

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



ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药
学

第二十一卷
第五期

第117~1402页

二〇二三年五月

中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

2023年5月 第21卷 第5期

Volume 21 Number 5 May 2023

CENTRAL

SOUTH

PHARMACY

- ◆ 微生物感染治疗药物发现新策略研究专题
- ◆ 莜术醇柔性脂质体雾化吸入剂的制备及体内外评价
- ◆ 基于Notch/STAT信号通路研究神香草对哮喘免疫失衡的调节作用
- ◆ 假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 次级代谢产物研究

ISSN 1672-2981



9 771672 298231

5
2023



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

中南药学

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2022年12月

证书编号: 2021-G599-2450
有效期至: 2023年12月





中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第21卷 第5期(总第208期) 2023年5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

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

微生物感染治疗药物发现新策略研究专题

- (1117) 产肠毒素脆弱拟杆菌在结直肠癌中致病机制和治疗策略研究进展
..... 王芳芳, 黄亚辉, 王孝清, 等
- (1125) *MIR1* 基因影响白念珠菌对唑类药物的敏感性
..... 邢信昊, 王欣荣, 陈莉, 等

研究论文

- (1130) 莜术醇柔性脂质体雾化吸入剂的制备及体内外评价
..... 陈博, 刘一帅, 田葳, 等
- (1138) 基于 Notch/STAT 信号通路研究神香草对哮喘免疫失衡的调节作用
..... 潘雅朦, 康雨彤, 蔡晓翠, 等
- (1145) 假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 次级代谢产物研究
..... 陈浒良, 韩立峰, 王罗医
- (1149) 建昌帮纹法对远志 4 种成分在大鼠体内药代动力学和组织分布的影响研究
..... 熊晓莉, 陆美霞, 施林峰, 等
- (1157) 藏药二十五味松石丸抑制血管生成和上皮间充质转化改善四氯化碳-酒精诱导的大鼠肝纤维化研究
..... 许湘, 黄丹, 陆华冠, 等
- (1164) 网络药理学整合巨噬细胞差异基因揭示双氢杨梅树皮素改善急性肺损伤的作用机制及实验验证
..... 唐木兰, 曾春晖, 黄鑫波, 等
- (1170) 基于网络药理学和体外实验验证大蒜含硫化合物蒜氨酸抑制慢性气道炎症的作用机制研究
..... 王秋雨, 李新霞, 兰怡, 等
- (1177) 碳酸锂片的制备及体外溶出行为考察
..... 胥骞, 戴慧, 李鸣, 等
- (1183) 半夏水溶性成分抗氧化活性谱效关系研究
..... 张雪丽, 杨长福, 李玮, 等
- (1190) Wilms 肿瘤 1 相关蛋白促进宫颈癌细胞增殖的作用及其机制
..... 陈义波, 龙玲, 范幸, 等
- (1196) RGD 和泊洛沙姆 F127 共修饰载多西紫杉醇脂质体的制备及体外抗卵巢癌的初步研究
..... 马宁珠, 王振霖, 张建国, 等
- (1203) 凤丹皮内生真菌 *Alternaria arborescens* 发酵产物中甾醇类化合物
..... 翟晓东, 孙磊, 吴德玲, 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 睢大策 肇丽梅 翟 青
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

- (1207) 柳叶蒿地上部分中酚酸类成分的分离与结构鉴定
..... 高茜, 杨丁山, 阮静雅, 等
- (1212) 喷昔洛韦乳膏体外释放一致性研究
..... 信长颖, 赵龙山, 多凯, 等
- (1218) 外泌体对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响
..... 程永芳, 段慧明
- (1222) 鱼腥草素钠鼻喷雾剂的喷雾特性评价
..... 王淼, 贾青, 吴陈亮
- (1228) 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的乌鳖返春口服液化学成分分析 王允吉, 潘文华, 王海丹, 等
- (1240) 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方身痛逐瘀汤化学成分 刘艳梅, 刘金金, 梁慧, 等
- (1251) 基于补益脾肾研究独活寄生贴对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用
..... 董立财, 王德龙, 赵义军, 等
- (1256) 黄芪多糖对急性放射性肠炎大鼠肠黏膜细胞凋亡及 TXNIP/NLRP3 轴的影响 李浩田, 李鹏, 王玉凤, 等
- (1263) 基于分子对接技术探讨刺玫果对急性心肌缺血的保护作用及其有效成分 于晓瑾, 张萌, 刘采艳, 等
- (1270) 不同干燥方法对桑叶主要成分和芦丁含量的影响
..... 林伟雄, 邓李红, 钟志奎, 等
- (1276) 连翘叶的化学成分研究 罗旋, 沈霞, 王薇, 等
- (1280) 基于血清药物化学的肾炎康复片 5 种指标成分含量测定研究
..... 唐千, 王晓丽, 邢红, 等
- (1286) 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术结合分子网络快速筛查 3 种蓟属药用植物化学成分
..... 王宇航, 黄晓欣, 叶定红, 等
- (1296) 长裂藤黄化学成分分离鉴定及其抗肿瘤活性初筛
..... 张少武, 应晶晶, 师马俊杰, 等

综述

- (1300) 中药活性物质对肠屏障功能的保护作用研究进展
..... 冯雯, 张亚薇, 张祎, 等
- (1307) 皂苷类化合物抗肝癌作用机制的研究进展
..... 张哲, 龙佳瑶, 陈晓勇, 等
- (1315) 川西獐牙菜药物代谢动力学和质量控制研究进展
..... 杜茜, 张珍源, 陈西敬, 等
- (1321) 大蒜有机硫化物对药物代谢酶和转运体影响的研究进展
..... 杨园园, 王彬, 刘燕, 等
- (1329) 治疗诱导性衰老在胶质母细胞瘤中的研究进展
..... 曾女金, 邢孟韬, 何玲

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 晓 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
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
陆窈窕

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。

药物分析与检验

- (1335) 衍生化高效液相色谱法测定醋酸西曲瑞克中 10 种手性氨基酸的含量 韩承刚, 李明显, 姬丽芳, 等
- (1341) 分离鉴定黄连花茎的差异性成分并测定其中 4 个成分的含量 王梦琪, 罗定强, 刘海静
- (1347) UPLC-MS/MS 测定萘敏维滴眼液包材中 6 种抗氧剂的含量及其向药液的迁移研究 吴月霞, 杨秋红, 丰丽蕊, 等
- (1352) 一测多评法同时测定丹参配方颗粒中 7 个酚酸类成分 邝敏, 严玉晶, 林嘉明, 等
- (1358) 不同产地天麻 HPLC 指纹图谱、含量测定及化学模式识别研究 王夏茵, 岳宝森, 张炜华, 等
- (1363) UPLC-MS/MS 法测定利伐沙班中的基因毒性杂质 侯继鹏, 时晓燕, 张业华, 等
- (1366) 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定百荷冻干含化糖中 18 种无机元素及健康风险评估 孙常胜, 宇泉霖, 吴婧楠, 等
- (1372) 衰减全反射傅里叶变换红外分光光度法快速测定西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量 郝自强, 田葳, 王欣茹, 等

医院药学

- (1377) 9 城市老年患者使用他汀类药物潜在药物相互作用分析 郭恒, 李丹丹, 温爱萍, 等
- (1383) 4899 例住院患者注射用洛铂相关血小板减少临床特征及影响因素分析 张博, 郭代红, 高奥, 等

药事管理

- (1388) 集中带量采购政策下的药品临床综合评价研究进展 董艳珍, 宋沧桑, 李兴德, 等
- (1393) 国家医保谈判新型抗肿瘤药物的发展变化 谢杏梅, 高悦

药品不良反应

- (1399) 万古霉素致重度血小板减少症 1 例 李海俏, 周桂保, 冯尚军, 等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*286*zh*P*25.0*46*2023-5

本期责任编辑: 彭金飞, 陆窈窕, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 5 May 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

Published by

Central South Pharmacy
Publishing House

Advertisement Publishing Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (1117) Advance in pathogenesis and treatment strategies of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in colorectal cancer
..... WANG Fang-fang, HUANG Ya-hui, WANG Xiao-qing, et al
- (1125) Effect of *MIR1* gene on the sensitivity of *Candida albicans* to azoles
..... XING Xin-Hao, WANG Xin-Rong, CHEN Li, et al
- (1130) Preparation of curcumol flexible liposomes for nebulized inhalation and in vitro and in vivo evaluation
..... CHEN Bo, LIU Yi-shuai, TIAN Wei, et al
- (1138) Effect of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. extract on the immune imbalance induced by asthma based on Notch/STAT signaling pathway
..... PAN Ya-meng, KANG Yu-tong, CAI Xiao-cui, et al
- (1145) Secondary metabolites from *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1
..... CHEN Hu-liang, HAN Li-feng, WANG Luo-yi
- (1150) Effect of Jianchang stewing method on the pharmacokinetics and tissue distribution of 4 components in *Polygala tenuifolia* in rats
..... XIONG Xiao-li, LU Mei-xia, SHI Lin-feng, et al
- (1157) Tibetan medicine Ershiwuwei Songshi pills inhibit angiogenesis and epithelial mesenchymal transformation to improve carbon tetrachloride alcohol-induced liver fibrosis in rats
..... XU Xiang, HUANG Dan, LU Hua-guan, et al
- (1164) Network pharmacology integrates the differential genes of macrophages to explain the mechanism of ampelopsin alleviating acute lung injury and experimental verification
..... TANG Mu-lan, ZENG Chun-hui, HUANG Xin-bo, et al
- (1170) Mechanism of action about garlic sulfur-containing compound alliin in inhibiting chronic airway inflammation based on network pharmacology and in vitro experiments
..... WANG Qiu-yu, LI Xin-xia, LAN Yi, et al
- (1177) Preparation and in vitro dissolution behavior of lithium carbonate tablets
..... XU Qian, DAI Hui, LI Ming, et al
- (1183) Spectrum-effect relationship of antioxidant activity of water-soluble components in *Pinelliae Rhizoma*
..... ZHANG Xue-li, YANG Chang-fu, LI Wei, et al
- (1190) Promotion effect of Wilms' tumor 1 associated protein on the proliferation of cervical cancer cells and its mechanism
..... CHEN Yi-bo, LONG Ling, FAN Xing, et al
- (1196) Preparation of docetaxel-loaded liposomes co-modified by RGD and poloxamer F127 and preliminary study on anti-ovarian cancer in vitro
..... MA Ning-zhu, WANG Zhen-lin, ZHANG Jian-guo, et al

Postal code

42-290

PublishEditorial 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.

- (1203) Ergosterols of *Alternaria arborescens*, an endophytic fungus from *Paeonia ostii* ZHAI Xiao-dong, SUN Lei, WU De-ling, et al
- (1208) Isolation and identification of phenolic constituents from the aerial part of *Artemisia integrifolia* L. GAO Qian, YANG Ding-shan, RUAN Jing-ya, et al
- (1212) In vitro release consistency of penciclovir cream XIN Chang-ying, ZHAO Long-shan, DUO Kai, et al
- (1218) Effect of exosomes on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells CHENG Yong-fang, DUAN Hui-ming
- (1222) Spray characteristics of sodium houttuifonate nasal spray WANG Miao, JIA Qing, WU Chen-liang
- (1228) Chemical components in Wubie Fanchun oral liquid by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS WANG Yun-ji, PAN Wen-hua, WANG Hai-dan, et al
- (1240) Identification of chemical constituents in Shentong Zhuyu decoction based by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS LIU Yan-mei, LIU Jin-jin, LIANG Hui, et al
- (1251) Effect of Duhuo Jisheng paste on rats with adjuvant arthritis based on invigorating the spleen and kidney DONG Li-cai, WANG De-long, ZHAO Yi-jun, et al
- (1257) Effect of astragalus polysaccharide on the intestinal mucosal cell apoptosis and TXNIP/NLRP3 axis in rats with acute radiation enteritis LI Hao-tian, LI Peng, WANG Yu-feng, et al
- (1263) Protection of *Rosa davurica* pall. against acute myocardial ischemia and its active ingredients based on molecular docking YU Xiao-jin, ZHANG Meng, LIU Cai-yan, et al
- (1270) Effect of drying methods on the main compositions and rutin content in mulberry leaves LIN Wei-xiong, DENG Li-hong, ZHONG Zhi-kui, et al
- (1276) Chemical constituents from the leaves of *Forsythia suspensa* LUO Xuan, SHEN Xia, WANG Wei, et al
- (1280) Determination of 5 index components in Shenyan Kangfu tablets based on serum pharmacology TANG Qian, WANG Xiao-li, XING Hong, et al
- (1287) Rapid identification of chemical constituents in 3 *Cirsium* mill medicinal plants based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS and molecular network technology WANG Yu-hang, HUANG Xiao-xin, YE Ding-hong, et al
- (1296) Isolation and identification of chemical constituents in *Garcinia lancilimba* and their anti-tumor activity screening ZHANG Shao-wu, YING Jing-jing, SHI Ma-jun-jie, et al
- (1300) Research progress in the protective effect of active substances of Chinese medicine on intestinal barrier function FENG Wen, ZHANG Ya-wei, ZHANG Yi, et al
- (1307) Research progress on the mechanism of saponins against hepatocellular carcinoma ZHANG Zhe, LONG Jia-yao, CHEN Xiao-yong, et al
- (1315) Research progress in pharmacokinetics and quality control of *Swertia mussotii* DU Xi, ZHANG Zhen-yuan, CHEN Xi-jing, et al

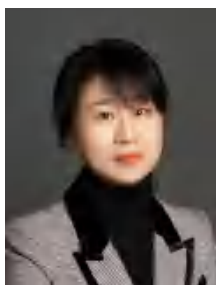
- (1321) Research progress in the effect of garlic organosulfur compounds on drug metabolic enzymes and transporters
 YANG Yuan-yuan, WANG Bin, LIU Yan, et al
- (1329) Advance in the therapy-induced senescence in glioblastoma
 ZENG Nv-jin, XING Meng-tao, HE Ling
- (1335) Determination of 10 chiral amino acids in cetorelix acetate by derivatization HPLC method
 HAN Cheng-gang, LI Ming-xian, JI Li-fang, et al
- (1341) Separation and analysis of characteristic components in *Coptis chinensis* flower moss and content determination of 4 components
 WANG Meng-qi, LUO Ding-qiang, LIU Hai-jing
- (1347) Content of 6 antioxidants in naphazoline hydrochloride, chlorphenamine maleate and vitamin B₁₂ eye drops by UPLC-MS/MS and their migration to liquid WU Yue-xia, YANG Qiu-hong, FENG Li-chun, et al
- (1352) Simultaneous determination of 7 phenolic acids in Danshen formula granules by quantitative analysis of multi-components by single-marker
 KUANG Min, YAN Yu-jing, LIN Jia-ming, et al
- (1358) HPLC fingerprint, content determination and pattern recognition of *Gastrodia elata* Bl. from different regions
 WANG Xia-yin, YUE Bao-sen, ZHANG Wei-hua, et al
- (1363) Determination of genotoxic impurity in rivaroxaban by UPLC-MS/MS
 HOU Ji-peng, SHI Xiao-yan, ZHANG Ye-hua, et al
- (1367) Inorganic elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets and their health risk assessment
 SUN Chang-sheng, YU Quan-lin, WU Jing-nan, et al
- (1372) Rapid content determination of simethicone in simethicone emulsion by Fourier transform infrared spectrophotometry with attenuated total reflection spectrophotometry
 HAO Zi-qiang, TIAN Wei, WANG Xin-ru, et al
- (1377) Potential drug-drug interactions with statins among elderly patients in 9 cities in China
 GUO Heng, LI Dan-dan, WEN Ai-ping, et al
- (1383) Clinical characteristics and influence factors of thrombocytopenia associated with lobaplatin for injection in 4899 inpatients
 ZHANG Bo, GUO Dai-hong, GAO Ao, et al
- (1388) Research progress in clinical comprehensive evaluation of drugs under centralized drug volume-based procurement policy
 DONG Yan-zhen, SONG Cang-sang, LI Xing-de, et al
- (1393) Changes of novel anti-tumor drugs in national medical insurance negotiation XIE Xing-mei, GAO Yue

微生物感染治疗药物发现新策略研究专题

【编者按】

微生物是主要包括细菌、病毒、真菌以及一些小型的原生生物、显微藻类等在内的一大类生物群体，与人类健康密切相关。真菌感染是一种常见病，随着过去三年全球新型冠状病毒疫情的蔓延，侵袭性真菌感染（深部真菌感染）作为致死率极高的并发症也极大地引起了人们的关注，然而临床上治疗侵袭性真菌感染的药物十分有限。近年来，有研究表明肠道微生物群失衡和结直肠癌的发病机制相关，而目前该领域的研究尚处于起步阶段。本课题组多年来从事抗感染药物发现研究，本专栏主要对真菌和肠道致病菌的药物发现新策略进行综述和相关成果报道，旨在为抗感染新药研发提供新的科研思路。

【特邀专家介绍】



刘娜，女，海军军医大学（原第二军医大学）药学院副教授，硕士研究生导师。主要研究方向为抗感染药物研究，抗真菌新靶点、新机制和新分子骨架发现。主持国家自然科学基金等项目，授权发明专利 17 项，以第一作者或通信作者在 *Adv Drug Delivery Rev*、*APSB*、*J Med Chem* 等权威期刊发表 SCI 论文 27 篇（其中封面论文 4 篇），主编/参编中英文专著 7 部。获上海市科技进步二等奖、全国高等学校药学类专业青年教师微课教学大赛二等奖。入选海军军医大学 A 级优秀教师和“远航”人才计划。

产肠毒素脆弱拟杆菌在结直肠癌中致病机制和
治疗策略研究进展

王芳芳¹，黄亚辉¹，王孝清²，盛春泉¹，刘娜^{1*}（1. 海军军医大学，上海 200433；2. 福建中医药大学，福州 350122）

摘要：结直肠癌（CRC）已成为全球第二大致命癌症，严重威胁人类生命健康。近年来，肠道微生物群失衡被认为与 CRC 的发病机制相关，产肠毒素脆弱拟杆菌（ETBF）等具有致癌可能的特定病原体参与 CRC 的发生发展。ETBF 通过其毒力因子脆弱拟杆菌毒素（BFT）发挥致病作用，BFT 可导致肠道黏膜产生炎症反应和组织损伤，参与 CRC 相关的多种信号通路（STAT3、NF- κ B、WNT）改变，继而引起结直肠组织的癌变。本文对产肠毒素脆弱拟杆菌在 CRC 中的致病机制和相关治疗策略进行综述，为开发靶向 ETBF 药物用于 CRC 的预防和治疗提供科学依据。

关键词：微生物群；结直肠癌；产肠毒素脆弱拟杆菌；致病机制；药物治疗

中图分类号：R378，Q939.93 文献标识码：A 文章编号：1672-2981(2023)05-1117-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.001

Advance in pathogenesis and treatment strategies of enterotoxigenic
Bacteroides fragilis in colorectal cancer

WANG Fang-fang¹, HUANG Ya-hui¹, WANG Xiao-qing², SHENG Chun-quan¹, LIU Na^{1*} (1. Navy Medical University, Shanghai 200433; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2020YFA0509200）。

作者简介：王芳芳，女，硕士，实验师，主要从事药物化学研究，email: wff546@163.com *通信作者：刘娜，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗感染药物研究，email: liuna@smmu.edu.cn

Abstract: Colorectal cancer (CRC) has become the world's second deadliest cancer, which is a serious threat to human life and health. In recent years, the imbalance of intestinal microbiota is regarded as the pathogenesis of CRC, and specific pathogens with carcinogenic potential such as enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) are involved in the occurrence and development of CRC. ETBF plays the pathogenic role through its virulence factor *Bacteroides fragilis* toxin, which can lead to intestinal mucosa inflammation and tissue damage, participate in various CRC-related signaling pathways (STAT3, NF- κ B, and WNT), and subsequently cause CRC. This paper reviewed the pathogenic mechanism and related treatment strategies of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in CRC, to provide scientific basis for the development of ETBF targeted drugs to prevent and treat CRC.

Key words: microbiota; colorectal cancer; enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*; pathogenesis; drug therapy

据统计, 全球每年约有 90 万人死于结直肠癌 (colorectal cancer, CRC), CRC 已成为全球第三大常见恶性肿瘤和第二大致命癌症^[1]。虽然科研人员已经进行了广泛的研究, 但 CRC 的致病机制仍未完全阐明。由于高通量测序等科学技术的进步, 肠道微生物群失衡被认为和 CRC 的发病机制相关^[2]。微生物群是指存在于特定环境中的微生物的集合, 包括细菌、古细菌、病毒 (噬菌体和真核病毒)、真菌、单细胞原生动植物和蠕虫^[3]。人体健康虽然我们自身的基因组密切相关, 但是很大程度上依然与生活在我们体内的微生物有关^[4]。在人体中, 胃肠道是微生物最易富集的部位, 大约含有 3×10^{13} 个细菌, 其中大多数是共生菌^[5]。肠道微生物通常分为有益微生物和有害微生物: 有益微生物在肠道内为人体提供营养物质和预防疾病发生, 而有害微生物在肠道内定植会产生毒素和致癌物质^[6]。肠道内细菌主要由拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和瘤胃球菌科等组成, 此外还包括少量的梭状芽孢杆菌^[7]。肠道内定植的细菌中, 拟杆菌门的产肠毒素脆弱拟杆菌尤其引人关注且被发现参与 CRC 的发生发展。

1 脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*, *B. fragilis*)

拟杆菌门为无芽孢、专性厌氧的革兰氏阴性菌。拟杆菌门种类繁多, 超过 20 多种, 这些细菌在人体肠道中通常扮演健康菌群的角色, 维持着肠道菌群平衡。脆弱拟杆菌隶属于拟杆菌门, 属于条件致病菌, 分为非产肠毒素脆弱拟杆菌 (nontoxigenic *Bacteroides fragilis*, NTBF) 和产肠毒素脆弱拟杆菌 (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF)^[8]。NTBF 与 ETBF 的不同之处

在于是否能够产生脆弱拟杆菌毒素 (*Bacteroides fragilis* enterotoxin, BFT)。BFT 是 ETBF 的毒力因子, 共有 BFT-1、BFT-2 和 BFT-3 三种基因型。BFT 是一种 20 kDa 锌依赖型金属蛋白酶, 也被称为 Fragilysin^[9]。BFT 作为一种无活性酶原, 由一个 N 前端结构域、一个柔性连接体和一个 C 端催化结构域组成^[10], 通过一种被称为 fragipain (Fpn) 的肽酶裂解其柔性连接蛋白中的精氨酸位点而被激活^[10-12]。Fpn 是一种 C11 家族半胱氨酸蛋白酶, 通过去除 BFT 前端结构域而直接激活脆弱拟杆菌细胞中的 BFT。BFT 通过破坏细胞间紧密连接和增加肠黏膜通透性而导致肠道炎症和组织损伤^[9], 进一步研究发现, 肠道炎症和组织损伤会促进 CRC 的形成^[13]。

2 ETBF 促进 CRC 发生的作用机制

ETBF 可通过以下几种途径促进 CRC 的发生: ① 诱导炎症反应; ② 降解 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 刺激细胞增殖; ③ 激活转录激活因子 3 (STAT3) 通路; ④ 促进调节性 T 细胞 (Treg) 和辅助性 T 细胞 17 (Th17) 累积; ⑤ 参与 CRC 相关的多种信号通路; ⑥ 形成生物膜 (见图 1)。

2.1 ETBF 诱导炎症反应

正常情况下, 肠道黏膜屏障由一层紧密连接的肠上皮细胞组成并将肠道菌群与免疫细胞隔离开来^[14]。在人体和 CRC 小鼠模型中, 肠黏膜屏障具有高渗透性^[15]。ETBF 产生的 BFT, 会降解结肠上皮细胞上的 E-cadherin, 从而破坏结肠黏膜屏障^[16]。ETBF 还通过分泌颗粒刺激结肠上皮细胞产生外泌体样纳米颗粒, 这些颗粒含有高水平的 C-C 类趋化因子 20 和前列腺素 E2, 是 Th17 细胞募集和 IL-17 信号增殖转化所必需的^[17]。ETBF 还

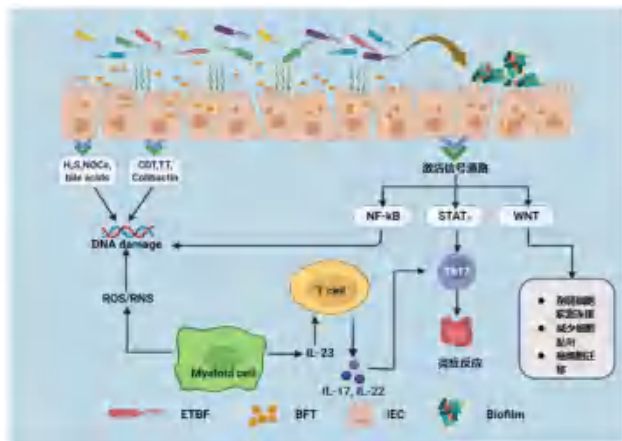


图 1 ETBF 与结直肠癌相关作用机制图

Fig 1 ETBF associated mechanism in colorectal cancer

会与宿主免疫系统相互作用，进而发展为慢性炎症，导致肿瘤发生^[18]。导致 CRC 发展的主要环境风险因素之一是慢性肠道炎症，慢性炎症会改变细胞微环境，促使基因突变，抑制细胞凋亡，诱导血管新生和细胞增殖产生癌前病变，最终导致癌症^[19]。在肿瘤发展过程中，肿瘤细胞和 ETBF 相互作用，产生基因和炎症免疫因子，这些因子影响肿瘤细胞的存活和增殖^[20]。

2.2 ETBF 通过降解 E-cadherin 刺激细胞增殖

除了炎症反应，BFT 还会通过降解 E-cadherin 改变结肠上皮细胞的结构和功能^[21]。E-cadherin 是一种 120 kDa 跨膜糖蛋白，是黏着带的主要结构蛋白，也被认为是肿瘤抑制因子黏着带蛋白。正常情况下，E-cadherin 的表达与细胞凋亡以及同型细胞之间黏附等细胞功能相关^[22]。然而，当 E-cadherin 与肠上皮细胞中的 BFT 相互作用时，它以一种不依赖三磷酸腺苷（ATP）的方式迅速降解 E-cadherin。这种降解会导致结肠损伤加重，进而导致细胞形态学改变和细胞转移能力增强。同时，E-cadherin 的降解也促进了 β -连环蛋白（ β -catenin）和依赖 T 细胞因子的转录激活因子的核定位结合^[23-25]，这种结合促进了基因调控与转录。此外， β -catenin 在 WNT 信号通路中通过促进细胞增殖和上皮-间充质转化，在增强原癌基因表达中发挥重要作用^[21, 26]。

2.3 ETBF 激活 STAT3 通路

ETBF 引发的慢性炎症导致基因改变直接影响 STAT3 通路并促进癌变^[27]。ETBF 能够在结肠上皮细胞和结肠细胞中通过磷酸化和核易位迅速激活黏膜免疫细胞中的 STAT3。而要激活免疫细胞中的 STAT3，上皮细胞要响应产生的细胞因子，如白细胞介素（IL）-6、IL-10 和 IL-23。除了细

胞因子，生长因子如血管内皮生长因子（VEGF）和碱性成纤维细胞生长因子（FGF-2）也参与了 STAT3 的激活。当 ETBF 与结肠上皮细胞相互作用时，它们将刺激结肠黏膜免疫细胞中 STAT3 的早期激活。这种 STAT3 激活持续缓慢上升，直到达到峰值水平，此时意味着 ETBF 激活了免疫系统^[28]。在 ETBF 诱发的结肠炎中，由于激活了结肠黏膜中的 STAT3 通路和 Th17 细胞免疫应答，因此诱发了原癌性炎症反应并增加了肠黏膜的渗透性^[28]。虽然 STAT3 激活是长期的，可持续数月，但它会极大地增加慢性炎症引起肿瘤的概率。此外，STAT3 激活会促进肿瘤 Treg 的积累，并阻止产生抗肿瘤免疫反应，对身体产生不利影响。这种异常持续的 STAT3 激活增加了肿瘤细胞的耐受性，阻止了免疫系统的排斥反应，降低了免疫治疗的有效性，增强了肿瘤发生的可能性^[29]。

2.4 ETBF 促进 Treg 和 Th17 细胞的累积

在正常状态下，Treg 通过高度表达 IL-2 受体并产生内源性 IL-2 来抑制 IL-17 的产生，因而在炎症反应和肠道免疫调节中发挥重要作用。然而，当 ETBF 定植在结肠中某个特定的部位时，产生的 BFT 会激活 STAT3 通路并诱发结肠炎从而破坏肠道黏膜。同时还会导致 Treg 与 ETBF 直接接触从而促进 Treg 的激活，激活后的 Treg 缺乏产生内源性 IL-2 的能力^[30]。一旦 Treg 不能产生内源性 IL-2，它只能通过消耗外源性 IL-2 来维持生存，Treg 对外源性 IL-2 的消耗降低了外源性 IL-2 的水平，这就产生了有利于 Th17 细胞生长的微环境。这表明 ETBF 在肠道内定植促进了 Treg 和 Th17 细胞的累积，Th17 细胞开始产生大量的肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）和 IL-17 等炎症细胞因子，这些细胞因子在组织损伤时促进细胞生长和增殖，进而引发慢性炎症。由致病性 Th17 细胞产生的 IL-17 不仅参与组织损伤的早期炎症反应，而且还会促进肿瘤细胞存活和增殖、肿瘤新生血管形成和转移，从而导致癌变^[31]。同时 IL-17 可通过 IL-6 间接激活 STAT3 通路^[28]。由此可见，当 ETBF 在肠道内定植时，STAT3 通路激活与 Treg 细胞累积都与 CRC 发生相关。

2.5 ETBF 参与 CRC 多种信号通路（NF- κ B、WNT、MAPK）

ETBF 产生的 BFT 参与了结肠上皮细胞的多种信号通路。当 BFT 激活这些信号通路时，它会给身体带来不利影响，并可能导致 CRC 发生。结肠上皮细胞信号转导可激活 NF- κ B、WNT 和

MAPK 等多种信号通路^[32]。BFT 通过激活血红素加氧酶 -1 (HO-1) 表达的肠上皮细胞 NF- κ B 通路而导致肠黏膜产生炎症, 该通路可以防止肿瘤细胞凋亡, 增强肿瘤细胞存活能力, 从而导致肿瘤的发生^[33]。此外, 当结肠上皮细胞内的 NF- κ B 通路长期被激活时, 就会导致一氧化氮合酶活性增强而分解 L-精氨酸产生一氧化氮^[34]。WNT 信号通路是维持结肠上皮细胞结构的重要途径, 因此 WNT 信号通路对于 CRC 的发生和进展是极其重要的^[35]。随着 WNT 信号通路被激活, 它会削弱细胞间紧密连接, 减少细胞黏附, 因而使肿瘤细胞得以迁徙和转移到其他器官^[36]。基质金属蛋白酶是锌依赖性蛋白酶, 在控制肠道屏障中的基膜及细胞外基质的合成和降解起到重要作用^[37]。通过处理非基质生物活性物质来修饰趋化因子或生长因子相关的基质, 以及调节其他蛋白酶的活性^[38]。基质金属蛋白酶 -7 (MMP-7) 的分泌与肿瘤转移和炎症相关^[39]。NF- κ B 和激活因子 -1 (AP-1) 等转录因子可调节 MMP-7 的表达^[40]。有研究发现, BFT 刺激结肠上皮细胞可诱导 MMP-7 激活 NF- κ B 和 AP-1 等转录因子, 丝裂原激活蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路对于 MMP-7 诱导至关重要^[41]。

2.6 ETBF 形成的生物膜在 CRC 中的作用

CRC 发生的风险因素有很多, 包括家族史、年龄、性别、个人病史、吸烟、饮食 (红肉)、肥胖、酗酒和炎症性肠病等。然而, 最近的研究也发现了一种新的危险因素, 即细菌生物膜的形成, 也被证实与 CRC 的进展相关^[42]。结肠上皮增生的增加导致微生物群落关系的改变, 从而改变微生物的组成和活性, 进而导致生物膜的形成^[43]。生物膜的形成是细菌黏附和生长所必需的, 它伴随着细胞外聚合物和黏附基质的产生而产生, 这将导致细菌生长和基因表达的变化。而这些微生物形成的生物膜作为前致癌炎症反应的触发器, 有可能最终发展成 CRC^[44]。生物膜会导致结肠上皮细胞 E-cadherin 的重新分布, 增加肠道通透性, 导致肠道屏障功能丧失, 从而加剧肠道失调, 同时生物膜的形成也降低了细菌对辐射和抗菌药物的敏感性^[45]。

与健康人相比, CRC 患者结肠组织样本中产生的生物膜更为常见。有一种理论认为, 生物膜承载着不同种类的细菌, 而不是入侵微生物的单一变种, 并可能导致炎症反应的增加和具有遗传毒性的细菌源衍生物的产生。无论是健康个体

还是 CRC 患者, 肠道微生物群形成的生物膜都与促癌生物学变化一致, 即结肠上皮增生增加, IL-6、STAT3 激活增加, 多胺增加, E-cadherin 减少^[46]。而多胺代谢物水平的增加被认为协同促进生物膜的形成和细胞增殖, 为结肠细胞的致癌转化的创造有利条件^[46]。此外, 改变结肠黏膜的渗透性和细胞代谢也会导致肿瘤微环境的变化。另一方面, 在家族性腺瘤性息肉病患者中也发现了生物膜存在, 这些患者遗传了突变的 APC 基因, 作为“腺瘤-癌序列”^[47]的早期阶段, 由于息肉和腺瘤的形成, 极易发展成 CRC。

3 靶向 ETBF 药物治疗策略

CRC 的常规治疗手段包括化疗和手术, 两者都有可能严重的并发症。手术具有侵入性、死亡率高; 化疗容易产生耐药性、细胞毒性和其他不良反应。ETBF 被认为是导致 CRC 癌变的关键病原体, 而开发靶向这些关键病原体的药物可以减少不良反应或增强现有 CRC 化疗方案的疗效, 成为一种实用的辅助策略。本文将对几种作用于 ETBF 药物进行简要回顾, 包括抗菌药物、天然产物、抗炎药物、益生菌类等。

3.1 抗菌药物

临床上用来治疗 ETBF 感染的常用抗菌药物有青霉素类 (如苄青霉素)、头孢菌素类、喹诺酮类 (如诺氟沙星)、克林霉素和甲硝唑等药物。然而, 近年来不断有抗菌药物耐药的相关报道, 且耐药率呈逐步升高趋势。同时细菌形成的生物膜也会导致其对抗菌药物的耐药性增加, 迄今为止, 还没有一种抗菌药物被证明可以有效治疗细菌生物膜相关感染。抗菌药物如多黏菌素、亚胺培南的研究表明, 它们不能完全消除生物膜, 而只是减少生物膜的产生^[48]。最近的研究也表明, 广谱抗菌药物在包括 CRC^[8]在内的各种类型癌症患者中并不能产生良好的临床效果。生物膜会导致吞噬细胞和补体系统的激活减弱, 从而保护致病菌不受宿主免疫系统的影响, 使其对常规抗菌药物的耐药性增加约 1000 倍^[49]。细菌在生物膜中的代谢状态和有限的供氧也是导致其对抗菌药物产生耐药性的可能因素^[50]。Jeyaraj 等^[51]发现, 当给予致死浓度的抗菌药物时含有生物膜的细胞比浮游细胞的突变率更高, 从而增加了抗菌药物耐药基因通过质粒转移的机会。虽然使用抗菌药物治疗可以杀灭 ETBF 等肠道致病菌, 但是由于缺乏靶向性, 抗菌药物的使用会破坏胃肠道生态系统的平衡性和导致耐药性的发生, 使得 CRC

的临床治疗效果受到限制。

3.2 天然产物

天然产物由于化学结构的多样性及其已知的生物活性,已成为药物开发中十分具有潜力的候选药物。许多天然产物已被证明具有良好的抗菌和抗生物膜活性,最近报道的几种源自植物的天然产物显示了其对 CRC 相关病原体的抗菌作用。

3.2.1 花姜酮 (zerumbone) 近年来有研究表明,花姜酮具有抗诱变、抗菌、抗癌变、抗炎等多种生物活性^[52]。Kim 等^[53]研究发现,花姜酮对不同的脆弱拟杆菌菌株,包括野生型 ETBF、BFT-2 过表达的 ETBF 和 NTBF,均具有抗菌活性。研究证实花姜酮不仅可以抑制生物膜的形成,而且能够根除已形成的生物膜。同时花姜酮对含有毒性 BFT-2 基因的脆弱拟杆菌菌株的生物膜形成的抑制作用比非产肠毒素菌株更有效。此外,花姜酮的抗菌膜活性可能是通过下调与生物膜形成相关的外排泵基因 (*bmeB12*) 而诱导的^[53]。以上结果表明,花姜酮可作为一种抗生物膜和抗菌剂,用于治疗 and 预防 ETBF 引起的生物膜相关感染,同时还是一种有效的免疫调节剂以及一种具有开发潜力的抗肿瘤药物。

3.2.2 α -葎草烯 (α -caryophyllene) α -葎草烯也显示了抑制 ETBF 生物膜形成的潜力^[54]。 α -葎草烯是一种倍半萜,存在于芳香植物包括薄荷、鼠尾草和生姜 (姜科) 的精油中^[55]。有报道称 α -葎草烯精油具有抗炎和抗菌作用^[56-57]。与花姜酮类似, α -葎草烯也通过诱导 RND 型外排泵基因 *bmeB1* 和 *bmeB3* 的下调来发挥抗菌活性,导致 ETBF 的细胞膜破坏和生物膜形成的抑制^[54]。此外, α -葎草烯在动物模型中表现出显著的抗炎活性,可减少组胺注射引起的水肿^[56]。在卡拉胶注射的大鼠模型中,使用 α -葎草烯全身治疗可以阻止 TNF- α 和 IL-1 β 的产生^[56]。

3.2.3 小檗碱 (berberine) Chen 等^[58]对小檗碱预防结直肠腺瘤复发的一项多中心、随机、双盲研究发现小檗碱可以降低息肉切除术后患者结肠腺瘤和息肉样病变复发的风险。小檗碱的低成本 and 安全性展现了它在预防 CRC 方面的潜力。小檗碱 (最初从中草药黄连中提取) 在中国已经使用了几个世纪,用于治疗腹泻和肠炎。小檗碱的抗肿瘤活性在动物实验中也有报道,它可以调节肿瘤微环境,阻断肿瘤发生相关通路的激活,此外,研究也证实小檗碱可以通过改变微生物群的组成来预防小鼠大肠癌的发生。

3.3 抗炎药物

金诺芬 (auranofin) 是一种金属盐,已获得美国食品和药品监督管理局 (FDA) 批准作为治疗类风湿关节炎的药物。同时它还具有抑制肠道细菌 (如 ETBF) 生长的作用,有可能作为一种抗肿瘤药物而被重新使用。对类似于金诺芬等已批准药物的重新使用,可以节省开发和测试新药所需的时间和费用,同时其安全性也得到了广泛的验证^[59]。一项研究表明,金诺芬对 p53 为零的卵巢癌 SKOV3 细胞系具有抗肿瘤活性^[60]。Jang 等^[59]研究了金诺芬对 ETBF 的抗菌和抗生物膜作用,证实了用相对较低浓度的金诺芬对 ETBF 有很好的抑制和根除细菌生物膜作用。经金诺芬治疗后,外膜蛋白 (*OmpA*) 基因和外排泵相关基因 *bmeB3* 的表达显著降低。后续研究需要进一步在体内模型中验证金诺芬抑制 ETBF 的作用机制。

3.4 益生菌

益生菌被认为是无致病性的安全菌株,通过维持肠道微生物平衡而起到促进健康的作用,常被作为活补剂使用^[60]。益生菌在治疗微生物感染,促进人类健康,并在预防抗菌药物相关的腹泻、早产儿坏死性小肠结肠炎,治疗婴儿结肠绞痛、牙周病以及诱导或维持溃疡性结肠炎缓解等方面表现出良好的应用前景^[61]。不同益生菌混合物对产生生物膜的肠菌病原体 (包括 ETBF 和产肠毒素的大肠埃希菌) 都有抗菌膜特性^[62-63]。Shin 等^[62]最近研究了益生菌丁酸梭菌 NCTC 7423 上清液对 ETBF 基因表达和生物膜形成的影响。丁酸梭菌对 ETBF 的生长表现出拮抗作用,丁酸梭菌的细菌定植因子 (CFs) 还抑制了生物膜的成熟,使已形成的生物膜被破坏,降低了生物膜中细胞的代谢活性^[62]。

益生菌产生多种拮抗化合物,包括胞外多糖^[64]、细菌素^[64]和生物表面活性剂^[65],这些拮抗化合物可以干扰生物膜的附着和形成,以及分解成熟的生物膜。此外,益生菌能够改变肠道 pH 值,从而与致病菌竞争营养物质^[66]。益生菌在进入宿主体内后,除与病原体直接相互作用外,还可以通过与免疫系统相互作用发挥免疫调节作用。研究表明,益生菌和其产生的可溶性因子可通过 Toll 样受体识别调节和激活特异性免疫细胞,释放细胞因子,从而产生免疫调节作用^[67]。有研究报道联合补充 ω -3 脂肪酸和微生物细胞制剂可以改善 CRC 患者化疗的生活质量,减少炎症生物标志物 (如 IL-6、TNF- α) 水平,缓解化

疗产生的不良反应^[68]。在结肠癌患者肿瘤组织和附近的黏膜中有明显的微生物群存在, 经过益生菌干预后, 患者粪便中具核梭杆菌和 ETBF 含量显著降低^[69]。目前, 益生菌的摄入在一些临床试验中显示出了良好的结果, 被认为是一种可行的通过调节肠道微生物群来预防 CRC 的方法。

4 总结和展望

随着 CRC 发病率逐年升高, ETBF 作为导致 CRC 发生的关键病原体, 正成为近年来研究的热点, 而开发靶向这些关键病原体的药物将为 CRC 的治疗开辟新的方向。本文通过对 ETBF 的致病机制和靶向治疗药物进行简要回顾, 发现研发新的 CRC 针对性治疗药物迫在眉睫, 而开发靶向肠道微生物相关药物将成为一种潜在的预防和治疗 CRC 的方法。结直肠特殊的生理位置, 胃肠道的生理复杂性, 结肠生物利用度以及干预的特定部位靶向能力等问题都为开发抗 CRC 药物增加了难度。对定植于胃肠道中的具有致病性的 ETBF 等微生物进行针对性的干预, 不仅可以消除特定的致病微生物, 同时也可以最大限度地降低对胃肠道生态系统的破坏。开发靶向肠道致病菌相关药物, 将为优化精准治疗方案, 提高患者生存率提供可能。微生物学和肿瘤学领域未来的挑战将包括开发快速和经济有效的肠道微生物群失调诊断方法, 以及阐明致病菌对 CRC 的生物效应和作用机制。

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] Nejman D, Livyatan I, Fuks G, et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria [J]. Science, 2020, 368 (6494): 973-980.
- [3] Stappenbeck TS, Virgin HW. Accounting for reciprocal host-microbiome interactions in experimental science [J]. Nature, 2016, 534 (7606): 191-199.
- [4] Relman DA, Falkow S. The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology [J]. Trends Microbiol, 2001, 9 (5): 206-208.
- [5] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body [J]. PLoS Biol, 2016, 14 (8): e1002533.
- [6] Mitsuoka T. Intestinal flora and human health [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 1996, 5 (1): 2-9.
- [7] Shukla SD, Budden KF, Neal R, et al. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung [J]. Clin Transl Immunol, 2017, 6 (3): e133.
- [8] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science, 2018, 359 (6371): 91-97.
- [9] Snezhkina AV, Krasnov GS, Lipatova AV, et al. The dysregulation of polyamine metabolism in colorectal cancer is associated with overexpression of c-Myc and C/EBP β rather than enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 2353560.
- [10] Goulas T, Arolas JL, Gomis-Rüth FX. Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/adam xenolog [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108 (5): 1856-1861.
- [11] Shiryayev SA, Aleshin AE, Muranaka N, et al. Structural and functional diversity of metalloproteinases encoded by the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island [J]. FEBS J, 2014, 281 (11): 2487-2502.
- [12] Choi VM, Herrou J, Hecht AL, et al. Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice [J]. Nat Med, 2016, 22 (5): 563-567.
- [13] Lv Y, Ye T, Wang HP, et al. Suppression of colorectal tumorigenesis by recombinant *Bacteroides fragilis* enterotoxin-2 in vivo [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23 (4): 603-613.
- [14] Lee TC, Huang YC, Lu YZ, et al. Hypoxia-induced intestinal barrier changes in balloon-assisted enteroscopy [J]. J Physiol, 2018, 596 (15): 3411-3424.
- [15] Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth [J]. Nature, 2012, 491 (7423): 254-258.
- [16] Wu S, Rhee KJ, Zhang M, et al. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage [J]. J Cell Sci, 2007, 120 (Pt 11): 1944-1952.
- [17] Deng Z, Mu J, Tseng M, et al. Enterobacteria-secreted particles induce production of exosome-like s1p-containing particles by intestinal epithelium to drive Th17-mediated tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6956.
- [18] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota [J]. Science, 2012, 338 (6103): 120-123.
- [19] Brücher BL, Jamall IS. Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 331.
- [20] Whisner CM, Athena AC. The role of the microbiome in cancer initiation and progression: how microbes and cancer cells utilize excess energy and promote one another's growth [J]. Curr Nutr Rep, 2019, 8 (1): 42-51.
- [21] Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer [J]. Cell Host Microbe, 2014, 15 (3): 317-328.

- [22] Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121: 11-22.
- [23] Wu S, Lim KC, Huang J, et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (25): 14979-14984.
- [24] Chen LA, Van Meerbeke S, Albesiano E, et al. Fecal detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34 (9): 1871-1877.
- [25] Gilmore WJ, Johnston EL, Bitto NJ, et al. *Bacteroides fragilis* outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 970725.
- [26] Rhee KJ, Wu S, Wu X, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type c57bl/6 mice [J]. *Infect Immun*, 2009, 77 (4): 1708-1718.
- [27] Wu S, Powell J, Mathioudakis N, et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor-kappaB pathway [J]. *Infect Immun*, 2004, 72 (10): 5832-5839.
- [28] Wang L, Yi T, Zhang W, et al. IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (24): 10112-10120.
- [29] Yu H, Pardoll D, Jove R. Stats in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (11): 798-809.
- [30] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation [J]. *Immunity*, 2007, 26 (3): 371-381.
- [31] Brockmann L, Giannou AD, Gagliani N, et al. Regulation of T(h)17 cells and associated cytokines in wound healing, tissue regeneration, and carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (5): 1033.
- [32] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and STAT3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15 (2): 103-113.
- [33] Ko SH, Rho Da J, Jeon JI, et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin upregulates heme oxygenase-1 in intestinal epithelial cells via a mitogen-activated protein kinase-and NF- κ B-dependent pathway, leading to modulation of apoptosis [J]. *Infect Immun*, 2016, 84 (9): 2541-2554.
- [34] Shaked H, Hofseth LJ, Chumanevich A, et al. Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (35): 14007-14012.
- [35] Schneikert J, Behrens J. The canonical WNT signalling pathway and its APC partner in colon cancer development [J]. *Gut*, 2007, 56 (3): 417-425.
- [36] Mármol I, Sánchez-De-Diego C, Pradilla DA, et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (1): 197.
- [37] Kelppe J, Thorén H, Haglund C, et al. MMP-7, -8, -9, E-cadherin, and beta-catenin expression in 34 ameloblastoma cases [J]. *Clin Exp Dent Res*, 2021, 7 (1): 63-69.
- [38] Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance [J]. *Eur Respir J*, 2011, 38 (1): 191-208.
- [39] Liao HY, Da CM, Liao B, et al. Roles of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in cancer [J]. *Clin Biochem*, 2021, 92: 9-18.
- [40] Kwon MJ, Hong E, Choi Y, et al. Interleukin-1 α promotes extracellular shedding of syndecan-2 via induction of matrix metalloproteinase-7 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446 (2): 487-492.
- [41] Jeon JI, Lee KH, Kim JM. *Bacteroides fragilis* enterotoxin upregulates matrix metalloproteinase-7 expression through MAPK and AP-1 activation in intestinal epithelial cells, leading to syndecan-2 release [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (21): 11817.
- [42] Tomkovich S, Dejea CM, Winglee K, et al. Human colon mucosal biofilms from healthy or colon cancer hosts are carcinogenic [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (4): 1699-1712.
- [43] Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the muc2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (Suppl 1): 4659-4665.
- [44] Li S, Konstantinov SR, Smits R, et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23 (1): 18-30.
- [45] Kemung HM, Tan LT, Khan TM, et al. *Streptomyces* as a prominent resource of future anti-MRSA drugs [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2221.
- [46] Johnson CH, Dejea CM, Edler D, et al. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis [J]. *Cell Metab*, 2015, 21 (6): 891-897.
- [47] Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, et al. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30 (1): 147-160.
- [48] Wu H, Moser C, Wang HZ, et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections [J]. *Int J Oral Sci*, 2015, 7 (1): 1-7.
- [49] Götz F. *Staphylococcus* and biofilms [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43 (6): 1367-1378.
- [50] Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin [J]. *Antimicrob*

- Agents Chemother, 2003, 47 (1): 317-323.
- [51] Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanandhan G, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 106: 86-92.
- [52] Haque MA, Jantan I, Arshad L, et al. Exploring the immunomodulatory and anticancer properties of zerumbone [J]. Food Funct, 2017, 8 (10): 3410-3431.
- [53] Kim HR, Rhee KJ, Eom YB. Anti-biofilm and antimicrobial effects of zerumbone against *Bacteroides fragilis* [J]. Anaerobe, 2019, 57: 99-106.
- [54] Jang HI, Rhee KJ, Eom YB. Antibacterial and antibiofilm effects of α -humulene against *Bacteroides fragilis* [J]. Can J Microbiol, 2020, 66 (6): 389-399.
- [55] Bouajaj S, Benyamna A, Bouamama H, et al. Antibacterial, allelopathic and antioxidant activities of essential oil of *Salvia officinalis* L. Growing wild in the atlas mountains of morocco [J]. Nat Prod Res, 2013, 27 (18): 1673-1676.
- [56] Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of cordia verbenacea [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 569 (3): 228-236.
- [57] Pichette A, Larouche PL, Lebrun M, et al. Composition and antibacterial activity of abies balsamea essential oil [J]. Phytother Res, 2006, 20 (5): 371-373.
- [58] Chen YX, Gao QY, Zou TH, et al. Berberine versus placebo for the prevention of recurrence of colorectal adenoma: a multicentre, double-blinded, randomised controlled study [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5 (3): 267-275.
- [59] Jang HI, Eom YB. Antibiofilm and antibacterial activities of repurposing auranofin against *Bacteroides fragilis* [J]. Arch Microbiol, 2020, 202 (3): 473-482.
- [60] Park SH, Lee JH, Berek JS, et al. Auranofin displays anticancer activity against ovarian cancer cells through foxo3 activation independent of p53 [J]. Int J Oncol, 2014, 45 (4): 1691-1698.
- [61] Ghouri YA, Richards DM, Rahimi EF, et al. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2014, 7: 473-487.
- [62] Shin DS, Rhee KJ, Eom YB. Effect of probiotic clostridium butyricum NCTC 7423 supernatant on biofilm formation and gene expression of *Bacteroides fragilis* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30 (3): 368-377.
- [63] Abdelhamid AG, Esaam A, Hazaa MM. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. Coli* [J]. Saudi Pharm J, 2018, 26 (5): 603-607.
- [64] Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, et al. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli* [J]. Microb Pathog, 2018, 125: 448-453.
- [65] Tan Y, Leonhard M, Moser D, et al. Inhibition activity of lactobacilli supernatant against fungal-bacterial multispecies biofilms on silicone [J]. Microb Pathog, 2017, 113: 197-201.
- [66] Kaur S, Sharma P, Kalia N, et al. Anti-biofilm properties of the fecal probiotic lactobacilli against *Vibrio* spp [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 120.
- [67] Balzaretta S, Taverniti V, Guglielmetti S, et al. A novel rhamnose-rich hetero-exopolysaccharide isolated from lactobacillus paracasei dg activates THP-1 human monocytic cells [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83 (3): e02702-16.
- [68] Golkhalkhali B, Rajandram R, Paliany AS, et al. Strain-specific probiotic (microbial cell preparation) and omega-3 fatty acid in modulating quality of life and inflammatory markers in colorectal cancer patients: a randomized controlled trial [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2018, 14 (3): 179-191.
- [69] Hibberd AA, Lyra A, Ouwehand AC, et al. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention [J]. BMJ Open Gastroenterol, 2017, 4 (1): e000145.

(收稿日期: 2023-03-01; 修回日期: 2023-04-04)

MIR1 基因影响白念珠菌对唑类药物的敏感性

邢信昊¹, 王欣荣¹, 陈莉², 仲华¹, 韩蕾², 王彦^{1, 3*} (1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 3. 军事药学国家级实验教学示范中心, 上海 200433)

摘要: 目的 考察 MIR1 基因对白念珠菌对唑类药物敏感性的影响。方法 以野生型白念珠菌、*mir1Δ/Δ* 敲除菌和 *mir1Δ/MIR1* 回复菌为实验对象, 应用斑点法考察 MIR1 基因敲除对抗真菌药物敏感性的影响, 利用罗丹明 6G 外排实验考察白念珠菌 MIR1 基因敲除对药物外排能力的影响, 利用 JC-1 考察 MIR1 基因敲除对线粒体膜电位的影响, 利用 BacTiter-Glo Reagent 考察 MIR1 基因敲除对三磷酸腺苷 (ATP) 生成能力的影响。结果 MIR1 基因敲除使白念珠菌对唑类药物的敏感性提高, 药物外排能力缺陷, 线粒体膜电位有降低趋势, ATP 生成能力缺陷。结论 MIR1 基因影响白念珠菌对唑类药物的敏感性, 可能是通过影响 ATP 生成进而影响 ABC 转运蛋白的药物外排功能造成的。以白念珠菌 MIR1 为靶点, 有望开发与唑类药物协同的新型抗真菌药物。

关键词: 白念珠菌; MIR1 基因; 唑类药物; 敏感性; 药物外排

中图分类号: R378

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1125-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.002

Effect of MIR1 gene on the sensitivity of *Candida albicans* to azoles

XING Xin-Hao¹, WANG Xin-Rong¹, CHEN Li², ZHONG Hua¹, HAN Lei², WANG Yan^{1, 3*} (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122; 3. National Experimental Teaching Demonstration Center of Military Pharmacy, Shanghai 200433)

Abstract: Objective To determine the role of MIR1 gene on the sensitivity of *Candida albicans* to azoles. **Methods** Wild-type *Candida albicans*, *mir1Δ/Δ* mutant and *mir1Δ/MIR1* mutant were used as experimental strains. Spot assay was conducted to determine the effect of MIR1 gene knockout on antifungal susceptibility. Rhodamine 6G was used to check the effect of MIR1 gene on drug efflux in *Candida albicans*. JC-1 was used to decide the effect of MIR1 gene on mitochondrial membrane potential. Finally, the effect of MIR1 gene on ATP production was examined by BacTiter-Glo Reagent. **Results** MIR1 gene knockout increased the sensitivity of *Candida albicans* to azoles, impaired drug efflux, decreased the mitochondrial membrane potential, and impaired the ability of ATP production. **Conclusion** MIR1 gene affects the sensitivity of *Candida albicans* to azoles, which may be caused by affecting ATP production and drug efflux mediated by ATP-binding cassette transporter. Targeting MIR1 gene in *Candida albicans* helps develop new antifungal drugs that synergize with azoles.

Key words: *Candida albicans*; MIR1 gene; azoles; sensitivity; drug efflux

白念珠菌是最常见的病原真菌之一, 可引起皮肤感染、黏膜感染甚至危及生命的系统性感染。对脓毒症、器官移植、恶性肿瘤等免疫功能低下的患者来说, 白念珠菌引起的系统性感染尤为凶险, 据统计, 念珠菌血症患者的归因死亡率高达 10% 至 47%^[1-2]。

唑类药物是现今临床上常用的抗真菌药物, 然而其耐药性问题日益凸显, 严重困扰了抗真菌治疗的有效实施。目前临床上多采用优化剂量和多药联合疗法应对耐药性问题, 但存在毒性大、效率低、价格高等缺点^[3]。研究白念珠菌的药物敏感性相关基因, 开发抗真菌新药并解决耐药性

基金项目: 生物安全研究专项 (No.20SWAQX29-1-6); 国家自然科学基金项目 (No.82204470)。

作者简介: 邢信昊, 男, 硕士, 主要从事抗感染药理学研究, email: xhxing98@gmail.com * 通信作者: 王彦, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事抗感染药理学研究, email: wangyansmmu@126.com

问题具有重要的临床意义。

真菌耐药的机制包括药物外排功能增强、药物摄入减少、生物被膜形成、靶蛋白动态变化以及药物代谢相关通路改变等,而白念珠菌对唑类药物耐药的最主要机制是药物外排能力的增强,尤其是能量依赖的药物外排^[3-5]。线粒体是能量代谢的核心细胞器,众多研究表明,线粒体功能影响白念珠菌的药物敏感性。例如,白念珠菌氧化磷酸化解偶联突变体对氟康唑和伏立康唑的敏感性显著降低^[6],线粒体复合体 I 活性必需基因 *GOA1* 或其亚基编码基因 *NDH51* 的缺失都会使白念珠菌对唑类药物的敏感性显著提高^[7],线粒体生物发生必需基因 *FZO1* 缺失使唑类药物耐受性显著降低^[8]。可见,线粒体能量代谢是白念珠菌对唑类药物的敏感性的关键影响因素。

前期有研究报道,小分子化合物 ML316 通过选择性抑制线粒体磷酸盐转运蛋白 Mir1 发挥抗真菌作用,并在酿酒酵母中研究了其可能的机制^[9]。我们推测,线粒体磷酸盐转运蛋白可能影响线粒体有氧呼吸进而影响能量代谢,成为新的白念珠菌抗真菌药物靶点。然而,其编码基因 *MIR1* 在白念珠菌药物敏感性中的作用还缺乏系统研究。课题组前期研究了白念珠菌 *MIR1* 基因的功能,然而而是基于传统的营养标记型敲除筛选策略^[10],对表型研究有一定干扰^[11-12]。本研究聚焦 *MIR1* 基因对白念珠菌对唑类药物敏感性的影响,利用 SAT1 flipper 法对白念珠菌标准株进行敲除和重组,并探索 *MIR1* 基因在其中的作用机制。

1 材料

野生型白念珠菌 SC5314 (wild-type *Candida albicans*, WT, 由美国乔治敦大学 William A Fonzi 教授馈赠); SanPrep 柱式质粒抽提试剂盒(上海生工生物), *Sac I* 内切酶、*Xho I* 内切酶、*Apa I* 内切酶、*Sac II* 内切酶 (New England Biolabs), 酵母转化试剂盒、诺尔斯菌素(上海懋康生物), Ex Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 罗丹明 6G (Sigma-Aldrich), JC-1 膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物), ATP 检测试剂盒 BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega), 三磷酸腺苷 (ATP) 溶液(北京索莱宝); 蛋白胨、酵母浸膏、营养肉汤(美国 BD 公司); 糖类、抗菌药物、缓冲液、培养基、引物、DNA Marker 等其他基础试剂购自上海生工生物。

2 方法

2.1 菌株培养

挑取冻存菌株,在 YPD 液体培养基中活化,30 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h 后,吸取 10

μL 于新的 1 mL YPD 液体培养基中,相同条件下继续培养 16 h。取该菌液后接种于沙氏葡萄糖琼脂 (SDA) 培养基,30 °C 培养静置培养 48 h。实验时挑取单克隆菌落置于 YPD 液体培养基中,振荡培养 16 h 至对数生长期用于实验。

2.2 *MIR* 敲除菌 (*mir1Δ/Δ*) 和回复菌 (*mir1Δ/MIR1*) 的构建与鉴定

用引物 *MIR1-up-FWD* 和 *MIR1-up-RV* 扩增 *MIR1* 基因 5'-端的一个 0.661 kb 片段,经 *Apa I* 和 *Xho I* 双酶切后,克隆到 pSFS2 载体中 *MAL2p-CaFLP-CaSAT1* 盒的上游,得到质粒 pSFS2-*MIR1up*;同理,用引物 *MIR1-down-FWD* 和 *MIR1-down-RV* 扩增 *MIR1* 基因 3'-端的一个 0.504 kb 片段,经 *Sac II* 和 *Sac I* 双酶切后,克隆到 pSFS2 载体中 *MAL2p-CaFLP-CaSAT1* 盒的下游,得到质粒 pSFS2-*MIR1updown*。用 *Apa I* 和 *Sac I* 两种限制性内切酶对其进行双酶切,酶切后的片段用醋酸锂法转化进白念珠菌 SC5314,然后此片段会以同源重组的方式替换掉目的基因的一个等位基因。使用多个引物通过菌落 PCR 鉴定出对诺尔丝菌素表现出抗性的转化子,将正确的转化子删除诺尔丝菌素抗性标记 *CaSAT1* 后即可得到目的基因的单等位基因敲除菌。经过两次重组和删除,即可得到双等位基因敲除菌 *mir1Δ/Δ*。

为了将 *MIR1* 基因重新整合到 *mir1Δ/Δ* 中,用引物 *MIR1-FWD* 和 *MIR1-RV* 扩增一个 2.30 kb 的片段,其中包含完整的开放阅读框,以及 *MIR1* 等位基因上游 0.661 kb 和下游 0.504 kb 的序列,用 *Apa I* 和 *Xho I* 双酶切。以该酶切片段替换 pSFS2-*MIR1updown* 中 *MIR1* 基因序列的 5'-端,生成质粒 pSFS2-*MIR1Rec*。pSFS2-*MIR1Rec* 质粒用 *Apa I* 和 *Sac I* 酶切,用该酶切片段转化 *mir1Δ/Δ*。由此获得了具有诺尔斯菌素抗性的菌株,再经删除诺尔丝菌素抗性标记 *CaSAT1* 后,即得回复菌 *mir1Δ/MIR1*,以供进一步研究。菌株构建和鉴定所用引物如表 1 所示,PCR 鉴定的引物设计原理如图 1 所示,预测结果如表 2 所示。

2.3 斑点法 (spot assay) 检测药物敏感性

取活化的野生型白念珠菌,敲除菌 *mir1Δ/Δ*, 回复菌 *mir1Δ/MIR1*, 用 PBS 洗涤后,调整野生型和回复菌菌液浓度为 2×10⁶ 个·mL⁻¹,再倍比稀释为 2×10⁵、2×10⁴、2×10³、2×10² 个·mL⁻¹,敲除菌浓度分别为野生型的 2 倍。各浓度菌液分别取 5 μL 点于含不同抗真菌药物 [氟康唑 (Fluconazole)、酮康唑 (Ketoconazole)、伊曲康唑 (Itraconazole)、咪康唑 (Miconazole) 和伏立康唑 (Voriconazole) 等 5 种唑类药物,以及布雷

表 1 菌株构建和鉴定所用引物

Tab 1 Primers for strain construction and identification

名称	序列
菌株构建所用引物	
MIR1-up-FWD	cccgggcccCCCTTGCCGATTTGACCAATC
MIR1-up-RV	cccctcgagCAGCTAAGGCAAATGAGGCG
MIR1-down-FWD	cccccgggCTTTGAACTGTCCACCAGCC
MIR1-down-RV	cccagagctCACCTACTGAAGGGTCTTAC
MIR1-FWD	cccgggcccGTTTTGCGTACGTTTGTGGTC
MIR1-RV	cccctcgagGCACGTACTCCATAACCAAG
菌株鉴定所用引物	
Ident-F	GGTGCTATTGGTTGTGGTGCC
Ident-R	ATGGCTTCGTTGGCTCTTTCG
Casset-F	GCTTTCGGTCGCTGTTCTCA
Casset-R	TGTTAGGCGTCATCCTGTGC
Up-F	GTTTTGCGTACGTTTGTGGTC
Up-R	CGTGCTTCGCTATCGCCT
Dn-F	TCTCGGCGGCATTGACCTCTT
Dn-R	GCCAATTTATGTTGGGAGCAGC

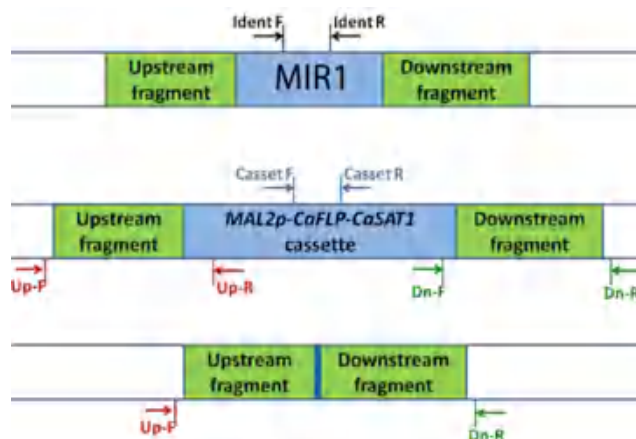


图 1 用于 PCR 鉴定的引物设计示意图

Fig 1 Schematic diagram of primer design in PCR identification

表 2 所构建菌株的 PCR 鉴定预测结果 (kb)

Tab 2 Predicted results of PCR identification of the constructed strains (kb)

菌株	Ident	Casset	Up	Dn	Up-F to Dn-R
SC5314	0.524	none	none	none	2.140
<i>mir1Δ/MIR1</i> (heterozygous)	0.524	1.404	1.281	0.879	2.140; 5.509
<i>mir1Δ/Δ</i> (homozygous)	none	1.404	1.281	0.879	1.323; 5.509
<i>mir1Δ/MIR1</i> (re-integrated)	0.524	1.404	2.677	0.879	1.323; 6.905

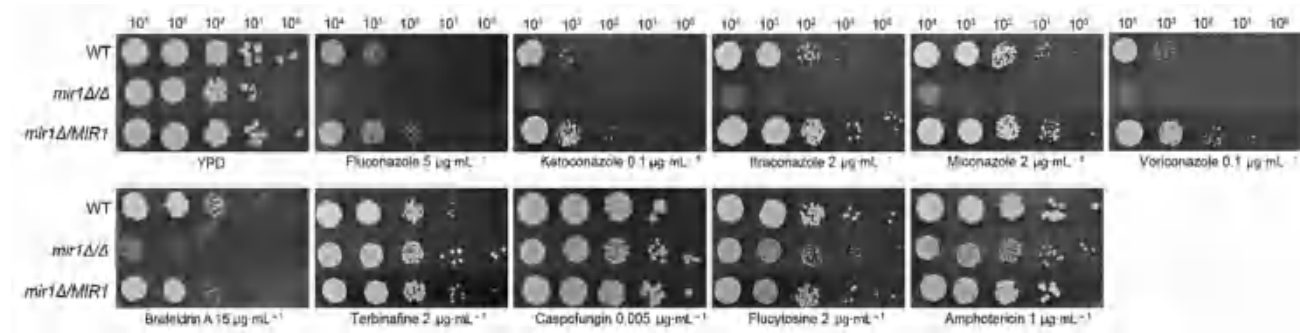


图 2 *MIR1* 敲除菌、回复菌与野生型白念珠菌对抗真菌药物的敏感性

Fig 2 Sensitivity of *MIR1* knockout, revertant and wild-type *Candida albicans* to antifungal drugs

非德菌素 A (Brefeldin A)、特比萘芬 (Terbinafine)、卡泊芬净 (Caspofungin)、氟胞嘧啶 (Flucytosine) 和两性霉素 (Amphotericin) 等其他药物] 的 YPD 平板上, 自然晾干。于 30 °C 静置培养 48 h, 观察并拍照。

结果显示, 在 YPD 培养平板以及含有特比萘芬、卡泊芬净、氟胞嘧啶和两性霉素的培养平板上, *mir1Δ/Δ* 敲除菌的菌落生长情况与野生型或回复菌没有显著差异; 而在含有 5 种唑类药物和布雷非德菌素 A 的平板上, 与野生型或回复菌相比, *mir1Δ/Δ* 敲除菌的菌落生长明显较少 (见图 2)。该结果表明, *MIR1* 基因敲除使白念珠菌对唑类药物的敏感性显著提高。

2.4 药物外排能力检测

将上述菌株在 YPD 中振荡培养 16 h, PBS 洗涤后, 调整菌液浓度 5×10^7 个 \cdot mL⁻¹。用 PBS 重悬细胞并振荡培养 2 h, 耗竭能量。加入罗丹明使其终浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹, 30 °C、200 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 60 min。菌液离心, PBS 洗涤后, 计数并调整菌液浓度为 5×10^7 个 \cdot mL⁻¹。加入葡萄糖使其终浓度为 20 mmol \cdot L⁻¹, 提供供能底物, 取 1 mL 在 30 °C 下、200 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 2 h。3000 r \cdot min⁻¹ 离心菌液 5 min, 取 100 μ L 上清液, 检测 527 nm 处的 OD 值。

结果显示, 在 30 °C 培养环境下, 与野生型相比, *mir1Δ/Δ* 敲除菌泵出的罗丹明 6G 显著较低 ($P < 0.05$, 见图 3)。该结果表明, *MIR1* 基因敲除使白念珠菌的药物外排能力缺陷。

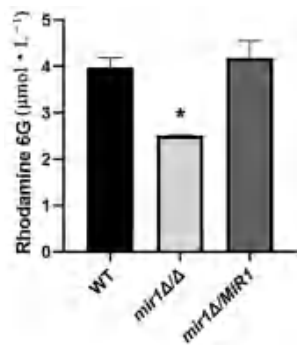


图3 *MIR1* 敲除菌、回复菌与野生型白念珠菌对罗丹明 6G 的外排能力

Fig 3 Efflux of Rhodamine 6G by *MIR1* knockout, revertant and wild-type *Candida albicans*

注：与野生型组比较，**P* < 0.05。

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

2.5 线粒体膜电位检测

活化的菌株经 200 r · min⁻¹ 振荡培养 16 h, 收集细胞, 经 PBS 洗涤后, 使用 YPD 培养基重悬细胞, 在 30 °C 下振荡培养 30 min。收集细胞并洗涤, 然后用 PBS 调节菌液浓度至 5 × 10⁶ 个 · mL⁻¹。将 0.5 mL 菌液与等体积的 JC-1 染色工作液混合, 阳性对照组使用线粒体电子传递链抑制剂 CCCP (终浓度为 10 μmol · L⁻¹), 37 °C 避光孵育 20 min。使用 JC-1 染色缓冲液洗涤 3 次, 重悬至 100 μL。使用多功能酶标仪在 490 nm 激发波长下, 检测并计算红色 / 绿色荧光强度比 (590 nm/530 nm)。

结果显示, 与野生型相比, *mir1Δ/Δ* 敲除菌的红绿荧光强度之比有降低趋势 (见图 4A), 表明 *MIR1* 基因敲除使白念珠菌的线粒体膜电位有降低趋势。

2.6 ATP 生成检测

活化的菌株经 200 r · min⁻¹ 振荡培养 16 h, 收集细胞, 经 PBS 洗涤后, 用 YPD 培养基调整菌液浓度至 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹, 在 30 °C 下振荡培养 30 min。取 50 μL 菌液与等体积 BacTiter-Glo Reagent, 在 96 孔板中混匀, 孵育 10 min 后, 使用多功能酶标仪测定荧光信号强度。按说明书制备 ATP 标准曲线, 根据标准曲线计算 ATP 含量。

结果显示, *mir1Δ/Δ* 敲除菌与野生型相比 ATP 浓度显著降低 (*P* < 0.01, 见图 4B), 表明 *MIR1* 基因敲除使白念珠菌的 ATP 生成能力缺陷。

3 讨论

本项研究发现 *MIR1* 基因的缺失显著提高了白念珠菌的唑类药物敏感性, 而对特比萘芬、卡泊芬净、氟胞嘧啶和两性霉素等其他抗真菌药物的敏感性没有显著改变, 表现出一定的特异性。

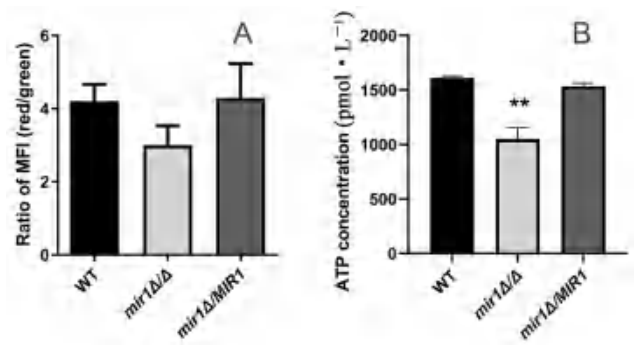


图4 *MIR1* 敲除菌、回复菌与野生型白念珠菌的线粒体膜电位 (A) 和 ATP 生成能力 (B)

Fig 4 Mitochondrial membrane potential (A) and ATP production (B) in *MIR1* knockout, revertant and wild-type *Candida albicans*

注：与野生型组比较，***P* < 0.01。

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

通过罗丹明 6G 外排实验发现 *MIR1* 敲除使白念珠菌对唑类药物敏感性的提高可能与药物外排能力缺陷有关, *MIR1* 敲除引起的线粒体膜电位降低和 ATP 生成能力缺陷可能是其作用机制。

与其他抗真菌药物耐药机制不同, ABC 转运蛋白依赖的药物外排作用是白念珠菌对唑类药物耐药性的主要机制, 特异性阻断 ABC 转运蛋白是逆转唑类药物耐药性的一种可行手段, 小分子抑制剂 FK506、普罗帕酮以及米尔贝霉素等均可以提高对唑类药物的敏感性^[13-14]。由于 ABC 转运蛋白功能的发挥依赖于 ATP, 因此线粒体 ATP 生成障碍会抑制其转运功能, 进而提高白念珠菌对唑类药物敏感性。例如, 白念珠菌线粒体复合物 I、III 和 V 的功能变化, 可能会改变线粒体有氧呼吸及 ATP 生成, 影响药物外排活性, 从而改变对唑类药物的敏感性^[7, 15]。琥珀酸脱氢酶编码基因 *SDH2* 缺失也会导致白念珠菌药物外排能力下降, 唑类药物敏感性提高^[16]。可见, 线粒体相关基因是研究白念珠菌唑类耐药性机制及其逆转手段的重要方向。

MIR1 基因编码线粒体磷酸盐转运蛋白, 其缺失会导致向线粒体基质的磷酸盐转运障碍^[17]。在线粒体基质中, 二磷酸腺苷 (ADP) 和无机磷酸盐在 ATP 合酶的催化下生成 ATP, 无机磷酸盐的转运障碍会引起 ATP 合成受阻^[9], 这可能是本研究中 *MIR1* 敲除提高白念珠菌对唑类药物敏感性的主要机制。此外, 线粒体功能障碍也可能通过减少药物外排泵表达或提高活性氧 (ROS) 累积来提高抗真菌药物敏感性, 未来值得通过实验进一步探索。

课题组前期在白念珠菌 *MIR1* 基因功能的研究中, 考察了 *MIR1* 基因和白念珠菌耐药性的相

关性^[10]，但是存在缺陷：在构建 *MIR1* 基因敲除菌时采用了营养缺陷型标记筛选策略，亲本菌是 *URA3* 基因缺陷的白念珠菌 CAI4 株，不能在缺乏尿苷或尿嘧啶的培养基上生长，这种代谢相关基因的缺陷会对白念珠菌的表型产生影响，继而对表型研究造成干扰^[11]。在本研究中，我们以 SC5314 标准株为亲本菌，采用了更加先进的 SAT1 flipper 技术进行敲除菌的构建，得到了更加可信的结果和结论。

综上所述，本研究发现 *MIR1* 基因缺失会导致白念珠菌对唑类药物敏感性提高；*MIR1* 基因缺失后，白念珠菌的药物外排能力缺陷，可能是 *MIR1* 敲除对线粒体膜电位降低和 ATP 生成能力缺陷所导致的。可见，*MIR1* 基因对白念珠菌的能量供应和药物敏感性至关重要，Mir1 蛋白特异性抑制剂有望开发与唑类药物协同的新型抗真菌药物，以 *MIR1* 为靶点开发抗真菌药物可能具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Strollo S, Lionakis MS, Adjemian J, et al. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive Candidiasis, United States, 2002—2012 (1) [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 23 (1): 7-13.
- [2] Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive candidiasis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18026.
- [3] Mota Fernandes C, Dasilva D, Haranahalli K, et al. The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65 (2): e01719-20.
- [4] Lee Y, Puumala E, Robbins N, et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond [J]. *Chem Rev*, 2021, 121 (6): 3390-3411.
- [5] Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20 (9): 557-571.
- [6] Cheng S, Clancy CJ, Nguyen KT, et al. A *Candida albicans* petite mutant strain with uncoupled oxidative phosphorylation overexpresses MDR1 and has diminished susceptibility to fluconazole and voriconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51 (5): 1855-1858.
- [7] Sun N, Fonzi W, Chen H, et al. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (1): 532-542.
- [8] Thomas E, Roman E, Claypool S, et al. Mitochondria influence CDR1 efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (11): 5580-5599.
- [9] McLellan CA, Vincent BM, Solis NV, et al. Inhibiting mitochondrial phosphate transport as an unexploited antifungal strategy [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14 (2): 135-141.
- [10] 黄海. 白念珠菌 *MIR1* 基因的功能研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [11] 吕权真, 张景翔, 姜远英, 等. 白念珠菌基因功能研究的策略 [J]. *菌物学报*, 2020, 39 (11): 2149-2160.
- [12] Bi S, Lv QZ, Wang TT, et al. SDH2 is involved in proper hypha formation and virulence in *Candida albicans* [J]. *Future Microbiol*, 2018, 13 (10): 1141-1156.
- [13] Silva L V, Sanguinetti M, Vandeputte P, et al. Milbemycins: more than efflux inhibitors for fungal pathogens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (2): 873-886.
- [14] Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Egner R, et al. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22 (3): 291-300.
- [15] Guo H, Xie SM, Li SX, et al. Involvement of mitochondrial aerobic respiratory activity in efflux-mediated resistance of *C. albicans* to fluconazole [J]. *J Mycol Med*, 2017, 27 (3): 339-344.
- [16] 王欣荣, 鲁仁义, 王彦. *SDH2* 基因在白念珠菌环境适应性中的作用 [J]. *药实践杂志*, 2022, 40 (4): 309-313.
- [17] Murakami H, Blobel G, Pain D. Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor [J]. *Nature*, 1990, 347 (6292): 488-491.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-04-25)

研究论文

莪术醇柔性脂质体雾化吸入剂的制备及体内外评价

陈博^{1, 4, 5}, 刘一帅², 田葳⁵, 叶田田², 杨瑞³, 王淑君^{2*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 3. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034; 4. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司, 江苏 南通 226133; 5. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133)

摘要: **目的** 制备雾化吸入的莪术醇柔性脂质体, 优化其处方工艺, 对其进行表征并测定其对细胞增殖的影响和肺部靶向性。**方法** 以包封率为主要考察指标, 筛选脂质体的制备方法, 以微柱离心-气相法测定其包封率, 研究药脂比、膜材比、旋蒸温度、水化温度等因素对脂质体包封率的影响; 通过正交实验对处方和工艺进行优化, 并进行质量评价。以 TGF- β 1 诱导的 A549 上皮细胞为模型, 通过 IncuCyte 平台进行细胞抑制率实验。采用雾化吸入的给药方式, 测定莪术醇柔性脂质体的体内分布。**结果** 采用薄膜水化法进行莪术醇柔性脂质体的制备, 优化后的制备处方为药脂比 1:30, 不加胆固醇, 平均包封率为 83.92%, 平均粒径为 0.116 μ m。体外释放研究表明, 莪术醇柔性脂质体相比游离莪术醇具有缓释效果。细胞增殖实验表明莪术醇柔性脂质体对 TGF- β 1 诱导的 A549 上皮细胞的抑制作用高于游离莪术醇。雾化吸入的莪术醇柔性脂质体具有更好的肺部靶向性。**结论** 优选处方制备的莪术醇柔性脂质体包封率高、粒径小且均匀, 具有良好的肺部靶向性。

关键词: 莪术醇; 柔性脂质体; 包封率; 雾化吸入; 肺部靶向性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1130-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.003

Preparation of curcumol flexible liposomes for nebulized inhalation and in vitro and in vivo evaluation

CHEN Bo^{1, 4, 5}, LIU Yi-shuai², TIAN Wei⁵, YE Tian-tian², YANG Rui³, WANG Shu-jun^{2*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 3. Second Hospital Affiliated to Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034; 4. Jiangsu Aidi Nano Biomedical Company, Nantong Jiangsu 226133; 5. Drug Advanced Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133)

Abstract: Objective To prepare curcumol flexible liposomes for nebulized inhalation, optimize their prescription process, characterize them, and determine their effect on the cell proliferation and lung targeting. **Methods** The encapsulation ratio was used as the main index. The liposome preparation methods were screened, and the encapsulation ratio was determined by microcolumn centrifugation-gas chromatography. The effect of drug-lipid ratio, membrane material ratio, spinning temperature, and hydration temperature on the encapsulation ratio of liposomes was determined. The prescription and process were optimized by orthogonal test, and the quality was evaluated. TGF- β 1-induced A549 epithelial cells were used as models, and cytostatic rate experiments were conducted with the IncuCyte platform. The in vivo distribution of curcumol loaded in flexible liposomes was

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81973494); 基础加强计划重点基础研究项目 (No.2021-JCJQ-ZD-077-11)。

作者简介: 陈博, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂与抗纤维化研究, email: bchen.hm@simmm.ac.cn *通信作者: 王淑君, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药制剂与新药开发研究, email: 1252116911@qq.com

determined after administering nebulized inhalation. **Results** The curcumol flexible liposomes were prepared by film hydration. The optimized prescription was a 1 : 30 drug-lipid ratio (without cholesterol), with an average encapsulation ratio of 83.92% and an average particle size of 0.116 μm . In vitro release studies showed that curcumol flexible liposomes had a slower release than that of free curcumol. Cell proliferation experiments showed that curcumol flexible liposomes inhibited TGF- β 1-induced A549 cells more than did free curcumol. The curcumol flexible liposomes for nebulized inhalation better targeted at the lung. **Conclusion** Curcumol flexible liposomes prepared by the optimized prescription have a high encapsulation ratio, small and uniform particle size, and good lung targeting effect.

Key words: curcumol; flexible liposome; encapsulation rate; nebulized inhalation; lung targeting effect

肺是人的重要器官，空气中的灰尘颗粒、有毒物质和细菌等吸入肺部都有可能引起肺部疾病以及全身疾病^[1]。肺部疾病包括各种肺炎（细菌、真菌、病毒性或吸入性肺炎）、肺纤维化、肺癌和哮喘等。靶向药物递送到肺部已成为全身或局部药物递送系统的重要研究方向之一。莪术醇（curcumol, Cur）又名姜黄醇，主要来自于姜科植物莪术、姜黄等中药中提取分离的一种倍半萜类化学成分，为无色针状结晶，易溶于乙醚、氯仿，溶于乙醇，微溶于石油醚，几乎不溶于水，在水中的溶解度仅为 0.3%^[2]。莪术醇是莪术挥发油的重要成分之一，具有抗纤维化、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血脂等药理作用，在临床治疗中具有广阔的应用前景^[3-4]。现代药理学证实，莪术醇可使致纤维化因子 α -SMA、Smad2/3、TGF- β 的 mRNA 表达水平降低^[5]。莪术醇可以降低肺纤维化大鼠肺组织中 TGF- β 1 和 PAI-1 的表达，降低肺组织中羟脯氨酸的含量，缓解博来霉素诱导的大鼠肺纤维化^[6]。莪术醇可以通过抑制 JAK1/STAT3 信号通路激活而抑制肺癌细胞的增殖和侵袭^[7]。张国立等^[8]通过将莪术挥发油和莪术醇制备成肺吸入给药的粉雾剂，将药物递送至肺部，不仅对急性肺损伤具有良好的治疗作用，而且提高了药物的肺组织分布，减少了全身其他组织分布及不良反应。

由于莪术醇几乎不溶于水，很难达到口服或注射给药的要求，极大地限制了其实验研究和临床应用。脂质体（liposome, LP）主要是由两亲性的磷脂和其他辅料构建的双层囊泡，具有类细胞结构，可以作为药物的有效载体。利用脂质体包裹莪术醇可提高其溶解度，增强稳定性，同时具有低毒性、缓释、改善稳定性等优点^[9]。其中，

柔性脂质体又称为可变形脂质体，由于其高变性、高柔韧性、高渗透性的特点被广泛应用于经皮给药系统中，但是在雾化吸入给药方面报道较少^[10]。相比较于静脉注射，雾化吸入由于使用方便、肺组织浓度较高、全身不良反应少等特点而日益受到重视^[11]。本实验采用薄膜水化法制备了莪术醇柔性脂质体，优化了其处方和工艺，并对该制剂的质量以及体外活性进行了评价，通过雾化吸入的给药方式考察了莪术醇柔性脂质体的肺部靶向性，以期提高莪术醇柔性脂质体的肺部靶向性和肺部疾病的治疗效果，为莪术醇新剂型的进一步研究提供依据。

1 材料

1.1 细胞和动物

A549 人肺腺癌细胞（武汉尚恩生物技术有限公司，批号：SNL-089），SPF 级 KM 雄性小鼠 12 只 [辽宁长生生物技术股份有限公司，许可证号：SCXK（辽）2020-0001]，在沈阳药科大学动物实验中心 [许可证编号：SYXK（辽）2021-0009] 进行实验，操作严格遵守实验动物伦理保护等相关规定。

1.2 试药

莪术醇（自制^[12]，纯度 > 97%，批号：20220401），莪术醇对照品（中国食品药品检定研究院，纯度 \geq 99.9%，批号：100185-201908），磷钨酸负染色液（北京索莱宝科技有限公司，批号：20201130），大豆卵磷脂 S100（德国利宝益公司，批号：903910B），吡啶菁绿（批号：C14185060），葡聚糖凝胶 G50（批号：C14185058），胆固醇（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C12398354），TGF- β 1 [派普泰克生物科技（苏州）有限公司，批号：0719354]，磷酸盐缓冲液（含 5% 海藻糖，pH 7.2，联科生物，批号：A20635），RPMI-1640 培

培养基、1×磷酸盐缓冲液(Gibco公司),胎牛血清(HyClone公司),无水乙醇、二氯甲烷为国产分析纯,甲醇为国产色谱纯。

1.3 仪器

PTX-FA2105 电子天平[华志(福建)电子科技有限公司];GC-2010 Pro 气相色谱仪(日本岛津);JM-1200EX 透射电镜(日本电子株式会社);RE-2000B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Scientz-II D 超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);TOPSIZER 激光粒度分析仪(珠海欧美克仪器有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);荧光分子成像仪(北京数字精准医疗科技有限公司);TDZ4-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);IncuCyte S3[赛多利斯(上海)贸易有限公司];超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);培养箱和水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 莪术醇柔性脂质体含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为DB-WAX(30 m×0.32 mm, 0.25 μm);进样口温度为240℃;检测器温度为250℃;柱流量为1.5 mL·min⁻¹;进样方式为液体直接进样;分流比为5:1;升温程序为起始温度185℃,保持10 min,以20℃·min⁻¹升温至225℃,保持8 min。

2.1.2 专属性实验 ①空白溶剂为甲醇;②取空白脂质体0.2 mL置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得空白脂质体溶液;③精密称取莪术醇对照品20 mg,置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得2 mg·mL⁻¹的莪术醇对照品储备液,精密移取莪术醇对照品储备液0.2 mL置10 mL量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,即得0.04 mg·mL⁻¹的莪术醇对照品溶液;④精密称取莪术醇供试品20 mg,置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得2 mg·mL⁻¹的莪术醇供试品储备液,同莪术醇对照品储备液处理,即得0.04 mg·mL⁻¹的莪术醇供试品溶液。取空白溶剂、空白脂质体、供试品溶液及对照品溶液各2 μL,分别进样分析,结果如图1所示,莪术醇对照品及供试品在该色谱条件下的保留时间分别为8.919、8.921 min,空白溶剂、空白辅料溶液均不干扰莪术醇测定,专属性良好。

2.1.3 线性关系考察 精密量取莪术醇储备液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL,置10 mL量瓶中,加

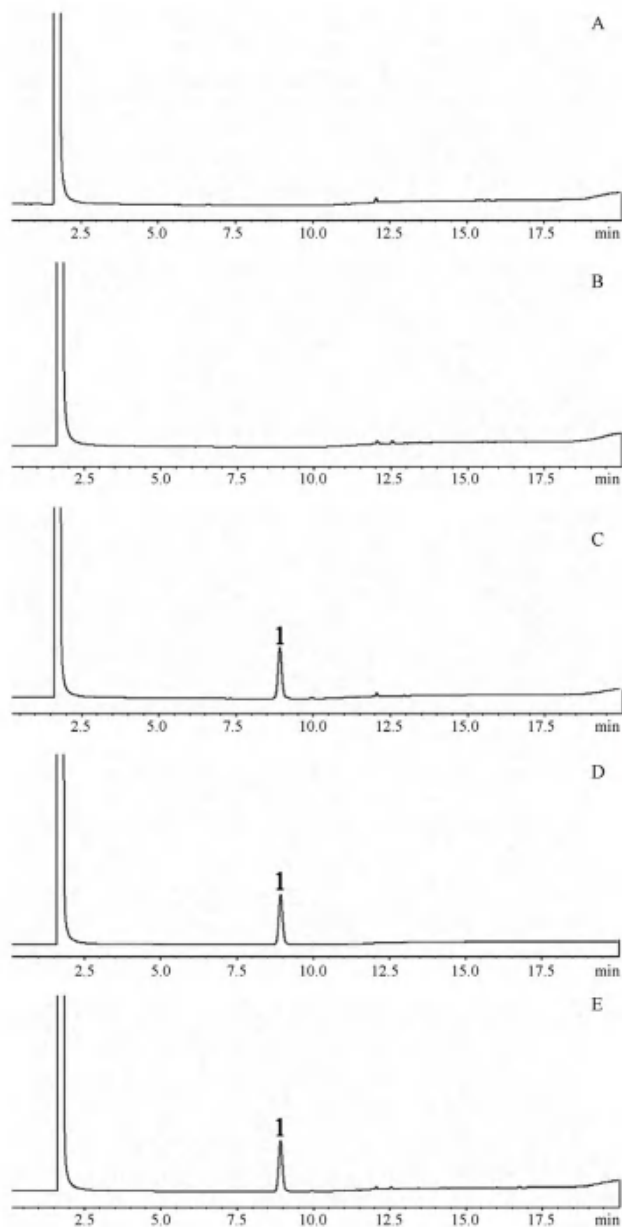


图1 专属性色谱图

Fig 1 Specificity chromatogram

A. 空白溶剂(blank solvent); B. 空白脂质体(blank liposome); C. 游离药物(free drug); D. 对照品溶液(reference solution); E. 莪术醇柔性脂质体(curcumin flexible liposomes); 1. 莪术醇(curcumin)

甲醇稀释至刻度,照“2.1.1”项下色谱条件,进样测定,以莪术醇的质量浓度(C , mg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,得线性方程为: $A = 4.769 \times 10^6 C + 1.382 \times 10^3$, r 为0.9992。结果表明,莪术醇在0.020~0.120 mg·mL⁻¹与峰面积线性关系良好。

2.1.4 仪器精密度考察 取莪术醇柔性脂质体对照品溶液连续进样6次。取供试品溶液连续进样6次,结果莪术醇的保留时间RSD值为0.02%,峰面积RSD值为0.48%,仪器精密度符合规定。

2.1.5 重复性考察 按照“2.1.2”项下方法配制供试品溶液,平行 6 份,进样分析,结果莪术醇含量的 *RSD* 值为 0.52%,表明方法重复性良好。

2.1.6 溶液稳定性考察 按照“2.1.2”项下方法配制溶液,对照品溶液和供试品溶液分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样测定,记录色谱图,考察放置稳定性。结果对照品溶液、供试品溶液峰面积 *RSD* 值分别为 0.61%、0.59%,说明供试品溶液、对照品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 加样回收实验 按照“2.1.2”项下方法配制溶液,精密称取莪术醇对照品溶液,分别配制成低、中、高 (0.02、0.04、0.06 mg·mL⁻¹) 3 个质量浓度,加入等量莪术醇柔性脂质体,平行配制 3 份;测得低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 99.05%、101.89%、102.05%,其 *RSD* 分别为 0.71%、0.20%、0.15%,结果表明加样回收率良好。

2.1.8 包封率的测定 采用微柱离心法^[13]测定脂质体包封率,取制备好的微型凝胶柱,精密吸取 0.2 mL 脂质体溶液,加于微型凝胶柱的顶端,3000 r·min⁻¹ 离心 3 min,继续加入 0.2 mL 纯化水于凝胶柱的顶端,3000 r·min⁻¹ 离心 3 min,用相同体积的纯化水分别连续洗脱,重复上述操作 4 次,合并洗脱液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,稀释定容至刻度,摇匀,取 2 μL 进样分析,得峰面积 $A_{\text{样}}$,平行测定 3 份;另分别精密吸取 0.2 mL 脂质体溶液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,稀释定容至刻度,摇匀,取 2 μL 进样分析,得峰面积 $A_{\text{对}}$,平行测定 3 份。包封率 (%) = $A_{\text{样}}/A_{\text{对}} \times 100\%$ 。

2.2 莪术醇柔性脂质体制备方法筛选

2.2.1 薄膜水化法^[14] 分别精密称取处方量莪术醇、大豆卵磷脂 S100 和胆固醇于茄形瓶中,加入 5 mL 无水乙醇,超声至固体全部溶解,得到淡黄色澄清透明溶液,待脂质膜材料溶解后。将茄形瓶于 40 °C 下真空旋转蒸发 30 min,除去乙醇,得干燥的脂质沉积物。量取 10 mL 纯化水,于 40 °C 下预热,预热完全后加入茄形瓶中,水化 30 min。将水化后脂质体混悬液置于 EP 管在冰浴中,于 400 W 探头超声 15 min (工作 3 s,间歇 3 s),随后过 1 次 0.8 μm 微孔滤膜,过 2 次 0.22 μm 微孔滤膜,即得,测定脂质体包封率及粒径。

2.2.2 逆向蒸发法^[15] 分别精密称取处方量莪术醇、大豆卵磷脂 S100 和胆固醇于 EP 管,加入 6 mL 二氯甲烷,超声至固体全部溶解。用注射器将 2 mL 纯化水抽出,将针头完全插在有机相液

面下方,缓缓打入其中,在冰浴中于 400 W 探头超声 5 min (工作 3 s,间歇 3 s),成白色乳浊液,静置 10 min 稳定无明显分层。45 °C 减压旋蒸除去有机溶剂约 30 min,成凝胶状。取 10 mL 纯化水 40 °C 下预热,预热完全后加入茄形瓶中,水化 30 min。将水化后脂质体混悬液于 EP 管在冰浴中 400 W 探头超声 10 min (工作 3 s,间歇 3 s),随后过 1 次 0.8 μm 微孔滤膜,过 2 次 0.22 μm 微孔滤膜,即得,测定脂质体包封率及粒径。

2.2.3 乙醇注入法^[16] 分别精密称取处方量莪术醇、大豆卵磷脂 S100 和胆固醇,加入 5 mL 无水乙醇,超声至固体全部溶解。将有机相通过注射器缓缓注入处方量纯化水中。于 45 °C 水浴磁力搅拌至无醇味后将脂质体混悬液置于 EP 管,在冰浴中于 400 W 探头超声 15 min (工作 3 s,间歇 3 s),随后过 1 次 0.8 μm 微孔滤膜,过 2 次 0.22 μm 微孔滤膜,即得,测定脂质体包封率及粒径。

2.2.4 确定制备方法 根据包封率选择合适的脂质体制备方法,测定其包封率、中值粒径 (D_{50})、跨度 (Span),结果见表 1。薄膜水化法制得脂质体包封率最高。薄膜水化法可能由于在旋蒸过程中,在茄形瓶内壁上形成一层脂质薄膜,使莪术醇与磷脂有序且均匀地排列在薄膜上,经水化后得到包封率较高、均匀、稳定的脂质体混悬液。因此,最终选用薄膜水化法制备莪术醇柔性脂质体。

表 1 不同方法制备的脂质体包封率、粒径

Tab 1 Encapsulation rate and particle size of liposomes prepared by different methods

方法	包封率 /%	$D_{50}/\mu\text{m}$	Span
薄膜水化法	79.46	0.122	1.214
逆向蒸发法	75.64	0.115	0.835
乙醇注入法	77.51	0.104	0.818

2.3 莪术醇柔性脂质体处方的单因素考察

根据脂质体常用的辅料及种类,以包封率为重点考察指标,参照表 2 条件对辅料的种类及用量进行筛选,对脂质体的制备工艺进行优化。结果表明,当药脂比为 1:30 (w/w) 时,包封率达到最大值,当磷脂用量过大时包封率反而会下降,稳定性降低;当无胆固醇时包封率高、Span 值小,粒径分布均匀,最终选择无胆固醇为进一步的优化条件;成膜温度在 50 °C 时脂质体的包封率较高;水化温度在 40 °C 时包封率最高,再结合磷脂的相变温度,考虑制剂稳定性,最终选择水化温度 40 °C 为进一步的优化条件;水化

15 min 时包封率最高, 且可水化完全, 最终选择水化时间 15 min 为进一步的优化条件; 水化转速为 1204 ~ 1212 r · min⁻¹ 时包封率最高, 且可水化完全, 最终选择水化转速为 1204 ~ 1212 r · min⁻¹ 为进一步的优化条件。

表 2 单因素考察 (n = 3)

Tab 2 Single factor examination (n = 3)

考察因素	条件	包封率 /%	D ₅₀ /μm	Span
药脂比 (w/w)	1 : 15	59.55	0.118	1.023
	1 : 20	73.43	0.117	0.962
	1 : 25	70.74	0.118	1.044
	1 : 30	78.56	0.115	1.103
	1 : 40	73.55	0.115	1.237
	膜材比 (w/w)	7.5 : 1	76.01	0.117
10 : 1		77.17	0.116	1.173
15 : 1		77.81	0.112	1.085
30 : 1		76.12	0.114	1.073
旋蒸温度 /°C	无胆固醇	79.31	0.113	1.000
	30	79.22	0.119	1.018
	40	79.44	0.117	0.994
	50	79.80	0.115	1.172
水化温度 /°C	60	77.31	0.113	1.068
	40	79.81	0.120	1.192
	50	76.23	0.117	1.075
	60	76.64	0.114	1.078
水化时间 /min	15	80.53	0.118	1.084
	30	78.91	0.118	1.083
	45	75.64	0.117	1.323
水化转速 / (r · min ⁻¹)	1204 ~ 1212	81.05	0.113	1.196
	1856 ~ 1863	80.89	0.113	1.192
	2488 ~ 2508	78.34	0.112	1.190

2.4 正交设计优化莪术醇柔性脂质体处方

在单因素考察结果的基础上, 选择药脂比 (A)、膜材比 (B)、旋蒸温度 (C) 3 个影响因素, 每个因素 3 个水平, 以包封率为主要考察指标, 进行三因素三水平的正交实验, 实验设计见表 3。选用 L₉ (3³) 正交表, 分别制得莪术醇柔性脂质体, 测定其包封率, 结果见表 4, 方差分析见表 5。

表 3 正交实验因素水平

Tab 3 Factor and level

水平	因素		
	药脂比 (A)	膜材比 (B)	旋蒸温度 (C)
1	1 : 20	10 : 1	40 °C
2	1 : 30	无胆固醇	50 °C
3	1 : 40	30 : 1	60 °C

重要程度依次为药脂比 (A) > 膜材比 (B) > 旋蒸温度 (C), 最终确定最佳处方为 A₂B₂C₂, 即药脂比为 1 : 30, 不加胆固醇, 旋蒸温度为 50 °C。

表 4 正交实验结果

Tab 4 Orthogonal test

No.	A	B	C	包封率 /%
1	1	1	1	65.14
2	2	1	2	76.32
3	3	1	3	70.28
4	1	2	2	74.86
5	2	2	3	78.88
6	3	2	1	72.56
7	1	3	3	68.97
8	2	3	1	73.63
9	3	3	2	71.41
K ₁	69.66	70.58	70.44	
K ₂	76.28	75.43	74.20	
K ₃	71.42	71.34	72.71	
K _j	6.62	4.85	3.76	

表 5 方差分析

Tab 5 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
A	70.54	2	35.55	0.027
B	40.91	2	20.62	0.046
C	21.43	2	10.80	0.085
误差	1.984	2		

2.5 验证实验

按最优处方制备 3 批莪术醇柔性脂质体, 测定其包封率和粒径, 结果见表 6, 脂质体的平均包封率为 83.92%, 平均粒径为 0.116 μm。

表 6 3 批脂质体的包封率和粒径

Tab 6 Encapsulation rate and particle size of the 3 batches of liposomes

批次	包封率 /%	粒径			
		D ₁₀ /μm	D ₅₀ /μm	D ₉₀ /μm	Span
第一批	83.74	0.059	0.111	0.206	1.322
第二批	83.85	0.067	0.118	0.208	1.196
第三批	84.16	0.067	0.119	0.209	1.195

2.6 透射电子显微镜观察

取稀释后的莪术醇柔性脂质体 10 μL 滴在铜网上, 静置 10 min 后用毛边滤纸吸去多余的水分, 向铜网表面滴加 2% 磷钨酸溶液, 负染 3 min, 烘干后将样品放置在透射电镜下观察并拍摄电镜照片, 可观察到脂质体外观呈圆整球形, 粒径在 100 ~ 200 nm, 如图 2 所示。

2.7 体外释放的测定

精密量取莪术醇柔性脂质体以及莪术醇溶液 2 mL, 加入透析袋中, 两端夹紧后置于含 40% 乙醇 (V/V) 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5, 30 mL) 中, 每个样品平行 3 份, 避光, 37 °C 恒温振荡。分别于 1、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 吸取 2



图 2 莪术醇柔性脂质体的透射电镜图

Fig 2 Transmission electron micrograph of curcumol liposomes

mL 透析液，并补加等体积磷酸盐缓冲液^[17-18]。按“2.1.1”项下色谱条件测定其含量，并计算药物的累积释放百分率，结果如图 3 所示。

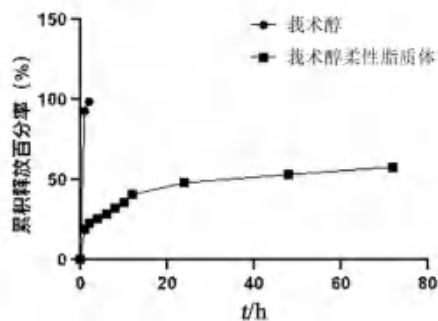


图 3 莪术醇柔性脂质体的体外释放曲线

Fig 3 In vitro release curves of curcumol liposomes

2.8 莪术醇柔性脂质体对细胞增殖的影响

目前，对于细胞增殖监测的方法采用的是传统的终点法，即仅仅给出某个时间点的结果，而在监测的时候需要破坏细胞，这种方法无法获得细胞真正的生长状态，对细胞的生长过程无法做出动态检测和分析。为了更好地观察和统计莪术醇对 A549 细胞的影响，本实验采用了能够非伤害的、长时间实时动态观察活细胞的功能分析系统 (IncuCyte) 来监测细胞增殖情况。

2.8.1 莪术醇对细胞增殖的影响 将复苏的 A549 细胞接种到 F-12 培养基中 (含 10% 胎牛血清)，在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。传代 2~3 次，取处于对数生长期的 A549 细胞制备成单细胞悬液，以 5000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后，每孔再加入 10 μL 质量浓度为 10 ng·mL⁻¹ 的 TGF-β1 进行造模。再将 96 孔板置于 IncuCyte 中，对每孔持续拍照 24 h。观察各组细胞形态，如图 4 所示，对照组 A549 细胞呈鹅卵石样，细胞大小均匀，没有突触、多角，贴壁状态良好。经 TGF-β1 刺激后，A549 细胞呈现梭状，细胞圆形度明显降低，与成纤维细胞相似，说明造模

成功。弃去板中液体，再加入不同质量浓度的莪术醇 (80、53、35、23、15、10、7、4、3 μg·mL⁻¹) 至 96 孔板中，以 0.1% DMSO 作为对照组处理细胞，每组 5 个复孔。将 96 孔板放入 IncuCyte 中，每孔持续拍照 48 h，结果莪术醇呈浓度依赖性抑制细胞增殖 (见图 5)，选取合适浓度的莪术醇进行后续实验。

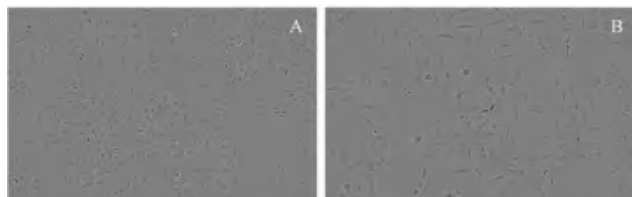


图 4 A549 细胞 (A) 和 TGF-β1 诱导的 A549 细胞 (B)

Fig 4 A549 cells (A) and TGF-β1-induced A549 cells (B)

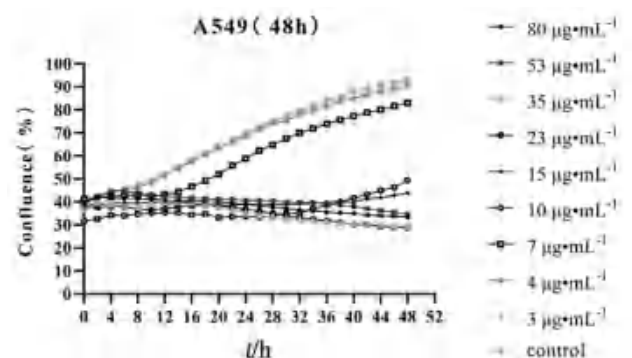


图 5 不同浓度莪术醇对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞活性的影响

Fig 5 Effect of different concentrations of curcumol on the viability of TGF-β1-induced A549 cells

2.8.2 莪术醇柔性脂质体对细胞增殖的影响 将空白脂质体、莪术醇、莪术醇柔性脂质体加至 96 孔板中 (设置空白组、对照组)，每组 5 个复孔，测定药物对细胞动态生长趋势的影响，用 Confluence (%) 表示细胞增殖的汇合度。将板放入 IncuCyte 中，96 孔板每孔持续拍照 48 h，结果如图 6 所示，空白脂质体 48 h 时在实验浓度范围内细胞的存活率大于 90%，表明空白脂质体无明显毒性作用。莪术醇组和莪术醇柔性脂质体组对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞均具有浓度和时间依赖性的抑制作用，且莪术醇柔性脂质体组效果优于莪术醇组。在 48 h 时，莪术醇柔性脂质体的半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 9.11 μg·mL⁻¹，优于游离莪术醇的 12.23 μg·mL⁻¹。

2.9 体内实验

本研究通过包裹吲哚菁绿光敏剂进行动物活体成像，将 12 只健康 KM 小鼠 (提前剃去腹部鼠毛) 随机分为空白对照组、雾化吸入莪术醇溶液组、雾化吸入莪术醇柔性脂质体组、静脉注射莪术醇柔性脂质体组，每组 3 只。雾化吸入药物质

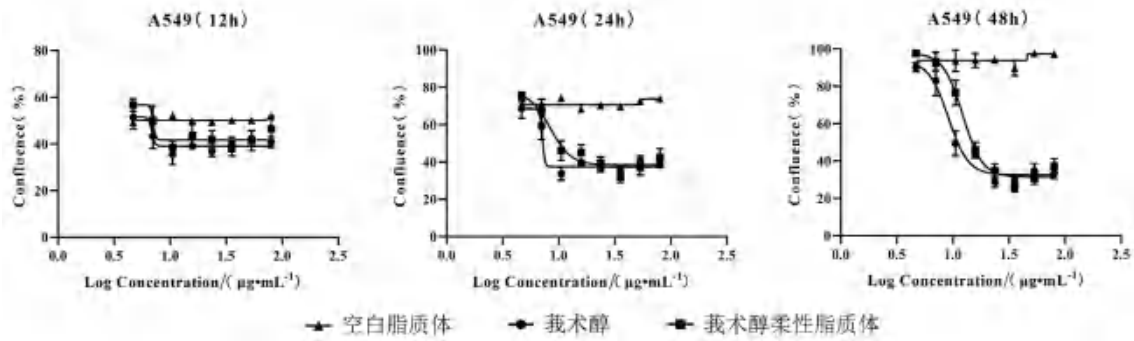


图 6 莪术醇与莪术醇柔性脂质体对 TGF-β1 诱导的 A549 细胞活性的影响
 Fig 6 Effect of curcumin and curcumin liposomes on the viability of TGF-β1-induced A549 cells

量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的莪术醇溶液和莪术醇柔性脂质体 5 min，静脉注射莪术醇柔性脂质体 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次给药)。在给药后 0 min、5 min、30 min、1 h、3 h、6 h、8 h、12 h、24 h 分别测定小鼠体内荧光强弱。结果如图 7 所示，莪术醇柔性脂质体组雾化吸入肺部滞留时间及滞留量优于雾化吸入莪术醇溶液组和静脉注射莪术醇柔性脂质

体组。24 h 后脱颈处死小鼠，取出主要器官（包括心、肝、脾、肺、肾），生理盐水冲洗后置于血管成像仪中观察各组织荧光情况并拍照。结果如图 8 所示，雾化吸入莪术醇柔性脂质体组只分布于肺部，雾化吸入莪术醇溶液在肝部及肺部均有分布，静脉注射莪术醇柔性脂质体主要分布于肝组织。

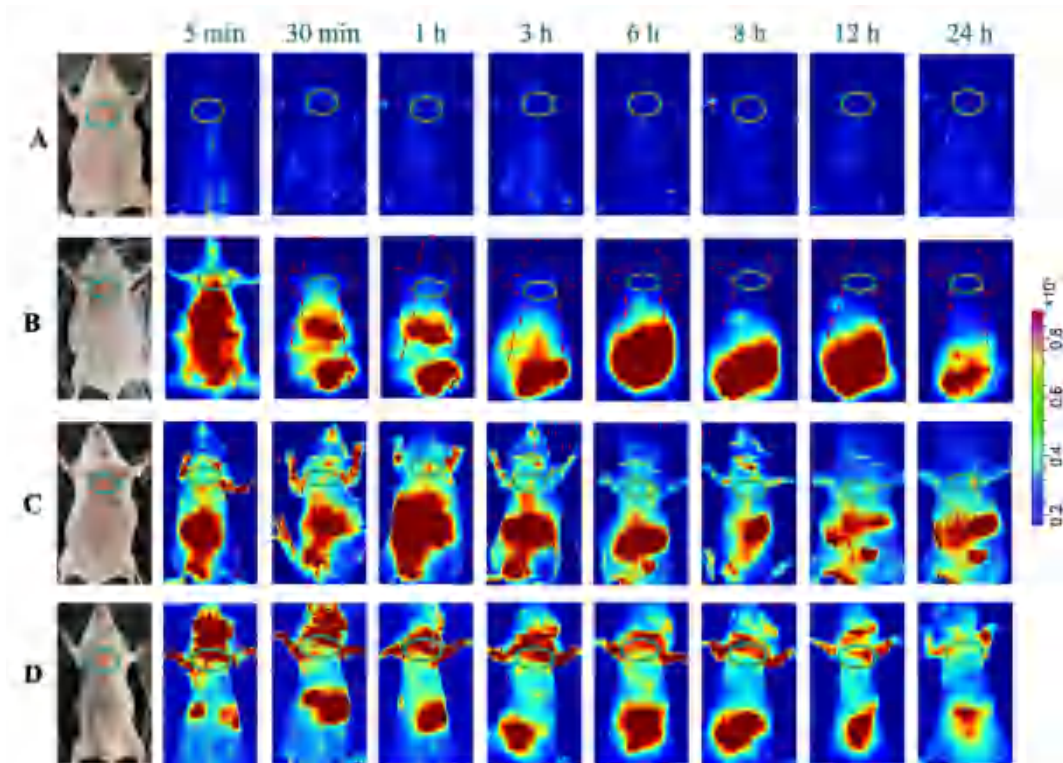


图 7 莪术醇在小鼠体内的分布
 Fig 7 In vivo distribution of curcumin in mice
 A. 空白对照组 (the blank control); B. 静脉注射莪术醇柔性脂质体 (curcumin liposomes for intravenous injection); C. 雾化吸入莪术醇溶液 (curcumin solution for nebulized inhalation); D. 雾化吸入莪术醇柔性脂质体 (curcumin liposomes for nebulized inhalation)

3 讨论

莪术醇为脂溶性药物，难溶于水，属于倍半萜类化合物，且分子中具有共轭双键，因此化学性质比较活泼，使其临床应用具有一定的困难。

本研究通过将莪术醇包封于脂质体中，不仅改善了其脂溶性问题，而且提高了其稳定性。

本研究采用薄膜水化法制备了莪术醇柔性脂质体，薄膜水化法是一种经典的制备方法，可以

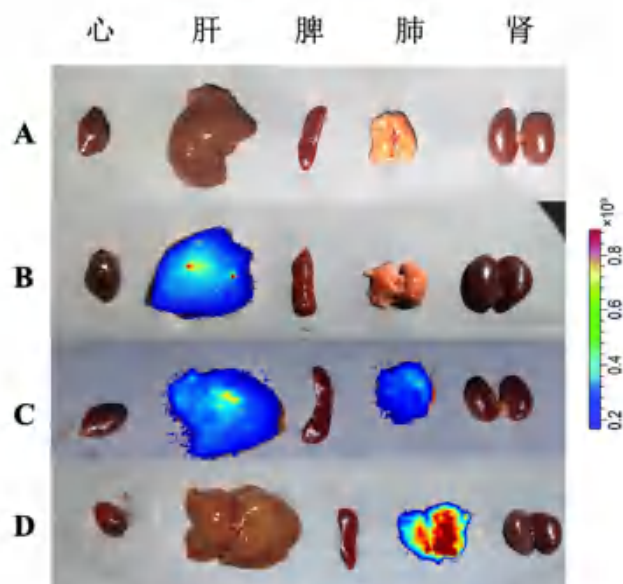


图 8 莪术醇在小鼠组织的分布

Fig 8 Tissue distribution of curcumol in mice

A. 空白对照组 (the blank control); B. 静脉注射莪术醇柔性脂质体 (curcumol liposomes for intravenous injection); C. 雾化吸入莪术醇溶液 (curcumol solution for nebulized inhalation); D. 雾化吸入莪术醇柔性脂质体 (curcumol liposomes for nebulized inhalation)

制备得到多室脂质体, 经过超声处理得到小单室脂质体。该法所制的莪术醇柔性脂质体粒径分布均匀, 方法简单, 工艺可行。通过单因素考察和正交实验确定了莪术醇的最优处方和制备工艺。体外释放实验表明, 莪术醇柔性脂质体相比较游离莪术醇具有更好的缓释作用。细胞增殖实验中, 莪术醇柔性脂质体的抑制作用优于游离的莪术醇, 推测其可能与脂质体提高莪术醇的溶解度和增加莪术醇在细胞内的滞留时间相关。通过雾化吸入的给药方式可以极大地提高莪术醇柔性脂质体的肺部靶向性, 使得药物能够更好地到达疾病部位, 减少在其他器官中的蓄积, 提高药物的有效性。

综上所述, 本研究制备的雾化吸入莪术醇柔性脂质体安全可靠, 经雾化吸入后在肺部缓慢释放, 起到缓释作用, 且在具有肺部靶向功能的同时减少了在其他健康组织的蓄积, 可减轻不良反应, 增加治疗效果。而本实验仅在细胞水平初步验证了莪术醇抗纤维化活性及其在体内的肺部靶向性, 未进行莪术醇柔性脂质体的抗肺纤维化药效学实验, 后续本课题组将继续考察莪术醇柔性脂质体的体内外药效学实验和体内药代动力学等, 为进一步研究莪术醇柔性脂质体抗纤维化活性奠定基础。

参考文献

- [1] 金义光, 李森. 肺部给药系统及其治疗肺部疾病的进展[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42 (3): 289-295, 322.
- [2] 钟章锋, 陈修平, 吴铁, 等. 莪术醇的研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21 (31): 2959-2961.
- [3] 赵铁建, 傅品悦, 刘露露, 等. 中药莪术几种活性成分对肝脏疾病防治作用的机制[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25 (27): 2433-2440.
- [4] 王中会, 闫平慧, 晁旭. 莪术醇抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38 (6): 703-708.
- [5] 李宁. 三七、莪术主成分调控巨噬细胞 NF- κ B、TGF- β 信号通路的实验研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [6] 顾燕兰, 张雅琴, 孙钢. 莪术醇对大鼠肺纤维化模型的干预作用及对 TGF- β 1 和 PAI-1 表达的影响[J]. 中医药导报, 2019, 25 (10): 27-31.
- [7] 张琰, 马娜, 王芳, 等. 莪术醇抑制 JAK1/STAT3 信号通路对肺癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6 (34): 10-15.
- [8] 张国立, 肖志美, 于翔, 等. 治疗急性肺损伤的莪术油和莪术醇粉雾剂的比较研究[J]. 药学报, 2020, 55 (6): 1312-1319.
- [9] Wang J, Song Y, Zhang M, et al. A liposomal curcumol nanocomposite for magnetic resonance imaging and endoplasmic reticulum stress-mediated chemotherapy of human primary ovarian cancer [J]. J Mater Chem B, 2019, 7 (18): 2938-2947.
- [10] 梅佳华, 普娟, 高家菊, 等. 草果油纳米柔性脂质体的制备及体外透皮研究[J]. 中药材, 2021, 44 (6): 1451-1456.
- [11] 张广平, 高云航, 苏萍, 等. 经肺吸入用中药液体制剂的研发及其应用前景展望[J]. 中国现代中药, 2019, 21 (12): 1732-1738.
- [12] 王小琴, 江莹, 胡道德. 星点设计-效应面法优化超声提取莪术中莪术醇与 β -榄香烯的工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36 (11): 895-901.
- [13] 王洪亮, 徐雪晴, 王汝冰, 等. 微柱离心法测定新型口服抗脑瘤前药 CAT3 油酸缀合物固体脂质纳米粒的包封率[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55 (12): 1021-1026.
- [14] 关延彬, 韩冰, 田雨冬, 等. 姜黄素脂质体的制备及质量评价[J]. 中药材, 2019, 42 (2): 385-389.
- [15] 张勇军, 巫辅达, 徐志高, 等. 黄芪多糖脂质体的制备及表征研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55 (7): 72-75, 127.
- [16] 常大伟, 闫瑾, 雷琦, 等. 乙醇注入法制备肉桂醛脂质体的工艺优化[J]. 食品与机械, 2022, 38 (2): 190-196.
- [17] 齐娜, 杨新平, 唐安丽, 等. 丹皮酚温度敏感型凝胶的制备及体外性能探索[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19 (2): 375-380.
- [18] 杜云. 莪术油脂质体的制备及体外释药研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.

(收稿日期: 2023-01-08; 修回日期: 2023-03-07)

基于 Notch/STAT 信号通路研究神香草对哮喘免疫失衡的调节作用

潘雅朦¹, 康雨彤², 蔡晓翠², 张思蓉¹, 贺金华^{2*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830010)

摘要: **目的** 观察神香草提取物 (JAX2) 对哮喘模型小鼠 Notch/STAT 受体配体表达的影响, 探讨 JAX2 对哮喘免疫失衡的作用机制。 **方法** 选取雌性 Balb/c 小鼠 42 只随机分为空白组、模型组、JAX2 (高、中、低剂量) 组、肺宁片组和地塞米松组, 每组 6 只。先后注射和吸入卵白蛋白 (OVA) 液制备小鼠哮喘模型, 给药组从第 15 日开始分别给予相应的药物治疗后雾化刺激, 空白组用生理盐水代替 OVA 进行实验。肺组织切片进行免疫组织化学染色, 观察 Notch/STAT 受体配体蛋白的表达; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中细胞因子水平; 流式细胞术检测外周血 Th17/Treg、Th1/Th2, 并进行相关性分析。 **结果** 与空白组相比, 模型组小鼠 Delta1、Delta4 显著升高, Notch3、STAT3、P-STAT3、STAT6 表达无明显差异; 与模型组相比, JAX2 各剂量组 Delta1 显著升高, Delta4 表达显著下降, 其中 JAX2 中剂量组 Notch3 表达显著下降; STAT3、P-STAT3、STAT6 均无明显变化。模型组 BALF 中白细胞介素 (IL)-4 和 IL-17 水平高于空白组, 干扰素 (IFN)- γ 和 IL-10 表达低于空白组; 与模型组相比, JAX2 组小鼠 BALF 中 IL-4 和 IL-17 表达明显降低, IFN- γ 和 IL-10 表达明显升高。模型组 Th2、Th17 细胞水平及 Th17/Treg 均显著高于空白组, JAX2 组 Th1、Treg 细胞数量及 Th1/Th2 高于模型组, Th2、Th17 细胞数量及 Th17/Treg 低于模型组。相关性分析结果表明, Delta1 与 Th1、Th2、Th17 细胞水平成正相关, Notch3 与 Th2、Th17 细胞水平、Th17/Treg 成负相关, 与 Treg 细胞水平、Th1/Th2 成正相关。 **结论** JAX2 可通过调控 Notch 通路中受体/配体蛋白表达, 改善哮喘小鼠体内 T 细胞免疫失衡。

关键词: 神香草提取物; 支气管哮喘; Notch/STAT 信号通路; T 细胞

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1138-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.004

Effect of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. extract on the immune imbalance induced by asthma based on Notch/STAT signaling pathway

PAN Ya-meng¹, KANG Yu-tong², CAI Xiao-cui², ZHANG Si-rong¹, HE Jin-hua^{2*} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830010)

Abstract: Objective To observe the effect of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. extract (JAX2) on the expression of Notch/STAT receptor or ligand in mice with asthma and to determine the mechanism of JAX2 on immune imbalance induced by asthma. **Methods** Forty-two female Balb/c mice were randomly divided into a blank group, a model group, 3 JAX2 (high, medium and low dose) groups, a Feining tablet group and a dexamethasone group (6 mice in each group). The asthma mice models were established by injection and inhalation of ovalbumin (OVA) solution respectively. The administration groups were nebulized and stimulated after corresponding drug treatment from day 15, and physiological saline was used to replace OVA in the blank group. The lung tissue sections were immunohistochemically stained to observe the expressions of Notch/STAT receptor or ligand. The

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81860727, No.81560644)。

作者简介: 潘雅朦, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学相关研究, email: 1716072724@qq.com * **通信作者:** 贺金华, 女, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药民族药药效物质基础及作用机制研究, email: hejh1216@163.com

secretions of cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by ELISA. The ratios of Th1, Th2, and Th17/Treg cells in the peripheral blood were counted with flow cytometry and the correlation between Notch receptor/ligand and T cell ratios was analyzed. **Results** The expressions of Delta1 and Delta4 significantly increased in the model group as compared with those of the blank group, while expressions of Notch3, STAT3, P-STAT3 and STAT6 showed no significant difference. Delta1 expression in JAX2 group was higher and Delta4 expressions was lower than that in the model group, the expression of Notch3 in the mild-dose group of JAX2 was significantly lower than that in the model group; STAT3, P-STAT3, and STAT6 protein didn't significantly differ. IL-4 and IL-17 expressions in the BALF in the model group were significantly higher than those in the blank group, while IFN- γ and IL-10 levels were lower than those in the blank group. Compared with the model group, IL-4 and IL-17 levels in the BALF were reduced in JAX2 group, while IFN- γ and IL-10 levels were improved. The number of Th2, Th17 cells and Th17/Treg in the model group was significantly higher than that in the blank group. The number of Th1, Treg cells and Th1/Th2 in JAX2 group were higher than those in the model group, and the number of Th2, Th17 cells and Th17/Treg in JAX2 group was lower compared with that of the model group. Delta1 and the number of Th1, Th2 and Th17 cells had a positive correlation, Notch3 was negatively correlated with the number of Th2, Th17 cells and Th17/Treg, and positively correlated with the number of Treg and Th1/Th2. **Conclusion** JAX2 can regulate immune imbalance in asthmatic mice via receptor/ligand expression in Notch signaling pathway.

Key words: *Hyssopus cuspidatus* Boriss. extract; bronchial asthma; Notch/STAT signaling pathway; T cell

支气管哮喘简称为哮喘,严重影响患者生活质量。哮喘是一种以慢性气道炎症为特征,由多种炎性细胞如淋巴细胞、嗜酸性粒细胞以及细胞组分共同参与的气道疾病^[1],其中T淋巴细胞起着非常重要的作用。在哮喘免疫异常发病过程中, Th1、Th2、Th17和Treg细胞比例失衡以及细胞因子效应失调扮演着重要角色, Th1/Th2以及Th17/Treg免疫失衡是哮喘发病的重要免疫学机制^[2]。

在Th1、Th2、Th17和Treg细胞的分化过程中,Notch发挥着重要作用^[3]。Notch信号通路包括4种Notch受体(包括Notch3)和5种Notch配体(包括Delta1和Delta4),它们表达在T细胞和多个成熟免疫细胞的表面,同时参与T细胞的分化。当Notch受体结合配体后,下游产物被激活以抑制分化调节因子的表达,从而影响T细胞的发育过程^[4]。研究证实,Notch信号通路的异常活化与哮喘中Th1/Th2的免疫失衡密切相关,能够调节哮喘Th1/Th2平衡^[5];Treg细胞可以通过Delta4-Notch信号通路来改善气道重塑^[6]。CD4⁺T细胞表达的Notch3与Delta1结合,促使Th0向Th1细胞分化,从而减弱Th2型免疫反应;Treg细胞表达的Notch3与Delta4结合,可减少肺内新生血管生成^[7-8]。STAT信号通路在哮喘发病过程中也发挥重要的调控作用。当肺部感染时,存在Th17/Treg失衡以及STAT3和STAT5信号通路的异常表达^[9]。STAT3和NF- κ B能协同调节多个细胞因子和趋化因子,在慢性炎症中发挥重要作用

用^[10]。STAT6激活后通过JAK-STAT6通路介导哮喘炎症反应和气道高反应性^[11]。有研究表明通过抑制JAK1/STAT6通路能够改善哮喘的气道黏液分泌失衡,从而达到缓解症状的效果^[12]。

本课题组前期研究发现神香草提取物(JAX2)能减轻肺组织支气管周围、血管周围Eos浸润,减少黏液的过度分泌,降低哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中TNF- α 、IL-4及血清中特异性IgE的含量,升高IFN- γ 含量,对哮喘小鼠气道炎症具有显著的抑制作用;JAX2作用于脂多糖(LPS)诱导的RAW264.7细胞后能显著降低一氧化氮(NO)的释放、抑制TNF- α 和IL-6的表达,增加细胞内活性氧(ROS)浓度;并且能够显著抑制乙酰胆碱、组胺导致的气管平滑肌收缩,缓解支气管痉挛。T淋巴细胞亚群、细胞因子效应失调在哮喘免疫异常发病中扮演着重要角色,而介导T细胞间及胞内传递信息的信号转导通路在疾病发生发展过程中作用尤为重要。因此,本研究建立小鼠哮喘模型,观察JAX2对哮喘小鼠肺组织Notch/STAT信号通路蛋白表达的影响,进一步探讨JAX2治疗哮喘免疫失衡的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性健康Balb/c小鼠,共42只,6~8周龄,体质量18~20g。由新疆医科大学动物实验中心提供,常规饲养于新疆药物研究所动物房,温度20~25℃,湿度50%~60%,自由摄食及饮水,

动物许可证号: SYXK(新)2022-0002。

1.2 试药与仪器

神香草经新疆药物研究所何江研究员鉴定为唇形科植物硬尖神香草 *Hyssopus cuspidatus* Boriss. 的干燥地上部分, 提取物由新疆药物研究所制备; 卵清白蛋白(OVA, Sigma); 氢氧化铝胶生理盐水(哈药集团生物有限公司); Delta4 抗体(美国 R&D 公司); STAT3、P-STAT3 抗体(美国 CST 公司); Delta1(ab10554)、Notch3(ab23426)、STAT6 抗体(ab263947)(美国 Abcam 公司); 小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒(美国赛默飞公司); 小鼠 IL-4(abs520003)、IL-17(abs520009)、IFN- γ (abs520007) ELISA 试剂盒(上海爱必信公司); 全自动脱水仪(TP1020)、石蜡包埋机(EG1150H)、手转轴式切片器(RM2235)(德国莱卡); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 JAX2 制备

神香草干燥地上部分用 50% 乙醇加热回流提取, 再经过减压浓缩、干燥, 将干浸膏用水混悬后经聚酰胺树脂分离纯化, 收集 40% 乙醇水洗脱液并浓缩、干燥, 即得 JAX2。JAX2 主要含咖啡酸、咖啡酸甲酯、木犀草素 7-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 6)- β -D 吡喃葡萄糖苷、香叶木苷、迷迭香酸、新西兰牡荆苷、三裂鼠尾草素、金丝桃苷、金合欢素、3, 4-二甲氧基肉桂酸等黄酮类和酚类化合物^[13]。课题组采用高效液相色谱法对提取物中主要活性成分迷迭香酸、总多糖和总黄酮进行了定量研究^[14]。

1.4 哮喘模型的建立

模型组与各给药组小鼠分别于实验第 1、8 日腹腔注射 10% OVA 致敏液 0.2 mL 致敏; 空白组于实验第 1、8 日腹腔注射 0.2 mL 生理盐水代替 OVA 溶液。从第 15 日起, 将小鼠置于雾化箱内, 模型组、给药组小鼠用压缩雾化器吸入 OVA 溶液激发哮喘, 空白组雾化吸入生理盐水, 每日 1 次, 每次 30 min。小鼠出现呼吸和运动失常, 连续刺激后小鼠状态持续变差, 出现呼吸困难, 躁动, 动作迟缓, 食欲不振为造模成功。

1.5 分组及给药

42 只小鼠随机分为空白组, 模型组, JAX2(高、中、低剂量)组, 肺宁片组和地塞米松组, 每组 6 只。给药组小鼠从第 15 日开始分别给予相应药物治疗 1 h 后雾化刺激 30 min, 每日 1 次。

1.6 标本采集

末次激发 24 h 后, 快速摘去小鼠右眼球, 按压腹部, 使血液尽可能完全滴入抗凝管中。小鼠取血后, 暴露并剪开气管, 将 1 mL 注射器针头插入气管内并固定。每次注入 0.5 mL 生理盐水回

吸, 总共灌注 3 次(回抽率为 80%~90%), 将收集到的 BALF 于 4 $^{\circ}$ C、1500 r \cdot min $^{-1}$ 离心 2 次, 每次 10 min, 取上清液置 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。迅速打开胸腔, 暴露肺及心脏, 摘取肺组织, 用 4 $^{\circ}$ C 的生理盐水冲洗干净后, 使其完全浸透在 4% 多聚甲醛中固定后备用。

1.7 小鼠外周血淋巴细胞中 T 细胞数量及比例测定

利用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(PBMC), 细胞计数后, 取适宜浓度细胞悬液待用。① Th1、Th2、Th17 细胞检测: 取细胞悬液加入细胞刺激剂, 置于培养箱中孵育 4 h 后, 洗涤 1 次, 加入 CD4 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后, 加入破膜剂孵育 30 min; 再加入 IFN- γ 、IL-4、IL-17 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后, 用 PBS 洗 1 次, 重悬后上机检测。② Treg 细胞检测: 取细胞悬液加入 CD4、CD25 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min 后, 加入破膜剂孵育 30 min; 接着加入 FOXP3 抗体避光孵育 20 min, 洗涤 2 次, 重悬后上机检测。

1.8 肺组织中受体/配体蛋白的表达

采用免疫组化染色, 将肺组织切片烘片、脱蜡、水化、封闭、抗原修复后滴加对应的一抗, 置于干燥箱内 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h, 再用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加二抗, 于 37 $^{\circ}$ C 下继续孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 SABC, 37 $^{\circ}$ C 下恒温 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入二氨基联苯胺(DAB)显色 5~8 min 后, 用自来水冲洗 2 min 终止显色; 用苏木精染色冲洗后封片。在光学显微镜下观察各组小鼠肺组织切片的染色情况及蛋白在肺组织切片中的分布情况, 记录各组数据。

1.9 BALF 中细胞因子的含量检测

采用 ELISA 法检测 IFN- γ 、IL-4、IL-10 和 IL-17 的水平, 酶标仪测定 OD 值, 根据样品 OD 值算出相应样品的含量。

1.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 数据不符合正态分布时, 采用非参数检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。两个变量服从正态分布, 其相关性用 Pearson 相关分析; 若不符合正态分布, 其相关性采用 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 一般行为学变化

模型组小鼠毛发直立稀疏、枯燥无光泽, 呼吸急促常伴有喘息、抓耳挠腮, 连续雾化后小鼠呼吸频率增加, 精神逐渐变差, 多数出现咳嗽现象, 烦躁不安, 反应迟钝, 食欲减少; 与模型组相比, 治疗组小鼠激发后出现呼吸频率增加, 喘息等现象,

经过治疗, 食欲增加, 呼吸和喘息频率下降, 毛发有光泽, 偶尔咳嗽, 症状减轻; 空白组小鼠毛发油亮, 呼吸正常, 情绪稳定, 食欲良好。

2.2 Th1、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值
模型组 Th2 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞比例显

著高于空白组, Th1 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞比例较空白组无明显变化。JAX2 组和阳性药组 Th1 细胞数量及 Th1/Th2 显著高于模型组, JAX2 组 Th2 细胞数量显著低于模型组 (见图 1 和图 2)。

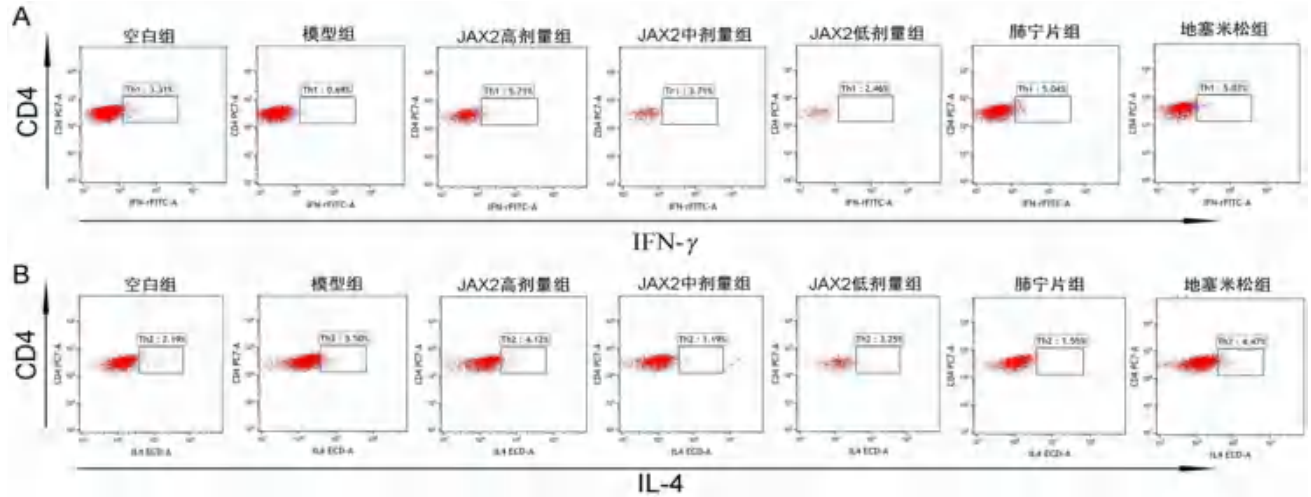


图 1 小鼠 Th1 细胞 (A)、Th2 细胞 (B) 占 CD4⁺T 淋巴细胞百分比 (%)
Fig 1 Percentage of Th1 (A) and Th2 (B) cells in mice CD4⁺T lymphocytes (%)

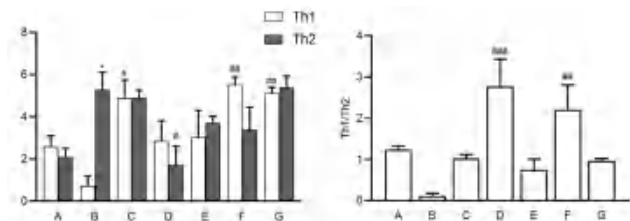


图 2 小鼠 Th1 细胞、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值变化
Fig 2 Changes in the proportion of Th1 and Th2 cells and the ratio of Th1/Th2 in each group of mice

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. JAX2 高剂量组 (JAX2 high-dose group); D. JAX2 中剂量组 (JAX2 medium-dose group); E. JAX2 低剂量组 (JAX2 low-dose group); F. 肺宁片组 (Feining tablet group); G. 地塞米松组 (dexamethasone group)

注 (Note): 与空白组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (Compared with the blank group, *P < 0.05; compared with the model group, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001)。

2.3 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 比值

模型组 Th17 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞比例与 Th17/Treg 均显著高于空白组; 模型组 Treg 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞比例较空白组无明显变化。JAX2 组和阳性药组 Treg 细胞数量高于模型组, JAX2 组 Th17 细胞数量与 Th17/Treg 显著低于模型组, 阳性药组 Th17/Treg 明显低于模型组 (见图 3 和图 4)。

2.4 Notch/STAT 信号通路受体 / 配体蛋白的表达

小鼠肺组织染色后观察各组染色情况。与空白组相比, 模型组小鼠肺组织内 Delta1、Delta4 显著升高, 而 Notch3、STAT3、P-STAT3 及 STAT6 表达

无显著差异; 与模型组相比, JAX2 组小鼠肺组织内 Delta1 表达升高, Delta4 显著降低, 其中 JAX2 中剂量组治疗后, Notch3 表达显著降低, 而 STAT3、P-STAT3、STAT6 表达均无明显变化。上述结果提示, JAX2 对于哮喘小鼠肺组织中 STAT 信号通路活性的调控作用弱于 Notch 通路, 因此将进一步对 Notch 通路进行结果分析。结果见图 5 和 6。

2.5 JAX2 对小鼠 BALF 中 IFN-γ、IL-4、IL-10 和 IL-17 水平的影响

与空白组比较, 模型组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-17 水平显著升高, IFN-γ 和 IL-10 水平显著下降。与模型组比较, JAX2 治疗后小鼠 BALF 中 IL-4 和 IL-17 的表达水平明显降低, 而 IFN-γ 和 IL-10 的表达明显升高。结果见表 1。

2.6 Delta1、Delta4、Notch3 蛋白与 T 细胞比例及各比值的相关性分析

小鼠肺组织内 Delta1 与 Th1、Th2、Th17 细胞水平成正相关, 与 Treg 细胞水平、Th1/Th2、Th17/Treg 不相关; Delta4 与 Th1、Th2、Th17、Treg 细胞水平、Th1/Th2、Th17/Treg 均不相关; Notch3 与 Th2、Th17 细胞水平、Th17/Treg 成负相关, 与 Treg 细胞水平、Th1/Th2 成正相关, 与 Th1 细胞水平不相关。结果见表 2。

3 讨论

哮喘是一种由淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等许多细胞参与的慢性气道炎症性疾病。本课题组前期研究证实 JAX2 可能通过抑制炎症因子产生

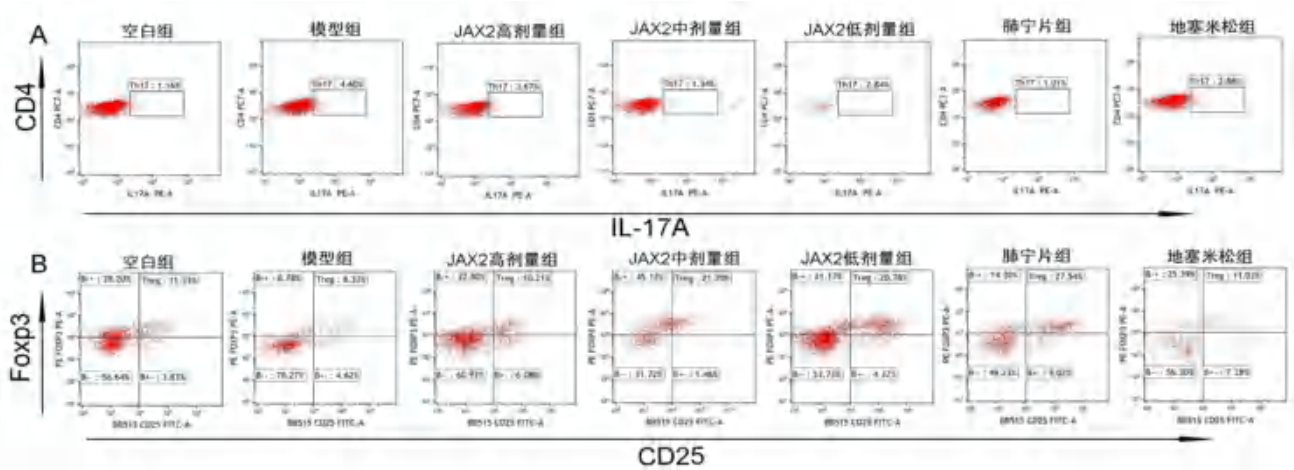


图 3 小鼠 Th17 细胞 (A)、Treg 细胞 (B) 占 CD4⁺T 淋巴细胞百分比 (%)
Fig 3 Percentage of Th17 (A) and Treg (B) cells in mice CD4⁺T lymphocytes (%)

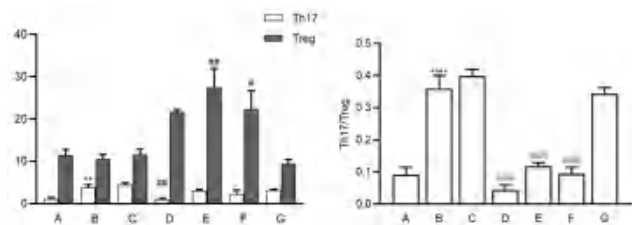


图 4 小鼠 Th17 细胞、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 的比值变化
Fig 4 Changes in the proportion of Th17 and Treg cells and the ratio of Th17/Treg in each group of mice

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. JAX2 高剂量组 (JAX2 high-dose group); D. JAX2 中剂量组 (JAX2 medium-dose group); E. JAX2 低剂量组 (JAX2 low-dose group); F. 肺宁片组 (Feining tablet group); G. 地塞米松组 (dexamethasone group)
注 (Note): 与空白组比较, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; 与模型组比较, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ####*P* < 0.0001 (Compared with the blank group, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; compared with the model group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ####*P* < 0.0001).

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞因子的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 1 Content of cytokines in the BALF of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IL-4/ (pg · mL ⁻¹)	IL-10/ (ng · mL ⁻¹)	IFN-γ/ (pg · mL ⁻¹)	IL-17/ (pg · mL ⁻¹)
空白组	505.0 ± 21.76	1.561 ± 0.06	631.3 ± 21.80	426.0 ± 18.69
模型组	832.2 ± 35.10****	0.4719 ± 0.04**	445.2 ± 29.07****	888.8 ± 41.28****
JAX2 高剂量组	553.4 ± 39.33###	1.239 ± 0.03##	613.0 ± 21.96####	593.9 ± 35.03####
JAX2 中剂量组	669.6 ± 31.70	0.9767 ± 0.04#	588.8 ± 13.29###	633.4 ± 15.65###
JAX2 低剂量组	735.6 ± 18.48	0.6110 ± 0.02	509.9 ± 8.64#	684.0 ± 12.36##
肺宁片组	600.3 ± 9.70##	0.8165 ± 0.02	598.4 ± 10.49###	602.5 ± 16.33###
地塞米松组	648.6 ± 9.38	1.164 ± 0.05##	557.2 ± 17.33###	632.0 ± 11.63####

注: 与空白组比较, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; 与模型组比较, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, ####*P* < 0.0001。

Note: Compared with the blank group, ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001; compared with the model group, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001, ####*P* < 0.0001.

表 2 Delta1、Delta4、Notch3 与 T 细胞比例和比值的相关性分析 (*r*)
Tab 2 Correlation analysis of Delta1, Delta4, Notch3 and T cell proportions (*r*)

组别	Th1	Th2	Th17	Treg	Th1/Th2	Th17/Treg
Delta1	0.3612*	0.3838*	0.4407**	-0.1034	0.04911	0.0419
Delta4	0.1912	0.09502	-0.1023	-0.09627	0.1318	-0.06717
Notch3	-0.1138	-0.3338*	-0.3103*	0.4064**	0.3178*	-0.4051**

注 (Note): **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

和炎性介质的表达, 促进 Th1/Th2 免疫平衡; 能通过抑制小鼠支气管壁增厚和 hASMC 的增殖和迁移, 防止气道重塑^[15]; 还能通过抑制 MAPK/NF-κB 炎症信号来预防哮喘的发生^[16]。因此, 鉴于免疫变态反应与气道炎症在哮喘中的密切关系, 进一步深入研究 T 细胞、相关细胞因子以及信号通路间的相互作用, 分析神香草对哮喘相关指标表达水平的影响, 使得揭示神香草抗哮喘免疫炎症反应机制更具完整性。

近年来研究显示, Notch 信号通路在许多疾病的 T 细胞免疫反应中发挥重要作用, 更与哮喘的免疫失衡关系密切^[17]。研究结果表明, 通过上调 Delta1 蛋白的表达, 抑制 Jagged1、Notch1 和 NICD 蛋白表达可缓解豚鼠的哮喘症状^[18]。Notch 能直接调控 GATA-3 水平, 通过阻断 Notch 通路,

降低 GATA-3 的表达^[19], 抑制 Th2 细胞反应, 从而改善哮喘气道炎症。实验证明 Notch3 在哮喘大鼠气道上皮细胞中呈高表达, 下调 Delta4-Notch 信号后, 能够减轻哮喘气道重塑和气道高反应性^[20]。本研究结果显示, 哮喘小鼠肺组织 Delta1、Delta4 表达水平与空白组相比明显增加, JAX2 组治疗后, Delta1 表达明显升高, Delta4 明显降

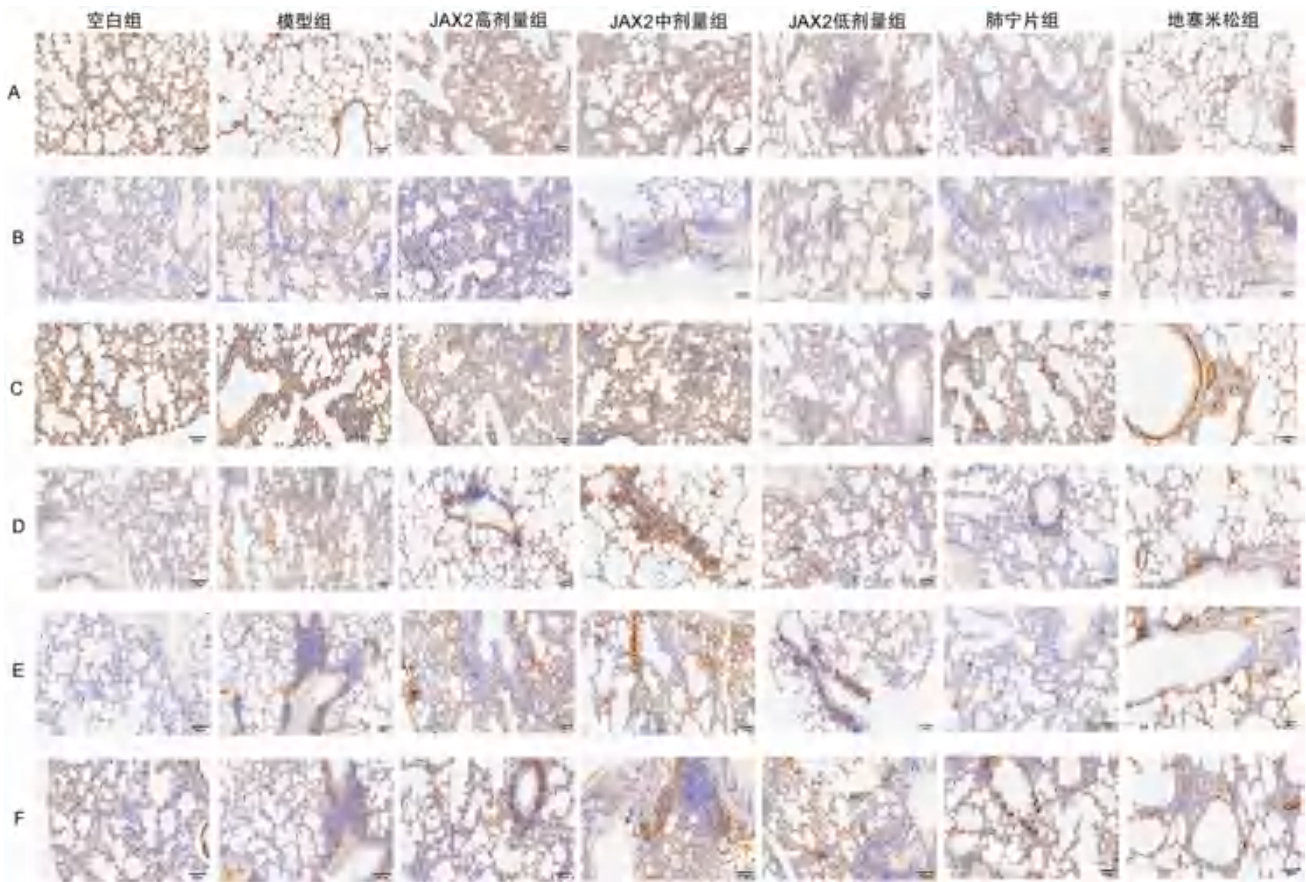


图 5 免疫组化测定各组受体 / 配体蛋白的表达 (×200)

Fig 5 Receptor/ligand protein expression of each group by immunohistochemistry (×200)

A. Delta1 蛋白 (Delta1 protein); B. Delta4 蛋白 (Delta4 protein); C. Notch3 蛋白 (Notch3 protein); D. STAT3 蛋白 (STAT3 protein); E. P-STAT3 蛋白 (P-STAT3 protein); F. STAT6 蛋白 (STAT6 protein)

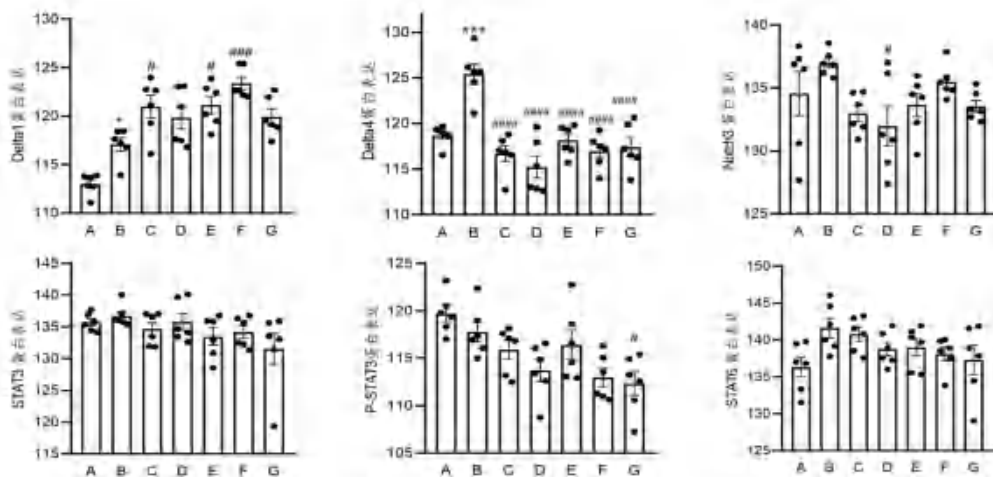


图 6 各组小鼠肺组织受体 / 配体蛋白表达的比较

Fig 6 Receptor/ligand protein expression in the lung tissue of each group

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. JAX2 高剂量组 (JAX2 high-dose group); D. JAX2 中剂量组 (JAX2 medium-dose group); E. JAX2 低剂量组 (JAX2 low-dose group); F. 肺宁片组 (Feining tablet group); G. 地塞米松组 (dexamethasone group)

注 (Note): 与空白组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$ (Compared with the blank group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; compared with the model group, # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$).

低, Notch3 表达下降, 说明三者均参与了哮喘的气道炎症反应, 故推测 Notch 信号可能影响哮喘小鼠的炎症反应过程。同时, Th1/Th2 细胞比值

降低是气道炎症和高反应性形成过程中重要的起始和维持因素^[21], Th17/Treg 免疫失衡也在哮喘的发病过程中发挥了重要作用^[22]。本研究结果显

示 JAX2 能明显提高哮喘小鼠 Th1、Treg 细胞水平, 升高 Th1/Th2 比值, 且提高哮喘小鼠 BALF 中 IFN- γ 和 IL-10 表达水平; Th2、Th17 细胞水平及 Th17/Treg 均低于模型组, 且哮喘小鼠 BALF 中 IL-4 和 IL-17 表达降低。JAX2 干预哮喘小鼠后, Notch3 表达降低与 Th17/Treg 降低、Th1/Th2 增加相关, Delta1 表达与 Th1、Th2、Th17 相关。因此推断 JAX2 对哮喘模型中的免疫失衡具有调节作用, 其机制可能是通过抑制 Notch 通路中部分受体 / 配体蛋白的表达来发挥调节作用。

JAK/STAT 通路是一条能够通过生长因子、细胞因子、干扰素和细胞因子信号转导抑制蛋白调节激活的保守通路, 并且参与炎症过程^[23]。有研究提出, JAK/STAT 通路可能是哮喘潜在治疗方略的一个重点^[24]。本研究结果表明, JAX2 对 STAT3、STAT6、P-STAT3 蛋白的表达并无明显影响, 提示 JAX2 不能通过下调 STAT3、STAT6、P-STAT3 蛋白的表达来改善哮喘免疫炎症反应。

综上所述, JAX2 可通过调节 Notch 配体 / 受体蛋白表达改善哮喘免疫失衡的病理状态, 这可能是其治疗哮喘的作用机制之一。但是, 对调节该通路具体调节的炎症因子及靶点均不明确, 尚需进一步深入研究。

参考文献

- Christianson CA, Alam R. Mechanisms of sustained signalling in asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13 (1): 100-105.
- Yang CH, Tian JJ, Ko WS, et al. Oligo-fucoidan improved unbalance the Th1/Th2 and Treg/Th17 ratios in asthmatic patients: an ex vivo study [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17 (1): 3-10.
- Radtke F, Macdonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (6): 427-437.
- Saito K, Nobuhisa I, Harada K, et al. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intraaortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 365 (1): 145-155.
- Kang JH, Kim BS, Uhm TG, et al. Gamma-secretase inhibitor reduces allergic pulmonary inflammation by modulating Th1 and Th2 responses [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179 (10): 875-882.
- Huang MT, Dai YS, Chou YB, et al. Regulatory T cells negatively regulate neovasculature of airway remodeling via DLL4-Notch signaling [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (7): 4745-4754.
- 崇蕾, 李昌崇, 张维溪. Notch 信号通路及其在支气管哮喘中的作用 [J]. *中华哮喘杂志*, 2011, 5 (3): 44-47.
- 张悦, 马蕾, 宋守君, 等. Notch 信号通路调控 Th17 细胞的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30 (6): 657-660.
- 丁凤鸣, 陈宇清, 廖若敏, 等. SOCS3 过表达对铜绿假单胞菌慢性肺部感染小鼠 Th17 免疫反应的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2017, 33 (5): 389-393, 399.
- Liu Q, Xie W, Wang Y, et al. JAK2/STAT1-mediated HMGB1 translocation increases inflammation and cell death in a ventilator-induced lung injury model [J]. *Lab Invest*, 2019, 99 (12): 1810-1821.
- 褚保凤, 底建辉, 方强, 等. 血清中 STAT-6、Galectin-9、TSLP、miR-31 表达及炎症因子的变化在哮喘儿童中的诊断分析 [J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26 (1): 25-29, 35.
- 王志旺, 姚楠, 丁茂鹏, 等. 当归对阴虚哮喘小鼠气道杯状细胞及 JAK1/STAT6 信号通路的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (24): 3009-3013.
- 毛艳, 贺金华, 铁德, 等. 维药神香草聚酰胺树脂柱 40% 乙醇洗脱物的成分分析及其对哮喘小鼠炎症的改善作用 [J]. *中国药房*, 2017, 28 (25): 3532-3535.
- 戎晓娟, 康雨彤, 袁凤娟, 等. 神香草抗哮喘有效部位定性定量研究 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38 (8): 1437-1411.
- Cai X C, Mao Y, Shen X L, et al. The extract from *Hyssopus cuspidatus* Boriss. Prevents bronchial airway remodeling by inhibiting mouse bronchial wall thickening and hASMC proliferation and migration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 303: 116047.
- Yuan F, Liu R, Hu M, et al. JAX2, an ethanol extract of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. can prevent bronchial asthma by inhibiting MAPK/NF- κ B inflammatory signaling [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 305-314.
- Hu C, Li Z, Feng J, et al. Glucocorticoids Modulate Th1 and Th2 responses in asthmatic mouse models by inhibition of Notch1 signaling [J]. *Int Arch Allergy Imm*, 2018, 175 (1-2): 44-52.
- 徐方蔚, 路晨, 李盼盼, 等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘豚鼠 Notch 受体 / 配体蛋白的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31 (10): 2309-2312.
- Liu L, Wu F, Zhang X, et al. gamma-secretase inhibitor MW167 reduces the level of GATA3 in peripheral blood mononuclear cells in children with respiratory syncytial virus bronchiolitis [J]. *Article in Chinese*, 2017, 33 (8): 1035-1039.
- Strati TM, Kotoula V, Kostopoulos I, et al. Prognostic subcellular Notch2, Notch3 and Jagged1 localization patterns in early triple-negative breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37 (5): 2323-2334.
- 黄敬青, 李向楠, 刘秋亮, 等. 咳嗽变异性哮喘患者 Th1/Th2 相关上游转录因子及细胞因子的表达 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2009, 44 (4): 824.
- Xi X, Liu JM, Guo JY. Correlation of PD-1/PD-L1 signaling pathway with Treg/Th17 imbalance from asthmatic children [J]. *Int Arch Allergy Imm*, 2018, 176 (3-4): 255-267.
- Banerjee S, Biehl A, Gadina M, et al. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects [J]. *Drugs*, 2017, 77 (5): 521-546.
- Athari SS. Targeting cell signaling in allergic asthma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 45-53.

(收稿日期: 2022-12-21; 修回日期: 2023-01-10)

假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 次级代谢产物研究

陈浒良^{1,2}, 韩立峰¹, 王罗医^{2*} (1.天津中医药大学中医药研究院 组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2.中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101)

摘要: 目的 研究假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 的次级代谢产物。方法 采用 MCI 柱色谱及半制备高效液相色谱法对发酵产物进行分离纯化, 通过 HR-ESI-MS、NMR 等多种波谱学技术鉴定化合物的化学结构。结果 从假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 的液体发酵物乙酸乙酯萃取部位分离得到了 3 个化合物, 分别鉴定为 promysalin (1)、promynicotin (2)、dihydrodeoxypromynicotin (3)。结论 化合物 2 和 3 为新化合物。

关键词: 假单胞菌; 次级代谢产物; *Pseudomonas promysalinigenes*; promysalin

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1145-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.005

Secondary metabolites from *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1

CHEN Hu-liang^{1,2}, HAN Li-feng¹, WANG Luo-yi^{2*} (1. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites of *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1. **Methods** MCI column chromatography and semi-preparative HPLC were used for the isolation and purification of fermented products. The structures of isolated compounds were elucidated by HR-ESI-MS, NMR and other related spectroscopic analyses. **Results** Three compounds were identified as promysalin (1), promynicotin (2) and dihydrodeoxypromynicotin (3). **Conclusion** Promynicotin (2) and dihydrodeoxypromynicotin (3) have been identified for the first time.

Key words: *Pseudomonas*; secondary metabolite; *Pseudomonas promysalinigenes*; promysalin

假单胞菌 (*Pseudomonas*) 是一类广泛存在于土壤、水、动植物及人体中的革兰氏阴性细菌^[1], 可产生多种的次级代谢产物^[2], 如莫匹罗星 (mupirocin)^[3-4]、硝吡咯菌素 (pyrrolnitrin)^[5]、藤黄绿菌素 (pyoluteorin)^[6]、safracins^[7] 等, 在医药研发、生物防治和工业微生物开发等领域具有重要应用价值。

Pseudomonas promysalinigenes (原名 *Pseudomonas putida*) RW10S1 于 1990 年分离自斯里兰卡的水稻根际^[8], 2011 年 Li 等^[9] 报道了该假单胞菌中次级代谢产物 promysalin 的化学结构 (见图 1)、抗菌活性及其生物合成途径。该化合物由

脯氨酸 (proline)、十四酸 (myristic acid) 及水杨酸 (salicylic acid) 3 个结构单元组成, 其名称 promysalin 即由此而来。Promysalin 可选择性抑制多重耐药的铜绿假单胞菌生长, 是具有重要开发价值的抗菌先导化合物^[10-15]。然而, 该化合物在酸性条件下不稳定, 可发生分子内重排得到化合物 1a (见图 1) 而丧失活性^[15], 限制了其进一步开发和应用。

微生物培养基作为微生物次级代谢产物产生的重要一环, 其成分含量的不同, 对发酵产物的结果具有重要影响, 有研究通过探究菌种培养基与培养条件, 成功提升了次级代谢产物

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2021YFC2100501)。

作者简介: 陈浒良, 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学研究, email: chenhuiliang@foxmail.com * 通信作者: 王罗医, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事微生物天然产物生物合成与生物催化研究, email: wangluoyi@im.ac.cn

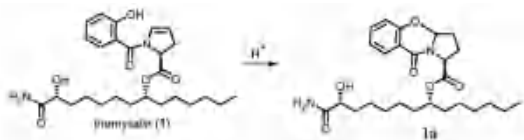
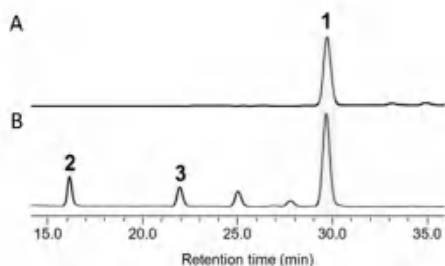


图 1 Promysalin 的化学结构及其重排产物

Fig 1 Structures of promysalin and its rearrangement products

的产量与丰富度^[16-18]。为进一步挖掘假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 来源的天然产物, 本研究对该菌株发酵条件进行改变和优化, 从其 LB 培养基发酵液的乙酸乙酯萃取部位分离鉴定了 3 个化合物(见图 2), 其中 2 个为新的 promysalin 结构类似物(见图 3), 由烟酸(nicotinic acid)取代了 promysalin 中的水杨酸部分, 稳定性优于 promysalin。本文不仅探究了不同培养条件对假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 发酵产物的影响, 也对该菌株次级代谢产物的化学成分进行了研究。

图 2 假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 在不同发酵条件下的 HPLC 图Fig 2 HPLC chromatogram of *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 under different fermentation conditions

A. TSA 固体培养基 (30 °C) [TSA agar (30 °C)]; B. LB 液体培养基 (22 °C) [LB liquid medium (22 °C)]; 1. promysalin; 2. promynicotin; 3. dihydrodeoxypromynicotin

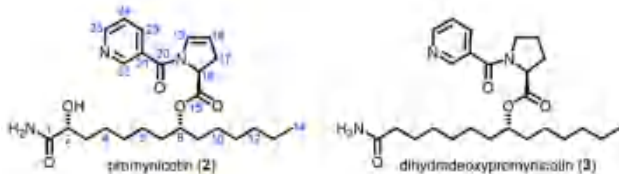


图 3 化合物 2 和 3 的化学结构

Fig 3 Structures of compounds 2 and 3

1 材料

Bruker Avance III-600 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Q-Exactive Orbitrap MS 高分辨质谱、Nicolet IS5 红外光谱仪(美国 Thermo 公司); Chirscan 圆二色光谱仪(英国应用光物理公司); Anton Paar MCP 200 高精度智能旋光仪(奥地利 Anton Paar 公司); LC-20A 分析型高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司); Waters 2695 半制备型

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 绿百草色谱柱 GH0525046C18AQ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 绿百草色谱柱 GH0525010C18AQ (250 mm×10 mm, 5 μm); SBC MCI GEL 反相色谱填料 F 型 50 ~ 70 μm (成都科谱生物有限公司); MQD-S3R 振荡器(上海旻泉仪器有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); AIRTECH 超净台(苏州安泰空气技术有限公司); 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); 色谱级乙腈(美国 Thermo 公司); 分析级甲醇、乙酸乙酯(天津康科德公司); LB 培养基、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、琼脂粉(北京奥博星生物技术公司); 葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司)。

实验菌株假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 由比利时鲁汶大学 René De Mot 教授提供, 现保存于中国科学院微生物研究所。

2 菌株的发酵、萃取及其代谢产物的分离

将生长在 LB 琼脂培养基上的假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 单克隆接种到 LB 培养基中, 30 °C、200 r·min⁻¹ 在摇床中培养 1 d 作为种子液备用。然后以体积分数 5% 的接种量接入含 4% 葡萄糖的 LB 发酵培养基中(5 个 2000 mL 三角瓶分别装有 500 mL 培养基), 22 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养 2 d。

发酵液用等量乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩干燥, 得到浸膏 1.1 g。浸膏经 SBC MCI GEL 柱色谱用甲醇-水(56:44、92:8、100:0)梯度洗脱得到 3 个组分(Fr.1 ~ Fr.3), 采用 HPLC 法检测分析, 组分 Fr.2 含主要目标成分, 经半制备高效液相色谱分离, 乙腈-水梯度洗脱(体积比 45:55 → 50:50, 40 min 程序)分别得到化合物 1 ($t_R = 29.5$ min, 2.6 mg)、化合物 2 ($t_R = 16.0$ min, 2.6 mg)、化合物 3 ($t_R = 22.0$ min, 2.4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 无色黏稠固体, 易溶于甲醇。 $[\alpha]_D^{25} - 15.55$ (c 0.09, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 282.4 (0.038) nm; IR (KBr) ν_{max} 3342, 2929, 2857, 1738, 1669, 1614, 1197, 757 cm⁻¹; CD (c 0.18, MeOH) λ ($\Delta\epsilon$): 208.0 (-20.42)。HR-ESI-MS 准分子离子峰 m/z 475.2792 [$M + H$]⁺ (C₂₆H₃₉N₂O₆, 计算值为 475.2802), 结合 NMR 数据, 推测分子式为 C₂₆H₃₈N₂O₆。¹H-NMR (600 MHz, chloroform-*d*) δ_H 9.53 (1H, s, -OH) 为低场区羟基信号; δ_H 7.41 ~ 7.34 (2H, m, H-26, 24)、6.99 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-23)、6.91 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-25) 为芳香氢质子信号; δ_H 6.64 (1H, s, -NH)、5.46 (1H, s, -NH) 为一组氨基氢信号;

6.72 (1H, br s, H-19)、5.29 (1H, dd, $J=4.5$, 2.4 Hz, H-18) 为一组烯炔氢信号; δ_{H} 5.02 (1H, m, H-16) 为脯氨酸酮基的 α 氢信号; δ_{H} 5.00 (1H, m, H-8) 为一个与脯氨酸末端氧相连的次甲基氢信号; δ_{H} 4.10 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-2) 为一个与乙酰氨基相连的亚甲基氢信号; δ_{H} 3.15 (1H, m, H-17)、2.70 (1H, d, $J=17.1$ Hz, H-17')、1.80 (1H, m, H-3)、1.65 (1H, m, H-3')、1.59 (4H, m, H-7, 9)、1.44 (4H, m, H-4, 6, 10)、1.28 (10H, m, H-5, 6', 10', 11, 12, 13) 为一组亚甲基氢信号; δ_{H} 0.87 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-14) 为甲基氢信号; $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, chloroform- d) δ_{C} : 177.2 (C-1)、171.3 (C-15)、166.5 (C-20)、157.6 (C-22)、133.4 (C-24)、130.9 (C-19)、119.4 (C-25)、118.8 (C-23)、118.0 (C-21)、111.0 (C-18)、76.0 (C-8)、71.4 (C-2)、59.3 (C-16)、34.5 (C-9)、34.3 (C-7)、33.4 (C-17)、34.1 (C-3)、31.8 (C-12)、29.9 (C-11)、28.4 (C-5)、25.5 (C-10)、24.9 (C-6)、24.6 (C-4)、22.7 (C-13)、14.2 (C-14)。以上数据与文献报道的 promysalin 的数据基本一致^[9-10]。

化合物 2: 无色黏稠固体, 易溶于甲醇。[α] -21.21 (c 0.06, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 254.2 (0.021) nm; IR (KBr) ν_{max} 3342, 2929, 2857, 1738, 1667, 1619, 1468, 1433, 1408, 1197 cm^{-1} ; CD (c 0.13, MeOH) λ ($\Delta\epsilon$): 208.0 (-11.50), 228.0 (-5.02)。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 460.2798 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$, 计算值为 460.2806), 结合 $^1\text{H-NMR}$ 与 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (见表 1), 可推定其分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$ 。比较化合物 2 与 promysalin (1) 的核磁数据可知, 化合物 2 中含有与化合物 1 中同样的脯氨酸及 2-羟基十四酰胺结构单元, 两者的主要差别在于芳香区域的信号, 表现为化合物 2 中芳香区域信号进一步向低场位移 δ_{H} 8.79 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-22)、8.72 (1H, dd, $J=5.0$, 1.6 Hz, H-23)、7.89 (1H, dt, $J=7.9$, 2.0 Hz, H-25)、7.40 (1H, m, H-24); 在化合物 2 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中, 碳原子的信号也由 26 个变为 25 个, 除芳香区碳信号发生变化外, 其他碳信号与化合物 1 基本一致。结合化合物的分子式可知, 该结构单元含有一个额外氮原子, 通过进一步对化合物 2 的 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ 、HSQC 和 HMBC 谱相关信号进行分析 (见图 4), 可确定该结构单元为烟酸; 同时, 该烟酸基团与文献中化合物 pyridin-3-yl (pyrrolidin-1-yl) methanone 的烟酸基团核磁数据基本一致^[19]。Promysalin 的手性区域存在于 C-2、C-8、C-16 位置, 其构型已有化学

全合成研究进行确认^[10], 在化合物 2 中 δ_{H} 5.02 (1H, dd, $J=11.6$, 5.6 Hz, H-16)、5.02 (1H, m, H-8)、4.10 (1H, m, H-2); δ_{C} 58.7 (C-16)、75.6 (C-8)、70.9 (C-2) 手性碳区域核磁数据与 promysalin 的数据基本一致。圆二色谱 (CD) 测定结果 (见图 5) 显示, promysalin 与 promynicotin 在 210 nm 波长处均表现为负的 Cotton 效应, 且峰形接近。通过对化合物 1 和化合物 2 的比旋光度、波谱和 CD 数据结果分析, 推测化合物 2 手性中心的构型与 promysalin 一致, 即 C-16 为 *S* 构型, C-2、C-8 为 *R* 构型。同时, 生物合成的代谢产物立体选择性较高, 产物的构型会相对保持一致, 也能为化合物 2 的构型维持提供一定参考。综合以上分析, 最终确定化合物 2 的结构, 并命名为 promynicotin。

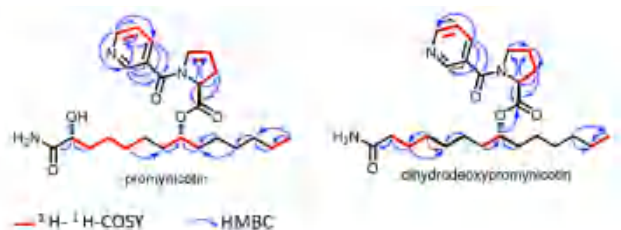


图 4 化合物 2 和 3 关键二维相关信号 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (红色线条) 和 HMBC (蓝色箭头)

Fig 4 Key $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (red lines) and HMBC (blue arrows) correlations of compounds 2 and 3

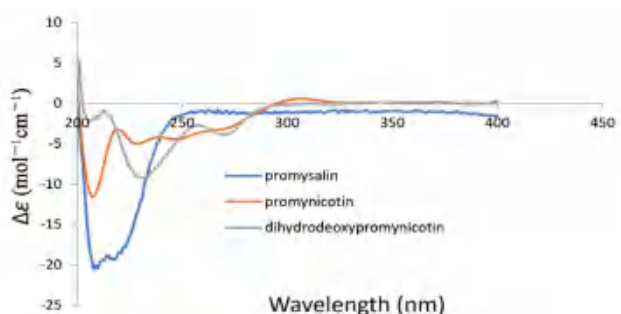


图 5 化合物 1 ~ 3 在甲醇中的 CD 谱

Fig 5 CD spectra of compounds 1 ~ 3 in methanol

化合物 3: 无色黏稠固体, 易溶于甲醇。[α] -33.99 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 259.0 (0.021) nm; IR (KBr) ν_{max} 3342, 2929, 2857, 1737, 1668, 1632, 1434, 1407, 1190 cm^{-1} ; CD (c 0.13, MeOH) λ ($\Delta\epsilon$): 205.0 (-2.06), 232.0 (-9.25), 270.0 (-3.89)。HR-ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 446.3004 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ ($\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4$, 计算值为 446.3013), 结合 $^1\text{H-NMR}$ 与 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (见表 1), 可推定其分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_4$ 。化合物 3 与化合物 2 相比, 少了一个羟基信号, 化学位移向高场移动 δ_{H} 2.20 (2H, t, $J=7.7$ Hz, H-2), 另外 18 位和 19 位

双键信号消失, 在高场区显示信号为 δ_{H} 2.04 (1H, m, H-18), 1.93 (1H, m, H-18'), 3.67 (1H, q, $J = 8.3, 7.4$ Hz, H-19), 3.54 (1H, q, $J = 9.5, 7.7$ Hz, H-19'), δ_{C} 50.1 (C-19) 和 25.2 (C-18) 特征烯碳信号也相应消失, 其他位置信号与化合物 2 基本一致。化合物 3 的手性区域为 C-8、C-16 位置, 该手性碳区域核磁数据与化合物 2 的数据基本一致, 由于 C-2 位置少了羟基的一个手性中心, 与化合物 2 相比, CD 谱呈现的吸收峰发生红移, 但总体峰形基本一致 (见图 5), 因此, 其构型同化合物 2, 即 C-8 为 *R* 构型, C-16 为 *S* 构型。通过对化合物 3 的比旋光度、波谱和 CD 数据分析, 最终确定了结构, 并命名为 dihydrodeoxypromynicotin。

表 1 化合物 2 和 3 的 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) 数据 (in CDCl_3)

Tab 1 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) data of compounds 2 and 3 in CDCl_3

No.	promynicotin (2)		dihydrodeoxypromynicotin (3)	
	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)
1	177.4	—	176.2	—
2	70.9	4.10 m	36.0	2.20 t (7.7)
3	33.9	1.82 m, 1.67 m	24.8	1.64 m
4	24.4	1.44 m	24.8	1.35 m
5	27.6	1.26 m	28.7	1.29 m
6	24.7	1.44 m, 1.26 m	25.5	1.29 m
7	34.0	1.61 m	34.3	1.57 m
8	75.6	5.02 m	75.4	4.97 dq (7.8, 4.0, 3.1)
9	34.7	1.61 m	34.5	1.57 m
10	25.6	1.44 m, 1.26 m	25.5	1.41 m, 1.29 m
11	29.2	1.26 m	29.6	1.29 m
12	31.8	1.26 m	31.9	1.29 m
13	22.7	1.26 m	22.7	1.29 m
14	14.2	0.87 t (6.9)	14.2	0.86 t (7.0)
15	170.4	—	171.9	—
16	58.7	5.02 dd (11.6, 5.6)	59.6	4.65 dd (8.4, 5.1)
17	33.9	3.16 ddt (14.0, 11.6, 2.5) 2.73 ddd (17.2, 5.0, 2.6)	29.3	2.36 m, 2.04 m
18	111.3	5.02 m	25.2	2.04 m, 1.93 m
19	130.0	6.47 dt (4.5, 2.2)	50.1	3.67 q (8.3, 7.4) 3.54 q (9.5, 7.7)
20	165.1	—	167.3	—
21	130.8	—	132.3	—
22	148.5	8.79 d (1.7)	148.0	8.81 s
23	151.9	8.72 dd (5.0, 1.6)	151.2	8.67 d (17.1)
24	123.8	7.40 m	123.6	7.39 m
25	135.7	7.89 dt (7.9, 2.0)	135.4	7.89 d (7.7)
NH ₂	—	6.76 s, 5.38 s	—	6.12 s, 5.27 s

4 讨论

前期研究仅对假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 在 TSA 或 TSB 培养基中进行了发酵和代谢产物研究, 在此条件下只获得了化合物 promysalin^[9]。本研究通过对其发酵培养基的改变和优化, 在 LB 培养基中加入 4% 葡萄糖, 22 °C、200 r · min⁻¹ 振荡培养, 提升了假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 代谢产物的丰富度, 并从中分离鉴定了 2 个新的、结构更加稳定的 promysalin 类似物 (化合物 2 和 3), 其获得可能与 LB 培养基中酵母提取物含有的烟酸成分有关^[20], 该成分的加入为菌株发酵提供不同底物, 进而丰富了该菌株次级代谢产物的类型。另外, 由于培养温度的降低, 菌种的生长速度和酶的催化效率也相应下降, 通过检测能发现中间代谢产物, 化合物 3 即为中间代谢产物。总之, 本研究丰富了假单胞菌属次级代谢产物的化学成分多样性, 也为假单胞菌 *Pseudomonas promysalinigenes* RW10S1 次级代谢产物的开发利用提供更多研究基础。后期将通过前体喂养、组合生物合成等方法获得更多的 promysalin 结构类似物, 并对这些衍生物进行生物活性测试。

参考文献

- [1] Girard L, Lood C, Höfte M, et al. The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group [J]. *Microorganisms*, 2021, 9 (8): 1766.
- [2] Masschelein J, Jenner M, Challis GL. Antibiotics from gram-negative bacteria: a comprehensive overview and selected biosynthetic highlights [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34 (7): 712-783.
- [3] Thomas CM, Hothersall J, Willis CL, et al. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8 (4): 281-289.
- [4] Gurney R, Thomas CM. Mupirocin: biosynthesis, special features and applications of an antibiotic from a gram-negative bacterium [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90 (1): 11-21.
- [5] Chang CJ, Floss HG, Hook DJ, et al. The biosynthesis of the antibiotic pyrrolnitrin by *Pseudomonas aureofaciens* [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1981, 34 (5): 555-566.
- [6] Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS, et al. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181 (7): 2166-2174.
- [7] Ikeda Y, Idemoto H, Hirayama F, et al. Safracins, new anti-tumor antibiotics. I. producing organism, fermentation and isolation [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1983, 36 (10): 1279-1283.
- [8] Vlassak K, Holm L, Duchateau L, et al. Isolation and

- characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka [J]. Plant Soil, 1992, 145 (1): 51-63.
- [9] Li W, Estrada-de los Santos P, Matthijs S, et al. Promysalin, a salicylate-containing *Pseudomonas putida* antibiotic, promotes surface colonization and selectively targets other *Pseudomonas* [J]. Chem Biol, 2011, 18 (10): 1320-1330.
- [10] Steele AD, Knouse KW, Keohane CE, et al. Total synthesis and biological investigation of (–)-promysalin [J]. J Am Chem Soc, 2015, 137 (23): 7314-7317.
- [11] Knouse KW, Wuest WM. The enantioselective synthesis and biological evaluation of chimeric promysalin analogs facilitated by diverted total synthesis [J]. J Antibiot (Tokyo), 2016, 69 (4): 337-339.
- [12] Giglio KM, Keohane CE, Stodghill PV, et al. Transcriptomic profiling suggests that promysalin alters the metabolic flux, motility, and iron regulation in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. ACS Infect Dis, 2018, 4 (8): 1179-1187.
- [13] Keohane CE, Steele AD, Fetzer C, et al. Promysalin elicits species-selective inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by targeting succinate dehydrogenase [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140 (5): 1774-1782.
- [14] Post SJ, Keohane CE, Rossiter LM, et al. Target-based design of promysalin analogues identifies a new putative binding cleft in succinate dehydrogenase [J]. ACS Infect Dis, 2020, 6 (6): 1372-1377.
- [15] Kaduskar RD, Scala GD, Al Jabri ZJH, et al. Promysalin is a salicylate-containing antimicrobial with a cell-membrane-disrupting mechanism of action on gram-positive bacteria [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 8861.
- [16] Davis ND, Diener UL, Eldridge DW. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium [J]. Appl Microbiol, 1966, 14 (3): 378-380.
- [17] Nielsen ML, Nielsen JB, Rank C, et al. A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 321 (2): 157-166.
- [18] Bode HB, Bethe B, Höfs R, et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity [J]. Chembiochem, 2002, 3 (7): 619-627.
- [19] Hassan TA, Krupička M, Chudoba J, et al. Amide bond formation via aerobic photooxidative coupling of aldehydes with amines catalyzed by a riboflavin derivative [J]. Org Lett, 2021, 23 (17): 6825-6830.
- [20] Pflügl S, Marx H, Mattanovich D, et al. 1, 3-propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans* [J]. Bioresour Technol, 2012, 119: 133-140.
- (收稿日期: 2022-12-30; 修回日期: 2023-03-13)

建昌帮炆法对远志 4 种成分在大鼠体内药代动力学和组织分布的影响研究

熊晓莉, 陆美霞, 施林峰, 钟凌云, 叶喜德* (江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 目的 研究建昌帮炆法对远志中 4 种寡糖酯类成分在大鼠体内药代动力学和组织分布作用的影响。方法 以炆远志为研究对象, 生远志为对照, 运用 UPLC-MS/MS 法测定远志炮制前后大鼠血浆和组织中西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的浓度。选取灌胃给药后 13 个时间点的血浆样品和 4 个时间点的组织样品, 测定大鼠血浆和组织中 4 种寡糖酯类成分的浓度, 并运用 DAS 3.2.1 软件计算药代动力学参数, SPSS 21.0 分析主要参数的差异, 比较两组血药浓度和组织浓度的差异。结果 与生远志组相比, 炆远志组西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim 12}$ 均明显增加 ($P < 0.05$), 细叶远志苷 A 的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim 12}$ 虽差异无统计学意义, 但具有增加趋势, 并在 6 个组织中浓度整体均增加。结论 远志经炆制后, 有利于 4 种寡糖酯类成分的吸收和分布, 可提高其生物利用率。

关键词: 生远志; 炆远志; 炮制; 药代动力学; 组织分布

中图分类号: R284.1, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1149-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.006

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (No.2018YFC1707205); 江西省中医药中青年骨干人才 (第一批) 培养计划 [赣中医药科教字 [2020] 2 号]; 中药炮制技术传承创新团队 (No.CXTD22003)。

作者简介: 熊晓莉, 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制研究, email: 1149585138@qq.com *通信作者: 叶喜德, 男, 博士, 教授, 主要从事中药炮制研究, email: 552376722@qq.com

Effect of Jianchang stewing method on the pharmacokinetics and tissue distribution of 4 components in *Polygala tenuifolia* in rats

XIONG Xiao-li, LU Mei-xia, SHI Lin-feng, ZHONG Ling-yun, YE Xi-de* (School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To determine the effect of Jianchang stewing method on the pharmacokinetics and tissue distribution of 4 oligosaccharide esters in *Polygala tenuifolia* in rats. **Methods** Licorice-simmered *Polygala tenuifolia* was used as the study object, *Polygala tenuifolia* as the control, the concentrations of sibiricose A5, sibiricose A6, tenuifoliside A and 3, 6'-disinapoyl sucrose in the plasma and tissue before and after the processing were determined by UPLC-MS/MS. The plasma samples at 13 time points and tissue samples at 4 time points after the intragastric administration were selected to determine the concentrations of 4 oligosaccharide esters in the rat plasma and tissue. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.2.1 software. SPSS 21.0 was used to analyze the differences in the main parameters to compare the blood concentration and tissue concentration of both groups. **Results** Compared with the *Polygala tenuifolia* group, C_{max} and $AUC_{0\sim 12}$ of sibiricose A5, sibiricose A6, and 3, 6'-disinapoyl sucrose were significantly increased in Licorice-simmered *Polygala tenuifolia* group ($P < 0.05$). There was no significant difference in C_{max} and $AUC_{0\sim 12}$ of tenuifoliside A, and the concentrations of the 4 components increased in 6 tissues as a whole. **Conclusion** The stewing of *Polygala tenuifolia* is conducive to the absorption and distribution of the above 4 oligosaccharide esters and improving their bioavailability.

Key words: *Polygala tenuifolia*; Licorice-simmered *Polygala tenuifolia*; processing; pharmacokinetics; tissue distribution

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根^[1], 具有安神益智之功, 临床上多用于心肾不交之心神不宁、失眠健忘等证^[2]。远志生品对机体刺激性大, 服后易“戟人咽喉”。远志经炮制后可减少其刺激性, 缓解药性, 达到减毒增效之目的^[3], 2020年版《中国药典》收录的远志炮制品为甘草制品, 是目前常用炮制品, 而炆远志为江西“建昌帮”特色炮制品, 该法系指将远志低温长时间加热, 并加入辅料甘草汁, 在微火慢蒸过程中, 借助辅料与药物成分之间的相互作用, 使药物化学成分发生变化, 从而影响药效。临床经验证明, 远志经炆制后可增强药物疗效, 并使其保留“原汁原味、醇香浓郁、厚而不腻”等特征^[4]。现代研究表明, 远志主含皂苷类、寡糖酯类、吡啶类等成分, 其中寡糖酯类成分是其主要有效活性成分之一^[5-6]。课题组前期研究了远志炆制前后成分的变化, 发现炆制后远志中寡糖酯类成分含量均有所下降^[7]。在对比分析远志生品与炆制品差异时发现, 远志中所含西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、黄花远志素 A、

细叶远志苷 A 等成分是其主要差异性成分^[8]。但前期并未对这些主要差异性成分开展体内过程研究, 致使远志经炆制后药效增强这一理论, 仍缺乏科学数据支撑。基于此, 本研究以“建昌帮”炆远志为对象, 从药代动力学和组织分布角度, 运用 UPLC-MS/MS 分析技术, 研究远志炮制前后西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖等 4 种寡糖酯类成分在大鼠血浆和组织中的浓度分布情况, 拟通过对比分析炆制前后血浆和组织中各成分浓度差异, 为远志炆制后药效增强理论提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-30A 型超高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); QQQ4500 型串联三重四极杆质谱仪 (美国 AB Sciex 公司), FA1004N 万分之一电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); AE240 十万分之一电子天平 (美国 Mettler-Toledo 公司); YF-111B 高速中药粉碎机 (瑞安市永历制药机械有限公司); OSB-2200XU 旋转蒸发仪 (上海爱郎仪器有限公司); XW-80AXUA 旋涡混合器 (上海

精科实业有限公司); Neofuge 13R 型高速冷冻离心机(上海力申科学仪器公司); ANPEL DC12 氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司)。

1.2 试药

远志药材购于山西汉广中药材加工有限公司,产地为山西运城;甘草购于安徽汇仁堂中药饮片有限公司,经江西中医药大学中药鉴定室刘应蛟副教授鉴定,分别为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。西伯利亚远志糖 A5 对照品(批号: MUST-21052704, 纯度: 93.91%)、西伯利亚远志糖 A6 对照品(批号: MUST-20082523, 纯度: 96.42%)(成都曼思特生物科技有限公司); 细叶远志苷 A 对照品(批号: wkq20073005)、3, 6'-二芥子酰基蔗糖对照品(批号: wkq21031112)、芦丁对照品(批号: wkq20030203)(四川省维克奇生物科技有限公司, 纯度均 ≥ 98%)。水为屈臣氏纯净水, 乙腈、甲醇、甲酸为质谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量为 220 ~ 250 g

[济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号为 SCXK(鲁)20190003]。大鼠在标准环境下[温度(23 ± 1) °C, 湿度(55 ± 5)%]适应性喂养 7 d, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。本研究涉及的动物实验经江西中医药大学研究伦理委员会审查批准(批准号: JZLLSC20220493)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水(A) - 乙腈(B); 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 10% ~ 95%B; 3 ~ 4 min, 95%B; 4 ~ 4.1 min, 95% ~ 10%B; 4.1 ~ 6 min, 10%B); 流速 0.2 mL · min⁻¹; 进样体积 1 μL; 柱温 40 °C。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 采用负离子模式检测, 扫描模式为多反应监测(MRM), 喷雾电压(IS) 4500 V, 离子源温度(TEM) 450 °C, 离子源气压 1(GS1) 45 kPa, 离子源气压 2(GS2) 50 kPa, 气帘气(CUR) 10 psi, 碰撞气(CAD) 9 psi。其他特征参数见表 1。

表 1 各指标成分及内标的质谱参数

Tab 1 Mass spectrum parameters of each index component and internal standard

化合物	保留时间 /min	MRM	去簇电压(DP)/V	碰撞电压(CE)/V
西伯利亚远志糖 A5	2.70	514.7 → 174.9	- 111	- 31
西伯利亚远志糖 A6	2.72	547.3 → 205.0	- 103	- 33
细叶远志苷 A	3.16	681.4 → 443.2	- 133	- 34
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	3.06	753.3 → 547.0	- 140	- 35
芦丁	2.91	609.1 → 299.8	- 150	- 45

2.3 受试药物的制备

2.3.1 炮制品的制备 生远志按《中国药典》2020 年版一部炮制方法制备。炆远志按《江西省中药饮片炮制规范》(2008 年版)^[9]炮制方法制备: 取净甘草, 切段, 与净远志搅匀, 置炆药坛内, 加适量 40 °C 温水(以平药面为度); 坛四周堆适量谷糠, 点火, 液面保持沸腾炆制 5 h, 起坛, 捡去甘草, 干燥。每 100 kg 远志, 用甘草 6 kg。

2.3.2 远志乙醇提取物的制备 取生远志、炆远志各 50 g, 粉碎后过三号筛, 先后加 10 倍量、8 倍量 60% 的乙醇回流提取 2 次, 每次提取 1 h, 滤过, 合并滤液, 滤液水浴减压旋转蒸发, 得无醇味浸膏, 于 - 4 °C 保存。使用前加水至 100 mL, 至生药含量为 0.5 g · mL⁻¹。

2.4 给药和样品的采集

2.4.1 血浆样品 将健康雄性 SD 大鼠 12 只, 随

机分成两组(生品组 S1 ~ S6, 炆制组 W1 ~ W6), 每组 6 只。给药前 12 h 禁食不禁水, 按剂量 10 mL · kg⁻¹ 灌胃给予生远志、炆远志提取物, 于给药前及给药后 5、10、20、30、45 min 和 1、1.5、2、3、5、8、12 h 自眼底静脉丛取血, 每次 0.3 mL, 置于 1.5 mL 肝素钠 EP 管中, 3500 r · min⁻¹ 离心 15 min, 分离上层血浆, 于 - 80 °C 冷冻保存。

2.4.2 组织样品 将健康雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分成两组(生品组 S1 ~ S24, 炆制组 W1 ~ W24), 每组 24 只, 给药前 12 h 禁食不禁水。按剂量 10 mL · kg⁻¹ 灌胃给予生远志、炆远志提取物, 于给药前及给药后 0.5、2、5 h(每个时间点各 6 只) 4 个时间点断颈处死大鼠, 立即解剖采集心、肝、肺、肾、小肠、脑等组织。用冰生理盐水洗净, 滤纸沾干, 置于 EP 管中, 于 - 80 °C 冷冻保存。

2.5 样品的处理

2.5.1 血浆样品 取 100 μL 大鼠血浆样品, 置于 1.5 mL 离心管中, 加芦丁内标溶液 10 μL , 漩涡混合 3 min, 再加入 600 μL 甲醇, 漩涡震荡 3 min, 13 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液置于 EP 管中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 残渣加 100 μL 甲醇复溶, 漩涡震荡 3 min, 3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 1 μL 进样。

2.5.2 组织样品 取出大鼠组织样品, 解冻后将各组织剪碎, 混合均匀。精密称取各组织置于 EP 管中, 按组织-生理盐水 1:3 的比例加冰生理盐水, 用匀浆机制成匀浆。取上层组织匀浆 100 μL , 按“2.5.1”项下血浆样品同法处理。

2.6 对照品溶液的制备

2.6.1 混合对照品溶液的制备 精密称取西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖对照品适量, 加甲醇制成西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A 均为 9.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖为 2.88 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 并逐级稀释, 制得系列溶液。以低 (49.9、50.0、49.9、16.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 (999.2、999.6、999.2、320.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 (8992.8、8996.4、8992.8、2880 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量浓度的对照品溶液, 用于药代动力学研究。加甲醇制成西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 均为 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 细叶远志苷 A 为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖为 0.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 并逐级稀释, 制得系列溶液, 以低 (10.1、10.0、20.0、5.9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 (50.4、49.9、100.0、29.6 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 (504.0、498.8、1000.1、296.2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量浓度的对照品溶液, 用于组织分布研究。

2.6.2 内标溶液的制备 精密称取芦丁适量, 加甲醇制成质量浓度为 6.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁内标溶液。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 取大鼠空白血浆和肝组织匀浆 (作为组织样品分析的代表)、加对照品和内标溶液的空白大鼠血浆和肝组织匀浆、给药 30 min 后的大鼠血浆和肝组织匀浆, 按“2.5”项下方法处理, 分析得空白血浆和肝组织匀浆、血浆和肝组织样品图谱, 见图 1。

2.7.2 线性范围及定量限 取 100 μL 空白大鼠血浆和心、肝、肺、肾、脑、肠组织匀浆, 分别加入“2.6.1”项下混合对照品系列溶液, 按“2.5”项下方法处理, 配制系列浓度的血浆和组织样品,

以指标成分的血药浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 以指标成分与内标物的峰面积比为纵坐标 (Y), 用加权 ($1/\chi^2$) 最小二乘法进行线性回归, 得到相应的线性回归方程。结果表明, 各待测成分在相应范围内线性关系较好, 符合生物样品分析要求, 结果见表 2。

2.7.3 精密度和准确度 取 100 μL 空白大鼠血浆和肝组织匀浆, 分别加入“2.6.1”项下低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 每个浓度取 6 份, 按“2.5”项下方法处理, 配制药代动力学和组织分布质控 (QC) 样品, 连续测定 3 d。以各分析批内随行标准曲线计算日内和日间精密度 (RSD) 及准确度 (RE)。各指标成分在血浆中日内 $RSD \leq 8\%$, 日间 $RSD \leq 9\%$, RE 为 $-9.57\% \sim 9.64\%$; 在肝组织中日内 $RSD \leq 11\%$, 日间 $RSD \leq 13\%$, RE 为 $-10.34\% \sim 11.28\%$ 。结果均 $< 15\%$, 表明该法精密度和准确度良好, 符合生物样品分析要求。

2.7.4 残留效应考察 取 100 μL 空白大鼠血浆和肝组织匀浆, 分别加入“2.6.1”项下高质量浓度的混合对照品溶液, 每个浓度取 6 份, 按“2.5”项下方法处理, 配制药代动力学和组织分布 QC 样品, 进样分析; 取空白大鼠血浆和肝组织样品, 不加内标溶液, 同法操作。各指标成分和内标溶液的残留峰面积分别小于定量下限质量浓度 QC 血浆和肝组织对应成分峰面积的 15%、5%, 表明该法各指标残留效应符合生物样品分析要求。

2.7.5 提取回收率和基质效应 取 100 μL 空白大鼠血浆和肝组织匀浆, 分别加入“2.6.1”项下低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 每个浓度取 6 份, 按“2.5”项下方法处理, 得不同浓度的药代动力学和组织分布 QC 样品, 进样测得各色谱峰面积 A ; 取空白血浆和肝组织匀浆, 按“2.5”项下方法沉淀蛋白后, 取上清液分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液, 氮气吹干溶剂, 复溶后同法测定, 得各色谱峰面积 B ; 取“2.6.1”项下低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液加入内标溶液, 同法操作, 得各色谱峰面积 C ; 提取回收率 = $A/B \times 100\%$, 基质效应 = $B/C \times 100\%$ 。各指标成分在血浆中提取回收率为 84.64% \sim 97.69%, $RSD < 6\%$, 基质效应为 84.77% \sim 104.51%, $RSD < 5\%$; 各指标成分在肝组织中提取回收率为 86.21% \sim 103.36%, $RSD < 7\%$, 基质效应为 83.52% \sim 107.48%, $RSD < 6\%$, 符合生物样品分析要求。

2.7.6 稳定性实验 取 100 μL 空白大鼠血浆和肝组织匀浆, 分别加入“2.6.1”项下低、中、高 3

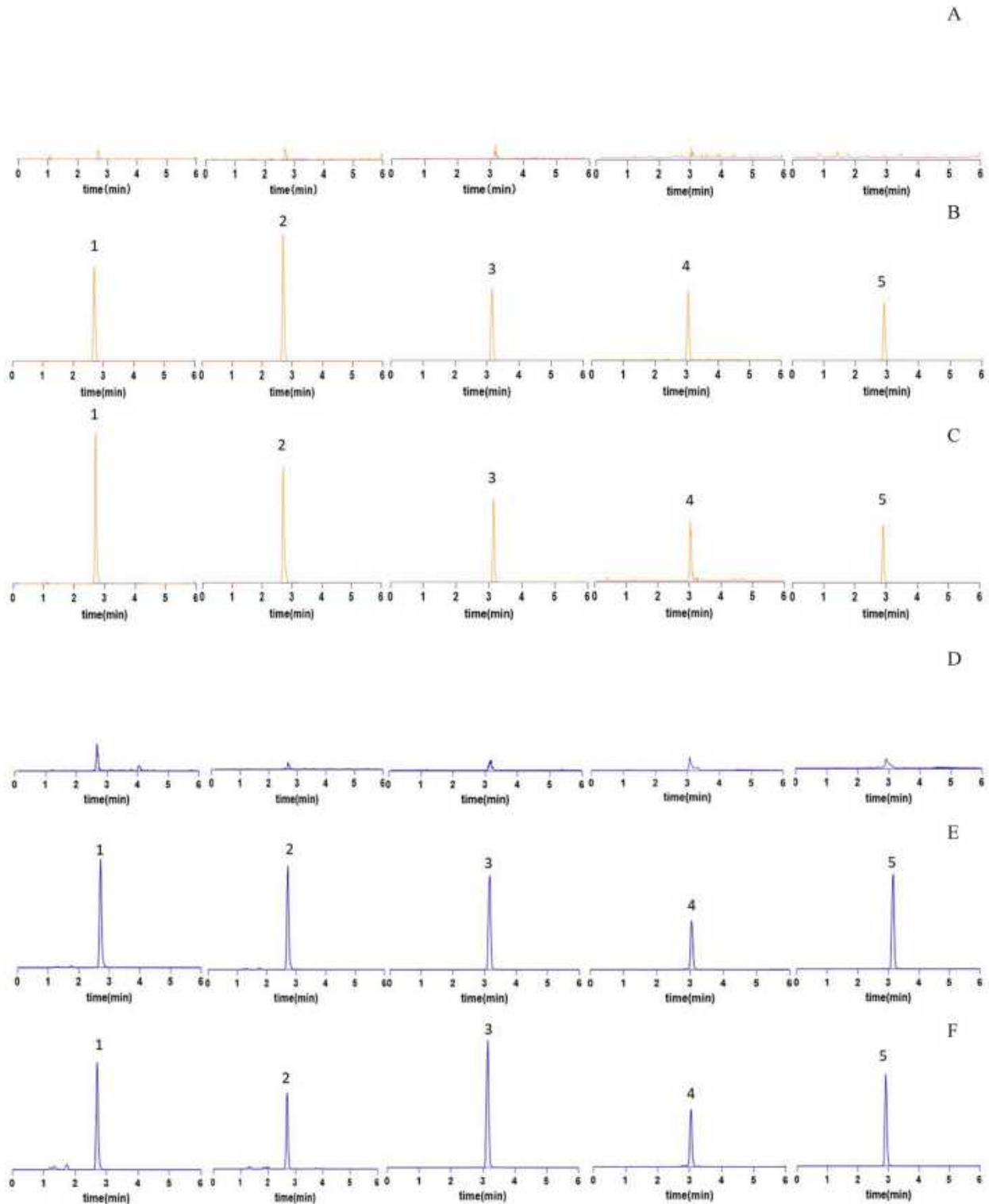


图 1 各指标成分及提取离子流 UPLC-MS/MS 图

Fig 1 Components and extraction ion current UPLC-MS/MS

A.空白血浆 (blank plasma); B.空白血浆 + 对照品 (blank plasma + control); C.给药 30 min 后血浆 (plasma 30 min after the administration); D.空白肝组织匀浆 (blank liver homogenate); E.空白肝组织匀浆 + 对照品 (blank liver tissue homogenate + control); F.给药 30 min 后肝组织匀浆 (liver tissue homogenate 30 min after the administration); 1.西伯利亚远志糖 A5 (sibiricose A5); 2.西伯利亚远志糖 A6 (sibiricose A6); 3.细叶远志苷 A (tenuifoliside A); 4.3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-disinapoyl sucrose); 5.芦丁 (rutin)

个质量浓度的混合对照品溶液，每个浓度取 6 份，并置于以下 4 种条件下考察远志中 4 种指标成分

在大鼠血浆和肝组织中的稳定性：血浆和肝组织匀浆样品室温放置 4 h 后，按“2.5”项下方法处

表 2 各指标成分在大鼠血浆和组织中的标准曲线和线性范围

Tab 2 Standard curves and linear ranges for each indicator component in the rat plasma and tissues

基质	化合物	线性回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	r	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
血浆	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.029X + 0.061$	2.0 ~ 8992.8	0.997	2.0
	西伯利亚远志糖 A6	$Y = 0.037X + 0.106$	2.0 ~ 8996.4	0.998	2.0
	细叶远志苷 A	$Y = 0.005X + 0.029$	2.0 ~ 8992.8	0.997	2.0
	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 0.004X + 0.004$	3.2 ~ 2880.0	0.997	3.2
心	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.206X + 0.012$	0.5 ~ 100.8	0.999	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.233X + 0.027$	1.0 ~ 200.0	0.995	1.0
肝	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.288X - 0.008$	0.5 ~ 504.0	0.997	0.5
	西伯利亚远志糖 A6	$Y = 0.236X - 0.008$	0.5 ~ 498.8	0.994	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.230X - 0.029$	1.0 ~ 1000.1	0.999	1.0
	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 0.066X - 0.001$	0.3 ~ 296.2	0.996	0.3
肺	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.207X + 0.007$	0.5 ~ 504.0	0.997	0.5
	西伯利亚远志糖 A6	$Y = 0.277X + 0.001$	0.5 ~ 99.8	0.997	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.303X + 0.117$	1.0 ~ 1000.1	0.995	1.0
肾	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.143X - 0.012$	0.5 ~ 504.0	0.999	0.5
	西伯利亚远志糖 A6	$Y = 0.197X - 0.012$	0.5 ~ 99.8	0.997	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.198X - 0.019$	1.0 ~ 1000.1	0.997	1.0
	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 0.046X - 0.003$	0.3 ~ 59.2	0.998	0.3
脑	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.207X + 0.001$	0.5 ~ 100.8	0.998	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.173X - 0.009$	1.0 ~ 200.0	0.995	1.0
肠	西伯利亚远志糖 A5	$Y = 0.206X + 0.022$	0.5 ~ 1008.0	0.997	0.5
	西伯利亚远志糖 A6	$Y = 0.224X + 0.010$	0.5 ~ 498.8	0.999	0.5
	细叶远志苷 A	$Y = 0.311X + 0.030$	1.0 ~ 2000.2	0.999	1.0
	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 0.054X + 0.003$	0.3 ~ 296.2	0.998	0.3

理再测定；血浆和肝组织匀浆样品按“2.5”项下方法处理后，在室温放置 24 h 后再测定；血浆和肝组织匀浆样品 - 80 °C 放置 3 周及 - 80 °C 冻融循环 3 次后，按“2.5”项下方法处理再测定。结果表明，各指标成分在 4 种考察条件下的 RSD 均在 ± 15% 以内，符合生物样品分析要求。

2.8 药代动力学研究

大鼠灌胃生远志提取物、炆远志提取物后，采用“2.4”项下方法隔点取血，再按“2.5.1”项下方法处理。以血药浓度为纵坐标，时间为横坐标采用 GraphPad Prism 7 软件绘制浓度 - 时间曲线，见图 2。采用 DAS 3.2.1 软件计算药代动力学参数。运用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，见表 3。结果表明，与生远志组相比，炆远志组中西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的药代学动力参数 C_{max} 、 $AUC_{0\sim 12}$ 均显著增加 ($P < 0.05$)，细叶远志苷 A 的 C_{max} 、 $AUC_{0\sim 12}$ 有增加趋势。炆远志中 4 种寡糖酯类成分的 V_z/F 和 CL_z/F 较生远志明明显降低 ($P < 0.05$)。

2.9 组织分布研究

大鼠灌胃生远志提取物、炆远志提取物后，采用“2.4”项下方法在 4 个时间点取组织，再按

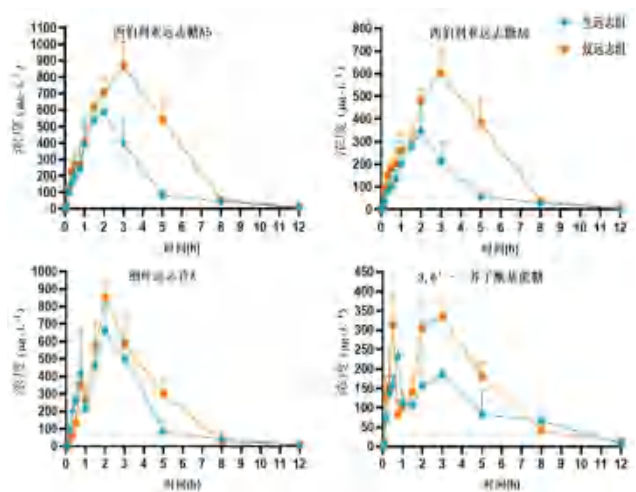


图 2 生远志、炆远志中 4 种成分的浓度 - 时间曲线 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)
Fig 2 Time curves of 4 constituents in *Polygala tenuifolia* and Licorice-simmered *Polygala tenuifolia* ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

“2.5.2”项下方法处理，样品进样分析。给药前，4 种寡糖酯类成分在大鼠各组织中均未检测到，同一个化合物在不同器官的 4 个时间点浓度分布见表 4。结果表明，与生远志组相比，炆远志组中西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的组织分布浓度整体均增大。

3 讨论

表 3 4 种成分的药代动力学参数 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)
Tab 3 Pharmacokinetic parameters of 4 components (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

化合物	分组	$C_{max}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	t_{max}/h	$AUC_{0 \sim 12}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$)	$AUC_{0 \sim 12}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$)	$MRT_{0 \sim 12}/\text{h}$	$V_z/F/$ ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$CL_z/F/$ [$\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]
西伯利亚远志糖 A5	生远志	667.95±61.10	2.08±0.49	1975.42±194.47	1989.44±193.41	2.90±0.18	1159.31±2793.71	5071.31±554.14
	炆远志	875.52±126.98*	2.85±0.43	4023.10±640.99**	4043.75±645.96**	3.50±0.16	4979.05±1144.03**	2540.07±507.48**
西伯利亚远志糖 A6	生远志	382.66±88.21	2.00±0.63	1128.26±135.30	1136.76±136.84	3.07±0.22	20110.23±2626.16	8910.38±1138.55
	炆远志	604.34±99.40*	2.83±0.41	2724.63±483.67**	2738.29±490.90**	3.56±0.18	7210.87±1597.81**	3775.31±834.76**
细叶远志昔 A	生远志	697.48±110.71	2.17±0.41	2136.79±659.69	2149.82±665.98	2.84±0.35	1159.77±3600.80	5016.03±1507.56
	炆远志	874.80±67.80	2.10±0.50	2905.72±444.50	2921.41±444.76	3.18±0.21	7342.02±1741.41*	3497.21±581.59*
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	生远志	241.70±15.18	1.17±0.64	1072.00±106.17	1096.78±110.69	4.06±0.26	27270.63±1793.47	9196.90±947.13
	炆远志	367.64±32.45**	1.83±1.12	1589.93±177.36**	1625.67±179.53**	3.69±0.16	16679.55±2959.19*	6212.11±662.55*

注：与生远志组比较，*P < 0.05, **P < 0.01。

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

表 4 4 种成分在不同组织中的浓度 ($\bar{x} \pm s$, n = 6, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Tab 4 Tissue distribution concentration of 4 components ($\bar{x} \pm s$, n = 6, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

化合物	组织	0.5 h		2 h		5 h	
		生远志	炆远志	生远志	炆远志	生远志	炆远志
西伯利亚远志糖 A5	心	1.11±0.34	1.88±0.82	7.80±1.30	6.14±1.23*	1.95±0.74	5.31±1.52**
	肝	8.89±3.22	15.38±4.68*	22.39±6.55	34.62±12.61	10.52±3.23	13.17±1.63
	肺	4.39±1.47	14.23±5.27*	47.95±7.18	68.12±16.04*	14.91±8.24	20.03±4.46
	肾	19.41±5.23	33.10±11.99*	115.71±65.31	76.81±19.29	24.44±8.35	32.38±18.12
	脑	0.64±0.04	0.74±0.17	1.01±0.32	1.27±0.22	0.59±0.10	0.77±0.20
	小肠	87.75±35.53	129.95±54.12	361.57±74.40	571.38±125.22*	79.55±40.26	151.41±42.76*
西伯利亚远志糖 A6	肝	13.09±7.79	10.11±4.52	21.25±7.57	31.43±4.04*	8.01±2.97	11.36±6.35
	肺	0.72±0.42	1.23±0.73	3.85±0.52	5.40±1.35*	1.15±0.27	1.67±0.57
	肾	1.04±0.35	0.86±0.33	16.39±7.89	14.54±4.68	0.95±0.36	1.48±0.83
	小肠	22.38±7.75	49.95±15.87*	108.25±40.77	134.36±47.30	9.73±2.75	28.25±6.81**
细叶远志昔 A	心	1.22±0.30	2.73±1.23*	8.18±2.50	8.90±2.17	1.41±0.48	2.87±1.10*
	肝	18.19±8.54	27.88±5.66*	28.94±5.39	48.92±11.87*	17.79±7.63	23.87±4.44
	肺	6.37±1.59	10.25±5.34	65.44±4.75	98.78±13.96**	11.25±4.14	17.33±3.28*
	肾	20.33±9.77	32.89±18.60	50.90±10.85	85.37±13.34*	25.72±7.30	38.42±1.76*
	脑	1.21±0.23	1.68±0.41	2.47±0.47	1.91±0.54	1.36±0.32	1.48±0.19
	小肠	117.71±36.73	122.67±70.30	579.42±99.22	876.51±61.73**	115.10±65.01	109.76±62.19
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	肝	10.99±2.42	15.46±5.73	22.08±10.88	38.66±16.78	3.61±1.43	6.32±1.10*
	肾	0.98±0.35	2.19±0.89*	14.70±5.23	29.63±9.09**	0.55±0.33	1.69±0.32**
	小肠	2.27±0.44	4.11±0.20**	9.46±1.95	18.60±1.10**	2.59±1.13	3.49±0.80

注：与生远志组比较，*P < 0.05, **P < 0.01。

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

前期预实验采用正负离子两种模式进行成分检测，发现西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志昔 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖在负离子模式下灵敏度更高，响应强度更大，这与文献报道相吻合^[10]，且负离子模式检测时间短、经济，因此，选择负离子模式进行定量分析。《中国药典》2020 年版一部规定远志对人最大给药量换算成大鼠为 0.9 g · kg⁻¹，结合文献^[11]，按远志生药量 5 g · kg⁻¹ 大鼠体质量灌胃给药。

本文首次采用 UPLC-MS/MS 测定炆远志与生

远志中西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志昔 A、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 4 种寡糖酯类成分在大鼠血液中的药代动力学参数。前期研究表明，与生远志相比，炆远志中大多数成分含量下降^[7]。

根据血浆药代动力学的结果，选取了给药前及给药后 0.5、2、5 h 进行组织分布研究，分别代表吸收相、分布相，4 种成分在各组织中的浓度由高到低为 2 h > 0.5 h > 5 h，再根据 4 种成分的 t_{max} 均为 2 h 左右，推测这些成分在组织分

布中的 t_{max} 为 2.5 ~ 3 h。与生远志组相比, 炆远志组中 4 种成分在 6 个组织中的浓度整体呈增加趋势。西伯利亚远志糖 A5 和细叶远志苷 A 在心、肝、肺、肾、脑和小肠 6 个组织中都有分布, 表明这两个成分在组织中分布广泛; 西伯利亚远志糖 A6 在肝、肺、肾、小肠 4 个组织中有分布, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖在肝、肾、小肠中有分布, 这两个成分在心、脑中都没有检测到, 且在组织中浓度都不高, 可能跟这两个成分入血浓度不高, 再经过肝肠循环, 大部分被代谢了有关。^[12] 4 种成分整体在小肠中浓度最高, 这可能与灌胃给药后, 药物经过小肠吸收进入体内有关^[12], 其次在肾、肝、肺中浓度也较高, 这与远志入肾、肺经吻合, 在脑和心中浓度低, 表明这 4 种成分的原形不易透过血脑屏障。有文献报道, 远志中寡糖酯类成分不稳定, 酯键易水解转化为次级苷和苷元^[13-14], 因此, 可能是这 4 种寡糖酯的代谢产物在脑部发挥药效, 但在心中浓度低与远志入心经不符, 后期需进一步研究。

综上所述, 与生品相比, 远志炆制后可促进西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、细叶远志苷 A 和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 4 种寡糖酯类成分在大鼠体内的吸收和分布, 使其血药浓度增加, 组织分布浓度增加, 提高其生物利用度。此外, 文献研究表明远志炆制后可提高学习记忆能力, 增强安神益智作用^[15], 其中寡糖酯类成分是远志发挥安神益智药效的主要成分之一^[16-18]。因此, 推测远志炆制后药效增强可能与西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志苷 A 4 种有效成分的吸收和分布增强有关。本研究可为深入研究“建昌帮”特色饮片炆远志炮制机制提供数据支撑, 但远志炆制后有效成分在体内吸收与分布作用增强的原因还需深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 163.
- [2] 蒲雅洁, 王丹丹, 张福生, 等. 远志的本草考证[J]. 中草药, 2017, 48(1): 211-218.
- [3] 唐卫东, 梁永枝. 远志炮制品减毒增效实验研究[J]. 中国民族民间药, 2010, 19(12): 55-56.
- [4] 宋金菊, 钟凌云, 解杨, 等. 中药特色炮制炆法的历史考证与现代研究[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3108-3112.
- [5] Cheng YG, Tan JY, Li JL, et al. Chemical constituents from the aerial part of *Polygala tenuifolia* [J]. Nat Prod Res, 2022, 45(2): 331-334.
- [6] 袁蒙蒙, 阴美华, 唐志书, 等. Box-Behnken 响应面法优化制远志与蜜远志的炮制工艺[J]. 中南药学, 2021, 19(7): 1310-1315.
- [7] 高慧, 熊晓莉, 张青, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术分析远志炮制前后成分变化[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12): 1845-1854.
- [8] 崔月莉, 吴鹏, 张丹捷, 等. 远志与炆远志 HPLC 指纹图谱比较[J]. 中药材, 2020, 43(3): 575-581.
- [9] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 81.
- [10] Zhao X, Wang M, Xiong YF, et al. UHPLC-MS/MS method for pharmacokinetic and bioavailability determination of five bioactive components in raw and various processed products of *Polygala tenuifolia* in rat plasma [J]. Pharma Biol, 2020, 58(1): 969-978.
- [11] Yang L, Jiang H, Guo XY, et al. Pharmacokinetic comparisons of eight active components from raw farfarae flos and honey-processed farfarae flos after oral administration in rats by UHPLC-MS/MS approaches [J]. J Anal Methods Chem, 2020, 58(1): 969-978.
- [12] Ba YY, Wang ML, Zhang KF, et al. Intestinal absorption profile of three *Polygala* Oligosaccharide esters in *Polygalae Radix* and the effects of other components in *Polygalae Radix* on their absorption [J]. Evid Based Compl Alt, 2019, 29(6): 613-627.
- [13] 徐保鑫, 刁家威, 张学兰, 等. 远志炮制过程中 6 种寡糖酯类成分转化机制[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1790-1794.
- [14] 曲丛丛, 吴鹏, 张学兰, 等. HPLC-TOF/MS 法研究远志炮制过程中寡糖酯和皂苷类成分的转化机制[J]. 中药材, 2018, 41(3): 576-580.
- [15] 赵鑫, 崔月莉, 吴鹏, 等. 远志与炆远志对心肾不交失眠大鼠学习记忆, HPA 轴功能及神经递质的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 147-154.
- [16] 桑旭星, 杨依, 方芳. 远志寡糖酯类化合物药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(18): 1576-1579.
- [17] 李旭冉, 陈思邈, 陈伟燕, 等. 远志的化学成分及防治阿尔兹海默症的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(1): 15-23.
- [18] 桑旭星. 远志寡糖酯改善实验性痴呆小鼠学习记忆能力及神经保护作用的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

(收稿日期: 2023-01-25; 修回日期: 2023-02-26)

藏药二十五味松石丸抑制血管生成和上皮间充质转化改善四氯化碳 - 酒精诱导的大鼠肝纤维化研究

许湘¹, 黄丹^{1, 2}, 陆华冠¹, 刘延涛¹, 刘馨³, 谢新^{1, 2}, 雷昌^{1, 2}, 赵洪庆^{1, 2}, 刘建军^{1, 2*} (1.湖南中医药大学 科技创新中心, 长沙 410208; 2.中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410208; 3.中山大学附属医院第三医院超声科, 广州 510630)

摘要: **目的** 研究二十五味松石丸是否通过抑制血管生成和上皮间充质转化改善四氯化碳 (CCl₄) - 酒精诱导的大鼠肝纤维化模型。**方法** SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为正常组, 模型组, 二十五味松石丸低、中和高 [88、176、352 mg/(kg·d)] 剂量组, 每组 6 只。采用 50%CCl₄ 橄榄油腹部皮下左右交替注射, 同时以 5% 酒精饮料喂养建立肝纤维化模型; 正常组皮下注射同体积橄榄油以蒸馏水喂养, 持续 8 周, 造模的同时按照分组灌胃相应的药物和 0.4% 羧甲基纤维素钠治疗。HE 和 Masson 染色检测大鼠肝脏组织病理变化和胶原纤维增生; 生化试剂盒测定血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST), 酶联免疫分析测定肿瘤坏死因子 (TNF- α)、透明质酸 (HA) 和层黏连蛋白 (LA) 水平; 免疫组化检测血小板内皮细胞黏附分子 -1 (CD31)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达; 免疫印迹法检测 α -SMA、TGF- β 1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织病理损伤严重, 胶原纤维明显增生; 模型组中大鼠血清中 ALT、AST 活性明显升高, TNF- α 含量明显增加, HA 和 LN 含量明显升高; 模型组大鼠肝组织内 CD31、 α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白表达明显增加, E-cadherin 蛋白表达明显降低。与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组均能改善大鼠肝组织病理损伤、降低肝功能和肝纤维化指标, 降低大鼠血清中 TNF- α 水平及肝组织内 CD31、 α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白表达, 增加 E-cadherin 蛋白表达。**结论** 二十五味松石丸可改善 CCl₄ 酒精复合因素诱导的大鼠肝纤维化, 其作用可能与抑制血管新生和上皮间充质转化相关。

关键词: 二十五味松石丸; 肝纤维化; 血管生成; 上皮间充质转化; 血小板内皮细胞黏附分子 -1
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1157-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.007

Tibetan medicine Ershiwuwei Songshi pills inhibit angiogenesis and epithelial mesenchymal transformation to improve carbon tetrachloride alcohol-induced liver fibrosis in rats

XU Xiang¹, HUANG Dan^{1, 2}, LU Hua-guan¹, LIU Yan-tao¹, LIU Xin³, XIE Xin^{1, 2}, LEI Chang^{1, 2}, ZHAO Hong-qing^{1, 2}, LIU Jian-jun^{1, 2*} (1. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. State Key Laboratory Cultivation Base of Traditional Chinese Medicine Powder and Innovative Drugs, Changsha 410208; 3. Department of Ultrasound, the Third Hospital of Sun Yat-Sen University Affiliated Hospital, Guangzhou 510630)

Abstract: Objective To determine whether Ershiwuwei Songshi pills improve Carbon tetrachloride (CCl₄) alcohol-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition. **Methods** Totally 30 SPF healthy male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, and a low, a middle, and a high dose group [88, 176, and 352 mg/(kg·d)], with 6 rats

基金项目: 湖南省教育厅资助科研项目 (No.18A228); 国家自然科学基金资助项目 (No.82104836)。

作者简介: 许湘, 女, 硕士研究生, 主要从事肝病发生机制及中药防治研究, email: 2468019005@qq.com * **通信作者:** 刘建军, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事肝病发生机制及中药防治研究, email: 80228661@qq.com

in each group. The liver fibrosis model was established by subcutaneous injection of 50%CCl₄ olive oil and feeding with 5% alcohol beverage. The normal group was fed with distilled water by subcutaneous injection of the same volume of olive oil for 8 weeks. Each group was treated with corresponding drugs and 0.4% sodium carboxymethylcellulose by gavage. HE staining and Masson staining were used to detect the pathological changes and collagen fiber proliferation in the rat liver. The levels of aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) in the serum were measured via biochemical kits; tumor necrosis factor- α (TNF- α), hyaluronic acid (HA) and laminin (LA) in the serum were detected by ELISA. The expressions of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), E-cadherin and Vimentin were detected by immunohistochemistry. The protein expressions of α -SMA, TGF- β 1, E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the pathological damage in the liver tissue in the model group was severe, and the collagen fibers were obviously proliferated. The activities of ALT and AST in the serum of rats in the model group were significantly increased, the content of TNF- α was effectively increased, and the content of HA and LN was increased. The expression of CD31, α -SMA, TGF- β 1 and Vimentin protein in the liver tissue of the model group was effectively down-regulated, and the expression of E-cadherin protein was significantly decreased. Compared with the model group, all dose groups of Ershiwuwei Songshi pills improved the pathological damage of the liver tissue, reduced the liver function and liver fibrosis indexes, reduced the level of TNF- α in the serum of rats, the expression of CD31, α -SMA, TGF- β 1 and Vimentin protein in the liver tissue of rats, and increased the expression of E-cadherin protein. **Conclusion** Ershiwuwei Songshi pill can protect against CCl₄ alcohol-induced liver fibrosis in rats, which may be related to the inhibition of angiogenesis and epithelial epithelial-mesenchymal transition.

Key words: Ershiwuwei Songshi pill; liver fibrosis; angiogenesis; epithelial mesenchymal transformation; platelet endothelial cell adhesion molecule-1

肝纤维化常见于慢性肝病，可由多种致病因子引起，造成细胞外基质（extracellular matrix, ECM）大量沉积，纤维瘢痕替代正常组织。研究发现，缺氧和炎症是诱导肝纤维化形成最重要的因素，也是导致血管生成和血管重塑的原因，故血管生成在肝纤维化向肝硬化和肝癌进展中发挥重要作用^[1]。目前，抗血管生成治疗已被证明可改善肝纤维化，降低门静脉高压，延长肝癌患者的总生存期^[2-3]。在肝纤维化过程中，ECM主要由肌成纤维细胞产生，而肌成纤维细胞主要来源于活化的肝星状细胞^[4]。且越来越多的研究发现，上皮间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）也是肌成纤维细胞来源之一，可能会促进肝纤维化的发生^[5]。

二十五味松石丸（Ershiwuwei Songshi pill, ESP）是藏区治疗肝脏疾病的经典方剂，具有清热解毒、疏肝利胆等功效，可用于治疗肝中毒、肝痛、肝硬化、腹水等疾病，收载于2020年版《中国药典》一部^[6]。研究发现，二十五味松石丸在临床上具有治疗病毒性肝炎和肝硬化等疗效^[7-8]。此外，二十五味松石丸也被证明在胆汁淤积性肝损

伤^[9]、非酒精性脂肪性肝炎^[10]和药物性肝损伤^[11]动物模型中具有肝保护作用，但较少人研究该药的抗肝纤维化作用^[12]。目前关于二十五味松石丸如何发挥抗肝纤维化作用的机制尚不清楚。因此，本课题通过构建四氯化碳（CCl₄）-酒精诱导的大鼠肝纤维化模型，探究二十五味松石丸防治肝纤维化的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠，6~8周龄，体质量（200±20）g [湖南斯莱克景达实验动物公司，单位使用许可证号：SYXK（湘）2019-0009，动物许可证号：SCXK（湘）2019-0004]，实验均符合动物伦理审查，伦理批准号：LL2022062803。所有动物均饲养于湖南中医药大学实验动物中心，温度（22±2）℃，湿度50%~55%，自由饮食饮水，黑暗和光照环境各12h，适应性喂养7d后开始实验。

1.2 试剂

大鼠谷丙转氨酶（ALT，批号：2109R28）、大鼠谷草转氨酶（AST，批号：2109R30），大鼠透明质酸（HA，批号：2211R11）、大鼠层黏

蛋白 (LN, 批号: 2211R40)(江苏酶免实业有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号: KE20001, 武汉三鹰有限公司); 苏木素染液 (批号: 20123002)、伊红染液 (批号: 19071801)、兔二步法检测试剂盒 (货号: PV-9001)(北京中杉金桥生物技术有限公司); Masson 试剂盒 (货号: CR2108024, 武汉塞维尔生物科技有限公司); α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA, 货号: AF1032, 江苏亲科生物有限公司); 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1, 货号: ab215715)、血小板内皮细胞黏附分子-1 (CD31, 货号: ab182981)(Abcam 公司); E-钙黏蛋白 (E-cadherin, 货号: 20874-1-AP)、波形蛋白 (Vimentin, 货号: 10366-1-AP)(武汉三鹰公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: CW00145, 康为世纪公司)。

1.3 仪器

超纯水仪 (法国 milli-Q 公司); HistoCore PEARL 型自动脱水机、HistoCore Arcadia H 型自动包埋机、RM2235 型石蜡切片机、正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Panoramic MIDI 数字玻片扫描系统 (匈牙利 3DHISTECH 公司); MK3 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法与结果

2.1 二十五味松石丸的制备

二十五味松石丸 (松石 50 g、珍珠 10 g、珊瑚 40 g、朱砂 20 g 等二十五味药, 批号: 19061A, 西藏甘露藏药股份有限公司, 规格: 1 g/丸)。药丸研磨后以 0.4% 羧甲基纤维素钠溶液为溶剂, 超声波混匀制成混悬液, 在使用前摇匀。

2.2 造模与给药

30 只动物按照随机数字表分为正常组, 模型组, 二十五味松石丸低、中、高剂量组 [88、176、352 mg/(kg·d)], 低剂量相当于临床等效量 (按丸计算)^[13], 每组 6 只。除正常组外, 各组大鼠给予腹部皮下注射 50%CCl₄ 橄榄油溶液, 每次注射剂量为 3 mL·kg⁻¹, 每周 2 次, 同时给予 5% 酒精饮料饲养, 连续造模 8 周^[14]。正常组给予等体积的橄榄油腹部皮下注射, 以蒸馏水喂养。从造模开始给予药物灌胃治疗, 正常组给予等量的 0.4% 羧甲基纤维素钠溶液 (以双蒸水配制), 一日一次, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹。末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 10% 水合氯醛麻醉, 收集血清和肝脏组织。

2.3 检测指标及结果

2.3.1 HE 和 Masson 染色检测大鼠肝脏组织病理变化和胶原增生 HE 染色: 新鲜肝脏组织用 4%

多聚甲醛溶液室温固定 24 h, 行梯度乙醇脱水、透明、石蜡包埋、切片 (厚度 4 μ m), 苏木素染色 5 min, 然后伊红染色 5 min, 光学显微镜下检测大鼠肝脏组织病理变化。Masson 染色方法: 肝组织石蜡切片常规脱蜡至水, 重铬酸钾媒染剂室温浸泡 15 h, 其余按照试剂盒操作, 光学显微镜下检测组织胶原增生情况。

结果显示 (见图 1 及表 1), 正常组大鼠肝组织形态结构整齐, 肝小叶完整, 肝索排列紧密, 未见任何的胶原纤维增生; 模型组大鼠肝组织结构紊乱, 无完整的肝小叶结构, 假小叶形成, 大小不一的脂滴弥散在肝细胞周围, 大量的胶原纤维增生, 纤维结构内可见炎性细胞堆积。与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组大鼠肝组织病理损伤有明显改善, 胶原纤维阳性面积明显减少 ($P < 0.01$), 高剂量组改善效果最好。

表 1 二十五味松石丸对肝纤维化大鼠模型胶原纤维增生的影响 ($n = 6$)

Tab 1 Effect of Ershiwuwei Songshi pills on collagen fiber proliferation in the rat model with hepatic fibrosis ($n = 6$)

组别	胶原纤维阳性区域 /%
正常组	0.37±0.20
模型组	6.28±0.78**
二十五味松石丸低剂量组	3.37±0.33###
二十五味松石丸中剂量组	1.46±0.61###
二十五味松石丸高剂量组	1.19±0.55###

注: 与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ### $P < 0.01$ 。

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

2.3.2 ELISA 法测定大鼠血清肝功能、TNF- α 以及肝纤维化指标 取材时, 大鼠腹主动脉收集全血, 室温静置 1 h 分层后, 4 $^{\circ}$ C、4000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离上清液, -20 $^{\circ}$ C 备用。按 ELISA 试剂盒方法操作, 检测 ALT、AST、TNF- α 和 HA、LN 水平。

如表 2 所示, 与正常组相比, 模型组大鼠血清中肝功能 ALT、AST 指标水平和 TNF- α 含量明显上升; 与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组大鼠血清能明显降低 AST、ALT 和 TNF- α 含量。如表 3 所示, 与正常组相比, 模型组大鼠血清中肝纤维化指标 HA 和 LN 明显上升; 与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组能明显降低大鼠血清中 HA 和 LN 水平。

2.3.3 免疫组化检测肝组织中 CD31、 α -SMA、TGF- β 1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达 取得的肝组织石蜡切片, 经过常规脱蜡至水; 配制 EDTA (pH = 9.0) 抗原修复液, 使用高压锅进行

表 2 二十五味松石丸对各组大鼠血清中 AST、ALT 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 Effect of Ershiwuwei Songshi pill on the serum levels of AST, ALT and TNF- α in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	AST/(U · L ⁻¹)	ALT/(U · L ⁻¹)	TNF- α /(pg · mL ⁻¹)
正常组	80.38 ± 7.61	29.28 ± 4.21	65.50 ± 10.66
模型组	328.21 ± 8.75**	116.57 ± 5.12**	247.5 ± 9.17**
二十五味松石丸低剂量组	200.32 ± 9.72 [#]	81.12 ± 4.66 [#]	168.8 ± 14.17 [#]
二十五味松石丸中剂量组	130.24 ± 6.32 [#]	63.90 ± 2.45 [#]	120.48 ± 8.21 [#]
二十五味松石丸高剂量组	98.34 ± 7.42 [#]	33.90 ± 3.52 [#]	75.76 ± 13.13 [#]

注：与正常组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，[#] $P < 0.01$ 。

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

表 3 二十五味松石丸对大鼠血清中肝纤维化指标 HA 和 LN 水平的的影响 ($n = 6$)

Tab 3 Effect of Ershiwuwei Songshi pill on the HA and LN levels in the serum of rats in each group ($n = 6$)

组别	HA/(ng · mL ⁻¹)	LN/(ng · mL ⁻¹)
正常组	24.17 ± 3.64	31.09 ± 5.14
模型组	108.78 ± 7.23**	82.39 ± 7.89**
二十五味松石丸低剂量组	93.16 ± 5.46 [#]	70.30 ± 3.49 [#]
二十五味松石丸中剂量组	75.23 ± 6.69 [#]	56.09 ± 4.97 [#]
二十五味松石丸高剂量组	43.97 ± 9.66 [#]	45.61 ± 3.81 [#]

注：与正常组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，[#] $P < 0.05$ ，[#] $P < 0.01$ 。

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

抗原修复;3%过氧化氢孵育 30 min, PBS 洗 3 次;5% 正常山羊血清 37℃ 封闭 1 h; 孵育一抗 CD31 (1 : 2000)、 α -SMA (1 : 500)、TGF- β 1 (1 : 500)、E-cadherin (1 : 8000) 和 Vimentin (1 : 2500); 后续操作按照兔二步法检测试剂盒 PV-9001 操作; DAB 显色, 苏木素染细胞核, 中性树脂封片。Pannoramic MIDI 数字玻片扫描仪扫描全片, 随机选择区域, Image-Pro Plus6.0 软件分析各组目的蛋白的平均积分光密度 (IOD)。

结果显示 (见图 2 及表 4), CD31 主要表达在血管内皮细胞的细胞膜上。正常组大鼠肝组织中可见少量的 CD31 蛋白表达, 模型组可见大量的 CD31 蛋白表达, 主要分布在增生胆管、中央静脉和肝窦周围。与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组 CD31 蛋白表达均有降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中

二十五味松石丸高剂量组 CD31 蛋白降低更明显。

表 4 二十五味松石丸对大鼠肝组织中 CD31 表达的 IOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 4 Effect of Ershiwuwei Songshi pill on the average optical density of CD31 expression in the liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	CD31
正常组	0.60 ± 0.10
模型组	2.13 ± 0.46**
二十五味松石丸低剂量组	1.43 ± 0.25 [#]
二十五味松石丸中剂量组	1.30 ± 0.17 [#]
二十五味松石丸高剂量组	1.00 ± 0.21 [#]

注：与正常组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，[#] $P < 0.05$ ，[#] $P < 0.01$ 。

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

由图 3 及表 5 可知, α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白主要表达在细胞质上, E-cadherin 蛋白主要表达在细胞膜上。正常组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白表达较少, 模型组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白表达明显增多 ($P < 0.01$); 而在正常组大鼠肝组织中 E-cadherin 蛋白表达量多, 模型组大鼠肝组织中 E-cadherin 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组大鼠肝组织能明显降低 α -SMA、TGF- β 1 和 Vimentin 蛋白表达 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 二十五味松石丸各剂量组均显著增加 E-cadherin

表 5 二十五味松石丸对大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1、E-cadherin 和 Vimentin 表达的 IOD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 5 Effect of Ershiwuwei Songshi pill on the the average optical density of α -SMA, TGF- β 1, E-cadherin, and Vimentin in the liver tissue of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	α -SMA	TGF- β 1	E-cadherin	Vimentin
正常组	0.37 ± 0.05	0.61 ± 0.01	1.30 ± 0.08	0.54 ± 0.04
模型组	1.19 ± 0.12**	1.84 ± 0.10**	0.68 ± 0.05**	2.03 ± 0.09**
二十五味松石丸低剂量组	0.83 ± 0.04 [#]	1.51 ± 0.06 [#]	0.70 ± 0.15 [#]	1.56 ± 0.15 [#]
二十五味松石丸中剂量组	0.63 ± 0.05 [#]	1.30 ± 0.03 [#]	0.90 ± 0.05 [#]	1.36 ± 0.14 [#]
二十五味松石丸高剂量组	0.32 ± 0.12 [#]	0.51 ± 0.12 [#]	1.34 ± 0.11 [#]	0.56 ± 0.13 [#]

注：与正常组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，[#] $P < 0.05$ ，[#] $P < 0.01$ 。

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

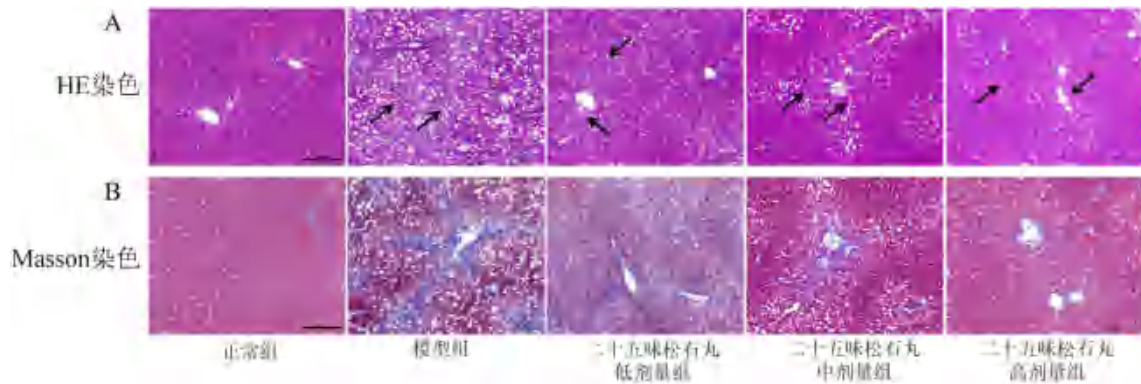


图 1 二十五味松石丸对大鼠肝组织形态学的影响 (箭头为坏死区域; bar = 200 μm)

Fig 1 Effect of Ershiwuweishi pill on the liver histomorphology of rats in each group (the arrow for necrosis area, bar = 200 μm)

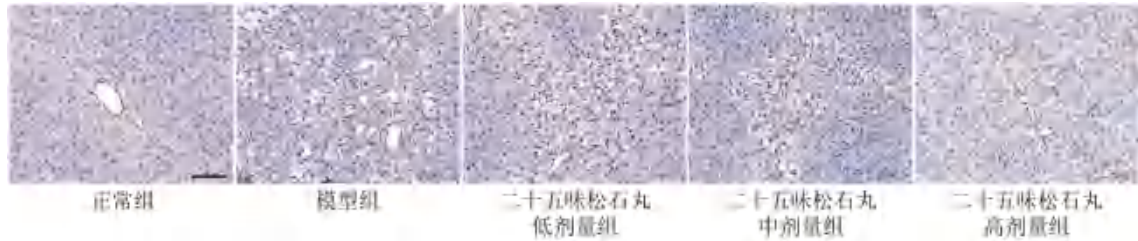


图 2 二十五味松石丸对大鼠肝组织血小板内皮细胞黏附分子-1 (CD31) 蛋白表达的影响 (×400, bar = 100 μm)

Fig 2 Effect of Ershiwuweishi pill on the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) protein expression in the liver tissue of rats in each group (×400, bar = 100 μm)

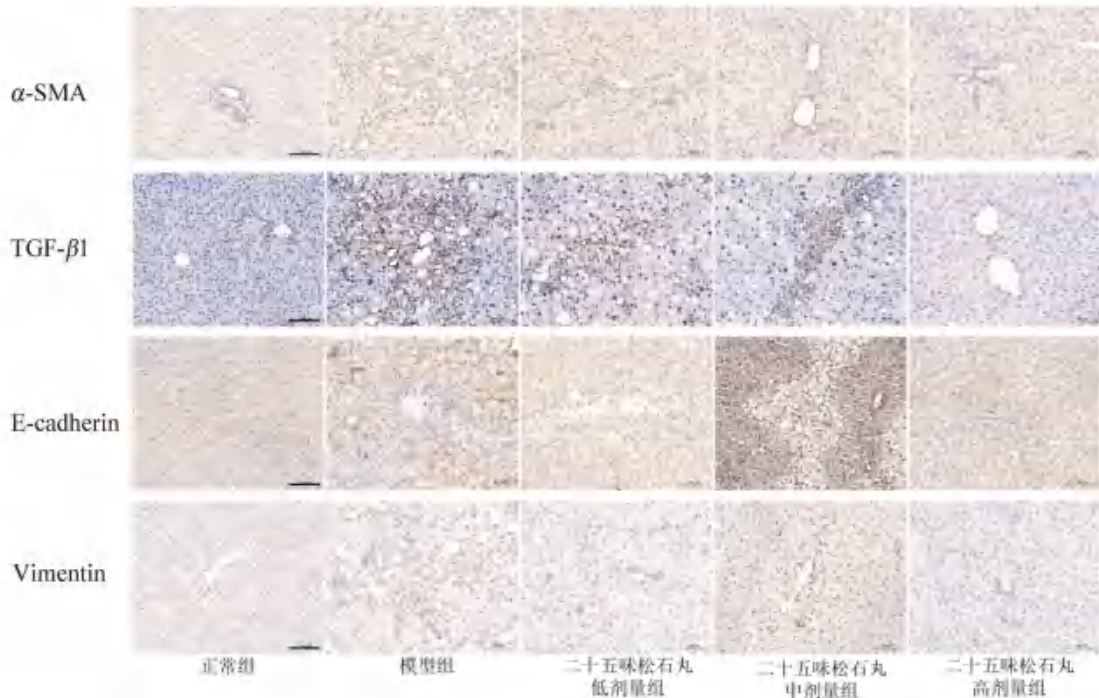


图 3 二十五味松石丸对大鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达比较 (×400, bar = 100 μm)

Fig 3 Effect of Ershiwuweishi pill on the α-SMA, TGF-β1, E-cadherin and Vimentin protein expression in the liver tissue of rats in each group (×400, bar = 100 μm)

蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.4 免疫印迹法检测肝组织中 α-SMA、TGF-β1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达 称取 100 mg 各组大鼠肝组织, 加入 RIPA 强裂解液裂解蛋白, 匀浆仪磨碎组织、静置冰上继续裂解 30 min, 12 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集上清液。BCA 法测定组织总蛋白浓度, 加入 $5 \times$ loading buffer, 99°C 变性蛋白 10 min, 冰上冷却, -20°C 保存备用。上样量为 $20 \mu\text{g}$, 经电泳、转膜、封闭后, 分别加入 β-actin (1 : 8000)、α-SMA (1 : 500)、TGF-β1 (1 : 2000)、

E-cadherin (1 : 10 000) 和 Vimentin (1 : 5000) 抗体, 4℃ 过夜。孵育二抗, 室温 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 按说明书等体积配制化学发光试剂, 避光显影。Image J 分析各泳道蛋白灰度值, 然后用目的蛋白的灰度值与 β-actin 的比值进行统计。

结果显示 (见图 4 及表 6), 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β1 和 Vimentin 蛋白表达量明显升高 (P < 0.01), E-cadherin 蛋白表达量明显降低 (P < 0.01)。二十五味松石丸各剂量组大鼠肝组织中的相关蛋白均有不同程度的降低或升高, 与免疫组化结果相似。

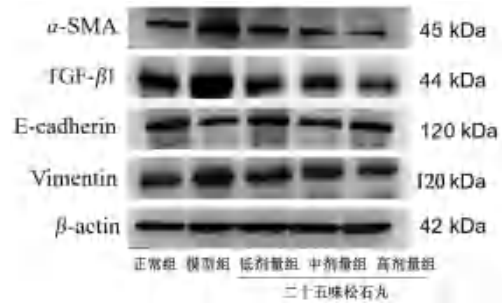


图 4 二十五味松石丸对大鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达比较

Fig 4 Effect of Ershiwuweishi Songshi pill on the expression of α-SMA, TGF-β1, E-cadherin and Vimentin in the liver tissue of rats in each group

表 6 二十五味松石丸对大鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β1、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Tab 6 Effect of Ershiwuweishi Songshi pill on the α-SMA, TGF-β1, E-cadherin, and Vimentin protein expression in the liver tissue of rats in each group (x̄ ± s, n = 3)

组别	α-SMA/β-actin	TGF-β1/β-actin	E-cadherin/β-actin	Vimentin/β-actin
正常组	0.44 ± 0.05	0.59 ± 0.07	0.81 ± 0.08	0.41 ± 0.08
模型组	1.23 ± 0.25**	1.34 ± 0.32**	0.31 ± 0.08**	1.02 ± 0.18**
二十五味松石丸低剂量组	0.67 ± 0.02###	0.58 ± 0.15###	0.64 ± 0.09###	0.70 ± 0.07
二十五味松石丸中剂量组	0.59 ± 0.13###	0.53 ± 0.10###	0.74 ± 0.06#	0.63 ± 0.06#
二十五味松石丸高剂量组	0.35 ± 0.07###	0.42 ± 0.09###	0.83 ± 0.08###	0.45 ± 0.06###

注: 与正常组相比, **P < 0.01; 与模型组相比, #P < 0.05, ###P < 0.01。

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

2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析, 所有统计数据均以 (x̄ ± s) 表示; 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 中 Tukey's test 进行多组间比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝损伤的共同病理阶段, 其病理特征是 ECM 的大量沉积。早期肝纤维化是可逆的, 但晚期肝纤维化导致的肝硬化是不可逆的, 因此, 防治肝纤维化对延缓慢性肝病进展具有重要意义^[15]。全球因慢性肝病死亡人数高达 200 万, 且随着现代生活节奏的加快呈现上升趋势^[16]。藏医药是我国民族医药文化宝库的重要组成部分, 理论体系完善, 在治疗慢性肝病方面具有独特的疗效。二十五味松石丸作为藏区治疗肝胆疾病的代表方剂之一, 能明显改善病毒性肝炎患者肝脾肿大和肝功能异常等症状^[7]。肝纤维化在藏医“隆、赤巴、培根”三因理论中属于“热性”肝病的范畴^[17], 二十五味松石丸方中涉及 5 种“药味”: 绿绒蒿、诃子、檀香等 11 种属于“涩”味药; 牛黄、鸭嘴花、伞形虎耳草等 7 种属于“苦”味药; 西红花、石灰华、五灵脂属于“甘”味药; 丁香、天竺黄、肉豆蔻属于“辛”味药; 余甘子属于“酸”味药^[18]。藏医经典著作《四部医典》中记载, “涩”“苦”“甘”味在临床上主要治

疗“赤巴”为主的热性病。此外, 二十五味松石丸配伍被认为是“西红花-牛黄”为代表的“清热药”, 具有清热解毒的功效, 符合藏医治疗肝病的基本原则^[12]。TNF-α 等炎症细胞因子水平影响慢性肝病的进展, 对肝纤维化患者病情的减轻具有诊断价值^[19]。本研究成功构建了肝纤维化大鼠模型并同时给予二十五味松石丸灌胃治疗, 结果发现, 与模型组相比, 二十五味松石丸组大鼠的肝脏病理学状态明显改善, 肝功能 (AST 和 ALT)、肝纤维化指标 (HA 和 LN) 和 TNF-α 水平明显降低。前期研究显示, 与复方鳖甲软肝片相比, 该方防治效果最佳, 与文献类似^[12], 但其发挥作用的机制尚不清楚, 因此本文重点采用 3 种不同剂量的药物进行研究。

有证据证明, CD31 与血管生成成正相关, 并在血管生物学中发挥多种作用^[20]。一般肝窦内皮细胞少量表达 CD31, 当肝脏受损发生肝纤维化时, 肝窦内皮细胞微环境改变, 发生“去分化”, 高表达血管内皮标志物 CD31 蛋白^[21]。以往研究表明, 内皮细胞介导的血管生成是肝纤维化一个关键特征, 因此, 抗血管生成治疗可能是治疗肝纤维化和门脉高压症的一种策略^[22]。本研究发现, 模型组肝纤维化大鼠肝组织高表达 CD31 蛋白, 而二十五味松石丸干预组 CD31 蛋白有不同程度的降低, 表明二十五味松石丸可能通过抑制肝窦内

皮细胞血管生成来发挥抗纤维化作用。

肝纤维化发病的中心环节是肝星状细胞的激活，以 α -SMA 大量表达为标志，肝星状细胞的激活可诱导 EMT 的发生。E-cadherin 是上皮细胞正常发挥功能的标志物，N-cadherin、Vimentin 等是间质细胞的重要特征^[23]。EMT 是上皮细胞（肝细胞等）失去功能向间质细胞转化的过程，具体表现为上皮细胞的标志物 E-cadherin 的丢失，高表达间质细胞标志物如：N-cadherin、Vimentin 等。此外，在众多细胞因子中，TGF- β 1 是肝纤维化中刺激肝星状细胞激活和诱导 EMT 发生的关键分子^[24-25]。研究表明，抑制 EMT 的发生可在一定程度上延缓肝纤维化、甚至肝硬化的进展^[26]。本研究发现，模型组大鼠肝组织中 TGF- β 1、 α -SMA、Vimentin 蛋白表达增多，而 E-cadherin 蛋白表达降低；而二十五味松石丸干预后 TGF- β 1、 α -SMA、Vimentin 蛋白表达降低，E-cadherin 蛋白表达升高，表明二十味松石丸可能通过影响 TGF- β 分子信号从而抑制 EMT 发生。

综上所述，二十五味松石丸能够有效改善四氯化碳-酒精诱导的大鼠肝纤维化，其机制可能与抑制肝窦内皮细胞血管生成和 EMT 有关。本研究可为该方在临床治疗肝纤维化方面提供新的理论依据。

参考文献

[1] Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 15 (3): 217-233.

[2] Brusilovskaya K, Königshofer P, Schwabl P, et al. Vascular targets for the treatment of portal hypertension [J]. *Semin Liver Dis*, 2019, 39 (4): 483-501.

[3] Zadorozhna M, Di Gioia S, Conese M, et al. Neovascularization is a key feature of liver fibrosis progression: anti-angiogenesis as an innovative way of liver fibrosis treatment [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47 (3): 2279-2288.

[4] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.

[5] Lee SJ, Kim KH, Park KK. Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: the molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition [J]. *World J Hepatol*, 2014, 6 (4): 207-216.

[6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 453.

[7] 多加. 藏药二十五味松石丸治疗 50 例病毒性肝炎的疗效观察 [J]. *中国疗养医学*, 2015, 24 (8): 860-861.

[8] 张长法, 潘雪飞, 邱蔚蔚, 等. 二十五味松石丸治疗肝硬化疗效分析 [J]. *安徽中医临床杂志*, 1999 (3): 147-148.

[9] 李彦希, 李晓朋, 顾健, 等. 基于 FXR 信号通路研究藏族药二十五味松石丸对胆汁淤积型肝损伤大鼠的保护作

用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (21): 5273-5279.

[10] 简程芳, 张博宇, 王存萍, 等. 藏族药二十五味松石丸调控肠道菌群改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (8): 2038-2048.

[11] 沙玉茹, 罗晓敏, 丁翼, 等. 基于 Keap1/Nrf2 与 TLR4/NF- κ B p65 信号通路研究藏族药二十五味松石丸改善对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (8): 2049-2055.

[12] 次仁巴珍. 二十五味松石丸的配伍分析及减方对大鼠慢性肝纤维化的防治作用研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2019.

[13] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 12-13.

[14] 李红, 肖建英, 高明涛, 等. 构建大鼠肝纤维化模型并观察大豆磷脂的保护作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008 (20): 3914-3917.

[15] Yoon YJ, Friedman SL, Lee YA. Antifibrotic therapies: where are we now? [J]. *Semin Liver Dis*, 2016, 36 (1): 87-98.

[16] Moon AM, Singal AG, Tapper EB. Contemporary epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18 (12): 2650-2666.

[17] 刘媛媛, 陈蔚, 马腾飞, 等. 藏医学“胆腑”理论及其在胆囊炎诊疗中的指导价值 [J]. *世界中医药*, 2022, 17 (10): 1465-1469.

[18] 次仁巴珍, 顾健, 史志龙. 探讨藏药二十五味松石丸的配伍特点及其治疗肝病的核心组合成分 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20 (10): 1840-1845.

[19] 朱晓文, 孙瑜, 戴新征, 等. 细胞因子水平对药物性肝损伤患者肝功能恢复的预测价值 [J]. *江苏医药*, 2021, 47: 1235-1237, 1241.

[20] Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23 (3): 253-259.

[21] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2017, 66 (1): 212-227.

[22] Kantari-Mimoun C, Castells M, Klose R, et al. Resolution of liver fibrosis requires myeloid cell-driven sinusoidal angiogenesis [J]. *Hepatology*, 2015, 61 (6): 2042-2055.

[23] Yu K, Li Q, Shi G, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2018, 24 (1): 5-11.

[24] Sakai K, Jawaid S, Sasaki T, et al. Transforming growth factor- β -independent role of connective tissue growth factor in the development of liver fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184 (10): 2611-2617.

[25] Shrestha N, Chand L, Han MK, et al. Glutamine inhibits CCl₄ induced liver fibrosis in mice and TGF- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 93: 129-137.

[26] Kong D, Zhang Z, Chen L, et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101600.

(收稿日期: 2023-01-02; 修回日期: 2023-02-20)

网络药理学整合巨噬细胞差异基因揭示双氢杨梅树皮素改善急性肺损伤的作用机制及实验验证

唐木兰, 曾春晖, 黄鑫波, 王溢, 朱海滨, 杨柯* (广西中医药大学, 南宁 530000)

摘要: **目的** 基于网络药理学和巨噬细胞差异表达基因探讨双氢杨梅树皮素改善急性肺损伤的作用机制及实验验证。**方法** 应用 Cytoscape 软件, 通过 PharmMapper 服务器、GeneCards 和 OMIM 数据库构建“化合物-靶点-通路”网络; 利用 STRING 数据库构建靶点蛋白互作网络, 推测核心靶点; 使用 Metascape 数据库对核心靶点进行 GO、KEGG 富集分析。下载巨噬细胞芯片数据, 利用 GEO2R 分析芯片数据的差异表达基因, DAVID 平台进行差异基因 KEGG 通路富集。采用流式细胞术检测 M1 型和 M2 型巨噬细胞标志物 F4/80、CD11b、CD86 和 CD206 的表达; 采用 Western blot 法检测肺组织中 PI3K 和 Akt 蛋白表达量。**结果** 筛选出 102 个双氢杨梅树皮素抗急性肺损伤的潜在靶点, 主要富集在 PI3K/Akt 信号通路、JAK/STAT 信号通路、雌激素信号通路等; 分子对接结果显示双氢杨梅树皮素与 MMP9 和 IGF1 具有较好的结合活性。差异表达基因富集到 PI3K-Akt、细胞因子-细胞因子-受体相互作用、趋化因子等炎症相关信号通路。流式细胞术实验证明, 双氢杨梅树皮素能明显增加 M2 型巨噬细胞极化和降低 M1/M2 的比例, 且明显降低肺组织中 PI3K 和 Akt 蛋白表达量。**结论** 通过网络药理学和动物实验证实双氢杨梅树皮素通过 PI3K/Akt 信号通路调节巨噬细胞极化改善急性肺损伤, 为进一步阐明双氢杨梅树皮素改善 ALI/ARDS 的机制提供理论依据。

关键词: 双氢杨梅树皮素; 急性肺损伤; 网络药理学; 巨噬细胞极化

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1164-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.008

Network pharmacology integrates the differential genes of macrophages to explain the mechanism of ampelopsin alleviating acute lung injury and experimental verification

TANG Mu-lan, ZENG Chun-hui, HUANG Xin-bo, WANG Yi, ZHU Hai-bin, YANG Ke* (*Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000*)

Abstract: Objective To determine the mechanism of ampelopsin in the treatment of acute lung injury based on network pharmacology and differentially expressed genes of macrophages, and verify by experiments. **Methods** Cytoscape software was used to construct an compound-target-pathway network through PharmMapper, GeneCards and OMIM databases. The protein interaction network was established with the STRING database, and the core targets were speculated. GO and KEGG enrichment analysis were conducted on the targets with Metascape database. The macrophage chip data were downloaded, and the differential genes were obtained by GEO2R. KEGG signaling pathway analysis of differential genes were performed by DAVID platform. The expression of M1-polarized and M2-polarized macrophage F4/80, CD11b, CD86 and CD206 were detected by flow cytometry. PI3K and Akt protein expression in the lung were detected by Western blot. **Results** Ampelopsin

基金项目: 广西中医药大学 2021 年校级硕士研究生科研创新项目 (No.YCXJ2021014); 广西自然科学基金项目 (No.2020GXNSFDA 238028); 国家中医药管理局“中药炮制传承技术传承基地”资质项目 (桂中医药发〔2020〕9 号); 广西中医药大学 2020 年校级硕士研究生科研创新项目 (No.YCSZ2020009); 广西教育厅广西研究生教育创新计划资助项目 (No.JGY2014086)。

作者简介: 唐木兰, 女, 在读硕士研究生, 主要从事抗炎免疫药理研究, email: tcandy0709@163.com *通信作者: 杨柯, 男, 教授, 主要从事抗炎免疫药理研究, email: kyang_11@126.com

had 102 targets intersection with acute lung injury, which were mainly enriched in PI3K/Akt, JAK/STAT, and Estrogen signaling pathway. Molecular docking showed that ampelopsin had good binding activity with MMP9 and IGF1. Differentially expressed genes were enriched in PI3K-Akt, cytokine-cytokine receptor interaction and chemokine signaling pathway. Flow cytometry showed that ampelopsin significantly increased the percentage of M2-polarized, reduced the proportion of M1/M2 and the expression of PI3K and Akt in lung. **Conclusion** Network pharmacology and animal experiments confirm that ampelopsin may alleviate ALI/ARDS by regulating macrophage polarization through PI3K/Akt pathway, which provides a theoretical basis to elucidate the mechanism of ampelopsin for ALI/ARDS.

Key words: ampelopsin; acute lung injury; network pharmacology; macrophage polarization

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指继发于非心源性呼吸窘迫的低氧血症 - 原发性肺水肿。ALI 随着病情进一步发展为更严重的急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 病死率高达 30% ~ 50%^[1-2]。巨噬细胞在炎症发生过程和免疫系统激活起到关键作用, 其具有可塑性和功能多样性, 可以极化为 M1 或 M2 亚型。M1 型巨噬细胞与促炎有关, 而 M2 型巨噬细胞则与抗炎、伤口愈合及纤维化作用相关^[3-4]。已有研究证实, 在 ALI/ARDS 急性渗出期 M1 型巨噬细胞的数量明显增加, 因此巨噬细胞可被作为治疗 ALI/ARDS 的靶细胞。

藤茶 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W.T.Wang] 系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄的嫩茎叶, 含有丰富的黄酮类化合物, 以双氢杨梅树皮素为主^[5]。课题组前期实验已证明藤茶能显著增加小鼠胸腺、脾脏等免疫器官的重量^[6-7], 具有增强非特异性免疫功能和体液免疫功能的作用; 前期研究也表明双氢杨梅树皮素具有抵抗博来霉素诱导的小鼠肺纤维化作用, 改善呼吸功能衰退的症状^[8]。本文构建“化合物-靶点-通路”网络, 提示双氢杨梅树皮素可通过 PI3K-Akt 信号通路改善 ALI, 且进行巨噬细胞极化差异基因 KEGG 通路富集分析发现, 巨噬细胞的极化也与 PI3K/Akt 信号通路密切相关, 因此后续实验选取 PI3K/Akt 信号通路的主要蛋白进行验证。网络药理学结合体外实验考察双氢杨梅树皮素对 ALI 小鼠肺部调节巨噬细胞极化的功能及蛋白表达进行测定, 为后续探讨双氢杨梅树皮素调节巨噬细胞极化改善 ALI/ARDS 的机制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂

双氢杨梅树皮素 [广西中医药大学中药化学实验室提供, 从藤茶 (*Ampelopsis grossedentata* (Hand-

Mass) W.T.Wang) 的茎叶中分离、纯化得到, 为白色粉末状, 纯度 $\geq 98\%$]。醋酸地塞米松 (批号: 2201222, 安徽金太阳生化药业有限公司); 脂多糖 (LPS, 批号: 12101031, 北京索莱宝科技有限公司); 流式抗体 PE-F4/80、FITC-CD11b、CD86-APC、PE-Cy7-CD206 (批号分别为 12-4801-82、11-0112-82、17-0862-82、25-2061-82, 美国赛默飞世尔科技公司); PI3K 抗体、Akt 抗体 (批号分别为 2893S、4691S, Cell Signaling Technology), β -Actin 抗体 (批号: 00078629, Proteintech); 10%SDS-PAGE 凝胶配制盒 (批号: 02581100, 上海雅酶生物科技有限公司)。BD LSRFortessa 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

1.2 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 36 只, 雌雄各半, 体质量 (20 \pm 2) g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004; 动物使用许可证号: SYXK (桂) 2019-0001]。

1.3 数据库

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>), Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>), 微生信 (<https://www.bioinformatics.com.cn/login/>) 在线作图平台, GEO 数据库 (<https://gene-expression-omnibus>), DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

应用 PharmMapper、GeneCards 和 OMIM 数据库检索双氢杨梅树皮素的预测靶点和 ALI/ARDS 相

关疾病靶点，两者取交集，上传至 STRING 数据库，根据 Degree ≥ 16 、Closeness Centrality ≥ 0.524 、Betweenness Centrality ≥ 0.002 筛选靶点并导入 Cytoscape 3.7.1 构建蛋白互作 (PPI) 网络，获得 41

个潜在核心靶点。利用 Metascape 数据库对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析，主要通路包括 PI3K-Akt、雌激素信号通路、内分泌抵抗，并运用 Cytoscape 软件构建“化合物-靶点-通路”网络图，结果见图 1。

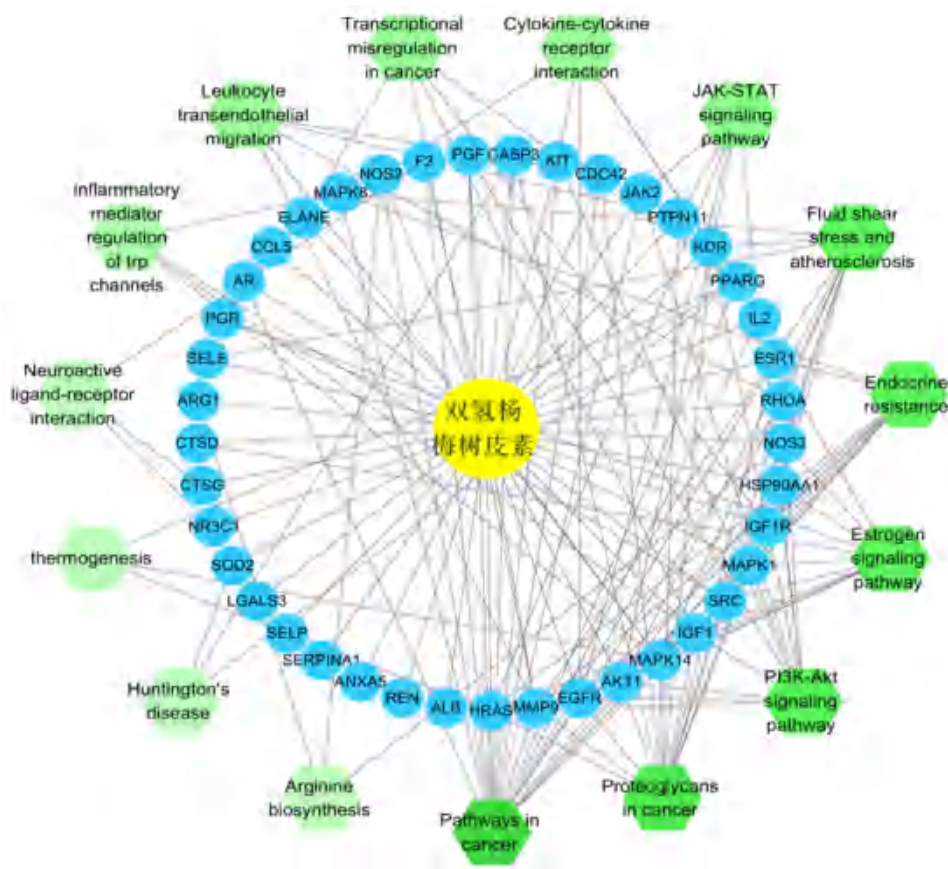


图 1 “化合物-靶点-通路”网络图

Fig 1 “Compound-target-pathway” network

根据筛选出的 6 个核心靶点与双氢杨梅树皮素进行对接。在 PubChem 数据库中获得“ampelopsin”的化学结构 (PubChem CID: 25184515)，利用 AutoDock 软件进行分子对接计算， ΔG 值越小表示结合能越高，越容易与受体结合，对接结果见表 1，与双氢杨梅树皮素对接的相互作用见图 2。其中 MMP9、IGF1 与双氢杨梅树皮素的结合能力较强，结合能分别为 $-7.77 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $-7.27 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

表 1 双氢杨梅树皮素与关键靶点的分子对接结果

Tab 1 Molecular docking of ampelopsin with key target

靶点	度值	PDB ID	结合能 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
ALB	75	4K2C	-3.82
AKT1	61	1UNQ	-5.48
MMP9	57	6ESM	-7.77
MAPK1	56	6SLG	-5.16
EGFR	56	6ICG	-4.65
IGF1	54	1WQJ	-7.27

2.2 巨噬细胞差异基因筛选及 KEGG 通路分析

从 GEO 数据库中获得 GSE95405 基因芯片数据集。此数据为 GPL570 平台 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 基因芯片，选取经干扰素 γ (INF- γ) 和 LPS 诱导巨噬细胞 M1 型极化的 3 例样本，白细胞介素 -4 (IL-4) 诱导巨噬细胞 M2 型极化的 3 例样本，共获得 3980 个差异基因。其中 1682 个基因在 M1 型巨噬细胞中表达上调，在 M2 型巨噬细胞中表达下调；2298 个基因在 M1 型巨噬细胞中表达下调，在 M2 型巨噬细胞中表达上调。利用 GEO2R 分析芯片数据的差异表达基因，过滤条件为 $P < 0.001$ 及差异倍数 $|\log_{2}FC| > 2$ 。利用 DAVID 数据库将筛选的差异基因导入 DAVID 在线数据库进行 KEGG 通路富集分析，按照 P 值排序，主要包括 PI3K-Akt、细胞因子-细胞因子-受体相互作用等信号通路，选取前 20 条信号通路可视化，富集通路结果见图 3。

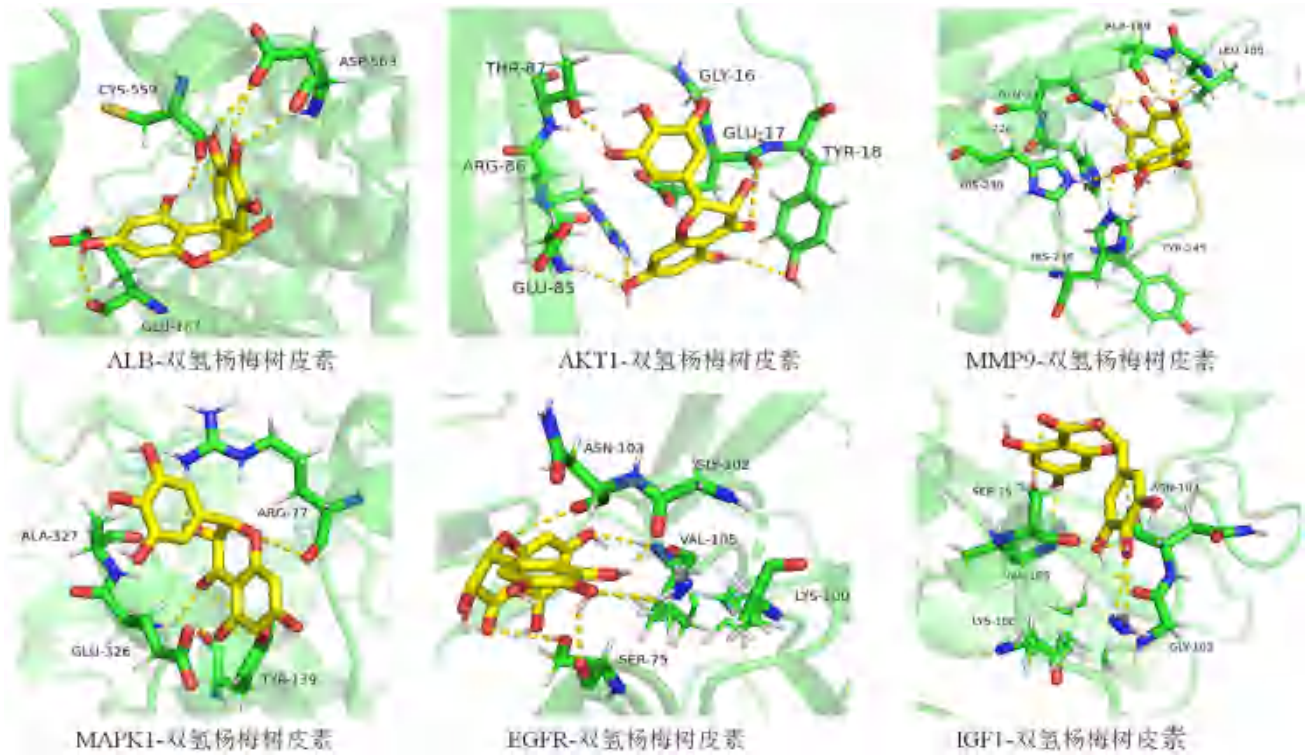


图 2 蛋白与双氢杨梅树皮素对接的相互作用示意图

Fig 2 Interaction between protein and ampelopsin

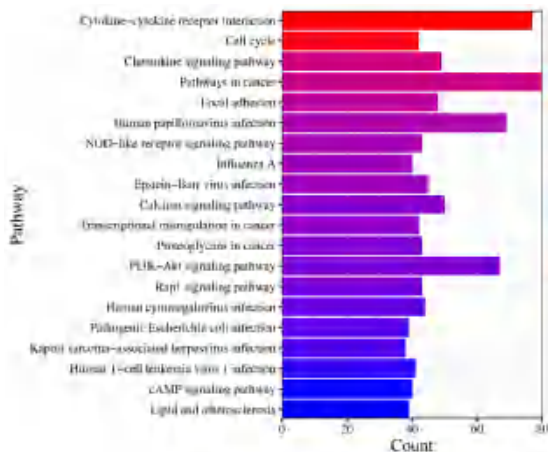


图 3 差异基因 KEGG 通路富集分析

Fig 3 KEGG pathway enrichment analysis of differential gene

2.3 动物实验

2.3.1 动物分组与给药方法 将 36 只 SPF 级 KM 小鼠随机分为 6 组：正常对照组，模型组，地塞米松组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)，双氢杨梅树皮素高、中、低 (400 、 200 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组，每组 6 只。正常对照组小鼠气管内滴注等体积生理盐水，其余各组小鼠气管内滴注 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 LPS 建立 ALI 小鼠模型，双氢杨梅树皮素各剂量组和地塞米松组灌胃相应剂量的药物，正常对照组和模型组灌胃等体积生理盐水，连续 3 d。

2.3.2 肺泡灌洗液的收集与巨噬细胞亚型的检

测 肺泡灌洗液用 1 mL 注射器向气管内缓慢注入 0.5 mL 预冷的生理盐水灌洗小鼠肺组织，慢慢回抽灌洗液，反复灌 3 次，每遍冲洗 3 次，回收肺泡灌洗液 (BALF)。BALF 4°C 、 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，收集细胞沉淀。向细胞悬液中加入 1 mL 的红细胞裂解液，颠倒混匀放置 15 min，期间轻轻混匀 2 次，红细胞裂解后，溶液为清亮透明液体； 4°C 、 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，小心倒去上清液，获取细胞沉淀，PBS 重悬细胞；每管加入 FITC-CD11b、PE-F4/80、CD86-APC 和 PE-Cy7-CD206 抗体。冰上避光孵育 30 min，孵育完成后，每支流式管加入 1 mL PBS 洗涤细胞； 4°C 、 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，洗去未结合或者非特异性结合的流式抗体，重复 2 次；加入 1 mL PBS 重悬细胞，过滤到流式管中，得到流式抗体染色后的小鼠 BALF 单细胞悬液，上机检测。

2.3.3 双氢杨梅树皮素诱导肺巨噬细胞向 M2 型极化 流式细胞术检测小鼠 BALF 中巨噬细胞标志物 F4/80 和 CD11b、M1 型标志物 CD86 以及 M2 型标志物 CD206。如图 4 和表 2 显示，与正常对照组相比，模型组中表达 $\text{F4/80}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD86}^+$ 的 M1 型巨噬细胞数量显著增加 ($P < 0.001$)，而 $\text{F4/80}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD206}^+$ 的 M2 型巨噬细胞数量显著减少 ($P < 0.001$)；双氢杨梅树皮素干预后

F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺的M2型巨噬细胞数量显著增加 ($P < 0.01$), 且M1/M2的比例也明显降低 ($P < 0.01$)。由此可见, 双氢杨梅树皮素可促进肺巨噬细胞向M2型极化。

表 2 双氢杨梅树皮素对小鼠 BALF 中巨噬细胞极化的影响
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 2 Effect of ampelopsin on macrophage polarization in BALF
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	M1	M2	M1/M2
正常对照组	0.19±0.11	69.75±9.78	0.29±0.20
模型组	0.68±0.16 ^{###}	1.14±0.53 ^{###}	69.73±26.33 ^{###}
地塞米松组	0.46±0.12 [*]	24.48±9.39 ^{***}	2.25±1.23 ^{***}
双氢杨梅树皮素高剂量组	0.76±0.13	4.17±1.64 ^{***}	22.65±10.40 ^{***}
双氢杨梅树皮素中剂量组	0.81±0.21	3.73±1.95 ^{**}	29.91±21.19 ^{***}
双氢杨梅树皮素低剂量组	0.89±0.24 [*]	3.46±1.70 ^{***}	33.35±20.60 ^{**}

注: 与正常对照组比较, ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal control group, ^{###} $P < 0.001$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

2.3.4 双氢杨梅树皮素降低小鼠肺组织 PI3K、Akt 蛋白的表达 取小鼠肺组织以 1 : 1 比例 (1 g 组织 : 1 mL 裂解液) 使用匀浆机进行研磨, 4 °C、15 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。采用 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备 10% 的 PAGE 胶, 上样, 电泳, PVDF 转膜, 快速封闭液封闭 40 min 后加一抗, 其中内参 β -Actin 为 1 : 5000, PI3K/Akt 抗体为 1 : 1000, 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 1 : 5000, 常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光液显影, 利用 Image Lab 软件进行灰度值统计得到结果。与正常对照组相比, 模型组 PI3K、Akt 蛋白表达量明显增加; 与模型组相比, 双氢杨梅树皮素高剂量组 PI3K 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$), 双氢杨梅树皮素各剂量组 Akt 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), 结果见图 5。

2.4 数据处理

本研究数据分析和作图采用软件为 SPSS 20 和

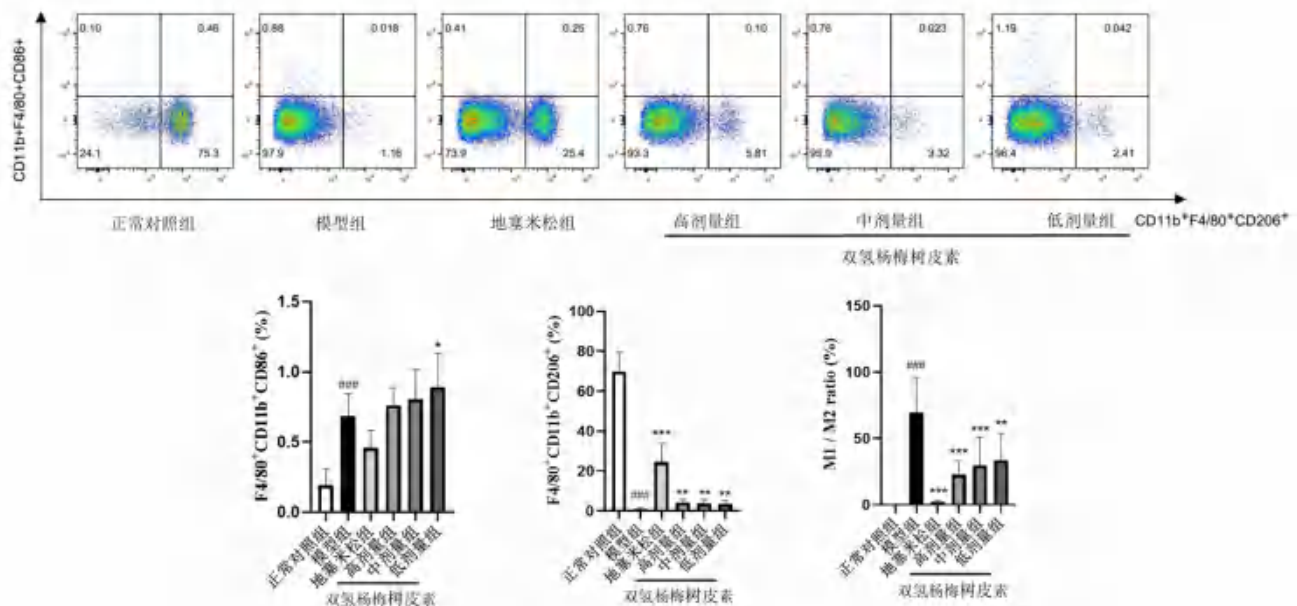


图 4 双氢杨梅树皮素对小鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞极化的影响

Fig 4 Effect of ampelopsin on macrophage polarization in BALF

注: 与正常对照组比较, ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal control group, ^{###} $P < 0.001$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ 。

GraphPadPrism8.0, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异使用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 讨论

本研究通过网络药理学发现 AKT1、ALB 等为双氢杨梅树皮素改善 ALI/ARDS 的关键靶点, AKT1 是肺内皮细胞中 AKT 的主要亚型, 对内皮细胞迁移和血管渗漏预防具有重要作用, 敲除 AKT1 会降低层黏连蛋白和基底膜厚度, 造成血

管通透性增加, 从而加重肺损伤^[9-10]。KEGG 通路分析表明, 双氢杨梅树皮素改善 ALI/ARDS 与 PI3K/Akt、雌激素等信号通路相关, 其中 PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一, 调控细胞分化、增殖和凋亡等功能, 通过激活 μ 阿片类受体 (MOR) 抑制 PI3K/Akt 信号通路可以改善 LPS 造成的 ALI/ARDS^[11]。黄芩苷通过降低 PI3K/Akt 信号通路的活化水平可以诱导巨噬细胞向 M2 型极化和抑制 M1 型极化^[12]。另外, 相

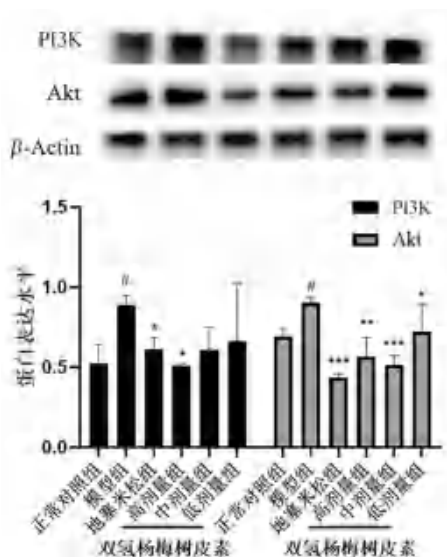


图 5 双氢杨梅树皮素对小鼠肺组织 PI3K、Akt 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 5 Effect of ampelopsin on the expression level of PI3K and Akt in the lung ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与正常对照组比较， $^{\#}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ， $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal control group, $^{\#}P < 0.05$; compared with the model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

关研究发现，雌激素能显著促进巨噬细胞向 M2 型极化^[13-14]，与本研究通路分析结果一致，雌激素信号通路作为调节 M2 型极化的重要通路之一。课题组前期研究发现，双氢杨梅树皮素能抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路，降低肺泡内 IL-6 和 IL-1 β 等促炎细胞因子的释放，同时降低单核-巨噬细胞的比例改善 ALI。流式细胞术实验结果显示，双氢杨梅树皮素能明显增加 M2 型巨噬细胞极化和降低 M1/M2 的比例，Western blot 结果表明模型组小鼠肺组织中 PI3K 和 Akt 蛋白表达量明显增加，给予双氢杨梅树皮素干预后，各给药组 PI3K 和 Akt 蛋白表达量显著降低，证实双氢杨梅树皮素具有调节巨噬细胞极化改善 ALI/ARDS 的潜在治疗作用，且作用机制可能是与调节 PI3K/Akt 信号通路有关。

综上，本研究借助多种生物信息学手段，将双氢杨梅树皮素进行靶点预测、通路分析，联合 ALI 中免疫细胞-巨噬细胞极化差异表达基因，通过流式细胞术检测 M1/M2 型巨噬细胞及肺组织中 PI3K 和 Akt 的蛋白表达量验证网络药理学预测结果。双氢杨梅树皮素通过降低 PI3K 和 Akt 的蛋白表达量调节巨噬细胞极化从而改善 ALI。本课题组后续将进一步深入研究双氢杨梅树皮素调控

巨噬细胞极化的作用机制，以期为指导通过药物调控巨噬细胞向有利于遏制疾病的方向极化，为疾病的治疗提供新的方法。

参考文献

- [1] Bellni G, Laffey J, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 788-800.
- [2] Williams GW, Berg NK, Reskallah A, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. Anesthesiology, 2021, 134 (2): 270-282.
- [3] Impellizzeri D, Giuseppe G, Esposito E, et al. Emerging drugs for acute lung [J]. Expert Opin Emerging Drugs, 2014, 20 (1): 1-15.
- [4] Brower RG, Matthay MA, Morris A, et al. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. NEJM, 2020, 342 (18): 1301-1308.
- [5] 覃洁萍, 谭建宁, 欧莹, 等. 广西瑶族藤茶中双氢杨梅树皮素的含量测定方法研究 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13 (10): 915-917.
- [6] 周月婵, 胡怡秀, 臧雪冰, 等. 藤茶安全性毒理学评价及其免疫调节作用实验研究 [J]. 实用预防医学, 2001, 8 (6): 412-414.
- [7] 曾春晖, 杨柯, 王燕. 广西藤茶提取物 APS 对免疫功能的影响 [J]. 中成药, 2007, 29 (9): 976-978.
- [8] 黄海涛, 方静, 曾春晖, 等. 双氢杨梅树皮素对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2020, 19 (3): 270-275.
- [9] Artham S, Gao F, Verma A, et al. Endothelial stromelysin1 regulation by the forkhead box-O transcription factors is crucial in the exudative phase of acute lung injury [J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 249-263.
- [10] Juhua C, Azorenova OR, Razorenova O, et al. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo [J]. Nat Med, 2005, 11 (11): 1188-1196.
- [11] Ji S, Wang L. μ -opioid receptor signalling via PI3K/Akt pathway ameliorates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome [J]. Exp Physiol, 2019, 104 (10): 1555-1561.
- [12] 鲁小红. 黄芩苷调节 PI3K/AKT 通路对 LPS 诱导大鼠流产子宫巨噬细胞的影响 [J]. 东南大学学报 (医学版), 2021, 40 (5): 683-689.
- [13] 陈琦, 张或涵, 张伟薇, 等. 梓醇通过调节雌激素受体抑制巨噬细胞极化和预防绝经后动脉粥样硬化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35 (10): 721-723, 782.
- [14] 卓灵剑, 王烁辰, 刘星, 等. 雌二醇通过上调 IRE1 α -XBP1 信号轴抑制小鼠腹腔巨噬细胞的分化 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42 (3): 432-437.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-03-08)

基于网络药理学和体外实验验证大蒜含硫化合物蒜氨酸抑制慢性气道炎症的作用机制研究

王秋雨¹, 李新霞¹, 兰怡³, 毛新民^{4, 5*}, 马红梅^{2, 5*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学中医学学院, 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830011; 4. 新疆地区高发疾病研究教育部重点实验室, 乌鲁木齐 830011; 5. 新疆维吾尔自治区中西医结合重点学科, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子对接模拟和体外细胞实验探讨蒜氨酸治疗慢性气道炎症的相关作用机制。**方法** 运用数据库整理分析蒜氨酸与疾病共同靶点, 进行 KEGG 通路富集分析, 构建可视化药物-靶点-通路-疾病网络图。利用分子对接技术模拟获得相关通路蛋白与蒜氨酸结合能。通过 MTT 实验检测蒜氨酸对 16HBE 细胞活性的影响, 并利用流式细胞术观察蒜氨酸对细胞氧化应激的保护作用, 采用 ELISA 法检测蒜氨酸对细胞上清液中 IL-6、TNF- α 表达的影响、Western blot 法检测各组中 IL-6、TGF- β 1、PPAR α 蛋白表达水平。**结果** 蒜氨酸与疾病关键潜在靶点有 EGFR、MMP9、AKT1、MAPK1、PPAR α 等, KEGG 通路富集分析得到主要信号通路有 MAPK 信号通路和 PPAR 信号通路等, 分子对接实验中蒜氨酸与 MMP9、AKT1、STAT、PPAR α 结合能稳定, 小于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。体外细胞实验结果表明蒜氨酸对细胞无明显毒性作用, 结果显示蒜氨酸可以明显降低炎症状态下细胞内过多的活性氧水平, 上调 PPAR α 表达, 并显著下调炎症因子 IL-6、TNF- α 与 TGF- β 1 的表达。**结论** 蒜氨酸能改善因香烟烟雾与脂多糖刺激下 16HBE 细胞的氧化应激和炎症反应, 可能通过调控 PPAR α 信号通路改善细胞炎症损伤状态, 从而恢复细胞内正常的抗氧化、炎症反应。

关键词: 16HBE 细胞; 网络药理学; 分子对接; 活性氧; 炎症因子; 蒜氨酸

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1170-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.009

Mechanism of action about garlic sulfur-containing compound alliin in inhibiting chronic airway inflammation based on network pharmacology and in vitro experiments

WANG Qiu-yu¹, LI Xin-xia¹, LAN Yi³, MAO Xin-min^{4, 5*}, MA Hong-mei^{2, 5*} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 3. Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 4. Key Laboratory of High Incidence Diseases in Xinjiang, Ministry of Education, Urumqi 830011; 5. Key Discipline of Integrated Traditional and Western Medicine in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the mechanism of action of alliin for chronic airway inflammation by network pharmacology, molecular docking and in vitro cell experiments. **Methods** The common targets of alliin and disease were analyzed by database collection, and the enrichment analysis of KEGG pathway was conducted to construct the visual drug-target-pathway-disease network diagram. The binding energy of related pathway proteins and alliin was obtained by molecular docking technique. MTT was used to

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (No.2020D01C162); 2020 年新疆维吾尔自治区研究生创新项目 (No. XJ2020G176); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03007-2)。

作者简介: 王秋雨, 女, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物药理与新药研发, email: 853049774@qq.com ***通信作者:** 毛新民, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事糖尿病药理与新药研发, email: mxm3277@139.com; 马红梅, 女, 副教授, 主要从事中药药理学研究, email: 411967924@qq.com

detect the effect of alliin on the activity of 16HBE cells, flow cytometry was used to detect the effect of alliin on cell oxidative stress, ELISA was used to detect the effect of alliin on IL-6 and TNF- α expression in the cell supernatant, and Western blot was used to detect the expression levels of IL-6, TGF- β 1 and PPAR α proteins in each group. **Results** Alliin and the key potential targets of disease included EGFR, MMP9, AKT1, MAPK1, and PPAR α , etc. The enrichment analysis of KEGG pathway shows that the main signaling pathways included MAPK signaling pathway and PPAR signaling pathway, etc. The binding energy of alliin and MMP9, AKT1, STAT, and PPAR α was stable in the molecular docking, less than $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. The in vitro cellular assays showed that alliin had no significant toxic effect on cells. Alliin significantly reduced the level of excessive intracellular reactive oxygen species (ROS) in inflammatory states, upregulated PPAR α expression, and significantly downregulated the expression of inflammatory factors IL-6, TNF- α and TGF- β 1. **Conclusion** Alliin may ameliorate the oxidative stress and inflammatory responses in 16HBE cells stimulated by cigarette smoke and lipopolysaccharide, and may improve the state of cellular inflammatory damage by modulating the PPAR α signaling pathway, thereby restoring the normal intracellular antioxidant, and inflammatory responses.

Key words: 16HBE cell; network pharmacology; molecular docking; reactive oxygen; inflammatory factor; alliin

气道炎症是许多慢性呼吸道疾病的特征, 包括常见的肺部疾病, 如哮喘和慢性阻塞性肺疾病 (COPD) [1] 等。空气污染和其他环境吸入性危害物的增加是导致慢性肺部炎症和呼吸道疾病发展的重要原因 [2]。气道上皮细胞作为呼吸系统与外界接触的第一道天然屏障, 通过释放炎症介质参与肺部慢性炎症和呼吸道疾病的发生发展 [3]。目前临床上采用吸入皮质类固醇药物的联合用药进行治疗, 但患者对药物效应产生的个体间差异很大, 仍然迫切需要改进慢性呼吸道疾病的抗感染治疗方法 [4]。近年对于天然药物抗炎作用的深入研究, 探索具有抗炎活性的天然产物来改善或治愈炎症已成为当前研究的热点之一, 有必要进一步研究调控气道炎症的分子机制, 并寻找、开发有效的治疗和预防慢性气道炎症的潜在抗炎天然药物。

大蒜 (Garlic) 是百合科葱属植物大蒜 (*Allium Sativum* L.) 的地下鳞茎, 有天然抗生素之称, 是药食同源的植物 [5]。大量现代医学研究表明, 大蒜具有抗炎、抗氧化、调血脂、降血压、抗菌等多种药理作用, 这多归因于其中的有机硫化物等活性成分 [6]。本课题组前期研究发现, 大蒜中主要的物质有硫化物和多聚果糖, 其中特征性含硫化物为蒜氨酸 (alliin) [S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷 (S-allyl-L-cysteinesulfoxide)] [7-8]。蒜氨酸性质稳定, 目前关于蒜氨酸的药效研究也显示其具有天然抗氧化特性 [9] 和抗炎特性 [10]。大量研究证明了炎症与慢性气道炎症之间的密切关系, 但关于蒜氨酸对肺部慢性气道炎症方面的作用和机制尚未阐明, 为明确大蒜含硫化物蒜氨酸的抗炎机制, 本实验利用

网络药理学方法、分子对接技术与体外细胞实验对蒜氨酸的抗炎机制进行初步探索与验证, 以期为大蒜含硫化物蒜氨酸在肺部慢性气道炎症的临床抗炎药物开发和研究中提供理论实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人支气管上皮细胞株 (16HBE), 购于武汉细胞库, 已经过支原体 PCR 检测。

1.2 试剂

蒜氨酸 (纯度: 98%, 新疆埃乐欣药业有限公司); 雪莲过滤嘴香烟 (新疆卷烟厂); MEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 硫化钠水合物 (NaSH)、脂多糖 (LPS) (美国 Sigma 公司); IL-6 检测试剂盒 (YX-091206H, 上海优选生物科技有限公司); TNF- α 检测试剂盒 (JL10208, 上海江莱生物科技有限公司); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (CA1410, Solarbio 生物科技有限公司); TGF- β 1 (bs-0086R) 抗体、IL-6 (bs-0782R) 抗体、山羊抗鼠二抗 (bs-40296G-HRP)、山羊抗兔二抗 (bs-40295G-HRP) (北京 Bioss 生物技术有限公司); PPAR α (66826-1-Ig)、内参 β -Actin Rabbit (20536-1-AP) (Proteintech 中国公司)。

1.3 仪器

MultiskanGo 酶标仪、PowerPac HC 电泳仪、BIO-RAD 蛋白显色仪 (含 ChemiDOC MP 全自动成像系统) (美国 Bio-Rad 公司); SW-CJ-2F 超净工作台 (美国 Airtech 公司); 371 型直热式 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific); 5424R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); IX73 荧光

倒置显微镜(日本 Olympus 公司); FACS Aria II Cell Sorter 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学预测

2.1.1 蒜氨酸-慢性气道炎症靶点筛选及网络构建 利用 PharmMapper 数据库以“钓靶”方式进行蒜氨酸靶点获取,通过 TCMSp、GeneCards 等数据库收集蒜氨酸靶点,得到 313 个靶点。通过 DisGeNET、OMIM、TTD 数据库检索疾病“Chronic airway inflammation”,获取靶点 1926 个。整理得到蒜氨酸-慢性气道炎症共同靶点 110 个,将其导入 String 平台,设置“Organism”选项选择“Homo Sapiens”进行分析,利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络拓扑分析,前 20 个关键靶点有 SRC、EGFR、MMP9、AKT1、PPAR α 、MAPK1、STAT1 和

CASP3 等,对蒜氨酸-慢性气道炎症共同靶点进行 KEGG 通路富集。利用 Cytoscape 3.9.1 软件绘制“药物-靶点-通路-疾病”网络图,结果见图 1。

2.1.2 “蒜氨酸-靶点”分子对接 将蒜氨酸与网络药理学预测的关键靶点 MMP9、AKT1、STAT、PPAR α 进行分子对接。利用 PubChem 数据库获得蒜氨酸“3D.mol2”结构,通过 RCSB PDB 数据库下载核心靶蛋白 3D 结构。通过 AutoDock Vina 程序进行蒜氨酸-关键蛋白分子对接,分析蒜氨酸与靶点的结合活性,结果见表 1。药物分子与蛋白的结合自由能(Affinity)越小,预测两者结合越紧密牢固^[11],4 个关键靶点蛋白与蒜氨酸对接结合分数小于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明与蒜氨酸有较好的结合活性。使用 PyMol 软件对结果进行可视化分析,结果见图 2。

表 1 蒜氨酸与相关靶点对接结果
Tab 1 Alliin docking with relevant targets

成分	Mol ID	结合能 / ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)			
		AKT1	MMP9	PPAR α	STAT
蒜氨酸	MOL007601	-21.76	-24.69	-21.34	-23.01

2.2 体外细胞实验

2.2.1 细胞培养与传代 液氮冻存的 16HBE 细胞 37°C 水浴复苏后,在超净工作台将细胞接种于 25 cm^2 无菌培养瓶中,使用 10% 标准胎牛血清(FBS),含 1% 青霉素-链霉素溶液的 MEM 培养液,于 37°C 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养,待细胞生长至 80%~90% 后进行传代^[12],取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2.2 香烟烟雾(CSE)的制备^[13] 在两个串联的大包氏管内各加入 5 mL 不含血清的空白 MEM 培养基,在串联管的一端连接去掉滤嘴的香烟,另一端连接 50 mL 的注射器。点燃香烟后,模拟标准化人体吸烟模式,使用注射器以 50 mL/10 s 的速度抽吸,使烟雾溶于培养基,形成气溶胶。每次 1 支香烟,每支香烟用注射器抽吸 10 次,收集培养基,调节 pH 值为 7.4,使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤除菌,即得到 100% 的 CSE 原液,封装后于 -80°C 冰箱保存备用。实验开始前进行快速解冻,30 min 内用于实验,依据实验分组,用 10% FBS-MEM 培养基将 CSE 原液分别稀释成实验所需浓度。

2.2.3 MTT 检测细胞活力

① 蒜氨酸对 16HBE 细胞的毒性检测:将 16HBE 细胞接种至 96 孔细胞板上,设置空白组,正常对照组,蒜氨酸药物组(100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),于培养箱中干预 24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液,继续孵育 4 h

后,弃去细胞上清液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶液,震荡至结晶溶解,使用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度(A)值,筛选最适给药浓度。结果见图 3,发现当采用浓度为 100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒜氨酸干预细胞后,各组细胞存活率之间差异没有统计学意义,故后续实验采用了 200、400、800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蒜氨酸作为低、中、高给药浓度。

② 体外 16HBE 细胞炎症模型建立:以 16HBE 细胞为载体,利用 CSE 与 LPS 模拟体外模型^[14],设置空白组(不加细胞的溶剂组),正常对照组(Control 组),不同浓度 CSE 组(1%、5%、10%、15%、20%),不同质量浓度 LPS 组(25、50、100、150、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),CSE + LPS 组(5% + 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、5% + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、5% + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)干预细胞,结果见图 4。采用 5% CSE + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 干预时,细胞存活率相比正常对照组有显著下降趋势,差异有统计学意义。故后续实验采用了 5% CSE + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 作为造模干预条件。

③ 阳性药物对细胞毒性检测:参考文献^[15],采用不同浓度 NaSH 干预 16HBE 细胞,结果见图 5。与正常对照组相比,当 NaSH 浓度为 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率出现了明显下降趋势,差异有统计学意义,后续采用 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度 NaSH 作为给药浓度。

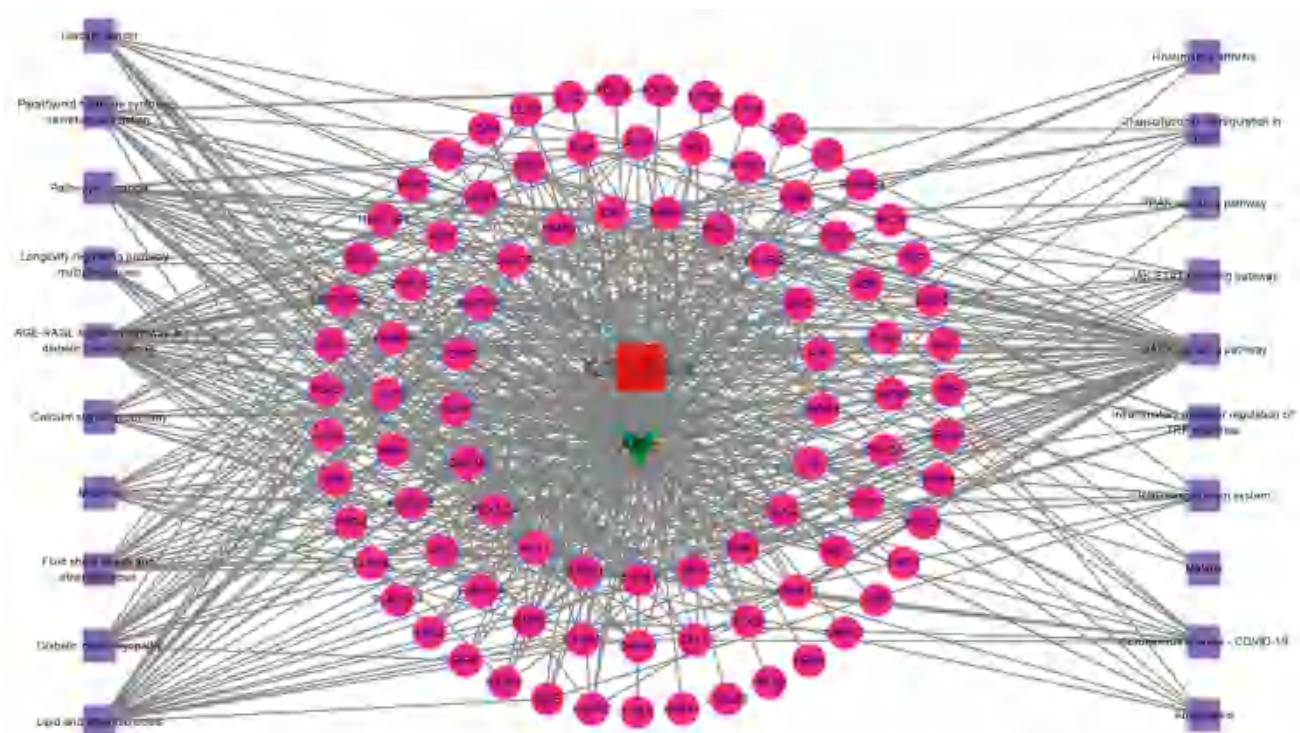


图 1 “蒜氨酸-靶点-通路-慢性气道炎症”网络图
Fig 1 Network diagram of “alliin-target-pathway-chronic airway inflammation”

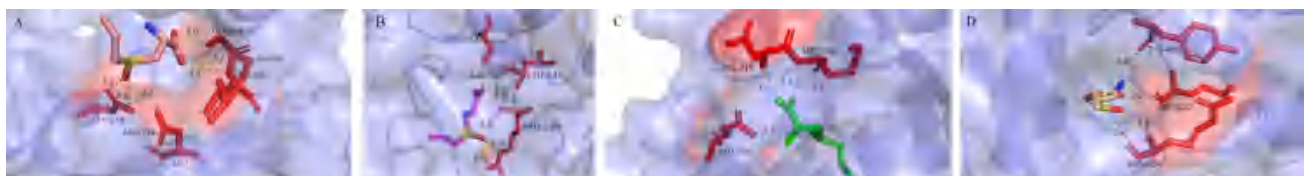


图 2 蒜氨酸与关键靶点对接结果
Fig 2 Alliin docking with key targets
A. 蒜氨酸与 AKT1 (alliin with AKT1); B. 蒜氨酸与 STAT (alliin with STAT); C. 蒜氨酸与 PPAR α (alliin with PPAR α); D. 蒜氨酸与 MMP9 (alliin with MMP9)

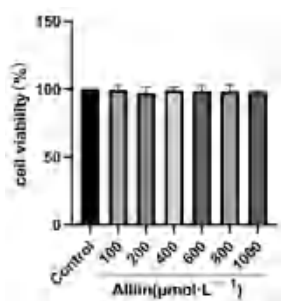


图 3 不同浓度蒜氨酸对细胞毒性作用
Fig 3 Toxic effect of different concentrations of alliin on cells

2.2.4 细胞分组及形态观察 设置分组正常对照组 (Control 组)、模型组 (5% CSE + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS)、阳性药组 (NaSH 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、蒜氨酸低浓度组 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、蒜氨酸中浓度组 (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、蒜氨酸高浓度组 (800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。观察细胞形态, 结果见图 6, 正常对照组细胞贴壁状态良好、形态呈现不规则状, 细胞间连接紧密, 边界清晰; 模型组中细胞形态发生了明显变化,

细胞两端触角增长, 细胞密度下降, 部分细胞边缘模糊, 给予不同浓度蒜氨酸后, 能改善细胞形态, 并逐步趋于正常细胞。

2.2.5 蒜氨酸对炎症因子 IL-6、TNF- α 表达的影响 细胞分组同“2.2.4”项下方法, 药物干预 24 h 后, 收集细胞上清液, ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- α 的水平, 操作严格按照说明书进行, 结果见表 2。与正常对照组相比, 加入 CSE 和 LPS 干预的细胞上清液中 IL-6、TNF- α 表达明显增加。加入不同浓度蒜氨酸进行治疗后, 蒜氨酸可以有效减少细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 的表达。

2.2.6 流式细胞术检测细胞内 ROS 表达 使用无血清的 MEM 培养基稀释 DCFH-DA 探针, 使浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞前处理及分组同“2.2.4”项下方法, 药物干预 24 h 后, 收集细胞装载探针, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 20 min, 用无血清 MEM 培养基清洗 3 遍, 使用流式细胞仪进行上机检测 (参数设置为 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长检

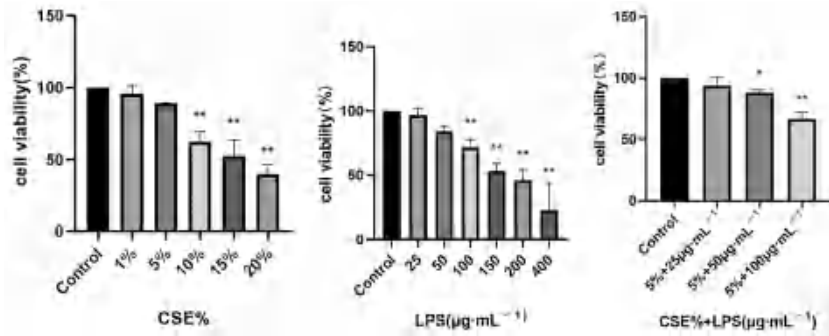


图 4 不同造模方法对细胞毒性作用

Fig 4 Cytotoxic effect of different modelings

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

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

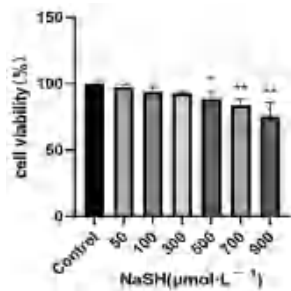


图 5 NaSH 对细胞的毒性作用

Fig 5 Cytotoxic effect of NaSH on cells

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

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

测细胞荧光强弱)，使用 FlowJo v10.8.1 进行结果分析。结果见图 7，与正常组相比，5% CSE + 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 造模组出峰明显右移、显著增加细胞内 ROS 表达，加入不同浓度蒜氨酸后，观察发现蒜氨酸可以有效抑制 16HBE 细胞内 ROS 的表达。

2.2.7 Western blot 法检测各组相关炎症蛋白的表达 细胞前期培养及分组处理同“2.2.4”项下方法，药物干预 24 h 后，收集细胞，加入细胞裂解液 (RIPA : PMSF = 100 : 1)，置于冰上裂解 30 min，将裂解后的细胞悬液离心处理，收集上清液，使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行细胞总蛋白

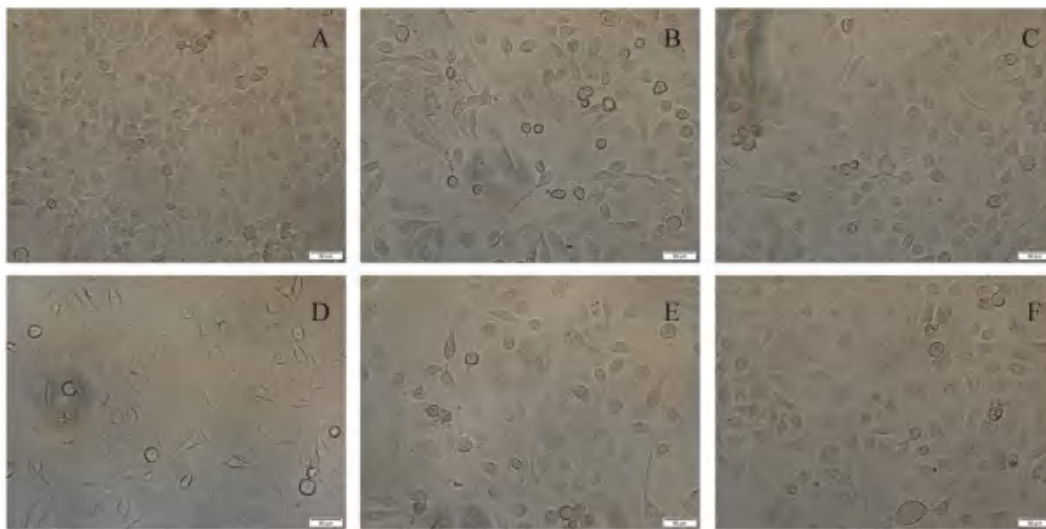


图 6 蒜氨酸对香烟烟雾加 LPS 刺激下的细胞正常形态及活性的影响 ($\times 400$)

Fig 6 Effect of alliin on the normal shape and activity of cells stimulated by cigarette smoke and LPS ($\times 400$)

A. 正常对照组 (the normal control group); B. 模型组 (5% CSE + LPS 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group); C. 阳性药组 (NaSH 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group); D. 蒜氨酸低浓度组 (alliin 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group); E. 蒜氨酸中浓度组 (alliin 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group); F. 蒜氨酸高浓度组 (alliin 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group)

含量测定，操作严格按照试剂盒说明书进行。采用 SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒，进行蛋白凝胶电泳，湿法转膜、5% 脱脂牛奶封闭，一抗孵育过夜，次日二抗孵育 50 min，使用 ECL 法显色，软件 Image Lab 进行蛋白条带灰度值分析。Western blot 实验结果见图 8，与正常对照组相比，模型组

中 IL-6 和 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均显著增加、PPAR α 的表达显著降低。与模型组相比，加入不同浓度蒜氨酸干预后发现，蒜氨酸可以显著下调 IL-6 和 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达，并上调 PPAR α 蛋白表达。

2.2.8 统计学处理 使用 SPSS 26.0 软件进行实验数据统计学分析，组间比较采用单因素方差分

表 2 细胞上清液中炎症因子表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 2 Inflammatory factor expression in the cell supernatants ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	IL-6/ (pg · mL ⁻¹)	TNF- α / (pg · mL ⁻¹)
正常对照组	7.6768 ± 0.22492	5.2376 ± 0.6271
模型组 (5% CSE + LPS 50 μ g · mL ⁻¹)	10.3961 ± 0.36977 ^{###}	14.8838 ± 0.58575 ^{###}
阳性药组 (NaSH 100 μ mol · L ⁻¹)	9.7748 ± 0.08728 ^{**}	12.8925 ± 0.70398 ^{**}
蒜氨酸低浓度组 (200 μ mol · L ⁻¹)	9.3794 ± 0.13332 ^{**}	9.7633 ± 0.86394 ^{**}
蒜氨酸中浓度组 (400 μ mol · L ⁻¹)	9.0308 ± 0.14365 ^{**}	8.4961 ± 0.70398 ^{**}
蒜氨酸高浓度组 (800 μ mol · L ⁻¹)	8.5241 ± 0.1575 ^{**}	7.1254 ± 0.58575 ^{**}

注: 与正常对照组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

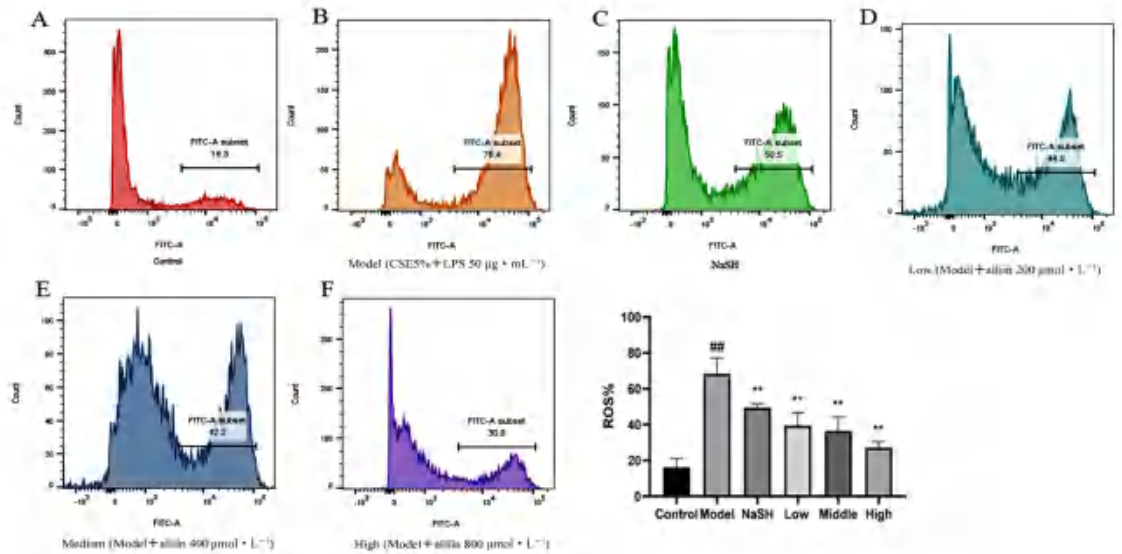


图 7 流式细胞术检测蒜氨酸抑制细胞内 ROS 表达

Fig 7 Inhibition of alliin on the intracellular ROS expression by flow cytometry

注: 与正常对照组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

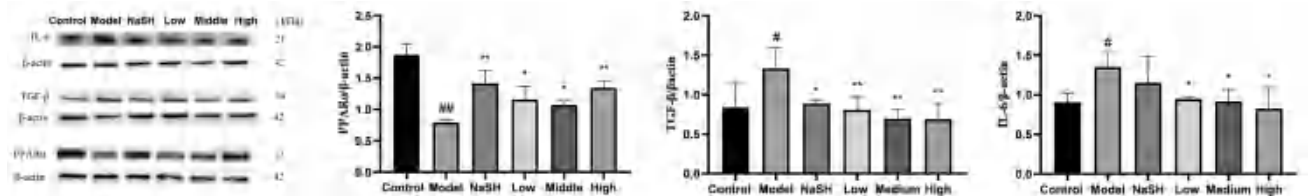


图 8 Western blot 检测蒜氨酸对 IL-6、TGF- β 1 和 PPAR α 表达的影响

Fig 8 Effect of alliin on the expression of IL-6, TGF- β 1 and PPAR α by Western blot

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

大蒜作为烹饪的一种香料, 同时具有抗菌、抗衰老和抗肿瘤的特性, 并且可以通过激活免疫系统来预防感染^[16]。蒜氨酸作为大蒜中主要的生物活性物质^[17], 同样展现出了良好的抗炎、抗氧化活性^[18]。本实验通过网络药理学、分子对接模拟初步预测了蒜氨酸与慢性气道炎症之间的密切联系。发现其中的 PPAR α 是蒜氨酸 - 慢性气道

炎症的关键蛋白, 并且与蒜氨酸的对接活性也较好, 故推测 PPAR α 可能与蒜氨酸调控慢性气道炎症的发生发展有关。

CSE 会引起高氧化剂负荷, 并使机体抗氧化能力显著减弱, 容易在机体累积过量 ROS, 引起氧化应激^[19], 导致脂质过氧化和 DNA 损伤, 造成器官、组织或细胞的严重损伤^[20]。PPAR α 是过氧化物酶体增殖物激活的受体, 在细胞脂肪酸氧化、炎症和免疫反应发挥重要作用^[21]。据报道, 过量的 ROS 会抑制 PPAR α 的表达, 导致氧化还原失衡,

并且可能激活促纤维化细胞因子 TGF- β 诱导肺泡上皮细胞损伤, 刺激成纤维细胞增殖, 导致小气道周围纤维化, 加剧肺部纤维化发生^[22]。

在体外细胞实验中发现, CSE 和 LPS 干预导致细胞发生了氧化应激反应, 过多的 ROS 引起了相关炎症因子表达, 造成细胞的炎症损伤。蒜氨酸可以降低细胞内 ROS 水平, 上调 PPAR α 表达, 减少相关炎症因子表达, 促进细胞修复。表明蒜氨酸可能通过 PPAR α 信号通路来调控细胞内氧化与抗氧化平衡的作用, 从而减少气道上皮细胞的炎症反应。

综上所述, 结合网络药理学、分子对接技术及体外细胞实验结果得出, 蒜氨酸通过调控 PPAR α 信号通路来改善 CSE 与 LPS 诱导的 16HBE 细胞的氧化应激与炎症损伤状态, 恢复细胞内正常的抗氧化、炎症反应。为后续研究蒜氨酸对慢性气道炎症及其他肺部慢性炎症疾病的保护机制提供了理论参考。

参考文献

- [1] Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, et al. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367 (3): 537-550.
- [2] Thatcher TH, Woeller CF, McCarthy CE, et al. Quenching the fires: pro-resolving mediators, air pollution, and smoking [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 197: 212-224.
- [3] Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131 (13): 1541-1558.
- [4] Agusti A, Fabbri LM, Singh D, et al. Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? [J]. *Eur Respir J*, 2018, 52 (6): 1801219.
- [5] 邢利沙. 大蒜脂溶性成分及其生物活性的研究 [D]. 天津: 天津大学, 2015.
- [6] 宋莎莎, 吕佳煜, 冯叙桥. 大蒜多糖研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38 (1): 364-368, 374.
- [7] 罗春霞, 朱丽, 李心雨, 等. 叶酸-蒜酶缀合物的合成及联合蒜氨酸原位抑制肿瘤细胞增殖作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50 (6): 721-727.
- [8] 李新霞, 史荣梅, 刘睿婷. 大蒜主要化学成分及检测标准 [J]. *新疆医科大学学报*, 2020, 43 (6): 697-700.
- [9] 罗春霞, 朱丽, 李心雨, 等. 叶酸-蒜酶缀合物的合成及联合蒜氨酸原位抑制肿瘤细胞增殖作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50 (6): 721-727.
- [10] Li N, Chen K, Dong H, et al. Alliin inhibits adipocyte differentiation by downregulating Akt expression: implications for metabolic disease [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 563.
- [11] 周昊言, 孙若岚, 季千惠, 等. 基于网络药理学-分子对接解析川芎-赤芍药对于预防缺血的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (12): 3007-3015.
- [12] 马顺鹏, 王全凯, 王苗, 等. 甲基丙烯酸环氧丙酯诱导 16HBE 细胞恶性转化过程中细胞凋亡相关 lncRNA 的筛选及功能研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2021, 33 (1): 1-5.
- [13] Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, et al. Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280 (3): H1293-300.
- [14] Victoni T, Gleonnec F, Lanzetti M, et al. Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e85243.
- [15] Guan R, Cai Z, Wang J, et al. Hydrogen sulfide attenuates mitochondrial dysfunction-induced cellular senescence and apoptosis in alveolar epithelial cells by upregulating sirtuin 1 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (24): 11844-11864.
- [16] Arreola R, Quintero-Fabián S, López-Roa RI, et al. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 401630.
- [17] El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): a review [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (3): 872.
- [18] Nadeem MS, Kazmi I, Ullah I, et al. Allicin, an antioxidant and neuroprotective agent, ameliorates cognitive impairment [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 11 (1): 87.
- [19] Zuo L, Wijegunawardana D. Redox role of ROS and inflammation in pulmonary diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1304: 187-204.
- [20] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96 (9): 2181-2196.
- [21] Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, et al. PPARs: key regulators of airway inflammation and potential therapeutic targets in asthma [J]. *Nucl Receptor Res*, 2018, 5: 101306.
- [22] Zhang Y, Li T, Pan M, et al. SIRT1 prevents cigarette smoking-induced lung fibroblasts activation by regulating mitochondrial oxidative stress and lipid metabolism [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 222.

(收稿日期: 2023-01-12; 修回日期: 2023-03-13)

碳酸锂片的制备及体外溶出行为考察

胥骞¹, 戴慧¹, 李鸣¹, 端木彦涛¹, 王福东¹, 彭东明^{1*}, 袁秀菊², 罗隽², 向大佐² (1.湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2.湖南千金湘江药业股份有限公司, 湖南 株洲 412003)

摘要: **目的** 制备碳酸锂片, 并考察其体外溶出行为。**方法** 以马铃薯淀粉、小麦淀粉、羧甲基淀粉钠和硬脂酸镁为辅料制备碳酸锂片; 采用单因素试验, 以水含量、休止角、硬度、脆碎度、崩解时限和溶出度为指标筛选片剂处方, 比较自制片剂与参比制剂(进口片剂)在 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8 和水 4 种不同介质中的体外溶出曲线。**结果** 确定了碳酸锂片的制备工艺, 最佳处方为 75.3% 的碳酸锂片原料药、15% 的马铃薯淀粉(淀粉浆浓度 10%)、2% 的羧甲基淀粉钠、7.2% 的小麦淀粉、0.5% 的硬脂酸镁; 在 4 种介质中, 自制片剂与进口片剂溶出行为均相似。**结论** 自制的碳酸锂片处方合理、工艺可行、质量可控, 其体外溶出行为与进口片剂相似。

关键词: 碳酸锂片; 制备工艺; 单因素试验; 体外溶出

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1177-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.010

Preparation and in vitro dissolution behavior of lithium carbonate tablets

XU Qian¹, DAI Hui¹, LI Ming¹, DUAN-MU Yan-tao¹, WANG Fu-dong¹, PENG Dong-ming^{1*}, YUAN Xiu-ju², LUO Juan², XIANG Da-zuo² (1.School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2.Hunan Qianjin Xiangjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou Hunan 412003)

Abstract: Objective To prepare lithium carbonate tablets and determine their in vitro dissolution behaviors. **Methods** Lithium carbonate tablets were prepared with potato starch, wheat starch, sodium carboxymethyl starch and magnesium stearate as excipients. The formulation of tablets was selected by single factor test based on the moisture, resting angle, hardness, brittleness, disintegration time and dissolution. The in vitro dissolution profiles of prepared tablets and the reference formulations (imported tablets) were compared in 4 media with pH 1.0, pH 4.5, pH 6.8, and water. **Results** The preparation process of lithium carbonate tablets were established. The optimal prescription by single-factor test included: 75.3% lithium carbonate API, 15% potato starch slurry (10% concentration), 2% sodium carboxymethyl starch (addition), 7.2% wheat starch and 0.5% magnesium stearate. The dissolution behaviors of prepared tablets and the imported tablets were similar in the 4 media. **Conclusion** The prepared lithium carbonate tablets have feasible process, reasonable prescription and controllable quality, and their in vitro dissolution behaviors are similar to those of imported tablets.

Key words: lithium carbonate tablet; preparation process; single-factor test; in vitro dissolution

躁狂症是一种心境或情感性精神障碍疾病, 流行病学调查显示躁狂症患病率高达 7.6% ~ 9.8%^[1-2]。碳酸锂在临床上主要用于治疗躁狂症, 它能加强神经元内去甲肾上腺素的灭活, 促进 5-羟色胺的合成、传递, 调节细胞内钙离子浓度,

抑制糖原合成酶激酶, 有助于起到抗躁狂症的作用^[3-4]。国际指南认为锂是治疗躁狂发作的关键疗法, 并建议将其作为一线治疗剂^[5]。2017 年 7 月 21 日, 国家食品药品监督管理局(NMPA)公布法国赛诺菲-安万特公司上市销售的 250 mg 碳酸锂

基金项目: 湖南省自然科学基金株洲联合基金资助项目(No.2019JJ60071); 湖南省药学一流学科开放基金(No.科函[2021]8号-2021YX12)。

作者简介: 胥骞, 男, 硕士, 主要从事新药研究, email: x_q_1995@163.com *通信作者: 彭东明, 男, 教授, 主要从事新药研究, email: pdmcsu@126.com

片为我国碳酸锂片的参比制剂。本文以水分、硬度、脆碎度、崩解时限和溶出度为指标,对碳酸锂片的辅料用料及比例进行研究,确定适宜的制备工艺,以满足国内患者临床用药的需求。

1 材料

1.1 仪器

DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器(上海棱标仪器有限公司);YD-4 型硬度仪(天津创兴电子设备制造有限公司);RC-8 型智能溶出试验仪(天津市新天光分析仪器技术有限公司);ZB-1D 型智能崩解仪(天津大学精密仪器厂);CJY-300D 型片剂脆碎度测定仪(上海黄海药检仪器有限公司);JJ224BC 电子天平(万分之一天平,常熟市双杰测试仪器厂);ICE-3000 型原子吸收分光光度计(上海双旭电子有限公司);MB23 型水分测定仪(奥豪斯仪器有限公司);pHS J-3F 型酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司);ZP9 旋转式压片机(上海雪马制药机械有限公司);HSD30 实验室料斗混合机(浙江南迦科技股份有限公司);DZF 真空干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 试药

碳酸锂片参比制剂(批号:432,规格:250 mg 刻痕片,法国赛诺非-安万特公司);碳酸锂对照品(Alfa Aesar 化学有限公司,批号:24286,纯度:99.9%);碳酸锂原料药(批号:170315,纯度:99.1%,湖南千金湘江药业股份有限公司);小麦淀粉、马铃薯淀粉、羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁(安徽山河药用辅料股份有限公司);锂单元素标准溶液(质量浓度:1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,国家有色金属及电子材料分析测试中心);盐酸(AR,湖南汇虹试剂有限公司);无水乙酸钠(AR,广东光华科技股份有限公司);乙酸(AR,太仓沪试剂有限公司);无水乙醇、磷酸二氢钾(AR,国药集团化学试剂有限公司);氢氧化钠(AR,西陇化工股份有限公司),硫酸(AR,湖南汇虹试剂有限公司);去离子水(华润怡宝饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 碳酸锂片溶出度分析方法的建立

2.1.1 溶出条件及检测条件的选择 查阅各国药典^[6-12]、《仿制药生物等效性试验指导原则》、《固体制剂处方变更后生物等效性试验指导原则》^[13-15]发现关于碳酸锂片的溶出测定标准在测定方法、检测方法和限度方面有一定的区别,溶出的标准介质、介质体积、转速均一致,主要区

别在于溶出测定的装置有篮法和浆法,检测仪器有原子吸收分光光度(AAS)法和火焰光度法两种。根据实验室条件,本课题拟选用 AAS 法测定碳酸锂片的溶出度,只考察溶出测定的装置,即篮法与浆法的选择。

① 溶出装置的选择:取碳酸锂参比制剂 6 片分别投入干燥的转篮内(浆法则分别投入溶出杯内再降入浆叶),在温度(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,转速 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,溶出介质 900 mL 的条件下运转 3 h。分别在 15、30、60、120、180 min 吸取试液,用微孔滤膜滤过,同时补充相同温度、相同体积的溶出介质。测定溶出液中药物含量,计算溶出度,绘制溶出曲线。结果如图 1 所示,碳酸锂参比制剂的溶出度只满足日本药典的限度要求,拟选用日本药典测定方法进行后续研究。

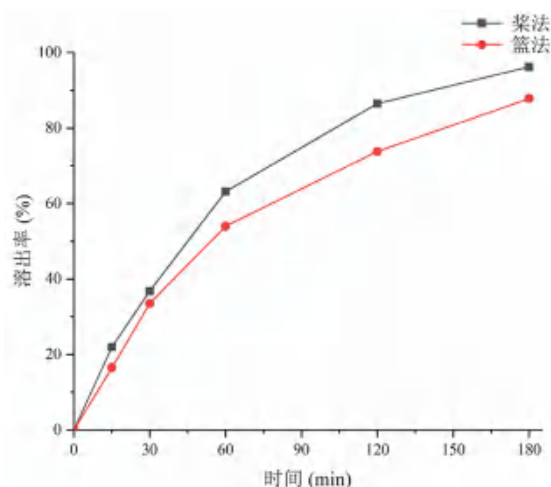


图 1 不同溶出方法的溶出曲线

Fig 1 Dissolution curve of different extrusion methods

② 溶出转速的选择:体外机械搅拌可以有效模拟体内胃肠道生理蠕动和食物对药物的摩擦作用等。对于多数药物制剂,溶出实验应在温和的条件下进行,以保证溶出方法的区分性;篮法一般在 50 ~ 120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,浆法一般在 50 ~ 75 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,搅拌太慢或太快均会导致混合作用不一致^[16]。日本药典收录的碳酸锂片溶出浆法转速条件为 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,相对较高,可能会影响各溶出的区分力,拟采用 50、75、100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行对比,选择最有区分力的转速条件。不同转速下碳酸锂片的溶出曲线如图 2 所示,由图 2 可知,50 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的溶出条件下,180 min 时溶出率未达到 80%,没有满足日本药典的限度要求;100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下,溶出速率较快,影响各溶出的区分率;所以采用浆法 75 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速进行试验。

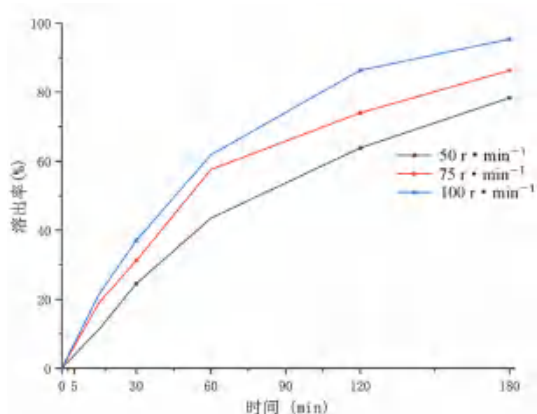


图2 不同转速下的溶出曲线

Fig 2 Dissolution curves at different dissolution rotating rates

③ 释放介质的选择: 根据《日本橙皮书》中推荐的碳酸锂片仿制药一致性评价的溶出介质, 确定 pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液和水作为溶出介质。

④ 溶出取样时间的选择: 参照日本厚生劳动省颁布的《仿制药生物等效性试验指导原则》、《固体制剂处方变更后生物等效性试验指导原则》中对溶出曲线评价的具体操作细则^[13, 15], 可知碳酸锂片在 pH 1.0 的溶出介质中所得溶出曲线最具有区分力, 取样时间点为 5、10、15、30、45、60、90、120 min, 另需考察碳酸锂片在水介质中 180 min 时的溶出率是否符合《日本药典》要求。故取样时间设定为 5、10、15、30、45、60、90、120、180 min; 且以 pH 1.0 的盐酸溶液为溶出介质的溶出曲线作为主要考察对象。

2.1.2 检测方法与方法学验证

① 仪器测定条件: 参照《中国药典》2020 年版第四部^[6], 采用 AAS 法, 以 670.8 nm 为检测波长。

② 对照品溶液配制: 精密量取锂元素标准溶液 ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.00 mL, 加入 100 mL 量瓶中, 分别用 pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液以及水介质定容, 作为锂离子含量 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

③ 供试品溶液配制: 取参比制剂碳酸锂片样品 (规格为 250 mg) 10 片, 充分研碎, 精密称定 4 份 0.0201 g 细粉 (相当于碳酸锂 14.75 mg), 置于 100 mL 量瓶中, 分别用 pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液以及水介质定容, 超声 20 min, 再用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为锂离子含量为 $27.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

④ 线性关系: 分别精密量取“2.1.2”项下 4

种溶出介质稀释的对照品溶液 2.50、5.00、7.50、8.75、10.00、11.25 mL 置于 25 mL 量瓶中, 用相对应的溶出介质稀释定容, 得到系列对照品溶液, 在 670.8 nm 下测定其吸光度, 并由溶液质量浓度 (C) 对吸光度 (A) 进行线性回归, 得回归方程, 结果见表 1。在 4 种不同的溶出介质中, 锂离子质量浓度 (C) 在 $1.0 \sim 4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与吸光度 (A) 呈良好的线性关系。

表 1 碳酸锂片在不同溶出介质中的回归方程和相关系数

Tab 1 Regression equation and correlation coefficient of lithium carbonate tablets in different mediums

溶出介质	回归方程	R^2
pH 1.0 的盐酸溶液	$A = 0.1284C + 0.0213$	0.9999
pH 4.5 的醋酸盐溶液	$A = 0.1295C + 0.0194$	0.9997
pH 6.8 的磷酸盐溶液	$A = 0.1282C + 0.0230$	0.9998
水	$A = 0.1271C + 0.0267$	0.9998

⑤ 辅料干扰试验: 精密称定处方辅料 4 份, 置 100 mL 量瓶中, 加适量水超声溶解, 分别用 4 种溶出介质稀释定容, 在 670.8 nm 下测定各溶液的吸光度, 结果均小于 0.001, 表明辅料对测定无干扰。

⑥ 精密度试验: 取适量不同溶出介质稀释的供试品溶液 ($3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 进样测定, 各重复进样 6 次。结果显示, pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液和水溶出介质稀释的供试品溶液测得浓度 RSD 值分别为 0.45%、0.69%、0.33%、0.65%, RSD 均 $< 2\%$, 表明仪器精密度良好。

⑦ 稳定性试验: 取适量不同溶出介质稀释的供试品溶液 ($3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别于 0、2、4、8、12、16 h 时进样测定。结果显示, pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液和水溶出介质稀释的供试品溶液在 16 h 内吸光度的 RSD 值分别为 0.33%、0.29%、0.22%、0.24%, RSD 均 $< 2\%$ ($n = 6$), 表明供试品溶液稳定性良好。

⑧ 加标回收试验: 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液 1.50 mL, 加入 25 mL 的量瓶中, 再分别精密量取对照品溶液 3.30、4.00、5.00 mL, 用 pH 1.0 的盐酸溶液定容, 进样测定。结果表明, 低、中、高质量浓度加标试验的平均回收率分别为 99.65%、99.69%、100.38%, RSD 均 $< 2\%$ 。pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液和水 3 种溶出介质的加标回收试验除定容溶液不同外, 其余操作和测定方法同上, 结果显示 RSD 值

均 < 2%。表明锂在 pH 1.0 的盐酸溶液、pH 4.5 的醋酸盐溶液、pH 6.8 的磷酸盐溶液和水 4 种溶出介质中回收率良好。

2.2 碳酸锂片的制备

将碳酸锂、小麦淀粉、马铃薯淀粉、羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁过 80 目筛网，按初定处方量称定原辅料（见表 2），其中马铃薯淀粉按不同浓度制浆备用；将过筛后的碳酸锂、小麦淀粉、部分羧甲基淀粉钠投入混合机中混合 6 ~ 10 min；加适量黏合剂（马铃薯淀粉浆）于预混合物中制成软材，挤压过筛制粒后，置于真空干燥箱中，温度 65 °C，干燥 1 ~ 2 h，通过检测中间产品颗粒含水量来确定具体干燥时间，含水量以 1% ~ 3% 为宜；再将处方量的硬脂酸镁和剩余羧

甲基淀粉钠加入总混合机中，转速 15 r · min⁻¹，混合 6 ~ 10 min，得到总混合物；取少量总混合物，进行压片机试压，逐步调整冲头压力、填充量等，待试压的片重、崩解时限等参数合格后，再正式进行压片；采用直径为 10 mm 的浅凹圆形冲模压片。

2.3 处方单因素考察

根据参比制剂片重（332 mg）、规格（250 mg）以及辅料性质，初步确定原料药和润滑剂的处方量，变量为黏合剂马铃薯淀粉使用量以及崩解剂羧甲基淀粉钠使用量，确定黏合剂和崩解剂用量时，根据片重确定填充剂小麦淀粉的处方用量^[17-19]。初步设计原辅料占比见表 2。

表 2 初步设计原辅料占比

Tab 2 Proportion of raw and auxiliary materials in preliminary design

原辅料	用量范围	初始处方量	备注
碳酸锂	—	75.30%	规格片重比：250 mg/332 mg
小麦淀粉	20% ~ 90%	—	小麦淀粉量 = 片重 - 碳酸锂 - 马铃薯淀粉 - 羧甲基淀粉钠 - 硬脂酸镁
马铃薯淀粉	5% ~ 25%	—	分别考察制浆浓度 7%、10%、13%；处方量 5%、8%、12%、15%
羧甲基淀粉钠	1% ~ 10%	6%（内外 1 : 1）	确定马铃薯淀粉浆后，考察其加入法（内加法、外加法、内外加法）以及用量（2%、4%、6%、8%、10%）
硬脂酸镁	0.3% ~ 1.0%	0.5%	根据休止角大小适当调整润滑剂的用量

2.3.1 润滑剂的考察 硬脂酸镁为疏水性润滑剂，一般使用浓度为 0.3% ~ 1.0%^[20-21]。本研究拟定润滑剂用量为 0.5%（1.66 g/1000 片），休止角 ≤ 40°，满足制备工艺所需的流动性。

2.3.2 黏合剂浓度及用量考察 马铃薯淀粉一般占处方量的 5% ~ 25%，本研究结合实际拟对马铃薯淀粉含量为 5%、8%、12%、15% 的处方进行考察。小麦淀粉作为填充剂，随马铃薯淀粉含量变化适量添加以维持总量。

马铃薯淀粉作为黏合剂，通常以淀粉浆形式加入处方，常用的马铃薯淀粉制浆的浓度为 7% ~ 10%，为进一步考察马铃薯淀粉浆的浓度对溶出影响，拟对马铃薯淀粉制浆浓度为 7%、10%、13% 的处方进行考察，具体配比见表 3。

各处方水分、硬度、脆碎度、崩解时限等指标的评价结果均符合要求，与参比制剂的溶出相似因子（ f_2 ）结果表明，马铃薯淀粉含量为 15%，淀粉浆浓度为 10% 时，与参比溶剂的 f_2 最高（见表 4）。

2.3.3 崩解剂的考察 根据黏合剂考察项下的结果，在各处方理化特征均满足要求的情况下，比较 f_2 值；从溶出曲线趋势可得，崩解剂含量为 6%

时，溶出速率均大于参比制剂，则考率降低崩解剂用量进行试验，具体处方配比见表 3。

进一步对崩解剂加入法进行考察，处方一至处方十四中均采用内加法和外加法 1 : 1 的形式加入崩解剂，处方十五采用内加法，处方十六采用外加法，具体处方配比见表 3。

各处方水分、硬度、脆碎度、崩解时限等指标的评价结果均符合要求， f_2 值见表 4，处方十三和十四对比结果表明，崩解剂用量为 2% 时，碳酸锂片的溶出相似因子更高，则拟定崩解剂用量为 2%；处方十三、十五和十六的结果表明，采用外加法的处方十六的 f_2 最高，且 f_2 均大于 70，则拟订用外加法加入崩解剂。

综上所述，根据各辅料考察结果，最佳处方为处方十六，即碳酸锂原料药占 75.3%、马铃薯淀粉质量占 15%、羧甲基淀粉钠占 2%（外加）、小麦淀粉占 7.2%、硬脂酸镁占 0.5%。

2.4 工艺验证试验

根据上述制备工艺及处方筛选的结果，得到自制碳酸锂片最优的处方（按 1000 片量计算）：碳酸锂原料药 250 g、马铃薯淀粉 49.80 g、外加羧甲基淀粉钠 6.64 g、小麦淀粉 23.90 g、硬脂酸 1.66 g，自

表 3 碳酸锂片的 16 个处方设计 (1000 片, g)

Tab 3 Sixteen prescriptions for lithium carbonate tablets (1000 tablets, g)

处方	碳酸锂	小麦淀粉	马铃薯淀粉	羧甲基淀粉钠	硬脂酸镁
处方一	250.00	43.82	16.60 (浓度 7%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方二	250.00	33.96	26.56 (浓度 7%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方三	250.00	20.58	39.84 (浓度 7%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方四	250.00	10.62	49.80 (浓度 7%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方五	250.00	43.82	16.60 (浓度 10%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方六	250.00	33.96	26.56 (浓度 10%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方七	250.00	20.58	39.84 (浓度 10%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方八	250.00	10.62	49.80 (浓度 10%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方九	250.00	43.82	16.60 (浓度 13%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方十	250.00	33.96	26.56 (浓度 13%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方十一	250.00	20.58	39.84 (浓度 13%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方十二	250.00	10.62	49.80 (浓度 13%)	19.92 (内外 1:1)	1.66
处方十三	250.00	23.90	49.80 (浓度 10%)	6.64 (内外 1:1)	1.66
处方十四	250.00	17.26	49.80 (浓度 10%)	13.28 (内外 1:1)	1.66
处方十五	250.00	23.90	49.80 (浓度 10%)	6.64 (内加法)	1.66
处方十六	250.00	23.90	49.80 (浓度 10%)	6.64 (外加法)	1.66

表 4 不同处方在不同溶出介质中的 f_2 值

Tab 4 f_2 values in different media for different prescriptions

处方	pH 1.0 盐酸溶液	pH 4.5 醋酸溶液	pH 6.8 磷酸溶液	水
处方一	28	24	26	28
处方二	31	29	29	33
处方三	33	35	32	39
处方四	41	43	39	48
处方五	31	23	27	29
处方六	34	29	32	36
处方七	39	37	36	42
处方八	51	49	45	49
处方九	30	27	27	31
处方十	37	32	30	36
处方十一	40	38	36	42
处方十二	46	43	42	49
处方十三	63	67	61	64
处方十四	62	57	53	59
处方十五	67	67	68	65
处方十六	78	75	74	70

制 3 批碳酸锂片 (批号分别为 20200701、20200702、20200703), 各批次外观均为直径 10 mm 的白色刻痕片, 各批次的基本属性见表 5。

参照“2.1”项下溶出曲线的测定方法, 从 3 批自制产品中各随机抽取 48 片, 均分为 4 组, 采用桨法, 转速为 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 测定温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 在 4 种不同的介质中进行溶出实验, 取样时间分别为 5、10、15、30、45、60、90、120、180 min; 用 AAS 法测定各试样浓度, 计算溶出度。各批次的溶出曲线对比见图 3, f_2 均大于 50, 具体结果见表 6, 说明自制片剂与参比制剂具有良好的溶出一致性。

3 结论

以水分、休止角、硬度、脆碎度、崩解时限和溶出度为指标对碳酸锂片的处方进行筛选, 筛选出的最佳处方为: 碳酸锂原料药占 75.3%、干马铃薯淀粉占 15%、羧甲基淀粉钠占 2% (外加)、

表 5 3 批自制碳酸锂片的评价结果

Tab 5 Evaluation of 3 batches of prepared lithium carbonate tablets

考察指标	堆密度 / ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	振实密度 / ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	水分 / %	平均片重 / mg	脆碎度 / %	硬度 / kg	崩解时限 / s	半片分割重量损 / %
参比制剂	—	—	1.52	332.1	0.15	5.13	83	0.32
20200701	0.55	0.62	1.46	332.1	0.17	4.92	96	0.24
20200702	0.56	0.62	1.38	332.0	0.19	5.08	118	0.34
20200703	0.55	0.62	1.56	331.9	0.23	5.24	132	0.29

小麦淀粉占 7.2%、硬脂酸镁占 0.5%。根据碳酸锂的物理特性以及制备工艺的相关参考文献^[22-23]可知, 碳酸锂原料药吸湿性低、熔点高, 对湿、

热环境相对稳定, 且碳酸锂的可压性低, 因此采用湿法制粒法压片的工艺进行制备, 并成功制备出和参比制剂体外溶出行为相似的片剂。

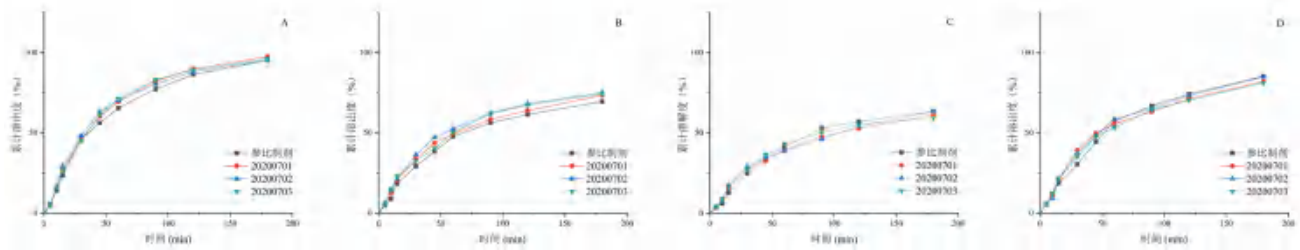


图 3 3 批自制碳酸锂片溶出曲线对比图

Fig 3 Lysis curves of 3 batches of prepared lithium carbonate tablets

A. pH 1.0; B. pH 4.5; C. pH 6.8; D. 水 (water)

表 6 3 批自制碳酸锂片在不同溶出介质中的溶出相似因子

Table 6 Similarity factors of 3 batches of prepared lithium carbonate tablets in different dissolution media

批号	相似度			
	f_2 (pH 1.0)	f_2 (pH 4.5)	f_2 (pH 6.8)	f_2 (水)
20200701	75	75	74	69
20200702	72	63	72	76
20200703	73	70	76	73

3 批自制碳酸锂片的外观、含量、片重、硬度、脆碎度等关键属性均符合要求, 4 种溶出介质溶出曲线的相似因子 f_2 均大于 50。《中国药典》2020 版第二部^[24]中碳酸锂片溶出方法采用水为溶出介质, 但是经试验表明, 参比碳酸锂片及自制碳酸锂片在水介质中的溶出度都很低, 而溶出行为最好的溶出介质为 pH 1.0 的盐酸溶液。故选择 pH 1.0 的盐酸溶液进行溶出体外评价。在 pH 1.0 的盐酸溶液中, 自制 3 批碳酸锂片的溶出曲线 f_2 均大于 70, 在 120 min 时溶出度大于 85%, 在 180 min 时溶出完全; 在水中, 180 min 时的溶出度大于 80%, 满足 NMPA 规定的仿制药与原研药质量一致性要求; 初步确定受试产品生产工艺及配方的合理性, 且本品辅料均为国产辅料, 工艺简单, 为碳酸锂片的研发和生产提供了有力的科学依据。

参考文献

[1] 庞军委, 许学明. 阿立哌唑联合碳酸锂治疗急性躁狂症临床效果分析[J]. 中国基层医药, 2018, 25 (10): 1334-1337.
 [2] 李书琴, 罗捷. 足量丙戊酸钠合并其他药物治疗急性躁狂症的疗效[J]. 检验医学与临床, 2018, 15 (7): 921-923.
 [3] Malhi GS, Outhred T. Therapeutic mechanisms of lithium in bipolar disorder: recent advances and current understanding[J]. CNS Drugs, 2016, 30 (10): 931-949.
 [4] 戴慧, 李鸣, 端木彦涛, 等. 碳酸锂抗躁狂症的临床应用进展及不良反应分析[J]. 中国药物警戒, 2021, 18

(3): 294-299.

[5] Morlet E, Hozer F, Costemale-Lacoste JF. Neuroprotective effects of lithium: what are the implications in humans with neurodegenerative disorders? [J]. Geriatr Psychol Neur, 2018, 16 (1): 78-86.
 [6] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020.
 [7] 欧洲药典 9.2 版 [S]. 2014.
 [8] 法国药典 2007 版 [S]. 2007.
 [9] 美国药典 / 国家处方集 USP41-NF36 [S]. 2018.
 [10] 日本药典 2018 版 [S]. 2018.
 [11] 英国药典 2015 版 [S]. 2015.
 [12] 国际药典第 5 版 [S]. 2015.
 [13] 谢沐风. 溶出曲线相似性的评价方法 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40 (4): 308-311.
 [14] 谢沐风. 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43 (3): 243-252.
 [15] 谢沐风. 具有区分力的溶出曲线 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45 (7): 687-689, 705.
 [16] 阳长明, 侯世祥. 药物溶出度研究进展 [J]. 中成药, 2000, 22 (7): 53-57.
 [17] 孔彬, 刘晓霞, 赵昕. 格列齐特片 (II) 溶出曲线的一致性评价研究 [J]. 实用药物与临床, 2020, 23 (10): 920-922.
 [18] 罗可. 奥美拉唑肠溶片关键工艺的初步研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
 [19] 陈李平. 阿司匹林肠溶片的体外质量一致性评价 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2019.
 [20] 安勇. 制剂企业药用辅料内控质量标准的研究 [J]. 药学研究, 2013, 32 (10): 614-615.
 [21] 龙海燕, 刘雁鸣, 粟贵, 等. 硬脂酸镁功能性参数对尼群地平片溶出行为影响的研究 [J]. 中南药学, 2016, 14 (12): 1298-1302.
 [22] 陈美红, 陈建华, 贾可, 等. 制备含利福平与异烟肼抗结核四联片的三种方法对比研究 [J]. 实用医药杂志, 2017, 34 (7): 641-644.
 [23] 马莉, 刘兆迅, 王文笙, 等. 制备工艺对格列美脲片溶出行为的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (11): 1572-1575.
 [24] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020.

(收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2023-03-29)

半夏水溶性成分抗氧化活性谱效关系研究

张雪丽¹, 杨长福¹, 李玮¹, 杨菁¹, 刘杰英¹, 杨涛¹, 林昶^{1, 2*} (1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学 林下中药材研究中心, 贵阳 550025)

摘要: 目的 建立半夏 HPLC 指纹图谱, 并分析其与抗氧化活性之间的谱效关系。方法 以 HPLC 法建立半夏指纹图谱, 不同批次间相似度用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行评价, 分别以 ABTS、铁离子还原能力 (FRAP) 及超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 清除率测定不同产地半夏抗氧化活性, 采用偏最小二乘回归分析及灰色关联度法分析谱效关系。结果 半夏药材水溶性成分 HPLC 指纹图谱共确定 15 个峰为共有峰, 30 批半夏药材的相似度为 0.749 ~ 0.989; 偏最小二乘回归分析及灰色关联度法分析中与抗氧化活性密切相关的峰为 5 (尿苷)、6 (腺嘌呤)、7 (鸟苷)、11 (腺苷)、14 号峰。结论 半夏水溶性提取物具有一定抗氧化活性, 其活性为多个组分协同作用的结果。

关键词: 半夏; 指纹图谱; 抗氧化活性; 谱效关系; 灰色关联度; 偏最小二乘回归分析

中图分类号: R282, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1183-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.011

Spectrum-effect relationship of antioxidant activity of water-soluble components in Pinelliae Rhizoma

ZHANG Xue-li¹, YANG Chang-fu¹, LI Wei¹, YANG Jing¹, LIU Jie-ying¹, YANG Tao¹, LIN Chang^{1, 2*} (1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025*; 2. *Research Center of Traditional Chinese Medicine Under Forest, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025*)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Pinelliae Rhizoma and determine the relationship between the fingerprint and the antioxidant activity. **Methods** HPLC method was used to establish the fingerprint of Pinelliae Rhizoma, and the similarity was evaluated by ‘Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine’ (2012 Edition) software. The antioxidant activity of Pinelliae Rhizoma from different habitats was determined by ABTS, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging rate, respectively. Partial least squares regression analysis and grey correlation analysis were conducted to determine the spectrum-effect relationship. **Results** A total of 15 peaks were identified as common peaks in the water-soluble HPLC fingerprint of Pinelliae Rhizoma. The similarity of 30 batches of Pinelliae Rhizoma ranged 0.749 ~ 0.989. Peaks 5 (uridine), 6 (adenine), 7 (guanosine), 11 (adenosine) and 14 were closely related to the antioxidant activity by partial least squares regression analysis and grey relational analysis. **Conclusion** The water-soluble extract of Pinelliae Rhizoma has certain antioxidant activity, resulting from the synergistic action of multiple components.

Key words: Pinelliae Rhizoma; fingerprint; antioxidant activity; spectrum-effect relationship; grey relational analysis; partial least squares regression analysis

基金项目: 贵州省农业农村厅项目 [No.XATH (GZ) 2020/042]; 贵州省中医药管理局项目 (No.QZYY-2022-018)。

作者简介: 张雪丽, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及作用机制研究, email: 1920093220@qq.com *通信作者: 林昶, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药、民族药产地加工、炮制工艺及机制研究, email: 375718640@qq.com

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎^[1], 主要化学成分为生物碱类、有机酸类、多糖、黄酮类、挥发油、半夏蛋白、氨基酸以及微量元素等^[2-3], 具有镇咳祛痰、镇吐、抗早孕、抗溃疡、抗肿瘤、降血脂、抗动脉粥样硬化等药理作用^[4-5]。此外, 半夏还具有抗氧化活性, 研究发现其与心血管疾病、动脉粥样硬化^[6]、肿瘤及炎症^[7]等的发生密切相关。在半夏抗氧化能力研究中, 有学者发现以 DPPH 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 为抗氧化指标, 半夏多糖均有清除效果, 且对 DPPH 的清除能力大于 $\cdot\text{OH}$ ^[8]; 半夏生物碱同样具有抗氧化能力^[9], 分别以 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、 $\cdot\text{OH}$ 进行研究, 其清除率呈减小趋势, 对 DPPH 自由基的清除能力最大。此外半夏中 β -谷甾醇、半夏水提液^[10]、醇提液^[11] 同样具有抗氧化能力, 但目前尚未见相关研究报道。本文通过灰色关联度及偏最小二乘回归分析研究半夏 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系, 初步筛选出与抗氧化活性相关的色谱峰, 可为进一步揭示半夏水提液抗氧化活性成分提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate3000 高效液相色谱仪、1530 型酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司], LC-LX-L408 型台式低速离心机 (上海力辰邦西仪器科技有限公司), AUW220D 型分析天平 (苏州岛津仪器有限公司), SHZ-III 循环水式真空泵 (上海亚荣生化仪器厂), YQ-1000A 超声波清洗仪 (上海易净超声波仪器有限公司), WP-UP-WF-20 微量分析型超纯水机 (四川沃特尔水处理设备有限公司)。

1.2 试药

对照品鸟苷 (纯度: 93.6%, 批号: 111977-201501)、腺苷 (纯度: 99.7%, 批号: 110879-201703)、尿苷 (纯度: 99.5%, 批号: 110887-201803)、腺嘌呤 (纯度: 99.4%, 批号: 110886-201102)、尿嘧啶 (纯度: 99.6%, 批号: 100469-201302) (中国食品药品检定研究院); 对照品 β -胸苷 (纯度: 98.0%, 批号: C100897-211107, 贵州迪大科技有限责任公司); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 批号: C13383711)、硝基四氮唑蓝 (NBT, 批号: C13692681) (上海麦克林生化

科技有限公司); 吩嗪硫酸甲酯 (PMS, 批号: H2131077)、还原性辅酶 I 二钠盐 (β -NADH, 批号: L2115726)、2, 4, 6-三(2-吡啶基)三嗪 (TPTZ, 批号: T819085)、2, 2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS, 批号 A109612) (美国阿拉丁工业公司); 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

市售的不同批次半夏药材均由贵州中医药大学魏升华教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 详见表 1。

表 1 半夏样品产地信息

Tab 1 Origin information for *Pinelliae Rhizoma* sample

编号	产地	编号	产地
S1	甘肃清水	S16	贵州威宁
S2	甘肃天水	S17	河北安国
S3	甘肃西和	S18	河北安国
S4	甘肃西和	S19	河北保定
S5	甘肃西和	S20	湖北荆州
S6	甘肃西和	S21	吉林长春
S7	贵州大方	S22	山东泗水
S8	贵州安顺	S23	山东泗水
S9	贵州毕节	S24	山西运城
S10	贵州毕节	S25	山西忻州
S11	贵州赫章	S26	山西吕梁
S12	贵州赫章	S27	山西新绛
S13	贵州惠水	S28	山西兴县
S14	贵州安龙	S29	四川成都
S15	贵州晴隆	S30	四川南充

2 方法与结果

2.1 半夏 HPLC 指纹图谱研究

2.1.1 供试品溶液的制备 取半夏粉末 (过四号筛) 2.0 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 20 mL 蒸馏水, 称重, 超声 60 min (500 W, 50 Hz), 冷却后, 补重, 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即可。

2.1.2 对照品溶液的制备 取尿嘧啶、尿苷、腺嘌呤、鸟苷、 β -胸苷、腺苷对照品适量, 精密称定, 以蒸馏水溶解后定容至 10 mL, 再分别取 1 mL 以蒸馏水定容至 10 mL, 配制成含有 19.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 尿嘧啶、12.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 尿苷、11.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 腺嘌呤、12.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鸟苷、10.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ β -胸苷、11.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 腺苷的混合对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate AQC18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 1%A, 10 ~ 25 min, 1% ~ 2%A, 25 ~ 45 min, 2% ~ 15%A,

45 ~ 50 min, 15% ~ 20%A, 50 ~ 60 min, 20% ~ 10%A); 柱温 30℃; 检测波长 260 nm; 流速 0.8 mL · min⁻¹; 进样量 10 μL。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取供试品溶液, 连续进样 6 次, 将 5 号尿苷色谱峰定为参照峰 (S)。计算得到各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 值均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性试验 取同一批次半夏粉末 (S12) 2.0 g, 精密称定, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 计算得到各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明该法重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 取半夏供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 计算得到各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

分别取 30 批次的半夏粉末 2.0 g, 精密称定, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 版)^[12], 以 S5 样品色谱图为参照指纹图谱, 确定了 15 个共有峰, 建立半夏 HPLC 共有模式生成对照图谱, 结果见图 1、2。30 批半夏指纹图谱相似度在 0.749 ~ 0.989, 其中除 S24、S25 两个产地外, 其他产地相似度均大于 0.850, 相似度结果见表 2。通过混合对照品溶液 HPLC 色谱峰对比, 指认了其中 6 个成分, 分别是 3 号峰尿嘧啶、5 号峰尿苷、6 号峰腺嘌呤、7 号峰鸟苷、9 号峰 β-胸苷、11 号峰腺苷, 见图 3。

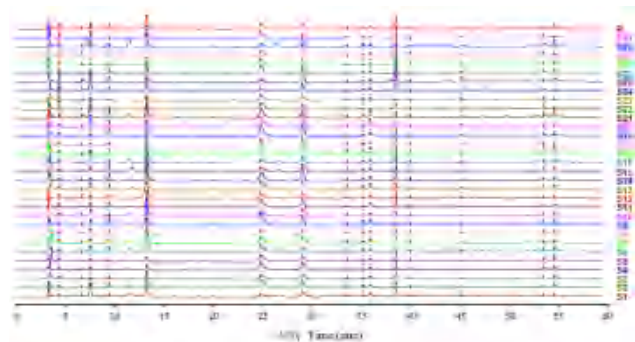


图 1 半夏的对照指纹图谱 (R) 及指纹图谱
Fig 1 Control fingerprint (R) and fingerprint of Pinelliae Rhizoma

2.4 体外抗氧化活性测定

2.4.1 ABTS 自由基清除率 参考文献方法^[13], 并稍作修改, 制备 ABTS 储备液, 临用时以蒸馏

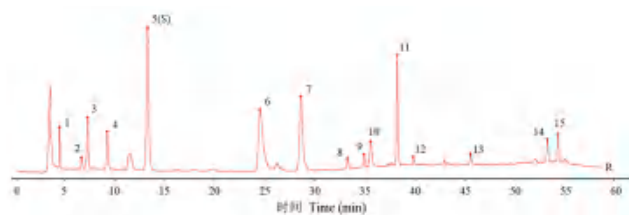


图 2 半夏 HPLC 对照指纹图谱
Fig 2 Control fingerprint of Pinelliae Rhizoma

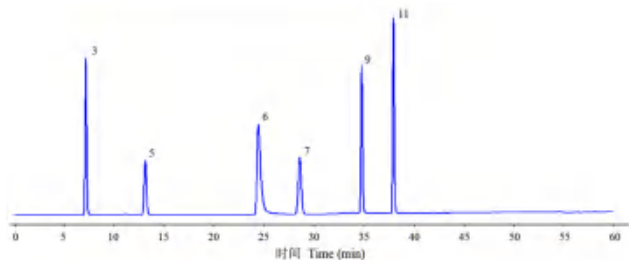


图 3 混合对照品 HPLC 色谱图
Fig 3 HPLC chromatogram of mixed reference substance
3. 尿嘧啶 (uracil); 5. 尿苷 (uridine); 6. 腺嘌呤 (adenine); 7. 鸟苷 (guanosine); 9. β-胸苷 (β-thymidine); 11. 腺苷 (adenosine)

表 2 30 批半夏指纹图谱相似度分析结果

Tab 2 Fingerprint similarity of 30 batches of Pinelliae Rhizoma

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.911	S16	0.910
S2	0.966	S17	0.942
S3	0.936	S18	0.926
S4	0.870	S19	0.954
S5	0.875	S20	0.963
S6	0.913	S21	0.944
S7	0.985	S22	0.897
S8	0.960	S23	0.876
S9	0.962	S24	0.759
S10	0.956	S25	0.749
S11	0.989	S26	0.929
S12	0.980	S27	0.927
S13	0.989	S28	0.884
S14	0.951	S29	0.882
S15	0.926	S30	0.932

水稀释, 即得 ABTS 工作液。另取“2.1.1”项下供试品溶液 31.3、62.5、125、250、500、1000 μL 于 2 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度线, 即得不同浓度半夏水提液, 分别设置空白组 (蒸馏水 20 μL + ABTS 工作液 180 μL, 测定吸光度记为 A₀), 样品组 (半夏水提液 20 μL + ABTS 工作液 180 μL, 测定吸光度记为 A₁), 对照组 (半夏水提液 20 μL + 蒸馏水 180 μL, 置于 96 孔板中混匀, 避光室温下静置 5 min, 酶标仪中振荡 1 min, 测定吸光度记为 A₂), 重复 3 次, 每次 3 个复孔。按公式 (1) 计算不同浓度样品液清除率, 导入 SPSS

26.0 计算不同产地样品 IC_{50} 值 (以生药浓度计算), 结果见表 3。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

2.4.2 O_2^- 清除率 参考文献方法^[14-15], 以 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液分别配制 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT、 $234 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH 和 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMS 溶液, 置于 4°C 冰箱保存备用。另取“2.4.1”项下稀释的不同浓度的半夏水提液, 分别设置空白组 (蒸馏水 $10 \mu\text{L} + 100 \mu\text{L}$ NBT 溶液 + $100 \mu\text{L}$ NADH 溶液 + $100 \mu\text{L}$ PMS 溶液, 测定吸光度记为 A_0), 样品组 (半夏水提液代替空白组中蒸馏水, 测定吸光度记为 A_1), 对照组 (半夏水提液 $10 \mu\text{L} + 300 \mu\text{L}$ Tris-HCl 缓冲液, 于 96 孔板中混匀, 室温下反应 5 min, 测定吸光度记为 A_2), 重复 3 次, 每次 3 个复孔。按公式 (1) 计算清除率, 导入 SPSS 26.0 计算不同产地样品 IC_{50} 值 (以生药浓度计算), 结果见表 3。

2.4.3 总抗氧化能力 (FRAP) 法 参考文献方法^[16], 制备 FRAP 工作液。分别设置空白组 (蒸馏水 $20 \mu\text{L} + \text{FRAP}$ 工作液 $180 \mu\text{L}$, 测定吸光度记为 A_0), 样品组 [半夏水提液代替空白组中蒸馏水, 于 96 孔板中混匀, 酶标仪 (37°C) 下静置 10 min, 测定吸光度记为 A_1]。另参考文献方法^[17], 配制浓度分别为 0.10 、 0.20 、 0.40 、 0.60 、 0.80 以及 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FeSO_4 溶液, 同上测定 A 值, 以 FeSO_4 浓度为横坐标, ($A_1 - A_0$) 为纵坐标绘制标准曲线。分别计算半夏水提液总抗氧化能力 (FeSO_4 值)。重复 3 次, 每次 3 个复孔, 结果见表 3。

2.5 谱效关系研究

2.5.1 灰色关联度分析 由灰色系统理论, 分别以“2.4”项下 3 种方法测得半夏抗氧化活性为参考序列, 30 批供试品半夏药材的共有峰峰面积为比较序列, 参考文献方法^[16]对数据进行处理, 结果见表 4, ABTS 法测定的抗氧化活性与各峰关联度排名为色谱峰 $1 > 5 > 11 > 14 > 10 > 12 > 7 > 2 > 4 > 9 > 6 > 15 > 3 > 8 > 13$, 关联度均大于 0.75; FRAP 法测定的抗氧化活性与各峰关联度排名为色谱峰 $6 > 7 > 9 > 15 > 14 > 4 > 5 > 1 > 13 > 12 > 8 > 10 > 2 > 11 > 3$, 关联度均大于 0.80; O_2^- 法测定的抗氧化活性与各峰关联度排名为色谱峰 $5 > 6 > 7 > 14 > 1 > 12 > 9 > 3 > 8 > 11 > 4 > 15 > 2 > 10 > 13$, 关联度均大于 0.75, 峰 5、6、7、14 在两个抗氧化指标中关联度居于前五位, 其与抗氧化活性关联性最强。

表 3 30 批半夏体外抗氧化活性测定结果

Tab 3 In vitro antioxidant activity of 30 batches of Pinelliae Rhizoma

编号	ABTS [$IC_{50} / (\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$]	FRAP [FeSO_4 值 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)]	$O_2^- \cdot$ [$IC_{50} /$ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)]
S1	0.226	0.388	0.485
S2	0.043	0.309	0.490
S3	0.044	0.419	0.412
S4	0.099	0.515	0.587
S5	0.058	0.761	0.116
S6	0.023	0.626	0.067
S7	0.083	0.272	0.236
S8	0.635	0.576	0.360
S9	0.110	0.511	0.201
S10	0.437	0.534	0.928
S11	0.209	0.387	0.320
S12	0.473	0.343	0.448
S13	0.064	0.621	0.202
S14	0.219	0.345	0.210
S15	0.436	0.532	0.210
S16	0.411	0.315	0.357
S17	0.012	0.847	0.045
S18	0.022	1.036	0.049
S19	0.075	0.613	0.123
S20	0.016	0.590	0.337
S21	0.038	0.734	0.220
S22	0.473	0.482	0.298
S23	0.262	0.582	0.299
S24	0.043	0.678	0.047
S25	0.041	0.440	0.185
S26	0.015	0.891	0.152
S27	0.126	0.514	0.179
S28	0.022	0.630	0.077
S29	0.121	0.565	0.575
S30	0.024	0.858	0.072

2.5.2 偏最小二乘回归分析 参考文献方法^[17-18], 利用 SIMCA 14.1 软件, 以 30 批半夏水提物的 ABTS、 O_2^- 清除率的 IC_{50} 、 FeSO_4 值为因变量 x , 共有峰峰面积为自变量 y , 运用偏最小二乘回归分析, 计算标准化回归系数和 VIP 值, 评价半夏水提物与抗氧化活性之间的关联。结果以 ABTS 为指标, 与之成正相关的峰, 贡献程度由大到小为峰 14、5、4、12; 与之成负相关的峰, 贡献程度由大到小为峰 6、8、3、10、11、15、2、7、1、13、9。以 FRAP 为指标, 与之成正相关的峰, 贡献程度由大到小为峰 1、13、8、2、6、14、12、10、4; 与之成负相关的峰, 贡献程度由大到小为峰 5、11、9、3、15、7。以 O_2^- 为指标, 与之成正相关的峰, 贡献程度由大

表 4 抗氧化活性与各峰之间关联度
Tab 4 Correlation between antioxidant activity and chromatographic peaks

峰号	ABTS		FRAP		O ₂ ^{-•}	
	关联度	排名	关联度	排名	关联度	排名
1	0.7974	1	0.8453	8	0.7937	5
2	0.7806	8	0.8183	13	0.7791	13
3	0.7720	13	0.8093	15	0.7911	8
4	0.7806	9	0.8503	6	0.7863	11
5	0.7919	2	0.8480	7	0.8205	1
6	0.7778	11	0.8863	1	0.8125	2
7	0.7830	7	0.8847	2	0.8065	3
8	0.7629	14	0.8302	11	0.7911	9
9	0.7786	10	0.8579	3	0.7914	7
10	0.7858	5	0.8197	12	0.7789	14
11	0.7918	3	0.8100	14	0.7881	10
12	0.7836	6	0.8334	10	0.7921	6
13	0.7582	15	0.8340	9	0.7646	15
14	0.7901	4	0.8511	5	0.8020	4
15	0.7725	12	0.8523	4	0.7810	12

到小为峰 10、3、7、2、14、5、9；与之成负相关的峰，贡献程度由大到小为峰 4、1、13、12、15、11、6、8（见图 4）。VIP 值被称为变量投影重要性指标^[19]，在统计分析中用其表示 x 对 y 的解释能力，当 VIP 值 (> 1) 越大，其相对解释能力则越强，以 ABTS 为指标，VIP > 1 的峰由大到小为峰 5、14、6、7、8；以 FRAP 为指标，VIP > 1 的峰由大到小为峰 5、11、6、13、15；以 O₂^{-•} 为指标，VIP > 1 的峰由大到小为峰 11、7、1、4、10、2、13，以上 3 个指标中 VIP > 1 的峰 5、6、7、11 均出现两次（不同指标中排名前五），峰 14 虽然只出现一次，但其偏回归系数在 ABTS 中正相关程度最高，且结合灰色关联度法的分析结果，得到与半夏抗氧化活性相关性最密切的几个峰为 5（尿苷）、6（腺嘌呤）、7（鸟苷）、11（腺苷）、14 号峰（见图 5）。

3 讨论

本研究前期建立指纹图谱时，考察了不同的流动相（乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-水、甲醇-水）对样品的洗脱效果，结果乙腈-水为流动相时，基线较平稳，分离效果较好；对 210、260、310 nm 3 个波长进行考察，在 260 nm 波长下，色谱图的整体效果较好，大多数成分均有吸收，色谱峰较多，因此选择了检测波长为 260 nm；考察流速分别为 0.6、0.8、1.0 mL · min⁻¹ 时色谱峰分离度，结果流速在 0.8 mL · min⁻¹ 时色谱峰的峰形及分离效果均较好，故选择了流速为 0.8

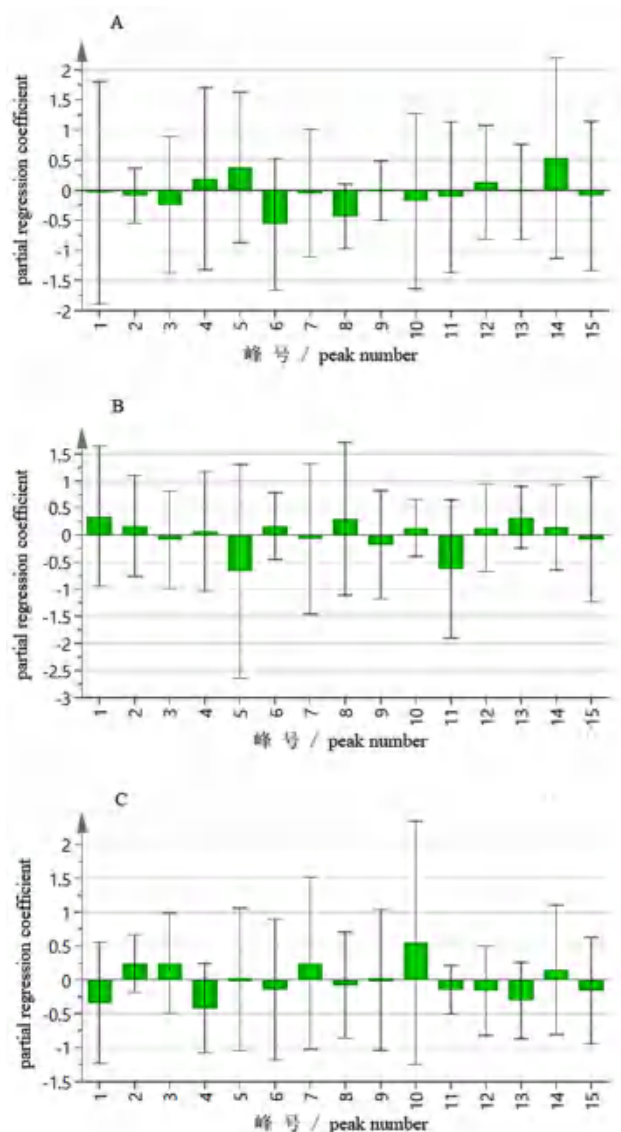


图 4 半夏提取物各共有峰与抗氧化指标间偏回归系数
Fig 4 Partial regression coefficient between common peaks of Pinelliae Rhizoma extract and antioxidant indexes
A. ABTS 自由基 (ABTS free radical); B. FRAP 自由基 (FRAP free radical); C. O₂^{-•} 自由基 (O₂^{-•} free radical)

mL · min⁻¹。此外对提取条件进行了考察，分别考察了不同提取方法（超声及回流法），不同提取溶剂（蒸馏水、5% 甲醇、10% 甲醇），不同提取时间（30、60、90 min）及不同料液比（1 : 5、1 : 10、1 : 15），结果以文中提取条件最佳。

体外抗氧化的研究方法较多，诸如化学分析法及细胞抗氧化活性法等^[20]，在化学分析法中又分为基于还原能力测定的铁离子还原能力（FRAP），铜离子还原能力及普鲁士蓝法，基于自由基清除能力测定的 ABTS 法^[12]、DPPH 法^[13]、·OH 法及 O₂^{-•} 等^[20]方法，其中 FRAP 法在天然植物的抗氧化能力研究中应用较多，但局限于测定结果仅能表明抗氧化剂的还原能力，

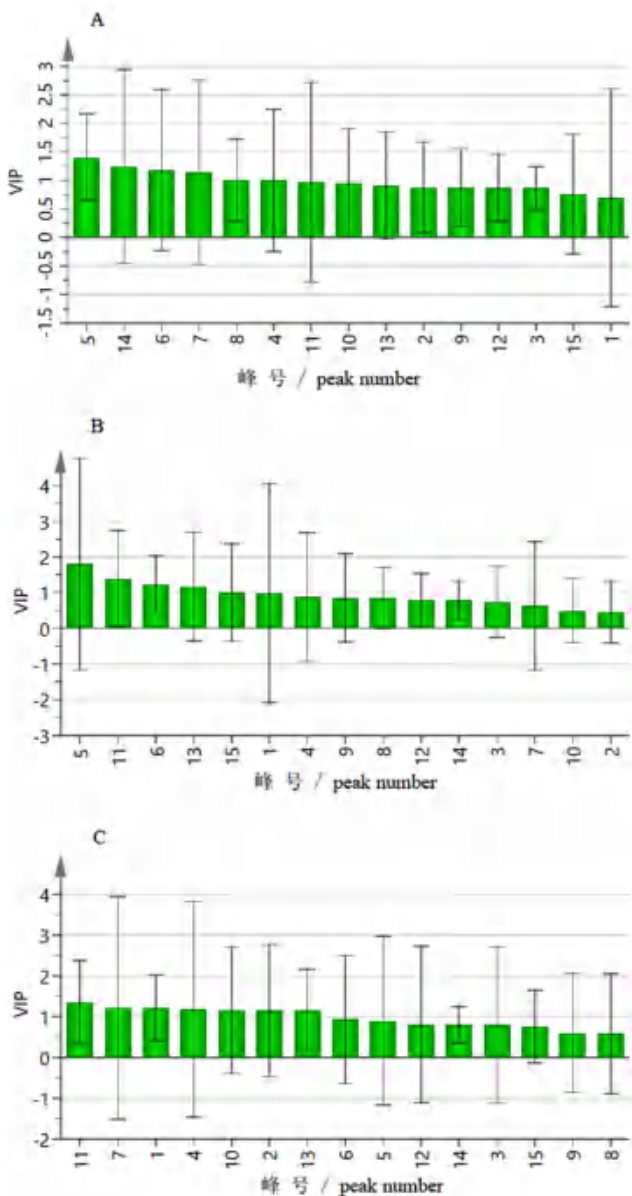


图 5 半夏提取物各共有峰与抗氧化指标间 VIP 值
Fig 5 VIP value between common peaks of Pinelliae Rhizoma extract and antioxidant indexes
B. ABTS 自由基 (ABTS free radical); B. FRAP 自由基 (FRAP free radical); C. O₂⁻ 自由基 (O₂⁻ free radical)

在体外抗氧化研究中往往与自由基清除能力的测定方法结合应用,更好地说明测定成分的抗氧化能力,本研究发现半夏水提取物中含有多糖类成分,以 DPPH 法进行测定,会产生白色絮状沉淀,干扰实验结果,因此选择 ABTS 法结合 O₂⁻· 及 FRAP 法为指标进行体外抗氧化研究。中药指纹图谱因其影响因素多、图谱复杂等特点,分析时通常需要阐明其不同成分之间的互作关系,灰色关联度法在一定程度上能较为客观地体现各变量间的相互影响^[21];而偏最小二乘回归分析在多元统计分析的基础上还能建立两变量间的回归模型,

从而进行变量关系的预测分析^[22],本文综合灰色关联度法与偏最小二乘回归分析,分析得到半夏 HPLC 指纹图谱中与抗氧化活性关联性最强的几个峰为 5 (尿苷)、6 (腺嘌呤)、7 (鸟苷)、11 (腺苷)、14 号峰。体外抗氧化的研究报道中尿苷^[23]、鸟苷、腺苷^[24]均具有抗氧化作用,王惠等^[25]在蝉花抑菌抗氧化谱效关系的研究中筛选出与抗氧化密切相关的成分中同样含有鸟苷、腺苷。李兵^[26]的研究提示一定剂量的蛹虫草腺苷可通过调节小鼠肾脏抗氧化酶的活力,从而减轻肾脏氧化应激所造成的损伤。文中并未指出 14 号峰,后续可通过液质联用等手段继续研究。

研究报道半夏可以降低动脉粥样硬化内膜增生大鼠的血脂水平^[27],具有抗动脉粥样硬化作用,但其作用机制尚未完全清楚。有学者以氧化应激为切入点,研究发现血管内氧自由基及其产物的增加与动脉粥样硬化密切相关,其中被氧化的低密度脂蛋白会干扰血管合成释放一氧化氮 (NO),使正常的血管舒缩功能受到影响,还能参与调控相关因子的表达,从而影响血管内皮功能及机体凝血功能,促进动脉粥样硬化^[28],而抗氧化剂可以防止低密度脂蛋白氧化^[29],减轻机体氧化应激。本研究中尿苷、鸟苷、腺苷等核苷类成分可在体外发挥抗氧化作用,体内研究表明腺苷 A_{2B} 受体在机体内也可以参与调节血管氧自由基^[30],但该核苷类成分是否为半夏机体内抗氧化的物质基础,能否减轻机体氧化损伤还有待进一步研究。

综上,本文对半夏 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性的谱效关系进行初步研究,其水溶性成分抗氧化活性为多成分协同发挥作用,为半夏体外抗氧化活性物质基础研究提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 123.
- [2] 王龙,高鑫,郭栩廷,等.经典名方半夏厚朴汤研究进展[J].中南药学,2022,20(9):2000-2007.
- [3] 王依明,王秋红.半夏的化学成分、药理作用及毒性研究进展[J].中国药房,2020,31(21):2676-2682.
- [4] 何华康.半夏的化学成分及其药理作用的研究进展[J].当代医药论丛,2020,18(7):18-20.
- [5] 杨丽,周易,王晓明,等.炮制对半夏化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(2):49-53.
- [6] 曾彦.动脉粥样硬化性心血管疾病抗氧化应激治疗的新启示[J].中国卒中杂志,2017,12(1):85-88.
- [7] 郭建恩,米树斌,闫秀川,等.瓜蒌薤白半夏汤对

- ApoE 小鼠血脂代谢、氧化应激和主动脉 Lox-1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (4): 752-757.
- [8] 叶兆伟, 叶润, 赫丁轩, 等. 息半夏多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33 (1): 90-98.
- [9] 张楠, 郭春延, 薛晶晶, 等. 半夏生物碱提取方法及抗氧化性研究 [J]. 实验技术与管理, 2019, 36 (8): 61-64.
- [10] 唐晓霞, 余跃, 张小燕, 等. 散结消癭颗粒及方中各相关药物体外抗氧化活性研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38 (2): 201-207, 218.
- [11] 丰丕雪, 易弋, 黄锦翔, 等. 半夏等 15 种常见中草药提取物的抗氧化能力比较研究 [J]. 广西科技大学学报, 2022, 33 (3): 91-99.
- [12] 李昌勤, 姚辰, 朱荣遥, 等. 基于 DPPH、ABTS 和 FRAP 的中药女贞子抗氧化谱效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (9): 1670-1677.
- [13] 李媛媛, 李灵犀, 崔艳, 等. 微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法动态监测从红酒中分离得到的不同种类多酚化合物的抗氧化活性 [J]. 现代食品科技, 2017, 33 (8): 130-140.
- [14] 杨少辉, 宋英今, 王洁华, 等. 雪莲果体外抗氧化和自由基清除能力 [J]. 食品科学, 2010, 31 (17): 166-169.
- [15] 黄婷, 周璐, 梅婵, 等. 枸杞中原花青素和总黄酮的抗氧化活性研究 [J]. 生物化工, 2020, 6 (1): 72-75.
- [16] 徐晶晶, 刘斌. 基于 DPPH、FRAP 法的薄荷药材抗氧化谱效关系研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38 (6): 405-410.
- [17] 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.
- [18] 姜红, 史亚军, 赵生玉, 等. 基于偏最小二乘法对三果汤抗氧化作用谱-效关系的分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (3): 8-12.
- [19] 丘琴, 卢显兴, 阮必高, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的扁担藤抗炎谱效关系研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (2): 369-373.
- [20] 曾文俊, 吕彩梦, 丁建宝, 等. 体外抗氧化活性评价方法的反应机理研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2022, 39 (12): 13-19.
- [21] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展 [J]. 中医药学报, 2018, 46 (4): 119-122.
- [22] 肖瑞瑶, 滕攀攀, 胡超, 等. 偏最小二乘回归分析应用于中药谱效关系的研究进展 [J]. 辽宁化工, 2020, 49 (3): 303-305.
- [23] Mohandoss S, Atchudan R, Edison TNJI, et al. Enhancement of solubility, antibiofilm, and antioxidant activity of uridine by inclusion in β -cyclodextrin derivatives [J]. J Mol Liq, 2020, 306 (19): 112849.
- [24] Zhang YN, Song M, TZI Bun Ng, et al. Purification and characterization of antioxidant components from the fruiting bodies of *Pleurotus abalonus* including 9-beta-D-ribofuranosyladenine, 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine, and a triterpenoid [J]. Environ Toxicol Phar, 2013, 36 (2): 689-696.
- [25] 王惠, 陈康, 郝雯雯, 等. 蝉花抑菌抗氧化谱效关系的初步研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41 (5): 56-65.
- [26] 李兵. 蛹虫草中虫草素和腺苷的提取分离及其对糖尿病小鼠肾脏氧化应激的影响 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
- [27] 卢海克, 戴颖仪, 陶青, 等. 半夏在动脉粥样硬化颈动脉内膜增生中的修复机制研究 [J]. 热带医学杂志, 2020, 20 (10): 1283-1287, 1402.
- [28] 陈华, 赵斌, 王婉. 抗氧化剂和 B 族维生素对缺血性脑卒中和脑动脉粥样硬化患者发病的影响 [J]. 山西医药杂志, 2019, 48 (24): 3030-3033.
- [29] 聂秋华, 韩蕊. 加味半夏白术天麻汤辅助西药治疗后循环缺血性眩晕 (痰瘀阻窍型) 对 DHI-S、DARS 评分及血清 CML、ox-LDL 水平的影响观察 [J]. 四川中医, 2021, 39 (12): 188-191.
- [30] 易云, 高云. 腺苷 A_{2B} 受体在心血管系统研究新进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30 (1): 21-24.

(收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-03-08)

Wilms 肿瘤 1 相关蛋白促进宫颈癌细胞增殖的作用及其机制

陈义波, 龙玲*, 范幸, 林蓓蓓 (长沙市妇幼保健院妇科, 长沙 410007)

摘要: **目的** 探讨 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (WTAP) 对宫颈癌细胞增殖的影响及其机制。 **方法** 结合 OncoLnc 数据库和 Cancer RNA-Seq Nexus (CRN) 数据库分析 WTAP 基因与宫颈癌患者预后的相关性; 通过 Western blot 分析人正常宫颈上皮细胞 (HUCEC)、宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞之间 WTAP 蛋白表达的差异; 利用小干扰 RNA (siRNA) 和质粒转染分别调控 HeLa 细胞中 WTAP 的表达。 HeLa 细胞分为对照 siRNA 组 (NC siRNA)、WTAP-siRNA 组 (WTAP siRNA)、对照质粒组 (Empty vector)、WTAP 过表达质粒组 (WTAP OE vector)。通过 Western blot 验证转染效果, CCK8 和克隆形成实验检测细胞增殖, Western blot 检测丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 活性和 G 蛋白信号调节物 5 (RGS5) 的表达, m6A-IP-qPCR 检测 RGS5 的 N6-甲基腺嘌呤 (m6A) 修饰水平。 **结果** WTAP 基因高表达组宫颈癌患者的总生存期显著低于 WTAP 基因低表达组患者 [Log-rank 检验 $P = 0.0412$ (OncoLnc) 和 0.0078 (CRN)]。与 HUCEC 相比, 宫颈癌细胞 SiHa 和 HeLa 细胞 WTAP 蛋白表达显著升高, HeLa 细胞升高更加显著 ($P < 0.05$)。与对照 siRNA 组相比, WTAP-siRNA 组 HeLa 细胞增殖能力显著升高 ($P < 0.05$), AKT 磷酸化水平显著降低、RGS5 表达显著增多 ($P < 0.05$), RGS5 m6A 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与对照质粒组相比, WTAP 过表达质粒组 HeLa 细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.05$), AKT 磷酸化水平显著升高、RGS5 表达显著减少 ($P < 0.05$), RGS5 m6A 水平显著升高 ($P < 0.05$)。 **结论** WTAP 促进宫颈癌 HeLa 细胞增殖, 其机制与调节 RGS5 的 m6A 修饰, 从而影响 AKT 信号通路有关。

关键词: Wilms 肿瘤 1 相关蛋白; 宫颈癌; HeLa 细胞; 增殖

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1190-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.012

Promotion effect of Wilms' tumor 1 associated protein on the proliferation of cervical cancer cells and its mechanism

CHEN Yi-bo, LONG Ling*, FAN Xing, LIN Bei-bei (Department of Gynecology, Changsha Hospital for Maternal and Child Health Care, Changsha 410007)

Abstract: Objective To determine the effect of Wilms' tumor 1 associated protein (WTAP) on the proliferation of cervical cancer cells and its mechanism. **Methods** OncoLnc and Cancer RNA-Seq Nexus (CRN) were used to analyze the correlation between WTAP expression and prognosis of cervical cancer patients. Western blot was used to analyze the differential WTAP protein expression between human cervical epithelial cells (HUCEC) and cervical cancer cells (SiHa and HeLa). Small interfering RNA (siRNA) and plasmid transfection were used to regulate the expression of WTAP in HeLa cells. HeLa cells were divided into a negative control (NC) siRNA group, a WTAP siRNA group, an empty vector group, and a WTAP OE vector group. The transfection effect was verified by Western blot. The proliferation of HeLa cells was detected by CCK8 and clone formation assay. AKT serine/threonine kinase (AKT) activity and regulator of G protein signaling 5 (RGS5) expressions were measured by Western blot, and the level of RGS5 N6-methyladenosine (m6A) was detected by m6A-IP-qPCR. **Results** The overall survival of patients with cervical cancer in WTAP gene high expression

基金项目: 湖南省卫健委科研项目 (No. 20200208)。

作者简介: 陈义波, 女, 主任医师, 主要从事妇科肿瘤研究, email: 13908472892@sohu.com *通信作者: 龙玲, 女, 主任医师, 主要从事妇科肿瘤研究, email: 941109223qq.com

group was significantly lower than that of patients with low expression of *WTAP* gene, the Log-rank test $P = 0.0412$ (oncolnc) and 0.0078 (CRN). Compared with the HUVEC, the protein expression of *WTAP* in SiHa and HeLa cells was significantly higher, the increased expression was more significant in HeLa cells ($P < 0.05$). Compared with the scrambled siRNA group, the proliferation of HeLa cells in the *WTAP* siRNA group increased significantly ($P < 0.05$), AKT phosphorylation decreased significantly, *RGS5* expression increased significantly ($P < 0.05$), and *RGS5* m6A level decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the empty vector group, the proliferation of HeLa cells in the *WTAP* OE vector group decreased significantly ($P < 0.05$), AKT phosphorylation increased significantly, *RGS5* expression decreased significantly ($P < 0.05$), and *RGS5* m6A level increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** *WTAP* promotes the proliferation of cervical cancer HeLa cells, whose mechanism is related to m6A modification of *RGS5* and AKT signaling pathway.

Key words: Wilms' tumor 1 associated protein; cervical cancer; HeLa cell; proliferation

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤, 据最新全球癌症年报报道, 我国 2020 年新发宫颈癌病例 11 万例, 其中死亡病例数近 6 万例^[1], 严重危害女性健康。Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (Wilms' tumor 1 associating protein, *WTAP*) 作为一种致癌分子, 在基因表达调控中发挥重要作用^[2]。研究表明 *WTAP* 在胰腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞中异常高表达, 具有肿瘤特异性和促癌效应^[3-4], 但其在宫颈癌中的作用尚未见明确报道。宫颈癌的发生发展过程极其复杂, 细胞增殖失控在其中起重要作用^[5]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT serine/threonine kinase, AKT) 作为细胞存活和代谢过程的一种丝氨酸苏氨酸激酶, 在细胞增殖调控中发挥重要作用^[6]。AKT 信号通路的激活能够调节大量下游靶分子, 影响宫颈癌细胞增殖^[7]。N6 甲基腺嘌呤 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰是最常见的 RNA 转录后修饰之一, 影响 RNA 的剪接、翻译和稳定性^[8]。m6A 参与宫颈癌细胞增殖的调控, 但作为 m6A 甲基转移酶关键组分的 *WTAP* 在宫颈癌细胞增殖调控中的作用暂无报道。本研究旨在探讨 *WTAP* 与宫颈癌预后的关系以及在宫颈癌 HeLa 细胞中的表达情况, 并在 HeLa 细胞中敲低或过表达 *WTAP*, 观察其对细胞增殖的影响及探讨其可能的调控机制。

1 材料

人正常宫颈上皮细胞 HUVEC、宫颈癌 SiHa 细胞和 HeLa 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司), DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 (美国 Gibco 公司), CCK8 试剂盒和结晶紫染料 (北京兰杰柯科技有限公司)。靶向 *WTAP* 的 siRNA 和对照 siRNA (NC siRNA) (广州锐博生物

公司), 对照质粒 (empty vector) 和 *WTAP* 过表达质粒 (*WTAP* OE vector) (武汉森灵生物科技有限公司), 转染试剂 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司), 抗 *WTAP*、p-AKT、AKT 和 G 蛋白信号调节物 5 (Regulator of G Protein Signaling 5, *RGS5*) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), m6A 抗体 (美国 Abcam 公司), PrimeScript RT reagent Kit 和 TB Green Premix Ex Taq (日本 Takara 公司)。

2 方法

2.1 生物信息学资料分析

通过 OncoLnc 数据库 (<https://www.oncolnc.org>) 和 Cancer RNA-Seq Nexus (CRN) 数据库 (<https://syslab4.nchu.edu.tw>), 采用 COX 回归法进行 *WTAP* 表达高/低表达组的宫颈癌生存分析, 数据库中宫颈癌资料均来源于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库。

2.2 细胞培养

HUVEC、SiHa 和 HeLa 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。隔天换液、0.125% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3 HeLa 细胞转染和实验分组

HeLa 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待密度达 50% 时进行细胞转染操作, 按 Lipofectamine 3000 说明书进行转染细胞 48 h, 利用 Western blot 检测 *WTAP* 蛋白表达水平, 用于后续实验。细胞分为对照 siRNA 组 (NC siRNA)、*WTAP*-siRNA 组 (*WTAP* siRNA)、对照质粒组 (Empty vector)、*WTAP* 过表达质粒组 (*WTAP* OE vector)。

2.4 CCK8 实验检测 HeLa 细胞增殖

将 HeLa 细胞依照不同分组进行转染处理 48 h

后,按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每组 6 个复孔,48 h 后每孔加入 CCK8 试剂 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后通过酶标仪测定 450 nm 的吸光度值^[9],上述实验重复 3 次。

2.5 克隆形成实验检测 HeLa 细胞增殖

将 HeLa 细胞依照不同分组进行转染处理 48 h 后,按 1×10^3 个/孔接种于 35 mm 培养皿,每组 3 个复孔,每隔 2~3 d 换液,14 d 后 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色液体染色 10 min 后拍照,记录克隆形成数量^[10],上述实验重复 3 次。

2.6 Western blot 检测蛋白表达

将细胞依照不同分组进行转染处理 48 h 后,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,48 h 后用 RIPA 裂解细胞收集总蛋白并进行 BCA 定量,煮沸 5 min 蛋白变性。取 20 μ g 总蛋白通过 10% 的 SDS-PAGE 胶电泳分离,转移至 PVDF 膜并用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,WTAP、p-AKT、AKT 或 RGS5 一抗(1:2000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜 5 次,二抗(1:5000)室温孵育 1 h,ECL 化学发光采集图像及灰度分析,以 GAPDH 作为内参照,各组蛋白表达水平=各目的蛋白灰度值/GAPDH 蛋白灰度值^[11]。上述实验重复 3 次。

2.7 m6A-IP-qPCR 检测 RGS5 m6A 水平

将 HeLa 细胞依照不同分组进行转染处理 48 h 后,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,每组 6 个复孔,48 h 后用 Trizol 裂解细胞收集总 RNA 并分为 2 份,分为用于 Input 和 m6A 抗体 IP 富集 m6A 修饰的 RNA,再逆转录扩增成 cDNA^[12],qPCR 检测 RGS5 水平,程序为 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 34 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。RGS5 引物由上海生工生物公司合成,根据 RGS5 mRNA 序列,在 Primer3 在线数据库(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计 RGS5 mRNA 的引物,序列为 Forward primer (5'-GACATGGCCCCAGAAAAGAATC-3') 和 Reverse primer (5'-CACAAAGCGAGGCAGAGAATC-3'),并进一步在 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 上比对证明其扩增产物的特异性。上述实验重复 3 次。

2.8 统计学分析

采用 Log-rank 检验分析 WTAP 表达与宫颈癌生存的相关性。采用 GraphPad Prism 8 软件处理数据及绘图,用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示数据,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行多组间比较,其中两两比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 WTAP 基因表达与宫颈癌患者预后关系

通过 OncoLnc 数据库和 Cancer RNA-Seq Nexus (CRN) 数据库分别分析 WTAP 基因表达与宫颈癌患者预后的相关性,结果显示,WTAP 高表达组宫颈癌患者总生存期显著低于 WTAP 低表达患者,Log-rank 检验 $P = 0.0412$ (OncoLnc) 和 0.078 (CRN),见图 1。

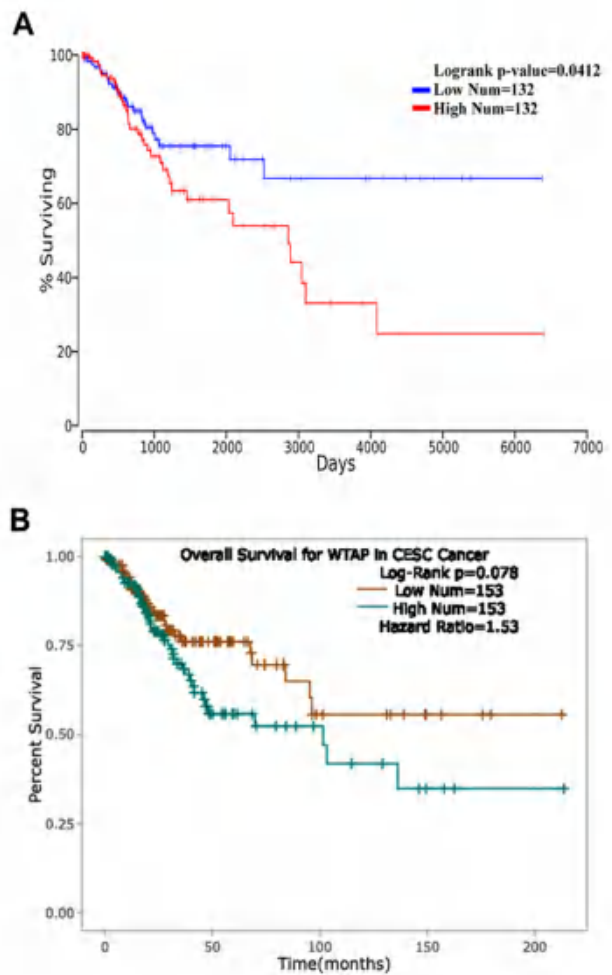


图 1 WTAP 基因表达与宫颈癌患者预后关系

Fig 1 Relationship between WTAP gene expression and prognosis of patients with cervical cancer

A. OncoLnc; B. Cancer RNA-Seq Nexus (CRN)

3.2 正常宫颈上皮细胞 HUVEC 和宫颈癌细胞 WTAP 蛋白表达

通过 Western blot 实验检测正常宫颈上皮细胞 HUVEC、宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞的 WTAP 蛋白表达,结果显示,与 HUVEC 相比,SiHa 细胞和 HeLa 细胞 WTAP 蛋白表达显著高表达 ($P < 0.05$),HeLa 细胞中 WTAP 蛋白升高更显著,用于后续实验研究,见图 2。

3.3 HeLa 细胞 WTAP siRNA 或质粒转染效率检测

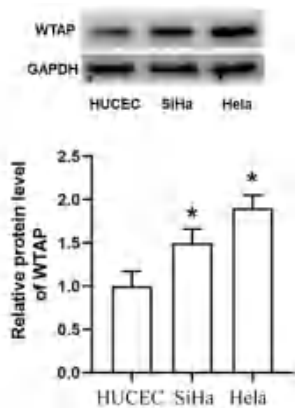


图 2 正常宫颈上皮细胞 (HUVEC) 和宫颈癌细胞 WTAP 蛋白表达
Fig 2 Expression of WTAP protein in HUVEC and cervical cancer cells
注 (Note): 与 HUVEC 细胞比较, * $P < 0.05$ (vs the HUVEC cell, * $P < 0.05$)。

通过 Western blot 实验检测 siRNA 或质粒转染后 48 h 的 HeLa 细胞的 WTAP 蛋白表达, 结果显示, 与对照 siRNA (NC siRNA) 组相比, WTAP-siRNA 组 WTAP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与对照质粒组相比, WTAP 过表达质粒组 WTAP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.4 WTAP 对 HeLa 细胞增殖的影响

通过 CCK8 和克隆形成实验检测 HeLa 细胞增殖情况, 结果显示, 与对照 siRNA 组相比, WTAP-

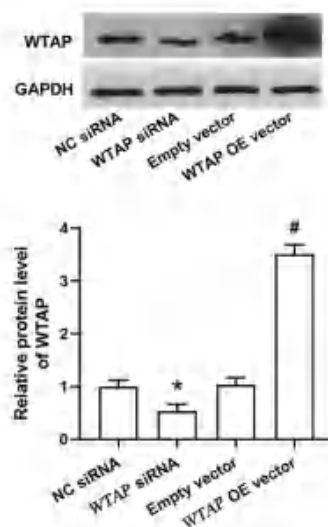


图 3 HeLa 细胞中 WTAP siRNA 和过表达效果
Fig 3 Effect of WTAP siRNA and its overexpression in HeLa cells
注 (Note): 与 NC siRNA 组比较, * $P < 0.05$; 与对照质粒组比较, # $P < 0.05$ (vs the NC siRNA group, * $P < 0.05$; vs the Empty vector group, # $P < 0.05$)。

siRNA 组细胞 CCK8 的 $OD_{450\text{nm}}$ 值显著降低、细胞克隆形成数量显著减少 ($P < 0.05$); 与对照质粒组相比, WTAP 过表达质粒组细胞 CCK8 的 $OD_{450\text{nm}}$ 值显著升高、细胞克隆形成数量显著增多 ($P < 0.05$), 见图 4。

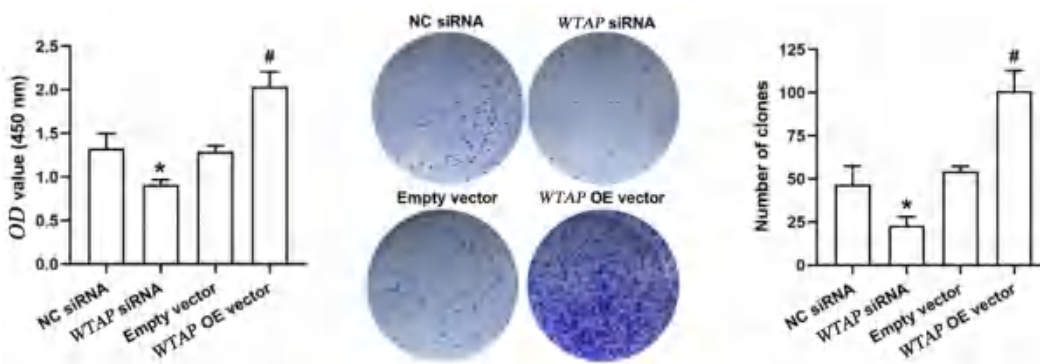


图 4 WTAP 对 HeLa 细胞增殖的影响

Fig 4 Effect of WTAP on the proliferation of HeLa cells

注 (Note): 与 NC siRNA 组比较, * $P < 0.05$; 与对照质粒组比较, # $P < 0.05$ (vs the NC siRNA group, * $P < 0.05$; vs the Empty vector group, # $P < 0.05$)。

3.5 WTAP 对 HeLa 细胞 AKT 磷酸化和 RGS5 表达的影响

通过 Western blot 实验检测 HeLa 细胞 p-AKT、AKT 和 RGS5 情况, 结果显示, 与对照 siRNA 组相比, WTAP-siRNA 组 AKT 磷酸化水平 (p-AKT/AKT) 显著降低, RGS5 表达显著增多 ($P < 0.05$); 与对照质粒组相比, WTAP 过表达质粒组 AKT 磷酸化水平显著升高, RGS5 表达显著降低 ($P < 0.05$),

见图 5。

3.6 WTAP 对 HeLa 细胞 RGS5 m6A 水平的影响

通过 m6A-IP-qPCR 实验检测 HeLa 细胞 RGS5 m6A 水平, 结果显示, 与对照 siRNA 组相比, WTAP-siRNA 组 RGS5 m6A 水平降低 ($P < 0.05$); 与对照质粒组相比, WTAP 过表达质粒组 RGS5 m6A 水平升高 ($P < 0.05$), 见图 6。

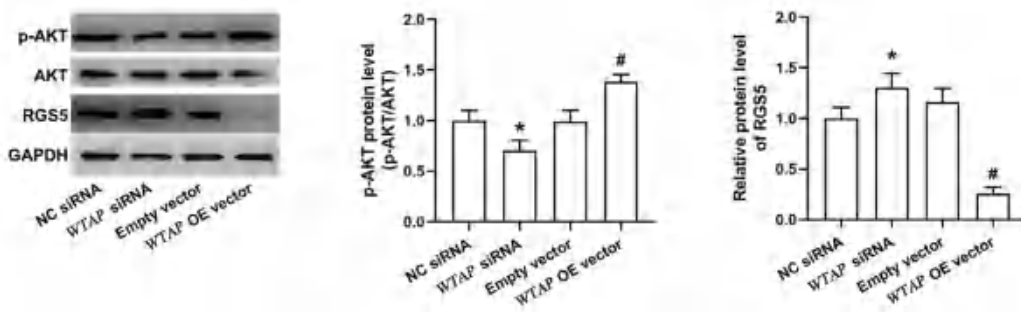


图 5 *WTAP* 对 HeLa 细胞 AKT 磷酸化和 RGS5 表达的影响
Fig 5 Effect of *WTAP* on AKT phosphorylation and RGS5 expression of HeLa cells

注 (Note): 与 NC siRNA 组比较, * $P < 0.05$; 与对照质粒组比较, # $P < 0.05$ (vs the NC siRNA group, * $P < 0.05$; vs the Empty vector group, # $P < 0.05$).

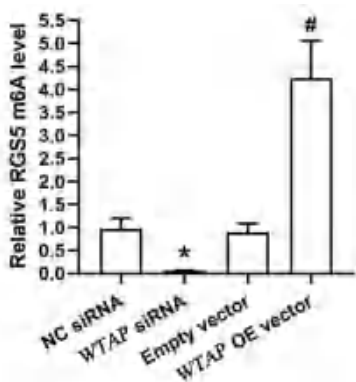


图 6 *WTAP* 对 HeLa 细胞 RGS5 m6A 水平的影响
Fig 6 Effect of *WTAP* on RGS5 m6A level of HeLa cells

注 (Note): 与 NC siRNA 组比较, * $P < 0.05$; 与对照质粒组比较, # $P < 0.05$ (vs the NC siRNA group, * $P < 0.05$; vs the Empty vector group, # $P < 0.05$).

4 讨论

宫颈癌发病率在我国女性恶性肿瘤中居第二位, 仅次于乳腺癌, 近年来, 宫颈癌发病率上升, 且呈现年轻化趋势。尽管宫颈细胞学筛查在一定程度上能降低宫颈癌患者死亡率, 但其在女性健康方面仍是一个巨大挑战^[13]。RNA 修饰种类多达 100 多种, 其中 m6A 修饰是真核生物中最为普遍的修饰形式, 在组织发育、细胞更新和分化、损伤应答等生物学过程中发挥着重要的作用。m6A 和癌症发生发展的关系也十分密切^[14]。*WTAP* 作为一种重要的 m6A 甲基转移酶, 最初被鉴定为与 Wilms 肿瘤 1 蛋白结合的剪接因子^[15], 在许多肿瘤中发挥着重要的作用^[16], 研究报道显示它能够调节肝内胆管癌细胞的迁移与侵袭, 在急性白血病中也被认为是一种致癌基因, 还能作为胶质瘤耐预后不良的预测指标^[17-18]。

本文首先通过肿瘤公共数据库挖掘 *WTAP* 与宫颈癌患者生存期的关联, 结果显示 *WTAP* 高表达组宫颈癌患者总生存期明显低于 *WTAP* 低表达

患者。并进一步比较正常宫颈上皮细胞 HUCEC、宫颈癌 SiHa 和 HeLa 细胞中 *WTAP* 蛋白的表达, 结果显示 HeLa 细胞中 *WTAP* 蛋白显著升高, 提示 *WTAP* 在宫颈癌中同样高表达, 且可能起致癌作用。本研究结果表明, 利用 siRNA 敲低 *WTAP* 后, HeLa 细胞增殖明显受限; 而过表达 *WTAP* 则显著促进 HeLa 细胞的增殖, 这与已有文献报道敲低 *WTAP* 会抑制肾癌肿瘤细胞增殖的结果类似^[19]。

AKT 是细胞增殖调控的关键信号通路之一, 针对 AKT 信号通路“关键点”的小分子抑制剂在抗肿瘤方面已取得明显的应用效果^[20]。研究报道显示宫颈癌组织中 p-AKT 的表达显著增高, 且随着疾病的进展表达逐渐增强, 与宫颈癌的分化及分期相关^[21]。本研究结果显示, 敲低 *WTAP* 抑制 AKT 活化, 而过表达 *WTAP* 促进 AKT 活化, 这与已有研究报道的 *WTAP* 能激活 AKT 通路促进胰腺癌细胞的结果类似^[22]。

G 蛋白偶联受体的激活能够调控 AKT 信号通路^[23], RGS5 作为 GTP 酶激活剂调节异源三聚体 G 蛋白, 能够钝化 AKT 信号通路而影响细胞活力^[24]。本研究结果显示, 敲低 *WTAP* 促进 RGS5 表达, 而过表达 *WTAP* 抑制 RGS5 表达。考虑到 *WTAP* 作为一种 m6A 甲基转移酶^[25], Chen 等^[26]报道 *WTAP* 能够通过 m6A 修饰 HMBX1 而促进骨肉瘤发生。本文选用 m6A-IP-qPCR 进行 *WTAP* 是否调控 RGS5 的 m6A 修饰分析, m6A-IP-qPCR 是一种利用 m6A 抗体富集 m6A 修饰的 RNA 并进行 qPCR 定量分析检测方法, 本文研究结果显示敲低 *WTAP* 后 RGS5 的 m6A 修饰减少, 而过表达 *WTAP* 则促进 RGS5 的 m6A 修饰, 提示 *WTAP* 能影响 RGS5 的 m6A 修饰, 但具体 m6A 修饰的位点和区域仍需要进一步的深入研究。

综上所述, 本研究利用肿瘤生物信息学网络

分析 *WTAP* 与宫颈癌患者预后的相关性情况,并在细胞水平证实宫颈癌细胞 *WTAP* 蛋白高表达,并进一步明确 *WTAP* 促进 HeLa 细胞增殖,其机制可能与调节 *RGS5* 的 m6A 修饰继而影响 AKT 信号通路活化有关,这为以 *WTAP* 及其调控的通路作为潜在靶标治疗宫颈癌提供了实验依据。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70 (1): 7-30.
- [2] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian *WTAP* is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. *Cell Res*, 2014, 24 (2): 177-189.
- [3] Deng J, Zhang J, Ye Y, et al. N6-methyladenosine-mediated upregulation of *WTAPP1* promotes *WTAP* translation and Wnt signaling to facilitate pancreatic cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2021, 81 (20): 5268-5283.
- [4] Yu HL, Ma XD, Tong JF, et al. *WTAP* is a prognostic marker of high-grade serous ovarian cancer and regulates the progression of ovarian cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6191-6201.
- [5] Sun H, Ma H, Zhang H, et al. Up-regulation of *MELK* by *E2F1* promotes the proliferation in cervical cancer cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (14): 3875-3888.
- [6] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 125-132.
- [7] Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20 (2): 74-88.
- [8] Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (10): 608-624.
- [9] 钟桂兰, 周知, 王茹, 等. 紫檀芪对宫颈癌细胞自噬及 *SIRT1-FoxO* 信号通路的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36 (8): 1439-1443.
- [10] 肖莉, 高月, 马秀洁, 等. *ARMCX1* 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36 (1): 170-174.
- [11] Jiang Y, Liu Y, Xiao W, et al. Xinmailong attenuates doxorubicin-induced lysosomal dysfunction and oxidative stress in H9c2 cells via *HO-1* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5896931.
- [12] Hao CC, Xu CY, Zhao XY, et al. Up-regulation of *VANGL1* by *IGF2BPs* and *miR-29b-3p* attenuates the detrimental effect of irradiation on lung adenocarcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39 (1): 256.
- [13] Kim JJ, Burger EA, Regan C, et al. Screening for cervical cancer in primary care: a decision analysis for the US preventive services task force [J]. *JAMA*, 2018, 320 (7): 706-714.
- [14] 张哲明, 吴艳, 卞涛. RNA m6A 修饰在肺部疾病中的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (9): 1719-1723.
- [15] Little NA, Hastie ND, Davies RC. Identification of *WTAP*, a novel Wilms' tumour 1-associating protein [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9 (15): 2231-2239.
- [16] Jo HJ, Shim HE, Han ME, et al. *WTAP* regulates migration and invasion of cholangiocarcinoma cells [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48 (11): 1271-1282.
- [17] Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, et al. *WTAP* is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2014, 28 (5): 1171-1174.
- [18] Xi Z, Xue Y, Zheng J, et al. *WTAP* expression predicts poor prognosis in malignant glioma patients [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 60 (2): 131-136.
- [19] Tang J, Wang F, Cheng G, et al. Wilms' tumor 1-associating protein promotes renal cell carcinoma proliferation by regulating *CDK2* mRNA stability [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37 (1): 40.
- [20] Brown JS, Banerji U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172: 101-115.
- [21] 牟大英, 黄露, 李坪原. 宫颈癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达及与临床病理特征和预后的关系 [J]. *重庆医科大学学报*, 2021, 46 (6): 675-680.
- [22] Li BQ, Liang ZY, Seery S, et al. *WT1* associated protein promotes metastasis and chemo-resistance to gemcitabine by stabilizing *Fak* mRNA in pancreatic cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 451: 48-57.
- [23] Hooks SB, Callihan P, Altman MK, et al. Regulators of G-protein signaling *RGS10* and *RGS17* regulate chemoresistance in ovarian cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 289.
- [24] Silini A, Ghilardi C, Figini S, et al. Regulator of G-protein signaling 5 (*RGS5*) protein: a novel marker of cancer vasculature elicited and sustained by the tumor's proangiogenic microenvironment [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69 (7): 1167-1178.
- [25] Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 74.
- [26] Chen S, Li Y, Zhi S, et al. *WTAP* promotes osteosarcoma tumorigenesis by repressing *HMBOX1* expression in an m6A-dependent manner [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (8): 659.

(收稿日期: 2022-10-24; 修回日期: 2023-03-26)

RGD 和泊洛沙姆 F127 共修饰载多西紫杉醇脂质体的制备及体外抗卵巢癌的初步研究

马宁珠¹, 王振霖¹, 张建国¹, 齐娜^{1, 2*} (1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 南方医科大学中西医结合医院, 广州 510315)

摘要: **目的** 制备精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽序列 (RGD) 和泊洛沙姆 F127 共修饰载多西紫杉醇脂质体 (DTX-F127-RGD-LP) 并研究其对卵巢癌体外抗肿瘤效应。**方法** 采用薄膜水化法制备 DTX-F127-RGD-LP, 通过电镜测定其形态, 并进行粒径、电位、包封率、载药量等表征的测定及体外稳定性的考察; 以香豆素 6 为荧光探针考察 SKOV3 细胞对修饰的脂质体的摄取情况, 通过加入不同的内吞抑制剂研究修饰的脂质体的摄取机制; 采用 MTT 法及结晶紫染色法考察修饰的脂质体对 SKOV3 细胞的毒性。**结果** DTX-F127-RGD-LP 粒径为 (107.2 ± 0.67) nm, 电位为 $-(19.7 \pm 0.4)$ mV, 包封率为 86.4%, 载药量为 2.7%, 体外稳定性良好。RGD 和泊洛沙姆 F127 修饰后显著增加 SKOV3 细胞对脂质体的摄取量, DTX-F127-RGD-LP 的内吞主要通过小窝蛋白、巨胞饮以及整合素蛋白途径摄取进入细胞。与未修饰的脂质体相比, DTX-F127-RGD-LP 对 SKOV3 细胞毒性最大, 结晶紫染色法的结果与 MTT 结果一致, 经计算 DTX-F127-RGD-LP 的 IC_{50} 值为 $0.039 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论** DTX-F127-RGD-LP 能显著增强体外卵巢癌细胞的摄取, 提高体外抗卵巢癌效应。

关键词: 多西紫杉醇; 泊洛沙姆 F127; 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽序列; 卵巢癌

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1196-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.013

Preparation of docetaxel-loaded liposomes co-modified by RGD and poloxamer F127 and preliminary study on anti-ovarian cancer in vitro

MA Ning-zhu¹, WANG Zhen-lin¹, ZHANG Jian-guo¹, QI Na^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541004; 2. Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315)

Abstract: Objective To prepare docetaxel-loaded liposome co-modified by RGD and poloxamer F127 (DTX-F127-RGD-LP) and determine its antitumor effect on ovarian cancer in vitro. **Methods** DTX-F127-RGD-LP was prepared by thin film hydration method. Its morphology was determined by electron microscope. Its particle size, potential, encapsulation efficiency, drug loading and stability in vitro were measured. The uptake of modified liposomes by SKOV3 cells was investigated with coumarin 6 as the fluorescent probe, and the uptake mechanism of modified liposomes was revealed by adding different endocytosis inhibitors. The toxicity of modified liposomes on SKOV3 cells was detected by MTT and crystal violet staining. **Results** The particle size of DTX-F127-RGD-LP was (107.2 ± 0.67) nm, the potential was $-(19.7 \pm 0.4)$ mV, the encapsulation efficiency was 86.4%, the drug loading was 2.7%, with good stability in vitro. After RGD and F127 modification, the uptake of liposomes by SKOV3 cells was significantly increased. The endocytosis of DTX-F127-RGD-LP was mainly absorbed into cells through the caveolin pathway, megacytosis and integrin pathway. Compared with the unmodified liposomes, DTX-F127-RGD-LP was the most toxic to SKOV3 cells. Crystal violet staining results were

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (No. 2017GXNSFAA198061)。

作者简介: 马宁珠, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物新型递送系统的研究, email: 2717074865@qq.com *通信作者: 齐娜, 女, 博士, 副教授, 主要从事药物新型递送系统的研究, email: 53123453@qq.com

consistent with MTT results. The IC_{50} value of DTX-F127-RGD-LP was $0.039 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion** DTX-F127-RGD-LP can significantly enhance the uptake of ovarian cancer cells in vitro and improve the anti-ovarian cancer effect in vitro.

Key words: docetaxel; poloxamer F127; RGD; ovarian cancer

卵巢癌是危及女性健康和生命的恶性肿瘤之一,其病死率居妇科肿瘤之首^[1]。2020年数据统计显示,全球卵巢癌新增患者约31万人,死亡人数约20万,具有明显的上升趋势^[2]。卵巢癌发病隐匿,临床确诊多为晚期,对于早期癌症手术治疗有效,但中晚期手术治疗不能完全切除,预后不良,且易复发和转移^[3],在临床治疗中化疗药物发挥着至关重要的作用。

大多数化疗药物存在水溶性差、生物相容性低、体内分布广等问题^[4]。此外,化疗药物生物选择性差,进入体内后杀伤肿瘤细胞的同时会对正常细胞、组织机体造成巨大的毒副作用,降低患者的生活质量,制约了其临床应用^[5]。为解决这一系列问题,需要寻找合适的药物递送系统降低不良反应。脂质体是由胆固醇和磷脂及其衍生物在体外自我组装形成的囊泡,其结构类似于细胞膜的磷脂双分子层,具有良好的生物相容性和细胞亲和力^[6],同时,纳米脂质体通过注射能够渗透、滞留于肿瘤部位,将药物带入肿瘤细胞内,是一种优良稳定的药物递送系统。

肿瘤细胞增殖快,与正常组织有较大差异,其组织内血管间隙大、淋巴管不完整,脂质体因其独特的尺寸和结构,以及具有高渗透和滞留效应(EPR效应),能通过被动靶向作用积聚于肿瘤组织,但是其肿瘤富集是有限的^[7]。为实现药物精准给药,单靠EPR效应远远不够,主动靶向是解决药物肿瘤富集率低和降低正常细胞的毒副作用的有效方案^[8]。肿瘤微环境复杂,与正常细胞相较,整合素家族在肿瘤细胞中过度表达^[9]。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽序列(RGD)可以与细胞膜表面的跨膜黏附蛋白整合素特异性结合^[10]。经聚乙二醇化(PEG)和RGD修饰后,脂质体可以延长体内循环时间,具有相关肿瘤新生血管和肿瘤细胞的主动靶向能力^[11]。泊洛沙姆是由聚环氧乙烷(PEO)和聚环氧丙烷(PPO)组成的两亲性三嵌段共聚物,具有无毒性和良好的生物相容性等优点^[12-13],是一种可静脉注射的高分子非离子表面活性剂,其两端的亲水嵌段可以抑制血小板聚集,延长体内循环时间^[14]。中间的疏水嵌段可以嵌入磷脂双分子层,不同嵌段的泊洛沙姆可以调控脂质体形态结构,增强脂质体的稳

定性和细胞内化水平^[15]。本研究选取多西紫杉醇(DTX)为模型药物,DTX可影响肿瘤细胞微管蛋白聚合和解聚,使细胞G₂/M期受到阻滞,达到抑制肿瘤细胞生长作用^[16]。DTX包载于脂质体疏水域,RGD修饰在表面,泊洛沙姆F127镶嵌其中,以期增加药物溶解性,延长循环时间,提高内化水平,实现药物靶向递送,降低全身毒副作用,提高生存期和抗肿瘤效果。

1 材料

1.1 试剂

蛋黄卵磷脂(Epc,美国SBTI公司);胆固醇(Chol,上海行知化工厂);DTX(北京诺瑞医药技术有限公司);泊洛沙姆F127(德国BASF公司);RGD-DSPE-PEG2000(上海芃硕生物科技有限公司);DMEM高糖培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(FBS)、PBS缓冲液、青链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶细胞消化液(北京索莱宝科技有限公司);香豆素-6(广州日化化工有限公司);Hoechst 33342染色剂、抗荧光淬灭封片液(碧云天生物技术有限公司);4%多聚甲醛(上海如吉生物科技发展有限公司);SKOV3卵巢癌细胞(桂林医学院科学实验中心惠赠)。

1.2 仪器

R-1001W旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);DZF-300真空干燥箱(上海喆钛机械制造有限公司);20-AT高效液相色谱仪(日本岛津公司);2D-85恒温振荡器(常州国华仪器);UV-1800PC紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司);Nano ZSE粒径电位分析仪(英国马尔文仪器公司);AXio Imager z2倒置荧光显微镜(日本ZEISS公司)。

2 方法与结果

2.1 DTX分析方法学

配制 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DTX溶液,以甲醇为溶剂作为空白,在200~800 nm波长内进行紫外扫描^[17],结果DTX在230 nm处有最大吸收峰,后续实验选择230 nm作为其检测波长。分别配制20.0、40.8、61.2、81.6、102.0、204.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DTX对照品溶液进样,记录峰面积,以DTX质量浓度C为横坐标,峰面积A为纵坐标,得到线性回归方程 $A = 1.277 \times 10^4 C - 1.970 \times 10^4$, $r =$

0.997, 结果显示 DTX 在 $20 \sim 204 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。配制 $30.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DTX 对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录峰面积并计算日内精密度^[18-19], 结果显示, RSD 值为 0.5%, 说明实验测量准确, 仪器精密度高, 可用于分析结果。取载 DTX 脂质体样品、DTX 对照品以及

空白脂质体样品进样, 记录峰面积, 考察专属性^[20], 结果如图 1 所示, DTX 的 HPLC 色谱图基线平稳, 峰形稳定。图 1B 显示 DTX 的保留时间为 6.520 min, 结合图 1A 中空白脂质体甲醇溶液仅有溶剂峰, 并不影响 DTX 出峰及峰形, 专属性良好。

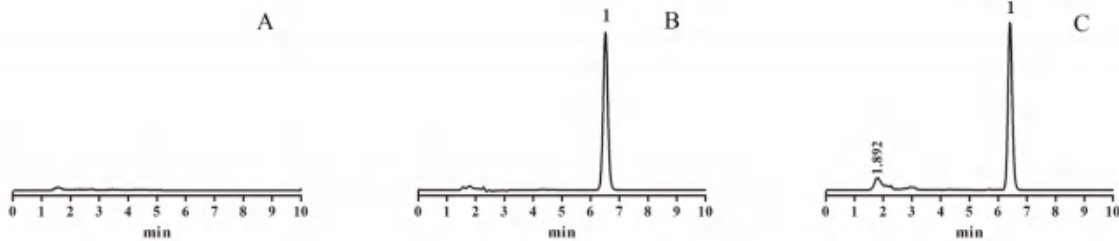


图 1 HPLC 专属性实验

Fig 1 HPLC specific experimental

A. 空白脂质体 (blank liposomes); B. 对照品溶液 (reference); C. 含药脂质体溶液 (docetaxel liposomes); 1. 多西紫杉醇 (docetaxel)

2.2 脂质体的制备

采用薄膜水化法制备脂质体, 按摩尔比 95 : 20 : 5 : 0.1 : 2 精确称量 Epc、Chol、DTX、RGD-DSPE-PEG2000、泊洛沙姆 F127 溶于 5 mL 氯仿中, 转移至 250 mL 圆底烧瓶, 37 °C 水浴中减压蒸发 15 min 使有机溶剂挥发成膜 ($90 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 37 °C 真空干燥 2 h 后, 加入 5 mL pH 为 7.4 的 PBS 溶液水化 30 min ($90 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 水化完成后转移至西林瓶, 150 W 下超声 3 min 得到 RGD 和泊洛沙姆 F127 共修饰的载多西紫杉醇脂质体 (DTX-F127-RGD-LP), 封口后于 4 °C 冰箱冷藏^[21-22]。DTX-LP、DTX-F127-LP 和 DTX-RGD-LP 根据上述方法进行制备。用香豆素 -6 (C6) 代替 DTX, 根据上述方法制备载香豆素 -6 荧光探针的脂质体 C6-LP、C6-F127-LP、C6-RGD-LP 和 C6-F127-RGD-LP, 全程注意避光。

2.3 脂质体的初步表征

2.3.1 形态观察 取适量 DTX-F127-RGD-LP 脂质体用 1% 磷钨酸负染滴入铜网, 放入干燥皿中过夜, 干燥后使用透射电子显微镜观察形态^[23]。DTX-F127-RGD-LP 透射电子显微镜图片如图 2 所示, 脂质体呈球形囊泡状, 大小基本均一。

2.3.2 电位与粒径的测定 各组脂质体稀释 10 倍后, 置于比色皿中, 使用马尔文粒径电位测量仪测量脂质体粒径与电位。结果如表 1 和图 3 所示, 各组脂质体粒径均在 200 nm 以下, 多分散指数 (PDI) 在 0.23 左右, 脂质体分散良好, 符合制剂要求。DTX-F127-RGD-LP 粒径和电位, 近似正态分布。粒径为 $(107.2 \pm 0.67) \text{ nm}$, 电位为 $-(19.7 \pm 0.4) \text{ mV}$, 脂质体表面带负电荷更具有稳定性。

2.3.3 包封率和载药量的测定 取 DTX-LP、DTX-

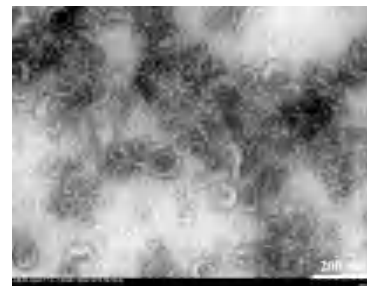


图 2 DTX-F127-RGD-LP 脂质体透射电子显微镜图

Fig 2 Transmission electron micrograph of DTX-F127-RGD-LP liposomes

表 1 各组脂质体的粒径和电位

Tab 1 Particle size and potential of liposomes in each group			
组别	粒径 /nm	多分散指数	Zeta 电位 /mV
DTX-LP	108.2 ± 1.70	0.226 ± 0.007	-24.3 ± 0.5
DTX-F127-LP	104.9 ± 0.90	0.243 ± 0.01	-23.6 ± 0.4
DTX-RGD-LP	132.0 ± 0.55	0.237 ± 0.01	-20.2 ± 0.3
DTX-F127-RGD-LP	107.2 ± 0.67	0.206 ± 0.02	-19.7 ± 0.4

RGD-LP、DTX-F127-RGD-LP 各 1 mL 于透析袋中, 置于 pH 7.4 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PBS 缓冲溶液中, 使用恒温振荡器透析 8 h ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 透析后转移至 10 mL 量瓶定容, 超声破乳, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 另取 1 mL 未透析过的脂质体按以上方法处理, 进样测定其含药量。按下述公式计算各组脂质体中药物的包封率和载药量^[22]: 包封率 (EE, %) = (包封于脂质体内的药量 / 药物投药量) $\times 100\%$, 载药量 (DL, %) = (包封于脂质体内的药量 / 载药脂质体的总重量) $\times 100\%$ 。

结果如表 2 所示, DTX-LP 包封率为 82.7%, 载药量为 2.5%, DTX-RGD-LP 包封率为 80.5%, 载药量为 2.4%, DTX-F127-RGD-LP 包封率为 86.4%,

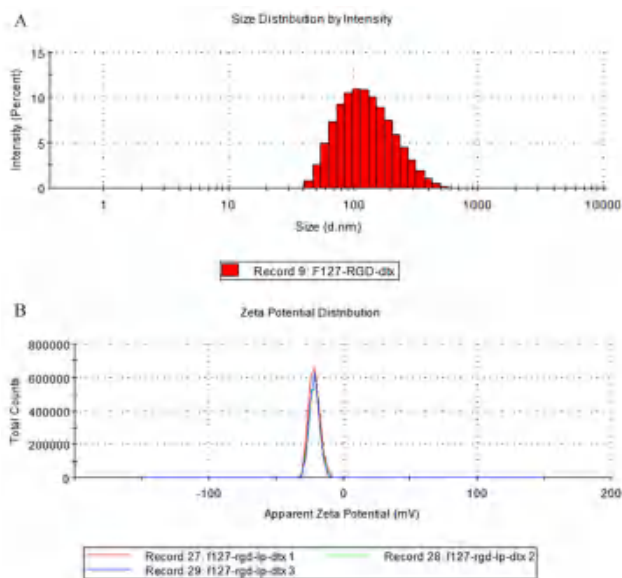


图 3 DTX-F127-RGD-LP 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig 3 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of DTX-F127-RGD-LP

载药量为 2.7%。泊洛沙姆 F127 的镶嵌增加了 DTX 在脂质体中的包封率。

表 2 多西紫杉醇的包封率和载药量

Tab 2 Entrapment efficiency and loading efficiency of docetaxel

组别	EE/%	DL/%
DTX-LP	82.7±1.31	2.5±0.02
DTX-RGD-LP	80.5±1.91	2.4±0.05
DTX-F127-RGD-LP	86.4±2.07	2.7±0.02

2.4 脂质体稳定性实验

将制备好的各组脂质体于 4℃ 避光保存, 检测保存 33 d 脂质体的平均粒径, 并根据粒径变化来评价其长期稳定性^[24]。采用 FBS 模拟血浆环境。将各组含 DTX 质量浓度为 200 μg · mL⁻¹ 的脂质体与 10%FBS 等体积混合, 置于振荡器内, 37℃、150 r · min⁻¹ 振摇 24 h, 定时取样测其粒径变化来评价其血清稳定性^[25]。

脂质体放置 33 d 的体外长期稳定性结果如图 4A 所示, DTX-LP 和 DTX-RGD-LP 随时间变化粒径略微增大, 而加入泊洛沙姆 F127 的脂质体不同时间粒径几乎不变。结果表明, 制备的脂质体在 33 d 内相对稳定。脂质体在体内容易与血清白蛋白等大分子蛋白结合形成蛋白冠, 影响其在体内的预期功能, 无法发挥治疗作用。各组脂质体与含 FBS 的培养基共同孵育 24 h, 结果如图 4B 所示, 各脂质体粒径在前 4 h 略有波动, 但在合理范围内。在之后的 20 h 内, 粒径无明显变化, 也未见沉淀物, 表明几乎没有血清白蛋白吸附在脂质体上, PEG 有效避免了蛋白冠的形成, 脂质体在血液中具有有良好的稳定性。

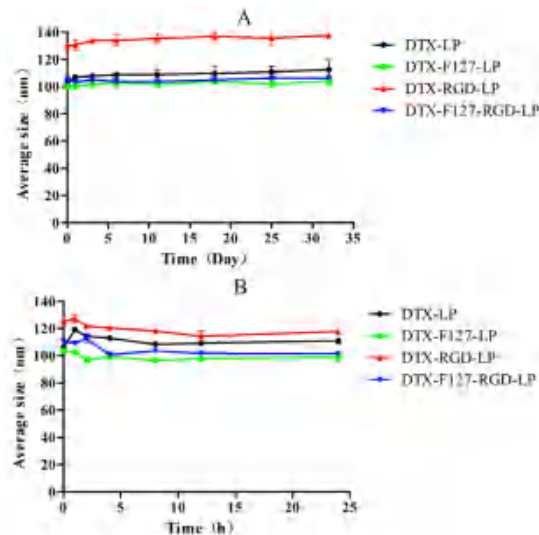


图 4 各组脂质体的稳定性

Fig 4 Stability of liposomes in each group

A. 长期稳定性 (long term stability); B. 血清稳定性 (serum stability)

2.5 细胞摄取实验

摄取定性: 实验分为 5 组, 分别为 Control 组、C6-LP 组、C6-F127-LP 组、C6-RGD-LP 组和 C6-F127-RGD-LP 组。细胞爬片放置于 6 孔板中, 取 2 mL 细胞悬液按 2 × 10⁵ 个/孔将 SKOV3 细胞接种至 6 孔板中, 5%CO₂、37℃ 条件下孵育 24 h。细胞单层覆盖至 70% 时, 分别加入 2 mL 培养基和香豆素-6 质量浓度为 2 μg · mL⁻¹ 的脂质体 (即 C6-LP、C6-F127-LP、C6-RGD-LP 和 C6-F127-RGD-LP), 37℃ 条件下孵育 4 h 后吸出培养基, PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤多余固定液。加入 2 mL Hoechst 33342 (15 μg · mL⁻¹) 核染色剂染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 晾干, 抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜观察细胞荧光情况^[26-27]。

摄取定量: 实验分为 4 组, 分别为 C6-LP 组、C6-F127-LP 组、C6-RGD-LP 组和 C6-F127-RGD-LP 组。将 SKOV3 细胞按 5000 个/孔密度接种至 96 孔黑板, 分别加入 100 μL C6-LP、C6-F127-LP、C6-RGD-LP 和 C6-F127-RGD-LP (2 μg · mL⁻¹), 按上述孵育条件孵育 4 h, 洗涤后加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 裂解细胞, 静置 15 min, 使用全波长荧光酶标仪 (E_x = 466 nm, E_m = 504 nm) 检测荧光强度^[28]。

SKOV3 对细胞的摄取如图 5A 所示, Control 组几乎没有荧光, C6-LP 具有微弱荧光, C6-RGD-LP 显示中等强度的荧光, C6-F127-RGD-LP 荧光强度最强。由图 5B 荧光定量可知, 与 C6-LP 相比, C6-RGD-LP 荧光强度明显增加, 说明 RGD 修饰脂质体后选择性提高了 SKOV3 细胞对荧光脂质体的摄取。与 C6-RGD-LP 相比, C6-F127-RGD-LP 的荧光

强度增加,表明泊洛沙姆 F127 镶嵌于 RGD 脂质体后, SKOV3 细胞对其摄取量增加,推测泊洛沙姆 F127 镶嵌磷脂双分子层后选择性提高了肿瘤细胞对目标性脂质体的摄取。RGD 和泊洛沙姆 F127 修饰脂质体后,促进 SKOV3 细胞摄取脂质体的机制如图 5C 所示,推测其原因为 RGD 与肿瘤细胞表面过表达的 $\alpha v \beta 3$ 整合素蛋白结合,通过受体与配体结合促进细胞摄取脂质体,泊洛沙姆 F127 促进细胞膜流动,增加细胞内化作用。

2.6 摄取抑制实验

将 SKOV3 细胞按照 5000/孔接种至 96 孔黑板,孵育 24 h 后弃去培养基,对照组用 DMEM 培养基培养 2 h,实验组加入摄取抑制剂阿米洛利 ($15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、氯丙嗪 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、菲律平 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、秋水仙碱 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以及 RGD ($200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 条件下孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次,加入含 C6 质量浓度为 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 C6-F127-RGD-LP 孵育 4 h, PBS 洗涤 3 次,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO 裂解细胞,静置 15 min。使用全波长荧光酶标仪 ($E_x = 466 \text{ nm}$, $E_m = 504 \text{ nm}$) 检测荧光强度^[29]。

结果如图 6 所示, SKOV3 细胞与摄取抑制剂孵育后封闭摄取受体,能够降低对 C6-F127-RGD-LP 的摄取。与对照组相比,巨胞饮抑制剂秋水仙碱和小窝蛋白抑制剂菲律平摄取率下降较明显,与对照组存在统计学差异。 Na^+/H^+ 交换体抑制剂阿米洛利和网格蛋白抑制剂氯丙嗪摄取率无明显降低。SKOV3 细胞主要通过小窝蛋白途径和巨胞饮途径摄取脂质体。此外,靶向阻断剂 RGD 也抑制 C6-F127-RGD-LP 的摄取,其摄取率降低,与对照组差异存在统计学意义。

2.7 细胞毒性实验

SKOV3 细胞以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h。吸去培养基,加入 $100 \mu\text{L}$ 质量浓度为 0.2、0.4、0.08、0.016 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DTX 原料药或各组脂质体,孵育 48 h 后每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 噻唑蓝 (MTT) 孵育 4 h,孵育结束后,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,孵育 15 min, 560 nm 处测量吸光度,计算细胞存活率,细胞存活率 (%) = (实验组吸光度/空白组吸光度) $\times 100\%$ ^[30-31]。

如表 3 所示, DTX、DTX-LP、DTX-F127-LP、DTX-RGD-LP 和 DTX-F127-RGD-LP 的 IC_{50} 值分别为 0.210、0.152、0.109、0.079、0.039 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 值越小代表对细胞的毒性越强。细胞存活率如图 7 所示,各组脂质体对 SKOV3 细胞的毒性呈现

浓度依赖性,随着浓度的增加,与 DTX 原料药相比毒性效果明显。药物质量浓度在 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,与 DTX 组相比,包载 DTX 的脂质体对细胞的毒性显著增强。在 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,泊洛沙姆 F127 或 RGD 的加入进一步增强了细胞的毒性,且 DTX-RGD-LP 比 DTX-F127-LP 有更强的细胞杀伤效果,差异具有统计学意义。泊洛沙姆 F127 和 RGD 共同修饰后,可协同增强细胞毒性,有最小的 IC_{50} 值,与细胞摄取实验结果一致,可能与卵巢癌细胞对脂质体的摄取量增加有关。

表 3 各组脂质体对 SKOV3 细胞的 IC_{50} 值

Tab 3 IC_{50} value of liposomes and DTX to SKOV3 cells

组别	IC_{50} 值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
DTX	0.210 ± 0.05
DTX-LP	0.152 ± 0.08
DTX-F127-LP	0.109 ± 0.02
DTX-RGD-LP	0.079 ± 0.01
DTX-F127-RGD-LP	0.039 ± 0.02

2.8 结晶紫染色观察凋亡

SKOV3 细胞以 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔板中,孵育 24 h 后加入 2 mL 含 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DTX、DTX-LP、DTX-F127-LP、DTX-RGD-LP、DTX-F127-RGD-LP 脂质体的 DMEM 培养基孵育 48 h, Control 组只加入 2 mL DMEM 培养基, PBS 清洗 2 次,细胞在 4% 多聚甲醛中固定 20 min,用 2 mL 含 0.5% 结晶紫染色剂染色 20 min, PBS 清洗 5 次,显微镜下观察实验情况^[32]。

结果如图 8 所示, Control 组细胞密度在 70% 左右, DTX 原料药使大部分细胞死亡,但存在一部分细胞团;泊洛沙姆 F127 或 RGD 单独修饰的脂质体进一步减小了细胞团,细胞毒性增强;而 DTX-F127-RGD-LP 结果显示视野中仅存在零星的细胞数,无细胞团,细胞毒性效果显著,其结果与细胞毒性实验结果一致,说明 DTX-F127-RGD-LP 体外抗卵巢癌效果显著。

3 讨论

DTX 是临床治疗卵巢癌常用的化疗药物,属于脂溶性药物,薄膜分散法本身适合难溶性药物,并且操作简单,因此选用此法制备了 DTX-F127-RGD-LP^[33]。其形态为球形囊泡状,大小基本均一,分布较均匀,符合脂质体的要求。泊洛沙姆 F127 嵌入后脂质体的粒径稍有下降,这与先前的报道一致,泊洛沙姆 F127 镶嵌于磷脂双分子层,可以减小脂质体的粒径^[15]。RGD 修饰在脂质体上后,脂质体的粒径稍有增加,可能是因为 RGD 的头部空间较大,形成

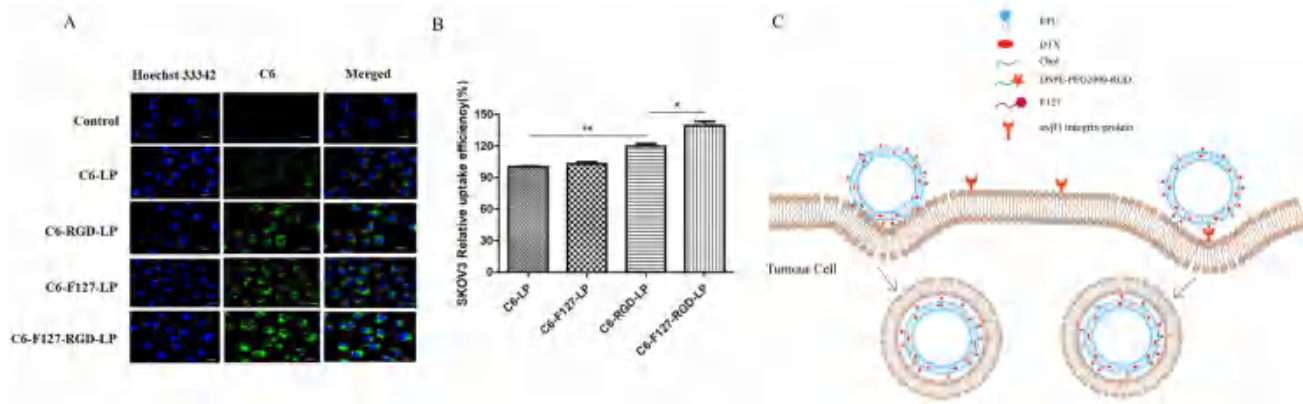


图 5 细胞摄取结果

Fig 5 Cell uptake

A. SKOV3 细胞的荧光摄取图片 (fluorescence uptake picture of SKOV3 cells, scale bar: $\times 400$); B. 酶标定量分析图 (quantitative analysis of enzyme markers); C. 细胞摄取脂质体机制 (mechanism of cell uptake of liposomes)

注: 与 C6-RGD-LP 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C6-RGD-LP group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

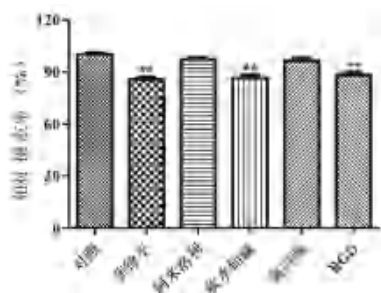


图 6 C6-F127-RGD-LP 对 SKOV3 细胞摄取机制结果

Fig 6 Uptake mechanism of C6-F127-RGD-LP to SKOV3 cells

注: 与对照组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

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

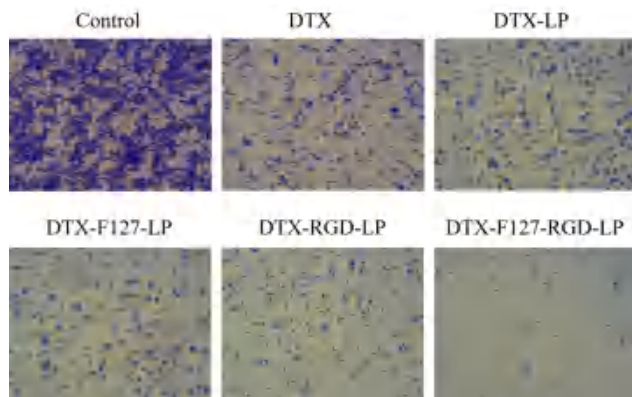


图 8 SKOV3 细胞结晶紫染色 (比例尺: $\times 200$)

Fig 8 Crystal violet dyeing of SKOV3 cells (scale bar: $\times 200$)

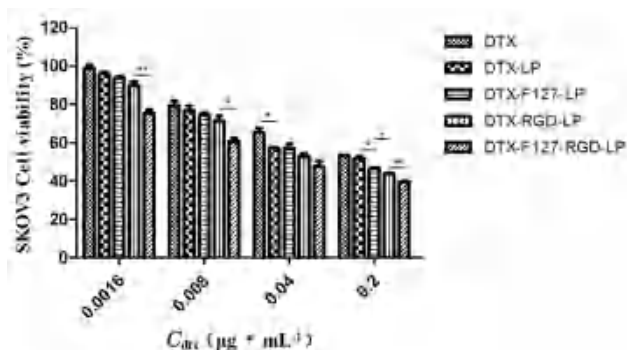


图 7 SKOV3 细胞存活率 ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

Fig 7 Viability rate of SKOV3 cells ($^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

的脂质体较疏松, 导致粒径增大。DTX-F127-RGD-LP 的包封率为 86.4%, 载药量为 2.7%, 包封率高于 80%, 对 DTX 的包载性能良好。脂质体在 4 °C 和血清条件下的稳定性良好, 且 DTX-F127-LP 和 DTX-F127-RGD-LP 组粒径几乎不变, 这可能是泊洛沙姆 F127 的嵌入增加了脂质体的稳定性^[34-36]。

脂质体因其独特的尺寸与结构以及 EPR 效

应, 在肿瘤细胞中积聚, 对肿瘤细胞的毒性作用增强^[37]。DTX-RGD-LP 与 DTX-LP 相比对肿瘤细胞有更强的细胞毒性, 这可能是 RGD 修饰脂质体后, RGD 与肿瘤细胞表面过表达的整合素家族结合, 通过受体与配体介导的作用主动靶向肿瘤细胞, 增加肿瘤细胞对脂质体的摄取, 药物在细胞内浓度增加, 对肿瘤细胞的毒性增强。泊洛沙姆 F127 的添加使得 DTX-RGD-LP 对肿瘤细胞毒性增加, 这可能得益于泊洛沙姆 F127 可以加速细胞膜的流动, 促进肿瘤细胞对修饰脂质体的摄取, 提高细胞内化水平, 使得毒性增强, 这表明 RGD 和泊洛沙姆 F127 修饰至脂质体表面增强肿瘤细胞摄取脂质体及脂质体对肿瘤细胞的毒性具有协同作用^[38]。

综上所述, 制备的 DTX-F127-RGD-LP 具有较好的主动靶向性及体外抗卵巢癌的能力, 为卵巢癌的主动靶向治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] 邓黎, 梁志清. 卵巢癌手术治疗新进展 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2019, 11 (10): 12-15.
- [2] 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.
- [3] Dastmalchi N, Safaralizadeh R, Baghbanzadeh A, et al. Molecular mechanisms of breast cancer chemoresistance by immune checkpoints [J]. Life Sci, 2020, 263: 118604.
- [4] Mo H, Xu B. Progress in systemic therapy for triple-negative breast cancer [J]. Front Med, 2021, 15 (1): 1-10.
- [5] 何晓玲. 载雷公藤红素还原敏感型聚合物胶束的制备及体外抗卵巢癌评价 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [6] Zhao X, Zhang W, Cao Y, et al. A cleverly designed novel lipid nanosystem: targeted retention, controlled visual drug release, and cascade amplification therapy for mammary carcinoma in vitro [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 3953-3964.
- [7] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63 (3): 136-151.
- [8] 张曼玉, 楼晨曦, 曹傲能. 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39 (3): 633-638.
- [9] Davis P, Mousa S, Cody V, et al. Small molecule hormone or hormone-like ligands of integrin $\alpha V\beta 3$: implications for cancer cell behavior [J]. Horm Cancer, 2013, 4 (6): 335-342.
- [10] Sun Y, Kang C, Liu F, et al. RGD peptide-based target drug delivery of doxorubicin nanomedicine [J]. Drug Dev Res, 2017, 78 (6): 283-291.
- [11] Tang T, Huang B, Liu F, et al. Enhanced delivery of therapeutic liposomes through NO-mediated tumor microenvironment remodeling [J]. Nanoscale, 2022, 14 (20): 7473-7479.
- [12] Pellosi D, Moret F, Fraix A, et al. Pluronic® P123/F127 mixed micelles delivering sorafenib and its combination with verteporfin in cancer cells [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 4479-4494.
- [13] Shaarani S, Hamid S, Kaus N. The influence of pluronic F68 and F127 nanocarrier on physicochemical properties, in vitro release, and antiproliferative activity of thymoquinone drug [J]. Pharmacognosy Res, 2017, 9 (1): 12-20.
- [14] Liang X, Mao G, Ng K. Effect of chain lengths of PEO-PPO-PEO on small unilamellar liposome morphology and stability: an AFM investigation [J]. J Colloid Interface Sci, 2005, 285 (1): 360-372.
- [15] Li Z, Peng S, Chen X, et al. Pluronic modified liposomes for curcumin encapsulation: sustained release, stability and bioaccessibility [J]. Food Res Int, 2018, 108: 246-253.
- [16] Yang Y, Mao J, Tan X. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18 (12): 10-17.
- [17] 范仲雄. 多西紫杉醇-磷脂复合物及其自组装纳米载药系统的构建及性能评价 [D]. 昌吉: 昌吉学院, 2017.
- [18] 赵文艳, 钟皎. 高效液相色谱法测定人血浆中多西紫杉醇浓度 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29 (7): 558-559.
- [19] 汪晓凌, 吕竹芬, 陈燕忠, 等. 高效液相色谱法测定多西紫杉醇脂质体药物含量及包封率 [J]. 广东药学院学报, 2006, 22 (5): 513-515.
- [20] 宋文文, 许健, 刘雁. 超高效液相色谱法测定多西他赛注射液含量的研究 [J]. 中华全科医学, 2018, 16 (10): 1632-1634, 1642.
- [21] 侯丽芬, 谷克仁, 吴永辉. 不同制剂脂质体制备方法的研究进展 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2016, 37 (5): 118-124.
- [22] 黄红兵, 刘韬, 徐月红, 等. 多西紫杉醇脂质体制备工艺及处方优化研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 42 (24): 1872-1876.
- [23] 张素红, 周敬, 李阳杰, 等. 甘草次酸脂质体制备及其药剂学性质分析 [J]. 化工设计通讯, 2022, 48 (2): 97-99.
- [24] 季珂, 韩华, 韩冰, 等. 转铁蛋白修饰的姜黄素脂质体的制备及体外抗肿瘤活性 [J]. 中草药, 2022, 53 (18): 5649-5656.
- [25] 龙苗苗, 毛静, 吴小瑜, 等. Her-2 环肽修饰的多糖聚合物胶束的制备及体外评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38 (12): 1255-1261.
- [26] Lazarian G, Guièze R, Wu C. Clinical implications of novel genomic discoveries in chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2017, 35 (9): 984-993.
- [27] 曾诚, 许芳, 杨晓艺, 等. 双配体修饰脂质聚合物杂化纳米粒的制备及细胞摄取研究 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35 (2): 243-248.
- [28] 樊梅, 袁志翔, 宋联强, 等. 脘修饰的包载荧光探针香豆素-6 脂质体的制备 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30 (2): 146-148.
- [29] 于彩桐. 纳米材料的物理化学性质对细胞摄取、内吞机制及生物安全性影响的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [30] 李宁. 多西紫杉醇-双氢青蒿素偶联前药自组装纳米粒的构建与抗肿瘤活性评价 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [31] 程凯. 多西紫杉醇靶向纳米粒制备、表征及抗肿瘤作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2018.
- [32] Momeny M, Sankanian G, Hamzehlou S, et al. Cediranib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor kinases, inhibits proliferation and invasion of prostate adenocarcinoma cells [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 882: 173298.
- [33] 华金仁, 程慧明, 占戈兰, 等. 多西紫杉醇治疗卵巢癌的临床疗效及毒理研究 [J]. 临床医药实践, 2021, 30 (5): 323-326.
- [34] Wu G, Lee K. Interaction of poloxamers with liposomes: an isothermal titration calorimetry study [J]. J Phys Chem B, 2009, 113 (47): 15522-15531.
- [35] 李资玲. Pluronic 修饰脂质体的结构特性、稳定性及细胞毒性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [36] 邓方豪. 两亲性嵌段共聚物 Pluronic 对脂质体稳定性的研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2011.
- [37] 张曼玉, 楼晨曦, 曹傲能. 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39 (3): 633-638.
- [38] 关延彬. Pluronic 胶束给药系统的构建及与肠道 P-糖蛋白药泵作用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.

(收稿日期: 2023-02-16; 修回日期: 2023-03-20)

凤丹皮内生真菌 *Alternaria arborescens* 发酵产物中甾醇类化合物

翟晓东, 孙磊, 吴德玲, 许凤清* (安徽中医药大学药学院 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: 目的 研究从铜陵凤凰山牡丹根皮中分离得到的一株内生菌 *Alternaria arborescens* 的次生代谢产物。方法 应用硅胶柱色谱结合半制备高效液相色谱分离技术对发酵液的乙酸乙酯提取部位进行分离纯化, 并经核磁共振、质谱分析, 与文献对比鉴定结构。结果 分离得到 6 个甾醇类化合物, 分别鉴定为 (22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 β , 5 α , 6 β -三醇 (1)、麦角甾醇 (2)、5 α , 8 α -环氧-(22*E*, 24*R*)麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇 (3), 5 α , 8 α -环氧-(22*E*, 24*R*)麦角甾-6, 9, 22-三烯-3 β -醇 (4), 麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇 (5) 和 β -谷甾醇 (6)。结论 化合物 1~6 为首次从该内生菌的发酵液中分离得到。

关键词: *Alternaria arborescens*; 甾醇; 牡丹皮; 内生菌

中图分类号: R285, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1203-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.014

Ergosterols of *Alternaria arborescens*, an endophytic fungus from *Paeonia ostii*

ZHAI Xiao-dong, SUN Lei, WU De-ling, XU Feng-qing* (Anhui Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites of *Alternaria arborescens*, an endophytic fungus from the fresh root barks of *Paeonia ostii*. **Methods** The compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of this bacterial strain fermented broth by multiple column chromatographies, such as silica gel and semi-preparation HPLC. Their structures were identified by NMR, MS spectroscopic analysis and literature contrast. **Results** Six compounds were isolated and identified as follows: (22*E*, 24*R*)-ergosta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol (1), ergosterol (2), 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (3), 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 9, 22-trien-3 β -ol (4), ergosta-7, 22-dien-3 β -ol (5) and β -sitosterol (6). **Conclusion** Compounds 1~6 have been isolated from the endophytic fungus for the first time.

Key words: *Alternaria arborescens*; sterol; *Paeonia ostii*; endophytic fungus

牡丹皮 Cortex Moutan 始载于《神农本草经》, 性微寒, 味苦, 辛, 为清热凉血、活血化瘀之要药。安徽省铜陵市自晋代就有栽培牡丹的记载, 距今已有 1700 多年的历史, 其中凤凰山所出者因皮厚、木心小、香气足、疗效好享有道地药材之美誉。道地药材是植物基因组、植物外环境(土壤、气候、生物等因素)以及植物内环境(内生菌群、pH 等)相互作用的产物^[1]。内生真菌(endophytic fungi)是指生活在宿主植物组织

中, 与宿主植物共生时期对宿主植物组织没有引起明显病害症状并与宿主植物共生互惠的真菌^[2]。其对宿主的促生长、抗逆性、促进活性物质生成和积累、吸附重金属等功能是道地药材形成的重要因子^[3-4]。本实验前期对凤丹皮不同生长期内生真菌多样性研究中, 分离并鉴定了 9 属 13 种内生真菌, 并运用生物发酵工程研究分离纯化得到的 *Aspergillus sp.* MBL1612、*Fusarium oxysporum* 和 *Fusarium acutatum* 等菌株的次生代谢产物^[5-8]。本

基金项目: 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室开放基金(No. P2017-KF03)。

作者简介: 翟晓东, 男, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学成分研究, email: 1148114157@qq.com *通信作者: 许凤清, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然药物化学成分研究, email: xufengqing@ahtcm.edu.cn。

文报道来源于凤丹皮中的一株优势菌株 *Alternaria arborescens*, 经液体发酵产生的麦角甾醇类成分的分离和结构鉴定工作。

1 材料

1.1 仪器与试剂

捷欧路 JNM-ECP 600 MHz 型核磁共振波谱仪 (日本电子株式会社); Agilent 1260 Infinity 2 液相色谱系统 (Agilent 公司); SW-CJ-2FD 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 万分之一电子天平 (EL104 型); 低温冰箱 50 L (海信集团有限公司); 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (粒径: 5 μm , 孔径: 12 nm; 250 mm \times 10.0 mm); Sephadex LH-20 (GE 公司); 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目)、薄层色谱用硅胶板 (GF254) (青岛海洋化工厂); 甲醇、乙腈 (色谱纯, TEDIA 公司); 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 显色剂为 10% 硫酸 - 乙醇溶液 (105 $^{\circ}\text{C}$ 加热显色)。

1.2 菌株来源及鉴定

新鲜凤丹皮块根于 2017 年采集安徽省铜陵市凤凰山铁山村凤丹种植基地, 经安徽中医药大学方成武教授鉴定为芍药科芍药属 *Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang 的新鲜植株。按文献^[9]进行分离纯化, 经上海生工生物工程有限公司进行分子鉴定。大致流程为: 纯化的菌株经 PDA 平板培养 5 d, 依据《真菌鉴定手册》对真菌菌落、培养特征、菌丝形态、产孢结构类型以及孢子的形态、颜色、大小进行初步鉴定分类; 同时将菌丝置于无菌研钵中研磨 (液氮), 参照试剂盒步骤进行操作提取 DNA, 进行 rDNA-ITS 的 PCR 扩增 [上游引物 ITS1: 5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3', 下游引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'], 将 PCR 扩增产物交由海生工生物工程股份有限公司进行测序, 测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对分析, 寻找具有较高同源性的 16S rDNA 序列, 经基因测序对比后鉴定为 *Alternaria arborescens* (GenBank: AF347033), 现保存于安徽中医药大学天然药物化学研究室 (样本凭证号 m 26)。

1.3 培养基

PDA 培养基: 每 500 mL 培养基中含去皮马铃薯 100 g、磷酸二氢钾 1.5 g、蛋白胨 0.5 g、葡萄糖 10 g、维生素 B 55 mg、硫酸镁 0.75 g, 最后加入氢氧化钠, 调节 pH 值至 5.5 ~ 6.0。每 500 mL 加 3.0 g 琼脂粉。将 PDA 培养基放入 500 mL 锥形瓶中, 用铝箔封口, 高压灭菌 30 min, 趁热导入已灭菌的冷却干燥培养皿中, 凝固冷却, 备

用。大米固体培养基: 取 100 g 大米, 120 mL 超纯水于 500 mL 锥形瓶中, 封口。放入高压蒸汽灭菌锅 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min, 备用。

2 发酵、提取与分离

2.1 液体发酵

将保存于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的斜面培养基的 *Alternaria arborescens* 接种于 PDA 平板, 在恒温培养箱中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 d, 待菌种长至约 2/3 平板, 观察菌落形态, 挑选无污染长势良好的平板, 用接种环挑取菌落周围新长出的菌丝, 接种于多个 PDA 平板中, 培养 8 d 待菌种铺满整个平板时, 将其用打孔器制成约 6 mm 的圆片, 接种于已灭菌的液体培养基中, 设置温度 28 $^{\circ}\text{C}$, 转速 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的全温振荡培养箱中培养 15 d。共培养 120 瓶。

2.2 发酵产物的提取与分离

将内生真菌 *Alternaria arborescens* 的发酵产物过滤, 得到菌丝体和发酵液。将过滤得到的菌丝置于三角烧瓶中, 加乙醇 35 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min 3 次, 过滤, 收集浸提液, 减压浓缩至无醇, 混入发酵液中, 浓缩至 500 mL。乙酸乙酯萃取, 合并萃取液, 减压回收溶剂, 得到浸膏乙酸乙酯部位 (16.8 g)。取乙酸乙酯萃取部位 16.0 g, 经硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯比例为 39:1、19:1、9:1、4:1、2:1、1:1、1:2、0:100, 每 200 mL 一个流分, 各 2 L) 洗脱, 经 TLC 检识合并得到 8 个流分 Fr.1 ~ Fr.8。流分 Fr.2 经硅胶柱色谱, 石油醚 - 乙酸乙酯 (9:1) 洗脱, 重结晶得到化合物 **6** (118 mg)。流分 Fr.3 通过硅胶柱 (石油醚 - 丙酮比例为 9:1、4:1、1:1、0:100) 洗脱, 使用 TLC 检识合并得到 5 个流分 Fr.3.1 ~ Fr.3.5。将 Fr.3.2 部位 (250 mg) 经制备液相 (甲醇 - 水 = 98:2, 流速 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm) 得到化合物 **2** (16 mg, $t_{\text{R}} = 22.5$ min) 和 **5** (9 mg, $t_{\text{R}} = 18.3$ min)。流分 Fr.3.3 (450 mg) 依次经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷 - 甲醇 = 1:1)、制备液相 (甲醇 - 水 = 95:5, 流速 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm, $t_{\text{R}} = 8.5$ min) 得到化合物 **1**。将流分 Fr.4 经硅胶柱色谱 (石油醚 - 乙酸乙酯的比例为 7:1、4:1、1:1、0:100) 洗脱, 经 TLC 检识合并得到 4 个流分 Fr.4.1 ~ Fr.4.4。流分 Fr.4.3 依次经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷 - 甲醇 = 1:1)、制备液相 (甲醇 - 水 = 90:10, 流速 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm, $t_{\text{R}} = 32$ min) 得到化合物 **3** (4 mg)。流分 Fr.5 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (二氯甲烷 - 甲醇 = 1:1)、制备液相 (甲醇 - 水 = 100:0, 流速 3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm, $t_{\text{R}} = 10.5$ min) 得到化合物 **4** (10 mg), 化合物结构见图 1。

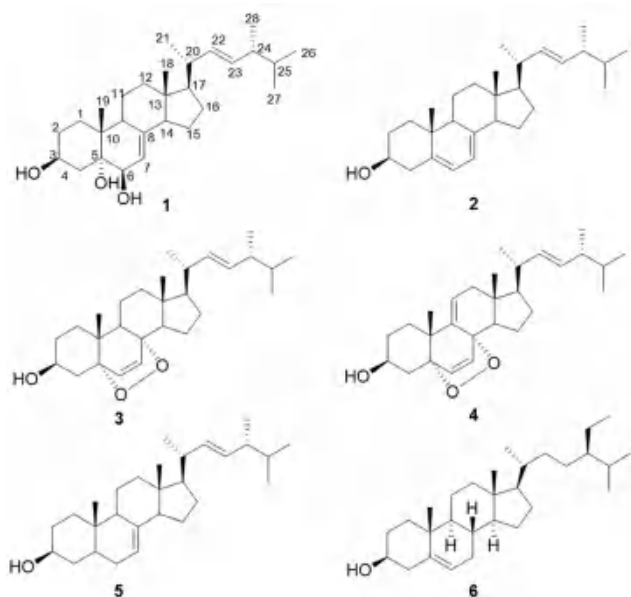


图 1 化合物 1~6 的结构式

Fig 1 Chemical structure of compound 1~6

3 结构鉴定

化合物 1 白色针状结晶 (二氯甲烷:甲醇 = 1:1), 10% 硫酸乙醇显色为紫红色。ESI-MS m/z : 431.3[M + Na]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.33 (1H, dt, $J = 7.2$ 、2.4 Hz, H-7), 5.20 (1H, dd, $J = 15.0$ 、7.2 Hz, H-23), 5.13 (1H, dd, $J = 15.0$ 、8.4 Hz, H-22), 4.04 (1H, m, H-3), 3.61 (1H, br s, H-6), 2.11 (1H, t, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.03 (1H, dt, $J = 12.0$ 、4.2 Hz, H-12a), 2.00 (1H, m, H-20), 1.83 (2H, m, H-15), 1.95 (1H, m, H-9), 1.88 (1H, m, H-14), 1.83 (1H, m, H-24), 1.75 (1H, dd, $J = 13.2$ 、4.8 Hz, H-4b), 1.71、1.26 (1H each, m, H-15), 1.60、1.53 (1H each, m, H-1), 1.54 (2H, m, H-11), 1.46 (1H, m, H-25), 1.41 (2H, m, H-16), 1.30 (1H, m, H-12b), 1.28 (1H, m, H-17), 1.07 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.59 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 144.10 (s, C-8), 135.44 (d, C-22), 132.26 (d, C-23), 117.62 (d, C-7), 76.03 (s, C-5), 73.75 (d, C-6), 67.81 (d, C-3), 56.07 (d, C-17), 54.83 (d, C-14), 43.84 (s, C-13), 43.56 (d, C-9), 42.89 (d, C-24), 40.47 (d, C-20), 39.55 (t, C-4), 39.30 (t, C-12), 37.22 (s, C-10), 33.15 (d, C-25), 33.05 (t, C-1), 30.94 (t, C-2), 27.98 (t, C-16), 22.96 (t, C-15), 22.13 (t, C-11),

21.19 (q, C-21), 20.02 (q, C-27), 19.72 (q, C-26), 18.92 (q, C-19), 17.66 (q, C-28), 12.41 (q, C-18)。以上数据与文献^[10]报道一致, 故化合物 1 鉴定为 (22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 β , 5 α , 6 β -三醇。

化合物 2 白色针状结晶 (二氯甲烷:甲醇 = 1:1), 10% 硫酸乙醇显色为紫红色。ESI-MS m/z : 396.3 [M + H]⁺; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.57 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-7), 5.20 (1H, dd, $J = 15.2$ 、7.2 Hz, H-23), 5.14 (1H, dd, $J = 15.2$ 、7.2 Hz, H-22), 3.61 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 141.45 (s, C-8), 139.86 (s, C-5), 135.64 (d, C-22), 132.06 (d, C-23), 119.67 (d, C-6), 116.36 (d, C-7), 70.55 (d, C-3), 55.82 (d, C-17), 54.64 (d, C-14), 46.33 (d, C-9), 42.92 (d, C-24), 42.90 (s, C-13), 40.88 (t, C-4), 40.49 (d, C-20), 39.16 (t, C-12), 38.45 (t, C-1), 37.11 (s, C-10), 33.17 (d, C-25), 32.08 (t, C-2), 28.36 (t, C-16), 23.07 (t, C-15), 21.19 (t, C-11), 21.18 (q, C-21), 20.03 (q, C-27), 19.72 (q, C-26), 17.68 (q, C-28), 16.35 (q, C-19), 12.13 (q, C-18)。以上数据与文献^[11]报道一致, 故化合物 2 鉴定为麦角甾醇。

化合物 3 白色针状结晶 (二氯甲烷:甲醇 = 1:1), 10% 硫酸乙醇显色为紫红色。ESI-MS m/z : 429.3 [M + H]⁺; ¹H NMR (MeOD, 600 MHz) δ : 6.52 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 5.27 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 5.22 (1H, dd, $J = 15.6$ 、7.6 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, $J = 15.6$ 、6.8 Hz, H-22), 3.77 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.90 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-26); ¹³C NMR (MeOD, 150 MHz) δ : 136.90 (d, C-6), 136.90 (d, C-22), 133.56 (d, C-23), 131.81 (d, C-7), 83.57 (s, C-5), 80.84 (s, C-8), 67.08 (d, C-3), 57.67 (d, C-17), 53.20 (d, C-14), 52.85 (d, C-9), 45.85 (d, C-24), 44.41 (t, C-4), 41.19 (s, C-13), 40.77 (d, C-20), 38.25 (t, C-12), 37.86 (s, C-10), 36.00 (d, C-25), 34.45 (t, C-2), 30.96 (t,

C-1), 29.87 (t, C-16), 24.49 (t, C-15), 21.85 (t, C-11), 21.47 (q, C-21), 20.03 (q, C-27), 20.17 (q, C-26), 18.58 (q, C-28), 18.26 (q, C-19), 13.37 (q, C-18)。以上数据与文献^[10-12]报道一致, 故化合物 **3** 鉴定为 $5\alpha, 8\alpha$ -环氧-(22*E*, 24*R*) 麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇。

化合物 **4** 白色针状结晶 (二氯甲烷: 甲醇 = 1 : 1), 10% 硫酸乙醇显色为紫红色。ESI-MS m/z : 427.3[M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 6.58 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 5.41 (1H, dd, $J = 6.0$ 、1.8 Hz, H-11), 5.21 (1H, dd, $J = 15.6$ 、7.2 Hz, H-23), 5.13 (1H, dd, $J = 15.6$ 、8.4 Hz, H-22), 3.98 (1H, m, H-3), 2.23 (1H, dd, $J = 16.8$ 、6.0 Hz, H-12a), 2.05 (1H, d, $J = 16.8$, H-12b), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 1.08 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.80 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-26), 0.72 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 142.61 (s, C-9), 135.56 (d, C-6), 135.18 (d, C-22), 132.48 (d, C-23), 130.81 (d, C-7), 119.93 (d, C-11), 82.87 (s, C-5), 78.47 (s, C-8), 66.47 (d, C-3), 55.94 (d, C-17), 48.24 (d, C-14), 43.67 (s, C-13), 42.89 (d, C-24), 41.18 (t, C-12), 39.96 (d, C-20), 38.03 (s, C-10), 36.15 (t, C-4), 33.17 (d, C-25), 32.65 (t, C-1), 30.68 (t, C-2), 28.69 (t, C-16), 25.61 (q, C-19), 20.95 (t, C-15), 20.78 (q, C-21), 20.00 (q, C-26), 19.70 (q, C-27), 17.61 (q, C-28), 13.02 (q, C-18)。以上数据与文献^[11]报道一致, 故化合物 **4** 鉴定为 $5\alpha, 8\alpha$ -环氧-(22*E*, 24*R*) 麦角甾-6, 9, 22-三烯-3 β -醇。

化合物 **5** 白色针状结晶 (二氯甲烷-甲醇 = 1 : 1); 10% 硫酸-乙醇显色为紫红色斑点。ESI-MS m/z : 399.4[M + H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.35 (1H, m, H-6), 5.21 (1H, dd, $J = 15.0$ 、7.8 Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 15.0$ 、9.0 Hz, H-22), 3.61 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.96 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, H-28), 0.88 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-27), 0.86 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.65 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 139.04 (s, C-8), 135.23 (d, C-22), 131.42 (d, C-23), 117.15 (d, C-7), 70.80 (d, C-3), 55.84 (d, C-17), 55.01 (s, C-14), 49.42 (d, C-9), 43.15 (d, C-13), 42.74 (d,

C-24), 40.42 (d, C-20), 40.23 (d, C-5), 39.42 (t, C-12), 37.94 (t, C-4), 37.13 (t, C-1), 34.12 (s, C-10), 33.06 (d, C-25), 31.45 (t, C-6), 29.62 (t, C-2), 28.16 (t, C-16), 22.91 (t, C-15), 21.54 (t, C-11), 21.12 (q, C-21), 19.94 (q, C-27), 19.61 (q, C-26), 17.53 (q, C-28), 13.04 (q, C-19), 12.15 (q, C-18)。以上数据与文献^[13]报道一致, 故鉴定化合物 **5** 为麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇。

化合物 **6** 白色针状结晶 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1 : 1); 10% 硫酸-乙醇显色为紫红色斑点。ESI-MS m/z : 415.4[M + H]⁺。 ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 5.33 (1H, m, H-6), 3.48 (1H, m, H-3), 0.99 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.82 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.69 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 140.84 (s, C-5), 121.79 (d, C-6), 71.89 (d, C-3), 56.85 (d, C-14), 56.14 (d, C-17), 50.22 (d, C-9), 45.92 (d, C-24), 42.20 (s, C-13), 42.38 (t, C-4), 39.86 (t, C-12), 37.34 (t, C-1), 36.59 (s, C-10), 36.23 (d, C-20), 34.03 (t, C-22), 31.99 (t, C-2, -7), 31.74 (d, C-8), 29.24 (d, C-25), 28.33 (t, C-16), 26.16 (t, C-23), 24.38 (t, C-15), 23.15 (t, C-28), 21.16 (t, C-11), 19.90 (q, C-26), 19.48 (q, C-27), 19.11 (q, C-19), 18.86 (q, C-21), 12.06 (q, C-29), 11.94 (q, C-18)。以上数据与文献^[14]报道一致, 故鉴定化合物 **6** 为 β -谷甾醇。

4 结论

本文从凤丹皮内生真菌 *Alternaria arborescens* 的液态发酵物中分离得到 6 个甾醇类化合物。甾醇类成分作为一类重要医药化工原料, 在氧化、抗菌、抗肿瘤、抗补体以及减少心脑血管疾病的发病率方面发挥着积极的作用^[15]。随着黄体酮和氢化可的松等甾体类激素的微生物全合成的实现, 甾体制药技术迎来一个全新阶段^[16]。内生真菌 *Alternaria arborescens* 在液体培养基中产生过氧麦角甾醇在抗炎、降血糖等方面发挥较好的活性^[17-18]。内生真菌的次生代谢产物受培养基及培养方式影响较大, 后续的研究工作将着眼于菌株培养条件的筛选, 以期固化发酵工艺, 综合药效学研究结果, 合理开发利用该菌株。

参考文献

[1] 马昭, 唐承晨, 张纯, 等. 内生菌与宿主植物关系对中药

- 材道地性研究的启示[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(6): 4-11.
- [2] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves//Andrews JH, Hirano SS. Microbial ecology of leaves [M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [3] Khan AL, Gilani SA, Waqas M, et al. Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress [J]. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol), 2017, 18(2): 125-137.
- [4] Shi YA, Xie HR, Cao LX, et al. Effects of Cd-and Pb-resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of Brassicanapus in metal-contaminated soils [J]. Environ Sci Pollut Res, 2017, 24: 417.
- [5] Zhang PL, Wang G, Xu FQ, et al. Aspergilolide, a steroid lactone produced by an endophytic fungus *Aspergillus* sp. MBL1612 isolated from *Paeonia ostii* [J]. Nat Prod Res, 2019, 33(15): 2133-2138.
- [6] Wang JT, Zhang PL, Liu JS, et al. Aspergilates A to E, second metabolites from *Aspergillus* sp. isolated from *Paeonia ostii* [J]. Fitoterapia, 2018, 131: 204-208.
- [7] 王举涛, 张培良, 王刚, 等. 凤丹内生真菌 *Fusarium oxysporum* 次生代谢产物的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5247-5253.
- [8] 孔垂皓, 孙磊, 赵焕, 等. 一株凤丹皮内生真菌 *Fusarium acutatum* 的次生代谢产物研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3): 78-84.
- [9] 张培良, 王国凯, 郁阳, 等. 不同生长时期凤丹内生真菌的分离鉴定及多样性研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(5): 78-82.
- [10] Gao H, Hong K, Zhang X, et al. New sterylestere of fatty acids from the mangrove fungus *Aspergillus awamori* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2007, 90(6): 1165-1178.
- [11] 刘振东, 孙越, 王强锋, 等. 西藏林芝地区野生黑木耳的化学成分 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 164-169.
- [12] 李艳军, 李小霞, 陈国栋, 等. 内生真菌 *Sporormiella irregularis* (No. 71-11-4-1) 中一个新的二裂甾体 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(9): 22-45.
- [13] Keller AC, Maillard MP, Hostettmann K. Antimicrobial sesteroids from the fungus *Fomitopsis pinicola* [J]. Phytochemistry, 1996, 41(4): 1041-1046.
- [14] 王菲, 张娇, 李玉泽, 等. 麻布七化学成分的研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(7): 1321-1324.
- [15] Mawhand PS, Yianikouros GP, Belica PS. Nickel-mediated conjugate addition elaboration of calcitriol from ergocalciferol [J]. J Org Chem, 1995, 60: 6574-6581.
- [16] 熊亮斌, 宋璐, 赵云秋, 等. 甾体化合物绿色生物制造: 从生物转化到微生物从头合成 [J]. 合成生物学, 2021, 2(6): 942-963.
- [17] 吕晓发, 温炳钦, 陈靖涓, 等. 蔓荆子化学成分及主要单体降血糖活性研究 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(4): 17-21.
- [18] 龙利, 彭俊超, 杨会, 等. 艾纳香中抗炎活性成分虚拟筛选及麦角甾醇过氧化物对 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(9): 1357-1363.
- (收稿日期: 2022-09-15; 修回日期: 2022-10-11)

柳叶蒿地上部分中酚酸类成分的分离与结构鉴定

高茜, 杨丁山, 阮静雅, 张雅琦, 王涛, 张祎* (天津中医药大学天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 301617)

摘要: 目的 对柳叶蒿地上部分的化学成分进行研究。方法 应用硅胶、ODS 及高效液相等多种色谱法对提取物进行分离纯化, 并通过核磁共振和质谱技术鉴定化合物的结构。结果 从柳叶蒿地上部分的 70% 乙醇提取物中分离鉴定了 14 个酚酸类成分, 分别为苯甲醇-7-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷(1)、金盏菊苷 A(2)、对羟基苯甲酸(3)、原儿茶醛(4)、原儿茶酸(5)、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(6)、丁香酸(7)、丁香酸葡萄糖苷(8)、云杉苷(9)、scolochinenside B(10)、2, 6-羟基-4-甲氧基苯乙酮-2'-O- β -葡萄糖苷(11)、2-甲氧基-4-(2-烯丙基)苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(12)、4-烯丙基-2, 6-二甲氧基苯基葡萄糖苷(13)和二氢丁香苷(14)。结论 所有化合物均为首次从柳叶蒿中分离得到, 其中化合物 1、2、10、13 和 14 为首次从蒿属植物中分离得到。

关键词: 柳叶蒿; 酚酸类; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R285, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1207-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.015

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82074118)。

作者简介: 高茜, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: gq1186274424@163.com * 通信作者: 张祎, 女, 教授, 主要从事中药化学研究, email: zhwwwxzh@tjutc.edu.cn

Isolation and identification of phenolic constituents from the aerial part of *Artemisia integrifolia* L.

GAO Qian, YANG Ding-shan, RUAN Jing-ya, ZHANG Ya-qi, WANG Tao, ZHANG Yi* (Key Laboratory of Traditional Chinese Medicinal Chemistry and Analytical Chemistry of Tianjin, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from the aerial part of *Artemisia integrifolia* L.. **Methods** Various chromatographic columns such as silica gel, ODS and HPLC were used to isolate and purify the constituents, whose structures were elucidated by NMR and MS spectra. **Results** As a result, 14 phenolic derivatives were obtained, including benzyl primeveroside (1), calendnoside A (2), *p*-hydroxybenzoic acid (3), protocatechuic aldehyde (4), protocatechuic acid (5), 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (6), syringic acid (7), glucosyringic acid (8), picein (9), scolochinenoside B (10), domesticoside (11), 2-methoxy-4-(2-propenyl)phenyl- β -D-glucopyranoside (12), 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol glucoside (13), and dihydrosyringic acid (14). **Conclusion** All of the compounds have been separated from *Artemisia integrifolia* L. for the first time. Among them, 1, 2, 10, 13 and 14 have been firstly obtained from *Artemisia* genus.

Key words: *Artemisia integrifolia* L.; phenolic acid; isolation; structural identification

柳叶蒿 (*Artemisia integrifolia* L.) 为菊科 (Compositae) 蒿属 (*Artemisia*) 多年生草本植物, 别名柳蒿, 主要分布于我国吉林省长白山、内蒙古呼伦贝尔及黑龙江大兴安岭东部等地区, 多生于低海拔或中海拔湿润或半湿润地区。其性寒、味苦, 以全草入药, 具有清热解毒之功效^[1]。作为药食两用植物, 其嫩枝叶 (柳蒿芽) 既可炒食、做汤菜, 也可做成即食调味酱、香醋、发酵酒等; 成熟的地上部分还可腌制成咸菜, 或者晾晒成干菜食用, 具有丰富的营养价值; 临床常用于治疗肝炎、糖尿病、高血压、高血脂等多种疾病^[2]。民间用药以及现代药理学研究表明, 柳叶蒿全草和地上部分均具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌、降血脂、调节免疫等多种作用^[2-3], 其化学成分主要为黄酮、奎宁酸酯、萜类及挥发油等^[4]。目前对于柳叶蒿的研究多集中于黄酮类化合物, 而对于其酚酸类化合物鲜有报道。为了进一步明确其物质基础, 本文对柳叶蒿地上部分的 70% 乙醇提取物进行了化学成分研究, 共从中分离鉴定了 14 个酚酸类化合物, 分别为苯甲醇-7-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (1)、金盏菊苷 A (2)、对羟基苯甲酸 (3)、原儿茶醛 (4)、原儿茶酸 (5)、3-甲氧基-4-羟基苯甲酸 (6)、丁香酸 (7)、丁香酸葡萄糖苷 (8)、云杉苷 (9)、scolochinenoside B (10)、2, 6-羟基-4-甲氧基苯乙酮-2'-O- β -葡萄糖苷 (11)、2-甲氧基-4-(2-烯丙基) 苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (12)、4-烯

丙基-2, 6-二甲氧基苯基葡萄糖苷 (13) 和二氢丁香苷 (14)。所有化合物均为首次从柳叶蒿中分离得到, 其中化合物 1、2、10、13 和 14 为首次从蒿属植物中分离得到。

1 仪器与试剂

液质联用仪 (UHPLC: Ultimate 3000、MS: Q-Orbitrap, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超导核磁共振波谱仪 (Burker 500、600 NMR, 德国 Bruker 公司)。大孔吸附树脂 (净品级, 天津海光化工有限公司); 正相柱色谱用硅胶 (48 ~ 75 μ m, 青岛海洋化工厂); 反相 ODS (YMC*Gel ODS-A-HG, S-50 μ m, 日本 YMC 株式会社)、高效液相色谱法 (HPLC) 用分析柱及制备柱 [Cosmosil 5C18-MS-II 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 250 mm \times 20 mm, 5 μ m, 日本 Nacalai Tesque 公司]; 氘代甲醇 (CD₃OD) 等氘代试剂 (北京崇熙科技孵化器公司); 分析及色谱纯二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、乙腈、冰醋酸等试剂 (天津康科德科技有限公司); 薄层色谱高效硅胶 GF254 (天津思利达科技有限公司)。

柳叶蒿于 2020 年 9 月采自吉林省伊通满族自治县县黄岭子村, 经天津中医药大学中药学院马琳教授鉴定为菊科 (Compositae) 蒿属 (*Artemisia*) 植物柳叶蒿 (*Artemisia integrifolia* L.) 的干燥地上部分。

2 提取分离

干燥的柳叶蒿地上部分 (5.0 kg) 经 70% 乙

醇加热回流提取 3 次, 依次为 3、2、2 h, 减压回收溶剂, 得到 70% 乙醇提取物 (1.0 kg)。该提取物 (920.0 g) 经乙酸乙酯-水 (体积比 1:1) 萃取 3 次, 得到乙酸乙酯萃取物 (AIE, 187.3 g) 和水萃取物 (703.1 g)。水萃取物经 D101 大孔吸附树脂分离, 依次用水和 95% 乙醇溶液洗脱, 得到水洗脱物 (391.6 g) 和 95% 乙醇洗脱物 (AIH, 123.0 g)。AIE (150.0 g) 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得到 15 个组分 (AIE 1 ~ AIE 15), 再经 ODS 以及制备型 HPLC 等现代分离技术分离纯化, 得到化合物 **1** (12.5 mg)、**3** (15.0 mg)、**4** (7.9 mg)、**5** (12.0 mg)、**6** (15.0 mg)、**7** (7.5 mg)、**8** (3.0 mg)、**9** (11.5 mg)、**10** (3.3 mg)、**12** (19.1 mg) 和 **13** (35.3 mg)。AIH (90.0 g) 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 得到 AIH 1 ~ AIH 13, 再经 ODS 以及制备型 HPLC 等现代分离技术分离纯化, 得到化合物 **2** (25.2 mg)、**11** (12.6 mg) 和 **14** (51.7 mg)。化合物 **1** ~ **14** 的结构如图 1 所示。

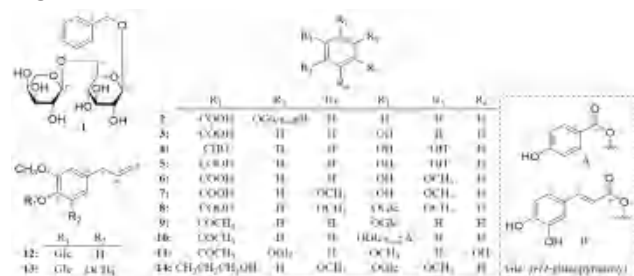


图 1 化合物 1 ~ 14 的结构

Fig 1 Structures of compound 1 ~ 14

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₁₈H₂₆O₁₀ (*m/z* 447.149 29 [M + COOH]⁻; calcd for C₁₉H₂₇O₁₂, M_r = 447.149 70)。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.42 (2H, brd, *J* = 7.2 Hz, H-2, 6), 7.32 (2H, 类三重峰, *J* = 7.2 Hz, H-3, 5), 7.26 (1H, 类三重峰, *J* = 7.2 Hz, H-4), [4.66 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.91 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), H₂-7], 4.36 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 3.25 ~ 4.15 (11H, m, H-2' ~ H-6' 和 H-2'' ~ H-5''), 4.34 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-1'')。 ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 139.2 (C-1), 129.3 (C-2, 6), 129.2 (C-3, 5), 128.7 (C-4), 72.0 (C-7), 103.4 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.0 (C-5'), 69.5 (C-6'), 105.3 (C-1''), 72.4 (C-2''), 74.2 (C-3''), 69.6 (C-4''), 66.8 (C-5'')。以上与文献^[5]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为苯甲醇-7-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖-(1 → 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 2: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₂₂H₂₂O₁₁ (*m/z* 461.108 73 [M - H]⁻; calcd for C₂₂H₂₁O₁₁, M_r = 461.107 84)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.32 (1H, brd, *J* = 8.5 Hz, H-3), 7.40 (1H, 类三重峰, *J* = 8.0、8.5 Hz, H-4), 7.08 (1H, 类三重峰, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.81 (1H, brd, *J* = 8.5 Hz, H-6), 4.91 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 3.43 ~ 4.59 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 7.06 (1H, brs, H-2''), 6.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-5''), 6.96 (1H, brd, *J* = 8.0 Hz, H-6''), 7.58 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7''), 6.30 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-8'')。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 134.9 (C-1), 158.6 (C-2), 119.2 (C-3), 134.9 (C-4), 124.0 (C-5), 132.5 (C-6), 169.9 (C-7), 104.3 (C-1'), 74.9 (C-2'), 77.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 75.9 (C-5'), 64.6 (C-6'), 127.8 (C-1''), 115.2 (C-2''), 146.9 (C-3''), 149.7 (C-4''), 116.6 (C-5''), 123.1 (C-6''), 147.3 (C-7''), 115.0 (C-8''), 169.0 (C-9'')。以上与文献^[6]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为金盏菊苷 A。

化合物 3: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₇H₆O₃ (*m/z* 137.023 09 [M - H]⁻; calcd for C₇H₅O₃, M_r = 137.023 32)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.87 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.81 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5)。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 122.9 (C-1), 133.0 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 5), 163.4 (C-6), 170.2 (C-7)。以上与文献^[7]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为对羟基苯甲酸。

化合物 4: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₇H₆O₃ (*m/z* 137.023 41 [M - H]⁻; calcd for C₇H₅O₃, M_r = 137.023 32)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.32 (1H, brs, H-2), 6.93 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.33 (1H, brd, *J* = 8.5 Hz, H-6), 9.72 (1H, s, 7-CHO)。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 130.8 (C-1), 115.4 (C-2), 147.3 (C-3), 153.9 (C-4), 116.3 (C-5), 126.5 (C-6), 193.1 (C-7)。以上与文献^[8]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为原儿茶醛。

化合物 5: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₇H₆O₄ (*m/z* 153.018 60 [M - H]⁻; calcd for C₇H₅O₄, M_r = 153.018 24)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.46 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.44 (1H, dd, *J* = 2.0、8.0 Hz, H-6)。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 123.4 (C-1), 117.8 (C-2), 146.1 (C-3), 151.5 (C-4), 115.8 (C-5), 123.9 (C-6), 170.5 (C-7)。以上与文

献^[9]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为原儿茶酸。

化合物 **6**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_8H_8O_4$ (m/z 167.033 89 $[M - H]^-$; calcd for $C_8H_8O_4$, $M_r = 167.033$ 89)。¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.55 (1H, brs, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.56 (1H, brd, $J = 8.5$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 123.1 (C-1), 113.8 (C-2), 148.7 (C-3), 152.7 (C-4), 115.9 (C-5), 125.3 (C-6), 170.1 (C-7), 56.4 (3-OCH₃)。以上与文献^[7]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 3-甲氧基-4-羟基苯甲酸。

化合物 **7**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_9H_{10}O_5$ (m/z 197.044 56 $[M - H]^-$; calcd for $C_9H_{10}O_5$, $M_r = 197.044$ 45)。¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 7.33 (2H, s, H-2, 6), 3.88 (6H, s, 3, 5-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 122.2 (C-1), 108.4 (C-2, 6), 148.9 (C-3, 5), 141.7 (C-4), 170.2 (C-7), 56.8 (3, 5-OCH₃)。以上与文献^[10]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为丁香酸。

化合物 **8**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_{15}H_{20}O_{10}$ (m/z 359.098 57 $[M - H]^-$; calcd for $C_{15}H_{19}O_{10}$, $M_r = 359.097$ 27)。¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.35 (2H, s, H-2, 6), 5.07 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.18 ~ 3.80 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 3.88 (6H, s, 3, 5-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 128.1 (C-1), 108.5 (C-2, 6), 154.1 (C-3, 5), 139.9 (C-4), 169.7 (C-7), 104.5 (C-1'), 75.7 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.5 (C-5'), 62.5 (C-6'), 57.0 (3, 5-OCH₃)。以上与文献^[11]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为丁香酸葡萄糖苷。

化合物 **9**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_{14}H_{18}O_7$ (m/z 333.075 44 $[M + Cl]^-$; calcd for $C_{14}H_{18}O_7Cl$, $M_r = 333.073$ 56)。¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.97 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 7.16 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 2.56 (3H, s, H₃-8), 5.03 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.37 ~ 3.93 (6H, m, H-2' ~ H-6')。 ¹³C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 132.7 (C-1), 131.7 (C-2, 6), 117.3 (C-3, 5), 163.1 (C-4), 199.5 (C-7), 26.5 (C-8), 101.6 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.5 (C-6')。以上与文献^[12]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为云杉苷。结合 HSQC 谱中给出的碳氢相关信号以及 ¹H NMR 谱中 H-3' 和 H-5' 的裂分情况 (H-5' 裂分为

ddd 峰, H-3' 裂分为 dd 峰), 对文献中 C-3' 与 C-5' 的化学位移值进行了调换。

化合物 **10**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$ (m/z 417.119 78 $[M - H]^-$; calcd for $C_{21}H_{21}O_9$, $M_r = 417.118$ 01)。¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.78 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 7.09 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 2.50 (3H, s, H₃-8), 5.03 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.39 ~ 4.67 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 7.90 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2'', 6''), 6.84 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3'', 5'')。 ¹³C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 132.5 (C-1), 131.5 (C-2, 6), 117.2 (C-3, 5), 162.7 (C-4), 199.3 (C-7), 26.5 (C-8), 101.2 (C-1'), 74.8 (C-2'), 77.9 (C-3'), 72.1 (C-4'), 75.7 (C-5'), 64.9 (C-6'), 121.9 (C-1''), 133.1 (C-2'', 6''), 116.3 (C-3'', 5''), 164.1 (C-4''), 167.8 (C-7'')。以上与文献^[13]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 scolochinenoside B。

化合物 **11**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_{15}H_{20}O_9$ (m/z 343.102 91 $[M - H]^-$; calcd for $C_{15}H_{19}O_9$, $M_r = 343.102$ 36)。¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 6.30 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 6.10 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5), 2.71 (3H, s, H₃-8), 5.06 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 3.35 ~ 3.93 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 107.6 (C-1), 162.3 (C-2), 94.8 (C-3), 167.6 (C-4), 96.5 (C-5), 167.7 (C-6), 205.2 (C-7), 33.6 (C-8), 102.2 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.5 (C-6'), 56.2 (4-OCH₃)。以上与文献^[14]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2, 6-羟基-4-甲氧基苯乙酮-2'-O- β -葡萄糖苷。

化合物 **12**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 $C_{16}H_{22}O_7$ (m/z 371.135 22 $[M + COOH]^-$; calcd for $C_{17}H_{23}O_9$, $M_r = 371.133$ 66)。¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 6.82 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 6.72 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-5), 7.08 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 3.33 (1H, m, H-7), 5.95 (1H, m, H-8), [5.02 (1H, dd, $J = 1.5, 10.5$ Hz), 5.06 (1H, dd, $J = 1.5, 17.0$ Hz), H₂-9], 4.84 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 3.35 ~ 3.90 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 3.83 (3H, s, 2-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 146.4 (C-1), 150.8 (C-2), 114.2 (C-3), 136.5 (C-4), 122.1 (C-5), 118.3 (C-6), 40.8 (C-7), 139.0 (C-8), 115.9 (C-9), 103.1 (C-1'), 75.0 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.4 (C-4'),

78.2 (C-5'), 62.5 (C-6'), 56.7 (2-OCH₃)。以上与文献^[15]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2-甲氧基-4-(2-烯丙基)苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **13**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₁₇H₂₄O₈ (*m/z* 401.145 78 [M + COOH]⁻; calcd for C₁₈H₂₅O₁₀, *M_r* = 401.144 22)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 6.52 (2H, s, H-3, 5), 3.33 (1H, m, H-7), 5.94 (1H, m, H-8), [5.05 (1H, dd, *J* = 1.0、10.0 Hz), 5.09 (1H, dd, *J* = 1.0、17.5 Hz), H₂-9], 4.81 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1'), 3.38 ~ 3.80 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 3.82 (6H, s, 2, 6-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 134.7 (C-1), 154.2 (C-2, 6), 107.5 (C-3, 5), 138.4 (C-4), 41.4 (C-7), 138.7 (C-8), 116.2 (C-9), 105.6 (C-1'), 75.7 (C-2'), 77.8 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.6 (C-6'), 57.0 (2, 6-OCH₃)。以上与文献^[16]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 4-烯丙基-2, 6-二甲氧基苯基葡萄糖苷。结合 ¹H NMR 谱中 H-3' 和 H-5' 的裂分情况 (H-5' 裂分为 m 峰, H-3' 裂分为 dd 峰) 以及 HSQC 谱中给出的碳氢相关信号, 对文献中 C-3' 与 C-5' 的化学位移值进行了调换。

化合物 **14**: 白色粉末。HR-ESI-MS 测定其分子式为 C₁₇H₂₆O₉ (*m/z* 419.155 24 [M + COOH]⁻; calcd for C₁₈H₂₇O₁₁, *M_r* = 419.154 79)。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 6.55 (2H, s, H-2, 6), 2.63 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H₂-7), 1.82 (2H, 类五重峰, *J* = 7.0 Hz, H₂-8), 3.57 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H₂-9), 4.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1'), 3.18 ~ 3.80 (6H, m, H-2' ~ H-6'), 3.83 (6H, s, 3, 5-OCH₃)。 ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 140.5 (C-1), 107.5 (C-2, 6), 154.1 (C-3, 5), 134.5 (C-4), 33.4 (C-7), 35.4 (C-8), 62.2 (C-9), 105.7 (C-1'), 75.7 (C-2'), 77.8 (C-3'), 71.3 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.6 (C-6'), 57.1 (3, 5-OCH₃)。以上与文献^[17]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为二氢丁香苷。

4 结果与讨论

本文采用多种色谱和波谱技术相结合的方法, 从柳叶蒿地上部分分离鉴定出了 14 个酚酸类成分。通过 SciFinder 检索, 确定所有化合物均

为首次从柳叶蒿中分离得到, 其中化合物 **1**、**2**、**10**、**13** 和 **14** 为首次从蒿属植物中分离得到, 进一步丰富了柳叶蒿的物质基础。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 815.
- [2] 穆师洋, 胡文忠, 姜爱丽. 柳蒿芽营养成分及生物活性成分研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36 (13): 385-387, 392.
- [3] 王青虎, 额尔敦布拉嘎, 徐艳华, 等. 柳蒿芽化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53 (20): 1726-1728.
- [4] 焦美, 刘蕊, 李悦铭, 等. 柳蒿中化学成分的研究现状 [J]. 辽宁化工, 2017, 46 (4): 402-404.
- [5] Mosad RR, Ali MH, Ibrahim MT, et al. New cytotoxic steroidal saponins from *Cestrum parqui* [J]. Phytochem Lett, 2017, 22: 167-173.
- [6] 陈玥, 李晓霞, 武一玫, 等. 卢旺达产金盏菊花化学成分研究 II [J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24 (5): 390-394.
- [7] 郑蓉蓉, 轧霖, 王文婧, 等. 五指毛桃的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (21): 3696-3701.
- [8] 齐曼, 郑晓珂, 曹彦刚, 等. 皂角刺醋酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (23): 5510-5515.
- [9] 赵燕燕, 崔承彬, 蔡兵, 等. 洋紫荆化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15 (5): 302-304, 256.
- [10] Abbas FA, Al-Massarany SM, Khan S, et al. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L [J]. Nat Prod Res, 2007, 21 (5): 383-391.
- [11] 李军, 姜勇, 屠鹏飞. 密花远志的化学成分研究 (II) [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (1): 45-47.
- [12] Junior P. Iridoidglucoside und ein acetophenonglucosid aus *Penstemon whippleanus* [J]. Planta Med, 1984, 50 (5): 444-445.
- [13] Lu YN, Xie GB, Bi D, et al. Constituents from leaves of *Scolopia chinensis* [J]. Helv Chim Acta, 2008, 91 (5): 825-830.
- [14] Chevalley I, Marston A, Hostettmann K. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for detection and isolation of an antifungal acetophenone from *Ribes rubrum* (Saxifragaceae) [J]. Chromatographia, 2001, 54 (3): 274-277.
- [15] Shimoda K, Kondo Y, Nishida T, et al. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana* [J]. Phytochemistry, 2006, 67 (20): 2256-2261.
- [16] 李硕, 胡立宏, 楼凤昌. 云木香化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2 (1): 63-65.
- [17] 张勇, 郭夫江, 曾鹏, 等. 毛裂蜂斗菜中酚类成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (12): 1782-1787.

(收稿日期: 2022-09-07; 修回日期: 2022-10-15)

喷昔洛韦乳膏体外释放一致性研究

信长颖¹, 赵龙山², 多凯¹, 于新颖¹, 寻延滨¹, 刘利群^{1*} (1. 黑龙江省药品检验研究院, 哈尔滨 150088; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立并验证喷昔洛韦乳膏体外释放的测定方法, 比较国内仿制制剂与参比制剂体外释放行为的差异。**方法** 采用 Franz 扩散池, 以生理盐水作为接收液, 以混合纤维素微孔滤膜作为隔离膜, 采用 HPLC 法测定喷昔洛韦乳膏的体外释放速率。并采用 Mann-Whitney U 检验评价仿制制剂与参比制剂体外释放速率的一致性。**结果** 经验证, 所建立的体外释放测定方法线性、日内及日间精密度良好, 具有一定的灵敏性、特异性、选择性和耐用性, 可用于喷昔洛韦乳膏体外释放速率的测定。国内 7 家企业仿制制剂仅有 1 家喷昔洛韦乳膏的体外释放速率与参比制剂一致, 其他 6 家企业的样品与参比制剂均不一致。**结论** 本研究表明体外释放试验结果具有高度灵敏性, 可区分不同喷昔洛韦乳膏之间释放行为的差异, 为进一步开展乳膏等半固体制剂的质量一致性评价奠定基础。

关键词: 喷昔洛韦乳膏; 体外释放; 方法学验证; 一致性研究

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1212-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.016

In vitro release consistency of penciclovir cream

XIN Chang-ying¹, ZHAO Long-shan², DUO Kai¹, YU Xin-ying¹, XUN Yan-bin¹, LIU Li-qun^{1*} (1. Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150088; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016)

Abstract: Objective To establish and verify the in vitro release method of penciclovir cream, and to compare the in vitro release behaviors of domestic generic preparations and reference preparations. **Methods** A Franz diffusion cell with normal saline as the receiving fluid was used, and a mixed cellulose membrane was used as the isolation membrane. The in vitro release rate of penciclovir cream was determined by high performance liquid chromatography. The consistency of the in vitro release rates of the generic and reference preparations was evaluated by Mann-Whitney Test. **Results** The established in vitro release method has good linearity, good intra-day and inter-day precision, sensitivity, specificity, selectivity and durability, which can be used to determine the in vitro release of penciclovir cream. Among the 7 domestic imitation preparations, only 1 penciclovir cream showed the same in vitro release as the reference preparation, and the samples of the other 6 enterprises are inconsistent with the reference preparation. **Conclusion** The in vitro release is highly sensitive and can distinguish the difference in release behaviors of different products, laying a foundation for further quality consistency evaluation of semi-solid preparations such as cream.

Key words: penciclovir cream; in vitro release; methodological validation; consistency

喷昔洛韦是抗病毒药物, 对水痘、带状疱疹病毒有很强的抑制作用^[1]。喷昔洛韦乳膏剂属于半固体制剂, 发挥治疗作用主要取决于递药的 3 个过程^[2]: ① 活性成分从基质中释放到第一层

生物屏障 - 角质层, 即体外释放 (in vitro release, IVR); ② 渗透扩散于角质层或其他皮肤层, 即体外渗透 (in vitro permeation test, IVP); ③ 在作用部位产生期望的药理作用。2021 年 3 月我国国家

基金项目: 2021 年国家药品抽检中央补助地方经费项目 (No. 42)。

作者简介: 信长颖, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事仿制药一致性评价研究, email: 1145841324@qq.com * 通信作者: 刘利群, 女, 硕士, 主任药师, 主要从事化学药品质量评价研究, email: 13766969599@163.com

药品监督管理局药品审评中心发布了《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则(试行)》^[3],该指导原则明确指出在对皮肤外用仿制药一致性评价时,应对关键质量属性(CQAs)体外释放试验(IVRT)和体外渗透试验(IVPT)进行研究。国外对阿昔洛韦乳膏的IVRT进行了详尽的研究^[4-5],但国内多集中于在制剂研发初期采用IVRT和IVPT进行处方筛选^[6-9]及综述^[10],仍未见关于半固体制剂IVRT全面验证及等效性评价的实例分析。因此本文以2021年国家抽检的7个厂家的喷昔洛韦乳膏为例,采用Franz扩散池及与喷昔洛韦具有惰性的商品膜,研究该乳膏剂的体外释放,建立科学完善的方法学验证过程,评价国内市售喷昔洛韦乳膏与参比制剂体外释放速率的差异,为喷昔洛韦乳膏等半固体制剂开展质量一致性评价奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

XS205DU型电子天平(十万分之一,梅特勒公司);精控型体外经皮渗透试验系统KX-V/HDP(大连科翔科技开发有限公司,带有12个竖式扩散池);UltiMate 3000高效液相色谱仪(赛默飞世尔公司)。混合纤维素微孔滤膜(0.45 μm,江苏绿盟科学仪器有限公司);尼龙微孔滤膜(0.45 μm,江苏绿盟科学仪器有限公司);Strat-M膜(直径25 mm,厚度300 μm,编号:SKBM02560,默克密理博)。

1.2 试验

对照品喷昔洛韦(批号:100769-201502,纯度:99.8%,中国食品药品检定研究院);甲醇(色谱纯,美国霍尼韦尔公司);磷酸二氢钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);生理盐水(兰西哈三联制药有限公司)。

喷昔洛韦乳膏原研制剂(美国Perrigo,批号:I9210411,规格:10 g/支),作为参比制剂(R);2021年国家评价性抽检中涉及到的7个生产企业各1批样品作为仿制制剂(T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7)。

2 方法与结果

2.1 接收液的选择

将过量的喷昔洛韦对照品溶解在生理盐水中,制备喷昔洛韦饱和溶液;将配制好的喷昔洛韦饱和溶液在(32.0±0.5)℃下恒温振荡24 h,实验平行3组,然后将饱和溶液取出离心,并用恒温至(32.0±0.5)℃的混合纤维素微孔滤膜过滤,将过滤好的溶液用生理盐水稀释并用HPLC分析,计算喷昔洛韦的饱和溶解度。结果喷昔洛韦在32℃生理盐水中的饱和浓度为1.975(SD:

0.05) mg·mL⁻¹,接收池体积为10 mL,接收液理论上可溶解约20 mg的喷昔洛韦;当喷昔洛韦乳膏的给药量约为0.2 g时,喷昔洛韦乳膏的规格为1%,样品中喷昔洛韦的给药量约为2 mg,用10 mL的生理盐水作为接收液进行体外释放试验可满足漏槽条件。

2.2 膜的选择

2.2.1 膜的惰性研究 在(32±0.5)℃条件下,分别将纤维素微孔滤膜、尼龙微孔滤膜、Strat-M膜浸入10 mL约为0.2 mg·mL⁻¹的喷昔洛韦生理盐水溶液(上样0.2 g时,若喷昔洛韦全部释放,接收液中喷昔洛韦质量浓度为0.2 mg·mL⁻¹)中保温24 h,平行3组。作为对照,制备没有膜的同浓度的喷昔洛韦生理盐水溶液,同时保温24 h,平行3组。随后用HPLC测定各测试溶液的浓度,通过将放有浸渍膜的溶液的平均浓度除以对照品溶液的平均浓度,计算相对于对照的回收率,回收率应在(100.0±5.0)%,说明膜对喷昔洛韦无吸收^[5]。结果混合纤维素微孔滤膜回收率为(98.5±0.9)%,尼龙微孔滤膜的回收率为(97.4±0.5)%,Strat-M膜的回收率为(97.8±0.8)%,3种膜对喷昔洛韦均无明显吸收。

2.2.2 膜的阻滞性研究 分别将混合纤维素微孔滤膜、尼龙微孔滤膜、Strat-M膜(各膜均预先在接收液中浸泡30 min以消除气泡)固定于Franz扩散池的一端,接收池接收液总体积为10 mL,扩散池上精密加入0.2 mg·mL⁻¹的喷昔洛韦生理盐水溶液0.2 mL,在600 r·min⁻¹和(32±0.5)℃条件下恒速恒温搅拌,并于0.5、1、2 h取接收液0.2 mL,每次取样完成后立即补加0.2 mL(32±0.5)℃的接收液,根据测定每一取样点喷昔洛韦的浓度,计算药物溶液累积释放率。以累积释放百分率对时间 t 作图,结果见图1,喷昔洛韦溶液在混合纤维素微孔滤膜上的释放速率最大,无阻滞作用,因此选择混合纤维素微孔滤膜进行研究。

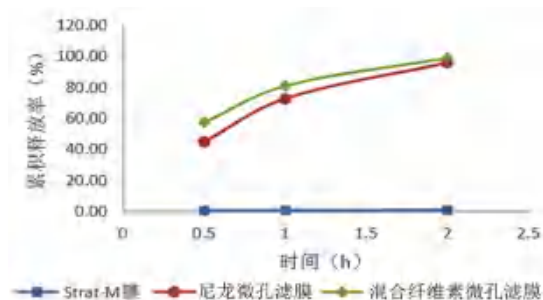


图1 昔洛韦溶液在不同商品膜上的释放情况

Fig 1 Release of penciclovir solution on different commercial films

2.3 体外释放的测定方法

2.3.1 方法 采用 Franz 扩散池^[11] (《美国药典》USP43 中的 C 型立式扩散池) 进行体外释放试验, 装置示意图见图 2。将混合纤维素微孔滤膜 (预先在接收液中浸泡 30 min 以消除气泡) 固定于扩散池的一端, 精密称取约 0.2 g 喷昔洛韦乳膏, 在释药面积 1.77 cm² 的膜上通过定量环均匀涂抹上样, 接收池接收液总体积为 10 mL, 在 600 r·min⁻¹ 和 (32±0.5) °C 条件下恒速恒温搅拌, 并于 0.5、1、2、4、6 h 取接收液 0.2 mL [每次取样完成后立即补加 0.2 mL (32±0.5) °C 的接收液], 分别作为体外释放测定用供试品溶液, 采用 HPLC 法进行定量分析。每个样品运行 6 次, 每次在不同的扩散池上运行, 并与参比制剂进行对比, 以消除不同扩散池带来的差异。

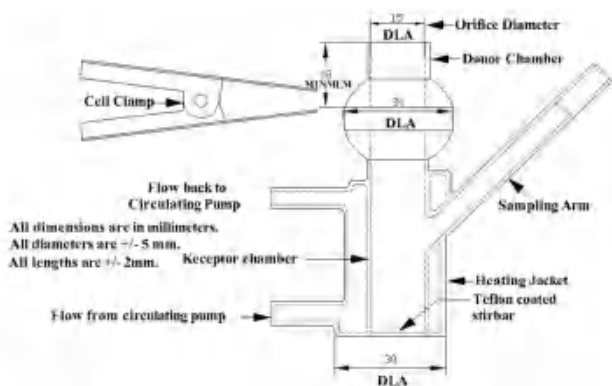


图 2 C 型立式扩散池^[11]

Fig 2 Vertical diffusion cell model C^[11]

2.3.2 方法学验证^[14] 按 FDA 的阿昔洛韦乳膏指南草案方法学验证方法对本 IVRT 方法进行方法学验证。

① 日内精密度和日间精密度的精密称取参比制剂 6 份, 分别置于 6 个扩散池, 计算每个扩散池的释放速率, 6 个释放速率的变异系数 (CV) 应小于 15%, 即为日内精密度的。次日, 再次精密称取参比制剂 6 份, 分别置于 6 个扩散池, 计算每个扩散池的释放速率, 计算 3 d 共 18 个释放速率的 CV, 即为日间精密度的。结果日内精密度的 CV 为 4.6%, 日间精密度的 CV 为 9.2%, 均小于 15%。符合检测重现性的要求。

② 线性: “①” 项下 18 个释放曲线方程, 每个方程的 r^2 均大于 0.99, 满足指南草案中要求的 r^2 大于 0.90 的要求, 说明本 IVRT 方法可采用 Higuchi 方程进行线性拟合计算。

③ 灵敏性: 按某一已知企业的喷昔洛韦乳膏的制备方法制备 0.5%、1.0%、1.5% 3 种不同规格的喷昔洛韦乳膏, 每个浓度测定 6 份, 计算平均释放速率, 0.5% 乳膏的释放速率为 143.8 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{1/2}$, 1% 乳膏的释放速率为 241.3 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{1/2}$, 1.5%

乳膏的释放速率为 352.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{1/2}$ 。说明该方法是灵敏的。

④ 特异性: 以 “①” 项下 0.5%、1.0%、1.5% 制剂的释放速率为纵坐标, 以标示百分含量为横坐标, 线性回归方程为 $Y = 2.07 \times 10^4 X + 35.87$, r^2 为 0.9989。可见本方法具有特异性, 能准确监测制剂中释放速率随药物浓度变化的比例关系。

⑤ 选择性: 取 “①” 项下喷昔洛韦乳膏, 分别计算 0.5%、1.0%、1.5% 与 1.0% 乳膏的 90% 置信区间, 1.0% 乳膏与 1.0% 乳膏相比, 90% 置信区间均在 75.00% ~ 133.33% 内, 但新制备的 0.5%、1.5% 的喷昔洛韦乳膏的释放速率与 1.0% 乳膏相比, 在 75.00% ~ 133.33% 外, 可见本方法具备足够的选择能力, 可以识别处方中主药浓度的变化。

⑥ 耐用性: 测定温度为 (34±0.5) °C、(30±0.5) °C 时, 转速为 540、660 r·min⁻¹ 时的释放速率, 与原条件相比, 平均释放速率的 CV 分别为 10.2%、11.5%、12.0%、14.0%, 均小于 15%, 说明本方法的耐用性良好。

2.4 高效液相色谱法测定喷昔洛韦的含量^[12]

2.4.1 方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 流动相为 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-甲醇 (9:1); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL 。

2.4.2 方法学验证

① 专属性: 精密称取喷昔洛韦对照品 12.91 mg 置 100 mL 量瓶中, 用生理盐水超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。精密量取 “2.3.1” 项下的供试品溶液、对照品溶液及空白溶剂 10 μL 进样分析, 典型色谱图见图 3。空白溶剂对测定无干扰, 本方法专属性好。

② 线性: 精密称取喷昔洛韦对照品 12.91 mg 置 100 mL 量瓶中, 用生理盐水超声使溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为喷昔洛韦对照品储备液。精密量取喷昔洛韦对照品储备液 0.1、1、5、7.5、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 用生理盐水稀释至刻度, 摇匀, 即得标准系列溶液, 精密量取各溶液 10 μL 进样分析, 绘制标准曲线。以质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 线性回归方程为 $Y = 505.7X - 0.00181$ ($r = 1.000$), 喷昔洛韦在 0.0013 ~ 0.1288 mg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

③ 精密度的精密称取对照品溶液 10 μL , 连续进样 5 次, 5 次峰面积 RSD 为 0.20%, 符合测定要求。

④ 准确度: 取 6 份参比制剂 R 约 0.2 g, 置于 20 mL 量瓶中, 各分别精密加入约 2 mg 喷昔洛

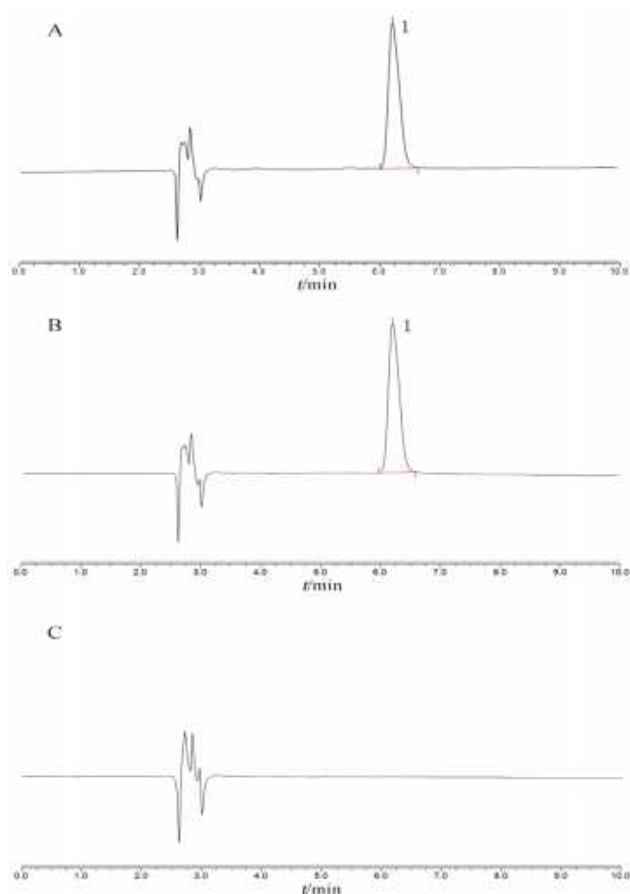


图 3 喷昔洛韦的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of penciclovir

A. 供试品溶液 (sample solution); B. 对照品溶液 (standard solution); C. 空白溶剂 (blank solvent); 1. 喷昔洛韦 (penciclovir)

韦对照品, 超声使溶解, 用生理盐水稀释至刻度。精密量取各溶液 10 μL 进样分析, 结果得回收率平均值为 95.5%, RSD 为 3.5%, 满足测定要求。

⑤ 重复性: 取 6 份参比制剂 R, 置于 10 mL 量瓶中, 用生理盐水溶解并稀释刻度, 摇匀, 精密量取各溶液 10 μL 进样分析, 结果得峰面积 RSD 为 3.3%。可认为本方法重复性好。

⑥ 稳定性: 取“⑤”重复性项下供试品溶液分别放置 0、4、8、12、24 h 测定, 结果得峰面积的 RSD 为 0.50%, 稳定性符合测定要求。

⑦ 检测限和定量限: 精密量取专属性项下的对照品溶液, 反复稀释, 以喷昔洛韦色谱峰信噪比为 3:1 时为检测限, 检测限为 0.32 ng, 以信噪比为 10:1 时为定量限, 定量限为 0.64 ng。

2.5 体外释放速率和累积释放率的计算及统计分析方法^[13]

实验过程中每次取样测得的接收介质中的药物浓度, 按以下公式计算单位面积的累积释放量:

$$Q_n = C_n \frac{V_c}{A_c} + \frac{V_s}{A_c} \sum_{i=1}^n C_{i-1}$$

Q_n = 每单位面积在时间 (n) 释放的量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$); C_n = 不同采样时间 (n) 下接收介质中的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$); V_s = 样品体积 (cm^3); V_c = 接收室容积 (cm^3); A_c = 有效扩散面积 (cm^2)。

半固体制剂中的药物释放一般遵循 Higuchi 方程, 释放达稳态后单位面积累积释放量与时间的平方根呈线性关系, 其相关系数 r^2 应大于 0.90, 直线部分的斜率为药物释放速率。

将各取样点的累积释放量, 除以加入扩散池中的药物的实际量, 计算各时间点的累积释放率。体外释放参比制剂 (R) 和仿制制剂 (T) 各产生 6 个斜率 (体外释放速率)。计算仿制制剂的体外释放速率与参比制剂的体外释放速率比值的 90% 置信区间, 用百分比表示。基于 SUPAC-SS 指南中描述的 Mann-Whitney U 检验, 来判断两组数据的中位数有无差别。Mann-Whitney U 检验是将两组样本的数值统一由小到大编排, 由 Mann-Whitney U 检验求出 90% 置信区间的上下界值的范围。如上下限均落在 75.00% ~ 133.33%, 则表示仿制制剂与参比制剂的释放速率的中位数差异在允许范围内, 仿制制剂与参比制剂的释放速率是等效的, 如置信区间的值仍落在 75.00% ~ 133.33% 外, 则判断为两制剂的释放速率不等值。

2.6 仿制制剂与参比制剂的释放结果比较

以不同时间累积释放量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) 为纵坐标 Y , 以时间的平方根为横坐标 X , 对其进行线性回归, 参比制剂与 7 个仿制制剂的释放速率方程见表 1, 方程的斜率为释放速率。各仿制制剂与参比制剂释放速率的比较见图 4。7 家仿制制剂与参比制剂 (T/R) 释放速率比值的 90% 置信区间上下限及一致性判定见表 2。可知, 7 家仿制制剂中, 仅一家企业的制剂 (T4) 与参比制剂的释放速率一致, 其他 6 家仿制制剂均不一致。其中 T1、T2、T5、T6、T7 释放速率高于 R, 而 T3 释放速率低于 R。

3 讨论

FDA 在其颁布的 SUPAC-SS 指导原则“非无菌半固体制剂扩大规模和上市后变更: 体外释放试验和体内生物等效性要求”中指出, 半固体局部用制剂在生产放大和产品批生产发生变更时须进行体外释放试验, 以保证产品质量的一致性和等效性^[13]。FDA 已发布了多个外用半固体仿制药的指南草案, 如阿昔洛韦乳膏、磷酸克林霉素凝胶、甲硝唑阴道用凝胶、维甲酸凝胶、贝沙罗汀凝胶和二十二烷醇乳膏等, 完成 IVRT 或 IVRT 和体外渗透试验后可申请生物等效性豁免^[14-19]。

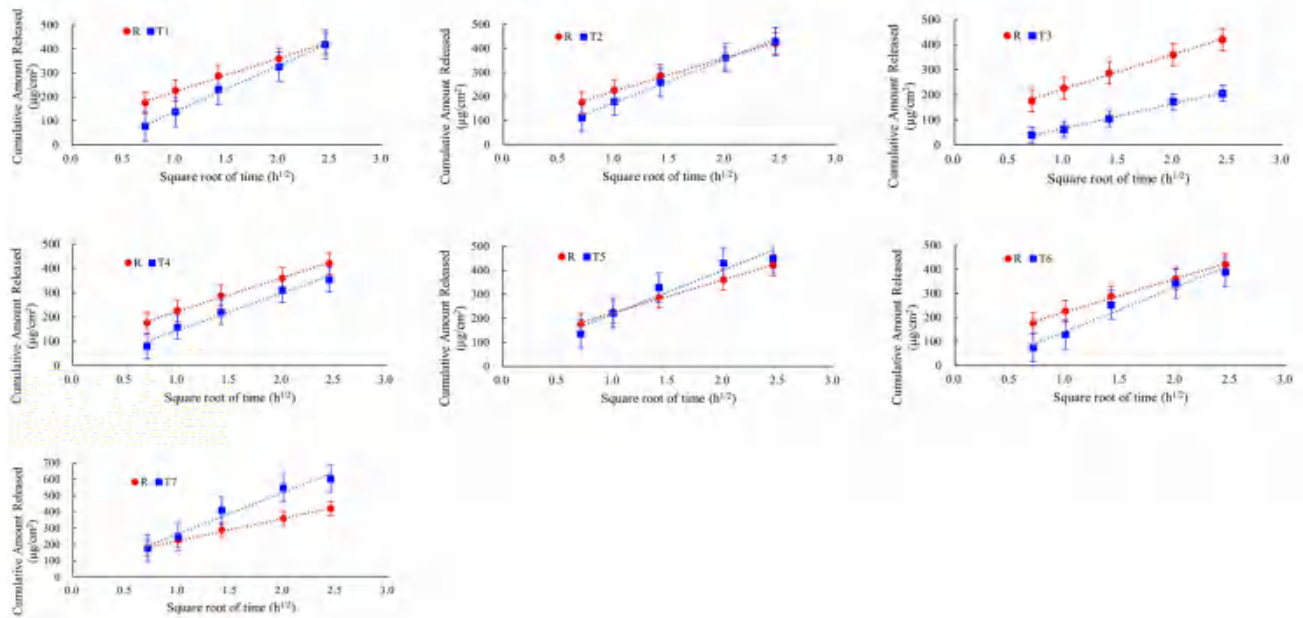


图 4 7 家仿制制剂与参比制剂释放速率的比较

Fig 4 Release rate of generic preparation from 7 manufacturers and reference preparation

表 1 释放速率方程
Tab 1 Release rate equation

产品	速率方程	r^2
R	$Y = 138.1X + 84.60$	0.9968
T1	$Y = 192.5X - 53.57$	0.9972
T2	$Y = 181.1X - 6.483$	0.9955
T3	$Y = 98.34X - 31.99$	0.9955
T4	$Y = 153.5X - 8.471$	0.9797
T5	$Y = 182.5X + 35.75$	0.9411
T6	$Y = 185.4X - 44.62$	0.9705
T7	$Y = 255.9X + 8.408$	0.9718

表 2 7 家仿制制剂与参比制剂释放速率比值的 90% 置信区间及一致性判定

Tab 2 Confidence interval and consistency of release rate of generic preparation from 7 manufacturers and reference preparation

成对比较	置信区间 / %		一致性判定
	低限	高限	
R vs T1	134.77	145.35	No
R vs T2	125.80	137.09	No
R vs T3	68.65	74.07	No
R vs T4	106.00	116.26	Yes
R vs T5	126.30	137.68	No
R vs T6	128.69	141.09	No
R vs T7	176.75	195.87	No

本文以喷昔洛韦乳膏作为模型药物，建立了乳膏体外释放测定方法，在方法建立之初，考察了 20% 丙二醇的生理盐水溶液、5% 吐温 80 溶液以及生理盐水 3 种接收液，发现因 3 种接收液均达到漏槽条件，参比制剂在 3 种接收液释放速率无差异，从一定程度说明 IVRT 作为半固体制剂

的一种物理性质，接收介质不影响制剂的形态，即接收介质不影响药物的释放，合适的接收介质可以是多种，在选择接收介质时，只要保证溶解度要求及接收介质的稳定性即可。

IVRT 试验选择膜时主要取决于三点：膜的惰性（与 API 和接收液无反应）、无扩散、无阻滞。因此本文设计了膜惰性试验，所选择的 3 种膜与喷昔洛韦均没有结合情况。但在膜的阻滞性研究中，3 种膜在 2 h 后均对喷昔洛韦无阻滞，但在纤维素微孔滤膜上速度快，阻滞作用小，因此本文选择纤维素微孔滤膜进行 IVRT 研究。喷昔洛韦溶液 2 h 在 Strat-M 膜中基本无透过，此外本次还监测了参比制剂与各仿制制剂在 Strat-M 膜 24 h 的释放情况，参比制剂和各仿制制剂在该膜上的释放量均低于检测限，Strat-M 膜与人体皮肤相似，适用于 IVPT 研究^[20]，不适用于药物释放的考察，同时证明各制剂均不透过皮肤，与说明书标注“本品在血液中无法检测到”一致，证明了各制剂的安全性^[21]。

体外释放速率可能不能完全反映药物透皮递送的速率，但可参考检测到的释放速率的变化来推测某些物理化学性质（如原料药粒度、物理状态）及工艺参数等变化带来的制剂内在质量差异，此类差异可能会最终影响制剂的疗效。并且有国外学者提出，如果仿制药与参比制剂辅料的种类（Q1）、用量（Q2）不同，即使辅料存在差异，但辅料是惰性的，对药物的透皮没有影响，如果反映物理性能与微观结构（Q3）的体外释放率相同，也可以申请生物等效豁免，这一理论是由提出生

物药剂学分类系统 (BCS) 理论的研究小组成员提出, 在 FDA 网站可以查到多次关于这一分类系统局部给药分类系统 (TCS) 的研讨, 可见体外释放试验对于半固体制剂研究的重要性^[22]。

本文首次建立了 IVRT 的方法学验证, 采用伪无限上样量 (取样最后时间点的累积释放率小于 30%), 不同浓度的喷昔洛韦乳膏释放速率不同, 验证了方法的灵敏性, 释放速率与浓度的变化呈线性关系验证了方法的特异性, 该方法可区分不同浓度的喷昔洛韦乳膏, 说明建立的方法具有选择性, 进一步证明了所选用的膜惰性无阻滞。此外本试验还控制环境温度 (21 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 20) %, 并在试验前对扩散池的体积、孔口直径、转速、工作台的倾斜度进行了全面的验证。经验证的 IVRT 方法可准确评价产品的质量, 但同时建议采用氯化可的松校正软膏对扩散池仪器进行更为全面的验证 (类似于溶出度中的水杨酸校正片)^[23]。

4 结论

本研究采用 IVRT 方法测定了喷昔洛韦乳膏国内 7 家仿制企业的各 1 批样品与参比制剂的释放速率, 并按照 FDA 的 SUPAC-SS 指导原则中的等效性判定方法对各试验制剂与参比制剂的等效性进行判定, 结果仅 1 家企业制剂的释放速率与参比制剂在等效性范围 75.00% ~ 133.33% 内, 其他 6 家企业制剂的释放速率与参比制剂均不等效。虽然在 IVRT 研究中测定的特定释放速率并不与药物在体内从产品中释放的速率相关, 但经过验证的 IVRT 方法可以对试验制剂和参比制剂之间的释放速率差异敏感^[24]。如果在 IVRT 研究中观察到这种差异, 则增加了产品性能可能在体内存在的潜在差异。相反, 与参比制剂相比, 试验制剂具有相同的药物释放率, 则降低了生物等效性失败模式的风险, 因此支持生物等效性的论证。本研究为进一步扩大建立乳膏体外释放测定方法及质量一致性评价奠定基础。

参考文献

[1] Schmid-Wendtner MH, Korting HC. Penciclovir cream-improved topical treatment for herpes simplex infections [J]. *Skin Pharmacol Phys*, 2004, 17 (5): 214-218.

[2] Shah VP, Yacobi A, Rădulescu FS, et al. A science based approach to topical drug classification system (TCS) [J]. *Int J Pharmaceut*, 2015, 491: 21-25.

[3] 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)》[S]. 2021.

[4] Tiffner KI, Kanfer I, Augustin T, et al. A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an in vitro release test (IVRT) method for acyclovir cream, 5% [J]. *Int J Pharmaceut*, 2018, 535 (1-2): 217-227.

[5] Kamal NS, Krishnaiah YSR, Xu X, et al. Identification of critical formulation parameters affecting the in vitro release, permeation, and rheological properties of the acyclovir topical cream [J]. *Int J Pharmaceut*, 2020, 590: 119914.

[6] 单瑞平, 鲍毅, 尚海萍, 等. 他克莫司软膏的制备及体外经皮渗透评价 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (8): 1082-1087.

[7] 王雪莹, 闫淑静, 牛若惠, 等. 结合雌激素阴道用脂质体温敏凝胶的制备与性质考察 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (8): 1059-1066.

[8] 唐靖, 田娟, 黄辉, 等. 基于全自动二维液相色谱的地奈德乳膏体外经皮渗透研究 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (12): 1242-1246.

[9] 张志华, 何周康, 王鑫, 等. 他克莫司类脂质体凝胶体内经皮渗透性研究 [J]. *中南药学*, 2016, 14 (8): 823-826.

[10] 邵鹏, 郑金琪, 潘芳芳, 等. 外用半固体制剂的体外释放试验和等效性评价 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38 (20): 2481-2487.

[11] USP, 2020. USP chapter < 1724 > Semisolid drug products-Performance tests, United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38) [S]. 2020: 8473-8486.

[12] 国家药典委员会. WS1-(X-075)-2005Z. 新药转正标准第 63 册. 国家药品标准 [M]. 中国医药科技出版社, 2011.

[13] U. S. FDA, 1997. Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms, scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation (SUPAC-SS). Guid. Ind.

[14] FDA. Draft Guidance on Acyclovir [S]. 2016.

[15] FDA. Draft Guidance on Clindamycin Phosphate [S]. 2020.

[16] FDA. Draft Guidance on Metronidazole [S]. 2019.

[17] FDA. Draft Guidance on Tretinoin [S]. 2020.

[18] FDA. Draft Guidance on Bexarotene [S]. 2019.

[19] FDA. Draft Guidance on Docosanol [S]. 2017.

[20] 岑月眉, 闻萍, 李久盛, 等. 体外实验用人工皮肤模型的研究简介 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40 (9): 1543-1549.

[21] 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.

[22] Shah VP, Rădulescu FS, Mironc DS, et al. Commonality between BCS and TCS [J]. *Int J Pharmaceut*, 2016, 509: 35-40.

[23] Hauck WW, Shah VP, Shaw SW, et al. Reliability and reproducibility of vertical diffusion cells for determining release rates from semisolid dosage forms [J]. *Pharm Res*, 2007, 24 (11), 2018-2024.

[24] Tiffner KI, Kanfer I, Augustin T, et al. Comparative in vitro release testing (IVRT) of acyclovir products [J]. *Int J Pharmaceut*, 2021, 609: 121186.

(收稿日期: 2022-09-15; 修回日期: 2022-12-07)

外泌体对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响

程永芳, 段慧明* (广西中医药大学科学实验中心, 广西中医基础重点实验室, 南宁 530200)

摘要: **目的** 观察肝癌细胞来源的外泌体对肝癌细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 采用多步超速离心法从肝癌 HepG2 细胞的培养液上清中分离出外泌体; 采用透射电子显微镜观察外泌体形态; 采用 Western blot 检测其标志物的表达; 采用 CCK-8 法检测外泌体对 HepG2 细胞增殖的影响; 采用绿色荧光法检测外泌体对 HepG2 细胞凋亡的影响。**结果** 透射电子显微镜观察到的外泌体一般为圆形或椭圆形膜性囊泡状结构, 直径 30 ~ 100 nm; Western blot 检测到外泌体具有标志性蛋白 CD9、TSG101、ALIX; CCK-8 法显示外泌体对 HepG2 细胞具有促增殖作用; 绿色荧光法显示外泌体具有抑制 HepG2 细胞凋亡的作用。**结论** 肝癌细胞来源的外泌体具有促进 HepG2 细胞增殖并抑制其凋亡的作用。

关键词: 肝癌; 外泌体; 增殖; 凋亡

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1218-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.017

Effect of exosomes on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells

CHENG Yong-fang, DUAN Hui-ming* (Center of Science Experiment, Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Foundation Research, Nanning 530200)

Abstract: Objective To determine the effect of exosomes derived from hepatocellular carcinoma cells on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Exosomes were isolated from the culture medium supernatant of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by multi-step hypercentrifugation. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscopy. The expression of its markers was detected by Western blot. CCK-8 assay was used to detect the effect of exosomes on the proliferation of HepG2 cells. The effect of exosomes on apoptosis of HepG2 cells was detected by green fluorescence method. **Results** Exosomes observed by transmission electron microscopy were generally round with oval membranous vesicles with diameters ranging 30 ~ 100 nm. Western blot showed that the exosomes had marker proteins CD9, TSG101 and ALIX. CCK-8 assay showed that exosomes promoted the proliferation of HepG2 cells. Green fluorescence showed that exosomes inhibited the apoptosis of HepG2 cells. **Conclusion** Exosomes from hepatocellular carcinoma cells can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of HepG2 cells.

Key words: hepatocellular carcinoma; exosome; proliferation; apoptosis

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是临床上较为常见的消化系统恶性肿瘤, 发病率和病死率高。美国癌症协会发布的癌症统计分析报告显示, 全球 HCC 发病率和病死率在恶性肿瘤中分别排第 6 位和第 3 位, 主要分布在亚洲和非洲等^[1-2]。由于肝癌早期不易被察觉, 其转移快且

隐蔽, 大多数肝癌患者确诊时已到中晚期, 并且我国肝癌患者大多在确诊时还伴随有严重的肝硬化, 目前的多种治疗手段包括手术放化疗、靶向治疗、免疫治疗甚至联合治疗均未能改变其预后差、5 年生存率低等特征。外泌体研究的兴起, 深入研究外泌体在肝癌中的作用机制, 将为肝癌

基金项目: 广西中医药大学校级课题面上项目 (No.2018MS010); 广西中医药大学校级课题青年基金项目 (No.2021QN010); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (No.2022KY0301); 广西中医药大学广西一流学科建设开放课题青年基金项目 (No.2019XK060)。
作者简介: 程永芳, 女, 助理研究员, 主要从事中医药防治疾病的现代科学基础研究, email: cyf1990yy@163.com *通信作者: 段慧明, 男, 副教授, 主要从事肿瘤分子生物学的研究, email: 1833474187@qq.com

的早期诊断、治疗和预后的评估开辟新的途径。

外泌体是一种几乎所有类型细胞(包括肿瘤细胞)都会分泌的,直径为 30 ~ 100 nm 的小囊泡^[3]。它们富含来自亲代细胞的选择性蛋白质和核酸,具有标志蛋白(CD81、CD9、CD63、TSG101、ALIX 等)^[4],可传递关键成分,具有调节细胞间通信的潜力,并且是通过“运输”分子来调节细胞过程的关键信使。外泌体可以传递蛋白质、可溶性因子,最重要的是可以传递调节受体细胞蛋白表达的 RNA 和 microRNAs (miRNAs)^[5]。这对于机体的正常稳态和各种疾病包括肿瘤的发病机制都是非常重要的^[6]。肿瘤来源的外泌体可能有助于肿瘤微环境的募集和重编程以形成促致瘤的土壤。肿瘤来源的外泌体可改变局部和全身微环境,通过将其内容物(如 EGFRVIII、KRAS、lncRNAs 或 miRNAs 等)转移到其他肿瘤细胞以诱导上皮间充质转变,迁移和侵袭或受体细胞耐药,从而促进肿瘤进展和转移并可通过 TGF- β 1 或其他配体的分泌抑制肿瘤细胞凋亡^[7-10],本研究通过对 HepG2 肝癌细胞系外泌体的分离及分析,揭示外泌体在肝癌进展中的作用。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞株,购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂

DMEM 高糖培养基(凯基生物);胎牛血清(四季青);兔 CD9、TSG101、ALIX 单克隆抗体及 HRP-山羊抗兔二抗(Servicebio);胰蛋白酶(Solarbio);PBS 缓冲液(凯基生物);CCK-8 试剂盒(Beyotime);Caspase3/7 细胞凋亡活性检测试剂盒“绿色荧光”(上海生工);BCA 蛋白定量试剂盒(南京建成)。

1.3 仪器

MCO-18AIC 二氧化碳培养箱(日本 PHCbi 公司);CP100NX 超速冷冻离心机、HT7800/HT7700 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);Multiskan Sky 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);Infinite M200Pro Nanoquant 光吸收微孔板荧光检测仪(瑞士 TECAN 公司);DYCZ-24DN 双垂直电泳仪、DYCZ-40D 转印电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HepG2 肝癌细胞置于 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清)中。种板 24 h 后,换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基^[11],将细胞置于

37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养。

2.2 外泌体提取

待细胞状态良好且生长至 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$,收集细胞培养上清液用以提取外泌体。4 °C,300 × g 离心 10 min,去除细胞污染。吸取上清液于 2000 × g 离心 10 min,去除死细胞。吸取上清液于 10 000 × g 离心 30 min,去除细胞碎片,吸取上清液于 100 000 × g 超速离心 90 min,去除上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后于 100 000 × g 超速离心 90 min,沉淀即为外泌体^[12]。PBS 重悬,BCA 法测定蛋白浓度,− 80 °C 冻存备用。

2.3 电镜观察

用移液枪吸取外泌体 20 μ L 滴在碳膜铜网放置 5 min,用滤纸吸去多余液体。将 2% 磷钨酸滴在碳膜铜网上放置 2 min,用滤纸吸去多余液体,室温干燥。透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.4 外泌体定性检测

取出冻存的外泌体,室温下冰上放置融化 3 min,取出 10 μ L 分离出的外泌体,加入 5 μ L 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,振荡混匀,室温放置 10 min,4 °C 下 20 000 × g 离心 20 min。上清液为蛋白裂解液,取 10 μ L 裂解液加入 5 × loading buffer,95 °C 加热 5 min,冷却,经 12%SDS-PAGE 150 V 恒压跑胶 1.5 h,15 V 恒压转膜,于室温下脱色摇床上用 5% 的脱脂牛奶(0.5%TBST 配)封闭 1 h,加入 1 : 1000 稀释兔抗人 CD9、TSG101、ALIX 单克隆抗体,4 °C 摇床孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,将二抗用 TBST 稀释 3000 倍,室温下孵育 30 min 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次,每次 5 min,化学发光显色,凝胶图像分析。

2.5 肝癌细胞增殖检测(CCK-8 法)

收集处于对数生长期细胞,接种至 96 孔板中(2500 细胞/孔),种板 24 h 后,换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,加入外泌体(300 μ g · mL⁻¹) 10 μ L 共孵育作为外泌体组,用等体积的 PBS 处理的细胞作为对照组,没有细胞的小孔加入等体积 PBS 作空白组。每组设置 3 个复孔,细胞培养 24 ~ 72 h 后,每孔加 10 μ L CCK-8 溶液,再孵育 1 h,450 nm 处测定吸光度值。

2.6 荧光法检测外泌体对细胞凋亡的影响

收集处于对数生长期细胞,接种至 96 孔板中(2250 细胞/孔),种板 24 h 后,换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,加入外泌体(206 μ g · mL⁻¹) 20 μ L 共孵育 48 h 作为外泌体组。对

照组未作共培养处理, 用 Caspase3/7 细胞凋亡活性检测试剂盒检测细胞凋亡情况 (酶标仪检测 $E_x/E_m = 490/525 \text{ nm}$ 处的荧光强度)。

2.7 统计学分析

所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 Excel 对数据进行统计和分析作图, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外泌体的形态观察

用透射电子显微镜观察外泌体的形态, 一般为圆形或椭圆形膜性囊泡, 直径 $30 \sim 100 \text{ nm}$, 见图 1。

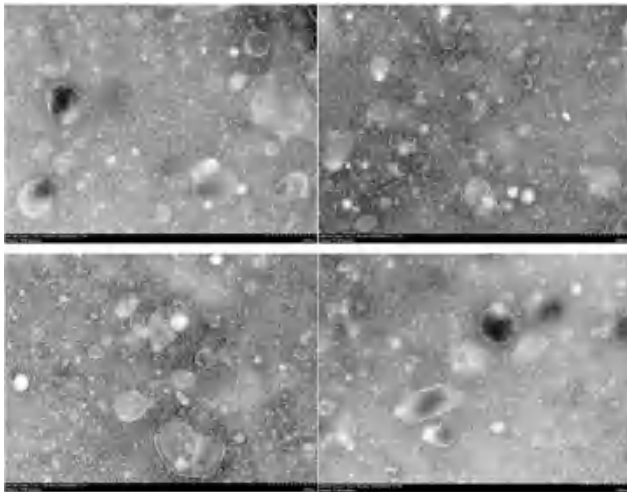


图 1 透射电子显微镜下观察到的外泌体形态 ($\times 40\,000$)

Fig 1 Morphology of exosomes under transmission electron microscope ($\times 40\,000$)

3.2 外泌体标志物的检测

对 HepG2 细胞分泌的外泌体作 Western blot 定性分析, 可见外泌体稳定表达 CD9、TSG101、ALIX 等蛋白标志物, 见图 2。



图 2 外泌体标志物的表达

Fig 2 Expression of exosomal markers

3.3 外泌体对肿瘤细胞增殖的影响

以 CCK-8 法检测加入外泌体处理后的肿瘤细胞的增殖趋势, 可发现外泌体具有促进肿瘤细胞增殖的能力, 但 72 h 相比 48 h 细胞吸光度值有所减少, 见表 1。

表 1 CCK-8 法检测细胞不同时间点吸光度值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Absorbance of cells at different time measured by CCK-8 method ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	吸光度值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.280 ± 0.029	0.437 ± 0.006	0.384 ± 0.026
外泌体组	0.284 ± 0.019	0.514 ± 0.064	$0.474 \pm 0.020^{\#}$

注: 与对照组比较, $^{\#}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $^{\#}P < 0.01$.

3.4 外泌体对肿瘤细胞凋亡的影响

采用绿色荧光法 (Caspase3/7 细胞凋亡活性检测试剂盒) 检测细胞凋亡的水平, 可发现相比于对照组, 外泌体具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用, 但不显著, 见图 3。

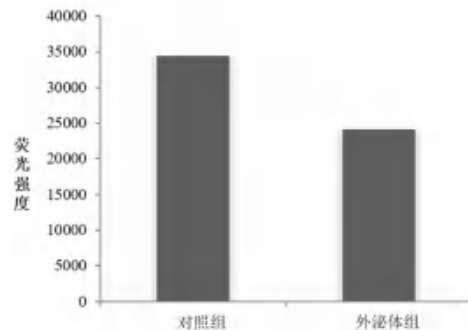


图 3 外泌体对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effects of exosomes on apoptosis of HepG2 cells ($n = 3$)

4 讨论

外泌体是近些年国内外研究的热点, 尤其在肿瘤方面应用广泛, 越来越多的证据表明, 来源于肿瘤细胞的外泌体在癌症中起着关键作用^[13], 本研究主要探索肝癌细胞外泌体对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。

本研究采用多步超速离心法从肝癌 HepG2 细胞的培养液上清液中分离出外泌体 (因考虑最大限度利用外泌体, 同时为了防止其降解, 外泌体是分批次提取, 每次实验提取一次) 并通过透射电子显微镜观察外泌体形态, 利用 Western blot 检测其标志物的表达。采用 CCK-8 法、绿色荧光法分别检测外泌体对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。

多步超速离心分离外泌体是最常见的外泌体提取方法, $100\,000 \times g$ 超速离心, 时间在 70 min 以上是多步离心的关键步骤。最后 PBS 溶解后的外泌体可以直接使用不影响后续实验, 而不需要在使用前过滤除菌, 过滤很容易使外泌体浓度降低, 因为外泌体直径与滤膜孔径接近, 不易滤过。

电镜观察到的外泌体一般为圆形或椭圆形膜性囊泡状结构, 直径在 200 nm 以下, 也有直径在

200 nm 以上的其他微泡和凋亡小体等, 外泌体具有标志性蛋白 CD9、TSG101、ALIX 等。外泌体的电镜观察证明提取到的囊泡从形态和大小上符合外泌体的描述, 但还不能完全证实就是外泌体, 只是初步验证, 而 Western blot 检测到外泌体的标志性蛋白则更进一步从结构成分上验证了外泌体的存在。

CCK-8 法显示外泌体对 HepG2 细胞具有促增殖作用, 24 h 和 48 h 效果较弱且 48 h 细胞量要高于 72 h, 可能细胞在生长到 72 h 时营养下降, 导致细胞量下降的作用可能逐渐超过增殖作用, 原因可能是种板时采用的是含 10% 血清的高糖 DMEM, 而在外泌体处理前 (即种板 24 h 后) 将含 10% 血清的高糖 DMEM 换成了含 1% 血清的高糖 DMEM (血清浓度高会影响增殖), 但浓度低了又会导致后续营养不足, 也可能是种板时三块板上的细胞未处在同一个生长期导致, 需要更好的优化生长条件并对培养基进一步摸索条件使其在进入第 3 日时还能保持很好的营养, 为了有更好的效果同时还应进一步加大外泌体的提取浓度。

绿色荧光法检测用外泌体共培育的 HepG2 细胞的凋亡情况, 结果显示外泌体有一定的抑制 HepG2 细胞凋亡的作用, 但幅度不大, 作用不显著, 这可能和本批次提取的外泌体浓度 (质量浓度为 $206 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 不高有关。

增殖和凋亡是外泌体功能的一体两面, 能促进增殖就能抑制凋亡。促进增殖的作用强, 必定抑制凋亡的作用也强, 反之亦然, 促增殖能力弱必定抑制凋亡能力也弱。而本研究促增殖能力要稍强于抑制凋亡能力, 没有较好表现出两种作用强度的一致性, 很可能是由于外泌体是分批次提取, 导致浓度的差异, 因此体外实验也应尽量接近体内这种作用的统一性, 最好所有实验都采用一次提取的外泌体, 这样能保证增殖和凋亡实验都是采用同一浓度的外泌体, 但是这样也会导致一次收集的细胞工作量过大的问题, 而且, 外泌体长时间低温保存也会导致外泌体的降解, 因此需要找到一个合理的浓度。

综上, 本研究从肝癌细胞的培养液中提取到的外泌体 (其浓度还应进一步提高), 具有促进肝癌细胞增殖和抑制其凋亡的能力。

参考文献

- [1] 尤然, 黄健. 外泌体与肝癌的研究进展 [J]. 江苏医药, 2017, 43 (6): 428-431.
- [2] 周毓旻, 沈凌, 田焯, 等. 光甘草定对肝癌 Hep3B 细胞增殖的影响 [J]. 中南药学, 2020, 18 (9): 1483-1487.
- [3] 鲍倩倩, 王强, 桑冉, 等. 巨噬细胞外泌体-脂质体杂化纳米粒的制备及表征 [J]. 中南药学, 2022, 20 (2): 266-270.
- [4] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes [J]. Annu Rev Biochem, 2019, 88: 487-514.
- [5] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9 (6): 654-659.
- [6] Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (49): 34211-34222.
- [7] Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91 (4): 431-437.
- [8] 吴伟东, 易永盛, 刘丹, 等. 外泌体对 A549 细胞增殖、凋亡及迁移功能的影响 [J]. 广东医学, 2017, 38 (10): 1477-1480.
- [9] Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019, 1871 (2): 455-468.
- [10] Kharaziha P, Ceder S, Li Q, et al. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826 (1): 103-111.
- [11] Lu Y, Zi X, Zhao Y, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin) [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93 (24): 1852-1857.
- [12] Saman S, Kim WH, Raya M, et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (6): 3842-3849.
- [13] Dai J, Su Y, Zhong S, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5 (1): 145.

(收稿日期: 2022-09-07; 修回日期: 2022-11-03)

鱼腥草素钠鼻喷雾剂的喷雾特性评价

王淼^{1,2}, 贾青³, 吴陈亮^{3*} (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 海门 226133; 3. 上海欧米尼医药科技有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 考察鱼腥草素钠鼻喷雾剂的喷雾特性。**方法** 采用 HPLC、激光粒度仪、Andersen 级联撞击器、SprayVIEW 激光成像系统等考察所制备的鼻喷雾剂的递送剂量、雾滴粒径分布(激光衍射法、撞击器法)、喷雾模式和羽流几何学。**结果** 为保证给药剂量的准确性,鼻喷雾剂启动需喷废 3 喷,在超出 7 d 的使用周期时需进行再启动,应喷废 1 喷;递送剂量均一性测试中,平均值均在标示量的 85%~115%,且全部测定值均在标示量的 80%~120%;雾滴粒径分布测试中,激光衍射法检测结果表明雾滴粒径集中分布在 14~82 μm;撞击器法检测结果显示小于 9 μm 雾滴中药物含量均未检出;喷雾角度为 31°~35°,呈扇形分布,横截面接近圆形,椭圆率为 1.13~1.24。**结论** 鱼腥草素钠鼻喷雾剂递送剂量准确,具有良好的喷雾特性。

关键词: 鱼腥草素钠鼻喷雾剂;递送剂量;激光衍射法;撞击器法;喷雾模式;羽流几何学
中图分类号: R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1222-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.018

Spray characteristics of sodium houttuyfonate nasal spray

WANG Miao^{1,2}, JIA Qing³, WU Chen-liang^{3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Haimen Jiangsu 226133; 3. Shanghai OMNI Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203)

Abstract: Objective To evaluate the characteristics of sodium houttuyfonate nasal spray. **Methods** The delivery dose, droplet/particle size distribution (laser diffraction method; cascade impaction method), spray pattern and plume geometry of the prepared nasal spray were determined with HPLC, laser particle size analyzer, Andersen cascade impactor and SprayVIEW laser imaging system. **Results** To ensure the accuracy of delivery dose, 3 sprays should be discarded for the priming, and 1 spray should be discarded for repriming beyond 7-day use period. In the delivery dose uniformity test, the mean value was within 85%~115% of the labeled amount, and all the measured values were within 80%~120% of the labeled amount. In the droplet/particle size distribution test, the laser diffraction showed that the droplet size mainly ranged between 14~82 μm. The cascade impaction showed that the drug in the droplets less than 9 μm was not detected. The spray angle was 31°~35°, with fan-shaped distribution, the cross section was close to a circle, with ellipticity 1.13 to 1.24. **Conclusion** The sodium houttuyfonate nasal spray has accurate delivery dose and good spray characteristics.

Key words: sodium houttuyfonate nasal spray; delivery dose; laser diffraction method; cascade impaction method; spray pattern; plume geometry

鱼腥草素钠(sodium houttuyfonate),化学名为十二酰乙醛亚硫酸氢钠,是三白草科植物蕞菜的有效成分——癸酰乙醛与亚硫酸氢钠的加成物,其生物活性和药理作用与癸酰乙醛相似,研

究发现其具有抗炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、保护心血管等^[1]作用。目前,临床上以鱼腥草素钠为原料开发了鱼腥草素钠片和鱼腥草素钠栓,片剂主要用于治疗慢性支气管炎及其他上呼吸道感

作者简介:王淼,女,硕士研究生,主要从事吸入制剂研究, email: 2365770082@qq.com *通信作者:吴陈亮,男,博士,主要从事吸入制剂研究, email: clwu@omni-pharma.com

染性疾病, 栓剂用于治疗宫颈糜烂。

近年来, 鼻腔给药由于起效迅速、给药方便、无肝脏首过效应、生物利用度高以及脑靶向作用等特点, 成为国内外制剂领域研究的热点^[2]。目前尚未见以鱼腥草素钠为原料制备鼻喷雾剂的相关报道。本研究以鱼腥草素钠为原料开发了鱼腥草素钠鼻喷雾剂, 拟用于治疗鼻腔局部炎症。参照《中国药典》、美国药典和美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 相关指南, 对自制的鱼腥草素钠鼻喷雾剂的启动/再启动、递送剂量均一性、雾滴粒径分布 (激光衍射法、撞击器法)、喷雾模式和羽流几何学等喷雾特性指标进行评价, 为后续鱼腥草素钠鼻喷雾剂的工业化开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

XSR205DU/AC (分析天平, 精度: 十万分之一, 梅特勒-托利多仪器有限公司); LC-20A 型高效液相色谱仪 [岛津国际贸易 (上海) 有限公司]; Andersen 级联撞击器 (英国 Westech Instrument 公司); HELOS/BF 型激光粒度仪 (德国 Sympatec 公司); Mighty Runt 自动喷射器 (美国 Innovasystem 公司); SprayVIEW 激光成像系统 (美国 Proveris Scientific 公司); Millipore 纯水系统 (默克密理博贸易有限公司); 鼻腔液体药用喷雾泵 (规格: 100 μ L, 深圳博纳精密给药系统股份有限公司); 低硼硅玻璃管制螺口瓶 [双峰格雷海姆医药包装 (镇江) 有限公司]。

1.2 试药

鱼腥草素钠对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 100247-202102, 含量: 99.4%); 鱼腥草素钠鼻喷雾剂 (自制, 批号: 221129-1, 规格: 32 μ g/喷、30 喷/瓶); 鱼腥草素钠 (西安皓泽生物科技有限公司, 批号: HZ210706, 含量: 99%); 亚硫酸氢钠 (成都华邑药用辅料有限公司, 批号: 20200901); 无水葡萄糖 (潍坊盛泰药业有限公司, 批号: w20200401); 依地酸二钠 (南京化学试剂有限公司, 批号: 181114082c, 含量: 100.2%); 山梨酸钾 (成都华邑药用辅料有限公司, 批号: 20220701, 含量: 100.2%); 甲醇 (色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司); 10% 四丁基氢氧化铵水溶液 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 鱼腥草素钠含量测定

2.1.1 色谱条件^[3] 色谱柱: Xtimate C8 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水-10% 四丁基氢氧化铵水溶液 (65:35:0.35, V/V/V);

检测波长: 280 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 进样量: 20 μ L; 稀释液: 甲醇-水 (70:30, V/V)。

2.1.2 溶液配制

① 取鱼腥草素钠对照品约 50 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 0.5 mL 置 250 mL 量瓶中, 用稀释液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品工作液。

② 取供试品 1 瓶, 有雾喷出后喷废 3 喷。将药瓶垂直向上放置, 使泵的喷头恰好插入一垂直倒立的 25 mL 量瓶中, 揿压泵 1 次, 迅速直立量瓶, 使药液流入量瓶底部。用稀释液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品工作液。

③ 参照“2.2”项下方法制备不含鱼腥草素钠的鼻喷雾剂, 并按照供试品工作液配制过程配制空白辅料溶液。

2.1.3 专属性考察 分别取对照品工作液、供试品工作液、空白辅料溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图 (见图 1)。结果显示空白辅料溶液色谱图中无色谱峰与鱼腥草素钠峰重叠, 对照品工作液和供试品工作液中主峰保留时间一致, 表明该方法专属性良好。

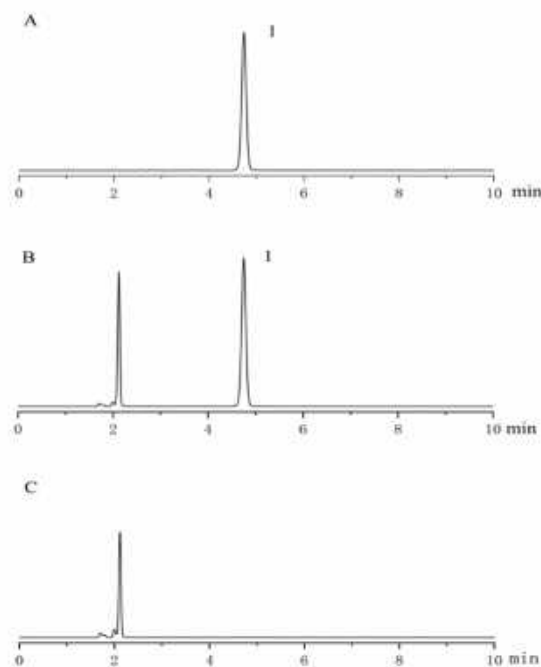


图 1 方法专属性考察的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of method specificity

A. 对照品工作液 (reference working solution); B. 供试品工作液 (test working solution); C. 空白辅料溶液 (blank excipient solution); 1. 鱼腥草素钠 (sodium houtuyfonate)

2.1.4 线性关系考察

用稀释液逐级稀释对照品

储备液，制备成质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.49、0.98、1.57、1.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。以质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标，绘制标准曲线，得到鱼腥草素钠的回归方程： $Y = 8.600 \times 10^4 X + 6.152 \times 10^2$ ($r = 0.9999$)。结果表明，鱼腥草素钠在 0.05 ~ 1.96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.1.5 重复性考察 平行制备 6 份供试品工作液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。以外标法计算鱼腥草素钠含量，含量 RSD 为 1.6%，表明该分析方法重复性良好。

2.1.6 回收试验 平行配制 9 份空白辅料溶液，分别加入“2.1.2”项下对照品工作液 1.3、1.6、1.9 mL，得到鱼腥草素钠低、中、高质量浓度 (1.02、1.25、1.49 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 供试品工作液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，计算回收率。低、中、高质量浓度供试品的回收率分别为 99.94%、99.71%、99.88%， RSD 分别为 0.25%、0.19%、0.20%，表明该方法准确度符合要求。

2.2 鼻喷雾剂的制备

精密称取鱼腥草素钠 0.16 g，用适量水溶解；精密称取亚硫酸氢钠 1.00 g、无水葡萄糖 20.00 g、依地酸二钠 0.05 g 和山梨酸钾 0.65 g 至适量水中，搅拌溶解，合并鱼腥草素钠溶液和辅料溶液，并用水定量至 500 g，搅拌均匀。量取药液 5 mL 置低硼硅玻璃管制螺口瓶中，盖上鼻腔液体药用喷雾泵，即得。

2.3 启动 / 再启动

启动 / 再启动采用重量法和 HPLC 法进行测试。取鱼腥草素钠鼻喷雾剂 3 瓶，以相同的力触发鼻喷雾剂至有液滴喷出，开始记录喷射重量和次数，至喷射重量稳定，结果见图 2。由图 2 可知，该鼻喷雾剂喷射 1 喷后，从第 2 喷开始，每喷的喷射重量在目标喷量 (100 ± 10) mg，从第 4 喷开始保持稳定。为保证给药剂量的准确性，本研究中的鼻喷雾剂在初次给药时，需至少喷废 3 喷。

将启动后的样品于室温条件下垂直放置，分别间隔 0、2、4、7、14 d 进行再启动测试，采用 HPLC 法测试递送剂量，每个间隔时间测试 3 喷，结果见表 1。由表 1 数据可以看出，间隔 14 d 时，第 1 喷递送剂量的平均值超出了标示量的 85% ~ 115%，说明放置了 14 d 的鼻喷雾剂，再次给药时不能立刻递送出准确剂量。因此，在超出 7 d 的使用周期后再次给药前应至少喷废 1 喷。

2.4 递送剂量均一性

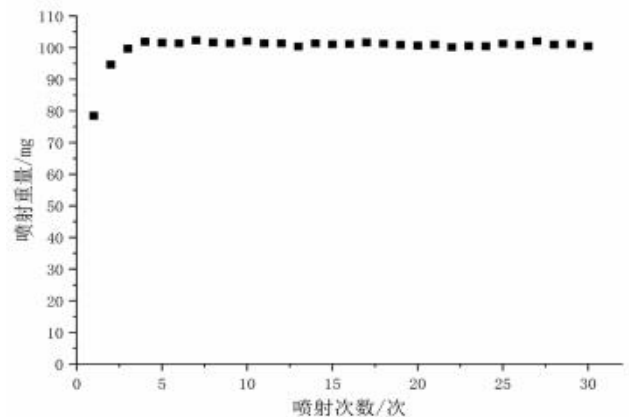


图 2 鱼腥草素钠鼻喷雾剂启动时喷射重量变化

Fig 2 Changes in shot weight of sodium houttuynfonate nasal spray during priming

表 1 再启动测试结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 1 Repriming test ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

间隔时间 / d	递送剂量 / %		
	第 1 喷	第 2 喷	第 3 喷
0	103.91 ± 2.34	103.40 ± 2.69	103.90 ± 1.89
2	100.78 ± 3.44	101.34 ± 1.90	101.77 ± 2.27
4	101.07 ± 2.68	99.54 ± 4.47	99.54 ± 4.83
7	96.71 ± 2.58	97.67 ± 1.33	98.72 ± 1.45
14	81.88 ± 11.53	95.27 ± 2.00	97.05 ± 1.87

递送剂量均一性是剂量喷雾剂的主要质量标准之一，包括瓶间递送剂量均一性和瓶内递送剂量均一性。递送剂量均一性采用 HPLC 法进行测试。

取样品 1 瓶，有雾喷出后喷废 3 喷。将药瓶垂直向上放置，使泵的喷头恰好插入一垂直倒立的 25 mL 量瓶中，揿压泵 1 次 (第 1 喷)，迅速直立量瓶，使药液流入量瓶底部。用稀释液稀释至刻度，摇匀。重复测定 10 瓶，共 10 个测定结果，作为瓶间递送剂量均一性。10 个测定结果的平均值为 104.85%， RSD 为 1.5%，其中最大值为 106.58%，最小值为 101.84%。

取样品 1 瓶，有雾喷出后喷废 3 喷。测试每瓶前段 (第 1 喷) 和后段 (第 30 喷) 的递送剂量。重复测定 5 瓶，共 10 个测定结果，作为瓶内递送剂量均一性。10 个测定结果的平均值为 105.12%， RSD 为 1.8%，其中最大值为 108.48%，最小值为 102.79%。

瓶间和瓶内递送剂量均一性共 20 个测定结果中，平均值均在标示量的 85% ~ 115%，且全部测定值均在标示量的 80% ~ 120%，表明该鼻喷雾剂给药剂量稳定、准确。

2.5 雾滴粒径分布 (激光衍射法)

研究中采用自动喷射器进行触发，使用激光粒度仪进行雾滴粒径分布测试，主要考察 D_{10} 、

D_{50} 、 D_{90} 、Span 值和小于 $10\ \mu\text{m}$ 雾滴百分比。

取样品 5 瓶，有雾喷出后喷废 3 喷。将样品固定于自动喷射器上，并将自动喷射器置于激光与镜头中央，使激光束能够穿过喷射范围的中心。分别测定 3 cm 和 6 cm（鼻喷雾泵喷头顶端距离激光源中心的垂直距离）下的雾滴粒径分布，在有效喷次内，每个样品初始段和末段每个距离分别测定 3 次。

鼻腔定量喷雾泵的一次触发可分为形成期、稳定期和消退期 3 个阶段^[4]，这 3 个阶段的雾滴粒径分布有很大区别。鱼腥草素钠鼻喷雾剂雾滴粒径随时间变化如图 3 所示。

形成期由于是触发开始阶段，雾化压力和喷雾流速较低，所以形成的雾滴粒径较大；之后雾滴粒径变小，进入稳定期，此时雾化压力和喷雾流速处于最优状态，形成的雾滴粒径较小且最稳定；最后由于定量室变空，雾化压力和流速降低，雾滴粒径变大，从而进入消退期。通常稳定期形成的雾滴粒径均一旦稳定，与药物的治疗效果密切相关，因此本研究对稳定期的雾滴粒径分布进行测定和分析。

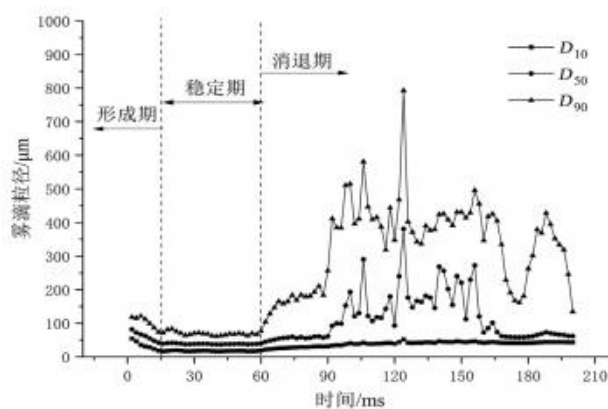


图 3 鱼腥草素钠鼻喷雾剂喷雾过程
Fig 3 Course of sodium houttuymfonate nasal spray

2020 年版《中国药典》要求鼻用喷雾剂喷出后的雾滴粒子绝大多数应大于 $10\ \mu\text{m}$ ^[5]。鼻喷雾剂雾滴粒径分布结果如表 2 所示，雾滴粒径主要集中在 $14\sim 82\ \mu\text{m}$ ，初始段和末段雾滴粒径分布无明显区别 ($P > 0.05$)，符合《中国药典》对鼻用喷雾剂的要求。

表 2 鱼腥草素钠鼻喷雾剂雾滴粒径分布 ($\bar{x}\pm s, n = 3$)

Tab 2 Droplet/particle size distribution of sodium houttuymfonate nasal spray ($\bar{x}\pm s, n = 3$)

距离/cm	编号	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	小于 $10\ \mu\text{m}$ 雾滴百分比/%	Span 值
初始段 -3	1	14.36±0.18	32.21±0.24	69.44±1.60	5.35±0.40	1.71±0.03
	2	16.26±0.11	36.24±0.35	77.74±0.79	3.49±0.11	1.70±0.01
	3	17.17±0.25	37.16±0.57	79.36±1.41	3.03±0.16	1.67±0.01
	4	16.76±0.29	37.79±0.47	81.05±0.67	3.32±0.21	1.70±0.02
	5	15.73±0.15	35.22±0.22	75.36±0.95	4.29±0.27	1.69±0.01
初始段 -6	1	17.66±0.37	38.06±0.35	67.50±0.14	3.91±0.42	1.31±0.02
	2	18.40±0.12	39.58±0.21	71.75±0.18	3.88±0.18	1.35±0.01
	3	19.55±0.07	39.97±0.15	71.83±1.11	3.19±0.32	1.31±0.02
	4	18.50±0.19	39.64±0.18	72.82±0.32	3.93±0.02	1.37±0.02
	5	17.45±0.18	38.04±0.32	68.58±1.86	3.85±0.36	1.34±0.03
末段 -3	1	15.37±0.23	33.81±0.46	71.98±1.24	4.36±0.42	1.67±0.02
	2	16.76±0.33	38.52±1.32	82.40±1.47	3.15±0.32	1.70±0.03
	3	16.75±0.30	37.49±0.68	81.05±2.26	3.14±0.37	1.71±0.02
	4	17.07±0.03	38.62±0.10	81.95±0.42	2.78±0.13	1.68±0.01
	5	15.82±0.10	34.97±0.14	74.18±0.44	3.76±0.23	1.67±0.01
末段 -6	1	16.75±0.13	36.81±0.01	61.73±0.21	5.50±0.16	1.22±0.01
	2	18.57±0.12	39.73±0.25	73.24±1.22	3.71±0.23	1.38±0.02
	3	19.03±0.21	39.76±0.41	70.21±0.91	2.79±0.30	1.29±0.01
	4	18.81±0.13	40.51±0.29	75.29±4.42	3.08±0.40	1.39±0.10
	5	17.93±0.36	38.37±0.27	67.41±0.89	3.51±0.16	1.29±0.02

2.6 雾滴粒径分布 (撞击器法)

通过 Andersen 级联撞击器 (Andersen Cascade Impactor, ACI) 对喷雾的空气动力学粒径分布进行研究，主要考察小于 $9\ \mu\text{m}$ 雾滴中药物含量，从而判断进入气管等下呼吸道的药物量百分比。

在 F 层放上玻璃纤维滤纸，将撞击器各部件按顺序组装好，调整流速为 $(28.3\pm 1.4)\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。用适宜的橡胶接头将 5 L 圆底玻璃烧瓶 (侧面带

有直径 $1.5\ \text{cm}$ 小孔) 与 ACI 的进口端 (锥口) 连接起来。取样品 3 瓶，有雾喷出后喷废 3 喷，每瓶测试 10 喷。用 250 mL 稀释液清洗回收圆底玻璃烧瓶、橡胶接头、负 1 层及其接收盘，作为大于 $9\ \mu\text{m}$ 雾滴的供试品；用 50 mL 稀释液清洗回收 0~6 层和含滤纸的 F 层，作为小于 $9\ \mu\text{m}$ 雾滴的供试品。分别经 $0.45\ \mu\text{m}$ 亲水滤膜过滤，取续滤液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。结果显

示, 3 瓶样品的回收率分别为 101.0%、100.9%、99.3%, 大于 9 μm 雾滴中药物含量均为 100.0%, 小于 9 μm 雾滴中药物含量均未检出, 表明几乎无药物进入气管等下呼吸道。

2.7 喷雾模式和羽流几何学

采用 SprayVIEW 激光成像系统进行喷雾模式和羽流几何学测定, 结果见图 4。根据预实验结果

确定仪器的各项参数, 设置自动喷射器触发速度和加速度分别为: 45 mm · s⁻¹ 和 2500 mm · s⁻²。取样品 3 瓶, 有雾喷出后试喷 3 次。将鼻喷雾泵固定于自动喷射器上, 分别测定喷雾模式和羽流几何学, 每个样品测定 3 次。喷雾模式测试结果以 D_{max}、椭圆率和喷雾面积表示 (见表 3)。羽流几何学测试结果以喷雾角度和喷雾宽度表示 (见图 5 及表 4)。

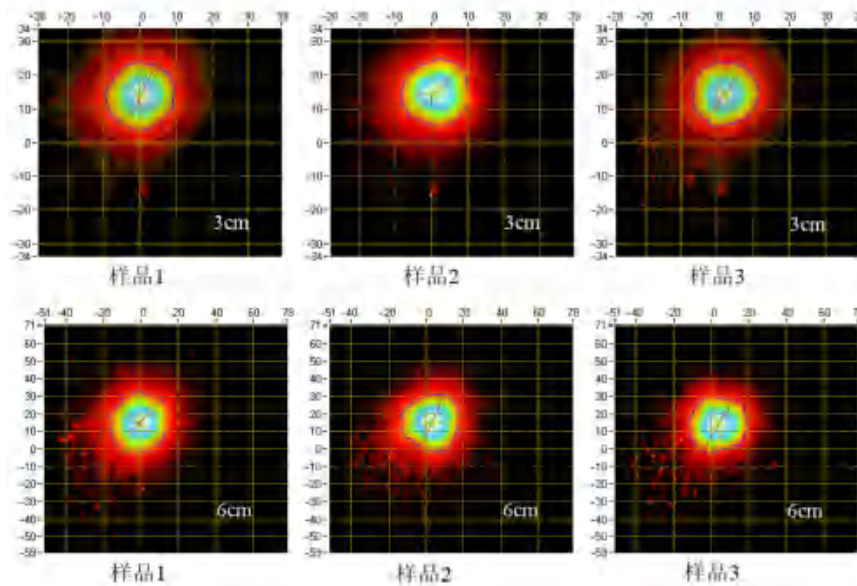


图 4 不同样品在不同检测距离下的喷雾模式照片

Fig 4 Spray pattern images of different samples at different detection distances

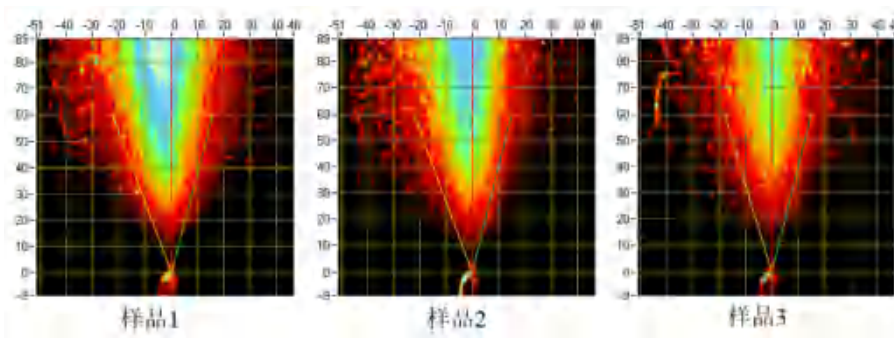


图 5 不同样品的羽流几何学照片

Fig 5 Plume geometry images of different samples

表 3 鱼腥草素钠鼻喷雾剂喷雾模式 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Spray pattern of sodium houttuynonate nasal spray ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

距离/cm	编号	D _{max} /mm	椭圆率	喷雾面积/mm ²
3	1	20.95 ± 0.24	1.146 ± 0.010	304.2 ± 5.1
	2	20.89 ± 0.42	1.143 ± 0.015	297.5 ± 6.5
	3	20.16 ± 0.24	1.136 ± 0.011	278.2 ± 6.7
6	1	36.00 ± 0.60	1.237 ± 0.019	836.5 ± 23.7
	2	34.65 ± 0.67	1.174 ± 0.021	808.0 ± 17.5
	3	34.57 ± 0.41	1.187 ± 0.038	768.1 ± 28.2

表 4 鱼腥草素钠鼻喷雾剂羽流几何学 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 4 Plume geometry of sodium houttuynonate nasal spray ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	喷雾角度/°	喷雾宽度/mm
1	35.2 ± 0.2	38.31 ± 0.22
2	34.5 ± 0.2	37.55 ± 0.22
3	31.1 ± 0.4	33.37 ± 0.44

由图 4 可知, 不同检测距离下鼻喷雾剂的喷雾形状都比较规则, 接近圆形, 且随着检测距离的增加, 喷雾形状无明显变化。检测距离为 3 cm

和 6 cm 的样品的椭圆率也无明显变化, RSD 分别为 1.0%、3.1%, 表明该鼻喷雾剂重现性较好, 在各个方向上的分布比较均匀, 有利于药液在鼻腔中的沉积。

由图 5 可以看出, 鱼腥草素钠鼻喷雾剂的喷

雾以鼻喷雾喷头为原点,呈扇形分布。由表 4 可知,喷雾宽度与检测距离为 6 cm 的 D_{\max} 值一致,表明喷雾形状比较规则。该鼻喷雾剂的喷雾角度为 $31^{\circ} \sim 35^{\circ}$, RSD 为 5.8%,表明该鼻喷雾剂重现性较好。

3 讨论

将药物递送至鼻腔是一个复杂的过程,它取决于许多参数,如喷雾产生的原理、鼻喷装置、处方设计以及患者因素等^[6]。FDA 建议通过递送剂量、体外沉积等^[7-8]方面对鼻喷雾剂的体外特性进行评价。多剂量鼻喷雾剂产品,为保证其在使用期间递送剂量的准确性和稳定性,需对产品的启动/再启动、递送剂量均一性进行考察。递送剂量是评估产品使用过程中实际递送剂量与标示量差异的重要指标。递送剂量均一性反映了同一批次间不同鼻喷雾泵递送剂量的差异。通过对递送剂量均一性的控制,保证了药品使用过程中递送剂量的准确性,避免了单次剂量过高超过安全剂量,或者单次剂量过低达不到有效剂量。

鼻喷雾剂的喷雾特性对药物的吸收和疗效有很大影响,特别是雾滴粒径分布和喷雾模式。鼻喷雾剂的雾滴粒径分布^[9-10]与药物在鼻腔中的分布与沉积密切相关。雾滴粒径太大,易被鼻黏膜表面的纤毛清除;粒径太小,药物会随呼吸进入肺部。因此,采用激光衍射法对喷雾的雾滴粒径分布进行测试。除此之外,为保证药物在鼻腔中的沉积,同时尽可能减少雾滴进入肺部的风险,采用撞击器法来检测鼻喷雾剂到达肺部的微小粒子的概率。喷雾模式和羽流几何学是评价喷雾性能的重要指标,主要描述鼻喷雾剂在经鼻喷装置雾化后的气溶胶形态。

雾滴粒径分布(激光衍射法)测试中,检测距离为 3 cm 和 6 cm 的雾滴粒径分布数据有细微差异,可能是因为测试过程中雾滴发生了聚集、蒸发、二次破裂等^[11]原因。检测距离为 3 cm 的 D_{10} 和 D_{50} 相对于 6 cm 小,可能是因为慢速的雾滴在到达激光束之前会在短距离内沉降,另外,本研究中的鼻喷雾剂为水溶液制剂,雾化过程中高速的较小雾滴由于蒸发作用而造成粒径较小;而检测距离为 3 cm 的 D_{90} 相对于 6 cm 大,可能因为检测距离为 6 cm 的雾滴相对于 3 cm 处更分散,大雾滴不易发生聚集,故雾滴粒径相对较小。

鼻喷雾剂药液的流变学性质也会影响其喷雾特性,例如:随着药液黏度的增加,喷雾雾滴会增大,而喷雾面积和喷雾角度会减小^[12-13]。本研究中制剂黏度为 $3.54 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$,与纯水黏度相当,改变辅料用量,制剂黏度无明显变化,故未深入探究黏

度对鱼腥草素钠鼻喷雾剂喷雾特性的影响。

本研究参照《中国药典》、美国药典以及 FDA 发布的相关指南,对鱼腥草素钠鼻喷雾剂的启动/再启动、递送剂量均一性、雾滴粒径分布(激光衍射法、撞击器法)、喷雾模式和羽流几何学进行了评价。结果表明,该鼻喷雾剂的递送剂量均一性、雾滴粒径分布均符合《中国药典》的要求,具有良好的喷雾形态。本研究中的喷雾特性评价指标对鱼腥草素钠鼻喷雾剂的后续工业化开发具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Liu X, Zhong LL, Xie JN, et al. Sodium houttuynonate: a review of its antimicrobial, antiinflammatory and cardiovascular protective effects [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 902: 174110.
- [2] 杨林, 贾梅, 甄英丽. 鼻腔给药系统研究进展 [J]. 西北国防医学杂志, 2016, 37 (10): 671-673.
- [3] 曾令高, 李静. 高效液相色谱法测定鱼腥草素钠片的含量 [J]. 中国药业, 2007, 13 (9): 19-20.
- [4] Fung MC, Inthavong K, Yang W, et al. External characteristics of unsteady spray atomization from a nasal spray device [J]. J Pharm Sci, 2013, 102 (3): 1024-1035.
- [5] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 8-9.
- [6] 李森, 高永良. 药物鼻黏膜递送的影响因素 [J]. 中国新药杂志, 2007, 17 (5): 356-360.
- [7] FDA. Bioavailability and bioequivalence studies for nasal aerosols and nasal sprays for local action [EB/OL]. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances>, 2003-04/2022-12-25.
- [8] FDA. Nasal spray and inhalation solution, suspension, and spray drug products—chemistry, manufacturing, and controls documentation [EB/OL]. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances>, 2018-08-24/2022-12-25.
- [9] Frank DO, Kimbell JS, Pawar S, et al. Effects of anatomy and particle size on nasal sprays and nebulizers [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 146 (2): 313-319.
- [10] Wingrove J, Swedrowska M, Scherlie R, et al. Characterisation of nasal devices for delivery of insulin to the brain and evaluation in humans using functional magnetic resonance imaging [J]. J Control Release, 2019, 302: 140-147.
- [11] James VS, Phred P, Petros L, et al. Spray characteristics from nasal spray atomization [J]. J Aerosol Sci, 2022, 165: 106009.
- [12] Kundoor V, Dalby RN. Effect of formulation and administration-related variables on deposition pattern of nasal spray pumps evaluated using a nasal cast [J]. Pharm Res, 2011, 28 (8): 1895-1904.
- [13] Dayal P, Shaik MS, Singh M. Evaluation of different parameters that affect droplet-size distribution from nasal sprays using the Malvern Spraytec [J]. J Pharm Sci, 2004, 93 (7): 1725-1742.

(收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2023-03-09)

基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的 乌鳖返春口服液化学成分分析

王允吉¹, 潘文华², 王海丹³, 王仲建¹, 叶明灯¹, 张引兰^{1*} (1. 南京中医药大学附属南京医院/南京市第二医院药学部, 南京 210003; 2. 联勤保障部队第901医院药剂科, 合肥 230031; 3. 南京中医药大学附属医院江苏省中医院药理实验室, 南京 210029)

摘要: **目的** 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对乌鳖返春口服液的化学成分进行定性分析。**方法** 对纯乙醇沉淀后的乌鳖返春口服液上清液, 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.30 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 4 μL, 采用 HESI 源在正、负离子监测模式下采集数据。根据 Xcalibur 软件的精确相对分子质量、准分子离子峰、碎片离子, 结合对照品比对, 相关文献和数据库对乌鳖返春口服液中的化学成分进行识别和鉴定。**结果** 乌鳖返春口服液的醇提液中鉴定出 131 个化学成分, 包括三萜类、亚精胺类、萜类、酚酸类、蒽醌类、二苯乙烯类、氨基酸类、黄酮类、脂肪酸类、有机酸类、生物碱类等化合物。**结论** 首次采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 对乌鳖返春口服液的化学成分进行了研究, 该研究对为乌鳖返春口服液中药效物质基础及作用机制研究提供了重要的理论依据。

关键词: 乌鳖返春口服液; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; 化学成分; 裂解规律; 三萜类; 亚精胺类; 萜类

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1228-12
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.019

Chemical components in Wubie Fanchun oral liquid by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

WANG Yun-ji¹, PAN Wen-hua², WANG Hai-dan³, WANG Zhong-jian¹, YE Ming-deng¹, ZHANG Yin-lan^{1*} (1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing Unniversity of Chinese Medicine, Nanjing 210003; 2. Department of Pharmacy, The 901st Hospital of the Joint Logistics Support Force of the People's Liberation Army, Hefei 230031; 3. Pharmacology Laboratory, Jiangsu Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical compositions of empirical prescription Wubie Fanchun oral liquid by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** The supernatant of Wubie Fanchun oral liquid was precipitated by ethanol. The analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid water solution and acetonitrile at a flow rate of 0.30 mL·min⁻¹. The column temperature was 35 °C and the injection volume was 4 μL. The mass spectrometry was acquired with a HESI ion source in both positive and negative ion modes. The components were identified according to the accurate relative molecular weight, excimer ion peak, fragmentation in Xcalibur software, the MS data of reference substances and other information with literature and database. **Results** Totally 131 components were rapidly identified, including triterpenoids, spermidine derivatives, terpenes, phenolic acids, anthraquinones, distyrene glycosides, amino acids, flavonoids, fatty acids, organic

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81804131)。

作者简介: 王允吉, 男, 主管药师, 博士研究生, 主要从事中药分析、药代动力学研究, email: wangyunji1984@126.com

*通信作者: 张引兰, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: fsyy01657@njucm.edu.com

acids, and alkaloids, etc. **Conclusion** The chemical components of Wubie Fanchun oral liquid have been identified by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS for the first time, which provides the theoretical basis for the study of pharmacodynamic materials basis and mechanism of Wubie Fanchun oral liquid.

Key words: Wubie Fanchun oral liquid; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; chemical component; fragmentation pattern; triterpenoid; spermidine derivative; terpene

乌鳖返春口服液是根据中医补肾健脾组方改良而成, 主要是由制何首乌、川续断、白术、鳖甲、茯苓、枸杞子以及黄狗肾 7 味药材组成, 30 多年的临床应用证实其对卵巢功能早衰 (premature ovarian failure, POF) 患者具有很好的治疗效果^[1], 且药效显著优于常规的激素补充疗法^[2-4]。目前, 关于乌鳖返春口服液的研究大多集中于临床前药理和临床药效学观察, 有关乌鳖返春口服液化学成分的研究较少, 虽有少数研究表明乌鳖颗粒中含有 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、川续断皂苷 VI 两个化学成分^[5-6], 尚缺乏系统性研究, 因此表征其全成分迫在眉睫。

Orbitrap 高分辨质谱技术利用其高通量、高灵敏度的特性, 适用于非目标化合物的大规模范围筛选、识别、分析及鉴定, 并广泛应用于中药成分分析等领域^[7]。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱 (UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 技术对乌鳖返春口服液的化学成分进行快速准确识别和归属, 提供全面的化学轮廓, 以期为其质量评价体系提升, 药效物质基础和代谢特征阐释、临床合理应用研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 XRS 超高效液相系统、Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Xcalibur 3.1 数据处理系统、Heraeus Multifuge X1R 冷冻离心机、脉冲式涡流混合器 (Thermo 公司), ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, Serial No.01653502816004) (Waters 公司), AB135-S 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), Milli-Q Direct 超纯水仪 (默克 Millipore 公司)。

1.2 试药

乌鳖返春口服液 (规格: 10 mL, 批号: 1905006, 江苏省中医院制剂部), 对照品甜菜碱 (纯度: 99.29%, 批号: MUST-19032105), 茯苓酸 (纯度: 98.31%, 批号: MUST-18072910), 白术内酯 III (纯度: 99.99%, 批号: MUST-19030203),

川续断苷 VI (纯度: 99.35%, 批号: MUST-19042510), 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷 (纯度: 99.44%, 批号: MUST-19051603) (成都曼思特生物科技有限公司); 对照品 L-脯氨酸 (纯度>99%, 批号: S30J6G1)、甘氨酸 (纯度>99%, 批号: SM0315GA14) (上海源叶生物科技有限公司)。甲醇、乙腈 (色谱纯, Merck 公司), 甲酸 (优级纯, Sigma-Aldrich 公司), 超纯水 (由实验室超纯水仪 Milli-Q Direct 制备)。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

取甜菜碱、茯苓酸、白术内酯 III、川续断苷 VI、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷、L-脯氨酸、甘氨酸对照品, 精密称取约 1 mg, 置于 1 mL 的量瓶中, 分别用水 (2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷、L-脯氨酸、甘氨酸) 和 50% 甲醇-水 (甜菜碱、茯苓酸、白术内酯 III、川续断苷 VI) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 1.00 g·L⁻¹ 的储备液。分别取上述对照品各 100 μL, 加入 200 μL 50% 甲醇-水, 于 2~8 °C 冰箱保存待用。

2.2 供试品溶液的制备

吸取乌鳖返春口服液约 300 μL, 加入乙醇 700 μL 沉淀后以 3000 r·min⁻¹ 涡旋样品 3 min, 放置于 2~8 °C 冰箱 24 h, 24 h 后取出样品于 4 °C 条件下以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液并用 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 液相色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 正、负离子全扫描模式下流动相为 0.1% 甲酸-水溶液 (A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~0.5 min, 2.0%B; 0.5~4.0 min, 2.0%~15%B; 4.0~15.0 min, 15%~25%B; 15.0~19.0 min, 25%~34%B; 19.0~25.0 min, 34%~80%B; 25.0~28.0 min, 80%~98%B; 28.0~30.0 min, 98%B; 30.0~30.5 min, 98.0%~2.0%B; 30.5~34.5 min, 2.0%B), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为

35 °C, 进样量为 4 μL, 样品盘温度为 8 °C。

2.3.2 质谱条件 数据处理工作站为 Xcalibur 3.1, 采用离子源为 HESI 源, 扫描模式为正负离子 Full MS/dd-MS² 扫描, Full MS 分辨率 70 000 FWHM, dd-MS² 分辨率 17 500 FWHM, 扫描范围 m/z 70 ~ 1000 Da, MS/MS 模式, 喷雾电压为 3000 V, 离子传输管温度 350 °C, 鞘气和辅助气均为氮气, 鞘气流量为 35 arb, 辅助气流量为 15 arb, 自动增益控制 (AGC) 目标为 3×10^6 个离子, 最大离子注入时间 (IT) 为 100 ms, 碰撞能为 25、35 和 45 eV。

2.4 数据处理

通过查阅 SciFinder、ChemSpider、HMDB 数据库中涉及乌鳖返春口服液组方中单味药材中化学成分质谱信息, 建立化学成分信息库, 根据乌鳖返春口服液的高分辨质谱数据提供的准分子离子信息, 推测一级质谱的精确相对分子量, 选择误差 (δ) 在 ± 10 ppm ($1 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-6}$) 以内的化合物, 运用 Xcalibur 3.1 软件拟合计算相应的分子式, 初步对各化学成分进行推测, 再结合对照品、相关文献对色谱峰进行指认和归属。

3 结果

3.1 色谱峰鉴定

采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 正、负离子模式分析乌鳖返春口服液乙醇沉淀后的 (+) HESI-MS、(-) HESI-MS 的质谱总离子流图 (TIC), 如图 1 所示, 将检测得到离子流峰的保留时间和质谱数据信息, 按照“2.4”项下的数据处理方法, 最终在乌鳖返春口服液中鉴定出 131 个化合物^[8-23], 其中三萜类化合物 19 个、亚精胺类化合物 18 个, 萜类化合物 17 个, 酚酸类化合物 17 个, 蒽醌类化合物 17 个, 氨基酸类化合物 11 个, 二苯乙烯类化合物 10 个, 黄酮类化合物 5 个、脂肪酸类化合物 5 个, 有机酸类化合物 5 个, 生物碱类 2 个, 木脂素类 2 个, 苯丙素类 1 个, 其他类化合物 2 个。各化学成分的保留时间、准分子离子峰质荷比的理论值和测量值、碎片离子等数据结果, 如表 1 所示。

3.2 乌鳖返春口服液中各类化合物成分的分析鉴定

3.2.1 三萜类化合物的结构解析

乌鳖返春口服液中共鉴定出三萜类成分 19 种, 三萜类化合物主要来源于本方中的续断、茯苓。续断中三萜类化合物属于五环三萜类, 而茯苓中三萜类化合物属于四环三萜类, 包括川续断皂苷 V、川续断皂苷 VI、去氢川续断皂苷 VI、灰毡毛忍冬次苷 A、茯苓酸、氢化茯苓酸、去氢茯苓酸等。以化合物 95、130 为例阐述三萜类化合物裂解规律。化

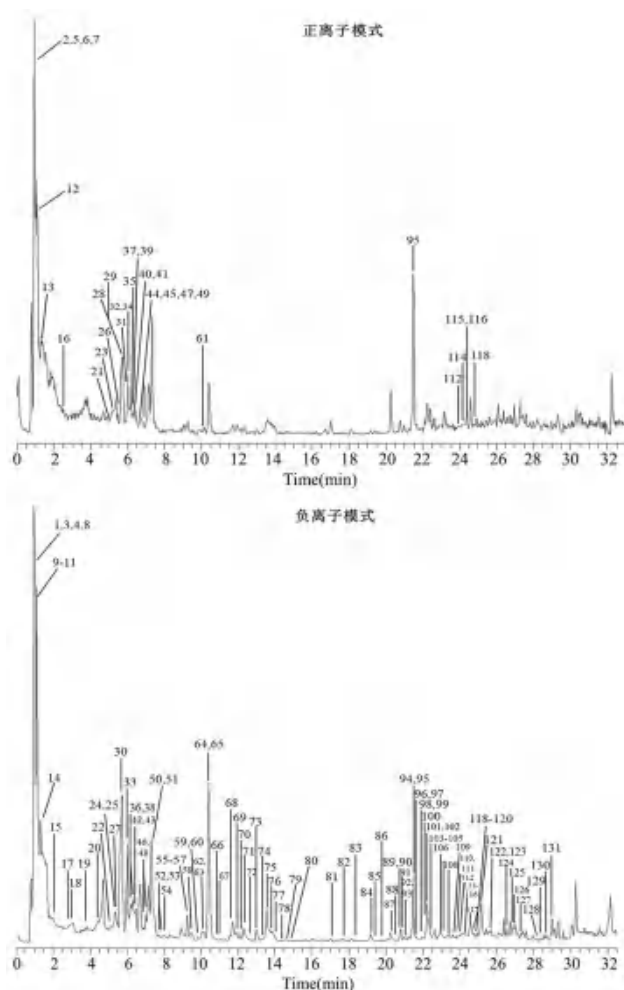


图 1 乌鳖返春口服液 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 总离子流图
Fig 1 Total ion chromatogram of Wubie Fanchun oral liquid under positive ion and negative ion modes by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

合物 95 保留时间 21.49 min, 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 927.4861[M-H]⁻, 同时可观察到二级碎片离子为丢失葡萄糖和鼠李糖后的特征碎片离子 m/z 603.3858[M-H-2C₆H₁₀O₅]⁻, 与对照品比对, 保留时间、特征碎片均一致, 可确定该化合物为川续断皂苷 VI, 其二级质谱及裂解规律见图 2。化合物 130 保留时间 28.86 min, 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 527.3687[M-H]⁻, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 465.3346[M-H-H₂O-CO₂]⁻、 m/z 405.2705[M-H-H₂O-CO₂-CH₃COOH]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[26-28]和数据库, 并进一步与对照品比对, 保留时间均一致, 可确定该化合物为茯苓酸。

3.2.2 亚精胺类化合物的结构解析 乌鳖返春口服液中共鉴定出亚精胺类成分 18 种, 亚精胺类化合物是本方中枸杞的代表性成分, 包括苦

表 1 正、负离子模式下的乌鳖返春口服液化学成分鉴定及归属

Tab 1 Identified chemical constituents of Wubie Fanchun oral liquid by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

No.	t_R /min	分子式	化合物鉴定结果	理论值	实测值	$\delta/\times 10^{-6}$	离子模式	碎片离子	来源
1	0.86	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	赖氨酸 ^[8]	145.0971	145.0960	- 7.58	[M-H] ⁻	127.0744, 99.0795	鳖甲 / 黄狗肾
2	0.89	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	精氨酸 ^[8]	175.1189	175.1178	- 6.28	[M+H] ⁺	158.0915, 130.0967, 116.0701, 112.0865, 70.0654, 60.0561	鳖甲 / 黄狗肾
3	0.89	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	鸟氨酸 ^[8]	131.0815	131.0804	- 8.39	[M-H] ⁻	113.0335, 95.0230, 70.0279	鳖甲 / 黄狗肾
4	0.92	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	天门冬酰胺 ^[8]	131.0451	131.0438	- 9.92	[M-H] ⁻	114.0175, 95.0230, 85.0275, 70.0279, 58.0279	鳖甲 / 黄狗肾
5	0.94	C ₅ H ₁₁ NO ₂	甜菜碱 ^{[15-16]*}	118.0863	118.0858	- 4.23	[M+H] ⁺	58.0656	枸杞
6	0.94	C ₅ H ₁₁ NO ₂	缬氨酸 ^[8]	118.0862	118.0858	- 3.39	[M+H] ⁺	71.0687, 55.8510	鳖甲 / 黄狗肾
7	0.94	C ₅ H ₁₃ NO	胆碱 ^[8, 16]	104.1070	104.1068	- 1.92	[M+H] ⁺	60.0813	鳖甲 / 黄狗肾 / 枸杞
8	0.95	C ₆ H ₁₂ O ₇	葡萄糖酸 ^[8]	195.0499	195.0488	- 5.64	[M-H] ⁻	177.0383, 159.0275, 99.0067, 87.0068, 75.0068, 59.0120	鳖甲 / 黄狗肾
9	1.02	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蔗糖	341.1078	341.1058	- 5.86	[M-H] ⁻	179.0541, 161.0434, 119.0329, 101.0224, 89.0224, 71.0119, 59.0120	所有药材
10	1.05	C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸 ^{[8]*}	114.0550	114.0540	- 8.77	[M-H] ⁻	85.0275, 66.0330	鳖甲 / 黄狗肾
11	1.05	C ₇ H ₁₀ O ₇	高柠檬酸 ^[14]	205.0343	205.0327	- 7.80	[M-H] ⁻	187.0955, 141.0891, 129.0901, 99.0796, 72.9911, 59.0119	枸杞
12	1.09	C ₅ H ₅ N ₅	腺嘌呤 ^[8]	136.0618	136.0610	- 5.88	[M+H] ⁺	119.0486, 94.0398	鳖甲 / 黄狗肾
13	1.29	C ₆ H ₅ NO ₂	烟酸 ^[8]	124.0393	124.0387	- 4.84	[M+H] ⁺	97.0283, 95.0490, 80.0497, 53.0391	鳖甲 / 黄狗肾
14	1.30	C ₇ H ₆ O ₅	柠檬酸 ^[11, 14]	191.0186	191.0175	- 5.76	[M-H] ⁻	173.0069, 129.0172, 111.0067, 87.0067, 85.0275	何首乌 / 枸杞
15	2.06	C ₆ H ₁₃ NO ₂	亮氨酸 ^[8]	130.0862	130.0853	- 6.92	[M-H] ⁻	85.0275, 71.0119	鳖甲 / 黄狗肾
16	2.49	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷 ^[8]	268.104	268.1035	- 1.86	[M+H] ⁺	136.061	鳖甲 / 黄狗肾
17	2.92	C ₆ H ₆ O ₃	焦枞酸 ^[12]	125.0233	125.0229	- 3.20	[M-H] ⁻	97.0274, 69.0326	何首乌
18	3.05	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 ^[10-12]	169.0131	169.0119	- 7.10	[M-H] ⁻	125.0222, 107.0118, 97.0274, 81.0325, 69.0326	何首乌
19	3.83	C ₉ H ₁₀ NO ₂	苯丙氨酸 ^[8]	164.0706	164.0694	- 7.31	[M-H] ⁻	147.0430, 120.0433, 94.0278, 72.0071	鳖甲 / 黄狗肾
20	4.62	C ₉ H ₈ O ₆	5-羧基香草酸 ^[12]	211.0237	211.0224	- 6.16	[M-H] ⁻	167.0331, 123.0443, 136.0414, 108.0434	何首乌
21	4.94	C ₄₀ H ₆₂ N ₄ O ₁₆	二葡萄糖-苦可胺 ^[16]	855.4233	855.4167	- 7.72	[M+H] ⁺	693.3656, 455.2354, 384.1623, 293.1839, 222.1111, 165.0536	枸杞
22	5.10	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸 ^[8]	180.0655	180.0644	- 6.11	[M-H] ⁻	163.0378, 136.0746, 109.0274, 72.0070	鳖甲 / 黄狗肾
23	5.18	C ₃₄ H ₅₂ N ₄ O ₁₁	葡萄糖-苦可胺 B ^[16]	693.3705	693.3655	- 7.21	[M+H] ⁺	531.3140, 455.2352, 384.1621, 293.1839, 222.1110	枸杞
24	5.37	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	色氨酸 ^[8]	203.0815	203.0804	- 5.42	[M-H] ⁻	186.0542, 159.0906, 142.0640, 116.0484, 74.0228	鳖甲 / 黄狗肾
25	5.37	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸 ^[20]	353.0867	353.0862	- 1.42	[M-H] ⁻	191.0539, 179.0327, 135.0430	川续断
26	5.46	C ₂₈ H ₄₂ N ₄ O ₆	苦可胺 B ^[16]	531.3177	531.3145	- 6.02	[M+H] ⁺	293.1839, 222.1110, 165.0536, 123.0433	枸杞
27	5.51	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	香豆酸苷 ^[15]	325.0917	325.0897	- 6.15	[M-H] ⁻	163.0379, 145.0273, 119.0482	枸杞
28	5.66	C ₃₇ H ₅₃ N ₃ O ₁₆	N ¹ -dihydrocaffeoyl-N ³ -caff- eoyl-spermidine-di-hex ^[15]	796.3498	796.3439	- 7.41	[M+H] ⁺	634.2924, 472.2412, 382.1465, 310.2103, 220.0954, 163.0379	枸杞
29	5.69	C ₃₇ H ₅₅ N ₃ O ₁₆	lycibarbarspermidine M ^[14, 16]	798.3655	798.3585	- 8.77	[M+H] ⁺	636.3074, 474.2564, 384.1622, 222.1110, 165.0537	枸杞
30	5.74	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸 ^[19-21]	375.1286	375.1268	- 4.80	[M-H] ⁻	332.8820, 213.0747, 169.0850, 151.0742, 119.0327, 113.0223	川续断
31	5.83	C ₃₇ H ₅₅ N ₃ O ₁₆	lycibarbarspermidine M 异构 体 ^[14, 16]	798.3655	798.3583	- 9.02	[M+H] ⁺	636.3074, 474.2564, 384.1622, 222.1110, 165.0537	枸杞
32	6.00	C ₃₇ H ₅₃ N ₃ O ₁₆	lycibarbarspermidine F ^[14, 16]	796.3498	796.3436	- 7.79	[M+H] ⁺	634.2946, 472.2409, 310.2105, 220.0954, 163.0380	枸杞
33	6.01	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸异构体 ^[14]	375.1286	375.1268	- 4.80	[M-H] ⁻	195.0643, 169.0845, 151.0743, 113.0223	川续断

续表 1

No.	t_R /min	分子式	化合物鉴定结果	理论值	实测值	$\delta/\times 10^{-6}$	离子模式	碎片离子	来源
34	6.03	$C_{31}H_{43}N_3O_{11}$	N^1 -caffeoyl- N^3 -caffeoyl-spermidine-hex ^[15]	634.2970	634.2921	- 7.73	[M+H] ⁺	472.2406, 382.1463, 310.2104, 293.1893, 220.0954, 163.0379	枸杞
35	6.16	$C_{43}H_{63}N_3O_{21}$	glucosyl-lycibarbarspermidine F ^[14]	958.4027	958.3947	- 8.35	[M+H] ⁺	796.3433, 634.2922, 472.2417, 310.2103, 220.0953, 163.0379	枸杞
36	6.21	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸 ^[14]	191.0550	191.0539	- 5.76	[M-H] ⁻	173.0435, 127.0379, 109.0273, 93.0326	枸杞
37	6.26	$C_{31}H_{45}N_3O_{11}$	N^1, N^3 -bis-dihydro-caffeoyl-spermidine-hex ^[15]	636.3127	636.3075	- 8.17	[M+H] ⁺	474.2567, 384.1624, 293.1837, 222.1111, 165.0536	枸杞
38	6.31	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 ^[13, 19-22]	353.0867	353.0874	1.98	[M-H] ⁻	191.0539, 179.0327, 173.0434, 161.0225, 135.0430	川续断 / 枸杞 / 白术
39	6.33	$C_{31}H_{43}N_3O_{11}$	N^1 -dihydrocaffeoyl- N^3 -caffeoyl-spermidine-hex ^[15]	634.2970	634.2925	- 7.09	[M+H] ⁺	472.2420, 310.2101, 293.1836, 220.0953, 163.0379	枸杞
40	6.43	$C_{31}H_{43}N_3O_{11}$	N^1 -caffeoyl- N^3 -dihydro-caffeoyl-spermidine-hex ^[15]	634.2970	634.2924	- 7.25	[M+H] ⁺	472.2407, 382.1465, 310.2103, 293.1836, 220.0954, 163.0379	枸杞
41	6.46	$C_{37}H_{53}N_3O_{16}$	lycibarbarspermidine F 异构体 ^[14, 16]	796.3498	796.3431	- 8.41	[M+H] ⁺	634.2944, 472.2408, 310.2104, 220.0954, 163.0379	枸杞
42	6.48	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸 ^[20]	353.0867	353.0844	- 6.51	[M-H] ⁻	191.0538, 179.0327, 173.0434, 135.0430	川续断
43	6.58	$C_9H_{10}O_4$	藜芦醇 ^[10, 12]	181.0495	181.0484	- 6.08	[M-H] ⁻	153.1017, 135.0430, 124.0256, 119.0481	何首乌
44	6.70	$C_{25}H_{35}N_3O_6$	N^1, N^{10} -双(二氢咖啡酰)亚精胺 ^[15]	474.2598	474.2567	- 6.54	[M+H] ⁺	310.2112, 293.1840, 222.1111, 165.0536, 123.0434, 100.0755, 72.0810	枸杞
45	6.74	$C_{25}H_{33}N_3O_6$	二氢咖啡酰-咖啡酰亚精胺 ^[15]	472.2442	472.2410	- 6.78	[M+H] ⁺	310.2103, 293.1837, 236.1265, 220.0953, 163.0379	枸杞
46	6.86	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸 ^[18, 21]	193.0495	193.0482	- 6.73	[M-H] ⁻	178.0250, 149.0587, 134.0352, 106.0401	白术 / 枸杞
47	6.91	$C_{31}H_{41}N_3O_{11}$	N^1, N^3 -二咖啡酰亚精胺-六碳糖 ^[15]	632.2813	632.2767	- 7.28	[M+H] ⁺	470.2365, 382.1468, 308.1946, 220.0952, 163.0379	枸杞
48	7.00	$C_9H_8O_4$	咖啡酸 ^[12, 18, 20-22]	179.0338	179.0326	- 6.70	[M-H] ⁻	135.0429	何首乌 / 川续断 / 枸杞 / 白术
49	7.02	$C_{25}H_{33}N_3O_6$	二氢咖啡酰-咖啡酰亚精胺 异构体 ^[15]	472.2442	472.2409	- 6.99	[M+H] ⁺	310.2102, 293.1838, 236.1265, 220.0954, 163.0379	枸杞
50	7.33	$C_{16}H_{22}O_9$	獐牙菜苷 ^[19, 21]	357.1180	357.1163	- 4.76	[M-H] ⁻	195.0642, 125.0222, 81.0326	川续断
51	7.40	$C_{21}H_{30}O_{13}$	月腺大戟苷 C ^[19]	489.1603	489.1576	- 5.52	[M-H] ⁻	195.0640, 149.0434, 131.0692, 125.0223, 81.0326	川续断
52	7.70	$C_{25}H_{31}N_3O_6$	N^1, N^8 -二咖啡酰亚精胺 ^[15]	470.2285	470.2259	- 5.53	[M-H] ⁻	308.1947, 220.0954, 163.0380, 145.0276	枸杞
53	7.89	$C_8H_8O_4$	香草酸 ^[11, 18, 21]	167.0339	167.0328	- 6.59	[M-H] ⁻	152.0098, 108.0200	何首乌 / 川续断 / 枸杞
54	8.14	$C_{20}H_{22}O_8$	白藜芦醇-3-O-吡喃葡萄糖苷 ^[11]	389.1231	389.1204	- 6.94	[M-H] ⁻	227.0692, 185.0587, 143.0481	何首乌
55	9.18	$C_{26}H_{32}O_{12}$	羟基松脂醇-葡萄糖苷 ^[21]	535.1810	535.1769	- 7.66	[M-H] ⁻	373.1261, 343.1160, 313.1057, 284.1031, 269.0799, 254.0556, 193.0483, 181.0484, 163.0378	川续断
56	9.22	$C_{32}H_{46}O_{19}$	林生续断苷 I 衍生物 ^[19]	733.2549	733.2505	- 6.00	[M-H] ⁻	571.1968, 471.1468, 375.1265, 357.1161, 295.1159, 213.0746, 195.0640, 151.0742	川续断
57	9.28	$C_{16}H_{24}O_9$	7-脱氧马钱苷酸 ^[19, 21]	359.1337	359.1329	- 2.23	[M-H] ⁻	197.0796, 153.0899, 135.0793, 93.0326	川续断
58	9.50	$C_{26}H_{32}O_{12}$	羟基松脂醇-葡萄糖苷异构体 ^[21]	535.1810	535.1769	- 7.66	[M-H] ⁻	373.1257, 343.1159, 284.1034, 269.0797, 254.0566, 181.0483, 193.0487, 163.0379	川续断
59	9.86	$C_{10}H_8O_4$	菘菪亭 ^[25]	191.0338	191.0328	- 5.23	[M-H] ⁻	176.0094, 148.0143, 104.0246	白术
60	9.93	$C_{14}H_{12}O_3$	白藜芦醇 ^[10-12]	227.0703	227.0691	- 5.28	[M-H] ⁻	185.0585, 157.0632, 143.0480, 130.9813, 119.0475	何首乌

续表 1

No.	t_R/min	分子式	化合物鉴定结果	理论值	实测值	$\delta/\times 10^{-6}$	离子模式	碎片离子	来源
61	10.06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷 ^[10]	465.1027	465.0991	- 7.74	[M+H] ⁺	447.1599, 303.0479	何首乌
62	10.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁 ^[14]	609.1450	609.1411	- 6.40	[M-H] ⁻	343.0415, 300.0253, 271.0228, 151.0015	枸杞
63	10.14	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	polygonimitin B ^[10, 12]	417.1180	417.1171	- 2.16	[M-H] ⁻	255.0641, 153.0171, 135.0066, 119.0480	何首乌
64	10.43	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	氧化白藜芦醇 ^[12]	243.0652	243.0641	- 4.53	[M-H] ⁻	225.0536, 215.0694, 201.0539, 173.0587, 123.0065, 109.0247	何首乌
65	10.43	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	2, 3, 5, 4- 四羟基二苯乙 烯葡萄糖苷 ^{[10-12]*}	405.1180	405.1163	- 4.20	[M-H] ⁻	243.0642, 119.0481, 93.0324	何首乌
66	10.82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	羟基大黄素 -O- 己糖苷 ^[12]	447.0922	447.0909	- 2.91	[M-H] ⁻	285.0381, 243.0622, 169.0485	何首乌
67	11.03	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	2, 3, 5, 4- 四羟基二苯乙 烯 -O- 没食子酰基 - 葡萄 糖苷 ^[11]	557.1289	557.1252	- 6.64	[M-H] ⁻	405.1155, 313.0542, 243.0642, 169.0118, 125.0227	何首乌
68	11.71	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 B ^[19]	515.1184	515.1138	- 8.93	[M-H] ⁻	353.0849, 191.0540, 173.0434, 135.0431	川续断
69	11.92	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₉	林生续断苷 I ^[19]	747.2706	747.2646	- 8.03	[M-H] ⁻	585.2116, 485.1629, 459.1473, 375.1263, 323.1109, 297.0955, 227.0905, 195.0641, 125.0221	川续断
70	12.10	C ₃₃ H ₄₆ O ₂₀	tricoloroside ^[19]	761.2498	761.2444	- 7.09	[M-H] ⁻	581.1863, 511.1412, 371.0952	川续断
71	12.32	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 A ^[19, 22]	515.1184	515.1143	- 7.96	[M-H] ⁻	353.0848, 191.0538, 179.0327, 135.0430	川续断 / 白术
72	12.57	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	2, 3, 5, 4- 四羟基二苯乙 烯 -O- 没食子酰基 - 葡萄 糖苷 ^[11-12]	557.1289	557.1258	- 5.56	[M-H] ⁻	405.1161, 313.0543, 243.0643, 169.0121, 125.0223	何首乌
73	13.07	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素 -O- 吡喃葡萄糖 苷 ^[11]	431.0973	431.0952	- 4.87	[M-H] ⁻	269.0434, 240.0409, 225.0529, 161.0221	何首乌
74	13.39	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	polygonumosides A ^[12]	555.1133	555.1089	- 7.93	[M-H] ⁻	393.0585, 349.0686, 285.0019, 274.0098, 258.0150, 229.4174	何首乌
75	13.53	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 C ^[19, 22]	515.1184	515.1143	- 7.96	[M-H] ⁻	353.0848, 191.0538, 179.0327, 173.0433, 135.0430	川续断 / 白术
76	13.81	C ₃₃ H ₄₆ O ₁₉	茶茱萸苷 ^[19, 21]	745.2549	745.2491	- 7.78	[M-H] ⁻	583.2093, 539.1752, 513.1572, 459.1456, 373.1112, 297.0952, 209.0797, 141.0171	川续断
77	13.95	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	polygonumosides A 异构 体 ^[12]	555.1133	555.1088	- 8.11	[M-H] ⁻	393.0587, 349.0686, 285.0013, 274.0097, 258.0159	何首乌
78	14.46	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	根皮苷 ^[12]	435.1286	435.1255	- 7.12	[M-H] ⁻	273.0748, 229.0863, 167.0328, 151.0014, 125.0224	何首乌
79	14.60	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	2, 3, 5, 4'- 四羟基二苯 乙烯 -2-O- 乙酰基 - 葡萄 糖苷 ^[11]	447.1286	447.1253	- 7.38	[M-H] ⁻	243.0642, 137.0222	何首乌
80	14.82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素 -O- 葡萄糖苷 ^[12]	431.0973	431.0952	- 4.87	[M-H] ⁻	269.0434, 240.0409, 225.0529, 161.0221	何首乌
81	17.17	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	大黄素甲醚 -O- 葡萄糖 苷 ^[12]	445.1129	445.1096	- 7.41	[M-H] ⁻	283.0589, 255.0640	何首乌
82	17.67	C ₁₈ H ₂₂ O ₆	6- (3-hydroxy-propionyloxy) atractylenolid III ^[25]	333.1332	333.1313	- 5.70	[M-H] ⁻	305.1371, 293.1371, 261.1474, 203.1055, 185.0949, 135.0426	白术
83	18.36	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素 ^[12-13]	301.0342	301.0328	- 4.65	[M-H] ⁻	273.0385, 256.0959, 178.9965, 151.0014, 121.0274, 108.0434	何首乌 / 枸杞
84	19.16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素 -O- 葡萄糖苷 ^[12]	431.0973	431.0949	- 5.57	[M-H] ⁻	311.0531, 269.0435, 240.0404, 225.0534	何首乌
85	19.30	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	羧基大黄素 ^[12]	313.0343	313.0325	- 5.75	[M-H] ⁻	241.0474, 225.0536, 198.7953, 185.2757	何首乌
86	19.92	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	羧基大黄素异构体 ^[12]	313.0343	313.0329	- 4.47	[M-H] ⁻	269.0435, 241.0485, 225.0538	何首乌

续表 1

No.	t_R/min	分子式	化合物鉴定结果	理论值	实测值	$\delta/\times 10^{-6}$	离子模式	碎片离子	来源
87	20.43	$C_{20}H_{36}O_7$	tetradecylcitric acid ^[24]	389.2534	389.2519	- 3.85	[M-H] ⁻	371.2415, 330.2037, 311.2097, 284.1987, 244.1680, 232.1681	白术
88	20.60	$C_{15}H_{12}O_5$	柚皮素 ^[13]	271.0601	271.0591	- 3.69	[M-H] ⁻	177.0172, 151.0015, 119.0481, 107.0118, 93.0325	枸杞
89	20.81	$C_{47}H_{76}O_{17}$	3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖基齐墩果酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷 ^[21]	911.4999	911.4935	- 7.02	[M-H] ⁻	749.4420, 603.3855, 585.3751, 471.3445, 423.3232	川续断
90	20.85	$C_{15}H_{10}O_3$	芦荟大黄素 ^[12]	269.0444	269.0426	- 6.69	[M-H] ⁻	225.1010, 183.0901, 156.0796	何首乌
91	20.99	$C_{47}H_{76}O_{18}$	medicoside F ^[19]	927.4948	927.4861	- 9.38	[M-H] ⁻	603.3854, 323.0941	川续断
92	21.24	$C_{41}H_{66}O_{12}$	HN saponin F ^[19, 21]	749.4471	749.4416	- 7.34	[M-H] ⁻	603.3853, 585.3744, 471.3441	川续断
93	21.28	$C_{21}H_{20}O_{10}$	大黄素-O-葡萄糖苷 ^[12]	431.0973	431.0936	- 8.58	[M-H] ⁻	311.0552, 282.0509, 269.0434, 225.0529	何首乌
94	21.47	$C_{15}H_{22}$	白术内酯VI ^[25]	203.1794	203.1782	- 5.91	[M+H] ⁺	161.1315, 133.1004, 105.0696	白术
95	21.49	$C_{47}H_{76}O_{18}$	川续断皂苷VI ^{[19-21]*}	927.4947	927.4861	- 9.27	[M-H] ⁻	603.3858	川续断
96	21.66	$C_{47}H_{74}O_{19}$	赤芍苷B ^[19]	941.4740	941.4650	- 9.56	[M-H] ⁻	747.4275, 617.3642, 423.3234	川续断
97	21.70	$C_{15}H_{10}O_6$	山奈酚 ^[12, 19]	285.0394	285.0376	- 6.31	[M-H] ⁻	268.0351, 257.0435, 241.0483, 211.0375	何首乌/枸杞
98	21.95	$C_{23}H_{22}O_{11}$	乙酰大黄素-O-己糖 ^[12]	473.1078	473.1048	- 6.34	[M-H] ⁻	431.0953, 311.0541, 269.0433, 241.0485, 225.0537	何首乌
99	21.98	$C_{47}H_{74}O_{18}$	去氢川续断皂苷VI ^[19]	925.4791	925.4705	- 9.29	[M-H] ⁻	601.3699, 323.0958, 263.0742,	川续断
100	22.09	$C_{49}H_{78}O_{19}$	4'-O-乙酰基续断皂苷VI ^[19]	969.5053	969.4965	- 9.08	[M-H] ⁻	645.3958, 603.3857, 323.0956, 119.0327	川续断
101	22.23	$C_{18}H_{34}O_5$	trihydroxyoctadecaenoic acid ^[14]	329.2322	329.2305	- 5.16	[M-H] ⁻	311.2209, 293.2097, 211.1313, 199.1309, 171.1301, 155.1051, 139.1106	枸杞
102	22.26	$C_{49}H_{78}O_{19}$	2'-O-乙酰基续断皂苷VI ^[19]	969.5053	969.4959	- 9.70	[M-H] ⁻	645.3958, 603.3861, 323.0964	川续断
103	22.40	$C_{49}H_{78}O_{19}$	3'-O-乙酰基续断皂苷VI ^[19]	969.5053	969.4960	- 9.59	[M-H] ⁻	645.3958, 603.3861, 323.0964, 119.0328	川续断
104	22.54	$C_{42}H_{68}O_{14}$	川续断皂苷A ^[21]	795.4525	795.4469	- 7.04	[M-H] ⁻	471.3440, 323.0957, 221.0642, 119.0328	川续断
105	22.64	$C_{47}H_{76}O_{17}$	川续断皂苷V ^[19, 21]	911.4999	911.4916	- 9.11	[M-H] ⁻	587.3907, 323.0954, 221.0642	川续断
106	22.99	$C_{18}H_{34}O_5$	trihydroxyoctadecaenoic acid 异构体 ^[14]	329.2322	329.2307	- 4.56	[M-H] ⁻	311.2205, 293.2094, 227.1272, 213.3992, 199.1317, 181.1209, 129.0900, 99.0794	枸杞
107	23.14	$C_{15}H_{10}O_6$	羟基大黄素 ^[12]	285.0393	285.0382	- 3.86	[M-H] ⁻	257.0431, 241.0486	何首乌
108	23.42	$C_{15}H_8O_6$	大黄酸 ^[12]	283.0237	283.0220	- 6.01	[M-H] ⁻	239.0329, 211.0383, 184.0507	何首乌
109	23.63	$C_{47}H_{76}O_{17}$	灰毡毛忍冬次苷A ^[19, 21]	911.4999	911.4931	- 7.46	[M-H] ⁻	749.4414, 731.4316, 603.3853, 585.3745, 471.3442, 423.3234	川续断
110	23.74	$C_{15}H_{10}O_4$	大黄酚 ^[12]	253.0495	253.0484	- 4.35	[M-H] ⁻	224.0459, 209.0586, 181.0635	何首乌
111	23.77	$C_{46}H_{74}O_{16}$	dipsacussaponin N ^[19]	881.4893	881.4833	- 6.81	[M-H] ⁻	749.4419, 731.4331, 603.3857, 585.3748, 471.3443, 423.3234	川续断
112	23.99	$C_{15}H_{20}O$	苍术酮 ^[23-25]	217.1587	217.1573	- 6.45	[M+H] ⁺	199.1467, 147.1156, 160.0214, 133.1003, 95.0490	白术
113	24.16	$C_{41}H_{66}O_{12}$	α -常春藤皂苷 ^[19, 21]	749.4470	749.4417	- 7.07	[M-H] ⁻	603.3856, 585.3749, 471.3443, 423.3243	川续断
114	24.18	$C_{15}H_{20}O_2$	3β -羟基苍术酮 ^[24]	233.1536	233.1521	- 6.43	[M+H] ⁺	215.1419, 205.1575, 159.1158, 145.1002, 131.0847	白术
115	24.35	$C_{15}H_{20}O_3$	白术内酯III ^{[23-25]*}	249.1485	249.1466	- 7.63	[M+H] ⁺	231.1362, 203.1420, 189.0898, 175.0749, 163.0743, 135.0434, 119.0852, 105.0696, 93.0697	白术
116	24.35	$C_{15}H_{18}O_2$	白术内酯II ^[23-25]	231.1379	231.1364	- 6.49	[M+H] ⁺	213.1260, 203.1420, 185.1313, 163.0743, 135.0433	白术
117	24.58	$C_{35}H_{56}O_8$	木通皂苷PA ^[19-20]	603.3891	603.3853	- 6.30	[M-H] ⁻	603.3853, 468.9007, 324.8915	川续断

续表 1

No.	t_R /min	分子式	化合物鉴定结果	理论值	实测值	$\delta/\times 10^{-6}$	离子模式	碎片离子	来源
118	24.73	C ₁₅ H ₁₉ NO	白术内酰胺 ^[24-25]	230.1539	230.1525	- 6.08	[M+H] ⁺	215.1287, 187.1347, 160.0745	白术
119	24.91	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	1-(2-hydroxy-2-methyl-propyl)-2, 5, 5, 8 α -tetramethyldecahydro-2-naphthalenol ^[25]	281.1383	281.1365	- 6.40	[M-H] ⁻	263.2358, 245.2249, 221.2245	白术
120	25.17	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	大黄素 ^[10-12]	269.0444	269.0433	- 4.09	[M-H] ⁻	241.0483, 225.0534, 210.0296, 197.0583, 181.0633	何首乌
121	25.71	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	isoasterolide A ^[25]	233.1536	233.1518	- 7.72	[M-H] ⁻	215.1416, 205.1575, 187.1469, 163.0745, 105.0695	白术
122	25.79	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	大黄酸甲醚 ^[12]	285.0393	285.0381	- 4.21	[M-H] ⁻	257.0432, 241.0485, 217.0483, 213.0532	何首乌
123	25.85	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	白术内酯 I ^[23-25]	233.1536	233.1519	- 7.29	[M-H] ⁻	215.1414, 187.1467, 163.0746, 121.1006, 105.0694	白术
124	26.45	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	dehydrotumulosic acid ^[26-27]	483.3468	483.3430	- 7.86	[M-H] ⁻	439.2791, 421.2712, 391.2602	茯苓
125	26.76	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	hydroxyoctadecatrienoic acid ^[14]	293.2111	293.2094	- 5.80	[M-H] ⁻	275.2017, 249.2200, 197.1167, 185.1158, 125.0949, 113.0949	枸杞
126	26.94	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	hydroxyoctadecatrienoic acid 异构体 ^[14]	293.2111	293.2099	- 4.09	[M-H] ⁻	275.2017, 249.2200, 197.1167, 185.1158, 125.0949, 113.0949	枸杞
127	27.18	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	大黄素甲醚 ^[12]	283.0601	283.0589	- 4.24	[M-H] ⁻	268.0351, 240.0406	何首乌
128	28.40	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	13-hydroxyoctadecadienoic acid ^[14]	295.2267	295.2248	- 6.44	[M-H] ⁻	277.2148, 251.2356, 223.2047, 97.0274, 71.0482	枸杞
129	28.58	C ₃₃ H ₅₀ O ₅	去氢茯苓酸 ^[27]	525.3574	525.3539	- 6.66	[M-H] ⁻	470.8251, 202.8408	茯苓
130	28.86	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	茯苓酸 ^{[26-28]*}	527.3731	527.3687	- 8.34	[M-H] ⁻	465.3346, 405.2705, 249.1617	茯苓
131	29.10	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	氢化松苓酸 ^[26]	455.3520	455.3492	- 6.15	[M-H] ⁻	407.3270, 331.9701, 265.2497	茯苓

注 (Note): * 为与对照品比对的化合物 (Refers to the compound compared with the reference substance)。

可胺 B、葡萄糖 - 苦可胺 B、二葡萄糖 - 苦可胺、lycibarbarspermidine F、glucosyl-lycibarbarspermidine F、lycibarbarspermidine M、N¹, N¹⁰- 双 (二氢咖啡酰) 亚精胺等。以化合物 44 为例阐述亚精胺类化合物裂解规律。

化合物 44 保留时间为 6.70 min, 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 474.2567[M + H]⁺, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 310.2112[M + H-C₉H₈O₃]⁺、 m/z 293.1840[M + H-C₉H₈O₃-NH₃]⁺、 m/z 222.1111[M + H-C₉H₈O₃-NH₃-C₄H₉N]⁺、 m/z 165.0536[M + H-C₁₆H₂₇N₃O₃]⁺、 m/z 123.0434[M + H-C₉H₈O₃-NH₃-C₄H₉N-C₇H₈O₂]⁺、 m/z 100.0755[M + H-C₉H₈O₃-NH₃-C₄H₉N-C₃H₅NO]⁺和 m/z 72.0810[M + H-C₉H₈O₃-NH₃-C₁₂H₁₅NO₃]⁺, 根据正离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[23-25]和数据库, 可推测为 N¹, N¹⁰- 双 (二氢咖啡酰) 亚精胺, 其二级质谱及裂解规律见图 3。

3.2.3 萜类化合物的结构解析 乌鳖返春口服液中鉴定出萜类成分 17 种, 萜类化合物包括环烯醚萜类、倍半萜类化合物, 其中本方川续断中的獐芽菜苷、马钱苷酸及其异构体、林生续断苷 I、茶茱萸苷等为环烯醚萜类化合物, 本方白术

中的白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮等为倍半萜类化合物。以化合物 30、115 为例阐述萜类化合物裂解规律。

化合物 30 保留时间为 5.74 min, 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 375.1268[M-H]⁻, 可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 332.8820[M-H-CO₂]⁻、 m/z 213.0747[M-H-C₆H₁₂O₅]⁻、 m/z 169.0850[M-H-CO₂-C₆H₁₀O₅]⁻、 m/z 151.0742[M-H-CO₂-C₆H₁₂O₆]⁻、 m/z 119.0327[M-H-CO₂-C₆H₁₂O₆-2O]⁻、 m/z 113.0223[M-H-CO₂-C₆H₁₂O₆-C₂H₄O]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献信息^[19-20], 推测其为马钱苷酸。化合物 115 保留时间为 24.35 min, 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 249.1466[M + H]⁺, 可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 231.1362[M + H-H₂O]⁺、 m/z 203.1420[M + H-H₂O-CO]⁺、 m/z 189.0898[M + H-H₂O-C₃H₆]⁺、 m/z 163.0743[M + H-H₂O-C₅H₈]⁺、 m/z 175.0749[M + H-H₂O-C₃H₆-CH₂]⁺、 m/z 119.0852[M + H-H₂O-C₅H₈-CO₂]⁺、 m/z 105.0696[M + H-H₂O-C₅H₈-CO₂-CH₂]⁺、 m/z 93.0697[M + H-H₂O-C₃H₈-CO₂-C₂H₂]⁺, 根据正离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[23-25]

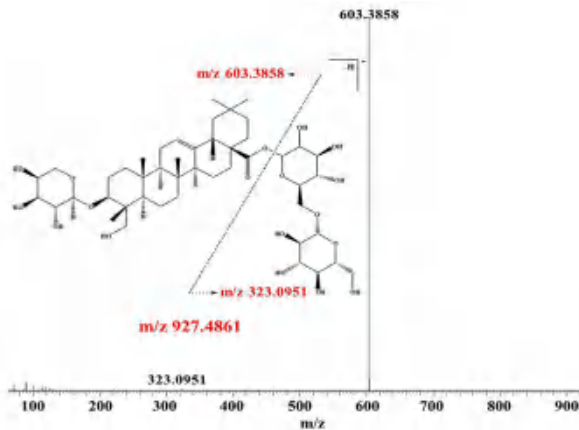


图 2 川续断皂苷 VI 可能的裂解途径
Fig 2 Proposed fragmentation pathways of asperosaponin VI

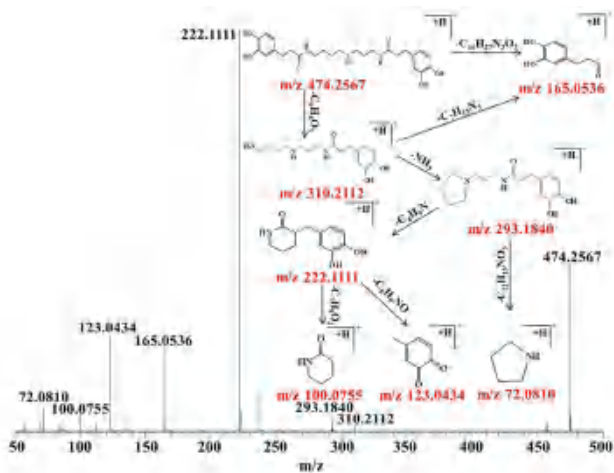


图 3 N^1, N^{10} -双(二氢咖啡酰)亚精胺可能的裂解途径
Fig 3 Proposed fragmentation pathways of N^1, N^{10} -bis-dihydrocaffeoyl-spermidine

和数据库, 并进一步与对照品比对, 保留时间、特征碎片均一致, 可确定该化合物为白术内酯 III, 其二级质谱及裂解规律见图 4。

3.2.4 酚酸类化合物的结构解析 乌鳖返春口服液中鉴定出酚酸类成分 17 种, 主要包括没食子酸、焦棓酸、绿原酸、隐绿原酸、奎宁酸、咖啡酸等, 质谱裂解规律较为简单, 先是各种取代基的裂解, 进而 H_2O , $COOH$, CO_2 等中性分子丢失, 一般在负离子模式下存在较高的响应, 以化合物 **18**、**38** 为例阐述酚酸类化合物裂解规律。

化合物 **18** 保留时间 3.05 min, 在负离子模式下的准分子离子峰 m/z 169.0119 $[M-H]^-$, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 125.0222 $[M-H-CO_2]^-$ 、 m/z 97.0274 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 、 m/z 107.0118 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ 、 m/z 69.0326 $[M-H-CO_2-2CO]^-$, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合相关文献报道^[10-11], 故推测化合物 **18** 为没食子酸。

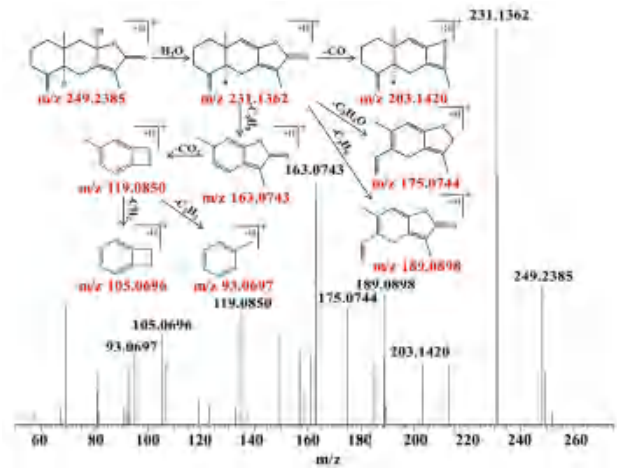


图 4 白术内酯 III 可能的裂解途径
Fig 4 Proposed fragmentation pathways of atractylenolide III

化合物 **38** 保留时间 6.31 min, 在负离子模式下的准分子离子峰 m/z 353.0874 $[M-H]^-$, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 191.0539 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 、 m/z 179.0327 $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$ 、 m/z 173.0434 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$ 、 m/z 135.0430 $[M-H-C_7H_{10}O_5-H_2O]^-$ 、 m/z 161.0225 $[M-H-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[19, 21]和数据库比对, 推测其为绿原酸, 其二级质谱及裂解规律见图 5。

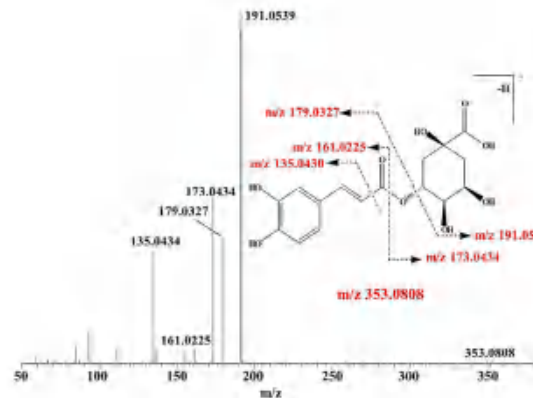


图 5 绿原酸可能的裂解途径
Fig 5 Proposed fragmentation pathways of chlorogenic acid

3.2.5 蒽醌类化合物的结构解析 蒽醌类为蓼科植物的代表性成分, 本方中何首乌含有多种蒽醌苷元及其苷类, 共鉴定出蒽醌类成分 17 种, 主要包括大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸甲醚、羟基大黄素等。以化合物 **108**、**120** 为例阐述蒽醌类化合物裂解规律。

化合物 **108** 保留时间为 23.42 min, 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 283.0220 $[M-H]^-$, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 239.0329 $[M-H-CO_2]^-$ 、 m/z 211.0383 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 、 m/z

184.0507[M-H-CO₂-2CO]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合相关文献^[10-12], 推测其为大黄酸。化合物 **120** 保留时间为 25.17 min, 在负离子模式下其准分子离子峰为 m/z 269.0433[M-H]⁻, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 241.0483[M-H-CO]⁻、 m/z 225.0534[M-H-CO₂]⁻、 m/z 210.0296[M-H-CO₂-CH₃]⁻、 m/z 197.0583[M-H-CO₂-CO]⁻ 碎片离子、 m/z 181.0633[M-H-CO₂-CH₃-CO]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[10-12]对比, 推测其为大黄素, 其二级质谱及裂解规律见图 6。

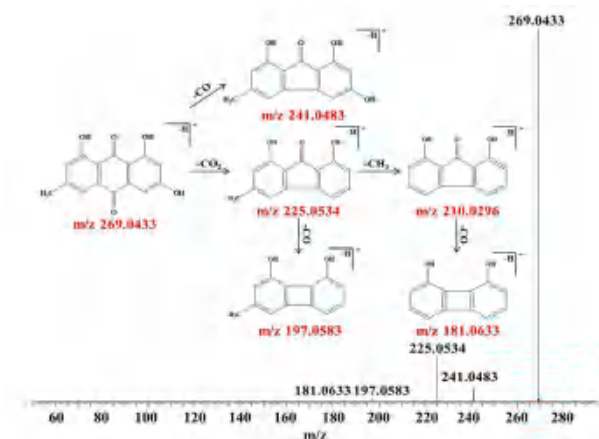


图 6 大黄素可能的裂解途径

Fig 6 Proposed fragmentation pathways of emodin

3.2.6 二苯乙烯类化合物的结构解析 乌鳖返春口服液中共鉴定出二苯乙烯类成分 10 种, 二苯乙烯类化合物是本方中何首乌的代表性成分, 包括 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷、2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-O-没食子酰基-葡萄糖苷、2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-2-O-乙酰基-葡萄糖苷、白藜芦醇、氧化白藜芦醇等。以化合物 **60**、**65** 为例阐述二苯乙烯类化合物裂解规律。

化合物 **60** 保留时间为 9.93 min, 在负离子模式准分子离子峰为 m/z 227.0691[M-H]⁻, 同时可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 185.0585[M-H-C₂H₂O]⁻、 m/z 143.0480[M-H-2C₂H₂O]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合相关文献^[10-12], 推测其为白藜芦醇。化合物 **65** 保留时间为 10.43 min, 在负离子模式准分子离子峰为 m/z 405.1163[M-H]⁻, 其脱去葡萄糖后得到特征性碎片离子 m/z 243.0642[M-H-C₆H₁₂O₆]⁻, 根据负离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合相关文献^[10-12], 并进一步与对照品对比, 保留时间、特征碎片均一致, 可确定该化合物为 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷, 其

二级质谱及裂解规律见图 7。

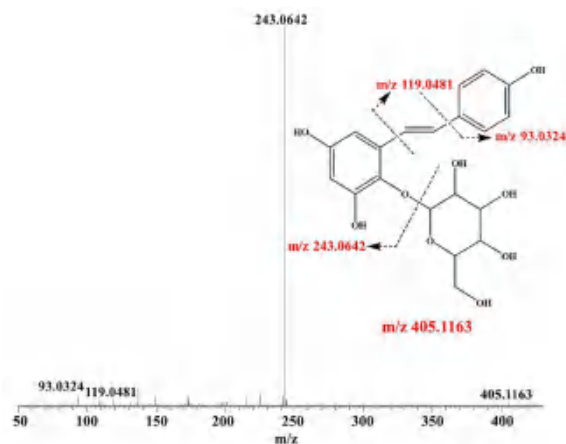


图 7 2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷可能的裂解途径

Fig 7 Proposed fragmentation pathways of 2, 3, 5, 4-tetrahydroxystilbene glucoside

3.2.7 氨基酸类化合物的结构解析 乌鳖返春口服液中鉴定出氨基酸类成分 11 种, 主要包括精氨酸、缬氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等, 氨基酸类化合物含有氨基和羧基官能团, 易发生 α -裂解失去氨基或羧基基团。现以化合物 **2** 为例阐述氨基酸类化合物裂解规律。

化合物 **2** 保留时间 0.89 min, 推测该化合物极性较大, 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 175.1178[M + H]⁺, 可观察到主要的碎片离子分别为 m/z 130.0967[M + H-COOH]⁺、 m/z 158.0915[M + H-OH]⁺、 m/z 116.0701[M + H-OH-CH₇N₃+H₂O]⁺、 m/z 112.0865[M + H-COOH-NH₃]⁺、 m/z 70.0654[M + H-COOH-CH₇N₃]⁺、 m/z 60.0561[M + H-COOH-C₄H₉N]⁺, 根据正离子模式下的精确分子质量及特征碎片的质量, 结合文献^[7]和数据库, 推测其为精氨酸, 其二级质谱及裂解规律见图 8。

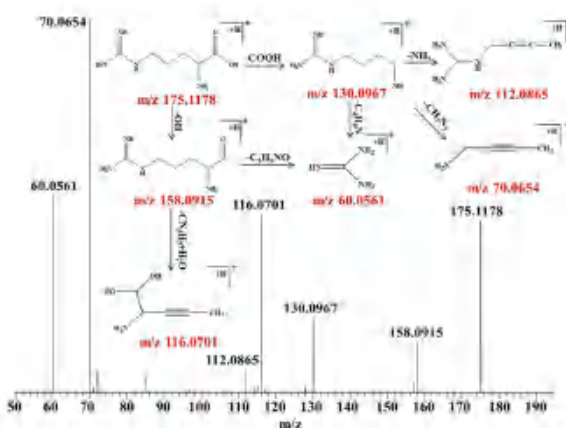


图 8 精氨酸可能的裂解途径

Fig 8 Proposed fragmentation pathways of arginine

4 讨论

根据对照品对比、裂解规律总结,本研究采用 LC-MS 技术共鉴定出 131 个化学成分,包括三萜类、亚精胺类、萜类、酚酸类、蒽醌类、氨基酸类、二苯乙烯类、黄酮类、脂肪酸类、有机酸类、生物碱类、木脂素类,苯丙素类等。结合乌鳖返春口服液的药效基础,选择可测的标识性成分作为质量控制标志物(Q-marker),提高制剂质量一致性、可控性和溯源性,对质量控制有重要意义,而筛选能改善 POF 作用的药效成分尤为重要。川续断中三萜类化合物川续断皂苷 VI 可促进大鼠体外骨髓间充质干细胞向成骨细胞增殖和分化,具有促进骨形成的作用,可改善 POF 患者卵巢分泌的雌激素减少造成的骨质疏松症状^[29]。白术中萜类成分白术内酯 I 可通过调节脂质代谢改善黄体功能,促进 FOGCs 雌孕激素分泌相关的主要信号通路即胆固醇代谢通路和卵巢类固醇激素生成通路,对动物先兆流产起到预防和治疗的效果^[30]。枸杞中亚精胺类化学成分能与多种生殖激素建立复杂的反馈联系,进而参与调控动物繁殖,在维持卵巢类固醇激素水平和生成过程中具有重要作用^[31]。何首乌中二苯乙烯苷类化学成分,能明显改善大鼠因绝经导致的体重增加与子宫萎缩^[32],抑制去卵巢大鼠衰老骨髓间充质干细胞成骨、成脂分化,能改善去卵巢肾虚大鼠骨髓间充质干细胞增殖能力^[33-34],二苯乙烯苷类化合物白藜芦醇可通过抑制卵巢氧化应激和激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来改善 POF 模型大鼠卵巢功能^[35-36]。何首乌和枸杞中黄酮类化合物槲皮素可通过上调 POF 模型大鼠卵巢组织中谷胱甘肽的表达,下调 caspase-3、核因子 κ B 及丙二醛的表达以及调节 PI3K/Akt 信号通路抑制卵巢氧化应激,促进卵巢自噬,调节性激素水平,增加卵巢组织中各级生长卵泡数目,来改善卵巢功能^[37-38]。上述与药效相关的 Q-marker 可确定为续断皂苷类、白术内酯类、亚精胺类、二苯乙烯苷类、槲皮素等,此类化合物的药理作用与乌鳖返春口服液的恢复卵巢功能,改善围绝经期临床症状,延缓衰老,治疗早发性卵巢功能不全的功效一致,可能是乌鳖返春口服液主要的药效物质基础。

本研究利用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术具有高灵敏度、高质量精度、高分辨率等特点,结合现有乌鳖返春口服液中单味药材已报道的成分,建立了一种快速分析鉴定乌鳖返春口服液中化学成分的方法,为其质量控制和药效物质基础的研究提供了参考。此外,本研究仍有不足

之处,由于样品前处理方式以及 LC-MS 检测方式的特殊性未能全面分析,鳖甲、黄狗肾中只检测出氨基酸、核苷类化合物,表明乌鳖返春口服液中尚有未知成分如多糖、多肽类化合物需要进行系统的化学分离、鉴定。

参考文献

- [1] 施艳秋,夏桂成.乌鳖口服液治疗卵巢功能早衰临床观察[J].南京中医药大学学报,1998,14(5):270-271.
- [2] 吴曦桐,施艳秋.乌鳖口服液治疗早发性卵巢功能不全脾肾亏虚证临床研究[J].内蒙古中医药,2019,38(4):1-3.
- [3] 施艳秋,朱萱萱,施荣山,等.乌鳖口服液对免疫功能影响的实验研究[J].中国药业,2000,9(4):20-21.
- [4] 朱萱萱,王海丹,张莹,等.乌鳖口服液对自身免疫性卵巢早衰小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 和卵巢 Fas、FasL 蛋白表达的影响[J].中华中医药学刊,2016,38(4):1799-1802.
- [5] 陶永华,孙兰,殷洪梅,等.基于药效筛选乌鳖颗粒中间体的醇沉工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(12):28-31.
- [6] 刘志辉,陈武,贾媛.乌鳖颗粒定性定量方法研究[J].药物分析杂志,2011,31(9):1646-1649.
- [7] 覃翔,廖强.静电场轨道阱高分辨质谱技术在中药分析中的应用进展[J].中国药师,2022,25(7):1240-1245.
- [8] 韩鑫龙,成欣,孙颖超,等.基于 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 法分析青蒿鳖甲汤化学成分[J].中成药,2021,43(12):3531-3535.
- [9] 罗亚红,张志军.动物类中药材质量控制研究新进展[J].海峡药学,2016,28(8):55-57.
- [10] 王敏,王晶,杨娜,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 代谢组学技术研究炮制前后何首乌化学成分变化[J].辽宁中医杂志,2022,49(2):149-153.
- [11] 靳宝芬,叶昊,王凤云,等.基于 UPLC/Q-TOF MS 法分析生何首乌药材的化学成分[J].广东药科大学学报,2020,36(4):473-478.
- [12] Wang L, Sang M, Liu E, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds include extract from Polygonum multiflorum by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 45-61.
- [13] 彭玉娇,崔学宇,邵元元,等.利用 LC-MS 技术解析黑果枸杞、红果枸杞代谢物的差异[J].食品与生物技术学报,2021,40(9):56-63.
- [14] Mocan A, Moldovan C, Zengin G, et al. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (Lycium barbarum L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 115: 414-424.
- [15] 甘小娜,王辉俊,李廷钊,等.黑果枸杞化学成分的分析及其总花色苷类含量测定[J].

- 食品科学, 2021, 42 (18): 185-190.
- [16] 刘建飞, 巩媛, 杨军丽, 等. 枸杞属植物中生物碱类成分研究进展 [J]. 科学通报, 2022, 67 (4-5): 332-350.
- [17] 刘海彬, 张炜, 陈元涛, 等. 高效液相色谱法同时测定枸杞中槲皮素、山柰酚和异鼠李素 [J]. 分析实验室, 2015, 34 (11): 1336-1338.
- [18] 李佳兴, 周利, 金艳, 等. 枸杞子药材中 12 种有机酸类成分含量测定与分析 [J]. 中国药房, 2018, 29 (24): 3344-3349.
- [19] 洪智慧, 杜伟锋, 杨莹, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 分析续断“发汗”前后化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51 (5): 1233-1241.
- [20] 陶益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 续断酒炙前后化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (4): 672-676.
- [21] Tao Y, Chen L, Yan J. Traditional uses, processing methods, phytochemistry, pharmacology and quality control of *Dipsacus asper* Wall. ex C. B. Clarke: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 258: 112912.
- [22] 曹清华. 白术抗氧化活性成分的提取及鉴定研究 [D]. 贵州: 贵州师范大学, 2018.
- [23] 黄小方, 欧阳辉, 李军茂, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析不同产地白术的差异性化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (23): 27-33.
- [24] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于 UPLC/Q-TOF MS 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.
- [25] Sun X, Cui X, Wen H, et al. Influence of sulfur fumigation on the chemical profiles of *Atractylodes macrocephala* Koidz. evaluated by UPLC-QTOF-MS combined with multivariate statistical analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 141: 19-31.
- [26] 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.
- [27] 赵秋龙, 张丽, 卞晓坤, 等. UPLC-QTRAP-MS 分析不同产地茯苓药材中 8 个三萜酸类成分 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40 (7): 1169-1177.
- [28] 蒋希羽, 庄楷, 张雅净, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的桂枝茯苓丸化学成分分析 [J]. 中药材, 2021, 44 (8): 1898-1903.
- [29] 牛银波, 潘亚磊, 李晨睿, 等. 续断防治骨质疏松的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29 (7): 891-894.
- [30] 郭羽丽. 白术内酯 I 对先兆流产家猫的保胎效果及机理初探 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2021.
- [31] Lefevre P, Palin M, Murphy B. Polyamines on the reproductive landscape [J]. Endocr Rev, 2011, 32 (5): 694-712.
- [32] 郑明轩. 基于 Wnt/ β -catenin 通路探讨二苯乙烯苷影响绝经后大鼠骨折愈合的分子机制 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
- [33] 黄进, 张进, 徐志伟. 二苯乙烯苷对去卵巢大鼠衰老 MSCs 成骨、成脂分化的影响 [J]. 新中医, 2013, 45 (8): 184-186.
- [34] 黄进, 潘华峰, 张进, 等. 二苯乙烯苷对肾虚大鼠 MSCs 增殖及旁分泌的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24 (4): 347-351.
- [35] Jiang Y, Zhang Z, Cha L, et al. Resveratrol plays a protective role against premature ovarian failure and prompts female germline stem cell survival [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (14): E3605.
- [36] Li N, Liu L. Mechanism of resveratrol in improving ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2018, 44 (8): 1431-1438.
- [37] Elkady M, Shalaby S, Fathi F, et al. Effects of quercetin and rosuvastatin each alone or in combination on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in female albino mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2019, 38 (11): 1283-1295.
- [38] Zheng S, Ma M, Chen Y, et al. Effects of quercetin on ovarian function and regulation of the ovarian PI3K/Akt/FoxO3a signalling pathway and oxidative stress in a rat model of cyclophosphamide-induced premature ovarian failure [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2022, 130 (2): 240-253.

(收稿日期: 2022-09-02; 修回日期: 2022-11-05)

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析 经典名方身痛逐瘀汤化学成分

刘艳梅¹, 刘金金^{1, 2}, 梁慧¹, 彭致铖¹, 朱德全¹, 陈向东¹, 孙冬梅^{1*} (1. 广东一方制药有限公司, 广东佛山 528244; 2. 华南农业大学, 广州 510642)

摘要: **目的** 应用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对身痛逐瘀汤基准样品化学成分进行分析和鉴定。**方法** 采用 Waters HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹; 结合 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 扫描提供化合物的准确分子量、二级质谱碎片离子信息等, 参照软件预测分析、对照品、文献报道等进行化学成分鉴定。**结果** 从身痛逐瘀汤基准样品中共鉴定出 151 个化学成分, 包括黄酮类 52 个、三萜皂苷类 25 个、苯酞类 19 个、含氮类 20 个、有机酸类 11 个、香豆素类 8 个、环烯醚萜类 5 个及其他 11 个。**结论** 利用液质联用技术鉴定身痛逐瘀汤基准样品的化合物及结构信息, 并初步归纳各类主要化学成分的质谱裂解特点, 为身痛逐瘀汤的药效物质基础及质量控制研究提供科学依据。

关键词: 身痛逐瘀汤; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 黄酮类; 三萜皂苷类; 香豆素类

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1240-11
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.020

Identidication of chemical constituents in Shentong Zhuyu decoction based by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

LIU Yan-mei¹, LIU Jin-jin^{1,2}, LIANG Hui¹, PENG Zhi-cheng¹, ZHU De-quan¹, CHEN Xiang-dong¹, SUN Dong-mei^{1*} (1. *Guangdong Efang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan Guangdong 528244*; 2. *South China Agricultural University, Guangzhou 510642*)

Abstract: Objective To identify the chemiical constituents from Shentong Zhuyu decoction by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. **Methods** The separation was performed on Waters HSS T3 C₁₈ column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) with gradient elution, 0.1% formic acid water solution (A)-acetonitrile (B), the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. The chemical constituents were identified and confirmed by analyzing the accurate molecular weight and the mass fragmentation pattern by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS, and comparing with the multistage mass spectrometric data from the standard substances, software prediction and literature data. **Results** Totally 151 constituents were identified from Shentong Zhuyu decoction, including 52 flavonoids, 25 triterpenoid saponins, 19 phthalides, 20 nitrogen-containing components, 11 phenoliacids, 8 coumarins, 5 iridoids, and 11 others compounds. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS can be used to elucidate the chemical constituents in Shentong Zhuyu decoction, and classify herb sources of each conpound. The study provides scientific basis for pharmacodynamic material basis and the quality control of Shentong Zhuyu decoction.

Key words: Shentong Zhuyu decoction; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; flavonoid; triterpenoid saponin; coumarin

基金项目: 佛山市核心技术攻关项目 (No.1920001000378)。

作者简介: 刘艳梅, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量标准研究, email: 947193632@qq.com * **通信作者:** 孙冬梅, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药质量标准研究, email: 10268667@qq.com

身痛逐瘀汤由红花、桃仁、川芎、当归、羌活、秦艽、五灵脂、没药、香附、牛膝、地龙和甘草 12 味中药组成, 具有活血行气、祛瘀通络、通痹止痛功效, 处方中秦艽、羌活祛风湿, 桃仁、红花、当归、川芎活血祛瘀, 没药、五灵脂、香附行血气, 止疼痛, 牛膝、地龙疏通经络以利关节, 甘草调和诸药^[1]。临床常用于治疗风湿关节痛、腰椎间盘突出、风湿腰腿痛等痹症^[2]。常有军等^[3]观察身痛逐瘀汤与非甾体抗炎药物均能减少大鼠变性腰椎间盘内肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素 1 α (IL-1 α)、白介素 6 (IL-6)、基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 的分泌, 延缓椎间盘变性的进程, 减少炎症因子分泌的作用优于非甾体抗炎药物。董昌盛等^[4]建立大鼠 Walker-256 乳腺癌细胞骨癌痛模型, 发现身痛逐瘀汤能够显著延长骨癌痛大鼠机械痛觉缩足阈值、热痛觉缩足潜伏期并减轻自发痛评分, 对骨癌痛大鼠模型侧胫骨骨密度无明显影响。鉴于身痛逐瘀汤的临床疗效报道较多, 针对其药效物质基础缺乏系统性研究, 本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术首次对身痛逐瘀汤基准样品进行全成分分析, 建立整体和类群化学成分快速筛选鉴定方法, 结合对照品及相关文献, 快速分析鉴定未知成分, 并对各成分进行药味归属, 以期明确经典方身痛逐瘀汤的药效物质基础, 为其质量控制指标的选择提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与软件

UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 含 Xcalibur 4.1 工作站、Thermo Scientific mzVault 2.0 数据库软件 (美国赛默飞世尔科技公司); QI 数据处理软件 (美国沃特世公司); XP26 型百万分之一天平、ME204E 十万分之一天平 (梅特勒-托利多公司); KQ-3000E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Direct-Q5 型超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

色谱级甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司); HPLC 级甲酸 (美国 Thermo-fisher 公司); 水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

对照品 α -香附酮 (批号: 110748-202117, 纯度 $\geq 99.8\%$)、槲皮素 (批号: 100081-201610, 纯度 $\geq 99.8\%$)、芦丁 (批号: 100080-202012, 纯度 $\geq 92.2\%$)、7-羟基香豆素 (批号: 111739-200501, 纯度 $\geq 100\%$)、羌活醇 (批号: 111820-202106, 纯度 $\geq 97.5\%$)、欧前胡素 (批号: 110826-

201918, 纯度 $\geq 99.0\%$)、异欧前胡素 (批号: 110827-202113, 纯度 $\geq 99.2\%$)、紫花前胡苷 (批号: 111821-201604, 纯度 $\geq 99.6\%$)、人参皂苷 Ro (批号: 111903-202106, 纯度 $\geq 95.0\%$)、洋川芎内酯 I (批号: 112071-202101, 纯度 $\geq 99.2\%$)、藁本内酯 (批号: 111737-201910, 纯度 $\geq 100.0\%$)、苦杏仁苷 (批号: 110820-202109, 纯度 $\geq 93.1\%$)、獐芽菜苦苷 (批号: 110785-201404, 纯度 $\geq 98.3\%$)、阿魏酸 (批号: 110773-201915, 纯度 $\geq 99.4\%$)、甘草苷 (批号: 111610-201908, 纯度 $\geq 95.0\%$)、甘草酸铵 (批号: 110731-202122, 纯度 $\geq 94.4\%$)、甘草次酸 (批号: 110723-201715, 纯度 $\geq 99.6\%$)、L-色氨酸 (批号: 140686-202205, 纯度 $\geq 100.0\%$)、异亮氨酸 (批号: 140683-202103, 纯度 $\geq 99.8\%$)、腺苷 (批号: 110879-201703, 纯度 $\geq 99.7\%$)、鸟苷 (批号: 111977-201501, 纯度 $\geq 93.6\%$)、尿苷 (批号: 110887-202104, 纯度 $\geq 99.6\%$) (中国食品药品检定研究院); 紫云英苷 (批号: wkq17032404)、伞形花内酯 (批号: wkq16072703)、新绿原酸 (批号: wkq19021413)、隐绿原酸 (批号: wkq0000930)、异绿原酸 A (批号: wkq20020403)、獐牙菜苷 (批号: wkq17092203)、甘草酸 (批号: wkq20022509)、芹糖甘草苷 (批号: wkq0001634) (纯度均 $\geq 98.0\%$) (四川省维克奇生物科技有限公司)。

身痛逐瘀汤基准样品 (冻干粉自制), 红花、桃仁、川芎、当归、羌活、秦艽、没药、五灵脂 (醋制)、香附、牛膝、甘草、地龙 (国药集团冯了性药材饮片有限公司, 经广州中医药大学孙冬梅教授鉴定, 均符合《中国药典》有关规定)。

2 方法

2.1 溶液的制备

供试品溶液: 精密称取身痛逐瘀汤冻干粉 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 25 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失重量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

混合对照品溶液: 取各对照品适量, 加 70% 甲醇制成各成分质量浓度约为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Waters HSS T3 C₁₈ (2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μm), 流速为 0.3 mL \cdot min⁻¹, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 1 μL , 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 0%B; 3 ~ 7 min, 0% ~ 4%B; 7 ~ 15 min, 4% ~ 10%B; 15 ~ 25 min, 10% ~ 12%B;

25 ~ 30 min, 12% ~ 15%B; 30 ~ 40 min, 15% ~ 22%B; 40 ~ 50 min, 22% ~ 32%B; 50 ~ 55 min, 32% ~ 50%B; 55 ~ 60 min, 50% ~ 65%B; 60 ~ 70 min, 65% ~ 78%B; 70 ~ 75 min, 78% ~ 0%B)。

2.3 质谱条件

HESI 离子源, 正、负离子监测模式; 裂解电压 3.80 kV; 辅助气流量 $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 离子传输管温度 $320 \text{ }^\circ\text{C}$; 辅助气温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$; 扫描模式 Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500; 质量扫描范围 m/z 120 ~ 1200。MS/MS 模式时, 正负离子模式下的碰撞能均为 20、40 eV, 以亮氨酸脑啡肽为内标校正质量精度。

3 结果与分析

取“2.1”项下身痛逐瘀汤供试品溶液及混合对照品溶液, 按照“2.2”和“2.3”项下条件进样分析, 分别得到正、负离子模式下总离子流图 (TIC), 见图 1。根据一级质谱提供的精确分子质量, 利用 Xcalibur 2.1 工作站计算未知化合物元素组成和分子式 [误差范围 $(5 \pm 1.0) \times 10^{-11}$], 利用色谱峰的保留时间、准分子离子峰及特征 MS/MS 碎片离子峰信息, 结合对照品质谱信息、相关文献数据及电子数据库 (PubMed、CNKI、Scifinder、OTCML、TCMP) 等, 分析相关化合物的裂解规律和分子结构。结果从身痛逐瘀汤基准样品中鉴定出 151 个化合物, 包括黄酮及其苷类 52 个、三萜皂苷类 25 个、苯酞类 19 个、含氮类 20 个、有机酸类 11 个、香豆素类 8 个、环烯醚萜类 5 个及其他类 11 个, 并对每个化合物的保留时间、分子式、化合物名称、高分辨质谱母离子及差值、碎片离子信息、药材来源等信息数据进行了归属, 结果见表 1。

3.1 黄酮类

黄酮类化合物是身痛逐瘀汤中一类主要成分, 该类化合物主要来自红花、秦艽、甘草、醋五灵脂等。黄酮苷类化合物通常在负离子模式下信号较强, 在高能量碰撞诱导电压下首先脱去糖基, 二级质谱可观察到相对丰度较高的黄酮苷元信号。黄酮苷元一般具有相同的母核, 母核 A 环的 C-7 和 C-5 位, B 环 C-4' 位常有羟基、甲基、甲氧基、异戊烯基、糖苷等不同取代基, A 环较稳定, B 环和 C 环连接的取代基易断裂产生中性分子碎片, C 环在 1, 3 键和 1, 4 键易开裂发生 RAD 重排, 可根据丢失的中性分子碎片推断母核取代基的类型。

红花中的黄酮苷主要为查耳酮类, 在正离子模式下可观察到 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 质谱信号。峰 27 在正离子模式下得到 m/z 613.1758 $[\text{M} +$

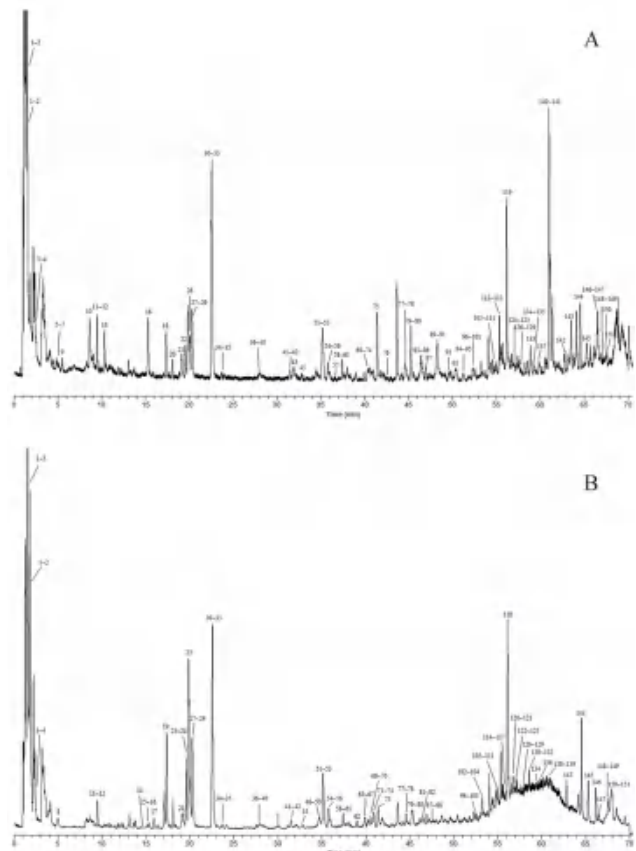


图 1 身痛逐瘀汤的 UPLC-Q-Exactive MS 正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogras of UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS of Shentong Zhuyu decoction in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

$\text{H}]^+$, 利用软件 Xcalibur 2.1 分析其元素组成为 $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$, 二级质谱中可观察到丢失葡萄糖生成碎片离子 m/z 451.1232 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ 、289.0707 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ 、433.1127 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^+$ 、271.0602 $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$; 脱去葡萄糖基的查耳酮苷元易发生侧链断裂重排形成稳定的环状结构; 在高能量碰撞诱导电压下, 苷元结构中的 α 、 β 不饱和酮发生裂解重排得到碎片离子 m/z 147.0441 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 - \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4]^+$ 、169.0131 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 - \text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^+$ 、121.0648 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 - \text{C}_7\text{H}_4\text{O}_5]^+$, 根据相关文献报道^[5]及对照品比对, 鉴定该化合物为羟基红花黄色素 A, 其可能的裂解规律见图 2。

甘草中的黄酮苷类化合物大多为甘草素的衍生物, 二级质谱中通常可观察到 m/z 255、135 的碎片离子。峰 31 其准分子离子峰为 m/z 417.1190 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 其元素组成为 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 二级质谱主要特征碎片离子为 255.0661 $[\text{M} - \text{H} - \text{Glc}]^-$ 、135.0077 $[\text{M} - \text{H} - \text{Glc} - \text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^-$ 、119.0492 $[\text{M} - \text{H} - \text{Glc} - \text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3]^-$, 判断结构中存在 1 分子葡萄糖取代基, 苷元部分

表 1 身痛逐瘀汤中化合物的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 定性分析结果

Tab 1 Qualitative analysis of chemical constituents in Shentong Zhuyu decoction by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

No.	t_R / min	质荷比 (m/z)		误差 / ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
		[M+H]	[M-H]					
1	1.25	130.0499	—	-0.15	C ₅ H ₇ NO ₃	130.0450, 84.0449	焦谷氨酸	All
2	1.31	175.1189	—	-0.41	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	158.0924, 116.0708, 70.0658	精氨酸	All
3	2.24	136.0617	—	-0.82	C ₅ H ₅ N ₃	118.9427, 90.9481, 55.9351	腺嘌呤	DL
4	2.35	124.0393	—	-0.04	C ₆ H ₅ NO ₂	112.0393, 96.0448, 80.0500, 53.0392	烟酸	TR
5	4.15	499.1670	—	2.49	C ₁₉ H ₃₂ O ₁₅	432.2724, 191.0554, 173.0444, 161.9355, 126.0438, 87.9017	3-[[6- <i>O</i> - (<i>D</i> -galactopyranosyl)- β - <i>D</i> -galactopyranosyl]-oxy]-1, 2-propanediyl diacetate	HH
6	4.48	132.1020	—	1.02	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113.9640, 90.9486, 86.0969, 69.0706	异亮氨酸*	All
7	4.79	132.1018	—	-0.42	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113.9639, 90.9481, 86.0969, 69.0705	亮氨酸	All
8	4.99	—	243.0619	3.12	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	200.0555, 152.0342, 110.0234	尿苷	DL
9 [*]	5.60	182.0811	—	-0.38	C ₉ H ₁₁ NO ₃	165.0545, 147.0440, 136.0756, 131.9742, 123.0441	<i>L</i> -酪氨酸	All
10	8.68	268.1037	—	-2.13	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	136.0617, 119.0441, 110.0100	腺苷*	HH, DL, TR
11	9.49	284.0982	—	-2.69	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	152.0566	鸟苷*	HH, DL, TR
12	9.61	137.0457	—	-0.49	C ₅ H ₄ N ₄ O	128.9506, 119.0355, 114.9711, 110.0351, 94.0405	次黄嘌呤	DL
13	10.41	166.0862	—	-0.45	C ₆ H ₁₁ NO ₂	131.0491, 120.0808, 103.0546, 77.0391	<i>L</i> -苯丙氨酸	All
14	14.54	—	169.0132	0.18	C ₇ H ₆ O ₃	140.9500, 125.0231, 97.9591, 81.0331, 65.0016	没食子酸	HH, QH
15	15.23	—	353.0879	3.35	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0552, 179.0340, 173.0447, 161.0233, 135.0436	新绿原酸*	HH, QH
16	15.34	205.0976	—	2.13	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	188.0706, 159.0917, 132.0809, 118.0651	<i>L</i> -色氨酸*	All
17	15.50	—	137.0232	-0.73	C ₇ H ₆ O ₃	137.0232, 109.0281, 93.0332, 65.0382	对羟基苯甲酸	TR
18	17.27	179.0701	—	-0.90	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	161.0596, 151.0753, 137.0597, 109.0650, 95.0859, 81.0704	阿魏醛	DG, CX
19	17.54	—	375.1293	1.83	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	213.0762, 195.0653, 169.0859	马钱苷酸*	QJ
20	18.90	217.0971	—	-0.16	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	171.0916, 144.0807	2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H-pyrido [3, 4-b]indole-3-carboxylic acid	HH
21	19.06	803.1873	—	-0.50	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₃	641.1331, 479.0819, 303.0495	2- (3, 4-dihydroxyphenyl) -3-[[2- <i>O</i> - (β - <i>D</i> -erythro-hexopyranosyl) - β - <i>D</i> -glycero-hexopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl- β - <i>D</i> -threo-hexopyranosyliduronic acid	HH
22	19.14	289.0716	—	3.20	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	271.0612, 245.0815, 179.0338, 165.0178, 151.0389, 109.0281	圣草酚	QH
23 [*]	19.23	—	353.0879	3.32	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0552, 173.0443, 179.0338, 161.0233, 135.5607	绿原酸*	QH, HH, CX, DG
24 [*]	19.61	—	456.1488	-2.65	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	323.0984, 263.0767, 179.0552, 119.0336, 89.0229, 71.0124, 59.0124	<i>L</i> -苦杏仁苷*	TR
25	19.92	—	456.1502	0.36	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	323.0982, 263.0770, 179.0550, 119.0337, 89.0229, 71.0124, 59.0124	<i>D</i> -苦杏仁苷	TR
26	20.09	375.1301	—	4.18	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	213.0757, 195.0652, 177.0545, 143.0339, 85.0287	獐芽菜苦苷*	QJ
27	20.23	613.1758	—	2.49	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	451.1232, 433.1127, 289.0707, 271.0602, 169.0131, 121.0648, 147.0441	羟基红花黄色素 A*	HH
28	20.37	433.1129	—	-0.17	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	415.1021, 397.0916, 367.0810, 313.0671	牡荆素*	QJ
29	20.41	—	353.0878	3.15	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0551, 179.0340, 173.0445, 155.0338, 135.0439	隐绿原酸*	QH, HH, CX, DG
30	22.52	—	195.0651	-0.69	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177.0545, 149.0596, 131.0491, 121.0649, 93.0703, 71.0135	阿魏酸*	QH, QJ, CX, DG
31	22.53	—	417.1190	2.43	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	255.0661, 135.0077, 119.0492	甘草苷*	GC

续表 1

No.	t_R / min	质荷比 (m/z)		误差/ ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
		[M+H]	[M-H]					
32	22.56	357.1176	—	— 1.03	$C_{16}H_{20}O_9$	195.0654, 177.0549, 149.0598, 121.0650, 85.0288	龙胆苦苷*	QJ
33	22.67	—	417.1191	2.64	$C_{21}H_{22}O_9$	255.0660, 223.0190, 154.0142, 135.0077, 119.0493	甘草苷或其同分异构体	GC
34	23.68	—	403.1245	2.61	$C_{17}H_{24}O_{11}$	357.1192, 195.0654, 161.0438, 143.0336, 125.0231, 101.0229, 59.0123	gentiascabaside A	QJ
35	23.72	359.1324	—	— 3.64	$C_{16}H_{22}O_9$	197.0809, 179.0701, 151.0754, 127.0391	獐芽菜苷*	QJ
36	27.40	163.0388	—	— 1.17	$C_9H_6O_3$	162.8379, 119.0488, 92.9942	伞形花内酯*	QH
37	27.92	595.1652	—	— 0.99	$C_{27}H_{30}O_{15}$	577.1554, 559.1445, 541.1344, 457.1130, 439.1029, 433.1110, 355.0808	皂草苷	QJ
38	27.93	—	367.1035	3.08	$C_{17}H_{20}O_9$	193.0494, 191.0552, 173.0444, 155.0331	5-O-阿魏酰奎宁酸	QH
39	27.99	—	529.3532	1.48	$C_{27}H_{30}O_{15}$	577.1554, 559.1445, 541.1344, 457.1130, 427.1015, 379.0802, 325.0713	皂草苷同分异构体	QJ
40	28.09	—	515.1195	2.15	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.0879, 335.0775, 191.0553, 179.0340, 173.0445, 135.0435	异绿原酸 A*	QH, HH, CX, DG
41	31.49	—	625.1413	2.13	$C_{27}H_{30}O_{17}$	463.0880, 301.0345	6-羟基山柰酚-3-, 6-二-O-葡萄糖苷	HH
42	31.53	773.2130	—	2.17	$C_{33}H_{41}O_{21}$	627.1549, 465.1026, 303.0497	cyandin-3-O- β -(2"-E-caffeoylglucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- β -galactopyranoside	HH
43	31.81	—	579.1724	2.74	$C_{27}H_{32}O_{14}$	417.1159, 323.0997, 255.0660, 179.0550, 153.0185, 119.0355	甘草素-7-, 4'-二葡萄糖苷	GC
44	32.69	—	563.1413	2.76	$C_{26}H_{28}O_{14}$	503.1173, 437.1087, 443.0981, 353.0672, 211.8878	异夏佛塔苷或其同分异构体	GC
45	33.48	223.060	—	1.01	$C_{11}H_{10}O_5$	208.0364, 190.0261, 177.9563, 165.0546, 159.9691, 141.9587, 93.0703	异嗉皮啶	QH
46	34.40	—	417.1196	3.74	$C_{21}H_{22}O_9$	297.0774, 269.0014, 255.0659, 135.0074, 119.0486	异甘草苷	GC
47	34.71	—	463.0884	2.76	$C_{21}H_{20}O_{12}$	301.0356	异槲皮苷*	HH, QJ, XF, CWLZ
48	34.73	—	463.0880	1.90	$C_{21}H_{20}O_{12}$	301.0347	异槲皮苷同分异构体	HH, QJ, XF, CWLZ
49*	34.74	303.0497	—	— 0.82	$C_{15}H_{10}O_7$	285.0391, 257.0438, 229.0498, 201.0546, 153.0181	槲皮素*	HH, QJ, XF, CWLZ
50	34.79	209.1172	—	— 0.15	$C_{12}H_{16}O_3$	191.1066, 163.1116, 165.1269, 121.1013, 93.0703, 84.9603	洋川芎内酯 G	CX, DG
51	35.09	257.0808	—	— 0.25	$C_{15}H_{12}O_4$	257.0808, 239.0700, 211.0753, 163.0384, 137.0232, 88.5050	甘草素*	GC
52	35.11	—	417.1193	3.14	$C_{21}H_{22}O_9$	255.0661, 153.0185, 135.0072, 119.0495	新甘草苷	GC
53	35.28	—	579.1747	6.75	$C_{27}H_{32}O_{14}$	459.1286, 417.1192, 297.0774, 269.0821, 255.0661, 162.8380, 119.0495	kaempferitrin	GC
54	35.42	595.1665	—	1.27	$C_{27}H_{30}O_{15}$	433.1130, 415.1017, 397.0921, 301.0710	牡荆素葡萄糖苷	HH, QJ
55	35.76	—	549.1617	2.68	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.1617, 417.1202, 297.0765, 255.06620, 135.0083	甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷	GC
56	35.88	257.0806	—	— 1.03	$C_{15}H_{12}O_4$	257.0806, 239.0707, 211.0756, 163.0382, 137.0232, 69.7592	甘草素或其同分异构体	GC
57	36.66	611.1609	—	0.37	$C_{27}H_{30}O_{16}$	465.1057, 303.0498	芦丁*	HH, QJ, CWLZ
58	37.37	—	577.1566	2.49	$C_{27}H_{30}O_{14}$	577.1566, 559.1435, 457.1140, 383.0775	异佛莱心苷	GC
59	37.47	303.0865	—	0.48	$C_{16}H_{15}O_6$	280.8669, 263.1277, 226.8931, 193.0495, 165.0548, 111.0444	橙皮素	HH
60	37.62	409.0000	—	0.12	$C_{20}H_{24}O_9$	247.1328, 229.1222, 187.1116, 159.0804, 85.0655	紫花前胡苷	QH

续表 1

No.	t_R / min	质荷比 (m/z)		误差 / ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
		[M+H]	[M-H]					
61	37.70	247.0963	—	-0.91	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	229.0860, 175.0388, 159.0803, 139.0389, 121.8414, 95.0494	异紫花前胡内酯	QH
62	38.46	—	239.0920	2.64	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	195.1018, 183.9123, 154.0260, 101.0594	洋川芎内酯 S	CX, DG
63	39.92	595.1665	—	1.27	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	449.1077, 415.1017, 301.0710, 287.0546	山柰酚 -3- <i>O</i> -芸香糖苷	HH, QJ, CWLZ
64	39.94	595.1497	—	-0.21	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	449.1077, 287.0546, 270.3978, 147.0649, 85.0289	红花黄色素 A	HH
65	39.94	449.1077	—	-0.40	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	287.0546	木犀草苷	HH, QJ, CWLZ
66	39.94	—	593.1514	2.18	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	575.1424, 548.4203, 503.1187, 405.1044, 285.0400, 135.0199	山柰素或其同分异构体	GC
67	39.97	287.0546	—	-1.41	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	241.0492, 213.0546, 153.0181	山柰酚*	HH, QJ, XF, CWLZ
68	40.271045.2815	—	—	-0.32	C ₄₈ H ₅₂ O ₂₆	883.2286, 721.1758, 601.1225, 313.0703	脱水红花黄色素 B	HH
69	40.40	207.1016	457.3682	-0.10	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	189.0908, 179.1072, 161.0961, 133.1010	洋川芎内酯 F	CX, DG
70	40.56	625.1760	—	-0.45	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	317.0654, 85.0290, 147.0651	异鼠李素 -3- <i>O</i> -新橙皮苷	HH
71	40.85	449.1077	—	-0.29	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	404.0920, 287.0546, 145.0494, 85.0290	槲皮苷*	GC, HH, CX, XF
72	40.86	449.1078	—	-0.11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	287.0547, 303.0451	木犀草苷 -7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	HH, QJ, CWLZ
73	40.86	—	447.0934	2.60	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	285.0403	紫云英苷*	QJ
74	40.90	—	271.0612	3.91	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	151.0025, 115.6536	柚皮素*	QJ
75	41.83	—	459.1296	2.28	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	417.1186, 255.0659, 239.4200, 211.1162, 135.0074, 119.0480	6'- <i>O</i> -乙酰基甘草苷	GC
76	42.59	207.1016	—	-0.10	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	189.0908, 179.1072, 161.0961, 133.1010, 125.9864, 143.9967, 84.9602, 71.0496	5-羟基正丁基苯酚	CX, DG
77	44.57	431.1332	—	-1.04	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	269.0803, 70.6837	芒柄花苷或其同分异构体	GC
78	44.66	—	549.1612	1.74	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	417.1186, 297.0772, 255.0659, 135.0074, 119.0489	芹糖甘草苷*	GC
79	45.33	—	613.1570	2.88	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₄	595.1471, 551.1562, 425.1104, 361.1080	1, 5-anhydro-1-[3-[2-carboxy-1-(4-hydroxyphenyl) ethyl]-1, 2, 4-trihydroxy-5-[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]-6-oxo-2, 4-cy-clohexadien-1-yl]hexitol	HH
80	45.37	—	417.1192	2.95	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	349.1983, 297.0759, 269.0815, 255.0659, 135.0076, 119.0494	新异甘草苷	GC
81	46.00	—	201.0184	0.92	C ₁₁ H ₆ O ₄	218.9256, 172.9366, 164.8352, 116.9470	佛手酚	QH
82	46.23	—	613.1572	-2.07	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₄	595.1467, 551.1560, 425.1083, 361.1084	1, 5-anhydro-1-[3-[2-carboxy-1-(4-hydroxyphenyl) ethyl]-1, 2, 4-trihydroxy-5-[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]-6-oxo-2, 4-cy-clohexadien-1-yl]hexitol or isomer	HH
83	46.32	207.1014	—	-0.63	C ₁₂ H ₁₅ O ₃	189.0912, 163.0752, 143.9968, 137.0596, 105.0700, 84.9602, 69.0340	异丁香酚乙酸酯	MY
84	46.54	353.2317	—	-1.59	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	335.2216, 317.2106, 299.2003, 289.2158, 271.2054, 255.2107, 191.1066, 147.1169	天师酸	NX, XF, TR
85	46.61	257.0803	—	-1.97	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.0803, 239.0699, 211.0744, 163.0381, 137.0232	甘草素或其同分异构体	GC
86	46.63	287.0913	—	-0.52	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	269.2262, 245.0807, 193.0500, 135.1167, 121.0286, 95.0859	甘草查耳酮 B	GC

续表 1

No.	t_R / min	质荷比 (m/z)		误差 / ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
		[M+H]	[M-H]					
87	47.24	415.2144	—	6.85	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	351.1980, 287.2003, 269.1897, 219.1377, 155.1065, 135.1166	异布苷配基	HH
88	47.99	—	221.0813	2.10	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	203.0721, 177.0911	洋川芎内酯 D	CX, DG
89	48.17	301.0706	—	-0.35	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	254.9521, 179.1067, 171.9962, 161.1324	香叶木素或其同分异构体	QH
90	48.18	163.0389	—	-0.92	C ₉ H ₆ O ₃	149.0604, 135.0442	7-羟基香豆素*	QH
91	48.57	285.0755	—	-0.98	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	267.2105, 39.1794, 227.1793, 199.1477, 163.0392, 145.1014, 133.1013	毛蕊异黄酮	GC
92	49.87	189.0909	—	-0.56	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	189.0909, 171.0802, 153.0699, 143.0856, 128.0621, 115.0543, 91.0547, 55.0185	<i>E</i> -丁烯基苯酚	CX, DG
93	50.42	584.2753	—	-1.36	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	438.2384, 318.1812	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumaroylsper- midine	HH
94	51.21584.27640	—	—	1.52	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	438.2387, 318.1798	<i>N</i> ¹ (<i>E</i>)- <i>N</i> ⁵ -(<i>Z</i>)- <i>N</i> ¹⁰ -(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -cou- maroylspermidine	HH
95	51.86	584.2752	—	-0.62	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	438.2385, 318.1811	<i>N</i> ¹ (<i>Z</i>)- <i>N</i> ⁵ -(<i>Z</i>)- <i>N</i> ¹⁰ -(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -cou- maroylspermidine	HH
96	52.28	223.0970	—	2.44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	205.0861, 182.9867, 179.1067, 154.9915, 116.9944, 92.9943	洋川芎内酯 I*	CX, DG
97	52.32	—	821.3983	3.46	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	645.3555, 351.0568, 193.0345	甘草酸*	GC
98	52.39	245.1169	—	-1.19	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	227.1064, 217.1219, 199.1117, 189.1271, 65.9332	乌药内酯	MY
99	52.48	—	821.39752	2.57	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	809.4312, 647.3786, 453.3354, 141.0181, [M-2NH ₃] • 2NH ₃ 435.3260, 357.2414, 217.1584	甘草酸二铵	GC
100	52.66	584.2753	—	-1.34	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	438.2384, 318.1806	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -(<i>Z</i>)-tri- <i>p</i> -coumaroylsper- midine	HH
101	52.92	—	269.0818	3.44	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	228.9889, 185.0024, 175.0391, 149.0593, 133.0276, 108.0203	欧前胡素*	QH
102	53.31	295.2268	—	-0.07	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	277.2160, 203.1278, 121.1014, 95.0859	(9 <i>Z</i> , 11 <i>E</i>)-13-oxooctadeca-9, 11-di- enoic acid	HH
103	53.32	469.3313	—	0.07	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.3203, 423.3250, 405.3153, 217.1950, 175.1481, 95.0861	光甘草内酯	GC
104	53.89	—	297.1131	3.25	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	253.1230, 189.0548, 165.0546, 107.0486	阿魏酸苯乙醇酯	QH
105	54.61	301.0706	—	-0.15	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	254.1983, 198.1361, 179.1067, 161.1324, 121.1013	金圣草黄素	GC, HH, CX
106	54.78	—	953.4763	2.37	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₉	834.4639, 793.4410, 497.1153, 435.1134, 351.0574, 279.7068	achyranthoside E dimethyl ester	NX
107	54.91	189.0910	—	-0.19	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	189.0910, 171.0803, 153.0698, 143.0855, 128.0621, 115.0543, 91.0548, 55.4534	<i>Z</i> -丁烯基苯酚	CX, DG
108	54.92	—	1117.5087	2.26	C ₅₃ H ₈₂ O ₂₅	997.5023, 955.4917, 793.4397, 731.4385, 631.3842, 613.3750, 455.3455, 161.0080	achyranthoside D	NX
109	54.94	439.3568	—	-0.56	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	421.3449, 393.3540, 249.1848, 221.1895, 217.1951, 203.1795, 191.1794, 149.1325, 123.1170, 95.0860	α -香树脂酮	MY
110	54.97	369.1330	—	-0.72	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	309.1334, 231.1012, 193.0495, 165.0546	甘草宁 N	GC
111	54.98	191.1066	—	0.56	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	173.0963, 163.1118, 149.0233, 145.1012, 135.0440, 107.0858	<i>E</i> -藜本内酯*	CX, DG
112	55.35	819.3811	—	1.57	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	771.2501, 351.0579, 323.4473, 294.7391, 231.5860, 193.0343, 113.0232	licoricesaponi E ₂	GC
113	55.44469.33095	—	—	-0.61	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.3200, 405.3142, 217.1584, 175.1485, 95.0857	光甘草内酯或其同分异构体	GC
114	55.45	—	879.4028	2.21	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	784.2911, 351.0569, 333.0468, 193.0344	uralsaponins M	GC
115	55.46	—	1011.4820	2.43	C ₅₀ H ₇₆ O ₂₁	993.4647, 689.3865, 497.1145, 435.1140, 339.0931	licoricesaponi D ₃	GC

续表 1

No.	t_R / min	质荷比 (m/z)		误差/ ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
		[M+H]	[M-H]					
116	55.62	—	821.3973	2.35	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	645.3687, 561.0743, 351.0567	甘草皂苷 K ₂	GC
117	55.70	—	821.3973	2.35	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	351.0567, 193.0341	3-正丁烯基-4, 5-二羟基苯酚	CX, DG
118	56.00	—	793.4390	2.62	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	631.3873, 556.6122, 425.8100, 222.1531, 162.6241, 113.0230	竹节参皂苷 IVa*	NX
119	56.11	471.3465	—	-0.84	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3377, 435.2830, 425.3009, 407.3314, 317.2108, 235.1693, 175.1481, 135.1173	甘草次酸*	GC
120	56.23	—	821.3974	2.47	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	645.3522, 469.3332, 351.0578, 193.0343	甘草酸*	GC
121	56.35	—	925.4458	3.29	C ₄₆ H ₇₀ O ₁₉	793.4390, 631.3849, 479.8257, 307.0316, 130.9973	achyranthoside E	NX
122	56.65	—	955.4918	2.15	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	497.1151, 435.1131, 339.0934	人参皂苷 Ro*	GC, NX
123	56.68	—	807.4171	1.16	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	627.3528, 477.2483, 351.0569, 259.1006, 193.0352	licoricesaponi B ₂	GC
124	56.71	469.3313	—	0.07	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.32028, 423.32596, 405.31680	光甘草内酯或其同分异构体	GC
125	56.82	369.1330	—	-0.64	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	313.0703, 301.0699, 211.0412, 189.0912, 161.1316	甘草瑞酮	GC
126	57.20	—	821.3973	2.35	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	351.0568, 193.0343	甘草酸二铵	GC
127	57.23	469.3311	—	-0.29	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.3206, 423.3260, 405.3159	光甘草内酯或其同分异构体	GC
128	57.38	—	271.0964	-0.19	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	243.1011, 161.0597, 137.0597, 123.0442	美迪紫檀素	QH
129	57.83	—	805.4028	0.96	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	645.3665, 499.3714, 351.0569, 193.0341	uralsaponins W	GC
130	58.52	—	955.4554	2.22	C ₄₇ H ₇₂ O ₂₀	835.4496, 793.4388, 533.7169, 499.0939, 161.0080	achyranthoside G	NX
131	58.91	193.1223	—	-0.03	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	175.1114, 147.1166, 137.0597, 93.0700, 81.0704, 55.0549	洋川芎内酯 A	CX, DG
132	58.94	219.1741	—	-1.10	C ₁₅ H ₂₂ O	201.1638, 177.1635, 163.1118, 159.1168, 137.1324, 121.1016, 107.0860, 95.08587, 81.0705, 69.0704	吉马酮	MY, XF
133	59.10	271.0954	—	-4.12	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	229.0494, 215.0338, 203.0340, 159.0440, 147.1169, 131.0495, 105.0702	异欧前胡素*	QH
134	59.31	—	353.1025	1.40	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	332.9768, 312.9893, 292.9854, 266.9861, 248.9955, 219.2078	甘草异黄烷酮	GC
135	59.34	191.1065	—	-0.87	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	173.0961, 163.1120, 149.0233, 145.1011, 105.0700	3-正丁基苯酚	CX, DG
136	59.88	—	381.1343	2.66	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	340.9848, 300.9880, 228.9895, 208.9840, 166.6961	甘草利酮	GC
137	59.91	355.1535	—	-1.41	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	337.1074, 203.1069, 175.0387, 159.1168, 147.0440, 119.0858, 91.0581	羌活醇*	QH
138	60.52	—	793.4022	2.17	C ₄₁ H ₆₂ O ₁₅	673.3962, 631.3852, 455.2642, 337.0408, 282.4061, 161.0081, 117.0180	28-deglucosyl achyranthoside C	NX
139	60.70	—	791.3867	2.44	C ₄₁ H ₆₀ O ₁₅	631.3857, 613.3774, 455.3516, 291.0364, 133.0129, 116.9815	achyranthoside IV	NX
140	61.00	195.1016	—	0.35	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	177.1273, 121.0285, 95.0496	尼泊金异丁酯	TR, MY, XF
141	61.23	191.1066	—	-0.29	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	173.0960, 163.1115, 149.0233, 145.1009, 135.0439, 105.0702	Z-藜本内酯*	CX, DG
142	62.86	219.1742	—	-0.60	C ₁₅ H ₂₂ O	201.1636, 177.1639, 163.1478, 135.1167, 123.1169, 109.1014	α -香附酮*	XF
143	63.31	—	423.1769	-1.74	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	395.2430, 339.2000, 229.0864, 193.0861	甘草宁 E	GC
144	64.60	471.3463	—	-1.24	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3364, 435.3253, 235.1339, 175.1487, 135.1168	甘草次酸或其同分异构体	GC
145	65.41	219.1742	—	-0.47	C ₁₅ H ₂₂ O	201.1636, 177.1271, 163.1119, 109.1014	诺卡酮	MY, XF
146	66.43	381.2066	—	1.48	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	335.2003, 191.1066, 173.0962, 145.1010, 91.0544	riligustilide	CX, DG

续表 1

No.	t_R / min	质荷比 (m/z) [M+H] [M-H]	误差/ ($\times 10^{-6}$)	分子式	二级质谱 (m/z)	化合物名称	来源
147	66.62	381.2055	-	$C_{24}H_{28}O_4$	335.2005, 191.1066, 173.0963, 145.1012, 91.0543	欧当归内酯 A	CX, DG
148	67.02	381.2055	-	$C_{24}H_{28}O_4$	335.2005, 191.1066, 173.0955, 145.1012, 91.0543	Z-6, 8', 7, 3'-二聚体蒿本内酯	CX, DG
149	67.05	381.2077	-	$C_{24}H_{28}O_4$	335.2005, 191.1065, 173.0955, 145.1011, 91.0543	Z, Z'-6, 6', 7, 3'a-二聚体蒿本内酯	CX, DG
150	67.48	381.2064	-	$C_{24}H_{28}O_4$	191.1066, 177.5034, 149.0591, 149.0591, 135.0444, 113.0000	3', 6, 8', 3a-二聚体蒿本内酯	CX, DG
151	67.64	381.2051	-	$C_{24}H_{28}O_4$	191.1066, 184.2657, 149.0591, 113.0001	tokinolide B	CX, DG

注：^{*}通过对对照品对比确认的成分，HH. 红花；TR. 桃仁；CX. 川芎；DG. 当归；QH. 羌活；QJ. 秦艽；MY. 没药；XF. 香附；CWLZ. 醋五灵脂；NX. 牛膝；GC. 甘草；DL. 地龙。

Note: ^{*}Refers to the compound compared with the reference substance, HH. Carthami Flos; TR. Persicae Semen; CX. Chuanxiong Rhizoma; DG. Angelicae Sinensis Radix; QH. Notopterygii Rhizoma et Radix; QJ. Gentiana Macrophyllae Radix; MY. Myrrha; XF. Cyperi Rhizoma; CWLZ. vinegar-processed Trogopterori Faeces; NX. Achyranthis Bidentatae Radix; GC. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; DL. Pheretima.

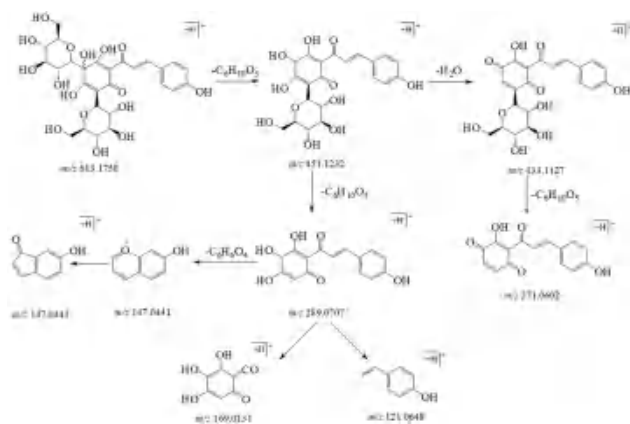


图 2 羟基红花黄色素 A 的裂解途径推测

Fig 2 Fragmentation process of hydroxysafflor yellow A

的裂解规律与甘草素质谱裂解规律一致，与对照品甘草苷的保留时间相同，因此鉴定 31 号峰化合物为甘草苷；峰 33、46、52、80 在负离子模式下均能观察到质荷比为 m/z 417 准分子离子峰，二级碎片离子有 m/z 255、135、119，其裂解规律和分子信息与甘草苷高度相似，结合文献^[6]，推测峰 33、46、52、80 分别为甘草苷或其同分异构体、异甘草苷、新甘草苷、新异甘草苷。峰 43、峰 53 母核离子分别为 m/z 579.1724 [M-H]⁻、579.1747 [M-H]⁻，其分子离子比甘草苷多出 1 个 $C_6H_{10}O_5$ ，检索文献报道确定上述化合物分别为甘草素-7, 4'-二葡萄糖苷、Kaempferitrin^[7]。类似地，峰 55、峰 78 分子式为 $C_{26}H_{30}O_{13}$ ，[M-H]⁻ 连续丢失芹糖基和葡萄糖基得到相对丰度较高的碎片离子 m/z 417 [M-H-C₅H₈O₄]⁻、255 [M-H-C₅H₈O₄-C₆H₁₀O₅]⁻，故推断峰 55 为甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷，峰 78 为芹糖甘草苷。

3.2 三萜皂苷类

三萜皂苷类化合物主要来源于牛膝和甘草，

此类化合物 C_3 位和 C_{28} 位均有取代的双糖链苷，葡萄糖基的端基碳与苷元 C_{28} 位的羧基成酯， C_{28} 位的酯键比 C_3 位的醚键更易断裂，故将 C_{28} 位的糖链称为 α 链， C_3 位糖链称为 β 链。在质谱高能量的碰撞下，容易脱去 C_{28} 糖基部分，五碳糖优先于六碳糖丢失，苷元部分容易失去 AcOH、H₂O、CO₂、CH₂O、HCOOH 等中性基团。

牛膝中的三萜皂苷主要为齐墩果酸型，在负离子模式下有更高的响应值。峰 108 在负离子低能量质谱中可以观察到 m/z 1117.5087 [M-H]⁻，二级质谱可观察到碎片离子 m/z 997.5023 [M-H-COOH-CH₂OH-CO₂]⁻、955.4917 [M-H-C₅H₇O₆]⁻、793.4397 [M-H-C₅H₇O₆-Glu]⁻、631.3842 [M-H-C₅H₇O₆-2Glu]⁻，高能量下可观察到齐墩果酸母核的特征性碎片离子 455.3455 [M-H-C₅H₇O₆-2Glu-Glu A]⁻，故推测峰 108 为 achyranthoside D，其可能的裂解规律见图 3。峰 106、121、130、138、139 有类似的裂解规律，结合相关文献报道^[8]，分别推测为 achyranthoside E dimethyl ester、achyranthoside E、achyranthoside G、28-deglucosyl achyranthoside C、achyranthoside IV。

甘草中的三萜皂苷均为甘草酸的衍生物，峰 120 在负离子模式下，观察到准分子离子峰 m/z 821.3974 [M-H]⁻，二级质谱中母离子首先失去 C_3 位连接的葡萄糖醛酸，得到 m/z 645.3522 [M-H-Glc A]⁻、469.3332 [M-H-2Glc A]⁻ 和 351.0578 [M-H-470 Da]⁻ 等碎片离子，与甘草酸对照品保留时间一致，故确定峰 120 为甘草酸^[6]。峰 119 的分子离子峰为 m/z 471.3465 [M + H]⁺，分别丢失 H₂O、CO 得到碎片离子 m/z 453.3377 [M + H-H₂O]⁺、435.2830 [M + H-2H₂O]⁺、425.3009 [M + H-H₂O-CO]⁺、407.3314 [M + H-H₂O-2CO]⁺，由于结构中

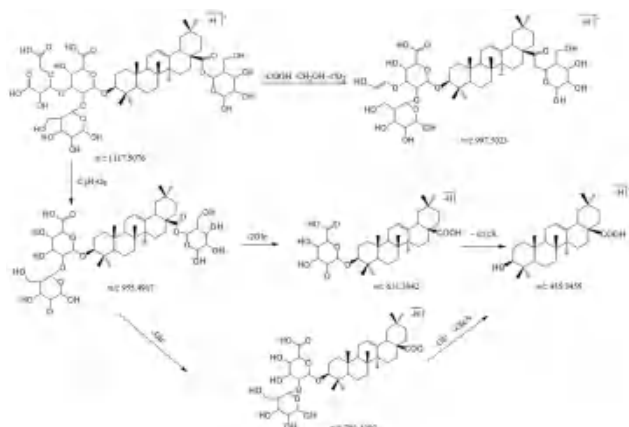


图 3 Achyranthoside D 的裂解途径推测
Fig 3 Fragmentation process of achyranthoside D

存在烯丙键和 C₁₁ 羰基, C₁ 具有可以转移的 γ H 原子, 容易发生 RAD 裂解和麦氏重排, 得到碎片离子 m/z 317.2108 [M + H-C₉H₁₄O₂]⁺、235.1693 [M + H-C₉H₁₄O₂-C₃H₆O]⁻, 与甘草酸苷元部分有相似的裂解规律, 推测峰 119 为甘草次酸^[6]。

3.3 苯酞类

苯酞类化学成分主要来源于川芎和当归, 以正丁基苯酞为母核, 侧链和苯环上有羟基取代, 通常在一级质谱中可检测出特征性母核离子 m/z 191, 主要在正离子模式下检出, 二级质谱中产生信号较强的 [M-C₂H₅]⁺、[M-C₃H₆]⁺、[M-C₄H₉]⁺ 碎片离子峰^[9]。正离子模式下, 峰 111 准分子离子峰为 m/z 191.1066 [M + H]⁺, 二级质谱中可观察到连续丢失 CO、H₂O 后产生的碎片离子 m/z 173.0963 [M + H-H₂O]⁺、145.1012 [M + H-H₂O-CO]⁺、163.1118 [M + H-CO]⁺, 以及丢失不饱和侧链的碎片离子 m/z 135.0440 [M + H-C₄H₈]⁺、107.0858 [M + H-C₄H₈-CO]⁺, 结合文献报道, 推测峰 111 为 *E*-藁本内酯, 裂解规律见图 4。该类化合物的同分异构体较多, 根据二级质谱特征性碎片离子, 通过 OTCML 数据库以及相关文献参考, 鉴定出同系列化合物洋川芎内酯 G、S、F、D、I、A^[9-10]。

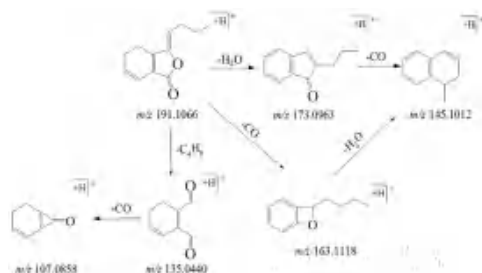


图 4 藁本内酯的裂解途径推测
Fig 4 Fragmentation process of ligustilide

3.4 香豆素类

香豆素类化学成分主要来源于羌活, 主要裂解途径为母核侧链甲氧基键、苯甲醚键的断裂, C-5 位或 C-8 位取代基的丢失; 在正离子模式下连续丢失羰基形成 [M + H-nCO]⁺ 特征性离子, 内酯环在高碰撞能量下容易失去 CO₂ 中性分子进而发生麦氏重排。呋喃型香豆素有 3 种碎裂形式失去羰基 (m/z 28), 由环上的羰基 (5 位或 8 位羰基)、酯键上羰基或者呋喃环上的碳氧碎裂^[11]。峰 137 在正离子模式下产生 m/z 355.1535 [M + H]⁺ 准分子离子峰, C-5 侧链取代基丢失生成 m/z 203.1069 [M + H-C₁₀H₁₆O]⁺ 母核离子, 母核离子连续丢失羰基产生 m/z 175.0387 [M + H-CO]⁺、147.0440 [M + H-2CO]⁺、119.0858 [M + H-3CO]⁺、91.0581 [M + H-4CO]⁺ 等碎片离子, 其中由母核内酯环开裂失去一分子 CO₂ 经麦氏重排得到碎片离子 m/z 159.1168, 推测该化合物为羌活醇, 具体裂解途径见图 5。二氢呋喃型香豆素由于取代基通常在 C-2' 和 C-3', 质谱裂解规律主要有呋喃环上的碳氧碎裂, 例如峰 60 在正离子模式下断裂 C-2' 侧链连接的糖苷键得到 m/z 247.1328 [M + H-C₆H₁₀O₅]⁺, 进一步丢失 C₃H₈O 得到 m/z 187.1116 [M + H-C₉H₁₈O₆]⁺, 再丢失 CO 得到 m/z 159.0804 [M + H-C₉H₁₈O₆-CO]⁺ 碎片离子, 结合文献和对照品比对确定为紫花前胡苷^[12]。

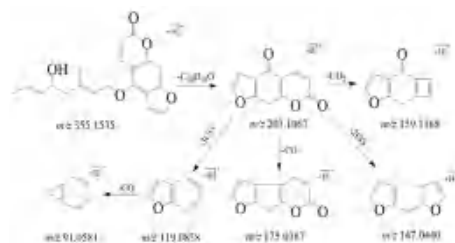


图 5 羌活醇的裂解途径推测
Fig 5 Fragmentation process of notopterol

3.5 其他类成分

身痛逐瘀汤除了黄酮类和皂苷类成分较多, 还存在少量核苷类、有机酸类、环烯醚萜类化合物。峰 23 在负离子模式下产生 m/z 353.0879 [M-H]⁻ 分子离子峰, 二级质谱有 2 种裂解途径, 失去 1 分子脱水咖啡酸, 得到基峰 m/z 191.0552 [M-H-C₉H₆O₃]⁻, 继续失去 1 分子 H₂O 产生碎片离子 m/z 173.0443 [M-H-C₉H₆O₃-H₂O]⁻, 碎片离子 m/z 179.0338 由准分子离子峰失去 1 分子脱水奎宁酸, 脱去 1 分子 CO₂ 和 H₂O 产生碎片离子 m/z 161.0233 [M-H-C₇H₁₀O₅-H₂O]⁻、135.5607 [M-H-C₇H₁₀O₅-CO₂]⁻, 故推测峰 23 为绿原酸^[12]。峰 19 在正负离子模式下, 分别显示 m/z 375.1293 [M-H]⁻ 和 399.1259 [M + Na]⁺ 的准分子离子峰, 确定分子式为 C₁₆H₂₄O₁₀, 二级质谱母核离

子失去葡萄糖基产生 m/z 213.0762 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、195.0653 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$ 碎片离子, 进一步失去 COOH 得到 m/z 169.0859 $[M-H-C_6H_{10}O_5-COOH]^-$, 与对照品马钱苷酸的保留时间和裂解碎片信息相同, 推测峰 19 为环烯醚萜类化合物马钱苷酸^[13]。

4 讨论

本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对液相流速、柱温、毛细管电压、碰撞能量等多个参数进行优化, 首次建立了身痛逐瘀汤基准样品化学成分的质谱分析方法, 根据各色谱峰的一级、二级碎片离子的质谱数据及相关数据库匹配和参考文献、对照品比对, 共鉴定出了 151 个化合物。首次较全面地分析身痛逐瘀汤的化学成分, 为深入研究其药理作用及药效物质基础, 更全面地开发应用该复方提供了科研依据。

研究表明, 身痛逐瘀汤基准样品的化学成分主要以黄酮类、三萜皂苷类为主, 多来源于君药红花, 佐使药牛膝和甘草。现代药理研究表明, 红花黄酮、牛膝皂苷、甘草皂苷均表现出良好的抗炎、镇痛活性, 红花黄色素能够抑制血小板活化因子 (PAF) 诱发的血小板聚集, 缓解毛细血管的通透性增加, 抑制 PAF 诱导的 5-羟色胺释放以及血小板内游离钙增加^[14]。牛膝总皂苷通过影响 PI3K/AKT、NF- κ B、Caspase 等信号通路的表达, 抑制促炎因子表达、软骨基质降解、软骨细胞凋亡、关节结构重构等, 产生减轻滑膜炎症和治疗膝骨关节炎的药理作用^[15]。甘草中的黄酮和皂苷类成分均具有抗炎抗氧化作用, 通过降低脂多糖诱导的巨噬细胞系 RAW264.7 细胞一氧化氮 (NO)、IL- β 及 TNF- α 的释放, 抑制磷脂酶 A2 酶活性及环氧合酶 -2 表达而降低花生四烯酸代谢途径 PGE₂ 的合成, 发挥抗炎镇痛作用^[16]。根据以上文献报道, 本研究解析的身痛逐瘀汤化学成分活性与其报道的药理作用具有良好的一致性。然而, UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对于易挥发性成分较难检测到丰度适应的碎片离子, 后续将采用气质联用技术对其挥发性成分进行系统表征。

参考文献

[1] 王清任. 医林改错 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 51-68.
[2] 朱志飞, 樊启猛, 刘有志, 等. 身痛逐瘀汤方证释义及

其现代研究进展 [J]. 中国中医信息杂志, 2020, 27 (8): 136-140.

- [3] 常有军, 邱恒, 马天洪, 等. 身痛逐瘀汤对大鼠变性腰椎间盘突出内 TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、MMP-3 的影响 [J]. 西部医学, 2017, 29 (8): 1046-1050.
[4] 董昌盛, 焦丽静, 王菊勇, 等. 身痛逐瘀汤对骨癌痛大鼠痛觉行为学的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11 (1): 24-28.
[5] 王松松, 马艳, 张毅, 等. UHPLC-MS/MS 快速鉴别红花中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (7): 1347-1354.
[6] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47 (12): 2061-2068.
[7] 段伟萍, 李缘媛, 郑云枫, 等. 基于 LC-MS/MS 法分析生、炙甘草中水溶性成分 [J]. 中成药, 2020, 42 (5): 1237-1243.
[8] 傅俊, 吴欢, 吴虹, 等. UPLC-QTOF/MS^E 联合 UNIFI 筛选平台快速分析牛膝中三萜皂苷类成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31: 1054-1061, 1090.
[9] 高昕, 孙文军, 岐琳, 等. 基于超高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱的川芎化学成分的快速分析 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33 (6): 711-715.
[10] Long ZL, Xian GH, Li ZL, et al. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide [J]. J Chromatogr A, 1998, 810: 71-79.
[11] 孙明谦, 卢建秋, 张宏桂, 等. 呋喃香豆素类化合物电喷雾质谱裂解途径 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (1): 82-85.
[12] 任晓蕾, 霍金海, 孙国东, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析防风中香豆素类化学成分 [J]. 中国药房, 2019, 30 (3): 349-354.
[13] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47 (18): 3175-3180.
[14] 倪力军, 赵雯雯, 马骏, 等. 基于腰痛宁胶囊的中药有效部位组方抗炎镇痛活性评价与筛选 [J]. 中草药, 2016, 47 (18): 3255-3262.
[15] 黄竞杰, 杨俊兴, 陈浩雄, 等. 牛膝总皂苷治疗膝骨关节炎的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (4): 592-595.
[16] Uchino K, Okamoto K, Sakai E, et al. Dual effects of liquiritigenin on the proliferation of bone cells: promotion of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast differentiation [J]. Phytother Res, 2015, 29 (11): 1714-1721.

(收稿日期: 2022-09-07; 修回日期: 2022-11-04)

基于补益脾肾研究独活寄生贴对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用

董立财¹, 王德龙¹, 赵义军¹, 林春盛¹, 王锐^{2*} (1. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 研究独活寄生贴对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用。**方法** 采用大鼠右后足部注射完全弗氏佐剂, 建立佐剂性关节炎模型。实验分为正常对照组、模型组、穴位贴组、阳性组, 在“脾俞”“肾俞”给予独活寄生贴。观察各组大鼠足肿胀程度; 记录大鼠体质量; 测定足关节炎指数评分; 苏木素-伊红染色检测大鼠踝关节病理形态变化; 利用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中 IL-1 β 、IL-10 的表达水平; 摘取大鼠脾脏、胸腺, 计算脾脏、胸腺指数。同时取小鼠, 在“脾俞”“肾俞”给予独活寄生贴进行热板致痛实验, 观察该穴位贴的镇痛作用。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠体质量自造模第 9 日起显著下降 ($P < 0.01$), 足肿胀度及关节指数评分显著升高 ($P < 0.01$), 踝关节形态功能受损, IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著下降 ($P < 0.01$), 胸腺、脾脏指数升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 阳性对照组和治疗组大鼠踝关节滑膜组织病理学改善明显, 自造模第 9 日起体质量升高 ($P < 0.05$), 足肿胀度、关节炎指数以及胸腺、脾脏指数降低 ($P < 0.05$), 血清炎症因子 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$), 抗炎因子 IL-10 水平显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 独活寄生贴可以降低大鼠的炎症反应, 改善机体功能, 从而发挥治疗佐剂性关节炎的作用。

关键词: 补益脾肾法; 独活寄生贴; 佐剂性关节炎

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1251-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.021

Effect of Duhuo Jisheng paste on rats with adjuvant arthritis based on invigorating the spleen and kidney

DONG Li-cai¹, WANG De-long¹, ZHAO Yi-jun¹, LIN Chun-sheng¹, WANG Rui^{2*} (1. *The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001*; 2. *Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of Duhuo Jisheng paste on rats with adjuvant arthritis. **Methods** Complete Freund's adjuvant (CFA) was injected into the right hind foot of rats to establish the adjuvant arthritis model. The experiment was divided into a normal control group, a model group, a acupoint paste group and a positive group. The spleen and the kidney acupoints were given Duhuo Jisheng paste. The degree of foot swelling was observed. The body mass of the rats was recorded. The foot arthritis index score was measured. Hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological changes of the ankle joint of the rats. The levels of IL-1 β and IL-10 in the serum were detected by ELISA. The spleen and thymus of the rats were removed and their index was calculated. At the same time, mice were given Duhuo Jisheng paste in spleen and kidney acupoints for hot plate pain test to observe the analgesic effect of the acupoint paste. **Results** Compared with the normal control group, the body mass of the model group was significantly decreased from day 9 ($P < 0.01$), the foot swelling degree and joint index score were significantly increased ($P < 0.01$), the ankle joint morphology and function were impaired, the serum inflammatory factor IL-1 β level was significantly increased ($P < 0.01$), and the anti-inflammatory factor IL-10 level was significantly decreased ($P <$

基金项目: 黑龙江中医药大学附属第二医院青年人才基金项目 (No.2021KY-15)。

作者简介: 董立财, 男, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型及机制研究, email: zzydlc123@163.com * **通信作者:** 王锐, 男, 教授, 主要从事中药新剂型及机制研究, email: family8385@126.com

0.01). The indexes of thymus and the spleen were increased from day 9 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the pathological changes of the ankle synovium in the positive group and the treatment group were significantly improved, the body mass was increased ($P < 0.05$), the toe volume, arthritis indexes, thymus and spleen index were decreased ($P < 0.05$), and the level of serum inflammatory factor IL-1 β was significantly decreased ($P < 0.01$). The level of anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Duhuo Jisheng paste can reduce the inflammatory response, improve the body function in rats, and treat adjuvant arthritis.

Key words: invigorating the spleen and kidney; Duhuo Jisheng paste; adjuvant arthritis

在我国关节炎发病率高达 18%^[1], 且人数在逐渐上升, 其临床治疗上多以手术治疗、服用激素等化学药物缓解症状, 但费用高, 还具有胃肠道和心血管不良反应^[2-3], 同时患者依从性低。患者若未进行规范治疗, 易发生关节损伤甚至残疾^[4-5]。

中医认为, 关节炎属于痹症范畴^[6]。独活寄生贴是在独活寄生汤的基础上进行剂型改造而得。独活寄生贴由独活、细辛、桑寄生等药材组成, 能够祛风湿, 止痹痛, 治疗痹证日久、肝肾两亏之证^[7]。“膏药能治病, 无殊汤药, 用之得法, 其响立应”, 把汤剂改为贴膏剂后, 不但可以规避汤药的苦味及煎药之烦琐, 而且还可以避免“陡然下咽、入胃、并可以毙”的弊端^[8]。故本文将独活寄生的汤剂改变成贴剂, 使药性从毛孔而入其腠理, 通经贯络, 起到治疗关节炎的作用。

1 材料

1.1 试药

独活、桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂心、防风、川芎、人参、甘草、当归、芍药、干地黄饮片(哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司, 批号分别为 211004、200415、211004、200907、200704、210710、201021、200907、210804、211021、210709、210805、201102、211005、210504), 均经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定符合 2020 年版《中国药典》要求; 完全弗氏佐剂(CFA, 美国 Sigma 公司); 甲氨蝶呤片(规格: 2.5 mg/片, 通化茂祥制药有限公司, 批号: 220903); 布洛芬片(规格: 0.1 g/片, 吉林万通药业集团郑州万通复升药业股份有限公司, 批号: 220605); 大鼠白介素(IL)- β 、IL-10 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(北京冬歌生物科技有限公司, 货号分别为 DG20049D、DG94478Q); 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙液(飞净生物科技有限公司, 批号: 20220705)。

1.2 仪器

Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司); WD-2105A 微型离心机(美国六一仪器

厂); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); Scope A1 正置荧光显微镜(德国卡尔蔡司); RM2235 切片机(德国徕卡); YLS-6B 热板仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 Wistar 健康大鼠 50 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g; 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 22 g, 均购于黑龙江中医药大学动物实验中心, 实验动物使用许可证编号: SYXK(黑)2018-007。将大鼠饲养于温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度 55% ~ 60% 的标准居住环境, 自由摄食及饮水。

2 方法

2.1 独活寄生贴的制备

独活、桑寄生、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂心、防风、川芎、人参、甘草、当归、芍药、干地黄粉碎机粉碎, 过 80 目药典筛。将上述药物混匀, 加入姜汁: 食醋 = 1 : 10 调和至糊状装入空白穴位贴内, 备用。

2.2 佐剂性关节炎(AA)大鼠模型的建立、给药及取材

2.2.1 AA 模型建立 大鼠适应性喂养后, 随机挑选 6 只作为正常对照组, 剩余大鼠于大鼠右足趾处, 朝向踝关节注射 CFA 0.15 mL 以致炎^[9], 制备大鼠 AA 模型。正常对照组大鼠同法注射等体积生理盐水。

2.2.2 分组及处理 将造模成功的大鼠分为模型组、治疗组(穴位贴组)、阳性组(甲氨蝶呤片), 每组 6 只。穴位贴组: 将独活寄生贴贴敷于“肾俞”“脾俞”, 2 次 \cdot d⁻¹、4 h/次。阳性组: 甲氨蝶呤片按照每周 0.8 mg \cdot kg⁻¹ 的剂量进行灌胃。正常对照组和模型组大鼠不作任何干预。

2.2.3 取材 戊巴比妥钠麻醉(45 mg \cdot kg⁻¹)大鼠, 腹主动脉取血, 室温静置 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C、3000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min 分离血清, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。戊巴比妥钠(60 mg \cdot kg⁻¹)过量麻醉大鼠安乐死, 固定, 大鼠踝关节上下两侧断开, 保存在组织固定液中固定备用^[10]。

2.3 观察指标

2.3.1 一般情况观察 在给药第 3、6、9、12、15、18、21 日观察上述各组大鼠的生活状态(饮食及活动变化,毛色的改变)和关节部位红肿的情况。

2.3.2 关节炎指数(AI)评分 各组大鼠参考 AI 评分标准(见表 1),对其双侧后足关节进行炎性评分^[1],每个足爪的关节炎严重程度由 0 到 4 分表示:AI 为每只大鼠两只后足的累积评分,最大值为 8 分。当 AI ≥ 3 分即认定为 AA 模型复制成功。

表 1 AI 评分标准
Tab 1 Scoring criteria for AI

评分 / 分	标准
0	关节正常,无肿胀
1	足趾关节或踝关节轻度肿胀
2	踝关节至跖关节或掌关节轻度肿胀
3	踝关节至跖关节或掌关节中度肿胀
4	全足严重肿胀,关节僵直变形

2.3.3 大鼠体质量、关节足肿胀度 首先在大鼠的踝关节处用画笔做标记,每隔 3 日称定大鼠体质量,同时用排水法测量左右后足体积大小作为基础值。以造模当日为第 0 日,每隔 3 日采用足容积法测量足肿胀体积,每次测量 3 次取平均值,记录并计算足肿胀度。比较各组间肿胀度大小的差异,并绘制变化图形。

大鼠足肿胀度(%) = (造模后足容积 - 初始足容积) / 初始足容积 × 100%。

2.3.4 IL-β、IL-10 检测 取各组大鼠离心血清,按照 ELISA 试剂盒说明书测定大鼠血清中的 IL-β、IL-10。

2.3.5 HE 染色 取大鼠踝关节,修剪大约 5 mm 厚度,在组织固定液中固定 48 h 后,先后用 PBS 和蒸馏水清洗 3 次,每次 20 min。转移到约 20 倍体积的 EDTA 脱钙液中,置于 37℃ 温箱中,每 2 日更换一次 EDTA 脱钙液。直到用针刺无阻力,表示到达脱钙终点。将脱钙终点的踝关节置于不同浓度的乙醇中,之后用二甲苯将其脱水至透明。石蜡包埋,切成约 5 mm 的切片,进行染色后使用中性树脂封片,并在光学显微镜下观察其组织病理形态变化。

2.3.6 脾脏、胸腺指数 摘取处死大鼠的脾脏和胸腺,称定质量,计算脾脏和胸腺指数。脾脏(胸腺)指数(%) = 脾脏(胸腺)(g) / 大鼠质量(g) × 100%。

2.3.7 小鼠热板致痛实验 取小鼠 50 只,雌雄各半,实验前选择舔足时间在 5 ~ 30 s 内的小鼠,将符合条件的小鼠随机分为正常对照组、阳性对照组(布洛芬片)、贴剂组。启动仪器,将小鼠置于事先预热的热板仪上(55.0 ± 0.5)℃,以小鼠舔后足为疼痛反应指标,观察小鼠出现舔后足所需时间(s)作为该鼠痛阈值。连续给药 6 日,于末次给药后 30、60、90、120 min 分别测量各组小鼠给药后的痛阈值。

2.3.8 数据处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用单因素方差分析。经方差齐性检验,方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Donnett T3 检验。

3 结果

3.1 一般情况观察

与正常对照组比较,模型组大鼠在注射后 1 日,后足趾局部开始出现红肿,紧接着红肿部位变大,注射部位溃疡结痂,结果见图 1。模型组大鼠在整个实验期间,进食减少、毛发干枯且发黄、活动减少,体质量增加缓慢甚至减少。与模型组比较,阳性对照组、治疗组大鼠精神状态较佳、皮毛光泽、饮食正常、自由活动关节、无异常状态出现。

3.2 对 AA 大鼠 AI 的影响

各组大鼠造模前足跖肿胀度差异均无统计学意义。与正常对照组比较,模型组大鼠在给予 CFA 的第 6 日开始 AI 显著升高,在第 9 日达到峰值($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组、治疗组大鼠 AI 均显著降低。结果见图 2。

3.3 对 AA 大鼠体质量影响

各组大鼠造模前体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。造模第 9 日,模型组大鼠体质量较正常对照组显著减轻($P < 0.01$);贴敷干预 12 d 后,治疗组的大鼠体质量均高于模型对照组($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 独活寄生贴对 AA 大鼠体质量的影响(g, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 2 Effect of Duhuo Jisheng paste on body mass of AA rat (g, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	第 0 日	第 3 日	第 6 日	第 9 日	第 12 日	第 15 日	第 18 日	第 21 日
正常对照组	—	198.21 ± 7.01	204.26 ± 6.13	207.51 ± 5.20	212.65 ± 5.07	214.94 ± 2.86	218.96 ± 2.81	222.81 ± 5.28	228.15 ± 5.44
模型组	—	200.93 ± 4.09	202.35 ± 5.63	204.09 ± 4.19	192.36 ± 8.59**	194.07 ± 7.07**	199.4 ± 9.90**	204.54 ± 4.87**	209.88 ± 5.50**
阳性对照组	0.5 × 10 ⁻³	199.93 ± 3.22	203.48 ± 2.42	207.35 ± 4.16	209.38 ± 3.37 ^{###}	209.84 ± 2.92 ^{###}	210.13 ± 3.21 ^{###}	210.15 ± 2.17 [#]	217.12 ± 1.93 [#]
治疗组	10.62	200.76 ± 4.36	203.33 ± 2.77	205.94 ± 2.54	208.32 ± 1.94	212.49 ± 2.13 ^{###}	215.50 ± 2.95 ^{###}	218.20 ± 2.53 ^{###}	221.15 ± 3.57 ^{###}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$,与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$ 。

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



图 1 独活寄生贴对 AA 大鼠踝关节及足肿胀程度的影响
Fig 1 Effect of Duhuo Jisheng paste on ankle swelling and paw in AA rat

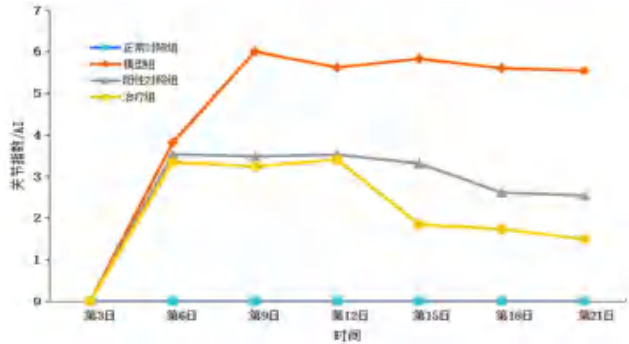


图 2 独活寄生贴对 AA 大鼠关节炎指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 2 Effect of Duhuo Jisheng paste on arthritis index of AA rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 对 AA 大鼠足肿胀的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠在致炎后第 6 ~ 15 日足趾肿胀度逐渐升高, 18 日达到峰值。与模型组比较, 阳性对照组、治疗组大鼠足趾肿胀度上升速度较慢, 呈先上升后下降趋势。结果见图 3。抑制率 % = (右后足肿胀后厚度 - 右后足肿胀前厚度) / 右后足肿胀前厚度 × 100%。

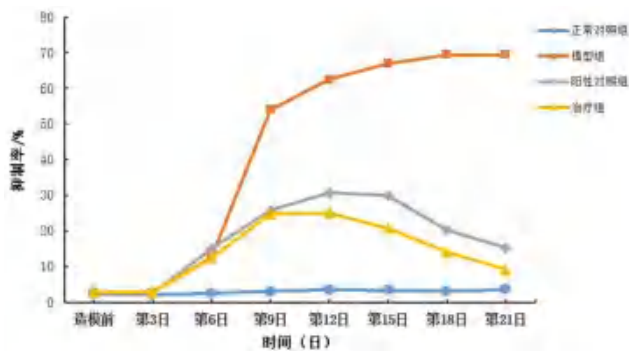


图 3 独活寄生贴对 AA 大鼠足肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 3 Effect of Duhuo Jisheng paste on foot swelling of rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 对 AA 大鼠血清 IL-1 β 及 IL-10 水平的影

与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$), IL-10 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组、治疗组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著下降 ($P < 0.01$), IL-10 水平出现不同程度的升高 ($P < 0.01$)。结果见图 4。

3.6 对 AA 大鼠踝关节组织病理形态的影响

与正常对照组比较, 模型组踝关节组织中坏死骨组织增多、被大面积增生的结缔组织取代, 同时

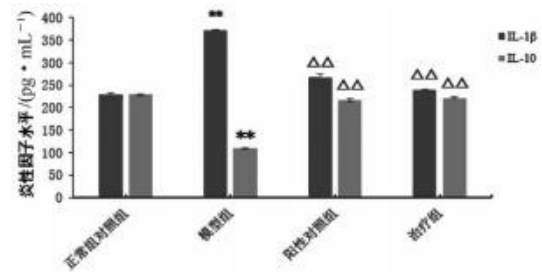


图 4 独活寄生贴对 AA 大鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 4 Effect of Duhuo Jisheng paste on inflammatory factors levels of AA rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$, 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

中性粒细胞与巨噬细胞浸润。与模型组比较, 阳性对照组、治疗组关节软骨表面无增生、关节软骨边缘的滑膜组织肿胀减轻, 炎症细胞浸润降低, 提示能够抑制滑膜细胞增生和纤维组织渗出。结果见图 5。

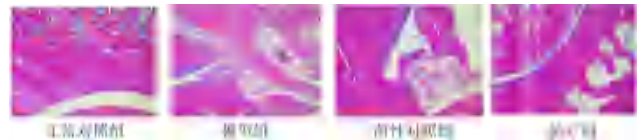


图 5 独活寄生贴对 AA 大鼠踝关节组织病理形态的影响 (HE, ×100)

Fig 5 Effect of Duhuo Jisheng paste on histopathological morphology of ankle joint in AA rats (HE, ×100)

3.7 对 AA 大鼠脾脏、胸腺指数的影响

与正常对照组比较, 模型组大鼠脾脏、胸腺指数升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组、治疗组大鼠脾脏、胸腺指数降低 ($P < 0.05$), 结果见图 6。

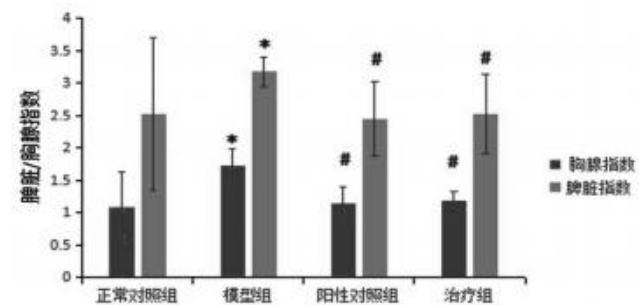


图 6 独活寄生贴对大鼠脾脏 / 胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig 6 Effect of Duhuo Jisheng paste on spleen/thymus index in AA rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

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

3.8 对小鼠热板痛阈值的影响

结果表明, 各组小鼠给药前的痛阈值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较, 阳

性对照组、贴剂组小鼠出现舔足所需时间显著延长 ($P < 0.01$), 提示该贴剂具有镇痛作用。结果见图 7。

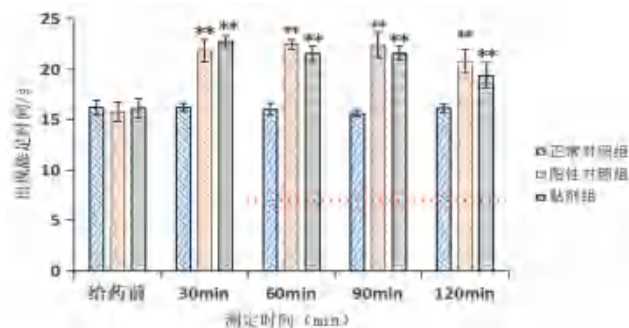


图 7 独活寄生贴对小鼠热板痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig 7 Effect of Duhuo Jisheng paste on pain threshold of mouse pain model induced by hot plate method ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$.

4 讨论

中药穴位敷贴是在中医理论指导下, 将药物制成需要的穴位贴, 用于特定穴位。穴位贴通过化学、温度等方式刺激穴位发挥作用。穴位敷贴作用机制描述为“切于皮肤, 彻于肉理。摄于吸气, 融于渗液”。膏方用药, 其法通于汤丸, 凡汤丸行之有效者, 其方皆可熬膏以用。因此本文以独活寄生汤为基础, 改变其汤剂为贴剂。

独活寄生贴在中医理论指导下, 方中各味药按照君臣佐使的配伍关系, 相互协调发挥治疗作用。药理研究发现, 该贴剂的各味药具有抗炎、镇痛、抗氧化、免疫抑制等作用, 可预防和治疗关节炎。

研究表明, 致病大鼠外周血 T 细胞迁移到病变的关节组织, 或许是与参与关节免疫损伤有关, 导致血 T 细胞比例降低^[12]。循环系统和关节腔中的 T 细胞过度活化, 导致 T 细胞功能紊乱、Th1/Th2 细胞失衡、调节性 T 细胞异常等免疫应答^[13]。病变关节组织的 T 细胞和关节滑膜组织的纤维细胞样滑膜细胞相结合, 以组织相容性复合体 - II (MHC II) 类分子依赖的方式递呈修饰后自身的抗原, 活化 T 细胞, 促进 B 细胞生成自身抗体, 形成免疫复合物, 沉积在关节组织, 进一步加速免疫反应, 参与滑膜炎炎症反应^[14]。Th1、Th2 细胞分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 等炎性因子加速破骨细胞形成, 参与骨与软骨的破坏, 促进关节炎病理损伤^[15-16]。炎症相关因子持续影响着关节炎的发生与发展进程。关节炎发生后, 在炎性因子的刺激下, 关节内产生炎症反应, NF- κ B 通路被激活, 导致下游白介素系列炎性因子大量增多。在相关因子的作用下, 软骨细胞的结构和功能被破坏, 导致关节软骨基质损伤与衰减^[17]。

本研究采用 CFA 制备 AA 模型, 模型大鼠关

节存在与 AA 相似的滑膜病理改变和骨质破坏。模型组大鼠造模后, 精神倦怠、食欲减退、四肢出现明显红肿及变形、足趾肿胀度和关节炎指数显著升高, 显示造模成功。大鼠踝关节滑膜细胞增生明显, 可见滑膜组织充血、炎症细胞浸润、软骨细胞破坏、血管翳生成, 表明模型大鼠体内炎症反应加剧, 关节结构破坏严重。因此本研究检测 IL-1 β 、IL-10 水平, 研究独活寄生贴对关节炎的作用, 结果与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著升高, IL-10 水平显著降低; 与模型组比较, 阳性对照组、治疗组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著下降, IL-10 水平出现不同程度的升高。提示该贴剂可能参与了关节炎的发生发展, 不仅减少了关节炎性损伤, 而且明显减轻了关节病理损伤。

脾脏和胸腺是机体发挥免疫作用的关键器官, 常用其指数的高低来反映免疫器官发育的程度, 脾脏和胸腺发育越好, 质量越大, 机体的免疫能力越强^[18]。本实验通过称质量大鼠的脾脏、胸腺的重量, 计算其指数, 评估该贴剂对免疫系统的作用。结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠胸腺、脾脏指数显著升高, 标志着 AA 大鼠免疫系统的激活, 滑膜组织中炎症因子释放, 发生炎症症状。经独活寄生贴干预后, 与模型组比较, 阳性药物组、治疗组大鼠胸腺、脾脏指数明显降低, 提示治疗组能在一定程度上改善大鼠的免疫功能。同时大鼠造模成功后, 炎性反应发生, 导致模型组大鼠的足肿胀程度增高。给予穴位贴敷后, 抑制炎性的发生, 阳性对照组、治疗组足肿胀度降低。

综上, 独活寄生贴对 AA 大鼠具有一定的防治作用, 可明显减轻大鼠足肿胀程度、踝关节滑膜炎炎症。其作用机制可能与 IL-1 β 和 IL-10 水平有关, 可抑制炎性反应, 提高机体免疫力, 本研究对独活寄生贴的开发与应用具有一定的指导作用。

参考文献

- [1] 王斌, 邢丹, 董圣杰, 等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18 (2): 134-142.
- [2] Chevalier X, Eymard F, Richette P. Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9 (7): 400-410.
- [3] Rodriguez-Merchan EC. Intra-articular injections of hyaluronic acid and other drugs in the knee joint [J]. HSS J, 2013, 9 (2): 180-182.
- [4] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med, 2011, 365 (23): 2205-2219.
- [5] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388 (10055): 2023-2038.
- [6] 石璐. 芍甘附子汤治疗类风湿关节炎的药效及作用机制初

- 步研究[D].北京:北京中医药大学,2020.
- [7] 苗诗琪,姚家树,高明利.基于络病理理论探讨独活寄生汤治疗类风湿关节炎中晚期的组方原理[J].风湿病与关节炎,2022,11(7):52-54,58.
- [8] 齐潇丽,白彦萍.吴尚先中医外治法学术思想探析[J].北京中医药,2017,36(1):69-70,73.
- [9] 祁芳,李艳玲,艾坤,等.SD大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估[J].湖南中医药大学学报,2016,36(1):23-26.
- [10] 邓超,孔立红.一种快速取大鼠膝关节滑膜的方法[J].实验动物科学,2019,36(2):76-77.
- [11] 李培培,解国雄,宋珊珊,等.大鼠佐剂性关节炎模型表现特征及评价指标[J].中国免疫学杂志,2012,28(5):453-457.
- [12] 王克军.类风湿关节炎患者外周CD4 T细胞关节局部趋化机制[J].中国老年学杂志,2015,35(18):5259-5261.
- [13] Yany SJ, Zhang XM, Chen JR, et al. Induced, but not natural, regulatory T cells retain phenotype and function following exposure to inflamed synovial fibroblasts[J]. Sci Adv, 2020, 6: eabb0606.
- [14] Testa D, Calvacchi S, Petrelli F, et al. One year in review 2021: pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2021, 39(3): 445-452.
- [15] 李艳彦,赵乐,王永辉,等.黄芪桂枝五物汤对阳虚寒凝型骨关节炎大鼠免疫及瘀血状态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(23):149-154.
- [16] 肖超,陈臣,陈荣富,等.塞来昔布对膝关节炎患者血清IL-1及TNF- α 水平的影响[J].重庆医学,2015,44(5):700-702.
- [17] 杨林,吕丹,沈小芳,等.细胞因子对类风湿性关节炎骨平衡的调节作用[J].生命科学,2019,31(1):35-43.
- [18] 李向辉,黄慧,周延州,等.刺五加多糖纳米乳对免疫抑制小鼠的免疫增强作用[J].中国兽医杂志,2022,58(4):96-100.
- (收稿日期:2022-09-18;修回日期:2022-11-04)

黄芪多糖对急性放射性肠炎大鼠肠黏膜细胞凋亡及 TXNIP/NLRP3 轴的影响

李浩田¹, 李鹏¹, 王玉凤¹, 张春礼^{2*} (1.郑州市第九人民医院普外科, 郑州 450053; 2.河南中医药大学人民医院/郑州人民医院普外二科, 郑州 450053)

摘要:目的 探讨黄芪多糖(APS)对急性放射性肠炎(ARE)大鼠肠黏膜细胞凋亡及TXNIP/NLRP3轴的影响。方法 按照随机数字表法将大鼠分为6组,即对照组(NC组)、模型组(Model组)、黄芪多糖低剂量组(APS-L组)、黄芪多糖中剂量组(APS-M组)、黄芪多糖高剂量组(APS-H组)、阳性药物组(Positive组),每组12只。除NC组外,其余各组大鼠均构建ARE模型,造模24h后,APS-L组、APS-M组、APS-H组大鼠分别按100、200、400 mg·kg⁻¹ APS的剂量进行灌胃,Positive组大鼠按照300 mg·kg⁻¹ 柳氮磺吡啶的剂量进行灌胃,NC组及Model组大鼠给予生理盐水灌胃,末次给药24h后,对各组大鼠进行疾病活动指数(DAI)评分;苏木精-伊红(HE)染色观察各组大鼠肠黏膜病理学变化;ELISA法检测各组大鼠肠黏膜中IL-6、TNF- α 的含量;TUNEL法检测肠黏膜细胞凋亡;qRT-PCR检测大鼠肠黏膜组织中TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA的表达;Western blot检测各组大鼠肠黏膜组织中Bax、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)及TXNIP/NLRP3通路相关蛋白的表达。结果 与NC组比较,Model组大鼠肠黏膜损伤严重,出现炎性细胞浸润,隐窝及上皮破坏等现象,DAI评分、白细胞介素6(IL-6)含量、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量、细胞凋亡率及Bax蛋白、Caspase-3蛋白、TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA及蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与Model组比较,APS-L组、APS-M组、APS-H组及Positive组大鼠肠黏膜损伤程度明显减轻,DAI评分、IL-6含量、TNF- α 含量、细胞凋亡率及Bax蛋白、Caspase-3蛋白、TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。结论 APS可抑制ARE大鼠肠黏膜细胞凋亡,该机制可能与抑制TXNIP/NLRP3轴有关。

关键词: 黄芪多糖;急性放射性肠炎;肠黏膜;细胞凋亡;硫氧还蛋白互作蛋白/炎性小体3通路
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1256-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.022

基金项目:2019年度河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(No. LHGJ20191072)。

作者简介:李浩田,男,副主任医师,主要从事普外(肝胆,胃肠,甲乳,周围血管,创面)疾病研究, email: sh19work@163.com

*通信作者:张春礼,男,副主任医师,主要从事胃肠外科研究, email: justzhang@126.com

Effect of astragalus polysaccharide on the intestinal mucosal cell apoptosis and TXNIP/NLRP3 axis in rats with acute radiation enteritis

LI Hao-tian¹, LI Peng¹, WANG Yu-feng¹, ZHANG Chun-li^{2*} (1. Department of General Surgery, Zhengzhou Ninth People's Hospital, Zhengzhou 450053; 2. Second Department of General Surgery, People's Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine/Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450053)

Abstract: Objective To determine the effect of astragalus polysaccharide (APS) on the apoptosis and TXNIP/NLRP3 axis of the intestinal mucosal cells in rats with acute radiation enteritis (ARE). **Methods** According to the random number table, the rats were divided into 6 groups: a control group (NC group), a model group (Model group), a low-dose astragalus polysaccharide group (APS-L group), a middle-dose astragalus polysaccharide group (APS-M group), a high-dose astragalus polysaccharide group (APS-H group), and a positive drug group (Positive group), with 12 rats in each group. Except for the NC group, ARE models were constructed the rats in other groups. After 24 h of modeling, the rats in the APS-L group, the APS-M group, and the APS-H group were given 100, 200, and 400 mg · kg⁻¹ APS by gavage, respectively. The rats in the Positive group were given 300 mg · kg⁻¹ sulfasalazine by gavage, and the rats in the NC group and Model group were given normal saline by gavage. At 24 h after the last administration, the disease activity index (DAI) score was measured on rats in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of the intestinal mucosa of rats in each group. ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the intestinal mucosa of rats in each group. TUNEL was used to detect the intestinal mucosal cell apoptosis. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *TXNIP*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *IL-1 β* and *IL-18* in the rat intestinal mucosa. Western blot was used to detect the expression of Bax, Caspase-3 and TXNIP/NLRP3 pathway related proteins in the intestinal mucosal tissues of the rats in each group. **Results** Compared with the NC group, the intestinal mucosa was severely damaged, with inflammatory cell infiltration, crypt and epithelium destruction. The DAI score, IL-6 content, TNF- α content, apoptosis rate and Bax protein, Caspase-3 protein, TXNIP, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 mRNA and protein expression levels were significantly increased in the Model group ($P < 0.05$). Compared with the Model group, while the intestinal mucosal damage was significantly reduced, the DAI score, IL-6 content, TNF- α content, apoptosis rate and Bax protein, Caspase-3 protein, TXNIP, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 mRNA and protein expression levels were significantly increased in the APS-L group, the APS-M group, the APS-H group and the Positive group ($P < 0.05$). **Conclusion** APS can inhibit the intestinal mucosal cell apoptosis in ARE rats, and the mechanism may be related to the inhibition of TXNIP/NLRP3 axis.

Key words: astragalus polysaccharide; acute radiation enteritis; intestinal mucosa; apoptosis; thioredoxin interaction protein/NLR family pyrin domain containing 3 pathway

近年来, 肿瘤放射治疗已达成临床共识, 且其治疗逐渐规范。然而, 随着肿瘤发病率的增加和放射治疗的普及, 越来越多的患者在接受盆腔和腹部恶性肿瘤的放射治疗后不可避免地发生急性放射性肠炎 (acute radiation enteritis, ARE)^[1]。ARE 已成为腹部和盆腔恶性肿瘤放射性治疗之后常见的肠道并发症^[2]。研究显示, 电离辐射可导

致肠组织内凋亡相关蛋白表达, 进而诱导肠黏膜细胞凋亡, 是 ARE 形成的重要机制^[3]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是从中药黄芪中提取的主要活性成分之一, 有研究表明 APS 可有效治疗三硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎^[4], 提示 APS 在肠炎中发挥着保护作用。但目前关于 APS 治疗 ARE 的研究鲜有报道。硫氧还蛋白互

作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) / 炎性小体 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3) 通路的激活与溃疡性结肠炎肠道炎症有关^[5], 但 APS 对 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡及 TXNIP/NLRP3 轴的影响尚不清楚, 因此, 本研究拟构建 ARE 大鼠模型, 以探究 APS 对 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡及 TXNIP/NLRP3 轴的影响。

1 材料

1.1 实验动物

72 只体质量为 (200 ~ 250) g 的健康雄性 SD 大鼠, 购自广州赛业百沐生物科技有限公司 [生产许可证号: SCXK (粤) 2020-0055]。所有大鼠均无特定病原体的环境下饲养, 并在实验前一周提供自由饮水和饮食。大鼠被饲养在温度为 (25 ± 2) °C, 光照/黑暗周期为 12 h 的环境中。该动物研究得到郑州市第九人民医院动物伦理委员会的批准 (批准号: 20200019), 所有动物实验均遵循 3R 原则。

1.2 试剂

APS (纯度: 98%, 批号: 20211223, 上海吉至生化科技有限公司); 柳氮磺吡啶肠溶片 (批号: 20220102, 上海信谊天平药业有限公司); 白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒 (武汉赛培生物科技有限公司); TUNEL 检测试剂盒、ECL 发光检测试剂盒、BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Bax、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GAPDH 兔多克隆抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗兔 IgG 二抗 (广州易锦生物技术有限公司); JY04S-3C 型凝胶成像分析系统 (西安明克斯检测设备有限公司)。

2 方法

2.1 造模及分组

按照随机数字表法将大鼠分为 6 组, 即对照组 (NC 组)、模型组 (Model 组)、黄芪多糖低剂量组 (APS-L 组)、黄芪多糖中剂量组 (APS-M 组)、黄芪多糖高剂量组 (APS-H 组)、阳性药物组 (Positive 组), 每组 12 只。参考文献^[6]构建 ARE 大鼠模型, 即除 NC 组外, 其余各组大鼠均给予 3% 戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉后, 将大鼠以仰卧位固定于手术台上, 利用直线加速器对大鼠腹部 (胸骨剑突至耻骨联合处) 进行单次照射, 照射源距离皮肤 50 cm, 总照射剂量为 12 Gy, 照射时间为 3 min。照射后 24 h 内若观察到

大鼠出现腹泻、稀便、血便等症状则表明造模成功。造模 24 h 后, 参考文献^[7]及前期预实验结果对 APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组大鼠分别按照 100、200、400 mg · kg⁻¹ APS 的剂量进行灌胃, Positive 组大鼠按照 300 mg · kg⁻¹ 柳氮磺吡啶的剂量进行灌胃, NC 组及 Model 组大鼠给予等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 15 d。

2.2 疾病活动指数评分

末次给药 24 h 后, 参照文献^[8], 根据大鼠体质量、粪便性状和粪便潜血情况进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分, 包括体质量下降 (0 分: < 1%; 1 分: 1% ~ 5%; 2 分: 6% ~ 10%; 3 分: 11% ~ 15%; 4 分: > 15%), 大便性状 (0 分: 正常; 1 分: 软便成形, 不黏附肛门; 2 分: 软便成形, 黏附肛门; 3 分: 腹泻), 粪便潜血 (0 分: 正常; 1 分: 粪便中有暗红色斑点; 2 分: 肛门可见出血; 3 分: 粪便中有深红色斑点, 肛门有血液黏附)。DAI 的计算公式如下: DAI = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 粪便潜血分数) / 3。

2.3 标本收集

DAI 评分测定完成后, 处死大鼠, 取大鼠肠黏膜组织, 分为两部分 (每部分包含各组 6 只大鼠的肠黏膜组织), 一部分固定于 4% 多聚甲醛中用于苏木精-伊红 (HE)、TUNEL 染色, 另一部分在液氮中迅速冷冻后保存于 -80 °C 中用于 ELISA、qRT-PCR、Western blot 实验。

2.4 HE 染色

将各组大鼠肠黏膜组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 石蜡包埋后将组织切成 5 μ m 的切片并用 HE 染色, 光学显微镜观察 HE 染色切片的病理形态变化。

2.5 ELISA 法检测各组大鼠肠黏膜中 IL-6、TNF- α 的含量

取各组大鼠肠黏膜组织, 加入磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4), 用组织捣碎机以 15 000 r · min⁻¹ 的转速将肠黏膜组织匀浆, 并在 4 °C 下以 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液, 利用 BCA 试剂盒检测上清液蛋白浓度, 测量标准品、实验组样本的吸光度值, 以标准品浓度为 X 轴, OD 值为 Y 轴建立标准曲线, 通过标准曲线计算实验组样本 IL-6、TNF- α 含量。

2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

将大鼠肠黏膜组织的石蜡包埋切片脱蜡并用乙醇梯度脱水至水化, 利用 TUNEL 检测试剂盒检测各组大鼠肠黏膜细胞凋亡情况, 利用光学

显微镜随机选取 5 个视野进行观察, 细胞核染色为棕黄色的细胞即为凋亡细胞, 细胞凋亡率 (%) = (凋亡细胞数目 / 总细胞数目) × 100%。

2.7 qRT-PCR 检测大鼠肠黏膜组织中相关因子 mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂提取肠黏膜组织匀浆中总 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行定量反应。以 GAPDH 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *TXNIP*、*NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	CATTCTTCCACCTTTGAT	CTGTAGCCATATTCATTGT
<i>TXNIP</i>	TTCCGTGTGACTCCTTAG	AGAGCCTCCATCTATAACC
<i>NLRP3</i>	GTATCTGGTTGTGTTAATG	AACTACGACTTGATTCTG
<i>Caspase-1</i>	AGAGATGGATACAATCAA	TTGTAATGAAGACTGCTA
<i>IL-1β</i>	CTTCAGCCAATCTTCATT	CACTGTAATAAGCCATCAT
<i>IL-18</i>	CGAACAGCCAACGAATCC	TCACAGCCAGTCTCTTAC

2.8 Western blot 检测相关蛋白质的表达

利用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解肠黏膜组织, 在 4℃ 下以 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 收集蛋白质裂解物, 并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定总蛋白质浓度。使用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离 30 μ g 蛋白质, 电泳分离后转移至 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 将膜与 Bax (1 : 2000)、Caspase-3 (1 : 2000)、TXNIP (1 : 1000)、NLRP3 (1 : 1000)、Caspase-1 (1 : 1000)、IL-1 β (1 : 2000)、IL-18 (1 : 3000)、GAPDH (1 : 2500) 抗体在 4℃ 下孵育过夜。随后, 将膜与 HRP 偶联的羊抗兔 (1 : 5000) 二抗在室温下孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂盒观察蛋白质条带, 以 GAPDH 为内部参照, 利用 Image J 软件扫描蛋白条带的灰度值。

2.9 统计学方法

使用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析。所有数据均表示为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 APS 对各组大鼠 DAI 的影响

经单因素方差分析, 6 组大鼠的 DAI 差异具有统计学意义 ($F = 250.696, P < 0.01, n = 12$)。行 SNK-*q* 检验, 与 NC 组比较, Model 组大鼠 DAI 评分 [(2.86 ± 0.32) 分] 显著升高 ($P < 0.05$); 与

Model 组比较, APS-L 组 [(2.05 ± 0.29) 分]、APS-M 组 [(1.54 ± 0.27) 分]、APS-H 组 [(0.97 ± 0.12) 分]、Positive 组 [(0.89 ± 0.11) 分] 大鼠 DAI 显著降低 ($P < 0.05$), 且 APS 浓度越高, DAI 越低。

3.2 各组大鼠结肠黏膜组织病理学变化

NC 组大鼠肠黏膜结构完整, 无明显病理变化; 与 NC 组比较, Model 组大鼠肠黏膜损伤严重, 出现炎性细胞浸润, 隐窝及上皮破坏等现象; 与 Model 组比较, APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组、Positive 组大鼠肠黏膜损伤程度明显减轻, 炎性细胞浸润减少, 隐窝及上皮受损逐渐恢复, 且 APS 浓度越高, 对应的趋势越明显, 见图 1。

3.3 APS 对各组大鼠肠黏膜中 IL-6、TNF- α 含量的影响

与 NC 组比较, Model 组大鼠肠黏膜中 IL-6、TNF- α 含量显著升高 (P 均 < 0.05); 与 Model 组比较, APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组、Positive 组大鼠肠黏膜中 IL-6、TNF- α 含量显著降低 (P 均 < 0.05), 且 APS 浓度越高, IL-6、TNF- α 含量越低, 见图 2。

3.4 APS 对各组大鼠肠黏膜细胞凋亡的影响

与 NC 组比较, Model 组大鼠肠黏膜细胞凋亡率及肠黏膜组织中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$); 与 Model 组比较, APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组、Positive 组大鼠肠黏膜细胞凋亡率及肠黏膜组织中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 (均 $P < 0.05$), 且 APS 浓度越高, 上述指标对应的趋势越明显, 见图 3 ~ 5。

3.5 APS 对 TXNIP/NLRP3 通路相关因子 mRNA 表达水平的影响

与 NC 组比较, Model 组大鼠肠黏膜组织中 *TXNIP*、*NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达水平显著升高 (P 均 < 0.05); 与 Model 组比较, APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组、Positive 组大鼠肠黏膜组织中 *TXNIP*、*NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-1 β* 、*IL-18* mRNA 表达水平显著降低 (P 均 < 0.05), 且 APS 浓度越高, 上述指标对应的趋势越明显, 见图 6。

3.6 APS 对 TXNIP/NLRP3 通路相关因子表达的影响

与 NC 组比较, Model 组大鼠肠黏膜组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平显著升高 (P 均 < 0.05); 与 Model 组比较, APS-L 组、APS-M 组、APS-H 组、Positive 组大鼠

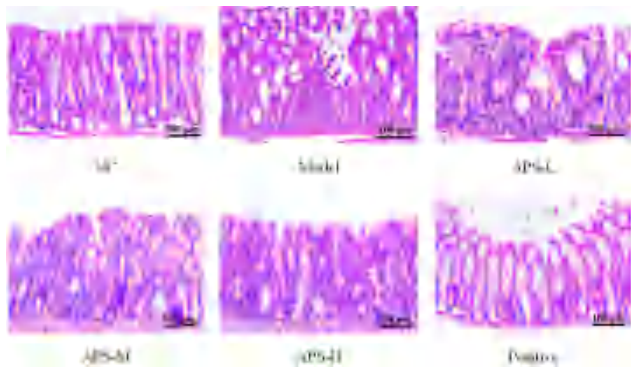


图 1 HE 染色观察大鼠结肠组织病理学变化 (×200)

Fig 1 Histopathological changes of rat colon by HE staining (×200)

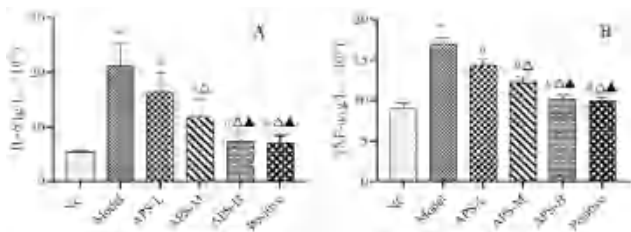


图 2 APS 对各组大鼠肠黏膜中 IL-6、TNF-α 含量的影响

Fig 2 Effect of APS on the content of IL-6 and TNF-α in the intestinal mucosa of rats in each group

注：与 NC 组比较，* $P < 0.05$ ；与 Model 组比较，# $P < 0.05$ ；与 APS-L 组比较，△ $P < 0.05$ ；与 APS-M 组比较，▲ $P < 0.05$ 。

Notes: Compared with the NC group, * $P < 0.05$; compared with the Model group, # $P < 0.05$; compared with the APS-L group, △ $P < 0.05$; compared with the APS-M group, ▲ $P < 0.05$.

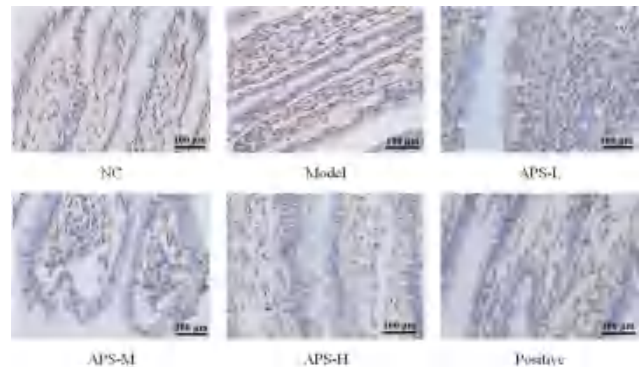


图 3 TUNEL 检测 APS 对各组大鼠肠黏膜细胞凋亡的影响 (×400)

Fig 3 Effect of APS on the apoptosis of the intestinal mucosal cells of rats in each group by TUNEL (×400)

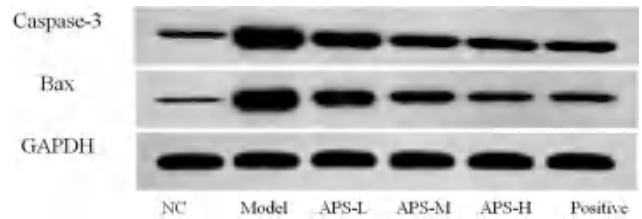


图 4 APS 对各组大鼠肠黏膜组织中 Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of APS on the expression of Bax and Caspase-3 protein in intestinal mucosa of rats in each group

肠黏膜组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达水平显著降低 (P 均 < 0.05)，且 APS 浓度越高，上述指标对应的趋势越明显，见图 7。

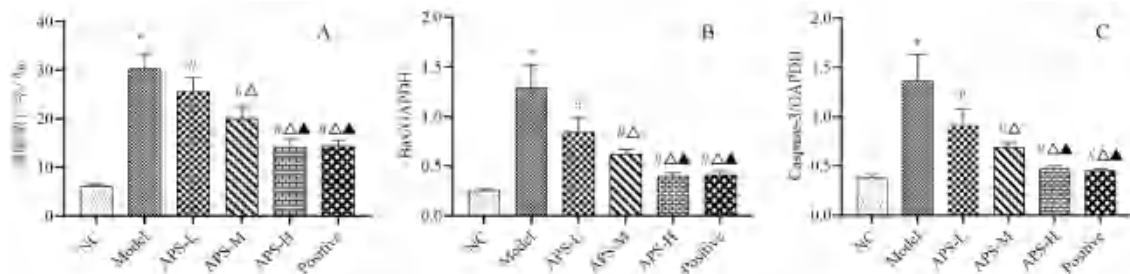


图 5 APS 对各组大鼠肠黏膜细胞凋亡的影响

Fig 5 Effect of APS on the apoptosis of the intestinal mucosal cells in each group

注：与 NC 组比较，* $P < 0.05$ ；与 Model 组比较，# $P < 0.05$ ；与 APS-L 组比较，△ $P < 0.05$ ；与 APS-M 组比较，▲ $P < 0.05$ 。

Notes: Compared with the NC group, * $P < 0.05$; compared with the Model group, # $P < 0.05$; compared with the APS-L group, △ $P < 0.05$; compared with the APS-M group, ▲ $P < 0.05$.

4 讨论

腹部和盆腔经辐射后引起的 ARE 是临床中常见且严重的问题，其临床表现通常包括腹痛、腹泻、血便、败血症、全身炎症和多器官功能障碍综合征等^[9-10]。目前，对于 ARE 的治疗只是对症治疗^[11]。随着该疾病的发展，它会引起肠道纤维化和闭塞性动脉内膜炎，并导致高死亡率^[12]。最近的研究显示，诱导细胞凋亡是放射性肠炎形成的重要机制，其中与 ARE 密切相关的凋亡基因有 Caspase-3、Bax 等^[13]；辐射可使肠黏膜结构

的完整性遭到破坏^[14]。本研究发现，与 NC 组比较，Model 组大鼠肠黏膜损伤严重，出现炎性细胞浸润，隐窝及上皮被破坏等现象，DAI 评分、炎症因子 (IL-6、TNF-α) 含量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 表达显著升高，提示 ARE 大鼠肠黏膜病理损伤严重，且存在炎症反应及细胞凋亡。

黄芪，含有多糖、皂苷、黄酮、氨基酸等成分，可促进抗体产生和免疫反应^[15]。APS 是从黄芪中提取的有效成分之一，具有多种药理作用，

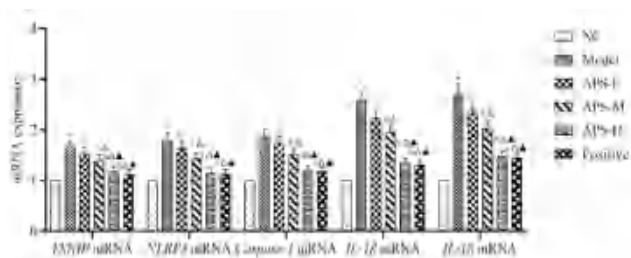


图 6 APS 对各组大鼠 TXNIP/NLRP3 通路相关因子 mRNA 表达水平的影响

Fig 6 Effect of APS on the mRNA expression level of TXNIP/NLRP3 related pathways of the intestinal mucosal cells in various rat groups

注：与 NC 组比较，* $P < 0.05$ ；与 Model 组比较，# $P < 0.05$ ；与 APS-L 组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与 APS-M 组比较， $\blacktriangle P < 0.05$ 。

Notes: Compared with the NC group, * $P < 0.05$; compared with the Model group, # $P < 0.05$; compared with the APS-L group, $\Delta P < 0.05$; compared with the APS-M group, $\blacktriangle P < 0.05$.

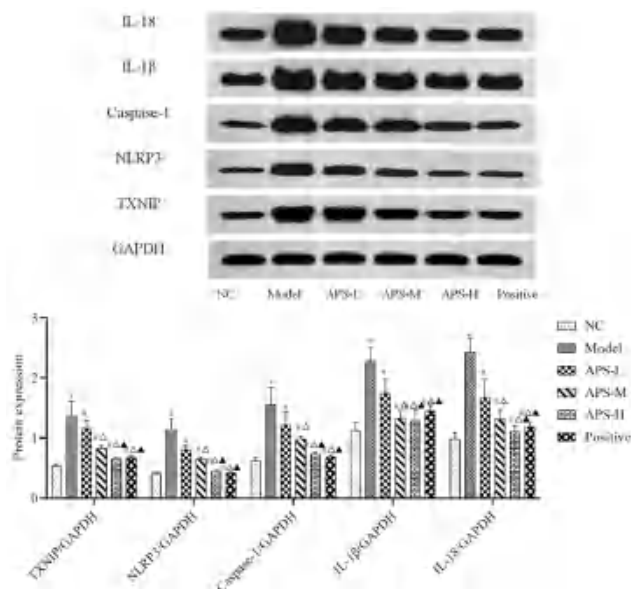


图 7 APS 对各组大鼠肠黏膜组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of APS on the protein expression of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in the intestinal mucosa of rats in each group

注：与 NC 组比较，* $P < 0.05$ ；与 Model 组比较，# $P < 0.05$ ；与 APS-L 组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与 APS-M 组比较， $\blacktriangle P < 0.05$ 。

Notes: Compared with the NC group, * $P < 0.05$; compared with the Model group, # $P < 0.05$; compared with the APS-L group, $\Delta P < 0.05$; compared with the APS-M group, $\blacktriangle P < 0.05$.

包括调节免疫功能、抗衰老、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗纤维化、抗菌、防辐射和抗病毒等^[16]。据报道，APS 能通过激活 Akt/mTOR 通路调控凋亡相关蛋白表达，对缺氧/复氧所致乳鼠心肌细胞凋亡起到抑制作用^[17]；APS 能够显著改善溃疡性结肠炎小鼠体内炎症水平，促进结肠组织病理学恢复^[7]；APS 能可改善溃疡性结肠炎中稀

便、血便及体质量下降等症状，并且可维持肠黏膜和肠上皮的完整性，减轻炎症反应程度^[18]。而关于 APS 对 ARE 大鼠的影响尚未见报道，本研究结果发现，与 Model 组比较，APS 各剂量组及 Positive 组大鼠肠黏膜损伤程度明显减轻，DAI 评分、炎症因子 (IL-6、TNF- α) 含量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 表达显著降低，提示 APS 可抑制 ARE 大鼠肠黏膜组织分泌炎症因子及肠黏膜细胞凋亡，对 ARE 具有明显的改善作用。

TXNIP/NLRP3 通路的激活与炎症反应的发生密切相关。经多种内源性损伤信号 (如活性氧) 刺激后，TXNIP 表达上调，促进其与 NLRP3 结合及 NLRP3 炎性复合体的形成，进一步激活 Caspase-1，进而介导炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的分泌^[19-20]。崔勇和等^[21]报道白藜芦醇通过抑制 TXNIP/NLRP3 信号通路改善脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎性损伤；An 等^[22]发现安石榴苷通过调控 TXNIP/NLRP3 通路抑制细胞凋亡发挥对糖尿病肾病的保护作用。以上研究表明，抑制 TXNIP/NLRP3 通路可减轻炎症反应及细胞凋亡，而关于 TXNIP/NLRP3 通路在 ARE 中发挥何种效应尚不清楚。本研究发现，与 NC 组比较，Model 组大鼠肠黏膜组织中 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 及蛋白表达水平显著升高，提示 TXNIP/NLRP3 通路可能参与了 ARE 的发生；与 Model 组比较，APS 各剂量组及 Positive 组大鼠肠黏膜组织中上述 mRNA 及蛋白表达水平显著降低，且 APS 浓度越高，上述蛋白表达越低。提示 APS 可抑制 ARE 大鼠肠黏膜组织炎症因子的分泌及肠黏膜细胞凋亡，可能与抑制 TXNIP/NLRP3 通路有关。然而，本研究未在 APS 作用的基础上再加上 TXNIP/NLRP3 通路激活剂来干预 ARE 大鼠来验证 APS 是否通过调控 TXNIP/NLRP3 通路来抑制 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡是本研究的不足之处，后期将会在机制探讨中作重要研究，以便更深入地挖掘 APS 抑制 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡的具体机制。

综上所述，APS 可抑制 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡，该机制可能与抑制 TXNIP/NLRP3 轴有关。本研究初步了解 TXNIP/NLRP3 轴在 ARE 中的作用，为临床应用 APS 及靶向治疗 ARE 提供了理论依据，但 APS 抑制 ARE 大鼠肠黏膜细胞凋亡的具体机制较为复杂，有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, et al. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19 (2): 199-208.
- [2] Yang C, Yang J, Xia M, et al. Efficacy of compound herbal medicine Tong-Xie-Yao-Fang for acute radiation enteritis and its potential mechanisms: evidence from transcriptome analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020 (1): 1-11.
- [3] Murley JS, Arbiser JL, Weichselbaum RR, et al. ROS modifiers and NOX4 affect the expression of the survivin-associated radio-adaptive response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 123 (1): 39-52.
- [4] 赵海梅, 鹿秀云, 岳海洋, 等. 黄芪多糖对结肠炎小鼠结肠黏膜 JAK/STAT 信号的调控作用 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34 (1): 145-146.
- [5] 王德龙, 卢爱妮, 郑红斌, 等. 芍药汤调控 TXNIP/NLRP3 通路改善溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (6): 3240-3245.
- [6] 王遥, 高颖, 陈海若, 等. 小檗碱对大鼠急性放射性结肠炎的疗效及机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46 (10): 968-974.
- [7] 宋艳, 何永恒, 杨芳, 等. 黄芪多糖调节脂联素 /TLR/NF- κ B 信号通路对溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (11): 1319-1324.
- [8] 马清林, 任远, 吴国泰, 等. 乌梅丸对 2, 4, 6-三硝基苯磺酸诱导的溃疡性结肠炎大鼠的作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (13): 1688-1691, 1704.
- [9] Huang Y, Guo F, Yao D, et al. Surgery for chronic radiation enteritis: outcome and risk factors [J]. *J Surg Res*, 2016, 204 (2): 335-343.
- [10] Grabenbauer GG, Holger G. Management of radiation and chemotherapy related acute toxicity in gastrointestinal cancer [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016, 30 (4): 655-664.
- [11] Zhang T, Shi L, Xu Y, et al. Purified PEGylated human glucagon-like peptide-2 reduces the severity of irradiation-induced acute radiation enteritis in rats [J]. *J Radiat Res*, 2019, 60 (1): 7-16.
- [12] Li J, Jiang Y, Yu H, et al. Effects of UCMSCs delivered through different transplantation approaches on acute radiation enteritis in rats [J]. *Cell Transplant*, 2021, 30 (1): 1-8.
- [13] 李思聪, 李玉明. 肠复康方对急性放射性肠炎大鼠小肠黏膜细胞凋亡基因的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35 (4): 67-73.
- [14] Moussa L, Usunier B, Demarquay C, et al. Bowel radiation injury: complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25 (10): 1723-1746.
- [15] Lan RX, Park JW, Lee DW, et al. Effects of Astragalus membranaceus, Codonopsis pilosula and allicin mixture on growth performance, nutrient digestibility, faecal microbial shedding, immune response and meat quality in finishing pigs [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2017, 101 (6): 1122-1129.
- [16] 张国荣, 张建萍, 马小花, 等. 基于 P 物质和 P-糖蛋白探讨黄芪多糖温敏凝胶改善小鼠放射性皮炎的机制 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (5): 1072-1076.
- [17] 沈玉珏. 黄芪多糖抑制缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞凋亡与自噬机制研究 [J]. *陕西中医*, 2021, 42 (5): 561-564.
- [18] 宋艳, 何永恒, 杨芳, 等. 黄芪多糖通过激活脂联素信号通路减轻小鼠溃疡性结肠炎 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (2): 315-321.
- [19] Liu Y, Cheng Y, Zhang H, et al. Integrated cascade nanozyme catalyzes in vivo ROS scavenging for anti-inflammatory therapy [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (29): 1-11.
- [20] Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, et al. Sleep apnea: types, mechanisms, and clinical cardiovascular consequences [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69 (7): 841-858.
- [21] 崔勇和, 沈先敏. 白藜芦醇抑制 TXNIP/NLRP3 信号通路改善脂多糖诱导的肾小管上皮细胞炎性损伤 [J]. *天津中医药*, 2019, 36 (5): 495-498.
- [22] An X, Zhang Y, Cao Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (5): 1516-1526.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-07)

基于分子对接技术探讨刺玫果对急性心肌缺血的保护作用及其有效成分

于晓瑾¹, 张萌¹, 刘采艳¹, 王硕¹, 舒尊鹏², 杨连荣¹ (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 广东药科大学, 广州 510006)

摘要: **目的** 研究刺玫果乙酸乙酯、正丁醇、水 3 个提取部位对急性心肌缺血小鼠心肌损伤的保护作用, 并采用分子对接技术筛选刺玫果中抗急性心肌缺血的活性成分。**方法** 将小鼠随机分为 6 组, 包括空白组、模型组、生脉饮组、乙酸乙酯组、正丁醇组、水组, 连续灌胃给药 15 d, 在第 14、15 日腹腔注射盐酸异丙肾上腺素 (ISO), 建立急性心肌缺血模型, 考察刺玫果 3 个部位对小鼠急性心肌缺血时心率与 ST 段的影响, 并检测小鼠血清和心肌组织中相关指标。然后, 从相关文献中确定 10 个刺玫果各组分的化学成分, 通过 AutoDockTools 软件与 6 个心肌缺血相关靶标进行对接, 根据对接情况筛选活性成分。**结果** 刺玫果乙酸乙酯、正丁醇和水部位均可降低模型小鼠心率、减轻 ST 段下移现象, 降低模型小鼠血清心肌酶的活性, 同时使心肌中总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 与过氧化氢酶 (CAT) 活性升高, 丙二醛 (MDA) 含量降低, 且乙酸乙酯组与正丁醇组还能纠正乳酸脱氢酶 (LDH) 水平的升高与还原性谷胱甘肽 (GSH) 的减少。而刺玫果中的 10 个成分与心肌缺血相关蛋白都产生较好结合, 其中化合物的结合程度高低顺序为齐墩果酸 > 熊果酸 > 木犀草素 > 槲皮素 > 原花青素 B₂ > 没食子酸 > 金丝桃苷 > 橙皮苷 > 银槲苷 > 芦丁。**结论** 刺玫果对 ISO 所致急性心肌缺血有保护作用, 以刺玫果乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物效果最佳, 且初步推断刺玫果抗急性心肌缺血的有效成分为三萜类、黄酮类、多酚类。

关键词: 刺玫果; 急性心肌缺血; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1263-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.023

Protection of *Rosa davurica* pall. against acute myocardial ischemia and its active ingredients based on molecular docking

YU Xiao-jin¹, ZHANG Meng¹, LIU Cai-yan¹, WANG Shuo¹, SHU Zun-peng², YANG Lian-rong¹ (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

Abstract: Objective To determine the protective effect of the ethyl acetate extract, *n*-butanol extract and water extract of *Rosa davurica* pall. on acute myocardial ischemic injury in mice, and to screen the active components of *Rosa davurica* pall. based on molecular docking. **Methods** Mice were randomly divided into 6 groups: a blank group, a model group, a shengmai Yin group, an ethyl acetate group, an *n*-butanol group and a water group. The four groups were given relevant medicine intragastrically, while the blank control group and the model group were given constant volume of water intragastrically, all for 15 consecutive days. The model of acute myocardial ischemia was established by intraperitoneal injection of isoprenaline on the 14th and 15th day to determine the effect of the three extracts of *Rosa davurica* pall. on the heart rate and ST segment in mice with acute myocardial ischemia, and to detect the related indexes in the serum and the myocardial tissue of mice. Then, 10 chemical components in *Rosa davurica* pall. were determined from relevant literatures. Six targets related to myocardial ischemia were docked by AutoDockTools software, and the active components were screened according to the docking. **Results** The ethyl acetate extract, *n*-butanol extract and water extract of *Rosa davurica* pall. significantly reduced the heart rate, the ST segment

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82174043)。

作者简介: 于晓瑾, 女, 副教授, 主要从事中药活性成分的化学研究, email: yuxiaojin1608@163.com

depression and the activities of serum myocardial enzymes in the mice with acute myocardial ischemia. The three extracts of *Rosa davurica* pall. significantly increased the activities of total superoxide dismutase and catalase, decrease the content of malondialdehyde in the mice. Meanwhile, the ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Rosa davurica* pall. also corrected the elevation of lactate dehydrogenase activity and the reduction of glutathione content in the mice. The 10 components in *Rosa davurica* pall. and myocardial ischemia-related proteins bound equally well, the order of binding being oleanolic acid > ursolic acid > luteolin > quercetin > proanthocyanidin B₂ > gallic acid > hyperoside > hesperidin > tiliroside > rutin. **Conclusion** The ethyl acetate extract and *n*-butanol extract of *Rosa davurica* pall. can best protect against isoprenaline-induced acute myocardial ischemia. Triterpenoids, flavonoids and polyphenols are the possible effective components of *Rosa davurica* pall. acute myocardial ischemia.

Key words: *Rosa davurica* pall.; acute myocardial ischemia; molecular docking

急性心肌缺血 (acute myocardial ischemia, AMI) 是由冠脉闭塞或血管痉挛而导致心肌缺血、缺氧或坏死的一种疾病^[1]。有报道指出,我国心血管疾病的患病率持续上升,而心肌缺血仍是导致心血管疾病患者死亡的关键因素^[2]。目前,其主要治疗手段为介入、药物和外科手术。中药可以通过多靶点多途径发挥预防和改善心肌缺血损伤的作用而受到广泛关注^[3],在心血管系统保护和防治方面具有较好的疗效和应用前景。

刺玫果为蔷薇科蔷薇属植物山刺玫 (*Rosa davurica* pall.) 的果实,是一种药食同源的传统中药,其含有黄酮类、多酚类、多糖、鞣质、皂苷和维生素 C 等成分,具有抗氧化、抗炎、抗疲劳、抗衰老等作用^[4]。研究还发现,其提取物能有效缓解心肌缺血症状^[5]。生脉饮主要成分为党参、麦冬、五味子,用于气阴两亏,心悸气短,脉微自汗。临床研究表明,生脉饮可有效治疗心肌缺血等多种心血管疾病^[6]。目前,对刺玫果的研究主要集中在黄酮、皂苷和多糖的提取、抗氧化等生物活性方面,但是未见刺玫果不同极性部位对急性心肌缺血保护作用的报道,刺玫果的抗急性心肌缺血活性成分也尚不清楚。

分子对接技术是一种中药的计算机辅助药物设计手段,可通过计算机编程建模功能模拟药物分子和受体之间的相互作用方式,并借助 PDB、PubChem 等数据库实现活性成分的虚拟筛选。目前,该技术操作简单,周期短,已经逐渐成为虚拟筛选中药活性组分的重要手段^[7]。

因此,本研究通过建立小鼠急性心肌缺血模型,进一步观察刺玫果不同部位对心肌损伤小鼠的保护作用。同时,采用分子对接技术虚拟筛选刺玫果中抗心肌缺血的活性成分,以阐明中药具备多成分、多靶点、多途径的作用特点,为进一

步探讨刺玫果对心肌缺血疾病的治疗提供参考。

1 材料

1.1 动物

60 只 SPF 级健康昆明小鼠,体质量 (19±2) g,雌雄各半 [黑龙江中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK (黑): 2018-0004]。将小鼠喂养在通风良好,温度、湿度适宜的环境下,每日更换纯净水,喂标准的小鼠饲料,进行 7 d 适应性饲养。

1.2 试药

刺玫果采摘于黑龙江省大兴安岭,经黑龙江中医药大学中药资源与开发教研室王振月教授鉴定为正品。生脉饮 (批号: 200919,仲景宛西制药股份有限公司)。

盐酸异丙肾上腺素 (ISO,批号: 2124297,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);还原性谷胱甘肽 (GSH)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、 α -羟丁酸脱氢酶 (α -HBDH)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所);谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司);水合氯醛 [批号: 20210520,福晨 (天津) 化学试剂有限公司]。

1.3 仪器

BL-420F 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); Synergy MX 酶标仪 (美国 BIOTEK 公司)。

2 方法

2.1 提取物的制备

将刺玫果粉碎,过 40 目筛,以 70% 的乙醇为提取溶剂,料液比为 1:10,在 80℃ 的水浴温度下回流提取 3 次,每次 2 h,减压浓缩至稠膏后,加适量蒸馏水分散,依次用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取分离,各萃取液与萃余液浓缩,60℃

真空干燥箱，即得乙酸乙酯、正丁醇、水（萃余液浓缩）提取部分。灌胃时用蒸馏水制备混悬液。

2.2 分组、给药与造模

取 60 只心电图正常的小鼠，雌雄各半，随机分为 6 组，每组 10 只，分别为空白组、模型组、生脉饮组（ $4.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，阳性对照）、乙酸乙酯组（ $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）、正丁醇组（ $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）、水组（ $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）。空白组与模型组给予等量的蒸馏水，其余各组均灌胃给药（ig），每日一次，连续 15 日。除空白组外，其余各组在第 14、15 日，在给药 2 h 后腹腔注射 ISO（ $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ），空白组腹腔注射等量氯化钠溶液。

2.3 小鼠的心电图检测

末次给药后，将各组小鼠以 2.5% 水合氯醛（ $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）腹腔注射麻醉^[8-10]，仰位固定，将针状电极连接 BL-420F 生物机能实验系统，观察造模后 1、5、10、15、20 min 各组小鼠肢体 III 导联心电图变化，记录各时间点的心率、ST 段波幅。

2.4 小鼠血清中生化指标检测

在末次注射 ISO 16 h 后眼球取血，离心取血清，按试剂盒说明书检测各组小鼠血清中 α -HBDH、CK、AST、LDH 的活力。

2.5 小鼠心肌组织中生化指标检测

在小鼠眼球取血后，处死小鼠，取心脏，用生理盐水冲洗除去血污，剔除脂肪组织，滤纸吸干后称取适量，充分研磨，制得 10% 心肌组织匀浆，按试剂盒说明书检测各组小鼠心肌组织中 T-SOD、CAT 的活力和 MDA、GSH 的含量。

2.6 软件及数据库

AutoDockTools 软件；PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>）；PDB 数据库（<https://www.rcsb.org>）；uniprot 数据库（<https://www.uniprot.org>）；CTD 数据库（<http://ctdbase.org>）。

2.7 配体的选择

根据相关文献可知^[11-18]，刺玫果含有以下 10 种潜在活性成分，其中黄酮类 7 个，三萜 2 个，多酚类 1 个，并在 PubChem 数据库中下载这些化合物的 3D 结构，详细信息见表 1。

2.8 心肌缺血蛋白受体的选择

通过 CTD 数据库和相关文献搜集到与心肌缺血相关的 6 个靶点蛋白，分别为肿瘤坏死因子（TNF）、白细胞介素- 1β （IL- 1β ）、抗凋亡蛋白（Bcl-2）、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3（CASP3/Caspase-3）、转化生长因子 β 1（TGFB1），蛋白激酶 B（AKT1）（见表 2），在 PDB 数据库中优先选择具有原配体且

表 1 刺玫果中 10 个化合物

Tab 1 Ten compounds from *Rosa davurica* pall.

编号	化合物	PubChem CID	分子式
1	芦丁	5280805	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$
2	金丝桃苷	5281643	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$
3	槲皮素	5280343	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$
4	齐墩果酸	10494	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$
5	熊果酸	64945	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$
6	原花青素 B ₂	130556	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$
7	没食子酸	370	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$
8	木犀草素	5280445	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$
9	橙皮苷	10621	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$
10	银椴苷	5320686	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$

分辨率好的人源受体晶体结构，下载三维结构。

表 2 心肌缺血相关的靶点蛋白

Tab 2 Target proteins associated with myocardial ischemia

蛋白	晶体
TNF	4TWT
IL- 1β	3O4O
Bcl-2	1YSW
CASP3	1CP3
TGFB1	3RJR
AKT1	4GV1

2.9 分子对接

首先采用 PyMOL 软件除去蛋白分子的原配体与水分子，其次采用 AutoDockTools 进行配体与靶点蛋白的两两对接，获取结合能值，对接结果采用 PyMOL 软件进行可视化。同时，为了对接方法的可靠性与对接参数的合理性，计算原配体与对接构象的均方根偏差（root mean square deviation, RMSD），通常认为 RMSD 在 2 Å 范围之内。

2.10 统计学分析

实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行处理分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有数据均符合正态分布，方差齐时组间比较采用单因素方差分析和 LSD 两两比较，方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 刺玫果不同部位对小鼠心电图的影响

除空白组外，其余组小鼠注射 ISO，模型组小鼠 ST 段明显下移（为急性心肌缺血造模成功标志^[19]），见图 1。由图 2 可知，与空白组相比，各组心率开始明显上升，其中，模型组心率于造模 1~10 min 显著上升。与模型组相比，给药后各组心率都有明显降低，其中，乙酸乙酯组、正丁醇组和水组于造模 10 min 时心率显著降低（ $P < 0.01$ ）。由图 3 可知，与空白组相比，各组 ST 段明显下移，其中模型组 ST 段

在 1 ~ 20 min 内极显著下移 ($P < 0.01$), 提示造模成功。与模型组相比, 给药组在 1 ~ 20 min 内均能显著抑制急性心肌缺血小鼠 ST 段的下移。

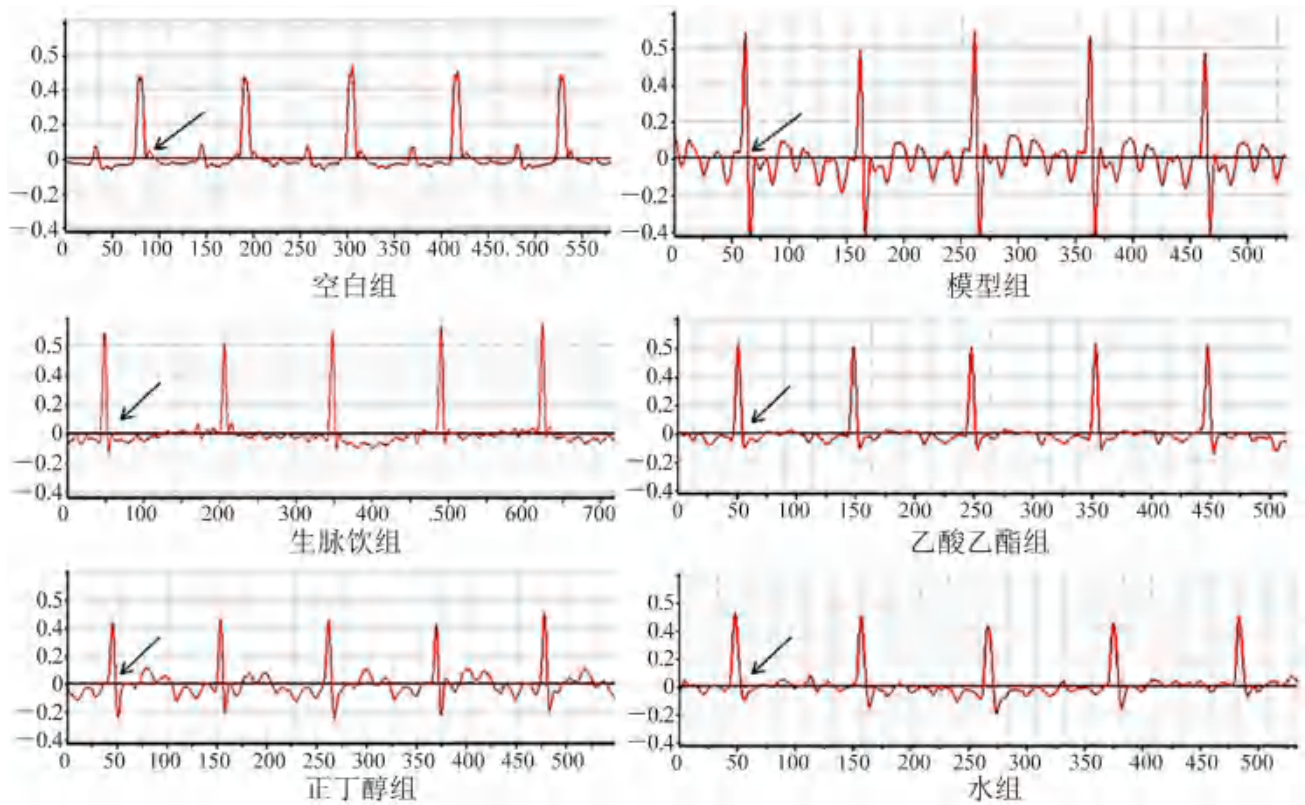


图 1 刺玫果不同部位的心电图

Fig 1 Electrocardiogram of different extracts of *Rosa davurica* pall.

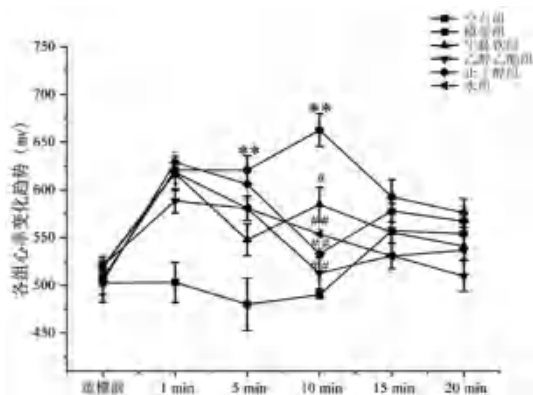


图 2 刺玫果不同部位对急性心肌缺血小鼠心率的影响

Fig 2 Effect of different extracts of *Rosa davurica* pall. on the heart rate of mice with acute myocardial ischemia

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

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

3.2 刺玫果不同部位对小鼠血清中生化指标的影响

由图 4 可知, 与空白组相比, 模型组小鼠血清中 α -HBDH、CK、AST 和 LDH 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各给药组都能显著改善 α -HBDH、CK、AST 水平的异常情况, 此外,

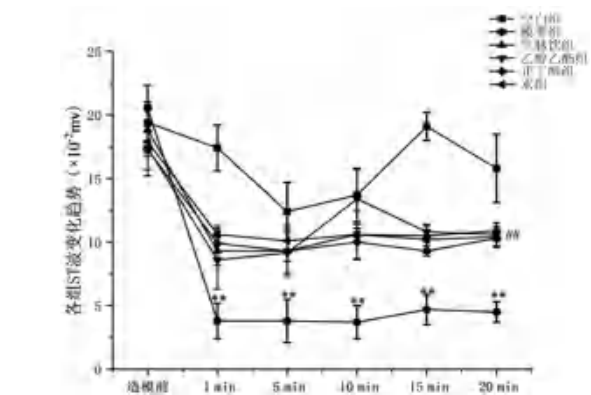


图 3 刺玫果不同部位对急性心肌缺血小鼠 ST 段的影响

Fig 3 Effect of different extracts of *Rosa davurica* pall. on ST segment in mice with acute myocardial ischemia

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, $^{\#\#}P < 0.01$.

乙酸乙酯组和正丁醇组还能明显降低 LDH 的水平。

3.3 刺玫果不同部位对小鼠心肌组织中生化指标的影响

由图 5 可知, 与空白组相比, 模型组小鼠心肌组织中 T-SOD 活力、GSH 含量和 CAT 活力显著降

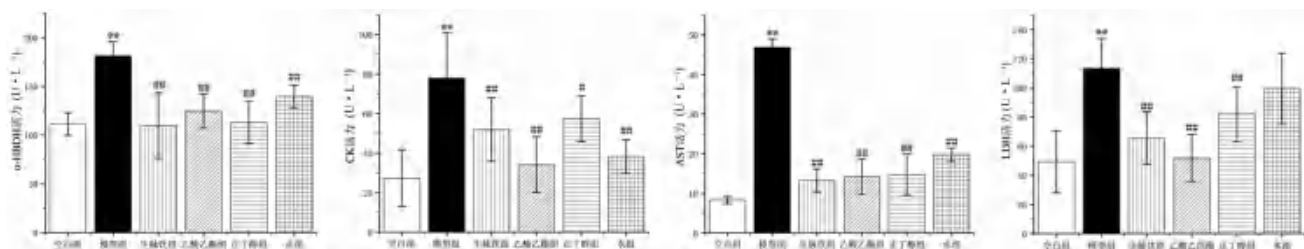


图 4 刺玫果不同提取部位对急性心肌梗死小鼠血清心肌酶的影响

Fig 4 Effect of different extracts of *Rosa davurica* pall. on serum myocardial enzymes in mice with acute myocardial ischemia

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

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

低 ($P < 0.01$), MDA 含量明显提高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 乙酸乙酯组、正丁醇组和水组小鼠心肌组织中总 SOD 和 CAT 活力明显增强, MDA

含量也明显减少, 此外, 乙酸乙酯组与正丁醇组心肌组织中 GSH 含量明显增多。

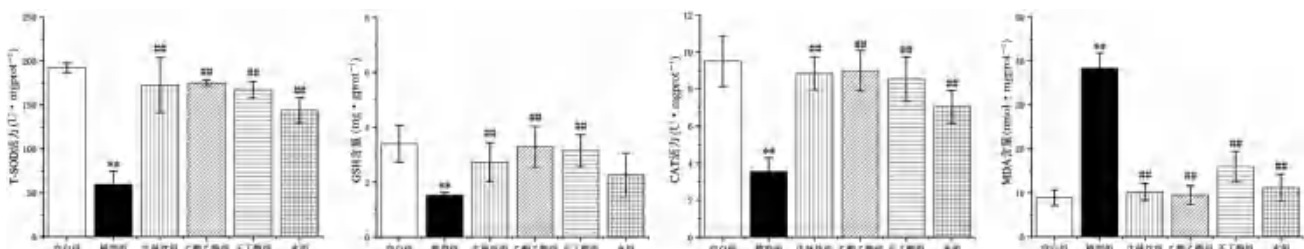


图 5 刺玫果不同提取部位对急性心肌梗死小鼠心肌组织中抗氧化因子的影响

Fig 5 Effect of different extracts of *Rosa davurica* pall. on antioxidant factors in myocardial tissue of mice with acute myocardial ischemia

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, ### $P < 0.01$.

3.4 分子对接实验结果

将 6 个靶点蛋白的原有配体剔除, 然后在对接到原活性位点上, 计算原配体与对接后配体的 RMSD, 见表 3, 结果均小于 2, 说明所对接的分子构象能够较好地重现配体与蛋白的结合模式, 对接参数设置合理。

表 3 各靶点重新对接后与原靶点构象的 RMSD

Tab 3 RMSD of each target conformation after re-docking with the original target

靶点名称	RMSD/Å
TNF (4TWT)	0.000
IL-1 β (3O4O)	0.405
Bcl-2 (1YSW)	1.485
CASP3 (1CP3)	0.015
TGFB1 (3RJR)	0.251
AKT1 (4GV1)	0.684

应用 AutoDockTools 软件进行蛋白与药物分子的两两对接, 对接结合能量见图 6。其中, 横坐标为相关靶点, 纵坐标为刺玫果主要活性成分。颜色越深表示结合能越低, 受体与配体结合得越好。结果显示, 所有分子与靶点蛋白的最低结合能在 $-8.69 \sim 0.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 当结合能小于 0, 表明受体与配体可以自发结合, 与靶点蛋

白之间均具有良好的结合活性。此外, 基于个案排秩加法得到 10 个成分对接综合得分, 从大到小依次为齐墩果酸、熊果酸、木犀草素、槲皮素、原花青素 B₂、没食子酸、金丝桃苷、橙皮苷、银槲苷、芦丁。

为更清晰地了解化合物与蛋白的对接情况, 选取 6 个结合自由能较低的结果进行可视化处理。由图 7A 可知, 熊果酸与 TNF 中的氨基酸残基 CYS69B、LYS112B 形成氢键相互作用, 与 TRP114B、CYS69B 形成疏水性相互作用; 由图 7B 可知, 齐墩果酸与 IL-1 β 中的氨基酸残基 LYS165C 形成氢键相互作用, 与 LYS153C 形成疏水性相互作用; 由图 7C 可知, 橙皮苷与 Bcl-2 中的氨基酸残基 TYR16A、SER22A、TYR19A、GLN23A、ASP99A、ARG103A 形成氢键相互作用, 与 LYS20A、SER102A 形成疏水性相互作用; 由图 7D 可知, 原花青素 B₂ 与 CASP3 中的氨基酸残基 LYS260B、GLU248B、ASP990D、GLU246B 形成氢键相互作用, 与 GLU246B、PHE247B 形成疏水性相互作用; 由图 7E 可知, 齐墩果酸与 TGFB1 中的氨基酸残基 HIS289B 形成氢键相互作用, 与 TYR288B、ARG56A、PRO334B、LEU335B、

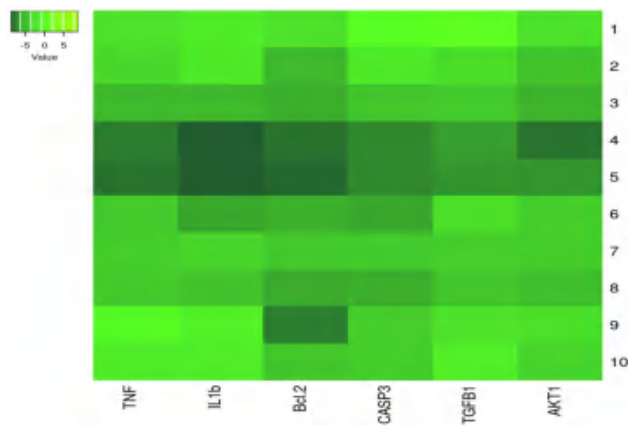


图 6 分子对接热图

Fig 6 Molecular docking heat-map

1. 芦丁 (rutin); 2. 金丝桃苷 (hyperoside); 3. 槲皮素 (quercetin);
4. 齐墩果酸 (oleanolic acid); 5. 熊果酸 (ursolic acid); 6. 原花青素 B₂ (proanthocyanidin B₂); 7. 没食子酸 (gallic acid); 8. 木犀草素 (luteolin); 9. 橙皮苷 (hesperidin); 10. 银椴苷 (tiliroside)

ILE354B 形成疏水性相互作用; 由图 7F 可知, 槲皮素与 AKT1 中的氨基酸残基 THR450A、PHE150A、TYR152A、ILE447A 形成氢键相互作用, 与 TYR152A 形成疏水性相互作用。

4 讨论

心肌中通常存在多种心肌酶, 其中包括 α -HBDH、CK、AST、LDH 等, 通常将这 4 种酶统称为心肌酶谱, 可以间接反映心肌损伤程度。目前大量研究表明^[20], 心肌缺血会导致抗氧化与氧化体系失衡, 产生大量活性氧 (ROS) 物质, 导致心肌氧化应激损伤, SOD、GSH、CAT 是体内重要的抗氧化酶体系, 可清除体内过多的氧自由基, 而 MDA 是自由基攻击机体的产物, 其含量反映机体过氧化程度。因此, 测量以上指标有助于评价抗心肌缺血药物的作用效果。本研究结果显示, 各给药组均可降低血清中 α -HBDH、

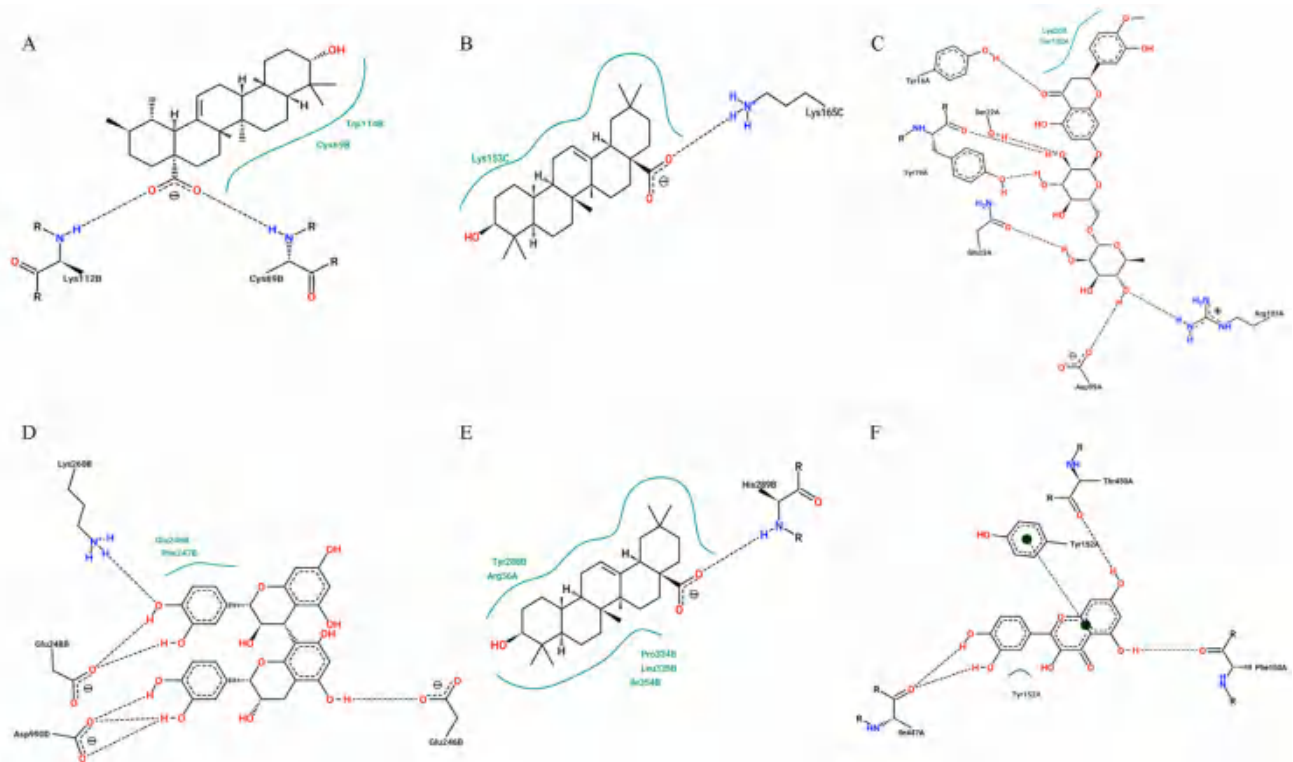


图 7 主要活性成分与靶点蛋白的分子对接模型

Fig 7 Molecular docking model of the main active ingredients and target proteins

- A. TNF 与熊果酸 (TNF and ursolic acid); B. IL-1 β 与齐墩果酸 (IL-1 β and oleanolic acid); C. Bcl-2 与橙皮苷 (Bcl-2 and hesperidin); D. CASP3 与原花青素 B₂ (CASP3 and proanthocyanidin B₂); E. TGFB1 与齐墩果酸 (TGFB1 and oleanolic acid); F. AKT1 与槲皮素 (AKT1 and quercetin)

CK、AST 的活性、降低心肌组织中 MDA 的含量, 升高心肌组织中总 SOD 和 CAT 活力, 而乙酸乙酯组和正丁醇组小鼠血清中 LDH 的水平明显减少, 心肌中 GSH 的活性升高, 且乙酸乙酯组小鼠的大多生化指标与对照组无显著差异。因此对急性心肌缺血小鼠的保护作用从强到弱依次为乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位。

心肌缺血的发生机制比较复杂, 与自由基损伤、钙离子超载、血管内皮细胞损伤和细胞凋亡等诸多因素有关^[21]。有研究表明, Bcl-2、Caspase-3、TNF、IL-1 β 、TGFB1 与 AKT1 蛋白都与心肌缺血都有着密切联系^[22-25]。当药物进行预保护后, 其有效成分与蛋白进行结合从而调控相关蛋白的表达, 进一步减轻急性心肌缺血损伤。从分子对接综合结

果来看,这 10 个成分均是抗急性心肌缺血活性成分,其中,齐墩果酸和熊果酸对接结果优良,两者为同分异构体,可以通过其抗氧化、抗炎、抗凋亡活性改善心肌损伤,这与文献报道符合^[26-27]。

相关研究显示,刺玫果乙酸乙酯相、正丁醇相与水相相比,槲皮素、齐墩果酸、熊果酸、原花青素 B₂ 成分含量高^[14],推测这是刺玫果乙酸乙酯部位和正丁醇部位抗急性心肌缺血作用更好的原因之一;而乙酸乙酯部位与正丁醇部位相比,其含有综合对接结果较佳的金丝桃苷,这也可能是乙酸乙酯部位对急性心肌缺血小鼠疗效强的原因之一。

综上所述,对 ISO 所诱导的小鼠急性心肌缺血损伤的影响中,刺玫果乙酸乙酯部位和正丁醇部位的保护作用优于水部位。同时,本实验利用分子对接技术筛选出刺玫果中抗急性心肌缺血活性成分,阐明刺玫果通过多成分-多靶点-多途径发挥保护作用。分子对接可以实现中药成分的快速筛选,节省时间。但该技术具有局限性,不能完全实现体内药物分子与受体蛋白结合的模型,因此,未来的研究方向会探究刺玫果防治急性心肌缺血的作用机制,以进一步验证分子对接结果。

参考文献

- [1] He Y, Liu Y, Zhou M, et al. C-type natriuretic peptide suppresses ventricular arrhythmias in rats with acute myocardial ischemia [J]. *Peptides*, 2020, 126 (C): 170238.
- [2] 国家心血管病中心.《中国心血管健康与疾病报告》2020[J]. *心肺血管病杂志*, 2021, 40 (10): 1005-1009.
- [3] 耿乃志, 瞿安琪, 金娟, 等. 中医药治疗无症状性心肌缺血作用机制的研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31 (9): 1310-1314.
- [4] 王彦硕. 刺玫果活性成分的提取及抗炎、免疫活性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [5] 侯少平, 侯敏娜. 山刺玫化学成分及药理作用研究概况 [J]. *陕西农业科学*, 2021, 67 (12): 78-80, 97.
- [6] 蔡小军, 许惠琴, 方泰惠, 等. 生脉饮对气阴两虚型心肌缺血病证结合大鼠模型的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27 (2): 3-6.
- [7] 李志立, 杨冰, 翟艳敏, 等. 基于分子对接技术虚拟筛选红花中抗心肌缺血活性组分 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (12): 2881-2890.
- [8] 乔逸, 雷露, 曹金一, 等. 黄芪-红花预防大鼠脑缺血再灌注损伤的药对、配伍、给药剂量研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (11): 2598-2605.
- [9] 杜孟姣, 钟艳梅, 邓善滨, 等. 盐酸班布特罗改善慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的作用机制研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31 (5): 564-570.
- [10] 谷艳, 臧鹏, 李进霞, 等. 基于超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱的深静脉血栓模型大鼠血浆代谢组学分析 [J]. *色谱*, 2022, 40 (8): 736-745.
- [11] 王光函, 姜鸿, 张振秋, 等. 刺玫果药材中黄酮类成分测定 [J]. *中成药*, 2011, 33 (4): 710-712.
- [12] Kuang HX, Kasai R, Ohtani K, et al. Chemical constituents of pericarps of *Rosa davurica* Pall. a traditional Chinese medicine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37 (8): 2232-2233.
- [13] 娜仁图雅, 翰塔娜. 刺玫果中齐墩果酸、熊果酸含量测定 [J]. *北方药学*, 2014, 11 (5): 17-18.
- [14] 张晓丽. 刺玫果化学成分及其生物活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [15] 杨扬, 王晓林, 薛健飞, 等. 刺玫果提取物中没食子酸的含量测定 [J]. *食品工业*, 2015, 36 (1): 284-286.
- [16] 雷永平, 钟方丽, 王晓林, 等. 离子液体辅助提取刺玫果中木犀草素与金丝桃苷的工艺研究 [J]. *经济林研究*, 2018, 36 (3): 142-150.
- [17] 符群, 吴桐, 廖声玲, 等. 刺玫果醇提物制备及其主要活性成分与抗氧化相关性 [J]. *北京林业大学学报*, 2019, 41 (8): 131-137.
- [18] 李维, 朱捷, 许忠海, 等. 刺玫果功效成分和开发利用综述 [J]. *现代农业科技*, 2019 (15): 229-231.
- [19] 陈念, 王建, 樊亚梅, 等. 苏合香对大鼠心肌缺血的影响 [J]. *中成药*, 2019, 41 (3): 533-538.
- [20] Halladin NL. Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries [J]. *Danish Med J*, 2015, 62 (4): B5054.
- [21] Wu C, Chen RL, Wang Y, et al. Acacetin alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and apoptosis via the Nrf-2/HO-1 pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60 (1): 553-561.
- [22] 马汉宁, 姬艳燕, 陈伟, 等. 甘草次酸通过抑制 Caspase 3/Bax/Bcl-2 凋亡信号通路保护心脏骤停心肺复苏大鼠心脏功能 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35 (4): 28-33.
- [23] Ashton KJ, Tupicoff A, Williams-Pritchard G, et al. Unique transcriptional profile of sustained ligand-activated preconditioning in pre-and post-ischemic myocardium [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e72278.
- [24] Liao Z, Li D, Chen Y, et al. Early moderate exercise benefits myocardial infarction healing via improvement of inflammation and ventricular remodelling in rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (12): 8328-8342.
- [25] Kunuthur SP, Mocanu MM, Hemmings BA, et al. The Akt1 isoform is an essential mediator of ischaemic preconditioning [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16 (8): 1739-1749.
- [26] Senthil S, Chandramohan G, Pugalendi KV. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats [J]. *Int J Cardiol*, 2007, 119 (1): 131-133.
- [27] Long C, Yang J, Yang H, et al. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by oleanolic acid preconditioning via its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (6): 4697-4704.

(收稿日期: 2022-08-29; 修回日期: 2022-12-07)

不同干燥方法对桑叶主要成分和芦丁含量的影响

林伟雄^{1,2}, 邓李红^{1,2}, 钟志奎^{1,2}, 陈仕妍^{1,2}, 杨赞^{1,2}, 罗毓^{1,2}, 张正^{1,2*}, 吴晓英^{1,2} (1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 2. 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** 研究阴干、晒干、烘干 3 种不同干燥方法对桑叶化学成分的影响, 为桑叶的采收加工提供参考。**方法** 测定桑叶中芦丁的含量和特征图谱, 通过相似度评价、方差分析和熵权 TOPSIS 法对不同方法干燥的桑叶进行一致性和差异性研究。**结果** 在采集的特征图谱中, 不同方法干燥的桑叶确定了 7 个共有峰, 指认 1、3、6 号峰分别为新绿原酸、隐绿原酸、芦丁; 相似度分析结果显示不同方法干燥的桑叶相似度均大于 0.95, 方差分析结果表明方法干燥的桑叶 7 个共有峰含量差异无统计学意义; 熵权 TOPSIS 法分析显示不同方法干燥的桑叶 C_i 值存在差异, 晒干的 C_i 值整体优于阴干和烘干, 烘干的 C_i 值浮动较大, 阴干的 C_i 值则整体偏低, 提示晒干桑叶质量整体稳定且优于阴干和烘干桑叶。含量测定结果显示晒干桑叶的芦丁含量整体高于阴干和烘干桑叶, 与熵权 TOPSIS 法分析一致。**结论** 该方法稳定性及重复性较好, 可用于评价不同干燥方法对桑叶化学成分的影响。

关键词: 桑叶; 干燥方法; 含量测定; 特征图谱; 方差分析; 熵权 TOPSIS 法

中图分类号: R243

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1270-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.024

Effect of drying methods on the main compositions and rutin content in mulberry leaves

LIN Wei-xiong^{1,2}, DENG Li-hong^{1,2}, ZHONG Zhi-kui^{1,2}, CHEN Shi-yan^{1,2}, YANG Zan^{1,2}, LUO Yu^{1,2}, ZHANG Zheng^{1,2*}, WU Xiao-ying^{1,2} (1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan Guangdong 528244; 2. Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244)

Abstract: Objective To determine the influence of 3 drying methods drying in the shade, drying in the sun and heat drying on the chemical compositions of mulberry leaves, to provide reference for mulberry leaves harvesting and processing. **Methods** Rutin content and characteristic chromatogram of mulberry leaves were collected. The consistency and difference in mulberry leaves prepared with different drying methods were studied by similarity evaluation, variance analysis, and entropy TOPSIS method. **Results** In the collected characteristic chromatogram, 7 common peaks were confirmed in mulberry leaves by different drying methods. Peaks 1, 3 and 6 were identified as neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and rutin. Similarity analysis showed that the similarity of mulberry leaves by different drying methods was greater than 0.95, and variance analysis also showed that content of 7 common peaks of mulberry leaves prepared by different drying methods had no difference. But entropy TOPSIS showed difference in C_i values of mulberry leaves. C_i values of mulberry leaves dried under the sun were better than dried under the shade and in the heat, and C_i values of mulberry leaves dried in the heat fluctuated, while C_i values of mulberry leaves dried in the shade were overall lower, indicating the quality of mulberry leaves dried under the sun was generally stable and better than that in the shade and in the heat. Rutin content of mulberry leaves dried under the sun was more

基金项目: 佛山市应急科技攻关专项 (No.2020001000206)。

作者简介: 林伟雄, 男, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药饮片及配方颗粒工艺和质量标准研究, email: linwx2020@163.com

*通信作者: 张正, 男, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药饮片及配方颗粒工艺和质量标准研究, email: 524928277@qq.com

than mulberry leaves dried in the shade or in the heat, which was consistent with that of entropy TOPSIS analysis. **Conclusion** The method has good stability and reproducibility, which can be used to evaluate the effect of different drying methods on the chemical compositions of mulberry leaves.

Key words: mulberry leaf; drying method; content determination; characteristic chromatogram; variance analysis; entropy TOPSIS

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 性味甘、苦、寒, 归肺、肝经, 具有疏散风热、清肝明目、清肺润燥的功效, 主要用于治疗风热感冒、头晕头痛、肺热燥咳、目赤昏花等症^[1]。桑叶资源分布广泛, 主产于广东、广西、安徽、重庆、云南等地^[2], 具有降血糖、调血脂、抗病毒、抗氧化等药理作用^[3-6], 含有黄酮类、酚酸类、生物碱类等主要化学成分^[2, 7-9]。桑叶作为传统大宗中药材, 临床应用十分广泛, 采收加工方法也丰富多样^[10]。历代本草记载, 民国以前桑叶加工方法以阴干、炙干为主, 阴干、炙干法首次明确记载于宋《本草图经》^[11]; 民国至今桑叶加工方法则由阴干、炙干转变为晒干, 晒干法最早见于清《本经疏证》^[12], 被后续本草沿用至今。本研究在测定桑叶指标成分芦丁含量^[1]的基础上, 建立桑叶药材高效液相色谱特征图谱, 通过单因素方差分析和熵权 TOPSIS 法等对芦丁含量及特征图谱的多指标变量进行统计分析, 探究阴干、晒干、烘干 3 种加工干燥方法对桑叶化学成分的影响, 建立科学合理的桑叶加工干燥方法评价体系。

1 材料

1.1 仪器

ARC 型高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); ME204E 型、XP26 型分析天平 (瑞士 METTLER

TOLEDO 公司); MiliQ Direct 8 型超纯水机 (德国默克有限公司); KQ-500DE 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 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)。

1.2 试药

新绿原酸 (批号: DSTDX001503, 纯度: 99.58%)、隐绿原酸 (批号: DST220104-035, 纯度: 99.30%)、芦丁 (批号: DST210520-017, 纯度: 99.19%) (成都乐美天医药科技有限公司); 液相用水为超纯水, 甲醇、磷酸为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

15 批桑叶药材 (编号 1 ~ 15) 经广东一方制药有限公司孙冬梅教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 来源信息详见表 1。15 批桑叶药材, 每批均分 3 份, 分别平铺于托盘中, 一份于室内阴凉干燥通风处放置阴干, 得桑叶阴干饮片 (编号 Y1 ~ Y15); 一份于室外阳光直射处放置晒干, 得桑叶晒干饮片 (编号 S1 ~ S15); 一份于烘箱内设置 55 °C 烘干, 得桑叶烘干饮片 (编号 H1 ~ H15)。3 种干燥方法均是以药典标准水分不超过 15% 评价为干, 并测定各批次药材水分在 10% ~ 12%。干燥过程中尽可能确保每种方法不同编号的样品处理一致。

表 1 15 批桑叶药材来源信息

Tab 1 Source information of 15 batches of mulberry leaf

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
1	广东揭阳	2020 年 9 月	6	广东东莞	2020 年 10 月	11	广东佛山	2020 年 10 月
2	广东揭阳	2020 年 9 月	7	云南昆明	2020 年 9 月	12	广东佛山	2020 年 10 月
3	广东揭阳	2020 年 9 月	8	江苏宿迁	2020 年 10 月	13	广东佛山	2020 年 10 月
4	广东东莞	2020 年 10 月	9	河南确山	2020 年 10 月	14	广东佛山	2020 年 11 月
5	广东东莞	2020 年 10 月	10	广西柳州	2020 年 9 月	15	广东佛山	2020 年 11 月

2 特征图谱的建立及分析

2.1 色谱条件

Waters XBridge C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇为流动相 A, 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 15%A; 5 ~ 20 min, 15% ~ 30%A; 20 ~ 40 min, 30% ~ 60%A; 40 ~ 42 min, 60% ~ 15%A; 42 ~ 47 min,

15%A); 检测波长 358 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取新绿原酸、隐绿原酸和芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含新绿原酸 39.04 μg、隐绿原酸 24.83 μg 和芦丁 22.42 μg 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取阴干、晒干和烘干桑叶样品粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 10 mL,称定重量,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz) 45 min,取出冷却,再称定重量,用 50% 甲醇补量,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取桑叶供试品粉末约 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,重复进样 6 次,以 6 号峰芦丁为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间(RRT)和相对峰面积(RPA)的 RSD 均小于 3.0%,提示仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取桑叶供试品粉末约 0.5 g,精密称定,平行制备 6 份,按“2.3”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 6 号峰芦丁为参照峰(S),计算得到各特征峰 RRT 和 RPA 的 RSD 均小于 3.0%,提示该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取桑叶供试品粉末约 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1”

项下色谱条件测定,以 6 号峰芦丁为参照峰(S),计算得到各特征峰 RRT 和 RPA 的 RSD 均小于 3.0%,提示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC 特征图谱的建立及相似度评价

取 15 批阴干、晒干及烘干桑叶样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,采集 15 批不同干燥方法桑叶色谱图,将其导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件中进行色谱图匹配,分别以 Y1、S1、H1 图谱作参照图谱,设置时间窗宽度为 0.1 min,经多点校正、全谱峰匹配、中位数法分别生成阴干、晒干及烘干桑叶的共有特征图谱及相应的对照特征图谱,详见图 1。15 批阴干、晒干及烘干桑叶共有特征图谱中均标定了共有峰 7 个,通过对照品比对,指认了 1 号峰为新绿原酸、3 号峰为隐绿原酸、6 号峰为芦丁,详见图 2。计算 15 批阴干、晒干及烘干桑叶样品特征图谱与各自生成的共有对照特征图谱的相似度,同批次阴干、晒干及烘干样品间的相似度,结果见表 2。结果显示相同干燥方法下的不同批次桑叶样品以及不同干燥方法下的同批次桑叶样品间相似度均大于 0.95,表明不同批次及不同干燥方法的同批次桑叶样品间的质量一致性较好。

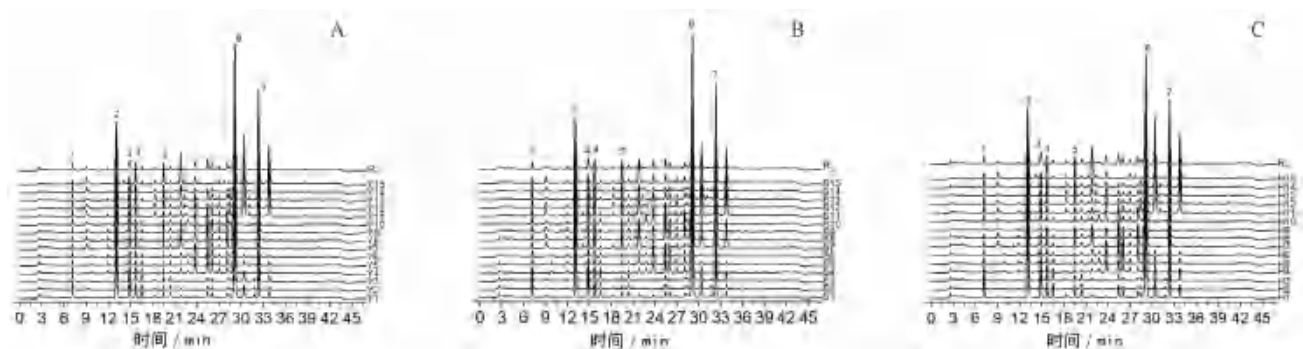


图 1 不同干燥方法桑叶共有特征图谱及对照图谱(R)

Fig 1 Common characteristic chromatogram and reference characteristic chromatogram (R) by different drying methods of mulberry leaves

A. 阴干(drying in the shade); B. 晒干(drying in the sunshine); C. 烘干(heat drying)

2.6 方差分析

采用 SPSS 20.0 软件对 15 批阴干、晒干及烘干桑叶共有特征峰的单位峰面积进行单因素方差分析。结果显示,共有峰 1~7 单位峰面积在阴干、晒干、烘干三者之间差异无统计学意义($P > 0.05$),表明不同干燥方法对桑叶化学成分影响较小,但整体上晒干桑叶的峰面积含量优于阴干与烘干桑叶,另烘干桑叶峰 1~3 的峰面积含量略高于晒干桑叶,而峰 4~7 的峰面积含量较晒干

桑叶则略有下降,提示峰 4~7 或为热敏成分。15 批阴干、晒干及烘干桑叶特征图谱共有峰单位峰面积的方差分析结果见表 3。

2.7 熵权 TOPSIS 法分析

2.7.1 建立初始决策矩阵 假设样本有 m 个,指标有 n 个。各样本(1, 2, 3, ..., m)在各指标(1, 2, 3, ..., n)下的测量值为 X_{ij} ,按如下公式计算初始决策矩阵 V 。

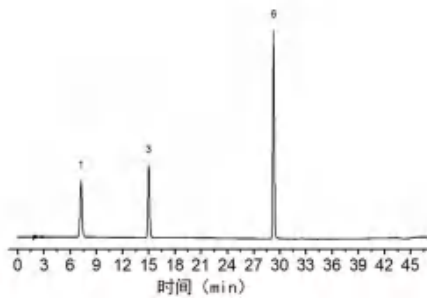


图 2 混合对照品溶液的 HPLC 图
Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference substances

1. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 6. 芦丁 (rutin)

表 2 不同干燥方法桑叶特征图谱的相似度结果

Tab 2 Similarity of the characteristic chromatogram of mulberry leaves by different drying methods

批次	阴干	晒干	烘干	阴干与晒干	晒干与烘干	烘干与阴干
1	0.986	0.990	0.996	0.997	0.999	0.995
2	0.985	0.984	0.965	1.000	0.984	0.981
3	0.990	0.992	0.996	0.997	0.998	0.999
4	0.993	0.985	0.992	0.987	0.999	0.992
5	0.987	0.985	0.986	0.997	0.999	0.998
6	0.993	0.987	0.987	0.994	0.999	0.989
7	0.995	0.995	0.994	0.997	0.997	1.000
8	0.980	0.991	0.974	0.999	0.999	1.000
9	0.983	0.988	0.993	0.994	0.995	0.990
10	0.982	0.981	0.989	1.000	1.000	1.000
11	0.999	0.996	0.987	0.989	0.967	0.989
12	0.980	0.992	0.989	0.994	0.996	0.998
13	0.999	0.996	0.998	0.999	0.999	0.999
14	0.983	0.990	0.992	0.996	0.996	0.996
15	0.984	0.992	0.984	0.999	0.999	0.999

表 3 不同干燥方法桑叶特征图谱共有峰单位峰面积方差分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Tab 3 Variance analysis of common peak area of mulberry leaves by different drying methods ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

共有峰	阴干	晒干	烘干
1	72 501.33 ± 20 315.80	76 520.73 ± 24 010.48	80 433.20 ± 38 269.91
2	606 934.07 ± 267 044.42	646 428.67 ± 253 508.71	704 639.40 ± 251 904.10
3	113 813.67 ± 36 594.97	123 350.87 ± 44 798.79	137 525.93 ± 69 814.66
4	98 114.80 ± 36 159.27	102 490.07 ± 40 642.08	89 928.13 ± 31 809.23
5	70 214.53 ± 44 972.98	81 893.80 ± 54 804.26	59 611.60 ± 29 304.11
6	1 015 570.33 ± 409 264.17	1 180 612.73 ± 426 067.12	1 116 798.53 ± 376 830.34
7	502 579.27 ± 279 744.76	558 532.73 ± 294 685.32	495 255.93 ± 203 671.35

2.7.5 贴近度的计算及评价 按如下计算各批次不同干燥方法桑叶样品中最优向量 Z^+ 和最劣向量 Z^- 的距离 D , 和各批次不同干燥方法桑叶样品与最佳方案的欧氏贴近度 C_i , 并进行排名, C_i 越大表明越接近最佳方案, 结果见表 4 和图 3。

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^m (z_{ij}^+ - z_j^+)^2}, D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^m (z_{ij}^- - z_j^-)^2}$$

$$C_i = D_i^- / (D_i^+ + D_i^-)$$

$$V = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2n} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ X_{i1} & X_{i2} & \dots & X_{in} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ X_{m1} & X_{m2} & \dots & X_{mn} \end{bmatrix}$$

2.7.2 建立标准化决策矩阵 以 15 批不同干燥方法桑叶特征图谱 7 个共有特征峰的单位峰面积为高优指标, 按如下公式对原始数据进行高优指标同向化处理, 计算指标越大越优型 R_{ij} , 然后进行数据归一化处理。

$$R_{ij} = \frac{X_{ij} - \min(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{mj})}{\max(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{mj}) - \min(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{mj})}$$

2.7.3 确定各指标权重 按如下公式计算各评价指标的熵值 E_j 和权重 w_j , 得到熵值 $E_j = (0.9486, 0.9437, 0.9201, 0.9488, 0.9100, 0.9547, 0.9289)$; 权重 $w_j = (0.1156, 0.1265, 0.1795, 0.1150, 0.2021, 0.1017, 0.1597)$ 。

$$E_j = -k \sum_{i=1}^m R_{ij} \ln R_{ij}$$

$$k = 1/\ln m, \text{ 当 } R_{ij} = 0 \text{ 时, 令 } R_{ij} \ln R_{ij} = 0$$

$$w_j = [(1 - E_j) / \sum_{j=1}^n (1 - E_j)] (\sum_{j=1}^n w_j = 1)$$

2.7.4 建立加权决策矩阵 加权决策矩阵计算公式如下, 确定最优向量 $Z^+ = (Z_1^+, Z_2^+, \dots, Z_n^+)$, 其中 $Z_j^+ = \max(Z_{1j}, Z_{2j}, \dots, Z_{mj})$; 最劣向量 $Z^- = (Z_1^-, Z_2^-, \dots, Z_n^-)$, 其中 $Z_j^- = \min(Z_{1j}, Z_{2j}, \dots, Z_{mj})$ 。得到 $Z_j^+ = (0.1156, 0.1265, 0.1795, 0.1150, 0.2021, 0.1017, 0.1597)$; Z_j^- 均为 0。

$$Z = (R_{ij} \times w_j)_{m \times n}$$

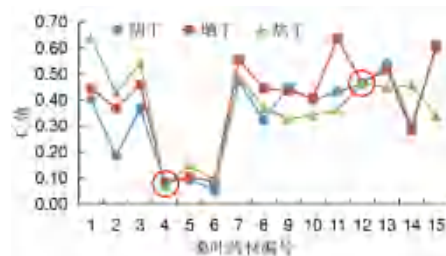


图 3 15 批不同干燥方法桑叶样品 C_i 值折线图
Fig 3 C_i value fold line diagram of 15 batches of different drying methods of mulberry leaves

表 4 15 批不同干燥方法桑叶样品质量评价排序

Tab 4 Quality evaluation ranking of 15 batches of mulberry leaf samples by different drying methods

编号	D^+	D^-	C_i	排序	编号	D^+	D^-	C_i	排序	编号	D^+	D^-	C_i	排序
Y1	0.239	0.162	0.404	24	S1	0.229	0.183	0.444	19	H1	0.166	0.298	0.641	1
Y2	0.330	0.075	0.185	36	S2	0.270	0.159	0.370	27	H2	0.271	0.202	0.428	22
Y3	0.258	0.150	0.367	28	S3	0.229	0.194	0.458	14	H3	0.201	0.237	0.540	6
Y4	0.365	0.033	0.083	43	S4	0.367	0.034	0.084	42	H4	0.366	0.028	0.070	44
Y5	0.360	0.038	0.095	39	S5	0.355	0.042	0.105	38	H5	0.337	0.060	0.151	37
Y6	0.376	0.022	0.055	45	S6	0.365	0.034	0.086	41	H6	0.360	0.035	0.089	40
Y7	0.227	0.204	0.473	10	S7	0.197	0.246	0.556	5	H7	0.220	0.212	0.490	9
Y8	0.283	0.135	0.323	33	S8	0.235	0.188	0.444	18	H8	0.276	0.163	0.371	26
Y9	0.239	0.195	0.450	16	S9	0.245	0.188	0.435	20	H9	0.285	0.138	0.327	32
Y10	0.260	0.173	0.400	25	S10	0.264	0.181	0.407	23	H10	0.288	0.149	0.342	30
Y11	0.230	0.174	0.431	21	S11	0.167	0.291	0.635	2	H11	0.263	0.150	0.362	29
Y12	0.216	0.186	0.462	13	S12	0.212	0.186	0.467	11	H12	0.218	0.190	0.466	12
Y13	0.188	0.218	0.537	7	S13	0.193	0.207	0.517	8	H13	0.220	0.179	0.448	17
Y14	0.275	0.119	0.302	34	S14	0.280	0.112	0.285	35	H14	0.217	0.182	0.456	15
Y15	0.199	0.299	0.600	4	S15	0.187	0.292	0.611	3	H15	0.260	0.133	0.340	31

结果显示除桑叶药材编号为 4、12 的同批次阴干、晒干、烘干桑叶样品 C_i 值几乎重叠外 (见图 3), 其余同批次不同干燥方法制备的桑叶样品 C_i 值存在差异, 且个别批次浮动较大, 表明不同干燥方法制备的桑叶样品多数存在一定差异。同批次样品中, 最低 C_i 值晒干桑叶仅占 1 批, 烘干桑叶占 6 批, 阴干桑叶占 8 批; 最高 C_i 值晒干桑叶占 7 批, 烘干桑叶占 6 批, 阴干桑叶占 2 批; 可知同批次制备的晒干桑叶 C_i 值整体优于阴干和烘干桑叶, 且同批次制备的烘干桑叶最高及最低 C_i 值浮动较大, 同批次制备的阴干桑叶样品 C_i 值则整体偏低。

3 芦丁的含量测定

3.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇为流动相 A, 0.5% 磷酸为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 30%A; 5 ~ 10 min, 30% ~ 35%A; 10 ~ 15 min, 35% ~ 40%A; 15 ~ 18 min, 40% ~ 50%A; 18 ~ 19 min, 50% ~ 30%A; 19 ~ 30 min, 30%A); 检测波长 358 nm; 流速 0.8 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL。

3.2 对照品溶液的制备

取芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 芦丁的溶液, 即得。

3.3 供试品溶液的制备

取阴干、晒干、烘干桑叶样品粉末 (过三号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 摇匀, 密塞, 称定重量, 加热回流 1.0 h, 冷却, 再称定重量, 用 70% 甲醇补重, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

3.4 专属性考察

取上述供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液 (70% 甲醇) 各适量, 按 “3.1” 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果桑叶供试品及对照品色谱图的基线均平稳, 芦丁色谱峰分离度、对称性良好, 供试品中芦丁色谱峰与对照品色谱峰的保留时间基本相同, 且阴性对照无干扰, 见图 4。

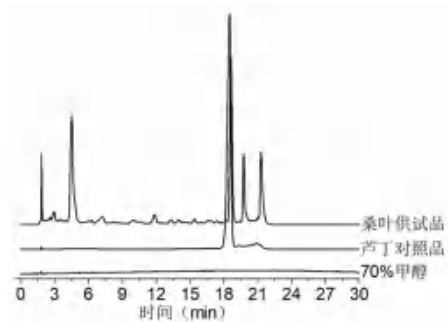


图 4 桑叶专属性考察的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of the virginity exclusive investigation of mulberry leaf

3.5 线性关系考察

取芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含芦丁 199.54 μg · mL⁻¹ 的对照品储备液, 分别取芦丁对照品储备液 0.2、0.4、1、2、5、10 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得每 1 mL 含 3.99、7.98、19.95、39.91、99.77、199.54 μg 芦丁的系列对照品溶液, 按 “3.1” 项下色谱条件检测样品。横坐标为进样质量浓度 (μg · mL⁻¹, X), 纵坐标为峰面积值 (Y), 进行线性回归, 得回归方程, $Y = 2.313 \times 10^4 X + 2.330 \times 10^4$, $R^2 = 0.9992$, 结果表明芦丁在质量浓度 3.99 ~ 199.54 μg · mL⁻¹ 与峰面积值呈良好的线性关系。

3.6 精密度考察

取桑叶样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件重复检测 6 次, 记录峰面积。结果芦丁峰面积的 *RSD* 为 0.99%, 提示仪器精密度良好。

3.7 重复性考察

取桑叶样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 平行制备 6 份, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件检测, 记录峰面积。结果芦丁峰面积的 *RSD* 为 0.64%, 提示该方法重复性良好。

3.8 稳定性考察

取桑叶样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在样品制备后 0、2、4、8、12、24 h, 按“3.1”项下色谱条件检测, 记录峰面积。结果芦丁峰面积的 *RSD* 为 0.20%, 提示供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.9 加样回收率考察

取含量已知的桑叶样品 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按样品中芦丁含量的 50%、100% 和 150% 分别加入相应的对照品, 设计 3 组实验, 每组平行 3 份。按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 在“3.1”项色谱条件下检测样品, 计算得低、中、高浓度水平下芦丁平均加样回收率分别为 102.88%、103.56%、100.17%, *RSD* 分别为 0.68%、0.42%、0.38%, 表明方法准确度良好。

3.10 样品测定

取 15 批阴干、晒干和烘干桑叶样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“3.1”项色谱条件测定, 结果见表 5, 同批次样品中, 最低芦丁含量阴干桑叶占 8 批, 烘干桑叶占 7 批; 最高芦丁含量晒干桑叶占 13 批, 烘干与阴干桑叶各占 1 批; 可知晒干制备的桑叶样品芦丁含量整体优于阴干和烘干桑叶。

4 讨论

本研究通过图谱相似度、方差分析、熵权 TOPSIS 法对比分析了阴干、晒干、烘干 3 种干燥方法对桑叶特征图谱共有峰的影响。特征图谱相似度结果表明 3 种干燥方法制备的桑叶样品相似度均大于 0.95, 方差分析结果也显示 7 个共有峰的单位峰面积间差异无统计学意义, 表明不同干燥方法桑叶样品间一致性较好, 即不同干燥方法对桑叶化学成分影响较小。熵权 TOPSIS 法通过数据本身的离散性进一步确定了桑叶样品中 7 个共有峰的权重, 根据 C_i 值对不同干燥方法的桑叶样品进行排序^[13], 结果表明不同干燥方法制备的桑叶样品 C_i 值存在一定差异, 晒干桑叶的 C_i

表 5 15 批不同干燥方法桑叶芦丁含量结果 (%)

Tab 5 Rutin content of 15 batches of mulberry leaves by different drying methods (%)

编号	阴干	晒干	烘干
1	0.375	0.453	0.466
2	0.160	0.304	0.218
3	0.334	0.502	0.455
4	0.182	0.187	0.161
5	0.174	0.231	0.183
6	0.145	0.183	0.169
7	0.469	0.450	0.431
8	0.413	0.515	0.490
9	0.488	0.502	0.450
10	0.307	0.356	0.312
11	0.346	0.444	0.302
12	0.340	0.446	0.377
13	0.383	0.414	0.320
14	0.259	0.288	0.240
15	0.394	0.480	0.332
均值	0.318±0.11	0.384±0.12	0.327±0.11

值整体优于阴干和烘干桑叶, 烘干桑叶的 C_i 值浮动较大, 阴干桑叶的 C_i 值则整体偏低, 提示不同干燥方法制备的桑叶样品间化学成分含量差异虽无统计学意义, 但晒干桑叶样品质量整体稳定且优于阴干、烘干桑叶样品。另通过测定不同干燥方法的桑叶样品中芦丁含量的结果可知, 晒干桑叶样品芦丁含量整体优于阴干和烘干桑叶样品, 与熵权 TOPSIS 法分析结论一致。该方法稳定性及重复性较好, 且操作简单, 可为桑叶干燥工艺参数进一步研究提供科学合理的评价方法, 也可作为桑叶资源进一步开发利用提供依据。

5 展望

为保证药食两用桑叶药材的质量和品质, 可考虑进一步加强桑叶干燥方法的规范化研究, 同时考虑到桑叶中主要含芦丁、绿原酸等具有热敏、易氧化特性的有效成分^[2], 在干燥方法选择上应尽量遵循低温、快速原则^[14]。传统干燥方法中, 阴干干燥方法虽遵循了低温原则, 但在长时间阴干过程中, 桑叶容易腐烂、变质, 失去药用价值和经济价值; 现代干燥技术烘干的干燥进程虽快, 但也会加速桑叶有效成分的氧化、水解等反应。这可能是本次研究结果中阴干、烘干桑叶样品质量稳定性不如晒干桑叶的主要原因, 在桑叶大生产干燥应用中其不稳定性极可能会进一步放大^[15-16], 进而造成市场上流通的桑叶质量参差不齐, 故在保证桑叶干燥品质的基础上, 建议对阴干、晒干、烘干等干燥方法的工艺参数进行更精细的研究, 以确保采收加工的桑叶药材质量稳定且均一, 从而使桑叶得到更有效的利用。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 310-311.
- [2] 林闪闪, 王梦娇, 许金国, 等. 基于化学成分与药理机制的桑叶质量标志物预测分析研究[J/OL]. 中草药, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20210831.1146.002.html>.
- [3] 段钰卉, 代泓钰, 安永铖, 等. 基于 PPAR- α /CPT-1 信号通路的桑叶总黄酮调控 T2DM 大鼠肝脏脂质代谢作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 61-69.
- [4] 赵保胜, 桂海水, 朱寅荻, 等. 桑叶降糖有效部位及其作用机制的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(2): 77-79.
- [5] 季涛, 宿树兰, 郭盛, 等. 桑叶防治糖尿病的效应成分群及其作用机制研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(5): 778-784.
- [6] 孙玲. 桑叶的化学成分、研究方法及其药理活性研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(28): 178-179.
- [7] 张倩, 张立华. 桑叶的化学成分及开发利用进展[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(15): 16-19.
- [8] 王婷婷, 马天宇, 李琪, 等. 桑叶化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品与药品, 2018, 20(5): 390-393.
- [9] 杨永玉, 曾光尧, 谭健兵, 等. 桑叶化学成分研究[J]. 中南药学, 2011, 9(2): 92-95.
- [10] 宋向文, 李光燕, 韩邦兴. 桑叶采收加工与临床应用沿革[J]. 中华医史杂志, 2018, 48(5): 275-279.
- [11] 苏颂. 本草图经[M]. 尚志钧, 辑校. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 380-381.
- [12] 邹澍. 本经疏证[M]. 张金鑫, 点校. 北京: 学苑出版社, 2011: 278-279.
- [13] 马天翔, 顾志荣, 许爱霞, 等. 基于 OPLS 结合熵权 TOPSIS 法对不同产地锁阳的鉴别与综合质量评价[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3284-3291.
- [14] 喻芬, 万娜, 李远辉, 等. 中药材干燥过程中的理化性质变化规律与机制分析[J]. 中草药, 2021, 52(7): 2144-2153.
- [15] 尚平, 关亚鹏, 张丽媛, 等. 热风干燥桑叶的干燥特性、活性成分含量及抗氧化能力研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(1): 52-59.
- [16] 盛金凤, 陈坤, 王雪峰, 等. 不同干燥方式桑叶粉物理特性、氨基酸及挥发性成分分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 108-118.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-10-14)

连翘叶的化学成分研究

罗旋¹, 沈霞², 王薇², 张东东^{2*} (1. 咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 研究连翘叶的化学成分。方法 采用硅胶柱色谱, 葡聚糖凝胶柱色谱和高效液相色谱等方法进行分离, 根据 MS 和 NMR 等数据进行化合物结构鉴定。结果 从连翘叶中共分离鉴定了 7 个化合物, 分别鉴定为对羟基苯乙基-O- β -D-葡萄糖苷(1)、2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-乙基-O- β -D-葡萄糖苷(2)、(+)-8-羟基松脂醇-4-O- β -葡萄糖苷(3)、异樱花素-5-O-芸香糖苷(4)、山柰酚(5)、槲皮素(6)和芦丁(7)。结论 化合物 1~4 为首次从连翘叶中分离鉴定。

关键词: 连翘; 叶; 化学成分; 苯乙醇苷; 黄酮

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1276-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.025

Chemical constituents from the leaves of *Forsythia suspensa*

LUO Xuan¹, SHEN Xia², WANG Wei², ZHANG Dong-dong^{2*} (1. Xianyang Vocational Technical College, Xianyang Shaanxi 712000; 2. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents in the leaves of *Forsythia suspensa*.

Methods The chemical constituents were studied by chromatographies on silica gel, Sephadex LH-20

基金项目: 陕西省教育厅一般专项科学研究计划项目(No. 19JK0934); 咸阳职业技术学院科研基金项目(No. 2020KJC06)。

作者简介: 罗旋, 男, 硕士, 助教, 主要从事中药药效物质及资源开发利用, email: luoxuan4869@126.com *通信作者: 张东东, 男, 博士, 讲师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: zhangnatprod@163.com

and HPLC, and the chemical structures were deduced on the basis of MS and NMR spectral data analysis.

Results Seven compounds were obtained and identified as *p*-hydroxyphenethyl-*O*- β -*D*-glucoside (**1**), 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethyl-*O*- β -*D*-glucoside (**2**), (+)-8-hydroxypinoresinol-4-*O*- β -glucoside (**3**), isosakuranetin-5-*O*-rutinoside (**4**), kaempferol (**5**), quercetin (**6**) and rutin (**7**), respectively. **Conclusion** Compounds **1** ~ **4** were isolated from the leaves of *Forsythia suspensa* for the first time.

Key words: *Forsythia suspensa*; leaf; chemical constituent; phenethyl glycoside; flavonoid

连翘 (*Forsythiae Fructus*) 为木犀科 (*Oleaceae*) 连翘属 (*Forsythia*) 植物连翘 (*Forsythia suspensa*) 的成熟干燥果实^[1], 又称旱连子、大翘子、空翘等^[2], 文献报道其主要化学成分为木脂素类、三萜类、黄酮类和苯乙醇苷类等^[3-5]。连翘性凉味苦, 具有抗炎、抗病毒、抗氧化和抗菌等药理活性^[6-7]。目前关于连翘的化学成分研究多集中于其果实和花, 而连翘叶的化学成分研究并不系统^[8], 为进一步明确连翘叶的化学成分, 为其临床科学应用提供科学依据。本文对其乙醇提取物的正丁醇萃取部位进行了系统研究, 从中共鉴定了 7 个化合物 (结构见图 1), 分别为对羟基苯乙基-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (**1**)、2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-乙基-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (**2**)、(+)-8-羟基松脂醇-4-*O*- β -葡萄糖苷 (**3**)、异樱花素-5-*O*-芸香糖苷 (**4**)、山柰酚 (**5**)、槲皮素 (**6**) 和芦丁 (**7**)。化合物 **1** ~ **4** 为首次从连翘叶中分离鉴定。

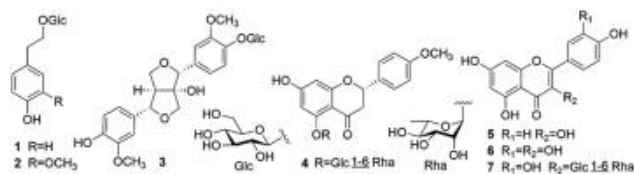


图 1 化合物 **1** ~ **7** 的结构图

Fig 1 Chemical structures of compounds **1** ~ **7**

1 材料

Avance400 核磁共振仪 (Bruker 公司); 岛津 LC-6AD 半制备液相色谱仪 (SPD-20A 检测器, 日本岛津公司); 6550Q-TOF 质谱仪 (美国安捷伦公司); Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (10 mm × 250 mm, 5 μm, 月旭科技上海股份有限公司); 恒温水浴锅 (江苏天翎有限公司); Sephadex LH-20 (美国 GE 公司); 薄层色谱硅胶、柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂); 色谱甲醇和乙腈 (Admas 试剂公司); 甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯等均为分析纯 (天津科密欧化学试剂有限公司)。

连翘叶于 2019 年 9 月采自陕西省咸阳市旬邑县, 经陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为

木犀科 *Oleaceae* 连翘属 *Forsythia* 植物植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb) Vahl 的干燥叶。标本 (编号: 20190911LQ) 保存于陕西中医药大学中药标本馆。

2 提取分离

干燥的连翘叶 6.0 kg, 粉碎后以 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h。回收乙醇后浓缩至浸膏, 加水稀释, 分别用乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取 3 次, 得到乙酸乙酯部位 88.5 g, 正丁醇部位 173.1 g。取正丁醇部位 170 g, 经硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (100 : 0、50 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1、7 : 1、3 : 1、2 : 1 和 1 : 1) 薄层色谱检测, 合并相同流分后, 得到 A1 ~ A11 共 11 个组分。A4 (13.2 g) 经葡聚糖凝胶柱色谱分离, 甲醇-二氯甲烷 (1 : 1) 洗脱, 得到化合物 **5** (31.8 mg)。A5 (9.9 g) 经葡聚糖凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到化合物 **6** (17.6 mg)。A6 (19.6 g) 经葡聚糖凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, 薄层色谱检测合并后, 得到 A6-1 ~ A6-7 共 7 个组分。A6-4 (0.4 g) 经半制备高效液相色谱分离, 甲醇-水 (44 : 56) 洗脱, 流速 1.5 ml · min⁻¹, 得到化合物 **1** (8.5 mg, *t_R* = 41.4 min) 和 **2** (13.2 mg, *t_R* = 36.2 min); A6-7 (0.4 g) 经半制备 HPLC 分离, 甲醇-水 (20 : 80) 洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 得到化合物 **3** (6.9 mg, *t_R* = 22.6 min); A8 (15.0 g) 经葡聚糖凝胶柱色谱分离, 甲醇洗脱, TLC 检测合并后, 得到 A8-1 ~ A8-5 共 5 个组分。A8-4 (0.5 g) 经半制备液相色谱分离, 乙腈-水 (18 : 82) 洗脱, 流速 2.0 mL · min⁻¹, 得到化合物 **4** (7.1 mg, *t_R* = 35.0 min) 和化合物 **7** (19.2 mg, *t_R* = 38.4 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, ESI-MS *m/z* 301 [M + H]⁺, ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 6.74 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2, 6), 7.09 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3, 5), 2.85 (2H, t, *J* = 6.7 Hz, H-7), 3.65 (2H, m, H-8), 4.32 (1H, d, *J* =

7.9 Hz, H-1'), 3.17 (1H, m, H-2'), 3.29 (1H, m, H-3'), 3.34 (1H, m, H-4'), 3.41 (1H, m, H-5'), 3.60 (1H, m, H-6'a), 3.85 (1H, m, H-6'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 156.7 (C-1), 116.1 (C-2, 6), 130.7 (C-3, 5), 131.0 (C-4), 36.3 (C-7), 71.6 (C-8), 104.3 (C-1'), 75.2 (C-2'), 77.8 (C-3'), 72.0 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.6 (C-6')。以上数据与文献报道^[9]基本一致, 故化合物 **1** 鉴定为对羟基苯乙基 -*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **2**: 白色粉末, ESI-MS m/z 331 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.67 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.64 (1H, dd, $J = 1.9, 8.4$ Hz, H-3), 6.84 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-5), 2.88 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-7), 3.55 (2H, m, H-8), 3.66 (3H, s, OCH_3), 4.31 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 3.16 (1H, m, H-2'), 3.25 (1H, m, H-3'), 3.35 (1H, m, H-4'), 3.43 (1H, m, H-5'), 3.63 (1H, m, H-6'a), 3.86 (1H, m, H-6'b); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 148.8 (C-1), 113.7 (C-2), 116.0 (C-3), 131.5 (C-4), 122.5 (C-5), 145.9 (C-6), 36.3 (C-7), 71.7 (C-8), 104.3 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.8 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.8 (C-6')。以上数据与文献报道^[10]基本一致, 故化合物 **2** 鉴定为 2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-乙基 -*O*- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **3**: 白色粉末, ESI-MS m/z 535 [$\text{M} + \text{H}$]⁻, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 10.4$ (c 0.1, MeOH)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.09 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7.15 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.97 (1H, dd, $J = 1.8, 8.2$ Hz, H-6), 4.71 (1H, s, H-7), 3.85 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-9a), 4.04 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-9b), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.85 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz, H-6'), 4.83 (1H, s, H-7'), 3.33 (1H, m, H-8'), 3.76 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-9'a), 4.45 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-9'b), 3.85 (3H, s, 3-OCH_3), 3.87 (3H, s, $3'\text{-OCH}_3$), 4.85 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.34 ~ 3.70 (6H, m, H-2'' ~ H-6'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 132.8 (C-1), 113.4 (C-2), 150.4 (C-3), 148.0 (C-4), 117.6 (C-5), 121.3 (C-6), 88.8 (C-7), 92.9 (C-8), 76.0 (C-9), 133.1 (C-1'), 111.2 (C-2'), 149.2 (C-3'), 147.8 (C-

4'), 116.1 (C-5'), 120.5 (C-6'), 87.9 (C-7'), 62.3 (C-8'), 72.2 (C-9'), 56.6 (3-OCH_3), 56.3 ($3'\text{-OCH}_3$), 102.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.8 (C-3''), 71.2 (C-4''), 78.1 (C-5''), 62.4 (C-6'')。以上数据与文献报道^[11]基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为 (+)-8-羟基松脂醇-4-*O*- β -葡萄糖苷。

化合物 **4**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z 593 [$\text{M} - \text{H}$]⁻。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.43 (1H, dd, $J = 3.0, 12.0$ Hz, H-2), 2.76 (1H, m, H-3a), 3.15 (1H, m, H-3b), 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.18 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 7.43 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.95 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 3.79 (3H, s, $4'\text{-OCH}_3$), 4.93 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.29 ~ 3.73 (6H, m, H-2'' ~ 6''), 4.65 (1H, br s, H-1'''), 3.33 ~ 3.69 (4H, m, H-2'' ~ 5''), 1.18 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6''')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 78.8 (C-2), 41.7 (C-3), 196.9 (C-4), 163.5 (C-5), 96.5 (C-6), 165.4 (C-7), 95.6 (C-8), 163.0 (C-9), 103.5 (C-10), 130.5 (C-1'), 127.6 (C-2', 6'), 113.6 (C-3', 5'), 160.0 (C-4'), 54.4 ($4'\text{-OCH}_3$), 100.8 (C-1''), 75.6 (C-2''), 76.6 (C-3''), 71.0 (C-4''), 76.4 (C-5''), 66.1 (C-6''), 99.6 (C-1'''), 70.8 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 72.6 (C-4'''), 68.4 (C-5'''), 16.4 (C-6''')。以上数据与文献报道^[12]基本一致, 故化合物 **4** 鉴定为异樱花素-5-*O*-芸香糖苷。

化合物 **5**: 黄色粉末, ESI-MS m/z 287 [$\text{M} + \text{H}$]⁺。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 6.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 6.39 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 8.13 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', H-5'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ : 146.6 (C-2), 135.9 (C-3), 175.7 (C-4), 156.8 (C-5), 97.8 (C-6), 164.2 (C-7), 93.3 (C-8), 161.2 (C-9), 103.4 (C-10), 122.3 (C-1'), 129.5 (C-2'), 114.8 (C-3'), 159.3 (C-4'), 114.9 (C-5'), 129.5 (C-6')。以上数据与文献报道^[13]基本一致, 故化合物 **5** 鉴定为山柰酚。

化合物 **6**: 黄色粉末, ESI-MS m/z 301 [$\text{M} - \text{H}$]⁻。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 12.49 (1H, br s, 5-OH), 6.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 7.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.53 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$

Hz, H-6'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 147.1 (C-2), 136.0 (C-3), 176.4 (C-4), 161.0 (C-5), 98.7 (C-6), 164.4 (C-7), 93.9 (C-8), 156.4 (C-9), 103.6 (C-10), 122.5 (C-1'), 115.6 (C-2'), 147.3 (C-3'), 145.4 (C-4'), 115.6 (C-5'), 120.3 (C-6')。以上数据与文献报道^[14]基本一致,故化合物 6 鉴定为槲皮素。

化合物 7: 黄色粉末, ESI-MS: *m/z* 611 [M + H]⁺。 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 12.56 (1H, br s, 5-OH), 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.35 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.53 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 5.31 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 3.22 ~ 3.73 (6H, m, H-2'' ~ 6''), 4.36 (1H, br s, H-1'''), 3.05 ~ 3.68 (4H, m, H-2''' ~ 5'''), 1.00 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-6''')。 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 177.4 (C-4), 161.3 (C-7), 160.2 (C-5), 157.5 (C-9), 156.6 (C-2), 148.5 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.7 (C-1'), 121.2 (C-6'), 117.1 (C-5'), 116.2 (C-2'), 100.9 (C-10), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 100.8 (C-1''), 74.1 (C-2''), 76.5 (C-3''), 70.4 (C-4''), 75.9 (C-5''), 67.0 (C-6''), 100.6 (C-1'''), 70.0 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 17.8 (C-6''')。以上数据与文献报道^[15]基本一致,故化合物 7 鉴定为芦丁。

4 讨论

本研究从连翘叶中共分离鉴定了 7 个化合物,包括 2 个苯乙醇苷类, 1 个木脂素类和 4 个黄酮类化合物,其中化合物 1 ~ 4 为首次从连翘叶中分离得到,可为连翘叶的临床应用提供参考,关于所得化合物后续药理活性筛选需继续深入研究。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 177-178.

[2] 赵佩媛, 韩立柱, 汪芸兰, 等. 连翘的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (4): 19-27.

[3] 张旭, 邵思远, 冯子明, 等. 连翘化学成分研究[J]. 中药材, 2021, 44 (9): 2095-2099.

[4] 齐丽娜, 陈炫好, 金华, 等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40 (2): 168-175.

[5] 龚莉虹, 余琳媛, 胡乃华, 等. 连翘抗炎药效物质基础及其作用机理研究进展[J]. 中药与临床, 2019, 10 (1): 43-49.

[6] 王婷婷, 张蕪, 杨志敏, 等. 连翘及连翘叶抑菌抗炎活性及其主要化学成分研究[J]. 中国药物与临床, 2019, 19 (14): 2380-2381.

[7] Wang ZY, Xia Q, Liu X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb) Vahl: a review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 210 (10): 318-339.

[8] 李敬, 尤颖, 赵庆生, 等. 连翘叶成分及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41 (18): 344-352.

[9] Ouyang MA, He ZD, Wu CL. Anti-oxidative activity of glycosides from *Ligustrum sinense* [J]. Nat Prod Res, 2003, 17 (6): 381-387.

[10] 吴娟, 周先礼, 周小力, 等. 藏角蒿花的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43 (1): 55-59.

[11] Schumacher B, Scholle S, Hölzl J, et al. Lignans isolated from *Valerian*: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A1 adenosine receptors [J]. J Nat Prod, 2002, 65 (10): 1479-1485.

[12] González-Cortazar M, Maldonado-Abarca AM, Jiménez-Ferrer E, et al. Isosakuranetin-5-*O*-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* vahl [J]. Molecules, 2013, 18 (11): 13260-13270.

[13] 常晓薇. 鄂西鹿药化学成分研究[J]. 中南药学, 2017, 15 (6): 762-764.

[14] 杨洁, 张东东, 张欣, 等. 黄花油点草化学成分研究[J]. 中南药学, 2017, 15 (7): 922-924.

[15] 雷军, 肖云川, 王文静, 等. 糯米藤中黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (4): 478-482.

(收稿日期: 2022-09-17; 修回日期: 2022-11-08)

基于血清药物化学的肾炎康复片 5 种指标成分含量测定研究

唐千, 王晓丽, 邢红, 石玉梦, 王涛, 陈晓鹏* (天津中医药大学 组分中药国家重点实验室, 天津 301617)

摘要: 目的 建立肾炎康复片入血成分的含量测定方法, 为其质量控制提供参考。方法 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q/TOF-MS) 分析雄性 C57BL/6J 小鼠灌胃给予肾炎康复片 (给药剂量 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后的入血成分: 色谱柱为 Shim-pask GIST C18 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。质谱条件采用电喷雾离子源, 正、负离子扫描模式采集数据。采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 建立肾炎康复片 5 种指标成分的含量测定方法: 色谱柱为 Agilent C18 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 波长 270 nm , 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结果 鉴定出肾炎康复片入血原形成分 21 个。综合考虑入血成分、片剂中含量较高成分和药材归属, 建立了入血原形成分 (丹参酮 II A 和隐丹参酮) 和主要成分 (大豆苷, 落新妇苷和丹酚酸 B) 的 HPLC 含量测定方法。结论 初步明确了肾炎康复片的体内药效物质基础, 所建立的含量测定方法准确可靠, 适用于肾炎康复片的质量控制。

关键词: 肾炎康复片; UPLC-Q/TOF-MS; 入血成分; HPLC; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R286, O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1280-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.026

Determination of 5 index components in Shenyan Kangfu tablets based on serum pharmacochimistry

TANG Qian, WANG Xiao-li, XING Hong, SHI Yu-meng, WANG Tao, CHEN Xiao-peng* (State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Objective To establish the content determination method of serum components in Shenyan Kangfu tablets to provide a reference for their quality control. **Methods** UPLC-Q/TOF-MS was used to analyze the blood components in male C57BL/6J mice after intragastric administration of Shenyan Kangfu tablets (dosage: $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Chromatographic separation was performed on Shim-pask GIST C18 column ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$) with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as the mobile phase with gradient elution at $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the column temperature was $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Mass spectrometry was performed on electrospray ionization, and data were collected under positive and negative ion modes. HPLC-DAD was used to determine the content of the 5 index components in Shenyan Kangfu tablets. Chromatographic separation was performed on Agilent C18 column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) at $35 \text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phase was methanol-0.1% formic acid aqueous solution for gradient elution, with a flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the detection wavelength at 270 nm . **Results** Twenty-one prototype components of Shenyan Kangfu tablets were preliminarily identified. The HPLC methods for the determination of prototype components (tanshinone II A and cryptotanshinone) and the main components (daidzin, astilbin and salvianolic acid B) were established by comprehensively considering the blood components, components with high content in the tablets and attribution of the medicinal materials. **Conclusion** The pharmacodynamic material basis of

基金项目: 天津市科技重大专项与工程计划 (No.18ZXXYSY00060)。

作者简介: 唐千, 男, 硕士研究生, 主要从事中药物质基础和质量控制研究, email: 18372566736@163.com *通信作者: 陈晓鹏, 女, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药物质基础和质量控制研究, email: xpchen@tjutcm.edu.cn

Shenyan Kangfu tablets in vivo is clarified. The content determination method is accurate and reliable, which is suitable for the quality control of Shenyan Kangfu tablets.

Key words: Shenyan Kangfu tablet; UPLC-Q/TOF-MS; blood component; HPLC; content determination; quality control

肾炎康复片由人参、西洋参、地黄、盐杜仲、山药、白花蛇舌草、黑豆、土茯苓、益母草、丹参、泽泻、白茅根、桔梗 13 味中药组成, 收载于 2020 年版《中国药典》中, 具有益气养阴、健脾补肾、清解余毒的功效, 临床上用于气阴两虚、脾肾不足、水湿内停所致的腰膝酸软、头晕目眩、浮肿等症^[1], 也广泛用于慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病等疾病^[2-3]。并在 2007 年被国家食品药品监督管理局列为国家二级中药保护品种^[4]。目前, 关于肾炎康复片的研究主要集中于临床疗效研究, 体内药效物质基础鲜有报道, 质量控制研究有待深入。

本课题组前期采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术, 利用其高精度、高灵敏度、高分辨率等特点, 对肾炎康复片进行成分鉴定分析, 共鉴定出 78 个化学成分^[5]。在此基础上, 本文对小鼠口服给药肾炎康复片后的入血成分进行分析, 初步阐明其体内药效物质基础; 并进一步建立多指标成分 HPLC 含量测定方法, 以更好地控制其整体质量。

1 材料

1.1 仪器

LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪、Shim-pak GIST C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)(日本岛津公司); 1260 型高效液相色谱仪、Agilent C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国 Agilent 公司); MSA125P-0CE-DU 十万分之一电子天平 (德国赛多利斯集团); 5424 R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); LP Vortex Mixer 涡旋混合仪 (赛默飞世尔科技有限公司); Milli-Q IQ 7005 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

15 批肾炎康复片 (批号: 17395、17396、17397、17398、17399、17400、17401、17402、17403、17404、17405、17406、17407、17408、17409, 天津同仁堂有限公司, 规格: 0.48 g/片)。京尼平苷酸 (批号: DST190221-040, 纯度: 98%)、京尼平苷 (批号: DST180103-032, 纯度: 98%)、水苏碱 (批号: DST180321, 纯度: 98%)、益母草碱 (批号: DST180301, 纯度: 98%)、大豆苷 (批号: DST180519-019, 纯度: 98%)、丹酚酸 B (批号: DST181127-009, 纯度: 98%)、丹参酮 II A (批号: DSTDD001101, 纯度:

98%)、落新妇苷 (批号: DSTDL005401, 纯度: 98%)(成都德斯特生物科技有限公司); 隐丹参酮 (批号: wkq20021006, 纯度: 98%, 四川省维克奇生物科技有限公司)。色谱纯乙腈和甲醇 (美国 Fisher 公司), 水由超纯水系统制备。

1.3 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 17 只 [北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号: SCXK(京)2019-0008], 体质量 20 ~ 30 g, 饲养于天津中医药大学中医药研究院 D 楼动物实验室, 常规条件喂养, 温度 22 °C, 湿度 30% ~ 40%, 光照 12 h 交替循环。动物实验遵循天津中医药大学动物使用与护理委员会颁发的《实验动物的护理与使用》。

2 方法与结果

2.1 肾炎康复片入血成分鉴定

2.1.1 灌胃药液的配制 取肾炎康复片 50 片, 研细, 称取 5 g, 加 0.5% 羧甲基纤维素钠制备 200 mg · mL⁻¹ 的混悬液, 即得肾炎康复片的灌胃药液。

2.1.2 对照品溶液的配制 分别精密称取京尼平苷酸、水苏碱、益母草碱、丹参酮 II A、京尼平苷对照品适量, 加甲醇制成含各对照品约 1 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 血清样品的采集与制备

① 含药血清样品采集: 取同批次雄性 C57BL/6J 小鼠 12 只, 禁食不禁水 12 h, 灌胃给予肾炎康复片, 药液给药剂量: 8 g · kg⁻¹, 给药 30 min 后, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 自小鼠腹主动脉取血, 置于含抗凝剂的离心管中。全血离心, 取上清液, 即得血清样品, 置 -80 °C 冰箱, 待测。

② 空白血清样品采集: 取同批次雄性 C57BL/6J 小鼠 5 只, 禁食不禁水 12 h, 给予与肾炎康复片药液同等体积的生理盐水灌胃, 其余处理方法同含药血清样品采集。

③ 血清样品的制备: 血清样品于冰上解冻, 取 200 μL 置于 1.5 mL 离心管中, 涡旋振荡 1 min; 加入 800 μL 甲醇沉淀蛋白, 涡旋混合 60 s, 14 000 r · min⁻¹、4 °C 离心 15 min, 取上清液; 氮气吹干, 加 50 μL 甲醇溶液复溶, 离心, 取上清液, 进样分析。

2.1.4 色谱、质谱条件

① 色谱条件：流动相 A 为 0.1% 甲酸水，流动相 B 为乙腈；柱温 35℃；流速 0.2 mL·min⁻¹；进样量 2 μL；梯度洗脱（0~10 min, 95%~85%A；10~13 min, 85%~76%A；13~17 min, 76%~70%A；17~19 min, 70%~42%A；19~26 min, 42%~32%A；26~28 min, 32%~8%A；28~30 min, 8%~5%A；30~31 min, 5%~95%A；31~36 min, 95%A）。

② 质谱条件：离子源为电喷雾离子源；数据采集模式为正负离子全扫描、数据依赖采集模式；离子源接口电压-3.0 kV；干燥气流速 10 L·min⁻¹；雾化气流速 3.0 L·min⁻¹；脱溶剂管温度 250℃；加热块温度 400℃；接口温度 300℃；扫描模式

母离子 MS Scan (*m/z* 100~500; 500~1000; 1000~1500)，碎片离子 MS/MS (*m/z* 50~500; 50~1000; 50~1500)；碰撞能量为 18~52 V。校准方法为外标法校准质量数（调谐液为 NaI，质量浓度 400 mg·L⁻¹）。

2.1.5 肾炎康复片入血原形成分 将空白组血清、给药组血清和肾炎康复片的甲醇提取液中获得对应化合物的质谱信息进行对比分析，结果见图 1。根据色谱峰保留时间及质谱碎裂规律，结合对照品对比和文献相关信息，鉴定出肾炎康复片的入血原形成分 21 个，主要为皂苷类、环烯醚萜类、二萜类、生物碱类等，见表 1。

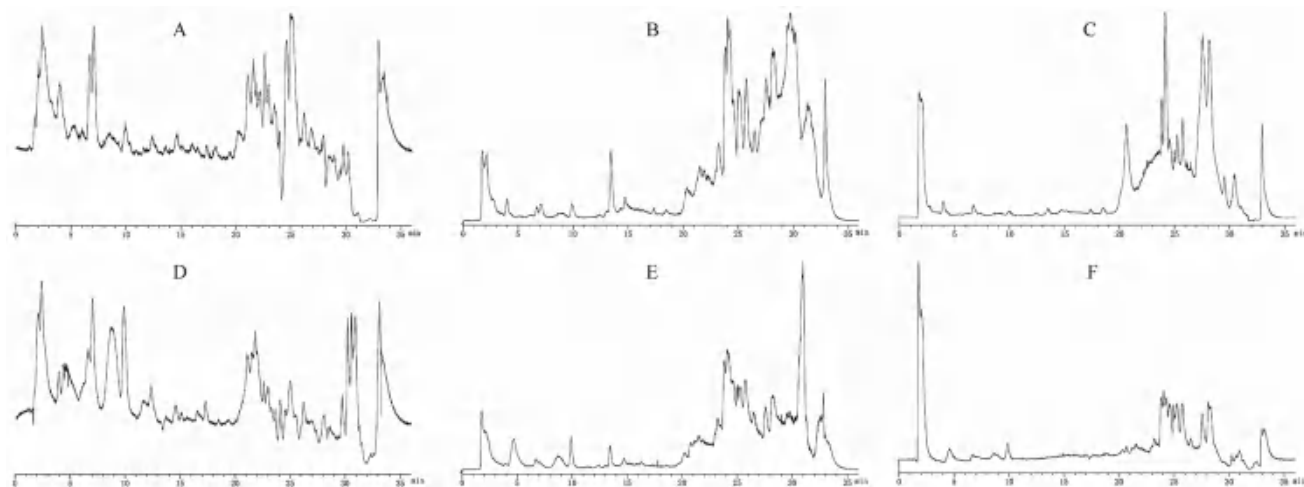


图 1 肾炎康复片给药血清 UPLC-Q/TOF-MS 总离子流图

Fig 1 UPLC-Q/TOF-MS total ion chromatogram of serum after the administration of Shenyan Kangfu tablets

注 (Note)：正离子模式 (positive ion mode)：*m/z* 100~500 (A)；500~1000 (B)；1000~1500 (C)；负离子模式 (negative ion mode)：*m/z* 100~500 (D)；500~1000 (E)；1000~1500 (F)。

环烯醚萜类化合物的质谱裂解方式主要是糖苷键的断裂后脱羧基、水，开环裂解以及去甲基等^[6]。以化合物 **5** 为例，在负离子模式下，其准分子离子峰为 *m/z* 373.1118 [M-H]⁻，并且二级碎片离子分别为糖苷键断裂后形成的 *m/z* 211.0598 [M-H-C₆H₉O₅]⁻，接着脱去羧基形成 *m/z* 167.0095 [M-H-C₆H₉O₅-CO₂]⁻，最后开环裂解成 *m/z* 123.0438 [C₇H₇O₂]⁻ 碎片离子。通过与对照品京尼平昔酸的质谱信息及相关文献^[7]对比分析，鉴定其为京尼平昔酸，裂解途径见图 2。

皂苷类化合物主要存在于人参中，结构中主要含有多个糖基取代，质谱裂解规律一般是逐级丢失糖基后产生一系列碎片离子，糖基主要包括葡萄糖、鼠李糖、阿拉伯糖等。以化合物 **13** 为例，在负离子模式下，其准分子离子峰为 *m/z* 1107.5929 [M-H]⁻，其特征碎片离子为 *m/z* 945.5402、*m/z* 783.4868、*m/z* 621.4351、*m/z*

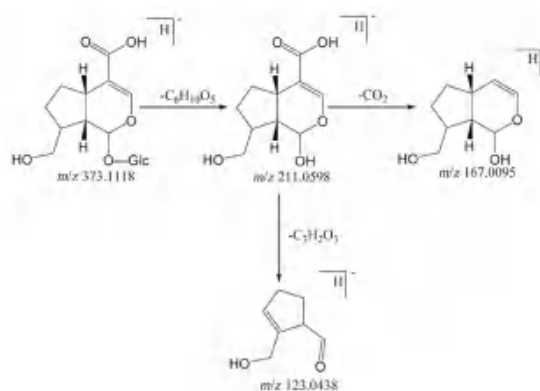


图 2 京尼平昔酸裂解途径

Fig 2 Fragmentation pathway of geniposidic acid

459.3903，是准分子离子连续失去 4 分子葡萄糖而产生的，通过与相关文献^[8-9]报道对比分析，鉴定其为人参皂苷 Rb₁，裂解途径见图 3。

二萜类化合物在正离子模式下的响应较好，该类化合物的主要裂解特征是脱羧基，丢失水分

表 1 肾炎康复片入血成分鉴定

Tab 1 Identification of components of Shenyan Kangfu tablets absorbed in the serum

No.	名称	t/min	分子式	质荷比	加合离子	二级碎片
1	水苏碱 [*]	2.11	C ₇ H ₁₄ NO ₂	144.1018	[M] ⁺	144.1019, 102.0551, 84.0804, 58.0647
2	melibiose	2.11	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	365.1062	[M + Na] ⁺	203.0524, 185.0425
3	5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,6-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-7-ylβ-D-glucopyranoside hydrate	2.16	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₄	539.1365	[M-H] ⁻	503.1594, 341.1069, 181.9659
4	piscidic acid	5.06	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	255.0493	[M-H] ⁻	165.0540, 107.0490, 179.0335, 135.043, 119.0488
5	京尼平苷酸 [*]	5.26	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.1118	[M-H] ⁻	211.0598, 167.0095, 123.0438
6	京尼平苷 [*]	10.96	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	433.1325	[M + HCOO] ⁻	225.0751, 207.0642, 123.0431, 101.0231
7	地黄苦苷元	12.66	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	183.1011	[M-H] ⁻	183.1016, 139.1117
8	3-羟基肉桂酸	13.62	C ₉ H ₈ O ₃	163.0387	[M-H] ⁻	119.0490, 117.0334
9	益母草碱 [*]	14.30	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₅	312.1556	[M + H] ⁺	181.0490, 153.0545, 114.1016
10	阿魏酸	15.10	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0490	[M-H] ⁻	134.0383, 102.9308
11	人参皂苷 Re	18.43	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5443	[M + HCOO] ⁻	945.5395, 783.4876, 475.3797, 637.4293
12	大豆苷元	19.27	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.0654	[M + H] ⁺	237.0544, 227.0704, 199.0752, 181.064, 152.0618, 91.0540
13	人参皂苷 Rb ₁	20.53	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1107.5929	[M-H] ⁻	1107.5929, 945.5402, 783.4868, 621.4351, 459.3903
14	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁	20.66	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1193.5936	[M-H] ⁻	1149.6037, 1107.5930, 945.5437, 783.4874, 621.4373
15	人参皂苷 Rc	20.67	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1123.5884	[M + HCOO] ⁻	1077.5821, 945.5391, 783.4936, 621.4367
16	人参皂苷 Ro	20.98	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.4876	[M-H] ⁻	955.4872, 793.4355, 523.3744
17	人参皂苷 Rd	21.02	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5450	[M + HCOO] ⁻	945.5395, 783.4864, 621.4344, 323.0958
18	ailanthoidol	22.55	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	325.1062	[M-H] ⁻	281.1162, 265.0850, 237.0904, 183.0102
19	隐丹参酮	23.06	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297.1468	[M + H] ⁺	251.1429, 269.1533, 171.1165
20	新隐丹参酮	24.08	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	313.1433	[M-H] ⁻	283.1323, 267.1373, 255.1375, 239.1061
21	丹参酮 II A [*]	27.75	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	295.1334	[M + H] ⁺	277.1227, 249.1276

注 (Note): ^{*} 与对照品比对确证 (Confirmed by comparing with reference substance)。

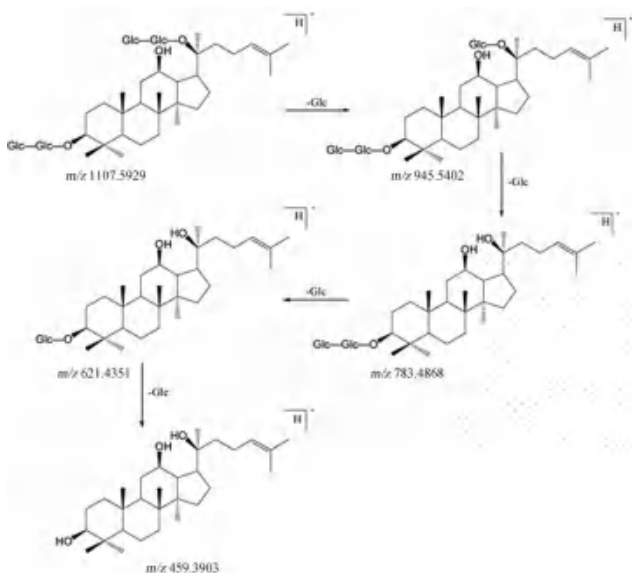


图 3 人参皂苷 Rb₁ 裂解途径
Fig 3 Fragmentation pathway of ginsenoside Rb₁

子^[10]。以化合物 21 为例,其准分子离子峰为 m/z 295.1334 $[M + H]^+$,在裂解过程中易脱去 1 个 H₂O 分子并继续脱去 CO,进而形成 m/z 277.1227 $[M + H - H_2O]^+$ 和 m/z 249.1276 $[M + H - H_2O - CO]^+$ 的碎片离子^[11],通过与对照品比对,鉴定为丹参酮 II A,裂解途径见图 4。

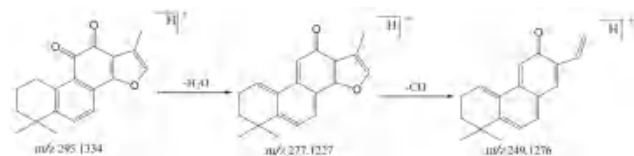


图 4 丹参酮 II A 裂解途径
Fig 4 Fragmentation pathway of tanshinone II A

2.2 肾炎康复片含量测定

2.2.1 含量测定指标成分选择 综合考虑肾炎康复片中含量较高,可测性好的成分,以及“2.1”项下鉴定的入血原形成分,并尽量涵盖更多的药材选取含量测定指标成分,选择大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 为指标成分。其中隐丹参酮、丹参酮 II A 为入血原形成分。5 种指标成分中隐丹参酮、丹参酮 II A 和丹酚酸 B 一起为丹参的主要成分^[12]。大豆苷为黑豆的主要成分^[13],落新妇苷为土茯苓的主要成分^[14]。

2.2.2 对照品储备液的制备 分别精密称取大豆苷、丹参酮 II A、丹酚酸 B、落新妇苷、隐丹参酮对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片,除去薄膜衣,精密称定,研细,取约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,密塞,

称定重量，加热回流 60 min，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 色谱条件 Agilent C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相为甲醇 (C) -0.1% 甲酸水 (D)；梯度洗脱 (0 ~ 2 min: 5% ~ 25% C, 2 ~ 30 min: 25% ~ 53% C, 30 ~ 32 min: 53% ~ 79% C, 32 ~ 48 min: 79% ~ 95% C)；流速: 1 mL · min⁻¹；柱温: 35 °C；二极管阵列检测器，检测波长: 270 nm；进样量: 2 μL。

2.2.5 专属性的考察 用“2.2.2”项下对照品储备液，加甲醇稀释，配制成含大豆苷 100 μg · mL⁻¹、落新妇苷 200 μg · mL⁻¹、丹酚酸 B 200 μg · mL⁻¹、隐丹参酮 100 μg · mL⁻¹、丹参酮 II A 100 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.4”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果见图 5，表明方法专属性良好。

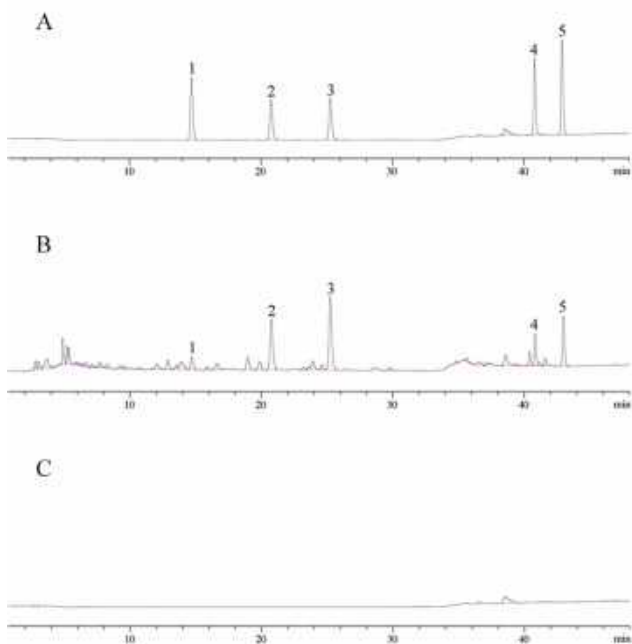


图 5 对照品 (A)、供试品 (B) 和空白溶剂 (C) 的 HPLC 图
Fig 5 HPLC of reference substance (A), sample (B) and blank solvent (C)

1. 大豆苷 (daidzin); 2. 落新妇苷 (astilbin); 3. 丹酚酸 B (salvianolic acid B); 4. 隐丹参酮 (cryptotanshinone); 5. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

2.2.6 线性关系考察 取“2.2.2”项下各对照品储备液，加甲醇制成稀释成系列质量浓度对照品溶液，按“2.2.4”项下色谱条件进样分析。以对照品质量浓度为横坐标，相应峰面积为纵坐标，进行线性回归，得各指标成分的线性回归方程和线性范围，结果见表 2。

2.2.7 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品储备

表 2 5 种成分的线性回归方程与线性范围

成分	回归方程	r	范围 / (μg · mL ⁻¹)
大豆苷	$Y = 4.613X - 1.589$	0.9997	2.5 ~ 100
落新妇苷	$Y = 1.639X + 1.607$	0.9997	25 ~ 1000
丹酚酸 B	$Y = 1.532X + 11.31$	0.9990	25 ~ 1000
隐丹参酮	$Y = 8.572X + 15.24$	0.9993	2.5 ~ 100
丹参酮 II A	$Y = 10.32X - 3.039$	0.9998	2.5 ~ 100

液稀释至相应浓度，连续进样 6 次，测得峰面积，结果大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积 RSD 分别为 1.9%、1.7%、1.7%、1.8%、1.7%，表明方法日内精密性良好。取对照品溶液，连续进样 3 d，每日 1 次，测得峰面积，结果大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积 RSD 分别为 2.0%、1.9%、1.8%、1.8%、1.8%，表明方法日间精密性良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批次样品 (批号: 17396) 6 份，每份称取约 2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备，进样测定，计算峰面积的 RSD，结果大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积的 RSD 分别为 0.66%、1.5%、1.9%、1.9%、2.0%，表明方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.8”项下同一供试品溶液，分别于 0、2、4、6、10、12、24 h 进样分析，记录 24 h 内峰面积，计算 RSD，结果大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 峰面积 RSD 分别为 2.0%、1.6%、1.8%、1.5%、1.7%，表明样品在 24 h 内的稳定性良好。

2.2.10 加样回收试验 取已知含量的同一批样品 (批号: 17395，含大豆苷 209.17 μg · g⁻¹、落新妇苷 2493.04 μg · g⁻¹、丹酚酸 B 3601.04 μg · g⁻¹、隐丹参酮 182.07 μg · g⁻¹、丹参酮 II A 285.69 μg · g⁻¹) 约 2 g，精密称定，精密加入相当于各成分含量的 80%、100%、120% 的对照品 (n = 3)，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.4”项下色谱条件进样分析，计算低、中、高浓度的平均加样回收率及 RSD 值，结果见表 3。

2.2.11 样品含量测定 取 15 批次肾炎康复片，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样分析，计算样品中大豆苷、落新妇苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A 含量，结果见表 4。

3 讨论

3.1 血清药物化学采血时间点的选择

考虑到不同时间点的吸收入血成分可能存在差异，笔者通过预实验分别于小鼠灌胃给药肾炎

表 3 5 种成分的加样回收率 (n = 3)

Tab 3 Recovery of 5 components (n = 3)

成分	样品含量 / μg	加入量	平均加样回收率 /%	RSD/%
大豆苷	418.34	80%	102.53	0.88
		100%	100.24	1.7
		120%	98.48	1.4
落新妇苷	4986.08	80%	100.84	3.3
		100%	100.48	3.8
		120%	98.02	3.4
丹酚酸 B	7202.08	80%	99.95	1.5
		100%	98.48	1.2
		120%	102.92	0.29
隐丹参酮	364.14	80%	99.82	3.9
		100%	100.64	2.9
		120%	100.47	1.5
丹参酮 II A	571.38	80%	97.05	1.0
		100%	97.66	2.8
		120%	99.27	3.8

表 4 15 批样品中 5 种成分的含量 (n = 3)

Tab 4 Contents of 5 compounds in 15 batches of samples (n = 3)

批号	质量分数 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)				
	大豆苷	落新妇苷	丹酚酸 B	隐丹参酮	丹参酮 II A
17395	209.17	2493.04	3601.04	182.07	285.69
17396	210.62	2324.02	3640.63	181.37	284.43
17397	218.49	2274.79	3506.19	170.40	266.50
17398	241.11	2434.26	3844.68	188.13	290.12
17399	225.29	1676.18	3654.12	185.26	285.37
17400	199.06	2049.42	3763.32	190.58	293.12
17401	195.30	1710.56	3454.63	169.90	263.82
17402	192.55	2580.71	3851.64	199.37	302.33
17403	183.95	1674.56	3434.19	173.82	267.51
17404	222.03	1805.75	3715.46	193.31	294.03
17405	225.07	2483.89	3531.64	189.92	319.80
17406	246.46	2491.62	3934.09	199.64	300.81
17407	288.59	2184.28	4356.55	225.86	336.28
17408	211.92	1888.74	3433.32	175.26	265.37
17409	218.64	1717.68	3540.13	180.78	274.45

康复片药液后 30 min、1 h、2 h 经腹主动脉取血，置于含抗凝剂的离心管中，于 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 离心 10 min，分离血清，比较发现给药 30 min 后的血清样品检测到的色谱峰最多，响应值最强。故选择给药 30 min 后作为取血时间点。

3.2 含量测定指标成分分析

本研究选择的 5 种指标成分的药理作用与肾炎康复片治疗肾炎、糖尿病肾病的功效密切相关。在药理作用方面隐丹参酮、丹参酮 II A 和丹酚酸 B 都具有心血管保护、抗炎、抗氧化等作用，丹酚酸 B 又具有降低血糖作用^[15-19]。大豆苷属于异黄酮类化合物具有保护心血管、治疗糖尿病、预防骨质疏松等作用^[20]。落新妇苷具有抗炎、保肝护肾、抗糖尿病等作用^[21]。

在肾炎康复片药典质量标准中采用薄层色谱法鉴别了人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、拟人参皂苷 F11、盐酸水苏碱、丹参酮 II A 成分和桔梗药材；采用高效液相色谱法测定了丹参酮 II A 的含量。本实验选择的 5 种指标成分含量测定，新增了黑豆和土茯苓中成分的含量测定，补充了丹参中隐丹参酮和丹酚酸 B 的含量测定，结合药典的鉴别方法，更有利于肾炎康复片的整体质量控制。

3.3 含量测定高效液相色谱条件的选择

在色谱条件优化过程中，先选择了乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相，但色谱图中各峰的分度度较差，洗脱时间较长，后将乙腈换为甲醇，各色谱峰的峰形与分度度有了明显改善；在 270 nm 下各指标成分都有较大吸收且基线噪声较小，故选择 270 nm 为检测波长。

3.4 含量测定结果分析

药典规定肾炎康复片薄膜衣片每片含丹参酮 II A 不得少于 80 μg ，去除薄膜衣后肾炎康复片每片 0.45 g。含量测定结果显示，各批次肾炎康复片丹参酮 II A 的含量均符合药典规定，但不同批次样品中各成分的含量具有一定的差异，可能与不同批次样品所使用原料药材的批次、来源、采收期等因素有关。药效成分含量的均一性和稳定性是药品临床疗效的重要保障。因此，建立多指标成分含量测定方法，完善肾炎康复片的质量控制方法，对于确保产品质量和临床安全用药十分重要。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 1125.
- [2] Chen Q, Ren D, Wu J, et al. Shenyan Kangfu tablet alleviates diabetic kidney disease through attenuating inflammation and modulating the gut microbiota [J]. J Nat Med, 2021, 75 (1): 84-98.
- [3] 谷粒, 胡耀, 彭璇, 等. 肾炎康复片结合氯沙坦钾片治疗慢性肾小球肾炎临床疗效及对 IL-1 β 、IL-1 及 VEGF 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (5): 213-216.
- [4] 王晓丽, 薛倍倍, 李春霞, 等. 肾炎康复片治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. 世界中医药, 2022, 17 (4): 565-570.
- [5] Wang X, He Q, Chen Q, et al. Network pharmacology combined with metabolomics to study the mechanism of Shenyan Kangfu Tablets in the treatment of diabetic nephropathy [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113817.
- [6] 周菲, 林美斯, 李锐, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析百合地黄汤的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (7): 15-22.
- [7] Zhang H, Duan S, Wang L, et al. Identification of the absorbed components and their metabolites of Tian-

- ma-Gouteng granule in rat plasma and bile using ultra-high-performance liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33 (4): e4480.
- [8] 孟青, 钟艳梅, 郭晓玲, 等. 人参中皂苷类成分的快速识别及其质谱裂解规律的初步探讨 [J]. 中药材, 2013, 36 (2): 240-245.
- [9] Zhang YC, Pi ZF, Liu CM, et al. Analysis of low-polar ginsenosides in steamed Panax ginseng at high-temperature by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Chem Res Chin Univ, 2012, 28 (1): 31-36.
- [10] 戴海学, 李晓蓉, 李宇航, 等. 丹参酮 II A 和丹参酮 I 的电子轰击与电喷雾电离质谱分析 [J]. 分析试验室, 2008, 27 (5): 24-29.
- [11] 陈嘉慧, 张雅心, 刘孟华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36 (1): 1-9.
- [12] 杨贵雅, 薛紫鲸, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (21): 5328-5335.
- [13] 曹冬英, 李鸢, 许文, 等. 4 种市售黑豆及成品淡豆豉中异黄酮含量分析 [J]. 药学研究, 2020, 39 (10): 581-584.
- [14] 徐硕, 尚明英, 刘广学, 等. 高效液相色谱法测定土茯苓药材中 7 种活性成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (3): 469-479.
- [15] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53 (2): 609-618.
- [16] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (21): 5496-5511.
- [17] 吴筱霓, 刘伟, 何玉华, 等. 丹参酮 II A 药理作用研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29 (21): 93-97.
- [18] 魏西羽, 杨婷, 刘厚汝, 等. 丹酚酸 B 的药理作用研究进展 [J]. 药学研究, 2021, 40 (11): 748-752.
- [19] 曾金, 张志荣, 缪萍, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2015, 37 (6): 1309-1313.
- [20] 余强, 郭传勇. 大豆异黄酮药理作用及其临床应用 [J]. 世界临床药物, 2018, 39 (9): 643-646.
- [21] 李玉琪, 袁婷婷, 茅风燕, 等. 落新妇苷的药理活性及植物来源研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28 (19): 2718-2723.

(收稿日期: 2022-09-17; 修回日期: 2022-11-16)

基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术结合分子网络快速筛查 3 种蓟属药用植物化学成分

王宇航^{1, 2}, 黄晓欣¹, 叶定红³, 刘勇^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 102488; 3. 宁波甬蓟农业发展有限公司, 浙江 宁波 315538)

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS) 技术快速筛查大蓟、小蓟、杭蓟化学成分。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相梯度洗脱。在 Parallel Reaction Monitoring (PRM) 模式下采集大蓟、小蓟、杭蓟醇提物质谱数据。根据保留时间信息、高分辨质谱分子离子质量和 MS/MS 多级碎片信息鉴定 3 种蓟属药用植物中的化学成分; 最后基于各成分 MS/MS 碎片的相似度值而创建 GNPS 分子网络, 利用软件 Cytoscape 3.6.1 可视化结构相似的分子簇。**结果** 在此模式下快速筛查到 3 种植物 71 种化合物。其中包括 22 种有机酸类化合物、24 种黄酮类化合物、3 种醌类化合物、5 种三萜类化合物、3 种挥发油类化合物及 14 种其他类化合物。**结论** 采用 UHPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS 技术为蓟属药用植物的定性分析和质量控制提供了一种快速、灵敏、准确的方法, 为今后进一步阐明其药效、质量标准及资源开发利用提供了科学依据。

关键词: 蓟属药用植物; 液质联用; 结构鉴定; 绿原酸; 黄酮类

中图分类号: R284.1, R932 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1286-10
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.027

基金项目: 北京中医药大学科研 A 级横向科研发展基金 (No.90020272220003)。

作者简介: 王宇航, 男, 硕士研究生, 主要从事杭蓟的化学成分分析和药理作用研究, email: wangyuhangbucm@sina.com *通信作者: 刘勇, 男, 教授, 主要从事药用植物亲缘学研究, email: yongliubucm@163.com

Rapid identification of chemical constituents in 3 *Cirsium* mill medicinal plants based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS and molecular network technology

WANG Yu-hang^{1,2}, HUANG Xiao-xin¹, YE Ding-hong³, LIU Yong^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 3. Ningbo Yongji Agricultural Development Co., Ltd., Ningbo Zhejiang 315538)

Abstract: Objective To rapidly identify the chemical constituents of *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC, *Cirsium setosum* (Willd) MB and *Cirsium tianmushanicum* Shih by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** The chromatography was performed on a Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) as the mobile phase gradient elution. Alcohol extracts of *Cirsium japonicum* Fisch.ex DC, *Cirsium setosum* (willd) MB and *Cirsium tianmushanicum* Shih were analyzed by primary and multistage full-scan mass spectrometry (MS) under ESI anion mode to collect the MS data. According to the similarity of MS/MS fragmentation patterns, GNPS molecular network was established. Cytoscape 3.6.1 software was used to screen molecular clusters with similar structures. Finally, chemical components of 3 *Cirsium* mill medicinal plants were identified by retention time, precise molecular weight of high resolution mass spectrometry and multilevel MS/MS fragmentation information. **Results** Totally 71 compounds from 3 species of plants were identified, including 22 organic acids, 24 flavonoids, 3 quinones, 5 triterpenoids, 3 volatile oil compounds and 14 other compounds. **Conclusion** The UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS technique provides a rapid, sensitive and accurate method for the qualitative analysis and quality control of *Cirsium* mill medicinal plants, and also a scientific basis to further elucidate its efficacy, quality standards, resource development and utilization.

Key words: *Cirsium* mill medicinal plant; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; structure elucidation; chlorogenic acid; flavonoid

大蓟 *Cirsium japonicum* Fisch.ex DC 和小蓟 *Cirsium setosum* (Willd) MB. 大多以全草、地上部分或根入药, 近年来, 大量药理学实验证明该属植物具有保肝、止血、抗炎、抗疲劳等多种药理作用^[1-10]。杭蓟 *Cirsium tianmushanicum* Shih 与两者同为菊科蓟属植物, 是宁海力洋、胡陈一带的地方用药, 具有显著的止血、去黄疸、降血压的功效^[8]。

大蓟、小蓟在《中国药典》中的功效主治描述完全一致, 未能起到指导临床应用的作用^[11-12]。且两者化学成分研究大部分都集中于单一成分的分离和鉴定, 无法系统地成分层面研究大小蓟差别; 而杭蓟因野生资源有限, 暂未发现大规模群居, 其成分和药效的研究还处于停滞阶段, 仅凭民间用药理论无法为杭蓟作为药用植物提供科学依据。

在药用植物中, 许多代谢物具有相同的分子

亚结构, 并形成不同化学类型的结构相关分子家族, 从而增加了对药用植物中复杂成分体系定性分析的难度。全球天然产物分子网络集群数据库 GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking, <https://gnps.ucsd.edu/>) 是在现有的多个质谱数据库基础上, 进行新的谱图注释, 最终建立的包括 272 个公共数据集和 8400 万个二级图谱的公共数据分析平台^[13]; 利用 GNPS 创建基于各成分质谱二级碎片相似性的分子网络, 同时与液质联用数据相结合, 可以更直观地观测到测试样品中所有能够检测到的化合物准分子离子, 反映串联质谱试验中捕获的分子多样性^[14]; 同时液质联用技术因其高通量和高灵敏度多被用于药用植物成分的快速筛查研究, 更有助于复杂成分体系的定性分析^[15-16]。本研究拟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结合分子网络技术对大蓟、小蓟、

杭蓟化学成分进行快速筛查鉴定,为后续蓟属药用植物的质量控制和药效评价等提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Q-Exactive-Orbitrap-MS 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(美国 Thermo Scientific 公司),配有热喷雾离子源(HESI)、Xcalibur4.1 化学工作站(美国 Thermo 公司);Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC Plus Focused 超高液相色谱系统(含 Chromleon 7 工作站,Evolution220 型紫外-可见分光光度计,赛默飞世尔科技公司);Millipore Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore 公司);Sartorius BT 25S 型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试药

芦丁(货号 B20771-20 mg)、新绿原酸(货号 B25371-20 mg)、Pectolarin(货号 B20249-20 mg)、绿原酸(货号 B20782-20 mg)、Buddloside(货号 B20860-20 mg)、槲皮素(货号 B20527-20 mg)、山柰酚(货号 B21126-20 mg)(HPLC 测纯度均 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司),大蓟、小蓟(北京同仁堂药业公司),杭蓟采自浙江宁波,经北京中医药大学刘勇教授鉴定为菊科蓟属大蓟 *Cirsium japonicum* Fisch.ex DC,小蓟 *Cirsium setosum* (Willd) MB 和杭蓟 *Cirsium tianmushanicum* Shih 的干燥地上部分。甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher Scientific 公司),质谱纯甲酸、氯仿(天津市科密欧化学试剂有限公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

供试品制备:取样品约 1 g 研磨(过 4 号筛),精密称定,置索氏提取器中,加石油醚适量(50 mL),加热回流 2 h,弃去石油醚液;待药渣挥干后加入 70% 甲醇 20 mL,索氏提取 2 h,滤过,滤渣用 70% 甲醇 5 mL 洗涤,合并洗液与滤液,浓缩溶液至 10 mL,转移至 10 mL 量瓶中,用微孔滤膜(0.45 μm),滤过,即得。

对照品制备:称取山柰酚、绿原酸、芦丁、Pectolarin、Buddloside、槲皮素对照品适量分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得单一对照品溶液,试验前混合各溶液得混合对照品溶液,稀释至各对照品质量浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

2.2 色谱条件

色谱柱 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm),流动相:A 为乙腈溶液,B 为甲酸水溶液;梯度洗脱(0.0~3.0 min, 5%A;

3.0~35.0 min, 5%~75%A; 35.0~40.1 min 75%~5%A; 40.1~45 min, 5%A);流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 3 μL 。

2.3 质谱条件

HESI 离子源,负离子检出模式,扫描范围 m/z 50~1500;离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$,电离源电压 4 kV,毛细管电压 35 V,管透镜电压 110 V,鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度 $> 99.99\%$),鞘气流速 40 arb,辅助气流速 20 bar;数据采用傅里叶变换高分辨全扫描方式(TF, full scan, Resolution 30 000)数据依赖性(data-dependent acquisition) ddMS²;碰撞模式:运用 CID 和 HCD 相结合的碎裂方式;碰撞能量:Stepped NCE 50%;母离子列表(parent ion list) PIL-MS²。

3 结果与分析

3.1 杭蓟成分鉴别

按照“2.3”项下方法分析 3 种蓟属药用植物提取物,得到其负离子模式下的总离子流图(见图 1)。结合对照品(见图 2)和参考文献对其进行成分确认,在 Parallel Reaction Monitoring (PRM) 模式下快速筛查到 3 种植物中的 71 种化合物。其中包括 22 种有机酸类、24 种黄酮类、3 种醌类、5 种三萜类、3 种挥发油类及 14 种其他类化合物,详情见表 1。

3.2 对照品的质谱裂解行为

奎宁酸类衍生物:结合参考文献^[17-20]和二级图谱数据发现,在 HCD 和 CID 碰撞裂解下,绿原酸和新绿原酸均会产生 m/z 191.1571 [M-caffeoyl-H]⁻ 和 m/z 179.3615 [caffeic acid-H]⁻ 两个特征碎片离子,其中 m/z 191.1571 进一步碎裂形成 m/z 173.2372 [M-caffeoyl-H₂O-H]⁻。两者的主要裂解区别是由于酰化位置不同,绿原酸产生的碎片离子 m/z 135.4260 的丰度大于新绿原酸。综上,奎宁酸类化合物的质谱碎裂规律主要是围绕酯键断裂形成奎宁酸母核碎片和各类酚酸如咖啡酸、阿魏酸的碎片为主,此类衍生物主要结构单元如图 3 所示。

黄酮类化合物:根据参考文报道^[21-23]和高分辨质谱数据,对黄酮化合物质谱裂解规律进行归纳总结:黄酮类化合物裂解方式主要为糖苷键的解离和黄酮母核 C 环的断裂;对于糖苷键的解离,常存在中性丢失糖残基而得到苷元离子;对于黄酮母核上 C 环的 1/3、1/4、0/2、0/3、0/4 键断裂会产生 ^{i,j}A⁻ 和 ^{i,j}B⁻ 两类碎片离子^[24]。还可以观察到常见的中性丢失,如 CO (28 Da)、CO₂ (44 Da)、H₂O (18 Da) 等中性丢失;分子中带有甲氧基($\cdot\text{OCH}_3$)等基团时还可以发生自由基($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da)丢失。

3.3 奎宁酸衍生物快速筛查

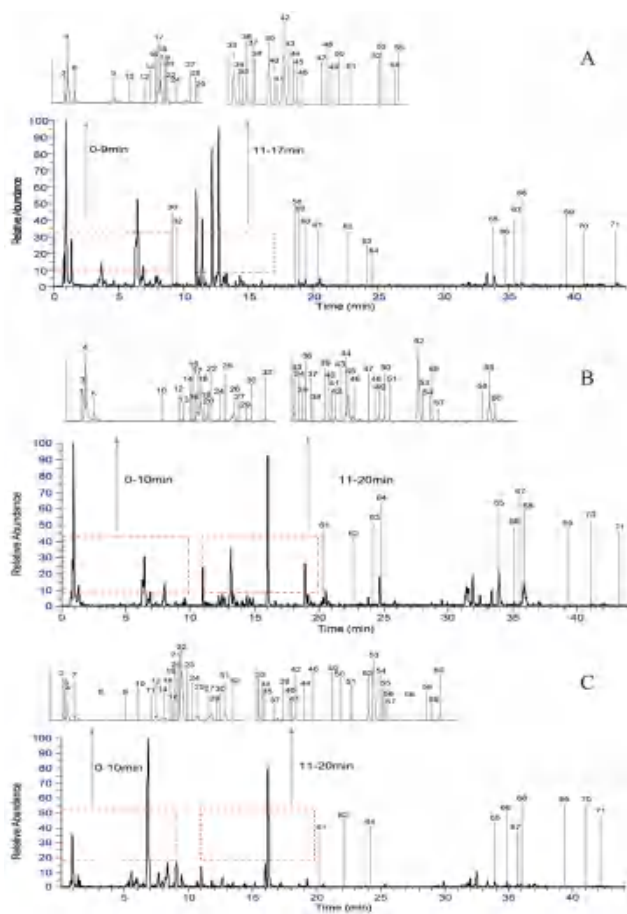


图 1 样品负离子模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of sample in negative ion mode

A. 大蓟 (*Cirsium japonicum* Fisch.ex DC); B. 小蓟 [*Cirsium setosum* (Willd) MB]; C. 杭蓟 (*Cirsium tianmushanicum* Shih)

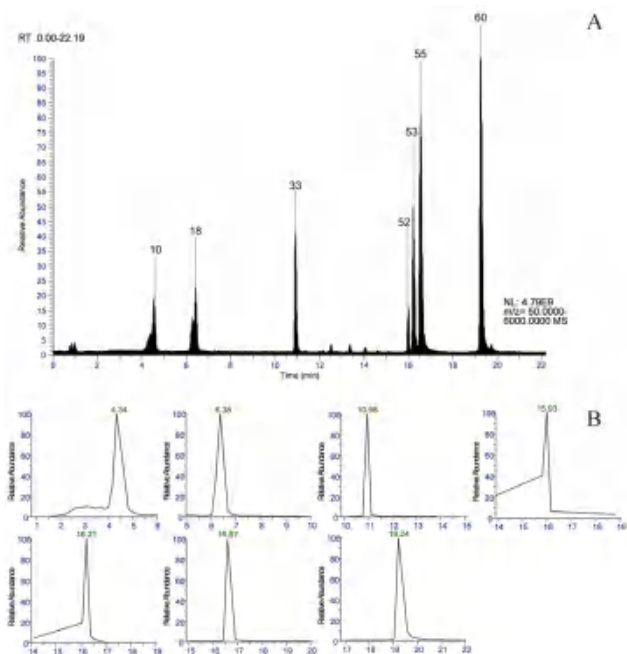


图 2 混合对照品总离子流图 (A) 及杭蓟中各对照品提取离子流图 (B)

Fig 2 Total ion flow diagram of reference substance (A) and ion flow chart of reference substances extracted from *Cirsium tianmushanicum* Shih (B)

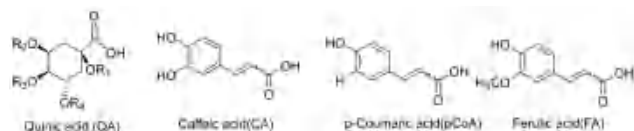


图 3 奎宁酸类生物的结构单元

Fig 3 Structure units of quinic acid derivatives

3.3.1 单咖啡酰奎宁酸 化合物 **10**、**18**、**22** 的准分子离子峰 m/z 353.0881、353.0893、353.0890, 推测其元素组成为 $C_{16}H_{18}O_9$ (0.28、0.85、0.57), 主要碎片离子 m/z 191.1571 [M-H-caffeoyl]⁻、179.3615 [caffeic acid-H]⁻ 和 173.2372 [M-H-caffeoyl-H₂O]⁻ 符合咖啡酰奎宁酸 (caffeoylquinic acid, CQA) 的裂解规律, 通过对照品比对 (见图 4), 推断化合物 **10**、**18** 分别为绿原酸、新绿原酸; 结合参考文献^[25-27], 当酰化位置在 3-位时 m/z 179.3615 丰度比在 5-位上高^[28], 根据极性大小和上述规律初步判断化合物 **22** 为隐绿原酸。CQA 类化合物具有能清除自由基、抗菌消炎的活性, 170 余种具有清热解毒、抗菌消炎的中成药均含有 CQA 且为主要成分^[29]。

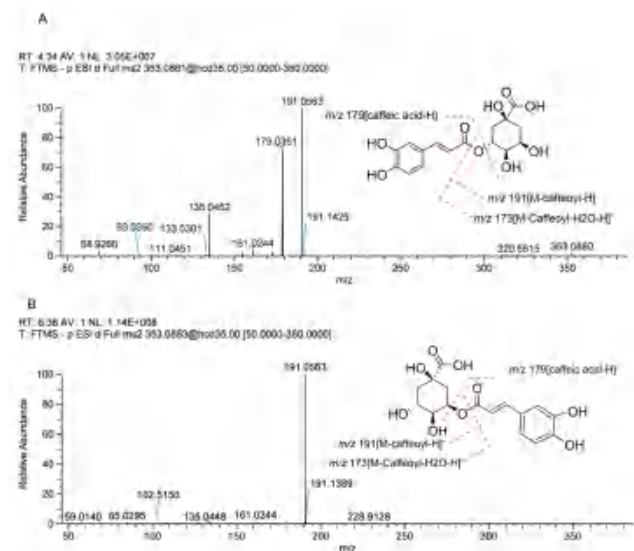


图 4 奎宁酸类生物对照品质谱图以及裂解规律

Fig 4 Standard mass spectra and pyrolysis rules of quinone compounds

A. 绿原酸 (chlorogenic acid); B. 新绿原酸 (neochlorogenic acid)

3.3.2 双咖啡酰奎宁酸 (DiCQA) 化合物 **42**、**46**、**51** 准分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 515.1224、515.1226、515.1219, 推测其元素组成为 $C_{25}H_{24}O_{12}$ (0.78、0.58、0.97), 主要碎片离子 m/z 353.2473 的 MS³ 碎片离子与绿原酸的 MS² 碎片离子基本一致, 初步判断此类化合物为 DiCQA, 母核结构如表 2 所示。根据报道, 4-位取代时二级碎片离子基峰为 m/z 173, 而 3-位取代的离子碎片 m/z 179.3613 丰度为 m/z 191.1573 的一半, 5-位取代时, m/z 179.3617 相对丰度较 1-和 3-位取代要高, 结合表 1 中的碎片离子初步推断化合物 **42**、**46**、**51** 分别为 3、5-O-二咖啡酰奎宁酸、4、

表 1 3 种植物地上部分化学成分负离子模式下质谱信息

Tab 1 Mass spectrometric information in the above ground part of three plants under negative ion mode

编号	t_R / min	测量值 (m/z)	理论值 (m/z)	质量误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	化学成分	二级碎片 MS^2 (实验值)	大蓟	小蓟	杭蓟
1	0.91	195.0507	195.0511	2.05	$C_6H_{12}O_7$	葡萄糖酸酯	50.1284、99.1825、129.6961	-	+	-
2	0.92	135.0302	135.0300	- 1.48	$C_4H_8O_5$	蔗糖酸	117.2896、156.2547	-	-	+
3	0.94	191.0559	191.0563	2.09	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸	173.2571、191.2156	+	+	+
4	0.96	133.0139	133.0142	2.25	$C_4H_6O_5$	苹果酸	89.2693、115.1152、132.1630	+	+	+
5	1.35	128.0339	128.0355	1.25	$C_5H_7NO_3$	L- 焦谷氨酸	82.2854、110.5082、128.3550	-	+	-
6	1.36	191.0206	191.0200	- 3.14	$C_6H_8O_7$	柠檬酸盐	130.5673、173.3651	+	-	-
7	1.51	130.0871	130.0874	2.31	$C_6H_{13}NO_2$	L- 亮氨酸	92.2286、112.1358	-	-	+
8	2.49	125.0242	125.0246	3.20	$C_6H_6O_3$	1, 2, 4- 苯三酚	101.1472、124.2536	-	-	+
9	4.00	153.0188	153.0193	3.27	$C_7H_6O_4$	3, 4- 二羟基苯甲酸	91.2854、108.2543、123.1630	+	-	+
10	4.63	353.0881	353.0891	2.55	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸	135.4260、173.2372、179.3615、 191.1571	+	+	+
11	5.29	151.0411	151.0405	- 3.97	$C_8H_8O_3$	对甲氧基苯甲酸	68.2658、101.1514、133.2513	-	-	+
12	5.55	137.0242	137.0245	2.19	$C_7H_6O_3$	水杨酸	110.8745、108.6418	+	+	+
13	5.60	175.0609	175.0612	1.71	$C_7H_{12}O_5$	2- 异丙基苹果酸	85.3651、129.3518	-	+	-
14	5.95	337.0931	337.0934	0.89	$C_{16}H_{18}O_8$	3- 对香豆酰基奎宁酸	163.3841、173.7510、191.1563	+	+	+
15	6.15	153.0191	153.0193	1.31	$C_7H_6O_4$	2, 5- 二羟基苯甲酸甲酯	110.9641、125.2874	-	+	-
16	6.32	325.0935	325.0930	- 1.54	$C_{15}H_{18}O_8$	coumaroyl hexoside	103.2874、129.5541、163.5692	+	+	+
17	6.41	341.0882	341.0881	- 0.29	$C_{15}H_{18}O_9$	caffeic acid hexoside	136.4891、179.3657	+	-	-
18	6.48	353.0893	353.0891	- 0.57	$C_{16}H_{18}O_9$	新绿原酸	191.1573、173.2370、179.3613	+	+	+
19	6.58	162.0455	162.0452	- 1.85	$C_9H_8O_3$	苯丙酮酸	65.0240、119.0896、136.7813	-	-	+
20	6.70	367.1039	367.1035	- 1.09	$C_{17}H_{20}O_9$	3-O- 阿魏酰奎宁酸	155.1276、173.7420、191.3647、 193.8710	+	+	+
21	6.87	177.0563	177.0560	- 1.69	$C_{10}H_{10}O_3$	2- 甲氧基肉桂酸	131.7416、167.8412	-	-	+
22	6.95	353.0890	353.0891	0.28	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸	135.4252、173.2370、179.3611、 191.1559	+	+	+
23	7.12	177.0173	177.0196	1.30	$C_9H_6O_4$	瑞香素	121.2217、150.2410、162.4492	-	-	+
24	7.36	179.0327	179.0349	1.23	$C_9H_8O_4$	咖啡酸	93.3618、121.7530	+	+	+
25	7.64	121.0314	121.0298	- 1.32	$C_7H_6O_2$	3- 羟基苯甲醛	69.1276、91.4530	-	-	+
26	8.04	421.0779	421.0782	0.71	$C_{19}H_{18}O_{11}$	芒果苷	271.3513、301.5748	-	+	-
27	8.26	337.0932	337.0934	0.59	$C_{16}H_{18}O_8$	5- 香豆酰基奎宁酸	163.3838、173.7508、191.1561	+	+	+
28	8.52	367.1037	367.1035	- 0.54	$C_{17}H_{20}O_9$	4-O- 阿魏酰奎宁酸	155.3568、173.5543、191.5971	+	-	-
29	8.72	563.1427	563.1411	- 0.28	$C_{26}H_{28}O_{14}$	异夏佛塔苷	353.0258、383.7614	+	+	+
30	8.90	367.1021	367.1035	3.81	$C_{17}H_{20}O_9$	5-O- 阿魏酰奎宁酸	155.2894、173.1276、191.1568	+	+	+
31	9.07	337.7819	337.7821	0.59	$C_{16}H_{18}O_8$	4- 香豆酰基奎宁酸	173.7502、191.1559	-	-	+
32	9.64	163.0429	163.0404	- 0.15	$C_9H_8O_3$	对香豆酸	119.5127、136.0513	+	+	+
33	10.98	609.1458	609.1477	3.12	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁	271.3072、300.0608	+	+	+
34	11.14	593.1503	593.1523	3.37	$C_{27}H_{30}O_{15}$	山柰酚 -7-O- 新橘皮糖苷	285.5126、447.2089	+	+	+
35	11.26	463.0877	463.0896	4.10	$C_{21}H_{20}O_{12}$	金丝桃苷	151.2271、271.5130、300.7549	+	+	+
36	11.50	461.0725	461.0733	1.74	$C_{21}H_{18}O_{12}$	山柰酚葡萄糖醛酸苷	133.6214、257.2871、285.8120	+	+	-
37	11.66	577.2869	577.2875	1.04	$C_{27}H_{30}O_{14}$	山柰苷	285.3364、537.3428	+	+	+
38	11.71	447.0943	447.0948	1.12	$C_{21}H_{20}O_{11}$	木犀草苷	105.5138、285.6120、327.4518	+	+	-
39	12.21	593.1534	593.1523	- 1.85	$C_{27}H_{30}O_{15}$	山柰酚 -3-O- 芸香糖苷	257、285、410	+	+	+
40	12.29	447.0946	447.0948	0.45	$C_{21}H_{20}O_{11}$	山柰酚 3-O- 葡萄糖苷	270、285、418	-	-	+
41	12.49	623.1634	623.1641	1.12	$C_{28}H_{32}O_{16}$	异鼠李素 -3-O- 芸香糖苷	111.3184、300、357	+	+	+
42	12.68	515.1224	515.1207	- 3.30	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3, 5- 二咖啡酰奎宁酸	173.2451、179.3411、353.2473	+	+	+
43	12.72	255.0261	255.0262	0.39	$C_{14}H_8O_5$	羟基茜草素	170.2518、214.3217	+	-	-
44	13.07	187.0949	187.0979	1.60	$C_9H_{16}O_4$	壬二酸	125.5710、141.3319	-	-	+
45	13.15	445.0777	445.0778	0.22	$C_{21}H_{18}O_{11}$	芹菜素 -7-O- 葡萄糖醛酸苷	175.6210、269.5523	+	+	-
46	13.42	515.1226	515.1207	- 3.69	$C_{25}H_{24}O_{12}$	4, 5- 二咖啡酰奎宁酸	173.2447、179.3415、353.2471	+	+	+
47	14.03	475.0881	475.0883	0.42	$C_{22}H_{20}O_{12}$	takakin-8-glucuronide	255.5128、284.7416、299.7700	+	+	-
48	14.23	677.1238	677.1263	3.69	$C_{34}H_{30}O_{15}$	1, 3, 5-tricafeoylquinic acid (1, 3, 5- 三咖啡酰奎宁酸)	191.2740、353.6841	+	+	-
49	14.35	607.1647	607.1667	3.29	$C_{28}H_{32}O_{15}$	香叶木苷	300.3351、471.6173	+	+	+

续表 1

编号	t_R / min	测量值 (m/z)	理论值 (m/z)	质量误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	化学成分	二级碎片 MS^2 (实验值)	大蓟	小蓟	杭蓟
50	14.64	529.5424	529.5413	- 2.08	$C_{26}H_{26}O_{12}$	3-阿魏酰-4-咖啡酰奎宁酸	191.5127、353.3125	+	+	+
51	15.05	515.1219	515.1207	- 2.32	$C_{25}H_{24}O_{12}$	3, 4-二咖啡酰奎宁酸	173.2446、179.3410、353.2471	+	+	+
52	15.93	591.1722	591.1741	3.21	$C_{28}H_{32}O_{14}$	蒙花苷	200.6138、268.3310、283.0409	+	+	+
53	16.21	621.2028	621.201	- 2.90	$C_{29}H_{34}O_{15}$	柳穿鱼叶苷	298.0477、313.4019	+	+	+
54	16.59	285.0411	285.0406	- 1.75	$C_{15}H_{10}O_6$	木犀草素	153.6371、269	+	+	+
55	16.67	301.0353	301.0358	1.66	$C_{15}H_{10}O_7$	槲皮素	121.2790、151.4639、179.0421、 300.1572	+	+	+
56	16.82	593.1303	593.1317	2.36	$C_{30}H_{26}O_{13}$	银锻苷	285.2815、441.5572	-	-	+
57	16.84	315.0511	315.0517	1.90	$C_{16}H_{12}O_7$	泽兰黄酮	228.5732、285.1289、300.1443	-	+	+
58	18.66	271.0615	271.0612	- 1.10	$C_{15}H_{12}O_5$	柚皮素	177.3517、225.8214	+	+	+
59	18.90	269.0466	269.0462	- 1.49	$C_{15}H_{10}O_5$	芦荟大黄素	117.3358、150.4389、228.4178	+	+	+
60	19.24	285.0411	285.0408	- 1.05	$C_{15}H_{10}O_6$	山柰酚	257.5127、229.5179、213.1245、 169.0781	+	+	+
61	20.29	299.0569	299.0565	- 1.34	$C_{16}H_{12}O_6$	异山柰素	227.2541、278.5716	+	+	+
62	22.75	322.2027	322.2031	1.24	$C_{22}H_{32}O_8$	<i>N</i> -jasmony- <i>L</i> -isoleucine (<i>N</i> -茉莉酰- <i>L</i> -异亮氨酸)	192.7913、254.2461	+	+	+
63	24.27	253.0516	253.0511	- 1.98	$C_{15}H_{10}O_4$	7, 2'-二羟基黄酮	166.3351、200.8415、209.3317	-	+	-
64	24.69	283.0613	283.0619	2.12	$C_{16}H_{12}O_5$	黄芩素	195.6179、220.4510、255.0271	+	+	+
65	33.94	295.2268	295.2280	4.06	$C_{18}H_{32}O_3$	9-hydroxy-10, 12-octadeca- dienoic acid	134.2447、195.5138、209.3204	+	+	+
66	34.88	279.2334	279.2330	- 1.43	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸	192.4027、243.1503	-	-	+
67	35.59	311.1691	311.1693	0.64	$C_{20}H_{24}O_3$	山海棠素	183.7051、271.2175	+	+	+
68	35.64	487.3426	487.3430	0.82	$C_{30}H_{48}O_5$	积雪草酸	146.5127、426.6289、463.2047	+	-	-
69	39.42	485.3279	485.3284	1.03	$C_{30}H_{46}O_5$	美洲茶酸	196.6123、441.2279	+	-	-
70	41.16	471.3481	471.3485	0.85	$C_{30}H_{48}O_4$	科罗索酸	273.0503、409.3047	+	-	-
71	42.31	455.3544	455.3540	- 0.88	$C_{30}H_{48}O_3$	熊果酸	251.1523、381.1750	+	-	+

注 (Note): “+” 代表在该样品中检测到此成分, “-” 代表未检测到此成分 (“+” represents the component detected in the sample, “-” represents the component not detected)。

表 2 各化合物取代位置

Tab 2 Substitution position of each compound

类型	化合物	R1	R2	R3	R4
CQA	1-CQA	CA	H	H	H
	3-CQA (chlorogenic acid)	H	CA	H	H
	4-CQA	H	H	CA	H
	5-CQA (neochlorogenic acid)	H	H	H	CA
DiCQA	1, 3-diCQA	CA	CA	H	H
	1, 5-diCQA	CA	H	H	CA
	3, 4-diCQA	H	CA	CA	H
	3, 5-diCQA	H	CA	H	CA
	4, 5-diCQA	H	H	CA	CA
pCoQA	4-pCoQA	H	H	pCoA	H
	5-pCoQA	H	H	H	pCoA
	3-pCoQA	H	pCoA	H	H
FQA	3-FQA	H	FA	H	H
	5-FQA	H	H	H	FA
	4-FQA	H	H	FA	H

5-*O*-二咖啡酰奎宁酸和 3, 4-*O*-二咖啡酰奎宁酸^[28]。以 3, 4-*O*-二咖啡酰奎宁酸为例具体的碎片离子信息和裂解规律如图 5A 所示。

3.3.3 肉桂酰奎宁酸 (pCoQA) 化合物 14、27、31

精确准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 337.0931、337.0932、337.7819, 分子式 $C_{16}H_{18}O_8$, 结合文献和母离子分子离子质量^[29]推断化合物可能为 pCoQA 类化合物。3-pCoQA、5-pCoQA、4-pCoQA 二级碎片离子基峰分别是 m/z 163.3838、173.7508、191.1561, 结合保留时间和参考文献^[30-31]判断化合物 14、27、31 分别为 3-香豆酰基奎宁酸、5-香豆酰基奎宁酸、4-香豆酰基奎宁酸。以 3-香豆酰基奎宁酸为例, 其具体的碎片离子信息和裂解规律见图 5B。

3.3.4 阿魏酰奎宁酸 (FQA) 化合物 20、28、30

准分子离子峰分别为 m/z 367.1039、367.1037、367.1021, 二级质谱裂解过程中产生 m/z 191.3647、191.5971、191.5971 $[M-H-feruloyl]^-$ 和 m/z 173.7420、173.5543、173.5543 $[M-H-feruloyl-H_2O]^-$ 等二级碎片离子, 根据参考文献和母离子分子离子质量推断为 FQA^[32]; 而根据基峰的不同可判断 FQA 的同分异构体 3-FQA、4-FQA、5-FQA 的二级碎片基峰分别为 m/z 193.8710、173.5543 和 191.5971, 初步推测化合物 20、28、30 分别为 3-*O*-阿魏酰奎宁酸、4-*O*-阿魏酰奎宁酸、5-*O*-阿魏酰奎宁酸。

从 3 种菊科蓟属植物中分离出多种以奎宁酸

为母核具有药效活性的化合物，此类成分普遍具有抗菌、抗病毒、保肝和心血管保护等作用^[33]，推测其药效物质基础为奎宁酸衍生物成分群，可能与抗炎保肝作用相关。

3.4 黄酮类化合物快速筛查

化合物 33、35、55 部分二级离子与槲皮素碎片离子相同，初步推断为槲皮素和昔元分别为槲皮素的黄酮苷，3 个化合物的准分子离子峰为 m/z 609.1458、463.0877、301.0353，结合对照品质谱图（见图 6）和参考文献^[34]分析判断化合物 33、35、55 分别为芦丁、金丝桃苷和槲皮素，其中金丝桃苷裂解途径如图 5C 所示。

化合物 34、36、37、39、40、60 准分子离子峰分别为 m/z 593.1523、461.0733、577.2875、593.1523、447.0948、285.0408，上述化合物的 MS² 均产生 m/z 285、257 等山柰酚对照品碎片离子相同二级离子，且主要碎片离子强度与山柰酚对照品二级图谱相同，判断化合物 36、38、40、42、43 的昔元为山柰酚或者以山柰酚为昔元的黄酮苷，结合参考文献^[35]和对照品初步判断化合物分别为山柰酚-7-*O*-新橘皮糖苷、山柰酚葡萄糖醛酸苷、山柰苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、山柰酚。以山柰酚葡萄糖醛酸苷为例，其具体的碎片离子信息和裂解规律。

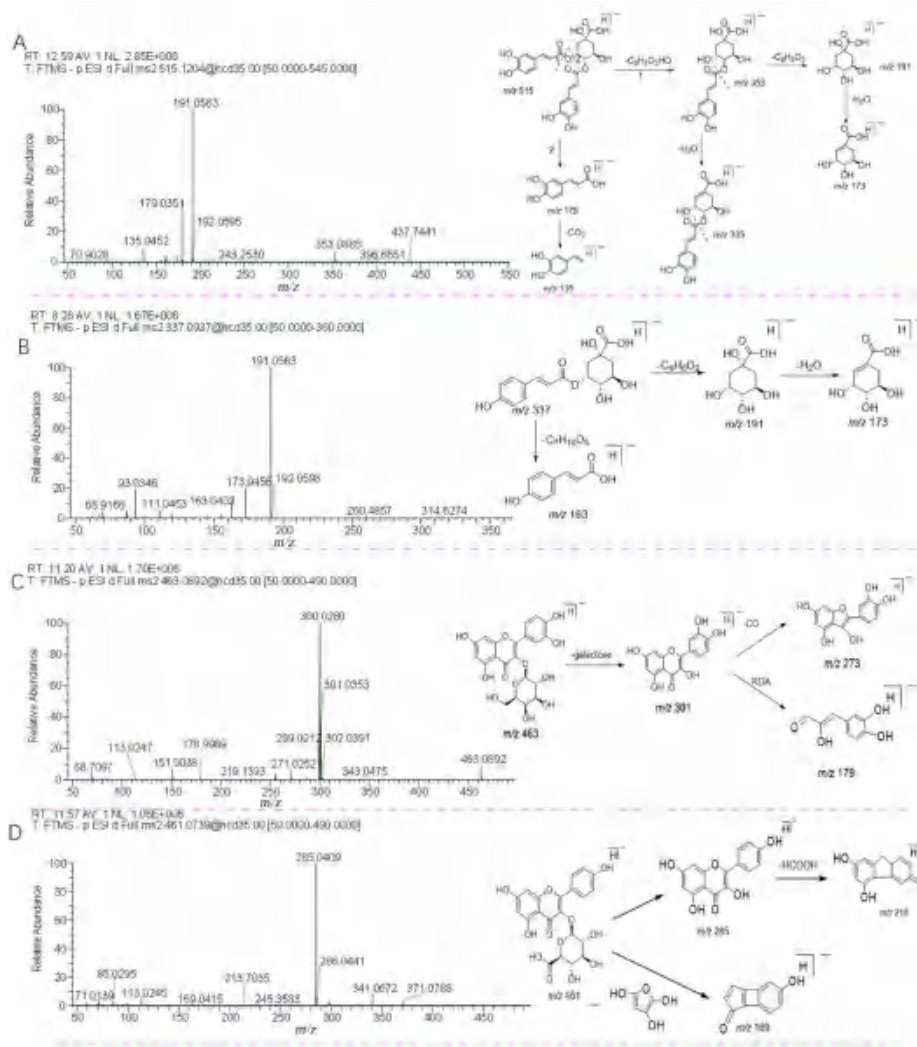


图 5 推断化合物的质谱图和可能的裂解途径

Fig 5 Spectrum and possible fragmentation pathway of chemical substances

A. 3, 4-*O*-二咖啡酰奎宁酸 (3, 4-di-*O*-caffeoylquinic acid); B. 3-香豆酰基奎宁酸 (3-coumaroylquinic acid); C. 金丝桃苷 (hyperoside); D. 山柰酚葡萄糖醛酸苷 (kaempferol-3-glucuronide)

同理，根据该类化合物在质谱条件下有相似的裂解规律在蓟属植物中共筛查到黄酮类化合物 24 种，详情见表 1。

3.5 3 种蓟属植物分子网络分析

在快速筛查蓟属植物化学成分的基础上，运用分子网络技术进一步进行复杂成分的分类分析^[36-38]。本研究中分别使用绿原酸、山柰酚、芦丁、槲皮素等对照品作为“种子”节点进行分类筛

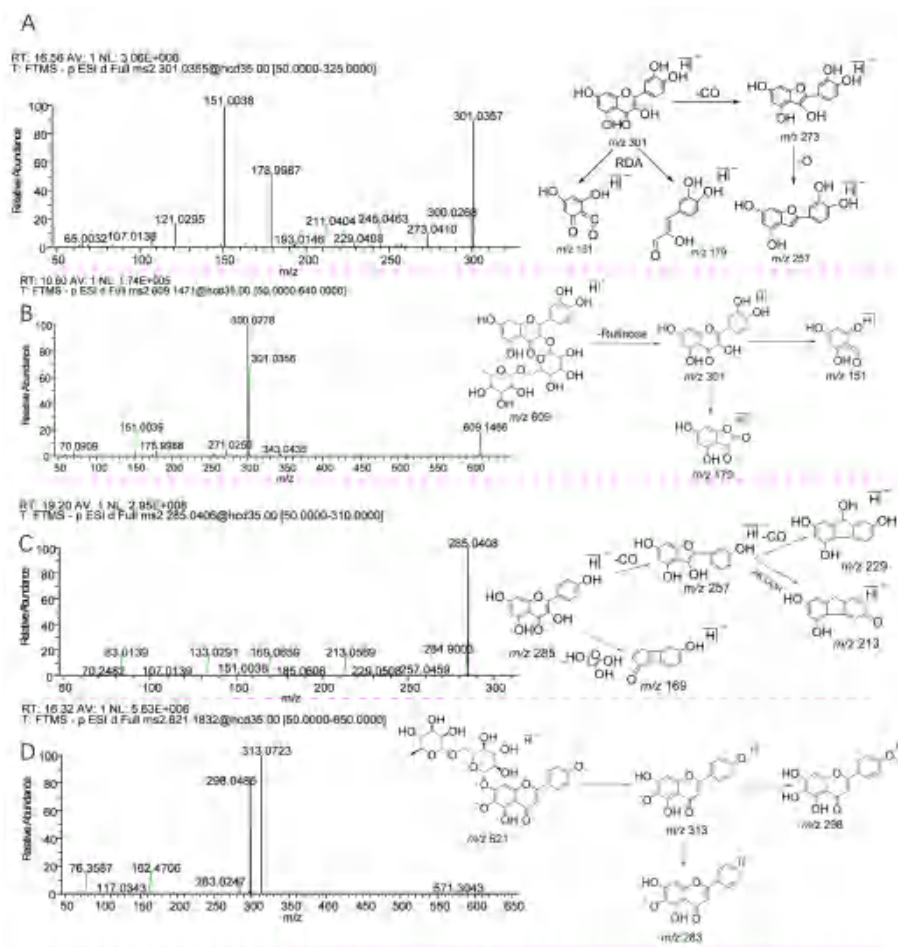


图 6 黄酮类对照品质谱图以及裂解途径

Fig 6 Standard mass spectrum of flavonoids and fragmentation pathway

A. 槲皮素 (quercetin); B. 芦丁 (rutin); C. 山柰酚 (kaempferol); D. 柳穿鱼叶苷 (pectolarin)

选, 然后根据“种子”成分的二级碎片图谱进而计算各成分与“种子”成分的相似度, 根据相似度的值进行聚类分析, 并可以在分析的过程中计算同一化合物在不同植物中的相对含量^[39]。如图 7 所示, 每个节点代表 1 种化合物, 运用丰度归一化算法可以通过显示不同颜色所占面积的大小表示该化合物在不同样品中的相对含量^[40]。结果将网络图划为 A、B、C、D 4 个主要簇, A 区域中检测到的所有化合物都含有 m/z 191 奎宁酸碎片离子, 对照品山柰酚、新绿原酸出现在该区域; B 区域主要为蒽醌母核碎片离子 m/z 208、180^[41]; C 区域所有化合物都含有 m/z 300 碎片离子, 对照品芦丁、槲皮素出现在该区域; D 区域所有化合物都含有 m/z 285 的山柰酚碎片离子, 对照品山柰酚出现在该区域。同时也在各区域内发现准准分子离子峰 m/z 505.2981、415.0897、823.4723 等一系列未知化合物, 由于暂无相关文献报道, 难以确定相关构型, 有待后续通过制备分离和核磁鉴定等方法进行研究。

3.6 基于分子网络分析主要化合物在 3 种蓟属中的分布情况

奎宁酸类在 3 种蓟属植物的分布较广, 新绿原酸、绿原酸、3, 4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸甲酯、3-*O*-阿魏酰奎宁酸等都分布在大蓟、小蓟、杭蓟 3 种蓟属中, 在大蓟、杭蓟中奎宁酸类化合物相对含量较高; 蒽醌类化合物分布差异较明显、主要分布在小蓟中, 主要成分芦荟大黄素在小蓟中含量也相对较高; C、D 区域中黄酮类化合物在大蓟、小蓟中分布较广, 特别是以山柰酚为苷元的黄酮苷类化合物在小蓟中具有较高的相对含量。上述相比于大蓟、小蓟在相对含量上具有一定程度差异的成分可能是未来研究杭蓟药理作用并区别于大蓟、小蓟药效的重要有效成分。

在已筛查化合物中, 共有 36 个化合物是 3 种蓟属植物的共有成分; 43 个化合物为大蓟和小蓟的共有成分; 杭蓟与大蓟、小蓟的共有成分分别为 39 个、38 个化合物, 结合图 7 所示, 对 3 种蓟属植物中成分分布研究得出, 大蓟、小蓟、杭蓟 3 种蓟属相似度较高, 前两者可在临床用药中替代入药, 而杭蓟作为宁海力洋、胡陈一带传统民间滋补药材在成分层面上证明了具有一定的药用价值, 为今后进一步阐明杭蓟药效提供了科学依据。

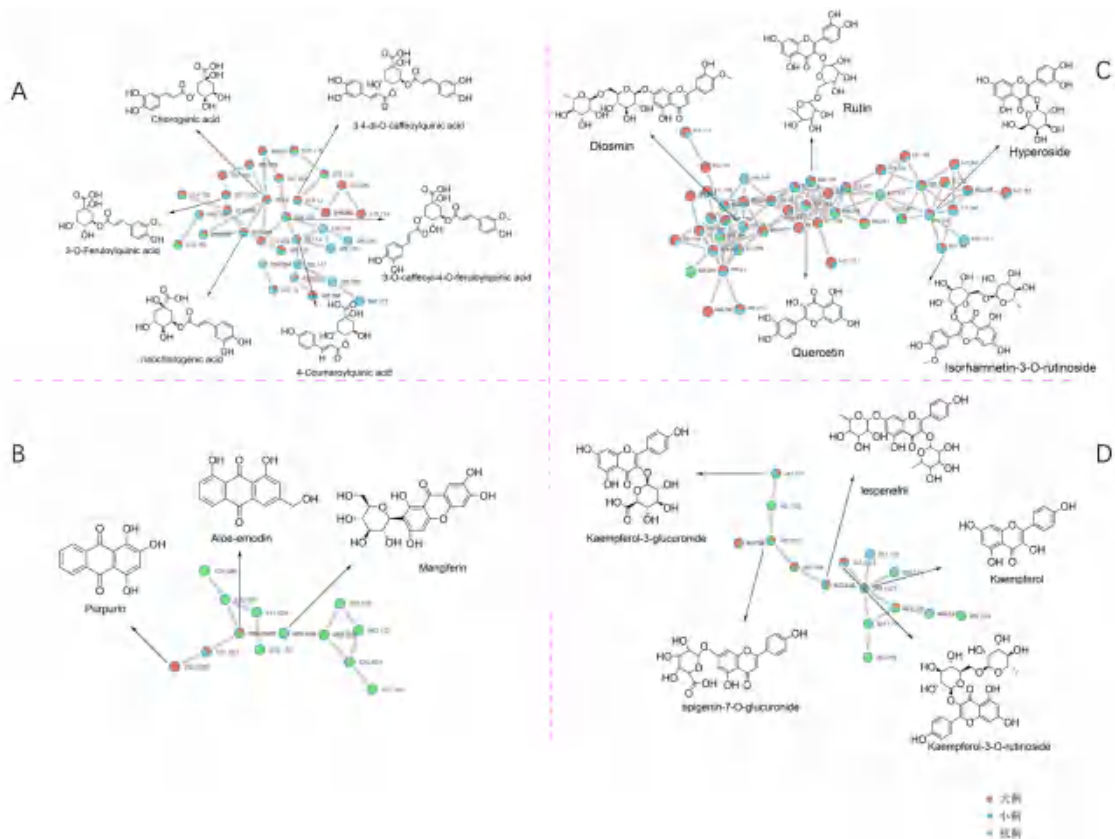


图 7 3 种蓟属中主要成分网络图

Fig 7 Molecular network of main compounds from 3 *Cirsium* mill medicinal plant

A. 奎宁酸类 (quinic acid); B. 蒽醌类 (anthraquinone); C, D. 黄酮类 (flavonoids)

4 讨论

本研究利用 UHPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS 结合分子网络技术首次对大蓟、小蓟、杭蓟中的化学成分进行快速定性鉴别, 通过对照品、文献数据对照和质谱裂解规律共快速筛查出 3 种植物 71 种化合物, 包括 22 种有机酸类、24 种黄酮类、3 种醌类、5 种三萜类、3 种挥发油类及 14 种其他类化合物, 并使用分子网络技术对有效成分进行相对含量的评价, 对质谱复杂体系的成分量化有一定的参考价值^[42]。但不足之处在于 ESI 作为一种软电离方式, 不同单体成分的离子化效率不同, 量化的结果存在一定的误差, 后续还需要通过对照品进行绝对含量的比较。

大蓟、小蓟作为传统药用植物, 为同科不同属植物, 本研究提供了两者主要有效成分的异同, 为大蓟、小蓟后续的药效研究从化学成分水平上提供思路。而研究结果同时表明杭蓟在有效成分层面上与成熟的药用植物大蓟、小蓟高度相似, 具有较高的临床研究价值和药用潜力, 有利于杭蓟作为药用植物更好地推广, 并为在当地产生经济效益和科技成果转化作出贡献。本研究进一步加深了对蓟属植物的认识, 为后续蓟属药用植物的质量控制和药理作用研究提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 48-49.
- [2] 万成杰, 张春菁, 谢宗会, 等. 大蓟抗结核杆菌的活性成分及作用机制研究[J]. 中草药, 2021, 52 (21): 6561-6567.
- [3] 王卫明, 刘亮, 彭慧, 等. 大蓟、小蓟功效的考证和现代研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (1): 81-84.
- [4] 符玲, 龚千锋, 钟凌云. 大蓟的研究进展综述[J]. 江西中医药, 2003, 34 (10): 42-43.
- [5] 植飞, 孔令义, 彭司勋. 中药大蓟的化学及药理研究进展[J]. 中草药, 2001, 32 (7): 90-93.
- [6] 吴晨光, 孙岩, 黄胜阳. 正交实验法优选小蓟中总黄酮的提取工艺[J]. 当代化工, 2021, 50 (8): 1798-1801, 1805.
- [7] 杨炳友, 杨春丽, 刘艳, 等. 小蓟的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48 (23): 5039-5048.
- [8] 付易. 市药检所中药专家助力宁海药农脱贫致富[DB/OL] http://scjgj.ningbo.gov.cn/art/2020/5/27/art_1229135352_48782699.html, 2020-05-27/2022-03-12
- [9] 侯坤, 许浚, 张铁军. 蓟属药用植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2010, 41 (3): 506-509.
- [10] 熊钢. 江西菊科蓟属新记录种——杭蓟[J]. 种子, 2014, 33 (12): 61-62.
- [11] 倪晓霓. 大蓟与小蓟的研究现状及展望[J]. 时珍国医国药, 2005, 16 (6): 548-549.
- [12] 王卫明, 刘亮, 彭慧, 等. 大蓟、小蓟功效的考证和现代研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (1): 81-84.

- [13] 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.
- [14] 李珮. 基于多组学技术的药用植物亲缘学探索研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.
- [15] 张权, 齐梦蝶, 康莹, 等. UHPLC-LTQ Orbitrap MS 快速鉴别无患子果皮中部分苷及苷元成分[J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 224-239.
- [16] 贾帅龙. 基于 LC-MS/MS 技术的姜黄素类化合物系统表征及内源性含羰基甾体激素定性分析[D]. 武汉: 华中科技大学, 2021.
- [17] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(8): 828-837.
- [18] 洪昕. 蒲公英菊苷酸和绿原酸提取及抗氧化活性研究[D]. 成都: 西华大学, 2022.
- [19] 徐玉琴, 刘娟, 欧阳婷, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定热毒宁注射液中活性成分[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(12): 1869-1875.
- [20] 尹智慧. 咖啡酰奎宁酸类化合物 ESI-ITMSⁿ 裂解的量子化学研究[D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2017.
- [21] 孙倩. 基于液质联用技术的大小蓟多组分分析与黄酮类成分的药物代谢动力学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [22] 龚兴成, 刘文静, 曹丽波, 等. DI-MS/MS^{ALL} 法快速定性分析金银花的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2220-2228.
- [23] 尹亮亮, 董静, 徐英, 等. 应用负的 ESI-IT-TOF/MSⁿ 方法研究黄酮类化合物的裂解规律[A]// 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集[C]. 中国药学会, 2007: 10.
- [24] 毛怡宁, 武文奇, 康莹, 等. 酸枣仁中化学成分的 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 快速分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 4884-4891.
- [25] 陈秋竹, 王钢力, 林瑞超. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 分析双黄连注射液中 22 个化学成分[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 321-328.
- [26] Clifford Michael N, Johnston Kelly L, Knight Susan, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids[J]. J Agr Food Chem, 2003, 51(10): 2900-2911.
- [27] 刘颖, 卢建秋, 张加余, 等. 苦碟子药材及其注射液中化学成分的 HPLC-ESI-MSⁿ 分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2675-2681.
- [28] 张倩. 基于 LC-MSⁿ 技术的清开灵注射液 Chlorogenic Acid 类成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [29] 王文龙, 文超越, 郭秋平, 等. Chlorogenic Acid 的生物活性及其作用机制[J]. 动物营养学报, 2017, 29(7): 2220-2227.
- [30] 刘晔, 王远兴. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术对庐山云雾茶成分分析及真伪判别[J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 269-277.
- [31] 于小杰. 基于 LC-MS 技术的芪归银方药效物质基础研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [32] 张加余, 蔡伟, 李云, 等. HPLC/LTQ-Orbitrap MSⁿ 结合 MDF 数据挖掘技术快速鉴定藏白蒿 Chlorogenic Acid 类似物[J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 321-327.
- [33] 国鸽, 张靖杰, 李鹏高. 甘薯中主要生物活性成分研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 533-538.
- [34] 杨丽, 袁丰瑞, 曹岚, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术快速鉴定柴石退热颗粒的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 152-159.
- [35] 李翁坤, 王艳鸽, 曾丽珊, 等. UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS 法分析 5 种紫金牛属植物的黄酮类成分[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(1): 91-96.
- [36] 权建野, 范斌, 刘安, 等. 基于 UHPLC Q-Exactive Orbitrap MSⁿ 和分子网络技术快速鉴定吴茱萸汤中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(1): 71-81.
- [37] 刘梦诗, 杨得坡, 杨婉玲, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析四花青皮的成分[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2395-2400, 2427.
- [38] 向进乐, 赵胜娟, 马丽苹, 等. 可食牡丹鲜花酶法制汁及主成分 HPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 137-143.
- [39] 程桃芳, 金慧子, 刘昌孝, 等. LC-MS/MS 分子网络及其对中药研究的启发[J]. 中草药, 2018, 49(2): 265-273.
- [40] 袁恩, 邓敏芝, 周立分, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap MS 结合分子网络技术鉴别铁线莲属植物中三萜皂苷类成分[J]. 中草药, 2020, 51(24): 6157-6167.
- [41] 刘娟秀, 罗益远, 刘训红, 等. UPLC-QTRAP-MS/MS 法同时测定苍耳类药材中酚酸、蒽醌及黄酮类成分[J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 542-553.
- [42] 熊倩, 杨丽娟, 丁筱雪, 等. UPLC-HRMS 结合质谱分子网络高通量分析人血浆中的代谢物[J]. 质谱学报, 2022, 43(3): 365-373.

(收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2022-12-20)

长裂藤黄化学成分的分离鉴定及其抗肿瘤活性初筛

张少武, 应晶晶, 师马俊杰, 熊焯, 孟祥敏, 汪梁, 孙雅婷* (沈阳医学院药学院, 沈阳 110034)

摘要: 目的 研究长裂藤黄 (*Garcinia lancilimba*) 叶中的化学成分。方法 长裂藤黄叶用 95% 乙醇提取, 二氯甲烷萃取, 采用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱、ODS 柱色谱、半制备高效液相色谱等方法对化合物进行分离, 根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。结果 从长裂藤黄叶中分离得到 7 个咕吨酮类化合物, 分别鉴定为 1, 3, 7-trihydroxy-2, 4-diprenylxanthone (1)、globuxanthone (2)、2, 6-dihydroxy-1, 5-dimethoxyxanthone (3)、1, 2, 5-trihydroxyxanthone (4)、1, 2, 8-trihydroxyxanthone (5)、1, 7-dihydroxyxanthone (6)、1, 3, 6, 7-tetrahydroxyxanthone (7)。分离得到的咕吨酮类化合物对人原髓细胞性白血病细胞株 HL-60 具有很强的抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 7.1, 3.8, 16.2, 13.7, 23.5, 22.0, 18.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 化合物 1 ~ 5 为首次从长裂藤黄中分离得到, 且具有较好的抗肿瘤活性。

关键词: 长裂藤黄; 咕吨酮; 结构鉴定; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1296-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.028

Isolation and identification of chemical constituents in *Garcinia lancilimba* and their anti-tumor activity screening

ZHANG Shao-wu, YING Jing-jing, SHI Ma-jun-jie, XIONG Zhuo, MENG Xiang-min, WANG Liang, SUN Ya-ting* (School of Pharmacy, Shenyang Medical College, Shenyang 110034)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents from the leaves of *Garcinia lancilimba*. **Methods** The compounds from dichloromethane fraction of 95% ethanol extraction of *Garcinia lancilimba* were separated and purified by column chromatography of silica gel, Sephadex LH-20, ODS, and semi-preparative HPLC. The structures of the isolates were elucidated by physicochemical properties and spectral analysis. **Results** Seven xanthenes were obtained and their structures were identified as 1, 3, 7-trihydroxy-2, 4-diprenylxanthone (1), globuxanthone (2), 2, 6-dihydroxy-1, 5-dimethoxyxanthone (3), 1, 2, 5-trihydroxyxanthone (4), 1, 2, 8-trihydroxyxanthone (5), 1, 7-dihydroxyxanthone (6), and 1, 3, 6, 7-tetrahydroxyxanthone (7). The isolated xanthone compounds showed strong inhibitory activities against HL-60 cells, with IC_{50} values of 7.1, 3.8, 16.2, 13.7, 23.5, 22.0, 18.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Compounds 1 ~ 5 are obtained from *Garcinia lancilimba* for the first time, which shows good anti-tumor activity.

Key words: *Garcinia lancilimba*; xanthone; structure identification; chemical constituents

长裂藤黄 (*Garcinia lancilimba*) 为藤黄属 (*Garcinia*) 植物, 主要分布于我国云南、广西等地区^[1]。藤黄属植物有着悠久的民间用药历史, 具有消炎、止血和杀虫之功效, 用于治疗溃疡、湿疮、出血及烫伤等^[2]。藤黄属植物的代表性化合物为咕吨酮类、间苯三酚类及萜类化合物

等^[3-5], 具有抗肿瘤、抗氧化和抗炎等多种药理作用^[6-9]。长裂藤黄作为中国特有的藤黄属植物, 与其他藤黄属植物相比, 其化学成分和活性的相关研究很少, 主要的化学成分包括咕吨酮类、联苯类和黄酮类化合物, 具有较好的抗肿瘤和抗病毒活性^[10-14]。为了丰富藤黄属植物的化合物资

基金项目: 沈阳医学院大学生科研课题 (No. 20229036); 辽宁省教育厅科学技术研究面上项目 (No. LJKZ1140)。

作者简介: 张少武, 男, 主要从事天然产物研究, email: 1194874849@qq.com *通信作者: 孙雅婷, 女, 博士, 讲师, 主要从事天然药物的化学成分及活性研究, email: sunyatingna@163.com

源, 本文对长裂藤黄叶的化学成分进行研究, 采用多种色谱手段进行分离, 共得到 7 个咕吨酮类化合物 (见图 1), 通过理化常数测定、波谱数据分析等方法分别鉴定为 1, 3, 7-trihydroxy-2, 4-diprenylxanthone (1)、globuxanthone (2)、2, 6-dihydroxy-1, 5-dimethoxyxanthone (3)、1, 2, 5-trihydroxyxanthone (4)、1, 2, 8-trihydroxyxanthone (5)、1, 7-dihydroxyxanthone (6)、1, 3, 6, 7-tetrahydroxy xanthone (7)。

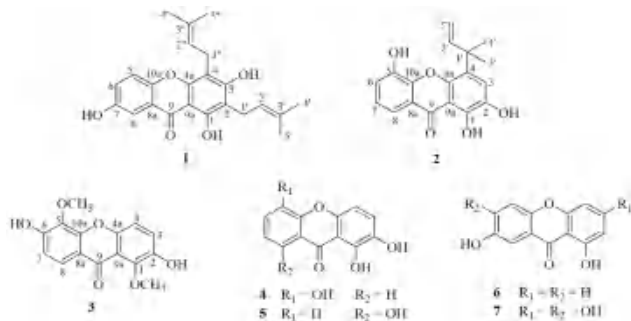


图 1 化合物 1 ~ 7 的化学结构

Fig 1 Structure of the compounds 1 ~ 7

1 材料

Bruker ARX-400 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司, TMS 内标); 高效液相色谱仪 (日本岛津, SPD-20A 紫外检测器, LC-6AB 高压输液泵), 色谱柱 YMC-Pack Pro C18 (5 μm , 250 \times 20 mm); OSB-2100 旋转蒸发仪 (日本 EYELA 公司); 薄层硅胶板、200 ~ 300 目硅胶 (青岛海洋化工厂), ODS 柱色谱填料 (15 μm , 北京绿百草科技发展有限公司), Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (瑞典 GE Healthcare 公司); 色谱纯甲醇 (天津科密欧公司), 氘代试剂 DMSO- d_6 和 CDCl_3 (美国 Sigma 公司), 人原髓细胞性白血病细胞株 HL-60 (美国 ATCC), 噻唑蓝 (MTT, Biosharp 公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司), 其他常规试剂均为分析纯; 显色剂 (10% 硫酸乙醇)。五氟尿嘧啶 (5-FU, 美国 Sigma 公司)。

长裂藤黄叶采自云南省西双版纳热带植物园, 经陈渝工程师鉴定为藤黄属植物长裂藤黄 *Garcinia lancilimba*。

2 提取分离

长裂藤黄叶 12.4 kg 用 95% 乙醇加热提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 回收溶剂, 将所得提取物分散于水中, 用二氯甲烷等体积萃取并浓缩, 得到二氯甲烷萃取物 270 g。对二氯甲烷萃取物进行硅胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇系统 (100:0 ~ 0:100) 进行梯度洗脱, 得到 5 个

组分 Fr.A ~ Fr.E。对 Fr.B 组分进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚-丙酮系统 (100:3 ~ 100:50) 进行梯度洗脱, 得到 8 个亚组分 Fr.B1 ~ Fr.B8。Fr.B2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和开放 ODS 柱色谱 (30% ~ 100% 甲醇水) 纯化得到化合物 1 (6.5 mg) 和化合物 2 (5.0 mg)。Fr.B4 经开放 ODS 柱色谱 (30% ~ 100% 甲醇水) 和高效液相色谱 [70% 甲醇水, 流速 2 mL \cdot min $^{-1}$, YMC-Pack C18 (5 μm , 250 mm \times 20 mm)] 纯化得到化合物 6 (12.0 mg, $t_R = 18.0$ min) 和化合物 7 (8.0 mg, $t_R = 13.5$ min)。Fr.B6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和开放 ODS 柱色谱 (50% ~ 100% 甲醇水) 纯化得到化合物 3 (7.0 mg)、化合物 4 (10.0 mg) 和化合物 5 (4.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 381.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.08 (1H, s, 1-OH), 7.34 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5), 7.23 (1H, dd, $J = 2.3, 8.7$ Hz, H-6), 7.61 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 3.45 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'), 5.28 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 1.88 (3H, s, 4'- CH_3), 1.78 (3H, s, 5'- CH_3), 3.54 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 5.26 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 1.84 (3H, s, 4''- CH_3), 1.73 (3H, s, 5''- CH_3)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 158.3 (C-1), 109.1 (C-2), 161.0 (C-3), 105.6 (C-4), 152.2 (C-4a), 119.0 (C-5), 120.5 (C-6), 153.2 (C-7), 109.0 (C-8), 120.7 (C-8a), 181.0 (C-9), 103.1 (C-9a), 152.2 (C-10a), 21.7 (C-1'), 121.9 (C-2'), 133.8 (C-3'), 26.1 (C-4'), 18.2 (C-5'), 22.3 (C-1''), 121.5 (C-2''), 135.7 (C-3''), 26.2 (C-4''), 18.0 (C-5'')。该化合物的波谱数据同文献^[15]中的化合物基本一致, 故鉴定为 1, 3, 7-trihydroxy-2, 4-diprenylxanthone。该化合物为首次从长裂藤黄中分离得到。

化合物 2: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 313.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.60 (1H, s, 1-OH), 10.47 (1H, s, 2-OH), 9.22 (1H, s, 5-OH), 7.28 (1H, s, H-3), 7.30 (1H, dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz, H-6), 7.24 (1H, t, $J = 8.2$ Hz, H-7), 7.57 (1H, dd, $J = 2.1, 8.2$ Hz, H-8), 6.31 (1H, dd, $J = 10.6, 17.4$ Hz, H-2'), 5.05 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, Ha-3'), 4.94 (1H, d,

$J = 10.6$ Hz, Hb-3'), 1.60 (6H, s, 4'-CH₃, 5'-CH₃)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 146.5 (C-1), 138.6 (C-2), 122.8 (C-3), 125.0 (C-4), 145.2 (C-4a), 145.8 (C-5), 120.1 (C-6), 123.8 (C-7), 114.3 (C-8), 120.1 (C-8a), 182.7 (C-9), 109.0 (C-9a), 145.8 (C-10a), 39.8 (C-1'), 146.5 (C-2'), 111.3 (C-3'), 26.9 (C-4'), 26.9 (C-5')。该化合物的波谱数据同文献^[16]中的化合物基本一致, 故鉴定为 globuxanthone。该化合物为首次从长裂藤黄中分离得到。

化合物 3: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 289.1 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.56 (1H, s, 2-OH), 9.40 (1H, s, 6-OH), 7.30 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3), 7.24 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-4), 6.92 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-7), 7.72 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-8), 3.91 (3H, s, 1-OCH₃), 3.78 (3H, s, 5-OCH₃)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 155.7 (C-1), 147.2 (C-2), 123.8 (C-3), 121.6 (C-4), 150.3 (C-4a), 134.5 (C-5), 145.6 (C-6), 115.6 (C-7), 114.0 (C-8), 116.4 (C-8a), 174.5 (C-9), 113.8 (C-9a), 150.0 (C-10a), 61.4 (1-OCH₃), 61.1 (5-OCH₃)。该化合物的波谱数据同文献^[17]中的化合物基本一致, 故鉴定为 2, 6-dihydroxy-1, 5-dimethoxyxanthone。该化合物为首次从长裂藤黄中分离得到。

化合物 4: 黄色粉末 (丙酮), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 245.1 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (1H, s, 1-OH), 10.45 (1H, s, 2-OH), 9.35 (1H, s, 5-OH), 7.33 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3), 6.89 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 7.32 (1H, brd, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.24 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.61 (1H, brd, $J = 8.1$ Hz, H-8)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 148.2 (C-1), 140.8 (C-2), 123.5 (C-3), 108.8 (C-4), 147.5 (C-4a), 146.4 (C-5), 120.3 (C-6), 124.6 (C-7), 115.0 (C-8), 120.0 (C-8a), 182.1 (C-9), 106.3 (C-9a), 145.4 (C-10a)。该化合物的波谱数据同文献^[17]中的化合物基本一致, 故鉴定为 1, 2, 5-trihydroxyxanthone。该化合物为首次从长裂藤黄中分离得到。

化合物 5: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 245.0 [M + H]⁺。¹H

NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.10 (1H, s, 1-OH), 11.56 (1H, s, 8-OH), 7.37 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3), 6.69 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-4), 7.02 (1H, brd, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.58 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.82 (1H, brd, $J = 8.5$ Hz, H-7)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 150.2 (C-1), 142.8 (C-2), 125.5 (C-3), 109.2 (C-4), 149.5 (C-4a), 114.4 (C-5), 134.8 (C-6), 110.1 (C-7), 164.4 (C-8), 113.2 (C-8a), 179.3 (C-9), 106.3 (C-9a), 155.5 (C-10a)。该化合物的波谱数据同文献^[18]中的化合物基本一致, 故鉴定为 1, 2, 8-trihydroxyxanthone。该化合物为首次从长裂藤黄中分离得到。

化合物 6: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 229.1 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.65 (1H, s, 1-OH), 10.10 (1H, s, 7-OH), 6.78 (1H, dd, $J = 0.8, 8.5$ Hz, H-2), 7.70 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-3), 7.05 (1H, dd, $J = 0.8, 8.5$ Hz, H-4), 7.55 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5), 7.36 (1H, dd, $J = 3.0, 9.0$ Hz, H-6), 7.44 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-8)。该化合物的波谱数据同文献^[19]中的化合物基本一致, 故鉴定为 1, 7-dihydroxyxanthone。

化合物 7: 黄色粉末 (甲醇), 10% 硫酸乙醇溶液显黄色, ESI-MS m/z 261.0 [M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13.18 (1H, s, 1-OH), 6.14 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 6.30 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4), 6.77 (1H, s, H-5), 7.35 (1H, s, H-8)。¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 162.6 (C-1), 98.0 (C-2), 164.5 (C-3), 93.5 (C-4), 157.3 (C-4a), 102.2 (C-5), 151.1 (C-6), 143.7 (C-7), 108.0 (C-8), 111.5 (C-8a), 178.9 (C-9), 101.6 (C-9a), 154.2 (C-10a)。该化合物的波谱数据同文献^[20]中的化合物基本一致, 故鉴定为 1, 3, 6, 7-tetrahydroxyxanthone。

4 抗肿瘤活性检测

采用 MTT 方法检测分离得到的咕吨酮类化合物对人原髓细胞性白血病细胞株 HL-60 的抑制活性。取对数生长期的 HL-60 细胞接种于 96 孔培养板内, 次日加入不同浓度分离得到的化合物稀释液, 同时设立空白对照, 继续培养 24 h。然后每孔加入 50 μ L 5 mg \cdot mL⁻¹ 的 MTT 溶液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 200 μ L DMSO 溶解结晶, 室温振荡 10 min 后, 在酶标

仪 570 nm 处测量每个孔的光密度值 (OD), 并计算得到半数抑制浓度 (IC_{50})。结果显示从长裂藤黄中分离得到的 7 个咕吨酮类化合物具有很好的细胞生长抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 7.1、3.8、16.2、13.7、23.5、22.0、18.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 阳性对照药 5-氟尿嘧啶的 IC_{50} 为 3.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5 讨论

藤黄属药用植物最具代表性的化合物为咕吨酮类化合物, 本文从长裂藤黄中分离得到了 7 个咕吨酮类化合物, 其中化合物 1~5 为首次从该植物中分离得到, 化合物 6 和 7 在已发表的大苞藤黄和长裂藤黄相关文献中报道过。分离得到的 7 个化合物具有很好的 HL-60 细胞抑制活性, 与简单氧代咕吨酮相比, 结构中含有异戊烯基的化合物表现出了更强的细胞生长抑制作用。该研究进一步丰富了长裂藤黄的次级代谢产物的多样性, 为其资源合理的开发应用提供科学依据。从近几年分离得到的化合物的结构以及活性数据来看, 长裂藤黄仍有一定的研究发展空间, 有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 50 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 郑赵倩, 张莉, 沈凯凯, 等. 藤黄的研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11 (7): 1180-1188.
- [3] Niu SL, Li DH, Wang YT, et al. Neobraclactones A-C, three unprecedented chaise longue-shaped xanthenes from *Garcinia bracteata* [J]. Org Biomol Chem, 2017, 15 (22): 4901-4906.
- [4] 李浩浩, 张洪, 付文卫, 等. 中国藤黄属植物中多环多异戊烯基间苯三酚类化合物的研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11 (7): 1195-1201.
- [5] Bui TQ, Bui AT, Nguyen KT, et al. A depsidone and six triterpenoids from the bark of *Garcinia celebica* [J]. Tetrahedron Lett, 2016, 57 (23): 2524-2529.
- [6] Hemshekhar M, Sunitha K, Sebastin SM, et al. An overview on genus *garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects [J]. Phytochem Rev, 2011, 10 (3): 325-351.
- [7] Niu SL, Li DH, Li XY, et al. Bioassay-and chemistry-guided isolation of scalemic caged prenylxanthenes from the leaves of *Garcinia bracteata* [J]. J Nat Prod, 2018, 81 (4): 749-757.
- [8] Tian DS, Gu W, Wang LP, et al. Cytotoxic and anti-oxidant biphenyl derivatives from the leaves and twigs of *Garcinia multiflora* [J]. Phytochem Lett, 2017, 19 (1): 132-135.
- [9] Dzoyem JP, Lannang AM, Fouotsa H, et al. Anti-inflammatory activity of benzophenone and xanthenone derivatives isolated from *Garcinia* (Clusiaceae) species [J]. Phytochem Lett, 2015, 14 (4): 153-158.
- [10] Sun YT, Li DH, Jia CC, et al. Three new xanthenes from the leaves of *Garcinia lancilimba* [J]. J Nat Med, 2016, 70 (2): 173-178.
- [11] Yang NY, Han QB, Cao XW, et al. Two new xanthenes isolated from the stem bark of *Garcinia lancilimba* [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55 (6): 950-952.
- [12] Han QB, Tian HL, Yang NY, et al. Polyprenylated xanthenes from *Garcinia lancilimba* showing apoptotic effects against HeLa-C3 cells [J]. Chem Biodivers, 2008, 5 (12): 2710-2717.
- [13] Gao XM, Cui D, Wang SS, et al. New biphenyls from *Garcinia lancilimba* [J]. Phytochem Lett, 2018, 27 (5): 219-222.
- [14] 王玉婷, 于熙, 岳佳音, 等. 长裂藤黄叶的化学成分研究 [J]. 中南药学, 2022, 20 (2): 354-358.
- [15] Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, et al. Three new xanthenes from the bark of *Garcinia dioica* [J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44 (1): 232-234.
- [16] Locksley HD, Moore I, Scheinmann F. Extractives from Guttiferae. Part III. The isolation and structure of symphoxanthone and globuxanthone from *Symphonia globulifera* [J]. J Chem Soc, 1966, 23: 2186-2189.
- [17] Minami H, Kinoshita M, Fukuyama Y, et al. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica* [J]. Phytochemistry, 1994, 36 (2): 501-506.
- [18] Li WK, Chan CL, Leung HW, et al. Xanthenes from *Polygala caudate* [J]. Phytochemistry, 1999, 51 (7): 953-958.
- [19] Monache DF, Mac-Quhae MM, Monache GD, et al. Xanthenes, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae* [J]. Phytochemistry, 1983, 22 (1): 227-232.
- [20] Frahm AW, Chaudhuri RK. ^{13}C NMR spectroscopy of substituted xanthenes- II: ^{13}C NMR spectral study of polyhydroxy xanthenes [J]. Tetrahedron, 1979, 35 (17): 2035-2038.

(收稿日期: 2023-02-16; 修回日期: 2023-03-29)

综述

中药活性物质对肠屏障功能的保护作用研究进展

冯雯, 张亚薇, 张祎, 王丹, 陈倩, 刘梦扬, 吴昱铮*, 王涛* (天津中医药大学中医药研究院, 天津 300190)

摘要: 肠屏障可以防止肠道内的有害物质从肠腔进入人体内其他组织、器官和血液循环中, 以确保机体内环境稳态。然而, 肠屏障完整性可能受到诸如感染、肠道菌群改变、免疫失调等内在和外在因素的破坏, 从而导致外部有害物质侵入机体内环境, 引起消化系统疾病、免疫系统疾病或代谢性疾病。中药作为中国传统医学的瑰宝, 具有特有的活性成分和明确的药理作用, 对疾病有极其显著的治疗作用。本文就中药活性物质对肠屏障损伤的修复作用相关文献进行综述, 为治疗肠屏障损伤提供新思路。

关键词: 中药活性物质; 肠屏障; 损伤

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1300-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.029

Research progress in the protective effect of active substances of Chinese medicine on intestinal barrier function

FENG Wen, ZHANG Ya-wei, ZHANG Yi, WANG Dan, CHEN Qian, LIU Meng-yang, WU Yu-zheng*, WANG Tao* (*Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300190*)

Abstract: The intestinal barrier can prevent the passage of harmful substances from the intestinal lumen to other tissues and blood circulation to ensure the internal environmental homeostasis. However, the intestinal barrier integrity may be disrupted by intrinsic and extrinsic factors such as infection, altered intestinal flora, and immune dysregulation, which further disturbs the internal environmental homeostasis and cause digestive, immune and metabolic diseases. Chinese herbal medicine has significant therapeutic effects on human body with its unique active ingredients and pharmacological effects. This paper reviewed literatures on the protective effect of active substances of traditional Chinese medicine on intestinal barrier damage to provide new ideas for the treatment of intestinal barrier damage.

Key words: Chinese medicine active substance; intestinal barrier; dysfunction

肠道是人体重要的消化器官, 参与营养物质的消化吸收并维持机体电解质和水的稳态。与此同时, 肠道也与外部环境中大量存在的病毒、细菌、促炎因子等不利因素不断发生着密切接触。正常生理状态下, 肠屏障可以防止潜在有害物质

从肠腔进入内部环境, 同时选择性地允许营养物质通过, 以确保机体内环境稳态。然而, 如果肠屏障受损, 肠上皮细胞通透性增加, 肠腔内的细菌及毒素发生移位进入体内环境, 将会激活炎症信号通路, 引发肠道微生物群失调, 进而导致消化

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82074118)。

作者简介: 冯雯, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药治疗肠炎的药效及机制研究, email: fengwen9759@163.com *通信作者: 吴昱铮, 女, 助理研究员, 主要从事中药治疗肠炎的药效及机制研究, email: wuz2019@tjutc.edu.cn; 王涛, 男, 教授, 主要从事中药代谢性疾病调控研究, email: wangtao@tjutc.edu.cn

系统疾病、免疫系统疾病、甚至代谢性疾病的发生^[1]。因此,维护肠屏障功能对于预防疾病及维持机体稳态至关重要。目前,有大量研究显示,中药活性物质对肠屏障损伤有显著治疗作用。本文就肠屏障的结构组成及功能,中药活性物质保护肠屏障功能的机制,以及中药活性物质对肠屏障损伤的修复作用进行综述。

1 肠屏障的结构组成及功能

肠屏障由机械屏障、化学屏障、肠道微生物屏障和免疫屏障构成^[2]。

机械屏障主要包括肠上皮细胞和细胞间紧密连接^[3]。肠上皮细胞构成了机械屏障的基本骨架,包括肠细胞、杯状细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞等类型,其中肠细胞是吸收型细胞,杯状细胞、潘氏细胞、肠内分泌细胞是分泌型细胞。吸收型细胞负责营养物质的消化、吸收和代谢,分泌型细胞分泌 MUC2、MUC5、MUC6 等黏蛋白和抗菌肽,形成黏液层,将肠腔中的共生菌和宿主组织隔离开来,以维持肠道和机体内环境的稳态^[4]。同时,肠上皮细胞还负责将肠腔内的抗原、内毒素等微生物信号传递给黏膜免疫细胞,调控宿主-肠道微生物的相互作用,促进肠道环境的平衡^[5]。肠上皮细胞之间的缝隙由紧密连接填充。紧密连接由咬合蛋白(Occludin)、闭合蛋白(Claudins)、闭合小环蛋白(Zonula occludens, ZO)和连接黏附分子(JAMs)构成,受到肌球蛋白轻链激酶(MLCK)、蛋白激酶 C(PKC)、Rho/Rho 激酶等蛋白或者信号分子的调控^[6-7]。紧密连接具有选择透过性和动态可变性,在正常生理条件下可以限制肠腔内抗原和细菌位移到固有层,同时为营养物质的吸收提供了通道^[8]。

化学屏障主要指肠道黏液层,由黏蛋白、电解质、脂质以及水分等组成^[9]。肠道黏液层分为内层和外层,内层黏液层紧贴肠上皮细胞,细菌无法穿透,避免细菌对肠免疫系统的影响。外层黏液由内层黏液转化而来,厚度约为内层黏液层的两倍。与内层黏液不同,外层黏液为松散的网状结构,体积扩展为内层黏液的四倍,有更强的流动性,因此成为了共生肠菌的栖息地^[10]。除此之外,肠道黏液层还作为表面清洁剂发挥作用,在肠道蠕动力的辅助下,结合并收集肠腔中的食物残渣、碎片和细菌,将其排出体外。黏蛋白与水结合的能力还赋予了肠道黏液层保湿和润滑的特性,保护上皮细胞在管腔内容物通过时免受脱水及机械应力的影响^[11]。

肠道微生物屏障是由共生微生物附着在肠道表面黏膜层上形成的。肠道微生物群主要由拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门和放线菌门等细菌组成,还包含古菌、真菌、病毒以及噬菌体^[12-13]。肠道微生物最主要的功能是调节营养物质的消化和吸收,为肠道上皮细胞提供能量,诱导免疫球蛋白 A(IgA)产生并调节抗炎因子的表达,通过提供低水平的免疫刺激来促进肠道的适应性免疫^[14-16]。肠道益生菌是肠道微生物屏障的重要组成部分,可以与病原体竞争营养物质和黏膜定植位点,以抵抗病原体的入侵^[17]。研究表明,益生菌通过促进肠道免疫细胞的分化,刺激黏蛋白和抗菌肽的分泌,上调肠道紧密连接蛋白的表达从而起到保护肠屏障的作用^[18-19]。此外,许多共生菌能代谢产生丙酸盐和丁酸盐等生物活性代谢物。丁酸盐是肠上皮细胞的主要能量来源,有助于维持肠上皮的完整性^[20]。丙酸盐可以促进肠上皮紧密连接蛋白合成,增加 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达,增强肠黏膜机械屏障功能^[21]。

免疫屏障包括肠道固有层中的树突状细胞、巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞等免疫细胞及其分泌的免疫介质[如分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)和细胞因子等]。SIgA 由肠道固有层中的 B 细胞产生,穿过肠上皮,分泌到黏液层。细胞因子由免疫细胞和肠上皮细胞分泌,是炎症和免疫反应中的重要调节因子^[22]。在抗原的刺激下,肠道免疫细胞能够对黏膜表面的抗原进行摄取和递呈,帮助机体识别外来抗原以及自身的异常抗原,保护肠道免受异常免疫反应的影响^[23-24]。SIgA 可以与病原体和毒素结合,以一种免疫排斥的机制防止其黏附在肠黏膜上;同时,SIgA 还能调节肠道微生物群组成,在维持肠道微生物群与宿主之间的稳态方面发挥作用^[25]。细胞因子白细胞介素(IL)-22 参与上皮细胞再生,诱导杯状细胞分泌黏液,释放抗菌肽,在调节肠道免疫及维持肠道微生态平衡方面具有重要作用^[14, 26]。

2 中药活性物质保护肠屏障功能的机制

中药活性物质通过作用于不同的肠屏障结构,对肠屏障功能进行整体调控。就目前的研究结果进行分析,中药活性物质主要通过调控紧密连接蛋白表达,抑制肠道炎症和调节肠道微生态等途径发挥治疗作用。

紧密连接蛋白(包括 Claudins、Occludin、和 ZO)是肠道机械屏障的重要组成部分,其表达缺失直接导致肠屏障损伤及通透性增加。

Claudins 蛋白家族主要形成肠道中离子和水的选择性屏障^[27]。其中, Claudin-1 的敲除会导致小鼠严重脱水和出生后死亡^[28]。对 Claudin-2 离子通道的调节可作为调控肠屏障通透性的药物靶点^[29]。Occludin 限制大分子的细胞旁通透性, Occludin 的缺失明显增加肠屏障的渗漏^[30]。ZO-1 是第一个被确认的上皮细胞紧密连接蛋白, 其是 Wnt 信号介导的细胞增殖的重要调控因子, 对黏膜修复至关重要^[31]。中药活性物质通过直接调节 Claudins、Occludin 和 ZO 等肠道紧密连接蛋白的表达, 维持其正常生理功能, 从而维护肠道机械屏障完整性。

炎症是导致肠屏障损伤的关键因素。体外实验表明, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导肌球蛋白轻链磷酸化, 进而导致肠上皮细胞间隙增加, 肠屏障功能受损^[32]。炎症因子 γ -干扰素 (INF- γ) 协同 TNF- α , 通过激活 NF- κ B 信号通路和 MLCK, 影响紧密连接蛋白 Occludin 的表达, 增加肠屏障对大分子化合物的通透性^[33]。除此之外, 多种 IL 对上皮细胞紧密连接蛋白也有不同程度的影响。例如, 在炎症性肠病患者肠黏膜中高表达的促炎细胞因子 IL-1, 抑制紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 的表达, 增加肠上皮细胞旁通路孔隙, 导致屏障渗漏^[34]。中药活性物质抑制细胞因子诱导的肌动蛋白重塑和紧密连接蛋白表达的变化, 维持细胞间孔隙和离子通道的正常功能。

肠道上皮既是外部环境和机体内环境之间的屏障, 也是肠道菌栖息的场所。在体内和体外模型中, 肠道菌群的种类和数量变化可直接改变紧密连接蛋白的表达和定位^[35-36]。肠道微生物可通过释放可溶性肽或毒素对紧密连接蛋白和肠道屏障功能进行直接调控^[37], 也可通过短链脂肪酸 (SCFA) 等代谢物影响肠上皮细胞的生理状态^[38]。此外, 微生物也可以通过调控宿主免疫细胞和细胞因子的释放间接地改变上皮屏障的通透性^[39]。中药活性物质通过调控肠道微生物稳态, 维持肠道菌群正常的丰度和代谢状态, 从而恢复正常的肠道通透性。

3 中药活性物质对肠屏障的保护作用

肠屏障功能损伤和通透性增加是多种因素作用于不同屏障结构导致的结果。针对这一特点, 中药活性物质发挥多途径、多靶点、协同作用的优势, 对肠屏障进行整体修复。下面将从中药活性物质直接调控紧密连接蛋白表达、抑制炎症及氧化反应、调节肠道微生物等方面, 对肠屏障保

护作用进行综述。

3.1 中药活性物质直接调控紧密连接蛋白表达

肠道的机械屏障对维持肠道正常结构及功能具有重要作用, 中药活性物质能够直接调控肠道黏膜紧密连接, 改善肠道机械屏障功能。Fan 等^[40]研究发现, 槲皮素和杨梅素通过降低细胞旁通透性、增加细胞单层的跨上皮细胞阻力、增强 Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 三种紧密连接蛋白的表达, 从而拮抗丙烯酰胺诱导的大鼠小肠上皮细胞 (IEC-6) 屏障功能障碍。Yue 等^[41]用脂多糖 (LPS) 刺激 Caco-2 细胞单层, 在体外建立肠屏障损伤模型, 用乔松素处理后, 发现紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-1、ZO-1 和 JAM-A 的表达显著升高, Caco-2 细胞单层的通透性增加, 维持了正常的肠上皮屏障功能。Claudin-7 是肠上皮细胞中的一种重要的紧密连接蛋白, 在调控肠上皮干细胞存活、自我更新和分化方面不可或缺。Wen 等^[42]研究发现, 川陈皮素可显著上调葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 Claudin-7 的表达, 保护结肠黏膜屏障, 并且减轻模型小鼠结肠病理损伤。

3.2 中药活性物质抑制炎症及氧化反应

大部分中药活性物质都具有抗炎的药理活性, 这一药理作用在修复肠道屏障损伤方面也具有积极的效果^[43-45]。有研究证实, 大黄素通过抑制脓毒症引起的全身性炎症反应从而阻止了炎症因子对肠上皮紧密连接的损伤, 维护了肠屏障的完整性^[46-48]。Zhou 等^[49]研究发现, 重症急性胰腺炎能够引起肠屏障损伤。大黄素通过降低体内高浓度的促炎细胞因子, 缓解了模型鼠因炎症导致的结肠黏膜水肿、充血以及微绒毛脱落。同时, 大黄素通过抑制炎症反应缓解了肠道细胞的凋亡, 增加了结肠紧密连接蛋白的表达。Yuan 等^[50]用十溴二苯醚处理 Caco-2 细胞单层模拟肠屏障损伤, 发现木犀草素通过降低活性氧 (ROS) 水平, 增加超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 的活性, 抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等促炎细胞因子的分泌, 并增加紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin-1) 的表达, 从而减轻十溴二苯醚诱导的肠上皮屏障损伤。Ren 等^[51]研究发现猴头菌多糖通过下调小鼠结肠中氧化应激的关键标志物一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA)、髓过氧化物酶 (MPO) 和炎性因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、环氧合酶-2 (COX-2), 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达, 阻断核因子- κ B (NF-

κ B)、NF- κ B 抑制剂 α (IkB- α)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和蛋白激酶 B (Akt) 的磷酸化, 起到抗炎和抗氧化应激的作用, 从而减轻溃疡结肠炎小鼠肠黏膜屏障损伤。绿原酸是一种天然多酚, 具有强大的抗氧化活性。Chen 等^[52]用敌草快刺激断奶仔猪, 导致空肠和回肠中肠绒毛高度降低, 碱性磷酸酶活性受到抑制, 采用绿原酸治疗提高了肠道绒毛高度和碱性磷酸酶活性, 抑制了模型动物肠道细胞的氧化应激和凋亡, 升高了 Occludin、Claudin-1、ZO-1 等紧密连接蛋白的表达, 表明绿原酸可以减轻氧化应激诱导的肠黏膜损伤, 增强肠屏障完整性。

3.3 中药活性物质调节肠道微生物

过量饮酒、高脂饮食、过量食用肉类食品等会使肠道菌群失调, 进而损伤肠屏障功能, 造成肠道通透性增加^[53]。中药活性物质可以通过调节肠道微生物稳态, 起到肠屏障保护作用。Zhang 等^[54]实验发现淫羊藿苷显著降低了溃疡性结肠炎模型鼠粪便中拟杆菌、螺杆菌等有害菌的比例和活性, 显著增加了有益菌群(乳酸杆菌、毛螺菌科、阿克曼氏菌)的比例和活性, 从而改善了结肠微生物屏障功能。抗菌药物介导的肠道微生物群紊乱模型中, 小鼠肠屏障功能受损。Bai 等^[55]研究发现, 人参皂苷 Rk3 能有效改善肠道微生物群生态失调, 调节厚壁菌/拟杆菌 (Firmicutes/Bacteroidetes, F/B) 的比例。改善肠道微生物群多样性, 增加 SCFA 乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐的水平。此外, 研究还发现人参皂苷 Rk3 增加了紧密连接蛋白 (ZO-1、Occludin 和 Claudin-1) 的表达, 抑制结肠炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的过度产生, 进而修复肠屏障功能障碍。Dai 等^[56]实验发现, 黄连的主要成分——小檗碱, 可以修复非酒精性脂肪肝病模型大鼠的肠屏障功能受损。小檗碱和吴茱萸碱联合给药丰富了肠道微生物群的丰度和多样性, 减少了梭杆菌、毛螺菌等有害菌数量。此外, 小檗碱还能抑制肠上皮细胞凋亡, 增加肠紧密连接蛋白表达量, 降低促炎因子的表达, 进而缓解非酒精性脂肪性肝病状态下的肠屏障损伤。越来越多的证据表明, 2 型糖尿病 (T2D) 与肠道屏障功能障碍有关。T2D 患者肠道微生物结构失衡, 降低了微生物多样性和丁酸盐的水平, 导致慢性低度炎症从而破坏肠屏障^[57]。穿心莲内酯通过增加拟杆菌与厚壁菌的比例, 增加肠黏膜有益菌嗜黏蛋白阿克曼氏菌的丰度, 调节 SCFA 的含量, 重塑机体内肠道微生物群组成。

此外, 穿心莲内酯能够增加糖尿病小鼠肠道中 Occludin 和 ZO-1 的表达, 进一步改善糖尿病小鼠肠屏障功能^[58]。

除此之外, 中药活性物质还能通过抑制肠道细胞凋亡, 保护肠道黏液层等作用起到保护肠黏膜屏障的作用。青蒿琥酯通过抑制细胞凋亡, 增加肠道杯状细胞分化, 修复肠道隐窝损坏, 显著保护了溃疡性结肠炎小鼠肠道屏障的完整性^[59]。Li 等^[60]研究表明柴胡皂苷 D 增加 DSS 模型鼠结肠中黏蛋白 Muc1 和 Muc2 的表达, 维持肠道黏液层的完整性。增加紧密连接蛋白 ZO-1 和 Claudin-1 的表达, 改善结肠黏膜水肿、炎性浸润和隐窝结构, 调节 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 等细胞因子表达, 抑制 NF- κ B 的激活, 并调节肠道微生物群, 增加肠菌丰富度, 进而恢复结肠炎小鼠肠屏障功能的完整性。肢体缺血-再灌注引起肠道屏障损伤, 广藿香挥发油通过增加肠黏液分泌量, 减少肠黏膜肥大细胞数目, 降低二胺氧化酶 (DAO) 活性, 提高肠道自身防御体系, 维持了正常的肠黏膜上皮结构, 修复肠道屏障损伤^[61]。

对上述中药活性物质对肠屏障的保护作用进行归纳总结, 详见表 1。

4 总结

本文总结讨论了肠屏障结构与功能以及中药活性物质对肠屏障损伤的修复作用与机制, 为肠黏膜屏障修复的机制研究, 新药研发及相关保健品开发提供了参考和科学依据。

肠屏障损伤是许多疾病的伴随症状和诱因, 如不及时治疗, 可能会加重原发疾病或引起严重的并发症。中药活性物质通过增加紧密连接蛋白, 抑制肠道炎症, 调节肠道菌群等途径, 在维护肠屏障完整性, 修复肠屏障功能方面发挥了显著疗效, 对炎症性肠病和代谢性疾病的疾病症状有很好的改善效果。因此, 从中药活性物质中识别和开发新的可以改善肠屏障完整性的化合物十分有意义。然而, 通过恢复肠屏障功能对疾病进行治疗和干预是一个新兴的话题, 我们对调节肠道通透性的机制的理解还有待进一步深入。此外, 现有的中药活性物质治疗肠屏障损伤的研究主要集中在细胞水平和动物实验, 临床应用研究较少。接下来, 需要在实验模型中对调节肠屏障功能的机制进行进一步探索, 以加强对免疫系统、炎症、肠道微生物菌群和肠屏障功能之间关系的理解。除此之外, 还需在人体组织样本中进行转化研究, 进一步明确肠屏障功能和疾病治疗的关系。

表 1 中药活性物质对肠屏障的保护作用

Tab 1 Protective effect of bioactive compounds of Chinese medicine on the intestinal barrier

药理作用	活性物质	模型	作用靶点	文献
直接调控紧密连接蛋白	槲皮素和杨梅素 乔松素	丙烯酰胺诱导的大鼠小肠上皮细胞 (IEC-6) 屏障功能障碍 LPS 诱导的 Caco-2 细胞单层模拟肠屏障损伤	ZO-1↑、Occludin↑、Claudin-1↑ ZO-1↑、Occludin↑、Claudin-1↑、JAM-A↑	[40] [41]
抗炎抗氧化	川陈皮素 大黄素	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 脓毒症引起肠屏障损伤	Claudin-7↑ IL-1β↓、IL-4↓、IL-17↓、IL-2↓、IL-3↓、IL-12p70↓、TNF-α↓、IFN-γ↓、SOD↑、GSH↑、Nrf2↑、HO-1↑	[42] [47-48]
	木犀草素	十溴二苯醚处理 Caco-2 细胞单层模拟肠屏障损伤	ROS↓、SOD↑、GSH↑、TNF-α↓、IL-6↓、IL-1β↓	[50]
	猴头菌多糖	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠	NO↓、MDA↓、MPO↓、IL-6↓、IL-1β↓、TNF-α↓、COX-2↓、iNOS↓、NF-κB↓、MAPK↓、Akt↓	[51]
	绿原酸	敌草快刺激断奶仔猪	MDA↓、GSH↑、Nrf2↑、HO-1↑	[52]
	木香内酯	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠	MPO↓、NO↓、iNOS↓、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓、IFN-γ↓、p-NF-κB↓、STAT1/3↓、Akt↓	[62]
	高良姜素	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠	TNF-α↓、IL-6↓、IL-10↑、MPO↓、p-NF-κB↓、COX-2↓、iNOS、Nrf2↑、HO-1↑	[63]
	白藜芦醇	环磷酰胺造成的免疫抑制小鼠肠屏障严重受损	TNF-α↓、IFN-γ↓、IL-4↓、TLR4↓、NF-κB↓	[64]
调节肠道微生物	淫羊藿苷 人参皂苷 Rk ₃ 小檗碱 穿心莲内酯	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 抗菌药物介导的肠道微生物群落紊乱模型 非酒精性脂肪性肝病模型大鼠 糖尿病小鼠	拟杆菌 ↓、螺杆菌 ↓、乳酸杆菌 ↑、毛螺菌科 ↑、阿克曼氏菌 ↑ SCFA↑、F/B↑ 梭杆菌 ↓、毛螺菌 ↓ 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 ↑、F/B↑、SCFA↑	[54] [55] [56] [58]
抑制凋亡	青蒿琥酯 橙皮素	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠	BAX↓、Bcl-2↑、半胱天冬酶 3↓ p-RIPK3↓、p-MLKL↓	[59] [65]
保护肠道黏液层	柴胡皂苷 D 牡荆素	DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠	Muc1↑、Muc2↑ Muc2↑	[60] [66]

参考文献

[1] Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312 (3): 171-193.

[2] Hao WD, Hao CY, Wu CG, et al. Aluminum induced intestinal dysfunction via mechanical, immune, chemical and biological barriers [J]. *Chemosphere*, 2022, 288 (Pt 2): 132556.

[3] Barmeyer C, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-related intestinal diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 42: 30-38.

[4] Iyer N, Corr SC. Gut microbial metabolite-mediated regulation of the intestinal barrier in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (12): 4259.

[5] Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (3): 141-153.

[6] Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair [J]. *Gastroenterology*, 2016, 15 (4): 616-632.

[7] Chaithanya C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50 (8): 1-9.

[8] Katherine RG, Simon PH. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124 (1): 3-20.

[9] Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: composition, synthesis and organization [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 124: 3-15.

[10] Niewiem M, Grzybowska CU. Intestinal barrier permeability in allergic diseases [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (9): 1893.

[11] Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? [J]. *Gut*, 2020, 69 (12): 2232-2243.

[12] 张萌萌, 姜宁, 张爱忠. 肠道微生物对肠道屏障功能完整性的维护机制研究概况 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47 (3): 933-940.

[13] Hu WJ, Kong XY, Wang H, et al. Ischemic stroke and intestinal flora: an insight into brain-gut axis [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27 (1): 73.

[14] Di TN, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal barrier in human health and disease [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18 (23): 12836.

[15] Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the intestinal

- microbiome and gut barrier to hepatic disorders [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159 (3): 849-863.
- [16] An J, Liu YQ, Wang YQ, et al. The role of intestinal mucosal barrier in autoimmune disease: a potential target [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 871713.
- [17] Gou HZ, Zhang YuL, Ren LF, et al. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 929346.
- [18] Su WF, Gong T, Jiang ZP, et al. The role of probiotics in alleviating postweaning diarrhea in piglets from the perspective of intestinal barriers [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 883107.
- [19] Schoultz I, Keita AV. Cellular and molecular therapeutic targets in inflammatory bowel disease-focusing on intestinal barrier function [J]. *Cells*, 2019, 8 (2): 193.
- [20] Thoo L, Noti M, Krebs P. Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (11): 849.
- [21] Tong LC, Wang Y, Wang ZB, et al. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 253.
- [22] Gao YN, Meng L, Liu HM, et al. The compromised intestinal barrier induced by mycotoxins [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12 (10): 619.
- [23] 吕宾. 肠黏膜屏障与肠功能障碍 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2013, 18 (4): 232-234.
- [24] 谢天宇, 胡红莲, 高民. 肠黏膜免疫屏障及其保护措施 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26 (5): 1157-1163.
- [25] Pietrzak B, Tomela K, Olejnik SA, et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (23): 9254.
- [26] Han HJ, Davidson LA, Fan YY, et al. Loss of aryl hydrocarbon receptor suppresses the response of colonic epithelial cells to IL22 signaling by upregulating SOCS3 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2022, 322: 93-106.
- [27] Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 403-429.
- [28] Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156 (6): 1099-1111.
- [29] Weber CR, Liang GH, Wang YT, et al. Claudin-2-dependent paracellular channels are dynamically gated [J]. *Elife*, 2015, 4: e09906.
- [30] Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, et al. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123 (16): 2844-2852.
- [31] Kuo WT, Zuo Li, Odenwald MA, et al. The tight junction protein ZO-1 is dispensable for barrier function but critical for effective mucosal repair [J]. *Gastroenterology*, 2021, 161 (6): 1924-1939.
- [32] Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, et al. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123 (1): 163-172.
- [33] Wang FJ, Schwarz BT, Graham WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131 (4): 1153-1163.
- [34] Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability [J]. *J Immunol*, 2007, 178 (7): 4641-4649.
- [35] Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295 (5): 1025-1034.
- [36] Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, et al. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 316.
- [37] Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity [J]. *PLoS One*, 2007, 2 (12): e1308.
- [38] Parada VD, De la Fuente MK, Landskron G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 277.
- [39] Wells JM, Rossi O, Meijerink M, et al. Epithelial cross-talk at the microbiota-mucosal interface [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (Suppl 1): 4607-4614.
- [40] Fan J, Zhang Q, Zhao XH, et al. The impact of heat treatment of quercetin and myricetin on their activities to alleviate the acrylamide-induced cytotoxicity and barrier loss in IEC-6 cells [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2022, undefined: undefined.
- [41] Yue B, Ren JY, Yu ZL, et al. Pinocembrin alleviates ulcerative colitis in mice via regulating gut microbiota, suppressing TLR₄/MD₂/NF- κ B pathway and promoting intestinal barrier [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40 (7): BSR20200986.
- [42] Wen X, Zhao H, Wang L, et al. Nobiletin attenuates DSS-induced intestinal barrier damage through the HNF4 α -claudin-7 signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (16): 4641-4649.
- [43] 常化松, 袁雯雯, 玄红专, 等. 黄酮类化合物吸收代谢及其对胃肠道功能影响的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40 (18): 340-347.
- [44] 陈晓, 周艳, 孙晓红. 多酚类化合物与肠黏膜机械屏障研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2020, 47 (23): 4317-4320.
- [45] 赵盼盼, 佟继铭, 田沂凡, 等. 蒽醌类化合物药理作用研究进展 [J]. *承德医学院学报*, 2016, 33 (2): 152-155.

- [46] 石凯歌, 段志军. 大黄素修复肠屏障的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (9): 130-133.
- [47] Zhang MN, Lian B, Zhang R, et al. Emodin ameliorates intestinal dysfunction by maintaining intestinal barrier integrity and modulating the microbiota in septic mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 5026103.
- [48] Shang LR, Liu YH, Li JX, et al. Emodin protects sepsis associated damage to the intestinal mucosal barrier through the VDR/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 724511.
- [49] Zhou Q, Xiang H, Liu H, et al. Emodin alleviates intestinal barrier dysfunction by inhibiting apoptosis and regulating the immune response in severe acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2021, 50 (8): 1202-1211.
- [50] Yuan JW, Che SY, Ruan Z, et al. Regulatory effects of flavonoids luteolin on BDE-209-induced intestinal epithelial barrier damage in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 150: 112098.
- [51] Ren YL, Geng Y, Du Y, et al. Polysaccharide of *Hericium erinaceus* attenuates colitis in C57BL/6 mice via regulation of oxidative stress, inflammation-related signaling pathways and modulating the composition of the gut microbiota [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 57: 67-76.
- [52] Chen JL, Chen DW, Yu B, et al. Chlorogenic acid attenuates oxidative stress-induced intestinal mucosa disruption in weaned pigs [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 806253.
- [53] Martel J, Chang SH, Ko YF, et al. Gut barrier disruption and chronic disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33 (4): 247-265.
- [54] Zhang HR, Zhuo SX, Song D, et al. Icariin inhibits intestinal inflammation of DSS-induced colitis mice through modulating intestinal flora abundance and modulating p-p65/p65 molecule [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2021, 32 (4): 382-392.
- [55] Bai X, Fu RZ, Duan ZG, et al. Ginsenoside Rk3 alleviates gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in antibiotic-treated mice [J]. *Food Res Int*, 2021, 146: 110465.
- [56] Dai YF, Zhu WY, Zhou JX, et al. The combination of berberine and evodiamine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease associated with modulation of gut microbiota in rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2022, 55: e12096.
- [57] Ibrahim KS, Bourwis N, Dolan S, et al. Characterisation of gut microbiota of obesity and type 2 diabetes in a rodent model [J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2021, 40 (1): 65-74.
- [58] Su HM, Mo JL, Ni JD, et al. Andrographolide exerts antihyperglycemic effect through strengthening intestinal barrier function and increasing microbial composition of *Akkermansia muciniphila* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6538930.
- [59] Yin SJ, Yang HF, Tao Y, et al. Artesunate ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by protecting intestinal barrier and inhibiting inflammatory response [J]. *Inflammation*, 2020, 43 (2): 765-776.
- [60] Li PZ, Wu MN, Xiong WC, et al. Saikosaponin-d ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing NF- κ B activation and modulating the gut microbiota in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106288.
- [61] 谢肆聪, 唐方. 广藿香挥发油对肠屏障功能的保护作用 [J]. *中草药*, 2009, 40 (6): 942-944.
- [62] Xie F, Zhang H, Zheng C, et al. Costunolide improved dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in mice through NF- κ B, STAT1/3, and Akt signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106567.
- [63] Sangaraju R, Nalban N, Alavala S, et al. Protective effect of galangin against dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in Balb/c mice [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68 (8): 691-704.
- [64] Song X, Liu L, Peng SW, et al. Resveratrol regulates intestinal barrier function in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102 (3): 1205-1215.
- [65] Zhang JX, Lei HB, Hu X, et al. Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK3/MLKL necroptosis signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992.
- [66] Zhang J, Liang FL, Chen ZW et al. Vitexin protects against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice and its potential mechanisms [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (38): 12041-12054.

(收稿日期: 2022-09-08; 修回日期: 2022-10-23)

皂苷类化合物抗肝癌作用机制的研究进展

张哲¹, 龙佳瑶², 陈晓勇², 饶利兵², 林玲³, 唐根云^{2*} (1. 广州医科大学研究生院, 广州 510000; 2. 湖南医药学院, 湖南 怀化 418000; 3. 三亚中心医院, 海南 三亚 572000)

摘要: 皂苷类化合物是一类苷元为三萜或甾烷类的糖苷类化合物, 具有广泛的抗肿瘤作用, 其具体机制包括抑制肝癌细胞增殖、促进细胞凋亡、促进细胞自噬、阻滞细胞周期、抑制肿瘤侵袭转移及肿瘤耐药性。本文通过检索近年来国内外最新研究成果, 首次系统阐述滇重楼、人参、柴胡、桔梗、地肤子传统植物药中主要天然皂苷类化合物的抗肝癌作用机制, 以期为肝癌的治疗与药物的研发提供参考。

关键词: 皂苷类化合物; 肝癌; 作用机制; 研究进展

中图分类号: R730, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)5-1307-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.030

Research progress on the mechanism of saponins against hepatocellular carcinoma

ZHANG Zhe¹, LONG Jia-yao², CHEN Xiao-yong², RAO Li-bing², LIN Ling³, TANG Gen-yun^{2*} (1. Graduate School of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000; 2. Hunan University of Medicine, Huaihua Hunan 418000; 3. Sanya Central Hospital, Sanya Hainan 572000)

Abstract: Saponins are a class of glycosides with triterpenoids or steranes, which have a wide range of anti-tumor effects. These saponins have been found several mechanisms of anti-hepatocellular carcinoma, such as inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, promoting apoptosis, facilitating autophagy, arresting cell cycle, repressing tumor invasion and metastasis and tumor drug resistance. Therefore, this paper reviewed the mechanism of anti-hepatocellular carcinoma of natural saponins in the traditional phytomedicine, including *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz, *Panax ginseng*, *Radix Bupleuri*, *Platycodon grandiflorum*, and *Kochiae Fructus*, by retrieving the latest research at domestic and overseas in recent years for the first time, in order to provide novel reference for the treatment and drug development of hepatocellular carcinoma.

Key words: saponin; hepatocellular carcinoma; mechanism; research progress

皂苷类化合物是一类苷元为三萜或甾烷类的糖苷类化合物, 主要分布于人参、柴胡、桔梗、甘草等高等植物中, 少量存在于海星、海参、珊瑚等海洋生物中。现代药理学研究表明, 皂苷类化合物具有显著的抗肿瘤作用^[1], 其在抗肝癌^[2]、胃癌^[3]、肺癌^[4]、白血病^[5]等恶性肿瘤药理机制的研究中取得了较大进展。原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 又称肝细胞癌, 占据所有肝癌类型的 70% ~ 90%, 其病死率在所有恶性肿瘤中居第四位^[6]。NCCN 指南指

出^[7], 临床上治疗中晚期 HCC 患者常采用姑息性手术、化疗、放疗及免疫治疗等方法。考虑到这些手段有着较明显的不良反应和并发症, 限制了其在 HCC 患者中的广泛应用, 所以寻找并开发新型有效、毒性较低、适应性更广的抗肝癌药物具有重要意义。我国传统植物药滇重楼、人参、柴胡、桔梗、地肤子中富含的天然皂苷毒副作用小且药理活性广泛, 能够通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、增加细胞自噬、阻滞细胞周期、抑制肿瘤侵袭转移及肿瘤耐药性等多途径发挥抗肝癌

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81703821)。

作者简介: 张哲, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理基础研究, email: zhangzhe292@126.com * **通信作者:** 唐根云, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药理研究, email: tanggenyun@foxmail.com

作用。因此,笔者归纳总结了近 20 年的国内外文献,首次系统综述滇重楼、人参、柴胡、桔梗、地肤子皂苷抗肝癌的药理作用机制,以期为先导化合物的发现与新药的开发提供新思路。

1 皂苷类化合物抗肝癌的作用机制

1.1 抑制肝癌细胞增殖

不受机体控制地无限增殖几乎是所有肿瘤细胞的一个共同特点^[8]。许多皂苷类化合物可以通过表观遗传学如 DNA 甲基化、转录后修饰调节基因的表达来抑制肝癌细胞的增殖。人参皂苷 Rh₂ 在体内外均可通过上调 miR-491, 促进表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 降解, 从而抑制细胞的增殖^[9]。DNA 甲基转移酶 (DNMT) 是 DNA 甲基化修饰的关键酶, 可使启动子 CpG 岛序列上的胞嘧啶发生甲基化来抑制基因的转录。Teng 等^[10] 采用高效液相色谱结合质谱法从人参中分离出 20 (R)-人参皂苷 Rg₃、20 (S)-人参皂苷 Rg₃, 经鉴定两者均可通过增加 DNMT3a、DNMT3b 的表达, 促进基因 P53 转录, 并甲基化血管内皮生长因子 (VEGF) 的启动子来抑制肝癌细胞增殖, 而体外实验表明后者效果较前者更优。此外, 人参皂苷 Rh₂ 可下调甲基转移酶 Zeste 同源物 2 的增强子 (EZH2) 的表达, 减少基因 CDKN2A-2B 启动子的甲基化修饰, 促进下游基因 p14、p15、p16 的转录, 从而抑制 HepG2 细胞的增殖^[11]。环氧合酶 -2 (COX-2) 是前列腺素生成的限速酶, 与肿瘤细胞的增殖成正相关^[12]。Ren 等^[13] 报道柴胡皂苷 d 可以通过激活信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) / 增强子结合蛋白 β (C/EBPβ) 信号通路降低肝癌细胞中 COX-2 的水平, 提示其在肝癌治疗中的潜在作用。

皂苷类化合物抑制肝癌细胞增殖主要源于对表观遗传学及转录后修饰的调节, 通过增加甲基转移酶 DNMT3a、DNMT3b、EZH2 及非编码 RNA miR-491 的表达, 驱动下游基因的转录与翻译。此外, 在抑制肝癌细胞增殖过程中, 翻译后修饰作为蛋白质成熟的关键环节, 亦可能是皂苷类化合物的候选作用靶点。

1.2 促进肝癌细胞凋亡

凋亡是指细胞自主发生程序性死亡的过程^[14]。皂苷类化合物促进肝癌细胞凋亡主要包括内源性途径^[15-17]、外源性途径^[18-19]、内源性与外源性双途径^[19-20]及内质网应激^[21-22]四种方式, 其通过直接或间接作用于下游凋亡相关基因来介导胱天蛋白酶 (Caspase) 的激活导致细胞死亡 (见图 1)。

1.2.1 内源性途径 细胞内染色体 DNA 发生损伤或断裂、线粒体动力学紊乱及活性氧 (ROS) 激增均可使肿瘤细胞经内源性途径发生凋亡^[14]。一般而言, 某种因素单独作用或多种因素相互叠加促使抗凋亡基因 *Bcl-2* 与促凋亡基因 *Bax* 的比例发生改变, 增加线粒体膜通透性, 释放大量的细胞色素 C, 从而激活凋亡执行蛋白 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7, 诱导细胞凋亡^[14]。人参皂苷作为经典的天然皂苷类化合物具有显著的促肝癌细胞凋亡作用。人参皂苷 Rk₁ 和人参皂苷 Rg₅ 在结构上互为同分异构体, 是从人参中新提取的一类小分子皂苷化合物, 可同时激活 MHCC-97H 细胞中丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路及核因子-κB (NF-κB) 信号通路致使细胞发生内源性途径凋亡^[23]。另外, 人参皂苷 Rh₂ 通过降低凋亡相关蛋白 *Bcl-2/Bax* 的比例激活 Caspase-3, 促进肝癌细胞凋亡^[15, 24]。桔梗皂苷 D 亦可通过增加 H22 细胞静脉注射的荷瘤裸鼠中促凋亡蛋白 *Bax*、切割型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 的水平来诱导其凋亡^[25-26]。

随着人们对肠道微生物菌群的重视, 目前肝肠轴的发生机制已成为肝癌治疗的研究热点之一。Compound K 是人参皂苷在肠道微生物代谢中提取出的一种具有明显抗肿瘤作用的化合物。研究发现^[27], Compound K 可呈时间依赖性与剂量依赖性地增加促凋亡蛋白 *Bid* 的表达, 激活线粒体途径促进 BEL7402、SMMC-7221 细胞凋亡。为了广泛开发 Compound K 的抗肿瘤疗效, Zhang 等^[17] 利用壳聚糖来源的归巢肽纳米胶束作为药物的运输载体, 在体外实验中, 相比于对照组, 当给药质量浓度超过 20 μg · mL⁻¹ 时, 含运输载体的 Compound K 可明显增加肝癌细胞的凋亡率。

百合科植物滇重楼中富含多种天然皂苷类成分, 其中以皂苷 I、II、VI、VII 研究最为广泛, 体外实验表明这四种化合物对肝癌细胞均有细胞毒作用^[16]。滇重楼皂苷 I、II 通过协同作用于线粒体依赖途径促进肝癌细胞凋亡^[28], 其中滇重楼皂苷 I 主要调控 *p53* 基因的表达, 增加线粒体膜通透性并释放细胞色素 C, 导致细胞内 ROS 的含量激增, 激活 Caspase-9、Caspase-3、PARP, 促 HepaRG 细胞凋亡^[16]。此外, 柴胡皂苷 d 能通过 Caspase-3 依赖性、非依赖性 & 线粒体途径三种方式共同诱导细胞凋亡, 在使用 Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 后仅能部分消除皂苷对肝癌细胞的促凋亡作用^[29]。

1.2.2 外源性途径 细胞凋亡外源性途径亦称死亡受体介导的细胞凋亡,是指细胞外多种信号分子特异性结合细胞膜表面的 Fas 受体,以此诱导 Fas 相关死亡结构域 (FADD) 复合体活化,切割 Caspase-8 前体蛋白,进一步激活 Caspase-3,最终导致细胞凋亡的过程^[30]。柴胡皂苷 d 通过抑制 NF- κ B 信号通路,增加 Fas 受体的表达,诱导 p53 基因阳性表达的 HepG2 细胞发生外源性凋亡^[31]。另一种天然皂苷类化合物滇重楼皂苷 I 可剂量依赖性地增加 p53 蛋白、Fas 受体蛋白的表达,促进肝癌细胞凋亡^[18]。而人参皂苷 Rk₁ 抗肝癌作用是以非 FADD 依赖的信号途径激活 Caspase-8、Caspase-3,其机制可能与端粒酶的活性受抑制有关^[32]。

1.2.3 内源性与外源性双重途径 天然皂苷类化合物多靶点、多通路的药理作用更有利于协同发挥抗肿瘤效应。滇重楼皂苷 VII 可经 MAPK 通路及 PTEN/p53 通路介导 HepG2 细胞发生内源性与外源性凋亡,在使用 PTEN、MAPK 通路抑制剂后细胞凋亡率显著降低^[19]。类似地,滇重楼皂苷 II 也可以同时激活内外双途径促进肝癌细胞凋亡^[33]。人参皂苷 Rh2 可使 SK-HEP-1 细胞内 Bcl-2/Bax 比例下调, Caspase-8、Caspase-9 表达水平增加,诱导细胞凋亡^[34]。此外,有研究发现地肤子皂苷 momordin Ic 可介导一种新型促肝癌细胞凋亡的机制, momordin Ic 通过激活抑制磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路与 MAPK 信号通路,增加下游转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 入核启动叉头框转录因子 4 (FoxO4)、COX-2 基因的转录,导致肝癌细胞凋亡,而这种机制可能并不直接依赖于 Caspase 家族成员,但可促进 RARP 蛋白的切割导致细胞凋亡^[35]。最新研究显示,桔梗皂苷 D 与核糖体失活蛋白能协同抑制 PI3K/Akt、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路,并磷酸化 MAPK 通路中的 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 蛋白,从而使肝癌细胞发生 Caspase-3 依赖性凋亡^[20]。

1.2.4 内质网应激 蛋白质的正确折叠与成熟依赖于内质网的动态调控,当细胞内外环境发生变化时会打破蛋白质的生成平衡,激活内质网信号通路,导致内质网应激的发生,促使细胞凋亡^[36]。转录因子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 既作为内质网应激中的关键蛋白,又参与调节细胞凋亡,在细胞死亡方式的调节中扮演着重要的角色^[36]。人参皂苷 Rg₃ 通过上调 CHOP 介导的死亡受体 5

(DR5) 的表达,促进肺癌细胞凋亡^[37]。近期一项研究显示,Compound K 可抑制 STAT3 的磷酸化,使其无法形成二聚体结构,削弱 STAT3 入核结合 DNA 的能力,导致 HepG2、SMMC-7221 细胞发生内质网应激和凋亡^[22]。然而, Luo 等^[21] 研究发现,重楼皂苷 I 以内源性途径促进细胞凋亡的同时,还通过 CHOP 非依赖途径激活核糖核酸内切酶肌醇需求酶 1 (IRE-1) 信号通路抑制 HepG2 细胞凋亡,显示了其促细胞凋亡的双向机制。

总之,天然皂苷类化合物可通过内源性途径、外源性途径、内源性与外源性双重途径及内质网应激等多种途径促进肝癌细胞凋亡(见图 1)。但皂苷类化合物药理机制复杂,具有多靶点、多途径作用的特点,例如,滇重楼皂苷 I 经内源性途径促进肝癌细胞凋亡同时,也能激活内质网应激抑制凋亡,这就给皂苷类化合物作用机制的研究带来了新的挑战。所以,笔者认为后期研究者可采用网络药理学结合实验验证的方法多维度揭示皂苷的分子调节网络。另外,在皂苷促凋亡的机制研究中大多局限在体外实验,应增加如裸鼠成瘤模型等体内实验进一步验证相关机制。

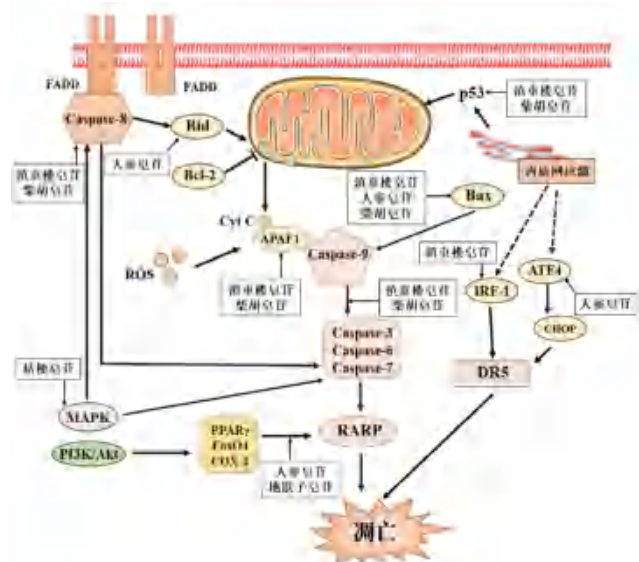


图 1 皂苷类化合物促进肝癌细胞凋亡机制图
Fig 1 Mechanisms of saponins promoting apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

1.3 促进肝癌细胞自噬

自噬是指细胞内衰老的细胞器和某些蛋白质等成分被光面内质网膜包裹,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体后将其降解,以实现细胞自我更新的过程^[38]。适度自噬可延缓细胞衰老,但过度自噬会导致细胞凋亡。越来越多的研究表明自噬是皂苷类化合物发挥抗肿瘤作用的新途径,其中哺

乳动物雷帕霉素受体 (mTOR) 途径是自噬上游负性调节的经典信号通路^[39]。滇重楼皂苷 I、VII 均可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进 HepG2 细胞自噬, 诱导细胞凋亡^[40-41], 而滇重楼皂苷 VII 还能通过激活 ADP 活化的蛋白激酶 (AMPK)、JNK 通路诱导 HepG2 肝癌细胞过度自噬来发挥抗肝癌作用^[41]。柴胡皂苷 d 作用于 SMMC-7721 和 MHCC97L 细胞后, 亦可抑制 mTOR 的磷酸化, 增加下游自噬相关蛋白 LC3- II Beclin-1 的表达, 促进细胞自噬^[42]。另一项研究发现, 柴胡皂苷 d 可增加肝癌细胞对放疗的敏感性, 其原因在于柴胡皂苷 d 可通过诱导自噬增加来提高肝癌细胞对放疗的敏感性, 但是, 在使用自噬抑制剂后, 仅能部分逆转柴胡皂苷 d 的放疗增敏作用, 表明可能存在其他机制参与自噬的调节^[43]。

上述研究表明, 皂苷类化合物可通过激活 AMPK、JNK 通路, 抑制 PI3K/Akt/mTOR 途径增强自噬, 进而促进肝癌细胞凋亡, 其中, 多数皂苷类化合物通过直接或间接抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路来发挥抗肝癌作用, 这可为其他天然分子提供有效的作用靶点。

1.4 阻滞肝癌细胞周期

细胞周期是指从上一次细胞分裂结束时开始到下一次细胞分裂结束时为止的时间过程^[44]。该过程需要周期蛋白激酶 (CDK) 与周期蛋白 (Cyclin) 的广泛参与, CDK 与 Cyclin 结合形成复合物后激活下游的特定基因, 维持周期的正常运转^[44]。阻滞肝癌细胞周期在任意时期均可显著抑制肝癌细胞的增殖。CDK2、CDK4/6 系参与细胞周期 S 期、G₁ 期的关键激酶, 可以精准调控细胞的增殖。人参皂苷 Rh₂ 可显著降低 CDK2、CDK4/6 的表达, 将 SK-HEP-1 细胞分别阻滞于 G₁/S 期、G₀/G₁ 期, 实验证实, 人参皂苷 Rh₂ 可直接结合热休克蛋白 90A (HSP90A), 后者减少与细胞分裂周期控制蛋白 37 (CDC37) 结合, 抑制 CDK 正确折叠和成熟^[45]。滇重楼皂苷 I 与 formosanin C 均是从滇重楼中提取的主要皂苷成分, 两者以 1:1 的比例混合体外处理肝癌细胞, 可协同减少 CDK2/CyclinE 复合物的形成, 使细胞停留在 G₁ 期^[28]。另有研究发现, 滇重楼皂苷 II 亦具有类似的抗肿瘤作用, 可将 HepaRG 细胞与 HL-7702 细胞阻滞于 S 期, 且呈剂量依赖性^[33]。细胞周期检查点专司细胞周期精确调控, 保证细胞能够进行正常的 DNA 复制与染色体的分离^[44]。柴胡皂苷 d 通过促进 p53 表达, 上调 p21/WAF1 的水平, 阻滞肝癌细胞于 G₁ 期^[31]。

此外, 在低氧条件下, 柴胡皂苷 d 可将 SMMC-7721 细胞的细胞周期同时阻滞于 G₀/G₁ 期与 G₂/M 期, 而恢复常氧后却失去了对细胞 G₂/M 期的阻滞作用, 这一特性能更好地遏制肿瘤细胞在缺氧条件下旺盛生长的速率^[46] (见表 1)。

表 1 皂苷类化合物抑制肝癌细胞周期
Tab 1 Cell cycle of saponins with anti-hepatocellular carcinoma

化合物	阻滞细胞周期	作用靶点
滇重楼皂苷 I	G ₁	CDK2
滇重楼皂苷 II	S	CyclinE
人参皂苷 Rh ₂	G ₀ /G ₁	CDK4/6
	G ₁ /S	CDK2
柴胡皂苷 d	G ₀ /G ₁	p53, p21/WAF1
	G ₂ /M	p53

人参皂苷 Rh₂、滇重楼皂苷 I、滇重楼皂苷 II 及柴胡皂苷 d 以阻滞细胞周期的方式来抑制肝癌细胞的生长。其主要药理机制不仅可以影响细胞周期相关调节蛋白 CDK2、CDK4/6、CyclinE 的表达, 还能在不同氧环境条件下适应性地调节细胞周期上游蛋白 p53 的水平, 抑制肝癌细胞周期。

1.5 抑制肝癌细胞侵袭和转移

肿瘤细胞的侵袭和转移是指肿瘤细胞经血管、淋巴管迁徙到机体的不同部位形成同类型的肿瘤^[47]。该过程通常需要上皮钙黏蛋白 (E-cadherin)、细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 -1 (VCAM-1)、基质金属蛋白酶 (MMP) 的参与^[48]。人参皂苷 Compound K 可促进 NF-κB 的核因子 p65 出核, 减少下游 MMP-2 与 MMP-9 的表达, 抑制 MHCC97-H 细胞的转移能力^[49]。人参皂苷 Rh₂ 抑制 HepG2 肝癌细胞迁移与 MMP-3 的高表达有关^[15]。近期研究发现, 地肤子皂苷 momordin Ic 一方面通过激活 PPARγ, 抑制 COX-2、MMP-9 蛋白的表达^[50]; 另一方面可以磷酸化 MAPK (ERK、p38、JNK) 信号通路, 抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达, 促进 E-cadherin 的表达, 协同减弱肝癌细胞的侵袭和转移能力^[51]。血管生成拟态 (VM) 与肿瘤的侵袭和转移密切相关, 主要是指具备类上皮细胞功能的肿瘤细胞形成微血管来供应自身生长必需的营养物质^[52]。滇重楼皂苷 I 通过抑制 PI3K/Akt/Twist/E-cadherin 通路降低 VM 的形成, 其抑制 VM 的两种主要机制: ① 抑制 Twist 启动子的转录激活; ② 干扰 Twist 的稳定性, 减少与下游 E-cadherin 的启动子结合^[53]。此外, 滇重楼皂苷 II 能抑制 Akt/NF-κB 通路, 进而降低 HepG2 与 BEL7402 细胞分泌 MMP-2、MMP-9, 从而削弱其侵袭转移能力^[54]。

上述研究提示,皂苷类化合物可以通过调节 PPAR γ 、MAPK、Akt/NF- κ B 信号通路及相关蛋白的表达,抑制肝癌细胞的侵袭和转移。虽然人参皂苷 Compound K 与滇重楼皂苷 II 在药理机制上均能抑制肝癌的转移能力,但两者介导 NF- κ B 途径的活化形式不同,笔者认为除了使用的细胞模型不同外,还可能不存在其他潜在机制。

1.6 降低肝癌细胞耐药性

对常规化疗药物的耐药是癌症治疗失败的重要原因之一。在化疗药物干预下,肝癌细胞可通过增强自噬降低化疗药对胞内细胞器的破坏,而抑制细胞自噬可明显降低肝癌细胞对化疗药物的耐药性^[55]。人参皂苷 Rg₃ 联合阿霉素治疗 HCC 移植瘤裸鼠,与对照组相比,能显著提高肝癌细胞对阿霉素的敏感性,因为人参皂苷 Rg₃ 作为新发现的自噬抑制剂,可减少肝癌细胞中自噬小体的形成^[56]。此外,人参皂苷 Rg₃ 经由 CHOP 上调

DR5 介导内质网应激途径来降低肝癌细胞的耐药性^[37]。丝切蛋白 -1 (cofilin-1) 是与肝癌细胞增殖、侵袭、迁移密切相关的蛋白^[57]。研究表明,桔梗皂苷 D 通过抑制 ERK1/2 介导的 cofilin-1 的磷酸化,逆转肝癌细胞对组蛋白去乙酰化酶抑制剂的耐药性^[58]。肿瘤耐药的体内逃逸机制是指脂溶性小分子化疗药物从内涵体 (endosome) 中逃逸的过程^[59]。Lei 等^[20] 发现桔梗皂苷 D 在不损伤细胞器膜的前提下促进内体逃逸,从而逆转 HepG2 细胞对化疗药的耐药性。

因此,皂苷类化合物可通过抑制细胞自噬、促进内质网应激及激活 ERK1/2 通路增加肝癌细胞化疗药物的敏感性。同时,皂苷类化合物联合化疗药治疗的效果要大于单药治疗,显著逆转肝癌细胞的耐药性。另外,天然皂苷类化合物通过增加内体逃逸可能是未来研究肿瘤耐药的新方向 (见表 2)。

表 2 皂苷类化合物抗肝癌的作用机制

Tab 2 Mechanism of saponins against hepatocellular carcinoma

种类	名称	模型	给药剂量	作用机制	分子靶点 / 信号通路	文献
滇重楼	滇重楼皂苷 I	HepG2 细胞	1/2/4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡	Fas	[18]
			2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制凋亡	IRE-1, Caspase-12	[21]
		HepaRG 细胞	1.25/2.5/5/7.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		P53	[16]
		HepG2 细胞	0.5/1/2/4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进自噬	PI3K/Akt/mTOR	[40]
		SMMC-7721 细胞, PLC 细胞, HepG2 细胞, Hep3B 细胞, BEL7402 细胞	0.1/0.3/1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制侵袭和转移	PI3K/Akt/Twist/E-cadherin	[53]
	滇重楼皂苷 I、II (1:1 混合)	HepG2 细胞, BEL7402 细胞	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡, 阻滞细胞周期	RARP, Caspase-9, Caspase-3, CDK2/CyclinE	[28]
			滇重楼皂苷 II	HepaRG 细胞 HepG2 细胞, BEL7402 细胞	1.25/2.5/5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	阻滞细胞周期
			3/6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		抑制侵袭和转移	Akt/ NF- κ B, MMP-2, MMP-9
	滇重楼皂苷 VII	HepG2 细胞	0.88/1.32/1.98 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡	MAPK, PTEN/p53	[19]
				促进自噬	PI3K/Akt/mTOR	[41]
人参	Compound K	MHCC97-H 细胞	25/50/75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制侵袭和转移	NF- κ B	[49]
		BEL7402 细胞, SMMC-7721 细胞	2.5/5.0/7.5/10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡	Bid	[27]
		HepG2 细胞, SMMC-7221 细胞	20/40/60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		STAT3	[22]
	Rh ₂	SMMC-7721 细胞, HepG2 细胞	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制增殖	miR-491	[9]
			HepG2 细胞, Hep3B 细胞	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		EZH2, CDKN2A-2B
		SK-HEP-1 细胞, HepG2 细胞	7.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡, 抑制侵袭和转移	Bcl2, Bax, GSK-3 β / β -catenin	[15, 24]
		SK-HEP-1 细胞	12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡	Bax, Bad, Caspase-8	[34]
		SK-HEP-1 细胞	2/6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	阻滞周期	CDK2、CDK4/6	[45]
	Rg ₃	HepG2 细胞	7.81/15.63/31.25/62.5/125/250/500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	抑制增殖	DNMT3a, DNMT3b	[10]
			HepG2 细胞, SK-Hep1 细胞, Huh-7 细胞, Hep3B 细胞	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	促进凋亡, 降低耐药	CHOP, DR5
SK-Hep1 细胞		25/50/100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	降低耐药	LC3I, LC3II, p62	[56]	

续表 2

种类	名称	模型	给药剂量	作用机制	分子靶点 / 信号通路	文献
	Rk ₁	HepG2 细胞	50/75/100 μmol · L ⁻¹	促进凋亡	Caspase-8	[32]
	Rg ₃	MHCC-97H 细胞	7.5 μg · mL ⁻¹		MAPK, NF-κB	[23]
柴胡	柴胡皂苷 d	SMMC-7721 细胞, MHCC97L 细胞	3 μg · mL ⁻¹	抑制增殖, 促进自噬	STAT3/C/EBPβ, LC3I, LC3II	[43]
		HSC-T6 细胞, LX-2 细胞	0.5/1 μmol · L ⁻¹	促进凋亡	Caspase-9, Caspase-3	[29]
		HepG2 细胞, Hep3B 细胞	5/10 μmol · L ⁻¹	促进凋亡, 阻滞细胞周期	p53, Fas, NF-κB	[31]
		SMMC-7721 细胞, MHCC97L 细胞	3 μg · mL ⁻¹	促进自噬	p-mTOR	[42]
		SMMC-7721 细胞	3 μg · mL ⁻¹	阻滞细胞周期	G ₀ /G ₁ , G ₂ /M	[46]
桔梗	桔梗皂苷 D	HepG2 细胞	24/36/48 mmol · L ⁻¹	促进凋亡	PI3K/Akt	[25]
		H22 细胞荷瘤小鼠	12.5/25/50 mg · kg ⁻¹		Bax, PARP	[26]
		HepG2 细胞, SMMC-7721 细胞	10 μmol · L ⁻¹	促进凋亡, 降低耐药	PI3K/Akt, ERK1/2, MAPK	[20]
		HA22T 细胞, HDACi-R 细胞	5/10 μmol · L ⁻¹	降低耐药	ERK1/2, cofilin-1	[58]
地肤子	momordin Ic	HepG2 细胞	5/10/15 μmol · L ⁻¹	促进凋亡	PI3K/Akt, MAPK, PPARγ	[35]
			10 μmol · L ⁻¹ , 5/10 μmol · L ⁻¹	抑制侵袭和转移	PPARγ, COX2, MMP-9, ICAM-1, VCAM-1, p38, JNK	[50] [51]

2 总结

天然皂苷类化合物是从滇重楼、人参、柴胡、桔梗及地肤子等传统植物药中提取出来且具有广泛抑制肝癌药理活性的糖苷类化合物, 其具体机制包括抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡、促进细胞自噬、阻滞细胞周期、抑制肿瘤侵袭转移及肿瘤耐药等。这些皂苷类化合物通过多靶点、多途径协同发挥治疗肝癌的作用, 成为国内外研究者寻找的疗效更佳、毒性更低的候选先导化合物。然而, 由于目前大部分皂苷类化合物的体内研究较少, 无法得到更高循证等级的研究结论。目前, 有少数皂苷类化合物如人参皂苷 Rg₃ 已经开始应用于 II 期临床试验^[8, 60], 该研究主要入选对象包括 HCC I 期或 II 期以及进展期的受试者, 这一突破为这类患者带来了福音。此外, 人参皂苷作为一种研究较早且应用广泛的天然皂苷, 不仅在治疗肝癌方面起作用, 还可以显著提高患者的免疫力, 而这一特点亦为肿瘤的免疫治疗提供了新思路^[47]。因此, 研究者们下一步可充分挖掘各种皂苷类化合物的潜在药理机制, 并结合现代分子生物学技术如三代测序、代谢组学、纳米传递系统等新兴技术, 为先导化合物的合成与新药的研发提供可靠的基础理论。

参考文献

- [1] Li XJY, Li XY, Huang NN, et al. A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 73-87.
- [2] Li KX, Xiao KM, Zhu SJ, et al. Chinese herbal medicine for primary liver cancer therapy: perspectives and challenges [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 889799.
- [3] Wang Z, Xu JW, Wang YH, et al. Total saponins from *Tupistra chinensis baker* inhibits growth of human gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114323.
- [4] Xu F, Cui WQ, Wei Y, et al. Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37 (1): 207.
- [5] Sun KJ, Du YY, Hou YZ, et al. Saikosaponin D exhibits anti-leukemic activity by targeting FTO/m (6) A signaling [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (12): 5831-5846.
- [6] Shi JF, Cao MM, Wang YT, et al. Is it possible to halve the incidence of liver cancer in China by 2050? [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148 (5): 1051-1065.
- [7] Benson AB, D'Angelica MI, Abbott DE, et al. Hepatobiliary cancers, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in Oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021, 19 (5): 541-565.
- [8] Man SL, Luo C, Yan MY, et al. Treatment for liver cancer: from sorafenib to natural products [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 224: 113690.
- [9] Chen WW, Qiu YR. Ginsenoside Rh₂ targets EGFR by up-regulation of miR-491 to enhance anti-tumor activity in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72 (2): 325-331.
- [10] Teng SY, Wang Y, Li PY, et al. Effects of R type and S type ginsenoside Rg₃ on DNA methylation in human hepatocarcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15 (4): 2029-2038.
- [11] Li Q, Li B, Dong CY, et al. 20 (S)-Ginsenoside Rh₂

- suppresses proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by targeting EZH2 to regulate CDKN2A-2B gene cluster transcription [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815: 173-180.
- [12] Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: a review [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (5): 5683-5699.
- [13] Ren MD, McGowan E, Li YR, et al. Saikosaponin-d suppresses COX2 through p-STAT3/C/EBP β signaling pathway in liver cancer: a novel mechanism of action [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 623.
- [14] Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15 (12): 738-752.
- [15] Shi QQ, Shi XP, Zuo G, et al. Anticancer effect of 20 (S)-ginsenoside Rh₂ on HepG2 liver carcinoma cells: activating GSK-3 β and degrading β -catenin [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36 (4): 2059-2070.
- [16] Wang WP, Liu Y, Sun MY, et al. Hepatocellular toxicity of paris saponins I, II, VI and VII on two kinds of hepatocytes-HL-7702 and HepaRG cells, and the underlying mechanisms [J]. *Cells*, 2019, 8 (7): 690.
- [17] Zhang JM, Jiang YY, Li YP, et al. Micelles modified with a chitosan-derived homing peptide for targeted intracellular delivery of ginsenoside compound K to liver cancer cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115576.
- [18] Zeng YW, Zhang ZQ, Wang WP, et al. Underlying mechanisms of apoptosis in HepG2 cells induced by polyphyllin I through Fas death and mitochondrial pathways [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2020, 30 (6): 397-406.
- [19] Zhang C, Jia XJ, Bao JL, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK pathways [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 58.
- [20] Lei J, Zhao J, Long MYC, et al. In addition to its endosomal escape effect, platycodin D also synergizes with ribosomal inactivation protein to induce apoptosis in hepatoma cells through AKT and MAPK signaling pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 364: 110058.
- [21] Luo QH, Yang DD, Qi Q, et al. Role of the death receptor and endoplasmic reticulum stress signaling pathways in polyphyllin I-regulated apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5241941.
- [22] Zhang X, Zhang SL, Sun QT, et al. Compound K induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cancer cells by regulating STAT3 [J]. *Molecules*, 2018, 23 (6): 1482.
- [23] Chen C, Lv Q, Li Y, et al. The anti-tumor effect and underlying apoptotic mechanism of ginsenoside Rk₁ and Rg₅ in human liver cancer cells [J]. *Molecules*, 2021, 26 (13): 3926.
- [24] Park JA, Lee KY, Oh YJ, et al. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh₂-induced apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 1997, 121 (1): 73-81.
- [25] Li T, Xu WS, Wu GS, et al. Platycodin D induces apoptosis, and inhibits adhesion, migration and invasion in HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15 (4): 1745-1749.
- [26] Li W, Tian YH, Liu Y, et al. Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41 (3): 417-428.
- [27] Song G, Guo SG, Wang WW, et al. Intestinal metabolite compound K of ginseng saponin potently attenuates metastatic growth of hepatocellular carcinoma by augmenting apoptosis via a bid-mediated mitochondrial pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (24): 12753-12760.
- [28] Liu J, Man SL, Liu Z, et al. A synergistic antitumor effect of polyphyllin I and formosanin C on hepatocarcinoma cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26 (20): 4970-4975.
- [29] Chen MF, Huang SJ, Huang CC, et al. Saikosaponin d induces cell death through caspase-3-dependent, caspase-3-independent and mitochondrial pathways in mammalian hepatic stellate cells [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 532.
- [30] Meynier S, Rieux-Laucat F. FAS and RAS related apoptosis defects: from autoimmunity to leukemia [J]. *Immunol Rev*, 2019, 287 (1): 50-61.
- [31] Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, et al. Involvement of p53, nuclear factor kappaB and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2004, 213 (2): 213-221.
- [32] Kim YJ, Kwon HC, Ko H, et al. Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk₁ in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31 (5): 826-830.
- [33] Wang WP, Dong XX, You LT, et al. Apoptosis in HepaRG and HL-7702 cells induced by polyphyllin II through caspases activation and cell-cycle arrest [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (5): 7078-7089.
- [34] Guo XX, Guo Q, Li Y, et al. Ginsenoside Rh₂ induces human hepatoma cell apoptosis via bax/bak triggered cytochrome C release and caspase-9/caspase-8 activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (12): 15523-15535.
- [35] Wang J, Yuan L, Xiao HF, et al. A novel mechanism for momordin Ic-induced HepG2 apoptosis: involvement of PI3K-and MAPK-dependent PPAR γ activation [J]. *Food Funct*, 2014, 5 (5): 859-868.
- [36] Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21 (2): 71-88.

- [37] Lee JY, Jung KH, Morgan MJ, et al. Sensitization of TRAIL-induced cell death by 20 (S)-ginsenoside Rg₃ via CHOP-mediated DR5 upregulation in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (3): 274-285.
- [38] Chao XJ, Qian H, Wang SG, et al. Autophagy and liver cancer [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26 (4): 606-617.
- [39] Han B, He CW. Targeting autophagy using saponins as a therapeutic and preventive strategy against human diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105428.
- [40] Shi YM, Yang L, Geng YD, et al. Polyphyllin I induced-apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22 (13): 1139-1149.
- [41] Zhang C, Jia XJ, Wang K, et al. Polyphyllin VII induces an autophagic cell death by activation of the JNK pathway and inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway in HepG2 cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (1): e0147405.
- [42] Wang BF, Min WL, Lin S, et al. Saikosaponin-d increases radiation-induced apoptosis of hepatoma cells by promoting autophagy via inhibiting mTOR phosphorylation [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18 (6): 1465-1473.
- [43] Tian YD, Lin S, Yang PT, et al. Saikosaponin-d increases the radiosensitivity of hepatoma cells by adjusting cell autophagy [J]. *J Cancer*, 2019, 10 (20): 4947-4953.
- [44] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17 (7): 395-417.
- [45] Chen C, Wang YS, Zhang ET, et al. (20S) ginsenoside Rh₂ exerts its anti-tumor effect by disrupting the HS-P90A-Cdc37 system in human liver cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 13170.
- [46] Wang BF, Dai ZJ, Wang XJ, et al. Saikosaponin-d increases the radiosensitivity of smmc-7721 hepatocellular carcinoma cells by adjusting the G0/G1 and G2/M checkpoints of the cell cycle [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 263.
- [47] Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19 (3): 151-172.
- [48] Liu CP, Hsieh CH, Wu BN, et al. Inhaled KMUP-1 prevents allergic pulmonary vascular inflammation and remodeling via NO and suppressed MMP-9 and ICAM-1/VCAM-1 [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012, 11 (4): 251-261.
- [49] Ming YL, Chen ZY, Chen LH, et al. Ginsenoside compound K attenuates metastatic growth of hepatocellular carcinoma, which is associated with the translocation of nuclear factor- κ B p65 and reduction of matrix metalloproteinase-2/9 [J]. *Planta Med*, 2011, 77 (5): 428-433.
- [50] Wang J, Han Y, Wang M, et al. Natural triterpenoid saponin Momordin Ic suppresses HepG2 cell invasion via COX-2 inhibition and PPAR γ activation [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 65: 104784.
- [51] Wang J, Liu Q, Xiao HF, et al. Suppressive effects of Momordin Ic on HepG2 cell migration and invasion by regulating MMP-9 and adhesion molecules: involvement of p38 and JNK pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 56: 75-83.
- [52] Zheng N, Zhang SQ, Wu WD, et al. Regulatory mechanisms and therapeutic targeting of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105507.
- [53] Xiao T, Zhong WL, Zhao JM, et al. Polyphyllin I suppresses the formation of vasculogenic mimicry via Twist1/VE-cadherin pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (9): 906.
- [54] Pang DJ, Yang CC, Li C, et al. Polyphyllin II inhibits liver cancer cell proliferation, migration and invasion through downregulated cofilin activity and the AKT/NF- κ B pathway [J]. *Biol Open*, 2020, 9 (2): bio046854.
- [55] Zamame Ramirez JA, Romagnoli GG, Kaneno R. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy [J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118745.
- [56] Kim DG, Jung KH, Lee DG, et al. 20 (S)-ginsenoside Rg₃ is a novel inhibitor of autophagy and sensitizes hepatocellular carcinoma to doxorubicin [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (12): 4438-4451.
- [57] Guo W, Guo T, Zhou QH, et al. Cofilin-1 promotes fibrocyte differentiation and contributes to pulmonary fibrosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 565: 43-49.
- [58] Hsu WC, Ramesh S, Shibu MA, et al. Platycodin D reverses histone deacetylase inhibitor resistance in hepatocellular carcinoma cells by repressing ERK1/2-mediated cofilin-1 phosphorylation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153442.
- [59] Xu CC, Haque F, Jasinski DL, et al. Favorable biodistribution, specific targeting and conditional endosomal escape of RNA nanoparticles in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 57-70.
- [60] Lu MX, Fei ZH, Zhang GL. Synergistic anticancer activity of 20 (S)-ginsenoside Rg₃ and sorafenib in hepatocellular carcinoma by modulating PTEN/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1282-1288.

(收稿日期: 2022-10-19; 修回日期: 2022-12-09)

川西獐牙菜药物代谢动力学和质量控制研究进展

杜茜, 张珍源, 陈西敬*, 赵娣* (中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 211199)

摘要: 川西獐牙菜是龙胆科植物干燥全草, 在藏医体系中自古以来用于治疗肝胆疾病。本文查阅近年来川西獐牙菜相关文章, 重点围绕川西獐牙菜提取物及所含单体的药物代谢动力学过程, 分别从吸收、分布、代谢和排泄等体内处置环节进行描述, 同时对其质量控制方面进行综述, 分析药物开发可能的挑战和困难, 为进一步利用或开发川西獐牙菜提供参考。

关键词: 川西獐牙菜; 药理学; 药物代谢动力学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1315-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.031

Research progress in pharmacokinetics and quality control of *Swertia musсотii*

DU Xi, ZHANG Zhen-yuan, CHEN Xi-jing*, ZHAO Di* (Clinical Pharmacokinetics Laboratory, China Pharmaceutical University, Nanjing 211199)

Abstract: *Swertia musсотii* is a dried whole herb of the gentian family, which has been used in the Tibetan medicine system since ancient times to treat liver and gallbladder diseases. This article reviewed literatures related to *Swertia musсотii* in recent years, focusing on the pharmacokinetic processes of *Swertia musсотii* extract and the monomers contained therein, describing them from the in vivo disposal links such as absorption, distribution, metabolism and excretion. The quality control, possible challenges and difficulties of drug development were also analyzed, providing reference for further development of *Swertia musсотii*.

Key words: *Swertia musсотii*; pharmacology; pharmacokinetics

川西獐牙菜又称藏茵陈, 是龙胆科獐牙菜属干燥全草, 为一年生矮小草本植物^[1]。川西獐牙菜始最早收录在《四部医书》, 被称为藏药中的奇葩, 是清热利胆的良药^[2], 常用于治疗肝胆疾病如慢性肝炎、肝硬化、胆囊疾病等^[3]。近年来发现川西獐牙菜有抗肿瘤^[4]、抗微生物^[5]、抗突变^[6]等作用。川西獐牙菜中主要化合物分为三类: 一是环烯醚萜类, 如獐芽菜苷、獐芽菜苦苷和龙胆苦苷等; 二是三萜类化合物, 如齐墩果酸等; 三是咕吨酮类, 如芒果苷、当药醇苷等^[7-10]。化合物的结构式见图 1。以往报道对该药的药理作用和化学成分综述较多, 本文主要从川西獐牙菜的药物代谢动力学和质量控制方面进行综述, 分析药物开发可能的挑战和困难, 为进一步利用或开发川西獐牙菜提供参考。



图 1 川西獐牙菜主要成分化学结构式

Fig 1 Structural formula of the main ingredients of *Swertia musсотii*

1 川西獐牙菜的药物代谢动力学研究

中药是化合物组成的复杂体系, 具有多成分、多环节、多靶点的特征, 尤其是各种成分之间由于结构相近可能存在相互转化、相互影响, 使得中药进入体内后的吸收、分布、代谢以及排泄等一系列

作者简介: 杜茜, 女, 硕士研究生, 主要从事药代动力学研究, email: d504138068@163.com *通信作者: 陈西敬, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学研究, email: 83271286@163.com; 赵娣, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学研究, email: zh_d99@cpu.edu.cn

过程的作用机制变得极为复杂。目前川西獐牙菜提取物的药物代谢动力学研究报道非常少。Ye 等^[11]通过 UPLC-MS/MS 的方法对獐牙菜提取物在大鼠体内的药物代谢动力学行为进行了研究, 结果如表 1 所示, 目标分析物分别为环烯醚萜类成分中的龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苦苷, 3 种成分都是在 1.09 ~ 2.67 h 达峰, 半衰期在 3.03 ~ 6.35 h, 从药物浓度 - 时间曲线峰面积来看呈现出非线性吸收的

特点。Suryawanshi 等^[12]发现, 家兔耳缘静脉注射獐牙菜的提取物 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 芒果苷的半衰期为 0.73 ~ 1.05 h, 与单体芒果苷相比无显著差异。川西獐牙菜提取物所含的主要单体比如龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苦苷、芒果苷的药物代谢动力学研究相对较多^[13-15], 故接下来分别从吸收、分布、代谢和排泄的角度对上述 4 种主要成分进行药物代谢动力学描述。

表 1 川西獐芽菜提取物以及主要单体的药代动力学参数
Tab 1 Pharmacokinetic parameters of Swertia mussotii extract and main monomer

文献	研究对象	给药剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	吸收				分布		消除	
			C_{max} / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	t_{max} /h	F/%	$AUC_{0 \sim t}$ / ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$AUC_{0 \sim \infty}$ / ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	V/ ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$t_{1/2}$ / h	Cl/ [$\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$]
[11]	大鼠	500 (ig) 獐芽菜苦苷	46.67±28.74	2.67±0.82	/	0.21±0.13	/	/	5.10±1.40	/
		獐牙菜 獐芽菜苦苷	27.92±9.53	1.83±0.75	/	0.17±0.05	/	/	3.14±0.89	/
		提取物 龙胆苦苷	6692.17±2681.27	1.09±0.31	/	16.74±7.26	/	/	3.24±1.00	/
	1000 (ig)	獐芽菜苦苷	44.98±10.34	2.17±1.04	/	0.36±0.09	/	/	5.06±1.04	/
		獐牙菜 獐芽菜苦苷	30.13±2.86	1.70±0.80	/	0.26±0.03	/	/	3.03±1.43	/
		提取物 龙胆苦苷	8256.90±3322.46	1.50±0.84	/	41.37±12.68	/	/	3.47±1.04	/
	2000 (ig)	獐芽菜苦苷	86.79±35.38	2.50±1.29	/	0.92±0.36	/	/	6.35±1.43	/
		獐牙菜 獐芽菜苦苷	69.35±21.13	1.67±0.72	/	0.64±0.25	/	/	3.36±1.06	/
		提取物 龙胆苦苷	9926.33±5121.24	1.63±0.48	/	81.43±40.12	/	/	3.78±1.77	/
[12]	家兔	1 (ig) 獐牙菜提取物	401.38±31.02	/	/	/	0.18±0.01	0.15±0.06	1.05±0.16	0.14±0.01
		0.025 (ig) 芒果苷	338.32±26.93	/	/	/	0.20±0.01	0.08±0.01	0.73±0.03	0.12±0.01
[18]	小鼠	150 (ig) 龙胆苦苷	33 100 000.00	0.50	39.6	60 000.00	/	0.62	/	0.91
		50 (iv) 龙胆苦苷	/	/	/	50 500.00	/	0.34	/	0.78
[19]	大鼠	150 (ig) 龙胆苦苷	5782.00±2240.00	0.75±0.62	4.71	32.67±12.9	/	22.35±13.10	/	4.88±2.89
		30 (iv) 龙胆苦苷	/	/	/	138.60±48.20	/	0.10±0.08	/	0.25±0.08
[21]	大鼠	50 (ig) 獐芽菜苦苷	3020.67±90.66	1.00	8	0.006±0.0002	0.007±0.0002	2975.66±496.24	1.02±0.19	602.52±261.75
		100 (ig) 獐芽菜苦苷	4105.51±216.38	1.00	6.7	0.010±0.001	0.011±0.002	4193.57±339.21	1.16±0.29	647.54±199.27
		150 (ig) 獐芽菜苦苷	5526.42±376.51	1.00	6.2	0.013±0.001	0.015±0.001	6189.64±402.58	1.21±0.46	752.18±237.61
		2 (iv) 獐芽菜苦苷	3270.95±341.91	0.25	/	0.003±0.0003	0.003±0.0003	661.62±102.57	/	612.86±64.74
[22]	大鼠	25 (ig) 獐芽菜苦苷	2312.02±1102.03	0.95±0.14	10.3	/	4.97±2.15	9.44±4.19	1.01±0.25	6.14±1.86
		4 (iv) 獐芽菜苦苷	/	/	/	/	7.68±3.01	8.39±3.82	1.10±0.23	5.73±2.11
[24]	大鼠	25 (ig) 芒果苷	301.30±133.00	2.50±0.80	1.2	1.86±0.89	2.04±0.94	/	3.20±0.60	(13.95±4.64) F
		10 (iv) 芒果苷	67 798.30±31 235.90	0.08	/	61.18±22.47	62.07±23.01	/	0.90±0.40	0.15±0.04
[25]	大鼠	25 (ig) 芒果苷	180.90	3.00	/	1.04	1.52	/	4.49	/
		芒果苷磷脂复合物: 含芒果苷 25 (ig)	377.66	3.00	/	2.36	4.30	/	9.31	/
[27]	大鼠	17.5 (ig) 芒果苷	119.00	1.00	/	0.43	0.46	/	2.34	/
		35 (ig) 芒果苷	149.00	1.00	/	0.63	0.67	/	3.41	/
		70 (ig) 芒果苷	190.00	0.25	/	0.75	0.98	/	5.1	/
[26]	大鼠	3.0 (iv) 芒果苷	1152.34±116.21	/	/	/	2.03±0.26	2.35±0.45	1.08±0.09	1.50±0.18

1.1 吸收

龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、獐芽菜苦苷作为川西獐牙菜药效物质基础的一部分^[16-17], 均属于环烯醚萜类成分, 存在吸收较快, 生物利用度相对低的情况。龙胆苦苷是川西獐牙菜中含量最多的化合物^[14]。Wang 等^[18-19]先后研究了小鼠和大鼠体内龙胆苦苷的吸收特征。小鼠分为两组, 一组灌胃 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 龙胆苦苷, 另一组静脉注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 龙胆苦苷, 龙胆苦苷符合开放性二房室

模型, 生物利用度约为 39.6%; 大鼠分别静脉注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或灌胃 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 龙胆苦苷, 结果表明龙胆苦苷生物利用度仅为 4.71%, 推测两者差异可能是由于种属不同, 肠道壁或肝脏的首过代谢, 细菌菌群在肠道中的代谢不同导致的^[20]。Shi 等^[21]将 24 只大鼠分为了 4 组, 分别尾静脉注射 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 灌胃 50、100 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的獐芽菜苦苷, 结果表明獐芽菜苦苷的生物利用度较低 ($\leq 8.0\%$), 且达峰时间 (t_{max}) 在 1 h 左

右,说明獐芽菜苦苷在体内吸收较快。Li 等^[22]将大鼠分为两组,一组尾静脉注射 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的獐芽菜苦苷,另一组灌胃 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的獐芽菜苦苷,采用 DAS 软件计算其绝对生物利用度,结果其生物利用度较低,仅为 10.3%,推测可能是獐芽菜苦苷肠道渗透性较差或者肝脏的首过效应造成的。Luo 等^[23]使用 HPLC-UV 测定静脉注射 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以及灌胃 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 獐芽菜苦苷的大鼠血浆、粪便和胆汁样品,结果表明其生物利用度约为 0.31%,而粪便和胆汁的排泄率分别为 $(43.38 \pm 3.2) \%$ 和 $(31.2 \pm 7.2) \%$,说明獐芽菜苦苷大部分会随着粪便被排出体外,这也可能是其生物利用度低的原因之一。

而咕吨酮类成分芒果苷在大鼠体内的绝对生物利用度较低,只有 0.31% ~ 1.2%,且研究发现其存在非线性吸收的现象。Han 等^[24]将大鼠分为两组,一组灌胃 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的芒果苷,另外一组尾静脉注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芒果苷,使用 DAS 计算得出其生物利用度约为 1.2%。这可能与芒果苷极性较大,渗透性较差有关。Ma 等^[25]通过磷脂络合技术,采用大鼠原位肠灌注模型研究络合物的肠吸收,发现大鼠分别灌胃芒果苷和络合物后,络合物的生物利用度约为单体的 2.3 倍,这也说明肠通透性能影响芒果苷的吸收。Qiu 等^[26]对静脉注射 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芒果苷的大鼠进行药物代谢动力学研究,发现半衰期较短,为 1 h 左右。Liu 等^[27]开展了芒果苷在大鼠体内的多剂量研究,灌胃给予不同剂量 (17.5 、 35 、 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的芒果苷后计算其药物代谢动力学参数,发现芒果苷在体内能够快速吸收,达峰时间在 $0.25 \sim 1 \text{ h}$,同时达峰浓度 C_{max} 和曲线下面积 (AUC) 会随着芒果苷剂量的增高而增大,但并未成比例增加,这也暗示了其在体内可能以非线性的方式进行吸收。Cai 等^[28]也发现灌胃给药后芒果苷在大鼠体内的吸收是非线性过程。同时, Hou 等^[29]研究了 21 名男性中国志愿者,分别口服 0.1 g 、 0.3 g 和 0.9 g 芒果苷,采用 HPLC-MS 测定血浆浓度,使用非房室模型计算其药物代谢动力学参数,当芒果苷剂量从 0.1 g 增加到 0.3 g ,从 0.3 g 增加到 0.9 g 时 $AUC_{0 \sim t}$ 并没有随着剂量增加而成比例增加,且 $\text{Log}(\text{浓度}/\text{剂量})$ -时间关系曲线没有重叠,以上均说明芒果苷是非线性吸收。

1.2 分布

组织分布研究结果表明,川西獐牙菜提取物所含的主要的环烯醚萜类成分如龙胆苦苷、獐芽菜苦苷等可以在机体内广泛分布,而咕吨酮类物质如芒果苷则在胃肠道出现一定的蓄积。郜尽^[30]

将大鼠以 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌内注射龙胆苦苷后发现,在 3.5 min 时肺、肝、心、脾等龙胆苦苷有较高的浓度,但脑中未检测到,说明该药可能不通过血脑屏障。同时王长虹等^[31]将小鼠静脉注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 龙胆苦苷后,发现在 1 ~ 3 h 肾、肝、肺、脾、胃、心等浓度较高,在 8 h 左右基本消除完毕。两者消除时间可能是种属差异导致结果有较大差异。Li 等^[22]对灌胃 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 獐芽菜苦苷的大鼠进行了组织分布实验,实验结果表明在 1 h 左右会在各个器官(肝,心,脾,肺,肾和脑)产生广泛分布,獐芽菜苦苷的浓度达到峰值,另外在肾脏和肝中有很高的浓度,说明獐芽菜苦苷可能被肝脏大量摄取且主要随着尿液排出体外。Lin 等^[32]对服用 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芒果苷的大鼠进行组织分布实验,单体组的结果表明,芒果苷在血浆和组织中的分布迅速且广泛,在胃和肠中浓度最高,且在给药 6 h 后其浓度仍高于其他组织,提示可能在胃肠道中存在积累,导致血浆浓度和生物利用度降低。

1.3 代谢

环烯醚萜类化合物的母核含有环戊烷结构,是五元碳环并六元氧杂环单萜类化合物。裂环环烯醚萜则是环戊烷 C7-C8 共价键断裂形成,龙胆苦苷、獐芽菜苦苷与獐芽菜苦苷均为裂环环烯醚萜类。该类化合物进入体内后容易被肠道的 β -葡萄糖苷酶水解,生成对应的苷元,但由于所生成的苷元为半缩醛结构,故容易形成更稳定的结构,例如双醛或含氮杂环化合物等^[33]。

早在 1989 年,El-Sedawy 等^[20]将龙胆苦苷与人肠道的厌氧细菌进行温孵,发现能够代谢为红白金花内酯、龙胆醛等。Zeng 等^[34]和 Han 等^[35]分别使用 UPLC/ESI-Q-TOF-MS 和 UHPLC/Q-TOF-MS 研究龙胆苦苷的代谢过程,发现龙胆苦苷与 β -葡萄糖苷酶孵育后形成半缩醛苷元,易于转化为双醛形式:一是双醛结构双醛与氮原子反应生成席夫碱,经分子内环化得到代谢产物如红白金花内酯、龙胆醛等;二是双醛结构在体内进行葡萄糖醛酸化,例如在人尿液和大鼠尿液中^[36]中代谢为葡萄糖醛酸缀合物。

Shi 等^[21]使用 UPLC-Q/TOF-MS/MS 鉴定獐芽菜苦苷的大鼠体内代谢产物,推断存在 3 种代谢途径:一是 6-羟基断裂后,吡喃环被保留,然后发生 $\text{C}=\text{O}$ 反应;二是半缩醛的开环反应,半缩醛异构成双醛;三是 RDA 裂解反应,由于六元环烯醚的存在,吡喃环被分离(见图 2);由此可见去羟基化、去羰基化和裂解环是獐芽菜苦苷裂解的特征步骤,整体来讲糖苷化过程在下一

次代谢前先形成苷元，得到中间配基，但是其苷元不稳定，是形成半缩醛。此时暴露的两个羰基碳原子容易受到氮原子的亲核攻击。当氮原子攻击其中一个羰基碳时，原来位置上的氧原子就会脱落，氮原子也可以攻击另一个羰基碳原子，最终环化形成吡啶结构，形成龙胆宁碱。同时，半缩醛结构也会以另一种方式打开，然后异构化、重排得到红白金花内酯^[37]。Wu等^[38]使用衍生化的方法也得到了同样的结论。Ma等^[39]

对獐芽菜苦苷的代谢物鉴定研究也发现了多种不同的生物转化反应，包括还原、脱水、脱氢、羧化、氢化、磺化、甲基化、甲氧基化、*N*-杂环化，确定了龙胆宁碱是其主要代谢产物。Han等^[40]使用UHPLC/Q-TOF-MS鉴定了大鼠灌胃100 mg·kg⁻¹獐芽菜苷的尿液代谢产物，约有11种代谢物包含I相代谢产物、II相代谢产物和苷元，苷元及其葡萄糖缀合物是主要的代谢产物。

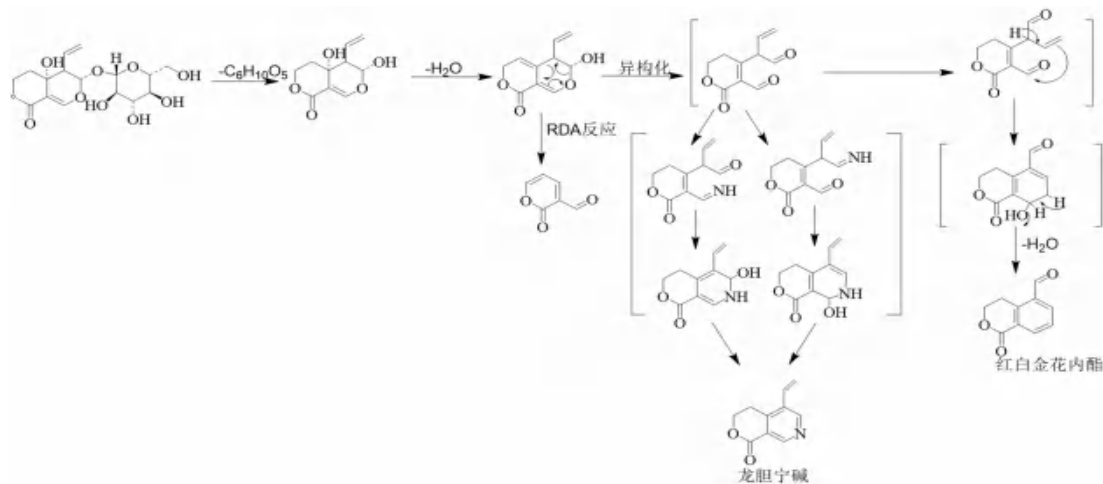


图2 獐芽菜苦苷裂解机制^[21, 37]

Fig 2 Cleavage mechanism of pyroside sprouts^[21, 37]

除了裂环烯醚萜类，粗提物还含有咕吨酮类化合物，比如芒果苷。芒果苷在体内主要以II相代谢为主，会被体内的 β -葡萄糖苷酶水解糖苷键形成苷元，继而进行葡萄糖醛酸化、硫酸化等II相反应^[41]。Liu等^[42]对灌胃200 mg·kg⁻¹芒果苷的大鼠进行代谢产物鉴定，发现尿液中的代谢产物约有32种，同时发现代谢产物在大鼠体内分布广泛但是差异较大，如在心脏和脾脏检测到1种代谢产物，在肺组织中可见芒果苷及2种代谢产物，在肝脏中除芒果苷外，还鉴定出6种代谢产物，在肾脏则出现5种代谢产物。目前已经明确了芒果苷在体内先经过去糖基化再进行去羟基化、甲基化、糖基化、葡萄糖醛酸化和硫酸化等反应。对部分代谢产物进行肠道体外培养，发现肠道细菌参与甲基化和去糖基化代谢产物的形成，但代谢产物是否有活性尚未确定。

1.4 排泄

川西獐芽菜提取物及相应单体在机体内的排泄研究相对较少。冯怡等^[43]将健康受试者分别静脉滴注80、240、400 mg龙胆苦苷，发现3个剂量25.5 h时平均累计尿排泄率为76.1%，说明龙胆苦苷在人体内主要是以原形从尿液中排出。徐贵丽^[44]发现大鼠灌胃20 mg·kg⁻¹獐芽菜苦

苷后从尿中排泄量约占给药量的1.0%，而粪便仅为0.05%。Wang等^[45]研究表明大鼠灌胃120 mg·kg⁻¹的芒果苷后，其尿液的累计排泄率为(6.52±0.12)%，推测排泄率低可能是因为芒果苷在肠道中被代谢或者首过效应的影响，也有可能是其他原因造成的。

2 川西獐芽菜的质量控制

根据现有的青海省藏药炮制规范规定^[46]，川西獐芽菜粉末呈黄绿色，加75%的乙醇，滤过浓缩，点于滤纸上，置紫外光灯(365 nm)下观察，显淡橙黄色荧光，滴加1%乙酸镁甲酸液，荧光明显加强，呈亮金黄色，另取滤液，点滤纸上，烘干后，滴加1%三氯化铁乙醇液，呈浅墨绿色；且按干燥品计算獐芽菜苦苷和龙胆苦苷总计不得少于1.3%。川西獐芽菜所含主要成分龙胆苦苷、獐芽菜苷、獐芽菜苦苷、当药醇苷、芒果苷和齐墩果酸，可以使用薄层色谱或超高效液相色谱方法进行鉴别^[47-48]。近年来尚未在药典中录入川西獐芽菜提取物的质量标准，需对主要成分制定质量标准，防止市场上出现以次充好的局面。

有学者对同一地区的川西獐芽菜进行指纹图谱分析，发现四川境内的药材质量稳定^[49]。另外，川西獐芽菜和印度獐芽菜在磨碎后肉眼无法

辨别, Fan 等^[50]使用核磁共振氢谱发现与印度獐牙菜相比, 川西獐牙菜含有的龙胆苦苷、异菝菥素、葡萄糖、马钱苷酸含量会更高。保怡等^[51]测定时发现川西獐牙菜的采摘日期或地域的不同会导致化学成分差异较大, 例如四川产出的獐牙菜含有当药醇苷, 而青海玉树产出的不含该类化合物。这也意味着产地不同, 提取物所含的成分也会有所差异, 这可能会对其体内药效、毒性以及药代动力学行为产生差异化影响。

3 讨论及展望

川西獐牙菜因分布广、疗效好, 受藏医的喜爱, 许多藏药书籍记载了川西獐牙菜广泛的临床运用, 有些疗效已经被证实, 有些仍旧在探索之中。

龙胆苦苷、獐芽菜苷、獐芽菜苦苷和芒果苷均是川西獐牙菜的主要成分。目前的研究表明, 主要单体在体内都可以较快地吸收达峰, 除龙胆苦苷外, 其余单体以原形的暴露及排泄都较少, 说明其生物利用度低可能存在广泛代谢并以代谢物的形式排出。但是对于其可能的机制比如是否存在肠道代谢、肝脏首过效应, 是否有转运体参与其吸收等都有待进一步的研究。同时, 环烯醚萜类化合物(龙胆苦苷、獐芽菜苷、獐芽菜苦苷)均是以Ⅱ相代谢为主, 在体内先经过 β -葡萄糖水解为苷元, 呈半缩醛形式, 易于转化为双醛形式且二醛与氮原子反应生成席夫碱, 经分子内环化得到含氮代谢产物; 芒果苷也以Ⅱ相代谢为主, 糖苷键发生断裂后形成苷元, 在苷元的基础上再进行去羟基化、甲基化、糖基化、葡萄糖醛酸化和硫酸化反应。但是缺少相关代谢酶亚型的鉴定以及酶动力学研究。另外虽然鉴定出的代谢产物较多, 但关于活性代谢物的评估较少, 希望后续能对代谢产物进行筛选, 再对活性化合物进行评估, 从而扩展药物的使用范畴。再者, 上述研究大多是以单体的形式在正常动物体内开展的, 川西獐牙菜提取物中所含的不同单体之间是否有相互作用, 在病理情况下其药物处置过程是否会发生改变尚未见报道。最后, 川西獐牙菜目前缺乏有效的质量控制标准, 这在限制其国际化的同时, 也可能对其体内药效、毒性以及药代行为产生差异化的影响。

参考文献

[1] 谢新年, 李珂, 梁君. 藏茵陈的资源学研究[J]. 中医药管理杂志, 2016, 24(10): 74-75.
 [2] 宇妥·元丹贡布等著. 李永年译. 四部医典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
 [3] 帝玛尔·丹增彭措著. 晶珠本草[M]. 上海: 上海科学技术

出版社, 1986.
 [4] 乔卫, 张彦文, 吴寿金. 天然环烯醚萜类化合物的生物活性[J]. 国外医药(植物药分册), 2001, 16(2): 65-67.
 [5] 曹长年, 米琴, 屠兰英, 等. 川西獐牙菜有效成分的分离及其抑菌活性测定[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2004, 22(1): 16-18.
 [6] 王冲, 侯娟, 韩晶, 等. 藏茵陈总萜酮致突变性及抗突变性研究[J]. 天津药学, 2014, 26(1): 17-20.
 [7] 叶本贵, 柳莹, 陈雄. 藏药川西獐牙菜及其同属植物的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(7): 72-74.
 [8] Tian CW, Zhang TJ, Wang LL, et al. The hepatoprotective effect and chemical constituents of total iridoids and xanthenes extracted from *Swertia mussotii* Franch [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(1): 259-266.
 [9] 周永福, 黄飞燕, 文荣荣, 等. 川西獐牙菜的化学成分研究(Ⅱ)[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2011(1): 14-16.
 [10] Wang H, Yuan X, Huang H, et al. Chemical constituents from *Swertia mussotii* Franch. (Gentianaceae) [J]. Nat Prod Res, 2017, 31(14): 1704-1708.
 [11] Ye XY, Zhang T, Han H. Metabolite profiling of *Swertia cincta* extract in rats and pharmacokinetics study of three bioactive compounds using UHPLC-MS/MS [J]. Planta Med, 2022, 89(3): 333-346.
 [12] Suryawanshi S, Asthana R, Gupta R. Assessment of systemic interaction between *Swertia chirata* extract and its bioactive constituents in rabbits [J]. Phytother Res, 2009, 23(7): 1036-1038.
 [13] 杨红霞, 马芳, 杜玉枝, 等. 藏药川西獐牙菜及其不同提取物的红外光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(11): 2973-2977.
 [14] 靳有才, 肖远灿, 邹小艳, 等. HPLC法同时测定2种獐牙菜中4种苷类成分[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(7): 1889-1890.
 [15] 卢永昌, 林鹏程, 李连隆. HPLC测定青海不同地区川西獐牙菜活性成分的含量[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1558-1559.
 [16] 高瑞斌, 董树清, 杨艳, 等. 高效毛细管电泳同时测定川西獐芽菜中龙胆苦苷和獐芽菜苦苷[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 994-997.
 [17] 张莹. HPLC法测定川西獐牙菜中獐芽菜苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(2): 97-99.
 [18] Wang CH, Wang ZT, Bligh SW, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of gentiopicroside following oral and intravenous administration in mice [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 2004, 29(3): 199-203.
 [19] Wang CH, Cheng XM, He YQ, et al. Pharmacokinetic behavior of gentiopicroside from decoction of *Radix Gentianae*, *Gentiana macrophylla* after oral administration in rats: a pharmacokinetic comparison with gentiopicroside after oral and intravenous administration alone [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(9): 1149-1154.
 [20] El-sedawy, Hattori M, Kobashi K, et al. Metabolism of gentiopicroside (gentiopicrin) by human intestinal bacteria [J].

- Chem Pharm Bull (Tokyo), 1989, 37 (9): 2435-2437.
- [21] Shi M, Xiong K, Zhang T, et al. Pharmacokinetics and metabolic profiles of swertiamarin in rats by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 112997.
- [22] Li HL, He JC, Bai M, et al. Determination of the plasma pharmacokinetic and tissue distributions of swertiamarin in rats by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Arzneimittelforschung, 2012, 62 (3): 138-144.
- [23] Luo YD, Chen J, Cao J, et al. Determination of sweroside in rat plasma and bile for oral bioavailability and hepatobiliary excretion [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2009, 57 (1): 79-83.
- [24] Han DD, Chen CJ, Zhang C, et al. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51 (1): 260-263.
- [25] Ma H, Chen HM, Sun L, et al. Improving permeability and oral absorption of mangiferin by phospholipid complexation [J]. Fitoterapia, 2014, 93: 54-61.
- [26] Qiu XJ, Zhao JL, Hao C, et al. Simultaneous determination of mangiferin and neomangiferin in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application for pharmacokinetic study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 124: 138-142.
- [27] Liu YM, Xu FP, Zeng X, et al. Application of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to pharmacokinetic study of mangiferin in rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878 (32): 3345-3350.
- [28] Cai F, Sun L, Gao SH, et al. An improved LC-MS/MS method for the determination of mangiferin in rat plasma and its application in nonlinear pharmacokinetics [J]. Pharmazie, 2014, 69 (3): 168-172.
- [29] Hou SY, Wang F, Li YM, et al. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration [J]. Food Chem, 2012, 132 (1): 289-294.
- [30] 郜尽. 龙胆苦苷的制备及药代动力学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2002.
- [31] 王长虹, 王峥涛. 小鼠静脉注射和口服龙胆苦苷体内药代动力学及组织分布 [A]/2003 年中国博士后生命科学学术研讨会暨院士论坛论文集 [C]. 长沙, 2003: 330-336.
- [32] Lin AH, Li JH, Li D, et al. Tissue distribution study of mangiferin after intragastric administration of mangiferin monomer, rhizoma anemarrhenae, and rhizoma anemarrhenae-phellodendron decoctions in normal or type 2 diabetic rats by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1122-1123: 18-28.
- [33] 郑浩然, 褚扬, 李伟, 等. 天然环烯醚萜类化合物的药理学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41 (6): 1147-1153.
- [34] Zeng WL, Han H, Tao YY, et al. Identification of bio-active metabolites of gentiopicroside by UPLC/Q-TOF MS and NMR [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27 (9): 1129-1136.
- [35] Han H, Xiong AZ, He CY, et al. Combination of UHPLC/Q-TOF-MS, NMR spectroscopy, and ECD calculation for screening and identification of reactive metabolites of gentiopicroside in humans [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406 (6): 1781-1793.
- [36] Xiong K, Gao TT, Zhang T, et al. Simultaneous determination of gentiopicroside and its two active metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetic studies [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1065-1066: 1-7.
- [37] Wang ZG, Wang XJ, Sun H, et al. Determination of novel nitrogen-containing metabolite after oral administration of swertiamarin to rats [J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14 (2): 176-181.
- [38] Wu XH, Tang SH, Jin Y, et al. New analytical method for the study of metabolism of swertiamarin in rats after oral administration by UPLC-TOF-MS following DNPH derivatization [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29 (8): 1184-1189.
- [39] Ma BB, Lou TY, Wang TT, et al. Comprehensive metabolism study of swertiamarin in rats using ultra high-performance liquid chromatography coupled with Quadrupole-Exactive Orbitrap mass spectrometry [J]. Xenobiotica, 2021, 51 (4): 455-466.
- [40] Han H, Zeng WL, He CY, et al. Characterization of metabolites of sweroside in rat urine using ultra-high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. J Mass Spectrom, 2015, 49 (11): 1108-1116.
- [41] 郭小珍. 1、芒果苷及苷元的体内过程研究 2、基于体内过程的三消汤降糖药效物质研究 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所), 2019.
- [42] Liu HH, Wang K, Tang YH, et al. Structure elucidation of in vivo and in vitro metabolites of mangiferin [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55 (5): 1075-1082.
- [43] 冯怡, 曾星, 陈延, 等. 龙胆苦苷在健康受试者尿中的药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25 (1): 22-25.
- [44] 徐贵丽. 天然活性成份獐芽菜苦苷在大鼠体内的药代动力学研究 [D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [45] Wang H, Ye G, Tang YH, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mangiferin in rat plasma and urine [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20 (12): 1304-1308.
- [46] 骆桂法. 青海省藏药炮制规范研究 [A]/2013 全国中药与天然药物高峰论坛暨第十三届全国中药和天然药物学术研讨会论文集 [C]. 中国药学会中药和天然药物专业委员会、浙江省药学会, 2013.
- [47] 田成旺, 张铁军, 蒋伶活. 藏药川西獐牙菜的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (4): 75-78.
- [48] 谭亮, 胡风祖, 董琦. UPLC 法同时测定青海川西獐牙菜中 3 个苦苷类成分和 3 个黄酮类成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (8): 1469-1475.
- [49] 吉文鹤, 卢学峰, 陈桂琛, 等. 四川西北地区川西獐牙菜指纹图谱研究 (I) [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (13): 977-979.
- [50] Fan G, Luo WZ, Luo SH, et al. Metabolic discrimination of Swertia mussotii and Swertia chirayita known as "Zangyinchen" in traditional Tibetan medicine by ¹H NMR-based metabolomics [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 364-370.
- [51] 保怡, 吉文鹤, 马玉花, 等. HPLC 测定四川及青海地区獐牙菜植物中 6 种主要成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (24): 2036-2038.

(收稿日期: 2023-02-08; 修回日期: 2023-03-11)

大蒜有机硫化物对药物代谢酶和转运体影响的研究进展

杨园园¹, 王彬², 刘燕^{1*}, 徐晓燕^{1*} (1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院, 山东 泰安 271000; 2. 山东特谱药物研发有限公司, 山东 泰安 271000)

摘要: 近年来, 大蒜有机硫化物(GOSCs)及其活性代谢产物在慢性阻塞性肺疾病(COPD)的治疗中表现出低毒高效的效果, 且可减少布地奈德等药物的不良反应, 因此GOSCs具有单独开发和与现有药物复方开发的巨大潜力。为发现可能存在的药物相互作用, 我们需明确GOSCs及活性代谢产物对药物代谢酶和转运体的影响。通过查阅PubMed、中国知网及万方数据等数据库, 检索到GOSCs药理作用相关文献46篇, GOSCs代谢转运和生物转化机制相关文献46篇及COPD相关文献6篇。作者对主要的GOSCs及活性代谢物的药理活性、生物转化机制, 对主要的药物I相、II相代谢酶及药物转运体的调控机制进行综述, 并结合目前主流COPD治疗药物的代谢机制, 推测了药物联用可能发生的药物相互作用, 以期GOSCs的进一步开发和临床合理用药提供理论基础。

关键词: 大蒜; 有机硫化物; 细胞色素P450酶; 药物代谢酶; 药物转运体; 药物相互作用

中图分类号: R284, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1321-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.032

Research progress in the effect of garlic organosulfur compounds on drug metabolic enzymes and transporters

YANG Yuan-yuan¹, WANG Bin², LIU Yan^{1*}, XU Xiao-yan^{1*} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an Shandong 271000; 2. Shandong Tops-pharm Research and Development Company Limited, Tai'an Shandong 271000)

Abstract: In recent years, garlic organosulfur compounds (GOSCs) and their active metabolites have shown low toxicity and high efficiency in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). They can reduce the side effects of such drugs as budesonide, so GOSCs have great potential to be developed both alone and in combination with other drugs. To identify possible drug interactions, the effects of GOSCs and their active metabolites on drug metabolic enzymes and transporters need to be clarified. By reviewing PubMed, China National Knowledge Infrastructure (CNKI) and Wanfang databases, 46 papers related to the pharmacological effects of GOSCs, 46 papers related to the metabolic transport and biotransformation mechanisms of GOSCs and 6 papers related to COPD were retrieved. This paper reviewed the pharmacological activities and biotransformation mechanisms of GOSCs and their active metabolites, as well as the regulatory mechanism of drug phase I and II metabolic enzymes and drug transporters. Based on the metabolic characteristics of the current main stream COPD therapeutic drugs, the authors speculated on the possible drug interactions between drugs for COPD and GOSCs in combination, to provide a theoretical basis for the further development and rational clinical use of GOSCs.

Key words: garlic; organosulfur compound; CYP450 enzyme; drug metabolic enzyme; drug transporter; drug interaction

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (No.ZR2020QH366)。

作者简介: 杨园园, 女, 硕士, 主要从事药代动力学和药物相互作用研究, email: yang2020yang2020@126.com *通信作者: 刘燕, 女, 博士, 讲师, 主要从事药代动力学和药物相互作用研究, email: liuyann@sdfmu.edu.cn; 徐晓燕, 女, 硕士研究生导师, 副教授, 主要从事药物对学习记忆行为影响的研究, email: xyxu@sdfmu.edu.cn

百合科葱属植物大蒜，是药食同源的代表性物质。大蒜中的挥发性有机硫化物 (garlic organosulfur compounds, GOSCs) 是大蒜发挥药理作用的重要组成部分^[1-2]，具有抗炎^[3-4]、抗氧化^[5]、抗肿瘤^[6]、抗菌^[7]、抗真菌^[8-9]、抗病毒^[10]、抗高血压^[11]以及保护心脏^[12]等多种药理活性。近年来，GOSCs 的抗慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 作用开始被关注，其药理学机制包括抗炎、抗氧化、抗弹性蛋白酶失衡以及免疫调节^[13]。此外，GOSCs 中的二烯丙基三硫醚 (diallyl trisulfide, DATS) 可以减轻顺铂引起的肾毒性^[14]，提示该类化合物具有联合用药的巨大潜力和临床价值。因此，开发 GOSCs 的单体化合物制剂或与目前主流的药物组成复方制剂，都具有较广阔的应用前景。为了这项工作的顺利进行，我们需要明确 GOSCs 在体内的生物转化特征以及活性成分对药物代谢酶和转运体的影响，以便推测其潜在的药物相互作用。目前 GOSCs 的相关研究主要集中在药理活性的探究^[15-16]，或仅归纳了少数烯丙基硫化物对部分药物代谢酶和转运体的影响^[17-20]。因此，本文筛选了药理活性强、应用前景广的几种 GOSCs 进行综述，包括大蒜素 (allicin)、阿霍烯 (ajoene)、二烯丙基硫醚 (diallyl sulfide, DAS)、二烯丙基二硫醚 (diallyl disulfide, DADS)、二烯丙基三硫醚 (diallyl trisulfide, DATS)、烯丙基甲基硫醚 (allyl methyl sulfide, AMS)、*S*-烯丙基半胱氨酸 (*S*-allyl cysteine, SAC) 及 *S*-烯丙基巯基半胱氨酸 (*S*-allyl

mercaptocysteine, SAMC)，对这些化合物的生物转化机制，对药物 I 相代谢酶、II 相代谢酶以及药物转运体影响的文献进行汇总，并对其可能存在的药物相互作用进行分析，旨在为 GOSCs 的制剂开发和联合用药提供参考。

1 大蒜中的主要有机硫化物及其药理活性

完整的大蒜无刺激性气味，鳞茎中含有 γ -谷氨酰半胱氨酸，存于液泡内并可转化为蒜氨酸 (alliin)，大蒜细胞质中存在可与蒜氨酸反应的蒜酶。 γ -谷氨酰半胱氨酸可以通过不同的转化途径生成脂溶性和水溶性两大类有机硫化物。第一条路径，大蒜细胞破损后，蒜氨酸与蒜酶接触产生大蒜素，大蒜素不稳定易降解，转化成脂溶性有机硫化物包括阿霍烯、DAS、DADS、DATS 以及 AMS；另一条路径， γ -谷氨酰半胱氨酸可以在转氨酶作用下生成水溶性含硫化合物 SAC 和 SAMC。目前市场上常见的大蒜制品主要包括：以 DAS、DADS、DATS 以及 AMS 为主的大蒜油；以 SAC 和 SAMC 为主的大蒜提取液；以阿霍烯为主的大蒜浸油和以大蒜素为主的大蒜粉^[21-22]。大蒜素、阿霍烯、DAS、DADS、DATS、AMS、SAC 以及 SAMC，是 GOSCs 主要的生物活性成分和研究对象^[23]。另外 GOSCs 在体内的主要代谢产物甲基烯丙基砜 (allyl methyl sulfone, AMSO₂) 的药理活性也被证实，现将包括 AMSO₂ 在内的几种 GOSCs 的药理活性汇总至表 1。

表 1 GOSCs 的药理活性及化学结构
Tab 1 Pharmacological activity and structure of GOSCs

化合物名称	药理活性	化学结构
大蒜素	抗菌 ^[24] ，抗真菌 ^[9] ，抗肿瘤 ^[25]	
阿霍烯	抗菌 ^[26] ，抗肿瘤 ^[27] ，抗血栓 ^[28] ，降低胆固醇 ^[29] ，抗微生物 ^[30]	
二烯丙基硫醚	抗肿瘤 ^[31] ，抗菌 ^[32] ，免疫调节 ^[33] ，抑制氧化应激 ^[34] ，抗炎 ^[35]	
二烯丙基二硫醚	抗肿瘤 ^[36] ，神经保护 ^[37] ，抑制炎症、氧化应激、细胞凋亡 ^[38] ，治疗 COPD ^[13]	
二烯丙基三硫醚	抗肿瘤 ^[39] ，抗血小板活性 ^[40] ，减轻顺铂引起的肾毒性 ^[14]	
烯丙基甲基硫醚	保护心脏，抑制氧化应激 ^[41-42]	
<i>S</i> -烯丙基半胱氨酸	抗炎，抗氧化 ^[43] ，抗肿瘤 ^[44]	
<i>S</i> -烯丙基巯基半胱氨酸	抗肿瘤 ^[45] ，抗菌 ^[46]	
甲基烯丙基砜	抗炎，抗氧化，抑制肺损伤 ^[47]	

2 GOSCs 对药物代谢酶的影响

药物的代谢过程受到各种酶的调控，参与代

谢的酶主要分为 I 相代谢酶和 II 相代谢酶。I 相代谢酶包括细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450)、单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO)、黄素单加氧酶 (flavin monooxygenase, FMO)、黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO)、醛氧化酶 (aldehyde oxidase, AO)、醛/醇脱氢酶 (alcohol/aldehyde dehydrogenase, ADH/ALDH) 以及环氧化物水解酶 (epoxide hydratase, EH) 等; II 相代谢酶包括尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (uridine diphosphate glucuronosyl transferases, UGTs)、硫酸转移酶 (sulfotransferases, SULTs)、谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 以及醌还原酶 (quinone reductase, QR) 等。这些酶介导氧化、还原、水解以及结合等反应, 促进药物生物转化和排泄。CYP450 酶是最重要 I 相代谢酶, 其在药物相互作用研究中, 主要有两方面的应用: 一是鉴别待测物的代谢产物及明确代谢途径; 二是研究待测物对代谢酶的抑制程度, 以预测其与该类酶的底物联合用药时可能发生的药物相互作用。明确 GOSCs 对药物代谢酶的影响, 对预测潜在的药物相互作用, 促进药物临床合理应用有至关重要的作用。

2.1 GOSCs 对 I 相药物代谢酶的影响

2.1.1 大蒜素 大蒜素对 CYP2E1、CYP2C9 及 CYP2C19 均有抑制作用。在酒精性脂肪肝小鼠模型中, 大蒜素可降低 CYP2E1 的表达, 但显著增加 ADH 活性^[48]。Zou 等^[49]的研究表明, 大蒜素对 CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2D6 产生弱抑制作用, IC_{50} 值分别为 $44.22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $60.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $47.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 CYP2C9、CYP2C19 产生中等强度的抑制, IC_{50} 值分别为 $5.41 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.52 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。有研究表明大蒜素具有抑制 XO 的活性^[50], 表现出抗氧化活性。

2.1.2 阿霍烯 有关阿霍烯对药物代谢酶的影响的研究相对较少。阿霍烯以 Z 构型和 E 构型两种形式存在, Z-阿霍烯可以抑制谷胱甘肽还原酶 (GR), 导致谷胱甘肽 (GSH) 合成减少^[51], 有研究发现 CYP1A1 和 CYP3A4 参与阿霍烯的代谢^[52], 但研究并未指出阿霍烯对 CYP1A1 和 CYP3A4 存在何种影响。

2.1.3 DAS DAS 是 CYP2B 的有效诱导剂, 对 CYP1A1/2、CYP2B1/2、CYP3A1/2 均有诱导作用, 同时 DAS 是 CYP2E1 的选择性抑制剂, 其 IC_{50} 值为 $(17.3 \pm 1.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[53]。实验组大鼠给予 DAS, 对照组给予空白玉米油, 分别取其肝脏处理后进行免疫印迹分析, 结果实验组大鼠肝脏中 CYP1A1、CYP2B1、CYP3A1/2 蛋白水平高

于对照组, CYP2E1 蛋白低于对照组, 且都表现出剂量依赖性^[54-55]。按照 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予大鼠 DAS, 利用免疫印迹法检测, 发现其肝脏 CYP2E1 蛋白水平降低 45%, CYP1A1 和 CYP1A2 蛋白水平分别升高 684% 和 282%^[56]。

2.1.4 DADS Haber 等^[57]在大鼠饮食中添加 0.2% 烯丙基硫醚类物质, 发现 DADS 可以提高 CYP1A1/2、CYP2B1/2 和 EH 蛋白水平, 并降低 CYP2E1 蛋白水平。将 DADS 按照 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予大鼠, 结果大鼠肝脏中 CYP2E1 蛋白的含量减少 25%^[56], 且研究表明 DADS 是 CYP2E1 的中等强度抑制剂, IC_{50} 为 $(7.62 \pm 5.43) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[58]。Guyonnet 等^[55]的研究表明 DADS 对 CYP2B1/2 及 CYP3A2 产生诱导作用但作用都弱于 DAS。

2.1.5 DATS 研究表明, DATS 可抑制 CYP2E1 活性, 增强 CYP1A1 和 CYP2B1 的活性。按照 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予 DATS 后, 大鼠肝脏中 CYP2E1 的活性降低 47%, CYP1A1 和 CYP2B1 的活性分别提高 44% 和 114%, CYP2E1 的蛋白表达降低, CYP1A1 和 CYP2B1 的蛋白表达升高^[59]。

2.1.6 AMS AMS 被发现可以竞争性抑制 CYP2E1, 其 IC_{50} 值为 $(11.4 \pm 1.1) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[53]。有研究按照 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给予雄性大鼠 AMS, 结果大鼠肝脏中 CYP2E1 蛋白减少 47%, CYP1A2 蛋白增加 70%, CYP3A2 蛋白水平显著提高^[60]。另有研究以 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射给予大鼠 AMS, 免疫印迹分析结果显示, 大鼠肝脏内 EH 蛋白含量增加, 且以时间依赖性的方式提高 EH 的 mRNA 水平^[60]。

2.1.7 SAC SAC 为水溶性 GOSCs^[61], 对 CYP2E1 无影响^[60], 推测这是因为 CYP2E1 活性位点是疏水性的, 而 SAC 是水溶性化合物, 两者无法结合, 所以不产生影响。将 XO 与不同浓度的 SAC 共同孵育测定 XO 的活性, 结果表明 SAC 呈剂量依赖性地抑制 XO 活性, 其 IC_{50} 值为 $33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[62]。

2.1.8 SAMC 研究表明, SAMC 可以上调 CYP2B1/2 的 mRNA 表达^[63]。此外, SAMC 可抑制 CYP2E1 和 CYP1A1 的活性, 但对 CYP3A4、CYP2C9 及 CYP2C19 几乎无影响^[64]。

综上, GOSCs 对 I 相药物代谢酶影响的研究主要集中于 CYP450 酶, 其中大蒜素、DAS、DADS、DATS、AMS 及 SAMC 皆对 CYP2E1 表现出抑制作用。DAS、DADS 及 DATS 皆使 CYP1A1、CYP2B1 和 CYP3A1 的蛋白含量增加, 且强度随化合物中硫原子数量增多而减弱, 即 $\text{DAS} > \text{DADS} > \text{DATS}$ 。现将文献报道的相关结果进行汇总, 见表 2。

表 2 GOSCs 对 I 相药物代谢酶的影响
Tab 2 Effect of GOSCs on phase I drug metabolic enzymes

GOSCs	I 相药物代谢酶
大蒜素	CYP2E1 (-*), CYP2C9 (---), CYP2C19 (---), CYP3A4 (-), CYP2D6 (-), CYP1A2 (-), XO (-*), ADH (+*)
阿霍烯	GR (-*)
DAS	CYP2E1 (-), CYP1A1/2 (+*), CYP2B1/2 (+*), CYP3A1/2 (+*)
DADS	CYP2E1 (---), CYP1A1/2 (+*), CYP2B1/2 (+*), CYP3A2 (+*), EH (+*)
DATS	CYP2E1 (-*), CYP1A1 (+*), CYP2B1 (+*)
AMS	CYP2E1 (-), CYP3A2 (+*), CYP1A2 (+*), EH (+*)
SAC	XO (-)
SAMC	CYP1A1 (-*), CYP2E1 (-*), CYP2B1/2 (+*)

注：“-”表示有抑制作用但作用强度未知，“-”表示弱抑制作用，“---”表示中等抑制作用，“+*”表示诱导作用但作用强度未知。

Note: “-” means the inhibitory effect, but the strength of the effect is unknown, “-” means weak inhibition, “---” means medium inhibition, “+*” means the induction effect, but the strength of the effect is unknown.

2.2 GOSCs 对 II 相药物代谢酶的影响

2.2.1 DAS

DAS 对 GST 的诱导强度大于 DAS 对 CYP2B1 的诱导强度^[65], 且 DAS 可以增强肝脏 UGTs 的活性^[66]。利用 *N*-亚硝基二乙胺诱导大鼠产生肝肿瘤, 大鼠体内 GST 活性升高, 给予 DAS 后 GST 活性恢复正常, 提示 DAS 可促进重建氧化还原稳态^[67]。Sueyoshi 等^[68]指出 DAS 可诱导小鼠肝脏 *SULT1E1* 基因表达, 使小鼠体内雌激素磺基转移酶 (estrogen sulfotransferase, EST) 增加。

2.2.2 DADS

Chittezhath 等^[69]发现 DADS 可显著提高小鼠肠道和肝脏中的 GSH 水平。大鼠饮食中添加 DADS 后, 其肝脏中 UGTs、GST 及 QR 的活性升高^[70-71]。DADS 对谷胱甘肽-S-转移酶 A5 产生诱导作用^[55]。此外, 大鼠饮食中添加 DAS 或 DADS 后其肝脏内 UGT1 的活性得到提高^[72]。

2.2.3 DATS

在 DAS、DADS 和 DATS 中, DATS 是 II 相药物代谢酶最有效的诱导剂^[73]。给予 DATS 的大鼠, 其体内 GST、QR 和谷胱甘肽过氧化物酶的活性升高^[74]。将 5 ~ 200 μmol · L⁻¹ 的 DATS 加入正常大鼠肝脏的克隆细胞体系中孵育, 结果显示 DATS 可提高克隆细胞中 GST 蛋白水平, 并表现出浓度依赖性^[75]。

2.2.4 SAC

按照 3.5 mmol · kg⁻¹ 的剂量给予大鼠 SAC, 12 h 后其肝脏中 GST 的活性增加 41%。连续 3 日以 1.8 mmol · kg⁻¹ 的剂量给予大鼠 SAC, 其肝脏和小肠中 GST 水平都得到提高^[76]。

大蒜素、阿霍烯、AMS 和 SAMC 对 II 相药物代谢酶的影响尚未见报道, 故本文不进行讨论。现将 GOSCs 诱导的 II 相药物代谢酶进行汇总, 见表 3。以上 GOSCs 对 II 相药物代谢酶活性的影响主要表现为诱导作用, 但文献并未确切表明诱导作用程度。

3 GOSCs 对转运体的影响

药物的体内过程需要转运体的参与, 转运体

表 3 GOSCs 诱导的 II 相药物代谢酶种类

Tab 3 Types of phase II drug metabolic enzymes induced by GOSCs

GOSCs	II 相药物代谢酶
DAS	GST、UGTs、EST
DADS	GST、UGTs、QR
DATS	GST、QR
SAC	GST

分为摄入型和外排型。摄入型转运体包括有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptide, OATP)、有机阴离子转运体 (organic anion transporter, OAT) 及有机阳离子转运体 (organic cation transporter, OCT) 等; 外排型转运体包括 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated proteins, MRPs) 和乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 等, 其中比较重要的外排转运体包括 P-gp、MRP1、MRP2 和 MRP3。外排型转运体在药物的吸收、分布、代谢和排泄过程中起重要作用, 是决定药物生物利用度的重要因素^[77-78]。阐明 GOSCs 对外排转运体的调控作用, 利于科学评价其临床用药, 避免联合用药时产生不良药物相互作用。

研究表明, 大蒜素及 DAS 可以抑制 P-gp 表达, 大蒜素、DAS、DADS 及 DATS 都对 MRPs 产生影响。利用蛋白质印迹法检测肝癌细胞内 P-gp 和 MRP1 蛋白表达水平, 发现使用大蒜素能降低肝癌细胞内 P-gp 和 MRP1 的表达, 与单独使用 5-氟尿嘧啶相比, 大蒜素与 5-氟尿嘧啶联用时可以更强烈地降低肝癌细胞内 P-gp 和 MRP1 蛋白表达^[79]。Arora 等^[80]用长春花碱 (VBL) 诱导 K562 白血病细胞内 P-gp 水平升高, 给予 DAS 后 P-gp 水平恢复至正常, 体内实验也表明, DAS 可以有效抑制 VBL 诱导的小鼠肝细胞 P-gp 过表达。在人结肠癌细胞耐药基因表达的相关研究中, 体外实验显示 DAS 和 DADS 促进 *MRP3* 基因表达, DATS 促进多药耐药基因 (multidrug resistant 1, *MDR1*) 和

MRP1 的基因表达；体内研究表明 DADS 和 DATS 促进 *MDR1*、*MRP1* 基因表达^[81]。此外，DADS 可以提高大鼠肾脏 MRP2 蛋白水平，DADS 与抗肿瘤药物顺铂联合用药时 MRP2 蛋白水平可以提高 30 倍。但是当 SAC 与顺铂联合使用时 P-gp 蛋白表达和 *MDR1* 的 mRNA 水平降低^[82]。

4 GOSCs 的生物转化

GOSCs 的体内外生物转化已有诸多报道，现将文献报道的 DADS 和 DATS 的相关生物转化进行汇总，见图 1。

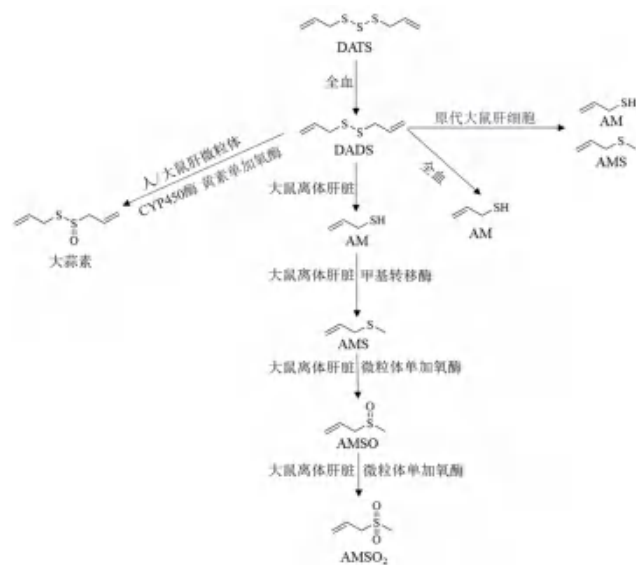


图 1 DADS 和 DATS 的生物转化

Fig 1 Biotransformation of DADS and DATS

研究 GOSCs 生物转化的体系主要有离体肝灌流^[83-84]、人/大鼠肝微粒体^[83]、全血^[85]及原代肝细胞系统^[86]。在离体肝脏灌流体系和大鼠体内实验中，DADS 的主要代谢产物研究结果一致，主要是烯丙基硫醇（allyl mercaptan, AM）、AMS、甲基烯丙基亚砜（allyl methyl sulfoxide, AMSO）和 AMSO₂^[87-88]。在全血中 DATS 不稳定，可以转化成 DADS^[85]，DADS 在全血中又进一步代谢为 AM，进而发生后续的生物转化。从药动学参数来分析，GOSCs 在血细胞中代谢的半衰期仅为 6.28 min，其在体内主要以代谢产物的形式存在，其中代谢产物以 AMSO 和 AMSO₂ 为主，两者的消除半衰期分别为 18.17 h 和 17.50 h^[89]。目前更多研究者开始关注 AMSO 和 AMSO₂，现有研究已经明确 AMSO₂ 可通过抑制 ERK/p38 MAPK 和 NF- κ B 通路降低炎症细胞因子水平，具有抗炎、抗氧化和抵抗肺损伤的作用^[47, 90]。这表明 AMSO 和 AMSO₂ 在预防和治疗肺部疾病中有巨大潜力。

综上所述，GOSCs 类化合物具有相似的生物转化特征，即体内原形药物半衰期极短，主要以

代谢物的形式存在，且代谢物以 AMSO 和 AMSO₂ 为主。目前对于 GOSCs 药物相互作用机制的研究，都集中在 GOSCs 原形药物。GOSCs 对药物代谢酶和转运体的研究已在各种体外模型中展开，但由于 GOSCs 自身生物转化特征，目前体外研究的结论，对于预测 GOSCs 临床可能发生的药物相互作用，无法提供强有力的直接证据。

5 讨论

GOSCs 对治疗某些呼吸系统疾病有显著疗效，尤其是对 COPD 具有巨大治疗潜力。COPD 已成为我国主要的呼吸系统慢病^[91]，其发病机制尚不明确，但主要包括炎症、氧化应激、弹性蛋白酶-抗弹性蛋白酶失衡、免疫失衡等^[92-94]。

研究表明，GOSCs 中的 SAMC 有抗氧化、抗炎特性，且能抑制 *MUC5AC* 基因表达，增加 AQP5 蛋白表达，从而抑制气道黏液分泌起到治疗 COPD 的作用^[95-96]。GOSCs 可通过提高体内 GSH 水平达到抗氧化及调节氧化应激的效果。AMSO₂ 可以提升酶抗氧化系统中超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性，降低过氧化物水平从而发挥抗氧化作用，并且在大鼠肺气肿模型中 AMSO₂ 也显现出抵抗肺部细胞凋亡的活性^[47, 90]。在脂多糖诱导的 Raw264.7 细胞炎症模型里 DADS 被发现可以通过抑制 NF- κ B、激活 Nrf2 通路以及抑制炎症因子的释放，从而发挥抗炎作用。在利用香烟提取物诱导的人肺成纤维细胞炎症模型中，DADS 可以抑制基质金属蛋白酶 MMP-9 和酶抑制剂 TIMP-1 的分泌，起到缓解弹性蛋白酶-抗弹性蛋白酶失衡的作用，此外，DADS 还可减少 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴 T 细胞，产生免疫调节作用^[13, 58]。综上所述，GOSCs 具有治疗 COPD 的巨大潜力。

目前，治疗 COPD 的主流药物主要包括糖皮质激素、磷酸二酯酶抑制剂和支气管扩张剂等。结合 GOSCs 的抗 COPD 活性及低毒等特点，将目前主流药物与 GOSCs 联用，或可产生增强疗效减轻不良反应的效果，这可能是未来研究的热点。联合用药时需关注药物间是否会发生药物相互作用，现将目前主流药物的代谢机制汇总如下。糖皮质激素类药物布地奈德，主要经 CYP3A4 代谢；磷酸二酯酶抑制剂罗氟司特主要经 CYP1A2 和 CYP3A4 代谢^[97]；支气管扩张剂格隆溴铵、噻托溴铵、茛地溴铵等其代谢酶主要是 CYP2D6 和 CYP3A4^[98]。目前对 GOSCs 的研究主要集中在原形药物上，其中 SAMC 对 CYP3A4 作用程度可忽略不计，推测布地奈德与 SAMC 联合使用治疗 COPD 无药物相互作用；

DAS、DADS 和 AMS 都能诱导 CYP1A2, 若与经 CYP1A2 代谢的罗氟司特联用, 则可能出现罗氟司特代谢速率变快的现象, 需考虑药物相互作用; 大蒜素对 CYP3A4、CYP2D6 的抑制程度在临床用药时可忽略, 因此大蒜素若与格隆溴铵、噻托溴铵、茚地那韦等联用, 可推测它们之间几乎无药物相互作用。但是 GOSCs 生物转化研究表明, GOSCs 在体内主要以活性产物 AMSO 和 AMSO₂ 的形式存在, 它们是在体内发挥药理作用的根本, 更具有临床应用价值。目前尚缺乏 AMSO 和 AMSO₂ 对相关药物代谢酶影响的研究, 这对预测 GOSCs 与抗 COPD 药物联用可能发生的药物相互作用造成阻碍, 所以未来研究重点应是活性代谢产物 AMSO 和 AMSO₂ 对药物代谢酶和转运体的影响, 从而为 GOSCs 合理应用提供理论支持, 为治疗 COPD 提供用药新思路。

根据相关药动学实验可知, 按照 200 mg · kg⁻¹ 的剂量给予大鼠 DADS, 其体内 DADS、AM、AMS、AMSO 和 AMSO₂ 的 C_{max} 值分别能达到 0.001、0.008、0.008、0.376 和 1.440 mmol · L⁻¹[88]。但关于 GOSCs 在人体内的研究较少, 尚没有文献报道人摄取 GOSCs 后体内药物暴露程度问题, 因此, GOSCs 在人体内暴露程度能否达到有生理意义的药物代谢酶和转运体的抑制或诱导水平, 还需进一步展开研究, 以期 GOSCs 合理用药提供理论依据。

参考文献

- [1] Wan QY, Li N, Du L, et al. Allium vegetable consumption and health: an umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes [J]. Food Sci Nutr, 2019, 7 (8): 2451-2470.
- [2] Liu PX, Weng R, Sheng XJ, et al. Profiling of organosulfur compounds and amino acids in garlic from different regions of China [J]. Food Chem, 2020, 305: 125499.
- [3] You BR, Yoo JM, Baek SY, et al. Anti-inflammatory effect of aged black garlic on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dermatitis in mice [J]. Nutr Res Pract, 2019, 13 (3): 189-195.
- [4] Yang J, Tang RH, Yi J, et al. Diallyl disulfide alleviates inflammatory osteolysis by suppressing osteoclastogenesis via NF-κB-NFATc1 signal pathway [J]. FASEB J, 2019, 33 (6): 7261-7273.
- [5] Wakamatsu J, Stark TD, Hofmann T. Antioxidative maillard reaction products generated in processed aged garlic extract [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67 (8): 2190-2200.
- [6] Yue ZQ, Guan X, Chao R, et al. Diallyl disulfide induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 Cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Molecules, 2019, 24 (14): 2665.
- [7] Birring OJ, Vilorio IL, Nunez P. Anti-microbial efficacy of Allium sativum extract against Enterococcus faecalis biofilm and its penetration into the root dentin: an in vitro study [J]. Indian J Dent Res, 2015, 26 (5): 477-482.
- [8] Wang YC, Wei KK, Han XB, et al. The antifungal effect of garlic essential oil on phytophthora nicotianae and the inhibitory component involved [J]. Biomolecules, 2019, 9 (10): 632.
- [9] Pârnu M, Moț CA, Pârnu AE, et al. Allium sativum extract chemical composition, antioxidant activity and antifungal effect against meyerozyma guilliermondii and rhodotorula mucilaginosa causing onychomycosis [J]. Molecules, 2019, 24 (21): 3958.
- [10] Aboubakr HA, Nauertz A, Luong NT, et al. In vitro antiviral activity of clove and ginger aqueous extracts against feline calicivirus, a surrogate for human norovirus [J]. J Food Prot, 2016, 79 (6): 1001-1012.
- [11] Ried K. Garlic lowers blood pressure in hypertensive subjects, improves arterial stiffness and gut microbiota: a review and meta-analysis [J]. Exp Ther Med, 2020, 19 (2): 1472-1478.
- [12] Sobenin IA, Myasoedova VA, Il'tchuk MI, et al. Therapeutic effects of garlic in cardiovascular atherosclerotic disease [J]. Chin J Nat Med, 2019, 17 (10): 721-728.
- [13] Liu Y, Li A, Feng XL, et al. Pharmacological investigation of the anti-inflammation and anti-oxidation activities of diallyl disulfide in a rat emphysema model induced by cigarette smoke extract [J]. Nutrients, 2018, 10 (1): 79.
- [14] Jiang XY, Zhu XS, Liu N, et al. Diallyl trisulfide inhibits growth of NCI-H460 in vitro and in vivo, and ameliorates cisplatin-induced oxidative injury in the treatment of lung carcinoma in xenograft mice [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13 (2): 167-178.
- [15] 赵铭洋, 王知斌, 孙延平, 等. 大蒜中的有机硫化物及其生物活性研究进展 [J]. 食品与药品, 2021, 23 (6): 565-571.
- [16] Shang A, Cao SY, Xu XY, et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Foods, 2019, 8 (7): 246.
- [17] 杨丽君, 周宏灏. 大蒜对药物代谢酶及转运体活性影响研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23 (6): 453-456.
- [18] Thomson M, Ali M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3 (1): 67-81.
- [19] Smith TJ, Yang CS. Effect of organosulfur compounds from garlic and cruciferous vegetables on drug metabolism enzymes [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2000, 17 (1-4): 23-49.
- [20] Gao CC, Jiang XY, Wang HN, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics of organosulfur compounds from garlic [J]. J Drug Metab Toxicol, 2013, 4 (5): 1-10.
- [21] Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, et al. Intake of garlic and its bioactive components [J]. J Nutr, 2001, 131 (3s): 955S-962S.
- [22] 张晓林, 刘萍. 大蒜有机硫化物的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17 (3): 432-434.
- [23] Melguizo-Rodríguez L, García-Recio E, Ruiz C, et al. Biological properties and therapeutic applications of garlic and its components [J]. Food Funct, 2022, 13 (5): 2415-2426.
- [24] Reiter J, Levina N, Van Der Linden M, et al. Diallylthiosulfinate (Allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor [J]. Molecules, 2017, 22 (10): 1711.
- [25] Zhou Y, Li XX, Luo WY, et al. Allicin in digestive system

- cancer: from biological effects to clinical treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 903259.
- [26] Choi JA, Cho SN, Lim YJ, et al. Enhancement of the antimycobacterial activity of macrophages by ajoene [J]. *Innate Immun*, 2018, 24 (1): 79-88.
- [27] Kaschula CH, Hunter R, Parker MI. Garlic-derived anticancer agents: structure and biological activity of ajoene [J]. *Biofactors*, 2010, 36 (1): 78-85.
- [28] Apitz-Castro R, Badimon J, Badimon LJ. A garlic derivative, ajoene, inhibits platelet deposition on severely damaged vessel wall in an in vivo porcine experimental model [J]. *Thromb Res*, 1994, 75 (3): 243-249.
- [29] Gebhardt R, Beck H, Wagner KG. Inhibition of cholesterol biosynthesis by allicin and ajoene in rat hepatocytes and HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1213 (1): 57-62.
- [30] Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, et al. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62 (11): 4238-4242.
- [31] Singh A, Shukla Y. Antitumor activity of diallyl sulfide in two-stage mouse skin model of carcinogenesis [J]. *Biomed Environ Sci*, 1998, 11 (3): 258-263.
- [32] Tsao S, Yin M. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47 (5): 665-670.
- [33] Elbaz EM, Amin HAA, Kamel AS, et al. Immunomodulatory effect of diallyl sulfide on experimentally-induced benign prostate hyperplasia via the suppression of CD4⁺ T/IL-17 and TGF-beta1/ERK pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28 (5): 1407-1420.
- [34] Wu CC, Sheen LY, Chen HW, et al. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2001 39 (6): 563-569.
- [35] Kema VH, Khan I, Kapur S, et al. Evaluating the effect of diallyl sulfide on regulation of inflammatory mRNA expression in 3T3L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages during ethanol treatment [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2018, 41 (3): 302-313.
- [36] 张瑞涛, 史惠蓉, 任芳, 等. 二烯丙基二硫化物诱导 G₂/M 期阻滞对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2019, 41 (1): 43-52.
- [37] 柴继侠, 李微微, 王元元, 等. 二烯丙基二硫对 AD 模型小鼠学习记忆能力和海马突触的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36 (10): 1417-1422.
- [38] Ko JW, Park SH, Shin NR, et al. Protective effect and mechanism of action of diallyl disulfide against acetaminophen-induced acute hepatotoxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 109 (Pt 1): 28-37.
- [39] Stan SD, Abtahi M. Diallyl trisulfide induces apoptosis in breast ductal carcinoma in situ derived and minimally invasive breast cancer cells [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (7): 1455.
- [40] Hosono T, Sato A, Nakaguchi N, et al. Diallyl trisulfide inhibits platelet aggregation through the modification of sulfhydryl groups [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (6): 1571-1578.
- [41] Mohammed SA, Paramesha B, Meghwani H, et al. Allyl methyl sulfide preserved pressure overload-induced heart failure via modulation of mitochondrial function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111316.
- [42] Mohammed SA, Paramesha B, Kumar Y, et al. Allylmethylsulfide, a sulfur compound derived from garlic, attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7856318.
- [43] Park JM, Han YM, Kangwan N, et al. S-allyl cysteine alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damages by increasing cyclooxygenase-2 inhibition, heme oxygenase-1 induction, and histone deacetylation inhibition [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29 (Suppl 4): 80-92.
- [44] Ho JN, Kang M, Lee S, et al. Anticancer effect of S-allyl-L-cysteine via induction of apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (1): 623-629.
- [45] Lv Y, So KF, Wong NK, et al. Anti-cancer activities of S-allylmercaptocysteine from aged garlic [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17 (1): 43-49.
- [46] Uzun L, Dal T, Kalcioğlu MT, et al. Antimicrobial activity of garlic derivatives on common causative microorganisms of the external ear canal and chronic middle ear infections [J]. *Turk Arch Otorhinolaryngol*, 2019, 57 (4): 161-165.
- [47] Li A, Liu Y, Zhu XS, et al. Methylallyl sulfone attenuates inflammation, oxidative stress and lung injury induced by cigarette smoke extract in mice and RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 369-374.
- [48] Panyod S, Wu WK, Ho CT, et al. Diet supplementation with allicin protects against alcoholic fatty liver disease in mice by improving anti-inflammation and antioxidative functions [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64 (38): 7104-7113.
- [49] Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity [J]. *Life Sci*, 2002, 71 (13): 1579-1589.
- [50] Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide [J]. *J Med Food*, 2006, 9 (2): 205-213.
- [51] Cho SJ, Ryu JH, Surh YJ. Ajoene, a major organosulfide found in crushed garlic, induces NAD(P)⁺H: quinone oxidoreductase expression through nuclear factor E2-related factor-2 activation in human breast epithelial cells [J]. *J Cancer Prev*, 2019, 24 (2): 112-122.
- [52] 田莉, 杨秀伟, 王莹, 等. 顺式-和反式-阿霍烯在 Caco-2 细胞模型中的体外摄取、转运和外排特性 [J]. *药学学报*, 2007, 43 (1): 87-92.
- [53] Rahman MA, Midde NM, Wu XX, et al. Kinetic characterizations of diallyl sulfide analogs for their novel role as CYP2E1 enzyme inhibitors [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2017, 5 (5): e00362.
- [54] Wu CC, Sheen LY, Chen HW, et al. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (2): 378-383.
- [55] Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, et al. Mechanisms of protection against aflatoxin B₁ genotoxicity in rats treated by orga-

- nosulfur compounds from garlic [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23 (8): 1335-1341.
- [56] Davenport DM, Wargovich MJ. Modulation of cytochrome P450 enzymes by organosulfur compounds from garlic [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43 (12): 1753-1762.
- [57] Haber D, Siess MH, Canivenc-Lavier MC, et al. Differential effects of dietary diallyl sulfide and diallyl disulfide on rat intestinal and hepatic drug-metabolizing enzymes [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1995, 44 (4): 423-434.
- [58] 刘燕. 用于治疗慢性阻塞性肺病的二烯丙基二硫醚和左旋薄荷醇复方制剂的初步成药性评价 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [59] Wang S, Li M, Wang XJ, et al. Diallyl trisulfide attenuated n-hexane induced neurotoxicity in rats by modulating P450 enzymes [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 265: 1-7.
- [60] Kim ND, Kim SG, Kwak MK. Enhanced expression of rat microsomal epoxide hydrolase gene by organosulfur compounds [J]. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47 (3): 541-547.
- [61] 牟感恩, 周则卫. S-烯丙基-L-半胱氨酸主要药理活性研究进展 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2017, 40 (6): 465-470.
- [62] Johnson P, Loganathan C, Iruthayaraj A, et al. S-allyl cysteine as potent anti-gout drug: insight into the xanthine oxidase inhibition and anti-inflammatory activity [J]. *Biochimie*, 2018, 154: 1-9.
- [63] Yu Q, Lee YY, Xia ZY, et al. S-allylmercaptocysteine improves nonalcoholic steatohepatitis by enhancing AHR/NRF2-mediated drug metabolising enzymes and reducing NF- κ B/I κ B α and NLRP3/6-mediated inflammation [J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60 (2): 961-973.
- [64] 杨民. S-烯丙基巯基半胱氨酸的代谢、抗慢阻肺机制及联合用药研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [65] Lubet RA, Dragnev KH, Chauhan DP, et al. A pleiotropic response to phenobarbital-type enzyme inducers in the F344/NCr rat. Effects of chemicals of varied structure [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43 (5): 1067-1078.
- [66] Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM, et al. Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 154 (1): 50-58.
- [67] Ibrahim SS, Nassar NN. Diallyl sulfide protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver tumorigenesis: role of aldose reductase [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14 (40): 6145-6153.
- [68] Sueyoshi T, Green WD, Vinal K, et al. Garlic extract diallyl sulfide (DAS) activates nuclear receptor CAR to induce the Sult1e1 gene in mouse liver [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e21229.
- [69] Chittechath M, Kuttan G. Radioprotective activity of naturally occurring organosulfur compounds [J]. *Tumori*, 2006, 92 (2): 163-169.
- [70] Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, et al. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides [J]. *Cancer Lett*, 1997, 120 (2): 195-201.
- [71] Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, et al. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from Allium is associated with phase II enzyme induction [J]. *Mutat Res*, 2001, 495 (1-2): 135-145.
- [72] Haber D, Siess MH, De Waziers I, et al. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rat fed naturally occurring allyl sulphides [J]. *Xenobiotica*, 1994, 24 (2): 169-182.
- [73] Fukao T, Hosono T, Misawa S, et al. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42 (5): 743-749.
- [74] Lii CK, Tsai CW, Wu CC. Garlic allyl sulfides display differential modulation of rat cytochrome P450 2B1 and the placental form glutathione S-transferase in various organs [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54 (14): 5191-5196.
- [75] Tsai CW, Chen HW, Yang JJ, et al. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55 (3): 1019-1026.
- [76] Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase [J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17 (5): 1041-1044.
- [77] Zhou T, Arya V, Zhang L. Comparing various in vitro prediction methods to assess the potential of a drug to inhibit P-glycoprotein (P-gp) transporter in vivo [J]. *J Clin Pharmacol*, 2019, 59 (8): 1049-1060.
- [78] Akamine Y, Yasui-Furukori N, Uno T. Drug-drug interactions of P-gp substrates unrelated to CYP metabolism [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20 (2): 124-129.
- [79] 杨丹, 颜琼, 罗德兰, 等. 大蒜素对 5-氟尿嘧啶治疗肝癌的增效作用及机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39 (1): 72-75.
- [80] Arora A, Seth K, Shukla Y. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by diallyl sulfide in K562 leukemic cells and in mouse liver [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25 (6): 941-949.
- [81] Lai KC, Kuo CL, Ho HC, et al. Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colo 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Phyto-medicine*, 2012, 19 (7): 625-630.
- [82] Demeule M, Brossard M, Turcotte S, et al. Diallyl disulfide, a chemopreventive agent in garlic, induces multidrug resistance-associated protein 2 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324 (2): 937-945.
- [83] Teyssier C, Siess MH. Metabolism of dipropyl disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28 (6): 648-654.
- [84] Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver [J]. *Planta Med*, 1992, 58 (4): 301-305.
- [85] Sun XH, Guo T, He J, et al. Determination of the concentration of diallyl trisulfide in rat whole blood using gas chromatography with electron-capture detection and identification of its major metabolite with gas chromatography mass spectrometry [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2006, 126 (7): 521-527.
- [86] Sheen LY, Wu CC, Lii CK, et al. Metabolites of diallyl disulfide and diallyl sulfide in primary rat hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37 (12): 1139-1146.
- [87] Germain E, Chevalier J, Siess MH, et al. Hepatic metabolism

- of diallyl disulphide in rat and man [J]. *Xenobiotica*, 2003, 33 (12): 1185-1199.
- [88] Germain E, Auger J, Ginies C, et al. In vivo metabolism of diallyl disulphide in the rat: identification of two new metabolites [J]. *Xenobiotica*, 2002, 32 (12): 1127-1138.
- [89] Liu Y, Li A, Jiang XY, et al. Metabolism and pharmacokinetics studies of allyl methyl disulfide in rats [J]. *Xenobiotica*, 2019, 49 (1): 90-97.
- [90] Li A, Liu Y, Zhu XS, et al. Protective effect of methylallyl sulfone in the development of cigarette smoke extract-induced apoptosis in rats and HFL-1 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498 (3): 627-632.
- [91] 成玮, 陈平. 我国慢性阻塞性肺疾病的特点及治疗现状 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (10): 2228-2230.
- [92] 彭淮淮, 梁桂宾, 何智辉. 内皮祖细胞和慢性阻塞性肺疾病 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (2): 382-387.
- [93] 黄敏轩, 金洁, 马红映. 丙烯醛致慢性阻塞性肺疾病发病机制 [J]. *生命的化学*, 2022, 42 (3): 424-429.
- [94] 谭琳. 慢性阻塞性肺疾病的发病机制 [J]. *家庭生活指南*, 2020, (11): 185-186.
- [95] Yang M, Wang YJ, Zhang YC, et al. S-allylmercapto-l-cysteine modulates MUC5AC and AQP5 secretions in a COPD model via NF-small ka, Cyrillic B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39: 307-313.
- [96] Zhu XS, Jiang XY, Li A, et al. S-allylmercaptocysteine attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through suppression of apoptosis, oxidative stress, and inflammation [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (2): 166.
- [97] Garnock-Jones KP. Roflumilast: a review in COPD [J]. *Drugs*, 2015, 75 (14): 1645-1656.
- [98] Keam SJ, Keating GM. Tiotropium bromide. A review of its use as maintenance therapy in patients with COPD [J]. *Treat Respir Med*, 2004, 3 (4): 247-268.
- (收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2023-02-13)

治疗诱导性衰老在胶质母细胞瘤中的研究进展

曾女金, 邢孟韬, 何玲* (中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要: 胶质母细胞瘤 (GBM) 是一种恶性程度最高的脑肿瘤, 主要治疗方法是最大程度手术切除, 后继以化疗和放疗。DNA 损伤性化疗药物和辐照可能引起细胞广泛发生衰老, 被称为“治疗诱导性衰老” (TIS)。在治疗早期, TIS 起到抑制肿瘤发生发展的有利作用, 但放化疗会导致肿瘤和正常组织中衰老细胞累积, 产生不利影响。本文旨在综述 TIS 在 GBM 治疗中的研究进展, 对衰老细胞通过重编程和重塑肿瘤微环境等产生促瘤作用的具体机制重点阐述, 并展望新型抗衰老疗法——senolytics 在 GBM 治疗中的挑战和机遇, 为提高 GBM 治疗效果提供指导, 推动细胞衰老在 GBM 治疗的基础与临床应用研究。

关键词: 胶质母细胞瘤; 治疗诱导性衰老; 衰老消融剂

中图分类号: R739.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1329-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.033

Advanced in the therapy-induced senescence in glioblastoma

ZENG Nv-jin, XING Meng-tao, HE Ling* (*College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: Glioblastoma (GBM) is the most malignant type of primary brain tumor, and the main treatment includes maximum surgical resection, followed by chemotherapy and radiotherapy. DNA-damaging chemotherapeutic drugs and radiation can cause widespread cellular senescence, a phenomenon called therapy-induced senescence (TIS). While TIS may exert tumor-suppressive effects in the early stage of treatment, chemoradiotherapy eventually leads to the accumulation of senescent cells in both tumor and normal tissues, resulting in unfavorable clinical outcomes. This review summarized the

基金项目: 中央高校基本科研业务费 (No.2632021PY05)。

作者简介: 曾女金, 女, 硕士研究生, 主要从事胶质母细胞瘤病理机制研究及药物靶点的发现, email: 2433716958@qq.com

*通信作者: 何玲, 女, 教授, 主要从事神经药理学研究, email: hexyz@163.com

research progress of TIS in the treatment of GBM, with a focus on the mechanisms by which senescent cells promote tumorigenesis through reprogramming and reshaping the tumor microenvironment. We also prospected the challenges and opportunities of senolytics, a novel anti-senescence therapy, in the treatment of GBM, hoping to help improve the outcome of GBM treatment and promote further research in basic and clinical application in GBM treatment.

Key words: glioblastoma; therapy-induced senescence; senolytics

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是一种常见的脑肿瘤, 恶性程度高, 被世界卫生组织归类为 IV 级胶质瘤, 年发病率约 4.03/10 万^[1]。目前针对胶质瘤的治疗以最大程度手术切除为主, 辅以放化疗。但综合治疗后, 大多数患者仍在相对较短的时间内复发, 且复发肿瘤往往更具侵袭性和耐药性, 导致患者预后不良, 中位生存期少于两年^[2]。减少 GBM 复发是亟待解决的临床问题。

DNA 损伤性化疗药物和辐照可能引起肿瘤细胞和非肿瘤细胞的衰老, 这种现象被称为治疗诱导性衰老 (therapy-induced senescence, TIS)^[3]。GBM 具有高侵袭性, 虽然目前对 GBM 的最大安全性切除通常包括肿瘤以外的区域, 但切除边缘仍可能存在残留 GBM 细胞^[4]。浸润到正常组织中的肿瘤细胞在放化疗作用下被诱导衰老, 生长增殖受到抑制, 使患者受益。但越来越多的临床及临床前研究证据表明, 放化疗会引起肿瘤和正常组织中衰老细胞累积, 持续增加的衰老细胞可能分泌多种促肿瘤因子, 诱导 GBM 复发^[5-6]; 且残留 GBM 细胞在治疗压力诱导的衰老状态下可能转化为对治疗有更高抗性的分子亚型, 产生恶性更强的复发肿瘤^[7-8], 引起患者不良预后, 表现出比初发时更高的转移率和病死率。基于衰老细胞在肿瘤治疗中的双重作用, 完善 TIS 有关治疗策略成为众多科学家关注的焦点。本文就 TIS 对 GBM 治疗的影响作一综述, 旨在为降低 GBM 复发和研发 GBM 治疗药物提供参考。

1 放化疗引起 GBM 细胞衰老

细胞衰老 (cellular senescence) 是发生在二倍体细胞中的一种稳定的细胞周期停滞现象, 最早于 19 世纪 60 年代由 Hayflick 和 Moorhead 提出^[9]。体外培养的人成纤维细胞在连续培养 50 ~ 70 代后即丧失增殖能力并进入生长停滞状态, 达到“Hayflick 极限”, 这种衰老类型被命名为复制型衰老 (replicative senescence)。除复制型衰老外, 在各种压力刺激下, 细胞也会发生衰老, 这种衰老没有明显端粒缺失, 被命名为早

衰, TIS 就是早衰的一种^[3]。

放化疗引起 GBM 细胞广泛发生衰老。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是治疗 GBM 的一线化疗药物, 通过诱导 O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶-methylguanine, O6MeG) 发挥细胞毒性作用, 诱导 DNA 双链断裂和细胞死亡。关于替莫唑胺的作用机制研究发现, 除诱导凋亡和自噬外, 替莫唑胺还可引起胶质瘤细胞大量发生衰老^[10]。近期的一项研究指出, 使用替莫唑胺处理 GBM 细胞后, 衰老细胞逐渐增多, 第 8 日时达到 80%, 是凋亡细胞数量的 4 倍, 这表明衰老可能是 TMZ 治疗后的主要反应^[4]。同样, 辐照放疗也会诱导细胞衰老^[11-12], 实验发现辐照导致 60% ~ 80% 的 GBM 细胞生长停滞, 进入衰老状态, 白细胞介素 (IL)-6、IL-1 α 、IL-1 β 等衰老相关因子表达增加, NF- κ B 途径被激活。

通常而言, TIS 以一种细胞自主调控的方式限制 DNA 损伤细胞的增殖, 从而阻止肿瘤发展。因此, 以各种治疗手段加速肿瘤细胞的衰老成为既往肿瘤治疗的一大理论基石。各种临床常见的化疗药物, 如烷化剂、铂类药物, 都是常见的细胞衰老诱导剂; 部分分子靶向药物也可导致细胞衰老, 达到治疗肿瘤的目的^[13]。然而, 随着肿瘤研究的深入, TIS 带来的潜在问题逐渐暴露。肿瘤细胞经化疗或放射治疗后进入衰老状态, 衰老肿瘤细胞通过退出细胞周期来躲避化疗药物的直接细胞毒性作用, 可能在治疗结束后幸存, 进入蛰伏状态, 伺机而动, 引起肿瘤复发。

2 治疗压力诱导衰老细胞重编程

衰老在过去一直被认为是一种不可逆转的生长停滞状态, 但最近的研究表明, 一些已表现出衰老的肿瘤细胞亚群可能逃逸衰老, 恢复增殖能力, 且恢复的细胞可能比亲本细胞群更具侵袭性^[14]。基于大规模的表现遗传重编程和增强的可塑性, 衰老的肿瘤细胞可能在治疗压力下进化, 获得更恶性的表型特征, 出现治疗抗性, 进而引起肿瘤复发。替莫唑胺诱导的 DNA 损伤是引起 GBM 细胞发生衰老

的主要触发因素, 该过程由 MRN-ATR-CHEK1 途径的激活引发, 并依赖于 CDC25c 降解^[15], 此外该过程还伴随着 E2F1/DP1 复合物的破坏, 导致 DNA 修复因子 EXO1、MSH2、MSH6 和 RAD51 的下调, 进而引起 DNA 错配修复和同源重组下调。DNA 损伤修复能力下降, 积累遗传改变, 可能阻碍衰老的诱导和维持, 包括 *CDKN2A* 纯合子丢失, 或 *TP53* 相关途径突变^[14]。

还有研究揭示, TIS 可能通过促进细胞重编程诱导干性表型来推动肿瘤生长^[16-17]。衰老的关键组件, 如 p16^{INK4a}、p21^{CIP1}、p53 以及组蛋白 H39 号位赖氨酸处的三甲基化 (H3K9me3) 等, 也是调节细胞干性的关键因子, 表明细胞衰老和细胞干性由重叠的信号网络共同调节^[16]。衰老相关的干性是一种意料之外的细胞自主特征, 在逃离细胞周期阻滞后表现出高侵袭性的生长潜力, 并在复发肿瘤中富集。根据基因特征, 胶质母细胞瘤干细胞 (glioblastoma stem cells, GSCs) 可分为前神经型 (proneural GSCs, pGSCs) 和间质型 (mesenchymal GSCs, mGSCs)^[18]。在肿瘤治疗中, 原发性 GBM 会倾向于发生原神经-间质转化 (proneural-mesenchymal transition, PMT)^[19], pGSCs 在放化疗期间, 原神经样相关特征 (如 CD133、OLIG2) 减少, 间充质样基因特征 (如 CD44、YKL40) 上调, 转化为 mGSCs, 且复发 GBM 中 mGSCs 显著增加。PMT 过程是 GBM 复发的关键因素^[20], 包含多个信号通路的激活, 涉及 NF- κ B、Notch1、C/EBP- β 等关键调节因子。有趣的是, 这些信号通路也在 TIS 中被激活^[21], 提示 GSCs 的 PMT 过程与衰老相关基因表达特征具有相似性。衰老细胞重编程可能促进 GSCs 发生干细胞亚型转化, 侵袭性增强, 恶性程度变高, 导致复发和患者不良预后。

3 治疗诱导脑内衰老细胞积累

除了对肿瘤细胞的影响外, 放化疗手段也可能引起脑中非肿瘤细胞发生衰老^[6]。星形胶质细胞是大脑中最丰富的细胞类型, 研究发现, 放疗会引起小鼠大脑中广泛的细胞衰老^[22-24], 尤其是星形胶质细胞的衰老, 且辐照后衰老的星形胶质细胞促进了小鼠胶质瘤的生长, 侵袭性增强。衰老基质细胞通过分泌多种促肿瘤因子, 促进邻近肿瘤细胞的生长, 包括生长因子、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分等。比如衰老星形胶质细胞过量分泌肝细胞生长因子 (HGF), 激活间质表

皮转化因子 (cellular-mesenchymal to epithelial transition factor, c-MET), 促进肿瘤细胞在体外的迁移和侵袭; 衰老星形胶质细胞也会产生过量的纤连蛋白, 促进细胞存活和侵袭^[22]。衰老星形胶质细胞分泌的 IL-6 和 IL-8, 可以激活胶质瘤细胞中的 NF- κ B 和 STAT3 信号传导, 以维持其干性并促进其侵袭性。此外, 研究发现星形胶质细胞体外诱导衰老后, 其培养基中 c-Myc 水平升高, 当与 GBM 细胞共培养时, 增加的 c-Myc 可以促进 GBM 细胞增殖, 并提高后者对替莫唑胺的耐药性^[25]。总之, 衰老基质细胞可能通过旁分泌作用促进肿瘤复发, 且导致复发肿瘤的治疗抗性。

胶质母细胞瘤常发生于年龄较大的人, 其中确诊为异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 野生型肿瘤的患者中位年龄是 62 岁^[5, 26]。确诊时的年龄与生存率成负相关, 这种不良预后主要归因于肿瘤切除程度以及和高龄相关的体质虚弱或恢复不佳, 但有学者指出这可能在一定程度上也与大脑老化有关^[5]。脑中增多的衰老细胞既是人衰老的原因, 也促进了癌症的发展, 且年龄相关性炎症已在多种肿瘤的发生发展中被证明^[27]。矛盾的是, 放射治疗和各种抗癌化疗药物引起肿瘤细胞和非肿瘤细胞的衰老, 造成组织内衰老细胞大量增加; 且 TIS 会降低免疫系统对衰老肿瘤细胞的去除效率, 进一步导致衰老细胞在肿瘤和治疗小鼠的正常组织中积累^[3]。这意味着当对 GBM 患者采用放化疗手段治疗时, 本身就可能诱导其脑部衰老细胞的增加, 这可能导致进一步的不良预后, 包括复发。

4 衰老相关分泌表型的双重作用

衰老细胞具有增强的分泌活性, 产生衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 包括炎症介质、生长因子、MMPs 等^[3, 27]。在治疗早期, 通过 SASP, 衰老细胞可以旁分泌诱导邻近细胞衰老, 起到阻止肿瘤生长的屏障作用。且 SASP 由多种趋化因子和细胞因子组成, 可激活免疫监视, 并带来先天性和适应性免疫反应, 清除衰老和增殖的肿瘤细胞, 增强衰老对肿瘤的抑制能力。

但随着衰老细胞的增多以及衰老进程的加速, 持续激活的 SASP 信号可能反过来促进肿瘤的发生和发展。SASP 中有多种炎症因子, 过量释放的炎症因子可能引起局部和全身的炎症, 促进多种疾病发展 (包括肿瘤), 引起患者不良预后^[28-29]。SASP 中的多种因子有促肿瘤的特性, 如 MMP3

可以促进肿瘤侵袭；血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）可以促进肿瘤血管生成。SASP 的持续激活还能重塑肿瘤微环境，促进肿瘤发生发展，引起 GBM 复发^[30]。在异种移植小鼠模型中，与仅注射未照射的对照细胞相比，联合注射经照射的、衰老的原代 GBM 细胞和未照射的 GBM 将产生更大的、侵袭性更强的肿瘤块^[31]。另外，研究发现，当衰老细胞出现在疾病后期时，SASP 会抑制免疫监视，帮助衰老逃逸，从而促进肿瘤复发和转移^[3]。

5 GBM 治疗的新方向

衰老和 SASP 在肿瘤治疗中是一把双刃剑，如何更好地发挥 TIS 在肿瘤治疗中的抑癌作用而避免其促癌作用，是目前完善肿瘤治疗方案的关键。衰老细胞的持续存在和 SASP 的负面作用是主要问题，因此多项研究开始聚焦于选择性清除衰老细胞或减少衰老细胞的产生，衰老消融剂（senolytics），是一类选择性清除衰老细胞的药物^[32-33]，包括靶向性小分子化合物和天然化合物。

5.1 BCL-2 蛋白家族抑制剂

细胞在治疗压力下发生衰老，相较于发生凋亡这种直接的细胞死亡，是一种更温和的细胞反应。此时细胞虽周期停滞，但仍保持较高的代谢水平和细胞活力^[14]。实际上，凋亡抗性是衰老细胞的特征之一，可能有助于它们在衰老组织和化疗后积聚。NF- κ B 在衰老细胞中被激活，诱导抗凋亡因子产生，抑制肿瘤细胞凋亡，保持细胞活力和代谢。BCL-2 蛋白家族，包括 Bcl2、BclW、Bcl-XL 和 Mcl-1，在细胞死亡相关过程（包括自噬和凋亡）中起核心作用，在衰老细胞中表达上调^[34]；因此，针对这些蛋白的化合物作为衰老消融剂被广泛研究。研究显示，BCL-2 家族抑制剂显示出缓解年龄相关疾病（如肿瘤）的潜力^[33]。ABT-737 是最早发现的 BclW/Bcl-XL 抑制剂之一，它能在体内和体外优先诱导衰老细胞的凋亡^[35]。然而，ABT-737 的口服利用度较低，于是一种可口服类似物 ABT-263（Navitoclax）被开发出来，并作为第一代 Bcl2/Bcl-XL 抑制剂进入临床试验^[36]。无论是替莫唑胺还是辐照诱导的衰老 GBM 细胞系，都可以被 ABT-263 选择性地清除^[14]。实验揭示，当对 C57BL/6J 小鼠辐照一段时间后再移植肿瘤，与对照组相比，预先使用 ABT-263 消除衰老细胞的小鼠肿瘤生长更慢，存活期更长^[22]。

5.2 p53 再激活

p53 是一种常见的肿瘤抑制蛋白，激活的 p53 会诱导细胞周期停滞在 G₁、G₂ 和 S 期，以便基因组

DNA 在合成受损时有时间修复自己，从而防止异常细胞增殖和保护癌基因应激的基因组完整性^[37]。恢复细胞核内 p53 的水平被认为是治疗多种癌症的潜在方法，包括 GBM^[38]。小鼠双微体扩增基因 2（mouse double minute 2, MDM2）诱导 p53 降解，其抑制剂可以有效恢复 p53 水平，尽管这种作用仅在具有 MDM2 扩增和突变型 TP53 的 GBM（8% ~ 10%）中有效^[38]。FOXO4（Forkhead box protein O4）可以整合 p53 以促进周期停滞并阻止其引发细胞凋亡^[39]。实验发现，使用细胞穿透性阻断肽可以从 FOXO4 中解离 p53，使之重定位到线粒体，继而引起半胱天冬酶依赖性凋亡^[40]。但 FOXO4-p53 干扰是否能在 GBM 中起作用仍有待验证。

5.3 HSP90 抑制剂

热休克蛋白 90（heat shock protein, HSP90）是一种常见的分子伴侣，已被证明在包括 GBM 在内的多种癌症中发挥着促肿瘤的作用^[41]。2017 年，HSP90 抑制剂首次被发现能作为一种衰老消融剂杀伤衰老癌细胞^[42]，其机制是抑制 HSP90 对客户蛋白的稳定作用，从而抑制客户蛋白的促衰老癌细胞存活信号。HSP90 抑制剂作为抗 GBM 药物已被广泛研究，但这主要是基于其在抑制 GBM 细胞活力和增殖方面的作用，其在 GBM 中清除衰老细胞的作用目前还没有报道。根据现有证据，我们有理由认为 HSP90 抑制剂可以作为替莫唑胺的辅助药物，改善临床治疗效果。

5.4 活性氧（reactive oxygen species, ROS）清除剂

ROS 水平升高对于诱导和维持细胞衰老状态具有潜在的关键作用^[43]。放化疗通常引起肿瘤细胞和基质细胞 DNA 损伤，导致 ROS 等自由基水平增加，进而引起氧化应激反应，进一步导致衰老发生。高水平的 ROS 可直接作用于 DNA，触发 DNA 损伤反应及激活 NF- κ B、MAPK 等通路，引起衰老。ROS 还可能促进肿瘤的上皮-间充质转化过程和干性的获得，促进肿瘤发生发展^[44]。研究发现，与对照组细胞相比，使用替莫唑胺诱导衰老后的细胞中 ROS 水平显著上调^[4]。清除 ROS、NO 等自由基，降低氧化应激反应可能是减少衰老细胞产生，改善 GBM 治疗效果的有效手段。

5.5 天然化合物

几种植物来源的天然化合物也展示出有效清除衰老细胞的作用，且这些化合物具有低毒性的优势，表现出转化为临床药物的巨大潜力^[32]。达沙替尼是已被美国 FDA 批准用于治疗白血病的药物，

是一种酪氨酸激酶抑制剂，它可以通过选择性抑制 Src 激酶促进肾上腺素受体依赖的细胞凋亡^[32, 45]。当达沙替尼和槲皮素（一种天然类黄酮）联合使用时，可以有效杀死衰老细胞，缓解小鼠早衰症状，改善年龄相关疾病，如阿尔茨海默病^[32, 45]。非瑟汀（fisetin）是一种存在于多种蔬菜和水果的天然类黄酮，新的一项研究揭示非瑟汀可以有效降低替莫唑胺诱导的衰老细胞数量。同样作用的还有青蒿琥酯，一种青蒿素的半合成衍生物。姜黄素作为衰老清除剂的相关研究也有很多，其已被证明在脑相关疾病和癌症中发挥有益作用。白藜芦醇也被证明可通过加强替莫唑胺诱导的胶质瘤细胞衰老来起作用^[14]。此外，白藜芦醇和其他多酚能够抑制 ROS 的形成并限制神经元中的细胞衰老^[45]，从而减少衰老基质细胞对 GBM 的促进作用。

抗衰老治疗的相关靶点总结见表 1。

表 1 抗衰老治疗在 GBM 中的潜在靶点

Tab 1 Potential targets for anti-senescence therapies against GBM

靶点	作用机制
BCL-2	抗凋亡因子，帮助衰老细胞存活 ^[3, 34]
BCL-XL	抗凋亡因子，帮助衰老细胞存活 ^[35]
MDM2	促进 p53 降解 ^[38]
FOXO4	整合 p53，抑制 p53 活性 ^[39-40]
mTOR	驱动衰老发生 ^[46-47]
HSP90	稳定相关癌蛋白 ^[42]
ROS	促进衰老发生；诱导衰老基质细胞对 GBM 的促进作用 ^[43]

6 结语

随着对肿瘤发生发展认识的逐步加深，细胞衰老在肿瘤治疗中的负面影响逐渐引起研究者的重视，尤其是持续存在的衰老细胞。GBM 具有高度可塑性，在治疗压力下可能发生表型转变，逃逸衰老后引起更恶性的复发肿瘤；且 TIS 引起肿瘤和非肿瘤细胞的分泌表型改变，可能建造促肿瘤生长的微环境，诱导残留病灶复发，给 GBM 的治愈造成极大的困难。目前，抗衰老治疗在 GBM 中存在较多空白，相关药物是否安全有效有待进一步研究。了解不同类型的衰老及其在残留病灶中的作用，以开发抗衰老疗法来对抗化疗和放射治疗引起的耐药性，是未来治疗 GBM，提高患者生存率有希望的途径。

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] Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70 (4): 299-312.

[3] Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, et al. Cellular senescence: aging, cancer, and injury [J]. Physiol Rev, 2019, 99 (2): 1047-1078.

[4] Beltzig L, Schwarzenbach C, Leukel P, et al. Senescence is the main trait induced by temozolomide in glioblastoma cells [J]. Cancers (Basel), 2022, 14 (9): 2233.

[5] Putavet DA, De Keizer PLJ. Residual disease in glioma recurrence: a dangerous liaison with senescence [J]. Cancers (Basel), 2021, 13 (7): 1560.

[6] Demaria M, O'leary MN, Chang J, et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse [J]. Cancer Discov, 2017, 7 (2): 165-176.

[7] Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Murray GF, et al. Tumor cell escape from therapy-induced senescence [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 162: 202-212.

[8] Yang L, Fang J, Chen J. Tumor cell senescence response produces aggressive variants [J]. Cell Death Discov, 2017, 3: 17049.

[9] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1961, 25: 585-621.

[10] Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e55665.

[11] Beltzig L, Christmann M, Kaina B. Abrogation of cellular senescence induced by temozolomide in glioblastoma cells: search for senolytics [J]. Cells, 2022, 11 (16): 2588.

[12] Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M, et al. An interplay between senescence, apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme-role in pathogenesis and therapeutic perspective [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (3): 889.

[13] Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, et al. Therapy-induced senescence in cancer [J]. J Nat Cancer Inst, 2010, 102 (20): 1536-1546.

[14] Rahman M, Olson I, Mansour M, et al. Selective vulnerability of senescent glioblastoma cells to Bcl-XL inhibition [J]. Mol Cancer Res, 2022, 20 (6): 938-948.

[15] Aasland D, Gotzinger L, Hauck L, et al. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of atr-chk1, p21, and NF-kappab [J]. Cancer Res, 2019, 79 (1): 99-113.

[16] Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness [J]. Nature, 2018, 553 (7686): 96-100.

[17] Triana-Martinez F, Loza MI, Dominguez E. Beyond tumor suppression: senescence in cancer stemness and tumor dormancy [J]. Cells, 2020, 9 (2): 346.

[18] Wang L, Babikir H, Muller S, et al. The phenotypes of proliferating glioblastoma cells reside on a single axis of

- variation [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9 (12): 1708-1719.
- [19] Segerman A, Niklasson M, Haglund C, et al. Clonal variation in drug and radiation response among glioma-initiating cells is linked to proneural-mesenchymal transition [J]. *Cell Rep*, 2016, 17 (11): 2994-3009.
- [20] Hua TNM, Oh J, Kim S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a theragnostic target for mesenchymal-type glioblastoma patients [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52 (4): 629-642.
- [21] Hoare M, Ito Y, Kang TW, et al. Notch1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18 (9): 979-992.
- [22] Fletcher-Sananikone E, Kanji S, Tomimatsu N, et al. Elimination of radiation-induced senescence in the brain tumor microenvironment attenuates glioblastoma recurrence [J]. *Cancer Res*, 2021, 81 (23): 5935-5947.
- [23] Turnquist C, Beck JA, Horikawa I, et al. Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by delta133p53 [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21 (4): 474-485.
- [24] Von Bartheld CS, Bahney J, Herculanu-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting [J]. *J Comp Neurol*, 2016, 524 (18): 3865-3895.
- [25] Hallal S, Mallawaarachy DM, Wei H, et al. Extracellular vesicles released by glioblastoma cells stimulate normal astrocytes to acquire a tumor-supportive phenotype via p53 and myc signaling pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56 (6): 4566-4581.
- [26] Alvarez-Satta M, Moreno-Cugnon L, Matheu A. Primary cilium and brain aging: role in neural stem cells, neurodegenerative diseases and glioblastoma [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 52: 53-63.
- [27] Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, et al. Ageing: from inflammation to cancer [J]. *Immun Ageing*, 2018, 15: 1.
- [28] Carreno G, Guiho R, Martinez-Barbera JP. Cell senescence in neuropathology: a focus on neurodegeneration and tumours [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2021, 47 (3): 359-378.
- [29] Cortesi M, Zanoni M, Pirini F, et al. Pancreatic cancer and cellular senescence: tumor microenvironment under the spotlight [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23 (1): 254.
- [30] Ruhland MK, Loza AJ, Capietto AH, et al. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11762.
- [31] Halliday J, Helmy K, Pattwell SS, et al. In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (14): 5248-5253.
- [32] Kirkland JL, Tchkonja T. Senolytic drugs: from discovery to translation [J]. *J Intern Med*, 2020, 288 (5): 518-536.
- [33] Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (6): 340-355.
- [34] Calcinotto A, Alimonti A. Aging tumour cells to cure cancer: "pro-senescence" therapy for cancer [J]. *Swiss Med Wkly*, 2017, 147: w14367.
- [35] Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of bcl-w and bcl-xl [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11190.
- [36] Zhu Y, Tchkonja T, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the bcl-2 family of anti-apoptotic factors [J]. *Ageing Cell*, 2016, 15 (3): 428-435.
- [37] Moir JA, White SA, Mann J. Arrested development and the great escape—the role of cellular senescence in pancreatic cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 57: 142-148.
- [38] Verreault M, Schmitt C, Goldwirt L, et al. Preclinical efficacy of the mdm2 inhibitor rg7112 in mdm2-amplified and tp53 wild-type glioblastomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (5): 1185-1196.
- [39] Gurau F, Baldoni S, Praticchizzo F, et al. Anti-senescence compounds: a potential nutraceutical approach to healthy aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 46: 14-31.
- [40] Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging [J]. *Cell*, 2017, 169 (1): 132-147.
- [41] Van Ommeren R, Staudt MD, Xu H, et al. Advances in hsp27 and hsp90-targeting strategies for glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2016, 127 (2): 209-219.
- [42] Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, et al. Identification of hsp90 inhibitors as a novel class of senolytics [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 422.
- [43] Davalli P, Mitic T, Caporali A, et al. Ros, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3565127.
- [44] Chatterjee R, Chatterjee J. Ros and oncogenesis with special reference to emt and stemness [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99 (2-3): 151073.
- [45] Wissler GEO, Zhu Y, Weigand BM, et al. Cellular senescence in aging and age-related diseases: implications for neurodegenerative diseases [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2020, 155: 203-234.
- [46] Liu H, Qiu W, Sun T, et al. Therapeutic strategies of glioblastoma (gbm): the current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (4): 1781-1804.
- [47] Walters HE, Cox LS. Mtorc inhibitors as broad-spectrum therapeutics for age-related diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (8): 2325.

(收稿日期: 2022-10-28; 修回日期: 2023-01-13)

衍生化高效液相色谱法测定醋酸西曲瑞克中 10 种手性氨基酸的含量

韩承刚^{1, 2}, 李明显³, 姬丽芳³, 沙向阳³, 郑枫^{1, 2*} (1. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 211198; 2. 浙江省原料药安全研究中心(工艺技术创新平台), 杭州 310018; 3. 南京锐志生物医药有限公司, 南京 211100)

摘要: **目的** 衍生化高效液相色谱法(HPLC)测定醋酸西曲瑞克中 10 种手性氨基酸的含量。**方法** 醋酸西曲瑞克水解后, 采用 Marfey 法进行柱前衍生化反应, 使用 Heder ODS-2 C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.065% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 按程序进行梯度洗脱, 紫外检测器检测波长为 340 nm。**结果** 醋酸西曲瑞克水解后各氨基酸之间分离度良好, LOD 和 LOQ 的浓度均分别为 0.68 μmol·L⁻¹ 和 2.04 μmol·L⁻¹, 组成醋酸西曲瑞克的 10 种手性氨基酸线性范围为 10.20 ~ 24.49 μmol·L⁻¹。**结论** 本方法专属性强, 准确度高, 可用于同时测定醋酸西曲瑞克中 10 种手性氨基酸的含量。

关键词: 醋酸西曲瑞克; 含量测定; 手型异构体; 高效液相色谱法; Marfey 法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1335-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.034

Determination of 10 chiral amino acids in cetorelix acetate by derivatization HPLC method

HAN Cheng-gang^{1, 2}, LI Ming-xian³, JI Li-fang³, SHA Xiang-yang³, ZHENG Feng^{1, 2*} (1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 2. Zhejiang Center for Safety Study of Drug Substances (Industrial Technology Innovation Platform), Hangzhou 310018; 3. Nanjing Raise Biomedical Co., Ltd., Nanjing 211100)

Abstract: Objective To determine the content of 10 chiral amino acids in cetorelix acetate based on the pre-column derivatization HPLC method. **Methods** After hydrolysis of cetorelix acetate, Marfey's method was used for the pre-column derivatization reaction. Heder ODS-2 C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, with gradient elution of 0.065% formic acid solution and acetonitrile as the mobile phase. The detection wavelength of the ultraviolet detector was 340 nm. **Results** All the 10 chiral amino acids in cetorelix acetate were well separated. The concentration of LOD and LOQ were 0.68 μmol·L⁻¹ and 2.04 μmol·L⁻¹ respectively. The linear range was 10.20 ~ 24.49 μmol·L⁻¹. **Conclusion** This method is specific and accurate for the simultaneous content determination of the 10 chiral amino acids in cetorelix acetate.

Key words: cetorelix acetate; content determination; chiral amino acid; HPLC; Marfey's method

醋酸西曲瑞克(cetorelix acetate)是一种由 10 个氨基酸组成的人工合成多肽(绝对构型见图 1), 是第三代促性腺激素释放激素拮抗剂的代表, 可以促排卵获取适当数量的高质量成熟卵母细胞^[1]。

多肽类药物的生物活性与其氨基酸的手性密切相关。在研究醋酸西曲瑞克一级结构时, 需要将多肽在 6 mol·L⁻¹ 的盐酸和 110 °C 条件下反应, 该过程可能会引起手性氨基酸发生外消旋化^[2-3]。

作者简介: 韩承刚, 男, 硕士研究生, 主要从事药物现代仪器分析工作, email: cpuchenggang@163.com *通信作者: 郑枫, 男, 教授, 主要从事现代分析技术应用、创新药物体内外质量评价研究, email: cpu_analyst@126.com

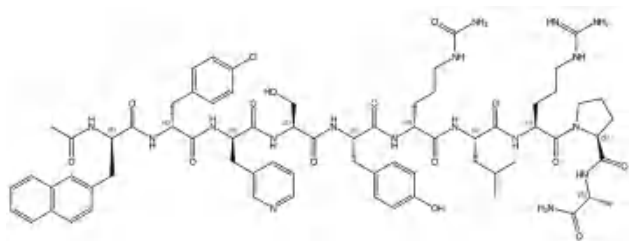


图1 西曲瑞克的绝对构型(来源于 SciFinder, CAS: 120287-85-6)

Fig 1 Absolute configuration of cetrorelix acetate (obtained from SciFinder, CAS: 120287-85-6)

2023年2月药品审评中心(CDE)发布的《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则》(试行)版中,对含有手性中心的氨基酸提出需要控制其异构体的要求,因此有必要对多肽合成中手性氨基酸的含量进行研究和控制。目前各国药典未见收载醋酸西曲瑞克的质量标准,关于其质量研究的文献报道也较少^[4-6]。

除含芳环结构的氨基酸外,绝大多数氨基酸不含发色基团,因此一般需经衍生化反应处理。柱前衍生化法是利用衍生试剂与氨基酸反应形成非对映体衍生产物的方法。目前已有文献报道了多种衍生化试剂用于氨基酸及胺类化合物的分析检测,包括 Marfey 试剂、2,4-二硝基氟苯(FDNB)、荧光胺(FA)、邻苯二甲醛(OPA)、异硫氰酸苯酯(PITC)、丹磺酰氯等^[2, 7-9]。许多衍生试剂具有一定的局限性,例如不能分离手性氨基酸、衍生物性质不稳定、氨基酸衍生物的可检测性差等^[10]。其中 Marfey 试剂具有强紫外吸收官能团,衍生产物专属性、稳定性强,衍生操作简便等优点^[2]。因此本文开发了一种基于 Marfey 法,采用常规反相 HPLC 即可对醋酸西曲瑞克水解后 10 种氨基酸的构型及含量进行测定的方法,以期对醋酸西曲瑞克的结构确证提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Shimadzu LC-20AD XR 高效液相色谱仪(配有 LC-20AD XR 二元泵、SIL-20A XR 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器,日本岛津有限公司); Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra AM 质谱仪(液相 U3000 DAD 检测器,美国赛默飞世尔科技); XS205DU/A 电子分析天平($d = 0.01 \text{ mg}$), S210-K pH 计[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; TGL-16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); DHG-9070A、DHG-9140A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药

L-精氨酸(L-Arg, 纯度: 99%, 批号: H2113190)、D-精氨酸(D-Arg, 纯度: 98%, 批号: D2114171)、3-(3-吡啶基)-D-丙氨酸(D-Pal, 纯度: 98%, 批号: A1921075)、L-酪氨酸(L-Tyr, 纯度: 98%, 批号: E1811066)、D-酪氨酸(D-Tyr, 纯度: 98%, 批号: F2118400)、L-丝氨酸(L-Ser, 纯度: 99%, 批号: H1908018)、D-丝氨酸(D-Ser, 纯度 > 98.5%, 批号: J2123636)、L-脯氨酸(L-Pro, 纯度: 99%, 批号: J2012169)、D-脯氨酸(D-Pro, 纯度: 99%, 批号: B2108066)、L-丙氨酸(L-Ala, 纯度: 99%, 批号: G2110117)、D-丙氨酸(D-Ala, 纯度: 98%, 批号: K1906051)、L-亮氨酸(L-Leu, 纯度: 99%, 批号: K2002002)、D-亮氨酸(D-Leu, 纯度: 99%, 批号: J2111318)、L-4-氯苯丙氨酸(L-Phe, 纯度: 98%, 批号: G1809096)、D-4-氯苯丙氨酸(D-Phe, 纯度: 95%, 批号: E1529076)、L-3-(2-萘基)-丙氨酸盐酸盐(L-Nal, 纯度: 95%, 批号: H2205521)、D-3-(2-萘基)-丙氨酸(D-Nal, 纯度: 98%, 批号: F2117074)(阿拉丁); D-瓜氨酸(D-Cit, 纯度: 98%, 批号: C10929512, 麦克林); 3-(3-吡啶基)-L-丙氨酸盐酸盐(L-Pal, 纯度: 95%, 批号: H2205521, 毕得医药); L-瓜氨酸(L-Cit, 纯度: 98%, 批号: LI20V67, 百灵威); 乙腈(色谱级, 批号: 21115279, TEDIA); 甲酸(色谱级, 批号: J2027128, 阿拉丁); $N\alpha$ -(2,4-二硝基-5-氟苯基)-L-亮氨酸酰胺(L-FDLA, 色谱级, 批号: K280K-OQ, TCI); DMSO(色谱级, 批号: EA617-CN, Honeywell); 盐酸(分析级, 批号: 220707328F, 南京化试股份有限公司); 氢氧化钠(分析级, 批号: 20210813)、碳酸氢钠(分析级, 批号: 200523674X)(国药集团化学试剂有限公司); 实验用水(杭州娃哈哈集团有限公司); 醋酸西曲瑞克供试品(南京锐志生物医药有限公司, 批号: XQRK-210801、XQRK-210901、XQRK-210902)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hedera ODS-2 C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.065% 的甲酸溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL ; 波长: 340 nm。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正离子模式采集; 喷雾电压: 4000; 鞘气体压力: 35 psi; 离子扫描气体压力: 0.5 psi; 辅助气压力: 5 psi; 毛细管温度:

350 °C；套管透镜补偿电压：44 V；源内碰撞解析电压：0 V；碰撞压力：0 psi。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	30	70
5	46	54
10	49	51
30	49	51
50	70	30
55	30	70
60	30	70

2.3 溶液配制

2.3.1 L-FDLA 溶液 取 L-FDLA 适量，加二甲亚砜溶解制成约 1.0 g · L⁻¹ 的溶液。

2.3.2 手性氨基酸对照品溶液 精密称取组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸对照品适量，加适宜溶剂溶解，得到浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 的储备液。用 0.1 mol · L⁻¹ 的盐酸或 0.1 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 左右，最终得到浓度为 40 μmol · L⁻¹ 的溶液。

2.3.3 手性氨基酸及对映异构体氨基酸混合对照品溶液 精密称取各氨基酸及其对映异构体对照品适量，加适宜溶剂溶解，得到浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 的储备液。用 0.1 mol · L⁻¹ 的盐酸或 0.1 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 左右，最终得到浓度为 20 μmol · L⁻¹ 的溶液。

2.3.4 供试品溶液 精密称取醋酸西曲瑞克适

量，用 6 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液溶解并稀释制成浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 的溶液，充氮后密封，置 110 °C 烘箱中水解 8.0 h 后取出，放冷，启封，用 2 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液和 0.1 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0 左右，最终得到浓度为 40 μmol · L⁻¹ 的溶液。

2.3.5 衍生化空白溶液 精密量取调节 pH 至 7.0 左右的水溶液 125 μL 置 1.5 mL 聚丙烯管底部，加入 0.1 mol · L⁻¹ 的碳酸氢钠溶液 10 μL 与 1.0 g · L⁻¹ 的 L-FDLA 衍生试剂 100 μL，混匀，置 37 °C 电热鼓风干燥箱中 1 h 后，取出，加入 0.1 mol · L⁻¹ 的盐酸溶液 10 μL 终止反应；于离心机上 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min，取上清液得到衍生化空白溶液。

2.3.6 衍生化操作 精密量取氨基酸对照品溶液 125 μL 置 1.5 mL 聚丙烯管底部，加入 0.1 mol · L⁻¹ 的碳酸氢钠溶液 10 μL 与 1.0 g · L⁻¹ 的 L-FDLA 衍生试剂 100 μL，混匀，置 37 °C 电热鼓风干燥箱中 1 h 后，取出，加入 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 10 μL 终止反应；于离心机上 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min，取上清液得到衍生化对照溶液。衍生化供试品溶液、手性氨基酸及对映异构体氨基酸混合对照品溶液同法进行衍生化操作。

2.4 高效液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 鉴定与液相专属性

10 种氨基酸衍生物 LC-MS/MS 鉴定结果见表 2。

表 2 正离子模式检测中 10 种衍生化氨基酸的相关参数和 LC-MS/MS 特性

Tab 2 Related parameters and LC-MS/MS characteristics of 10 derived amino acids in positive mode detection

氨基酸	精确分子量		母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 /eV	LC 保留时间 /min	
	衍生化前	衍生化后				衍生化 L-型氨基酸	衍生化 D-型氨基酸
Arg	174.1117	468.2081	469.1	362.2	- 25	5.936	5.459
Pal	166.0742	460.1706	461.2	416.2	- 30	6.644	6.879
Tyr	181.0739	475.1703	476.4	385.1	- 24	7.399	7.618
Cit	175.0957	469.1921	470.1	408.5	- 23	8.782	8.223
Ser	105.0426	399.1390	400.9	354.9	- 26	9.096	9.545
Pro	115.0633	409.1597	410.0	365.1	- 20	11.673	14.045
Ala	89.0477	383.1441	384.0	339.0	- 24	12.000	15.411
Leu	131.0946	425.1910	426.0	336.0	- 24	19.372	37.863
Phe	199.0400	493.1364	494.0	448.7	- 20	27.562	42.323
Nal	215.0946	509.1910	510.0	465.2	- 20	32.142	44.853

分别精密量取衍生化空白溶液、衍生化对照品溶液、衍生化供试品溶液和衍生化手性氨基酸及对映异构体氨基酸混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，结果显示组成醋酸西曲瑞克的 10 种手性氨基酸及其对映异构体不会受

到空白干扰；衍生化对照品溶液中，各氨基酸衍生物峰与相邻峰之间的最小分离度为 1.19；2 份衍生化对照品溶液的含量匹配应在 96% ~ 105%；第一份衍生化对照品溶液连续进样 5 针，各氨基酸衍生物峰校正因子 RSD 均不大于 0.8%，表明

进样精密度良好；衍生化供试品溶液中，其他峰不干扰各目标氨基酸衍生物峰的测定；该方法专属性良好，典型色谱图见图 2。

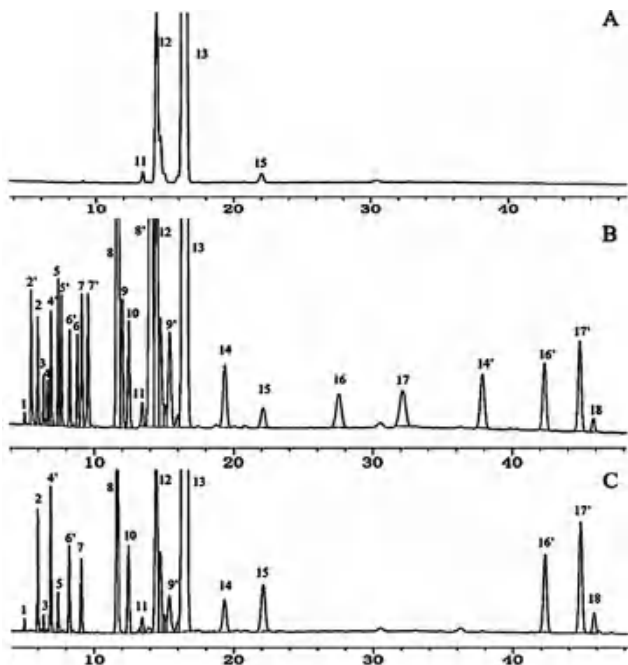


图 2 醋酸西曲瑞克水解后氨基酸含量测定的典型色谱图
Fig 2 Typical chromatogram for content determination of amino acid after hydrolysis of cetorelix acetate

A. 衍生化空白溶液 (derivatized blank solution); B. 衍生化手型氨基酸对照与对映异构体氨基酸对照混合溶液 (mixed solution of derivatized reference and enantiomeric amino acid); C. 衍生化供试品溶液 (derivatized sample solution); 1, 3. *Mar-D-Orn*; 2. **Mar-L-Arg**; 2'. *Mar-D-Arg*; 4. *Mar-L-Pal*; 4'. **Mar-D-Pal**; 5. **Mar-L-Tyr**; 5'. *Mar-D-Tyr*; 6. *Mar-L-Cit*; 6'. **Mar-D-Cit**; 7. **Mar-L-Ser**; 7'. *Mar-D-Ser*; 8. **Mar-L-Pro**; 8'. *Mar-D-Pro*; 9. *Mar-L-Ala*; 9'. **Mar-D-Ala**; 10. *Mar-L-Tyr* 副产物 (*L-Tyr* by-product); 11, 12, 15. 衍生试剂副产物 (*L-FDLA* by-products); 13. *L-FDLA*; 14. **Mar-L-Leu**; 14'. *Mar-D-Leu*; 16. *Mar-L-Phe*; 16'. **Mar-D-Phe**; 17. *Mar-L-Nal*; 17'. **Mar-D-Nal**; 18. *Bis-Mar-L-Tyr* [粗体为组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生后产物 (The bold type refers to the 10 amino acids derivative products of cetorelix acetate)]

2.5 检测限和定量限

精密移取“2.3.2”项下氨基酸对照品溶液，逐级稀释合适倍数后同“2.3.6”项下进行衍生化处理后进样，分别将信噪比 (S/N) ≥ 3 和 10 的浓度作为检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)(见表 3)。结果 10 种氨基酸衍生物的 LOD 和 LOQ 的浓度均分别为 $0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 LOQ 浓度衍生化溶液连续进样 6 针，氨基酸衍生物峰面积 $RSD < 4.2\%$ ，保留时间的 $RSD < 0.20\%$ ，结果表明定量限测定精密度良好。

2.6 线性与范围

精密移取“2.3.2”项下氨基酸对照品储备液，

表 3 10 种氨基酸衍生物的 LOD 与 LOQ 的信噪比

Tab 3 LOD and LOQ of 10 amino acid

氨基酸	LOD/dB	LOQ/dB
Mar-L-Arg	48	124 ~ 208
Mar-D-Pal	48	122 ~ 204
Mar-L-Tyr	68	161 ~ 268
Mar-D-Cit	58	148 ~ 248
Mar-L-Ser	40	85 ~ 144
Mar-L-Pro	156	402 ~ 676
Mar-D-Ala	9	43 ~ 73
Mar-L-Leu	25	60 ~ 101
Mar-D-Phe	31	78 ~ 123
Mar-D-Nal	44	109 ~ 171

依次制备成 10.20、16.33、20.41、22.45、24.49 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列浓度的线性测试溶液。照“2.3.6”项下方法分别进行衍生化处理，进样分析，以峰面积为纵坐标，摩尔浓度为横坐标，作图并进行线性回归，结果表明组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生物在 10.20 ~ 24.49 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好， r 值均大于 0.991。

2.7 重复性与中间精密度试验

按“2.3.5”和“2.3.6”项下方法分别配制衍生化空白溶液、衍生化对照品溶液及平行 6 份衍生化供试品溶液，进行重复性考察，结果组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生化后的含量 RSD 在 0.41% ~ 0.90%，表明重复性良好。不同分析人员在不同日期重复上述试验，考察方法中间精密度，结果组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生化后含量 RSD 在 0.23% ~ 1.6%。精密度试验中组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生化后含量 RSD 在 0.46% ~ 5.8%，表明方法中间精密度良好。

2.8 稳定性试验

按“2.3.6”项下方法分别配制衍生化空白溶液、衍生化对照品溶液及衍生化供试品溶液，于室温放置 0、11、14、17、22、40 h 后进样分析，记录各氨基酸衍生化后的峰面积并计算供试品中各氨基酸衍生物的含量。结果显示对照品溶液中组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生化后的峰面积 RSD 均低于 1.8%；水解供试品溶液中 10 种氨基酸衍生后产物的含量 RSD 均低于 1.8%，表明在 40 h 内溶液稳定性良好。

2.9 耐用性考察

改变流动相中甲酸添加量 (%)、流速 ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、柱温 ($^{\circ}\text{C}$) 以考察环境的微小变动对方法测定结果的影响，结果发现在各个色谱条件下 10 种氨基酸的检测均不会受到干扰，衍生化对

照品溶液中, 各氨基酸校正因子 *RSD* 均低于 2.7%, 峰与峰之间的最小分离度均不小于 1.0; 各条件下供试品溶液中各氨基酸含量的 *RSD* 均低于 6.9%, 方法耐用性良好, 具体结果见表 4。

表 4 耐用性结果
Tab 4 Durability test

氨基酸	<i>RSD</i> /%		
	流速 (±0.1 mL·min ⁻¹)	柱温 (±1 °C)	甲酸添加量 (±0.5%/1000 mL)
Mar- <i>L</i> -Arg	0.24	0.30	4.7
Mar- <i>D</i> -Pal	0.39	0.17	4.3
Mar- <i>L</i> -Tyr	1.6	0.71	6.9
Mar- <i>D</i> -Cit	0.24	0.87	5.0
Mar- <i>L</i> -Ser	0.44	0.44	4.8
Mar- <i>L</i> -Pro	0.57	2.0	4.6
Mar- <i>D</i> -Ala	0.57	0.65	5.4
Mar- <i>L</i> -Leu	0.23	1.1	5.5
Mar- <i>D</i> -Phe	0.21	0.33	2.4
Mar- <i>D</i> -Nal	1.3	0.51	4.6

2.10 样品检测

分别取 3 批醋酸西曲瑞克样品 (批号: XQRK-210801、XQRK-210901、XQRK-210902) 进行检测, 结果各批次组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸衍生物含量均在 83.5% ~ 109.5% 内, 见表 5。

表 5 10 种氨基酸在 3 批醋酸西曲瑞克供试品中的检测结果 (%)
Tab 5 10 amino acids in 3 batches of cetorelix acetate (%)

氨基酸	含量 /%		
	XQRK-210801	XQRK-210901	XQRK-210902
Mar- <i>L</i> -Arg	89.5	90.4	90.5
Mar- <i>D</i> -Pal	93.0	94.1	94.0
Mar- <i>L</i> -Tyr	103.1	104.2	104.4
Mar- <i>D</i> -Cit	87.4	88.3	88.4
Mar- <i>L</i> -Ser	98.6	99.5	99.7
Mar- <i>L</i> -Pro	91.7	92.7	92.7
Mar- <i>D</i> -Ala	99.5	99.1	99.1
Mar- <i>L</i> -Leu	106.4	105.4	109.5
Mar- <i>D</i> -Phe	83.5	84.9	84.5
Mar- <i>D</i> -Nal	104.5	106.4	106.0

3 讨论

3.1 衍生条件的选择

对影响 *L*-FDLA 与氨基酸反应的因素进行了考察。分别在 37、50、60 °C 下反应相同时间, 或在相同温度下分别反应 0.5、1.0、1.5 h, 结果显示反应温度越高, 衍生物峰面积越大, 但是温度高于 37 °C 后, 衍生试剂产生的杂质会显著干扰样品峰的测定, 在 37 °C 左右反应 1.0 h 时没有明显

干扰; 反应时间越长衍生物峰面积越大, 考虑到试验效率结合文献^[11]已报道的方法 (Marfey 试剂在与 *L* 型与 *D* 型氨基酸的 α -氨基在 40 °C 碱性条件下反应 1 h 后, 不会产生外消旋产物), 决定反应时限定为 1.0 h。对 10 种氨基酸总摩尔之和与 *L*-FDLA 的用量摩尔比 (1:1 ~ 1:10) 进行考察, 结果显示摩尔比在 1:5 左右时即可达到最大产率。

3.2 水解条件摸索

取醋酸西曲瑞克的 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液, 分别在 110 °C 加热 4、6、8、12、24 h 后测定。结果选取多数氨基酸能较大程度水解且变化趋势较平稳的 8 h 作为水解终点时间。在 8 h 时, 组成醋酸西曲瑞克的 10 种氨基酸外消旋化程度小, 结果见图 3。

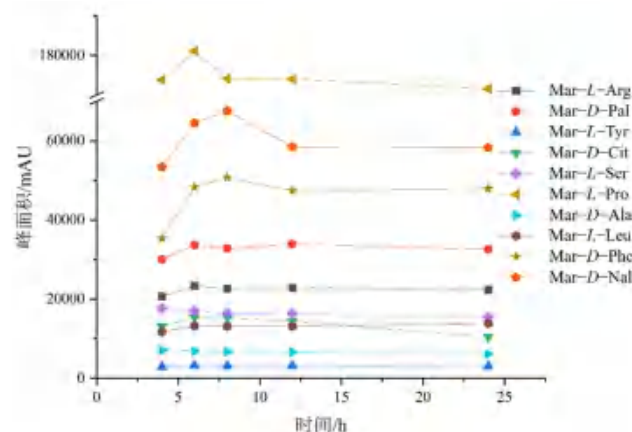


图 3 醋酸西曲瑞克水解时间与衍生化产物峰面积的关系

Fig 3 Relationship between hydrolysis time and peak area of derivatization products

3.3 色谱条件的选择

在 C18 色谱柱上考察了不同流动相系统对醋酸西曲瑞克水解产生的氨基酸衍生物分离效果。结果以甲醇-水系统作为流动相时部分氨基酸有拖尾现象, 且分离度小于 1.0; 改用乙腈-磷酸盐系统作流动相时, 调节 pH、柱温、梯度或者更换色谱柱都无法使所有氨基酸分离度均大于 1.0; 最终选取乙腈-甲酸水体系, 甲酸添加量为 0.065% 左右时, 能使所有氨基酸达到良好的分离效果, 且峰形良好。

3.4 质谱结果讨论

瓜氨酸每种构型都产生的两个杂质衍生产物峰 m/z ($M + H$) = 427.18, 符合鸟氨酸衍生后分子量, 推测反应过程见图 4A; 酪氨酸产生的保留时间约 46.0 min 的副产物峰 m/z ($M + H$) = 770.77, 符合酪氨酸双衍生物的分子量, 见图

4B, 该产物与文献报道结果相符^[12]。此外, 衍生试剂产生的最大副产物 $m/z (M + H) = 313.10$,

推测是 *L*-FDLA 的氟原子在碱性条件下水解为羟基形成的化合物, 见图 4C。

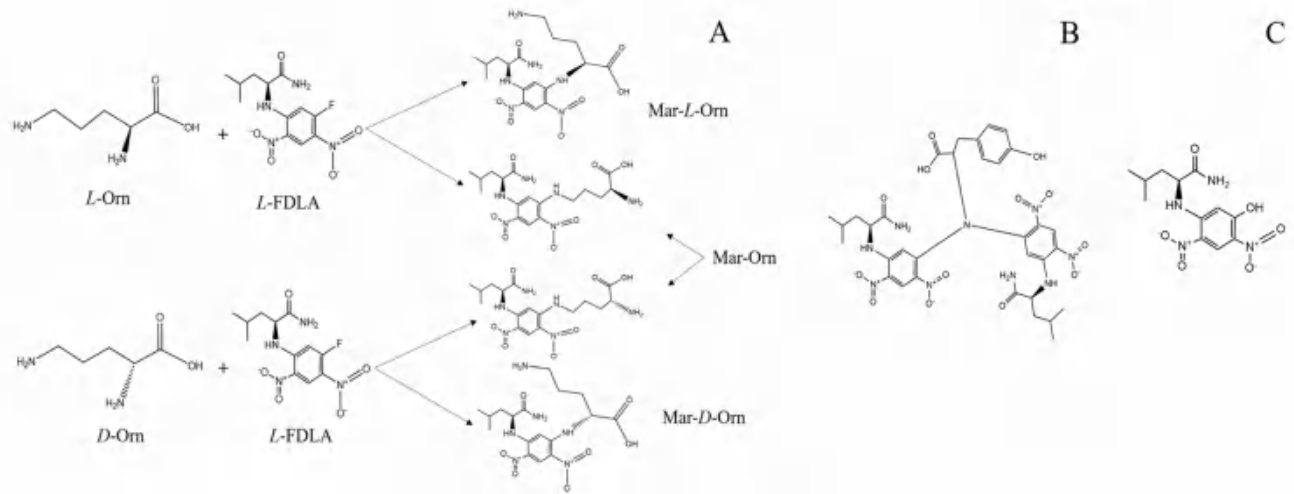


图 4 4 种鸟氨酸衍生物 (A)、酪氨酸双衍生物 (B) 与衍生试剂水解产物 (C) 示意图

Fig 4 Schematic diagram of 4 ornithine derivatives (A), Bis-Mar-Tyr (B), and hydrolysate of *L*-FDLA (C)

3.5 含量测定结果讨论

D-Cit 衍生物含量测定结果偏差较大, 推测是 *D*-Cit 在水解条件下被破坏成了鸟氨酸而产生损失; *D*-Phe 偏差较大的原因暂且未知; 其他氨基酸衍生物含量在 90% ~ 110% 内, 无明显异构体产生。

3.6 总结与展望

本文建立了一种能够排除对映异构体氨基酸的干扰从而准确测定醋酸西曲瑞克产生的 10 种手性氨基酸含量的方法; 该方法高效、简便, 仅用液相色谱系统结合普通 C18 色谱柱就能完成测定, 可为多肽药物的手性氨基酸含量测定提供参考。

参考文献

[1] 杜娟, 田东梅, 熊洪平. 控制性超促排卵中垂体激素与卵巢激素的变化分析 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2014, 6 (7): 56-59.
 [2] Bhushan R, Brückner H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review [J]. Amino Acids, 2004, 27 (3-4): 231-247.
 [3] 林洁虹, 陈钢, 邵泓, 等. 氘代酸水解-柱前衍生化-超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱法同时测定胸腺法新中 9 种痕量 *D*-氨基酸 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55 (11): 933-938.
 [4] 薛巧如, 刘冰滢, 陈华, 等. UPLC 测定注射用醋酸西曲瑞克中有关物质的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (2): 203-207.
 [5] Hooshfar S, Mortazavi SA, Piryaei M, et al. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for assay of the decapeptide cetorelix acetate in bulk and phar-

maceutical dosage forms [J]. Iran J Pharm Res, 2014, 13 (supplement): 43-50.
 [6] Li M, Li H, Huang H, et al. Identification and structural elucidation of a new cetorelix methylene dimer impurity in cetorelix acetate by using LC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 197 (113946): 1-6.
 [7] Fujii K, Ikai Y, Mayumi T, et al. A Nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism [J]. Anal Chem, 1997, 69 (16): 3346-3352.
 [8] Harada K, Fujii K, Hayashi K, et al. Application of *D*, *L*-FDLA configuration derivatization of constituent by advanced Marfey's to determination of absolute amino acids in peptide method [J]. Tetrahedron Lett, 1996, 37 (17): 3001-3004.
 [9] The United States Pharmacopieial Convention. The United States Pharmacopeia: General Information/ < 1052 > Biotechnology-Derived Articles [S]. USP, 2017: 1093-1105.
 [10] Sethi S, Martens J, Bhushan R. Assessment and application of Marfey's reagent and analogs in enantioseparation: a decade's perspective [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 35 (1): 1-24.
 [11] Marfey P. Determination of *D*-amino acids II. Use of a bifunctional reagent, 1, 5-difluoro-2, 4-dinitrobenzene [J]. Carlsberg Res Commun, 1984, 49 (6): 591-596.
 [12] Ayon NJ, Sharma AD, Gutheil WG. LC-MS/MS-based separation and quantification of Marfey's reagent derivatized proteinogenic amino acid *DL*-stereoisomers [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2019, 30 (3): 448-458.

(收稿日期: 2022-12-14; 修回日期: 2023-02-08)

分离鉴定黄连花藎的差异性成分并测定其中 4 个成分的含量

王梦琪^{1, 2}, 罗定强², 刘海静^{1, 2*} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省食品药品检验研究院, 西安 710065)

摘要: **目的** 采用薄层鉴别法与高效液相色谱法对比寻找出黄连药材与黄连花藎中含量最大的差异性成分, 并对其进行鉴定; 同时建立一测多评法测定黄连花藎中 4 个化学成分的含量。**方法** 采用聚酰胺柱层析等分离纯化手段对黄连花藎与黄连药材差异性成分进行提取、分离、纯化, 并采用液质联用以及核磁鉴定的方法对差异性成分进行确证; 采用资生堂 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 340 nm, 柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL, 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (每 1000 mL 加入 20 μL 三乙胺) (B), 梯度洗脱。以盐酸小檗碱为内标物, 计算其他 3 个成分的相对校正因子, 建立用一测多评法和常规外标法测定黄连花藎中 4 个化学成分的含量, 并对两种方法的含量测定结果进行比较。**结果** 分离鉴定出黄连花藎与黄连药材的差异性成分蒙花苷, 同时在各自的线性范围 ($r > 0.9999$) 内, 芦丁、绿原酸、蒙花苷的相对校正因子分别为 2.5704、2.4532、1.7700。6 批黄连花藎一测多评法测定结果与外标法测定结果无显著差异, 但大大提高了检测的效益, 节约了检测成本。**结论** 分离鉴定出黄连花藎与黄连药材的差异性成分蒙花苷, 同时建立的一测多评法测定结果准确, 可用于黄连花藎的定量分析及质量控制。

关键词: 黄连花藎; 分离鉴定; 蒙花苷; 一测多评; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1341-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.35

Separation and analysis of characteristic components in *Coptis chinensis* flower moss and content determination of 4 components

WANG Meng-qi^{1, 2}, LUO Ding-qiang², LIU Hai-jing^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065)

Abstract: Objective To determine the largest content difference in components in *Coptis chinensis* and *Coptis chinensis* flower moss by thin layer identification method and high performance liquid chromatography, and to simultaneously determine 4 chemical components in *Coptis chinensis* by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method. **Methods** Different components were extracted and purified by polyamide column chromatography, and further confirmed by liquid mass spectrometry and nuclear magnetic identification. Shiseido C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The detection wavelength was 340 nm and the column temperature was 40 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the sample size was 10 μL, and the mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid (20 μL triethylamine per 1000 mL) (B) gradient elution. Berberine hydrochloride was used as the internal standard, the relative correction factors of the other 3 components were calculated, and the content of 4 chemical components in *Coptis chinensis* was determined by QAMS and conventional external standard method. The results of the two methods were compared. **Results** The differential components of *Coptis chinensis* flower moss and *Coptis*

作者简介: 王梦琪, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: 554528096@qq.com *通信作者: 刘海静, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药化学研究, email: liuhaijing1@163.com

chinensis were isolated and identified. At the same time, within the linear range ($r > 0.9999$), f of rutin, chlorogenic acid, and linarin was 2.5704, 2.4532, and 1.7700, respectively. Under different experimental conditions, the relative correction factor was relatively stable, without significant difference in the results of 6 batches of *Coptis chinensis* flower moss by QAMS and external standard method, but it greatly improved the detection efficiency and saved the detection cost. **Conclusion** The differential components of montanin are isolated and identified, and the QAMS method is accurate, feasible for the quantitative analysis and quality control of *Coptis chinensis* flower moss.

Key words: *Coptis chinensis* flower moss; separation and identification; linarin; quantitative analysis of multi-components by single-marker; quality control

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎^[1], 收载于《中国药典》2020 年版一部中, 具有清热燥湿、泻火解毒的功效; 常用于治疗湿热痞满, 泻痢, 黄疸, 目赤, 牙痛等疾病^[2]。黄连花茎为毛茛科植物黄连属黄连的干燥花序, 春季开花, 其花为淡黄色; 黄连的花期较短, 一般为每年 2~4 月, 在移栽后第 2 年春季开花, 开花后会消耗植物大量养分, 为了提高药用部分(根茎)的产量, 黄连生产基地除了会将少数黄连花茎留种外, 其余均摘除丢弃, 造成了资源的浪费。现代药理学研究表明, 黄连花茎具有抗氧化、润肠通便和保护心肌缺血再灌注损伤等药理作用^[3-5], 具有良好的开发利用价值。目前在黄连种植基地已将黄连花茎开发成花茶保健品供应于市场^[6-7], 但是黄连花茎的化学成分还未得到充分研究, 与其根茎的物质基础和作用机制差别也不明确, 同时又缺乏相关的质量控制与评价方法, 从而造成了黄连植物资源的浪费。基于我国“绿色发展”及“资源综合利用”的发展理念, 为了综合利用黄连中药材资源^[8], 本文以黄连花茎为研究对象, 采用薄层鉴别法(TLC)与高效液相色谱法对比, 寻找出黄连药材与黄连花茎中含量最大的差异性成分, 采用聚酰胺柱层析等分离手段对黄连花茎与黄连药材差异性成分进行提取分离纯化, 并采用液质联用以及核磁鉴定的方法对差异性成分进行确证, 同时建立一测多评法(QAMS)^[9]测定黄连花茎中酚酸类(绿原酸)、黄酮类(蒙花苷、芦丁)、生物碱类(小檗碱)4 个成分的含量, 并进行方法学验证, 为黄连花茎质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AVANCE 3HD 600 MHz 型核磁共振波谱仪(美国布鲁克公司); LC-2030C 3D 高效液相色谱仪(日

本岛津); e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters); 质谱仪 AB 5500 + (美国 AB 公司); UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); ME-204 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); 高纯水仪 UPH-II-10T(四川优普超纯科技有限公司); 数控超声仪(KQ-500DE, 昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发仪(LABORIA4001, 德国 Heidoph 公司)。

1.2 试剂

乙醇(工业乙醇)、乙腈(色谱纯)(霍尼韦尔国际公司), 高纯水、磷酸(分析纯)(天津市科密欧化学试剂有限公司), 三乙胺(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 聚酰胺(30~60 目, 国药集团化学试剂有限公司)。对照品绿原酸(批号: 11053-202018, 纯度: 96.1%)、芦丁(批号: 100080-201610, 纯度: 91.9%)、盐酸小檗碱(批号: 110713-202015, 纯度: 85.9%)、蒙花苷(批号: 111528-201710, 纯度: 96.6%)(中国食品药品检定研究院)。

黄连花茎采自陕西省安康市南皋县、重庆市石柱县, 经陕西省食品药品检验研究院中药室主任罗定强主任药师鉴定为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch)的干燥花序。

2 黄连花茎特征成分的分离与纯化

2.1 提取

取黄连花茎样品 700 g 粉碎, 过二号筛, 以 85% 乙醇溶液回流提取 3 次, 8 倍量溶剂, 每次 1.5 h, 合并滤液, 真空减压干燥, 得到总浸膏(191 g), 备用。

2.2 聚酰胺柱层析分离与纯化^[10-14]

用少量的 5% 乙醇溶液溶解黄连花茎浸膏 50.04 g, 加入已处理好的聚酰胺, 水浴上低温挥去溶剂, 干法上样, 柱规格为 6.0 cm×100 cm, 有效柱长 88 cm, 分别用 95% 水-乙醇、90% 水-

乙醇进行梯度洗脱, 洗脱过程每 100 mL 收集馏分, 用 TLC 跟踪检查, 合并 R_f 值相似馏分, 减压浓缩至干, 趁热加入少量 20% 乙醇溶液使溶解, 放置室温后转入冰箱内进行低温析晶, 静置过夜后得到大量晶体, 抽滤后, 得到化合物 I (116.5 mg)。将所得晶体经 HPLC 法测定, 利用峰面积归一化法, 测定纯度 > 95%。

2.3 结构鉴定

化合物 I 为淡黄色无定型粉末, 纯度为 95%; 分子式为 $C_{28}H_{32}O_{14}$, ESI-MS m/z : 593.1 ($[M + H]^+$); 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.92 (s, 1H, 5-OH), 8.06 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2', 6'), 7.16 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3', 5'), 6.96 (s, 1H, H-3), 6.80 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 6.46 (d, $J = 2.5$ Hz, H-6), 5.45 (m, 1H, -OH), 5.24 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, -OH), 5.21 (m, 1H, -OH), 5.07 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-1''), 4.71 (m, 1H, -OH), 4.62 (m, 1H, -OH), 4.56 (s, 1H, H-1'''), 4.47 (m, 1H, -OH), 3.87 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.86 (s, 1H, H-6''), 3.68 (m, 1H, H-2'''), 3.62 (m, 1H, H-5'''), 3.45 (m, 1H, H-3''), 3.45 (m, 1H, H-6''), 3.42 (m, 1H, H-5'''), 3.33 (m, 1H, H-3''), 3.29 (m, 1H, H-2''), 3.17 (m, 1H, H-4''), 3.15 (m, 1H, H-4'''), 1.09 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-6'''); ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 18.30 (C-6''), 56.06 (4'-OCH₃), 66.57 (C-6''), 68.81 (C-5'''), 70.07 (C-4''), 70.83 (C-3'''), 71.22 (C-2''), 72.53 (C-4''), 73.55 (C-2''), 76.14 (C-5''), 76.73 (C-3''), 95.26 (C-8), 100.13 (C-1''), 100.40 (C-1'''), 101.01 (C-6), 104.30 (C-3), 105.94 (C-10), 115.20 (C-3', 5'), 123.16 (C-1'), 128.95 (C-2', 6'), 157.46 (C-7), 161.63 (C-5), 162.92 (C-4'), 163.44 (C-9), 164.43 (C-2), 182.53 (C-4)。以上波谱数据与已知化合物 I 的谱图数据^[15]一致, 确认为蒙花苷 (linarin), 结构式见图 1。

3 QAMS 法同时测定黄连花萼特征成分及其他 3 个成分的含量

3.1 对照品溶液的制备^[16-20]

精密称取绿原酸对照品 5.92 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得到质量浓度为 $0.2368 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液; 精密称取芦丁对照品 6.18 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得到质量浓度为 $0.1236 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液; 精

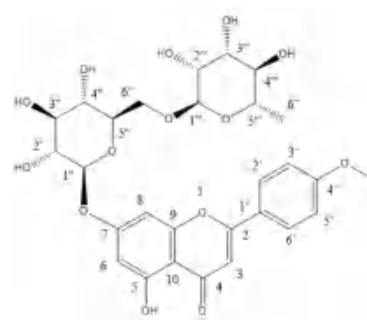


图 1 化合物 I 的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of compound I

密称取盐酸小檗碱对照品 7.16 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得到质量浓度为 $0.2864 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液; 精密称取蒙花苷对照品 3.46 mg, 置 25 mL 量瓶中, 分别加入绿原酸、芦丁、盐酸小檗碱储备液 2 mL、3 mL、5 mL, 配制含绿原酸 $0.01821 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芦丁 $0.01363 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、盐酸小檗碱 $0.04920 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、蒙花苷 $0.1337 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品混合溶液 (注: 储备液配制浓度为原始浓度, 混合对照品溶液配制浓度均已进行折算)。

3.2 供试品溶液的配制

取 6 批黄连花萼样品各 0.2 g, 分别加入 70% 乙醇 25 mL, 称量, 超声处理 (500 W, 40 kHz) 45 min, 取出, 放冷, 再称量, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.3 色谱条件

采用资生堂 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (每 1000 mL 加 20 μL 三乙胺) (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 27 min, 92%B; 27 ~ 45 min, 92% → 80%B; 45 ~ 50 min, 80% → 77%B, 50 ~ 65 min, 77%B → 73%B, 65 ~ 70 min, 73% → 20%B, 70 ~ 72 min, 20% → 92%B, 72 ~ 75 min, 92%B), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 340 nm, 柱温 40°C , 进样量 10 μL 。

3.4 方法学考察^[21-24]

3.4.1 系统适用性试验 在“3.3”项色谱条件下, 4 个待测成分的理论塔板数均大于 5000, 且色谱峰峰形良好, 与相邻峰的分度大于 1.5。混合对照品及黄连花萼样品色谱图见图 2。

3.4.2 线性关系考察 取“3.1”项下混合对照品溶液适量, 稀释成系列浓度混合对照品溶液 (绿原酸: 0.01821、0.03642、0.09105、0.1821、0.2732 μg ; 芦丁: 0.01363、0.02726、0.06815、0.1363、0.2044 μg ; 盐酸小檗碱: 0.04920、0.09840、0.2460、

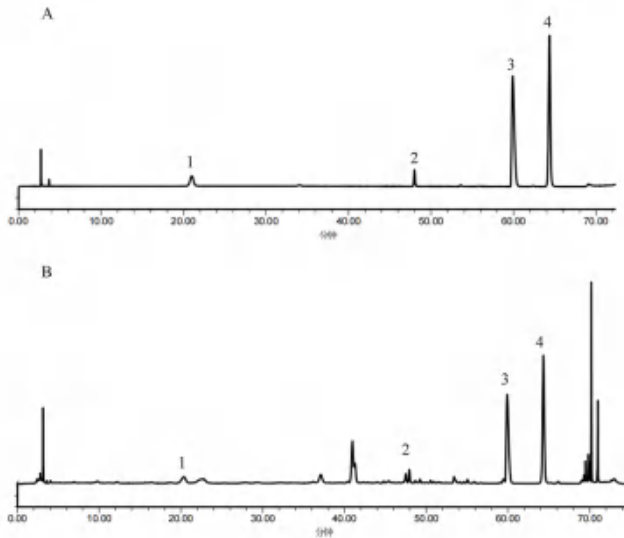


图 2 混合对照品 (A) 和黄连花薹样品 (B) 的 HPLC 图谱
Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference substance (A) and Coptis chinensis flower moss sample (B)

1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 2. 芦丁 (rutin); 3. 盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride); 4. 蒙花苷 (linarin)

0.4920、0.7380 μg; 蒙花苷: 0.1337、0.2674、0.6685、1.3370、2.0055 μg), 每个质量浓度平行测定 3 次, 以对照品质量 X 和平均峰面积 Y 进行线性回归分析, 得到回归方程及相关系数, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察
Tab 1 Linearity

成分	回归方程	r	线性范围 /μg
绿原酸	$Y = 1.96 \times 10^6 X - 933$	0.9999	0.018 21 ~ 0.2732
芦丁	$Y = 1.87 \times 10^6 X - 690$	0.9999	0.013 63 ~ 0.2044
盐酸小檗碱	$Y = 4.85 \times 10^6 X - 625$	0.9999	0.049 20 ~ 0.7380
蒙花苷	$Y = 2.74 \times 10^6 X - 998$	0.9999	0.133 70 ~ 2.0055

3.4.3 相对校正因子计算 取“3.1”项下混合对照品溶液, 分别进样 1、2、5、10、15 μL 进样测定, 按公式 [相对校正因子 (f_{si}) = ($A_s \times W_i$) / ($A_i \times W_s$)] (A_s 为内标物质峰面积, W_s 为内标物质的质量浓度, A_i 为其他待测组分的峰面积; W_s 为其他待测组分的质量浓度) 计算盐酸小檗碱对绿原酸、芦丁、蒙花苷的相对校正因子, 结果见表 2。

3.4.4 精密度试验 取“3.1”项下混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 计算得绿原酸、芦丁、盐酸小檗碱、蒙花苷峰面积 RSD 分别为 0.99%、1.1%、0.09%、0.43%, 表明仪器精密度良好。

3.4.5 稳定性试验 取同一黄连花薹供试品溶液, 分别于 0、5、10、15、20、25、30、35、40 h 进样分析, 平行测定 3 次, 记录峰面积, 计算得到 40 h 内绿原酸、芦丁、盐酸小檗碱、蒙花苷色谱峰峰面积的 RSD 分别为 1.9%、0.97%、1.2%

表 2 黄连花薹中 4 个成分的相对校正因子结果

Tab 2 Relative correction factors of 4 components in Coptis chinensis flower moss

进样体积 /μL	$f_{\text{小檗碱/芦丁}}$	$f_{\text{小檗碱/绿原酸}}$	$f_{\text{小檗碱/蒙花苷}}$
1	2.5318	2.4178	1.7699
2	2.5623	2.4458	1.7700
5	2.5810	2.4629	1.7700
10	2.5873	2.4687	1.7701
15	2.5894	2.4706	1.7701
平均值	2.5704	2.4532	1.7700
$RSD/\%$	0.94	0.90	0.0048

和 1.1%, 表明供试品溶液在 40 h 内稳定性良好。
3.4.6 重复性试验 取同一批黄连花薹样品, 每份 0.2 g, 共 6 份, 精密称定, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 得到 6 份样品绿原酸、芦丁、盐酸小檗碱、蒙花苷的平均含量分别为 2.2486、1.9353、6.1675、21.5566 mg · g⁻¹, RSD 分别为 0.59%、0.31%、0.32%、0.28%, 表明此方法重复性良好。

3.4.7 加样回收试验 取已知含量的黄连花薹样品适量, 每份约 0.1 g, 共 9 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入相当于含有量 80%、100%、120% 的混合对照品溶液, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果 4 种成分的平均加样回收率在 94.88% ~ 96.68%, RSD 均小于 3.0%, 表明该方法的准确性较好。

3.4.8 QAMS 法与外标法测定结果的比较 取 6 批黄连花薹样品各 2 份, 分别按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 以“3.3”项下色谱条件进样测定, 采用 QAMS 法和外标法 (ESM) 计算各成分含量。结果表明, QAMS 法与 ESM 法测得绿原酸、芦丁、蒙花苷含量基本一致, 验证了采用 QAMS 法测定黄连花薹中含量具有可行性, 见表 3。

3.4.9 校正因子耐用性考察

① 不同仪器和色谱柱对相对校正因子的影响: 分别考察 Waters 2495、岛津 LC-2030C 3D、安捷伦 1260 型 3 种高效液相色谱仪及 Agilent TC-C₁₈、Kromasil 100-5C₁₈、资生堂 C₁₈ 3 种色谱柱对相对校正因子的影响, 结果 RSD 均 < 3.0%, 表明不同仪器和色谱柱对相对校正因子无明显影响, 结果见表 4。

② 不同流速对相对校正因子的影响: 采用 Waters e2695 高效液相色谱仪和资生堂 C₁₈, 分别考察流速为 0.8、1.0、1.2 mL · min⁻¹ 对相对校正因子的影响, 结果 RSD 均 < 3.0%, 表明不同流速对相对校正因子无明显影响, 结果见表 4。

表 3 QAMS 与外标法 ESM 测得黄连花茎中 4 个成分的含量比较结果 (mg · g⁻¹, n = 3)

Tab 3 Content of 4 components in Coptis chinensis flower moss measured by QAMS and ESM (mg · g⁻¹, n = 3)

产地	盐酸小檗碱		绿原酸		芦丁			蒙花苷		
	ESM	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%	ESM	QAMS	RSD/%
陕西安康南皋县 20210309	6.6503	2.4085	2.3703	1.4	1.4937	1.4971	0.44	20.3747	20.4106	0.39
陕西安康南皋县 20210310	6.7878	2.6309	2.5747	0.48	1.2808	1.2900	0.52	18.9089	18.9798	0.53
陕西安康南皋县 20210311	6.6882	2.6057	2.5543	0.64	1.3945	1.3956	0.28	23.1528	23.2200	0.88
陕西安康南皋县 20210312	6.3411	1.5045	1.5288	0.54	2.1802	2.1902	1.3	23.0681	23.1054	1.1
陕西安康南皋县 20210313	6.2658	1.4499	1.4762	1.1	2.1772	2.1726	1.6	22.9816	22.9516	1.1
重庆石柱县	6.3895	2.6849	2.6222	1.2	1.2560	1.2582	0.38	17.6072	17.6142	1.5

③ 不同柱温对相对校正因子的影响：采用 Waters e2695 高效液相色谱仪和资生堂 C₁₈ 色谱柱，分别考察不同柱温 30、35、40 °C 时的相对校正因子。结果表明不同柱温对相对校正因子无明显影响，结果见表 4。

表 4 不同条件对相对校正因子的考察结果

Tab 4 Relative correction factors under different conditions

条件		$f_{\text{小檗碱/芦丁}}$	$f_{\text{小檗碱/绿原酸}}$	$f_{\text{小檗碱/蒙花苷}}$
Waters 2495	资生堂 C ₁₈	2.6013	2.4913	1.7743
	Agilent TC-C ₁₈	2.6258	2.5119	1.7899
	Kromasil 100-5C ₁₈	2.6134	2.5077	1.7778
岛津 LC2030	资生堂 C ₁₈	2.6035	2.4962	1.7758
	Agilent TC-C ₁₈	2.6243	2.5225	1.7855
	Kromasil 100-5C ₁₈	2.6127	2.5019	1.7798
安捷伦 1260	资生堂 C ₁₈	2.6019	2.4865	1.7661
	Agilent TC-C ₁₈	2.6234	2.5129	1.7878
	Kromasil 100-5C ₁₈	2.6121	2.4965	1.7766
0.8 mL · min ⁻¹		2.6068	2.4768	1.7736
1.0 mL · min ⁻¹		2.6161	2.4961	1.7749
1.2 mL · min ⁻¹		2.5999	2.4824	1.7556
30 °C		2.6180	2.4888	1.7765
35 °C		2.6130	2.4844	1.7647
40 °C		2.6161	2.4961	1.7749
平均值		2.6126	2.4968	1.7756
RSD/%		0.32	0.50	0.48

4 讨论

4.1 黄连花茎特征成分的选择

通过两种不同的 TLC 系统：① 固定相为聚酰胺薄膜，展开剂为 50% 乙醇；② 固定相为硅胶 G，展开剂为乙酸乙酯 - 丁酮 - 甲酸 - 水 (7 : 3 : 1 : 1)，显色剂为 1% 三氯化铝乙醇试液，加热，置 365 nm 下观察，发现了与黄连药材明显不同的清晰斑点；又通过 HPLC 法，对比找出与黄连药材不同的色谱峰，其峰面积占黄连花茎峰面积的 22.62%，故将其作为黄连花茎与黄连药材的差异性成分。采用正交试验设计法考察提取时间 (1 h、1.5 h、2 h)，乙醇浓度 (70%、85%、95%)，溶剂

用量 (6 倍、8 倍、10 倍) 三因素三水平对黄连花茎差异性成分提取率的影响，结果显示，在 70% 乙醇浓度，加入 8 倍量溶剂，提取 1.5 h，得到黄连花茎差异性成分的出膏率最高。

4.2 检测波长的选择

根据各成分在紫外吸收谱图来确定检测波长。绿原酸在 326 nm 处有最大吸收，芦丁在 354 nm 处有最大吸收，盐酸小檗碱在 344 nm 处有最大吸收，蒙花苷在 332 nm 处有最大吸收，混合对照品在 340 nm 处响应值较好，故最终选择 340 nm 作为检测波长。

4.3 内参物的选择

盐酸小檗碱是 2020 年版《中国药典》规定的黄连质量控制的指标性成分，而且其在供试品溶液中含量较高，性质稳定，较易获得，故选择为内参物。

4.4 供试品溶液制备方式的考察

本研究考察了提取溶剂、提取方式、提取体积、提取时间对黄连花茎特征成分提取效果的影响，结果显示超声提取法对特征成分的提取率较高，考虑到超声法操作简便，节省时间，以及酚酸类化合物的不稳定性 (待测成分中有绿原酸)，最终选择 70% 乙醇超声提取 45 min 作为提取条件。

4.5 色谱条件的优化

本研究考察了采用乙腈 - 水、乙腈 - 0.1% 磷酸、乙腈 - 0.1% 磷酸 (每 1000 mL 加入 20 μL 的三乙胺) 溶液作为流动相对 4 个待测成分含量测定结果的影响，结果显示用乙腈 - 0.1% 磷酸 (每 1000 mL 加入 20 μL 的三乙胺) 时的峰形效果较好，故选择溶液乙腈 - 0.1% 磷酸 (每 1000 mL 加入 20 μL 的三乙胺) 为流动相。考察不同梯度洗脱程序，在最终确定的色谱条件下，4 个待测成分峰形良好，理论塔板数均大于 5000，待测成分间以及与样品中其他成分之间的分离度良好。

4.6 指标的选择

2020 年版《中国药典》中以盐酸小檗碱的含量来控制黄连药材的质量,规定以盐酸小檗碱计,含小檗碱不得少于 5.5%,测定的黄连花茎样品中盐酸小檗碱含量在 0.626% ~ 0.679%,仅用盐酸小檗碱作为黄连花茎的质量控制指标专属性较差,同时蒙花苷为黄连花茎与黄连药材的差异性成分,在测定 4 个化学成分中含量最高,并且与黄连药材相比具有专属性。蒙花苷具有较好抗炎、抗氧化活性,可抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡,对肝、肾等器官有保护作用,可调节骨代谢,还具有降血压、抑制胆碱酯酶活性等药理作用,说明黄连花茎极具开发利用价值^[25]。由于芦丁、绿原酸在黄连花茎中成分含量较高且易于测定,因此本文选择用芦丁、绿原酸、盐酸小檗碱、蒙花苷作为黄连花茎测定的指标性成分。

5 小结

迄今为止,黄连药材的化学成分、药理作用等已有相关的研究,但是对于黄连花茎的化学成分、药理活性等方面的研究涉及甚少,且其具有降脂、降糖、抗氧化的作用,与黄连药材的治疗功效有所不同。于是,本研究选择黄连花茎作为研究对象,寻找并分离了黄连药材与黄连花茎中不同的化学成分,建立了 QAMS 同时测定黄连花茎差异性成分及其他 3 个成分的含量,可用于黄连花茎的质量控制,为开发黄连花茎提供参考。

参考文献

- 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第 27 卷. 1979: 593-595.
- 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 316-318.
- 张焯, 邓琦, 魏敏, 等. 黄连花茎化学成分的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (15): 91-99.
- 杨慧, 张佳, 刘博文, 等. 黄连花茎 HPLC 指纹图谱的建立及其抗氧化和抑菌作用谱效关系研究[J]. 中国药房, 2021, 32 (5): 559-564.
- 杨慧, 刘晓凤, 刘钱, 等. Q-marker 思路下的黄连花茎抗菌作用及机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47 (6): 550-555.
- 魏华波, 董洋, 谭兵, 等. 黄连花茎化学成分和药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14 (27): 5342-5344.
- 郭杰, 林先明. 黄连规范化栽培中花茎对根茎产量的影响[J]. 湖北农业科学, 2012 (24): 5722-5723, 5733.
- 杨慧, 朱红梅, 伍蕊嗣, 等. 基于次生代谢产物和网络药理学探索黄连及黄连花茎抗菌作用的物质基础及机制差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (10): 133-141.
- 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (6): 657-658.
- 苏慧珊, 张琳, 张一帆, 等. 聚酰胺在黄酮类化合物分离纯化中的应用[J]. 广州化工, 2019, 47 (22): 23-24.
- 吕纱平, 潘浪胜. 莲子心中二种黄酮类化合物的分离与鉴定[J]. 广东化工, 2015, 42 (15): 19.
- 田燕. 黄酮类化合物在聚酰胺上的层析行为[J]. 大连医科大学学报, 2002 (2): 147-148.
- 郭艳华, 许江扬. 鱼腥草总黄酮的提取纯化及黄酮类型的初步鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28 (9): 287-291.
- 甘春丽, 王晶, 杨异卉, 等. 聚酰胺柱色谱法分离黄酮醇与二氢黄酮醇类化合物[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41 (6): 552-554.
- 龙泽海, 王琦瑶, 李波, 等. 密蒙花中的 1 个新的环烯醚萜苷类化合物[J]. 中草药, 2021, 52 (1): 35-44.
- 高倩. 黄连须中生物碱含量测定及分布研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- 李春燕, 张学敏, 岳璐, 等. 黄连四个部位中五种生物碱含量和生物积累量分析研究[J]. 中医学报, 2018, 46 (2): 29-32.
- 叶富强, 徐颂芬. 黄连与吴茱萸配伍比例对黄连生物碱含量的影响[J]. 河北中医, 2000, 22 (5): 397-398.
- 谭晓杰, 贾英, 陈晓辉, 等. RP-HPLC 法测定野菊花中蒙花苷含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21 (6): 434-435, 464.
- 郭巧生, 房海灵, 申海进. 不同产地野菊花中绿原酸, 咖啡酸和蒙花苷含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (9): 1160-1163.
- 嵇增云, 贾鑫, 赵海龙, 等. 一测多评法同时测定蒙药述达格-4 中 5 个黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (9): 1605-1611.
- 王瑜婷, 邝敏, 何荣荣, 等. 一测多评法同时测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分[J]. 中南药学, 2023, 21 (2): 497-502.
- 陈江平, 余欣彤, 黎桃敏, 等. 一测多评法同时测定白芷配方颗粒中 6 种成分的含量[J]. 中南药学, 2022, 20 (11): 2626-2630.
- 曹士政, 赵登高, 马燕燕, 等. 一测多评法同时测定不同产地佛手中 6 种化学成分的含量[J]. 中南药学, 2022, 20 (5): 1167-1172.
- 许韩婷, 苏洁, 吴亚军, 等. 蒙花苷对脂多糖诱导的血管内皮细胞炎症损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32 (1): 29-32.

(收稿日期: 2023-01-06; 修回日期: 2023-04-20)

UPLC-MS/MS 测定萘敏维滴眼液包材中 6 种抗氧化剂的含量及其向药液的迁移研究

吴月霞, 杨秋红, 丰丽苑, 张倩, 范围, 陈杰 (河南省食品药品检验所, 郑州 450018)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法 (UPLC-MS/MS) 考察萘敏维滴眼液包材中 6 种抗氧化剂的含量及向药液的迁移研究。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹。质谱采用电喷雾 (ESI) 离子源, 多反应监测 (MRM) 正、负离子切换模式进行定性定量分析。结果 6 种抗氧化剂均在 0.5 ~ 100 ng·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.9997$), 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别在 0.003 ~ 0.122 ng·mL⁻¹ 和 0.010 ~ 0.432 ng·mL⁻¹, 平均加标回收率在 98.9% ~ 101.3%, RSD 在 0.23% ~ 1.6%。经检验, 25 批萘敏维滴眼液中 6 种抗氧化剂含量均不超过检测限浓度, 均符合规定, 包材中检出 2 种抗氧化剂。影响因素试验表明, 6 种抗氧化剂的迁移不受强光照射、高温和高湿的影响, 表明本品由包材中抗氧化剂迁移带来的安全风险较低。结论 本方法操作简便、灵敏度高、准确度高、检测限低, 可用于萘敏维滴眼液中 6 种抗氧化剂迁移情况的监测、溯源及快速筛查。

关键词: 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法; 快速筛查; 萘敏维滴眼液; 抗氧化剂; 包材
中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1347-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.036

Content of 6 antioxidants in naphazoline hydrochloride, chlorphenamine maleate and vitamin B₁₂ eye drops by UPLC-MS/MS and their migration to liquid

WU Yue-xia, YANG Qiu-hong, FENG Li-chun, ZHANG Qian, FAN Wei, CHEN Jie (*Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450018*)

Abstract: Objective To establish an UPLC-MS/MS method to determine the content of 6 antioxidants in naphazoline hydrochloride, chlorphenamine maleate and vitamin B₁₂ eye drops, and the migration of antioxidants in the package materials to the liquid. **Methods** Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) was used. Gradient elution was performed with 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. Mass spectrometry was performed with electrospray (ESI) ion source and multiple reaction monitoring (MRM) in both positive and negative ion switching modes. **Results** The linearity of the 6 antioxidants was good at 0.5 ~ 100 ng·mL⁻¹ ($r \geq 0.9997$). The limit of detection was 0.003 ~ 0.122 ng·mL⁻¹ and limit of quantification was 0.010 ~ 0.432 ng·mL⁻¹. The average recoveries were 98.9% ~ 101.3%, and RSD was 0.23% ~ 1.6%. After the inspection, the content of 6 antioxidants in 25 batches of eye drops did not exceed the detection limit concentration, all in line with the regulations. Two antioxidants were detected in the package materials. The migration of 6 antioxidants was not affected by high light irradiation, high temperature and high humidity, indicating that the safety risk caused by the migration of antioxidants in the package materials was low. **Conclusion** The method is simple, sensitive, and accurate with low detection limit, which can be used for the monitoring, tracing and rapid screening of the migration of 6 antioxidants in vitamin B₁₂ eye drops.

Key words: UPLC-MS/MS; rapid screening; naphazoline hydrochloride, chlorphenamine maleate and vitamin B₁₂ eye drop; antioxidant; package material

萘敏维滴眼液多采用聚乙烯塑料制品作为包材, 此类包材在生产中都会加入抗氧化剂, 以提高其延展性和弹性, 延缓氧化, 方便生产, 易于加工及保持性状稳定^[1]。部分抗氧化剂如苯基取代的亚磷酸酯类被认为有一定的毒性^[2], 且部分抗氧化剂的降解产物有潜在的致癌作用^[3]。由于药品包装材料直接接触药液, 在长期储存过程中, 抗氧化剂易与药液发生相互作用或直接迁移至药液中, 会影响药效甚至直接危害人体健康^[4]。国家药审中心发布了《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)》^[5], 指出包装系统浸出物的水平应符合安全性要求。欧洲药典收录了部分塑料药包材抗氧化剂的信息, 并规定每种树脂添加抗氧化剂的种类不得超过 3 种, 单种抗氧化剂的量不得超过 0.3%, 总量不得超过 0.3%^[6]。因此有必要对其中所含的抗氧化剂进行考察, 进一步提高药品质量, 保障人们用药安全。

目前国内对药品包材中抗氧化剂的研究主要集中在注射液和输液上^[7-12]。张冬梅等^[13]用 HPLC 法对妥布霉素滴眼液中抗氧化剂含量进行测定, 但是方法灵敏度低, 且分析时间较长; 也有文献采用离子色谱法测定抗氧化剂的含量, 但前处理非常麻烦, 基质干扰大^[14-16]; 采用 LC-MS 对抗氧化剂的分析主要集中在胶塞和输液上, 但使用该方法对滴眼液中抗氧化剂的研究却很少^[17-19]; 付蒙等^[20]采用 GC-MS 对卤化丁基胶塞中的抗氧化剂进行分析, 但该方法不适用于高沸点抗氧化剂(如抗氧化剂 168 等)的分析, 监测范围有限。液相色谱串联质谱技术由于 UPLC 的高分离能力以及 MS 所具备的高选择性、高灵敏度, 在现代分析领域中应用广泛。相对而言, 采用超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法(UPLC-MS/MS)对滴眼液包装的相关报道比较少见, 本文以聚乙烯类药用塑料包材为代表, 考察滴眼液药用包材中抗氧化剂的含量情况, 建立基于超高效液相色谱串联质谱技术检测萘敏维滴眼液中 6 种抗氧化剂的含量, 并对 2022 年省专项监督抽检的 25 批次样品、包材和影响因素进行了分析和评估, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 UPLC-30AD(日本 Shimadzu 公司), 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪、QTRAP 6500 质谱仪、数据采集和处理软件为 Analyst 1.6.3(美国 AB SCIEX 公司); XPE 205 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 超声仪 KQ-700DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

抗氧化剂 LK-1081(AO LK-1081, 批号: N17GS 168157, 纯度: 98%)(上海源叶生物科技有限公司); 抗氧化剂 702(AO 702, 批号: B2210291, 纯度 > 98.0%)、抗氧化剂 3114(AO 3114, 批号: H2117038, 纯度: 98%)、抗氧化剂 1010(AO 1010, 批号: F2129325, 纯度 ≥ 95.0%)、抗氧化剂 1076(AO 1076, 批号: J2122553, 纯度: 98%)、抗氧化剂 168(AO 168, 批号: B2222432, 纯度 > 98.0%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 化学文摘登记号、分子式和分子量等信息见表 1。盐酸萘甲唑啉(批号: 100111-202105)、马来酸氯苯那敏(批号: 100047-202008)、维生素 B₁₂(批号: 100248-202006)(中国食品药品检定研究院, 均供含量测定用), 甘油(批号: 20210415, 天津市大茂化学试剂厂), 依地酸二钠(批号: 20190425, 天津市光复科技发展有限公司), 苯扎溴铵(批号: L8A0T35, 北京百灵威科技有限公司)。25 批次萘敏维滴眼液为 2022 年省专项监督抽检样品, 由 A、B、C、D、E、F、G、H 8 家企业生产。低密度聚乙烯药用滴眼剂瓶(批号: 2201031, A 企业); 乙腈、甲酸(均为质谱级, 德国默克公司); 水为 Milli-Q 水(18.20 MΩ·cm⁻¹)。

表 1 6 种抗氧化剂的相关信息
Tab 1 Information of 6 antioxidants

化合物	CAS 号	分子式	分子量
AO LK-1081	90-66-4	C ₂₂ H ₃₀ O ₂ S	358.54
AO 702	118-82-1	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	424.66
AO 3114	27676-62-6	C ₄₈ H ₆₉ N ₃ O ₆	784.08
AO 1010	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1177.63
AO 1076	2082-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530.86
AO 168	31570-04-4	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	646.94

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件

色谱柱采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱(0~2 min, 55%B; 2~4 min, 55%~80%B; 4~5.5 min, 80%B; 5.5~7.5 min, 80%~100%B; 7.5~11.5 min, 100%B, 11.5~12.5 min, 100%~55%B; 12.5~13 min, 55%B); 柱温为 35 °C; 进样体积为 3 μL。通过六通切换阀, 将 4.5 min 之前的液相流出液切换至旁路, 不进入质谱分析。

2.2 质谱条件

采用 ESI 离子源, 正、负离子同时采集模式, 离子源参数见表 2。采用多反应监测(MRM)模式, 参数见表 3。

表 2 6 种抗氧化剂测定的 ESI 离子源参数

Tab 2 ESI source parameters for the determination of 6 antioxidants

化合物	气帘气 /PSI	离子化电压 /V	离子源温度 /°C	喷雾气 /PSI	辅助加热气 /PSI	碰撞气
AO LK-1081	30	- 4500	550	55	55	Medium
AO 702	30	+ 5500	550	55	55	Medium
AO 3114	30	+ 5500	550	55	55	Medium
AO 1010	30	+ 5500	550	55	55	Medium
AO 1076	30	+ 5500	550	55	55	Medium
AO 168	30	+ 5500	550	55	55	Medium

表 3 6 种抗氧化剂的母离子、子离子、离子模式、去簇电压、碰撞能和保留时间

Tab 3 Parent ion, daughter ion, polarity, declustering potential, collision energy and retention time of 6 antioxidants

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	离子模式	去簇电压 /V	碰撞能 /eV	保留时间 /min
AO LK-1081	357.5	194.1*, 163.4	Negative	- 80	- 33, - 31	5.75
AO 702	442.3	219.1*, 163.3	Positive	+ 80	24, 21	7.08
AO 3114	801.6	219.3*, 784.1	Positive	+ 80	32, 32	8.15
AO 1010	1194.8	563.1*, 729.4	Positive	+ 80	56, 72	9.49
AO 1076	530.3	515.2*, 147.1	Positive	+ 80	18, 24	11.33
AO 168	648.5	347.2*, 290.9	Positive	+ 80	56, 56	11.96

注 (Note): * 代表 MRM 定量离子 (* means quantitative MRM ion)。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取 6 种抗氧化剂对照品适量, 分别加乙腈溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 6 种抗氧化剂各约 10 μg 的溶液, 作为对照品储备液。取上述对照品储备液适量, 用乙腈定量稀释制成每 1 mL 中约含 6 种抗氧化剂 0.5、5、10、25、50、75、100 ng 的系列浓度混合对照品溶液。分别准确量取对照品储备液适量, 用乙腈稀释制成含抗氧化剂 LK-1081、抗氧化剂 702 和抗氧化剂 168 的质量浓度约为 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抗氧化剂 1010 和抗氧化剂 1076 的质量浓度约为 2000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抗氧化剂 3114 的质量浓度约为 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取萘敏维滴眼液 10 g, 精密称定, 置离心管中, 精密加入正己烷 2 mL, 漩涡振荡 2 min, 超声 2 min, 混匀, 以 15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤, 取续滤液作为萘敏维滴眼液供试品溶液。

2.3.3 空白溶液的制备 采用乙腈作为空白溶液。

2.3.4 空白辅料溶液的制备 根据各个生产厂家提供的制剂处方配比, 取空白辅料适量, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。按照“2.3.2”项下前处理方法同法制备空白辅料溶液 (与供试品溶液中辅料浓度相同)。

2.3.5 包材溶液的制备 取包材 10 套, 剪至大小约 0.2 $\text{cm} \times 0.2 \text{cm}$ 的单个碎片, 混匀。精密称取包材碎片约 2 g, 加 20 mL 正己烷煮沸回流 5 h, 残渣再用 20 mL 正己烷重复提取 1 次, 合并滤液

置 50 mL 量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 即得。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 分别取空白溶液、空白辅料溶液、混合对照品溶液、供试品溶液和包材溶液, 按照“2.1”和“2.2”项下的方法进行分析, 记录 MRM 质谱图, 得到 6 种抗氧化剂的混合对照品溶液总离子流色谱图 (TIC), 典型图谱见图 1。结果显示 6 种抗氧化剂均能有效分离, 空白溶液 (乙腈) 和萘敏维滴眼液中的主成分盐酸萘甲唑啉、马来酸氯苯那敏、维生素 B_{12} 及辅料均在 3 min 前出峰, 不干扰 6 种抗氧化剂的检测。各个厂家空白辅料在 6 种抗氧化剂相同保留时间位置均无明显干扰峰。

2.4.2 线性范围、检测限及定量限 取“2.3.1”项下 6 种抗氧化剂的系列浓度的对照品溶液, 按“2.1”和“2.2”项下方法进行测定, 以各抗氧化剂的质量浓度为横坐标, 对应的定量离子峰面积为纵坐标进行线性回归, 建立线性方程, 结果见表 4。6 种抗氧化剂在线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.3 检测限与定量限 精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量, 用乙腈逐级定量稀释。按“2.1”和“2.2”项下条件进行测定, 分别以 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 确定各抗氧化剂的方法检测限和定量限。结果见表 4。

2.4.4 精密度 精密量取“2.3.1”项下的混合对照品溶液, 重复进样 6 次, RSD 为 0.24% ($n = 6$), 说明仪器精密度良好。同时在不同日期由不同人员在同一台机器上分别进样测试, 6 种抗氧化剂峰面积 RSD 值结果均在 0.21% ~ 0.62% ($n =$

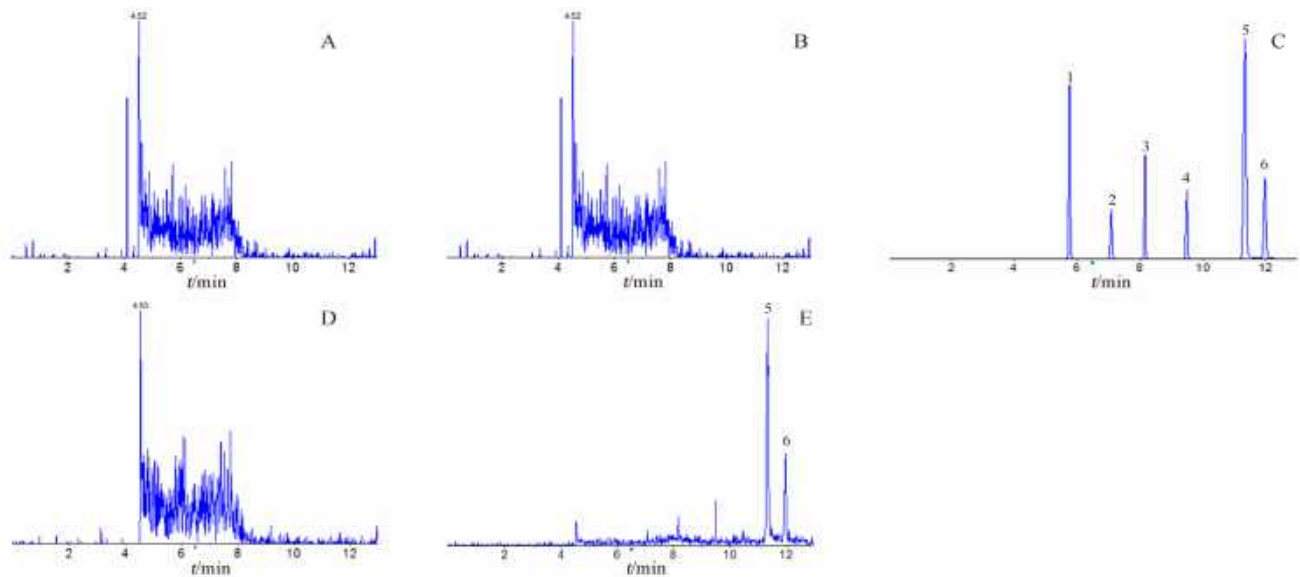


图 1 萘敏维滴眼液中 6 种抗氧化剂专属牲试验 MRM 质谱图

Fig 1 MRM mass spectrogram of the specificity test of 6 antioxidants in naphazoline hydrochloride, chlorphenamine maleate and vitamin B₁₂ eye drops

A. 空白溶液 (blank solution); B. 空白辅料溶液 (blank excipient solution); C. 对照品溶液 (reference solution); D. 供试品溶液 (test solution); E. 包材溶液 (packaging material solution); 1. 抗氧化剂 LK-1081 (AO LK-1081); 2. 抗氧化剂 702 (AO 702); 3. 抗氧化剂 3114 (AO 3114); 4. 抗氧化剂 1010 (AO 1010); 5. 抗氧化剂 1076 (AO 1076); 6. 抗氧化剂 168 (AO 168)

表 4 6 种抗氧化剂的线性、范围、检测限及定量限

Tab 4 Linear, range, LOQ and LOD of 6 antioxidants

化合物	线性方程	r	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	检测限 / (ng · mL ⁻¹)	定量限 / (ng · mL ⁻¹)
AO LK-1081	$y = 1.74 \times 10^4 x + 3.48 \times 10^3$	1.000	0.5 ~ 100	0.004	0.010
AO 702	$y = 7.28 \times 10^3 x - 1.09 \times 10^3$	1.000	0.5 ~ 100	0.052	0.212
AO 3114	$y = 1.48 \times 10^4 x + 3.63 \times 10^3$	1.000	0.5 ~ 100	0.003	0.011
AO 1010	$y = 1.07 \times 10^4 x + 1.96 \times 10^3$	1.000	0.5 ~ 100	0.023	0.072
AO 1076	$y = 3.89 \times 10^4 x + 1.85 \times 10^3$	0.9999	0.5 ~ 100	0.122	0.432
AO 168	$y = 1.19 \times 10^4 x + 3.63 \times 10^3$	0.9997	0.5 ~ 100	0.032	0.141

6), 说明中间精密密度良好。

2.4.5 准确度 精密量取 6 种抗氧化剂含量已知的萘敏维滴眼液 10 mL, 置离心管中, 按照“2.3.2”项下的方法制备回收率本底供试品溶液; 同法加入 80%、100%、120% 浓度的抗氧化剂对照溶液, 制备回收率加标供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果 6 种抗氧化剂的回收率为 98.9% ~ 101.3%, RSD 为 0.23% ~ 1.6%。

2.4.6 稳定性 取“2.3.1”项下混合对照品溶液和“2.3.2”项下供试品溶液, 在室温下放置, 分别在 0、2、4、6、8、10、18、20 h 进样测定, 混合对照品溶液中 6 种抗氧化剂峰面积的 RSD 值在 0.81% ~ 1.9%, 表明对照品溶液在 20 h 内稳定性良好。供试品溶液中均未检出 6 种抗氧化剂, 表明供试品溶液在室温 20 h 内稳定性良好。

3 样品测定

3.1 制剂测定

取 25 批次样品, 按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定, 结果制剂中均未检出 6 种抗氧化剂。

3.2 包材测定

按照“2.3.5”项下方法制备包材溶液, 分别进样测定, 结果显示 25 批次包材中检出抗氧化剂 1076, 检出量为 4.26 ~ 7.84 ng · g⁻¹; 其余抗氧化剂均未检出。22 批次抗氧化剂 168 检出量为 3.81 ~ 6.25 ng · g⁻¹。

3.3 影响因素试验

取萘敏维滴眼液 (A 企业, 211101), 置强光 (照度 4500 lx)、高温 (60 °C)、高湿 (相对湿度 92.5%), 环境下在 0、5、10 d 分别取样。按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。结果显示 6 种抗氧化剂含量均无变化, 不受高温、高湿和强光照的影响。

4 讨论

4.1 质谱条件的优化

首先采用流动注射泵连续进样方式, 分别在 ESI 的正离子模式及负离子模式下对 6 种抗氧化剂的单标溶液进行全扫描, 确定母离子; 其次根据母离子分别对其子离子进行扫描, 选取响应强度最大的 2 个子离子, 两者中以响应强度大者为定

量离子, 另一个为定性离子; 最后进行去簇电压和碰撞能的优化, 得到 6 种抗氧化剂的最佳质谱参数。探索试验发现, 抗氧化剂 LK-1081 在 ESI 正离子模式下响应相对较差, 因此对其采用负离子模式。另外, ESI 离子源参数中, CE 能显著影响质谱检测灵敏度。因此, 通过调整质谱参数来优化抗氧化剂的响应, 有效提高了检测方法的灵敏度。

4.2 阀切换技术的应用

萘敏维滴眼液为复方制剂, 在进行液相色谱分离时, 流出液中含有 3 种高浓度的主成分及大量辅料, 为防止污染质谱, 降低 6 种抗氧化剂的离子化效率, 本试验采用了阀切换技术, 将保留时间 4.5 min 之前的辅料成分及高浓度的主成分切换到旁路, 不进入质谱, 使采集的质谱基线更平稳, 保证了方法的重现性、专属性和灵敏度。

5 结论

本试验建立了超高效液相色谱串联质谱法考察萘敏维滴眼液包材中 6 种抗氧化剂的含量及其向药液的迁移, 方法操作简便、快速准确、灵敏度高、专属性好, 适用于萘敏维滴眼液中抗氧化剂的限度检查和定量测定。25 批萘敏维滴眼液中 6 种抗氧化剂的残留量均低于检测限, 均符合规定, 表明生产厂家的工艺可有效避免抗氧化剂的引入。因此, 对于萘敏维滴眼液中抗氧化剂的含量的监控应更加关注包装材料的选择, 可不在萘敏维滴眼液中进行控制。本研究结果为监管机构评估萘敏维滴眼液产品质量提供了数据支撑, 同时可为其他滴眼液中抗氧化剂的检测提供参考。

参考文献

- [1] 谢兰桂, 孙会敏, 杨会英, 等. 塑料类药包材抗氧化剂的检测分析策略[J]. 中国药事, 2022, 36(9): 1002-1009.
- [2] 张璐, 涂家生. 注射剂和滴眼剂中抑菌剂和抗氧化剂的添加及检测[J]. 药学与临床研究, 2012, 20(2): 137-141.
- [3] 常亮, 陈珍珍, 朱碧君. 药用复合膜中抗氧化剂含量及其原材料来源研究[J]. 江西中医药大学学报, 2021, 33(4): 89-92.
- [4] 谭明国. 酮洛芬醋酸钠注射液与三层共挤输液用袋的相容性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)[S]. 2012-09-07.
- [6] The European Pharmacopoeia 10.0th Edition [S]. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), 2020 (1): 423-436.
- [7] 邹宇, 刘杨, 刘亚威, 等. 醋酸钠林格注射液与包材中抗氧化剂的相容性研究[J]. 中南药学, 2022, 20(4): 905-909.
- [8] 李兴春, 路杰, 李洁, 等. HPLC 法测定高密度聚乙烯桶包装血液透析浓缩液中抗氧化剂 1010、抗氧化剂 330、抗氧化剂 1076、抗氧化剂 168 的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(2): 86-88.
- [9] 李越, 孙会敏, 张焯. 塑料输液包装材料与容器中抗氧化剂含量测定方法的建立及其在注射液中的迁移研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(19): 1699-1705.
- [10] 朱碧君, 胡红刚, 李婷婷, 等. HPLC 法测定聚丙烯输液瓶中抗氧化剂 1010、抗氧化剂 1076、抗氧化剂 168、抗氧化剂 330 的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 416-418, 433.
- [11] 吴红洋, 李莎, 张璞, 等. 药用胶塞中抗氧化剂 2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚含量测定及迁移量研究[J]. 中国药业, 2022, 31(1): 63-66.
- [12] 王丽, 赵锐, 田恩圣, 等. 35 批次头孢类抗生素注射用粉针丁基胶塞中游离硫及常见抗氧化剂的迁移研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 2033-2041.
- [13] 张冬梅, 于明艳, 刘文坤, 等. HPLC 考察妥布霉素滴眼液中 11 种抗氧化剂[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1862-1866.
- [14] 陈宁, 张远杏, 黄权华. 离子色谱法测定盐酸米托蒽醌注射液中抗氧化剂焦亚硫酸钠的含量[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38(1): 18-22.
- [15] 石洁, 朱飞, 周静, 等. 离子色谱法同时测定复方电解质注射液中果糖、乳酸钠和抗氧化剂的含量[J]. 药学与临床研究, 2022, 30(2): 123-126.
- [16] 高丛丛, 李珉, 侯金凤, 等. 离子色谱法测定注射剂中 4 种常用水溶性抗氧化剂的含量[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(3): 262-264.
- [17] 余秋玲, 张永梅, 邱月, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速筛查药用胶塞中 12 种抗氧化剂[J]. 分析测试学报, 2022, 41(6): 910-915.
- [18] 叶汝汉, 王成刚, 张广文, 等. 高效液相色谱-质谱法测定五层共挤输液用袋中的抗氧化剂、增塑剂和紫外吸收剂[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(3): 333-337.
- [19] 冯彬, 徐婷婷, 赵铁凯, 等. 超高效液相色谱法快速测定复合助剂中抗氧化剂 168、抗氧化剂 1010 及硬脂酸钙的含量[J]. 精细石油化工进展, 2022, 23(2): 55-58.
- [20] 付蒙, 袁怡, 夏汉桥, 等. 气质联用法分析卤化丁基胶塞中的挥发性成分[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 818-826.

(收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-11-10)

一测多评法同时测定丹参配方颗粒中 7 个酚酸类成分

邝敏, 严玉晶, 林嘉明, 汪梅, 黄醒鹏, 李玲, 张正* (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** 建立一测多评法测定丹参配方颗粒中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的含量, 验证其准确性及可行性。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.2 mL·min⁻¹; 检测波长为 286 nm。以原儿茶醛为内参物, 计算其他 6 个成分的相对校正因子。同时采用外标法和一测多评法测定丹参配方颗粒中 7 个酚酸类成分的含量, 比较两种方法的测定结果是否存在差异。**结果** 丹参素、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.999$); 相对校正因子分别为 7.36、1.18、2.82、1.99、2.82、3.31。一测多评法与外标法测得 12 批样品中 7 个酚酸类成分的含量结果无显著差异, 丹参素、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 相对误差分别在 0.43%~0.53%、0.00%~3.70%、0.00%~0.34%、1.71%~2.01%、2.53%~2.93%、1.69%~1.73%。**结论** 建立的一测多评法测定丹参配方颗粒中 7 个酚酸类成分简便稳定, 可用于丹参配方颗粒的定量分析及质量控制。

关键词: 一测多评; 相对校正因子; 丹参配方颗粒; 丹参素; 原儿茶醛; 咖啡酸; 丹酚酸 E; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1352-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.037

Simultaneous determination of 7 phenolic acids in Danshen formula granules by quantitatively analyze of multi-components by single-marker

KUANG Min, YAN Yu-jing, LIN Jia-ming, WANG Mei, HUANG Xing-peng, LI Ling, ZHANG Zheng* (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244)

Abstract: Objective To establish quantitatively analyze of multi-components by single-marker (QAMS) in the simultaneous determination of tanshinol, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, salvianolic acid E, rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic acid B in Danshen formula granules, and to verify the accuracy and feasibility. **Methods** HPLC method was adopted. The chromatographic column Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution under gradient elution; and the flow rate was 1.2 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 286 nm. The relative correction factors of the other 6 components were calculated with protocatechuic aldehyde as the internal reference. Meanwhile, the content of the 7 phenolic acids in Danshen formula granules was determined by both the external standard method (ESM) and QAMS for further comparison. **Results** Tanshinol, caffeic acid, salvianolic acid E, rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic acid B showed good linearity in their respective concentration ranges ($r > 0.999$), whose relative correction factors were 7.36, 1.18, 2.82, 1.99, 2.82 and 3.31. The content of the 7 phenolic acids in 12 batches of samples determined by two assays showed no significant difference. The relative errors of tanshinol, caffeic acid, salvianolic acid E, rosmarinic acid, lithospermic acid and salvianolic

作者简介: 邝敏, 男, 主要从事中药制剂工艺研究与质量控制, email: 1298723223@qq.com *通信作者: 张正, 男, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药配方颗粒质量标准与工艺研究, email: zhangzhengbill@163.com

acid B were 0.43% ~ 0.53%, 0.00% ~ 3.70%, 0.00% ~ 0.34%, 1.71% ~ 2.01%, 2.53% ~ 2.93% and 1.69% ~ 1.73%, respectively. **Conclusion** QAMS established for the determination of the 7 phenolic acids in Danshen formula granules is simple and stable, which can be used for the quantitative analysis and quality control of Danshen formula granules.

Key words: QAMS; relative correction factor; Danshen formula granule; tanshinol; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; salvianolic acid E; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 性微寒, 味苦, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效。临床上常用于胸痹心痛、胶腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛^[1]。丹参含有二萜类、三萜类、酚酸类、黄酮类及生物碱类等化合物, 其中脂溶性二萜类与水溶性酚酸类化合物是丹参的主要活性成分^[2]。现代研究表明, 酚酸类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗高血压、抗动脉粥样硬化、保护心肌细胞和抗胃溃疡等药理作用^[3-8]。

丹参配方颗粒是在中医药理论指导下, 用符合药典标准的丹参饮片经现代工业水提、分离、浓缩、干燥、制粒而成的中药产品; 其性味、归经、功效与丹参饮片一致, 不含糖、防腐剂和其他赋形剂。用其代替丹参饮片供临床配方使用, 既保持了丹参饮片的药性药效, 又具有免煎煮、易于调剂、方便服用等优点。中药有效成分复杂多样, 单一指标成分评价难以准确反映中药内在质量, 具有一定的局限性。而多指标质量评价模式需要的对照品种类繁多, 且部分对照品存在难分离、造价高、稳定性差等问题。王智民等^[9]提出的一测多评 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS) 法是利用一种相对易得、廉价的对照品作为内参物, 同时实现多个同类型化合物含量测定的多指标质量控制方法。该方法克服了对照品紧缺、检测成本高等困难, 适合中药多指标质量评价检测。丹参配方颗粒作为中药新剂型在现代临床被广泛使用, 但目前针对丹参配方颗粒整体质量控制的研究较少。因此, 本试验采用 QASM 法同时测定丹参配方颗粒中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的含量, 以期为提高丹参配方颗粒整体质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Waters Arc 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Agilent 1290 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent

公司); XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q Direct 型超纯水系统 (德国 Merck 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

对照品原儿茶醛 (批号: 110810-201909, 纯度: 99.6%)、咖啡酸 (批号: 110885-201703, 纯度: 99.7%)、迷迭香酸 (批号: 111871-202007, 纯度: 98.1%)、丹酚酸 B (批号: 111562-201917, 纯度: 96.6%) (中国食品药品检定研究院); 丹参素 (批号: DSTDD001501, 纯度: 98.79%, 成都乐美天医药科技有限公司); 紫草酸 (批号: wkq21031202, 纯度: 99.31%, 四川省维克奇生物科技有限公司); 丹酚酸 E (批号: 040169-202203, 纯度: 97.75%, 上海鸿永生物科技有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯 (德国 Merck 股份有限公司); 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; 其他试剂均为分析纯。12 批丹参配方颗粒 (编号: DS-1 ~ DS-12) 均由广东一方制药有限公司制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.05% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 10% ~ 20%A; 15 ~ 40 min, 20% ~ 25%A; 40 ~ 50 min, 25% ~ 30%A; 50 ~ 51 min, 30% ~ 10%A; 51 ~ 56 min, 10%A); 流速: 1.2 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 286 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 50.699、10.558、2.161、11.300、19.777、20.100、108.540 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取丹参配方颗粒适量, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 100 mL, 称重, 超声处理 (功率 140 W, 频率 42 kHz)

30 min, 取出, 放冷, 再称重, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液及供试品溶液 (编号 DS-2), 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果见图 1。可见, 供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应的保留时间处具有相同的色谱峰, 且空白溶剂无干扰, 表明该方法专属性良好。

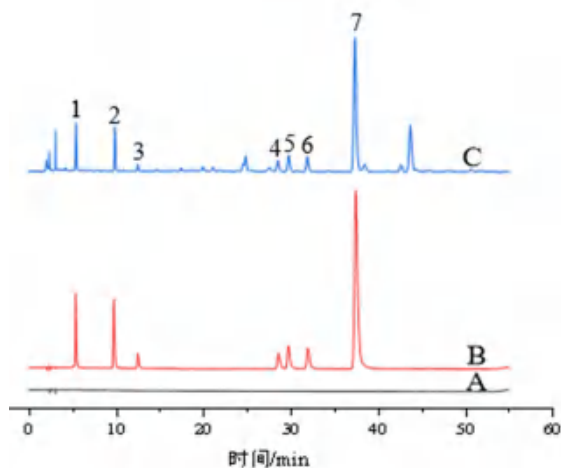


图 1 专属性试验 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of specific test

A. 空白溶剂 (blank solution); B. 混合对照品 (mixed reference); C. 供试品 (sample); 1. 丹参素 (tanshinol); 2. 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde); 3. 咖啡酸 (caffeic acid); 4. 丹酚酸 E (salvianolic acid E); 5. 迷迭香酸 (rosmarinic acid); 6. 紫草酸 (lithospermic acid); 7. 丹酚酸 B (salvianolic acid B)

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以对照品溶液质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果见表 1。可知 7 个成分在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 7 个成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 7 components

成分	回归方程	相关系数 (r)	线性范围 / 数 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
丹参素	$Y = 4.654 \times 10^3 X + 1.275 \times 10^3$	0.9997	2.5350 ~ 50.6990
原儿茶醛	$Y = 3.461 \times 10^4 X + 1.424 \times 10^3$	0.9997	0.5279 ~ 10.5576
咖啡酸	$Y = 2.877 \times 10^4 X + 605.0$	0.9995	0.1081 ~ 2.1615
丹酚酸 E	$Y = 1.203 \times 10^4 X + 890.5$	0.9999	0.5650 ~ 11.2999
迷迭香酸	$Y = 1.732 \times 10^4 X + 1.345 \times 10^3$	0.9998	0.9888 ~ 19.7770
紫草酸	$Y = 1.233 \times 10^4 X + 604.2$	0.9999	1.0050 ~ 20.1003
丹酚酸 B	$Y = 1.078 \times 10^4 X - 2.996 \times 10^3$	1.000	5.4270 ~ 108.5398

2.4.3 精密度考察 分别精密吸取混合对照品溶液 (丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 质量浓度分别为 50.325、10.933、2.089、12.132、20.014、20.256、110.587 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.0、5.0、10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成低、中、高浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件分别连续进样 6 次, 计算色谱峰峰面积 RSD , 测定日内精密度; 分别连续进样 6 次, 连续测定 3 d, 计算色谱峰峰面积 RSD , 测定日间精密度; 结果 7 个成分低、中、高质量浓度日内精密度 RSD 在 0.38% ~ 2.1%, 日间精密度 RSD 在 1.2% ~ 3.7%, 表明方法日内精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取丹参配方颗粒 (编号 DS-2), 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定, 计算得丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.52%、1.3%、0.80%、1.2%、1.1%、0.28%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取丹参配方颗粒 (编号 DS-2), 精密称定, 平行 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。计算得丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 含量的 RSD 分别为 1.5%、0.92%、2.3%、0.59%、2.3%、1.5%、0.60%, 表明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收试验 取已知含有量的丹参配方颗粒 (编号 DS-2) 适量, 精密称取 9 份, 每份约 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 分为 3 组, 每组分别精密加入相当于含有量 50%、100%、150% 的混合对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算得到丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的平均加样回收率均在 97.50% ~ 105.59%, RSD 均小于 5.0%, 表明该方法准确度良好。

2.5 QAMS 法的建立

2.5.1 相对校正因子 (f) 的确定 取“2.2”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 进样测定, 以原儿茶醛作为内参物, 计算丹参素、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的相对校正因子。公式为 $f_{s_i} = f_i / f_s = (A_i / C_s) / (A_s / C_i) = (A_s \times C_i) / (A_i \times C_s)$, 式中 A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物浓度, A_i 为某待测成分峰面积, C_i 为某待测成分浓度^[10]。计算得相对校正因子, 结果见表 2。

表 2 6 个成分的相对校正因子 ($n = 6$)

Tab 2 Relative correction factors of 6 components ($n = 6$)

序号	$f_{\text{原儿茶醛/丹参素}}$	$f_{\text{原儿茶醛/咖啡酸}}$	$f_{\text{原儿茶醛/丹酚酸 E}}$	$f_{\text{原儿茶醛/迷迭香酸}}$	$f_{\text{原儿茶醛/紫草酸}}$	$f_{\text{原儿茶醛/丹酚酸 B}}$
1	6.99	1.19	2.73	1.97	2.78	3.44
2	7.61	1.11	2.69	1.97	2.91	3.38
3	7.27	1.17	2.87	2.01	2.80	3.28
4	7.47	1.19	2.89	2.00	2.82	3.29
5	7.41	1.19	2.87	2.00	2.83	3.25
6	7.43	1.20	2.86	2.00	2.80	3.21
平均值	7.36	1.18	2.82	1.99	2.82	3.31
RSD/%	2.9	2.8	3.0	0.87	1.6	2.6

2.5.2 不同测定仪器及色谱柱对相对校正因子的影响 以原儿茶醛为内参物, 考察其他 6 个成分在不同高效液相色谱仪 Waters Arc 型、Agilent 1290 型, 以及不同色谱柱 Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Xbridge C18

(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Athena C18-WP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 下的相对校正因子, 结果见表 3, 各成分的相对校正因子 RSD 均小于 3.0%, 表明不同色谱系统和色谱柱对各成分相对校正因子无显著影响。

表 3 不同色谱仪和色谱柱对相对校正因子的影响 ($n = 3$)

Tab 3 Influence of instrument and column on relative correction factors ($n = 3$)

仪器	色谱柱	相对校正因子 (内参物原儿茶醛)					
		丹参素	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
Agilent 1290	Xselect HSS T3	7.46	1.20	2.90	2.00	2.85	3.29
	Xbridge C18	7.59	1.18	2.84	1.97	2.81	3.28
	Athena C18-WP	7.65	1.18	2.93	2.00	2.75	3.22
Waters Arc	Xselect HSS T3	7.38	1.19	2.81	1.95	2.75	3.28
	XBRIDGE C18	7.37	1.18	2.92	1.96	2.81	3.26
	Athena C18-WP	7.48	1.19	2.98	2.02	2.84	3.23
平均值		7.49	1.19	2.90	1.98	2.80	3.26
RSD/%		1.5	0.69	2.1	1.4	1.5	0.89

2.5.3 不同流速对相对校正因子的影响 以原儿茶醛为内参物, 考察其他 6 个成分在不同流速 (0.8、1.0、1.2、1.5 mL·min⁻¹) 下的相对校正因子, 结果见表 4, 各成分的相对校正因子 RSD 均小于 3.0%, 表明不同流速对各成分相对校正因子无显著影响。

表 4 不同流速对相对校正因子的影响 ($n = 3$)

Tab 4 Influence of flow rate on relative correction factors ($n = 3$)

流速 / (mL·min ⁻¹)	相对校正因子 (内参物原儿茶醛)					
	丹参素	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
0.8	7.40	1.17	2.88	1.90	2.89	3.31
1.0	7.29	1.12	2.83	1.94	2.83	3.29
1.2	7.34	1.12	2.92	1.96	2.81	3.18
1.5	7.24	1.11	2.88	1.94	2.89	3.23
平均值	7.32	1.13	2.88	1.94	2.86	3.25
RSD/%	0.94	2.4	1.3	1.3	1.4	1.8

2.5.4 不同柱温对相对校正因子的影响 以原儿茶醛为内参物, 考察其他 6 个成分在不同柱温 (25、30、35、40 °C) 下的相对校正因子, 结果见表 5, 各成分的相对校正因子 RSD 均小于

3.0%, 表明不同柱温对各成分相对校正因子无显著影响。

2.5.5 不同进样体积对相对校正因子的影响 以原儿茶醛为内参物, 考察其他 6 个成分在不同进样体积 (5、8、10、12、15 μL) 下的相对校正因子, 结果见表 6, 各成分的相对校正因子 RSD 均小于 5.0%, 表明不同流速对各成分相对校正因子无显著影响。

2.6 待测成分色谱峰的定位

采用不同色谱仪及色谱柱测定时, 待测成分的保留时间会有所波动, 目前在 QAMS 研究中常用的色谱峰定位方法有相对保留值法、保留时间差法、时间校正法、对照提取物法等。本试验采用相对保留值法, 计算公式为 $t_{is} = t_i/t_s$ ^[11-14]。以原儿茶醛为内参物, 考察其他 6 个成分在不同高效液相色谱仪 (Waters Arc 型、Agilent 1290 型) 及不同色谱柱 [Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Xbridge C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Athena C18-WP (250 mm×4.6 mm, 5 μm)] 下的相对保留值, 结果见表 7, 各成分相

表 5 不同柱温对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 5 Influence of column temperature on relative correction factors (n = 3)

柱温 /℃	相对校正因子 (内参物原儿茶醛)					
	丹参素	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
25	7.28	1.12	2.93	1.96	2.81	3.19
30	7.42	1.13	2.85	1.94	2.84	3.21
35	7.45	1.13	2.79	1.95	2.90	3.20
40	7.54	1.13	2.85	1.95	2.86	3.26
平均值	7.42	1.13	2.86	1.95	2.85	3.22
RSD/%	1.5	0.44	2.0	0.42	1.3	0.97

表 6 不同进样体积对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 6 Influence of injection volume velocity on relative correction factors (n = 3)

进样体 积 /μL	相对校正因子 (内参物原儿茶醛)					
	丹参素	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
5	7.24	1.25	2.84	2.04	2.85	3.30
8	7.29	1.20	2.82	1.91	2.90	3.25
10	7.34	1.15	2.92	1.96	2.81	3.10
12	7.58	1.23	2.95	1.98	2.91	3.15
15	7.61	1.19	2.77	1.91	2.72	3.25
平均值	7.41	1.20	2.86	1.96	2.84	3.21
RSD/%	2.3	3.2	2.6	2.8	2.7	2.6

表 7 不同色谱仪和色谱柱对相对保留值的影响 (n = 3)

Tab 7 Influence of instrument and column on relative retention time (n = 3)

仪器	色谱柱	相对保留时间 (内参物原儿茶醛)					
		丹参素	咖啡酸	丹酚酸 E	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B
Agilent1290	Xselect HSS T3	0.55	1.00	1.28	2.93	3.05	3.28
	Xbridge C18	0.56	1.00	1.24	3.07	3.04	3.41
	Athena C18-WP	0.54	1.00	1.27	2.86	2.93	3.17
Waters Arc	Xselect HSS T3	0.55	1.00	1.26	2.93	3.05	3.27
	Xbridge C18	0.56	1.00	1.23	3.05	3.19	3.39
	Athena C18-WP	0.54	1.00	1.27	2.89	2.96	3.21
平均值		0.55	1.00	1.26	2.96	3.04	3.29
RSD/%		1.6	0.00	1.5	2.9	3.0	2.9

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择

本研究对供试品溶液的提取方式 (超声法、回流法)、提取溶剂 (水、30% 甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇)、提取时间 (20、30、40 min) 进行考察。结果表明, 本研究供试品制备方法操作简便, 且供试品溶液色谱峰峰面积、分离度均较好。

3.2 色谱条件的选择

本研究比较了甲醇、乙腈两种有机溶剂和不同浓度的磷酸、甲酸、醋酸组合的流动相体系, 发现使用乙腈作为有机相较甲醇洗脱能力强, 峰分离度好, 使用磷酸作为水相时色谱图基线更平稳, 噪音小。乙腈-0.05% 磷酸洗脱时目标峰与相邻杂质峰分离度均大于 1.5, 峰形良好, 故采

对保留值的 $RSD < 3.0\%$, 表明不同色谱系统和色谱柱对各成分相对保留值无显著影响。

2.7 外标法 (ESM) 和 QAMS 测定结果对比

取 12 批丹参配方颗粒适量 (DS-1 ~ DS-12), 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 分别采用 QAMS 和 ESM 法测定各成分含量, 利用 SPSS 26.0 软件对两组结果进行 Pearson 相关系数 (r) 分析, 结果见表 8。两种方法之间的 r 均为 1.000, 两种方法计算的含量具有高相关性 ($P > 0.05$)。使用 QAMS 和 ESM 法测定丹参配方颗粒中丹参素、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的含量, 计算两种测定方法下的相对误差 (RAD), $RAD (\%) = [(QAMS \text{ 计算值} - ESM \text{ 实测值}) / \text{外标法实测值}] \times 100\%^{[15]}$, 结果显示丹参素、咖啡酸、丹酚酸 E、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的相对误差范围分别为 0.43% ~ 0.53%、0.00% ~ 3.70%、0.00% ~ 0.34%、1.71% ~ 2.01%、2.53% ~ 2.93%、1.69% ~ 1.73%, 说明建立的丹参配方颗粒 QAMS 准确可行。

用该流动相系统。采用 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 内对供试品溶液进行扫描, 得到 3D 色谱图, 发现在 286 nm 时各组分的响应值较强, 各待测成分色谱峰纯度角均小于纯度阈值, 各色谱峰无杂质干扰, 因此选择 286 nm 作为检测波长。

3.3 内参物的选择

原儿茶醛相较于其他丹参酚酸类成分化学性质稳定, 对照品价廉易得, 且使用 HPLC 法测定时响应值高^[16], 因此本次研究选择原儿茶醛为内参物, 保证所建立方法稳定可靠, 同时达到降本增效的目的。

4 结论

本研究建立 QAMS 法同时测定丹参中 7 个酚酸类成分, 所选用的内参物原儿茶醛化学性质稳

表 8 6 个成分的含量测定结果 (n = 3, %)

Tab 8 Content determination of 6 components (n = 3, %)

编号	原儿茶醛	丹参素		咖啡酸		丹酚酸 E		迷迭香酸		紫草酸		丹酚酸 B	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
DS-1	0.161	0.916	0.912	0.025	0.025	0.271	0.271	0.308	0.314	0.356	0.365	4.403	4.328
DS-2	0.140	0.704	0.701	0.026	0.026	0.185	0.185	0.162	0.165	0.253	0.260	2.989	2.938
DS-3	0.122	0.596	0.593	0.017	0.017	0.296	0.297	0.280	0.285	0.373	0.383	4.535	4.458
DS-4	0.131	0.641	0.638	0.025	0.025	0.181	0.181	0.165	0.168	0.255	0.262	3.065	3.012
DS-5	0.130	0.636	0.633	0.015	0.015	0.290	0.290	0.292	0.297	0.366	0.376	4.400	4.325
DS-6	0.154	0.684	0.681	0.022	0.022	0.300	0.300	0.232	0.236	0.314	0.323	3.177	3.122
DS-7	0.122	0.612	0.609	0.013	0.013	0.224	0.224	0.350	0.356	0.376	0.387	4.855	4.773
DS-8	0.180	0.865	0.861	0.027	0.026	0.312	0.312	0.299	0.305	0.391	0.401	4.352	4.278
DS-9	0.131	0.630	0.627	0.008	0.008	0.322	0.322	0.339	0.345	0.357	0.367	4.682	4.602
DS-10	0.052	0.376	0.374	0.012	0.012	0.221	0.221	0.253	0.258	0.350	0.359	4.785	4.703
DS-11	0.060	0.406	0.404	0.016	0.016	0.252	0.252	0.258	0.263	0.345	0.354	4.964	4.879
DS-12	0.186	0.881	0.877	0.017	0.017	0.266	0.266	0.369	0.376	0.349	0.359	3.555	3.494
r			1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
P			> 0.05		> 0.05		> 0.05		> 0.05		> 0.05		> 0.05

定、来源充足，供试品溶液制备方法简便，可用于快速定量制剂中的各指标成分，全面反映丹参配方颗粒的内在质量。各色谱峰分离度好，通过方法学验证、相对校正因子确认、耐用性考察、色谱峰的定位等过程验证，证明建立的方法科学可靠，稳定性良好，可为丹参配方颗粒的整体质量控制和质量评价提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 77-79.
 [2] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等 . 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (21): 5496-5511.
 [3] Wang ZS, Peng L, Dai SH, et al. Salvianolic acid B induces apoptosis in human glioma U87 cells through p38-mediated ROS generation [J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33 (7): 921-928.
 [4] 曹春芽, 龚明, 仇成凤, 等 . 丹参提取物对铅中毒小鼠肾氧化应激的保护作用 [J]. 中成药, 2020, 42 (2): 507-510.
 [5] Zhang J, An SJ, Fu JQ, et al Mixed aqueous extract of Salvia miltiorrhiza reduces blood pressure through inhibition of vascular remodelling and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40 (1/2): 347-360.
 [6] Zhang J, Liang R, Wang L, et al. Effects and mechanisms of Danshen-Shanzha herb-pair for atherosclerosis treatment using network pharmacology and experimental pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 229:

104-114.
 [7] 丁玉红, 郭秀颖 . 丹参素对缺氧 / 复氧诱导 H9C2 心肌细胞损伤和内质网应激的改善作用 [J]. 中国试验诊断学, 2020, 24 (4): 652-655.
 [8] 姜静宜, 单悦梅, 高明奇 . 丹酚酸 A 对缺血再灌注大鼠缺血期胃粘膜血流量及再灌注期胃粘膜脂质过氧化的影响 [J]. 微循环学杂志, 2008, 18 (2): 25-27.
 [9] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等 . “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (23): 1925-1928.
 [10] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等 . 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (6): 657-658.
 [11] 张作华, 褚光松, 王海燕, 等 . 一测多评法同时测定苍耳子中 5 个酚酸类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (9): 1612-1620.
 [12] 许海燕, 何春喜, 罗思旭, 等 . 指纹图谱与一测多评法相结合测定积雪草中 5 种三萜类成分 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56 (3): 181-188.
 [13] 刘艳芬, 段芳, 张翘, 等 . 基于一测多评 (QAMS) 法联合化学计量学的参贝止咳颗粒综合质量评价 [J]. 中草药, 2022, 53 (2): 413-423.
 [14] 曹士政, 赵登高, 马燕燕, 等 . 一测多评法同时测定不同产地佛手中 6 种化学成分的含量 [J]. 中南药学, 2022, 20 (5): 1167-1172.
 [15] 孙云波, 陈育鹏, 张创峰, 等 . 一测多评法同时测定连花清瘟胶囊中 7 个成分 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (7): 1128-1136.
 [16] 张珺, 程月发 . 关于丹参及其制剂高效液相色谱指纹图谱参照物的选择研究概况 [J]. 药学研究, 2014, 33 (11): 664-666, 673.

(收稿日期: 2022-09-22; 修回日期: 2022-11-04)

不同产地天麻 HPLC 指纹图谱、含量测定及化学模式识别研究

王夏茵, 岳宝森, 张炜华, 田欢, 杨帅, 王巧玲, 李爱婷, 职媛*, 赵锋* (西安市中医医院, 西安 710000)

摘要: 目的 建立天麻 HPLC 指纹图谱, 测定天麻素和对羟基苯甲醇的含量, 并进行化学模式识别分析。方法 采用 HPLC 建立不同产地天麻指纹图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行相似度分析, 测定天麻素和对羟基苯甲醇的含量, 采用 SPSS 进行聚类分析 (CA), SIMCA 软件进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法分析 (OPLS-DA), 对不同产地天麻进行分类并找出差异标记物。结果 建立了天麻 HPLC 指纹图谱, 共标定 16 个共有指纹峰, 指认出 6 个成分, 21 批样品相似度为 0.758 ~ 0.995, 天麻素和对羟基苯甲醇总量为 0.21% ~ 0.80%。通过 CA、PCA 可将不同产地天麻区分为两类, 通过 OPLS-DA 筛选出 8 个差异标记物。结论 所建指纹图谱和含量测定方法分离度良好、稳定性高, 结合化学模式识别分析为不同产地天麻质量控制及综合评价提供参考。

关键词: 天麻; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1358-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.038

HPLC fingerprint, content determination and pattern recognition of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

WANG Xia-yin, YUE Bao-sen, ZHANG Wei-hua, TIAN Huan, YANG Shuai, WANG Qiao-ling, LI Ai-ting, ZHI Yuan*, ZHAO Feng* (Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710000)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Gastrodia elata* Bl., determine the content of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol, and recognize the chemical pattern. **Methods** The fingerprints of *Gastrodia elata* Bl. from different origins were established. Similarity evaluation system was used to evaluate the similarity. The content of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol was determined. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to classify *Gastrodia elata* Bl. from different origins and find out the difference markers. **Results** The HPLC fingerprint of *Gastrodia elata* Bl. was established. Totally 16 common fingerprint peaks were calibrated and 6 components were identified, the similarity being 0.758 ~ 0.995. The total content of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol ranged 0.21% ~ 0.80%. The samples were divided into two categories by CA and PCA. Totally 8 different markers determined by OPLS-DA. **Conclusion** The established fingerprint and content determination method have good resolution and stability. Combination with chemical pattern recognition can provide reference for the quality control and comprehensive evaluation of *Gastrodia elata* Bl. from different regions.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least square discriminant analysis

天麻, 又名赤箭, 始载于《神农本草经》^[1-2], 为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块

基金项目: 陕西省名中医(药)师传承工作室建设项目 (No.201836); 全国中药特色技术传承人才培训项目 (国中医药人教函[2018]204号); 陕西省中医医院医疗质量控制能力建设项目 2022; 陕西省中医药管理局委托项目 (No. 141020001)。

作者简介: 王夏茵, 女, 硕士, 药师, 主要从事中药质量标准研究, email: CrisXY@126.com *通信作者: 职媛, 女, 主管药师, 主要从事中药质量标准研究, email: 970403316@qq.com; 赵锋, 男, 主任药师, 主要从事中药制剂研究, email: zf6369@126.com

茎^[3], 是药食两用、名贵中药材^[4]。随着人工栽培技术的发展, 天麻在我国多个省份均有分布, 但不同产地之间气候条件、品种基原及加工方式的不同导致其存在质量差异。为了保证天麻药材成分及疗效的稳定性, 对不同产地天麻的质量进行控制显得尤为重要。

目前, 指纹图谱被广泛用于天麻的质量控制^[5-7], 化学模式识别技术可对指纹图谱信息进行数字化识别与处理, 进一步评价中药质量^[8-9]。研究者前期通过 2020 年版《中国药典》中指纹图谱方法, 对来自 7 个主要产地的 21 批天麻样品进行分析, 发现该方法下湖南、湖北天麻色谱峰分离度较差。湖南地区是我国天麻主要产区之一^[10-11], 研究者查阅资料发现湖南天麻少见报道。本研究通过 HPLC 建立不同产地天麻指纹图谱, 测定天麻素和对羟基苯甲醇的含量, 并结合化学模式识别技术对包括湖南、湖北天麻在内的 7 个主要产地 21 批天麻样品进行分析, 为天麻质量控制及综合评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TDZ5-BP 台式高速离心机 (陕西德祥实验设备有限公司); ZA305AS 电子天平 (十万分之一天平, 上海赞维衡器有限公司); LC-20A 高效液相色谱仪 (配置 Lab Solutions 色谱工作站, 日本岛津公司); CQ-150A-DST 超声波清洗机 (上海跃进仪器厂)。

1.2 试药

对照品天麻素 (批号: 110807-202010, 含量: 95.5%)、对羟基苯甲醇 (批号: 111970-201702, 含量: 99.4%) (中国食品药品检定研究院); 对照品巴利森苷 A (批号: 03F-RTY-12-0, 含量: 98.65%)、巴利森苷 B (批号: 19J-PGH-22-1, 含量: 99.49%)、巴利森苷 C (批号: 19J-GTR-19-2, 含量: 97%)、巴利森苷 E (批号: 19J-FTR-20-1, 含量: 97%) (Panphy Chemicals Corporation); 乙腈为色谱纯 (Grace Chemical Technology Co., Ltd.); 21 批天麻药材经西安市中医医院药剂科岳宝森主任鉴定, 为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 药材来源具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsustain C18 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 2%~5%A; 15~25 min, 5%~12%A; 25~45 min, 12%~18%A;

表 1 天麻药材来源信息

Tab 1 Source information of *Gastrodia elata* Bl.

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	陕西 20190101	陕西汉中	S12	贵州 20200301	贵州大方
S2	陕西 20190103	陕西汉中	S13	安徽 20200301	安徽六安
S3	陕西 20190302	陕西汉中	S14	安徽 20200701	安徽六安
S4	四川 20200701	四川广元	S15	安徽 20201102	安徽六安
S5	四川 20200901	四川广元	S16	湖南 20200601	湖南怀化
S6	四川 20201102	四川广元	S17	湖南 20200701	湖南怀化
S7	云南 20200601	云南昭通	S18	湖南 20200702	湖南怀化
S8	云南 20200801	云南昭通	S19	湖北 20200901	湖北宜昌
S9	云南 20200802	云南昭通	S20	湖北 20200902	湖北宜昌
S10	贵州 20200101	贵州大方	S21	湖北 20201102	湖北宜昌
S11	贵州 20200102	贵州大方			

45~60 min, 18%~25%A; 60~62 min, 25%~95%A); 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量 3 μL; 柱温 30℃; 检测波长 220 nm。

2.2 不同产地天麻指纹图谱的建立

2.2.1 供试品溶液制备 精密称定天麻药材粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 30 min, 放凉后, 50% 甲醇补足缺失重量, 离心, 上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加 50% 甲醇配制成含巴利森苷 C 0.88 mg·mL⁻¹、天麻素 1.98 mg·mL⁻¹、巴利森苷 A 1.80 mg·mL⁻¹、对羟基苯甲醇 1.70 mg·mL⁻¹、巴利森苷 E 1.76 mg·mL⁻¹、巴利森苷 B 2.04 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 精密度试验 取 S9 号供试品溶液, 连续进样 6 次, 以天麻素为参照峰, 其余 5 个共有特征峰 (8、11、13、14、16 号峰) 相对保留时间 RSD 值为 0.11%~0.26%, 相对峰面积 RSD 值为 0.74%~2.8%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取 S9 号供试品溶液, 分别于 0、1、2、6、12、24 h 进样, 以天麻素为参照峰, 其余 5 个共有特征峰相对保留时间 RSD 值为 0.13%~0.33%, 相对峰面积 RSD 值为 0.29%~3.2%, 表明 24 h 内样品稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 平行制备 S9 号供试品溶液 6 份, 进样分析, 以天麻素为参照峰, 其余 5 个共有特征峰相对保留时间 RSD 值为 0.19%~0.30%, 相对峰面积 RSD 值为 0.76%~3.5%, 表明方法重复性良好。

2.2.6 指纹图谱建立及分析 取 21 批天麻样品, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定并记录色谱图, 采用《中药色谱指纹图谱相似

度评价系统》(2004A 版)进行分析,以 S9 为参照,设时间窗宽度 0.5 min,采用中位数法计算,生成对照指纹图谱,选定 16 个共有峰进行多点校正,自动匹配后得到 21 批天麻样品指纹图谱叠加图,见图 1^[12-14]。相似度评价作为中药指纹图谱的重要评价手段,可反映多个样本间化学成分差异及离散程度^[15-16],通过相似度分析,得出 21 批样品与对照指纹图谱相似度为 0.758 ~ 0.995,见表 2,说明不同批次天麻存在一定差异^[14]。

通过对照品比对,指认其中 6 个特征峰,分别为 7 号峰(天麻素)、8 号峰(对羟基苯甲醇)、11 号峰(巴利森苷 E)、13 号峰(巴利森苷 B)、14 号峰(巴利森苷 C)、16 号峰(巴利森苷 A),见图 2。

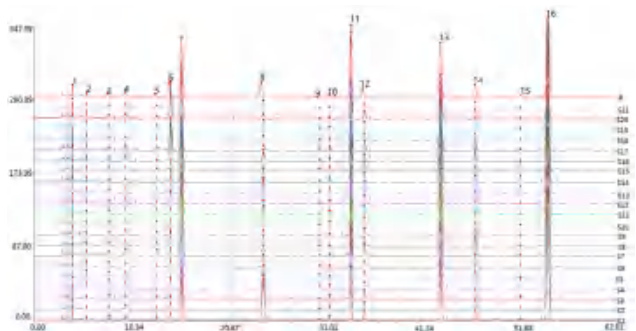


图 1 不同产地天麻指纹图谱叠加图
Fig 1 Fingerprint chromatograms of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

表 2 不同产地天麻相似度评价结果

Tab 2 Similarity of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.982	S12	0.987
S2	0.985	S13	0.986
S3	0.987	S14	0.986
S4	0.985	S15	0.977
S5	0.960	S16	0.816
S6	0.947	S17	0.917
S7	0.995	S18	0.877
S8	0.992	S19	0.831
S9	0.992	S20	0.894
S10	0.993	S21	0.758
S11	0.987		

2.3 不同产地天麻中天麻素及对羟基苯甲醇的含量测定

2.3.1 供试品溶液制备 同“2.2.1”项下方法操作。

2.3.2 对照品溶液制备 分别精密称定天麻素 12 mg、对羟基苯甲醇 6 mg 置于 10 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇充分溶解定容,得各对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量,加 50% 甲醇配制成含天麻素 24、72、120、240、360、720 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对羟基苯甲醇 6、24、48、60、120、

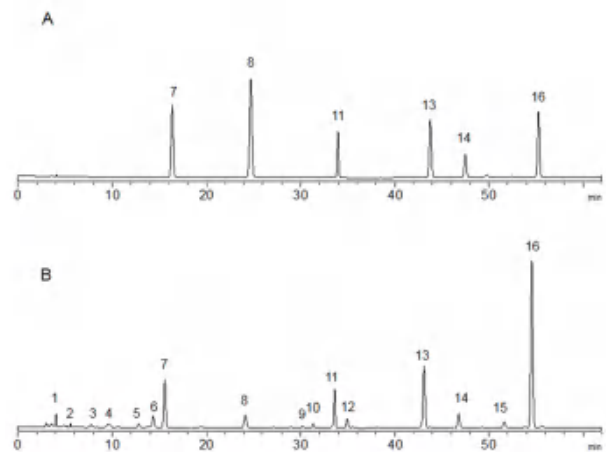


图 2 混合对照品(A)与天麻样品(B)的色谱图
Fig 2 Chromatogram of mixed reference substances (A) and *Gastrodia elata* Bl. (B)

7. 天麻素 (gastrodin); 8. 对羟基苯甲醇 (*p*-hydroxybenzyl alcohol); 11. 巴利森苷 E (parishin E); 13. 巴利森苷 B (parishin B); 14. 巴利森苷 C (parishin C); 16. 巴利森苷 A (parishin A)

240 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3.3 线性关系考察 取“2.3.2”项下混合对照品溶液,进样测定,以质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,峰面积为纵坐标建立回归方程,结果天麻素的回归方程为 $Y = 5.639 \times 10^3 X - 2.151 \times 10^4$ ($r = 0.9990$),对羟基苯甲醇的回归方程为 $Y = 1.300 \times 10^4 X - 3.492 \times 10^4$ ($r = 0.9989$)。

2.3.4 精密度试验 取 S9 号供试品溶液,连续进样 6 次,天麻素和对羟基苯甲醇峰面积 RSD 值分别为 0.63% 和 3.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取 S9 号供试品溶液,分别于 0、1、2、6、12、24 h 进样,天麻素和对羟基苯甲醇峰面积 RSD 值分别为 1.0% 和 3.5%,表明 24 h 内样品稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 平行制备 S9 号供试品溶液 6 份,进样分析,天麻素和对羟基苯甲醇峰面积 RSD 值分别为 2.0% 和 4.3%,表明方法重复性良好。

2.3.7 加样回收试验 精密称定 S9 号样品约 1 g,分别按已知含量的 80%、100%、120% 加入天麻素 4.5、5.5、7.0 mg,对羟基苯甲醇储备液 0.8、1.0、1.2 mL,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液各 3 份,进样测定,结果天麻素和对羟基苯甲醇加样回收率分别在 103.81% ~ 104.59% 和 100.84% ~ 104.42%,RSD 值分别在 0.96% ~ 3.9% 和 1.0% ~ 4.0%,表明此方法准确可行。

2.3.8 含量测定 取 S1 ~ S21 号样品,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液各 2 份,进样测定,结果见表 3。

表 3 不同产地天麻的含量测定 (n = 2, %)

Tab 3 Content of *Gastrodia elata* Bl. from different regions (n = 2, %)

编号	天麻素	对羟基苯甲醇	总量	编号	天麻素	对羟基苯甲醇	总量
S1	0.32	0.16	0.48	S12	0.54	0.12	0.66
S2	0.31	0.14	0.45	S13	0.46	0.08	0.54
S3	0.32	0.12	0.44	S14	0.40	0.07	0.47
S4	0.39	0.10	0.49	S15	0.41	0.07	0.48
S5	0.31	0.06	0.37	S16	0.17	0.04	0.21
S6	0.74	0.06	0.80	S17	0.27	0.03	0.30
S7	0.51	0.05	0.56	S18	0.19	0.03	0.22
S8	0.56	0.06	0.62	S19	0.30	0.05	0.35
S9	0.52	0.03	0.55	S20	0.39	0.03	0.42
S10	0.47	0.09	0.56	S21	0.20	0.04	0.24
S11	0.58	0.07	0.65				

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 聚类分析 (CA) 将 21 批天麻指纹图谱中共有峰峰面积导入 SPSS 25.0 分析软件进行 CA 分析^[17]。当分类距离为 15 时, 可将 21 批天麻样品归为两类, 其中湖南、湖北天麻 (S16 ~ S21) 归为一类, 其他产地天麻 (S1 ~ S15) 归为一类, 结果见图 3。

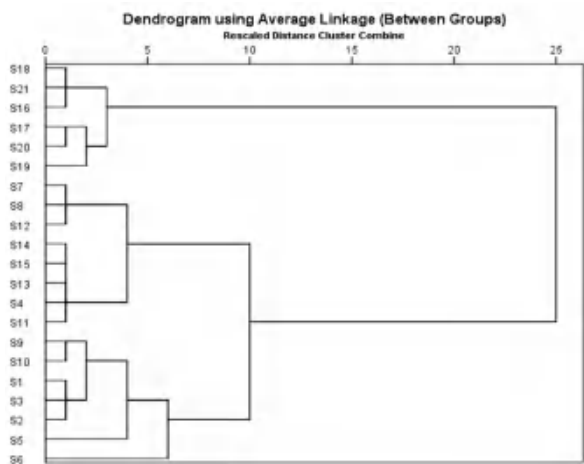


图 3 不同产地天麻 CA 结果

Fig 3 Cluster analysis of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

2.4.2 主成分分析 (PCA) 将 21 批天麻指纹图谱中共有峰峰面积导入软件 SIMCA14.1 中, 建立 PCA 模型, 累计贡献率 $R^2X = 0.593$, 表明模型可较好解释原始变量, 得分见图 4^[17]。结果显示 21 批天麻样品基本分为两类, 与 CA 结果一致。

2.4.3 偏最小二乘法分析 (OPLS-DA) 将 21 批天麻指纹图谱中共有峰峰面积导入软件 SIMCA14.1 中, 建立 OPLS-DA 模型^[18], 模型解释率参数 $R^2X = 0.534$, $R^2Y = 0.924$, 模型预测能力参数 $Q^2 = 0.826$, 表明模型解释与预测能力良好, OPLS-DA 模型结果与 CA、PCA 结果一致, 进一步验证了分析结果的可靠性, 见图 5。提取 16 个共有峰变量重要性投影

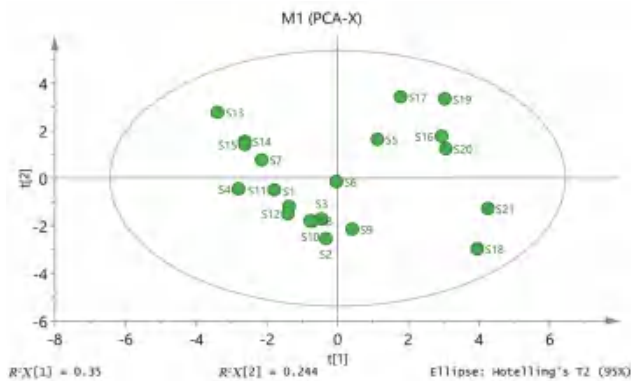


图 4 不同产地天麻 PCA 得分图

Fig 4 PCA score plot of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

(VIP) 值并进行排序, 见图 6, 结果显示峰 6、16 (PA)、13 (PB)、14 (PC)、11 (PE)、1、7 (天麻素)、12 的 VIP 值均 > 1, 表示这 8 个成分可作为评价湖南、湖北天麻与其他产地天麻的差异性标记成分^[19]。

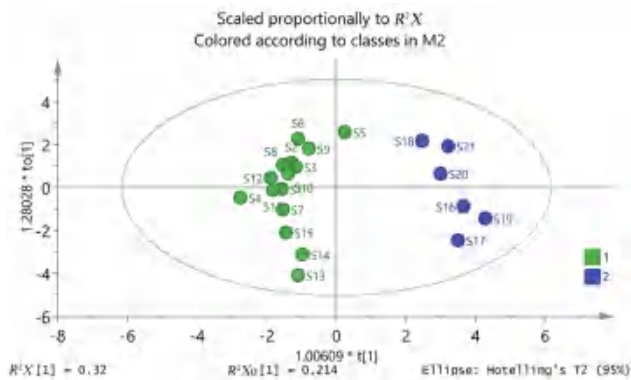


图 5 不同产地天麻 OPLS-DA 得分图

Fig 5 OPLS-DA score plot of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

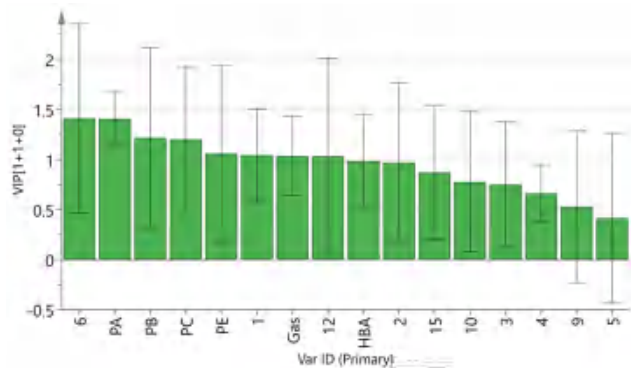


图 6 不同产地天麻差异标志物 VIP 图

Fig 6 VIP diagram of *Gastrodia elata* Bl. from different regions

3 讨论

3.1 方法学的优化

对提取溶剂 (50% 甲醇、50% 乙醇、60% 甲醇、60% 乙醇)、提取时间 (15、30、45 min)、检测波长 (220、254、270 nm) 及流动相 (甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸) 进行考察, 以分离度、共有峰面积、峰形及提取效率为

考察指标,最终确定本文提取条件(以50%甲醇为溶剂,超声提取30 min)及色谱条件(波长220 nm下,以乙腈-0.1%磷酸为流动相)。

3.2 指纹图谱的建立与分析

前期试验过程中发现,湖南、湖北地区天麻6号峰面积较大,使用药典方法无法有效分离6号峰和7号峰(天麻素)。本研究建立了天麻HPLC指纹图谱,对包括湖南、湖北在内的7个主要产地21批天麻样品分离度良好,标定16个共有指纹峰,并指认了其中6个成分。通过相似度分析,21批天麻样品与对照指纹图谱相似度为0.758~0.995,其中云南、贵州、陕西、安徽、四川产天麻与对照指纹图谱相似度较高(0.947~0.995),湖南、湖北产天麻与对照指纹图谱相似度较低(0.758~0.917)。

3.3 含量测定的分析

2020年版《中国药典》以天麻素和对羟基苯甲醇的总量对天麻进行含量测定,本研究中21批样品中天麻素和对羟基苯甲醇总量为0.21%~0.80%,其中云南、贵州地区天麻不同批次间稳定性好、总含量高,分别为0.58%、0.62%,湖南、湖北地区总含量较其他产地偏低,分别为0.24%、0.33%。

3.4 化学模式识别分析

通过CA、PCA可将21批天麻分为湖南、湖北天麻与其他产地天麻两类。通过OPLS-DA筛选出8个差异标记物,包含天麻素(6号峰)、巴利森苷类成分(16号峰巴利森苷A、13号峰巴利森苷B、14号峰巴利森苷C、11号峰巴利森苷E)及3个未知成分(6、1、12号峰)。天麻素和巴利森苷类成分是天麻的主要活性成分,受地域环境、种植技术等多因素影响,2020年版《中国药典》新增天麻素和巴利森苷类成分建立指纹图谱对天麻进行质量控制。本研究发现,天麻素和巴利森苷类成分可用于区分湖南、湖北天麻与其他产地天麻的差异,是天麻重要质控成分。查阅文献,关于湖南、湖北天麻与其他产地天麻的综合评价少见报道,包永睿等^[20]通过CA将10个不同产地天麻分为三类,区别于贵州、安徽等地,湖北、四川天麻归为一类;林昕等^[5]将12个不同产地天麻分为三类,区别于陕西、贵州等地,湖北、西藏和辽宁归为一类,与本研究结果一致。考虑到本研究纳入单个产地样本量较少,仅3个批次,故通过本研究可认为湖南、湖北天麻与其

他产地天麻可能存在一定差异,但后期仍需要大样本研究进一步证实。

参考文献

- [1] 张进强,肖承鸿,周涛,等.神奇的天麻[J].中国食品药品监管,2021(2):114-119.
- [2] 徐博,吴翠,李卓俊,等.天麻的资源分布及采后现状调研[J].中国中医药信息杂志,2021,28(7):11-16.
- [3] 中国药典2020年版[S].2020:59-60.
- [4] 王彩云,成忠均,侯俊,等.不同产区天麻质量评价[J].中成药,2022,44(2):487-492.
- [5] 林昕,王丽,邵金良,等.不同产区天麻HPLC指纹图谱研究[J].中国现代应用药学,2020,37(13):1543-1549.
- [6] 刘旭燕,张公信,田孟华,等.不同等级昭通乌天麻与其他产地天麻的天麻素含量测定及比较[J].中国现代中药,2015,17(1):35-38.
- [7] 刁飞燕,李俊婕,李启艳,等.不同产地天麻药材的指纹图谱建立及分析[J].中国药师,2020,23(10):1920-1925.
- [8] 宋奇,王隆隆,杨忠杰,等.双石清热合剂指纹图研究及5种成分含量测定[J].中南药学,2022,20(1):154-158.
- [9] 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.
- [10] 李梁,张艺,成群芝.中药天麻产区生态环境分析与评价[J].中药研究与信息,2004,6(6):14-16,22.
- [11] 刘大会,龚文玲,詹志来,等.天麻道地产区的形成与变迁[J].中国中药杂志,2017,42(18):3639-3644.
- [12] 杨燕,于春强,郭子娟,等.基于HPLC指纹图谱及多指标成分定量分析的不同产地当归质量特征研究[J].中草药,2021,52(15):4666-4674.
- [13] 郑振兴,胡瀚文,曾利,等.基于HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(21):174-180.
- [14] 毛莹莹,栗焕焕,郑富香,等.不同产地板蓝根HPLC指纹图谱结合化学模式识别研究[J].中华中医药杂志,2021,36(6):3147-3151.
- [15] 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.
- [16] 邹纯才,鄢海燕.我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法30年(1988—2017年)研究进展与展望[J].中国中药杂志,2018,43(10):1969-1977.
- [17] 何艳,周艳玲,胡小祥,等.消炎退热颗粒高效液相色谱指纹图谱及多成分含量测定研究[J].中药新药与临床药理,2021,32(5):693-700.
- [18] 黄紫炎,沈钱能,李平,等.不同产地葛根饮片的UPLC指纹图谱结合多成分含量测定研究[J].中国中药杂志,2019,44(10):2051-2058.
- [19] 贾萌,王洪兰,赵晓莉,等.不同产地蔓荆子HPLC指纹图谱及模式识别研究[J].中华中医药杂志,2020,35(12):6306-6309.
- [20] 包永睿,王帅,唐爽,等.基于指纹图谱结合多元统计分析的天麻总苷差异指标的研究[J].中药材,2016,39(5):1082-1085.

(收稿日期:2022-09-06;修回日期:2022-12-13)

UPLC-MS/MS 法测定利伐沙班中的基因毒性杂质

侯继鹏, 时晓燕, 张业华, 郝贵周*, 张贵民* (鲁南制药集团股份有限公司, 国家手性制药工程技术研究中心, 山东 临沂 273400)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定利伐沙班中基因毒性杂质 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮。**方法** 采用 Thermo Hypersil Gold C18 (2.1 mm×100 mm, 3 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1% 甲酸 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱; 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 25℃; 质谱采用电喷雾离子 (ESI) 源正离子扫描、多反应监测 (MRM) 模式对 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮同时进行定性、定量检测。**结果** (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮在 1.50 ~ 29.96 ng·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r = 0.9991$); 平均回收率在 99.72% ~ 101.51%, RSD 均小于 5%; 检测限和定量限分别为 0.45 ng·mL⁻¹ 和 1.50 ng·mL⁻¹, 6 批利伐沙班样品中均未检出杂质。**结论** 该方法灵敏度高, 专属性强, 可用于测定利伐沙班中基因毒性杂质 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮。

关键词: 利伐沙班; 基因毒性杂质; (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮; 超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)05-1363-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.039

Determination of genotoxic impurity in rivaroxaban by UPLC-MS/MS

HOU Ji-peng, SHI Xiao-yan, ZHANG Ye-hua, HAO Gui-zhou, ZHANG Gui-min* (Lunan Pharmaceutical Group, National Engineering Research Center of Chiral Drugs, Linyi Shandong 273400)

Abstract: Objective To determine the genotoxic impurities (S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1H-isoindole-1, 3-diketone in rivaroxaban by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** A Thermo Hypersil Gold C18 column (2.1 mm×100 mm, 3 μm) was used, with the mobile phase of 0.1% formic acid (A) and 0.1% formic acid acetonitrile (B) by gradient elution at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The column temperature was 25℃. Multiple reaction monitoring was performed on a mass spectrometer equipped with an electrospray ion source in the positive mode to qualitatively and quantitatively detect (S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1H-isoindole-1, 3-diketone, simultaneously. **Results** The linearity for (S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1H-isoindole-1, 3-diketone was 1.50 ~ 29.96 ng·mL⁻¹ ($r = 0.9991$). The average recovery was 99.72% ~ 101.51%, with RSD < 5%. The LOD and LOQ were 0.45 ng·mL⁻¹ and 1.50 ng·mL⁻¹, respectively. No impurities were detected in 6 batches samples. **Conclusion** The method is sensitive and specific in the quantification of genotoxic impurities of (S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1H-isoindole-1, 3-diketone in rivaroxaban.

Key words: rivaroxaban; genotoxic impurity; (S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1H-isoindole-1, 3-diketone; UPLC-MS/MS

利伐沙班为一种高选择性抗凝药物, 可直接抑制凝血因子 Xa, 从而达到抗凝目的。临床上用于降低关节置换术后下肢静脉血栓风险, 预防

骨科大手术后深静脉血栓形成, 提高非瓣膜性心房颤动患者抗凝治疗的临床疗效^[1-5]。

利伐沙班的合成工艺主要使用三个起始物

作者简介: 侯继鹏, 男, 硕士, 主要从事药物质量研究, email: houjipeng1985@126.com *通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 主要从事新药研究与开发, email: lunanzhangguimin@163.com; 郝贵周, 男, 高级工程师, 主要从事新药研究与开发, email: haoguizhou@lunan.cn

料, 其中 4-(4-氨基苯基)-3-吗啉酮为合成利伐沙班的中心前体, 与化合物 2-[(2*S*)-2-环氧乙烷基甲基]-1*H*-异吲哚-1, 3-(2*H*)-二酮和 5-氯噻吩-2-碳酰氯为原料合成利伐沙班^[6]。这三个起始物料均含有基因毒性警示结构, 具有潜在的基因毒性^[7], 它们及其副反应产物可能残留于利伐沙班。目前对于 4-(4-氨基苯基)-3-吗啉酮及其副产物杂质、5-氯噻吩-2-碳酰氯及其副产物杂质、2-[(2*S*)-2-环氧乙烷基甲基]-1*H*-异吲哚-1, 3-(2*H*)-二酮的研究均已报道^[8-14], 但未见 2-[(2*S*)-2-环氧乙烷基甲基]-1*H*-异吲哚-1, 3-(2*H*)-二酮副产物杂质 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮的相关研究。

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 定量测定利伐沙班中的基因毒性杂质 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮, 根据人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) M7 和 2020 年版《中国药典》9306 遗传毒性杂质控制指导原则相关规定^[15-16], 基于毒理学关注阈值 (TTC) 法, 控制 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮限度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 以保证利伐沙班的用药安全, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Vanquish TSQ Altis 型超高效液相色谱-质谱联用仪 (美国 Thermo 公司); 十万分之一电子天平 MS105DU (瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

利伐沙班原料药 (山东新时代药业有限公司, 含量 > 98.0%, 批号: 595190401、595190402、595190403、59171201、59171202、59171203); (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮对照品 (深圳斯坦德, 含量: 99.2%, 批号: 1894253R-YX-01); 甲酸 (质谱级, 赛默飞世尔科技公司); 乙腈为 (质谱级, Merck 公司); 水 (超纯水, 美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

UPLC 系统: 色谱柱 Thermo Hypersil Gold C18 (2.1 mm × 100 mm, 3 μm); 以 0.1% 甲酸为流动相 A, 0.1% 甲酸乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 20% ~ 40%B; 10 ~ 10.1 min, 40% ~ 20%B; 10.1 ~ 15 min, 20%B); 流速 0.2

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

质谱: 离子源为电喷雾电离源 (ESI), 正离子模式采集; 选择多监测模式 (MRM), 喷雾电压为 3500 V, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$; 定量监测离子对 m/z 239.95 \rightarrow 186.11, 碰撞电压为 16.30 V; 定性监测离子对 m/z 239.95 \rightarrow 221.97, 碰撞电压为 10.01 V。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮对照品适量, 加 25% 乙腈溶解并定量稀释制成 150 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品储备液; 精密量取对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 25% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密称取利伐沙班约 15 mg, 置 50 mL 量瓶中, 依次加乙腈 12.5 mL、水 3 mL 使溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。

2.3 专属性

取空白溶液 (25% 乙腈)、对照品溶液和供试品溶液进样测定, 结果见图 1。(S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮的保留时间为 6.667 min。空白溶液及供试品溶液不干扰杂质的测定。

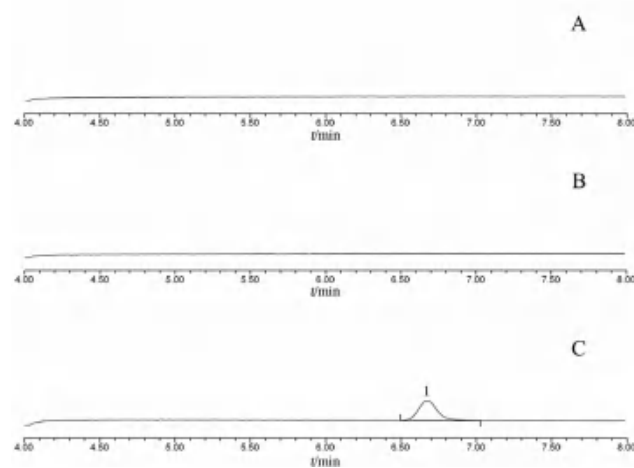


图 1 专属性试验色谱图

Fig 1 Specific test chromatogram

A. 空白溶液 (blank solution); B. 供试品溶液 (sample solution); C. 对照品溶液 (reference solution); 1. (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1*H*-异吲哚-1, 3-二酮 [(S)-2-(2-hydroxyl-chloropropyl)-1*H*-isindole-1, 3-diketone]

2.4 线性关系考察

精密量取对照品储备液适量, 用 25% 乙腈分别稀释制成 1.50、3.74、7.49、14.98、22.47、29.96 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液进样测定, 记录色谱图。以质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A)

为纵坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程 $A = 7.241 \times 10^4 C + 1.778 \times 10^4$, $r = 0.9991$, 表明 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮在 $1.50 \sim 29.96 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.5 定量限和检测限

取对照品储备液, 用 25% 乙腈逐级稀释至信噪比 (S/N) 约为 10, 测定定量限; 用 25% 乙腈逐级稀释至 S/N 约为 3, 测定检测限。测得 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮的定量限为 $1.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 $0.45 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 回收试验

精密称定利伐沙班 15 mg, 置 50 mL 量瓶中, 依次加乙腈 12.5 mL、水 3 mL 使溶解, 共 9 份, 各加入对照品储备液 0.5、1、1.5 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 制成低、中、高浓度的溶液, 每个浓度平行制备 3 份。依法测定, 计算平均回收率, 结果见表 1, 表明本方法准确度良好。

表 1 回收试验结果

Tab 1 Recovery

加入质量浓度 / 测得质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 / %	平均回 收率 / %	RSD / %
7.49	7.95	106.14	101.51	4.2
	7.54	100.67		
	7.32	97.73		
14.98	15.74	105.07	100.98	3.6
	14.97	99.93		
	14.67	106.14		
22.47	22.92	102.00	99.72	2.2
	21.95	97.69		
	22.35	99.47		

2.7 精密度、重复性试验

精密量取对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 25% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 配制 6 份, 进样测定, 计算 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮峰面积的 RSD 为 0.63% ($n = 6$), 表明本方法精密度良好。

精密称取利伐沙班 15 mg, 置 50 mL 量瓶中, 依次加乙腈 12.5 mL、水 3 mL 使溶解, 加入对照品储备液 1 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 配制 6 份, 进样测定, 结果 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮含量的 RSD 为 2.8% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取新配制的对照品溶液, 在 0、3、6、9、12 h 进样测定, 记录色谱图。计算得 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮峰面积的 RSD 为

4.3%, 表明对照品溶液于室温放置 12 h 内稳定。

2.9 样品测定

取 6 批利伐沙班原料药, 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液。精密量取供试品和对照品溶液, 分别进样测定。按外标法以峰面积计算 6 批利伐沙班中 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮的含量, 结果 6 批次利伐沙班中均未检出。

3 讨论

基因毒性杂质由于其毒性相对较高, 引起了国内外药物工作者的高度重视, 各药品管理机构发布了相应的指导原则, 对基因毒性杂质推荐以 $TTC 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 来控制用药风险。基于 TTC , 根据利伐沙班产品说明书, 以使用利伐沙班每日最大口服剂量 $30 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 计算, 控制 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮的限度须不超过 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

方法摸索时, 根据 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮的结构, 选择采用 ESI 离子源, 正离子检测模式, 使用三通连接注射泵、超高效液相色谱仪和质谱检测器, 调整质谱的参数使杂质的响应达到最大; 同时根据仪器优化的离子对, 选择 $m/z 239.95 \rightarrow 186.11$ 为定量离子对, $m/z 239.95 \rightarrow 221.97$ 为定性离子对, 采用同时进行定性定量的方法提高检测方法的准确度, 防止假阳性结果的产生。

应用 TTC 法计算得到杂质的限度较低, 当质谱常规进样量为 $5 \mu\text{L}$ 时发现, 杂质的响应无法达到检测限度要求, 故提高进样量至 $20 \mu\text{L}$, 使方法满足限度检测要求; 但此时系统进样体积较大, 而 $UPLC$ 系统的管路及色谱柱较细, 杂质产生较强的溶剂效应, 峰形较差。根据流动相中有机相的比例, 测试 25%、30%、40% 乙腈为稀释液发现, 使用 25% 和 30% 乙腈为稀释液时 (S)-2-(2-羟基-氯丙基)-1H-异吲哚-1, 3-二酮峰形较好, 使用 40% 乙腈峰形变差, 最终选择 25% 乙腈为稀释液。

利伐沙班在水中溶解性较差, 直接使用 25% 乙腈配制质量浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利伐沙班时, 供试品无法完全溶解; 经摸索发现可以先加部分乙腈和水让利伐沙班原料溶解, 然后再加水进行定容, 用 25% 乙腈作为稀释液的配制思路进行供试品的配制。通过加标验证该配制方法杂质回收率较好, 解决了原料无法完全溶解的问题。

参考文献

- [1] 陆慧杰, 庄汝杰, 陈之青. 利伐沙班对比依诺肝素预防骨科大手术后深静脉血栓形成的疗效与安全性评价 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31 (9): 693-695.
- [2] 赵志刚, 谢林, 丁凡, 等. 利伐沙班预防关节置换术后下肢深静脉血栓的临床前瞻性对照研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24 (7): 619-622.
- [3] 江丽华, 黄嘉利, 陈丽华. 利伐沙班用于非瓣膜性心房颤动患者抗凝治疗的疗效及安全性 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19 (3): 304-308.
- [4] 吴仲洪, 严鹏科, 卢泳妍, 等. 利伐沙班和磺达肝癸钠在髋、膝关节置换术后预防静脉血栓有效性和安全性的 meta 分析 [J]. 中南药学, 2014, 12 (6): 544-548.
- [5] 黄洁, 徐飞, 单敏, 等. 利伐沙班片溶出区分介质的筛选 [J]. 中南药学, 2018, 16 (11): 1511-1516.
- [6] 拜耳医药保健股份公司. 制备 4-(4-氨基苯基)-3-吗啉酮的方法: 200480026537. X [P]. 2006-10-25.
- [7] 马磊, 王玉楠, 陈震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (18): 2106-2111.
- [8] 徐洁. 利伐沙班中苯胺类潜在基因毒性杂质的 HPLC 法测定 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (1): 105-110.
- [9] 宋更申, 李军立, 安百锋, 等. 高效液相色谱法测定利伐沙班中遗传毒性杂质的方法: 110118836A [P]. 2019-08-13.
- [10] 谢晓燕. 衍生化 HPLC-DAD 测定利伐沙班基因毒杂质的方法: 110320306A [P]. 2019-10-11.
- [11] 陈轶嘉, 胡楚红, 赵琛, 等. 一种测定利伐沙班中基因毒性杂质的方法: 111721858A [P]. 2020-09-29.
- [12] 徐强, 孙春霞, 张晓晴, 等. 高效液相色谱法测定利伐沙班中潜在基因毒性杂质的方法: 111855836A [P]. 2020-10-30.
- [13] 王倩倩, 顾铭盼, 沈志超. HPLC 法测定利伐沙班中基因杂 5-氯噻吩-2-甲酰氯 [J]. 广东化工, 2019, 46 (3): 176-177.
- [14] 陈轶嘉, 石玲玲, 陈阳, 等. 无催化剂衍生 GC-MS 法测定利伐沙班基因毒杂质 5-氯-2-酰氯噻吩 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (4): 714-719.
- [15] ICH. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [S]. 2017.
- [16] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 527-530.

(收稿日期: 2022-09-23; 修回日期: 2022-11-05)

电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定百荷冻干含化糖中 18 种无机元素及健康风险评估

孙常胜¹, 宇泉霖¹, 吴婧楠¹, 吴雪纯¹, 邱漪¹, 蒋巧萍¹, 宋嘉佳¹, 马宏瑞², 孙诚诚², 蔡程科^{1*}, 王洪飞^{2*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京量子高科制药科技有限公司, 北京 102200)

摘要: 目的 建立百荷冻干含化糖中 18 种无机元素的电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 分析方法并对其进行质量评价和风险评估。方法 采用微波消解法对百荷冻干含化糖样品进行处理, 通过 ICP-MS 同时测定 K、Ca、Mg、Mn、Fe、Al、B、Zn、Ni、Cu、Co、Cr、Pb、As、Se、Cd、V、Mo 等 18 种无机元素的含量, 并通过计算重金属元素每日最大可耐受量 (EDI)、靶标危害系数 (THQ)、总危害指数 (HI) 和致癌风险 (CR) 进行健康风险评估。结果 18 种元素在相应质量浓度范围内与响应强度线性关系良好 ($R^2 > 0.999$)。重金属健康风险评估结果显示, 按标示量摄入百荷冻干含化糖后, EDI < PTDI, THQ 和 HI 均小于 1, 不会对人体造成明显的健康危害, CR 远低于 1×10^{-6} , 致癌风险可忽略不计。结论 百荷冻干含化糖无机元素种类含量丰富, 日常服用无健康风险; 该方法快速、简便、灵敏度高, 可为百荷冻干含化糖质量评价提供参考。

关键词: 微量元素; 口崩片; 电感耦合等离子体质谱法; 多元素测定; 健康风险评估

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1366-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.040

基金项目: 国家科技重大专项项目 (No.2011ZX09201-201); 北京市科技计划专项研发项目 (No.Z16010101390)。

作者简介: 孙常胜, 男, 硕士研究生, 主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究, email: 2544905646@qq.com *通信作者: 蔡程科, 男, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究, email: cck98@126.com; 王洪飞, 男, 博士, 主要从事药物速释制剂的研发和产业化研究, email: bjwhf@vip.sina.com

Inorganic elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets and their health risk assessment

SUN Chang-sheng¹, YU Quan-lin¹, WU Jing-nan¹, WU Xue-chun¹, QIU Yi¹, JIANG Qiao-ping¹, SONG Jia-jia¹, MA Hong-rui², SUN Cheng-cheng², CAI Cheng-ke^{1*}, WANG Hong-fei^{2*} (1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102200; 2. Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Technical Co., Ltd., Beijing 102200)

Abstract: Objective To analyze 18 inorganic elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and evaluate its quality and risks. **Methods** The sample of Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets was processed by microwave digestion, and the contents of 18 inorganic elements, such as K, Ca, Mg, Mn, Fe, B, Zn, and Ni, were determined by ICP-MS. The estimated daily intake (EDI), target hazard quotients (THQ), hazard index (HI) and carcinogenic risks (CR) of heavy metals were determined to evaluate the health risks. **Results** The linear correlation coefficient of the standard curve was greater than 0.999. The EDI, THQ and CR of heavy metal health risk assessment models showed that the Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets did not cause significant health harm and carcinogenic risks to the exposed population. **Conclusion** Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets contain rich inorganic elements. The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the accurate determination of inorganic elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablets, providing a comprehensive quality control and evaluation method.

Key words: trace element; oral disintegrating tablet; ICP-MS; multielement determination; health risk assessment

微量元素指在人体中含量低于体重万分之一的元素，它们量虽微但作用并不弱^[1]。其中，人体必需微量元素（8种）和人体可能必需微量元素（5种）常作为酶系统的催化剂或功能蛋白，对人体的生长、发育有重要影响，甚至与部分疾病直接相关^[2]。如儿童缺乏 Zn、Fe、Ca 时易发生反复呼吸道感染^[3]。Fe 的缺乏常常会导致红细胞生成受损，引起缺铁性贫血。塞尔维亚一项病例对照研究发现，习惯性流产、胎膜早破和稽留流产孕妇血清 Cu 浓度均低于正常孕妇^[4]。

近年来，以补充微量元素为目标的产品也受到大家的关注。有机态的微量元素在吸收利用率、稳定性等方面均优于无机态微量元素。中医理论指导养生保健是中国传统医学的一部分，与疾病的康复有密切的关系。研究发现，不同产地、不同栽培年限及不同药用部位的同种药材中微量元素含量存在显著差异^[5]。经过调研不同中药中的微量元素^[6-14]，结合中医药的五行和象思维理论，选取了荷叶、高良姜、菊花、百合、黑枣五味中药材，采用半仿生提取，浓缩后的提取物经 Q-sorb 冻干闪释技术制备成富含有机态微

量元素的冻干型口腔崩解片（商品名：百荷冻干含化糖）。本产品立足于中医药理论，同时补充多种微量元素，促进人体内各种微量元素之间保持平衡。

电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）法能同时快速测定多种元素，检测限低，干扰少，效率高，精密度好，本研究利用 ICP-MS 对百荷冻干含化糖进行含量测定，为产品的质量标准的制订提供参考。

1 材料

1.1 仪器

电感耦合等离子体质谱仪（ICPMS-2030 series, Shimadzu）；TOPEX 微波消解仪、可调控温电热板（上海屹尧仪器科技发展有限公司）；AB135-S 型十万分之一天平（德国 Mettler Toledo 公司）。

1.2 试剂

纯净水（娃哈哈饮用纯净水）；95% 硝酸（优级纯，北京化工厂）；单元素标准溶液：Co [批号：GBW (E) 082832/B1902041]、Cu [批号：GBW (E) 082780/B1911051]、Cr [批号：GBW (E) 083340/B1905082]、Pb [批号：GBW (E) 082825/

B1911047]、B[批号: GBW(E)082782/B1912183]、Ca[批号: GBW(E)082777/B2102031]、Mo(批号: BW30013-1000-C-50/B1903131)、V(批号: BW30034-1000-C-50/B1905183)、Al(批号: BW30019-1000-NC-50/B1904147)、In(批号: B1912042)、Re(批号: BW30048-1000-N-50/B2103415)均来源于坛墨质检标准物质中心; Ni[批号: GBW(E)081582/8212]、As[批号: GBW(E)100203/J5F1]、Ge[批号: GBW(E)100202/A4V1]、Cd[批号: GBW(E)0801581/F5X1]、Fe[批号: GBW(E)081585/S4X1]、Mn[批号: GBW(E)081587/M541]、Zn[批号: GBW(E)081580/J5V1]、K[批号: GBW(E)081590/7342]、Mg[批号: GBW(E)081586/F4U1]均来源于北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司; Sc[批号: GSB04-1750-2004/212024]、Be[批号: GSB04-1718-2004/20A027-2]均来源于国家有色金属及电子材料分析测试中心; Se[批号: GBW(E)080215/19123]来源于中国计量科学研究院。以上标准品质量浓度均为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。百荷冻干含化糖(SC11361050100941, 规格: 46 mg, 陕西量子高科药业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 工作参数

分析模式为全定量分析, 等离子体高频功率为 1.20 kW。采用氦气碰撞反应池模式, 以氦气为载气, 氦气为碰撞气体; 等离子体气流速为 $9.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流速为 $1.10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 载气流速为 $0.70 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 池气体流速为 $6.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 池电压为 -21.0 V ; 能量过滤器电压为 7.0 V ; 蠕动泵转数为 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 采样深度为 5.00 mm ; 每点滞留时间为 20 ms 。

2.2 内标溶液的配制

精密取 Sc、Ge、Be、In、Re 单元素标准溶液适量于 100 mL 量瓶中, 加 5% 硝酸制成质量浓度为含 Sc、Ge、Be $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含 In、Re $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合内标溶液。

2.3 标准溶液的配制

精密取含 Fe、Cu、Mn、Zn、Se、Cr 等 18 种待测金属元素的单元素标准溶液适量, 用 5% 硝酸稀释成质量浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准使用液, 临用时用 5% 硝酸稀释成各元素系列质量浓度的混合标准溶液。

分别精密取 Co、Cr、Cu、Mo、Ni、Se、V、Pb、As、Cd 单元素标准溶液 $100 \mu\text{L}$ 置于 10 mL 量瓶中, 加 5% 硝酸稀释至刻度, 摇匀, 以 5%

硝酸为溶剂逐级稀释, 制成质量浓度分别为 0、1、2.5、5、7.5、10、20、30 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准品溶液 1, 配制 Fe、Mn、Al、Zn、B 质量浓度分别为 0、20、50、100、150、200、300、400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准品溶液和 K、Ca、Mg 质量浓度分别为 0、200、500、1000、1500、2000、4000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准品溶液。

2.4 供试样品的预处理

取百荷冻干含化糖, 置于自封袋中密闭, 用研钵研细、混匀, 精密称取研细粉末 0.5 g , 置于 100 mL 聚四氟乙烯微波消解罐中, 加入 6 mL 65% 硝酸, 加盖密封, 静置 30 min 。将消解罐对称放入微波消解仪中, 按照表 1 升温步骤进行消解。待消解完全后, 打开消解罐, 放置在通风橱内控温电热板上, 于 $160 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 2 h 至红棕色蒸汽挥尽, 溶液剩余 1 mL , 放冷, 用 5% 的硝酸转入 25 mL 量瓶中, 用少量 5% 的硝酸洗涤, 洗液合并于量瓶中, 定容至 25 mL , 混匀备用。

表 1 微波消解仪升温程序

Tab 1 Temperature rise program of microwave digestion instrument

步骤	程序	温度 / $^\circ\text{C}$	时间 /min	搅拌器	通风等级
1	快速升温	160	15	/	1
2	恒温	/	5	关	1
3	快速升温	180	5	关	1
4	恒温	/	15	关	1
5	冷却	70	19	关	3

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 将系列混合对照品溶液, 按照“2.1”项下条件进样测定, 以响应强度为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得到 18 种元素的回归方程, 结果见表 2。

2.5.2 精密度试验 取“2.2”项下配制的混合标准溶液 (质量浓度 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 连续进样 6 次, 各元素响应值的 RSD 值均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好, 可以满足分析要求。

2.5.3 重复性试验 精密称取百荷冻干含化糖粉末 0.5 g , 采用“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算得到各元素含量的 RSD 值均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一供试品溶液于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 计算供试品中各待测元素的含量。计算得各元素含量的 RSD 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收试验 精密称取 6 份百荷冻干含

表 2 18 种元素的回归方程和线性范围 (n = 6)

Tab 2 Regression equation and linearity of 18 elements (n = 6)

元素	回归方程	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	R ²
Co	Y = 0.2082X - 0.0553	0 ~ 30	0.999
Cr	Y = 0.3396X - 0.3532	0 ~ 30	0.999
Cu	Y = 0.2441X - 0.5153	0 ~ 30	0.999
Mo	Y = 0.5149X - 0.2039	0 ~ 30	0.999
Ni	Y = 0.6702X - 0.2175	0 ~ 30	0.999
Se	Y = 90.35X - 0.3045	0 ~ 30	0.999
V	Y = 0.4903X - 0.1296	0 ~ 30	0.999
Pb	Y = 0.1517X - 0.2483	0 ~ 30	0.999
As	Y = 1.776X - 0.0975	0 ~ 30	0.999
Cd	Y = 0.9342X - 0.1427	0 ~ 30	0.999
Fe	Y = 15.38X - 0.4771	0 ~ 400	0.999
Mn	Y = 0.6188X + 0.8382	0 ~ 400	0.999
Al	Y = 25.29X - 1.1493	0 ~ 400	0.999
Zn	Y = 1.179X - 0.5974	0 ~ 400	1.000
B	Y = 1.777X - 1.1358	0 ~ 400	0.999
K	Y = 7.932X - 0.1484 × 10 ³	0 ~ 4000	1.000
Ca	Y = 0.1502 × 10 ³ X - 35.73	0 ~ 4000	0.999
Mg	Y = 9.508X - 4.105	0 ~ 4000	0.999

化糖粉末约 0.25 g, 分别加入适量“2.3”项下制备的 3 种混标溶液, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算得到 18 种无机元素的平均加样回收率为 94.2% ~ 102.3%, RSD 均小于 15%, 表明该方法准确度良好。

2.5.6 百荷冻干含化糖无机元素含量的测定 参照“2.4”项下供试品溶液的制备方法和“2.1”项下的 ICP-MS 工作参数将样品溶液与内标溶液同时配伍注入仪器, 对百荷冻干含化糖中 18 种元素进行测定, 结果见表 3。

由表 3 可知百荷冻干含化糖中无机元素含量丰富, 18 种无机元素平均含量大小为: K、Ca、Mg、Mn、Fe、Al、B、Zn、Ni、Cu、Co、Cr、Pb、As、Se、Cd、V、Mo, 其中 K、Ca、Mg、Mn 含量较高, 占总含量平均值的 99.41%。

常量元素中 K 含量最高, 平均高达 36.90 mg · g⁻¹。必需微量元素 Fe、Cu、Zn、Co、Cr、Se、Mo 含量为 178.53 mg · kg⁻¹, 占总含量平均值的 0.39%, 可能必需微量元素 Mn、Ni、B、V 含量为 1522.73 mg · kg⁻¹, 占总含量平均值的 3.29%, 必需微量元素中 Fe 含量最高, 平均可达 148 mg · kg⁻¹。重金属及有害元素 Pb、Cd、Cr、Cu 和 As 含量为 5.06 mg · kg⁻¹, 占总含量平均值的 0.011%。

2.6 百荷冻干含化糖中健康风险评估 试验参考美国环保署 (US EPA) 提出的评

表 3 百荷冻干含化糖中各元素的含量 (n = 3)

Tab 3 Content of trace elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablet (n = 3)

元素	质量分数 / (mg · kg ⁻¹)	每片所含的元素 /ng
K	36 900	1 697 000.00
Ca	4470	205 600.00
Mg	3070	141 200.00
Mn	1480	68 080.00
Fe	148	6808.00
Al	49.9	2295.00
B	39.5	1817.00
Zn	25.9	1191.00
Ni	3.18	146.30
Cu	2.41	110.90
Co	0.984	45.27
Cr	0.92	42.32
Pb	0.797	36.66
As	0.736	33.86
Se	0.285	13.11
Cd	0.2	9.20
V	0.0497	2.29
Mo	0.0333	1.53

估人体通过食物摄取重金属风险的方法, 采用目前较为主流的重金属风险评估模型: 每日最大可耐受量 (estimated daily intake, EDI)、靶标危害系数 (target hazard quotients, THQ)、总危害指数 (hazard index, HI) 评估 Cu、As、Pb、Cr、Cd 对人体非致癌健康风险; 致癌风险 (carcinogenic risks, CR) 评估 As、Pb、Cd 对人体致癌健康风险。

2.6.1 每日摄入重金属量评估 EDI 代表每日估计摄入重金属量, 将 EDI 与每日暂定可耐受摄入量 (provisional tolerable daily intake, PTDI)^[15-16] 对比, 当 EDI < PTDI 时, 认为人体负荷重金属的量无明显健康影响。PTDI 参考值见表 4, EDI 的计算公式如 (1) 所示, 公式中各参数如表 5 所示。

表 4 重金属元素的每日暂定可耐受摄入量 PTDI 值

Tab 4 Provisional tolerable daily intake of heavy metal element

元素	PTDI/[mg/(kg · d)]
Cu	0.500
Pb	3.570 × 10 ⁻³
As	2.140 × 10 ⁻³
Cr	2.140 × 10 ⁻³
Cd	0.830 × 10 ⁻³

$$EDI = C \times IRD / BW \quad (1)$$

EDI 测定结果见表 6, 百荷冻干含化糖样品中重金属元素的每日摄入量 (EDI 指数) 均低于其参考可耐受摄入量 PTDI。因此, 以 EDI 作为风险

评估指标时, 可认为日常服用百荷冻干含化糖后, 重金属的量对人体健康无明显影响。

表 5 百荷冻干含化糖的健康风险评估参数汇总

Tab 5 Summary of health risk assessment parameters of Baihe freeze-dried orally disintegrated tablet

参数	参数意义	取值
C	重金属质量分数	本试验测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
EF	每年暴露于重金属的天数	365 d
ED	暴露于重金属中的年数	70 年
IRD	每日摄入药材量	$0.184 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$
BW	人体平均质量	55.9 kg
AT	平均接触重金属的时间 ($\text{EF} \times \text{ED}$)	25 550 d
RFD	每日参考剂量 ^[17]	RFD (Cu) = $0.0400 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ RFD (As) = $0.0003 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ RFD (Cd) = $0.0010 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ RFD (Cr) = $0.0030 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ RFD (Pb) = $0.0035 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$
CSF	致癌斜率因子 ^[17]	CSF (As) = $1.5000 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ CSF (Cd) = $6.1000 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ CSF (Pb) = $0.0085 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$

2.6.2 非致癌重金属健康风险评价 THQ 用于评估污染物对人体的非致癌健康危害, 该模型的评价标准为: $\text{THQ} < 1$ 表示该元素对人体没有明显的健康风险; $\text{THQ} > 1$ 表示该元素对人体可引起非致癌风险。该模型公式如 (2) 所示, 公式中各参数如表 5 所示。

由于多种重金属对人体的风险叠加性, 采用总危害指数 HI 评价多种重金属对人体健康非致癌总风险的大小, 公式如 (3) 所示, 式中 HI 为危害指数, 如果 $\text{HI} \leq 1.0$, 表示对人体没有明显的非致癌风险; 而 $\text{HI} > 1.0$, 表示引起人体健康非致癌危害的可能性较大。

$$\text{THQ} = (C \times \text{EF} \times \text{ED} \times \text{IRD}) / (BW \times \text{AT} \times \text{RFD}) \quad (2)$$

$$\text{HI} = \sum_{i=1}^N \text{THQ}_i \quad (3)$$

THQ 和 HI 结果见表 6, 5 种重金属通过百荷冻干含化糖的摄入对人体造成的健康风险顺序为 $\text{Cu} < \text{Cd} < \text{Pb} < \text{Cr} < \text{As}$, 其中 As 所引起人体的健康风险最高, 占 HI 值的贡献比例为 75.53%。样品中重金属元素的 THQ 以及 HI 值均远远小于 1.0, 表明 5 种重金属通过百荷冻干含化糖的摄入不会对人体健康造成明显的危害。

2.6.3 致癌重金属健康风险评价 重金属的致癌风险采用 CR 模型评估, 根据 US EPA 的指导, CR 的可接受范围为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$, 当 $\text{CR} > 1 \times 10^{-4}$ 时, 说明具有致癌风险, 而当 $\text{CR} < 1 \times 10^{-6}$, 该风

表 6 百荷冻干含化糖中重金属元素的 EDI、THQ 和 HI
Tab 6 EDI, THQ and HI values of heavy metal elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablet

元素	EDI/[$\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]	THQ	HI
Pb	2.62×10^{-6}	7.49×10^{-4}	0.0106
Cd	0.66×10^{-6}	6.58×10^{-4}	
Cu	7.93×10^{-6}	1.98×10^{-4}	
As	2.42×10^{-6}	8.08×10^{-3}	
Cr	3.03×10^{-6}	1.01×10^{-3}	

险可忽略不计。CR 的计算公式如 (4) 所示, 公式中各参数如表 5 所示。

$$\text{CR} = (C \times \text{EF} \times \text{ED} \times \text{IRD} \times \text{CSF}) / (BW \times \text{AT}) \times 10^{-6} \quad (4)$$

由表 7 可知, 百荷冻干含化糖的摄入对人体造成的健康风险顺序为 $\text{Pb} < \text{Cd} < \text{As}$, 并且 Pb、Cd、As 的 CR 均远小于 1×10^{-4} , 因此, 百荷冻干含化糖不存在潜在的致癌影响。

表 7 百荷冻干含化糖中重金属元素的 CR
Tab 7 CR values of heavy metal elements in Baihe freeze-dried orally disintegrated tablet

元素	CR
Pb	0.02×10^{-12}
Cd	4.02×10^{-12}
As	3.63×10^{-12}

3 讨论

本研究中所用的百荷冻干含化糖是由荷叶、高良姜、菊花、百合、黑枣五味药食同源中药材组成, 本研究对百荷冻干含化糖中重金属元素运用 EDI、THQ、CR 3 种模型进行风险评估, 结果显示该产品中 Pb、Cd、Cu、As、Cr 5 种重金属元素的 EDI 均比 PTDI 小两个数量级以上, 5 种重金属元素的 THQ 均在 1×10^{-2} 以下, HI 约为 1×10^{-2} , 对人体基本没有非致癌风险。Pb、Cd、As 3 种重金属元素的 CR 均远小于 1×10^{-6} , 致癌风险可忽略不计。综合 3 种模型结果, 按照推荐剂量服用百荷冻干含化糖, 不会对人体健康造成明显的危害, 不存在潜在的致癌影响。

百荷冻干含化糖中微量元素在具体含量方面, 略低于预期水平, 但本产品立足于中医药理论, 同时补充多种有机态微量元素, 以期通过维持脏腑与自然界之间以及各脏腑之间的协调统一, 促进人体内各种微量元素之间保持平衡, 能够在维护人体健康方面发挥出独有的疗效。与无机态微量元素相比, 百荷冻干含化糖中有机态的微量元素具有稳定性好、吸收利用率高、绿色环保的特点。

研究表明, As、Cd、Pb、Hg 等重金属与癌

症的发生有着明显的相关性^[18], 本试验由于仪器受限的原因, 未对重金属 Hg 进行测定, 后续试验会补充对百荷冻干含化糖中 Hg 的含量测定, 以期对产品进行更加全面的健康风险评估。

参考文献

- [1] 王茂堂. 枣庄市台儿庄不同年龄段儿童锌、铁缺乏情况调查分析[J]. 求医问药(下半月), 2011, 9(8): 260-261.
- [2] 熊婵, 蒋学慧, 田亚平, 等. ICP-MS 法测定采血管中的 20 种微量元素[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(11): 3676-3682.
- [3] 宋春梅, 许波, 晁玉瑾. 不同年龄反复呼吸道感染儿童体内锌、铁、钙及维生素 A、维生素 E 水平检测分析[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2020, 12(12): 68-71.
- [4] Vukelić J, Kapamadžija A, Petrović Đ, et al. Variations of serum copper values in pregnancy [J]. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo, 2012, 140(1-2): 42-46.
- [5] 张亚丽, 王东青, 尹晓峰. 微量元素与中药功效关系探讨[J]. 国医论坛, 2012, 27(6): 20-21.
- [6] 刘志伟, 邓斌, 章爱华. 火焰原子吸收光谱法测定郴州荷叶中的微量元素[J]. 化学工程师, 2008(7): 24-25, 30.
- [7] 谢志慧, 尹智慧, 盛振华. 基于电感耦合等离子体发射光谱法对不同产地菊花微量元素的含量测定及主成分分析[J]. 医药导报, 2015, 34(8): 1075-1077.
- [8] 徐世伟, 徐蓉, 孙雨茜, 等. 电感耦合等离子体质谱法分析菊花茶中微量元素含量及其溶出特性[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4946-4954.
- [9] 黄明堦, 魏道智, 陈燕丹, 等. 荷叶无机营养元素含量及溶出率[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2010, 31(5): 80-82, 86, 112.
- [10] 孙双姣, 简红霞, 刘梯楼. 药用龙牙百合中微量元素含量测定[J]. 广东微量元素科学, 2010, 17(11): 50-54.
- [11] 郑骁, 刘临, 熊知行. 原子吸收分光光谱法测定百合中微量元素[J]. 微量元素与健康研究, 2009, 26(4): 37-38.
- [12] 陈福北, 余俊华, 何飞龙. 桂产高良姜中化学元素的分析[J]. 中国调味品, 2012, 37(5): 106-108.
- [13] 罗辉, 张建和, 揭新明, 等. 不同产地高良姜无机元素含量的比较[J]. 广东微量元素科学, 1997, 4(2): 69-71.
- [14] 张美皖, 胡丹, 李娜, 等. ICP-MS 法测定贡菊不同提取液中无机元素的浸出率[J]. 中南药学, 2023, 21(1): 212-217.
- [15] 卜桐, 于晓, 张欣芮, 等. 金银花中重金属污染分析及其健康风险评估[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 643-650.
- [16] 孙岚萍, 马转霞, 吕鑫, 等. 锁阳中重金属、有害元素污染分析及健康风险评估[J]. 中成药, 2021, 43(6): 1538-1542.
- [17] 孔丹丹, 李歆悦, 闫卉欣, 等. 药食两用植物药中重金属污染及其健康风险评估模型的建立——以黄芪、党参、昆布为例[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23): 5042-5050.
- [18] 蔡睿, 卜俊国, 许嘉俊, 等. 重金属暴露及其致癌分子机制的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(10): 1786-1789.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-04-17)

衰减全反射傅里叶变换红外分光光度法快速测定 西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量

郝自强^{1,4}, 田葳^{4,5}, 王欣茹^{4,5}, 魏文静^{1,4}, 杨瑞^{3*}, 王淑君^{2*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 3. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034; 4. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 5. 江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要: **目的** 建立衰减全反射傅里叶变换红外分光光度法 (ATR-FTIR) 快速测定西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量。**方法** 采用标准曲线法, 以液体石蜡和正己烷为混合溶剂, 测定西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量。扫描次数为 64 次, 扫描范围为 $4000 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} , 测定特征吸收峰为 1260 cm^{-1} 处, 量取峰高作为吸光度。**结果** 西甲硅油在 $5.724 \sim 85.86 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与吸光度呈良好的线性关系 ($r = 0.9993$), 低、中、高浓度样品的平均加样回收率分别为 98.8%、102.5%、103.1%, *RSD* 分别为 0.68%、0.44%、0.65% ($n = 3$)。3 批样品的含量测定结果为 39.14、39.88、40.38 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论** 本方法简便、快捷, 适用性广、安全性高, 巧妙采用液体石蜡减少正己烷的挥发性并省去液体吸收池等附件带来的误差, 优于以往的方法, 可用于西甲硅油乳剂中西甲硅油含量的快速测定。

关键词: 衰减全反射傅里叶变换红外分光光度法; 西甲硅油乳剂; 液体石蜡; 含量测定; 快速检测
中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)05-1372-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.041

Rapid content determination of simethicone in simethicone emulsion by Fourier transform infrared spectrophotometry with attenuated total reflection spectrophotometry

HAO Zi-qiang^{1,4}, TIAN Wei^{4,5}, WANG Xin-ru^{4,5}, WEI Wen-jing^{1,4}, YANG Rui^{3*}, WANG Shu-jun^{2*}
(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 3. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034; 4. Drug Advanced Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133; 5. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To establish a Fourier transform infrared spectrophotometry with attenuated total reflection (ATR-FTIR) to determine simethicone content in simethicone emulsion. **Methods** The standard-curve was used to measure simethicone with liquid paraffin and N-hexane as the mixed solvent. The spectra were recorded after 64 scans, each measured in the range $4000 \sim 650 \text{ cm}^{-1}$ with a resolution of 4 cm^{-1} . A characteristic wave number (1260 cm^{-1}) was chosen for the determination and the peak height was used as the absorbance value. **Results** An excellent linearity ($r = 0.9993$) was found between the absorbance and the concentration of simethicone ($5.724 \sim 85.86 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). The average recovery of low, medium and high concentration samples were 98.8%, 102.5%, and 103.1%, and *RSD* were 0.68%, 0.44% and 0.65% ($n = 3$). The content determinations of three batches were 39.14, 39.88, and 40.38 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple, safe and useful. The smart use of liquid paraffin to reduce the volatility of *n*-hexane and to decrease errors due to accessories such as liquid absorption cells helps quickly determine the content

作者简介: 郝自强, 男, 硕士研究生, 主要从事药物创新制剂研究, email: 1146696757@qq.com ***通信作者:** 杨瑞, 女, 研究员, 主要从事药剂学及药物动力学研究, email: yang_rui1983@163.com; 王淑君, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药剂学、创新制剂研究, email: 1252116911@qq.com

of simethicone in simethicone emulsion, which is superior to previous methods.

Key words: ATR-FTIR; simethicone emulsion; liquid paraffin; content determination; rapid detection

西甲硅油乳剂属于消泡类药^[1], 主要用来治疗因气体过度产生或聚集导致的腹部膨胀、肠胃气胀, 联合其他药物治疗功能性消化不良以及辅助腹部影像学检查等, 还可以用于治疗婴幼儿胃肠功能紊乱及儿童便秘^[2-8]。西甲硅油作为西甲硅油乳剂中起主要消泡作用的成分, 为二甲硅油与二氧化硅复合物, 其中二甲硅油的含量为 90.5% ~ 99.5%, 胶态二氧化硅的含量为 4.0% ~ 7.0%, 本品为灰白色或乳白色黏稠油状液体^[9]。因西甲硅油没有紫外吸收光谱特征峰, 而红外特征吸收明显且专属性好, 故目前已报道的国内外各种西甲硅油的含量测定方法均采用红外分光光度法 (FTIR), 在 1260 cm^{-1} 波数附近测定吸光度, 对西甲硅油乳剂破乳后用甲苯^[10]或正己烷^[11]提取, 采用 0.5 mm 溴化钾 (KBr) 液体吸收池, 以透射法测定。目前《中国药典》暂未收录西甲硅油乳剂中的西甲硅油含量测定方法, 仅有《西甲硅油乳剂进口药品注册标准》可供参考^[12], 其他各国药典目前仅查到美国药典收录西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量测定方法^[13]。本文建立了一种衰减全反射傅里叶变换红外 (ATR-FTIR) 光度法快速地测定西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量, 巧妙采用液体石蜡减少正己烷的挥发性并省去液体吸收池等附件带来的误差, 优于以往的方法, 可用于西甲硅油乳剂中西甲硅油含量的快速测定, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪, 配有衰减全反射 (ATR) 附件 (安捷伦科技有限公司); PX85Z 型分析天平 (奥豪斯仪器有限公司, $d = 0.01\text{ mg}$); SB25-12D 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药

西甲硅油对照品 (含量: 95.4%, 湖南九典宏阳, 批号: T202105YB203); 西甲硅油乳剂 (德国柏林化学股份有限公司, 批号: 01005A、04080A、04081A); 液体石蜡 (批号: 20220602)、正己烷 (批号: 20211028)、甲醇 (批号: 20211118)、无水硫酸钠 (批号: 20210514) (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液的制备 称取西甲硅油对照品 1200 mg, 用正己烷定容至 10 mL 量瓶中, 加无水硫酸钠 0.3 g, 振摇, 离心 ($4000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 取上清液, 即得。后续试验所需浓度以液体石蜡稀释得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定西甲硅油乳剂约 5.4 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇 2.5 mL, 混匀, 超声 5 min, 精密加正己烷 5 mL, 混匀, 超声 5 min, 静置, 分取正己烷层, 加无水硫酸钠 1 g, 混匀后离心 ($4000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 取上清液, 即得。后续试验所需浓度以液体石蜡稀释得。

2.1.3 空白溶液的制备 分别取正己烷和液体石蜡适量于离心管中, 加入适量无水硫酸钠干燥, 振摇, 离心 ($4000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), 取上清液, 即得。

2.1.4 光谱测定条件 使用 ATR 附件, 扫描范围 $4000 \sim 650\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数为 64 次, 选取特征吸收峰波数 1260 cm^{-1} , 试验操作为将样品直接涂布在 ATR 附件金刚石检测窗口, 以特征吸收峰测定峰高计为吸光度。

2.2 专属性考察

取质量浓度为 $60\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 西甲硅油对照品、液体石蜡和正己烷, 分别按“2.1.4”项下条件进样测定。结果显示, 西甲硅油的红外特征吸收峰在 1260 cm^{-1} 波数处, 液体石蜡和正己烷对西甲硅油的特征吸收峰均无干扰 (见图 1)。

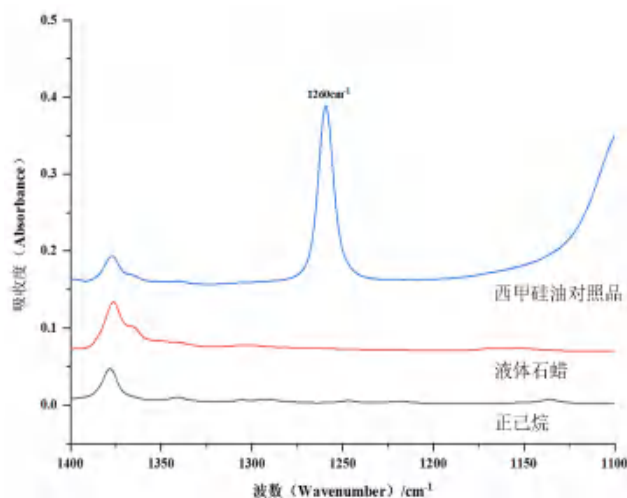


图 1 西甲硅油对照品、液体石蜡和正己烷光谱图

Fig 1 Spectra of simethicone reference, liquid paraffin and *n*-hexane

2.3 精密度考察

取质量浓度为 $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的西甲硅油对照品, 按“2.1.4”项下的试验条件连续测定 6 次, 结果显示西甲硅油红外特征吸收峰的位置稳定, 均为 1260 cm^{-1} 波数, 吸光度的 $RSD (n=6)$ 为 1.4%, 表明试验仪器的精密度良好。

2.4 线性关系以及范围考察

精密量取西甲硅油对照品储备液 0.1、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL, 置于不同 5 mL 离心管中, 加液体石蜡稀释至 2.0 mL, 分别配成 5.724、28.62、45.79、57.24、68.688、85.86 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的西甲硅油对照品溶液, 按“2.1.4”项下的试验条件测定 1260 cm^{-1} 波数处的吸光度。以对照品溶液浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。得到的线性关系方程为 $Y = 0.0036X + 0.0079$, 相关系数 $r = 0.9993 (n=6)$, 结果表明西甲硅油在 $5.724 \sim 85.86 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

2.5 重复性考察

取批号为 01005A 的西甲硅油乳剂样品, 按照“2.1.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液并测定含量, 分别按“2.1.4”项下的试验条件测定, 结果测得西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量分别为 100.0%、102.5%、104.5%、102.5%、103.8%、105.8%, 平均值为 103.2%, RSD 为 1.9% ($n=6$), 显示本次试验的方法重复性良好。

2.6 加样回收率考察

取 1.0 mL 已知含量 $39.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液 (批号: 01005A) 于 5 mL 离心管中, 共 9 份, 分为 3 组, 分别加入质量浓度 $38.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 西甲硅油对照品 0.8、1.0、1.2 mL, 用液体石蜡稀释至 3 mL, 超声 5 min 使混合均匀, 按照“2.1.4”项下条件测定含量, 结果在相当于标示量限度 85% ~ 110% 内, 低、中、高浓度样品的平均加样回收率分别为 98.8%、102.5%、103.1%, RSD 分别为 0.68%、0.44%、0.65%, 表明本法准确度符合规定。

2.7 样品含量测定

取 3 批西甲硅油乳剂样品 (批号: 01005A、04080A、04081A), 按“2.1.2”项下方法制备溶液, 按“2.1.4”项下方法测定并计算样品含量, 结果测得 3 批西甲硅油乳剂样品的含量分别为 39.14、39.88、40.38 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均含量为 $39.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.3% (见表 1), 说明本法适用于西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量测定。

2.8 稳定性考察

取西甲硅油乳剂样品 (批号: 01005A), 按“2.1.2”项下方法制备溶液, 再按“2.1.4”项下方法, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定 1260 cm^{-1} 处的吸光度值, 结果西甲硅油吸光度的 RSD 为 1.8%, 结果表明样品待测溶液在室温下 12 h 内是稳定的。

2.9 美国药典方法与本文方法含量测定结果比较

目前仅有美国药典中收录了的西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量测定方法, 操作如下: ① 精密称定西甲硅油对照品 50 mg, 置于具塞锥形瓶中, 加稀盐酸溶液 (2 → 5) 50 mL, 振荡 5 s, 再精密加入甲苯 25 mL, 选用往复摇床 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 振摇 10 min; 然后离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min), 取出后立即将约 5 mL 的上层有机层 (甲苯) 转移到含有约 1 g 无水硫酸钠的 10 mL 离心管中, 剧烈振摇后, 离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清液作为对照品溶液。② 分别取 3 批西甲硅油乳剂样品, 精密称定西甲硅油乳剂约 1.35 g, 按“①”项下方法处理, 取上清液作为供试品溶液; ③ 精密量取 25 mL 的甲苯, 按“①”项下方法处理, 取上清液作为空白溶液。选择 0.5 mm KBr 液体吸收池, 测定波长为 $(1260 \pm 4) \text{ cm}^{-1}$ 。按公式 $= (A_U/A_S)(C_S/C_U) \times 100\%$ 计算, 其中 A_U : 供试品溶液的吸光度; A_S : 对照品溶液的吸光度; C_S : 标准溶液中西甲硅油中的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_U : 供试品溶液中西甲硅油的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

取 3 批西甲硅油乳剂样品 (批号: 01005A、04080A、04081A), 分别按照美国药典方法 (FTIR) 以及本文方法 (ATR-FTIR) 进行含量测定, 并对测定结果进行比较 (见表 1)。美国药典中规定含西甲硅油应为标示量的 85% ~ 110%, 本文方法测定含量结果为标示量的 99.5%, 美国药典方法测定的含量结果为标示量的 99.3%, 均符合药典规定, 同时两种方法的 RSD 均小于 2%, 但本文方法更简便快捷, 安全性更高。

3 讨论

3.1 试验装置比较

林翔等^[14]对于 ATR 的原理进行了研究, ATR 的原理是基于光内反射, 当反射元件的折射率 (n^1) 大于样品的折射率 (n^2), 并且入射角 θ 大于临界角 θ ($\sin\theta = n^2/n^1$) 时, 就会发生全反射。如果在入射辐射的频率范围内有样品的吸收区, 则部分入射辐射被吸收, 在反射辐射中相应频率的部分形成吸收带, 携带出样品的结构信息, 这就是

表 1 ATR-FTIR 光度法与美国药典方法 (FTIR) 的结果比较

Tab 1 ATR-FTIR spectrophotometry method and United States Pharmacopoeia method (FTIR)

方法	批号	含量 / (mg · mL ⁻¹)	平均含量 / (mg · mL ⁻¹)	RSD/%	F	t
ATR-FTIR	01005A	39.14	39.80	1.3	0.908	0.912
	04080A	39.88				
	04081A	40.38				
FTIR	01005A	40.13	39.72	1.9		
	04080A	38.65				
	04081A	40.38				

ATR 谱。FTIR 的 ATR 法与透射法相比，其差别主要是附件系统：ATR 法用到衰减全反射附件，透射法通常采用 KBr 压片或者是吸收池，因此只要在 FTIR 上配置 ATR 附件即可实现 ATR 测试（见图 2）。对于一些能涂在全反射晶体反射面上的液体，可用一般测量固体样品的 ATR 附件，直接把液体涂在晶体反射面上进行测定。但对于低沸点液体，或不能在全反射晶体的反射面上形成液层的高沸点液体，必须使用带液体池的 ATR 附件^[15]。

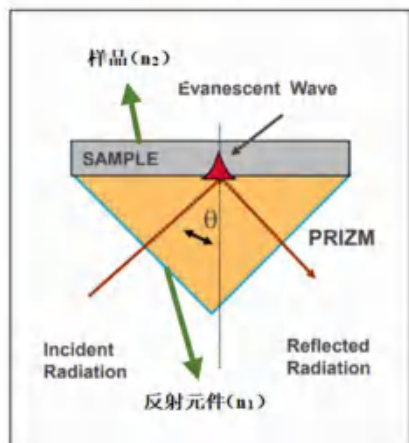


图 2 衰减全反射操作台以及原理示意图

Fig 2 Operating of attenuating total reflection and principle sketch map

目前已知的两种方法中，西甲硅油乳剂中的西甲硅油含量测定均采用 0.5 mm KBr 液体吸收

池，以透射法测定，而本文采用的是反射法，虽然透射法灵敏度高于反射法^[16]，但由于西甲硅油和稀释用的液体石蜡在室温下均具有低挥发性，反射法的灵敏度已满足西甲硅油乳剂中西甲硅油的含量测定，而透射法需要将测定所需的液体样品注入到 KBr 液体吸收池中，无论采用甲苯还是正己烷作为溶剂，均有较大挥发性，易导致配制的对照品溶液和供试品溶液浓度在加入 KBr 液体吸收池密封前发生偏离，继而导致测量的不确定度上升^[17]。除此之外，在此过程中如果操作不当，会带入气泡，并且 KBr 液体吸收池易吸收空气中的水分，使 KBr 液体吸收池窗片模糊发毛，导致透光率下降，基线噪音上升，检测灵敏度下降，而本文采用的 ATR-FTIR 光度法，不仅在稀释剂选择上降低了溶剂的挥发性，而且操作简便，减少了因为操作不当对试验结果的影响。

3.2 试验原理比较

目前已报道的国内外各种西甲硅油的含量测定方法均采用红外分光光度法 (FTIR)，在 1260 cm⁻¹ 波数附近测定吸光度，采用 0.5 mm 溴化钾 (KBr) 液体吸收池，以透射法测定，应用的理论是朗伯比尔定律，其公式为 $A = \lg (1/T) = Kbc$ ，其中 K 为摩尔吸光系数， A 为吸光度， b 为吸收层厚度， c 为吸光物质的浓度，因此需要精准的控制光程，即液膜厚度。

而衰减全反射法是根据麦克斯韦理论，其公式如下： $d_p = \lambda_1 / [2\pi n_1 \sqrt{ \sin^2 \theta - (n_2 / n_1)^2 }]$ ，其中 λ_1 为红外光束在反射介质中的波长， θ 为入射角， n_1 、 n_2 分别为晶体材料和样品的折射率，当检测条件固定时，光程即液膜厚度也是固定的，因此相比于采用 0.5 mm 溴化钾 (KBr) 液体吸收池的方法更加简便快捷。

3.3 溶剂的选择

李舸远等^[18]研究发现液体石蜡能与二甲硅油以任意比例混溶，对选取的二甲硅油的红外特征吸收无干扰且具有低挥发性，为本试验的溶剂选择提供了依据。本研究是对西甲硅油乳剂含量

测定方法的探讨,需破乳后用提取剂提取,方可对西甲硅油进行测定,目前国内外已报道的测定西甲硅油含量的方法,采用甲苯或正己烷作为西甲硅油的溶剂,但甲苯在提取过程容易乳化^[17],造成分层困难,加上甲苯属于易制毒类的管控试剂,购买使用较烦琐,最终选择正己烷作为溶剂。继而对正己烷、液体石蜡以及西甲硅油三者的溶解情况进行考察,发现3种试剂可以任意比例混溶,且正己烷、液体石蜡对西甲硅油的红外特征吸收无干扰,并且在加入液体石蜡后能有效降低正己烷的挥发性,故本研究采用液体石蜡作为稀释剂。

3.4 其他

本方法受外界环境影响小,适用范围更广,尤其适用于湿度较高、KBr窗片不易于保存的地区,如长三角区域;由于KBr窗片容易吸湿导致窗片发毛,需要经常更换,此方法省去了KBr窗片的应用,在检测费用上也更加低廉;在简便性上不用液体池,直接滴在检测平台上即可,省时省力;减少了有机溶剂如正己烷或甲苯的挥发性,这两个有机溶剂对人体均有危害,因此可以减少操作人员的意外吸入。本方法的不足之处是不能大批量、长时间进行含量测定,因为在操作过程中发现ATR操作台在长时间使用后,会造成发热,继而加速混合溶剂中正己烷的挥发,影响试验结果。除此之外,本试验并未考察正己烷与液体石蜡的混合比例是否对试验结果存在影响,所以在混合体系的比例方面还有待于进行进一步研究。

参考文献

- [1] Brecević L, Bosan I, Strajnar F. Mechanism of antifoaming action of simethicone [J]. *J Appl Toxicol*, 1994, 14 (3): 207.
- [2] 王洋, 黎晓琴, 史思文, 等. 聚乙二醇联合西甲硅油对结肠镜检查患者 Boston 肠道准备量表评分及耐受度的影响 [J]. *中国综合临床*, 2021, 37 (5): 411-415.
- [3] 谭林, 杨培. 5HT₄ 受体激动剂联合西甲硅油治疗非溃疡性消化不良的效果观察 [J]. *广东医学*, 2021, 42 (3): 331-334.
- [4] 黄世廷, 荣晓玲, 张殿星, 等. 西甲硅油乳剂在上消化道气钡双重造影中的应用价值 [J]. *医学影像学杂志*, 2021, 31 (7): 1193-1195.
- [5] 陈树亮, 陈泽杰, 高华. 西甲硅油乳剂联合枯草杆菌肠球菌多维治疗新生儿胃肠功能紊乱 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2017, 38 (5): 100-101.
- [6] 张仕超, 汪莎莎, 李敬凤. 聚乙二醇 4000 联合西甲硅油乳剂治疗儿童便秘的疗效分析 [J]. *儿科药学杂志*, 2017, 23 (9): 12-14.
- [7] Megan K. Therapeutic review: simethicone [J]. *J Exot Pet Med*, 2014, 23 (4): 415-417.
- [8] 李悠, 李子祥, 梅兴国, 等. 西甲硅油乳剂临床应用的研究进展 [J]. *湖北科技学院学报 (医学版)*, 2022, 36 (1): 78-81.
- [9] 杨莉, 葛亚彬, 赵志刚. 西甲硅油乳剂 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16 (8): 651-653.
- [10] 严拯宇, 艾小霞, 唐璐, 等. 红外分光光度法测定二甲硅油含量 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (2): 180-181.
- [11] 冯锁民, 冯家星, 周柄全, 等. 红外分光光度法测定西甲硅油中西甲硅油的含量 [J]. *中国食品添加剂*, 2018, 29 (4): 201-204.
- [12] JX20140233. 西甲硅油乳剂进口药品注册标准 [S]. 2015: 33.
- [13] USP 43-NF 38 [S]. 2020: 4044.
- [14] 林翔, 李娟, 彭熙琳, 等. 透射与衰减全反射: 红外光谱测试的实际案例及讨论 [J]. *实验科学与技术*, 2022, 20 (4): 76-81.
- [15] 黄红英, 尹齐和. 傅里叶变换衰减全反射红外光谱法 (ATR-FTIR) 的原理与应用进展 [J]. *中山大学研究生学刊 (自然科学、医学版)*, 2011, 32 (1): 20-31.
- [16] 刘咏, 倪春明, 李斌. 红外 ATR 技术在液体样品检验中的应用研究 [J]. *云南警官学院学报*, 2017, 28 (4): 101-105.
- [17] 申雷, 孔璇, 屈颖, 等. 红外分光光度法测定西甲硅油乳剂中西甲硅油含量的测量不确定度评定 [J]. *天津药学*, 2015, 27 (5): 5-9.
- [18] 李嗣远, 崔燕如, 何华, 等. 衰减全反射傅立叶变换红外光度法快速测定西甲硅油中二甲硅油的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40 (4): 750-758.

(收稿日期: 2022-12-19; 修回日期: 2023-02-23)

9 城市老年患者使用他汀类药物潜在药物相互作用分析

郭恒, 李丹丹, 温爱萍, 程晟, 李哲, 王维娜, 李新刚* (首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050)

摘要: **目的** 对老年患者处方中他汀类药物的潜在药物相互作用进行分析。**方法** 抽取 2016 年至 2021 年 9 座城市 160 余家医院使用他汀类药物的老年患者门诊处方, 根据 Lexicomp 药物相互作用数据库筛查存在的 D 类及 X 类的药物相互作用。同时根据最新版他汀类药物说明书中针对合并用药推荐的每日最大剂量, 筛选超出该推荐剂量的处方。使用 sql server 2019 及 R 4.2 软件进行数据处理、Logistic 回归及其他统计学分析。**结果** 共收集 2 733 777 例次门诊处方, 涉及 7 种他汀类药物, 筛查出潜在相互作用 37 584 例次, 整体发生率为 1.38%。多因素二元 Logistic 回归分析显示, 相对于男性, 女性 ($OR = 1.18$, $95\%CI 1.16 \sim 1.21$, $P < 0.001$) 的潜在药物相互作用风险更高; 相对于 65 ~ 74 岁患者, 75 ~ 84 岁 ($OR = 1.03$, $95\%CI 1.01 \sim 1.05$, $P < 0.05$) 患者风险略增加, 85 ~ 94 岁 ($OR = 0.96$, $95\%CI 0.93 \sim 0.99$, $P < 0.05$) 患者风险略降低, 95 岁及以上患者差异无统计学意义; 相对于合用 2 种药物的患者, 随着合用药数量的增加风险增加: 3 种 ($OR = 2.23$, $95\%CI 2.12 \sim 2.34$, $P < 0.001$), 4 种 ($OR = 3.24$, $95\%CI 3.10 \sim 3.40$, $P < 0.001$), 5 种 ($OR = 4.15$, $95\%CI 3.96 \sim 4.34$, $P < 0.001$), 5 种以上 ($OR = 5.47$, $95\%CI 5.23 \sim 5.72$, $P < 0.001$)。 **结论** 老年患者使用他汀类药物时存在发生潜在药物相互作用的风险, 临床工作者需要给予足够的重视。

关键词: 老年患者; 他汀; 药物相互作用; Lexicomp 数据库; Logistic 回归

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1377-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.042

Potential drug-drug interactions with statins among elderly patients in 9 cities in China

GUO Heng, LI Dan-dan, WEN Ai-ping, CHENG Sheng, LI Zhe, WANG Wei-na, LI Xin-gang* (Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050)

Abstract: Objective To analyze the potential drug-drug interactions with statins among elderly patients. **Methods** We collected outpatient prescriptions of elderly patients using statins from more than 160 hospitals in 9 cities between 2016 to 2021. We screened class D and class X drug-drug interactions with Lexicomp database. We also screened prescriptions whose dosage of statins was beyond the recommended amounts. After that, data processing, Logistic regression and other statistical analyse were performed by sql server 2019 and R 4.2 software. **Results** Totally 2 733 777 prescriptions were collected and 37 584 (1.38%) potential interactions concerning 7 statins were found. The multivariate binary Logistic regression showed that females ($OR = 1.18$, $95\%CI 1.16 \sim 1.21$, $P < 0.001$) had higher risks of potential drug-drug interactions compared to males. Patients at 75 ~ 84 years ($OR = 1.03$, $95\%CI 1.01 \sim 1.05$, $P < 0.05$) had a slightly increased risk, while at 85 ~ 94 years ($OR = 0.96$, $95\%CI 0.93 \sim 0.99$, $P < 0.05$) patients had a slightly decreased risk, as compared with the 65 ~ 74 age group. The risks in patients aged 95 and above showed no statistical difference. For patients taking

作者简介: 郭恒, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学相关研究, email: guoheng825@sohu.com *通信作者: 李新刚, 男, 博士, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药事管理及群体药代动力学研究, email: lxg198320022003@163.com

2 or more combination drugs, risks increased with the number of combination drugs: 3 drugs ($OR = 2.23, 95\%CI 2.12 \sim 2.34, P < 0.001$), 4 drugs ($OR = 3.24, 95\%CI 3.10 \sim 3.40, P < 0.001$), 5 drugs ($OR = 4.15, 95\%CI 3.96 \sim 4.34, P < 0.001$), and more than 5 drugs ($OR = 5.47, 95\%CI 5.23 \sim 5.72, P < 0.001$). **Conclusion** Risk of potential drug-drug interactions exist when elderly patients take statins, together with other drugs.

Key words: elderly patient; statin; drug-drug interaction; Lexicomp database; Logistic regression

老年人常共患多种疾病, 由此产生的多重用药可导致有害药物相互作用的增多及药品不良反应发生率的增加^[1-2]。血脂异常是我国老年人的常见疾病, 总体发病率为 47%^[3]。他汀类药物是治疗血脂异常的主要药物^[4], 与多种药物存在潜在药物相互作用^[5]。本研究利用“医院处方分析合作项目”数据库, 抽取 2016 年至 2021 年 9 座城市 160 余家医院老年患者的门诊处方, 对老年患者处方中他汀类药物的潜在药物相互作用进行分析。

1 资料与方法

1.1 数据来源

数据来源于中国药学会医院药专业委员会“医院处方分析合作项目”。每季度随机抽取 10 d 门急诊处方及住院医嘱信息。目前已有 9 座城市 160 余家医院参加该项目。本研究利用该项目 2016—2021 年的门诊处方数据, 抽取满足以下条件的处方并提取处方信息(患者编码、性别、年龄、处方编号、处方时间、医院等级、药品通用名、药品规格、用法用量): ① 患者年龄 ≥ 65 岁^[6]; ② 含有他汀类药物的处方, 以及该处方患者同时开具的所有处方。数据已进行脱敏处理, 不包含患者个人敏感信息。

1.2 研究指标及方法

① 潜在药物相互作用: 根据 Lexicomp 药物相互作用数据库判断患者开具的他汀类药物与同时开具的其他药物间的潜在相互作用, 并对存在的 D 类(建议调整治疗)及 X 类(避免合用)相互作用进行记录并分析。同时, 查阅最新版他汀类药物产品说明书, 提取其中针对合并用药时推荐的日最大剂量, 并筛选超出该推荐剂量的处方。本研究中, 将同一位患者单次就医开具的全部处方记为 1 处方例次, 并将其中所有药品纳入潜在相互作用分析。

② 分析内容: 使用 sql server 2019 数据库软件分析患者基本信息及存在的 D、X 类相互作用情况, 使用 R 4.2 进行 Logistic 回归及其他统计学分析。

2 结果

2.1 基本情况

本研究筛查了 160 余家医院 2016 年至 2021 年 65 岁及以上的老年患者共 20 665 525 例次就诊的门诊处方, 收集了使用他汀类药物老年患者 2 733 777 例次的门诊处方, 涉及 7 种他汀药物, 占比 13.23%, 其年度占比变化见图 1。收集到的处方中 90.93% 由三级医院开具, 7.65% 由二级医院开具, 1.42% 由一级医院开具。将单次取药处方中他汀类药物规格乘以取药数量得到单次取药总剂量, 其时间变化情况见图 2。纳入患者中男女比例为 1.12 : 1, 年龄中位数 75 (四分位间距: 69 ~ 81) 岁, 处方合用药物数量中位数为 4 (四分位间距: 2 ~ 5) 种。根据 Lexicomp 药物相互作用数据库(查询时间 2022 年 6 月), 结合本研究中涉及的药物, 提取药物相互作用分级目录, 结果见表 1。各种他汀类药物处方例次占比随时间分布情况见表 2。

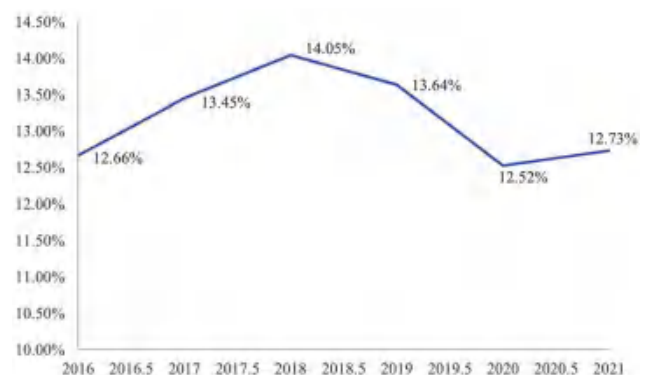


图 1 2016—2021 年他汀类药物处方例次占比 (%)

Fig 1 Proportion of statin prescriptions from 2016 to 2021 (%)

2.2 潜在药物相互作用情况分析

2.2.1 潜在药物相互作用基本情况 本研究中共有 37 584 例次处方被筛查出存在他汀类药物的潜在相互作用。处方存在 D 类相互作用 35 407 例次, 存在 X 类 2262 例次, 同时存在 D 类及 X 类 85 例次。

可与他汀类药物产生相互作用的药物种类、作用机制、相互作用级别及相应的处方例次分布见表 3。同一处方例次中出现多个潜在相互作用将分别计入各自项下。部分药物与他汀类药物合

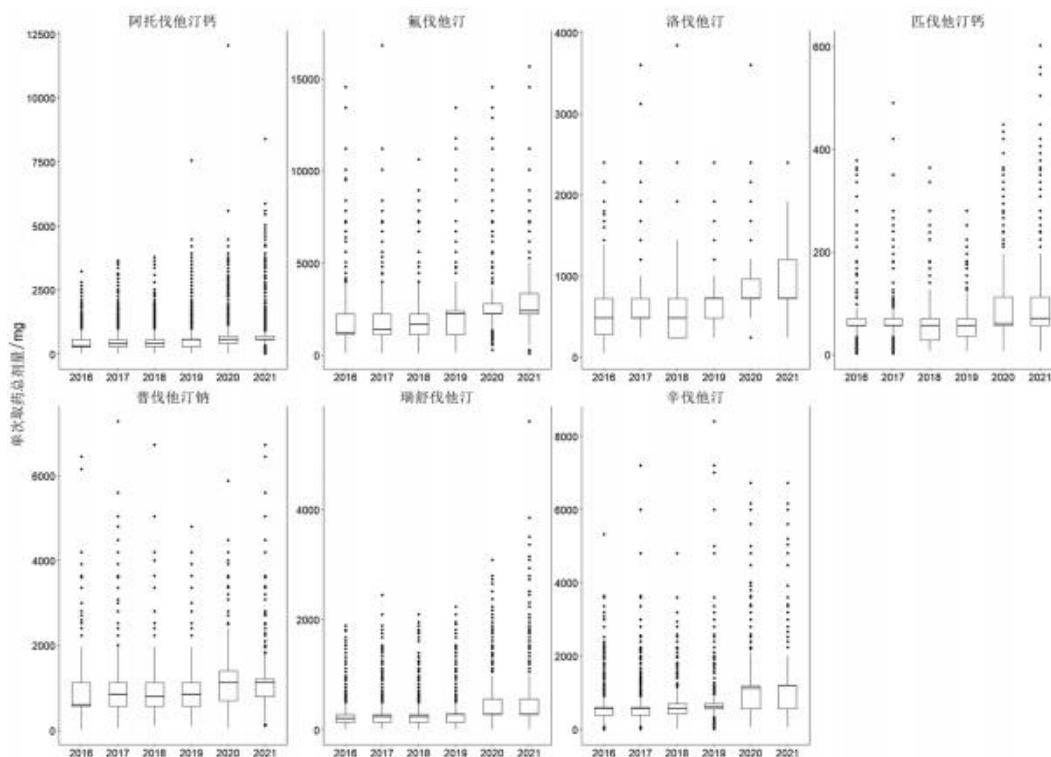


图 2 2016—2021 年各种他汀类药物单次取药总剂量 (mg)
Fig 2 Total dosage of statins in a single prescription from 2016 to 2021 (mg)

表 1 本研究中与他汀类药物存在潜在相互作用的药物
Tab 1 Drugs with potential interactions with statins in this study

他汀类药物	相互作用等级	存在相互作用药物
辛伐他汀	D	胺碘酮, 氨氯地平, 左旋氨氯地平, 苯扎贝特, 地尔硫草, 钆, 乐卡地平, 圣约翰草, 替格瑞洛, 维拉帕米
	X	环孢素, 克拉霉素, 伊曲康唑, 米非司酮, 泊沙康唑, 伏立康唑, 达那唑, 红霉素, 吉非贝齐
阿托伐他汀	D	苯扎贝特, 克拉霉素, 伊曲康唑, 钆, 利福平, 圣约翰草, 维拉帕米
	X	环孢素, 吉非贝齐, 泊沙康唑
瑞舒伐他汀	D	苯扎贝特, 环孢素, 吉非贝齐, 钆, 瑞戈非尼
普伐他汀	D	苯扎贝特, 克拉霉素, 环孢素, 钆
	X	吉非贝齐
氟伐他汀	D	苯扎贝特, 环孢素, 氟康唑, 米非司酮, 钆
	X	吉非贝齐
匹伐他汀	D	苯扎贝特, 红霉素, 钆, 利福平
	X	环孢素, 吉非贝齐
洛伐他汀	D	胺碘酮, 苯扎贝特, 达那唑, 地尔硫草, 钆, 圣约翰草, 替格瑞洛, 维拉帕米
	X	环孢素, 克拉霉素, 伊曲康唑, 米非司酮, 泊沙康唑, 伏立康唑, 红霉素, 吉非贝齐

表 2 2016—2021 年他汀类药物处方例次占比 (%)

药品	2016	2017	2018	2019	2020	2021	总计
阿托伐他汀钙	8.21	9.18	10.10	10.98	7.86	6.95	53.27
瑞舒伐他汀	4.35	5.09	5.60	4.98	3.90	3.45	27.36
匹伐他汀钙	0.87	1.04	1.34	1.86	1.31	0.82	7.24
辛伐他汀	1.49	1.29	1.07	0.89	0.44	0.27	5.46
普伐他汀钠	0.71	0.70	0.71	0.78	0.57	0.56	4.04
氟伐他汀	0.54	0.44	0.39	0.39	0.38	0.25	2.39
洛伐他汀	0.07	0.06	0.05	0.03	0.01	0.02	0.24
总计	16.24	17.80	19.26	19.91	14.47	12.32	100.00

用时, 说明书对他汀类药物的最大日剂量进行了推荐, 这些药物潜在相互作用处方为 32 335 例次, 其中他汀日用量超过说明书推荐量的处方共 12 717 例次, 占比 39.33%。超过每日最大推荐量的具体药物处方占比也分别列入表 3 相应项下。

2.2.2 影响潜在药物相互作用的因素 纳入性别、年龄、合用药数量, 构建影响药物相互作用的多因素二元 Logistic 回归, 见图 3。结果显示相对于男性患者, 女性的潜在药物相互作用风险更高 ($OR = 1.18, 95\%CI 1.16 \sim 1.21, P < 0.001$)。

表 3 引起他汀类药物潜在相互作用的处方例次分布

Tab 3 Distribution of prescription with potential interactions with statins

发生潜在相互作用药物	作用机制 ^a	辛伐他汀		阿托伐他汀		瑞舒伐他汀	氟伐他汀	普伐他汀	匹伐他汀	洛伐他汀		总计
		D 级	X 级	D 级	X 级	D 级	D 级	D 级	D 级	D 级	X 级	
氨氯地平 / 左旋氨氯地平	抑制 CYP3A4	28 652 (37.77% 超过说明书每日最大量 20 mg)										28 652
环孢素	抑制 CYP3A4, OATP1B1		91		2006	301	351	220 (90.45% 超过说明书每日最大量 20 mg)				2969
地尔硫草	抑制 CYP3A4	1391 (84.33% 超过说明书每日最大量 10 mg)										1417
胺碘酮	抑制 CYP3A4	786 (24.43% 超过说明书每日最大量 20 mg)										800
克拉霉素	抑制 CYP3A4, OATP1B1		64	650 (18.62% 超过说明书每日最大量 20 mg)				52 (1.92% 超过说明书每日最大量 40 mg)			2	768
维拉帕米	抑制 CYP3A4	73 (71.23% 超过说明书每日最大量 10 mg)										497
红霉素	抑制 CYP3A4, OATP1B1		86						150 (84.00% 超过说明书每日最大量 1 mg)		1	237
伊曲康唑	抑制 CYP3A4		8	145 (16.55% 超过说明书每日最大量 20 mg)								153
圣约翰草	抑制 CYP3A4			34								34
伏立康唑	抑制 CYP3A4		1									1
泊沙康唑	抑制 CYP3A4					1						1
氟康唑	抑制 CYP2C9						1					1
瑞戈非尼	抑制 BCRP						1					1
苯扎贝特	抑制 OATP1B1	39		141		115	9	18	94			416
利福平	抑制 OATP1B1			58								58
吉非贝齐	抑制 OATP1B1		1		5	5						11
乐卡地平	不明确, 合用可增加辛伐他汀血浆浓度	958										958
替格瑞洛	不明确, 合用可增加洛伐他汀、辛伐他汀血浆浓度	207 (2.90% 超过说明书每日最大量 40 mg)										216
碳酸镧	结合他汀类药物, 减少吸收	18		523		48	10	42	12			653
总计		32 124	251	1969	2012	470	371	332	256	55	3	37 843

注: ^aCYP. 细胞色素 P450; OATP. 有机阴离子转运多肽; BCRP. 乳腺癌耐药蛋白。

Note: ^aCYP. cytochrome P450; OATP. organic anion transporting polypeptide; BCRP. breast cancer resistance protein.

相对于 65 ~ 74 岁患者, 75 ~ 84 岁 ($OR = 1.03, 95\%CI 1.01 \sim 1.05, P < 0.05$) 患者的潜在药物相互作用风险略增加, 85 ~ 94 岁 ($OR = 0.96, 95\%CI 0.93 \sim 0.99, P < 0.05$) 患者的风

险降低；95 岁及以上患者差异无统计学意义。

相对于合用 2 种药物的患者，随着合用药数量的增加，其潜在药物相互作用风险也在增加：3 种 ($OR = 2.23, 95\%CI 2.12 \sim 2.34, P < 0.001$)，4 种 ($OR = 3.24, 95\%CI 3.10 \sim 3.40, P < 0.001$)，5 种 ($OR = 4.15, 95\%CI 3.96 \sim 4.34, P < 0.001$)，5 种以上 ($OR = 5.47, 95\%CI 5.23 \sim 5.72, P < 0.001$)。

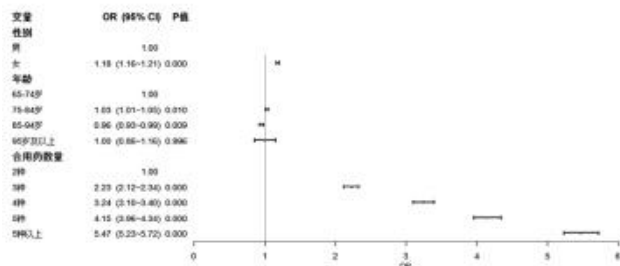


图 3 影响潜在药物相互作用的多因素二元 Logistic 回归分析

Fig 3 Multivariable binomial Logistic regression analysis of potential interactions

3 讨论

近 30 年来，我国血脂异常发病率显著增加，2012 年我国成人血脂异常总体患病率高达 40.40%^[4]。有研究发现他汀类药物的处方占比近年来也在不断增加^[7]，本研究也得到了类似的结论。本研究发现 2016—2018 年他汀类药物处方占比由 12.66% 增加到了 14.05%，之后小幅下降至 2020 年的 12.52%，2021 年又回升至 12.73%。2019 年后占比波动的部分原因可能与新型冠状病毒感染疫情后出台的长处方政策有关^[8]，客观上减少了包含他汀类药物在内的慢病处方数量。虽然处方频次有所下降，但与之相对应的是他汀类药物单次取药的总剂量在 2020 年均出现了一定程度的增加，可以推测他汀类药物整体使用量并没有明显下降。总之，他汀类药物处方的占比较高，其潜在药物相互作用的整体发生率为 1.38%，不容忽视。

目前，药物相互作用的判断与分级并没有统一的标准，常用的判断依据包括 Lexicomp、Micromedex 数据库以及临床治疗指南、药品说明书等权威文献。本研究使用的 Lexicomp 数据库，分级清晰，更新及时，在国内外已广泛使用^[9-11]。然而，本研究使用的 Lexicomp 数据库在筛查时不依赖于药物剂量信息，为了保持方法的一致性及结果的完整性，本研究记录了所有筛查结果。作为补充，本研究同时查阅了最新版他汀类药物产品说明书，参考其中针对特定合并用药时的他汀类药物日最大推荐剂量，对超出该剂量的合并用药处方进行了分析。结果显示，经 Lexicomp 数据库筛查存在潜在相互作用且有推荐最大日剂量的处方中，

39.33% 超过了该推荐量。这部分处方不仅进一步增加了出现有害药物相互作用的风险，也增加了处方的责任风险，临床实践中应予以关注。

氨氯地平 / 左旋氨氯地平是二氢吡啶类钙通道阻滞剂 (CCB)，被广泛用于老年高血压的治疗^[12]。本研究中，其与辛伐他汀的潜在相互作用出现例次最多，占全部相互作用的 76.23%。其中 37.77% 的辛伐他汀用量超过了说明书及美国心脏病协会 (AHA) 的建议：与氨氯地平合用时每日剂量不大于 20 mg^[13]。其可能的原因是本研究涉及他汀类药物中，仅辛伐他汀与二氢吡啶类 CCB 存在 D 类相互作用，且多项研究指出氨氯地平 / 左旋氨氯地平处方数量位居口服二氢吡啶类 CCB 首位，占比超过 50%^[14-17]，大量的使用增加了相互作用出现的概率。氨氯地平 / 左旋氨氯地平是细胞色素 P450 (CYP) 3A4 酶抑制剂，而辛伐他汀为 CYP3A4 底物，两者合用会使后者的暴露量增加，进而增加其发生相关不良反应的风险^[18]。

本研究筛查出的潜在药物相互作用涉及了多种机制，主要包括抑制 CYP3A4 及 CYP2C9 酶，抑制有机阴离子转运多肽 (OATP) 1B1，抑制乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 等。研究显示辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀由 CYP3A4 和 CYP2C8 代谢；匹伐他汀和氟伐他汀由 CYP2C9 代谢；瑞舒伐他汀仅约 10% 进行代谢，是 CYP 酶的弱底物，主要由 CYP2C9 参与；普伐他汀几乎不被 CYP 酶代谢^[19]。药物可以通过抑制特定 CYP 酶抑制相应他汀药物的代谢，增加其血浆浓度，进而增加其发生相关不良反应的风险。与此同时，多数他汀类药物经过 OATP1B1 转运至肝细胞内^[20]。若其活性受到抑制，则肝细胞内药物浓度将下降而外周循环中浓度将升高，进而导致肌毒性等相关不良反应风险增加^[21]。研究显示环孢素 A 与吉非贝齐可以显著抑制 OATP1B1 的活性，且环孢素 A 还可抑制 CYP3A4 活性，两者合用时需特别注意^[20]。此外，BCRP 可转运多种内外源物质进入胆汁排泄，其活性受到抑制也可导致外周循环中药物浓度升高，增加不良反应风险，已知受影响的他汀类药物包括匹伐他汀和瑞舒伐他汀^[19, 22]。

老年人常存在多病共存的情况，联合用药比例较高，而多药联合治疗会增加有害药物相互作用的风险。研究显示，美国老年人平均使用 10 种药物^[23]，欧洲 50% 的 80 岁以上老年人使用 6 种以上药物^[24]，韩国使用超过 6 种药物的老年人占比 86.4%^[25]，中国香港地区使用超过 5 种药物的老年人占比 65%^[26]。中国大陆地区老年人平均患有 6 种疾病，同时使用 3 种药物的老年人占 50%，4 ~ 6

种的占 25%^[27]。本研究中, 50% 以上老年人使用 4 种以上药物, 25% 以上老年人使用 5 种以上药物。与此同时, 既往研究发现联合用药品种越多, 有害药物相互作用发生的风险越高: 合用 5 种时发生率为 4.2%, 6~7 种为 7.4%, 11~15 种为 24.2%, 16~20 种为 40.0%, 21 种及以上为 45.0%^[27]。

本研究尚存在一定的局限性。首先, Lexicomp 数据库在不断更新, 本研究仅代表查询时间的相互作用情况; 其次, 本研究中部分非禁忌的 D 类潜在药物相互作用未能找到明确的合用推荐剂量, 其临床意义需要结合实际用量进一步研究; 最后, 因数据内容的限制, 某些可能影响潜在药物相互作用发生的因素, 如合理用药软件的使用、临床药师数量等未能纳入分析, 今后可对上述因素进行进一步研究。

4 结论

老年患者使用他汀类药物时存在发生潜在药物相互作用的风险, 临床工作者需要给予足够的重视。

参考文献

- [1] 刘葳, 于德华, 金花, 等. 社区老年多病共存患者多重用药情况评价研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23 (13): 1592-1598.
- [2] 杨明珠, 李娜. 老年人多重用药的认知管理研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (6): 1715-1717.
- [3] 陈曾丽, 蒋运兰, 卢宇彤, 等. 中国老年人血脂异常患病率的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2022, 25 (1): 115-121.
- [4] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南 (2016 年修订版)[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44 (10): 833-853.
- [5] 方志远, 李倩, 骆静, 等. 含他汀类药物门诊处方中潜在不良药物相互作用分析[J]. 药物不良反应杂志, 2018, 20 (6): 413-418.
- [6] Principles and recommendations for a vital statistics system: revision 3 [M]. New York: UN, 2013: 32-33.
- [7] Liu Y, Lv X, Xie N, et al. Time trends analysis of statin prescription prevalence, therapy initiation, dose intensity, and utilization from the hospital information system of Jinshan Hospital, Shanghai (2012—2018) [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2020, 20 (1): 201.
- [8] 王彧杰, 原永芳. 慢病患者长处方的安全性评价[J]. 中南药学, 2021, 19 (10): 2189-2193.
- [9] 郭恒, 吴汀溪, 李丹丹, 等. 高血压患者常见合并症及潜在药物相互作用筛查[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16 (12): 38-41.
- [10] Baniasadi S, Farzanegan B, Alehashem M. Important drug classes associated with potential drug-drug interactions in critically ill patients: highlights for cardiothoracic intensivists [J]. Ann Intensive Care, 2015, 5 (1): 44.
- [11] Kardas P, Urbański F, Lichwierowicz A, et al. The prevalence of selected potential drug-drug interactions of analgesic drugs and possible methods of preventing them: lessons learned from the analysis of the real-world national database of 38 million citizens of Poland [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 607852.
- [12] 中国老年医学学会高血压分会, 国家老年疾病临床医学研究中心中国老年心血管病防治联盟. 中国老年高血压管理指南 2019 [J]. 中国心血管杂志, 2019, 24 (1): 1-23.
- [13] Wiggins BS, Saseen JJ, Page RL, et al. Recommendations for management of clinically significant drug-drug interactions with statins and select agents used in patients with cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association [J]. Circulation, 2016, 134 (21): e468-e495.
- [14] 杨春霞, 陈旭光. 北京市顺义区医院 21300 张口服降压药处方分析[J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46 (4): 411-413.
- [15] 秦舟, 吴斌, 田方圆, 等. 全国 8 市 712192 例高血压患者口服钙通道阻滞剂的使用分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17 (10): 52-56.
- [16] 韩凤, 杨明娜, 陈世财. 2018 年北京市 125 家社区卫生服务中心门诊高血压患者用药分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20 (5): 593-595.
- [17] 张婉馨. 我院门诊抗高血压药的应用情况分析[J]. 海峡药学, 2018, 30 (4): 243-245.
- [18] Nishio S, Watanabe H, Kosuge K, et al. Interaction between amlodipine and simvastatin in patients with hypercholesterolemia and hypertension [J]. Hypertens Res, 2005, 28 (3): 223-227.
- [19] 王丽萍, 宋金春. 影响他汀类药物疗效的主要转运体的遗传药理学因素研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18 (3): 344-351.
- [20] 薛阳, 刘凯歌. 有机阴离子转运多肽 1B1 (OATP1B1) 基因多态性对他汀类药物影响的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 35 (4): 820-824.
- [21] 邓晟, 李元建. HMG-CoA 还原酶抑制剂与转运体 OATP1B1 [J]. 中南药学, 2008, 6 (5): 583-586.
- [22] 田蕾, 韩璐璐, 蒋娟娟, 等. 乳腺癌耐药蛋白 BCRP 基因多态性对瑞舒伐他汀人体药动学的影响[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (1): 62-66.
- [23] Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, et al. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey [J]. JAMA, 2002, 287 (3): 337-344.
- [24] Fialová D, Topinková E, Gambassi G, et al. Potentially inappropriate medication use among elderly home care patients in Europe [J]. JAMA, 2005, 293 (11): 1348-1358.
- [25] Kim HA, Shin JY, Kim MH, et al. Prevalence and predictors of polypharmacy among Korean elderly [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e98043.
- [26] Lam DP, Mak CF, Chan SM, et al. Polypharmacy and inappropriate prescribing in elderly Hong Kong Chinese patients [J]. J Am Geriatr Soc, 2010, 58 (1): 203-205.
- [27] 殷立新, 张立辉. 特殊人群用药指导丛书: 老年人用药指导 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.

(收稿日期: 2022-09-02; 修回日期: 2022-11-10)

4899 例住院患者注射用洛铂相关血小板减少 临床特征及影响因素分析

张博^{1,2}, 郭代红^{1*}, 高奥¹, 郭海丽^{1,2}, 伏安^{1,2}, 李伯妍^{1,2}, 王嘉熙^{1,3} (1. 解放军总医院医疗保障中心药剂科, 北京 100853; 2. 解放军医学院, 北京 100853; 3. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

摘要: **目的** 探讨住院人群中注射用洛铂相关血小板减少的临床特征及影响因素, 为临床安全合理用药提供参考。**方法** 基于“医疗机构药物不良事件主动监测与智能评估警示系统 (adverse drug event active surveillance and assessment system, ADE-ASAS)” 回顾性监测 2012 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31 日期间本院使用注射用洛铂 (10 mg) 的住院病例, 分析其相关血小板减少的发生特征, 采用倾向性评分匹配 (propensity score matching, PSM) 的方法选取对照组以探究相关影响因素。**结果** 4899 例使用注射用洛铂的住院患者中, 360 例发生血小板减少, 发生率为 7.35%; Logistic 回归模型分析结果显示注射用洛铂相关血小板减少的影响因素主要包括既往洛铂用药史 ($OR: 2.967; 95\%CI: 1.676 \sim 5.250$)、合并使用吡柔比星 ($OR: 3.634; 95\%CI: 1.355 \sim 9.750$) 以及血小板基值 ($OR: 0.955; 95\%CI: 0.947 \sim 0.962$)。**结论** ADE-ASAS 可精准高效地获取大样本目标用药人群的真实世界数据; 注射用洛铂相关血小板减少属于常见的不良反应; 临床使用注射用洛铂应关注既往使用过该药的患者, 谨慎联用抗肿瘤、抗菌特别是蒽环类药物 (如吡柔比星), 加强血小板计数监测。

关键词: 注射用洛铂; 血小板减少; 影响因素; 自动监测; 药物警戒

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1383-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.043

Clinical characteristics and influence factors of thrombocytopenia associated with lobaplatin for injection in 4899 inpatients

ZHANG Bo^{1,2}, GUO Dai-hong^{1*}, GAO Ao¹, GUO Hai-li^{1,2}, FU An^{1,2}, LI Bo-yan^{1,2}, WANG Jia-xi^{1,3} (1. Department of Pharmacy, Medical Supplies Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853; 2. Medical School of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853; 3. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract: Objective To determine the clinical characteristics and influence factors of thrombocytopenia associated with lobaplatin for injection in hospitalized population, and to provide reference for clinical safe and rational drug use. **Methods** Based on the adverse drug event active surveillance and assessment system (ADE-ASAS), inpatients receiving lobaplatin for injection (10 mg) in our hospital from January 1st, 2012 to December 31st, 2019 were retrospectively analyzed the occurrence and characteristics of thrombocytopenia. Propensity score matching (PSM) method was used to select the control group to determine the relevant influence factors. **Results** Among the 4899 inpatients receiving lobaplatin for injection, 360 (7.35%) had thrombocytopenia. Logistic regression model analysis showed that the influencing factors of thrombocytopenia associated with lobaplatin for injection mainly included previous lobaplatin administration history ($OR: 2.967; 95\% CI: 1.676 \sim 5.250$), combined use of pirubicin ($OR: 3.634; 95\% CI: 1.355 \sim 9.750$) and platelet base

基金项目: 2017 年军事医学创新工程重点项目 (No.17CXZ010); 中国研究型医院学会临床重点药品的使用监测和评价研究专项 (No. Y2021FH-YWJP01)。

作者简介: 张博, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: 18612690370@126.com * 通信作者: 郭代红, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学与药物警戒方面的研究, email: guodh301@163.com

value ($OR: 0.955; 95\% CI: 0.947 \sim 0.962$). **Conclusion** ADE-ASAS can accurately and efficiently collect the real world data of large sample target drug users. Thrombocytopenia associated with lobaplatin for injection is a common adverse drug reaction. Attention should be paid to patients with clinical use of lobaplatin for injection in the past, the combination of antitumor antibiotics, especially anthracycline drugs such as pirubicin, and platelet count monitoring.

Key words: lobaplatin for injection; thrombocytopenia; influence factor; automatic monitoring; pharmacovigilance

洛铂 (lobaplatin) 是具有自主知识产权的国家一类抗肿瘤药物, 于 2005 年率先在我国上市, 主要用于治疗乳腺癌、小细胞肺癌及慢性粒细胞性白血病; 因具有较高的肝癌细胞敏感性, 国内也推荐洛铂用于经导管动脉化疗栓塞术 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE)^[1]。血液毒性是洛铂最主要的剂量相关性毒性, 以血小板减少最为强烈。这与本团队前期基于药品不良反应 (adverse drug reaction, ADR) 自发报告数据挖掘得到洛铂在血管/出血及凝血疾病 (血小板减少) 具有较强风险信号的结果高度一致^[2]。目前, 国内外洛铂相关血小板减少研究多针对具体疾病或治疗方案开展, 鲜有相关大样本真实世界研究 (real world study, RWS) 结果。

鉴于此, 本课题组借助团队自主研发的“医疗机构药物不良事件主动监测与智能评估警示系统 (adverse drug event active surveillance and assessment system, ADE-ASAS)”^[3-5] 开展了相关研究。该系统对接医院信息系统 (hospital information system, HIS), 自 2012 年使用以来, 经过多年持续完善、拓展、实践, 目前已完成涉及百万例次用药人群的自动监测研究。本研究提取 2012 年至 2019 年期间住院患者使用注射用洛铂的真实世界数据 (real world data, RWD), 计算洛铂相关血小板减少的发生率并探究其临床特征及影响因素, 以期为临床用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

利用 ADE-ASAS 对本院某医学中心使用注射用洛铂 (10 mg) 的住院患者进行回顾监测研究。考虑到 2019 年末开始流行的新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19)^[6] 的影响, 结合本院 HIS 中病例数据的实际情况, 监测时间选取为 2012 年 1 月 1 日至 2019 年 12 月 31 日。

1.2 研究方法

纳入目标时间内使用注射用洛铂 (10 mg) 且年龄在 18 岁及以上的住院患者, 排除相关指标缺

失及罹患血液疾病者, 得到目标人群 4899 例, 用药 10 756 例次。参照美国卫生与公众服务部 (U.S. department of health and human services, HHS) 2017 年 11 月发布的《不良事件通用术语标准》(common terminology criteria for adverse events, CTCAE) 5.0 版^[7] 相关内容, 将血小板计数 $< 100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 定义为血小板减少, 得到报警病例 555 例次, 以 $75 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 、 $50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 、 $25 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 为节点将血小板减少程度由轻至重分为 1~4 级。根据《药品不良反应术语使用指南》中的关联性评价标准, 分别由两名临床药师对报警病例进行独立人工甄别, 结果不一致者提请相关领域专家评审以确定阳性病例。最终得到评价结果为“肯定”“很可能”“可能”的病例 360 例, 并将其纳入病例组。其余 4539 例用于对照组病例的选取。

结合文献调研及本院 HIS 数据实际, 收集的变量主要有患者年龄、性别、民族、吸烟史、饮酒史、体质量指数 (body mass index, BMI)、入院次数、住院天数、科室、肿瘤类型、肿瘤转移情况、输血史、既往洛铂用药史、洛铂给药剂量、既往病史 (病毒性肝炎、高血压、心脏病、糖尿病)、部分风险合并用药 (吉西他滨、氟尿嘧啶、丝裂霉素、吡柔比星、表柔比星、羟喜树碱、亚叶酸钙等)、部分实验室检查 (血小板、血红蛋白) 结果以及病例组 ADR 发生时间等。其中, 罹患肿瘤类型参考美国国家综合癌症网络 (national comprehensive cancer network, NCCN) 发布的相关肿瘤临床实践指南; 以用药前 7 d 至用药后 2 h 内最近一次实验室检查结果为基值。

1.3 统计学处理

采用倾向性评分法 (propensity score matching, PSM) 平衡患者性别、年龄等因素, 1:1 匹配选取对照组, 匹配容差为 0.1。病例组及对照组基线信息录入使用 Microsoft Excel 2019, PSM 匹配及数据统计分析采用 SPSS Statistics 26.0 和 R 软件。符合或近似符合正态分布的计量变量用均数 \pm 标准差表示, 组间差异性统计分析采用 t 检验; 偏态分布的计量变量用中位数和四分位数范围表示, 组间

差异性统计分析采用 Mann-Whitney U 检验。计数变量用率或构成比表示, 组间差异性统计分析采用卡方检验。相关影响因素分析采用单因素和多因素 Logistic 回归模型, 将单因素 Logistic 回归模型分析结果中 $P < 0.1$ 的变量纳入多因素 Logistic 回归模型, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用药人群概况

使用注射用洛铂的住院患者共计 4899 例, 用药 10 756 例次。其中, 男性 3060 例 (62.46%), 女性 1839 例 (37.54%); 患者年龄为 (57±10.96) 岁, 63.11% (3092 例) 集中在 45 ~ 64 岁; 具体分布见表 1。患者 BMI 为 (24.08±9.09) kg·m⁻², 发生肿瘤转移者 1570 例 (32.05%), 单次洛铂给药中位剂量为 40 (20 ~ 50) mg。

表 1 4899 例注射用洛铂用药患者性别、年龄分布

Tab 1 Gender and age distribution of 4899 inpatients receiving lobaplatin injection

年龄 / 岁	男性		女性		总计	
	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %
18 ~ 44	283	9.25	343	18.65	626	12.78
45 ~ 64	1951	63.76	1141	62.05	3092	63.11
≥ 65	826	26.99	355	19.30	1181	24.11

2.2 病例组与对照组基线特征

科室分布方面, 注射用洛铂相关血小板减少病例组患者主要集中在介入放射科 (310 例, 86.11%), 对照组患者在放射治疗科 (123 例, 34.17%)、介入放射科 (108 例, 30.00%) 等均有分布; 其余涉及科室有肿瘤科、介入超声科、妇产科、普通外科、耳鼻咽喉科、消化科、骨科、肝胆外科等。肿瘤类型方面, 两组患者均罹患消化系统肿瘤最多, 病例组 329 例 (91.39%), 其中肝癌 301 例; 对照组 209 例 (58.06%)。其余涉及肿瘤类型有呼吸系统肿瘤、妇科肿瘤、头颈部肿瘤、乳腺癌、体表肿瘤、骨与软组织肉瘤、泌尿生殖系统肿瘤等, 具体见表 2。

病例组中, 351 例 (97.50%) ADR 发生于给药 7 d 内, 其中以给药第 4 日为最多 (215 例, 59.72%)。ADR 发生程度方面, 血小板减少 1 级 283 例 (78.61%)、2 级 74 例 (20.56%)、3 级 2 例 (0.56%)、4 级 1 例 (0.27%)。

本研究采用 PSM 平衡患者年龄、性别等因素, 得到病例组与对照组在这两个因素上差异均无统计学意义; 而两组患者在入院次数、住院天数、肿瘤转移、既往洛铂用药史、单次洛铂给药剂量 ≥ 40 mg、既往病毒性肝炎病史、既往糖尿

表 2 注射用洛铂相关血小板减少病例组与对照组主要肿瘤类型分布

Tab 2 Distribution of major tumor types in the case group and the control group of thrombocytopenia associated with lobaplatin injection

肿瘤类型	病例组 (n = 360)		对照组 (n = 360)		总计	
	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %	例数	构成比 / %
消化系统肿瘤	329	91.39	209	58.06	538	74.72
呼吸系统肿瘤	12	3.33	67	18.61	79	10.97
妇科肿瘤	8	2.22	37	10.28	45	6.25
头颈部肿瘤	4	1.11	40	11.11	44	6.11

病史、合并用药、血小板基值、血红蛋白基值等方面差异有统计学意义, 具体见表 3。

2.3 注射用洛铂相关血小板减少影响因素概况

本研究采用 Logistic 回归模型分析注射用洛铂相关血小板减少的影响因素, 其中, 单因素 Logistic 回归模型分析结果显示, 相关影响因素包括肿瘤转移、既往洛铂用药史、单次洛铂给药剂量 ≥ 40 mg、既往病毒性肝炎病史、既往糖尿病史、合并用药、血小板基值和贫血, 具体见表 4; 将上述因素全部纳入多因素 Logistic 回归模型, 最终得到的影响因素有既往洛铂用药史、合并吡柔比星、血小板基值, 具体见表 5。

3 讨论

3.1 注射用洛铂相关血小板减少临床特征分析

本研究结果显示, 在 4899 例患者中, 360 例血小板减少与注射用洛铂的使用存在关联性, 发生率为 7.35%, 属常见的 ADR。这一数据低于其说明书记载的 26.90% (实体瘤患者, 3 级以上) 和 75.00% (大剂量化疗后的卵巢癌患者, 未分级), 也低于国内相关专家共识^[8]中报道的发生率 (70.00%)。参照 CTCAE 5.0 作血小板减少程度分组, 得到 1 ~ 4 级的发生率分别为 5.78%、1.51%、0.04%、0.02%。一项使用洛铂治疗原发性肝癌的 TACE 后血小板减少症的回顾性研究结果显示, 轻度 (对应 1 级)、中度 (对应 2 级)、重度 (对应 3 ~ 4 级) 的血小板减少发生率分别为 16.50%、10.47% 和 4.88%^[9], 与本研究结果存在差异, 可能是由于纳入的研究对象不同, 本研究纳入了所有注射用洛铂的用药患者而非仅肝癌患者。鉴于本研究中病例组肝癌患者的占比高达 83.61%, 同时考虑到洛铂在 TACE 中的应用^[1], 后续可进一步针对性地开展肝癌人群使用洛铂相关血小板减少的研究。在 ADR 发生时间方面, 说明书报道血小板计数降低常在用药后 2 周开始, 但本研究 351 例 (97.50%) ADR 却发生于给药 1 周内, 其中以第 4 日为最多 (215 例, 59.72%)。

表 3 注射用洛铂相关血小板减少病例组与对照组基线特征

Tab 3 Baseline characteristics of thrombocytopenia associated with lobaplatin injection case group and control group

变量	病例组 (n = 360)	对照组 (n = 360)	P	变量	病例组 (n = 360)	对照组 (n = 360)	P
人口学数据				既往病史/[n(%)]			
年龄/岁	58.20±10.50	58.13±10.49	0.929	病毒性肝炎	258 (71.67)	96 (26.67)	< 0.001
男性/[n(%)]	299 (83.06)	296 (82.22)	0.768	高血压	102 (28.33)	90 (25.00)	0.301
汉族/[n(%)]	345 (95.83)	345 (95.83)	1.000	心脏病	21 (5.83)	27 (7.50)	0.370
吸烟史/[n(%)]	199 (55.28)	217 (60.28)	0.174	糖尿病	67 (18.61)	43 (11.94)	0.013
饮酒史/[n(%)]	182 (50.56)	197 (54.72)	0.263	合并用药/[n(%)]			
BMI/(kg·m ⁻²)	23.88±3.28	23.97±3.40	0.713	吉西他滨	26 (7.22)	11 (3.06)	0.011
入院次数/次	3 (2, 6)	2 (1, 3)	< 0.001	氟尿嘧啶	231 (64.17)	104 (28.89)	< 0.001
住院天数/d	9 (7, 11)	8 (5, 11)	< 0.001	丝裂霉素	53 (14.72)	28 (7.78)	0.003
肿瘤转移/[n(%)]	121 (33.61)	162 (45.00)	0.002	吡柔比星	130 (36.11)	40 (11.11)	< 0.001
输血史/[n(%)]	36 (10.00)	35 (9.72)	0.901	表柔比星	177 (49.17)	70 (19.44)	< 0.001
洛铂用药数据/[n(%)]				羟喜树碱	131 (36.39)	53 (14.72)	< 0.001
既往洛铂用药史	222 (61.67)	55 (15.28)	< 0.001	亚叶酸钙	208 (57.78)	83 (23.06)	< 0.001
单次洛铂给药剂量≥ 40 mg	49 (13.61)	231 (64.17)	< 0.001	实验室检查基值			
				血小板/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	125.34±23.75	209.01±54.25	< 0.001
				血红蛋白/(g·L ⁻¹)	131.33±19.90	127.12±19.77	0.005

表 4 注射用洛铂相关血小板减少单因素 Logistic 回归模型分析结果

Tab 4 Single-way Logistic regression model for thrombocytopenia associated with lobaplatin injection

变量	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
吸烟史	- 0.205	0.151	1.843	0.175	0.815	0.606 ~ 1.095
饮酒史	- 0.167	0.149	1.253	0.263	0.846	0.631 ~ 1.134
BMI	- 0.008	0.022	0.136	0.712	0.992	0.949 ~ 1.036
肿瘤转移	- 0.480	0.154	9.733	0.002	0.619	0.458 ~ 0.837
输血史	0.031	0.250	0.016	0.901	1.032	0.632 ~ 1.684
既往洛铂用药史	2.188	0.182	144.201	< 0.001	8.921	6.241 ~ 12.751
单次洛铂给药剂量≥ 40 mg	- 2.431	0.189	165.461	< 0.001	0.088	0.061 ~ 0.127
既往病毒性肝炎病史	1.940	0.167	134.914	< 0.001	6.956	5.014 ~ 9.649
既往高血压病史	0.175	0.169	1.068	0.301	1.191	0.855 ~ 1.658
既往心脏病史	- 0.269	0.301	0.800	0.371	0.764	0.424 ~ 1.378
既往糖尿病史	0.522	0.212	6.094	0.014	1.686	1.114 ~ 2.552
合并吉西他滨	0.904	0.368	6.045	0.014	2.470	1.201 ~ 5.078
合并氟尿嘧啶	1.483	0.160	85.946	< 0.001	4.408	3.221 ~ 6.032
合并丝裂霉素	0.716	0.247	8.434	0.004	2.047	1.262 ~ 3.320
合并吡柔比星	1.509	0.200	56.685	< 0.001	4.522	3.053 ~ 6.697
合并表柔比星	1.388	0.170	66.787	< 0.001	4.007	2.872 ~ 5.590
合并羟喜树碱	1.198	0.185	42.059	< 0.001	3.314	2.307 ~ 4.759
合并亚叶酸钙	1.519	0.164	85.297	< 0.001	4.567	3.309 ~ 6.304
血小板基值	- 0.052	0.004	188.634	< 0.001	0.950	0.943 ~ 0.957
贫血	- 0.475	0.151	9.887	0.002	0.622	0.462 ~ 0.836

表 5 注射用洛铂相关血小板减少多因素 Logistic 回归模型分析结果

Tab 5 Multivariate Logistic regression model for thrombocytopenia associated with lobaplatin injection

变量	β	SE	Wald	P	OR	95%CI
既往洛铂用药史	1.087	0.291	13.937	< 0.001	2.967	1.676 ~ 5.250
合并吡柔比星	1.290	0.504	6.568	0.010	3.634	1.355 ~ 9.750
血小板基值	- 0.046	0.004	133.227	< 0.001	0.955	0.947 ~ 0.962

一方面，本院对于洛铂用药患者的血小板监测较为密切，能够较早地发现目标 ADR；另一方面，病例组患者住院中位时间为 9 (7, 11) d，低于说明书中 2 周的血小板减少潜伏期，以致患者

出院后血小板计数的变化难以被监测，这或许也是本研究得到的 ADR 发生率较既往报道偏低的原因之一。此外，本研究中病例组血小板基值为 (125.34±23.75) × 10⁹ · L⁻¹，用药后易降至

$100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 以下而引发 ADE-ASAS 报警。多因素 Logistic 模型分析结果也提示较低的血小板基值与 ADR 发生增多存在关联关系 ($OR: 0.955$; $95\%CI: 0.947 \sim 0.962$), 与既往同类研究^[10-11]报道基本一致。

3.2 注射用洛铂相关血小板减少风险因素分析

多因素 Logistic 回归模型分析结果显示, 既往洛铂用药史为血小板减少的风险因素 ($OR: 2.967$; $95\%CI: 1.676 \sim 5.250$)。鉴于其说明书记载用药 2 周后才发生 ADR, 因而考虑病例组部分患者血小板减少可能是上一次使用注射用洛铂的结果, 这也在一定程度上造成了病例组血小板基值普遍偏低的情况。而患者前一次用药并非都在本院, 具体情况较难判定, 可能对相关结果产生一定偏倚影响, 这也是本研究的局限性之一。因此, 临床可对使用过注射用洛铂患者的血小板计数作持续监测, 若发现其有降低趋势, 再次用药需谨慎, 以规避 ADR 的发生。这也提示开展血小板计数变化趋势研究^[12]具有重要意义, 后续将在此方向作深入探讨, 或可得到更具参考价值的结果。本研究得到的另一风险因素为合并使用吡柔比星 ($OR: 3.634$; $95\%CI: 1.355 \sim 9.750$)。作为蒽环类抗肿瘤抗菌药物的一种, 吡柔比星的骨髓抑制 ADR 较为常见^[13]。另有研究表明, 与吡柔比星同属抗肿瘤抗菌药物的丝裂霉素是药物诱导的血栓性微血管病 (drug-induced thrombotic microangiopathy, DITMA) 的可能诱因, 而血小板减少正是 DITMA 的典型临床表现^[14]。因此, 临床使用注射用洛铂时应警惕联用抗肿瘤、抗菌药物特别是蒽环类药物的潜在风险, 密切关注患者血小板计数变化, 必要时可输注血小板或预防性应用促血小板生长因子^[15], 以纠正血小板减少。

综上, 本研究基于 ADE-ASAS 血小板模块, 开展了注射用洛铂相关血小板减少的大样本用药人群真实世界研究, 高效经济地获取了注射用洛铂相关血小板减少的发生率并分析得到了相关影响因素。研究结果提示临床使用注射用洛铂应重点关注既往有洛铂用药史的患者, 加强血小板计数监测; 同时应避免抗肿瘤、抗菌药物特别是蒽环类药物如吡柔比星的联用, 从而降低血小板减少的发生风险。

参考文献

- [1] 单鸿, 庞鹏飞. 注射用洛铂在原发性肝癌 TACE 治疗中的专家共识 (2016 版) [J]. 中华介入放射学电子杂志, 2016, 4 (1): 1-3.
- [2] 张博, 郭代红, 刘思源, 等. 1374 例铂类抗肿瘤药相关严重药品不良反应报告分析及风险信号挖掘 [J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30 (2): 105-110.
- [3] 陈超, 郭代红, 薛万国, 等. 住院患者药品不良事件主动监测与评估警示系统的研发 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10 (7): 411-414, 418.
- [4] 王啸宇, 郭代红, 徐元杰. 基于文本分类技术的住院患者药源性变态反应自动监测模块研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2016, 13 (2): 117-120.
- [5] 郭代红, 于承喧. 基于医院信息系统数据的临床用药风险自动监测评价专家共识 [J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18 (5): 277-287.
- [6] 中国疾病预防控制中心新型冠状病毒肺炎应急响应机制流行病学组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41 (2): 145-151.
- [7] Freites-Martinez A, Santana N, Arias-Santiago S, et al. Using the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE-Version 5.0) to evaluate the severity of adverse events of anticancer therapies [J]. Actas Dermosifiliogr (Engl Ed), 2021, 112 (1): 90-92.
- [8] 广东省药学会. 铂类药物临床应用与不良反应管理专家共识 [J]. 今日药学, 2019, 29 (9): 577-585.
- [9] Lv Y, Xu A, Wang N, et al. Retrospective study of TACE in the treatment of lobaplatin-induced thrombocytopenia in primary hepatocellular carcinoma [J]. J BUON, 2019, 24 (6): 2385-2393.
- [10] 常莹莹, 朱斌. 胃肠癌患者 XELOX 化疗方案致血小板减少症风险预测评分系统的建立 [J]. 中国临床药学杂志, 2019, 28 (6): 414-418.
- [11] 李伯妍, 郭代红, 朱雨, 等. 4864 例应用贝伐珠单抗住院患者致血小板减少自动监测及相关影响因素分析 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19 (12): 1362-1367.
- [12] 郭代红, 胡鹏洲, 朱曼, 等. 5336 例利奈唑胺用药人群相关血小板减少的自动监测与评价研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2018, 15 (4): 197-200, 210.
- [13] 石远凯, 巴一, 冯继锋, 等. 中国蒽环类药物特性专家共识 [J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45 (3): 110-112.
- [14] Al-Nouri Z, Reese J, Terrell D, et al. Drug-induced thrombotic microangiopathy: a systematic review of published reports [J]. Blood, 2015, 125 (4): 616-618.
- [15] 中国临床肿瘤学会. 肿瘤化疗所致血小板减少症共识专家委员会. 肿瘤化疗所致血小板减少症诊疗中国专家共识 (2018 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40 (9): 714-720.

(收稿日期: 2022-09-24; 修回日期: 2022-10-26)

药事管理

集中带量采购政策下的药品临床综合评价研究进展

董艳珍^{1, 2}, 宋沧桑^{1, 2*}, 李兴德¹, 刘璐¹ (1. 昆明市第一人民医院药学部, 昆明 650000; 2. 大理大学药学院, 云南 大理 671000)

摘要: 药品临床综合评价是促进药品回归临床价值的重要技术工具, 在集中带量采购工作常态化制度化开展背景下, 积极组织开展集采药品临床综合评价工作至关重要。本文通过梳理我国药品临床综合评价指南共识, 回顾集采药品临床综合评价文献, 探索集采药品临床综合评价体系, 以期为集采药品临床合理应用提供参考。

关键词: 集采药品; 临床综合评价; 指南共识; 文献回顾

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1388-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.044

Research progress in clinical comprehensive evaluation of drugs under centralized drug volume-based procurement policy

DONG Yan-zhen^{1, 2}, SONG Cang-sang^{1, 2*}, LI Xing-de¹, LIU Lu¹ (1. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650000; 2. College of Pharmacy, Dali University, Dali Yunnan 671000)

Abstract: Comprehensive clinical evaluation of drugs is important in emphasizing the clinical value of drugs. Under the background of normalization and institutionalization of centralized drug volume-based procurement, it is crucial to actively organize and comprehensively evaluate centralized purchase of drugs. This paper reviewed the guidelines and consensus for clinical comprehensive evaluation of drugs in China, and literatures on clinical comprehensive evaluation of centralized drugs purchase, exploring the clinical comprehensive evaluation system for centralized drugs purchase, and to provide reference for centralized purchase of drugs.

Key words: centralized drug purchase; clinical comprehensive evaluation; guideline and consensus; literature review

国家集中带量采购(以下简称集采)政策通过以量换价, 药价明显降低, 减轻了患者的药费负担。然而, 大幅度降价, 使有些医师和患者主观上对集采药品的临床疗效和安全性存在质疑^[1-2]。药品临床综合评价是药品供应保障决策的重要技术工具, 在药品集中带量采购工作常态化制度化开展的背景下, 积极组织开展集采药品临床综合评价工作至关重要^[3]。因此综合评价集采药品在真实世界中的临床使用证据, 明确集采药品在临床疾病诊治中

的应用效果, 从而打消临床及患者对集采药品的疑虑, 提高对集采药品的认同度和接受度, 是保障科学、合理、安全用药的重要支撑。

基于此, 本研究拟梳理我国药品临床综合评价指南共识, 同时回顾集采药品临床综合评价文献, 探索集采药品临床综合评价体系, 以期为集采药品的合理应用提供参考。

1 药品临床综合评价指南共识

近年药品临床综合评价快速发展, 国家多

基金项目: 云南省卫生健康委员会医学领军人才培养计划项目 (No. L-2018012); 昆明市卫生科技人才培养项目 [No. 2018-SW (省)-05]。

作者简介: 董艳珍, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 583644485@qq.com *通信作者: 宋沧桑, 女, 主任药师, 教授, 主要从事临床药学和药物基因组学研究, email: songcs163@163.com

个政策性文件陆续发布^[4-5]，均明确要做好药品临床综合评价工作。同时多个指南和共识发布^[3, 5-22]，详细介绍了评价设计、评价方法、评价维度、评价流程、质量控制等内容，为评价工作提供全面、系统、权威的技术规范和流程引导，减少评价实施者的设计和实施负担，节约评价过程中的成本和时间，对获得高质量临床综合

评价结果具有重要的支撑作用，详见表 1。这些指南共识发布集中在 2021—2022 年，说明药品临床综合评价在药品合理应用中的重要性愈加凸显。指南共识中既包含指导药品快速评价与遴选的量化评分细则，也有基于完整证据的综合评价流程，供评价者临床实际决策选择。

表 1 我国药品临床综合评价指南共识

Tab 1 Guidelines and consensus for clinical comprehensive evaluation of drugs in China

文件名称	发布机构	时间
《中国药品综合评价指南参考大纲（第二版）》 ^[6]	中国药学会医院药专业委员会等	2015 年
《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南（2020 年）》 ^[7]	首都医科大学附属北京天坛医院等	2020 年
《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》 ^[5]	国家卫生健康委	2021 年
心血管病药品临床综合评价技术指南（2022 版） ^[8]		2022 年
儿童药品临床综合评价技术指南（2022 版） ^[8]		
抗肿瘤药物临床综合评价技术指南（2022 版） ^[8]		
中国医疗机构药品临床综合评价质量控制体系共识 ^[9]	南昌大学第一附属医院等	2022 年
中成药临床综合评价指南（2022 年版试行） ^[10]	中华中医药学会等	2022 年
中成药临床综合评价技术规范 ^[11]	中国中医科学院中医临床基础医学研究所等	2021 年
中成药临床综合评价报告规范 ^[12]		
多准则决策分析应用于罕见病药品临床综合评价的专家共识（2022 年） ^[13]	北京协和医院罕见病多学科协作组联合中国罕见病联盟等	2022 年
江苏省药品临床综合评价项目质量控制指南 ^[14]	苏州大学第一附属医院等	2022 年
集中带量采购政策下山东省调脂药物临床综合评价药学专家共识 ^[3]	山东省医院协会药物经济学专业委员会等	2022 年
心血管慢病药品临床综合评价杭州专家共识 ^[15]	浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院（杭州市药事管理质控中心）等	2022 年
广东省 SGLT-2 抑制剂临床快速综合评价专家共识 ^[16]	广东省药学会等	2022 年
广东省血管紧张素 II 受体拮抗剂（ARB）临床快速综合评价专家共识 ^[17]		
广东省选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂临床快速综合评价专家共识 ^[18]		
广东省胰高糖素样肽 1 受体激动剂（GLP-1RA）临床快速综合评价专家共识 ^[19]		
广东省二氢吡啶类钙通道阻滞剂药品评价与遴选专家共识 ^[20]		
广东省 DPP-4 抑制剂评价与遴选专家共识 ^[21]		
广东省他汀类药物评价与遴选专家共识 ^[22]		

2 集中带量采购政策下的药品临床综合评价

2.1 药品集中带量采购政策

药品集中带量采购政策是对既往药品集中采购制度的重大改革，目的是让人们以比较低廉的价格用上质量更高的药品，通过带量采购，以量换价，为群众就医减负。目前第 7 批集采已落地执行，涉及 31 个治疗类别，包括高血压、糖尿病、抗感染等常见病、慢性病用药，以及肺癌、肝癌等重大疾病用药，拟中选药品平均降价 48%。例如，通过集采，糖尿病患者常用药阿卡波糖片（拜唐苹）每盒价格从 61.29 元下降至 5.42 元，降幅 91%；治疗肝癌的一线靶向药物仑伐替尼胶囊，集采后每粒平均价格从 108 元下降到 18 元，一个治疗周期可节约费用 8100 元，使需要

治疗的患者得到充分的用药保障^[23]。

然而，随着集采制度化、常态化实施，质量和价格问题凸显。集采降低药品虚高价格后，人们对中选药品的质量非常关注，并产生一些质疑：在低廉的价格压力下集采药品质量是否会打折扣？通过一致性评价的集采仿制药与原研药是否具有临床等效性？临床疗效与安全性如何？其次，中选药品大多是仿制药，原研药种类较少，受带量采购的影响，中选药品价格的降低会带动非中选药品降价，使药品价格整体普遍下降，很多患者有“仿制药不如原研药”的认识，在这种情况下更倾向于使用原研药和进口药，而对中选药品接受度不高，但医院需要完成中选药品的带量任务，会减少对原研药的采购，导致患者需求难以充分

满足。此外,医师在患者对集采药品的选择上起重要作用,非集采品种在医院长时间使用,医师对其安全性和有效性较为了解,形成固定用药习惯,对集采药品的有效性、安全性持谨慎态度,导致使用集采药品的积极性欠佳。吴雅兰等^[1]调查门诊患者对国家集采药品政策的认知情况、使用意向及患者拒绝低价中标国家集采药品的原因,结果显示 111 例患者(111/297)拒绝低价集采药品,最主要原因是认为价格太低,药品质量难以保证。患者认知存在偏差,以及认可程度不高,阻碍集采政策的常态化、制度化推进。另一项调研也发现患者对药品治疗效果的敏感度远高于价格敏感度^[24]。可见医师和患者较关注集采药品在降低价格的同时是否能保证药品质量及疗效,是否做到真正意义上的质量优先。

针对公众关注的集采中选药品质量问题,国家药监局多措并举,加强质量监管,确保中选药品降价不降质。由于仿制药具有一定的价格优势,集采药品多以仿制药为主,国家同时加强了仿制药一致性评价的评审。药品一致性评价包括药学等效性和生物学等效性评价,但通过一致性评价,也只能说明它与原研药具有生物等效性,并不等于临床等效性。因仿制药上市前缺乏 I、II、III 期大量临床数据积累,安全性可能无法达到原研药的高度。因此有必要开展药品临床综合评价,观察集采药品临床疗效和安全性,以真实世界数据推动集采药品的遴选和合理使用,为国家政策和临床决策提供理论依据和数据支撑。

2.2 集采药品临床综合评价

2.2.1 医疗机构集采药品管理专家共识

2022 年 6 月山东省发布《集中带量采购政策下山东省调脂药物临床综合评价药学专家共识》^[3],采用百分制量化评估法,首次针对涉及集采的调脂药物开展快速临床综合评价,根据分值形成不同推荐级别,有助于医疗机构在集中带量采购背景下合理配备和使用调脂药物。《医疗机构国家组织集中采购药品管理中国专家共识》^[25]、《医疗机构抗菌药物集中带量采购管理专家共识》^[26],以及山东省、辽宁省、北京市等医疗机构落实药品集中采购政策专家共识相继发布^[27-29],其中均提及鼓励医疗机构在集采药品的管理中开展临床综合评价,探索并完善集采中选药品临床评价体系,从临床实际用药需求出发,充分利用各级医疗卫生机构的真实世界数据,综合评估集中带量采购药品的安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性、可及性

等多维证据。以评价结果作为指导药品集采的重要依据,可以促进集采药品的合理使用,为全国集采政策实施提供科学的循证医学数据支持,切实有效地推动药品集中带量采购落地工作。

2.2.2 国家指导下的大型集采药品真实世界研究

在国家医保局指导下,北京市 20 家大型三甲医院围绕第一批集采的 14 个中选药品,开展时间跨度长达 2 年、用药患者样本量超过 11 万例的临床疗效及安全性的真实世界研究^[30]。涉及心脑血管(抗血小板、降压、降脂)、神经精神(抑郁症、精神分裂症、癫痫)、慢性乙型病毒性肝炎(恩替卡韦)、肿瘤和麻醉剂 5 大类药品。每个药品的研究都纳入了成百上千个真实世界的临床样本,并根据临床指南及医院信息系统的大数据,选择具有针对性的评价指标,来对原研药和集采仿制药进行对比研究:有效性指标如血压、血脂、病毒血清转换率、临床缓解率等,安全性指标如肝功能、肾功能、血液毒性等。同时在统计分析时,采取相应措施控制样本组之间的偏倚,如倾向性评分匹配等,使组间具有可比性,提高了研究结果的可信度。研究结果于 2021 年陆续发布^[31-39],评价显示,在临床真实诊疗环境中,14 个集采中选仿制药与原研药在临床疗效和使用上等效,不良反应差异无统计学意义,部分药品安全性优于原研药;患者使用仿制药后用药依从性也很高,提出换为原研药的情况很少;因疗效达不到预期效果、需更换为其他药物的发生概率和原研药基本持平。

2.2.3 其他学者的研究

黄炎清等^[40]对 260 例长期服用国产恩替卡韦治疗产生完全病毒学应答的慢性乙型病毒性肝炎患者随访以评估集采药物疗效与安全性。156 例患者换用集采恩替卡韦治疗,24 周及 48 周时分析病毒学应答指标变化情况,数据显示集采恩替卡韦的疗效和安全性与国产恩替卡韦相当,随访观察期内所有患者均未出现药物相关不良反应及检测结果异常。特别值得关注的是,随着集采工作在全国展开,越来越多抗菌药物纳入集采范畴。集采中抗菌药物是国内消耗量最大的药物,且具有特殊性,治疗基础是对细菌的抗菌活性强弱,临床使用不等效的仿制抗菌药物不仅可能导致治疗失败,更可能导致细菌耐药的发生^[41]。多个学者对集采抗菌药物疗效和安全性展开了评价,张旭东等^[42]结果证实集中采购莫西沙星注射液在价格大幅度降低的同时,治疗肺部感染的有效率也基本能达到非集中采购和

进口药物标准,且未发现较严重的不良反应,为低收入患者提供了更多的选择,这与庞婕等^[43]的研究是一致的。许惠溢等^[44]经药物经济学研究发现集采中选用的头孢呋辛对比原研产品具有更高的成本-效果优势。鲁虹等^[45]发现在相同人群和相同给药方案时,注射用美罗培南省集采和进口品种的血浆浓度差异无统计学意义,得出不能因价格低廉,怀疑省集采品种血药浓度比进口品种低、临床疗效欠佳而加大剂量使用的结论。

综上,以上真实世界研究证明集采药品在降低价格的同时保证了药品质量及疗效,与原研药没有临床应用区别,确保降价不降质,医师和患者都可以放心选择和使用。也证明运用真实世界数据对集采药品做综合评价的必要性,对回复各方对集采药品、国产仿制药的疑虑以及对集采政策的持续推进和改进有重要的意义。归纳发现因集采药品多数为国产仿制药,常与同品种原研药进行对比,多聚焦在有效性、安全性、经济性三个重要维度。另外,发现集采药品临床综合评价的数据来源多是回顾性收集真实世界临床患者用药信息,如医院电子信息病历系统、医院处方数据等。基于真实世界数据的集采药品评价及证据可反映集采药品在患者中的真实治疗情况。我国多个指导原则支持真实世界证据应用在药品研发、审评、使用、评价等流程中,涉及真实世界研究设计、数据来源及适用性、数据治理(信息保护与数据安全、数据提取、清洗、转化、传输与储存)、偏倚考虑、统计分析计划、质量控制等,为真实世界数据更好转化为证据提供指导^[46-48]。

3 小结

集采政策是一项国家高度重视的利国惠民的改革创新举措。随着集采工作常态化制度化开展,相关部门应加强药品临床综合评价的学习培训,建立相应真实世界数据库,持续开展大规模、多中心的集采中选药品真实世界研究,为临床医师和患者放心使用集采药品提供参考,为集采政策更好地推进与实施提供有力的循证数据支持。

参考文献

[1] 吴雅兰,李三望,刘健.我门诊患者对国家集中带量采购药品认知情况与使用意愿的问卷调查[J].临床合理用药杂志,2022,15(16):40-43.

[2] 汪皖青,郑爽,侯欢,等.不同地区两家三甲医院医师和患者国家药品集中采购政策认知现状及药学需求调查研究[J].医药导报,2022,41(10):1557-1563.

[3] 山东省医院协会药物经济学专业委员会.集中带量采购

政策下山东省调脂药物临床综合评价专家共识[J].中国药房,2022,33(15):1793-1798.

- [4] 国家卫生健康委.国家卫生健康委关于开展药品使用监测和临床综合评价工作的通知:国卫药政函〔2019〕80号[EB/OL].(2019-04-03)[2023-01-04].<https://www.nhc.gov.cn/yaozs/pqt/201904/31149bb1845e4c019a04f-30c0d69c2c9.shtml>.
- [5] 国家卫生健康委办公厅.国家卫生健康委办公厅关于规范开展药品临床综合评价工作的通知:国卫办药政发〔2021〕16号[EB/OL].(2021-07-28)[2023-01-03].<https://www.nhc.gov.cn/yaozs/s2908/202107/532e20800a-47415d84adf3797b0f4869.shtml>.
- [6] 中国药品综合评价指南项目组.中国药品综合评价指南参考大纲(第二版)[J].药品评价,2015,12(8):6.
- [7] 赵志刚,董占军,刘建平.中国医疗机构药品评价与遴选快速指南[J].医药导报,2020,39(11):1457-1465.
- [8] 国家药物和卫生技术综合评估中心.关于心血管病、抗肿瘤、儿童药品临床综合评价技术指南公开征求意见的公告[EB/OL].(2021-12-31)[2023-01-04].<https://www.nhei.cn/nhei/ztnfb/202112/9e350a54d2ea4c3ab9a0237ee4e-ab9f0.shtml>.
- [9] 胡锦涛,吕燕妮,胥甜甜,等.中国医疗机构药品临床综合评价质量控制体系共识[J].中国药业,2022,31(15):1-9.
- [10] 元唯安,张俊华,刘建平,等.中成药临床综合评价指南(2022年版试行)[J].中国中药杂志,2023,48(1):256-264.
- [11] 张强,王志飞,谢雁鸣,等.中成药临床综合评价技术规范[J].世界中医药,2021,16(22):3394-3397,3403.
- [12] 张强,王志飞,谢雁鸣,等.中成药临床综合评价报告规范[J].中国中药杂志,2021,46(23):6062-6067.
- [13] 北京协和医院罕见病多学科协作组,中国罕见病联盟.多准则决策分析应用于罕见病药品临床综合评价的专家共识(2022)[J].协和医学杂志,2022,13(2):235-254.
- [14] 张晶晶,李洪超,朱建国,等.江苏省药品临床综合评价项目质量控制指南[J].中国药理学杂志,2022,57(10):862-866.
- [15] 杭州市药事管理质控中心药品评价专家,浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院.心血管慢病药品临床综合评价杭州专家共识[J].中国药房,2022,33(9):1025-1030.
- [16] 伍俊妍,彭玲玲.广东省SGLT-2抑制剂临床快速综合评价专家共识[J/OL].今日药学,<https://gfffgbb8353b-b55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.R.20220728.1036.002.html>.
- [17] 李玉珍,张育茂.广东省血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)临床快速综合评价专家共识[J/OL].今日药学,<https://gfffgbb8353bb55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.R.20221130.0816.001.html>.
- [18] 温预关,胡晋卿,尚德为.广东省选择性5-羟色胺再摄取抑制剂临床快速综合评价专家共识[J/OL].今日药学,

- <https://gfffgbb8353bb55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.R.20220817.1500.002.html>.
- [19] 季波, 萧伟斌, 台力丽, 等. 广东省胰高糖素样肽 1 受体激动剂 (GLP-1RA) 临床快速综合评价专家共识 [J/OL]. 今日药学, <https://gfffgbb8353bb55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.r.20220919.1335.002.html>.
- [20] 广东省药学会. 广东省二氢吡啶类钙通道阻滞剂药品评价与遴选专家共识 [J/OL]. 今日药学, <https://gfffgbb8353bb55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.R.20221125.1201.002.html>.
- [21] 广东省药学会. 广东省 DPP-4 抑制剂评价与遴选专家共识 [J/OL]. 今日药学, <https://gfffgbb8353bb55a248bbhqxx0wfc5pn9x60qv.fffg.dali.cwkeji.cn/kcms/detail/44.1650.R.20220815.1432.002.html>.
- [22] 李亦蕾, 刘世霞, 宾建平. 广东省他汀类药物评价与遴选专家共识 [J]. 今日药学, 2022, 32 (7): 481-489.
- [23] 人民日报. 这些药品平均降价 48%, 深度解读第七批国家药品集采 [EB/OL]. (2022-07-15) [2023-01-05]. <https://wap.peopleapp.com/article/6807647/6676796>.
- [24] 赵洁, 李巍, 王皋俊. 价值医疗视角下国家药品集中带量采购在某公立医院的实施效果评价 [J]. 中国药房, 2021, 32 (19): 2410-2414.
- [25] 中国药师协会. 医疗机构国家组织集中采购药品管理中国专家共识 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32 (3): 311-322.
- [26] 童荣生, 赵杰, 王明贵, 等. 医疗机构抗菌药物集中带量采购管理专家共识 [J]. 医药导报, 2023, 42 (1): 1-5.
- [27] 张雅慧. 山东省医疗机构落实药品集中带量采购政策的药学专家共识 (2022) [J]. 山东医药, 2022, 62 (21): 113-115.
- [28] 张敬一. 辽宁省医疗机构执行药品集中采购政策专家共识 [J]. 实用药物与临床, 2022, 25 (9): 769-772.
- [29] 陈月, 冯英楠, 孔旭东, 等. 北京市医疗机构落实国家组织药品集中采购专家共识 [J]. 中国医药, 2022, 17 (11): 1601-1604.
- [30] 国家医疗保障局. 国家医保局召开集采中选药品疗效和安全性真实世界研究成果发布会 [EB/OL]. (2021-06-11) [2023-01-04]. https://www.nhsa.gov.cn/art/2021/6/11/art_52_5263.html.
- [31] 岳小林, 付娜, 赵艳玲, 等. 国家集中带量采购中选药品疗效与安全性的真实世界研究 [J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20 (6): 43-48.
- [32] 杨黎, 董宪喆, 崔晓辉, 等. 带量采购中标药品左乙拉西坦片的临床应用评价 [J]. 中国医药导报, 2021, 18 (22): 41-45.
- [33] 韩嘉伦, 张翼, 林佰弟, 等. 中标对比原研氯吡格雷用于急性冠脉综合征患者经皮冠状动脉介入术后治疗的临床有效性及安全性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (6): 601-605.
- [34] 赵强, 石秀锦, 张翼, 等. 仿制和原研氯吡格雷在冠状动脉介入术后有效性、安全性和经济性的对比研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18 (2): 74-78.
- [35] 谢英, 马骁, 赵艳玲, 等. 恩替卡韦仿制药与原研药治疗慢性乙型肝炎的疗效及安全性研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21 (8): 905-907, 914.
- [36] Xie Y, Zhan HQ, Zhu XH, et al. Comparison of the efficacy and adherence of generic and brand-name entecavirs in chronic hepatitis B patients: a multicenter cohort study [J]. Chin Pharm Sci, 2021, 30 (12): 986-993.
- [37] 杨琪, 果伟, 刘珊珊, 等. 药品带量采购对某医院抗精神病药原研药和仿制药使用情况影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (4): 400-403, 418.
- [38] 杨琪, 臧彦楠, 庄红艳, 等. “4 + 7” 带量采购对某医院 SSRI 类抗抑郁药使用的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (13): 1479-1483.
- [39] 贾菲, 臧彦楠, 牛梦溪, 等. 帕罗西汀片药品集中采购中标药疗效与安全性的真实世界研究 [J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32 (1): 18-24.
- [40] 黄炎清, 张红宇, 李莎莎, 等. 评估慢性乙型病毒性肝炎患者换用集采恩替卡韦的疗效与安全性 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2022, 31 (4): 434-437.
- [41] 马攀, 陈勇川, 胡显飞, 等. 仿制和原研左氧氟沙星的体外抗菌活性比较 [J]. 中南药学, 2021, 19 (1): 56-61.
- [42] 张旭东, 苏丹, 方莘莘, 等. 集采非集采和进口莫西沙星注射液治疗肺部感染的药物经济学评价 [J]. 中国药物经济学, 2022, 17 (9): 31-35, 39.
- [43] 庞婕, 吴晓雯, 李春华, 等. 中标与原研盐酸莫西沙星片治疗门诊社区获得性肺炎的有效性、安全性与经济性比较 [J]. 中国药房, 2023, 34 (2): 200-204.
- [44] 许惠溢, 马椿乔, 徐峰, 等. 利用药物经济学方法评价部分 4 + 7 集中采购药品 [J]. 海峡药学, 2020, 32 (10): 38-42.
- [45] 鲁虹, 史群志, 吴戈, 等. 基于治疗药物监测的注射用美罗培南省集采和进口品种的临床应用实践分析 [J]. 中南药学, 2021, 19 (7): 1493-1497.
- [46] 吴阶平医学基金会和中国胸部肿瘤研究协作组. 中国真实世界研究指南 (2018 年版) [EB/OL]. (2018-08-03) [2023-01-04]. https://www.sohu.com/a/252293718_777125.
- [47] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《用于产生真实世界证据的真实世界数据指导原则 (试行)》的通告 (2021 年第 27 号) [EB/OL]. (2021-04-13) [2023-01-04]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/2a1c437ed54e7b838a7e-86f4ac21c539>.
- [48] 国家药监局药审中心. 国家药监局药审中心关于发布《药物真实世界研究设计与方案框架指导原则 (试行)》的通告 (2023 年第 5 号) [EB/OL]. (2023-02-06) [2023-03-07]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/14aac16a4fc5b5841bc2529988a611cc>.

(收稿日期: 2022-12-05; 修回日期: 2023-02-05)

国家医保谈判新型抗肿瘤药物的发展变化

谢杏梅, 高悦* (上海市松江区中心医院药剂科, 上海 201600)

摘要: **目的** 以新型抗肿瘤药物为重点, 分析 2018 年起《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》(简称《指导原则》) 中纳入国家医保谈判药品的发展变化情况。**方法** 对比历年《指导原则》和上一年份或对应年份《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》(简称《医保目录》) 中新型抗肿瘤药物数量、系统分布、靶点检测及医保支付限定适应证等方面的发展变化。**结果** 2018 年版《指导原则》中纳入 33 个新型抗肿瘤药物, 2019、2020、2021 年分别增加了 13、27、44 个; 2018 年《指导原则》纳入国家谈判药品 26 个, 2019、2020、2021 年分别增至 31、39、48 个。历年《指导原则》中新型抗肿瘤药物主要分布在呼吸系统、消化系统、血液系统。《指导原则》需靶点检测药品从 17 个发展至 40 个, 从 EGFR、HER2、VEGFR 传统靶点发展到作用于 PD-L1、BRCA、ALK 等新兴靶点。国谈医保目录中新型抗肿瘤药物医保支付限定适应证覆盖范围扩大。**结论** 《指导原则》纳入国家医保谈判新型抗肿瘤药物数量逐年丰富, 靶点检测逐步纳入医保, 医保支付限定适应证覆盖范围不断扩大, 提升了肿瘤患者享受公平可及的医保资源。《指导原则》适应证更新存在滞后性; 在后续《指导原则》和《医保目录》更新中应关注我国发病率较高但缺乏药物治疗的肿瘤类型以满足不同肿瘤治疗的需求。

关键词: 新型抗肿瘤药物; 指导原则; 国家医保谈判药品

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)05-1393-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.045

Changes of novel anti-tumor drugs in national medical insurance negotiation

XIE Xing-mei, GAO Yue* (Department of Pharmacy, Shanghai Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600)

Abstract: Objective To determine the changes of Chinese national medical insurance negotiation drugs (especially novel anti-tumor drugs) in the *Guiding Principles of Clinical Application of Novel Anti-tumor Drugs* (the *Guiding Principles*) since 2018. **Methods** The number, distribution, target detection and limited indications for medical insurance payment of novel anti-tumor drugs were compared between the *Guiding Principles* and the *Medicine Catalogues for National Basic Medical Insurance, Work-related Injury Insurance and Maternity Insurance* (the "Medical Insurance Catalogues") in the preceding year or corresponding years. **Results** Totally 33 new anti-tumor drugs were included in the 2018 edition of the *Guiding Principles*, which increased by 13, 27 and 44 in 2019, 2020 and 2021, respectively. In 2018, 26 drugs were included in the *Guiding Principles*, which were increased to 31, 39 and 48 in 2019, 2020 and 2021, respectively. Novel anti-tumor drugs in the *Guiding Principles* over the years mainly covered respiratory system, the digestive system and the blood system. According to the *Guiding Principles*, the number of drugs required for target detection increased from 17 to 40, and from traditional targets of EGFR, HER2 and VEGFR to emerging targets such as PD-L1, BRCA, and ALK. The medical insurance payment limitation indications of the novel

基金项目: 2018 年上海市临床药学重点专科建设项目 [编号: 沪卫计药政(2018)9 号]。

作者简介: 谢杏梅, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: m15026956267@163.com * 通信作者: 高悦, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学及医院管理方面的研究, email: gynjmu@163.com

anti-tumor drug in the national medical insurance catalogue were expanded. **Conclusion** The number of novel anti-tumor drugs included in the national medical insurance negotiation increases year by year. Target detection is gradually included in the medical insurance, and the coverage of medical insurance payment is expanding. Cancer patients have fairer and more accessible medical insurance resources. Delay exists in the update of indications in the *Guiding Principles*. Attention should be paid to the tumor types with high incidence with few drug treatments in China.

Key words: novel anti-tumor drug; guiding principle; national medical insurance negotiation drug

肿瘤是严重危害人类生命的医学难题,据全球癌症统计数据显示:2020 年全球恶性肿瘤新发病例 1929 万例、死亡病例 996 万例,其中我国新发病例 457 万,占世界肿瘤新发比例 23.39%;2020 年我国肿瘤死亡病例 300 万例,占世界肿瘤死亡比例 30.2%,均位列全球第一^[1-2]。随着恶性肿瘤发病率的升高,肿瘤学发展速度加快。近年来,新型抗肿瘤药物逐渐成为肿瘤治疗领域的新手段,相比较传统肿瘤化疗药物,新型抗肿瘤药物具有疗效好、选择性高、患者依从性好等特点,越来越多的新型抗肿瘤药物被纳入国家医保谈判药品目录,然而这些药物临床数据有限、权威用药指南缺失、医师药师用药经验不足,存在临床用药不合理现象^[3-5],因此规范抗肿瘤药物合理应用以提高疗效、降低不良反应至关重要。

国家卫生健康委员会为规范新型抗肿瘤药物临床应用,提高肿瘤治疗的合理用药水平,保障医疗质量与医疗安全,维护肿瘤患者健康权益,牵头制定的第一版《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》(简称《指导原则》)^[6]于 2018 年 9 月 21 日发布,并于 2019 年 12 月 16 日、2020 年 12 月 29 日、2021 年 12 月 27 日对《指导原则》进行更新^[7-9]。本研究将对比历年《指导原则》与上一年份或相应年份《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》(简称《医保目录》),重点剖析新型抗肿瘤药物数量、系统分布、靶点检测及医保支付限定适应证等方面的发展变化。

1 资料来源和研究方法

1.1 资料来源

2018—2021 年版《指导原则》和 2017 年版、2019 年版、2020 年版、2021 年版的《医保目录》。

《医保目录》分为西药部分、中成药部分、协议期内谈判部分及中药饮片部分,本文仅研究《指导原则》被西药部分和协议期内谈判(或称国家医保谈判)部分收录的新型抗肿瘤药物。

1.2 研究方法

本文采用描述性分析方法,主要比较《指导原则》和上一年或对应年份《医保目录》中新型抗肿瘤药物数量、系统分布、靶点检测及医保支付限定适应证等方面的发展变化。2018 年版《指导原则》对应 2017 年版《医保目录》,2019—2021 年版《指导原则》对应相应年份《医保目录》。

2 结果

2.1 《指导原则》及《医保目录》抗肿瘤药物发展变化

2018 年版《指导原则》中纳入 33 个新型抗肿瘤药物,2019、2020、2021 年分别增加了 13、27、44 个。分别以上一年度或相应年度《医保目录》为基准,2018 年版《指导原则》中有 26 个新型抗肿瘤药物品种加入国家医保谈判(简称“国谈”),5 个被纳入常规医保目录;2019 年版《指导原则》中共有 34 个国谈品种,其中 3 个被调入常规医保目录;2020 年版《指导原则》中共有 41 个国谈品种,其中 2 个被调入常规医保目录;2021 年版《指导原则》中共 51 个国谈品种,其中 3 个被调入常规医保目录(见图 1)。国谈工作趋于常态化机制,参与谈判的药品品种数量逐步增加^[5],被纳入常规医保目录品种也稳健增加,减轻了参保人的医疗负担。

2.2 《指导原则》各系统抗肿瘤药物分布及数量变化情况

2018 年版《指导原则》共涉及 7 个系统肿瘤用药,2019 年版《指导原则》增加了“生殖系统肿瘤用药”。2020 年版较前两版《指导原则》稍有不同,将“皮肤与软组织系统用药”拆分为“皮肤系统用药”与“骨与软组织系统用药”。2021 年版《指导原则》各系统分类与 2020 年版《指导原则》一致。与 2020 年相比,2021 年《指导原则》呼吸系统新增药品 7 个;消化系统新增 8 个;血液系统新增 4 个;泌尿系统新增 3 个,删除 1 个;头颈部新增 5 个;生殖系统新增 2 个;乳腺癌、

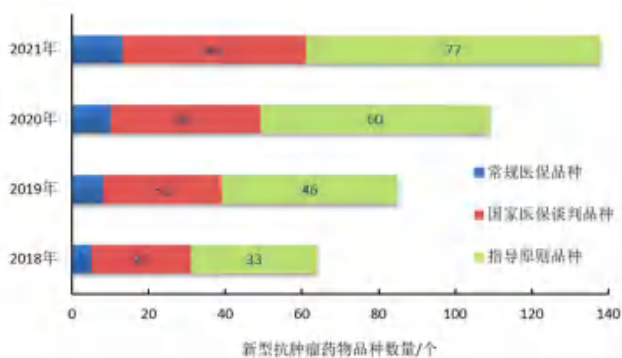


图 1 历年《指导原则》药品、常规医保支付药品和国谈药品品种数量的变化

Fig 1 Changes in the number of drugs in the Guiding Principles, conventional medical insurance payments and national negotiated drug variety over the years

皮肤系统及骨与软组织数量未发生变化。《指导原则》抗肿瘤药物数量逐年稳步增加，各药物适应证以相应年份药品说明书为准，同一药品适应证可覆盖多个肿瘤系统（见表 1）。

表 1 新型抗肿瘤药物品种在系统肿瘤中的分布

Tab 1 Distribution of novel anti-tumor drug variety in system tumors

年份	系统肿瘤									品种数
	呼吸	消化	血液	泌尿	乳腺	皮肤	骨与软组织	头颈部	生殖	
2018	11	9	10	5	3	3	0	2	0	33
2019	15	11	13	7	5	5	0	2	1	46
2020	19	14	17	9	6	6	3	4	2	60
2021	26	22	21	11	6	6	3	9	4	77

与 2020 年版相比，2021 年版《指导原则》共新增 17 个品种。新增谈判抗肿瘤药物主要分布在消化系统、呼吸系统、头颈部系统及泌尿系统；新增自费抗肿瘤药物集中于呼吸系统、消化系统、血液系统和头颈部系统。其中泌尿系统肿瘤用药新增 3 个均纳入谈判，删除 1 个（安罗替尼）。除骨与软组织肿瘤系统用药，各系统均有新增药品（见表 2）。

2.3 新型抗肿瘤药物靶点检测情况

新型抗肿瘤药物中部分靶向药物须遵循靶点检测后方可使用的原则，不得在未做相关检查的情况下盲目用药^[9]。历年《指导原则》中已明确需要检测靶点的药物，可分为小分子靶向药物和大分子单克隆抗体两大类。2018—2021 年版《指导原则》中需检测靶点的药物从 17 个发展为 40 个，其中 2021 年《指导原则》中需检测靶点的小分子药物 28 个，大分子单抗 12 个。自 2018 年来，《指导原则》中新型抗肿瘤药物从 EGFR、HER2、

表 2 2021 年版《指导原则》较 2020 年版《指导原则》新增品种分布情况

Tab 2 Guiding Principles for new variety distribution of 2020 and 2021 edition

序号	系统肿瘤	谈判目录		自费目录		2021 年各系统药物数量	占比/%
		2020 年版	2021 年版新增	2020 年版	2021 年版新增		
1	呼吸系统肿瘤	15	4	4	3	26	33.77
2	消化系统肿瘤	12	5	2	3	22	28.57
3	血液系统肿瘤	17	1		3	21	27.27
4	泌尿系统肿瘤	6	3	2		11	14.29
5	乳腺肿瘤	6	1	3		10	12.99
6	皮肤肿瘤	5		1		6	7.79
7	骨与软组织肿瘤	3				3	3.90
8	头颈部肿瘤	3	4	1	1	9	11.69
9	生殖系统肿瘤	2	2			4	5.19

注：占比 = 各系统药物数量 / 2021 年《指导原则》收录药物总数。

Note: proportion (%) = number of drugs in each system/total number of drugs in the Guiding Principles in 2021 × 100%.

VEGFR 传统靶点发展到作用于 PD-L1、BRCA、ALK 等新兴靶点^[10]。部分药品可能具有多个靶点，不同病种的治疗需检测不同靶点，如帕博利珠单抗治疗食管癌和头颈部鳞状细胞癌需检测 PD-L1，治疗结直肠癌时要求 KRAS、NARA、BRAF 均阴性方可使用（见表 3）。

2.4 常规医保目录中新型抗肿瘤药物及其适应证变化

截至 2021 年，共 13 个新型抗肿瘤药物陆续纳入常规医保目录，较前一年新增 4 个新型抗肿瘤药物，包括 2 个单克隆抗体以及 2 个蛋白激酶抑制剂，并将埃克替尼从医保常规目录中删除，纳入 2021 年协议期内谈判目录。常规医保目录新型抗肿瘤药物适应证可覆盖淋巴瘤、肺癌、胃肠间质瘤、肝细胞癌、肾细胞癌、白血病、骨髓瘤等多个瘤种，新纳入 4 个品种进一步扩大医保常规目录的覆盖适应证，如索拉非尼治疗甲状腺癌；但对于发病率较高的宫颈癌和膀胱癌目前暂无新型抗肿瘤药物被纳入医保支付限定条件中^[5]。此外，部分新型抗肿瘤药物的医保支付适应证可覆盖多个瘤种，如贝伐珠单抗可覆盖结直肠癌、肺癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌；沙利度胺无适应证限制。对比《指导原则》适应证，常规医保限定支付适应证的范围扩大（见表 4）。主要因为肿瘤药物治疗证据更新快，《指导原则》适应证仅参考药品说明书，存在一定滞后性。

表 3 2021 年版《指导原则》中明确需靶点检测新型抗肿瘤药物
Tab 3 Novel anti-tumor drugs with required in the Guiding Principles 2021 edition

靶点	病种	药品
EGFR	肺癌	吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、达可替尼、奥希替尼、阿美替尼、伏美替尼
	鼻咽癌	尼妥珠单抗
PDGFR (A)	胃肠间质瘤	阿伐替尼
	白血病	伊马替尼
HER2	乳腺癌	拉帕替尼、吡咯替尼、奈拉替尼、曲妥珠单抗、恩美曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、伊尼妥单抗
	胃癌	维迪西妥单抗、曲妥珠单抗
ALK	肺癌	阿来替尼、塞瑞替尼、恩沙替尼、克唑替尼
ROS1	肺癌	克唑替尼
RET	肺癌	普拉替尼
MET	肺癌	赛沃替尼
FLT3	白血病	吉瑞替尼
BRAF V600	黑色素瘤	维莫非尼、达拉非尼、曲美替尼
BRCA	前列腺癌	奥拉帕利
	卵巢癌(一线维持)	奥拉帕利
	卵巢癌(多线复发治疗)	氟唑帕利、帕米帕利
PD-L1	尿路上皮癌	替雷利珠单抗
	食管癌	帕博利珠单抗
	头颈部鳞状细胞癌	纳武利尤单抗、帕博利珠单抗
费城染色体	白血病	尼洛替尼、伊马替尼、达沙替尼
BCR-ABL	白血病	伊马替尼、达沙替尼
C-KIT	胃肠间质瘤	伊马替尼
	黑色素瘤	伊马替尼
CD20	淋巴瘤	利妥昔单抗
CD30	淋巴瘤	维布妥昔单抗
RAS	结直肠癌	西妥昔单抗
KRAS、NARA、BRAF	结直肠癌	帕博利珠单抗

表 4 2021 年版《指导原则》与常规医保目录中新型抗肿瘤药物适应证比较

Tab 4 Indications of novel anti-tumor drugs in the Guiding Principles 2021 edition and the conventional medical insurance catalogues

序号	药品名称	《指导原则》适应证	医保支付限定适应证
1	利妥昔单抗	淋巴瘤	淋巴瘤
2	曲妥珠单抗*	乳腺癌	乳腺癌、胃癌
3	贝伐珠单抗*	肺癌	结直肠癌、肺癌、胶质母细胞瘤、肝癌
4	吉非替尼	肺癌	肺癌
5	伊马替尼	胃肠间质瘤	白血病、胃肠间质瘤
6	达沙替尼	白血病	白血病
7	阿法替尼	肺癌	肺癌
8	舒尼替尼	胃肠间质瘤、胰腺神经内分泌瘤	肾癌、胃肠间质瘤、胰腺神经内分泌瘤
9	硼替佐米	骨髓瘤、淋巴瘤	骨髓瘤、淋巴瘤
10	索拉非尼*	肾癌	肾癌、肝癌、甲状腺癌
11	厄洛替尼*	肺癌	肺癌
12	沙利度胺	瘤型麻风病	
13	来那度胺	骨髓瘤	骨髓瘤

注：*代表 2021 年医保常规目录新增药品。

Note: *Represents the new drugs added to the 2021 medical insurance routine catalogues.

2.5 协议期内谈判新型抗肿瘤药物及其适应证变化不仅是常规医保目录中新型抗肿瘤药物临床应用范围不断扩增，对比往年协议期内谈判目

录，2021 年协议期内谈判目录共有 48 个新型抗肿瘤药物，相继有药品扩大医保支付适应证，其中包括：① 2020 年，医保谈判增加伊布替尼和

依维莫司支付适应证范围；② 2021 年，医保谈判进一步增加 6 个药品的适应证，覆盖呼吸、消化道和生殖等系统（见表 5）。这些得益于基因组

学的进步，以及抗肿瘤药物作用靶点的发现和循证医学证据的不断更新。

表 5 协议期内谈判目录新型抗肿瘤药物适应证变化

Tab 5 Changes in indications for novel antitumor drugs in the negotiation catalogues

序号	药品名称	既往医保谈判适应证	新增医保谈判适应证
1	伊布替尼	淋巴瘤、淋巴细胞白血病	华氏巨球蛋白血症
2	依维莫司	肾癌、胰腺神经内分泌瘤、肾血管平滑肌脂肪瘤	胃肠道或肺源神经内分泌瘤
3	西妥昔单抗	结直肠癌	头颈部鳞状细胞癌
4	信迪利单抗	淋巴瘤	肺癌、肝癌
5	替雷利珠单抗	淋巴瘤、尿路上皮癌	肺癌、肝癌
6	特瑞普利单抗	黑色素瘤	鼻咽癌、尿路上皮癌
7	安罗替尼	肺癌、肉瘤	甲状腺髓样癌
8	泽布替尼	淋巴瘤、淋巴细胞白血病	华氏巨球蛋白血症

3 讨论

3.1 规范新型抗肿瘤药物的合理使用

为规范新型抗肿瘤药物临床应用，提高肿瘤治疗的合理用药水平，保障医疗质量和医疗安全，维护肿瘤患者健康权益，国家卫生健康委员会特制订了《指导原则》。《指导原则》规定抗肿瘤药物临床应用须遵循药品说明书，不能随意超适应证使用。临床实践中，发现具有高级别循证医学证据的新适应证及新用法用量在说明书中未体现，往往存在滞后情况。因此临床医师通常优先参考权威指南及高级别循证证据，导致现有的《指导原则》不能满足实际需求，增大了其在临床中推行的难度^[11-12]。《指导原则》及时更新及开展合理超说明书用药工作尤为重要，一方面国家政策严格把控循证医学证据，另一方面综合分析瘤种治疗现状；另外，借助信息化手段是关键，例如前置审方系统，将该项管理工作真正落地，能从根本上规范临床抗肿瘤药物的超说明书使用，规范抗肿瘤药物使用安全性^[13]。2020 年版《指导原则》删除《管理办法》，新增“附表”指导发生不良反应时调整治疗方案，进一步规范抗肿瘤药物使用的安全性。

在《指导原则》落实中，要求临床药师要全面掌握其药品说明书外也应结合当前高级别循证医学，从用药合理性、用药安全性、用药教育、医嘱点评等参与新型抗肿瘤药物的合理使用中，为患者提供高质量的药学服务。

3.2 靶点检测纳入医保亟待推广，提升肿瘤治疗经济性

基因突变与抗肿瘤疗效直接相关，不同肿瘤患者对特定药物的敏感性和毒副反应的大小不同，

通过检测特定靶点基因可指导肿瘤靶向用药，进而提高肿瘤靶向治疗的有效性和安全性，但另一方面也增加了肿瘤患者的治疗费用。2021 年版《指导原则》共收入 77 个新型抗肿瘤药物，其中明确需基因检测的共计 40 个，占比 51.95%。2021 年版《指导原则》中共有 61 个新型抗肿瘤药物被纳入《医保目录》，其中需基因检测药品共 31 个，占比 50.82%（注：如图 1 所示，在 2021 年，《指导原则》中新型抗肿瘤药品有 13 个纳入常规医保目录+ 48 个纳入国谈目录，所以《医保目录》是 61 个新型抗肿瘤药物）。由于肿瘤患者的复发检测和耐药较为常见，若在治疗中出现耐药，往往需要多次检测，导致整体肿瘤基因检测总费用高。自 2019 年 6 月 15 日起，北京医耗联动综合改革正式实施，全市执行病理检测医疗保险新政策，首次将肿瘤基因检测纳入医保，报销比例高达 90%^[14]。目前，我国很多地区未将抗肿瘤靶向药物基因检测纳入医保范围，基因检测作为使用靶向药前的必经之路纳入医保需进一步推进，以减轻肿瘤患者的经济负担。

3.3 医保适应证覆盖范围扩大

《指导原则》中纳入医保目录的药品稳步增加，治疗覆盖范围不断扩大。以 2021 年版《医保目录》为准，国产君实生物的特瑞普利单抗、信达生物的信迪利单抗、恒瑞医药的卡瑞利珠单抗、百济神州的替雷利珠单抗这四款 PD-L1 全部谈判成功纳入医保。这不仅激励我国药品创新，降低我国对进口药品的依赖，还极大减轻了肿瘤患者的经济负担^[6]。目前《指导原则》和国谈抗肿瘤药物适应证均主要以肺癌、乳腺癌和淋巴瘤为主，而我国负担较重的甲状腺癌（索拉非尼）、鼻咽癌

(特瑞普利单抗)仅有 1 个抗肿瘤药物被纳入,对于发病率较高的宫颈癌和膀胱癌,当前暂无新型抗肿瘤药物适应证被《指导原则》和《医保目录》收入,提示制订《指导原则》专家组在后续更新中关注缺乏抗肿瘤药物治疗的瘤种;与此同时,卫生行政部门应积极推动肿瘤药物的研发工作,满足不同瘤种的治疗需求^[10, 13, 15]。很多国外指南推荐使用的创新抗肿瘤药物,因价格昂贵、不规范的使用途径以及可及性低,在我国不能及时用于临床治疗。对此,通过医保谈判,提高了抗肿瘤创新药可支付性和可及性,让更多癌症患者享受到了公平可及的医保资源。

3.4 进一步提高国谈新型抗肿瘤药物的可及性

自 2017 年国家人力资源和社会保障部牵头开展数轮国谈工作,国家陆续将临床疗效确切的新型抗肿瘤药物纳入医保范围或签订协议。截至 2021 年,《指导原则》共有 48 个新型抗肿瘤药物进入国谈医保目录,但因国家政策、医疗水平、市场需求,导致部分新型抗肿瘤药物的可及性较低^[16]。为提高谈判新型抗肿瘤药物的可及性,需要不同监管部门共同探讨政策的兼容性;医院应及时积极落实、改进相关制度和操作流程(解除对医保谈判药品不配套的政策管制,如医院药占比考核;建立谈判药的审批绿色通道,将新型抗肿瘤药物纳入常规采购目录,保证临床供应,提高药物可及性)^[17-18]。

4 总结

《指导原则》中新型抗肿瘤药物不断纳入医保常规目录和协议期谈判目录,不仅提高肿瘤治疗水平、改善抗肿瘤领域的合理用药问题,还大幅提升了医保对癌症患者的保障力度,让更多癌症患者享受公平可及的医保资源。在后续《指导原则》和《医保目录》更新中应关注我国发病率较高但缺乏药物治疗的肿瘤类型,相关研发部门、医疗机构应加强此类瘤种的研发工作以满足肿瘤治疗的需求。

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] World Health Organization. Global Cancer Observatory [DB/OL]. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.

[3] 权修权, 朴惠顺, 康琳, 等. 抗肿瘤靶向药物研究现状 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31 (5): 610-614.

[4] Audino TA. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2015, 12 (1): 3-20.

[5] 李凯悦, 刘辉, 蒋倩. 历年国家医保谈判药品概况与分析—抗肿瘤药物专题 [J]. *肿瘤药学*, 2021, 11 (2): 229-235.

[6] 国家卫生健康委医政医管局. 关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2018年版)的通知: 国卫办医函[2018]821号 [EB/OL]. <https://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/201809/0ea15475f58a4f36-b675cfa4716fa1e4.shtml>.

[7] 国家卫生健康委医政医管局. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2019年版)的通知: 国卫办医函[2019]896号 [EB/OL]. <https://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/201912/3922e93c3ef-84c54879f36777db73568.shtml>.

[8] 国家卫生健康委医政医管局. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2020年版)的通知: 国卫办医函[2020]1047号 [EB/OL]. <https://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202012/6c00e8559e54cd-29585c7f39e8a23c4.shtml>.

[9] 国家卫生健康委医政医管局. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型抗肿瘤药物临床应用指导原则(2021年版)的通知: 国卫办医函[2021]612号 [EB/OL]. <https://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202112/0fbf3f04092b4d-67be3b3e89040d8489.shtml>.

[10] 藕顺龙, 罗静, 蒋倩, 等. 历年《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》概况与变迁 [J]. *中国药房*, 2022, 33 (11): 1392-1396.

[11] 刘家伟, 孔维华, 林丽开, 等. 2021年《新型抗肿瘤药物临床应用指导原则》解读与思考 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2022, 20 (3): 1-5.

[12] 刘婧琳, 吴春暖, 宋晓坤. 抗肿瘤药物临床超常用药分析 [J]. *中国药房*, 2020, 31 (7): 873-878.

[13] 杜鹃, 张文周. 对抗肿瘤药物分级管理中三个核心问题的思考 [J]. *肿瘤药学*, 2022, 12 (1): 108-111.

[14] 北京市人民政府. 关于印发《北京推出医耗联动综合改革》的通知 [N]. *人民日报*, 2018-12-28.

[15] Li GQ, Qin YH, Xie CC, et al. Trends in oncology drug innovation in China [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20 (1): 15-16.

[16] Zhang L, Zhou QY, Zhang XM, et al. Investigation and study on the accessibility of antibiotics in essential medicine list in medical institutions of Nanjing area [J]. *China Pharmacy*, 2020, 31 (11): 1281-1287.

[17] 蒋慧群, 李歆, 韩峰. 国家医保谈判抗肿瘤药物在常州地区可获得性和可负担性研究 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18 (11): 1075-1079.

[18] 陈金燃, 郭凯宁, 陈纯, 等. 2018—2019年福建省国家谈判药品患者用药可及性调研分析 [J]. *中国医疗保险*, 2020, 12: 59-64.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-10-02)

药品不良反应

万古霉素致重度血小板减少症 1 例

李海俏¹, 周桂保^{2*}, 冯尚军³, 邓海灵⁴ (1. 珠海市中西医结合医院药学部, 广东 珠海 519000; 2. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院临床药学科, 广东 深圳 518019; 3. 广西省河池市环江毛南族自治县人民医院药剂科, 广西 河池 547100; 4. 惠州市中医医院药学部, 广东 惠州 516001)

关键词: 万古霉素; 重度血小板减少症; 治疗药物监测; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)05-1399-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.05.046

万古霉素为糖肽类抗菌药物, 是治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 相关感染的首选药物^[1-2], 如血流感染、心内膜炎等, 临床应用广泛。随着制备工艺的提高及治疗药物监测 (TDM) 的广泛开展, 万古霉素相关肾毒性的发生率有所下降^[3], 但其他罕见的严重药物不良反应仍有报道^[4], 如万古霉素诱发的血小板减少症^[5], 严重者可出现危及生命的血尿、咯血等。在临床药学服务实践中, 临床药师成功处置了万古霉素导致 MRSA 血流合并皮肤软组织感染患者重度血小板减少症 1 例, 现报道如下。

1 病例资料

患者, 女, 67 岁, 体质量 65 kg, 入院 5 日前行双膝关节穿刺术+硬膜外置管术, 2 日前出现腰背部疼痛来院就诊。查体: 体温 (T) 36.2 °C, 脉搏 (P) 92 次·min⁻¹, 呼吸次数 (R) 18 次·min⁻¹, 血压 (BP) 138/84 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); 神清, 精神可, NRS 评 5 分, 腰棘突间压痛、叩击痛; 双侧膝腱及跟腱反射 (++) ; 双下肢肌力 V 级, 生理反射存在。实验室检查示: 白细胞计数 (WBC) 15.77×10⁹·L⁻¹↑, 中性粒细胞比值 (NEUT%) 77.6%↑, 血红蛋白浓度 (HGB) 134 g·L⁻¹, 血小板计数 (PLT) 278×10⁹·L⁻¹, C 反应蛋白 (CRP) 142 mg·L⁻¹↑, 降钙素原 (PCT) < 0.05 ng·mL⁻¹。胸腰椎 MRI 检查示: 胸椎椎体多发血管瘤、腰椎椎体多发血管瘤、椎间盘变性并突出、腰骶部皮下软组织及腰部左侧肌肉炎性改变。既往有高血脂症、重度骨质疏松症、糖尿病病史, 否认食物、药物过敏史。入院主要诊断: 腰部软组织感染, 双膝骨关

节炎, 重度骨质疏松症, 糖尿病等。

入院第 1 日 (d1) 给予头孢曲松注射液抗感染, 帕瑞昔布注射液及曲马多缓释片镇痛, 具体用药方案见表 1。d2 查肝肾功能、血脂、尿酸、肿瘤标志物、尿常规等未见异常。d4 患者腰背部仍有疼痛, NRS 评分 4 分, 复查: WBC 8.90×10⁹·L⁻¹, NEUT%65.2%, PLT 294×10⁹·L⁻¹, CRP 103 mg·L⁻¹↑, 糖化血红蛋白 8.57%↑, 具体见图 1。d5 血培养示 MRSA, 对克林霉素、阿奇霉素、左氧氟沙星、万古霉素、利奈唑胺等敏感, 余耐药, 调整为万古霉素 (1 g ivgtt q12h) 抗感染, 同时加用平素使用的降糖药二甲双胍片及格列美脲片。d7 腰背部疼痛较前减轻 NRS 评分 3 分, 复查血常规大致正常, CRP 105 mg·L⁻¹↑, 万古霉素谷浓度 15.5 mg·L⁻¹。d8 ~ d16 患者疼痛明显改善, 规律复查血常规、感染指标均提示较前改善。d18 查万古霉素谷浓度 23.3 mg·L⁻¹↑, 维持原剂量, 密切关注。d19 患者皮肤可见瘀斑, 当日 3 次查血常规, PLT 分别为 8×10⁹·L⁻¹↓、3×10⁹·L⁻¹↓和 16×10⁹·L⁻¹↓; WBC 分别为 9.9×10⁹·L⁻¹、3.3×10⁹·L⁻¹↓和 2.40×10⁹·L⁻¹↓, 红细胞 (RBC)、凝血功能、肝肾功能未见异常。临床药师分析 PLT 降低伴皮肤瘀点不排除为万古霉素不良反应所致, 建议停用, 调整为克林霉素, 医师采纳。同时予输注血小板 2 单位, 重组人粒细胞刺激因子注射液 (150 μg ih qd) 升白细胞, 地塞米松注射液 (10 mg ivgtt qd) 及静脉注入免疫球蛋白 (20 g ivgtt qd) 抑制免疫反应, 注射用奥美拉唑 (40 mg ivgtt qd) 护胃等处理。d20 复查 PLT 8×10⁹·L⁻¹↓, WBC 16.87×10⁹·L⁻¹↑,

作者简介: 李海俏, 女, 主管药师, 主要从事医院药品管理和临床药学方面的研究, email: sunshine05@126.com * 通信作者: 周桂保, 男, 主管药师, 主要从事临床药学、呼吸与抗感染方面的研究, email: szjiayang@sohu.com

继续输注血小板及药物治疗。d22 患者皮肤瘀斑变淡，部分消失，查 PLT $140 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，WBC $14.53 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$ 。d27 患者无腰背部疼痛，复查感染指标无异常，PLT $362 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，遂予出院。d30 患者门诊随诊复查 PLT $365 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。

表 1 患者住院期间的主要治疗药物

药品及用法用量	起止时间
帕瑞昔布注射液 40 mg + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL iv qd	d1 ~ d8
曲马多缓释片 100 mg po q12h	d1 ~ d8
注射用头孢曲松钠 2 g + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt qd	d1 ~ d4
注射用万古霉素 1 g + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt q12h	d5 ~ d19
二甲双胍片 1 g po bid	d5 ~ d27
格列美脲片 2 mg po 早餐前	d5 ~ d27
地塞米松注射液 10 mg + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt qd	d19 ~ d21
静注人免疫球蛋白 20 mg ivgtt qd	d19 ~ d21
注射用奥美拉唑钠 40 mg + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt qd	d19 ~ d24
注射用克林霉素 0.6 g + 0.9% 氯化钠注射液 100 mL ivgtt q8h	d19 ~ d27

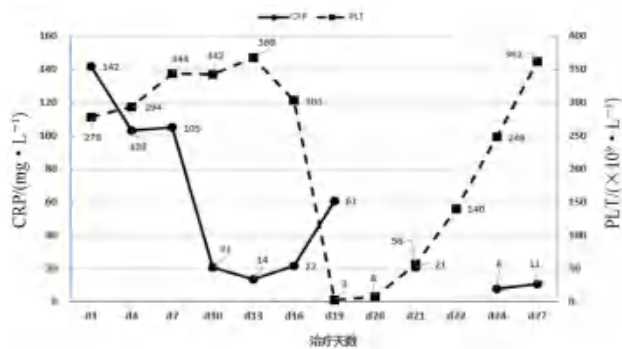


图 1 患者 PLT、CRP 的变化情况

2 讨论

2.1 万古霉素使用分析

血培养阳性是诊断血流感染的关键性依据，需结合临床情况综合判断^[6]。该患者近期有行外科手术史，存在腰部软组织感染，双侧双瓶血标本均在 8 ~ 17 h 内培养出金黄色葡萄球菌，药敏结果显示为 MRSA，故该患者诊断为 MRSA 所致的血流感染明确，来源于腰部软组织感染可能性大。相关指南^[1-3]均推荐万古霉素为 MRSA 血流感染的首选药物，每次 15 ~ 20 mg · kg⁻¹，每 8 ~ 12 h 给药 1 次，日剂量一般不超过 4 g。结合药敏结果，遂将头孢曲松调整为万古霉素（1 g ivgtt q12h）。《中国万古霉素治疗药物监测指南》^[7]指出特殊人群、肝肾功能异常者及高剂量给药时

应监测肾功能和血药浓度，建议万古霉素稳态谷浓度维持在 10 ~ 20 mg · L⁻¹。用药期间监测万古霉素浓度，d18 检测为 23.3 mg · L⁻¹ 偏高，考虑患者为老年女性，临床药师建议万古霉素用法用量调整为 0.5 g ivgtt q8h，医师未采纳；同时警惕不良反应发生，建议临床医师复查肾功能、血常规，评估耳毒性。经万古霉素抗感染治疗 14 d 余，该患者无发热，腰背部疼痛明显改善，感染相关指标明显好转，多次血培养转阴，提示抗感染治疗有效。考虑患者出现重度血小板减少症，且不排除腰椎骨感染，临床药师建议调整为克林霉素继续抗感染治疗 8 d 余，待症状好转序贯为口服克林霉素，总疗程 4 ~ 6 周，医师采纳。

2.2 重度血小板减少症原因与处置

2.2.1 原因分析

PLT 是维持血管壁完整性的重要细胞，当 PLT < $100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，即可诊断为血小板减少症，其中 PLT < $30 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 为重度血小板减少症^[8-9]。发生血小板减少症的主要原因包括血小板生成减少、破坏或消耗过多和分布异常等。药源性血小板减少症（drug-induced thrombocytopenia, DIT）的临床报道^[10]并不少见，其年发病率约为 1/100 000，有超过 300 种药物引起血小板减少的不良反应，常见药物包括抗菌药物（β-内酰胺类、乙胺丁醇、利奈唑胺、万古霉素、哌拉西林等）、抗癫痫药物（卡马西平、苯妥英钠、丙戊酸钠）、肝素、替罗非班、抗肿瘤药物等^[11]。DIT 机制尚未明确^[12]，在典型的 DIT 中已经发现了几种不同的机制，包括：① 免疫机制；② 骨髓巨核细胞中毒机制；③ 直接破坏血小板机制。但是 DIT 的诊断相对困难，需要排除引起血小板减少症的疾病。该患者入院初期多次查血常规示 PLT 波动（294 ~ 368）× 10⁹ · L⁻¹，住院第 19 日 PLT 最低降至 3 × 10⁹ · L⁻¹，因此，该患者重度血小板减少症诊断明确。结合该患者既往无血液系统疾病，无弥漫性血管内凝血、脾大等，肝肾功能未见明显异常，血流感染已得到有效控制，暂未发现引起血小板减少症的相关疾病因素，临床药师会诊分析，药物所致的重度血小板减少症可能性大。

查阅文献资料，发现不少万古霉素致 DIT 的案例报道。Guleng 等^[13]报告了 1985—2020 年搜索到的 38 例万古霉素致 DIT 病例，其中男性 24 例（63.2%），女性 14 例（36.8%）。发病时间大多在用药后的 7 ~ 10 d，如果患者有万古霉素过敏史则容易在给药后 24 h 内发生 DIT^[14]。Boodhai 等^[15]的报道中，患者在首次入院时接受静脉注

射万古霉素治疗 9 d 无任何不良反应，再次引入该药后 3 d 出现重度血小板下降。Hameed 等^[16]报道了 1 例 74 岁男性，有 2 型糖尿病、阿尔茨海默病和中风病史，因脓毒症入住 ICU，应用万古霉素后患者的 PLT 从 $400 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 显著下降到 $70 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，停药后 PLT 改善。

结合患者用药史及药品特征等，根据国家药品不良反应检测中心制订的《药品不良反应报告和监测工作手册》中关联性评价标准及诺氏评估^[17]结果（具体见表 2），万古霉素导致该患者重度血小板减少症的可能性为“很可能”。

表 2 万古霉素致患者重度血小板减少症的诺氏评估结果

相关问题	Naranjo 评分			万古霉素		
	是	否	未知	是	否	未知
1. 以前是否有关于此种不良反应确定的研究报告	1	0	0	1		
2. 此种不良反应是否发生于服药后	2	-1	0	2		
3. 当停药或服用此药之解药，不良反应是否减轻	1	0	0	1		
4. 停药一段时间再重新服用此药，同样的不良反应是否再度发生	2	-1	0			0
5. 有没有其他原因（此药物以外）可以引起同样的不良反应	-1	2	0	-1		
6. 当给予安慰剂时，此不良反应是否再度发生	-1	1	0			0
7. 此药物的血中毒是滞达到中毒剂量	1	0	0	1		
8. 对此患者而言，药物剂量与不良反应的程度是否是正向关系	1	0	0			0
9. 患者过去痛去同样或类似药物是否也产生同样的不良反应	1	0	0			0
10. 此项不良反应是否有客观的证据证明是药物所引起	1	0	0	1		
总分				5		

注：判断结果分为 4 级，依次为“可疑”（总分 ≤ 0），“可能”（总分 1 ~ 4 分），“很有可能”（总分 5 ~ 8 分），“确定”（总分 ≥ 9 分）。

2.2.2 血小板减少症发生机制及处置 万古霉素致 DIT 是一种药源性血液系统不良反应，两项回顾性研究^[18-19]显示其发病率分别为 5.9% 和 7.1%，与用药时间有一定相关性，多发生在用药后 1 ~ 2 周，表现为皮肤瘀斑或出血点，消化道出血、肺出血，严重者可出现致死性脑出血^[19-20]。目前，大多学者推测 DIT 主要通过免疫机制致血小板减少症发生，研究显示，患者首次使用万古霉素后，刺激机体产生特异性万古霉素依赖性 IgG 或 IgM 抗体，再次接触万古霉素时，体内已存在的抗体被诱导并与血小板膜糖蛋白 II b/III a 结合形成复合物，引起血小板结构破坏和功能丧失，出现血小板计数降低和出血倾向等^[21-22]。Mohammadi 等^[23]建议综合评估万古霉素替代治疗方案或直接停药，同时输注血小板，应用糖皮质激素类药物如强的松 1 ~ 2 mg/(kg · d) 或等效价的其他糖皮质激素类药物、静脉注射免疫球蛋白 2 g/(kg · d) 等处理，效果不佳者可考虑进行血浆置换，联合使用利妥昔单抗 375 mg · m⁻²，每周 1 次，疗程 4 周。该患者血小板从入院的 $303 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 降至 $3 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，为重度血小板减少症，且伴有皮肤瘀斑等出血倾向。与管床医师沟通考虑腰椎骨存在感染病灶，抗感染治疗疗程不足。临床药师综合评估后，建议：立即停用万古霉素，加用克林霉素注射抗感染治疗；地塞米松注射（10 mg iv qd）联合免疫球蛋白

（20 g ivgtt qd）免疫治疗，密切监测血常规，关注血小板变化；视情况输注新鲜血小板。临床医师采纳并执行。3 d 后，该患者皮肤瘀斑基本消散，复查 PLT、CRP 等进一步改善，遂停用地塞米松注射液及免疫球蛋白。d27 复查血常规示 PLT 稳定，拟带药出院治疗。门诊随诊复查血常规示 PLT $365 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，治疗效果较好。

3 小结

在本案例中，临床药师通过收集、整理和分析病情变化，当出现万古霉素 TDM 超限量时警惕不良反应发生；监测肾功能、血常规，发现症状和感染指标好转与 PLT 急速下降相互矛盾，同时患者出现皮肤瘀斑，结合 TDM 推断可能的万古霉素致 DIT；分析继续抗感染的必要性，并及时更换抗菌药物，予输注升血小板药物等治疗，同时监测凝血功能、肝肾功能和出血迹象。临床药师充分发挥自身专业优势，参与诊疗过程，通过 TDM 监测和不良反应监护，协助调整治疗方案，避免了严重的不良反应，取得了良好的治疗效果，体现了临床药师的价值。

参考文献

[1] Brown NM, Brown EM. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK [J]. J Antimicrob Chemoth, 2021, 76 (6): 1377-1378.

- [2] Cao B, Tan TT, Poon E, et al. Consensus statement on the management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia in Asia [J]. *Clin Respir J*, 2014, 9 (2): 129-142.
- [3] 万古霉素临床应用中国专家共识 (2011 版) [J]. *中国新药与临床杂志*, 2011, 30 (8): 561-572.
- [4] Abdalhadi H, Fahmawi Y, Das A, et al. Life-threatening intrapulmonary hemorrhage due to vancomycin-induced thrombocytopenia: a case report [J]. *Case Rep Crit Care*, 2020, 2020: 8890335.
- [5] Li XX, Wang GR, Li C, et al. Severe thrombocytopenia caused by vancomycin in the intensive care unit: a case report [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 829267.
- [6] 王敏, 许顺姬, 金春梅, 等. 血培养阳性报警时间对临床病原菌鉴别的探讨 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27 (3): 528-531.
- [7] He N, Su S, Ye Z, et al. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin: 2020 update by the division of therapeutic drug monitoring, Chinese pharmacological society [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71 (Suppl 4): S363-S371.
- [8] 王建祥, 张奉春, 刘晓清, 等. 中国成人血小板减少症诊疗专家共识 [J]. *中华内科杂志*, 2020, 59 (7): 498-510.
- [9] 中国成人血小板减少症急诊管理共识专家组. 中国成人血小板减少症急诊管理专家共识 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2022, 31 (2): 161-168.
- [10] Priziola JL, Smythe MA, Dager WE. Drug-induced thrombocytopenia in critically ill patients [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38 (6 Suppl): S145-154.
- [11] 秦伟, 王晓雪, 杜雯雯, 等. 药源性血小板减少症的研究进展 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17 (5): 577-580.
- [12] Vayne C, Guéry EA, Rollin J, et al. Pathophysiology and diagnosis of drug-induced immune thrombocytopenia [J]. *J Clin Med*, 2020, 9 (7): 2212.
- [13] Guleng SR, Wu RH, Guo XB. Vancomycin-induced thrombocytopenia in endocarditis: a case report and review of literature [J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9 (7): 1696-1704.
- [14] Getz TM, Packer CD. Rapid-onset vancomycin-induced thrombocytopenia with reexposure [J]. *Ann Pharmacother*, 2019, 53 (12): 1259-1261.
- [15] Boodhai B, Maharaj A, Rodriguez CA, et al. Re-exposure causing rapid onset of vancomycin induced thrombocytopenia [J]. *IDCases*, 2022, 27: e01398.
- [16] Hameed M, Alamri S, Almustanyir S. A rare case of vancomycin-induced immune thrombocytopenia [J]. *Cureus*, 2022, 14 (3): e23328.
- [17] Gerstein W, Colombo E, Harji F. Documented vancomycin-induced severe immune-mediated thrombocytopenia [J]. *BMJ Case Rep*, 2018, 2018: bcr2018224682.
- [18] Moenster RP, Linneman TW, Finnegan PM, et al. Daptomycin compared to vancomycin for the treatment of osteomyelitis: a single-center, retrospective cohort study [J]. *Clin Ther*, 2012, 34 (7): 1521-1527.
- [19] Marinho DS, Huf G, Ferreira BL, et al. The study of vancomycin use and its adverse reactions associated to patients of a Brazilian university hospital [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4: 236.
- [20] 陈静静, 钱佩佩, 曹凯, 等. 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析 [J]. *中国药事*, 2020, 34 (8): 988-992.
- [21] Von Drygalski A, Curtis BR, Bougie DW, et al. Vancomycin-induced immune thrombocytopenia [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356 (9): 904-910.
- [22] 张金红, 余林芳, 侯微, 等. 万古霉素致血小板减少症的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (15): 1607-1612.
- [23] Mohammadi M, Jahangard-Rafsanjani Z, Sarayani A, et al. Vancomycin-induced thrombocytopenia: a narrative review [J]. *Drug Safety*, 2017, 40 (1): 49-59.

(收稿日期: 2022-10-12; 修回日期: 2023-01-06)

中南药学审稿专家

(按姓名笔画排序)

丁劲松	丁 骁	丁莉坤	丁惠萍	于世慧	于海洋	马恩龙	马健雄	马瑞娟	王 玉
王立辉	王永军	王亚平	王 成	王 刚	王启斌	王 玮	王明仲	王春江	王 珊
王 赵	王 洪	王莉宁	王 峰	王淑梅	王朝辉	王 颖	文晓柯	文 锐	方平飞
方伟进	尹 桃	尹 焯	孔令提	孔维军	邓远雄	邓桂明	邓 晟	甘 勇	左笑丛
龙勤强	卢海儒	叶喜德	申月明	田雪松	史志华	白 勇	冯宇飞	冯炜炜	冯 星
冯素香	边 原	吕永宁	朱运贵	朱志红	朱荣华	朱 虹	朱 斌	伍参荣	向大雄
刘小伟	刘艺平	刘文虎	刘文辉	刘玉峰	刘芳群	刘丽华	刘应蛟	刘 宏	刘宏飞
刘茂柏	刘 畅	刘建平	刘剑敏	刘 娜	刘艳芳	刘晓慧	刘高峰	刘海林	刘梦扬
刘 检	刘 敏	刘塔斯	刘雁鸣	刘 斌	刘新义	刘 韶	江俊麟	江翊国	汤正义
汤海峰	许 喆	孙万阳	孙丙军	孙平华	孙 进	孙国祥	孙晓慧	孙铁民	孙 逸
严建业	劳海燕	苏 丹	苏玉文	苏薇薇	杜恩明	李文龙	李 芬	李 昕	李顺祥
李语玲	李 勇	李晓宇	李晓晖	李健和	李 娟	李乾斌	李 爽	李湘平	李新刚
杨志平	杨 波	杨树龙	杨星钢	杨 琳	杨献文	肖轶雯	肖贵南	肖 雪	肖朝江
吴成军	吴 昊	吴昊妹	邱玉玲	邱 宏	何江江	何 艳	何鸽飞	余自成	余 娜
谷福根	邹振兴	宋 程	张 川	张水寒	张 永	张永杰	张毕奎	张军民	张 岗
张妙红	张纯刚	张 凭	张奕之	张 俐	张洪文	张 峻	张程亮	阿卜杜拉·玉苏普	
陈 力	陈卫东	陈 平	陈四保	陈礼峰	陈志永	陈志高	陈 英	陈国宁	陈治军
陈勇川	陈 琦	陈富超	陈 鹏	奉建芳	范国荣	林小伟	林丽美	林 菁	杭永付
易小清	罗开忠	罗 兰	罗 聪	金 卓	金 锐	金鹏飞	周冬初	周 权	周志旭
周 晋	郑杭生	郑稳生	屈 建	屈 健	孟宪生	赵龙山	赵立波	赵志刚	赵春杰
赵剑锋	赵 亮	赵家宏	赵 娣	赵瑞芝	赵 鹏	胡彦武	胡 楠	柳 芳	柳鹏程
段现来	段宣初	姜志平	姜 茹	姜 敏	姜 雷	姜德建	娄月芬	官 建	祝德秋
贺 敏	秦红岩	秦绪军	袁 成	袁红梅	袁志翔	袁 易	贾王平	贾素洁	夏彬彬
夏道宗	原永芳	原海燕	柴 琴	倪 赞	徐文峰	徐必学	徐 珽	徐 硕	高会乐
高利臣	高德民	郭代红	郭 韧	郭怀忠	郭建军	郭海彪	郭 智	唐 芳	黄云峰
黄壮壮	黄 芳	黄 勋	黄胜阳	黄振鹏	梅升辉	曹东升	曹仕鹏	曹 伟	曹 玲
曹 蔚	龚力民	常福厚	麻兵继	章越凡	梁光平	梁 海	寇龙发	隋 峰	巢志茂
彭文兴	彭再梅	彭 亮	葛宇清	董亚琳	董得时	董德刚	蒋云生	蒋利和	蒋受军
蒋兴华	蒋孟良	蒋 倩	蒋跃平	蒋德旗	韩立峰	韩晓芳	韩晓鹏	覃 丽	程汝滨
程 军	程忠哲	傅 强	舒 畅	鲁 琼	曾贵荣	温金华	谢 诚	谢奕丹	蒲位凌
蒙光义	睢大笈	蔡天革	蔡 宇	蔡洪鲲	蔡骅琳	裴 奇	廖端芳	廖德华	谭红胜
谭胜蓝	谭朝阳	肇丽梅	翟 青	缪明星	樊启猛	黎 苏	黎 敏	颜 苗	潘卫三
潘宏春	潘 昊	薄 涛	魏高文	魏 博					



科技期刊世界影响力指数 (WJCI) 报告 (2022)

收录证书

This is certificate for

中南药学

(ISSN 1672-2981 CN 43-1408/R)

to be indexed in

*World Journal Clout Index(WJCI) Report of
Scientific and Technological Periodicals(2022)*

项目联合研发单位 Project research units:

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition)

Electronic Publishing House Co.Ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals