网络拓扑分析结果

Fig 1 PPI network topology analysis

注：矩形图代表靶点基因，连线代表两靶点间相互作用关系，黄色矩形代表被筛选基因。

Note: The rectangle represents the target gene, and the connecting line represents the interaction between the two targets, and the yellow rectangle represents the screened gene.

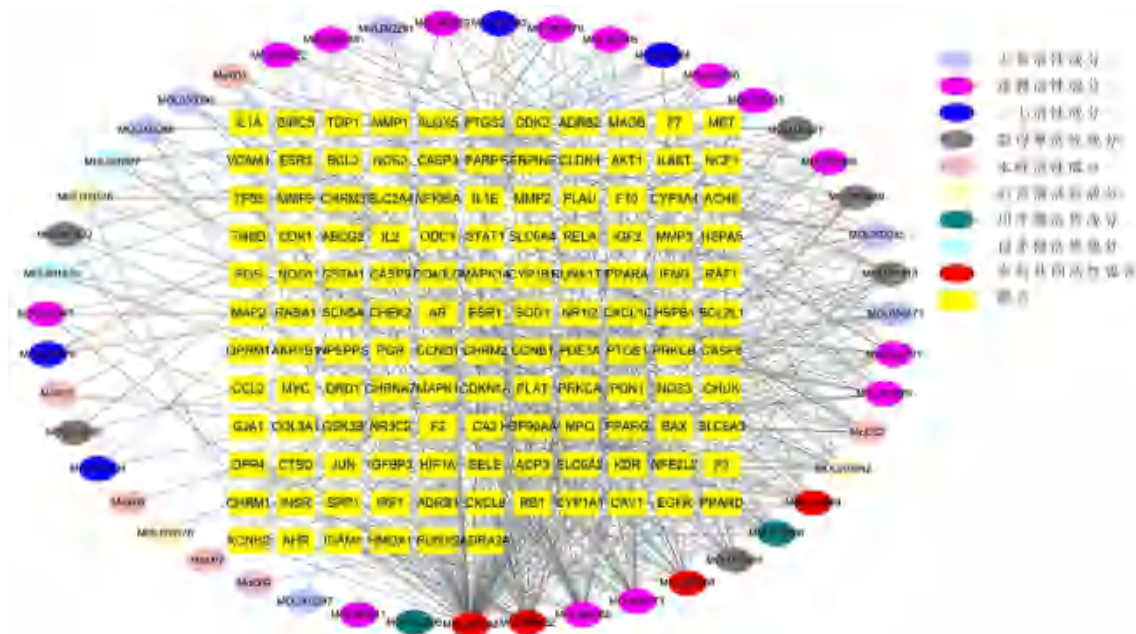


图 2 脑疏宁药物-活性成分-作用靶点网络图

Fig 2 Network diagram of Naoshuning drug-active component-action target

注：黄色矩形代表疾病基因靶点，周围椭圆形为药物活性成分。药物活性成分与疾病靶点之间的连线代表相互联系。

Note: The yellow rectangle represents the disease gene target, and the oval shape is the active ingredient of the drug. The connection between the active components of drugs and disease shows represents mutual connection.

润，间质轻微水肿。与模型组对比，脑疏宁组细胞排列相对整齐，神经细胞结构基本正常，可见较小的炎性细胞浸润，神经细胞部分水肿，间质轻微水肿。脑疏宁组与尼莫地平组对比，组织形态、细胞排列无明显差异（见图 6）。

**3.7.3 Western blot 法检测 MMP9、COX2 蛋白的表达** 与空白组相比，模型组大鼠大脑缺血半暗带区 MMP9 蛋白、COX2 蛋白表达明显上升 ( $P < 0.0001$ )；与模型组对比，尼莫地平组缺血半暗带区 MMP9 蛋白、COX2 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )；脑疏宁组相对于模型组，缺血半暗带区的 MMP9 蛋白、COX2 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )；尼莫地平组与脑

疏宁组对比，MMP9、COX2 蛋白表达无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 7)。

#### 4 讨论

脑梗死发病过程中，会导致包括氧化应激、炎症反应等一些列的脑组织的损伤，进而出现神经功能障碍。脑梗死在中医学属于中风范畴，中风是以“颅脑气机逆乱、瘀水交互为患”为病理特点，国医大师张学文教授<sup>[1]</sup>认为脑梗死的急性期主要以瘀血及痰湿互相交阻于脑窍为主要病机，以神明失主、肢体失用、七窍失司为主要表现的一类脑病。脑疏宁是利用气、血、水三者生理病理上的密切关联，针对不同病理环节，治以“活血利水、通腑泄浊、调畅气机”<sup>[9]</sup>。活血利

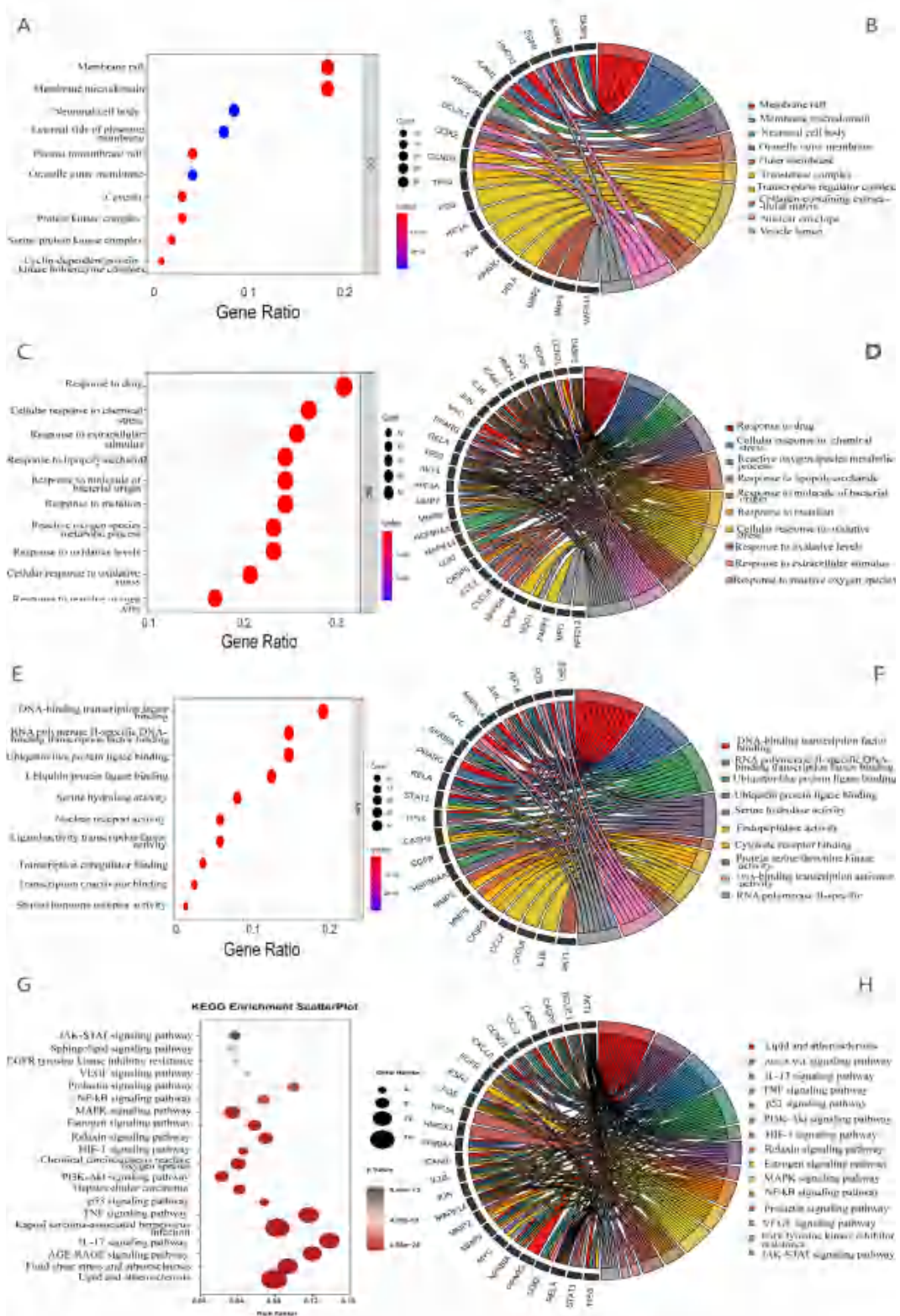


图 3 GO 富集分析及 KEEG 通路图

Fig 3 GO enrichment analysis and KEEG pathway diagram

注：图横坐标为富集分数，气泡越大代表该条目富集的基因数越多，气泡颜色越红则代表富集程度越显著；和弦图为所募集条目涉及的核心基因；A ~ B 为分子功能，C ~ D 为生物学过程，E ~ F 为细胞成分，G ~ H 为 KEEG 富集通路。

Note: The abscissa is the enrichment fraction. The bubbles represent the number of the enriched genes. The larger the bubbles, the more genes enriched; the darker the color of the bubbles, the more significant the enrichment. The chord diagram shows the core genes involved in the items collected. A ~ B show molecular functions, C ~ D show biological processes, E ~ F show cellular components, and G ~ H are KEEG enrichment pathways.



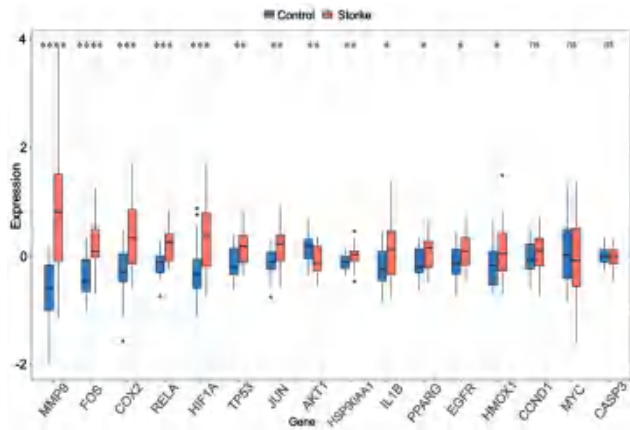


图 4 GEO 数据库验证核心靶点差异基因表达

Fig 4 Verification of core target expression by GEO

注：蓝色为正常组，红色为脑梗死组；\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

Note: Blue is control, red is stroke; \* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

水可以促进瘀血和水湿等病理产物的清除，改善脑部供血情况和促进经络通畅，从而恢复颅脑功能。腑气不通是脑梗死早期重要的临床表现，因此急性期应该及时调畅腑气，调利中焦气机，能有效改善脑梗死患者病情。气机升降有机，腑气降浊，清气上达脑窍，九窍通利，气机顺达，经络通畅，瘀血、水湿、痰饮、宿食等浊邪排除有道，亢盛之气血得以下行，气血津液疏布代谢有律，通痹达络，机体功能得以恢复。促进脑梗死患者排气排便，可以促进新陈代谢，降低颅脑压力，减轻脑组织水肿，促进血液通畅循环，并有效清除氧自由基作用。

“药物 - 活性成分 - 作用靶点”网络关系图显示脑疏宁活性成分中槲皮素、山柰酚、木犀草素活性较高，在治疗脑梗死中起着关键作用。槲皮素能够抑制血小板血栓形成的潜能，具有抗炎、

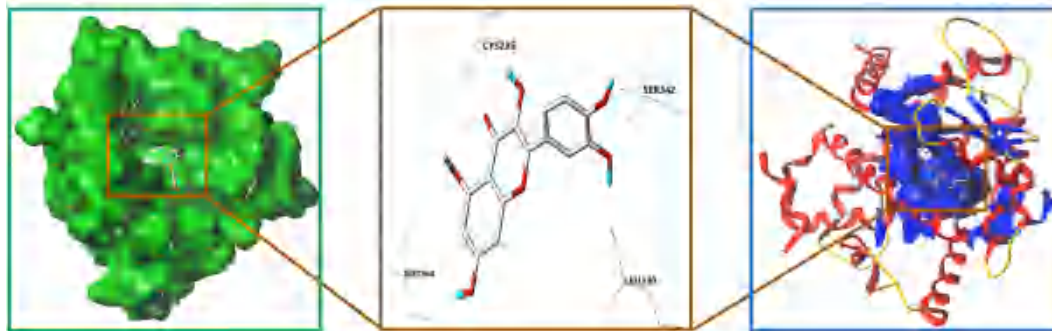


图 5 槲皮素与 PPAR $\gamma$  基因靶蛋白可视化对接示意图

Fig 5 Visual docking demonstration of quercetin and PPAR $\gamma$  gene target protein



图 6 大鼠脑组织 HE 染色图 (x200)

Fig 6 HE staining of rat brain tissue (x200)

抗氧化作用，能够改善脑卒中小鼠疾病进展<sup>[10]</sup>。山柰酚可以通过抑制神经细胞凋亡、炎症反应及血脑屏障的破坏等途径发挥神经细胞的保护机制<sup>[11-12]</sup>。木犀草素具有抗炎、抗氧化、对抗凋亡、增强免疫力的药理活性，对缺血性卒中具有明显

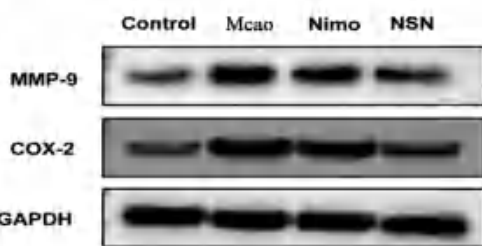
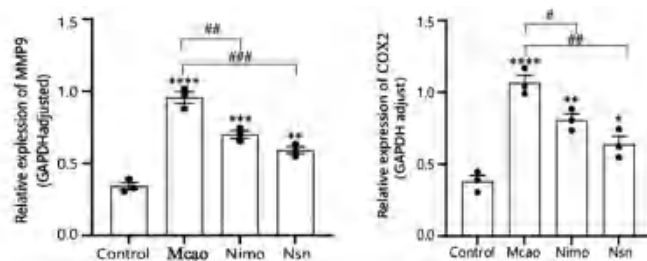


图 7 大鼠脑组织中 MMP9、COX2 蛋白表达

Fig 7 Expression of MMP9 and COX2 in rat brain tissue

注：与正常组对比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ ；与模型组对比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

Note: Versus the Control group, \* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ ；Versus the Mcao group, # $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。



的脑细胞保护作用<sup>[13]</sup>。

PPI 图显示 MMP9、HSP90AA1、COX2、RELA、

PPAR $\gamma$  等基因可能是脑疏宁作用的核心靶点。MMP9 可以通过降解基底膜上的 IV 型胶原，破



坏血脑屏障, 导致脑水肿、细胞炎症的发生, 同时对神经元有不同程度的毒副作用, 是脑梗死发生时的关键检测指标, 其水平可用来预测梗死面积<sup>[14-15]</sup>。*PPARG* 为过氧化物酶体增生激活受体  $\gamma$  编码基因, 主要参与脂质分解代谢, 在脑梗死缺血缺氧发生 6 h 以后, 阿莫果素 B 可以通过调节 *PPARG* 基因的表达, 维持线粒体完整性、抑制氧化应激和相关 DNA 损伤等方式, 对缺氧和缺血损伤发挥神经保护作用<sup>[16]</sup>。*RELA* 通过募集趋化因子活性、免疫反应、炎症过程等相关受体, 参与神经细胞损伤机制<sup>[17]</sup>, *RELA* 是核转录因子 *NF- $\kappa$ B* 的主要功能亚基, 在发生局灶性脑缺血小鼠, 下调 *RELA* 的表达, 能够明显延缓神经元的凋亡<sup>[18]</sup>。*COX2* 基因表达的增高, 是海马神经细胞铁死亡标志, 富马酸二甲酯通过降低 *COX2* 的表达, 增加了 *FTH1* 和 *xCT* 的表达, 抑制海马神经元的铁死亡, 发挥神经细胞保护作用<sup>[19-20]</sup>。*HSP90AA1* 是 PI3K-Akt 信号通路上的关键机制基因, 参与氧化应激、炎症反应、脂质代谢、调节自噬等过程<sup>[21]</sup>。由此推断, 脑疏宁治疗脑梗死可能通过氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等方式保护神经细胞, 减少脑缺血后循环障碍。

KEGG 通路富集分析显示, PI3K-Akt、AGE-RAGE、IL-17、TNF、MAKP、NF- $\kappa$ B 信号通路是脑疏宁治疗脑梗死的直接或者间接的信号通路, 查阅脑疏宁治疗脑梗死信息通路相关文献<sup>[9, 22-28]</sup>, 发现脑疏宁主要通过炎症反应、氧化应激、调控神经细胞的凋亡程序等作用机制发挥作用。GO 富集分析显示, 富集最多基因的反应过程为药物反应、细胞对化学刺激反应、对细胞外刺激的反应、对脂多糖反应、对细胞源分子反应等, 这些反应过程与免疫炎症、氧化应激反应息息相关。槲皮素、木犀草素等关键活性成分与核心靶蛋白的分子对接有较高的综合得分, 从而验证预测的准确性。GEO 数据库对募集的核心基因靶点进行验证, *MMP9*、*FOX*、*COX2*、*RELA*、*AKT1* 等基因在健康人与脑梗死患者表达具有明显差异性。利用大鼠脑梗死模型验证脑疏宁治疗脑梗死核心基因 *MMP9*、*COX2* 的蛋白的表达, HE 染色结果显示脑疏宁治疗组脑组织结构破坏、神经细胞变性坏死情况明显轻于模型组, 脑疏宁组脑组织 *MMP9*、*COX2* 蛋白也较模型组低, 进一步说明脑疏宁可以通过作用 *MMP9*、*COX2* 等核心靶点发挥治疗脑梗死及改善缺血性卒中相关症状。

综上所述, 通过网络药理学及实验验证对脑疏宁治疗脑梗死的作用机制进行分析研究, 发现脑疏宁治疗脑梗死具有多组分、多靶点、多信号通路的

复杂作用机制。多种活性成分与作用靶点相互之间具有很密切的作用关系, 动物实验表明脑疏宁可以显著改善脑梗死大鼠形态学和脑组织病理结构, 验证本研究结果的准确性, 进一步为脑疏宁治疗脑梗死分子水平的机制研究提供了新的思路和方向, 为脑疏宁临床运用提供了新的依据。

## 参考文献

- [1] Jian C, Plab C, Xdab C, et al. The role of lncRNAs in ischemic stroke [J]. *Neurochem Int*, 2021, 147: 105019.
- [2] 周海哲, 赵欢, 严亚锋. 国医大师张学文从热瘀论治中风先兆症思想探析 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37 (7): 3928-3931.
- [3] Zhang W, Chen Y, Jiang H, et al. Integrated strategy for accurately screening biomarkers based on metabolomics coupled with network pharmacology [J]. *Talanta*, 2020, 211: 120710.
- [4] Barr TL, Conley Y, Ding J, et al. Genomic biomarkers and cellular pathways of ischemic stroke by RNA gene expression profiling [J]. *Neurology*, 2010, 75 (11): 1009-1014.
- [5] O'Connell GC, Treadway MB, Petrone AB, et al. Peripheral blood AKAP7 expression as an early marker for lymphocyte-mediated post-stroke blood brain barrier disruption [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1172.
- [6] Kun-Yi H, Samik G, Hiroaki K, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e83922.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [8] Williner P, Bianchin M, Walz R, et al. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing [J]. *Behav Pharmacol*, 1993, 4 (2): 95-99.
- [9] 荆莉, 唐丽, 李敏, 等. 脑疏宁对缺血性脑卒中神经再生作用的研究 [J]. *中央民族大学学报 (自然科学版)*, 2020, 29 (3): 71-79.
- [10] Park DJ, Shah FA, Koh PO. Quercetin attenuates neuronal cells damage in a middle cerebral artery occlusion animal model [J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80 (4): 676-683.
- [11] Wang S, Xu H, Xin Y, et al. Neuroprotective effects of kaempferide-7-O-(4'-O-acetylramnosyl)-3-O-rutinoside on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 788: 335-342.
- [12] Li WH, Cheng X, Yang YL, et al. Kaempferol attenuates neuroinflammation and blood brain barrier dysfunction to improve neurological deficits in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Brain Res*, 2019, 1722: 146361.
- [13] 乔会敏, 李震中, 郭书英, 等. 木犀草素对大鼠脑缺血后 TRAF6 表达的影响及其保护作用机制研究 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2015, 23 (6): 425-427.
- [14] Qiu LB, Zhou Y, Qi W, et al. Synthetic gelatinases inhibitor attenuates electromagnetic pulse-induced blood-brain

- barrier disruption by inhibiting gelatinases-mediated ZO-1 degradation in rats [J]. *Toxicology*, 2011, 285 (1-2): 31-38.
- [15] 徐鑫森, 金勇君, 郭伟, 等. 胍丁胺对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性水通道蛋白 4 和基质金属蛋白酶 9 的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2015, 24 (3): 204-207.
- [16] Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, et al. Post-treatment with amorfrutin B evokes PPAR $\gamma$ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (8): 854.
- [17] Lu S, Kong W, Wang S. Exploring the changes of brain immune microenvironment in Alzheimer's disease based on PANDA algorithm combined with blood brain barrier injury-related genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 557: 159-165.
- [18] 陈卫银, 孙承铭, 丹参酮 II A 预处理对局灶性脑缺血模型大鼠 IL-1 $\beta$ 、RelA mRNA 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30 (9): 2115-2118.
- [19] 杨田丽, 杨勇飞, 袁增强, HT22 细胞系铁死亡敏感性研究 [J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41 (1): 87-91.
- [20] Yan N, Xu Z, Qu C, et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- $\kappa$ B signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107844.
- [21] Li J, Yang F, Zeng LW, et al. An Efficient regioselective synthesis of 8-formylhomoisoflavonoids with neuroprotective activity by enhancing autophagy [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84 (4): 1385-1391.
- [22] Tu L, Wang Y, Chen D, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 via regulation of the PI3K-Akt-mTOR/JNK pathway in neonatal cerebral hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43 (6): 1210-1226.
- [23] Li ZR, Yang L, Zhen J, et al. Nobiletin protects PC12 cells from ERS-induced apoptosis in OGD/R injury via activation of the PI3K/AKT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (2): 1470-1476.
- [24] Beringer A, Miossec P. IL-17 and IL-17-producing cells and liver diseases, with focus on autoimmune liver diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17 (12): 1176-1185.
- [25] Zepp J, Wu L, Li X. IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32 (5): 232-239.
- [26] Lei WU, Wang HM, Jin-Long LI, et al. Dual anti-ischemic effects of rosmarinic acid *n*-butyl ester via alleviation of DAPK-p53-mediated neuronal damage and microglial inflammation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38 (4): 459-468.
- [27] Guo YB, Bao XJ, Xu SB, et al. Honokiol induces cell cycle arrest and apoptosis via p53 activation in H4 human neuroglioma cells [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (5): 7168.
- [28] 张梅奎, 沈绍清, 刘若卓, 等. 脑疏宁对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究 [A]// 国家中医药管理局脑病重点研究室建设研讨会暨中风病科研成果推广交流会议论文集编 [C]. 2010: 324-331.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-02)

## 固肾止遗双子颗粒的制备工艺研究

李国玉, 梁昊都, 管彤, 闫晶媛 (哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

**摘要:** 目的 探究固肾止遗双子颗粒的制备工艺。方法 采用单因素试验结合星点设计优化, 以五味子醇甲含量及干膏得率作为评价指标, 进一步优选工艺, 以颗粒的成型率、休止角、堆密度、吸湿率、溶化性作为考察指标, 对辅料的种类、用量、润湿剂及干燥时间进行工艺优化, 按 2020 年版《中国药典》对制得的颗粒进行相关检查。结果 颗粒剂最佳提取工艺: 提取次数 2 次, 溶媒量 8 倍, 提取时间 2 h。制剂工艺: 选择糊精和微晶纤维素作为辅料, 糊精与微晶纤维素比例为 2:1, 70% 乙醇作为润湿剂, 颗粒剂干燥时间 2 h。验证试验结果显示, 3 批固肾止遗双子颗粒大小、粒度均匀, 外观呈米黄色, 气微香, 溶化性、成品率、含水量各项指标均符合 2020 年版《中国药典》相关项下的规定。结论 此研究可为固肾止遗组方后续的体内研究提供理论依据, 并为进一步的工业化生产提供技术指导。

**关键词:** 固肾止遗双子颗粒; 提取工艺; 成型工艺

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0700-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.023

基金项目: 黑龙江省中医药管理局中医药中青年科技攻关项目 (No.ZHY2020-176)。

作者简介: 李国玉, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新资源药效物质基础及新药研发, email: Leegy@163.com

## Preparation technology of Gushen Zhiyi double seeds granules

LI Guo-yu, LIANG Hao-du, GUAN Tong, YAN Jing-yuan (School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076)

**Abstract: Objective** To improve the preparation technology of Gushen Zhiyi double seeds granules. **Methods** The single-factor test combined with central composite design was used to optimize the process, with the content of schisandrin A and dry extract yield as the evaluation indexes. The forming rate, resting angle, stack density, moisture absorption rate and dissolubility of the granules were used as evaluation indexes. The type, amount, wetting agent and drying time of auxiliary materials were optimized, and the prepared granules were inspected according to the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition). **Results** The best extraction process for the granules included 2 extractions, 8 times of solvents, extraction for 2 h. The preparation process: dextrin and microcrystalline cellulose served as excipients for this preparation, the ratio of dextrin to microcrystalline cellulose was 2 : 1, 70% ethanol was used as the wetting agent, and the drying lasted 2 h. The granule validation results: three batches of Gushen Zhiyi granules showed uniform size and particle size, with beige appearance. The slight fragrance, and the indexes of solubility, yield and water content all met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition). **Conclusion** This study provides a theoretical basis for the subsequent in vivo pharmacological experimental study of the formula and technical guidance for further industrial production.

**Key words:** Gushen Zhiyi double seeds granule; extraction process; molding process

小儿遗尿是由于肾气不足、脾肾阳虚等原因使膀胱气化失约不能固摄尿液，最终导致排尿功能障碍<sup>[1]</sup>。固肾止遗双子颗粒是基于古方秘精丸中的中药加减制成的复方颗粒制剂，主要由韭菜子、五味子、甘草等组成，是治疗小儿遗尿症的中药复方制剂。方中韭菜子为君药，补肾阳、暖腰膝、益肾气，归肾、肝经，用于治疗小儿遗尿、小便淋漓不尽<sup>[2-3]</sup>；加以五味子味酸性收敛，起到补阴固阳的辅助作用<sup>[4]</sup>；另取甘草辅佐诸药，调和药性，既能防止过度壮阳，也能补肾助阳<sup>[5]</sup>。在临床上韭菜子、五味子、甘草等常以汤剂的形式使用，但汤剂存在诸多缺点，制成颗粒剂方便易携带。考虑组方不同溶剂提取物对药效的影响，本文通过采用单因素试验结合星点设计优化，以五味子醇甲含量及浸膏得率作为评价指标，以颗粒的成型率、休止角、堆密度、吸湿率、溶化率作为考察指标，对辅料的种类、用量、润湿剂及干燥时间进行工艺优化，按照 2020 年版《中国药典》对制得的颗粒进行相关检查，为该组方的开发与应用提供药学研究基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

ME403E 电子天平 (梅特勒 - 托利多仪器); RC-2009 旋转蒸发仪 (广州新月仪器有限公司);

SXKW 数显控温电热套 (北京永光明医疗仪器有限公司); Waters2695 高效液相色谱仪 [沃特世科技 (美国) 有限责任公司]; KQ-800DB 超声清洗器 (昆山舒美超声仪器有限公司); T6028 电鼓风干燥箱 (天津通利信达仪器厂); SHZ- (III) 循环水式多用真空泵 (北京科伟永兴仪器有限公司); 5810R 高速台式离心机 (Eppendorf)。

#### 1.2 试药

韭菜子、五味子、甘草等均购自哈尔滨世一堂中药饮片有限公司，经哈尔滨商业大学制药工程教研室李国玉教授鉴定均为正品，药材标本储存于哈尔滨商业大学药学院生药实验室。

五味子醇甲 (含量  $\geq 96\%$ ，成都曼斯特生物，批号：110857-202008); 可溶性淀粉 (批号：20210119)、糊精 (批号：20201226)、乳糖 (批号：20210317)、甘露醇 (批号：20210328)、微晶纤维素 (批号：20201123) (天津祥瑞鑫化工科技有限公司); 氯化镁 (批号：20210225)、氯化钾 (批号：20201130) (天津市福晨化学制剂厂)，氯化钠 (天津化工三厂有限公司，批号：20210512); 蒸馏水 (实验室自制)。酒石酸托特罗定片 (南京美瑞制药有限公司，批号：20201101); 垂体后叶素注射液 (南京新百药业有限公司，批号：20210102); 腺嘌呤 (山东富禾生物科技公司，批号：A108896)。



## 2 方法与结果

### 2.1 五味子醇甲的含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 2.5 μm); 流动相: 甲醇-水 (55:45); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 250 nm; 柱温: 35℃, 进样量: 10 μL。

#### 2.1.2 溶液的制备

① 供试品溶液的制备: 精密称取本品 5 g, 研细, 置于锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇定容, 超声处理 30 min 至颗粒溶解, 放冷至室温, 过滤, 蒸干, 残渣加入 10 mL 水溶解。用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯提取液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中并定容, 过滤, 取续滤液通过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

② 对照品溶液的制备: 精密称取五味子醇甲对照品 10.45 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取上述储备液 10 mL 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 20.9 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

③ 阴性样品溶液的制备: 取不含五味子药材的组方颗粒剂 5 g, 按供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。

**2.1.3 专属性试验** 分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液以及阴性样品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 1。

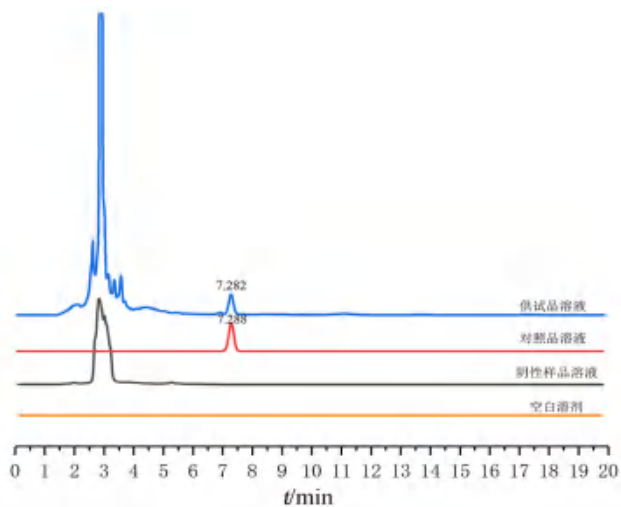


图 1 固肾止遗双子颗粒的专属性色谱图

Fig 1 Specific chromatogram of Gushen Zhiyi double seeds granules

**2.1.4 线性关系考察** 精密称取五味子醇甲对照品 10.55 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加入 55% 甲醇稀释成系列浓度的对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别进样, 以五味子醇甲质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线

性方程  $y = 714.23x + 0.697$ ,  $r = 0.9998$ 。五味子醇甲在 0.01 ~ 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取同一质量浓度的五味子醇甲对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 结果峰面积的 RSD 值为 0.66%, 说明仪器的精密度较好。

**2.1.6 稳定性试验** 取同一批供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件操作, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 峰面积 RSD 值为 1.0%, 表明该颗粒剂在 24 h 内稳定性良好。

**2.1.7 重复性试验** 精密称取同一批固肾止遗双子颗粒 (批号: 20211106) 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 结果五味子醇甲含量的 RSD 值为 1.6%, 说明该方法重复性良好。

**2.1.8 回收试验** 取已知含量的固肾止遗双子颗粒 (批号: 20211112) 共 6 份, 按“2.1.2”项下方法制得供试品溶液, 分别加入 0.155 mg·mL<sup>-1</sup> 五味子醇甲对照品溶液 1 mL, 进样测定, 结果其平均回收率为 97.20%, RSD 为 1.4%, 表明本方法回收率良好, 符合含量测定的要求。

### 2.2 提取工艺单因素试验研究

**2.2.1 提取时间** 按组方配比量取韭菜子、五味子、甘草等共 5 份各 115 g, 加入 8 倍量溶媒, 药材提取 2 次, 考察提取时间对五味子醇甲含量和干浸膏得率的影响。当提取时间超过 3 h, 五味子醇甲含量及浸膏得率变化不大, 说明随着提取时间不断增多, 五味子醇甲以及浸膏得率先上升后逐渐平稳, 故单因素试验最终选择提取时间为 1、2、3 h (见表 1)。

表 1 组方水提取物提取时间单因素考察结果

Tab 1 Single factor of the extraction time of the water extract of the formula

提取时间/h	药材总量/g	五味子醇甲含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	浸膏得率/%
1	115	6.23	8.36
2	115	6.78	12.18
3	115	6.84	15.29
4	115	6.87	16.16
5	115	6.89	17.32

**2.2.2 溶媒用量** 按组方配比量取韭菜子、五味子、甘草等共 5 份各 115 g, 提取 2 次, 每次提取 2 h, 分别采用不同倍数溶媒用量, 考察其对五味子醇甲和干浸膏得率的影响。根据结果可知, 当溶媒用量大于 10 倍时, 五味子醇甲含量及浸膏得率变化不大, 因此单因素试验最终选择溶媒用量 6、8、10 倍 (见表 2)。

表 2 组方水提物溶媒用量单因素考察结果

Tab 2 Single factor of solvent dosage of the water extract of the formula

溶媒量 / 倍	药材总量 /g	五味子醇甲含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	浸膏得率 /%
4	115	6.53	10.17
6	115	6.61	12.13
8	115	6.82	17.29
10	115	6.95	21.96
12	115	6.97	23.22

**2.2.3 提取次数** 按组方配比量取韭菜子、五味子、甘草等共 5 份各 115 g, 加入 8 倍量溶媒, 分别采用不同提取次数, 每次提取 2 h, 考察其对五味子醇甲和干浸膏得率的影响。根据表 3 结果可知, 当提取次数超过 3 次时, 五味子醇甲含量及浸膏得率变化不大, 因此单因素试验最终选择提取 1 次、2 次、3 次进行考察。

表 3 组方水提物提取次数单因素考察结果

Tab 3 Single factor of the extraction times of the water extract of the formula

提取次数	药材总量 /g	五味子醇甲含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	浸膏得率 /%
1	115	4.91	10.35
2	115	6.35	16.06
3	115	6.87	20.87
4	115	6.91	22.66
5	115	6.95	23.19

**2.3 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺**

**2.3.1 模型方差结果分析** 组方水提物提取工艺条件优化试验设计方案及结果见表 4; 回归方程方差分析结果见表 5。

应用 Design-Expert V8.0.6.1 统计软件对响应对面试验数据进行二次多元回归拟合, 得到方程模型:  $Y = 28.20 + 3.29A - 0.63B + 1.45C + 0.33AB - 3.03AC + 1.70BC - 6.36A^2 - 6.15B^2 - 7.88C^2$ , 式中:  $Y$  为浸膏得率 (%),  $A$  为提取次数 (次),  $B$  为溶媒用量 (倍),  $C$  为提取时间 (h)。方差分析发现回归模型 ( $P < 0.001$ ) 显著相关, 相关系数  $R^2 = 0.9826$ , 失拟项 ( $P = 0.1808 > 0.05$ ), 表明失拟项相对于绝对误差不显著。根据  $F$  值可知, 在所选择的试验范围内 3 个因素对组方水提物浸膏得率的影响顺序为提取次数 ( $A$ ) > 提取时间 ( $C$ ) > 溶媒量 ( $B$ ), 且  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $AC$ 、 $BC$  均达到显著水平, 说明各提取工艺参数对组方水提物浸膏得率的影响不是简单线性关系。

**2.3.2 提取工艺响应面结果分析** 利用 Design-Expert V8.0.6.1 软件根据检测结果绘制各因素的响应曲面与等高线, 结果表明这两个因素间交互

表 4 组方水提物提取工艺条件优化试验设计方案及结果

Tab 4 Experimental design and results for the optimization of the extraction process conditions of the water extract

实验号	A	B	C	浸膏得率 /%
1	-1	-1	0	13.93
2	1	-1	0	17.96
3	-1	1	0	12.74
4	1	1	0	18.10
5	-1	0	-1	5.69
6	1	0	-1	20.20
7	-1	0	1	13.78
8	1	0	1	16.16
9	0	-1	-1	14.99
10	0	1	-1	9.58
11	0	-1	1	15.35
12	0	1	1	16.74
13	0	0	0	29.43
14	0	0	0	26.52
15	0	0	0	28.48
16	0	0	0	28.69
17	0	0	0	27.87

表 5 回归方程方差分析结果

Tab 5 Regression equation analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	814.61	9	90.51	43.99	< 0.0001
A	86.33	1	86.33	41.96	0.0003
B	3.21	1	3.21	1.56	0.2516
C	16.73	1	16.73	8.13	0.0246
AB	0.44	1	0.44	0.21	0.6570
AC	36.78	1	36.78	17.88	0.0039
BC	11.56	1	11.56	5.62	0.0496
A <sup>2</sup>	170.39	1	170.39	82.82	< 0.0001
B <sup>2</sup>	159.46	1	159.46	77.51	< 0.0001
C <sup>2</sup>	261.38	1	261.38	127.05	< 0.0001
残差	14.40	7	2.06		
失拟项	9.64	3	3.21	2.70	0.1808
纯误差	4.76	4	1.19		
总值	829.01	16			

效应的显著性强, 而溶媒量与提取次数、溶媒量与提取时间这两组因素的响应曲面坡度较平缓, 等高线趋于椭圆形, 表明上述两组因素间均具有一定的交互作用, 但不显著, 此结果与回归方程方差分析结果一致 (见图 2)。

**2.3.3 残差分析** 结果表明该模型的各个残差点大致呈正态分布趋势, 各残差点在区间内分布无规律性, 随机性较好, 该模型预测值与实际值各点大部分分布在同一条直线上, 误差较小 (见图 3)。经过 Box-Behnken 设计优化提取条件, 得到最佳的提取工艺参数为: 提取次数 2 次, 溶媒量 8 倍, 提取时间 2 h, 此时组方水提物提取得率理论值可达到 28.20%。以此最佳工艺条件下进行 3 次平行提取验证, 结果测得组方水提物平均总提取率为 27.96%。

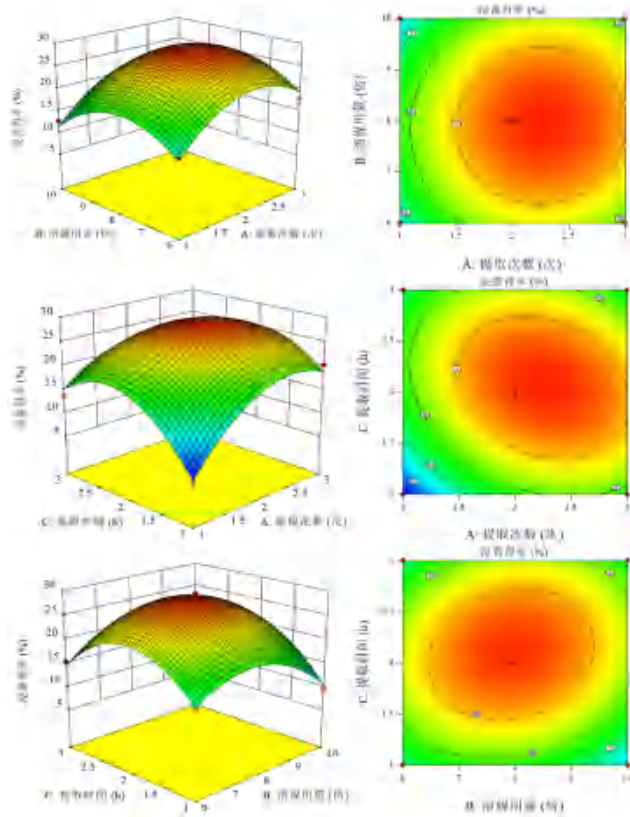


图 2 提取次数、溶媒量和提取时间对浸膏得率影响的响应曲面与等高线

Fig 2 Response surface of the influence of extraction times, solvent amount and extraction time on the yield of extract

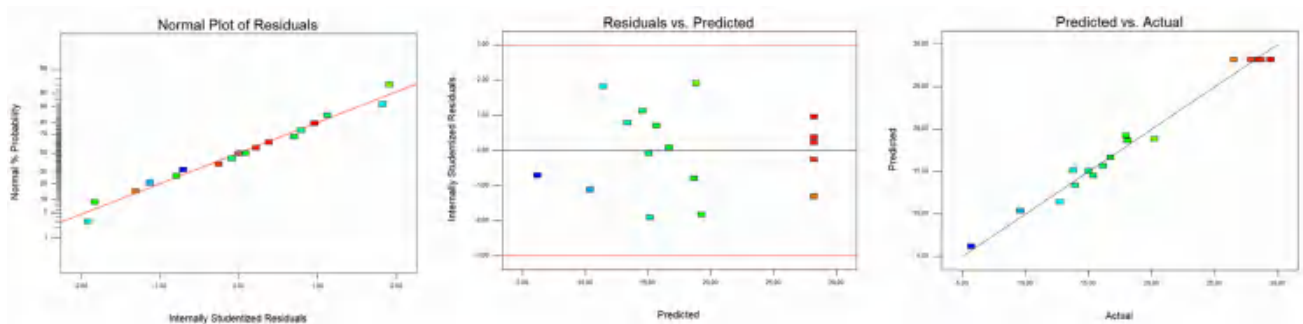


图 3 残差分析检验分布图

Fig 3 Residual analysis test distribution plot

## 2.4 成型工艺研究

**2.4.1 辅料种类的筛选** 选择可溶性淀粉、甘露醇、糊精、乳糖、微晶纤维素五种预实验辅料，将其分别与干浸膏粉均匀混合，并加入润湿剂制粒，检测相应指标从而评价颗粒。辅料为微晶纤维素的颗粒流动性最佳、辅料为糊精的颗粒堆密度最佳、辅料为乳糖组吸湿性效果最好、辅料为糊精、可溶性淀粉以及微晶纤维素制得颗粒成型率高，考虑到可溶性淀粉吸湿性较大影响制剂，乳糖含有糖分不利于小儿服用，故选择糊精及微晶纤维素作为本制剂的辅料（见表 6 及表 7）。

**2.4.2 辅料干浸膏粉与辅料比例的考察** 选取不同比例的辅料进行评估，在干浸膏粉与辅料比例为（1：1.5）的条件下，加入糊精及微晶纤维素，比例分别为 2：1、1：1、2：3，从颗粒外观性状、流动性、成型性方面对该颗粒剂进行综合评估，当糊精与微晶纤维素比例为 2：1 时，制得颗粒外观性状良好、流动性强、成型率最高（见表 8）。

**2.4.3 颗粒剂润湿剂的考察** 选择水以及不同比例的乙醇作为润湿剂考察制粒情况，取适量的干浸膏粉加入辅料以 1：1.5 的比例混匀，四组分别加入水、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇润湿制粒，从外观、成型性、硬度方面考察该颗粒，当

表 6 干浸膏粉与不同辅料颗粒的吸湿性考察

Tab 6 Hygroscopicity of dry extract powder and different excipient particles

时间 /h	吸湿率 /%					
	空白干浸膏粉组	可溶性淀粉	乳糖	糊精	甘露醇	微晶纤维素
4	7.21	5.93	4.28	5.67	4.59	4.76
6	7.92	6.53	4.51	6.42	4.97	4.92
8	8.85	8.06	5.06	8.33	5.92	5.51
12	12.81	10.94	7.19	9.78	8.6	7.93
24	16.37	13.01	9.85	10.97	11.05	10.45
48	17.29	13.88	10.63	11.63	11.69	11.16
72	17.76	14.23	11.02	12.11	12.18	11.37

润湿剂为 70% 及 90% 乙醇时，颗粒大小均匀、硬度及成型性较好，结合生产成本及环境保护等

因素，最终选用 70% 乙醇作为润湿剂（见表 9）。



表 7 不同辅料制得颗粒的成型率考察结果

Tab 7 Effect of different excipients on forming rate of granules

样品	成型率 /%	颗粒外观
浸膏粉+可溶性淀粉	89	颗粒大小均匀, 成型性较好
浸膏粉+乳糖	73	颗粒易软化粘连筛网, 不易成型
浸膏粉+糊精	93	颗粒大小均匀, 成型性良好
浸膏粉+甘露醇	76	颗粒易粘连筛网, 易结成团, 不易成型
浸膏粉+微晶纤维素	85	颗粒大小均匀, 成型性良好

表 8 不同比例糊精与微晶纤维素制粒考察结果

Tab 8 Effect of different proportions of dextrin and microcrystalline cellulose on granules

糊精:微晶纤维素	休止角	成型率 /%	性状
2 : 1	30.56	92.28	易制粒, 易过筛, 颗粒均匀
1 : 1	30.91	83.06	易制粒, 易过筛, 细粉少
2 : 3	29.88	85.52	易制粒, 过筛后细粉较多

表 9 不同润湿剂制粒考察结果

Tab 9 Effect of different wetting agents on granules

润湿剂种类	制粒情况
水	易粘连, 颗粒呈条状, 制粒困难
50%乙醇	颗粒具黏性, 硬度较差, 颗粒松散
70%乙醇	成型性较好, 硬度较好, 颗粒均匀
90%乙醇	成型性较好, 硬度较好, 颗粒均匀

表 11 颗粒剂优化工艺验证

Tab 11 Validation of optimized process for granules

批号	外观性状	溶性	成品率 /%	水分 /%	五味子醇甲含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )
20211106	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	91.68	5.12	6.86
20211112	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	95.22	5.43	6.51
20211118	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	93.19	5.06	6.69

### 3 讨论

#### 3.1 指标成分选择

2020年版《中国药典》没有君药韭菜子含量测定的方法及相关对照品, 本研究选取了五味子醇甲含量作为评价指标, 对五味子醇甲进行含量测定, 其余辅助药材, 因药量占比较小未进行含量测定。

#### 3.2 提取工艺研究

采用单因素试验与 Box-Behnken 试验相结合, 以干浸膏得率及五味子醇甲含量作为评价指标, 确定提取时间、溶媒用量、提取次数的最佳参数。由于提取得到的药液存在大量杂质, 不利于后续颗粒质量标志物的含量测定, 为减少杂质对样品带来的影响, 采用水提醇沉工艺除杂, 并

2.4.4 颗粒剂干燥时间的考察 在干燥时间为 2 h 及以上时, 颗粒含水量变化相差不大, 且含水量低于 8.0%, 符合药典制剂要求, 综合考虑成本、药物有效成分等多方面因素, 确定将干燥时间 2 h 作为颗粒的最佳干燥时间 (见表 10)。

表 10 不同干燥时间对颗粒所含水分的影响

Tab 10 Effect of different drying time on moisture content

干燥时间 /h	水分 /%			
	1	2	3	平均值
1	8.91	8.66	8.83	8.80
2	6.52	6.94	6.28	5.58
3	4.91	4.53	4.62	4.69
4	4.67	4.16	4.08	4.30

2.4.5 颗粒验证性试验 按最佳制备工艺, 制备 3 批固肾止遗双子颗粒, 根据 2020 年版《中国药典》相关项下制剂工艺的规定, 对颗粒剂的外观性状、溶化性、水分、五味子醇甲含量等指标进行评估与测定, 判断 3 批成品颗粒的各项指标是否与药典中颗粒剂相关要求一致, 结果表明, 3 批固肾止遗双子颗粒大小、粒度均匀, 外观呈米黄色, 气微香, 溶化性、成品率、含水量各项指标均符合 2020 年版《中国药典》相关项下的规定 (见表 11)。

考察不同提取液相对密度、乙醇浓度对组方除杂工艺的影响, 通过计算干浸膏得率及五味子醇甲含量确定最佳除杂工艺并验证。结果表明固肾止遗双子颗粒的制备工艺稳定可控、合理可行。

### 参考文献

- [1] 卢野, 杨昆. 小儿遗尿症中医药治疗进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17 (86): 51-52, 54.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 39, 377.
- [3] 兰金旭, 王静, 张飞, 等. 韭菜子的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2020, 22 (11): 1879-1887.
- [4] 马艳春, 冯天甜, 韩宇博, 等. 五味子的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48 (11): 67-71.
- [5] 马鸿雁, 邓雨娇, 马倩, 等. 甘草的研究概况 [J]. 中药与临床, 2018, 9 (1): 59-62.

(收稿日期: 2022-11-08; 修回日期: 2023-01-12)

## 居家慢性病药物治疗管理研究专题

### 【编者按】

慢性病患者常合并多种疾病，需要同时服用多种药物。坚持药物治疗对于慢性病的控制至关重要，然而，我国慢性病用药依从性不佳现象非常普遍。而且，长期以来我国对慢性病患者的居家药物治疗缺乏管理，居民对药物治疗自我管理知识掌握严重不足，具备包括合理用药在内基本医疗素养的居民比例仅为 9.56%，能够正确阅读药品说明书的居民比例仅为 15%。因此，亟需优化社区慢性病管理，探索分级诊疗体系下全流程的居家慢性病管理模式，实现慢性病患者长期、全程、连续的药学监护，提高慢性病患者用药依从性，提升慢性病管控效果。本专题从我国慢性病药物治疗依从性研究现状、地图分布及地区之间的差异入手，深入了解慢性病居家药学服务的现状、研究热点和全球趋势，以期为我国慢性病药学服务的切入点和服务模式提供研究思路。

### 【特邀专家简介】



赵志刚，博士，主任药师/教授，博士研究生导师，1990 年毕业于北京大学医学部，现任北京天坛医院药学部主任、首都医科大学临床药学博士研究生导师、首都医科大学药学院临床药学系主任、北京市医院管理中心总药师。兼任国家药典委员会第十一届委员、中国健康促进基金会医药知识管理专项基金专家委员会主任委员、紫禁城国际药师论坛执行主席、中国医药新闻信息协会儿童安全用药分会会长、中日医学科技交流协会药学专业委员会主任委员等。同时担任《药品评价》(医院药学版)主编、《中南药学》副主编、《中国医院药学杂志》常务编委及多个杂志编委。发表各类学术文章 300 余篇，SCI 论文 45 篇。主编和参编 80 多部学术著作并出版。

## 中国“三高”慢性病患者药物治疗依从性差异与分布情况

殷雪梅<sup>1, 2</sup>，赵志刚<sup>3</sup>，闫宇佳<sup>1, 4</sup>，武明芬<sup>3\*</sup> (1. 首都医科大学临床药学系，北京 100069; 2. 北京市丰台区铁营社区卫生服务中心附属城外城社区卫生服务站，北京 100079; 3. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部，北京 100070; 4. 北京市昌平区回龙观社区卫生服务中心，北京 100096)

**摘要：目的** 回顾性分析我国高血压、糖尿病、高脂血症“三高”慢性病患者药物治疗依从性研究文献，了解慢性病患者药物治疗依从性研究现状及地理差异，为后续研究提供参考。**方法** 检索 PubMed、中国知网、万方和维普等国内外数据库，以“三高”患者为研究对象，筛选与药物治疗依从性研究相关的文献，分析不同地区药物治疗依从性的现状及差异，并应用 Excel 软件分析依从性分布情况。**结果** 最终纳入相关文献 277 篇。我国“三高”患者药物治疗依从性研究地区分布不均衡，北京 (33 篇)、广东 (27 篇)、上海 (25 篇) 等发达地区相关研究较多，其次是以江苏 (22 篇) 和浙江 (20 篇) 为代表的沿海地区，而西北和东北地区相关研究很少 (< 5 篇)。依从性判定方法多种多样，以 MMAS 量表应用最多，依从性在 37.80% ~ 95.50%。病种研究也有较大差异，高血压、糖尿病和高脂血症依从性研究数量占比分别为 70.40%、25.99%、1.44%。医师、护理人员、药师作为依从性干预者的比例分别为 25.41%、30.33%、21.31%。**结论** 我国“三高”患者药物治疗依从性存在明显的地理差异，越发达的地区，依从性研究越多，但仍缺乏全国范围的大样本研究，药师作为依从性干预者仍有较大的提升空间。

**关键词：**“三高”患者；用药依从性；差异；分布

中图分类号：R95

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2023)03-0706-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.024

基金项目：北京药学会 2020 年临床药学研究项目 (No.KY 2020-085-02)。

作者简介：殷雪梅，女，主管药师，在读硕士研究生，主要从事药品调剂工作，email: taikongyun@126.com

\*通信作者：武明芬，女，硕士，副主任药师，主要从事慢性病药物治疗管理与脑血管病合理用药，email: wmfing@163.com

## Differences and distribution of medication adherence among patients with chronic diseases in China

YIN Xue-mei<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhi-gang<sup>3</sup>, YAN Yu-jia<sup>1,4</sup>, WU Ming-fen<sup>3\*</sup> (1. Department of Clinical Pharmacy, Capital Medical University, Beijing 100069; 2. Chengwaicheng Community Health Service Station, Teying Community Health Center, Fengtai District, Beijing 100079; 3. Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070; 4. Huilongguan Community Health Center, Changping District, Beijing 100096)

**Abstract: Objective** To reveal the research status and geographical differences by retrospectively analyzing literatures on medication adherence among patients with chronic diseases in China, and to provide reference for adherence studies. **Methods** Domestic and foreign databases of PubMed, CNKI, Wanfang, and VIP were retrieved. Patients with hypertension, diabetes and hyperlipidemia were selected as the research subjects, and literatures on medication adherence were screened. The current status of and differences in medication adherence in different regions were compared and analyzed, and the distribution of medication adherence was analyzed by Microsoft Excel. **Results** Totally 277 literatures were included. Regional distribution imbalance was found in the medication adherence studies in China, with more studies conducted in Beijing (33 articles), Guangdong (27 articles), Shanghai (25 articles) and other developed areas, followed by coastal areas represented by Jiangsu (22 articles) and Zhejiang (20 articles), while very limited studies in northwest and northeast China (< 5 articles). There were various adherence assessments, and MMAS scale was the most widely used, with medication adherence ranging from 37.80% to 95.50%. There was also a great difference in the number of medication adherence studies, with hypertension, diabetes and hyperlipidemia accounting for 70.40%, 25.99% and 1.44%, respectively. Physicians, nurses and pharmacists as adherence interveners occupied 25.41%, 30.33% and 21.31%, respectively. **Conclusion** There are significant geographical differences in medication adherence of patients with chronic disease in China. The more developed the region, the more studies on adherence. Nationwide large sample studies are not found. Pharmacists as adherence interveners can do better jobs improvement.

**Key words:** patients with hypertension, diabetes and hyperlipidemia; medication adherence; difference; distribution

慢性病是指慢性非传染性疾病，是一类起病隐匿、潜伏期长、病程长且缓慢、病情迁延不愈、缺乏确切的生物病因证据、无明确“治愈”指征的疾病总称<sup>[1]</sup>。当前最常见且发病率较高的三种慢性病是高血压、糖尿病和高脂血症，简称“三高”<sup>[2]</sup>。调查发现，我国慢性病患者人数逐年递增，2019年因慢性病导致的死亡占总死人数的88.50%<sup>[3]</sup>。多项研究表明，用药依从性对疾病的治疗结局有重要影响<sup>[4-6]</sup>。用药依从性差会导致慢性病药物治疗受阻，血压、血糖、血脂控制达标率降低、不良反应事件增加及医疗经济负担加重。提高患者用药依从性是慢性病管理的重要措施，目前尚缺乏全国范围内药物治疗依从性的研究数据。本研究通过文献检索与分布图绘制的方法，对我国“三高”慢性病患者药物治疗依从性

研究进行对比分析，绘制依从性分布图以便更直观地了解用药依从性研究现状及地理差异。

### 1 资料与方法

#### 1.1 研究对象

纳入标准：以诊断为高血压或糖尿病或高脂血症的患者为研究对象，研究内容为药物治疗依从性，依从性判定标准明确，文献类型为研究论文，中文文献所属期刊评级为北大核心、中国科学引文数据库（SCSD）或中国科技论文与引文数据库（CSTPCD）。

排除标准：排除重复发表文献、个案报道、报纸摘要、综述及 meta 分析等类型的文献。

#### 1.2 检索策略

中文检索主题词/关键词。英文文献检索 PubMed 数据库，以 Title/Abstract= (“medication ad-



herence” or “medication compliance”) and (“hypertension” or “high blood pressure” or “T2DM” or “diabetes” or “HPL” or “hyperlipidaemia” or “hyperlipemia”) and (“China” or “Chinese”) 进行检索。检索结果以 Excel 表格导出, 剔除重复发表文献, 然后通过阅读题目和摘要对检索结果进行人工筛选, 最后通过阅读全文剔除与研究不相关或不符合纳入标准的文献, 最终筛选得到的文献进行数据提取, 汇总分析, 并绘制分布图。

### 1.3 区域划分标准

参考我国地理区域划分标准, 按文献病例来源划分为以下地区: 华北地区(北京、天津、河北、山西、内蒙古)、东北地区(黑龙江、吉林、辽宁)、华东地区(上海、江苏、浙江、安徽、福建、江西、山东)、华中地区(河南、湖北、湖南)、华南地区(广东、广西、海南)、西南地区(重庆、四川、贵州、云南、西藏)、西北地区(陕西、甘肃、青海、宁夏、新疆)。

### 1.4 统计学方法

阅读全文提取相关研究数据, 提取的内容包括患者来源、样本量、抽样方法、研究疾病(高血压、糖尿病、高脂血症)、研究类型(前瞻性研究、横断面研究、随机对照试验、队列研究)、依从性评估方法、干预措施、干预者、依从性研究结果(依从率、依从性评分、疾病控制达标率)。将提取的数据录入 Microsoft Excel 表格编排整理、汇总分析, 并绘制分布图。

## 2 结果

### 2.1 文献筛选结果

检索 PubMed 数据库初筛得到 221 篇英文文献, 检索中国知网、万方和维普数据库初筛得到 2046 篇中文文献, 删除重复文献、不符合研究主题和纳入标准的文献、雷同或重复发表文献, 最终纳入 277 篇中英文文献, 全部导入 Endnote 20 文献管理软件, 建立“依从性专题数据库”。文献筛选过程见图 1。

根据文献类型对 277 篇文献进行分类, 分为临床研究(122 篇)和调查问卷(155 篇)两种文献类型。其中按疾病种类分类, 高血压占比分别为 70.49% 和 70.32%, 糖尿病占比分别为 27.05% 和 25.16%, 高脂血症占比分别为 1.64% 和 1.29%, 合并症“三高”或其他慢性病占比分别为 0.82% 和 3.23%; 按评估方法分类, MMAS-4 (Morisky medication adherence scale-4) 量表占比分别为 28.69% 和 45.16%, MMAS-8 量表占比分别为 14.75% 和 18.06%, 其他依从性评估方法(自行设计调查问卷、

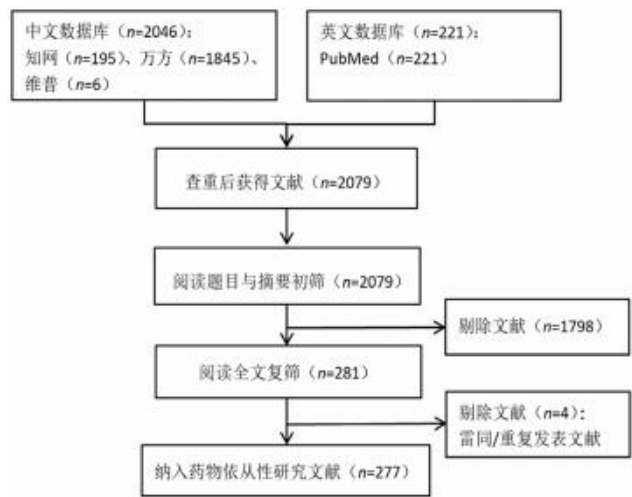


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flow chart of literature screening

维克孙林医师信任量表 WFPTS、严格按照遵医嘱服药天数计算依从性、用药依从性量表、药物依从性积分量化评估、高血压用药依从性量表、根据患者坚持服药时间长短分类、日历记录、依从性计算公式、续配盒用药依从性量表) 占比分别为 56.56% 和 36.77%; 按干预者分类, 医师占比为 25.41%, 护理人员占比 30.33%, 药师占比为 21.31%, 其他(家庭成员、医疗联合干预、质谱检测) 占比为 22.95%; 按研究类型分类, 临床试验中随机对照研究占比为 65.57%, 队列研究占比为 11.48%, 前瞻性研究占比为 22.95%, 调查问卷中队列研究占比 0.65%, 横断面研究占比 99.35% (见表 1)。

表 1 纳入文献基本信息情况 [n(%)]

Tab 1 Basic information of included articles [n(%)]

项目	分类	临床试验	调查问卷	合计
按疾病种类	高血压	86 (70.49)	109 (70.32)	195 (70.40)
	糖尿病	33 (27.05)	39 (25.16)	72 (25.99)
	高脂血症	2 (1.64)	2 (1.29)	4 (1.44)
	合并症	1 (0.82)	5 (3.23)	6 (2.17)
按评估标准	MMAS-4 量表	35 (28.69)	70 (45.16)	105 (37.91)
	MMAS-8 量表	18 (14.75)	28 (18.06)	46 (16.61)
	其他	69 (56.56)	57 (36.77)	126 (45.49)
按干预者	医师	31 (25.41)	—	—
	护理人员	37 (30.33)	—	—
	药师	26 (21.31)	—	—
	其他	28 (22.95)	—	—
依从性表示方法	依从率	99 (81.15)	143 (92.26)	242 (87.36)
	依从性评分	21 (17.21)	8 (5.16)	29 (10.47)
	其他	2 (1.64)	4 (2.58)	6 (2.17)
研究类型	随机对照研究	80 (65.57)	—	80 (28.88)
	队列研究	14 (11.48)	1 (0.65)	15 (5.42)
	前瞻性研究	28 (22.95)	—	28 (10.11)
	横断面研究	—	154 (99.35)	154 (55.60)
总计		122	155	277

注 (Note): “—” 表示没有相关数据 (Represents no data)。

## 2.2 我国各省市用药依从性研究分布情况

将用药依从性研究文献按照发文量、依从率(以 MMAS-4 量表评估)绘制分布图,将干预者情况绘制柱形图,直观对比分析我国各省市用药依从性研究发文量、用药依从率及干预者的差异。高脂血症患者依从性相关研究文献较少,故未单独绘制。

图 2A 为我国各省市“三高”患者用药依从性研究发文量分布图,其中依从性研究发文量较多的是北京(33 篇)、广东(27 篇)、上海(25 篇),其次是沿海地区,以江苏(22 篇)、浙江(20 篇)、四川(15 篇)为代表;发文量较少的是西北、东北地区,如宁夏(2 篇)、甘肃(3 篇)、黑龙江(2 篇)、吉林(2 篇)。

图 2B 为高血压患者用药依从性百分比分布图,华东地区高血压患者用药依从性高,比如上海依从率为 67.65%;华中地区高血压患者用药依从性低,比如湖南依从率为 28.80%。

图 2C 为糖尿病患者用药依从性百分比分布图,我国西北地区糖尿病患者用药依从性高,比如新疆依从率为 83.70%;华中地区糖尿病患者用药依从性低,比如湖北依从率为 18.80%。

图 2D 为各省市不同干预者开展用药依从性干预工作情况分布。蓝色表示护理人员,发文数最多;其次是医师,以绿色表示;红色表示药师,发文数最少。

## 2.3 我国“三高”患者用药依从性研究现状

我国“三高”患者用药依从性研究不同地区差异较大,高血压患者依从性研究开展的最多,其次是糖尿病,高脂血症最少。由于各文献中,用药依从性判断标准及研究方法不同,难以直接进行对比分析,为此,本研究选取具有统一评估标准的代表性文献进一步对比分析(见表 2)。选取标准为:① 研究纳入样本量 > 500 例;② 药物依从性评估标准为 Morisky 依从性量表(MMAS-4 或 MMAS-8);③ 研究结果以依从率表示。部分地区因不能满足选取标准未纳入代表性研究。由表 2 可知,总共有 11 项研究入选,其中 7 项研究病种为高血压,4 项研究病种为糖尿病。高血压依从性研究纳入病例数最多为 2445 例,糖尿病依从性研究纳入病例数最多为 1156 例。入选文献有 1 项前瞻性研究、1 项随机对照研究、9 项横断面研究。我国各地区高血压、糖尿病患者用药依从率有很大差异,高血压患者依从性研究显示,华东地区的上海高血压患者依

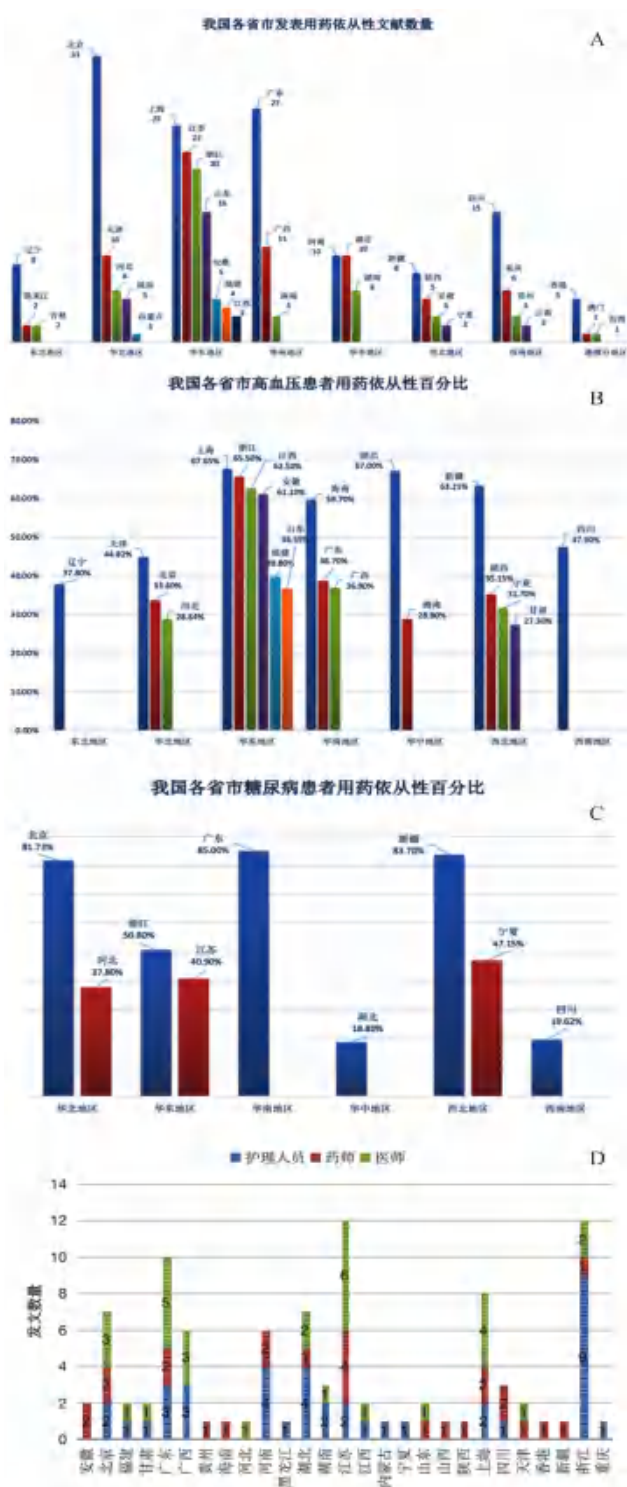


图 2 我国 31 省份“三高”慢性病患者用药依从性研究分布  
Fig 2 Distribution of medication adherence research among “3 highs” patients in 31 provinces in our country

从性最高,为 83.00%<sup>[8]</sup>;糖尿病患者依从性研究显示,西北地区的新疆糖尿病患者依从性最高,为 83.70%<sup>[16]</sup>。

## 2.4 我国 2000—2021 年用药依从性研究文献发表数量

我国近 20 年用药依从性研究发文量呈现两

表 2 我国各地区“三高”慢性病患者药物依从性代表性研究

地区	题名	病种	样本量 (n)	研究类型	评判依据	结果
华北	北京地区高血压患者用药依从性及影响因素调查与研究 <sup>[7]</sup>	高血压	1382	前瞻性研究	MMAS-8	干预前后用药依从性分别为 67.66%、74.24%
华东	上海市社区高血压患者服药依从性现状及其影响因素分析 <sup>[8]</sup>	高血压	2128	横断面研究	MMAS-8	用药依从性为 83.00%
华中	Mediating effect of self-efficacy on the relationship between medication literacy and medication adherence among patients with hypertension <sup>[9]</sup>	高血压	790	横断面研究	MMAS-8	用药依从性为 39.10%
西北	社区老年高血压患者服药依从性影响因素的路径分析 <sup>[10]</sup>	高血压	1157	横断面研究	MMAS-4	用药依从性为 63.21%
西南	Effects of Pharmacist Intervention on Community Control of Hypertension: A Randomized Controlled Trial in Zunyi, China <sup>[11]</sup>	高血压	636	随机对照研究	MMAS-8	干预组基线用药依从性为 78.30%，6 个月为 95.50%；对照组基线用药依从性为 62.80%，6 个月为 70.10%
东北	高血压患者药物治疗依从性调查及护理对策分析 <sup>[12]</sup>	高血压	2342	横断面研究	MMAS-4	用药依从性为 37.80%
港澳台	Medication adherence and blood pressure control among hypertensive patients with coexisting long-term conditions in primary care settings: a cross-sectional analysis <sup>[13]</sup>	高血压	2445	横断面研究	MMAS-8	用药依从性为 53.40%
华北	基于计划行为理论的北京市社区 2 型糖尿病患者服药依从性影响因素研究 <sup>[14]</sup>	糖尿病	1156	横断面研究	MMAS-8	用药依从性为 77.16%
华东	Factors influencing Medication Non-adherence among chinese older adults with diabetes mellitus <sup>[4]</sup>	糖尿病	1002	横断面研究	MMAS-4	用药依从性为 80.10%
华中	糖尿病患者服药依从性影响因素研究 <sup>[15]</sup>	糖尿病	549	横断面研究	MMAS-8	用药依从性为 69.22%
西北	老年糖尿病患者药物依从性影响因素的因子分析 <sup>[16]</sup>	糖尿病	835	横断面研究	MMAS-4	用药依从性为 83.70%

个长高峰（见图 3）。第一个增长高峰是 2009—2012 年，在 2007 年之前，年发文量仅为个位数，2009 年发文量突破 10 篇并呈现快速增长趋势，2012 年达到第一个峰值 16 篇。这一增长高峰与我国临床药学的迅速发展密切相关，这个时期正处于医院药学服务从调剂供应转到药学服务为主，各大医院相继开设药物咨询门诊，全国范围内开展临床药师培训<sup>[17]</sup>。第二个增长高峰是在 2014—2017 年，年度发文量突破 20 篇，2017 年发文量达到 30 篇，2018 年发文量显著下降，之后又逐渐回升。分析原因如下：2015 年底国家卫计委、国家中医药管理局联合发文《关于进一步规范社区卫生服务管理和提升服务质量的指导意见》，提出推进家庭医生签约服务，提升老年人、慢性病等特殊人群健康养护，研究者对老年慢性病患者的用药管理更加关注，社区医师、护理人员、药师开始探索提高老年慢性病患者的依从性的干预措施，因此，2016 年我国各地区用药依从性研究文献数量快速增长，其中吉林文献数量破零。为落实国家“十三五”规划纲要，国务院办公厅印发《深化医药卫生体制改革 2017 年重要工作任务》，我国各省市相继启动医疗改革，公立医院全面取消药品加成，研究者的关注重点转移到医疗改革与药师转型方面，所以 2018 年用药

依从性研究文献发表数量显著减少。2019—2021 年，随着医疗改革的稳步推进，用药依从性研究发文量又逐步回升。

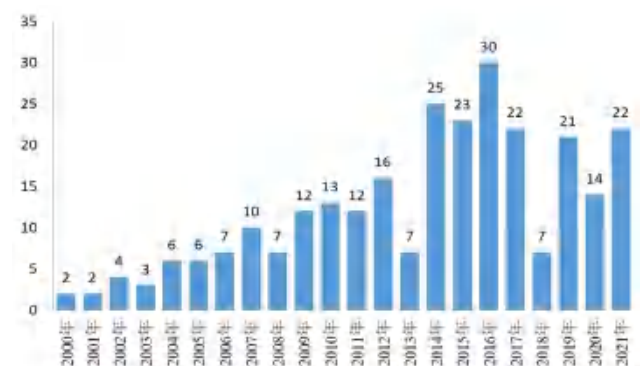


图 3 2000—2021 年我国“三高”慢性病患者用药依从性年度发文量  
Fig 3 Annual publications on medication adherence of patient with hypertension, diabetes and heperlipidemia from 2000 to 2021 in China

2.5 不同干预者对用药依从性的影响差异

对药物治疗依从性干预者进行分析，主要为医师、护理人员及药师。122 篇临床试验中有 94 篇是医疗相关人员独自提供用药依从性干预研究，其余 28 篇是家庭成员、自我监测、质谱检测和医疗人员联合干预，药师作为依从性干预者仅 26 篇（21.31%）。由图 4 可知，不同干预者对依从性的干预措施大致相同，主要以用药指导、健康教育、随访、生活方式干预及心理干预为基础，在此基





理模式,通过实时采集住院患者血糖数据,提高糖尿病患者血糖管理效率,对生活行为方式调整情况提供参考。西北地区对糖尿病患者的政策支持更实事求是,社会支持是提高患者用药依从性的重要方法之一<sup>[26]</sup>。

本研究显示,高脂血症在“三高”患者用药依从性中研究数量最少,发文量低。高脂血症是一种不易被发觉的疾病,它治疗单一,用药品种少,服用方法简单,患者不易产生混乱现象,因此关注度不高。据《血脂异常基层诊疗指南(2019)》显示,导致我国冠心病死亡率增加的首要原因是血脂异常水平升高,占比为 77.00%,明显超过其他慢性病因素。因此,高脂血症患者的用药依从性不容忽视,应加强高脂血症患者用药依从性研究,提升血脂水平达标率。

### 3.2 不同干预者对患者用药依从性的影响

坚持服药是一个复杂的过程,患者可能会基于生理、心理、经济和社会方面的考虑导致用药依从性受到影响<sup>[27]</sup>。结合国内外研究经验,用药依从性干预工作需因地因时而异,结合政府支持,医疗相关人员、家庭成员的共同努力,提高慢性病患者用药依从性。在 2003 年关于用药依从性的报告中,WHO 引用了 Haynes 等<sup>[28]</sup>的声明:“提高干预措施的有效性,比任何特定的医学治疗对患者的健康影响大得多”。本研究结果显示,无论是医师、护理人员还是药师在开展用药依从性干预时,主要工作是开展健康教育、随访监测、用药指导、心理干预、生活行为干预、家庭和社会支持,这些都是基于人文需求和疾病健康指导,以人为本的干预工作有助于增强慢性病患者坚持服药的信心,提高用药依从性。

美国心脏病学会《药物依从性和血压控制》声明中提出,由临床药师主导的患者教育和咨询服务更能显示出一定优势,提供的干预措施更多样化。本研究显示,我国药师在患者用药依从性管理工作的参与力度薄弱。有文献研究指出,家庭药师可根据治疗方案评估、历史用药回顾、用药方案调整,为患者提供个性化用药指导,通过随访答疑,增强患者合理用药意识,提高用药依从性<sup>[29]</sup>。与医师和护理人员相比,药师在药学方面更具专业性,在用药依从性提高的工作中效用更强。2018 年我国药学服务工作下沉社区卫生服务机构,社区药师与患者接触最紧密,沟通交流最方便,挖掘空间更大。在提高药学服务方面,社区药师可以以慢性病患者为突破口,以患

者常用药为基础开展工作,规范患者合理用药,提高患者用药依从性和血压、血糖、血脂达标率。

### 3.3 衡量用药依从性研究的不同评估方法

目前用药依从性评估方法有患者自我报告、药片(丸)计数、实验室监测、电子药物监测、调查问卷、合并多种调查方法和统计建模<sup>[30]</sup>等,MMAS 量表在慢性病用药依从性评估中应用最多,而且已经在全球多个国家验证过。但是,目前仍没有用药依从性评估的金标准,有文献指出,金标准不应作为用药依从性评估的主要衡量标准,它可在临床实践中被考虑作为一种工具,以验证用药依从性干预措施的有效性,再通过干预结果来判定可能确定的最终的用药依从性评估金标准<sup>[30]</sup>。本研究中,为避免因评估方法不同导致的判断偏倚,均以 MMAS-4 依从性评估量表作为统一标准,对比分析采用 MMAS-4 评估的用药依从性文献数据。MMAS-4 依从性评估量表是目前应用较广的一种,根据相关文献评价结果,MMAS-4 的 Cronbach  $\alpha$  系数为 0.760,折半信度为 0.751, Spearman 相关系数为 0.516,表明其内部一致性及稳定性较好,可有效评估我国患者用药依从性<sup>[31]</sup>。

## 4 结语

本研究以分布图的方式直观地展现了我国“三高”患者用药依从性研究现状与差异。结果显示,我国用药依从性存在明显地区差异,发达地区研究数量及用药依从性均显著高于欠发达地区,因此应加强欠发达地区用药依从性研究;药师应发挥其药学专长,推动药学服务工作开展,在用药依从性工作中发挥积极作用。

## 参考文献

- [1] 田华,李沐,张相林.慢性病管理模式的国内外现状分析[J].中国药房,2016,27(32):4465-4468.
- [2] 张阳,王强,史文硕,等.体医融合对中老年“三高”慢性病患者体成分及骨密度状况的影响[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2020,43(5):505-510.
- [3] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020年)[J].营养学报,2020,42(6):521.
- [4] Xu NZ, Xie SY, Chen YY, et al. Factors influencing medication non-adherence among chinese older adults with diabetes mellitus [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(17): 6012.
- [5] Wang Y, Wang JW, Wang Y, et al. Monitoring antihypertensive medication adherence by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method establishment and clinical application [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 78

- (4): 581-596.
- [6] 陈朝聪, 蔡水苗, 唐庆业. 全程药学服务对高龄高血压住院患者治疗安全性和依从性的影响 [J]. 中华高血压杂志, 2021, 29 (8): 780-783.
- [7] 武明芬, 朱斌, 徐晓涵, 等. 北京地区高血压患者用药依从性及影响因素调查与研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (21): 2255-2260.
- [8] 陈希, 严青华, 吴菲, 等. 上海市社区高血压患者服药依从性现况及其影响因素分析 [J]. 现代预防医学, 2022, 49 (1): 72-76.
- [9] Shen Z, Shi S, Ding S, et al. Mediating effect of self-efficacy on the relationship between medication literacy and medication adherence among patients with hypertension [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 569092.
- [10] 王永馨, 李小菊, 井明霞, 等. 社区老年高血压患者服药依从性影响因素的路径分析 [J]. 中国全科医学, 2021, 24 (4): 503-508.
- [11] Li Y, Liu G, Liu C, et al. Effects of pharmacist intervention on community control of hypertension: a randomized controlled trial in Zunyi, China [J]. *Glob Health Sci Pract*, 2021, 9 (4): 890-904.
- [12] 李艳. 高血压患者药物治疗依从性调查及护理对策分析 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2017, 25 (12): 893-897.
- [13] Li YT, Wang HHX, Liu KQL, et al. Medication adherence and blood pressure control among hypertensive patients with coexisting long-term conditions in primary care settings: a cross-sectional analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95 (20): e3572.
- [14] 吴瑶, 林燕铭, 郭恺, 等. 基于计划行为理论的北京市社区 2 型糖尿病患者服药依从性影响因素研究 [J]. 中国全科医学, 2021, 24 (34): 4398-4403.
- [15] 黄笋, 文艳玲, 陈健. 糖尿病患者服药依从性影响因素研究 [J]. 中国社会医学杂志, 2016, 33 (4): 368-370.
- [16] 崔王飞, 井明霞, 李小菊, 等. 老年糖尿病患者药物依从性影响因素的因子分析 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (20): 5098-5101.
- [17] 屈建, 刘高峰, 朱珠, 等. 我国医院药学学科的建设与发展 (上) [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34 (15): 1237-1246.
- [18] 陈国伶, 沈勤, 卢晓杰, 等. 2 型糖尿病患者医养护一体化签约服务管理效果评价 [J]. 预防医学, 2019, 31 (1): 100-102.
- [19] 宋建华, 梁彤, 孙晨. 2 型糖尿病患者社区护理干预效果 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2009, 17 (2): 193-194.
- [20] 王唯, 李情, 李锋. 医院-社区-家庭三级干预模式对提高老年 2 型糖尿病患者治疗依从性影响研究 [J]. 重庆医学, 2014, 43 (13): 1659-1661.
- [21] Stirratt MJ, Curtis JR, Danila MI, et al. Advancing the science and practice of medication adherence [J]. *J Gen Intern Med*, 2018, 33 (2): 216-222.
- [22] 戴小霞, 史涛, 文晓丽. 门诊老年慢性病患者用药依从性影响因素分析与药师干预措施 [J]. 中国卫生标准管理, 2021, 12 (11): 74-77.
- [23] Kim YY, Lee JS, Kang HJ, et al. Effect of medication adherence on long-term all-cause-mortality and hospitalization for cardiovascular disease in 65 067 newly diagnosed type 2 diabetes patients [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 12190.
- [24] 宋佳丽, 杨静玮, 张丹薇, 等. 我国华中地区三省年龄 35 ~ 75 岁成人高血压知晓、治疗和控制情况 [J]. 中华高血压杂志, 2019, 27 (11): 1054-1060.
- [25] 严小芳, 杨静玮, 白雪珂, 等. 华东地区 64 万成年人高血压知晓、治疗和控制情况 [J]. 中华高血压杂志, 2021, 29 (2): 200.
- [26] 刘洋洋, 张冰, 郑颖, 等. 药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制的影响分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (23): 2437-2440.
- [27] Natarajan N, Putnam W, van Aarsen K, et al. Adherence to antihypertensive medications among family practice patients with diabetes mellitus and hypertension [J]. *Can Fam Physician*, 2013, 59 (2): e93-e100.
- [28] Brown MT, Bussell JK. Medication adherence: WHO cares? [J]. *Mayo Clin Proc*, 2011, 86 (4): 304-314.
- [29] 陈宇红, 王国庆, 石蓉, 等. 家庭药师参与家庭医师提供药学服务的应用研究 [J]. 河北医药, 2022, 44 (12): 1900-1903, 1907.
- [30] Kreys E. Measurements of medication adherence in search of a gold standard [J]. *J Clin Path*, 2016, 2 (8): 43-47.
- [31] 李坤, 梁会营, 李恂, 等. Morisky 问卷应用于社区高血压患者服药依从性评价的信度和效度分析 [J]. 中华高血压杂志, 2010, 18 (11): 1067-1070.

(收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2023-01-05)



## 居家药学研究现状与热点文献计量学分析

武明芬, 朱斌, 刘腾, 赵志刚\* (首都医科大学附属北京天坛医院 药学部, 北京 100070)

**摘要:** **目的** 分析居家药学的研究现状与热点, 为我国居家药学研究与家庭药师培养提供参考。**方法** 在 Web of Science 和中国知网数据库中检索居家药学相关文献。利用 CiteSpace 5.8.R3 和 VOSviewer1.6.18 软件对发文量、期刊、作者、国家、机构和关键词等文献计量学指标进行定性和定量分析。**结果** 共纳入文献 1302 篇, 其中英文文献 1214 篇。英文年发文量呈快速增长趋势, 中文发文量自 2018 年开始迅速增长。英文发文量第一的期刊、作者、国家和机构分别为 *Journal of the American Pharmacists Association* (89 篇)、Lisa Dolovich (9 篇) 和 William Hogg (9 篇)、美国 (474 篇) 及多伦多大学 (31 篇)。中文发文量第一的期刊、作者和机构分别为《中国药业》(9 篇)、吴晓玲 (5 篇) 和广东省中西医结合医院 (5 篇)。慢性病药物治疗管理和用药依从性研究是目前居家药学的研究热点。**结论** 居家药学研究关注度越来越高, 美国是最多产的国家, 加拿大的研究机构较为集中, 我国尚处于居家药学研究初步探索阶段, 研究质量还需进一步提升, 不同研究机构之间应加强合作。

**关键词:** 居家药学; 家庭药师; 文献计量学; 现状; 热点

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0714-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.025

### Bibliometrics analysis of research status and hotspots of home pharmacy

WU Ming-fen, ZHU Bin, LIU Teng, ZHAO Zhi-gang\* (*Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070*)

**Abstract: Objective** To analyze the research status and hotspots of home pharmacy's, and provide references for home pharmacy research and family pharmacists training in China. **Methods** Literatures related to home pharmacy were retrieved in Web of Science and CNKI databases. were conducted on the bibliometric indicators of literature, such as the annual publications, journals, authors, countries, institutions, and keywords were quantitatively and qualitatively analyzed with CiteSpace 5.8.R3 and VOSviewer1.6.18 software. **Results** Totally 1302 articles were included, including 1214 English articles. The annual publications in English showed a rapid growth, while the publications in Chinese began to grow rapidly in 2018. The journal, author, country, and institution with the most publications in English were "*Journal of the American Pharmacists Association*" (89 articles), Lisa Dolovich (9 articles) and William Hogg (9 articles), the USA (474 articles) and the University of Toronto (31 articles). The journal, author, and institution with the most publications in Chinese were "China Pharmaceuticals" (9 articles), WU Xiao-ling (5 articles), and Guangdong Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (5 articles). Medication management of and medication adherence to chronic diseases were the current research hotspots. **Conclusion** Increasing attention has been paid to the research of home pharmacy. The United States has published the most papers so far, while Canada has more research institutions, China is still in the preliminary stage of home pharmacy research. The quality of research needs improvement, and cooperation between research institutions should be strengthened.

**Key words:** home pharmacy; family pharmacist; bibliometrics; status; hotspot

基金项目: 北京药学会 2020 年临床药学研究项目 (No.KY 2020-085-02)。

作者简介: 武明芬, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事慢性病药物治疗管理与脑血管病合理用药研究, email: wmfing@163.com

\*通信作者: 赵志刚, 男, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事医院药学与药事管理研究, email: 1022zzg@sina.com

居家老年慢性病患者需要长期服药控制,随之而来的用药问题频发。研究证实,药师主导的居家药学服务能够识别并减少患者用药相关问题,提高临床治疗效果,降低治疗成本,并能优化患者的生活质量<sup>[1-5]</sup>。居家药学服务是药学服务向家庭用药管理的延伸,是药师为居家药物治疗患者上门提供普及健康知识,开展用药评估和用药教育,指导药品贮存和使用,进行家庭药箱管理,提高患者用药依从性等个体化、全程、连续的药学服务<sup>[6]</sup>。

文献计量学通过分析定量(如发文量、引用量)和定性因素(如作者、机构和国家的特征和分布),可以概述其随时间的发展前沿及热点,定位引文及参考文献突现情况,并探索特定研究主题的未来趋势<sup>[7-10]</sup>。本文通过文献计量学方法对国内外居家药学研究进行分析,以期了解居家药学的现状与热点趋势,为我国居家药学的研究及家庭药师的培养提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源

选择 Web of Science Core Collection (WoSCC) 数据库为英文文献检索平台, Index = SCI-Expanded, 检索式为 Topic = "home pharmacy" or "home care pharmacy practice" or "home pharmaceutical services" or "home pharmaceutical care" or "family pharmaceutical care" or "family pharmacist", 文献类型为 "Article", 语种限定为 "English"。选择中国知网 (CNKI) 为中文文献检索平台, 检索式为: 主题 = "居家药学" or "家庭药师", 选择 "同义词扩展", 文献类型为 "学术期刊" 和 "学位论文", 语种限定为 "中文"。检索时间均为建库至 2022 年 3 月。

### 1.2 文献筛选与分析

纳入与居家药学或家庭药师主题相关的文献, 全部导入 NoteExpress3.0 文献管理软件, 建立中文和英文两个专题数据库, 双人核对, 剔除不符合主题的文献并检查记录的完整性。利用 Excel 2017 对期刊、年发文量及被引频次进行统计分析。利用 CiteSpace 5.8.R3 对作者、国家及机构进行共现分析, 以关键词为节点进行聚类 and 突现分析; 利用 VOSviewer 1.6.18 对关键词进行共现分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 年度发文量与引用量

共纳入 1214 篇英文和 88 篇中文文献。居家药学相关英文文献最早发表于 1992 年, 之后发文量逐年递增, 2020 年最高, 为 113 篇。而中文直到 2008 年才发表第一篇相关文章, 之后 10 年仅有 4 篇相关文章发表。2018 年开始发文量迅速增长, 从 9 篇增加到 2021 年的 24 篇。

截至 2022 年 3 月, 英文文献的总被引频次为 21 047 次, 去除自引 20 531 次, 篇均被引频次 17.01 次。被引频次第一的是 1996 年发表的一项随机对照研究 (206 例)<sup>[11]</sup>, 被引 388 次, 研究内容是评价临床药师对门诊老年多重用药患者持续干预的效果; 被引频次第二的是一篇老年人不适当处方清单共识研究<sup>[12]</sup>, 被引 335 次, 该研究制订了一个有效的老年人不适当处方清单, 清单制订专家组包括家庭药师在内。被引频次第三的是 2007 年发表的一项随机对照研究 (314 例)<sup>[13]</sup>, 被引 308 次, 该研究评价了药师干预是否能改善低收入心力衰竭患者的用药依从性和健康结局。中文文献被引频次第一的是 2019 年中国医院协会药事专业委员会发布的《医疗机构药学服务规范—居家药学服务规范》<sup>[14]</sup>, 被引 33 次; 其次是吴晓玲教授团队发表的《家庭药师制度的构建与实践探索》<sup>[15]</sup>, 是我国首个由政府主导的居家药学服务实践探索; 第三是《家庭药师服务标准与路径专家共识》<sup>[16]</sup>。中英文文献被引频次与发文量均呈现逐年增长趋势, 具体见图 1 (因检索时间截至 2022 年 3 月, 故统计不计入 2022 年发表的文献)。

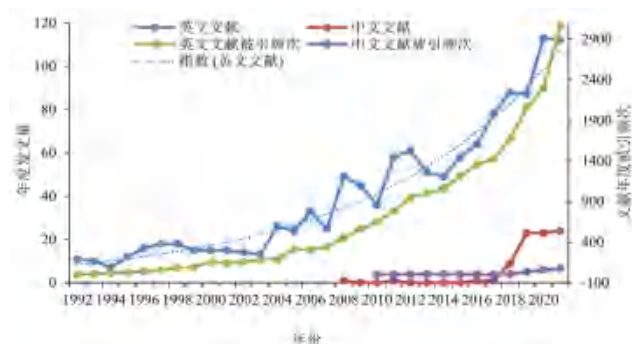


图 1 中英文文献的年度发文量及被引频次

Fig 1 Annual publications and citations of Chinese and English literatures

### 2.2 发文期刊

英文期刊中, *Journal of the American Pharmacists Association* 以 89 篇发文量排第一, h 指数为 16; *Journal of Pharmaceutical Sciences* 的 h 指数、总被引频次、篇均被引频次、影响因子和 JCR 分区均排名第一, 在发文量中排第三 (43 篇)。中文期刊中, 《中国药业》发文量 9 篇排第一, 《今日药学》总被引频次和篇均被引频次均排第一 (见表 1)。

### 2.3 作者合作网络分析

应用 CiteSpace 5.8.R3 软件<sup>[17-18]</sup>对作者的合作网络进行分析 (见图 2)。图 2 中圆形的节点代表发文量  $\geq 2$  的作者, 节点在网络中的重要作用以中介中心性来表示, 中心性数值越大, 表明此节点在合作网络中的桥梁作用越好。如图 2A 所示

表 1 居家药学中英文文献发文量前 5 位期刊

Tab 1 Top 5 journals of Chinese and English literatures on home pharmacy

类别	排序	期刊名称	发文量		占比 / %		h 指数	被引频次	篇均被引频次	JCR		
			占比	占比	IF2021	类别				类别排序	分区	
英文	1	Journal of the American Pharmacists Association	89	7.33	16	777	8.73	2.118	Pharmacology & Pharmacy	227/279	Q4	
	2	American journal of health-system pharmacy	52	4.43	19	1096	16.36	2.98	Pharmacology & Pharmacy	180/279	Q3	
	3	Journal of pharmaceutical sciences	43	3.53	20	1370	33.41	3.784	Pharmacology & Pharmacy	125/279	Q2	
	4	Annals of Pharmacotherapy	41	3.54	17	742	17.26	3.463	Pharmacology & Pharmacy	148/279	Q3	
	5	International Journal of Clinical Pharmacology	33	2.86	12	433	13.12	2.054	Pharmacology & Pharmacy	185/279	Q3	
中文	1	中国药业	9	10.23	—	4	0.44	—	—	—	—	
	2	中国合理用药探索	5	5.68	—	6	1.20	—	—	—	—	
	3	今日药学	3	3.41	—	33	11.00	—	—	—	—	
	4	临床药物治疗杂志	3	3.41	—	20	6.67	—	—	—	—	
	5	中国药房	3	3.41	—	8	2.67	—	—	—	—	

注 (Note): “—” 表示不适用 (represents not applicable)。

(设置时间切片为 8), 来自加拿大麦克马斯特大学家庭医学系的 Lisa Dolovich 教授和加拿大渥太华大学家庭医学系的 William Hogg 教授发文量 9 篇 (0.74%) 并列第一; 加拿大渥太华大学家庭医学系助理教授 Barbara Farrell 发文量 8 篇 (0.66%) 排第二。英文高产作者之间有一定的合作关系, 但是中心性均小于 0.1, 说明高产作者的个人影响力还比较弱。如图 2B 所示, 中文研究者中, 广东省中西医结合医院的吴晓玲教授发文 5 篇 (5.68%) 居第一; 广东省深圳市罗湖区人民医院药学部的邹绮雯和曹伟灵发文量 4 篇 (4.55%), 并列排第二, 其余作者发文量在 1~3 篇。中文作者的合作网络仅限于本单位同事之间。

2.4 国家 / 地区及机构合作网络分析

发文量前 5 名的国家 / 地区和机构见表 2, 国家 / 地区和机构合作网络分析见图 3。居家药学相关研究发文量最多的国家 / 地区是美国, 其次为加拿大、英格兰、澳大利亚和日本。美国最早于 1992 年在居家药学领域发表相关文章, 之后在此领域的发文量一直保持遥遥领先, 与其他国家之间的合作也比较密切, 中心度为 0.38, 说明美国在此领域起到了纽带作用, 为其他国家之间在此领域中的合作交流搭建了桥梁。加拿大和英格兰最早发文时间为 1994 年, 英格兰 (中心度 0.23) 在此领域的桥梁作用要优于加拿大 (中心度 0.07)。

由图 3B 和表 2 可以看出, 居家药学发文量排第一的研究机构为 University Toronto, 其次为 University Montreal、McMaster University、University Ottawa 和 University Sydney。多伦多大学 1999 年开始在居家药学方面发表文章, 随后发文量逐年增加。排名前 5 位的大学之间均有一定的合作关系, 但是中介中心性均小于 0.1, 说明高产研究机构的影响力较弱。

2.5 关键词的共现、聚类 and 突现分析

表 2 英文发文量前 5 名的国家 / 地区和机构

Tab 2 Top 5 countries/regions and institutions in the number of articles published in English

类别	排名	名称	发文量		占比 / %	中介中心性	最早发文年份
			发文量	占比 / %			
国家 / 地区	1	美国	474	39.04	0.38	1992	
	2	加拿大	158	13.01	0.07	1994	
	3	英格兰	91	7.50	0.23	1994	
	4	澳大利亚	87	7.17	0.15	1999	
	5	日本	57	4.70	0.01	2008	
机构	1	University Toronto	31	2.55	0.05	1999	
	2	University Montreal	25	2.06	0.04	2009	
	3	McMaster University	23	1.89	0.01	2003	
	4	University Ottawa	22	1.81	0.01	2001	
	5	University Sydney	21	1.73	0.02	2000	

2.5.1 关键词的共现分析 本研究采用 VOSviewer 1.6.18 进行关键词共现分析, 共探测到英文关键词 4595 个, 频次大于 10 的 163 个英文关键词得到 6 个聚类 (见图 4A)。聚类 1 “药师” (pharmacist, 红色) 包含 38 个关键词和 152 条连线, 药师对患者的健康知识、信念和行为展开研究; 聚类 2 “管理” (management, 绿色) 包含 37 个关键词和 138 条连线, 研究内容为居家药物治疗管理; 聚类 3 “多学科药学服务” (polypharmacy, 蓝色) 包含 26 个关键词和 74 条连线, 社区药师与家庭医师或者护理人员建立多学科团队开展药学服务。通过对高频关键词及关联强度随时间的演变进行深入分析, 可以推测出社区药师开展的药物治疗管理服务是目前居家药学的研究热点, 研究内容为提高社区老年慢性病患者用药依从性和降低用药风险 (见图 4B)。

共探测到 385 个中文关键词, 频次大于 5 的有 14 个关键词。中文关键词共得到 3 个聚类 (见图 4C), 聚类 1 (红色) 研究内容为药师对社区高血压和糖尿病患者开展居家药学服务; 聚类 2 (绿色) 为家庭药师开展药物治疗管理服务; 聚类 3



(蓝色)为社区中心以医联体的方式对慢性病患者开展用药管理服务。通过关键词叠加可视化图谱可以看出,以医联体为主体的居家药学服务是目前中文研究的热点(见图 4D)。共现频次排名前 3 位的中文关键词是“药学服务”(20 次,9 条连线,总强度 22)、“家庭药师”(12 次,6 条连线,总强度 12)和“居家药学服务”(9 次,6 条连线,总强度 10),通过对热门关键词及关联强度进行分析,可以推测出包括家庭药师、临床药师和社区药师在内的药师提供的慢性病药物治疗管理服务是当前我国居家药学的研究热点,与英文研究热点基本一致。

### 2.5.2 关键词的聚类 and 突现分析 使用 CiteSpace

5.8.R3 对关键词进行聚类 and 突现分析(见图 5 和表 3)。表 3 中列出排名前 10 位的聚类,Size 值为聚类团所含文献数量;S 值用来衡量聚类成员的同质性,S > 0.7 表明网络模块具有较好的同质性和聚类效果。本研究中文得到 21 个聚类,Size > 10 的聚类团有 4 个;英文得到 68 个聚类,Size > 10 的聚类团有 10 个。由表 3 可见,英文以美国医院药剂师学会(American Society of Hospital Pharmacists, ASHP)开展的全国性调查为主要研究类型,内容侧重于老年潜在不适当用药和居家用药依从性。中文研究以社区卫生服务中心为主体,内容侧重于药学服务和用药依从性。

表 3 前 10 个关键词聚类

Tab 3 Top 10 largest clusters of keywords

聚类序号	英文文献			中文文献		
	聚类名称	Size	S	聚类名称	Size	S
0	ashp national survey	90	0.842	社区卫生服务中心	22	0.963
1	inappropriate medication	83	0.702	药学服务	21	0.932
2	home hospice	79	0.567	依从性	16	0.847
3	medical home	74	0.612	家庭医生	11	0.85
4	medication adherence	66	0.632	药师	5	0.98
5	family medicine residents' knowledge	49	0.851	实践和探索	5	0.96
6	left ventricular systolic dysfunction	30	0.772	县城	5	0.97
7	American	24	0.949	效果研究	4	0.939
8	pharmacist-managed hypertension therapy conversion	20	0.949	首都医科大学	3	1
9	aged-care home	18	0.873	药师主导	3	1

通过关键词的突现可以看出研究热点随时间的动态变化,本文共探测出 31 个英文和 13 个中文突现关键词,将前 10 位的关键词按时间排序,推测居家药学研究的发展趋势。结果见表 4 和表 5。由表 4 可见,国外居家药学发展主要经历了 3 个阶段:① 药学服务模式初步探索(1992 - 2005 年),主要针对门诊患者开展居家药学服务,收集数据评估效果;② 研究规模和质量的提升阶段(2006 - 2012 年),主要针对社区患者开展初级护理和药学监护,此阶段开展了一些随机对照研究,研究质量

有一定的提升;③ 研究的深化和拓展阶段(2013 - 2022 年),此阶段开展了医师、患者、护士、药师等多人群角度的居家药学服务认知评估,通过药师参与家庭医生团队或将药学服务费纳入医保的方式进行药学服务补偿研究,从依从性及生命质量的提升、临床、经济、人文获益等多个维度评估服务效果。“risk”(风险)是最新突现关键词,从 2018 年突现至今,说明近几年研究侧重患者用药风险的识别与管理。中文关键词突现作用很弱,突现强度最大的关键词是“医联体”,强度仅 1.20(见表 5)。

表 4 突现强度最大的前 10 个英文关键词

Tab 4 Top 10 keywords with the strongest burst in English publications

序号	关键词	强度	起始	结束	1992—2022 年
1	pharmaceutical service	10.4	1992	2010	
2	data collection	7.54	1992	2005	
3	ambulatory care	6.59	1995	2005	
4	community pharmacy	5.03	2004	2011	
5	primary care	5.25	2005	2009	
6	randomized controlled trial	4.59	2008	2012	
7	perception	6.30	2013	2019	
8	physician	4.43	2015	2018	
9	quality of life	4.86	2016	2018	
10	risk	4.84	2018	2022	

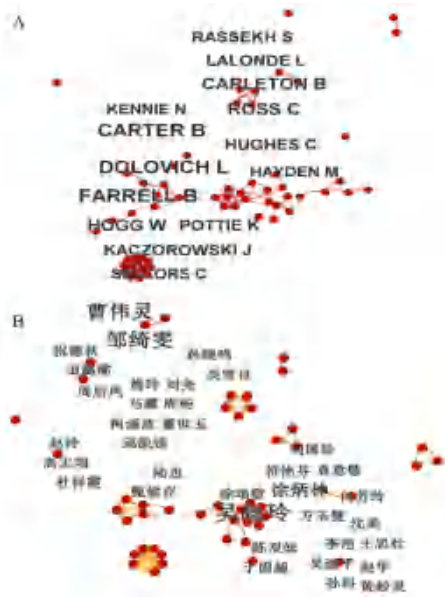


图 2 英文文献 (A) 及中文文献 (B) 高被引作者合作网络图谱  
Fig 2 Collaboration network of highly cited authors of English literature (A) and Chinese literature (B)

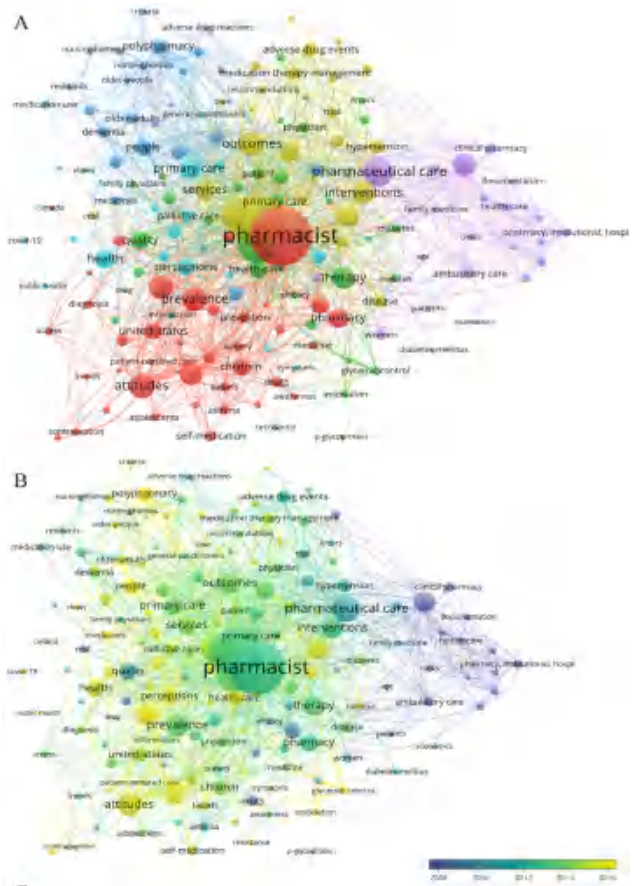


图 4 中英文关键词共现图谱 (A、C) 及叠加可视化图谱 (B、D)  
Fig 4 Co-occurrence of keywords



图 3 国家/地区 (A) 和机构 (B) 合作网络图谱  
Fig 3 Collaboration network of country/region (A) and institution (B)

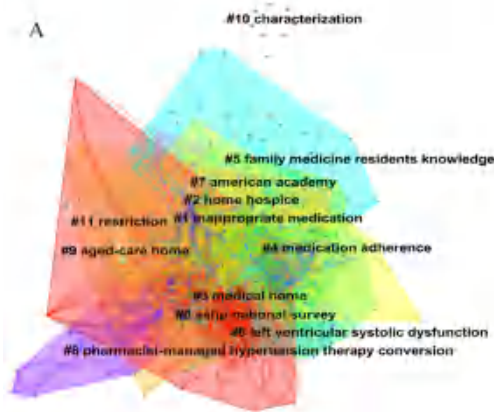


图 5 中英文文献关键词聚类分析图谱  
Fig 5 Clusters analysis of keywords in Chinese and English





对药学服务补偿机制的研究起到一定的促进作用。从关键词聚类 and 突现结果可以推测, 居家药学服务的临床、经济和人文获益研究、用药风险的识别与管理将会成为未来几年的研究热点。

综上所述, 本文首次采用文献计量学方法, 定性、定量、直观地分析了居家药学研究现状、发展趋势和研究热点。同时比较了国内外居家药学研究的侧重点与差异, 并将这种差异可视化地展示出来, 为我国居家药学研究及家庭药师培养提供参考。

## 参考文献

- [1] Lee CY, Su HH, Chang YC, et al. The impact of pharmaceutical home care on medical utilization for frequent users of outpatient services in Taiwan [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18 (14): 7336-7347.
- [2] Zheng X, Ding H, Xu S, et al. Pharmacist-led management improves treatment adherence and quality of life in opioid-tolerant patients with cancer pain: a randomized controlled trial [J]. *Pain Ther*, 2022, 11 (1): 241-252.
- [3] Margolis KL, Asche SE, Bergdall AR, et al. Effect of home blood pressure telemonitoring and pharmacist management on blood pressure control: a cluster randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2013, 310 (1): 46-56.
- [4] Dehmer SP, Maciosek MV, Trower NK, et al. Economic evaluation of the home blood pressure telemonitoring and pharmacist case management to control hypertension (hyperlink) trial [J]. *J Am Coll Clin Pharm*, 2018, 1 (1): 21-30.
- [5] Merks P, Jakubowska M, Drelich E, et al. The legal extension of the role of pharmacists in light of the COVID-19 global pandemic [J]. *Res Social Adm Pharm*, 2021, 17 (1): 1807-1812.
- [6] 曹爱霖, 丁楠, 蒙龙, 等. 医疗机构药学服务规范第 8 部分居家药学服务 [J]. *中国药房*, 2019, 30 (24): 3321-3324.
- [7] Deng P, Wang S, Sun X, et al. Global trends in research of gouty arthritis over past decade: a bibliometric analysis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 910400.
- [8] Song Y, Ma P, Gao Y, et al. A bibliometrics analysis of metformin development from 1980 to 2019 [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 645810.
- [9] 段蓉, 李正翔. 国内外药物警戒研究现状与热点的文献计量学分析 [J]. *中国药房*, 2022, 33 (1): 116-122.
- [10] Okhovati M, Arshadi H. COVID-19 research progress: bibliometrics and visualization analysis [J]. *Med J Islam Repub Iran*, 2021, 35: 20-30.
- [11] Hanlon JT, Weinberger M, Samsa GP, et al. A randomized, controlled trial of a clinical pharmacist intervention to improve inappropriate prescribing in elderly outpatients with polypharmacy [J]. *Am J Med*, 1996, 100 (4): 428-437.
- [12] Mcleod PJ, Huang AR, Tamblyn RM, et al. Defining inappropriate practices in prescribing for elderly people: a national consensus panel [J]. *CMAJ*, 1997, 156 (3): 385-391.
- [13] Murray MD, Young J, Hoke S, et al. Pharmacist intervention to improve medication adherence in heart failure: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2007, 146 (10): 714-725.
- [14] 甄健存, 陆进, 梅丹, 等. 医疗机构药学服务规范 [J]. *医药导报*, 2019, 38 (12): 1535-1556.
- [15] 吴晓玲, 谢奕丹, 邱宇翔, 等. 家庭药师制度的构建与实践探索 [J]. *今日药学*, 2018, 28 (5): 340-343.
- [16] 吴晓玲, 赵志刚, 于国超. 家庭药师服务标准与路径专家共识 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2018, 16 (7): 1-6.
- [17] Synnestevedt MB, Chen C, Holmes JH. CiteSpace II: visualization and knowledge discovery in bibliographic databases [J]. *AMIA Annu Symp Proc*, 2005, 2005: 724-728.
- [18] Chen C, Hu Z, Liu S, et al. Emerging trends in regenerative medicine: a scientometric analysis in CiteSpace [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12 (5): 593-608.
- [19] Tan EC, Stewart K, Elliott RA, et al. Pharmacist services provided in general practice clinics: a systematic review and meta-analysis [J]. *Res Social Adm Pharm*, 2014, 10 (4): 608-622.
- [20] 杨丽娟, 刘思彤, 杨雅麟, 等. 国内外居家药学服务现状及补偿机制探讨 [J]. *中国医院*, 2021, 25 (1): 41-43.
- [21] 田璐璐, 祝德秋. 居家药学服务研究进展 [J]. *山西医药杂志*, 2020, 49 (15): 1962-1964.
- [22] 宋碧辉, 余江恒, 杨光丽, 等. 医联体建设中一体化药学服务模式的建立及应用研究 [J]. *中国药业*, 2021 (11): 5-8.
- [23] Schwalm JD, Ivers NM, Bouck Z, et al. Length of initial prescription at hospital discharge and long-term medication adherence for elderly, post-myocardial infarction patients: a population-based interrupted time series study [J]. *BMC Med*, 2022, 20 (1): 213.
- [24] 江苏省扬州市卫生健康委. 扬州——打通居家药学服务“最后一公里” [J]. *中国卫生*, 2021 (7): 78.
- [25] 郭潇雅. 居家药师的安徽实践 [J]. *中国医院院长*, 2021, 17 (12): 75-77.
- [26] 吴文辉, 杨燕, 唐密, 等. 上海市社区临床药师能力提升模式与建设现状 [J]. *世界临床药物*, 2021, 42 (1): 21-24.
- [27] 王丽敏, 陈志华, 张梅, 等. 中国老年人群慢性病患病状况和疾病负担研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40 (3): 277-283.
- [28] Wang X, Wang S, Yu X, et al. Impact of pharmacist-led medication therapy management in ambulatory elderly patients with chronic diseases [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (7): 2937-2944.
- [29] 陈云, 邹宜誼, 邵蓉, 等. 美国、英国、澳大利亚社区药师职责扩展的实践及对我国的启示 [J]. *中国药房*, 2017 (34): 4758-4762.
- [30] 宋维, 葛佳佳, 束庆, 等. 美国医疗保险与药物治疗管理服务 [J]. *医药导报*, 2021, 40 (3): 336-339.
- [31] 中国健康促进基金会, 中国药学会, 中国药师协会. 推进药学服务体系建设和医疗保障协同发展专家共识 [J]. *医药导报*, 2022, 41 (6): 755-761.

(收稿日期: 2022-06-18; 修回日期: 2022-08-29)

## 综述

## 基于纳米材料的光学治疗在动脉粥样硬化性疾病中的应用与研究进展

席洋<sup>1,2</sup>, 张雷<sup>3,4</sup>, 郭鹏程<sup>3,4</sup>, 舒畅<sup>3,4</sup>, 张毕奎<sup>1,2</sup>, 李焕德<sup>1,2</sup>, 李鑫<sup>3,4\*</sup> (1.中南大学湘雅二医院药理学部, 长沙 410011; 2.中南大学临床药学研究所, 长沙 410011; 3.中南大学湘雅二医院血管外科, 长沙 410011; 4.中南大学血管病研究所, 长沙 410011)

**摘要:** 动脉粥样硬化是由血管壁脂肪堆积引起的动脉壁慢性炎症反应, 是引起心血管狭窄/闭塞性疾病的主要原因。然而目前临床上治疗动脉粥样硬化引起的冠状动脉或外周动脉狭窄/闭塞血管主要通过介入治疗, 其存在易发生血管再狭窄和预防内膜增生的药效时间有限等缺点。然而随着纳米材料的兴起, 无创的光学治疗为动脉狭窄/闭塞性疾病带来了新的机会。本文综述了近年来基于纳米材料的动脉粥样硬化相关光学治疗方法, 并对其在临床治疗的应用前景做出展望。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 动脉狭窄; 动脉闭塞; 纳米粒; 光热治疗; 光动力学治疗

中图分类号: R94 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0721-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.026

### Current status and prospect of photo-therapy with nanomaterials for cardiovascular stenosis/obliterans disease induced by atherosclerosis

XI Yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>3,4</sup>, GUO Peng-cheng<sup>3,4</sup>, SHU Chang<sup>3,4</sup>, ZHANG Bi-kui<sup>1,2</sup>, LI Huan-de<sup>1,2</sup>, LI Xin<sup>3,4\*</sup> (1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Institute of Clinical Pharmacy, Central South University, Changsha 410011; 3. Department of Vascular Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 4. Institute of Vascular Diseases, Central South University, Changsha 410011)

**Abstract:** Atherosclerosis is a chronic inflammatory responses on the arterial wall from lipid deposition, the main cause of cardiovascular stenosis/obliterans disease. However, the current clinical interventional for coronary or peripheral artery stenosis/occlusion induced by atherosclerosis has some disadvantages, such as possible vascular restenosis and limited effect time to prevent intimal hyperplasia. However, with the rise of nanomaterials, non-invasive photo-therapy has brought new opportunities for arterial stenosis/occlusive diseases. This paper reviewed the recent photo-therapy with nanomaterials for atherosclerosis based on and its prospect in clinical treatment.

**Key words:** atherosclerosis; arterial stenosis; arterial occlusion; nanoparticle; photothermal therapy; photodynamic therapy

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是动脉壁的一种慢性炎症性疾病, 主要原因是脂质代谢紊乱和炎症反应失调<sup>[1]</sup>, 其会引起动脉壁的增厚

和硬化, 使动脉管腔变窄甚至闭塞, 导致血液难以通过, 从而引起脑血管病、冠心病和外周动脉疾病等缺血性心脑血管疾病的发生<sup>[2-4]</sup>。近年来随

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82120108005)。

作者简介: 席洋, 男, 博士, 主要从事纳米制剂的研究, email: xiyang@csu.edu.cn \*通信作者: 李鑫, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事外周动脉和大动脉疾病治疗新技术和新器械开发, email: lixin1981@csu.edu.cn

着纳米技术与医学交叉融合日益深入,越来越多的学者把具有独特光学性能的纳米材料用于治疗动脉粥样硬化的光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 和光动力学治疗 (photodynamic therapy, PDT)。这些新方法为动脉粥样硬化引起的血管狭窄/闭塞性疾病患者带来了新的希望。本综述旨在阐明近年纳米材料在动脉粥样硬化光学治疗的应用现状。

## 1 动脉粥样硬化的病因及治疗现状

### 1.1 动脉粥样硬化的病因学说

动脉粥样硬化的病因复杂,研究者一直在探索其发生发展的机制,近年来动脉粥样硬化的发生发展始于脂质在血管壁中的沉积以及血管内皮层的损伤假说已为人们所公认。内皮损伤学说认为,多种因素的刺激可以导致血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 受损,为了应对损伤,内皮细胞会分泌大量的炎症因子和趋化因子,引起单核细胞向血管损伤处的招募。同时内皮功能性损伤还会促使细胞表面黏附因子的表达上调,导致被黏附在内皮处的单核细胞增多,这些单核细胞会进一步向内皮下迁移、浸润,随后分化成巨噬细胞 (macrophage, M $\phi$ )<sup>[5-6]</sup>。另外,黏附分子和趋化因子会刺激血管中膜的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 向血管内膜迁移和增殖。巨噬细胞和血管平滑肌细胞在内皮下吞噬脂质,转化成泡沫细胞<sup>[7-9]</sup>,随着泡沫细胞堆积,逐步演变为脂质条纹和纤维斑块<sup>[10]</sup>。

### 1.2 心血管动脉狭窄/闭塞的治疗

经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 是治疗心血管疾病的常用手段,目前植入抗内膜增殖的药物洗脱支架与涂覆抗增殖药物涂层球囊在临床上较为常用。然而,现有的血管支架 (冠状动脉和外周动脉) 都存在由于内膜增生或血管重塑等导致的再狭窄问题,而以药物涂层支架来预防内膜增生的药效时间有限,因此需要寻找更加有效的方法在 PCI 治疗后持续抗动脉粥样硬化和预防再狭窄。

纳米材料在动脉粥样硬化的精准治疗中展现出了潜力<sup>[11-12]</sup>。纳米材料不仅可以被循环吞噬细胞内吞,经细胞募集和浸润转移到动脉粥样硬化病变处<sup>[13]</sup>,还可以利用动脉粥样硬化病变处炎症内皮及新生血管的高通透性在斑块处被动蓄积<sup>[14]</sup>。除此之外,纳米材料具有主动靶向作用,可通过修饰不同的功能分子主动靶向动脉粥样硬化病变部位,从而提高治疗效果,减轻不良反应。比如靶向动脉粥样硬化病变处特异性高表达的黏附分子 [例如细胞间黏附分子-1 (intercellular

adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等]或靶向动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞及泡沫细胞表面的清道夫受体 [例如 CD36、凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1)、巨噬细胞清道夫受体 1 (macrophages scavenger receptor1, MSR-1) 等]。

## 2 动脉粥样硬化的光学治疗

### 2.1 光动力学治疗

光动力学疗法是一种新型的无创治疗方法,包含三个组成部分:光敏剂、光和氧气分子。光敏剂在合适的激发光下可产生单线态氧、过氧化物等活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS),继而诱导一系列细胞毒性事件,例如线粒体膜电位的丧失、脂质过氧化以及细胞膜和细胞器的蛋白质变性等<sup>[15]</sup>,并可以分别通过高强度和低强度的光照射引起细胞非程序性死亡 (坏死) 和程序性死亡 (凋亡和自噬) 等<sup>[16]</sup>。

在动脉粥样硬化的进展中,巨噬细胞扮演着重要的角色。它一方面吞噬大量的氧化低密度脂蛋白 (oxLDL) 形成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化斑块的形成;另一方面,作为斑块中主要的炎症细胞,它能够分泌大量的炎症因子、趋化因子等调节斑块中细胞的增殖或凋亡等,因此利用光动力学方法耗竭巨噬细胞可以用于动脉粥样硬化的治疗以及预防临床上冠状动脉手术后的再狭窄。

Kim 等<sup>[17]</sup>通过将光敏剂二氢卟吩 e6 (Ce6) 与透明质酸偶联制备了靶向巨噬细胞的诊疗纳米粒 (macrophage-targeted theranostic nanoparticles, MacTNP),该纳米制剂实现了主动靶向巨噬细胞的光动力学治疗。巨噬细胞表面高表达 CD44 受体,透明质酸可以与其结合,从而起到主动靶向的作用。被脂多糖激活的巨噬细胞摄入 MacTNP 之后,过量的过氧亚硝酸盐会裂解透明质酸的化学键导致光敏剂释放。结果显示在近红外光的照射下,66% 的巨噬细胞坏死,表明光动力学治疗可以显著抑制巨噬细胞的增殖,从而实现动脉粥样硬化的治疗。清道夫受体 A (SR-A) 是巨噬细胞中参与修饰低密度脂蛋白摄取和泡沫细胞形成的关键受体,硫酸葡聚糖对其具有明显的选择性,于是 Song 等<sup>[18]</sup>将硫酸葡聚糖与 Ce6 结合,开发了一种靶向巨噬细胞的纳米制剂 (DS-Ce6 NPs) 用于动脉粥样硬化的光动力学治疗。实验结果表明 DS-Ce6 NPs 可以诱导巨噬细胞自噬并最终减少斑块负荷和炎症,表明靶向巨噬细胞的光动力学治疗是治疗粥样斑块的有效策略。



考虑到光敏剂 Ce6 激发波长的穿透深度有限, Han 等<sup>[19]</sup>利用上转换纳米粒将近红外光转换为紫外光或可见光激活光敏剂,用于动脉粥样硬化的光动力学治疗,研究制备了介孔二氧化硅涂层修饰的上转换纳米粒负载 Ce6 (UCNPs-Ce6),研究了光动力学治疗对人髓系白血病单核细胞 (THP-1) 巨噬细胞来源的泡沫细胞胆固醇外溢的影响,发现 UCNPs-Ce6 介导的光动力学治疗可以通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有效诱导 THP-1 巨噬细胞程序性细胞死亡,并增强巨噬细胞的胆固醇流出。Yi 等<sup>[20]</sup>也利用上转换纳米粒在 980 nm 的光照下产生单线态氧,杀伤动脉粥样硬化病变部位激活的巨噬细胞,结果显示光动力学治疗后斑块面积和巨噬细胞含量明显降低。

因此,靶向病变巨噬细胞和诱导巨噬细胞凋亡已成为抑制动脉粥样硬化斑块进展的有效治疗策略。然而,由于光的穿透深度差,对正常组织存在脱靶损伤,光动力学对深部组织病变的治疗效果难以达到预期,限制了其在临床中的进一步应用。但如果与现有的腔内治疗结合,直接利用介入操作的方法实现安全微创的血管内的照射有望解决这一困难。

## 2.2 光热治疗

光热治疗是指利用光热试剂 (photothermal transduction agent, PTAs) 吸收近红外光并将其转化为热量,从而消除目标细胞的一种治疗方法。光热治疗的效果依赖于光热试剂将光转化为足够热量的能力,因此开发不同的光热试剂消融巨噬细胞是一种可行的策略。Zhang 等<sup>[21]</sup>制备了  $\text{CuCo}_2\text{S}_4$  纳米晶体用于动脉粥样硬化的光热治疗,体外实验表明,  $\text{CuCo}_2\text{S}_4$  孵育结合 808 nm 近红外激光照射可有效消融炎症巨噬细胞;在  $\text{ApoE}^{-/-}$  小鼠模型中进行的体内实验表明,局部注射  $\text{CuCo}_2\text{S}_4$  后,用 808 nm 近红外光照射可以显著消融浸润的炎症巨噬细胞,并有效减少动脉炎症。这项研究通过探索双金属硫化物作为有效的光热试剂,为治疗动脉粥样硬化的光热治疗提供了新的策略。Wang 等<sup>[22]</sup>制备了  $\text{MoO}_2$  纳米簇并首次用于炎症巨噬细胞介导的动脉粥样硬化,结果表明  $\text{MoO}_2$  纳米簇可以有效治疗动脉粥样硬化且没有明显的毒副作用。Peng 等<sup>[23]</sup>利用光热转换效率高达 50% 的  $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{S}$  纳米制剂用于动脉粥样硬化的光热治疗,结果表明该纳米制剂可以消除巨噬细胞,缓解  $\text{ApoE}^{-/-}$  小鼠颈动脉狭窄的形成且具有较好的生物安全性。

VSMCs 是血管壁的主要细胞成分,对于维持血管稳态至关重要。在生理状态下, VSMCs

表现出收缩表型并表达一系列收缩蛋白,如  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和钙调蛋白,以调节收缩和舒张功能。而在动脉粥样硬化过程中, VSMCs 会向分化程度低的合成表型转化,并分泌促炎因子和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs),这增加了斑块的易损性<sup>[24-25]</sup>。有研究发现, VSMCs 表面具有瞬时受体电位香草素亚家族 1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1) 阳离子通道,而激活 TRPV1 阳离子可以减少脂质存储和动脉粥样硬化病变的形成。辣椒素可激活 TRPV1 通道,但是辣椒素具有慢性毒性,且对 TRPV1 的激活缺乏可控性,受此启发, Gao 等<sup>[26]</sup>使用光热试剂硫化铜纳米粒 (CuS NPs) 与 TRPV1 抗体偶联,作为开关激活 VSMCs 中 TRPV1 信号通路。体外实验结果表明,在近红外激光照射的条件下,局部温度的升高会导致 TRPV1 通道打开,细胞内增加的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加从而激活自噬系统,并通过 AMPK 信号通路抑制 oxLDL 处理过的 VSMCs 形成泡沫细胞。  $\text{ApoE}^{-/-}$  小鼠体内实验表明, TRPV1 抗体修饰的硫化铜纳米粒 (CuS-TRPV1) 可以有效减少高脂饮食的  $\text{ApoE}^{-/-}$  小鼠脂质堆积和斑块的形成,而且使主动脉根部病变部位与主动脉弓病变部位分别减少了 54.2% 和 72.3%。以上结果均表明基于纳米材料的光热治疗是动脉粥样硬化的一种有效治疗手段。

## 2.3 基于光学治疗的协同治疗

光学治疗方法在动脉粥样硬化的治疗中已经展现出了相当的潜力,而光动力学疗法和光热疗法结合具备良好的协同作用,能更好地应用于动脉粥样硬化的治疗。Liu 等<sup>[27]</sup>利用光热试剂碳纳米管负载光敏剂 Ce6 构建了 CS-CNCs@Ce6/DS 纳米制剂,实现了动脉粥样硬化的光动力学疗法与光热疗法的协同治疗。这两种光学疗法的结合,显著消融了活化的巨噬细胞,减少了促炎细胞因子的分泌,减轻了平滑肌细胞的增殖和迁移,抑制了动脉粥样硬化的发展和恶化,是治疗动脉粥样硬化非常具有潜力的手段。考虑到细胞凋亡会增加斑块破裂的风险,因此如果不杀死泡沫细胞的情况下降低细胞内的脂质水平会是一项更安全的策略。Dai 等<sup>[28]</sup>利用卟啉和透明质酸修饰二氧化钛 ( $\text{TiO}_2$ ) 纳米粒实现了靶向泡沫细胞的光热和光动力学协同疗法,结果表明在单一的光动力学治疗下,会引起大量细胞凋亡或坏死,且只能轻微降低脂质水平,而在光动力学与光热疗法的结合模式下,可以通过激活 SERBP2/LDLR 通

路减少细胞内胆固醇的生物合成、对外在胆固醇的摄取,且激活 ABCA1 介导的胆固醇外排,从而显著降低泡沫细胞内的脂质水平,同时不引起明显的细胞凋亡或坏死。

此外,化学治疗与光热治疗结合也是治疗动脉粥样硬化常见的模式。Liu 等<sup>[29]</sup>利用介孔二氧化硅纳米粒作为载体递送抗凝血药物肝素,并利用光热试剂硫化铜纳米粒封孔,实现了光热治疗与化学治疗(chemistry therapy)的协同治疗,在体内外实现了比单一疗法更好的效果。Li 等<sup>[30]</sup>利用介孔二氧化硅同时负载光热试剂金纳米粒、修复血管内皮损伤血管内皮生长因子(VEGF)和抗组织增殖药物紫杉醇(PTX),并靶向巨噬细胞,实现了动脉粥样硬化的光热与化学疗法的联合治疗。Ma 等<sup>[31]</sup>利用人血清白蛋白作为载体,负载了光敏剂有机荧光染料吲哚菁绿(ICG)和 Sirt1 激活剂 SRT1720,通过光热治疗和激活细胞内的 Sirt1 阻断 VSMCs 表型转化而起到了协同抗动脉粥样硬化的作用。

### 3 纳米粒在动脉粥样硬化光学治疗中的临床研究现状

截至 2022 年 7 月,权威临床试验查询网站(clinicaltrials.gov)上显示,共有 2796 项试验与动脉粥样硬化有关,迄今为止完成了 1484 项,其中仅一项关于动脉粥样硬化的光热治疗:NANOs 是一种二氧化硅-金的核壳结构纳米粒,用于动脉粥样硬化的等离子体光热疗法(plasmatic photothermal therapy, PPTT)。据 2012 年的报道,NANOs 在尤卡坦小型猪的动物实验中,可以使总动脉粥样硬化体积(TAV)减少 22.92%,效果优于用包含磁性纳米粒微泡或释放西罗莫司的植入支架处理<sup>[32]</sup>。Kharlamov 等<sup>[33]</sup>在 2015 年首次进行人体试验(NCT01270139)评价利用 NANOs 介导的 PPTT 减少 TAV 的可行性与安全性。结果 12 个月后,92% 接受 NANOs 治疗的患者可以成功地减少总粥样斑块体积 47.9 mm<sup>3</sup>、斑块负荷约 39.4%<sup>[33]</sup>。尽管使用 NANOs 治疗动脉粥样硬化的临床效果令人鼓舞,但是这种治疗方法对于实际的临床应用还不够安全,因为在使用 NANOs 治疗的患者中观察到红细胞膜缺陷增加。因此,还需要更加关注金属纳米粒的生物安全性。遗憾的是,一项使用金纳米粒为核,二氧化硅-氧化铁为壳的核壳纳米粒用于研究光热治疗对动脉粥样硬化影响的 I 期临床试验(编号:NCT01436123)因政治原因而终止。

值得一提的是,还有一项名为 BRIGHT-CEA(旨在研究 ICG 在人类颈动脉斑块中的摄

取以及近红外荧光成像)的临床研究正在进行(NCT01873716)。ICG 是一种被 FDA 批准广泛用于荧光成像的有机荧光染料,同时具有作为光热治疗的光热试剂和光动力学治疗光敏剂的双重作用。除此之外,临床上目前也有利用光敏剂的纳米制剂用于其他疾病的治疗,比如注射用维替泊芬脂质体 Visudyn,是 Novartis 2000 年推出的用于光动力治疗的眼科药物,其主要成分维替泊芬是光敏剂,在有氧条件下,通过一定波长的光激活产生 ROS 损伤局部新生血管内皮细胞,引起血管闭合,临床上用于治疗具有脉络膜新生血管症状(CNV)的湿型年龄相关黄斑变性(AMD),是目前 FDA 唯一批准的用于治疗湿型 AMD 的药物,数以百万计的患者已经接受了这种治疗,这也为光动力学治疗在动脉粥样硬化中的应用提供了参考。

### 4 动脉粥样硬化光学治疗展望

基于纳米材料的光学治疗在动脉粥样硬化引起的血管狭窄/闭塞性疾病中的应用目前没有临床转化的原因可能由以下几点:

① 积极开发光学疗法的制药公司正在进行或即将启动其 I 期和 II 期临床试验时,药物释放支架在心血管领域取得成功。② 需要大样本量的临床前实验,进一步阐明动脉粥样硬化中光学治疗的具体机制。鉴于光学治疗介导的巨噬细胞、平滑肌细胞或成纤维细胞的破坏有可能导致纤维帽变薄或增加脂质核心,其是否存在潜在风险并不确定。③ 纳米材料及其递送的小分子光热试剂和光敏剂在体内长期安全性问题仍存在争议。④ 外科介入治疗与药物递送同步性不够。在干预前 8~24 h 使用光敏剂/光热试剂,阻碍了光学治疗在急性冠状动脉综合征中的应用。因此,基于光学的动脉粥样硬化治疗尚处于起步阶段。

目前,第二代药物洗脱支架的出现大大降低了支架再狭窄的风险,但是无论是第一代还是第二代支架都无法防止再狭窄的发生。将光学治疗与传统的 PCI 治疗结合,可有效预防或减少支架诱导的再狭窄复发。随着光学疗法和纳米技术的兴起,结合光学疗法与技术的纳米工程实现对动脉粥样硬化引起的血管狭窄/闭塞性疾病中的有效治疗可能成为未来的研究方向,有望为动脉粥样硬化及其相关的心血管疾病治疗带来新的希望。

### 参考文献

- [1] Liu B, Tang D. Computer simulations of atherosclerotic plaque growth in coronary arteries [J]. Mol Cell Biomech, 2010, 7 (4): 193-202.



- [2] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592 (7855): 524-533.
- [3] Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70 (1): 1-25.
- [4] Michiels C. Endothelial cell functions [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196 (3): 430-443.
- [5] Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures [J]. *J Immunol*, 1987, 139 (11): 3703-3709.
- [6] Montanari E, Stojkovic S, Kaun C, et al. Interleukin-33 stimulates GM-CSF and M-CSF production by human endothelial cells [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116 (2): 317-327.
- [7] Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis [J]. *Immunity*, 2017, 47 (4): 621-634.
- [8] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20 (1): 17-28.
- [9] Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, et al. LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, 467 (2-3): 217-220.
- [10] Maguire EM, Pearce WA, Xiao Q. Foam cell formation: a new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 54-71.
- [11] Zhong Y, Qin X, Wang Y, et al. "Plug and Play" functionalized erythrocyte nanopatform for target atherosclerosis management [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13 (29): 33862-33873.
- [12] Wang Y, Zhang K, Li T, et al. Macrophage membrane functionalized biomimetic nanoparticles for targeted anti-atherosclerosis applications [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (1): 164-180.
- [13] Dou Y, Chen Y, Zhang X, et al. Non-proinflammatory and responsive nanopatforms for targeted treatment of atherosclerosis [J]. *Biomaterials*, 2017, 143: 93-108.
- [14] Lobatto ME, Calcagno C, Millon A, et al. Atherosclerotic plaque targeting mechanism of long-circulating nanoparticles established by multimodal imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9 (2): 1837-1847.
- [15] Chen Z, Woodburn KW, Shi C, et al. Photodynamic therapy with motexafin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (5): 759-764.
- [16] Jain M, Zellweger M, Wangieres G, et al. Photodynamic therapy for the treatment of atherosclerotic plaque: lost in translation? [J]. *Cardiovasc Ther*, 2017, 35 (2): e12238.
- [17] Kim H, Kim Y, Kim IH, et al. ROS-responsive activatable photosensitizing agent for imaging and photodynamic therapy of activated macrophages [J]. *Theranostics*, 2013, 4 (1): 1-11.
- [18] Song JW, Ahn JW, Lee MW, et al. Targeted theranostic photoactivation on atherosclerosis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19 (1): 338.
- [19] Han XB, Li HX, Jiang YQ, et al. Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces autophagy and cholesterol efflux of macrophage-derived foam cells via ROS generation [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (6): e2864.
- [20] Yi BG, Park OK, Jeong MS, et al. In vitro photodynamic effects of scavenger receptor targeted-photoactivatable nanoagents on activated macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 97: 181-189.
- [21] Zhang X, Liu J, Yang X, et al. CuCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> nanocrystals as a nanopatform for photothermal therapy of arterial inflammation [J]. *Nanoscale*, 2019, 11 (19): 9733-9742.
- [22] Wang X, Wu X, Qin J, et al. Differential phagocytosis-based photothermal ablation of inflammatory macrophages in atherosclerotic disease [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11 (44): 41009-41018.
- [23] Peng X, Liu J, Li B, et al. Janus Ag/Ag<sub>2</sub>S beads as efficient photothermal agents for the eradication of inflammation and artery stenosis [J]. *Nanoscale*, 2019, 11 (42): 20324-20332.
- [24] Grootaert OJ, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114 (4): 622-634.
- [25] Song W, Gao K, Hhuang P, et al. Bazedoxifene inhibits PDGF-BB induced VSMC phenotypic switch via regulating the autophagy level [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118397.
- [26] Gao W, Sun Y, Cai M, et al. Copper sulfide nanoparticles as a photothermal switch for TRPV1 signaling to attenuate atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 231.
- [27] Liu J, Zhou B, Guo Y, et al. SR-A-Targeted nanopatform for sequential photothermal/ photodynamic ablation of activated macrophages to alleviate atherosclerosis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13 (25): 29349-29362.
- [28] Dai T, He W, Tu S, et al. Black TiO<sub>2</sub> nanoprobe-mediated mild phototherapy reduces intracellular lipid levels in atherosclerotic foam cells via cholesterol regulation pathways instead of apoptosis [J]. *Bioact Mater*, 2022, 17: 18-28.
- [29] Liu S, Zhao Y, Shen M, et al. Hyaluronic acid targeted and pH-responsive multifunctional nanoparticles for chemo-photothermal synergistic therapy of atherosclerosis [J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10 (4): 562-570.
- [30] Li X, Wu R, Chen H, et al. Near-infrared light-driven multifunctional tubular micromotors for treatment of atherosclerosis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13 (26): 30930-30940.
- [31] Ma S, Motevalli SM, Chen J, et al. Precise theranostic nanomedicines for inhibiting vulnerable atherosclerotic plaque progression through regulation of vascular smooth muscle cell phenotype switching [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (13): 3693-3706.
- [32] Kharlamov AN, Gabinsky JL. Plasmonic photothermic and stem cell therapy of atherosclerotic plaque as a novel nanotool for angioplasty and artery remodeling [J]. *Rejuvenation Res*, 2012, 15 (2): 222-230.
- [33] Kharlamov AN, Tyurnina AE, Veselova VS, et al. Silica-gold nanoparticles for atheroprotective management of plaques: results of the NANOM-FIM trial [J]. *Nanoscale*, 2015, 7 (17): 8003-8015.

(收稿日期: 2022-08-10; 修回日期: 2022-08-19)



## 沙库巴曲缬沙坦在心律失常治疗中的研究进展

曹馨瑞<sup>1</sup>, 严思敏<sup>2</sup>, 姚惠敏<sup>1</sup>, 葛卫红<sup>2\*</sup> (1. 南京中医药大学鼓楼临床医学院, 南京 210029; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008)

**摘要:** 沙库巴曲缬沙坦是一种脑啡肽-血管紧张素受体拮抗剂 (ARNI)。ARNI 在肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAs) 和利钠肽系统 (NPs) 中的协同作用, 让它在心力衰竭、高血压等临床试验中疗效显著, 从而在心血管领域获得非常高的地位。近年来的研究表明, 沙库巴曲缬沙坦对房性和室性心律失常患病率的影响结论不一, 对于沙库巴曲缬沙坦治疗心律失常的作用也缺乏整体认识。本文对沙库巴曲缬沙坦在心律失常中的有效性和安全性进行综述和评价, 并阐释沙库巴曲缬沙坦与心律失常之间可能的联系。

**关键词:** 沙库巴曲缬沙坦; 心律失常; 脑啡肽-血管紧张素受体拮抗剂

中图分类号: R972 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0726-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.027

### Advances in the treatment of arrhythmias with sacubitril/valsartan

CAO Xin-rui<sup>1</sup>, YAN Si-min<sup>2</sup>, YAO Hui-min<sup>1</sup>, GE Wei-hong<sup>2\*</sup> (1. *Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029*; 2. *Department of Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008*)

**Abstract:** Sacubitril/valsartan, an angiotensin receptor neprilysin inhibitor (ARNI), plays a synergistic role in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAs) and natriuretic peptides (NPs). Owing to its significant efficacy in clinical trials for heart failure and hypertension, ARNI gains a very high status in the treatment of cardiovascular diseases. Experiments in recent years have shown that the effect of sacubitril/valsartan on the morbidity of atrial and ventricular arrhythmias is inconsistent, and an overall understanding of its effect on arrhythmias is lacking. This review evaluated the efficacy and safety of sacubitril/valsartan in arrhythmias and explained the possible link between sacubitril/valsartan and arrhythmias.

**Key words:** sacubitril/valsartan; arrhythmia; angiotensin receptor neprilysin inhibitor

随着我国老龄化人口增加和人们生活日益改善, 心血管疾病患病率持续上升。《中国心血管健康与疾病报告 2020》<sup>[1]</sup> 中表明, 目前我国心血管疾病患者数高达 3.30 亿, 病死率 0.3%, 心血管疾病在我国已连续多年成为死亡原因之首, 占全部居民死因的 40% 以上, 其中严重的心律失常是诱发心源性猝死最主要的原因<sup>[2]</sup>。沙库巴曲缬沙坦在上市之初用于治疗射血分数降低的心力衰竭 (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF), 心力衰竭住院和心血管死亡的风险大幅降低。后有研究发现脑啡肽-血管紧张素受体拮抗剂 (ARNI) 在高血压、心肌梗死后心室重构等也显著获益。随着研究的不断深入, 近年来沙库巴曲缬沙坦在心律失常

方面的研究成果涌现, 因此本文就沙库巴曲缬沙坦在心律失常治疗中的潜在作用展开综述。

#### 1 沙库巴曲缬沙坦的简要介绍

沙库巴曲缬沙坦作用于肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAs) 和利钠肽系统 (NPs), 是由沙库巴曲和缬沙坦按摩尔比 1:1 组成的共晶体复合物<sup>[3]</sup>。RAAs 系统在心血管疾病中起重要作用: 在心力衰竭早期, 心输出量的减少会激活 RAAs 系统, 使血管紧张素 II 增多<sup>[1]</sup>, 血管平滑肌收缩, 外周血管阻力增加, 这是心力衰竭早期机体维持血压的代偿机制。然而长期激活 RAAs 系统后, 心脏会进入失代偿期, 心肌细胞收缩力下降, 不足以应对室壁张力的增加, 这会促进心脏重构,

基金项目: 江苏省药学会恒瑞医院药学基金 (No.H202020)。

作者简介: 曹馨瑞, 女, 硕士研究生, 主要从事药学方面的研究, email: 1971320539@qq.com \*通信作者: 葛卫红, 女, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事临床药学、药事管理研究, email: glg6221230@163.com

具体表现为心肌肥大、纤维组织增生等,最终心功能减退,演变为心力衰竭<sup>[4]</sup>。而 NPs 系统可以拮抗 RAAs 系统的过度激活:心脏分泌的 A、B 型利钠肽以及血管分泌的 C 型利钠肽,最初以无活性的利钠肽前体形式存在较多,RAAs 系统长时间激活后,利钠肽前体在内切酶的作用下转化为活性利钠肽增多<sup>[5]</sup>,利钠肽活性片段再与利钠肽受体结合,发挥利钠、利尿、扩张血管、降低血压、提高血管通透性的作用。活性利钠肽进入血液循环后也可作用于肾脏、肾上腺、大脑等,抵消心脏一部分心室容量的增加和压力负荷反应,抑制平滑肌细胞增殖,从而抑制心力衰竭患者的心脏重构和肥大<sup>[4]</sup>。脑啡肽酶抑制剂也叫中性内肽酶抑制剂,它通过抑制利钠肽降解,增加 NPs 系统的活性<sup>[4]</sup>。沙库巴曲缬沙坦口服后迅速分解为沙库巴曲(AHU377,前体药物)和缬沙坦,沙库巴曲经酯酶代谢为活性产物 LBQ657。缬沙坦阻断血管紧张素 II 与 AT1 受体结合, LBQ657 抑制利钠肽的降解,两者共同发挥扩张血管、抑制肾脏钠离子和水分重吸收、改善心脏重构的作用。

沙库巴曲缬沙坦作为重磅心力衰竭药物于 2015 年在欧美国家上市,2017 年在中国获批上市,国内外心力衰竭指南——《ESC 急慢性心力衰竭诊断和治疗指南》《心力衰竭合理用药指南(第 2 版)》等<sup>[6-7]</sup>推荐:纽约心脏协会(New York Heart Association, NYHA) II ~ III 级的 HFrEF 患者,在血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blockage, ACEI/ARB)耐受的前提下,使用 ARNI 可降低心力衰竭发病率和病死率(推荐等级 I,推荐级别 B-R)。这意味着 ARNI 开始逐渐取代心力衰竭“金三角”中的 ACEI/ARB。而 2022 年最新的《AHA/ACC/HFSA 心力衰竭管理指南》<sup>[8]</sup>表明,对于 NYHA II ~ III 级的 HFrEF 患者,推荐 ARNI 的使用顺序优先于 ACEI/ARB(推荐等级 I,推荐级别 A),这进一步夯实了 ARNI 在心力衰竭管理中一线首选的地位。经典的 PARADIGM-HF<sup>[9]</sup>试验证明了沙库巴曲缬沙坦在 HFrEF 方面的疗效,与依那普利相比,沙库巴曲缬沙坦组因心力衰竭住院率、心血管疾病死亡率、全因死亡率等降低约 20%。沙库巴曲缬沙坦因在 HFrEF 方面获益显著,吸引了众多学者探索其新适应证:PARAGON-HF<sup>[10]</sup>的实验结果表明,沙库巴曲缬沙坦可降低射血分数保留心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)患者因心力衰竭住院的发生率,改善生活质量和心力衰竭症状,效果优于缬沙坦。沙库

巴曲缬沙坦对轻中度、重度、盐敏感性高血压和高血压伴肾功能不全患者都有效,不仅可以作为单药使用,也可与其他降压药物联合使用增加降压效果<sup>[11]</sup>。2021 年 6 月,我国国家药品监督管理局批准增加沙库巴曲缬沙坦用于治疗原发性高血压的适应证。HFrEF 合并室性心律失常、高血压、心肌梗死后心室重构、非缺血性心肌病合并心功能不全等也纳入《沙库巴曲缬沙坦钠在基层心血管疾病临床应用的专家共识》中<sup>[12]</sup>。

## 2 沙库巴曲缬沙坦治疗心律失常的循证证据

心力衰竭与心律失常之间存在相互作用,如房颤和心力衰竭经常共存,相互影响<sup>[13]</sup>。一方面,心房纤颤可能使心室前负荷减少,心室需要做更多的功维持心输出量,这会加快心室重构和心力衰竭发生的进程;类似的是,房颤期间快而不规则的心室反应可促进心动过速型心肌病,加重心室重塑。另一方面,心力衰竭引起的血流动力学紊乱可促进心房扩大、重构<sup>[14]</sup>。心力衰竭相关的结构重塑也可能进一步造成室性心律失常。因此心力衰竭治疗的药物可以降低心律失常的患病风险<sup>[15]</sup>。实际上,临床研究和临床前研究的结果都已表明,沙库巴曲缬沙坦具有潜在的抗心律失常和促心律失常作用,下面将对此展开讨论。

### 2.1 沙库巴曲缬沙坦对房性心律失常的影响

陈青松<sup>[16]</sup>的研究表明,沙库巴曲缬沙坦能降低持续性房颤患者电复律失败的发生率。对于接受射频消融术后的持续性房颤患者,沙库巴曲缬沙坦有利于房颤射频消融术后窦性心律的维持<sup>[17]</sup>,沙库巴曲缬沙坦相较于缬沙坦可显著降低房颤射频消融术后房颤的复发率<sup>[18]</sup>。心房纵向应变峰值(peak atrial longitudinal strain, PALS)是心房储备功能的重要指标。De Vecchis 等<sup>[19]</sup>的回顾性研究证明,沙库巴曲缬沙坦组对 PALS 的增幅大于 ACEI/ARB 组(26.5% vs 22.5%,  $P < 0.001$ ),房颤复发风险显著降低。Guerra 等<sup>[20]</sup>的研究采用心脏植入式电子装置(cardiac implantable electronic devices, CIEDs)远程检测,评估沙库巴曲缬沙坦对 HFrEF 患者房性心律失常的影响,结果使用沙库巴曲缬沙坦治疗阵发性房颤患者,房性心律失常复发率较低且负担减轻,室性早搏减少。而 Martens 等<sup>[21]</sup>的研究中观察到沙库巴曲缬沙坦组房颤的负荷没有减轻( $P = 0.332$ ),阵发性房性心动过速或房颤发作的次数也没有减少( $P = 0.159$ )。因此,尽管有一些研究证明沙库巴曲缬沙坦对房性心律失常有效,但现有的研究证据比较零散,研究结论也不完全一致,需要通过系统性评价寻找较为全面、可靠的证据。Anagnostopoulos 等<sup>[22]</sup>的系统性评价纳入了 4 项研



究, 涉及 497 例用 CIEDs 检测心律失常的 HFrEF 患者, 比较沙库巴曲缬沙坦与 ACEI/ARB 的疗效, 结果表明沙库巴曲缬沙坦组阵发性房颤/房性心动过速发生率显著降低 ( $RD: 0.09$ ,  $95\%CI: 0.14 \sim 0.03$ ,  $I^2: 0\%$ ), 同时室性心动过速、CIEDs 干预、不充分双室起搏风险也均有降低。在 PARADIGM-HF<sup>[9]</sup> 研究中, 沙库巴曲缬沙坦组 HFrEF 患者新发房颤的概率与依那普利组差异无统计学意义 ( $3.1\%$  vs  $3.1\%$ ,  $RD: 0.97$ ,  $95\%CI: 0.72 \sim 1.31$ ,  $P = 0.83$ )。在 PARAGON-HF<sup>[10]</sup> 研究中, 相比缬沙坦, 沙库巴曲缬沙坦显著增加了 HFpEF 患者中女性新发房颤的概率 ( $RR: 1.41$ ,  $95\%CI: 1.02 \sim 1.97$ ), 但沙库巴曲缬沙坦对男性无显著影响 ( $RR: 0.79$ ,  $95\%CI: 0.55 \sim 1.13$ ;  $P = 0.0189$ )。在 PIONEER-HF<sup>[23]</sup> 研究中, 针对急性失代偿性心力衰竭的患者, 沙库巴曲缬沙坦组与依那普利组新发房颤的概率差异无统计学意义 ( $RR: 1.32$ ,  $95\%CI: 0.30 \sim 5.88$ )。Patoulias 等<sup>[24]</sup> 的 Meta 分析包括了 PARADIGM-HF、PARAGON-HF、PIONEER-HF 三项研究, 共纳入 14 128 例 HFrEF 患者, 与单独使用缬沙坦相比, 沙库巴曲缬沙坦并未显著降低房颤的风险 ( $RR 1.05$ ,  $95\%CI 0.89 \sim 1.24$ ,  $I^2 = 0\%$ )。相关 Meta 分析也得出了阴性的结论, 即与 ACEI/ARB 类药物相比, 沙库巴曲缬沙坦不能降低心力衰竭患者发生房性心律失常的风险<sup>[25-26]</sup>。这给我们带来了一些启发: 未来的研究可从沙库巴曲缬沙坦对房性和室性心律失常作用机制的区别入手, 如何精准地检测房性心律失常也是值得思考的问题, 除了记录发作次数, 也可增加对房性心律失常持续时间的记录<sup>[25]</sup>。不难发现, 几项系统性评价纳入的研究都存在一定的局限性, 即房颤不是预先指定的终点, 并非所有患者都接受了连续心律监测, 也未报告房颤的检测方法, 而是根据报告的不良反应事件计算房颤发生率, 很难排除一些患者有自发转变成无症状房颤的可能性, 试验中房颤的发生率比实际值偏低。因此关于沙库巴曲缬沙坦对房性心律失常的作用还需要进一步探究。

## 2.2 沙库巴曲缬沙坦对室性心律失常的影响

相比 RAAs 系统受体阻滞剂, 服用沙库巴曲缬沙坦可降低发生心源性猝死、室性心律失常以及使用植入型心律转复除颤器 (implantable cardioverter defibrillator, ICD) 治疗的概率<sup>[27-28]</sup>。Snezhickiy 等<sup>[29]</sup> 报道了一例 61 岁扩张型心肌病、HFrEF 合并室性心律失常的患者, 在使用中等剂量 (49/51 mg bid) 的沙库巴曲缬沙坦治疗 6 个月后, 左室射血分数 (LVEF) 由 23% 增加到 52%, 室性早搏和室性心动过速发作的风险明显降低。为期 6 个月的

SAVE-ICD<sup>[30]</sup> 和 DISCOVER-沙库巴曲缬沙坦<sup>[31]</sup> 试验, 通过 LVEF 值判断沙库巴曲缬沙坦对 ICD 一级预防心源性猝死的影响, 两项研究表明, 使用沙库巴曲缬沙坦治疗 6 个月后 LVEF 增加, 分别有 25%、60% 的患者不再符合 ICD 植入一级预防的适应证。沙库巴曲缬沙坦的使用减小了因 ICD 植入带来的潜在风险, 如感染、其他并发症的出现以及多年后的再次干预等。然而, SAVE-ICD 试验表明, 服用沙库巴曲缬沙坦不能推迟所有心力衰竭患者植入 ICD 的时间, 原因是 5.9% 的患者在使用沙库巴曲缬沙坦治疗的前 6 个月出现心律失常事件, 因此通过 LVEF 检测心律失常事件的灵敏度较低<sup>[30]</sup>。

而对于已经接受 ICD 植入的心力衰竭患者, 沙库巴曲缬沙坦也可以降低阵发性室性心动过速及室颤的发生率<sup>[32]</sup>。De Diego 等<sup>[33]</sup> 纳入了 120 例使用 ICD 治疗的 HFrEF 患者, 为期 9 个月的研究表明, 服用沙库巴曲缬沙坦显著降低了持续性和非持续性室性心动过速的发作率, ICD 干预的次数减少, 室性早搏负担减轻, 双心室起搏百分比增加。Russo 等<sup>[34]</sup> 为期 12 个月的研究纳入了 167 例 ICD 植入的原发性扩张型心肌病患者, 这些患者在使用沙库巴曲缬沙坦治疗后, 室性和房性心律失常的发生率显著降低, 休克次数减少<sup>[34]</sup>, 心功能明显改善, 表明沙库巴曲缬沙坦在抗心律失常与诱导心脏逆重构方面有效。相比之下, El-Battrawy 等<sup>[35]</sup> 针对 59 例 HFrEF 患者的观察性研究中, 服用沙库巴曲缬沙坦治疗 12 个月后, 快速性室性心律失常的风险并没有降低, 推测心律失常事件的增加可能与患者依从性降低、心肌电解质水平的变化有关。沙库巴曲缬沙坦在服用 12 个月没有显著改善 LVEF 和心力衰竭分级<sup>[35]</sup>, 这表明沙库巴曲缬沙坦诱导心脏逆重构的作用有限。Vicent 等<sup>[36]</sup> 的研究记录了 19 例 (8.7%) 既往服用过 RAAs 系统受体阻滞剂的男性 HFrEF 患者, 在使用沙库巴曲缬沙坦后室性心律失常发生率较高, 其中大多数患者有缺血性心脏病史 (11/19)、室性心律失常史 (12/19) 和 ICD 病史 (17/19)<sup>[36]</sup>, 然而沙库巴曲缬沙坦是否是导致心律失常的原因仍然未知。

## 2.3 沙库巴曲缬沙坦治疗心律失常的临床前研究

Li 等<sup>[37]</sup> 的研究表明, 在家兔的房颤模型中, 沙库巴曲缬沙坦可抑制心房快速起搏引起的一系列反应, 如 L 型钙电流减少、心房有效不应期缩短、心房扩大、心肌纤维化及房颤发生率增高等, 可见沙库巴曲缬沙坦抑制心房电重塑和结构重塑, 在一定程度上降低了房性心律失常的发生率。左心耳封堵术 (left atrial appendage closure, LAAC) 可导致 A 型利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 水平降低, 间接诱发房性和室性心律失常。Cheng 等<sup>[38]</sup> 的研究



发现,在心室快速起搏诱导的 HF-LAAC 家兔模型中,沙库巴曲缬沙坦不仅恢复了 ANP 水平,使心房和心室的有效不应期正常化,还调节了钙调控蛋白的表达水平,降低了房颤和室颤的发生率。Sung 等<sup>[39]</sup>研究证明,在心室舒张功能障碍的高血压大鼠模型中,沙库巴曲缬沙坦显著降低了模型大鼠室性心动过速(1.14 次 vs 2.91 次)和室颤(1.72 次 vs 5.81 次)的发作次数,缩短了室性心律失常发作的时间,心功能、心室肥大和高血压得到改善,动作电位时程正常化, KCNN2 蛋白的表达减少[(0.38±0.07) vs (0.74±0.12) ng·mL<sup>-1</sup>, P<0.001]。在心肌梗死合并心力衰竭的家兔模型中,沙库巴曲缬沙坦组动作电位时程较短、传导速度较快、室性心律失常诱发率较低<sup>[40-41]</sup>,这可能与沙库巴曲缬沙坦部分下调心室肌细胞内 CaMK II -p 的表达有关<sup>[40]</sup>。Tsai 等<sup>[41]</sup>研究发现,沙库巴曲缬沙坦组外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞计数减少,其抗炎作用似乎也对减少室性心律失常的发生率有效。类似的是,在心肌梗死合并心力衰竭的大鼠模型中,沙库巴曲缬沙坦上调钾通道 ERG、KCNE1 和 KCNE2 蛋白的表达,缩短了心力衰竭诱导的心室有效不应期延长<sup>[42]</sup>。而在缺血性心肌病的大鼠模型中,沙库巴曲缬沙坦可降低室性心律失常的发生率,抑制交感神经重构,逆转心肌纤维化并上调间隙连接蛋白-43 的表达<sup>[43]</sup>。沙库巴曲缬沙坦也具有直接的抗心律失常作用:沙库巴曲(LBQ657)可显著降低晚期心力衰竭患者心室心肌细胞的钙火花频率、振幅、持续时间和肌浆网钙渗漏<sup>[44]</sup>。此外沙库巴曲缬沙坦减轻了心房快速起搏诱导的 HL-1 细胞内钙超载<sup>[37]</sup>。

### 3 结论

沙库巴曲缬沙坦作为作用于 RAAs 系统和 NPs 系统双系统的药物,其在心血管方面发挥了重要的作用,现已用于治疗 HFrfEF、高血压等疾病。越来越多的数据表明,沙库巴曲缬沙坦通过抑制心肌电重塑和结构重塑,在一定程度上对心律失常的治疗有效;此外沙库巴曲缬沙坦也可能对心肌细胞发挥直接的抗心律失常作用。沙库巴曲缬沙坦可在不同程度上调节心脏电生理学,并影响房性和室性心律失常的几个决定因素。未来,期待更多的研究阐明沙库巴曲缬沙坦在心律失常治疗上的有效性和安全性,以及心血管病理生理学上的复杂机制。

### 参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志, 2021, 36 (6): 521-545.

[2] Moran AE, Roth GA, Narula J, et al. 1990—2010 global cardiovascular disease atlas [J]. Glob Heart, 2014, 9 (1):

3-16.

[3] Feng LL, Karpinski PH, Sutton P, et al. LCZ696: a dual-acting sodium supramolecular complex [J]. Tetrahedron Lett, 2012, 53 (3): 275-276.

[4] Rossi F, Mascolo A, Mollace V. The pathophysiological role of natriuretic peptide-RAAS cross talk in heart failure [J]. Int J Cardiol, 2017, 226: 121-125.

[5] Jhund PS, McMurray JJ. The neprilysin pathway in heart failure: a review and guide on the use of sacubitril/valsartan [J]. Heart, 2016, 102 (17): 1342-1347.

[6] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. Eur Heart J, 2016, 37 (27): 2129-2200.

[7] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会. 心力衰竭合理用药指南(第 2 版) [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2019, 11 (7): 1-78.

[8] Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79 (17): e263-e421.

[9] McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (11): 993-1004.

[10] Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction [J]. N Engl J Med, 2019, 381 (17): 1609-1620.

[11] 张跃, 李宁, 邱健, 等. 血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂沙库巴曲缬沙坦治疗高血压的研究进展 [J]. 中华高血压杂志, 2021, 29 (6): 519-524.

[12] 中国医师协会全科医师分会. 沙库巴曲缬沙坦钠在基层心血管病临床应用的专家共识 [J]. 中国全科医学, 2021, 24 (23): 2885-2897.

[13] Verhaert DVM, Brunner-La Rocca HP, van Veldhuisen DJ, et al. The bidirectional interaction between atrial fibrillation and heart failure: consequences for the management of both diseases [J]. Europace, 2021, 23: ii40-ii45.

[14] Sutanto H, Lyon A, Lumens J, et al. Cardiomyocyte calcium handling in health and disease: insights from in vitro and in silico studies [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2020, 157: 54-75.

[15] Verma A, Kalman JM, Callans DJ. Treatment of patients with atrial fibrillation and heart failure with reduced ejection fraction [J]. Circulation, 2017, 135 (16): 1547-1563.

[16] 陈青松. 沙库巴曲缬沙坦对持续性心房颤动电复律短期结局的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.

[17] 黄琼, 刘荣. 持续性心房颤动射频消融术后应用沙库巴曲缬沙坦的疗效分析 [J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40 (7): 872-876.

[18] Wang Q, Zhuo C, Xia Q, et al. Sacubitril/valsartan can reduce atrial fibrillation recurrence after catheter ablation in

- patients with persistent atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2022, doi:10.1007/s 10557-022-07315-1.
- [19] De Vecchis R, Paccone A, Di Maio M. Favorable effects of sacubitril/valsartan on the peak atrial longitudinal strain in patients with chronic heart failure and a history of one or more episodes of atrial fibrillation: a retrospective cohort study [J]. *J Clin Med Res*, 2020, 12 (2): 100-107.
- [20] Guerra F, Pimpini L, Flori M, et al. Sacubitril/valsartan reduces atrial fibrillation and supraventricular arrhythmias in patients with HFrEF and remote monitoring: preliminary data from the save the rhythm [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41: 926.
- [21] Martens P, Nuyens D, Rivero-Ayerza M, et al. Sacubitril/valsartan reduces ventricular arrhythmias in parallel with left ventricular reverse remodeling in heart failure with reduced ejection fraction [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108: 1074-1082.
- [22] Anagnostopoulos I, Kousta M, Kossyvakis C, et al. Is there an antiarrhythmic benefit from switching to sacubitril/valsartan therapy? A systematic review and meta-analysis [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (1): 337.
- [23] Velazquez EJ, Morrow DA, DeVore AD, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in acute decompensated heart failure [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380 (6): 539-548.
- [24] Patoulias D, Papadopoulos C, Toumpourleka M, et al. Meta-analysis of dedicated heart failure trials evaluating the effect of sacubitril/valsartan on major cardiac rhythm disorders [J]. *Am J Cardiol*, 2021, 161: 120-122.
- [25] Ahmad J, Sultan A, Dominic P. Effect of sacubitril-valsartan on incidence of atrial fibrillation: a meta-analysis [J]. *Circulation*, 2021, 144 (1): A10789.
- [26] Liu X, Liu H, Wang L, et al. Role of sacubitril-valsartan in the prevention of atrial fibrillation occurrence in patients with heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (1): 1-9.
- [27] Valentim GA, Pereira-da-Silva T. Antiarrhythmic effect of sacubitril-valsartan: cause or consequence of clinical improvement [J]. *J Clin Med*, 2019, 8: 869.
- [28] Vecchi AL, Abete R, Marazzato J, et al. Ventricular arrhythmias and ARNI: is it time to reappraise their management in the light of new evidence? [J]. *Heart Fail Rev*, 2022, 27 (1): 103-110.
- [29] Snezhitskiy VA, Kalatsei LV, Matyukevich MC, et al. Clinical experience of use of sacubitril/valsartan in a patient with dilated cardiomyopathy, chronic heart failure with reduced ejection fraction and ventricular arrhythmias [J]. *Cardiac Arrhythmias*, 2021, 1 (1): 39-48.
- [30] Guerra F, Ammendola E, Ziacchi M, et al. Effect of Sacubitril/Valsartan on left ventricular ejection fraction and on the potential indication for implantable cardioverter defibrillator in primary prevention: the SAVE-ICD study [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2021, 77 (12): 1835-1842.
- [31] Pastore MC, Mandoli GE, Giannoni A, et al. Sacubitril/valsartan reduces indications for arrhythmic primary prevention in heart failure with reduced ejection fraction: insights from discover-arni, a multicenter Italian register [J]. *Eur Heart J Open*, 2022, 2 (1): 1-10.
- [32] 张常莹, 刘晓宇, 等. 沙库巴曲缬沙坦对植入了心脏除颤器的心力衰竭患者室性心律失常发生的影响 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2021, 35 (4): 305-309.
- [33] De Diego C, Gonzalez-Torres L, Nunez JM, et al. Effects of angiotensin-neprilysin inhibition compared to angiotensin inhibition on ventricular arrhythmias in reduced ejection fraction patients under continuous remote monitoring of implantable defibrillator devices [J]. *Heart Rhythm*, 2018, 15 (3): 395-402.
- [34] Russo V, Bottino R, Rago A, et al. The effect of sacubitril/valsartan on device detected arrhythmias and electrical parameters among dilated cardiomyopathy patients with reduced ejection fraction and implantable cardioverter defibrillator [J]. *J Clin Med*, 2020, 9 (4): 1111.
- [35] El-Battrawy I, Pilsinger C, Liebe V, et al. Impact of sacubitril/valsartan on the long-term incidence of ventricular arrhythmias in chronic heart failure patients [J]. *J Clin Med*, 2019, 8 (10): 1582.
- [36] Vicent L, Mendez-Zurita F, Vinolas X, et al. Clinical characteristics of patients with sustained ventricular arrhythmias after sacubitril/valsartan initiation [J]. *Heart Vessel*, 2020, 35 (1): 136-142.
- [37] Li LY, Lou Q, Liu GZ, et al. Sacubitril/valsartan attenuates atrial electrical and structural remodelling in a rabbit model of atrial fibrillation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881: 173120.
- [38] Cheng WH, Lugtu IC, Chang SL, et al. Effects of angiotensin receptor-neprilysin inhibitor in arrhythmogenicity following left atrial appendage closure in an animal model [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2021, 35 (4): 759-768.
- [39] Sung YL, Lin TT, Syu JY, et al. Reverse electromechanical modelling of diastolic dysfunction in spontaneous hypertensive rat after sacubitril/valsartan therapy [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7 (6): 4040-4050.
- [40] Chang PC, Wo HT, Lee HL, et al. Sacubitril/valsartan therapy ameliorates ventricular tachyarrhythmia inducibility in a rabbit myocardial infarction model [J]. *J Card Fail*, 2020, 26 (6): 527-537.
- [41] Tsai YN, Cheng W, Chang YT, et al. Mechanism of angiotensin receptor-neprilysin inhibitor in suppression of ventricular arrhythmia [J]. *J Cardiol*, 2021, 78 (4): 275-284.
- [42] Chang PC, Lin SF, Chu Y, et al. LCZ696 therapy reduces ventricular tachyarrhythmia inducibility in a myocardial infarction-induced heart failure rat model [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019: 6032631.
- [43] Huo JY, Jiang WY, Chen C, et al. Effects of angiotensin receptor neprilysin inhibitors on inducibility of ventricular arrhythmias in rats with ischemic cardiomyopathy [J]. *Int Heart J*, 2019, 60 (5): 1168-1175.
- [44] Eiringhaus J, Wunsche CM, Tirilomis P, et al. Sacubitrilat reduces pro-arrhythmic sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in human ventricular cardiomyocytes of patients with end-stage heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7 (5): 2992-3002.

(收稿日期: 2022-06-23; 修回日期: 2022-09-16)

# 决奈达隆和直接口服抗凝血药相互作用的研究进展

姚云娟, 张峻, 吴迪\* (昆明医科大学第一附属医院临床药学科, 昆明 650032)

**摘要:** 房颤患者在接受抗凝治疗的同时, 常需要联合抗心律失常药。在抗凝血药与抗心律失常药联用方案中, 直接口服抗凝血药联合决奈达隆较为常见。直接口服抗凝血药均为 P-糖蛋白 (P-gp) 的底物, 且部分经细胞色素 P450 (CYP450) 酶代谢; 而决奈达隆能抑制 P-gp 的转运, 是 CYP3A4 的中度抑制剂, 两者联用可能会发生相互作用, 从而影响房颤患者的抗凝治疗安全性。由于相关研究数量有限, 目前国内外指南及专家共识对决奈达隆与直接口服抗凝血药联用的推荐存在不一致现象, 本文对决奈达隆分别与四种直接口服抗凝血药相互作用的最新研究进行综述, 以期为临床合理用药提供更多参考依据。

**关键词:** 直接口服抗凝血药; 决奈达隆; 房颤; 药物相互作用

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0731-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.028

## Updates on drug-drug interactions between dronedarone and direct oral anticoagulants

YAO Yun-juan, ZHANG Jun, WU Di\* (Department of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

**Abstract:** Patients with atrial fibrillation often receive a concomitant administration of antiarrhythmic drugs and anticoagulations, most commonly dronedarone with direct oral anticoagulants (DOACs). Dronedarone is a moderate inhibitor of CYP3A4 and P-glycoproteins (P-gp), while all DOACs are substrates of P-gp and are partly metabolized by CYP450 enzymes. There have been safety concerns of dronedarone when used in combination with DOACs, yet current recommendations have conflicts due to limited clinical evidence. This article reviewed recent studies on interaction between dronedarone with 4 DOACs to provide more references for rational clinical use.

**Key words:** direct oral anticoagulant; dronedarone; atrial fibrillation; drug-drug interaction

抗凝治疗和节律控制是房颤患者药物治疗中不可或缺的重要部分, 临床常需要将抗凝血药和抗心律失常药联合使用<sup>[1-2]</sup>。决奈达隆是目前国内外权威指南推荐的用于房颤患者长期节律控制的一线治疗药物<sup>[3-4]</sup>。有调查研究显示, 在房颤患者的用药方案中, 决奈达隆与直接口服抗凝血药 (direct oral anticoagulants, DOACs) 的联合使用率达 3.41%<sup>[5]</sup>。决奈达隆是中度 CYP3A4 抑制剂和 P-gp 抑制剂; 而 DOACs, 包括达比加群、利伐沙班、阿哌沙班和艾多沙班, 均为 P-gp 的底物, 其中利伐沙班、阿哌沙班和艾多沙班还不同程度地经 CYP3A4 酶代谢<sup>[6-7]</sup>。理论上, 决奈达隆可能抑制 DOACs 代谢或排泄而增加 DOACs

的暴露量, 从而增加房颤患者的不良事件发生风险<sup>[8]</sup>, 但由于现有的临床数据较为有限, 目前国内外用药说明及指南推荐也不一致, 因此给临床用药带来一定困扰。本文对决奈达隆分别与上述四种 DOACs 相互作用的最新研究进展进行综述, 以期为临床合理用药提供参考。

### 1 决奈达隆与达比加群的相互作用

目前欧洲药品管理局规定禁止将决奈达隆与达比加群联合使用<sup>[9]</sup>。这主要是基于一项在健康受试者身上开展的关于决奈达隆和达比加群联合用药的药动学/药效学 (pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD) 研究<sup>[10]</sup>, 该研究纳入 16 名健康志愿者, 采用开放标签、随机、两

基金项目: 昆明医科大学研究生创新基金 (No. 2022S249)。

作者简介: 姚云娟, 女, 硕士, 主要从事临床药学工作, email: 2996954510@qq.com \*通信作者: 吴迪, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学及医院药事管理, email: shelleywu928@hotmail.com



期、双交叉治疗方法,比较联用决奈达隆(400 mg bid)对单剂量达比加群(150 mg qd)的药代动力学参数的影响程度。研究发现当达比加群(150 mg qd)与决奈达隆(400 mg bid)联合用药时,达比加群稳态  $C_{max}$  和  $AUC_{0\sim 24}$  分别增加 1.73 倍和 1.99 倍;但在药效学方面,该研究并未观察到实际的临床严重不良事件,推测可能是由于达比加群增加的暴露量仍在其治疗窗内,但鉴于该研究中选用的达比加群的给药频次为 qd,与说明书中规定的给药频次 bid 不相同,因此对该结果的解读仍需谨慎。来自美国食品药品监督管理局(FDA)的不良事件数据在一定程度上也显示了达比加群与决奈达隆联合使用在真实世界的安全性,Gandhi 等<sup>[11]</sup>从 FDA 不良事件报告系统数据库中提取到 108 份在 2010 年 10 月—2011 年 12 月期间联合使用决奈达隆及达比加群的病例数据,其中有 51 份与出血事件相关,分析结果显示,与单用达比加群的患者相比,联合使用达比加群与决奈达隆并没有增加患者的出血风险( $OR: 13.80, 95\%CI: 9.45 \sim 20.14$ )。

Gandhi 等<sup>[11]</sup>的报道中并未详述患者使用达比加群的剂量,而在一项瑞典开展的前瞻性研究中,进一步探讨了决奈达隆联合低剂量达比加群的可行性<sup>[12]</sup>。该研究纳入 33 名同时接受达比加群(110 mg bid)和决奈达隆(400 mg bid)治疗的房颤患者,结果发现,联用决奈达隆使达比加群暴露量增加,研究中 110 mg bid 达比加群中位血药谷浓度与达比加群 III 期临床试验(RE-LY 试验)<sup>[13]</sup>中单用 150 mg bid 达比加群患者的中位血药谷浓度相似;在中位治疗时间为 13 个月的联合用药期内,患者发生出血和血栓栓塞事件的风险均较低。Lock 等<sup>[14]</sup>报道了 2 例个案:其中 1 例 40 岁且肾功能正常的女性房颤患者联用决奈达隆(400 mg bid)和达比加群(150 mg bid),用药期间监测得到的达比加群血药浓度高于 RE-LY<sup>[13]</sup>研究中单用 150 mg bid 达比加群的患者,医师考虑存在出血风险,将达比加群剂量减少至 110 mg bid,一周后重新监测的达比加群血药浓度在可接受的范围内,在后期的随访中也没有发生不良事件;另一例 71 岁且肾功能正常的男性患者,将达比加群(150 mg bid)和决奈达隆(400 mg bid)间隔 2 h 分开服用,监测其达比加群血药浓度,没有观察到暴露量的显著增加。

基于现有研究表明,房颤患者联用决奈达隆和达比加群会使达比加群暴露量增加,但通过优化联合用药方案,包括减少达比加群剂量、增加两药的给药间隔、规律监测达比加群的血药浓度,

可降低患者的出血风险。

## 2 决奈达隆与利伐沙班的相互作用

目前尚无决奈达隆与利伐沙班合并用药的临床 PK/PD 数据,利伐沙班的用药说明及国内外专家共识<sup>[2, 15]</sup>中暂不推荐将其与决奈达隆联用。

在一项以利伐沙班为探针底物的体外抑制实验中,将体外抑制参数拟合到静态机制模型中,结果显示决奈达隆能够抑制 CYP3A4 和 CYP2J2 在肝脏及肠道对利伐沙班的代谢以及 P-gp 介导的利伐沙班外排,使利伐沙班暴露量增加<sup>[16]</sup>。此外,该研究还发现决奈达隆的主要代谢产物 *N*-脱丁基决奈达隆(N-desbutyldronedarone, NDBD)对 CYP3A4 和 CYP2J2 也有抑制作用,但研究中采用的模型无法同时模拟上述所有因素的协同抑制作用,因此,该研究认为决奈达隆对利伐沙班的抑制作用可能被低估。Wen 等<sup>[17]</sup>利用既往相关文献中报道的决奈达隆 PK 参数建立了决奈达隆生理药代动力学(physiologically-based pharmacokinetic modeling, PBPK)模型,预测决奈达隆与利伐沙班及阿哌沙班的药物相互作用程度,模型预测中以生物等效性为剂量调整标准,当联合使用决奈达隆时,肾功能正常与中重度肾功能损害的房颤患者分别选择 15 mg qd 和 10 mg qd 剂量利伐沙班与单药使用时生物等效,出血风险相当。因此建议,当联合使用决奈达隆时,肾功能正常的房颤患者可采用 15 mg qd 利伐沙班的减剂量方案,中重度肾功能损害患者选择 10 mg qd 利伐沙班的减量方案可能是合适的。

在临床数据方面,一项纳入 91 330 名房颤患者的大样本研究,评估了 DOACs 联合使用具有相同代谢途径的药物时的出血风险<sup>[18]</sup>。研究发现与单用 DOACs 相比,决奈达隆联合达比加群( $P = 0.89$ )、阿哌沙班( $P = 0.68$ )或利伐沙班( $P = 0.92$ )均没有显著增加患者发生大出血的风险;但由于决奈达隆联合利伐沙班的房颤患者的胃肠道出血风险增加( $P = 0.06$ ),进而导致患者的整体出血风险增加( $P = 0.04$ )。由于研究中并未详述房颤患者使用利伐沙班的剂量,出血风险与剂量之间的关系不明确。

Escobar 等<sup>[19]</sup>评估了房颤患者联合使用决奈达隆和利伐沙班治疗的安全性和有效性,研究纳入 23 名阵发性房颤患者[年龄( $60.9 \pm 9.1$ )岁],在随访期内[( $9.1 \pm 6.7$ )个月],没有患者发生重大的血栓栓塞或出血事件。该研究提示决奈达隆和利伐沙班联合治疗可能是安全的。由于房颤患者发生出血的风险与利伐沙班剂量显著相关,而研究约 1/4 的患者接受低于标准剂量的利伐沙

班 (15 mg qd), 这在一定程度上也可能抵消了决奈达隆与利伐沙班相互作用的影响。

减少剂量的利伐沙班与决奈达隆联合使用的安全性和有效性也被基于亚洲人群的研究证实。一项在中国台湾开展的多中心队列研究显示, 房颤患者分别接受利伐沙班、利伐沙班联合胺碘酮、利伐沙班联合决奈达隆以及利伐沙班联合普罗帕酮四组间的安全性 ( $P = 0.892$ )、有效性 ( $P = 0.336$ ) 和主要心脏不良事件 ( $P = 0.674$ ) 的累积发生率相似; 而且在利伐沙班联合决奈达隆组中, 房颤患者的新发系统性血栓栓塞事件最少 ( $P = 0.029$ ), 全因死亡率最低 ( $P = 0.013$ )<sup>[20]</sup>。在剂量方面, 相较于其他三组, 利伐沙班联合决奈达隆组中使用低剂量利伐沙班 (10 mg qd) 的患者 (77.1%) 是最多的。另一项回顾性队列研究<sup>[21]</sup>, 评估比较了 93 例房颤患者单用决奈达隆以及联合用药的安全性和有效性, 其中联合用药组中联用药物有利伐沙班 (10 mg qd)、华法林以及抗血小板药。与其他三组相比, 联用 10 mg qd 利伐沙班与决奈达隆的患者的轻度出血和胃肠道出血的发生率有升高的趋势, 但差异无统计学意义 (轻度出血  $P = 0.101$ ; 胃肠道出血  $P = 0.196$ ); 另外, 利伐沙班联用决奈达隆组中没有观察到任何疗效终点事件、严重心脏不良事件和非胃肠道安全终点事件, 该研究结果进一步证实了决奈达隆联用利伐沙班 10 mg qd 的可行性。

上述研究提示, 对于房颤患者, 当需要联合使用决奈达隆时, 采用较低剂量的利伐沙班似乎是合理的, 特别是对于肾功能差的患者, 可考虑联用 10 mg qd 利伐沙班, 但联合用药期间仍需警惕消化道出血的风险。

### 3 决奈达隆与阿哌沙班的相互作用

在一项来自美国的回顾性队列研究中, 比较了房颤患者使用 P-gp 和中度 CYP3A4 抑制剂联合利伐沙班或阿哌沙班治疗的出血风险<sup>[22]</sup>。经过 17 个月的随访, 与单用 DOACs 的患者相比, 联用包括决奈达隆在内的 P-gp 和中度 CYP3A4 抑制剂的房颤患者的出血风险增加 ( $P = 0.006$ )。但该研究并没有将不同的抑制剂及不同的 DOACs 进行分组比较, 因此, 决奈达隆对阿哌沙班作用的单独影响仍需进一步评估。

Friberg 等<sup>[23]</sup> 比较了决奈达隆联合标准剂量阿哌沙班 (5 mg bid) 与决奈达隆联合华法林两队列间的出血事件发生风险。在 14 个月随访窗内, 阿哌沙班和华法林两个队列的出血事件和死亡事件均较少, 且两个队列在出血风险方面没有显著差异 ( $P = 0.121$ )。

一项来自美国的回顾性队列研究评估了使用 DOACs 联合决奈达隆的房颤患者发生大出血的风险, 发现与单用阿哌沙班相比, 决奈达隆联用阿哌沙班的大出血风险没有增加 ( $P = 0.16$ )<sup>[24]</sup>。该研究结论与 2017 年的一项大样本研究结果相似<sup>[18]</sup>, 与单用 DOACs 相比, 决奈达隆联合阿哌沙班没有显著增加房颤患者发生大出血的风险 ( $P = 0.68$ )。由于前期的临床研究没有显示出决奈达隆与阿哌沙班联用有明显的相互作用, 相关指南和说明书均没有提出两药联用时需要调整剂量。然而值得注意的是, 最新发表的 PBPK 研究中<sup>[17]</sup>, 模型预测: 在正常肾功能或肾功能不全的房颤人群中, 合用决奈达隆会导致阿哌沙班的 AUC 平均增加 1.33 ~ 1.46 倍; 在出血风险方面, 与单用 5 mg bid 阿哌沙班的老年房颤患者相比, 肾功能正常、中度受损和严重受损的房颤患者在接受阿哌沙班 5 mg bid 与决奈达隆合用时, 出血风险增加 1.45 ~ 1.95 倍。该研究结果提示, 决奈达隆和阿哌沙班的相互作用不可忽视, 特别是伴有肾功能不全的患者, 联用决奈达隆和阿哌沙班发生出血的风险更高, 可能需要减量处理。但体外研究和数据模拟的结果可能与真实临床研究存在不一致, 该结论仍需要更多临床研究结果证实。

根据有限的研究结果提示, 决奈达隆联合阿哌沙班可能存在一定的出血风险, 在两药联用期间需要根据患者肾功能情况谨慎选择用药剂量。

### 4 决奈达隆与艾多沙班的相互作用

艾多沙班上市较晚, 关于决奈达隆与艾多沙班相互作用的文献报道非常有限。一项针对 34 名健康志愿者的开放标签、随机、两期、双交叉治疗研究评估了艾多沙班 (60 mg qd) 与包括决奈达隆在内的 6 种 P-gp 底物和 / 或抑制剂之间潜在的药代动力学相互作用<sup>[25]</sup>。结果显示, 与单用艾多沙班相比, 艾多沙班与决奈达隆联合用药的  $C_{max}$  和  $AUC_{0\sim 24}$  分别增加 45.8% 和 84.5%, 24 h 血药浓度增加 157.6%。在安全性方面, 房颤患者对艾多沙班与决奈达隆联合方案耐受性良好, 研究中没有发生死亡或严重不良事件。一项随机双盲试验比较了两种剂量的艾多沙班 (60 mg qd 和 30 mg qd) 与华法林的有效性和安全性<sup>[26]</sup>。研究中对于中度肾功能不全、体质量  $\leq 60$  kg 或使用包括决奈达隆在内的强效 P-gp 抑制剂的房颤患者选择剂量减半的艾多沙班。结果显示, 在 33 个月随访期内, 两种剂量的艾多沙班在安全性和有效性方面均不劣于华法林。与高剂量艾多沙班组 (60 mg qd) 相比, 低剂量艾多沙班组 (30 mg qd) 的各种出血 (大出血、颅内出血、胃肠道大出血和致命 /



威胁生命的出血)发生率均较低。由此推测,对于同时服用 P-gp 抑制剂(如决奈达隆)的患者,选择低剂量艾多沙班的方案或许是合理的。基于该研究,艾多沙班说明书中推荐:当房颤患者在使用艾多沙班期间联用决奈达隆时,艾多沙班的推荐剂量为 30 mg qd。

目前,关于决奈达隆与艾多沙班相互作用的研究相对较少,在有更多临床研究数据之前,具体用药建议遵照艾多沙班说明书及指南推荐。

## 5 小结

根据相关临床研究和病例报道,决奈达隆联合 DOACs 均会不同程度的引起 DOACs 暴露量增加,但这种暴露量的增加并没有观察到有显著临床意义的安全性事件,这也提示 DOACs 的治疗窗范围可能较宽。但需要注意的是,目前决奈达隆联合 DOACs 的研究相对较少,且多为小样本量的回顾性研究,并且多数研究并未报道小出血事件的风险,因此这种联合方案仍需谨慎。在联合用药时,采用更低的 DOACs 给药剂量、调整两药给药间隔、规律监测血药浓度等手段似乎是可行的。但在有更多临床研究数据之前,具体用药仍需遵照相关用药说明书及指南推荐。

## 参考文献

- [1] 中华医学会心电生理和起搏分会,中国医师协会心律学专业委员会,中国房颤中心联盟心房颤动防治专家工作委员会.心房颤动:目前的认识和治疗建议(2021)[J].中华心律失常学杂志,2022,26(1):15-88.
- [2] Steffel J, Collins R, Antz M, et al. 2021 European Heart Rhythm Association practical guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation[J]. *Europace*, 2021, 23(10): 1612-1676.
- [3] Naccarelli GV, Bhatt DL, Camm AJ, et al. Evaluation of the switch from amiodarone to dronedarone in patients with atrial fibrillation: results of the ARTEMIS AF studies[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2020, 25(5): 425-437.
- [4] 陈意浓,孙艺红.决奈达隆在心房颤动治疗中的证据和地位[J].中华心血管病杂志,2021,49(3):278-282.
- [5] Boriani G, Blomström-Lundqvist C, Hohnloser SH, et al. Safety and efficacy of dronedarone from clinical trials to real-world evidence: implications for its use in atrial fibrillation[J]. *Europace*, 2019, 21(12): 1764-1775.
- [6] Chao TF, Joung B, Takahashi Y, et al. 2021 Focused update consensus guidelines of the asia pacific heart rhythm society on stroke prevention in atrial fibrillation: executive summary[J]. *Thromb Haemost*, 2022, 122(1): 20-47.
- [7] Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. ESC Scientific document group. 2020 ESC guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)[J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(5): 373-498.
- [8] Kambayashi R, Goto A, Nunoi Y, et al. An exploratory analysis of effects of poyendarone, a deuterated analogue of dronedarone, on the canine model of paroxysmal atrial fibrillation[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394(6): 1103-1112.
- [9] Boriani G, Blomström-Lundqvist C, Hohnloser SH, et al. Safety and efficacy of dronedarone from clinical trials to real-world evidence: implications for its use in atrial fibrillation[J]. *Europace*, 2019, 21(12): 1764-1775.
- [10] Brunet A, Hermabessiere S, Benain X. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of dronedarone and dabigatran in healthy subjects[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32: 618-619.
- [11] Gandhi PK, Gentry WM, Bottorff MB. Dabigatran-dronedarone interaction in a spontaneous reporting system[J]. *J Am Pharm Assoc*, 2013, 53(4): 414-419.
- [12] Mochalina N, Juhlin T, Platonov PG, et al. Concomitant use of dronedarone with dabigatran in patients with atrial fibrillation in clinical practice[J]. *Thromb Res*, 2015, 135(6): 1070-1074.
- [13] Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(12): 1139-1151.
- [14] Lock J, Patel RK, Brookes C, et al. Clinical experience of prescribing dabigatran etexilate with dronedarone: the role of therapeutic drug monitoring[J]. *Ther Drug Monit*, 2016, 38(6): 813-814.
- [15] 孙艺红,马长生,吴书林.决奈达隆临床应用的中国专家建议[J].中华内科杂志,2021,60(12):1139-1147.
- [16] Cheong EJ, Goh JJ, Hong Y, et al. Application of static modeling-in the prediction of in vivo drug-drug interactions between rivaroxaban and antiarrhythmic agents based on in vitro inhibition studies[J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(3): 260-268.
- [17] Wen HN, He QF, Xiang XQ, et al. Predicting drug-drug interactions with physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and optimal dosing of apixaban and rivaroxaban with dronedarone co-administration[J]. *Thromb Res*, 2022, 218: 24-34.
- [18] Chang SH, Chou IJ, Yeh YH, et al. Association between use of non-vitamin K oral anticoagulants with and without concurrent medications and risk of major bleeding in nonvalvular atrial fibrillation[J]. *JAMA*, 2017, 318(13): 1250-1259.
- [19] Escobar C, Arceluz M, Montes de Oca R, et al. Concomitant rivaroxaban and dronedarone administration in patients with nonvalvular atrial fibrillation[J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2017, 70(2): 121-122.
- [20] Chiou WR, Huang CC, Lin PL, et al. Safety and effectiveness of rivaroxaban in combination with various antiarrhythmic drugs in patients with non-permanent atrial fibrillation[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2021, 21(4): 459-469.
- [21] Lin PL, Chiou WR, Su MI, et al. Exploratory evaluation of rhythm control by dronedarone in combination with low-dose rivaroxaban, warfarin, antiplatelet, or none of the an-



- tithrombotic therapy in high-risk patients with non-permanent atrial fibrillation: a retrospective cohort study [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2021, 27: 10760296211052968.
- [22] Hanigan S, Das J, Pogue K, et al. The real world use of combined P-glycoprotein and moderate CYP3A4 inhibitors with rivaroxaban or apixaban increases bleeding [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2020, 49 (4): 636-643.
- [23] Friberg L. Safety of apixaban in combination with dronedarone in patients with atrial fibrillation [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 264: 85-90.
- [24] Gandhi SK, Reiffel JA, Boiron R, et al. Risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation taking dronedarone in combination with a direct acting oral anticoagulant ( from a U. S. claims database ) [J]. *Am J Cardiol*, 2021, 159: 79-86.
- [25] Mendell J, Zahir H, Matsushima N, et al. Drug-drug interaction studies of cardiovascular drugs involving P-glycoprotein, an efflux transporter, on the pharmacokinetics of edoxaban, an oral factor Xa inhibitor [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2013, 13 (5): 331-342.
- [26] Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (22): 2093-2104.

(收稿日期: 2022-08-18; 修回日期: 2022-10-08)

## 胃癌靶向治疗的研究进展

潘旭红<sup>1</sup>, 马未节<sup>1</sup>, 邵香香<sup>1</sup>, 王永英<sup>1</sup>, 李红玲<sup>2\*</sup> (1.甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000; 2.甘肃省人民医院肿瘤科, 兰州 730000)

**摘要:** 胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤, 严重威胁人类健康。其发病与幽门螺杆菌感染、遗传、高亚硝酸盐饮食、癌前病变等多种因素相关。早期胃癌发病隐匿, 诊断率低(约10%), 同时缺乏治疗和预后相关的生物学标志物, 治疗预后不佳, 患者的中位生存期较短。近年来随着对癌基因序列、发病机制的深入研究, 基于基因的靶向精准医疗成为胃癌尤其是晚期及复发癌治疗的新模式。分子靶向治疗不仅能提高抗癌疗效的特异性, 同时能降低非选择性耐药和毒性作用。本文将对胃癌靶向治疗分子机制及最新的临床试验研究作一综述, 以为胃癌的治疗提供更好的帮助。

**关键词:** 胃癌; 靶向治疗; 分子机制; 研究进展

中图分类号: R735.2, R97 文献标识码: A  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.029

文章编号: 1672-2981(2023)03-0735-07

## Research progress in targeted therapy for gastric cancer

PAN Xu-hong<sup>1</sup>, MA Wei-jie<sup>1</sup>, SHAO Xiang-xiang<sup>1</sup>, WANG Yong-ying<sup>1</sup>, LI Hong-ling<sup>2\*</sup> (1. *Clinical Medical College of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000*; 2. *Department of Oncology, Gansu People's Hospital, Lanzhou 730000*)

**Abstract:** Gastric cancer is the most common malignant tumor of the digestive system, which seriously threatens human health. Its incidence is related to helicobacter pylori infection, genetics, high nitrite diet, precancerous lesions and other factors. Early gastric cancer has insidious onset, and low diagnostic rate (about 10%), lacks treatment and prognosis related biomarkers, and result in poor prognosis and short median survival of patients. In recent years, with the in-depth study of oncogene sequence and pathogenesis, gene-based targeted precision medicine has become a new model in the

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.81760537, No.81560498); 甘肃省科技厅国际合作项目 (No.20YF8WA096); 甘肃省人民医院院内项目 (No.19SYPYA-3); 甘肃省优秀研究生“创新之星”项目 (No.2021CXZX-737)。

**作者简介:** 潘旭红, 女, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事肿瘤发病机制及临床治疗方面的研究, email: 18093205554@163.com

**\*通信作者:** 李红玲, 女, 博士, 主任医师, 主要从事恶性肿瘤药物治疗的基础研究和恶性肿瘤的临床诊断与治疗, email: Lihongling1969@126.com

treatment of gastric cancer, especially advanced and recurrent cancer. Molecular targeted therapy not only improves the specificity of anticancer efficacy, but also reduces non-selective drug resistance and toxicity. This article reviewed the molecular mechanism of targeted therapy for gastric cancer and the latest clinical trials to provide better help for gastric cancer.

**Key words:** gastric cancer; targeted therapy; molecular mechanism; research progress

胃癌 (gastric cancer, GC) 是全球第五大恶性肿瘤, 我国胃癌的发病率和病死率高居第二, 社会负担和卫生经济支出负担也随之加重<sup>[1-2]</sup>。早期胃癌的治疗主要采用内镜下切除或手术治疗, 进展期胃癌主要采用放化疗等治疗方法, 但其中位生存期 (median survival time, MS) 仍小于 1 年<sup>[3]</sup>。靶向治疗在晚期胃癌治疗中, 显示出良好的效果。

分子靶向治疗是使用针对特定分子靶点的药物, 调控与肿瘤发生密切的突变基因及相关信号通路, 从而抑制肿瘤细胞的生长及扩散。大量研究表明, 分子靶向治疗可延长晚期胃癌患者的生存时间<sup>[4-5]</sup>。这些突变基因和相关信号通路的识别为胃癌患者分层提供了路线图, 并为靶向治疗提供了有前景的策略。分子靶向治疗不仅有较高的特异性和选择性, 而且能够准确地识别和攻击肿瘤细胞中的异常蛋白, 同时不会对正常细胞造成损害<sup>[6]</sup>。全面了解分子靶向治疗的理论基础将有助于胃癌临床治疗的突破, 本文就胃癌靶向治疗分子机制以及最新的临床试验研究作一综述。

## 1 表皮生长因子家族受体

表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR), 也称为 ErbB 受体, 属于 I 型酪氨酸激酶受体家族, 是一类跨膜糖蛋白受体酪氨酸激酶。主要包括 HER1 (EGFR)、HER2 (Neu)、HER3 和 HER4 等四个家族成员, 它们具有相似的结构, 由胞外配体结合域、跨膜域和胞内酪氨酸激酶等结构域组成。EGFR 在胃癌中表达率约为 30%, 是引起胃癌患者不良预后的重要独立危险因素, 其过表达与患者不良预后相关, 是胃癌治疗的重要靶点<sup>[7-8]</sup>。目前在抗 HER1 (EGFR)、HER2 单克隆抗体的研究方面取得了一定的进展。

### 1.1 西妥昔单抗 (cetuximab, C225)

西妥昔单抗是第一个针对 EGFR 的 IgG1 单克隆抗体, 通过封闭配体结合区来竞争受体, 阻止了配体诱导的 EGFR 酪氨酸激酶的激活而发挥抗肿瘤作用。一项西妥昔单抗联合化疗 (奥沙利铂/亚叶酸钙/5-氟尿嘧啶, FUFOX) 治疗进展期胃癌患者的 II 期研究显示, 西妥昔单抗联合 FUFOX 在转移性胃癌中显示了高反应率<sup>[9]</sup>。然而在一项

针对晚期胃癌的随机 III 期研究显示, 与单独化疗相比, 在卡培他滨和顺铂的基础上加用西妥昔单抗并不能改善患者的无进展生存期 (progression free survival, PFS)<sup>[10]</sup>。关于西妥昔单抗在胃癌患者中的应用, 有待进一步研究。

其他抗 EGFR 的药物有帕尼单抗、厄洛替尼及吉非替尼, 其在晚期结直肠癌、非小细胞肺癌的治疗中取得了较为理想的效果<sup>[11-12]</sup>。一项 III 期临床试验研究, 与单独化疗相比, 接受帕尼单抗加 EOX 化疗方案 (表柔比星、奥沙利铂、卡培他滨) 的进展期胃癌患者生存期无明显改善, 且 EGFR 抑制剂可能拮抗蒽环类药物的抗肿瘤作用<sup>[13]</sup>。目前尚缺乏厄洛替尼及吉非替尼关于在胃癌的辅助治疗中的相关研究及文献, 其有效性及安全性还有待进一步临床验证。

### 1.2 曲妥珠单抗 (trastuzumab)

曲妥珠单抗是抗 HER2 的重组人源化单克隆抗体, 已被批准用于晚期 HER2 + 胃癌的一线治疗<sup>[14-15]</sup>。研究显示约 20% 的胃癌患者存在 HER2 蛋白过表达或扩增<sup>[16-17]</sup>, 与胃癌患者的性别、肿瘤部位、分化程度、TNM 分期、淋巴结及远处转移等临床病理参数相关。作为首个抗 HER2 靶向治疗药物, 曲妥珠单抗在多年的临床治疗中使胃癌患者获益匪浅。根据 TOGA 临床随机对照试验显示, 曲妥珠单抗联合化疗 (顺铂联合卡培他滨或氟尿嘧啶) 治疗 HER2 + 转移性胃癌患者, 其中位总生存期 (overall survival, OS) 较单纯化疗组明显延长 (13.8 个月 vs 11.1 个月;  $HR$  0.74, 95% $CI$  0.60 ~ 0.91;  $P = 0.0046$ ); HER2 高表达亚组 (IHC 评分 2 + 加 FISH + 或 IHC 评分 3 +) 受益最大 (中位 OS: 16.0 vs 11.8 个月;  $HR$  0.65, 95% $CI$  0.51 ~ 0.83;  $P = 0.0368$ ); 中位 PFS 较单纯化疗组亦获得明显改善 (6.7 个月 vs 5.5 个月)<sup>[18]</sup>。此外, PETRARCA 试验中, HER2 + 胃癌患者接受曲妥珠单抗 + 帕妥珠单抗 + FLOT (5-氟尿嘧啶、多西他赛、奥沙利铂、亚叶酸钙) 方案的病理完全缓解率明显高于单用 FLOT (35% vs 12%),  $R_0$  切除率也略有增加 (93% vs 90%)。虽然术前联合“双靶”抗 HER2 的病理缓解率更高, 但是患者中位无病生存期 (disease free survival, DFS) 未达到, 最终未能转化为患者的生

存获益<sup>[19]</sup>。

### 1.3 曲妥珠单抗德鲁替康 (DS-8201)

曲妥珠单抗德鲁替康是由曲妥珠单抗、可切割连接物和细胞毒性拓扑异构酶 I 抑制剂组成的抗体偶联药物 (antibody-drug conjugate, ADC)。在一项比较曲妥珠单抗德鲁替康与化疗治疗 HER2 + 晚期胃癌患者疗效的随机 II 期临床研究中, 曲妥珠单抗德鲁替康组治疗效果和 OS 相比于化疗组显著改善 (12.5 个月 vs 8.4 个月)<sup>[20]</sup>。曲妥珠单抗德鲁替康初步显示出优势, 后期可进一步将曲妥珠单抗德鲁替康扩展到 HER2 + 晚期胃癌的后线治疗中。

### 1.4 维迪西妥单抗 (disitamab vedotin, RC48)

维迪西妥单抗是一种新开发的针对 HER2 的 ADC 药物, 由 Hertuzumab 通过可切割的连接子偶联甲基澳瑞他汀 E (MMAE) 组成, 主要通过特异性结合肿瘤细胞并介导细胞内吞作用, 酶消化与释放, 以及毒素介导的肿瘤细胞凋亡等机制发挥精准抗肿瘤作用<sup>[21]</sup>。在一项开放式多中心的 II 期临床研究中, 共招募了 127 例既往接受过  $\geq 2$  线治疗的 HER2 过表达 (包括 ICH3 + 或 IHC2 +) 晚期胃癌 (包括胃食管结合部腺癌) 患者, 每 2 周单独接受一次维迪西妥单抗 ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 治疗。结果表明经维迪西妥单抗治疗, 患者客观缓解率 (objective response rate, ORR) 为 24.4%, 伴随的中位反应时间为 4.7 个月, 中位 PFS 和 OS 分别为 4.1 个月和 7.9 个月, 其不良反应为白细胞计数减少 (53.6%)、乏力 (53.6%)、脱发 (53.6%)、中性粒细胞计数减少 (52.0%)、贫血 (49.6%) 和谷草转氨酶水平升高 (43.2%), 说明其临床安全性可控<sup>[22]</sup>。此外, 胃癌患者中 HER2 低表达 (IHC2 + /FISH -) 者占 40% ~ 60%<sup>[23]</sup>。在维迪西妥单抗的 I 期研究中, HER2 IHC2 + /FISH - 患者的抗肿瘤与 IHC2 + /FISH + 和 IHC3 + 的患者反应相似, ORR 分别为 35.7% (5/14)、20% (2/10) 和 13.6% (3/22)。此外大部分患者肿瘤显著缩小<sup>[24]</sup>。因此, 维迪西妥单抗扩大了 HER2 表达的获益人群, 成为我国首个自主研发获批上市的新一代 ADC 药物。

### 1.5 Margetuximab (MGAH22)

Margetuximab 是新型 Fc 结构域优化免疫增强单克隆抗体, 荣获 FDA 批准胃食管癌孤儿药, 其与 CD16A 结合有较高的亲和力, 通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 增强天然免疫反应而发挥抗肿瘤作用。在一项多中心、单臂、开放的 I b / II 期临床研究中, Margetuximab 联合 Pembrolizumab (派姆单抗, PD-1 单克隆抗体)

显示出可接受的安全性和耐受性, ORR 为 18% (95%CI: 11.15 ~ 27.93)<sup>[25]</sup>。这些结果为耐曲妥珠单抗的 HER2 + 进展期胃癌患者提供了更多的治疗选择性, 同时提示靶向治疗联合免疫治疗可能是晚期胃癌治疗的新机会。

## 2 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)

VEGF 在绝大多数实体肿瘤中过表达, 在大约 40% 的胃癌中发现了 VEGF 的表达<sup>[26]</sup>。肿瘤血管生成是肿瘤生长的先决条件, VEGF 可通过诱导体内生理性和病理性的血管生成, 介导肿瘤血管生成, 促进肿瘤的发生发展<sup>[27]</sup>。此外, VEGF 可影响存在于肿瘤微环境中的免疫细胞的功能, 并参与了肿瘤干细胞的功能, 这为开发新的治疗方法提供了机会<sup>[28]</sup>。

### 2.1 贝伐珠单抗 (bevacizumab)

贝伐珠单抗是一种抗血管内皮生长因子 -A (VEGF-A) 的大分子单克隆抗体, 通过抑制循环中 VEGF-A 的活性, 阻断肿瘤血管生成的相关信号通路, 从而发挥抗肿瘤作用<sup>[29]</sup>。AVAGAST 试验显示: 贝伐单抗联合化疗治疗进展期胃癌的中位 OS 为 12.1 个月, 单纯化疗组中位 OS 为 10.1 个月。此项研究虽未达到主要终点 (OS), 但贝伐珠单抗联合化疗与单纯化疗相比在 PFS (6.7 个月 vs 5.3 个月)、有效率 (46.0% vs 37.4%) 和一年生存率 (50% vs 42%) 均显示出明显的疗效<sup>[30]</sup>。说明贝伐珠单抗联合常规化疗治疗进展期胃癌的临床疗效确切, 显著延长进展期胃癌患者的无进展存活期, 改善总有效率 (overall clinical effective rate, OR)。

### 2.2 雷莫芦单抗 (ramucirumab)

雷莫芦单抗是一种抗 VEGFR-2 的单克隆抗体, 可阻断 VEGF 介导的肿瘤新生血管。FDA 批准雷莫芦单抗单药使用或联合紫杉醇用于晚期胃癌的二线治疗。REGARD 研究显示: 雷莫芦单抗单药治疗一线化疗后病情恶化的晚期胃癌患者, 其中位 OS 较安慰剂组明显延长 (5.2 个月 vs 3.8 个月,  $P = 0.047$ )<sup>[31]</sup>。RAINBOW-Asia 的桥接研究也同样达到预设终点: 雷莫芦单抗联合紫杉醇治疗组较安慰剂联合紫杉醇组中位 OS (9.6 个月 vs 7.4 个月,  $P = 0.017$ ) 明显延长<sup>[32]</sup>。进一步说明 VEGFR-2 信号通路可作为胃癌的理想治疗靶点。

### 2.3 阿帕替尼 (apatinib)

阿帕替尼是新一代 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂, 已被国家药品监督管理局批准用于晚期胃癌三线及三线以上的治疗<sup>[33]</sup>。一项随机 III 期临床试验结果显示: 在治疗既往至少有两次化疗失败的



晚期胃癌患者, 其中位 OS (6.5 个月 vs 4.7 个月) 及中位 PFS (2.6 月 vs 1.8 月) 均得到了显著改善, 且安全性可耐受<sup>[34]</sup>。AHEAD-G202 研究共招募了 337 名尽管全身化疗但仍进展或复发的晚期胃癌患者, 分别接受了阿帕替尼第一、第二、第三级别或更高级别的治疗, 结果中位 OS 和 PFS 分别为 7.13 个月和 4.20 个月, 除高血压 (6.8%) 外, 很少发生 (< 5%) 3/4 级不良事件<sup>[35]</sup>。由于阿帕替尼上市还比较早, 前瞻性 IV 期研究有待进一步积累。

### 3 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]

早在 20 年前人们就已认识到 DNA 损伤缺陷机制与肿瘤的发生密切相关, 随着基因组学的发展, 人们对肿瘤分子水平的理解也在不断加深, DNA 修复途径相关的抑制剂 (PARP inhibitor, PARPi) 逐渐引起了人们的关注<sup>[36]</sup>。PARP 蛋白家族由 17 个成员组成, 其中研究最多的是 PARP1 和 PARP2, 它们具有不同的结构域、活性、亚细胞定位和功能<sup>[37]</sup>。PARP 是 DNA 损伤的感受器, 当细胞 DNA 发生断裂时, PARP 可在断裂处寡集与 DNA 修复相关的合酶及其 DNA 修复酶, 最终完成受损 DNA 的修复。目前已上市的 PARP 抑制剂主要针对乳腺癌、卵巢癌等, 如奥拉帕利、尼拉帕利、Rucaparib 等, 而 PARP 在胃癌中的研究正在进行中。在一项随机、双盲的 II 期临床试验 (NCT01063517) 中, 奥拉帕尼联合紫杉醇治疗复发或转移性胃癌患者, 与单用紫杉醇相比, 奥拉帕尼联合紫杉醇没有显著改善 PFS (3.91 个月 vs 3.55 个月), 而 OS 有显著改善 (13.1 个月 vs 8.3 个月), 这一益处共济失调毛细血管扩张突变 (ataxia-telangiectasia mutation, ATM) 水平低的患者中更加明显<sup>[38]</sup>。令人遗憾的是, 在 III 期 GOLD (NCT01924533) 临床试验中, 无论 ATM 状态如何, 添加奥拉帕尼并未明显改善胃癌患者的 OS (8.8 个月 vs 6.9 个月,  $HR = 0.79$ ,  $P = 0.0262$ )<sup>[39]</sup>。近年来在临床前研究中, PARPi 联合药物治疗的实验取得了令人鼓舞的结果。PARP 抑制剂奥拉帕尼与 WEE1/PLK1 双重抑制剂 AZD1775 联合使用, 可通过阻断 DNA 损伤修复信号转导通路和 DNA 损伤检查点而增强抗肿瘤活性。AZD1775 取消了奥拉帕尼激活的 DNA 损伤检查点, 并导致胃癌细胞有丝分裂 DNA 损伤<sup>[40]</sup>。这为 WEE1/PLK1 双抑制剂与 PARPi 在胃癌治疗中的联合策略提供了有益的启示。

### 4 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)

mTOR 是在哺乳动物细胞中发现的一种丝氨

酸/苏氨酸蛋白激酶, 在调控细胞增殖凋亡、免疫代谢、黏附和运动等各种活动起重要作用<sup>[41]</sup>。雷帕霉素 (西罗莫司) 是 mTOR 的抑制剂, 通过干扰 mTOR 依赖的下游信号元件的磷酸化, 促进细胞周期的阻滞而发挥抗肿瘤作用<sup>[42]</sup>。Kamata 等<sup>[43]</sup> 研究发现, 顺铂联合雷帕霉素可加强顺铂对产甲胎蛋白胃癌细胞的化疗效果。依维莫司 (everolimus, RAD001) 是雷帕霉素的衍生物, RADPAC 试验显示: 经含氟尿嘧啶/铂类化疗失败后的进展期胃癌患者, 紫杉醇联合依维莫司组与单用紫杉醇治疗组中位 OS (6.1 个月 vs 5.0 个月) 和中位 PFS (2.2 个月 vs 2.07 个月) 无明显差异<sup>[44]</sup>, 说明在紫杉醇基础上增加依维莫司并不能明显改善经治晚期胃癌患者的预后。

### 5 间充质上皮转化因子 (mesenchymal epithelial transforming factor, MET)

MET 是受体型酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 家族成员之一, 与多种癌基因产物和调节蛋白有关, 通过基因扩增和过表达促进肿瘤细胞的分裂、增殖与侵袭<sup>[45]</sup>。目前处于临床试验阶段的以 MET 为靶点的小分子抑制剂有奥那妥单抗 (onartuzumab)、利妥木单抗 (rilotumumab)、克唑替尼 (crizotinib)、Foretinib (GSK1363089)、Tivantinib (ARQ 197) 等。

YO28252 II 期试验表明, mFOLFOX6 (氟尿嘧啶、亚叶酸钙和奥沙利铂) 联合奥那妥单抗与安慰剂组的中位 PFS (6.77 个月 vs 6.97 个月)、ORR (60.5% vs 57.1%) 均无明显差异<sup>[46]</sup>。同样在 NCT01662869 III 期临床试验中, 在 HER2 阴性、MET 阳性的进展期胃癌患者治疗中, 一线 mFOLFOX6 联合奥那妥单抗较 mFOLFOX6 组中位 OS (11.0 个月 vs 11.3 个月)、中位 PFS (6.7 个月 vs 6.8 个月) 无明显改善<sup>[47]</sup>, 说明奥那妥单抗联合 mFOLFOX6 并不能改善非选择人群或 MET 免疫组织化阳性的晚期胃癌患者的疗效。此外, 在 NCT01697072 III 期临床试验中期安全性分析中, 因利妥木单抗治疗组的死亡风险增加而提前终止<sup>[48]</sup>。多因素分析表明, MET 阳性可能仍是胃癌中位 OS 较差的预后因素, 因此, 继续研究抑制 MET 信号转导的最佳途径是非常重要的。

### 6 成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2)

FGFR2 属于成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor, FGFR) 家族成员, 位于人染色体 10q26 上, 在弥漫性胃癌中过表达和扩增 (52.6%), 扰乱成纤维细胞生长因子的信号通路, 增加了胃癌细胞的侵袭性, 是胃癌患者的独立预后指标<sup>[49-50]</sup>。Bemarituzumab 是一种人源化的

IgG1 单克隆抗体, 可结合 FGFR2b, 抑制多种下游促肿瘤信号通路, 延缓癌症进展。美国 FDA 已授予 Bemarituzumab 首创靶向疗法突破性药物资格。FIGHT 研究评估了 Bemarituzumab 与安慰剂分别联合化疗 (mFOLFOX6) 治疗晚期胃癌的疗效和安全性。结果显示, Bemarituzumab 组与安慰剂相比获得了 PFS 和 OS 的双重改善<sup>[51]</sup>。作为一款以 FGFR2b 为靶点的抗体新药, Bemarituzumab 给无数抗癌患者带来了希望。

## 7 Claudin 18.2

Claudins 是人体紧密连接蛋白的一种, 其功能是保持上皮细胞的稳定性, Claudin 18.2 是 Claudin 蛋白的异构体, 其参与构成胃黏膜上皮屏障, 与胃癌的组织分化和肿瘤细胞侵袭、转移、预后密切相关; 研究显示 Claudin 18 的丢失可能是胃癌患者预后不良的独立指标<sup>[52-53]</sup>。

Zolbetuximab (IMAB362) 是一种人鼠嵌合单克隆抗体, 通过抗体依赖性细胞毒和补体依赖性细胞毒诱导 Claudin 18.2 阳性细胞死亡。2016 年 ASCO 大会上, Ganymed 表示, 在治疗局部晚期或转移性胃癌患者中, Zolbetuximab + CAPOX (卡培他滨 + 奥沙利铂) 治疗组较仅采用 CAPOX 化疗组的中位 OS (13.2 个月 vs 8.4 个月) 及中位 PFS (7.9 个月 vs 4.8 个月) 均明显延长。此外, FAST 试验显示, 在 Claudin 18.2 阳性胃癌患者中, 一线 EOX (表阿霉素 + 奥沙利铂 + 卡培他滨) 中加入 Zolbetuximab 可获得较长的 PFS (9.1 个月 vs 6.1 个月) 和 OS (16.6 vs 9.3 个月), 且不良反应是可控的<sup>[54]</sup>。同样在 MONO 研究中显示, Zolbetuximab 临床受益率为 23%, 治疗耐受性良好, 在 CLDN18.2 阳性的晚期胃癌患者中显示出较强的抗肿瘤活性<sup>[55]</sup>。目前正在进行的两个 III 期临床试验 (NCT03504397 和 NCT03653507), 将进一步验证 Zolbetuximab 联合 mFOLFOX/CAPOX 在 CLDN18.2 阳性 (> 75% 阳性肿瘤细胞) 胃癌患者一线治疗中的作用。

## 8 其他机制

随着对肿瘤细胞研究的不断深入, 仍有许多胃癌靶向治疗药物正处于不断研究与改进中。如基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 抑制剂, MMP-9 是一种细胞外酶, 参与血管生成、基质重构、肿瘤生长和转移, 其表达水平是早期胃癌的预后指标<sup>[56]</sup>。已有研究表明, 抑制 MMP-9 可促进化疗药物和免疫细胞的渗透<sup>[57]</sup>。针对 MMP-9, 开发了 Andecaliximab, Andecaliximab 与化疗联合治疗 HER2 阴性的胃癌 I 期试验取得了令人鼓舞的结果<sup>[58]</sup>。而遗憾的是, 在一项 III 期临床试验中, 未经治疗的 HER2 阴胃癌患者, 在化疗的基础上

加用 Andecaliximab 后 OS 并没有得到改善<sup>[59]</sup>。另一个有希望的靶点是黏蛋白 17 (MUC17), 它属于糖基化蛋白的黏蛋白家族。黏蛋白是正常胃肠道上皮细胞黏膜屏障的跨膜蛋白<sup>[60]</sup>。MUC17 在胃癌细胞中高表达, 一项针对 MUC17 的 I 期临床试验 (NCT04117958) 正在进行中。

## 9 结语和展望

尽管越来越多的临床研究探索了靶向治疗或与化疗联合在胃癌治疗中的效果, 但其在胃癌中的应用仍处于初级阶段, 胃癌的靶向治疗仍面临巨大的挑战。由于胃癌发病机制复杂, 胃癌细胞的亚克隆表现出不同的生物学行为, 因此单分子靶向治疗作用有限。此外, 因个体相关基因突变的差异, 限制了靶向药物的临床适用范围, 并不是所有的患者都能从新的治疗方式中受益。而目前仅有曲妥珠单抗、雷莫芦单抗、阿帕替尼被批准用于治疗晚期胃癌, 因此必须进行更加深入和精确的 III 期临床试验, 以获得足够的证据来支持更多的靶向治疗应用于胃癌中。尽管存在这些挑战, 但经过深入了解和探究靶向药物的分子机制, 定能取得胃癌靶向治疗的突破, 为胃癌患者带来更多福音。

## 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] 沈晓, 汪新茹, 陈明, 等. 免疫检查点抑制剂联合小分子靶向药物治疗晚期胃癌患者的药理学监护分析 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (7): 1215-1218.
- [3] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10251): 635-648.
- [4] Song H, Zhu J, Lu D. Molecular-targeted first-line therapy for advanced gastric cancer [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 7 (7): CD011461.
- [5] Patel TH, Cecchini M. Targeted therapies in advanced gastric cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2020, 21 (9): 70.
- [6] Wang L, Li W, Liu Y, et al. Clinical study on the safety, efficacy, and prognosis of molecular targeted drug therapy for advanced gastric cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13 (5): 4704-4711.
- [7] Sun Y, Li S, Yu W, et al. CD148 serves as a prognostic marker of gastric cancer and hinders tumor progression by dephosphorylating EGFR [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (9): 2667-2678.
- [8] Ma H, Wu J, Zhou M, et al. Inhibition of glutamine uptake improves the efficacy of cetuximab on gastric cancer [J]. *Integr Cancer Ther*, 2021, 20: 15347354211045349.
- [9] Lordick F, Lubberink B, Lorenzen S, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft

- Internistische Onkologie (AIO) [J]. Br J Cancer, 2010, 102 (3): 500-505.
- [10] Lordick F, Kang YK, Chung HC, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2013, 14 (6): 490-499.
- [11] Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25 (13): 1658-1664.
- [12] Passaro A, Alesini D, Pochesci A, et al. Erlotinib and gefitinib for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14 (5): 646-650.
- [13] Smyth EC, Vlachogiannis G, Hedayat S, et al. EGFR amplification and outcome in a randomised phase III trial of chemotherapy alone or chemotherapy plus panitumumab for advanced gastro-oesophageal cancers [J]. Gut, 2021, 70 (9): 1632-1641.
- [14] Ajani JA, D' Amico TA, Almhanna K, et al. Gastric Cancer, Version 3.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2016, 14 (10): 1286-1312.
- [15] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4) [J]. Gastric Cancer, 2017, 20 (1): 1-19.
- [16] Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies-a role beyond breast cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17 (1): 33-48.
- [17] Haffner I, Schierle K, Raimúndez E, et al. HER2 expression, test deviations, and their impact on survival in metastatic gastric cancer: results from the prospective multicenter VARIANZ study [J]. J Clin Oncol, 2021, 39 (13): 1468-1478.
- [18] Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2010, 376 (9742): 687-697.
- [19] Al-batran SE, Haag GM, Ettrich TJ, et al. 1421MO Final results and subgroup analysis of the PETRARCA randomized phase II AIO trial: perioperative trastuzumab and pertuzumab in combination with FLOT versus FLOT alone for HER2 positive resectable esophagogastric adenocarcinoma [J]. Ann Oncol, 2020, 31: S899.
- [20] Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive gastric cancer [J]. N Engl J Med, 2020, 382 (25): 2419-2430.
- [21] Zhu Y, Zhu X, Wei X, et al. HER2-targeted therapies in gastric cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876 (1): 188549.
- [22] Peng Z, Liu T, Wei J, et al. Efficacy and safety of a novel anti-HER2 therapeutic antibody RC48 in patients with HER2-overexpressing, locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: a single-arm phase II-study [J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41 (11): 1173-1182.
- [23] Moelans CB, Milne AN, Morsink FH, et al. Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer [J]. Cell Oncol (Dordr), 2011, 34 (2): 89-95.
- [24] Xu Y, Wang Y, Gong J, et al. Phase I study of the recombinant humanized anti-HER2 monoclonal antibody-MMAE conjugate RC48-ADC in patients with HER2-positive advanced solid tumors [J]. Gastric Cancer, 2021, 24 (4): 913-925.
- [25] Catenacci DVT, Kang YK, Park H, et al. Margetuximab plus pembrolizumab in patients with previously treated, HER2-positive gastro-oesophageal adenocarcinoma (CP-MGAH22-05): a single-arm, phase 1b-2 trial [J]. Lancet Oncol, 2020, 21 (8): 1066-1076.
- [26] Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma [J]. Cancer, 1996, 77 (5): 858-863.
- [27] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. Nature, 2005, 438 (7070): 967-974.
- [28] Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13 (12): 871-882.
- [29] Presta LG, Chen H, O' Connor SJ, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders [J]. Cancer Res, 1997, 57 (20): 4593-4599.
- [30] Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study [J]. J Clin Oncol, 2011, 29 (30): 3968-3976.
- [31] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2014, 383 (9911): 31-39.
- [32] Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2014, 15 (11): 1224-1235.
- [33] 国家卫生健康委员会. 胃癌诊疗规范 (2018年版) [J]. 中华消化病与影像杂志, 2019, 9 (3): 118-144.
- [34] Li J, Qin S, Xu J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction [J]. J Clin Oncol, 2016, 34 (13): 1448-1454.
- [35] Wang X, Zhang R, Du N, et al. An open label, multi-center, noninterventional study of apatinib in advanced pa-



- tients with gastric cancer ( AHEAD-G202 ) [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920905424.
- [36] Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly ( ADP-ribose ) and PARPs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13 ( 7 ): 411-424.
- [37] Vyas S, Matic I, Uchima L, et al. Family-wide analysis of poly ( ADP-ribose ) polymerase activity [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4426.
- [38] Bang YJ, Im SA, Lee KW, et al. Randomized, double-blind phase II trial with prospective classification by ATM protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33 ( 33 ): 3858-3865.
- [39] Bang YJ, Xu RH, Chin K, et al. Olaparib in combination with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer who have progressed following first-line therapy ( GOLD ): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 ( 12 ): 1637-1651.
- [40] Lin X, Chen D, Zhang C, et al. Augmented antitumor activity by olaparib plus AZD1775 in gastric cancer through disrupting DNA damage repair pathways and DNA damage checkpoint [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37 ( 1 ): 129.
- [41] Chen Y, Zhou X. Research progress of mTOR inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 208: 112820.
- [42] Ligresti G, Militello L, Steelman LS, et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8 ( 9 ): 1352-1358.
- [43] Kamata S, Kishimoto T, Kobayashi S, et al. Possible involvement of persistent activity of the mammalian target of rapamycin pathway in the cisplatin resistance of AFP-producing gastric cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6 ( 7 ): 1036-1043.
- [44] Lorenzen S, Knorrenschild JR, Pauligk C, et al. Phase III randomized, double-blind study of paclitaxel with and without everolimus in patients with advanced gastric or esophago-gastric junction carcinoma who have progressed after therapy with a fluoropyrimidine/platinum-containing regimen ( RAD-PAC ) [J]. *Int J Cancer*, 2020, 147 ( 9 ): 2493-2502.
- [45] Appleman LJ. MET signaling pathway: a rational target for cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 ( 36 ): 4837-4838.
- [46] Shah MA, Cho JY, Tan IB, et al. A randomized phase II study of FOLFOX with or without the met inhibitor onartuzumab in advanced adenocarcinoma of the stomach and gastroesophageal junction [J]. *Oncologist*, 2016, 21 ( 9 ): 1085-1090.
- [47] Shah MA, Bang YJ, Lordick F, et al. Effect of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with or without onartuzumab in HER2-negative, MET-positive gastroesophageal adenocarcinoma: the MET gastric randomized clinical trial [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3 ( 5 ): 620-627.
- [48] Catenacci DVT, Tebbutt NC, Davidenko I, et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer ( RILOMET-1 ): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 ( 11 ): 1467-1482.
- [49] Wang Y, Shi T, Wang X, et al. FGFR2 alteration as a potential therapeutic target in poorly cohesive gastric carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2021, 19 ( 1 ): 401.
- [50] Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) and epidermal growth factor receptor ( EGFR ) is an independent prognostic indicator of worse outcome in patients with gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15 ( 1 ): 69-79.
- [51] Wainberg Z, Enzinger P, Kang YK, et al. A double-blind randomized study of bemarituzumab ( bema ) plus mFOLF-FOX6 versus placebo plus mFOLFOX6 as first-line treatment for advanced gastric/gastroesophageal junction cancer ( FIGHT ) [A]. ASCO-GI, 2021.
- [52] Jun KH, Kim JH, Jung JH, et al. Expression of claudin-7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric cancer [J]. *Int J Surg*, 2014, 12 ( 2 ): 156-162.
- [53] Zhang J, Dong R, Shen L. Evaluation and reflection on claudin 18.2 targeting therapy in advanced gastric cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2020, 32 ( 2 ): 263-270.
- [54] Sahin U, Türeci Ö, Manikhas G, et al. FAST: a randomised phase II study of zolbetuximab ( IMAB362 ) plus EOX versus EOX alone for first-line treatment of advanced CLDN18.2-positive gastric and gastro-oesophageal adenocarcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32 ( 5 ): 609-619.
- [55] Türeci O, Sahin U, Schulze-Bergkamen H, et al. A multi-centre, phase II a study of zolbetuximab as a single agent in patients with recurrent or refractory advanced adenocarcinoma of the stomach or lower oesophagus: the MONO study [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30 ( 9 ): 1487-1495.
- [56] Lian PL, Liu Z, Yang GY, et al. Integrin  $\alpha v \beta 6$  and matrix metalloproteinase 9 correlate with survival in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22 ( 14 ): 3852-3859.
- [57] Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations [J]. *Science*, 2002, 295 ( 5564 ): 2387-2392.
- [58] Shah MA, Starodub A, Sharma S, et al. Andecaliximab/GS-5745 alone and combined with mFOLFOX6 in advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from a phase I study [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24 ( 16 ): 3829-3837.
- [59] Shah MA, Bodoky G, Starodub A, et al. Phase III study to evaluate efficacy and safety of andecaliximab with mFOLF-FOX6 as first-line treatment in patients with advanced gastric or GEJ Adenocarcinoma ( GAMMA-1 ) [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 ( 9 ): 990-1000.
- [60] van Putten JPM, Strijbis K. Transmembrane mucins: signaling receptors at the intersection of inflammation and cancer [J]. *J Innate Immun*, 2017, 9 ( 3 ): 281-299.

( 收稿日期: 2022-07-20; 修回日期: 2022-08-20 )

## 颗粒酶 B 在肿瘤诊治中的研究进展

徐尚尚<sup>1</sup>, 刘天奇<sup>2\*</sup> (1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 广西壮族自治区江滨医院, 南宁 530000)

**摘要:**肿瘤免疫治疗在肿瘤治疗中的地位日益提高。肿瘤免疫治疗是通过重新启动并维持肿瘤-免疫循环, 恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应, 从而控制与清除肿瘤的一种治疗方法。颗粒酶 B 主要由细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞分泌, 参与细胞凋亡的过程, 是免疫细胞发挥抗肿瘤作用的重要因子。本文重点阐述了颗粒酶 B 的基本生物学功能及其在肺癌、结直肠癌、乳腺癌等肿瘤治疗中的研究进展。

**关键词:** 颗粒酶 B; 肿瘤; 诊治

中图分类号: R96, R54 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0742-04  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.030

### Research progress of granzyme B in the diagnosis and treatment of tumor

XU Shang-shang<sup>1</sup>, LIU Tian-qi<sup>2\*</sup> (1. Youjiang Medical Institute for Nationalities, Baise Guangxi 533000; 2. Jiangbin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000)

**Abstract:** Tumor immunotherapy is becoming increasingly important. Tumor immunotherapy is a therapeutic method to control and eliminate tumors by restarting and maintaining the tumor-immune cycle and restoring the normal anti-tumor immune response of the body. Granzyme B is a protease secreted by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. It participates in the cell apoptosis, which is an important factor for immune cells to play an anti-tumor role. This paper reviewed the basic biological function of granzyme B and its research progress in the treatment of lung cancer, colorectal cancer, breast cancer and other tumors.

**Key words:** granzyme B; tumor; diagnosis and treatment

颗粒酶属于胰蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶成员<sup>[1]</sup>。迄今为止, 在人类中发现了 5 种不同的颗粒酶, 分别是颗粒酶 A、B、H、K 和 M, 在小鼠中共发现了 11 种颗粒酶, 分别是颗粒酶 A、B、C、D、E、F、G、K、L、M 和 N<sup>[2]</sup>。每种颗粒酶都具有底物特异性和功能特异性, 其中, 颗粒酶 A 和颗粒酶 B 是免疫细胞中最丰富的颗粒酶, 目前颗粒酶 B 是在生物功能和疾病领域研究最广泛的颗粒酶<sup>[3]</sup>。本文着重对颗粒酶 B 的生物学特性及其在肿瘤研究中的进展进行综述。

#### 1 颗粒酶 B

颗粒酶 B 主要由细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL 细胞) 和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 分泌, 由 207 个氨基酸构成, 结构类似于糜蛋白酶, 含 3 个催化残基 His57、Asp102、Ser195<sup>[4]</sup>。颗粒酶 B 的基因

位于人类染色体 14q.11.2 上, 长约 3500 个碱基对, 包含 5 个外显子和 4 个内含子<sup>[5]</sup>。颗粒酶 B 的信号序列能够引导其转运至内质网, 在内质网上表达成为一种无活性的酶原, 随后以酶原的形式进入高尔基体, 被标记上 6-磷酸甘露糖, 通过组织蛋白酶 C 切除 N 末端二肽而激活, 活化的颗粒酶 B 被递送至靶细胞<sup>[6]</sup>。颗粒酶 B 递送至靶细胞的途径有两种, 一个途径是经穿孔素产生的小蛋白和离子扩散的通道进入靶细胞; 另一个途径为依赖囊泡破坏机制的内吞作用进入靶细胞<sup>[7]</sup>。颗粒酶 B 进入靶细胞后, 可以通过细胞凋亡途径和非凋亡途径杀伤细胞。在细胞凋亡途径中, 颗粒酶 B 一方面通过直接激活 caspase 级联反应来诱导细胞凋亡; 另一方面还可以通过线粒体外膜的透化来间接激活 caspase 的级联反应而引起细胞凋

基金项目: 广西壮族自治区人民医院卫生健康委自筹经费课题 (No.Z20180722)。

作者简介: 徐尚尚, 男, 在读硕士研究生, 主要从事肝胆外科研究, email: 971553803@qq.com \*通信作者: 刘天奇, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事肝胆胰脾外科研究, email: ljrqt@126.com

亡<sup>[8]</sup>。在非凋亡途径中, 颗粒酶 B 通过裂解细胞内的  $\alpha$  微管蛋白等物质来促进细胞死亡<sup>[9]</sup>。颗粒酶 B 可以杀灭许多已经对细胞毒性药物有抗性的肿瘤细胞, 因此其可能成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[7]</sup>。

## 2 颗粒酶 B 与肿瘤诊治

### 2.1 颗粒酶 B 与肺癌诊治的关系

肺癌是最常见的肿瘤之一, 颗粒酶 B 是人体免疫治疗中的重要杀伤因子, 有研究提示, 其杀伤作用会因肿瘤细胞的低敏感性而受到限制, 丝氨酸蛋白酶抑制剂 B9 (SprinB9) 会降低肿瘤细胞对颗粒酶 B 的易感性。Han 等<sup>[10]</sup> 的实验研究显示颗粒酶 B 可通过下调 SprinB9 的表达, 增强对肺癌细胞的杀伤作用。苏艳丽等<sup>[11]</sup> 在一项非小细胞肺癌体外试验中发现, Th9 细胞分泌白介素 9 (IL-9) 来刺激非小细胞肺癌患者 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖及颗粒酶 B 的分泌, 增强了对非小细胞肺癌细胞的杀灭作用。研究发现不同浓度的程序性死亡受体 -1 (PD-1) 抑制剂对 NK 细胞分泌颗粒酶 B 的水平有影响, 提示不同浓度的 PD-1 抑制剂可能改变颗粒酶 B 的水平, 影响其对非小细胞肺癌的杀伤作用<sup>[12]</sup>, 目前以 PD-1 为代表的单克隆抗体类免疫检查点抑制剂在肿瘤治疗领域取得了优异的成绩, 对非小细胞肺癌患者组织中的 PD-L1 免疫染色进行阳性表达计算分析发现, PD-L1 高表达组中生物标志物 (CD8<sup>+</sup> T 细胞、颗粒酶 B) 的浓度低, 通过识别和量化生物标志物, 可以判断非小细胞肺癌患者选择 PD-1/PD-L1 免疫治疗的适用性<sup>[13]</sup>。目前肺癌免疫治疗的疗效主要是通过治疗后的评估, 为了寻找提前评估疗效的方法, 学者们聚焦于颗粒酶 B 在治疗过程中的作用。一项 Nivolumab 单抗治疗 43 名非小细胞肺癌患者的研究发现, 血清颗粒酶 B 高浓度组与低浓度组比较, 治疗效果具有明显差异。在晚期非小细胞肺癌的免疫治疗中, 治疗前后颗粒酶 B 的浓度变化, 与患者治疗的疗效相关, 颗粒酶 B 的连续变化可作为非小细胞肺癌免疫治疗的预测性生物标志物<sup>[14-15]</sup>。通过安培免疫传感器检测 44 名肺癌患者与 51 名健康人, 结果健康人和肺癌患者的颗粒酶 B 的平均含量分别为 25.98 和 10.88  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ), 提示检测颗粒酶 B 的含量, 可以帮助识别肺癌患者, 对于肺癌诊断具有辅助价值<sup>[16]</sup>。使用安培免疫传感器进一步检测免疫治疗前后的 7 名非小细胞肺癌患者血清颗粒酶 B 水平, 发现疗效较好的患者其治疗后的颗粒酶 B 的含量较治疗前明显增加, 因此可以通过测定治疗前后的颗粒酶 B 的含量来评估癌症的进展<sup>[17]</sup>。

### 2.2 颗粒酶与结直肠癌诊治的关系

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 细胞是  $\gamma\delta$ T 细胞中常见的亚型, 约占人体外周血细胞的 5%<sup>[18]</sup>。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 细胞具有强大的肿瘤杀伤活性, 对结直肠癌患者外周血的研究发现, Tim-3 信号的激活会通过降低颗粒酶 B 的表达来抑制 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 细胞对结肠癌细胞的杀伤作用<sup>[19]</sup>。研究发现在新辅助放化疗的 130 名直肠癌患者中, 肿瘤浸润淋巴细胞的总量降低, 但颗粒酶 B 毒性 T 细胞的数量较前增加, 说明颗粒酶 B 在直肠癌放化疗中起着一定的作用<sup>[20]</sup>。颗粒酶 B 不仅在结直肠癌新辅助化疗中起作用, 在免疫治疗中也发挥着重要的作用, 在结直肠癌模型小鼠中发现, 基质细胞 PD-L1 在肿瘤微环境中的表达有助肿瘤细胞逃避免疫细胞的清除起到核心作用, 可能机制是 PD-L1 抑制了 CD8<sup>+</sup> T 细胞的颗粒酶 B 分泌, 促进结肠癌的发展<sup>[21]</sup>。不仅是 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌的颗粒酶 B 对肿瘤细胞有杀伤作用, 小鼠模型的中性粒细胞所表达的颗粒酶 B 也是结直肠癌消退过程中的关键参与者<sup>[22]</sup>。为了进一步证实颗粒酶 B 在结直肠癌免疫治疗中的作用, 针对颗粒酶 B 制订了两种具有生物成像作用的探针, 第一种为用于体内非侵入性、实时和纵向成像的颗粒酶 B 激活的生物发光探针 GBLI-2, GBLI-2 成像主要与肿瘤中表达 PD-1 和表达颗粒酶 B 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞群的变化相关。在治疗有效的组别中, 生物发光强度与颗粒酶 B 含量都有所增加, 证实颗粒酶 B 可以起到预测结直肠癌免疫治疗疗效的作用<sup>[23]</sup>, 另一种是靶向颗粒酶 B 的肽探针, 可作为小鼠结肠癌模型中免疫联合化疗过程中的 PET 成像生物标志物。PET 成像结果与肿瘤相关免疫细胞亚群的多色流式细胞分析相结合, 深入比较评估与肿瘤反应相关的表达颗粒酶 B 的免疫细胞类型, 从而获得肿瘤对于治疗效果的敏感度<sup>[24]</sup>。通过以上生物成像技术, 可以预测结直肠肿瘤治疗疗效。一项结直肠癌 TMN II 期的队列研究证实, 通过 TMN II 期结直肠癌的免疫组织化学染色, 使用数字图像分析, 针对肿瘤细胞周围具有不同半径 (10 ~ 100  $\mu\text{m}$ ) 的肿瘤邻近区域计算不同免疫细胞类型的频率, 颗粒酶 B 和 CD68 的综合空间评分在 25  $\mu\text{m}$  范围内为 TNM II 期结直肠癌的独立预后因素<sup>[25]</sup>。

### 2.3 颗粒酶 B 与乳腺癌诊治的关系

乳腺癌是女性最常见的癌症类型, 有研究发现, 颗粒酶 B 在乳腺癌的发展及乳腺癌淋巴结转移中都起到了一定的作用, 在浸润性导管乳腺癌患者中, 与非转移性淋巴结相比, 转移性淋巴结



中颗粒酶 B<sup>+</sup> B 细胞的数量显著降低, 两者间差异有统计学意义, 说明颗粒酶 B<sup>+</sup> B 细胞在乳腺肿瘤免疫中可能发挥着重要的作用<sup>[26]</sup>。检测 23 名乳腺癌患者肿瘤组织中的颗粒酶 B 的表达, 发现高表达颗粒酶 B 的患者与区域淋巴结转移状态成负相关, 这也说明颗粒酶 B 在抑制乳腺癌细胞淋巴结转移中起到重要作用<sup>[27]</sup>。在乳腺癌化疗的过程中, 检测到患者颗粒酶 B 的血清浓度较化疗前增加, 提示颗粒酶 B 的浓度变化有可能成为评价乳腺癌化疗效果的一种指标<sup>[28]</sup>, 在三阴性乳腺癌小鼠模型的化疗联合免疫治疗研究中, 依靠颗粒酶 B 特异性正电子发射断层扫描成像技术, 无创成像可以提供有关肿瘤微环境的数据, 与免疫治疗单药治疗相比, 化疗联合免疫治疗成像更明显, 这种技术对于化疗联合免疫治疗的疗效有一定的预测作用<sup>[29]</sup>。

#### 2.4 颗粒酶 B 与黑色素瘤诊治的关系

近年来, 皮肤黑色素瘤的发病率有所增加, 并且预后不佳。黑色素瘤患者可以从免疫治疗中获益, 5 种颗粒酶已经被证实为黑色素瘤的抑制因子, 颗粒酶可以激活免疫反应延长黑色素瘤患者的总生存期, 其过表达会抑制黑色素瘤细胞系的增殖和迁徙, 目前颗粒酶已经成为皮肤黑色素瘤的预测生物标志物<sup>[30]</sup>, 在顺铂诱导的突变小鼠免疫细胞中, 检测到颗粒酶 B 的含量明显增加, 小鼠抗肿瘤能力增强, 提示颗粒酶 B 在杀伤肿瘤方面起到重要作用<sup>[31]</sup>。在特定的疫苗刺激下颗粒酶 B 的表达水平也会增加, Yang 等<sup>[32]</sup>给黑色素瘤模型小鼠注射 HCA587 蛋白疫苗, 发现其能诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞表达颗粒酶 B, 介导发挥特异性抗肿瘤免疫, 更有效地杀灭肿瘤细胞。

#### 2.5 颗粒酶 B 与其他肿瘤诊治的关系

对 12 名非霍奇金淋巴瘤患者的外周血进行蛋白质定量检测, 发现非霍奇金淋巴瘤中的穿孔素及颗粒酶 B 的表达均低于正常人, 且穿孔素及颗粒酶 B 的低表达与患者的预后相关。因此穿孔素和颗粒酶 B 的表达可能是非霍奇金淋巴瘤的潜在预后标志物<sup>[33]</sup>。在小鼠舌鳞状细胞癌模型中, 采用天花粉蛋白联合颗粒酶 B 治疗能够明显抑制肿瘤增殖, 加速肿瘤细胞的凋亡<sup>[34]</sup>。白藜芦醇可以增加前列腺癌的放射敏感性, 在其机制研究中发现颗粒酶 B 和穿孔素的表达明显增加, 这表明颗粒酶 B 和穿孔素在白藜芦醇增强前列腺癌对放疗敏感性的过程中起到一定的作用<sup>[35]</sup>。研究发现在小鼠肝细胞癌模型中, 采用油橄榄仁的单宁成分再培养肿瘤相关巨噬细胞, 颗粒酶 B 表达明显增

加, 抑制了肝细胞癌的生长<sup>[36]</sup>。Chen 等<sup>[37]</sup>在对肝细胞癌小鼠的研究中发现, 使用 siRNA-PD-L1 联合乐伐替尼和乐伐替尼单药治疗肝细胞癌相比, 联合治疗组颗粒酶 B<sup>+</sup> T 细胞的数量增加, 肿瘤细胞凋亡增加。

### 3 展望

综上所述, 颗粒酶 B 参与细胞凋亡, 是免疫细胞发挥抗肿瘤作用的重要因子。其在肿瘤发生发展中的作用与机制值得更深更广的研究。是否可以将颗粒酶 B 作为预测肿瘤免疫治疗效果的一种指标, 或者通过改变机体内的颗粒酶 B 含量来增强肿瘤免疫治疗的疗效, 需要开展相关研究进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Kam CM, Hudigd, Powers JC. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477 (1-2): 307-323.
- [2] Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (Pt 24): 5011-5014.
- [3] Turner CT, Lim D, Granville DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease [J]. *Matrix Biol*, 2019, 75-76: 126-140.
- [4] Estébanez-Perpiña E, Fuentes-Prior P, Belorgey D, et al. Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue [J]. *Biol Chem*, 2000, 381 (12): 1203-1214.
- [5] Rousalova I, Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review) [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37 (6): 1361-1378.
- [6] Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, et al. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma [J]. *Lab Invest*, 2009, 89 (11): 1195-1220.
- [7] Kurschus FC, Jenne DE. Delivery and therapeutic potential of human granzyme B [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235 (1): 159-171.
- [8] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (6): 725-731.
- [9] Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235 (1): 105-116.
- [10] Han R, Yu L, Zhao C, et al. Inhibition of SerpinB9 to enhance granzyme B-based tumor therapy by using a modified biomimetic nanoplatfrom with a cascade strategy [J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121723.
- [11] 苏艳丽, 李波. Th9 细胞对非小细胞肺癌患者 CD8<sup>+</sup> T 细胞抗肿瘤活性的调控作用 [J]. *陕西医学杂志*, 2021, 50 (1): 15-21.
- [12] 王贺双, 纪军, 吴园园, 等. PD-1 阻断增强体外扩增的 NK 细胞对人非小细胞肺癌杀伤作用的研究 [J]. *中国免疫*

- 学杂志, 2021, 37 (11): 1331-1334.
- [13] Silva MA, Ryall KA, Wilm C, et al. PD-L1 immunostaining scoring for non-small cell lung cancer based on immunosurveillance parameters [J]. PLoS One, 2018, 13 (6): e0196464.
- [14] Costantini A, Julie C, Dumenil C, et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab [J]. Oncoimmunology, 2018, 7 (8): e1452581.
- [15] Chung JH, Ha JS, Choi J, et al. Granzyme B for predicting the durable clinical benefit of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer [J]. Transl Cancer Res, 2022, 11 (2): 316-326.
- [16] Chung JH, Yoon SH, Jeon D, et al. The feasibility of granzyme B levels using an amperometric immunosensor for lung cancer detection [J]. Ann Transl Med, 2022, 10 (11): 622.
- [17] Saputra HA, Chung JH, Yoon SH, et al. Disposable amperometric immunosensor with a dual monomers-based bioconjugate for granzyme B detection in blood and cancer progress monitoring of patients [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 198: 113846.
- [18] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [19] Li XM, Lu HM, Gu YZ, et al. Tim-3 suppresses the killing effect of Vgamma9Vdelta2 T cells on colon cancer cells by reducing perforin and granzyme B expression [J]. Exp Cell Res, 2020, 386 (1): 111719.
- [20] Jarosch A, Sommer U, Bogner A, et al. Neoadjuvant radiochemotherapy decreases the total amount of tumor infiltrating lymphocytes, but increases the number of CD8<sup>+</sup>/Granzyme B<sup>+</sup> (GrzB) cytotoxic T-cells in rectal cancer [J]. Oncoimmunology, 2018, 7 (2): e1393133.
- [21] O' Malley G, Treacy O, Lynch K, et al. Stromal cell PD-L1 inhibits CD8<sup>+</sup> T-cell antitumor immune responses and promotes colon cancer [J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6 (11): 1426-1441.
- [22] Martin A, Seignez C, Racœur C, et al. Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment [J]. Oncotarget, 2018, 9 (47): 28364-28378.
- [23] Chen M, Zhou KX, Dai SY, et al. In vivo bioluminescence imaging of granzyme B activity in tumor response to cancer immunotherapy [J]. Cell Chem Biol, 2022, 29 (10): 1556-1567. e6.
- [24] Lee J, Kim J, Sin JI. B16 melanomas evade antitumor immunity by the loss of epitope presentation and the acquisition of tumor resistance to granzyme B [J]. Cell Immunol, 2021, 367: 104394.
- [25] Noti L, Galvan JA, Dawson H, et al. A combined spatial score of granzyme B and CD68 surpasses CD8 as an independent prognostic factor in TNM stage II colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2022, 22 (1): 987.
- [26] Arabpour M, Rasolmali R, Talei AR, et al. Granzyme B production by activated B cells derived from breast cancer-draining lymph nodes [J]. Mol Immunol, 2019, 114: 172-178.
- [27] Kontani K, Sawai S, Hanaoka J, et al. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers [J]. Eur J Surg Oncol, 2001, 27 (2): 180-186.
- [28] Kadam CY, Abhang SA. Serum levels of soluble Fas ligand, granzyme B and cytochrome C during adjuvant chemotherapy of breast cancer [J]. Clin Chim Acta, 2015, 438: 98-102.
- [29] Napier TS, Hunter CL, Song PN, et al. Preclinical PET imaging of granzyme b shows promotion of immunological response following combination paclitaxel and immune checkpoint inhibition in triple negative breast cancer [J]. Pharmaceuticals, 2022, 14 (2): 440.
- [30] Wu X, Wang XJ, Zhao Y, et al. Granzyme family acts as a predict biomarker in cutaneous melanoma and indicates more benefit from anti-PD-1 immunotherapy [J]. Int J Med Sci, 2021, 18 (7): 1657-1669.
- [31] Gorgun FM, Widen SG, Tyler DS, et al. Enhanced antitumor response to immune checkpoint blockade exerted by cisplatin-induced mutagenesis in a murine melanoma model [J]. Front Oncol, 2021, 11: 701968.
- [32] Yang WM, Zhang WH, Wang XZ, et al. HCA587 protein vaccine induces specific antitumor immunity mediated by CD4<sup>+</sup> T-cells expressing granzyme B in a mouse model of melanoma [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21 (6): 738-746.
- [33] Souza BMB, De Vito FB, Calado ML, et al. Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma [J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59 (1): 214-220.
- [34] Zhu ZY, Ying ZG, Zeng MQ, et al. Trichosanthin cooperates with Granzyme B to restrain tumor formation in tongue squamous cell carcinoma [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21 (1): 88.
- [35] Fang YJ, Herrick EJ, Nicholl MB. A possible role for perforin and granzyme B in resveratrol-enhanced radiosensitivity of prostate cancer [J]. J Androl, 2012, 33 (4): 752-760.
- [36] Chang ZH, Zhang QN, Hu Q, et al. Tannins in Terminalia bellirica inhibits hepatocellular carcinoma growth via re-educating tumor-associated macrophages and restoring CD8 (+) T cell function [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113543.
- [37] Chen PF, Li YJ, Wei PK, et al. siRNA targeting PD-L1 delivered with attenuated Salmonella enhanced the anti-tumor effect of lenvatinib on mice bearing hepatocellular carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 111: 109127.

(收稿日期: 2022-11-28; 修回日期: 2023-01-12)

## 不同干旱梯度胁迫对欧李果肉品质的影响

张冉昊<sup>1,2</sup>, 李卫东<sup>1\*</sup>, 陈家雯<sup>3</sup>, 陈晓娜<sup>2</sup>, 张晔韬<sup>4</sup>, 王金铃<sup>5</sup>, 刘怀远<sup>2</sup>, 杨战<sup>2</sup> (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中国林业科学研究院沙漠林业实验中心, 内蒙古 磴口 015200; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 4. 北京国电电力新能源技术有限公司内蒙古分公司, 内蒙古 磴口 015200; 5. 吉林双辽白鹤省级自然保护区管理局, 吉林 双辽 136400)

**摘要:** **目的** 研究不同田间土壤水分处理下欧李果肉品质的变化规律, 以为欧李精确灌溉和节水生产提供依据。**方法** 通过测定不同田间水分条件处理下欧李植株所产果肉品质, 探讨长期土壤干旱胁迫对欧李果肉品质及水分生产效率等的影响, 确定欧李的最佳田间水分条件。**结果** ① 随施水量的增加, 欧李全果质量及果肉质量均呈先增后减的趋势, 单个欧李果肉质量在 4682.040 ~ 7876.213 mg, 并在 400 mm 田间水分条件下达到最大值 7876.213 mg。② 在 400 mm 田间水分条件下, 最有利于欧李果肉及种仁中成分的积累, 果实各种成分含量高、抗氧化能力强; 欧李果肉总黄酮含量、总糖含量、可滴定酸含量、总蛋白含量分别在 400 mm 田间水分条件下达到最大值 74.661 mg · g<sup>-1</sup> 样品鲜重 (FW)、36.337 mg · g<sup>-1</sup> FW、4.461 mg · g<sup>-1</sup> FW、4.237 mg · g<sup>-1</sup> FW; 单个欧李果实果肉总黄酮含量、总糖含量、总蛋白含量、总原花青素含量分别达到最大值 298.947 mg、591.094 mg、33.369 mg、91.757 mg。③ 欧李果肉各类成分的积累之间普遍成正相关, 田间水分条件与欧李果肉的抗氧化能力成负相关。**结论** 欧李的最佳田间水分条件为年均降雨量相当 400 mm, 此时果实各种成分含量高、抗氧化能力强。

**关键词:** 欧李; 果肉品质; 田间水分条件; 干旱胁迫

中图分类号: S662.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0746-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.031

Effect of drought stress on pulp quality of *Cerasus humilis*

ZHANG Ran-hao<sup>1,2</sup>, LI Wei-dong<sup>1\*</sup>, CHEN Jia-wen<sup>3</sup>, CHEN Xiao-na<sup>2</sup>, ZHANG Ye-tao<sup>4</sup>, WANG Jin-ling<sup>5</sup>, LIU Huai-yuan<sup>2</sup>, YANG Zhan<sup>2</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Experimental Center of Desert Forestry, Chinese Academy of Forestry, Dengkou Inner Mongolia 015200; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193; 4. Beijing GD Power New Energy Technology Co., Ltd., Inner Mongolia Branch, Dengkou Inner Mongolia 015200; 5. Jilin Shuangliao Baihe Provincial Nature Reserve Administration Bureau, Shuangliao Jilin 136400)

**Abstract: Objective** To determine the variation of fruit meat quality of *Cerasus humilis* under different soil water conditions in the field to provide evidence for irrigation and water-saving production of plums. **Methods** By measuring the pulp quality under different field water conditions, we determined the effect of long-term soil drought stress on the pulp quality and water production efficiency of plum, and the best field water condition for plums. **Results** ① With the increase of water, the whole fruit weight and flesh mass content of *Cerasus humilis* increased first and then decreased; the meat weight of single plum fruit ranged from 4682.040 to 7876.213 mg, and reached the maximum 7876.213 mg under 400 mm field water. ② Under 400 mm field water, the accumulation of components in the meat and kernel of *Cerasus*

**基金项目:** 林业公益性行业科研专项 (No.201504710-01); 自治区重点研发计划项目 (No.2020BBF02027); 北京市自然科学基金资助项目 (No.5212014)。

**作者简介:** 张冉昊, 男, 硕士研究生, 主要从事中药材规范化生产与质量控制研究, email: 542832419@qq.com \*通信作者: 李卫东, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药资源评价与品种创新研究, email: liweidong2005@126.com



*humilis* was most favorable, and the content of various components in the fruit was high with strong the antioxidant capacity. The content of total flavonoids, total sugar, titratable acid and total protein in *Fructo auriculata* reached the maximum of  $74.661 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,  $36.337 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,  $4.461 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  and  $4.237 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  under 400 mm field water, respectively. The content of components, total flavone content, total sugar content, total protein content and total proanthocyanidin content of single fruit flesh reached the maximum value of 298.947 mg, 591.094 mg, 33.369 mg and 91.757 mg, respectively. ③ There was a positive correlation between the accumulation of various components of plum fruit meat and seed kernel, and a negative correlation between field water and antioxidant capacity of plum fruit meat. **Conclusion** When the optimum field water condition of the plum is 400 mm (annual rainfall), the fruit has high content of various components, strong antioxidant capacity, and high content of kernel components.

**Key words:** *Cerasus humilis*; pulp quality; field water condition; drought stress

欧李 [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.] 为蔷薇科樱桃属植物, 具有耐寒、耐强光、耐干旱、耐贫瘠等特性, 能够在多种极端干旱和半干旱环境下良好生存, 并起到防风阻沙、保持水土、改善土质等生态效益<sup>[1]</sup>。欧李果实营养成分丰富, 其微量元素钙含量极高且易于吸收、利用率高, 属于我国第三代功能性水果<sup>[2]</sup>; 其种仁为我国传统中药郁李仁的来源之一, 富含黄酮类、脂肪酸类、氨基酸类成分, 具有润肠通便、下气利水等功效。目前, 欧李果肉及种仁已被广泛应用, 欧李果肉被用于果酒、果粉、果脯、果醋、功能性饮料等产品开发; 种仁除去其药用价值, 还可以泡茶、煎汤、煮粥等, 起到养生保健的效果<sup>[3-7]</sup>。因其具有良好的药用价值, 国内外市场对其需求量逐渐增加。

土壤水分条件是影响欧李生长发育、生理状态及化学成分积累最主要、最常见的因素。开展土壤水分胁迫对欧李果肉品质的影响研究, 有助于深入了解欧李对水分逆境的抗性机制, 充分挖掘欧李生产潜能, 提高生产效率, 更有利于指导欧李的栽培, 为欧李果实和产量相关产品的后续研发提供保障<sup>[8-9]</sup>。近年来关于调控灌溉、节水栽培等的研究表明, 适度干旱胁迫有助构建适宜株型结构, 提高叶片活力和净光合速率, 为优质高产和高水分生产效率奠定基础<sup>[10-11]</sup>。张洪银等<sup>[12]</sup>研究通过改变施水量, 发现过度干旱与过度灌溉都不利于欧李果树的生长和果实的积累, 培育欧李的最佳田间持水量大约在 55%, 在此条件下能够实现经济效益的最大化; 许帅等<sup>[13]</sup>发现土壤相对湿度在 50% ~ 60% 时有利于欧李的生长发育以及光合作用; 邢钟毓<sup>[14]</sup>发现应对干旱胁迫, 蒙原欧李叶片将通过改变自身超微结构应对旱情, 并对叶绿素的合成及欧李果树的光合作用产生一

定的影响。目前国内外对欧李的研究多集中在药理作用及化学成分上, 关于栽培对品质影响的研究少有报道。

基于此, 本研究以不同田间土壤水分处理下的欧李栽培试验为基础, 探讨不同梯度土壤水分胁迫对欧李果肉品质的影响, 以期为欧李精确灌溉和节水生产提供依据。探究植物在不同田间水分条件下化学成分尤其是有效成分的积累趋势, 将从根本上提高生产效率, 并为产品质量提供保障。

## 1 材料

欧李果实取自三年生农大四号欧李果树, 试验于 2021 年 9 月于内蒙古巴彦淖尔市磴口县中国林业科学研究院沙漠林业实验中心第四实验场进行。试验区气候干旱, 雨量稀少, 多年平均降水量约 140.3 mm, 全年降水平均为 374.6 mm, 光照充足。多年平均气温  $7.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 光热资源丰富, 累年平均总辐射量  $6493.3 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ , 年平均风速  $3.0 \sim 3.7 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 以春季 3 ~ 5 月风速最大, 风沙频繁, 昼夜温差大, 无霜期短, 土壤类型以风沙土为主。

## 2 方法

### 2.1 试验设计

选择欧李长势较为均匀的三年生欧李林布置试验, 样地布置时间为 2021 年 4 月。试验设置 5 个等距水平的灌水量处理, 5 个不同的田间水分梯度条件依次为 300、400、500、600、700 mm, 以自然降水量为对照 (120 mm), 5 个田间水分处理的实际浇水量为 180 mm (66.2 L)、280 mm (107.57 L)、380 mm (148.947 L)、480 mm (190.323 L)、580 mm (231.698 L)。利用浇水管进行人工浇水, 按照时间计算水管每秒的出水量, 确定各处理欧李所需浇水时间。为保证均匀浇水, 需手提水管围绕欧李树冠, 转圈浇水。每个处理

设置 3 个随机区组小区, 每个小区面积约 50 m<sup>2</sup>, 株行距 1 m×2 m, 每个处理测定 10 个重复, 各处理组浇水时间为萌芽前、花后 1 周、花后 3 周、转色后 1 周、转色后 2~3 周。每个处理组处理间留 1 株作保护株, 行间留 1 行作保护行。

## 2.2 研究方法

### 2.2.1 欧李果肉醇、水提取液的制备

从不同田间水分条件处理的每个试验小区欧李植株中随机采取成熟欧李果实, 分离欧李果肉并切块, 称取 20 g 鲜果果肉, 冻干, 记录冻干质量后研磨成粉, 之后数据处理中将干重含量换算为鲜重含量进行表示。果肉醇提取液: 精密称取 1 g 于锥形瓶中, 加入含 0.1% HCl 的 40% 乙醇水溶液 50 mL, 超声提取 60 min, 漏斗过滤。果肉水提取液: 精密称取 1 g 于锥形瓶中, 加入蒸馏水 50 mL, 在 75 °C 下水浴加热 60 min, 漏斗过滤。滤液储存在 -20 °C, 待进一步的分析。每个田间水分条件重复 4 次。

### 2.2.2 欧李果肉品质的测定

在不同田间水分条件处理下的试验小区内选择 3 株不同欧李的果实, 每株采集 10 个成熟度相似的果实, 每次随机取果实 7 个, 将果肉粉碎, 按规定称量后测定欧李果肉品质。其中, 总酚酸含量采用福林酚比色法测定, 总黄酮含量采用 NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH 比色法测定, 总花青素含量和总原花青素含量采用铁盐催化比色法测定, 总糖含量采用硫酸苯酚法测定, 维生素 C 含量采用 2, 4-二硝基苯肼比色法测定, 利用紫外分光光度计测定 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力、FRAP 铁离子还原能力, 分别在 517 nm、734 nm、593 nm 条件下测定吸光度值, 各重复 3 次, 取平均值<sup>[15-17]</sup>。

## 2.3 数据分析

利用 Excel 2007 软件进行数据整理与计算, 利用 SPSS 19 软件进行单因素方差分析 ANOVA 和多重比较 LSD 方法分析不同处理之间的差异。利用 Qorigin Pro 8.5 软件绘制图表, 并进行相关分析和主成分分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同水分条件对欧李果实和果肉质量的影响

随施水量的增加, 全果质量及果肉质量均呈先增后减的趋势。其中, 单个欧李全果质量在 4963.326 ~ 8300.913 mg, 并在 500 mm 田间水分条件下达到最大值 8300.913 mg, 且与 500 mm 和 600 mm 田间水分条件差异不明显; 单个欧李果肉质量在 4682.040 ~ 7876.213 mg, 并在 400 mm 田间水分条件下达到最大值 7876.213 mg, 且与 500 mm 和 600 mm 田间水分条件差异不明显(见图 1)。

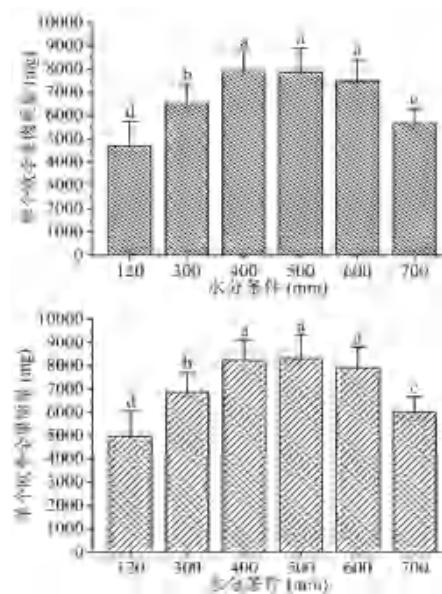


图 1 不同田间水分条件下单个欧李全果及果肉质量

Fig 1 Fruit and pulp quality of *Cerasus humilis* plum under different field water conditions

注: 不同字母表示不同组间数据经单因素 ANOVA 分析差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences in data between different groups by univariate ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ).

### 3.2 不同田间水分条件对欧李果肉品质的影响

随着施水量的增加, 欧李果肉中总酚酸含量、总糖含量、可滴定酸含量呈现先降低后增加再降低的变化趋势, 总黄酮含量、总花青素含量、糖酸比、维生素 C 含量、总蛋白含量总体呈现先增加后降低的趋势。欧李果肉中总酚酸含量在 11.074 ~ 15.454 mg·g<sup>-1</sup> FW (样品鲜重), 总黄酮含量在 26.667 ~ 36.337 mg·g<sup>-1</sup> FW, 总花青素含量在 0.152 ~ 0.293 mg·g<sup>-1</sup> FW, 总原花青素含量在 11.313 ~ 13.127 mg·g<sup>-1</sup> FW, 总糖含量在 58.766 ~ 74.661 mg·g<sup>-1</sup> FW, 可滴定酸含量在 3.661 ~ 4.461 mg·g<sup>-1</sup> FW, 糖酸比在 16.737 ~ 19.290, 维生素 C 含量在 0.172 ~ 0.295 mg·g<sup>-1</sup> FW, 总蛋白含量在 3.571 ~ 4.237 mg·g<sup>-1</sup> FW。其中, 总酚酸含量、总原花青素含量分别在 120 mm 田间水分条件下达到最大值; 总黄酮含量、总糖含量、可滴定酸含量、总蛋白含量分别在 400 mm 田间水分条件下达到最大值; 总花青素含量、糖酸比、维生素 C 含量分别在 500 mm 田间水分条件下达到最大值, 且与其他田间水分条件存在差异, 说明适度施水达到半湿润条件有利于欧李果肉中各果肉品质含量的积累(见图 2)。

单个欧李果肉中总酚酸含量在 62.932 ~ 102.590 mg, 总黄酮含量在 132.355 ~ 298.947 mg, 总花青素含量在 0.711 ~ 2.305 mg, 总原花青素含量在



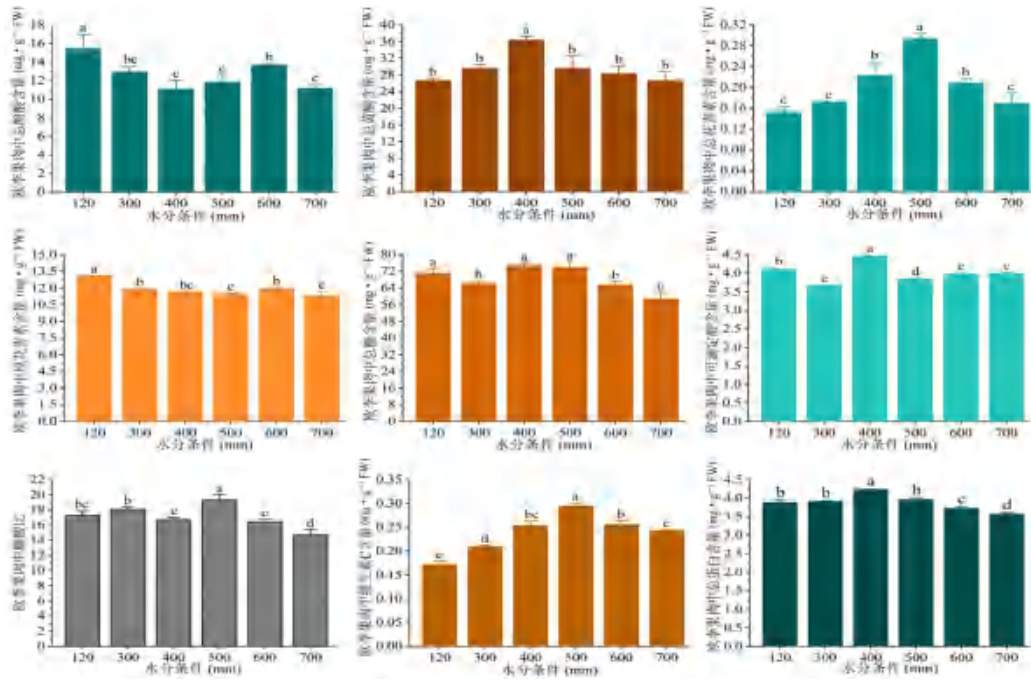


图 2 不同田间水分条件下欧李果肉中成分含量的变化特征

Fig 2 Variation characteristics of components in fruit meat of *Cerasus humilis* under different field water conditions

注：不同字母表示不同组间数据经单因素 ANOVA 分析差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences in data between different groups by univariate ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ).

61.459 ~ 91.757 mg, 总糖含量在 331.031 ~ 591.094 mg, 可滴定酸含量在 19.292 ~ 30.194 mg, 糖酸比含量在 80.829 ~ 151.680, 维生素 C 含量在 0.852 ~ 2.446 mg, 总蛋白含量在 18.169 ~ 33.369 mg。总黄酮含量、总糖含量、总蛋白含量、原花青素含量均

在 400 mm 田间水分条件下达到最大值;花青素含量、可滴定酸含量、糖酸比、维生素 C 含量均在 500 mm 田间水分条件下达到最大值;总酚酸含量在 600 mm 田间水分条件下达到最大值,与其他各田间水分条件差异均有统计学意义(见图 3)。

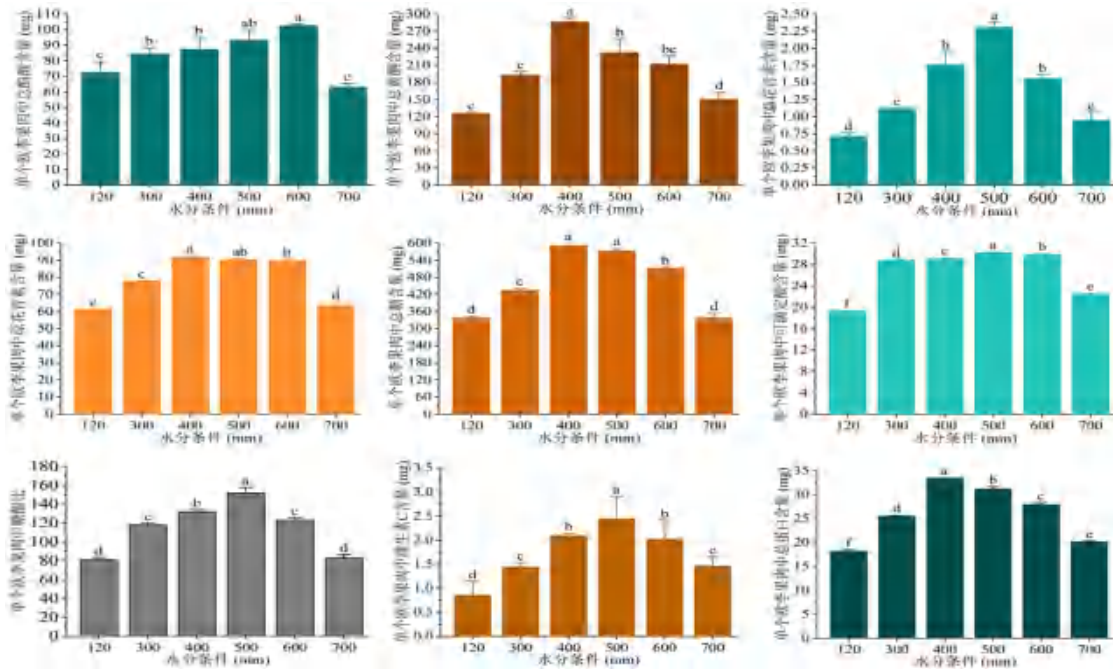


图 3 不同田间水分条件下单个欧李果肉中成分含量的变化特征

Fig 3 Variation characteristics of component content in meat of single *Cerasus humilis* fruit under different field water conditions

注：不同字母表示不同组间数据经单因素 ANOVA 分析差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences in data between different groups by univariate ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ).



### 3.3 不同田间水分条件对欧李果肉抗氧化能力的影响

如图 4 所示, 随着施水量的增加, 欧李果肉的抗氧化能力逐步下降。DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和 FRAP 铁离子还原能力均在 120 mm 田间水分条件达到最高, 分别为

57.45%、77.83%、77.83 mmol, 说明干旱条件最有利于欧李果肉抗氧化物质的积累。其中 DPPH 及 ABTS 自由基清除能力在 120 mm、300 mm 及 400 mm 田间水分条件下差异不明显, FRAP 铁离子还原能力在各田间水分条件间均差异不明显。

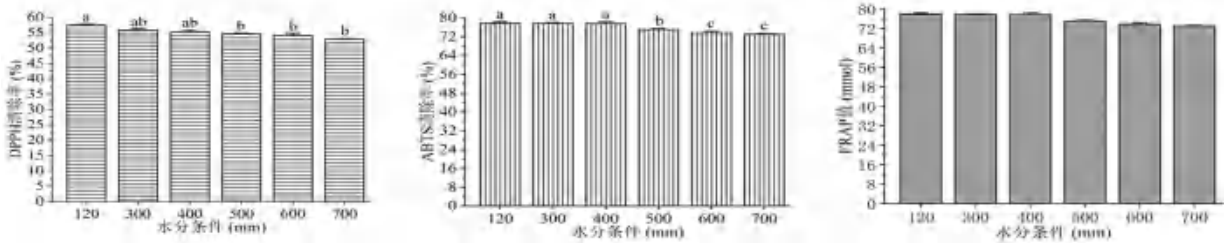


图 4 不同田间水分条件下欧李果肉抗氧化能力

Fig 4 Antioxidant capacity of *Cerasus humilis* fruit meat under different field water conditions

注: 不同字母表示不同组间数据经单因素 ANOVA 分析差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant differences in data between different groups by univariate ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ).

### 3.4 欧李果肉成分及抗氧化能力相关性分析

对欧李果肉中所测定的 8 种成分及欧李果肉的抗氧化能力进行相关性分析, 结果如图 5 所示。欧李果肉中抗氧化能力的 3 种指标除与花青素及维生素 C 含量积累成负相关以外, 与其他绝大部分成分的含量积累均成正相关。其中 ABTS 自由基清除能力与总糖、总原花青素、总蛋白含量积累成显著正相关。FRAP 铁离子还原能力与总原花青素和总蛋白含量积累成显著正相关。总花青素含量的积累与 FRAP 铁离子还原能力成显著负相关, 维生素 C 含量的积累与 FRAP 铁离子还原能力及 DPPH 自由基清除能力成显著负相关。

类成分的积累与田间水分条件均成负相关。其中总蛋白、酚酸、原花青素及糖的含量积累与田间水分条件成显著负相关。花青素与维生素 C 的含量积累均与田间水分条件成正相关, 其中维生素 C 与田间水分条件成显著正相关。

为进一步探讨不同田间水分条件对欧李果肉成分积累的影响, 利用所测得 6 种田间水分条件下的 8 类成分含量进行主成分分析。

根据各个田间水分条件的主成分综合得分可知, 随田间水分条件的增加, 综合得分呈现先上升后下降的趋势, 并在 400 mm 田间水分条件下得分最高。说明在利用所测得的 8 种成分含量进行主成分分析评价田间水分条件对成分积累所带来的影响时, 可知 400 mm 的田间水分条件最有利于各类成分的积累。根据图 6 可知, 田间水分条件为 400 mm 田间水分条件时, 与糖、总蛋白、黄酮和可滴定酸这 4 类成分含量的积累成正相关, 说明田间水分条件为 400 mm 时对这 4 类成分含量的积累最为有利。

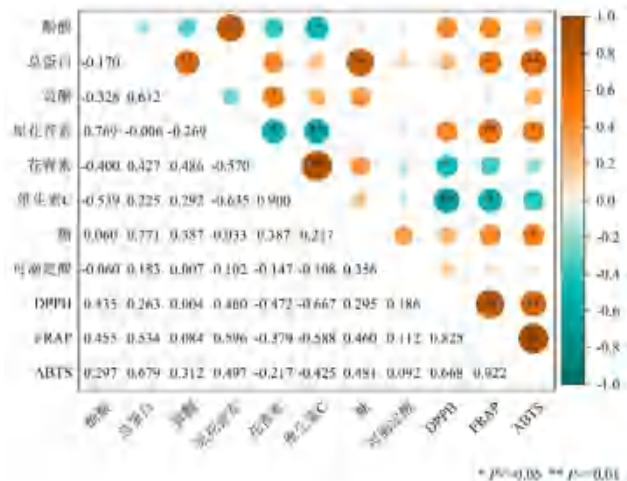


图 5 欧李果肉成分及抗氧化能力相关性分析

Fig 5 Correlation analysis of meat composition and antioxidant capacity of *Cerasus humilis* plum fruit

欧李果肉中所测定的各成分之间也具有一定的相关性, 总体来看, 大部分成分的积累之间成正相关。欧李果肉中除去花青素和维生素 C 外, 其他 6

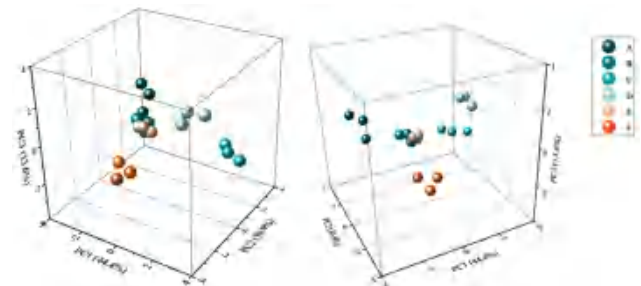


图 6 不同田间水分条件下欧李果肉主成分分析得分图 (左) 及双标图 (右)

Fig 6 Principal component analysis scores (left) and biplot (right) of plum fruit meat under different field water conditions

A ~ F. 120、300、400、500、600、700 mm

#### 4 讨论

欧李果肉中成分的积累, 总体以干旱及半干旱条件最佳。欧李果肉抗氧化能力以 120 mm 田间水分下的最为突出, 并与欧李果肉中除花青素及维生素 C 外的其他成分之间均成正相关, 与总蛋白、总糖以及原花青素等成分关系最为密切。欧李果肉中的各类成分的积累之间普遍具有正向的相关关系, 且与田间水分条件成负相关, 田间水分条件与欧李果肉的抗氧化能力也成负相关。主成分分析综合评分得出结论, 通过所测定成分含量评价欧李果肉质量, 最佳栽培田间水分条件均在 400 mm 左右。

目前关于欧李果肉抗氧化能力成分的研究, 主要集中于黄酮中的多酚类成分的抗氧化性质。徐潇吟等<sup>[18]</sup>测定认为欧李果肉中原花青素具有良好的抗氧化活性, 并能通过使脂质过氧化降低、肝细胞中抗氧化酶活性增强和清除自由基等方式对小鼠起到保肝的作用; 李卫东等<sup>[2]</sup>通过实验得到欧李果肉中总酚酸、总黄酮及原花青素等均有良好的抗氧化能力。本研究结果显示欧李果肉中的总黄酮、总酚酸、原花青素、总糖、可滴定的含量积累均与欧李果肉的抗氧化能力成正相关关系。花青素和维生素 C 的积累虽然与抗氧化能力成负相关趋势, 但含量均极小, 不能证明其抗氧化能力不强, 仅能推测不属于欧李果肉发挥抗氧化能力的主要成分。

应对生物及非生物的环境胁迫, 植物中的次级代谢及其代谢产物往往会发挥一定的作用。植物中的次级代谢产物结构复杂多样, 包括萜类、多酚类、生物碱类等, 这些产物对于植物自身通常具有抗真菌、释放信号、抗氧化、抗辐射乃至抵御草食性动物等活性, 能够起到保护防御、促进生长等效果<sup>[19]</sup>。一些次级代谢产物对于动物还具有一定的药效功能, 具有良好的药品及保健品开发潜力<sup>[20]</sup>。目前, 如何通过栽培提高这些成分在植物中的含量已经受到了广泛的关注。田间水分条件是影响植物中次级代谢的一大环境因素, 在田间水分胁迫的条件下, 将会有利于一些植物中次级代谢物质的积累, 往往会影响到植物的风味、色泽、香气以及口感<sup>[21-25]</sup>等。综上所述, 研究田间水分条件对植物中次级代谢产物的积累对于提高植物作物生产质量具有重要的现实意义。本研究得出在适当干旱胁迫的条件下更有利于欧李果肉中各类成分, 尤其是如总黄酮、总酚酸、原花青素等次级代谢产物的积累能够为通过改良栽培、灌溉条件提高欧李果肉质量

提供一定的依据。

田间水分条件对于欧李果肉成分积累的影响较为相似, 大部分成分的含量都随田间水分条件的增加呈现一个先上升后下降的趋势, 以年平均降水量在 400 mm 左右的半干旱条件最为适宜欧李果肉中成分的积累, 说明欧李果肉成分的积累同叶片等情况一样, 在降水量过低和过高时均会受到不利的影

#### 5 结论

① 增加施水量会提高欧李全果质量及果肉质量含量, 但并非水分含量越高, 促进效果越好。水分条件在 40~500 mm 时, 欧李果肉质量最高。② 欧李果肉总黄酮含量、总糖含量、可滴定酸含量、总蛋白含量分别在 400 mm 田间水分条件下达到最大值; 单个欧李果肉总黄酮含量、总糖含量、总蛋白含量、原花青素含量均在 400 mm 田间水分条件下达到最大值。③ 欧李果肉各类成分的积累之间普遍具有正向的相关关系, 田间水分条件与欧李果肉的抗氧化能力成负相关的关系。主成分综合分析显示, 欧李最佳栽培田间水分条件为年均降雨量相当 400 mm 左右。

#### 参考文献

- [1] 宫海志, 田福军. 干旱地区生态建设中的先锋树种——欧李[J]. 防护林科技, 2004 (3): 77-78.
- [2] 李卫东, 顾金瑞. 果药兼用型欧李的保健功能与药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19 (9): 1336-1340.
- [3] 王瑶, 徐春晖, 杜俊民. 欧李山楂沙棘复合饮料的研制及其抗疲劳研究[J]. 保鲜与加工, 2022, 22 (4): 46-51, 58.
- [4] 李姝琪, 郭晓梦, 张惠玲. 不同发酵条件对欧李酒多酚含量及苦味的影响[J]. 食品工业, 2021, 42 (12): 6-10.
- [5] 刘皓涵. 欧李果实营养成分分析及其固体饮料加工工艺研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2020.
- [6] 冯媛媛, 李雪丹, 桑亚新, 等. 微波渗糖技术加工低糖欧李果脯[J]. 食品科技, 2015, 40 (7): 103-109.
- [7] 潘艳芳, 王威, 郝晓磊, 等. 欧李醋饮料加工工艺研究[J]. 饮料工业, 2014, 17 (12): 19-22.
- [8] 褚建民, 孟平, 张劲松, 等. 土壤水分胁迫对欧李幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 林业科学研究, 2008, 21 (3): 295-300.
- [9] 牛洪斌, 白润娥, 张宪. 水分胁迫对欧李光合速率日变化的影响[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2000, 18 (2): 15-17.
- [10] 郭颖. 黄土高原四种乡土禾草耗水规律和抗旱特性的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2010.
- [11] 张坚, 张博, 周文贵, 等. 干旱胁迫对桔梗生长特性、生理特性及总皂苷成分积累的影响[J]. 天津中医药,

- 2015, 32 (11): 684-688.
- [12] 张洪银, 蔡焱红, 殷韶梅, 等. 田间水分胁迫对欧李生长和经济效益的影响 [J]. 农学学报, 2020, 10 (9): 48-52.
- [13] 许帅, 郭瑞雪, 乔建磊, 等. 不同土壤相对湿度对果实膨大期野生欧李生长发育及光合特性的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2022, 24 (5): 1-7.
- [14] 邢钟毓. 干旱胁迫下蒙原欧李的生理响应及转录组分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [15] 刘玉明, 李珂娴, 何颖, 等.  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定枇杷花水提液中总黄酮含量 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (1): 248-251.
- [16] 傅武胜, 蔡一新, 林丽玉, 等. 铁盐催化比色法测定葡萄籽提取物中的原花青素 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27 (10): 57-61.
- [17] Mahmoudi S, Khali M, Benkhaled A, et al. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten algerian *Ficus carica* L. varieties [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2016, 6 (3): 239-245.
- [18] 徐潇吟, 田争福, 张惠玲. 欧李原花青素体外抗氧化性及对小鼠肝损伤保护的研究 [J/OL]. 食品与发酵工业, 2022, 24 (5): 1-8
- [19] Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, et al. Secondary metabolites of plants and their role: overview [J]. Curr Trends Biotechnol Pharm, 2015, 9 (3): 293-304.
- [20] Yang L, Wen KS, Ruan X, et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors [J]. Molecules, 2018, 23 (4): 762.
- [21] Savoi S, Herrera JC, Carlin S, et al. From grape berries to wines: drought impacts on key secondary metabolites [J]. OENO One, 2020, 54 (3): 569-582.
- [22] Rahmati M, Vercambre G, Davarynejad G, et al. Water scarcity conditions affect peach fruit size and polyphenol contents more severely than other fruit quality traits [J]. J Sci Food Agr, 2015, 95 (5): 1055-1065.
- [23] Liu H, Wang X, Wang D, et al. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Ind Crops Prod, 2011, 33 (1): 84-88.
- [24] Liu Z. Drought-induced in vivo synthesis of camptothecin in *Camptotheca acuminata* seedlings [J]. Physiol Plantarum, 2000, 110 (4): 483-488.
- [25] Randriamampionona D, Diallo B, Rakotoniriana F, et al. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: application for ex situ conservation and clonal propagation [J]. Fitoterapia, 2007, 78 (7-8): 482-489.
- (收稿日期: 2022-08-10; 修回日期: 2022-11-17)

## 河北省赞皇县药用植物资源调查与分析

柴天川, 李俊雪, 张焕, 郑路静, 陈红艳\* (河北省中医院, 石家庄 050013)

**摘要:** **目的** 调查河北省赞皇县的药用植物资源, 掌握该区域药用植物的种类、分布、种植、开发和利用状况, 为该区域药用植物的保护、开发利用提供科学依据。 **方法** 采用调查走访、拍照、标本采集和制作、文献检索、品种鉴定等方法, 对该区域药用植物进行全面调查。 **结果** 赞皇县药用植物资源现有 105 科, 324 属, 489 种。其中, 被 2020 年版《中国药典》一部收载的有 95 种。 **结论** 赞皇县野生药用植物资源丰富, 不乏大宗和道地药材品种, 但少见药材种植; 当地政府可利用该区域的生态环境特点引导企业和农户开展适宜性种植, 并注意野生资源保护。

**关键词:** 赞皇县; 药用植物; 资源调查

中图分类号: S567

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0752-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.032

## Investigation and analysis of medicinal plant resources in Zanhuang county, Hebei province

CHAI Tian-chuan, LI Jun-xue, ZHANG Huan, ZHENG Lu-jing, CHEN Hong-yan\* (*Hebei Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050013*)

**基金项目:** 河北省中医药管理局科研计划项目 (No.2020009); 河北省中医药管理局科研计划项目 (No.2021007); 河北省中药制剂产业技术研究院项目 (No.SC2021003)。

**作者简介:** 柴天川, 男, 硕士研究生, 主任药师, 主要从事中药资源的开发与利用, email: 690903chai@163.com \*通信作者: 陈红艳, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药制剂的生产与开发, email: 1024041642@qq.com



**Abstract: Objective** To determine the medicinal plant resources in Zanhuang county Hebei province, to understand the type, distribution, cultivation, exploitation and utilization, provide scientific evidence for the protection, exploitation and utilization in this area. **Methods** By field investigation, photograph, specimen collection and preparation, literatures were searched, and variety identified in Zanhuang county. **Results** Totally 105 families, 324 genera, and 489 species of medicinal plant resources were found in Zanhuang county, 95 of which were recorded by Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 (Volume 1). **Conclusion** There have been rich resources of medicinal wild plant in Zanhuang county, with a lot Genuine medicinal materials. The plantation of traditional Chinese medicine is not common. Owing to favorable ecological environment, local government may help guide the plantation of medicinal materias and protection of wild resources.

**Key words:** Zanhuang county; medicinal plant; resource survey

全国第三次中药资源普查距今已有多年,河北省赞皇县药用植物资源在种类、分布、蕴藏量、人工种植等方面的变化有待掌握,药用植物资源有待调查。在全国第四次中药资源普查中,赞皇县是河北省普查的先行试验区域,于2013—2016年开展,试点普查时随机产生了样地43个,发现药用植物品种380余种;试点普查中发现,随机产生的许多样地位于农田、大路旁边、矿场和农舍旁边,大量植被良好和植物品种丰富的区域并未纳入样地范围,因此可能导致普查结果与实际植物品种数量有出入。因此,在第四次全国中药资源普查的基础上,我们自2020年对河北省赞皇县进行了详细的补充调查,现对该区域野生药用植物资源系统的总结和分析。

## 1 自然概况

赞皇县隶属于河北省石家庄市,地处太行山中段东麓,地势西高东低,绝大部分为山区,仅东部为丘陵和少量的平原地带;全县总面积约1210平方公里,人口20余万。赞皇县境内属于暖温带半湿润季风型大陆性气候,一年四季分明,春季干旱多风,夏季炎热多雨,秋季天高气爽,冬季寒冷干燥;全年平均气温13.3℃,全年无霜期平均193d,年平均降水量568mm,干旱、冰雹、暴雨、大风、寒潮等极端天气多见。赞皇县山区的地形复杂,自然生态保存较好,植物种类丰富,其中不乏贮量大、有重要经济价值和开发前景的野生药用植物资源。

## 2 方法

### 2.1 外业调查

按照《全国中药资源普查技术规范》<sup>[1]</sup>,外业采取走访和踏查的方法,对赞皇县药用植物品种的分布情况进行全面调查。调查过程中详细记录该区域药用植物的种类、生境,通过拍照、采集标本等方法,搜集到大量一手珍贵资料。

### 2.2 内业整理

对所采集品种制作腊叶标本。通过查阅《河北植物志》和相关文献资料<sup>[2-12]</sup>、Iplant植物智(<http://www.ipiant.cn/>)及PPBC中国植物图像库(<http://ppbc.ipiant.cn/>),对药用植物进行品种鉴定,对其科属、生境、群落、蕴藏量等信息进行登记,完成内业整理、统计和分析。

## 3 调查结果

### 3.1 药用植物分类分析

此次资源调查,共发现药用植物489种,涉及105科324属,详见表1。植物类别分析显示:藻类、菌类、地衣类和苔藓类植物的科、属和种数量均较少,四者合计的科占比7.62%、属占比3.08%、种占比2.04%,显示此四类少见入药使用,其中藻类仅有双星藻科光洁水绵*Spirogyra nitida*(Dillw.)Link一种,地衣类仅有石蕊科多层石蕊*Cladonia verticillata*Hoffm.一种。裸子植物仅有柏科侧柏*Platycladus orientalis*(L.)Franco和松科油松*Pinus tabulaeformis*Carr.被子植物在赞皇县药用植物中占绝对优势,科占比84.76%、属占比92.90%、种占比94.28%。

表1 赞皇县药用植物的分类分析 [n(%)]

Tab 1 Classification of medicinal plants in Zanhuang county [n(%)]

类别	科	属	种
被子植物	89 (84.76)	301 (92.90)	461 (94.28)
裸子植物	2 (1.91)	3 (0.93)	3 (0.61)
蕨类植物	6 (5.71)	10 (3.09)	15 (3.07)
苔藓植物	2 (1.91)	2 (0.61)	2 (0.41)
地衣植物	1 (0.95)	1 (0.31)	1 (0.20)
菌类植物	4 (3.81)	6 (1.85)	6 (1.23)
藻类植物	1 (0.95)	1 (0.31)	1 (0.20)
合计	105 (100.00)	324 (100.00)	489 (100.00)

### 3.2 药用植物组成分析

调查发现,赞皇县药用植物资源的科别和种类较多,资源丰富。根据科内物种数量的多少,

将科划分为不同的类别；其中种数 ≥ 16 的科有 6 个，科占比 5.71%；种数 11 ~ 15 的科有 5 个，科占比 4.76%；种数 6 ~ 10 的科有 10 个，科占比 9.52%；种数 2 ~ 5 的科有 48 个，科占比 45.72%；单种的科有 36 个，科占比 34.29% (见表 2)。分析发现，含有 6 种以上植物品种的科数量相对较少，

科占比合计为 19.99%，但种占比合计为 59.09%，说明该区域的生境条件相对适合菊科、豆科、唇形科、蔷薇科、毛茛科和禾本科等植物的生长。单种科的科数量相对较多，科占比 34.29%；但植物品种数量仅 52 种，种占比仅 10.63%。

表 2 赞皇县药用植物组成统计分析结果

Tab 2 Component analysis of medicinal plants in Zanhuang county

科类别	科 [n(%)]	种 [n(%)]	全部科名 (种数)
≥ 16 种	6 (5.71)	158 (32.31)	菊科 (51)、豆科 (27)、唇形科 (23)、蔷薇科 (21)、毛茛科 (19)、禾本科 (17)
11 ~ 15 种	5 (4.76)	61 (12.47)	百合科 (14)、十字花科 (13)、伞形科 (12)、蓼科 (11)、玄参科 (11)
6 ~ 10 种	10 (9.52)	70 (14.31)	茄科 (10)、萝藦科 (8)、石竹科 (8)、桔梗科 (7)、堇菜科 (7)、葫芦科 (6)、大戟科 (6)、藜科 (6)、锦葵科 (6)、荨麻科 (6)
2 ~ 5 种	48 (45.72)	148 (30.26)	罂粟科 (5)、壳斗科 (5)、旋花科 (5)、大麻科 (5)、败酱科 (5)、茜草科 (5)、葡萄科 (5)、莎草科 (5)、卷柏科 (5)、苋科 (5)、杨柳科 (5)、榆科 (4)、胡颓子科 (4)、景天科 (4)、桑科 (4)、天南星科 (4)、多孔菌科 (3)、水龙骨科 (3)、鳞毛蕨科 (3)、木贼科 (3)、椴树科 (3)、紫草科 (3)、忍冬科 (3)、牻牛儿苗科 (3)、夹竹桃科 (3)、龙胆科 (2)、铁角蕨科 (2)、蹄盖蕨科 (2)、松科 (2)、报春花科 (2)、木樨科 (2)、车前科 (2)、酢浆草科 (2)、鸢尾科 (2)、胡桃科 (2)、商陆科 (2)、鼠李科 (2)、苦苣苔科 (2)、远志科 (2)、小檗科 (2)、桦木科 (2)、五加科 (2)、槭树科 (2)、防己科 (2)、列当科 (2)、卫矛科 (2)、杜鹃花科 (2)、天门冬科 (2)
单种	36 (34.29)	52 (10.63)	双星藻科 (1)、木耳科 (1)、地星科 (1)、羊肚菌科 (1)、石耳科 (1)、蛇苔科 (1)、地钱科 (1)、蕨科 (1)、柏科 (1)、苦木科 (1)、楝科 (1)、瑞香科 (1)、芸香科 (1)、蕈蕨科 (1)、马鞭草科 (1)、柿树科 (1)、无患子科 (1)、马齿苋科 (1)、漆树科 (1)、千屈菜科 (1)、川续断科 (1)、山茱萸科 (1)、透骨草科 (1)、泽泻科 (1)、鸭跖草科 (1)、柳叶菜科 (1)、薯蕨科 (1)、凤仙花科 (1)、眼子菜科 (1)、香蒲科 (1)、胡麻科 (1)、秋海棠科 (1)、石榴科 (1)、灯心草科 (1)、石蒜科 (1)、麻黄科 (1)

3.3 药用植物生活型分析

实地调查中发现赞皇县并无大面积草甸或草地，但药用植物普查结果以草本植物为主，合计 387 种，种占比达到 79.14%，由此可见，赞皇县药用植物的优势生活类型为草本植物。赞皇县

绝大部分区域为山区，植被覆盖率高，次生林较多，但藤本、灌木和乔木类的入药植物品种较少，三者合计的种占比 20.86%；其中藤本类最为少见，种占比仅为 4.50% (见表 3)。

表 3 赞皇县药用植物生活型统计分析结果

Tab 3 Life-form analysis of medicinal plants in Zanhuang county

生活型	种 [n(%)]	举例
草本	387 (79.14)	薄荷 <i>Mentha canadensis</i> Linnaeus、白头翁 <i>Pulsatilla chinensis</i> (Bunge) Regel
藤本	22 (4.50)	穿龙薯蓣 <i>Dioscorea nipponica</i> Makino、蝙蝠葛 <i>Menispermum dauricum</i> DC.
灌木	44 (9.00)	酸枣 <i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> (Bunge) Hu ex H.F.Chow、枸杞 <i>Lycium chinense</i> Miller
乔木	36 (7.36)	臭椿 <i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle、君迁子 <i>Diospyros lotus</i> L.

3.4 药用植物习性分析

赞皇县药用植物以旱生物种为主，包括在阴潮处生长的品种，占物种总数的 93.66%，提示中药材种植可优先考虑耐旱品种。水生和湿生药用植物品种较少，两者合计占 6.34%，其中水生生物种最少，仅占 1.64%；因赞皇县水资源缺乏，地表湿地和河塘少见，因此不利于水生和湿生药用植物的种植 (见表 4)。

表 4 赞皇县药用植物习性统计分析结果

Tab 4 Behavior of medicinal plants in Zanhuang county

习性	种数 (种占比 %)	举例
水生	8 (1.64)	北水苦苣 <i>Veronica anagallis-aquatica</i> Linnaeus、浮萍 <i>Lemna minor</i> L.
湿生	23 (4.70)	水蓼 <i>Polygonum hydropiper</i> L.、茵陈蒿 <i>Ranunculus chinensis</i> Bunge
旱生	458 (93.66)	曼陀罗 <i>Datura stramonium</i> L.、茵陈蒿 <i>Artemisia capillaris</i> Thunb.

3.5 重点药用植物

3.5.1 重点药用植物品种统计 以是否收载于 2020 年版《中国药典》<sup>[3]</sup> 为参考指标，对赞皇县的重点药用植物品种进行统计。发现 489 种药用植物中共有 95 种被药典收载，种占比 19.43%，说明赞皇县不

乏药典正品品种 (见表 5)，亦不乏地道药材和大宗药材的原植物，如艾、苍耳、苍术、茵陈蒿、蒲公英、北柴胡、半夏、酸枣等。

3.5.2 重点药用植物的功效多样性分析 依据 2020 年版《中国药典》一部有关中药饮片“入药

表 5 赞皇县重点药用植物品种统计结果  
Tab 5 Species of key medicinal plants in Zanhuan county

No.	基原植物		入药部位 (药材名称)
	植物名称	植物学名	
1	艾	菊科 <i>Artemisia argyi</i> Levl. et Van. var. <i>argyi</i>	叶 (艾叶)、嫩叶 (艾绒)、地上部分 (艾把)、果实 (艾实)
2	苍耳	菊科 <i>Xanthium strumarium</i> L.	全草 (苍耳)、花 (苍耳花)、果实 (苍耳子)、根 (苍耳根)
3	刺儿菜	菊科 <i>Cirsium arvense</i> var. <i>integrifolium</i> C. Wimm. et Grabowski	地上部分 (小蓟)
4	苍术	菊科 <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	根茎 (苍术、茅苍术、南苍术)
5	猪毛蒿	菊科 <i>Artemisia scoparia</i> Waldst. et Kit.	地上部分 (茵陈、猪毛蒿)
6	黄花蒿	菊科 <i>Artemisia annua</i> L.	地上部分 (青蒿)、根 (青蒿根)、果实 (黄花蒿子、青蒿子)
7	漏芦	菊科 <i>Rhaponticum uniflorum</i> (L.) DC.	根 (漏芦)、花序 (追骨风、漏芦花)
8	驴欺口	菊科 <i>Echinops latifolius</i> Tausch.	根 (禹州漏芦)、花序 (蓝刺头、驴欺口)
9	蒲公英	菊科 <i>Taraxacum mongolicum</i> Hand.-Mazz.	全草 (蒲公英)
10	腺梗豨莩	菊科 <i>Sigesbeckia pubescens</i> Makino	地上部分 (豨莩草)、根 (豨莩根)、果实 (豨莩果)
11	旋覆花	菊科 <i>Inula japonica</i> Thunb.	地上部分 (金沸草、金佛草)、头状花序 (旋覆花)、根 (旋覆花根)
12	茵陈蒿	菊科 <i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	地上部分 (茵陈)
13	白蜡树	木樨科 <i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	枝皮或干皮 (秦皮)、叶 (白蜡树叶)、花 (白蜡花)、种子 (白蜡籽、白蜡树子)
14	白藜	葡萄科 <i>Ampelopsis japonica</i> (Thunb.) Makino	块根 (白藜)、果实 (白藜子)
15	白屈菜	罂粟科 <i>Chelidonium majus</i> L.	地上部分 (白屈菜)、根 (小人血七)
16	白头翁	毛茛科 <i>Pulsatilla chinensis</i> (Bunge) Regel	根 (白头翁)、花 (白头翁花)、地上部分 (白头翁茎叶)
17	白芷	伞形科 <i>Angelica dahurica</i> (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. ex Franch. e	根 (白芷)、叶 (白芷叶)
18	北柴胡	伞形科 <i>Bupleurum chinense</i> DC. <sup>△</sup>	根 (北柴胡)
19	红柴胡	伞形科 <i>Bupleurum scorzonrifolium</i> Willd.	根 (南柴胡)
20	防风	伞形科 <i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. <sup>△▲</sup>	根 (防风)、叶 (防风叶)、花 (防风花)
21	茴香	伞形科 <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. <sup>▲</sup>	果实 (小茴香)、根 (茴香根)、茎叶 (茴香茎叶)
22	辽藁本	伞形科 <i>Ligusticum jeholense</i> (Nakai et Kitag.) Nakai et Kitag.	根茎和根 (藁本、辽藁本)
23	半夏	天南星科 <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit. <sup>△</sup>	块茎 (半夏)
24	一把伞南星	天南星科 <i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott	块茎 (天南星)
25	东北南星	天南星科 <i>Arisaema amurense</i> Maxim.	块茎 (天南星)
26	蒿蓄	蓼科 <i>Polygonum aviculare</i> L.	全草 (蒿蓄)
27	杠板归	蓼科 <i>Polygonum perfoliatum</i> L.	地上部分 (杠板归)、根 (杠板归根)
28	何首乌	蓼科 <i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Harald. <sup>△</sup>	块根 (何首乌)、叶 (何首乌叶)、藤茎或带叶藤茎 (夜交藤)
29	红蓼	蓼科 <i>Polygonum orientale</i> L.	果实 (水红花子)、茎叶 (荭草)、花序 (荭草花)、根茎 (荭草根)
30	蝙蝠葛	防己科 <i>Menispermum dauricum</i> DC. <sup>△</sup>	根茎 (北豆根)、藤茎 (蝙蝠藤)、叶 (蝙蝠葛叶)
31	独行菜	十字花科 <i>Lepidium apetalum</i> Willdenow	种子 (北葶苈子)
32	播娘蒿	十字花科 <i>Descurainia sophia</i> (L.) Webb ex Prantl	种子 (南葶苈子)、全草 (播娘蒿)
33	薄荷	唇形科 <i>Mentha canadensis</i> Linnaeus	地上部分 (薄荷)
34	丹参	唇形科 <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	根和根茎 (丹参)
35	益母草	唇形科 <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn <sup>△</sup>	果实 (茺蔚子)、地上部分 (益母草)、花 (益母草花、茺蔚花)
36	草麻黄	麻黄科 <i>Ephedra sinica</i> Stapf	根和根茎 (麻黄根)、草质茎 (麻黄)
37	侧柏	柏科 <i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco <sup>△</sup>	枝梢和叶 (侧柏叶)、枝条 (柏枝节)、根皮 (柏根白皮)、树脂 (柏脂)、种仁 (柏子仁)
38	车前	车前科 <i>Plantago asiatica</i> L.	种子 (车前子)、全草 (车前草)
39	平车前	车前科 <i>Plantago depressa</i> Willd.	种子 (车前子)、全草 (车前草)
40	臭椿	苦木科 <i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle <sup>△</sup>	根皮或干皮 (椿皮、檮白皮)、叶 (檮叶)、果实 (凤眼草)
41	穿龙薯蓣	薯蓣科 <i>Dioscorea nipponica</i> Makino <sup>△</sup>	根茎 (穿山龙)
42	薯蓣	薯蓣科 <i>Dioscorea polystachya</i> Turczaninow <sup>▲</sup>	块茎 (山药)、茎叶 (山药藤)、珠芽 (零余子)
43	刺五加	五加科 <i>Eleutherococcus senticosus</i> (Ruprecht & Maximowicz) Maximowicz	根或根茎或茎 (刺五加)、叶 (五加叶)
44	大豆	豆科 <i>Glycine max</i> (L.) Merr. <sup>△▲</sup>	种子 (黑豆)、叶 (黑大豆叶)、花 (黑大豆花)、种皮 (黑豆衣)
45	葛	豆科 <i>Pueraria montana</i> (Loureiro) Merrill <sup>△</sup>	根 (葛根)、花 (葛花)、藤茎 (葛蔓)、叶 (葛叶)
46	槐	豆科 <i>Styphnolobium japonicum</i> (L.) Schott <sup>△▲</sup>	花 (槐花)、花蕾 (槐米)、果实 (槐角)、嫩枝 (槐枝)、槐叶 (槐叶)、根 (槐根)、树皮和根皮 (槐白皮)



续表 5

No.	基原植物		入药部位(药材名称)
	植物名称	科名 植物学名	
47	决明	豆科 <i>Senna tora</i> (Linnaeus) Roxburgh <sup>△</sup>	种子(决明子)、全草或叶(野生花生)
48	苦参	豆科 <i>Sophora flavescens</i> Alt.	根(苦参)、种子(苦参实、苦参子)、全草(苦参草)
49	党参	桔梗科 <i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.	根(党参)
50	桔梗	桔梗科 <i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC.	根(桔梗)、根茎(桔梗芦头)
51	轮叶沙参	桔梗科 <i>Adenophora tetraphylla</i> (Thunb.) Fisch.	根(南沙参)
52	灯芯草	灯芯草科 <i>Juncus effusus</i> L.	茎髓(灯芯草)、根及根茎(灯芯草根)
53	地锦草	大戟科 <i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	全草(地锦草)
54	斑地锦	大戟科 <i>Euphorbia maculata</i> L.	全草(地锦草)
55	地黄	列当科 <i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey. <sup>△</sup>	块根(地黄)、叶(地黄叶)、花蕾(地黄花)、种子(地黄实)
56	阴行草	列当科 <i>Siphonostegia chinensis</i> Benth.	全草(北刘寄奴)
57	地榆	蔷薇科 <i>Sanguisorba officinalis</i> L. <sup>△</sup>	根(地榆)、叶(地榆叶)
58	龙芽草	蔷薇科 <i>Agrimonia pilosa</i> Ldb.	根(龙芽草根、仙鹤草根)、带有不定芽的根茎(仙鹤草根芽)、地上部分(仙鹤草)
59	路边青	蔷薇科 <i>Geum aleppicum</i> Jacq.	全草(蓝布正、水杨梅)
60	委陵菜	蔷薇科 <i>Potentilla chinensis</i> Ser.	全草或带根全草(委陵菜)、根(委陵菜根)
61	瓦松	景天科 <i>Orostachys fimbriata</i> (Turczaninow) A. Berger	地上部分(瓦松)
62	杠柳	夹竹桃科 <i>Periploca sepium</i> Bunge <sup>△</sup>	根皮(香加皮)
63	枸杞	茄科 <i>Lycium chinense</i> Miller	果实(枸杞)、根(地骨皮)、叶(枸杞叶)
64	酸浆	茄科 <i>Alkekengi officinarum</i> Moench	全草(酸浆)、根(酸浆根)、宿萼或带果实的宿萼(锦灯笼、挂金灯)
65	构树	桑科 <i>Broussonetia papyrifera</i> (Linnaeus) L'Heritier ex Ventenat	果实(楮实子)、嫩根或根皮(楮树根)、树皮(楮树白皮)、枝条(楮茎)、叶(楮叶)、树汁液(楮皮间白汁)
66	桑	桑科 <i>Morus alba</i> L. <sup>△△</sup>	叶(桑叶)、根皮(桑白皮)、嫩枝(桑枝)、果穗(桑椹)、桑树皮液汁(桑皮汁)、结节(桑癭)、枝条烧灼后沥出的汁液(桑沥)、根(桑根)、桑木灰(桑柴灰)、桑叶蒸馏液(桑叶露)、桑叶液汁(桑叶汁)、花序(桑椹花)
67	孩儿参	石竹科 <i>Pseudostellaria heterophylla</i> (Miq.) Pax	块根(太子参)
68	瞿麦	石竹科 <i>Dianthus superbus</i> L.	地上部分(瞿麦)
69	胡桃	胡桃科 <i>Juglans regia</i> L. <sup>△△</sup>	种仁(核桃仁)、叶(核桃叶)、果核内的木质隔膜(分心木)、花(胡桃花)、嫩枝(胡桃枝)、根或根皮(胡桃根)、树皮(胡桃树皮)、成熟果实的内果皮(胡桃壳)、未成熟的果实(青胡桃果)、未成熟果实的外果皮(胡桃青皮)、种仁的脂肪油(胡桃油)、种仁返油而变黑色者(油胡桃)
70	花椒	芸香科 <i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim. <sup>△</sup>	果皮(花椒)、根(花椒根)、叶(花椒叶)、种子(椒目)
71	败酱	忍冬科 <i>Patrinia scabiosifolia</i> Link	全草(败酱)
72	忍冬	忍冬科 <i>Lonicera japonica</i> Thunb.	茎枝(忍冬藤)、花蕾或带初开花(金银花)、叶(金银花叶)、果实(金银花子)
73	蒺藜	蒺藜科 <i>Tribulus terrestris</i> Linnaeus	果实(蒺藜)、茎叶(蒺藜苗、蒺藜草)、花(蒺藜花)、根(蒺藜根)
74	老鹳草	牻牛儿苗科 <i>Geranium wilfordii</i> Maxim.	地上部分(老鹳草)
75	牻牛儿苗	牻牛儿苗科 <i>Erodium stephanianum</i> Willd.	地上部分(老鹳草)
76	芦苇	禾本科 <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	根茎(芦根)、嫩茎(芦茎)、花序(芦花)、箨叶(芦竹箨)、叶(芦叶)、嫩苗(芦笋)
77	马齿苋	马齿苋科 <i>Portulaca oleracea</i> L.	地上部分(马齿苋)、种子(马齿苋子)
78	牛膝	苋科 <i>Achyranthes bidentata</i> Blume	根(牛膝)、茎叶(牛膝茎叶)
79	茜草	茜草科 <i>Rubia cordifolia</i> L.	地上部分(茜草藤)、茎叶(茜草茎)、根和根茎(茜草)
80	苘麻	锦葵科 <i>Abutilon theophrasti</i> Medicus	全草或叶(苘麻)、种子(苘麻子)、根(苘麻根)
81	沙棘	胡颓子科 <i>Hippophae rhamnoides</i> L.	果实(沙棘)
82	香附子	莎草科 <i>Cyperus rotundus</i> L.	茎叶(莎草)、根茎(香附、香附子)
83	山茱萸	山茱萸科 <i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc. <sup>△</sup>	果肉(山茱萸)
84	商陆	商陆科 <i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.	根(商路)、花(商陆花)、叶(商陆叶)
85	酸枣	鼠李科 <i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> (Bunge) Hu ex H.F.Chow. <sup>△</sup>	种子(酸枣仁)、果肉(酸枣肉)、根皮(酸枣根皮)、根(酸枣根)、树皮(酸枣树皮)、棘刺(棘针)、叶(棘叶)、花(棘刺花)
86	天门冬	天门冬科 <i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	块根(天冬)
87	知母	天门冬科 <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	根茎(知母)
88	玉竹	百合科 <i>Polygonatum odoratum</i> (Mill.) Druce	根茎(玉竹)

续表 5

No.	基原植物		入药部位(药材名称)
	植物名称	植物学名	
89	菟丝子	旋花科 <i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	种子(菟丝子)、全草(菟丝、菟丝子藤)
90	圆叶牵牛	旋花科 <i>Ipomoea purpurea</i> Lam.	种子(牵牛子、黑丑、白丑)
91	薤白	石蒜科 <i>Allium macrostemon</i> Bunge	鳞茎(薤白)、叶(薤叶)
92	鸭跖草	鸭跖草科 <i>Commelina communis</i> L.	地上部分(鸭跖草)
93	有柄石韦	水龙骨科 <i>Pyrrosia petiolosa</i> (Christ) Ching	全草(有柄石韦)、叶(石韦)
94	远志	远志科 <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. <sup>△</sup>	地上部分(小草)、根(远志)、根皮(远志肉、远志筒、远志棍)
95	紫花地丁	堇菜科 <i>Viola philippica</i> Cav. <sup>△</sup>	全草(紫花地丁)

注( Note): <sup>△</sup>为道地药材; <sup>▲</sup>为人工栽培品种( <sup>△</sup> shows the genuine medicinal materials; <sup>▲</sup> shows the species of manual cultivation )。

部位”和“功能与主治”的描述,我们对以上 95 种重点药用植物的主要功效进行分类汇总。结果 95 种重点药用植物中(包含同一基原的不同药用部位),清热药 24 个、补虚药 15 个,解表药 11 个、利水渗湿药 9 个,化痰止咳平喘药 9 个,止血药 8 个,祛风湿药和活血化瘀药各 5 个,安神药 3 个,温里药、收涩药和理气药各 2 个,化湿药、泻下药和平肝熄风药各 1 个。除清热药品种较多外,其他功效类的药用植物分布不集中,功效分类较为分散。

#### 4 分析与建议

##### 4.1 生态环境分析

赞皇县山区的地形复杂,山势险峻、沟壑纵横,因此大片田地少见,且土壤多包含大小碎石;地形和土壤条件限制了大面积开垦和种植,目前农作物和中药材多为小片或零星种植。赞皇县东部地势渐平缓,但面积较小,为主要的农作物种植区。

##### 4.2 中药材种植现状分析

赞皇县东部的种植品种主要为常见农作物、瓜果蔬菜及经济作物等,少见中药材种植。虽然赞皇县不乏野生的药典品种及大宗中药材品种,但北柴胡、黄芩、远志、地黄、半夏等品种长期未见种植,经调查其原因包括地块和土质限制、水肥等田间管理困难、山区退耕还林及环保政策、当地青壮年有效劳动力逐年减少、种植收益低或不稳定等。

##### 4.3 中药材收购情况分析

有药商定期到赞皇县收购药材,但收购品种有限,收购量不大,收购价随当年行情;采收和出售的野生药材品种一般为酸枣仁、黄精、土元胡等。

##### 4.4 建议

基于赞皇县的地理位置、土壤、水肥条件和气候特征,考虑当地农户传统种植习惯,并参考当地农村劳动力情况、农户家庭经济情况、环保和封山育林政策、道路交通等因素,赞皇县个体农户的中药材种植近期不会出现较快发展,农户无大面积规模化种植的意愿,依旧会延续零星、小面积和间断性种植。因此,参考赞皇县相邻县

市的成功经验,当地政府可配套出台相关激励政策,引导中成药生产企业或中药饮片加工企业的资金投入,采取公司加合作社加农户等方式,推动赞皇县中药材产业规模化、产业化和可持续发展,做到当地政府、药企和农户多赢的局面。

#### 5 结论

此次赞皇县药用植物资源调查,共发现药用植物 105 科 324 属 489 种。药用资源以被子植物为主,菊科、豆科和唇形科等为优势科,草本和中生旱生植物占绝大多数;药典品种 95 种,以清热药、补虚药和解表药为主。通过此次资源调查,掌握了赞皇县药用植物资源的基本情况,全面、系统地摸清了该区域药用植物资源的种类和分布特点,并可为当地管理部门研究制定中药产业规划、开发利用政策、环境和物种保护措施等提供参考。

#### 参考文献

- [1] 黄璐琦,王永炎.全国中药资源普查技术规范[M].上海:上海科学技术出版社,2015.
- [2] 河北植物志编辑委员会.河北植物志.全卷[M].石家庄:河北科学技术出版社,1991.
- [3] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020.
- [4] 南京中医药大学编.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2014.
- [5] 王国强.全国中草药汇编[M].北京:人民卫生出版社,2014.
- [6] 中华本草编委会.中华本草.全卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [7] 闫路娜.河北省崞石岩区域常见动植物图谱[M].保定:河北大学出版社,2011.
- [8] 付正良,周海平,林飞武.河北省本草图鉴[M].石家庄:河北科学技术出版社,2018.
- [9] 柴天川,马晓莉,王彦刚.太行本草图谱-崞石岩[M].北京:中国中医药出版社,2018.
- [10] 李玉,李泰辉,杨祝良,等.中国大型菌物资源图鉴[M].郑州:中原农民出版社,2015.
- [11] 王立安,通占元.河北省野生大型真菌原色图谱[M].北京:科学出版社,2011.
- [12] 赵建成,谢晓亮.河北珍稀濒危药用植物资源[M].北京:科学出版社,2015.

(收稿日期:2022-08-23;修回日期:2022-09-15)

## 药物分析与检验

## 深绿卷柏的显微鉴别和高效液相色谱特征图谱研究

王新桂<sup>1, 2</sup>, 朱田密<sup>1, 2\*</sup> (1. 湖北省中医院 湖北中医药大学附属医院, 武汉 430061; 2. 湖北省中医药研究院, 武汉 430074)

**摘要:** **目的** 研究深绿卷柏的显微鉴别特征, 并建立其 HPLC 特征图谱。**方法** 采用茎横切片法和叶表面制片方法研究深绿卷柏的显微特征。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 Narrow-Bore (2.1 mm×150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.25 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 330 nm, 柱温为 30℃, 记录 15 批深绿卷柏的色谱图, 计算相似度, 确认 10 个共有峰为特征峰, 以穗花杉双黄酮色谱峰为参照, 计算相对保留时间, 建立特征图谱, 对部分特征峰进行指认, 且与 3 种混淆品特征图谱进行比较。用 SPSS 软件对深绿卷柏进行聚类分析。**结果**

深绿卷柏的茎、叶显微特征明显。15 批深绿卷柏样品的相似度为 0.765~0.964, 特征峰稳定, 并且可以与混淆品中华卷柏、江南卷柏、卷柏相区别。指认了 4 种双黄酮类成分, 分别为穗花杉双黄酮、罗波斯塔双黄酮、橡胶树双黄酮、穗花杉双黄酮-7, 4', 7'', 4'''-四甲醚。聚类分析将深绿卷柏分为两类, 与产地相关。**结论** 所建立的方法简便、实用, 可为深绿卷柏的鉴别提供依据。

**关键词:** 深绿卷柏; 显微鉴别; 特征图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0758-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.033

### Microscopic identification and HPLC characteristic chromatogram of *Selaginella doederleinii* Hieron.

WANG Xin-gui<sup>1, 2</sup>, ZHU Tian-mi<sup>1, 2\*</sup> (1. Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine/Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 2. Hubei Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074)

**Abstract: Objective** To determine the microscopic characteristics and identify the characteristic chromatogram method of *Selaginella doederleinii* Hieron. by HPLC. **Methods** Stem transverse sectioning and leaf sealing were used in the microscopic study. Agilent ZORBAX SB-C18 Narrow-Bore (2.1 mm×150 mm, 5 μm) column was used with gradient elution with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 0.25 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 330 nm, the column temperature was 30℃. The HPLC chromatogram of 15 batches of *Selaginella doederleinii* Hieron. samples was recorded and similarity calculated. Totally 10 common peaks were confirmed as characteristic peaks. Each relative retention time was calculated with Amentoflavone peak as the reference. The characteristic chromatogram was established and compared with 3 confusing varieties. Some characteristic peaks were identified. Hierarchical cluster analysis was performed with SPSS. **Results** The microscopic characteristics of the stem and leaves were obvious. The similarity of 15 batches of *Selaginella doederleinii* Hieron. ranged from 0.765 to 0.964. The characteristic peaks were stable and could be distinguished from adulterants such as *Selaginella sinensis*, *Selaginella moellendorffii* and *Selaginella tamariscina*. Four biflavonoids in the characteristic chromatogram of *Selaginella doederleinii* Hieron. were identified as amentoflavone, robustaflavone, heveaflavone, and 7, 4', 7'', 4'''-tetra-*O*-methyl-amentoflavone. The 15 samples from

基金项目: 全国中药特色技术传承人才培养项目 [ 国中医药人教函 (2019) 43 号 ]。

作者简介: 王新桂, 女, 主管药师, 主要从事中药鉴定研究, email: 2120235040@qq.com \* 通信作者: 朱田密, 女, 副主任药师, 硕士生导师, 主要从事中药的品种和质量研究, email: sweetness2001@126.com



different areas were divided into 2 clusters by hierarchical cluster analysis. **Conclusion** The method is simple and practical, which can be used to identify authentic *Selaginella doederleinii* Hieron..

**Key words:** *Selaginella doederleinii* Hieron.; microscopic identification; characteristic chromatogram; HPLC

深绿卷柏 (*Selaginella doederleinii* Hieron.) 是卷柏科卷柏属植物, 又名“石上柏”, 是一种在我国南方部分地区广泛使用的民间药材, 也被广西、广东、湖北、湖南、江西、香港中药材标准收载<sup>[1-2]</sup>。另外广西中药材标准也收载江南卷柏作为石上柏<sup>[3]</sup>。深绿卷柏具有清热解毒、活血、祛风、抗肿瘤、止血等功效, 用于治疗多种癌症、感染性炎症和风湿等疾病<sup>[4-6]</sup>。卷柏属植物物种丰富, 茎、叶细小又形态相近, 为了避免混淆, 有必要研究其鉴别方法。有关深绿卷柏的分析、鉴别研究曾有部分报道, 王佳芷<sup>[7]</sup>采用 HPLC 法对深绿卷柏乙酸乙酯部位的主要成分双黄酮进行了分析, 徐燃等<sup>[8]</sup>报道了深绿卷柏和江南卷柏的 HPLC 指纹特征, 刘葭等<sup>[9]</sup>报道了卷柏属叶缘细胞特征的分类学意义, 万定荣等<sup>[10]</sup>报道了 10 种卷柏属茎的解剖特征, 但未包含深绿卷柏。本文在相关研究报道和地方标准的基础上进一步开展研究, 应用茎横切片和叶表面制片鉴定深绿卷柏显微特征, 采用溶剂消耗量小的窄内径色谱柱和低流速建立深绿卷柏的 HPLC 特征图谱, 为药材

标准的提高和真伪鉴别提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

PH100-DB310U-PL 生物显微镜 (凤凰光学集团有限公司); Waters alliance 高效液相色谱系统 (e2695 四元梯度泵, 自动进样器, 2998 PDA 检测器, 美国 Waters 公司); ES 225SM-DR 电子天平 (瑞士普利赛斯公司); AS 220·R2 电子天平 (波兰 RADWAG 公司); KQ-500VDE 双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); FW177 高速万能粉碎机 (北京市永光明医疗仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

深绿卷柏样品以及混淆品江南卷柏样品的基源由湖北中医药大学陈科力教授鉴定。中华卷柏、卷柏样品的基源由湖北省中医院朱田密副主任药师鉴定。标本保存于湖北省中医院中药研究所, 试验样品均为干燥全草, 具体信息见表 1。穗花杉双黄酮对照品 (批号: 40584-5MG-F, 纯度  $\geq 99.0\%$ , 美国 Sigma 公司)。色谱纯乙腈 (德国默克), 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

表 1 15 批深绿卷柏样品及 3 种混淆品的来源信息

Tab 1 Source of 15 batches of *Selaginella doederleinii* Hieron. samples and 3 confusing varieties

编号	鉴定名称	产地	收集日期
S1	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2020 年 8 月 9 日
S2	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2020 年 10 月 20 日
S3	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2021 年 10 月 19 日
S4	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2021 年 11 月 5 日
S5	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 5 月 7 日
S6	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 5 月 8 日
S7	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 5 月 18 日
S8	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 5 月 19 日
S9	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 6 月 7 日
S10	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广西省钦州市	2022 年 6 月 19 日
S11	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	云南省屏边县	2022 年 8 月 20 日
S12	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	云南省屏边县	2022 年 8 月 21 日
S13	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	云南省河口县	2022 年 8 月 21 日
S14	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	云南省河口县	2022 年 8 月 22 日
S15	深绿卷柏 <i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	广东省揭阳市	2022 年 8 月 21 日
S16	中华卷柏 <i>Selaginella sinensis</i> (Desv.) Spring	河南省南阳市	2021 年 6 月 22 日
S17	中华卷柏 <i>Selaginella sinensis</i> (Desv.) Spring	河南省南阳市	2022 年 6 月 26 日
S18	江南卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i> Hieron.	安徽省霍山县	2021 年 5 月 6 日
S19	江南卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i> Hieron.	安徽省霍山县	2021 年 11 月 2 日
S20	卷柏 <i>Selaginella tamariscina</i> (P. Beauv.) Spring	湖北省宜昌市	2021 年 5 月 25 日
S21	卷柏 <i>Selaginella tamariscina</i> (P. Beauv.) Spring	湖北省南漳县	2022 年 5 月 24 日
S22	卷柏 <i>Selaginella tamariscina</i> (P. Beauv.) Spring	湖北省南漳县	2022 年 5 月 31 日

## 2 方法与结果

### 2.1 性状<sup>[2, 11-12]</sup>

本品常成束，绿色或黄绿色；质稍柔软。茎扁圆形或卵状梯形，有棱，光滑，不具沟槽，直径 1~3 mm，多回分枝，在分枝处常生有黄色的细长不定根。鳞片状叶密集着生，纸质，覆瓦状排列，4 列；外侧 2 列叶长圆状镰形，长 3~5 mm，宽 1~2 mm，不具白边，边缘具不规则锯齿；孢子叶穗顶生，四棱形；气微，味甘、淡（见图 1）。



图 1 深绿卷柏的性状图

Fig 1 Photographs of *Selaginella doederleinii* Hieron.

A. 干燥全草 (dried whole plant); B. 侧枝 (side branch and leaves); C. 主茎 (main stem)

### 2.2 显微鉴别

**2.2.1 茎横切面<sup>[2]</sup>** 取样品的主茎徒手切片，经水合氯醛透化，在显微镜下观察。略呈卵状梯形。表皮细胞 1 列，壁厚。皮层由厚壁细胞和薄壁细胞构成，厚壁细胞 3~7 列，位于皮层外层，壁加厚，严重木化；薄壁细胞 8~12 列，位于皮层内侧，壁稍木化。内皮层细胞 1 列。中央维管束周韧型，类长椭圆形。木质部细胞数列，较小，完全木化，排成“一”字形，常两端尖，被韧皮部包围。叶迹维管束 2~4 个，周韧型，分散在皮层外侧（见图 2）。深绿卷柏横切面的显微特征与文献<sup>[10]</sup>报道的其他 10 种卷柏属植物的茎的横切面皆不同，可用于区分混淆品。

**2.2.2 叶表面制片** 取样品茎上的侧叶，用整体封藏法于水合氯醛液中制片<sup>[9]</sup>。置显微镜下观察，叶长圆镰形，略斜生，斜升向上的一侧边缘具细齿，向下的一侧边缘近全缘，基部具细齿。近叶缘尖部的细齿短，叶缘中部至基部的细齿长；细齿即单细胞非腺毛，三角形，之间有长条形细胞相连接，细齿着生的边缘窄，仅 1~3 列长梭形细胞，故在宏观上表现为叶“不具白边”。叶和细齿的形状及细齿在叶缘不同位置的分布变化是深绿卷柏的鉴别特征（见图 3）。



图 2 深绿卷柏主茎横切面的显微特征图 (×40)

Fig 2 Microscopic characteristics of transverse section of main stem of *Selaginella doederleinii* Hieron. (×40)

1. 表皮 (epidermis); 2. 皮层 (cortex); 3. 叶迹维管束 (leaf trace vascular bundle); 4. 内皮层 (endodermis); 5. 木质部 (xylem); 6. 韧皮部 (phloem)

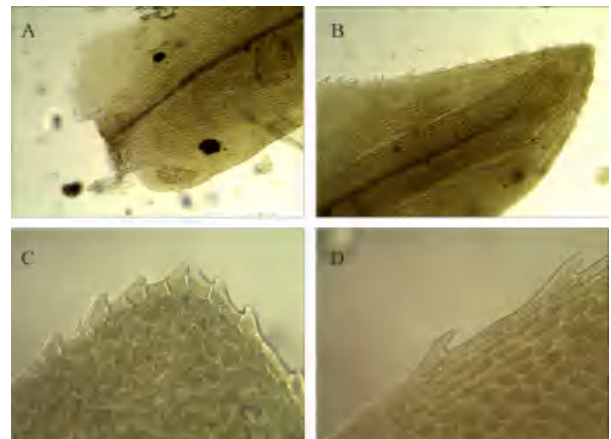


图 3 深绿卷柏侧叶的显微特征图 (A、B、×40; C、D、×400)

Fig 3 Microscopic characteristics of side leaf of *Selaginella doederleinii* Hieron. (A and B. ×40; C and D. ×400)

### 2.3 深绿卷柏 HPLC 特征图谱研究

**2.3.1 色谱条件** 采用 Agilent ZORBAX SB-C18 Narraw-Bore 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B)，梯度洗脱 (0~21 min, 20%~90% A; 21~26 min, 90%A, 26~30 min, 90%~20%A); 柱温为 30℃; 流速为 0.25 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 330 nm, 全波长扫描范围为 210~400 nm; 进样量为 2 μL, 记录色谱图。理论板数按穗花杉双黄酮峰计应不低于 10 000。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取穗花杉双黄酮对照品适量，加甲醇制成含穗花杉双黄酮 100 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液，即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取深绿卷柏 (过 2 号筛) 0.25 g, 精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 10 mL, 称定重量，超声处理 30 min (功率 300 W, 频率 80 kHz), 放冷，再称定重量，用甲醇补足损失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

### 2.3.4 方法学考察

① 精密度试验：取供试品 (S1)，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录特征图谱。结果各特征峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.14%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.7%，表明仪器精密度良好。

② 稳定性试验：取供试品溶液分别于制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 注入液相色谱仪，记录特征图谱。结果各特征峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.17%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.6%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

③ 重复性试验：取同一批号供试品 (S1) 6 份，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录特征图谱。结果主要色谱峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 0.14%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.6%，表明方法的重复性良好。

④ 耐用性试验<sup>[13]</sup>：取同一批号供试品 (S1)，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，选用 3 种不同型号的 C18 色谱柱 (ZORBAX SB-C18 Narrow-Bore 色谱柱，2.1 mm×150 mm，5 μm；ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，4.6 mm×150 mm，5 μm；Agilent 5 TC-C18 色谱柱，4.6 mm×250 mm，5 μm)，以穗花杉双黄酮峰为 S 峰，计算得不同型号色谱柱各特征峰相对保留时间的 *RSD* 均小于 3.4%，表明方法的耐用性良好。

**2.3.5 深绿卷柏特征图谱的建立** 取 15 批深绿卷柏供试品，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下方法依次检测，将所得图谱的 CDF 文件导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件，以 S1 批药材的图谱为参照图谱，设置时间窗宽度为 0.10，多点校正，加以自动匹配，15 批深绿卷柏的相似度计算结果为 0.765 ~ 0.964 (见表 2)，15 批叠加如图 4，生成对照图谱，确定 10 个特征色谱峰，建立了深绿卷柏的特征图谱 (见图 5)，穗花杉双黄酮对照品图谱见图 6。经 3 种不同型号色谱柱测试，10 个特征峰的相对保留时间及可变范围见表 3。

表 2 15 批深绿卷柏的相似度

Tab 2 Similarities of 15 batches of *Selaginella doederleinii* Hieron.

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.898	S9	0.920
S2	0.845	S10	0.907
S3	0.851	S11	0.837
S4	0.874	S12	0.861
S5	0.885	S13	0.765
S6	0.864	S14	0.964
S7	0.836	S15	0.852
S8	0.891		

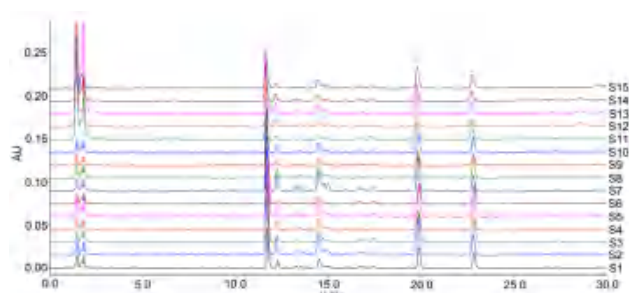


图 4 15 批深绿卷柏样品的指纹图谱

Fig 4 Fingerprint chromatogram of 15 batches of *Selaginella doederleinii* Hieron.

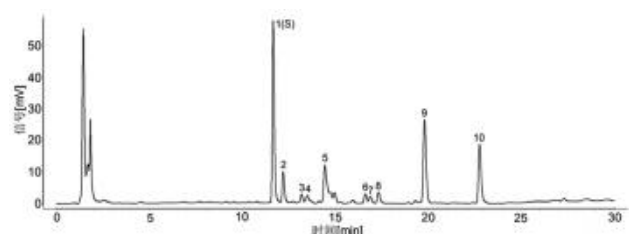


图 5 深绿卷柏的对照特征图谱 (峰 1 ~ 10 为特征峰)

Fig 5 Typical chromatogram of *Selaginella doederleinii* Hieron. (peak 1 to 10 are characteristic peaks)

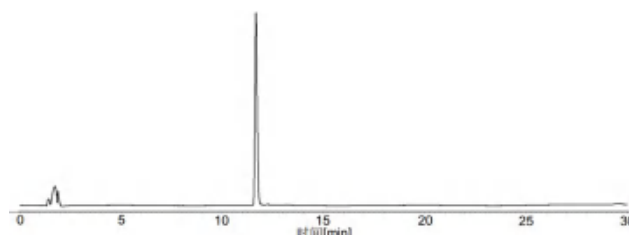


图 6 穗花杉双黄酮对照品色谱图

Fig 6 Chromatogram of amentoflavone

表 3 深绿卷柏 10 个特征峰的相对保留时间及可变范围

Tab 3 Relative retention time and variation of 10 characteristic peaks of *Selaginella doederleinii* Hieron.

峰号	相对保留时间	可变范围
1 (穗花杉双黄酮)	1.00	—
2	1.05	±0.00
3	1.14	±0.01
4	1.16	±0.01
5	1.25	±0.02
6	1.44	±0.03
7	1.47	±0.04
8	1.51	±0.04
9	1.73	±0.05
10	1.99	±0.06

**2.3.6 成分的指认** 采用穗花杉双黄酮对照品作比对，指认深绿卷柏特征图谱中峰 1 为穗花杉双黄酮。根据文献报道的 HPLC 位移值<sup>[7, 14]</sup>，鉴定了峰 1、2、9、10 分别为穗花杉双黄酮、罗波斯塔双黄酮、橡胶树双黄酮、穗花杉双黄酮-7, 4', 7'', 4''- 四甲醚。采用液质联用仪的 Q1 离子扫描



模式验证了所鉴定特征峰的准分子离子峰的质荷比, 均与所鉴定成分相符, 见表 4。

**2.3.7 特征图谱用于深绿卷柏的真伪鉴别** 将深绿卷柏和混淆品按照“2.3.3”项下方法制备, 进样测定, 结果见图 7。深绿卷柏与 3 种混淆品都具有峰 1 (穗花杉双黄酮) 和峰 2 (罗波斯塔双黄酮), 而峰 9 (橡胶树双黄酮) 和峰 10 (穗花杉双黄酮-7, 4', 7'', 4'''-四甲醚) 为深绿卷柏特有。因此, 特征图谱能够区分正品与混淆品。

**2.3.8 不同地区深绿卷柏的聚类分析** 进一步研究不同产地的差异, 运用 SPSS 23.0 软件对 15

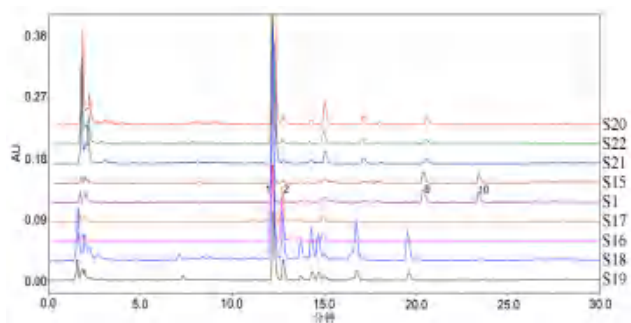


图 7 深绿卷柏与混淆品的特征图谱  
Fig 7 Chromatogram of *Selaginella doederleinii* Hieron. and adulterants

表 4 液质联用分析结果  
Tab 4 Anaysis of LC-MS

峰号	$t_R$ /min	测量值 [M + H] <sup>+</sup>	计算值 [M + H] <sup>+</sup>	分子式	鉴定成分
1	11.71	539.2	539.1	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	穗花杉双黄酮
2	12.24	539.1	539.1	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	罗波斯塔双黄酮
9	19.84	581.2	581.1	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	橡胶树双黄酮
10	22.80	595.2	595.2	C <sub>34</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	穗花杉双黄酮-7, 4', 7'', 4'''-四甲醚

批深绿卷柏的特征图谱进行聚类分析, 采用组间联接法, 以余弦为度量标准进行聚类, 聚类分析结果见图 8。根据聚类分析结果, 将深绿卷柏大致分为两类, 第一类为 S1 ~ S10、S15, 产地为广西省钦州市与广东省揭阳市, 第二类为 S11 ~ S14, 产地为云南省屏边县与河口县, 表明深绿卷柏存在地区差异。其差异主要体现于色谱图中 1 ~ 2 min 的色谱峰的强弱不同, 云南省屏边县与河口县样品的该色谱峰较高。

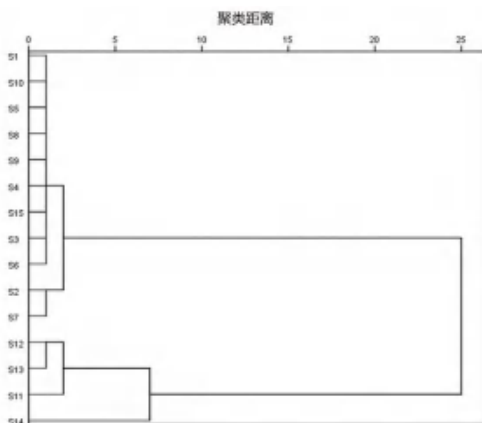


图 8 15 批深绿卷柏样品的聚类分析树状图  
Fig 8 Cluster analysis dendrogram of 15 bathes of *Selaginella doederleinii* Hieron.

**3 讨论**

卷柏属植物茎的内皮层以内有大型气室, 中柱由多数横桥与内皮层相连, 多数种的横桥仅由 1 列薄壁细胞构成<sup>[10]</sup>。而本研究显示, 深绿卷柏的茎几乎没有气室和横桥。云南屏边县、河口县的新鲜和干燥样品、广西钦州的干燥样品中都没

有观察到气室和横桥, 广东揭阳的干燥样品中观察到了局部存在的气室与横桥。故茎的横切面中气室与横桥少见是该种的特点。4 个产地深绿卷柏的叶的显微特征没有明显的差异。

中药 HPLC 特征图谱是一种有效的中药鉴别手段, 可用于中药的真伪鉴别和质量控制。特征图谱的与指纹图谱不尽相同, 特征图谱是检验供试品色谱中应呈现规定的特征峰, 并与对照药材参照物色谱或对照品色谱中的特征峰相对应, 且保留时间相一致, 或在规定的可变范围之内。而指纹图谱研究一般参照“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”进行。本文研究特征图谱过程中也借鉴了指纹图谱相似度评价方法, 利用相似度软件生成了深绿卷柏对照特征图谱。特征图谱更注重专属性, 因此考察了 3 种混淆品图谱与之对比。试验过程中曾考察色谱条件, 比较了乙腈-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液两种流动相。结果色谱峰出峰顺序类似, 但乙腈-0.1% 磷酸的梯度洗脱使特征峰的布局更均衡, 峰 9 和峰 10 分离度更好。HPLC 特征图谱所用的色谱柱通常长 250 mm, 内径为 4.6 mm, 流速一般采用 0.7 ~ 1.0 mL · min<sup>-1</sup>[8, 15], 本研究应用 Agilent ZORBAX SB-C18 Narraw-Bore 色谱柱, 长 150 mm, 内径为 2.1 mm, 流速低, 仅 0.25 mL · min<sup>-1</sup>, 分析时间较短, 仅 30 min。该方法的优势是使用溶剂少, 降低分析溶剂对环境的污染, 同时也保证了分析效果。本研究为深绿卷柏药材的鉴定和中药材标准的提高提供了一种较好的方法。

**致谢:** 感谢湖北中医药大学陈科力教授在深绿卷

柏植物鉴定方面给予的指导与帮助。

## 参考文献

- [1] 张焱. 积雪草苷的生物转化和深绿卷柏化学成分的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [2] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准: 第七册[S]. 香港: 中华人民共和国香港特别行政区中医药卫生事务部, 2017: 428-430.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准[S]. 2卷. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 79.
- [4] 黎霜, 黄可龙. 深绿卷柏的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2637-2639.
- [5] 周同冲, 林晓丹, 宋先璐, 等. 中药石上柏联合放疗治疗晚期鼻咽癌的长期疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(24): 2122-2123.
- [6] 李三华, 黎丹, 蒋永梅, 等. 石上柏抗肿瘤活性与其红外指纹图谱的谱效研究[J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(6): 603-608.
- [7] 王佳芷. 深绿卷柏乙酸乙酯部位抗肿瘤活性及其作用机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [8] 徐燃, 丁奇, 万定荣, 等. 深绿卷柏和江南卷柏 HPLC 指纹特征及 3 种成分的含量测定研究[J]. 中药材, 2017, 40(7): 1638-1642.
- [9] 刘葭, 陈科力, 万定荣. 11 种卷柏属药用植物叶缘细胞特征及其在分类学中的意义[J]. 中国药师, 2009, 12(10): 1335-1338.
- [10] 万定荣, 陈科力, 王兵娥. 10 种卷柏属植物茎的解剖学研究及其分类鉴定意义[J]. 武汉植物学研究, 2008, 26(4): 343-349.
- [11] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准 2018 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 52-54.
- [12] 科学出版社. 中国植物志第 6(3)卷[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 136.
- [13] 方磊, 胡亮, 李瑞莲, 等. 土牛膝 UPLC 特征图谱的研究[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(2): 176-180.
- [14] Li SG, Zhao MF, Li YX, et al. Preparative isolation of six anti-tumour biflavonoids from *Selaginella doederleinii* Hieron. by high-speed counter-current chromatography[J]. Phytochem Anal, 2014, 25(2): 127-133.
- [15] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 59, 96, 190, 193, 231.

(收稿日期: 2022-07-28; 修回日期: 2022-10-08)

## 莱博雷生片中莱博雷生的含量测定

郭思瑞, 徐文峰, 徐硕, 张闪闪, 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所 北京市药物临床风险与个体化应用评价北京市重点实验室(北京医院), 北京 100730)

**摘要:** 目的 建立测定莱博雷生片含量的高效液相色谱法, 为建立其质量标准提供依据。方法 采用 Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈 (40:60) 为流动相; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 282 nm, 柱温 30℃。结果 莱博雷生在 24.90~398.4 μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积成线性关系, 相关系数 (*r*) 为 0.9999; 重复性、精密度及稳定性良好, RSD 分别为 0.40%、0.20% 及 0.40%; 平均加样回收率在 99.34%~100.8%, RSD 在 0.70%~1.3%, 3 份样品中莱博雷生含量分别为标示量的 93.48%、93.67% 和 93.46%。结论 该方法准确、快速、简便, 可用于莱博雷生片的含量测定。

**关键词:** 莱博雷生; 失眠症; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R971.3; R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0763-04  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.034

## Determination of lemborexant content in lemborexant tablets

GUO Si-rui, XU Wen-feng, XU Shuo, ZHANG Shan-shan, JIN Peng-fei\* (Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drugs Risk and Individual Application (Beijing Hospital), Beijing 100730)

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, email: siruiguo@126.com \*通信作者: 金鹏飞, 男, 主任药师, 主要从事医院药学和药物分析, email: j790101@163.com

**Abstract: Objective** To determine lemborexant content in lemborexant tablets by high performance liquid chromatography (HPLC) and help establish its quality standard. **Methods** An Alltima C<sub>18</sub> column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for the separation, with 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (40 : 60) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 282 nm and the column temperature was 30 °C. **Results** There was a good linearity between lemborexant and the peak area at 24.90 ~ 398.4 μg · mL<sup>-1</sup>, with the correction coefficient (*r*) of 0.9999. Relative standard deviations (*RSD*) of repeatability, precision and stability were 0.40%, 0.20% and 0.40%, respectively. The average spiked recovery was between 99.34% ~ 100.8% with *RSD* of 0.70% ~ 1.3%. The content of 3 emborexant samples was 93.48%, 93.67% and 93.46%, respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate, which can be used for the content determination in lemborexant tablets.

**Key words:** lemborexant; insomnia; HPLC; determination

莱博雷生片 (lemborexant) 是一种蛋白偶联受体食欲素的 OX1/OX2 受体拮抗剂, 用于治疗难以入睡和 / 或睡眠维持困难为特征的失眠症<sup>[1-3]</sup>。食欲素产生于下丘脑部位<sup>[4]</sup>, 是一种小分子神经多肽, 可通过保持觉醒来调节睡眠 / 觉醒周期, 并且助于食欲调节和维持能量稳态<sup>[5]</sup>。莱博雷生片由日本药企卫材开发研究, 于 2019 年 12 月在美国获批上市, 商品名为 Dayvigo<sup>[6]</sup>, 随后分别于 2020 年 7 月和 11 月在日本和加拿大上市, 2021 年 9 月在中国台湾上市, 剂型为片剂, 分为 5 mg 和 10 mg 两种规格<sup>[7]</sup>。临床试验结果表明: 莱博雷生能够显著改善主观苏醒状态, 缩短睡眠起始潜伏期、显著增加睡眠维持时间<sup>[6, 8-10]</sup>。随着睡眠障碍患病率的逐年增长, 镇静催眠类药物的使用量也在不断扩大, 莱博雷生片在 2020 年和 2021 年的销售额分别为 1.95 亿元和 9.64 亿元, 也提示该药的市场需求量较大。通过数据库检索可知, 莱博雷生已在国内申请开展了两项临床试验, 分别为已完成的 I 期 CTR20191247 试验和正在进行的 III 期 CTR20190248 试验。目前, 我国药品监督管理局尚未批准莱博雷生片上市, 查阅文献未见其含量测定相关的研究报道。因此, 亟待对莱博雷生的质量标准进行研究。莱博雷生 (CAS: 1369764-02-2), 分子式: C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 分子量 410.42, 白色粉末, 易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂, 水溶性较低<sup>[11-15]</sup>。本试验拟定采用高效液相色谱法建立莱博雷生片中莱博雷生含量测定的方法, 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 仪器与试药

Waters e2695 型高效液相色谱仪、KQ-300DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、Mettler Toledo XP205 型电子天平 (梅特勒托利

多)。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯、实验用水为纯净水。莱博雷生对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: D28GS172754, 供含量测定用)。莱博雷生片 (达卫眠, 规格: 5 mg/片, 批号: 133171, 英国 Eisai 药厂, 辅料为乳糖、羟丙纤维素和硬脂酸镁等)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱选择 Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 - 乙腈 (40 : 60); 检测波长为 282 nm; 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 进样体积为 10 μL; 柱温为 30 °C; 经过 0.22 μm 孔径滤膜滤过后进样。

### 2.2 对照品储备液的制备

精密称取莱博雷生对照品 25 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加 5 mL 0.1% 磷酸水溶液和适量甲醇溶解, 超声 15 min, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品储备液 (500 μg · mL<sup>-1</sup>) 备用。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密称定 20 粒莱博雷生片, 研细, 精密称取细粉适量 (约相当于莱博雷生 5 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加 5 mL 0.1% 磷酸水溶液和适量甲醇溶解, 超声 15 min, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

### 2.4 阴性样品的制备

按照说明书提供的辅料, 按“2.3”项下步骤, 制备不含莱博雷生的阴性样品溶液, 用于专属性考察。

### 2.5 专属性

**2.5.1 基质干扰试验** 分别取阴性样品溶液、莱博雷生对照品溶液和供试品溶液按照“2.1”项下色谱条件进行测定分析, 色谱图见图 1, 结果显示, 样品中其他成分对待测成分莱博雷生无干扰。

**2.5.2 强制降解试验** 为考察降解产物对试验分



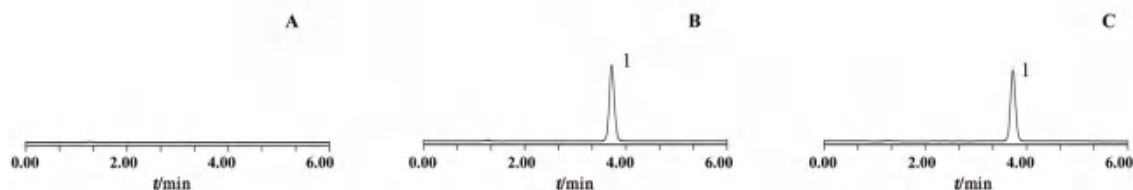


图1 阴性样品溶液(A)、对照品溶液(B)和供试品溶液(C)色谱图

Fig 1 Chromatograms of negative sample solution (A), reference solution (B) and sample solution (C)

1. 莱博雷生 (lemborexant)

析是否存在干扰,对供试品进行特殊条件下的强制降解。取供试品粉末适量(约相当于5 mg 莱博雷生)置于50 mL量瓶中,分别经过高温(105 °C加热,暗处静置4 h)、光照(10 000 lx光照,静置4 h)、氧化(加入2 mL 3%过氧化氢溶液,暗处静置4 h)、酸化(加入2 mL 1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液暗处静置4 h,后用1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶

液中和)和碱化(加入2 mL 1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液暗处静置4 h,后用1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液中和)等条件处理后,按照“2.3”项下方法制备,按“2.1”项下条件进样测定,结果表明样品在高温、光照、氧化及酸化条件下,均有不同程度的降解,且在高温和氧化条件下的降解产物在该色谱条件下产生了明显的色谱峰,但不干扰测定(见图2)。

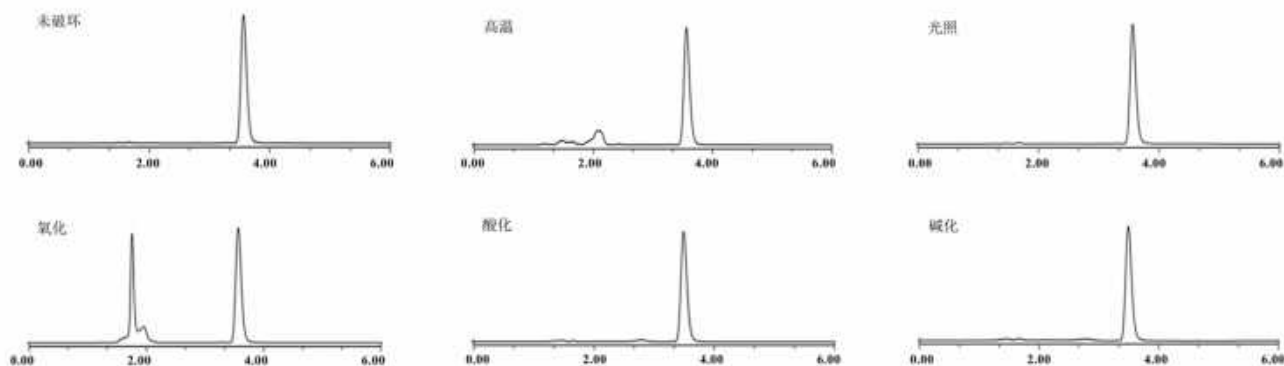


图2 强制降解产物色谱图

Fig 2 Chromatograms of forcibly degraded samples

## 2.6 系统适用性、灵敏度和线性关系

取“2.2”项下对照品储备液2.0 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。重复进样6针,记录莱博雷生的平均理论塔板数和对称因子,分别为(6643±6)和(1.042±0.001)。将对照品储备液以甲醇逐渐稀释后进样分析,当信噪比约为3时,确定检测限为(LOD)0.1250 μg·mL<sup>-1</sup>;当信噪比约为10时,确定定量限(LOQ)为0.2500 μg·mL<sup>-1</sup>。

分别精密量取对照品储备液0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得5个不同质量浓度的线性溶液,进样测定,记录色谱峰面积,以对照品溶液质量浓度( $x$ , μg·mL<sup>-1</sup>)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,得回归方程 $y = 1.518 \times 10^4 x + 5.010 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ )。结果显示莱博雷生在24.90 ~ 398.4 μg·mL<sup>-1</sup>内与峰面积成线性关系。

## 2.7 精密度试验

取“2.2”项下对照品储备液2.0 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。重复进样6针,记录色谱峰面积。结果显示莱博雷生色谱峰面积的RSD为0.20%,说明仪器精密度良好。

## 2.8 重复性试验

按“2.3”项下方法平行制备6份样品,进样测定,记录色谱峰面积。结果显示莱博雷生平均含量分别为标示量的92.60%、93.11%、92.90%、93.20%、93.01%和92.99%,RSD为0.40%,说明该方法的重复性良好。

## 2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液分别于0、4、6 h进行含量测定,结果显示莱博雷生色谱峰面积的RSD为0.40%,说明供试品溶液在6 h内稳定。

## 2.10 加样回收试验

精密称取莱博雷生片适量(约0.12 g),共9份,置于50 mL量瓶中,分别精密加入“2.2”项

下对照品储备液 8.0、10.0 和 12.0 mL, 按照“2.3”项下方法处理样品, 作为加样回收液, 进样测定, 记录色谱峰面积并进行计算, 结果平均回收率分别为 99.34%、100.8% 和 99.64%, 对应 RSD 分别为 0.70%、1.0% 和 1.3%。

### 2.11 样品含量测定

应用建立的检测方法对莱博雷生片样品进行制备并按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 共制备 3 份, 取平均值。结果显示 3 份, 样品中莱博雷生的含量分别为标示量的 (93.48±0.64)%、(93.67±0.29)% 和 (93.46±0.42)%。

### 3 讨论

查阅文献发现, 莱博雷生片的相关研究多集中于药效学, 尚无质量标准相关研究。因此本试验采用高效液相色谱法建立了莱博雷生片中莱博雷生的含量测定方法。研究中方法学验证内容严格参照《中国药典》(2020 年版) 及国际通行的 ICH 方法学验证原则中的要求, 针对系统适用性、线性和灵敏度、精密度、重复性、稳定性、准确度等项目进行考察, 结果显示本法操作简便, 重复性好、检测迅速、结果准确稳定, 可满足药品质量控制需求。

本试验采取超声提取法作为样品的提取方法, 考察不同比例的 0.1% 磷酸水溶液 - 甲醇 (0:100、10:90 及 40:60) 为提取溶剂的影响。结果显示 0.1% 磷酸水溶液 - 甲醇 (10:90) 作为提取溶剂可以将待测成分提取完全, 待测成分色谱峰峰形良好, 提取完全, 测定结果稳定。且因待测样品中含有羟丙基纤维素、乳糖、硬脂酸镁等辅料, 为减少基质干扰, 故在样品提取过程中先加入一定量的 0.1% 磷酸水, 使样品充分溶散后再加入有机相, 可使样品提取完全。

### 参考文献

[1] 胡红雨, 胡春. 莱博雷生 (Lemborexant, Dayvigo) [J]. 中国药物化学杂志, 2020, 30 (11): 711.

[2] Landry I, Aluri J, Nakai K, et al. Evaluation of the CYP3A and CYP2B6 drug-drug interaction potential of lemborexant [J]. Clin Pharm Drug Dev, 2021, 10 (6): 681-690.

[3] Suzuki H, Hibino H. The effect of lemborexant for insomnia disorder [J]. SAGE Open Med, 2021, 9: 1-4.

[4] 关惠盈, 张巍. 食欲素与阿尔茨海默病的睡眠-觉醒紊乱 [J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40 (4): 420-423.

[5] 王来海, 王领军, 张瑞岭. 苏沃雷生的药理学与临床评价 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31 (18): 1883-1885.

[6] Zammit G, Krystal A. Evaluating lemborexant for the treatment of insomnia [J]. Expert Opin Pharmacol, 2021, 22 (10): 1235-1243.

[7] Scott J. Lemborexant: first approval [J]. Drugs, 2020, 80 (4): 425-432.

[8] Murphy P, Moline M, Mayleben D, et al. Lemborexant, a dual orexin receptor antagonist (DORA) for the treatment of insomnia disorder: results from a bayesian, adaptive, randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. J Clin Sleep Med, 2017, 13 (11): 1289-1299.

[9] Cheng JY, Filippov G, Moline M, et al. Respiratory safety of lemborexant in healthy adult and elderly subjects with mild obstructive sleep apnea: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study [J]. J Sleep Res, 2020, 29 (4): e13021.

[10] Kishi T, Nomura I, Matsuda Y, et al. Lemborexant vs suvorexant for insomnia: a systematic review and network meta-analysis [J]. J Psychiatr Res, 2020, 128: 68-74.

[11] Yu Y, Naoe Y, Terauchi T, et al. Discovery of (1R, 2S)-2-[(2, 4-Dimethylpyrimidin-5-yl)oxy]methyl-2-(3-fluorophenyl)-N-(5-fluoropyridin-2-yl) cyclopropanecarboxamide (E2006): a potent and efficacious oral orexin receptor antagonist [J]. J Med Chem, 2015, 58 (11): 4648-4664.

[12] Landry I, Aluri J, Hall N, et al. Effects of lemborexant on the pharmacokinetics of oral contraceptives: results from a phase 1 drug-drug interaction study in healthy females [J]. Clin Pharm Drug Dev, 2021, 10 (9): 1089-1098.

[13] Roch C, Bergamini G, Steiner MA, et al. Nonclinical pharmacology of daridorexant: a new dual orexin receptor antagonist for the treatment of insomnia [J]. Psychopharmacology, 2021, 238 (10): 2693-2708.

[14] Dayal S, Aluri J, Hall N, et al. Effect of hepatic impairment on pharmacokinetics, safety, and tolerability of lemborexant [J]. Pharmacol Res Persp, 2021, 9 (2): e00758.

[15] Beuckmann CT, Suzuki H, Musiek ES, et al. Evaluation of SAMP8 mice as a model for sleep-wake and rhythm disturbances associated with Alzheimer's disease: impact of treatment with the dual orexin (Hypocretin) receptor antagonist lemborexant [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 81 (3): 1151-1167.

(收稿日期: 2022-08-02; 修回日期: 2022-09-10)

# HPLC 测定枳实导滞丸中枳实所含 6 种成分及其药材基原分析

刘永富, 熊英, 赵香玉, 赖宇文, 李宗年, 邓可众\* (江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

**摘要:** 目的 建立枳实导滞丸中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏的含量测定方法, 同时鉴别其中枳实来源。方法 采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分析, 以乙腈 (A) - 乙酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30℃, 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 285 nm、320 nm, 进样量 10 μL。结果 6 个成分在各自线性范围内均符合要求, 相关系数  $r$  均  $\geq 0.9993$ ; 各成分平均回收率范围在 98.68% ~ 101.16%,  $RSD$  均  $\leq 2.5\%$ 。12 批枳实导滞丸中芸香柚皮苷质量分数在 0.37 ~ 5.65 mg·g<sup>-1</sup>, 柚皮苷在 0 ~ 12.16 mg·g<sup>-1</sup>, 橙皮苷在 0 ~ 53.90 mg·g<sup>-1</sup>, 新橙皮苷在 0 ~ 18.90 mg·g<sup>-1</sup>, 水合橙皮内酯在 0 ~ 0.23 mg·g<sup>-1</sup>, 马尔敏在 0 ~ 0.13 mg·g<sup>-1</sup>。12 批次枳实导滞丸样品分别呈现与酸橙或甜橙药材一致的黄酮类成分含量情况。香豆素类成分主要存在于酸橙制备的丸剂中且含量偏低。结论 该方法简便、准确、可靠, 可同时测定枳实导滞丸中 6 种有效成分的含量并鉴别丸剂中枳实的基原, 可为枳实导滞丸质量评价提供依据。

**关键词:** 枳实导滞丸; 酸橙; 甜橙; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 水合橙皮内酯; 马尔敏

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0767-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.035

## HPLC determination of 6 component of Aurantii Fructus Immaturus in Zhishi Daozhi pills and genetic analysis of medicinal materials

LIU Yong-fu, XIONG Ying, ZHAO Xiang-yu, LAI Yu-wen, LI Zong-nian, DENG Ke-zhong\* (College of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

**Abstract: Objective** To simultaneous determine 6 constituents in Zhishi Daozhi pills (narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, meranzin hydrate and marmin) by HPLC, and identify the source of Fructus Aurantii Immaturus. **Methods** The analysis was performed on a Waters Symmetry C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.1% acetic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 285 nm and 320 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** All the 6 components met the requirements in their respective linear ranges, and their correlation coefficients ( $r$ ) were all  $\geq 0.9993$ . The average recovery of each component ranged 98.68% ~ 101.16%, and their  $RSDs$  were all less than 2.5%. The contents of narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, meranzin hydrate and marmin was 0.37 ~ 5.56 mg·g<sup>-1</sup>, 0 ~ 12.16 mg·g<sup>-1</sup>, 0 ~ 53.90 mg·g<sup>-1</sup>, 0 ~ 18.90 mg·g<sup>-1</sup>, 0 ~ 0.23 mg·g<sup>-1</sup>, and 0 ~ 0.13 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. Totally 12 batches of Zhishi Daozhi pills showed similar content of flavonoids as in Citrus aurantium and Citrus sinensis. Coumarins mainly existed in the pills prepared by Citrus aurantium and their contents was low. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the content determination of 6 components simultaneously and identify the source of Fructus Aurantii Immaturus in Zhishi Daozhi pills, which can provide reference for the quality control of Zhishi Daozhi pills.

**Key words:** Zhishi Daozhi pill; *Citrus aurantium*; *Citrus sinensis*; narirutin; naringin; hesperidin; neohesperidin; meranzin hydrate; marmin

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81960709); 江西省大学生创新创业计划 (No.s202101412018)。

作者简介: 刘永富, 男, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价研究, email: 1721137110@qq.com \*通信作者: 邓可众, 男, 博士, 教授, 主要从事中药品质评价研究, email: dengkezhong@126.com



枳实导滞丸<sup>[1]</sup>出自名医李东垣的《内外伤辨惑论·辨内伤饮食用药所宜所禁》，由枳实(炒)、大黄、白术(炒)、茯苓、黄芩、黄连(姜汁炙)、六神曲(炒)和泽泻 8 味药水泛丸制成，原用于治疗“伤湿热之物，不得施化，而作痞满闷乱不安”，该方被《中国药典》收载<sup>[2]</sup>，具有消积导滞、清利湿热之功效，主要用于饮食积滞、湿热内阻所致的脘腹胀痛、不思饮食、大便秘结、痢疾里急后重。

枳实(*Aurantii Fructus Immaturus*)为枳实导滞丸君药<sup>[2]</sup>，始载于《神农本草经》，为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果，是中医常用的理气药，具有调节肠胃运动、促进排便的功效。酸橙与甜橙均为枳实来源，但传统以酸橙为道地药材。枳实基原不同，产地不同，活性不同，市场价格也存在巨大差异。不同基原枳实所制备的中成药质量也可能存在一定差异。因此建立中成药中多来源药材的鉴别方法，对于完善中成药质量评价，促进中成药优质优价具有重要意义<sup>[3]</sup>。

研究表明<sup>[4]</sup>，黄酮类化合物是枳实中含量最高的一类成分。枳实中的黄酮苷(芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷)在调节胃肠运动上具有显著效果，具体为促进小肠推进<sup>[5]</sup>，通过调节肠道菌群改善结肠炎症状<sup>[6]</sup>，增加盲肠菌群的丰度<sup>[7]</sup>，增加回肠绒毛高度，降低十二指肠、空肠和回肠隐窝深度<sup>[8]</sup>等。水合橙皮内酯和马尔敏是枳实中香豆素类化合物的代表性成分，其中水合橙皮内酯具有抗抑郁、促进胃肠动力等药理作用<sup>[9]</sup>，马尔敏具有神经保护、抗炎、抗肿瘤等药理活性<sup>[10]</sup>。可见，枳实中的这 6 种成分是枳实导滞丸中的药效活性成分。因此本文选择枳实导滞丸中芸香柚皮苷等 6 种成分定量分析，为完善该丸的质量标准提供参考，同时探索枳实导滞丸中枳实的区分方法，为综合评价该丸提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

百万分之一电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-300B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 循环水式真空泵(江西鼎技科学仪器有限公司); 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); HH-S 型恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂); Waters Symmetry C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

### 1.2 试药

甲醇(分析纯, 四川西陇科学有限公司); 乙腈(色谱纯, 安徽天地高纯溶剂有限公司); 娃哈哈饮用纯净水。芸香柚皮苷(批号: wkq21050615)、柚皮苷(批号: wkq21020606)、橙皮苷(批号: wkq21010611)、新橙皮苷(批号: wkq21081203)对照品(四川维克奇生物技术有限公司, HPLC 纯度均≥98%)。马尔敏、水合橙皮内酯为实验室自制, 经 HPLC 测定纯度均≥98%<sup>[11]</sup>。

枳实药材 12 批, 其中酸橙枳实 6 批, 甜橙枳实 6 批, 由江西中医药大学药学院中药鉴定学科组吴志瑰副教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果。大黄、白术、茯苓、黄连、黄芩、六神曲、泽泻等 7 味饮片来源于樟树药材市场, 经江西中医药大学药学院吴志瑰副教授鉴定均为合格的中药饮片, 按照 2020 年版《中国药典》(一部)标准及相关规定对其进行检验合格后备用。

枳实导滞丸由实验室自制: 参照 2020 年版《中国药典》, 将以上 8 味饮片按规定炮制后, 粉碎成细粉, 过筛, 混匀, 用水泛丸, 干燥, 即得(ZS01~ZS12)。同理制备缺枳实的阴性丸剂(ZS15)。分别从不同药店购买市售枳实导滞丸两份(ZS13、ZS14)。详见表 1。

表 1 枳实导滞丸样品编号  
Tab 1 Information of Zhishi Daozhi pills

No.	样品编号	枳实基原	来源	采购时间/批号
1	ZS01	酸橙	江西樟树药材市场	2014 年 5 月 21 日
2	ZS02	酸橙	江西武宁	2014 年 6 月 11 日
3	ZS03	酸橙	江西新干三湖镇	2015 年 5 月 21 日
4	ZS04	酸橙	江中饮片有限公司	20200306
5	ZS05	酸橙	江中饮片有限公司	20200512
6	ZS06	酸橙	江西樟树药材市场	2015 年 5 月 21 日
7	ZS07	甜橙	江西樟树药材市场	2014 年 5 月 22 日
8	ZS08	甜橙	江西武宁	2014 年 6 月 11 日
9	ZS09	甜橙	江西樟树昌傅镇	2014 年 6 月 21 日
10	ZS10	甜橙	江西新干三湖镇	2015 年 6 月 21 日
11	ZS11	甜橙	江西樟树药材市场	2014 年 5 月 22 日
12	ZS12	甜橙	江西樟树药材市场	2015 年 5 月 21 日
13	ZS13	—	长春市永新堂大药房	20200701
14	ZS14	—	定西市德生堂大药房	20201001
15	ZS15	—	缺枳实阴性丸剂	—

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分析, 以乙腈(A)-0.1% 乙酸水(B)为流动相, 梯度洗脱条件(0~25 min,

16% ~ 17%A; 25 ~ 40 min, 17% ~ 26%A; 40 ~ 54 min, 26% ~ 29%A; 54 ~ 55 min, 29% ~ 30%A; 55 ~ 64 min, 30% ~ 33%A; 64 ~ 69 min, 33% ~ 36%A; 69 ~ 70 min, 36% ~ 42%A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波

长: 黄酮类 (芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷) 285 nm, 香豆素类 (水合橙皮内酯、马尔敏) 320 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。对照品、枳实阴性丸剂、酸橙枳实丸剂 (ZS01)、甜橙枳实丸剂 (ZS07) 样品色谱图见图 1。

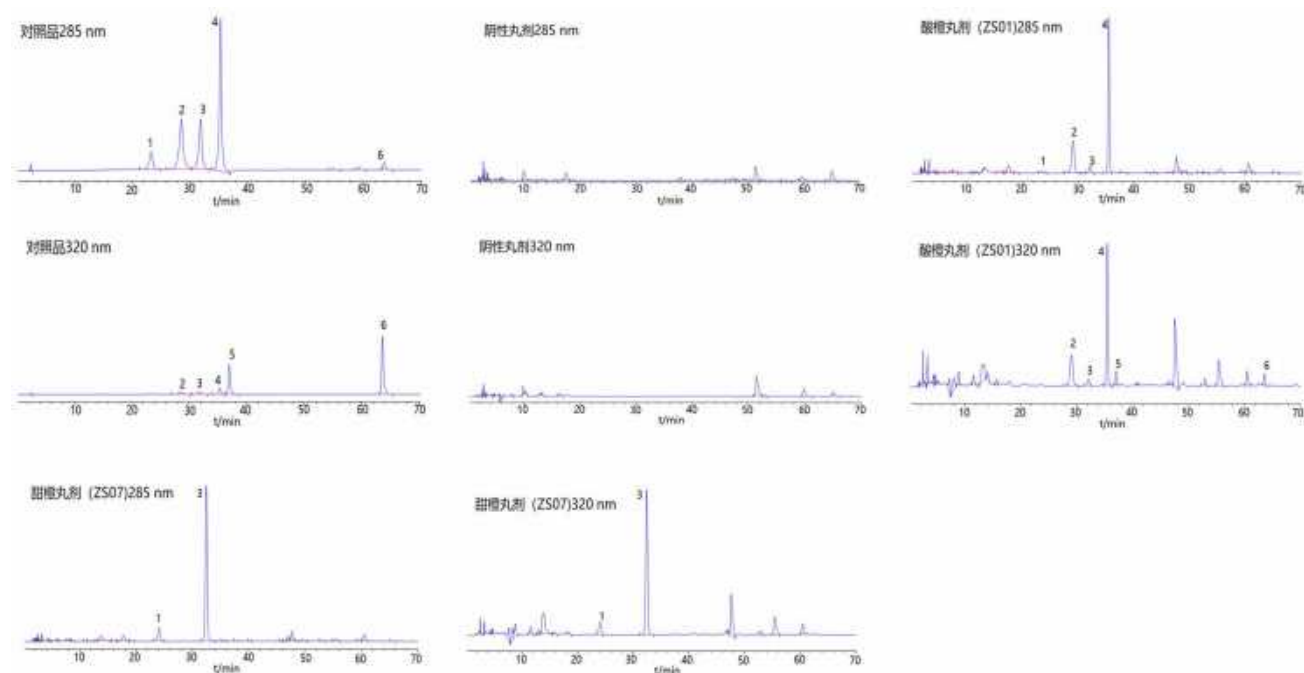


图 1 对照品及样品色谱图

Fig 1 HPLC of mixed reference and Zhishi Daozhi pills

1. 芸香柚皮苷 (naringin); 2. 柚皮苷 (naringin); 3. 橙皮苷 (hesperidin); 4. 新橙皮苷 (neohesperidin); 5. 水合橙皮内酯 (meranzin hydrate); 6. 马尔敏 (marmin)

## 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 制得芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏质量浓度分别为 0.48、2.74、2.65、2.6、0.17、0.14 mg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备

取枳实导滞丸 (或阴性丸剂) 粉末 1.0 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称重。80 °C 水浴加热冷凝回流提取 1.5 h, 放至常温后以甲醇补足失重。摇匀后过滤, 滤液用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系考察** 分别精密吸取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏对照品溶液 0.1、0.5、2.5、5、7.5、10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样, 以进样质量浓度为

横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 建立回归方程。结果见表 2。

表 2 6 种成分回归方程及线性范围

Tab 2 Linear regression equation and linear range of 6 components

化合物	回归方程	r	线性范围 / (μg · mL <sup>-1</sup> )
芸香柚皮苷	y = 15.766x - 4.2673	0.9998	4.8 ~ 480.0
柚皮苷	y = 18.924x - 14.988	0.9996	27.4 ~ 2740.0
橙皮苷	y = 14.152x + 4.51	0.9993	26.5 ~ 2650.0
新橙皮苷	y = 22.267x + 7.11	0.9998	26.0 ~ 2600.0
水合橙皮内酯	y = 32.745x - 9.856	0.9993	1.7 ~ 170.0
马尔敏	y = 36.314x + 9.307	0.9994	1.4 ~ 140.0

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取“2.2”项下的对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 制得混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯和马尔敏峰面积的 RSD 分别为 0.15%、0.080%、0.040%、0.15%、0.010%、0.34%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一批次枳实导滞丸供试品 (ZS01) 溶液, 分别在 0、4、8、12、24、48 h

时进样, 结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯和马尔敏峰面积的 *RSD* 分别为 1.1%、0.93%、0.15%、0.68%、0.22%、0.58%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 取同一份枳实导滞丸粉末 (ZS01) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液并进样测定, 结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏峰面积的 *RSD* 分别为 0.22%、0.43%、0.61%、0.40%、0.73%、0.86%, 表明操作重复性良好。

**2.4.5 加样回收试验** 称取已知含量的枳实导滞丸粉末 (ZS01) 6 份, 每份 500 mg, 分别精密加入一定量的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷对照品溶液; 再称取已知含量的枳实导滞丸粉末 (ZS01) 6 份, 每份 1000 mg, 分别精密加入一定量的水合橙皮内酯和马尔敏对照品溶液。按“2.3”项下方法制备供试品溶液并进样测定含量, 计算 *RSD* 值。结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏平均加样回收率均在 98.64% ~ 101.19%, *RSD* 均在 0.34% ~ 2.5%。

## 2.5 样品含量测定

分别称取不同批次枳实导滞丸适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液并进样测定, 记录峰面积并分别计算 6 种成分的含量。含量结果见表 3。

表 3 枳实导滞丸的含量测定结果 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )

Tab 3 Content determination of Zhishi Daozhi pills ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )

样品编号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	水合橙皮内酯	马尔敏
ZS01	0.70	9.35	2.09	18.90	0.16	0.10
ZS02	1.04	12.16	—	7.71	0.23	—
ZS03	0.63	11.10	—	9.78	0.14	0.09
ZS04	0.38	10.32	1.35	8.63	0.15	—
ZS05	0.62	10.23	—	5.79	0.13	0.07
ZS06	0.37	10.15	—	12.54	—	0.13
ZS07	5.65	—	53.90	—	—	—
ZS08	5.44	—	36.15	—	—	—
ZS09	2.28	—	23.53	—	—	—
ZS10	2.27	—	43.40	—	—	—
ZS11	3.34	—	38.49	—	—	—
ZS12	1.99	—	44.94	—	—	—
ZS13	2.85	—	30.22	—	—	—
ZS14	1.77	5.54	8.31	16.41	—	0.35
ZS15	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示未检出。

Note: “—” Indicates that it is not detected.

## 3 讨论与小结

### 3.1 枳实基原是枳实导滞丸合格的关键

6 种成分的含量测定结果显示, 酸橙枳实导滞丸中含量最高的是新橙皮苷, 其次是柚皮苷; 甜橙枳实导滞丸中含量最高的是橙皮苷, 其次是芸香柚皮苷, 且不含柚皮苷与新橙皮苷; 水合橙皮内酯和马尔敏主要存在于酸橙丸剂中且含量偏低。2020 年版《中国药典》以橙皮苷含量不少于 2% 作为枳实导滞丸质控指标。枳实导滞丸中橙皮苷含量测定结果表明, 甜橙枳实导滞丸全部合格, 而酸橙枳实所制导滞丸难以符合《中国药典》规定。两个市售枳实导滞丸样品的含量测定结果显示: 样品 (ZS14) 中含有柚皮苷和新橙皮苷, 推测其为酸橙枳实生产; 而样品 (ZS13) 中不含柚皮苷与新橙皮苷, 同时橙皮苷含量符合药典规定, 推测该丸为甜橙枳实生产。结合本文阴性丸剂含量测定结果可知, 枳实导滞丸中的橙皮苷来源于方中的枳实。枳实是一味多来源的药材, 在长江流域及各省均有分布, 市场上枳实药材来源众多且质量参差不齐。多项研究表明<sup>[12-14]</sup>, 不同品种枳实成分差异显著, 其中甜橙枳实主要含有橙皮苷及芸香柚皮苷, 几乎不含有柚皮苷与新橙皮苷, 而酸橙枳实中主要含有柚皮苷和新橙皮苷, 橙皮苷在酸橙枳实中的含量普遍偏低, 这是导致酸橙所制枳实导滞丸难以合格的主要原因。故有必要建立枳实导滞丸中枳实的鉴别方法, 进一步区分丸中的枳实来源, 以完善制剂的质量评价。

### 3.2 小结

目前《中国药典》中枳实导滞丸均以单一成分 (橙皮苷) 为质量控制指标。枳实导滞丸中橙皮苷来源于方中枳实, 而枳实是一味多来源的药材, 市场枳实质量良莠不齐, 且不同枳实药效存在差异<sup>[15-16]</sup>, 因此建议加以区分。从枳实导滞丸中橙皮苷含量上看, 酸橙枳实并不适用于制作枳实导滞丸, 不同枳实所制备的枳实导滞丸是否会导致药效存在差异, 尚需进一步研究。综上, 本实验建立的 HPLC 同时鉴别枳实导滞丸中枳实来源和 6 种有效成分含量测定的方法, 方法学考察稳定, 为两种枳实导滞丸质量控制和成分对比提供了基础, 检测指标更全面, 可为枳实导滞丸质量评价提供依据。

## 参考文献

[1] (金) 李东垣. 内外伤辨惑论 [M]. 北京: 中国中医药出版



- 社. 2007: 40.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1252.
- [3] 刘晶晶, 胡晓茹, 何轶, 等. HPLC 测定牛黄清胃丸中枳实所含 4 种黄酮类成分及其药材基原分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (18): 155-159.
- [4] 张霄潇, 李正勇, 马玉玲, 等. 中药枳实的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (2): 185-190.
- [5] 谭舒舒, 陈海芳, 罗小泉, 等. 枳壳中芸香柚皮苷和橙皮苷配伍对正常小鼠小肠推进作用的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29 (4): 73-75.
- [6] 张伟东, 徐阳, 郑路, 等. 柚皮苷对 DSS 诱导结肠炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 实验动物科学, 2021, 38 (6): 5-10.
- [7] 杨季. 橙皮苷对肉鸡生长性能、抗氧化、免疫及肠道菌群的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [8] Zhu A, Zhang K, Wang J, et al. Effect of different concentrations of neohesperidin on performance, egg quality, serum biochemistry and intestinal morphology in laying hens[J]. Poultry science, 2021, 100 (7): 10197.
- [9] 王喆, 孙波, 任平, 等. 基于肠道菌群探讨水合橙皮内酯对 AS 抑郁症共病模型大鼠的调节作用[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38 (6): 511-519.
- [10] 张普照, 黎艳刚, 涂明珠, 等. 葡萄内酯和马尔敏的合成及活性研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (8): 1851-1853.
- [11] 邓可众, 陈虹, 熊艺, 等. 不同产地及不同采收期江枳实的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2017, 40 (9): 2051-2054.
- [12] 陆超颖, 王佳丽, 王洪兰, 等. 不同基原枳实药材的质量差异评价研究[J]. 中草药, 2022, 53 (14): 4493-4503.
- [13] 曾鸿莲, 刘振丽, 宋志前, 等. 不同品种枳实 HPLC 指纹图谱及成分含量差异性研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (17): 3272-3278.
- [14] 张振霞, 郑玉忠, 梁丽娟, 等. 酸橙和甜橙 2 种枳实药材 HPLC 指纹图谱研究及其柚皮苷和辛弗林含量分析[J]. 中国药房, 2011, 22 (39): 3711-3714.
- [15] 张越颖. 酸橙与甜橙枳实所制枳术丸治疗功能性消化不良脾虚气滞证的临床疗效比较[J]. 北京中医, 2007 (3): 172-175.
- [16] 崔海峰, 周艳华, 吕署一, 等. 不同品种枳实对大鼠心血管及呼吸系统的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (6): 41-43.

(收稿日期: 2022-11-02; 修回日期: 2022-12-20)

## 基于全时段多波长融合特征定量指纹图谱的 满药仙灵脾颗粒质量控制方法研究

于洋<sup>1</sup>, 王帅<sup>1, 2, 3</sup>, 李天娇<sup>1, 2, 3</sup>, 赵琳<sup>1\*</sup>, 包永睿<sup>1, 2, 3\*</sup>, 张秀君<sup>4</sup>, 孟宪生<sup>1, 2, 3</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心, 辽宁 大连 116600; 3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600; 4. 丹东药业集团有限公司, 辽宁 丹东 118303)

**摘要:** **目的** 建立全时段多波长融合特征定量指纹图谱, 为仙灵脾颗粒质量控制提供科学依据。**方法** 选取 270 nm、327 nm、353 nm 3 个波长, 建立 10 批仙灵脾颗粒的高效液相 (HPLC) 指纹图谱, 确定 18 个共有峰, 通过对照品指认出 8 个成分; 指纹图谱与多指标成分含量测定结合, 建立全时段多波长融合特征定量指纹图谱, 并将 8 个成分进行相对于内标物柚皮苷的含量测定; 同时选取 5 个批次的仙灵脾颗粒, 对其 8 个成分进行绝对定量, 确定建立的含量测定方法的误差率。**结果** 建立了全时段多波长融合特征定量指纹图谱, 运用其对仙灵脾颗粒指认出的成分进行相对定量, 其结果与绝对定量相比, 误差率小于 5%。**结论** 所建立的方法准确可靠, 可用于仙灵脾颗粒的质量控制, 并为中药复方的质量评价提供参考。

**关键词:** 满药; 仙灵脾颗粒; 指纹图谱; 多指标成分含量测定; 全时段多波长融合特征定量指纹图谱; 质量控制方法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0771-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.036

基金项目: 大连市民族药天然活性成分研究与开发重点实验室开放课题 (No.20200707001, No.20200707002)。

作者简介: 于洋, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析与药物制剂研究, email: yuyang101221@163.com \*通信作者: 赵琳, 男, 硕士, 副教授, 主要从事中药制剂及质量控制研究, email: zhao3lin@126.com; 包永睿, 男, 博士, 正高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: byr1026@163.com

## Quality control of Manchu medicine Xianlingpi granules by characteristic quantitative fingerprint based on full-time multi-wavelength fusion

YU Yang<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1,2,3</sup>, LI Tian-jiao<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Lin<sup>1\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1,2,3\*</sup>, ZHANG Xiu-jun<sup>4</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1,2,3</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Liaoning Technical Innovation Center for Multi-Dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 3. Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian Liaoning 116600; 4. Dandong Pharmaceutical Group Co., Ltd, Dandong Liaoning 118303)

**Abstract: Objective** To establish the characteristic quantitative fingerprints based on full-time multi-wavelength fusion, and provide scientific basis for the quality control of Xianlingpi granules. **Methods** Three wavelengths (270 nm, 327 nm and 353 nm) were selected to establish HPLC fingerprints for 10 batches of Xianlingpi granules, 18 common peaks were identified, and 8 components were identified by the reference substances. The fingerprints were combined with the content determination of multi-index component to establish the full-time multi-wavelength fusion characteristic quantitative fingerprints, and 8 components were determined with reference to the internal standard naringenin. At the same time, 5 batches of Xianlingpi granules were selected and 8 components were absolutely quantified to determine the error rate of the established determination method. **Results** The full-time multi-wavelength fusion characteristic quantitative fingerprints were established to relatively quantify the identified components in Xianlingpi granules. The results showed an error rate of less than 5% compared with absolute quantification. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control of Xianlingpi granules and provide reference for the quality evaluation of Chinese medicine compounds.

**Key words:** Manchu medicine; Xianlingpi granule; fingerprint; multi-index component content determination; full-time multi-wavelength fusion characteristics quantitative fingerprint; quality control method

仙灵脾颗粒为满药成药制剂，目前多家制药公司在生产，功效为补肾强心、壮阳通痹。用于阳痿遗精、筋骨痿软，胸闷头晕、气短乏力，风湿痹痛等症的治疗，在临床上被广泛应用。其标准收载于《部颁标准·中药成方制剂》(第十册)，只有一项理化鉴别；与仙灵脾颗粒质量控制相关的文献中，主要应用了中药指纹图谱技术和多指标成分定量的方法，但存在着一些问题，如指纹图谱技术对化学成分进行的相对定量结果与真实含量相差较大，多指标成分虽绝对定量，但是需要大量对照品，成本较高，且报道的文献中只对几种黄酮类成分进行含量测定<sup>[1-3]</sup>，不能全面控制仙灵脾颗粒的质量。因此亟需建立相对完善、成本较低的仙灵脾颗粒定量控制方法。

本实验在中药指纹图谱技术与多指标成分含量测定的基础上，建立基于全时段多波长融合特征定量指纹图谱。构建“简易方程”，得到的数学方程在一定的变量范围内，可以通过成方制剂

中化学成分峰面积与含量之间的关系达到对其进行质量控制的要求。该方法解决了现有的中药复方定量控制方法的问题，对中药复方的质量控制具有重大意义。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

Agilent-1290 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), Mettler Toledo ME55 分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], KQ-250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

#### 1.2 试药

仙灵脾颗粒 10 批次(丹东药业集团有限公司, 批号: 20211201、20211202、20211203、20211204、20211205、20211206、20211207、20211208、20211209、20211210); 淫羊藿苷(批号: 110737-200415, 纯度 ≥ 98%)、绿原酸(批号: 110753-201415, 纯度 ≥ 98%) 对照品(中国食品药品检定研究院), 朝藿定 A(批号: wkq21060111, 纯

度  $\geq 98\%$ )、朝藿定 B (批号: wkq21071613, 纯度  $\geq 98\%$ )、朝藿定 C (批号: wkq21041304, 纯度  $\geq 98\%$ )、淫羊藿属苷 A (批号: wkq21091610, 纯度  $\geq 98\%$ )、宝藿苷 II (批号: wkq21081105, 纯度  $\geq 98\%$ )、柚皮苷 (批号: wkq22012906, 纯度  $\geq 98\%$ ) 对照品 (四川省维克奇生物科技有限公司), 金丝桃苷对照品 (成都普菲德生物技术有限公司, 批号: JOT-101930, 纯度  $\geq 98\%$ )。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,  $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ ,  $2.7\text{ }\mu\text{m}$ ); 以  $0.5\%$  甲酸水为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 梯度洗脱, 洗脱程序:  $0 \sim 8\text{ min}$ ,  $5\% \rightarrow 7\% \text{B}$ ;  $8 \sim 10\text{ min}$ ,  $7\% \rightarrow 9\% \text{B}$ ;  $10 \sim 14\text{ min}$ ,  $9\% \rightarrow 14\% \text{B}$ ;  $14 \sim 18\text{ min}$ ,  $14\% \rightarrow 15\% \text{B}$ ;  $18 \sim 26\text{ min}$ ,  $15\% \rightarrow 22\% \text{B}$ ;  $26 \sim 30\text{ min}$ ,  $22\% \rightarrow 24\% \text{B}$ ;  $30 \sim 35\text{ min}$ ,  $24\% \rightarrow 30\% \text{B}$ ;  $35 \sim 40\text{ min}$ ,  $30\% \rightarrow 37\% \text{B}$ ;  $40 \sim 45\text{ min}$ ,  $37\% \rightarrow 52\% \text{B}$ 。流速  $0.8\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ; DAD 检测器, 检测波长为  $270\text{ nm}$ 、 $327\text{ nm}$ 、 $353\text{ nm}$ ; 进样量  $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

### 2.2 对照品溶液的制备

取淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿属苷 A、宝藿苷 II、金丝桃苷、绿原酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每  $1\text{ mL}$  分别含  $3.5584$ 、 $0.5216$ 、 $0.4928$ 、 $0.3776$ 、 $0.1152$ 、 $0.0704$ 、 $0.0688$ 、 $0.2096\text{ mg}$  的溶液, 作为储备液待用。

### 2.3 内标溶液的制备

取柚皮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为  $0.2364\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液, 存放于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存待用。

### 2.4 供试品溶液的制备

取仙灵脾颗粒粉末约  $5\text{ g}$ , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10 倍量的  $70\%$  甲醇, 密塞, 称重, 超声处理 (功率  $200\text{ W}$ , 频率  $40\text{ kHz}$ )  $30\text{ min}$ , 放冷, 称重, 用  $70\%$  甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 滤液蒸至浸膏,  $70\%$  甲醇复溶并定容至  $10\text{ mL}$  量瓶中。另取  $3\text{ mL}$  仙灵脾颗粒样品溶液和  $1\text{ mL}$  柚皮苷储备液置于  $5\text{ mL}$  量瓶, 用  $70\%$  甲醇定容至刻度, 混匀, 经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度** 取同一样品 (批号: 20211201), 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 S (柚皮苷) 为参照, 结果显示, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿属苷 A、朝藿

定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II 相对保留时间的  $RSD$  均  $\leq 1.3\%$ , 相对峰面积的  $RSD$  均  $\leq 2.4\%$ , 表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性** 分别称取仙灵脾颗粒 (批号: 20211201) 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 S (柚皮苷) 为参照, 结果显示, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II 相对保留时间的  $RSD$  均  $\leq 0.17\%$ , 相对峰面积的  $RSD$  均  $\leq 2.9\%$ , 表明方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性** 取同一样品 (批号: 20211201), 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于  $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $12\text{ h}$  进样测定, 以 S (柚皮苷) 为参照, 结果显示, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II 的相对保留时间的  $RSD$  均  $\leq 1.6\%$ , 相对峰面积的  $RSD$  均  $\leq 2.7\%$ , 表明样品在  $12\text{ h}$  以内稳定性良好。

**2.5.4 耐用性试验** 取同一供试品溶液, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别用不同规格的色谱柱 [Poroshell 120 EC-C18、Raptor C18 (ODS)] 及不同型号的高效液相色谱仪 (Agilent-1290 型高效液相色谱仪、Agilent-1260 II 型高效液相色谱仪) 进样测定, 记录色谱图。结果显示, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II 的相对保留时间的  $RSD$  均  $\leq 1.3\%$ , 相对峰面积的  $RSD$  均  $\leq 4.0\%$ , 表明方法耐用性良好。

**2.5.5 线性关系考察** 取各对照品储备液, 精确配制一系列不同质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样测定, 重复 3 次, 以各成分峰面积 ( $Y$ ) 对被测组分的质量浓度 ( $X$ ,  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行线性回归, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 8 个成分线性关系  
Tab 1 Linearity of 8 components

成分	线性方程	$r$	线性范围 / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
绿原酸	$Y = 3.14 \times 10^4 X - 23.115$	0.9994	0.0131 ~ 0.1048
金丝桃苷	$Y = 4.67 \times 10^4 X + 0.6055$	0.9997	0.0043 ~ 0.0344
淫羊藿属苷 A	$Y = 1.39 \times 10^4 X - 3.6607$	0.9997	0.0072 ~ 0.0576
朝藿定 A	$Y = 1.02 \times 10^4 X - 3.2722$	0.9999	0.0326 ~ 0.2608
朝藿定 B	$Y = 1.47 \times 10^4 X + 2.4541$	0.9999	0.0308 ~ 0.2464
朝藿定 C	$Y = 1.18 \times 10^4 X + 4.7286$	0.9999	0.0236 ~ 0.1888
淫羊藿苷	$Y = 1.19 \times 10^4 X + 208.92$	0.9990	0.0278 ~ 1.7792
宝藿苷 II	$Y = 4.15 \times 10^4 X + 5.7099$	0.9995	0.0022 ~ 0.0352

**2.5.6 加样回收试验** 分别精密量取已知含量的



供试品溶液(批号: 20211201) 6 份, 每份取 3 mL, 加入与样品含量约 1 : 1 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿属苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 II 的平均回收率分别为 99.69%、101.96%、102.37%、96.99%、102.38%、96.87%、101.78%、102.94%, RSD 分别为 2.4%、2.7%、0.78%、2.8%、1.9%、2.7%、2.5%、0.69%。

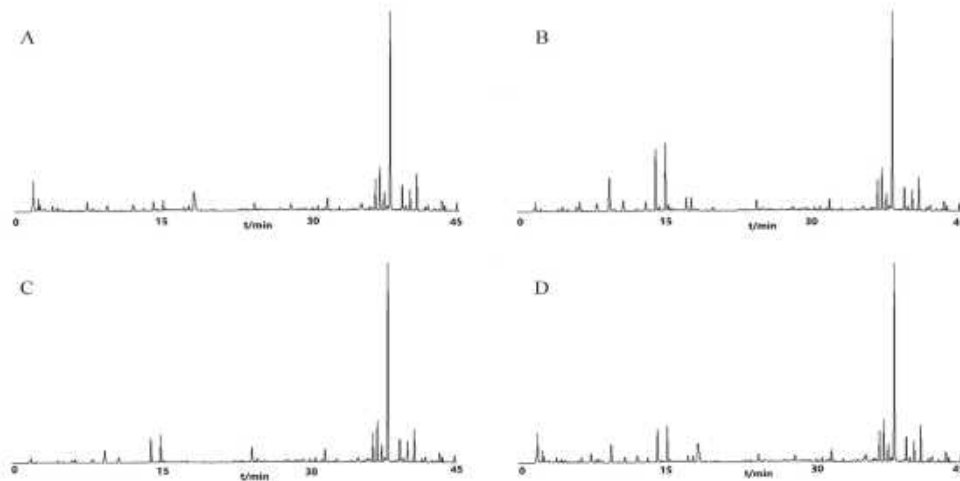


图 1 仙灵脾颗粒不同波长下的色谱图

Fig 1 Chromatogram of Xianlingpi granule at different wavelengths

A. 270 nm; B. 327 nm; C. 353 nm; D. 多波长融合色谱图 (multi-wavelength fusion chromatography)

**2.6.2 仙灵脾颗粒多波长融合指纹图谱** 将仙灵脾颗粒的 10 批样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.6.1”项下方法进行多波长融合, 将融合后的图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本), 中位数法设定 S1 为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1, 得到了 10 批仙灵脾颗粒的对照图谱 R, 相似度均大于 0.9, 并确定了 18 个分离度较好的共有峰, 经对照品比对指认出 8 个峰, 分别为 6 号峰绿原酸、9 号峰金丝桃苷、10 号峰淫羊藿属苷 A、11 号峰朝藿定 A、12 号峰朝藿定 B、13 号峰朝藿定 C、14 号峰淫羊藿苷、18 号峰宝藿苷 II。结果见图 2。

**2.6.3 含量测定方法的建立** 方程的构建依据为待测成分与内标物的含量比 ( $Y$  值) 不完全等于待测成分与内标物的峰面积比 ( $X$ ), 对照品配制浓度与供试品溶液中待测组分的浓度相近, 将 10 批次中  $X$  的最大值与最小值作为  $X$  的取值范围, 可满足含量测定方程成立的条件。以  $A_2/A_5$  作为  $X$  值, 以  $(C_1 \times A_2) / (A_1 \times C_5)$  作为  $Y$  值, 取 10 个批次中  $X$  的最大值、最小值和与之相对应的  $Y$  值, 建立二元一次方程组, 如下:

**2.6 仙灵脾颗粒指纹图谱以及含量测定方法的建立**

**2.6.1 仙灵脾颗粒各波长色谱图以及多波长融合色谱图** (见图 1) 本研究采用本实验室独创的等基线全时段多波长融合指纹图谱技术 (具体技术参照专利: ZL 2012 1 0223306.4), 根据 DAD 全波长扫描结果, 发现在 270 nm、327 nm、353 nm 这 3 个波长下色谱峰具有差异性, 相互间可以全面地反映仙灵脾颗粒的成分信息, 故将以上 3 个波长色谱数据用 Matlab 软件编程并进行全时段多波长融合。

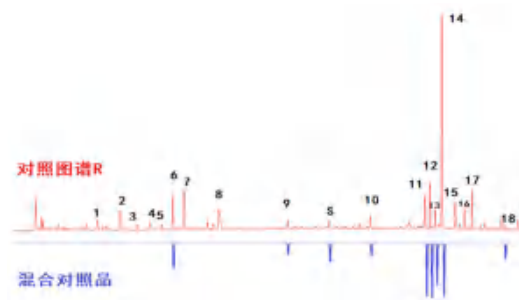


图 2 混合对照品图谱与对照图谱 R

Fig 2 Mixed standard chromatogram and control chromatogram R

6. 绿原酸 (chlorogenic acid); 9. 金丝桃苷 (hyperoside); 10. 淫羊藿属苷 A (epimodoside A); 11. 朝藿定 A (epimedin A); 12. 朝藿定 B (epimedin B); 13. 朝藿定 C (epimedin C); 14. 淫羊藿苷 (icariin); 18. 宝藿苷 II (baohuoside II)

$$Y_1 = aX_1 + b$$

$$Y_2 = aX_2 + b$$

其中  $C_1$  为各指标成分对照品的浓度;  $A_1$  为各指标成分对照品的峰面积;  $A_2$  为样品中各指标成分的峰面积;  $C_5$  为内标物柚皮苷的浓度;  $A_5$  为内标物柚皮苷的峰面积;  $X_1$  为  $X$  值最大值,  $Y_1$  为其对应的  $Y$  值;  $X_2$  为  $X$  值最小值,  $Y_2$  为其对应的  $Y$  值; 求出相关系数  $a$ 、 $b$  后, 得到 8 个成分相对于内标物柚

皮苷的含量测定方程, 结果见表 2。10 个批次仙灵脾颗粒的 8 个指标成分含量测定结果见表 3。

表 2 8 个指标成分相对于内标物柚皮苷的含量测定方程及 X 值取值范围  
Tab 2 Content determination equation of 8 index components relative to the internal standard naringin, and the range of values for the X

成分	含量测定方程	X 值取值范围
绿原酸	$Y = 0.3026X + 0.0649$	3.695 ~ 4.270
金丝桃苷	$Y = 0.1957X + 0.0144$	1.020 ~ 1.204
淫羊藿属苷 A	$Y = 0.6845X + 0.0867$	1.549 ~ 1.866
朝藿定 A	$Y = 0.9644X + 0.0256$	2.966 ~ 4.173
朝藿定 B	$Y = 0.5972X + 0.3018$	4.091 ~ 4.374
朝藿定 C	$Y = 0.7273X + 0.1637$	1.572 ~ 1.682
淫羊藿苷	$Y = 0.7530X + 0.7655$	19.018 ~ 20.002
宝藿苷 II	$Y = 0.1875X + 0.0210$	0.432 ~ 0.464

表 3 10 个批次仙灵脾颗粒 8 个成分的含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 3 Content of 8 components of 10 batches of Xianlingpi granules ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

批号	绿原酸	金丝桃苷	淫羊藿属苷 A	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	宝藿苷 II
20211201	0.160	0.030	0.140	0.497	0.344	0.164	1.871	0.013
20211202	0.152	0.026	0.161	0.347	0.330	0.158	1.814	0.012
20211203	0.140	0.026	0.138	0.345	0.329	0.157	1.797	0.012
20211204	0.146	0.027	0.146	0.356	0.340	0.162	1.863	0.013
20211205	0.140	0.026	0.136	0.343	0.325	0.155	1.794	0.012
20211206	0.140	0.026	0.158	0.341	0.326	0.156	1.783	0.012
20211207	0.143	0.027	0.140	0.353	0.331	0.160	1.844	0.012
20211208	0.142	0.026	0.143	0.350	0.332	0.158	1.823	0.012
20211209	0.140	0.025	0.139	0.343	0.324	0.156	1.797	0.012
20211210	0.143	0.026	0.137	0.345	0.326	0.156	1.803	0.012
$\bar{x} \pm s$	$0.144 \pm 0.006$	$0.026 \pm 0.001$	$0.143 \pm 0.009$	$0.359 \pm 0.040$	$0.330 \pm 0.006$	$0.158 \pm 0.003$	$1.817 \pm 0.027$	$0.012 \pm 0.000$

表 4 5 个批次仙灵脾颗粒 8 个成分的加内标相对定量结果、绝对定量结果 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 4 Relative quantitative with internal standards, absolute quantitative of 8 components in 5 batches of Xianlingpi granules ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

批号	绿原酸			金丝桃苷			淫羊藿属苷 A			朝藿定 A		
	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%
20211201	0.160	0.160	0	0.030	0.030	0	0.140	0.135	3.70	0.497	0.476	4.41
20211203	0.140	0.139	0.72	0.026	0.026	0	0.138	0.133	3.76	0.345	0.341	1.17
20211204	0.146	0.144	1.39	0.027	0.027	0	0.146	0.141	3.55	0.356	0.350	1.71
20211207	0.143	0.141	1.42	0.027	0.027	0	0.140	0.134	4.48	0.353	0.346	2.02
20211208	0.140	0.140	0	0.026	0.026	0	0.143	0.137	4.38	0.350	0.345	1.45
批号	朝藿定 B			朝藿定 C			淫羊藿苷			宝藿苷 II		
	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%	相对含量	绝对含量	误差率 /%
20211201	0.344	0.345	0.29	0.164	0.164	0	1.871	1.919	2.50	0.013	0.013	0
20211203	0.329	0.326	0.92	0.157	0.156	0.64	1.797	1.833	1.96	0.012	0.012	0
20211204	0.340	0.337	0.89	0.162	0.161	0.62	1.863	1.895	1.69	0.013	0.013	0
20211207	0.331	0.327	1.22	0.160	0.158	1.27	1.844	1.870	1.39	0.012	0.012	0
20211208	0.332	0.328	1.22	0.158	0.157	0.64	1.823	1.853	1.51	0.012	0.012	0

合并有高血压的患者更有利, 且能增加脑血流量, 对脑缺血、脑缺氧有保护作用<sup>[3-4]</sup>, 对应治疗“胸闷头晕、气短乏力”等症; 淫羊藿苷也对细胞激素和生殖器官的增益有作用, 可直接刺激雄性生殖系统中睾酮、雌二醇的分泌, 从而促进黄体生成素的分泌来增强雄性生殖器功能<sup>[5-6]</sup>, 对应治疗“阳痿遗精、筋骨痿软”等症; 淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 均能发挥一定的

2.7 所建立的含量测定方法准确性的验证

在 10 批次中, 随机抽取 5 个批次 (批号: 20211201、20211203、20211204、20211207、20211208) 进行多指标成分的绝对定量, 比较两种含量测定方法的误差率, 误差率均小于 5%, 说明建立的含量测定方法准确、可靠。误差率 (%) = |(绝对定量结果 - 加内标相对定量结果) / 绝对定量结果| × 100%。结果见表 4。

### 3 讨论

#### 3.1 指标成分的选择

经文献报道仙灵脾颗粒发挥药效的成分包括黄酮类、酚酸类等, 其中淫羊藿苷对心肌细胞具有保护作用<sup>[1]</sup>, 且可以用来治疗心肌缺血<sup>[2]</sup>、对

骨保护作用<sup>[7]</sup>, 绿原酸具有很强抗氧化和抗炎特性<sup>[8]</sup>, 对应治疗“风湿痹痛”等症; 金丝桃苷可保护心脑血管缺血、再灌注损伤<sup>[9-10]</sup>、改善骨关节炎<sup>[11]</sup>, 对应治疗“胸闷头晕、风湿痹痛”等症。上述化学成分均为仙灵脾颗粒发挥其“补肾强心、壮阳通痹”功效的有效成分, 可作为仙灵脾颗粒质量控制的指标成分。

#### 3.2 融合波长的选择

鉴于上述仙灵脾颗粒发挥药效的化学成分, 黄酮类化合物淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C, 检测波长为 270 nm<sup>[12-15]</sup>。黄酮醇苷类化合物金丝桃苷检测波长为 256 nm、353 nm<sup>[16]</sup>。酚类成分绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸等检测波长为 325 ~ 327 nm<sup>[16-17]</sup>。本实验选择 270、327、353 nm 作为融合的波长, 解决了单一波长下难以全面展现仙灵脾颗粒真实的化学成分的问题, 使色谱图可以全面反映色谱峰信息。

### 3.3 内标物的选择

实验过程中考察了咖啡因、丙硫异烟胺、杨梅苷、梔子苷、大豆苷、柚皮苷等物质作为内标, 发现柚皮苷可与待测物质完全分离, 且廉价易得、稳定性好, 同时其色谱峰的位置在被测组分色谱峰中间, 故选择柚皮苷作为内标。

### 3.4 定量方法的优劣

中药指纹图谱技术手段在含量测定方面对化学成分进行相对定量的结果与实际含量差距较大, 不能完全代替真实的含量值<sup>[18]</sup>; 多指标成分含量虽是真实值, 但需要用大量的对照品, 企业大批量生产仙灵脾颗粒的情况下, 在购买对照品上花费较多, 而仙灵脾颗粒在市场的售卖价格与企业成本上的花费并不成正比, 与此同时, 大量对照品的浪费, 测定方法的烦琐, 使企业在生产中既浪费了资源又降低了效率。本研究通过全时段多波长融合特征定量指纹图谱, 建立了绿原酸等 8 个成分相对于内标物柚皮苷的含量测定方程, 并将  $X_{\min} \sim X_{\max}$  作为含量测定方程成立的范围。随机选取 5 个批次的仙灵脾颗粒, 分别用建立的方法和指标成分绝对含量测定的方法对其进行含量测定, 结果显示, 误差率均小于 5%, 表明该方法准确、可靠。

综上所述, 本文所建立的全时段多波长融合特征定量指纹图谱的仙灵脾颗粒质量控制方法, 经方法学考察和含量测定验证, 稳定性和重复性良好, 可用于控制仙灵脾颗粒的质量, 可为中药复方的质量控制奠定基础。

## 参考文献

[1] Liu XJ, Lv YF, Cui WZ, et al. Icariin inhibits hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis of cardiomyocytes via regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. FEBS

Open Bio, 2021, 11 (11): 2966-2976.

[2] Zheng Y, Lu L, Yan Z, et al. mPEG-icariin nanoparticles for treating myocardial ischaemia [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47 (1): 801-811.

[3] Du A, Cai R, Shi J, et al. Protective effects of icariin on traumatic brain injury [J]. Curr Neurovasc Res, 2021, 18 (5): 508-514.

[4] 何丽君, 江金井, 陈豪, 等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2020, 12 (2): 17-20.

[5] 龚华乾, 高敏, 柴艺汇, 等. 淫羊藿化学成分与药理作用研究进展 [J]. 湖北民族大学学报 (医学版), 2021, 38 (4): 75-78.

[6] 高学勇, 林珊, 韩咪莎. 淫羊藿苷对环磷酰胺诱导生精障碍大鼠下丘脑-垂体-睾丸轴的影响 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41 (2): 147-151.

[7] 刘颖. 淫羊藿及其主要成分朝藿定 A 对骨质疏松影响及机制的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.

[8] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55 (10): 2273-2280.

[9] 杨诗婷, 王晓倩, 廖广辉. 金丝桃苷的药理作用机制研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35 (6): 947-951.

[10] He S, Yin X, Wu F, et al. Hyperoside protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury via upregulation of microRNA-138 [J]. Mol Med Rep, 2021, 23 (4): 286.

[11] Sun K, Luo J, Jing X, et al. Hyperoside ameliorates the progression of osteoarthritis: an in vitro and in vivo study [J]. Phytomedicine, 2021, 80: 153387.

[12] 李虹. 仙灵脾颗粒质量标准的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (7): 1679-1680.

[13] 单淑敏, 张丽萍, 高宏. HPLC 法测定仙灵脾颗粒中淫羊藿苷的含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32 (9): 957.

[14] 陈彦, 蔡垠, 贾晓斌, 等. 高效液相色谱法测定仙灵脾配方颗粒中 5 种主要黄酮类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (11): 1-3.

[15] 高芳芳, 刘耀龙, 李慧, 等. 高效液相色谱法检测二仙汤中淫羊藿黄酮类成分的含量 [J]. 世界中医药, 2019, 14 (7): 1654-1657, 1662.

[16] 陈文钧, 骆媛, 章建华, 等. 淫羊藿-川芎药对中 8 个成分的定量分析方法研究 [J]. 中药材, 2020, 43 (12): 2983-2987.

[17] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌, 等. UPLC 法同时测定朝鲜淫羊藿中 4 个成分的含量 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (7): 1795-1797.

[18] 李楠楠, 陈宇, 王帅, 等. 双莲方全时段多波长融合 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (5): 71-74.

(收稿日期: 2022-09-08; 修回日期: 2022-11-06)



# 不同产地党参的总硒、蛋白质、多糖含量及土壤总硒含量的相关性分析

段耿婷, 刘付松, 张澜, 李婷婷, 吴发明, 姚秋阳\* (遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563003)

**摘要:** 目的 了解国内不同产地党参的总硒、总蛋白、总多糖含量和土壤总硒含量及其相互间的相关性, 为富硒党参的品质评价和富硒栽培提供参考。方法 采集代表性产区的 100 份党参样品及其土壤, 采用氢化物原子荧光光度法测定党参及土壤的总硒含量, 采用紫外分光光度法测定党参的总蛋白和总多糖含量, 并对上述指标进行 Pearson 相关性分析。所测党参的硒含量平均值为  $(0.165 \pm 0.037) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 土壤硒含量平均值为  $(0.350 \pm 0.184) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 总蛋白含量平均值为  $(2.396 \pm 0.575) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 总多糖含量平均值为  $(0.513 \pm 0.063) \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此四项指标的两两相关性分析结果显示, 仅土壤总硒含量和党参总硒含量成显著正相关 ( $P < 0.01$ )。结论 全国产区中约有 55% 的党参样品达到富硒标准 ( $0.150 \sim 0.300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。不同产地的党参中总硒、总蛋白质、总多糖含量及土壤总硒含量存在较大差异。党参的总硒含量、总蛋白和总多糖这三个农艺性状相对独立, 相互之间影响甚小。

**关键词:** 党参; 硒; 蛋白质; 多糖; 相关性分析

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0777-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.037

## Correlation between total selenium, protein and polysaccharide content of Codonopsis Radix and soil selenium content in different areas

DUAN Geng-ting, LIU Fu-song, ZHANG Lan, LI Ting-ting, WU Fa-ming, YAO Qiu-yang\* (School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563003)

**Abstract: Objective** To determine the correlation between the total selenium, protein and polysaccharide content of Codonopsis Radix and soil selenium content in different areas in China so as to provide basis for the cultivation and quality evaluation of selenium-enriched Codonopsis Radix. **Methods** Totally 100 Codonopsis Radix samples and their soil from corresponding producing areas were collected. The total selenium content of Codonopsis Radix and the soil was detected by hydride atomic fluorescence spectrometry. The total protein and polysaccharide content of Codonopsis Radix were determined by UV spectrophotometry. Pearson correlation analysis was conducted on the above indicators. **Results** The mean selenium content of Codonopsis Radix was  $(0.165 \pm 0.037) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the mean soil selenium content was  $(0.350 \pm 0.184) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the total protein content was  $(2.396 \pm 0.575) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , and the polysaccharide content was  $(0.513 \pm 0.063) \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Pairwise correlation analysis of these four indicators showed that only soil selenium content and Codonopsis Radix selenium content revealed a significant positive correlation ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** 55% of domestic samples reached the selenium-enriched standard ( $0.150 \sim 0.300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The total selenium, protein, and polysaccharide content of Codonopsis Radix as well as soil selenium from different regions varied greatly. The total selenium, protein and polysaccharide content of Codonopsis Radix are relatively independent with little influence on each other.

**Key words:** Codonopsis Radix; selenium; protein; polysaccharide; correlation analysis

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.31760063, No.82060687, No.81760679); 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2021] 一般 248)。  
**作者简介:** 段耿婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药资源的开发与利用, email: 877218900@qq.com \*通信作者: 姚秋阳, 男, 副教授, 博士, 主要从事药用植物种质资源与基因资源挖掘, email: yaoqiuyang@zmu.edu.cn

硒 (selenium, Se) 是人类和其他动物必需微量元素之一<sup>[1]</sup>。根据中国卫生行业标准 WS/T 578.3—2017, 成人的合理摄入量为  $55 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 。由于耕地土壤中的硒普遍不足, 据估计目前全球仍有 5 ~ 10 亿人硒摄入量不足<sup>[2]</sup>。硒元素在提高人体抗氧化和免疫力方面非常重要, 且与克山病、大骨节病等多种疾病相关<sup>[3-5]</sup>。研究发现, 硒在乳腺癌等癌症的预防与治疗中产生良好效果<sup>[6]</sup>, 在阿尔茨海默病等疾病的干预中也有积极的应用前景<sup>[7]</sup>。植物有机硒被认为是人类安全补硒的重要来源<sup>[8]</sup>。党参 (*Codonopsis Radix*) 为桔梗科植物党参 [*Codonopsis Radix* (Franch.) Nannf.]、素花党参 [*C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen] 或川党参 (*C. tangshen* Oliv.) 的干燥根及根茎<sup>[9]</sup>。有报道显示被硒化修饰后的党参多糖具有更强的免疫活性<sup>[10]</sup>, 且党参富硒潜力强, 因此党参被认为是极具开发潜力的药食两用富硒资源<sup>[11]</sup>。随着党参道地产区的西移南扩, 贵州遵义、威宁 (川党参), 甘肃陇西、渭源 (党参), 湖北恩施 (川党参, 又称板桥党参) 等地逐渐成为党参的重要产区<sup>[12]</sup>, 这些新的主产区气候适宜且具有丰富的硒资源。在此背景下, 全面了解我国富硒党参的现状与分布具有重要意义。根据李增禧等<sup>[13]</sup>的报道, 不同来源的 14 份党参样品中得出党参硒含量变幅为  $0.001 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。尚未见更大规模的党参及土壤总硒含量调查报道, 党参总硒量、总蛋白和总多糖含量是否相互影响仍不得而知。因此, 本研究拟采集国内代表性产地的 100 份党参及对应土壤样品, 测定党参的总硒、总蛋白质和总多糖的含量及其对应土壤样品的总硒含量, 探究上述指标之间的相关性, 为全面了解富硒党参的现状与分布提供数据支持。

## 1 材料

T125D 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; 超纯水机 (德国默克密理博有限公司); DB 型不锈钢电热板 (上海上登实验设备有限公司); AFS-8800 双道原子荧光光度计 (北京海光仪器公司); 101-3A 电热鼓风干燥箱 (北京中兴伟业世纪仪器有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅 (常州普天仪器制造有限公司); SXJQ-1 高速离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司); MODEL U-3010/3310 分光光度计 (日本 Hitachi 公司)。

党参药材及土壤样品于 2021 年 8 月—2022 年 1 月分别采集自甘肃 (23 份)、吉林 (9 份)、内蒙古 (10 份)、宁夏 (3 份)、青海 (2 份)、山西 (7 份)、陕西 (1 份)、云南 (5 份)、湖北 (6 份)、四川 (10 份)、重庆 (11 份)、辽宁 (2 份)、贵州 (11

份), 共 13 个省份。土壤采集方式按照代表性原则, 每个点采集距地表 0 ~ 30 cm 土层的土壤, 共 100 份; 并取土壤采集处长势正常的两年生党参植株, 共 100 份。

## 2 方法

### 2.1 土壤和党参样品的制备

土壤及新鲜党参样品  $60^\circ\text{C}$  烘干, 烘干后党参样品全部粉碎后混匀, 过 65 目筛备用, 土壤用木棍碾碎混匀后过 85 目筛备用。

### 2.2 土壤及党参中硒含量测定

采用氢化物原子荧光光度法测定硒含量, 称取约 0.3 g 样品粉末, 加入 10 mL 硝酸-高氯酸 (9 : 1) 于电热板上消解, 将消解后溶液定容至 25 mL, 测定其硒含量<sup>[14]</sup>。标准曲线硒含量设置为 0、5、10、20、40  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回归方程为  $y = 44.056x + 9.238$  ( $R^2 = 0.9999$ )。每个试验做 3 个平行。根据《天然富硒土地划定与标识》对土壤硒养分进行评价, 评价标准见表 1。党参对硒元素的富集系数 (BCF) 根据以下公式计算:  $\text{BCF} = C_i/S_i$ ,  $C_i$  为地上部第  $i$  个植物样品的重金属含量;  $S_i$  为对应土壤样品重金属含量。

表 1 中国土壤硒含量的分级

Tab 1 Classification of soil selenium content in China

级别	Se/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	评价等级
1	$\leq 0.125$	缺硒
2	$0.125 < \text{Se} \leq 0.175$	少硒
3	$0.175 < \text{Se} \leq 0.400$	足硒
4	$0.400 < \text{Se} \leq 3.000$	富硒
5	$> 3.000$	过剩硒

### 2.3 党参中蛋白和多糖含量测定

使用蒸馏水作为提取党参中总蛋白的浸提剂, 称取约 2 g 样品, 加入 40 mL 蒸馏水, 室温搅拌 1 h, 抽滤, 用少量水洗涤残渣 3 次, 抽滤至干, 滤液可按照 GB 5009.5—2016 方法测蛋白含量<sup>[15]</sup>; 称取约 0.5 g 样品至锥形瓶中, 加 25 mL 蒸馏水, 超声 ( $70^\circ\text{C}$ , 360 W, 40 kHz) 35 min, 离心, 取上清液, 按照苯酚-硫酸法进行多糖测定<sup>[16-17]</sup>。每个试验做 3 个平行。

### 2.4 数据处理

采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同产地的党参及土壤中总硒含量的测定

对来自国内 13 个省份的代表性产区的 100 份党参及其根系土壤进行测定, 结果见表 2。所测党参的总硒含量的变幅为  $0.113 \sim 0.292 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 平均值为  $0.165 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其中, 总硒含量最高的

表 2 不同产地党参中总硒、总蛋白质、总多糖含量及其对应土壤总硒的含量 (n = 3)

Tab 2 Contents of total selenium, total protein and total polysaccharide in *Codonopsis Radix* and the corresponding contents of total selenium in soil from different habitats (n = 3)

编号	产地信息	党参总硒 / (mg · kg <sup>-1</sup> )	土壤总硒 / (mg · kg <sup>-1</sup> )	富集系数	总蛋白 / (mg · g <sup>-1</sup> )	总多糖 / (g · g <sup>-1</sup> )
S1	甘肃省白银市靖远县	0.139±0.005	0.225±0.023	0.625±0.080	2.069±0.053	0.648±0.200
S2	甘肃省白银市靖远县	0.144±0.003	0.175±0.026	0.837±0.137	3.626±0.241	0.520±0.087
S3	甘肃省陇南市宕昌县	0.115±0.003	0.203±0.032	0.579±0.111	1.819±0.071	0.530±0.120
S4	甘肃省陇南市宕昌县	0.113±0.002	0.176±0.044	0.675±0.201	2.208±0.319	0.493±0.078
S5	甘肃省定西市渭源县	0.117±0.002	0.254±0.016	0.462±0.021	3.231±0.262	0.491±0.100
S6	甘肃省定西市渭源县	0.119±0.002	0.239±0.023	0.503±0.059	3.115±0.151	0.525±0.050
S7	甘肃省定西市渭源县	0.113±0.002	0.169±0.059	0.720±0.216	2.641±0.240	0.522±0.094
S8	甘肃省定西市临洮县	0.118±0.002	0.267±0.027	0.445±0.039	2.346±0.471	0.565±0.071
S9	甘肃省定西市临洮县	0.115±0.001	0.206±0.026	0.563±0.082	4.630±0.339	0.409±0.066
S10	甘肃省定西市临洮县	0.115±0.001	0.207±0.025	0.565±0.072	3.160±0.373	0.522±0.075
S11	甘肃省定西市陇西县	0.117±0.001	0.138±0.012	0.848±0.068	2.070±0.422	0.566±0.143
S12	甘肃省定西市陇西县	0.116±0.001	0.143±0.009	0.810±0.047	3.418±0.196	0.469±0.123
S13	甘肃省定西市陇西县	0.123±0.005	0.234±0.031	0.536±0.097	3.498±0.137	0.402±0.109
S14	甘肃省定西市陇西县	0.120±0.002	0.246±0.022	0.491±0.053	3.005±0.045	0.507±0.110
S15	甘肃省定西市陇西县	0.128±0.004	0.229±0.035	0.571±0.111	3.324±0.170	0.492±0.148
S16	甘肃省定西市陇西县	0.131±0.000	0.191±0.044	0.715±0.189	2.591±0.381	0.545±0.167
S17	甘肃省定西市岷县	0.121±0.004	0.166±0.024	0.741±0.134	2.277±0.197	0.508±0.096
S18	甘肃省定西市岷县	0.124±0.002	0.178±0.023	0.704±0.106	3.493±0.214	0.551±0.096
S19	甘肃省定西市岷县	0.125±0.003	0.205±0.024	0.617±0.069	3.185±0.243	0.531±0.104
S20	甘肃省天水市甘谷县	0.120±0.002	0.196±0.015	0.614±0.056	2.769±0.335	0.540±0.106
S21	甘肃省天水市甘谷县	0.130±0.002	0.212±0.035	0.626±0.103	4.431±0.320	0.519±0.114
S22	甘肃省天水市甘谷县	0.133±0.001	0.218±0.044	0.629±0.140	3.605±0.139	0.538±0.086
S23	甘肃省陇南市文县	0.176±0.007	0.469±0.046	0.379±0.049	1.474±0.140	0.425±0.116
S24	吉林省延边州安图县	0.126±0.005	0.228±0.024	0.557±0.066	1.810±0.148	0.434±0.127
S25	吉林省延边州安图县	0.135±0.001	0.218±0.031	0.630±0.089	2.354±0.231	0.439±0.029
S26	吉林省延边州安图县	0.135±0.001	0.214±0.039	0.648±0.129	2.080±0.137	0.455±0.079
S27	吉林省延边州安图县	0.137±0.000	0.249±0.061	0.573±0.134	1.720±0.171	0.415±0.075
S28	吉林省延边州安图县	0.134±0.001	0.256±0.022	0.526±0.044	2.025±0.246	0.433±0.069
S29	吉林省延边州安图县	0.147±0.001	0.234±0.061	0.657±0.151	1.501±0.033	0.385±0.093
S30	吉林省通化市柳河县	0.131±0.002	0.237±0.076	0.589±0.179	1.735±0.149	0.392±0.063
S31	吉林省通化市柳河县	0.123±0.001	0.219±0.031	0.570±0.087	2.123±0.324	0.421±0.085
S32	吉林省通化市柳河县	0.131±0.002	0.217±0.035	0.617±0.105	1.878±0.347	0.378±0.062
S33	内蒙古自治区赤峰市巴林左旗	0.125±0.002	0.159±0.033	0.811±0.195	1.206±0.137	0.574±0.081
S34	内蒙古自治区赤峰市巴林左旗	0.128±0.001	0.164±0.047	0.833±0.265	1.492±0.148	0.504±0.119
S35	内蒙古自治区赤峰市巴林左旗	0.131±0.002	0.160±0.040	0.858±0.233	1.951±0.316	0.498±0.122
S36	内蒙古自治区赤峰市翁牛特旗	0.139±0.002	0.173±0.039	0.832±0.215	2.934±0.333	0.556±0.098
S37	内蒙古自治区赤峰市翁牛特旗	0.144±0.002	0.154±0.031	0.964±0.229	3.554±0.595	0.525±0.109
S38	内蒙古自治区赤峰市翁牛特旗	0.129±0.004	0.157±0.032	0.851±0.219	3.310±0.722	0.531±0.177
S39	内蒙古自治区赤峰市阿鲁科尔沁旗	0.136±0.000	0.155±0.023	0.889±0.138	3.869±0.452	0.546±0.099
S40	内蒙古自治区赤峰市阿鲁科尔沁旗	0.131±0.001	0.148±0.025	0.906±0.171	3.855±0.483	0.507±0.150
S41	内蒙古自治区赤峰市阿鲁科尔沁旗	0.140±0.003	0.140±0.024	1.019±0.163	4.189±0.594	0.391±0.108
S42	内蒙古自治区赤峰市阿鲁科尔沁旗	0.139±0.001	0.150±0.026	0.947±0.192	2.627±0.676	0.473±0.086
S43	宁夏回族自治区固原市隆德县	0.147±0.003	0.211±0.031	0.704±0.103	2.692±0.572	0.579±0.082
S44	宁夏回族自治区固原市隆德县	0.185±0.001	0.235±0.032	0.797±0.115	2.842±0.475	0.546±0.085
S45	宁夏回族自治区固原市隆德县	0.158±0.002	0.219±0.054	0.757±0.209	2.162±0.284	0.469±0.066
S46	青海省西宁市大通回族土族自治县	0.141±0.003	0.231±0.054	0.634±0.145	2.649±0.491	0.607±0.110
S47	青海省西宁市大通回族土族自治县	0.140±0.003	0.194±0.041	0.740±0.138	2.429±0.499	0.581±0.096
S48	山西省晋城市陵川县	0.221±0.005	0.497±0.061	0.449±0.053	2.920±0.278	0.460±0.088
S49	山西省晋城市陵川县	0.251±0.001	0.372±0.054	0.685±0.096	4.446±0.375	0.442±0.118
S50	山西省晋城市陵川县	0.213±0.001	0.400±0.033	0.536±0.043	2.837±0.101	0.540±0.078
S51	山西省长治市平顺县	0.261±0.004	0.402±0.032	0.650±0.043	3.352±0.117	0.402±0.048
S52	山西省长治市平顺县	0.212±0.001	0.399±0.042	0.534±0.057	2.895±0.244	0.384±0.069



续表 2

编号	产地信息	党参总硒 / ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	土壤总硒 / ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	富集系数	总蛋白 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	总多糖 / ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
S53	山西省长治市平顺县	0.163±0.002	0.318±0.042	0.517±0.060	3.237±0.210	0.538±0.054
S54	山西省长治市平顺县	0.187±0.003	0.316±0.009	0.591±0.020	3.974±0.552	0.516±0.102
S55	陕西省汉中市留坝县	0.185±0.002	0.183±0.028	1.025±0.134	2.477±0.236	0.406±0.038
S56	云南省昭通市永善县	0.193±0.002	0.271±0.054	0.735±0.166	0.910±0.140	0.528±0.118
S57	云南省昭通市永善县	0.152±0.002	0.544±0.081	0.285±0.050	1.075±0.059	0.549±0.040
S58	云南省昭通市昭阳区	0.151±0.001	0.336±0.037	0.452±0.049	2.093±0.094	0.570±0.092
S59	云南省昭通市昭阳区	0.151±0.001	0.358±0.063	0.432±0.087	2.467±0.270	0.532±0.109
S60	云南省昭通市昭阳区	0.160±0.004	0.344±0.054	0.473±0.073	2.197±0.198	0.563±0.092
S61	湖北省恩施土家族苗族自治州利川市	0.292±0.002	1.029±0.120	0.287±0.035	1.921±0.081	0.481±0.035
S62	湖北省恩施土家族苗族自治州利川市	0.264±0.001	0.974±0.058	0.272±0.018	2.339±0.117	0.493±0.072
S63	湖北省恩施土家族苗族自治州利川市	0.288±0.008	1.050±0.047	0.275±0.018	1.210±0.063	0.467±0.081
S64	湖北省恩施土家族苗族自治州利川市	0.222±0.003	0.703±0.043	0.317±0.016	1.953±0.115	0.534±0.061
S65	湖北省恩施土家族苗族自治州利川市	0.277±0.007	0.718±0.041	0.386±0.031	1.685±0.153	0.463±0.132
S66	湖北省恩施土家族苗族自治州恩施市	0.182±0.003	0.319±0.046	0.578±0.083	2.922±0.179	0.497±0.079
S67	四川省阿坝藏族羌族自治州九寨沟县	0.179±0.004	0.492±0.028	0.365±0.025	1.096±0.013	0.497±0.056
S68	四川省阿坝藏族羌族自治州九寨沟县	0.158±0.002	0.214±0.052	0.774±0.206	1.727±0.293	0.512±0.069
S69	四川省绵阳市北川县	0.181±0.003	0.279±0.063	0.674±0.166	2.286±0.348	0.494±0.063
S70	四川省绵阳市北川县	0.184±0.004	0.358±0.005	0.515±0.003	2.425±0.306	0.554±0.113
S71	四川省绵阳市北川县	0.173±0.003	0.292±0.091	0.630±0.195	1.455±0.610	0.461±0.073
S72	四川省绵阳市北川县	0.201±0.004	0.227±0.021	0.890±0.083	2.217±0.233	0.523±0.075
S73	四川省阿坝藏族羌族自治州红原县	0.156±0.002	0.175±0.083	1.116±0.709	1.606±0.077	0.476±0.107
S74	四川省阿坝藏族羌族自治州红原县	0.154±0.003	0.258±0.046	0.607±0.089	1.999±0.320	0.575±0.116
S75	四川省雅安市宝兴县	0.270±0.004	1.441±0.161	0.189±0.023	1.658±0.214	0.571±0.070
S76	四川省雅安市宝兴县	0.115±0.005	0.190±0.046	0.626±0.138	2.267±0.267	0.507±0.089
S77	重庆市巫溪县	0.192±0.005	0.348±0.059	0.564±0.099	1.300±0.057	0.411±0.074
S78	重庆市巫溪县	0.173±0.004	0.374±0.068	0.474±0.088	1.573±0.132	0.463±0.049
S79	重庆市巫溪县	0.177±0.001	0.420±0.087	0.432±0.081	2.311±0.116	0.478±0.066
S80	重庆市云阳县	0.190±0.004	0.405±0.073	0.480±0.088	1.126±0.093	0.605±0.038
S81	重庆市云阳县	0.216±0.002	0.606±0.144	0.371±0.089	1.205±0.062	0.540±0.063
S82	重庆市巫山县	0.177±0.003	0.410±0.175	0.495±0.225	2.003±0.181	0.512±0.065
S83	重庆市巫山县	0.192±0.001	0.369±0.042	0.526±0.059	1.840±0.112	0.564±0.048
S84	重庆市巫山县	0.195±0.003	0.466±0.051	0.421±0.041	2.267±0.023	0.533±0.027
S85	重庆市巫山县	0.176±0.003	0.373±0.076	0.483±0.089	1.669±0.006	0.612±0.059
S86	重庆市奉节县	0.180±0.001	0.408±0.033	0.444±0.034	1.949±0.036	0.463±0.130
S87	重庆市奉节县	0.178±0.001	0.427±0.053	0.421±0.056	2.479±0.086	0.583±0.039
S88	辽宁省丹东市振安区	0.189±0.002	0.425±0.054	0.449±0.055	1.600±0.260	0.423±0.040
S89	辽宁省丹东市振安区	0.211±0.008	0.422±0.085	0.513±0.104	1.138±0.093	0.425±0.085
S90	贵州省毕节市威宁縣	0.170±0.002	0.374±0.090	0.475±0.132	2.407±0.191	0.630±0.080
S91	贵州省毕节市威宁縣	0.181±0.001	0.435±0.098	0.428±0.085	2.708±0.203	0.651±0.036
S92	贵州省毕节市威宁縣	0.156±0.001	0.645±0.242	0.262±0.083	2.822±0.233	0.599±0.016
S93	贵州省毕节市威宁縣	0.157±0.002	0.748±0.177	0.219±0.058	2.374±0.608	0.620±0.035
S94	贵州省毕节市威宁縣	0.171±0.003	0.481±0.075	0.361±0.054	1.960±0.097	0.576±0.021
S95	贵州省遵义市道真县	0.217±0.003	1.138±0.127	0.192±0.022	1.899±0.181	0.554±0.020
S96	贵州省遵义市道真县	0.232±0.003	0.828±0.178	0.288±0.055	1.520±0.018	0.608±0.068
S97	贵州省遵义市道真县	0.182±0.002	0.479±0.113	0.395±0.096	2.373±0.064	0.532±0.034
S98	贵州省遵义市道真县	0.216±0.002	0.385±0.060	0.568±0.081	2.697±0.565	0.619±0.028
S99	贵州省遵义市道真县	0.196±0.004	0.510±0.102	0.393±0.073	3.004±0.920	0.579±0.046
S100	贵州省毕节市七星关区	0.218±0.007	0.443±0.057	0.497±0.054	0.745±0.060	0.707±0.038

前三者均来自湖北恩施自治州 (S61、S63、S65), 最低的三者均来自甘肃省 (S7、S4、S10)。由于目前尚无关于富硒党参的国家或行业标准, 本研究根据湖北省食品安全地方标准 (DBS42/002—2022) 中的“其他蔬菜”类的限定规定将硒含量为

0.150 ~ 0.300  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时定义为富硒党参, 结果显示 55 份 (55%) 党参达到富硒标准。总体而言, 各省份的党参的硒含量平均值中, 湖北、山西、辽宁为前三, 甘肃、吉林和内蒙古靠后。

所测土壤的总硒含量的变幅为 0.138 ~ 1.441

mg · kg<sup>-1</sup>, 平均值为 0.350 mg · kg<sup>-1</sup>。其中, 土壤总硒含量高的前三分别来自四川雅安市 (S75)、贵州遵义市 (S95) 及湖北恩施自治州 (S63), 含量居后三位者分别来自于甘肃定西市 (S11)、内蒙古赤峰市 (S41) 和甘肃定西市 (S12)。根据《天然富硒土地划定与标识》土壤硒限度规定, 将所测的 100 样品土壤中硒含量分为缺硒、少硒、足硒、富硒和硒过剩组。共有 16% 土壤样品为少硒组, 55% 土壤样品为足硒组, 29% 土壤样品为富硒组。总体而言, 各省份的土壤硒含量平均值中, 湖北 (0.799 mg · kg<sup>-1</sup>)、贵州 (0.588 mg · kg<sup>-1</sup>)、辽宁 (0.424 mg · kg<sup>-1</sup>) 较高, 属于富硒土壤组, 而内蒙古最低, 为 0.156 mg · kg<sup>-1</sup>, 属于少硒土壤组。值得一提的是, 相邻地域的土壤硒含量相对接近, 个别地区也存在较大差异, 例如湖北省恩施市板桥镇的土壤硒含量明显低于湖北其他地区的; 而四川省雅安市宝兴县永富乡的土壤硒含量明显高于四川其他地区的。

植物体某器官中特定元素的富集系数能客观反映植物对其根际土壤的富集能力。如表 2 所示, 党参对土壤硒的生物富集系数介于 0.189 ~ 1.116, 平均值为 0.582。其中四川阿坝自治州 (S73)、陕西汉中市 (S55) 和内蒙古赤峰市 (S41) 的样品富集系数最高, 分别为 1.116、1.025 和 1.019。四川省雅安市 (S75)、贵州省遵义市 (S95) 和贵州毕节市 (S93) 最低, 分别为 0.189、0.192 和 0.219。值得注意的是, 富集系数最高的样品其土壤的硒含量均处于少硒与足硒之间的限定值附近 (0.175), 富集系数最低的样品其土壤的硒含量均处于富硒组。

### 3.2 不同产地的党参中总蛋白和总多糖的含量

所测党参总蛋白含量的变幅为 0.745 ~ 4.630 mg · g<sup>-1</sup>, 平均值为 2.396 mg · g<sup>-1</sup> (见表 2 ~ 3)。其中, 甘肃定西市 (S9)、山西晋城市 (S49)、甘肃天水市 (S21) 的总蛋白含量是最高的, 分别为 4.630 mg · g<sup>-1</sup>、4.446 mg · g<sup>-1</sup> 和 4.431 mg · g<sup>-1</sup>。贵州毕节市 (S100)、云南邵通市 (S56、S57) 的总蛋白含量最低, 分别为 0.745 mg · g<sup>-1</sup>、0.910 mg · g<sup>-1</sup> 和 1.075 mg · g<sup>-1</sup>。总多糖含量范围为 0.378 ~ 0.707 g · g<sup>-1</sup>, 平均值为 0.513 g · g<sup>-1</sup>。其中, 贵州毕节市 (S100、S91)、甘肃白银市 (S1) 的总多糖含量是最高的, 分别为 0.707 g · g<sup>-1</sup>、0.651 g · g<sup>-1</sup> 和 0.648 g · g<sup>-1</sup>。吉林通化市 (S32)、山西长治市 (S52) 和吉林延边州 (S29) 的总多糖含量最低, 分别为 0.378 g · g<sup>-1</sup>、0.384 g · g<sup>-1</sup> 和 0.385 g · g<sup>-1</sup>。总体而言, 山西 (3.380 mg · g<sup>-1</sup>)、甘肃 (2.956 mg · g<sup>-1</sup>) 和内蒙古 (2.899 mg · g<sup>-1</sup>) 的总蛋白含量是最高的, 而辽宁 (1.369 mg · g<sup>-1</sup>) 的最低;

而位列总多糖前三是贵州 (0.607 g · g<sup>-1</sup>)、青海 (0.594 g · g<sup>-1</sup>) 和云南 (0.548 g · g<sup>-1</sup>), 而陕西 (0.406 g · g<sup>-1</sup>) 的平均值最低 (见表 3)。

表 3 不同省份的党参中总硒、总蛋白、总多糖含量及其对应土壤总硒的平均含量

Tab 3 Average content of total selenium, total protein, total polysaccharide in Codonopsis Radix and the corresponding total selenium in soil of in different provinces

省份	党参总硒含量 / (mg · kg <sup>-1</sup> )	总蛋白含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	总多糖含量 / (g · g <sup>-1</sup> )	土壤总硒含量 / (mg · kg <sup>-1</sup> )
湖北	0.254 ± 0.001 <sup>a</sup>	2.005 ± 0.084 <sup>c</sup>	0.489 ± 0.076 <sup>c</sup>	0.799 ± 0.042 <sup>a</sup>
山西	0.215 ± 0.001 <sup>b</sup>	3.380 ± 0.154 <sup>a</sup>	0.469 ± 0.072 <sup>c</sup>	0.386 ± 0.019 <sup>e</sup>
辽宁	0.200 ± 0.005 <sup>b</sup>	1.369 ± 0.162 <sup>d</sup>	0.424 ± 0.056 <sup>d</sup>	0.424 ± 0.069 <sup>e</sup>
贵州	0.191 ± 0.001 <sup>c</sup>	2.228 ± 0.233 <sup>c</sup>	0.607 ± 0.031 <sup>a</sup>	0.588 ± 0.102 <sup>b</sup>
重庆	0.186 ± 0.002 <sup>c</sup>	1.793 ± 0.059 <sup>c</sup>	0.524 ± 0.050 <sup>b</sup>	0.419 ± 0.073 <sup>c</sup>
陕西	0.185 ± 0.002 <sup>c</sup>	2.477 ± 0.236 <sup>b</sup>	0.406 ± 0.038 <sup>d</sup>	0.183 ± 0.028 <sup>d</sup>
四川	0.177 ± 0.001 <sup>c</sup>	1.874 ± 0.252 <sup>c</sup>	0.517 ± 0.077 <sup>b</sup>	0.393 ± 0.026 <sup>c</sup>
宁夏	0.163 ± 0.001 <sup>d</sup>	2.565 ± 0.443 <sup>b</sup>	0.531 ± 0.061 <sup>b</sup>	0.222 ± 0.036 <sup>d</sup>
云南	0.161 ± 0.001 <sup>d</sup>	1.748 ± 0.109 <sup>d</sup>	0.548 ± 0.084 <sup>b</sup>	0.370 ± 0.057 <sup>c</sup>
青海	0.140 ± 0.003 <sup>d</sup>	2.539 ± 0.495 <sup>b</sup>	0.594 ± 0.102 <sup>a</sup>	0.212 ± 0.047 <sup>d</sup>
内蒙古	0.134 ± 0.001 <sup>e</sup>	2.899 ± 0.395 <sup>b</sup>	0.510 ± 0.109 <sup>b</sup>	0.156 ± 0.031 <sup>d</sup>
吉林	0.133 ± 0.001 <sup>e</sup>	1.914 ± 0.176 <sup>c</sup>	0.417 ± 0.074 <sup>d</sup>	0.230 ± 0.038 <sup>d</sup>
甘肃	0.125 ± 0.002 <sup>e</sup>	2.956 ± 0.088 <sup>a</sup>	0.514 ± 0.103 <sup>b</sup>	0.215 ± 0.024 <sup>d</sup>
平均值	0.165 ± 0.037	2.396 ± 0.575	0.513 ± 0.063	0.350 ± 0.184

注: 同列不同小写字母表示  $P < 0.05$ 。

Note: Different lower case letters in the same column mean  $P < 0.05$ .

### 3.3 党参总硒、总蛋白、总多糖含量与土壤总硒含量的相关性分析

党参的总硒含量与土壤总硒及党参总蛋白、总多糖含量之间的数据分布模式如图 1 所示。随着党参硒含量升高, 土壤硒含量呈现快速上升趋势 (见图 1A), 而同一样品的总多糖 (见图 1B)、总蛋白 (见图 1C) 含量总体分布规律不明显。Pearson 相关性分析进一步验证上述结果, 表明土壤总硒含量与党参总硒含量成极显著正相关 (相关系数 = 0.778,  $P < 0.01$ , 见表 4); 其他两两比较均未发现有明显相关性。

表 4 不同地区党参根中总硒、总蛋白、总多糖含量及土壤总硒含量的相关性分析

Tab 4 Correlation analysis of total selenium, total protein, total polysaccharide content of Codonopsis Radix total selenium content of soil from different areas

	土壤总硒	党参总硒	总蛋白	总多糖
土壤总硒	1	0.778**	-0.326**	0.162
党参总硒	0.778**	1	-0.273**	0.026
总蛋白	-0.326**	-0.273**	1	-0.077
总多糖	0.162	0.026	-0.077	1

注 (Note): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

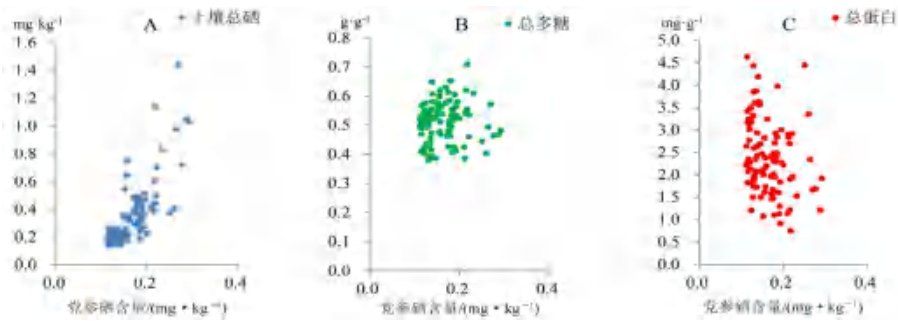


图1 党参中总硒和土壤总硒(A)、总多糖(B)及总蛋白(C)相关性散点图

Fig 1 Scatter plot of correlation between total selenium in *Codonopsis Radix* and soil total selenium (A), total polysaccharide (B) and total protein (C)

#### 4 讨论

李婷婷等<sup>[11]</sup>报道的施硒水培实验表明党参具有较高的富硒潜能,但关于党参的总硒含量及其土壤的硒背景值的大规模测定与统计分析目前未见报道。本文对来自国内13个省份的代表性产区的100份党参及其根系土壤进行测定,有助于初步摸清党参总硒及产区土壤总硒含量概况。所测党参总硒的平均值为 $0.165 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,大部分(55%)党参样品达到富硒标准(DBS42/002—2022,  $0.150 \sim 0.300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),表明党参可作为良好的富硒原材料进一步发掘利用。党参作为药食两用中药材,药典规定用量为每日 $9 \sim 30 \text{ g}$ ,据此计算,党参硒含量需达到 $1.6 \sim 5.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 方可完全补充正常人每日所需硒元素 $50 \mu\text{g}$ (中国卫生行业标准WS/T 578.3—2017)。据报道在添加外源硒的水培条件下很容易达到此理想富硒党参的标准<sup>[11]</sup>,但通过大田富硒栽培实现此目标仍任重道远,因为土壤的理化因素对植物的硒吸收与积累有重要影响<sup>[18]</sup>。

本研究所测土壤的总硒含量平均值为 $0.350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,高于全国耕地的平均水平 $0.217 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[19]</sup>,但仍低于全球的平均水平 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[20]</sup>。中国属缺硒大国,硒资源分布不均,同时也存在硒资源丰富地区。例如,湖北省恩施市境内含有独立硒矿床被认为是世界天然生物硒资源最富集的地区,本研究所测党参总硒含量高的前三均来自湖北恩施自治州(S61、S63、S65)。值得注意的是,虽然土壤总硒含量最高的S75采样点( $1.441 \pm 0.161 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )来自四川雅安市,但其党参总硒含量为( $0.270 \pm 0.004 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),仅排第四位。我们推测恩施地区采样点的土壤硒活化度比雅安地区的高。鉴于恩施地区土壤的有效硒含量高<sup>[21]</sup>,而土壤有效硒对植物的硒吸收与积累有更直接的影响<sup>[19]</sup>,恩施可作为党参富硒栽培的重要土地资源。甘肃、吉林和内蒙古等地属于低硒带,所产的党参硒含量低于全国平均水平。

但这些地区的党参样品的硒富集系数相对较高,这反映这些地区土壤的有效硒占比高,或者所产的党参对其根际土壤的硒富集能力较强,尚有待于进一步验证。Pearson相关性分析结果表明土壤总硒含量与党参总硒含量成显著正相关(相关系数 $= 0.778, P < 0.01$ )。可见,要提高低硒地区的党参硒含量,施加硒肥进行富硒栽培是重要途径。鉴于甘肃是重要的道地产区,但土壤硒含量低,如果在此产区进行富硒栽培田间实验获得富硒党参并进一步验证其是否起到在临床上提质增效作用,对富硒党参功能发掘具有重要意义。

山西长治是党参的传统道地产区,随着党参道地产区的西移,贵州遵义、威宁,甘肃陇西、渭源,四川九寨沟等地逐渐成为党参的道地产区<sup>[12]</sup>。值得注意的是,传统产区如山西、甘肃地区的党参总蛋白含量最高,而贵州党参的多糖含量最高。这些产区的党参在营养价值、临床疗效方面是否存在差异仍有待进一步研究。周武先等<sup>[21]</sup>报道显示,党参中有机硒占总硒的 $80.1\% \sim 83.6\%$ 。有机硒主要以硒蛋白和硒多糖为主的大分子形式存在,也有部分以硒核酸、硒代氨基酸及其衍生物等形式存在<sup>[22]</sup>。李婷婷等<sup>[11]</sup>的报道显示,在水培条件下添加适量硒浓度时,党参总多糖和总蛋白含量都有所增加,在高浓度的硒胁迫条件下党参的总多糖和总蛋白含量均有所降低,表明硒积累对蛋白质和多糖的积累有重要影响。与之不同的是,本研究结果显示,常规大田栽培的党参硒含量在 $0.112 \sim 0.294 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,与总蛋白及总多糖均无显著相关性。推测可能存在两个主要原因:首先,蛋白质、多糖和有机硒的合成途径迥异。无机硒进入植物机体后,会以多种形式嵌入多糖和蛋白质;这些大分子能够结合硒的位点较多,在植物吸收的硒量很少的情况下,嵌入多糖和蛋白质的硒不会使植物生理受到大的变化,因此一般的土壤硒背景值下的硒对植物的蛋白质和多糖的合成影响极其有限<sup>[23-24]</sup>。反之,由于嵌入多糖和蛋白



质的硒远未达到饱和状态, 植物蛋白质和多糖的增加或减少也不会对党参根部的硒积累有明显影响。其次, 在全国各产区的土壤理化性质和生态因素的差异巨大, 水分、温度、光照是多糖和蛋白质合成与积累的主要因素, 其影响远大于硒元素的影响。由此可见, 全国大多数土壤硒背景条件常规种植的党参的总硒含量、总蛋白和总多糖这三个农艺性状相对独立, 相互之间影响甚小。

## 5 结论

全国产区中约有 55% 的党参样品达到富硒标准 ( $0.150 \sim 0.300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。不同产地的党参中总硒、总蛋白质、总多糖含量及土壤总硒含量存在较大差异。在常规大田栽培条件下, 党参总硒含量变幅为  $0.112 \sim 0.294 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 在此范围内, 党参总硒含量与土壤总硒含量成显著正相关, 与总蛋白、总多糖无明显相关性。此外, 富硒党参的栽培与生产宜在湖北恩施等富硒产区进行研究和实践, 而如果在甘肃、吉林和内蒙古等地生产富硒党参则易受到土壤硒背景值低的限制。本研究初步摸清党参主产区的土壤总硒与党参总硒、总蛋白质和总多糖含量的现状、分布及其相关关系, 为富硒党参的质量评价与栽培提供依据。

## 参考文献

- [1] Kieliszek M. Selenium-fascinating microelement, properties and sources in food [J]. *Molecules*, 2019, 24 (7): 1298.
- [2] Feinberg A, Maliki M, Stenke A, et al. Mapping the drivers of uncertainty in atmospheric selenium deposition with global sensitivity analysis [J]. *Atmos Chem and Phys*, 2020, 20 (3): 1363-1390.
- [3] Santesmasses D, Gladyshev VN. Pathogenic variants in selenoproteins and selenocysteine biosynthesis machinery [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (21): 11593.
- [4] Xu J, Gong Y, Sun Y, et al. Impact of selenium deficiency on inflammation, oxidative stress, and phagocytosis in mouse macrophages [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 194 (1): 237-243.
- [5] 王溪, 王爽, 何淑兰, 等. 中国大骨节病与克山病基因表达谱的比较分析 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43 (8): 672-678.
- [6] Tan HW, Mo HY, Lau ATY, et al. Selenium species: current status and potentials in cancer prevention and therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20 (1): 75.
- [7] Tamtaji OR, Heidari-Soureshjani R, Mirhosseini N, et al. Probiotic and selenium co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, controlled trial [J]. *Clini Nutr*, 2019, 38 (6): 2569-2575.
- [8] Chao W, Rao S, Chen QW, et al. Advances in research on the involvement of selenium in regulating plant ecosystems [J]. *Plants*, 2022, 11 (20): 2712.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 293.
- [10] 刘宽辉, 田卫军, 高珍珍, 等. 多糖-硒化多糖复方增强鸡免疫功能的比较研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40 (3): 521-528.
- [11] 李婷婷, 段耿婷, 张澜, 等. 不同亚硒酸钠浓度对党参生长、生理特性和品质的影响 [J]. *广西植物*, 2022: 1-12 (网络首发).
- [12] 吴晓俊, 张小波, 郭兰萍, 等. 党参药材分布区划研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (22): 4368-4372.
- [13] 李增禧, 潘伟健, 谭永基, 等. 中药微量元素数据 (10) [J]. *广东微量元素科学*, 2013, 20 (11): 42-70.
- [14] 李婷婷, 王丹丹, 卢晓琦, 等. 氢化物原子荧光光谱法测定党参中的硒含量 [J]. *吉林化工学院学报*, 2021, 38 (9): 9-12.
- [15] 王金灿. GB 5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》之 5.1 凯氏定氮法具体操作疑难解析 [J]. *食品安全导刊*, 2018 (30): 54-55.
- [16] 胡涛. 不同生长年限与采收期川党参中主要成分含量的比较研究 [J]. *药学研究*, 2017, 36 (10): 571-574.
- [17] 李达, 何先元, 冯婧, 等. 不同生长年限川党参多糖、总黄酮含量的分析比较 [J]. *光谱实验室*, 2012, 29 (3): 1724-1728.
- [18] 王锐, 余涛, 杨忠芳, 等. 富硒土壤硒生物有效性及影响因素研究 [J]. *长江流域资源与环境*, 2018, 27 (7): 1647-1654.
- [19] 张建东, 王丽, 赫栗涛, 等. 岚皋县岩石、土壤和农产品中硒分布规律研究 [J]. *土壤通报*, 2022, 53 (1): 195-203.
- [20] Zhu YG, Pilon-Smits EA, Zhao FJ, et al. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 14 (8): 436-442.
- [21] 周武先, 张雅娟, 张美德. 湖北恩施富硒药用植物资源调查与利用 [J]. *河南农业科学*, 2021, 50 (3): 49-58.
- [22] Zou YJ, Du F, Zhang HJ, et al. Selenium speciation and biological characteristics of selenium-rich Bailing mushroom, *Pleurotus tuoliensis* [J]. *Emir J Food Agr*, 2018, 30 (8): 704-708.
- [23] 刘为, 尹金晶, 吴慕慈, 等. 富硒农产品中硒代氨基酸形态及其在不同蛋白组分中的分布 [J]. *食品与机械*, 2022, 38 (6): 45-51, 190.
- [24] Gu YG, Qiu Y, Wei X, et al. Characterization of selenium-containing polysaccharides isolated from selenium-enriched tea and its bioactivities [J]. *Food Chem*, 2020, 316: 126371.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-08)

# 基于高效液相色谱指纹图谱与一测多评法的 大黄碳酸氢钠片质量评价

吴勇<sup>1</sup>, 刘燕<sup>1</sup>, 王雷<sup>2, 3, 4</sup>, 陈卫东<sup>2, 3, 4\*</sup> (1. 马鞍山市食品药品检验和药品不良反应监测中心, 安徽 马鞍山 243000; 2. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 3. 安徽省道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 4. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**摘要:** **目的** 建立大黄碳酸氢钠片的 HPLC 指纹图谱, 并采用一测多评 (QAMS) 法测定其中 4 种成分的含量, 对其进行质量评价。**方法** 采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸溶液 (B)(梯度洗脱), 检测波长为 254 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10 μL, 柱温为 30 °C。采用 HPLC 法测定 10 批大黄碳酸氢钠片的指纹图谱, 建立指纹图谱共有模式。以大黄素为内参物, 建立其他 4 个成分大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚和芦荟大黄素的相对校正因子, 并进行含量计算, 并与外标法测定结果进行比较, 以验证 QAMS 方法的准确性、重复性及可行性。**结果** 10 批大黄碳酸氢钠片指纹图谱标定了共有峰 13 个, 10 批大黄碳酸氢钠片指纹图谱的相似度均大于 0.95, 10 家企业生产的大黄碳酸氢钠片含量存在显著性差异。**结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱和 QAMS 可用于大黄碳酸氢钠片的质量评价。

**关键词:** 大黄碳酸氢钠片; 高效液相色谱; 指纹图谱; 一测多评; 质量控制

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0784-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.038

## Quality evaluation of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets based on HPLC fingerprints and quantitative analysis of multi-components with single markers

WU Yong<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2, 3, 4</sup>, CHEN Wei-dong<sup>2, 3, 4\*</sup> (1. *Maanshan Institute for Food and Drug Control and Adverse Drug Reaction, Maanshan Anhui 243000*; 2. *College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012*; 3. *Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012*; 4. *Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012*)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC fingerprints of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets and quantitatively analyze multi-components by single markers (QAMS) to determine the content of 4 components, and evaluate the quality of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets. **Methods** HPLC was performed on an Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with the mobile phase of acetonitrile (phase A)-0.1% phosphoric acid solution (phase B) (with gradient elution). The detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the injection volume was 10 μL, and column temperature was 30 °C. The HPLC fingerprints of 10 batches of samples were determined, a common pattern of fingerprints established. Emodin was used as the internal reference substance to determine the relative correction factors of rhein, chrysophanol, physcion, and aloemodin. The content of each component was calculated, and were compared with the results of the

**基金项目:** 安徽高校协同创新项目 (No.GXXT-2019-043); 安徽省中央引导地方科技发展专项 (No.201907d07050002); 安徽省自然科学基金项目 (No.1908085QH351); 安徽省科技重大专项 (No.18030801131); 安徽中医药大学校级科研项目 (No.2018zrzd04)。

**作者简介:** 吴勇, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事药品质量评价及相关分析研究工作, email: aqwuyong@126.com \*通信作者: 陈卫东, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药代动力学和中药学研究, email: wdchen@ahtcm.edu.cn

external standard method to verify the accuracy, repeatability and feasibility of QAMS method.

**Results** The HPLC fingerprints of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets were established. Totally 13 common peaks were marked. The similarity of HPLC fingerprints was above 0.95 for 10 batches of samples. The content of Rhubarb and sodium bicarbonate tablet samples from 10 manufacturers was significantly different. **Conclusion** The established HPLC fingerprints and QAMS can be used to evaluate the quality of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets.

**Key words:** Rhubarb and sodium bicarbonate tablet; HPLC; fingerprint; multi-components by single markers; quality control

大黄碳酸氢钠片是一种传统的中西药复方制剂, 主要成分为大黄、碳酸氢钠和薄荷油。该药具有健胃、抗酸作用, 主要适用于胃酸过多、消化不良、食欲不振等症状<sup>[1-3]</sup>, 因价格低廉、疗效确切, 广泛应用于临床, 被国家列为乙类非处方药。安徽省将其列入补充基本药物目录。大黄碳酸氢钠片的现标准收载于《卫生部药品标准》化学药品及制剂第一册, 定性仅有大黄及钠盐两项, 定量控制为电位滴定法测定碳酸氢钠, 未对方中大黄进行定量要求<sup>[4]</sup>。

复方制剂由于组方复杂, 不同药材又含有多种成分, 且药材的产地、采集、基原、炮制等也有明显差异, 因此复方制剂中有效成分复杂多样, 但单一成分的定量分析, 难以全面反映其质量。因此, 多指标成分分析评价已逐步应用于相关药品的质量控制<sup>[5]</sup>。大黄的成分及研究较多<sup>[6-8]</sup>, 但由于法定标准要求控制较低, 在检验过程中, 按标准检验均为合格品, 但实际上样品间差异性极大<sup>[9]</sup>, 可能其在原料采购投料生产工艺方面存在显著差异, 因此, 为了更好地控制大黄碳酸氢钠片的质量, 本实验利用 HPLC 法建立大黄碳酸氢钠片的指纹图谱, 同时采用一测多评(QAMS)法测定, 以大黄素为内参物, 同步测定大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚的含量, 为大黄碳酸氢钠片的整体质量评价和标准完善提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters e2695 液相色谱仪(美国沃特世公司), XPR 105 电子天平(0.1 mg/0.01 mg)(瑞士梅特勒托利多公司); Elma S120H 超声波清洗仪(德国艾尔玛公司)。

### 1.2 试剂

对照品大黄素(批号: 110756-200110, 纯度: 100%)、芦荟大黄素(批号: 110795-201308, 纯度: 97.80%)、大黄酚(批号: 110796-201118, 纯度:

99.5%)、大黄素甲醚(批号: 110758-201616, 纯度: 99.0%)、大黄酸(批号: 110757-200206, 纯度: 100%)(中国食品药品检定研究院), 乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯; 水为超纯水; 大黄碳酸氢钠片自安徽省市场上抽样品种, 样品 S1 ~ S10 来自 6 个省份 10 家生产企业。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 检测波长为 254 nm; 柱温 30 ℃; 进样量为 10 μL; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 流动相 A 为乙腈、流动相 B 为 0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱程序 0 ~ 35.0 min, 35.0%A; 35.0 ~ 40.0 min, 35.0% ~ 80.0%A; 40.0 ~ 41.0 min, 80.0% ~ 90.0%A; 41.0 ~ 45.0 min, 90.0% ~ 25%A<sup>[10]</sup>。在该色谱条件下, 理论塔板数按大黄素峰计算, 不低于 10 000, 各组分离度均大于 2.0, 色谱图见图 1。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别取大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸对照品适量, 精密称定, 加适量甲醇超声使其溶解并定量稀释制成单一对照品溶液, 其质量浓度分别为 0.4428、0.3623、0.1739、0.1867、0.2092 mg·mL<sup>-1</sup>, 再精密量取适量对照品溶液用甲醇稀释得到混合对照品溶液, 质量浓度分别为大黄素 44.28 μg·mL<sup>-1</sup>、芦荟大黄素 36.23 μg·mL<sup>-1</sup>、大黄酚 34.78 μg·mL<sup>-1</sup>、大黄素甲醚 18.67 μg·mL<sup>-1</sup>、大黄酸 20.92 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取样品适量研成细粉, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 超声 30 min, 取出放置室温, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.3 阴性样品溶液** 按大黄碳酸氢钠片处方工艺不加大黄, 制备阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。



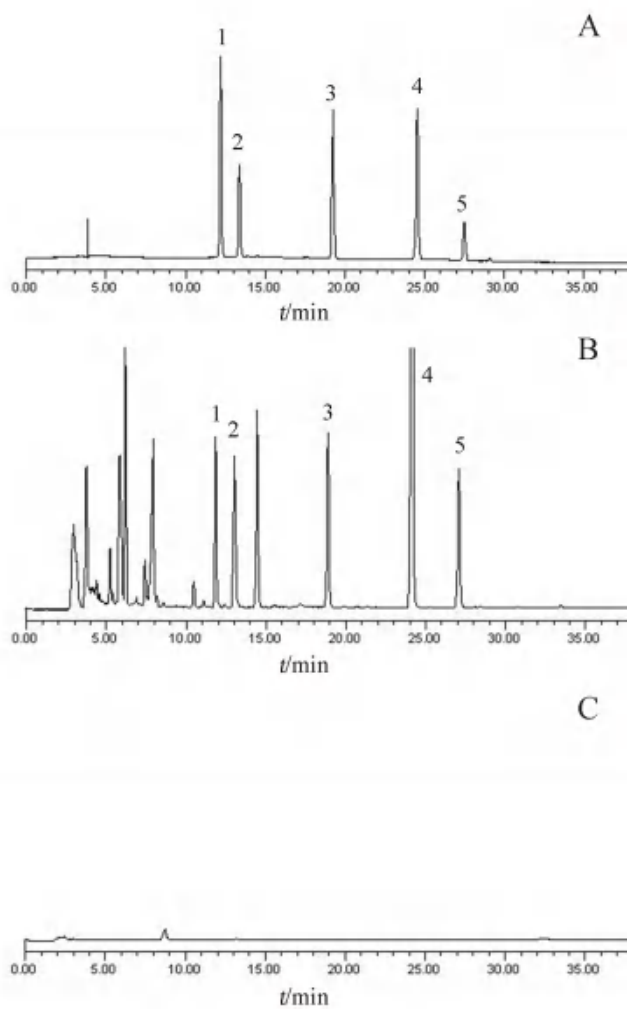


图 1 混合对照品 (A)、大黄碳酸氢钠片样品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A), Rhubarb and sodium bicarbonate tablets sample (B), and negative sample solution (C)

1. 芦荟大黄素 (aloe-emodin); 2. 大黄酸 (rhein); 3. 大黄素 (emodin); 4. 大黄酚 (chrysophanol); 5. 大黄素甲醚 (physcion)

### 2.3 指纹图谱建立

**2.3.1 精密度试验** 取同一混合对照品溶液, 在“2.1”项下的色谱条件下吸取 10  $\mu\text{L}$  进样测定 ( $n = 6$ ), 记录大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的峰面积, 计算相对峰面积的 *RSD* 值, 结果依次为 0.83%、0.94%、0.86%、0.89%、0.94%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在配制后 0、2、4、8、12、24 及 40 h 精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素峰面积的 *RSD* 依次为 0.55%、0.75%、0.63%、0.58%、0.37%, 表明供试品溶液在 40 h 内稳定性良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批供试品, 按“2.2.2”项

下方法制备供试品溶液, 平行制备样品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$  测定, 分别计算大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素峰面积的 *RSD*, 结果依次为 1.3%、1.6%、1.9%、2.2%、2.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.4 指纹图谱的建立** 取大黄碳酸氢钠片样品 (S1 ~ S10), 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件精密量取 10  $\mu\text{L}$  进样测定, 将所得的 10 批样品的色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版) 软件进行数据分析, 以 S1 为参照, 采用多点校正方式, 用平均数进行自动匹配, 生成指纹图谱和对照指纹图谱 (见图 2、3), 通过对 10 批次样品指纹图谱分析, 共标定出 13 个共有峰, 通过与混合对照品溶液的色谱图中保留时间进行比对, 确认了 5 个共有峰。峰 8、峰 9、峰 11、峰 12、峰 13 分别是芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 其中峰 11 分离度以及对称性良好, 作为参照峰 (S)。

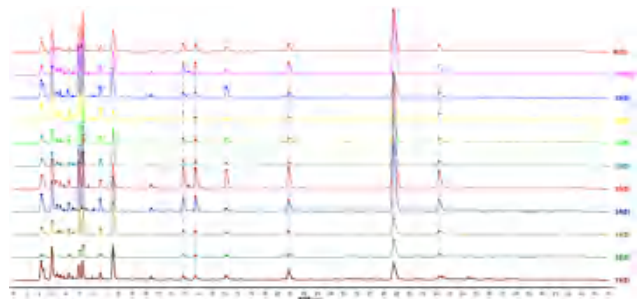


图 2 10 批大黄碳酸氢钠片 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets and its reference fingerprint (R)

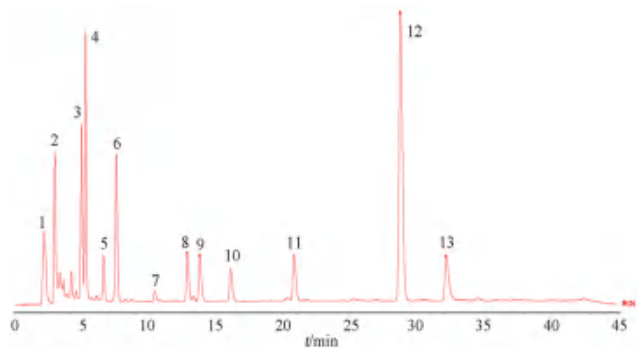


图 3 大黄碳酸氢钠片 HPLC 对照指纹图谱

Fig 3 HPLC reference fingerprint of Rhubarb and sodium bicarbonate tablets

1 ~ 7、10. 未知峰 (unknown peaks); 8. 芦荟大黄素 (aloe-emodin); 9. 大黄酸 (rhein); 11. 大黄素 (emodin); 12. 大黄酚 (chrysophanol); 13. 大黄素甲醚 (physcion)

**2.3.5 相似度评价** 将 10 批大黄碳酸氢钠片所测得的液相色谱图采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版) 软件进行相似度

的评价, 得 10 批样品和对照指纹图谱的相似度成分基本一致。以大黄素为参照物, 计算相对保留时间和相对峰面积, 见表 2。

表 1 10 批大黄碳酸氢钠片指纹相似度结果

Tab 1 Similarity of 10 batches of sample

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.944	0.950	0.958	0.964	0.939	0.949	0.927	0.964	0.963	0.960
S2	0.944	1.000	0.997	0.994	0.995	0.999	0.999	0.998	0.992	0.996	0.997
S3	0.950	0.997	1.000	0.998	0.998	0.997	0.997	0.994	0.998	0.998	0.999
S4	0.958	0.994	0.998	1.000	0.999	0.996	0.996	0.990	0.998	0.999	0.999
S5	0.964	0.995	0.998	0.999	1.000	0.996	0.997	0.991	0.998	1.000	1.000
S6	0.939	0.999	0.997	0.996	0.996	1.000	0.999	0.999	0.992	0.997	0.998
S7	0.949	0.999	0.997	0.996	0.997	0.999	1.000	0.998	0.993	0.998	0.999
S8	0.927	0.998	0.994	0.990	0.991	0.999	0.998	1.000	0.986	0.992	0.994
S9	0.964	0.992	0.998	0.998	0.998	0.992	0.993	0.986	1.000	0.998	0.997
S10	0.963	0.996	0.998	0.999	1.000	0.997	0.998	0.992	0.998	1.000	1.000
R	0.960	0.997	0.999	0.999	1.000	0.998	0.999	0.994	0.997	1.000	1.000

表 2 10 批大黄碳酸氢钠片共有峰的相对峰面积

Tab 2 Relative retention time and relative peak area of common peaks

No.	相对保留时间					相对峰面积				
	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
S1	0.618	0.663	1.000	1.381	1.555	0.131	0.295	1.000	1.499	0.964
S2	0.617	0.668	1.000	1.382	1.547	0.187	0.290	1.000	1.603	0.616
S3	0.617	0.662	1.000	1.383	1.548	0.101	1.341	1.000	2.448	1.094
S4	0.617	0.662	1.000	1.382	1.547	0.230	0.337	1.000	2.190	0.700
S5	0.617	0.662	1.000	1.383	1.547	0.231	0.403	1.000	2.479	0.790
S6	0.617	0.661	1.000	1.382	1.547	0.267	0.520	1.000	2.914	0.182
S7	0.617	0.662	1.000	1.382	1.547	0.142	1.682	1.000	4.898	1.410
S8	0.617	0.663	1.000	1.382	1.547	0.515	0.337	1.000	8.201	2.800
S9	0.616	0.661	1.000	1.383	1.548	0.376	0.461	1.000	2.508	1.332
S10	0.617	0.662	1.000	1.382	1.546	0.764	0.833	1.000	7.408	3.127
RSD/%	0.08	0.30	0.00	0.05	0.17	70.1	75.1	0.00	66.5	72.9

## 2.4 QAMS 测定 5 种成分含量

**2.4.1 线性关系考察** 取“2.2.1”项下的混合对照品溶液, 分别精密量取 1.0、2.0、3.0、5.0 和 10.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得到系列不同浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以溶液质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ) 绘制标准曲线, 进行线性回归分析, 结果见表 3, 可知各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

表 3 各成分线性关系

Tab 3 Linearity of various constituents

成分	回归方程	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$r$
大黄素	$Y = 7.644 \times 10^4 X - 3827.3$	4.424 ~ 44.24	0.9998
大黄酸	$Y = 9.041 \times 10^4 X - 929.3$	2.092 ~ 20.92	0.9998
大黄酚	$Y = 1.120 \times 10^5 X - 459.2$	3.478 ~ 34.78	0.9998
大黄素甲醚	$Y = 4.932 \times 10^4 X + 2.321 \times 10^4$	1.867 ~ 18.67	0.9994
芦荟大黄素	$Y = 1.079 \times 10^5 X + 2.850 \times 10^3$	3.622 ~ 36.22	0.9998

**2.4.2 加样回收试验** 取含量已知的供试品适量 (批号: 170903), 研成细粉, 精密称取 6 份, 每份约 0.25 g, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入“2.2.1”项下的混合对照品溶液 5 mL, 甲醇 20 mL, 按“2.2.2”项下方法平行制备, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚和芦荟大黄素的平均回收率分别为 100.7% ( $RSD = 2.2\%$ )、103.3% ( $RSD = 1.5\%$ )、103.5% ( $RSD = 1.2\%$ )、102.3% ( $RSD = 1.2\%$ )、99.1% ( $RSD = 1.9\%$ ), 表明该方法的回收率良好。

**2.4.3 相对校正因子计算** 吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 5、10、20、30、40、60  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以大黄素为参照物, 计算大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的相对校正因子 (RCF)。计算公式为  $f_{s/i} = A_s C_i / A_i C_s$ , 其中  $A_s$  为参照物

品峰面积,  $C_s$  大黄素对照品质量浓度,  $A_i$  为待测成分对照品峰面积,  $C_i$  为待测成分对照品质量浓度<sup>[11]</sup>。RSD 均小于 0.50%, 结果见表 4。

表 4 以大黄素为参照对其余 4 个成分的相对校正因子

进样体积/ $\mu\text{L}$	$f_{\text{大黄素/大黄酸}}$	$f_{\text{大黄素/大黄酚}}$	$f_{\text{大黄素/大黄素甲醚}}$	$f_{\text{大黄素/芦荟大黄素}}$
5	0.8404	0.6762	1.5158	0.6999
10	0.8367	0.6790	1.5158	0.7023
20	0.8401	0.6784	1.5138	0.7035
30	0.8388	0.6781	1.5095	0.7012
40	0.8370	0.6780	1.5043	0.7049
60	0.8368	0.6748	1.5048	0.7051
均值	0.8383	0.6774	1.5107	0.7028
RSD/%	0.20	0.23	0.35	0.30

**2.4.4 耐用性考察** 取“2.2.1”项下对照品混合溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 考察 Waters 2695、Agilent 1260、UItiMate 3000 高效液相色谱仪, 以及 Thermo Hypersil GOLD  $C_{18}$  (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Agilent Eclipse XDB- $C_{18}$  (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、依利特 Hypersil ODS2  $C_{18}$  (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱对相对校正因子的影响, 检测结果 RSD 均小于 2.5%, 表明不同仪器和色谱柱耐用性适用性良好, 结果见表 5。

表 5 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

色谱仪	色谱柱	相对保留值				
		大黄酸	大黄酚	大黄素甲醚	芦荟大黄素	
Thermo	Agilent Eclipse XDB $C_{18}$	0.8556	0.6823	1.5779	0.7170	
Fisher	Thermo Hypersil GOLD $C_{18}$	0.8603	0.6633	1.5550	0.7201	
	依利特 Hypersil ODS2 $C_{18}$	0.8744	0.6823	1.4919	0.7197	
	waters	Agilent Eclipse XDB $C_{18}$	0.8580	0.6563	1.5286	0.6909
waters	Thermo Hypersil GOLD $C_{18}$	0.8535	0.6645	1.5936	0.7062	
	依利特 Hypersil ODS2 $C_{18}$	0.8797	0.6480	1.5551	0.6987	
	Agilent	Agilent Eclipse XDB $C_{18}$	0.8743	0.6806	1.5292	0.7254
Agilent	Thermo Hypersil GOLD $C_{18}$	0.8648	0.6747	1.5868	0.7176	
	依利特 Hypersil ODS2 $C_{18}$	0.8982	0.6805	1.5563	0.7164	
	平均值	—	—	—	—	
RSD/%	—	—	1.7	1.9	2.1	1.6

**2.4.5 色谱峰定位** 在“2.2.1”项下的供试品溶液, 分别采用 3 种液相色谱仪和 3 种品牌的色谱柱计算相对保留时间, 以大黄素出峰时间为内标, 考察其他 4 种成分在不同色谱仪、色谱柱下与内标的相对保留比, 结果见表 6, 可知色谱仪与色谱柱对组分检出的保留时间均无明显影响。

表 6 各成分相对保留值

色谱仪	色谱柱	相对保留值			
		大黄酸	大黄酚	大黄素甲醚	芦荟大黄素
Thermo Fisher	Agilent $C_{18}$	0.6590	1.3834	1.5485	0.6127
	Thermo $C_{18}$	0.6962	1.3271	1.4822	0.6343
	依利特 $C_{18}$	0.6879	1.3431	1.5228	0.6320
waters	Agilent $C_{18}$	0.6707	1.4025	1.5696	0.6237
	Thermo $C_{18}$	0.6885	1.3308	1.4880	0.6238
	依利特 $C_{18}$	0.6809	1.3463	1.5286	0.6223
Agilent	Agilent $C_{18}$	0.6693	1.3606	1.5682	0.6022
	Thermo $C_{18}$	0.6799	1.4019	1.5096	0.6166
	依利特 $C_{18}$	0.6713	1.3623	1.5522	0.6132
平均值	—	0.6782	1.3620	1.5300	0.6201
RSD/%	—	1.7	2.1	2.1	1.6

**2.4.6 外标法与 QAMS 的含量测定结果** 取大黄碳酸氢钠片 (S1 ~ S10), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 分别采用外标法和 QAMS 计算含量, 结果见表 7, 可知两种方法无显著差异。不同生产企业样品中的总含量最高为 1.435 mg/片, 最低为 0.231 mg/片, 表明不同企业生产的大黄碳酸氢钠片的含量差异性显著, 见图 4。

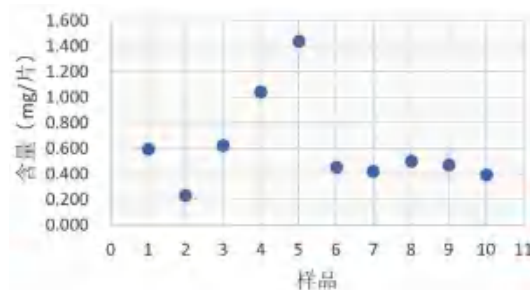


图 4 不同企业样品含量离散图

Fig 4 Discrete graph of sample content in different enterprises

### 3 讨论

中药指纹图谱是一种多指标质量控件模式, 可通过表征中药复杂成分及其内在质量的关系来较全面地反映所含化学成分的种类和数量, 从而反映药品的质量, 在中药制剂的质量评价中广泛应用<sup>[12-14]</sup>。本研究所建立的大黄碳酸氢钠片 HPLC 指纹图谱, 可反映大黄碳酸氢钠片的整体性和特异性, 结合 QAMS 与外标法测定各成分的含量, 结果表明两者没有显著性差异, 指纹图谱法与 QAMS 联合可更全面地评价药品质量<sup>[15]</sup>。通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)进行匹配, 共有 13 个成分能完全匹配, 5 个色谱峰能确认, 各共有峰相对



表 7 QAMS 与外标法测定大黄碳酸氢钠片各成分的含量

Tab 7 Content of components in Rhubarb and sodium bicarbonate tablets by QAMS and external reference method

序号	大黄素 / (mg·g <sup>-1</sup> )			大黄酸 / (mg·g <sup>-1</sup> )			大黄素甲醚 / (mg·g <sup>-1</sup> )			芦荟大黄素 / (mg·g <sup>-1</sup> )			
	外标法	QAMS	RAD/ %	外标法	QAMS	RAD/ %	外标法	QAMS	RAD/ %	外标法	QAMS	RAD/ %	
S1	0.2114	0.1654	0.1616	1.17	1.1056	1.0845	0.96	0.3629	0.3722	-1.27	0.1434	0.1420	0.52
S2	0.0657	0.0302	0.0293	1.51	0.4835	0.4592	2.58	0.1410	0.1573	-2.04	0.0371	0.0367	0.53
S3	0.2604	0.2076	0.2034	1.03	0.9630	0.9466	0.86	0.4008	0.4098	-1.10	0.1636	0.1621	0.46
S4	0.3592	0.2634	0.2588	0.88	1.8465	1.8199	0.73	0.7519	0.7509	0.07	0.2121	0.2103	0.43
S5	0.3590	0.2660	0.2614	0.87	2.5551	2.5187	0.72	0.8637	0.8566	0.41	0.2404	0.2382	0.46
S6	0.1216	0.0911	0.0880	1.73	0.8498	0.8264	1.40	0.2604	0.2712	-2.03	0.0936	0.0923	0.71
S7	0.1302	0.0889	0.0860	1.67	0.7573	0.7374	1.33	0.2331	0.2454	-2.57	0.0903	0.0892	0.61
S8	0.0648	0.0803	0.0761	2.68	0.8763	0.8367	2.31	0.2952	0.2993	-0.69	0.1168	0.1128	1.75
S9	0.1879	0.1854	0.1809	1.24	0.7379	0.7226	1.05	0.3454	0.3551	-1.38	0.1279	0.1265	0.54
S10	0.2864	0.2151	0.2110	0.97	1.3529	1.3314	0.80	0.4488	0.4559	-0.78	0.1589	0.1576	0.41

保留时间的 *RSD* 差异很小, 但相对峰面积的 *RSD* 相差极大, 表明不同厂家生产的大黄碳酸氢钠片中的成分虽一致, 但含量存在显著差异。若企业采用大黄饮片投料, 提取率为 100%, 每片含大黄 0.15 g, 参照 2020 年版《中国药典》一部中大黄饮片的游离蒽醌含量为不得少于 0.35%, 进行换算, 样品中的游离蒽醌的含量应不少于 0.525 mg/片, 10 家企业中仅有 4 家符合, 6 家不符合要求。通过相似度评价及结合定量分析, 表明不同生产企业的原料及生产工艺可能存在差异, 部分企业有掺假、或减少了投样量、用劣质药材非合格饮片或原料提取后再使用嫌疑。

#### 4 结论与建议

大黄碳酸氢钠片的现行标准不能有效控制产品质量, 质量状况一般, 建议尽快提高现行质量标准, 增加大黄定量测定检测项目; 生产企业必须把确保原药材质量放在首位, 进一步强化原药材的购进、检验和投料等环节的质量管理; 监管部门应加强对该品种的生产监管及市场监督。

#### 参考文献

[1] 金鹏, 吴旭. 大黄碳酸氢钠片评价性抽验结果及质量评价 [J]. 中国药物评价, 2017, 34 (4): 300-304.  
 [2] 薛晓会, 范荣, 冯鹏飞. 大黄碳酸氢钠片的含量测定 [J]. 海峡药学, 2018, 30 (8): 70-72.  
 [3] 曾玉梅, 刘志辉, 陈繁华, 等. 大黄碳酸氢钠片中大黄及薄荷油的质量控制研究 [J]. 中国药物评价, 2019, 36 (1): 21-25.

[4] 中华人民共和国卫生部. 药品标准: 化学药品及制剂 (第一册) [S]. 1989: 8.  
 [5] 符海邨, 张倩睿, 熊蕊, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展 [J]. 中国药师, 2022, 25 (5): 861-867.  
 [6] 中国药典 2020 版. 一部 [S]. 2020: 24-25.  
 [7] 蒋范任, 王伟, 肖正贤, 等. 反相高效液相色谱法同时测定清泻丸中 8 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2022, 20 (6): 1422-1425.  
 [8] 周燕霞, 毛坤军, 周慧云, 等. 大黄通便胶囊中 5 种蒽醌类化合物的含量测定 [J]. 广州化工, 2018, 46 (22): 79-81.  
 [9] 杨亚婷, 王嫦鹤, 王菽璇. 大黄碳酸氢钠片总蒽醌含量测定及指纹图谱研究 [J]. 西北药学, 2020, 35 (1): 45-48.  
 [10] 吴勇, 刘燕, 陈卫东, 等. 高效液相色谱法同时测定大黄碳酸氢钠片中 5 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2019, 17 (10): 1718-1720.  
 [11] 谢百波, 苏加乐, 里艳茹, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱及一测多评法的复方珍珠解毒口服液质量评价 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1639-1643.  
 [12] 郭庆, 许东亚, 程世云. 肺宁颗粒高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2019, 17 (10): 1695-1698.  
 [13] 徐妍, 杨华蕊, 杨永寿, 等. 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (76): 91-94.  
 [14] 符海邨, 张倩睿, 熊蕊, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药质量评价中的应用进展 [J]. 中国药师, 2022, 25 (5): 861-867.  
 [15] 刘紫璇, 吴样明, 蒋鑫铖, 等. 基于指纹图谱及一测多评法的芍药甘草汤物质基准质量评价研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2384-2389.

(收稿日期: 2022-10-01; 修回日期: 2022-11-09)

# 基于指纹图谱结合化学模式识别的前胡和紫花前胡分类模型的建立

刘英慧<sup>1</sup>, 刘海涛<sup>2\*</sup>, 付小艳<sup>3</sup> (1. 湖南食品药品职业学院, 长沙 410208; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 3. 长沙医学院, 长沙 410219)

**摘要:** **目的** 基于前胡和紫花前胡指纹图谱结合化学模式识别技术, 建立前胡和紫花前胡的分类识别模型。**方法** 采用高效液相色谱法, 以 Venusil C<sub>18</sub> Plus (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 以乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相梯度洗脱; 检测波长 334 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30℃; 进样量 10 μL。采用聚类分析、主成分分析、样本判别分析等化学模式识别方法对数据进行分析。**结果** 结合化学模式识别方法对同步建立的前胡和紫花前胡的 HPLC 指纹图谱数据分析表明, 收集到的 18 批样本基本分为三类: 前胡、紫花前胡以及其他。**结论** 所建立的指纹图谱结合化学模式识别的方法可靠、简单易行, 建立的分类识别模型可有效区分前胡和紫花前胡, 并为两者各自的质量控制提供依据和参考。

**关键词:** 前胡; 紫花前胡; 高效液相色谱; 指纹图谱; 化学模式识别

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0790-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.039

## Classification and recognition model for *Peucedanum praeruptorum* Dunn and *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. based on fingerprints combined with chemical patterns

LIU Ying-hui<sup>1</sup>, LIU Hai-tao<sup>2\*</sup>, FU Xiao-yan<sup>3</sup> (1. Hunan Food and Drug Vocational College, Changsha 410208; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 3. Changsha Medical University, Changsha 410219)

**Abstract: Objective** To establish the classification and recognition model for *Peucedanum praeruptorum* Dunn and *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. based on HPLC fingerprints combined with chemical patterns. **Methods** Venusil C<sub>18</sub> Plus (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with mobile phase consisting of acetonitrile and water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30℃ and the detection wavelength was 334 nm. Cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis were conducted. **Results** The synchronously established HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition showed that 18 batches of samples included 3 kinds: *Peucedanum praeruptorum* Dunn, *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. and others. **Conclusion** HPLC fingerprints combined with chemical pattern recognition is reliable and simple. The established classification and recognition model can distinguish *Peucedanum praeruptorum* Dunn and *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim., and also can provide reference for their quality control.

**Key words:** *Peucedanum praeruptorum* Dunn; *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim.; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (No.18C1509)。

作者简介: 刘英慧, 女, 硕士, 讲师, 主管药师, 主要从事中药质量控制方面的研究, email: 12liuhui@163.com \*通信作者: 刘海涛, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学与药物质量控制方面的研究, email: sdhwht@126.com

前胡始载于《名医别录》，被列为中品：“味苦，微寒，无毒。主治痰满，胸胁中痞，心腹结气，风头痛，去痰实，下气。治伤寒热，推陈致新，明目，益精”<sup>[1]</sup>。《中国药典》首次收载前胡时记载其来源为伞形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 或紫花前胡 *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. 的干燥根。2020 年版《中国药典》中前胡的基源植物定为白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 一种，而紫花前胡 *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. 则作为当归属药材单列<sup>[2]</sup>。

前胡药用历史悠久，历来为痰气要药，临床应用广泛，地区用药也较为复杂，有文献报道在我国、日本、朝鲜、韩国等东亚国家，有伞形科 16 属的 40 多种植物当作前胡使用<sup>[3]</sup>。其中以紫花前胡最具有代表性，并且在近代以来很长一段时期内对紫花前胡代前胡用亦予认可。前者在我国广西、贵州、浙江、福建等地区多见，主要生长于山坡林缘或半阴性的山坡草丛中。后者则广泛分布于湖南、江西、山东、两广等地<sup>[4]</sup>，两者在分布地域上出现重叠，药材饮片性状相似，在药典中功效表述一致，这也不免为临床应用中将两者的混用提供依据<sup>[5]</sup>，但文献分析表明，两者在化学成分上有较大区别<sup>[6-9]</sup>，前胡主要含有角型吡喃香豆素如白花前胡甲素、白花前胡乙素等，紫花前胡主要含有线型呋喃香豆素类成分。另有系统的分子生物学研究表明紫花前胡应列为当归属植物<sup>[10]</sup>，现行药典也是将其作为当归属植物单列<sup>[2]</sup>，故厘清两者对用药安全有效有着十分重要的意义。

目前，大多数文献都是关于前胡或紫花前胡的含量测定，对两者全面综合的质量控制研究较少。为了更好地区分前胡和紫花前胡，并进行各自的质量控制，本文采用指纹图谱结合化学模式识别方法<sup>[11-13]</sup>对于前胡和紫花前胡药材进行系统性地研究，作为药材鉴定和质量控制的方法，为两者的真实性和稳定性提供理论依据，从而为科学、全面地制订质量控制标准提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); YQ-620C 超声波清洗器 (上海易净超声波仪器有限公司); MS205DU 电子分析天平 (十万分之一) [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]; YP5001 电子天平 (上海光正医疗仪器有限公司); FW177 中草

药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 试药

白花前胡甲素对照品 (批号: 111711-201904, 纯度: 99.4%)、白花前胡乙素对照品 (批号: 111904-201804, 纯度: 98.9%)、紫花前胡苷对照品 (批号: 111821-201604, 纯度: 99.6%) (中国食品药品检定研究院); 甲醇 (色谱纯, Tedia Company USA); 其他试剂为分析纯; 纯化水为中南大学湘雅医院自制。

18 批样品药材或饮片, 均经中南大学湘雅医院刘海涛药师鉴定, 其中 S18 为前胡对照药材粉末, 具体信息见表 1。

表 1 样本信息

Tab 1 Sample information

样品	标注品种	鉴定品种	产地/来源	编号或购买(采挖)时间
S1	紫花前胡	紫花前胡	湖南大围山	201907
S2	前胡	前胡	重庆	201912
S3	前胡	前胡	浙江磐安	20201028
S4	前胡	待定	广东	20201015
S5	前胡	前胡	四川泸州	20200113
S6	紫花前胡	紫花前胡	江西明月山	202010
S7	前胡	前胡	浙江	20210721
S8	前胡	前胡	贵州	20210702
S9	前胡	待定	贵州兴文	20201028
S10	前胡	待定	云南	202010
S11	前胡	待定	湖南	20190501
S12	前胡	前胡	湖南	20200301
S13	前胡	前胡	浙江	20201010
S14	前胡	待定	贵州	20210723
S15	前胡	前胡	浙江	20210620
S16	前胡	待定	湖南	20210723
S17	紫花前胡	紫花前胡	湖南大围山	201909
S18	前胡对照药材	前胡	中国食品药品 检定研究院	201706

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil C<sub>18</sub> Plus (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~10 min, 20%~30%A; 10~20 min, 30%~50%A; 20~40 min, 50%~60%A; 40~50 min, 60%~70%A; 50~70 min, 70%A; 70~80 min, 70%~90%A); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 334 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取白花前胡甲素 20.90 mg、白花前胡乙素 19.06 mg、紫花前胡苷 17.90 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加



70% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得白花前胡甲素、白花前胡乙素、紫花前胡苷对照品溶液。分别精密称取三种对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为紫花前胡苷  $57.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白花前胡甲素  $66.88 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、白花前胡乙素  $60.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取药材或饮片粉末约 1 g, 精密称定。置于具塞锥形瓶中, 精密量取 25 mL 的 70% 甲醇加入锥形瓶内, 称重, 超声处理 30 min, 冷却, 再称定锥形瓶重量, 用 70% 甲醇补足重量, 滤过, 精密量取续滤液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 即用微孔滤膜 ( $0.45 \mu\text{m}$ ) 过滤, 即得供试品溶液。

### 2.3 指纹图谱方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取同一份紫花前胡药材供试品溶液 (S17), 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以紫花前胡苷为参照峰, 结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 均  $< 2.2\%$ , 相对保留时间 *RSD* 均  $< 0.29\%$ , 表明仪器精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取同一份前胡药材供试品溶液 (S17), 分别于 0、3、6、10、16、19、22、24 h 进样测定, 记录色谱图, 以紫花前胡苷为参照峰, 结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 均  $< 2.7\%$ , 相对保留时间 *RSD* 均  $< 0.24\%$ , 表明供试品溶液在室温条件下放置 24 h 内稳定。

**2.3.3 重复性试验** 取同一份前胡药材按照确定的方法平行制备供试品溶液 6 份 (S17), 分别进样分析, 记录色谱图, 以紫花前胡苷为参照峰, 结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 均  $< 2.8\%$ , 相对保留时间 *RSD* 均  $< 0.27\%$ , 说明该仪器方法重复性良好。

### 2.4 指纹图谱建立及色谱峰确认

将 18 批样品按照“2.2.2”项下方法制备, 在“2.1”项色谱条件下进样, 记录其色谱图。将得到的图谱数据以 AIA 格式导出, 并将 18 批样品的色谱图分别导入相似度计算软件中, 得到全部样品的指纹图谱 (见图 1A), 结合性状鉴别和化学模式识别结果对所有图谱进行分析, 分别以 S18 和 S6 为参照图谱, 采用多点校正法进行色谱峰匹配, 选择平均数法分别建立了前胡和紫花前胡各自的共有模式, 其中前胡共有峰 19 个, 紫花前胡共有峰 14 个 (见图 1B 和图 1C)。混合对照品色谱图见图 2。

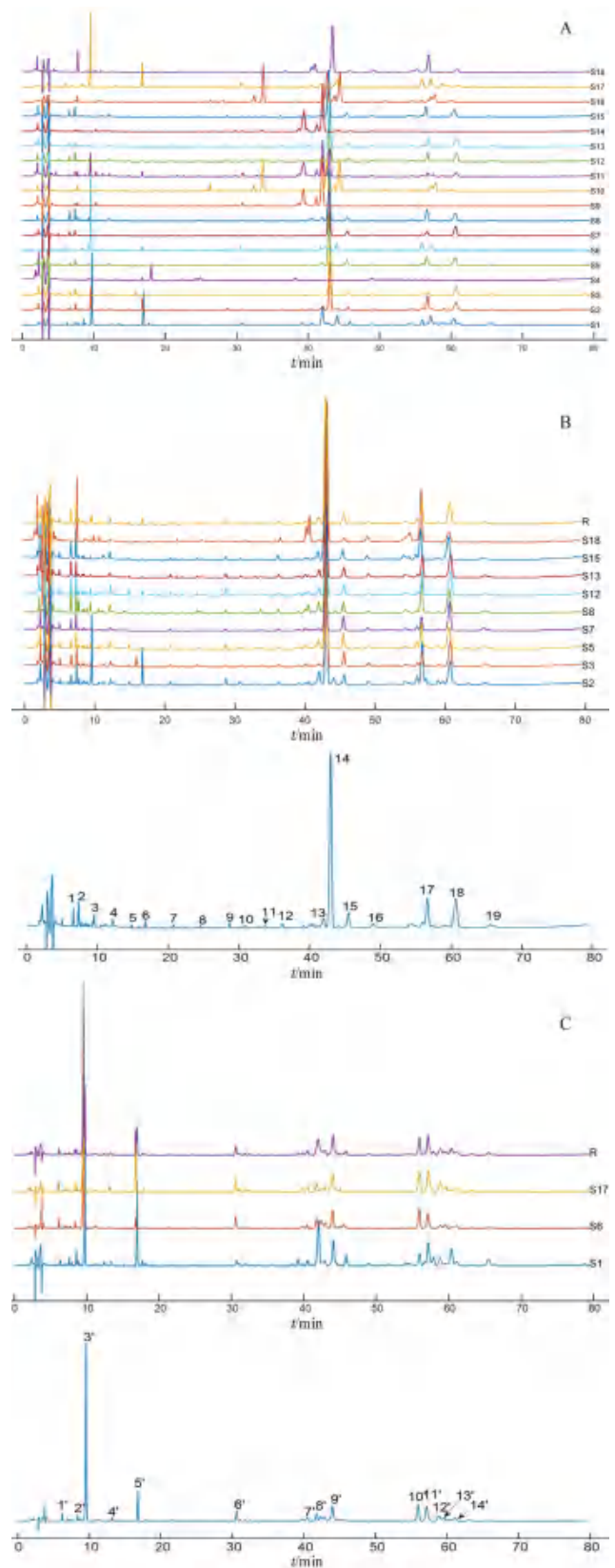


图 1 18 批样本的 HPLC 叠加指纹图谱 (A), 前胡叠加指纹图谱及对照指纹图谱 (B), 紫花前胡叠加指纹图谱及对照指纹图谱 (C)  
Fig 1 HPLC superposed fingerprint of 18 batches of sample (A), superposed fingerprint and referential fingerprint of *Peucedanum praeruptorum* Dunn (B), and superposed fingerprint and referential fingerprint of *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim. (C)

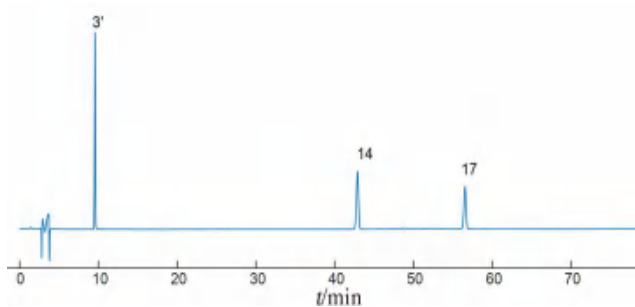


图 2 混合对照品的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference

3'. 紫花前胡苷 (nodakenetin); 14. 白花前胡甲素 (praeruptorin A); 17. 白花前胡乙素 (praeruptorin B)

2.5 相似度评价

采用中药指纹图谱相似度评价软件 (2012 版) 将“2.4”项下所得指纹图谱对 18 批样品进行初步的相似度评价。结果表明, 18 批样品差异较大, 相似度在 0.451 ~ 0.794, 说明在同色谱条件下, 前胡和紫花前胡的指纹图谱区别明显; 其中经性状鉴定为白花前胡和紫花前胡各自的相似度计算结果见表 2 和表 3。

2.6 聚类分析

将 18 批样本的色谱图以 CSV 的格式导出, 将全成分的保留时间和峰面积的数据归整并导入

表 2 白花前胡相似度计算结果

Tab 2 HPLC fingerprints similarity of *Peucedanum praeruptorum* Dunn

样品	S18	S8	S7	S12	S5	S13	S15	S3	S2	对照指纹图谱
S18	1	0.892	0.917	0.915	0.940	0.930	0.936	0.909	0.926	0.956
S8	0.892	1	0.951	0.975	0.932	0.901	0.861	0.929	0.897	0.953
S7	0.917	0.951	1	0.992	0.964	0.956	0.937	0.994	0.954	0.989
S12	0.915	0.975	0.992	1	0.956	0.938	0.915	0.983	0.950	0.985
S5	0.94	0.932	0.964	0.956	1	0.992	0.972	0.956	0.928	0.986
S13	0.93	0.901	0.956	0.938	0.992	1	0.985	0.950	0.921	0.978
S15	0.936	0.861	0.937	0.915	0.972	0.985	1	0.936	0.921	0.965
S3	0.909	0.929	0.994	0.983	0.956	0.950	0.936	1	0.964	0.984
S2	0.926	0.897	0.954	0.950	0.928	0.921	0.921	0.964	1	0.966
对照指纹图谱	0.956	0.953	0.989	0.985	0.986	0.978	0.965	0.984	0.966	1

表 3 紫花前胡相似度计算结果

Tab 3 HPLC fingerprints similarity of *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim.

样品	S1	S6	S17	对照指纹图谱
S6	1	0.930	0.674	0.971
S1	0.930	1	0.644	0.972
S17	0.674	0.644	1	0.773
对照指纹图谱	0.971	0.965	0.773	1

SPSS 23.0 分析软件中进行聚类分析, 采用系统聚类法, 选择组间均联法, 以平方欧氏距离为测度, 对样本进行聚类分析, 结果见图 3。

2.7 主成分分析

同样将 18 个样本的指纹图谱的色谱峰经手动调整, 去掉前 5 min 的溶剂峰, 将其余的所有全成分色谱峰数据作为分析的数据源全部纳入评价, 利用 Matlab 软件进行主成分分析, 结果见表 4; 共提取出 6 个主成分, 累计方差贡献率为 84.57%, 特征值均大于 3, 可用于表征前胡和紫花前胡以区分两者。通过选取前三个主成分绘制主成分图, 见图 4。

2.8 样本判别分析

在上述无监督学习基础上, 分别通过确定的

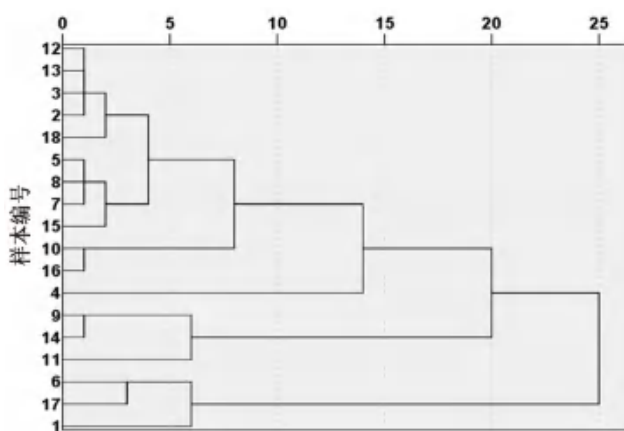


图 3 18 批样本聚类分析谱系

Fig 3 Cluster family correlation of 18 batches of samples

表 4 样本主成分分析特征值及方差贡献率

Tab 4 Principal component eigenvalues and cumulative variance contribution rate of samples

成分	特征值	方差贡献率 /%	累积方差贡献率 /%
1	21.74	32.89	32.89
2	12.97	19.62	52.51
3	7.78	11.77	64.28
4	5.12	7.76	72.04
5	4.78	7.23	79.28
6	3.50	5.30	84.57

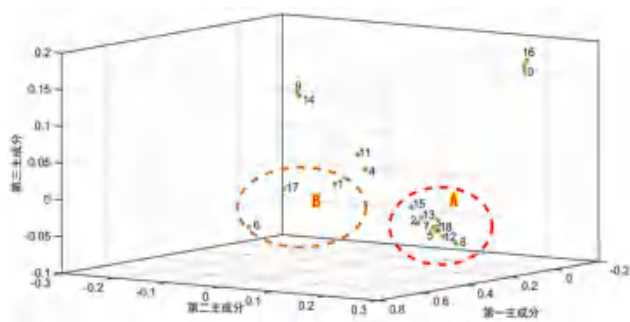


图 4 18 批样品主成分分析得分图  
Fig 4 PCA scores of 18 batches of samples

前胡和紫花前胡样本为参考，对其他样本进行类别判别。本文将所建立的指纹图谱的全成分色谱峰进行手动调整，将 5 min 之前的溶剂信号峰去掉，保留了其他的成分峰，并将其全部纳入

评价体系，这样避免了仅采用共有峰的峰面积进行计算对图谱间相关性的影响而忽略了其他非共有峰贡献。分别采用了皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient, PC)、欧氏夹角余弦 (euclidean cosine, EC)、欧氏夹角余弦平方 (squared euclidean cosine, SEC)、一阶差分欧氏夹角余弦平方 (squared first difference euclidean cosine, SFEC) 等方法<sup>[14]</sup>，对样本的类别进行判别。首先以 6 号样本 (课题组赴江西明月山采挖且经性状鉴定为紫花前胡) 为参考，样本相关性分析结果显示样本 1、17 同参考样本 6 相关性良好 (样本 1 和 17 为课题组于不同时间赴湖南大围山采挖的紫花前胡)，其余样本与其相关性均较差，结果见图 5。

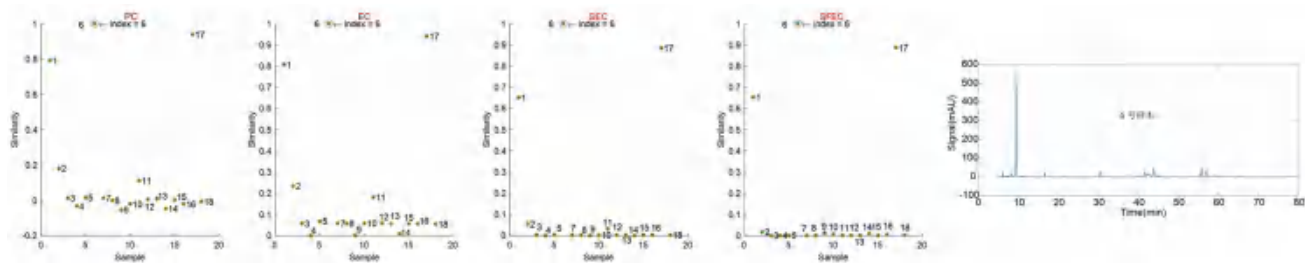


图 5 相关性分析结果 (6 号样本为参考)  
Fig 5 Correlation analysis (index = 6)

同样方法以样本 18 为参考样本进行相关性分析，结果显示样本 2、3、5、7、8、12、13、15 与其相关性良好，而样本 10、11、16 与其相

关性较差，样本 1、4、6、9、14、17 与其相关性则更差，结果见图 6。

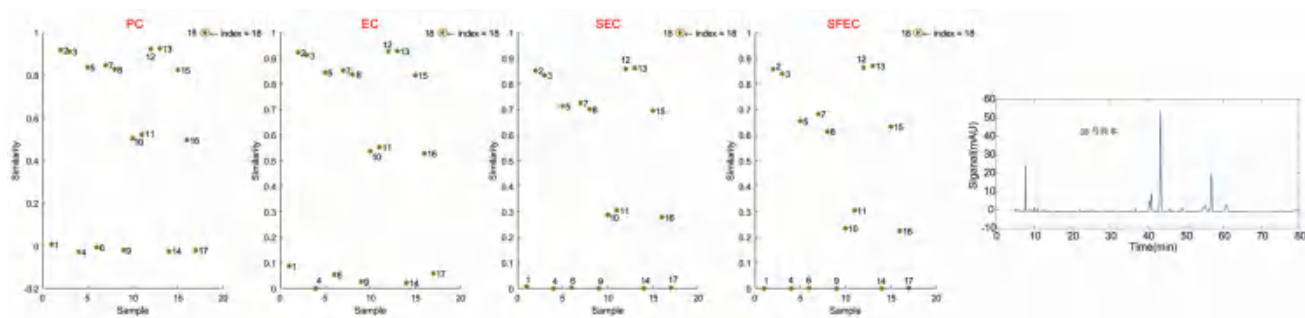


图 6 相关性分析结果 (18 号样本为参考)  
Fig 6 Correlation analysis (index = 18)

### 3 讨论

#### 3.1 提取方法的考察

本试验对样品提取方法 (超声提取法和回流提取法)，提取溶剂 (氯仿、甲醇、乙醇) 进行考察，确定了甲醇超声提取，并对不同浓度 (50%、70%、80%、90% 和 100%) 甲醇以及超声时间 (20 min、30 min) 考察，最终确定为 70% 甲醇超声提取 30 min。

#### 3.2 色谱条件的考察

为了得到能够同时适用于前胡和紫花前胡的色谱条件，本试验对指纹图谱测定的色谱条件进行优化。通过查阅 2020 年版《中国药典》，紫花前胡和白花前胡的含量测定均使用了 C<sub>18</sub> 柱，故选用 C<sub>18</sub> 柱为色谱柱。因为化合物分离需考虑柱效分离的效果，所以考察了 Welchrom C<sub>18</sub>、Agilent C<sub>18</sub> 和 Venusil C<sub>18</sub> 色谱柱。根据分离度好，峰形好，保留时间适宜等考虑最终确定了 Venusil C<sub>18</sub> 柱。对于药典中采用甲醇-水 (40:60) 作为



流动相, 通过流动相考察发现并不理想, 所以改用乙腈-水作为流动相, 进行梯度洗脱, 分离度较好。对于检测波长的选择, 在 334 nm 处紫花前胡苷吸收最好, 在 321 nm 处白花前胡甲素和白花前胡乙素吸收最好, 经试验, 比较了 5 个不同检测波长下 (254、280、321、334、360 nm) 的图谱, 发现在 334 nm 波长下得到的色谱峰信息最多, 综合考虑, 确定以 334 nm 作为检测波长。

### 3.3 化学模式识别方法的分析

聚类分析结果显示, 取  $d = 5$  时共聚为 7 类, 第一类 (前胡): 2、3、5、7、8、12、13、15、18; 第二类: 10、16; 第三类: 4; 第四类: 9、14; 第五类: 11; 第六类 (紫花前胡): 6、17; 第七类 (紫花前胡): 1。而  $d = 10$  时, 则 1、6、17 为一类, 但此时样本 10 和 16 则对前胡样本的聚类存在干扰, 此时应结合其他化学计量学方法进行综合判断。主成分分析结果表明: A 区域为前胡品种; B 区域为紫花前胡品种, 但样本之间相对远离, 考虑因药材采收时间不同, 其成分及含量可能存在差异所导致, 这也在一定程度上反映了采收时间对于药材质量的影响。其他样本 4、9、10、11、14、16 均远离这两个区域, 能够和前胡及紫花前胡区分开来, 具体品种仍需进一步研究。样本判别分析结果表明: 将全色谱峰作为数据源进行分析, 结果显示均能正确进行类别的判别, 以 6 号紫花前胡作为参考时能够将 1 号和 17 号样本识别为一类。以 18 号前胡对照药材作为参考时, 经鉴定为前胡品种的样本 2、3、5、7、8、12、13、15 等能够被准确识别为同类, 而未确证来源的样本 10、11、16 则与其距离较远, 未确证来源或者已鉴定为紫花前胡的样本 1、4、6、9、14、17 与其距离则更远, 非常直观地体现了不同样本间的差别。以上分析结果基本一致, 能够将样本分为三类: 前胡、紫花前胡、其他。故本研究同步建立的指纹图谱既能够有效区分前胡和紫花前胡, 同时又可为两者单独的质量控制提供参考。

### 4 结论

长期以来, 在临床实践中白花前胡和紫花前胡都被用作前胡的药材来源, 两者饮片性状特征具有一定的混淆性。目前市面上销售的前胡药材除了药典收载的前胡之外, 仍有紫花前胡混作药用, 当中还不乏其他前胡同科属的混伪品, 这将导致前胡药材质量的不稳定性。

本实验对数批市面上购买到的和课题组自行采挖到的前胡以及紫花前胡样本进行了研究, 通过高效液相色谱法同时建立了两者的指纹图谱, 并结合化学模式识别方法进行分析, 结果基本一致, 揭示了前胡和紫花前胡指纹图谱存在差异, 建立了能够区分两者的分类模型, 并为今后各自的质量控制以及前胡其他混伪品的研究提供依据。但也存在因时间问题, 样本量采集数量有限, 后续会进一步扩大样本量对建立的方法进行验证, 为前胡质量控制以及质量标准的制订提供更为详实的参考依据。

### 参考文献

- [1] (梁)陶弘景集尚志钧辑校. 名医别录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 122.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 277, 352.
- [3] 饶高雄, 孙汉董, 林中文, 等. 中药前胡的本草考证和现代品种论述 [J]. 云南中医学院学报, 1995, 18 (1): 1-6.
- [4] 张琳, 邓亦麒, 谢登峰, 等. 前胡和紫花前胡在中国的潜在分布区预测 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2017, 54 (3): 641-647.
- [5] 单锋, 郝近大, 黄璐琦. 2010 年版《中国药典》中“紫花前胡”功效描述的商榷 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (12): 2464-2469.
- [6] 张村, 李丽, 肖永庆, 等. 白花前胡中香豆素类成分的分析 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26 (9): 1995-1997.
- [7] 刘定平. 白花前胡的化学成分研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [8] 孔令义. 中药前胡物质基础的系统研究 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41 (3): 203-207.
- [9] 廖志超, 姜鑫, 田文静, 等. 紫花前胡中化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (15): 2999-3003.
- [10] 刘春生, 王朋义, 陈自泓, 等. 紫花前胡分类位置修订的分子基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (18): 1488-1490.
- [11] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48 (20): 4339-4345.
- [12] 于洋, 李军, 李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药, 2018, 40 (5): 1139-1142.
- [13] 孙国祥, 闫波, 侯志飞, 等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 13 (7): 673-681.
- [14] Samuel AZ, Mukojima R, Horii S, et al. On selecting a suitable spectral matching method for automated analytical applications of Raman spectroscopy [J]. ACS Omega, 2021, 6 (3): 2060-2065.

(收稿日期: 2022-08-16; 修回日期: 2022-09-14)

## 不同产地红芪指纹图谱的构建及 6 种活性成分的测定

焦洁<sup>1,2</sup>, 郑旭<sup>1,2</sup>, 胡萌萌<sup>1,2</sup> (1. 陕西省食品药品检验研究院, 西安 710065; 2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 西安 710065)

**摘要:** **目的** 建立不同产地红芪指纹图谱及 6 种活性成分的含量测定方法, 并对不同部位、不同产地、不同批次红芪样品进行对比研究。**方法** 采用 HPLC 进行多成分含量测定, 运用 2012 版指纹图谱相似度软件建立不同产地、批次指纹图谱。**结果** 建立了红芪中阿魏酸、异阿魏酸、香草酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷 6 种成分的色谱条件及 HPLC 指纹图谱方法, 其中共有峰 21 个。含量测定结果表明红芪药用部位须根部含量高于根部, 不同批次武都红芪产地药材质量优于其他产地。**结论** 建立的不同产地红芪指纹图谱及 6 种活性成分的测定方法简单、可靠, 可用于后期红芪的质量控制。

**关键词:** 红芪; 指纹图谱; 高效液相色谱; 活性成分; 不同产地

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0796-04

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.040

## Construction of fingerprints of Hedysari Radix from different areas and determination of 6 active components

JIAO Jie<sup>1,2</sup>, ZHENG Xu<sup>1,2</sup>, HU Meng-meng<sup>1,2</sup> (1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065; 2. State Drug Administration Key Laboratory of Drug Microbiological Detection Technology, Xi'an 710065)

**Abstract: Objective** To establish the fingerprints of Hedysari Radix from different areas determine 6 active components, and compare the samples from different parts, areas and batches of Hedysari Radix by the established HPLC method. **Methods** HPLC was used to determine the content of multi-components, and the fingerprints of different areas and batches were established by fingerprint similarity software 2012. **Results** The chromatographic conditions and HPLC fingerprints of ferulic acid, isoferulic acid, vanillic acid, formoside, calycosin and calycosin glycoside in Hedysari Radix were established. There were 21 peaks in total. The content of Hedysari Radix medic was higher than that in the root, and the quality of Hedysari Radix from Wudu was better than that from other places. **Conclusion** The method of fingerprints of Hedysari Radix from different areas and determination of 6 active components are simple and reliable, which can be used for the quality control of Hedysari Radix.

**Key words:** Hedysari Radix; fingerprint; HPLC; active component; different area

红芪 (*Hedysari Radix*) 为豆科植物多序岩黄芪 (*Hedysarumpolybotrys* Hand.-Mazz.) 的干燥根。红芪是甘肃特色药材, 在甘肃陇南北部山区及定西地区已广泛栽培。最早记载于《神农本草经》黄芪项下, 列为上品, 载有黄耆、戴糝, 于 1977 年收录于《中国药典》至今<sup>[1-2]</sup>。2020 年版《中国药典》主要是从性状、鉴别、水分、总灰分和浸出物等方面进行药材质量控制, 缺乏有效的质控指标。红芪化学成分主要为多糖、皂苷、黄酮、氨

基酸等, 具有补气升阳、利水消肿、敛疮生肌、脱毒等功效, 药理作用为抗肿瘤、抗病毒、抗氧化等<sup>[3]</sup>。红芪黄酮类化合物中的芒柄花苷和毛蕊异黄酮均具雌激素样活性, 毛蕊异黄酮具有保护缺糖缺氧损伤细胞、防止肝纤维化等作用, 其苷可促进机体对其他苷类物质及其苷元的吸收; 芒柄花苷可与人体肠道细菌相互作用, 其苷元具有降低血脂、改善肝硬化等作用<sup>[4]</sup>。目前关于红芪的研究多集中于其多糖和无机元素, 黄酮类、有

**基金项目:** 陕西省重点研发计划 (No.2019SF-075, 2021SF-304); 陕西省创新能力支撑计划科技资源开放共享平台 (No.2020PT-041)。

**作者简介:** 焦洁, 女, 主要从事药品、药包材、医疗器械、化妆品等安全性评价工作, email: 674272301@qq.com

机酸类成分及指纹图谱研究较少, 采用 HPLC 进行红芪多指标质量控制的研究鲜有报道, 故本研究以多指标结合指纹图谱作为出发点对红芪进行研究, 为后期红芪药材临床药用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Sartorius 电子天平 ( $d = 0.1 \text{ mg}$ )、Sartorius 电子天平 ( $d = 0.01 \text{ mg}$ ) [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]。

### 1.2 试药

甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 甲醇、甲酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。毛蕊异黄酮 (批号: D0806AS)、芒柄花苷 (批号: O0930AS)、异阿魏酸 (批号: M0607AS) 对照品 (纯度  $> 98\%$ , 大连美仑生物科技有限公司); 毛蕊异黄酮苷 (批号: 111920-201505, 纯度  $\geq 97.1\%$ )、阿魏酸 (批号: 110773-201614, 纯度  $\geq 99\%$ ) 对照品 (中国食品药品检定研究院); 香草酸 (批号: H11J9Z65318, 纯度  $\geq 97\%$ , 上海源叶生物科技有限公司)。红芪药材样品采自甘肃武都、岷县、舟曲、宕昌, 见表 1。经陕西中医药大学药学院王西芳鉴定为豆科植物多序岩黄芪 (*Hedysarumpolybotrys* Hand.-Mazz.) 的干燥根。

表 1 不同产地红芪来源信息表

Tab 1 Hedysari Radix from different producing areas

编号	购入地	产地	部位
S1	甘肃	岷县	根
S2	甘肃	岷县	须根
S3	甘肃	岷县	根
S4	甘肃	岷县	须根
S5	甘肃	岷县	须根
S6	甘肃	岷县	根
S7	甘肃	武都	须根
S8	甘肃	武都	根
S9	甘肃	舟曲	根
S10	甘肃	宕昌	根

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱条件为  $0 \sim 10 \text{ min}$ ,  $10\% \text{A}$ ;  $10 \sim 20 \text{ min}$ ,  $10\% \sim 15\% \text{A}$ ;  $20 \sim 26 \text{ min}$ ,  $15\% \text{A}$ ;  $20 \sim 30 \text{ min}$ ,  $20\% \sim 23\% \text{A}$ ;  $30 \sim 40 \text{ min}$ ,  $23\% \sim 20\% \text{A}$ ;  $40 \sim 50 \text{ min}$ ,  $20\% \sim 18\% \text{A}$ ;  $50 \sim 55 \text{ min}$ ,  $18\% \sim 15\% \text{A}$ ;  $55 \sim 60 \text{ min}$ ,  $15\% \sim 10\% \text{A}$ ; 检测波长为  $280 \text{ nm}$ ; 流速为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 进样量为  $10 \mu\text{L}$ 。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别取香草酸、阿魏酸、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷对照品适量, 精密称定, 以甲醇配制成质量浓度分别为  $319.13$ 、 $400.95$ 、 $342.02$ 、 $430.22$ 、 $326.34$ 、 $344.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品母液。精密吸取以上各对照品母液  $0.5 \text{ mL}$ , 置于  $5 \text{ mL}$  棕色量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 备用 (色谱图见图 1A)。

### 2.3 供试品溶液的制备

取红芪样品粉末  $3 \text{ g}$ , 精密称定, 置具塞瓶中, 加  $30 \text{ mL}$  甲醇, 超声处理  $30 \text{ min}$  (功率  $250 \text{ W}$ , 频率  $100 \text{ kHz}$ ), 取出, 漏斗过滤, 用甲醇少量多次冲洗残渣, 浓缩后置  $10 \text{ mL}$  量瓶中用甲醇定容, 摇匀后  $0.45 \mu\text{m}$  滤头滤过, 即得 (色谱图见图 1B)。

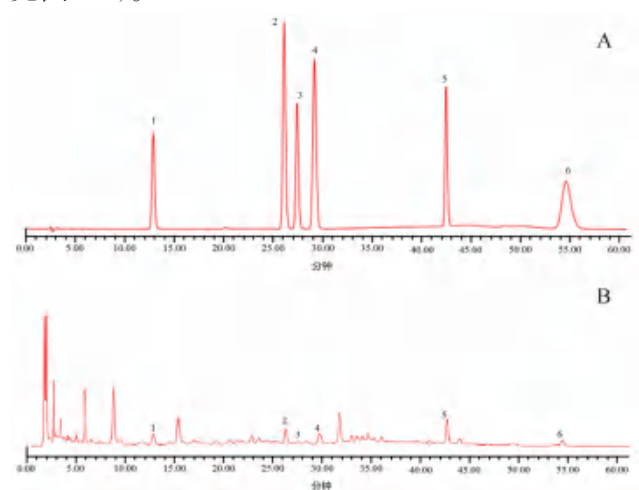


图 1 对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of mixed standard solution (A) and test solution (B)

1. 香草酸 (vanillic acid); 2. 阿魏酸 (ferulic acid); 3. 毛蕊异黄酮苷 (calycosin glucoside); 4. 异阿魏酸 (isoferulic acid); 5. 芒柄花苷 (formonoside); 6. 毛蕊异黄酮 (calycosin)

### 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性关系考察** 分别精密吸取各对照品溶液适量, 置于不同量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得一系列线性对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 以峰面积  $Y$  为纵坐标, 质量浓度  $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$  为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 2。

**2.4.2 精密度考察** 取“2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算得各对照品的峰面积  $RSD$  值为  $1.5\%$ , 说明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性考察** 取供试品 (S1) 溶液, 分别于  $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $10$ 、 $12$ 、 $24 \text{ h}$  进样测定, 计算 6 种成分峰面积的  $RSD$  值, 得香草酸、阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮苷、异阿魏酸、毛蕊异黄



表 2 红芪各对照品线性考察结果

Tab 2 Linearity of Hedysari Radix reference materials

对照品	标准曲线	范围/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	<i>r</i>
香草酸	$Y = 1.689 \times 10^4 X - 1.173 \times 10^3$	0.82 ~ 16.45	0.9999
阿魏酸	$Y = 3.304 \times 10^4 X - 1.914 \times 10^3$	0.51 ~ 20.25	0.9999
毛蕊异黄酮苷	$Y = 2.062 \times 10^4 X - 1.209 \times 10^3$	0.89 ~ 17.75	0.9999
异阿魏酸	$Y = 3.304 \times 10^4 X - 2.441 \times 10^3$	0.44 ~ 17.40	0.9999
芒柄花苷	$Y = 1.725 \times 10^4 X - 1.809 \times 10^3$	1.10 ~ 21.95	0.9997
毛蕊异黄酮	$Y = 3.099 \times 10^4 X - 2.138 \times 10^3$	0.83 ~ 16.65	0.9999

酮峰面积的 *RSD* 为 0.78% ~ 1.7%，表明样品在 24 h 内稳定。

**2.4.4 重复性考察** 取同一批红芪 (S1) 药材，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，根据外标法计算香草酸、阿魏酸、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷含量，并含量 *RSD* ( $n = 6$ ) 为 0.84% ~ 1.9%，均小于 5%，表明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收** 按“2.3”项下方法制备供试品 (S1) 溶液，并按照 100% 精密加入与样品中待测定成分含量对应的对照品，平行制备 6 份，进样测定，计算加样回收率，结果香草酸、阿魏酸、异阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷的平均加样回收率分别为 100.6%、99.2%、104.5%、103.4%、101.2%、98.7%，*RSD* 分别为 2.5%、2.5%、1.9%、1.8%、1.7%、1.8%，表明该方法准确度高。

## 2.5 指纹图谱方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一批 (S1) 红芪根样品，按“2.3”项下方法制备，连续进样 6 次，记录指纹图谱，以 7 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 0.18% ~ 4.5%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.12% ~ 1.7%，表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批 (S1) 红芪根样品，按“2.3”项下条件平行制备 6 份，进样测定，以 7 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 2.4% ~ 4.8%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.12% ~ 0.14%，表明该方法重复性好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一批 (S1) 红芪根样品，按照“2.3”项下方法进行制备，分别在 0、1.5、3、6、12、24 h 进样测定，以 7 号峰为参照物峰，结果各共有峰相对峰面积的 *RSD* 为 0.15% ~ 4.5%，相对保留时间的 *RSD* 为 0.058% ~ 0.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.6 红芪指纹图谱建立<sup>[5-6]</sup>

将 10 批红芪样品 S1 ~ S10 按“2.3”项下方法制备，并在“2.1”项色谱条件下测定，后将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统

(2012 版)”软件，以 S3 作为参照图谱，以多点进行自动校正，形成共有模式的指纹图谱，结果见图 2。对 10 批红芪样品的相似度评价，10 批样品与对照图谱间的相似度分别为 0.817、0.871、0.724、0.805、0.847、0.931、0.901、0.817、0.901、0.871，相似度较低的为样品 S3，可能与该样品所在产地气候、土壤因子及生产年限有关，其中共有峰为 21 个。结果表明红芪不同批次样品的指纹图谱相似度较好，重复性较好。通过建立指纹图谱，不同产地以及不同部位 (根、须根) 的红芪样品化学成分的一致性较好，化学成分的种类无明显差异，量却有明显差异。

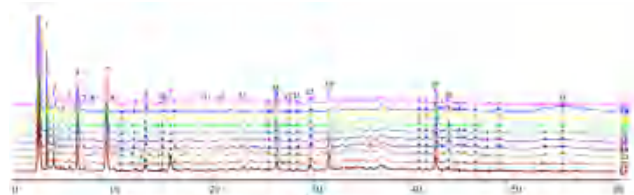


图 2 10 批红芪样品 HPLC 指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Hedysari Radix

9. 香草酸 (vanillic acid); 14. 阿魏酸 (ferulic acid); 15. 毛蕊异黄酮苷 (calycosin glucoside); 17. 异阿魏酸 (isoferulic acid); 19. 芒柄花苷 (formonoside); 21. 毛蕊异黄酮 (calycosin)

## 2.7 不同批次红芪样品含量测定

采用外标法对 10 批红芪样品进行含量测定，结果见表 3。由表 3 可知：① 同一地方不同批次之间样品质量品质有一定差异，通过计算各批次样品含量的总黄酮 (芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷) 及有机酸 (香草酸、阿魏酸、异阿魏酸) 含量，发现岷县红芪 S1 ~ S6 样品的总黄酮为 107.07 ~ 264.44  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，有机酸为 94.95 ~ 187.26  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ；武都红芪 S7 ~ S8 的总黄酮为 277.93 ~ 289.99  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，有机酸为 203.00 ~ 365.24  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ；② 根须部的含量高于根部；③ 岷县、宕昌、武都、舟曲红芪产地的质量研究中，不同批次的武都红芪质量均优于其他产地；④ 在 6 种指标测定中，芒柄花苷的含量较高，优于其他指标成分。

## 3 讨论

### 3.1 供试品制备

通过单因素试验，考察了不同提取方法、提取溶剂、溶剂用量和提取时间对 6 种成分含量的影响，最终选择了甲醇超声提取 30 min 为样品溶液的最佳制备方法。

### 3.2 色谱条件的选择

本试验前期对 0.1% 甲酸水 - 乙腈、0.1% 磷酸水 - 乙腈为流动相进行考察，采用 0.1% 甲酸水 - 乙腈时色谱峰较多、分离度好、出峰时间短，

表 3 红芪不同批次含量测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 3 Content determination of different batches of Hedysari Radix ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

批次	香草酸	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷	异阿魏酸	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	总黄酮	有机酸
S1	83.58	56.26	15.73	47.42	149.25	7.40	172.38	187.26
S2	63.62	57.07	13.50	43.02	186.63	5.72	205.85	163.70
S3	65.23	43.25	14.18	35.31	140.52	21.99	176.69	143.79
S4	43.07	16.80	19.95	51.22	203.50	40.99	264.44	111.09
S5	77.55	46.32	22.20	93.28	171.92	67.33	261.45	217.16
S6	36.72	11.71	14.98	46.51	83.04	9.05	107.07	94.95
S7	83.14	72.96	11.30	46.90	198.68	80.01	289.99	203.00
S8	174.70	141.56	11.77	48.98	208.96	57.20	277.93	365.24
S9	87.55	143.73	11.83	19.47	101.00	62.43	175.26	250.76
S10	81.82	57.30	7.48	18.56	117.13	49.25	173.85	157.68

故选用 0.1% 甲酸水 - 乙腈作为流动相。通过波谱扫描及相关文献报道<sup>[7-8]</sup> 选用 320 nm、250 nm、280 nm 等多个波长作为检测通道, 并进行色谱峰图谱比较, 发现在 280 nm 时各峰的吸光度、峰形、峰面积均较好, 故选用 280 nm 作为检测波长。同时对流动相不同比例乙腈也进行了考察, 发现乙腈比例为 23% 时图谱出峰数目最多。

### 3.3 指纹图谱的建立

中药指纹图谱相似度评价计算方法采用峰重叠率法 (Nei 系数法)、距离系数法、向量夹角法、改进 Nei 系数法、夹角余弦法、相关系数法<sup>[9-11]</sup> 等。本试验对 10 批红芪药材的指纹图谱相似度考察, 结果红芪样品相似度在 0.724 ~ 0.931, 相对于已报道的指纹图谱相似度值较低<sup>[12-13]</sup>, 可能由于各样品产地、处理方法不同及在本色谱条件下各色谱峰的响应值低等, 不同批次存在部分峰的缺失及峰形变化致使其相似度相对较低。有学者认为相似度计算方法 Nei 系数变化幅度较大, 对小峰缺失比较敏感, 相关系数、夹角余弦法对大峰变化敏感, 小峰相对不敏感, 其他算法对结果也存在一些影响, 如响应值、单位等。而中药材的产地、来源、储藏条件、加工工艺、仪器设备的稳定性等原因可使指纹图谱产生一定的波动及峰的缺失, 从而影响样品的相似度<sup>[14-16]</sup>。

### 3.4 样品含量

药材药用部位不同其有效成分含量、功效、药理作用亦存在一定差异, 本试验通过对不同部位、不同产地、不同批次药材进行研究, 为红芪药材资源的合理运用、开发利用及质量控制提供参考。对红芪样品不同部位的质量研究发现, 须根部的有效成分含量高于根部, 而在日常药店及医院中, 通常为除去须根部的饮片, 造成了红芪须根部药效的资源浪费, 建议在红芪洗净切片炮制等处理时, 保留其须根部药用部位, 使资源得到有效利用。同时产地批次不同药物的有效成分含量有一定差异, 为保证药用的有效性, 应尽量使用同一产地药材, 并测

定不同批次的药材含量, 使药物达到最佳药效。

### 参考文献

- [1] 靳贵林, 陈正红, 罗珍, 等. 红芪和黄芪的药理药效研究比较 [J]. 西藏科技, 2020, 3 (5): 51-55.
- [2] 李俊岳, 强正泽, 李成义. 红芪的本草考证 [J]. 中国药房, 2015, 26 (34): 4860-4862.
- [3] 邓六勤, 吴宝仪, 陈洁, 等. 中药红芪化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2013, S3 (8): 36-39.
- [4] 李俊岳. 甘肃道地药材红芪活性成分积累规律研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [5] 高必兴, 苟琰, 齐景梁, 等. 多基原兔耳草 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51 (15): 4019-4024.
- [6] 施崇精, 李希, 冯建安, 等. 古代经典名方济川煎物质基准 HPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2020, 51 (15): 3930-3936.
- [7] 田静, 夏玉凤, 房克慧. HPLC 法同时测定苍耳类药材中 8 种酚酸类成分的含量 [J]. 中药材, 2013, 36 (10): 1623-1626.
- [8] 李越峰, 牛江涛, 曹瑞, 等. 不同干燥工艺对红芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的影 [J]. 中国现代中药, 2019, 21 (7): 941-950.
- [9] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47 (22): 4085-4094.
- [10] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40 (6): 994-998.
- [11] 谢百波, 苏加乐, 里艳茹, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱及一测多评法的复方珍珠解毒口服液质量评价 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1639-1643.
- [12] 杨秀娟, 李硕, 杨志军, 等. 甘肃不同产地红芪的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (7): 3070-3073.
- [13] 李成义, 强正泽, 王燕, 等. 基于灰色关联分析方法评价甘肃产红芪质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (12): 60-65.
- [14] 谷瑞敏, 涂洪谊, 孙鹤. 中药色谱指纹图谱相似度计算方法的探讨 [J]. 中成药, 2009, 31 (7): 988-990.
- [15] 聂磊, 曹进, 罗国安, 等. 中药指纹图谱相似度评价方法的比较 [J]. 中成药, 2005, 3 (6): 5-8.
- [16] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (18): 282-287.

(收稿日期: 2022-08-19; 修回日期: 2022-10-14)

# 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法测定 *N*-乙酰氨基葡萄糖中的葡萄糖和氨基葡萄糖的含量

齐雯依<sup>1, 2, 3</sup>, 郑枫<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 中国药科大学药物分析系, 南京 211198; 2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009; 3. 浙江省原料药安全研究中心(工艺技术创新平台), 杭州 310018)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定发酵工艺来源的 *N*-乙酰氨基葡萄糖中的葡萄糖和氨基葡萄糖的含量。**方法** 采用 Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (80:20) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30℃; 使用蒸发光散射检测器, 载气为空气, 气体压力为 350 kPa, 漂移管温度为 80℃, 增益为 5。**结果** *N*-乙酰氨基葡萄糖与葡萄糖和氨基葡萄糖之间分离度良好, 葡萄糖在 76.12 ~ 304.50 μg·mL<sup>-1</sup>、氨基葡萄糖在 124.68 ~ 498.71 μg·mL<sup>-1</sup>、*N*-乙酰氨基葡萄糖在 150.15 ~ 600.60 μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好, *R*<sup>2</sup> 均大于 0.9990。**结论** 本方法准确、简便, 可用于发酵工艺来源的 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖的检测。

**关键词:** *N*-乙酰氨基葡萄糖; 葡萄糖; 氨基葡萄糖; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法

**中图分类号:** R917

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0800-04

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.041

## Determination of glucose and glucosamine in *N*-acetylglucosamine by HPLC-ELSD

QI Wen-yi<sup>1, 2, 3</sup>, ZHENG Feng<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 210009; 3. Zhejiang Center for Safety Study of Drug Substances (Industrial Technology Innovation Platform), Hangzhou 310018)

**Abstract: Objective** To determine glucose and glucosamine in *N*-acetylglucosamine from fermentation by HPLC-ELSD. **Methods** The determination was performed on an Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (80:20) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 30℃. The evaporative light scattering detector was used, the carrier gas was air, the gas pressure was 350 kPa, the drift tube temperature was 80℃, and the gain was 5. **Results** *N*-acetylglucosamine was well separated from glucose and glucosamine. The linear range of glucose was 76.12 ~ 304.50 μg·mL<sup>-1</sup> (*R*<sup>2</sup> > 0.9990), while that of glucosamine was 124.68 ~ 498.71 μg·mL<sup>-1</sup> (*R*<sup>2</sup> > 0.9990) and that of *N*-acetylglucosamine was 150.15 ~ 600.60 μg·mL<sup>-1</sup> (*R*<sup>2</sup> > 0.9990). **Conclusion** The method is accurate, simple and reliable in the determination of glucose and glucosamine in *N*-acetylglucosamine from fermentation.

**Key words:** *N*-acetylglucosamine; glucose; glucosamine; HPLC-ELSD

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨的变性、进行性损害以及骨质增生为特征的慢性关节紊乱综合征<sup>[1-2]</sup>。氨基葡萄糖是存在于关节软骨中的一种氨基单糖的衍生物, 是软

骨基质中合成蛋白聚糖必需的物质, 它不仅能提高关节软骨的自身修复能力<sup>[3-6]</sup>, 还具有加速伤口愈合<sup>[7]</sup>, 免疫调节<sup>[8]</sup>, 抗菌<sup>[9]</sup>, 改善动脉粥样硬化<sup>[10]</sup>等作用。氨基葡萄糖的生产方式一般有

作者简介: 齐雯依, 女, 硕士研究生, 主要从事药物现代仪器分析工作, email: 1531004189@qq.com \*通信作者: 郑枫, 男, 教授, 主要从事应用现代分析技术, 创新药物体外质量评价与体内处置研究, email: cpu\_analyst@126.com



3 种, 即甲壳素水解法<sup>[11]</sup>、生物酶转化法<sup>[12]</sup>与微生物发酵法<sup>[13]</sup>。甲壳素水解法会产量大量的环境污染物, 而且其原料会受到地域和季节的限制<sup>[14]</sup>; 生物酶转化法生产氨基葡萄糖增加了企业的生产成本, 不适用于工业化生产<sup>[15]</sup>; 而微生物发酵法作为最有潜力的生产方式, 基本克服了以上两种生产方式的缺点, 具有发酵时间短, 生产效率高, 环境污染较小的优点<sup>[16]</sup>。

微生物发酵法主要以葡萄糖和氮源为发酵底物, 利用菌种或代谢工程改良过的菌种进行发酵培养、分离纯化制得 *N*-乙酰氨基葡萄糖, 进一步在盐酸水解下脱乙酰制得盐酸氨基葡萄糖。*N*-乙酰氨基葡萄糖作为合成盐酸氨基葡萄糖的关键中间体, 在发酵过程中, 会引入未反应完全的原料葡萄糖和水解产生的氨基葡萄糖, 影响盐酸氨基葡萄糖的质量。因此, 需要对 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖进行测定。目前仅《美国药典》第 43 版收录了 *N*-乙酰氨基葡萄糖的质量标准, 且检测方法与盐酸氨基葡萄糖一样, 所使用的流动相体系 [磷酸盐缓冲体系 (pH 7.5) - 乙腈] (25 : 75) 很难平衡, 本底较高, 方法灵敏度低, 且并未见同时测定 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖的相关报道。葡萄糖和氨基葡萄糖无紫外特征吸收, 常规紫外检测器往往不能满足检测要求, 因此在分析该类杂质时通常会考虑通用型检测器以提高方法的灵敏度。而本文建立了一种高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法 (HPLC-ELSD) 对 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖进行分离与检测, 该方法具有良好的分离效果及重现性, 能为发酵工艺来源的 *N*-乙酰氨基葡萄糖的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Shimadzu LC-2010 高效液相色谱仪 (ELSD-LT II 蒸发光散射检测器、LabSolutions 色谱工作站, 日本岛津公司); 赛多利斯 SQP 电子天平、赛多利斯 BSA124S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); KH-250DB 型数控超声波清洗仪 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

*N*-乙酰氨基葡萄糖 (含量: 99.9%, 批号: 101011-200801)、*D*-无水葡萄糖 (含量: 99.9%, 批号: 110833-202109)、*D*-盐酸氨基葡萄糖 (含量: 100.0%, 批号: 140649-202007) 对照品 (中国食品药品检定研究院); *N*-乙酰氨基葡萄糖供试品 (批号: NA-F-20220917A、NA-F-20220917B、NA-F-20220917C、GH-20221011-1、GH-20221011-2、GH-

20221011-3、GH-20221011-4、NA-F-221104, 江苏正大清江制药有限公司); 乙腈 (色谱级, 批号: 2022075303, 美国天地公司); 实验用水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (80 : 20); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL; 检测器: ELSD; 载气: 空气; 气体压力: 350 kPa; 漂移管温度 80 °C; 增益: 5。

### 2.2 溶液配制

**2.2.1 空白溶剂** 即稀释剂, 乙腈 - 水 (50 : 50)。

**2.2.2 各杂质定位溶液** 取葡萄糖、氨基葡萄糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖对照品约 5 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 杂质混合对照品溶液** 取葡萄糖对照品约 15 mg 和氨基葡萄糖对照品约 30 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.4 混合对照工作溶液** 取葡萄糖对照品约 15 mg、氨基葡萄糖对照品约 30 mg 和 *N*-乙酰氨基葡萄糖对照品约 30 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.5 对照溶液** 精密移取“2.2.4”项下混合对照工作溶液 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.6 供试品溶液** 取 *N*-乙酰氨基葡萄糖盐供试品约 0.3 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度约为 30 mg · mL<sup>-1</sup> 的供试品溶液。

**2.2.7 系统适用性溶液 (供试品加样溶液)** 取 *N*-乙酰氨基葡萄糖盐供试品约 0.3 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密移取“2.2.3”项下杂质混合对照品溶液 1.0 mL, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得系统适用性溶液。

### 2.3 系统适用性和专属性

取空白溶剂、葡萄糖定位溶液、氨基葡萄糖定位溶液、*N*-乙酰氨基葡萄糖定位溶液、对照溶液, 供试品溶液和系统适用性溶液各 20 μL 依次进样分析, 记录色谱图, 结果见图 1。空白溶剂不干扰各杂质的测定; 各色谱图中各杂质峰与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5。

### 2.4 检测限和定量限试验

取“2.2.4”项下混合对照工作溶液逐级稀释后进样分析, 以信噪比约为 3 : 1 和 10 : 1 的溶液浓

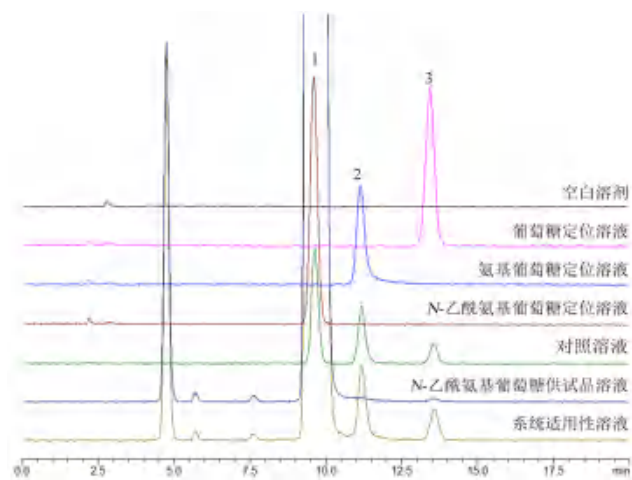


图 1 系统适用性和专属性 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability and specificity test  
1. *N*-乙酰氨基葡萄糖 (*N*-acetylglucosamine); 2. 氨基葡萄糖 (glucosamine); 3. 葡萄糖 (glucose)

度作为 *N*-乙酰氨基葡萄糖及其杂质的检测限与定量限。结果葡萄糖的检测限为  $60.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为  $76.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 氨基葡萄糖的检测限为  $99.74 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为  $124.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; *N*-乙酰氨基葡萄糖的检测限质量浓度为  $120.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限质量浓度为  $150.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取定量限对应浓度溶液连续进样 6 针, 葡萄糖峰面积 *RSD* 为 5.3%, 氨基葡萄糖峰面积 *RSD* 为 4.8%, *N*-乙酰氨基葡萄糖峰面积 *RSD* 为 1.9%。

### 2.5 线性试验

精密移取“2.2.4”项下混合对照工作溶液 0.5、0.8、1.0、1.5 和 2.0 mL, 分别置于 5 个 10 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 得系列浓度混合对照溶液, 取上述线性测试溶液各 20  $\mu\text{L}$  依次进样分析, 记录色谱图, 以峰面积的对数值为纵坐标, 浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线, 进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 线性关系结果

Tab 1 Linearity

待测物	范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	线性方程	$R^2$
葡萄糖	76.12 ~ 304.50	$y = 1.706x + 1.065$	0.9995
氨基葡萄糖	124.68 ~ 498.71	$y = 1.779x + 0.9868$	0.9995
<i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	150.15 ~ 600.60	$y = 1.552x + 1.655$	0.9991

### 2.6 进样精密度与重复性试验

取“2.2.5”项下对照溶液, 精密量取 20  $\mu\text{L}$  连续进样 6 次。结果葡萄糖、氨基葡萄糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖峰面积的 *RSD* 分别为 3.2%、1.1% 和 1.1%; 保留时间的 *RSD* 分别为 0.19%、0.21% 和 0.18%, 表明进样精密度良好。另按“2.2.7”项下方法平行配制 6 份供试品加样溶液, 精密量取 20  $\mu\text{L}$  进样分析, 记录峰面积并按标准曲线法计算供

试品加样溶液中葡萄糖和氨基葡萄糖的含量。结果显示葡萄糖和氨基葡萄糖含量的 *RSD* 分别为 0.81% 和 1.6% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

### 2.7 稳定性试验

取“2.2.7”项下的供试品加样溶液室温放置, 分别在 0、2、4、6、8 和 12 h 进样分析, 记录各杂质峰面积并计算其含量变化率。结果显示供试品加样溶液中葡萄糖和氨基葡萄糖含量的变化率分别低于 5.7% 和 9.8%, 表明供试品加样溶液在 12 h 内稳定。

### 2.8 准确度试验

按“2.2.7”项下方法配制杂质限度为 50%、100% 和 150% 的供试品加样溶液, 每个水平平行配制 3 份; 另按“2.2.6”项下方法平行配制两份供试品溶液。取上述溶液 20  $\mu\text{L}$  分别进样分析, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果显示葡萄糖和氨基葡萄糖的低浓度平均加样回收率分别为 103.4% 和 118.5%, *RSD* 分别为 3.9% 和 3.0% ( $n = 3$ ), 中浓度平均加样回收率分别为 99.1% 和 105.5%, *RSD* 分别为 1.6% 和 0.40% ( $n = 3$ ), 高浓度平均加样回收率分别为 97.9% 和 97.5%, *RSD* 分别为 0.70% 和 0.60% ( $n = 3$ ), 表明方法回收率良好。

### 2.9 耐用性考察试验

在柱温 ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )、流速 ( $\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )、流动相比比例 ( $\pm 1\%$ ) 的范围内变动色谱条件, 取“2.2.7”项下供试品加样溶液, 分别在不同条件下进样分析, 考察方法的耐用性。结果显示, 各组分色谱峰与相邻峰之间的分离度符合要求 ( $> 1.5$ ), 供试品加样溶液中葡萄糖和氨基葡萄糖的含量在不同条件下与原条件相比变化率分别低于 9.8% 和 5.9% ( $< 10.0\%$ ), 该方法耐用性良好。

### 2.10 样品检测

分别取 8 批 *N*-乙酰氨基葡萄糖样品进行检测, 结果见表 2。

表 2 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖的含量测定结果

Tab 2 Content determination of glucose and glucosamine in *N*-acetylglucosamine

批号	葡萄糖含量	氨基葡萄糖含量
NA-F-20220917A	$< 0.25\%$ (LOQ)	未检出
NA-F-20220917B	$< 0.25\%$ (LOQ)	未检出
NA-F-20220917C	未检出	未检出
GH-20221011-1	未检出	未检出
GH-20221011-2	未检出	未检出
GH-20221011-3	未检出	未检出
GH-20221011-4	未检出	未检出
NA-F-221104	未检出	未检出

## 3 讨论

### 3.1 色谱柱的筛选



*N*-乙酰氨基葡萄糖含有多个羟基, 极性高, 在反相色谱条件下保留能力弱, 故优先选择氨基柱为分离色谱柱。选用 Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E 和 Agilent Zorbax NH<sub>2</sub> 两种不同品牌氨基柱进行试验, 结果表明 Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E 色谱柱的分离度更好, 可以更有效地分离 *N*-乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖和氨基葡萄糖, 且采用聚合物基质填料, 色谱柱化学稳定性好, 寿命长, 分离效果随使用时间变化小, 具有更好的重现性。而 Agilent Zorbax NH<sub>2</sub> 会出现峰前沿和展宽等现象。因此选用 Asahipak NH<sub>2</sub>P-50 4E (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为本研究的分析柱。

### 3.2 溶剂的选择

*N*-乙酰氨基葡萄糖易溶于水, 微溶于乙醇。本研究优先采用水作为溶剂, 结果出现 *N*-乙酰氨基葡萄糖峰展宽的现象。为了避免此类溶剂效应的发生, 尽量使用流动相来溶解样品, 而 *N*-乙酰氨基葡萄糖在高比例的乙腈中很难溶解, 故经过优化后选择乙腈-水 (50:50) 作为溶剂。

### 3.3 检测器的选择

本研究采用 DAD 检测器对 *N*-乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖和氨基葡萄糖在 190~800 nm 波长内进行紫外光谱扫描, 结果表明待测物仅在 195 nm 附近有末端吸收。在此波长下葡萄糖的灵敏度达不到检测要求, 因此需要选择通用型的检测器进行检测。相较于示差折光检测器, ELSD 灵敏度高、对环境温度变化不敏感、基线更加稳定。故选择 ELSD 作为最终检测器。

### 3.4 流动相的选择

由于氨基柱的键合官能团氨基基要比 C<sub>8</sub> 柱的键合官能团更容易水解, 在反相条件下使用时水的比例不应超过 50%。本文曾参照《美国药典》第 43 版含量测定方法测定 *N*-乙酰氨基葡萄糖有关物质, 结果该流动相体系 [磷酸盐缓冲体系 (pH7.5)-乙腈] (25:75) 很难平衡, 本底较高, 使得方法灵敏度降低, 故不推荐用于 *N*-乙酰氨基葡萄糖中葡萄糖和氨基葡萄糖的测定。拟定方法将磷酸盐缓冲体系更改为纯水, 选用乙腈-水 (80:20) 作为流动相, *N*-乙酰氨基葡萄糖与葡萄糖和氨基葡萄糖也能实现很好的分离, 各杂质之间的分离度均满足要求。

## 4 结论

本文建立了一种测定 *N*-乙酰氨基葡萄糖中的葡萄糖和氨基葡萄糖的 HPLC-ELSD 法。该方法分离度、灵敏度和耐用性良好; 方法学验证表明

该方法可以为盐酸氨基葡萄糖中间体 *N*-乙酰氨基葡萄糖质量研究提供参考, 保证药物的质量。

## 参考文献

- [1] 黄伟东, 吴华贵, 林春豪. 双氯芬酸结合盐酸氨基葡萄糖对膝关节骨关节炎的疗效观察 [J]. 当代医学, 2012, 18 (9): 13-14.
- [2] 吴春媛. 氨基葡萄糖的药理作用研究进展 (综述) [J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2013, 12 (5): 86-87.
- [3] 刘永强, 史庆轩, 郭书英. 盐酸氨基葡萄糖治疗骨关节炎的临床观察 [J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26 (19): 1820-1821.
- [4] 吴子英, 李云霞, 陈世益. 氨基葡萄糖在骨性关节炎治疗中的应用 [J]. 上海医药, 2012, 33 (15): 8-11.
- [5] Tantikanlayaporn D, Wichit P, Suksen K, et al. Andrographolide modulates OPG/RANKL axis to promote osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells and protects bone loss during estrogen deficiency in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110763.
- [6] Amiraghoubi N, Fathi M, Pesyan NN, et al. Bioactive polymeric scaffolds for osteogenic repair and bone regenerative medicine [J]. Med Res Rev, 2020, 40 (5): 1833-1870.
- [7] Mccarty MF. Glucosamine for wound healing [J]. Med Hypotheses, 1996, 47 (4): 273.
- [8] Yang Y, Liu WS, Han BQ, et al. The antioxidative and immuno stimulating properties of *D*-glucosamine [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7 (1): 29-35.
- [9] Blagodatskikh IV, Kulikov SN, Vyshivannaya OV, et al. Influence of glucosamine on oligochitosan solubility and antibacterial activity [J]. Carbohydr Res, 2013, 381 (15): 28-32.
- [10] Beriault DR, Sharma S, Shi YY, et al. Glucosamine-supplementation promotes endoplasmic reticulum stress, hepatic steatosis and accelerated atherogenesis in apoE<sup>-/-</sup>mice [J]. Atherosclerosis, 2011, 219 (1): 134-140.
- [11] 倪冉熹, 詹豪强. 氨基葡萄糖的化学结构、性质及合成 [J]. 同行, 2016 (15): 51-51, 11.
- [12] Lyu YM, Zheng F, Qiu CX, et al. Heterologous expression of a thermostable chitinase from *Myxococcus xanthus* and its application for high yield production of glucosamine from shrimp shell [J]. Foods, 2021, 10 (11): 2808.
- [13] 王升, 李丕武, 刘佃磊, 等. 利用发酵法生产氨基葡萄糖的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014 (1): 68-74.
- [14] Deng MD, Severson DK, Grund AD, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and *N*-acetylglucosamine [J]. Metab Eng, 2005, 7 (3): 201-214.
- [15] Pan CH, Rhim SL, Kim SI. Expression of two cDNAs encoding class I chitinases of rice in *Escherichia coli* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60 (8): 1346-1348.
- [16] 李旭, 李康, 汪俊卿, 等. 氨基葡萄糖微生物合成研究进展 [J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35 (1): 19-22.

(收稿日期: 2022-11-16; 修回日期: 2022-11-23)



## 替加环素群体药代动力学模型的外部验证

郑昕昕<sup>1</sup>, 王静<sup>1</sup>, 吴轩宇<sup>1</sup>, 王敏<sup>1, 2, 3</sup>, 朱怀军<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 南京中医药大学鼓楼临床医学院, 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008; 3. 南京临床药学中心, 南京 210008)

**摘要:** **目的** 评估已发表的替加环素群体药代动力学模型对外部数据的预测性能, 选择适合本院的替加环素群体药代动力学模型, 为个体化用药提供参考。**方法** 在知网、万方、PubMed 等数据库检索已发表的替加环素群体药代动力学模型, 提取模型信息, 利用本院患者数据采用基于模型预测的拟合优度法、预测误差检验法, 以及基于模型模拟的可视化预测检验法评估已报道模型对替加环素浓度的预测性能。**结果** 共收集本院 81 名患者 360 个药物浓度数据; 检索到 6 篇文献, 其中 2 篇为一室模型, 4 篇为二室模型。基于模型预测的拟合优度诊断和预测误差检验中, 所有模型的群体预测数据均不佳, 个体预测数据显示模型 1 和模型 5 拟合结果相对较好。基于模型模拟的可视化预测检验结果显示, 模型 3 和模型 6 拟合结果相对较好, 其余模型观测数据与模拟数据的分布偏差较大, 拟合效果不佳。**结论** 现有模型预测替加环素浓度的效果均不佳, 为进一步完善基于群体药代动力学技术的替加环素个体化用药, 有必要建立适合本院的替加环素群体药代动力学模型。

**关键词:** 替加环素; 群体药代动力学模型; 外部验证

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0804-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.042

## External validation of population pharmacokinetics model of tigecycline

ZHENG Xin-xin<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, WU Xuan-yu<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1, 2, 3</sup>, ZHU Huai-jun<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. Drum Tower Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008; 2. Department of Pharmacy, Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008; 3. Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy, Nanjing 210008)

**Abstract: Objective** To verify and evaluate the published population pharmacokinetics model of tigecycline and select the population pharmacokinetics model suitable for our hospital, so as to provide reference for individualized medication. **Methods** The published literatures on population pharmacokinetics model of tigecycline were searched in the databases of CNKI, Wanfang and PubMed. The model information was collected. The goodness-of-fit method based on model prediction, prediction error test method and visual predictive checks method based on model simulation were used to evaluate the prediction performance of the reported models for tigecycline concentration. **Results** Totally 360 drug concentration data of 81 patients were collected and 6 literatures were retrieved, including 2 one-compartment models and 4 two-compartment models. In the goodness-of-fit diagnosis and prediction error test based on the model prediction, the population prediction of all models did not fit well, and the individual prediction showed that the fitting results of model 1 and model 5 were relatively better. **Conclusion** The existing models do not work well in predicting the concentrations of tigecycline. To further improve the individual use of tigecycline based on population pharmacokinetics, it is necessary

基金项目: 国家重点研发计划资助 (No.2020YFC2008303); 南京鼓楼医院临床研究专项资金 (No.2022-LCYJ-PY-14)。

作者简介: 郑昕昕, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 1320853869@qq.com \*通信作者: 朱怀军, 男, 副主任药师, 主要从事临床药理学研究, email: huaijun.zhu@gmail.com

to establish a population pharmacokinetic model suitable for our hospital.

**Key words:** tigecycline; population pharmacokinetics model; external validation

替加环素 (tigecycline) 是一种广谱抗菌药物, 对多重耐药菌包括耐碳青霉烯类肠杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌等有较强的抗菌活性, 在临床上主要用于复杂的腹腔、皮肤和软组织感染以及社区获得性细菌性肺炎的治疗<sup>[1-2]</sup>。替加环素口服生物利用度不理想, 通常采用静脉滴注的方式给药, 随着给药剂量增加, 药物体内暴露量呈现线性增加的趋势, 生物效应也随之增强<sup>[3]</sup>。替加环素常见不良反应有胃肠道反应、低血糖、皮疹、静脉炎、肝损害、凝血功能障碍等, 不良反应的发生可能与药物剂量或体内暴露量有关<sup>[4]</sup>。目前多重耐药菌的流行日益严峻, 学术界指出抗菌药物应依据药动学/药效学 (pharmacokinetic/pharmacodynamic, PK/PD) 理论指导用药, PK/PD 理论的临床应用可以发挥抗菌药物最大治疗效益<sup>[5]</sup>。群体药代动力学 (population pharmacokinetics, PPK) 模型将传统药代动力学理论和统计学模型相结合, 探索药物在体内过程的群体规律, 计算 PPK 参数值, 优化患者给药方案, 有助于个体化用药的开展<sup>[6]</sup>。

目前国内外已有多个研究建立了替加环素 PPK 模型, 各研究模型纳入的协变量、建模方法、模型参数等各有差异, 这些模型的外推性能以及能否应用于其他医疗机构尚不清楚。因此, 有必要针对既往发表的替加环素 PPK 模型进行外部验证。本研究利用本院患者临床信息以及治疗药物监测数据构建的数据集, 采用拟合优度法 (goodness of fit, GOF) 和预测误差检验法以及可视化预测检验法 (visual predictive checks, VPC), 评价已发表的替加环素 PPK 模型对本院患者数据集的预测性能和可靠性, 探究现有模型对本院患者的适用性。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例选择

收集 2019 年 3 月至 2021 年 10 月在北京大学医学院附属鼓楼医院住院使用替加环素的患者作为研究对象。纳入标准: ① 静脉使用替加环素  $\geq 3$  d; ② 用药期间至少进行一次替加环素血药浓度监测。排除标准: 临床数据缺失者。本研究已获得北京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准 (编号: 2022-040-01)。

### 1.2 数据收集

回顾性收集符合纳入标准的患者基本资料、用药数据以及生化功能检测数据, 基本资料包括性别、年龄、身高、体质量、体表面积、感染部位和感染菌群等, 用药数据包括药物剂量、给药时间、治疗药物监测采样时间、血药浓度等, 生化功能检测数据包括谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、谷酰转氨酶、白蛋白、直接胆红素、总胆红素、尿素氮、肌酐以及采用 Cockcroft-Gault 公式计算的肌酐清除率等。

### 1.3 治疗药物监测

患者使用替加环素第 4 日后, 采集谷浓度、中浓度、峰浓度 3 个时间点的外周静脉血样本进行治疗药物监测。峰浓度的采集时间为静脉滴注结束后半小时, 中浓度为给药时间相隔的中间时间点, 谷浓度的采集为下次给药前半小时内。样本采集后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取血清样本  $200 \mu\text{L}$ , 加入  $40 \mu\text{L}$  10% 的高氯酸混匀,  $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后取上清液  $150 \mu\text{L}$  进样。采用 2D-LC-UV 系统, 包括 LC-20A 色谱部件 (日本岛津公司) 与 FLC2701 全自动二维液相色谱耦合仪 (湖南德米特公司) 进行测定, 替加环素血清质量浓度在  $0.03 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积线性关系良好, 检测限为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为  $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批内和批间 RSD 均小于 10%<sup>[7]</sup>。

### 1.4 模型检索

在中国知网、万方、PubMed 等数据库检索已发表的替加环素 PPK 模型, 检索关键词涉及 “tigecycline” “population pharmacokinetics” “non-linear mixed effect model” “NONMEN” “替加环素” “群体药代动力学” “药代动力学” “非线性混合效应模型” 等。检索时间为 2000 年 1 月至 2022 年 1 月。

纳入标准: ① 研究类型为替加环素 PPK 模型研究, 文种限定为中文及英文; ② 使用 PPK 相关软件建立模型并列出模型结构公式以及相关模型参数。排除标准: ① 文章类型为摘要、综述等; ② 模型信息不完整, 缺乏相关数据导致无法进行模型拟合的文献。

通过筛选, 获取符合纳排标准的 PPK 文献, 提取文献中患者的基础信息, 具有显著影响的协

变量、模型参数以及相应的模型公式等。

### 1.5 PPK 模型外部验证

本研究基于模型预测和模拟的诊断方法对替加环素 PPK 模型进行外部验证。提取已发表的模型结构及参数，将本院患者用药数据及相关生化功能作为数据文件，采用 NONMEM (Version 7.3.0, ICON Development Solutions, MD, USA) 对药物浓度进行预测，并与实测值比较评估，采用 SPSS (Version 23.0.0) 进行统计分析及绘图。

模型的验证采用基于模型预测的拟合优度法和预测误差检验法，以及基于模型模拟的可视化预测检验法进行评估和诊断。拟合优度法通过观察实际观测值与预测值的接近程度及相关性，绘制实际观测值 - 群体预测值 (dependent variable-population prediction, DV-PRED) 以及实际观测值 - 个体预测值 (dependent variable-individual prediction, DV-IPRED) 散点图，评估模型预测值与实际观测值的拟合程度。预测误差检验法根据公式分别基于群体预测值和个体预测值计算模型的预测误差 (prediction error, PE)，群体预测误差中位数 (median prediction error, MDPE)，群体绝对预测误差中位数 (median absolute prediction error, MAPE)，个体预测误差中位数 (median individual prediction error, MDIPE)，个体绝对预测误差中位数 (median absolute individual prediction error, MAIPE)，计算公式见公式 1 ~ 6。MDPE 和 MDIPE 可衡量模型预测的准确性，MAPE 和 MAIPE 可考察模型预测的精密性。 $F_{20}$  和  $F_{30}$  分别代表了群体预测值的 PE 在  $\pm 20\%$  和  $\pm 30\%$  之间的所占的比例， $IF_{20}$  和  $IF_{30}$  分别代表了个体预测值的 PE 在  $\pm 20\%$  和  $\pm 30\%$  之间的所占的比例，是同时评价模型准确性和精密度的复合指标。模型预测良好的数值标准为 MDPE 或 MDIPE  $\leq \pm 20\%$ 、MAPE 或 MAIPE  $\leq 30\%$ 、 $F_{20}$  或  $IF_{20} \geq 35\%$  和  $F_{30}$  或  $IF_{30} \geq 50\%$ <sup>[8]</sup>。可视化预测检验法利用模型参数对数据集进行 1000 次模拟，计算了不同模型中拟合浓度的第 5、50 和 95 百分位数的 95% 可信区间，并与观测值进行比较，以确定观测数据和模拟数据之间的系统偏差。通过对不同模型的拟合效果、偏差程度、准确性以及精确性进行综合评价，确定适合本院患者的替加环素 PPK 模型。

## 2 结果

### 2.1 患者基本信息

本研究共纳入 81 例患者的 360 个血药浓度监测数据，男性患者 53 例，女性患者 28 例。患者基本人口学信息及临床指标见表 1。

$$PE(\%) = \frac{PREDi - DVi}{DVi} \times 100\% \quad (\text{公式1})$$

$$MDPE(\%) = \text{Median} \left( \frac{PREDi - DVi}{DVi} \right) \times 100\% \quad (\text{公式2})$$

$$MAPE(\%) = \text{Median} \left( \left| \frac{PREDi - DVi}{DVi} \right| \right) \times 100\% \quad (\text{公式3})$$

$$MDIPE(\%) = \text{Median} \left( \frac{IPREDi - DVi}{DVi} \right) \times 100\% \quad (\text{公式4})$$

$$MAIPE(\%) = \text{Median} \left( \left| \frac{IPREDi - DVi}{DVi} \right| \right) \times 100\% \quad (\text{公式5})$$

表 1 纳入患者的基本人口学信息及临床指标

Tab 1 Basic demographic information and clinical indicators of including patients

项目	例数 / 均值 $\pm$ 标准差	中位数 (范围)
患者例数	81	—
药物浓度例数	360	—
性别 (男 / 女)	53/28	—
年龄 / 岁	64.80 $\pm$ 17.35	67 (24 ~ 93)
体质量 / kg	57.62 $\pm$ 10.79	59 (42 ~ 95)
身高 / cm	165.79 $\pm$ 6.17	(152 ~ 185)
体质量指数 / (kg $\cdot$ m <sup>-2</sup> )	20.87 $\pm$ 3.16	20.28 (15.62 ~ 29.41)
体表面积 / m <sup>2</sup>	1.63 $\pm$ 0.16	1.66 (1.37 ~ 2.19)
谷丙转氨酶 / (U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	47.39 $\pm$ 73.45	30.9 (2.3 ~ 1032)
谷草转氨酶 / (U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	50.47 $\pm$ 65.96	32.55 (8.1 ~ 875.9)
谷酰转氨酶 / (U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	82.27 $\pm$ 79.91	57.63 (8.05 ~ 788.4)
碱性磷酸酶 / (U $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	145.51 $\pm$ 91.47	121.87 (22.4 ~ 827.7)
白蛋白 / (g $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	34.14 $\pm$ 6.12	33.1 (21.7 ~ 90.2)
直接胆红素 / ( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	26.38 $\pm$ 58.45	8 (0.1 ~ 557.2)
总胆红素 / ( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	43.33 $\pm$ 89.42	16.1 (3.1 ~ 938.7)
尿素氮 / (mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	18.48 $\pm$ 11.93	15.68 (2.8 ~ 213.2)
血肌酐 / ( $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	100.84 $\pm$ 79.75	78 (17 ~ 714)
肌酐清除率 / (mL $\cdot$ min <sup>-1</sup> )	74.64 $\pm$ 49.3	61.33 (7.98 ~ 278.22)
感染部位 [n (%)]		
肺部感染	63 (77.78)	—
腹腔感染	22 (27.16)	—
皮肤和软组织感染	13 (16.04)	—
其他感染	28 (34.57)	—
感染菌群 [n (%)]		
鲍曼不动杆菌	58 (71.60)	—
肺炎克雷伯菌	51 (62.96)	—
大肠埃希菌	14 (17.28)	—

### 2.2 替加环素 PPK 模型信息

通过文献筛选，共纳入 6 篇符合标准的替加环素 PPK 模型进行研究，分别命名为模型 1 ~ 6。其中英文文献 5 篇，中文文献 1 篇；有 2 篇研究构建了一室模型，4 篇文献构建了二室模型。纳入 PPK 模型的基本信息和模型参数信息见表 2 和表 3。

### 2.3 基于模型预测的评价

**2.3.1 拟合优度诊断** 基于患者用药数据利用已发表的 PPK 模型对替加环素浓度进行预测，各个



表 2 替加环素 PPK 模型基本信息

Tab 2 Basic information of tigecycline PPK models

模型	研究者	国家	性别 (男/女)	年龄/岁	体质量/kg	血药浓 度个数	感染类型	血药浓度 检测方法	建模软件	验证方法
1	Van <sup>[9]</sup>	美国	216/109	46.3 (18 ~ 85)	79.3 (45 ~ 227)	631	cIAI/cSSTI	HPLC-MS/MS	NONMEN	BS
2	Rubino <sup>[10]</sup>	美国	250/160	56 (18 ~ 92)	74 (33.8 ~ 140)	1581	HAP/CAP	HPLC-MS/MS	S-ADAPT	BS
3	Borsuk-De <sup>[11]</sup>	波兰	26/11	61 (25 ~ 79)	80 (50 ~ 129)	942	Sepsis/Septic Shock	HPLC-UV	NONMEN	BS/GOF/VPC
4	邵蓉 <sup>[12]</sup>	中国	75/24	56.98±18.76	NM	NM	cIAI/cSSTI/HAP	UPLC-MS/MS	Phoenix NLME	BS
5	Zhou <sup>[13]</sup>	中国	55/34	61 (18 ~ 89)	60 (35 ~ 80)	328	HAP	HPLC	Phoenix NLME	GOF/VPC
6	Yang <sup>[14]</sup>	中国	50/17	65.5±23	64.83±14.96	186	cIAI/cSSTI/HAP	HPLC-MS/MS	NONMEN	BS

注 (Note): NM. 未提及 (not mentioned); cIAI. 复杂性腹腔内感染 (complicated intra-abdominal infection); cSSTI. 复杂性皮肤和皮肤软组织感染 (complicated skin and skin-structure infection); HAP. 医院获得性肺炎 (hospital-acquired pneumonia); CAP. 社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia); BS. 自举法 (bootstrap); GOF. 拟合优度法 (goodness of fit); VPC. 可视化预测检验法 (visual predictive check)。

表 3 替加环素 PPK 模型参数信息

Tab 3 Parameter information of tigecycline PPK models

模型	研究者	房室模型	显著协变量	结构模型公式	个体间变异	残差变异
1	Van <sup>[9]</sup>	二室	体质量 (WT)、肌酐清除率 (CrCL)、性别	$CL (L \cdot h^{-1}) = 15.7 \times (CrCL/88.3)^{0.250} + 0.0943 \times (WT - 80) + 3.23 \times Male; V_1 (L) = 115; Q (L \cdot h^{-1}) = 70.9; V_2 = 644$	$IIV CL = 35.1\%; IIV V_1 = 43.2\%; IIV Q = 49.3\%$	ProP = 22.2%
2	Rubino <sup>[10]</sup>	二室	体表面积 (BSA)、CrCL	$CL (L \cdot h^{-1}) = 19.6 + (BSA - 1.73) \times 10.2 + (CrCL - 100) \times 0.0638; V_1 (L) = 65.2; Q (L \cdot h^{-1}) = 85.1; V_{ss} (L) = 398$	$IIV V = 82.1\%; IIV Q = 110\%; IIV V_{ss} = 40.2\%$	ProP = 0.146; Add = 0.0250
3	Borsuk-De <sup>[11]</sup>	二室	无	$CL (L \cdot h^{-1}) = 22.1; V_1 (L) = 162; Q (L \cdot h^{-1}) = 69.4; V_2 (L) = 87.9$	$IIV CL = 17.3\%; IIV V_1 = 19.2\%; IIV Q = 0 \text{ FIX}; IIV V_2 = 38.7\%$	ProP = 14.4%
4	邵蓉 <sup>[12]</sup>	一室	尿素氮 (BUN)	$CL (L \cdot h^{-1}) = 66.99 \times BUN^{-0.39}; V (L) = 208.07$	$IIV CL = 0.26; IIV V = 0.18$	ProP = 0.169
5	Zhou <sup>[13]</sup>	二室	WT、年龄、肌酐 (Cr)、谷草转氨酶 (AST)	$CL (L \cdot h^{-1}) = 23.1 \times (AGE/61)^{-0.388} \times (Cr/73.4)^{-0.296} \times (AST/34.5)^{-0.174} \times (WT/60)^{2.271}; V (L) = 105.9 \times (WT/60)^{2.235}; Q (L \cdot h^{-1}) = 31.9; V_2 (L) = 124.9$	$IIV CL = 17.1\%; IIV V = 36.7\%$	ProP = 27.8%
6	Yang <sup>[14]</sup>	一室	BUN	$CL (L \cdot h^{-1}) = 25.2 \times (BUN/9)^{-0.271}; V (L) = 417$	$IIV CL = 0.587$	ProP = 0.576

注 (Note): CL. 清除率 (clearance); V. 分布体积 (volume of distribution); IIV. 个体间变异 (inter-individual variation); Q. 房室间清除率 (inter-compartmental clearance); V<sub>1</sub>. 中央室分布体积 (central compartment volume of distribution); V<sub>2</sub>. 周边室分布体积 (peripheral compartment volume of distribution); V<sub>ss</sub>. 稳态分布体积 (steady-state volume of distribution); ProP. 比例型残差 (proportional error); Add. 加法型残差 (additive error)。

模型的实际观测值 - 群体预测值 (DV-PRED) 散点图和实际观测值 - 个体预测值 (DV-IPRED) 散点图见图 1。图中横坐标是群体预测值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 或个体预测值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 纵坐标为实际观测值 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 黑色虚线为参考线 ( $Y = X$ ), 红色虚线为散点在坐标轴中分布的趋势线。预测值与实际观测值越接近, 即各散点的趋势线与参考线相重合的程度越高, 表明模型对数据的拟合效果越好<sup>[15]</sup>。

从左侧 DV-PRED 散点图中可以看出, 模型 1 ~ 6 群体数据趋势线与参考线的重合程度均不高, 趋势线和参考线没有重叠的部分, 且散点分

布不够均匀, 提示模型群体预测性能欠佳。DV-IPRED 散点图提示模型 1、5 的个体预测值与实际观测值有较好的相关性, 趋势线与参考线重合程度相对较高, 两个模型预测值与实测值线性拟合的回归系数分别为 0.90 和 0.87, 接近于 1, 残差分别为 0.18 和 0.22, 接近于 0, R<sup>2</sup> 分别为 0.64 和 0.57, 散点在对角线两侧分布对称且较为集中, 右侧有一个离散点导致趋势线的偏移, 总体上可以较好地呈现出个体数据的聚集趋势和分散程度。其余模型预测性能相对不佳, R<sup>2</sup> 均低于 0.5, 线性拟合的回归系数和残差也不够理想, 模型 4、6 在低浓度预测时无明显偏差, 在高浓度数据点

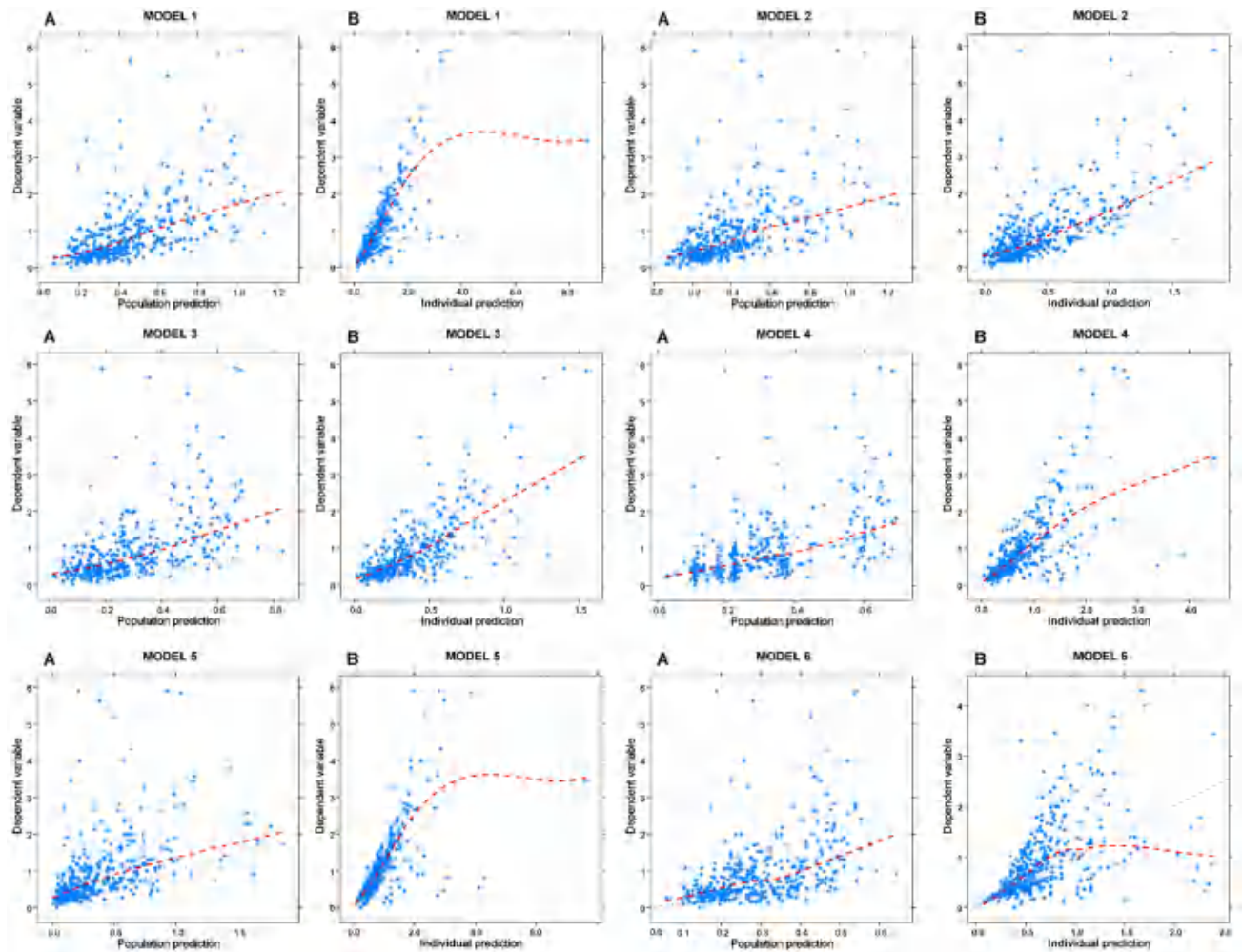


图 1 替加环素 PPK 模型对本院患者的拟合优度诊断图

Fig 1 Goodness-of-fit graphs of tigecycline PPK models for patients in our hospital

A. DV-PRED 散点图 (DV-PRED scatter plot); B. DV-IPRED 散点图 (DV-IPRED scatter plot)

时预测值趋势线和参考线有一定偏移且数据点较为分散,提示模型对高浓度的个体数据预测存在不足;模型 2、3 个体预测数据趋势线与参考线没有重合,预测效果不佳。

**2.3.2 预测误差检验** 预测误差检验结果如图 2 和表 4 所示。图中黑色实线为预测误差值的零点线,虚线和点线分别代表预测误差值为  $\pm 20\%$  和  $\pm 30\%$  的参考线。箱型图中箱体的实线(中位数)与零点线越接近,提示该模型预测的准确度越高,箱体越窄则提示该模型预测的精密度越好。

从预测误差检验结果中可以看出,各个模型群体预测误差箱体与零点线相隔均较远,MDPE、MAPE、 $F_{20}$  和  $F_{30}$  也不符合上述标准。个体预测误差箱图中模型 1、5 的箱体实线距离零点线接近,说明这几个模型在个体误差预测层面拟合效果良好。其中模型 1 的箱体实线最接近 0,其准确度最高,模型 5 的箱体最窄,其精密度最佳,这两个模型的  $MDIPE \leq \pm 20\%$ ,  $MAIPE \leq 30\%$ ,  $IF_{20} >$

$35\%$ ,  $IF_{30} > 50\%$ 。模型 4、6 的箱体实线与零点线也比较接近,两者的  $MDIPE$  也在  $\pm 20\%$  以内,但是  $MAIPE$  不符合小于  $30\%$  的标准,且  $IF_{20}$  和  $IF_{30}$  小于  $35\%$  和  $50\%$ ,未能达到要求。

**2.4 基于模型模拟的可视化预测检验**

利用 NONMEM 软件的 VPC 模块对模型及数据集进行 1000 次模拟,所得结果如图 3 所示。图中横坐标代表时间 (h),纵坐标代表实际观测质量浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),散点为实际观测浓度值,三个线条从下到上分别为实际观测浓度的第 5、第 50 以及第 95 百分位数,阴影区域部分代表模拟浓度值数据第 5、50、95 百分位数的 95% 置信区间。线条与对应区域的阴影区域重合度越高,则置信区间本身拟合所得结果与实际情况越符合,说明该模型的拟合效果越佳<sup>[16]</sup>。

在不同模型的可视化预测检验结果图中,模型 3 和模型 6 的第 95 百分位数线条部分落在阴影区域内,两个模型中散点落在 95% 置信区间外

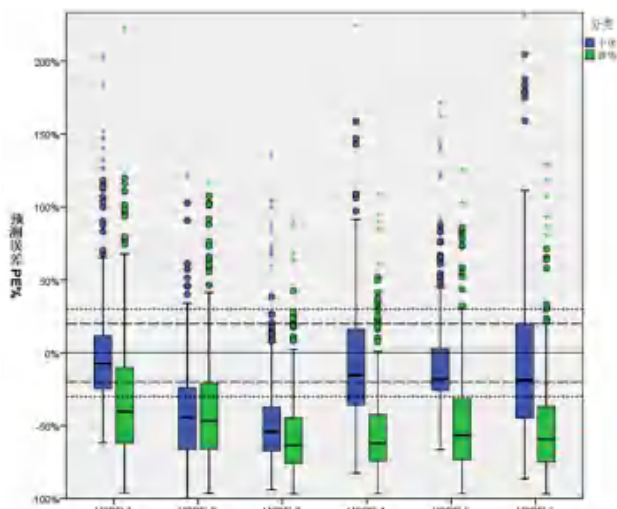


图 2 替加环素 PPK 模型对本院患者的预测误差箱型图

Fig 2 Box plot of prediction error of tigecycline PPK models for patients in our hospital

的比例较少, 均为 1.11%; 模型 5 模拟浓度值过高, 阴影区域范围非常大, 与实际观测值有较大偏差; 其他模型观测浓度数据的百分位数线条均不在对应的阴影区域内, 且散点落在置信区间外的部分占比相对较多, 均大于 15%, 说明模型 3 和模型 6 拟合效果相对较好之外, 其余几个模型拟合均不佳。

### 3 讨论

目前国内外已有多项研究建立了替加环素 PPK 模型, 但是缺乏外部数据集的验证, 模型对其他医疗机构的适用性尚不明确。因此, 本研究利用本院患者血药浓度对已发表替加环素 PPK 模型的预测性能进行评估, 结果显示现有模型的预测性能均未达到标准。基于模型预测的拟合优度诊断和预测误差检验中, 所有模型的群体预测

表 4 替加环素 PPK 模型对本院患者的预测误差检验结果

Tab 4 Prediction error test of tigecycline PPK models for patients in our hospital

模型	MDPE/%	MAPE/%	F <sub>20</sub> /%	F <sub>30</sub> /%	MDIPE/%	MAIPE/%	IF <sub>20</sub> /%	IF <sub>30</sub> /%
1	-40.54	44.07	19.00	32.68	-7.34	20.68	47.35	66.57
2	-46.57	50.52	17.27	27.30	-44.10	47.21	16.16	27.02
3	-63.29	63.75	6.40	13.09	-54.25	56.01	9.19	16.71
4	-62.09	62.87	7.24	13.09	-15.54	30.11	32.59	49.58
5	-56.59	58.76	11.14	20.06	-17.69	22.61	44.29	69.36
6	-59.48	61.41	10.58	16.16	-18.74	34.89	26.46	44.01

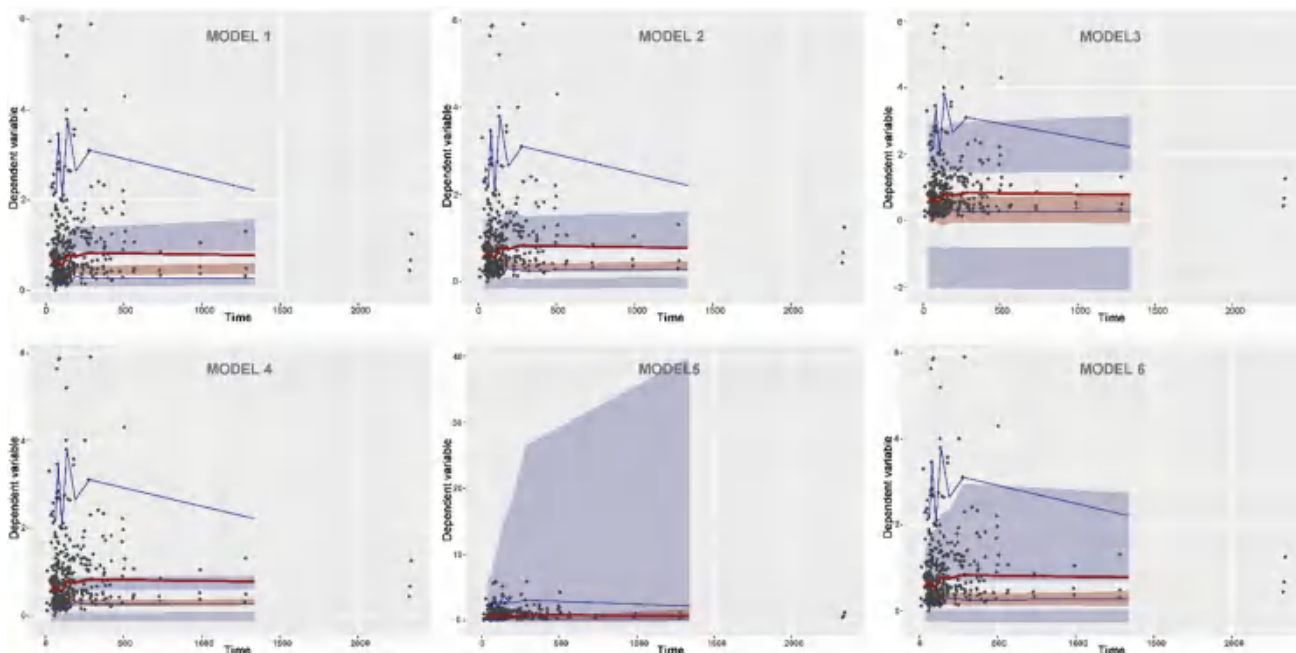


图 3 替加环素 PPK 模型对本院患者的可视化预测检验图

Fig 3 Visual predictive check of tigecycline PPK models for patients in our hospital

数据均不佳, 差异较大。个体预测数据显示模型 1 和模型 5 拟合结果相对较好, 模型预测的准确性和精密度复合指标 IF<sub>20</sub> 小于 35%, IF<sub>30</sub> 小于 50%; 两者的 DV-IPRED 散点图趋势线有一定的

偏移, 高浓度数据中存在的离散值导致重合度的下降。此外, 基于模型模拟的可视化预测检验结果显示, 模型 3 和模型 6 拟合结果相对较好, 观测数据与模拟数据的分布较为接近, 除此之外,



多数模型的观测浓度值数据落在模拟数据置信区间内的部分较少, 偏差较大, 预测效果不佳。

已发表模型预测本中心浓度与实测值结果存在差异, 可能与多种原因例如患者感染类型、血药浓度监测方法、建模方法的选择、模型评估等相关。模型中替加环素血药浓度检测的方法各异, 包括液相色谱-紫外分光光度法或者色谱串联质谱法等。不同方法检测所得结果的准确度和精密度差异可能影响模型预测浓度的性能和稳定性。已发表模型选择的房室结构、建模软件以及药代动力学参数影响因素的选择也不尽相同, 可能造成 PPK 模型参数估计的偏差, 影响最终浓度预测性能效果。此外, 已发表模型的评估方法也有所欠缺。一个完善的模型评估应该包含内部验证、独立外部数据集的验证以及前瞻性临床验证<sup>[17-18]</sup>。目前已发表的替加环素 PPK 模型尚没有进行完善的模型评估, 缺乏外部数据集的验证和临床前瞻性个体化治疗的模型应用, 可能也会对模型质量及拟合效果产生影响。

本研究采集临床常规监测的替加环素血药浓度数据, 可客观地反映临床的实际环境, 数据包含了谷浓度、中浓度及峰浓度, 能较为全面地评价模型对不同时间点浓度值的预测能力。由于现有模型的预测性能均欠佳, 有必要使用院内数据集建立适合本院的替加环素 PPK 模型, 进一步研究患者使用替加环素的群体药代动力学特征, 指导个体化用药和精准治疗。

## 参考文献

- [1] Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, et al. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115 (20-21): 345-352.
- [2] Wang J, Pan Y, Shen J, et al. The efficacy and safety of tigecycline for the treatment of bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2017, 16 (1): 24.
- [3] 张昭, 翟所迪, 单爱莲. 替加环素的药代动力学/药效学评价和剂量选择研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32 (20): 1914-1917.
- [4] 郑昕昕, 王静, 朱怀军, 等. 药源性低纤维蛋白原血症危险因素和可能机制的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (6): 1366-1372.
- [5] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63 (5): e61-e111.
- [6] 苏汉中, 张善堂, 陈卫东, 等. 群体药代动力学及其应用研究进展 [J]. *安徽医药*, 2015, 19 (2): 205-209.
- [7] 罗雪梅, 金路, 梁培, 等. 全自动二维液相色谱法测定腹腔感染患者血清中替加环素的浓度 [J]. *药学与临床研究*, 2016, 24 (4): 305-307.
- [8] Li YQ, Chen KF, Ding JJ, et al. External evaluation of published population pharmacokinetic models of polymyxin B [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2021, 77 (12): 1909-1917.
- [9] Van Wart SA, Owen JS, Ludwig EA, et al. Population pharmacokinetics of tigecycline in patients with complicated intra-abdominal or skin and skin structure infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50 (11): 3701-3707.
- [10] Rubino CM, Forrest A, Bhavnani SM, et al. Tigecycline population pharmacokinetics in patients with community-or hospital-acquired pneumonia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (12): 5180-5186.
- [11] Borsuk-De Moor A, Rypulak E, Potręć B, et al. Population pharmacokinetics of high-dose tigecycline in patients with sepsis or septic shock [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62 (4): 2273-2284.
- [12] 邵蓉. 人血浆中替加环素浓度的测定及其群体药代动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [13] Zhou Y, Xu P, Li H, et al. Population pharmacokinetics and exposure-response analysis of tigecycline in patients with hospital-acquired pneumonia [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (7): 2838-2846.
- [14] Yang T, Mei H, Wang J, et al. Therapeutic drug monitoring of tigecycline in 67 infected patients and a population pharmacokinetics/microbiological evaluation of A. baumannii study [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 678165.
- [15] 彭凯, 杨春兰, 冯丽娟, 等. 肾移植受者联合用药和基因多态性对他克莫司群体药代动力学影响的研究 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (6): 963-969.
- [16] 李梦婷, 刘昌林, 徐华, 等. 早产儿氟康唑群体药代动力学模型的外部验证和剂量优化 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41 (1): 24-29.
- [17] 陶玉瑛, 李惟滔, 赵明明, 等. 儿童癫痫患者托吡酯群体药代动力学模型外部验证 [J]. *中国药学杂志*, 2021, 56 (12): 1020-1026.
- [18] Zhao W, Kaguclidou F, Biran V, et al. External evaluation of population pharmacokinetic models of vancomycin in neonates: the transferability of published models to different clinical settings [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75 (4): 1068-1080.

(收稿日期: 2022-08-08; 修回日期: 2022-09-26)

# 非甾体抗炎药酮咯酸氨丁三醇注射液合理应用 评价标准的建议及应用

王德平, 魏海明\* (河西学院附属张掖人民医院药学部, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:** **目的** 调查某综合医院非甾体抗炎药酮咯酸氨丁三醇注射液临床使用情况, 进一步规范酮咯酸氨丁三醇注射液的管理及临床合理应用提供参考和管理依据。**方法** 回顾分析该医院 2021 年 10—11 月使用酮咯酸氨丁三醇注射液的 1180 例出院患者的病例资料, 分析存在的问题并提出相应的解决措施。**结果** 该院酮咯酸氨丁三醇注射液总体不合理使用率为 13.30%, 主要表现为疗程过长 (75.15%), 剂量过大 (11.46%) 和联合用药不适宜 (12.10%)。**结论** 该院酮咯酸氨丁三醇注射液在临床使用中存在较多问题, 需继续加强药物合理使用的培训学习, 加强信息化建设和药物点评工作, 不断提高临床科室的合理用药水平。

**关键词:** 非甾体抗炎药; 酮咯酸氨丁三醇注射液; 用药合理分析

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0811-04

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.043

非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 又称解热镇痛抗炎药, 通过抑制体内环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 活性, 减少体内前列腺素生成, 从而产生解热、镇痛、抗炎及抗风湿作用<sup>[1]</sup>。作为临床广泛使用的一类药物, NSAIDs 是多种类型关节炎以及轻中度疼痛的一线治疗用药, 在围手术期疼痛的治疗中也发挥着重要作用。同时, NSAIDs 作为多模式镇痛方案的主要组成部分, 联合阿片类药物使用可减少阿片类药物用量, 优化镇痛效果<sup>[2]</sup>。然而, 随着 NSAIDs 在临床治疗中的广泛应用, 其潜在的药物相关不良事件也被逐渐重视, 不当使用可能增加胃肠道溃疡、出血、心血管不良事件等风险<sup>[3]</sup>。酮咯酸氨丁三醇是一种可供注射的 NSAIDs, 适用于急性且较严重疼痛的短期治疗, 通常用于术后镇痛, 不推荐用于轻度或慢性疼痛的治疗<sup>[4]</sup>。随着酮咯酸氨丁三醇使用比例的大幅升高, 其不合理用药问题也日益突显。本研究通过调查某院 2021 年 10 月—11 月酮咯酸氨丁三醇注射液临床使用情况, 分析用药合理性, 为进一步规范酮咯酸氨丁三醇注射液的管理及临床合理用药提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 基于循证医学证据建立合理应用评价标准

根据以下主要参考文献及指南:《酮咯酸氨丁三醇注射液说明书》;《中华人民共和国药典临床用药须知》2015 版<sup>[5]</sup>; 普外科围手术期疼痛管理

上海专家共识 (2020 版)<sup>[6]</sup>; 成人手术后疼痛处理专家共识 (2017 版)<sup>[7]</sup>; 酮咯酸镇痛专家共识 2019 版<sup>[4]</sup>。初步建立酮咯酸氨丁三醇注射液合理应用评价标准。咨询相关临床使用科室具有中高级职称的临床医师, 结合临床实际治疗情况, 按照科学、实用、合理的原则进行修改完善, 使评价依据客观、准确。评价标准见表 1。

### 1.2 资料来源

通过医院 HIS 系统抽取 2021 年 10 月—11 月住院病历中使用酮咯酸氨丁三醇注射液所有医嘱, 采用回顾性研究方法, 通过病历号调取并仔细阅读相关患者的相关信息。入选标准如下: 疼痛筛查阳性且 VAS 评分 > 3。

## 2 结果

### 2.1 患者一般资料

临床应用酮咯酸氨丁三醇注射液共计 1180 例患者。酮咯酸氨丁三醇注射液静脉制剂通常用于急救、围手术期以及术后疼痛的患者, 因此使用科室主要以手术麻醉科及外科为主。使用比例前三的科室分别为手术麻醉科 (63.23%)、骨科 (81.69%)、血管外科 (58.24%), 详情见表 2。

### 2.2 用药合理性评价

1180 例患者不合理用药问题累计 157 个, 不合理用药类型主要包括疗程过长, 剂量过大, 联合用药不适宜, 用药禁忌, 给药途径不适宜; 不合理用药比例前三位的科室为骨科, 普外科和心胸外科, 详见表 3。

作者简介: 王德平, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学研究, email: 1052943620@qq.com \* 通信作者: 魏海明, 男, 主管药师, 主要从事医院药学研究, email: 335066004@qq.com

表 1 酮咯酸氨丁三醇注射液合理应用评价标准

项目	评价依据	不合理评价标准
适应证	说明书适应证： ① 需要阿片类药物水平镇痛药的急性较严重疼痛的短期治疗；② 手术后镇痛	不符合①或②
禁忌证	① 活动性消化性溃疡、近期出现过胃肠道出血或穿孔的患者或有消化性溃疡或胃肠道出血病史的患者禁用； ② 晚期肾功能损伤以及因血容量不足引起肾衰竭的患者禁用；③ 临产、分娩妇女禁用；④ 有酮咯酸氨丁三醇过敏史及对阿司匹林或其他非甾体抗炎药过敏的患者禁用；⑤ 禁用于大型手术前的止痛预防或手术中止痛，及需紧急止血时的手术，因为受手术中止血的限制有增加出血的危险性；⑥ 本品抑制血小板功能，疑有或确诊有脑血管出血、有出血倾向、止血不完全和高危出血患者禁用；⑦ 本品含乙醇成分，禁用于鞘内或硬膜外给药；⑧ 禁用于冠状动脉搭桥术围手术期疼痛的治疗	不符合①或②或③或④或⑤或⑥或⑦或⑧
用法用量	单次给药： 肌内注射剂量，① 65 岁以下：一次 60 mg；② 65 岁或以上、肾损伤和 / 或体质量低于 50 kg：一次 30 mg 静注剂量，③ 65 岁以下：一次 30 mg；④ 65 岁或以上、肾损伤和 / 或体质量低于 50 kg：一次 15 mg 多次给药（静脉注射或肌内注射）：⑤ 65 岁以下：建议每 6 小时 30 mg，最大日剂量不超过 120 mg；⑥ 65 岁或以上、肾损伤和体质量低于 50 kg：建议每 6 小时 15 mg，最大日剂量不超过 60 mg；⑦ 对于爆发性疼痛，无需增大给药剂量或频率；如非禁忌，可考虑同时给予低剂量阿片类药物	不符合①或②或③或④或⑤或⑥或⑦
用药疗程	连续用药时间一般不超过 5 d	超过 5 d
配伍禁忌	① 不应与硫酸吗啡、盐酸吗啡、盐酸哌替啶、盐酸异丙嗪或盐酸羟嗪在小体积容器中混合（如注射器），否则将会导致酮咯酸从溶液中析出；② 禁与 5-氨基水杨酸或其他非甾体抗炎药合用；③ 禁与丙磺舒合用；④ 禁止与己酮可可碱合用	不符合①或②或③或④
不良反应监测	① 无不良反应发生；② 发生相关不良反应，及时处理并填写不良反应报表上报	不符合①或②

表 2 全院各科室酮咯酸氨丁三醇注射液使用情况

科室	使用数量 / 支	使用病例数 / 人	出院总人数 / 人	使用患者比例 / %
手术麻醉科	1812	650	1028	63.23
心胸外科	1709	78	224	34.82
骨科	3711	308	377	81.69
介入医学科	498	67	131	51.15
神经外科	638	78	212	36.79
普外科	928	203	488	41.60
血管外科	510	53	91	58.24
肿瘤科	93	28	196	14.29
急诊科病区	30	6	90	6.67
康复医学科	49	6	125	4.80
消化内科	19	8	207	3.86
泌尿外科	5	3	212	1.42
神经内科	10	6	240	2.50
五官科	19	5	83	6.02
妇科	4	4	183	2.19
全科医学科	3	3	236	1.27
老年病科	2	1	227	0.44
中医科	1	1	117	0.85
内分泌肾内科	1	1	130	0.77
呼吸内科	2	4	269	1.49
儿科	1	1	353	0.28

本院的酮咯酸氨丁三醇注射液不合理联用主要集中在骨科和普外科，常见的不合理联用药物为吲哚美辛栓和洛芬待因，详见表 4。

### 3 讨论

#### 3.1 疗程过长、剂量过大

酮咯酸氨丁三醇注射液是临床较常使用的 NSAIDs，其不良反应与剂量和疗程密切相关<sup>[8]</sup>。因此，酮咯酸氨丁三醇注射液应避免超疗程、超

剂量使用。临床在不同程度疼痛患者使用酮咯酸氨丁三醇注射液时，应在满足患者止痛需求的同时，尽可能降低风险，做到合理使用。对于围术期镇痛，建议采用多模式镇痛管理及预防性镇痛措施<sup>[9-10]</sup>，尽可能以低有效剂量、短疗程使用 NSAIDs<sup>[4, 11]</sup>，最大程度地减少术后疼痛，降低不良反应发生率。本院存在的酮咯酸氨丁三醇注射液使用不合理类型主要为疗程过长（75.16%）和剂量过大（11.47%）。

疗程过长用药发生 118 例（75.16%）。酮咯酸氨丁三醇注射液说明书以及专家共识中均建议连续用药时间不宜超过 5 d，否则严重不良反应的风险会增加<sup>[4]</sup>。欧洲药品管理局也对酮咯酸氨丁三醇诱发的消化道出血及溃疡风险提出警示，建议药物使用时间限制在治疗的几天之内<sup>[12]</sup>。研究发现，在 65 岁以上的老年患者中，平均日剂量超过 60 mg，疗程超过 5 d，胃肠道出血风险会明显增加<sup>[10]</sup>。疗程过长用药主要发生于骨科（82 例），其原因主要是骨科手术患者年龄较大，平均年龄 65 岁，疼痛耐受程度低，术后患者易产生对镇痛药物的依赖性，故而造成酮咯酸氨丁三醇超剂量、不合理联合用药情况。

剂量过大用药发生 18 例（11.47%）。酮咯酸氨丁三醇具有强效、速效的镇痛作用，并且 NSAIDs 的血浆蛋白结合率较高（90% ~ 99%）。因此，其镇痛效果存在明显的“天花板效应”，使用剂量超过说明书允许的剂量上限后，并不能



表 3 酮咯酸氨丁三醇注射液不合理用药统计

不合理用药类型	病例数 (n)	构成比 /%	科室分布及例数 (n)
疗程过长	118	75.16	骨科 (82)、普外科 (16)、心胸外科 (16)、介入医学科 (3)、血管外科 (1)
剂量过大	18	11.47	血管外科 (9)、介入医学科 (7)、骨科 (2)
联合用药不适宜	19	12.10	骨科 (11)、普外科 (8)
用药禁忌	1	0.64	普外科 (1)
给药途径不适宜	1	0.64	消化内科 (1)

表 4 不合理联用分析

科室	联用药物	不合理例数
骨科	吲哚美辛栓	5
	洛芬待因	9
普外科	洛芬待因	8

增加其镇痛效果,反而会会增加不良反应发生的风险<sup>[11, 13]</sup>。为避免不良反应风险,临床上应避免超剂量使用及与多种 NSAIDs 联用。本院的酮咯酸氨丁三醇注射液剂量过大主要发生于血管外科和介入医学科,主要原因是科室医师对术后中重度疼痛及镇痛药物认知不足,有效镇痛方式单一,术后镇痛效果差,导致酮咯酸氨丁三醇注射液短期内大剂量重复使用。

### 3.2 联合用药不适宜

联合用药不适宜 19 例,主要发生于骨科和普外科。本院的酮咯酸氨丁三醇注射液不合理联用药物主要为吲哚美辛栓和洛芬待因。吲哚美辛栓同属 NSAIDs,通过减少体内前列腺素的合成,抑制炎症组织中痛觉神经冲动的形成,从而减轻疼痛、抑制炎性反应,同时可减少由疼痛诱发的尿潴留等不良反应。但其与酮咯酸氨丁三醇联合使用易导致不良反应的发生。洛芬待因是弱阿片类药物可待因和 NSAIDs 药物布洛芬的复方制剂,与酮咯酸氨丁三醇联合使用易导致药物不良反应的发生。临床治疗中应在停用酮咯酸氨丁三醇注射液后给予口服 NSAIDs 药物进行序贯治疗,不主张静脉 NSAIDs + 口服 NSAIDs 的用药模式。

### 3.3 用药禁忌

发现用药禁忌 1 例,发生于普外科。该患者为男性,年龄 63 岁,诊断为上消化道出血、胃溃疡伴出血、慢性失血性贫血;行腹腔镜下胃肠吻合术,2022 年 10 月 20 日—10 月 25 日期间静脉注射酮咯酸氨丁三醇注射液镇痛 (30 mg qd)。酮咯酸氨丁三醇可以抑制花生四烯酸或胶原诱发的血小板聚集作用,同时又对消化道黏膜屏障具有一定的损伤作用。因此对于有消化道出血症状或风险的患者,应避免使用酮咯酸氨丁三醇注射液<sup>[14]</sup>。

### 3.4 给药途径不适宜

给药途径不适宜 1 例,发生于消化内科。该

患者为男性,年龄 50 岁,诊断为慢性粒细胞白血病伴缓解(急淋变),肾结石。2022 年 11 月 5 日,皮下注射酮咯酸氨丁三醇注射液 (30 mg qd)。酮咯酸氨丁三醇注射液可抑制前列腺素生物合成,说明书中提供两种给药方式,肌肉注射 60 mg 或静脉滴注 30 mg。本例患者接受了皮下注射,给药途径不合理。其原因若为下医嘱时错将肌肉注射改为皮下注射,其剂量也不足说明书推荐的 60 mg,可能造成该患者镇痛失败。本病例反映出当事医师对酮咯酸氨丁三醇注射液用法和用量缺乏了解,需提高相关知识的学习。

疼痛管理是术后加速康复理念的重要核心之一,优化疼痛管理是其中重要组成部分<sup>[15]</sup>。本研究建立了注射用酮咯酸氨丁三醇合理应用评价标准,同时在说明书限定的适应证基础上进一步将评价标准的适应证进行补充,使得评价结果对实际临床治疗更具指导意义。通过本次对某院开展酮咯酸氨丁三醇用药合理性评价,发现疗程过长、剂量过大、联合用药不适宜较为常见,用药禁忌和给药途径不适宜也有发生,应引起足够的重视。本次酮咯酸氨丁三醇注射液抽样病例中不合理病例主要原因是患者疼痛控制不佳,临床医师为追求更好的镇痛效果,但又对 NSAIDs 药物及疼痛管理缺乏了解所致;针对此类问题需采取如下整改措施持续改进:① 定期开展酮咯酸氨丁三醇注射液等镇痛药物合理应用的培训学习,积极深入临床一线开展督导工作,发布酮咯酸氨丁三醇注射液不合理使用反馈表,发现不合理用药情况及时沟通并干预;② 加强完善相关信息化建设,形成酮咯酸氨丁三醇注射液药物使用和点评全闭环管理流程;③ 定期开展回顾性分析和评价工作,利用 PDCA 管理工具,提高酮咯酸氨丁三醇注射液药物临床应用的合理性。

### 参考文献

[1] Vinutna G, Kruthiga R, Shrimahitha D, et al. Colorectal carcinoma, cyclooxygenases, and COX inhibitors [J]. Cureus, 2022, 14 (8): e28579.  
 [2] 中华医学会麻醉学分会老年人麻醉与围术期管理学组,

- 中华医学会麻醉学分会疼痛学组国家老年疾病临床医学研究中心, 国家老年麻醉联盟. 老年患者围手术期多模式镇痛低阿片方案中国专家共识 (2021 版) [J]. 中华医学杂志, 2021, 101 (3): 170-184.
- [3] Shaheer B, Morten FL, Christina L, et al. Risks of serious adverse events associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in gastrointestinal surgery. a protocol for a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2022, 66 (10): 1266-1273.
- [4] 方向明, 朱涛, 卫东. 酮咯酸镇痛专家共识 [J]. 临床麻醉学杂志, 2019, 35 (3): 298-303.
- [5] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 19.
- [6] 上海市医学会麻醉科专科分会, 上海市医学会普通外科专科分会. 普通外科围手术期疼痛管理上海专家共识 (2020 版) [J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41 (1): 31-37.
- [7] 中华医学会麻醉学分会. 成人手术后疼痛处理专家共识 [J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33 (9): 911-917.
- [8] Roberto R, Carmen C, Bice A, et al. Ketogal: a derivative ketorolac molecule with minor ulcerogenic and renal toxicity [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 757.
- [9] 中华医学会麻醉学分会. 成人手术后疼痛处理专家共识 [J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33 (9): 911-917.
- [10] 上海市医学会麻醉科专科分会, 上海市医学会普通外科专科分会. 普通外科围手术期疼痛管理上海专家共识 (2020 版) [J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41 (1): 31-37.
- [11] Vadivelu N, Gowda AM, Urman RD, et al. Ketorolac tromethamine-routes and clinical implications [J]. Pain Pract, 2015, 15 (2): 175-193.
- [12] European Medicines Agency (EMA). Ketoprofen and ketorolac and risk of gastrointestinal toxicity final Sm PC and PL wording agreed by PhVWP December 2011 [EB/OL]. 2012.
- [13] Sergey M, Matthew Y, Antonios L, et al. Comparison of intravenous ketorolac at three single-dose regimens for treating acute pain in the emergency department: a randomized controlled trial [J]. Ann Emerg Med, 2017, 70 (2): 177-184.
- [14] 徐蓉贞, 王柳清, 卢建新, 等. 老年人使用非甾体类抗炎药的安全性及注意事项 [J]. 中国全科医学, 2019, 22 (5): 506-510.
- [15] Susan N, Irwin F, Hugh P. Enhanced recovery after surgery: pain management [J]. J Surg Oncol, 2017, 116 (5): 583-591.

(收稿日期: 2022-11-14; 修回日期: 2023-02-03)

## 儿童伏立康唑治疗药物监测及临床应用

胡林<sup>1</sup>, 黄师琼<sup>1</sup>, 黄琪<sup>2</sup> (1. 长沙市第一医院药剂科, 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008)

**摘要:** 目的 了解本院儿童伏立康唑 (VRC) 血药谷浓度的分布特点及影响因素, 为探讨合理使用 VRC 的给药方案提供依据。方法 回顾性分析 2015 年 6 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日住院使用 VRC 并监测血药谷浓度的 2~14 岁儿童患者的临床资料, 主要分析指标为患者一般情况、血药浓度分布特点、血药浓度影响因素等。结果 本研究中儿童患者的初次血药浓度中位值为 1.21 (0.01~9.98) mg·L<sup>-1</sup>, 1.0~5.5 mg·L<sup>-1</sup> 共 43 例 (47.8%), < 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 共 39 例 (43.3%), > 5.5 mg·L<sup>-1</sup> 共 8 例 (8.9%)。达到目标谷浓度的 < 6 岁患者使用的口服或静脉滴注维持剂量均高于 ≥ 6 岁患者 (P = 0.037), 达到目标谷浓度的口服和静脉滴注维持日剂量 (均值分别为 10.31 mg·kg<sup>-1</sup>, 12.11 mg·kg<sup>-1</sup>) 均小于说明书推荐剂量 (P = 0.013)。通过多元线性回归分析发现, CYP2C19 基因分型、合并使用质子泵抑制剂、白蛋白水平、谷丙转氨酶对 VRC 血药浓度的影响具有统计学意义。结论 治疗药物监测对临床使用 VRC 具有重要意义, 可为制订适用于儿童的剂量调整策略提供研究数据。

**关键词:** 儿童; 伏立康唑; 治疗药物监测; 临床应用

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0814-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.044

## Therapeutic drug monitoring and clinical application of voriconazole in children

HU Lin<sup>1</sup>, HUANG Shi-qiong<sup>1</sup>, HUANG Qi<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.82003929); 复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室项目 (No.2017TP1037)。

**作者简介:** 胡林, 女, 硕士研究生, 主要从事治疗药物监测研究, email: 1150721071@qq.com

**Abstract: Objective** To determine the influence factors and distribution of voriconazole (VRC) trough concentrations in children and provide a basis for the rational use of voriconazole. **Methods** Clinical data were retrospectively analyzed in children (2 ~ 14 years old) who were hospitalized and trough concentrations of VRC monitored from June 1st, 2015 to December 31st, 2021. **Results** There was significant inter-individual variability in VRC trough concentrations in children. The median of initial trough concentration was 1.21 (0.01 ~ 9.98)  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Totally 43 children (47.8%) achieved the therapeutic range of 1.0 ~ 5.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at the initial dosing, whereas 39 (43.3%) children < 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and 8 (8.9%) children > 5.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The median oral or intravenous maintenance dose of patients who reached the target range in children aged < 6 years was higher than children aged  $\geq 6$  years ( $P = 0.037$ ). The mean of oral and intravenous maintenance daily dose (10.31  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  and 12.11  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) that reached the therapeutic range was lower than the recommended dose ( $P = 0.013$ ). Multiple linear regression showed that CYP2C19 genotyping, combined use with proton pump inhibitors, albumin, and alanine aminotransferase had significant effect on the plasma trough concentrations of VRC. **Conclusion** Therapeutic drug monitoring is important for VRC and can provide reference for dose adjustment in Chinese paediatric patients.

**Key words:** children; voriconazole; therapeutic drug monitoring; clinical application

侵袭性真菌病 (invasive fungal disease, IFD) 是免疫功能低下儿童患者感染发病率和病死率的主要原因<sup>[1]</sup>。近年来国内外报道显示, 儿童侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA) 的发病率逐年增加<sup>[2-4]</sup>, 严重威胁到儿童易感人群的健康。伏立康唑 (voriconazole, VRC) 是一种广谱的三唑类抗真菌药, 是治疗 IA 的一线药物, 主要适用于进展性、可能威胁生命的真菌感染患者的治疗, 预防接受异基因造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplant, HSCT) 的高危患者中的侵袭性真菌感染<sup>[5]</sup>。

已有少数研究表明, 治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 能提高 VRC 的有效性和安全性<sup>[6-7]</sup>。相比成人, 儿童血药浓度个体差异较大, 浓度较低时影响疗效, 浓度较高时可能出现视觉障碍、肝功能损害等不良反应, 因此儿童患者比成人更需要监测血药浓度<sup>[8]</sup>。儿童 VRC 的血药浓度受肝脏 CYP2C19 代谢酶基因多态性的影响较大, 但 CYP2C19 代谢酶的基因分型具有种族差异<sup>[9-10]</sup>, 可能造成亚裔儿童的血药浓度分布特点不同于欧美儿童。目前, 关于中国儿童 VRC 血药浓度的研究较少, 为此, 本文收集中南大学湘雅医院住院患儿中使用 VRC 并监测血药浓度的临床资料进行回顾性分析, 旨在了解中国儿童患者 VRC 血药谷浓度的特点及影响因素, 为制订 VRC 的剂量调整策略提供数据支持, 同时为儿科临床医师安全合理地使用 VRC 提供参考。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 对象

选取中南大学湘雅医院 2015 年 6 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日使用 VRC 并监测血药谷浓度的 2 ~ 14

岁住院儿童患者。纳入静脉滴注或口服使用 VRC 3 d 以上, 测得的血药浓度为稳态血药谷浓度, 且病历资料完整的患儿。

### 1.2 方法

通过检索医院电子病历信息系统 (HIS) 收集研究对象的病历资料, 设定时间、检索词, 自行设计调查表格, 记录患者的一般情况、临床诊断、用药目的、给药剂量、给药疗程、给药途径、疗效、不良反应、合并用药、血药浓度及肝肾功能指标等。

血药浓度检测时间: ① 若给予负荷剂量, 给药 12 h 后其血药浓度接近于稳态浓度, 因此若第 1 日使用负荷剂量, 则在给予负荷剂量 24 h 后测定谷浓度; ② 若未给予负荷剂量, 则在维持剂量的第 6 日测定谷浓度<sup>[11]</sup>。达稳态血药浓度后, 在下次给药前 30 min 采集患者前臂浅静脉全血 2 mL 于 EDTA 抗凝管中, 测血药谷浓度。血药谷浓度检测采用高效液相色谱法 (岛津 LC-20AT 泵、SPD-20A 检测器、CTO-10ASvp 色谱柱箱、SIL-20A 自动进样器、CBM-20A 系统控制器)。色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C18 (5  $\mu\text{m}$ , 200 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相为乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) (43 : 57), 流速 1.3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 紫外检测波长 256 nm, 内标为醋酸可的松, 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 40  $\mu\text{L}$ 。

CYP2C19 基因分型检测: 采用 DNA 微阵列芯片法, 根据检测结果将基因型分为: 快代谢型 (CYP2C19\*1/\*1), 中间代谢型 (CYP2C19\*1/\*2, CYP2C19\*1/\*3), 慢代谢型 (CYP2C19\*2/\*2, CYP2C19\*3/\*3, CYP2C19\*2/\*3)。

本研究严格遵循赫尔辛基宣言, 并已通过



中南大学湘雅医院伦理委员会批准(批准号:2017121015)。本文中涉及的 IFD 诊断标准、治疗原则和疗效评判标准参考儿童血液系统疾病及恶性肿瘤侵袭性真菌病诊疗建议<sup>[12]</sup>、欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/IFICG)<sup>[13]</sup>。VRC 血药谷浓度的参考范围为 1.0 ~ 5.5 mg · L<sup>-1</sup>。研究中按照说明书推荐用药方案给予初次负荷或维持剂量,治疗过程中根据 TDM 结果和临床反映再进行剂量调整。VRC 说明书中 2 ~ 14 岁儿童口服或静脉滴注的维持剂量分别为 9 mg · kg<sup>-1</sup>、8 mg · kg<sup>-1</sup>(每 12 h 给药 1 次)。

### 1.3 数据统计分析

使用 SPSS 22.0 医学软件进行统计分析,分类变量的比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's 精确检验,连续变量的比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验,样本所在总体均值与已知总体均值的比较用单样本 t 检验。采用多元线性回归分析血药浓度的影响因素,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。VRC 血药浓度的个体间变异性采用变异系数(CV)表示,根据文献报道的经验,选择 VRC 给药时间  $\geq 14$  d,治疗期间给药剂量和途径不变,且至少测量过 3 次的稳态血药谷浓度的患者计算个体内变异性<sup>[14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 患者一般情况

共收集到患儿 90 例,血液标本 245 份,其中男性 58 例,女性 32 例,中位年龄为 10 (2 ~ 14) 岁,中位体质量为 30.8 (9.5 ~ 85.0) kg。90 例患者中 51 例患者(56.7%)患有急性淋巴细胞性白血病。IFD 确诊 7 例,临床诊断 16 例,拟诊 67 例;目标治疗 17 例,经验治疗 49 例,预防治疗 24 例;中位用药时间为 15.5 (7 ~ 148) d;使用 VRC 期间 53 例患者合并使用质子泵抑制剂(PPI),41 例患者合并使用糖皮质激素。患者基本资料见表 1。

### 2.2 VRC 血药浓度分布和变异性

用药后初次测量的 VRC 血药浓度中位值为 1.21 (0.01 ~ 9.98) mg · L<sup>-1</sup>,其中  $< 1.0$  mg · L<sup>-1</sup> 共 39 例次(43.3%),  $1.0 \sim 5.5$  mg · L<sup>-1</sup> 43 例次(47.8%),  $> 5.5$  mg · L<sup>-1</sup> 共 8 例次(8.9%)。静脉滴注给药 18 例(20.0%);口服给药 72 例(80.0%)。VRC 血药浓度个体间的 CV 为 117.1%,VRC 初次血药浓度的分布见图 1A。共收集 14 例患者 76 例次 VRC 血药浓度, CV 的中位值为 53.0% (9.0% ~ 78.0%),相同剂量和给药途径至少 3 剂的儿童患者的血药浓度见图 1B。

### 2.3 达到 VRC 目标谷浓度的维持剂量

在达到 VRC 目标血药谷浓度的 43 例患儿

表 1 患者基本信息

Tab 1 Patient characteristics

特征	总计
总例数	90
中位年龄 / 岁	10 (2 ~ 14)
中位体质量 / kg	30.8 (9.5 ~ 85.0)
性别 (男) [n (%)]	58 (64.4)
基础疾病 [n (%)]	
急性淋巴细胞性白血病	51 (56.7)
急性髓系白血病	12 (13.3)
淋巴瘤	12 (13.3)
地中海贫血	7 (7.8)
再生障碍性贫血	3 (3.3)
嗜血细胞综合征	3 (3.3)
朗格汉斯组织细胞增多症	1 (1.1)
骨髓增生异常综合征	1 (1.1)
IFD 诊断 [n (%)]	
确诊	7 (7.8)
临床诊断	16 (17.8)
拟诊	67 (74.4)
VRC 用药目的 [n (%)]	
目标治疗	17 (18.9)
经验治疗	49 (54.4)
预防治疗	24 (26.7)
CYP2C19 基因型 [n (%)]	
快代谢型	36 (40.0)
中间代谢型	43 (47.8)
慢代谢型	11 (12.2)
中位 VRC 用药时间 / d	15.5 (7 ~ 148)
合并用药 [n (%)]	
PPI <sup>a</sup>	53 (58.9)
糖皮质激素 <sup>b</sup>	41 (45.6)
给药途径 [n (%)]	
口服	72 (80.0)
静脉滴注	18 (20.0)
VRC 血药浓度测量次数 (中位数 [范围])	1 (1 ~ 21)
VRC 初次血药浓度分布 [n (%)]	
$< 1.0$ mg · L <sup>-1</sup>	39 (43.3)
$1.0 \sim 5.5$ mg · L <sup>-1</sup>	43 (47.8)
$> 5.5$ mg · L <sup>-1</sup>	8 (8.9)

注: PPIs<sup>a</sup> 为泮托拉唑 (37 例), 奥美拉唑 (11 例) 和兰索拉唑 (5 例)。糖皮质激素<sup>b</sup> 为地塞米松 (21 例), 甲泼尼龙 (16 例), 泼尼松 (4 例)。

Note: PPIs<sup>a</sup> were pantoprazole ( $n = 37$ ), omeprazole ( $n = 11$ ), and lansoprazole ( $n = 5$ ). The glucocorticoids<sup>b</sup> were dexamethasone ( $n = 21$ ), methylprednisolon ( $n = 16$ ), and prednisone ( $n = 4$ ).

中,  $< 6$  岁的患儿使用的口服和静脉滴注日剂量均显著高于  $\geq 6$  岁的患儿 ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.037$ ), 不同年龄组和给药途径达目标血药浓度使用的维持日剂量见图 2。达到 VRC 目标谷浓度的患儿使用的静脉滴注和口服维持日剂量分别为  $(12.11 \pm 3.51)$ 、 $(10.31 \pm 4.69)$  mg · kg<sup>-1</sup>, 均显著小于说明书推荐剂量 ( $P = 0.013$ ,  $P < 0.001$ )。

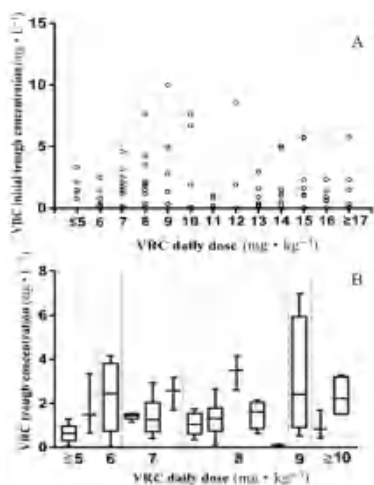


图 1 VRC 血药谷浓度的分布和变异性  
Fig 1 Distribution and variability of VRC plasma trough concentrations  
A. 儿童患者 VRC 初次血药浓度分布 (distribution of VRC first plasma trough concentrations in children); B. 相同剂量和给药途径至少 3 剂的儿童患者的血药浓度 (plasma trough concentrations for individual patients who received the same dose by the same route for at least 3 doses)

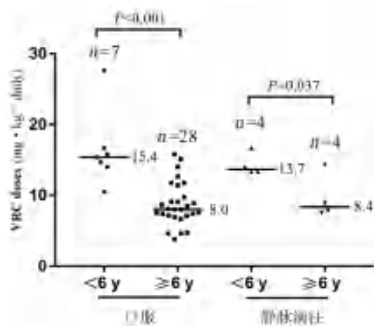


图 2 不同年龄组和给药途径达目标血药浓度使用的维持日剂量  
Fig 2 Maintenance daily dose used to reach the target range in different age groups and administration routes

### 2.4 影响 VRC 血药浓度的因素

影响 VRC 初次血药浓度的因素有性别、年龄、体重、给药途径、合并用药、肝肾功能、CYP2C19 基因分型等，以上述变量为自变量，血药浓度为因变量进行多元线性回归分析，结果显示 CYP2C19 基因分型、合并使用 PPI、白蛋白水平、谷丙转氨酶对儿童 VRC 血药浓度的影响具有统计学意义。多元线性回归模型经方差检验， $F = 3.294$ ,  $P < 0.001$ ,  $R^2 = 0.191$ ，表明血药浓度与 CYP2C19 基因分型、合并使用 PPI、白蛋白、谷丙转氨酶之间的线性关系是显著的，见表 2。

### 3 讨论

本研究是目前少有的针对 2 ~ 14 岁中国儿童患者的 VRC TDM 研究。VRC 呈现非线性药动力学的特征<sup>[15]</sup>，通过给药剂量很难预测血药浓度值。本研究发现儿童 VRC 个体间和个体内血药浓度差异较大，考虑到 VRC 的目标血药浓度范围较窄，为保障临床用药的疗效和安全性，有

表 2 多元线性回归分析法探索 VRC 血药浓度的影响因素

Tab 2 Coefficients of multivariate analysis by linear regression

影响因素	非标准化回归数		标准化偏回		<i>t</i>	<i>P</i>
	$\beta$	标准误	归数	Beta 值		
常量	2.386	1.294			1.844	0.067
年龄	0.058	0.061	0.123		0.959	0.339
性别	-0.126	0.270	-0.032		-0.468	0.640
体重	-0.022	0.014	-0.198		-1.506	0.134
给药途径	0.474	0.402	0.079		1.178	0.240
CYP2C19 基因型 <sup>a</sup>						
中间代谢	0.551	0.254	0.157		2.172	0.031
慢代谢	1.481	0.427	0.252		3.464	0.001
合并用药						
PPI	0.618	0.259	0.170		2.388	0.018
糖皮质激素	-0.223	0.250	-0.063		-0.892	0.373
肝功能						
白蛋白	-0.062	0.024	-0.202		-2.543	0.012
总胆红素	0.011	0.014	0.061		0.789	0.431
谷丙转氨酶	-0.008	0.003	-0.218		-2.358	0.019
谷草转氨酶	0.006	0.004	0.145		1.650	0.101
肾功能						
血肌酐	0.008	0.008	0.094		1.109	0.269
尿素氮	0.068	0.059	0.087		1.150	0.252

注 (Note): <sup>a</sup> 与快代谢型相比 (Compared to extensive metabolizers)。

必要在儿童患者中进行连续的 TDM。

本文研究达到 VRC 目标血药浓度的口服和静脉滴注的维持剂量时发现，< 6 岁患儿维持剂量均高于 ≥ 6 岁的患儿，这是由于低龄儿童较年长儿药物清除率高，表观分布容积大，需要的口服或静脉维持剂量更高的原因。Boast 等<sup>[15]</sup>研究表明达到目标浓度的静脉维持剂量 < 6 岁患儿高于 6 ~ 12 岁，6 ~ 12 岁患儿的静脉维持剂量高于 > 12 岁，与本研究相符。达到目标谷浓度的口服和静脉滴注维持日剂量 (均值分别为 10.31 mg·kg<sup>-1</sup>, 12.11 mg·kg<sup>-1</sup>) 均小于说明书的推荐剂量 ( $P = 0.013$ ,  $P < 0.001$ )，这是因为 VRC 主要经肝脏的 CYP2C19 酶代谢<sup>[16]</sup>，CYP2C19 酶具有基因多态性，本研究人群中 CYP2C19 酶的慢代谢型比例为 12.2%，高于白种人和黑种人报道的 2% ~ 3%<sup>[17]</sup>，慢代谢型的药物暴露量平均比纯合快代谢型的暴露量高 2 ~ 4 倍<sup>[18]</sup>，因此中国患者的 VRC 血药浓度水平可能比白种人或黑种人高，无论口服还是静脉滴注，中国儿童患者所需剂量可能小于原研厂家或欧美国家的推荐剂量。Liu 等<sup>[19]</sup>研究表明 5 ~ 7 mg·kg<sup>-1</sup> 的静脉给药剂量能使大部分亚裔儿童达到目标浓度，与本研究相符。

经过多元线性回归分析发现，CYP2C19 基因分型、合并使用 PPI、白蛋白、谷丙转氨酶对儿童 VRC 血药浓度的影响具有统计学意义，并

能解释 VRC 血药浓度部分变异性。CYP2C19 基因分型对 VRC 血药浓度的影响已在多个研究中被证实。本研究中合并使用的 PPI 主要有泮托拉唑、兰索拉唑、奥美拉唑三种, PPI 主要通过 CYP2C19 酶代谢, 是 VRC 代谢的竞争性抑制剂, Neely 等<sup>[20]</sup>研究表明, VRC 与任何 PPI 联用都会导致血药浓度显著高于单独使用 VRC, 临床用药中要注意合并用药的影响, 避免因合并使用 PPI 导致 VRC 血药浓度过高而诱发不良反应。

#### 4 小结

儿童患者给药后测量的血药浓度具有个体间变异性大, 初次达标率较低等特点, 因此, 进行连续的 TDM 是有必要的。患者的肝功能指标、白蛋白水平、是否合并使用 PPI 会影响血药浓度的变化, 在制订 VRC 给药策略时应充分考虑。由于基因背景的不同, 相比欧美儿童, 中国儿童患者使用 VRC 时可适当调低剂量, 但 < 6 岁患儿较年长患儿可使用更高的口服或静脉维持剂量, 具体的剂量调整规律还需要通过大样本的前瞻性研究来验证。儿童 VRC 血药浓度监测能指导临床制订优化的个体化用药方案, 为探索适用于亚裔儿童的剂量调整方法提供了研究数据, 对保障儿童用药有效性和安全性具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] King J, Pana ZD, Lehrnbecher T, et al. Recognition and clinical presentation of invasive fungal disease in neonates and children [J]. *J Pediatr Infect Dis Soc*, 2017, 6: S12-S21.
- [2] Frange P, Bougnoux ME, Lanternier F, et al. An update on pediatric invasive aspergillosis [J]. *Med Mal Infect*, 2015, 45 (6): 189-198.
- [3] Yong L, Min C, Hartmann T, et al. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126 (2): 361-368.
- [4] Elewa H, Elmekaty E, Elbardissy A, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole in the management of invasive fungal infections: a critical review [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54 (12): 1223-1235.
- [5] Knight-Perry J, Jennissen C, Long SE, et al. A phase I dose finding study of intravenous voriconazole in pediatric patients undergoing hematopoietic cell transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2020, 55: 955-964.
- [6] Park WB, Kim NH, Kim KH, et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55 (8): 1080-1087.
- [7] Jin H, Wang T, Falcione BA, et al. Trough concentration of voriconazole and its relationship with efficacy and safety: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71 (7): 1772-1785.
- [8] Tucker L, Higgins T, Egelund EF, et al. Voriconazole monitoring in children with invasive fungal infections [J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2015, 20 (1): 17-23.
- [9] Li ZW, Peng FH, Yan M, et al. Impact of CYP2C19 genotype and liver function on voriconazole pharmacokinetics in renal transplant recipients [J]. *Ther Drug Monit*, 2017, 39 (4): 422-428.
- [10] Shi HY, Yan J, Zhu WH, et al. Effects of erythromycin on voriconazole pharmacokinetics and association with CYP2C19, polymorphism [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66 (11): 1131-1136.
- [11] European Medicines Agency. Vfend: EPAR-Product Information (last updated 21/03/2012). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000387/WC500049756.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000387/WC500049756.pdf) (27 May 2012, date last accessed).
- [12] 中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童血液系统疾病及恶性肿瘤侵袭性真菌病诊疗建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2014, 52 (6): 426-429.
- [13] Pauw BED, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46 (12): 1813-1821.
- [14] Zonios D, Yamazaki H, Murayama N, et al. Voriconazole metabolism, toxicity, and the effect of cytochrome P450 2C19 genotype [J]. *J Infect Dis*, 2014, 209 (12): 1941-1948.
- [15] Boast A, Curtis N, Cranswick N, et al. Voriconazole dosing and therapeutic drug monitoring in children: experience from a paediatric tertiary care centre [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71 (7): 2031-2036.
- [16] Chen J, Wu Y, He Y, et al. Combined effect of CYP2C19 genetic polymorphisms and C-reactive protein on voriconazole exposure and dosing in immunocompromised children [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 846411.
- [17] PharmGKB.org. Gene-specific information tables for CYP2C19 [online]. Available at <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials> (last accessed 4 January 2019).
- [18] Wang G, Lei HP, Li Z, et al. The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65 (3): 281-285.
- [19] Liu L, Zhou X, Wu T, et al. Dose optimisation of voriconazole with therapeutic drug monitoring in children: a single-centre experience in China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49 (4): 483-487.
- [20] Neely M, Margol A, Fu X, et al. Achieving target voriconazole concentrations more accurately in children and adolescents [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (6): 3090-3097.

(收稿日期: 2022-12-15; 修回日期: 2023-02-05)



# 注射用生长抑素致低血糖风险的影响因素研究

陈雷, 张红, 王琦, 汪晓娟\* (阜阳市人民医院 药剂科, 安徽 阜阳 236000)

**摘要:** **目的** 探讨注射用生长抑素导致低血糖风险的危险因素, 为临床安全用药提供参考。**方法** 收集 2019 年 1 月—2021 年 12 月消化内科出院的 530 例接受生长抑素治疗的患者为研究对象, 回顾性分析患者的临床相关资料, 将单因素分析中有统计学意义的影响因素 ( $P < 0.05$ ) 纳入 Logistic 回归分析, 来分析生长抑素导致低血糖风险的危险因素。**结果** 530 例使用注射用生长抑素的患者中, 发生低血糖症状的患者有 38 例 (7.17%); 低血糖值在  $0.8 \sim 3.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其中有 22 例 (57.89%) 患者低血糖发生在用药 3 d 内。单因素分析结果显示, 低血糖发生的风险与年龄、血肌酐、血清总蛋白、白蛋白、前白蛋白、血红蛋白、红细胞、生长抑素使用总疗程及是否使用胰岛素密切相关。Logistic 回归显示: 年龄  $> 60$  岁、白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  是注射用生长抑素致低血糖发生的独立危险因素 ( $P < 0.05$ )。**结论** 临床使用注射用生长抑素治疗时需要注意监测患者的血糖水平, 尤其是针对年龄  $> 60$  岁及白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的患者, 一旦发现低血糖症状应立即采取有效处理措施, 保障患者用药的安全有效。

**关键词:** 生长抑素; 低血糖; 回顾性研究; 危险因素

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0819-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.045

## Risk factor for hypoglycemia caused by somatostatin for injection

CHEN Lei, ZHANG Hong, WANG Qi, WANG Xiao-juan\* (Department of Pharmacy, People's Hospital of Fuyang, Fuyang Anhui 236000)

**Abstract: Objective** To determine the risk factors for hypoglycemia caused by somatostatin for injection, and to provide reference for safe medication. **Methods** Totally 530 patients discharged from the Department of Gastroenterology from January 2019 to December 2021 who received somatostatin treatment were collected as the research objects. Clinical data of the patients were retrospectively analyzed. The risk factors for somatostatin-induced hypoglycemia with statistical significance in univariate analysis ( $P < 0.05$ ) were included in Logistic regression analysis. **Results** Among the 530 patients, 38 (7.17%) developed hypoglycemia ranging from  $0.8$  to  $3.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . While 22 (57.89%) out of the 38 had hypoglycemia within 3 days of medication. Single factor analysis showed that the risk of hypoglycemia was significantly correlated with age, serum creatinine, total serum protein, albumin, prealbumin, hemoglobin, erythrocyte, total duration of somatostatin use, and insulin use. Logistic regression showed that age  $> 60$  years and albumin  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  were independent risk factors for hypoglycemia induced by somatostatin for injection ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In clinical use of somatostatin for injection, attention should be paid to the blood glucose level of patients, especially for patients with age  $> 60$  years and albumin  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Once symptoms of hypoglycemia occur, effective treatment measures should be taken immediately to ensure the safety and effectiveness.

**Key words:** somatostatin; hypoglycemia; retrospective study; risk factor

生长抑素是人工合成的环状十四氨基酸肽, 其与天然的生长抑素在化学结构和作用方面完全相同, 静脉注射可抑制生长激素、促甲状腺激

素、胰岛素及胰高血糖素的分泌, 并抑制胃酸的分泌, 还能影响胃肠道的吸收、动力、内脏血流和营养功能, 临床主要用于治疗消化道出血、急

作者简介: 陈雷, 男, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 503649595@qq.com \*通信作者: 汪晓娟, 女, 主任药师, 主要从事医院药学、临床药理学和药事管理工作, email: wangxiaojuanfy@qq.com

性胰腺炎、食管静脉曲张出血, 预防和治疗胰腺手术后并发症及糖尿病酮症酸中毒等消化系统疾病<sup>[1]</sup>。虽然生长抑素在临床的应用较为广泛, 但其不良反应也值得关注, 特别是临床低血糖的发生时有报道<sup>[2-4]</sup>。而低血糖作为临床常见的急症, 若得不到及时有效的诊治, 可诱发心脑血管意外, 甚至危及患者生命<sup>[5]</sup>。因此, 临床上对生长抑素引起的低血糖症应做到尽早识别、发现及治疗。笔者采用回顾性研究方法, 分析生长抑素导致低血糖的相关危险因素, 旨在为临床安全有效地使用生长抑素提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

从本院合理用药信息系统 (PASS 系统) 筛选出 2019 年 1 月—2021 年 12 月消化内科出院的、使用过注射用生长抑素治疗的患者共 600 例。纳入标准: ① 2019 年 1 月—2021 年 12 月本院消化内科出院的且年龄  $\geq 18$  岁者; ② 病程中使用过注射用生长抑素者; ③ 临床资料记录完整者。排除标准: ① 年龄  $< 18$  岁者; ② 胰岛细胞瘤患者; ③ 同时或序贯使用奥曲肽者; ④ 生长抑素的溶媒非生理盐水者; ⑤ 临床资料记录不全者。最终纳入 530 例患者。

### 1.2 研究方法

通过本院 HIS 系统收集及查阅患者的电子病历信息, 使用 Excel 软件记录患者的临床资料, 包括住院号、姓名、性别、年龄、吸烟饮酒史、是否合并糖尿病、体质量、血肌酐、血清总蛋白、白蛋白、前白蛋白、血红蛋白、红细胞、有无使用胰岛素及有无感染以及生长抑素的使用情况 (剂量、总疗程等); 对于住院病程记录中记载的发生低血糖的患者, 详细记录这些患者低血糖发生的时间、低血糖值、低血糖症状及相应的处理措施, 并分析低血糖发生的危险因素。

参照 2012 年《中国糖尿病患者低血糖管理的专家共识》<sup>[6]</sup> 及 2020 年版的《中国 2 型糖尿病防治指南》<sup>[7]</sup>, 低血糖的判定标准为: 糖尿病患者血糖水平  $\leq 3.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 非糖尿病患者血糖水平  $< 2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照我国《药品不良反应报告和监测工作手册》中药物与不良反应的因果关系判定标准, 生长抑素致低血糖的关系分为肯定、很可能及可能; 其评价结果由两位研究者讨论后并由第三位研究者复核后最终确定。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 23 统计学软件进行分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 符合正态分布则用  $t$  检验, 不符合正态分布的采用  $U$  检验, 以

中位数  $M(P_{25}, P_{75})$  表示。计数资料采用  $n(\%)$  表示, 采用  $\chi^2$  检验。单因素分析中有统计学意义的影响因素 ( $P < 0.05$ ) 即纳入二元 Logistic 回归, 来分析生长抑素致低血糖的危险因素,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

使用注射用生长抑素的 530 例患者中, 男 307 例, 女 223 例; 年龄 18 ~ 95 岁, 中位数为 46.53 岁; 用药总疗程 1 ~ 15 d, 中位数为 3.01 d; 注射用生长抑素的用法用量均为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$  连续泵入; 主要用于治疗消化道出血、急性胰腺炎、食管静脉曲张出血及预防/治疗内镜下逆行胰胆管造影术 (ERCP) 术后胰腺炎的发生。

### 2.2 注射用生长抑素致低血糖发生的单因素分析

530 例使用注射用生长抑素的患者中有 38 例发生低血糖, 发生率为 7.17%。单因素分析结果显示, 年龄  $> 60$  岁、血肌酐  $> 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、血清总蛋白  $\leq 60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、前白蛋白  $\leq 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、血红蛋白  $\leq 90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、红细胞  $\leq 3.5 \times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生长抑素使用总疗程  $> 6 \text{ d}$  及使用胰岛素是导致患者发生低血糖风险的影响因素 ( $P < 0.05$ ), 详见表 1。

### 2.3 注射用生长抑素致低血糖发生的 Logistic 回归分析

选择单因素分析中有统计学意义的影响因素 ( $P < 0.05$ ) 进行赋值 (见表 2) 并进行二元 Logistic 回归分析。结果发现年龄  $> 60$  岁、白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  是注射用生长抑素致低血糖发生的独立危险因素。详见表 3。

### 2.4 不良反应发生的时间、处理和转归

38 例使用注射用生长抑素并发低血糖的患者中, 低血糖值范围在  $0.8 \sim 3.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 其中有 22 例 (57.89%) 患者低血糖发生在用药 3 d 内, 38 例患者低血糖发生的时间及血糖值详见图 1。其中, 34 例患者出现低血糖发作症状, 主要表现为心慌、烦躁、胸闷、大汗、饥饿感等; 4 例患者的低血糖是在临床血糖监测时发现的, 患者并无明显的临床表现。所有并发低血糖的患者均予以 50% 葡萄糖注射液静脉推注等对症处理后好转, 且对原发病的病程及预后均无明显影响。

## 3 讨论

生长抑素是人工合成的肽类激素, 半衰期在 1.1 ~ 3.0 min。基于其独特的药理作用, 生长抑素在消化道出血、急性胰腺炎及食管静脉曲张出血等消化系统疾病的治疗方面得到了较为广泛的应用<sup>[1]</sup>, 其诱发的低血糖不良反应也偶有报

表 1 注射用生长抑素致低血糖风险的单因素分析

Tab 1 Single factor analysis of the risk of hypoglycemia induced by somatostatin for injection

相关因素	总例数 /n	低血糖例数 /n	低血糖发生率 /%	$\chi^2$	P
年龄 / 岁	> 60	81	18	22.22	32.548 < 0.001
	≤ 60	449	20	4.45	
性别	女	223	11	4.93	0.089 2.895
	男	307	27	8.79	
吸烟史	否	407	28	6.88	0.222 0.638
	是	123	10	8.13	
饮酒史	否	365	23	6.30	1.329 0.249
	是	165	15	9.09	
合并糖尿病	否	494	36	7.29	0.000 0.992
	是	35	2	5.71	
血肌酐 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 100	10	4	40.00	9.781 0.002
	≤ 100	494	28	5.67	
体质量 /kg	> 60	325	18	5.54	2.255 0.133
	≤ 60	164	15	9.15	
总蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 60	355	13	3.66	11.087 0.001
	≤ 60	161	18	11.18	
白蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 35	481	15	3.12	94.282 < 0.001
	≤ 35	36	16	44.44	
前白蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 200	164	8	4.88	7.019 0.008
	≤ 200	115	16	13.91	
血红蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 90	412	22	5.34	7.839 0.005
	≤ 90	117	15	12.82	
红细胞 / ( $\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$ )	> 3.5	349	16	4.58	9.156 0.002
	≤ 3.5	180	21	11.67	
是否使用胰岛素	是	34	7	20.59	7.792 0.005
	否	496	31	6.25	
有无合并感染	有	70	7	10.00	0.971 0.325
	无	460	31	6.74	
生长抑素使用总疗程 /d	> 6	80	14	17.50	15.107 < 0.001
	≤ 6	450	24	5.33	

表 2 注射用生长抑素致患者发生低血糖的可能影响因素赋值

Tab 2 Assignment of possible influencing factors of hypoglycemia induced by somatostatin for injection

因素	变量名	赋值说明	
		0	1
$X_1$	年龄	≤ 60 岁	> 60 岁
$X_2$	血肌酐	≤ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	> 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_3$	总蛋白	≤ 60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	> 60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_4$	白蛋白	≤ 35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	> 35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_5$	前白蛋白	≤ 200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	> 200 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_6$	血红蛋白	≤ 90 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	> 90 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_7$	红细胞	≤ 3.5 $\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$	> 3.5 $\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$
$X_8$	是否使用胰岛素	否	是
$X_9$	生长抑素使用总疗程	≤ 6 d	> 6 d
Y	生长抑素致低血糖发生	未发生低血糖	发生低血糖

道<sup>[2-4]</sup>。而药物导致的低血糖临床不常见且不易被发现,若诊治不及时,后果较为严重<sup>[8-9]</sup>。Lunetta 等<sup>[10]</sup>研究显示静脉注射生长抑素能够抑制胰岛素和胰高血糖素的分泌,导致这两种激素的水平降低,从而引起血糖的降低。而其对血糖的调控作用一直未引起临床的关注,目前为止仅有少量文献进行相关报道<sup>[11]</sup>。生长抑素影响血糖的机制较为复杂,其能够从多个途径、多种机制引起机体血糖水平的下降,可能的机制主要有:① 延缓胃肠道对糖的吸收,降低餐后血糖水平;② 抑制葡萄糖及电解质的吸收,并促进血糖向组织内的转运,从而降低血糖水平<sup>[12]</sup>;③ 直接作用于胰岛  $\alpha$ 、 $\beta$  细胞,抑制胰高血糖素和胰岛素的分泌<sup>[13-14]</sup>,而其对前者的抑制作用较后者强 10 ~ 20 倍<sup>[15]</sup>;④ 减轻胰岛素抵抗,改善糖代谢从而降低血糖的水平<sup>[16]</sup>。此外,生长抑素还可以通过激活 2 型生

表 3 注射用生长抑素致患者发生低血糖的危险因素 Logistic 回归分析

Tab 3 Logistic regression analysis of risk factors for hypoglycemia in patients with somatostatin for injection

变量	分组	B 值	标准误	Wald	P	OR	95%CI
年龄	≤ 60 岁*						
	> 60 岁	1.284	0.631	4.140	0.042	3.612	1.048 ~ 12.449
白蛋白	≤ 35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ *						
	> 35 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	- 3.246	0.810	16.052	< 0.001	0.039	0.008 ~ 0.190

注 (Note): \* 为对照组 (\* Indicated the control group)。

长抑素受体来抑制胰高血糖素对低血糖刺激的反应,从而导致其对低血糖反应能力的下降<sup>[12-13]</sup>。

本研究结果显示,使用注射用生长抑素的患者低血糖的发生率为 7.17%,这与文献<sup>[4, 17]</sup>的研究类似。有报道<sup>[18]</sup>显示使用注射用生长抑素的患者低血糖的发生率为 18.75%,且所有低血糖反应均发生在凌晨 2 ~ 3 点;可能是由于该研究中纳入的患者均为急性胰腺炎及胰十二指肠切除后的患者,此类患者常须禁食,且机体处于应激状态、用药种类较多,而机体对低血糖的反应较

迟钝,不能及时对低血糖进行代偿;此外,急性胰腺炎(尤其是重度急性胰腺炎)时,由于胰岛破坏及应激激素水平的升高、感染与炎症反应等因素,使得血糖水平升高,此时临床上常使用胰岛素来治疗,导致低血糖发生的风险增高。徐华等<sup>[19]</sup>研究显示使用注射用生长抑素的患者低血糖反应发生率为 22.22%,可发生在一天当中的任意时间段。而本研究中 38 例患者中低血糖反应发生在 18 点至早上 7 点前的有 19 例(50%),故临床在使用注射用生长抑素的同时需严密监测患



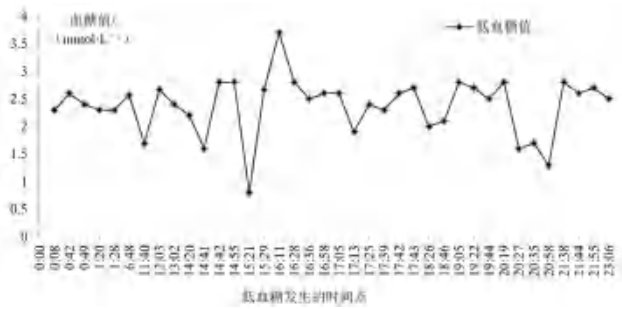


图 1 38 例使用注射用生长抑素并发低血糖患者低血糖发生的时间点及对应血糖值

Fig 1 Time points of hypoglycemia and corresponding blood glucose values in 38 patients with hypoglycemia complicated by somatostatin injection

者的血糖水平，特别是在夜间巡视病房时注意观察患者、询问不适，及早发现低血糖症状并处理，保障患者用药的安全。此外，本研究发现患者年龄 > 60 岁及血清白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  是使用注射用生长抑素过程中导致低血糖的独立危险因素。有研究报道，47 例消化道出血的患者使用注射用生长抑素后，有 34 例发生低血糖，平均年龄在 70 岁左右，这可能与老年患者的体质差、基础疾病多、胃肠道等器官耐受能力较差等相关<sup>[20]</sup>。静脉注射生长抑素在肾损伤的患者中的血浆清除会减少<sup>[21]</sup>，而对于高龄患者，其器官功能退化，可能导致生长抑素在体内的清除减慢、易引起药物在体内的蓄积，且老年患者低血糖较为缓慢<sup>[4]</sup>，易发生在夜间，自觉症状较少，故老年患者的低血糖发生风险较大<sup>[22]</sup>。白蛋白水平降低的患者机体内的白蛋白消耗增加，其合成不足以代偿其代谢，体内蛋白质代谢处于负氮平衡状态，且对外源性营养底物反应差，此类患者本身发生低血糖的风险就比较高，故对于白蛋白  $\leq 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的患者合并使用注射用生长抑素时需要注意监测血糖水平，以便及早发现低血糖症状并处理。

综上所述，注射用生长抑素作为治疗消化系统疾病的药物，在临床的使用越来越广泛，但其不良反应尤其是对患者血糖的影响不容忽视，特别是对于高龄及白蛋白水平较低的患者，在使用生长抑素治疗的同时需要注意监测患者的血糖水平，尤其是在夜间，一旦发现低血糖症状应立即采取有效处理措施，保障临床患者用药的安全有效。

### 参考文献

[1] 谷铁波, 宋欣颖, 周晓峰. 停用注射用生长抑素致严重腹泻 1 例[J]. 中南药学, 2010, 8(10): 796-797.  
 [2] 王茂茹, 余彬, 王宇. 生长抑素致低血糖症一例分析[J]. 现代医学, 2021, 49(10): 1237-1239.  
 [3] 怀一胜, 温红珠, 曲环汝. 生长抑素引起的血压升高、

心动过缓并发低血糖 1 例[J]. 中国药师, 2022, 25(5): 854-855.  
 [4] 赵西峰, 毛淑敏. 34 例注射用生长抑素致低血糖不良反应分析[J]. 中国处方药, 2021, 19(3): 64-66.  
 [5] 季卫忠. 急诊糖尿病低血糖临床诊治分析[J]. 中外医学研究, 2016, 14(17): 104-105.  
 [6] 中华医学会内分泌学分会. 中国糖尿病患者低血糖管理的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(8): 619-623.  
 [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2021, 41(5): 482-548.  
 [8] 金晨曦, 郭立新. 低血糖及低血糖-葡萄糖再灌注损伤[J]. 中华糖尿病杂志, 2017, 9(3): 153-156.  
 [9] 曹钰, 柴艳芬, 邓颖, 等. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南(2018)[J]. 临床急诊杂志, 2018, 19(9): 567-588.  
 [10] Lunetta M, MD Mauro, Moli RL, et al. Effect of octreotide on blood glucose and counterregulatory hormones in insulin-dependent diabetic patients: the role of dose and route of administration [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1996, 51(2): 139-144.  
 [11] Chantelau E, Frystyk J. Progression of diabetic retinopathy during improved metabolic control may be treated with reduced insulin dosage and/or somatostatin analogue administration—a case report [J]. Growth Horm IGF Res, 2005, 15(2): 130-135.  
 [12] 张芳林, 张闾珍. 生长抑素与糖尿病[J]. 国外医学(内分泌学分册), 2001, 21(1): 1-3.  
 [13] Hauge-Evans AC, Bowe J, Franklin ZJ, et al. Inhibitory effect of somatostatin on insulin secretion is not mediated via the CNS [J]. J Endocrinol, 2015, 225(1): 19-26.  
 [14] Yue JT, Burdett E, Coy DH, et al. Somatostatin receptor type 2 antagonism improves glucagon and corticosterone counterregulatory responses to hypoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Diabetes, 2012, 61(1): 197-207.  
 [15] 肖招英. 微量泵持续静脉注射生长抑素治疗消化道出血致低血糖 24 例分析[J]. 中国基层医药, 2013, 20(12): 1897-1898.  
 [16] 杨萍, 刘聪, 祝金明, 等. 生长激素和生长抑素对大鼠胰岛  $\beta$  细胞功能和糖代谢的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(8): 725-727.  
 [17] 王倩, 顾巧华. 老年性消化道出血患者使用生长抑素静脉治疗后发生低血糖反应的护理[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(82): 378.  
 [18] 李红梅, 张亚波. 持续泵入生长抑素时防止发生低血糖的方法[J]. 实用临床医药杂志, 2012, 16(16): 122-123.  
 [19] 徐华, 陈易, 金颖, 等. 生长抑素及其类似物奥曲肽治疗急性胰腺炎时诱发的低血糖[J]. 中华胰腺病杂志, 2014, 14(2): 117-119.  
 [20] 韩丽平, 彭静. 生长抑素治疗上消化道出血致低血糖原因分析及护理对策[J]. 全科护理, 2015, 13(35): 3583-3584.  
 [21] Harris AG. Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects [J]. Gut, 1994, 35(3 Suppl): 1-4.  
 [22] 王娜, 王海涛, 杨鑫, 等. 奥曲肽所致低血糖风险的回顾性研究[J]. 实用药物与临床, 2021, 24(1): 82-84.

(收稿日期: 2022-07-19; 修回日期: 2022-08-16)

## 分次立体定向放疗同步化疗联合贝伐珠单抗治疗肺癌脑转移的疗效及安全性

梁丹<sup>1</sup>, 张又红<sup>1</sup>, 苏天海<sup>2</sup>, 冯波<sup>2</sup>, 杨相辉<sup>2</sup>, 王桂华<sup>2\*</sup> (1. 湖南省中医药大学, 长沙 410208; 2. 南华大学附属长沙中心医院肿瘤科, 长沙 410004)

**摘要:** **目的** 探讨分次立体定向放疗同步化疗联合贝伐珠单抗治疗非小细胞肺癌脑转移患者的疗效及安全性。**方法** 选取 45 例非小细胞肺癌脑转移的患者进行回顾性研究, 根据治疗方法的不同分为观察组 ( $n = 22$ ) 和对照组 ( $n = 23$ )。两组均采用分次立体定向放疗同步化疗, 观察组在此基础上联合贝伐珠单抗。比较两组的客观缓解率 (ORR)、疾病控制有效率 (DCR)、颅内高压缓解率、卡氏评分 (KPS) 改善情况、1 年复发率和颅内疾病无进展生存时间 (iPFS), 记录两组的不良反应。**结果** 观察组的 ORR 为 59.09%, 高于对照组的 26.09% ( $P < 0.05$ ); 两组的 DCR 分别为 86.36% 和 69.57% ( $P > 0.05$ )。观察组的颅内高压缓解率为 59.09%, 高于对照组的 21.74% ( $P < 0.05$ )。观察组的 KPS 评分上升率为 68.18%, 较对照组的 39.13% 有改善趋势 ( $P = 0.05$ )。观察组的 1 年复发率为 40.91%, 低于对照组的 73.91% ( $P < 0.05$ ); 观察组的 iPFS 为 17.22 个月, 长于对照组的 10.30 个月 ( $P < 0.05$ )。两组不良反应相近 ( $P > 0.05$ )。**结论** 在非小细胞肺癌脑转移患者中, 分次立体定向放疗同步化疗联合贝伐珠单抗能提高 ORR, 改善颅内高压症状和生存质量, 降低 1 年复发率和延长颅内无疾病进展时间, 具有肯定的临床疗效和良好的安全性。

**关键词:** 非小细胞肺癌; 脑转移; 分次立体定向放疗; 化疗; 贝伐珠单抗

中图分类号: R73.37 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)03-0823-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.046

### Efficacy and safety of fractionated stereotactic radiotherapy concurrent chemotherapy combined with bevacizumab in the treatment of brain metastasis of lung cancer

LIANG Dan<sup>1</sup>, ZHANG You-hong<sup>1</sup>, SU Tian-hai<sup>2</sup>, FENG Bo<sup>2</sup>, YANG Xiang-hui<sup>2</sup>, WANG Gui-hua<sup>2\*</sup> (1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Department of Oncology, Changsha Central Hospital Affiliated to University of South China, Changsha 410004)

**Abstract: Objective** To evaluate the efficacy and safety of fractionated stereotactic radiotherapy concurrent chemotherapy combined with bevacizumab in the treatment of patients with brain metastasis of non-small cell lung cancer. **Methods** Totally 45 patients with brain metastasis of non-small cell lung cancer were selected for a retrospective study. According to the different treatment methods, they were divided into a observation group ( $n = 22$ ) and a control group ( $n = 23$ ). Both groups were treated with fractionated stereotactic radiotherapy concurrent chemotherapy, and the observation group was also combined with bevacizumab. The objective response rate (ORR), disease control rate (DCR), remission rate of intracranial hypertension, improvement rate of Karnofsky score

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目 (编号: 20201903) 和长沙市科技计划项目 (编号: kq1907022)。

作者简介: 梁丹, 女, 硕士研究生, 主要从事恶性肿瘤的放化疗、靶向治疗等方面的研究, email: 2301380842@qq.com

\*通信作者: 王桂华, 男, 主任医师, 主要从事恶性肿瘤放化疗、靶向及免疫治疗等方面的研究, email: Wangguihua8890@163.com

(KPS), 1-year recurrence rate and intracranial progression-free survival time (iPFS) were compared between the two groups. **Results** The ORR of the observation group was 59.09%, which was higher than that of the control group (26.09%,  $P < 0.05$ ), and the DCR of the two groups was 86.36% and 69.57% respectively ( $P > 0.05$ ). The remission rate of intracranial hypertension in the observation group was 59.09%, which was higher than that of the control group (21.74%,  $P < 0.05$ ). The rising rate of KPS score in the observation group was 68.18%, which was better than that in the control group (39.13%,  $P = 0.05$ ). The 1-year recurrence rate of the observation group was 40.91%, which was lower than that of the control group (73.91%,  $P < 0.05$ ), and the iPFS of the observation group was 17.22 months, which was longer than that of the control group (10.30 months,  $P < 0.05$ ). The adverse reactions of the two groups were similar ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In patients with brain metastasis of non-small cell lung cancer, fractionated stereotactic radiotherapy concurrent chemotherapy combined with bevacizumab can increase the objective response rate, improve the symptoms of intracranial hypertension and life of quality, decrease the 1-year recurrence rate and prolong intracranial progression-free survival time, with definite clinical efficacy and good safety.

**Key words:** non-small cell lung cancer; brain metastasis; fractionated stereotactic radiotherapy; chemotherapy; bevacizumab

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 极易发生脑转移 (brain metastasis, BM), 约 50% 的患者在首诊或疾病发展过程中发生 BM<sup>[1]</sup>。此类患者的生存质量及预后极差, 其中位生存期通常不足 3 个月<sup>[2]</sup>。目前, 化疗是临床上延长晚期 NSCLC 患者生存期的一种有效手段, 但全身化疗药物无法通过血脑屏障<sup>[3]</sup>, 因此在 BM 的治疗中效果欠佳。为进一步提高 NSCLC 伴 BM 患者的疗效, 放疗与靶向治疗受到临床关注<sup>[4-5]</sup>。有研究发现分次立体定向放疗 (fractionated stereotactic radiotherapy, FSRT) 能精准定位, 高剂量适形照射, 提高脑转移灶受照剂量的同时不增加放射性损伤, 已逐渐成为治疗 BM 的一项重要手段, 尤其是在是 1~5 个脑转移病灶中<sup>[6]</sup>。然而, FSRT 不能迅速缓解颅内高压症状和预防新发 BM<sup>[6]</sup>。贝伐珠单抗作为一种抗血管生成靶向药物, 它可以通过抑制新生血管形成达到抑制肿瘤形成的目的, 也可以降低血管通透性减轻脑水肿, 从而缓解患者的颅内高压症状, 提高生活质量<sup>[7]</sup>。因此, 为探讨 FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗治疗 NSCLC 伴 BM 患者的临床疗效及安全性, 本文对 45 例患者的临床资料进行回顾性研究, 现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

回顾性分析 2015 年 10 月至 2021 年 4 月于南华大学附属长沙中心医院 (以下简称“本院”) 肿瘤科收治的 45 例 NSCLC 伴 BM 患者的临床资料, 按照治疗方式分为两组, ① 观察组: 接受

FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗的患者 22 例; ② 对照组: 接受 FSRT 同步化疗的患者 23 例。本研究经过本院伦理委员会批准 (伦理批号: 2022-S0232)。纳入标准: ① 经病理学确诊为 NSCLC 患者; ② 经影像学检查 (MRI 或 CT) 证实有脑转移 (转移数目 1~5 个); ③ 无基因突变或经酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 治疗耐药后出现脑转移; ④ 年龄  $\geq 18$  岁; ⑤ 卡氏评分 (Karnofsky, KPS)  $\geq 70$  分; ⑥ 脑转移病灶治疗方式为 FSRT 同步化疗联合或不联合贝伐珠单抗; ⑦ 患者及家属均自愿签署治疗知情同意书。排除标准: ① 存在第二原位癌; ② 治疗前存在重要脏器功能障碍或认知功能障碍; ③ 对本研究所用药物过敏或存在明显的全身化疗禁忌证者; ④ 随访资料漏缺。

### 1.2 治疗方法

放疗方案: 采用陀螺旋转  $^{60}\text{Co}$  立体定向放疗系统 (上海西门子医疗器械有限公司) 行 FSRT, 处方剂量为 28~40 Gy, 分 7~10 次完成, 按 LQ 公式计算生物等效剂量 (biological effective dose, BED),  $\text{BED} = nd [1 + d / (\alpha/\beta)]$ ,  $\alpha/\beta = 10$ , 病灶的 BED 为 3900~5600 cGy。全部患者放疗期间均给予 20% 甘露醇 [四川科伦药业股份有限公司; 国药准字: H20043784; 规格: 50 mg (250 mL) / 瓶], 剂量为 125 mL, 2 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ 。化疗方案: 紫杉醇 (观察组 11 例, 对照组 9 例) [江苏红豆杉药业有限公司; 国药准字: H20067345; 规格: 30 mg (5 mL) / 瓶], 剂量为 175  $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$ , 3 周 / 次或培美曲塞 (观察组 11 例, 对照组 14 例) [Elilily



And Company; 国药准字: H20140662; 规格: 500 mg/瓶], 剂量为 500 mg · m<sup>-2</sup>, 3 周/次。靶向治疗方案: 贝伐珠单抗 [Roche Diagnostics GmbH; 国药准字: S20170035; 规格: 100 mg (4 mL)/瓶], 剂量为 7.5 mg · kg<sup>-2</sup>, 3 周/次。

对照组采用 FSRT 同步化疗; 观察组在对照组的基础上联合贝伐珠单抗。

### 1.3 观察指标

近期疗效评价标准参照 RECIST 1.1: 完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、疾病稳定 (SD) 以及疾病进展 (PD)。客观缓解率 (ORR, %) = (CR + PR) / 总病例数 × 100%, 疾病控制率 (DCR, %) = (CR + PR + PD) / 总病例数 × 100%。远期疗效: 记录 1 年颅内复发率; 颅内无进展生存期 (iPFS) 为患者开始接受脑放疗至脑转移灶进展或死亡或末次随访的时间。

采用 KPS 评分评估患者生存质量, 并在治疗期间观察药物不良反应和监测患者的颅内高压症状 (参照 CTCAE V4.03)。患者接受治疗后每 3 个月进行常规颅脑 MRI 检查, 当患者出现新发颅内压增高症状或原有颅内压增高症状加重时会立即再次复查颅脑 MRI 并进行评估。

### 1.4 随访情况

通过电话、门诊复查、住院检查等方式对患者进行随访, 记录截止时间为 2022 年 4 月 1 日。

### 1.5 统计方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理, 计数资料以率 (%) 表示, 两组间比较采用  $\chi^2$  或 Fisher 确切检验; 符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 不符合正态分布的计量资料用 *M* (*Q1*, *Q3*) 表示, 组间比较采用非参数秩和检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 研究结果

### 2.1 两组患者的一般资料的比较

观察组中男 13 例, 女 9 例; 年龄 (61.64 ± 10.66) 岁; 腺癌 15 例, 鳞癌 6 例, 大细胞癌 1 例; KPS 70 (70, 80) 分; 共 42 个脑转移病灶; 有颅外转移 13 例, 无颅外转移 9 例; 放疗剂量为 4000 (3000, 4000) cGy; BED 为 5600 (3900, 5600) cGy。对照组中男 19 例, 女 4 例; 年龄 (64.69 ± 8.72) 岁; 腺癌 17 例, 鳞癌 4 例, 腺鳞癌 2 例; KPS 80 (70, 80) 分; 共 44 个脑转移病灶; 有颅外转移 16 例, 无颅外转移 7 例; 放疗剂量为 4000 (3000, 4000) cGy; BED 为 5600 (3920, 5600) cGy。两组的一般资料比较, 差异无统计学意义。

### 2.2 两组患者的近期疗效的比较

观察组的 ORR 高于对照组 (*P* < 0.05)。观察组与对照组之间的 DCR 差异无统计学意义 (*P* > 0.05)(见表 1)。

表 1 两组患者治疗后的近期疗效比较 [n(%)]

Tab 1 Comparison of short-term efficacy between the two groups after the treatment [n(%)]

组别	CR	PR	SD	PD	ORR	DCR
观察组 ( <i>n</i> = 22)	1 (4.55)	12 (54.54)	6 (27.27)	3 (13.64)	13 (59.09)	19 (86.36)
对照组 ( <i>n</i> = 23)	1 (4.35)	5 (21.74)	10 (43.48)	7 (30.43)	6 (26.09)	16 (69.57)
Fisher' $\chi^2$					5.021	1.795
<i>P</i>					< 0.05	> 0.05

### 2.3 两组患者 KPS 的比较

观察组的患者经过治疗后 KPS 评分上升 15 例 (68.18%), 不变 7 例 (31.82%); 对照组中的患者经过治疗后 KPS 评分上升 9 例 (39.13%), 不变 14 例 (60.87%)。观察组较对照组的 KPS 评分有提高的趋势 (*P* = 0.05)。

### 2.4 两组患者的颅内压变化情况

根据 CTCAE V4.03 症状等级显示: 观察组中, 颅内高压症状分级降低 2 级的患者有 2 例 (9.09%), 降低 1 级的患者有 11 例 (50.00%), 无降低的患者 9 例 (40.91%), 观察组的患者经过治疗后颅内高压症状改善率为 59.09%; 对照组中, 颅内高压症状分级降低 2 级的患者有 1 例 (4.35%), 降低 1 级的患

者有 4 例 (17.39%), 无降低的患者 18 例 (78.26%), 对照组的患者经过治疗后颅内高压症状改善率为 21.74%。两组患者的颅内高压症状改善率差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。

### 2.5 两组患者的远期疗效的比较

观察组与对照组的 1 年复发率分别为 40.91% (9/22 例)、73.91% (17/23 例), 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); 观察组与对照组的 iPFS 分别为 17.22 个月、10.30 个月, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)(见图 1)。

### 2.6 两组患者不良反应的比较

观察组与对照组之间接受治疗后的不良反应差异无统计学意义 (*P* < 0.05)(见表 2)。

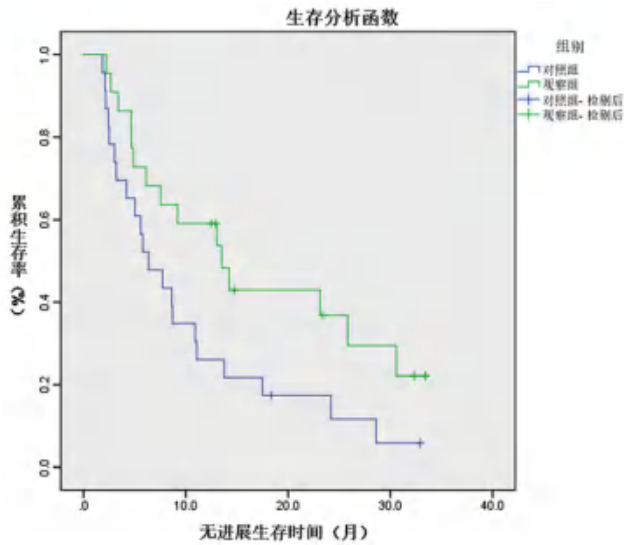


图 1 两组肺癌脑转移患者的 Kaplan-Meier 生存曲线  
Fig 1 Kaplan-Meier survival curve of the two groups of lung cancer patients with brain metastasis

表 2 两组患者不良反应发生率的比较 [n(%)]

Tab 2 Comparison of the incidence of adverse reactions between the two groups [n(%)]

组别	恶心 / 呕吐	白细胞减少	血小板减少	血红蛋白减少	中性粒细胞减少	腹泻
观察组 (n = 22)	8 (36.36)	3 (13.64)	1 (4.55)	9 (40.90)	3 (13.64)	3 (13.64)
对照组 (n = 23)	7 (30.43)	3 (13.04)	0 (0.00)	9 (39.13)	2 (8.69)	1 (4.35)
Fisher' $\chi^2$	0.101	0.003	1.045	1.015	0.272	1.171
P	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

能够竞争血管内皮生长因子结合位点的一种靶向抗肿瘤药物，它能降低血管通透性从而减轻瘤周水肿<sup>[3, 16]</sup>，这可能就是患者颅内压下降显著、生存治疗改善的重要原因。此外，贝伐珠单抗能够增加肿瘤乏氧细胞的血供和氧合，具有增强放疗敏感性的作用<sup>[17-18]</sup>。另有研究通过构建动物脑转移模型发现贝伐珠单抗能够穿透并改变血脑屏障<sup>[19]</sup>，这也有利于增加颅内的化疗药物的血药浓度<sup>[13]</sup>。因此联合贝伐珠单抗组能有更好的 ORR。本研究还发现联合贝伐珠单抗组能延长患者的 iPFS，降低 1 年复发率。这与其他报道<sup>[7, 20-21]</sup>研究发现一致。这可能是由于贝伐珠单抗能使异常血管正常化和抑制新生血管的生成<sup>[22]</sup>，在控制颅内肿瘤进展的同时还可降低 NSCLC 新发 BM 的发生风险。

本研究结果显示 FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗具有良好的安全性。贝伐珠单抗常见的不良反应主要为轻度的恶心呕吐、骨髓抑制及腹泻等<sup>[23]</sup>，本研究中两组患者的不良反应均无显著差异，该结果与较多报道一致<sup>[13, 23]</sup>；贝伐珠单抗少见的不良反应主要为脑出血、血压升高、肾病综合征、急性心肌梗死、胃肠穿孔等<sup>[24]</sup>，而本观察

### 3 讨论

研究数据显示，肺癌的死亡率居所有恶性肿瘤之首<sup>[8]</sup>，而 BM 尤其是肺癌患者疾病进展和死亡的重要原因<sup>[9]</sup>。因此，如何优化这类患者的生存质量和总体生存率是临床治疗的首要目标。

本研究结果表明，在 NSCLC 伴 BM 患者 FSRT 同步化疗期间，联合使用贝伐珠单抗能提高 ORR，减轻颅内高压，还可以提高 KPS 评分从而改善生存质量，这与已报道文献<sup>[10-13]</sup>研究结果一致，这提示 FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗具有积极的临床疗效。分析其原因为：肿瘤细胞的发生、发展与大量新生血管形成有关，这一过程需要依赖许多调节血管生成的因子，其中最重要的因子包括血管内皮生长因子，它能促进血管持续生长和增加血管内皮的通透性，从而导致肿瘤细胞的增殖与瘤周水肿<sup>[14-15]</sup>。贝伐珠单抗正是

组中仅 1 例患者出现血压升高，予以降压药物对症处理后血压控制稳定。这提示 FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗的少见不良反应在定期监测下，具有可控性。

本研究为回顾性研究，由于客观条件的限制，随访到的病例较少。综上所述，本回顾性研究结果发现对于 NSCLC 伴 BM 患者，FSRT 同步化疗联合贝伐珠单抗具有肯定的临床疗效且安全性良好，具有一定的临床价值。

### 参考文献

- [1] Ouyang W, Yu J, Zhou Y, et al. Metachronous brain metastasis in patients with EGFR-mutant NSCLC indicates a worse prognosis [J]. J Cancer, 2020, 11 (24): 7283-7290.
- [2] 吴寅飞, 周娟, 叶伶云, 等. 驱动基因阴性晚期非小细胞肺癌脑转移免疫微环境及免疫治疗的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48 (24): 1253-1258.
- [3] 张语涵, 李姗姗, 刘浩. 非小细胞肺癌脑转移靶向治疗及免疫治疗进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38 (14): 1788-1794.
- [4] 中国医师协会放射肿瘤治疗医师分会. 脑转移瘤立体定向放射治疗临床指南 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2021, 48 (8): 456-462.

- [5] 中国医师协会肿瘤医师分会, 中国医疗保健国际交流促进会肿瘤内科分会. 肺癌脑转移中国治疗指南(2021年版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(3): 269-281.
- [6] 韩雪, 李红梅. 非小细胞肺癌脑转移治疗的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(12): 1087-1094.
- [7] Liang P, Wang YD, Wei ZM, et al. Bevacizumab for non-small cell lung cancer patients with brain metastasis: a meta-analysis [J]. Open Med (Warsaw, Poland), 2020, 15(1): 589-597.
- [8] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [9] Siegel R, Miller K, Fuchs H, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [10] 潘绵顺, 李勇, 邱书珺, 等. SRT联合贝伐珠单抗治疗肺腺癌脑转移瘤的疗效评估[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(8): 880-883.
- [11] 王强. 放疗联合贝伐珠单抗治疗肺腺癌脑转移瘤伴脑水肿的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(31): 81-82, 5.
- [12] 杨泽兴. 贝伐珠单抗治疗腺癌脑转移瘤顽固性瘤周水肿的临床研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
- [13] 张小燕, 张婕, 张义灵, 等. 培美曲塞联合贝伐珠单抗治疗非鳞非小细胞肺癌脑转移的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(19): 24-26.
- [14] Daum S, Hagen H, Naismith E, et al. The role of anti-angiogenesis in the treatment landscape of non-small cell lung cancer-new combinational approaches and strategies of neovessel inhibition [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 610903.
- [15] Alshangiti A, Chandhoke G, Ellis PM. Antiangiogenic therapies in non-small-cell lung cancer [J]. Curr Oncol, 2018, 25(Suppl 1): S45-S58.
- [16] 马明, 郝倩, 牛婷婷, 等. 贝伐珠单抗治疗非小细胞肺癌脑转移瘤放射治疗后难治性瘤周水肿疗效观察[J]. 临床军医杂志, 2020, 48(11): 1343-1344.
- [17] 李冬, 岳成山, 胡勇, 等. VEGFR2-V297 I 位点基因多态性与贝伐珠单抗联合全脑放疗对非小细胞肺癌脑转移患者的疗效及相关性研究[J]. 徐州医科大学学报, 2022, 42(4): 248-254.
- [18] Zhuang HQ, Yuan ZY, Wang P. Research progress on the mechanisms of combined bevacizumab and radiotherapy [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014, 9(1): 129-134.
- [19] Masuda C, Sugimoto M. Bevacizumab suppresses the growth of established non-small-cell lung cancer brain metastases in a hematogenous brain metastasis model [J]. Clin Exp Metastasis, 2020, 37(1): 199-207.
- [20] Varlotto JM, Wang Y, Sun Z, et al. Bevacizumab's association with a decreased risk of brain metastases in ECOG-ACRIN E1505, a phase 3 randomized trial of adjuvant chemotherapy with or without bevacizumab in surgically resected NSCLC [J]. JTO Clini Res Rep, 2022, 3(3): 100274.
- [21] Li L, Feng M, Xu P, et al. Stereotactic radiosurgery with whole brain radiotherapy combined with bevacizumab in the treatment of brain metastases from NSCLC [J]. Int J Neurosci, 2021, 1-8.
- [22] 陈意, 王鑫, 孙冰, 等. 抗血管药物治疗放射性脑坏死专家共识[J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(5): 291-294.
- [23] 韩全乡, 王磊, 胡应亮, 等. 靶向治疗联合全脑同步加量调强放疗治疗脑转移瘤的疗效[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2022, 25(2): 176-182.
- [24] Berghoff AS, Breckwoldt MO, Riedemann L, et al. Bevacizumab-based treatment as salvage therapy in patients with recurrent symptomatic brain metastases [J]. Neuro Oncol Adv, 2020, 2(1): 1-9.

(收稿日期: 2022-11-09; 修回日期: 2023-01-12)



## 药品不良反应

## 奥氮平致 1 例青少年转氨酶升高的药学监护

陈诗芸<sup>1,2</sup>, 杨婷<sup>1,3</sup>, 吴泽幼<sup>1</sup>, 郑萍<sup>1</sup>, 李亦蕾<sup>1</sup>, 古春萍<sup>1\*</sup> (1. 南方医科大学南方医院药理学部, 广州 510515; 2. 国药葛洲坝中心医院药理学部, 湖北 宜昌 443002; 3. 河源市人民医院药理学部, 广东 河源 517000)

关键词: 奥氮平; 青少年; 转氨酶; 个体化用药; 神经内科; 临床药师

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)03-0828-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.047

奥氮平是一种抑制多种神经递质的非典型抗精神病药。它能拮抗 5-羟色胺 (5-HT<sub>2A/2B/2C</sub>)、多巴胺 (D<sub>2</sub>)、组胺 (H<sub>1</sub>) 和肾上腺素 (α<sub>1</sub>) 受体<sup>[1]</sup>。奥氮平适用于精神分裂症和双相 I 型障碍 (躁狂或混合发作), 美国 FDA 批准奥氮平口服剂型用来治疗 13 ~ 17 岁青少年的精神分裂症和双相 I 型障碍, 急性混合性或躁狂发作。2021 年版广东省药学会发布的超药品说明书用药目录将奥氮平用于 13 ~ 17 岁青少年精神分裂和双相 I 型情感障碍列入超说明用药范围。

奥氮平对 13 ~ 17 岁青少年具有潜在的长期风险。与成年人相比, 13 ~ 17 岁青少年的平均体重较低, 其奥氮平的平均暴露量较高。奥氮平被列入儿童重要潜在不合理用药列表 (key potentially inappropriate drugs in pediatrics, KIDs), 18 岁以下青少年使用奥氮平超过 24 周需警惕代谢综合征风险, 如体重增加、高血脂和高血糖 (强推荐, 高质量)<sup>[2]</sup>。与成人临床试验的受试者比较, 儿童服用奥氮平的不良反应可能更为突出, 即体重增加更多, 镇静效果增强, 且总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、催乳素和转氨酶含量均上升较多。奥氮平诱发青少年转氨酶水平升高的发生率为 7% ~ 8%<sup>[3-4]</sup>。出现肝损伤的青少年可能需要调整奥氮平的剂量, 但目前没有针对性的建议。本文报道了 1 例奥氮平致 14 岁患者转氨酶水平升高的病例, 为青少年安全使用奥氮平提供参考依据。

## 1 病例资料

### 1.1 主要症状

患者, 男, 14 岁, 165 cm, 45 kg, 因“双侧

眼睑红肿 4 个月, 发热伴精神异常 10 d”就诊于本院。家属代诉患儿在 4 个月前无明显诱因出现右眶周外下方红肿, 无触痛, 起病后多次在当地卫生院就诊, 诊断“眶周水肿”, 予抗感染、针刺抽液等治疗。2021 年 11 月患儿红肿症状再次出现并加重, 扩散至颜面部, 至当地医院就诊, 行右眼睑组织活检提示寄生虫病, 左眼结膜囊分泌物培养可见金黄色葡萄球菌, 予抗感染、激素抗炎、驱虫、沙利度胺治疗, 症状无好转, 出院后患者症状持续存在。2022 年 1 月患儿突然出现高烧, 精神淡漠, 伴呕吐 2 次, 无头痛、寒颤等, 立即于某市人民医院就诊, 给予头孢曲松 2 g qd ivgtt、利奈唑胺 0.6 g q12h ivgtt, 以及甲泼尼龙 40 mg qd ivgtt。治疗后, 体温下降至正常范围, 颜面红肿较前好转, 仍有精神淡漠。1 月 15 日为求进一步治疗, 于门诊收入本院。既往否认重大传染病和严重外伤病史, 否认血吸虫病、疟疾、病毒性肝炎和结核分枝杆菌等病史。否认对食物、药品的过敏史。否认在疫区居留史和接触病史。

### 1.2 主要检查

入院后, 体温 36.7 °C, 脉搏 102 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸 22 次·min<sup>-1</sup>, 血压 117/70 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。意识清楚, 精神躁动, 高级智能检查不能配合。双侧下眼睑水肿、左侧眼睑下 1 cm 瘢痕, 结膜未见异常。四肢有自发活动。血常规提示嗜酸性粒细胞数量偏低, 肌红蛋白和肌酶升高, 感染指标降钙素原略高。查头颅磁共振显示两侧大脑半球、小脑多发异常信号, 脑回状强化。腰椎穿刺提示蛋白 0.640 g·L<sup>-1</sup> (参考范围 0.2 ~ 0.4

基金项目: 广东省新药设计与评价重点实验室开放基金资助项目 (No.2017B03031403016); 广东省医院协会药学科专项基金 (恒瑞) 项目 (No.2021YXQN05); 南方医科大学南方医院院长基金 (No.2018C026); 广东省医院药学研究基金 (正大天晴基金) (No.2018A)。

作者简介: 陈诗芸, 女, 药师, 主要从事神经内科临床药学工作, email: sy172021@126.com \* 通信作者: 古春萍, 女, 博士, 主管药师, 主要从事神经内科临床药学工作, email: gcpl2@smu.edu.cn

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 脑脊液常规、糖、氯化物未见异常。脑脊液二代测序(宏基因组病原测序, 检测范围更广, 可从临床样本中识别出病毒、细菌、真菌和寄生虫等病原体)阴性。

### 1.3 入院以及出院诊断

入院诊断: ① 脑炎; ② 寄生虫病; ③ 面部蜂窝织炎。

出院诊断: ① 颅内寄生虫感染; ② 面部蜂窝织炎; ③ 肝功能异常; ④ 低白蛋白血症; ⑤ 三尖瓣轻度反流; ⑥ 下鼻甲肥大; ⑦ 筛窦炎(双侧)。

## 2 主要诊疗与用药过程

入院第 1~3 日, 患者神清, 但胡言乱语, 对答不切题, 颜面部、口周红肿。查体不配合, 双眼球各方向运动不配合, 四肢肌张力正常, 四肢存在自发活动。谷丙转氨酶(ALT)  $38 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 谷草转氨酶(AST)  $39 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 体温  $37.5^\circ\text{C}$  ↑; 血常规: 白细胞计数  $3.07 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$  ↓, 中性粒细胞计数  $1.35 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$  ↓, 嗜酸性粒细胞计数  $0.01 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$  ↓; 感染指标: C 反应蛋白(CRP)  $27.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑; 降钙素原  $1.08 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑; 血清白细胞介素 6 为  $1660 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑, 疑难病理会诊与显微摄影提示:(左下睑)软组织慢性化脓性炎; 另见异物, 考虑寄生虫虫体, 延续外院抗感染联合激素治疗(利奈唑胺、头孢曲松以及甲泼尼龙), 驱虫药(阿苯达唑  $400 \text{ mg bid}$ ), 奥氮平由  $2.5 \text{ mg qd}$  逐渐增加剂量至  $5 \text{ mg qd po}$ , 改善精神症状。

入院第 4~5 日, 患者双侧眼周、口周红肿减轻, 胡言乱语较前减少。体温  $36.6^\circ\text{C}$ ; CRP  $16.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑; 血清白细胞介素 6 为  $306.30 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑。考虑面部蜂窝织炎, 调整抗菌药物治疗方案(万古霉素  $1 \text{ g q12h ivgtt}$ , 以及头孢曲松钠  $2 \text{ g qd ivgtt}$ )。按照初定的诊疗计划, 奥氮平由  $5 \text{ mg qd}$  逐渐增加剂量至  $5 \text{ mg q12h po}$ 。

入院第 14~16 日, 患者双侧眼周、口周红肿稍加重, 伴发热, 四肢存在自发活动。颜面部磁共振提示: 右侧下唇部小结节状异常信号影, 结合病史, 考虑为寄生虫并周围异物性肉芽肿形成。自身免疫抗体十四项均为阴性; ALT  $70 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑, AST  $55 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑, 间接胆红素  $4.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ↓。体温  $38.1^\circ\text{C}$  ↑, 降钙素原  $0.066 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑; 血清白细胞介素 6 为  $283.00 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑。考虑感染加重, 调整抗感染方案为(万古霉素  $1 \text{ g q12h ivgtt}$ , 以及美罗培南  $1 \text{ g q8h ivgtt}$ )。同时不排除咪唑类驱虫药引起迟发性脑炎的可能, 入院第 10 日已停用阿苯达唑。

入院第 23~25 日, 患者双侧眼周、口周红肿减轻, 面部蜂窝织炎明显好转。ALT  $70 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑; AST  $53 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑; 加用护肝药物(还原型谷胱甘肽  $1 \text{ g qd ivgtt}$ , 以及异甘草酸镁  $20 \text{ mL qd ivgtt}$ ); 降钙素原  $0.074 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑; 血清白细胞介素 6 为  $226.30 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ↑, 停用抗菌药物治疗。

入院第 28 日, 患者诉面部皮肤张力明显下降, 双侧眼周、口周仍红肿, ALT  $174 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑, AST  $93 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑, 间接胆红素  $4.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 医师调整奥氮平剂量, 由  $5 \text{ mg q12h}$  调整为  $5 \text{ mg qd}$ 。

入院第 35 日, 患者精神状况可, 双侧眼周红肿较前减轻。ALT  $125 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ↑, AST  $37.5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , 间接胆红素  $2.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 较之前的转氨酶水平略有下降, 但 ALT 水平仍超过正常值的 3 倍。继续调整奥氮平剂量由  $5 \text{ mg qd}$  调整至  $2.5 \text{ mg qd}$ , 精神状态较前好转。并调整护肝药剂量(异甘草酸镁由  $20 \text{ mL qd}$  调整至  $40 \text{ mL qd}$ )。

根据上诉患者的住院期间的用药情况以及转氨酶指标的变化情况, 2022 年 1 月 28 日(入院第 14 日)之前, 患者 ALT、AST 指标均在正常参考范围内。之后 ALT、AST 持续升高, 2 月 8 日(入院第 25 日)升高超过正常参考值的两倍; 2 月 11 日(入院第 28 日)升高超过正常参考值的三倍, 但间接胆红素等指标在此期间均在正常参考范围内。经过医师与药师共同讨论该指标出现异常升高的原因并给出处理措施后, 2022 年 2 月 18 日(入院第 35 日)患者转氨酶指标逐渐下降, 后续恢复至正常范围内(ALT  $41 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ , AST  $27 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

## 3 重点问题分析

### 3.1 引起患者转氨酶升高的药物因素

导致转氨酶升高的因素包括病理和非病理因素, 而药物是导致一些转氨酶升高的常见非病理因素。药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是最常见的最严重的药物不良反应之一。有研究表明, 对乙酰氨基酚、抗菌药物、中草药和精神药物是引起儿童 DILI 的主要药物<sup>[5-6]</sup>。为了分析患者转氨酶水平升高的药物因素, 临床药师首先通过药物重整对患者住院期间的用药情况和转氨酶指标的变化情况进行整理, 汇总见图 1。其次通过查询中国药物性肝损伤专业网络平台“Hepatox”(http://www.hepattox.org/), 并结合我国药品不良反应监测报告工作手册中的 5 条原则, 根据用药的时间性, 以及药物不良反应发生率, 依次考虑可能由奥氮平、阿苯达唑、美罗培南、万古霉素引起转氨酶升高。

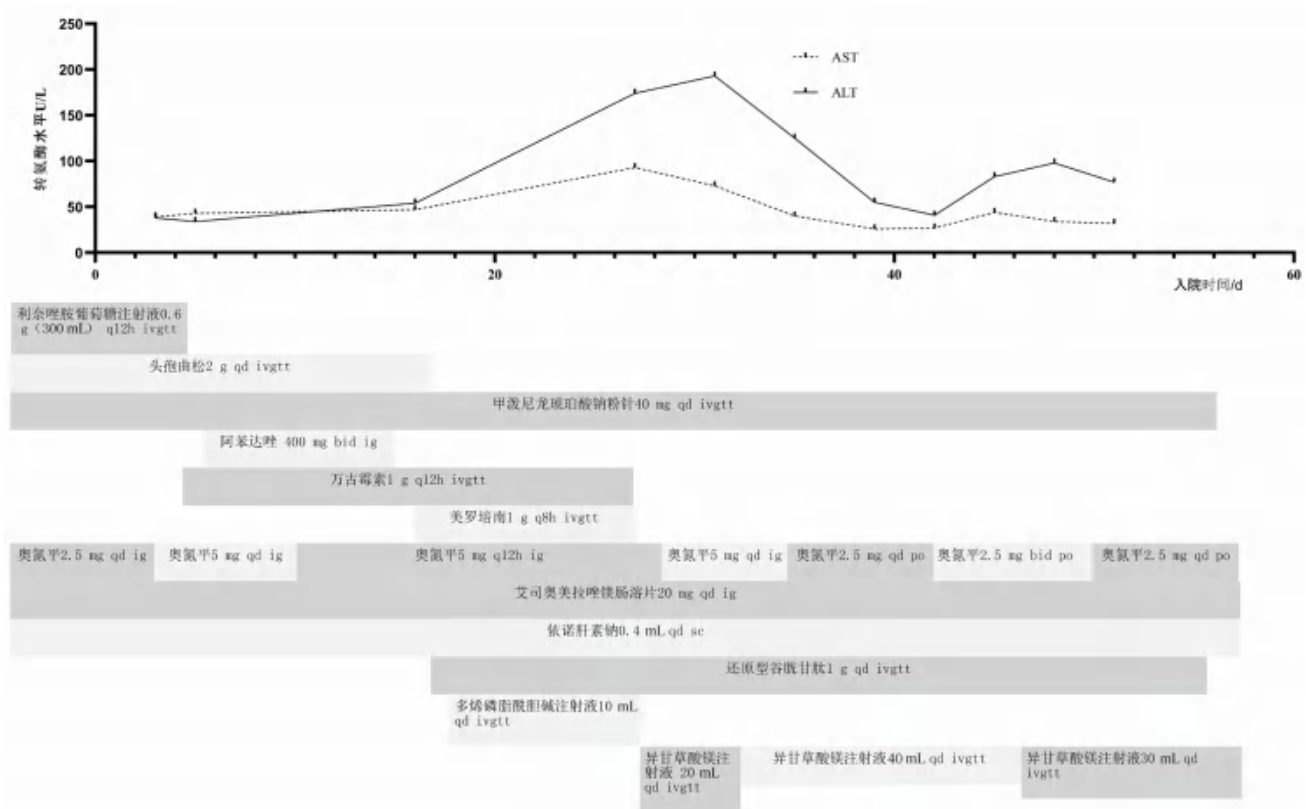


图 1 患者在住院期间所使用的药物信息以及 ALT、AST 指标变化情况

其中奥氮平与患者转氨酶水平升高的相关性更大。结合图 1，分析具体原因如下：① 奥氮平的剂量调整与患者转氨酶升高具有时间先后关系，即具有时序性；② 符合奥氮平已知的不良反应类型：奥氮平主要经肝脏代谢，其药品说明书提到奥氮平会引起轻度而短暂的无症状性肝脏转氨酶升高（ALT、AST），尤其在治疗早期，且建议治疗期间出现指标异常的患者需慎用，酌情考虑减量；③ 去激发试验阳性：随着奥氮平剂量的减量（由 5 mg qd 减量至 2.5 mg qd）后 7 d，患者的转氨酶指标逐渐恢复至正常范围内；④ 再激发试验：再次增加奥氮平剂量（由 2.5 mg qd 增加剂量至 2.5 mg bid）后 9 d，患者再次出现转氨酶指标升高，之后再次降低剂量（由 5 mg · d<sup>-1</sup> 降低至 2.5 mg · d<sup>-1</sup>）后，复查转氨酶水平再次下降；⑤ 患者疗程较长且合并多种药物，还需排除其他药物原因导致的转氨酶水平升高。通过时序性分析，笔者发现阿苯达唑、万古霉素和美罗培南与患者转氨酶水平升高的相关性不大。虽然阿苯达唑、万古霉素和美罗培南都有引起转氨酶水平升高的不良反应的报道，且与患者初期转氨酶水平升高具有时序性，但是，停用阿苯达唑、万古霉素和美罗培南后，患者转氨酶水平仍持续升高。

综上，从药物因素分析，奥氮平与引起患者转氨酶升高的关联性更大，且与剂量相关。

### 3.2 颅内寄生虫感染引起的脑炎伴精神异常的治疗方案

患者因“双侧眼睑红肿 4 个月，发热伴精神异常 10 d”入院，外周血裂头蚅 IgG 抗体（+），结合头颅 MRI 提示双侧大脑半球、小脑多发异常信号，定位于双侧大脑半球、小脑，定性为寄生虫感染。根据 2008 年美国感染病学会关于脑炎管理的指南<sup>[7]</sup>，寄生虫感染引起的脑炎的临床特点包括了精神症状异常。神经内科医师在诊疗过程中，根据各项检查和感染科会诊意见在病程中明确患者为颅内寄生虫感染，精神异常不排除是颅内寄生虫感染引起脑炎的伴发症状。患者精神异常表现为胡言乱语，对答不切题，四肢可见自主运动。按精神分裂症的临床分型，患者属于以阳性症状为主的 I 型精神分裂症。根据脑炎伴发精神症状的控制，指南推荐选用奥氮平、氯硝西泮、丙戊酸钠、氟哌啶醇和喹硫平等药物<sup>[8]</sup>。奥氮平是第二代抗精神病药物，对阳性、阴性症状均有效。2015 年中国精神分裂症防治指南（第二版）<sup>[9]</sup>也将奥氮平列入精神分裂的一线治疗药物。患者颅内寄生虫感染诊断明确，有研究者<sup>[10]</sup>



提出寄生虫诱导的去甲肾上腺素减少导致中枢神经系统免疫细胞中去甲肾上腺素能信号传导减少,进而释放促炎机制,这最终可能改变认知功能。但病程中未排除驱虫药引起的脑病,这是一种自身免疫性疾病,该病的发病机制可能是因为药物刺激机体产生免疫应答引起Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型变态反应(以Ⅳ型为主)导致脑白质脱髓鞘改变<sup>[11]</sup>。临床报道驱虫药所致脑病多指咪唑类驱虫药,通常发生在服用咪唑类驱虫药1~10周后,呈急性或亚急性起病。临床表现为弥漫性脑损害症状:意识障碍及精神障碍;神经症状及体征。治疗上主要以糖皮质激素为主(可采用甲泼尼龙治疗,0.5~1.0 g·d<sup>-1</sup>,静脉滴注,冲击治疗3~5 d,后根据病情用泼尼松60 mg·d<sup>-1</sup>口服并逐渐减量,患者的总疗程≥1个月以上),根据临床症状也予以神经营养剂治疗、脱水治疗、抗癫痫、针灸、康复等对症治疗。

### 3.3 奥氮平在 14 岁青少年中的使用

与传统抗精神病药物(第一代)相比,第二代非典型抗精神病药物的安全性显著提高,因此越来越多地被用于儿童和青少年。在儿童群体药代动力学的研究<sup>[12]</sup>中,以及 Lobo 等<sup>[13]</sup>的调查中,观察到青少年的模拟奥氮平暴露量比成人高 27%。也有研究表明<sup>[14]</sup>儿童、青少年和成人具有类似的血药浓度治疗范围。临床应用,奥氮平用于儿童和青少年口服剂量推荐 2.5~10 mg<sup>[15-16]</sup>。因此建议针对需要使用奥氮平治疗的儿童,条件允许的话进行血药浓度监测,奥氮平血药浓度参考范围为 20~80 ng·mL<sup>-1</sup><sup>[17]</sup>。但是本病例的家属拒绝了相关监测。

### 3.4 奥氮平引起转氨酶水平升高的处理

儿童发生不良反应的事件类型与成人相似,但体重增加和代谢相关的不良反应较成人多见,肝损伤相关不良事件较少见<sup>[18]</sup>。但对出现肝酶异常的儿童患者,需要明确如何处理,是否以及何时需要调整奥氮平的剂量。根据美国的处方信息,对每种抗精神病药物是否需要肝肾功能受损的患者进行剂量调整进行了审查,结果发现奥氮平对肝肾功能受损患者是不需要进行剂量调整的。也有个案研究<sup>[19]</sup>奥氮平肝毒性的管理,可在不调整剂量的情况下,予以氧自由基清除剂、抗氧化剂(如维生素 E、熊去氧胆酸)、胞吞抑制剂和三磷酸腺苷生成剂来预防奥氮平引起的肝毒性。但是在我们的病例中,患者转氨酶指标超过正常值的三倍以上,且患者精神症状有所好

转,因此,我们建议减少奥氮平的剂量并加用护肝药,同时监测患者转氨酶情况,通过以上的干预措施之后患者的转氨酶逐渐恢复至正常范围。

## 4 结论

根据该病例分析,从用药时间相关性和药物代谢特点考虑患者转氨酶的升高与奥氮平的相关性较大,且通过加用护肝药并降低奥氮平的剂量为 2.5 mg·d<sup>-1</sup>,在控制精神症状的情况下,使升高的转氨酶指标逐渐恢复至正常水平,为青少年的个体化用药提供参考。

## 参考文献

- [1] Olten B, Bloch MH. Meta regression: relationship between antipsychotic receptor binding profiles and side-effects [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 84: 272-281.
- [2] Meyers RS, Thackray J, Matson KL, et al. Key potentially inappropriate drugs in pediatrics: the kids list [J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2020, 25 (3): 175-191.
- [3] Flank J, Sung L, Dvorak CC, et al. The safety of olanzapine in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Drug Safety*, 2014, 37(10): 791-804.
- [4] Emily E, Jane A, Titilola A, et al. Olanzapine: Pediatric drug information [DB/OL]. <https://www.uptodate.cn/contents/olanzapine-pediatric-drug-information>, 2022-9-29.
- [5] Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, et al. Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: the dilin prospective study [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (7): 1340-1352.
- [6] 甘雨,董漪,张鸿飞,等. 184 例儿童药物性肝损伤的临床特征及转归状况评价 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31 (8): 1244-1247.
- [7] Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, et al. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47 (3): 303-327.
- [8] 中华医学会神经病学分会. 中国自身免疫性脑炎诊治专家共识 [J]. *中华神经科杂志*, 2017, 50 (2): 91-98.
- [9] 赵靖平,施慎逊. 中国精神分裂症防治指南 [M]. 第二版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015.
- [10] Laing C, Blanchard N, McConkey GA. Noradrenergic signaling and neuroinflammation crosstalk regulate toxoplasma gondii-induced behavioral changes [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41 (12): 1072-1082.
- [11] 田淑芬. 驱虫药脑病的临床特点和 MRI 诊断价值 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14 (20): 2322-2323.
- [12] Maharaj AR, Wu H, Zimmerman KO, et al. Population pharmacokinetics of olanzapine in children [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (2): 542-554.
- [13] Lobo ED, Robertsonplouch C, Quinlan T, et al. Oral

- olanzapine disposition in adolescents with schizophrenia or bipolar I disorder: a population pharmacokinetic model [J]. *Paediatr Drugs*, 2010, 12 (3): 201-211.
- [14] Fekete S, Wewetzer C, Mehlerwex C, et al. Therapeutic drug monitoring in children and adolescents under pharmacotherapy with olanzapine in daily clinical practice [J]. *Ther Drug Monit*, 2017, 39 (3): 273-281.
- [15] Gerson R, Malas N, Feuer V, et al. Best practices for evaluation and treatment of agitated children and adolescents (BETA) in the emergency department: consensus statement of the American association for emergency psychiatry [J]. *West J Emerg Med*, 2019, 20 (2): 409-418.
- [16] Cole JB, Klein LR, Strobel AM, et al. The use, safety, and efficacy of olanzapine in a level I pediatric trauma center emergency department over a 10-year period [J]. *Pediatr Emerg Care*, 2020, 36 (2): 70-76.
- [17] Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017 [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2018, 51: 9-62.
- [18] Tohen M, Kryzhanovskaya L, Carlson G, et al. Olanzapine versus placebo in the treatment of adolescents with bipolar mania [J]. *Am J Psychiatry*, 2007, 164 (10): 1547-1556.
- [19] Dönmez YE, Özcan Ö, Soylu N, et al. Management of hepatotoxicity induced by the use of olanzapine [J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2017, 27 (3): 293-294.
- (收稿日期: 2022-06-10; 修回日期: 2022-09-02)

## 决奈达隆致不良反应的文献分析

林贤桂, 林杰茹, 陈巧燕, 常惠礼\* (广州医科大学附属第六医院药学部, 清远市人民医院药学部, 广东 清远 511518)

**摘要:** **目的** 分析决奈达隆所致药品不良反应 (ADR) 的发生情况及临床特点, 为其临床合理应用提供参考。**方法** 通过检索中国知网、万方数据、维普网、PubMed、Web of Science、Embase 数据库, 收集决奈达隆致 ADR 的个案报道, 并进行统计分析。**结果** 共收集 26 篇符合条件的文献, 涉及 27 例患者, 共发生 29 例次 ADR, 男性 15 例, 女性 12 例, 主要为 70 ~ 79 岁的患者 (51.86%), 51.72% 的 ADR 发生在用药 1 个月内。ADR 累及系统/器官主要涉及心血管系统, 其次是肝胆系统、皮肤及附属系统、呼吸系统, 少见泌尿系统和神经系统。**结论** 使用决奈达隆初期应加强监测, 警惕其 ADR, 以便发生 ADR 时能及时采取措施, 以降低用药风险, 提高临床疗效。

**关键词:** 决奈达隆; 药品不良反应; 文献分析

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)03-0832-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.048

## Literature analysis of adverse reactions induced by dronedarone

LIN Xian-gui, LIN Jie-ru, CHEN Qiao-yan, CHANG Hui-li\* (Department of Pharmacy, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan Guangdong 511518)

**Abstract: Objective** To analyze the occurrence and clinical features of adverse drug reaction (ADR) induced by dronedarone, and provide references for safe clinical medication. **Methods** Case reports of dronedarone-induced ADRs collected by searching the CNKI, Wanfang, VIP, PubMed, Web of Science and Embase databases were statistically analyzed. **Results** Totally 26 qualified literatures were collected, involving 27 patients (including 15 males and 12 females) and a total of 29 ADRs. The patients mainly aged 70 ~ 79 years old (51.86%), and 51.72% of ADRs occurred within one

作者简介: 林贤桂, 男, 硕士研究生, 药师, 主要从事临床药学工作, email: 351038150@qq.com \*通信作者: 常惠礼, 男, 主任药师, 主要从事医院药事管理工作, email: changhl01@126.com

month. The systems/organs involved in ADRs mainly involved the cardiovascular system, followed by hepatobiliary system, skin and accessory system, respiratory system, and less common in the urinary system and nervous system. **Conclusion** In the early stage of dronedarone use, monitoring should be strengthened to guard against ADR. Immediate measures should be taken in case of ADR to reduce the risk and improve clinical efficacy.

**Key words:** dronedarone; adverse drug reaction; literature analysis

决奈达隆是一种Ⅲ类抗心律失常药物, 2021 年 12 月获国家药品监督管理局批准用于有阵发性或持续性心房颤动病史的窦性心律患者, 减少因心房颤动住院的风险。决奈达隆是对胺碘酮进行结构修饰得到的苯并呋喃的衍生物, 其去掉了胺碘酮中的碘原子, 以减少对甲状腺及其他器官毒性; 在苯并呋喃一侧增加甲磺酰基, 可降低亲脂性, 从而缩短药物的半衰期, 减少药物的组织蓄积作用和可能的神经毒性<sup>[1]</sup>。但基于临床应用, 决奈达隆引发的药品不良反应 (ADR) 也不容忽视。本研究对决奈达隆上市以来致 ADR 的个案报道进行统计分析, 以期为其临床安全用药提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

以“决奈达隆”“不良反应”等为中文检索词, 以“dronedarone”“Multaq”“case”“adverse”“induced”“related”等为英文检索词分别检索中国知网 (CNKI)、万方数据、维普网和 PubMed、Web of Science、Embase 数据库, 检索时限均为建库或建站起至 2022 年 07 月 01 日。文献纳入标准: 国内外公开发表的原始病例文献; 文献语种为中文和英文; ADR 与决奈达隆相关; 患者基本信息、诊疗资料相对完整。文献排除标准: 动物实验、临床试验或综述; 重复报道或资料不全文献。共检索到文献 26 篇<sup>[2-27]</sup>, 涉及 27 例患者。

### 1.2 研究方法

用回顾性研究方法, 提取文中相关信息, 包括患者性别、年龄、国家/地区、决奈达隆用量、ADR 发生时间、ADR 累及器官/系统、临床表现、治疗与转归等, 进行描述性统计分析。

## 2 结果

### 2.1 性别与年龄分布

27 例患者中, 男性 15 例 (55.56%), 女性 12 例 (44.44%), 男女比例为 1.25 : 1。年龄最小的患者 41 岁, 年龄最大的患者 86 岁, 平均年龄为 (68.41±10.25) 岁, 主要集中在 70~79 岁 (51.86%)。

### 2.2 国家/地区分布

27 例病例报告涉及 7 个国家/地区, 其中美

国 13 例 (48.15%), 德国 5 例 (18.52%), 西班牙 3 例 (11.12%), 中国香港 2 例 (7.41%), 英国 2 例 (7.41%), 法国 1 例 (3.70%), 奥地利 1 例 (3.71%)。

### 2.3 原患疾病及决奈达隆用法用量

27 例患者均口服决奈达隆片用于治疗非永久性心房颤动, 其中 16 例患者给药剂量为 400 mg bid; 1 例患者给药剂量为 200 mg bid; 10 例患者文中未明确给药剂量。

### 2.4 ADR 发生时间

27 例患者共发生 29 例次 ADR, 其中 ADR 发生时间最短的是用药 20 min 后出现低血压, 最长的是用药 9 个月后出现组织性肺炎; 15 例次 (51.72%) ADR 发生在用药 1 个月内, 包括 6 例次皮肤及附属系统 ADR、4 例次心血管系统 ADR、2 例次泌尿系统 ADR、2 例次呼吸系统 ADR、1 例次肝胆系统 ADR。

### 2.5 ADR 累及系统/器官及临床表现

决奈达隆所致 ADR 累及的系统/器官以心血管系统最为多见, 其次为肝胆系统、皮肤及附属系统、呼吸系统, 少见泌尿系统和神经系统, 具体见表 1。

### 2.6 ADR 处理及转归

27 例患者出现不良反应后均接受相应治疗。26 例患者停用决奈达隆, 其中 24 例好转, 2 例死亡 (1 例致中毒性表皮坏死松解最终因多器官衰竭, 于住院 4 周后死亡; 1 例致组织性肺炎患者在经验性使用抗菌药物治疗 20 d 后出现呼吸衰竭, 微生物检查阴性, 更换为静脉糖皮质激素治疗并于 4 d 后死亡)。1 例急性肝损伤患者未停药, 因怀疑自身免疫性肝炎, 采用糖皮质激素进行治疗, 住院 18 d 后死亡。

## 3 讨论分析

### 3.1 ADR 与患者的关系

纳入分析的患者中男女比例为 1.25 : 1, 平均年龄 (68.41±10.25) 岁, 主要集中在 70~79 岁 (51.86%), 与我国心房颤动患者年龄与发病率变化趋势相符<sup>[28]</sup>。

### 3.2 ADR 发生与疗程的关系



表 1 决奈达隆所致 ADR 累及系统 / 器官及临床表现

Tab 1 Systems/organs involved in ADRs induced by dronedarone and clinical manifestations

累及系统 / 器官	ADR 主要临床表现	例次	构成比 / %
心血管系统	心律失常 (5)、心力衰竭 (2)、低血压 (1)、白细胞破裂性血管炎 (1)	9	31.03
肝胆系统	急性肝衰竭 (1)、急性肝损伤 (5)	6	20.69
皮肤及附属系统	光敏性皮炎 (3)、红斑性皮疹 (2)、中毒性表皮坏死松解症* (1)	6	20.69
呼吸系统	间质性肺病 (2)、组织性肺炎 (3)	5	17.24
泌尿系统	急性肾损伤 (2)	2	6.90
神经系统	视神经病变* (1)	1	3.45
合计		29	100.00

注 (Note): \* 尚未在说明书中记载的不良反应 (Adverse reaction that have not yet been included in the relevant instructions)。

根据统计结果显示, 51.72% 的 ADR 发生在使用决奈达隆的 1 个月内, 其中 6 例皮肤毒性均发生在此时间范围, 2 例肾损伤发生在用药 1 周内。其他系统 ADR 无论疗程长短均有相关报道。提示在使用决奈达隆初期, 特别是前 1 个月内, 应谨慎观察患者临床反应, 包括皮肤和视力, 监测肝肾功能、肺功能、心电图等指标, 以便发生 ADR 时能及时采取措施, 避免严重 ADR 的发生, 并定期随访。

### 3.3 心血管系统 ADR

决奈达隆致心血管系统 ADR 比例最高 (31.03%)。无论短期或长期使用决奈达隆均有可能出现心脏毒性, 短期毒性主要表现为心律失常, 包括 Q-T 间期延长、QRS 波增宽、房室传导阻滞、心动过缓 / 过速等, 一般停用决奈达隆可自行好转; 长期毒性主要表现为心力衰竭。纳入病例中有 1 例患者最终出现失代偿性的心力衰竭, 进行植入心脏起搏器。低血压和白细胞破裂性血管炎 ADR 见于短期治疗后出现, 其中低血压在停药后即可好转, 恢复时间与决奈达隆的半衰期相对应。罕见血管 ADR 白细胞破裂性血管炎主要是以小静脉、小动脉、毛细血管等小血管, 尤其是以毛细血管后静脉的炎症为特点, 患者可表现为皮肤瘙痒、灼热和疼痛性病变, 停用决奈达隆并给予糖皮质激素治疗可好转。决奈达隆可致白细胞破裂性血管炎的发生, 有助于临床上对病因进行筛查, 及时采取正确的治疗。

决奈达隆是一种多通道阻滞剂, 与胺碘酮一样, 表现出所有 4 种 Vaughan-Williams 分类药物的抗心律失常特性, 对钠、钾、钙离子通道和受体等均有抑制作用<sup>[1]</sup>。多通道抑制作用可能是患者使用决奈达隆后出现严重低血压、QRS 波增宽、Q-T 间期延长和强烈的负性肌力的原因, 而负性肌力作用可进一步使心力衰竭恶化。相关研究表明<sup>[29]</sup>, 决奈达隆可致 Q-T 间期延长, 发生率明显高于安慰剂组 (1.7% vs 0.6%,  $P < 0.001$ ), 且其所致心动过缓的发生率明显高于安慰剂

(3.5% vs 1.2%,  $P < 0.001$ )。因此, 使用决奈达隆期间, 定期监测心电图是必要的。

先前 ANDROMEDA 研究<sup>[30]</sup>发现决奈达隆在重度心力衰竭和左心室收缩功能障碍患者中与安慰剂相比病死率增加了一倍。而 PALLAS 研究<sup>[31]</sup>被提前终止, 因为在患有永久性心房颤动且有重大心血管事件风险的患者中, 与安慰剂组相比, 决奈达隆组的心力衰竭、中风和心血管原因病死率增加。因此, 决奈达隆目前仅限于维持阵发性和持续性心房颤动患者的窦性心律, 禁用于永久性心房颤动患者和当前或既往心力衰竭发作或左心室收缩功能障碍的患者。

### 3.4 肝胆系统 ADR

肝脏也是决奈达隆致 ADR 累及较多的器官。前期来自动物实验和体外细胞培养实验的结果表明, 决奈达隆具有肝毒性<sup>[32]</sup>。Euridis/Adonis 试验报道了 822 名使用决奈达隆的患者中有 100 名 (12%) 患者发生肝损伤事件<sup>[33]</sup>。在决奈达隆上市初期, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 发布安全警示, 提醒关于与决奈达隆使用有关的罕见的严重肝损伤<sup>[34]</sup>。决奈达隆通过细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 在肝脏中代谢, 其产生肝毒性的机制尚不清楚, 可能基于与胺碘酮天然结构相同的病理机制, 抑制线粒体  $\beta$ -氧化和氧化磷酸化解偶联作用, 导致活性氧积累, 诱导肝细胞脂肪变性、凋亡和坏死。也不能排除其主要代谢物 N-去甲基决奈达隆及其潜在的抑制肝药酶活性的作用<sup>[35]</sup>。

本文中 6 例患者发生肝毒性, 表现为乏力、黄疸、凝血功能障碍、转氨酶升高、高胆红素血症、腹痛等肝损伤症状, 前期发现肝功能异常予以停药后可逐渐自愈。其中 1 例出现急性肝衰竭患者进行肝移植, 对切除的肝组织活检显示广泛性肝细胞坏死。另 1 例患者因起初怀疑自身免疫性肝炎, 未停用决奈达隆, 住院 10 d 后肝性脑病加重, 第 18 日死亡。对于服用决奈达隆的患者, 建议定期监测肝血清酶, 特别是用药初期及治疗

的 6 个月内,若肝血清酶连续升高或出现骤升,应考虑药源性肝损伤。

### 3.5 皮肤及附属系统 ADR

FDA 曾分析来自五项决奈达隆随机对照研究的数据<sup>[36]</sup>,决奈达隆主要的皮肤 ADR 是出汗(2.7%)、瘙痒(1.3%)和红斑(0.8%)。在一项多中心治疗试验中<sup>[29]</sup>,决奈达隆的皮肤不良事件发生率(10.3%, 237/2291)明显高于安慰剂组(7.6%, 176/2313)( $P < 0.001$ )。本文 6 例次皮肤 ADR 均见于短期治疗、累积剂量较低的患者,一般在停药后可逐渐自愈。但其中 1 例为决奈达隆致中毒性表皮坏死松解症,此症病死率高达 30%,最后患者因多器官衰竭死亡。而光敏性是胺碘酮的常见不良反应,对于决奈达隆,光敏性和皮肤变色仅发生在 0.7% 的患者中<sup>[16]</sup>。使用人单核细胞白血病细胞(THP-1)和白细胞介素 8(IL-8)作为生物标志物的实验性光敏研究表明,决奈达隆也会导致皮肤光敏,停药或采取光防护措施后,在几周内可完全痊愈<sup>[17]</sup>。光过敏反应的临床特征与湿疹反应非常相似,并且通常发生在开始用药和随后的阳光照射后数日至数周。决奈达隆的终末消除半衰期从 13 h 到 31 h 不等,因此,患者在停药后,至少 5 ~ 9 d 内应避免阳光照射。

### 3.6 呼吸系统 ADR

ATHENA 试验中<sup>[29]</sup>,4628 名心房颤动的患者被分配到安慰剂组和决奈达隆组(400 mg bid),平均随访 21 个月,结果肺部相关不良事件无显著差异。而在一项动物研究报告中<sup>[37]</sup>,决奈达隆被发现对肺泡巨噬细胞比胺碘酮具有更大的毒性。本文中 5 例肺毒性患者,4 例用药时间较短,停药并予以糖皮质激素治疗后好转。1 例患者用药 9 个月,入院检查两肺呈弥漫性毛玻璃样改变,经验性予以抗菌药物治疗失败,住院 20 d 后出现呼吸衰竭、死亡。在假定为感染性肺炎但对抗菌药物无反应的患者中,应考虑是否药源性因素,早期识别对于避免有害药物很重要。需要留意的是,5 例患者中有 2 例在使用决奈达隆之前曾使用过胺碘酮,建议接受决奈达隆治疗的患者定期进行胸部 X 线检查,尤其是既往使用过胺碘酮的患者。

### 3.7 泌尿系统 ADR

决奈达隆致泌尿系统 ADR 主要是使肾肌酐清除率降低,导致血清肌酐浓度升高。一项针对健康受试者进行的研究表明,决奈达隆可部分抑制肌酐的肾小管转运,从而将肌酐清除率降低 15% ~ 20%<sup>[38]</sup>。肾肌酐清除率降低的机制可能与胺碘酮类似,部分抑制涉及肌酐和 N-甲基烟酰胺分泌的阳离子转运系统,而对肾小球滤过率则无影响<sup>[39]</sup>。相反,PALLAS 研究<sup>[31]</sup>的结果强调,与肾功能相关的 ADR,包括严重的肾衰竭,决奈达隆组高于安慰剂组。

相反,PALLAS 研究<sup>[31]</sup>的结果强调,与肾功能相关的 ADR,包括严重的肾衰竭,决奈达隆组高于安慰剂组。

本文 2 例急性肾损伤均发生在使用决奈达隆一周内,其中 1 例合并肝损伤,另 1 例患者需要血液透析数日,之后肾功能在 2 ~ 3 周内得到改善。欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)建议在开始服用决奈达隆前和开始后 7 d 监测血清肌酐值。2 例病例也强调了在心血管多药治疗患者中,更应留意决奈达隆产生的泌尿系统 ADR。

### 3.8 神经系统 ADR

决奈达隆可引起头晕、头痛、失眠、感觉异常等神经系统 ADR,但发生率与安慰剂组比较无显著差异<sup>[29]</sup>。本研究仅检索到 1 例决奈达隆致视神经病变 ADR 的报道,患者在使用决奈达隆 2 个月后,右眼出现了钝痛,未予以重视,7 个月后右眼出现飞蚊症、光斑闪烁以及视力恶化,停用决奈达隆 1 周后眼痛消失,在两年的随访期间,患者右眼一直处于中度视力不良。该案例提示意识和识别视神经病变症状的重要性,使用决奈达隆治疗可能会发生眼痛、飞蚊症、光斑闪烁或视力丧失,出现上述症状应及早停用决奈达隆以防止永久性视力衰弱或丧失。

综上所述,决奈达隆致 ADR 累及多个器官/系统,以心血管系统最为多见,其次为肝胆系统、皮肤及附属系统、呼吸系统,少见于泌尿系统和神经系统。多数 ADR 发生在用药后 1 个月内,用药初期关注患者皮肤和视力异常,监测肝肾功能和心电图变化,6 个月内需定期随访。临床上应加强关注既往使用过胺碘酮或心血管多药治疗的患者,避免严重 ADR 的发生,以确保临床安全用药。

## 参考文献

- [1] 陈意浓,孙艺红.决奈达隆在心房颤动治疗中的证据和地位[J].中华心血管病杂志,2021,49(3):278-282.
- [2] Coons JC, Plauger KM, Seybert AL, et al. Worsening heart failure in the setting of dronedarone initiation[J]. Ann Pharmacother, 2010, 44(9):1496-1500.
- [3] Genz C, Esperer HD, Schmeisser A, et al. Marked prolongation of QRS duration after initiation of dronedarone therapy[J]. Heart Int, 2014, 9(1):33-35.
- [4] Gonzalez JE, Sauer WH, Krantz MJ. Ventricular ectopy and QTc-interval prolongation associated with dronedarone therapy[J]. Pharmacotherapy, 2013, 33(10):e179-e181.
- [5] Huemer M, Sarganas G, Bronder, et al. Torsade de pointes tachycardia in a patient on dronedarone therapy[J]. Pharmaco-

- therapy, 2015, 35 (5): 61-65.
- [6] Rosman J, Hoffmeister P, Reynolds M, et al. Possible proarrhythmia with dronedarone [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2013, 24 (1): 103-104.
- [7] Wedler K, Dávid Á, Körber T. Increased ventricular pacing threshold caused by intake of dronedarone [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2020, 145 (4): 249-251.
- [8] Hassib M, Elkhoully A, Ansari S, et al. A case of dronedarone-induced hypotensive shock [J]. *Cureus*, 2020, 12 (6): e8478.
- [9] Smith SM, Al-Bataineh M, Iorfido SB, et al. A case report: multaq-induced leukocytoclastic vasculitis [J]. *Am J Ther*, 2014, 21 (3): e69-70.
- [10] Del Pozo Ruiz JJ, Martín Sanz A, Alvarez Vicente G, et al. Dronedarone-associated hepatotoxicity. a propos of a case [J]. *Farm Hosp*, 2012, 36 (6): 545-547.
- [11] Ragucci KR. Elevated liver enzymes associated with dronedarone for atrial fibrillation [J]. *SAGE Open Med Case Rep*, 2013, 1: 2050313X13511600.
- [12] Joghetaei N, Weirich G, Huber W, et al. Acute liver failure associated with dronedarone [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4 (4): 592-593.
- [13] Jahn S, Zollner G, Lackner C, et al. Severe toxic hepatitis associated with dronedarone [J]. *Curr Drug Saf*, 2013, 8 (3): 201-202.
- [14] Guzmán Ramos MI, Romero García T, Márquez Saavedra E, et al. Dronedarone-induced liver injury. A case report [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2018, 41 (10): 636-638.
- [15] Khan ZH, Mukhtar K, Ahmed MM, et al. Dronedarone-mediated acute hepatic and renal toxicity [J]. *Cureus*, 2020, 12 (8): e9611.
- [16] Amar L, Khalil M, Shulman K, et al. Dronedarone-induced photoallergic reaction [J]. *JAAD Case Rep*, 2020, 6 (12): 1208-1210.
- [17] Al-Jarrah R, Blasini A, Kurgiy Z, et al. Severe photoallergy to systemic dronedarone (Multaq) [J]. *Contact Dermatitis*, 2020, 83 (3): 241-242.
- [18] Datar P, Kafle P, Schmidt FM, et al. Dronedarone-induced phototoxicity in a patient with atrial fibrillation [J]. *Cureus*, 2019, 11 (9): e5731.
- [19] Ladizinski B, Elpern DJ. Dronedarone-induced phototoxicity [J]. *J Drugs Dermatol*, 2013, 12 (8): 946-947.
- [20] Miquel J, Adamski H, Oger E, et al. Febrile maculopapular eruption due to dronedarone [J]. *Ann Dermatol Venereol*, 2012, 139 (11): 740-742.
- [21] Gecks T, Prochnau D, Franz M, et al. Toxic epidermal necrolysis during dronedarone treatment: first report of a severe serious adverse event of a new antiarrhythmic drug [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15 (4): 399-401.
- [22] Siu CW, Wong MP, Ho CM, et al. Fatal lung toxic effects related to dronedarone use [J]. *Arch Intern Med*, 2012, 172 (6): 516-517.
- [23] Hernández Voth AR, Catalán JS, Benavides Mañas PD, et al. A 73-year-old man with interstitial lung disease due to dronedarone [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186 (2): 201-202.
- [24] Stack S, Nguyen DV, Casto A, et al. Diffuse alveolar damage in a patient receiving dronedarone [J]. *Chest*, 2015, 147 (4): e131-e133.
- [25] Thornton D, Avery S, Edey AJ, et al. Organising pneumonia due to dronedarone [J]. *J R Coll Physicians Edinb*, 2015, 45 (3): 213-214.
- [26] Young C, Maruthappu M, Wayne RP, et al. Reversible acute kidney injury requiring haemodialysis five days after starting dronedarone in a stable 71-year-old man at risk of cardiovascular polypharmacy [J]. *J R Coll Physicians Edinb*, 2013, 43 (2): 122-125.
- [27] Selvaraj V, Johnson KG. Dronedarone-induced optic neuropathy [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167 (1): e8-e9.
- [28] 丁昭鑫, 杨淋, 吴晓玲, 等. 在不同老年人群中进行房颤筛查的现状与进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2021, 21 (8): 152-154.
- [29] Hohnloser SH, Crijns HJ, van Eickels M, et al. ATHENA investigators. Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (7): 668-678.
- [30] Kober L, Torp-Pedersen C, McMurray JJ, et al. Increased mortality after dronedarone therapy for severe heart failure [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2678-2687.
- [31] Connolly SJ, Camm AJ, Halperin JL, et al. Dronedarone in high-risk permanent atrial fibrillation [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365: 2268-2276.
- [32] Felser A, Stoller A, Morand R, et al. Hepatic toxicity of dronedarone in mice: role of mitochondrial  $\beta$ -oxidation [J]. *Toxicology*, 2014, 323: 1-9.
- [33] Singh BN, Connolly SJ, Crijns HJ, et al. Dronedarone for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 987-999.
- [34] FDA Drug Safety Communication. Severe liver injury associated with the use of dronedarone (marketed as Multaq) [EB/OL]. (2011-01-14) [2011-9-29]. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ueM240011.html>.
- [35] Fromenty B, Fisch C, Labbe G, et al. Amiodarone inhibits the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 255: 1371-1376.
- [36] Walsh S. FDA approves Multaq to treat heart rhythm disorder [EB/OL]. [2009-07-02]. <http://WWW.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucml70276.html>.
- [37] Quaglino D, Ha HR, Duner E, et al. Effects of metabolites and analogs of amiodarone on alveolar macrophages: structure-activity relationship [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287 (2): L438-L447.
- [38] Tschuppert Y, Buclin T, Rothuizen LE, et al. Effect of dronedarone on renal function in healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64: 785-791.
- [39] Naccarelli GV, Wolbrette DL, Levin V, et al. Safety and efficacy of dronedarone in the treatment of atrial fibrillation/flutter [J]. *Clin Cardiol*, 2011, 5: 103-119.

(收稿日期: 2022-08-06; 修回日期: 2022-09-12)



# 1 例甲泼尼龙琥珀酸钠致迟发性超敏反应

王双英<sup>1</sup>, 周菊香<sup>1</sup>, 李艳飞<sup>1</sup>, 李艳芳<sup>2\*</sup> (1. 邵阳市中心医院药学部, 湖南 邵阳 422000; 2. 邵阳市中心医院神经内科, 湖南 邵阳 422000)

**关键词:** 糖皮质激素; 甲泼尼龙琥珀酸钠; 药物不良反应; 迟发性超敏反应

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1672-2981(2023)03-0837-02

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.03.049

糖皮质激素具有抗过敏、抗炎及免疫调节的药理作用, 被广泛应用于各种过敏性疾病及风湿免疫性疾病。由于糖皮质激素具有强大的抗过敏作用, 其引发的超敏反应容易被临床医师误诊从而延误治疗。本文报道 1 例由静脉注射甲泼尼龙琥珀酸钠后引起的迟发性过敏反应, 并结合文献总结其临床特点, 为识别及处理糖皮质激素引起的迟发性超敏反应提供参考。

## 1 临床资料

患者, 女, 48 岁, 身高 160 cm, 体质量 60 kg, 因“右眼视力突然下降 1 周, 左眼视力突然下降 2 d”于 2022 年 1 月 28 日入院。患者自诉既往无药物过敏史, 无糖皮质激素使用史, 10 年前因子宫肿瘤行子宫切除手术。入院体格检查, 专科查体: 右眼手动/20 cm, 光定位欠准, 左眼无光感; NCT (眼压): R17 mmHg (1 mmHg = 1.33 kPa), L19 mmHg。双眼结膜无充血, 无水肿, 角膜透明, 前房深度正常, Tyn (-), 右眼瞳孔圆, 直径 4 mm, 对光反射迟钝, 左眼瞳孔圆, 直径 6 mm, 对光反射消失。虹膜正常, 晶状体轻度混浊, 玻璃体轻度混浊, 双眼眼底可见, 双眼视盘边界清, 色泽淡红, 视网膜无出血渗出, 视网膜静脉走行正常, A/V (动静脉比) 2:3, 黄斑中心凹反光消失。头部核磁提示脑白质变性, 视觉诱发电位提示左眼 P100 分化差未引出反应波, 右眼 P100 潜伏时明显延长, 波幅明显降低。双眼球、视神经及眼眶 MR 平扫未见明显异常。完善腰椎穿刺提示脑脊液压力正常, 脑脊液生化及常规无异常, 血清 AQP4 抗体 (+)。入院诊断考虑视神经脊髓炎。

入院第 1 日, 完善相关检查, 排除禁忌证后给予甲泼尼龙琥珀酸钠 (辉瑞制药有限公司, 规格: 500 mg/支, 批号: t84367) 500 mg ivgtt qd, 进行冲击治疗, 并予以甲钴胺片、维生素 B<sub>1</sub> 片营养神经, 注射用泮托拉唑、维 D 钙咀嚼片及氯化

钾缓释片防范糖皮质激素相关不良反应。入院第 3 日, 将甲泼尼龙琥珀酸钠剂量调整为 1000 mg ivgtt qd, 使用 5 d 后逐渐减量 (甲泼尼龙琥珀酸钠的使用剂量依次为 500 mg×2 d, 1000 mg×5 d, 500 mg×3 d, 240 mg×3 d, 120 mg×2 d)。

入院第 12 日, 患者面部多发红色皮疹, 突出表面, 伴瘙痒, 无气促、喉头水肿、血压下降等表现。考虑药物过敏可能, 加用西替利嗪片和地氯雷他定片抗过敏治疗, 同时给予地奈德乳膏外涂。患者的面部皮疹增多, 并向颈部蔓延 (见图 1)。入院第 14 日, 新增躯干部及四肢皮疹。入院第 16 日, 患者面部皮疹颜色较前变淡, 躯干部及四肢皮疹较前增多。临床药师分析后考虑皮疹由甲泼尼龙琥珀酸钠引起, 予以停用, 因患者拒绝行免疫球蛋白及血浆置换治疗, 给予注射用地塞米松磷酸钠 (20 mg×3 d, 10 mg×3 d), 其他药物不更改。患者面部、颈部及四肢的皮疹逐渐变淡、消退。入院第 22 日, 患者全身皮疹基本消退。



图 1 入院第 14 日患者面部、颈部及腹部皮疹

## 2 分析与讨论

甲泼尼龙琥珀酸钠为我国最为常用的静脉制剂糖皮质激素<sup>[1-2]</sup>, 是视神经脊髓炎急性期首选的治疗药物<sup>[3]</sup>。甲泼尼龙琥珀酸钠所致速发型超敏反应常见报道<sup>[4-5]</sup>, 其引发的迟发性超敏反应较为罕见<sup>[6]</sup>。糖皮质激素所致迟发性过敏反应通常在给药后 1 h 后出现, 最为常见的是 4 h 至 7 d, 甚至可延迟到用药 6 个月后才出现<sup>[7-8]</sup>。本案例中患者在使用甲泼尼龙琥珀酸钠第 12 日出现了红色皮

**基金项目:** 湖南省医学会医学科研基金临床药学项目资助课题 (No.HMA202001016)。

**作者简介:** 王双英, 女, 主管药师, 主要从事合理用药及药物不良反应研究, email: wangshuangying06@163.com \*通信作者: 李艳芳, 女, 副主任医师, 主要从事神经免疫的研究, email: 452888979@qq.com

疹，伴瘙痒，皮疹出现后未停药，给予抗组胺药物治疗，患者的皮疹持续加重。停用甲泼尼龙琥珀酸钠后，改为等效剂量地塞米松磷酸钠进行治疗，其他药物未调整，患者的皮疹逐渐消失，故可排除为甲钴胺片、维生素 B<sub>1</sub> 片、注射用泮托拉唑、维 D 钙咀嚼片及氯化钾缓释片所引起。皮肤科会诊考虑该患者皮疹为多形性红斑，多形性红斑常见的原因为感染，其中病毒感染最为常见，少部分由药物引起<sup>[9]</sup>。患者原发疾病为视神经脊髓炎，除皮疹伴瘙痒外无其他不适，考虑病毒感

染引起的可能性小。此外，若为其他药物或食物引起的皮疹，在大剂量激素及抗组胺药物的治疗下，患者皮疹通常会缓解，该患者面部及躯干部皮疹在使用甲泼尼龙琥珀酸钠期间日益严重，考虑食物或者其他药物引起皮疹的可能性小。

甲泼尼龙琥珀酸钠说明书提到皮疹、红斑等皮肤软组织不良反应及药物过敏相关不良反应，使用诺氏评分量表<sup>[10]</sup>进行评分，得分为 5 分，见表 1。因此认为该超敏反应与甲泼尼龙琥珀酸钠之间的关系为“很可能”。

表 1 甲泼尼龙琥珀酸钠引起迟发性超敏反应的诺氏评估结果

相关问题	得分情况				
	是	否	未知	回答	得分
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告？	+ 1	0	0	是	+ 1
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的？	+ 2	- 1	0	是	+ 2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解？	+ 1	0	0	是	+ 1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现？	+ 2	- 1	0	未知	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR？	- 1	+ 2	0	未知	0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现？	- 1	+ 1	0	未知	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度？	+ 1	0	0	未知	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解？	+ 1	0	0	否	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应？	+ 1	0	0	否	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应？	+ 1	0	0	是	+ 1
总分 / 分					5

注：总分 ≥ 9 分，表明该药物与不良反应的因果关系为肯定的；5 ~ 8 分为很可能有关；1 ~ 4 分为可能有关；≤ 0 为可疑的。

糖皮质激素所致迟发性超敏反应在不同部位的表现形式有所不同。全身使用糖皮质激素所致迟发性超敏反应主要表现为遍布全身的湿疹、斑丘疹<sup>[11]</sup>，也可表现为汗疱疹和多形红斑<sup>[12]</sup>。外涂糖皮质激素引起的迟发性超敏反应，可表现为原发皮损的边缘皮损加重。外用糖皮质激素可导致面部或眼周水肿、结膜炎、眼睛烧灼感、瘙痒及流泪，吸入性糖皮质激素可导致鼻唇周围的湿疹，可能还会出现口炎、鼻塞、鼻炎，需要注意的是局部使用糖皮质激素也可导致全身反应<sup>[13]</sup>。在临床工作中要提高警惕，及时识别超敏反应，以免延误治疗。

### 参考文献

[1] 姚瑶, 束庆, 马祝悦, 等. 南京地区 52 家医院 2014 ~ 2016 年糖皮质激素用药情况分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2018, 27 (6): 406-409.  
 [2] 常艳璐, 刘腾, 朱斌. 我国 6 城市 84 家医院 2010 ~ 2014 年糖皮质激素用药情况分析 [J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15 (5): 56-61.  
 [3] 中国免疫学会神经免疫学分会. 中国视神经脊髓炎谱系疾病诊断与治疗指南 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2016, 23 (3): 155-166.  
 [4] Amano H, Kitagawa Y, Hayakawa T, et al. Methylprednisolone-induced anaphylaxis diagnosed by intradermal skin test:

a case report [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2021, 17 (1): 70.  
 [5] Patel A, Bahna SL. Immediate hypersensitivity reactions to corticosteroids [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2015, 115 (3): 178-182, e3.  
 [6] 舒文琳, 陈水飏. 甲泼尼龙琥珀酸钠致皮肤过敏反应 [J]. 药物不良反应杂志, 2020, 22 (12): 701-702.  
 [7] Rani RV. Hypersensitivity reactions to corticosteroids [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2014, 47 (1): 26-37.  
 [8] Kamm GL, Hagemeyer KO. Allergic-type reactions to corticosteroids [J]. Ann Pharmacother, 1999, 33 (4): 451-460.  
 [9] David A Wetter, MD. Erythema multiforme: management. <https://www.uptodate.cn/contents/Erythema-multiforme-management>. UpToDate. Oct 26, 2021.  
 [10] 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): 239-45.  
 [11] Baeck M, Chemelle JA, Terreux R, et al. Delayed hypersensitivity to corticosteroids in a series of 315 patients: clinical data and patch test results [J]. Contact Dermatitis, 2009, 61 (3): 163-175.  
 [12] Barbaud A, Waton J. Systemic allergy to corticosteroids: clinical features and cross reactivity [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22 (45): 6825-6831.  
 [13] Al-Shaikhly T, Rosenthal JA, Chau AS, et al. Systemic contact dermatitis to inhaled and intranasal corticosteroids [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2020, 125 (1): 103-105.

(收稿日期: 2022-11-02; 修回日期: 2022-12-20)