



# 中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第2期(总第217期) 2024年2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》编辑部

发行：湖南省报刊发行局

印刷：长沙建华印务有限公司

订阅：全国各地邮局

定价：每期 30.00 元，全年 360.00 元

邮编：410011

电话：(0731) 82258487/84895602

传真：(0731) 82258487

邮发代号：42-290

投稿网址：<http://znyx.cbpt.cnki.net>

email：[znyxzz2003@vip.163.com](mailto:znyxzz2003@vip.163.com)

广告经营许可证：4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2024 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

## 蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

- (279) 蒙药材质量标准及质量控制方法的研究进展  
..... 徐嘉璠, 韩子璇, 陶晓倩, 等
- (286) 蒙药文冠木配方颗粒指纹图谱及含量测定研究  
..... 刘梦, 韩子璇, 杨立茹, 等
- (291) 蒙药角茴香配方颗粒指纹图谱及含量测定研究  
..... 韩子璇, 刘梦, 杨立茹, 等

## 研究论文

- (296) 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的三种基原溪黄草及其干预小鼠肝纤维化的血清化学研究 ..... 覃萍, 苏阳静, 陈永苗, 等
- (302) 在体单向肠灌注模型测定甘草素的药物渗透性及生物药剂学分类预测 ..... 汪凯康, 贾文, 丁文华, 等
- (307) 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷 / 栀子苷对 PM<sub>2.5</sub> 暴露致血管内皮功能障碍的干预作用及其机制  
..... 孙欠欠, 张行行, 赵麓, 等
- (315) 基于 UPLC 特征图谱的苦杏仁、桃仁及甜杏仁药材鉴别研究  
..... 叶聪, 谢翡翡, 李国卫, 等
- (322) 香附的化学成分及其体外抗炎活性研究  
..... 韩建卫, 孙延平, 杨炳友, 等
- (329) 基于血清代谢组学分析人参化橘红干预慢性阻塞性肺疾病的代谢机制 ..... 钟鹏英, 张玉超, 张芳华, 等
- (335) 灰毡毛忍冬 *bZIP25* 基因的克隆及其表达模式分析  
..... 王珊, 曾娟, 谢瑜, 等
- (341) 奥氮平对乳腺癌相关巨噬细胞增殖与分化功能的影响  
..... 孟娟, 李东辉, 高元慧, 等
- (347) 负载 3-甲基腺嘌呤介孔二氧化硅的制备与释药性能研究  
..... 韩卓越, 王秀, 巫业振, 等
- (352) 龙眼肉多糖对 A $\beta$  诱导耐受的小胶质细胞吞噬功能的影响及其机制  
..... 赵晨阳, 崔鹤蓉, 岳德琼, 等
- (358) UPLC-Q-TOF-MS/MS 法快速鉴定加味八珍益母膏化学成分  
..... 王英力, 杨欣欣, 李天娇, 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 朱荣华 向大雄 刘 娜  
刘 韶 刘文虎 刘艺平 刘芳群  
刘茂柏 刘建平 刘高峰 刘塔斯  
刘雁鸣 汤海峰 孙 进 孙平华  
孙国祥 孙铁民 劳海燕 苏薇薇  
李 昕 李 勇 李文龙 李文莉  
李顺祥 李晓宇 李健和 李湘平  
杨志平 杨星钢 杨献文 肖 雪  
肖贵南 何 丹 何江江 何鸽飞  
余自成 谷福根 张 俐 张 峻  
张毕奎 张洪文 陈 力 陈 琦  
陈 碧 陈卫东 陈西敬 陈勇川  
武新安 范国荣 金鹏飞 周 权  
屈 建 孟宪生 赵立波 赵志刚  
姜志平 姜德建 姜月芬 宫 建  
祝德秋 秦红岩 袁 成 袁 易  
贾素洁 夏道宗 原永芳 徐 珽  
徐 萍 徐必学 徐华丽 高利臣  
郭 韧 郭怀忠 郭建军 唐 芳  
曹 玲 常福厚 章越凡 巢志茂  
彭文兴 董亚琳 董得时 蒋孟良  
覃 丽 傅 强 温金华 谢 诚  
谢奕丹 睢大箕 肇丽梅 翟 青  
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

- (368) 不同基原淫羊藿和巫山淫羊藿药材的化学成分差异研究  
..... 田祥木, 李天娇, 李强, 等
- (376) 红花注射液生物活性测定法的建立与评价研究  
..... 刘金辉, 梁耀月, 田颖颖, 等
- (383) 基于电子鼻技术结合网络药理学分析半夏不同炮制品的气味差异标志物  
..... 杨靖涵, 高杰, 孙立丽, 等
- (392) 基于网络药理学和动物实验探讨桃红四物汤抗缺血性脑卒中的分子机制  
..... 王艺霖, 孟祥国, 叶宇航, 等
- (399) 连翘种子品质检验及质量分级标准研究  
..... 邹晨鑫, 彭毅丹, 刘亦欣, 等
- (404) 茯神裂环羊毛甾烷型化学成分研究  
..... 邓子怡, 郁阳, 李莉, 等
- (409) 蔷薇红景天总黄酮提取物对  $A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及其活性部位筛选  
..... 刘忠毅, 王启文, 阿孜古丽·阿里木, 等
- (416) 基于网络药理学和实验验证探讨藤黄酸抑制膀胱癌的作用及机制  
..... 陈瑞琦, 熊洪, 刘宏伟
- (423) 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联合网络药理学及分子对接研究五味清浊颗粒治疗腹泻药效物质基础和作用机制  
..... 李伟, 孙佳, 李思雨, 等
- (433) pH 值对氟马西尼注射液质量的影响研究  
..... 郭丹峰, 金怡平, 肖利辉, 等

## 综述

- (437) 萸环类药物引发心脏毒性的研究进展 ..... 李薇, 徐晓红
- (445) 药用植物内生菌促药效成分生物合成的研究进展  
..... 曹际钊, 都晓伟, 李倩, 等
- (453) 青蒿素类化合物抗肿瘤作用机制研究进展 ..... 盛思晗, 沈征武
- (459) 衢枳壳主要化学成分及药效学作用和机制研究进展  
..... 李锦荣, 陈国玉, 虞立, 等
- (466) 中药防治乙型病毒性肝炎作用机制研究进展  
..... 李盼盼, 张凯悦, 呼欣怡, 等
- (473) 基于真实世界数据的药品临床综合评价研究进展  
..... 程瑶瑶, 宋沧桑, 李兴德, 等
- (477) miRNAs 对食管癌发生发展的影响及中医药的干预作用  
..... 李晨辉, 彭孟凡, 孔小莉, 等

## 药物分析与检验

- (483) 蒙药三子散多指标成分的含量测定  
..... 许佳琦, 刘妍妍, 白云霞, 等

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 骁 于世慧 王 刚 王 洪  
王春江 方伟进 孔维军 朱志红  
刘 宏 刘心如 刘丽华 刘宏飞  
刘剑敏 刘梦扬 孙 逸 孙万阳  
孙丙军 孙晓慧 苏 丹 杜恩明  
李 丹 李 娟 李语玲 李新刚  
肖朝江 吴成军 邱玉玲 何 艳  
邹振兴 张 弘 张 凭 张妙红  
张纯刚 张程亮 陈 倩 陈 璐  
陈国宁 陈富超 呼庆勋 罗 聪  
金 锐 周志旭 赵 亮 赵 娣  
胡 楠 姜 雷 贾王平 徐 硕  
徐文峰 郭海彪 黄 芳 黄亚辉  
梅升辉 龚力民 梁光平 寇龙发  
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。

- (489) 高效液相色谱法测定地氯雷他定口服膜的溶出度和溶出曲线  
..... 李国相,车颜婷,高迪,等
- (494) 不同处方美沙拉秦(噁)肠溶片中相关杂质的分析  
..... 吴琦琦,刘轶,周明,等
- (499) 维胺酯原料药的有关物质分析 ..... 李钰鑫,兰文,刘雁鸣
- (504) 高效液相色谱法测定新型促性腺激素释放激素拮抗剂 LPM7100328 原料药中的有关物质 ..... 李丽霞,王旭东,马树芝,等
- (509) 麻石清肺合剂 HPLC 指纹图谱的建立及 7 种成分含量测定  
..... 王博,吴茱萸,裴媛,等

## 药物与临床

- (514) 低分子肝素致血小板增多症的临床特点分析  
..... 彭理,何阳,樊志强,等
- (519) 氨基葡萄糖的药品临床快速综合评价  
..... 孔维崧,贾婷婷,张立超

## 医院药学

- (526) 地中海贫血造血干细胞移植患儿霉酚酸药时曲线下面积及药物不良反应影响因素分析 ..... 牛露露,伍云,黄天敏,等
- (532) 2022 年北京冬奥会延庆赛区定点医院药学服务体系的构建与实践  
..... 马康,纪永军,王新歌,等
- (537) 基于数据挖掘探讨《类证治裁》治疗淋浊的用药规律  
..... 马干辉,赵佳柱,祝雨辰,等

## 临床药师在临床

- (543) 临床药师参与 1 例新型抗肿瘤药物洛拉替尼致血脂异常的药学实践  
..... 李杨,梁灿华,蒙光义,等

## 药事管理

- (548) 陕西省药物临床试验机构现状分析  
..... 张娟利,刘美佑,樊婷婷,等

[本刊基本参数] CN43-1408/R\*2003\*b\*A4\*274\*zh\*P\*30.0\*44\*2024-2

本期责任编辑: 陆窈窕, 彭金飞, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

---

---

# CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 2 February 20 2024

---

## Consultant

ZHOU Hong-hao

## Editor-in-Chief

LI Huan-de

## Chief of Editorial Office

ZHANG Bi-kui

## Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

## Directed by

Food and Drug Administration of  
Hunan Province

## Edited by

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

## Tel

(0731) 82258487/84895602

## Fax

(0731) 82258487

## Website of Authors

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

## Email

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

## Published by

Central South Pharmacy  
Publishing House

## Advertisement Publishing

### Certification

4300004000764

## CONTENTS IN BRIEF

- (279) Research progress in quality standards and quality control of Mongolian medicinal herbs ..... *XU Jia-fan, HAN Zi-xuan, TAO Xiao-qian, et al*
- (286) Fingerprint and content determination of Mongolian medicine *Xanthoceras sorbifolia* formula granules ..... *LIU Meng, HAN Zi-xuan, YANG Li-ru, et al*
- (291) Fingerprint and content determination of Mongolian medicine hycoum formula granules ..... *HAN Zi-xuan, LIU Meng, YANG Li-ru, et al*
- (296) Chemical constituents in three origins of *Rabdosia serra* and their administration serum analysis in hepatic fibrosis mice based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS ..... *QIN Ping, SU Yang-jing, CHEN Yong-miao, et al*
- (302) Determination of drug permeability and biopharmaceutical classification of liquiritigenin in vivo by unidirectional intestinal perfusion model ..... *WANG Kai-kang, JIA Wen, DING Wen-hua, et al*
- (307) Intervention of baicalin/geniposide on vascular endothelial dysfunction caused by PM<sub>2.5</sub> exposure and its mechanism based on 5-LOX signaling pathway ..... *SUN Qian-qian, ZHANG Hang-hang, ZHAO Lu, et al*
- (315) Identification of *Armeniaca Semen Amarum*, *Persicae Semen* and sweet apricot kernel materials based on UPLC characteristic chromatograms ..... *YE Cong, XIE Fei-fei, LI Guo-wei, et al*
- (322) Chemical constituents of *Cyperi Rhizoma* and their anti-inflammation activities ..... *HAN Jian-wei, SUN Yan-ping, YANG Bing-you, et al*
- (329) Mechanism of Ginseng-Chemotaxis intervention in COPD based on the serum metabolomics ..... *ZHONG Peng-ying, ZHANG Yu-chao, ZHANG Fang-hua, et al*
- (335) Cloning and expression pattern of *bZIP25* transcription factor from *Lonicera macranthoides* ..... *WANG Shan, ZENG Juan, XIE Yu, et al*
- (341) Effect of olanzapine on the proliferation and differentiation of breast cancer-associated macrophages ..... *MENG Juan, LI Dong-hui, GAO Yuan-hui, et al*
- (347) Preparation and release properties of 3-methyladenine mesoporous silica ..... *HAN Zhuo-yue, WANG Xiu, WU Ye-zhen, et al*

**Postal code**

42-290

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

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

**CSSN**

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2024 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.

- (352) **Effect and mechanism of longan aril polysaccharides on phagocytosis of  $A\beta$ -induced tolerant microglia**  
..... ZHAO Chen-yang, CUI He-rong, YUE De-qiong, et al
- (358) **UPLC-Q-TOF-MS/MS for rapid identification of chemical components in Jiawei Bazhen Yimu ointment**  
..... WANG Ying-li, YANG Xin-xin, LI Tian-jiao, et al
- (368) **Differences in chemical compositions of different basal herbs of epimedium and Wushan epimedium**  
..... TIAN Xiang-mu, LI Tian-jiao, LI Qiang, et al
- (376) **Establishment and evaluation of a bioactivity assay for Safflower injection**  
..... LIU Jin-hui, LIANG Yao-yue, TIAN Ying-ying, et al
- (383) **Odor differential markers for different processed products of *Pinelliae Rhizoma* by electronic nose combined with network pharmacology**  
..... YANG Jing-han, GAO Jie, SUN Li-li, et al
- (392) **Molecular mechanism of Taohong Siwu decoction against ischemic stroke based on network pharmacology and animal experiment**  
..... WANG Yi-lin, MENG Xiang-guo, YE Yu-hang, et al
- (399) **Quality test and quality grading standard for *Forsythia suspensa* seeds**  
..... ZOU Chen-xin, PENG Yi-dan, LIU Yi-xin, et al
- (404) ***Seco-lanostane* constituents from *Poria cum Pini Radix***  
..... DENG Zi-yi, YU Yang, LI Li, et al
- (409) **Protective effect of total flavonoids extract of *Rhodiola rosea* L. on  $A\beta_{25-35}$  induced PC12 cell damage and screening of active parts**  
..... LIU Zhong-yi, WANG Qi-wen, Aziguli Alimu, et al
- (416) **Role and mechanism of gambogic acid in inhibiting bladder cancer based on network pharmacology and experimental verification**  
..... CHEN Rui-qi, XIONG Hong, LIU Hong-wei
- (423) **Pharmacodynamic substance basis and mechanism of Wuwei Qingzhuo granules for diarrhea based on combination of UPLC-Q-TOF-MS/MS with network pharmacology and molecular docking**  
..... LI Wei, SUN Jia, LI Si-yu, et al
- (433) **Effect of pH value on the quality of flumazenil injection**  
..... GUO Dan-feng, JIN Yi-ping, XIAO Li-hui, et al
- (437) **Research advance in cardiotoxicity induced by anthracyclines**  
..... LI Wei, XU Xiao-hong
- (445) **Research progress in effects of endophytes from medicinal plants on promoting biosynthesis of medicinal components**  
..... CAO Ji-zhao, DU Xiao-wei, LI Qian, et al
- (453) **Advances in the mechanism of antitumor activity of artemisinin and its derivatives** ..... SHENG Si-han, SHEN Zheng-wu
- (459) **Pharmacological effects of *Quzhou Aurantii Fructus* extract and its active components and related mechanism**  
..... LI Jin-rong, CHEN Guo-yu, YU Li, et al



- (466) **Research progress in mechanism of traditional Chinese medicine for viral hepatitis B** ..... *LI Pan-pan, ZHANG Kai-yue, HU Xin-yi, et al*
- (473) **Research progress in clinical comprehensive drug evaluation based on real world data** ..... *CHENG Yao-yao, SONG Cang-sang, LI Xing-de, et al*
- (477) **Impact of miRNAs on the development of esophageal cancer and intervention role of traditional Chinese medicine**  
..... *LI Chen-hui, PENG Meng-fan, KONG Xiao-li, et al*
- (483) **Determination of multi-index components in Mongolian medicine Sanzi powder** ..... *XU Jia-qi, LIU Yan-yan, BAI Yun-xia, et al*
- (489) **Determination of dissolution and dissolution profile of desloratadine oral soluble film by HPLC** ... *LI Guo-xiang, CHE Yan-ting, GAO Di, et al*
- (494) **Related impurities in different prescriptions of mesalazine enteric-coated tablets** ..... *WU Qi-qi, LIU Yi, ZHOU Ming, et al*
- (499) **Residual substances in viaminat raw materials**  
..... *LI Yu-xin, LAN Wen, LIU Yan-ming*
- (504) **Determination of related substances in the raw materials of novel GnRH antagonist LPM7100328 by HPLC**  
..... *LI Li-xia, WANG Xu-dong, MA Shu-zhi, et al*
- (509) **Fingerprints of Mashi Qingfei mixture and content determination of 7 components** ..... *WANG Bo, WU Zhu-yu, PEI Yuan, et al*
- (514) **Clinical characteristics of thrombocytosis induced by low molecular weight heparin** ..... *PENG Li, HE Yang, FAN Zhi-qiang, et al*
- (519) **Rapid clinical comprehensive evaluation of glucosamine**  
..... *KONG Wei-song, JIA Ting-ting, ZHANG Li-chao*
- (526) **Factors influencing the area under the concentration-time curve of mycophenolic acid and adverse drug reactions in children with thalassemia after hematopoietic stem cell transplantation**  
..... *NIU Lu-lu, WU Yun, HUANG Tian-min, et al*
- (532) **Construction and practice of pharmaceutical service system of designated hospitals in Yanqing District of Olympic Winter Games Beijing 2022**  
..... *MA Kang, JI Yong-jun, WANG Xin-ge, et al*
- (548) **Current situation of drug clinical trial institutions in Shaanxi province**  
..... *ZHANG Juan-li, LIU Mei-you, FAN Ting-ting, et al*

## 蒙药传统汤散剂剂型改良研究专题

## 【编者按】

蒙医药是我国四大民族药之一，理论基础独特，在制剂、炮制工艺上也有很强的民族特色。散剂是蒙药最常见的剂型，具有原材料廉价易得、制备简单、疗效好、吸收快的特点。但蒙药散剂主要是原药材打粉直接口服，具有味苦、对咽及食道有刺激、吞咽困难等缺点，导致患者依从性差，尤其不利于儿童患者用药。本项目对传统蒙药剂型进行优化，制备符合蒙医临床理论、便于随方调配的新型蒙药配方颗粒，对蒙药现代化发展具有重要意义。本专栏主要对蒙药有关制剂进行综述，报告蒙药配方颗粒的相关研究，旨在为传统蒙药制剂的优化改良提供参考。

## 【专题主持人简介】



张纯刚，男，博士，中医学博士后，辽宁中医药大学副教授，硕士研究生导师。主要研究方向为化药仿制药、改良型新药和创新新药、中药、民族药及保健品研发。主持国家自然科学基金、省级重点研发计划及各类基金 6 项。发表论文 60 余篇，其中 SCI 收录 16 篇。以第一发明人申请发明专利 15 项，授权 4 项（其中国际专利 2 项）。作为编委出版全国规划教材 7 部。第三届“中医药社杯”高等学校中药学专业青年教师教学设计大赛三等奖；指导“创青春”辽宁省大学生创业大赛创业计划竞赛项目获得铜奖。入选辽宁省高层次人才，辽宁省“百千万人才工程”千层次，沈阳市高层次人才拔尖人才，沈阳市中青年科技创新人才，2022 年辽宁省首届优秀研究生导师团队等。

## 蒙药材质量标准及质量控制方法的研究进展

徐嘉璠<sup>1</sup>，韩子璇<sup>1</sup>，陶晓倩<sup>1</sup>，王提<sup>1</sup>，程岚<sup>1</sup>，康廷国<sup>1\*</sup>，张纯刚<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁大连 116620; 2. 长治医学院药学院，山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司，内蒙古 赤峰 024330)

**摘要：**蒙药材质量稳定是保证蒙医药长久发展的首要前提。建立科学、完善的药材质量标准不仅可以保证临床用药的安全、有效，可为后续蒙药制剂的生产提供稳定的质量保证。本文对历版蒙药材及饮片质量标准的主要内容进行对比总结，阐述蒙药材标准的变化历程；总结蒙药材质量标准及现代分析技术中常见的质量控制方法；并对质量标准中存在的问题进行分析讨论，为推动蒙药标准化、现代化发展提供参考。

**关键词：**蒙药材；质量标准；质量控制；研究进展

中图分类号：R284.1

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2024)02-0279-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.001

## Research progress in quality standards and quality control of Mongolian medicinal herbs

XU Jia-fan<sup>1</sup>, HAN Zi-xuan<sup>1</sup>, TAO Xiao-qian<sup>1</sup>, WANG Ti<sup>1</sup>, CHENG Lan<sup>1</sup>, KANG Ting-guo<sup>1\*</sup>, ZHANG Chun-gang<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

**基金项目：**内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204); 2022 年辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (No.X202210162058)。

**作者简介：**徐嘉璠，女，在读本科生，email: Xujiafan202306@163.com \*通信作者：康廷国，男，博士研究生导师，教授，主要从事中药鉴定研究工作，email: kangtg@lnutcm.edu.cn; 张纯刚，男，硕士研究生导师，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究，email: gaogaoui123@163.com

**Abstract:** The stable quality of Mongolian medicine herbs is the prerequisite for the long-term development of Mongolian medicine. Establishing scientific and comprehensive quality standards for Mongolian medicine herbs can ensure not only the safety and effectiveness of clinical medication, but also stable quality of subsequent production of Mongolian medicine preparations. The article summarized the main content of the quality standards for Mongolian medicinal herbs and decoction pieces in the past versions, and elaborated the changes in the standards for Mongolian medicinal herbs. The article also summarized the quality standards of Mongolian medicinal herbs and common quality control methods in modern analytical techniques, and analyzed existing problems to provide reference for the standardization, modernization and development of Mongolian medicine.

**Key words:** Mongolian medicinal herb; quality standard; quality control; research progress

蒙医药是我国四大民族医药之一，是蒙古族几千年来的经验积累与文化遗产，具有极强的民族特色，可分为萌芽、形成、发展和现代蒙药四个阶段<sup>[1]</sup>。蒙医吸收汉、藏等民族的医药学经验理论，尤善外伤、骨伤的治疗，并创有独特的灸疗、马奶疗法等<sup>[2]</sup>。蒙医学著作《认药白晶鉴》将药物分为石类、珍宝类、本草类等七大类，并记载每味药物的产地、形态、性味、功能、炮制方法等，被誉为蒙药的奠基篇<sup>[3]</sup>。

近年来，包括蒙药在内的民族药理学稳步发展。蒙医药因其疗效显著逐渐被大众认可，目前生产配制的蒙药制剂已达几千种<sup>[4]</sup>。但由于蒙药材基原混杂难溯源、发展的投入及人才储备不足，现行的蒙药材标准仍处于较低的水平<sup>[5]</sup>，阻碍了蒙医药的现代化、标准化发展。因此，本文分析

蒙药材质量标准及质量控制方法的研究现状，并讨论目前蒙药材质量标准中存在的问题，以期为提高蒙药材质量控制水平、完善蒙药材质量标准提供思路。

### 1 蒙药材的质量标准研究现状

药品质量标准的制定与实施，是一个医药体系质量控制水平最直观的体现。在蒙药不断发展的过程中，蒙药材的质量标准也随之更新与完善。截至目前，有关部门共颁布 7 版蒙药材相关质量标准及炮制规范，历版蒙药材质量标准总结见表 1。现行蒙药材质量标准为《中华人民共和国卫生部药品标准》蒙药分册、2020 版《内蒙古蒙药饮片炮制规范》<sup>[6]</sup>和 2021 版《内蒙古蒙药材标准》。

表 1 蒙药材质量标准的历史沿革

Tab 1 Historical evolution of quality standards for Mongolian medicinal herbs

时间	标准名称	收录情况	特点
1986 年	《内蒙古蒙药材标准》(1986 年版)	收载品种 322 个，包括植物药 222 种，动物药 40 种，矿物药 44 种，其他类 16 种	少数有鉴别项，全部药材均无含量测定
1998 年	《中华人民共和国卫生部药品标准》蒙药分册	收载蒙成药 144 种，药材 57 种	收载药材中的 24 种蒙药材具有鉴别项，全部蒙药材均无含量测定
2015 年	《内蒙古蒙药材炮制规范》(2015 年版)	收载蒙药饮片 178 个品种规格，涉及蒙药材 78 种，其中与《中国药典》(2015 年版) 收录交叉 45 种	非交叉的 33 种蒙药材中，18 种有定性鉴别，12 种有含量测定
2015 年	《内蒙古蒙药材标准》(增补版)	收载蒙药材 51 种	其中 17 种蒙药材有含量测定
2017 年	《内蒙古蒙药材炮制规范》(增补版)	收载蒙药饮片 300 个品种规格，涉及蒙药材 192 种，其中与《中国药典》(2015 年版) 收录交叉 175 种	非交叉的 17 种蒙药材中，13 种有定性鉴别，8 种有含量测定
2020 年	《内蒙古蒙药饮片炮制规范》(2020 年版)	收载蒙药饮片 720 个品种规格，涉及蒙药材 408 种，其中与《中国药典》(2020 年版) 交叉 229 种，蒙药专属品种 170 种；颁布后同时废止收载于 2015 年版和 2017 年增补版中的同品种蒙药饮片标准	非交叉的 170 种蒙药材中，72 种有薄层定性鉴别，62 种有含量测定
2021 年	《内蒙古蒙药材标准》(2021 版)	收载蒙药材 420 种，其中与《中国药典》(2020 年版) 收录交叉 184 种；颁布后同时废止 1986 年版及 2015 年增补版中的同品种蒙药饮片标准	非交叉的 236 种蒙药材中，123 种有定性鉴别，73 种有含量测定



纵观蒙药材质量标准颁布时间可发现, 1998 年至 2015 年蒙药材质量标准的修订几乎处于空白状态。在此期间, 市场流通的蒙药饮片及蒙药制剂原药材多处于无法可依的状态。许多工厂只能依靠经验或老旧标准生产, 造成饮片及成方制剂质量的不稳定<sup>[7]</sup>。2015 年后, 在国家政策的推动下, 逐渐恢复对蒙药材质量标准的修订, 并首次颁布蒙药材炮制规范, 较好地规范了蒙药材在市场的流通情况, 为蒙药制剂在原料层次的质量控制提供参考。

现行的 3 部标准已收载蒙药材 420 种, 炮制饮片 720 个品种规格, 可在一定程度上满足生产制备的需求。1986 年颁布的第一部《内蒙古蒙药材标准》只对药材的外观性状进行简单描述, 几乎没有对药材进行定性、定量分析。而在《内蒙古蒙药材标准》(2021 版) 中, 近半数蒙药专属药

材的质量标准有定性分析, 73 种蒙药专属药材有定量分析。由此可见, 虽然蒙药材质量标准发展缓慢, 仍处于较低水平, 但较前几版已有很大提升。此外, 蒙医临床常用原粉入药, 在最新版的炮制规范中, 除包含了 362 个蒙医特殊炮制饮片品种外, 还收载了粉末饮片, 使之更贴合蒙医临证调剂、灵活施药的诊疗特点。

## 2 蒙药材的质量控制方法研究现状

### 2.1 蒙药材质量标准中的质量控制方法

目前, 蒙药材的质量控制采用传统经验与化学成分分析相结合的质量控制模式。质量标准的主要内容分为“性状-鉴别-检查-(浸出物)-含量测定-性味归经-功能主治-用法用量-贮藏”几部分, 其中“鉴别-检查-含量测定”与药材质量控制关系最为密切。蒙药材质量标准收录的质量控制方法有关总结见表 2。

表 2 蒙药材质量标准中的质量控制方法

Tab 2 Quality control methods in the quality standards of Mongolian medicinal herbs

检查项	植物药	动物药	矿物药	其他(树脂、真菌等)
鉴别	薄层鉴别、显微鉴别、理化性质鉴别、特征图谱、聚合酶链式反应法等	外观、薄层鉴别、显微鉴别、理化性质、聚合酶链式反应法等	薄层鉴别、理化性质鉴别、红外分光光度法等	薄层鉴别、理化性质鉴别、紫外-可见分光光度法、气相色谱法、挥发油测定法等
检查	杂质、水分、总灰分、酸不溶性灰分、重金属、有机氯类农药残留量、二氧化硫残留量、砷盐、元素形态及价态测定法、酸碱值、过氧化值、干燥失重、炽灼残渣、水可溶物、酸可溶物、氯化物、卤化物、体积比、吸水量等			
含量测定	高效液相色谱法、挥发油测定法、气相色谱法、紫外-可见分光光度法、高效液相色谱-质谱法	氮测定法、高效液相色谱法、气相色谱法	滴定法、紫外-可见分光光度法、原子吸收分光光度法、理化性质测定	高效液相色谱法、气相色谱法、挥发油测定法

### 2.2 现代分析技术在蒙药材质量控制中的应用

在现代分析技术的发展与支持下, 更多符合天然药物特性、对样品类型限制小、灵敏度高的现代分析方法逐渐应用到蒙药材鉴定、含量测定、检查等方面。

#### 2.2.1 指纹图谱技术在蒙药材质量控制中的应用

中药指纹图谱技术是目前药材质量控制中最常见的分析技术。可尽可能多地表达蒙药材的复杂化学体系, 更加全面地反映蒙药材的整体鉴别点<sup>[8]</sup>。目前指纹图谱技术常与成分含量测定、一测多评法、化学模式识别、化学轮廓色谱法等分析统计方法结合。可更好地分析同科不同种、同种不同产地、不同生长周期药材的特征成分与含量的差异, 更加全面地评价药材质量的优劣。指纹图谱技术在蒙医特色药材质量控制中的应用案例见表 3。

化学模式识别可帮助分析大量数据, 适用于不同批次间药材的分类与比对, 筛选差异色谱峰从而客观评价药材质量<sup>[36]</sup>; 化学轮廓色谱法则适

用于混用、代用药材的区分, 通过对比同一色谱条件下不同种药材指纹图谱的相似度, 分析两者化学成分种类及含量的差异。

#### 2.2.2 DNA 条形码鉴定技术在蒙药材质量控制中的应用

一些同属、种的植物药或来源相近的动物药很难通过化学成分区分。DNA 分子条形码技术是以 DNA 等分子特征作为遗传标记开发的各类中药分子鉴定的方法, 不受样品种类、药材部位、生长阶段的限制, 样品需求量低、准确可靠, 现已被纳入 2020 年版《中国药典》<sup>[37]</sup>。根据条形码片段长度的不同, 可分为 300 bp 以下的微型条形码、400 ~ 800 bp 的标准条形码及全基因组条形码。微型条形码可用于 DNA 发生严重降解的实验材料分析, 更适用于炮制后药材的鉴定; 全基因组的宏条形码则更适用于成分复杂的中成药的鉴别<sup>[38]</sup>。

目前蒙药材鉴定中植物药常用的 DNA 序列有 ITS2 序列<sup>[39-40]</sup>、*rbcL* 序列<sup>[41-42]</sup>、*psbA-trnH* 序列、*matK* 序列; 动物药常用的 DNA 序列有 COI

表 3 指纹图谱技术在蒙医特色药材质量控制中的应用

Tab 3 Fingerprint technology in quality control of Mongolian specialty medicine

方法	药材	用途	参考文献
高效液相色谱指纹图谱	蜀葵子、肋柱花、苦苣菜、玉簪花	对同种药材进行的整体性质量评价, 对比不同批次间药材相似度, 反映药材差异	[9-12]
结合多成分含量测定	尖叶假龙胆、多叶棘豆、漏芦花	全面评价药材质量, 对比不同批次间药材含量, 明确药材质量优劣	[13-15]
结合一测多评法	文冠木、蓝盆花	适用于对照品价格较高或不易获得的药材	[16-17]
结合化学模式识别	小秦艽花、蓝刺头、山苦菜、北点地梅、山川柳、紫花高乌头、悬钩子木、万年蒿、藜芦、文冠木、刺柏叶、牛胆粉	将不同批次的药材按相似度进行分类, 筛选出引起质量差异的色谱峰, 客观评价药材质量	[18-29]
结合化学轮廓法	龙胆科植物、齿缘草、小白蒿	探究同科异种或异科异种但化学成分相似的药材间化学信息的特征及差异	[30-32]
气相指纹图谱	瑞香狼毒花、山沉香	适用于有效成分多为挥发性的药材的指纹图谱建立	[33-34]
薄层指纹图谱	尖叶假龙胆	通过药材与对照品成分的薄层色谱对比, 定性鉴别药材种类	[35]

序列<sup>[43]</sup>、ITS2 序列等。一种药物可采用多种 DNA 序列鉴定, 但不同序列的鉴别能力有差异, 木其尔<sup>[44]</sup>对 14 种铁线莲属植物的 ITS2、*rbcL*、*psbA-trnH*、*matK* 四种序列进行 PCR 扩增及测序, 比较不同序列的种间种内的变异关系, 发现 ITS2 序列适于探究铁线莲的同源关系, *rbcL* 序列更适于铁线莲种间药材的鉴别。

**2.2.3 光谱、波谱技术在蒙药材质量控制中的应用** 蒙医药是使用矿物药种类最多的民族医药体系之一<sup>[45]</sup>,《内蒙古蒙药材标准》(2021 版)收录的矿物药约占收录总数的 11%。一种矿物常与其他矿物伴生, 如雄黄、雌黄, 仅依靠简单的外观观察, 无法准确区分<sup>[46]</sup>。近红外光谱(NIR)、拉曼光谱可通过分析各元素的特征谱线来鉴别物质的元素和化学组成, 对于矿物药这类外形相似, 但元素、晶型差异明显的药物来说尤为适用<sup>[47-48]</sup>。

X 射线衍射法(XRD)利用射线通过晶体的衍射效应形成衍射图谱, 可反映药材的物质组成、晶型等方面的信息, 达到鉴别药材真伪的目的<sup>[49]</sup>。XRD 具有较高的专属性, 相比于 NIR 和拉曼光谱, 更适用于同品种或混淆品种间的矿物类蒙药鉴别。潘发波等<sup>[50]</sup>对不同产地的阳起石生品与炮制品进行 XRD 分析, 建立了阳起石的物相图谱, 分析市售不同产地阳起石的内在质量及杂质含量。药用矿物属于地质学中的岩矿, 可借鉴岩矿鉴定体系, 将 XRD 技术与偏光显微特征相结合, 分别对麦饭石、白石英的偏光显微特征、物相组成及其相对含量进行分析, 建立两者的 X 射线衍射指纹图谱<sup>[51-52]</sup>。

**2.2.4 高分辨色谱在蒙药材质量控制中的应用** 高分辨质谱技术具有高通量、高选择性、高灵敏度的

分析特点, 可在单次分析中鉴别复杂混合物中的痕量级成分、筛查确认未知化合物, 在中药化学成分鉴定、中药代谢组学的研究及有害成分检测等方面均有应用<sup>[53]</sup>。毒性成分、农药残留、重金属等有害成分在药材中的含量往往较低, 检测时可采用分辨率较高、检测限较低的高分辨质谱法<sup>[54]</sup>。

电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)是一种元素检测方法, 可同时对多种元素和同位素进行分析测定, 适用于药物中杂质元素的分析, 在多个国家的药典中均有收录<sup>[55]</sup>。闫婧等<sup>[56]</sup>利用 ICP-MS 技术检测藤黄药材中铅、镉、砷、汞、铜 5 种重金属成分的含量, 结果显示药材中 5 种重金属元素的含量均在合格限度范围内, 铜检测的质量浓度范围最大, 在  $0 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 汞检出限最低为  $0.007 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另有研究对 X 射线荧光光谱法(XRF)和 ICP-MS 两种技术在蒙药重金属含量检测方面进行对比研究, 结果发现两种方法均能准确测定样品中 8 种重金属元素含量, XRF 比 ICP-MS 更加简单、快速、无损<sup>[57]</sup>。

### 3 蒙药材质量标准现存问题分析

#### 3.1 蒙药材基原复杂难统一

蒙医药是一门以人用经验与历史记载为主要依据传承发展的科学。早期蒙医药传承多以口授、亲缘相传为主, 使得蒙药材同名异物、同物异名、同功不同源的情况十分常见<sup>[4]</sup>。如“甘达嘎日”本草考证以“蔷薇科库页悬钩子 *Rubus sachalinensis* Lévl. 的干燥茎”为正品, 但在内蒙古部分地区及药材市场中有将功效相似的忍冬科接骨木、毛接骨木作为“甘达嘎日”代用或将同名异物的蔷薇科华北珍珠梅误用为“甘达嘎日”的现象<sup>[58]</sup>。

此外, 部分药材在中、蒙医的用法及药用部



位也有一定差异。传统中药秦艽是龙胆科植物秦艽的干燥根,而蒙医多使用秦艽的地上部分,如小秦艽花、基力哲等<sup>[59-60]</sup>。朱顺娟等<sup>[61]</sup>对小秦艽不同入药部位的指标成分的含量进行分析,发现小秦艽的花和根在獐芽菜苷、异荭草苷、异牡荆苷 3 种指标性成分的含量上有显著差异。

### 3.2 蒙药材炮制方法多且混乱

蒙药临床多为药材原粉入药,且动物类、矿物类的药物应用较多,对于一些性猛、服用不便、功效不顺或有毒的药物,常需炮制后服用。蒙药材炮制方法多样,且有极具民族特色的奶制、酸奶制、诃子汤制、黄油制等<sup>[62]</sup>。同种药材,因炮制目的、地区、时代的不同,炮制方法有差异;且当炮制目的相同时,同种药材也有多种不同的炮制方法<sup>[63]</sup>。瑞香狼毒常见的减毒方法有醋制、诃子汤制、奶制、童便制等 7 种,虽都可达到减毒效果,却尚未有明确说明哪一种效果更好<sup>[64]</sup>。

### 3.3 蒙药材物质基础研究较浅

目前蒙药材质量标准仍处于较低水平,尤其蒙药专属药材的基础研究有待提高。现行《内蒙古蒙药材标准》(2021 版)中 236 种为蒙药专属药材,定性鉴别中采用薄层鉴别方法的约占专属性药材的 29%;定量鉴别中采用 HPLC 检测方法的约占专属性药材的 17%。与《中国药典》(2020 年版)交叉部分相比(薄层鉴别占交叉总数的 85%,HPLC 检测占交叉总数的 46%),有较大差距。

同时,一些蒙药专属性药材尚无表征其内在质量的指标性成分,而对于规定了指标性成分的部分蒙药材,指标性成分的专属性与生物活性较低<sup>[65]</sup>。根据《内蒙古饮片炮制规范》(2020 年版),蒙药水柏枝、河柏、西河柳均为柽柳科不同种植物的干燥嫩枝,除河柏以没食子酸为指标成分外,其他两种药材暂无规定<sup>[6]</sup>。但没食子酸存在于同科属的多种植物中,以没食子酸为指标成分能否体现其种间差异还需进一步研究探讨<sup>[66]</sup>。目前蒙药材标准中多为单一指标成分的检验,如黄花铁线莲在《内蒙古蒙药材标准》(2021 版)中含量测定指标成分为槲皮素。但研究发现,黄花铁线莲中的木犀草苷、金丝桃苷等其他黄酮类成分也具有抗炎、镇痛的效果,因此单一成分能否有效反映药材质量尚需进一步研究验证<sup>[67]</sup>。

## 4 中药质量控制思路在蒙药材中的应用

### 4.1 质量标志物(quality marker, Q-marker)在蒙药材质量控制中的应用

Q-marker 是指存在于中药材和中药产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂)

中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质<sup>[68]</sup>。当前蒙药材存在基础研究薄弱、指标成分缺乏特征性、质控指标单一、与药效关联度低等问题。而蒙药 Q-marker 要求在蒙医理论指导下,以少量代表性成分的定性、定量表征蒙药材的整体质量及生物效应<sup>[69]</sup>。在筛选过程中不仅要具有“特征性、专属性、可传递性”,更应保证其临床的有效性。

蒙药材霞日森登为无患子科植物文冠木的干燥茎枝,杨洋等<sup>[69]</sup>采用 HPLC 指纹图谱和一测多评法同时测定其中 7 种 Q-marker 的含量,并通过聚类分析、主成分分析验证结果,发现两种方法均可用于文冠木的含量测定。廖翠平等<sup>[70]</sup>在预测葶苈 Q-marker 时从基原植物的特征成分、功效关联成分、炮制前后变化差异成分、代谢组学特殊成分、复方药物配伍等多方面进行综合分析,建议将生物碱类和挥发油类作为总成分 Q-marker 的备选物质。也有学者<sup>[71]</sup>将新的临床用途加入综合分析中,使筛选的 Q-marker 更加具有代表性。

### 4.2 代谢组学在蒙药材质量控制中的应用

代谢组学是指对生物在外界条件刺激下的代谢物整体进行定性、定量分析。其“整体-动态-综合-分析”的理念与中医药的整体观念具有一致性<sup>[72]</sup>。代谢组学借助质谱技术表征药材自身化学成分、入血活性成分的整体差异,将质量控制的指标性成分与药效作用相关联,提升指标成分的专属性。吴超<sup>[73]</sup>在筛选香青兰 Q-marker 时,应用高灵敏度、高分辨率的液质联用技术对药材提取物及入血后不同时段血清中的化学成分进行分析,结果显示田蓟苷、木犀草素、金合欢素等黄酮类成分为香青兰主要的化学成分及活性物质。

此外,代谢组学还可应用于药材不同产地、品种、药用部位、炮制加工方法等的差异性分析。利用化学计量学等统计学方法,对代谢组学产生的大量数据进行整理,筛选出重要的差异代谢物,可为药材的质量评价提供科学依据<sup>[74]</sup>。郭云<sup>[75]</sup>对 3 属 6 种蒙古野生豆科药用植物的根和叶中的酚类化合物含量进行测定,并对各种植物及不同部位的初级代谢产物进行全面分析,不仅揭示了酚类化合物与初级代谢产物间的关系,还详尽分析出不同种及不同部位间化合物及代谢产物的差异,为多叶棘豆等野生豆科植物的开发与利用提供依据。

中药质量标准经过多年的发展形成了较为完善的质量控制体系,形成“以整体观为基础,成分-药效-质量为核心”的全过程质量控制体系,将是蒙药材质量控制未来的发展方向。

## 参考文献

- [1] 巴·吉格木德. 蒙医药学史概述——四个发展阶段[J]. 中国民族医药杂志, 2007(1): 1-5.
- [2] 月亮, 吴双玉, 孟和宝鲁. 论蒙药的起源与发展[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(2): 125.
- [3] 朱小玲. 蒙药的发展历史与研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 667-670.
- [4] 涂守东, 鲍劲松. 浅谈蒙药发展现状及存在的问题[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(7): 55-57.
- [5] 李佳川, 何晓磊, 徐新, 等. 蒙药的现代研究概况与发展思考[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2019, 45(3): 272-277.
- [6] 那生桑. 内蒙古蒙药饮片炮制规范: 2020 年版[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2021.
- [7] 佟海英, 魏立新, 奥·乌力吉, 等. 蒙药标准化的现状和存在问题及对策[J]. 医药导报, 2019, 38(4): 452-455.
- [8] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.
- [9] 杨慧娟. 蜀葵子的化学成分及质量标准研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2020.
- [10] 孙兴姣, 席琳图雅, 那生桑, 等. 蒙药肋柱花 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1703-1707.
- [11] 杨非凡, 张亚妮, 武媛媛, 等. 不同产地抱茎苦苣菜的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1097-1104, 1109.
- [12] 李慧芳, 王敏杰, 朱贺年. 蒙药材玉簪花指纹图谱研究[J]. 中国医药导报, 2017, 14(13): 34-37.
- [13] 张闯, 刘卫哲, 董倩波, 等. 基于 HPLC 指纹图谱研究和多成分含量测定的尖叶假龙胆药材的质量评价研究[J]. 河北中医药学报, 2022, 37(3): 48-52.
- [14] 刘洋, 岳鑫, 王晓琴. 基于高效液相色谱指纹图谱的多叶棘豆指标成分的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(20): 2050-2053.
- [15] 吴东兴, 文花, 白玉霞, 等. 蒙药漏芦花 HPLC 指纹图谱及 4 种有效成分的含量测定研究[J]. 北方药学, 2021, 18(8): 19-22.
- [16] 李珍, 杨洋, 徐萌杰, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价文冠木药材的质量[J]. 中国药房, 2022, 33(18): 2245-2249.
- [17] 娜仁图雅, 籍学伟, 韩塔娜, 等. 蒙药材蓝盆花指纹图谱及一测多评含量测定方法研究[J]. 中国药事, 2020, 34(2): 184-194.
- [18] 张秀艳, 温爱平, 王晓琴. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别法对蒙药小秦艽花的质量评价[J]. 中药材, 2023, 46(1): 144-149.
- [19] 罗爱勤, 曹颖男, 钟春燕. 蓝刺头药材总黄酮的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国饲料, 2023, 717(1): 114-119.
- [20] 孙丽君, 王玉华, 李瑞娟, 等. 山苦苣高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2021, 30(13): 64-67.
- [21] 王鑫晶, 王建娜, 萨仁高娃, 等. 蒙药点地梅 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 98-102.
- [22] 钮松召, 崔颖, 卢菲, 等. 蒙药山川柳的 HPLC 指纹图谱建立、相似度评价和聚类分析[J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1091-1094.
- [23] 赵小梅, 杨志军, 袁文珺, 等. 蒙药紫花高乌头 HPLC 指纹图谱及生物碱含量测定[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(22): 2776-2782.
- [24] 刘贝女. 蒙药材悬钩子木特征图谱及多糖的分离、纯化和免疫调节活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- [25] 徐森. 万年蒿质量标准的建立及模式识别研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.
- [26] 郭晶晶, 包温根其其格, 哈斯娜布琪, 等. 中药藜芦与蒙药阿格希日嘎的指纹图谱评价及其急性毒性比较[J]. 中草药, 2017, 48(15): 3175-3181.
- [27] 阿拉木斯, 孟克吉日嘎拉, 李建良, 等. 不同生长期蒙药文冠木质量分析[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(12): 997-1004.
- [28] 吴珊珊, 徐瑞, 林燕. 不同来源刺柏叶及其易混淆品种的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(4): 46-50.
- [29] 石岩, 郑天骄, 魏锋, 等. 牛胆粉指纹图谱模式识别及多组分测定研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2487-2492.
- [30] 王美丽, 韩九林, 王青虎, 等. 3 种龙胆科蒙药及其混淆品的化学轮廓比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(9): 170-173, 254-255.
- [31] 永强, 斯日古冷, 萨仁高娃, 等. 蒙药齿缘草及混淆品的化学轮廓及镇痛抗炎作用比较研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2023, 38(1): 70-78.
- [32] 龙梅, 娜布其, 王青虎, 等. 蒙药小白蒿及其混淆品化学轮廓比较研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(10): 58-62.
- [33] 白丽. 瑞香狼毒花药材质量标准及抗虫活性研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2021.
- [34] 包小妹, 鞠爱华, 布仁, 等. 蒙药山沉香普通粉与超微粉气相色谱指纹图谱的研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 810-813.
- [35] 李玉华, 刘晶晶, 李景清, 等. 尖叶假龙胆薄层色谱特征图谱及高效液相指纹图谱的研究[J]. 中国药品标准, 2021, 22(3): 259-264.
- [36] 刘媚琪. 基于指纹图谱结合化学模式识别的中药(鹅不食草、锦灯笼)综合质量评价研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [37] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1902.
- [38] 邹何元, 吴文如, 陆亚茹, 等. 近年来 DNA 微型条形码和 DNA 宏条形码在中药鉴定中的应用[J]. 中药材, 2023(8): 2101-2108.
- [39] 赵玥, 王光函, 张颖, 等. 基于 ITS2 序列的火绒草药材分子鉴定研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(12): 1509-1514.
- [40] 赵日杂, 张英秀, 王君军, 等. 基于 DNA 条形码鉴别缘毛紫菀及狭苞紫菀[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6167-6173.
- [41] 陈玉花, 撒切尔, 肖田梅, 等. 蒙药蜀葵花 HPLC 指纹图谱及 rbcL 序列分子鉴定研究[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5607-5612.
- [42] 陈香梅, 王胡格吉乐图, 勤勤, 等. 蒙药悬钩子木的 rbcL 序列分析[J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(2): 168-171.



- [43] 刘旭朝. 水牛角、地龙药材 DNA 条形码鉴定研究及动物药材 DNA 提取方法优化研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [44] 木其尔. 4 种铁线莲属植物 DNA 条形码分子鉴定及棉团铁线莲指纹图谱研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2020.
- [45] 郭海燕, 李荣, 李莎, 等. 矿物药质量标准研究现状及思考 [J]. 中药材, 2022, 45 (3): 511-515.
- [46] 韩斯琴高娃, 李楠, 薛兰, 等. 拉曼光谱技术结合主成分分析-支持向量机对神类矿物药的分类识别研究 [J]. 分析科学学报, 2022, 38 (2): 224-228.
- [47] 陈龙, 袁明洋, 陈科力. 常见矿物药近红外漫反射光谱特征归纳与分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (19): 3528-3536.
- [48] 韩斯琴高娃, 阿木古楞, 王士燕, 等. 基于拉曼光谱技术结合 PCA-SVM 算法对含汞矿物药的分类识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38 (4): 1815-1818.
- [49] 王晓玲, 王子明, 付艺莹, 等. 现代仪器方法在中药分析检测中的应用进展 [J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2022, 48 (2): 156-165.
- [50] 潘发波, 杨胜琴, 张龙静, 等. 矿物药阳起石炮制前后 X 射线衍射分析 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15 (7): 80-84.
- [51] 吴思澄, 马瑜璐, 杨文国, 等. 矿物药麦饭石偏光显微特征及其 X 射线衍射指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (13): 166-172.
- [52] 徐晨昱, 赵倩, 刘圣金, 等. 矿物药白石英优质矿产资源筛选及 XRD Fourier 指纹图谱研究 [J]. 中国现代中药, 2022, 24 (6): 1033-1041.
- [53] 杨细蒙, 黄茜, 郝慧欣, 等. 高分辨质谱技术在农药残留分析中的应用研究进展 [J]. 北方农业学报, 2023, 51 (1): 85-92.
- [54] 周熙, 罗辉泰, 赖晓娜, 等. 高分辨质谱技术在中药分析中的应用研究进展 [J]. 分析测试学报, 2022, 41 (9): 1410-1418.
- [55] 李丽敏, 周如洁, 曹帅, 等. 电感耦合等离子体质谱法在不同药典中的方法体系和在中药无机成分研究中的应用进展 [J]. 理化检验 (化学分册), 2021, 57 (7): 665-672.
- [56] 闫婧, 马静, 赵梦中, 等. 基于微波消解 ICP-MS 法对蒙药材藤黄中 5 种重金属元素含量测定 [J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26 (5): 38-40.
- [57] Gao L, Di DH, Liu XJ, et al. Comparative study of heavy metals analysis in mongolian medicines based on high sensitivity X-ray fluorescence spectroscopy and ICP-MS [J]. Spectroscopy, 2022, 37 (7): 20-27.
- [58] 勤勤, 布日额, 陈香梅. 蒙药甘达嘎日的本草考证 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27 (10): 70-72.
- [59] 彭美晨, 艾晓辉. 秦艽花化学成分、药理作用及其临床应用的研究进展 [J]. 中农药学, 2021, 19 (6): 1243-1249.
- [60] 红霞. 蒙药基力哲的显微鉴别 [J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18 (3): 32.
- [61] 朱顺娟, 王小鹏, 卢建龙, 等. 小秦艽花和根中指标性成分含量比较研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42 (4): 20-24.
- [62] 张磊, 郭文芳, 梁慧, 等. 基于数据挖掘蒙古族药传统炮制方法与辅料用法规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (16): 3988-3996.
- [63] 吕颖, 张海涛, 郭文芳, 等. 论传统蒙古族药炮制的继承与发展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (13): 2742-2747.
- [64] 白小红, 包文双, 胡和珠拉, 等. 蒙药瑞香狼毒炮制对其化学成分、毒效影响概况 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39 (5): 624-630.
- [65] 董玉. 基于质量标志物的蒙药质量标准体系建设 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (1): 56-59.
- [66] 张梦焱, 德吉, 陈道峰, 等. 水柏枝化学成分、药理活性和质量标准研究进展 [J]. 药学研究, 2023, 42 (2): 73-81.
- [67] 刘婷, 李红娇, 孙兴姣, 等. HPLC 同时测定蒙药材黄花铁线莲中 4 种黄酮含量 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (10): 1365-1368.
- [68] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47 (9): 1443-1457.
- [69] 杨洋, 李珍, 乔向东, 等. 结合化学识别模式的霞日森登质量标志物研究 [J]. 中国药事, 2023, 37 (4): 404-413.
- [70] 廖翠平, 葛莎莎, 阿拉坦朝鲁门, 等. 葶苈的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (19): 5182-5192.
- [71] 赵鹿, 廖翠萍, 杨秀娟, 等. 诃子的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中草药, 2020, 51 (10): 2732-2744.
- [72] 毕跃峰, 王云雨, 张芳平, 等. 表观遗传学和代谢组学在中药研究中的应用 [J]. 中草药, 2020, 51 (19): 4837-4845.
- [73] 吴超. 基于血清药物化学的香青兰药材质量标志物的确认及其时-空累积规律分析 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [74] 田淑云, 廖朝华, 周紫薇, 等. 植物代谢组学在药材质量评价中的应用研究进展与展望 [J]. 药学学报, 2022, 57 (6): 1734-1749.
- [75] 郭云. 应用代谢组学研究内蒙古 6 种豆科药用植物的代谢基础 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.

(收稿日期: 2023-10-18; 修回日期: 2023-12-01)

## 蒙药文冠木配方颗粒指纹图谱及含量测定研究

刘梦<sup>1</sup>, 韩子璇<sup>1</sup>, 杨立茹<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 程岚<sup>1\*</sup>, 张纯刚<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药学院, 山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司, 内蒙古 赤峰 024330)

**摘要:** **目的** 建立蒙药文冠木配方颗粒的高效液相色谱方法指纹图谱及指标成分的含量测定, 为评价蒙药文冠木配方颗粒的质量提供参考。**方法** 色谱柱: COSMOSIL 5C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 建立 15 批蒙药文冠木配方颗粒指纹图谱, 同时对 14 种成分进行含量测定。**结果** 建立了蒙药材文冠木配方颗粒的指纹图谱, 相似度均大于 0.900, 共标定了 21 个共有峰, 指认了其中 14 种成分, 并对指认的成分进行含量测定。**结论** 建立的指纹图谱及含量测定方法准确, 稳定性好, 可为蒙药材文冠木配方颗粒的质量控制提供参考。

**关键词:** 蒙药; 文冠木; 指纹图谱; 含量测定; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0286-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.002

### Fingerprint and content determination of Mongolian medicine *Xanthoceras sorbifolia* formula granules

LIU Meng<sup>1</sup>, HAN Zi-xuan<sup>1</sup>, YANG Li-ru<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, CHENG Lan<sup>1\*</sup>, ZHANG Chun-gang<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

**Abstract: Objective** To establish a fingerprint and determine the content of index components of Mongolian medicine *Xanthoceras sorbifolia* formula granules by high performance liquid chromatography (HPLC), to provide a reference for the quality evaluation of Mongolian medicine *Xanthoceras sorbifolia* formula granules. **Methods** COSMOSIL 5C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used. The column temperature was 30 °C. The mobile phase was consisted of acetonitrin-0.1% phosphoric acid, a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>, and a detection wavelength was 270 nm. **Results** The fingerprint of *Xanthoceras sorbifolia* was established, with the similarity higher than 0.900. Totally 21 common peaks were identified and 14 components were confirmed. The content of 14 components were determined. **Conclusion** The fingerprint and content determination method is accurate and stable, which provides a reference for the quality control of Mongolian medicine *Xanthoceras sorbifolia* formula granules.

**Key words:** Mongolian medicine; *Xanthoceras sorbifolia*; fingerprint pattern; content determination; cluster analysis

文冠木为无患子科植物文冠 (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) 的干燥茎枝, 蒙药名为“森登等<sup>[1]</sup>”。文冠木性凉、涩, 味甘、微苦, 具有祛

**基金项目:** 内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 国家重点研发计划项目 (No.2018YFC1706903); 中医脏象理论及应用国家重点实验室一般项目 (No.zyx1809); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204); 辽宁中医药大学校级自然科学重点项目 (No.2021LZY047)。

**作者简介:** 刘梦, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型、新技术研究, email: 2569639951@qq.com \* **通信作者:** 程岚, 女, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究, email: sychenglan@163.com; 张纯刚, 男, 硕士研究生导师, 副教授, 主要从事中药新剂型、新技术、体内药物分析研究和保健食品开发研究, email: gaogaonii123@163.com

风除湿, 消肿止痛, 敛干黄水的功效, 临床上常用于治疗风湿性关节炎、风湿内热及皮肤湿热等<sup>[2]</sup>。现代药理发现文冠木具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和保护血管等作用<sup>[3]</sup>。文冠木在临床上的治疗范围涵盖了巴达干症、赫依症、关节炎、各类热症、丹毒等病症, 疗效显著, 同时也是“森登-4 味汤”“文冠木十味汤”“云香十五味丸”的常用药, 拥有悠久的用药历史<sup>[2]</sup>。但目前关于蒙药文冠木的药典介绍及文献研究都不够全面, 因此, 本研究建立指纹图谱和含量测定的 HPLC 方法, 并对其中 14 种指标成分进行含量测定研究, 以期对蒙药材文冠木二次开发利用及药典标准的提升提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

SHIMADZULC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 包括四元泵、UV 紫外检测器、Lab Solution 工作站); CP225D 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; SG3300H 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); Y-2 摇摆制粒机(上海天和制药机械有限公司); WGL-230B 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

对照品没食子酸(批号: 110831-201906, 纯度 $\geq 91.5\%$ )、儿茶素(批号: 110877-201604, 纯度 $\geq 99.2\%$ )、表儿茶素(批号: 110878-201703, 纯度 $\geq 99.2\%$ )、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG, 批号: 112072-202101, 纯度 $\geq 98.0\%$ )、鞣花酸(批号: 111959-201903, 纯度 $\geq 88.8\%$ )、芦丁(批号: 100080-202012, 纯度 $\geq 91.6\%$ )(中国食品药品检定研究院); 二氢杨梅素(批号: DSTSDE001201, 纯度 $\geq 98.0\%$ , 乐天美医药); 没食子儿茶素(批号: CRN1039)、表没食子儿茶素(批号: CRN0842)、二氢槲皮素(批号: CRN0451)、杨梅素(批号: CRN2642)、槲皮苷(批号: CRN0353)、槲皮素(批号: CRN1117)、柚皮素(批号: CRN0343)(纯度 $\geq 98.0\%$ , 湖北萃园生物科技股份有限公司)。乙腈(瑞典欧森巴克化学公司, 色谱纯), 甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯), 磷酸(上海润捷化学试剂有限公司), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司), 文冠木药材细粉(批号 WGM1 ~ WGM15, 祈蒙股份有限公司), 经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定为无患子科植物文冠(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) 的干燥茎枝。

## 2 方法与结果

### 2.1 蒙药文冠木配方颗粒的制备

称取 200.00 g 文冠木细粉(过 100 目), 加入适量辅料混合均匀, 采用湿法制粒, 选择水作为润湿剂, 将黏度适中、混合均匀的软材利用摇摆制粒机(14 目筛)制成湿颗粒, 后将其置于 60℃ 的烘干箱中干燥, 照粒度和粒度分布测定法(通则 0928 第二法双筛分法)测定, 得到 15 批文冠木配方颗粒(S1 ~ S15)置于阴凉处备用。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: COSMOSIL 5C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(1~6 min, 10%~13%A; 6~11 min, 13%A; 11~25 min, 13%~20%A; 25~40 min, 20%~40%A; 40~50 min, 40%A; 50~60 min, 40%~10%A); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 270 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30℃。

### 2.3 溶液的制备

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称定对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声(100 W, 频率 40 kHz, 下同) 15 min, 放冷至室温, 加甲醇定容, 配制没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、EGCG、二氢杨梅素、鞣花酸、芦丁、二氢槲皮素、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、柚皮素校正浓度分别为 120.00、157.00、1315.00、320.00、252.00、150.00、186.00、105.00、100.00、100.00、100.00、67.00、150.00、250.00 μg·mL<sup>-1</sup> 的单一对照品储备液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 取 15 批蒙药文冠木配方颗粒适量, 研细, 精密称取约 0.500 g, 置于 10 mL 量瓶中, 精密称定, 加 90% 甲醇适量, 超声 30 min, 放冷至室温, 用 90% 甲醇定容, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.3.3 混合对照品溶液的制备** 精密称取各单一对照品储备液适量, 加甲醇配制为校正质量浓度分别为 4.80、18.37、153.40、28.67、64.75、6.06、30.00、5.25、3.92、11.57、5.40、7.14、15.00、4.30 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液, 于 4℃ 保存, 待用。

### 2.4 指纹图谱的建立

**2.4.1 参照物峰的选择** 表儿茶素(8 号峰)在 15 批样品中图谱中分离度好, 稳定性较优, 故选其作为色谱参照物峰, 以计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。



**2.4.2 稳定性试验** 取同一批文冠木配方颗粒 (S1) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 计算各个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*。结果 15 批样品中的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值均  $\leq 2.0\%$ , 表明供试品在室温下放置 24 h 稳定性良好<sup>[4]</sup>。

**2.4.3 精密度试验** 取同一批文冠木配方颗粒 (S1) 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算各个共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD*。结果 15 批样品共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值均  $\leq 1.4\%$ , 表明仪器精密度良好<sup>[5]</sup>。

**2.4.4 重复性试验** 按“2.3.2”项下方法制备 6 份文冠木配方颗粒 (S1), 进样检测, 计算得到 15 批样品共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值均  $\leq 1.7\%$ , 表明该方法重复性良好<sup>[6]</sup>。

**2.4.5 指纹峰的指认** 按“2.3.2”项下方法制备供试品, 按“2.2”项下色谱条件检测, 记录色谱图, 与混合对照品色谱图比对保留时间, 共指认 14 个共有峰, 见图 1。

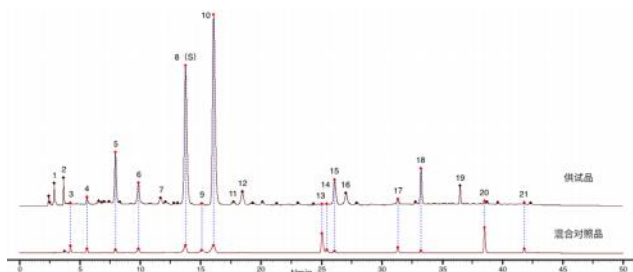


图 1 文冠木配方颗粒中色谱峰指认

Fig 1 Chromatographic peak identification of Xanthoceras sorbifolia formula particles

3. 没食子酸 (gallic acid); 4. 没食子儿茶素 (gallocatechin); 5. 表没食子儿茶素 (epigallocatechin); 6. 儿茶素 (catechin); 8. 表儿茶素 (1-epicatechin); 9. EGCG (epigallocatechin gallate); 10. 二氢杨梅素 (dihydromyricetin); 13. 鞣花酸 (ellagic acid); 14. 芦丁 (rutin); 15. 二氢槲皮素 (dihydroquercetin); 17. 槲皮苷 (quercitrin); 18. 杨梅素 (myricetin); 20. 槲皮素 (quercetin); 21. 柚皮素 (naringenin)

**2.4.6 指纹图谱的建立** 制备 15 批文冠木配方颗粒供试品溶液, 进样检测, 记录色谱图。利用《中药指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 对色谱图进行分析, 以 S1 为参照图, 采用平均数法, 经多点校正后, 进行 Mark 峰匹配, 系统生成 15 批配方颗粒的色谱图和对照图谱, 标定 21 个共有峰, 并与混合对照品的色谱图对比, 指认 14 个色谱峰, 分别为没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、EGCG、二氢杨梅素、鞣花酸、芦丁、二氢槲皮素、槲皮苷、杨梅素、槲皮素、柚皮素。15 批文冠木配方颗粒

指纹图谱见图 2。

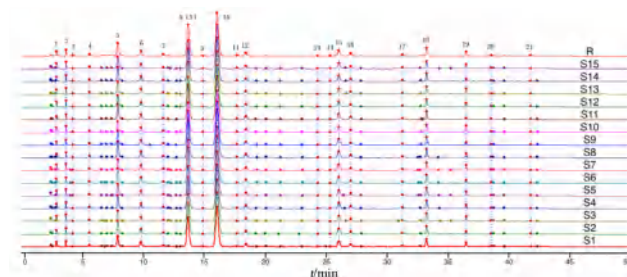


图 2 15 批文冠木配方颗粒指纹图谱

Fig 2 Fingerprint of 15 batches of Xanthoceras sorbifolia formula particles

**2.5 15 批蒙药文冠木配方颗粒含量测定**

**2.5.1 专属性考察** 取混合对照品储备液、90% 甲醇 (空白溶剂) 及供试品溶液适量, 进样检测, 记录色谱图见图 3, 14 个色谱峰峰形良好, 无杂峰干扰, 表明本方法专属性较强<sup>[7]</sup>。

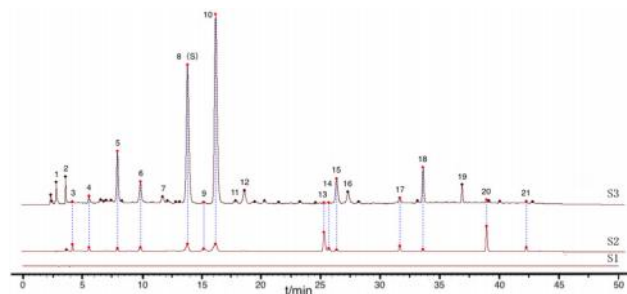


图 3 文冠木配方颗粒指纹图谱专属性考察

Fig 3 Specific test for fingerprint of Xanthoceras sorbifolia formula particles

S1. 甲醇 (空白溶剂) [methanol (blank solvent)]; S2. 混合对照品 (mixed control); S3. 供试品 (sample)

**2.5.2 线性关系考察** 精密量取“2.3.1”项下单一对照品储备液, 加甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 再用甲醇逐级稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液, 得到校正浓度分别为各对照系列浓度。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 见表 1。

**2.5.3 加样回收试验** 精密称取已知含量的 6 份文冠木配方颗粒, 按对照品加入量与样品相应成分含量为 1:1 的比例精密加入对照品溶液, 按“2.3.2”项下方法处理后, 进样检测, 计算加样回收率, 结果 14 种对照品平均加样回收率均在 99.83% ~ 106.96%, *RSD* 值均  $\leq 1.8\%$ <sup>[8]</sup>。

**2.5.4 系统适用性考察** 按照上述洗脱条件检测对照品和供试品溶液, 记录色谱图, 见图 4。结果显示 14 个色谱峰峰形尖锐, 对称性好; 与前后峰的分度均  $> 1.5$ , 达到基线分离; 理论塔板数不低于 3000<sup>[9]</sup>。

**2.6 15 批文冠木配方颗粒含量测定**



表 1 回归方程及线性范围

Tab 1 Regression equation and linearity			
化合物	回归方程	r	线性范围 / (μg · mL <sup>-1</sup> )
没食子酸	$Y = 20.900X - 1.6219$	0.9992	0.37 ~ 1.12
没食子儿茶素	$Y = 1.7495X - 3.9264$	0.9993	26.46 ~ 157.43
表没食子儿茶素	$Y = 1.7189X - 14.612$	0.9997	220.99 ~ 1314.90
儿茶素	$Y = 4.3394X + 6.505$	0.9990	52.26 ~ 159.50
表儿茶素	$Y = 5.2155X + 317.99$	0.9991	370.93 ~ 1132.00
EGCG	$Y = 10.018X + 2.728$	0.9996	2.03 ~ 6.18
二氢杨梅素	$Y = 12.184X - 16.599$	0.9990	200.21 ~ 611.00
鞣花酸	$Y = 45.326X + 0.2913$	0.9992	0.14 ~ 0.42
芦丁	$Y = 19.267X + 0.1755$	0.9999	0.32 ~ 0.99
二氢槲皮素	$Y = 15.766X - 27.162$	0.9998	16.66 ~ 99.12
槲皮苷	$Y = 12.758X + 3.4712$	0.9994	5.17 ~ 15.80
杨梅素	$Y = 25.608X - 39.466$	0.9990	10.29 ~ 61.22
槲皮素	$Y = 6.8219X + 1.3646$	0.9995	4.85 ~ 14.80
柚皮素	$Y = 17.375X + 1.3712$	0.9996	0.87 ~ 2.66

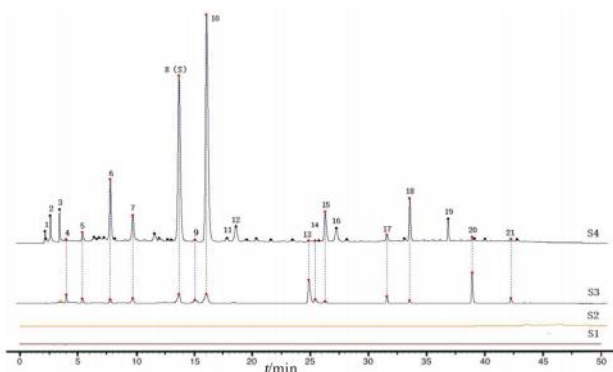


图 4 系统适用性试验色谱图

Fig 4 Chromatogram of the system suitability test

S1. 甲醇 (空白溶剂) [methanol (blank solvent)]; S2. 系统空针 (system empty needle); S3. 对照品 (control); S4. 供试品 (sample)

精密称定 15 批文冠木配方颗粒 0.500 g, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样检测, 记录峰面积, 采用外标法计算 15 批文冠木配方颗粒中 14 种成分的含量, 结果见表 2。

表 2 15 批文冠木配方颗粒 14 种成分含量测定结果 (%)

Tab 2 Content of 14 components in 15 batches of Xanthoceras sorbifolia formula granules (%)

编号	没食子酸	没食子儿茶素	表没食子儿茶素	儿茶素	表儿茶素	EGCG	二氢杨梅素	鞣花酸	芦丁	二氢槲皮素	槲皮苷	杨梅素	槲皮素	柚皮素
S1	0.001	0.094	0.727	0.146	0.811	0.004	0.628	0.001	0.003	0.057	0.023	0.033	0.002	0.003
S2	0.001	0.105	0.821	0.146	0.824	0.004	0.655	0.001	0.003	0.057	0.022	0.033	0.003	0.002
S3	0.001	0.097	0.697	0.135	0.731	0.004	0.644	0.001	0.003	0.056	0.021	0.034	0.003	0.002
S4	0.001	0.107	0.821	0.147	0.821	0.005	0.676	0.001	0.002	0.061	0.022	0.034	0.002	0.002
S5	0.001	0.105	0.754	0.147	0.791	0.005	0.383	0.001	0.003	0.058	0.021	0.036	0.002	0.002
S6	0.001	0.115	0.969	0.167	0.524	0.005	0.720	0.001	0.003	0.069	0.025	0.034	0.004	0.002
S7	0.002	0.105	0.704	0.149	0.813	0.006	0.663	0.001	0.003	0.061	0.021	0.037	0.002	0.002
S8	0.001	0.125	1.049	0.178	1.041	0.006	0.739	0.001	0.002	0.070	0.027	0.034	0.004	0.002
S9	0.001	0.104	0.910	0.173	0.960	0.006	0.690	0.001	0.002	0.063	0.026	0.032	0.003	0.002
S10	0.001	0.095	0.664	0.147	0.807	0.005	0.644	0.001	0.003	0.058	0.022	0.035	0.004	0.002
S11	0.001	0.110	1.002	0.157	0.946	0.006	0.684	0.001	0.002	0.061	0.023	0.031	0.004	0.002
S12	0.001	0.097	0.750	0.139	0.791	0.005	0.637	0.001	0.002	0.056	0.021	0.032	0.003	0.002
S13	0.001	0.105	0.845	0.148	0.842	0.005	0.661	0.001	0.002	0.058	0.022	0.034	0.002	0.002
S14	0.001	0.109	0.872	0.157	0.895	0.005	0.673	0.001	0.003	0.060	0.023	0.032	0.003	0.002
S15	0.001	0.103	0.747	0.138	0.753	0.004	1.063	0.001	0.005	0.059	0.020	0.033	0.002	0.003

2.7 化学模式识别分析

2.7.1 相似度评价 将 15 批文冠木配方颗粒色谱图导入《中药色谱图相似度评价系统》(2012 年版), 选定信号吸收和峰形较优、稳定性良好的 21 个色谱峰, 系统自动计算生成 15 批配方颗粒的相似度, 结果相似度均大于 0.900, 说明蒙药文冠木配方颗粒的制剂工艺具有良好的稳定性, 但峰面积大小存在差异, 说明各批次间成分存在差异。

2.7.2 聚类分析 将 15 批文冠木配方颗粒峰面积导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间连接的聚类方法,

以欧氏距离为测量区间, 进行系统聚类分析, 结果见图 5。15 批配方颗粒 (S1 ~ S15) 分为 3 类, S1 ~ S5、S10、S7、S12 ~ S13、S15 为 I 类, S9、S11、S14 为 II 类, S6、S8 为 III 类, 颗粒间质量差异较大, 与相似度评价结果一致。原料药材的产地、采收期、加工方式等都会影响药材质量, 说明仅以一个或多个指标成分不能完全评价文冠木配方颗粒的质量, 需要通过指纹图谱最大程度地反映整体的特征信息。

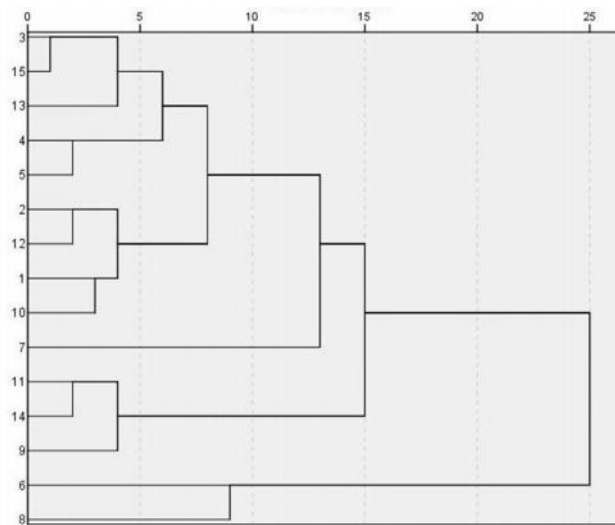


图 5 15 批文冠木配方颗粒聚类分析图

Fig 5 Cluster analysis of 15 batches of formula granules

### 3 讨论

#### 3.1 试验条件的考察

考察了流动相系统(乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%醋酸水、乙腈-0.2%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水),柱温(20、30、40℃),检测波长(250、270、280、300 nm),流速(0.8、1.0、1.2 mL·min<sup>-1</sup>)对含量测定的影响,结果发现,乙腈-0.1%磷酸水溶液,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 270 nm 条件下各特征峰响应值高,基线平稳。比较不同提取溶剂(80%乙醇、60%甲醇、70%甲醇、80%甲醇、90%甲醇、100%甲醇),不同料液比(1:10、1:12、1:20、1:25)和不同提取时间(30、45、60 min)对文冠木配方颗粒的提取效果,结果确定料液比 1:20,以 90% 甲醇超声提取 30 min 时所测成分的含量及分离情况最佳,杂峰干扰少。

#### 3.2 文冠木配方颗粒指纹图谱和含量测定结果分析

15 批文冠木配方颗粒的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度较高,均在 0.900 以上。由指纹图谱分析可知 15 批文冠木配方颗粒所含化学成分种类基本一致,但峰面积大小存在差异,聚类分析与相似度评价均提示各批次间成分含量存在一定差异性。目前市场流通的文冠木来源产地较为分散,地理环境影响了文冠木内代谢产物的生成和积累,并且各省市对药材验收的标准和限度各不相同,无法对文冠木进行客观准确的质控,是文冠木质量不稳定及开发利用受限的重要原因。

本研究在指纹图谱中共确认 21 个特征峰,指出 14 个峰并进行含量测定,文冠木中含量最多的是黄酮类化合物,主要为黄酮化合物和二氢

黄酮化合物,包括含量较高表没食子儿茶素、二氢杨梅素、二氢槲皮素、杨梅素等,是文冠木发挥抗炎、抗氧化、改善心血管系统的指标成分<sup>[10]</sup>;没食子酸作为有机酸类化合物也对细菌、真菌等具有抑制作用;表儿茶素、儿茶素、鞣花酸等多酚类化合物则使文冠木具有调节免疫、抗氧化及抗肿瘤等生物活性<sup>[11]</sup>,同时表儿茶素还具有抗凝血的作用等<sup>[12]</sup>。因此在指纹图谱基础上进一步对 14 种指标成分进行含量测定,为文冠木下一步的质量评价和药理活性研究奠定基础。由于含量测定与指纹图谱所用色谱条件相同,精密度、稳定性、重复性试验等方法学考察内容在指纹图谱中已考察且符合要求,因此,含量测定的方法学考察仅进行了线性关系、专属性和回收试验等内容。

### 参考文献

- [1] 敖敦格日乐,胡阿荣,艾力,等.药材文冠木的资源综合利用与开发研究概况[J].中国医药科学,2023,13(14):41-44.
- [2] 杨倩.文冠木化学成分、含量测定及酪氨酸酶抑制作用研究[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2020.
- [3] 张智敏,侯健,吴昊,等.基于网络药理学及分子对接研究蒙药文冠木治疗类风湿关节炎的作用机制[J].特产研究,2023,45(2):95-103,115.
- [4] 刘焕起,吴佩佩,吴海峰,等.风湿骨痛片及其中间体的指纹图谱建立及指标成分含量测定[J].中南药学,2023,21(11):3020-3024.
- [5] 徐倩,陆美霞,周亚萍,等.骨髓炎颗粒 HPLC 指纹图谱及一测多评法测定 7 种成分含量[J].中南药学,2023,21(11):3030-3035.
- [6] 唐茜,韩云凤,石懿,等.视力舒颗粒制备工艺优化及其物理指纹图谱建立[J].中成药,2023,45(11):3729-3735.
- [7] 李丽敏,周如洁,李康,等.急支糖浆 HPLC 特征图谱建立及 7 种成分测定[J].中成药,2023,45(11):3548-3552.
- [8] 王宁宁,高岩,张梅,等.基于 HPLC 指纹图谱的沙棘叶黄酮类功效成分研究[J].中国现代中药,2023,25(10):2078-2083.
- [9] 崔小丽,孙宁,赵瑞,等.高效液相色谱法同时测定桂芍镇痫片中 13 种成分的含量[J].中南药学,2023,21(11):3024-3029.
- [10] 赵彤,王姿婧,魏秀娟,等.黄酮类化合物生物活性研究进展[J].转化医学杂志,2023,12(3):210-214.
- [11] 其日格尔,韩晓静,布和巴特尔,等.蒙、藏药文冠木的研究进展[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2021,36(1):89-92.
- [12] 刘君,董秋梅.蒙药文冠木黄酮类有效成分的提取及含量测定[J].中国医药导报,2021,18(7):31-33,58.

(收稿日期:2023-11-07;修回日期:2023-12-26)

# 蒙药角茴香配方颗粒指纹图谱及含量测定研究

韩子璇<sup>1</sup>, 刘梦<sup>1</sup>, 杨立茹<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 康廷国<sup>1\*</sup>, 张纯刚<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药理学系, 山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司, 内蒙古 赤峰 024330)

**摘要:** **目的** 建立蒙药角茴香配方颗粒的 HPLC 指纹图谱及有效成分含量测定方法, 为角茴香配方颗粒的质量控制提供参考。**方法** 采用 COSMOSIL 5 C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵 (含 0.05% 冰醋酸) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 28 °C, 检测波长 300 nm, 进样量 10 μL, 建立角茴香配方颗粒的指纹图谱, 并对指认的 3 种化学成分进行含量测定。**结果** 建立了角茴香配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 标定了 18 个共有峰, 指认芦丁、原阿片碱、黄连碱 3 种化学成分, 15 批角茴香配方颗粒相似度在 0.982 ~ 1.000, 芦丁、原阿片碱、黄连碱的含量分别为 0.12% ~ 0.23%、0.50% ~ 0.54%、0.04% ~ 0.05%。**结论** 该方法稳定, 准确, 操作简单, 重复性好, 可为角茴香配方颗粒的评价及质量控制提供参考。

**关键词:** 角茴香; 配方颗粒; 指纹图谱; 含量测定; 质量控制

**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0291-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.003

## Fingerprint and content determination of Mongolian medicine hypecoum formula granules

HAN Zi-xuan<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, YANG Li-ru<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, KANG Ting-guo<sup>1\*</sup>, ZHANG Chun-gang<sup>1, 2, 3\*</sup>  
(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., Ltd., Chifeng Inner Mongolia 024330)

**Abstract: Objective** To establish HPLC fingerprint and content determination method of its active ingredients in Mongolian medicine hypecoum formula granules, and to provide a reference for the quality control of hypecoum formula granules. **Methods** An COSMOSIL 5 C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (containing 0.05% glacial acetic acid) for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 28 °C, the detection wavelength was 300 nm, and the injection volume was 10 μL. The fingerprint of hypecoum formula granules was established and the content of the 3 identified chemical ingredients was determined. **Results** The HPLC fingerprint of hypecoum formula granules was established, and 18 common peaks were identified. The similarity of 15 batches of hypecoum formula granules ranged from 0.982 to 1.000. The content of rutin, protopine, and coptisine in 15 batches of hypecoum formula granules ranged from 0.12% to 0.23%; 0.50% to 0.54%; and 0.04% to 0.05%. **Conclusion** The method is stable and accurate, with simple operation and good repeatability, providing a reference for the evaluation and quality control of hypecoum formula granules.

**Key words:** hypecoum; formula granule; fingerprint; content determination; quality control

**基金项目:** 内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 国家重点研发计划项目 (No.2018YFC1706903); 中医脏象理论及应用国家重点实验室一般项目 (No.zyx1809); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204)。

**作者简介:** 韩子璇, 女, 硕士, 主要从事中药新剂型、新技术研究, email: Hzx15184188783@163.com \*通信作者: 康廷国, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药鉴定研究工作, email: kangtg@lnutcm.edu.cn; 张纯刚, 男, 硕士研究生导师, 副教授, 主要从事中药新剂型、新技术、体内药物分析及保健食品开发研究, email: gaogaoui123@163.com



蒙药材角茴香是蒙医常用药材,为罂粟科植物直立角茴香(或细叶角茴香)*Hypocoum erectum* L.的干燥全草,别名咽喉草、山黄连等,主产于内蒙古、河北、辽宁等地<sup>[1-2]</sup>。角茴香具有解毒、解热、止痛等功效,含有生物碱类、黄酮类、糖类、酸类、微量元素等多种化学成分,其中的生物碱类成分具有抗炎、抗菌、镇痛、保肝等药理作用,是角茴香的主要活性成分<sup>[3-5]</sup>。

蒙医药的理论基础独特,在剂型方面多以散剂、丸剂为主,而且在许多药方、制剂中习惯性采用原粉入药,导致蒙药制剂服用口感差,患者依从性差。本课题组在前期研究中成功制备了角茴香配方颗粒,改善了原散剂的适口性,便于临床调配。经过实验室初步验证及试验生产,证实该颗粒符合蒙药制剂企业的制剂需要与生产要求。

通过对角茴香药材和相关制剂的质量标准及有关文献进行调研发现,目前角茴香药材收录于2020版《内蒙古蒙药饮片炮制规范》,并规定HPLC法测定药材中原阿片碱的含量不得少于0.3%<sup>[1]</sup>;文献涉及有对角茴香中生物碱、黄酮类成分的提取、含量测定及指纹图谱的研究,但文献数量较少,且内容不全,更无关于角茴香配方颗粒的研究<sup>[6-9]</sup>。为更好地对蒙药角茴香配方颗粒进行质量控制,本研究建立蒙药角茴香配方颗粒的HPLC指纹图谱,并在此基础上对指纹图谱指认的3种化学成分进行含量测定,以期对蒙药角茴香配方颗粒的质量控制及蒙药新剂型的发展提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 试药

15批直立角茴香药材细粉(批号:YL2022201、YL2022301、YL2022302、YL2022401~YL2022404、YL2022501~YL2022503、YL2022601~YL2022604、YL2022701,产地:祈蒙股份有限公司);芦丁(批号:100080-202012,纯度:91.6%)、原阿片碱(批号:110853-201805,纯度:99.6%)(中国食品药品检定研究院);黄连碱对照品(批号:F1111AS,纯度>98.0%,大连美仑生物技术有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);乙腈(色谱纯,瑞典欧森巴克化学公司);甲醇、乙酸铵(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);冰醋酸、盐酸(分析纯,上海润捷化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器

Y-2 摇摆制粒机(上海天和制药机械有限公司);SG3300H 超声波清洗器(上海冠特超声仪

器有限公司);CP225D 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];LC-1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,包括四元泵,VWD 可变波长扫描紫外检测器,Chemstations 化学工作站)。

## 2 方法与结果

### 2.1 角茴香配方颗粒的制备

分别取15批过100目筛的角茴香药材细粉各200.0 g,加入适量辅料混合均匀,再加入适量水为润湿剂,用手不断揉捏混匀得到“手握成团,轻压即散”状态的软材,通过摇摆制粒机制粒(14目筛网),收集所得颗粒,60℃下烘干。按照2020年版《中国药典》四部通则0982双筛分法整粒(能通过一号筛但不能通过五号筛),包装,得到15批蒙药角茴香配方颗粒,均符合制药企业生产要求,批号为JHXPFKL-1~JHXPFKL-15。

### 2.2 色谱条件

采用COSMOSIL 5C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;以乙腈(A)-0.1 mol·L<sup>-1</sup>乙酸铵(含0.05%冰醋酸)(B)为流动相,梯度洗脱(0~5 min, 5%~6%A; 5~15 min, 6%~11.5%A; 15~20 min, 11.5%A; 20~25 min, 11.5%~17.5%A; 25~30 min, 17.5%A; 30~35 min, 17.5%~20%A; 35~45 min, 20%A; 45~50 min, 20%~25%A; 50~55 min, 25%A; 55~60 min, 25%~30%A; 60~65 min, 30%~5%A);流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温28℃;检测波长300 nm;进样量10 μL。

### 2.3 供试品溶液的制备

取蒙药角茴香配方颗粒样品,研细,精密称定0.200 g,置于10 mL量瓶中,加入适量甲醇-1%盐酸溶液(50:50),超声提取(100 W, 40 kHz)30 min,放至室温后定容至刻度,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,即得<sup>[10]</sup>。

### 2.4 对照品溶液的制备

精密称取适量芦丁、原阿片碱、黄连碱对照品分别置于10 mL量瓶中,用甲醇-1%盐酸溶液(50:50)超声溶解,放至室温后定容至刻度,分别得到质量浓度为0.181、0.366、0.165 mg·mL<sup>-1</sup>的芦丁、原阿片碱、黄连碱对照品储备液。精密移取各储备液适量于10 mL量瓶中,用甲醇-1%盐酸溶液(50:50)稀释定容至刻度,配制成质量浓度分别为54.28、183.14、16.45 μg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。其中,芦丁校正质量浓度为49.72 μg·mL<sup>-1</sup>。



## 2.5 角茴香配方颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

**2.5.1 精密度试验** 取同一份供试品溶液(批号: JHXPFKL-1), 在“2.2”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 13 号峰(原阿片碱)为参照峰, 计算 18 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值, 结果各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均 < 0.79%, 相对峰面积 *RSD* 值均 < 1.2%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批角茴香配方颗粒(批号: JHXPFKL-1) 6 份, 每份 0.200 g, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进行分析测定, 记录色谱图, 以 13 号峰(原阿片碱)为参照峰, 计算 18 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值, 结果各共有峰的相对保留时间的 *RSD* 值均 < 0.82%, 相对峰面积的 *RSD* 值均 < 1.5%, 表明该方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一份供试品溶液(批号: JHXPFKL-1), 按“2.2”项下色谱条件分别于第 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录色谱图, 以 13 号峰(原阿片碱)为参照峰, 计算 18 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值, 结果各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均 < 0.91%, 相对峰面积的 *RSD* 值均 < 3.4%, 表明角茴香配方颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.4 指纹图谱的建立** 取 15 批角茴香配方颗粒(JHXPFKL-1 ~ JHXPFKL-15), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 得到指纹图谱见图 1。

**2.5.5 共有峰标记** 以原阿片碱作为参考峰, 标定了 18 个共有峰, 其中 11 号峰是芦丁, 13 号峰是原阿片碱, 16 号峰是黄连碱, 角茴香配方颗粒及混合对照品 HPLC 指纹图谱见图 1。以 13 号峰(原阿片碱)为参照峰, 18 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 均 < 0.49%, 相对峰面积的 *RSD* 在 2.9% ~ 28.3%。表明不同批次的角茴香配方颗粒化学成分种类相似, 但成分含量存在一定差异。

**2.5.6 相似度计算** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版, 导入 15 批角茴香配方颗粒的图谱数据, 采用“平均数”法生成对照图谱 R, 经多点校正、色谱峰匹配, 得到 15 批角茴香配方颗粒的色谱图见图 2。以对照图谱 R 为参照, 15 批角茴香配方颗粒的相似度均在 0.982 以上, 相似度见表 1。反映角茴香配方颗粒化学成分组成基本一致, 整体质量相对稳定, 符合指纹图谱研究要求。

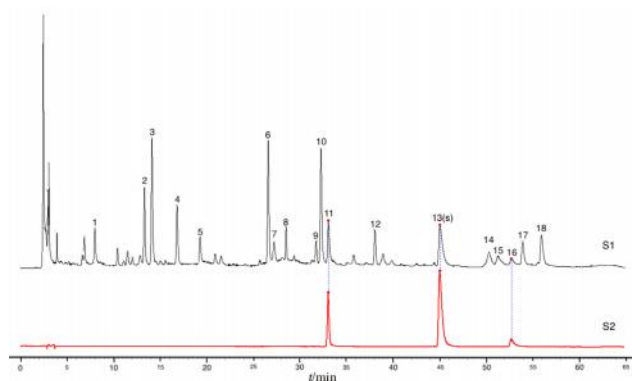


图 1 角茴香配方颗粒(S1)和混合对照品(S2)指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint of hyeoucoum formula granules (S1) and mixed reference substances (S2)

11. 芦丁(rutin); 13. 原阿片碱(protopine); 16. 黄连碱(coptisine)

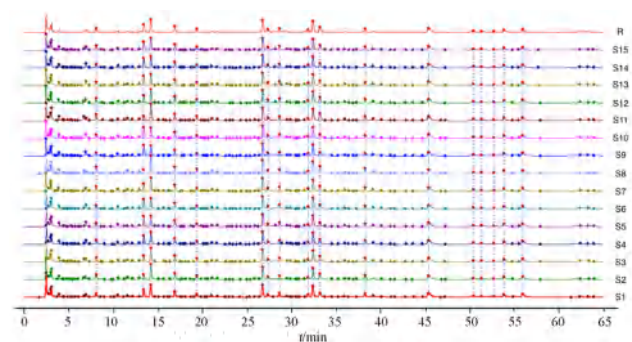


图 2 15 批角茴香配方颗粒 HPLC 叠加指纹图谱

Fig 2 HPLC overlapp fingerprint of 15 batches of hyeoucoum formula granules

表 1 15 批角茴香配方颗粒指纹图谱相似度

Tab 1 Fingerprint similarity of 15 batches of hyeoucoum formula granules

批号	相似度	批号	相似度
JHXPFKL-1	1.000	JHXPFKL-9	0.989
JHXPFKL-2	0.991	JHXPFKL-10	0.991
JHXPFKL-3	0.996	JHXPFKL-11	0.986
JHXPFKL-4	1.000	JHXPFKL-12	0.997
JHXPFKL-5	0.991	JHXPFKL-13	0.995
JHXPFKL-6	0.996	JHXPFKL-14	0.995
JHXPFKL-7	1.000	JHXPFKL-15	0.999
JHXPFKL-8	0.982	对照图谱	1.000

## 2.6 角茴香配方颗粒有效成分的含量测定

**2.6.1 专属性考察** 取空白溶剂(甲醇-1%盐酸溶液(50:50)、混合对照品溶液、角茴香配方颗粒供试品溶液(批号: JHXPFKL-1) 适量, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 结果见图 3。角茴香配方颗粒供试品与芦丁、原阿片碱、黄连碱对照品在相同保留时间有相同色谱峰且分离度良好, 空白溶剂在供试品及对照品色谱峰的保留时间处无干扰, 说明该方法专属性较好。

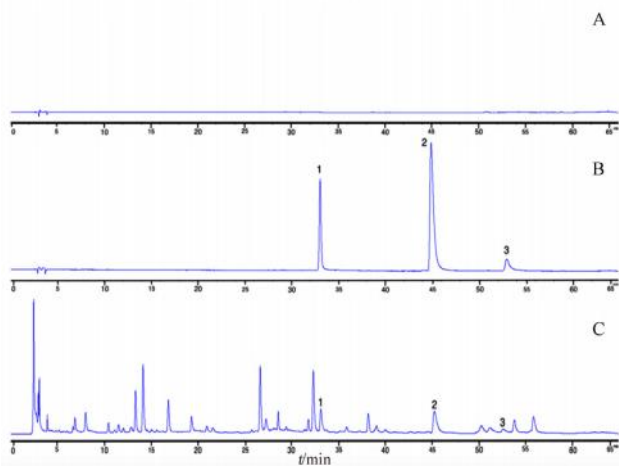


图 3 空白溶剂 (A)、混合对照品溶液 (B)、角茴香配方颗粒供试品 (C) HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of blank solvent (A), mixed reference substances (B), and sample of hypocoum formula granules (C)

1. 芦丁 (rutin); 2. 原阿片碱 (protopine); 3. 黄连碱 (coptisine)

**2.6.2 线性关系考察** 精密吸取“2.4”项下混合对照品溶液适量, 逐级稀释并定容摇匀, 得到含芦丁 (按校正质量浓度记) 13.03、16.30、20.36、25.46、31.82、39.77、49.72  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 原阿片碱 48.01、60.01、75.01、93.77、117.21、146.51、183.14  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 黄连碱 3.45、4.31、5.39、6.74、8.43、10.53、16.45  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列浓度的混合对照品溶液。依照“2.2”项下色谱条件进样, 测定芦丁、原阿片碱、黄连碱的峰面积。分别以 3 种对照品的质量浓度  $X$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和峰面积  $Y$  绘制回归曲线, 得回归方程如表 2 所示<sup>[10]</sup>。

表 2 各成分线性关系考察结果  
Tab 2 Linearity of each component

成分	回归方程	$r$	范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
芦丁	$Y = 8.018X - 2.505$	0.9999	13.03 ~ 49.72
原阿片碱	$Y = 4.166X + 14.18$	0.9995	48.01 ~ 183.14
黄连碱	$Y = 6.207X + 0.522$	0.9997	3.45 ~ 16.45

表 3 15 批角茴香配方颗粒中 3 种成分的含量测定结果

Tab 3 Content of 3 chemical ingredients in 15 batches of hypocoum formula granules

批号	芦丁 / %	原阿片碱 / %	黄连碱 / %	批号	芦丁 / %	原阿片碱 / %	黄连碱 / %
JHXPFKL-1	0.15	0.54	0.05	JHXPFKL-9	0.12	0.53	0.04
JHXPFKL-2	0.19	0.51	0.04	JHXPFKL-10	0.13	0.54	0.04
JHXPFKL-3	0.18	0.53	0.05	JHXPFKL-11	0.22	0.54	0.05
JHXPFKL-4	0.15	0.52	0.05	JHXPFKL-12	0.19	0.52	0.04
JHXPFKL-5	0.12	0.53	0.04	JHXPFKL-13	0.13	0.50	0.04
JHXPFKL-6	0.14	0.52	0.04	JHXPFKL-14	0.13	0.51	0.04
JHXPFKL-7	0.16	0.52	0.04	JHXPFKL-15	0.15	0.50	0.04
JHXPFKL-8	0.23	0.52	0.04				

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的优化

**2.6.3 精密度试验** 取同一份角茴香配方颗粒供试品溶液 (批号: JHXPFKL-1), 依照“2.2”项下色谱方法连续进样 6 次, 记录芦丁、原阿片碱、黄连碱峰面积, 结果  $RSD$  值分别为 0.49%、0.15%、0.81%, 表明仪器精密度良好。

**2.6.4 重复性试验** 取同一批角茴香配方颗粒 (批号: JHXPFKL-1) 6 份, 每份 0.200 g, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算芦丁、原阿片碱、黄连碱平均含量分别为 0.15%、0.54%、0.05%,  $RSD$  值分别为 0.22%、0.56%、0.90%, 表明该方法重复性良好。

**2.6.5 稳定性试验** 取同一份供试品溶液 (批号: JHXPFKL-1), 分别于第 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录芦丁、原阿片碱、黄连碱峰面积, 结果  $RSD$  值分别为 0.72%、0.41%、0.95%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.6.6 加样回收试验<sup>[11]</sup>** 精密称取 6 份已知含量的角茴香配方颗粒 (批号: JHXPFKL-1), 每份 0.100 g。按供试品中指标成分量与加入对照品量之比 1:1 原则, 分别在每份样品颗粒中加入适量的芦丁、原阿片碱、黄连碱对照品。按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液进样测定, 计算 3 种成分的加样回收率。结果显示, 芦丁、原阿片碱、黄连碱的平均加样回收率分别为 101.57%、107.44%、101.44%,  $RSD$  值分别为 0.78%、0.96%、1.7%, 表明该方法回收率良好。

**2.6.7 样品含量测定** 取 15 批角茴香配方颗粒, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 分别计算芦丁、原阿片碱、黄连碱的含量, 结果见表 3。15 批角茴香配方颗粒中芦丁的含量为 0.12%~0.23%、原阿片碱的含量为 0.50%~0.54%、黄连碱的含量为 0.04%~0.05%, 表明各批次颗粒间 3 种成分含量有一定差异, 但整体含量较稳定。

本课题组在前期研究中分别对乙腈 -1% 甲酸、乙腈 -0.1% 磷酸、乙腈 -0.1% 醋酸 (三乙胺调 pH

5.0)、甲醇 -0.3% 三乙胺、乙腈 -0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵、乙腈 -0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵 (含 0.05% 冰醋酸) 作为流动相进行考察, 发现采用乙腈 -0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵 (含 0.05% 冰醋酸) 作为流动相时色谱峰较多、分离度较好且基线稳定, 故选用此流动体系。同时, 对不同温度 (25、28、30 °C)、不同检测波长 (280、289、300 nm)、不同流速 (0.8、1.0、1.2 mL·min<sup>-1</sup>) 等条件进行考察。结果不同温度条件下, 出峰时间与各峰之间分离度有一定差异, 25、30 °C 条件下存在部分色谱峰峰高不明显或分离度不够的情况, 故选择柱温为 28 °C。检测波长为 300 nm 时, 指纹图谱整体峰高比例较好且溶剂峰影响较小, 故选择检测波长为 300 nm。

### 3.2 指纹图谱的建立及含量测定结果分析

指纹图谱技术兼具模糊性、整体性与差异性, 可在成分不明确的情况下区分药材种属、反映药材整体质量, 适用于成分复杂或对照品不足的中药及中药制剂的质量研究<sup>[12]</sup>。角茴香作为一种天然药物, 物质基础复杂, 仅采用单一指标很难综合考察其质量。因此本研究建立角茴香配方颗粒指纹图谱, 并对其中有效成分含量进行测定, 更加科学、全面地考察角茴香配方颗粒的质量。

生物碱是角茴香的主要药效成分, 其中的原阿片碱具有镇痛、抗炎的药理作用。黄酮类是角茴香中除生物碱外的另一主要化学成分, 因此, 在指认原阿片碱、黄连碱的基础上, 增加黄酮类成分芦丁色谱峰的指认, 并对 3 种有效成分进行含量测定, 可更加完善对蒙药角茴香配方颗粒的化学表征。建立的蒙药材角茴香配方颗粒指纹图

谱及含量测定结果显示, 制备的 15 批角茴香配方颗粒质量稳定, 符合质量要求, 可为后续角茴香药材及制剂的质量研究提供参考。

### 参考文献

- [1] 那生桑. 内蒙古蒙药饮片炮制规范: 2020 年版 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2021.
- [2] 美丽, 松林. 蒙药材角茴香药理作用实验初步研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21 (8): 59-60.
- [3] 胡日查, 特木儿. 蒙药材角茴香的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21 (1): 28-30.
- [4] 陈礼玲. 角茴香地上部化学成分的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [5] 敖亮亮, 李久明, 徐宁, 等. 蒙药材角茴香化学成分与药理研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报 (自然科学版), 2019, 34 (3): 197-200.
- [6] 刘永红, 陈晓, 汶凯, 等. 细果角茴香中总黄酮的提取及含量测定 [J]. 河北农业科学, 2011, 15 (6): 106-108.
- [7] 文怀秀, 邵赞, 陶燕铎, 等. RP-HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (1): 137-139.
- [8] 崔廷金. 正交设计优选细果角茴香中总黄酮的提取工艺条件 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (25): 10282-10283.
- [9] 丁玉, 梁永欣, 吴雪花, 等. 藏药细果角茴香的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2017, 40 (10): 2360-2365.
- [10] 包子威, 雷静文, 程岚, 等. 一种治疗膝骨关节炎的中药复方制剂有效成分含量测定 [J]. 亚太传统医药, 2023, 19 (3): 18-24.
- [11] 方朝缙, 甘力帆, 黄醒鹏, 等. 金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分含量测定研究 [J]. 中中药学, 2023, 21 (6): 1612-1620.
- [12] 吴思佳, 王可可, 徐双双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的皂角刺配方颗粒质量控制研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37 (2): 54-60, 95.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-22)



研究论文

## 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的三种基原溪黄草及其干预小鼠肝纤维化的血清化学研究

覃萍<sup>1</sup>, 苏阳静<sup>1</sup>, 陈永苗<sup>2</sup>, 郑瑞瑶<sup>3</sup>, 钟佳妮<sup>1</sup>, 叶晓燕<sup>1</sup>, 葛跃伟<sup>3</sup>, 陈阿丽<sup>1\*</sup> (1. 广东药科大学新药研发中心, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006; 2. 广东药科大学附属第一医院, 广州 510062; 3. 广东药科大学中药学院, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱串联质谱 (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) 技术研究三种基原溪黄草及其在肝纤维化小鼠口服给药后的血清化学成分。**方法** 采用 Shim-pack GIST-HP C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 3 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30℃。通过结合高分辨质谱数据及质谱裂解规律, 对三种基原溪黄草药材样本及其给药小鼠血清的化学成分进行表征。**结果** 在三种基原溪黄草药材中鉴定出 40 个化合物, 主要包括二萜类、黄酮类、酚酸类化合物。在小鼠血清中鉴定出 2 个入血成分以及 2 个可能的代谢产物。**结论** 本研究初步鉴定了三种基原溪黄草在四氯化碳致肝纤维化小鼠中的入血成分及部分代谢产物, 为其用于治疗肝纤维化的药效物质基础提供了理论参考。

**关键词:** 溪黄草; 肝纤维化; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱串联质谱

**中图分类号:** R917.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0296-06  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.004

### Chemical constituents in three origins of *Rabdosia serra* and their administration serum analysis in hepatic fibrosis mice based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

QIN Ping<sup>1</sup>, SU Yang-jing<sup>1</sup>, CHEN Yong-miao<sup>2</sup>, ZHENG Rui-yao<sup>3</sup>, ZHONG Jia-ni<sup>1</sup>, YE Xiao-yan<sup>1</sup>, GE Yue-wei<sup>3</sup>, CHEN A-li<sup>1\*</sup> (1. Center for Drug Research and Development, Guangdong Key Laboratory of Advanced Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2. The First Affiliated Hospital School of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510062; 3. School of Chinese Material Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

**Abstract: Objective** To identify the serum chemical compositions in three origins of *Rabdosia serra* and the serum in mice with hepatic fibrosis after the oral administration by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. **Methods** The three origins of *Rabdosia serra* and the serum samples administered in mice were collected and analyzed with the chromatographic column of Shim-pack GIST-HP C18 (2.1 mm×150 mm, 3 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid water (A)-methanol (B) for gradient elution and the flow rate was 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30℃. The chemical compositions in three origins of *Rabdosia serra* and the serum in mice after the oral administration were analyzed with the high resolution mass spectrometry data and mass spectrometry fragmentation law of the compound. **Results** Totally 40 compounds were identified in the three origins of *Rabdosia*

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No. 82104382)。

**作者简介:** 覃萍, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药品检验与分析研究, email: qinping000000@163.com \* **通信作者:** 陈阿丽, 女, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及新药开发研究, email: chenali2004@163.com



serra, mainly diterpenoids, flavonoids and phenolic acids. Two blood components and two possible metabolites were analyzed in the serum of mice. **Conclusion** This study preliminarily identifies the blood components in three origins of *Rabdosia serra* in mice with carbon tetrachloride induced liver fibrosis, providing a theoretical reference for the efficacy in the treatment of liver fibrosis.

**Key words:** *Rabdosia serra* (Maxim) Hara; liver fibrosis; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS

溪黄草是唇形科香茶菜属的一种多年生草本, 其性寒, 味苦, 主产于黑龙江、江西、广东、广西、福建等地, 长期以来一直作为民间中草药被广泛使用<sup>[1]</sup>。溪黄草是一种多基原中药, 包括线纹香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara、纤花香茶菜 *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara var. *gerardiana* (Benth) Hara 以及溪黄草 *Rabdosia serra* (Maxim) Hara 三种基原。研究表明, 溪黄草具有清热利湿、凉血散瘀的作用, 可用于急性胆囊炎、急性黄疸型肝炎等病症的治疗<sup>[2]</sup>。

肝纤维化是一种肝组织细胞外基质过度沉积(特别是胶原沉积)的病理生理过程<sup>[3]</sup>。若肝纤维化不能及时治愈, 可能会进一步发展为肝硬化, 甚至恶化为肝癌。肝纤维化是一个可逆的病理过程, 减弱或消除纤维化形成的致病因素可逆转肝纤维化病理过程<sup>[4-5]</sup>。

研究表明, 溪黄草可以抵抗多种因素引起的肝纤维化, 但不同基原溪黄草的化学成分差异大, 各企业采用的基原也无统一标准<sup>[6-7]</sup>。有学者采用经典的肝纤维化诱导剂四氯化碳对小鼠进行处理, 在病理生理学上可使小鼠的肝脏组织与人的肝脏组织具有相似性<sup>[8]</sup>。本研究分析三种基原溪黄草的药物化学成分及其口服给药后肝纤维化小鼠血清中的化学成分, 对后续溪黄草药效物质基础以及抗肝纤维化研究具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试药

50 只雄性 SPF 级 8 周龄 C57BL/6J 小鼠 [河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (豫) 2020-0005]; 线纹香茶菜药材、纤花香茶菜药材和溪黄草药材 (广州白云山和记黄埔中药有限公司溪黄草 GAP 基地, 由广东药科大学田素英教授鉴定为真品)。甲醇、甲酸均为质谱纯 (美国赛默飞公司); 蒸馏水 [屈臣氏集团 (香港) 有限公司]; 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 三种基原溪黄草提取物的制备

取三种基原溪黄草药材适量, 粉碎, 过 80

目筛, 加入 8 倍体积的 95% 乙醇, 于 80℃ 水浴中回流提取 1.5 h, 提取 2 次, 过滤, 合并滤液并减压浓缩, 冷冻干燥后得三种基原溪黄草乙醇提取物冻干粉。

### 1.3 供试品溶液的制备

精密称取溪黄草冻干粉 25 mg、纤花香茶菜冻干粉 41 mg、线纹香茶菜冻干粉 33 mg (相当于 0.5 g 药材量), 量取 10 mL 甲醇置于锥形瓶中, 称定质量, 超声处理 30 min 后, 补重, 10 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃ 离心 10 min, 取 500 μL 上清液于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 配制成供试品溶液。

### 1.4 动物分组与给药

50 只雄性 8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 随机分成空白对照组、模型组、线纹香茶菜给药组、纤花香茶菜给药组、溪黄草给药组。空白对照组腹腔注射橄榄油, 其余 4 组腹腔注射四氯化碳溶液, 给药剂量为 1 μL·g<sup>-1</sup>, 一周 2 次, 共 8 周。准确称取溪黄草冻干粉 257 mg、纤花香茶菜冻干粉 421.48 mg、线纹香茶菜冻干粉 339.24 mg (相当于 5.14 g 药材量), 分别溶解于 10 mL 羧甲基纤维素钠溶液, 配制成供试药液。空白对照组以及模型组小鼠每日灌胃羧甲基纤维素钠溶液, 各给药组给予供试药液, 给药剂量为 5.14 g·kg<sup>-1</sup>, 连续给药 8 周。末次给药 12 h 后摘眼球取血, 并用 1.5 mL EP 管收集, 4℃ 条件下 4500 r·min<sup>-1</sup> 离心 12 min, 取血清, 保存于 -80℃ 冰箱。

### 1.5 血清样品的制备

将血清样本从 -80℃ 冰箱中取出解冻, 涡旋混匀, 取 100 μL 置于 EP 管中, 加入 400 μL 提前预冷的甲醇, 充分涡旋 2 min, 冰水浴超声 30 min 后, 10 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃ 条件下离心 10 min。取上清液, 氮吹浓缩, 残留物加入 80 μL 的 80% 甲醇复溶, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 得到血清化学样品。

### 1.6 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 检测条件

采用 Shim-pack GIST-HP C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 3 μm), 预柱为 Shim-pack GIST-HP C18,

流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 甲醇 (B); 流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL, 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 10%B; 3 ~ 8 min, 10% → 35%B; 8 ~ 30 min, 35% → 55%B; 30 ~ 35 min, 55% → 65%B; 35 ~ 56 min, 65% ~ 95%B; 56 ~ 58 min, 95%; 58 ~ 63 min, 95% → 10%; 63 ~ 65 min, 10%B)。采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子模式下进行 Fullscan 及 MS/MS 扫描, MS/MS 采用数据依赖型 (DDA) 数据采集, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 1500; 毛细管电压: 3.5 kV; 鞘气流速: 45 arb; 辅助气体流速: 10 arb; 毛细管温度: 350 °C。

1.7 不同基原溪黄草药材及血清样品化学成分鉴定

应用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术对三种不同基原溪黄草药材样品以及给药小鼠血清样品进行分析, 包括保留时间、高分辨准分子离子峰、MS/MS 碎片离子等, 结合对照品比对及文献报道, 进行化合物推定。

2 结果

2.1 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 色谱图的采集

以负离子模式为例, 采集的三种基原溪黄草药材样本及其给药小鼠血清样本的色谱图结果见图 1, 鉴定药物化学成分结果见表 1。

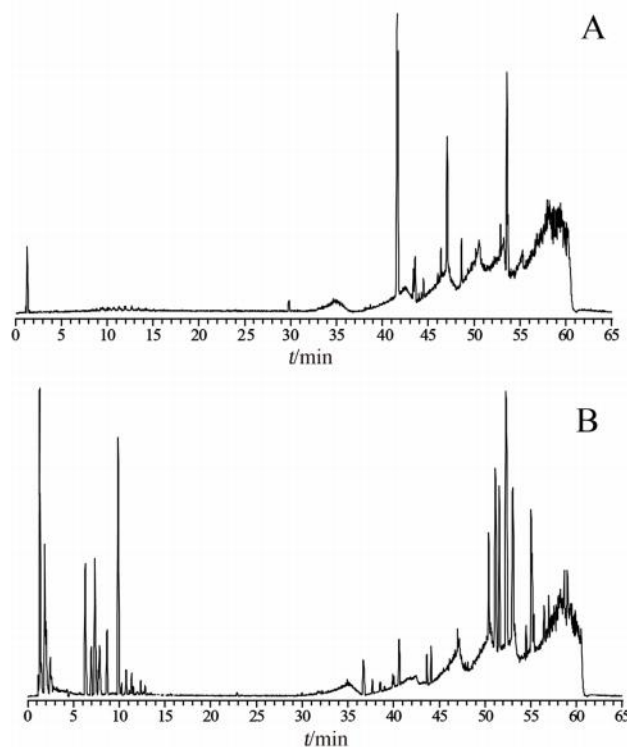


图 1 溪黄草药材 (A) 及其给药组血清 (B) 负离子模式基峰离子流色谱图

Fig 1 ESI<sup>-</sup> of based peak chromatogram of Rabdosia serra (A) and the serum of Rabdosia serra administration group (B)

2.2 三种不同基原溪黄草药材样品化学成分的裂解规律

2.2.1 酚酸类成分的裂解规律

结果显示, 酚酸类成分主要有香草酸、原儿茶酸和迷迭香酸等。以迷迭香酸为例, 在负离子模式下, 保留时间为 17.61 min, 准分子离子峰为 *m/z* 359.0778[M-H]<sup>-</sup>, 其在裂解过程中丢失一分子丹参素和一分子咖啡酸, 前者生成碎片离子 *m/z* 197.0454 和 *m/z* 161.0228, 后者生成碎片离子 *m/z* 179.0348。此外, 丹参素通过中性丢失一分子 H<sub>2</sub>O 可生成碎片离子 *m/z* 179.0348, 该碎片离子再失去一分子 CO<sub>2</sub>, 生成 *m/z* 135.0446。碎片离子 *m/z* 133.0295 则推测为 *m/z* 161.0228 通过中性丢失一分子 CO 生成。此裂解规律与文献报道一致<sup>[19]</sup>, 因此推测该结构为迷迭香酸, 其质谱裂解规律见图 2。

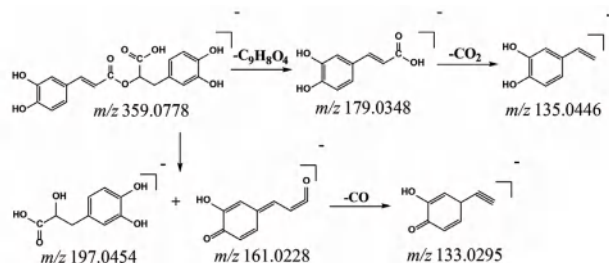


图 2 迷迭香酸质谱裂解规律

Fig 2 Proposed fragmentation pathways of rosmarinic acid

2.2.2 黄酮类成分的裂解规律

结果显示, 黄酮类成分主要有夏佛塔苷和芦丁等。以芦丁为例, 在负离子模式下, 保留时间为 17.03 min, 准分子离子峰为 *m/z* 609.1470[M-H]<sup>-</sup>, 其在裂解过程中丢失一分子糖苷, 生成碎片离子 *m/z* 301.0347。该碎片离子通过发生 RDA 反应裂解生成 *m/z* 178.9984, 而后通过中性丢失一分子 CO 生成碎片离子 *m/z* 151.0021, 此裂解规律与文献报道一致<sup>[20]</sup>。芦丁质谱裂解规律见图 3。

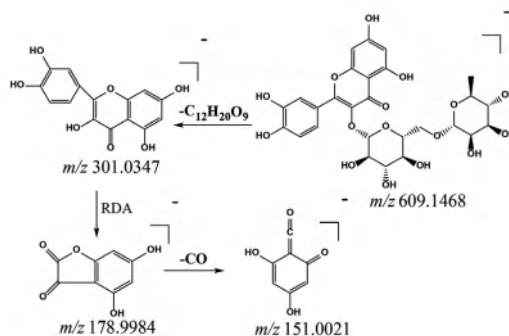


图 3 芦丁质谱裂解规律

Fig 3 Proposed fragmentation pathways of rutin

2.2.3 二萜类成分的裂解规律

结果显示, 二萜类成分主要有 horminone、kamebakaurin 和 maocrystal A 等。其中 maocrystal A 是一种有代表性的对映贝

表 1 鉴定药物化学成分结果  
Tab 1 Identification of chemical components

No.	化合物	$t_R$ /min	分子式	分类	离子模式	实测值	误差 $/\times 10^{-6}$	质谱碎片	来源
1	甜菜碱 <sup>[9]</sup>	1.94	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	生物碱	[M-H] <sup>-</sup>	118.0867	- 1.52	59.0738	a, b, c
2	香草酸 <sup>[10]</sup>	5.35	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	167.0341	- 2.16	123.0440, 91.9197	a, b, c
3	原儿茶酸 <sup>[11]</sup>	6.92	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	153.0184	- 2.68	109.0283, 108.0205	c
4	原儿茶醛 <sup>[11]</sup>	8.21	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	137.0234	- 1.46	108.8985, 119.0127, 109.0281	a, b, c
5	咖啡酸 <sup>[11]</sup>	10.42	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	179.0343	- 0.56	135.0442, 107.0492	a, b, c
6	新西兰牡荆苷 <sup>2[12]</sup>	11.24	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	黄酮类	[M-H] <sup>-</sup>	593.1519	2.36	503.1222, 473.1060, 395.0778	b, c
7	夏佛塔苷 <sup>[12]</sup>	12.36	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	黄酮类	[M-H] <sup>-</sup>	563.1407	1.07	443.1003, 353.0668	a, b, c
8	异夏佛塔苷 <sup>[12]</sup>	12.81	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	黄酮类	[M-H] <sup>-</sup>	563.1408	1.24	473.1093, 413.0887, 353.0668	c
9	芦丁 <sup>[12]</sup>	17.03	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	黄酮类	[M-H] <sup>-</sup>	609.1470	0.33	301.0347, 178.9984, 151.0021	b, c
10	迷迭香酸 <sup>[11]</sup>	17.61	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	359.0778	1.11	197.0454, 179.0348, 161.0228, 135.0446, 133.0295	a, b, c
11	N-反式阿魏酰酪胺 <sup>[11]</sup>	19.37	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	酰胺类	[M-H] <sup>-</sup>	312.1245	3.20	178.0507, 148.0513	b, c
12	迷迭香酸甲酯 <sup>[11]</sup>	21.33	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	酚酸类	[M-H] <sup>-</sup>	373.0932	2.41	371.1013, 355.0701, 327.2014	b, c
13	6, 7-二甲氧基香豆 <sup>[13]</sup>	25.06	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	香豆素	[M-H] <sup>-</sup>	205.0505	2.03	161.0235, 133.8742	b, c
14	溪黄草素 A <sup>[14]</sup>	27.27	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	345.1710	2.32	330.1474, 315.1244	a, b, c
15	laxiflorin B <sup>[15]</sup>	29.9	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	343.1554	2.62	328.1317, 313.1085, 295.0977	a, b, c
16	megathyrin B <sup>[14]</sup>	33.77	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	349.2022	0.29	313.1812, 273.1501	b
17	萹黄素 <sup>[11]</sup>	34.65	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	黄酮类	[M-H] <sup>-</sup>	313.0723	1.92	313.0723, 298.0480, 283.0251	a, b, c
18	毛利枋素 <sup>[12]</sup>	37.62	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	405.1903	- 2.22	345.171, 327.1636, 315.1595, 299.1643	b
19	maoecrystal A <sup>[15]</sup>	38.06	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	387.1815	- 1.55	327.1606, 309.1502, 297.1134	a, b, c
20	isodoacetal <sup>[16]</sup>	38.21	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	387.1816	2.58	327.1604, 312.1369	b, c
21	isodocarpin <sup>[11]</sup>	38.43	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	345.1709	2.32	315.1238, 287.0929, 257.0819	a, b, c
22	graciliflorin F <sup>[11]</sup>	38.69	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	387.1814	2.07	327.1580, 312.1369, 297.1134	b
23	kamebakaurin <sup>[17]</sup>	38.98	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	349.2020	- 0.29	331.1916, 313.1809	a, b, c
24	16-acetoxy-7-O-acetylhorninone <sup>[18]</sup>	39.31	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	431.2078	2.09	371.1861, 311.1654	b
25	effusanin A <sup>[16]</sup>	39.53	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	347.1856	- 0.58	347.1865, 329.1748, 301.1808	a, b, c
26	megathyrin A <sup>[15]</sup>	39.53	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	347.1856	- 0.58	347.186, 329.1748, 314.1528, 301.1808	a, b, c
27	rabdocoetsin <sup>[15]</sup>	39.7	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	347.1867	- 3.17	347.186, 329.1748, 314.1528, 301.1808, 286.1577	a, b, c
28	abietane diterpenoids <sup>[12]</sup>	41.56	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	二萜类	[M+H] <sup>+</sup>	331.1906	4.53	313.180, 299.0629, 257.1178, 243.1014, 228.0783	a, b, c
29	gerardianin C <sup>[11]</sup>	41.56	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	二萜类	[M+H] <sup>+</sup>	331.1892	- 5.43	313.179, 299.0618, 257.1159, 243.1016	a, b, c
30	长叶香茶菜甲素 <sup>[11]</sup>	41.9	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	403.2127	1.98	403.2133, 373.2004, 329.1745	b
31	graciliflorin E <sup>[11]</sup>	43.2	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	343.1916	0.87	343.1916, 311.1656	a
32	serrin A <sup>[14]</sup>	43.84	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	389.1955	- 2.06	329.1758, 223.0278, 149.0084	a, b, c
33	horninone <sup>[18]</sup>	44.54	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	331.1917	1.51	331.1917, 313.1811	a, b, c
34	16-acetoxy horninone <sup>[11]</sup>	44.87	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	389.1973	2.57	329.1769	a, c
35	wikstroemioidin H <sup>[11]</sup>	45.69	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	333.2075	3.00	315.1967, 297.1864, 257.1864	b, c
36	effusanin B <sup>[14]</sup>	46.29	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	389.1977	3.60	389.1978, 329.1760	a, b, c
37	rabdosin G <sup>[14]</sup>	46.47	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	389.1961	- 0.51	329.1758, 301.1813	a, c
38	6, 7-dehydroroyleanone <sup>[11]</sup>	46.98	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	313.1811	2.24	283.1337, 257.1179	a, b, c
39	6-hydroxy-5, 6-dehydrosugiol <sup>[11]</sup>	47.15	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	313.1811	2.24	283.1341, 257.1192	a, b, c
40	inflexarabdonin J <sup>[15]</sup>	51.53	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	二萜类	[M-H] <sup>-</sup>	317.2123	1.89	317.2123, 299.2018	a

注 (Note): a. 溪黄草药材组 [*Rabdosia serra* (Maxim) Hara group]; b. 线纹药材组 [*Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham.exD.Don) Hara group]; c. 纤花药材组 [*Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham.ex D.Don) Hara var. *gerardian* group]。



壳杉烷类二萜化合物，其 3, 20- 环氧 C-20 位被氧化。Maoecrystal A 的保留时间为 38.06 min，准分子离子峰为  $m/z$  387.1815[M-H]<sup>-</sup>，其在裂解过程中丢失了一分子 CH<sub>3</sub>COOH，生成碎片离子  $m/z$  327.1606，该碎片离子再丢失一分子 H<sub>2</sub>O，生成  $m/z$  309.1502，这与其他 C-20 位被氧化的对映贝壳杉烷类二萜的碎裂途径一致，并且此裂解规律与文献报道一致<sup>[15]</sup>。Maoecrystal A 的质谱裂解规律见图 4。

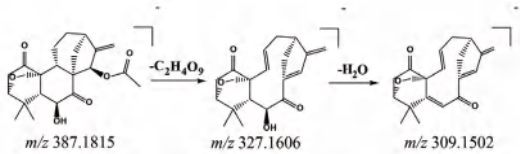


图 4 Maoecrystal A 质谱裂解规律

Fig 4 Proposed fragmentation pathways of maoecrystal A

### 2.3 三种不同基原溪黄草在给药小鼠血清中入血成分的鉴定

M1 在正离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  118.0867[M + H]<sup>+</sup>，推测其分子式为 C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>。在其二级质谱图中检测到特征碎片离子  $m/z$  59.0738，在溪黄草药材及其血清中均被检出，结合文献<sup>[9]</sup>推测该化合物为甜菜碱。M2 在负离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  188.9858[M-H]<sup>-</sup>，推测分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S，其特征碎片为  $m/z$  109.0283，推测是 M2 丢失一分子 SO<sub>3</sub> 所得。纤花药材中可检出原儿茶酸，但在血清中未检出原型，可能是由于其具有 3 个羟基与硫酸结合，因而推测 M2 为原儿茶酸失去一分子 CO<sub>2</sub> 所形成

的 O- 硫酸酯化合物<sup>[21]</sup>，其在小鼠体内可能的代谢途径见图 5。M3 在负离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  179.0343[M-H]<sup>-</sup>，推测分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>，其特征碎片离子  $m/z$  135.0442 可能是前体离子裂解过程中失去一分子 CO<sub>2</sub> 所得，且该碎片离子通过丢失一分子 CO，进而产生  $m/z$  107.0492，推测该结构为咖啡酸，在三种基原溪黄草血清中均被检出原型。结合文献，迷迭香酸在体内代谢产物有咖啡酸，因而推测咖啡酸可能是其代谢产物<sup>[22]</sup>。咖啡酸的质谱裂解规律见图 6，该裂解途径与文献报道一致<sup>[23-24]</sup>。

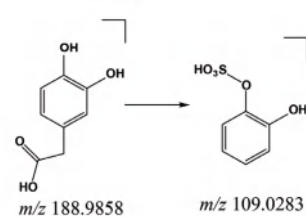


图 5 原儿茶酸体内代谢途径

Fig 5 Metabolic way of protocatechuic acid

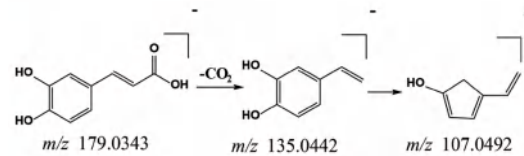


图 6 咖啡酸质谱裂解规律

Fig 6 Proposed fragmentation pathways of caffeic acid

具体三种基原溪黄草给药小鼠血清中入血成分及可能代谢产物见表 2。

表 2 小鼠血清中入血成分及可能代谢产物的鉴定

Tab 2 Identification of blood components and possible metabolites in mouse serum

No.	t <sub>R</sub> /min	分子式	离子模式	实测值	误差 / × 10 <sup>-6</sup>	质谱碎片	来源	化合物
M1	1.94	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	118.0867	- 1.52	59.0738	d	甜菜碱原型
M2	4.98	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	188.9858	0.16	109.0283	f	原儿茶酸代谢产物
M3	10.42	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	179.0343	- 0.56	135.0442, 107.0492	d, e, f	咖啡酸原型或迷迭香酸代谢产物

注 (Note): d. 溪黄草血清 [the serum of the *Rabdosia serra* (Maxim) Hara administration group]; e. 线纹血清 [the serum of the *Rabdosia lophanthoides* (Buch.-Ham.exD.Don) Hara administration group]; f. 纤花血清 (the serum of *Rabdosia lophanthoides* [Buch.-Ham.ex D.Don) Hara var. *gerardiana* (Benth) Hara administration group]。

### 3 讨论

本实验采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术研究四氯化碳致肝纤维化小鼠模型中三种基原溪黄草的入血成分。结果在三组药材中共鉴定出 40 个化合物，包括二萜、酚酸、黄酮及其他类化合物；在给药小鼠血清中鉴定出 2 个入血成分，包括 1 个有机酸类和 1 个生物碱类，鉴定出 2 个可能的代谢产物均为酚酸类化合物。其中，在溪黄草药材和给药组血清中分别鉴定出 26 个和 2 个化合物；在线纹香茶菜药材和给药组血清中分别鉴定出 34 个和

1 个化合物；在纤花香茶菜药材和给药组血清中分别鉴定出 33 个和 2 个化合物。

研究表明，氧化应激是四氯化碳诱导肝纤维化发病的重要机制之一<sup>[25]</sup>。甜菜碱为生物碱类化合物，具有抗氧化及抗炎作用，能够抑制肝星状细胞的活化进而达到抗肝纤维化的效果<sup>[24, 26]</sup>。原儿茶醛与原儿茶酸同为抗氧化、抗炎作用较强的酚酸类化合物，都具有很好的护肝功效<sup>[27-29]</sup>。在药材和给药小鼠血清中均检出酚酸类化合物咖啡酸，研究发现，其通过激活 NRF2/ARE 信号通路，提高抗氧

化相关基因水平, 增强肝细胞清除自由基的能力, 改善肝细胞氧化应激, 从而达到保肝作用<sup>[30]</sup>。

综上所述, 以上入血成分及代谢产物在抗炎、抗氧化等方面发挥着重要作用, 由此推测这些成分可能是三种药材发挥作用的潜在药效物质。虽然三种基原溪黄草药材中均检出较多二萜类成分, 但未在入血成分中检出, 其原因可能为二萜类成分进入小鼠体内后发生了生物转化过程, 因而难以检出原型成分<sup>[31-32]</sup>。

本研究应用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术完成了三种基原溪黄草及其给药后入血成分的初步鉴定, 为后续研究溪黄草的药效物质基础及其抗肝纤维化作用提供了理论参考。

## 参考文献

- [1] 蔡幸婷, 任博文, 李达凉. 溪黄草的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 福建轻纺, 2022 (7): 1-7.
- [2] 刘文彬, 钟景斌, 王晖. 基于网络药理学探讨溪黄草治疗酒精性肝损伤的作用机制 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (6): 9-17.
- [3] Šmíd V. Liver fibrosis [J]. Vnitr Lek, 2020, 66 (4): 61-66.
- [4] Dhar D, Baglieri J, Kisseleva T, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245 (2): 96-108.
- [5] Seki E, Brenner DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22 (7): 512-518.
- [6] 许琼梅, 李跃龙, 曹后康, 等. 溪黄草水提取物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2018, 29 (20): 2791-2796.
- [7] 郑玉峰, 张英剑, 郭虹, 等. 溪黄草黄酮对小鼠非酒精性脂肪肝纤维化的影响及其机制探讨 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27 (14): 28-32.
- [8] Sang L, Wang XM, Xu DY, et al. Morin enhances hepatic Nrf2 expression in a liver fibrosis rat model [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23 (47): 8334-8344.
- [9] 邹钊, 李佳珊, 徐颖, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 和分子对接技术的青盐方药效物质基础分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (22): 159-166.
- [10] 刘方乐, 陈德金, 冯秀丽, 等. 溪黄草的化学成分研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27 (2): 242-245.
- [11] 冯秀丽. 南药“溪黄草”化学成分研究——线纹香茶菜 (Isodon lophanthoides) 化学成分研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [12] 邱佳佳, 刘军民, 詹若挺, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-DAD 的不同品种溪黄草主要化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (13): 3539-3547.
- [13] 邓放, 刘欣, 郑振兴, 等. 5, 7-二甲氧基香豆素和 6, 7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢产物鉴定与代谢途径分析 [J]. 中草药, 2023, 54 (17): 5629-5639.
- [14] 胡娟娟. 溪黄草中对映-贝壳杉烷型二萜化合物的分离鉴定及其抗肝纤维化研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [15] 解伟伟. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术溪黄草化学成分分析及冬凌草乙素体内外代谢研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- [16] 谢瑞杰. 冬凌草和溪黄草化学成分及生物活性研究 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2012.
- [17] 郑琴, 崔炯谟, 傅宏征. 溪黄草的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (16): 2203-2206.
- [18] 陈晓, 廖仁安, 谢庆兰, 等. 溪黄草化学成分的研究 [J]. 中草药, 2000, 31 (3): 171-172.
- [19] 陈伟鸿. 南丹参地上部分酚类物质纯化、解析及其抗炎活性研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2017.
- [20] 丁丽娜. 青海特色食品资源沙棘、黑青稞、枸杞、黑枸杞中的黄酮类与脂肪酸类组分分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [21] 陈家全, 王慧, 李冬玉, 等. 原儿茶酸在大鼠体内代谢产物的分析 [J]. 中成药, 2017, 39 (3): 561-564.
- [22] 赵永跃, 褚扬, 阿基业, 等. 丹参主要水溶性成分的代谢产物研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18 (10): 1560-1563.
- [23] 肖观林, 钟惠娴, 黄华靖, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定小儿清咽颗粒化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (12): 1627-1636.
- [24] Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF, et al. Betaine treatment decreased oxidative stress, inflammation, and stellate cell activation in rats with alcoholic liver fibrosis [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 45: 170-178.
- [25] 康玉华, 杨宇, 王宝家, 等. 肝纤维化动物模型的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (10): 2229-2231.
- [26] Bingül İ, Aydın AF, Başaran-Küçükgergin C, et al. High-fat diet plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis is alleviated by betaine treatment in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39: 199-207.
- [27] Cui B, Yang Z, Wang SN, et al. The protective role of protocatechuic acid against chemically induced liver fibrosis in vitro and in vivo [J]. Pharmazie, 2021, 76 (5): 232-238.
- [28] Lee WJ, Lee SH. Protocatechuic acid protects hepatocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress [J]. Curr Res Food Sci, 2022, 5: 222-227.
- [29] 王莹莹, 高天, 李洋, 等. 基于分子对接技术探讨丹参治疗肝损伤的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, 17 (10): 1307-1310, 1312.
- [30] Pang C, Zheng ZY, Shi L, et al. Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 91: 236-246.
- [31] Du YF, Liu PW, Shi XW, et al. A novel analysis method for diterpenoids in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2010, 407 (1): 111-119.
- [32] 林丽华, 孟晓伟, 李家荣, 等. 基于血清药物化学和网络药理学的泽漆抗慢阻肺药效物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (14): 150-156.

(收稿日期: 2023-08-20; 修回日期: 2023-12-01)

# 在体单向肠灌注模型测定甘草素的药物渗透性及生物药剂学分类预测

汪凯康<sup>1</sup>, 贾文<sup>1</sup>, 丁文华<sup>1</sup>, 刘群山<sup>2</sup>, 徐维平<sup>1, 2, 3\*</sup> (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.安徽省老年医学研究所, 中国科学技术大学附属第一医院老年医学科(安徽省立医院), 合肥 230001; 3.中国科学技术大学附属第一医院药剂科(安徽省立医院), 合肥 230001)

**摘要:** **目的** 测定不同浓度甘草素在大鼠不同肠段的渗透性, 初步探讨甘草素在肠道中的吸收机制, 并对甘草素进行生物药剂学分类预测。**方法** 参考 2020 年版《中国药典》中关于溶解度定义, 考察甘草素在 pH 1.2、4.0、6.8、7.4 的缓冲液和水中的平衡溶解度来评价甘草素的溶解性, 采用在体单向肠灌注模型测定甘草素在 25、50、75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对大鼠十二指肠、结肠、空肠、回肠的渗透性; 结合溶解性和渗透性结果预测甘草素生物药剂学分类。**结果** 甘草素在不同 pH 下和水中平衡溶解度都低于  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 溶解度为不溶或几乎不溶, 亲脂性不强, 甘草素在大鼠不同肠段下的渗透性都大于  $1.2\times 10^{-3}\ \text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ , 为易吸收药物。**结论** 甘草素在大鼠肠吸收中存在自身吸收抑制, 存在吸收饱和特性, 可能有主动转运或扩散等转运机制参与, 预测甘草素为生物药剂学 II 类药物, 为低溶解度, 高渗透性药物。

**关键词:** 甘草素; 渗透性; 肠灌注; 生物药剂学分类

中图分类号: R927.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0302-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.005

## Determination of drug permeability and biopharmaceutical classification of liquiritigenin in vivo by unidirectional intestinal perfusion model

WANG Kai-kang<sup>1</sup>, JIA Wen<sup>1</sup>, DING Wen-hua<sup>1</sup>, LIU Qun-shan<sup>2</sup>, XU Wei-ping<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Department of Geriatrics, Gerontology Institute of Anhui Province, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001)

**Abstract: Objective** To determine the permeability of liquiritigenin at different concentrations, explore the absorption mechanism of liquiritigenin in different intestinal segments of rat, and predict the biopharmaceutical classification properties of liquiritigenin. **Methods** With reference to the definition of medium solubility in the 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia, the solubility of liquiritigenin was evaluated with the equilibrium solubility of buffer solution and water at pH 1.2, 4.0, 6.8, and 7.4. The permeability of liquiritigenin to duodenum, colon, jejunum and ileum of rats at 25, 50, and 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was determined by in vivo unidirectional intestinal perfusion model. The biopharmaceutical classification of liquiritigenin was inferred by combining the solubility and permeability results. **Results** The equilibrium solubility of liquiritigenin was lower than  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  at different pH values and in water, the solubility was low or almost insoluble, and lipophilicity was poor. The permeability of liquiritigenin in different intestinal segments of rats was greater than  $1.2\times 10^{-3}\ \text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ , indicating easy absorption. **Conclusion** Liquiritigenin has self-absorption inhibition and saturation absorption

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.52072360)。

作者简介: 汪凯康, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物新型制剂技术研究, email: 1615700891@qq.com \*通信作者: 徐维平, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事药剂学、药理学研究, email: weipingx@ustc.edu.cn



characteristics in the intestinal of rats, which may involve the transport mechanism such as active transport or diffusion. Liquiritigenin is predicted to be a biopharmaceutical class II drug with low solubility and high permeability.

**Key words:** liquiritigenin; permeability; intestinal perfusion; biopharmaceutical classification

甘草素 (liquiritigenin), 别名 4, 7-二羟基黄酮<sup>[1]</sup>, 是一种从豆科植物甘草根部中提取的二氢黄酮单体化合物<sup>[2-3]</sup>, 在自然界中主要以糖苷元形式存在。近年来, 甘草素的各种药理活性, 包括抗氧化应激<sup>[4-5]</sup>、抗肿瘤作用<sup>[6-8]</sup>、抗抑郁<sup>[9-10]</sup>、抗血脂<sup>[11]</sup>和肠道菌群调节作用先后被发现<sup>[12-13]</sup>。甘草素药效价值大, 市场前景广阔, 目前已成为研究热点<sup>[14]</sup>。

类药性是指先导化合物最终可能成为药物的一些相似特性 (包括溶解度、亲脂性、解离常数等), 以及化合物在机体内的生物学参数。因此在药物研发过程中, 类药性成为快速确认候选化合物能否成为临床前候选药物的重要标准之一<sup>[15-16]</sup>。

本研究通过对甘草素的理化性质及其渗透性研究, 以大鼠各肠段为模型, 测定大鼠对不同浓度的甘草素的吸收情况, 结合其理化性质, 为后续甘草素药物研发设计提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱仪 [岛津企业管理 (中国) 有限公司]; ZORBZX SB-Aq C18 色谱柱 [(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 安捷伦科技 (中国) 有限公司]; BT-50EA 蠕动泵 (重庆杰恒蠕动泵有限公司); BS224S 万分之一电子天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); HH 恒温水浴锅 (江苏金坛区中大仪器厂)。

### 1.2 试药

甘草素对照品 (纯度 > 98%, 批号: AF21021004)、甘草素原料药 (纯度: 98%, 批号: AFBH3102) (成都埃法生物科技有限公司); 葡萄糖 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 批号: G715BA0008]; 氯化钙 (西陇化工股份有限公司, 批号: 1001042); 氯化钾 (无锡市展望化工试剂有限公司, 批号: 70910076); 氯化钠 (天津欧博凯化工有限公司, 批号: 20220320); 碳酸氢钠 (批号: 20180608)、盐酸 (批号: 20210506)、磷酸二氢钾 (批号: 20160226) (国药集团化学试剂有限公司), 磷酸氢二钠 (批号: D1811141)、氯化镁 (批号: B2307832)、磷酸二氢钠 (批号:

F1829111) (上海阿拉丁生化科技有限公司); 氨基甲酸乙酯 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: C15348963); 乙腈 (加拿大 CALEDON 试剂公司, 批号: 52931); 磷酸 (上海易恩化学技术有限公司, 批号: R018659); 甲醇 (天津市大茂化学试剂厂, 批号: 20230301); 纯水 (自制)。

### 1.3 实验动物

SPF 雄性大鼠, 体重约 200 g [许可证号 SCXK (苏) 2020-0009], 本实验获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批件号: 2023030。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 对照品溶液的配制** 精密称取 10.20 mg 的甘草素对照品于 100 mL 量瓶中, 配制成质量浓度为 102.00 μg·mL<sup>-1</sup> 的甘草素对照品母液备用。

**2.1.2 供试品溶液的配制** 精密称取 10.0 mg 的甘草素原料药, 加甲醇溶解、稀释、定容至含甘草素质量浓度为 49.0 μg·mL<sup>-1</sup> 的甘草素供试品溶液, 备用。

**2.1.3 Krebs-Ringer's (K-R) 溶液的配制** 精密称取 NaCl 3.90 g、KCl 0.18 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.69 g、MgCl<sub>2</sub> 0.01 g、葡萄糖 0.70 g 于 500 mL 量瓶中, 加适量纯水超声溶解, 另取一烧杯, 精密称取 CaCl<sub>2</sub> 0.19 g, 加少量纯水溶解后, 分多次少量加入量瓶中, 并保持超声, 补水定容至刻度, 充分摇匀, 即得。

**2.1.4 含甘草素 K-R 溶液的配制** 称取少量的甘草素对照品于量瓶中, 加入适量的 K-R 溶液溶解, 配制成含甘草素的人工肠液。

### 2.2 甘草素含量测定方法学的建立

**2.2.1 色谱条件** C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸溶液-乙腈 (60:40); 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30℃; 检测波长 275 nm; 进样量 10 μL; 进样时间 20 min。

**2.2.2 专属性试验** 取甘草素对照品溶液、甲醇溶剂、人工肠液溶液、人工肠液+对照品溶液适量, 0.22 μm 滤膜过滤后, 进样检测, 比较各溶液之间的色谱峰, 进行峰定位, 结果见图 1, 各溶液色谱峰之间无干扰, 方法专属性良好。

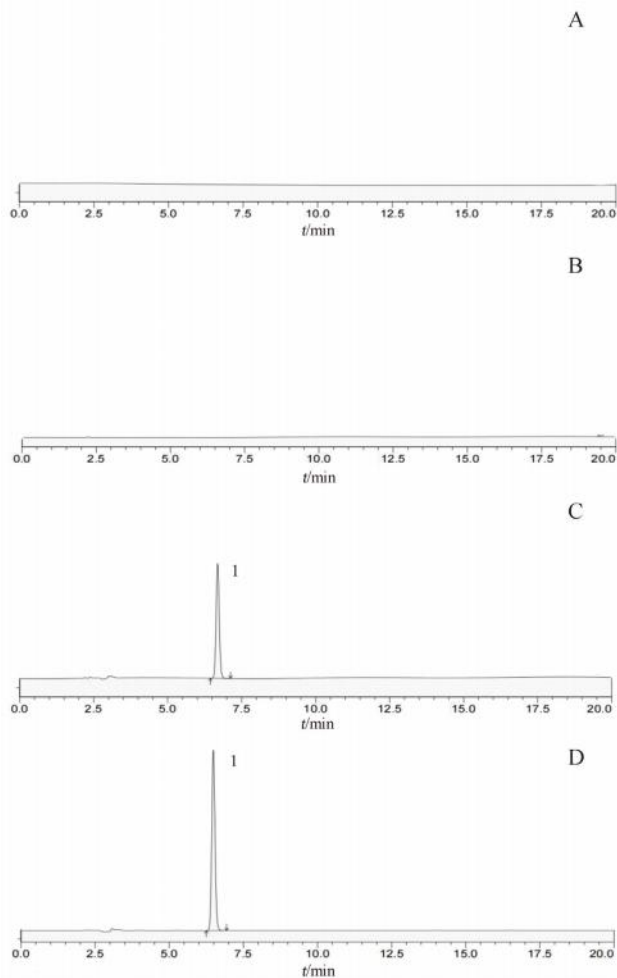


图 1 4 种溶液的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of 4 solutions

A. 溶剂 (solvent); B. 人工肠液 (artificial intestinal fluid); C. 人工肠液 + 甘草素对照品 (artificial intestinal fluid + licorice control); D. 甘草素对照品 (licorice control); 1. 甘草素 (licorice)

**2.2.3 线性关系考察** 取“2.1.1”项下对照品母液适量, 逐级稀释成质量浓度为 102.00、51.00、25.50、12.75、6.38  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的梯度溶液, 于 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 进样检测, 以甘草素质量浓度为横坐标 ( $x$ ), 峰面积 ( $y$ ) 为纵坐标, 得到线性回归方程为  $y = 3.33 \times 10^4 x + 648.54$ ,  $R^2 = 0.9999$ , 表明甘草素对照品质量浓度在 6.38 ~ 102.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积线性关系良好。

**2.2.4 精密度试验** 取供试品溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 连续进样 6 次, 分别测定峰面积, 计算得峰面积  $RSD$  值为 0.88%, 表明该方法精密度良好。

**2.2.5 重复性试验** 按“2.1.2”项下方法, 平行制备 6 组供试品溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 进样检测, 计算得峰面积  $RSD$  值为 0.15%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取供试品溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 于 0、2、4、6、8 h 分别进样测定, 计算得各时间点峰面积  $RSD$  值为 0.58%, 表明溶液在 8 h 内稳定性良好。

**2.2.7 加样回收试验** 取“2.1.2”项下供试品溶液, 按照低、中、高 3 组 (1 : 0.8, 1 : 1, 1 : 1.2) 分别加入甘草素对照品, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后进样测定, 每组平行测定 3 次, 低、中、高 3 组平均加样回收率分别为 99.15%、98.74%、98.94%,  $RSD$  值分别为 2.8%、1.4%、1.4%, 表明该方法准确度高。

**2.3 甘草素平衡溶解度和脂水 (PBS) 分配系数测定**

**2.3.1 缓冲液配制** 参考 2020 年版《中国药典》中关于 pH 缓冲液制备的规定, 配制 pH 分别为 1.2、2.0、5.0、6.8、7.4 的磷酸盐 (PBS) 缓冲液。

**2.3.2 饱和介质的配制** 取适量正辛醇, 分别与水、PBS 缓冲液混合, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴条件振荡 24 h, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 收集上层与下层, 即制备得正辛醇饱和的水、正辛醇饱和的 PBS 溶液、水饱和的正辛醇、PBS 溶液饱和的正辛醇。

**2.3.3 平衡溶解度测定** 分别称取适量甘草素原料药置于离心管中, 分别加入不同 pH 的缓冲液和水, 保持各溶液处于过饱和状态, 离心管底部有剩余甘草素原料药存在, 移至恒温水浴振荡器内 (温度 25  $^{\circ}\text{C}$ , 速度 120  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 振荡 1 d。稀释一定倍数后, 进样检测, 测定最大溶解度, 甘草素在各溶剂中溶解度均低于 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 为不溶或几乎不溶。

**2.3.4 油水分配系数测定** 取两份甘草素原料药适量于具塞锥形瓶中, 加入正辛醇饱和的水或正辛醇饱和的 PBS 溶液, 振荡均匀, 再分别加入等体积的水饱和的正辛醇或 PBS 缓冲液饱和的正辛醇, 盖上锥形瓶塞, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡 24 h, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分液、取样, 稀释一定倍数后于 0.22  $\mu\text{m}$  针式过滤器过滤, 进样检测, 测定水饱和的正辛醇中甘草素浓度为  $C_1$ 、正辛醇饱和的水中甘草素浓度为  $C_2$ 、PBS 饱和的正辛醇中甘草素浓度为  $C_3$ 、正辛醇饱和的 PBS 中甘草素浓度为  $C_4$ ; 计算正辛醇 / 水分配系数:  $\log P_{\text{water}} = \log (C_1 / C_2)$ , 正辛醇 / PBS 分配系数:  $\log P_{\text{PBS}} = \log (C_3 / C_4)$ , 结果见表 1。

**2.4 渗透性测定**

表 1 甘草素脂水 (PBS) 分配系数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 1 Distribution coefficient of liquiritigenin lipid-water (PBS)

溶剂体系	甘草素质量浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		脂水 (PBS) 分配系数
	正辛醇饱和的水 (PBS)	水 (PBS) 饱和的正辛醇	
水 - 正辛醇	$2.36 \pm 0.17$	$975 \pm 1.23$	$2.64 \pm 0.33$
PBS- 正辛醇	$1.87 \pm 0.22$	$612 \pm 1.17$	$2.51 \pm 0.14$

**2.4.1 含药 K-R 溶液的配制** 分别精密称取 0.0125、0.0250、0.0375 g 甘草素原料药于 500 mL 量瓶中, 取“2.1.3”项下人工肠液, 配制质量浓度约为 25、50、75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的含甘草素灌流溶液, 待用。

**2.4.2 肠灌流实验** 取 SPF 雄性大鼠 12 只, 分成低、中、高浓度 3 组。正常喂养, 实验前禁食不禁水 24 h, 麻醉, 剃去大鼠腹部毛发, 沿腹腔中线后打开腹腔, 分离出十二指肠, 肠两端连接注射导管, 将预热至 37 °C 的生理盐水以缓速清洗掉肠中残留瘀血和内容物, 盖上生理盐水浸润过的纱布。将含甘草素的 K-R 溶液置于 37 °C 恒温水浴锅中, 连接蠕动泵, 调节流速, 将蠕动循环装置连接在手术后大鼠的十二指肠两端。待流速稳定 30 min 后开始计时, 用称好质量的试管在十二指肠流出导管口处每隔 20 min 收集一次流出液体。重复操作 6 次后, 分别测定收集后液体的试管质量。实验结束后处死大鼠, 测量十二指肠长度和内径。将收集后的液体稀释后过滤, 进样检测, 测定不同时间点的药物浓度, 计算药物在大鼠十二指肠内的吸收速率常数  $K_a(\text{rat})$ 、药物表观渗透系数  $P_{\text{app}(\text{rat})}$ 。同法测定大鼠回肠、结肠、空肠的  $K_a(\text{rat})$  和  $P_{\text{app}(\text{rat})}$ <sup>[17]</sup>。结果见图 2、3, 大鼠各肠段  $P_{\text{app}(\text{rat})}$  均大于  $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 表明甘草素在各肠段中渗透性高, 而随着甘草素浓度的增加, 药物存在自身吸收抑制、药物有吸收饱和现象。

### 3 讨论

目前, 测定药物在肠道吸收的方法主要有 3 种, 包括体内法、体外法和在体法<sup>[18-19]</sup>, 体内法通常以机体的整体为研究对象, 通过测定机体血液中的药物浓度、药物达峰时间 ( $t_{\text{max}}$ )、表观分布容积 ( $V_d$ )、药时曲线下面积 ( $AUC$ ) 等其他药动学参数, 进而比较药物在机体内的吸收效率和速率。体外法包括外翻肠囊法、组织流动室法、Caco2 细胞模型法等, 在体法包括肠道血管插管法、肠灌流法等<sup>[20-23]</sup>。本研究采用单向肠灌流法来测定甘草素在大鼠各肠段的吸收情况, 相较于其他测定方法, 本方法实验模型构造相对简单, 且成本低, 易操作, 能较为准确地反映出药物在

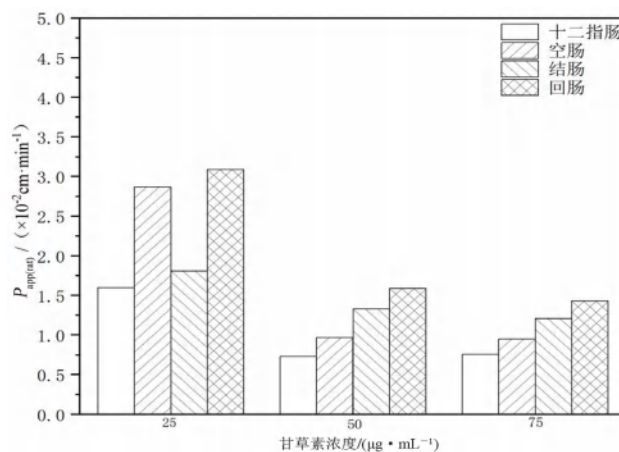


图 2 甘草素在不同肠段和浓度下的  $P_{\text{app}(\text{rat})}$  ( $n = 6$ )

Fig 2  $P_{\text{app}(\text{rat})}$  of liquiritigenin in different intestinal segments and concentrations ( $n = 6$ )

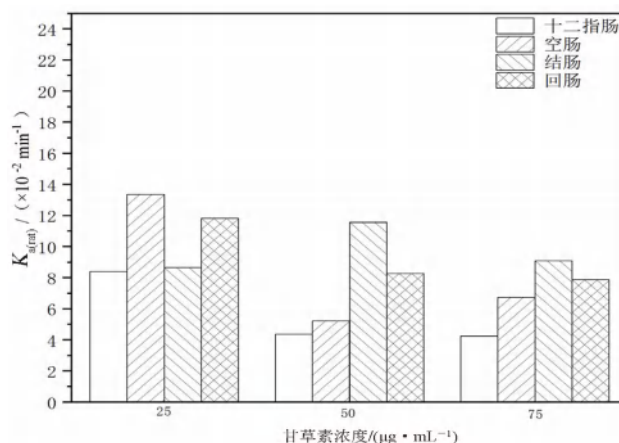


图 3 甘草素在不同肠段和浓度下的  $K_a(\text{rat})$  ( $n = 6$ )

Fig 3  $K_a(\text{rat})$  of liquiritigenin in different intestinal segments and concentrations ( $n = 6$ )

肠道的真实吸收情况<sup>[24-25]</sup>。此外在实验过程中, 为了减少大鼠各肠段中所吸收或分泌的水分对实验产生的误差, 本研究以重量法来消除灌流液流入和流出时的药物浓度差, 从而降低实验误差, 能够更加真实地反映出药物的吸收情况<sup>[17]</sup>。

通过不同浓度的甘草素灌流液对大鼠的肠吸收数据来看, 甘草素在不同肠段中的吸收情况不同, 在回肠和结肠中吸收效果比十二指肠和空肠好, 可能与肠段中膜成分、膜层厚度差异性有关, 后期在给药剂量方面应当考虑不同肠段对药物吸收的影响, 且随着甘草素给药浓度的增加, 其  $P_{\text{app}(\text{rat})}$ 、 $K_a(\text{rat})$  呈下降趋势, 推测甘草素在大鼠肠吸收中存在自身吸收抑制, 而随着其浓度进一步的提高, 各肠段对甘草素吸收趋于饱和。药物可能在吸收过程中, 存在主动转运或扩散等转运机制。药物在肠道中的吸收大小按  $P_{\text{app}(\text{rat})}$  分为 3 类: 当  $P_{\text{app}(\text{rat})} < 0.18 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 表明药物渗透性差; 当  $P_{\text{app}(\text{rat})}$  数值超过  $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ,



则表明药物渗透性高；当  $P_{app(rat)}$  在两者之间则药物渗透性一般。通过上述数据判断甘草素为易吸收药物，药物渗透性高<sup>[26]</sup>。

本研究中选择 pH 1.2、4.0、6.8、7.4 缓冲液和水为溶解介质对甘草素溶解度进行考察，通过 2020 年版《中国药典》对溶解度的相关规定，1 g 溶质在 10 000 mL 溶剂中不能完全溶解定性为不溶或几乎不溶，甘草素在不同 pH 溶液中溶解度基本一致，且都为不溶或几乎不溶。通过对甘草素溶解度、亲脂性以及渗透性进行研究，综上所述，预测甘草素为生物药剂学 II 类药物，为低溶解度，高渗透性药物。

目前以甘草素为研究对象的相关药理研究较为广泛，但以其为主要成分设计的药物剂型较少，可能与其自身溶解度差有关，本课题通过研究不同浓度甘草素在不同肠段的吸收情况及其溶解度和亲脂性特点，为甘草素成药性提供数据参考，同时也为后期甘草素的剂型设计、给药剂量方面提供思路。

## 参考文献

- [1] Wang LQ, Yang R, Yuan BC, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 5 (4): 310-315.
- [2] Li L, Fang H, Yu YH, et al. Liquiritigenin attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice through the TGF- $\beta$ 1/Smad2 and AKT/ERK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24 (4): 1-8.
- [3] 张霞, 张芳, 赵建军, 等. 甘草中黄酮类化合物的网络药理学研究 [J]. *中国药房*, 2019, 30 (11): 1529-1534.
- [4] Zhang YP, He YQ, Yu HB, et al. Liquiritigenin protects rats from carbon tetrachloride induced hepatic injury through PGC-1 $\alpha$  pathway [J]. *Evid-based Compl Alt*, 2015, 2015: 649568.
- [5] Choi EM, Suh KS, Lee YS. Liquiritigenin restores osteoblast damage through regulating oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Phytother Res*, 2014, 28 (6): 880-886.
- [6] 唐乃高, 李鹏程, 翁海勇, 等. 甘草素抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42 (11): 1863-1869.
- [7] 朱婷婷, 厉挺, 赵叶芳. 甘草素调控 circ-0006916/microRNA-513a-3p 对结肠癌细胞 LoVo 生物行为的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021, 29 (11): 809-814.
- [8] 陈钰龙, 王华启, 张莉蓉. 甘草素通过调控 miR-216b-5p 对肺腺癌细胞增殖凋亡及化疗敏感性的作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37 (11): 1559-1564.
- [9] Su Q, Tao WW, Huang H, et al. Protective effect of liquiritigenin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration [J]. *Psychiat Res*, 2016, 240: 131-136.
- [10] Tao WW, Dong Y, Su Q, et al. Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 308: 177-186.
- [11] 石盘棋, 周博, 孙晓燕, 等. 甘草黄酮苷元甘草素的研究及其应用 [J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32 (5): 108-112.
- [12] Keranmu A, Pan LB, Fu J, et al. Biotransformation of liquiritigenin into characteristic metabolites by the gut microbiota [J]. *Molecules*, 2022, 27 (10): 3057.
- [13] He R, Wang SH, Yang SX, et al. Shaoyao-Gancao-Tang regulates the T-helper-type 1/T-helper-type 2 ratio in the lung and gut and alters gut microbiota in rats with ovalbumin-induced asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116300.
- [14] 贾世亮, 武雪玲, 李筱筱, 等. 甘草中黄酮类物质的功能研究进展 [J]. *北京联合大学学报*, 2016, 30 (4): 67-73.
- [15] Sugiyama Y. Druggability: selecting optimized drug candidates [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 23 (10): 1577-1579.
- [16] 韩春艳, 李燕, 刘刚. 类药性: 预测与实践 [J]. *化学进展*, 2008, 20 (9): 1335-1344.
- [17] 罗轶凡, 任利翔, 李晓红, 等. 药物肠道吸收研究方法概述 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40 (5): 706-710.
- [18] 张宁, 平其能. 生物药剂分类系统 (BCS) 及应用进展介绍 [J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (19): 1655-1658.
- [19] He X, Song ZJ, Jiang CP, et al. Absorption properties of luteolin and apigenin in Genkwa Flos using in situ single-pass intestinal perfusion system in the rat [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45 (8): 1745-1759.
- [20] 刘雪婧, 李文龙, 关皓月, 等. 仿制药体外渗透性研究的应用进展 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31 (11): 1066-1071.
- [21] 沈青青, 江振洲, 张陆勇, 等. 药物肠道渗透性预测模型研究进展 [J]. *药学报*, 2018, 53 (5): 727-734.
- [22] 李莹, 康宁芳, 巩仔鹏, 等. 体循环肠灌注法研究红禾麻提取物在类风湿性关节炎大鼠与正常大鼠体内的肠吸收差异 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, (31) 11: 1896-1906.
- [23] 张小飞, 果秋婷, 邹俊波, 等. 黄芩甲苷自乳化释药系统的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. *中草药*, 2019, 50 (13): 3037-3043.
- [24] Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2007, 10 (3): 368-379.
- [25] 许敏, 姜壮壮, 陶丽, 等. 中药渗透性规律及其评价研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50 (14): 3477-3483.
- [26] 高惠静, 王鑫, 李玉玲, 等. 基于在体单向肠灌注模型探究去氢骆驼蓬碱衍生物 HM-Y-A 的肠吸收特性 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (3): 607-611.

(收稿日期: 2023-07-30; 修回日期: 2023-10-10)

# 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷 / 栀子苷对 PM<sub>2.5</sub> 暴露致血管内皮功能障碍的干预作用及其机制

孙欠欠<sup>1,3</sup>, 张行行<sup>1,3</sup>, 赵麓<sup>1,3</sup>, 赵安东<sup>1,3</sup>, 史永恒<sup>1,2,3</sup>, 王川<sup>1,2,3</sup>, 刘继平<sup>1,2,3</sup>, 王斌<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 中医药脑健康产业陕西省高校工程研究中心, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探究黄芩苷 / 栀子苷 (BC/GD) 对 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮功能障碍的改善作用及其机制。 **方法** 利用离体肌张力描记技术测定 BC/GD 对不同状态下血管环张力的影响。将 32 只大鼠随机分为对照组、PM<sub>2.5</sub> 组、30 mg · kg<sup>-1</sup> BC/GD 组和 60 mg · kg<sup>-1</sup> BC/GD 组, 利用气管滴注法构建 PM<sub>2.5</sub> 暴露模型, 持续 2 个月, 造模 1 个月后灌胃给予对应药物, 持续 1 个月, 末次给药后, HE 染色观察肠系膜动脉血管内皮状态; 化学发光法检测肠系膜动脉活性氧 (ROS) 水平; 硝酸还原酶法检测一氧化氮 (NO) 水平; ELISA 法检测血清炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、白三烯 B4 (LTB4) 水平; Western blot 法检测 5-脂氧酶 (5-LOX)、内皮细胞一氧化氮合酶 (eNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 蛋白表达。 **结果** BC/GD 对基础状态的肠系膜动脉血管环张力无明显影响, 但能明显舒张由 5-HT 预收缩的血管环; 一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME、环氧合酶抑制剂 INDO 或 L-NAME + INDO 均能明显抑制 BC/GD 的血管舒张作用, 但 L-NAME 的抑制作用更明显; 50、100 mg · mL<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 能降低血管环对乙酰胆碱 (ACh) 的舒张血管效应, 而 BC/GD 能明显改善 PM<sub>2.5</sub> 诱导的舒张效应减弱。与对照组相比, PM<sub>2.5</sub> 组大鼠肠系膜动脉内皮完整性严重受损、内皮皱缩, 大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、LTB4 水平显著升高、TGF- $\beta$ 1 水平显著降低, 肠系膜动脉组织中 5-LOX、iNOS 蛋白表达明显增加, eNOS 蛋白表达降低, ROS 水平升高, NO 水平降低。与 PM<sub>2.5</sub> 组相比, BC/GD 能改善内皮损伤程度和完整性, 可显著降低血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、LTB4 水平, 升高 TGF- $\beta$ 1 水平; 明显降低肠系膜动脉 5-LOX、iNOS 表达, 升高 eNOS 蛋白表达; 降低 ROS 水平, 升高 NO 水平。 **结论** BC/GD 可通过抑制 5-LOX/LTB4 信号通路表达, 从而降低 ROS 水平, 抑制炎症损伤, 上调 eNOS 表达, 下调 iNOS 表达, 升高血管中 NO 水平, 改善 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮功能障碍。

**关键词:** PM<sub>2.5</sub>; 黄芩苷; 栀子苷; 内皮功能障碍; 5-LOX/LTB4 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0307-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.006

## Intervention of baicalin/geniposide on vascular endothelial dysfunction caused by PM<sub>2.5</sub> exposure and its mechanism based on 5-LOX signaling pathway

SUN Qian-qian<sup>1,3</sup>, ZHANG Hang-hang<sup>1,3</sup>, ZHAO Lu<sup>1,3</sup>, ZHAO An-dong<sup>1,3</sup>, SHI Yong-heng<sup>1,2,3</sup>, WANG Chuan<sup>1,2,3</sup>, LIU Ji-ping<sup>1,2,3</sup>, WANG Bin<sup>1,2,3\*</sup> (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi University Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Brain Health Industry, Xianyang Shaanxi 712046; 3. Key Laboratory of Pharmacodynamic Mechanism and Material Base of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

**基金项目:** 中医药“双链融合”中青年科研创新团队 (No.2022-SLRH-YQ-006); 国家自然科学基金项目 (No.81473385); 陕西省中医药科研项目 (No.2021-ZZ-JC023); 咸阳市重点研发科技项目 (No.JBGS-001)。

**作者简介:** 孙欠欠, 女, 硕士研究生, 主要从事脑血管疾病药效机制研究, email: 1317654498@qq.com \*通信作者: 王斌, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管病的方药研究, email: wangbin812@126.com

**Abstract: Objective** To determine the ameliorative effect of baicalin/geniposide (BC/GD) on PM<sub>2.5</sub>-induced vascular endothelial dysfunction and its mechanism based on 5-LOX/LTB4 signaling pathway. **Methods** The effect of BC/GD on vascular ring tone in different states was determined with an ex vivo muscle tone tracing technique. Thirty-two rats were randomly divided into a control group, a PM<sub>2.5</sub> group, a 30 mg · kg<sup>-1</sup> BC/GD group and a 60 mg · kg<sup>-1</sup> BC/GD group. The exposure model of PM<sub>2.5</sub> was established by tracheal instillation for 2 months, and corresponding drugs were given by gavage for 1 month after the model establishment. After the last administration, HE staining was used to observe the endothelial status of mesenteric artery vasculature. Chemiluminescence detected the level of ROS in the mesenteric arteries; nitrate reductase detected the level of NO; serum levels of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1, and LTB4 were detected by ELISA; and Western blot detected the levels of 5-LOX, eNOS, and iNOS protein expression. **Results** BC/GD had no significant effect on the mesenteric artery vascular ring tone in the base state, but it significantly diastoled the vascular ring precontracted by 5-HT. The nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, the cyclooxygenase inhibitor INDO, or L-NAME + INDO all significantly inhibited the vasodilatory effect of BC/GD, and the inhibitory effect of L-NAME was more obvious; PM<sub>2.5</sub> at 50 mg · mL<sup>-1</sup> and 100 mg · mL<sup>-1</sup> reduced the vasodilatory effect of vascular ring on acetylcholine, whereas BC/GD significantly ameliorated the PM<sub>2.5</sub>-induced attenuation of the diastolic effect. The endothelial integrity of the mesenteric arteries was severely impaired and the endothelium was wrinkled in the PM<sub>2.5</sub> group. Compared with those of the control group, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and LTB4 were higher and the level of TGF- $\beta$ 1 much lower in the PM<sub>2.5</sub> group, and the protein expression of 5-LOX and iNOS was significantly increased and the expression of eNOS was decreased in the tissue of mesenteric arteries. The ROS level was elevated and the NO level decreased. Compared with the PM<sub>2.5</sub> group, BC/GD improved the degree and integrity of endothelial damage to various degrees, significantly reduced the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and LTB4, and increased the level of TGF- $\beta$ 1. Expression of 5-LOX and iNOS was significantly reduced, and eNOS protein expression elevated in the mesenteric arteries; ROS levels reduced, and NO levels elevated. **Conclusion** BC/GD can inhibit inflammatory injury by inhibiting the expression of the 5-LOX/LTB4 signaling pathway, down-regulating ROS levels, up-regulating eNOS expression, down-regulating iNOS expression, and increasing the level of NO in the vasculature, and improve the degree and integrity of PM<sub>2.5</sub>-induced vascular endothelial dysfunction.

**Key words:** PM<sub>2.5</sub>; baicalin; geniposide; endothelial dysfunction; 5-LOX/LTB4 signaling pathway

大气 PM<sub>2.5</sub> 可经呼吸直达肺泡, 沉积于肺泡表面; 其可溶性组分或 PM<sub>0.1</sub> 还可透过肺泡壁的生理屏障进入循环系统, 随血流而作用于全身的靶器官<sup>[1-2]</sup>。据大量流行病学及《中国心血管病报告 2018》最新研究数据显示, 大气 PM<sub>2.5</sub> 污染是引起我国居民心血管疾病发病率和死亡率持续增加的重要风险因素<sup>[3-5]</sup>。内皮细胞损伤是导致许多心血管疾病的起始环节和重要指标<sup>[6]</sup>, 而进入血液循环系统的 PM<sub>2.5</sub> 颗粒可通过多种途径损伤血管内皮细胞, 薛盼盼等<sup>[7]</sup>将 PM<sub>2.5</sub> 与人脐静脉内皮细胞共培养后发现, PM<sub>2.5</sub> 可诱导内质网应激并致其铁死亡; 张一凡等<sup>[8]</sup>研究发现, PM<sub>2.5</sub> 可触发氧化应激和炎症反应, 并激活 P38MAPK 信号

通路促进内皮细胞损伤和凋亡。

课题组前期研究发现, PM<sub>2.5</sub> 暴露可活化心肌组织 NLRP3 炎性小体, 促进炎症反应和心肌细胞凋亡<sup>[9]</sup>, 可以通过调节 MAPK 通路、AMPK 通路、NF- $\kappa$ B 通路与 Sirt1 通路, 影响内皮舒张因子一氧化氮 (NO) 以及活性氧 (ROS) 的释放, 引发血管内皮损伤<sup>[10-11]</sup>。课题组一直致力于黄芩苷 (baicalin, BC)、梔子苷 (geniposide, GD) 抗脑血管损伤药效及机制研究, 黄芩苷、梔子苷以最佳比例 7 : 3 配伍, 在 30、60 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量应用时可有效抑制 5-LOX/CysLTs/CysLTsR 通路表达<sup>[12]</sup>、抗炎<sup>[13]</sup>、降低兴奋性氨基酸毒性<sup>[14]</sup>、调节小胶质细胞极化状态<sup>[15]</sup>等。课题组最新的研



究表明,黄芩苷、栀子苷配伍可呈部分内皮依赖性地舒张由 U46619 预收缩的脑基底血管,其机制可能与调节 NO 表达有关;可通过调节 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 信号通路表达,保护由缺血缺氧诱导损伤的血管内皮损伤。因此,本实验拟通过离体血管环实验和在体动物实验探讨黄芩苷联合栀子苷在 30 (低)、60 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  (高) 剂量对改善 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮功能障碍作用及其机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 32 只,雄性,(220 $\pm$ 20) g [成都达硕实验动物有限公司,动物许可证编号:SCXK(川)2020-030]。饲养于陕西中医药大学中药药理实验动物房内,温度 23~25 $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~55%,自由摄食与饮水,昼夜各半,适应性饲养 1 周。实验过程中对动物的处置符合 3R 原则,本实验通过动物实验伦理审查(伦理批件号:SUCMDL20220301001)。

### 1.2 试剂

一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)、环氧合酶抑制剂(INDO)、乙酰胆碱(ACh)、5-羟色胺(5-HT)、硝普钠二水合物(SNP,批号分别为 67791、84227、133975、HY-B1473、HY-A0119, MCE 公司);黄芩苷(批号: B20570, 含量 $\geq$ 98%)、栀子苷(批号: B21661, 含量 $\geq$ 98%)(上海源叶生物科技有限公司);内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抗体(批号: ab215717, Abcam 公司);诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抗体(批号: BS-0162R, 北京博奥森生物技术有限公司);5-LOX 抗体(批号: GB111330-100, 武汉赛维尔生物科技有限公司);白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒(批号: 0047R2、0190R2、0180R2, 江苏酶免实业有限公司);转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) ELISA 试剂盒(批号: EK0514, 武汉博士德生物科技有限公司);白三烯 B4(LTB4) ELISA 试剂盒(批号: U96-3681E, YOBIBIO)。

### 1.3 仪器

DMT 630M 离体微血管张力测定系统(丹麦 DMT 公司);Powerlab 生物信号采集处理系统(澳大利亚 ADI 公司);TH-1000C II 智能大流量空气颗粒采样器(武汉市天虹有限责任公司);电泳仪、转膜仪及化学发光系统(美国 Bio-rad 公司);Scientz-10N 型真空冷冻干燥机(宁波新艺生物科技股份有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 血管肌张力测定

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) 麻

醉大鼠后,腹主动脉采血处死,剥离肠系膜组织,浸于预冷的 Na $^{+}$ -PSS 溶液中,显微镜下分离肠系膜动脉,切成 4 段,每段 2~3 mm,穿入 2 根 40  $\mu$ m 的金属丝,迅速移至盛有 37 $^{\circ}$ C、氧饱和的 Na $^{+}$ -PSS 溶液的浴槽中,利用两端金属丝固定血管环,平衡 30 min 后,分 3 次施加 1 mN 的预张力,每次间隔 10 min;更换 5 mL 60 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  K $^{+}$ -PSS 收缩血管,重复两次,当两次刺激收缩力均大于 5 mN,且无明显差异时,可用于后续实验<sup>[6]</sup>。即分别测定 BC/GD 对正常基础状态,5-HT 预收缩,以及一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)、环氧合酶抑制剂(INDO)、L-NAME + INDO 孵育血管后的肠系膜动脉血管的舒张作用。

### 2.2 PM<sub>2.5</sub> 颗粒采集及混悬液的制备

将 PM<sub>2.5</sub> 颗粒采集器固定于陕西中医药大学四号教学楼楼顶,楼高约 20 m。通过采集器将 PM<sub>2.5</sub> 颗粒附着于玻璃纤维膜上,将膜裁剪为 1 cm $\times$ 1 cm 方块,置于烧杯中,加入纯水没过,低温超声 60 min,洗脱滤膜,1800 目尼龙滤网过筛除去不溶性大颗粒,滤液真空冷冻干燥 3 d,转移至 60 $^{\circ}$ C 烘箱继续干燥 24 h 后,洁净台分装至无菌离心管, -20 $^{\circ}$ C 保存。使用前,称取适量溶于生理盐水,超声震荡 15 min,注意现用现配。

### 2.3 实验动物分组及给药

32 只大鼠适应性饲养结束后,按随机数字表法分为对照组、PM<sub>2.5</sub> 组(15 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ )、BC/GD 低剂量组(30 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ )、BC/GD 高剂量组(60 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ),每组 8 只,采用非暴露式气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 混悬液进行染毒<sup>[7]</sup>,对照组气管滴注等量生理盐水,每 6 日 1 次,共 10 次<sup>[8]</sup>,滴注体积为 1 mL $\cdot$ kg $^{-1}$ 。BC/GD 为灌胃给药,给药周期为 1 个月,从染毒 1 个月后开始给药。染毒期间观察各组大鼠毛发、精神、饮食、活动状况。给药结束后,禁食 12 h,1% 戊巴比妥钠(50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) 麻醉,腹主动脉取血处死,取肠系膜动脉进行指标检测。

### 2.4 HE 染色观察血管内皮状态

取出大鼠肠系膜动脉,用预冷的生理盐水清洗干净,吸水纸吸干表面多余水分,4% 多聚甲醛固定 72 h 后,经脱水、包埋、切片、脱蜡、染色、制片,光镜下不同倍数观察肠系膜动脉内皮组织病理学状态,选取固定位置拍照。

### 2.5 ELISA 检测血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、LTB4 水平

腹主动脉血液样本常温静置 30 min,3000 r $\cdot$ min $^{-1}$  离心 15 min,分装血清, -80 $^{\circ}$ C 冻存,严格按照试剂盒说明书测定血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、LTB4 水平。

### 2.6 化学发光法检测肠系膜动脉组织 ROS 水平

取适量肠系膜动脉血管组织，冰上消解后剪碎，用预冷的 PBS 冲洗，除去细胞碎片，与适量的酶消化液一起，37℃ 水浴 30 min，孵育过程中，使用移液枪吹打细胞，孵育结束后，PBS 清洗，300 目的尼龙网过筛，收集滤过的细胞，500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min，吸弃上清液，并用 PBS 洗 1~2 次沉淀。利用 DCFH-DA 对细胞沉淀重新悬浮 (1×10<sup>6</sup>~2×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup>)，在 37℃ 下培养 30 min，每 3~5 min 反转混合一次，以保证探头和细胞的完全接触，收集孵育 (探针标记) 后的单细胞悬液，1000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min，收集细胞沉淀，PBS 再次冲洗 1~2 次，再次悬浮，并在最佳激发波长 488 nm，最佳发射波长 525 nm 处测定荧光强度值。

### 2.7 硝酸还原酶法检测肠系膜动脉组织 NO 水平

取适量肠系膜动脉组织与 9 倍量生理盐水在冰上机械匀浆，制成 10% 的匀浆液，3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min，取上清液进行 NO 水平检测。

### 2.8 Western blot 法检测肠系膜动脉 5-LOX、eNOS、iNOS 蛋白表达

取肠系膜动脉组织，加入 RIPA 裂解液提取蛋白并测定蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后加入抗体 (1:1000)，4℃ 孵育过夜；洗涤后加入二抗 (1:5000) 孵育，洗涤后加入 ECL 超敏发光液显影，采用成像仪摄像、测量，利用 Image Pro Plus 5.0 软件分析计算条带灰度值。

### 2.9 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析，数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示，组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)， $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 BC/GD 对基础状态血管张力的影响

与二甲基亚砜 (DMSO) 组比较，BC/GD 对内皮完整的基础状态的肠系膜动脉血管环无明显影响 ( $P > 0.05$ )，提示 BC/GD 对正常基础状态的肠系膜动脉无舒张作用 (见图 1)。

### 3.2 BC/GD 对 5-HT 预收缩的肠系膜动脉血管张力的影响

结果显示，BC/GD 能明显舒张血管环。提示 BC/GD 能舒张 5-HT 预收缩的肠系膜动脉血管 (见图 2)。

### 3.3 BC/GD 舒张血管作用的内皮机制

L-NAME、INDO、L-NAME + INDO 孵育血管 30 min 后，5-HT 预收缩血管，加入 BC/GD 后监

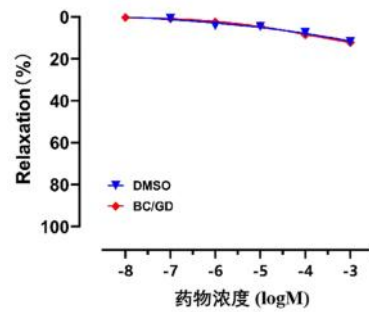


图 1 BC/GD 对基础状态的血管环张力的影响  
Fig 1 Effect of BC/GD on vascular ring tension in the base state

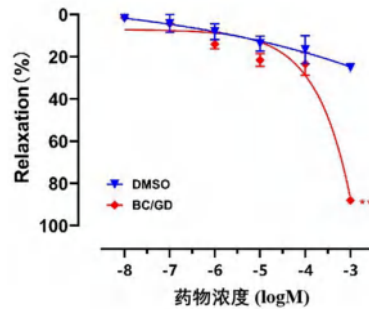


图 2 BC/GD 对 5-HT 预收缩的肠系膜动脉血管张力的影响  
Fig 2 Effect of BC/GD on the tension of the mesenteric artery pre-contracted with 5-HT

注：与 DMSO 组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the DMSO group, \*\* $P < 0.01$ .

测血管环张力变化，结果显示，L-NAME、INDO、L-NAME + INDO 均能抑制 BC/GD 的舒张血管作用，但 L-NAME 对 BC/GD 舒张血管的抑制作用较 INDO 强。提示 BC/GD 对血管的舒张作用与调节 NO 表达有关 (见图 3)。

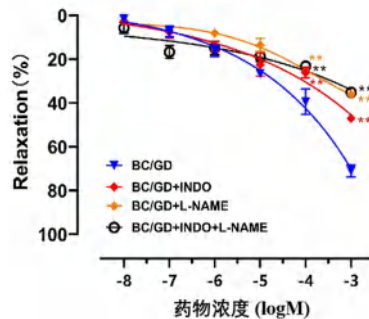


图 3 BC/GD 舒张血管作用的内皮机制  
Fig 3 Endothelial mechanism of BC/GD on the vasodilation

注：与 BC/GD 组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the BC/GD group, \*\* $P < 0.01$ .

### 3.4 PM<sub>2.5</sub> 对血管内皮功能的影响

ACh 是一种内皮依赖性血管扩张剂，通过刺激内皮细胞产生 NO；SNP 是一种非内皮依赖的血管扩张剂，直接释放 NO 来舒张血管<sup>[19-20]</sup>。为了研究 PM<sub>2.5</sub> 对肠系膜动脉血管内皮功能的影响，将内皮完整的肠系膜动脉分别与 DMSO、



25 mg · mL<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>、50 mg · mL<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub>、100 mg · mL<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 共孵育 2 h 后，加入 1 × 10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup> 5-HT 预收缩血管环，稳定后加入 ACh 舒张血管。结果显示，与 DMSO 组比较，50、100 mg · mL<sup>-1</sup> BC/GD 组对 ACh 的血管舒张效应明显减弱 ( $P < 0.01$ )；而各个浓度的 PM<sub>2.5</sub> 对 SNP 的血管舒张效应无明显影响。提示 50 mg · mL<sup>-1</sup> 以上的 PM<sub>2.5</sub> 可引起血管内皮损伤，血管舒张效应减弱 (见图 4)。

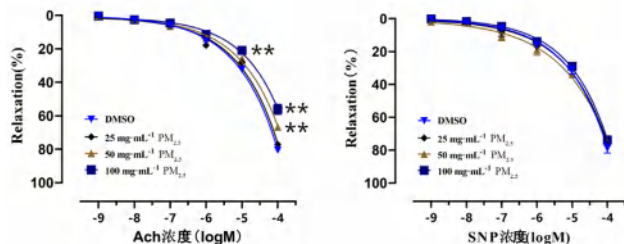


图 4 不同浓度 PM<sub>2.5</sub> 对 ACh、SNP 血管舒张效应的影响  
Fig 4 Effect of different concentrations of PM<sub>2.5</sub> on the vasodilation of ACh and SNP

注：与 DMSO 组比较，\*\* $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the DMSO group, \*\* $P < 0.01$ 。

### 3.5 BC/GD 对 PM<sub>2.5</sub> 诱发血管内皮损伤的影响

为了研究 BC/GD 对 PM<sub>2.5</sub> 引起的血管内皮损伤的影响，将 BC/GD (1 × 10<sup>-3</sup> mol · L<sup>-1</sup>) 与 PM<sub>2.5</sub> 共同孵育 2 h 后，加入 1 × 10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup> 5-HT 预收缩血管环，稳定后累加浓度加入 ACh 舒张血管，观察对血管舒张的影响。结果显示，PM<sub>2.5</sub> 组血管舒张效应明显减弱，加入 BC/GD 共同孵育后，血管舒张作用明显增强。提示 BC/GD 能增强血管舒张效应，对 PM<sub>2.5</sub> 造成的血管内皮损伤有保护作用 (见图 5)。

### 3.6 大鼠一般情况

滴注过程中，对照组大鼠毛色有光泽，饮食、行动正常，呼吸顺畅平稳，无其他明显异常

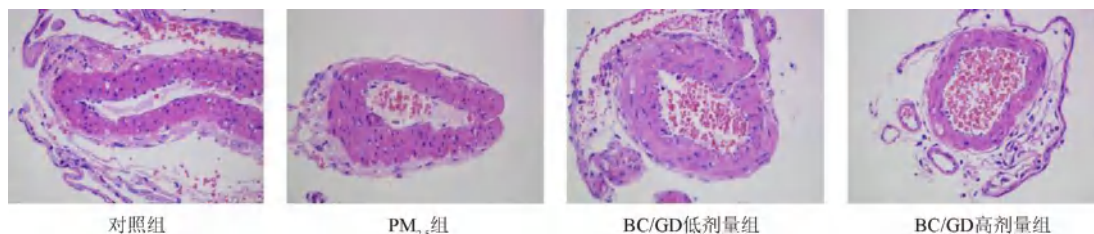


图 6 BC/GD 对各组大鼠肠系膜动脉内皮完整性的影响 (HE 染色，×200)  
Fig 6 Effect of BC/GD on the endothelial integrity of the mesenteric arteries in rats of each group (HE 染色，×200)

### 3.8 ELISA 法检测血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β1 水平

与对照组比较，PM<sub>2.5</sub> 组 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平明显升高 ( $P < 0.01$ )，TGF-β1 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；与 PM<sub>2.5</sub> 组比较，BC/GD 高剂量组

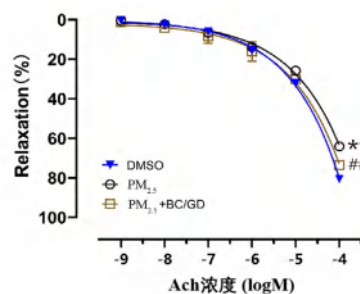


图 5 BC/GD 对 PM<sub>2.5</sub> 诱发血管内皮损伤的影响  
Fig 5 Effect of BC/GD on vascular endothelial injury induced by PM<sub>2.5</sub>

注：与 DMSO 组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与 PM<sub>2.5</sub> 组比较，## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the DMSO group, \*\* $P < 0.01$ ；compared with the PM<sub>2.5</sub> group, ## $P < 0.01$ 。

状态，滴注组大鼠在滴注 4 次后毛色变暗、呼吸急促、变得暴躁，且随着染毒次数的增多，上述症状逐渐加重；饮食未见明显异常，体重增长情况良好，无明显异常。而开始灌胃后，上述异常体征得到有效改善，但体重增长相较于未给药前减缓 (见表 1)。

表 1 大鼠体重变化 (g)

组别	第 1 周	第 4 周	第 8 周
对照组	244.17 ± 17.44	322.50 ± 22.30	315.83 ± 23.75
PM <sub>2.5</sub> 组	225.83 ± 12.81	304.17 ± 16.86	285.00 ± 12.65
BC/GD 低剂量组	240.83 ± 16.25	326.67 ± 39.33	299.17 ± 31.69
BC/GD 高剂量组	232.50 ± 10.37	309.17 ± 31.85	295.00 ± 27.20

### 3.7 各组大鼠肠系膜动脉病理学观察

对照组大鼠肠系膜动脉血管内皮细胞连续、完整，无明显病理损伤；PM<sub>2.5</sub> 组大鼠肠系膜动脉内皮完整性严重受损、出现缺失，内皮皱缩，BC/GD 能不同程度改善大鼠内皮损伤程度和完整性 (见图 6)。提示 BC/GD 对 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮损伤具有保护作用。

大鼠 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )，TGF-β1 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；BC/GD 低剂量组大鼠 TNF-α 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )，IL-1β、IL-6、TGF-β1 水平无明显差异 (见图 7)。

### 3.9 化学发光法检测肠系膜动脉中 ROS 水平



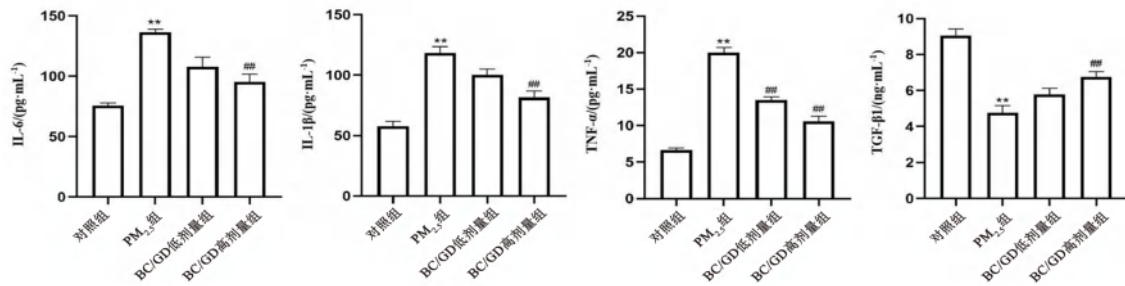


图 7 BC/GD 对各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1 水平的影响

Fig 7 Effect of BC/GD on the serum IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ 1 levels of rats in each group

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the PM<sub>2.5</sub> group, ## $P < 0.01$ .

与对照组比较, PM<sub>2.5</sub> 组大鼠肠系膜动脉中 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, BC/GD 高剂量组大鼠肠系膜动脉中 ROS 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); BC/GD 低剂量组大鼠肠系膜动脉中 ROS 水平与 PM<sub>2.5</sub> 组无明显差别 (见图 8)。

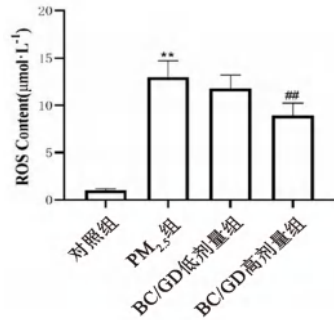


图 8 BC/GD 对各组大鼠肠系膜动脉 ROS 水平的影响

Fig 8 Effect of BC/GD on the ROS levels in mesenteric arteries of rats in each group

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the PM<sub>2.5</sub> group, ## $P < 0.01$ .

### 3.10 硝酸还原酶法检测肠系膜动脉中 NO 水平

与对照组比较, PM<sub>2.5</sub> 组大鼠肠系膜动脉中 NO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, BC/GD 高剂量组大鼠肠系膜动脉中 NO 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); BC/GD 低剂量组大鼠肠系膜

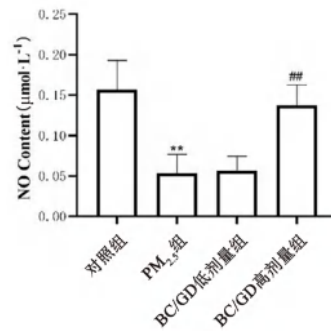


图 9 BC/GD 对各组大鼠肠系膜动脉 NO 水平的影响

Fig 9 Effect of BC/GD on the NO levels in mesenteric arteries of rats in each group

注: 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the PM<sub>2.5</sub> group, ## $P < 0.01$ .

动脉中 NO 水平与 PM<sub>2.5</sub> 组无明显差别 (见图 9)。

### 3.11 肠系膜动脉中 5-LOX、eNOS、iNOS 蛋白表达和血清中 LTB4 水平

与对照组比较, PM<sub>2.5</sub> 组 5-LOX、iNOS、LTB4 水平明显升高, eNOS 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, BC/GD 低、高剂量组大鼠 5-LOX、iNOS 蛋白表达显著降低, eNOS 蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ ); BC/GD 高剂量组 LTB4 水平降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 10)。

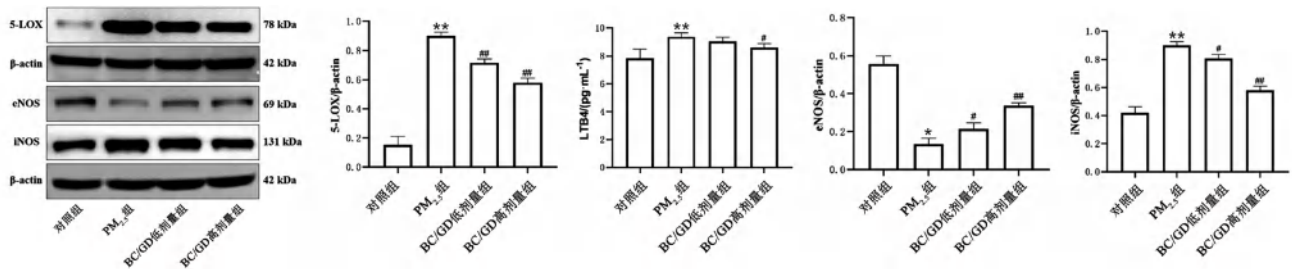


图 10 BC/GD 对各组大鼠肠系膜动脉中 5-LOX、eNOS、iNOS 蛋白表达和血清中 LTB4 水平的影响

Fig 10 Effect of BC/GD on the expression of 5-LOX, eNOS, and iNOS protein in the mesenteric artery and the level of LTB4 in the serum of rats in each group

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 PM<sub>2.5</sub> 组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the PM<sub>2.5</sub> group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

#### 4 讨论

PM<sub>2.5</sub> 具有粒径小、成分复杂、危害大等特点, 易通过上呼吸道黏膜到达并堆积在肺部, 再通过肺循环进入全身血液循环<sup>[21]</sup>。多项研究表明, PM<sub>2.5</sub> 已经成为诱发心肌细胞炎性细胞因子水平增加、诱导血管内皮凋亡、凝血功能异常、自主神经功能失衡等心血管疾病不可忽视的重要因素<sup>[22]</sup>。

血管内皮细胞是附着于血管内皮生长的单层鳞状细胞, 与血液直接接触, 对血液中的异物刺激具有直接反应<sup>[23]</sup>, 正常生理情况下, 内皮细胞可感知内外环境的变化并分泌多种血管活性物质来维持机体内环境稳定<sup>[24]</sup>。黄芩苷为唇形科植物黄芩干燥根中提取的黄酮类物质, 具有保肝、利胆、降压、镇静、消炎等药理活性。栀子苷为茜草科植物栀子干燥成熟果实中提取的环烯醚萜类物质, 具有保肝利胆、解热镇静、降压、抗炎、止血等药理作用。研究表明, 黄芩苷具有浓度依赖性血管舒张作用<sup>[25]</sup>, 但鲜见栀子苷舒张血管的相关报道。本实验中, BC/GD 对基础状态的肠系膜动脉血管环张力无明显影响, 但能明显舒张由 5-HT 预收缩的血管环, 加入一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME、环氧合酶抑制剂 INDO 或两者合用孵育血管环后, 均能明显抑制 BC/GD 的血管舒张作用, 但 L-NAME 的抑制作用更为明显, 提示 BC/GD 舒张血管作用与内皮舒张因子 NO 有关。体内外研究表明, 进入血液循环的 PM<sub>2.5</sub> 颗粒可通过多种途径引起血管内皮细胞损伤, 引起血管舒张功能障碍<sup>[26]</sup>。本实验将不同浓度 PM<sub>2.5</sub> 与血管环共孵育 2 h 后, 发现 50 mg · mL<sup>-1</sup> 的 PM<sub>2.5</sub> 能明显减弱 ACh 引发的血管舒张, 而对 SNP 引发的血管舒张效应无明显影响, 提示 PM<sub>2.5</sub> 引起的血管舒张效应减弱与内皮有关。将 BC/GD 和 PM<sub>2.5</sub> 共孵育血管环 2 h 后, BC/GD 能明显改善由 PM<sub>2.5</sub> 诱导的舒张效应减弱的作用。提示 PM<sub>2.5</sub> 与肠系膜动脉血管环共孵育后能通过多种途径损伤血管内皮, 诱发血管内皮功能障碍, 而 BC/GD 对 PM<sub>2.5</sub> 造成的血管损伤具有保护作用。

NO 是一种具有内皮功能的多效性功能分子, 也是机体最强的血管舒张物质, 由内皮细胞中的 L-精氨酸在钙-钙调蛋白依赖性的 NOS 催化下合成释放<sup>[27]</sup>。而 NOS 具有三种不同的亚型, 即在正常状态下表达的神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 和 eNOS 以及在损伤后诱导表达的 iNOS<sup>[28]</sup>。内皮细胞受到 PM<sub>2.5</sub> 刺激后, 会引起血管通透性增加、NO 生成减少, 促进血管紧张素 II 等血管收缩介质的表达与释放, 导致内皮功能障碍<sup>[29]</sup>。而 PM<sub>2.5</sub> 由于其复杂的化学组成和粒径

大小, 表面通常吸附重金属 (如铅、锌、铁、镉、镍、砷和铬等) 和毒害有机物, 其中过渡金属离子可以催化氧化还原反应, 在 PM<sub>2.5</sub> 表面产生 ROS 或活性氮<sup>[30]</sup>。ROS 可以直接灭活 NO, 也可通过耗竭四氢生物蝶呤 (BH4), 使 eNOS 的合成受到抑制, NO 含量减少, 加速内皮功能障碍<sup>[31]</sup>。为进一步探讨 BC/GD 抗 PM<sub>2.5</sub> 暴露致使的血管内皮功能障碍作用及其机制, 本研究利用气管滴注法构建 PM<sub>2.5</sub> 染毒模型。在前期的预实验中选择 7.5、15、30 mg · kg<sup>-1</sup> 三个 PM<sub>2.5</sub> 浓度分别滴注 1 个月、2 个月、3 个月进行造模浓度和时间的筛选, 结果发现, 15 mg · kg<sup>-1</sup> PM<sub>2.5</sub> 滴注 2 个月能明显激活 NLRP3 炎性小体, 诱导心肌细胞结构损伤、促进炎症反应和心肌细胞凋亡<sup>[9]</sup>; 致使脑组织炎性损伤和激活小胶质细胞并向 M1 型极化, 因此, 本实验继续采用该造模方法。对各组大鼠血管功能性指标进行检测, 结果显示, PM<sub>2.5</sub> 组大鼠肠系膜动脉内皮严重受损, 血管中 ROS 升高, NO 降低, 而 BC/GD 组大鼠内皮损伤得到改善; 60 mg · kg<sup>-1</sup> 能明显降低 ROS 水平、升高 NO 水平, 促进 eNOS、抑制 iNOS 表达。

课题组一直致力于研究 5-脂氧酶 (5-LOX) / 白三烯 B4 (LTB4) 信号通路介导的机体损伤, 5-LOX 可以催化花生四烯酸 (AA) 生成白三烯 A4 (LTA4), LTA4 在一系列酶催化反应下可生成半胱氨酰白三烯 (CysLTs) 和 LTB4<sup>[32]</sup>。LTB4 是重要的促炎脂质介质和炎症趋化因子, 主要表达于巨噬细胞、血小板、平滑肌细胞和内皮细胞等细胞中<sup>[33]</sup>, LTB4 可激活 LTB1 和 LTB2 两个受体, 从而激活并招募 B 细胞和 T 细胞, 促进核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 产生和 IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子表达, 引发炎症级联反应, 促进细胞凋亡<sup>[34]</sup>。有研究表明, 5-LOX、FLAP 和 LTA4H 在动脉粥样硬化病变处均处于高表达状态, 因此, 本研究继续选择该通路对 BC/GD 改善 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮功能障碍机制进行探讨。结果显示, PM<sub>2.5</sub> 组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、LTB4 水平显著升高, TGF- $\beta$ 1 水平显著降低, 大鼠肠系膜动脉中 5-LOX 蛋白表达明显增加, 而 60 mg · kg<sup>-1</sup> BC/GD 能明显下调 5-LOX、LTB4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达, 上调 TGF- $\beta$ 1 表达。提示 BC/GD 可通过抑制 5-LOX/LTB4 信号通路活化, 抑制下游炎性介质释放, 降低炎性损伤。

综上所述, BC/GD 可通过抑制 5-LOX/LTB4 信号通路表达, 下调 ROS 水平, 上调 eNOS 表达, 下调 iNOS 表达, 升高血管中 NO 水平, 改善 PM<sub>2.5</sub> 诱导的血管内皮功能障碍。

## 参考文献

- [1] Li RY, Zhou R, Zhang JG. Function of PM<sub>2.5</sub> in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (5): 7506-7514.
- [2] 吴海盛, 曾庆辉, 余晓琳, 等. 环境空气 PM<sub>2.5</sub> 化学成分暴露及其健康效应研究进展 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2021, 34 (2): 118-121.
- [3] 朱文涛, 胡雨晨, 蔡佳洁, 等. 大气 PM<sub>2.5</sub> 对心血管系统损伤机制的研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2020, 37 (9): 929-935.
- [4] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34 (3): 209-220.
- [5] Yang Y, Cao LM, Xia Y, et al. The effect of living environmental factors on cardiovascular diseases in Chinese adults: results from a cross-sectional and longitudinal study [J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2023, 30 (11): 1063-1073.
- [6] 常成成, 位庚, 李红蓉, 等. 微血管内皮细胞损伤在心血管疾病发病中的作用及通路干预研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (6): 1459-1462.
- [7] 薛盼盼. PM<sub>2.5</sub> 诱导人脐静脉内皮细胞内质网应激与铁死亡及大蒜素对其的保护作用研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2022.
- [8] 张一凡, 张林. 川芎对 PM<sub>2.5</sub> 诱导的人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用和机制 [J]. *中药材*, 2019, 42 (7): 1652-1655.
- [9] 张行行, 赵麓, 孙欠欠, 等. PM<sub>2.5</sub> 暴露对大鼠心脏功能及 NLRP3 炎性小体表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31 (4): 445-453.
- [10] Hu TT, Zhu P, Liu YH, et al. PM<sub>2.5</sub> induces endothelial dysfunction via activating NLRP3 inflammasome [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36 (9): 1886-1893.
- [11] Xu XD, Xu H, Qimuge A, et al. MAPK/AP-1 pathway activation mediates AT1R upregulation and vascular endothelial cells dysfunction under PM<sub>2.5</sub> exposure [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 188-194.
- [12] 李慧敏. 黄芩苷、栀子苷及其配伍通过 5-LOX/LTB<sub>4</sub> 通路调控小胶质细胞 M1/M2 极化抗脑缺血炎性损伤机制研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2021.
- [13] 何林, 刘寒, 高原雪, 等. 5-LOX-CysLTs-CysLTsR 表达规律及黄芩苷-栀子苷配伍对大鼠脑缺血抗炎作用机制研究 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2019, 42 (3): 57-63.
- [14] 李豪, 何林, 高原雪, 等. 微透析法测定脑缺血损伤后黄芩苷、栀子苷及兴奋性氨基酸含量变化 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35 (1): 107-112.
- [15] 吴杰. 黄芩苷、栀子苷及其配伍调控缺血性脑卒中后小胶质细胞 M1/M2 分化发挥神经元保护作用 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2020.
- [16] 张盼, 王钰莹, 王婷, 等. 香烟烟雾颗粒通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (6): 1238-1244.
- [17] 张行行, 赵麓, 孙欠欠, 等. 鼻内滴注与气管滴注 PM<sub>2.5</sub> 建立大鼠急性肺损伤模型比较研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38 (12): 2298-2304.
- [18] Zhang Q, Li QZ, Ma JC, et al. PM<sub>2.5</sub> impairs neurobehavior by oxidative stress and myelin sheaths injury of brain in the rat [J]. *Environ Pollut*, 2018, 242 (Pt A): 994-1001.
- [19] Attaye I, Smulders YM, de Waard MC, et al. The effects of hyperoxia on microvascular endothelial cell proliferation and production of vaso-active substances [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2017, 5 (1): 22.
- [20] 罗凤英. 基于血管活性物质探讨风药 (防风、白芷) 对高血压大鼠的降压增效作用机制 [D]. 泸州: 四川医科大学, 2015.
- [21] 陈欢, 刘永生, 尹扬光. PM<sub>2.5</sub> 对动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. *预防医学*, 2021, 33 (10): 1017-1021.
- [22] 王李晋, 赵田禾, 胡竟一, 等. 中药干预 PM<sub>2.5</sub> 所致呼吸系统和心血管系统损伤的研究现状 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (3): 188-192.
- [23] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, et al. Vascular endothelial cell biology: an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (18): 4411.
- [24] Pi XC, Xie L, Patterson C. Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis [J]. *Circ Res*, 2018, 123 (4): 477-494.
- [25] 刘蓉, 卞淑泓, 许激扬, 等. 中药单体组合的血管舒张作用研究 [J]. *华西药学杂志*, 2011, 26 (6): 551-553.
- [26] 熊丽林. PM<sub>2.5</sub> 诱导的炎性反应对心血管内皮的损伤及分子机制研究 [D]. 南京: 东南大学, 2019.
- [27] Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, et al. Nitric oxide and endothelial dysfunction [J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36 (2): 307-321.
- [28] Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, et al. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts [J]. *Endocrinology*, 2006, 147 (12): 5600-5610.
- [29] Long MH, Zhu XM, Wang Q, et al. PM<sub>2.5</sub> exposure induces vascular dysfunction via NO generated by iNOS in lung of ApoE<sup>-/-</sup> mouse [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16 (1): 49-60.
- [30] Arellano BAS, Tostado GM, Sánchez RO, et al. Immunomodulatory effects of the nutraceutical garlic derivative allicin in the progression of diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (10): 3107.
- [31] 翁依佳, 吴思毅, 罗君婷, 等. GDF15 对氧化应激诱导血管内皮损伤和血管生成的调节作用 [J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39 (5): 693-698.
- [32] 周铭涛, 郭琰. 基于 5-脂氧合酶代谢通路的中药复方干预动脉粥样硬化炎症的新思路 [J]. *心血管病学进展*, 2023, 44 (4): 350-354.
- [33] Dupouy C, Saban L, Dupré-Crochet S. The liposome: the site of LTB<sub>4</sub> synthesis, a mediator of sterile inflammation [J]. *Med Sci (Paris)*, 2020, 36 (5): 528-530.
- [34] Pal K, Feng X, Steinke JW, et al. Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase activation and leukotriene B<sub>4</sub> production by eosinophils in severe asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60 (4): 413-419.

(收稿日期: 2023-09-22; 修回日期: 2023-11-06)



# 基于 UPLC 特征图谱的苦杏仁、桃仁及甜杏仁药材鉴别研究

叶聪<sup>1,2</sup>, 谢翡翡<sup>1,2</sup>, 李国卫<sup>2</sup>, 胡绮萍<sup>2</sup>, 童培珍<sup>2</sup>, 吴润松<sup>1,2</sup>, 罗文汇<sup>2</sup>, 孙冬梅<sup>1,2\*</sup> (1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东一方制药有限公司广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱法建立 3 种蔷薇科种子类药材的特征图谱, 并结合化学计量学进行分析, 为甜杏仁、苦杏仁、桃仁的鉴别及质量控制提供依据。**方法** 选择 Agilent ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 为色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 0.2% 磷酸溶液为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 25℃, 检测波长为 210 nm, 共采集 3 种蔷薇科药材 35 批, 建立特征谱图并进行相似度评价, 结合聚类分析、正交偏最小二乘法判别分析对苦杏仁、甜杏仁、桃仁的化学成分进行研究。**结果** 3 种蔷薇科种子类药材的特征图谱具有明显差异, 可通过峰 2、峰 4 区分苦杏仁、甜杏仁和桃仁; 采用质谱指认结合相关文献研究初步指认了特征图谱中的 5 种成分, 并通过对照品对比进一步指认其中 2 种成分为苦杏仁苷和野黑樱苷; 通过聚类分析能准确区分 3 种药材, 且其种内相似度较高, 种间相似度较低; 正交偏最小二乘法判别分析结果与特征图谱分析、聚类分析一致, 并筛选出苦杏仁苷为 3 种药材的差异性标志物。**结论** 建立的分析方法操作简便, 可快速、准确区分苦杏仁、甜杏仁、桃仁, 为 3 种蔷薇科药材的鉴别及质量控制提供参考。

**关键词:** 苦杏仁; 桃仁; 甜杏仁; 特征图谱; 化学计量学; 质量评价

**中图分类号:** R284, O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0315-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.007

## Identification of *Armeniaca Semen Amarum*, *Persicae Semen* and sweet apricot kernel materials based on UPLC characteristic chromatograms

YE Cong<sup>1,2</sup>, XIE Fei-fei<sup>1,2</sup>, LI Guo-wei<sup>2</sup>, HU Qi-ping<sup>2</sup>, TONG Pei-zhen<sup>2</sup>, WU Run-song<sup>1,2</sup>, LUO Wen-hui<sup>2</sup>, SUN Dong-mei<sup>1,2\*</sup> (1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules Enterprise, Foshan Guangdong 528244)

**Abstract: Objective** To establish UPLC characteristic chromatogram of 3 Rosaceae medicinal materials to identify and control the quality of *Armeniaca Semen Amarum*, sweet apricot kernel and *Persicae Semen* combined with chemometrics analysis. **Methods** The gradient elution was performed on the Agilent ZORBAX SB-Aq column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution at 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 25℃. Totally 35 batches of 3 Rosaceae medicinal materials were collected, the characteristic spectrum was established and the similarity was evaluated. The chemical components of *Armeniaca Semen Amarum*, sweet apricot kernel and *Persicae Semen* were studied by cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. **Results** The characteristic chromatograms of the 3 seed medicinal materials of Rosaceae were obviously different. The *Armeniaca Semen Amarum*, sweet apricot kernel and *Persicae Semen* could be distinguished by peak 2 and 4. Totally 5 characteristic peaks were preliminarily identified through MS identification combined with relevant literature research, and 2 components were further identified as amygdalin and prunasin by comparison with the

**基金项目:** 国家工信部 2022 年产业技术基础公共服务平台项目 - 中药全产业链质量技术服务平台 (No. 2022-230-221)。

**作者简介:** 叶聪, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药质量评价研究, email: 630985790@qq.com \*通信作者: 孙冬梅, 女, 教授, 主要从事中药新药研发及中药质量评价研究, email: 1471237855@qq.com

reference substances. Cluster analysis accurately distinguished 3 types of medicinal materials, with high intra species similarity and low inter species similarity. The results of orthogonal partial least squares discriminant analysis were consistent with those of characteristic chromatogram analysis and cluster analysis, and amygdalin was selected as a Q-marker for the 3 medicinal materials. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can provide reference for the identification and quality control of 3 Rosaceae medicinal materials.

**Key words:** *Armeniaca Semen Amarum*; *Persicae Semen*; sweet apricot kerne; characteristic chromatogram; chemometrics; quality evaluation

苦杏仁、甜杏仁、桃仁均为蔷薇科 (Rosaceae) 种子类中药。苦杏仁为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim、西伯利亚杏 *Prunus sibirica* L.、东北杏 *Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne 或杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子<sup>[1]</sup>；甜杏仁收载在甘肃省中药材标准 (2020 年版) 中<sup>[2]</sup>，为蔷薇科植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子，它的基原与苦杏仁的基原杏 *Prunus armeniaca* L. 相同，但栽培方式不同，一般不作药用，常作为食品、饮料的原料<sup>[1, 3-4]</sup>；桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子。因 3 种药材同为蔷薇科植物种子类中药，化学成分均以苦杏仁苷等苷类化合物为主，相似性较高，具有止咳平喘、润肠通便等相似功效，但现代研究表明甜杏仁较苦杏仁药力缓和，苦杏仁偏降气止咳，甜杏仁偏于润肺止咳，而桃仁长于活血化瘀，兼具润肠通便、止咳平喘的功效，故三者不可混淆使用<sup>[5-7]</sup>。

苦杏仁、桃仁、甜杏仁的功能主治及临床应用范围不同，但其外观性状相似，容易混淆，市场上存在将价格相对较低的苦杏仁掺入桃仁的问题<sup>[8]</sup>，而目前 3 种药材的鉴别主要采用主观性较强、依赖传统经验的性状鉴别方法，不能有效保障苦杏仁、桃仁的用药有效性、安全性和甜杏仁的食品安全性，亟须建立一种简便、快速、专属性强的鉴别方法。本研究采用 UPLC 法建立了苦杏仁、甜杏仁、桃仁的特征图谱鉴别方法，并对 3 种蔷薇科种子类药材的质量进行了综合研究，以期为苦杏仁、甜杏仁、桃仁的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

SHIMADZU LC-40D XS 型超高效液相色谱仪 (日本岛津公司)；Thermo QE Focus Orbitrap 型高分辨质谱 (美国赛默飞公司)；ME204E 万

之一天平、XP26 百万分之一天平 (梅特勒-托利多公司)，KQ500D 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)，HWS28 型 (恒温水浴锅上海一恒科技有限公司)。

### 1.2 试药

苦杏仁苷 (批号：110820-201808，含量：88.2%，中国食品药品检定研究院)；野黑樱苷 (批号：8781，含量：98.0%，上海诗丹德标准技术服务有限公司)；15 批甜杏仁药材为蔷薇科植物杏 *P. armeniaca* L. 的干燥成熟种子，10 批苦杏仁药材为蔷薇科植物东北杏 *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne、山杏 *P. armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子，10 批桃仁药材为蔷薇科植物桃 *P. persica* (L.) Batsch、山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子，上述样品均由广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定，分别采集于河北、河南、山东、新疆、内蒙古、山西、辽宁、陕西、甘肃等地，详细信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

选择 Agilent ZORBAX SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 为色谱柱，以乙腈为流动相 A，0.2% 磷酸溶液为流动相 B，梯度洗脱 (0~5 min, 0%A；5~7 min, 0%~3%A；7~20 min, 3%~6%A；20~23 min, 6%~80%A；23~28 min, 80%A；28~30 min, 80%~0%A；30~35 min, 0%A)；流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>；柱温为 25℃；检测波长为 210 nm；进样量为 1 μL。

### 2.2 对照品溶液制备

取苦杏仁苷、野黑樱苷对照品适量，精密称定，加甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为 49.79、10.03 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液制备

药材粉碎，过二号筛。取 35 批苦杏仁、桃仁、甜杏仁药材粉末各约 2 g，精密称定，置于具塞

表 1 35 批蔷薇科药材来源信息

Tab 1 Source information of 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

编号	品名	基原	产地	编号	品名	基原	产地
K1	苦杏仁	东北杏	辽宁省凤城市	T9	桃仁	山桃	陕西省宝鸡市
K2	苦杏仁	东北杏	辽宁省凤城市	T10	桃仁	山桃	河北省承德市
K3	苦杏仁	东北杏	辽宁省阜新市	N1	甜杏仁	杏	新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州
K4	苦杏仁	东北杏	辽宁省阜新蒙古族自治县	N2	甜杏仁	杏	新疆维吾尔自治区乌鲁木齐沙依巴克区
K5	苦杏仁	东北杏	辽宁省阜新蒙古族自治县	N3	甜杏仁	杏	新疆维吾尔自治区乌鲁木齐沙依巴克区
K6	苦杏仁	山杏	甘肃省定西市	N4	甜杏仁	杏	新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
K7	苦杏仁	山杏	甘肃省定西市	N5	甜杏仁	杏	河南省三门峡市
K8	苦杏仁	山杏	陕西省宝鸡市	N6	甜杏仁	杏	河南省三门峡市
K9	苦杏仁	山杏	陕西省宝鸡市	N7	甜杏仁	杏	河南省三门峡市
K10	苦杏仁	山杏	陕西省宝鸡市	N8	甜杏仁	杏	河南省洛阳市
T1	桃仁	桃	山东省临沂市	N9	甜杏仁	杏	河南省洛阳市
T2	桃仁	桃	山东省临沂市	N10	甜杏仁	杏	山东省临沂市
T3	桃仁	山桃	甘肃省平凉市	N11	甜杏仁	杏	山东省临沂市
T4	桃仁	山桃	甘肃省平凉市	N12	甜杏仁	杏	山西省吕梁市
T5	桃仁	山桃	甘肃省平凉市	N13	甜杏仁	杏	山西省吕梁市
T6	桃仁	山桃	甘肃省平凉市	N14	甜杏仁	杏	河北省承德市
T7	桃仁	山桃	甘肃省平凉市	N15	甜杏仁	杏	内蒙古自治区赤峰市
T8	桃仁	山桃	陕西省宝鸡市				

锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定重量,加热回流 30 min,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

#### 2.4 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 条件

UPLC 条件同“2.1”项下,用 0.2% 甲酸代替 0.2% 磷酸;质谱采用 ESI 离子源,喷雾电压 3.24 kV,毛细管温度为 350  $^{\circ}\text{C}$ ,辅助气温度设置为 350  $^{\circ}\text{C}$ ,采用正、负离子扫描模式,Full MS 全波长扫描模式,一级质谱扫描范围  $m/z$ : 100 ~ 1000,分辨率为 70 000,二级质谱采用 Top 20 数据依赖模式选择母离子进行裂解,碰撞能量为梯度碰撞电压 20 eV、30 eV、50 eV。

#### 2.5 特征图谱研究

**2.5.1 精密度试验** 取甜杏仁(编号: N1)粉末按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以 7 号苦杏仁苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间  $RSD$  为 0.03% ~ 0.10%,相对峰面积  $RSD$  为 0.04% ~ 1.4%,表明仪器精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取甜杏仁粉末(编号: N1)按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件进样,以 7 号苦杏仁苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间  $RSD$  为 0.02% ~ 0.10%,相对峰面积  $RSD$  为 0.44% ~ 1.8%,表明方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取甜杏仁粉末(编号: N1)按“2.3”项下方法制备供试品溶液,于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定,以 7 号苦杏仁苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间  $RSD$  为 0.03% ~ 0.61%,相对峰面积  $RSD$  为 1.3% ~ 2.2%,表明方法重复性良好。

**2.5.4 特征图谱建立** 取表 1 中 35 批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。分别将 10 批苦杏仁(东北杏、山杏)、10 批桃仁(桃、山桃)、15 批甜杏仁(杏)的图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012 版),以 N1、K1、T1 样品作为参照图谱,进行多点校正和峰匹配,采用中位数法分别生成甜杏仁(R1)、桃仁(R2)、苦杏仁(R3)的对照特征图谱,如图 1 所示;35 批不同品种药材叠加谱图如图 2 所示;分别计算相同品种的相似度系数,10 批苦杏仁相似度均在 0.942 以上,10 批桃仁相似度均在 0.994 以上,15 批甜杏仁相似度均在 0.946 以上,计算结果见表 2。苦杏仁含有 7 个特征峰、桃仁含有 6 个特征峰、甜杏仁含有 6 个特征峰,三者含有 5 个共有峰,分别为峰 1、峰 3、峰 5、峰 6、峰 7。可通过峰 4 区分苦杏仁(东北杏、山杏)与甜杏仁(杏),可通过峰 2 区分苦杏仁(东北杏、山杏)与桃仁(桃、山桃)。



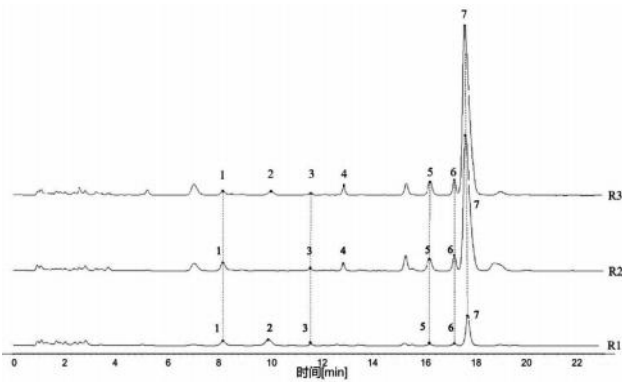


图 1 甜杏仁 (R1)、桃仁 (R2)、苦杏仁 (R3) 对照特征图谱  
Fig 1 Reference characteristic chromatogram of sweet apricot kernel (R1), *Persicae Semen* (R2), and *Armeniaca Semen Amarum* (R3)

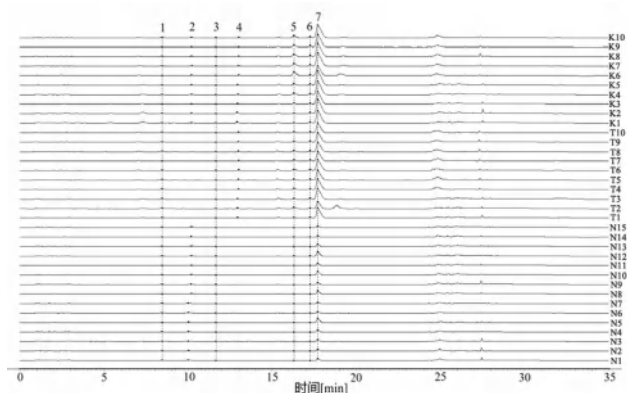


图 2 35 批蔷薇科种子类药材 UPLC 叠加图  
Fig 2 Overlay of UPLC for 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

**2.5.5 共有峰指认** 取苦杏仁、桃仁、甜杏仁药材 (K1、T1、N1) 粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下条件进样分析, 得到的总离子流色谱图 (TIC) 如图 3 所示。根据目标峰的一级和二级信息与 *mzVault* 标准进行数据库匹配分析, 结合相关文献研究, 指认出峰 1 为扁桃酸酰胺- $\beta$ -龙胆二糖苷, 峰 3 为扁桃酸- $\beta$ -龙胆二糖苷, 峰 5 为野黑樱苷, 峰 6 为 L-苦杏仁苷, 峰 7 为苦杏仁苷。色谱峰的详细质谱信息见表 3。

表 2 不同品种药材样品特征图谱相似度评价结果

Tab 2 Evaluation of similarity of characteristic chromatogram of different varieties of medicinal materials samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
K1	0.997	T1	0.999	N1	0.996
K2	0.997	T2	0.994	N2	0.946
K3	0.999	T3	0.999	N3	0.950
K4	0.999	T4	1.000	N4	0.950
K5	0.999	T5	1.000	N5	0.998
K6	0.942	T6	1.000	N6	0.998
K7	0.996	T7	0.999	N7	0.996
K8	0.998	T8	1.000	N8	0.998
K9	0.998	T9	1.000	N9	0.997
K10	0.999	T10	1.000	N10	0.999
				N11	0.965
				N12	0.999
				N13	0.987
				N14	0.987
				N15	0.992

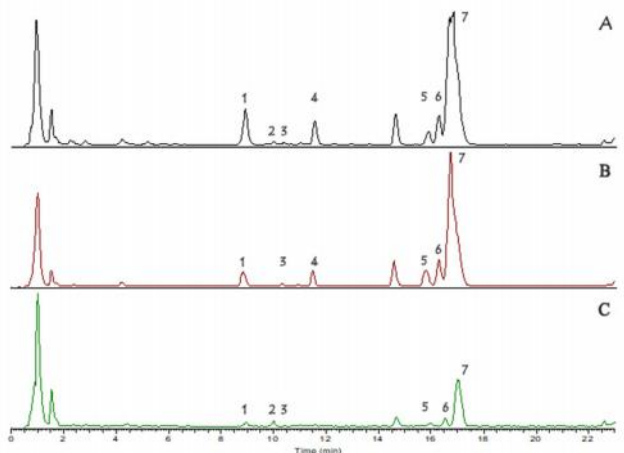


图 3 苦杏仁 (A)、桃仁 (B)、甜杏仁 (C) 的总离子流色谱图  
Fig 3 TIC of *Armeniaca Semen Amarum* (A), *Persicae Semen* (B), and sweet apricot kernel (C)

取“2.2”项下对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。通过甜杏仁药材供试品与对照品的 UPLC 色谱图比对, 进一步证

表 3 甜杏仁样品中色谱峰质谱指认结果

Tab 3 Identification of chromatographic peaks and mass spectrometry in sweet apricot kernel

化合物	保留时间 /min	分子式	准分子离子峰	主要碎片离子 ( <i>m/z</i> )	文献
扁桃酸酰胺- $\beta$ -龙胆二糖苷	8.88	$C_{20}H_{29}NO_{12}$	$520.1680[M + HCOO]^-$	161.0452, 150.0549, 119.0347, 101.0232, 89.0231, 71.0125, 59.0126	[8-9]
扁桃酸- $\beta$ -龙胆二糖苷	10.26	$C_{20}H_{28}O_{13}$	$475.1463[M - H]^-$	113.0231, 101.0232, 89.0231, 71.0125	[8-9]
野黑樱苷	15.94	$C_{14}H_{17}NO_6$	$340.1040[M + HCOO]^-$	161.0367, 101.9592	[10]
L-苦杏仁苷	16.47	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	$163.0389[M - H]^-$	179.6408, 161.0445, 101.0231, 89.0231	[10-11]
苦杏仁苷	16.95	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	$463.0881[M - H]^-$	161.0455, 101.0231, 89.0231	[10-11]

实峰 5 为野黑樱苷, 峰 7 为苦杏仁苷, 结果见图 4。因苦杏仁苷为苦杏仁、桃仁、甜杏仁主要有

效成分之一, 且其分离度较好, 峰面积最大, 稳定性较高, 故选择苦杏仁苷色谱峰为参照峰 S。

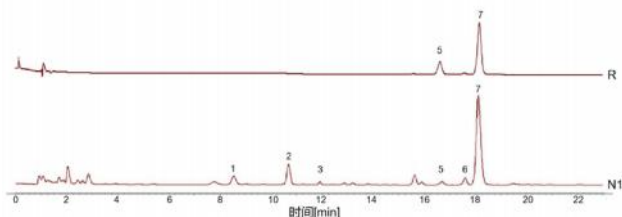


图 4 甜杏仁样品 (N1) 和对照品 (R) UPLC 图  
Fig 4 UPLC of sweet apricot kernel (N1) and reference (R)  
5. 野黑樱苷 (prunasin); 7. 苦杏仁苷 (amygdalin)

**2.5.6 聚类分析** 将 35 批样品的 7 个特征峰峰面积 (缺失峰的峰面积以 0 计算) 导入 Bioinformatics (www.bioinformatics.com.cn), 并对相同特征峰的峰面积进行样品间 z-score 归一化处理, 绘制得峰面积热图如图 5 所示, 图中方格颜色及深浅代表样品之间特征峰的峰面积差异, 峰面积的差异可以反映相对含量的差异。由图可见, 除峰 2 外, 苦杏仁、桃仁的特征峰峰面积总体上相较甜杏仁更高, 且可见甜杏仁特征峰峰面积与其余两者之间的差异更明显。采用 SPSS 25.0 软件对 35 批样品色谱数据进行分析, 以 7 个特征峰为变量 (缺失峰的峰面积以 0 计算)、以平方欧氏距离为区间, 采用组间连接法进行聚类分析, 结果见图 6。同一品种不同产地的苦杏仁、甜杏仁、桃仁药材质量均较为一致。可见当组间距离为 5 时, 35 批样品被分为 3 类, 15 批甜杏仁被聚为 I 类, 10 批苦杏仁被聚为 II 类, 10 批桃仁被聚为 III 类。当组间距离为 10 时, 桃仁和苦杏仁被聚集为一类, 而甜杏仁单独聚为另一类, 说明相较于甜杏仁, 桃仁与苦杏仁的上述 7 个特征峰对应的化合物相对含量更为相近, 进一步证实苦杏仁与甜杏仁虽然来源、功效相近, 但由热图分析可见其特征峰所代表的化合物成分相对含量具有一定的差异, 基于峰面积的聚类分析可以通过这些差异准确地将 10 批苦杏仁和 15 批甜杏仁聚类为两组。聚类分析结果与特征图谱鉴别一致。

**2.5.7 正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA)** 以 7 个特征峰的峰面积作变量 (缺失峰的峰面积以 0 计算), 采用 SIMCA 为 14.1 对 35 批样品色谱数据进行判别分析, 得到 2 个主成分, 各主成分因子载荷图见图 7, 色谱峰 7 距离原点最远, 说明苦杏仁苷成分含量为分类 3 种蔷薇科药材的重要变量。建立的 OPLS-DA 模型的  $R^2X$  为 0.938,  $R^2Y$  为 0.884,  $Q^2$  为 0.861, 均  $> 0.5$ , 说明所建

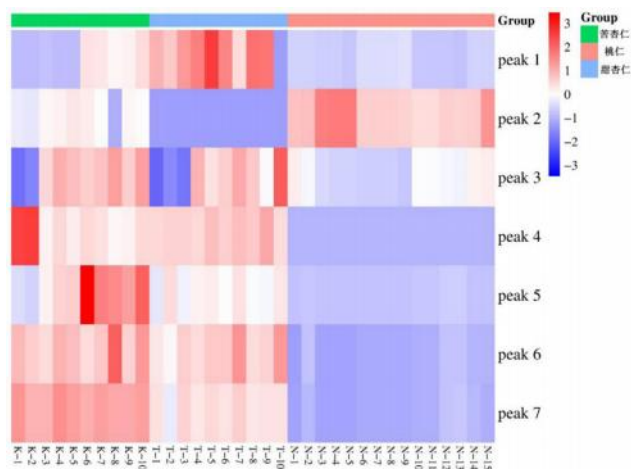


图 5 35 批蔷薇科种子药材 7 个特征峰峰面积热图  
Fig 5 Heat maps of 7 characteristic peak areas of 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

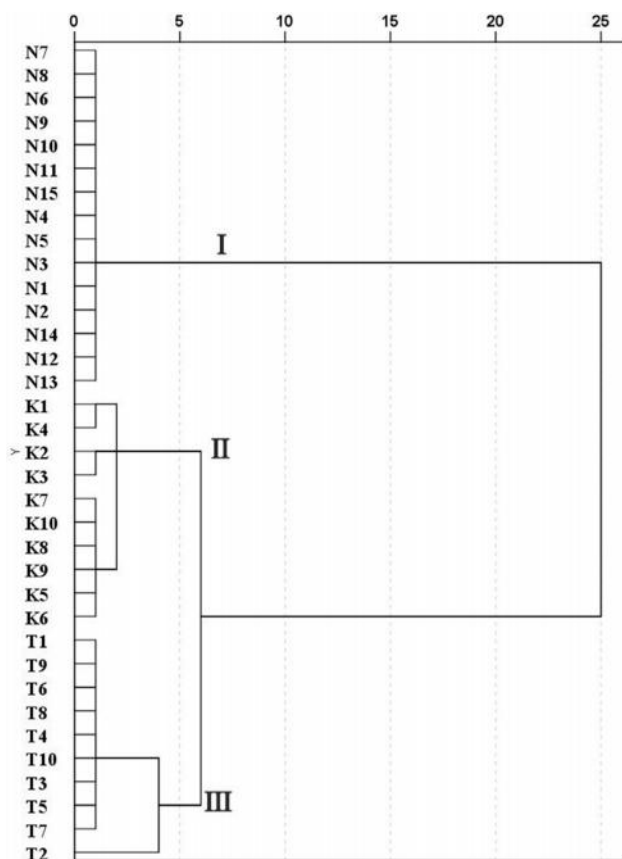


图 6 35 批蔷薇科种子药材聚类分析结果  
Fig 6 Cluster analysis of 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

立的模型预测能力及稳定性较好。通过 200 次置换检验得到  $R^2$  在 Y 轴上的截距为 -0.042, 小于 0.3, 说明模型拟合较好;  $Q^2$  在 Y 轴上的截距为 -0.261, 小于 0.05, 说明模型未过度拟合, 置换检验结果见图 8。35 批样品得分图见图 9, 可见 35 批样品被聚为 3 类, 15 批甜杏仁聚为一

类, 10 批苦杏仁聚为一类, 10 批桃仁聚为一类, 实现了 3 种蔷薇科药材的区分; 为进一步明确区别不同品种药材的标志性成分, 以 VIP 值 > 1 作为标准, 筛选出了 1 个差异性成分, 为峰 7, 即苦杏仁苷, 进一步证实苦杏仁苷对区分 3 种蔷薇科药材的贡献较大, VIP 值图见图 10。

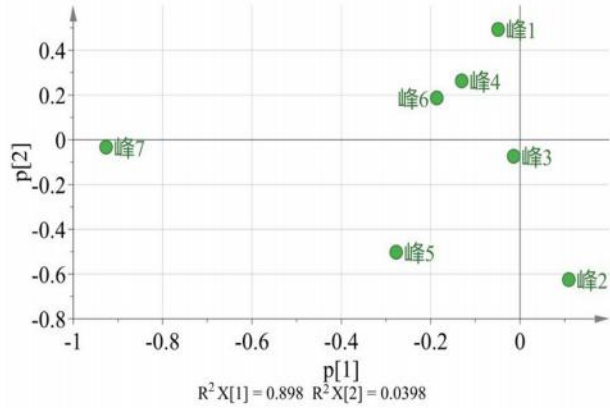


图 7 因子载荷图

Fig 7 Factor load diagram

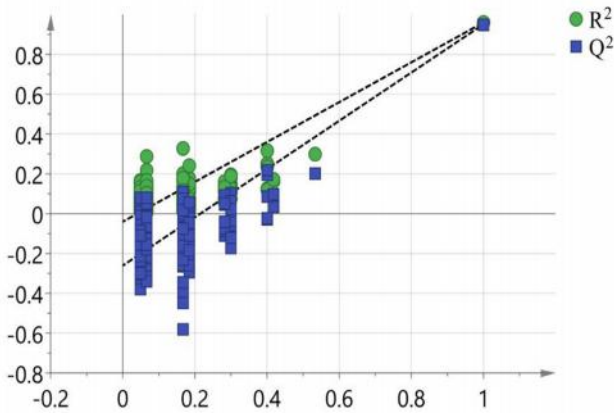


图 8 置换检验结果

Fig 8 Replacement test results

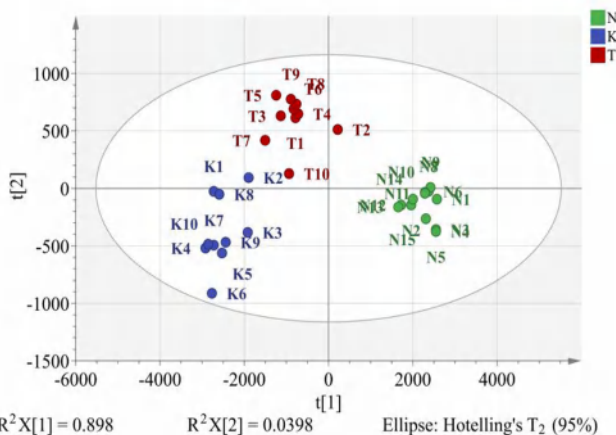


图 9 35 批蔷薇科种子药材 OPLS-DA 散点图

Fig 9 Scatter plot of OPLS-DA for 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

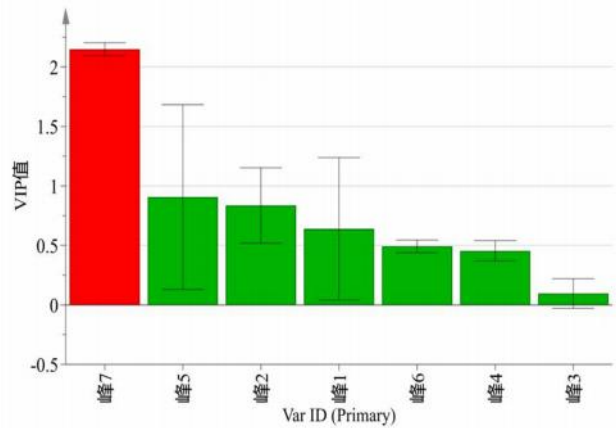


图 10 35 批蔷薇科种子药材 OPLS-DA VIP 值图

Fig 10 OPLS-DA VIP values of 35 batches of Rosaceae seed medicinal materials

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的考察

本研究考察了不同流动相 (乙腈 -0.1% 磷酸水溶液、乙腈 -0.2% 磷酸水溶液、乙腈 -0.2% 甲酸水溶液) 及检测波长 (PDA 检测器波长范围: 190 ~ 400 nm) 下各色谱峰的峰形和分离效果, 最终确定以乙腈 -0.2% 磷酸水溶液作为流动相体系, 在 210 nm 检测波长条件下色谱图中色谱峰分离度较好, 响应值较高, 基线平稳。

#### 3.2 提取方法的选择

本研究以“色谱峰总峰面积 / 称样量”及色谱图峰形为评价指标, 最终确定提取溶剂 70% 甲醇, 提取方式为加热回流, 提取时间为 30 min, 作为 3 种蔷薇科药材特征图谱的供试品溶液制备方法。

#### 3.3 特征图谱结果分析

本研究建立了 35 批蔷薇科药材的特征图谱, 确定甜杏仁药材含有 6 个特征峰、苦杏仁含有 7 个特征峰、桃仁含有 6 个特征峰。通过对照品比对、相关文献研究及质谱指认初步指认其中 5 个共有峰, 分别为扁桃酸酰胺-β-龙胆二糖苷 (峰 1)、扁桃酸-β-龙胆二糖苷 (峰 2)、野黑樱苷 (峰 5)、L-苦杏仁苷 (峰 6)、苦杏仁苷 (峰 7), 通过对照品进一步证实峰 5 为野黑樱苷, 峰 7 为苦杏仁苷。野黑樱苷在体内可作为原形成分被吸收, 具有抗纤维化的作用<sup>[11]</sup>; 苦杏仁苷代谢分解后产生的极微量氢氰酸有镇咳平喘之用, 但过量则会对人体产生毒害<sup>[6]</sup>。本研究构建 3 种蔷薇科种子药材的特征图谱可通过观察峰 2、峰 4 的存在区分甜杏仁 (杏)、苦杏仁 (东北杏、山杏)、桃仁



(桃、山桃), 但这 2 个色谱峰的指认还有待进一步研究鉴定。由热图分析可见 10 批苦杏仁与 15 批甜杏仁的苦杏仁苷相对含量差异较大, 可进一步对苦杏仁苷进行定量分析, 通过苦杏仁苷的含量鉴别基原相同的甜杏仁与苦杏仁。

### 3.4 化学计量学分析

本研究采用聚类分析和 OPLS-DA 分析 2 种方法对 3 种蔷薇科药材进行了判别分析。在组间距离为 5 时, 35 批蔷薇科药材准确聚为 3 大类, 15 批甜杏仁药材 N1 ~ N15 聚为 I 类, 10 批苦杏仁药材 K1 ~ K5 聚为 II 类, 10 批桃仁药材 T1 ~ T5 聚为 III 类, 说明甜杏仁、苦杏仁、桃仁等不同品种药材之间化学成分差异较大, 提示准确鉴别 3 种蔷薇科种子对苦杏仁、桃仁的用药安全性及临床有效性具备重要意义。根据基于特征峰峰面积的 OPLS-DA 分析, 甜杏仁、桃仁、苦杏仁分别聚集成 3 大类, 结果与特征图谱分析、聚类分析相互印证。VIP 值在 OPLS-DA 分析中用来衡量变量对于区分两个或多个类别的重要性, VIP 值越高, 表示该化合物对于区分不同类别的贡献越大, VIP 值高的化合物通常可以说明该化合物的含量差异是区别两个类别的重要因素。以 VIP 值 > 1 为标准筛选出苦杏仁、桃仁、甜杏仁的差异性标志物为苦杏仁苷 (峰 7), 提示苦杏仁苷含量的差异是区别 3 种药材的重要因素。

## 4 结论

本研究建立了苦杏仁、桃仁、甜杏仁的 UPLC 特征图谱鉴别方法, 通过化学计量学比较了 3 种药材之间的化学成分差异, 可以快速、准确区分甜杏仁、苦杏仁、桃仁药材, 为 3 种蔷薇

科药材的鉴别和蔷薇科种子药材资源的进一步研究提供了依据。

## 参考文献

- [1] 薛紫鲸, 张丹, 郭龙, 等. 经典名方中苦杏仁的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (10): 207-214.
- [2] 甘肃省药品监督管理局. 甘肃省中药材标准 (2020 年版) [S]. 兰州: 兰州大学出版社, 2021: 261-263.
- [3] 程鹏, 李薇红, 华剑, 等. 甜杏仁的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26 (5): 365.
- [4] 李素玲, 张子德, 王强, 等. 抗氧化剂对杏仁油贮藏稳定性的影响 [J]. 中国油脂, 2009, 34 (11): 59-61.
- [5] 王星晨, 勾楠, 郑东梅, 等. 基于药代动力学研究厚朴-苦杏仁配伍在大鼠体内的相互作用 [J]. 中南药学, 2021, 19 (5): 808-813.
- [6] 王玲波, 徐文东. 苦杏仁与甜杏仁的鉴别研究 [J]. 黑龙江医药, 2014, 27 (2): 278-280.
- [7] 邓静, 颜丹娜, 吴孟华, 等. 桃仁药性与应用的古今比较 [J]. 中药材, 2023, 46 (4): 1034-1042.
- [8] 周熙, 谢斌, 黄晓兰, 等. 基于高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法的苦杏仁与桃仁化学成分差异研究 [J]. 分析测试学报, 2021, 40 (6): 940-946.
- [9] 程遥, 毕玥琳, 冯欣, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术和代谢组学方法的苦杏仁“临方捣碎”的潜在质量标志物筛选 [J]. 药学学报, 2022, 57 (10): 3195-3202.
- [10] 张聪聪, 王长虹, 李兴佳, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析桃仁化学成分及快速测定苦杏仁苷和野黑樱苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (4): 347-355.
- [11] 许秀琼, 刘建博, 王硕辉, 等. HPLC 法测定苦杏仁苷两种差向异构体的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30 (1): 94-98.
- [12] Zhang CC, Zhang DQ, Wang YL, et al. Pharmacokinetics and antiliver fibrosis characteristics of amygdalin: key role of the deglycosylated metabolite prunasin [J]. Phyto-medicine, 2022, 99: 154018.

(收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2023-11-04)

## 香附的化学成分及其体外抗炎活性研究

韩建卫<sup>1</sup>, 孙延平<sup>1</sup>, 杨炳友<sup>1</sup>, 王秋红<sup>2</sup>, 匡海学<sup>1\*</sup> (1.黑龙江中医药大学, 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2.广东药科大学中药学院, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 研究香附 *Cyperi Rhizoma* 的化学成分及其抗炎活性。**方法** 利用硅胶、Sephadex LH-20 和制备型正相 HPLC 对香附 95% 乙醇提取物进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。以脂多糖诱导的小鼠小胶质细胞 BV-2 炎症模型评价其抗炎活性。**结果** 从香附中分离得到 15 个化合物, 鉴定为: 24-methylenecycloartenone (1)、cyperenal (2)、patchoulone (3)、4, 5, 6, 7, 8, 8a-六氢-3, 4, 8, 8-四甲基-1H-3a, 7-亚甲基甘菊环-4-醇甲酸酯 (4)、4-烯-广藿香醇 (5)、cyperenol (6)、cyperolactone (7)、(-)-caryophyllene oxide (8)、humulene epoxide II (9)、humulene diepoxide A (10)、 $\alpha$ -tocopherol (11)、litseachromolaevane A (12)、hyperhubein G (13)、nootkatone (14) 和 mustakone (15)。化合物 4 和 11 可显著抑制 NO 的释放, 抑制率分别为 (49.17±0.01)% 和 (51.91±0.05)%。**结论** 本文首次使用制备型正相 HPLC 技术对香附石油醚层进行系统分离, 化合物 2、6、9~11 和 13 为首次从莎草科植物中分离得到, 化合物 12 为首次从莎草属植物中分离得到, 化合物 4、5 和 7 为首次从香附中分离得到。化合物 4 和 11 有较强的体外抗炎活性。

**关键词:** 香附; 化学成分; 分离鉴定; 抗炎活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0322-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.008

### Chemical constituents of *Cyperi Rhizoma* and their anti-inflammation activities

HAN Jian-wei<sup>1</sup>, SUN Yan-ping<sup>1</sup>, YANG Bing-you<sup>1</sup>, WANG Qiu-hong<sup>2</sup>, KUANG Hai-xue<sup>1\*</sup> (1. Ministry of Education Key Laboratory for Basic and Application Research of Medicine in North China, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

**Abstract: Objective** To determine the chemical constituents of *Cyperi Rhizoma* and their anti-inflammatory activities. **Methods** The 95% ethanol extract was separated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 and preparative normal phase HPLC. The structures of the compounds were identified according to their physicochemical properties and spectral data. Their anti-inflammatory activities were evaluated by lipopolysaccharide induced BV-2 microglial cell model. **Results** Totally 15 compounds were isolated and identified as follows: 24-methylenecycloartenone (1), cyperenal (2), patchoulone (3), 3, 4, 8, 8-tetramethyl-4, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-1H-3a, 7-methanoazulen-4-ol (4), patchoulan-4-ene-6-ol (5), cyperenol (6), cyperolactone (7), (-)-caryophyllene oxide (8), humulene epoxide II (9), humulene diepoxide A (10),  $\alpha$ -tocopherol (11), litseachromolaevane A (12), hyperhubein G (13), nootkatone (14), and mustakone (15). Compounds 4 and 11 significantly inhibited the release of nitric oxide, and the inhibition rates were (49.17±0.01)% and (51.91±0.05)%, respectively. **Conclusion** The preparative normal phase HPLC has been used for the first time to

**基金项目:** 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程——岐黄工程首席科学家支持项目(国中医药人教函[2021]7号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)岐黄学者支持项目(国中医药人教函[2018]284号); 2022年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2022]76号)。

**作者简介:** 韩建卫, 女, 博士研究生, 主要从事中药及复方药效物质基础研究, email: 1442640619@qq.com \*通信作者: 匡海学, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药及复方药效物质基础研究、中药性味理论研究, email: hxkuang@hljucm.net

systematically separate the petroleum ether layer of *Cyperi Rhizoma*. Compounds **2**, **6**, **9** ~ **11** and **13** have been isolated from the Cyperaceae family for the first time, compound **12** isolated from the genus *Cyperus*, and compounds **4**, **5** and **7** isolated from *Cyperi Rhizoma* for the first time. Compounds **4** and **11** exhibit strong *in vitro* anti-inflammation activities.

**Key words:** *Cyperi Rhizoma*; chemical constituent; isolation and identification; anti-inflammation activity

香附为莎草科莎草属植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎<sup>[1]</sup>。香附味辛、微苦、微甘，性平，归肝、脾、三焦经，具有疏肝解郁、理气宽中、调经止痛的功效<sup>[2]</sup>。香附的主要化学成分有萜类、黄酮、生物碱、蒽醌类、甾醇类、糖类<sup>[3]</sup>。现代药理学研究表明，香附具有抗肿瘤、抗抑郁、

抑菌、抗炎和抗氧化等药理作用<sup>[4]</sup>。为了进一步对香附资源的开发和利用，本课题组首次使用制备型正相高效液相色谱技术对香附石油醚层进行系统分离，从中共分离并鉴定了 15 个萜类化合物，结构见图 1，现报道如下。

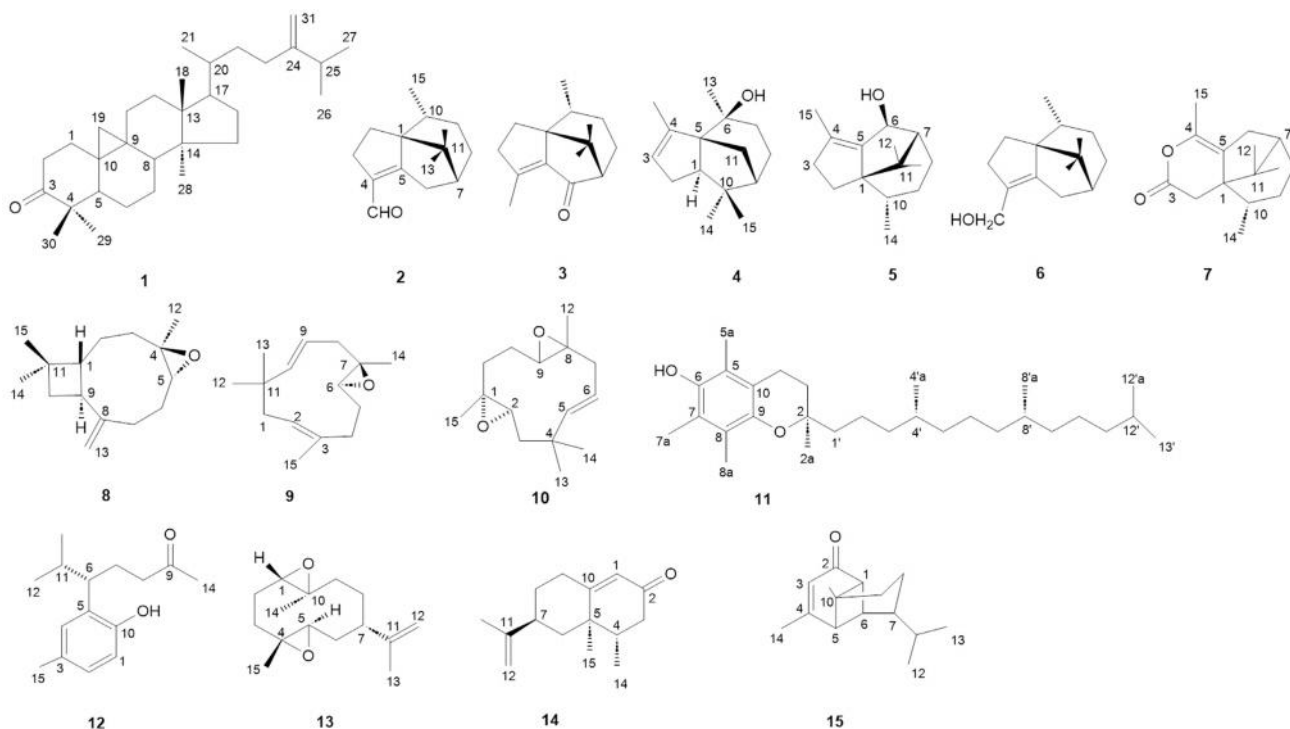


图 1 化合物 1 ~ 15 的结构式

Fig 1 Structures of compounds 1 ~ 15

## 1 材料

香附购于芍花堂国药股份有限公司，经黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室樊锐锋教授鉴定为莎草科莎草属植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的根茎。原植物标本（编号：20220331）保存于黑龙江中医药大学中药化学实验室。

Bruker-600 型超导核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；Q-TOF（ESI）高分辨质谱仪、2424-2998 型分析 HPLC 仪（美国 Waters 公司）；制备型硅胶色谱柱（19 mm×250 mm，10 μm，苏州速研医药科技有限公司）；柱色谱用硅胶 80~100 目、200~300 目（青岛海洋化工有限公司）；Silicage160 GF<sub>254</sub> 薄

层高效色谱硅胶板（美国默克公司）；柱色谱用化学试剂（分析纯，天津富宇精细化工有限公司）；正己烷、乙酸乙酯（色谱纯，上海麦克林生化科技股份有限公司）；恒温培养箱（美国赛默飞公司）；脂多糖（LPS）、地塞米松（美仑生物科技有限公司）；BV-2 细胞及专用培养基（普诺赛生命科技有限公司）；胰酶细胞消化液、一氧化氮（NO）检测试剂盒（碧云天公司）。

## 2 方法

### 2.1 提取分离

称取干燥香附 45 kg，粉碎过筛，用 95% 乙醇加热回流提取 2 次，每次 2 h，滤过，合并滤



液, 减压回收溶剂, 得总浸膏 (3.3 kg)。总浸膏加适量蒸馏水混悬, 依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇各萃取 3 次, 减压回收溶剂, 得石油醚萃取部位 (1.2 kg)、乙酸乙酯萃取部位 (1.1 kg) 和水饱和正丁醇萃取部位 (1.0 kg)。取石油醚萃取部位 (300 g) 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:0~0:100) 梯度洗脱, 经 TLC 分析后合并, 得到 14 个流分 Fr.A~Fr.N。

Fr.C 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:1~10:1) 梯度洗脱, 得 Fr.C1~Fr.C17。Fr.C6 经制备型正相 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=80:1) 分离纯化得到化合物 **1** (5.2 mg)。Fr.C8 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到 5 个流分 Fr.C8-1~Fr.C8-5, Fr.C8-2 经制备型 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=50:1) 分离纯化得到化合物 **3** (7.0 mg)、**8** (7.0 mg)、**9** (7.0 mg) 和 **11** (6.9 mg)。Fr.C11 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到 4 个流分 Fr.C11-1~Fr.C11-4, Fr.C11-2 经制备型 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=40:1) 分离纯化得到化合物 **2** (7.0 mg)、**4** (6.9 mg) 和 **5** (7.4 mg)。Fr.C14 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到 3 个流分 Fr.C14-1~Fr.C14-3, Fr.C14-2 经制备型 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=30:1) 分离纯化得到化合物 **7** (7.0 mg)。

Fr.E 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (50:1~0:1) 梯度洗脱, 得 Fr.E1~Fr.E9。Fr.E3 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到 3 个流分 Fr.E3-1~Fr.E3-3, Fr.E3-2 经制备型 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=10:1) 分离纯化得到化合物 **13** (7.0 mg)、**14** (7.0 mg) 和 **15** (7.0 mg)。Fr.E5 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱, 得到 5 个流分 Fr.E5-1~Fr.E5-5, Fr.E5-2 经制备型 HPLC (正己烷-乙酸乙酯=8:1) 分离纯化得到化合物 **10** (7.0 mg)、**12** (7.0 mg) 和 **6** (7.0 mg)。

## 2.2 体外抗炎活性评价

### 2.2.1 细胞的培养及毒性评价

采用 CCK-8 法测验化合物对 BV-2 细胞毒性的作用。BV-2 小胶质细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。将 BV-2 细胞以 1×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL。待细胞贴壁后, 分为空白组及不同浓度给药组 (6.25、12.5、25、50、100 μmol·mL<sup>-1</sup>), 每组 6 个复孔, 培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在 37℃ 下培养 3 h 后,

在 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。

### 2.2.2 NO 含量的测定

将 BV-2 细胞以 1×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL。待细胞贴壁后, 加入含药培养基。实验组分别设置为空白组、模型组、阳性药组、给药组, 每组 6 个复孔。空白组和模型组加入不含药培养基, 孵育细胞 1 h 后, 除空白组外, 其他各组均加入 LPS (0.5 μg·mL<sup>-1</sup>), 继续孵育细胞 24 h, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书检测 NO 的含量。

### 2.2.3 统计学分析

应用软件 GraphPad Prism 8.0 对数据进行处理和统计学说明, 通过对 NO 抑制率的大小表示化合物体外抗炎活性的强弱, 结果以  $\bar{x} \pm s$  的形式表示。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色油状, 分子式为 C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O。HR-ESI-MS *m/z*: 437.3864 [M-H]<sup>-</sup> (计算值 437.3862), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +22.2° (c 0.33, CHCl<sub>3</sub>)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ: 1.86 (1H, m, H-1a), 1.54 (1H, m, H-1b), 2.71 (1H, m, H-2a), 2.31 (1H, m, H-2b), 1.72 (1H, m, H-5), 1.55 (2H, m, H-6), 1.92 (1H, m, H-7a), 1.31 (1H, m, H-7b), 1.59 (1H, m, H-8), 1.40 (1H, m, H-11a), 1.10 (1H, m, H-11b), 1.32 (2H, m, H-12), 1.67 (2H, m, H-15), 2.05 (1H, m, H-16a), 1.14 (1H, m, H-16b), 1.64 (1H, m, H-17), 1.00 (3H, s, H-18), 0.79 (1H, m, H-19a), 0.58 (1H, m, H-19b), 1.41 (1H, m, H-20), 0.90 (3H, d, *J* = 5.6 Hz, H-21), 1.13 (2H, m, H-22), 2.13 (1H, m, H-23a), 1.89 (1H, m, H-23b), 2.24 (1H, m, H-25), 1.03 (3H, m, H-26), 1.03 (3H, m, H-27), 0.91 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-29), 1.10 (3H, s, H-30), 4.72 (1H, br.s, H-31a), 4.67 (1H, br.s, H-31b); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) δ: 33.4 (C-1), 37.4 (C-2), 216.5 (C-3), 50.2 (C-4), 48.4 (C-5), 21.5 (C-6), 28.1 (C-7), 47.9 (C-8), 21.1 (C-9), 27.0 (C-10), 25.9 (C-11), 35.6 (C-12), 45.4 (C-13), 48.8 (C-14), 32.8 (C-15), 26.8 (C-16), 52.3 (C-17), 18.3 (C-18), 29.5 (C-19), 36.1 (C-20), 18.1 (C-21), 35.0 (C-22), 31.3 (C-23), 156.9 (C-24), 33.8 (C-25), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 19.3 (C-28), 22.2 (C-29), 20.8 (C-30), 106.0 (C-31)。以上数据

与文献<sup>[5]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 24-methylenecycloartenone。

化合物 **2**: 淡黄色固体, 分子式为  $C_{15}H_{22}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 217.1673  $[M - H]^-$  (计算值 217.1671),  $[\alpha]_D^{25} = -28.4^\circ$  ( $c$  0.84,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 0.83 (3H, s, H-12), 1.01 (3H, s, H-13), 0.85 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 68.7 (C-1), 25.6 (C-2), 33.9 (C-3), 134.5 (C-4), 176.6 (C-5), 28.3 (C-6), 48.2 (C-7), 27.1 (C-8), 27.9 (C-9), 36.1 (C-10), 41.6 (C-11), 26.2 (C-12), 19.3 (C-13), 188.2 (C-14), 18.0 (C-15)。以上数据与文献<sup>[6]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 cyperenal。

化合物 **3**: 白色固体, 分子式为  $C_{15}H_{22}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 217.1675  $[M - H]^-$  (计算值 217.1671),  $[\alpha]_D^{25} = -115.2^\circ$  ( $c$  0.56,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.65 (1H, ddd,  $J = 13.5, 9.5, 1.4$  Hz, H-2a), 1.89 (1H, m, H-2b), 2.44 (1H, br.dd,  $J = 18.2, 9.5$  Hz, H-3a), 2.78 (1H, br.dt,  $J = 18.0, 9.5$  Hz, H-3b), 2.05 (1H, t,  $J = 3.5$  Hz, H-7), 1.73 (1H, m, H-8a), 1.93 (1H, ddt,  $J = 6.5, 3.5, 14.0$  Hz, H-8b), 1.15 (1H, ddt,  $J = 12.0, 7.1, 14.0$  Hz, H-9a), 1.57 (1H, dt,  $J = 14.0, 6.5$  Hz, H-9b), 2.16 (1H, ddq,  $J = 12.0, 6.5, 6.5$  Hz, H-10), 1.01 (3H, s, H-12), 0.88 (3H, s, H-13), 2.07 (3H, q like, H-14), 1.01 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 63.7 (C-1), 26.2 (C-2), 43.5 (C-3), 148.5 (C-4), 139.6 (C-5), 207.3 (C-6), 63.0 (C-7), 25.9 (C-8), 28.1 (C-9), 34.6 (C-10), 41.4 (C-11), 19.0 (C-12), 26.4 (C-13), 15.2 (C-14), 17.9 (C-15)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 patchoulenone。

化合物 **4**: 白色固体, 分子式为  $C_{15}H_{24}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 219.1825  $[M - H]^-$  (计算值 219.1827),  $[\alpha]_D^{25} = -22.4^\circ$  ( $c$  0.83,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 2.03 (1H, dd,  $J = 9.8, 6.8$  Hz, H-1), 2.13 (2H, m, H-2), 5.18 (1H, m, H-3), 1.45 (1H, m, H-7a), 1.16 (1H, m, H-7b), 1.68 (1H, m, H-8a), 1.43 (1H, m, H-8b), 1.57 (1H, m, H-9), 2.23 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-11a), 1.41 (1H, m, H-11b), 1.75 (3H, m, H-12), 1.10 (3H, s,

H-13), 1.08 (3H, s, H-14), 0.98 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 55.1 (C-1), 31.1 (C-2), 124.6 (C-3), 143.4 (C-4), 69.7 (C-5), 74.7 (C-6), 37.1 (C-7), 25.7 (C-8), 49.4 (C-9), 42.3 (C-10), 37.8 (C-11), 16.4 (C-12), 25.7 (C-13), 26.2 (C-14), 27.6 (C-15)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 4, 5, 6, 7, 8, 8a-六氢-3, 4, 8, 8-四甲基-1H-3a, 7-亚甲基甘菊环-4-醇甲酸酯。

化合物 **5**: 淡黄色固体, 分子式为  $C_{15}H_{24}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 219.1829  $[M - H]^-$  (计算值 219.1827),  $[\alpha]_D^{25} = +28.2^\circ$  ( $c$  0.61,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.40 (1H, ddd,  $J = 12.8, 7.9, 0.75$  Hz, H-2a), 1.79 ~ 1.75 (1H, m, H-2b), 2.62 (1H, m, H-3a), 2.24 (1H, dd,  $J = 16.2, 9.4$  Hz, H-3b), 4.28 (1H, s, H-6), 1.63 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz, H-7), 1.36 ~ 1.30 (2H, m, H-8a, H-9b), 1.73 ~ 1.68 (1H, m, H-8b), 0.84 ~ 0.77 (1H, m, H-9a), 1.84 ~ 1.79 (1H, m, H-10), 1.08 (3H, s, H-12), 0.87 (3H, s, H-13), 0.81 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-14), 1.81 (3H, m, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 67.5 (C-1), 26.4 (C-2), 42.8 (C-3), 132.3 (C-4), 145.8 (C-5), 73.0 (C-6), 58.3 (C-7), 26.4 (C-8), 28.7 (C-9), 34.9 (C-10), 40.5 (C-11), 27.4 (C-12), 20.2 (C-13), 17.8 (C-14), 14.6 (C-15)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 4-烯-广藿香醇。

化合物 **6**: 淡黄色晶体, 分子式为  $C_{15}H_{24}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 219.1825  $[M - H]^-$  (计算值 219.1827),  $[\alpha]_D^{25} = -14.2^\circ$  ( $c$  0.44,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.44 (1H, m, H-2a), 1.63 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, H-2b), 2.62 (1H, m, H-3a), 2.40 (1H, d,  $J = 15.0$  Hz, H-3b), 2.62 (1H, m, H-6a), 2.28 (1H, m, H-6b), 1.86 (1H, m, H-7), 1.25 (1H, m, H-8a), 1.72 (1H, m, H-8b), 1.07 (1H, m, H-9a), 1.43 (1H, m, H-9b), 1.96 (1H, m, H-10), 0.80 (3H, s, H-12), 0.92 (3H, s, H-13), 4.15 (2H, m, H-14), 0.89 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 65.8 (C-1), 26.2 (C-2), 37.9 (C-3), 131.2 (C-4), 146.3 (C-5), 28.2 (C-6), 48.5 (C-7), 27.5 (C-8, C-9), 35.2 (C-10), 41.1 (C-11), 26.1

(C-12), 19.3 (C-13), 60.6 (C-14), 17.9 (C-15)。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 cyperenol。

化合物 **7**: 淡黄色油状, 分子式为  $C_{15}H_{22}O_2$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 233.1623  $[M - H]^-$  (计算值 233.1620),  $[\alpha]_D^{25} = +5.2^\circ$  ( $c$  0.78,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 2.11 (2H, s, H-2), 2.03 (2H, dd,  $J = 15.8, 6.8$  Hz, H-6), 1.40 ~ 1.38 (1H, m, H-7), 1.02 ~ 0.98 (1H, m, H-8a), 1.56 ~ 1.47 (2H, m, H-8b, H-10), 0.91 ~ 0.84 (1H, m, H-9a), 1.13 ~ 1.07 (1H, m, H-9b), 0.46 (3H, s, H-12), 0.64 (3H, s, H-13), 0.8 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-14), 1.62 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 50.6 (C-1), 33.9 (C-2), 169.1 (C-3), 142.1 (C-4), 115.1 (C-5), 30.0 (C-6), 44.0 (C-7), 27.0 (C-8), 27.7 (C-9), 35.9 (C-10), 43.9 (C-11), 26.3 (C-12), 18.6 (C-13), 17.9 (C-14), 15.6 (C-15)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 cyperolactone。

化合物 **8**: 无色针状, 分子式为  $C_{15}H_{24}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 219.1829  $[M - H]^-$  (计算值 219.1827),  $[\alpha]_D^{25} = -70.1^\circ$  ( $c$  0.93,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.78 (1H, t,  $J = 10.0$  Hz, H-1), 1.45 (1H, m, H-2a), 1.64 (1H, m, H-2b), 2.09 (1H, m, H-3a), 0.90 (1H, m, H-3b), 2.89 (1H, dd,  $J = 10.6, 4.2$  Hz, H-5), 2.23 (1H, m, H-6a), 1.32 (1H, m, H-6b), 2.36 (1H, m, H-7a), 2.11 (1H, m, H-7b), 2.59 (1H, q,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 1.70 (1H, m, H-10a), 1.64 (1H, m, H-10b), 1.22 (3H, s, H-12), 4.99 (1H, br.s, H-13a), 4.88 (1H, br.s, H-13b), 1.0 (3H, s, H-14), 0.97 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 50.8 (C-1), 27.2 (C-2), 39.2 (C-3), 59.8 (C-4), 63.8 (C-5), 30.2 (C-6), 29.8 (C-7), 151.8 (C-8), 48.7 (C-9), 39.8 (C-10), 34.0 (C-11), 17.0 (C-12), 112.8 (C-13), 21.6 (C-14), 29.9 (C-15)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 (-)-caryophyllene oxide。

化合物 **9**: 淡黄色固体, 分子式为  $C_{15}H_{24}O$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 219.1824  $[M - H]^-$  (计算值 219.1827),  $[\alpha]_D^{25} = 0.0^\circ$  ( $c$  0.85,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.99 (1H, dd,  $J = 13.5, 9.6$  Hz, H-1a), 1.87 (1H, dd,  $J =$

13.7, 5.2 Hz, H-1b), 5.00 (1H, dd,  $J = 9.5, 6.7$  Hz, H-2), 2.20 (1H, m, H-4a), 2.10 (1H, m, H-4b), 2.10 (1H, m, H-5a), 1.37 (1H, m, H-5b), 2.52 (1H, dd,  $J = 10.1, 3.8$  Hz, H-6), 2.57 (1H, dd,  $J = 12.4, 5.2$  Hz, H-8a), 1.65 (1H, dd,  $J = 12.2, 10.4$  Hz, H-8b), 5.31 (1H, ddd,  $J = 15.7, 10.1, 5.2$  Hz, H-9), 5.17 (1H, d,  $J = 15.8$  Hz, H-10), 1.10 (3H, s, H-12), 1.13 (3H, s, H-13), 1.31 (3H, s, H-14), 1.57 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 40.3 (C-1), 125.7 (C-2), 131.9 (C-3), 36.6 (C-4), 24.8 (C-5), 62.0 (C-6), 63.2 (C-7), 42.5 (C-8), 122.1 (C-9), 143.1 (C-10), 36.5 (C-11), 29.7 (C-12), 24.8 (C-13), 17.2 (C-14), 15.1 (C-15)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 humulene epoxide II。

化合物 **10**: 无色针晶, 分子式为  $C_{15}H_{24}O_2$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 235.1773  $[M - H]^-$  (计算值 235.1776),  $[\alpha]_D^{25} = -2.2^\circ$  ( $c$  0.43,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 2.48 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-2), 1.57 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-3a), 1.40 (1H, m, H-3b), 5.31 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), 5.49 (1H, ddd,  $J = 15.6, 10.5, 4.8$  Hz, H-6), 2.64 (1H, dd,  $J = 12.5, 5.1$  Hz, H-7a), 1.64 (1H, dd,  $J = 14.1, 11.1$  Hz, H-7b), 2.74 (1H, dd,  $J = 9.9, 5.1$  Hz, H-9), 2.20 (1H, ddd,  $J = 14.1, 10.5, 5.1$  Hz, H-10a), 1.40 (1H, m, H-10b), 2.14 (1H, ddd,  $J = 7.5, 5.4, 1.8$  Hz, H-11a), 1.08 (1H, m, H-11b), 1.31 (3H, s, H-12), 1.19 (3H, s, H-13), 1.08 (3H, s, H-14), 1.31 (3H, s, H-15);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 60.0 (C-1), 64.6 (C-2), 38.3 (C-3), 35.6 (C-4), 142.8 (C-5), 122.5 (C-6), 43.3 (C-7), 63.3 (C-8), 60.3 (C-9), 25.1 (C-10), 34.8 (C-11), 16.4 (C-12), 23.4 (C-13), 30.7 (C-14), 16.5 (C-15)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 humulene diepoxide A。

化合物 **11**: 淡黄色油状, 分子式为  $C_{20}H_{50}O_2$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 429.3813  $[M - H]^-$  (计算值 429.3811),  $[\alpha]_D^{25} = +7.2^\circ$  ( $c$  0.65,  $CHCl_3$ )。 $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 1.24 (3H, s, H-2a), 1.75 (2H, m, H-3), 2.58 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 2.19 (3H, s, H-7a), 2.14 (6H, s, H-5a, 8a), 0.83 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz,



H-4'a), 0.83 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-8'a), 0.88 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-12'a), 0.86 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-13');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 74.5 (C-2), 23.8 (C-2a), 31.6 (C-3), 20.7 (C-4), 118.4 (C-5), 11.2 (C-5a), 144.5 (C-6), 121.0 (C-7), 12.1 (C-7a), 122.6 (C-8), 11.7 (C-8a), 145.6 (C-9), 117.3 (C-10), 39.8 (C-1'), 21.0 (C-2'), 37.5 (C-3'), 32.8 (C-4'), 19.7 (C-4'a), 37.4 (C-5'), 24.4 (C-6'), 37.4 (C-7'), 32.7 (C-8'), 19.6 (C-8'a), 37.3 (C-9'), 24.7 (C-10'), 39.4 (C-11'), 27.9 (C-12'), 22.7 (C-12'a), 22.6 (C-13')。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为  $\alpha$ -tocopherol。

化合物 **12**: 白色无定形粉末, 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 233.1623  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (计算值 233.1620),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6.2^\circ$  ( $c$  0.82,  $\text{CHCl}_3$ )。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.67 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1), 6.86 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-2), 6.83 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-4), 2.60 (1H, ddd,  $J = 12.0, 8.3, 3.6$  Hz, H-6), 2.10 (1H, m, H-7a), 1.73 (1H, m, H-7b), 2.22 (1H, ddd,  $J = 15.8, 7.7, 5.3$  Hz, H-8a), 2.16 (1H, dd,  $J = 15.8, 8.0$  Hz, H-8b), 1.85 (1H, m, H-11), 1.01 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-12), 0.73 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-13), 2.05 (3H, s, H-14), 2.25 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 115.8 (C-1), 127.4 (C-2), 129.9 (C-3), 128.7 (C-4), 130.0 (C-5), 44.5 (C-6), 26.8 (C-7), 42.0 (C-8), 210.9 (C-9), 152.1 (C-10), 33.1 (C-11), 21.0 (C-12), 21.4 (C-13), 30.2 (C-14), 20.9 (C-15)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为 litseachromolaevane A。

化合物 **13**: 淡黄色油状, 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 235.1773  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (计算值 235.1776),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -1.2^\circ$  ( $c$  0.78,  $\text{CHCl}_3$ )。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 3.13 (1H, dd,  $J = 9.1, 5.9$  Hz, H-1), 2.31 (1H, m, H-2a), 1.51 (1H, m, H-2b), 2.17 (1H, m, H-3a), 1.21 (1H, m, H-3b), 2.89 (1H, dd,  $J = 10.7, 3.8$  Hz, H-5), 2.11 (1H, td,  $J = 13.2, 3.8$  Hz, H-6a), 1.27 (1H, m, H-6b), 1.99 (1H, m, H-7), 1.69 (1H, m, H-8a), 1.58 (1H, m, H-8b), 2.21 (1H, dd,  $J = 13.9, 6.2$  Hz, H-9a), 1.10 (1H, dd,  $J = 13.9, 12.3$  Hz, H-9b), 4.65

(1H, br.s, H-12a), 4.61 (1H, br.s, H-12b), 1.70 (3H, s, H-13), 1.32 (3H, s, H-14), 1.37 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 60.4 (C-1), 24.9 (C-2), 34.7 (C-3), 59.6 (C-4), 63.7 (C-5), 33.2 (C-6), 45.0 (C-7), 28.6 (C-8), 41.0 (C-9), 60.0 (C-10), 150.1 (C-11), 108.9 (C-12), 19.7 (C-13), 16.8 (C-14), 15.8 (C-15)。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为 hyperhubein G。

化合物 **14**: 淡黄色油状, 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 217.1675  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (计算值 217.1671),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +200.2^\circ$  ( $c$  0.68,  $\text{CHCl}_3$ )。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 5.78 (1H, s, H-1), 4.72 (1H, br.s, H-12a), 4.74 (1H, br.s, H-12b), 1.74 (3H, br.s, H-13), 1.13 (3H, s, H-14), 0.97 (3H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-15);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 124.6 (C-1), 199.6 (C-2), 42.1 (C-3), 40.3 (C-4), 39.3 (C-5), 32.9 (C-6), 40.4 (C-7), 31.6 (C-8), 43.9 (C-9), 170.5 (C-10), 149.1 (C-11), 109.2 (C-12), 20.9 (C-13), 14.9 (C-14), 16.8 (C-15)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **14** 为 nootkatone。

化合物 **15**: 白色无定形粉末, 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ 。HR-ESI-MS  $m/z$ : 217.1673  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (计算值 217.1671),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.4^\circ$  ( $c$  0.64,  $\text{CHCl}_3$ )。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 2.65 (1H, dd,  $J = 6.7, 1.3$  Hz, H-1), 5.71 (1H, m, H-3), 1.96 (1H, dd,  $J = 6.7, 0.9$  Hz, H-5), 2.64 (1H, s, H-6), 1.70 (1H, m, H-7), 1.50 (1H, ddd,  $J = 2.8, 10.5, 10.5$  Hz, H-8a), 1.70 (1H, m, H-8b), 1.85 (1H, m, H-9a), 1.70 (1H, m, H-9b), 1.48 (1H, dd,  $J = 6.5, 6.5$  Hz, H-11), 0.83 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-12), 0.81 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-13), 1.98 (3H, d,  $J = 1.4$  Hz, H-14), 0.94 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ : 56.6 (C-1), 203.5 (C-2), 121.4 (C-3), 169.5 (C-4), 55.9 (C-5), 54.6 (C-6), 45.4 (C-7), 21.9 (C-8), 36.7 (C-9), 57.0 (C-10), 31.7 (C-11), 19.4 (C-12), 19.9 (C-13), 20.2 (C-14), 23.5 (C-15)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **15** 为 mustakone。

### 3.2 化合物生物活性测试结果

采用 CCK-8 法测定化合物 **1** ~ **15** 对 LPS 诱导小鼠 BV-2 细胞存活率的影响, 发现 15 个化合

物在浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率均高于 90%。15 个化合物在终浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对 LPS 诱导的 BV-2 细胞的炎症反应结果如表 1 所示。化合物 4 和 11 可显著抑制 NO 的释放, 提示化合物 4 和 11 具有一定的抗炎活性, 为后续抗炎机制研究奠定基础。

表 1 化合物 1 ~ 15 对 LPS 诱导的 BV-2 细胞产生 NO 的抑制效果  
Tab 1 Inhibition of compounds 1 ~ 15 on NO production in LPS-induced BV-2 microglial cells

化合物	NO 抑制率 /%	化合物	NO 抑制率 /%
化合物 1	21.15±0.08	化合物 9	32.36±0.07
化合物 2	30.24±0.05	化合物 10	28.71±0.08
化合物 3	14.36±0.04	化合物 11	51.91±0.05
化合物 4	49.17±0.01	化合物 12	27.83±0.06
化合物 5	24.25±0.03	化合物 13	33.76±0.03
化合物 6	12.34±0.04	化合物 14	20.54±0.04
化合物 7	13.38±0.01	化合物 15	36.21±0.03
化合物 8	26.14±0.06	地塞米松	52.18±0.02

#### 4 讨论

本研究首次使用制备型正相 HPLC 技术对香附石油醚层进行系统分离, 得到 15 个化合物, 其中化合物 2、6、9 ~ 11 和 13 为首次从莎草科植物中分离得到, 化合物 12 为首次从莎草属植物中分离得到, 化合物 4、5 和 7 为首次从香附中分离得到, 制备型正相 HPLC 解决了小极性化合物不溶于甲醇或乙腈而造成的损失。NO 是目前广泛被认可的炎症因子, 标志着免疫细胞的激活。LPS 可以刺激 BV-2 细胞产生炎症反应, 并增加细胞中 NO 的生成, 直接参与炎症的发生与发展。本实验测定了 15 种化合物对 LPS 诱导小鼠 BV-2 细胞释放 NO 的抑制率, 同时进行了 CCK-8 检测。结果显示, 化合物 4 和 11 能显著抑制 NO 的生成。本实验结果丰富了香附的化学成分, 可为香附的进一步开发利用提供参考。

#### 参考文献

- 陈运, 赵韵宇, 王晓轶, 等. 鲜香附挥发油镇痛活性及其 GC-MS 分析 [J]. 中药材, 2011, 34 (8): 1225-1229.
- Chen ZJ, Hu X, Liu GD. Research progresses on chemical constituents and pharmacological activities of *Cyperus rotundus* [J]. J Anhui Agric Sci, 2017, 45 (36): 113-115.
- Xue BX, He RS, Lai JX. Phytochemistry, data mining, pharmacology, toxicology and the analytical methods of *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae): a comprehensive review [J]. Phytochem Rev, 2023, 15: 1-46.
- Badgujar SB, Bandivdekar AH. Evaluation of a lactogenic activity of an aqueous extract of *Cyperus rotundus* Linn [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 163: 39-42.
- Jayasinghe UL, Vithana HS, Wannigama GP, et al. 24-methylenecycloartenone from *Bhesa nitidissima* [J]. Fitoterapia, 2001, 72 (5): 594-595.
- 李慧红. 鸡骨香和大托叶云实的化学成分与生物活性研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- Thebtaranonth C, Thebtaranonth Y, Wanauppathamkul S, et al. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10, 12-peroxy-calamenene, a sesquiterpene endoperoxide [J]. Phytochemistry, 1995, 40 (1): 125-128.
- 段文兰, 姜嘉豪, 王蕾, 等. 纸莎草的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33 (7): 1129-1136.
- Zana AO, Thierry AY, Yves-Alain B, et al. Composition and chemical variability of root bark oil from *Ivoirian Cleistopholis patens* [J]. Nat Prod Commun, 2018, 13 (5): 767-770.
- 杨先会, 陈尚文, 邓世明. 药用植物鸡骨香的化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (3): 515-517.
- Robin AC, Julie RLC, Veronika Z, et al. Constituents of Cypriol oil (*Cyperus scariosus* R. Br.): N-containing molecules and key aroma components [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64 (22): 4566-4573.
- Muhammad IC, Zafar AS, Sarfraz AN, et al. Microbial transformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivatives [J]. J Nat Prod, 2006, 69 (10): 1429-1434.
- Tsui WY, Brown GD. Sesquiterpenes from *Baeckea frutescens* [J]. J Nat Prod, 1996, 59: 1084-1086.
- 杨林, 乔立瑞, 谢丹, 等. 国产沉香中的倍半萜类和单萜类化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (13): 1973-1976.
- 游华林, 周芹茹, 吴林菁, 等. 艳山姜叶化学成分的研究 [J]. 中成药, 2022, 44 (1): 114-117.
- 唐进英, 何丽鸾, 福康, 等. 狭瓣鹰爪花枝叶中化学成分研究 [J]. 广东化工, 2018, 45 (6): 32-33.
- Yan XT, Chen JX, Wang ZX, et al. Hyperhubeins A-I, bioactive sesquiterpenes with diverse skeletons from *Hypericum hubeiense* [J]. J Nat Prod, 2023, 86 (1): 119-130.
- Xu JJ, Su J, Li Y. Eremophilane-type sesquiterpenes from *Alpinia oxyphylla* with inhibitory activity against nitric oxide production [J]. Chem Nat Compd, 2013, 49 (3): 390-393.
- Jonathan AM, Smith BB, James AM, et al. Anti-onchocerca metabolites from *Cyperus articulatus*: isolation, in vitro activity and in silico 'Drug-Likeness' [J]. Nat Prod Bioprospect, 2014, 4 (4): 243-249.

(收稿日期: 2023-10-25; 修回日期: 2023-11-09)

# 基于血清代谢组学分析人参化橘红干预慢性阻塞性肺疾病的代谢机制

钟鹏英<sup>1,2</sup>, 张玉超<sup>1,2</sup>, 张芳华<sup>3</sup>, 张喜利<sup>1,2</sup>, 刘文龙<sup>1,2\*</sup> (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 长沙 410208; 3. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410208)

**摘要:** **目的** 基于血清代谢组学探究人参化橘红干预慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的代谢机制。**方法** 选取雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为对照组、模型组、氨茶碱组、人参化橘红组。除对照组外, 其余大鼠接受脂多糖和烟雾诱导刺激, 构建 COPD 大鼠模型, 共计造模 45 d, 造模完成后, 对照组和模型组给予等剂量生理盐水, 人参化橘红组 (0.027 g · mL<sup>-1</sup>) 和氨茶碱组 (0.009 g · mL<sup>-1</sup>) 按 100 g 每 1 mL 灌胃, 给药 15 d; 采用 HE 染色观察肺组织形态学变化及气道变化情况; ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 水平; 应用 UPLC-Q-TOF/MS 对大鼠血清代谢组学分析, 筛选潜在生物标志物及其相关通路, 并应用 Western blot 法对相关通路进行验证。**结果** 人参化橘红能明显改善肺组织的炎症浸润和气道壁的增厚; 降低血清内炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 血清代谢组学分析共得出 33 个潜在生物标志物, 涉及组氨酸代谢、精氨酸合成、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢等, 经 Western blot 验证后, 人参化橘红干预 COPD 代谢主要通过促进精氨酸合成和抑制花生四烯酸代谢。**结论** 人参化橘红改善 COPD 大鼠肺组织内炎症浸润和气道壁增厚, 其机制可能与促进精氨酸合成和抑制花生四烯酸代谢后保护肺组织有关。

**关键词:** 慢性阻塞性肺疾病; 人参化橘红; 代谢组学; 潜在生物标志物

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2024)02-0329-06

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.009

## Mechanism of Ginseng-Chemotaxis intervention in COPD based on the serum metabolomics

ZHONG Peng-ying<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-chao<sup>1,2</sup>, ZHANG Fang-hua<sup>3</sup>, ZHANG Xi-li<sup>1,2</sup>, LIU Wen-long<sup>1,2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208; 3. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410208)

**Abstract: Objective** To determine the intervention role of Ginseng-Chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on serum metabolomics. **Methods** Totally 24 male SD rats were randomly divided into a control group, a model group, an aminophylline group, and a Ginseng-Chemotaxis group. Except for the control group, the other rats were induced by lipopolysaccharide (LPS) and smoke stimulation to construct a COPD model. After the modeling, the control group and the model group were given equal doses of normal saline. The Ginseng-Chemotaxis group (0.027 g · mL<sup>-1</sup>) and the aminophylline group (0.009 g · mL<sup>-1</sup>) were administered at 1 mL/100 g for 15 d. HE staining was used to observe the morphological changes in the lung tissue and the airway. ELISA was used to detect the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9, and TIMP-1. UPLC-Q-TOF/MS was applied to analyze the serum metabolism of the model group and the Ginseng-Chemotaxis group, to screen the potential biomarkers and their related pathways, and verify the related pathways by Western

**基金项目:** 湖南省自然科学基金 (No.2021JJ30514, No.2023JJ60474); 长沙市自然科学基金 (No.kq2208191, No.kq2208148)。

**作者简介:** 钟鹏英, 男, 硕士研究生, 主要从事中药质量研究, email: 954147621@qq.com; 刘文龙, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中医质量与药剂学等研究工作, email: dragon5240@126.com



blot. **Results** The Ginseng-Chemotaxis group significantly improved the inflammatory infiltration of the lung tissues, thickened the airway wall, and reduced the levels of inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9 and TIMP-1 in the serum ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Serum metabolomics analysis identified 33 potential biomarkers, involving histidine metabolism, arginine synthesis, arachidonic acid metabolism, and glycerophospholipid metabolism. After validation by Western blot, the treatment promoted arginine synthesis and inhibited arachidonic acid metabolism. **Conclusion** The combination of Ginseng-Chemotaxis may improve inflammation in the lung tissue and thicken the airway wall in rats with COPD, possibly through promoting arginine synthesis and inhibiting arachidonic acid metabolism.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease; Ginseng-Chemotaxis; metabolomics; potential biomarker

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种慢性肺部疾病, 其特点是气道气流受限, 并伴有炎症和肺气肿, COPD 患者气流受限的直接原因是气道重塑, 而肺气肿则源于肺泡壁的广泛破坏<sup>[1-2]</sup>。烟雾中含有各种有毒物质, 容易吸引巨噬细胞和中性粒细胞, 促进内源性物质的释放, 并加速氧化应激引起的肺组织损伤<sup>[3]</sup>。现代医学研究发现, 到 2030 年, COPD 可能与高血压和糖尿病一起成为全球三大死因, 极大地阻碍医疗保健的发展, 损害人类健康<sup>[4]</sup>。目前还没有可逆转或阻止疾病发展的治疗方案, 为此, 迫切需要确定治疗研究的新机制或新靶点。代谢组学 (代谢物分析) 是一种新兴的方法, 可用于鉴定代谢物的生物标志物和发现受干扰的代谢途径, 依据代谢途径的变化从而发现不同疾病中的治疗标志物<sup>[5-7]</sup>, 在 COPD 疾病中发现其部分代谢表达也出现了紊乱<sup>[8]</sup>, 选取关键代谢途径进行治疗, 有可能成为治疗新方式。

人参化橘红复方含人参、甘草、化橘红和陈皮, 其中, 药材陈皮和化橘红含有柚皮素、柚皮苷和陈皮苷, 其抑制黏蛋白分泌和调节炎症的作用已得到广泛认可, 具有祛痰和镇咳作用, 可用于治疗慢性支气管疾病<sup>[9]</sup>, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和总人参皂苷早已被证明可通过调节辅助性 T 细胞 1 和 T 细胞 2 的比例来平衡内环境。人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可介导上皮-间质转化 (EMT), 进而抑制气道重塑来增强 COPD 患者的肺功能和存活水平<sup>[10-11]</sup>。然而, 对于其如何干预 COPD 的作用机制并不清晰, 本研究经血清代谢组学分析并验证与 COPD 相关的生物标志物和代谢通路, 为人参化橘红治疗 COPD 提供更加丰富的理论基础。

## 1 材料

### 1.1 动物

24 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, (200 $\pm$ 20) g [湖南晶达实验动物有限公司, 生产许可证号为: SYXK 2019-0009]。大鼠自由进食和饮水, 饲养

温度为 20 ~ 25  $^{\circ}$ C, 湿度为 50% ~ 70%。所有实验均按照湖南中医药大学医学伦理审查委员会批准的动物实验方案和指南进行 (伦理审查号: LL2022090602)。

### 1.2 试剂

人参化橘红 (西藏嘉唐保健品有限公司); TBST、BCA 蛋白浓度测定试剂盒, RIPA (强) 组织细胞快速裂解液 (赛文科技有限公司); 脂多糖 (LPS, Sigma 生物技术有限公司); HE 染色 (武汉皮诺飞生物技术有限公司); 黄果树香烟 (中国, 含焦油 10 mg, 尼古丁 0.9 mg, 一氧化碳 12 mg); 琥珀酸合成酶 (ASS1)、激活激酶 (P21)、磷脂酶 (PLD1) 抗体、山羊抗鼠 IgG 二抗 (Affinity); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) ELISA 试剂盒 (上海抚生生物有限公司); 氨茶碱 (太原集团有限公司); 水合氯醛 (合肥博美生物科技有限责任公司); 氯化钠注射液 (湖南科伦制药有限公司); 无水乙醇、甲醇和乙腈 (上海安谱实验有限公司); 超纯水 (屈臣氏集团有限公司), 自制烟熏盒子 (80 cm $\times$ 40 cm $\times$ 20 cm)。

### 1.3 仪器

Q1320583 超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司); 电泳仪和化学发光成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); UPLC-Q-TOF/MS 质谱仪、Heraeus Fresco17 离心机、酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 COPD 造模和给药

大鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为对照组和模型组。对照组 (6 只) 暴露于室内空气中, 模型组 (18 只) 于自制箱子中熏二手烟, 每次 1.5 h, 每次 9 支烟, 每日 2 次 (间隔 4 h), 每周 6 d, 共 45 d; 第 1 日和第 14 日用 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 麻醉大鼠, 用脱毛膏清创咽喉部, 暴露喉部, 用静脉注射针代替气管插管, 向气管内注入 0.2 mL 质量浓度为 1 mL $\cdot$ mg<sup>-1</sup> 的

LPS, 然后将大鼠直立旋转 10 ~ 20 s, 使 LPS 均匀分布在肺部, 2 d 内不接触二手烟。人参化橘红人体给药每日 3 g, 氨茶碱每日 1 g, 大鼠按 1 mL/100 g 灌胃, 人参化橘红给药质量浓度为 0.027 g·mL<sup>-1</sup>, 氨茶碱给药质量浓度为 0.009 g·mL<sup>-1</sup>。

## 2.2 样品采集

末次给药后, 禁食 12 h, 各组大鼠经麻醉处理, 腹主动脉取血; 室温下静置 30 min 后, 以 4 °C、3000 r·min<sup>-1</sup> (离心半径 9 cm) 离心 15 min, 分离上层血清, -80 °C 保存。

## 2.3 组织病理学观察

取大鼠右肺组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后, 严格按照试剂盒说明书步骤, HE 染色观察肺组织内炎症情况。参考文献报道分级<sup>[12]</sup>: 0 级, 正常形态; 1 级, 轻度肺间质充血和中性粒细胞浸润; 2 级, 血管周围水肿形成, 肺组织结构部分损坏, 中度中性粒细胞浸润; 3 级, 肺组织结构损坏严重, 高密度中性粒细胞浸润。

## 2.4 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 水平

收集血清按照相关试剂盒说明书严格操作, 检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 水平。

## 2.5 血清代谢组学分析

移取 100  $\mu$ L 样品至 EP 管中, 加入 400  $\mu$ L 提取液 (甲醇-乙腈 = 1:1, 含同位素标记内标混合物), 涡旋混匀 30 s; 超声 10 min (冰水浴); -40 °C 静置 1 h; 将样品于 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> (半径 8.6 cm) 离心 15 min; 取上清液及 QC 样品 (另取等量上清混合成) 上机检测。

## 2.6 检测条件

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu$ m); 流动相 A 为含 25 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵和 25 mmol·L<sup>-1</sup> 氨水, B 为乙腈, 采用梯度洗脱 (0~0.5 min, 95%B; 0.5~7 min, 95%~65%B; 7~8 min, 65%~40%B; 8~9 min, 40%B; 9~9.1 min, 40%~95%B; 9.1~12 min, 95%B); 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 样品盘温度 4 °C, 进样量 2  $\mu$ L。

## 2.7 Western blot 检测

取大鼠左肺组织于 -80 °C 保存。按照 BCA 法蛋白质含量检测试剂盒的说明测定蛋白质浓度。取 50 mg 右肺组织, 用冷 PBS 冲洗 3 次, 用 RIPA 裂解液提取蛋白质, 用 BCA 法检测匀浆中的蛋白质浓度。将 5 $\times$ SDS 上样缓冲液与 100  $\mu$ g 蛋白按比例混合, 煮沸 5 min, 然后用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 电泳条件为 120 V, 1 h; 用甲醇活化的 PVDF 转膜, 转膜条件为 200 A,

1 h。转膜后, 用 5% 脱脂奶粉在 37 °C 下封闭 2 h。按说明书用 P21、PLD1、ASS1 和 GAPDH 一抗 (1:2200) 在 4 °C 下孵育过夜, 洗膜后加入稀释的二抗。二抗稀释后加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1:7000) 封闭, 37 °C 室温下轻轻振荡孵育 2 h。使用 BIO-Rad-ChemiDoc XRS 凝胶电泳, 导出图像, 测定各目标条带与 GAPDH 内参的灰度值, 计算比值, 得出预测蛋白的相对表达含量。

## 2.8 数据分析

使用 SPSS 25 软件对结果进行统计分析, 结果表示为平均值  $\pm$  标准差 (mean $\pm$ SD)。使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计比较。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后, 使用自主编写的 R 程序包 (内核为 XCMS) 进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 然后与 BiotreeDB (V2.1) 自建二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。采用 Sigmca-17 软件对所得数据进行无监督模式的主成分分析 (PCA) 及有监督模式的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 得到能够反映组间贡献率的代谢物变量重要性投影 (VIP) 值散点图, 利用 HMDB 数据库 (<http://hmdb.ca>) 与 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>) 对筛选得到的差异代谢物进行鉴定, 辨别出潜在生物标志物, 随后使用 MetaboAnalyst 5.0 数据库 (<http://www.metaboanalyst.ca>) 对潜在生物标志物进行富集分析。

## 3 结果

### 3.1 病理切片结果

HE 染色显示, 对照组大鼠肺组织有少许炎性细胞浸润, 支气管壁基本完整, 未见明显黏膜水肿和肺泡破坏; 模型组大鼠支气管壁增厚, 炎症细胞浸润, 肺泡破裂, 形成了大肺泡, 肺泡壁增厚。与对照组比较, 模型组大鼠肺组织病理评分升高 (P < 0.01); 与模型组相比, 人参化橘红组炎性浸润减少, 肺泡破裂情况少见, 病理评分降低 (P < 0.01)。结果见图 1。

### 3.2 人参化橘红对 COPD 大鼠血清内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 显著上升 (P < 0.01); 与模型组比较, 人参化橘红组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 均出现不同程度下降 (P < 0.05, P < 0.01), 可知用药后炎症浸润的效果明显改善, 且肺气道内气道壁增厚现象有所改善 (见图 2)。

### 3.3 多元统计分析

模型组大鼠和人参化橘红组血清样品能够明



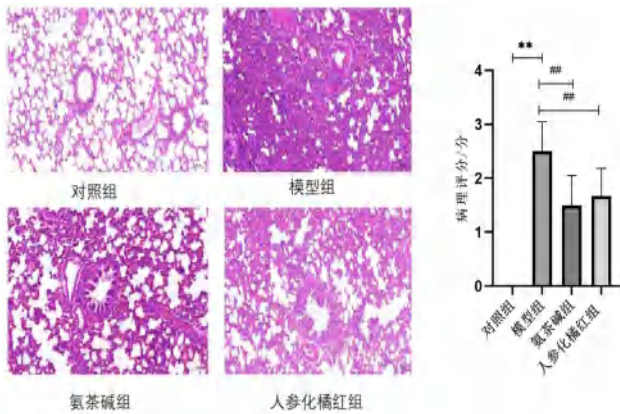


图 1 不同组别 HE 染色及评分图 ( $\times 200$ ,  $n = 6$ )  
 Fig 1 HE staining and scoring charts of different groups ( $\times 200$ ,  $n = 6$ )  
 注: 与对照组比较,  $**P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $##P < 0.01$ 。  
 Note: Compared with the control group,  $**P < 0.01$ ; compared with the model group,  $##P < 0.01$ .

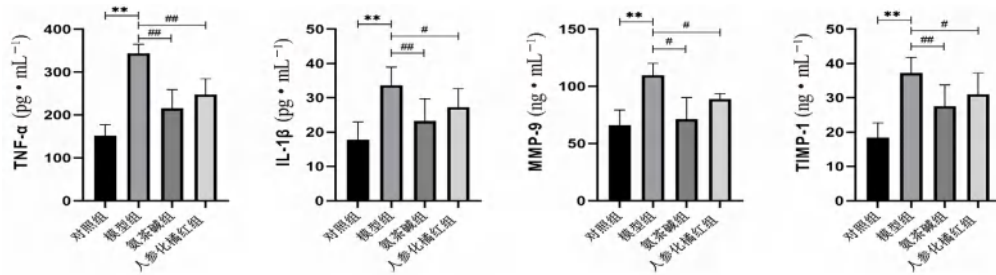


图 2 大鼠血清内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-9 和 TIMP-1 水平比较 ( $n = 6$ )  
 Fig 2 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-9, and TIMP-1 levels in rat serum ( $n = 6$ )  
 注: 与对照组比较,  $**P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$ 。  
 Note: Compared with the control group,  $**P < 0.01$ ; compared with the model group,  $#P < 0.05$ ,  $##P < 0.01$ .

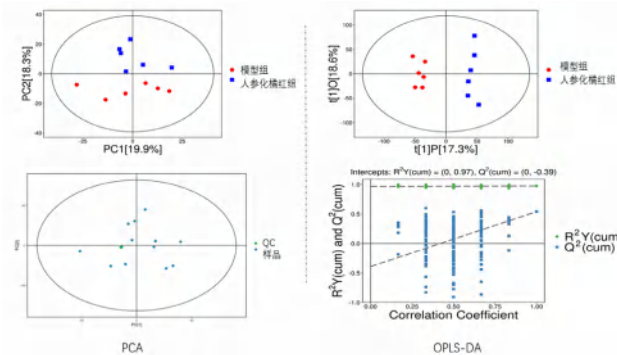


图 3 大鼠血清代谢物的多元统计分析  
 Fig 3 Multivariate statistical analysis of rat serum metabolites

### 3.4 人参化橘红生物标志物及 KEGG 富集分析

采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术的代谢组学分析, 根据设定的参数 ( $VIP > 1$  且  $P < 0.05$ ) 筛选差异代谢物, 将它们的二级质谱图分别与 HMDB 数据库、KEGG 数据库中代谢物的二级质谱图进行匹配, 反复比对, 共得到 33 个潜在生物标志物, 详细见表 1; 将上述差异代谢物代入 Metabo Analyst 5.0 富集分析共发现 15 条代谢路径, 见图 4, 其中涉及组氨酸代谢、精氨酸合成、

显分离, 且无交叉重叠, 表明 COPD 大鼠体内发生了明显的代谢差异变化; PCA 图中横坐标 PC[1] 和纵坐标 PC[2] 分别表示排名第一和第二的主成分的得分, 每个散点代表一个样本, 散点的颜色和形状表示不同的分组, 样本点分布越靠近, 说明样本中代谢物的种和含量越相似; 反之, 样本越远, 其整体代谢水平差异越大, 其结果可知样本全部处于 95% 置信区间内。结果见图 3。

在图 3 结果中, OPLS-DA 模型中  $R^2Y$  与  $Q^2$  接近于 1, 则表明模型对  $Y$  变量的解释性越好且模型的预测能力越好, 同时采用 200 次置换测试验证了 OPLS-DA 模型的可靠性, 所有模拟值均小于真实值, 且  $Q^2$  的回归线截距均小于 0.05。结果表明, OPLS-DA 模型具有良好的拟合度和预测能力, 其对血清样品的差异具有良好的解释性。

花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢和胆碱代谢等, 随后通过相关文献找到与 COPD 相关的通路 (精氨酸合成<sup>[13]</sup>、花生四烯酸代谢<sup>[14]</sup> 和甘油磷脂代谢<sup>[15]</sup>) 及其对应的酶 (ASS1、P21 和 PLD1)。

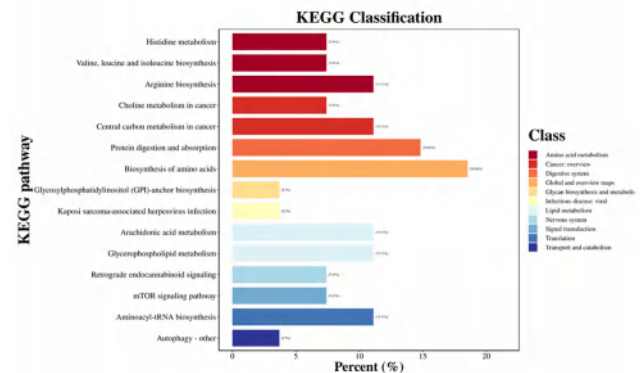


图 4 KEGG 富集分析得出 15 条路径  
 Fig 4 15 paths yielded by KEGG enrichment analysis

### 3.5 代谢通路结果验证

选择上述涉及的酶, 利用 Western blot 验证, 结果如图 5, 与模型组相比, P21 和 ASS1 的蛋白灰度值差异具有统计学意义, 而 PLD1 无显著差异, 由此推测人参化橘红可能通过促进 ASS1 和



表 1 人参加橘红潜在生物标志物

Tab 1 Potential biomarkers Ginseng-Chemetaxis

类型	英文名	中文名	HMDB	保留时间 /min	m/z	VIP	P	趋势
NEG	citrulline	L-瓜氨酸	HMDB0000904	3.847	174.089	1.400	0.045	↓
NEG	2-hydroxybutyric acid	2-羟基丁酸	HMDB0000008	1.847	103.040	1.391	0.028	↓
POS	p-cymene	4-异丙基甲苯	HMDB0005805	2.691	135.120	1.588	0.017	↓
POS	sarcosine	肌氨酸	HMDB0000271	3.528	90.054	1.841	0.007	↓
POS	L-leucine	L-亮氨酸	HMDB0000687	2.693	132.101	1.537	0.022	↓
POS	D-serine	D-丝氨酸	HMDB0003406	3.776	106.049	1.707	0.011	↓
POS	L-palmitoylcarnitine	棕榈酰-L-左旋肉碱	HMDB0000222	1.712	400.339	1.942	0.004	↓
POS	L-arginine	L-精氨酸	HMDB0000517	4.922	175.118	1.455	0.043	↓
POS	L-norleucine	L-正亮氨酸	HMDB0001645	3.226	132.101	1.512	0.020	↓
POS	L-kynurenine	L-犬尿氨酸	HMDB0000684	2.680	209.091	1.304	0.046	↓
POS	L-tyrosine	L-酪氨酸	HMDB0000158	3.048	182.080	1.385	0.001	↓
POS	imidazoleacetic acid	咪唑乙酸	HMDB0002024	3.238	127.050	1.711	0.019	↓
POS	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone	非洲豆蔻醇	HMDB0030801	2.753	261.179	1.972	0.001	↑
POS	1-pyrroline-5-carboxylic acid	—	HMDB0001301	3.235	114.054	1.409	0.018	↓
NEG	thymidine	胸腺嘧啶	HMDB0000273	0.687	301.105	1.294	0.049	↓
POS	asymmetric dimethylarginine	—	HMDB0001539	4.710	203.149	1.759	0.009	↓
POS	25-hydroxycholesterol	25-羟基胆固醇	HMDB0006247	1.687	425.342	1.709	0.023	↓
NEG	adipic acid	己二酸	HMDB0000448	1.268	145.051	1.005	0.036	↑
NEG	3-hydroxymethylglutaric acid	3-羟基-甲基谷氨酸	HMDB0000355	3.691	161.046	1.608	0.035	↓
POS	proline betaine	水苏碱	HMDB0004827	2.764	144.101	2.091	0.000	↑
NEG	citraconic acid	柠康酸	HMDB0000634	2.924	129.031	1.533	0.008	↓
POS	4-imidazolone-5-propionic acid	—	HMDB0001014	3.660	157.060	1.623	0.009	↓
POS	2-pyrrolidinone	2-吡咯烷酮	HMDB0002039	3.239	86.059	1.539	0.025	↓
POS	indole-5, 6-quinone	吡啶-5, 6, -醌	HMDB0006779	0.439	148.038	1.386	0.049	↓
POS	trans-cinnamic acid	肉桂酸	HMDB0000930	2.638	149.059	1.572	0.025	↓
POS	riboflavin	核黄素	HMDB0000244	2.180	377.143	2.057	0.002	↓
POS	betonicine	左旋水苏碱	HMDB0029412	2.968	160.096	2.319	0.001	↑
POS	phytosphingosine	植物鞘氨醇	HMDB0004610	0.482	318.298	1.974	0.014	↓
POS	marmesin	异紫花前胡内酯	HMDB0030786	1.431	247.091	1.518	0.046	↓
POS	L-targinine	—	HMDB0029416	4.827	189.133	1.661	0.032	↓
POS	N-a-acetylcitrulline	—	HMDB0000856	3.247	218.112	1.850	0.011	↓
NEG	15-deoxy-d-12, 14-pg2	15-脱氧-12, 14-前列腺素 2	HMDB0005079	0.866	315.197	1.738	0.010	↓
POS	piperidine	六氢吡啶	HMDB0034301	3.158	86.096	1.890	0.002	↓

抑制 P21，以促进精氨酸合成和抑制花生四烯酸 代谢来干预 COPD 的发生发展。

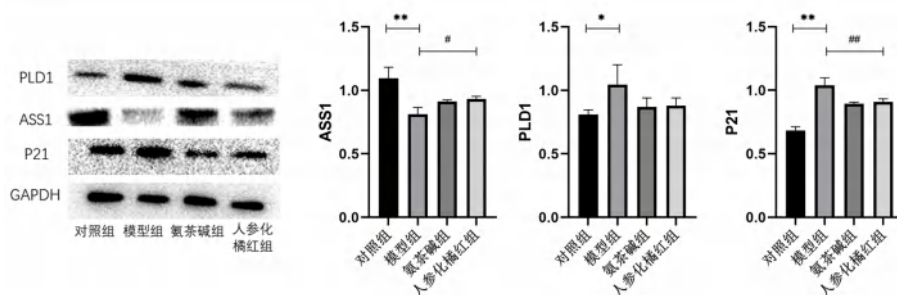


图 5 人参加橘红对 COPD 大鼠 PLD1、ASS1 和 P21 的影响

Fig 5 Effect of Ginseng-Chemetaxis on PLD1, ASS1 and P21 in rat with COPD

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

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

#### 4 讨论

COPD 是一种多种症状叠在一起的肺功能性疾病，其发病机制复杂，治愈难度大，临床上对其治疗多以延缓其发展，减轻患者症状为首要目标<sup>[16]</sup>。本研究以 LPS 和烟雾诱导大鼠 COPD 模

型，经人参加橘红干预一段时间，可明显看出肺组织和血清内炎症浸润减少，MMP-9 和 TIMP-1 的抑制对于气道壁的增厚有所改善，提示该方对 COPD 的肺组织具有一定的保护作用，随后为了探明其代谢机制，利用 UPLC-Q-TOF/MS 分析模

型组和人参化橘红组之间的血清, 考察 COPD 相关生物标志物及其代谢通路。

精氨酸是必需氨基酸的一种, 促进精氨酸的合成, 对于抑制 COPD 发展是有积极意义的。有研究发现, COPD 患者病情恶化时, 精氨酸酶支气管上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞和肺泡巨噬中参与调节炎症和气道重塑的关键成分<sup>[17]</sup>。随着时间的推移, COPD 患者肺动脉高压和动脉压呈现上升趋势, 应用精氨酸干预后, 肺组织损伤减轻, 肺功能得到改善<sup>[18-19]</sup>。

花生四烯酸代谢是构成炎症的重要一环, 通过抑制炎症反应达到阻碍疾病进程是治疗众多疾病的基础, 经脂氧酶的代谢作用后, 可活化 NF- $\kappa$ B, 肺泡灌洗液和肺组织内炎症因子白细胞数量显著增加, 推测其可能增加氧化应激和蛋白酶的负荷, 加重了 COPD 的发生发展<sup>[20]</sup>。其次其通过改变花生四烯酸代谢后, 可阻碍血栓素 B<sub>2</sub> 和白三烯等炎症因子的形成, 降低肺组织内细胞凋亡指数, 减少烟雾诱导累积的毒性效应<sup>[21]</sup>。甘油磷脂代谢作为 COPD 患者肺组织内代谢紊乱的重要标志物<sup>[22]</sup>, 其前体物质植物鞘磷脂可代谢为脂肪酸, 随后并入甘油磷脂内, 在细胞的凋亡、迁移和炎症中均可表达, 对于 COPD 的诊断具有重大价值<sup>[23]</sup>。但根据 Western blot 的检测结果显示, 人参化橘红对抑制其表达无显著性差异, 可能对甘油磷脂代谢抑制无明显作用。

综上所述, 本研究通过血清代谢组学探究人参化橘红干预 COPD 的作用机制, 发现人参化橘红可通过促进精氨酸的合成和抑制花生四烯酸代谢, 抑制肺组织的炎症浸润, 保护肺功能。

## 参考文献

- Calzetta L, Matera MG, Coppola A, et al. Prospects for severe asthma treatment [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2021, 56: 52-60.
- Matera MG, Cazzola M, Page C. Prospects for COPD treatment [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2021, 56: 74-84.
- López-campos JL, Calero-acuña C. What is in the guidelines about the pharmacological treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2013, 7 (2): 43-51.
- Luo YL, Zhang CC, Li PB, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13 (3): 301-307.
- Chen DQ, Cao G, Chen H, et al. Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1476.
- Puchalska P, Martin SE, Huang X, et al. Hepatocyte-macrophage acetoacetate shuttle protects against tissue fibrosis [J]. *Cell Metab*, 2019, 29 (2): 383-398.
- Bunning BJ, Contrepois K, Lee-mcmullen B, et al. Global metabolic profiling to model biological processes of aging in twins [J]. *Aging Cell*, 2020, 19 (1): e13073.
- Paige M, Burdick MD, Kim S, et al. Pilot analysis of the plasma metabolite profiles associated with emphysematous chronic obstructive pulmonary disease phenotype [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413 (4): 588-593.
- Teng F, Ye H, Xue TJ. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (9): e0204377.
- Shergis JL, Di YM, Zhang AL, et al. Therapeutic potential of panax ginseng and ginsenosides in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22 (5): 944-953.
- 管思彬. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 减轻 COPD 气道重塑的机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2023.
- Li JJ, Chen Q, He XH, et al. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through  $\alpha_2$ AR/PI3K/Akt pathway [J]. *J Transl Med*, 2018, 16 (1): 78.
- Li JM, Yang DC, Oldham J, et al. Therapeutic targeting of argininosuccinate synthase1-deficient pulmonary fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2021, 29 (4): 1487-1500.
- Beaulieu D, Attwe A, Breau M, et al. Phospholipase A<sub>2</sub> receptor 1 promotes lung cell senescence and emphysema in obstructive lung disease [J]. *Eur Respir J*, 2021, 58 (2): 2000752.
- Koo JB, Han JS. Cigarette smoke extract-induced interleukin-6 expression is regulated by phospholipase D1 in human bronchial epithelial cells [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41 (1): 77-89.
- 王旭红, 史捷, 张暮盈, 等. 基于“肺肠同治”的清肺化痰逐瘀汤治疗 COPD 的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30 (4): 124-133.
- Jose MGR, Germán RBP, Sandra RP, et al. Elevated levels of arginase activity are related to inflammation in patients with COPD exacerbation [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21 (1): 271.
- 朱慧. L-精氨酸对慢性阻塞性肺病大鼠模型的肺功能保护实验研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2005.
- 周松林. 左旋精氨酸对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 并肺动脉高压的治疗研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- 崔艳辉. PPAR $\gamma$  受体激动剂罗格列酮对慢阻肺大鼠花生四烯酸代谢产物的调节 [D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
- Aleyna NY, Hakan B, Fatih MS, et al. The protective effects of thymoquinone on lung damage caused by cigarette smoke [J]. *Biotech Histochem*, 2020, 95 (4): 268-275.
- Huang Q, Wu XJ, Gu YY, et al. Detection of the disorders of glycerophospholipids and amino acids metabolism in lung tissue from COPD Patients [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 839259.
- Kondo N, Ohno Y, Yamagata M, et al. Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5338.

(收稿日期: 2023-09-12; 修回日期: 2023-11-06)

## 灰毡毛忍冬 *bZIP25* 基因的克隆及其表达模式分析

王珊<sup>1</sup>, 曾娟<sup>2, 3, 4</sup>, 谢瑜<sup>1</sup>, 周日宝<sup>2, 3, 4</sup>, 刘湘丹<sup>2, 3, 4</sup>, 童巧珍<sup>2, 3, 4</sup>, 龙雨青<sup>2, 3, 4</sup>, 陈言<sup>5</sup>, 刘小丽<sup>1\*</sup> (1. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 3. 湘产大宗地道药材种质资源及规范化种植重点实验室, 长沙 410208; 4. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208; 5. 焦作市产品质量检验检测中心, 河南 焦作 454000)

**摘要:** **目的** 克隆灰毡毛忍冬 *bZIP25* 基因序列全长, 并进行生信分析及表达模式分析, 以初步探索其在灰毡毛忍冬中的生物学功能。**方法** 通过逆转录 PCR 技术克隆 *bZIP25* 基因的序列全长, 采用生物信息学分析方法对 *bZIP25* 及其编码的蛋白进行分析。运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术测定其在茎、叶及七个花期花中的表达水平。**结果** 克隆得到 *LmbZIP25* 基因 (OR551766), 其编码 191 个氨基酸, 具有典型的 bZIP 家族结构, 在 bZIP 结构域中与其他植物同源性较高。*LmbZIP25* 基因具有组织特异性, 在茎中的表达量显著高于花和叶, 在七个花期中黄色花蕾期的表达量最高。**结论** 克隆得到 *LmbZIP25* 基因全长, 分析其在不同器官和不同花期的表达差异, 为进一步探索其在灰毡毛忍冬中花发育中的功能奠定了研究基础。

**关键词:** 灰毡毛忍冬; *bZIP25*; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达模式分析

中图分类号: S567.79 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0335-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.010

## Cloning and expression pattern of *bZIP25* transcription factor from *Lonicera macranthoides*

WANG Shan<sup>1</sup>, ZENG Juan<sup>2, 3, 4</sup>, XIE Yu<sup>1</sup>, ZHOU Ri-bao<sup>2, 3, 4</sup>, LIU Xiang-dan<sup>2, 3, 4</sup>, TONG Qiao-zhen<sup>2, 3, 4</sup>, LONG Yu-qing<sup>2, 3, 4</sup>, CHEN Yan<sup>5</sup>, LIU Xiao-Li<sup>1\*</sup> (1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 3. Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan Bulk Authentic Medicinal Materials, Changsha 410208; 4. Key Laboratory of Modern Research of Chinese Medicine, Higher Education Division department of Hunan, Changsha 410208; 5. Jiaozuo Product Quality Inspection and Testing Center, Jiaozuo Henan 454000)

**Abstract: Objective** To clone the cDNA sequences of *bZIP25* gene from *Lonicera macranthoides*, and conduct bioinformatics analysis and expression pattern analysis, to determine the biological function of *bZIP25* in *Lonicera macranthoides*. **Methods** The full length of *bZIP25* sequence was cloned with reverse transcription PCR technology. *bZIP25* and its encoded proteins were analyzed with bioinformatics analysis methods. Its expression level in the stems, leaves and seven flowering stages were determined by real-time fluorescence quantitative PCR technology. **Results** The *LmbZIP25* (OR551766) gene was cloned, and 191 amino acids encoded. It contained a typical bZIP family structure and high homology with other plants in the bZIP domain. The *LmbZIP25* gene had tissue specificity and its expression level in the stem was much higher than that in the flowers and leaves. The highest expression occurred level in the yellow bud stage among the seven flowering stages. **Conclusion** The full length of *LmbZIP25* gene is cloned and its expression differences in organs and flowering stages are analyzed, laying a foundation for further exploring its biological functions in the floral development of *Lonicera macranthoides*.

**基金项目:** 2022 湖南省中医药科研计划项目 (No.D2022134); 2021 湖南省教育厅科学研究项目 (No.21C0245); 2021 校级科研基金与联合基金项目 (No.2021XJJ063); 2020 年湖南省一流专业建设点: 中药资源与开发; 湖南中医药大学中药学一流学科项目 (校行科字【2018】3 号)。  
**作者简介:** 王珊, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事中药资源质量与开发, email: 5656078@qq.com \***通信作者:** 刘小丽, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中药药理学与药效学研究, email: liuxiaoli0923@sina.com



**Key words:** *Lonicera macranthoides*; *bZIP25*; gene cloning; bioinformatic analysis; expression pattern analysis

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 是中药材山银花的主要来源, 具有清热解毒, 疏散风热的功效<sup>[1]</sup>, 是治疗内痈、外痈之要药。随着生物技术的快速发展, 灰毡毛忍冬分子水平的相关研究也越来越多。其中对灰毡毛忍冬的基因研究多集中在参与其活性成分绿原酸生物合成<sup>[2-4]</sup>、黄酮类化合物合成<sup>[5-6]</sup>、植物激素乙烯合成<sup>[7-8]</sup> 以及其花冠特殊表型等方面<sup>[9-11]</sup>, 而关于其转录因子的相关研究报道则很少。

bZIP (basic leucine zipper) 转录因子是植物中非常重要且常见的一类生物蛋白, 由高度保守的碱性区和相对保守的亮氨酸拉链区组成。bZIP 转录因子通过与靶基因的启动子区域结合, 激活或抑制其转录, 从而调控基因的表达, 参与植物各种生物学过程, 在植物的生长发育、次生代谢产物合成以及抵御逆境胁迫等方面都发挥着不可替代的作用<sup>[12-13]</sup>, 如 bZIP 转录因子可以加速马铃薯生殖块茎的生长和衰老<sup>[14]</sup>。苹果 *MdbZIP44* 通过增加 *MdMYB1* 与下游靶基因启动子的结合, 促进了脱落酸诱导的花青素生物合成<sup>[15]</sup>。陆地棉 *GhVIP1* 过表达后, 提高种子发芽率和改善根系发育, 使其耐旱性增强<sup>[16]</sup>。有研究对金银花五个花期的转录因子表达量进行差异分析, 发现 49 个 bZIP 转录因子的表达量存在明显差异, 提示其可能参与金银花的发育<sup>[17]</sup>。

本研究利用课题组前期研究获得的灰毡毛忍冬转录组测序数据, 筛选出在花不同发育阶段具有显著表达差异的 *bZIP25* ( $\log_2$  Fold Change: 2.12,  $P < 0.05$ ), 对其进行克隆及生信分析, 并对其在不同器官、不同开花阶段的表达量进行研究分析, 为后续深入探索灰毡毛忍冬 *bZIP25* 在花发育方面的功能研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 药材

灰毡毛忍冬花、叶及茎在湖南隆回采摘, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为灰毡毛忍冬的花、叶及茎, 将采集的花样品按不同花期分成七个阶段 (f1 ~ f7)<sup>[5]</sup>。将样品于封口袋中密封, 装入液氮罐中, 带回实验室于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 试剂

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (杭州博日科技有限公司); RevertAid First Strand cDNA synthesis 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、TS-GelRed Ver.2 1000 x in Water、Trelief 5 $\alpha$  感受态细胞 (北京擎科新业生物技术有限公

司); SMARTer RACE 5'/3' 试剂盒 (日本 Takara 公司); pEASY-Blunt Cloning 试剂盒、pEASY-T1 Cloning 试剂盒、TranStart Green qPCR SuperMix UDG (北京全式金生物科技有限公司); 2 $\times$  Taq Master Mix (Dye) (康为世纪科技有限公司)。所用引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列如表 1 所示, 浓度为  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 2 方法与结果

### 2.1 *bZIP25* 基因克隆

**2.1.1 *bZIP25* 基因核心片段扩增** 取适量灰毡毛忍冬花蕾, 根据多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒的方法提取灰毡毛忍冬总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白分析仪检测合格后, 参照 RevertAid First Strand cDNA synthesis 试剂盒的步骤, 用提取得到的 RNA 逆转录合成灰毡毛忍冬 cDNA。根据前期的转录组测序结果, 筛选出标注为 bZIP 的序列, 设计引物 *bZIP25-S* 和 *bZIP25-A* (见表 1), 以上步骤得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系共  $25\text{ }\mu\text{L}$ , 其中 cDNA  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 2 $\times$  Taq Master Mix (Dye)  $12.5\text{ }\mu\text{L}$ , *bZIP25-S* 和 *bZIP25-A* 各  $1\text{ }\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为  $94\text{ }^\circ\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $55\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$ , 90 s, 40 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶进行电泳分离, 凝胶回收试剂盒回收目的条带, 与 pEASY-T1 克隆载体连接, 转化至感受态细胞后, 涂抹于 LB 固体培养基进行蓝白斑筛选, 挑取出白斑进行菌落 PCR, 得到约 300 bp 的目的条带 (见图 1A), 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 明确核心片段序列长为 286 bp。

**2.1.2 *bZIP25* 基因 RACE 扩增** 根据上述测序结果, 设计 RACE 引物 *bZIP25-5'* 和 *bZIP25-3'* (见表 1)。参照 RACE 试剂盒的步骤分别获得 *bZIP25* 的 5' 和 3' RACE-Ready cDNA。PCR 体系包括 5' 或 3' RACE-Ready cDNA  $2.5\text{ }\mu\text{L}$ , Seq Amp DNA Polymerase  $1\text{ }\mu\text{L}$ , *bZIP25-5'* 或 *bZIP25-3'* 引物  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 10 $\times$  UPM  $5\text{ }\mu\text{L}$ , PCR-Grade H<sub>2</sub>O 补足  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 以及 2 $\times$  Seq Amp Buffer  $25\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为  $94\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  2 min, 5 个循环;  $94\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  2 min, 5 个循环;  $94\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $58\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  2 min, 40 个循环。回收、连接、克隆与测序等步骤同“2.1.1”项下, 其中所用载体为 pEASY-Blunt 克隆载体。5'-端和 3'-端 RACE 扩增结果显示, 分别在 400 bp 和 600 bp 左右有一明亮条带 (见图 1B 和 1C)。

**2.1.3 *bZIP25* 基因 cDNA 全长获得及验证** 应用序列拼接软件对 5'-端和 3'-端进行拼接, 获得灰毡毛

忍冬 *bZIP25* 基因 cDNA 序列全长。根据全长序列设计验证引物 Y-*bZIP25*-F 和 Y-*bZIP25*-R (见表 1), 以“2.1.1”项下所得 cDNA 为模板进行全长验证。PCR 体系共包括 cDNA 1 μL, Y-*bZIP25*-F 和 Y-*bZIP25*-R 各 1 μL, 2×Pfu Master Mix (Dye) 12.5 μL, 以及 ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。回收、连接、克隆与测序等步骤同“2.1.1”项下, 其中所用载体为 pEASY-Blunt 克隆载体。将 5'-端、3'-端及核心片段序列的测序结果用 Conting Express 软件拼接后, 得到 *bZIP25* 基因 cDNA 全长序列共 892 bp。验证 cDNA 全长, 发现在 900 bp 左右一明显亮带 (见图 1D), 经过回收、连接、克隆及测序, 证实测序结果与拼接全长序列一致。

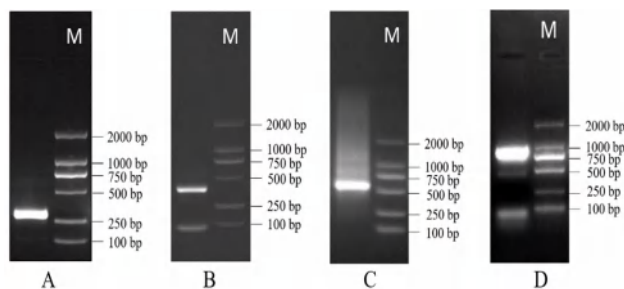


图 1 *bZIP25* 基因 PCR 产物

Fig 1 PCR product of *bZIP25* gene

注 (Note): M. Marker; A. 核心片段 PCR 产物 (PCR product of core fragment); B. 5'-RACE PCR 产物 (PCR product of 5'-RACE); C. 3'-RACE PCR 产物 (PCR product of 3'-RACE); D. 全长 cDNA PCR 产物 (PCR product of cDNA full-length)。

表 1 引物序列  
Tab 1 Primer sequence

引物名称	引物序列	引物用途
<i>bZIP25</i> -S	CTTCTTTTCCGCTCGTCTATT	核心片段扩增
<i>bZIP25</i> -A	TCTACCTTCTCCCTCTCAT	核心片段扩增
<i>bZIP25</i> -5'	CGCCATGTTGTCTTTGACAGCC	5'-RACE 扩增
<i>bZIP25</i> -3'	TGGTATTGAGAGAGGCTGTCAAAGG	3'-RACE 扩增
Y- <i>bZIP25</i> -F	TCTACCTTCTCCCTCTCATAA	全长验证
Y- <i>bZIP25</i> -R	CTAAGAAATCTAATAAACCAAACTG	全长验证
Q- <i>bZIP25</i> -F	TTACCCACCAAACCCAGTTC	qRT-PCR
Q- <i>bZIP25</i> -R	TAGTTGACGGACAAGCAAGAC	qRT-PCR
<i>18S</i> -F	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	内参基因
<i>18S</i> -R	GCGGAGTCTAGAAGCAACA	内参基因

## 2.2 *bZIP25* 基因生物信息学分析

对灰毡毛忍冬 *bZIP25* 进行生物信息学分析所

用的在线软件及具体网址见表 2。

表 2 生物信息学分析方法  
Tab 2 Bioinformatics analysis method

软件名称	网址	软件用途
ORF finder	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</a>	查找开放阅读框
ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>	分析蛋白理化性质
ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>	分析蛋白亲/疏水性
TMHMM 2.0	<a href="https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>	分析蛋白跨膜结构
SignalP 4.1 Server	<a href="https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/">https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/</a>	分析蛋白信号肽
WOLF PSORT	<a href="https://wolfsort.hgc.jp/">https://wolfsort.hgc.jp/</a>	分析蛋白亚细胞定位
NetPhos-3.1	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/</a>	分析蛋白磷酸化位点
CD-Search	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>	分析蛋白结构域
SOPMA	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>	分析蛋白二级结构
SWISS-MODEL	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>	分析蛋白三级结构
MEME	<a href="https://meme-suite.org/mem/">https://meme-suite.org/mem/</a>	分析蛋白保守基序

### 2.2.1 LmbZIP25 蛋白理化性质分析

灰毡毛忍冬 *bZIP25* 基因全长为 892 bp, 包含的 ORF 区长度为 576 bp, 编码 191 个氨基酸, 命名为 *LmbZIP25*, 其 GenBank 登录号为: OR551766。

*LmbZIP25* 蛋白分子式为 C<sub>966</sub>H<sub>1525</sub>N<sub>305</sub>O<sub>295</sub>S<sub>7</sub>, 相对分子质量为 22.35 kDa, 理论等电点为 9.99。 *LmbZIP25* 蛋白的 191 个氨基酸残基中, 精氨酸

(Arg) 和丝氨酸 (Ser) 含量最高, 为 11.5%; 缬氨酸 (Tyr) 含量最低, 仅 0.5%。 *LmbZIP25* 蛋白不稳定系数为 72.09, 大于阈值 40, 属于不稳定蛋白。 *LmbZIP25* 蛋白的脂溶系数为 63.25, 总平均疏水指数 (GRAVY) 为 -1.007, 为亲水性蛋白。通过 ProtScale 软件分析, 该蛋白亲水/疏水氨基酸分布负值明显大于正值, 提示亲水区占比远大于疏水

区, 与 ProtParam 预测的结果一致。

经 WOLF PSORT 在线分析, 该蛋白定位于细胞核中。利用 TMHMM 2.0 在线分析, 其编码的氨基酸均在膜外, 不具跨膜区域。通过 Signal P 4.1 Server 软件可知该蛋白无信号肽序列, 为非分泌蛋白。NetPhos 3.1 在线软件分析提示, LmbZIP25 中共有 28 个潜在磷酸化位点, 其中有 22 个 Ser

磷酸化位点、5 个 Thr 磷酸化位点及 1 个 Tyr 磷酸化位点。

**2.2.2 bZIP25 蛋白结构分析** 通过 CD-Search 在线分析, 发现灰毡毛忍冬 bZIP25 蛋白在第 81 ~ 132 位氨基酸残基上含有 bZIP\_plant\_GBF1 保守结构域 (见图 2), 提示其属于 bZIP 家族, 与家族中其他成员具有相同或相似的功能。



图 2 LmbZIP25 蛋白结构域分析

Fig 2 Domain prediction of LmbZIP25 proteins

SOPMA 在线预测 LmbZIP25 蛋白二级结构。 $\alpha$  螺旋为其主要结构组成元件, 占 46.07%; 其次为无规则卷曲, 占 41.88%。通过 SWISS-MODEL 对 LmbZIP25 蛋白进行同源建模, 发现其与阿拉伯咖啡的 bZIP 蛋白在三级结构水平的相似度为 53%, 三级结构的覆盖率达 99%, 且以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主, 与二级结构预测结果相符, 结果见图 3。

**2.2.3 氨基酸序列同源性比对、进化分析和基序分析** 将 LmbZIP25 编码的氨基酸序列与 NCBI-Blast 中的植物蛋白数据库进行搜索比对, 发现与可可 *Theobroma cacao*、哥伦比亚锦葵 *Herrania umbratica*、小蓬草 *Erigeron canadensis*、莴苣 *Lactuca sativa*、狭叶油茶 *Camellia lanceoleosa* 和甜橙 *Citrus sinensis* 等的同源性较高, 下载上述植物的氨基酸序列, 使用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 结果见图 4。这些植物中均包含有符合 bZIP 转录因子的“N-X7-R-X9-L-X6-L-X6-L”特征结构, 且碱性区的同源性非常高, 亮氨酸拉链区相对稍低。

将在 NCBI-Blast 上下载的部分植物 bZIP 基因家族氨基酸序列, 利用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树。由图 5A 可知, 进化树分为三支, 灰毡毛忍冬 LmbZIP25 与芝麻 SibZIP4、木犀榄 OebZIP4、旋蒴苣苔 DhbZIP5、小蓬草 EcbZIP4、刺苞菜蓟 CcbZIP4、莴苣 LsbZIP4 和除虫菊 TcbZIP4 聚为一支, 说明与这些植物的亲缘关系较近。茄科的 3 种植物, 渐狭叶烟草 NabZIP11、马铃薯 StbZIP63 和辣椒 CabZIP11 聚为一支, 其余植物为另一支。

对参与分析植物的蛋白序列进行保守基序分析 (见图 5B), 结果发现所有序列均具有 Motif 1、Motif 3、Motif 4 及 Motif 6 等 4 个保守基序, 而不同进化分支 bZIP 的基序组成有较明显的种属特性, 如第一大类均不含 Motif 8, 第二大类的 3 个茄科植物

*NabZIP11*、*CabZIP11* 和 *StbZIP63* 均无 Motif 7, 但具有 Motif 9。另外, 同一种属的植物保守基序也呈现出个体差异, 如第三大类中的菊科植物 *EcbZIP4* 无 Motif 8, 同为菊科的 *CcbZIP4* 则无 Motif 5 和 Motif 7。

### 2.3 bZIP25 基因的表达分析

基于 bZIP25 基因的全长序列, 设计实时荧光定量 PCR 的引物 Q-bZIP25-F 和 Q-bZIP25-R (见表 2)。提取灰毡毛忍冬七个花期的花及茎、叶的总 RNA, 定量后逆转录成 cDNA。将 18S rRNA 基因作为内参, 设计引物 18S-F、18S-R (见表 2) 进行 qRT-PCR。反应体系包括 2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix UDG 10  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.4  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。扩增条件为 50  $^{\circ}$ C 2 min, 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 10s, 40 个循环。重复 3 次, 进行熔解曲线分析, 运用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量, 结果见图 6。不同花期中, LmbZIP25 在黄色花蕾期的相对表达量最高, 显著高于其他花期; 不同器官中, 以花期黄色花蕾期为参照, LmbZIP25 相对表达量在茎中最高, 其次为花期黄色花蕾期, 而在叶中最低。其中, 在茎中的相对表达量为叶的 20.67 倍, 为黄色花蕾期的 2.07 倍。

### 3 讨论

bZIP 家族作为最大的转录因子家族之一, 具有多种生物学功能, 广泛地参与到植物的生命活动中。本研究为探索其在灰毡毛忍冬花器官发育中的功能克隆了 bZIP25 基因序列全长, 开放阅读框 (ORF) 为 576 bp, 编码 191 个氨基酸, 预测其为不稳定亲水蛋白, 无跨膜结构, 为非分泌蛋白。研究显示, bZIP 主要定位于细胞核中<sup>[18]</sup>, LmbZIP25 蛋白分析结果与之相符。结构域分析其含有 bZIP\_plant\_GBF1 保守结构域, 推测其属于 GBF1 类 bZIP 转录因子, 与蓖麻<sup>[19]</sup>、橡胶





图 3 LmbZIP25 蛋白三级结构预测

Fig 3 Prediction of tertiary structure of LmbZIP25 proteins

草<sup>[20]</sup>和野菊<sup>[21]</sup>等 bZIP 编码的结构域一致。同源性比对结果表明,同源性较高的区域主要位于保守结构域上。与灰毡毛忍冬 *LmbZIP25* 进化关系最近的芝麻、木犀榄、旋蒴苣苔、莴苣和除虫菊等的 bZIP 蛋白在基序组成上高度保守,均含有 Motif 1 ~ Motif 8。

灰毡毛忍冬的入药部位为花蕾或带初开的花,为研究 *bZIP25* 在灰毡毛忍冬开花进程中的表达量差异,课题组将整个花期细分为七个阶段。qRT-

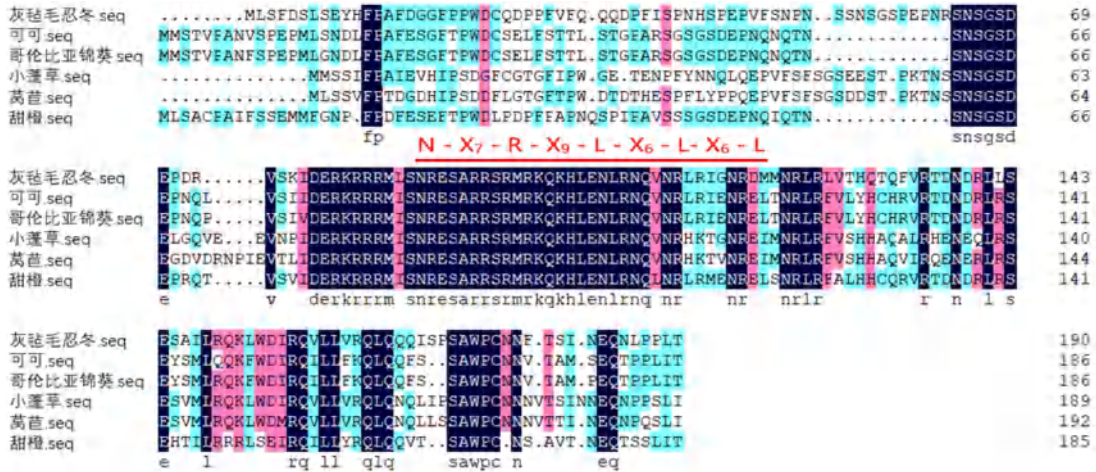


图 4 LmbZIP25 与其他植物 bZIP 蛋白的多序列比对

Fig 4 Multiple sequence alignment of LmbZIP25 with bZIP proteins of other plants

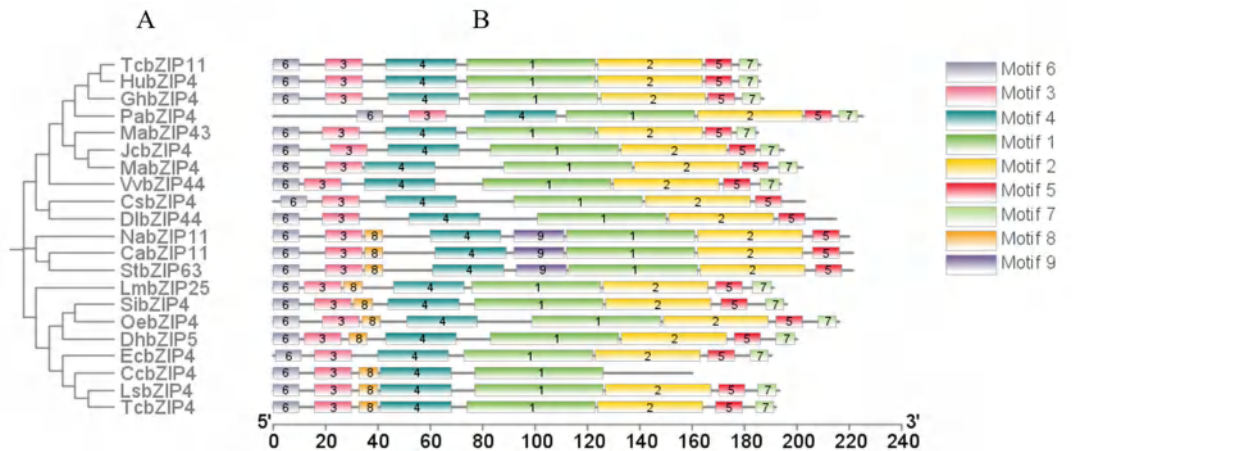


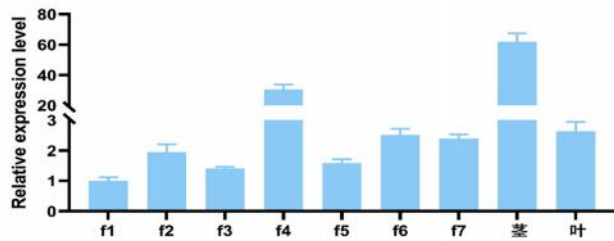
图 5 LmbZIP25 蛋白的系统进化树 (A) 和基序 (B)

Fig 5 Phylogenetic tree (A) and motif (B) of LmbZIP25 proteins

PCR 结果显示, *LmbZIP25* 在灰毡毛忍冬七个花期、茎和叶中均有表达,表达量为茎>黄色花蕾期>叶,但表达量存在时空差异与组织特异性。bZIP 家族在不同的物种中具有不同的组织表达模式。如金银花 *LjbZIP1* 表达量在叶中高于成熟花中<sup>[22]</sup>。牡丹 *PobZIP1* 在茎和叶中的表达量基本持平,在花芽中表达量最少<sup>[23]</sup>。红花 *CtbZIP47* 在茎中的表达量高于花中,在叶中则最低<sup>[24]</sup>。

*LmbZIP25* 在灰毡毛忍冬不同花期的表达水平整

体呈先升后降的趋势,其中黄色花蕾期的 *LmbZIP25* 表达量显著高于其他花期。黄色花蕾期是灰毡毛忍冬开花前的最后阶段,此时的 *LmbZIP25* 表达量突增,提示其很可能促进灰毡毛忍冬花的开放。在其他植物中,也发现不少此类现象。如大豆 *GmbZIP33* 在拟南芥中过表达后,转基因拟南芥出现早花,并使 *FT* 等开花基因的表达量升高<sup>[25]</sup>。bZIP 转录因子 *GmFDL19* 能与开花基因 *GmFT2a* 和 *GmFT5a* 相互作用, *GmFDL19* 在大豆中过表达时,能上调开

图 6 *LmbZIP25* 基因相对表达量Fig 6 Relative expression level of *LmbZIP25* gene

注 (Note): f1. 花蕾初期 (early buds); f2. 青绿色花蕾期 (green buds); f3. 绿白色花蕾期 (green and white buds); f4. 黄色花蕾期 (yellow buds); f5. 白色开花期 (white flowers); f6. 黄色开花期 (yellow flowers); f7. 枯萎期 (withered flowers)。

花基因的转录水平, 导致大豆出现早花<sup>[26]</sup>。水稻 *OsbZIP62* 不仅能够调控水稻的成花转变, 还参与调控分枝、幼穗、花分生组织以及花器官的发育<sup>[27]</sup>。后续可通过获得 *LmbZIP25* 基因的过表达植株或功能缺失突变株, 为深入研究其对灰毡毛忍冬开花的调控机制及验证其生物学功能提供参考。

## 参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 32.

[2] 陈娅, 王安琪, 刘聪, 等. 灰毡毛忍冬 *LmC3H1* 基因的克隆及表达模式与绿原酸含量相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (9): 167-175.

[3] 王珊, 陈勋, 龙雨青, 等. 灰毡毛忍冬苯丙氨酸解氨酶 (*LmPAL2*) 基因的克隆与表达分析[J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2285-2291.

[4] 刘湘丹, 陈勋, 龙雨青, 等. 灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因的克隆及表达分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43 (7): 1215-1224.

[5] 曾娟, 龙雨青, 李灿, 等. 灰毡毛忍冬 *CHI* 和 *CHS* 基因的克隆及功能研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (9): 2419-2429.

[6] Wu J, Wang XC, Liu Y, et al. Flavone synthases from *Lonicera japonica* and *L. macranthoides* reveal differential flavone accumulation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 19245.

[7] Long YQ, Zeng J, Yang M, et al. Comparative transcriptome analysis to reveal key ethylene genes involved in a *Lonicera macranthoides* mutant [J]. Genes Genomics, 2023, 45 (4): 437-450.

[8] 刘畅宇, 陈勋, 陈娅, 等. 不同品种灰毡毛忍冬 *ACS3* 基因克隆、表达及生物信息学分析[J]. 中草药, 2019, 50 (9): 2154-2164.

[9] Wang S, Peng MC, Chen X, et al. Molecular cloning and spatiotemporal expression of *APETALAI*-like gene in *Lonicera macranthoides* [J]. J Genet, 2018, 97 (5): 1281-1288.

[10] Long YQ, Liu X, Zeng J, et al. Cloning and expression of *AGL19* gene in two *Lonicera macranthoides* varieties [J]. J Genet, 2021, 100: 13.

[11] 龙丽君, 刘思思, 曾慧杰, 等. 灰毡毛忍冬 MADS-box 家族基因 *SVP* 克隆及表达分析[J]. 中草药, 2023, 54 (16):

5350-5357.

[12] Dröge-Laser W, Snoek BL, Snel B, et al. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family-an update [J]. Curr Opin Plant Biol, 2018, 45 (Pt A): 36-49.

[13] 吕薇, 徐郅卓, 何杰芳, 等. bZIP 转录因子影响植物次生代谢研究进展 [J/OL]. 分子植物育种: 1-13 [2023-11-14]. <http://h-p.kns.cnki.net/hnucm.opac.vip/kcms/detail/46.1068.S.20221110.1040.002.html>.

[14] Mason GA. A bZIP transcription factor accelerates the transition to reproductive tuber growth and aging in *Solanum tuberosum* [J]. Plant Physiol, 2022, 189 (3): 1194-1195.

[15] An JP, Yao JF, Xu RR, et al. Apple bZIP transcription factor *MdbZIP44* regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation [J]. Plant Cell Environ, 2018, 41 (11): 2678-2692.

[16] Zhao P, Xu YW, Chen W, et al. A bZIP transcription factor *GhVIP1* increased drought tolerance in upland cotton [J]. Journal of Cotton Research, 2023, 6 (2): 125-137.

[17] Wang TT, Yang BX, Guan QJ, et al. Transcriptional regulation of *Lonicera japonica* Thunb. during flower development as revealed by comprehensive analysis of transcription factors [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19 (1): 198.

[18] Zhang YT, Li SL, Chen Y, et al. Heterologous overexpression of strawberry *bZIP11* induces sugar accumulation and inhibits plant growth of tomato [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 292: 110634.

[19] 李艳肖, 朱贵爽, 张宏宇, 等. 蓖麻 *RcbZIP11* 基因克隆及表达特性[J]. 西北植物学报, 2023, 43 (9): 1478-1487.

[20] 李闯, 王肖肖, 杨玉双, 等. 橡胶草 *Tk-bZIP11* 转录因子基因的克隆及其表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2024, 22 (5): 1444-1453.

[21] 黄沁梅. 野菊镉响应基因 *CibZIP43* 及启动子的克隆与表达分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.

[22] 毛雪飞, 何金娇. 金银花 *LjbZIP1* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17 (24): 8014-8019.

[23] 张萍, 王顺利, 朱富勇, 等. 牡丹 *PobZIP1* 在种子发育中的表达及其与 ABA 含量的关系[J]. 园艺学报, 2014, 41 (8): 1642-1650.

[24] 刘怡麟, 王帅, 朱俐铭, 等. 红花 *CtbZIP47* 基因的表达分析及调控酵母油脂合成的作用研究 [J/OL]. 吉林农业大学学报, <http://doi.org/hnucm.opac.vip/10.13327/j.jjlau.2021.1352>.

[25] 张蕾, 陈昕涛, 白丽娟, 等. 大豆 bZIP 转录因子基因 *GmbZIP33* 的克隆与功能分析[J]. 大豆科学, 2023, 42 (5): 524-531.

[26] Nan HY, Cao D, Zhang DY, et al. *GmFT2a* and *GmFT5a* redundantly and differentially regulate flowering through interaction with and upregulation of the bZIP transcription factor *GmFDL19* in soybean [J]. PLoS One, 2014, 9 (5): e97669.

[27] Kaur A, Nijhawan A, Yadav M, et al. *OsbZIP62/OsFD7*, a functional ortholog of FLOWERING LOCUS D, regulates floral transition and panicle development in rice [J]. J Exp Bot, 2021, 72 (22): 7826-7845.

(收稿日期: 2023-09-10; 修回日期: 2023-11-08)

## 奥氮平对乳腺癌相关巨噬细胞增殖与分化功能的影响

孟娟<sup>1</sup>, 李东辉<sup>2\*</sup>, 高元慧<sup>3</sup>, 刘梅<sup>1</sup>, 李建旺<sup>1</sup> (海口市人民医院, 1. 肿瘤内科; 2. 泌尿外科; 3. 中心实验室, 海口 570208)

**摘要:** **目的** 探讨奥氮平对乳腺癌细胞共培养体系中人急性髓系白血病细胞系 THP-1 细胞增殖和分化功能的影响。**方法** 体外培养 THP-1 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 建立 THP-1 与 MDA-MB-231 共培养组, 用 CCK-8 法检测奥氮平处理后的 THP-1 单独组、共培养组中 THP-1 的活性变化; 用 qRT-PCR 法检测奥氮平对佛波酯诱导的 THP-1 单独组、共培养组中 THP-1 表面分子 CD68、CD80、CD163 的表达, 以及炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  和 IL-10 的表达, 同时进一步检测巨噬细胞极化相关 miRNA 分子 miRNA9、miRNA155 和 miRNA34a 的表达。**结果** 奥氮平能抑制 THP-1 单独组和共培养组中 THP-1 的增殖活性 ( $P < 0.05$ ); 在佛波酯诱导 THP-1 向巨噬细胞分化的研究中, 奥氮平能够显著提高 THP-1 单独组 CD68 分子的表达 ( $P < 0.05$ ), 而在共培养组中 CD68、CD80、CD163 的表达则均显著升高 ( $P < 0.05$ )。在 THP-1 单独组中, 奥氮平仅能够促进 IL-12 的表达; 在共培养组中, 奥氮平使 CCL2、CXCL10、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。在巨噬细胞分化相关 miRNA 的研究中, 在奥氮平作用下, THP-1 单独组中 miR155 和 Let7c 的表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), miR146、miR9 和 miR34a 的表达变化无差异; 在与 MDA-MB-231 共培养条件下, miR34a 和 Let7c 显著升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在肿瘤细胞存在的情况下, 奥氮平可参与肿瘤相关巨噬细胞表面分子、炎症因子以及巨噬细胞极化相关 miRNA 分子表达的调节, 这为进一步利用奥氮平治疗乳腺癌提供了新思路。

**关键词:** 奥氮平; 乳腺癌; 急性髓系白血病 THP-1 细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R96, R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0341-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.011

## Effect of olanzapine on the proliferation and differentiation of breast cancer-associated macrophages

MENG Juan<sup>1</sup>, LI Dong-hui<sup>2\*</sup>, GAO Yuan-hui<sup>3</sup>, LIU Mei<sup>1</sup>, LI Jian-wang<sup>1</sup> (1. Department of Oncology, 2. Department of Urology, 3. Department of Central Laboratory, Haikou Municipal Hospital, Haikou 570208)

**Abstract: Objective** To observe the effect of olanzapine on the proliferation and differentiation of human monocytic leukemia cells (THP-1) in the co-culture system. **Methods** THP-1 cells and human triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231) were cultured in vitro. A co-culture group of THP-1 and MDA-MB-231 was established. The changes in the activity of THP-1 in the THP-1-alone group and the co-culture group after the treatment with different concentrations of olanzapine were detected by the CCK-8 assay, respectively. Olanzapine on the phorbol myristate acetate-induced THP-1-alone group was detected by qRT-PCR assay. Expressions of THP-1 surface molecules CD68, CD80, and CD163, and inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IL-10 in the co-culture group were also detected by qRT-PCR. The expression of macrophage polarization-associated miRNA molecules miRNA9, miRNA155 and miRNA34a were further detected. **Results** Olanzapine inhibited the proliferation of THP-1 in both THP-1-alone and co-culture groups ( $P < 0.05$ ). In the

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目 (No.22A200121, No.20A200358)。

作者简介: 孟娟, 女, 硕士, 主要从事乳腺泌尿肿瘤的药物治疗研究, email: mengjuan888@163.com \*通信作者: 李东辉, 男, 硕士, 主任医师, 主要从事泌尿疾病的治疗研究, email: kada321@126.com



study of PMA-induced THP-1 differentiation to macrophages, olanzapine significantly increased the expression of CD68 molecules in THP-1-alone group ( $P < 0.05$ ), while in the co-culture group the expression of CD68, CD80 and CD163 were all significantly increased ( $P < 0.05$ ). Further studies showed that in the THP-1-alone group, olanzapine only promoted the expression of IL-12. In the co-culture group, olanzapine significantly increased the expression levels of CCL2, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-12, and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). In the study of macrophage differentiation-associated miRNAs, olanzapine significantly increased on the expression of miR155 and Let7c in the THP-1-alone group ( $P < 0.05$ ), and the effect on miR146, miR9 and miR34a was not obvious. In the co-culture with MDA-MB-231, expression of miR34a and Let7c, on the other hand, significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In the presence of tumour cells, olanzapine can regulate the expression of tumour-associated macrophage surface molecules, inflammatory factors, and macrophage polarization-associated miRNA molecules, which may provide new ideas for further use of olanzapine in the clinical treatment of breast cancer.

**Key words:** olanzapine; breast cancer; acute myeloid leukemia THP-1 cell; proliferation; differentiation

乳腺癌已成为全球女性发病率最高的肿瘤, 严重威胁到女性的健康。乳腺癌的发生发展是多种因素共同作用产生的, 除了生殖、遗传、饮食、生活方式及环境因素外, 精神因素也是造成乳腺癌发病风险增加的重要因素<sup>[1]</sup>。奥氮平(OLZ)作为一种能拮抗 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺、胆碱能作用的精神类药物, 不仅能稳定精神情绪, 改善抑郁状态, 提高睡眠质量, 还具有良好的止吐作用<sup>[2-3]</sup>。作为止吐药物, 奥氮平已成为美国国立综合癌症网络(NCCN)、欧洲肿瘤内科学会(ESMO)指南中预防高、中度致吐风险化疗药物的标准方案, 在肿瘤对症治疗中广泛使用。然而奥氮平对于肿瘤的影响尚不明确, 本研究通过奥氮平作用于体外乳腺癌细胞-巨噬细胞共培养体系, 研究其对巨噬细胞增殖与分化的影响, 探讨奥氮平在乳腺癌治疗中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系、主要试剂及仪器

奥氮平(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 佛波酯(PMA, Sigma, USA), DMEM基础培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco, USA), Transwell培养板(Corning, USA), CCK-8(碧云天生物技术有限公司), 动物组织/细胞总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], miRNeasy Mini Handbook(德国 Qiagen), HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA Wiper)试剂盒、miRNA 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒(by stem-loop)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞), CO<sub>2</sub>恒

温培养箱(上海一恒), 酶标仪(Thermo, USA), 荧光定量PCR仪(BioRad CFX96, USA)等。

### 1.2 细胞培养

THP-1细胞用完全培养基为含10%FBS的RPMI 1640培养, MDA-MB-231细胞用含10%FBS的DMEM培养。所有细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 当MDA-MB-231细胞生长至融合时, 先用pH 7.4 PBS缓冲液漂洗一次, 然后用1 mL 0.25%胰酶消化细胞, 待细胞开始变圆后, 加入3 mL培养基终止胰酶的消化作用, 吹吸细胞使其完全分散, 再1:3传代培养或调至所需细胞密度进行铺板。

### 1.3 CCK-8法检测共培养条件下THP-1的细胞增殖活性

将400  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的密度的THP-1、MDA-MB-231细胞铺进24 Transwell培养板中, 培养24 h后, 分别加入2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的奥氮平, 继续培养48 h后每100  $\mu\text{L}$  加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂, 继续培养2 h, 酶标仪450 nm测定吸光度。

### 1.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测巨噬细胞表面分子与相关炎症因子的表达

将400  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的密度的细胞铺进24 Transwell培养板中, 培养24 h后, 分别加入50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  奥氮平和100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  佛波酯。不同按处理方式, 分为PMA-T组: 佛波酯处理的THP-1细胞; PMA-OLZ-T组: 奥氮平和佛波酯共同处理的THP-1细胞; PMA-TM组: 佛波酯处理的THP-1与MDA-MB-231共培养体

系; PMA-OLZ-TM 组: 奥氮平和佛波酯共同处理的 THP-1 细胞与 MDA-MB-231 共培养体系。继续培养 72 h 后收集巨噬细胞, 细胞总 RNA 提取使用动物组织 / 细胞总 RNA 提取试剂盒。以提取的总 RNA 为模板, 使用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+ gDNA Wiper) 试剂盒进行反转录, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR 实验检测各基因的表达。qRT-PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火并延伸 30 s, 共 40 个循环, 熔解曲线 65 °C 5 s, 95 °C 5 s, 1 个循环。利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 miRNA 相对表达量。miRNA 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 检测 miRNA 表达用引物序列

Tab 1 Primer sequences for qRT-PCR detection of miRNA expression

引物名称	引物序列 (5' - 3')
<i>hCD68</i> forward	CGAGCATCATTCTTACCAGCT
<i>hCD68</i> reverse	ATGAGAGGCAGCAAGATGGACC
<i>hCD80</i> forward	CTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTT
<i>hCD80</i> reverse	GCCAGTAGATGCGAGTTTGTGC
<i>hCD163</i> forward	CCAGAAGGAAGTGTAGCCACAG
<i>hCD163</i> reverse	CAGGCACCAAGCGTTTTGAGCT
<i>hTNF-α</i> forward	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC
<i>hTNF-α</i> reverse	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC
<i>hIL-1β</i> forward	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA
<i>hIL-1β</i> reverse	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
<i>hIL-6</i> forward	ACTCACCTTTCAGAACGAATTG
<i>hIL-6</i> reverse	CCATCTTTGGAAGGTTCAAGTTG
<i>hCXCL10</i> forward	GGTGAGAAGAGATGCTGAATCC
<i>hCXCL10</i> reverse	GTCCATCCTTGAAGCACTGCA
<i>hIL-10</i> forward	ACGGCGCTGTCATCGATT
<i>hIL-10</i> reverse	TTGGAGCTTATTAAGGCATTCTTC
<i>hIL-12p40</i> forward	ACCCTGACCATCCAAGTCAAA
<i>hIL-12p40</i> reverse	TTGGCCTCGCATCTTAGAAAG
<i>hTGF-β1</i> forward	TGATGTCACCGAGTTGTGCGG
<i>hTGF-β1</i> reverse	GGTTCATGCCATGAATGGTGG
<i>hCCL2</i> forward	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTC
<i>hCCL2</i> reverse	TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG
<i>hActin</i> forward	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
<i>hActin</i> reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

### 1.5 qRT-PCR 检测巨噬细胞极化相关 miRNA 的表达

将 400 μL  $1 \times 10^5$  个 · mL<sup>-1</sup> 的密度的 THP-1、MDA-MB-231 共培养细胞铺进 24 Transwell 培养板中, 培养 24 h 后, 分别加入 50 μmol · L<sup>-1</sup> 奥氮平和 100 ng · mL<sup>-1</sup> 佛波酯, 继续培养 72 h 后收集细胞, 细胞 miRNA 提取使用 miRNeasy Mini Handbook。以提取的 miRNA 为模板, 利用 Stem-loop 引物, 使用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (by

stem-loop) 进行反转录, 使用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR 实验检测各 miRNA 的表达。利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 miRNA 相对表达量。实验所用 miRNA 的 Stem-loop 引物、上下游引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 检测 miRNA 表达用引物序列

Tab 2 Primer sequences for qRT-PCR detection of miRNA expression

miRNA 反转录和 qRT-PCR 引物	引物序列 (5' - 3')
miR16-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC CGCCAA
miR16-forward	CGCGTAGCAGCACGTAAATA
miR9-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC TCATAC
miR9-forward	GCGCGTCTTTGGTTATCTAGCT
miR155-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC AACCC
miR155-forward	CGCGTAAATGCTAATCGTGATA
miR34a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC ACAACC
miR34a-forward	CGCGTGGCAGTGTCTTAGCT
let7c-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC AACCAT
let7c-forward	GCGCGTAGGGTAGTAGGTTGT
miR146a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGACTGGATACGAC AACCCA
miR146a-forward	CGCGTGAGAACTGAATTCCA
Universal PCR reverse	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT

### 1.6 统计学分析

实验独立重复 2 次, 结果用 Graphpad Prism 10 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 奥氮平在体外抑制 THP-1、MDA-MB-231 共培养条件下 THP-1 细胞的增殖活性

经过不同浓度的奥氮平处理 48 h 后, CCK-8 法检测 THP-1 单独培养组中及其与 MDA-MB-231 共培养组 (Co-THP-1) 中 THP-1 细胞的增殖活性, 结果显示: 2 μmol · L<sup>-1</sup> 和 100 μmol · L<sup>-1</sup> 奥氮平对单独培养的 THP-1 细胞增殖均有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 100 μmol · L<sup>-1</sup> 奥氮平对 Co-THP-1 也有一定程度的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。两组 THP-1 (Co-THP-1) 的细胞活性并无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 1)。

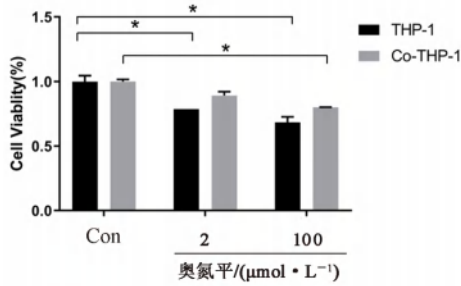


图 1 不同浓度奥氮平对 THP-1 和 Co-THP-1 组中 THP-1 的增殖活性的影响 (\* $P < 0.05$ )

Fig 1 Effect of different concentrations of olanzapine on activity of THP-1 in the THP-1-alone group and the co-culture group (\* $P < 0.05$ )

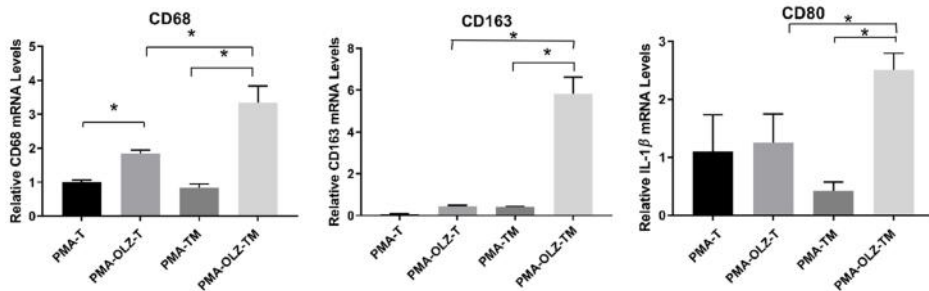


图 2 qRT-PCR 法检测各组中巨噬细胞表面分子 CD68、CD80 及 CD163 的表达 (\* $P < 0.05$ )

Fig 2 Expression of THP-1 surface molecules CD68, CD80, and CD163 by qRT-PCR (\* $P < 0.05$ )

### 2.3 奥氮平对巨噬细胞炎症因子和趋化因子表达的调控

与 PMA-T 组相比, PMA-OLZ-T 组中 THP-1 的炎症因子 IL-12 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其余因子的变化并不明显; 与 PMA-T 组相比, PMA-TM 组中 THP-1 的炎症因子和趋化因子均无明显变化 ( $P >$

### 2.2 奥氮平对巨噬细胞表面标志物表达的调节

与 PMA-T 组相比, PMA-OLZ-T 组中 THP-1 细胞表面分子 CD68 显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 PMA-T 组相比, PMA-TM 组中 THP-1 细胞表面分子 CD68、CD80 和 CD163 均无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 而与 PMA-TM 组相比, PMA-OLZ-TM 组中 THP-1 细胞中 CD68、CD80、CD163 的表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 PMA-OLZ-T 组相比, PMA-OLZ-TM 组中 THP-1 细胞的 CD68、CD80、CD163 水平也均有不同程度升高 ( $P < 0.05$ )(见图 2)。

0.05); 与 PMA-TM 组相比, PMA-OLZ-TM 组中 THP-1 的 CCL2、CXCL10、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 PMA-OLZ-T 组相比, PMA-OLZ-TM 组中 THP-1 的 CCL2、CXCL10、IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF- $\alpha$  水平也均有不同程度升高 ( $P < 0.05$ )(见图 3)。

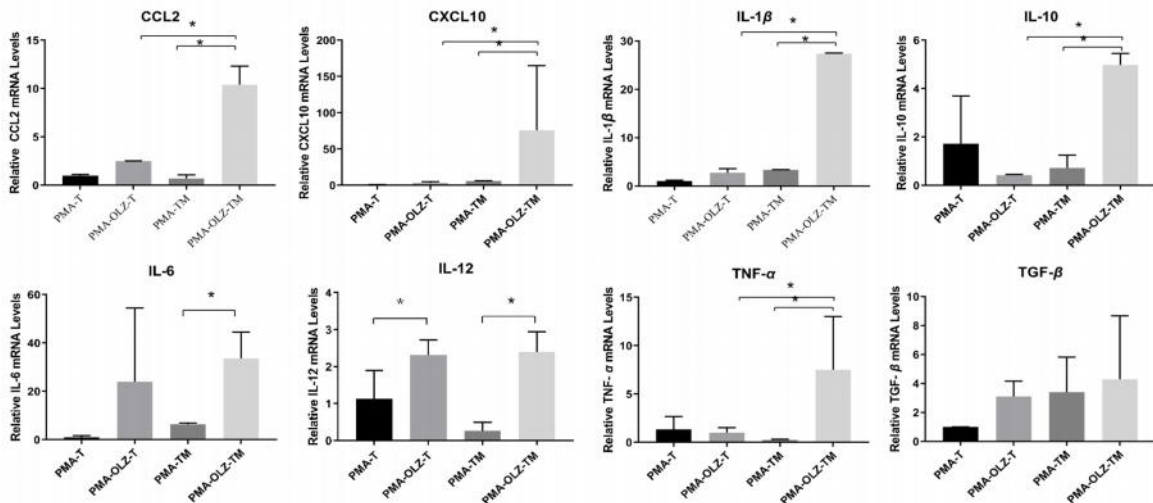


图 3 qRT-PCR 法检测各组巨噬细胞炎症因子和趋化因子表达水平 (\* $P < 0.05$ )

Fig 3 Expression of THP-1 surface molecules and inflammatory factors by qRT-PCR (\* $P < 0.05$ )

### 2.4 奥氮平对巨噬细胞极化相关 miRNA 分子表达的调控

奥氮平处理 THP-1 细胞 72 h 的结果显示, THP-1 组中, 奥氮平仅对 miR155 和 Let7c 的表达有明显

影响 ( $P < 0.05$ ), 对 miR146、miR9 和 miR34a 的影响并不明显。但在佛波酯诱导 THP-1 分化的情况下, 与 Co-THP-1 组巨噬细胞极化相关 miRNA 分子 miR34a 和 Let7c 出现显著变化 ( $P < 0.05$ )(见图 4)。



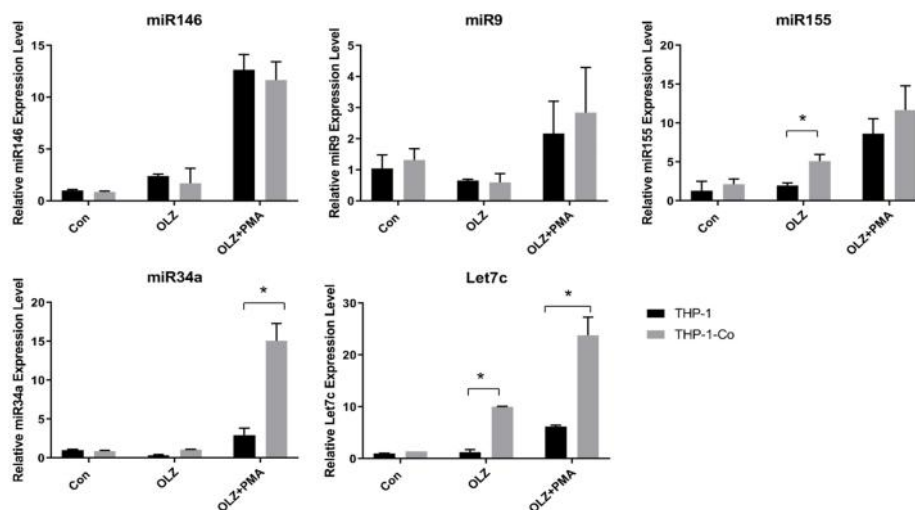


图 4 qRT-PCR 法检测各组巨噬细胞极化相关 miRNA 分子的表达 (\* $P < 0.05$ )

Fig 4 Expression of macrophage differentiation-associated miRNAs by qRT-PCR (\* $P < 0.05$ )

### 3 讨论

药物治疗是乳腺癌治疗的关键,但新药的研发成本巨大,而药物再利用与新药开发相比,可大幅缩短药物的研发时间、成本和风险,奥氮平作为一种经济、安全有效的药物,在临床中广泛应用。它可阻断多种神经递质,包括多巴胺 D1、D2、D3 和 D4 受体,5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、5-HT<sub>3</sub> 受体,儿茶酚胺受体, $\alpha$ 1-肾上腺素能受体,毒蕈碱受体的乙酰胆碱 M1,组胺 H1 受体等。而乳腺癌的发生与精神压力密切相关,在精神压力作用下神经系统调节交感神经,刺激末梢神经释放高浓度的儿茶酚胺和糖皮质激素,干扰神经内分泌和免疫系统的平衡,调节肿瘤微环境,诱导巨噬细胞分化<sup>[4]</sup>。而巨噬细胞是肿瘤微环境中重要的免疫细胞,参与抗原呈递、吞噬和其他免疫调节过程,在肿瘤的发生发展过程中起到重要作用。THP-1 细胞通常可被佛波酯诱导分化为巨噬细胞,广泛用于单核细胞和巨噬细胞相关的机制、信号通路以及营养和药物运输等研究中。巨噬细胞在不同因素的刺激下可分化为 M1 型或 M2 型巨噬细胞<sup>[5]</sup>。在肿瘤发展的初始阶段,巨噬细胞可以通过杀死肿瘤细胞直接促进抗肿瘤反应,表现为 M1 型<sup>[6]</sup>。由于肿瘤进展,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)开始表现出免疫抑制的 M2 型,通过产生大量生长因子、细胞外基质重塑分子和细胞因子促进肿瘤的生长、迁移和血管生成<sup>[7-8]</sup>。本课题组推测,具有神经系统调节功能的奥氮平可影响巨噬细胞的增殖和分化,从而影响肿瘤生长。因此进一步明确奥氮平在乳腺癌中的作用机制,为奥氮平的药物再

利用提供充分依据。

在前期实验中发现,不同浓度的奥氮平对单独 THP-1 细胞和 MDA-MB-231 细胞共培养条件下的 THP-1 细胞均有抑制作用,但两者之间并无差异。这提示奥氮平对 THP-1 细胞增殖活性的影响并不会受到 MDA-MB-231 细胞的影响。由于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的奥氮平对 THP-1 细胞增殖活性的影响较为明显,后续的实验中,采用  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的奥氮平对巨噬细胞的分化进行研究。

为了进一步研究奥氮平对 THP-1 细胞和 MDA-MB-231 细胞共培养条件下 THP-1 的分化是否存在差异,本研究通过佛波酯诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化,然后对巨噬细胞表面分子的表达进行检测。结果显示,在 THP-1 细胞单独培养组中,奥氮平仅参与 CD68 表达的调控;而在 MDA-MB-231 细胞参与的情况下,奥氮平能够显著提高 CD68、CD80 和 CD163 的表达水平,这提示奥氮平的存在对于 THP-1 细胞向巨噬细胞分化有着重要的意义,而 MDA-MB-231 细胞的存在对奥氮平影响巨噬细胞分化起着基础作用,但尚不能明确巨噬细胞 M1 或 M2 分化的方向。

为了进一步探索奥氮平对巨噬细胞分化的影响,我们检测了 THP-1 细胞向巨噬细胞分化时趋化因子和炎症因子表达的变化。结果显示,在 MDA-MB-231 细胞的参与下,单纯佛波酯诱导的 THP-1 细胞向巨噬细胞分化过程中炎症因子的变化并不明显。但是,在奥氮平的参与下,佛波酯诱导 THP-1 向巨噬细胞分化时 IL-12 的表达增加;随着 MDA-MB-231 细胞的进一步参与,CCL2、CXCL10、IL-1 $\beta$ 、IL-10、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$ 、

TGF- $\beta$  表达水平均显著升高。这一结果进一步证明了奥氮平对肿瘤微环境下巨噬细胞分化存在重要意义。已有文献显示, CCL-2、IL-6、IL-12、IL-1 $\beta$  是 M1 型亚群表型<sup>[9]</sup>, 说明经奥氮平处理后的 THP-1 有向 M1 型分化增强, 向 M2 型分化减弱的可能。但 M2 型炎症因子 CXCL10、IL-10、TNF- $\alpha$  也有升高<sup>[10]</sup>, 这提示肿瘤相关巨噬细胞的极化是一个复杂的过程, 受多因素的调控。

miRNAs 作为一种单链 RNA, 可以调节许多病理生理过程, 如细胞增殖、代谢、凋亡等<sup>[11]</sup>。越来越多的证据表明, miRNA 可以调节巨噬细胞极化<sup>[12]</sup>。结合前面的研究, 肿瘤细胞的存在是奥氮平在巨噬细胞分化和极化中发挥作用的重要基础, 因而我们进一步检测了巨噬细胞极化相关 miRNA 分子表达的变化。结果显示, 在肿瘤细胞参与的情况下, 奥氮平对 miR155、miR34a 和 Let7c 都有一定的调节作用。Graff 等<sup>[13]</sup> 比较了极化的人单核细胞源性巨噬细胞和极化的人单核细胞 THP-1 细胞系中 miRNA 的表达, 结果发现 miR-155 在 M1 和 M2b 条件下均升高。研究表明, miR-9 通过靶向过氧化物酶体增殖体激活受体  $\delta$  增强 M1 极化<sup>[14]</sup>, miR-155 水平在巨噬细胞 M1 向 M2 极化时显著下降, 但在巨噬细胞 M2 向 M1 极化时升高<sup>[15]</sup>。但有研究得出不同的结论, 张艳青等<sup>[16]</sup> 发现 TGF- $\beta$ 1 下调 miR-155 的表达, 巨噬细胞会趋向 M2 型活化。另外, miRNA34a 抑制 TAMs 细胞极化过程, TAMs 细胞过表达 miRNA34a 后可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞的生长增殖过程<sup>[17]</sup>。

综上所述, 本研究证明奥氮平能够通过调节巨噬细胞表面分子、炎症因子和极化相关 miRNA 分子, 参与肿瘤微环境的调控。因此, 奥氮平具有肿瘤治疗的潜力及深入研究的价值。今后我们会进一步研究奥氮平调控乳腺癌肿瘤微环境的作用机制, 并结合临床病例进行深入研究, 探索奥氮平在抗肿瘤治疗中的新作用。

## 参考文献

[1] 陈茂山, 吕青.《基于人口登记数据 2000—2020 年全球乳腺癌发病和死亡率分析》要点解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2022, 29(4): 401-406.  
[2] 朱玉英, 贾勇圣, 佟仲生. 奥氮平治疗化疗所致恶心和呕吐的作用及临床研究进展[J]. 肿瘤, 2018, 38(1): 68-72.

[3] 朱永华. 奥氮平对肿瘤相关性抑郁与焦虑的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2018, 13(31): 114-115.  
[4] Irwin MR, Cole SW. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(9): 625-632.  
[5] Ngambenjwong C, Gustafson HH, Pun SH. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 114: 206-221.  
[6] 孟凡荣, 王秀艳, 陈琛, 等. 肿瘤相关巨噬细胞促进上皮性卵巢癌迁移和侵袭能力的机制研究[J]. 中南药学, 2020, 18(10): 1617-1621.  
[7] Tu DY, Dou J, Wang MK, et al. M2 macrophages contribute to cell proliferation and migration of breast cancer[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(4): 831-838.  
[8] Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A breakthrough: macrophage-directed cancer immunotherapy[J]. Cancer Res, 2016, 76(3): 513-516.  
[9] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440.  
[10] Wang H, Yung MMH, Ngan HYS, et al. The impact of the tumor microenvironment on macrophage polarization in cancer metastatic progression[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6560.  
[11] Deiluiis JA. MicroRNAs. As regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics[J]. Int J Obes (Lond), 2016, 40(1): 88-101.  
[12] Sprenkle NT, Serezani CH, Pua HH. MicroRNAs in macrophages: regulators of activation and function[J]. J Immunol, 2023, 210(4): 359-368.  
[13] Graff JW, Dickson AM, Clay G, et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes[J]. J Biol Chem, 2012, 287(26): 21816-21825.  
[14] Thulin P, Wei T, Werngren O, et al. MicroRNA-9 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in human monocytes during the inflammatory response[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1003-1010.  
[15] Cai X, Yin Y, Li NZ, et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155[J]. J Mol Cell Biol, 2012, 4(5): 341-343.12.  
[16] 张艳青, 马礼丹, 孙芮, 等. TGF- $\beta$ 1 通过调节 miR-155 表达影响胃癌相关巨噬细胞表型的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(11): 1217-1220.  
[17] 李昌伟, 张浩, 余壮明, 等. 过表达 miR-34a 的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生长增殖的影响[J]. 现代医学, 2019, 47(10): 1248-1250.

(收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2023-12-27)

## 负载 3-甲基腺嘌呤介孔二氧化硅的制备与释药性能研究

韩卓越<sup>1, 2</sup>, 王秀<sup>2</sup>, 巫业振<sup>2</sup>, 胡浩然<sup>1, 2</sup>, 邢亚群<sup>1\*</sup> (1. 蚌埠医学院第二附属医院药剂科, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院药学院, 安徽 蚌埠 233000)

**摘要:** 目的 制备唑来膦酸 (ZOL) 修饰的聚多巴胺 (PDA) 包覆介孔二氧化硅 (MSN) 纳米颗粒, 对其进行表征及释药性能研究。方法 将 ZOL 与氨基-聚乙二醇-巯基连接作为骨靶向配体, 通过加成反应修饰在 PDA 包覆的 MSN 表面, 得到药物载体 MSN@PDA-PEG-ZOL, 通过 <sup>1</sup>H-NMR、FT-IR、TEM、粒径及 Zeta 电位等方法对其进行表征。以自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 为药物模型, 设计不同药物浓度计算载药量及包封率, 筛选最佳处方, 并考察药物在不同环境下的释放量。结果 制备得到的纳米颗粒为分散均匀的球形结构; 粒径及 Zeta 电位分别为 (229.1±8.8) nm、-(30.3±0.6) mV; 载药浓度在 1000 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 其包封率为 (90.87±0.05)%, 载药量为 (37.55±0.02)%。纳米颗粒在 pH 7.4 的 PBS 溶液中 48 h 内的药物释放率为 (16.99±0.15)%, 在 pH 5.0 的 PBS 溶液中的释放率为 (65.11±1.64)%, 有利于药物在肿瘤微环境中的释放。结论 本文成功制备了负载 3-MA 且具有靶向性和 pH 响应性的纳米制剂, 其分散性好, 具有高载药量、高包封率等特点, 可为后续研究奠定基础。

**关键词:** 介孔二氧化硅; 3-甲基腺嘌呤; 骨靶向; pH 响应

中图分类号: R914.2, R94 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0347-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.012

### Preparation and release properties of 3-methyladenine mesoporous silica

HAN Zhuo-yue<sup>1, 2</sup>, WANG Xiu<sup>2</sup>, WU Ye-zhen<sup>2</sup>, HU Hao-ran<sup>1, 2</sup>, XING Ya-qun<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233000; 2. School of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233000)

**Abstract: Objective** To prepare polydopamine (PDA) coated mesoporous silica nanoparticles (MSN) nanoparticles modified with zoledronic acid (ZOL), and to determine their characterization and drug release properties. **Methods** ZOL was connected with amino-pegyl-sulfhydryl group as the bone targeting ligand and modified on PDA-coated MSN surface by addition reaction to obtain MSN@PDA-PEG-ZOL, which was characterized by <sup>1</sup>H-NMR, FT-IR, TEM, particle size and Zeta potential. Autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) was used as a drug model. Different drug concentrations were designed to calculate the drug loading and encapsulation rate, and screen the optimal prescription. The drug release of in different environments was determined. **Results** The prepared nanoparticles had uniform spherical structure. The particle size was (229.1±8.8) nm and the Zeta potential was -(30.3±0.6) mV. When the drug loading concentration was 1000 μg·mL<sup>-1</sup>, the encapsulation rate was (90.87±0.05)% and the drug loading was (37.55±0.02)%. The drug release rate of nanoparticles was (16.99±0.15)% in PBS solution (pH 7.4) and (65.11±1.64)% in PBS solution (pH 5.0) within 48 h, which was more conducive to drug release in tumor microenvironment. **Conclusion** Nanometer preparations loaded with 3-MA with targeting and pH response are successfully prepared, with good dispersion, high drug loading and encapsulation rate, etc., laying the foundation for further research.

**Key words:** mesoporous silica nanoparticle; 3-methyladenine; bone targeting; pH response

作者简介: 韩卓越, 女, 硕士, 主要从事药物制剂研究, email: 1065567536@qq.com \*通信作者: 邢亚群, 女, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学研究, email: 674771439@qq.com



自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性的细胞降解途径,是机体内存在的一种自我修复和维持生命的过程。自噬可以表现出多种功能形式,包括发挥促生存作用的细胞保护形式、促进肿瘤细胞死亡的细胞毒性形式和不具有保护作用的非保护形式<sup>[1]</sup>。3-甲基腺嘌呤(3-MA)是一种非特异性磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抑制剂,通常在体外用于抑制自噬<sup>[2]</sup>,可与抗肿瘤药物联合发挥协同作用。研究表明早期自噬抑制剂 3-MA 的使用可保护心肌细胞免受阿霉素诱导的心脏毒性<sup>[3]</sup>。3-MA 可增强顺铂耐药下咽鳞状癌细胞的化疗敏感性<sup>[4]</sup>,还可促进埃索美拉唑在胃癌细胞中的抗增殖活性<sup>[5]</sup>。广泛使用 3-MA 可通过自噬激活显著降低氯仿对小鼠的肝毒性<sup>[6]</sup>。此外,3-MA 抑制自噬能够在体外增强缺氧诱导的人结肠癌细胞凋亡<sup>[7]</sup>。有研究已证明 3-MA 在体外和体内均可抑制骨肉瘤的生长<sup>[8]</sup>。可见 3-MA 在自噬相关的疾病中发挥了重要作用,尽管用途广泛,但 3-MA 只有在高浓度时才有效,并且在室温下的溶解度很差<sup>[9]</sup>。因此,更有效、更特异性的递送自噬抑制剂对于开发基于抑制自噬协同抗肿瘤的辅助治疗方法至关重要。

在纳米技术领域已经报道了许多纳米载体,其中,介孔二氧化硅(MSN)纳米粒子是现阶段非常理想的新型药物载体,其具有独特的多孔结构,良好的化学稳定性、表面功能性和生物相容性,能确保多种药物分子的可控释放和药物靶向性传递<sup>[10-11]</sup>。在纳米载体基础上通过靶向修饰可以改善药物利用率,提高治疗效果,并减少全身毒性相关的不良反应。骨靶向药物唑来膦酸(ZOL)是双膦酸盐的成员之一,对骨组织表现出良好的亲和力,具有与焦磷酸盐类似的调节骨骼矿化的能力,且比焦磷酸盐更稳定,其主链存在两个膦基,可以与羟基磷灰石表面双齿结构中的二价钙离子进行螯合<sup>[12-13]</sup>。因此,ZOL 是治疗骨相关疾病靶向配体的最佳选择。本研究设计了一种将 ZOL 连接在聚多巴胺(PDA)包覆的 MSN 纳米粒上,并装载 3-MA,通过性质表征及药物在不同条件下的释放行为研究,初步评价其基本性能。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

仪器 ZNCL-GS 智能磁力搅拌器(上海予申仪器有限公司);5424R 离心机(艾本德生命科学公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-3600 紫外分光光谱仪(岛津公司);JEM-2100F 透射电子显微镜(日本电子公司);IS50 红外分光光谱仪(赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 试剂

3-MA(批号:C13979809)、ZOL(批号:C134-76263)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC,批号:C12197343)、正硅酸乙酯(TEOS,批号:C12561839)、三乙醇胺(TEA,批号:20210507)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,批号:P2136663)、无水乙醇(批号:2211073501)、盐酸多巴胺(批号:C12659279)、二甲基亚砜(DMSO,批号:P2087852)(上海麦克林)。*N,N*-羰基二咪唑(CDI,批号:K00220563)、NH<sub>2</sub>-PEG-SH(批号:K00220819)(西安凯新生物)。

## 2 方法与结果

### 2.1 纳米制剂的制备

**2.1.1 MSN 的制备** 按照文献<sup>[14]</sup>的方法,并进行相应优化,简要方法如下:取适量 CTAC 置量瓶中加入去离子水(20 mL)混合均匀,加入 TEA(0.06 g),在 95 °C 油浴,搅拌 1 h 后逐滴加入 TEOS(1.5 mL),滴加完毕后继续搅拌 1 h,冷却至室温,离心收集,沉淀醇洗 3 次。然后在酸性乙醇溶液中 60 °C 冷凝回流 4 h,去除致孔模板剂 CTAC,离心收集,乙醇洗涤两次。同样的提取工艺重复两次。离心后的沉淀冷冻干燥 24 h,最终得到白色粉末 MSN。

**2.1.2 PDA 的包覆** 参考文献<sup>[15]</sup>已有的方法:将 100 mg MSN 完全溶解在 50 mL Tris-HCl 缓冲液中(pH 8.5),加入 50 mg 盐酸多巴胺,室温有氧条件下搅拌(200 r·min<sup>-1</sup>)4~6 h 后,离心 10 min,沉淀用去离子水洗涤两次,最终产物冷冻干燥,记为 MSN@PDA。

### 2.1.3 MSN@PDA-PEG-ZOL 的制备

①活化 ZOL:将 ZOL(100 mg)与适量 TEA 溶解在 DMF 中,加入 CDI(90 mg,无水),密闭氮气保护,60 °C 油浴,搅拌反应 24 h。用旋转蒸发仪蒸发未反应完的 TEA。沉淀物用乙腈洗涤两次以去除多余的 CDI,旋转蒸发干燥,得到纯活性沉淀物 ZOL<sup>[16]</sup>。

②活化 ZOL 与 NH<sub>2</sub>-PEG-SH 连接:将纯活性沉淀物 ZOL(22.6 mg)溶解在适量 DMSO 和 TEA 中,将分子量为 2000 的 NH<sub>2</sub>-PEG-SH(质量浓度为 2 mg·mL<sup>-1</sup>)滴加到溶液中,在密闭的氮气下反应 12 h。反应混合物在蒸馏水中透析 48 h 以去除多余的活性 ZOL,得到 ZOL-PEG-SH<sup>[17]</sup>。

③ MSN@PDA-PEG-ZOL 的制备:将上述所得化合物溶解在 20 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中,加入 100 mg MSN@PDA,室温搅拌过夜。然后,将溶液在 4 °C 下以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,得到 MSN@PDA-PEG-ZOL,用去离子水洗涤三次后,冷冻干燥。

### 2.2 3-MA 的包封率(EE)及载药量(DL)的测定

**2.2.1 3-MA 标准曲线的建立** 称取 5 mg 3-MA 于 25 mL 量瓶中, 加去离子水配制  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液, 取标准溶液稀释成 1.56、3.125、6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列工作液, 使用紫外检测, 波长为 273 nm。以 3-MA 浓度 ( $C$ ) 设为横坐标, 吸光度 ( $A$ ) 为纵坐标, 建立标准曲线。结果表明 3-MA 在  $1 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积线性关系良好, 回归方程为  $A = 0.0841C + 0.0159$  ( $R^2 = 0.9995$ )。

**2.2.2 EE 和 DL 的测定** 取 3-MA 对照品溶解在去离子水中, 分别配制 50、100、200、500、1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液。取 20 mg MSN 分别放在 20 mL 的离心管中, 依次加入 10 mL 不同浓度的 3-MA 标准溶液, 水浴超声至 MSN 完全分散, 室温下搅拌 24 h 后, 离心收集上清液, 用去离子水洗涤沉淀两次。洗涤液与上清液的合并液用于载药量和包封率的测定<sup>[18]</sup>; 沉淀冷冻干燥后备用, 记为 MSN@3-MA。

取合并液适量, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 用去离子水稀释至适宜浓度, 测定其吸光度, 代入标准曲线方程计算 3-MA 浓度, EE 和 DL 分别按公式 (1)、(2) 计算。

$$EE (\%) = (W_3 - W_1) / W_3 \times 100\% \quad (1)$$

$$DL (\%) = (W_3 - W_1) / W_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中 3-MA 的含量记为  $W_1$  (g), MSN@3-MA 称重记为  $W_2$  (g), 初始 3-MA 投入量记为  $W_3$  (g)。

结果如图 1 和表 1 所示, 3-MA 在 273 nm 处存在特征峰, 而 MSN@3-MA 的 UV 曲线中存在 3-MA 的特征峰, 证明 3-MA 加载在纳米粒子中。不同 3-MA 浓度的 DL 和 EE 如表 1 所示, 在  $50 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内, DL 随浓度的增加而增加, 浓度在  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, EE 为  $(90.87 \pm 0.05)\%$ , DL 为  $(37.55 \pm 0.02)\%$ 。

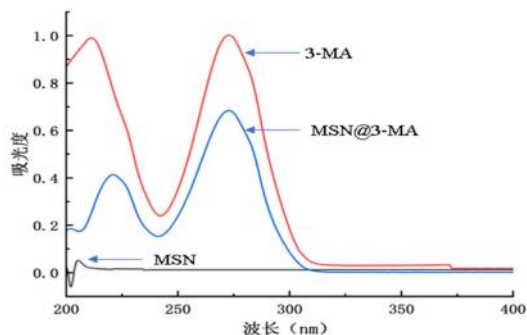


图 1 3-MA、MSN、MSN@3-MA 的 UV 图谱  
Fig 1 UV spectrum of 3-MA, MSN, and MSN@3-MA

### 2.3 MSN@PDA-PEG-ZOL 的表征分析

**2.3.1 核磁共振氢谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 分析** 取制得的产物适量, 在 DMSO 中检测, 检测条件为 500 MHz, 利用核磁共振氢谱仪对样品进行测定。结果如图 2 所示, ZOL 结构中相应氢的位置见图

表 1 不同浓度 3-MA 的 EE 及 DL

Tab 1 Encapsulation rate and drug loading amount of different mass ratios of 3-MA

3-MA 浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	EE/%	DL/%
50	$3.54 \pm 1.19$	$0.09 \pm 0.03$
100	$27.52 \pm 1.76$	$1.38 \pm 0.09$
200	$59.27 \pm 0.03$	$5.93 \pm 0.00$
500	$88.16 \pm 0.09$	$20.04 \pm 0.02$
1000	$90.87 \pm 0.05$	$37.55 \pm 0.02$

2A, 羟基活泼氢在谱图中未出峰, 图 2B 中 ZOL-PEG-SH 氢谱图出现与 ZOL 结构中相应氢的位置一致, 证实两药合成成功。

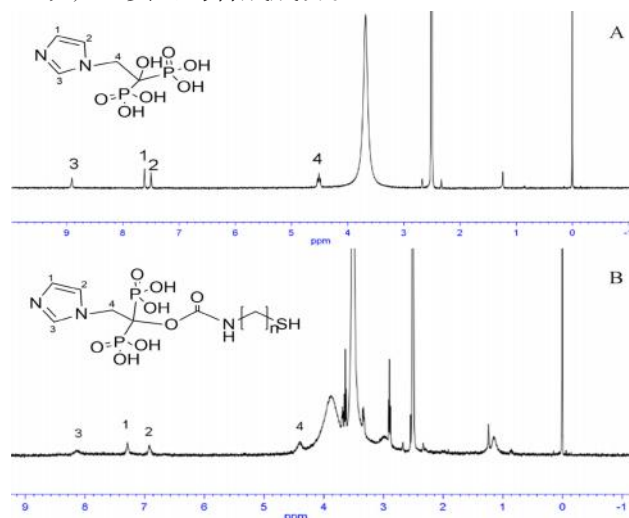


图 2 ZOL (A) 与 ZOL-PEG-SH (B) 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图  
Fig 2  $^1\text{H-NMR}$  of ZOL (A) and ZOL-PEG-SH (B)

**2.3.2 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)** ZOL 与  $\text{NH}_2$ -PEG-SH、ZOL-PEG-SH 的红外吸收光谱如图 3 所示。ZOL-PEG-SH 在  $3143 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1580 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1545 \text{ cm}^{-1}$ 、 $629 \text{ cm}^{-1}$  出现了与 ZOL 结构中咪唑环化学基团的吸收峰一致的峰。在  $1635 \text{ cm}^{-1}$  出现了吸收峰与酰胺 ( $\text{C}=\text{O}$ ) 的伸缩振动有关的吸收峰, 表明形成了新的酰胺键, 证实了两药成功合成。MSN 和 MSN@PDA、MSN@PDA-PEG-ZOL 的 FT-IR 光谱图如图 4 所示, 纳米粒子均在  $1054 \text{ cm}^{-1}$  和  $965 \text{ cm}^{-1}$  处出现吸收峰, 分别为 Si-O-Si 伸缩振动和硅醇基振动。包覆 PDA 后, 在  $1633 \text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于芳环骨架的伸缩振动,  $3385 \text{ cm}^{-1}$  处的宽吸收峰归属于 N-H/O-H 的伸缩振动, 证明 PDA 包覆在 MSN 表面。而 MSN@PDA-PEG-ZOL 在  $1457 \text{ cm}^{-1}$  和  $1349 \text{ cm}^{-1}$  处出现的峰表明目标配体 ZOL 存在于纳米粒子表面上。

**2.3.3 透射电子显微镜 (TEM) 分析** 取适量纳米粒子进行了 TEM 分析, 观察其纳米粒子形态、尺寸大小。从图 5A 中可以看到 MSN 表面清晰的介孔结构, 其形态为分散均匀的球体, 图 5B 中可以看到 PDA 包覆后 MSN 的表面覆盖了一层薄膜, 介孔结构被掩盖, 表明 PDA 成功包覆。



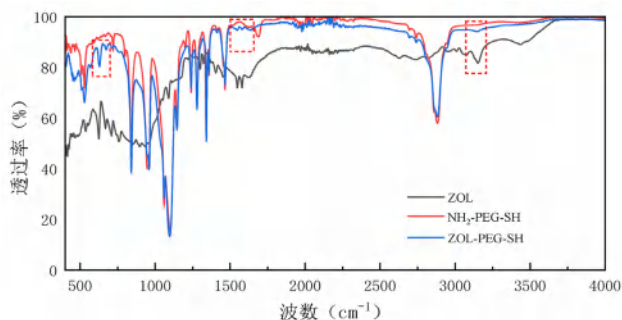


图 3 ZOL、NH<sub>2</sub>-PEG-SH 和 ZOL-PEG-SH 的 FT-IR 光谱图  
Fig 3 FT-IR spectra of ZOL, NH<sub>2</sub>-PEG-SH and ZOL-PEG-SH

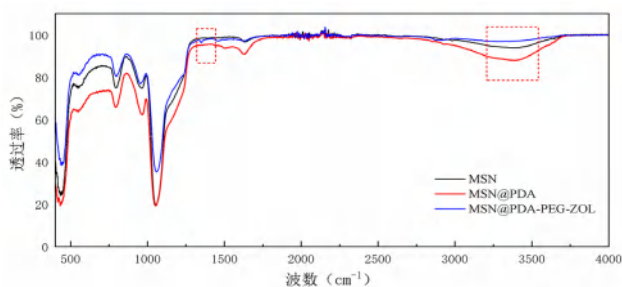


图 4 MSN、MSN@PDA 和 MSN@PDA-PEG-ZOL 的 FT-IR 光谱图  
Fig 4 FT-IR spectra of MSN, MSN@PDA and MSN@PDA-PEG-ZOL

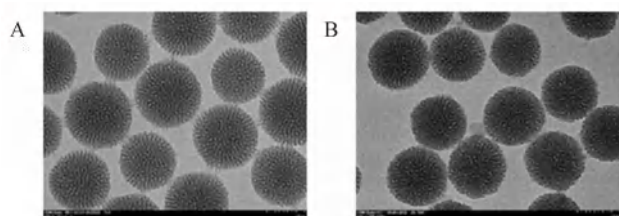


图 5 MSN (A) 和 MSN@PDA (B) 的 TEM 照片  
Fig 5 TEM diagram of MSN (A) and MSN@PDA (B)

**2.3.4 马尔文粒度电位仪分析纳米粒子的粒径及 Zeta 电位** 结果如图 6 所示, MSN 的粒径为 118 nm, 电位为  $-(24.2 \pm 0.4)$  mV, MSN@PDA 粒径为 148 nm, 电位为  $-(10.8 \pm 0.2)$  mV, MSN@PDA-PEG-ZOL 粒径为  $(229.1 \pm 8.8)$  nm, 电位为  $-(30.3 \pm 0.6)$  mV, 这是由于 ZOL 在溶液中呈负电性, 也说明 ZOL 成功修饰在纳米粒子表面, 纳米粒子的多分散性指数 (PDI) 在 0.21 ~ 0.42 (在可接受的大小范围内)。

**2.3.5 MSN@PDA-PEG-ZOL 在水及 PBS 中的稳定性** 连续 7 d 观察纳米粒子 MSN@PDA-PEG-ZOL 在 37 °C 的水中及 PBS 中的稳定性, 结果如图 7 所示, 结果表明在两种介质中 MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL 均能保持良好的粒径大小, 说明纳米颗粒在体内及体外环境下都较稳定。

**2.4 体外药物释放考察**

考察 MSN@3-MA-PDA 与 MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL 在不同 pH 缓冲液中的释药性。分别取三组样品适量, 每组平行三份, 每份 8 mg, 精密称定。于 2 mL PBS 中超声至完全溶解, 放入透析袋 (截断

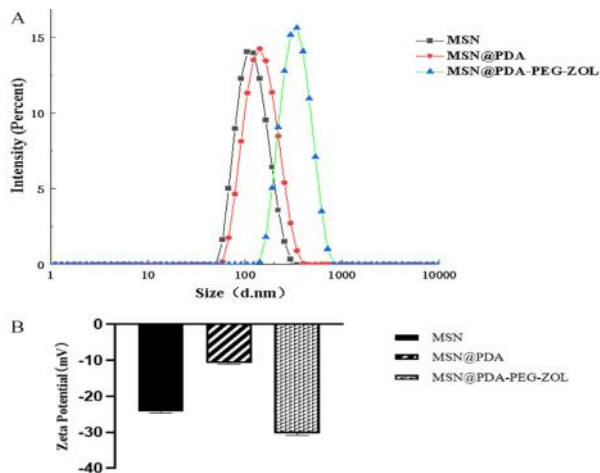


图 6 MSN 和 MSN@PDA、MSN@PDA-PEG-ZOL 的粒径 (A) 和电位 (B)  
Fig 6 Particle size (A) and potential (B) of MSN, MSN@PDA and MSN@PDA-PEG-ZOL

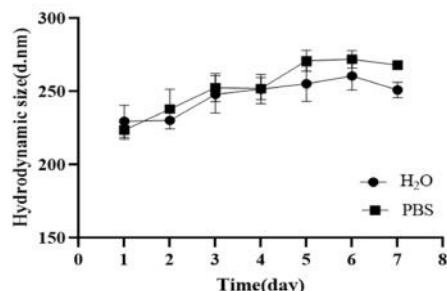


图 7 MSN@PDA-PEG-ZOL 在水及 PBS 中的粒径  
Fig 7 Particle size of MSN@PDA-PEG-ZOL in water and PBS

分子量 3500)。透析袋浸泡在 18 mL 的 PBS (pH 为 5.0、6.0、7.4) 中, 调整转速为  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 取样 1 mL, 同时迅速补加同等体积溶出介质。使用紫外分光光度法测定 3-MA 含量, 并使用公式 (3) 计算出不同时间累计释放率 (CRP)。

$$\text{CRP} (\%) = (V_c \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / m_{3-MA} \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $V_c$  为每次所取出的 PBS 溶液体积 (L);  $V_0$  为缓冲溶液总体积 (L);  $C_i$  为第  $i$  次取出溶液的 3-MA 浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $n$  为取液次数;  $m_{3-MA}$  为药物载体所负载的 3-MA 总质量 (mg)。

如图 8 所示, 图 8B 中 MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL 在 pH 7.4 的 PBS 溶液中释药缓慢, 平均释放率仅为  $(16.99 \pm 0.15)\%$ , 而在酸性条件下, 3-MA 的释放度增加, 在 pH 5.0 的 PBS 溶液中释放率达到  $(65.11 \pm 1.64)\%$ 。说明 MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL 有利于药物在肿瘤微环境中的释放。

**3 讨论**

本文使用模板剂法制备了 MSN, 将 PDA 包覆 MSN 纳米粒子后, 在其表面修饰 ZOL 与 NH<sub>2</sub>-PEG-



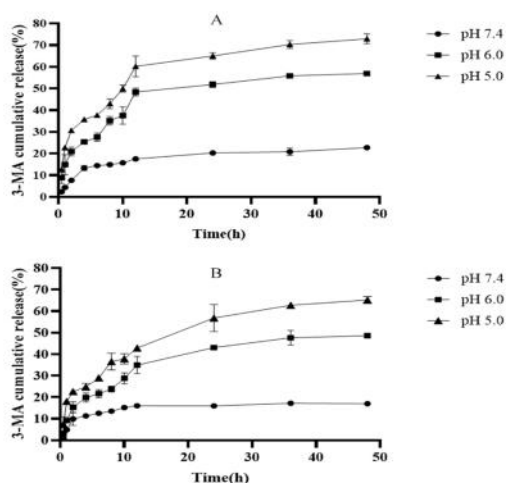


图 8 MSN@3-MA-PDA (A) 与 MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL (B) 在 pH 5.0、6.0、7.4 条件下的药物释放曲线

Fig 8 Release curves of MSN@3-MA-PDA (A) and MSN@3-MA-PDA-PEG-ZOL (B) in PBS (pH 5.0, 6.0, and 7.4)

SH 的连接物, 制得具有骨靶向性与 pH 响应性的载药纳米颗粒 MSN@PDA-PEG-ZOL。通过 <sup>1</sup>H-NMR、FT-IR 证实 ZOL 与 NH<sub>2</sub>-PEG-SH 连接成功。采用 TEM、FT-IR、动态光散射粒径分布仪 (DLS) 等表征手段对 MSN@PDA-PEG-ZOL 合成产物进行结构与性能分析。结果表明该纳米颗粒的粒径及 Zeta 电位分别为 (229.1±8.8) nm、-(30.3±0.6) mV; 通过浸渍离心法负载 3-MA, 结果表明, 这种多功能 MSN 纳米颗粒具有高包封率和高载药量, 并在体内外具有较好的稳定性。

MSN 表面包覆的 PDA 具有 pH 响应性, 在酸性条件下溶解释放药物, 而本试验的体外释药结果也初步证实了在肿瘤微环境中释药量明显高于在正常生理环境下的释药量, 这在生物医药领域具有潜在的应用价值。后续将继续深入研究该纳米颗粒在小鼠体内药效学及体内外靶向性, 进一步证实纳米颗粒对肿瘤的靶向性, 为后续骨相关疾病的治疗与自噬抑制剂的递送奠定研究基础。

### 参考文献

[1] Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 2014, 74 (3): 647-651.  
 [2] Seglen PO, Gordon PB. 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes [J]. *Autophagy*, 1982, 79 (6): 1889-1892.  
 [3] Sun XF, Meng H, Xiao J, et al. Pretreatment of 3-MA prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of autophagy initiation [J]. *Toxicology*, 2023, 490: 153512.  
 [4] Zhang J, Mao W, Liu YY, et al. 3-MA enhanced chemosensitivity in cisplatin resistant hypopharyngeal squamous carcinoma cells via inhibiting Beclin-1 mediated autophagy [J].

*Curr Pharm Des*, 2021, 27 (7): 996-1005.  
 [5] Du JF, Xu Q, Zhao H, et al. PI3K inhibitor 3-MA promotes the antiproliferative activity of esomeprazole in gastric cancer cells by downregulating EGFR via the PI3K/FOXO3a pathway [J]. *Biomedicine Pharm*, 2022, 148: 112665.  
 [6] Wang L, Li XK, Chen C. 3-methyladenine attenuates chloroform-induced hepatotoxicity via autophagy activation [J]. *Biomed Res*, 2018, 39 (2): 87-94.  
 [7] Dong Y, Wu Y, Zhao GL, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA promotes hypoxia-induced apoptosis in human colorectal cancer cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (3): 1047-1054.  
 [8] Yu W, Wang YT, Zhu J, et al. Autophagy inhibitor enhance ZnPc/BSA nanoparticle induced photodynamic therapy by suppressing PD-L1 expression in osteosarcoma immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2019, 192: 128-139.  
 [9] Wu YY, Wang X, Guo HJ, et al. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors [J]. *Autophagy*, 2013, 9 (4): 595-603.  
 [10] Bragagni M, Mennini N, Ghelardini C, et al. Development and characterization of niosomal formulations of doxorubicin aimed at brain targeting [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2012, 15 (1): 184-196.  
 [11] Puzyrev IS, Sobina EP, Adamova LV, et al. Template synthesis and water vapor adsorption by micro-and mesoporous silica gels with high specific surface area [J]. *Glass Physics Chemistry*, 2015, 41 (2): 187-193.  
 [12] Tong F, Ye YC, Chen B, et al. Bone-targeting prodrug mesoporous silica-based nanoreactor with reactive oxygen species burst for enhanced chemotherapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12 (31): 34630-34642.  
 [13] Lu KH, Lu EWH, Lin CW, et al. New insights into molecular and cellular mechanisms of zoledronate in human osteosarcoma [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 214: 107611.  
 [14] Cheng W, Nie JP, Xu L, et al. pH-sensitive delivery vehicle based on folic acid-conjugated polydopamine-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted cancer therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9 (22): 18462-18473.  
 [15] 张文静, 黄倩倩, 陈云娜, 等. 聚多巴胺包覆阿霉素 / 中空介孔硅纳米颗粒的制备及表征 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (3): 364-368.  
 [16] Alila S, Ferraria AM, Rego AMB, et al. Controlled surface modification of cellulose fibers by amino derivatives using *N,N'*-carbonyldiimidazole as activator [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77 (3): 553-562.  
 [17] Qiao H, Cui ZW, Yang SB, et al. Targeting osteocytes to attenuate early breast cancer bone metastasis by theranostic upconversion nanoparticles with responsive plumbagin release [J]. *ACS nano*, 2017, 11 (7): 7259-7273.  
 [18] Zhao WW, Wang H, Wang HM, et al. Light-responsive dual-functional biodegradable mesoporous silica nanoparticles with drug delivery and lubrication enhancement for the treatment of osteoarthritis [J]. *Nanoscale*, 2021, 13 (13): 6394-6399.

(收稿日期: 2023-09-04; 修回日期: 2023-10-26)

# 龙眼肉多糖对 $A\beta$ 诱导耐受的小胶质细胞吞噬功能的影响及其机制

赵晨阳<sup>1</sup>, 崔鹤蓉<sup>2</sup>, 岳德琼<sup>1</sup>, 张晗<sup>1</sup>, 李昶<sup>1</sup>, 李红艳<sup>1\*</sup> (1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**摘要:** **目的** 探究龙眼肉多糖 (LAPs) 对  $A\beta$  诱导耐受的小胶质细胞 (BV2) 吞噬功能的影响及其机制。 **方法** 采用  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  处理 (48 + 24) h 诱导细胞成为耐受模型, 使用 LAPs 0.8、1.6  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  进行干预。MTT 法检测细胞增殖, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位, 倒置荧光显微镜观察细胞吞噬功能及 mTOR 抑制剂 (Rapa) 和 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 (BAY) 对 LAPs 作用的影响, Western blot 检测 PI3K、Akt、p-Akt 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。 **结果** 经  $A\beta$  处理的 BV2 细胞增殖率和目的蛋白表达提高, 线粒体膜电位和细胞吞噬能力降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); LAPs 能逆转上述指标变化, 并且其提高吞噬功能的作用可被抑制剂阻断 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。 **结论** LAPs 能提高  $A\beta$  诱导耐受的 BV2 细胞吞噬功能, 作用途径可能与其促进耐受 BV2 细胞的增殖、提高其线粒体膜电位水平有关, 并涉及 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路的激活。

**关键词:** 龙眼肉多糖; BV2 细胞; 吞噬功能; PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0352-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.013

## Effect and mechanism of longan aril polysaccharides on phagocytosis of $A\beta$ -induced tolerant microglia

ZHAO Chen-yang<sup>1</sup>, CUI He-rong<sup>2</sup>, YUE De-qiong<sup>1</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup>, LI Chang<sup>1</sup>, LI Hong-yan<sup>1\*</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

**Abstract: Objective** To determine the effect and mechanism of longan aril polysaccharides (LAPs) on phagocytosis in  $A\beta$ -induced tolerant microglia (BV2). **Methods** Cells were treated with  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of  $A\beta$  for (48 h + 24 h) to establish an tolerant model, while the LAPs group was intervened by 0.8 and 1.6  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  LAPs. MTT method was used to detect the cell proliferation level. JC-1 kit was used to detect mitochondrial membrane potential. Inverted fluorescence microscope was used to observe the phagocytosis function of the cells and the effect of mTOR inhibitor (Rapa) and HIF-1 $\alpha$  inhibitor (BAY) on the action of LAPs. Western blot was used to detect the protein expression of PI3K, Akt, p-Akt and HIF-1 $\alpha$ . **Results** The proliferation rate and target protein expression of BV2 cells treated with  $A\beta$  were increased, and the mitochondrial membrane potential and cytophagocytosis were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). LAPs reversed these indexes, and inhibitors blocked their roles in improving the phagocytic function ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** LAPs can improve the phagocytosis of  $A\beta$ -induced tolerant BV2 cells, and the pathway of action may be related to the enhancement of the proliferation capacity and the level of mitochondrial membrane potential of tolerant BV2 cells, and may involve the activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  signalling pathway.

**Key words:** longan aril polysaccharide; BV2 cell; phagocytosis; PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$

**基金项目:** 辽宁省科学技术计划项目 (No.2022-MS-281); 辽宁省教育厅 2022 年度高校基本科研项目 (No.LJKZZ20220105); 辽宁中医药大学自然科学类项目 (No.2021LZY042)。

**作者简介:** 赵晨阳, 男, 硕士, 主要从事中药药理学研究, email: zhaochenyang0507@163.com \*通信作者: 李红艳, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药神经药理学研究方向, email: lhywaiw@163.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性发展的神经退行性疾病,  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 过度累积和清除不足是 AD 发生发展的始动因素<sup>[1]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统的固有免疫细胞<sup>[2]</sup>, 能够感知识别  $A\beta$  并将其吞噬在自身溶酶体中从而限制它们在大脑中扩散<sup>[3]</sup>, 有效抑制 AD 的自然病程, 该过程依赖于 mTOR/HIF-1 $\alpha$  途径<sup>[2]</sup>, 并伴有 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活<sup>[4]</sup>。但长期暴露于  $A\beta$  环境中, 小胶质细胞会出现能量代谢障碍并逐渐减少免疫应答而发展为慢性耐受<sup>[2]</sup>, 导致  $A\beta$  大量沉积, 造成大量神经元死亡和神经炎症反应, 最终导致 AD 发生<sup>[5]</sup>。

龙眼肉系无患子科植物龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 的假种皮, 龙眼肉多糖 (longan aril polysaccharides, LAPs) 是其主要有效成分之一。现代研究表明, LAPs 能抑制脂多糖 (LPS) 诱导的炎症介质产生和相关基因表达<sup>[6]</sup>, 促进巨噬细胞的吞噬功能和炎症因子释放水平<sup>[7-9]</sup>。本研究基于文献报道和前期研究结果, 体外建立  $A\beta$  诱导耐受的小胶质细胞 (BV2) 模型, 探讨 LAPs 对  $A\beta$  耐受 BV2 细胞吞噬能力的影响, 并结合课题组前期研究结果<sup>[10]</sup> 及小胶质细胞免疫应答反应与 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路的相关性<sup>[2, 4]</sup>, 通过 Western blot 技术和荧光  $A\beta$  吞噬实验等分析 LAPs 改善 BV2 细胞吞噬功能的作用机制, 为深入探究 LAPs 的抗 AD 作用奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 细胞及培养

小鼠小胶质细胞 BV2 (协和细胞库), 使用含 10% 胎牛血清与 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.2 试剂

龙眼肉 (货号: 2206001, 河北润滑药业);  $A\beta_{1-42}$  (批号: P210727-GB20601, 上海捷妮泰生物科技); Alexa Fluor 488 荧光标记  $A\beta_{1-42}$  (批号: 2156636, Anaspec); DMEM 高糖培养基 (批号: 8121526)、胰蛋白酶 (批号: 2277231)(Gibco); 胎牛血清 (批号: 18070505, 四季青); 双抗 (批号: J200044, Hyclone); 抗 GAPDH 抗体 (批号: 3561122204)、抗 AKT 抗体 (批号: 55500009442)、抗 P-AKT (S<sub>473</sub>) 抗体 (批号: 5500011663)、抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 (批号: 5500016723)、抗 PI3K 抗体 (批号: 3560538002)、HRP 山羊抗兔 IgG (H + L) (批号: 9300014001)(ABclonal); 线粒体膜电位 JC-1 检测试剂盒 (批号: 20210712)、雷帕霉素 (批号:

427W021)、BAY87-2243 (批号: 709B021)(索莱宝)。

### 1.3 仪器

万分之一电子分析天平 (Ohaus); 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); 调温电热套 (北京市永光明医疗仪器有限公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (Nuaire); 酶标仪 (Mindray); 荧光倒置显微镜 (Nikon); 电泳仪、半干式蛋白转膜仪 (Bio-Rad); 全自动化学发光/凝胶成像分析系统 (Tanon)。

## 2 方法与结果

### 2.1 龙眼肉多糖的制备

称取 200 g 去核龙眼肉, 剪碎, 置于 10 L 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量纯水浸泡 2 h 后, 于加热套中加热提取, 220 V 加热至沸腾后, 转至 50 V 保持微沸 1 h, 冷却后四层纱布过滤, 收集滤液, 同法煎煮 3 次, 合并滤液, 70 °C 蒸发浓缩至 200 mL 得龙眼肉水煎液, 采用“慢加快搅”的方式向其中加入 95% 乙醇至乙醇终浓度为 80% 以上, 充分搅拌后, 静置 12 h 以上, 5000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集沉淀, 60 °C 干燥至恒重即得 LAPs。根据公式: LAPs 收率 (%) = LAPs 称重质量 (g) / 龙眼肉质量 (200 g) × 100%, 计算得 LAPs 收率约为 25.51%; 依据文献<sup>[11]</sup>, 采用苯酚-硫酸法测得其多糖含量为 (56.25 ± 1.25) %。

### 2.2 $A\beta$ 耐受 BV2 细胞模型的建立

模型建立方法参考文献<sup>[2]</sup> 并进行适当修改。取对数生长期的 BV2 细胞, 无菌接种于 96 孔细胞培养板, 常规培养 12 h 后, 随机分为对照组及  $A\beta$  2、4、8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组。除对照组外, 各组分别采用 2、4、8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  处理细胞 48 h, 对照组加入终体积相同的培养基。48 h 后各组更换新鲜培养基常规培养 24 h, 再加入 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  诱导细胞激活, 依据 MTT 法进行细胞增殖实验, 确定诱导 BV2 细胞耐受的  $A\beta$  最佳浓度, 建立 BV2 细胞耐受模型。结果表明, 随着  $A\beta$  浓度增加, 细胞增殖率逐渐降低, 8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  已出现明显细胞毒性 (见图 1A,  $P < 0.05$ )。故选用 2 和 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  进行进一步实验, 即在  $A\beta$  处理细胞 48 h + 24 h 后, 加入 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  再次处理细胞, 观察细胞增殖情况, 结果表明, 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  组再次加入  $A\beta$  时 ( $A\beta$  2 + 2 组), 细胞较 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  组进一步增殖 (见图 1B,  $P < 0.05$ ), 提示细胞尚未耐受; 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  组再次加入  $A\beta$  时 ( $A\beta$  4 + 2 组) 细胞增殖较 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta$  组显著降低 (见图 1C,  $P < 0.01$ ), 表明再次经  $A\beta$  处理时细胞并未继续活化增殖,



且因  $A\beta$  的再次加入而出现增殖率下降, 提示在  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  处理细胞 48 h + 24 h 后, BV2

细胞已达到耐受状态, 以此条件建立  $A\beta$  耐受的 BV2 细胞模型, 作为模型组。

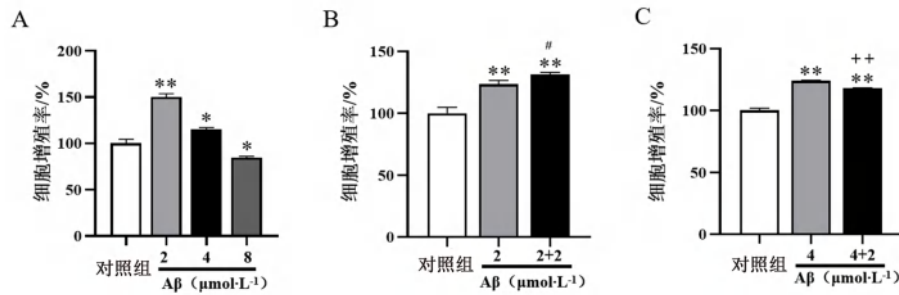


图1 MTT法筛选  $A\beta$  耐受 BV2 细胞模型的造模条件

Fig 1 Modeling conditions of immune-tolerant BV2 cell models by MTT method

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与  $A\beta 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较, # $P < 0.05$ ; 与  $A\beta 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较, ++ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  group, # $P < 0.05$ ; compared with the  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  group, ++ $P < 0.01$ .

### 2.3 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的 BV2 细胞, 接种于 96 孔细胞培养板, 12 h 后随机分为对照组、模型组和 LAPs 组 ( $0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。除对照组外, 其余各组均加入终浓度  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  培养 48 h 后常规培养 24 h 建立细胞耐受模型。除对照组外, 各组每孔加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  处理 24 h 诱导细胞激活, LAPs 组在加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  前分别加入终浓度  $0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LAPs 预处理细胞 2 h, MTT 法检测细胞增殖水平, 选取细胞增殖率较高的浓度作为 LAPs 最佳给药浓度。结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞增殖率显著提高 ( $P < 0.05$ ) (见图 2)。与模型组比较, 当 LAPs 质量浓度为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 细胞增殖率显著降低 ( $P < 0.01$ ); LAPs 浓度为  $0.2, 0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 细胞增殖差异无统计学意义; LAPs 质量浓度为  $0.8, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 细胞增殖率显著提高 ( $P < 0.05$ )。结果提示, LAPs 可能因使用剂量不同, 对 BV2 细胞活化有着双向调节作用, 低浓度 ( $0.2, 0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 可能具有抑制 BV2 细胞激活的作用, 高浓度 ( $0.8, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 则能促进  $A\beta$  诱导耐受的 BV2 细胞增殖。

### 2.4 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位

取对数生长期的 BV2 细胞以  $1 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 6 孔细胞培养板中, 随机分为对照组, 模型组, LAPs  $0.8, 1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组。除对照组外, 其余各组均加入终浓度  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta$  培养 48 h 后常规培养 24 h 建立细胞耐受模型; 各组每孔均加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{1-42}$  再次处理细胞 24 h, 对照

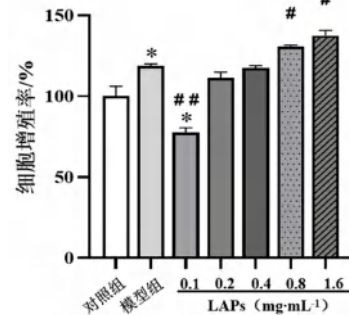


图2 MTT 检测不同浓度 LAPs 对  $A\beta$  诱导耐受的 BV2 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of LAPs on the proliferation of  $A\beta$ -induced tolerant BV2 cells by MTT method

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

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

组加入等体积培养基。按照试剂盒说明书, 每孔加入 1 mL JC-1 染色工作液, 置于细胞培养箱中  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min。孵育结束后弃去上清液, 使用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后于倒置荧光显微镜下观察, Image J 软件分析各组细胞红、绿色荧光强度, 计算红/绿荧光强度比, 比较各组细胞线粒体膜电位变化。由图 3 可见, 与对照组比较, 模型组细胞红/绿荧光比值显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, LAPs 组细胞红/绿荧光比值提高 ( $P < 0.01$ )。结果提示, 模型组细胞线粒体受损, 膜电位下降或丧失; LAPs 能提高  $A\beta$  诱导耐受的 BV2 细胞线粒体膜电位水平。

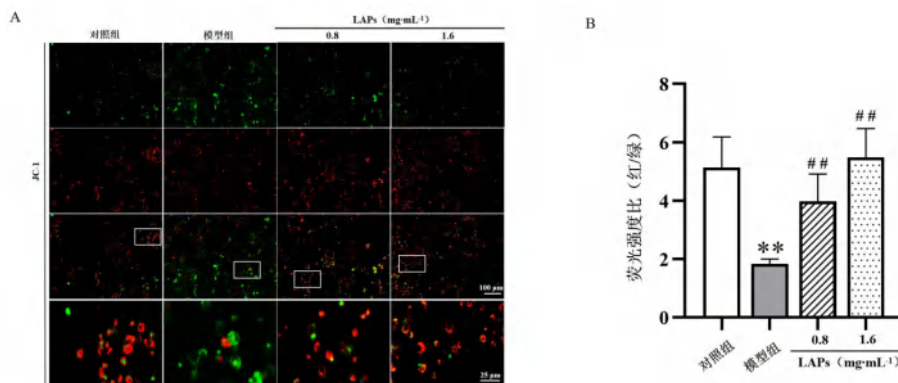


图 3 LAPs 对 BV2 细胞线粒体膜电位的影响

Fig 3 Effect of LAPs on mitochondrial membrane potential in BV2 cells

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

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

### 2.5 荧光显微镜检测细胞吞噬功能

取对数生长期的 BV2 细胞，接种于 96 孔细胞培养板，细胞分组及处理同“2.4”项下。在 LAPs 预处理细胞 2 h 后，除对照组外，其余各组均加入终浓度  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{A}\beta$  培养 48 h 后常规培养 24 h 建立细胞耐受模型；各孔细胞均加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光标记  $\text{A}\beta_{1-42}$  再次处理 24 h，对照组加入等体积培养基。24 h 后弃去各孔培养基，用 PBS 小心润洗后，于倒置荧光显微镜下观察，Image J 软件分析荧光强度，计算细胞荧光吞噬率。细胞荧光吞噬率 (%) = 实验组荧光强度 / 对照组荧光强度  $\times 100\%$ 。结果表明，与对照组比较，模型组细胞荧光吞噬率显著降低 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，LAPs 组细胞荧光吞噬率显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，其中 LAPs  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组荧光吞噬率尚未达到正常细胞水平 ( $P < 0.05$ )，LAPs  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  组细胞荧光吞噬率显著高于对照组细胞 ( $P < 0.05$ ) (见图 4A、B)。

### 2.6 Western blot 技术检测 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$ 信号通路相关蛋白表达

取对数生长期的 BV2 细胞以  $5 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于细胞培养瓶中，细胞分组及处理同“2.4”项下。收集各组 BV2 细胞，用预冷 PBS 洗涤 3 次，根据说明书按比例加入裂解液，冰上裂解，吸取上清液进行 BCA 蛋白含量检测。取等量蛋白，经 SDS-PAGE 凝胶电泳后，电转至 NC 膜上，使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，洗涤；加入一抗 (抗 PI3K、Akt、p-Akt、HIF-1 $\alpha$  以及 GAPDH 抗体，1 : 500)，4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，洗涤；加入二抗 (HRP 标记山羊抗兔抗体，1 : 3000)，室温孵育 2 h，洗涤；采用 ECL 化学发光，用 Image J 软件分析条带灰度值。由图 5 可见，与对照组比较，模型组除 PI3K 蛋白

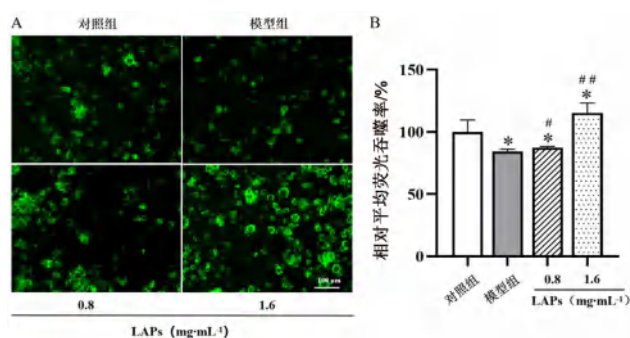


图 4 LAPs 对 BV2 细胞吞噬荧光  $\text{A}\beta$  的影响

Fig 4 Effect of LAPs on the phagocytosis of fluorescent  $\text{A}\beta$  in BV2 cells

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

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

表达减少外，Akt、p-Akt 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达均增加 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，LAPs ( $0.8$ 、 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组的 PI3K、Akt、p-Akt 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达水平均提高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.7 抑制剂 BAY、Rapa 对 LAPs 给药后的 BV2 细胞吞噬功能的影响

取对数生长期的 BV2 细胞，接种于 96 孔细胞培养板，12 h 后随机分为对照组、模型组、LAPs 组 ( $0.8$ 、 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和抑制剂组 (LAPs + BAY、LAPs + Rapa)，抑制剂组在 LAPs 给药前根据文献<sup>[2]</sup>分别加入 HIF-1 $\alpha$  抑制剂 BAY87-2243 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 mTOR 抑制剂 Rapa ( $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。除对照组外，其余各组均加入终浓度  $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{A}\beta$  培养 48 h 后常规培养 24 h 建立细胞耐受模型；各孔细胞均加入  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  荧光标记  $\text{A}\beta_{1-42}$  再次处理 24 h，对照组加入等体积培养基。24 h 后弃去各孔培养基，用 PBS

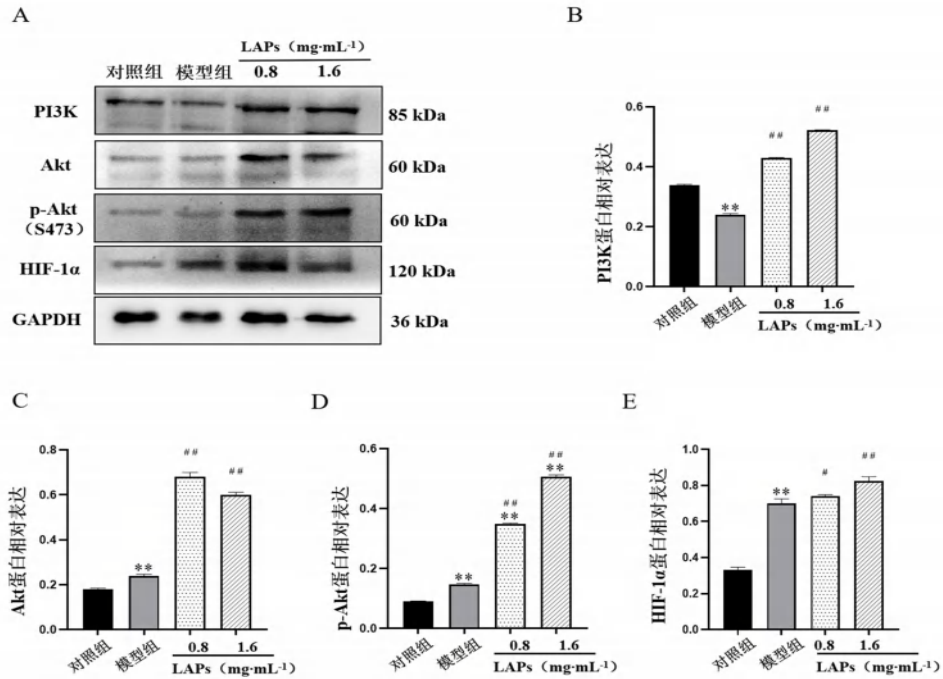


图 5 LAPs 对 BV2 细胞 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of LAPs on the expression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway proteins in BV2 cells

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

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

小心润洗后，于倒置荧光显微镜下观察，Image J 软件分析荧光强度。由图 6 可见，与对照组比较，模型组细胞胞内绿色荧光减少 ( $P < 0.01$ )；与模型组比

较，LAPs 组细胞胞内绿色荧光增多 ( $P < 0.01$ )；与 LAPs 组比较，BAY 及 Rapa 组细胞胞内绿色荧光均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

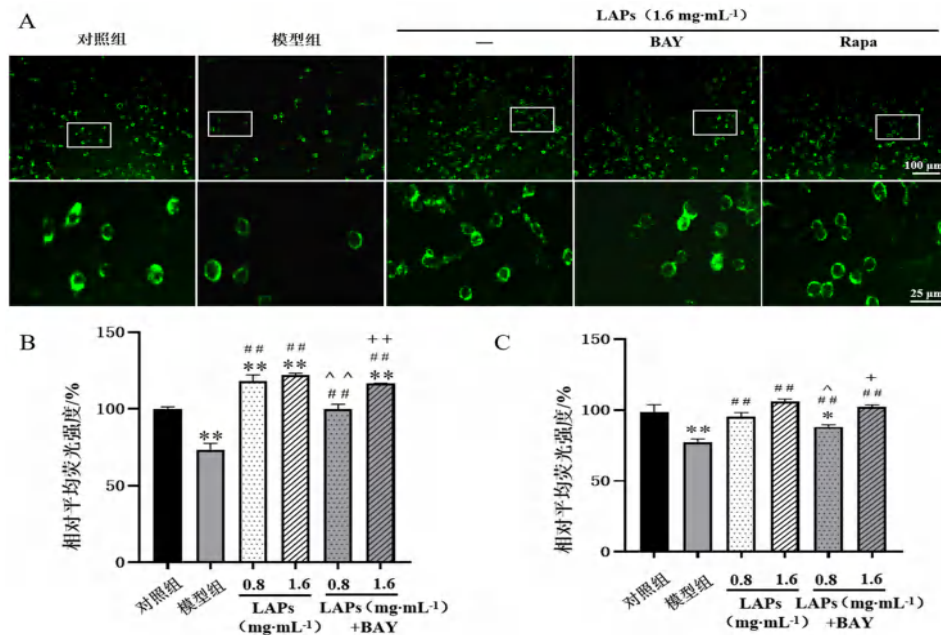


图 6 BAY 和 Rapa 对 LAPs 给药的 BV2 细胞吞噬荧光  $A\beta$  的影响

Fig 6 Effect of BAY and Rapa on the phagocytosis of fluorescent  $A\beta$  in BV2 cells administered with LAPs

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ ；与 LAPs 0.8  $mg \cdot mL^{-1}$  组比较，^ $P < 0.05$ ，^^ $P < 0.01$ ；与 LAPs 1.6  $mg \cdot mL^{-1}$  组比较，+ $P < 0.05$ ，++ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；compared with the model group, ### $P < 0.01$ ；compared with LAPs 0.8  $mg \cdot mL^{-1}$  group, ^ $P < 0.05$ ，^^ $P < 0.01$ ；compared with LAPs 1.6  $mg \cdot mL^{-1}$  group, + $P < 0.05$ ，++ $P < 0.01$ 。



## 2.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析, 实验数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 组间比较采用单因素方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 讨论

近年来研究表明,  $A\beta$  沉积可诱导小胶质细胞的增殖, 使其从静止态转变为活化态, 最终促使活化的小胶质细胞吞噬  $A\beta$  能力增强<sup>[12]</sup>。活化的小胶质细胞聚集在  $A\beta$  周围, 不断吞噬  $A\beta$  斑块以延缓 AD 的发生发展<sup>[13-14]</sup>。但因  $A\beta$  具有线粒体毒性, 长期的  $A\beta$  环境使小胶质细胞线粒体严重受损<sup>[2, 15]</sup>, 细胞能量代谢障碍, 而出现免疫耐受, 对  $A\beta$  的吞噬能力下降<sup>[16]</sup>。本文以  $A\beta$  慢性处理诱导 BV2 细胞耐受, 结果表明, 耐受的 BV2 细胞虽然仍表现出一定水平的增殖, 但其吞噬能力和线粒体膜电位均下降, 再次加入  $A\beta$  后细胞增殖率明显降低, 提示耐受的 BV2 细胞功能受损或已发生早期凋亡。经 LAPs 干预后, 耐受的 BV2 细胞增殖能力、线粒体膜电位水平及吞噬功能均提高, 提示 LAPs 能够逆转  $A\beta$  诱导的 BV2 细胞耐受, 在一定程度上恢复 BV2 细胞的吞噬功能。因免疫耐受的小胶质细胞存在 PI3K/Akt/mTOR 及 mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路抑制<sup>[2, 4]</sup>, 本研究通过 Western blot 技术检测 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路关键蛋白的表达情况, 并观察抑制剂 BAY 和 Rapa 对 LAPs 提高 BV2 吞噬功能的阻断作用。结果表明, LAPs 能显著提高信号通路关键蛋白的表达, Rapa 和 BAY 显著降低了 LAPs 的作用, 提示激活 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路是 LAPs 影响 BV2 细胞吞噬功能的可能作用机制, 但 Rapa 和 BAY 的加入均未能完全阻断 LAPs 的作用, 因此课题组认为 LAPs 可能存在多个作用靶点, 或存在多种作用途径。

本研究为基于调控小胶质细胞免疫应答反应探讨 LAPs 抗 AD 的作用机制提供了依据, 后续将基于体外实验开展 LAPs 抑制 AD 进程的体内作用与机制研究, 以全面阐释 LAPs 的抗 AD 作用。

## 参考文献

- [1] 马佳呈, 李炜, 张丹参. 老年痴呆症的发病机制研究 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33 (6): 469-470.
- [2] Baik SH, Kang S, Lee W, et al. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Cell Metab, 2019, 30 (3): 493-507.

- [3] Huang YT, Happonen KE, Burrola PG, et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid  $\beta$  plaques [J]. Nat Immunol, 2021, 22 (5): 586-594.
- [4] 林嘉楠, 阚默, 刘晓冉, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路人参皂苷 CK 抑制  $A\beta$  诱导小胶质细胞活化和炎症反应的作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (8): 4652-4657.
- [5] Leng FD, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. Nat Rev Neurol, 2021, 17 (3): 157-172.
- [6] Bai YJ, Jia XC, Huang F, et al. Structural elucidation, anti-inflammatory activity and intestinal barrier protection of longan pulp polysaccharide LPIIa [J]. Carbohydr Polym, 2020, 246: 116532.
- [7] Rong Y, Yang RL, Yang YZ, et al. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity [J]. Carbohydr Polym, 2019, 213: 247-256.
- [8] 冯潮, 温亚州, 杨宇哲, 等. 新鲜和干制龙眼果肉多糖免疫调节活性的分析 [J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40 (6): 52-59.
- [9] Lan HB, Cheng YX, Mu JJ, et al. Glucose-rich polysaccharide from dried 'Shixia' longan activates macrophages through  $Ca^{2+}$  and  $CR^{3-}$  mediated MAPKs and PI3K-AKT pathways [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 167 (15): 845-853.
- [10] Li HY, Lei TR, Zhang JH, et al. Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Aril ameliorates cognitive impairment in AD mice induced by combination of D-gal/AIC13 and an irregular diet via RAS/MEK/ERK signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113612.
- [11] 楼丽, 晏堂, 张苏霞, 等. 天冬多糖的提取方法研究 [J]. 药学研究, 2023, 42 (4): 232-237.
- [12] 马怡然, 郭大文, 孙伟, 等. 小胶质细胞的活化对其  $A\beta$  吞噬能力的影响 [J]. 解剖科学进展, 2010, 16 (1): 39-41, 44.
- [13] Prinz M, Priller J, Sisodia SS, et al. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration [J]. Nat Neurosci, 2011, 14 (10): 1227-1235.
- [14] Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, et al. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease [J]. Am J Pathol, 2011, 179 (3): 1373-1384.
- [15] Bennett JP. Medical hypothesis: neurodegenerative diseases arise from oxidative damage to electron tunneling proteins in mitochondria [J]. Med Hypotheses, 2019, 127: 1-4.
- [16] Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-mediated synapse loss in Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2018, 38 (12): 2911-2919.

(收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2023-07-08)

# UPLC-Q-TOF-MS/MS 法快速鉴定加味八珍益母膏化学成分

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

**摘要:** **目的** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析加味八珍益母膏的化学成分, 为加味八珍益母膏的质量控制奠定基础。**方法** 采用 Agilent Poroshell SB-C18 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 正离子模式下流动相系统为 0.2% 甲酸溶液 (A) - 甲醇 (B), 负离子模式下流动相系统为水 (A) - 甲醇 (B) 进行梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 分别采用正、负离子模式扫描, 结合文献检索和对照品比对分析加味八珍益母膏中的化学成分。**结果** 共鉴别出 140 个化合物, 包括有机酸及其衍生物 48 个, 黄酮类成分 32 个, 生物碱类成分 4 个, 糖及糖苷类成分 10 个, 萜类成分 19 个, 其他类成分 27 个。**结论** 确定了加味八珍益母膏所含有的主要化学成分, 可为后续加味八珍益母膏的质量控制研究奠定基础。

**关键词:** 加味八珍益母膏; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 化学成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0358-10  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.014

## UPLC-Q-TOF-MS/MS for rapid identification of chemical components in Jiawei Bazhen Yimu ointment

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

**Abstract: Objective** To analyze the chemical compositions in Jiawei Bazhen Yimu ointment by UPLC-Q-TOF-MS/MS to control the quality of Jiawei Bazhen Yimu ointment. **Methods** An Agilent Poroshell SB-C18 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) chromatographic column was used with mobile phase of 0.2% formic acid solution (A)-methanol (B) under positive ion mode and water (A)-methanol (B) under negative ion mode. The flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was 30 °C. Mass spectrometric data were obtained under electrospray ionization (ESI) in both positive and negative ion modes. Combined with literature retrieval and comparison of reference substances, the chemical components in Jiawei Bazhen Yimu ointment were analyzed. **Results** Totally 140 compounds were identified, including 48 organic acid and their derivatives, 32 flavonoids ingredients, 4 alkaloids components, 10 sugar and glycosidic ingredients, 19 terpenoids, and 27 other ingredients. **Conclusion** The main chemical components in Jiawei Bazhen Yimu ointment are identified, laying the foundation for its quality control.

**Key words:** Jiawei Bazhen Yimu ointment; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical composition

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目 (No. 2023-BS-138)。

作者简介: 王英力, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: 173741686@qq.com \*通信作者: 王帅, 女, 博士, 高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: christina8673028@126.com; 包永睿, 男, 博士, 正高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: byr1026@163.com

加味八珍益母膏来自满药“加味八珍益母汤”，由满族的益母草膏和清宫秘方八珍汤再结合桃仁、丹参、红花等几味活血药组成<sup>[1]</sup>。具有补气养血、祛瘀调经的功效，能够较好地改善患者盆腔循环功能，调节卵巢功能，增加子宫内膜厚度，且无肝肾毒性<sup>[2-3]</sup>，临床上常被用于治疗宫寒、痛经等疾病<sup>[4]</sup>。目前关于加味八珍益母研究的相关文献多为临床治疗、症候分型等方面，关于化学成分分析及质量控制的文献较少，且《中国药典》中相关质量控制为采用高效液相色谱法测定其中 1 个成分。加味八珍益母膏由 15 味药材加工而成，仅对其中的 1~2 个成分进行含量测定的质量控制具有一定片面性，所以本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对加味八珍益母膏的化学成分进行快速识别，拟结合后续药效实验及质量控制方法学验证实验，确定加味八珍益母膏潜在的质量标志物，以期对加味八珍益母膏更加全面的质量控制研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1290 UPLC-6500 Q-TOF 色谱-质谱联用仪（配置 MassHunter 质谱工作站和 Mass analysis 质谱数据处理系统）；T-124/85S 型电子天平（美国康州 HZ 电子科技有限公司）。

### 1.2 试药

盐酸益母草碱（批号：111823-201202）、盐酸水苏碱（批号：110754-201111）、人参皂苷 Re（批号：110754-200320）、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>（批号：110703-201530）、金丝桃苷（批号：111521-201507）、阿魏酸（批号：1107773-201915）（中国食品药品检定研究院）；异甘草苷（批号：wkq21021906）、芹菜素（批号：wkq18010301）、洋川芎内酯 H（批号：wkq21012907）、咖啡酸（批号：WP22101809）、肉豆蔻酸（批号：wkq19040812）、L-苯丙氨酸（批号：wkq18070501）、丹参素（批号：WP22120203）、毛蕊花糖苷（批号：WP22101809）、美迪紫檀素（批号：wkq20070203）、绿原酸（批号：wkq23022707）（成都维克奇生物科技有限公司）；芍药苷（批号：151120，成都普菲德生物技术有限公司）。所有对照品纯度均>98%。

加味八珍益母膏（批号：20220904，丹东药业集团有限公司，规格：150 mL/瓶）；LC-MS 级甲醇、LC-MS 级乙腈（德国 Darmstadt 公司）；LC-MS 级甲酸（美国 Fisher 公司）；娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Agilent Poroshell SB-C18（100 mm×4.6 mm，2.7 μm）色谱柱，正离子模式：流动相 0.2% 甲酸水（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~30 min，5%~100%B；30~35 min，100%B），流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>，柱温 30℃，进样量 0.5 μL。负离子模式下流动相为纯水（A）-甲醇（B），其他条件同正离子模式。

### 2.2 质谱条件

离子源：电喷雾电离离子源，干燥气体温度：250℃，干燥气体流速：11 mL·min<sup>-1</sup>，雾化器：45 psi，鞘气温度：350℃，鞘气流量：11 mL·min<sup>-1</sup>，碎裂电压：125 V，正、负离子模式下的毛细管电压分别为 4000 V、3500 V，喷嘴电压：500 V，质量范围 50~1200 m/z，采样频率为 1 spetra/s。二级质谱碰撞电压为 20 eV 和 40 eV。

### 2.3 供试品溶液的制备

量取加味八珍益母膏 10 mL，置 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 40 mL 50% 甲醇，称定质量，超声 30 min（功率 200 W，频率 40 kHz），放冷后称重，用 50% 甲醇补足减失的重量，混匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液于进样瓶中。分别称取益母草、甘草、茯苓、人参、泽兰、桃仁（制）、红花、当归、熟地黄、川芎、赤芍、丹参、香附（制）、（炒）白术、炮姜粉末约 2 g，置 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 20 mL 50% 甲醇，称定质量，超声 30 min（功率 200 W，频率 40 kHz），放冷后称重，用 50% 甲醇补足减失的重量，混匀，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

### 2.4 对照品溶液的制备

精密称取盐酸益母草碱 3.23 mg、盐酸水苏碱 2.12 mg、金丝桃苷 2.56 mg、阿魏酸 2.44 mg、异甘草苷 2.06 mg、人参皂苷 Re 2.36 mg、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 2.08 mg、芹菜素 3.34 mg、洋川芎内酯 H 2.64 mg、芍药苷 2.64 mg、咖啡酸 3.36 mg、肉豆蔻酸 2.62 mg、L-苯丙氨酸 2.58 mg、丹参素 2.68 mg、毛蕊花糖苷 2.88 mg、美迪紫檀素 2.52 mg、绿原酸 2.32 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容。分别吸取各对照品溶液 500 μL 于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，配制成质量浓度分别为 16.15、10.60、12.80、12.20、10.30、11.80、10.40、16.70、13.20、13.20、16.80、13.10、12.90、13.40、14.40、12.60、11.60 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

### 2.5 数据处理

通过 TCMSP、PubChem 等数据库以及文献查找的方式收集已知的加味八珍益母膏中 15 味药材



的化学成分信息,以化合物名称、化学式以及化合物相对分子质量为基本信息通过 PCDL 建立加味八珍益母膏化学成分数据库。根据一级质谱信息中的保留时间,采用 Target 模式对加味八珍益母膏提取液成分信息进行扫描。使用 MassHunter 和 PCDL 进行了质谱数据处理,包括提取离子色谱图和计算元素组成,质量误差在 10 ppm 以内,根据质谱信息、保留时间结合对照品与相关文献对加味八珍益母膏中的化学成分进行鉴定。

### 3 结果

#### 3.1 加味八珍益母膏中化学成分的鉴定

将加味八珍益母膏供试品溶液进行 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析,得到正、负离子模式下的总离子流图见图 1。混合对照品正、负离子模式下的总离子流图见图 2、3。通过 MassHunter 质谱工作站和 Mass analysis 质谱数据处理系统分析各化合物可能产生的碎片信息,结合相关文献及对照品进行比对分析从而对化合物进行鉴定;同法对 15 味药材的供试品溶液进行分析,根据各成分的来源进行药材归属。结果共鉴定和推测出 140 个化学成分,正离子模式下鉴定出 65 个化学成分,其中益母草 11 个,白术(炒)2 个,赤芍 3 个,川芎 11 个,丹参 5 个,当归 7 个,甘草 7 个,红花 4 个,炮姜 8 个,人参 3 个,熟地黄 9 个,泽兰 2 个,见表 1<sup>[5-24]</sup>。负离子模式下鉴定出 83 个化学成分,其中益母草 16 个,白术(炒)4 个,赤芍 10 个,川芎 10 个,丹参 9 个,当归 7 个,茯苓 2 个,甘草 4 个,红花 14 个,炮姜 3 个,人参 5 个,熟地黄 14 个,桃仁(制)3 个,香附(制)3 个,泽兰 9 个,见表 2<sup>[5-8, 10-20, 24-32]</sup>。其中正、负离子模式下鉴定出的共有化学成分有 8 个,分别为 3, 4, 5-三甲氧基苯甲酰胺、焦谷氨酸、梓醇、乌苷、马钱素、烟花苷、芹菜素、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷,且一些成分同时存在于不同药材中。

#### 3.2 化合物的裂解规律分析

##### 3.2.1 有机酸及其衍生物类

有机酸类是一类具有酸性的有机化合物,在 MS 裂解过程中主要产生 H<sub>2</sub>O、CO<sub>2</sub>、CO 等碎片离子<sup>[32]</sup>,如没食子酸、苯甲酸、香荚兰酸、阿魏酸、油酸、L-苯丙氨酸、丹参素、6-姜二酮。以没食子酸为例,准分子离子峰为  $m/z$  169.0141 [M-H]<sup>-</sup>,其脱羧基后生成二级碎片离子  $m/z$  125.0214 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>。结合文献<sup>[8]</sup>报道,该碎片与没食子酸的理论裂解碎片相似度较高,推测该化合物可能为没食子酸,其可能的裂解途径见图 4。

##### 3.2.2 黄酮类

黄酮类化合物本身具有 2-苯基色

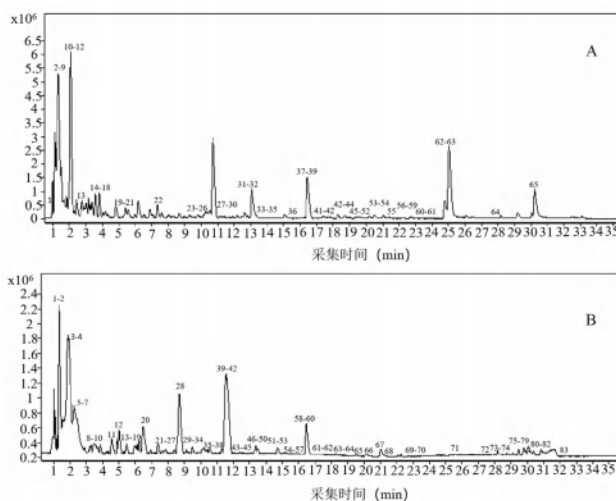


图 1 加味八珍益母膏正离子(A)及负离子(B)模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of Jiawei Bazhen Yimu ointment in positive ion (A) and negative ion (B) mode

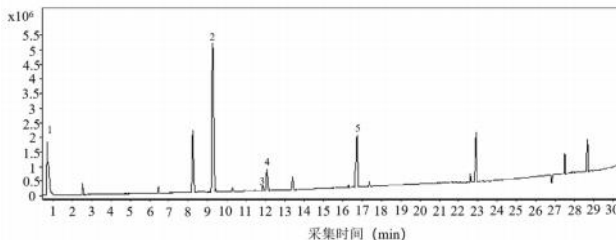


图 2 混合对照品正离子模式下的总离子流图

Fig 2 Total ion flow diagram of mixed reference in positive ion mode  
1. 盐酸水苏碱 (stachydrine hydrochloride); 2. 盐酸益母草碱 (lenurine hydrochloride); 3. 芹菜素 (apigenin); 4. 洋川芎内酯 H (senkyunolide H); 5. 美迪紫檀素 (medicarpin)

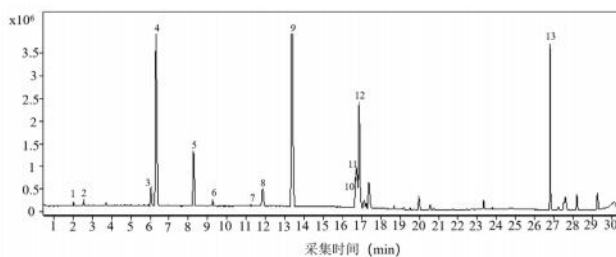


图 3 混合对照品负离子模式下的总离子流图

Fig 3 Total ion flow diagram of mixed reference in negative ion mode  
1. L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine); 2. 丹参素 (danshensu); 3. 绿原酸 (chlorogenic acid); 4. 咖啡酸 (caffeic acid); 5. 芍药苷 (paeoniflorin); 6. 阿魏酸 (ferulic acid); 7. 毛蕊花糖苷 (acteoside); 8. 金丝桃苷 (hyperoside); 9. 异甘草苷 (isoliquiritoside); 10. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re); 11. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>); 12. 芹菜素 (apigenin); 13. 肉豆蔻酸 (myristic acid)

原酮母核结构,在 MS 裂解过程中主要丢失中性的 CO 和 H<sub>2</sub>O,或是发生 RDA 裂解,其中黄酮苷类化合物则更多脱掉糖基,如果化合物中存在甲氧基,则首先发生甲基丢失,然后可能会发生碳环丢

表 1 正离子模式下加味八珍益母膏的化学成分解析

Tab 1 Chemical components of Jiawei Bazhen Yimu ointment in the positive ion mode

No.	$t_R$ /min	分子式	实测值 ( $m/z$ )	理论值 ( $m/z$ )	误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子 ( $m/z$ )	成分	分类来源文献
1	0.700	$C_7H_{13}NO_2$	144.1027[M+H] <sup>+</sup>	144.1019[M+H] <sup>+</sup>	5.55	84.9597	盐酸水苏碱*	C a [5]
2	1.229	$C_5H_{11}NO_2$	118.0865[M+H] <sup>+</sup>	118.0863[M+H] <sup>+</sup>	1.69	59.0729	L- 缬氨酸	A f [6]
3	1.284	$C_7H_7NO_2$	138.0544[M+H] <sup>+</sup>	138.0550[M+H] <sup>+</sup>	- 4.35	110.0570, 94.0649	葫芦巴碱	C a [5]
4	1.333	$C_{15}H_{18}O_2$	253.1184[M+Na] <sup>+</sup>	253.1199[M+Na] <sup>+</sup>	- 5.93	207.1122, 113.0334	白术内酯 I	E b [5]
5	1.390	$C_8H_{12}N_2$	137.1068[M+H] <sup>+</sup>	137.1073[M+H] <sup>+</sup>	- 3.65	122.0815	川芎嗪	C d [7]
6	1.476	$C_7H_{13}NO_2$	166.0840[M+Na] <sup>+</sup>	166.0838[M+Na] <sup>+</sup>	1.20	59.0733	(2S)-1, 1- 二甲基-2, 3, 4, 5- 四氢吡咯-2- 羧酸或异构体	A f [8]
7	1.572	$C_5H_5N_5$	136.0621[M+H] <sup>+</sup>	136.0618[M+H] <sup>+</sup>	2.20	119.0354, 109.4988	腺嘌呤	A l [8]
8	1.582	$C_9H_{13}N_3O_5$	266.0744[M+Na] <sup>+</sup>	266.0747[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.13	101.2631	胞苷	A l [8]
9	1.889	$C_5H_{11}NO_3$	182.0811[M+H] <sup>+</sup>	182.0812[M+H] <sup>+</sup>	- 0.55	136.0535	D- 酪氨酸	A b [7]
10	2.127	$C_{10}H_{13}NO_4$	212.0918[M+H] <sup>+</sup>	212.0917[M+H] <sup>+</sup>	0.47	140.9866	3, 4, 5- 三甲氧基苯甲酸	F a [8]
11	2.232	$C_5H_7NO_3$	130.0499[M+H] <sup>+</sup>	130.0499[M+H] <sup>+</sup>	0.00	84.0488	焦谷氨酸	A f [8]
12	2.249	$C_{16}H_{24}O_{10}$	399.1248[M+Na] <sup>+</sup>	399.1262[M+Na] <sup>+</sup>	- 3.51	237.0765, 193.0792, 175.0743	8- 表番木鳖酸	A l [6]
13	2.944	$C_{10}H_{13}N_3O_4$	268.1040[M+H] <sup>+</sup>	268.1040[M+H] <sup>+</sup>	0.00	136.0616	腺苷	A a, l [8]
14	3.017	$C_{15}H_{22}O_{10}$	385.1097[M+Na] <sup>+</sup>	385.1105[M+Na] <sup>+</sup>	- 2.08	223.0581	梓醇	E l [6]
15	3.237	$C_5H_5N_5O$	152.0569[M+H] <sup>+</sup>	152.0567[M+H] <sup>+</sup>	1.32	110.0325	鸟嘌呤	A a [6]
16	3.286	$C_{10}H_{13}N_3O_5$	306.0807[M+Na] <sup>+</sup>	306.0809[M+Na] <sup>+</sup>	- 0.65	133.0748	鸟苷	A l [6]
17	3.714	$C_{13}H_{18}O_7$	287.1107[M+H] <sup>+</sup>	287.1125[M+H] <sup>+</sup>	- 4.98	226.0588	天麻素	D d [9]
18	3.816	$C_{15}H_{24}O_9$	371.1301[M+H] <sup>+</sup>	371.1313[M+H] <sup>+</sup>	- 3.23	353.0824	益母草苷	E l [6]
19	5.543	$C_{17}H_{26}O_{10}$	413.1399[M+Na] <sup>+</sup>	413.1418[M+Na] <sup>+</sup>	- 4.60	179.0068, 127.0378	马钱素	E l [10]
20	5.649	$C_{11}H_{12}O_5$	225.0756[M+H] <sup>+</sup>	225.0757[M+H] <sup>+</sup>	- 0.44	165.0173	芥子酸	A d [11]
21	5.667	$C_7H_{30}O_{15}$	595.1612[M+H] <sup>+</sup>	595.1657[M+H] <sup>+</sup>	- 7.56	287.0983	烟花苷	B i [12]
22	7.787	$C_{27}H_{22}O_{12}$	539.1141[M+H] <sup>+</sup>	539.1184[M+H] <sup>+</sup>	- 7.98	296.8776	紫草酸	A e [10]
23	9.055	$C_{15}H_{14}O_6$	291.0835[M+H] <sup>+</sup>	291.0863[M+H] <sup>+</sup>	- 5.84	147.0487, 123.0759	儿茶素	F c [13]
24	9.145	$C_{14}H_{21}N_3O_5$	312.1557[M+H] <sup>+</sup>	312.1554[M+H] <sup>+</sup>	0.96	296.1321, 295.1249, 253.1049, 181.0494, 153.0540, 132.1126, 114.1023, 97.0760, 72.0807	盐酸益母草碱*	C a [5]
25	9.974	$C_{15}H_{22}O_4$	267.1574[M+H] <sup>+</sup>	267.1591[M+H] <sup>+</sup>	- 6.36	169.0745	4- 姜酚	B j [14]
26	10.103	$C_{22}H_{22}O_9$	431.1308[M+H] <sup>+</sup>	431.1337[M+H] <sup>+</sup>	6.73	269.1344	芒柄花苷	B h [13]
27	11.524	$C_{23}H_{28}O_{11}$	503.1516[M+Na] <sup>+</sup>	503.1524[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.59	381.1127, 341.0997, 219.0624	芍药内酯苷	E a, c [15-16]
28	11.752	$C_{25}H_{24}O_5$	405.1701[M+H] <sup>+</sup>	405.1697[M+H] <sup>+</sup>	0.99	387.1479	胀果甘草宁	E h [17]
29	11.862	$C_{15}H_{10}O_7$	303.0495[M+H] <sup>+</sup>	303.0499[M+H] <sup>+</sup>	- 1.32	229.0490, 165.0154, 153.0176	槲皮素	B a, o [8]
30	12.020	$C_{12}H_{16}O_4$	247.0938[M+Na] <sup>+</sup>	247.0941[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.21	201.9285, 141.9709	洋川芎内酯 H <sup>+</sup>	F d [7]
31	13.040	$C_{12}H_{16}O_2$	193.1231[M+H] <sup>+</sup>	193.1223[M+H] <sup>+</sup>	4.14	175.0272, 147.0067	洋川芎内酯 A	F d, f [7]
32	13.107	$C_{15}H_{10}O_6$	287.0543[M+H] <sup>+</sup>	287.055[M+H] <sup>+</sup>	- 2.44	153.0173, 121.0276	山柰酚	B a, i [18]
33	13.875	$C_{12}H_{16}O_4$	247.0938[M+Na] <sup>+</sup>	247.0941[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.21	165.2411	(3S, 3aR, 6S)-(-) 6- 羟基新蛇床内酯-10 酮	F d [19]
34	13.936	$C_{27}H_{30}O_{16}$	633.1415[M+Na] <sup>+</sup>	633.1426[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.74	255.7293	槲皮素 3-O- 洋槐糖苷	B a [20]
35	13.977	$C_{12}H_{16}O_4$	247.0938[M+H] <sup>+</sup>	247.0941[M+Na] <sup>+</sup>	- 1.21	165.2411	川芎内酯 R <sub>2</sub>	F d [7]
36	15.487	$C_{12}H_{12}O_2$	189.0910[M+H] <sup>+</sup>	189.0910[M+H] <sup>+</sup>	0.00	143.0015, 105.0033	丁烯基苯酚	F d, f [11]
37	16.224	$C_{20}H_{30}O_{12}$	463.1830[M+H] <sup>+</sup>	463.1810[M+H] <sup>+</sup>	4.32	133.6546	脱咖啡酰基毛蕊糖苷	D l [19]
38	16.731	$C_{42}H_{72}O_{14}$	823.4781[M+Na] <sup>+</sup>	823.4762[M+Na] <sup>+</sup>	2.31	631.3347	人参皂苷 Rf	F k [16]
39	16.880	$C_{15}H_{10}O_5$	271.0589[M+H] <sup>+</sup>	271.0601[M+H] <sup>+</sup>	- 4.43	119.0622, 109.0742	芹菜素*	B a [13]
40	17.010	$C_{16}H_{14}O_4$	271.0949[M+H] <sup>+</sup>	271.0965[M+H] <sup>+</sup>	- 5.90	123.0558	美迪紫檀素*	A h [21]
41	17.857	$C_{24}H_{32}O_7$	433.2191[M+H] <sup>+</sup>	433.2221[M+H] <sup>+</sup>	- 6.92	273.1466	malkangunin	F k [22]
42	18.830	$C_{12}H_{14}O_4$	245.0787[M+Na] <sup>+</sup>	245.0784[M+Na] <sup>+</sup>	1.22	177.3046	4, 7- 二羟基-3- 丁基苯酚	F d [20]
43	18.906	$C_{20}H_{30}O_5$	373.1985[M+Na] <sup>+</sup>	373.1985[M+Na] <sup>+</sup>	0.00	235.1834	甲基乙酰氧基 6- 姜酚	F j [14]
44	18.951	$C_{12}H_{14}O_4$	245.0787[M+Na] <sup>+</sup>	245.0784[M+Na] <sup>+</sup>	1.22	120.9098	洋川芎内酯 D	F d [7]
45	19.138	$C_{17}H_{26}O_3$	279.1955[M+H] <sup>+</sup>	279.1955[M+H] <sup>+</sup>	0.00	81.5579	6- 姜酮酚	B j [14]

续表 1

No.	$t_R$ /min	分子式	实测值 ( $m/z$ )	理论值 ( $m/z$ )	误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子 ( $m/z$ )	成分	分类来源文献
46	19.293	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	167.0701[M+H] <sup>+</sup>	167.0703[M+H] <sup>+</sup>	-1.20	149.5350	丹皮酚	F c [8]
47	19.319	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	325.1403[M+H] <sup>+</sup>	325.1434[M+H] <sup>+</sup>	-6.46	149.0138	光甘草定	B h [17]
48	19.443	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	303.099[M+H] <sup>+</sup>	303.0992[M+H] <sup>+</sup>	-0.66	263.1271, 252.1133	四氢丹参酮 I	B e [16]
49	19.467	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	371.1832[M+H] <sup>+</sup>	371.1853[M+H] <sup>+</sup>	-5.66	205.1165	粗毛甘草素 D	B h [23]
50	19.501	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	351.2516[M+H] <sup>+</sup>	351.2530[M+H] <sup>+</sup>	-3.99	333.2010, 178.3331	10-姜酚	B j [14]
51	19.545	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	247.1304[M+Na] <sup>+</sup>	247.1305[M+Na] <sup>+</sup>	-0.40	125.3793, 124.1397	吐叶醇	E i [24]
52	19.821	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	495.1259[M+H] <sup>+</sup>	495.1286[M+H] <sup>+</sup>	-5.45	205.0762, 161.0120	丹酚酸 A	A e [10]
53	20.803	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	375.2137[M+Na] <sup>+</sup>	375.2142[M+Na] <sup>+</sup>	-1.33	275.7331	甲基-3-乙酰氧基-6-姜二醇	F j [14]
54	21.191	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	299.1611[M+Na] <sup>+</sup>	299.1618[M+Na] <sup>+</sup>	-2.34	199.1475, 184.9814, 159.0484, 139.9857	6-姜烯酚	F j [15]
55	21.758	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	823.4089[M+H] <sup>+</sup>	823.4111[M+H] <sup>+</sup>	-2.67	647.3744, 453.3350	甘草酸	A h [23]
56	22.394	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	1131.5873[M+Na] <sup>+</sup>	1131.5922[M+Na] <sup>+</sup>	-4.33	789.4704	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	F k [16]
57	22.625	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	339.2148[M+H] <sup>+</sup>	339.2166[M+H] <sup>+</sup>	-5.31	229.6910	3-乙酰氧基-6-姜二醇	B j [14]
58	22.835	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	369.1674[M+H] <sup>+</sup>	369.1697[M+H] <sup>+</sup>	-6.23	309.8714, 265.5366	去氢粗毛甘草素 D	B h [23]
59	22.835	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	397.1983[M+H] <sup>+</sup>	397.201[M+H] <sup>+</sup>	-6.80	145.8121, 173.9691	欧当归内酯 A	E d, f [11]
60	23.036	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	371.1823[M+Na] <sup>+</sup>	371.1829[M+Na] <sup>+</sup>	-1.62	356.2507	micranthin B	F e [16]
61	23.676	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	315.1582[M+H] <sup>+</sup>	315.1591[M+H] <sup>+</sup>	-2.86	215.2915	新隐丹参酮	E e [16]
62	25.191	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	163.0391[M+H] <sup>+</sup>	163.0390[M+H] <sup>+</sup>	0.61	135.0427	7-羟基香豆素	B f [23]
63	25.288	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	301.1414[M+Na] <sup>+</sup>	301.1410[M+Na] <sup>+</sup>	1.33	121.0429	邻苯二甲酸二丁酯	A o [24]
64	27.538	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	375.2523[M+H] <sup>+</sup>	375.2530[M+H] <sup>+</sup>	-1.87	177.0141, 81.9612	1, 4-去二氢-12-姜酚	B j [16]
65	30.430	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	613.1803[M+H] <sup>+</sup>	613.1763[M+H] <sup>+</sup>	6.52	451.3922	羟基红花黄色素 A	B i [24]

注 (Note): A. 有机酸及其衍生物类 (organic acid and their derivatives); B. 黄酮类 (flavonoids); C. 生物碱类 (alkaloids); D. 糖及糖苷类 (sugar and glycosidic); E. 萜类 (terpenoids); F. 其他类 (other ingredients); a. 益母草 (Leonurus); b. 白术 (炒) [Atractylodes macrocephalus (stir-fried)]; c. 芍药 (Paeoniae radix rubra); d. 川芎 (Chuanxiong); e. 丹参 (Salvia); f. 当归 (Angelica); g. 茯苓 (Poria); h. 甘草 (Glycyrrhiza); i. 红花 (Safflower); j. 炮姜 [Ginger (Zingiber officinale)]; k. 人参 (Panax ginseng); l. 熟地黄 (Rehmannia glutinosa); m. 桃仁 (制) [Walnut kernel (made)]; n. 香附 (制) [Cyperus rhizoma (made)]; o. 泽兰 (Eupatorium); \* 为与对照品比对的化合物 (\* means confirmed with standards)。

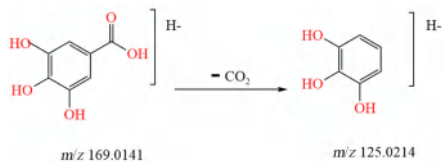


图 4 没食子酸可能的质谱裂解途径  
Fig 4 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of gallic acid

失 CO 碎片等<sup>[33]</sup>。如 7-羟基香豆素、10-姜酚、芒柄花苷、芹菜素、羟基红花黄色素 A、甘草苷、山柰酚-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰酚-3-O-槐糖苷、木犀草苷，以甘草苷为例，准分子离子峰为  $m/z$  417.1186[M-H]<sup>-</sup>，其产生的特征二级离子碎片  $m/z$  255.0666, 135.0079 分别为  $m/z$  417.1186 脱掉一分子 Glu 后继续脱掉一分子 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> 产生的，即  $m/z$  255.0666[M-H-Glu]<sup>-</sup>，和  $m/z$  135.0079[M-H-Glu-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>，结合文献<sup>[5]</sup>报道，该碎片与甘草苷理论裂解碎片相似度较高，推测该化合物为甘草苷，其可能的裂解途径见图 5。

**3.2.3 生物碱类** 生物碱类化合物是一种含氮有机物，生理活性较强，主要由芳香体系组成，具有较多环系，分子结构紧密，不易裂解，在 MS 裂解过

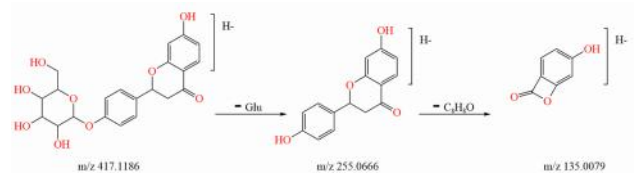


图 5 甘草苷可能的质谱裂解途径  
Fig 5 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of liquiritin

程一般发生在侧链或者取代基上<sup>[34]</sup>。如盐酸水苏碱、盐酸益母草碱、葫芦巴碱，以盐酸水苏碱为例，准分子离子峰为  $m/z$  144.1027[M+H]<sup>+</sup>，其失去一分子 C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>N 后生成二级碎片离子  $m/z$  84.9597[M+H-C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>。结合文献<sup>[6]</sup>报道及对照品比对，该碎片与盐酸水苏碱对照品的裂解规律一致，推测该化合物为盐酸水苏碱，其可能的裂解途径见图 6。

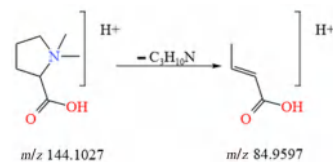


图 6 盐酸水苏碱可能的质谱裂解途径  
Fig 6 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of stachydrine hydrochloride



表 2 负离子模式下加味八珍益母膏的化学成分解析

Tab 2 Chemical components of Jiawei Bazhen Yimu ointment in negative ion mode

No.	$t_R/\text{min}$	分子式	实测值 ( $m/z$ )	理论值 ( $m/z$ )	误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子 ( $m/z$ )	成分	分类	来源	文献
1	1.421	$C_5H_7NO_3$	128.0352[M-H] <sup>-</sup>	128.0353[M-H] <sup>-</sup>	-0.78	52.1937	焦谷氨酸	A	f	[25]
2	1.588	$C_6H_6O_3$	125.0247[M-H] <sup>-</sup>	125.0244[M-H] <sup>-</sup>	2.40	107.0134, 79.0188	5-羟甲基糠醛	F	l	[6]
3	2.072	$C_9H_{11}NO_2$	164.0714[M-H] <sup>-</sup>	164.0717[M-H] <sup>-</sup>	-1.83	103.0522, 146.0714	L-苯丙氨酸 <sup>*</sup>	A	f	[8]
4	2.133	$C_9H_{10}O_5$	197.0454[M-H] <sup>-</sup>	197.0455[M-H] <sup>-</sup>	-0.51	179.0827	丹参素 <sup>*</sup>	A	e	[10]
5	2.322	$C_7H_6O_5$	169.0141[M-H] <sup>-</sup>	169.0142[M-H] <sup>-</sup>	-0.59	125.0214	没食子酸	A	h	[8]
6	2.363	$C_9H_{12}N_2O_6$	243.0622[M-H] <sup>-</sup>	243.0623[M-H] <sup>-</sup>	-0.41	82.0291	L-尿苷	A	l	[19]
7	2.890	$C_6H_6O_3$	125.0242[M-H] <sup>-</sup>	125.0244[M-H] <sup>-</sup>	-1.60	107.0488	糠酸甲酯	F	d	[7]
8	3.124	$C_{15}H_{22}O_{10}$	407.1185[M+COOH] <sup>-</sup>	407.1195[M+COOH] <sup>-</sup>	-2.46	199.0606	梓醇	E	l	[6]
9	3.171	$C_{21}H_{32}O_{15}$	547.1617[M+COOH] <sup>-</sup>	547.1633[M+COOH] <sup>-</sup>	-2.92	221.0783	地黄苷 A	E	l	[6]
10	3.543	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	282.0839[M-H] <sup>-</sup>	282.0844[M-H] <sup>-</sup>	-1.77	150.0416, 133.0127, 108.0204	鸟苷	A	l	[6]
11	4.511	$C_{15}H_{20}O_9$	343.1037[M-H] <sup>-</sup>	343.1035[M-H] <sup>-</sup>	0.58	299.0355, 197.0451	丁香酸-4-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷	D	l	[6]
12	4.953	$C_{17}H_{26}O_{10}$	435.1493[M+COOH] <sup>-</sup>	435.1508[M+COOH] <sup>-</sup>	-3.45	273.0872	马钱素	E	l	[6]
13	5.832	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0871[M-H] <sup>-</sup>	353.0878[M-H] <sup>-</sup>	-1.98	191.0563	绿原酸 <sup>*</sup>	A	n, m, i, a	[7]
14	5.929	$C_7H_6O_2$	121.0296[M-H] <sup>-</sup>	121.0295[M-H] <sup>-</sup>	0.83	77.0393	苯甲酸	A	c	[24]
15	5.983	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	502.1561[M+COOH] <sup>-</sup>	502.1566[M+COOH] <sup>-</sup>	-1.00	369.0845	苦杏仁苷	D	m	[8]
16	6.145	$C_{23}H_{28}O_{12}$	495.1506[M-H] <sup>-</sup>	495.1508[M-H] <sup>-</sup>	-0.40	333.0984	氧化芍药苷	E	c	[16]
17	6.272	$C_6H_5NO_2$	122.0246[M-H] <sup>-</sup>	122.0248[M-H] <sup>-</sup>	-1.64	80.8048	烟酸	A	f	[17]
18	6.285	$C_8H_8O_4$	167.0349[M-H] <sup>-</sup>	167.0350[M-H] <sup>-</sup>	-0.60	152.0136, 123.5181	香荚兰酸	A	d	[25]
19	6.295	$C_{20}H_{30}O_{12}$	461.1649[M-H] <sup>-</sup>	461.1664[M-H] <sup>-</sup>	-3.25	161.3435, 135.0430	脱咖啡酰基毛蕊糖苷	D	l	[19]
20	6.613	$C_9H_8O_4$	225.0404[M+COOH] <sup>-</sup>	225.0405[M+COOH] <sup>-</sup>	-0.44	135.0443	咖啡酸 <sup>*</sup>	A	o	[7]
21	7.259	$C_{20}H_{18}O_{10}$	417.0798[M-H] <sup>-</sup>	417.0827[M-H] <sup>-</sup>	-6.95	197.0444, 175.8679	丹酚酸 D	A	e	[10]
22	7.271	$C_8H_{10}O_3$	153.0554[M-H] <sup>-</sup>	153.0557[M-H] <sup>-</sup>	-1.96	120.8279	香草醇	A	a	[26]
23	7.520	$C_{16}H_{24}O_{10}$	375.1301[M-H] <sup>-</sup>	375.1297[M-H] <sup>-</sup>	1.07	179.0338, 167.0388	玉叶金花苷酸	A	l	[6]
24	7.642	$C_9H_{10}O_5$	197.0454[M-H] <sup>-</sup>	197.0455[M-H] <sup>-</sup>	-0.51	152.0377	丁香酸	A	a	[25]
25	7.865	$C_7H_6O_3$	137.0241[M-H] <sup>-</sup>	137.0244[M-H] <sup>-</sup>	-2.19	108.6020	原儿茶醛	A	e	[10]
26	8.036	$C_{33}H_{40}O_{21}$	771.1958[M-H] <sup>-</sup>	771.1989[M-H] <sup>-</sup>	-4.02	463.0881, 301.0303	6-羟基山柰酚-3-O- $\beta$ -芸香 糖-6-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	D	i	[27]
27	8.186	$C_{10}H_{13}NO_4$	210.0767[M-H] <sup>-</sup>	210.0772[M-H] <sup>-</sup>	-2.38	98.0983	3, 4, 5-三甲氧基苯甲酰胺	F	a	[28]
28	8.689	$C_{15}H_{14}O_7$	305.0684[M-H] <sup>-</sup>	305.0667[M-H] <sup>-</sup>	5.57	153.0670	白西尼多	B	n	[28]
29	9.065	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.1610[M+COOH] <sup>-</sup>	525.1614[M+COOH] <sup>-</sup>	-0.76	373.1225	芍药苷 <sup>*</sup>	E	a, c	[5]
30	9.158	$C_{10}H_{10}O_4$	193.0504[M-H] <sup>-</sup>	193.0506[M-H] <sup>-</sup>	-1.04	178.0258, 134.0360	阿魏酸 <sup>*</sup>	A	o, a, f, e, d	[5]
31	9.440	$C_8H_8O$	119.0500[M-H] <sup>-</sup>	119.0502[M-H] <sup>-</sup>	-1.68	91.5231	苯乙醛	F	i	[29]
32	9.594	$C_9H_8O_3$	163.0398[M-H] <sup>-</sup>	163.0401[M-H] <sup>-</sup>	-1.84	119.0510	cis-p-coumarate	A	m	[29]
33	9.660	$C_{12}H_{18}O_4$	225.1128[M-H] <sup>-</sup>	225.1132[M-H] <sup>-</sup>	-1.78	125.2171	洋川芎内酯 N	F	d	[7]
34	9.684	$C_{21}H_{22}O_9$	417.1186[M-H] <sup>-</sup>	417.1191[M-H] <sup>-</sup>	-1.20	255.0666, 135.0079	甘草苷	B	h	[5]
35	10.130	$C_{27}H_{30}O_{17}$	625.1399[M-H] <sup>-</sup>	625.1410[M-H] <sup>-</sup>	-1.76	439.1284, 301.1089, 298.8624	6-羟基山柰酚-6, 7-二-O- $\beta$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷	D	i	[27]
36	10.685	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.1608[M-H] <sup>-</sup>	549.1614[M-H] <sup>-</sup>	-1.09	417.1613, 255.0659, 135.0083	芹糖甘草苷	D	h	[7]
37	10.964	$C_{18}H_{16}O_8$	359.0772[M-H] <sup>-</sup>	359.0772[M-H] <sup>-</sup>	0.00	197.0450, 161.0235	迷迭香酸	A	e, o	[10]
38	11.201	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.1978[M-H] <sup>-</sup>	623.1981[M-H] <sup>-</sup>	-0.48	461.1397, 315.1088, 179.0325, 161.0239	毛蕊花糖苷 <sup>*</sup>	D	l	[5]
39	11.637	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0935[M-H] <sup>-</sup>	447.0933[M-H] <sup>-</sup>	0.45	285.0381, 255.0313, 227.0350	木犀草素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖 苷	D	o	[26]
40	11.810	$C_{35}H_{46}O_{20}$	785.2481[M-H] <sup>-</sup>	785.2451[M-H] <sup>-</sup>	3.82	623.1975, 179.0367, 161.0246	松果菊苷	F	l	[19]
41	11.831	$C_{34}H_{44}O_{20}$	771.2340[M-H] <sup>-</sup>	771.2352[M-H] <sup>-</sup>	-1.56	591.2692, 179.0363	益母草诺昔 C/D	F	a	[29]
42	11.944	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0877[M-H] <sup>-</sup>	463.0882[M-H] <sup>-</sup>	-1.08	301.0293, 271.0220	金丝桃苷 <sup>*</sup>	B	a	[18]
43	12.025	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0877[M-H] <sup>-</sup>	463.0882[M-H] <sup>-</sup>	-1.08	301.0258, 300.0238	异槲皮苷	B	a, o	[12]
44	12.073	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.1993[M-H] <sup>-</sup>	623.1981[M-H] <sup>-</sup>	1.93	461.1397, 161.0241	异毛蕊花糖苷	D	l	[19]

续表 2

No.	$t_R/\text{min}$	分子式	实测值 ( $m/z$ )	理论值 ( $m/z$ )	误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子 ( $m/z$ )	成分	分类	来源	文献
45	12.844	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1495[M-H] <sup>-</sup>	593.1512[M-H] <sup>-</sup>	- 2.87	285.0359	烟花苷	B	i	[30]
46	13.323	$C_{21}H_{22}O_9$	417.1186[M-H] <sup>-</sup>	417.1191[M-H] <sup>-</sup>	- 1.20	254.4940	异甘草苷 <sup>*</sup>	B	h	[7]
47	13.400	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0926[M-H] <sup>-</sup>	447.0933[M-H] <sup>-</sup>	- 1.57	285.0346	山柰酚 -3-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷	B	a	[27]
48	13.422	$C_{34}H_{44}O_{19}$	755.2401[M-H] <sup>-</sup>	755.2404[M-H] <sup>-</sup>	- 0.40	161.0233	异薰衣草叶苷	F	a	[30]
49	13.963	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1455[M-H] <sup>-</sup>	609.1461[M-H] <sup>-</sup>	- 0.98	300.0258	芦丁	B	a, o	[12]
50	14.005	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1455[M-H] <sup>-</sup>	609.1461[M-H] <sup>-</sup>	- 0.98	447.5399	山柰酚 -3-O- 槐糖苷	B	i	[27]
51	14.666	$C_{21}H_{20}O_{10}$	447.0921[M-H] <sup>-</sup>	447.0933[M-H] <sup>-</sup>	- 2.68	284.0800	三叶豆苷	B	a	[30]
52	14.773	$C_{30}H_{32}O_{12}$	629.1870[M+COOH] <sup>-</sup>	629.1876[M+COOH] <sup>-</sup>	- 0.95	553.8024	苯甲酰芍药苷	E	c	[16]
53	14.945	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.2284[M-H] <sup>-</sup>	651.2294[M-H] <sup>-</sup>	- 1.54	505.1645, 265.0738, 193.0516, 175.0409	地黄苷	E	l	[6]
54	15.065	$C_{15}H_{20}O$	261.1498[M+COOH] <sup>-</sup>	261.1496[M+COOH] <sup>-</sup>	0.77	234.1108	苍术酮	E	b	[25]
55	15.084	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.0921[M-H] <sup>-</sup>	447.0933[M-H] <sup>-</sup>	- 2.68	285.0354, 256.0355	木犀草苷	B	n	[28]
56	15.126	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1498[M-H] <sup>-</sup>	593.1512[M-H] <sup>-</sup>	- 2.36	285.0340	山柰酚 -3-O- 芸香糖苷	B	i	[7]
57	16.072	$C_{18}H_{14}O_8$	357.0607[M-H] <sup>-</sup>	357.0616[M-H] <sup>-</sup>	- 2.52	295.1365	原紫草酸	A	e	[10]
58	16.586	$C_{48}H_{82}O_{18}$	991.5435[M+COOH] <sup>-</sup>	991.5483[M+COOH] <sup>-</sup>	- 4.84	619.2372, 475.2307	人参皂苷 Re <sup>*</sup>	F	k	[16]
59	16.626	$C_{42}H_{72}O_{14}$	845.4869[M+COOH] <sup>-</sup>	845.4904[M+COOH] <sup>-</sup>	- 4.14	799.3101, 475.2425	人参皂苷 Rg <sub>1</sub> <sup>*</sup>	F	k	[16]
60	16.823	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0456[M-H] <sup>-</sup>	269.0455[M-H] <sup>-</sup>	0.37	117.9286, 107.0131	芹菜素 <sup>*</sup>	B	a	[13]
61	17.371	$C_{19}H_{22}O_2$	327.1602[M+COOH] <sup>-</sup>	327.1602[M+COOH] <sup>-</sup>	0.00	309.1727, 285.1119, 281.1180, 267.0663	丹参新酮	E	e	[16]
62	17.566	$C_{30}H_{26}O_{13}$	593.1296[M-H] <sup>-</sup>	593.1301[M-H] <sup>-</sup>	- 0.84	285.0316	银椴苷	B	a	[30]
63	18.451	$C_{18}H_{34}O_5$	329.2332[M-H] <sup>-</sup>	329.2333[M-H] <sup>-</sup>	- 0.30	211.1342, 183.1383, 171.1026	9, 10, 13- 三羟基 -11- 十八碳烯酸或 9, 12, 13- 三羟基 -10- 十八碳烯酸	A	i	[24]
64	18.473	$C_{16}H_{12}O_6$	299.0571[M-H] <sup>-</sup>	299.0561[M-H] <sup>-</sup>	3.34	284.0333, 256.0379	山柰素	B	o	[18]
65	19.366	$C_{15}H_{20}O_3$	247.1339[M-H] <sup>-</sup>	247.1340[M-H] <sup>-</sup>	- 0.40	229.0993, 173.0233	白术内酯 III	E	b	[23]
66	20.194	$C_{42}H_{72}O_{14}$	829.4936[M+COOH] <sup>-</sup>	829.4955[M+COOH] <sup>-</sup>	- 2.29	391.0225	人参皂苷 Rg <sub>2</sub>	F	k	[16]
67	21.060	$C_{19}H_{20}O_3$	341.1406[M+COOH] <sup>-</sup>	341.1394[M+COOH] <sup>-</sup>	3.52	323.0015	隐丹参酮	E	e	[16]
68	21.500	$C_{15}H_{20}O_2$	277.1447[M+COOH] <sup>-</sup>	277.1445[M+COOH] <sup>-</sup>	0.72	259.0191, 231.0052	白术内酯 II	E	b	[23]
69	22.911	$C_{17}H_{24}O_4$	291.1595[M-H] <sup>-</sup>	291.1602[M-H] <sup>-</sup>	- 2.40	263.1670	6- 姜二酮	A	j	[14]
70	23.164	$C_{20}H_{20}O_6$	401.1219[M+COOH] <sup>-</sup>	401.1242[M+COOH] <sup>-</sup>	- 5.73	239.0662	阿魏酸松柏酯	A	d, f	[20]
71	25.596	$C_{17}H_{26}O_4$	293.1775[M-H] <sup>-</sup>	293.1758[M-H] <sup>-</sup>	5.80	193.0555	6- 姜酚 /6- 姜辣素	B	j	[15]
72	27.630	$C_{31}H_{46}O_4$	481.3319[M-H] <sup>-</sup>	481.3323[M-H] <sup>-</sup>	- 0.83	379.1539, 290.9915	猪苓酸 C	A	g	[5]
73	28.217	$C_{18}H_{30}O_2$	277.2168[M-H] <sup>-</sup>	277.2173[M-H] <sup>-</sup>	- 1.80	109.7896	$\alpha$ - 亚麻酸	A	a, i	[25]
74	28.695	$C_{14}H_{28}O_2$	227.2012[M-H] <sup>-</sup>	227.2017[M-H] <sup>-</sup>	- 2.20	96.5635	肉豆蔻酸 <sup>*</sup>	A	i, f, c	[31]
75	29.101	$C_{16}H_{30}O_2$	253.2168[M-H] <sup>-</sup>	253.2173[M-H] <sup>-</sup>	- 1.97	95.2338	棕榈油酸	A	e	[31]
76	29.276	$C_{15}H_{30}O_2$	241.2165[M-H] <sup>-</sup>	241.2173[M-H] <sup>-</sup>	- 3.32	117.3587	十五烷酸	A	l, k, i, c	[31]
77	29.404	$C_{18}H_{32}O_2$	279.2327[M-H] <sup>-</sup>	279.2330[M-H] <sup>-</sup>	- 1.07	59.0103	亚油酸	A	o, d	[26]
78	29.596	$C_{21}H_{32}O_4$	347.2216[M-H] <sup>-</sup>	347.2228[M-H] <sup>-</sup>	- 3.46	191.0518	10- 姜二酮	B	j	[14]
79	29.907	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2329[M-H] <sup>-</sup>	255.2330[M-H] <sup>-</sup>	- 0.39	199.2585	棕榈酸	A	i, g, f, d, c, b	[11]
80	30.166	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2478[M-H] <sup>-</sup>	281.2486[M-H] <sup>-</sup>	- 2.84	237.0238	油酸	A	i, d, c	[11]
81	30.958	$C_{17}H_{34}O_2$	269.2481[M-H] <sup>-</sup>	269.2486[M-H] <sup>-</sup>	- 1.86	143.8805	棕榈酸甲酯	A	d, c	[32]
82	32.555	$C_{18}H_{36}O_2$	283.2635[M-H] <sup>-</sup>	283.2643[M-H] <sup>-</sup>	- 2.82	121.9941, 83.6519, 97.4286	硬脂酸	A	o, i, d	[31]
83	32.555	$C_{24}H_{48}O_2$	367.3573[M-H] <sup>-</sup>	367.3582[M-H] <sup>-</sup>	- 2.45	87.1936	二十三酸甲酯	A	k, c	[32]

注 (Note): A. 有机酸及其衍生物类 (organic acid and their derivatives); B. 黄酮类 (flavonoids); C. 生物碱类 (alkaloids); D. 糖及糖苷类 (sugar and glycosidic); E. 萜类 (terpenoids); F. 其他类 (other ingredients); a. 益母草 (leonurus); b. 白术 (炒) [Atractylodes macrocephalus (stir-fried)]; c. 赤芍 (Paenoniae radix rubra); d. 川芎 (Chuanxiong); e. 丹参 (Salvia); f. 当归 (Angelica); g. 茯苓 (Poria); h. 甘草 (Glycyrrhiza); i. 红花 (Safflower); j. 炮姜 [Ginger (Zingiber officinale)]; k. 人参 (Panax ginseng); l. 熟地黄 (Rehmannia glutinosa); m. 桃仁 (制) [Walnut kernel (made)]; n. 香附 (制) [Cyperus rhizoma (made)]; o. 泽兰 (Eupatorium); \* 为与对照品比对的化合物 (\* means confirmed with standards)。

**3.2.4 糖及糖苷类** 糖及糖苷类化合物通常为羧基糖的衍生物通过糖的半缩醛(酮)羟基脱水缩合与另一种非糖物质结合的产物。C-糖苷类化合物在 MS 裂解过程中首先在糖元内部进行裂解, O-糖苷类化合物则通常在糖苷键位置发生裂解。如毛蕊花糖苷、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹糖甘草苷、6-羟基山柰酚-3-O-β-芸香糖-6-O-β-D-葡萄糖苷, 以毛蕊花糖苷为例, 准分子离子峰为  $m/z$  623.1978[M-H]<sup>-</sup>, 其产生  $m/z$  461.1397、315.1088、179.0325、161.0239 的二级碎片离子,

$m/z$  461.1397 为  $m/z$  623.1978[M-H]<sup>-</sup> 失去一分子咖啡酰生成的, 即  $m/z$  461.1397[M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>-</sup>,  $m/z$  315.1088 为  $m/z$  461.1397 脱掉一分子鼠李糖生成的, 即  $m/z$  315.1088[M-H-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>-Rha]<sup>-</sup>,  $m/z$  179.0325 为产生的咖啡酸碎片离子,  $m/z$  161.0239 为咖啡酸脱一分子水生成的。结合文献<sup>[7]</sup>报道及对照品比对, 该碎片与毛蕊花糖苷对照品的裂解规律一致, 推测该化合物为毛蕊花糖苷, 其可能的裂解途径见图 7。

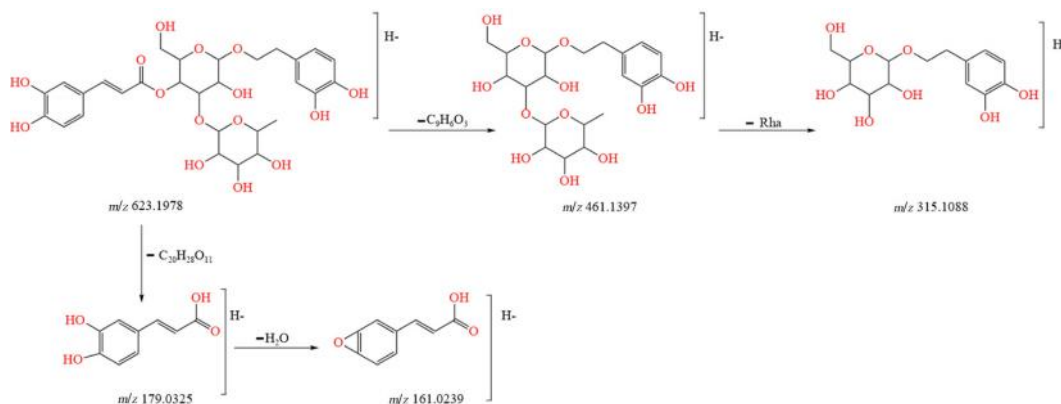


图 7 毛蕊花糖苷可能的质谱裂解途径

Fig 7 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of acteoside

**3.2.5 萜类** 萜类化合物由甲戊二羟酸衍生而来, 其基本结构单元为异戊二烯<sup>[35]</sup>。在 MS 裂解过程中主要表现为脱掉取代基、糖苷键断裂、羟基脱落等。如梓醇、芍药内酯苷、马钱素、地黄苷、丹参新酮、白术内酯Ⅲ、隐丹参酮、白术内酯Ⅱ。以白术内酯Ⅲ为例, 准分子离子峰为  $m/z$  247.1339 [M-H]<sup>-</sup>, 脱掉一分子 H<sub>2</sub>O 后继续脱掉一分子 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> 生成二级碎片离子分别为  $m/z$  229.0993 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> 与  $m/z$  173.0233[M-H-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>-</sup>, 结合文献<sup>[23]</sup>报道及对照品比对, 该碎片与白术内酯Ⅲ对照品的裂解规律一致, 推测该化合物可能为白术内酯Ⅲ, 其可能的裂解途径见图 8。

201.9285 为  $m/z$  247.0938[M + Na]<sup>+</sup> 脱掉一分子 H<sub>2</sub>O 和一分子 CO 生成的, 即  $m/z$  201.9285 [M + Na-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup>, 二级碎片离子  $m/z$  141.9709 为  $m/z$  201.9285 [M + Na-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup> 脱掉一分子 H<sub>2</sub>O 和一分子 C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> 生成的, 即  $m/z$  141.9709[M + Na-H<sub>2</sub>O-CO-H<sub>2</sub>O-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 结合文献<sup>[7]</sup>报道及对照品比对, 该碎片与洋川芎内酯 H 对照品的裂解规律一致, 推测该化合物可能为洋川芎内酯 H, 其可能的裂解途径见图 9。

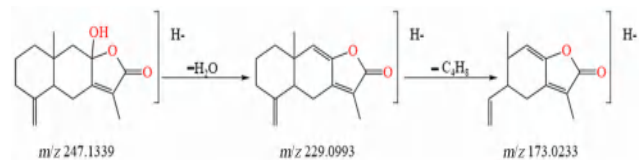


图 8 白术内酯Ⅲ可能的质谱裂解途径

Fig 8 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of atractylolactone III

**3.2.6 其他类** 加味八珍益母膏中还含有苯乙醇(苷)类、酰胺类、苯和取代衍生物等其他类化合物。以洋川芎内酯 H 为例, 准分子离子峰为  $m/z$  247.0938[M + Na]<sup>+</sup>, 其产生的二级碎片离子  $m/z$

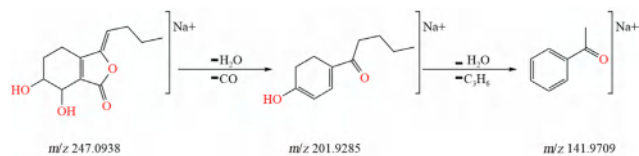


图 9 洋川芎内酯 H 可能的质谱裂解途径

Fig 9 Possible mass spectrometry fragmentation pathway of senkyunolide H

## 4 讨论

本试验通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 建立加味八珍益母膏正、负离子模式下的化学轮廓谱, 对其化学成分进行系统分析, 共鉴定出 140 个化学成分, 其中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、金丝桃苷、阿魏酸、异甘草苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、芹菜素、洋川芎内酯 H、芍药苷、咖啡



酸、肉豆蔻酸、L-苯丙氨酸、丹参素、毛蕊花糖苷、美迪紫檀素、绿原酸 17 种化学成分经过对照品比对,其他成分为结合相关文献分析得到。140 个成分包括有机酸及其衍生物类成分 48 个,黄酮类成分 32 个,生物碱类成分 4 个,糖及糖苷类成分 10 个,萜类成分 19 个,其他类成分 27 个。有机酸及其衍生物类成分在 MS 裂解过程中主要脱掉 H<sub>2</sub>O、CO<sub>2</sub>、CO 等碎片离子。黄酮类成分在 MS 裂解过程中主要丢失中性的 CO 和 H<sub>2</sub>O,其中黄酮苷类化合物则更多的是脱掉糖基。生物碱类成分分子结构紧密,不易裂解,在 MS 裂解过程一般发生在侧链或者取代基上。糖及糖苷类成分在 MS 裂解过程中首先在糖元内部进行裂解,O-糖苷类化合物则通常在糖苷键位置发生裂解。萜类成分在 MS 裂解过程中主要表现为脱掉取代基、糖苷键断裂、羟基脱落。

加味八珍益母膏的主要功效为补气养血、祛瘀调经,临床上常用于治疗女性经期前后及经期疾病,如气血不足或气滞血瘀引起的经期后移、痛经、头痛等疾病<sup>[3]</sup>。加味八珍益母膏中阿魏酸、丹参素、山柰酚-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷、异甘草素、毛蕊花糖苷、苦杏仁苷、苍术酮可以调节体内环氧酶(COX-2)、一氧化氮合成酶、白细胞介素(IL)-12、IL-6 等蛋白与炎症因子的表达,从而发挥抗炎、镇痛的作用<sup>[36-46]</sup>;阿魏酸能够调节子宫催产素水平<sup>[36]</sup>,盐酸益母草碱、盐酸水苏碱具有抗炎的功效,能够调节子宫收缩的频率和张力,调节子宫雌二醇水平<sup>[47-48]</sup>;芍药苷对急性盆腔炎大鼠有明显抗炎作用,可减轻其子宫组织病变<sup>[45]</sup>;苍术酮能够降低醋酸致小鼠扭体反应<sup>[46]</sup>,从而发挥治疗痛经的功效;丹参素、毛蕊花糖苷、梓醇、洋川芎内酯 H 具有抗凝、抗血小板聚集的作用<sup>[37-38, 49-50]</sup>,从而发挥活血补血的作用;丹参素、甘草苷、盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、异甘草苷、阿魏酸、洋川芎内酯 H、毛蕊花糖苷、苍术酮、梓醇具有抗炎镇痛、活血补血等功效。以上成分与加味八珍益母膏补气养血、祛瘀调经、治疗痛经的作用关系紧密,可作为其潜在的质量标志物。

本次研究对加味八珍益母膏的化学成分进行解析,共鉴定出 140 个化合物,其中益母草 27 个,白术(炒)6 个,赤芍 13 个,川芎 21 个,丹参 14 个,当归 14 个,茯苓 2 个,甘草 11 个,红花 18 个,炮姜 11 个,人参 8 个,熟地黄 23 个,桃仁(制)3 个,香附(制)3 个。鉴定出与补气养血、祛瘀调经、治疗痛经功效相关性较大的成

分,可能是加味八珍益母膏质量控制的潜在质量标志物,可为后续加味八珍益母膏的质量控制研究奠定基础。

## 参考文献

- [1] 韩丽颖,王帅,包永睿,等.基于雌激素信号通路传导加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(20):201-208.
- [2] 费菲,詹洪春.向民族医药新梦想进发——中国“满药之都”呼之欲出——2014 第三届满族医药国际论坛现场报道[J].中国医药科学,2014,4(18):1-6.
- [3] 杨艳旭.加味八珍益母汤联合盐酸川芎嗪注射液对妊娠期高血压患者血压控制及母婴结局的影响[J].亚太传统医药,2018,14(7):184-185.
- [4] 叶广华,张发波,何涛,等.中药颗粒制加味八珍益母膏治疗月经后期病临床疗效[J].内蒙古中医药,2021,40(11):28-29.
- [5] 宋珊,郭红丽,康江鹏.HPLC-ESI-MS/MS 同时测定八珍益母丸中 9 种有效成分[J].中草药,2019,50(2):402-407.
- [6] 雷星,王小平,张艳,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 的建昌帮砂仁陈皮制熟地黄适宜炮制时间分析[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(4):134-143.
- [7] 刘佳星,魏洁,武锦春,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(12):1-12.
- [8] 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):1889-1894.
- [9] 王媚,边敏琦,邹俊波,等.UPLC-ESI-MS/MS 法同时测定强力定眩胶囊中的 7 个指标成分[J].化学与生物工程,2020,37(12):63-68.
- [10] 商娟,李雪娇,顾潇,等.HPLC-MS/MS 法同时测定清心滋肾方中 27 种成分[J].中成药,2023,45(6):1774-1780.
- [11] 裴科,宁燕,蔡皓,等.基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 和整合网络药理学的川芎酒制后增强抗脑缺血损伤作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(12):164-173.
- [12] 高雅,王云,郑颖豪,等.基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学方法探讨栀子治疗缺血性脑中风的潜在药效物质及作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(14):119-128.
- [13] 孙卓然,贾丹,陈啸飞,等.基于 UHPLC-QTOF MS 的黄芩汤化学成分和大鼠入血成分分析[J].分析测试学报,2023,42(8):960-967.
- [14] 李曼倩,张晓娟,胡雪雨,等.基于 ESI-Q-TOF MS/MS 技术的姜辣素类成分质谱裂解规律研究[J].质谱学报,2021,42(3):218-227.
- [15] 田萍,马开,梁瑞峰,等.基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的真武汤化学成分分析[J].中药材,2022,45(5):1134-1142.
- [16] 张薇,李楚源,王德勤,等.心脉安的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 定性分析和 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含

- 量测定[J]. 中草药, 2023, 54(6): 1743-1756.
- [17] 常冠华, 薄颖异, 崔洁, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析甘草地上部分主要化学成分[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1449-1459.
- [18] 王力彬, 冯甜, 王芳, 等. 基于 UPLC-Q/Orbitrap/MS/MS 对白虎加人参汤的全成分分析及化学成分鉴定[J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32(2): 198-206.
- [19] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [20] 杨福燕, 许如玲, 钮钰, 等. 经典名方一贯煎标准煎液 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2134-2147.
- [21] 向锋, 周宜, 廖小娟, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的湖南新冠 2 号方的化学成分研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1313-1320.
- [22] 张立国, 黄凯雯, 倪力军, 等. HPLC-MS/MS 法鉴定丹参与紫丹参的水溶性成分[J]. 中成药, 2022, 44(12): 4063-4067.
- [23] 朱赟斐, 谭善忠, 王洪兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3601-3613.
- [24] 杨杰, 李卓伦, 周霖, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 方法的前列欣胶囊化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(14): 3291-3301.
- [25] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究[J]. 中草药, 2021, 52(18): 5496-5513.
- [26] 龙红萍, 易健, 蔺晓源, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术的复方钩藤降压片化学成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(3): 396-403.
- [27] 郑苏楠, 刘玉铃, 吴灏, 等. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的活心丸全成分分析[J]. 中中药学, 2023, 21(4): 924-932.
- [28] 胡萌, 付娟, 胡军华, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 与网络药理学小儿佛苕和中颗粒成分解析及治疗功能性腹痛药效物质基础及机制预测[J]. 药物评价研究, 2023, 46(5): 997-1011.
- [29] 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.
- [30] 倪力军, 诸葛敏, 高丽丽, 等. HPLC-MS/MS 法分析中华常春藤与洋常春藤化学成分[J]. 中成药, 2021, 43(4): 1094-1099.
- [31] 罗益远, 崔明超, 王翰华, 等. UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析浙贝母不同部位化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(15): 1984-1991.
- [32] 刘恃君, 陆玉爱, 李利, 等. 山银花油 GC-MS 及 LC-MS 的全成分表征及体外抗炎和抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(11): 1842-1856.
- [33] 续艳丽, 李晨曦, 杨飞霞, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 938-948.
- [34] 徐静, 崔议方, 汪冰, 等. 川乌与草乌中生物碱类成分的 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 比较分析[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(7): 3285-3295.
- [35] 卢兴美, 钟凌云, 王硕, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 分析不同炮制工艺对地黄化学成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 399-414.
- [36] 赵伟国, 李运景, 李雪芹. 红花黄色素、阿魏酸对痛经模型大鼠催产素受体及加压素受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国临床研究, 2015, 28(2): 151-154.
- [37] 张耀峰. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中医临床研究, 2019, 11(9): 141-142.
- [38] 许红蕾, 王庭芳, 张川. 丹参素及其衍生物药理作用机制和应用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 237-243.
- [39] 焦兵, 许承婷, 黎青, 等. 油茶枯黄酮类化学成分及其体外抗炎活性[J]. 中成药, 2019, 41(2): 327-333.
- [40] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(24): 7680-7692.
- [41] 王文萱, 张云封, 罗扬淦, 等. 血人参中分离的异甘草素对巨噬细胞的影响及其抗炎作用机制研究[J]. 环球中医药, 2022, 15(6): 976-983.
- [42] 乔晶晶, 吴啟南, 薛敏, 等. 益母草化学成分与药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(23): 5691-5704.
- [43] 郭梦环, 甘露, 司婧, 等. 毛蕊花糖苷的药理作用及作用机制研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2119-2125.
- [44] 张德珂, 聂金娥, 钱芳芳. 中药苦杏仁药理作用研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(22): 100-102, 105.
- [45] 陈春, 黄维洁. 芍药苷对急性盆腔炎大鼠子宫组织 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 中国妇幼保健, 2023, 38(5): 892-896.
- [46] 陈天阳, 张萍, 成扬. 苍术酮含量测定方法、燥性及药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(6): 1902-1905.
- [47] 梁博志, 罗建华, 杨冬花, 等. 益母草碱作用及机制研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2017, 39(4): 93-96, 101.
- [48] 秦美蓉, 王平, 王晓炜, 等. 盐酸益母草碱和盐酸水苏碱对大鼠离体子宫收缩的影响[J]. 今日药学, 2013, 23(7): 410-412.
- [49] 马婧, 任越, 赵博文, 等. 基于活血功效靶标的血府逐瘀汤有效成分群辨识研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(23): 6243-6250.
- [50] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.

(收稿日期: 2023-09-02; 修回日期: 2023-11-05)

## 不同基原淫羊藿和巫山淫羊藿药材的化学成分差异研究

田祥木<sup>1</sup>, 李天娇<sup>1, 2, 3</sup>, 李强<sup>4</sup>, 杨欣欣<sup>1, 2, 3</sup>, 王帅<sup>1, 2, 3\*</sup>, 包永睿<sup>1, 2, 3\*</sup>, 孟宪生<sup>1, 2, 3</sup> (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省中药多维分析专业技术创新中心, 辽宁 大连 116600; 3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600; 4. 河北百草康神药业有限公司, 河北 衡水 053800)

**摘要:** **目的** 通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 探讨不同基原淫羊藿和巫山淫羊藿的药材体外化学成分的差异, 为淫羊藿及巫山淫羊藿药材鉴定及质量控制奠定基础。**方法** 采用 Agilent SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇 (+) 及水 - 甲醇 (-) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。质谱采用电喷雾 (ESI) 离子源, 在正、负离子模式下进行数据采集。通过保留时间、相对分子质量及二级碎片离子对巫山淫羊藿、淫羊藿、柔毛淫羊藿、箭叶淫羊藿及朝鲜淫羊藿药材中的化学成分进行鉴定, 并基于所鉴定出的化合物对不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材的化学成分通过 SIMCA 软件进行差异分析。**结果** 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材中共鉴定出朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷等 37 种化学成分, 经过对比发现不同基原的淫羊藿及巫山淫羊藿药材中淫羊藿定 L、2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、木兰花碱等 12 种成分的相对含量具有明显差异, 差异化合物经鉴定主要为黄酮类化合物。**结论** 本试验所发现的差异化合物可以作为区分不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材的指标, 这 5 种药材的鉴别和质量控制奠定基础。

**关键词:** 淫羊藿; UPLC-Q-TOF-MS; 不同基原; 化学成分

**中图分类号:** R282.5, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0368-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.015

## Differences in chemical compositions of different basal herbs of epimedium and Wushan epimedium

TIAN Xiang-mu<sup>1</sup>, LI Tian-jiao<sup>1, 2, 3</sup>, LI Qiang<sup>4</sup>, YANG Xin-xin<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Shuai<sup>1, 2, 3\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1, 2, 3\*</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1, 2, 3</sup> (1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Professional Innovation and Technology Center for Multidimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600; 3. Liaoning Engineering Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine Research, Dalian Liaoning 116600; 4. Hebei Baicao Kang Pharmaceutical Co., Ltd., Hengshui Hebei 053800)

**Abstract: Objective** To determine the differences in chemical compositions of different basal herbs of epimedium and Wushan epimedium by UPLC-Q-TOF-MS, and identify and control the quality epimedium and Wushan epimedium based on their chemical compositions. **Methods** An Agilent SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) column was used with 0.1% formic acid water-methanol (+) and water-methanol (-) as the mobile phases for gradient elution at a flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. The mass spectrometry was performed with an electrospray ionization (ESI) ion source, and the data were collected in both positive and negative ion modes. The chemical components in different basal epimedium and Wushan epimedium herbs were identified via retention time, relative molecular mass and secondary fragment ions. Based on the identified compounds, the chemical compositions in the different basal epimedium and Wushan epimedium herbs were differentially analyzed by SIMCA

**基金项目:** 辽宁省教育厅 2022 年度高校基本科研课题项目 (No.LJKMZ20221318); 辽宁省博士科研启动基金项目 (No.2023-BS-138)。

**作者简介:** 田祥木, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: 2330239240@qq.com \***通信作者:** 包永睿, 男, 博士, 正高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: byr1026@163.com; 王帅, 女, 博士, 高级实验师, 主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究, email: christina8673028@126.com



software. **Results** Totally 37 chemical constituents such as epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin were identified in the different basal epimedium and Wushan epimedium herbs. The relative contents of 12 constituents, such as icariin L, 2'-*O*-rhamnosylcariside II and magnoflorine in the basal epimedium and Wushan epimedium herbs had obvious differences, and the differential compounds were flavonoids mainly. **Conclusion** The compounds found in this experiment can be used as the indicators to distinguishing different basal epimedium and Wushan epimedium, laying a foundation for the identification and quality control of the 5 kinds of epimedium herbs.

**Key words:** epimedium; UPLC-Q-TOF-MS; different basal; chemical composition

2020 年版《中国药典》中收载淫羊藿药材及巫山淫羊藿药材<sup>[1]</sup>, 其中淫羊藿包括 4 种基原植物, 分别为淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai, 巫山淫羊藿基原为巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying。目前该不同基原巫山淫羊藿及淫羊藿为市场上广泛销售的品种。而 5 种药材的产地也有所不同, 淫羊藿主要分布于贵州省; 箭叶淫羊藿主要分布于浙江省、安徽省等地; 柔毛淫羊藿主要分布于湖北省、四川省等地; 朝鲜淫羊藿主要分布于吉林省、辽宁省等地; 巫山淫羊藿主要分布于四川省、贵州省等地。淫羊藿及巫山淫羊藿药材分布的广泛性以及其资源分布的交叉性, 导致了在淫羊藿及巫山淫羊藿药材的使用方面较为混乱。

在功效方面淫羊藿及巫山淫羊藿均为补肾阳、强筋骨、祛风湿, 用于肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛。但在临床药理药效评价中有所不同, 具体表现在改善肾功能指标、抗氧化作用及对血清睾酮的影响等方面<sup>[2]</sup>。药材化学成分的差异可以直接影响其药效的差异。经过文献查阅发现<sup>[3]</sup>, 有文献对不同基原淫羊藿药材的化学成分进行分析, 但其中并未包含巫山淫羊藿, 且质量评价所选定的化合物数量较少, 故本文从淫羊藿及巫山淫羊藿药材的化学成分的数量与相对含量角度, 探讨不同基原药材化学成分的差异, 及快速鉴定巫山淫羊藿及淫羊藿不同基原药材的方法。

本试验以探讨巫山淫羊藿及淫羊藿 5 种不同药材化学成分为目的, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对淫羊藿及巫山淫羊藿药材的化学成分进行鉴定, 通过与对照品比对及相关文献报道, 共鉴定出 37 种化学成分, 并对 5 种药材化学成分鉴定的结果进行对比分析, 通过 SIMCA 数据处理软件对化学成分的相对含量进行统计学分析, 现报

道如下。

## 1 材料

安捷伦 1290 Infinity II 液相色谱仪、安捷伦 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), ME55/02 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。色谱纯甲醇、质谱纯甲醇 (德国默克集团), 质谱甲酸 (赛默飞世尔公司), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

对照品淫羊藿苷 (批号: wkq21042608)、朝霍定 A (批号: wkq21060111)、朝霍定 B (批号: wkq21071613)、朝霍定 C (批号: wkq21031304)、宝霍苷 I (批号: wkq21071508)、宝霍苷 II (批号: wkq21081105)、川陈皮素 (批号: wkq19012502)、新橙皮苷 (批号: wkq21020406)、淫羊藿次苷 I (批号: wkq21071908)、山柰苷 (批号: wkq21072107) (纯度  $\geq 98\%$ , 四川省维克奇生物科技有限公司), 金丝桃苷 (批号: 18090816)、木兰花碱 (批号: 17020802) (纯度  $\geq 98\%$ , 成都普菲德生物技术有限公司), 山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷 (批号: HR232W11)、紫云英苷 (批号: HS16824B1)、淫羊藿素 (批号: HR3508W4)、箭霍苷 B (批号: HS198266B2) (纯度  $\geq 98\%$ , 宝鸡市渭滨区新仪科技仪器经营部)。

巫山淫羊藿与淫羊藿于 2022 年 5 月采自贵州省, 柔毛淫羊藿与箭叶淫羊藿于 2022 年 5 月采自四川省, 朝鲜淫羊藿于 2022 年 5 月采自辽宁省, 经辽宁中医药大学张建奎教授分别鉴定为小檗科淫羊藿属巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 的干燥叶、小檗科淫羊藿属淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶、小檗科淫羊藿属柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 的干燥叶、小檗科淫羊藿属箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 的干燥叶、小檗科淫羊藿属朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

精密称取淫羊藿粉末约 1 g (过 3 号筛), 置

具塞锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,称重,超声提取 30 min,取出,放冷,用甲醇补足失重,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,取续滤液即得供试品溶液。

## 2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量,用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,即得对照品溶液(金丝桃苷、淫羊藿素、淫羊藿苷、朝霍定 B、宝霍苷 I、宝霍苷 II、新橙皮苷、紫云英苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 A、山柰苷、箭霍苷 B、朝霍定 A、朝霍定 C、川陈皮素、木兰花碱、山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷质量浓度分别为 0.103、0.098、0.101、0.104、0.099、0.100、0.097、0.103、0.099、0.101、0.106、0.099、0.109、0.100、0.099、0.104、0.097  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

## 2.3 色谱条件

### 2.3.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), 正离子模式下流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱 (0~30 min, 5%~100%B); 负离子模式下流动相 A 为水, 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱 (0~30 min, 5%~100%B)。两种模式下进样量均为 0.1  $\mu\text{L}$ , 流速为 0.4  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.3.2 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子测定模式, 毛细管电压: 4000 V, 鞘气温度为 350  $^{\circ}\text{C}$ , 干燥气体温度为 250  $^{\circ}\text{C}$ , 鞘气流速为 11  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 干燥气体流速为 13  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 雾化器压力为 45 psi, 碎裂电压为 125 V, 质量范围为 100~1500  $m/z$ ; 负离子测定模式, 除毛细管电压为 3500 V 以外, 其他质谱条件与正离子相同。所得数据采用 MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 软件处理。

## 2.4 测定

取“2.1”项下方法制备的供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件对淫羊藿及巫山淫羊藿不同基原药材进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析。所得样品色谱图见图 1。

## 3 结果

### 3.1 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的淫羊藿药材化学成分鉴定

运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,对淫羊藿及巫山淫羊藿药材的化学成分进行解析,根据各化学成分的保留时间以及质谱碎裂信息等,结合所提取的总离子流图和相关文献报道进行数据对比,指认化学成分。巫山淫羊藿中检测出 37 种化学成分,淫羊藿中检测出 32 种化合物,柔毛淫羊藿中检测出 34 种化合物,箭叶淫羊藿检测出 33 种化合物,朝鲜淫羊藿中检测出 32 种化合物。具体分布情况见表 1。

### 3.2 淫羊藿及巫山淫羊藿药材中部分化合物质谱裂解规律

化合物 1 保留时间为 7.297 min,一级质谱图中得到其准分子离子峰为  $m/z$  151.0398  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 推测其分子式为  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ 。在二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  136.1058  $[\text{M}-\text{H}-\text{O}]^{-}$ ,  $m/z$  108.0212  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^{-}$ 。通过与化合物异香草醛的碎片离子进行比较<sup>[3]</sup>,与化合物异香草醛的质谱碎片一致,推测化合物 1 为异香草醛。化合物 2 保留时间为 8.754 min,一级质谱图中得到其准分子离子峰为  $m/z$  549.1937  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ 。在二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  387.1424  $[\text{M} + \text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^{+}$ ,  $m/z$  297.0818  $[\text{M} + \text{H}-\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_8]^{+}$ 。通过与化合物茂藿苷 A 的碎片离子进行比较<sup>[4]</sup>发现与其质谱碎片一致,推测化合物 2 为茂藿苷 A。化合物 4 保留时间为 11.880 min,一级质谱图中得到其准分子离子峰为  $m/z$  463.0873  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ 。在二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  402.8090  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_3]^{-}$ ,  $m/z$  344.0462  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4]^{-}$ ,  $m/z$  314.0353  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5]^{-}$ ,  $m/z$  301.0299  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^{-}$ ,  $m/z$  271.0225  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6]^{-}$ 。通过与金丝桃苷对照品的碎片离子进行比较发现与其质谱碎片一致,推测化合物 4 为金丝桃苷。化合物 5 保留时间为 11.896 min,一级质谱图中得到准分子离子峰为  $m/z$  579.1697  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ 。二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  271.0599  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_9]^{-}$ ,  $m/z$  151.0034  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{10}]^{-}$ ,  $m/z$  119.0495  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_{13}]^{-}$ 。通过与化合物柚皮苷的碎片离子进行比较<sup>[6]</sup>发现与其质谱碎片一致,推测化合物 5 为柚皮苷。化合物 6 保留时间为 12.310 min,一级质谱图中得到准分子离子峰为  $m/z$  593.1494  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ 。二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  446.0825  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4]^{-}$ ,  $m/z$  299.0178  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_8]^{-}$ ,  $m/z$  271.0225  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_9]^{-}$ 。通过与化合物槲皮素-3,7-二-*O*-鼠李糖苷的碎片离子进行比较<sup>[7]</sup>发现与其质谱碎片一致,推测化合物 6 为槲皮素-3,7-二-*O*-鼠李糖苷。化合物 7 保留时间为 12.641 min,一级质谱图中发现其准分子离子峰为  $m/z$  609.1800  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ 。二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  343.0814  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_8]^{-}$ ,  $m/z$  302.0722  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9]^{-}$ ,  $m/z$  286.0459  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}]^{-}$ 。通过与新橙皮苷对照品的碎片离子进行比较发现与其质谱碎片一致,推测化合物 7 为新橙皮苷。化合

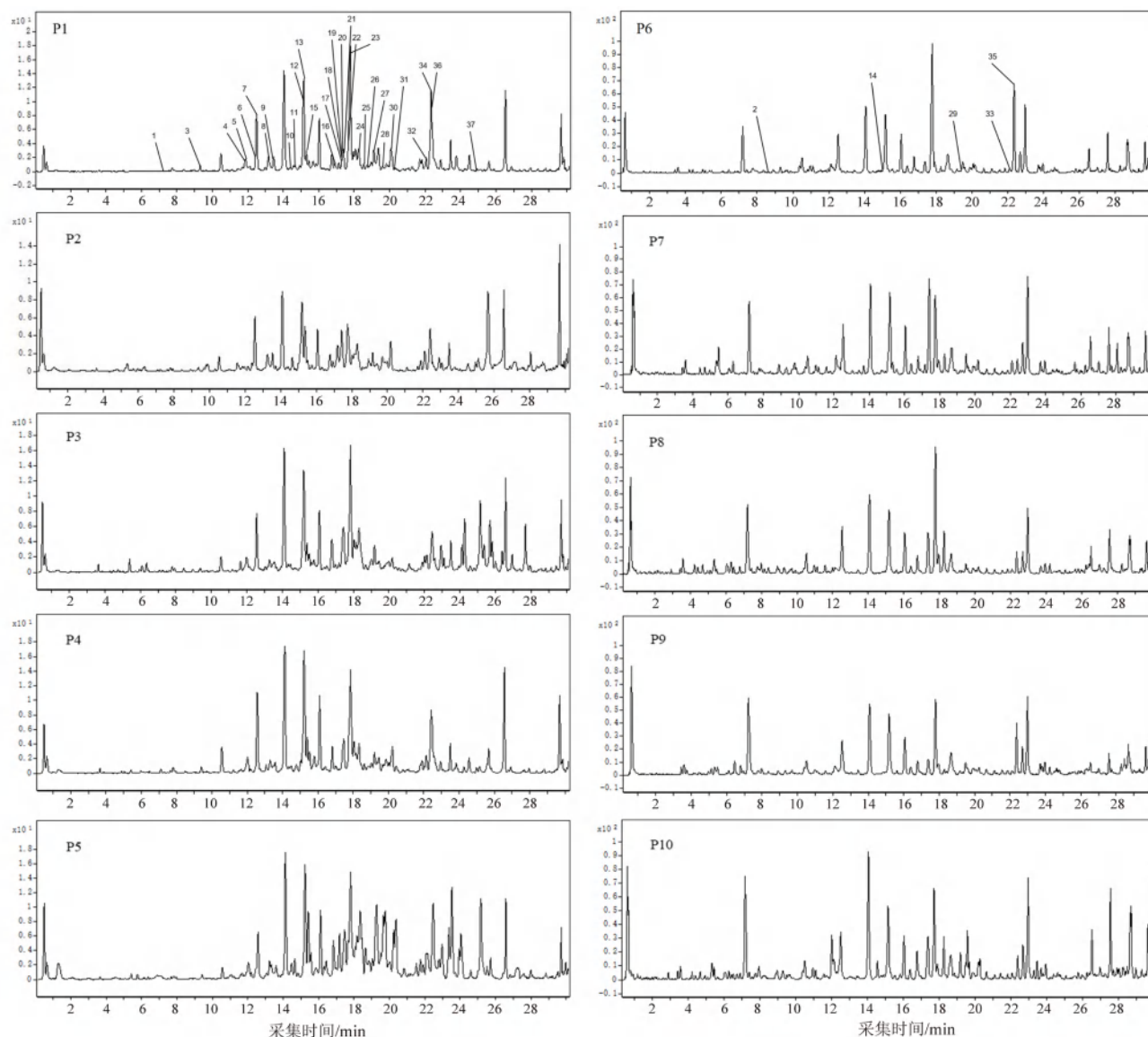


图 1 淫羊藿及巫山淫羊藿药材的质谱图

Fig 1 Mass spectra of different basal herbs of Epimedium and Wushan Epimedium

注:P1 ~ P5 依次为巫山淫羊藿、淫羊藿、柔毛淫羊藿、箭叶淫羊藿、朝鲜淫羊藿的负离子模式图, P6 ~ P10 依次为巫山淫羊藿、淫羊藿、柔毛淫羊藿、箭叶淫羊藿、朝鲜淫羊藿的正离子模式图。

Note: P1 ~ P5 are the negative ion patterns of Wushan Epimedium, Epimedium, Pilose Epimedium, Arrowleaf Epimedium, and Korean Epimedium in turn, and P6 ~ P10 are the positive ion patterns of Wushan Epimedium, Epimedium, pilose Epimedium, Arrowleaf Epimedium, and Korean Epimedium in turn.

物 **8** 保留时间为 13.170 min, 一级质谱图中发现其准分子离子峰为  $m/z$  447.0922  $[M-H]^-$ , 故推测其分子式为  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。二级质谱图中发现碎片离子  $m/z$  301.0311  $[M-H-C_5H_7O_5]^-$ ,  $m/z$  285.0375  $[M-H-C_6H_{11}O_5]^-$ ,  $m/z$  255.0272  $[M-H-C_7H_{13}O_6]^-$ ,  $m/z$  162.9586  $[M-H-C_{13}H_{18}O_7]^-$ ,  $m/z$  123.0105  $[M-H-C_{15}H_{17}O_8]^-$ 。通过与紫云英苷对照品的碎片离子进行比较发现与其的质谱碎片一致, 推测化合物 **8** 为紫云英苷。化合物 **19** 保留时间为 17.340 min, 一级质谱图中发现其准分子离子峰为  $m/z$  837.2788  $[M-H]^-$ , 故推测其分子式为  $C_{39}H_{50}O_{20}$ 。二级质谱

图中发现碎片离子  $m/z$  676.2387  $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ ,  $m/z$  675.2259  $[M-H-C_6H_{11}O_5]^-$ ,  $m/z$  645.2136  $[M-H-C_7H_{13}O_6]^-$ ,  $m/z$  366.1102  $[M-H-C_{18}H_{32}O_{14}]^-$ 。通过与朝霍定 A 对照品的碎片离子进行比较发现与其质谱碎片一致, 推测化合物 **19** 为朝霍定 A。化合物 **26** 保留时间为 18.895 min, 一级质谱图中发现其准分子离子峰为  $m/z$  691.2204  $[M-H]^-$ , 故推测其分子式为  $C_{33}H_{40}O_{16}$ 。二级碎片离子  $m/z$  545.1640  $[M-H-Rha]^-$ ,  $m/z$  529.1692  $[M-H-Glc]^-$ ,  $m/z$  383.1100  $[M-H-Rha-Glc]^-$ ,  $m/z$  368.0911  $[M-H-Rha-Glc-CH_3]^-$ ,  $m/z$  313.0375  $[M-H-Rha-Glc-C_3H_3O]^-$ 。通



表 1 淫羊藿及巫山淫羊藿药材中化学成分鉴定结果

Tab 1 Identification of chemical components in Epimedium and Wushan Epimedium herbs

No.	$t_R$ /min	$m/z$			分子式	碎片离子	化合物	离子模式	来源				
		实际值	理论值	误差 / ( $\times 10^{-6}$ )					a	b	c	d	e
1	7.297	151.0398	151.0401	1.77	$C_8H_8O_3$	136.1058, 108.0212	异香草醛 <sup>[4]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	-
2	8.754	549.1937	549.1967	5.38	$C_{27}H_{32}O_{12}$	387.1424, 297.0818	茂藿苷 A <sup>[5]</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
3	9.226	539.2116	539.2134	3.34	$C_{26}H_{36}O_{12}$	491.1872, 343.1399, 195.0626, 165.0537, 150.0298, 101.0234	淫羊藿次苷 E6 <sup>[6]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
4	11.880	463.0873	463.0882	1.94	$C_{21}H_{20}O_{12}$	402.8090, 344.0462, 314.0353, 301.0299, 271.0225	金丝桃苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
5	11.896	579.1697	579.1719	3.85	$C_{27}H_{32}O_{14}$	271.0599, 151.0034, 119.0495	柚皮苷 <sup>[7]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
6	12.310	593.1494	593.1512	3.02	$C_{27}H_{30}O_{15}$	446.0825, 299.0178, 271.0225	槲皮素-3, 7-二-O-鼠李糖苷 <sup>[8]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
7	12.641	609.1800	609.1825	4.09	$C_{28}H_{34}O_{15}$	343.0814, 302.0722, 286.0459	新橙皮苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	-	+	+	+
8	13.170	447.0922	447.0933	2.43	$C_{21}H_{20}O_{11}$	301.0311, 285.0375, 255.0272, 162.9586, 123.0105	紫云英苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
9	13.468	577.1546	577.1563	2.91	$C_{27}H_{30}O_{14}$	432.0982, 431.0930, 344.8945, 286.0411	山柰苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
10	14.362	677.2056	677.2087	4.59	$C_{32}H_{38}O_{16}$	661.4849, 515.1514, 353.1005	大花淫羊藿苷 B <sup>[9]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
11	14.610	431.0975	431.0984	2.02	$C_{21}H_{20}O_{10}$	284.0314, 255.0289, 227.0362	山柰酚-3-O-鼠李糖苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
12	15.040	823.2632	823.2666	4.15	$C_{38}H_{48}O_{20}$	703.2264, 661.2107, 352.0950	柔藿苷 <sup>[8]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
13	15.087	631.2008	631.2032	3.85	$C_{31}H_{36}O_{14}$	501.1644, 355.1188, 341.0651, 299.0571	大花淫羊藿苷 F <sup>[6]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
14	15.090	517.1708	517.1704	-0.70	$C_{26}H_{28}O_{11}$	355.1142, 299.0525	淫羊藿属苷 C <sup>[5]</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
15	15.305	661.2110	661.2138	4.23	$C_{32}H_{38}O_{15}$	353.1000, 351.0825, 323.0915, 514.1451	淫羊藿新苷 A <sup>[10]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
16	16.926	269.0448	269.0455	2.78	$C_{15}H_{10}O_5$	225.0523	大黄素 <sup>[7]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
17	17.307	675.2270	675.2294	3.62	$C_{33}H_{40}O_{15}$	495.0269, 367.1117, 116.9284	淫羊藿苷 <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
18	17.323	675.2276	675.2294	2.73	$C_{33}H_{40}O_{15}$	352.0899, 367.1185, 323.0968, 657.2132, 513.1766	宝藿苷 VII <sup>[8]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
19	17.340	837.2788	837.2823	4.14	$C_{39}H_{50}O_{20}$	676.2387, 675.2259, 645.2136, 366.1102, 146.9640, 96.9663, 61.9878	朝藿定 A <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
20	17.389	807.2683	807.2717	4.22	$C_{38}H_{48}O_{19}$	646.2173, 211.9975, 146.9640, 115.9187	朝藿定 B <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
21	17.555	819.2672	819.2717	5.50	$C_{39}H_{48}O_{19}$	367.1179, 352.0932, 309.0371, 529.1715, 657.2172	3'''-Carbonyl-2''-β-L-quinovosyl-Rha <sup>[11-12]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
22	17.704	1373.4402	1373.4388	-1.04	$C_{40}H_{33}O_9$	513.1759, 367.1212	2''-鼠李糖基淫羊藿次苷 II <sup>[9]</sup>	[2M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	+	-	-	-	-
23	17.770	821.2842	821.2874	3.84	$C_{39}H_{50}O_{19}$	660.2333, 216.9274, 146.9643, 96.9665	朝藿定 C <sup>*</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
24	18.399	401.1854	401.1844	-2.53	$C_{20}H_{24}NO_4$	322.8452, 281.0007, 216.9248, 154.9263, 96.9681	木兰花碱 <sup>*</sup>	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	+	+	-	+	+
25	18.581	717.2375	717.2400	3.50	$C_{35}H_{42}O_{16}$	531.1874, 369.1180, 313.0704	箭藿苷 C <sup>[6]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
26	18.895	691.2204	691.2244	5.73	$C_{33}H_{40}O_{16}$	383.1100, 368.0911, 313.0375, 545.1640, 529.1692	sagittasine C <sup>[8, 11]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
27	19.193	921.2978	921.3034	6.08	$C_{43}H_{54}O_{22}$	921.5606, 759.3390, 661.2332	epimedokoreanoside 或其异构体 <sup>[9]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	-	+	-	+
28	19.689	963.3081	963.3140	6.08	$C_{45}H_{56}O_{23}$	367.1195, 323.0942, 801.2624, 759.2483, 267.0215	淫羊藿定 L <sup>[12]</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	+	-	+	-	+
29	19.938	425.1206	425.1207	0.21	$C_{21}H_{22}O_8$	410.0942, 395.0698	川陈皮素 <sup>*</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	+	+	+	+	-

续表 1

No.	$t_R/\text{min}$	$m/z$			分子式	碎片离子	化合物	离子模式	来源				
		实际值	理论值	误差 / ( $\times 10^{-6}$ )					a	b	c	d	e
30	20.120	499.1592	499.1610	3.35	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$	353.0999, 309.0375, 281.0428	宝藜苣 II <sup>*</sup>	$[\text{M}-\text{H}]^-$	+	+	+	+	+
31	20.136	529.1692	529.1715	4.41	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$	493.0063, 473.0154, 368.1193, 353.1005	淫羊藜次苣 I <sup>*</sup>	$[\text{M}-\text{H}]^-$	+	+	+	+	+
32	22.072	645.2163	645.2189	4.00	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{14}$	496.1675, 367.1149, 116.9283	箭藜苣 B <sup>*</sup>	$[\text{M}-\text{H}]^-$	+	+	+	+	+
33	22.237	683.2317	683.2310	-0.98	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{14}$	515.1952, 369.1317, 313.0648	2"-O-鼠李糖基淫羊藜次苣 II <sup>[6, 12]</sup>	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	+	+	+	+	+
34	22.342	925.3051	925.2983	-7.34	$\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{O}_{21}$	367.1184, 352.0904, 717.2381, 323.0932, 309.0313	朝藜定 I <sup>[10]</sup>	$[\text{M}+\text{COOH}]^-$	+	-	+	+	+
35	22.354	369.1340	369.1330	-3.08	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	313.0691, 298.0478, 215.0713	淫羊藜素 <sup>*</sup>	$[\text{M}+\text{H}]^+$	+	+	+	+	+
36	22.403	513.1757	513.1766	1.79	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$	486.1852, 445.1077, 367.1118, 324.0931, 217.0484	宝藜苣 I <sup>*</sup>	$[\text{M}-\text{H}]^-$	+	+	+	+	+
37	25.067	720.2287	720.2271	-2.22	$\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{O}_{15}$	661.7224, 515.0933, 513.1798, 353.1012	icarisoside B <sup>[9]</sup>	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	+	+	-	-	-

注 (Note): “\*” 表示该化合物经过对照品比对 (“\*” indicates that the compound was confirmed with reference); “+” 表示该化合物在药材中被检测到, “-” 表示该化合物在药材中未被检测到 (“+” in the source of the compound indicates that the compound was detected in the material and “-” indicates that the compound was not detected in the material); a. 巫山淫羊 (Wushan epimedium); b. 淫羊藜 (epimedium); c. 柔毛淫羊藜 (Pilose epimedium); d. 箭叶淫羊藜 (Arrowleaf epimedium); e. 朝鲜淫羊藜 (Korean epimedium)。

过与化合物 sagittasine C 的碎片离子进行比较<sup>[7, 11]</sup>发现与其的质谱碎片一致, 推测化合物 26 为 sagittasine C。化合物 30 保留时间为 20.120 min, 一级质谱图中发现其准分子离子峰为  $m/z$  499.1592  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$ 。二级碎片离子  $m/z$  353.0999  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4]^-$ ,  $m/z$  309.0375  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4]^-$ ,  $m/z$  281.0428  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_5]^-$ 。通过与宝藜苣 II 对照品的碎片离子进行比较发现与其质谱碎片一致, 推测化合物 30 为宝藜苣 II。化合物 36 保留时间为 22.403 min, 一级质谱图中发现其分子离子峰为  $m/z$  513.1757  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 故推测其分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$ 。二级碎片离子  $m/z$  486.1852  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^-$ ,  $m/z$  445.1077  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_9]^-$ ,  $m/z$  367.1118  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_3]^-$ ,  $m/z$  324.0931  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_4]^-$ ,  $m/z$  217.0484  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_6]^-$ 。通过与宝藜苣 I 对照品的碎片离子进行比较发现与其的质谱碎片一致, 推测化合物 36 为宝藜苣 I。

### 3.3 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

取“2.1”项下方法制备的供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件对不同基原淫羊藜及巫山淫羊藜药材进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 结合淫羊藜中所含化学成分, 将所有成分在淫羊藜及巫山淫羊藜药材中相对含量进行统计, 并将数据导入 SIMCA 软件进行 OPLS-DA 分析。图 2A 的 OPLS-DA 结果表明不同基原淫羊藜及巫山淫羊藜药材可以明显区分, 存在组间差异。为了

更加直观地观察组间差异, 本研究采用有监督的 OPLS-DA 分析方法, 筛选淫羊藜及巫山淫羊藜 5 种药材的差异化化合物。由 OPLS-DA 结果可知,  $R^2X(\text{cum}) = 0.974$ ,  $R^2Y(\text{cum}) = 0.956$ ,  $Q^2(\text{cum}) = 0.853$ , 表明模型的解释度及预测度良好。根据变量重要投影 (VIP) 筛选出差异化化合物, 其中 VIP 值越大表明该化合物对分类的贡献越大, 当 VIP 值  $> 1$  时, 表示该变量对分类起到关键性作用。本研究 VIP 值如图 2C 所示, 从图中可以发现  $\text{VIP} > 1$  的化合物由大到小依次为淫羊藜定 L、2"-鼠李糖基淫羊藜次苣 II、木兰花碱、新橙皮苷、紫云英苷、epimedokoreanoside 或其异构体、宝藜苣 I、山柰苷、大黄素、朝藜定 I、淫羊藜苷、朝藜定 A 共 12 种成分。同时为了验证 OPLS-DA 模型的有效性, 进行了 200 轮置换测试。如图 2B 所示, 左侧所有蓝色  $Q^2$  值均低于右侧原点, 且  $Q^2$  蓝色回归线与垂直轴在零点或以下相交, 表示该模型是可靠的。

### 4 讨论

经过相关文献报道<sup>[13]</sup>, 黄酮类成分为淫羊藜药材中主要的活性成分, 故本研究以黄酮类成分为主进行淫羊藜药材化学成分差异性研究。通过对不同基原淫羊藜及巫山淫羊藜药材的化学成分进行分析鉴定, 共鉴定出 37 种化合物, 其中共同含有的化学成分包括宝藜苣 I、淫羊藜素、宝藜苣 I、淫羊藜次苣 I、sagittasine C、箭藜苣

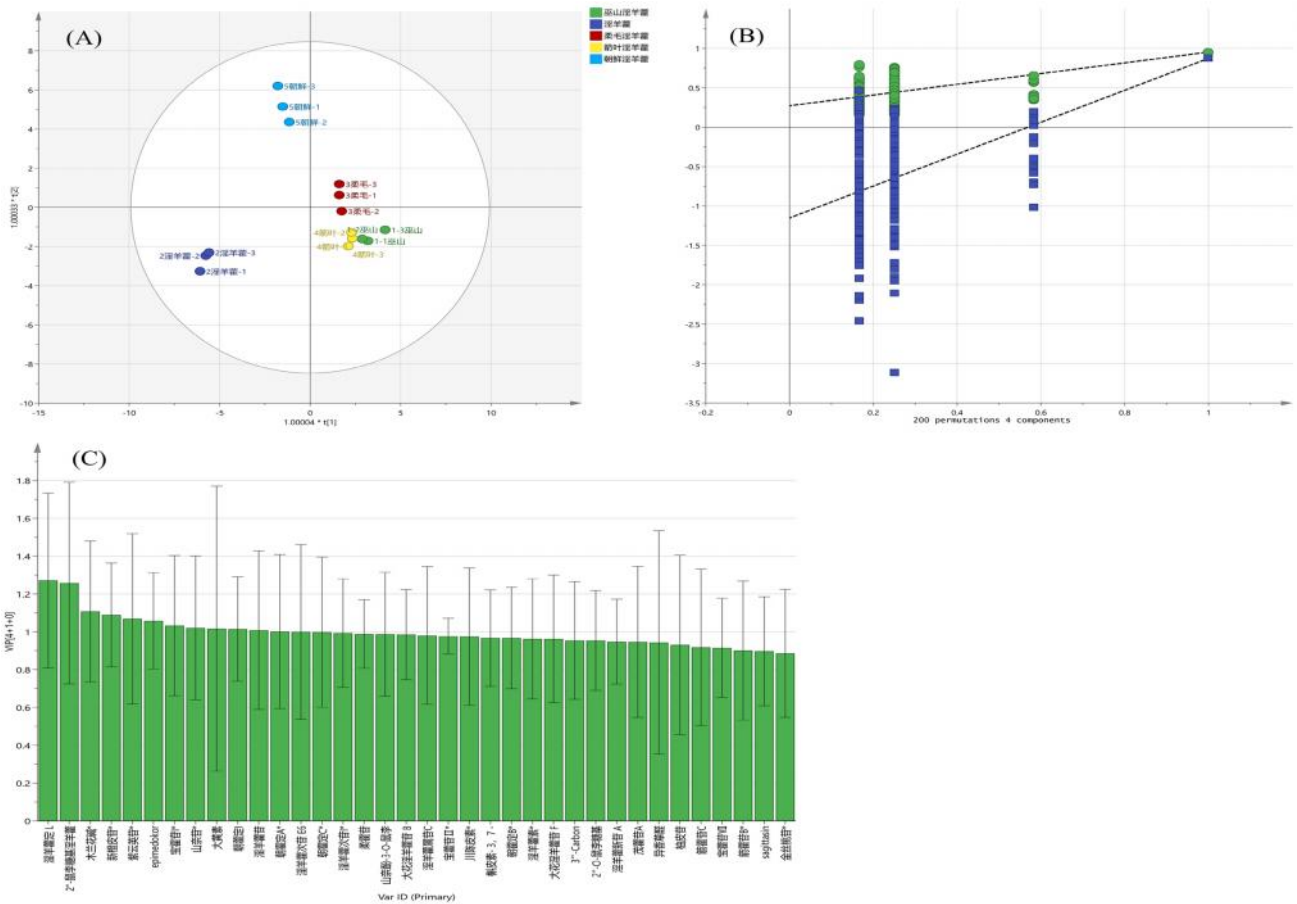


图 2 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材 OPLS-DA 分析结果

Fig 2 OPLS-DA analysis of different basal herbs of different basal epimedium and Wushan epimedium

C、朝霍定 A、朝霍定 B、朝霍定 C、宝霍苷 VII、淫羊藿苷、大黄素、淫羊藿新苷 A、淫羊藿属苷 C、大花淫羊藿苷 F 等共 28 种。其他化学成分并未广泛分布于各药材中，具体表现为淫羊藿中未检测到新橙皮苷、2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、epimedokoreanoside 或其异构体、淫羊藿定 L、朝霍定 I 5 种化合物；柔毛淫羊藿中不含有 2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、木兰花碱及 icarisoside B 3 种化合物；箭叶淫羊藿中不含有 2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、epimedokoreanoside 或其异构体、淫羊藿定 L 及 icarisoside B 4 种化合物；朝鲜淫羊藿中不含有异香草醛、2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、epimedokoreanoside 或其异构体、川陈皮素及 icarisoside B 5 种化合物；而巫山淫羊藿中包含了上述全部 37 种化合物。在 OPLS-DA 分析，我们所发现的 VIP > 1 的 12 个成分包括淫羊藿定 L、2"-鼠李糖基淫羊藿次苷 II、木兰花碱、新橙皮苷、紫云英苷、epimedokoreanoside 或其异构体、宝霍苷 I、山柰苷、大黄素、朝霍定 I、淫羊藿苷、朝霍定 A 可以作为区分不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的药材的指标性成分。

中医理论认为，淫羊藿能够温补肾阳、祛风湿、强筋骨。现代药理学研究表明，淫羊藿具有促进生殖系统、抗骨质疏松、抗肿瘤及抗动脉粥样硬化等作用<sup>[14-15]</sup>。Zhang 等<sup>[16]</sup>的相关研究结果表明，淫羊藿苷可以通过增加睾丸、附睾的重量、指数等方式来减弱全氟辛酸磺酸（PFOS）诱导所引发的睾丸毒性；同时也可以通过减轻 Sertoli 细胞的连接损伤来改善 PFOS 诱导的血液睾丸屏障的破坏；Meng 等<sup>[17]</sup>的研究结果表明，在淫羊藿粗提物中，正丁醇及乙醇部分可以对成骨细胞 UMR-106 有刺激增殖活性，其中淫羊藿苷、朝霍定 B 及朝霍定 C 3 种成分可以明显促进成骨细胞 UMR-106 的增殖。Hu 等<sup>[18]</sup>的研究结果表明，淫羊藿苷可以减轻异丙肾上腺素诱导的 H9c2 或者 NRCM 心肌细胞肥大。Li 等<sup>[19]</sup>的研究结果表明，淫羊藿苷可以通过 MDM2-p53 途径下调甲胎蛋白对肝癌细胞起到抑制作用。Tao 等<sup>[20]</sup>通过实验验证了淫羊藿素对人类髓源性抑制细胞（MDSCs）的抑制作用。结合淫羊藿药材的有效化学成分，淫羊藿中的淫羊藿苷、淫羊藿素、朝霍定 B 等成分，可以作为控制淫羊藿药材药效的指标性化学



成分。本研究发现,淫羊藿苷在柔毛淫羊藿中相对含量最高,其次为朝鲜淫羊藿,淫羊藿中所含最少;淫羊藿素在巫山淫羊藿中含量最高,其次为箭叶淫羊藿,柔毛淫羊藿中含量最少;朝霍定 B 在心叶淫羊藿中含量最高,其次为柔毛淫羊藿,巫山淫羊藿中含量最少。查阅相关文献报道<sup>[2]</sup>,对淫羊藿、箭叶淫羊藿及朝鲜淫羊藿 3 种不同基原淫羊藿药材的药效差异性进行对比分析发现,不同基原淫羊藿药材对不同指标方面的药效程度有所不同,如在肾功能指标改善作用方面,淫羊藿及朝鲜淫羊藿效果显著,但箭叶淫羊藿作用不明显;在抗氧化作用方面,淫羊藿及箭叶淫羊藿效果显著,但朝鲜淫羊藿效果不明显等。结合本试验研究结果,不同淫羊藿药材的化学成分差异可以直接影响其药效的差异。

通过本实验对不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的药材中所鉴定出成分的相对含量进行测定,结合相关文献,并通过数据分析软件初步探讨不同基原药材化学成分的差异性。由于淫羊藿药材分布的广泛性及其基原的复杂性,后续将继续收集多批次不同产地、不同基原的淫羊藿药材进一步验证,深入研究药材功效与化学成分之间的关系,为不同基原淫羊藿药材的鉴定、质量控制及临床上合理用药奠定基础。

## 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 174, 340-342.
- [2] 胡浩武,高羽,周青罡,等.不同基原淫羊藿补肾壮阳相关药效学比较研究[J].江西中医药,2022,53(8): 59-68.
- [3] 许婷,黄萌萌,李瑞云,等.多基原淫羊藿不同部位质量评价研究[J].中草药,2020,51(1): 190-196.
- [4] 董世奇,赵鹿,张东旭,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J].中国中药杂志,2022,47(6): 1546-1557.
- [5] 秦伟瀚,阳勇,李卿,等.基于高分辨质谱法的淫羊藿特征药效黄酮质谱裂解规律及新化合物鉴定研究[J].天然产物研究与开发,2021,33(9): 1478-1490.
- [6] 马文娟,姚广哲,贾琪,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分[J].中药材,2019,42(7): 1554-1559.
- [7] 张建伟,刘伟,沈沁,等.基于 UPLC-Q-Orbitrap-MS 的鹿角方化学成分及组织分布分析[J/OL].中国实验方剂学杂志,doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20240168.
- [8] 于雪娥,秦建平,李家春,等.基于 UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术快速分析淫羊藿总黄酮胶囊中的化学成分[J].中国中药杂志,2016,41(24): 4587-4597.
- [9] 王媛,袁磊,李遇伯,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 的淫羊藿化学成分分析[J].中草药,2017,48(13): 2625-2631.
- [10] 曾浏希,黎雄,王东,等.UHPLC-Q Exactive 高分辨质谱联用法分析淫羊藿中的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2023,40(5): 581-592,662.
- [11] 周茗,郑伟,郭宝林,等.基于 UHPLC-PDA-Q-TOF/MS<sup>E</sup> 技术的栽培淫羊藿质量研究[J].药科学报,2020,55(5): 995-1003.
- [12] Bae JY, Avula B, Zhao JP, et al. Analysis of prenylflavonoids from aerial parts of *Epimedium grandiflorum* and dietary supplements using HPTLC, UHPLC-PDA and UHPLC-QToF along with chemometric tools to differentiate *Epimedium* species [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 177: 112843.
- [13] 蒋俊,崔莉,孙娥,等.基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础[J].中草药,2014,45(5): 721-729.
- [14] Ma HP, He XR, Yang Y, et al. The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 519-41.
- [15] Cho JH, Jung JY, Lee BJ, et al. *Epimedium* herba: a promising herbal medicine for neuroplasticity [J]. Phytother Res, 2017, 31(6): 838-848.
- [16] Zhang Y, Wu XP, Zhu KL, et al. Icaritin attenuates perfluorooctane sulfonate induced testicular toxicity by alleviating Sertoli cell injury and downregulating the p38MAPK/MMP9 pathway [J]. Food Funct, 2022, 13(6): 3674-3689.
- [17] Meng FH, Li YB, Xiong ZL, et al. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim [J]. Phytomedicine, 2005, 12(3): 189-193.
- [18] Hu L, Wang ZY, Li H, et al. Icaritin inhibits isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophic injury through activating autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 593: 65-72.
- [19] Li H, Liu YJ, Jiang W, et al. Icaritin promotes apoptosis and inhibits proliferation by down-regulating AFP gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 318.
- [20] Tao HM, Liu MY, Wang Y, et al. Icaritin induces anti-tumor immune responses in hepatocellular carcinoma by inhibiting splenic myeloid-derived suppressor cell generation [J]. Front Immunol, 2021, 12: 609295.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2023-11-23)

## 红花注射液生物活性测定法的建立与评价研究

刘金辉<sup>1</sup>, 梁耀月<sup>3</sup>, 田颖颖<sup>1</sup>, 赵新月<sup>1</sup>, 李依林<sup>1</sup>, 吕英楠<sup>1</sup>, 刘闯<sup>1</sup>, 左泽平<sup>2\*</sup>, 王志斌<sup>1, 2\*</sup> (1.北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2.北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079; 3.康龙化成(北京)生物技术有限公司, 北京 100176)

**摘要:** **目的** 基于红花注射液具有抗血小板聚集作用, 建立红花注射液生物活性测定方法, 优化红花注射液质量控制模式。**方法** 通过红花注射液体外抗血小板聚集活性建立试验系, 对诱导剂的种类、血小板的数量及不同的剂间比都做了对比, 进行量效学关系考察并定义效价, 采用量反应平行线(3.3)法进行实验设计及计算效价, 建立红花注射液生物活性测定法并验证其可行性。**结果** 选择二磷酸腺苷作为血小板聚集诱导剂, 血小板的数量选用  $500 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$ 。通过量效关系考察, 发现红花注射液在剂间比为 1 : 0.5, 在 25% ~ 100% 与测定值线性良好, 并测定了 4 个厂家 8 个批次红花注射液的效价, 验证了方法的适用性。**结论** 本方法结果可靠且重复性和中间精密度良好, 通过效价测定量化了红花注射液抑制血小板聚集活性以评价不同批次红花注射液质量, 在现行的红花注射液质量控制的模式上进行补充, 对全面控制红花注射液的质量具有重大意义。

**关键词:** 生物活性测定; 红花注射液; 血小板聚集; 质量控制

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0376-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.016

### Establishment and evaluation of a bioactivity assay for Safflower injection

LIU Jin-hui<sup>1</sup>, LIANG Yao-yue<sup>3</sup>, TIAN Ying-ying<sup>1</sup>, ZHAO Xin-yue<sup>1</sup>, LI Yi-lin<sup>1</sup>, LYU Ying-nan<sup>1</sup>, LIU Chuang<sup>1</sup>, ZUO Ze-ping<sup>2\*</sup>, WANG Zhi-bin<sup>1, 2\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Institute of Scientific Research, Beijing Tong Ren Tang Chinese Medicine Co., Ltd., Beijing 100079; 3. Pharmaron Beijing Co., Ltd., Beijing 100176)

**Abstract: Objective** To determine the biological activity of Safflower injection, via the anti-platelet aggregation effect of Safflower injection, and to optimize the quality control of Safflower injection.

**Methods** In vitro antiplatelet aggregation of Safflower injection was used to establish a test line. The type of inducer, number of platelets and different inter-agent ratios were compared, the quantitative relationship was examined and the potency was defined, and the experiment was designed and potency calculated by the quantitative response parallel (3.3). The bioactivity assay of Safflower injection was established and feasibility verified. **Results** Adenosine diphosphate was selected as the platelet aggregation inducer, and the platelet count was chosen to be  $500 \times 10^9$  platelets  $\cdot L^{-1}$ . By examining the quantitative and qualitative relationship, the linearity of Safflower injection was found good at the inter-agent ratio of 1 : 0.5, and the linearity was good at 25% ~ 100%. The potency of eight batches of Safflower injection from four manufacturers was determined, and the applicability of the method verified. **Conclusion** The bioactivity assay is "potent" with good repeatability and intermediate precision. The method quantifies the platelet aggregation inhibiting activity of Safflower injection and evaluates the quality of different batches of Safflower injection through potency determination, which is complementary to the current quality control

基金项目: 国家药典委员会项目(No.12); 国家科技重大专项(No.2018ZX09201-011)。

作者简介: 刘金辉, 男, 硕士研究生, 主要从事中药生物活性测定研究, email: 18810629532@163.com \*通信作者: 左泽平, 女, 主管药师, 主要从事中药生物活性研究, email: zepingzuo@126.com; 王志斌, 男, 教授, 主要从事中药质量控制标准及生物活性测定研究, email: wangzhibin4804@126.com

model essential for the comprehensive quality control of Safflower injection.

**Key words:** determination of biological activity; Safflower injection; platelet aggregation; quality control

质量的稳定可控是确保中药安全有效的前提<sup>[1]</sup>。目前, 中药质量控制手段仍以化学手段检测指标性成分为主<sup>[2]</sup>。然而, 中药疗效涉及多个代谢和信号途径, 由多组分、多靶点、多环节共同发挥作用<sup>[3-6]</sup>。中药的药效是综合生物效应的体现, 中药注射剂更是如此, 进入体内后发挥药效物质众多, 单一的化学成分控制并不能全面反映药效, 现有的中药质控模式并不能完全保证中药的有效性。因此, 亟须建立一种能够体现临床疗效的质控新模式, 通过量化中药有效性反应并从整体控制中药的质量。近年来, 生物活性测定已经引起广泛关注和认可<sup>[7]</sup>, 该方法从中药临床疗效的角度反映其质量, 可用于有效成分不清、组分繁多、结构复杂、常规方法不能有效鉴定, 但具有明确的生物活性的中药的评估。

红花注射液有显著的抗血栓作用, 部颁标准中红花注射液是以羟基红花黄色素 A、总黄酮(以山柰酚计)来评价其质量是否合格。已有研究对红花注射液中的化学成分进行全面表征, 并研究其进入体内后的代谢产物, 结果发现除指标性成分外, 还有其他具有抗血小板聚集的成分及其代谢产物<sup>[8-9]</sup>, 由此可见, 仅仅依赖这些指标性成分难以表征其有效性。所以, 本研究以抗血小板聚集作用为红花注射液生物活性测定的指标, 在现有的红花注射液质量控制的模式上作为补充方法, 并通过试验系、量效关系及方法学研究建立红花注射液生物活性测定方法, 为其生物活性测定奠定了基础, 推动更加全面的红花注射液的质量控制, 本研究对于补充优化红花注射液的质量控制方法具有重要意义。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级日本大耳白兔, 1.8 ~ 2.2 kg [北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号为 SCXK(京)2019-0006, 合格证号为 1103231911000416]。

### 1.2 试药

生理盐水(石家庄四药有限公司, 批号: 1809013205), 血小板聚集功能检测试剂盒[花生四烯酸(AA)激活的比浊法, 批号: 401034]、血小板聚集功能检测试剂盒[二磷酸腺苷(ADP)激活的比浊法, 批号: 20190109B]、一次性测试杯、AG 400 半自动血小板聚集仪(山东泰利康信生物科技有限公司), 全自动血液分析仪(ADVIA

2120I 西门子股份公司), 红花注射液标准品(雅安三九药业有限公司, 批号: 19030100504); 红花注射液供试品共 4 个厂家 9 个批次, 详见表 1。

表 1 红花注射液供试品厂家批号信息  
Tab 1 Batch number of test material manufacturers of Safflower injection

生产厂家	编号	批号
A	SJ	19040101001
	SJ1	19040102005
	SJ2	19040202002
	SJ3	19040302005
B	LZ1	19081611
	LZ2	19063011
	LZ3	19050911
C	SW	181123C1
D	SY	1031805172

## 2 方法与结果

### 2.1 血浆制备

采取家兔颈总动脉血, 加 3.2% 枸橼酸钠抗凝(采血量: 抗凝剂 = 9 : 1), 160 g 离心 10 min, 吸取上层富血小板血浆 (PRP), 剩余血样以 3500 g 离心 10 min, 吸取贫血小板血浆 (PPP)。用全自动血液分析仪测定 PRP 和 PPP 中的初始血小板数量。后续实验用 PPP 稀释调整 PRP 数量。

### 2.2 血小板聚集率测定

取 PPP 290  $\mu\text{L}$ , 添加生理盐水 10  $\mu\text{L}$ , 依次添加不同含量的样品液 10  $\mu\text{L}$ , 用其进行仪器调零。再取 PRP 290  $\mu\text{L}$ , 依次添加不同含量的样品液 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 180 s, 并加入适量体积的血小板凝聚为诱导剂, 读取在 300 s 内的最大凝聚量, 得出聚集曲线。血小板测定在采血后 4 h 内完成。

### 2.3 试验系考察

**2.3.1 红花注射液对不同诱导剂致血小板聚集作用的影响** 将 ADP 配制成 600  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 在血小板聚集试验中 ADP 终浓度分别为 20、10、5、2.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 AA 配制成 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 在血小板聚集试验中 AA 终质量浓度为 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照“2.2”项下血小板聚集率测定方法, 考察不同诱导剂对血小板聚集作用的影响, 结果如表 2 所示, 与正常对照组相比, 红花注射液对 ADP 和 AA 致家兔体外血小板聚集均有明显的抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 红花注射液对 ADP 致血小板聚集具有更为显著的抑制作用, 因此选取 ADP 作为血小板聚集诱导剂。



表 2 红花注射液对不同诱导剂致家兔体外血小板聚集作用的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Tab 2 Effect of Safflower injection on the platelet aggregation in rabbits in vitro caused by different inducers ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	ADP		AA	
	血小板聚集率 / %	抑制率 / %	血小板聚集率 / %	抑制率 / %
正常对照组	43.92 ± 2.23	—	76.19 ± 4.49	—
红花注射液	16.96 ± 2.33**	61.38	59.16 ± 2.71**	22.35

注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

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

**2.3.2 血小板数量和诱导剂 ADP 浓度对家兔体外血小板聚集率的影响** 将不同数量血小板 ( $100 \times 10^9$ 、 $200 \times 10^9$ 、 $300 \times 10^9$ 、 $400 \times 10^9$ 、 $500 \times 10^9$ 、 $600 \times 10^9$ 、 $700 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$ ) 加入不同浓度的血小板激动剂 ADP ( $20$ 、 $10$ 、 $5$ 、 $2.5 \mu mol \cdot L^{-1}$ )，所得到的血小板聚集率结果见图 1。从图 1 可以看出，当 ADP 浓度为  $10 \mu mol \cdot L^{-1}$  时，血小板数量大于  $300 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  时，血小板聚集率达到平台期；但血小板数量在  $700 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  时，血小板聚集率稍有下降。当 ADP 浓度为  $5 \mu mol \cdot L^{-1}$  时，血小板数量大于  $400 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$  时，血小板聚集率达到平台期，且血小板聚集率曲线波动变化平缓，因此选用 ADP 浓度为  $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 。为后期避免加入药液体积和 ADP 的体积对血小板数量的影响，因此选用血小板的数量为  $500 \times 10^9$  个  $\cdot L^{-1}$ 。

**2.4 剂间比考察**

按照生物活性测定法中量反应平行线测定法对于标准品与供试品的高低剂间比例的要求

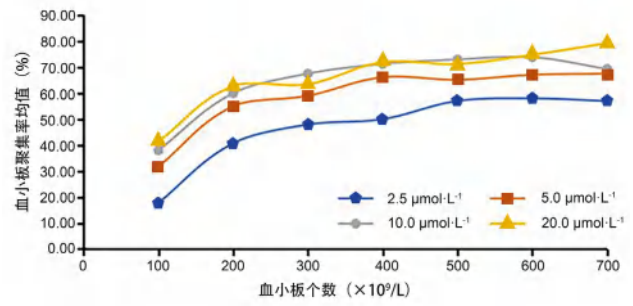


图 1 血小板数量和诱导剂 ADP 浓度对血小板聚集率的影响

Fig 1 Effect of platelet count and inducer ADP concentration on platelet aggregation rate

( $1 : 0.8$ ) ~ ( $1 : 0.5$ )，红花注射液标准品分别按剂间比  $1 : 0.8$ 、 $1 : 0.7$ 、 $1 : 0.6$ 、 $1 : 0.5$  进行配制，用生理盐水分别稀释成浓度为  $80.0\%$ 、 $64.0\%$ 、 $51.2\%$ 、 $41.0\%$ 、 $32.8\%$ 、 $26.2\%$ 、 $21.0\%$ 、 $16.8\%$ 、 $13.4\%$ 、 $10.7\%$ 、 $8.6\%$  (剂间比  $1 : 0.8$ )； $70.0\%$ 、 $49.0\%$ 、 $34.3\%$ 、 $24.0\%$ 、 $16.8\%$ 、 $11.8\%$ 、 $8.2\%$  (剂间比  $1 : 0.7$ )； $60.0\%$ 、 $36.0\%$ 、 $21.6\%$ 、 $13.0\%$ 、 $7.8\%$  (剂间比  $1 : 0.6$ )； $50.0\%$ 、 $25.0\%$ 、 $12.5\%$ 、 $6.3\%$  (剂间比  $1 : 0.5$ )，备用。

分别考察在  $1 : 0.8$ 、 $1 : 0.7$ 、 $1 : 0.6$ 、 $1 : 0.5$  不同剂间比的量效关系，每个浓度点平行测定 3 次，以红花注射液浓度为 X 轴，血小板聚集抑制率均值为 Y 轴作量效关系曲线图，结果如图 2 所示，红花注射液剂间比为  $1 : 0.5$  时，随着红花注射液浓度的上升，血小板聚集抑制率呈上升趋势，红花注射液的浓度与血小板聚集抑制率的量效关系更为显著且 3 次测定的平行性良好。

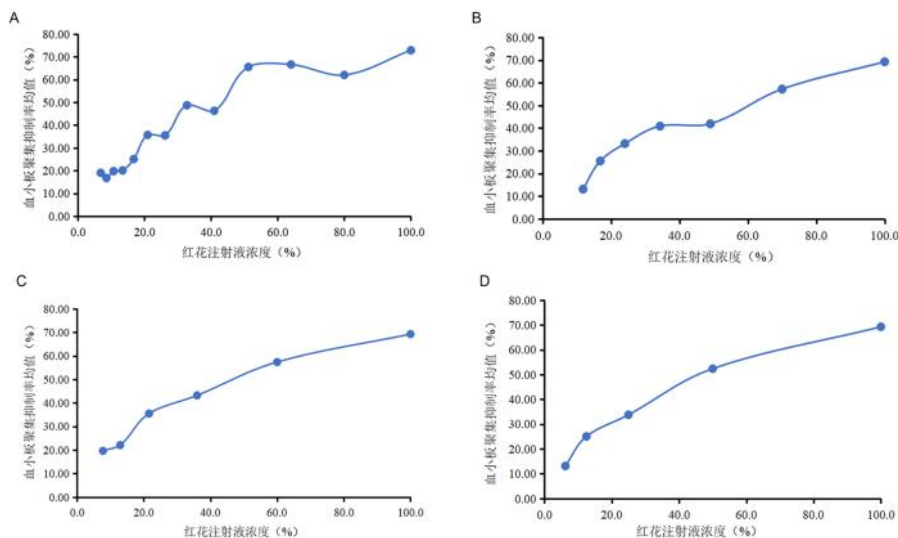


图 2 红花注射液标准品 (不同剂间比) 的量效关系考察结果

Fig 2 Quantitative and qualitative relationship of Safflower injection standard ( different inter-dose ratios )

A. 剂间比为  $1 : 0.8$  (inter-agent ratio of  $1 : 0.8$ ); B. 剂间比为  $1 : 0.7$  (inter-agent ratio of  $1 : 0.7$ ); C. 剂间比为  $1 : 0.6$  (inter-agent ratio of  $1 : 0.6$ ); D. 剂间比为  $1 : 0.5$  (inter-agent ratio of  $1 : 0.5$ )

## 2.5 量效学考察结果

取配制好的红花注射液，分别测定含药兔血浆在 5 min 内的血小板最大聚集率，平行测定 3 次，考察量效关系。综合评判量效关系检测结果，选取剂间比为 1 : 0.5 (6.3%、12.5%、25%、50%、100%) 测定，平行测定 3 次。结果显示，随着红花注射液浓度的上升，血小板聚集抑制率呈上升趋势，且量效关系较好。以红花注射液浓度为 X 轴，血小板聚集抑制率均值为 Y 轴作量效关系曲线图，如图 3 所示，结果显示 3 次测定的平行性良好，每次测定的结果均显示良好量效关系。

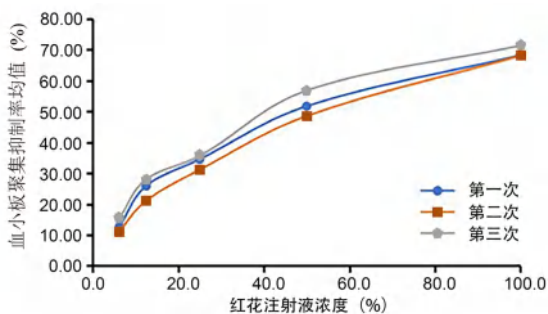


图 3 三次测定的量效关系考察结果

Fig 3 Examination results of the quantitative and qualitative relationships of the three measurements

## 2.6 测定方法的确定

利用量反应平行线 (3.3) 法<sup>[10]</sup>进行后续试验。按照量反应平行线 (3.3) 测定法中要求对数剂量 (x) 和反应或反应的特定函数 (y) 呈直线关系，因此需要考察线性关系。红花注射液选取 100%、50%、25% 3 个浓度剂量，以红花注射液浓度对数值为 X 轴，体外血小板聚集抑制率的对数值为 Y 轴作图，标示线性方程和相关系数，结果如图 4 所示，红花注射液在 100%、50%、25% 3 个浓度剂量时，血小板聚集抑制率的对数值与红花注射液浓度对数值线性关系较好，3 次测定结果的线性回归方程的相关系数分别为 0.9887、0.9941、0.9624，均在 0.9 以上，因此可以采用量反应平行线 (3.3) 法测定效价。

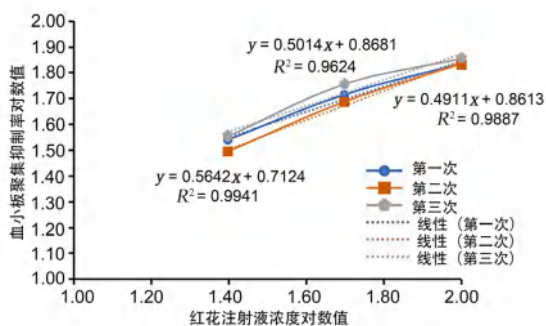


图 4 线性考察结果

Fig 4 Linear investigation

## 2.7 方法学考察

### 2.7.1 效价测定与可靠性

标准品与供试品按剂间比 1 : 0.5 分别配制高 (SH)、中 (SM)、低 (SL) 3 个浓度，即 100%、50% 和 25%。每一浓度平行测定 3 次，相应的血小板聚集抑制率如表 3 所示。

表 3 标准品及供试品的血小板聚集抑制率 (% , n = 3)

Tab 3 Platelet aggregation inhibition rate of the standard and the test material (% , n = 3)

组别	血小板聚集抑制率		
标准品低剂量 (SL)	22.67	13.79	22.14
标准品中剂量 (SM)	44.82	43.13	49.15
标准品高剂量 (SH)	83.50	69.17	75.17
供试品低剂量 (TL)	26.12	21.37	24.85
供试品中剂量 (TM)	46.60	46.29	48.89
供试品高剂量 (TH)	80.79	77.41	78.52

以浓度为 100% 的红花注射液标准品血小板聚集抑制率 1% 为 1 个效价单位 (U)，1 mL 的效价 ( $U \cdot mL^{-1}$ ) =  $X \times (1/0.01)$ ，X 为红花注射液血小板聚集抑制率的数值。据效价定义，测定的标准品效价为  $75.94 \times (1/0.01) = 7594 U \cdot mL^{-1}$ ，测定供试品 (批号: 19040101001) 的效价为 8478.5  $U \cdot mL^{-1}$ ，可信限率 (FL) 为 15.421%，可信限范围在 7288 ~ 9903  $U \cdot mL^{-1}$ 。采用量反应平行线 (3.3) 测定法进行供试品的效价测定，并进行可靠性检验，结果如表 4 所示，供试品间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，说明两组的效价无显著性差异，表示供试品的标示量基本正确。变异来源中的回归应非常显著 ( $P < 0.01$ )，偏离平行、二次曲线、反向二次曲线均应无显著性意义，表示两条直线基本平行并符合直线关系。在本实验中，回归项非常显著 ( $P < 0.01$ )，其余三项均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，符合要求。剂间差异应有显著性意义，表示试验剂量安排合理，本试验中剂间差异显著 ( $P < 0.01$ )，满足要求。以上结果表明测定供试品红花注射液的效价准确，FL < 20%，说明方法可靠。

表 4 供试品的可靠性检验结果

Tab 4 Reliability of the test material

变异来源	$d_f$	方差和	方差	F 值	P 值
试品间	1	0.008 84	0.008 84	2.636	> 0.05
回归	1	0.933 53	0.933 53	278.23	< 0.01
偏离平行	1	0.005 16	0.005 16	1.5399	> 0.05
二次曲线	1	0.013 18	0.013 18	3.9302	> 0.05
反向二次曲线	1	0.001 98	0.001 98	< 1	> 0.05
剂间	5	0.962 71	0.192 54	57.385	< 0.01
区组间	2	0.005 62	0.002 81	< 1	> 0.05
误差	10	0.033 55	0.003 35		
总	17				

**2.7.2 重复性** 在相同条件下, 取待测批次的红花注射液重复测定 6 次, 分别测得 6 次效价和可信限率并进行可靠性检验, 计算结果的平均值和相对标准偏差 ( $RSD$ ), 6 次测定的效价为  $(7697.32 \pm 321.38) U \cdot mL^{-1}$ ,  $RSD$  为 4.175%, 小于 10%; FL 平均值 16.47%, 小于 20%, 说明该方法测定的效价重复性良好。

**2.7.3 中间精密度** 在相同条件下, 不同人员取待测批次的红花注射液进行的生物活性效价测定, 每个人员重复测定 3 次并进行可靠性检验。不同的实验人员测得的结果均通过可靠性检验, 效价的  $RSD$  为 3.613%, 小于 10%, FL 平均值 10.88%, 小于 20%, 说明不同实验人员对测定结果的影响不大, 中间精密度良好。

**2.7.4 方法适用性** 在方法适用性的考察中, 选取了 4 个厂家 8 个批次的红花注射液, 测定结果见图 5, 表 5, 不同批次的红花注射液测得的效价不同, FL 均 < 20%, 检定结果精密度良好。可靠性考察显示, 不同批次间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 表明供试品的效价测定值基本准确, 且供试品的效价与标准品无明显差异, 偏离平行和反向二次曲线统计所得结果差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 变异来源中的回归显著 ( $P < 0.01$ ), 表明标准品和供试品是两条平行直线。本实验中, 不同剂量间所测结果差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 表明实验剂量设置合理, 且供试品效价测定方法稳定可靠。

表 5 不同厂家不同批次红花注射液效价结果

Tab 5 Summary of potency of different batches of Safflower injection from different manufacturers

厂家	标准品效价 / 样品效价 / ( $U \cdot mL^{-1}$ ) ( $U \cdot mL^{-1}$ )	FL 率 / %	FL 范围 / ( $U \cdot mL^{-1}$ )
A 厂家 (SJ1)	6365 8005.8	16.86	6807.0 ~ 9506.3
A 厂家 (SJ2)	6365 9006.2	8.47	8291.6 ~ 9816.9
A 厂家 (SJ3)	6365 8936.8	12.68	7909.1 ~ 10176.0
B 厂家 (LZ1)	5955 7248.6	12.39	6422.3 ~ 8218.2
B 厂家 (LZ2)	5955 6784.2	18.79	5651.3 ~ 8201.1
B 厂家 (LZ3)	7045 7024.1	17.61	5894.9 ~ 8368.3
C 厂家 (SW)	5955 5086.1	17.89	4237.6 ~ 6057.7
D 厂家 (SY)	7588 3971.8	18.68	3246.6 ~ 4730.3

## 2.8 统计分析

应用 SAS 9.4 (序列号: 647652) 软件处理数据, 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 Dunnett's  $t$  检验和单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 法。采用《中国药典》生物检定统计程序 BS2000 进行可靠性检验, 并计算各组供试品的效价和 FL。

## 3 讨论

可控的质量评价标准是我国科技工业发展和中医药现代化、国际化的国家战略, 随着科学技术的发展和现代技术的应用, 特别是中医药的创新, 中医药的质量和标准的研究不断提高<sup>[11-12]</sup>。当前, 基于化学方法的中药注射剂质量控制已被广泛采用。中药注射剂化学成分的复杂性给当前以色谱和光谱技术为基础的化学方法识别所有化合物造成了很大的困难<sup>[13]</sup>。此外, 由于化学方法提供的化学信息与体内整体活性之间的联系还未证实, 化学信息无法完全保证中药注射剂安全有效<sup>[14-15]</sup>。因此, 用化学方法控制中药注射剂的质量存在一定的缺陷。近年来, 利用生物测定方法控制复方中草药的质量受到了广泛的关注<sup>[16]</sup>。尽管生物测定不能提供化学信息, 但它们具有提供生物制品直接生物活性甚至临床安全性和有效性信息的优势<sup>[17]</sup>。受这些事实的启发, 我们认为将生物测定法引入中药注射剂的质量控制体系, 有利于提高中药注射剂的质量标准<sup>[18-19]</sup>。目前, 生物评价逐渐成为中药质量控制的发展方向之一, 被 2020 年版《中国药典》收录<sup>[20]</sup>, 为控制中药有效性提供了新的思路。

红花注射液是临床上的常用品种, 主要功效是活血化瘀。在最新的红花注射液质量标准中, 新增了羟基红花黄色素 A、总黄酮 (以山柰酚计) 的含量测定, 并新增成品的指纹图谱 (相似度  $\geq 0.85$ )<sup>[21]</sup>。但经文献调研, 红花注射液中的山柰酚-3- $O$ - $\beta$ -芸香糖苷、绿原酸、咖啡酸、山柰酚-3- $O$ - $\beta$ -槐糖苷等成分均有不同程度的抗血小板聚集作用, 而药典中规定检测的山柰酚却表现出较低的抗血小板聚集活性<sup>[22]</sup>。这说明, 目前红花注射液的质量控制方法尚处于单纯的化学控制阶段, 含量测定项目仍不足以整体控制其质量, 难以全面保证有效性, 加之进入体内后代谢产物繁多, 发挥药效的物质形式并不明确, 指纹图谱相似度考察也仅是对于成分的整体控制, 缺乏直接与有效性关联的指标。因此, 有必要在现有中药质量控制模式的基础上引入生物活性测定方法, 对红花注射液的质量进行综合评价。

鉴于红花注射液对血小板聚集具有良好的抑制作用, 本研究以血小板聚集抑制率来定义效价, 测定红花注射液标准品的效价为  $7594 U \cdot mL^{-1}$ , 对不同诱导剂的种类 (ADP 和 AA)、血小板的数量及不同的剂间比进行研究, 综合评判各项结果, 选择最适宜的条件建立方法并进行后期验证。研



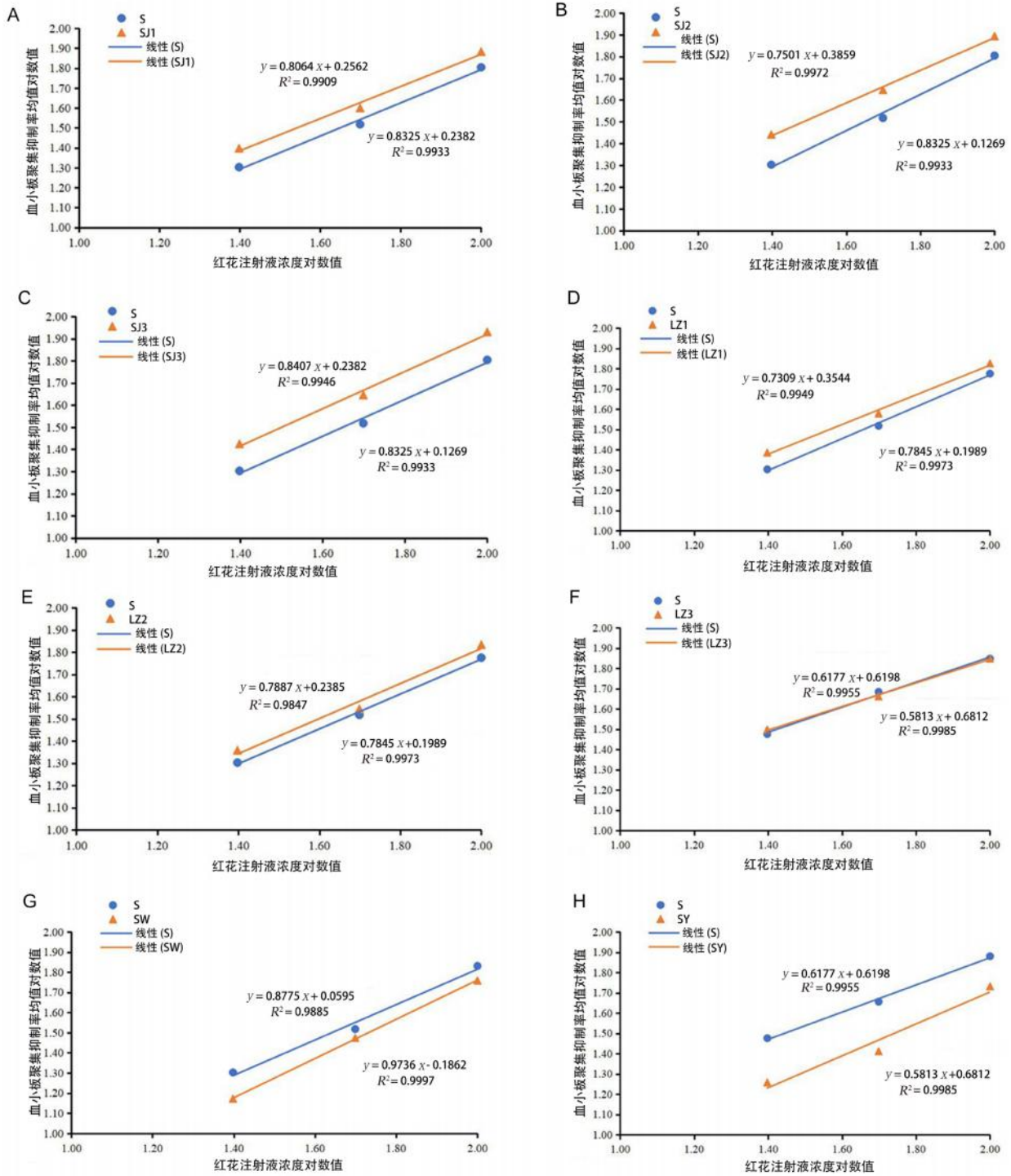


图 5 不同厂家不同批次的红花注射液线性考察结果  
Fig 5 Linearity of different batches of Safflower Injection from different manufacturers

究显示所建立的方法量效关系明显，线性关系良好，测定的效价可靠，能够较好地用于红花注射液质量评价。本研究发现，不同厂家不同批次的红花注射液虽然同质，理化检验结果均符合药典规定的标准，但通过生物活性测定方法测得的效价却各不相同，说明不同厂家不同批次间的红花注射液抑制血小板聚集的生物活性存在差异，从

而进一步说明单纯依靠化学指标并不能全面反映药品的有效性，而应该基于临床药效控制其有效性。本研究中基于“药效”建立的生物活性测定方法能够衡量不同厂家不同批次样品间抑制血小板聚集的活性，可以作为红花注射液质量评价方法的补充。后期可以采用更多厂家更多批次的红花注射液运用此方法来进一步验证本研究的适用性。

本方法的建立有望在一定程度上作为现行红花注射液质量控制方法的补充,为生物活性测定法在中药质量控制方面的发展提供一定借鉴意义,进而可以为中药注射液标准品的确立和方法学的发展开创新的思路,为中药质量控制模式及质量评价方法的建立提供新的研究思路,推动中药国际化进程。

### 参考文献

- [1] 王伽伯,李会芳,肖小河,等.生物检定方法控制中药质量的思考[J].世界科学技术-中医药现代化,2007,9(6):36-39.
- [2] Jiang Y, David B, Tu PF, et al. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines-a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 657(1): 9-18.
- [3] Chen X, Guo J, Bao J, et al. The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review[J]. *Med Res Rev*, 2014, 34(4): 768-794.
- [4] Hong M, Li S, Wang N, et al. A biomedical investigation of the hepatoprotective effect of radix *salviae miltiorrhizae* and network pharmacology-based prediction of the active compounds and molecular targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 620.
- [5] Hung YC, Wang PW, Pan PL, et al. Functional proteomics reveal the effect of *Salvia miltiorrhiza* aqueous extract against vascular atherosclerotic lesions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(6): 1310-1321.
- [6] Liang X, Chen X, Liang Q, et al. Metabonomic study of Chinese medicine Shuanglong formula as an effective treatment for myocardial infarction in rats[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(2): 790-799.
- [7] 肖小河,鄢丹,王伽伯,等.关于中药质量生物检定的几点商榷[J].世界科学技术-中医药现代化,2009,11(4):504.
- [8] 周剑,刘荣华,李祥.红花对ADP给药家兔血小板聚集率的影响[J].亚太传统医药,2008,4(3):50-51.
- [9] 臧宝霞,金鸣,李金荣.羟基红花黄色素A抗凝作用的研究[J].中草药,2007,38(5):741-743.
- [10] 李瑞吉,王婷婷,刘金辉,等.丹红注射液在体外抑制血小板聚集的生物活性测定法研究[J].药物分析杂志,2022,42(10):1763-1770.
- [11] Liang XM, Jin Y, Wang YP, et al. Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2033-2044.
- [12] Xie PS, Leung AY. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1933-1940.
- [13] Hao HP, Cui N, Wang GJ, et al. Global detection and identification of nontarget components from herbal preparations by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a strategy[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(21): 8187-8194.
- [14] Fu HY, Fu WQ, Sun MJ, et al. Kinetic cellular phenotypic profiling: prediction, identification, and analysis of bioactive natural products[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(17): 6518-6526.
- [15] 刘爽,乔艳,刘高峰.中药注射剂不良反应与不合理用药问题分析[J].中南药学,2016,14(11):1177-1182.
- [16] 欧阳杰湖,潘善庆,田洪.多组分制剂生物活性测定研究进展[J].中南药学,2013,11(6):450-451.
- [17] Sathish JG, Sethu S, Bielsky MC, et al. Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(4): 306-324.
- [18] Zhao ZZ, Hu YN, Liang ZT, et al. Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines[J]. *Planta Med*, 2006, 72(10): 865-874.
- [19] Wu YW, Gao WY, Xiao XH, et al. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on *Staphylococcus aureus* growth[J]. *Thermochim Acta*, 2005, 429: 167-170.
- [20] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020.
- [21] Markus G, Sonja S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis: an update covering 2011—2016[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 211-233.
- [22] 赵燕,石上梅,王旭,等.中药注射剂国家药品标准提高及进展情况分析[J].中国药事,2017,31(8):861-876.

(收稿日期:2023-07-08;修回日期:2023-10-06)

# 基于电子鼻技术结合网络药理学分析半夏不同炮制品的气味差异标志物

杨靖涵, 高杰, 孙立丽, 刘亚男\*, 任晓亮 (天津中医药大学中药学院, 天津 301617)

**摘要:** 目的 借助 Heracles II 超快速气相电子鼻获取半夏不同炮制品的气味指纹图谱信息, 并结合网络药理学分析半夏不同炮制品之间的的气味差异标志物。方法 使用 Heracles II 超快速气相电子鼻获取半夏不同炮制品的气相色谱图, 利用多元分析方法, 得到半夏不同炮制品的气味差异标志物, 结合网络药理学分析, 得到差异成分的靶点和通路, 从而预测半夏不同炮制品潜在的气味差异标志物。结果 半夏不同炮制品共鉴定出 21 个与气味相关的化学成分, 其中甲基丁香酚、二乙酰酮等 5 个成分是半夏不同炮制品的气味差异标志物, 经网络药理学分析, 这些成分具有止咳、抗炎等作用。结论 所建立的半夏及其炮制品气味指纹图谱专属性强, 筛选出 5 种可作为半夏不同炮制品的潜在气味差异标志物的化学成分, 可为中药炮制机制及工艺研究提供新思路 and 适用方法。

**关键词:** Heracles II 超快速气相电子鼻; 半夏; 炮制品; 气味差异标志物; 指纹图谱; 网络药理学  
**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0383-09  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.017

## Odor differential markers for different processed products of *Pinelliae Rhizoma* by electronic nose combined with network pharmacology

YANG Jing-han, GAO Jie, SUN Li-li, LIU Ya-nan\*, REN Xiao-liang (College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

**Abstract: Objective** To obtain the odor fingerprint information of different processed products of *Pinelliae Rhizoma* with Heracles II ultra-fast gas phase electronic nose, and to analyze the odor differential markers of different processed *Pinelliae Rhizoma* products combined with network pharmacology. **Methods** Heracles II ultra-fast gas phase electronic nose was used to obtain the gas chromatograms of different processed products of *Pinelliae Rhizoma*. Multivariate analysis was used to obtain the odor differential markers for products. Combined with network pharmacology, the targets and pathways of different components were obtained, and the potential odor differential markers of products of *Pinelliae Rhizoma* were predicted. **Results** Totally 21 odor related chemical components were identified in the processed products of *Pinelliae Rhizoma*. Among them, five components such as methyleugenol and diethyl ketone were the odor differential markers, and network pharmacological analysis showed that these components had anti-cough and anti-inflammation effects. **Conclusion** The odor fingerprint of *Pinelliae Rhizoma* and its processed products are highly specific, and five chemical components could be used as potential odor differential markers for processed products of *Pinelliae Rhizoma*. This study provides new ideas for the research on the mechanism and processing technology of traditional Chinese medicine.

**Key words:** Heracles II ultra-fast gas phase electronic nose; *Pinelliae Rhizoma*; processed product; odor differential marker; fingerprint; network pharmacology

基金项目: 天津市教委科研计划项目重点项目 (No.2021ZD009)。

作者简介: 杨靖涵, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分析研究, email: yjh19980120@163.com \*通信作者: 刘亚男, 女, 副教授, 主要从事中药炮制研究, email: tianyan2007@163.com



半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 归脾、胃、肺经。现代研究表明, 半夏的化学成分主要包括生物碱<sup>[1]</sup>、有机酸<sup>[2]</sup>、挥发油<sup>[3]</sup>、氨基酸<sup>[4]</sup>等, 半夏具有脏器毒性、黏膜刺激性、生殖毒性等毒副作用, 炮制可以减少生品的毒性, 从而达到减毒增效、改变药性的目的<sup>[5]</sup>。2020 年版《中国药典》收录的半夏的炮制品主要有半夏、姜半夏、法半夏、清半夏四种<sup>[6]</sup>。药理学研究证实半夏具有镇咳、祛痰、止呕、抗炎、抗氧化的功效, 而半夏的不同炮制品在临床中均具有止咳的作用<sup>[7-8]</sup>。王锐等<sup>[9]</sup>采用“同时蒸馏-萃取”的方法提取了半夏的挥发油, 并证明了半夏的挥发油具有一定的生理活性。也有研究表明, 半夏挥发油具有止咳、抗炎、抗氧化等功效, 这与半夏的药理作用具有较好的相关性<sup>[1, 10-11]</sup>。因此从半夏挥发油中筛选质量标志物是可行的思路。

半夏的炮制工艺多以复制法为主, 经炮制后挥发性的成分种类差异较大, 因此通过建立指纹图谱探索共有的化学特征, 进而确定其质量标志物是有效可行的思路<sup>[12-16]</sup>。Heracles II 超快速气相电子鼻的分析原理与气相色谱类似, 物质中的挥发性成分不同, 对色谱柱的吸附与解吸也存在较大差异, 能够实现混合气体之间的分离与分析<sup>[17]</sup>, 和气相色谱相比, 具有更短的色谱柱和更薄的填充材料, 能够极大缩短挥发性成分的分离时间, 提高样品分析效率<sup>[18]</sup>, 其配备的 Arochembase 数据库具有类似于 GC-MS 的成分定性功能。因此超快速气相电子鼻具有操作简单, 检测快捷, 无需对样品做过多处理等优点, 能够对中药成分进行快速的分离、定性、分析<sup>[19]</sup>。目前已被广泛用于中药材基原<sup>[20]</sup>、炮制品<sup>[21]</sup>、掺伪品<sup>[22]</sup>、采收期和贮存期<sup>[23]</sup>等方面的研究中。本研究借助 Heracles II 超快速气相电子鼻技术获得半夏及其炮制品的气相色谱图, 建立半夏不同炮制品的超快速气相电子鼻检测方法, 并分析了半夏不同炮制品之间的气味成分及差异标志物, 进一步结合网络药理学, 预测不同炮制品的差异成分靶点和通路信息, 旨在从挥发性成分的角度, 解释半夏不同炮制品的分子作用机制, 为炮制品的质量控制研究提供新思路。

## 1 样品、仪器与试药

### 1.1 样品

半夏收集于河北、四川、甘肃等地, 具体样品批次见表 1, 经天津中医药大学窦志英教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎。所有样品均按 2020 年版《中国药

典》<sup>[6]</sup> 中半夏炮制方法自制 4 种半夏炮制品。

表 1 样品来源信息  
Tab 1 Sample source information

编号	产地	编号	产地
SBX-S1	四川	SBX-S4	贵州
SBX-S2	河北	SBX-S5	河北
SBX-S3	甘肃	SBX-S6	安徽

**1.1.1 半夏** 取半夏药材, 除去杂质, 即得样品 SBX-S1 ~ S6。

**1.1.2 姜半夏** 选取直径大小约为 1 cm 的净制半夏, 用水浸泡至内无干心时, 取出; 另取生姜片煎汤, 加白矾与半夏共煮透, 取出, 晾干。即得样品 JBX-S1 ~ JBX-S6。每 100 g 净制半夏用生姜 25 g, 白矾 12.5 g。

**1.1.3 法半夏** 选取直径大小约为 1 cm 的净制半夏, 用水浸泡至内无干心。取适量甘草, 加水煎煮, 合并煎液, 倒入适量的石灰液中, 加入浸透的半夏, 每日搅拌 1 ~ 2 次, 保持溶液 pH 12 以上, 至剖面黄色均匀, 口尝微有麻舌感时取出, 洗净, 晾干, 即得样品 FBX-S1 ~ FBX-S6。每 100 g 净制半夏用甘草 15 g, 生石灰 10 g。

**1.1.4 清半夏** 选取直径大小约为 1 cm 的净制半夏, 用 8% 的白矾水浸泡至内无干心, 口尝微有麻舌感时取出, 洗净, 晾干。即得样品 QBX-S1 ~ QBX-S6。每 100 g 净制半夏用白矾 20 g。

将以上 4 种炮制品分别打粉, 过 4 号药典筛, 备用。精密称取药材粉末 0.5 g, 分别置于 20 mL 顶空进样瓶中, 加盖密封, 平行两次进样。半夏不同炮制品见图 1。

### 1.2 仪器与试药

Heracles II 超快速气相电子鼻 (法国 Alpha MOS 公司); FA2004 型万分之一天平, (上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。n<sub>C</sub>-n<sub>C</sub><sub>16</sub> 正构烷烃标准溶液 (批号: 563121, 美国 RESTEK 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 Heracles II 超快速气相电子鼻仪器条件

Heracles II 超快速气相电子鼻配有两根色谱柱: 一根为非极性的 MXT-5 色谱柱, 另一根为弱极性的 MXT-1701 色谱柱。待测样品通过平行工作的两根色谱柱进行分离后, 使用氢火焰离子检测器 FID 对分离出的物质进行检测, 从而得到半夏及其炮制品的有效气味信息, 具体分析条件参数如表 2 所示。

### 2.2 炮制品气味成分定性分析

根据“2.1”项下条件, 将所得图谱信息导入



图 1 半夏及其不同炮制品

Fig 1 *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

表 2 Heracles II 超快速气相电子鼻分析条件

Tab 2 Analysis conditions of Heracles II ultra-fast gas phase electronic nose

参数	实验条件	参数	实验条件
样品瓶	20 mL	捕集阱初始温度	40 °C
样品量	0.5 g	捕集阱分流速率	10 mL · min <sup>-1</sup>
振荡时间	20 min	捕集持续时间	42 s
振荡温度	60 °C	捕集阱最终温度	280 °C
进样体积	4000 μL	初始柱温	50 °C
进样速度	70 μL · s <sup>-1</sup>	程序升温	1.0 °C · s <sup>-1</sup> → 60 °C (0 s); 1.0 °C · s <sup>-1</sup> → 70 °C (0 s); 3.0 °C · s <sup>-1</sup> → 280 °C (10 s)
进样口温度	200 °C	采集时间	102 s
进样持续时间	37 s	检测器温度	260 °C
转速	500 r · min <sup>-1</sup>	FID 增益	12

Origin Pro 2022 软件得到半夏及其炮制品的色谱图 (如图 2 所示), 得半夏不同炮制品对照气味峰指纹图谱 (如图 3 所示)。利用正构烷烃标准溶液对各气味信息进行定性, 样品保留时间校准

为 Kovats 保留指数, 利用 Arochembase 数据库和 Alphasoftware 12.44 软件处理后, 得到半夏及其炮制品的可能气味信息如表 3 所示。

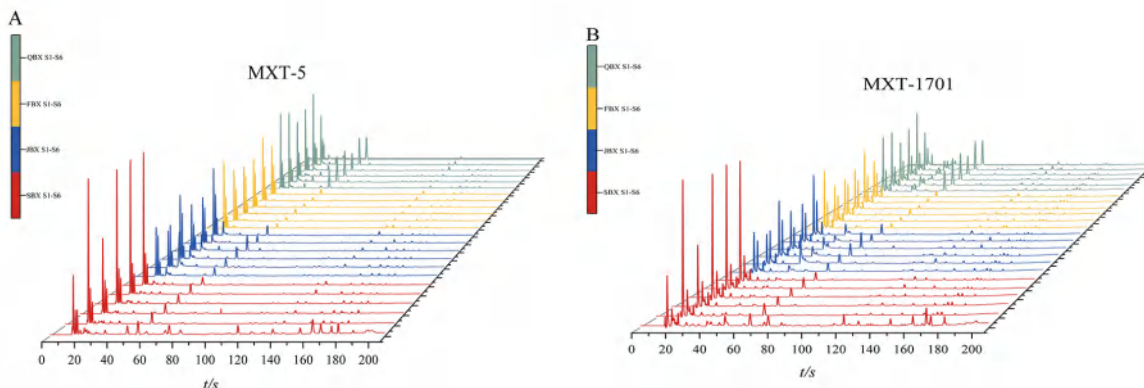


图 2 半夏不同炮制品气味指纹图谱

Fig 2 Odor fingerprint of *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

结果表明, 4 种炮制品气味之间的共有成分为正十三烷; 半夏的特有气味成分为 2- 甲基丙酸乙酯、正己醛、壬酸丙酯、丙戊酸、5- 甲基十五烷、肉桂酸正丙酯; 姜半夏的特有气味成分为正己烷、3- 戊酮、2- 甲基 -1- 戊醇、苯甲酸、4- 三癸醇; 法半夏的特有气味成分为甲酸甲酯、甲基丁香酚; 清半夏的特有气味成分为二乙基酮、正十六烷。由此可见半夏不同炮制品之间气味存在差异, 因此这些不同的

气味信息可能是鉴别半夏及其炮制品的物质基础。

### 2.3 半夏不同炮制品气味成分分析

利用电子鼻获取半夏不同炮制品气味信息, 通过 Kovats 保留指数定性, 采用峰面积归一化法得到半夏不同炮制品的气味成分相对含量。结果见表 4。半夏不同炮制品中共鉴定出 21 种成分, 包括酯类 6 种, 烷烃类 5 种, 醇类 2 种, 酸类 2 种, 醛类、酚类各 1 种, 其他类 4 种。

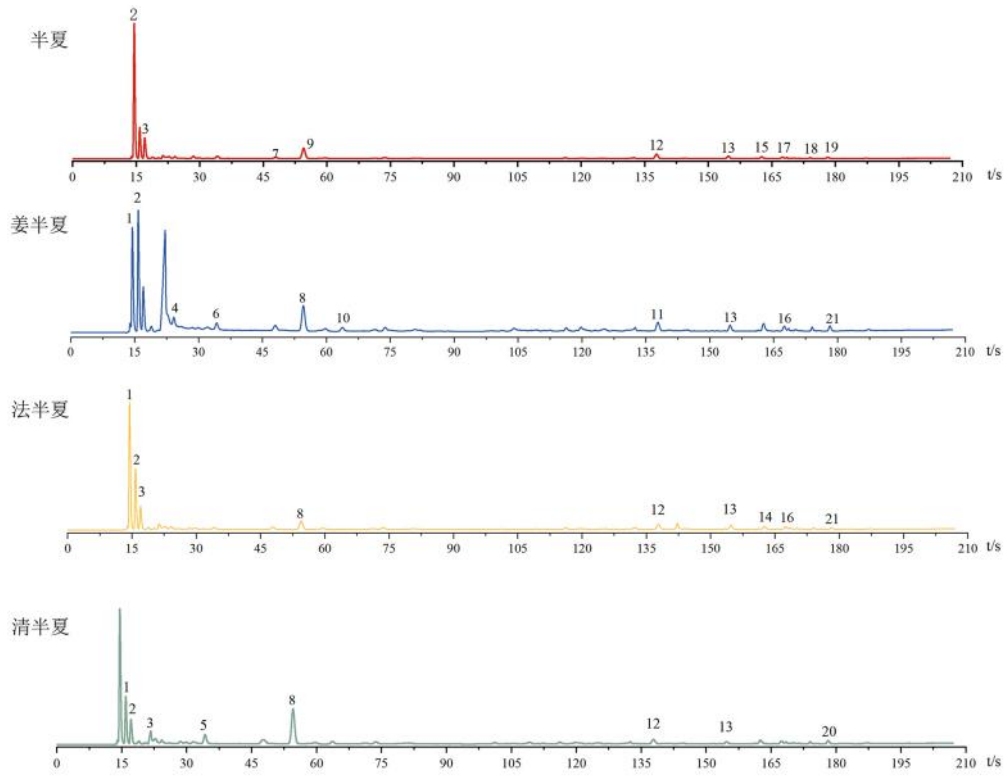


图 3 半夏及其炮制品对照气味峰指纹图谱比较

Fig 3 Common mode of odor fingerprint of *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

表 3 半夏及其不同炮制品可能气味信息

Tab 3 Possible compounds information of *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

No.	分子式	保留指数 (RI)		相关指数	可能存在的化合物	气味信息	半夏	姜半夏	法半夏	清半夏
		MXT-5 色谱柱	MXT-1701 色谱柱							
1	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	407	474	92.77	甲酸甲酯	水果味; 李子	-	-	+	-
2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Cl	436	525	79.67	乙基氯	辛辣的	+	-	+	+
3	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	461	604	49.25	丙酮	苹果; 水果; 甜的	-	-	+	+
4	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	581	604	94.48	正己烷	烷烃	-	+	-	-
5	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O	693	766	90.78	二乙基酮	丙酮; 奶酪	-	-	-	+
6	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O	693	766	49.61	3-戊酮	丙酮; 奶酪	-	+	-	-
7	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	766	812	95.22	2-甲基丙酸乙酯	酒精; 水果; 甜的	+	-	-	-
8	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	800	874	96.07	丙烯酸丙酯	/	-	+	+	+
9	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	800	874	95.07	正己醛	草本植物的	+	-	-	-
10	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	834	957	98.52	2-甲基-1-戊醇	杂醇; 酒精	-	+	-	-
11	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1151	1299	94.48	苯甲酸	香料香; 愉悦的	-	+	-	-
12	C <sub>10</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>5</sub>	1151	1139	91.77	环五聚二甲基硅氧烷	/	+	-	+	+
13	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	1318	1300	95.80	正十三烷	烷烃; 水果	+	+	+	+
14	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1418	1585	88.83	甲基丁香酚	丁香; 甜的	-	-	+	-
15	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	1419	1465	74.56	壬酸丙酯	发酵的	+	-	-	-
16	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O	1487	1585	83.02	4-三癸醇	/	-	+	-	-
17	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1503	1547	86.62	丙戊酸	/	+	-	-	-
18	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	1529	1557	50.42	5-甲基十五烷	/	+	-	-	-
19	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1589	1750	91.97	肉桂酸正丙酯	桃子味	+	-	-	-
20	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	1653	1625	95.70	正十六烷	/	-	-	-	+
21	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1654	1750	71.69	辛酸庚酯	蜡烛味	-	+	+	-

注: “+”表示检测出该成分; “-”表示未检测出该成分。

Note: “+” indicates that the component was detected; “-” indicates that the component was not detected.



表 4 半夏及其不同炮制品气味成分相对含量

Tab 4 Relative content of odorant components in *Pinelliae Rhizoma* and its different processed products

类别	保留时间 /min	化合物名称	相对含量 /%			
			半夏	姜半夏	法半夏	清半夏
酯类	14.45	甲酸甲酯	0.94±0.39	—	—	—
	47.83	2-甲基丙酸乙酯	—	1.24±0.59	0.21±0.03	1.24±0.25
	63.59	丙烯酸丙酯	—	1.24±0.59	0.21±0.03	1.24±0.25
	162.57	壬酸丙酯	1.49±0.35	—	—	—
	174.01	肉桂酸正丙酯	0.57±0.11	—	—	—
烃类	178.16	辛酸庚酯	—	0.98±0.27	0.91±0.05	—
	22.67	正己烷	—	2.55±0.46	—	—
	137.80	环五聚二甲基硅氧烷	2.25±0.64	—	2.46±0.72	2.36±0.77
	154.75	正十三烷	1.54±0.44	1.94±0.83	1.66±0.39	0.83±0.3
	170.16	5-甲基十五烷	0.26±0.05	—	—	—
醇类	178.14	正十六烷	—	—	—	0.7±0.22
	63.59	2-甲基-1-戊醇	—	1.79±0.41	—	—
酸类	167.38	4-三癸醇	—	1.25±0.24	—	—
	137.75	苯甲酸	—	2.46±0.72	—	—
醛类	168.52	丙戊酸	0.48±0.14	—	—	—
	54.51	正己醛	7.01±1.02	—	—	—
酚类	162.52	甲基丁香酚	—	—	1.66±0.11	—
	15.84	乙基氯	—	—	8.67±0.79	7.07±1.08
其他类	17.00	丙酮	—	—	8.67±0.79	7.07±1.08
	34.11	二乙基酮	—	—	—	3.91±0.41
	34.13	3-戊酮	—	1.89±0.72	—	—

注：—表示未检测出该成分。

Note: “—” indicates that the component was not detected.

结果表明，半夏不同炮制品中，共同存在的成分为酯类和烃类。半夏的气味成分主要为酯类、烃类、醇类、酸类、醛类；姜半夏的气味成分主要为酯类、烃类、醇类、酸类；法半夏的气味成分主要为酯类、烃类、酚类等；清半夏的气味成分主要为酯类、烃类。其中，姜半夏炮制过程中加入炮制辅料生姜，赋予了姜半夏辛辣的、香料的气味；法半夏炮制过程中加入辅料甘草汁，赋予了法半夏甜的、水果的气味，这表明不同的物料对半夏不同炮制品的影响不尽相同，因此炮制后的化学成分、药效、作用机制也会有所改变<sup>[24]</sup>。

## 2.4 多元统计分析

### 2.4.1 主成分分析 (PCA)

根据 Heracles II 超快速气相电子鼻得到半夏及其炮制品的色谱图，以其色谱图峰面积为变量进行 PCA 分析，结果如图 4 所示。判别指数为 70，主成分 (PC1 = 54.424%，PC2 = 18.414%) 的累计贡献率为 72.838%，表明所建立的模型能够较好地反映样品的气味信息。四种炮制品能够被良好地区分：半夏主要分布在第二、三象限，且样品分布较为分散，说明样品之间气味差异较大；姜半夏、法半夏、清半夏主要分布在第一、四象限，

与半夏分布距离较远，且这三种炮制品之间也能较好地地区分。以上结果表明半夏的不同炮制品之间存在气味差异，PCA 模型可以用于区分半夏及其炮制品，后续可以进一步使用有监督模型进一步分析。

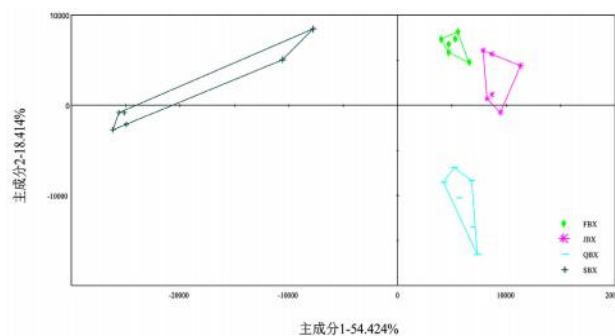


图 4 PCA 模型得分图

Fig 4 PCA model score chart

### 2.4.2 判别因子分析 (DFA)

DFA 是在 PCA 模型的基础上，扩大组间的差异，缩小组内的差异的一种分析方法<sup>[25-26]</sup>。DFA 模型的得分图如图 5 所示，样品按照不同的炮制方法分为 4 类。判别因子 (DF1 = 70.299%，DF2 = 22.999%) 的累计贡献率为 93.298%，DFA 模型能较好地地区分半夏不同炮制品。半夏沿着 DF1 的正半轴分布，沿着 DF1 方

向姜半夏、法半夏、清半夏距离半夏生品的距离较远，有着明显的界限，说明半夏经炮制后气味成分信息差异较大；各个炮制品中，姜半夏和法半夏主要分布在第三象限，清半夏则主要分布在第一象限，姜半夏和法半夏的距离相对较近，说明姜半夏和法半夏的气味信息较为相似，而清半夏的气味信息则与这两种炮制品的气味信息有较大的差异。半夏和不同炮制品之间距离有着明显的界限，结果与 PCA 模型分析结果一致。

**2.4.3 偏最小二乘法 - 判别分析 (PLS-DA)** 采用 IBM SPSS Statistics 对 21 个气味色谱峰进行单因素方差分析，结果如表 5 所示，除正己烷外的其他 20 个峰均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )；采用 SIMCA14.1 软件对 21 个峰进行 PLS-DA 分析，生成的 VIP 图如图 6 所示。结果表明，模型解释概率  $R^2Y$  为 0.967，模型预测率  $Q^2$  为 0.959，表明

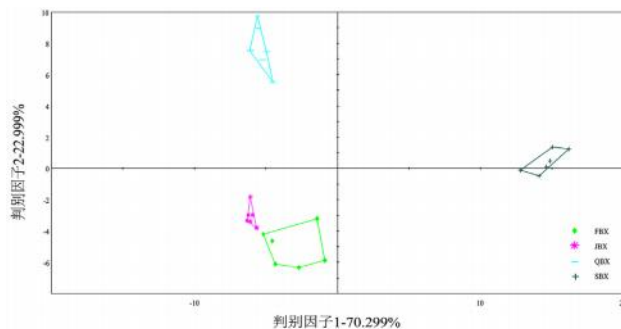


图 5 DFA 模型得分图  
Fig 5 DFA model score chart

模型具有较好的解释率和可靠性。选取 VIP 值大于 1 的变量作为潜在气味差异标志物。其中甲基丁香酚、二乙基酮、正十六烷、辛酸庚酯、丙烯酸丙酯的 VIP 值大于 1，推测这 5 个成分是影响半夏及其炮制品气味的差异标志物。

表 5 半夏及其炮制品组别间气味成分方差分析

Tab 5 Variance analysis of odor components among *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

No.	化合物	F	P	No.	化合物	F	P
1	甲酸甲酯	65.243	$3.10 \times 10^{-2}$	12	环五聚二甲基硅氧烷	16.999	$1.00 \times 10^{-5}$
2	乙基氯	8.913	$5.96 \times 10^{-4}$	13	正十三烷	7.493	$1.50 \times 10^{-3}$
3	丙酮	196.116	$7.35 \times 10^{-4}$	14	甲基丁香酚	3.300	$4.14 \times 10^{-2}$
4	正己烷	2.411	0.097	15	壬酸丙酯	137.373	$3.82 \times 10^{-3}$
5	二乙基酮	113.147	$8.50 \times 10^{-5}$	16	4-三癸醇	124.619	$3.73 \times 10^{-3}$
6	3-戊酮	35.315	$2.51 \times 10^{-3}$	17	丙戊酸	62.944	$4.72 \times 10^{-3}$
7	2-甲基丙酸乙酯	37.676	$1.02 \times 10^{-2}$	18	5-甲基十五烷	39.294	$5.82 \times 10^{-3}$
8	丙烯酸丙酯	110.305	$4.09 \times 10^{-4}$	19	肉桂酸正丙酯	3.310	$4.11 \times 10^{-2}$
9	正己醛	172.439	$6.30 \times 10^{-5}$	20	正十六烷烃	68.748	$3.80 \times 10^{-5}$
10	2-甲基-1-戊醇	26.557	$2.81 \times 10^{-3}$	21	辛酸庚酯	31.269	$2.35 \times 10^{-3}$
11	苯甲酸	18.751	$5.00 \times 10^{-6}$				

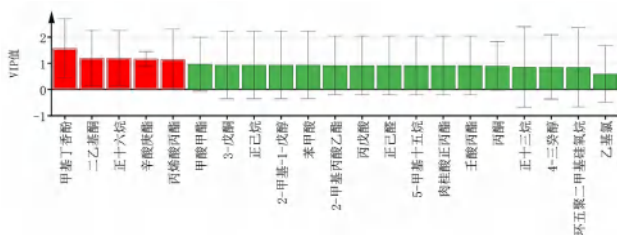


图 6 半夏及其炮制品 PLS-DA 模型中 21 个色谱峰 VIP 值  
Fig 6 VIP values of 21 chromatographic peaks in PLS-DA models of *Pinelliae Rhizoma* and its processed products

**2.5 半夏不同炮制品气味差异成分网络药理学分析**

**2.5.1 差异物靶点预测分析** 在 PubChem 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) 中检索半夏炮制前后差异性气味成分的丁香酚、二乙基酮、正十六烷、辛酸庚酯、丙烯酸丙酯的 SIMILES 号，导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.ch/>)，选择

Probability > 0.1 进行筛选和靶点预测分析，利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将靶点蛋白转换成标准基因名，筛去重复的靶点，最终得到与其有作用的靶点共 133 个。

**2.5.2 疾病基因靶点的获取** 在 GeneCard 和 DisGeNET 数据库中检索关键词“Cough”，将所得数据合并，去除重复值，获得疾病靶点的相关信息，共得到了 1823 个作用靶点，将药物主要成分与疾病基因取交集，共得到 48 个共同靶点。

**2.5.3 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络构建** 将筛选的 48 个靶点导入 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org>) 构建 PPI 网络，物种选择为“Homo sapiens”，最低关联度值选择为 > 0.4，得到差异性成分潜在作用靶点的 PPI 网络图。将其以 TSV 格式导入 Cytoscape3.9.1 中，进行可视化和拓扑分析。筛选出标准值 > 2 倍 Degree 的中

位数值, 1 倍 Betweenness 和 Closeness 的中位数值, 筛选出发挥活性的核心靶点, 包括 Toll 样受体 4 (TLR4)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、雌激素受体 (ESR1)、糖原合酶激酶 3 (GSK3B)、丝裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14) 等。

**2.5.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析** 利用 David 数据库 (<https://www.david.ncicrf.gov/tools.jsp>) 对筛选的核心靶点进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。选择生物属性为“Homo sapiens”, 标识符号为“OFFICIAL-GENE-SYMBOL”, 列表选择为“Gene List”。GO 功能富集共得 206 个条目, 其中 BP 通路 (biological process) 206 条, CC 通路 (cellular component) 45 条, MF 通路 (molecular

function) 50 条。取前 10 条绘制为条形图, 如图 7A 所示。其中 BP 通路主要包括对脂多糖的反应、蛋白质磷酸化通路、腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联受体信号传导通路等; CC 通路主要包括质膜、细胞质、高分子通路等; MF 主要包括蛋白激酶信号通路、G 蛋白耦联腺苷受体信号通路、ATP 结合受体通路等。共得 KEGG 富集的 92 条通路, 取前 20 条通路, 绘制 KEGG 气泡图, 如图 7B 所示, 主要涉及的通路为 PI3K-Akt 信号通路、表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制通路、Coronavirus disease-COVID-19 信号通路、乙型肝炎病毒信号通路等。进一步利用 Cytoscape 3.9.1 绘制“成分-靶点-通路”图, 如图 8 所示。

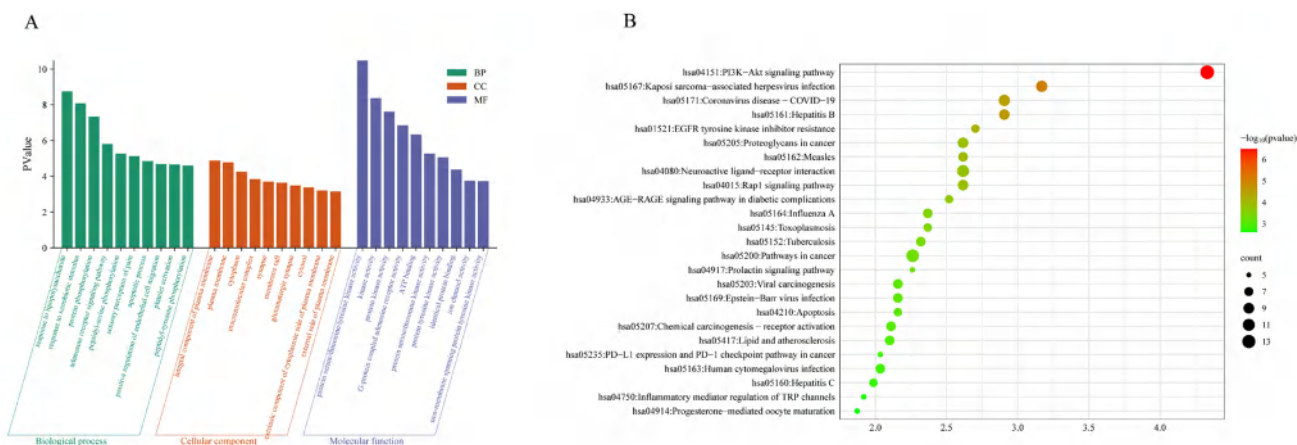


图 7 GO 功能富集分析 (A) 和 KEGG 通路富集分析 (B)

Fig 7 GO functional enrichment analysis (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B)

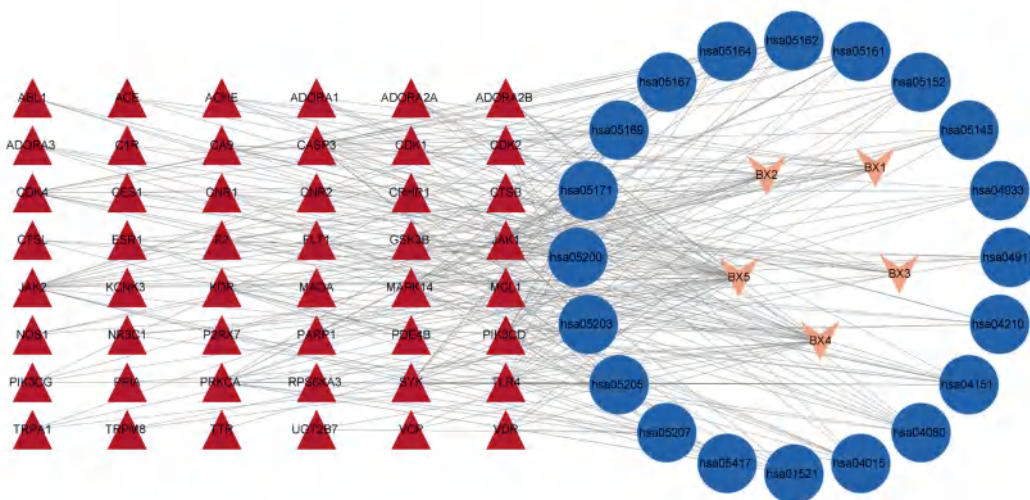


图 8 半夏挥发性成分-靶点-通路网络

Fig 8 Volatile component-target-pathway network of *Pinelliae Rhizoma*

### 3 讨论与结论

目前已有大量实验从半夏不同炮制品的非挥发性成分角度探究其止咳的机制, 但尚未有从挥发性成分角度进行研究的报道。气味是中药较为

重要的一个属性, 半夏不同炮制品之间气味差异明显, 其内在的化学成分更是不同炮制品发挥药效的重要依据。本研究运用了 Heracles II 超快速气相电子鼻技术, 在预实验考察了进样量、震荡



时间、震荡温度等实验条件后最终确立了最优实验条件, 实现了对半夏不同炮制品挥发性成分的快速检测, 获取了相关的气相色谱信息, 并基于此建立了半夏不同炮制品的气味指纹图谱。电子鼻共定性出 21 种可能存在的气味特征性成分, 明确了炮制前后各炮制品气味种类和相对含量的变化。半夏经炮制后醛类成分消失, 增加了如 2-甲基-1-戊醇、4-三癸醇、甲基丁香酚、乙基氯、二乙基酮等醇类、酚类和其他类的成分。姜半夏的炮制过程中加入生姜能够缓和半夏的刺激性, 半夏经炮制后挥发油的相对含量减少, 挥发性成分的种类数增加, 因此姜半夏炮制的减毒机制尚需进一步研究<sup>[24]</sup>; 法半夏的炮制过程中引入了甘草汁, 气味研究结果表明炮制后法半夏新增甲基丁香酚这一物质, 现代药理学已证实甲基丁香酚能够松弛气道平滑肌, 从而起到镇咳、平喘的作用<sup>[25-26]</sup>, 推测甘草的加入使得法半夏的止咳作用增强。利用 PCA、DFA、PLS-DA 等多元分析方法, 筛选出了 5 种气味差异性成分。

进一步利用网络药理学, 基于筛选出的 5 种气味差异性成分, 探究半夏不同炮制品止咳的分子作用机制。绘制 PPI 网络, 共筛选出 48 个靶点蛋白, 其中核心靶点蛋白包括 Toll 样受体 4 (TLR4)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、雌激素受体 (ESR1)、糖原合酶激酶 3 (GSK3B)、丝裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14) 等。TLR4 可有效杀伤 T 细胞及激活树突状细胞, 在介导细胞因子、调控气道炎性介质的释放方面具有重要的调控作用<sup>[27-29]</sup>; CASP3 与细胞凋亡关系密切, 其位于两条细胞凋亡通路的中心, 活化后可参与切割细胞结构和功能蛋白, 较好地反映凋亡过程<sup>[30-31]</sup>; ESR1 与雌激素相关, 可能在肺部疾病中起关键作用<sup>[32]</sup>; GSK3B 参与调控糖原合成酶的活性, 调节细胞的分化、增殖和凋亡等<sup>[33]</sup>, MAPK14 主要参与细胞生长、分化、应激、炎症反应等多种细胞活动<sup>[34-35]</sup>。此外, MAPK14 的激活是一种氧化和触发黏附蛋白的调节器, 能够磷酸化激活 MAPKAP2 来增强炎性因子的表达和分泌<sup>[36]</sup>。

KEGG 富集分析主要涉及的通路为 PI3K-Akt 信号通路、表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制通路、乙型病毒性肝炎信号通路等。研究证明, PI3K/Akt 信号通路的激活会使得气道中的炎性因子迁移到炎性病灶中, 同时 PI3K/Akt 信号通路在支气管哮喘中也表现出有效的抗炎活性<sup>[33, 37]</sup>。EGFR 信号通路在维持上皮细胞稳定性、促进气

道上皮组织修复方面起着至关重要的作用<sup>[30, 38]</sup>。乙型病毒性肝炎通路表现为直接或间接与免疫和炎症相关, 说明半夏不同炮制品在抗炎方面发挥着一定的作用<sup>[39]</sup>。

综上所述, 本实验在比较研究半夏炮制前后成分变化的基础上, 联合网络药理学初步探讨了半夏炮制增效的原理, 对“药物-成分-靶点”关系网络中关键成分分析, 发现原料药材与炮制辅料均在治疗疾病的过程中发挥重要作用。根据网络药理学的结果推测, 半夏不同的炮制品中的甲基丁香酚、二乙基酮、正十六烷等物质作为潜在的止咳有效成分, 通过 TLR4、CASP3、ESR1 等关键靶点, 调节 PI3K-Akt、EGFR 等信号通路的激活, 从而抑制组织炎症反应和气道结构重塑, 发挥止咳的作用。本研究从分子作用机制的角度阐释半夏中挥发性成分的止咳作用机制, 今后将通过相关生物学实验, 验证半夏不同炮制品在药性与临床止咳作用之间的联系与差别。

## 参考文献

- 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.
- 王恒, 于淼, 李伟楠, 等. 半夏化学成分及抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27 (8): 49-52.
- 李哲, 玄静, 赵振华, 等. 半夏化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23 (11): 154-158.
- 左军, 牟景光, 胡晓阳. 半夏化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21 (9): 26-29.
- 朱晓春, 夏振江, 沈庆红, 等. 半夏炮制方法及其现代研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2023, 57 (7): 81-87.
- 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 123-125.
- Bai J, Qi JB, Yang L, et al. A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical, pharmacological and toxicological evaluation, and quality control of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115650.
- Chen C, Sun YT, Wang ZJ, et al. Pinellia genus: a systematic review of active ingredients, pharmacological effects and action mechanism, toxicological evaluation, and multi-omics application [J]. Gene, 2023, 870: 147426.
- 王锐, 倪京满, 马蓉. 中药半夏挥发油成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 1995, 30 (8): 457-459.
- 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (2): 455-461.
- 黄凤英, 高健美, 龚其海. 半夏药理作用及其毒性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32 (10): 1773-1781.
- 吴姣姣, 刘东, 张莉, 等. 基于 GC-MS 指纹图谱和网络

- 络药理学的白术挥发性成分质量标志物预测分析[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(8): 1305-1313.
- [13] 崔美娜, 钟凌云, 张大永, 等. 中药半夏复制法炮制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1304-1310.
- [14] 沈华旦. 生半夏及其炮制品的差异性成分分析和抗老年痴呆作用机制初步研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [15] 邓亮, 王泽山, 赵晓琴. 经方中半夏的炮制方法与现代半夏炮制方法的去毒效果实验分析[J]. 山西中医, 2022, 38(5): 64-65.
- [16] 庞雪. 半夏 3 种炮制品的炮制工艺研究及其初步质量分析[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [17] 李英超, 谢小倩, 王梦真, 等. 甲基丁香酚药理及毒理作用的研究进展[J]. 中中药学, 2018, 16(9): 1249-1253.
- [18] 温英丽, 罗茵, 许淑清, 等. 不同类型电子鼻在中药质量评价研究中的应用[J]. 中国现代中药, 2021, 23(12): 2201-2208.
- [19] 卢一, 解达帅, 吴纯洁. 基于 Heracles II 超快速气相电子鼻的硫熏麦冬快速鉴别研究[J]. 中药材, 2017, 40(5): 1070-1073.
- [20] 李铭轩, 秦宇雯, 李昱, 等. 基于 Heracles Neo 超快速气相电子鼻对不同基原郁金饮片的快速识别及差异标志物研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1518-1525.
- [21] 刘立轩, 李吉宁, 陈海燕, 等. 基于 HPLC 法及电子鼻技术的苦杏仁药材不同炮制方法研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(4): 494-500.
- [22] 刘媚琪. 基于指纹图谱结合化学模式识别的中药(鹅不食草、锦灯笼)综合质量评价研究[D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [23] 余亦婷, 赵乙萌, 袁曦, 等. Heracles Neo 超快速气相电子鼻对不同产地、生长年限及采收期黄芪药材品质评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(5): 1328-1337.
- [24] 邹天志, 罗玉梅. 半夏三种炮制品对比及临床处方应用探讨[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(11): 31-33.
- [25] 匡柏成, 张季, 王梦琴, 等. 甲基丁香酚的生物学活性及其作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(7): 1533-1536.
- [26] 陈玲, 胡荆江, 覃军. 维生素 D<sub>3</sub> 辅助糖皮质激素对小儿支气管哮喘 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关因子水平的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(14): 22-27.
- [27] 荆文光, 张权, 程显隆, 等. 基于电子鼻、电子舌技术的姜厚朴炮制机理探讨[J]. 河北工业科技, 2021, 38(5): 414-422.
- [28] Fu YH, Liu B, Zhang NS, et al. Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(1): 193-199.
- [29] Li PF, Wang JK, Wang CG, et al. Therapeutic effects and mechanisms study of Hanchuan Zupa Granule in a Guinea pig model of cough variant asthma. [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 269: 113719.
- [30] 李昀泽, 任铭, 张颖, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探究麻干平喘制剂治疗咳嗽变异性哮喘的作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1543.r.20230830.1748.002>.
- [31] 丁敏, 何芳, 鲍敏, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨玉屏风散治疗慢性阻塞性肺病的作用机制[J]. 中成药, 2023, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230627.0916.002>.
- [32] 董杨逗, 钮宇恒, 张羽, 等. 白藜芦醇治疗非小细胞肺癌机制的网络药理学分析及实验验证[J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 28-36.
- [33] 孙嘉玲, 文彬, 杨雪梅, 等. 基于 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路探讨鳖甲煎丸调控肝癌细胞 Hep3B 增殖转移的机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1361-1365.
- [34] 刘畅, 梁爽, 郭雨莹, 等. 基于网络药理学探究百部止咳作用的机制及实验验证[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(3): 493-502.
- [35] 孙远, 耿强, 赵玉, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨清感冬饮治疗流行性感冒的作用机制[J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(1): 144-152.
- [36] 刘令令, 段飞, 杜巧婷, 等. 加减半夏泻心汤治疗幽门螺杆菌相关性胃炎的作用机制[J]. 中医学报, 2022, 37(3): 599-608.
- [37] 张贝贝, 曾梦楠, 张钦钦, 等. 基于网络药理学及实验验证的“麻黄-葶苈子”药对治疗支气管哮喘的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(18): 4996-5007.
- [38] 韦任玲. 益气清毒防癌茶的网络药理学研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [39] 赵艺, 卢秉久. 基于网络药理学及分子对接研究柴胡-黄芩药对治疗乙型病毒性肝炎作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(11): 90-94.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-01)

# 基于网络药理学和动物实验探讨桃红四物汤 抗缺血性脑卒中的分子机制

王艺霖<sup>1, 2</sup>, 孟祥国<sup>2</sup>, 叶宇航<sup>3</sup>, 胡霞敏<sup>1, 2\*</sup> (1. 上海中医药大学研究生院, 上海 201203; 2. 上海健康医学院, 上海 201318; 3. 上海理工大学, 上海 200093)

**摘要:** **目的** 通过网络药理学、分子对接技术和动物实验探讨桃红四物汤对缺血性脑卒中的调控机制。**方法** 运用数据库整理分析桃红四物汤与疾病的交集靶点, 进行网络拓扑分析及蛋白质相互作用分析并获取核心成分和核心靶点; 对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析; 利用分子对接技术获得通路蛋白与核心成分结合能; 采用线栓法建立小鼠脑缺血再灌注损伤 (MCAO/R) 模型, 利用神经行为学评分、TTC 染色技术考察桃红四物汤防治缺血性脑卒中的药效作用, 利用 Western blot 技术考察桃红四物汤对 MCAO/R 小鼠脑中 PI3K、AKT 蛋白和炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达的影响。**结果** 桃红四物汤抗缺血性脑卒中的核心成分可能为槲皮素、木犀草素、 $\beta$ -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、黄芩素、杨梅酮、 $\beta$ -胡萝卜素及常春藤苷, 核心靶点可能为 MAPK14、RELA、TNF、TR53、MAPK1、MYC、FOS、HSP9AA1、ESR1、AKT1、HF1A、CTNBN1。交集靶点主要富集在脂质和动脉粥样硬化、PI3K/AKT 等信号通路, 涉及氧化应激、对脂多糖的反应等生物进程。分子对接预测核心成分与通路蛋白具有较好的结合能力。动物实验表明桃红四物汤可降低 MCAO/R 小鼠神经功能评分, 减小脑梗死体积, 降低脑内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的表达, 提高 PI3K、AKT 的表达。**结论** 桃红四物汤可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 调节神经炎症, 防治缺血性脑卒中。

**关键词:** 网络药理学; 分子对接; 桃红四物汤; 脑卒中; 分子机制

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0392-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.018

## Molecular mechanism of Taohong Siwu decoction against ischemic stroke based on network pharmacology and animal experiment

WANG Yi-lin<sup>1, 2</sup>, MENG Xiang-guo<sup>2</sup>, YE Yu-hang<sup>3</sup>, HU Xia-min<sup>1, 2\*</sup> (1. Graduate School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318; 3. Shanghai University of Science and Technology, Shanghai 200093)

**Abstract: Objective** To determine the mechanism of Taohong Siwu decoction (THSWD) in ischemic stroke by network pharmacology, molecular docking and in vivo experiment. **Methods** The common targets of THSWD and disease were analyzed via database collection. Network topology analysis and protein interaction analysis were used to obtain the key components and key targets. The common targets were analyzed by GO and KEGG enrichment. The binding energy of related pathway proteins and key components was obtained by molecular docking. The mouse focal ischemia-reperfusion injury model was established by ligation of middle cerebral artery occlusion reperfusion (MCAO/R). The effect of THSWD on stroke was determined by neurobehavioral tests and TTC staining. Western blot was used to verify the effect of THSWD on the expression of IL-1 $\beta$ , IL-18, PI3K, and AKT in the middle MCAO/R mouse brain. **Results** The key components of THSWD on ischemic stroke might include quercetin,

作者简介: 王艺霖, 男, 硕士研究生, 主要从事心脑血管药理研究, email: wangyilin0603@126.com \*通信作者: 胡霞敏, 女, 教授, 主要从事心脑血管药理研究, email: huxm@sumhs.edu.cn



luteolin,  $\beta$ -sitosterol, kaempferol, stigmasterol, baicalin, myricetin,  $\beta$ -carotene and ivioside. THSWD and the key potential targets of disease included MAPK14, RELA, TNF, TR53, MAPK1, MYC, FOS, HSP9AA1, ESR1, AKT1, HF1A and CTNNB1. The common targets were mainly concentrated in the lipid and atherosclerosis signaling pathways, and PI3K/AKT signaling pathways, which involved in such biological processes as oxidative stress and response to lipopolysaccharide. The molecular docking showed that key components had strong binding affinity to pathway protein. The in vivo experiment assays showed that THSWD decreased the neural function score, reduced the cerebral infarction area, decreased the expression levels of IL-1 $\beta$  and IL-18, and increased the expression levels of PI3K and AKT in the MCAO/R mouse brain. **Conclusion** THSWT may prevent stroke via the activation of PI3K/AKT signaling pathway to regulate neuritis.

**Key words:** network pharmacology; molecular docking; Taohong Siwu decoction; ischemic stroke; molecular mechanism

缺血性脑卒中, 中医称之为中风, 是指由于脑的供血动脉(颈动脉和椎动脉)狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑组织坏死的总称<sup>[1]</sup>, 具有高发病率、高死亡率和致残率等特点<sup>[2]</sup>。目前临床上被 FDA 认证的治疗方法只有静脉溶栓及动脉取栓<sup>[3]</sup>, 其目的是迅速恢复缺血区的血流, 挽救缺血半暗带的神经元, 缓解脑组织因缺血缺氧引起的神经功能损伤<sup>[4]</sup>, 但由于治疗时间窗狭窄限制了其在临床上的应用。

《内经》有对中风病病机进行论述: 情志失调, 血逆瘀于脑, 是中风病发生的根本机制<sup>[5]</sup>。桃红四物汤(Taohong Siwu decoction, THSWD)是《医宗金鉴》记载的经典名方, 由桃仁、红花、当归、川芎、白芍、熟地黄六味药材组成<sup>[6]</sup>。其在四物汤补血养血的基础上, 加入活血祛瘀的桃仁及活血通经的红花, 使此方养血而不滞血, 活血而不破血, 补中有行, 破中有收, 六药合用, 达到活血行气、扶正祛邪之功效<sup>[7]</sup>。临床表明, 桃红四物汤对缺血性脑卒中有明显的治疗作用<sup>[8]</sup>, 但其机制有待进一步阐明。本研究通过网络药理学及实验验证探讨桃红四物汤治疗脑卒中的物质基础及可能的分子机制, 为后续实验研究提供研究思路。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠 50 只(雄性, SPF 级, 浙江维通利华实验动物技术有限公司, 6~8 周, No: 20220923Abzz0619000896), 饲养于上海健康医学院实验动物中心, 进食进水自由, 动物实验通过上海健康医学院实验动物伦理委员会批准(伦理批件号: 20220621)。

### 1.2 试剂

2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC, 上海

阿达玛斯试剂有限公司, 货号: 45959B), 兔抗 PI3K(货号: 4228S)、AKT(货号: 4060S)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ (货号: 12242S)、IL-18(货号: 57058S)(Cell Signaling Technology 公司),  $\beta$ -actin(美国 Proteintech Group 公司, 货号: 81115-1-RR), HRP 标记的山羊抗兔 IgG HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: GB23301)。

桃红四物汤组方: 川芎 8 g(批号: 230513), 桃仁 9 g(批号: 2023062101), 当归 12 g(批号: 230902), 熟地黄 15 g(20230707), 红花 9 g(批号: 20230717-1), 白芍 10 g(批号: 230717)(上海中医药大学附属曙光医院)。根据小鼠与人体表面积比值系数减压浓缩至 0.36 g · mL<sup>-1</sup>。

### 1.3 仪器

体视显微镜(日本 Olympus 公司), EPS-600 数显式稳压稳流电泳仪、Tanon 4800 系列全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司), 多普勒激光散斑血流仪(上海瑞沃德有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学

**2.1.1 桃红四物汤核心成分-核心靶点-通路网络的构建** 应用 TCMSP 和 Uniprot 数据库, 以口服生物利用度  $\geq 30\%$ , 分子类药性  $\geq 0.18$  为标准筛选获取桃红四物汤活性成分及活性成分的预测靶点, 再通过 GeneCards、PharmGkb、OMIM、TTD、Drugbank 5 个疾病数据库获取缺血性脑卒中相关的疾病靶点, 两者取交集, 将活性成分和交集靶点导入 Cytoscape 3.9.0 构建“活性成分-作用靶点”网络获得 9 个核心化合物: 槲皮素(quercetin)、木犀草素(luteolin)、 $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)、山柰酚(kaempferol)、豆甾醇(stigmasterol)、黄芩素(baicalin)、杨梅

酮 (myricanone)、β-胡萝卜素 (beta-carotene)、常春藤皂苷 (hederagenin)。交集靶点上传至 STRING 数据库, 筛选 score > 0.95 的靶点导入 Cytoscape 构建 PPI 网络, 获得 12 个潜在核心靶点, 分别为 MAPK14、RELA、TNF、TR53、MAPK1、MYC、FOS、HSP9AA1、ESR1、AKT1、HF1A、CTNNB1。利用使用 R 语言软件的 R 包“ClusterProfiler”对交集靶点进行通路富集分析, 选取前 8 条通路, 运用 Cytoscape 软件构建“核心成分-核心靶点-通路”网

络图, 见图 1。PI3K/AKT 信号通路是调节细胞迁移、增殖、分化和凋亡的重要途径, 为经典的抗凋亡 / 促生殖的信号传导通路之一, 是预防缺血性脑卒中的关键级联信号通路, 其通过调节线粒体障碍、细胞凋亡、细胞自噬、氧化应激和炎症反应等多种机制在抗脑卒中中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。由图 1 可发现核心靶点 AKT1、RELA、TP53、MYC、HSP、MAPK1 涉及 PI3K/AKT 信号通路。

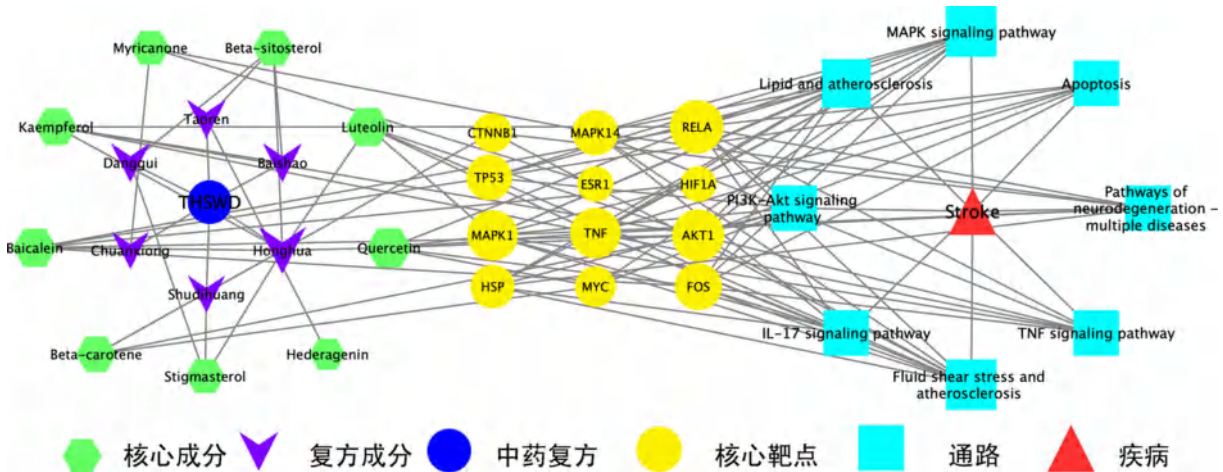


图 1 “核心成分-核心靶点-通路”网络图

Fig 1 Core compound-core target-pathway network

**2.1.2 GO 功能富集分析** 通过 R 包“ClusterProfiler”对交集靶点 GO 功能富集分析获得 2823 个 GO 功能条目, 主要涉及氧化应激、炎症反应等生物过程 (BP)。交集靶点在 BP、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 中显著富集的前 10 个 GO 条目, 见图 2。

研究发现, 神经炎症在缺血性脑卒中中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。脑缺血后继发性损伤的机制可能是由于缺血性脑卒中后脑内炎症的产生, 炎症反应加快了缺血性损伤的形成并影响神经元死亡和神经组织再生。提示桃红四物汤发挥脑保护作用可能与抗炎有关。

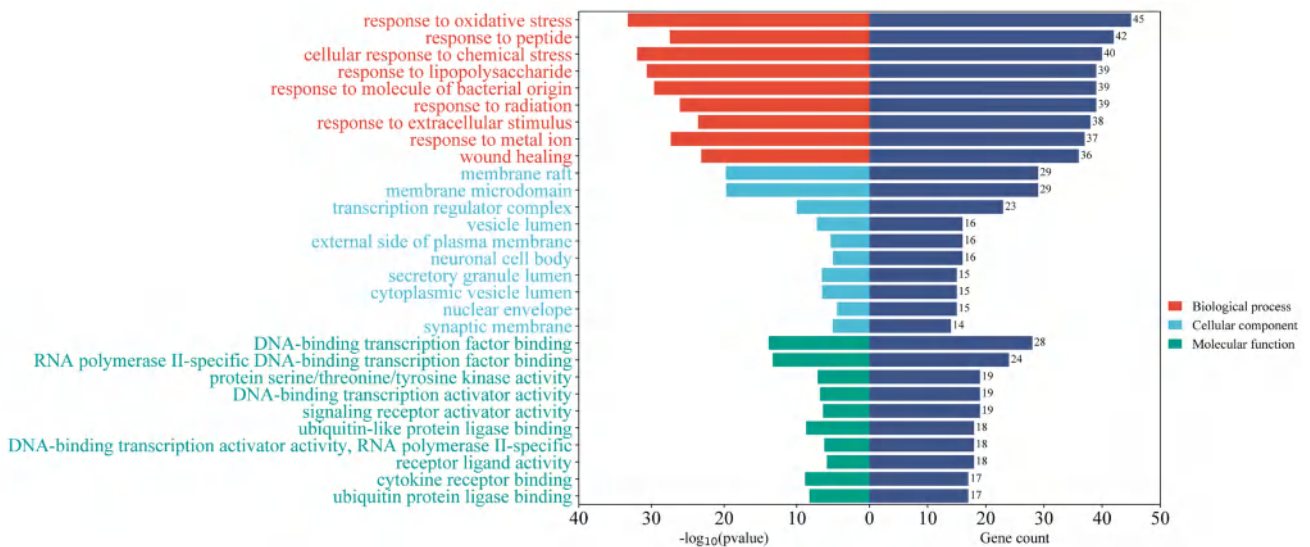


图 2 桃红四物汤与缺血性脑卒中疾病 GO 富集分析图

Fig 2 GO functional enrichment analysis of THSWD in treating ischemic stroke



**2.1.3 分子对接** 将鉴定筛选得到的 9 个潜在核心化合物作为配体，将涉及 PI3K/AKT 信号通路的核心靶点蛋白和 PI3K 蛋白作为受体进行分子对接。首先，从 TCMSPP 数据库下载核心成分的结构并以 mol2 格式保存。然后从 RCSB (PDB) 数据库下载核心靶点的配体结构，使用 Autodock 对接每个成分和配体。结合能  $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$

的对接分数表明该化合物与靶点之间具有良好的结合活性，结合能越低，说明结合活性越好。结果表明，大部分核心成分与 PI3K/AKT 相关蛋白具有较好的结合能力，进一步验证了桃红四物汤可能通过调节 PI3K/AKT 信号通路防治缺血性脑卒中，见表 1。将结合能较低的对接结果进行可视化，见图 3。

表 1 分子对接结合能

Tab 1 Binding energy of molecular docking

核心成分	Mol ID	结合能 / ( $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ )						
		PI3K	AKT1	RELA	HSP	MAPK1	MYC	TP53
木犀草素	MOL000006	-4.67	-6.29	-5.53	-5.74	-6.79	-6.82	-7.07
槲皮素	MOL000098	-4.68	-7.82	-5.21	-5.58	-6.73	-6.64	-7.32
长春藤皂苷	MOL000296	-5.66	-7.09	-6.11	-5.91	-6.71	-7.81	-7.30
$\beta$ -谷甾醇	MOL000358	-6.71	-6.87	-6.23	-8.00	-8.86	-9.83	-9.03
山柰酚	MOL000422	-4.71	-7.74	-5.17	-5.92	-6.37	-6.88	-7.50
豆甾醇	MOL000449	-5.84	-8.90	-7.54	-8.72	-9.96	-10.65	-9.21
杨梅酮	MOL002135	-6.08	-6.89	-6.47	-7.29	-7.31	-8.43	-8.62
黄芩素	MOL002714	-7.47	-6.77	-5.63	-6.71	-6.17	-7.24	-7.04
$\beta$ -胡萝卜素	MOL002773	-6.17	-8.56	-8.04	-8.93	-8.97	-10.51	-8.81

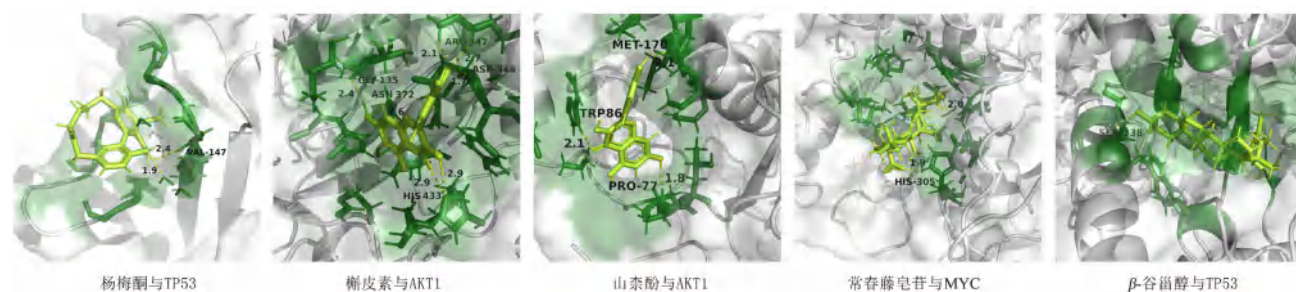


图 3 分子对接结果可视化

Fig 3 Visualization of molecular docking results

## 2.2 动物实验验证

**2.2.1 动物分组及给药** 将小鼠适应性喂养 7 d 后，随机分为假手术组 (Sham 组)，模型组 [脑缺血再灌注损伤 (MCAO/R) 组]，桃红四物汤低、中、高剂量组，每组 10 只。于饲养第 8 日开始给药，假手术组、模型组给予蒸馏水， $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃；桃红四物汤低、中、高剂量组分别给予桃红四物汤煎煮液  $0.9$ 、 $1.8$ 、 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃。

**2.2.2 MCAO/R 模型小鼠的构建** 小鼠饲养第 11 日，除空白组外，其余各组均依据 Zea-Longa 线栓法<sup>[11]</sup>的操作步骤建立 MCAO/R 小鼠模型，采用激光多普勒血流仪分别于缺血前、缺血后 5 min 和再灌注后 5 min 监测小鼠脑血流情况，与缺血前相比，缺血后的小鼠左脑血流明显缺失，再灌注后大部分血流恢复，表示小鼠造模成功。空白组 10 只，模型组 8 只，桃红四物汤低、中、

高剂量组各 9 只造模成功，分别于术后 24、48、72 h 分别进行神经功能学评分，评分后采用二氧化碳气体麻醉处死，每组 3 只小鼠断头取脑， $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，待 TTC 染色；每组 3 只小鼠同法取右侧大脑组织置液氮中速冻固定， $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存，供 Western blot 检测用。

**2.2.3 桃红四物汤对 MCAO/R 小鼠神经功能损伤的影响** 参照 Zea-Longa 评分标准和 mNss 法分别于缺血 1.5 h 再灌注 24、48 和 72 h 对神经功能缺损评分。Longa 法评分标准：0 分，无神经功能缺损；1 分，对侧前爪不能完全伸展；2 分，向对侧自发性旋转；3 分，向对侧倾倒；4 分，意识丧失。mNss 法评分项目包括运动实验、感觉实验、平衡木实验、反射丧失和不正常运动 4 项，评分从 0 ~ 18 分，0 分为正常无缺陷，18 分为最大缺陷。结果显示：与 Sham 组相比，模型组神经功能评分明显增高，主要表现为提尾时右侧前爪不能完



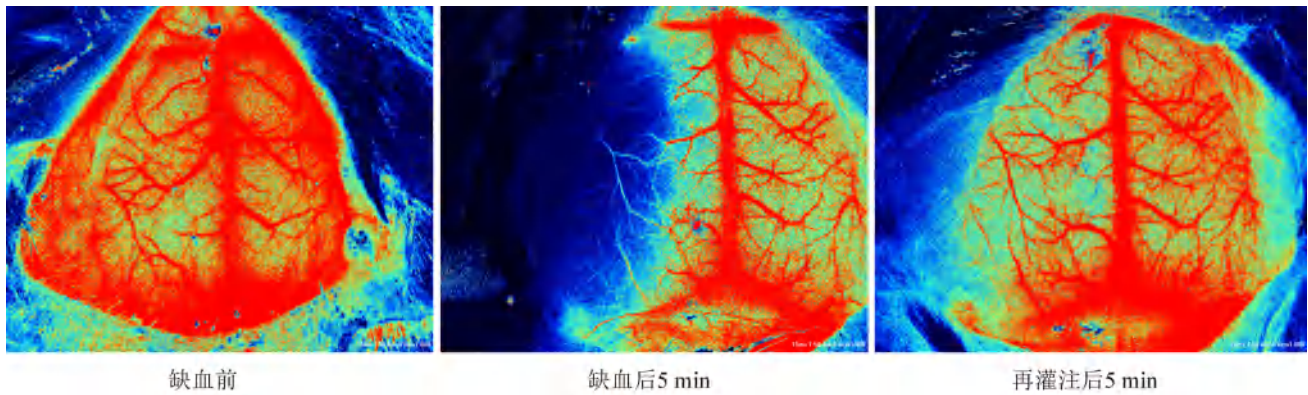


图 4 激光多普勒血流图  
Fig 4 Laser Doppler flow chart

全伸直，置于水平桌面时，向患侧转圈，偏瘫等症；与模型组相比，桃红四物汤中、高剂量组能明显减轻神经功能障碍，见图 5。

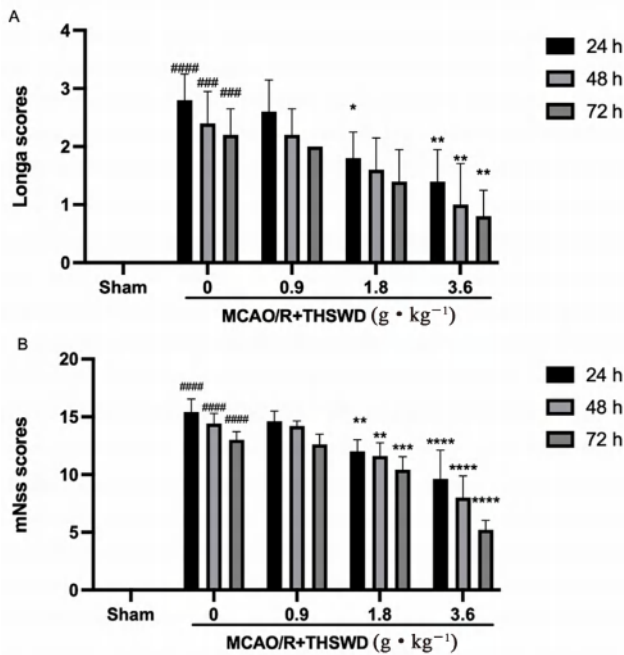


图 5 桃红四物汤对 C57BL/6 小鼠 MCAO/R Longa 评分和 mNss 评分的影响  
Fig 5 Effect of THSWD on Longa score and mNss score of MCAO/R mice

注 (Note)：与 Sham 组相比，#### $P < 0.0001$ ，##### $P < 0.00001$ ；与模型组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$  (Compare with the Sham group, #### $P < 0.0001$ , ##### $P < 0.00001$ ; compare with the model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )。

**2.2.4 桃红四物汤对 MCAO/R 小鼠脑梗死体积的影响** TTC 是一种脂溶性光敏感复合物，常用来染色检测哺乳动物组织的缺血梗死，可使正常脑组织染成红色，缺血区因组织坏死呈白色。取  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中脑组织迅速自视交叉点前后 1 mm 厚度冠状面切片 (约 5 片)，置于 1%TTC 溶

液中， $37^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min，4% 多聚甲醛溶液  $4^{\circ}\text{C}$  固定过夜，扫描拍照。用 Image J 软件计算脑梗死体积。脑梗死体积 (%) = 左侧脑半球梗死范围 / (左侧脑半球总范围 + 右侧脑半球总范围)  $\times 100\%$ 。结果显示，与 Sham 组相比，模型组脑梗死体积明显升高；与模型组相比，桃红四物汤中、高剂量组脑梗死体积明显减小，且高剂量组脑梗死体积减小最明显，表明桃红四物汤可有效减少小鼠 MCAO/R 后脑梗死体积，见图 6。

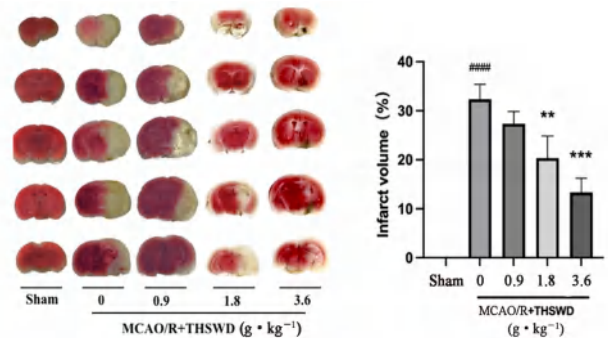


图 6 桃红四物汤对小鼠脑梗死体积的影响  
Fig 6 Effect of THSWD on the infarct volume

注 (Note)：与 Sham 组相比，#### $P < 0.0001$ ；与模型组相比 \*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$  (Compare with the Sham group, #### $P < 0.0001$ ; compare with the model group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

**2.2.5 桃红四物汤对 MCAO/R 小鼠脑组织 PI3K、AKT 蛋白表达的影响** 网络药理学及分子对接技术提示桃红四物汤可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路调节神经炎症发挥脑保护作用。用 Western blot 方法对脑组织中 PI3K、AKT 蛋白表达进行检测。取 Sham 组、MCAO/R 组及药效最为明显的桃红四物汤高剂量组左半脑组织，加入 RIPA 裂解液匀浆，提取蛋白。蛋白样本经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，封闭后加入 PI3K、AKT、 $\beta$ -actin 抗体， $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜；加入对应山羊抗兔 / 鼠抗体，孵育 2 h，使

用 ECL 发光系统显像，使用 Image J 软件进行灰度值 (DPI) 分析。结果显示，与 Sham 组比较，模型组小鼠脑组织 PI3K、AKT 蛋白表达均降低；

与模型组比较，桃红四物汤组小鼠脑组织 PI3K、AKT 蛋白表达升高 (见图 7)。

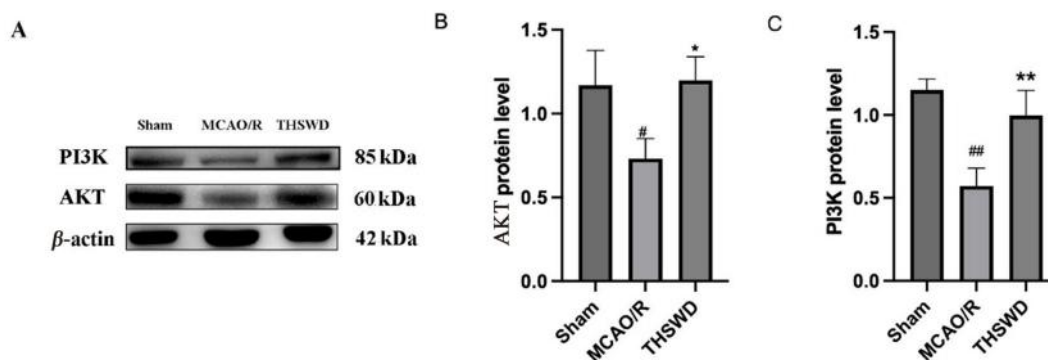


图 7 桃红四物汤对 PI3K、AKT 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of THSWD on the expression of PI3K and AKT protein

注 (Note): 与 Sham 组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (Compare with the Sham group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compare with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ).

### 2.2.6 桃红四物汤对 MCAO/R 小鼠神经炎症的影响

基于以上分析结果，检测了脑组织中 IL-1β、IL-18

炎症因子的蛋白表达。结果显示 (见图 8)，桃红四物汤可明显降低小鼠促炎因子 IL-1β、IL-18 的水平。

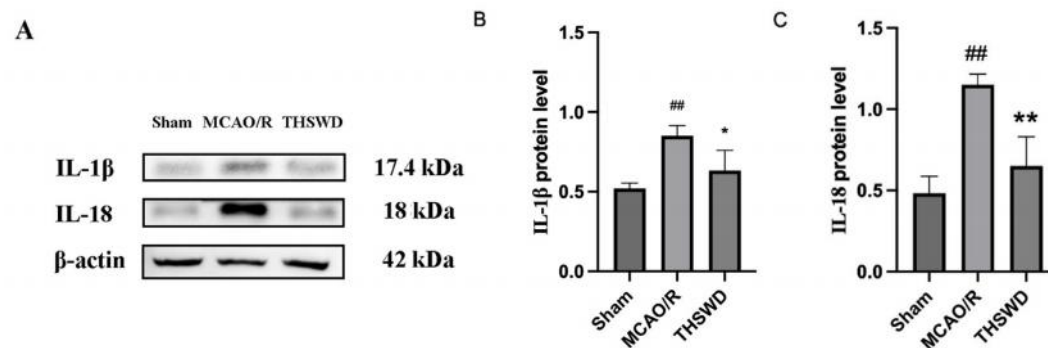


图 8 桃红四物汤对 IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响

Fig 8 Effect of THSWD on the expression of IL-1β and IL-18 protein

注 (Note): 与 Sham 组相比, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (Compare with the Sham group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compare with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ).

### 2.2.7 统计学分析

本实验采用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行统计学分析。采用单因素方差，后用 Turkey 法分析两组间差异分析进行统计学分析，用均数 (mean) ± 标准误 (SEM) 表示，以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 讨论

中医认为中风是由于气血逆乱，脑脉痹阻或血溢于脑所致。因此，活血理气是其基本治疗原则。桃红四物汤方中桃红、红花为主，主力活血化瘀；熟地、当归养血；白芍补血；川芎活血行气，是活血化瘀的经典名方。本研究使用网络药理学及分子对接技术初步探讨了桃红四物汤抗缺血性脑卒中的机制，利用 TCMSP 数据库共获取到桃红四物汤的成分 43 个，治疗缺血性脑卒中的

靶点 179 个，进一步筛选获得桃红四物汤干预缺血性脑卒中的主要成分可能为槲皮素、木犀草素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇、黄芩素、杨梅酮、β-胡萝卜素、常春藤皂苷，核心靶点可能为 AKT1、RELA、TP53、MYC、HSP、MAPK1、TNF、MAPK14 等。槲皮素<sup>[12]</sup>、木犀草素<sup>[13]</sup>、β-谷甾醇<sup>[14]</sup>、山柰酚<sup>[15]</sup>、黄芩素<sup>[16]</sup>、豆甾醇<sup>[17]</sup>、常春藤皂苷<sup>[18]</sup> 有相关抗脑卒作用的文献报道，AKT1、TNF、MAPK1、MAPK14 等核心靶点与炎症反应的调节密切相关，这与现代药理学研究发现桃红四物汤具有抗炎的药理作用一致。

GO 分析和 KEGG 分析富集结果显示桃红四物汤抗缺血性脑卒中的潜在靶点涉及对脂多糖的反应、氧化应激等多种生物学过程，涉及脂质和

动脉粥样硬化通路, PI3K/AKT 信号通路等。本研究从以上分析中选取了 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白, 并利用分子对接技术将核心成分与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白进行分子对接, 发现核心成分与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白具有较好的结合能力。由于炎症反应和 PI3K/AKT 信号通路在缺血性脑卒中的发生发展中起重要作用, 所以我们可以推断桃红四物汤抗缺血性脑卒中的机制可能与激活 PI3K/AKT 多条信号通路和调节神经炎症有关。

在小鼠 MCAO/R 模型上对桃红四物汤抗脑缺血再灌注损伤的保护作用进行验证, 结果发现, 桃红四物汤可明显降低 MCAO/R 模型小鼠的神经功能评分, 改善神经功能障碍; TTC 染色显示桃红四物汤可显著缩小脑梗死体积, 表明其对缺血性脑卒中有较为显著的防治作用。同时, 根据网络药理学及分子对接结果的提示, 我们对 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白和炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 表达水平进行了检测。结果显示桃红四物汤可明显提高 PI3K、AKT 的蛋白表达, 降低 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的表达。以上结果表明桃红四物汤能激活 PI3K/AKT 信号通路, 减轻神经炎症, 发挥抗脑缺血再灌注作用。

综上, 本研究探讨中医传统药方桃红四物汤抗脑卒中可能的作用机制。结合现代中药网络药理学及分子对接技术对桃红四物汤抗脑卒中的关键成分及作用靶点进行了推测, 并选择了其中较为重要的 PI3K/AKT 信号通路进行了初步的验证, 提示桃红四物汤作用机制与激活 PI3K/AKT 信号通路, 减轻神经炎症有关, 该研究结果对丰富桃红四物汤的现代研究, 进一步探索桃红四物汤防治缺血性脑卒中的作用机制提供了线索, 对其二次开发具有重要意义。但本研究仅对网络药理学推测结果中的 PI3K/AKT 通路进行了验证, 因此要阐明桃红四物汤抗脑卒中的作用机制仍需更深入的研究。

## 参考文献

[1] 张萍. 小脑顶核电刺激对缺血性脑卒中患者神经功能重建的治疗效果 [J]. 神经损伤与功能重建, 2017, 12 (4): 356-357.

[2] Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions [J].

Neurology, 2021, 97 (20 Suppl 2): S6-S16.

[3] Roaldsen MB, Lindekleiv H, Mathiesen EB. Intravenous thrombolytic treatment and endovascular thrombectomy for ischaemic wake-up stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 12 (12): CD010995.

[4] Zhao YF, Zhang XJ, Chen XY, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: from mechanisms to treatment [J]. Int J Mol Med, 2022, 49 (2): 15.

[5] 刘伍立, 欧阳建军, 黄博辉. 中医文献对中风病的阐述与述评 [J]. 针灸临床杂志, 2006 (10): 5-8, 66.

[6] 李双双, 郭春燕. 桃红四物汤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 神经药理学报, 2016, 6 (4): 42-49.

[7] 聂欣, 成颜芬, 王琳, 等. 桃红四物汤化学成分、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]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (4): 226-234.

[8] 利顺欣, 彭智, 尚发军. 桃红四物汤对老年急性脑梗死患者神经功能影响的临床研究 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32 (4): 136-138.

[9] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: at the bench and bedside [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125-132.

[10] Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, et al. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16 (1): 142.

[11] Williner P, Bianchin M, Walz R, et al. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing [J]. Behav Pharmacol, 1993, 4 (2): 95-99.

[12] 杨冉, 申艳佳, 李莉, 等. 槲皮素对缺血性脑卒中大鼠血脑屏障的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33 (9): 726.

[13] 郭彦芳, 董秀芳, 王瑜龙, 等. 木犀草素抑制 HIF-1 $\alpha$ /NLRP3 信号通路对脑卒中大鼠认知障碍和神经细胞凋亡的影响 [J]. 热带医学杂志, 2022, 22 (9): 1196-1202, 1325.

[14] 朱伟. 库拉索芦荟中的  $\beta$ -谷甾醇对蒙古沙土鼠脑缺血-再灌注损伤的促血管生成活性 [J]. 国外医药 (植物药分册), 2003 (2): 70-71.

[15] 徐芳琴, 郭超, 王婧雯. 山柰酚对脑缺血/再灌注损伤的体内外保护作用机制研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (17): 2065-2071.

[16] 李鸣. 抑制铁死亡介导的黄芩素对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.

[17] Liang QL, Yang J, He JJ, et al. Stigmasterol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammation and improving antioxidant defenses in rats [J]. Biosci Rep, 2020, 40 (4): BSR20192133.

[18] Yu HL, Song LL, Cao X, et al. Hederagenin attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by regulating MLK3 signalling [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1173.

(收稿日期: 2023-09-02; 修回日期: 2023-11-05)



## 连翘种子品质检验及质量分级标准研究

邹晨鑫, 彭毅丹, 刘亦欣, 谭启怡, 颜永刚, 孙静, 杨新杰\* (陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 建立连翘种子品质检验方法, 制订连翘种子质量分级标准。**方法** 通过测定不同产地连翘种子的生活力、净度、发芽率、含水量、千粒重、形态等指标, 对 16 份来自全国连翘主产地的连翘种子进行品质检验, 并且使用 SPSS 软件对所得数据进行 K-均值聚类分析, 初步制订连翘种子的质量分级标准。**结果** 连翘一级种子黑褐色、圆润饱满, 净度  $\geq 90\%$ , 千粒重  $\geq 3.2$  g, 含水量  $\leq 6.2\%$ , 生活力  $\geq 85\%$ , 发芽率  $\geq 85\%$ ; 二级种子褐色、较饱满, 净度  $\geq 75\%$ , 千粒重  $\geq 2.7$  g, 含水量  $\leq 5.5\%$ , 生活力  $\geq 65\%$ , 发芽率  $\geq 60\%$ ; 三级种子黄棕色、瘦瘪, 净度  $\geq 40\%$ , 千粒重  $\geq 2.2$  g, 含水量  $\leq 4.3\%$ , 生活力  $\geq 45\%$ , 发芽率  $\geq 35\%$ 。**结论** 本研究制订了连翘种子分级标准, 可为连翘种子的质量评价和人工栽培提供参考依据。

**关键词:** 连翘种子; 品质检验; 质量分级标准

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0399-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.019

Quality test and quality grading standard for *Forsythia suspensa* seeds

ZOU Chen-xin, PENG Yi-dan, LIU Yi-xin, TAN Qi-yi, YAN Yong-gang, SUN Jing, YANG Xin-jie\* (College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 712046)

**Abstract: Objective** To establish a method for quality inspection of *Forsythia suspensa* seeds and corresponding quality grading standards. **Methods** By measuring the vitality, purity, germination rate, moisture content, thousand grain weight, morphology and other indicators of *Forsythia suspensa* seeds from different producing areas, quality of 16 samples from the main producing areas of *Forsythia suspensa* in China was tested. The data were analyzed by K-means clustering analysis with SPSS software to formulate quality grading standards for *Forsythia suspensa* seeds. **Results** Grade one *Forsythia suspensa* seeds were black-brown, round and full, with a purity  $\geq 90\%$ , thousand grain weight  $\geq 3.2$  g, moisture content  $\leq 6.2\%$ , vitality  $\geq 85\%$  and germination rate  $\geq 85\%$ . Grade two seeds were brown, relatively full, with a purity  $\geq 75\%$ , thousand grain weight  $\geq 2.7$  g, moisture content  $\leq 5.5\%$ , vitality  $\geq 65\%$  and germination rate  $\geq 60\%$ . Grade three seeds were yellow-brown, shrunken, with a purity  $\geq 40\%$ , thousand grain weight  $\geq 2.2$  g, moisture content  $\leq 4.3\%$ , vitality  $\geq 45\%$  and germination rate  $\geq 35\%$ . **Conclusion** Quality grading standards for *Forsythia suspensa* seeds have been established, providing reference and guidance for the evaluation and artificial cultivation of *Forsythia suspensa* seeds.

**Key words:** *Forsythia suspensa* seed; quality inspection; quality grading standard

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. 为木犀科连翘属落叶灌木, 早春先花植物, 具观赏价值, 为重要的园林绿化植物<sup>[1]</sup>。在中医临床中以其干

燥果实作为药用, 通常在果实刚成熟还带有绿色时进行采收, 通过蒸熟或者沸水煮片刻后晒干, 将其称为“青翘”, 在果实成熟后采收晒干, 称之

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2021YFD1601004; No.2019YFC1712605); 陕西省中医药管理局专项 (No.2021-QYZL-02)。

作者简介: 邹晨鑫, 男, 硕士研究生, 主要从事中药资源的开发与利用研究, email: 1599972535@qq.com \*通信作者: 杨新杰, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药质量控制和中药资源研究, email: xxx211xxx@126.com

为“老翘”。连翘始载于《神农本草经》<sup>[2]</sup>，其性味苦、微寒，归肺、心、小肠经，具有清热解毒、散结消肿、疏散风热等功效，主治痈疮，风热感冒，温病初起，高热烦渴，神昏发斑，热淋涩痛等病症<sup>[3]</sup>，用途较广。连翘果实中含黄酮类、苯乙烷类、挥发油类等成分<sup>[4]</sup>。现代研究表明，连翘具有抗炎<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6]</sup>、抗菌<sup>[7]</sup>、抗氧化、解热<sup>[8]</sup>、抗内毒素、抗肿瘤<sup>[9-10]</sup>、调节免疫<sup>[10]</sup>等作用。

连翘的药材商品主要来源于野生资源，被列为国家计划管理品种<sup>[11]</sup>。近年来随着连翘的观赏和药用价值的不断被开发利用，野生资源的保有量难以满足市场需求，寻求人工播种育苗为最简单有效的途径之一<sup>[12]</sup>。科学的种植栽培是确保药材品质的一个重要措施，优质的种子是进行连翘种植栽培的重要保证，这也是对连翘种子做质量标准评价的重要原因。制订出连翘种子的质量标准，可以为连翘种子的筛选和使用提供参考价值。

有文献对连翘种子品质进行过相关的研究，但所收集的连翘种子范围较小，制订的标准较低<sup>[13-14]</sup>。此次研究过程中扩大了连翘种子的范围，采集 16 份来自全国连翘主产区的连翘种子，评价连翘种子品质，进行种子的质量分级研究，以期对连翘种子品质标准的制订提供参考依据。

本研究主要对种子形态色泽、千粒重、含水量、生活力、发芽率和发芽势进行测定。在实验过程中使用到的方法有四分法测量净度、徒手减半法测量千粒重、TTC 法测定种子生活力、高温烘干法测定含水量以及水培法测定种子发芽率。以上实验方法在种子质量标准制订中较为经典，被广泛用于种子相关实验，具有科学性。在进行数据处理时运用 K-均值聚类法和统计学分析来对数据进行处理，K-均值聚类法的优点在于对大型数据集也是简单高效，时间复杂度、空间复杂度低。最终参考综合影响因素和实际情况在所得数据的基础上进行连翘种子的质量分级标准的制订。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

FA2104 万分之一电子分析天平（上海民桥精密科学仪器有限公司）；MGC-300H 人工气候培养箱、DHG-9030 电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

### 1.2 试药

2, 3, 5-氯化三苯四氮唑（TTC，含量≥98%，福州飞净生物科技有限公司）。于 2020 年 9 月下旬选择陕西、山西、河北、河南、山东等五省种植基地对连翘种子进行收集，用于质量检验方法评价和

质量标准研究。种子编号和具体产地见表 1。所有的种子都通过陕西中医药大学中药标本馆王继涛高级实验师鉴定，均为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. 的种子。

表 1 连翘种子来源  
Tab 1 Source of *Forsythia suspensa* seeds

序号	产地
Z1	陕西省商洛市洛南县古城镇
Z2	陕西省商洛市洛南县石门镇
Z3	陕西省商洛市洛南县灵口镇
Z4	陕西省商洛市山阳县色河铺镇*
Z5	陕西省商洛市商南县湘河镇*
Z6	山西省运城市绛县南樊镇
Z7	山西省运城市新绛县北张镇北杜坞村
Z8	山西省临汾市襄汾县南贾镇荀董村
Z9	陕西省渭南市蒲城县
Z10	河北省保定市安国市河西村
Z11	河北省邯郸市涉县*
Z12	河南省洛阳市嵩县白云山
Z13	河南省洛阳市洛宁县神灵寨
Z14	陕西省延安市黄龙县石堡镇木柯寨*
Z15	陕西省宝鸡市眉县营头镇*
Z16	山东省济南市长清区*

注：\*种子来源于当地药材收购站，其余种子来源均为自行采集。

Note: \*sourced from local medicinal material procurement stations, while the rest of the seeds are self collected.

## 1.3 方法

**1.3.1 净度分析** 参照 GB/T3543.2 农作物种子检验规程扦取样品，采用四分法<sup>[15]</sup>。取种子近 5 g，置于桌面上分离净种子。使用电子天平进行精密称重，并且计算净种子含量的百分比，所有样品重复称量 3 次，最终取其平均值。净度公式如式 (1) 所示。

净度 (%) = 干净种子的重量 / 种子总重量 (5 g) × 100% (1)

**1.3.2 千粒重的测定** 将净种子混合均匀，采用徒手减半法<sup>[16-17]</sup>从样本中取 250 粒取 4 份，共 1000 粒为 1 组，用分析天平称重，重复 3 次，取平均值。

**1.3.3 含水量的测定** 采用高温烘干法<sup>[18]</sup>，称取 0.5 g 种子放入干燥培养皿中，放置在温度达 (131±2) °C 的恒温烘箱内烘 1 h 后取出放入干燥器内冷却后称重。计算种子含水量，公式如式 (2) 所示。

种子含水量 (%) = (M<sub>2</sub> - M<sub>3</sub>) / (M<sub>2</sub> - M<sub>1</sub>) × 100% (2)

式中 M<sub>1</sub> 为培养皿质量，M<sub>2</sub> 为培养皿及样品

烘干前质量,  $M_3$  为培养皿及样品烘干后质量。

**1.3.4 生活力的测定** 采用 TTC 法测定<sup>[19]</sup> 连翘种子的生活力, 活的种子具有一定的呼吸作用, 而呼吸作用产生的脱氢酶可使无色的氧化态 TTC 还原成红色物质, 该方法简便易行, 准确率高, 是测定种子生活力的常用方法。使用 0.5% 的 TTC 溶液对连翘种子进行染色, 拿刀片将种子纵切成两瓣取其中一瓣于常温染色 12 h 后倒出 TTC 溶液并使用清水冲洗种子, 观察种子染色情况, 若种子大部分或者全部被染红说明种子有生活力。

**1.3.5 发芽率测定** 从收集的连翘果实中收取种子, 置于干燥处贮藏。把样品种子置于培养皿中并加自来水浸泡 2 h, 取沉于水中的饱满种子, 使用 1% 高锰酸钾溶液消毒 30 min, 最后使用自来水、蒸馏水依次冲洗备用。将培养皿、镊子以及滤纸放入高压灭菌锅中灭菌, 在培养皿的底部放 2 层划有网格线的湿滤纸作为发芽基质, 将处理好的连翘种子放入培养基中, 用滴管定期补清水, 使种子保持湿润状态, 连翘种子以胚根露白为发芽标准<sup>[18]</sup>。

每个培养皿 ( $d = 90 \text{ mm}$ ) 放入 50 粒种子, 每组实验重复 3 次, 均在人工气候培养箱内进行培养, 培养箱中温度为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 湿度为 60%, 光照强度均为  $12\ 000 \text{ lx}$ <sup>[14]</sup>。记录种子发芽情况, 观察 14 d 后, 统计种子的总发芽数, 计算发芽率和发芽势, 公式如式 (3) 所示。

发芽率 (%) = 发芽种子数 / 供试种子数  $\times$  100% (3)

发芽势是发芽期间日发芽数达到最大值, 发芽的种子数占供试种子数的百分率。

**1.3.6 种子基本特征鉴定** 将健康饱满的种子置于桌面上, 使用游标卡尺测量 30 粒种子的长和宽, 并观察种子颜色、形态及表面特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子净度

从表 2、3 可以看出不同地区的连翘种子净度差异较大, 分布在 31.86% ~ 94.60%, 平均值为 60.47%。由此可知, 不同地区连翘种子的净度差别较大, 含果皮、果梗、短枝、石子等杂质, 其中河北省保定市安国市河西村 (Z10) 的连翘种子净度最高, 陕西省商洛市洛南县灵口镇 (Z3) 的连翘种子净度最低。主要原因是不同产地对连翘种子采集加工处理的方式不同, 有些产地种子加工处理较为粗糙, 导致种子净度过低。

### 2.2 千粒重

表 2 连翘种子质量检测结果分析

Tab 2 Quality analysis of *Forsythia suspensa* seeds

检测项目	极小值	极大值	均值	标准差
净度 /%	31.86	94.60	60.47	22.35
千粒重 /g	2.12	3.81	2.88	0.57
含水量 /%	2.72	8.45	4.82	1.44
生活力 /%	23.33	90.67	55.54	15.79
发芽率 /%	0	92.00	21.00	21.79
发芽势 /%	0	36.00	7.33	8.34

表 3 16 批连翘种子质量检测结果

Tab 3 Quality of 16 batches of *Forsythia suspensa* seeds

序号	净度 /%	千粒重 /g	含水量 /%	生活力 /%	发芽率 /%	发芽势 /%
Z1	33.80	3.33	4.34	60.67	28.00	7.33
Z2	72.80	2.23	4.98	30.00	4.00	1.33
Z3	31.86	3.32	4.73	62.00	27.33	6.00
Z4	39.00	2.68	7.47	54.00	4.00	2.67
Z5	71.93	2.22	4.13	36.00	4.00	0.67
Z6	36.67	3.36	3.65	53.33	29.33	11.33
Z7	72.13	2.28	4.56	60.00	15.33	5.33
Z8	36.53	3.46	4.77	56.67	24.67	8.00
Z9	39.40	3.38	3.99	59.33	26.00	8.67
Z10	94.60	2.82	4.31	90.67	92.00	36.00
Z11	40.47	3.54	8.45	65.33	26.67	10.00
Z12	77.20	2.78	2.72	50.00	8.00	5.33
Z13	72.53	3.81	3.85	68.00	3.33	2.00
Z14	81.00	2.12	4.62	58.00	18.00	6.67
Z15	82.73	2.37	4.28	23.33	0.00	0.00
Z16	84.80	2.44	6.30	61.33	25.33	6.00
均值	60.47	2.88	4.82	55.54	21.00	7.33
标准差	22.35	0.57	1.44	15.79	21.79	8.34

来自全国主产区的 16 份连翘种子的千粒重在 2.12 ~ 3.81 g, 平均值为 2.88 g。其中千粒重最小的是来自陕西延安市黄龙县 (Z14) 的种子, 河南洛宁县 (Z13) 的种子的千粒重最大 (见表 2、3)。

### 2.3 含水量

来自全国主产区的 16 份连翘种子的含水量在 2.72% ~ 8.45%, 平均含水量为 4.82%。其中含水量最低为 2.72%, 来自河南省洛阳市嵩县 (Z12), 河北省邯郸市涉县 (Z11) 的含水量最高为 8.45% (见表 2、3)。

### 2.4 种子活力

来自全国主产区的连翘种子之间的生活力有很大的区别, 本次实验 16 份连翘种子的生活力在 23.33% ~ 90.67%, 平均生活力为 55.54%。其中生活力最低的为陕西省宝鸡市眉县营头镇 (Z15) 的种子, 最高的为河北省保定市安国市河西村 (Z10) 的种子。生活力测定结果区别较大的原因主要与实验所选用的染色方法、染色时间、染色



温度以及染色试剂的浓度等有关<sup>[16]</sup>,故本次实验测定各产地连翘种子生活力时,统一测定标准,减少误差(见表2、3)。

### 2.5 发芽率与发芽势

来自全国主产区的16份连翘种子发芽率和发芽势之间有着很大的区别,发芽率变化范围为0~92.00%,发芽势的变化范围是0~36.00%。其中最高的为河北省保定市安国市河西村(Z10)的种子发芽率高达92.00%;陕西省商洛市洛南县石门镇、陕西省商洛市山阳县色河铺镇、陕西省商洛市商南县湘河镇、河南省洛阳市嵩县白云山、河南省洛宁县神灵寨和陕西省宝鸡市眉县营头镇的种子发芽率均未达10.00%,其中陕西宝鸡市眉县营头镇(Z15)的种子发芽率为0,为16份样本中最低。河北省保定市安国市河西村(Z10)的种子发芽势最高达36.00%,陕西省宝鸡市眉县营头镇(Z15)的种子发芽势最低为0。通过对产地分析的比较可以发现,各个连翘产地的生态环境和气候环境都有所差异,会导致连翘种子的成分和水分的含量不同,经研究发现河北省的连翘种子的发芽率普遍高于其他省份。

### 2.6 种子基本特征鉴定

连翘种子扁平,椭圆形,一侧具薄翅,且翅不规则,使连翘一端呈三角形,一端呈半圆形;成熟种子黄棕色或黑褐色,饱满,气微香,质坚韧;种子长5.14~6.36 mm,宽1.56~2.34 mm。

### 2.7 种子质量分级标准的制订

**2.7.1 K-均值聚类分析** 通过SPSS 20.0软件以及Excel统计数据对连翘种子的五项数据进行K-均值聚类分析并分为三级,最终类中心值见表4。16份连翘种子中1级有1个(Z10),2级有9个(Z2、Z5、Z7、Z12、Z13、Z14、Z15),3级有5个(Z1、Z3、Z4、Z6、Z8、Z9、Z11),具体见图1和表4。

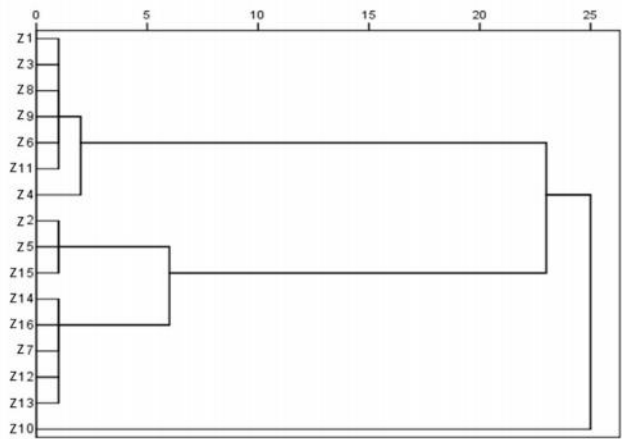


图1 连翘种子聚类分析树状关系图

Fig 1 Forsythia suspensa seeds cluster analysis

表4 K-均值聚类最终类中心(n=16)  
Tab 4 K-mean cluster final class center (n=16)

项目	序号		
	1	2	3
净度 /%	94.60	76.89	36.82
千粒重 /g	2.82	2.53	3.30
含水 /%	4.31	4.43	5.34
生活力 /%	90.67	48.33	58.76
发芽率 /%	92.00	9.75	23.71

**2.7.2 种子质量分级标准的制订** 通过K-均值聚类分析,初步将所测得的种子分为三类,根据分析数据最后确定在连翘种子的分级标准过程中,把发芽率和生活力作为一级参数,因为种子是否具有活性和发芽率直接关系到连翘的产量,将种子的净度、含水量以及千粒重作为二级参数。研究其他影响因素和K-均值聚类分析,并参考实际情况,制订出连翘种子质量分级标准(见表5),在分级标准中一级可作为品质良好的种子,可在生产过程中优先考虑。二级为质量合格的种子,可在栽种生产中可选择性使用。三级为未达标的种子,不建议在种植栽培过程中使用此类种植,否则收益不佳。

表5 连翘种子质量分级标准

Tab 5 Quality classification standards of Forsythia suspensa seeds

级别	指标					基本特征
	发芽率 /%	生活力 /%	千粒重 /g	含水量 /%	净度 /%	
一级	85	85	3.2	6.2	90	黑褐色、圆润饱满、有光泽、大小均匀,有少许杂质
二级	60	65	2.7	5.5	75	褐色、较饱满、略光泽、大小较均匀,有少许瘪粒及杂质多
三级	35	45	2.2	4.3	40	黄棕色、瘦瘪、无光泽、大小不均匀,有瘪粒及杂质较多

## 3 结论

### 3.1 不同产地连翘种子品质检验结果

不同产地的连翘种子各项指标之间有较大的差异,种子形态长5.14~6.36 mm,宽1.56~2.34 mm。发芽率在0~92.00%,生活力在23.33%~90.67%;平均生活力为55.54%。净度

在31.86%~94.60%,平均值为60.47%;千粒重在2.12~3.81 g,平均值为2.88 g。含水量在2.72%~8.45%,平均含水量为4.82%。河北省保定市安国市河西村连翘种子的净度、生活力、发芽率及发芽势较高,陕西宝鸡市眉县营头镇连翘种子的各项指标值相对较低,其连翘种子的发芽率为

0, 可能与其种子为陈旧种子或存储不当有关。

### 3.2 连翘种子质量初步分级标准

通过 K-均值聚类分析, 可将不同产地连翘种子初步分为三类, 其中一级为品质良好的种子, 二级为质量合格的种子, 三级为未达标的种子。通过分析可知, 影响连翘种子质量的主要因素有发芽率、发芽势、生活力、种子净度、千粒重、含水量。根据国际种子的分级标准, 结合连翘生产的现状, 综合考虑选定发芽率、生活力、千粒重、水分、净度作为连翘种子质量分级标准, 初步制订了连翘种子等级规定值。

### 4 讨论

通过试验结果可以发现来自不同产地的连翘种子的质量存在较大差异。净度差异较大是因为种子中含果皮、果梗、短枝、石子等杂质, 不同产地的连翘种子因采收时间及加工方法不同导致所含杂质有差异。千粒重和含水量的差异可能是由于不同产地间的气候及生态环境不同, 导致种子的颗粒大小以及饱满度有较大差异。其中作为种子质量最重要参数发芽率和生活力在不同产区之间也有很大的差异, 这对本次试验的最终目的即制订连翘种子质量标准起到主要影响。本次试验连翘种子的发芽率在 0~92.00%; 生活力在 23.33%~90.67%。分析其发芽率与生活力的差异大与地理分布、气候环境、采收时节以及贮藏过程都有着很大的关系。

在中医药临床应用中连翘以果实入药, 具有清热解毒、消肿散结等功效; 其药材商品主要来源于野生资源。但是近年来随着对连翘的不断研究开发, 连翘的野生资源保有量难以满足市场需求, 所以人工栽培种植变为连翘药材的主要来源之一。目前市场上并没有连翘种子统一的质量标准, 市售连翘种子中常常出现以次充好、新老种子混合出售等情况, 从而导致连翘种子质量混乱, 严重影响连翘药材的种植。因此对连翘种子进行品质检验和质量标准分级研究尤为必要, 是连翘药材规范化生产亟待解决的重要问题。

本实验严格按照《农作物种子检验规程》及有关种子分级方法要求, 结合连翘种子的自身特点进行连翘种子质量的初步研究, 所提出的分级标准可供有关部门制订通用标准时参考。

### 参考文献

[1] 赵成成. 连翘特征特性及培养技术[J]. 中国农业信息,

2016(11): 147-148.

- [2] 胡静, 马琳, 张坚, 等. 连翘的研究进展[J]. 中中药学, 2012, 10(10): 760-764.
- [3] 沈霞, 徐蓉蓉, 裴丽珊, 等. 基于网络药理学连翘清热解毒功效的分子机制研究[J]. 药学报, 2018, 53(11): 1834-1842.
- [4] 白响川, 马贝娜, 宋萍, 等. 连翘挥发油的生物酶辅助提取工艺优化、成分分析及体外抗氧化研究[J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(1): 70-74.
- [5] 刘文倩, 高耀, 张立伟, 等. 基于网络药理学研究连翘抗炎作用机制[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(1): 208-219.
- [6] 肖会敏, 王四旺, 王剑波, 等. 连翘抗病毒的研究进展[J]. 中国医药导报, 2010, 7(2): 9-10.
- [7] Zhao L, Li W, Dai SJ, et al. Alkaloids bearing rare skeletons from *Forsythia suspensa* with anti-inflammatory and anti-viral activities in vitro[J]. *Phytochemistry*, 2021, 186: 112739.
- [8] 郭健敏, 富力, 秦丽莉, 等. 连翘苷体内外抗病毒及解热作用机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(8): 1170-1175.
- [9] 聂承冬, 邓斌, 刘圆, 等. 连翘的苯乙醇苷类化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6641-6646.
- [10] 聂承冬, 阎新佳, 温静, 等. 基于分子对接和网络药理学的连翘抗肿瘤的作用机制分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4455-4465.
- [11] 李婷, 李石飞, 雷振宏, 等. 连翘药材商品规格等级标准研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2019, 42(3): 619-627.
- [12] 王贵元. 不同浓度 6-BA 和 GA<sub>3</sub> 处理对豆梨实生苗生长的影响[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(4): 87-89.
- [13] 李小玲, 华智锐. 商洛连翘种子品质检验与质量标准研究[J]. 江西农业学报, 2014, 26(11): 43-45.
- [14] 赵艳, 李安平, 孙斌, 等. 连翘种子质量标准研究[J]. 园艺与种苗, 2014(4): 29-33.
- [15] 寿纪纲, 霍志鹏, 王玉, 等. 基于随机模拟探讨《中国药典》四分法取样的注意事项[J]. 化工与医药工程, 2022, 43(1): 34-40.
- [16] 葛人杰, 李璐含, 李柳柳, 等. 黄芩种子质量的分级标准[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(3): 504-509.
- [17] 孙志蓉, 阎永红, 武继红, 等. 黄芩种子分级标准的研究[A]// 中国中西医结合学会中药专业委员会. 2007 年中华中医药学会第八届中药鉴定学术研讨会、2007 年中国中西医结合学会中药专业委员会全国中药学术研讨会论文集[C]. 2007.
- [18] 李书敏, 李钦, 袁王俊. 连翘种子质量检验方法和分级标准研究[J]. 中药材, 2019, 42(9): 1995-1998.
- [19] 沈志君, 刘海, 吴明开. 桔梗种子质量标准研究[J]. 种子, 2012, 31(3): 42-45.

(收稿日期: 2023-09-22; 修回日期: 2023-10-30)

## 茯苓裂环羊毛甾烷型化学成分研究

邓子怡<sup>1</sup>, 郁阳<sup>1,4</sup>, 李莉<sup>2</sup>, 杨财子<sup>1</sup>, 孙云鹏<sup>1,4</sup>, 王国凯<sup>1,3,4</sup>, 刘劲松<sup>1,4\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230012; 3. 中药研究与开发安徽省重点实验室, 合肥 230012; 4. 中药功效物质组分校级重点实验室, 合肥 230012)

**摘要:** **目的** 研究茯苓中裂环羊毛甾烷型化学成分。**方法** 应用硅胶柱色谱、RP-18 中压柱色谱、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶、半制备 HPLC 等分离手段进行分离纯化, 所获得的单体化合物经核磁共振波谱和质谱数据鉴定。**结果** 从茯苓中分离鉴定出 11 个裂环羊毛甾烷类单体化合物, 分别为茯苓新酸 B (1)、茯苓新酸 A (2)、茯苓新酸 DM (3)、16 $\alpha$ , 27-二羟基-3, 4-裂环羊毛甾-4 (28), 8 (9), 24-三烯-3, 21-二酸 (4)、茯苓新酸 ZC (5)、茯苓新酸 ZM (6)、茯苓新酸 E (7)、茯苓新酸 D (8)、茯苓新酸 ZG (9)、茯苓新酸 M (10)、茯苓新酸 L (11)。**结论** 化合物 4~6 和 9~11 首次从茯苓的药用部位茯苓中分离得到。

**关键词:** 茯苓; 裂环羊毛甾烷型; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0404-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.020

### *Seco-lanostane constituents from Poria cum Pini Radix*

DENG Zi-yi<sup>1</sup>, YU Yang<sup>1,4</sup>, LI Li<sup>2</sup>, YANG Cai-zi<sup>1</sup>, SUN Yun-peng<sup>1,4</sup>, WANG Guo-kai<sup>1,3,4</sup>, LIU Jin-song<sup>1,4\*</sup> (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 3. Anhui Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei 230012; 4. Key Laboratory for Functional Substances in Chinese Medicine and Natural Medicine, Hefei 230012)

**Abstract: Objective** To determine the chemical constituents of *seco-lanostane* in *Poria cum Pini Radix*. **Methods** The *seco-lanostanes* were separated and purified with a variety of chromatographic techniques as silica gel column, RP-18 medium pressure column, Sephadex LH-20 column, and preparative HPLC, and identified by NMR and MS spectroscopy. **Results** Totally 11 *seco-lanostanes* were isolated from *Poria cum Pini Radix*, and identified as poricoic acid B (1), poricoic acid A (2), poricoic acid DM (3), 16 $\alpha$ , 27-dihydroxy-3, 4-secolanosta-4 (28), 8 (9), 24-triene-3, 21-dioic acid (4), poricoic acid ZC (5), poricoic acid ZM (6), poricoic acid E (7), poricoic acid D (8), poricoic acid ZG (9), poricoic acid M (10) and poricoic acid L (11). **Conclusion** Compounds 4~6 and 9~11 have been obtained from the *Poria cum Pini Radix* for the first time.

**Key words:** *Poria cum Pini Radix*; *seco-lanostane*; chemical constituent; structural identification

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Show.) Wolf 的干燥菌核, 是一种寄生在松树根部的好气性、喜干燥的腐生真菌<sup>[1-2]</sup>。茯苓 (茯苓 *Poria cum Pini Radix*) 为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Show.) Wolf 菌核中抱有松根 (即茯苓木) 的白色部分。茯

苓与茯苓虽均来源于茯苓菌核, 但两者功效却有显著差别。茯苓味甘淡, 性平, 具有利尿渗湿、健脾等功效; 茯苓味甘淡, 性平, 具有安神宁心、利尿等功效, 多用于治疗惊悸失眠、健忘、惊痫、小便不利等症<sup>[3]</sup>。茯苓和茯苓均具有较好的生物活

基金项目: 安徽中医药大学探索性科研项目 (No.2020HXTS09); 安徽高等学校科学研究重点项目 (No.2022AH050489)。

作者简介: 邓子怡, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: deng.zy99@qq.com \*通信作者: 刘劲松, 男, 教授, 主要从事中药与天然药物活性成分研究, email: jinsongliu108@sina.com



性<sup>[4]</sup>,但茯神以宁心、安神见长,两者的化学成分和含量差异可能是导致其功效不同的因素之一<sup>[5]</sup>。三萜类成分是茯神主要活性成分之一,大多以四环三萜的结构呈现<sup>[6]</sup>,主要分为羊毛甾烷三萜烯型和 3,4-裂环-羊毛甾烷三萜烯型两种类型<sup>[7]</sup>。为进一步探究茯神的化学成分,寻找其安神宁心的药效物质基础,本课题组利用中药化学分离手段和现代波谱学鉴定技术对茯神化学成分进行研究,从

中分离鉴定出 11 个裂环羊毛甾烷型单体化合物,分别为茯苓新酸 B (1)、茯苓新酸 A (2)、茯苓新酸 DM (3)、16 $\alpha$ , 27-二羟基-3,4-裂环羊毛甾-4(28), 8(9), 24-三烯-3, 21-二酸(4)、茯苓新酸 ZC (5)、茯苓新酸 ZM (6)、茯苓新酸 E (7)、茯苓新酸 D (8)、茯苓新酸 ZG (9)、茯苓新酸 M (10)、茯苓新酸 L (11), 结构式见图 1。

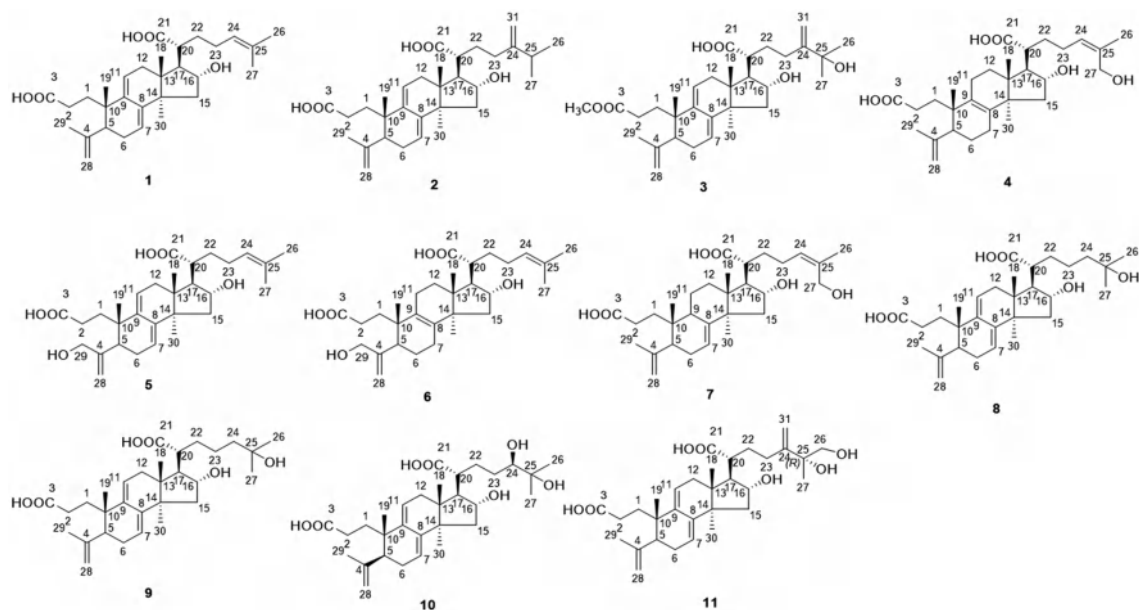


图 1 化合物 1 ~ 11 的化学结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 11

## 1 材料

### 1.1 仪器

Bruker AV III-600 (德国 Bruker 公司); Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Waters AutoSpec Premier P776 质谱仪、Waters 1525 半制备型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Agilent 5 HC-C18 (2) (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 分析柱; Waters Sunfire (250 mm $\times$ 19 mm, 5  $\mu$ m) 制备柱。

### 1.2 试药

200 ~ 300 目 (50 ~ 71  $\mu$ m) 柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); 45 mm Lichroprep RP-18 反相柱色谱硅胶 (日本 Fujisilysia 化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (美国 CE 公司); 色谱用甲醇、乙腈 (英国欧普森公司); 氘代吡啶 (美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司); 其他试剂均为分析纯。

样品于 2022 年 6 月采集于安徽省金寨县桃岭乡,由安徽中医药大学彭华胜教授鉴定其基原为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Show.) Wolf, 为菌核中间抱有松根的白色部分。鉴定标本 (LA20221001) 存于安徽中医药大学中药与天然药物化学教研室。

## 2 提取与分离

取茯神干燥药材 55 kg, 粉碎至 20 目, 用 3 倍量 100% 甲醇室温下冷浸 6 次, 每次 24 h。合并提取液, 减压浓缩至无甲醇味, 得浸膏 800 g。再经硅胶色谱柱二氯甲烷-甲醇 (100 : 0 ~ 0 : 100) 系统梯度洗脱, 通过薄层色谱法 (TLC) 检识, 合并相似流分, 得到 9 个流分段 (A1 ~ A9)。

流分段 A8 (4.5 g) 经 ODS RP-18 柱 (甲醇-水, 20 : 10 ~ 100 : 1) 梯度洗脱, 得到 33 个亚流分, 即 A8-1 ~ A8-33。流分 A8-33 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 分离, 得到 8 个流分, 即 A8-33-1 ~ A8-33-8; A8-33-8 经半制备型 HPLC (乙腈-0.01% 甲酸水, 65 : 35 ~ 80 : 20) 分离纯化得化合物 1 (12.57 mg, 7.3 min) 和化合物 2 (7.65 mg, 8.8 min)。流分 A8-32 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 分离, 得到 5 个流分, 即 A8-32-1 ~ A8-32-5; A8-32-3 经半制备型 HPLC (乙腈-0.01% 甲酸水, 55 : 45 ~ 70 : 30, 10.2 min) 分离纯化得化合物 3 (5.82 mg)。A8-32-5 经半制备型 HPLC (乙腈-0.01% 甲酸水, 55 : 45 ~ 70 : 30, 6.6 min) 分离纯化得化合物 4 (9.44 mg)。流分 A8-31 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 分离, 得到 6 个流分,

即 A8-31-1 ~ A8-31-6; A8-31-6 经半制备型 HPLC (乙腈 -0.01% 甲酸水, 50 : 50 ~ 65 : 35) 分离纯化得化合物 **5** (3.63 mg, 7.1 min) 和化合物 **6** (4 mg, 7.5 min)。流分 A8-30 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 分离, 得到 6 个流分, 即 A8-30-1 ~ A8-30-6; A8-30-5 经半制备型 HPLC (乙腈 -0.01% 甲酸水, 50 : 50 ~ 65 : 35) 分离纯化得化合物 **7** (33.5 mg, 7.0 min) 和化合物 **8** (9.6 mg, 7.6 min)。A8-30-3 经半制备型 HPLC (乙腈 -0.01% 甲酸水, 50 : 50 ~ 65 : 35, 6.6 min) 分离纯化得化合物 **9** (13.22 mg)。

流分段 A7 (6.3 g) 经 ODS RP-18 柱 (甲醇 - 水, 20 : 10 ~ 100 : 1) 梯度洗脱, 得到 31 个亚流分, 即 A7-1 ~ A7-31。流分 A7-26 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 分离, 得到 6 个流分, 即 A7-26-1 ~ A7-26-6; A7-26-3 经半制备型 HPLC (乙腈 -0.01% 甲酸水, 40 : 60 ~ 55 : 45) 分离纯化得化合物 **10** (14.1 mg, 8.7 min) 和化合物 **11** (7.4 mg, 9.8 min)。

### 3 结构解析

化合物 **1**: 黄色粉末。分子式  $C_{30}H_{44}O_5$ 。ESI-MS  $m/z$ : 483  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.32 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H, H-11), 5.27 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-7), 4.81 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-28a), 4.74 (1H, s, H-28b), 4.50 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-16), 2.91 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H, H-20), 2.83 (dd,  $J = 11.2, 5.9$  Hz, 1H, H-17), 2.33 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 1.71 (s, 3H, H-29), 1.59 (s, 3H, H-26), 1.57 (s, 3H, H-27), 1.47 (s, 3H, H-30), 1.07 (s, 3H, H-18), 1.01 (s, 3H, H-19)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[8]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为茯苓新酸 B。

化合物 **2**: 白色无定形粉末。分子式  $C_{31}H_{46}O_5$ 。ESI-MS  $m/z$ : 497  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.32 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, H-11), 5.27 (s, 1H, H-7), 4.96 (s, 1H, H-31a), 4.83 (s, 1H, H-31b), 4.81 (s, 1H, H-28a), 4.75 (s, 1H, H-28b), 4.49 (q,  $J = 12.3, 9.8$  Hz, 1H, H-16), 2.93 (td,  $J = 11.3$  Hz, 1H, H-16), 2.84 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-17), 2.32 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-5), 2.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-25), 1.72 (s, 3H, H-29), 1.47 (s, 3H, H-30), 1.08 (s, 3H, H-18), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.97 (d,  $J = 3.9$  Hz, 3H, H-27), 0.96 (d,  $J = 3.9$  Hz, 3H, H-26)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为茯苓新酸 A。

化合物 **3**: 白色无定形粉末。分子式  $C_{32}H_{48}O_6$ 。

ESI-MS  $m/z$ : 527  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.49 (s, 1H, H-31a), 5.29 (s, 1H, H-11), 5.27 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-31b), 5.17 (s, 1H, H-7), 4.81 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-28a), 4.76 (m, 1H, H-28b), 4.54 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-16), 3.62 (s, 3H, H-OMe), 3.01 (s, 1H, H-20), 2.89 (dd,  $J = 11.2, 5.9$  Hz, 1H, H-17), 2.27 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H-5), 1.71 (s, 3H, H-29), 1.55 (s, 3H, H-26), 1.55 (s, 3H, H-27), 1.43 (s, 3H, H-30), 1.07 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为茯苓新酸 DM。

化合物 **4**: 白色无定形粉末。分子式  $C_{30}H_{46}O_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 501  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.49 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-24), 5.00 (s, 1H, H-28a), 4.90 (s, 1H, H-28b), 4.53 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, H-27a), 4.48 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-16), 4.44 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, H-27b), 2.93 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H, H-20), 2.79 (dd,  $J = 11.2, 5.8$  Hz, 1H, H-17), 2.32 (d,  $J = 12.9$  Hz, 1H, H-5), 1.97 (s, 3H, H-26), 1.80 (s, 3H, H-29), 1.50 (s, 3H, H-30), 1.14 (s, 3H, H-18), 0.96 (s, 3H, H-19)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 16 $\alpha$ , 27-二羟基-3, 4-裂环羊甾甾-4 (28), 8 (9), 24-三烯-3, 21-二酸。

化合物 **5**: 白色无定形粉末。分子式  $C_{30}H_{44}O_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 499  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.87 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-28a), 5.34 (s, H, H-24), 5.33 (s, H, H-11), 5.28 (s, 1H, H-7), 5.23 (s, 1H, H-28b), 4.51 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-16), 4.26 (d,  $J = 3.4$  Hz, 2H, H-29), 1.81 (s, 3H, H-26), 1.74 (d,  $J = 3.5$  Hz, 3H, H-27), 1.49 (s, 3H, H-30), 1.07 (d,  $J = 3.5$  Hz, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为茯苓新酸 ZC。

化合物 **6**: 白色无定形粉末。分子式  $C_{30}H_{46}O_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 501  $[M-H]^-$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta_H$ : 5.75 (s, 1H, H-28a), 5.35 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-24), 5.15 (s, 1H, H-28b), 4.48 (m, 1H, H-16), 1.62 (s, 3H, H-27), 1.60 (s, 3H, H-26), 1.48 (s, 3H, H-30), 1.17 (s, 3H, H-18), 1.05 (s, 3H, H-19)。 $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $C_5D_5N$ ) 数据见表 1。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为茯苓新酸 ZM。

表 1 化合物 1~6 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据 (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

Tab 1	$^{13}\text{C}$ -NMR data for compounds 1~6 (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )					
C	$1\delta_{\text{c}}$	$2\delta_{\text{c}}$	$3\delta_{\text{c}}$	$4\delta_{\text{c}}$	$5\delta_{\text{c}}$	$6\delta_{\text{c}}$
1	36.8 (t)	36.7 (t)	35.6 (t)	33.8 (t)	36.8 (t)	32.9 (t)
2	30.4 (t)	30.04 (t)	29.3 (t)	30.7 (t)	30.4 (t)	29.7 (t)
3	176.6 (s)	176.4 (s)	174.3 (s)	176.9 (s)	177.4 (s)	176.6 (s)
4	149.6 (s)	149.0 (s)	148.9 (s)	148.2 (s)	155.0 (s)	153.0 (s)
5	51.1 (d)	50.5 (d)	50.5 (d)	47.3 (d)	48.8 (d)	42.7 (d)
6	28.9 (t)	28.3 (t)	28.2 (t)	23.6 (t)	29.0 (t)	24.9 (t)
7	118.3 (d)	117.7 (d)	117.7 (d)	26.9 (t)	118.4 (d)	26.1 (t)
8	142.2 (s)	141.6 (s)	141.5 (s)	139.6 (s)	142.4 (s)	138.8 (s)
9	137.9 (s)	137.6 (s)	136.9 (s)	130.2 (s)	138.0 (s)	129.9 (s)
10	39.2 (s)	38.6 (s)	38.5 (s)	41.0 (s)	39.3 (s)	40.1 (s)
11	120.7 (d)	120.0 (d)	120.2 (d)	22.0 (t)	120.6 (d)	21.1 (t)
12	37.3 (t)	36.0 (t)	36.7 (t)	30.2 (t)	37.5 (t)	30.3 (t)
13	46.0 (s)	45.4 (s)	45.4 (s)	46.4 (s)	46.1 (s)	45.7 (s)
14	49.6 (s)	49.1 (s)	49.0 (s)	50.0 (s)	51.2 (s)	49.4 (s)
15	44.1 (t)	43.5 (t)	43.5 (t)	44.1 (t)	44.2 (t)	43.4 (t)
16	76.8 (d)	76.2 (d)	76.1 (d)	76.7 (d)	76.9 (d)	76.2 (d)
17	58.1 (d)	57.4 (d)	57.3 (d)	57.6 (d)	58.1 (d)	57.1 (d)
18	18.7 (q)	18.1 (q)	18.1 (q)	18.4 (q)	18.8 (q)	17.8 (q)
19	22.6 (q)	22.0 (q)	21.9 (q)	22.9 (q)	22.7 (q)	22.1 (q)
20	48.7 (d)	48.2 (d)	48.6 (d)	48.7 (d)	49.7 (d)	48.3 (d)
21	178.6 (s)	178.4 (s)	176.4 (s)	179.3 (s)	179.1 (s)	178.6 (s)
22	33.4 (t)	31.1 (t)	32.0 (t)	33.7 (t)	33.4 (t)	34.0 (t)
23	27.5 (t)	33.0 (t)	32.0 (t)	26.6 (t)	28.0 (t)	26.9 (t)
24	125.5 (s)	155.8 (s)	157.7 (s)	127.0 (d)	125.0 (d)	125.0 (s)
25	131.9 (s)	33.8 (d)	72.3 (s)	137.3 (s)	130.7 (s)	131.3 (s)
26	26.1 (q)	21.8 (q)	29.8 (q)	22.0 (q)	27.1 (q)	25.5 (q)
27	18.1 (q)	21.6 (q)	29.8 (q)	61.1 (t)	18.8 (q)	17.5 (q)
28	112.5 (t)	111.9 (t)	112.0 (t)	114.5 (t)	112.6 (t)	114.4 (t)
29	22.6 (q)	22.0 (q)	21.9 (q)	22.2 (q)	65.8 (t)	66.7 (t)
30	25.2 (q)	24.6 (q)	24.6 (q)	24.7 (q)	25.3 (q)	26.0 (q)
31	—	106.8 (t)	106.7 (t)	—	—	—
3'-OMe	—	—	51.1 (q)	—	—	—

化合物 7: 白色无定形粉末。分子式  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 499  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.45 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-24), 5.30 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-11), 5.26 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-7), 4.81 (s, 1H, H-28a), 4.75 (s, 1H, H-28b), 4.51 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H, H-27a), 4.47 (m, 3H, H-16), 4.42 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, H-27b), 1.95 (s, 3H, H-26), 1.71 (s, 3H, H-29), 1.46 (s, 3H, H-30), 1.06 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 数据见表 2。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 7 为茯苓新酸 E。

化合物 8: 白色无定形粉末。分子式  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 513  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.48 (s, 1H, H-11), 5.33 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H-11), 5.29 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-7), 5.16 (s, 1H, H-31b), 4.83 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H-28a), 4.76 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-28b), 4.53 (dd,  $J = 8.4, 6.1$  Hz, 1H, H-16), 3.01 (m, 1H,

H-20), 2.89 (ddd,  $J = 10.8, 6.0, 2.7$  Hz, 1H, H-17), 2.34 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-5), 1.73 (s, 3H, H-29), 1.55 (s, 3H, H-27), 1.54 (s, 3H, H-26), 1.49 (s, 3H, H-30), 1.09 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 数据见表 2。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 8 为茯苓新酸 D。

化合物 9: 白色无定形粉末。分子式  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6$ 。ESI-MS  $m/z$ : 501  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.34 (s, 1H, H-11), 5.29 (m, 1H, H-7), 4.82 (s, 1H, H-28a), 4.76 (s, 1H, H-28b), 4.50 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-16), 1.75 (s, 3H, H-29), 1.49 (s, 3H, H-30), 1.36 (s, 6H, H-26, 27), 1.09 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 数据见表 2。以上波谱数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 9 为茯苓新酸 ZG。

化合物 10: 白色无定形粉末。分子式  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_7$ 。ESI-MS  $m/z$ : 517  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.33 (brs, 1H, H-11), 5.27 (brs, 1H, H-7), 4.83 (s, 1H, H-29a), 4.77 (s, 1H, H-29b), 4.53 (m, 1H, H-16), 3.84 (m, 1H, H-24), 1.73 (s, 3H, H-28), 1.49 (s, 6H, H-27, 30), 1.45 (s, 3H, H-26), 1.07 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 数据见表 2。以上波谱数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 10 为茯苓新酸 M。

化合物 11: 白色无定形粉末。分子式  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_7$ 。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} 30.8$  (c 0.7,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); ESI-MS  $m/z$ : 529  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.60 (s, 1H, H-31a), 5.33 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, H-31b), 5.32 (s, 1H, H-11), 5.28 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H, H-7), 4.83 (s, 1H, H-29a), 4.77 (s, 1H, H-29b), 4.53 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-16), 1.74 (s, 3H, H-28), 1.66 (s, 3H, H-27), 1.49 (s, 3H, H-30), 1.08 (s, 3H, H-18), 1.03 (s, 3H, H-19)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 数据见表 2。以上波谱数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 11 为茯苓新酸 L。同时针对 C-25 位立体构型确定, 将化合物 11 与  $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$  试剂以二甲基亚砷 (DMSO) 为溶剂混合后测定 ICD 图谱 (见图 2)。图中 314 nm 处 Cotton 效应为负, 根据 Snatzke 经验规则<sup>[12]</sup>, 该二醇体系的二面角扭角为逆时针方向, 从而确定化合物中 C-25 位的绝对构型为 25*R*。

#### 4 讨论

临床用药中的茯苓皮、茯苓和茯神均来源于茯苓菌核, 但药用部位不同, 功效作用也不相同, 茯



表 2 化合物 7~11 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据 (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

C	$7\delta_{\text{C}}$	$8\delta_{\text{C}}$	$9\delta_{\text{C}}$	$10\delta_{\text{C}}$	$11\delta_{\text{C}}$
1	36.1 (t)	36.2 (t)	36.8 (t)	36.7 (t)	36.2 (t)
2	30.0 (t)	30.0 (t)	30.9 (t)	30.6 (t)	29.7 (t)
3	176.5 (s)	176.6 (s)	177.2 (s)	177.1 (s)	176.5 (s)
4	149.0 (s)	149.0 (s)	149.6 (s)	149.6 (s)	149.0 (s)
5	50.4 (d)	50.5 (d)	51.0 (d)	51.0 (d)	50.5 (d)
6	28.3 (t)	28.3 (t)	28.9 (t)	29.9 (t)	28.3 (t)
7	117.7 (d)	117.7 (d)	118.2 (d)	118.2 (d)	117.7 (d)
8	141.6 (s)	141.6 (s)	142.2 (s)	142.2 (s)	141.6 (s)
9	137.2 (s)	137.3 (s)	137.8 (s)	137.8 (s)	137.2 (s)
10	38.6 (s)	38.6 (s)	39.2 (s)	39.1 (s)	38.6 (s)
11	120.0 (d)	120.0 (d)	120.6 (d)	120.6 (d)	120.1 (d)
12	36.7 (t)	36.8 (t)	37.3 (t)	37.3 (t)	36.8 (t)
13	45.4 (s)	45.4 (s)	46.0 (s)	45.9 (s)	45.4 (s)
14	49.0 (s)	49.0 (s)	49.0 (s)	49.42s	49.0 (s)
15	43.5 (t)	38.6 (t)	44.1 (t)	44.1 (t)	43.5 (t)
16	76.1 (d)	76.1 (d)	76.7 (d)	76.5 (d)	76.1 (d)
17	57.4 (d)	57.3 (d)	58.0 (d)	58.0 (d)	57.2 (d)
18	18.1 (q)	18.1 (q)	18.7 (q)	18.7 (q)	18.1 (q)
19	22.0 (q)	22.0 (q)	22.6 (q)	22.6 (q)	22.0 (q)
20	48.0 (d)	48.4 (d)	49.6 (d)	49.6 (d)	48.3 (d)
21	178.6 (s)	178.6 (s)	179.3 (s)	179.5 (s)	178.7 (s)
22	32.9 (t)	30.0 (t)	33.8 (t)	31.1 (t)	31.6 (t)
23	26.3 (t)	32.0 (t)	23.8 (t)	31.2 (t)	30.1 (t)
24	126.4 (d)	157.7 (s)	45.3 (t)	79.7 (d)	154.8 (s)
25	136.7 (s)	72.3 (s)	69.9 (s)	73.0 (s)	75.8 (d)
26	21.6 (q)	22.0 (q)	30.3 (q)	26.4 (q)	69.5 (t)
27	60.6 (t)	18.1 (q)	30.09 (q)	26.2 (q)	24.9 (q)
28	111.9 (t)	111.9 (t)	112.7 (t)	112.5 (t)	111.9 (t)
29	21.6 (q)	22.0 (q)	22.6 (q)	22.6 (q)	22.0 (q)
30	24.6 (q)	24.6 (q)	25.2 (q)	25.2 (q)	24.6 (q)
31	—	106.7 (t)	—	—	108.9 (t)

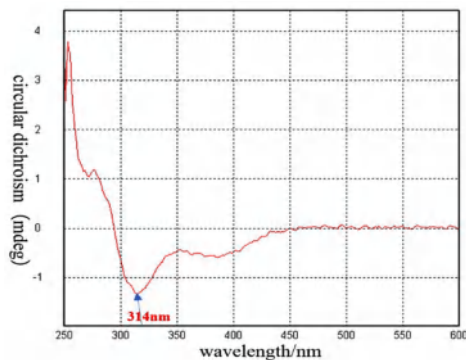


图 2 化合物 11 与  $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$  的配合物在 DMSO 中的 CD 图谱  
Fig 2 CD spectra of in situ formed  $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$  complexes of 11 recorded in DMSO

神长于宁心益智从而安神, 茯苓长于健脾渗湿, 赤茯苓长于行水利湿、益心润肺, 茯苓皮长于利水消肿。茯苓的主要化学成分为多糖、三萜类、甾醇等。王宏侠<sup>[13]</sup>的研究表明茯苓皮、茯神、茯苓中总三萜含量依次升高, 按植物形态学由内及外的顺序, 茯神、茯苓、赤茯苓、茯苓皮中 3, 4-裂环-羊毛

甾茯苓三萜类化合物含量相对增高, 而闭环羊毛甾茯苓三萜类化合物含量相对降低, 通过主成分分析 (PCA) 法寻找的茯神、茯苓、茯苓皮差异化合物为茯苓新酸 D、松苓酸, 通过 *t*-检验寻找的茯神与茯苓、茯苓皮的差异化合物为 26-羟基茯苓新酸 G、16- $\alpha$ -乙酰氧基-羊毛甾-8, 24-二烯-21-酸、羊毛甾-7, 9 (11), 24-三烯-21-酸<sup>[13]</sup>。

三萜类成分类型和含量可能为茯神功效区别于茯苓的重要物质基础<sup>[14]</sup>。本研究从茯神中分离得到 11 个裂环羊毛甾烷类化合物, 其中 6 个化合物为首次从茯苓的药用部位茯神中得到, 进一步丰富了茯神的化学成分种类, 可为今后发掘茯神安神宁心的药效物质基础提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 王国定, 李光华, 杨长群, 等. 马尾松林下套种茯苓栽培技术[J]. 现代农业科技, 2019 (21): 91-92.
- [2] 彭慧, 王妍妍, 张越, 等. 安徽大别山区茯苓产业发展的现状与前景[J]. 中南药学, 2018, 16 (3): 369-372.
- [3] Xu GC, Zhang DX, Li D, et al. Overview of pharmaceutical research on the Poria with Hostwood of Traditional Chinese medicine[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16 (10): 2115-2120.
- [4] 王军民, 张加研, 雷福厚, 等. 茯神挥发性成分及其生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31 (8): 1402-1407, 1356.
- [5] 许甜甜, 金传山, 吴德玲, 等. 茯苓不同药用部位化学成分分析[J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32 (1): 77-79.
- [6] 聂磊. 茯苓、茯神和茯苓皮成分比较研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [7] 胡云飞, 王玺, 刘晴, 等. 中药茯神相关研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25 (1): 115-121.
- [8] Tai T, Shingu T, Kikuchi T, et al. Triterpenes from the surface layer of *Poria cocos* [J]. Phytochemistry, 1995, 39 (5): 1165-1169.
- [9] Tai T, Akahori A, Shingu T. Triterpenes of *Poria cocos* [J]. Phytochemistry, 1993, 32 (5): 1239-1244.
- [10] 王明. 茯苓皮抗肾纤维化物质基础及其作用机制研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [11] Chen BS, Zhang JJ, Han JJ, et al. Lanostane triterpenoids with glucose-uptake-stimulatory activity from peels of the cultivated edible mushroom *Wolfiporia cocos* [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67 (26): 7348-7364.
- [12] Di Bari L, Pescitelli G, Pratelli C, et al. Determination of absolute configuration of acyclic 1, 2-diols with  $\text{Mo}_2(\text{OAc})_4$ . 1. Snatzke's method revisited [J]. J Org Chem 2001, 66 (14): 4819-4825.
- [13] 王宏侠. 茯苓不同药用部位化学成分分析及赤茯苓质量标准研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [14] 王军民, 刘思远, 杨莹, 等. 茯神化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43 (10): 2728-2732.

(收稿日期: 2023-09-04; 修回日期: 2023-10-14)

# 蔷薇红景天总黄酮提取物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及其活性部位筛选

刘忠毅, 王启文, 阿孜古丽·阿里木, 王晓梅, 胡君萍, 王新玲\* (新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 目的 考察蔷薇红景天总黄酮提取物 (TFE) 对  $\beta$  淀粉样蛋白 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ) 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其活性部位筛选。方法 采用  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$  诱导 PC12 细胞损伤, 经 AB-8 大孔吸附树脂色谱法分离蔷薇红景天 TFE, 得水及 20%、40%、60%、80%、95% 乙醇洗脱物 (即 TFE-0%、TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80% 和 TFE-95%)。计算不同体积分数乙醇洗脱物浸膏得率 (赋予 0.3 权重), 紫外分光光度法检测不同体积分数乙醇洗脱物总黄酮含量 (赋予 0.7 权重), 综合评价不同体积分数乙醇洗脱物。MTT 法检测不同体积分数乙醇洗脱物对损伤后 PC12 细胞活力的影响; 采用倒置显微镜观察细胞形态; 采用 2, 4-二硝基苯胍显色法检测乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性; 采用黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 的含量; 酶联免疫测定 (ELISA) 法分别检测细胞上清中白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、环氧合酶 -2 (COX-2) 和白细胞介素 -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的分泌水平。结果 TFE-40% 总黄酮浓度和浸膏得率的综合得分高于其他不同体积分数乙醇洗脱物。与空白组比较, 模型组细胞间隙变大, 数目减少, 出现细胞碎片, 突触明显减少, 存活率和 SOD 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), LDH 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, TFE-40%、TFE-60% 洗脱物和盐酸多奈哌齐组细胞形态均有一定程度改善, 数目增多, 突触增加, 细胞形态较完整; TFE-40%、TFE-60%、TFE-80% 及 TFE-95% 组的细胞上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、COX-2 和 IL-1 $\beta$  的水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论 蔷薇红景天 TFE-40% 洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞损伤具有较好保护作用, 为最佳活性部位, 其机制可能与拮抗  $A\beta_{25-35}$  的神经毒性和抑制细胞炎症的发生有关。

**关键词:** 蔷薇红景天; 总黄酮; PC12 细胞; 保护作用; 活性部位

中图分类号: R285, R961 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0409-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.021

## Protective effect of total flavonoids extract of *Rhodiola rosea* L. on $A\beta_{25-35}$ induced PC12 cell damage and screening of active parts

LIU Zhong-yi, WANG Qi-wen, Aziguli Alimu, WANG Xiao-mei, HU Jun-ping, WANG Xin-ling\* (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

**Abstract: Objective** To determine the protective effect of total flavonoids extract of *Rhodiola rosea* L. (TFE) on PC12 cell damage induced by amyloid  $\beta$ -protein 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ) and screen its active parts. **Methods** PC12 cell damage was induced by  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$ , and TFE was isolated by AB-8 macroporous adsorption resin chromatography. Water and 20%, 40%, 60%, 80% and 95% ethanol elution (TFE-0%, TFE-20%, TFE-40%, TFE-60%, TFE-80% and TFE-95%) were obtained. The extract yield of ethanol elution with different volume fractions (0.3 weight) was calculated. The total flavonoids content of ethanol elution with different volume fractions (0.7 weight) was detected by UV spectrophotometry, and the ethanol elution with different volume fractions was evaluated comprehensively. The effects of different volume fractions of ethanol elution on the viability of

基金项目: 新疆维吾尔自治区“十三五”重点学科建设项目 (No.XJDX17132016)。

作者简介: 刘忠毅, 男, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物活性成分研究与开发, email: 1516858828@qq.com \*通信作者: 王新玲, 女, 博士, 教授, 主要从事天然药物活性成分研究与开发, email: 365021216@qq.com

injured PC12 cells were detected by MTT method. The morphology of cells was observed by inverted microscope, the activity of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by 2, 4-dinitrophenylhydrazine colorimetric method, and the content of superoxide dismutase (SOD) by xanthine oxidase method. The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results** The comprehensive scores of total flavonoids concentration and extract yield of TFE-40% eluates were higher than those of other ethanol eluents with different volume fractions. Compared with the blank group, the intercellular space of the model group was larger, the number of cells decreased, the cell fragments appeared, the synapse decreased significantly, the survival rate and the level of SOD decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and the level of LDH increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the cell morphology of TFE-40%, TFE-60% and Donepezil hydrochloride groups improved to some extent, the number of synapses increased, with more complete cell morphology. The levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, and IL-1 $\beta$  in the supernatant of TFE-40%, TFE-60%, TFE-80% and TFE-95% groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The TFE-40% eluent of *Rhodiola rosea* L. has a good protective effect on the injury of PC12 cells induced by A $\beta_{25-35}$ , which is the best active part. The mechanism may be related to the neurotoxicity and inhibition of cellular inflammation of antagonism of A $\beta_{25-35}$ .

**Key words:** *Rhodiola rosea* L.; total flavonoid; PC12; protective effect; active part

蔷薇红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 为景天科 (Crassulaceae) 红景天属 (*Rhodiola*) 多年生草本植物, 是新疆的重要植物资源之一, 据《新疆药用植物志》记载<sup>[1]</sup>, 其主要分布于新疆天山山脉 1600 ~ 2700 米的高寒地区, 药用部位主要为根及根茎, 具有清肺止咳、止血、止带等功效, 也用作滋补强壮药<sup>[2]</sup>。近年研究表明蔷薇红景天还具有强壮机体、抗脑缺氧、抗疲劳、增强记忆、延缓衰老等作用<sup>[3]</sup>。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种多发于老年人的由多种因素引起的中枢神经退行性疾病, 临床症状主要为患者记忆力丧失、认知功能障碍等, 严重影响着老年人的身心健康, 也加重了国家医疗体系负担<sup>[4]</sup>。目前临床治疗以缓解症状为主, 减轻或阻止疾病的进程并不理想。中药在治疗 AD 方面表现出独特的优势, 也是药物研发的重要来源。现代药理研究表明, 黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、神经保护以及增强认知功能等方面的作用<sup>[5-6]</sup>, 可从多靶点改善 AD 模型动物的认知功能障碍, 减轻 AD 样病理症状, 抑制 AD 的病理进程<sup>[7]</sup>。课题组前期从新疆蔷薇红景天中得到了山柰酚-7-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷及其苷元山柰酚、5, 7, 3', 5'-四羟基二氢黄酮及草质素-7-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷等黄酮类化合物<sup>[8]</sup>, 并对总黄酮进行了提取和纯化工艺研究, 得到的提取物和纯化物的总黄酮含量分别为 56.97% 和 82.83%<sup>[9]</sup>, 药理作用结果表明, 其总黄

酮提取物具有较好的抗炎和对 A $\beta_{25-35}$  诱导 HT22 细胞损伤的保护作用, 且安全无毒<sup>[10]</sup>。鉴于前期所选纯化工艺存在流速慢而耗时、收率低而不利于工业化生产等缺点, 故本研究以蔷薇红景天总黄酮提取物 (total flavonoids extract, TFE) 为研究对象, 经 AB-8 大孔吸附树脂分离, 得不同体积分数的乙醇洗脱物; 测定不同洗脱物总黄酮含量同时, 利用 A $\beta_{25-35}$  诱导分化 PC12 细胞构建 AD 炎症细胞模型, 通过观察 PC12 细胞形态、检测 PC12 细胞活力及细胞培养液中炎症因子包括白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、环氧合酶-2 (COX-2) 和白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的水平, 探究不同体积分数的乙醇洗脱物对  $\beta$ -淀粉样蛋白 25-35 (A $\beta_{25-35}$ ) 诱导细胞损伤的保护作用, 筛选活性部位并阐明其中药效物质基础, 为进一步研究开发和应用新疆蔷薇红景天提供理论依据。

## 1 材料

蔷薇红景天购于新疆伊犁, 由新疆医科大学药学院丛媛媛教授鉴定为景天科红景天属植物蔷薇红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 的干燥根茎, 标本保存于新疆医科大学药学院天然药物化学/生药学教研室。蔷薇红景天总黄酮提取物 (TFE, 总黄酮含量 56.97%) 由新疆医科大学药学院天然药物化学/生药学教研室自制<sup>[9]</sup>。

胎牛血清 (VivaCell, 批号: 2148389); DMEM 高糖培养基 (Servicebio, 货号: G4511-500 mL);



磷酸缓冲液 (PBS)、0.25% 胰蛋白酶消化液、青霉素+链霉素 (VivaCell 公司);  $A\beta_{25-35}$  (美国 Sigma 公司, HPLC  $\geq 97\%$ , 批号: A4559-1MG); MTT (德国 Biofrox 公司); BCA 总蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝公司, 批号: 20220311); 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20220706、20220705); IL-6、TNF- $\alpha$ 、COX-2、IL-1 $\beta$  酶联免疫试剂盒 (上海将来实业股份有限公司, 批号分别为 JL13202、JL20896、JL20884、JL21044); 盐酸多奈哌齐片 (植恩生物技术股份有限公司, 批号: H20010723); 芦丁 (纯度: 98%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 0080-9705); PC12 细胞 (高分化, 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤, 武汉普赛诺生命科技有限公司)。

UV2700 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); N-1001 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); AB135-S 型十万分之一电子天平 (Mettler Toledo 公司); Heracell 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (美国赛默飞公司); KS12 型超净工作台、KS12 型离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); MLS-3750 型高压蒸汽灭菌锅 (日本三洋电机株式会社); W-HL828 型 -80 °C 超低温冰箱 (中科美菱); 01562 型荧光倒置显微镜 (上海蔡司光学仪器); Multiskan GO 全波长酶标仪 (Thermo Fisher 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮含量测定

#### 2.1.1 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物母液的制备

称取蔷薇红景天 TFE 适量, 采用 AB-8 大孔吸附树脂柱色谱法分离, 分别经 3 倍柱体积的蒸馏水及 20%、40%、60%、80% 及 95% 乙醇溶液进行梯度洗脱, 得不同体积分数乙醇洗脱液, 减压浓缩、干燥, 得干浸膏, 计算收率。分别记为 TFE-0%、TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、TFE-95%。精密称取不同体积分数乙醇洗脱物干浸膏 10 mg, 用 70% 乙醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得 1.0 mg · mL<sup>-1</sup> 各洗脱物样品溶液, 4 °C 保存备用。

**2.1.2 总黄酮含量测定方法** 参考相关文献<sup>[1]</sup>并对测定方法略加优化。在全波长扫描所确定的 508 nm 波长下测定吸光度 ( $A$ ), 以芦丁对照品溶液质量浓度 ( $X$ ) 为横坐标,  $A$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程  $A = 11.631X + 0.008$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围为 0.016 ~ 0.080 mg · mL<sup>-1</sup>。

**2.1.3 芦丁对照品溶液的配制** 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 8.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 0.16 mg · mL<sup>-1</sup> 芦丁对照品溶液, 4 °C 保存备用。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 精密量取芦丁对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 分别加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL, 摇匀, 静置 6 min; 再加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL, 摇匀, 静置 6 min; 再加入 4% NaOH 溶液 4.0 mL, 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置 15 min; 以 70% 乙醇溶剂为空白。

**2.1.5 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物中总黄酮含量的测定** 分别精密量取适量 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物母液, 按“2.1.2”项下方法分别测定吸光度, 根据标准曲线计算相应的总黄酮含量。

### 2.2 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤的 PC12 细胞保护作用

**2.2.1 细胞培养与分组** PC12 细胞复苏后, 在含 10% 胎牛血清和青霉素 100 U · mL<sup>-1</sup> + 链霉素 100 U · mL<sup>-1</sup> 的 DMEM 高糖培养基中 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 1 ~ 2 d 传代 1 次, 达到对数生长期后开始实验。

PC12 细胞损伤模型采用 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  建立。分组如下: 阴性组 (只加完全培养液)、空白组 (含细胞的完全培养液)、模型组 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-0% 组 (TFE-0% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-20% 组 (TFE-20% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-40% 组 (TFE-40% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-60% 组 (TFE-60% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-80% 组 (TFE-80% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、TFE-95% 组 (TFE-95% + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )、盐酸多奈哌齐组 (盐酸多奈哌齐 + 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$ )。

#### 2.2.2 溶液配制

①  $A\beta_{25-35}$  溶液: 将 1 mg  $A\beta_{25-35}$  溶解于 940  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中, 放入 37 °C 培养箱孵育 7 d, 使其老化形成凝聚态, 再分装成每支 100  $\mu\text{L}$  放入 -20 °C 冰箱保存, 使用前取出, 4 °C 保存备用。

② 药物溶液: TFE 不同体积分数乙醇洗脱物 (TFE-0%、TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、TFE-95%) 与盐酸多奈哌齐用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 加入完全培养基使 DMSO 终浓度为 0.1% mmol · L<sup>-1</sup>, 4 °C 保存备用。使用时用完全培养基对药物溶液进行稀释, 得到所需的浓度。

**2.2.3 MTT 法检测 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对 PC12 细胞存活率** 取对数生长期的细胞进行消化, 加入 DMEM 完全培养基重悬, 计数, 将浓度稀释至  $5 \times 10^4$  个 · mL<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 各组分别加入 TFE-0%、TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、

TFE-95% 及盐酸多奈哌齐不同浓度与 PC12 细胞共同培养 24 h, 每组设置 3 个平行对照。MTT 法检测细胞活力, 根据细胞存活率确定药物的安全浓度。

**2.2.4** MTT 法检测 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  损伤的 PC12 细胞存活率的影响 将 PC12 细胞按  $5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 按照“2.2.1”项下方法进行分组, 除空白组和模型组外, 其他各组分别加入 TFE-0%、TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、TFE-95% 及盐酸多奈哌齐进行干预 4 h, 再加入  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  共同培养 24 h, 每组设置 3 个平行对照, 放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后, MTT 法检测细胞活力。

**2.2.5** 细胞形态学观察 将 PC12 细胞按  $5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 12 孔板中, 待细胞贴壁后, 按照“2.2.4”项下方法分组给药, 共同培养 24 h 后, 在倒置显微镜下观察各组细胞形态并记录。

**2.2.6** PC12 细胞中 LDH 漏出量和 SOD 水平的测定 细胞以每孔 1 mL 的体积接种于 24 孔细胞培养板中, 培养 24 h, 待细胞贴壁生长后, 弃去上清液。按照“2.2.1”项下方法分组, 每组设置 3 个平行对照组, 实验组均每孔给药 500  $\mu\text{L}$ , 空白组加无血清培养液, 培养 4 h 后, 每孔加入 500  $\mu\text{L}$   $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  损伤 (终浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 共同培养 24 h 后, 收集细胞和细胞培养液。严格按照试剂盒说明书在 450 nm 处测定吸光度值 OD, 按下列公式计算各组 LDH 漏出量和 SOD 活力。

LDH 漏出量 ( $\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$ ) = (OD 测定孔 - OD 对照孔) / (OD 标准孔 - OD 空白孔)  $\times$  标准品浓度 ( $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $\times 1000$

SOD 活力 ( $\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ) = SOD 抑制率 /  $50\% \times$  稀释倍数 / 待测样本蛋白浓度

**2.2.7** ELISA 法检测细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2 的分泌量 按照“2.2.6”项下方法干预细胞, 收集细胞培养液, 离心并收集上清液, 严格按照 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 试剂盒说明书操作进行后续实验。450 nm 处酶标仪测定吸光度, 然后计算细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 的分泌水平。

## 2.3 统计学处理

所有实验数据结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 统计分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 实验数据采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 以  $P < 0.05$  为统计学有统计学意义。

## 2.4 结果与分析

### 2.4.1 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物中总黄酮的含量

计算 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物浸膏得率, 赋予浸膏得率 0.3 权重, 再根据“2.1.4”项下标准曲线计算不同洗脱物中总黄酮浓度, 赋予总黄酮浓度 0.7 权重, 以总得分为评价标准, 得分越高, 表明该洗脱物越优。结果见表 1, TFE-40% 洗脱物总黄酮浓度可达 91.12%, 浸膏得率为 23.17%, 总得分为 70.74, 高于其他体积分数的乙醇洗脱物。

表 1 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物浸膏得率及总黄酮含量及其得分 ( $n = 3$ )

Tab 1 Extract yield and total flavonoid content of TFE different volume fractions ethanol elution and their scores ( $n = 3$ )

组别	浸膏得率 /%	总黄酮浓度 /%	总得分
TFE-0% 组	46.59	60.74	56.49
TFE-20% 组	13.92	50.71	39.67
TFE-40% 组	23.17	91.12	70.74
TFE-60% 组	3.56	70.06	50.11
TFE-80% 组	1.61	29.65	21.24
TFE-95% 组	3.35	6.86	5.81

**2.4.2** TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对 PC12 细胞存活率的影响 结果显示, 与空白组相比, 盐酸多奈哌齐在  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞活力无统计学意义; TFE-40%、TFE-60% 及 TFE-95% 在  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, PC12 细胞活力明显下降 ( $P < 0.05$ ); TFE-0%、TFE-20% 及 TFE-80% 组在  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时细胞活力差异无统计学意义; 而 TFE 各洗脱物在给药剂量为  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对 PC12 细胞存活率的影响较小, 均未表现出明显毒性, 见表 2。为保持单一变量, 故在后续实验中均选择  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  为 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物的给药浓度。

**2.4.3** TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞存活率的影响 表 3 结果显示, 与空白组相比, 模型组细胞存活率明显下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比,  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TFE-0% 与 TFE-20% 组细胞存活率差异无统计学意义; TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、TFE-95% 与盐酸多奈哌齐组细胞存活率均明显上升 ( $P < 0.01$ )。

**2.4.4** TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞 LDH 漏出量和 SOD 水平的影响 与空白组相比, 模型组 LDH 漏出量明显升高 ( $P < 0.01$ ), SOD 水平明显下降 ( $P < 0.01$ ), 说明  $A\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞有一定程度的损伤。与模型组相比, TFE-0% 组 SOD 水平明显上升, LDH 漏出量明显下降 ( $P < 0.05$ ), TFE-20%、TFE-40%、TFE-60%、TFE-80%、TFE-95% 组及盐酸多奈哌齐组的 SOD 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), LDH 漏出量明显下降 ( $P < 0.01$ ), 结果见表 3。



表 2 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 2 Effect of ethanol eluent of different volume fractions of TFE on the survival rate of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量	细胞存活率 /%
空白组	—	100
盐酸多奈哌齐组	12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	115.99 $\pm$ 7.18*
	25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	119.10 $\pm$ 5.04**
	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	106.10 $\pm$ 8.87
TFE-0% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	118.41 $\pm$ 7.66**
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	117.11 $\pm$ 4.57*
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	105.65 $\pm$ 9.54
TFE-20% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	107.54 $\pm$ 3.92
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	101.30 $\pm$ 5.75
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	95.65 $\pm$ 6.90
TFE-40% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	100.21 $\pm$ 3.13
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	90.72 $\pm$ 10.01
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	76.09 $\pm$ 5.01*
TFE-60% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	106.13 $\pm$ 5.68
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	102.96 $\pm$ 4.58
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	85.51 $\pm$ 3.62**
TFE-80% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	133.04 $\pm$ 4.94**
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	129.86 $\pm$ 5.90**
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	99.57 $\pm$ 3.01
TFE-95% 组	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	137.97 $\pm$ 1.33**
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	136.81 $\pm$ 2.96**
	800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	78.12 $\pm$ 4.65**

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

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

**2.4.5 细胞形态学观察** 由图 1 可知，空白组 PC12 细胞形态结构完整，多呈梭形结构，有多个突触。模型组细胞经 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $A\beta_{25-35}$  诱导 24 h 后，细胞形态发生了明显损伤，细胞间隙变大，出现细胞碎片，细胞数目减少，且突触明显减少。与

模型组相比，TFE-0% 组、TFE-20% 组细胞形态无明显改变，但细胞碎片增加，细胞间隙变大，出现明显损伤；TFE-40% 组、TFE-60% 组和盐酸多奈哌齐组细胞形态均有一定程度改善，细胞数目增多，细胞突触增加，且细胞形态较为完整；TFE-80% 与 TFE-95% 组的细胞突触变长，但细胞碎片、间隙无明显改善。说明 TFE-40% 组、TFE-60% 组和盐酸多奈哌齐组对  $A\beta_{25-35}$  诱导损伤的 PC12 细胞结构及形态均有一定程度的保护作用。

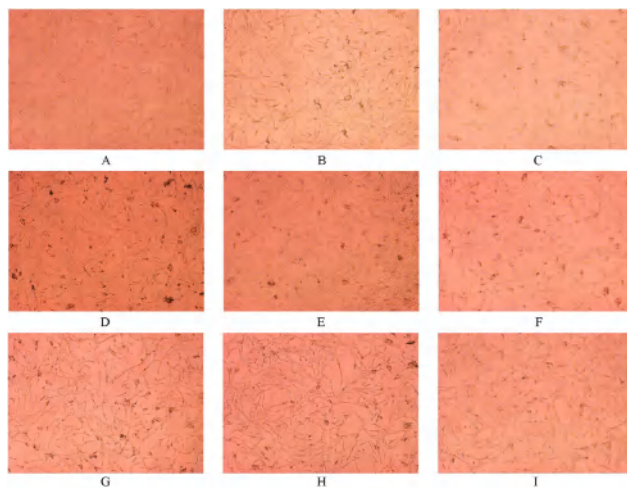


图 1 倒置显微镜下观察 PC12 细胞形态变化 ( $\times 100$ )

Fig 1 Morphological changes of PC12 cells under inverted microscope ( $\times 100$ )

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. TFE-0% 组 (TFE-0% group); D. TFE-20% 组 (TFE-20% group); E. TFE-40% 组 (TFE-40% group); F. TFE-60% 组 (TFE-60% group); G. TFE-80% 组 (TFE-80% group); H. TFE-95% 组 (TFE-95% group); I. 盐酸多奈哌齐组 (denpezil hydrochloride group)

表 3 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 3 Effect of ethanol eluent of different volume fractions of TFE on  $A\beta_{25-35}$  induced PC12 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量	细胞存活率 /%	LDH 漏出量 / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	SOD 水平 / ( $\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ )
空白组	—	100	160.42 $\pm$ 13.01	336.08 $\pm$ 3.04
模型组	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	69.75 $\pm$ 1.96 <sup>##</sup>	333.33 $\pm$ 15.73 <sup>##</sup>	227.32 $\pm$ 28.35 <sup>##</sup>
TFE-0% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	69.43 $\pm$ 2.56	289.58 $\pm$ 19.09*	258.09 $\pm$ 32.04*
TFE-20% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	72.80 $\pm$ 2.34	279.17 $\pm$ 25.26**	275.80 $\pm$ 2.02**
TFE-40% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	81.16 $\pm$ 0.88**	233.33 $\pm$ 21.95**	296.97 $\pm$ 8.50**
TFE-60% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	80.49 $\pm$ 3.88**	222.92 $\pm$ 21.95**	287.59 $\pm$ 1.23**
TFE-80% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	76.22 $\pm$ 0.97**	243.75 $\pm$ 10.83**	284.64 $\pm$ 8.67**
TFE-95% 组	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	76.26 $\pm$ 0.75**	247.92 $\pm$ 23.66**	309.29 $\pm$ 7.25**
盐酸多奈哌齐组	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	75.63 $\pm$ 3.08**	220.83 $\pm$ 19.09**	321.88 $\pm$ 9.27**

注：与空白组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

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

**2.4.6 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物对  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 水平的影响** 与空白组相比，模型组中 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 分泌量均明显上升 ( $P < 0.01$ )；与模

型组相比，TEF-0% 与 TEF-20% 组对细胞中 COX-2、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌量差异无统计学意义，TEF-20% 组中细胞 IL-6 的分泌量明显下降 ( $P < 0.05$ )；TFE-40% 组、TFE-60% 组、TFE-80% 组、TFE-95% 组



及盐酸多奈哌齐组使细胞中 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 的分泌量均明显下降 ( $P < 0.05$ ), 且 TFE-40% 组对 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响强于其他给药组, 结果见表 4。

表 4 PC12 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、COX-2、TNF- $\alpha$  及 IL-6 分泌量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Tab 4 Secretion of IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-6 in the supernatant of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量	IL-1 $\beta$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )	COX-2/ (ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )	TNF- $\alpha$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )	IL-6/ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ )
空白组	—	27.82 $\pm$ 2.17	0.99 $\pm$ 0.13	23.59 $\pm$ 1.98	40.15 $\pm$ 3.46
模型组	20 $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$	50.26 $\pm$ 4.51 <sup>###</sup>	3.23 $\pm$ 0.25 <sup>###</sup>	58.72 $\pm$ 7.62 <sup>###</sup>	79.19 $\pm$ 1.69 <sup>###</sup>
TFE-0% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	46.40 $\pm$ 4.12	3.24 $\pm$ 0.14	58.99 $\pm$ 4.27	72.95 $\pm$ 1.65
TFE-20% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	44.52 $\pm$ 3.31 <sup>*</sup>	2.82 $\pm$ 0.16	54.16 $\pm$ 1.05	70.81 $\pm$ 3.37
TFE-40% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	33.96 $\pm$ 2.37 <sup>**</sup>	2.34 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	39.21 $\pm$ 1.86 <sup>**</sup>	62.58 $\pm$ 1.76 <sup>**</sup>
TFE-60% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	35.01 $\pm$ 2.34 <sup>**</sup>	2.21 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	41.56 $\pm$ 2.09 <sup>**</sup>	61.16 $\pm$ 1.71 <sup>**</sup>
TFE-80% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	38.73 $\pm$ 2.21 <sup>**</sup>	2.67 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>	44.23 $\pm$ 1.65 <sup>**</sup>	63.41 $\pm$ 1.93 <sup>**</sup>
TFE-95% 组	400 $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$	38.01 $\pm$ 1.85 <sup>**</sup>	2.56 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>	40.84 $\pm$ 3.81 <sup>**</sup>	60.86 $\pm$ 2.26 <sup>**</sup>
盐酸多奈哌齐组	50 $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$	32.86 $\pm$ 1.63 <sup>**</sup>	2.06 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>	35.67 $\pm$ 2.51 <sup>**</sup>	56.36 $\pm$ 1.37 <sup>**</sup>

注: 与空白组比较, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

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

### 3 讨论

在正常生理情况下, A $\beta$  淀粉中的蛋白堆积量与其水解时间基本是趋于一致的; 但病理条件下, A $\beta$  蛋白质的分解数量会增加, 水解次数减少, 过量降解产生的 A $\beta$  蛋白易凝结形成一个寡聚体, 寡聚体间的过度聚集会形成一种难溶性的淀粉斑块, 并沉积在大脑皮层; 高浓度的 A $\beta$  淀粉聚集具有神经毒性, 会导致全身各种特异性免疫的炎症反应、神经毒性级联排斥反应以及大量神经元细胞坏死、变性甚至死亡, 最终导致 AD 的形成<sup>[12-13]</sup>。目前临床上可用于治疗 AD 的药物较少, 目前有单克隆抗体 (阿杜那单抗与仑卡那单抗) 和典型的小分子化合物如多奈哌齐、美金刚和卡巴拉汀外, 还有来源于天然植物的 EGb 761 和 GV-971, EGb 761 是银杏叶的标准化提取物, 其主要活性成分为类黄酮和银杏内酯<sup>[14]</sup>。天然黄酮化合物是一类具有广泛活性的成分, 可经肠道吸收, 穿过血脑屏障, 通过抑制脑组织炎症因子的表达和分泌、减轻氧化应激造成的损伤、抑制神经元凋亡、降低胆碱酯酶活性、减少 A $\beta$  聚集和形成而改善与年龄相关的认知障碍<sup>[15]</sup>。因此黄酮类化合物已成为一种潜在的神经保护剂, 有望开发成为抗 AD 的药物<sup>[16]</sup>。

本研究通过考察蔷薇红景天 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物总黄酮含量、浸膏得率、对 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导损伤 PC12 细胞的存活率、细胞形态及拮抗炎症因子的能力, 发现 TFE-40% 组总黄酮浓度 (91.12%) 和浸膏得率 (23.17%) 的综合评分高于其他各组; 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L $^{-1}$  A $\beta$ <sub>25-35</sub> 作用于 PC12 细胞 24 h 后, 细胞碎片增多, 细胞间隙增大, 细胞活力明显下降, 细胞形态明显受损, 当蔷薇红景天 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物干预后, 发现

TFE-40% 组与 TFE-60% 组中细胞形态得到明显改善, 细胞存活率明显上升。

SOD 属于抗氧化酶类, 通过清除自由基及减少过氧化物的生成而发挥抗氧化损伤的作用, 其水平高低可间接反映自由基含量的高低; 当 PC12 细胞受到具有神经毒性的 A $\beta$  蛋白损伤后, 细胞膜通透性增加而致 LDH 从细胞质中溢出, 反映出细胞受损的程度。本研究结果显示 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L $^{-1}$  A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导损伤 PC12 细胞的存活率和 SOD 水平均显著下降, LDH 漏出量显著升高, 而蔷薇红景天 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物干预后, 可不同程度地提高 PC12 细胞存活率和 SOD 水平, 降低 LDH 漏出量; 提示蔷薇红景天 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物可能会通过促进 PC12 细胞生成 SOD 而清除氧自由基, 通过降低 LDH 漏出量而维持细胞膜的完整性, 其中 TFE-40% 洗脱物组的作用强于其他各洗脱物组。

PC12 细胞来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞, 其细胞形态、结构、功能与神经元细胞相似, 因此, 在 AD 的炎症反应和氧化应激损伤研究中, 通常选择 A $\beta$  诱导的 PC12 细胞建立 AD 细胞模型<sup>[17-18]</sup>。有研究表明, A $\beta$  引起的 NLRP3 炎症小体激活是 AD 患者和 APP/PS1 小鼠疾病进展中炎症反应的关键过程<sup>[19]</sup>, 过量堆积的 A $\beta$  蛋白斑块会激活 NLRP3 炎症小体分泌各种促炎症分子, 如 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、自由基和趋化因子等而损伤神经元<sup>[20]</sup>。已有研究证实在 AD 患者体内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 COX-2 等炎症因子的水平高于正常人<sup>[21]</sup>, A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导的炎症反应导致神经元细胞凋亡和突触损失, COX-2 通过炎症信号、生长因子、缺氧等诱导致炎症反应加重<sup>[22]</sup>, 进而会加速 A $\beta$  的沉积和 AD 的进展<sup>[23]</sup>。本研究显示, 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L $^{-1}$  A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导损伤 PC12 细胞

胞后, 刺激 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 COX-2 等炎症因子的过度表达, 进一步诱发加重炎症反应, 细胞存活率下降, 形态发生变化, 突触减少。蔷薇红景天 TFE 不同体积分数乙醇洗脱物中, 除 TFE-0% 组和 TFE-20% 组外, 其他各洗脱物组均能明显降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 COX-2 的水平, 拮抗 A $\beta_{25-35}$  诱发的炎性神经毒性, 降低细胞凋亡, 提高细胞存活率; 且发现 TFE-40% 组抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 COX-2 的释放能力强于其他各洗脱物组。

综上所述, 总黄酮浓度最高的蔷薇红景天 TFE-40% 可通过促进清除 A $\beta_{25-35}$  诱导损伤的 PC12 细胞中的氧自由基, 维持细胞膜的完整性, 拮抗 A $\beta_{25-35}$  诱发的炎性神经毒性, 抑制细胞凋亡而起到保护损伤细胞的作用, TFE-40% 中总黄酮含量可达 91.12%, 提示 TFE-40% 是以总黄酮为药效物质基础的具有保护受损神经细胞作用的活性部位, 结合本课题组前期研究基础和洗脱溶剂极性大小推测, TFE-40% 中主要为极性大的游离黄酮类、二氢黄酮类及其苷类成分。后续将进一步对 TFE-40% 在保护受损神经细胞作用机制及其活性成分方面进行深入研究, 为开发蔷薇红景天在抗 AD 方面提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 34 卷第一分册. 北京: 科学出版社, 1986: 161-220.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 [M]. 补编第二册. 北京: 科学出版社, 1983.
- [3] Panossian A, Wikman G, Sarris J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (7): 481-493.
- [4] Meng XD, Fu MM, Wang SF, et al. Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23 (5): 1-13.
- [5] Melrose J. The potential of flavonoids and flavonoid metabolites in the treatment of neurodegenerative pathology in disorders of cognitive decline [J]. *Antioxidants*, 2023, 12 (3): 663-710.
- [6] Barreca MM, Alessandro R, Corrado C. Effects of flavonoids on cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases: role of NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (11): 9236-9257.
- [7] Williams RJ. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52 (1): 35-45.
- [8] 王晓梅, 何承辉, 王新玲, 等. 蔷薇红景天化学成分研究 [J]. *中药材*, 2010, 33 (8): 1252-1253.
- [9] 帕提曼·肖开提, 穆巴热科·吾普尔, 刘阳, 等. Box-Behnken 设计优化蔷薇红景天总黄酮提取纯化工艺 [J]. *中国药业*, 2020, 29 (11): 8-13.
- [10] 帕提曼·肖开提, 刘阳, 王晓梅, 等. 新疆蔷薇红景天总黄酮抗炎作用及急性毒性研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10 (9): 2590-2595.
- [11] 李卓俊, 吴翠, 徐博, 等. 毛白杨雌、雄花蕾总黄酮含量及抗氧化活性的比较 [J]. *中中药学*, 2022, 20 (5): 1034-1038.
- [12] Nagata K, Takahashi M, Matsuba Y, et al. Generation of App knock-in mice reveals deletion mutations protective against Alzheimer's disease-like pathology [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 1800-1807.
- [13] 刘晓伟, 赵幸福, 程灶火. 阿尔茨海默病概念变迁、患病率及诊疗进展 [J]. *中国临床心理学杂志*, 2021, 29 (6): 1251-1255, 1265.
- [14] Tomino C, Ilari S, Solfrizzi V, et al. Mild cognitive impairment and mild dementia: the role of Ginkgo biloba (EGb 761®) [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14 (4): 305-324.
- [15] Faria A, Pestana D, Teixeira D, et al. Flavonoid transport across RBE4 cells: a blood-brain barrier model [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2010, 15 (2): 234-241.
- [16] 袁丽娟, 王柯人, 桑志培. 具有多靶点抗阿尔茨海默病活性的黄酮类化合物研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2018, 49 (1): 10-19.
- [17] Zhang JR, An SS, Hu WJ, et al. The neuroprotective properties of *Hericium erinaceus* in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (11): 1810-1823.
- [18] Suttisansanee U, Charoenkiatkul S, Jongruaysup B, et al. Mulberry fruit cultivar 'Chiang Mai' prevents beta-amyloid toxicity in PC12 neuronal cells and in a Drosophila model of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2020, 25 (8): 1837.
- [19] Yang T, Zhang L, Shang YC, et al. Concurrent suppression of A $\beta$  aggregation and NLRP3 inflammasome activation for treating Alzheimer's disease [J]. *Chem Sci*, 2022, 13 (10): 2971-2980.
- [20] 杨贵珍, 柯尊记. 抗炎中药与阿尔茨海默病防治 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2019, 21 (9): 1917-1923.
- [21] Liu YC, Gao XX, Chen L, et al. Rapamycin suppresses A $\beta_{25-35}$  or LPS-induced neuronal inflammation via modulation of NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Neuroscience*, 2017, 355 (7): 188-199.
- [22] Palomino-Alonso M, Lachén-Montes M, González-Morales A, et al. Network-driven proteogenomics unveils aging-related imbalance in the olfactory I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B p65 complex functionality in Tg2576 Alzheimer's disease mouse model [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (11): 2-16.
- [23] Shi C, Zhu XM, Wang JS, et al. Intra-mitochondrial I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signaling pathway is involved in amyloid  $\beta$  peptide-induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2014, 46 (5): 371-376.

(收稿日期: 2023-09-22; 修回日期: 2023-10-27)

# 基于网络药理学和实验验证探讨藤黄酸抑制膀胱癌的作用及机制

陈瑞琦, 熊洪, 刘宏伟\* (广东医科大学附属泌尿外科研究室, 广东 湛江 524001)

**摘要:** **目的** 利用网络药理学和实验验证探讨藤黄酸 (gambogic acid, GA) 抑制膀胱癌的作用及机制。 **方法** 利用 PubChem、PharmMapper、GeneCards 数据库和 Venny 2.1.0 获取 GA 抑制膀胱癌的潜在靶基因; 通过 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件构建蛋白互作图; 通过 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并进行可视化处理。通过 CCK-8、细胞克隆形成实验检测 GA 对 UM-UC-3 细胞增殖能力的影响; 通过细胞划痕实验、Transwell 实验检测 GA 对 UM-UC-3 细胞迁移和侵袭能力的影响; 通过流式细胞术检测 GA 对 UM-UC-3 细胞凋亡的影响; 通过 Western blot 检测 GA 处理 UM-UC-3 后细胞 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、FoxO1 的蛋白水平变化。 **结果** 筛选出 GA 抑制膀胱癌的潜在靶点 57 个, 核心靶点为 EP300。GO 富集分析结果显示 GA 抑制膀胱癌可能涉及生物学过程 26 个、细胞组分 17 个、分子功能 28 个。KEGG 通路富集分析显示 GA 抑制膀胱癌可能与 PI3K/AKT、FoxO1、HIF-1 信号通路有关。细胞学实验表明, 与对照组相比, GA 处理 24 h 后, UM-UC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均降低, 凋亡率升高; UM-UC-3 细胞的 PI3K、p-PI3K、p-AKT 的蛋白表达水平均下调, FoxO1 的蛋白表达水平上调。 **结论** GA 抑制膀胱癌 UM-UC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭并促进其凋亡, 其机制可能与 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路有关。

**关键词:** 网络药理学; 藤黄酸; 膀胱癌; 增殖; 迁移侵袭; 凋亡

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0416-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.022

## Role and mechanism of gambogic acid in inhibiting bladder cancer based on network pharmacology and experimental verification

CHEN Rui-qi, XIONG Hong, LIU Hong-wei\* (*Laboratory of Urology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524001*)

**Abstract: Objective** To determine the role and mechanism of gambogic acid (GA) in inhibiting bladder cancer based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** PubChem, PharmMapper, GeneCards databases and Venny 2.1.0 were retrieved to obtain the potential target genes of GA in inhibiting bladder cancer. Protein-protein interaction diagram was made by STRING database and Cytoscape 3.9.1 software. The DAVID database was used for GO and KEGG enrichment analysis and visualization. CCK-8 and colony formation assays were used to detect the effect of GA on the proliferation of UM-UC-3 cells. Wound healing assay and Transwell assay were used to detect the effect of GA on the migration and invasion of UM-UC-3 cells. Flow cytometry was used to detect the effect of GA on the apoptosis of UM-UC-3 cells. Western blot was used to detect the effect of GA on the protein expression levels of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT and FoxO1 in UM-UC-3 cells. **Results** Totally 57 potential targets of GA in inhibiting bladder cancer were screened, and the core targets was EP300. GO analysis showed that the inhibitory effect of GA on bladder cancer may involved 26

**基金项目:** 广东省基础与应用基础研究基金 (No.2022A1515012195); 广东省中医药局课题 (No.20222099); 湛江市科技计划项目 (No.2022A01017)。

**作者简介:** 陈瑞琦, 男, 在读硕士研究生, 主要从事泌尿系肿瘤的临床与基础研究, email: c985618057@163.com \* **通信作者:** 刘宏伟, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事泌尿系肿瘤的临床与基础研究, email: lhwhongwei@gdmu.edu.cn



biological processes, 17 cellular components, and 28 molecular functions. KEGG pathway enrichment analysis showed that the inhibitory effect of GA on bladder cancer might be related to PI3K/AKT, FoxO1 and HIF-1 signaling pathways. Cytological experiments showed that after 24 h GA treatment, the proliferation, migration and invasion of UM-UC-3 cells were decreased, and the apoptosis rate was increased as compared with those of the control group. The protein expression levels of PI3K, p-PI3K, and p-AKT in UM-UC-3 cells were down-regulated, and the protein expression level of FoxO1 was up-regulated. **Conclusion** GA inhibits the proliferation, migration and invasion of UM-UC-3 cells, and promotes the apoptosis of UM-UC-3 cells, whose mechanism may be related to the PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway.

**Key words:** network pharmacology; gambogic acid; bladder cancer; proliferation; migration and invasion; apoptosis

膀胱癌 (bladder cancer, BC) 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 是世界上第十大常见癌症<sup>[1]</sup>。数据显示, 近年来我国膀胱癌的总发病率呈上升趋势<sup>[2]</sup>。膀胱癌根据其浸润深度可分为肌层浸润性膀胱癌 (muscle-invasive bladder cancer, MIBC) 和非肌层浸润性膀胱癌 (non muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)<sup>[3]</sup>。现阶段, 新辅助化疗联合根治性膀胱切除术是目前治疗 MIBC 的标准方案, 然而部分无法接受手术的患者只能采用化疗、放疗等方法, 在治疗过程中会出现较大的不良反应<sup>[4]</sup>。经尿道膀胱肿瘤切除术联合术后膀胱灌注化疗或免疫治疗是 NMIBC 的常规治疗方案之一, 但是治疗效果有限, 具有很高的复发率<sup>[5]</sup>。因此, 有必要寻找具有更好疗效且不良反应较小的治疗膀胱癌的潜在药物。

研究发现, 中药在抗肿瘤方面具有多靶点、不良反应小、不易产生耐药性等特点<sup>[6]</sup>。藤黄是藤黄科植物藤黄 (*Garcinia hanburyi* Hook.F.) 分泌出的树脂, 具有治疗痈疽、损伤出血、牙疳蛀齿等作用<sup>[7]</sup>。藤黄酸 (gambogic acid, GA) 是从藤黄中提取的主要化合物之一, 具有抗氧化、抗炎等多种功能。研究发现, GA 可抑制多种肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 并促进其凋亡<sup>[8]</sup>。网络药理学是建立在药物-基因-疾病的多层次网络基础上的新兴学科, 可以从整体上预测药物的作用靶点<sup>[9]</sup>。本研究通过网络药理学筛选 GA 抑制膀胱癌的潜在作用靶点, 通过细胞实验验证, 探讨 GA 抑制膀胱癌的作用及可能机制, 为筛选出膀胱癌的潜在辅助治疗药物提供理论基础。

## 1 材料

### 1.1 数据库与软件

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 数据库, UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库, STRING (<https://cn.string-db.org/>), David (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库, 数据分析软件 Cytoscape 3.9.1, 在线网站 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 在线网站微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn>)。

www.uniprot.org/) 数据库, GeneCards (<https://www.genecards.org>) 数据库, STRING (<https://cn.string-db.org/>), David (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库, 数据分析软件 Cytoscape 3.9.1, 在线网站 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 在线网站微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn>)。

### 1.2 材料

人膀胱癌 UM-UC-3 细胞 (中科院上海细胞库), DMEM 培养基 (货号: C11995500BT)、胰蛋白酶 (货号: 25200072)(美国 Gibco 公司), 藤黄酸 (成都植标化纯生物技术有限公司, 货号: PCS0866), Annexin V-FITC 凋亡分析试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 胎牛血清 (货号: Z7185FBS-500)、ECL-Western blot 化学发光液 (货号: 310208)(美国 Zeta Life 公司), PI3 Kinase (PI3K) 兔多克隆抗体、AKT 鼠单克隆抗体、Phospho-AKT (p-AKT) 鼠单克隆抗体 (美国 Proteintech 公司), Phospho-PI3 Kinase (p-PI3K) 兔多克隆抗体 (美国 GeneTex 公司), Cell counting Kit-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所), Transwell 小室 (美国 Corning 公司), 基质胶 (广州市沃德生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 获取 GA 的作用靶点

在 PubChem 数据库以 “gambogic acid” 为关键词获取 GA 的 3D 结构式的 sdf 文件, 将文件上传至 PharmMapper 数据库, 得到 GA 作用靶点, 再将靶点上传至 UniProt 数据库, 通过 ID mapping 匹配靶点的基因名称。

### 2.2 获取膀胱癌的靶基因

以 “bladder cancer” 为关键词, 在 GeneCards 数据库检索膀胱癌的相关靶基因。

### 2.3 获取 GA 抑制膀胱癌的潜在靶基因

通过在线网站 Venny 2.1.0, 取前两步获取的 GA 作用靶点和膀胱癌相关靶基因的交集, 得到 GA 抑制膀胱癌的潜在靶基因。

### 2.4 蛋白互作网络构建

将 GA 抑制膀胱癌的潜在靶基因上传至 STRING 数据库, 设置物种为“Homo sapiens”, 最低互动分数要求  $> 0.400$ , 隐藏网络中断开的节点, 并将 tsv 数据文件导入 Cytoscape 3.9.1 分析, 通过 Betweenness Centrality 算法得到潜在靶基因的中介中心性。

### 2.5 GO 和 KEGG 分析

将得到的中介中心性最高的 20 个潜在靶基因上传至 DAVID 数据库, 限制物种为“Homo sapiens”, 选择 GO 生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF), KEGG 通路进行分析, 将所得结果通过在线网站微生信进行可视化处理。

### 2.6 GA 溶液的制备

将 GA 粉末配制成  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GA 水溶液, 避光储存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱, 实验时稀释成实验所需浓度。

### 2.7 细胞培养和分组

将 UM-UC-3 细胞接种于培养皿, 使用 DMEM 完全培养基 (10% 浓度胎牛血清), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养, 待细胞生长至 80% 以上时传代。实验时按照 GA 药物浓度 (0、40、80、 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 分为 4 组,  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组为对照组。

### 2.8 CCK-8 实验

取对数生长期 UM-UC-3 细胞, 接种于 96 孔板, 每孔  $3 \times 10^3$  个细胞, 置于细胞培养箱中培养, 24 h 后弃旧培养基, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 每组设置 3 个复孔, 继续培养 24、48、72 h, 取出 96 孔板, 每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 避光孵育 2 h 后检测各孔在 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值, 计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times 100\%$ 。

### 2.9 细胞克隆形成实验

取对数生长期 UM-UC-3 细胞, 以每孔  $1 \times 10^3$  个细胞接种于 6 孔板, 24 h 后弃旧培养基, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 10 d 后弃培养基, 用 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染液染色, 冲洗、晾干后拍照, 计算克隆形成数目。

### 2.10 细胞划痕实验

取对数生长期 UM-UC-3 细胞, 接种于 6 孔板, 待细胞生长浓度超过 90% 后用  $200 \mu\text{L}$  规格的移液枪头划痕, 弃旧培养基, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 显微镜下随机选取 3 个视

野拍照, 继续培养 24 h 后取出, 在相同位置拍照, 用 Image J 软件测量划痕面积, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积  $\times 100\%$ 。

### 2.11 Transwell 迁移实验

取对数生长期 UM-UC-3 细胞, 接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后弃旧培养基, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 24 h 后弃培养基, 胰蛋白酶消化后用不含血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液, 调整细胞浓度, 取  $200 \mu\text{L}$  细胞悬液 (含  $4 \times 10^4$  个细胞) 加入上室, 下室加入  $600 \mu\text{L}$  DMEM 完全培养基, 继续培养 24 h 后取出小室, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染液染色, 冲洗、晾干后随机选取 3 个视野拍照, 计算细胞迁移数。

### 2.12 Transwell 侵袭实验

用无血清 DMEM 培养基按 8 : 1 的比例稀释基质胶, 取  $50 \mu\text{L}$  稀释后的基质胶铺于 Transwell 小室并放入培养箱, 待基质胶凝固后取出, 其余步骤同“2.1.1”项下 Transwell 迁移实验。

### 2.13 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期 UM-UC-3 细胞接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后弃旧培养基, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 继续培养 24 h 后取出, 收集培养基和贴壁细胞, 重悬, 取  $1 \times 10^6$  个细胞, PBS 清洗, 离心后弃 PBS, 使用  $195 \mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合缓冲液制成细胞悬液并移入流式管, 分别加入  $5 \mu\text{L}$  Annexin V 和  $10 \mu\text{L}$  PI, 避光孵育 20 min, 使用流式细胞仪分析。

### 2.14 Western blot 实验

取对数生长期 UM-UC-3 细胞接种于培养皿, 分别加入含有不同浓度 GA 的培养基, 继续培养 24 h 后弃培养基, PBS 清洗, 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 加热变性, 置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配置凝胶, 每孔上样  $30 \mu\text{g}$ , 经电泳、电转、封闭、切膜后加入对应一抗 (GAPDH 1 : 10 000, FoxO1 1 : 2000, AKT 1 : 2000, p-AKT 1 : 2000, PI3K 1 : 500, p-PI3K 1 : 500), 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱孵育过夜。次日取出条带, 洗膜 3 次后分别加入对应二抗, 孵育 1 h, 洗膜 3 次, 化学发光法曝光成像, Image J 软件统计分析蛋白相对表达水平。

### 2.15 统计学分析

使用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 所有实验重复 3 次, 实验数据以均数  $\pm$  标准差表示, 两组均数比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 GA 抑制膀胱癌的潜在靶点



通过 PubChem 获得 GA 的 3D 结构式 (见图 1), 通过 PharmMapper 数据库和 UniProt 数据库获得有效靶点 219 个; 通过 GeneCards 数据库获取膀胱癌相关基因 11 618 个。将两者上传至 Venny 2.1.0, 取交集, 得到 GA 抑制膀胱癌的潜在靶点 57 个。

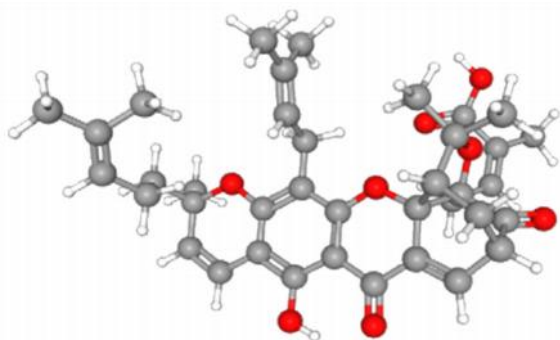


图 1 藤黄酸的 3D 结构式  
Fig 1 3D structural formula of gambogic acid

### 3.2 蛋白互作网络构建和核心靶点分析

通过使用 STRING 数据库, 得到 GA 抑制膀胱癌潜在靶点的蛋白互作图 (见图 2), 其中节点数量 55 个, 边数 60 条, 平均节点度 2.18, 平均局部聚类系数为 0.416, 蛋白互作富集 *P* 值为 0.007 48。Betweenness Centrality 算法得到中介中心性最高的 20 个靶点, 见表 1。

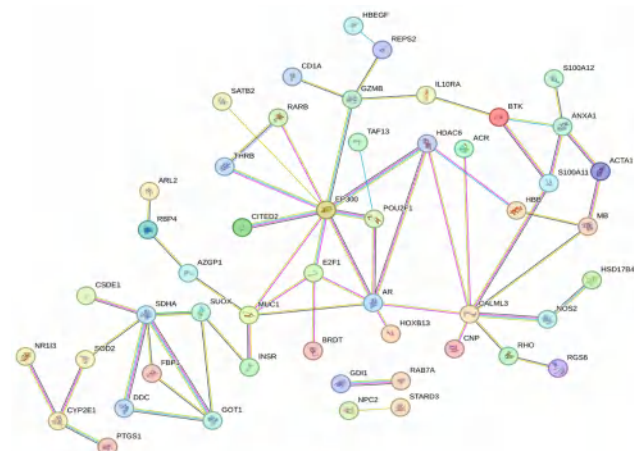


图 2 藤黄酸抑制膀胱癌的潜在靶点的蛋白互作图  
Fig 2 Protein-protein interaction diagram of the potential targets of inhibition of bladder cancer induced by gambogic acid

### 3.3 GO 和 KEGG 分析

将中介中心性最高的 20 个靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 得到 GO 分析条目 66 条, 其中包括维持中性粒细胞内稳态等 26 个 BP; 囊泡膜等 17 个 CC; 参与氧气转运等 28 个 MF, 见图 3; KEGG 通路富集分析显示 GA 抑制膀胱癌可能与 PI3K/AKT、FoxO1、HIF-1 等信号通路相关, 见图 4。通过查阅文献得知 FoxO1 作为 FoxO 家族的成员可以抑制膀胱癌, 故后续选择 FoxO1 进行验证。

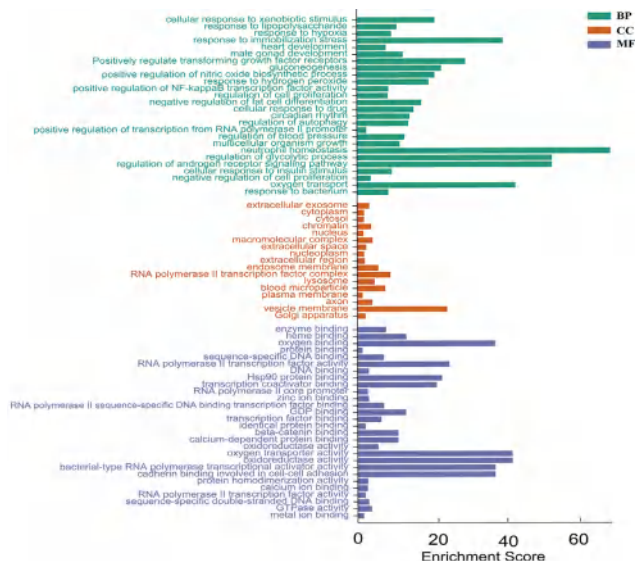


图 3 藤黄酸抑制膀胱癌的 20 个潜在靶基因的 GO 富集分析  
Fig 3 GO enrichment analysis of 20 potential target genes which inhibit bladder cancer by gambogic acid

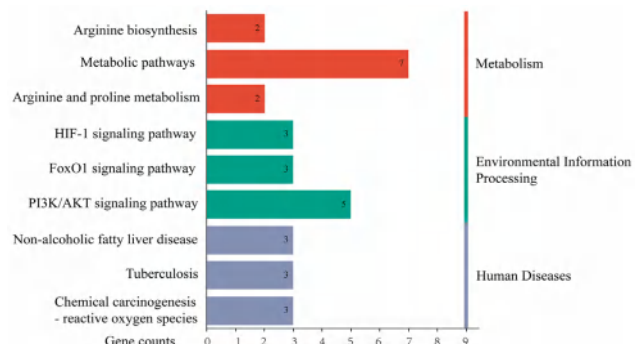


图 4 藤黄酸抑制膀胱癌的 20 个潜在靶基因的 KEGG 通路富集分析  
Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis of 20 potential target genes which inhibit bladder cancer by gambogic acid

### 3.4 GA 抑制 UM-UC-3 细胞的增殖能力

CCK-8 实验结果显示, GA 处理 24 h 后, 与对照组相比, 各实验组 UM-UC-3 细胞的增殖均受到抑制, 见表 2; 细胞克隆形成实验结果显示, 与对照组相比, 各实验组的克隆形成数目均降低, 见图 5。提示 GA 可抑制 UM-UC-3 细胞的增殖能力。

### 3.5 GA 抑制 UM-UC-3 细胞的迁移和侵袭能力

细胞划痕实验结果显示, GA 处理 24 h 后, 与对照组相比, 各实验组 UM-UC-3 细胞的划痕愈合面积降低, 见图 6; Transwell 实验结果显示, GA 处理 24 h 后, 与对照组相比, 各实验组 UM-UC-3 细胞的迁移和侵袭数均降低, 见图 7。提示 GA 抑制 UM-UC-3 细胞的迁移和侵袭能力。

### 3.6 GA 促进 UM-UC-3 细胞的凋亡

细胞凋亡检测实验结果显示, GA 处理 24 h 后, 与对照组相比, 各实验组 UM-UC-3 细胞的凋亡率均增加, 见图 8。提示 GA 可促进 UM-UC-3 细胞的凋亡。



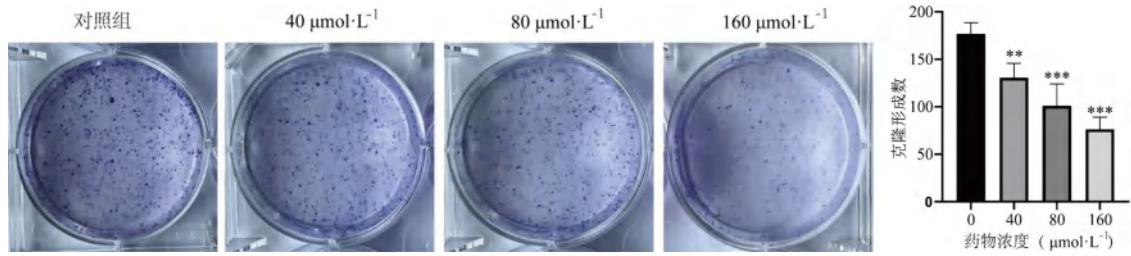


图 5 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞克隆形成能力的影响

Fig 5 Effect of gambogic acid on the colony formation of UM-UC-3 cells

注: 与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

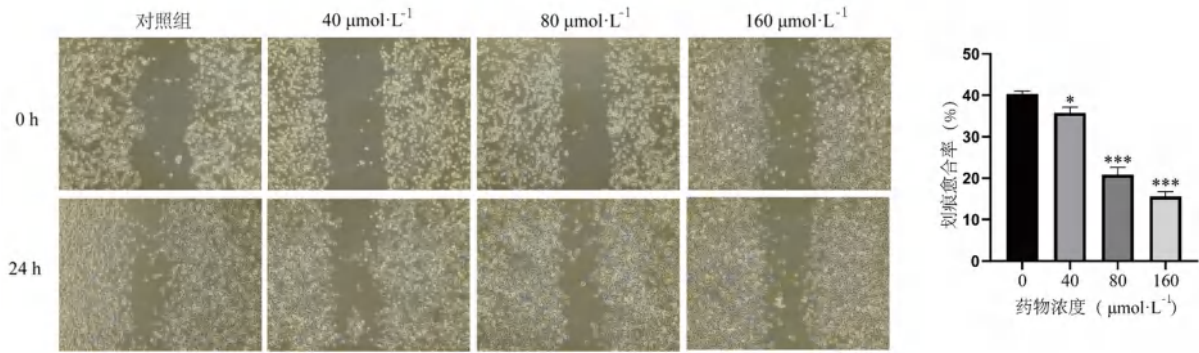


图 6 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞迁移能力的影响 (×200)

Fig 6 Effect of gambogic acid on the migration of UM-UC-3 cells (×200)

注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

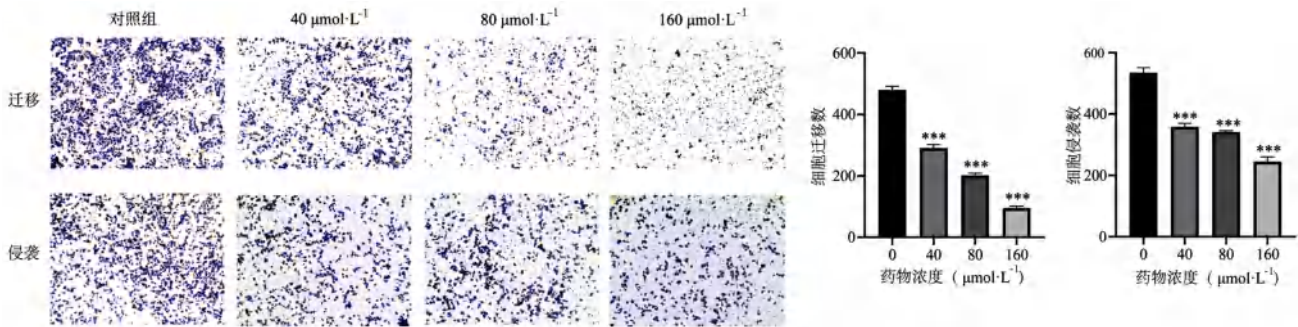


图 7 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞迁移和侵袭能力的影响 (×200)

Fig 7 Effect of gambogic acid on the migration and invasion ability of UM-UC-3 cells (×200)

注: 与对照组相比, \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*\* $P < 0.001$ .

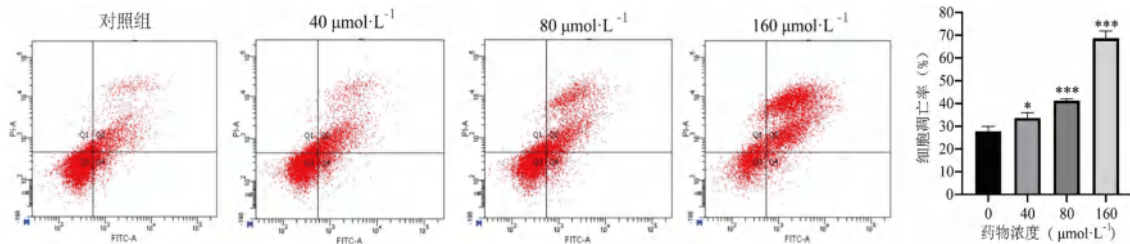


图 8 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞凋亡的影响

Fig 8 Effect of gambogic acid on the apoptosis of UM-UC-3 cells

注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

表 1 藤黄酸抑制膀胱癌的潜在靶点 (前 20)

Tab 1 Potential targets of inhibition of bladder cancer induced by gambogic acid (Top 20)

基因	靶点名称	GeneCards ID	中介中心性
EP300	e1a binding protein P300	GC22P050085	595.6667
NOS2	nitric oxide synthase 2	GC17M027756	497
HSD17B4	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4	GC05P119452	409
SOD2	superoxide dismutase 2	GC06M159669	337
SDHA	succinate dehydrogenase complex assembly factor 2	GC11P061430	269
GZMB	granzyme B	GC14M024630	266.3333
IL10RA	interleukin 10 receptor subunit alpha	GC11P117987	140
GOT1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1	GC10M099396	139
ANXA1	annexin A13	GC08M123680	125
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	GC09P122370	124
BTK	bruton tyrosine kinase	GC0XM101349	115
SI00A11	s100 calcium binding protein A11	GC01M152032	101
ACTA1	actin alpha 1, skeletal muscle	GC01M229799	101
AR	androgen receptor	GC0XP067544	78.3333
HBB	hemoglobin subunit beta	GC11M007496	71
CYP2E1	cytochrome p450 family 2 subfamily E member 1	GC10P133520	64
POU2F1	pou class 2 homeobox 1	GC01P167190	64
HDAC6	histone deacetylase 6	GC0XP048801	52.6667
INSR	insulin receptor	GC19M007112	45
SUOX	sulfite oxidase	GC12P055997	6

表 2 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞增殖能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 2 Effect of gambogic acid on the proliferation ability of UM-UC-3 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	药物作用时间	OD 值	增殖抑制率 /%
对照组	24 h	1.64 ± 0.11	—
GA 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	24 h	1.43 ± 0.08*	13.79 ± 1.23
GA 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	24 h	1.30 ± 0.12**	21.52 ± 2.79
GA 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	24 h	1.08 ± 0.05***	36.92 ± 3.40
对照组	48 h	3.46 ± 0.02	—
GA 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	48 h	2.59 ± 0.04***	22.67 ± 3.52
GA 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	48 h	2.11 ± 0.10***	37.01 ± 2.41
GA 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	48 h	1.42 ± 0.18***	55.05 ± 0.94
对照组	72 h	4.22 ± 0.08	—
GA 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	72 h	2.59 ± 0.05***	38.54 ± 0.61
GA 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	72 h	1.98 ± 0.05***	53.09 ± 2.12
GA 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	72 h	1.44 ± 0.01***	65.76 ± 0.47

注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.7 GA 调控 UM-UC-3 细胞 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路的表达

Western blot 实验结果显示, GA 处理 24 h 后, 与对照组相比, 各实验组 UM-UC-3 细胞的 AKT 蛋白表达水平未见变化, PI3K、p-PI3K 均下调, FoxO1 表达量上调; 与对照组相比, GA 80、160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 UM-UC-3 细胞的 p-AKT 表达量下调, 见图 9。提示 GA 可以下调 PI3K、p-PI3K、p-AKT 的表达, 上调 FoxO1 的表达。

### 4 讨论

研究表明, 中药可以直接抑制肿瘤的进展,

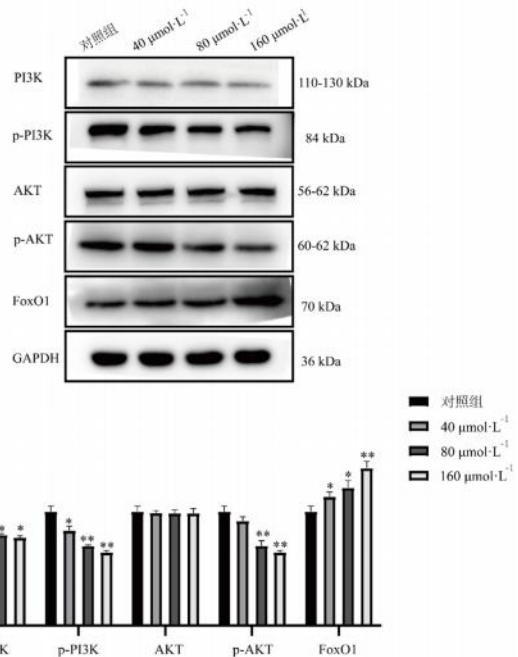


图 9 藤黄酸对 UM-UC-3 细胞 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig 9 Effect of gambogic acid on the expression of PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway-related proteins in UM-UC-3 cells

注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

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

也能减少化疗、放疗引起的不良反应, 目前已经被广泛运用于肿瘤的辅助治疗上, 具有一定的疗效<sup>[10]</sup>。GA 是近年的研究热点之一, 有多项研究发现 GA 具有抗肿瘤作用。例如 GA 以剂量依赖的方式抑制前列腺癌细胞的增殖能力, 并诱导其

凋亡<sup>[11]</sup>。此外, GA 可以抑制结肠癌 HCT116 和 CT26 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并引发抗肿瘤免疫反应<sup>[12]</sup>。本研究发现, 与对照组相比, GA 处理后 UM-UC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均下降, 提示 GA 可以抑制 UM-UC-3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力; 流式细胞术结果显示, GA 处理后 UM-UC-3 细胞的凋亡率高于对照组, 提示 GA 可以促进 UM-UC-3 细胞的凋亡。

本研究通过网络药理学分析, 筛选出 57 个 GA 抑制膀胱癌的潜在靶点, 其中 EP300 和 NOS2 是中介中心性最高的两个靶点。研究表明, EP300 在膀胱癌中易发生突变, 引起抗肿瘤免疫反应<sup>[13]</sup>。NOS2 已被证明在多种癌症中高表达, 并且可作为癌症预后的不良预测因子<sup>[14]</sup>。KEGG 通路富集分析显示 GA 抑制膀胱癌与 PI3K/AKT、HIF-1 和 FoxO1 信号通路具有较高相关性。HIF-1 是一个在生物体代谢过程中起关键作用的调节因子, 在多种良性或恶性肿瘤的表达均上调<sup>[15]</sup>。FoxO 是一个可调节多种生物过程的转录因子, 在细胞的衰老、凋亡、分化、DNA 损伤修复等方面都能发挥功能, 并且具有抑癌作用<sup>[16]</sup>。PI3K/AKT 信号通路是细胞内最重要的信号通路之一, 参与多种细胞功能; 但 PI3K/AKT 信号通路在癌症的发展过程中往往会过度激活, 促进癌症的发展<sup>[17]</sup>。研究发现, FoxO 转录因子在多种癌症的发展过程中会作为 PI3K/AKT 信号通路的下游靶点而受到抑制<sup>[18]</sup>。例如 PI3K/AKT 信号通路通过抑制 FoxO1 的磷酸化, 调控 hnRNP-F 蛋白的表达, 进而促进膀胱癌的增殖<sup>[19]</sup>。因此, 本研究选择 PI3K/AKT/FoxO1 通路, 通过 Western blot 进行验证, 结果显示 GA 可以下调 PI3K、p-PI3K、p-AKT 的表达, 并上调 FoxO1 的表达, 所以推测 GA 抑制膀胱癌的作用可能和 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路有关。

综上所述, 本研究基于网络药理学及细胞实验方法, 探讨了 GA 抑制膀胱癌的作用及可能机制。研究表明, GA 可以抑制膀胱癌 UM-UC-3 细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 并促进其凋亡; 其机制可能与调控 PI3K/AKT/FoxO1 信号通路有关。但本研究存在一定的不足之处, 研究机制不够深入, 后续需通过挽救实验及动物实验进一步验证。

## 参考文献

[1] Xia CF, Dong XS, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135 (5): 584-590.  
 [2] 季新灿, 程间开, 朱卫星, 等. 1990—2019 年中国膀胱癌发病率趋势 [J]. *济宁医学院学报*, 2023, 46 (2): 90-95.  
 [3] Lenis AT, Lec PM, Chamie K, et al. Bladder cancer: a

review [J]. *JAMA*, 2020, 324 (19): 1980-1991.  
 [4] Cathomas R, Lorch A, Bruins HM, et al. The 2021 updated European association of urology guidelines on metastatic urothelial carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2022, 81 (1): 95-103.  
 [5] Teoh JY, Kamat AM, Black PC, et al. Recurrence mechanisms of non-muscle-invasive bladder cancer—a clinical perspective [J]. *Nat Rev Urol*, 2022, 19 (5): 280-294.  
 [6] Wang KL, Chen Q, Shao YY, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111044.  
 [7] 高慧敏, 彭代银, 王雷, 等. 藤黄化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54 (8): 2668-2685.  
 [8] Luo H, Vong CT, Chen HB, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 48.  
 [9] Wu JS, Zhang FQ, Li ZZ, et al. Integration strategy of network pharmacology in traditional Chinese medicine: a narrative review [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42 (3): 479-486.  
 [10] Peng LJ, Zhang K, Li YJ, et al. Real-world evidence of traditional Chinese medicine (TCM) treatment on cancer: a literature-based review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7770380.  
 [11] Pan H, Lu LY, Wang XQ, et al. Gambogic acid induces cell apoptosis and inhibits MAPK pathway in PTEN/p53 prostate cancer cells in vitro and ex vivo [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24 (2): 109-116.  
 [12] Xu HJ, Zhang DY, Wei R, et al. Gambogic acid induces pyroptosis of colorectal cancer cells through the GSDME-dependent pathway and elicits an antitumor immune response [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (22): 5055.  
 [13] Zhu GM, Pei LJ, Li Y, et al. EP300 mutation is associated with tumor mutation burden and promotes antitumor immunity in bladder cancer patients [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (3): 2132-2141.  
 [14] Thomas DD, Wink DA. NOS2 as an emergent player in progression of cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26 (17): 963-965.  
 [15] Aldo P, Elisabetta C. Role of HIF-1 in cancer progression: novel insights, a review [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18 (6): 343-351.  
 [16] Jiramongkol Y, Lam EW. FoxO transcription factor family in cancer and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39 (3): 681-709.  
 [17] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.  
 [18] Farhan M, Wang HT, Gaur U, et al. FoxO signaling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13 (7): 815-827.  
 [19] Li F, Xie WW, Fang YZ, et al. HnRNP-F promotes the proliferation of bladder cancer cells mediated by PI3K/AKT/FoxO1 [J]. *J Cancer*, 2021, 12 (1): 281-291.

(收稿日期: 2023-09-07; 修回日期: 2023-10-24)



# 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联合网络药理学及分子对接研究 五味清浊颗粒治疗腹泻药效物质基础和作用机制

李伟, 孙佳, 李思雨, 余秋香, 王添敏, 宋慧鹏, 张慧\* (辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 目的 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定五味清浊颗粒中的化学成分, 联合网络药理学、分子对接技术探讨其治疗腹泻药效物质基础和作用机制。方法 采用 Eclipseplus C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 柱温为 30 °C, 流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。质谱采用电喷雾离子源 (ESI) 正、负离子模式, 扫描范围 *m/z* 50 ~ 2000 条件下采集多级质谱碎片信息。应用网络药理学构建“核心成分-作用靶点-通路”的网络, 对其潜在药效物质基础进行预测。利用 AutoDock Vina 进行分子对接验证。结果 共鉴定出 86 个主要化学成分, 包括生物碱类 25 个、黄酮类 23 个、有机酸类 12 个、鞣质类 16 个、苯丙素类 2 个、其他类化合物 8 个。网络药理学分析结果显示, 槲皮素、木犀草素、鞣花酸、胡椒碱、山柰酚、葎萜宁主要作用于 IL-6、TNF、EGFR、IFNG、IL-10、IL-8 等核心靶点, 调节 PI3K-Akt、HIF-1、JAK-STAT 等关键信号通路来发挥治疗腹泻作用。分子对接结果显示核心成分与核心靶点间具有良好的结合性能。结论 该研究成功采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对五味清浊颗粒化学成分进行全面分析鉴定, 初步阐明其治疗腹泻的作用机制, 为其药效物质基础和质量控制奠定基础。**关键词:** 五味清浊颗粒; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 网络药理学; 分子对接; 化学成分  
中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0423-10  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.023

## Pharmacodynamic substance basis and mechanism of Wuwei Qingzhuo granules for diarrhea based on combination of UPLC-Q-TOF-MS/MS with network pharmacology and molecular docking

LI Wei, SUN Jia, LI Si-yu, YU Qiu-xiang, WANG Tian-min, SONG Hui-peng, ZHANG Hui\* (College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600)

**Abstract: Objective** To identify the chemical components of Wuwei Qingzhuo granules by UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, and to determine their pharmacodynamic substance basis and mechanism in the treatment of diarrhea by combining network pharmacology and molecular docking. **Methods** Eclipseplus C<sub>18</sub> column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used, with 0.1% formic acid in water (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> at 30 °C. Mass spectrometry used electrospray ion source (ESI) positive and negative ion modes to collect multi-level mass spectrometry fragment information in the scanning range of *m/z* 50 ~ 2000. Network pharmacology was used to establish a network of “core components-targets-pathways” to predict the material basis of its potential pharmacodynamics. AutoDock Vina was used to validate molecular docking. **Results** Totally 86 main chemical components were identified, including 25 alkaloids, 23 flavonoids, 12 organic acids, 16 tannins, 2 phenylpropanoids and 8 other compounds. The network pharmacological analysis showed that quercetin, luteolin, ellagic acid, piperine, kaempferol, and piperlonguminine mainly acted on such core targets as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), epidermal growth factor receptor (EGFR), interferon γ (IFNG), interleukin-10 (IL-10), and interleukin-8 (IL-8), and regulated PI3K-Akt, HIF-1, JAK-STAT and other key signaling pathways in the treatment of

基金项目: 蒙药传统汤散剂剂型改良研究与示范项目 (No.2021SZD0030)。

作者简介: 李伟, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价与创新药物研究, email: 482919596@qq.com \*通信作者: 张慧, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药质量评价与创新药物研究, email: syyycs@163.com

diarrhea. The molecular docking showed that the core components had good binding properties with the core targets. **Conclusion** In this study, UPLC-Q-TOF-MS/MS technology has been successfully used to comprehensively analyze and identify the chemical compositions in Wuwei Qingzhuo granules, which preliminarily elucidates the mechanism of action for diarrhea, and lays a foundation for the pharmacodynamic substance basis and quality control.

**Key words:** Wuwei Qingzhuo granule; UPLC-Q-TOF-MS/MS; network pharmacology; molecular docking; chemical component

五味清浊颗粒又名当玛-5、通拉嘎-5, 为蒙古族验方, 始载于《后序医典》, 1985 年版《中国药典》首次将其载入<sup>[1]</sup>, 由石榴、红花、肉桂、萆薢、豆蔻五味药材组成, 具有开郁消食、暖胃的功效<sup>[2]</sup>。方中石榴为君药, 以温胃增火, 清肝热为主; 红花为臣药, 以清热、增强体质为辅; 萆薢、肉桂、豆蔻均为佐使药, 萆薢温中散寒、止泻化腐; 肉桂散寒止痛, 益胃火; 豆蔻温胃肾<sup>[3]</sup>。临床上常用于治疗腹泻<sup>[4-6]</sup>且效果较好, 寒证、热证均可使用, 但迄今为止, 处方药效物质潜在的有效成分及作用机制尚不明确。

网络药理学和分子对接技术是目前预测复方有效成分的有效手段, 但目前多以文献报道或 TCMSP 数据库中收录的化学成分为对象, 对五味清浊颗粒进行活性成分的预测, 目标性不强, 导致预测的活性成分在中药中检测不到, 预测的结果没有意义, 为此需要在五味清浊颗粒成分确定存在的基础上, 进行网络药理学和分子对接的预测。

本论文采用质谱分析技术, 对五味清浊颗粒进行分析, 以检测到的成分为对象, 进行网络药理学和分子对接分析, 筛选活性成分, 揭示作用机制, 为五味清浊颗粒研究奠定基础, 指导临床用药。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1290 型 UPLC 仪、Agilent 6550 型三重四极杆高分辨质谱仪 (配置 Dual AJS ESI 离子源) [安捷伦科技 (中国) 有限公司]、KQ250DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、十万分之一天平 (梅特勒 ME55C137550880, 精度: 0.01 mg)。

### 1.2 试药

五味清浊颗粒 (批号: 20211010, 规格: 3 g/袋, 祈蒙股份有限公司), 对照品没食子酸 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B20851)、胡椒碱 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B20516)、羟基红花黄色素 A (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B20968)、木犀草素 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B20888)、山柰酚 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B21126)、肉桂醛 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: B21081) (上海源叶

生物科技有限公司); 鞣花酸 (纯度  $\geq 98.0\%$ , 批号: BP0529, 成都普瑞法科技开发有限公司)。乙腈、甲酸、甲醇均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱和质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 采用 Eclipseplus C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.8  $\mu$ m), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0 ~ 13.3 min, 7% ~ 22%B; 13.3 ~ 14.6 min, 22% ~ 31%B; 14.6 ~ 22 min, 31% ~ 40%B; 22 ~ 29 min, 40% ~ 60%B; 29 ~ 35 min, 60% ~ 80%B; 35 ~ 39 min, 80% ~ 90%B。检测波长为 310 nm; 进样体积为 3  $\mu$ L; 柱温为 30  $^{\circ}$ C; 流速为 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 分析时间为 39 min; 柱色谱洗脱液不经分流直接导入质谱系统检测。

**2.1.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子模式下检测, 二级质谱采集采用 Auto MS/MS 模式; 干燥气体温度为 250  $^{\circ}$ C, 干燥气体流速为 14 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 毛细管电压为 3500 V, 碎裂电压为 3500 V, 雾化器压力为 35 psi, 二级质谱碰撞电压为 20 eV; 质谱采集范围为 (*m/z*) 50 ~ 2000。

### 2.2 供试品溶液的制备

取五味清浊颗粒 0.75 g 置 10 mL 的量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 超声 (频率 40 kHz, 功率 100 W) 30 min, 冷却后用 70% 甲醇补足体积, 用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别称取没食子酸、胡椒碱、羟基红花黄色素 A、木犀草素、山柰酚、肉桂醛、鞣花酸适量, 加甲醇制成各对照品质量浓度均为 50  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 即得。

### 2.4 结果

**2.4.1 化学成分的鉴定** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 按“2.1”项下方法对五味清浊颗粒进行正、负离子全扫描, 获得总离子流图, 见图 1。结合化学对照品, 共鉴定和推测出 86 个化学成分, 见表 1<sup>[7-14]</sup>。

**2.4.2 生物碱类化合物** 生物碱类化合物主要来源于萆薢, 如胡椒碱、萆薢宁、萆薢酰胺等, 质

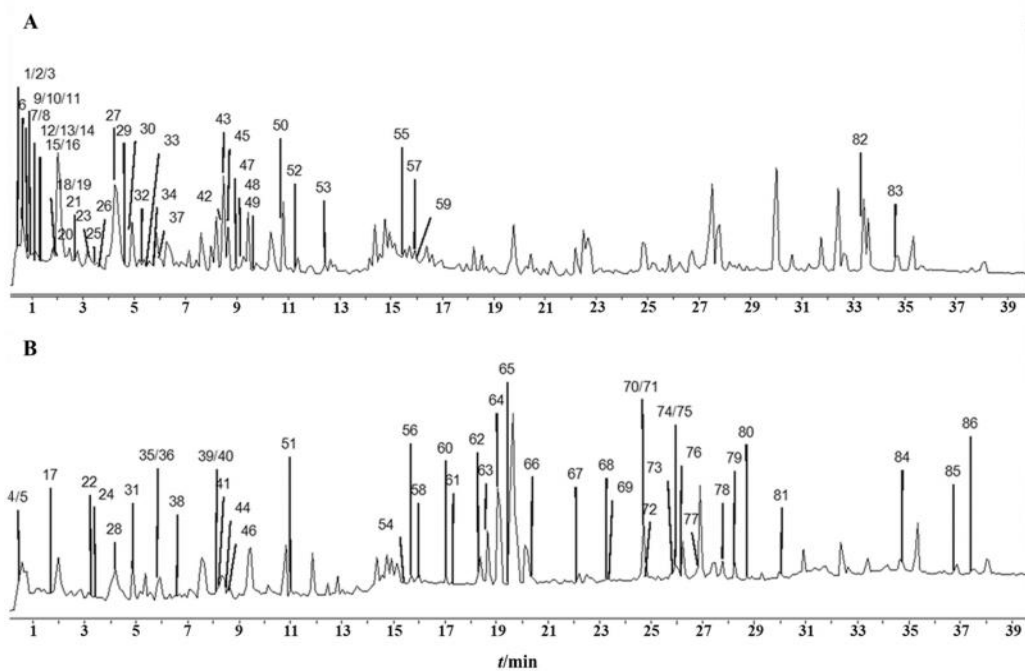


图 1 五味清浊颗粒的 HPLC-Q-TOF-MS/MS 负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of HPLC-Q-TOF-MS/MS by negative ion mode (A) and positive ion mode (B) for Wuwei Qingzhuo granules

谱裂解规律为胺部分容易失去一个中性哌啶或甲酰基哌啶, 末端结构易产生丙烯基亚甲二氧基苯和甲基亚甲二氧基苯<sup>[12]</sup>。在五味清浊颗粒中鉴别出生物碱类化合物共 25 个, 分别是 4、24、58、60、62 ~ 65、68 ~ 81、84 ~ 86。

以 65 为例, 阐述酰胺类生物碱的裂解规律和结构鉴定的解析过程。在正离子模式下, 其保留时间为 19.416 min, 准分子离子峰  $m/z$  286.1448 $[M + H]^+$ , 根据元素组成综合分析预测可能的分子式为  $C_{17}H_{19}NO_3$ 。母离子在质谱高能碰撞下, 丢失  $C_5H_{11}N$  形成  $m/z$  201.0550 的碎片离子, 再丢失 CO 形成  $m/z$  173.0594 的离子碎片, 脂肪酸末端产生  $m/z$  161.0593 $[C_{10}H_8O_2 + H]^+$  的丙烯基亚甲二氧基苯和  $m/z$  135.0441 $[C_8H_6O_2 + H]^+$  的甲基亚甲二氧基苯。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及与文献对照<sup>[12]</sup>, 确认该化合物为胡椒碱。可能的裂解途径见图 2。

**2.4.3 黄酮类化合物** 黄酮类化合物主要来源于红花, 如山柰酚、槲皮素、羟基红花黄色素 A 等。质谱裂解规律为逆狄尔斯-阿德尔 (RDA) 裂解和丢失中性碎片, 在 ESI 多级质谱中, CO、CO<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 等中性碎片的丢失首先发生在 C 环, 然后发生在 A 环上, B 环上没有中性碎片的丢失<sup>[13]</sup>。在五味清浊颗粒中鉴别出黄酮类化合物共 23 个, 分别是 15、16、20、22、23、26、28、31、34 ~ 36、39 ~ 45、47、48、52、53、59。

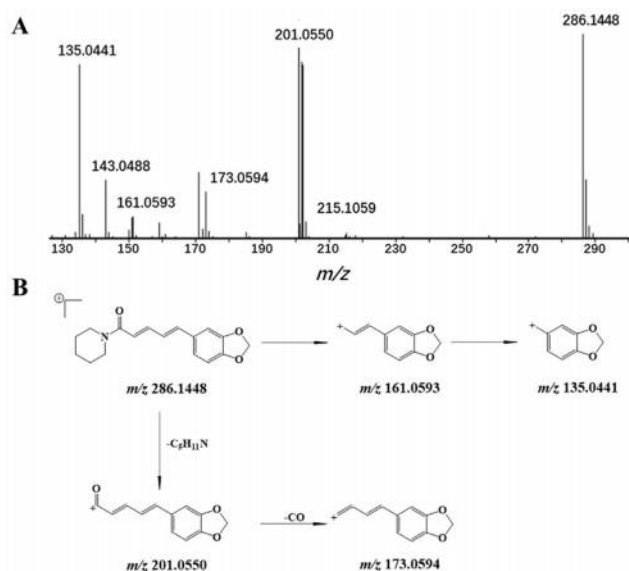


图 2 胡椒碱的质谱图 (A) 及裂解规律 (B)

Fig 2 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of piperine

以 53 为例, 阐述黄酮类化合物的裂解规律和结构鉴定的解析过程。在负离子模式下, 保留时间为 12.418 min, 准分子离子峰  $m/z$  285.0405 $[M - H]^-$ , 根据元素组成综合分析预测可能的分子式为  $C_{15}H_{10}O_6$ , 母离子在质谱高能碰撞下丢失 CO 形成  $m/z$  257.0446 的离子碎片, 再丢失 CO 形成  $m/z$  229.0500 的离子碎片。RDA 裂解产生  $m/z$  153.0181 的离子碎片。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及与文献对照<sup>[13]</sup>, 确认该化合物为山柰酚。可能的裂解途径见图 3。



表 1 五味清油颗粒中化学成分解析结果

Tab 1 Chemical constituents identified in extracts from Wuwei Qingzhuo granules

No.	$t_R$ /min	化合物	分子式	离子模 式	$m/z$		误差 / ( $\times 10^6$ )	主要离子碎片 ( $m/z$ )	来源
					理论值	实测值			
1	0.440	枸橼酸	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.0197	191.0190	3.66	111.0094, 129.0192, 154.9993, 173.0441	A
2	0.440	L-苹果酸	$C_4H_6O_5$	$[M-H]^-$	133.0142	133.0148	-4.51	115.0041, 109.0314, 111.3538, 116.0075	A
3	0.440	3- $\{[6-O-(D-galactopyrano-syl)-\beta-D-galactopyranosyl]oxy\}$ -1, 2-propanediyl diacetate	$C_{19}H_{32}O_{15}$	$[M-H]^-$	499.1668	499.1677	1.80	481.1572, 353.1079, 191.0558, 173.0454	B
4	0.450	甜菜碱	$C_5H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	118.0863	118.0863	0.00	58.0656, 59.0734, 77.0393, 91.0543	E
5	0.450	2-pyrrolidinecarboxylic acid <sup>[13]</sup>	$C_5H_9NO_2$	$[M+H]^+$	116.0706	116.0705	-0.86	70.0695, 68.0501, 91.0543, 105.0443	D/E
6	0.633	没食子酸	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.0142	169.0145	-1.77	125.0248, 107.0140, 126.0282	A/B
7	0.826	安石榴苷	$C_{34}H_{22}O_{22}$	$[M-H]^-$	781.0530	781.0537	0.89	601.9925, 300.9989, 270.9881	A
8	0.826	原儿茶酸	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	153.0193	153.0195	1.30	153.0188, 109.0283, 108.0217	A
9	0.923	没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	$[M-H]^-$	305.0667	305.0669	0.65	179.0312, 125.0247, 137.0249, 165.0192	A
10	0.923	terflavin D	$C_{27}H_{20}O_{18}$	$[M-H]^-$	631.0577	631.0591	2.21	450.9953, 425.0149, 571.0347	A
11	0.923	terflavin B	$C_{34}H_{24}O_{22}$	$[M-H]^-$	783.0686	783.0683	-0.38	631.0590, 450.9937, 425.0127, 351.0151	A
12	1.116	地榆酸双内酯	$C_{21}H_{10}O_{13}$	$[M-H]^-$	469.0049	469.0057	1.70	425.0156, 407.0050, 379.0097, 299.9912	A
13	1.116	valoneic acid dilactone	$C_{21}H_{10}O_{13}$	$[M-H]^-$	469.0049	469.0057	1.70	379.0097, 299.9912, 270.9886	A
14	1.116	valeric acid dilactone	$C_{21}H_{10}O_{13}$	$[M-H]^-$	469.0049	469.0057	1.70	299.9912, 425.0156, 407.0050, 270.9886	A
15	1.310	syringaldehyde <sup>[7]</sup>	$C_9H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	181.0506	181.0505	-0.55	151.0060, 123.0098, 110.0308	A
16	1.310	芸香苷水合物	$C_{27}H_{32}O_{17}$	$[M-H]^-$	627.1567	627.1571	0.63	135.0448, 205.0143, 299.0562, 341.0659	B
17	1.695	2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3- $\{[2-O-(\beta-D-erythro-hexopyranosyl)-\beta-D-glycero-hexopyranosyl]oxy\}$ -5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl- $\beta$ -D-threo-hexopyranosiduronic acid <sup>[10]</sup>	$C_{33}H_{38}O_{23}$	$[M+H]^+$	803.1877	803.1880	0.37	641.1351, 479.0834, 303.0503	B
18	1.889	没食子酸甲酯	$C_8H_8O_5$	$[M-H]^-$	183.0299	183.0303	2.18	167.9014, 124.0170, 139.0024	A
19	1.889	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.0878	353.0882	1.13	191.0560, 135.0453, 161.0244	B
20	1.986	羟基红花黄色素 A	$C_{27}H_{32}O_{16}$	$[M-H]^-$	611.1618	611.1630	1.96	119.0508, 283.0618, 473.1089, 491.1206	B
21	2.662	原花青素 B	$C_{30}H_{26}O_{12}$	$[M-H]^-$	577.1351	577.1364	2.25	407.0773, 289.0719, 425.0861, 125.0248	A
22	3.228	catechin hydrate	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	291.0863	291.0866	1.03	123.0441, 139.0390, 207.0649	D/E
23	3.241	(-)-epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M-H]^-$	289.0718	289.0731	4.49	123.0451, 125.0247, 137.0246, 203.0714	A
24	3.420	magnoflorine	$C_{20}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	342.1700	342.1701	0.29	297.1124, 265.0860, 237.0908	D
25	3.435	柯里拉京	$C_{27}H_{22}O_{18}$	$[M-H]^-$	633.0733	633.0745	1.89	463.0509, 300.9983, 169.0145, 125.0247	A
26	3.628	carthamidin-5-glucoside <sup>[1]</sup>	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M-H]^-$	449.1089	449.1100	2.44	287.0560, 329.0667, 359.0782	B
27	4.014	鞣花酸-己糖苷	$C_{20}H_{16}O_{13}$	$[M-H]^-$	463.0518	463.0528	2.15	300.9990, 283.9964, 101.0240	A
28	4.186	山柰酚-3-O-芸香糖苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M+H]^+$	595.1657	595.1653	-0.67	433.1149, 415.1035, 397.0929, 301.0714	B
29	4.594	gallic acid dilactone	$C_{28}H_{10}O_{16}$	$[M-H]^-$	600.9896	600.9904	1.33	300.9985, 298.9836, 270.9887, 242.9931	A

续表 1

No.	$t_R$ /min	化合物	分子式	离子模 式	$m/z$		误差 / ( $\times 10^6$ )	主要离子碎片 ( $m/z$ )	来源
					理论值	实测值			
30	4.655	methyl-3, 4, 5-trihydroxy-2-(2, 3, 7, 8-tetra hydroxy-5, 10-dioxo-5, 10-dihydrochromeno [5, 4, 3cde]chromen-1-yl) benzoat <sup>[9]</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> O <sub>13</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	483.0205	483.0215	2.07	450.9942, 169.0151, 125.0243	A
31	4.857	桑色素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	303.0499	303.0499	0.00	187.0385, 169.0131, 285.0399	D/E
32	5.270	<i>p</i> -coumaric acid- <i>O</i> -galloyl glucoside/isomer <sup>[11]</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	477.1038	477.1051	2.72	477.1016, 169.0146, 151.0041, 125.0245	A
33	5.463	石榴皮亭 B	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	951.0745	951.0755	1.05	933.0603, 300.9981, 273.0033, 169.0143	A
34	5.753	异槲皮苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	463.0882	463.0889	1.51	301.0350, 300.0274, 271.0246, 272.0319	B
35	5.814	芦丁	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	611.1607	611.1610	0.49	465.1030, 129.0548, 304.0540	B
36	5.814	槲皮素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	303.0499	303.0499	0.00	285.0393, 257.0446, 229.0494, 153.0175	B
37	5.946	鞣花酸	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	300.9990	300.9997	2.32	185.0249, 229.0146, 257.0090	A
38	6.581	香豆素 <sup>[15]</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	147.0441	147.0437	-2.72	77.0392, 91.0547, 65.0393, 119.0486	C
39	8.113	木犀草素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	287.0550	287.0553	1.04	137.0233, 68.9977, 153.0181, 241.0490	E
40	8.113	山柰酚 <sup>[13]</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	287.0550	287.0553	1.04	153.0181, 231.0651, 258.0523	E
41	8.209	荭草苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	449.1078	449.1087	2.00	287.0553, 313.0642, 301.0668	D
42	8.361	脱水红花黄色素 B	C <sub>48</sub> H <sub>52</sub> O <sub>26</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	1043.2670	1043.2690	1.15	449.1086, 287.0554, 407.0971, 862.1938	B
43	8.457	cynaroside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	447.0933	447.0942	2.01	301.0343, 285.0395, 284.0327	B
44	8.497	vitexin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	433.1129	433.1128	-0.23	271.0622, 379.0816, 397.0916, 295.0451	D
45	8.554	(+)-dihydrokaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	287.0561	287.0566	1.74	287.0529, 259.0600, 201.0546	A
46	8.592	isorhamnetin-3- <i>O</i> -nehesperi-dine	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	625.1763	625.1765	0.31	317.0670, 85.0287, 129.0548, 479.1190	E
47	8.940	isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside <sup>[8]</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	477.1038	477.1051	2.72	165.9900, 314.0432, 287.0516, 187.0404	B
48	9.133	3, 5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxy-methyl) oxan-2-yl]oxy-2, 3-dihydrochromen-4-one	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	449.1089	449.1100	2.44	449.1081, 287.0557, 259.0606, 125.0242	A
49	9.616	cinnamic acid- <i>o</i> -galloyl glucoside/isomer	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	461.1089	461.1090	0.21	461.1061, 169.0150	A
50	10.775	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-cyclohexadien-1-yl} hexitol	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	613.1563	613.1574	1.79	361.1087, 425.1090, 551.1558, 595.1456	B
51	10.987	( <i>E</i> )-cinnamaldehyde	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	133.0648	133.0645	-2.25	55.0187, 77.0392, 105.0698, 115.0541	C
52	11.258	红花黄色素 C	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	613.1563	613.1574	1.79	595.1439, 551.1543, 425.1080, 361.1086	B
53	12.418	山柰酚	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.0405	285.0405	0.00	257.0446, 229.0500, 153.0181	A
54	15.393	dihydroferuperine	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	290.1751	290.1750	-0.34	205.0849, 177.0908, 166.1221, 112.0756	D
55	15.413	methyl 4- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetyl-2, 6-di- <i>O</i> -benzyl-3- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-2, 6-di- <i>O</i> -benzyl-3- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	C <sub>45</sub> H <sub>54</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	785.3543	785.3568	3.18	665.2961, 639.3148, 545.2391	B
56	15.681	coumaroyl-piperidine	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	258.1489	258.1491	0.77	173.0601, 152.1065, 145.0646	D

续表 1

No.	$t_R$ /min	化合物	分子式	离子模 式	$m/z$		误差 / ( $\times 10^6$ )	主要离子碎片 ( $m/z$ )	来源
					理论值	实测值			
57	15.896	9 (S), 10 (S), 11 (R) -trihydroxy-12 (Z) -octadecenoic acid	$C_{18}H_{34}O_5$	[M-H] <sup>-</sup>	329.2333	329.2342	2.73	311.2225, 293.2123, 201.1129, 171.1033	B
58	15.968	fagaramide	$C_{14}H_{17}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	248.1281	248.1283	0.80	192.0632, 175.0374, 145.0267	D
59	15.992	5, 6-dihydroxy-3, 7, 4-trimethoxyflavone/isomer	$C_{17}H_{12}O_8$	[M-H] <sup>-</sup>	343.0459	343.0466	2.04	328.0212, 312.9977, 285.0022, 257.0083	A
60	17.022	piperlyline	$C_{16}H_{17}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	272.1281	272.1286	1.83	201.0543, 135.0434, 98.0598	D
61	17.309	piperodione	$C_{17}H_{19}NO_5$	[M+H] <sup>+</sup>	318.1336	318.1339	0.94	233.0431, 196.0959, 168.1012, 149.0228	D
62	18.267	二氢莨菪明宁碱	$C_{16}H_{21}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	276.1594	276.1600	2.17	175.0745, 135.0446, 203.0695	D
63	18.555	莨菪明宁碱	$C_{16}H_{19}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	274.1438	274.1440	0.72	135.0443, 201.0550, 171.0437	D
64	18.938	胡椒新碱	$C_{17}H_{21}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	288.1594	288.1597	1.04	135.0444, 161.0596, 203.0695	D
65	19.416	胡椒碱	$C_{17}H_{19}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	286.1438	286.1448	3.49	201.0550, 161.0593, 135.0441, 173.0594	D
66	20.374	胡椒酸甲酯	$C_{13}H_{12}O_4$	[M+H] <sup>+</sup>	233.0808	233.0808	0.00	201.0530, 135.0426, 171.0423, 115.0530	D
67	22.099	$\alpha$ -亚麻酸	$C_{18}H_{30}O_2$	[M+H] <sup>+</sup>	279.2319	279.2320	0.35	67.0543, 81.0693, 95.0844	D/E
68	23.248	胡椒亭碱 I	$C_{19}H_{21}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	312.1594	312.1599	1.60	169.0629, 135.0422, 131.0473	D
69	23.344	piperdardine	$C_{19}H_{23}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	314.1751	314.1748	-0.95	229.0822, 135.0416, 179.1277	D
70	24.685	假莨菪酰胺 A	$C_{20}H_{25}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	328.1907	328.1911	1.21	135.0433, 161.0594, 229.1217, 312.3250	D
71	24.685	brachyamide B	$C_{20}H_{25}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	328.1907	328.1911	1.21	257.1159, 229.1217, 135.0433	D
72	24.781	墙草碱	$C_{14}H_{25}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	224.2009	224.2013	-1.78	182.1520, 168.1364, 151.1101, 123.1154	D
73	25.834	piptigrine	$C_{21}H_{25}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	340.1907	340.1916	2.64	255.1010, 227.1061, 213.0900	D
74	25.930	pipercollosine	$C_{20}H_{27}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	330.2064	330.2080	4.84	257.1143, 229.1212, 135.0432	D
75	25.930	neopellitorine B	$C_{15}H_{25}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	236.2009	236.2015	2.54	151.1101, 109.0639, 112.0750, 69.0697	D
76	26.122	莨菪壬三烯哌啶	$C_{21}H_{25}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	340.1907	340.1916	2.64	227.1043, 135.0422, 131.0476	D
77	26.792	piperonaline	$C_{21}H_{27}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	342.2064	342.2073	-2.63	199.0958, 229.1046, 135.0336, 86.0902	D
78	27.750	piperolein B	$C_{21}H_{29}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	344.2220	344.2233	3.77	161.0515, 135.0375, 222.1738, 86.0926	D
79	28.229	假莨菪酰胺 B	$C_{22}H_{29}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	356.2220	356.2236	4.49	283.1325, 255.1380, 189.0905, 135.0444	D
80	28.707	<i>N</i> -isobutyl-2, 4-dodecadienamide <sup>[14]</sup>	$C_{16}H_{29}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	252.2322	252.2327	1.98	179.1305, 151.1378, 196.1561, 57.0669	D
81	30.048	piperchabamide B	$C_{23}H_{31}NO_3$	[M+H] <sup>+</sup>	370.2377	370.2379	0.54	161.0505, 257.1402, 89.0546, 285.1313	D
82	33.286	亚油酸	$C_{18}H_{32}O_2$	[M-H] <sup>-</sup>	279.2330	279.2335	1.79	251.1975, 261.2210, 128.0366	A
83	34.639	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	[M-H] <sup>-</sup>	255.2330	255.2341	4.30	237.2222, 238.2245, 201.0513	A
84	34.741	<i>N</i> -isobutyl-2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> -hexadecadienamide	$C_{20}H_{37}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	308.2948	308.2957	2.91	252.2316, 235.2047, 168.1374, 154.1222	D
85	36.753	1-(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> , 12 <i>E</i> )-octadeca-trinoylpiperidine <sup>[12]</sup>	$C_{23}H_{39}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	346.3104	346.3117	3.75	261.2204, 233.2260, 178.1224, 112.0759	D
86	37.423	<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> )-octadecadi-enamide	$C_{22}H_{41}NO$	[M+H] <sup>+</sup>	336.3261	336.3270	2.67	280.2631, 263.2362, 168.1375, 154.1221	D

注: A. 石榴; B. 红花; C. 肉桂; D. 莨菪; E. 豆蔻。

Note: A. *Punica granatum* L.; B. *Carthamus tinctorius* L.; C. *Cinnamomum cassia* L.; D. *Piper longum* L.; E. *Amomum Kravanh Pierre* ex Gagnep.

**2.4.4 有机酸类化合物** 有机酸类化合物来源于石榴、红花, 如绿原酸、没食子酸、苹果酸等。质谱裂解规律为一般丢失  $CO_2$  和  $H_2O$  的特征碎片<sup>[13]</sup>, 在五

味清浊颗粒中鉴别出有机酸类化合物共 12 个, 分别是 **1、2、5、8、9、19、32、49、57、67、82、83**。

以 **19** 为例, 阐述有机酸类化合物的裂解规律



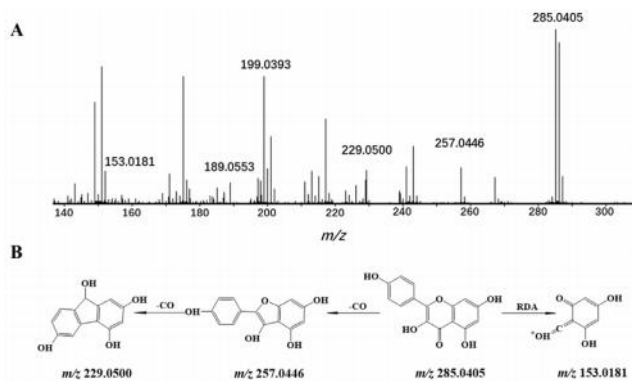


图 3 山柰酚的质谱图 (A) 及裂解规律 (B)  
Fig 3 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of kaempferol

和结构鉴定的解析过程。在负离子模式下，保留时间为 1.889 min，准分子离子峰  $m/z$  353.0882[M - H]<sup>-</sup>，根据元素组成综合分析预测可能的分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>，母离子在质谱高能碰撞下丢失 C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O、C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>-CO<sub>2</sub>，形成  $m/z$  161.0244、 $m/z$  135.0453 的离子碎片。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及与文献对照<sup>[13]</sup>，确认该化合物为绿原酸。可能的裂解途径见图 4。

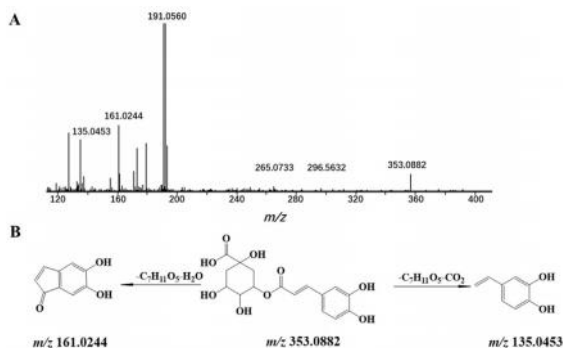


图 4 绿原酸的质谱图 (A) 及裂解规律 (B)  
Fig 4 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of chlorogenic acid

**2.4.5 鞣质类化合物** 鞣质类化合物主要来源于石榴，如原花青素 B、安石榴林、石榴皮亭 B 等。质谱裂解规律为通常发生 RDA 裂解、失去 H<sub>2</sub>O 而产生碎片离子峰<sup>[9]</sup>，在五味清浊颗粒中鉴别出鞣质类化合物共 16 个，分别是 6、7、10~14、18、21、25、27、29、30、33、37、55。

以 21 为例，阐述缩合鞣质类化合物的裂解规律和结构鉴定的解析过程。在负离子模式下，保留时间为 2.662 min，准分子离子峰  $m/z$  577.1364[M - H]<sup>-</sup>，根据元素组成综合分析预测可能的分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>，母离子在质谱高能碰撞下失去 C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>，发生 RDA 裂解重排得到  $m/z$  425.0861 离子碎片，接着失去一个 H<sub>2</sub>O，得到  $m/z$  407.0773 离子碎片，

两个儿茶素断裂，形成  $m/z$  289.0719 离子碎片，再失去 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>，经重排裂解得到  $m/z$  125.0248 离子碎片。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及与文献对照<sup>[9]</sup>，确认该化合物为原花青素 B。可能的裂解途径见图 5。

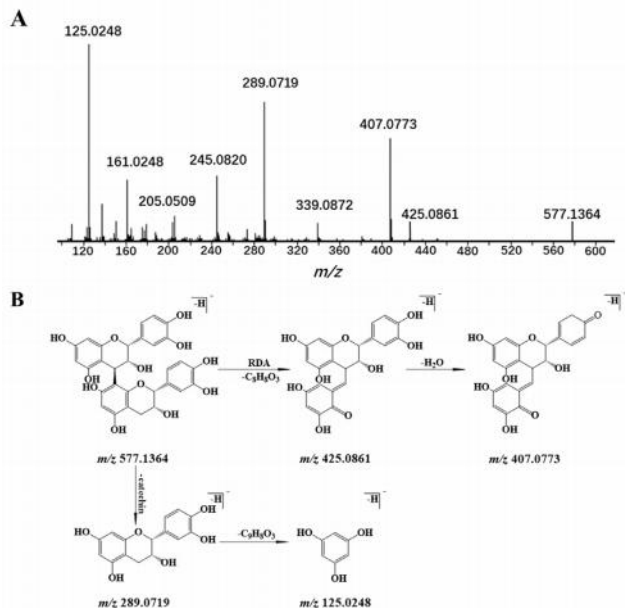


图 5 原花青素 B 的质谱图 (A) 及裂解规律 (B)  
Fig 5 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of procyanidin B

**2.4.6 苯丙素类化合物** 苯丙素类化合物主要来源于肉桂，如桂皮醛、香豆素。质谱裂解规律为内酯环容易丢失 CO、CO<sub>2</sub> 产生质量损失 28 和 44 的碎片离子<sup>[16]</sup>。在五味清浊颗粒中鉴别出苯丙素类化合物共 2 个，分别是 38、51。

以 38 为例，阐述苯丙素类化合物的裂解规律和结构鉴定的解析过程。在正离子模式下，保留时间为 6.581 min，准分子离子峰  $m/z$  147.0437[M + H]<sup>+</sup>，根据元素组成综合分析预测可能的分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>，母离子在质谱高能碰撞下失去 1 分子 CO，产生  $m/z$  119.0486 的离子碎片，再失去 1 分子 CO，得到  $m/z$  91.0547 的离子碎片。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及与文献对照<sup>[16]</sup>，确认该化合物为香豆素。可能的裂解途径见图 6。

## 2.5 治疗腹泻的网络药理学分析

**2.5.1 活性成分和疾病的靶点筛选** 将 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴别获得的 86 个化学成分代入 TCMSP 中，根据药代动力学特征 (ADME) 筛选得到活性成分。利用 TCMSP 和 Swiss Target Prediction 得到候选靶点 1014 个。以“Diarrhea”为关键词，在 GeneCards、OMIM 等数据库筛选得到腹泻相关靶点 320 个。最终筛选出五味清浊颗粒治疗腹泻疾病潜在

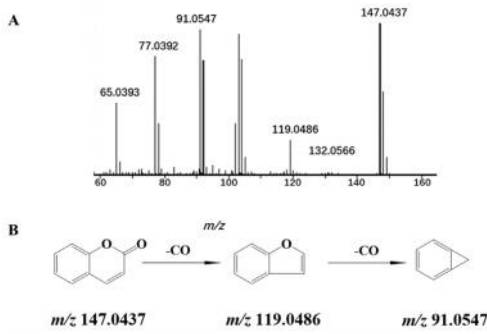


图 6 香豆素的质谱图 (A) 及裂解规律 (B)

Fig 6 Mass spectrum (A) and fragmentation pathway (B) of coumarin

靶点 57 个。利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“活性成分-作用靶点”网络，将活性成分按度值 (Degree) 排序，筛选排名靠前的 6 个成分，分别为槲皮素、木犀草素、鞣花酸、胡椒碱、山柰酚、萜萘宁。

**2.5.2 蛋白质互作网络 (PPI) 构建与分析** 将“活性成分-疾病”交集靶点导入 String 数据库，绘制 PPI。利用 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化，见图 7。利用 Network Analyzer 工具进行拓扑分析，以 Degree 为基准排序，最终筛选排名靠前的 6 个靶点，分别为 IL-6、TNF、EGFR、IFNG、IL-10、IL-8。

**2.5.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析** 应用

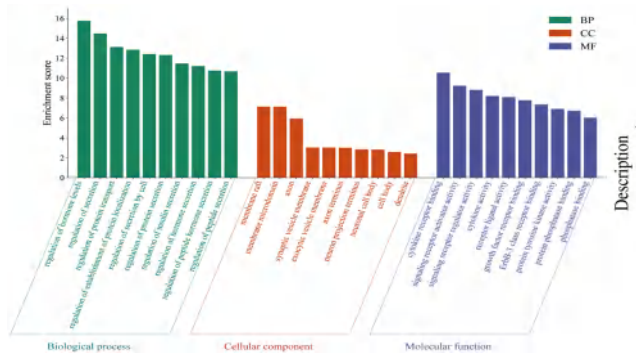


图 8 五味清浊颗粒治疗腹泻疾病靶点基因的 GO 及 KEGG 富集分析

Fig 8 GO and KEGG enrichment analysis of target genes of Wuwei Qingzhuo granules in treating diarrhea

**2.5.4 “核心成分-作用靶点-通路”网络构建与分析** 利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建五味清浊颗粒核心成分-作用靶点-通路相互作用网络图，见图 9。由图 9 可知，五味清浊颗粒活性成分通过作用于多个靶点、多条通路发挥作用，且成分、靶点、通路间存在错综复杂的关系。

**2.5.5 分子对接验证** 利用 AutoDock Vina 进行分子对接验证，见表 2。对接结合能均小于  $-20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，表明核心成分与核心靶点结合稳定，部分对接构象见图 10。

#### 4 讨论

腹泻是一种临床常见的消化道疾病，主要表现为排便次数增加和大便流动性增加<sup>[17]</sup>。腹泻会导致

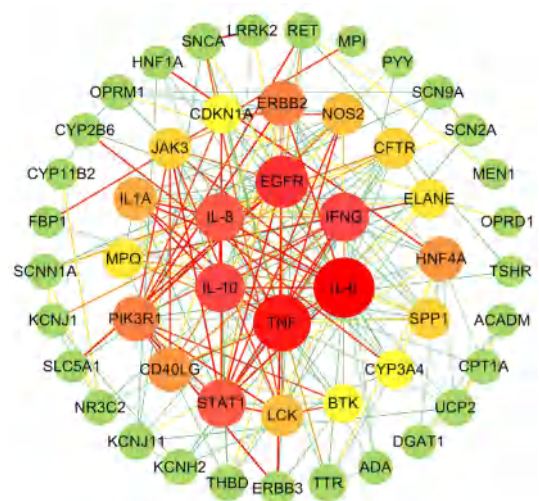
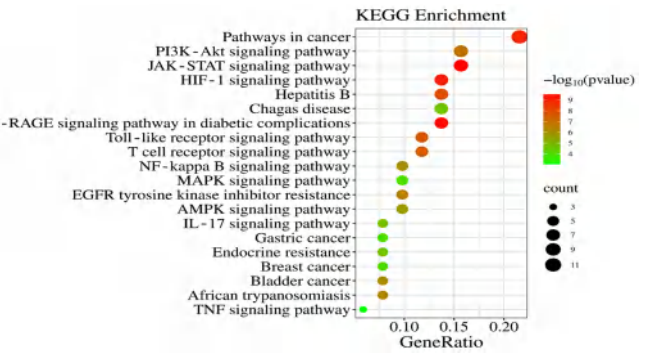


图 7 五味清浊颗粒治疗腹泻疾病 PPI 网络

Fig 7 PPI network of Wuwei Qingzhuo granules in treating diarrhea

Metascape 数据库，对 GO 功能排名前 10 的条目及 KEGG 排名前 20 的通路进行可视化。GO 分析得到生物过程 (BP) 条目 3251 个，细胞组分 (CC) 条目 287 个，分子功能 (MF) 条目 478 个。KEGG 通路富集分析得到 107 条通路，富集的主要信号通路包括 PI3K-Akt、JAK-STAT、HIF-1 等信号通路，见图 8。



机体丢失大量体液，引起脱水和电解质平衡紊乱，引起腹泻的病因较多，发病机制较复杂，可能是由于肠道吸收减少、渗透性活性电解质分泌增加、胃肠道快速转运引起的<sup>[18-19]</sup>。五味清浊颗粒是蒙医临床治疗腹泻的经验方，本文以其作为研究对象，采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术联合网络药理学及分子对接探讨治疗腹泻的药效物质基础和作用机制。

通过网络药理学筛选出 6 个核心成分，分别为槲皮素、木犀草素、鞣花酸、胡椒碱、山柰酚、萜萘宁。相关药理研究表明，槲皮素、山柰酚可抑制肠道运动，降低腹腔毛细血管的通透性、抑制肠内水分和电解质的分泌以及修复上皮黏膜治疗腹泻<sup>[20-21]</sup>，鞣花酸对肠道上皮细胞具有显著的保护作用，能够促







分析结果显示, 51 个交集靶点显著富集于 PI3K-Akt、JAK-STAT、HIF-1 信号通路等关键信号通路。JAK-STAT 信号通路参与细胞增殖、分化、凋亡, 可通过调控其来抑制炎性细胞因子的产生, 减轻肠黏膜损伤。HIF-1 为肠道炎症的关键调节因子, 腹泻会导致肠道菌群失调并会造成机体局部缺氧, 使得 HIF-1 信号通路激活<sup>[19]</sup>, 可通过抑制其激活, 减轻肠道炎症反应。PI3K-Akt 信号通路于腹泻的发生最为密切, 可通过抑制其活化, 促进细胞自噬与细胞凋亡, 降低促炎症因子 IL-6 释放, 减轻肠道炎症反应, 达到保护肠道黏膜的作用<sup>[22, 27]</sup>。分子对接结果显示, 核心成分与核心靶点间均具有良好的结合性能。

综上, 本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术联合网络药理学和分子对接技术充分表明五味清浊颗粒可通过多成分、多靶点、多途径协同发挥治疗腹泻作用, 可为后期五味清浊颗粒的药效物质基础研究提供参考依据。

## 参考文献

- [1] 李建良. 基于“清浊生华”理论的蒙药五味清浊散抗高脂血症的作用机制初探 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 648.
- [3] 代丹, 吴浩然, 胡春晨, 等. 豆蔻的临床应用及其用量探究 [J]. 吉林中医药, 2021, 41 (10): 1359-1362.
- [4] 康晓婕, 张亚军, 包立道, 等. 基于网络药理学探讨五味清浊散加味方治疗功能性腹泻的机制研究 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2022, 44 (5): 458-461, 470.
- [5] 郝海霞, 任秋兰. 五味清浊散对脾虚泻小鼠免疫功能的影响 [J]. 吉林中医药, 2013, 33 (9): 929-931.
- [6] 郝海霞, 刘月红. 五味清浊散对脾虚泻小鼠止泻和肠吸收功能的影响 [J]. 内蒙古医学院学报, 2012, 34 (S4): 826-827.
- [7] Mena P, Calani L, Dall' Asta C, et al. Rapid and comprehensive evaluation of (poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn [J]. *Molecules*, 2012, 17 (12): 14821-14840.
- [8] Si W, Yang WZ, Guo DA, et al. Selective ion monitoring of quinochalcone C-glycoside markers for the simultaneous identification of *Carthamus tinctorius* L. in eleven Chinese patent medicines by UHPLC/QTOF MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 510.
- [9] 刘月程, 戴衍朋, 王变利, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 结合诊断离子过滤技术快速分析石榴皮的鞣质类成分 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (5): 71-79.
- [10] 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): 1347-1355.
- [11] 刘月程, 耿雪, 蒋海强, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 结合分子网络的炮制前后石榴皮化学成分分析 [J]. 中药材, 2023, 46 (2): 338-351.
- [12] 张弘, 张慧文, 张晨, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术鉴定蒙药葶苈的化学成分 [J]. 中南药学, 2023, 21 (2): 442-450.
- [13] 韩金美, 乌力吉, 王树梅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 对蒙药苏格木勒-3 水提物化学成分的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (10): 1111-1116.
- [14] Luca SV, Minceva M, Gertsch J, et al. LC-HRMS/MS-based phytochemical profiling of Piper spices: global association of piperamides with endocannabinoid system modulation [J]. *Food Res Int*, 2021, 141: 110123.
- [15] Zhou WW, Liang ZT, Li P, et al. Tissue-specific chemical profiling and quantitative analysis of bioactive components of *Cinnamomum cassia* by combining laser-microdissection with UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Chem Cent J*, 2018, 12 (1): 71.
- [16] 王晓丽, 彭梅梅, 陈琪, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典名方黄连汤化学成分鉴定及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (5): 1249-1263.
- [17] 董永丽, 史海霞, 王敏, 等. 基于网络药理学的葛根苓连汤治疗腹泻作用机制研究 [J]. 陕西中医, 2021, 42 (5): 659-664.
- [18] Müllhaupt B. Diarrhea [J]. *Praxis*, 2002, 91 (42): 1749-1756.
- [19] 李哲, 李娜, 崔晓燕, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨陈皮藿香汤治疗腹泻的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (23): 79-86.
- [20] Hirudkar JR, Parmar KM, Prasad RS, et al. Quercetin a major biomarker of *Psidium guajava* L. inhibits SepA protease activity of *Shigella flexneri* in treatment of infectious diarrhea [J]. *Microb Pathog*, 2020, 138: 103807.
- [21] 张慈浩, 刘艳梅, 毛婷婷, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨肠复安治疗腹泻型肠易激综合征的机制研究 [J]. 中医临床研究, 2022, 14 (32): 1-7.
- [22] 田文国, 陈金鹏, 王春芳, 等. 基于网络药理学和分子对接探究肠炎宁颗粒治疗功能性腹泻和腹泻型肠易激综合征的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53 (22): 7135-7147.
- [23] 高宇, 孙建荣, 邓超, 等. 基于网络药理学及分子对接研究探索生姜泻心汤治疗化疗相关腹泻的作用机制 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28 (13): 1010-1020.
- [24] 陈杏苑, 杨元生, 陈昱, 等. 葶苈宁对急性胰腺炎大鼠干扰素- $\gamma$  及硫氧还蛋白过氧化物酶-4 基因的表达影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23 (36): 5823-5828.
- [25] 李莹莹, 黄适, 徐程, 等. 安肠汤治疗 IBS-D 作用机制研究: 基于网络药理学和分子对接技术 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18 (10): 165-173.
- [26] 杨晓琴, 吴淑洋, 李敏, 等. 基于特征图谱和网络药理学的葛根苓连汤树脂醇提物质量标志物 (Q-marker) 预测 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (18): 4993-5002.
- [27] 王超, 付瑞嘉, 左倩, 等. 基于网络药理学和 UPLC-Q-TOF/MS 结合动物实验探究葶苈宁预防急性肝损伤的作用机制 [J]. 中南药学, 2023, 21 (2): 342-350.
- [28] 陈影, 苏萍, 张海静, 等. 基于网络药理学探讨蒙药苏龙嘎-4 颗粒抗腹泻的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2020, 43 (7): 1259-1266.

(收稿日期: 2023-11-06; 修回日期: 2023-11-29)

# pH 值对氟马西尼注射液质量的影响研究

郭丹峰, 金怡平, 肖利辉, 袁金桥 (嘉实(湖南)医药科技有限公司, 长沙 410217)

**摘要:** 目的 考察 pH 值对氟马西尼注射液质量的影响, 为氟马西尼注射液生产过程中 pH 值控制提供依据。方法 分别制备 pH 值为 3.0、3.4、3.8、4.2、4.6 和 5.0 的氟马西尼注射液, 与参比制剂同时置于长期和加速稳定性试验箱中, 于 1、3 和 6 个月后取样检测关键质量指标, 评估不同 pH 的氟马西尼注射液和参比制剂的稳定性差异。结果 所有样品的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物和不溶性微粒在稳定性考察期间未改变, 含量无显著变化; 有关物质项下杂质 A 增长趋势明显, 未检出其他杂质。当 pH 值在 3.8 ~ 4.6 时, 自制氟马西尼注射液中杂质 A 增长相对缓慢, 与参比制剂中杂质 A 增长趋势一致。结论 氟马西尼注射液 pH 值在 3.8 ~ 4.6 时稳定性更好, 生产过程中应将 pH 值控制在 3.8 ~ 4.6。

**关键词:** 氟马西尼注射液; 高效液相色谱法; 有关物质; pH 值

中图分类号: R927, R917 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0433-04  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.024

## Effect of pH value on the quality of flumazenil injection

GUO Dan-feng, JIN Yi-ping, XIAO Li-hui, YUAN Jin-qiao (*Harvest (Hunan) Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410217*)

**Abstract: Objective** To determine the effect of pH values on the quality of flumazenil injection and provide a basis for the control of pH during the production process. **Methods** Flumazenil injections with pH values of 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6 and 5.0 were prepared and placed in the long-term and accelerated stability test chambers together with the reference preparations. The samples were taken out after 1, 3, 6 months and the key indicators were tested to evaluate the stability differences between flumazenil injections with different pH values and reference preparations. **Results** The characteristics, clarity and color of solution, visible particles and insoluble particles of all samples did not change during the stability test, and the content did not change obviously. Impurity A obviously tended to increase while no other impurities were detected in the related substances. When the pH value ranged 3.8 ~ 4.6, the growth of impurity A in the self-made flumazenil injections relatively slowed down, which was similar to that in the reference preparation. **Conclusion** Flumazenil injection is more stable when the pH value ranges 3.8 ~ 4.6.

**Key words:** flumazenil injection; HPLC; related substance; pH value

氟马西尼作为一种苯二氮草类药物的拮抗剂, 可与苯二氮草受体特异性结合, 减少  $\gamma$ -氨基丁酸的释放<sup>[1]</sup>, 临床主要用于逆转苯二氮草类药物所致的中枢镇静作用<sup>[2]</sup>, 如终止用苯二氮草类药物诱导及维持的全身麻醉。根据其特定的临床用途以及肝脏首过效应的影响<sup>[3]</sup>, 目前国内上市剂型均为注射液<sup>[4]</sup>。氟马西尼是一种酯类化

合物, 易水解生成杂质 A, 如图 1 所示, 可能导致氟马西尼注射液的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒和含量在贮藏期间发生改变, 影响药品的安全性和有效性。pH 值作为影响杂质 A 降解速度的关键因素之一, 暂无文献报告其对氟马西尼注射液质量稳定性的影响。本文参考国内外药典规定的 pH 值范围, 按照参比制剂

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No. 2021JJ80014)。

作者简介: 郭丹峰, 男, 中级工程师, 主要从事化学仿制药质量研究, email: guodf@harvest-pharm.com \*通信作者: 袁金桥, 男, 高级工程师, 主要从事中药、化学仿制药研究, email: yuanjq@harvest-pharm.com

的处方制备不同 pH 值的氟马西尼注射液, 考察自制氟马西尼注射液与参比制剂质量的稳定性, 为制剂工艺中 pH 值的选择提供科学依据。

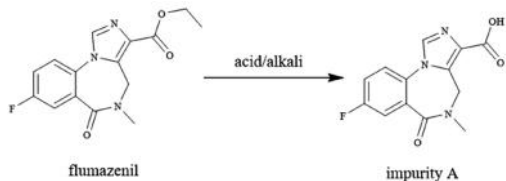


图 1 氟马西尼的水解反应

Fig 1 Hydrolysis reaction of flumazenil

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); XS105DU 型分析天平 (精度: 0.01 mg)、FE28 型 pH 计 (瑞士梅特勒托利多); FCD-2000 型恒温鼓风干燥箱 (上海琅环实验设备有限公司); Milli-Q 纯水仪 (德国默克); YXQ-LS-50A 型立式高压蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); AGL-2 型安瓿拉丝灌封机 (长沙益广制药机械有限公司); SHH-12W-SD 型稳定性试验箱 (重庆康诚永生试验设备有限公司); YB-2 型澄明度检测仪 (天大天发科技有限公司); LE100 型微粒检测仪 (苏州苏净仪器自控设备有限公司)。

氟马西尼对照品 (批号: 100727-202003, 纯度: 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 杂质 A 对照品 (批号: 190901, 纯度: 99.4%, 自制); 氟马西尼 (原料药, 批号: 180101, 湖南华纳大药厂手性药物有限公司); 依地酸二钠 (辅料级, 批号: 102320180301, 湖南尔康制药股份有限公司); 醋酸 (辅料级, 批号: 20180403, 台山市新宁制药有限公司); 氯化钠 (辅料级, 批号: 01170803, 天津寿光药业股份有限公司), 氢氧化钠 (辅料级, 批号: 180901, 四川金山制药有限公司), 甲醇 (色谱纯, Sigma, 批号: WXBC3660V); 水为超纯水; 磷酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20180315); 四氢呋喃 (色谱纯, Sigma, 批号: WXBC6565V); 氟马西尼参比制剂 (批号: F4001F02, 规格: 5 mL/0.5 mg, Cheplapharm Arzneimittel GmbH)。

## 2 方法与结果

### 2.1 氟马西尼注射液的制备

取纯化水 400 mL, 水浴维持 60 ~ 70 °C, 依次加入参比制剂处方量的氯化钠、依地酸二钠和冰醋酸, 搅拌使溶解, 再加入氟马西尼 50 mg, 搅拌使溶解, 冷却, 平行配制 6 份, 用稀冰醋酸溶液或 0.1% 氢氧化钠溶液分别调节 pH 值为 3.0、

3.4、3.8、4.2、4.6 和 5.0, 再分别用纯化水定容至 500 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 照每支 5 mL 灌装, 熔封, 于 121 °C 湿热灭菌 15 min, 放冷, 即得。

### 2.2 有关物质和含量分析方法的验证

**2.2.1 色谱条件** 照《中国药典》2020 年版二部氟马西尼注射液有关物质和含量测定方法的色谱条件<sup>[5]</sup>, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 [Waters Symmetry C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)], 以稀磷酸溶液 (取水 1000 mL, 用磷酸调节 pH 至 2.0) - 甲醇 - 四氢呋喃 (80 : 13 : 7) 为流动相进行洗脱; 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长为 230 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 20 μL。

**2.2.2 专属性试验** 取冰醋酸、依地酸二钠、氯化钠和氢氧化钠适量, 用水溶解并稀释制成处方浓度的溶液, 作为空白辅料溶液; 以流动相作为空白溶液; 取杂质 A 适量, 加甲醇适量使溶解, 再用水定量稀释制成每 1 mL 中含杂质 A 0.5 μg 的溶液, 作为杂质 A 溶液; 取氟马西尼注射液作为样品溶液。取各溶液进样, 结果空白溶液和辅料不干扰主峰和杂质峰检测, 样品溶液色谱图中无未知杂质, 杂质 A 峰与主峰之间的分离度为 22.2, 主峰拖尾因子为 1.1, 说明本方法具有良好的专属性, 典型图谱见图 2。

**2.2.3 检测限和定量限** 取杂质 A 对照品和氟马西尼对照品适量, 精密称定, 加甲醇适量使溶解, 再用水稀释至信噪比等于 3 的溶液 (即检测限溶液), 信噪比等于 10 的溶液 (即定量限溶液)。结果杂质 A 和氟马西尼检测限分别为 0.001 和 0.002 μg · mL<sup>-1</sup>, 定量限分别为 0.003 和 0.006 μg · mL<sup>-1</sup>。杂质 A 和氟马西尼定量限浓度相当于样品溶液中主成分浓度的 0.003% 和 0.006%, 说明本方法具有较好的灵敏度。

**2.2.4 线性关系考察** 取杂质 A 对照品和氟马西尼对照品适量, 精密称定, 加甲醇适量使溶解, 再用水稀释至含杂质 A 和氟马西尼 0.05、0.2、0.8、1.0、1.2 和 1.5 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 作为线性溶液。杂质 A 浓度 (X) 与峰面积 (Y) 的线性方程为  $Y = 7.758 \times 10^4 X - 72$ ,  $r = 1.000$ ; 氟马西尼浓度 (X) 与峰面积 (Y) 的线性方程为  $Y = 7.074 \times 10^4 X - 51$ ,  $r = 1.000$ 。根据标准曲线斜率比法测定杂质 A 的校正因子, 所得校正因子在 0.9 ~ 1.1, 因此杂质 A 可按照不加校正因子的自身对照法计算<sup>[6]</sup>。

**2.2.5 加样回收试验** 取杂质 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇适量使溶解, 按照 50%、100% 和 150% 的杂质限度浓度加入氟马西尼注射液 (pH



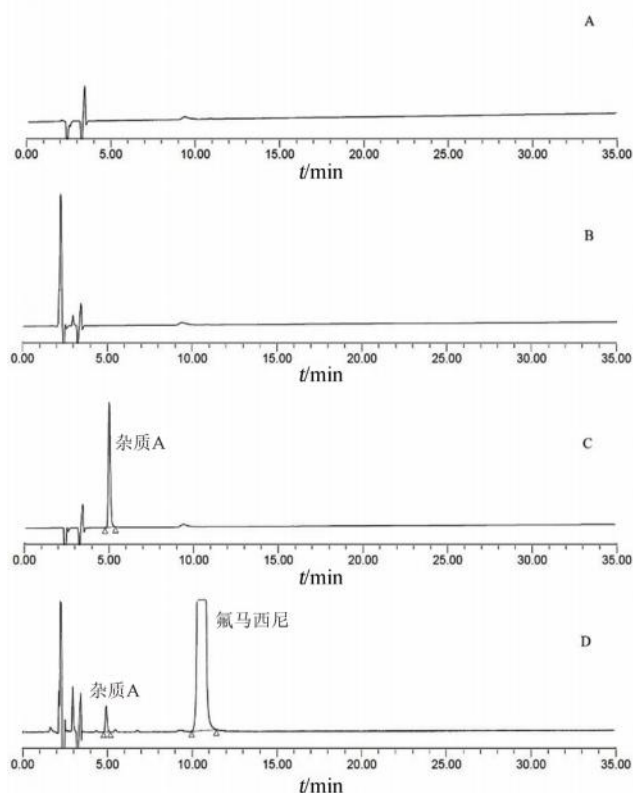


图 2 氟马西尼注射液色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of flumazenil injection

A. 空白溶液 (blank solution); B. 空白辅料溶液 (blank excipient solution); C. 杂质 A 溶液 (impurity A solution); D. 样品溶液 (sample solution)

3.8) 中; 另取氟马西尼对照品适量, 精密称定, 按照 80%、100% 和 120% 的理论浓度加入空白辅料溶液中, 按外标法以峰面积计算杂质 A 和氟马西尼的回收率。结果低、中、高浓度水平杂质 A 的

回收率在 97.2% ~ 101.2%, 氟马西尼的回收率在 100.3% ~ 101.2%, RSD 值均小于 2.0%, 说明本方法能准确检测氟马西尼注射液中杂质 A 和主药含量。

**2.2.6 重复性试验** 取氟马西尼注射液 (pH 3.8) 6 支, 精密量取样品溶液适量, 加水定量稀释制成每 1 mL 中约含氟马西尼 1 μg 的溶液, 作为对照溶液, 按不加校正因子的自身对照法计算重复性样品溶液中有关物质, 按外标法计算主药含量。6 份重复性样品溶液中杂质 A 平均含量为 0.05%, RSD 为 0.83%; 氟马西尼平均含量为 100.9%, RSD 为 0.36%, 说明本方法具有良好的重复性。

**2.2.7 精密度试验** 取氟马西尼注射液作为样品溶液, 连续进样 6 次, 氟马西尼主峰面积的 RSD 为 0.26%, 杂质 A 峰面积的 RSD 为 0.92%, 说明本方法具有良好的精密度。

### 2.3 pH 值对氟马西尼注射液质量的影响

**2.3.1 初始质量属性对比** 取不同 pH 值的自制氟马西尼注射液与参比制剂, 解析性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒、有关物质和含量等关键质量属性, 结果见表 1, 所有样品的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒和含量结果基本一致, 符合国内外药典标准以及通则要求; 有关物质除杂质 A 外, 均未检出其他杂质。当 pH 值在 3.4 ~ 4.6, 自制氟马西尼注射液中杂质 A 含量相对较低, 说明当 pH 值控制在上述范围时, 氟马西尼注射液在生产过程中稳定性较好, 不易降解。参比制剂中杂质 A 含量明显高于自制氟马西尼注射液, 这可能与参比制剂所用原料药中杂质 A 含量较高以及参比制剂在贮藏期间降解有关。

表 1 不同 pH 的氟马西尼注射液和参比制剂检测结果

Tab 1 Determination of flumazenil injections at different pH and reference preparations

制剂	性状	溶液澄清度与颜色	有关物质 /%		可见异物	不溶性微粒 /μm		含量 /%	
			杂质 A	其他杂质		≥ 10	≥ 25		
氟马西尼注射液	pH 3.0	无色澄明液体	澄清无色	0.13	未检出	未检出	27	2	100.2
	pH 3.4	无色澄明液体	澄清无色	0.07	未检出	未检出	14	2	99.8
	pH 3.8	无色澄明液体	澄清无色	0.05	未检出	未检出	26	3	99.6
	pH 4.2	无色澄明液体	澄清无色	0.04	未检出	未检出	20	1	99.7
	pH 4.6	无色澄明液体	澄清无色	0.07	未检出	未检出	28	2	99.6
	pH 5.0	无色澄明液体	澄清无色	0.14	未检出	未检出	15	2	99.4
参比制剂	无色澄明液体	澄清无色	0.27	未检出	未检出	20	5	99.6	

**2.3.2 pH 值对氟马西尼注射液稳定性的影响** 取不同 pH 值的氟马西尼注射液, 与参比制剂同时置于长期 (30 °C, 65% RH) 和加速 (40 °C, 75% RH) 稳定性试验箱中, 于 1、3 和 6 个月后分别取样, 评估不同 pH 值的氟马西尼注射液与参比制剂

的稳定性差异。所有样品的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒在加速和长期稳定性试验条件下基本不变; 有关物质除杂质 A 外, 未检出其他杂质, 杂质 A 检测结果见表 2, 氟马西尼含量测定结果见表 3。不同 pH 的氟马西尼注射液中

杂质 A 呈现不同幅度增长, 当 pH 值在 3.8 ~ 4.6 内, 自制氟马西尼注射液中杂质 A 在长期和加速稳定性试验条件下的增长速率与参比制剂相当。含量在长期试验条件下变化较小, 受检测误差的影响, 变化趋势不明显, 在加速试验条件下总体呈现逐渐降低的趋势, 但未发生显著变化。当 pH 为 3.0 时, 加速 3、6 个月的氟马西尼注射液中杂质 A 含量已超出国内外药典限度, 样品的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒检测结果不变, 说明氟马西尼降解不会导致本品的性状、溶液澄清度与颜色、可见异物、不溶性微粒在贮藏期间改变。

表 2 杂质 A 的含量检测结果 (%)

Tab 2 Content of impurity A (%)

制剂	长期试验条件			加速试验条件			
	1 个月	3 个月	6 个月	1 个月	3 个月	6 个月	
氟马西尼							
注射液	pH 3.0	0.19	0.30	0.52	0.47	1.05	2.01
	pH 3.4	0.11	0.16	0.27	0.23	0.47	0.77
	pH 3.8	0.08	0.12	0.21	0.12	0.24	0.51
	pH 4.2	0.08	0.13	0.22	0.11	0.23	0.52
	pH 4.6	0.10	0.13	0.21	0.16	0.25	0.58
	pH 5.0	0.16	0.23	0.33	0.22	0.46	0.79
参比制剂		0.30	0.37	0.45	0.36	0.53	0.76

表 3 氟马西尼注射液中氟马西尼的含量 (%)

Tab 3 Content of flumazenil in flumazenil injection (%)

制剂	长期试验条件			加速试验条件			
	1 个月	3 个月	6 个月	1 个月	3 个月	6 个月	
氟马西尼							
注射液	pH 3.0	100.0	99.9	99.7	99.5	99.0	98.3
	pH 3.4	99.9	99.9	99.5	99.7	99.5	99.1
	pH 3.8	99.6	99.5	99.5	99.6	99.5	99.3
	pH 4.2	99.5	99.5	99.5	99.7	99.5	99.2
	pH 4.6	99.3	99.3	99.4	99.4	99.3	99.0
	pH 5.0	99.5	99.3	99.3	99.5	99.3	98.8
参比制剂		99.6	99.5	99.3	99.5	99.2	99.0

### 3 讨论

#### 3.1 有关物质检测方法

本文对《中国药典》2020 年版二部氟马西尼注射液有关物质检测方法进行了验证, 结果表明该方法具有较好的专属性、灵敏度、准确度、线性、重复性和精密度, 能有效检测降解杂质 A 和其他杂质。氟马西尼注射液无需稀释直接注入色谱系统, 辅料浓度较高, 使用该方法检测有关物质时, 应注意识别空白辅料峰。

#### 3.2 氟马西尼注射液的制备方法

氟马西尼在冰醋酸中易溶, 在水中几乎不溶, 室温下氟马西尼溶解速率非常缓慢, 升高温度氟马西尼溶解速率增加, 但杂质 A 降解加剧。如何增加氟马西尼的溶解速率, 提升配液效率, 减少杂质降解是氟马西尼注射液配制时需要关注的重点。有专利报道了氟马西尼注射液的制备方法<sup>[7]</sup>, 专利处方与参比制剂基本一致, 配液温度为室温。重现该专利方法配制氟马西尼注射液时, 尽管有关物质未增长, 但原料药完全溶解所需时间长达 2 h, 不利于工业化生产。本文介绍的氟马西尼注射液配制方法为充分评估氟马西尼溶解速率以及杂质增长后制订的, 当配液温度为 60 ~ 70 °C, 氟马西尼完全溶解所需时间缩短至 30 min 以内, 杂质 A 增长可忽略不计, 更适用于工业化生产。

#### 3.3 pH 值控制范围

在氟马西尼注射液的法定药品标准中,《中国药典》规定的 pH 值为 3.5 ~ 4.2,《美国药典》规定的 pH 值是 3.4 ~ 4.6。根据 pH 值对氟马西尼注射液稳定性影响的研究结果, 当 pH 值控制在 3.8 ~ 4.6 时, 氟马西尼注射液在生产和贮藏过程中稳定性好, 与参比制剂的稳定性一致, 说明《美国药典》制定的 pH 值范围上限更加合理。当 pH 等于 3.4, 杂质 A 增长速度显著加快, 不利于本品在货架期内贮藏。为严格控制产品质量, 提高产品的稳定性, 生产过程中应将氟马西尼注射液的 pH 值控制在 3.8 ~ 4.6。

### 参考文献

- [1] 代玲杰, 袁清霞. 氟马西尼在术后催醒中的研究进展[J]. 现代医院, 2019, 19(8): 1214-1217.
- [2] 李虎将, 李文玉. HPLC 法检查氟马西尼的有关物质[J]. 中国药事, 2010, 24(4): 394-396.
- [3] 杨宝林, 石雪松, 迟欲欣, 等. 浅谈镇静药氟马西尼的研究[J]. 中外健康文摘, 2013(22): 147-148.
- [4] 侯成, 卢光照, 李文清, 等. 氟马西尼的药理、药效和剂型应用进展[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(6): 485-489.
- [5] 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 913.
- [6] 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 176.
- [7] 海南通用康力制药有限公司. 一种氟马西尼注射液及其制备方法: CN201510416026.9[P]. 2015-10-07.

(收稿日期: 2023-12-03; 修回日期: 2023-12-26)

## 综述

## 蒽环类药物引发心脏毒性的研究进展

李薇, 徐晓红\* (广东医科大学附属第一医院超声科, 广东 湛江 524000)

**摘要:** 蒽环类药物具有抗瘤谱广、作用强、疗效高等优点, 是抗肿瘤治疗中最有效的化疗药物之一, 但其会产生心脏毒性、肝肾毒性、骨髓抑制、手足综合征等一系列不良反应。心脏毒性是其最严重的不良反应, 大大影响了肿瘤患者的生存率和生存质量, 使其临床应用受到一定限制。如何早期监测和减轻其心脏毒性已成为临床亟待解决的问题。本文旨在探讨蒽环类抗肿瘤药物引发心脏毒性的作用机制、早期监测及预防进展, 以供临床参考。

**关键词:** 蒽环类药物; 心脏毒性; 肿瘤学; 发病机制; 早期监测; 治疗

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0437-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.025

## Research advance in cardiotoxicity induced by anthracyclines

LI Wei, XU Xiao-hong\* (Department of Ultrasound Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524000)

**Abstract:** Anthracyclines are among the most effective chemotherapeutic drugs in anti-tumor therapy because of their broad anti-tumor spectrum, strong action and high efficacy. However, anthracyclines may also cause many adverse reactions, such as cardiotoxicity, hepatorenal toxicity, myelosuppression, and hand-foot syndrome. Among these, cardiotoxicity is the most serious adverse reaction, and greatly affects the survival rate and quality of life of cancer patients and restricts their clinical application. Therefore, how to monitor and mitigate their cardiotoxicity at an early stage has become an urgent clinical problem. This paper aims to discuss the mechanism of action, early monitoring and progress in the prevention of cardiotoxicity induced by anthracycline antitumor drugs.

**Key words:** anthracycline; cardiotoxicity; oncology; pathogenesis; early detection; therapy

蒽环类药物 (anthracyclines, ANT, 见图 1)<sup>[1]</sup> 是一类由链霉素菌属产生的具有广谱杀伤肿瘤能力的细胞毒性药物, 主要包括阿霉素 (DOX)、米托蒽醇、柔红霉素等, 是多种实体瘤及血液系统恶性肿瘤的化疗基础药物, 但其同时也会对心脏产生明显的毒性作用, 主要表现为心肌细胞损伤及其相关的心脏功能障碍。现从 ANT 致心肌毒性的发病机制、监测及防治研究进展进行综述。

## 1 ANT 心脏毒性的发病机制

### 1.1 氧化应激途径

氧化应激被学界公认为是 ANT 引发心脏毒性最主要的机制, 它是由于活性氧 (ROS) 和活性氮

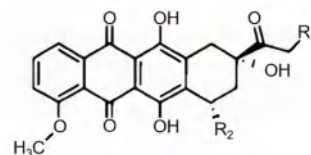


图 1 蒽环类药物结构式

Fig 1 Structure of anthracyclines

(RNS) 的生成与自身抗氧化作用的失衡造成的。阿霉素是 ANT 中被研究得最充分的心脏毒性化疗药物。ANT 聚集于心肌细胞的线粒体中, 超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ )、羟自由基 ( $OH^{\cdot}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 和过氧亚硝酸盐 ( $ONOO^-$ ) 等通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 脱氢酶和其他还

作者简介: 李薇, 女, 在读硕士研究生, 主要从事心脏超声工作, email: veralw123@163.com \*通信作者: 徐晓红, 女, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事乳腺、甲状腺、妇产、腹部、介入、心血管、胃肠造影等超声诊断工作, email: 13828297586@139.com



原酶氧化反应生成，这种非酶路径构建了一个自我维持的氧化还原循环，最终使超氧阴离子不断累积，诱导线粒体、脂质微粒体过氧化，造成细胞膜损伤，从而使心肌细胞启动程序性死亡<sup>[2-3]</sup>。此外，心肌与其他组织相比耗氧量更多，线粒体含量更丰富，同时其抗氧化酶如过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）及谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）等含量相对不足，ANT 进入心肌，可减少心肌细胞中的抗氧化酶，ROS 或 RNS 不能被及时清除而导致过量积聚，阻碍心脏内能量代谢，加剧了对心肌细胞的损伤<sup>[4-5]</sup>（见图 2）。

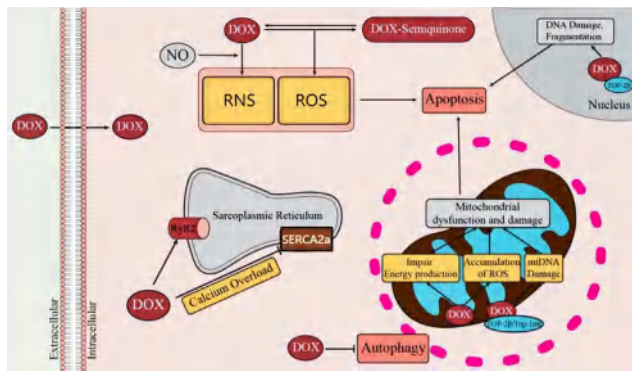


图 2 DOX 诱导心脏毒性的机制  
Fig 2 Mechanism of cardiotoxicity induced by DOX

与此同时，ANT 还可以利用铁调节蛋白和转铁蛋白受体，影响细胞内铁离子的聚集，增加心肌细胞内的游离铁，并与之形成复合体。所形成的复合物与心脏磷脂的结合可催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化为 OH<sup>-</sup>，生成 ROS，引起心肌细胞生物膜过氧化，诱导心肌细胞凋亡和自噬、线粒体损伤、钙超载等一系列病理改变<sup>[6]</sup>（见图 3）。

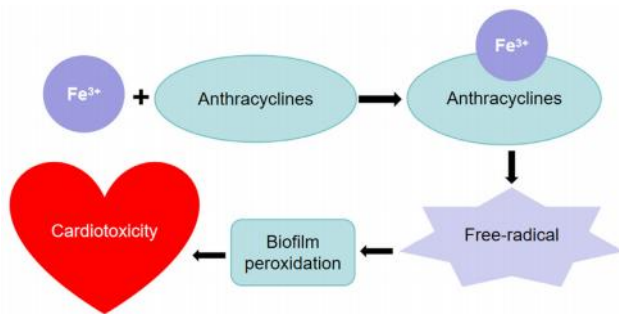


图 3 铁离子代谢紊乱  
Fig 3 Iron metabolism disorder

### 1.2 拓扑异构酶 II（Top II）

Top II 是 ANT 抗肿瘤作用的主要分子靶标。ANT 消灭肿瘤细胞的主要机制为通过将 Top II 和肿瘤细胞 DNA 结合起来形成 Top II -Dox-DNA 复合物，促使细胞 DNA 断裂及细胞死亡<sup>[7]</sup>（见图 2）。Top II 分为 Top II $\alpha$  和 Top II $\beta$  两种亚型，前

者高表达于肿瘤组织，后者高表达于心肌细胞中。ANT 与肿瘤细胞的 Top II $\alpha$  结合，被认为是抗肿瘤活性的分子基础。与 Top II $\beta$  结合，既能激活细胞凋亡信号通路，影响心肌细胞氧化磷酸化和线粒体生物合成反应，也能使 DNA 双链裂解，引发心肌细胞死亡。

### 1.3 钙超载

阿霉素可以通过抑制 SERCA2a 和短暂地增强 RyR2 的活性来促进 Ca<sup>2+</sup> 过载（见图 2）。ANT 可以增加 Ca<sup>2+</sup> 内流，诱导钙离子依赖性蛋白激酶激活，刺激心肌细胞膜上 Ca<sup>2+</sup> 通道开放，同时抑制 Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> 交换，诱发细胞内钙超载，导致心肌细胞动作电位时程延长、心肌收缩力降低、心律失常、心室重塑等一系列病理改变<sup>[8]</sup>。

### 1.4 细胞凋亡

ANT 可诱发包括细胞程序性死亡、坏死和自噬等各种形式的细胞死亡<sup>[9]</sup>。ANT 引起心肌细胞损伤的主要机制是通过上调促凋亡转录因子 p53 的表达和激活磷脂酰肌醇 -3- 羟激酶（PI3K）/ 蛋白激酶 B（PKB）信号通路，诱发并加速心肌细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。

### 1.5 microRNA（miRNA）

研究显示 miRNA 是心血管的关键调节分子。与高血压性心脏病、心肌梗死等心脏疾病类似，ANT 诱导的慢性心脏毒性与 miRNA 的调控有关。ANT 可通过上调 miR-133a、miR-523-3p 和 miR-320a 的表达损害心肌细胞线粒体，引起心肌细胞程序性死亡，加重心血管病变<sup>[12]</sup>。miR-499 可引起心肌肥厚及心律失常，对心脏产生不可逆性损伤<sup>[13]</sup>。另有研究显示，miR-140 和 miR-146a 能进一步增强 ANT 诱导的心肌细胞凋亡，而 miR-30e、miR-208 和 miR-21 则能改善 ANT 诱导的心肌细胞凋亡<sup>[14-17]</sup>。以上研究表明，miRNA 不仅可作为临床上用于评估 ANT 相关心脏毒性风险的生物标志物，同时有望成为潜在的治疗靶点。

### 1.6 Toll 样受体（TLRs）

Toll 样受体是一种在非特异性免疫中起关键作用的蛋白质分子，在细胞受损时可激活天然免疫应答<sup>[18]</sup>。研究显示，Toll 样受体参与了 ANT 介导的细胞应激与损伤，通过高迁移率组蛋白 B1（HMGB1）及其受体 TLR2 的药理学抑制可预防 ANT 诱导的心肌细胞凋亡、心肌纤维化和心脏炎症反应<sup>[19]</sup>。

### 1.7 炎症和免疫血栓形成

临床观察和实验室证据支持癌症幸存者中炎

症、先天免疫和凝血系统之间的复杂相互作用。癌症会引起血栓前状态，化疗可促进血液凝固，这是血栓栓塞事件的前兆<sup>[20]</sup>。人们猜测血管炎和血栓性血管事件之间存在潜在联系，炎症和凝血之间的这种相互作用被称为“免疫血栓形成”<sup>[21]</sup>。有证据表明，炎症过程有助于阿霉素诱导的心脏毒性的发展。给药时，阿霉素可触发单核细胞和巨噬细胞释放炎性介质拮抗剂，如组胺、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和促炎性白细胞介素，这些细胞因子在心肌中具有功能性受体，可能导致扩张型心肌病的发展<sup>[22-23]</sup>。Jadapalli 等<sup>[24]</sup> 等研究发现，在小鼠中观察到阿霉素引起脾脏收缩、环氧合酶和凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1 的持续失调，这种失调伴随着心肌炎症的增加。以上结

果表明，ANT 诱导的心脏毒性涉及炎症通路的激活和随后的心肌炎症。

### 1.8 其他途径

研究发现某些信号通路，如酪氨酸激酶受体 2 (erb-B2) / 酪氨酸激酶受体 4 (erb-B4) 和神经调节蛋白生长因子 1 (NRG-1) 信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、心肌营养素-1 (CT-1) / 白血病抑制因子 (LIF) / 糖蛋白-130 (gp130) 通路等均与 ANT 相关心脏毒性有关<sup>[22, 25]</sup>，某些受体包括  $\beta$  肾上腺素受体 ( $\beta$ AR) 和心肌细胞表面膜死亡受体 (DR) 等也可能参与其中<sup>[26]</sup>。

## 2 ANT 心脏毒性的监测方法

ANT 心脏毒性常用的监测方法的优势及在临床应用中的限制性比较见表 1。

表 1 蒽环类药物心脏毒性的监测方法

Tab 1 Methods for monitoring cardiotoxicity caused by anthracyclines

项目	优势	限制性
生物标志物	敏感性和特异性均较高	/
物理检查方法		
心电图 (ECG)	最简单、最常用，是临床常规使用的筛查与监测心脏电生理变化的方法	反映的是特定时间特定状态下的心电情况，在特异度和准确度方面都存在较大的局限性
超声心动图	无创、简便、经济、准确率较高，是肿瘤患者治疗过程中评估心脏结构与功能的首选方法	在早期检测亚临床心肌损伤方面的灵敏度不高
心脏磁共振成像 (CMRI)	测量精度高、非侵入性、无辐射，在心脏容积等定量测定及心肌功能评估方面被视为影像学检查中的金标准	成本高、耗时长、噪声大、患者自身因素 (如安装心脏起搏器、患有幽闭恐惧症、婴幼儿患者常需深度镇静及全身麻醉等) 限制了其广泛使用
核素心肌显像	可以显示缺血区，明确缺血的部位和范围大小，发现心脏微循环功能异常及能量代谢异常	侵入性检查、空间分辨率相对较低、价格昂贵，对监测早期亚临床心肌损伤不敏感
心肌活检	诊断心肌损伤的金标准，预测 ANT 所致的心脏毒性具有高度的敏感性及特异性	侵入性检查、高风险、高设备要求、高操作水平
遗传易感性基因组学	/	现有的研究多集中于服用阿霉素和佐柔比星的患儿，对于成人及其他 ANT 是否具有普遍性还有待进一步研究

### 2.1 生物标志物

心肌肌钙蛋白 T/I (CTnT/I) 可监测抗肿瘤药物的细胞凋亡情况并识别心脏损伤，是敏感性和特异性均较高的生物标志物<sup>[27-28]</sup>。氨基末端 B 型钠尿肽前体 (NT-proBNP) 半衰期长且性质稳定，在体内水平随着心肌受损程度加重而升高，是一种较灵敏的监测心脏功能的指标<sup>[29]</sup>。氧化应激是 ANT 诱导的心脏毒性的重要机制，而髓过氧化物酶 (MPO) 是过氧化物酶家族的重要成员，或可成为心脏毒性的独立风险预测因子。另外，miRNA、精氨酸-NO 代谢产物、超敏 C 反应蛋白 (hsCRP)、白细胞介素-6 (IL-6)、糖原磷酸化酶 BB (GPBB)、神经调节蛋白生长因子 1 (NRG-1)、生长刺激表达基因 2 蛋白 (ST2)、半乳糖凝集素-3 (Gal-3)、循环游离 DNA (cfDNA)、心

脏阿霉素反应蛋白 (CARP) 等是近年被诸多实验证实具有预测 ANT 相关心脏毒性价值的潜在生物标志物<sup>[22, 30-32]</sup>。

### 2.2 物理检查方法

心电图 (ECG) 是临床常规使用的 ANT 心脏毒性筛查与监测方法。ANT 所致心脏毒性的常见心电图改变包括 ST-T 改变、QRS 波低电压、QT 间期延长、窦性心动过速、室性早搏和短暂性房颤。Sandamali 等<sup>[33]</sup> 研究发现，经过 6 个疗程 ANT 治疗的乳腺癌患者，其 QT 间期离散度显著增大，证实了 ANT 化疗后不可避免地出现心脏毒性变化。超声心动图被广泛应用于心血管疾病的诊断、治疗及预后评估，是肿瘤患者治疗过程中评估心脏结构与功能的首选方法 (见表 2)。心脏磁共振成像技术在心脏容积等定量测定及心肌功



能评估方面被视为影像学检查中的金标准，被美国心脏病学院（ACC）/美国心脏协会（AHA）视为评价化疗相关心脏毒性的理想手段。心脏磁共振成像可以精确评估心室容量、功能和血流动力学变化，可以早期发现心肌组织炎症、水肿及纤维化。相关研究发现心肌 T1 期图像尤其是细胞外体积分数（ECV）与心肌纤维化程度高度相关<sup>[41]</sup>，

证明了心脏磁共振成像作为监测亚临床心脏毒性手段的可行性。核素心肌显像在临床上主要用于冠心病及大血管病变的诊断（见表 3），但目前基于使用核素心肌显像监测化疗药物导致的早期心脏损害的国内外研究尚较少，且其属于侵袭性检查、空间分辨率相对较低，对监测早期亚临床心肌损伤不敏感，限制了其临床应用。

表 2 超声心动图在评价蒽环类药物相关心脏毒性中的应用

Tab 2 Echocardiography in the evaluation of cardiotoxicity induced by anthracyclines

超声技术	在心脏毒性监测方面的价值
左心室射血分数（LVEF）	为识别肿瘤治疗引起的心力衰竭的可靠指标，但在多种疾病的亚临床阶段仍维持在正常范围，无法敏感地检测早期心肌功能损伤 <sup>[34]</sup>
多普勒心肌显像技术（DMI）	利用其检测接受高剂量 ANT 治疗的肿瘤患者的心肌功能，验证了其在早期检测细微血流动力学变化上的优点 <sup>[35]</sup>
二维斑点追踪技术（2D-STE）	整体纵向应变（GLS）在诸多 2D-STE 参数中具有与心脏毒性最高的相关性，且能在 LVEF 下降前就检测到心肌损害，故可作为心脏毒性的早期监测指标 <sup>[36-37]</sup> ；ASE / EACVI 共识对亚临床左心室功能障碍定义为 GLS 相对基线降低 > 15% <sup>[38]</sup>
三维斑点追踪技术（3D-STE）	在检测 ANT 化疗致心肌损伤方面较 2D-STE 更敏感 <sup>[39]</sup>
左室压力-应变环技术（PSL）	近期研究发现其能比斑点追踪技术更早发现 ANT 化疗患者的左心室心肌做功改变 <sup>[40]</sup>

表 3 核素心肌显像在心血管病变监测中的应用

Tab 3 Nuclide myocardial imaging in the monitoring of cardiovascular diseases

核素心肌显像	在心血管病变监测中的应用
心肌灌注显像	单光子发射型计算机断层成像（SPECT）可反映心肌血流的相对分布情况，但对心脏的整体评估效果欠佳 正电子发射断层扫描 / 计算机断层扫描（PET/CT）可监测冠状动脉及心肌灌注状况，具有空间分辨率高、动态采集、图像质量佳等优点，被认为是评估心肌血流状况的最佳无创性检查方法
心肌代谢显像	18F FDG 心肌代谢显像可评估心肌早期能量代谢异常

### 2.3 心肌活检

心内膜心肌活检术是诊断心肌损伤的金标准，其预测 ANT 所致的心脏毒性具有高度的敏感性及特异性，能直接在显微镜下观察到肌纤维破坏和肌浆网空泡化。但因其属于侵入性检查，具有高风险、高设备要求、高操作水平等特点，目前多以动物实验为主，临床应用受到极大限制。

### 2.4 遗传易感性基因组学

目前临床上使用 ANT 治疗的患者，因服用 ANT 引起的心脏毒性反应存在显著的个体差异，其原因可能与基因变异相关。近年来，随着对蒽环类化合物的全基因组分析，通过遗传易感性预测心脏毒性成为可能。理论上，参与 ANT 在体内吸收、分布及消除等过程的遗传多态性均可影响其心脏毒性的发展。研究发现，CYBA、CYP3A5、RARG、NCF4、UGT1A6、CBR3、ABC、RAC2、SLC28A3 等基因的多态性均与 ANT 心脏毒性相关<sup>[42-44]</sup>。

## 3 ANT 心脏毒性的防治措施

### 3.1 基线评估与全程心功能监测

ANT 具有明确的心脏毒性，须在治疗前对患者心脏的基本情况系统的基线评估，并配合

全程的心功能监测。年龄 > 60 岁或存在结构性心脏病、存在心血管危险因素、应用高剂量 ANT、低剂量 ANT 联合低剂量放疗、低剂量 ANT 联合曲妥单抗序贯治疗等患者均为高风险人群<sup>[45]</sup>，更应加强对化疗过程中心脏损伤的监测。2012 年版《欧洲化疗放疗及靶向药物所致的心脏毒性临床实践指南》建议每次化疗前都要检测 CTnT/I，阳性者须口服血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）治疗一年，并在化疗结束后一年内每隔三个月复查一次、未来五年内每半年复查一次心脏彩超，阴性患者在化疗结束后每年复查一次心脏超声，一旦出现左心室功能障碍，需要使用 ACEI 和 β-受体阻滞剂治疗，并定期随访<sup>[46]</sup>。Cardinale 等<sup>[47]</sup>研究指出，在成年肿瘤患者中，心脏损害几乎只在 ANT 治疗结束后的第一年发生，针对这一高危期进行心功能监测，可明显提升患者的依从性和临床获益率。

### 3.2 限制累积剂量

ANT 的心脏毒性是一种慢性剂量累积限制性毒性，为了减少心脏相关毒副作用的发生率，在使用过程中应限制 ANT 的累积剂量。目前阿霉



素最大累积剂量推荐为  $450 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ，表柔比星则为  $900 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$  [48]。

### 3.3 改变给药方式和使用特殊制剂

ANT 所致心脏毒性不仅受药物的累积剂量影响，而且与其在体内的血药峰浓度密切相关。研究表明，采用持续静脉输注 ( $\geq 6 \text{ h}$ ) 代替静脉推注的给药方法可有效减少 ANT 致亚临床心肌损伤和心力衰竭的发生率 [49]。此外，ANT 脂质体等特殊制剂，可防止其在血液中的降解、失活，选择性地穿过血管，到达肿瘤部位，降低其在心血管内的含量，减轻心脏毒性。Zhang 等 [50] 研究显示，阿霉素脂质体较传统阿霉素的心功能障碍发生率明显下降。多项动物模型及临床前实验证实米托蒽醌、吡柔比星、依达比星及表柔比星脂质体的疗效与阿霉素相当，但心脏毒性更低。

### 3.4 联合心脏保护药物，减少具有潜在心脏毒性药物的同步使用

多项临床观察和实验室证据表明心脏保护药物对 ANT 诱导的心肌损伤效果显著 (见表 4)。多项研究表明部分中药和其有效成分对 ANT 引起的心脏损伤也有一定的保护作用，如川芎、黄芪、人参、白蛇舌草、红景天等中药的活性成分川芎嗪、黄芪甲苷、刺五加叶皂苷、西红花酸、白藜芦醇、水飞蓟宾、粉防己碱、金圣草黄素、刺芒柄花素等均可通过抑制氧化应激及细胞凋亡反应、改善心脏微循环、改善心室重塑等途径拮抗化疗药物诱导的心肌损伤 [15, 63-66]。

研究表明，顺铂、环磷酰胺、曲妥珠单抗等药物对心脏具有潜在毒性 [67-68]，与 ANT 联合使用会加重其心脏损害，应减少其与 ANT 的同步使用。

表 4 心脏保护药物

Tab 4 Cardioprotective drugs

心脏保护药物	代表药物	在拮抗 ANT 心脏毒性中的应用
铁离子螯合剂	右雷佐生	唯一获批用于治疗 ANT 所致心肌损伤的药物，杨孟达等 [51] 研究发现其与 ANT 的联合应用能显著降低乳腺癌患者心脏毒性的发生率
ACEI	卡托普利、贝那普利、依那普利	ACEI、血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 及 $\beta$ -受体阻滞剂在预防含 ANT 的心脏毒性方面的益处非常显著 [52]
ARB	氯沙坦、缬沙坦、厄贝沙坦、替米沙坦	有共识认为，一旦诊断出射血分数降低的心力衰竭，可以同时开始 ACEIs/ARBs 和 $\beta$ -受体阻滞剂作为一线治疗，以降低发病率和死亡率 [53]
$\beta$ -受体阻滞剂	卡维地洛、普萘洛尔、美托洛尔、比索洛尔	研究发现比索洛尔对阿霉素诱导的心肌损伤有所改善，但普萘洛尔在高剂量时可严重抑制心肌收缩功能而使心功能受损加重，美托洛尔对 ANT 所致心脏损害则几乎无效 [54]
他汀类药物	辛伐他汀	Chotenimitkhun 等 [55] 研究证实他汀类药物可以通过抑制 ANT 引起的氧化应激及细胞凋亡减少心肌损伤
脂肪酸氧化抑制剂	曲美他嗪	王忠涛等 [56] 研究显示，曲美他嗪联合小剂量卡维地洛能通过预防左室舒张功能下降发挥对心脏的保护作用
抗氧化剂	维生素 C、褪黑激素、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、 $\beta$ -胡萝卜素、维生素 E	Nayak 等 [57] 研究发现在接受 ANT 治疗时搭配使用抗氧化剂对减少细胞内自由基有所获益
其他药物	二甲双胍、钠葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂 (SGLT2is)、磷酸二酯酶 -5、烟酰胺核糖、伊伐布雷定和雷诺嗪	心脏保护作用也被相关研究报道 [58-62]

### 3.5 对症治疗

① 疼痛患者可使用镇痛剂；② 心力衰竭患者可使用  $\beta$ -受体阻滞剂、ACEI (如依那普利、卡托普利) 及洋地黄类药物；③ 心律失常患者可使用抗组胺类药物。

### 3.6 生活方式措施

心血管疾病的诱发不仅会促进癌症的恶化，两者还存在相同的风险因素，如吸烟、肥胖、缺乏锻炼、饮酒等。有氧运动能够增加肿瘤患者的最大摄氧量，抑制心室重塑，改善心脏结构及功能，来自临床前研究的证据支持使用运动训练来

预防或减轻 ANT 对心血管系统的破坏作用 [69]。Kirkham 等 [70] 的研究证实，在化疗期间适度地限制热量摄入可以有效降低 ANT 诱导的心脏损害。

## 4 小结与展望

ANT 是临床上最常用的化疗药物之一，具有诱导细胞凋亡、抗肿瘤和抑制免疫反应等作用。然而，ANT 相关心脏毒性可导致心功能异常、心律失常、心力衰竭甚至心源性猝死。因此，如何有效地处理心血管系统与肿瘤的交互作用，以及在治疗过程中将心脏毒性控制在最小范围内，对肿瘤心脏病学领域的发展至关重要。氧化应激途

径是 ANT 引起心脏损害的最具代表性的机制之一, 在目前的临床实践中, 化疗相关性心肌损伤的诊断仍然主要依赖于超声心动图和实验室指标, 而铁离子螯合物、ACEI/ARB、 $\beta$ -受体阻滞剂、他汀类药物和一些抗氧化剂的使用可能对其起到缓解作用。目前对于 ANT 所致心脏毒性的认识, 已由早期的临床病理观察发展到了分子水平的研究, 但确切发病机制的研究尚不十分明确, 对其心脏毒性监测和治疗方式的研究仍不全面, 心血管肿瘤学的许多领域尚未探索。组学研究可能会产生新的治疗靶点, 为个性化抗肿瘤治疗提供有用的数据。由生物标志物和影像学等组成的多模式方法对于 ANT 引起的心脏毒性的早期诊断和风险分层是至关重要的, 可以为未来预防策略的开发制订提供有价值的信息。现有萘环类化合物的重组、心脏保护药物及其衍生物的合成、干细胞疗法、植物提取物、肠道菌群疗法和各种非药物疗法或是未来改善化疗相关心脏损伤的研究方向。亟待开展更多系统的探索与临床研究, 尽可能针对其发病机制制订有效的防治措施, 并验证有关 ANT 心脏毒性监测和防治策略的效能和可靠性, 改善肿瘤患者的预后。

### 参考文献

- [1] 凌亚豪, 郑敏, 靳洪涛. 萘环类抗生素致心脏毒性的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2019, 40(1): 20-24.
- [2] Pantazi D, Tselepis AD. Cardiovascular toxic effects of antitumor agents: pathogenetic mechanisms[J]. *Thromb Res*, 2022, 213(Suppl 1): S95-S102.
- [3] Bhagat A, Kleinerman ES. Anthracycline-induced cardiotoxicity: causes, mechanisms, and prevention[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1257: 181-192.
- [4] Simbre VC, Duffy SA, Dadlani GH, et al. Cardiotoxicity of cancer chemotherapy[J]. *Pediatr Drugs*, 2005, 7(3): 187-202.
- [5] Kluck GEG, Durham KK, Yoo JA, et al. High density lipoprotein and its precursor protein apolipoprotein a1 as potential therapeutics to prevent anthracycline associated cardiotoxicity[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 65.
- [6] Zhang GX, Yuan C, Su X, et al. Relevance of ferroptosis to cardiotoxicity caused by anthracyclines: mechanisms to target treatments[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 896792.
- [7] Seara FAC, Kasai-Brunswick TH, Nascimento JHM, et al. Anthracycline induced cardiotoxicity and cell senescence new therapeutic option? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11): 568.
- [8] Tscheschner H, Meinhardt E, Schlegel P, et al. CaMK II activation participates in doxorubicin cardiotoxicity and is attenuated by moderate GRP78 overexpression[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215992.
- [9] Schwach V, Slaats R, Passier R. Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for assessment of anticancer drug-induced cardiotoxicity[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 50.
- [10] Tarangelo A, Magtanong L, Bieging-Rolett TK, et al. p53 suppresses metabolic stress-induced ferroptosis in cancer cells[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 569-575.
- [11] Saleme B, Gurtu V, Zhang Y, et al. Tissue-specific regulation of p53 by PKM2 is redox dependent and provides a therapeutic target for anthracycline-induced cardiotoxicity[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(478): eaau8866.
- [12] Alves MT, Da Conceição IMCA, de Oliveira AN, et al. microRNA miR-133a as a biomarker for doxorubicin-induced cardiotoxicity in women with breast cancer: a signaling pathway investigation[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(7): 655-662.
- [13] Wan QG, Xu T, Ding W, et al. miR499-5p attenuates mitochondrial fission and cell apoptosis via p21 in doxorubicin cardiotoxicity[J]. *Front Genet*, 2019, 9: 734.
- [14] Liu YZ, Duan CF, Liu W, et al. Upregulation of let-7f-2-3p by long noncoding RNA NEAT1 inhibits XPO1-mediated HAX-1 nuclear export in both in vitro and in vivo rodent models of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(11): 3261-3276.
- [15] Zhang XN, Lv SC, Zhang WQ, et al. Shenmai injection improves doxorubicin cardiotoxicity via miR-30a/Beclin 1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111582.
- [16] Srikanthan K, Klug R, Tirona M, et al. Creating a biomarker panel for early detection of chemotherapy related cardiac dysfunction in breast cancer patients[J]. *J Clin Exp Cardiol*, 2017, 8(3): 507.
- [17] Gryshkova V, Fleming A, Mcghan P, et al. miR-21-5p as a potential biomarker of inflammatory infiltration in the heart upon acute drug-induced cardiac injury in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 286(1): 31-38.
- [18] Shao L, Cai XY, Zhu HM, et al. TLR2 and TLR3 expression as a biomarker for the risk of doxorubicin-induced heart failure[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 295: 205-211.
- [19] Yao YW, Xu XM, Zhang GH, et al. Role of HMGB1 in doxorubicin-induced myocardial apoptosis and its regulation pathway[J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 267.
- [20] Razak NBA, Jones G, Bhandari M, et al. Cancer-associated thrombosis: an overview of mechanisms, risk factors, and treatment[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(10): 380.
- [21] Budnik I, Brill A. Immune factors in deep vein thrombosis initiation[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(8): 610-623.
- [22] Serena B, Sandra G, Zoltán V, et al. Antineoplastic drugs inducing cardiac and vascular toxicity-an update[J]. *Vasc Pharmacol*, 2023, 153: 107223.
- [23] Tan X, Zhang RY, Lan MD, et al. Integration of transcriptomics, metabolomics, and lipidomics reveals the mechanisms of doxorubicin-induced inflammatory responses and myocardial dysfunction in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114733.
- [24] Jadapalli JK, Wright GW, Kain V, et al. Doxorubicin trig-

- gers splenic contraction and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters the inflammation-resolution program in the myocardium [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315 (5): H1091-H1100.
- [25] Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, Pourgholami MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175586.
- [26] Timm KN, Tyler DJ. The role of AMPK activation for cardioprotection in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34 (2): 255-269.
- [27] Canale ML, Casolo G, Donati S, et al. Baseline troponin level and cardiac toxicity in HER2-positive early breast cancer patients receiving trastuzumab [J]. *In Vivo*, 2023, 37 (5): 2139-2146.
- [28] Simões R, Silva LM, Cruz ALVM, et al. Troponin as a cardiotoxicity marker in breast cancer patients receiving an anthracycline-based chemotherapy: a narrative review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 989-996.
- [29] Allam H, Kamal M, Bendary M, et al. The diagnostic value of global longitudinal strain combined with cardiac biomarkers on early detection of anthracycline-related cardiac dysfunction [J]. *J Echocardiogr*, 2023, doi: 10.1007/s12574-023-00618-8.
- [30] Yu AF, Moore ZR, Moskowitz CS, et al. Association of circulating cardiomyocyte cell-free dna with cancer therapy-related cardiac dysfunction in patients undergoing treatment for ERBB2-positive breast cancer [J]. *JAMA Cardiol*, 2023, 8 (7): 697-702.
- [31] Li YY, Tian C, Huang S, et al. Potential biomarker of acute anthracycline-induced cardiotoxicity among children with acute lymphoblastic leukemia: cardiac adriamycin-responsive protein [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2023, doi: 10.1097/FJC.0000000000001479.
- [32] Nebigil CG, Désaubry L. Updates in anthracycline-mediated cardiotoxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01262.
- [33] Sandamali JAN, Hewawasam RP, Fernando MACSS, et al. Electrocardiographic and biochemical analysis of anthracycline induced cardiotoxicity in breast cancer patients from Southern Sri Lanka [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23 (1): 210.
- [34] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18 (8): 891-975.
- [35] Yagci-Küpelı B, Varan A, Yorgun H, et al. Tissue Doppler and myocardial deformation imaging to detect myocardial dysfunction in pediatric cancer patients treated with high doses of anthracyclines [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2012, 8 (4): 368-374.
- [36] Li L, Jiang XY, Xie QQ. Prognostic value of left ventricular global longitudinal strain on speckle echocardiography for predicting chemotherapy-induced cardiotoxicity in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Echocardiography*, 2023, 40 (4): 306-317.
- [37] Arciniegas Calle MC, Sandhu NP, Xia H, et al. Two-dimensional speckle tracking echocardiography predicts early subclinical cardiotoxicity associated with anthracycline-trastuzumab chemotherapy in patients with breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 1037.
- [38] Doherty JU, Kort S, Mehran R, et al. ACC/AATS/AHA/ASE/ASNC/HRS/SCAI/SCCT/SCMR/STS 2019 Appropriate Use Criteria for Multimodality Imaging in the Assessment of Cardiac Structure and Function in Nonvalvular Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology Appropriate Use Criteria Task Force, American Association for Thoracic Surgery, American Heart Association, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and the Society of Thoracic Surgeons [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73 (4): 488-516.
- [39] Song FY, Shi J, Guo Y, et al. Assessment of biventricular systolic strain derived from the two-dimensional and three-dimensional speckle tracking echocardiography in lymphoma patients after anthracycline therapy [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2017, 33 (6): 857-868.
- [40] 吴秋玲, 李华, 唐莎, 等. 压力-应变环评估蒽环类药物对乳腺癌患者左心室心肌做功的影响 [J]. *中国心血管病研究*, 2021, 19 (4): 319-323.
- [41] Hong YJ, Park HS, Han K, et al. Author Correction: early detection and serial monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity using T1-mapping cardiac magnetic resonance imaging: an animal study [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 9544.
- [42] Gvaldin DY, Timoshkina NN, Vashchenko LN, et al. Polymorphism rs4673 and plasma paraoxonase 1 level for prediction and early diagnosis of anthracycline-mediated cardiotoxicity in patients with breast cancer [J]. *Klin Lab Diagn*, 2022, 67 (2): 123-128.
- [43] Gvaldin DY, Timoshkina NN, Vashchenko LN, et al. SNP-SNP interactions and a 4-locus model for prediction the risk of anthracycline-mediated cardiotoxicity in patients with breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40 (16\_suppl): 12076-12076.
- [44] Yang XY, Li GP, Guan MK, et al. Potential gene association studies of chemotherapy-induced cardiotoxicity: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 651269.
- [45] Ruddy KJ, Sangaralingham LR, Van Houten H, et al. Utilization of cardiac surveillance tests in survivors of breast cancer and lymphoma after anthracycline-based chemotherapy [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2020, 13 (3): e005984.
- [46] Curigliano G, Cardinale D, Suter T, et al. Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23 (Suppl7): 155-166.



- [47] Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy [J]. *Circulation*, 2015, 131 ( 22 ) : 1981-1988.
- [48] Cai F, Luis MAF, Lin X, et al. Anmracline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: preventive strategies and treatment [J]. *Mol Clin Oncol*, 2019, 11 ( 1 ) : 15-23.
- [49] Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, et al. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46 ( 3 ) : 204-215.
- [50] Zhang J, Jiang HC, Zhang J, et al. Effectiveness and safety of pegylated liposomal doxorubicin versus epirubicin as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast cancer: a real-world study [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 ( 1 ) : 1301.
- [51] 杨孟达, 张鹏程, 张迅, 等. 右丙亚胺对表柔比星方案化疗乳腺癌患者表柔比星心脏毒性的预防作用观察 [J]. *山东医药*, 2021, 62 ( 15 ) : 38-43.
- [52] Gao Y, Wang RT, Jiang JT, et al. ACEI/ARB and beta-blocker therapies for preventing cardiotoxicity of anti-neoplastic agents in breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Heart Fail Rev*, 2023, doi: 10.1007/s10741-023-10328-z.
- [53] McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: developed by the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology ( ESC ) With the special contribution of the Heart Failure Association ( HFA ) of the ESC [J]. *Eur J Heart Fail*, 2022, 24 ( 1 ) : 4-131.
- [54] 吴锦波, 叶小汉, 洗绍祥, 等. 比索洛尔联合培哚普利对阿霉素诱导的心力衰竭大鼠心肌内质网应激的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32 ( 11 ) : 1939-1944.
- [55] Chotenimitkhun R, D' Agostino R Jr, Lawrence JA, et al. Chronic statin administration may attenuate early anthracycline associated declines in left ventricular ejection function [J]. *Can J Cardiol*, 2015, 31 ( 3 ) : 302-307.
- [56] 王忠涛, 符大天, 吴忠. 小剂量卡维地洛联合曲美他嗪对接受含蒽环类药物化疗乳腺癌患者的心脏保护作用分析 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2020, 27 ( 3 ) : 43-45.
- [57] Nayak J, P SV, Sahoo SK, et al. Kumar R. Computational insight of antioxidant and doxorubicin combination for effective cancer therapy [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, doi: 10.1080/07391102.2023.2242507.
- [58] Wang L, Shi WB, Gao XW, et al. Cardioprotective role of metformin against sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *IUBMB Life*, 2019, 72 ( 4 ) : 749-757.
- [59] Abdel-Oadir H, Carrasco R, Austin PC, et al. The Association of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors with cardiovascular outcomes in anthracycline-treated patients with cancer [J]. *JACC CardioOncol*, 2023, 5 ( 3 ) : 318-328.
- [60] Arinno A, Manechote C, Khuanjing T, et al. Cardioprotective effects of melatonin and metformin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats are through preserving mitochondrial function and dynamics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 208: 115414.
- [61] Hameau R, Gabrielli L, Garrido M, et al. Cardiotoxicity of anticancer therapies. Towards the implementation of cardiology units [J]. *Rev Med Chil*, 2018, 146 ( 1 ) : 68-77.
- [62] 谢诗宁. 烟酰胺核糖对阿霉素所致多脏器损伤及铁死亡的保护作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- [63] 郭传龙, 房洪杰, 张秋池, 等. 一种具有预防 / 治疗化疗药物心脏毒性并增效抗肿瘤活性的药物组合 [P]. 山东省: CN115645392A, 2023-01-31.
- [64] 顾俊莲, 李嘉豪, 高婷, 等. 白藜芦醇联合成纤维细胞生长因子 1 在缓解蒽环类药物诱导的心脏及肝脏毒性中的应用 [P]. 山东省: CN115154589A, 2022-10-11.
- [65] 黄寅, 张尊建, 许凤国, 等. 刺芒柄花素或其组合物在制备用于减轻蒽环类化疗药物心脏毒性的药物中的应用 [P]. 江苏省: CN115154457A, 2022-10-11.
- [66] Moini JA, Arabzade A, Haghi-Aminjan H, et al. The role of ginseng derivatives against chemotherapy-induced cardiotoxicity: a systematic review of non-clinical studies [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1022360.
- [67] Minerva, Bhat A, Verma S, et al. Cisplatin-based combination therapy for cancer [J]. *J Cancer Res Ther*, 2023, 19 ( 3 ) : 530-536.
- [68] Abulfadl YS, El Ela YA, Al Khaiyat AM, et al. Cyclophosphamide enfeebls myocardial isometric contraction force via RIP1/RIP3/MLKL/TRPM7-mediated necroptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114819.
- [69] Dozic S, Howden EJ, Bell JR, et al. Cellular mechanisms mediating exercise-induced protection against cardiotoxic anthracycline cancer therapy [J]. *Cells*, 2023, 12 ( 9 ) : 1312.
- [70] Kirkham AA, Ian Paterson D, Prado CM, et al. Correction to: rationale and design of the caloric restriction and exercise protection from anthracycline toxic effects ( CREATE ) study: a 3-arm parallel group phase II randomized controlled trial in early breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19 ( 1 ) : 75.

( 收稿日期: 2023-08-11; 修回日期: 2023-10-13 )

# 药用植物内生菌促药效成分生物合成的研究进展

曹际钊, 都晓伟, 李倩, 国立东\*, 于丹\* (黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 内生菌广泛存在于药用植物组织和细胞内, 主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌等, 对药用植物生长、促进药效物质的形成具有重要作用, 因此挖掘具有潜在应用价值的药用植物内生菌具有重要意义。本文归纳总结了常见药用植物内生菌的种类和内生菌促进药用植物药效物质生物合成的途径, 包括内生菌的直接合成、诱导子效应、生物转化作用, 并针对目前存在的问题加以展望, 旨在为药用植物内生菌的基础研究及应用提供参考。

**关键词:** 内生菌; 药用植物; 活性成分; 诱导子; 生物转化

中图分类号: R284.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0445-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.026

## Research progress in effects of endophytes from medicinal plants on promoting biosynthesis of medicinal components

CAO Ji-zhao, DU Xiao-wei, LI Qian, GUO Li-dong\*, YU Dan\* (College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

**Abstract:** Endophytes, mainly including endophytic fungi, bacteria and actinomycetes, widely coexist in the tissues and cells of medicinal plants. Endophytic fungi, bacteria and actinomycetes play important roles in the growth of medicinal plants and the biosynthesis of medicinal substances, so it is important to explore the potential application of endophytes from medicinal plants. This review summarized common endophytes from medicinal plants and the ways that endophytes promote the biosynthesis of medicinal components, including direct synthesis, elicitor effect and biotransformation. In addition, some problems in the biosynthesis of medicinal components by endophytes were also discussed to provide reference for the basic research and application of endophytes from medicinal plants.

**Key words:** endophyte; medicinal plant; bioactive component; elicitor; biotransformation

植物内生菌是指存活于植物内部, 又不会引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群, 主要为真菌、细菌和放线菌<sup>[1]</sup>。药用植物内生菌不仅能够促进寄主植物的生长, 增强寄主植物对各种病原菌和环境胁迫的抗性, 还能促进宿主植物化学成分的合成或产生与宿主相同或相似的化学成分<sup>[2]</sup>, 或者对化学成分进行结构修饰, 增强其药理活性<sup>[3]</sup>。1993年, Stierle等<sup>[4]</sup>首次从短叶紫杉的树皮中分离得到一株能够产生抗肿瘤活性物质紫杉醇的内生真菌安德氏紫杉霉 (*Taxomyces andreanae*), 这为生产紫杉醇提供了途径, 从而引发了药用植物内生菌的研究热潮。药用植物内

生菌现已成为获取活性成分的新宝库<sup>[5]</sup>。

本文归纳总结了现已报道的药用植物内生菌种类及其促进药用植物活性成分生物合成的途径, 包括直接合成生物活性物质、诱导子效应和生物转化作用, 为促进药用植物内生菌的应用和提升生药材质量提供参考。

### 1 药用植物内生菌种类

内生菌与宿主植物长期进化、共生, 形成了稳定的互利关系<sup>[6]</sup>。来源于内生细菌、内生真菌和内生放线菌的许多菌种均具有代谢产生与宿主相同或相似的活性成分, 或促进宿主植物活性成分生物合成, 或对宿主植物化学成分进行结构修

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81872967)。

作者简介: 曹际钊, 男, 硕士研究生, 主要从事天然药物质量评价与开发研究, email: caojizhaocjz@163.com \*通信作者: 于丹, 女, 博士, 副教授, 主要从事天然药物质量评价与开发研究, email: yd10011@163.com; 国立东, 男, 博士, 副教授, 主要从事益生菌及中药保健食品研究与开发, email: lidguo@126.com

饰的作用。

### 1.1 内生真菌

药用植物内生真菌多来源于双核菌门子囊菌亚门中的核菌纲、盘菌纲和腔菌纲<sup>[7]</sup>。根据内生真菌与宿主间的专一性分析,自然界至少有 100 多万种内生真菌<sup>[8]</sup>。研究人员总结了国内外药用植物内生真菌的种类,从 83 科 212 种药用植物的根、茎、叶、花、果实和叶柄中分离得到的内生真菌多达 376 属,涉及子囊菌、担子菌和无孢类群等。其中子囊菌为植物内生真菌的优势种群,有 372 属,例如镰刀菌属、链格孢属、青霉菌属、毛壳菌属、木霉属和拟茎点霉属等,以镰刀菌属真菌的数量最多,现已发现其寄生于 100 余种药用植物中<sup>[9]</sup>。从盾叶薯蓣中分离获得的一株内生尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),利用其灭活菌丝处理盾叶薯蓣的无菌苗可以提高薯蓣皂苷元的含量<sup>[10]</sup>。来自于链格孢属真菌的植物内生真菌也较为多见,从黄芪中分离获得的一株内生链格孢菌 *Alternaria eureka* 20131E1BL1 可以修饰环黄芪醇和黄芪醇的结构,生成具有端粒酶抑制作用的新化合物<sup>[11]</sup>。Kaur 等<sup>[12]</sup>研究发现牛角瓜内生真菌 *Allternaria destruens* 代谢生成的酚类化合物 AF1 和 AF2,既可以抗菌又可以抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性,这使其可能在糖尿病的治疗中获得应用。

### 1.2 内生细菌

药用植物内生细菌主要来源于芽孢杆菌目、肠杆菌目和假单胞菌目,在这些目中,又以来源于芽孢杆菌属、泛菌属和假单胞菌属的细菌最为常见<sup>[13]</sup>。现已发现药用植物内生细菌可以促进枯草菌脂肽钠、伊枯草菌素、丰原素等的生物合成<sup>[14]</sup>。周佳宇<sup>[15]</sup>研究显示,内生细菌荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) 侵染茅苍术后,茅苍术体内含氧倍半萜含量增加,挥发性成分苍术醇、 $\beta$ -桉叶醇和苍术酮的积累也显著提升。不动杆菌(*Acinetobacter*) 是分离自苍术的另一种内生细菌,其可以通过诱导植物内源激素分子的合成,促进苍术挥发油的积累,苍术醇、苍术酮和苍术素等主要挥发性化学成分的含量均有所提高<sup>[16]</sup>。Song 等<sup>[17]</sup>研究发现人参内生细菌芽孢杆菌属 LB5-3 诱导人参不定根 6 d 后,人参总皂苷的含量增加了 3 倍。

### 1.3 内生放线菌

在内生菌研究初期,有关内生放线菌的研究较少,直到 1999 年 Caruso 等<sup>[18]</sup>从欧洲红豆杉(*Taxus baccata* L.) 中分离得到多株能够自主产生紫杉烷类物质的内生放线菌菌株,尤其是北里

孢菌(*Kitasatospora*),可以完全依靠自身产生紫杉醇,这一发现使得内生放线菌备受关注。

迄今为止,已从药用植物中发现了 140 多个放线菌属,主要为链霉菌属(*Streptomyces*)、链轮丝菌属(*Streptoverticillum*)、游动放线菌属(*Antinoplanes*)、链孢子囊菌属(*Streptosporangium*)、诺氏卡菌属(*Nocardia*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*) 和小单胞菌属(*Micromonospora*) 等<sup>[19]</sup>。药用植物内生放线菌能产生包括多肽、有机酸、生物碱、醌、萜类等在内的多种次级代谢产物<sup>[20-21]</sup>。

内生放线菌还可以促进宿主植物生成活性成分。Li 等<sup>[22]</sup>发现一株黄花蒿内生放线菌假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*) YIM 63111,其可以通过上调黄花蒿中编码紫穗槐二烯氧化酶(CYP71AV1)和细胞色素 P450 还原酶(CPR)基因的表达,从而提高黄花蒿中青蒿素的产量。Zhou 等<sup>[23]</sup>从益智中分离出一株放线菌链霉菌属 YIM66017,发现其可显著提高宿主中 2, 6-二甲氧基对苯二甲酸、cyclo(Gly-Trp)和具有较强抗氧化性的  $\alpha$ -羟基乙酰香草酮的含量。

代表性促进活性成分合成的药用植物内生真菌,内生细菌及内生放线菌见表 1。

## 2 药用植物内生菌促活性成分生物合成途径

药用植物内生菌促活性成分生物合成的途径主要包括:① 内生菌直接合成与宿主植物相同的活性成分;② 通过诱导子效应改变宿主植物的基因表达和代谢途径;③ 通过生物转化作用对植物化学成分进行结构修饰与改造或提高活性成分的含量。

### 2.1 内生菌直接合成活性成分或其前体物质

目前已有报道,内生菌能通过自身代谢生成紫杉醇<sup>[25]</sup>、喜树碱<sup>[32]</sup>等多种活性化合物,或者以合成的次生代谢产物作为前体物再通过宿主植物的合成酶系催化生成活性成分,进而影响宿主的次生代谢积累<sup>[68]</sup>。研究表明,可直接合成活性成分的药用植物内生菌基本都可以在仅提供菌体生存必要成分的培养基中产生活性成分,并且不必依赖于宿主植物的存在,但若想提高产量还需要增加碳源氮源以及与宿主植物中相同的一些前体物质等<sup>[32, 69]</sup>。

**2.1.1 内生真菌直接合成活性成分** 可直接合成药用植物活性成分的内生真菌常见于镰刀菌属、链格孢属、曲霉属等。Kumar 等<sup>[25]</sup>从红豆杉中分离到可产生紫杉醇的内生烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),其液体培养基中的紫杉醇含量可达  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,是目前能够代谢生成紫杉醇的微生物中最高的。从喜树中分离筛选得到的一株内生链格



表 1 代表性促进活性成分合成的药用植物内生菌

Tab 1 Representative endophytes from medicinal plants in promoting the biosynthesis of active substances

种类	属名	宿主植物	促进合成的活性成分	文献		
内生真菌	<i>Arthrinium</i>	卡萨蒙纳姜	$\beta$ - 环柠檬醛, 香紫苏醇, $\gamma$ - 姜黄烯	[24]		
	<i>Aspergillus</i>	红豆杉	紫杉醇	[25]		
		雷公藤	丁烯酸内酯	[26]		
		东北红豆杉	紫杉醇	[27]		
	<i>Claroideoglossum</i>	苍术	香料油, 茅苍术醇, $\beta$ - 桉醇, 苍术素	[28]		
		鳢肠	莨菪碱	[29]		
	<i>Colletotrichum</i>	千层塔	石杉碱甲	[30]		
	<i>Diaporthe</i>	金鸡纳树	奎宁, 奎尼丁, 辛可宁	[31]		
	<i>Funneliformis</i>	苍术	香料油, 茅苍术醇, $\beta$ - 桉醇, 苍术素	[28]		
	<i>Fomitopsis</i>	金鸡纳树	奎宁, 奎尼丁, 辛可宁	[31]		
	<i>Fusarium</i>	盾叶薯蓣	薯蓣皂苷元	[10]		
		柴龙树	喜树碱, 9- 甲氧基喜树碱	[32]		
		光果甘草	鸦胆双内酯	[33]		
		黄芩	8 ( Z ) -lucilactaene, 4 ( Z ) -lucilactaene	[34]		
		暗紫贝母	根皮苷, 芦丁, 没食子酸	[35]		
		<i>Glomus</i>	苍术	香料油, 茅苍术醇, $\beta$ - 桉醇, 苍术素	[28]	
		<i>Mucor</i>	丹参	丹酚酸, 迷迭香酸	[36]	
		<i>Mycena</i>	石斛	石斛碱	[37]	
		<i>Neosartorya</i>	桃金娘	香桃木酮及其衍生物	[38]	
		<i>Penicillium</i>	金鸡纳树	奎宁, 奎尼丁, 辛可宁	[31]	
	虎杖		紫檀芪	[39]		
	青蒿		青蒿素	[40]		
	<i>Phialocephala</i>		大花红景天	酪醇, 红景天苷	[41]	
	<i>Phoma sp.</i>		魁蒿	异色酮	[42]	
	<i>Phomopsis</i>		金鸡纳树	奎宁, 奎尼丁, 辛可宁	[31]	
	<i>Rhizophagus</i>		黄花蒿	青蒿素	[43]	
	<i>Schizophyllum</i>		金鸡纳树	奎宁, 奎尼丁, 辛可宁	[31]	
	内生细菌		<i>Acetobacter</i>	人参	稀有人参皂苷 CK	[44]
			<i>Acinetobacter</i>	罂粟	吗啡	[45]
			<i>Agrobacterium</i>	人参	稀有人参皂苷 Rg <sub>3</sub> 、人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	[17]
			<i>Bacillus</i>	人参	稀有人参皂苷 CK	[46]
		华重楼		重楼甾体皂苷	[47]	
<i>Combretum molle</i>		总黄酮		[48]		
川芎		川芎嗪		[49]		
油樟		$\alpha$ - 松油醇		[50]		
百里香		邻苯二甲酸二丁酯		[51]		
<i>Burkholderia</i>		人参		稀有人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	[52]	
		黄连	小檗碱	[53]		
<i>Kytococcus</i>		麻黄	喜树碱	[54]		
<i>Lactobacillus</i>		人参	稀有人参皂苷 CK	[55]		
<i>Microbacterium</i>		长春花	文朵灵	[56]		
内生放线菌		<i>Actinomyces</i>	红树	红霉素类抗菌药物	[57]	
	<i>Kitasatospora</i>	欧紫杉	紫杉醇	[18]		
	<i>Marmoricola</i>	罂粟	吗啡	[58]		
	<i>Pseudonocardia</i>	黄花蒿	青蒿素	[22]		
		益智	2, 6- 二甲氧基对苯二甲酸, cyclo ( Gly-Trp ), $\alpha$ - 羟基乙酰香草酮	[23]		
		蛇藤	munumbicins E-4 和 munumbicins E-5	[59]		
		积雪草	吡啶乙酸	[60]		
		肉苁蓉	对羟基乙醇, 苯乙胺衍生物, 环二肽, N- 乙酰色胺, 吡咯 -2- 羧酸	[61]		
		苏木	$\alpha$ - 葡萄糖苷酶抑制剂	[62]		
		凹唇姜	非瑟酮	[63]		
		<i>Boesenbergia rotunda</i>	biphenyls	[64]		
		美登木	美登素	[65]		
毛萼香茶菜		anthracyclin	[66]			
肉桂	bafilomycin D	[67]				

孢属 *Alternaria* sp. 菌株, 其发酵液中喜树碱含量可达  $227 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[70]</sup>。从柴龙树中分离得到的内生真菌 *Fusarium solani* MTCC9667 和 MTCC9668, 两者均能产生喜树碱, 并且还可以产生 9-甲氧基喜树碱和 10-羟喜树碱<sup>[32]</sup>。研究人员从千层塔中分离到一株可产生石杉碱甲的内生真菌胶孢炭疽菌, 基因组和转录组分析显示该菌株的聚酮合酶相关基因对石杉碱甲的积累有重要作用<sup>[30]</sup>。

某些内生真菌活性成分的生成必须依赖于宿主植物。例如, 从喜树树皮组织中分离出的一株腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*), 在体外培养条件下其产生喜树碱的能力随着传代次数增加而逐渐下降, 优化发酵条件和添加前体物质均不能恢复其合成喜树碱的能力, 但进一步研究发现这株内生真菌能够自行合成喜树碱的前体物质  $\beta$ -吡啶基乙胺, 然后借助宿主植物中的异胡豆苷合成酶合成喜树碱<sup>[68]</sup>。

**2.1.2 内生细菌直接合成活性成分** 目前, 有关内生细菌直接合成皂苷类化合物的研究相对较多, 如三萜皂苷、甾体皂苷等。例如, 分离自人参的一株内生嗜气芽孢杆菌 (*Bacillus aerophilus*) PD17-15, 其可通过自身代谢产生稀有人参皂苷 F<sub>2</sub><sup>[69]</sup>。同样分离自人参的一株内生细菌农杆菌属 (*Agrobacterium*) PDA-2, 其液体培养基中的稀有人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和 Rh<sub>2</sub> 含量分别达到  $62.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $18.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[71]</sup>。金护定<sup>[72]</sup> 从人参中分离得到 81 种人参内生菌, 从中筛选得到 3 株具有较强产皂苷能力的菌株, 分别为 2 株节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) LB-2 和 R2A-2, 以及 1 株毛根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) PDA-2, 其中菌株 LB-2 可以产生人参皂苷 F<sub>2</sub>、人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 和原人参二醇 PPD, 而菌株 R2A-2 除了可以产生上述三种人参皂苷外, 还可以产生人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 菌株 PDA-2 可以产生人参皂苷 F<sub>2</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>、人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 和原人参二醇 PPD。

重楼甾体皂苷具有显著的抗肿瘤活性, 赵明等<sup>[47]</sup> 从华重楼中分离到的内生细菌西地西菌属 (*Cedecea davisae*) SS01 和类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus daejeonensis*) SS02 均能产生重楼甾体皂苷类化学成分。甾体皂苷是囊麦冬的主要活性成分之一, 余海忠等<sup>[73]</sup> 从不同生长时期的囊麦冬块根和须根中分离获得 50 株内生细菌, 后经纯培技术筛选出 3 株具有明显产甾体皂苷能力的内生细菌, 分别为墨西哥假黄单胞菌 (*Pseudoxanthomonas mexicana*)、山羊葡萄球菌 (*Staphylococcus caprae*) 和砖红色微杆菌 (*Microbacterium testaceum*)。

**2.1.3 内生放线菌直接合成活性成分** 与内生真菌和内生细菌相似, 内生放线菌也具有产生与宿主植物相同活性成分的能力, 但研究报道相对较少。Caruso 等<sup>[18]</sup> 从欧洲红豆杉中分离得到多株能够自主产生紫杉烷类物质的内生放线菌菌株, 其中北里孢菌 (*Kitasatospora*) 自身就能够合成紫杉醇。分离自银桦的内生放线菌 *Streptomyces* sp. NRRL 30566 可代谢生成 kakadumycin, 其是一种多肽抗菌药物, 对革兰氏阳性菌具有很强的抗菌活性, 同时对 RNA 合成酶也表现出抑制活性<sup>[74]</sup>。

## 2.2 内生菌介导的诱导子效应

诱导子是能够诱导植物细胞出现一种或几种反应, 并激发植物特征性自身防御反应的分子。植物能够通过化学识别系统检测到诱导子, 触发自身产生信号转导, 进而引起反应应答, 导致某些次生代谢物的积累<sup>[75]</sup>。内生菌作为药用植物环境的重要组成部分, 可起到诱导子的作用, 与药用植物形成长期稳定、互惠互利的共生关系<sup>[15, 76]</sup>。内生菌诱导子几乎全部为内生真菌, 可以快速、特异地诱导药用植物中特定基因的表达, 从而激活一系列特定的次生代谢途径, 促使有效成分的积累。目前内生真菌诱导子的研究主要有菌体和代谢物两种形式, 其中菌体又包括活细胞和菌丝体提取物两个方面。

**2.2.1 内生菌菌体作为诱导子** 通常通过直接接种内生菌活细胞于宿主植物组培苗和无菌苗等组织培养基中, 以研究内生菌活细胞的诱导子效应对宿主植物的诱导作用。Yuan 等<sup>[76]</sup> 通过对苍术的生根试管苗接种内生真菌, 发现苍术的内生真菌 *Gilmaniella* sp. AL12 能够上调与初级代谢 (碳固定, 碳水化合物代谢和能量代谢) 相关的基因和蛋白质表达, 并且 AL12 还上调了参与萜烯骨架生物合成的编码  $\beta$ -farnesene synthase 和  $\beta$ -caryophyllene synthase 基因的表达, 这说明内生菌与植物缔合可以通过增加能量来源, 调控糖酵解、三羧酸循环和增强代谢通量来提高生物活性物质含量, 同时发现 AL12 还可以上调苍术中编码 L-苹果酸脱氢酶 (MDH) 和丙酮酸脱氢酶 (PDHE) 基因的表达, MDH 可以促进苹果酸与草酰乙酸之间的可逆转化提高草酰乙酸的含量, 然后经过柠檬酸丙酮酸循环将乙酰辅酶 A 从线粒体中转运到胞液中, 使得丙酮酸和乙酰辅酶 A 含量升高, 表明有更多的前体物质和能量可用于萜类化学成分的生物合成<sup>[77]</sup>。Li 等<sup>[37]</sup> 将石斛内生真菌 *Mycena* sp. MF23 接种到石斛组织培养苗中, 其可通过调节甲羟戊酸 (MVA) 途径相关基因的表达来

提高石斛中石斛碱的含量。周佳宇<sup>[15]</sup>研究显示荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 侵染茅苍术后诱导茅苍术体内活性氧 (ROS) 迸发, 同时将不含氧倍半萜氧化成含氧倍半萜。

将宿主植物愈伤组织等置于附有菌丝体提取物诱导子的培养基中培养已成为提高植物次生代谢物产率的有效策略之一。江曙等<sup>[78]</sup>从 4 个产地的明党参植株中共分离到 8 属 116 株内生真菌, 其中使用内生真菌 *Fusarium* sp. 菌丝提取物处理的明党参细胞生长量和多糖含量较非处理组分别提高了 31.86% 和 38.01%。Xu 等<sup>[36]</sup>从丹参中分离得到一株内生真菌易脆毛霉 (*Mucor fragilis*), 将丹参毛状根置于添加该菌丝体提取物的液体培养基中培养, 发现毛状根中编码乙酰辅酶 A 硫解酶 (AACT)、香叶基二磷酸合成酶 (GGPPS) 和苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的基因表达上调, 进而使得丹酚酸、迷迭香酸、硬脂酸和油酸等初级和次级代谢物增多。

目前, 利用悬浮细胞培养是快速获取药用植物有效成分的途径之一, 而内生菌菌丝体提取物可在此基础上进一步提高原有活性物质含量, 甚至诱导产生新的代谢产物。有研究发现, 在苍术悬浮细胞中只能检测到  $\beta$ -桉叶醇, 但是苍术内生小克银杆孢菌 (*Cunninghamella* sp.) AL4 的灭活菌丝体作为诱导子可以诱导苍术悬浮细胞产生挥发油, 主要包括苍术醇、苍术酮和苍术素, 同时  $\beta$ -桉叶醇的含量也显著提高, 是同期对照组的 2.22 倍<sup>[79-80]</sup>。

**2.2.2 内生菌代谢物作为诱导子** 药用植物内生菌代谢物能够诱导促进寄主植物中活性物质的生物合成。内生菌和宿主植物的关系可以被视为一种灵活的、动态的相互作用, 内生菌可根据寄主植物的生长变化适应性改变宿主植物的基因表达或代谢物生成, 反之亦然。周佳宇<sup>[15]</sup>研究发现荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 产生的胞外蛋白、胞外多糖及挥发性化合物苯甲醛对苍术挥发油成分的积累具有促进作用, 其中苯甲醛可促进苍术醇、 $\beta$ -桉叶醇和苍术酮的积累, 胞外多糖可促进  $\beta$ -桉叶醇和苍术酮的积累, 胞外蛋白能促进苍术醇的积累。夏伟等<sup>[81]</sup>使用地黄内生真菌草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 的灭菌发酵液对地黄组培苗进行诱导处理, 与对照组相比, 经发酵液诱导的地黄组培苗中梓醇和毛蕊花糖苷的含量分别提高了 36% 和 68.2%。

## 2.3 内生菌的生物转化作用

微生物繁殖速度快, 拥有大量的酶系。药用植

物内生菌可利用其产生的胞内或胞外酶对宿主中的化学物质进行生物转化, 提高生物活性物质的含量或者通过结构修饰及改造生成新的活性物质<sup>[82-83]</sup>。

**2.3.1 内生真菌的生物转化作用** 研究表明, 内生真菌可以对宿主植物的活性成分进行羟基化、去糖苷化等修饰。甘草次酸因其水溶性差且长期服用会引起类醛固酮增多症等问题, 大大限制了其临床应用, 对其进行结构修饰是解决该问题的有效途径。研究发现甘草次酸可被其内生短刺小克银汉霉 (*Cunninghamella blakesleeana* Lendner) 生物转化成 3-酮基- $7\beta$ , 15 $\alpha$ -二羟基-18 $\beta$ -甘草次酸、 $7\beta$ -羟基-18 $\beta$ -甘草次酸和 15 $\alpha$ -二羟基-18 $\beta$ -甘草次酸等 5 个已知产物和 1 个新化合物 (3-酮基-15 $\beta$ -二羟基-18 $\beta$ -甘草次酸)<sup>[84]</sup>。该转化过程表现出短刺小克银汉霉对甘草次酸的羟基化作用, 在减轻甘草次酸不良反应的同时还改善了甘草次酸的溶解性。武伦鹏等<sup>[46]</sup>研究发现内生真菌 *Fungal* sp. GH26 能够高效地将人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 转化为药理活性更强的稀有人参皂苷 CK, 转化率达 76.6%。

**2.3.2 内生细菌的生物转化作用** 内生细菌对药用植物活性成分进行生物转化多与其糖苷水解酶相关。比如, 陈贺等<sup>[44]</sup>通过巴氏醋酸杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) 发酵人参, 发现发酵物中人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rd 和 Rg<sub>1</sub> 的含量显著减少, 而稀有人参皂苷 CK 的含量显著升高, 推测该菌株可以将人参中的人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 等常量皂苷水解成稀有人参皂苷 CK。李粟琳等<sup>[55]</sup>应用保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 等菌种成功水解了三七、人参和西洋参中皂苷类成分的糖苷键, 将常量人参皂苷转化为稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 及 CK 等。Siddiqi 等<sup>[85]</sup>对人参皂苷乳杆菌 (*Lactobacillus ginsenosidimutans*) EMM1 3041T 菌株进行了全基因组测序, 共鉴定出 12 组糖苷键水解酶, 其中重组酶 (GST-BglL.gin-952) 显示出良好的将人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 转化成人参皂苷 Rg<sub>3</sub> (S) 的能力。

**2.3.3 内生放线菌的生物转化作用** 鬼臼毒素是从鬼臼类植物 (如桃儿七、山荷叶等) 中分离获得的具有抗肿瘤活性的化合物, 但其强烈的毒副作用限制了其临床应用。曹松等<sup>[86]</sup>从桃儿七根茎中分离筛选出一株可将鬼臼毒素转化为 4'-去甲基表鬼臼毒素的内生放线菌 *Streptomyces* sp., 推测该内生放线菌可能含有 O-去甲基化酶和异构化酶。相较于鬼臼毒素, 4'-去甲基表鬼臼毒素的毒性减弱、抗肿瘤活性增强, 且其抗肿瘤机制也



有所不同, 因此 4'-去甲基表鬼臼毒素更具有开发前景。

### 3 展望

药用植物内生菌为提升药材质量, 获取生物活性成分提供了新途径。首先, 可利用内生菌介导的诱导子效应调控植物生长来生产优质药材; 其次, 利用内生菌可代谢产生与宿主植物相同的活性成分特性直接生产药效物质, 提高活性成分的生产效率, 解决自然资源不足的现状; 第三, 也可利用药用植物内生菌的生物转化作用, 通过发酵药材来获取药效物质。内生菌也为筛选具有药用价值的活性物质或新型化合物提供了新的源泉。然而, 现有研究大部分集中在内生真菌上, 在内生细菌和内生放线菌方面仍有很大空白需要填补。同时, 内生菌可以产生与寄主药用植物相似或相同的活性成分, 有必要明确区分活性成分是由寄主植物产生, 还是由内生菌产生, 或者是两者联合产生, 这将为探索药效物质合成机制提供帮助。总之, 药用植物内生菌具有广阔的应用及开发前景, 药用植物作为内生菌活动的重要场所, 是宝贵的内生菌资源库, 其中蕴含的大量具有潜在应用价值的内生菌亟待挖掘。

### 参考文献

- [1] 陈招荣, 刘新悦, 赵欣迪, 等. 植物内生菌群落组成及其功能研究进展 [J]. 生命科学, 2023, 35 (2): 132-139.
- [2] 赵红玲, 杨晴, 王洪凤, 等. 植物类中药材内生菌活性成分资源开发与利用 [J]. 生物资源, 2023, 45 (3): 210-217.
- [3] 李学. 内生细菌转化人参皂苷的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [4] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. Science, 1993, 260 (5105): 214-216.
- [5] Choudhary N, Dhingra N, Amel G, et al. Towards further understanding the applications of endophytes: enriched source of bioactive compounds and bio factories for nanoparticles [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1193573.
- [6] Wang Y, Zhang Y, Cong H, et al. Cultivable endophyte resources in medicinal plants and effects on hosts [J]. Life, 2023, 13 (8): 1695.
- [7] Carroll G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont [J]. Ecology, 1988, 69 (1): 2-9.
- [8] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves [A]// Andrews JH. Microbial ecology of leaves [M]. Springer New York, 1991: 179-197.
- [9] 谭小明, 周雅琴, 陈娟, 等. 药用植物内生真菌多样性研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (18): 1563-1580.
- [10] 张瑞芬, 李培琴, 赵江林, 等. 盾叶薯蓣内生真菌及其对宿主培养物生长和皂苷元生产的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22 (1): 11-15.
- [11] Ekiz G, Yilmaz S, Yusufoglu H, et al. Microbial transformation of cycloastragenol and astragenol by endophytic fungi isolated from *Astragalus* species [J]. J Nat Prod, 2019, 82 (11): 2979-2985.
- [12] Kaur J, Sharma P, Kaur R, et al. Assessment of alpha glucosidase inhibitors produced from endophytic fungus *Alternaria destruens* as antimicrobial and antibiofilm agents [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47 (1): 423-432.
- [13] Wu W, Chen WH, Liu SY, et al. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 646146.
- [14] Castronovo LM, Vassallo A, Mengoni A, et al. Medicinal plants and their bacterial microbiota: a review on antimicrobial compounds production for plant and human health [J]. Pathogens, 2021, 10 (2): 106.
- [15] 周佳宇. 内生荧光假单胞菌增加茅苍术倍半萜积累和多样性的机制研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2016.
- [16] 王笑咪. 内生直立枝顶孢霉和内生不动杆菌与宿主茅苍术协同共生机理的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2014.
- [17] Song XL, Wu H, Yin ZH, et al. Endophytic bacteria isolated from *Panax ginseng* improves ginsenoside accumulation in adventitious ginseng root culture [J]. Molecules, 2017, 22 (6): 837.
- [18] Caruso M, Colombo AL, Fedeli L, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers [J]. Ann Microbiol, 2000, 50: 3-13.
- [19] 封明, 刘文杰, 苏誉, 等. 植物内生放线菌多样性及其活性代谢产物的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2021, 41 (4): 64-73.
- [20] 严佳成, 李艳如, 陈让让, 等. 植物内生放线菌研究进展 [J]. 生物资源, 2020, 42 (1): 9-21.
- [21] 郑立昊, 王兰梦, 郎多勇, 等. 植物内生放线菌的多样性及其应用价值研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (1): 166-169.
- [22] Li J, Zhao GZ, Varma A, et al. An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. PLoS One, 2012, 7 (12): e51410.
- [23] Zhou H, Yang YB, Peng TF, et al. Metabolites of *Streptomyces* sp., an endophytic actinomycete from *Alpinia oxyphylla* [J]. Nat Prod Res, 2014, 28 (4): 265-267.
- [24] Pansanit A, Pripdeevech P. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053 isolated from *Zingiber cassumunar* [J]. Mycology, 2018, 9 (4): 264-272.
- [25] Kumar P, Singh B, Thakur V, et al. Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. of the Northern Himalayan region [J]. Biotechnol Rep (Amst), 2019, 24: e00395.
- [26] Qi CX, Gao WX, Wang JP, et al. Terrusnolides AD, new butenolides with anti-inflammatory activities from an endophytic *Aspergillus* from *Tripterygium wilfordii* [J]. Fitoterapia, 2018, 130: 134-139.
- [27] 张丽娜. 红豆杉内生菌 *A.niger* 紫杉醇相关酶基因的确定 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2015.
- [28] 梁雪飞, 唐梦君, 吕立新, 等. 三种丛枝菌根真菌对茅苍术的生长、生理及主要挥发油成分的影响 [J]. 生态学杂志,

- 2018, 37 (6): 1871-1879.
- [29] Vo AT, Haddidi I, Daood H, et al. Impact of arbuscular mycorrhizal inoculation and growth substrate on biomass and content of polyphenols in *Eclipta prostrata* [J]. HortScience, 2019, 54 (11): 1976-1983.
- [30] 沈鹏原, 康信聪, 胡莉琴, 等. 组蛋白甲基化与去乙酰化对蛇足石杉内生真菌盘长孢状刺盘孢合成石杉碱甲的影响 [J]. 菌物学报, 2019, 38 (2): 242-253.
- [31] Maehara S, Simanjuntak P, Maetani Y, et al. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce *Cinchona* alkaloids [J]. J Nat Med, 2013, 67: 421-423.
- [32] Shweta S, Zuehlke S, Ramesha BT, et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin [J]. Phytochemistry, 2010, 71 (1): 117-122.
- [33] Shah A, Rather MA, Hassan QP, et al. Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from *Fusarium solani*: an endophyte of *Glycyrrhiza glabra* [J]. J Appl Microbiol, 2017, 122 (5): 1168-1176.
- [34] Maharjan S, Lee SB, Kim GJ, et al. Isolation of unstable isomers of lucilactaene and evaluation of anti-inflammatory activity of secondary metabolites produced by the endophytic fungus *Fusarium* sp. QF001 from the roots of *Scutellaria baicalensis* [J]. Molecules, 2020, 25 (4): 923.
- [35] Pan F, Su TJ, Cai SM, et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 42008.
- [36] Xu WJ, Jin XY, Yang M, et al. Primary and secondary metabolites produced in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by an endophytic fungal elicitor from *Mucor fragilis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 160: 404-412.
- [37] Li Q, Ding G, Li B, et al. Transcriptome analysis of genes involved in dendrobine biosynthesis in *Dendrobium nobile* Lindl. infected with mycorrhizal fungus MF23 (*Mycena* sp.) [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 316.
- [38] Nicoletti R, Salvatore MM, Ferranti P, et al. Structures and bioactive properties of myrto-commulones and related acylphloroglucinols from Myrtaceae [J]. Molecules, 2018, 23 (12): 3370.
- [39] Xu Z, Tian J, Gan L, et al. Discovery of the endophytic fungi from *Polygonum cuspidatum* and biotransformation of resveratrol to pterostillbene by the endophyte *Penicillium* sp. F5 [J]. Appl Biochem Microbiol, 2020, 56: 313-320.
- [40] Zheng LP, Tian H, Yuan YF, et al. The influence of endophytic *Penicillium oxalicum* B4 on growth and artemisinin biosynthesis of in vitro propagated plantlets of *Artemisia annua* L [J]. Plant Growth Regul, 2016, 80: 93-102.
- [41] 王梦亮, 焦晋, 邢婕, 等. 内生真菌 ZPRa-R-1 对红景天中关键信号分子及主要次生代谢物的影响 [J]. 植物研究, 2016, 36 (3): 416-420.
- [42] Kim JW, Choi HG, Song JH, et al. Bioactive secondary metabolites from an endophytic fungus *Phoma* sp. PF2 derived from *Artemisia princeps* Pamp [J]. Journal Antibiot (Tokyo), 2019, 72 (3): 174-177.
- [43] Domokos E, Jakab-Farkas L, Darkó B, et al. Increase in *Artemisia annua* plant biomass artemisinin content and guaiacol peroxidase activity using the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 478.
- [44] 陈贺, 宋晓琳, 崔勇虎, 等. 微生物固体发酵提高人参药材中稀有皂苷的研究 [J]. 食品科技, 2015, (12): 31-34.
- [45] Ray T, Pandey SS, Pandey A, et al. Endophytic consortium with diverse gene-regulating capabilities of benzyloquinoline alkaloids biosynthetic pathway can enhance endogenous morphine biosynthesis in *Papaver somniferum* [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 925.
- [46] 武伦鹏, 白龙律, 韩春峰, 等. 微生物转化人参主要皂苷 Rb<sub>1</sub> 为 CK 的研究 [J]. 人参研究, 2016, 28 (2): 7-11.
- [47] 赵明, 贺声蓉, 陈小静, 等. 产甾体皂苷华重楼内生菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学报, 2005, 45 (5): 776-779.
- [48] Diale MO, Ubomba-Jaswa E, Serepa-Dlamini MH. The antibacterial activity of bacterial endophytes isolated from *Combretum mole* [J]. Afr J Biotechnol, 2018, 17 (8): 255-262.
- [49] Yin DD, Wang YL, Yang M, et al. Analysis of *Chuanxiong* Rhizoma substrate on production of ligustrazine in endophytic *Bacillus subtilis* by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2019, 42 (19): 3067-3076.
- [50] 黄金凤, 王鑫, 梁玉娟, 等. 油樟内生细菌分离及  $\alpha$ -松油醇高产菌株的筛选与诱变 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (1): 75-81.
- [51] Abdelshafy MOA, Ma JB, Liu YH, et al. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum* [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 47.
- [52] Singh R, Dubey AK. Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1767.
- [53] Liu TH, Zhang XM, Tian SZ, et al. Bioinformatics analysis of endophytic bacteria related to berberine in the Chinese medicinal plant *Coptis teeta* Wall [J]. Biotech, 2020, 10: 1-12.
- [54] Ghiasvand M, Makhdomi A, Matin MM, et al. Exploring the bioactive compounds from endophytic bacteria of a medicinal plant: *Ephedra foliata* (Ephedrales: Ephedraceae) [J]. Adv Tradit Med, 2020, 20: 61-70.
- [55] 李粟琳, 张翔宇, 王洋. 可发酵三七等中药材的食用菌种筛选和皂苷生物转化产物的分析 [J]. 食品与发酵工业, 2017, 43 (12): 164-168.
- [56] Anjum N, Chandra R. Endophytic bacteria of *Catharanthus roseus* as an alternative source of vindoline and application of response surface methodology to enhance its production [J]. Arch Biol Sci, 2019, 71 (1): 27-38.
- [57] Jiang ZK, Tuo L, Huang DL, et al. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 868.
- [58] Ray T, Pandey SS, Pandey A, et al. Endophytic consortium

- with diverse gene-regulating capabilities of benzylisoquinoline alkaloids biosynthetic pathway can enhance endogenous morphine biosynthesis in *Papaver somniferum* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 925.
- [59] Castillo UF, Strobel GA, Mullenberg K, et al. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 255 (2): 296-300.
- [60] Dochhil H, Dkhar MS, Barman D. Seed germination enhancing activity of endophytic *Streptomyces* isolated from indigenous ethno-medicinal plant *Centella asiatica* [J]. *Int J Pharm Bio Sci*, 2013, 4 (1): 256-262.
- [61] Lin ZJ, Lu XM, Zhu TJ, et al. GPR12 Selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. associated with *Cistanches deserticola* [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 1108-1114.
- [62] Pujiyanto S, Lestari Y, Suwanto A, et al. Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic *actinomyces* isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants [J]. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4 (1): 327-333.
- [63] Taechowisan T, Chanaphat S, Ruensamran W, et al. Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf [J]. *J Appl Pharm Sci*, 2014, 4 (4): 8-13.
- [64] Taechowisan T, Chaisaeng S, Phutdhawong WS. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A [J]. *Food Agr Immunol*, 2017, 28 (6): 1330-1346.
- [65] Zhao PJ, Fan LM, Li GH, et al. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131 [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28: 1228-1232.
- [66] Li W, Yang XQ, Yang YB, et al. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403 [J]. *J Antibiot*, 2015, 68 (3): 216-219.
- [67] Vu HNT, Nguyen DT, Nguyen HQ, et al. Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* Prels in Yen Bai province of Vietnam [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75: 1247-1255.
- [68] Kusari S, Zühlke S, Spitteller M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74 (4): 764-775.
- [69] 崔勇虎. 产皂苷内生菌的筛选及其发酵条件优化 [D]. 吉林: 延边大学, 2016.
- [70] 盛贻林, 李云霞, 俞文榜, 等. 一株喜树内生菌的分离与发酵试验 [J]. *药物生物技术*, 2016, 23 (5): 390-392.
- [71] Yan HY, Jin HD, Fu Y, et al. Production of rare ginsenosides Rg<sub>3</sub> and Rh<sub>2</sub> by endophytic bacteria from *Panax ginseng* [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67 (31): 8493-8499.
- [72] 金护定. 人参内生菌生产稀有皂苷的研究 [D]. 吉林: 延边大学, 2017.
- [73] 余海忠, 程旭, 王海燕, 等. 不同生育期囊麦冬内生细菌的分布及产甾体皂苷菌株的初步筛选 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34 (6): 1027.
- [74] Castillo U, Harper JK, Strobel GA, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 224 (2): 183-190.
- [75] Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants [J]. *Plant Sci*, 2007, 172 (5): 861-875.
- [76] Yuan J, Zhang W, Sun K, et al. Comparative transcriptomics and proteomics of *Atractylodes lancea* in response to endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 reveals regulation in plant metabolism [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1208.
- [77] Chen F, Wei YX, Zhang JM, et al. Transcriptomics analysis investigates sesquiterpenoids accumulation pattern in different tissues of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. plantlet [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2017, 130: 73-90.
- [78] 江曙, 段金彪, 陶金华, 等. 明党参内生真菌种群的生态分布及其诱导子活性研究 [J]. *中草药*, 2010, 41 (1): 121-125.
- [79] 方芳, 戴传超, 王宇. 一氧化氮和过氧化氢在内生真菌小克银汉霉属 AL4 诱导子促进茅苍术细胞挥发油积累中的作用 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25 (10): 1490-1496.
- [80] 方芳, 戴传超, 张波, 等. 茅苍术悬浮细胞系建立及内生真菌诱导子对其挥发油积累的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40 (3): 452-455.
- [81] 夏伟, 熊玉萍, 朱昀昊, 等. 真菌诱导子对怀地黄组培苗生长及次生代谢产物合成的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (3): 25-29.
- [82] Qin D, Dong JY. Multi-level optimization and strategies in microbial biotransformation of nature products [J]. *Molecules*, 2023, 28 (6): 2619.
- [83] Khojasteh SC, Argikar UA, Cho S, et al. Biotransformation novel advances-2021 year in review [J]. *Drug Metab Rev*, 2022, 54 (3): 207-245.
- [84] 马媛, 谢丹, 王照华, 等. 短刺小克银汉霉对甘草次酸的微生物转化 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (21): 4212-4217.
- [85] Siddiqi MZ, Srinivasan S, Park HY, et al. Exploration and characterization of novel glycoside hydrolases from the whole genome of *Lactobacillus ginsenosidimutans* and enriched production of minor ginsenoside Rg<sub>3</sub> (S) by a recombinant enzymatic process [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (2): 288.
- [86] 曹松, 曾志刚. 内生放线菌对鬼臼毒素的微生物转化 [J]. *微生物学杂志*, 2012, 32 (1): 37-42.

(收稿日期: 2023-08-18; 修回日期: 2023-11-02)



# 青蒿素类化合物抗肿瘤作用机制研究进展

盛思晗<sup>2</sup>, 沈征武<sup>1, 2\*</sup> (1. 上海交通大学医学院, 上海 200025; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**摘要:** 青蒿素及其衍生物不仅具有抗疟活性, 还展现出了广泛的抗肿瘤活性。这类化合物通过多种途径实现抗肿瘤作用, 包括诱导活性氧生成、阻滞肿瘤细胞增殖周期、引发肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞的侵袭和转移、克服肿瘤耐药性以及调节肿瘤免疫。本文对青蒿素类衍生物的抗肿瘤作用机制方面的最新研究进展进行了综述。

**关键词:** 青蒿素; 抗肿瘤; 作用机制

中图分类号: R682

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0453-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.027

## Advances in the mechanism of antitumor activity of artemisinin and its derivatives

SHENG Si-han<sup>2</sup>, SHEN Zheng-wu<sup>1, 2\*</sup> (1. School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

**Abstract:** In addition to their well-known antimalarial activity, artemisinin and its derivatives exhibit broad-spectrum antitumor activity. Artemisinin derivatives exert their antitumor effects through various mechanisms, including the induction of reactive oxygen species, cell cycle arrest in tumor cells, induction of apoptosis, inhibition of tumor angiogenesis, suppression of tumor cell invasion and metastasis, reversal of tumor drug resistance, and modulation of tumor immunity. This article summarized the latest research progress in the mechanism underlying the antitumor activity of artemisinin derivatives.

**Key words:** artemisinin; antitumor; mechanism of action

青蒿素 (artemisinin, 见图 1) 是 20 世纪 70 年代从传统中药菊科植物黄花蒿中分离提取的一种含有过氧桥结构的倍半萜内酯化合物, 具有强大的抗疟活性<sup>[1]</sup>。近年来, 有大量研究报道了青蒿素及其衍生物在抗肿瘤方面的作用<sup>[2-4]</sup>。青蒿素类衍生物包括双氢青蒿素、蒿甲醚及青蒿琥酯 (见图 1)。目前临床上主要使用的是蒿甲醚和青

蒿琥酯。一项英国的随机双盲临床试验显示, 口服青蒿琥酯片可降低结直肠癌的复发率, 并且具有良好的耐受性<sup>[5]</sup>。对于垂体腺瘤患者, 口服蒿甲醚 12 个月后, CT 扫描显示其肿瘤密度降低, 相关症状和体征明显缓解<sup>[6]</sup>。研究表明青蒿素及其衍生物具有开发为新型抗肿瘤药物的潜力。

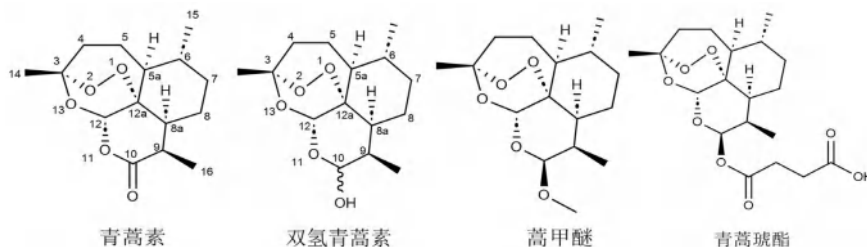


图 1 青蒿素及其常见衍生物的结构

Fig 1 Chemical structure of artemisinin and its common derivatives

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81673278)。

作者简介: 盛思晗, 女, 硕士研究生, 主要从事双氢青蒿素熊去氧胆酸缀合物抗肿瘤的机制研究, email: 15902776237@163.com

\*通信作者: 沈征武, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事青蒿素衍生物抗肿瘤的机制研究, email: jeff.shen@sjtu.edu.cn

然而,青蒿素及其衍生物的抗肿瘤机制尚未完全阐明,许多关键问题仍然存在争议。首先,青蒿素对肿瘤细胞特有的细胞毒性尚未被完全了解,这种特异性可能源于肿瘤细胞比正常细胞有更高的血红素合成能力<sup>[7]</sup>。其次,青蒿素类衍生物作用的靶标和具体作用机制尚不明确,青蒿素可以作用于多种关键的生物途径,导致肿瘤细胞死亡,其中较为关键的信号通路包括 P38-MAPK 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、Ras 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[8-9]</sup>。鉴于青蒿素类衍生物的多重靶向性,可以通过高通量的研究方法对其作用机制进行系统性探索。

## 1 青蒿素及其衍生物的抗肿瘤作用机制

### 1.1 青蒿素及其衍生物的激活

青蒿素过氧桥被激活后断裂,产生大量的自由基,参与蛋白质的烷基化<sup>[10]</sup>。过氧桥结构对抗疟和抗肿瘤作用至关重要。然而,激活过氧桥的确切机制仍存在争议,游离亚铁与血红素都被认为是过氧桥的激活剂。肿瘤细胞表达高浓度的细胞表面转铁蛋白受体,通过内吞作用促进血浆铁转运蛋白的摄取。青蒿素可通过与转铁蛋白共价标记被肿瘤细胞选择性地富集<sup>[11]</sup>。与正常细胞相比,肿瘤细胞具有更高的细胞铁含量,这为青蒿素的抗肿瘤特异性提供了一个合理的解释,即肿瘤细胞的富铁环境导致青蒿素的活化增强<sup>[2]</sup>。Zhang 等<sup>[12]</sup>发现添加亚铁血红素的合成前体可以增加青蒿素对细胞的毒性,加入亚铁血红素合成抑制剂(SA)则抑制青蒿素的细胞毒性。荧光探针检测结果显示,青蒿素治疗后的活性氧生成与血红素合成和细胞毒性成正相关。Stockwin 等<sup>[13]</sup>发现添加血红素加氧酶可以抑制青蒿素二聚体的抗肿瘤活性。

蛋白质组学(proteomics)是系统生物学的重要组成部分,能快速准确地解释药物分子作用机制。Wang 等<sup>[14]</sup>利用炔烃官能化的青蒿素探针 AP1 (见图 2)与荧光染料偶联,监测其与疟原虫蛋白的结合。只有在添加血红素后,AP1 探针才能与靶点蛋白结合,在血红素还原剂的存在下这种结合能力会进一步增强。Wang 等<sup>[15]</sup>在肿瘤细胞中也发现类似的激活机制,青蒿琥酯对结肠直肠癌(CRC)细胞的特异性细胞毒性是由于肿瘤细胞中血红素合成能力的提高。添加血红素合成前体 ALA ( $\alpha$ -氨基乙酰丙酸)可以显著增加 AP1 对结肠直肠癌细胞的毒性以及与癌蛋白的结合,进而抑制肿瘤生长。Zhou 等<sup>[16]</sup>使用青蒿素探针 ART-yne (见图 2)

对 HeLa 细胞蛋白质组进行了研究,在氯化血红素的存在下,青蒿素探针通过共价修饰多种蛋白质,约 80 种蛋白质被富集并鉴定为青蒿素烷基化靶标。Zhang 等<sup>[17]</sup>通过化学蛋白质组学方法研究了青蒿素在肿瘤细胞中的作用机制,基于游离血红素是青蒿素类化合物的激活剂,他们设计并合成了青蒿素衍生物 ART-TPP (见图 2),以点击化学发光法证明炔基化的青蒿素探针 ART-TPP-AIK (见图 2)中的 TPP 基团可以有效地将青蒿素导入线粒体。与青蒿素相比,ART-TPP 对肿瘤细胞具有更强的抑制作用。以上结果表明,血红素在青蒿素活化中起主要作用,而不是游离亚铁离子。这可能是青蒿素类衍生物抗肿瘤作用的分子机制之一。

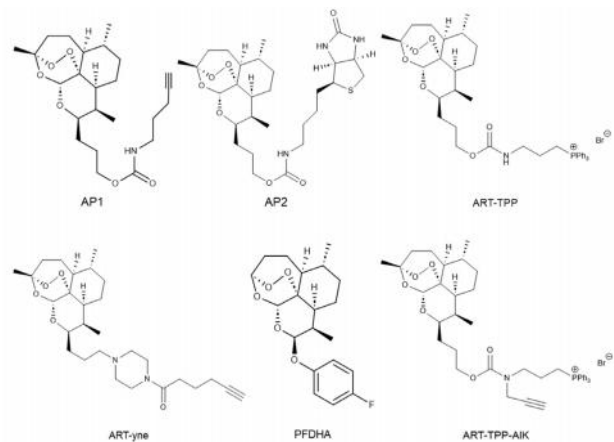


图 2 青蒿素探针

Fig 2 Artemisinin probes

青蒿素被激活后产生活性氧自由基(ROS),其包括羟基、超氧化物和过氧化氢<sup>[18]</sup>,ROS 可以诱导细胞膜、DNA、蛋白质和细胞器的损伤,在细胞自噬、凋亡和周期阻滞中起重要作用<sup>[19-20]</sup>。与正常细胞相比,肿瘤细胞抗氧化酶的表达水平比正常细胞低,因此对 ROS 损伤更为敏感。由此推测青蒿素的抗肿瘤作用可能依赖于 ROS 的产生<sup>[21]</sup>。Mercer 等<sup>[22]</sup>发现,用青蒿琥酯处理 HeLa 细胞 16 h 后,细胞中 ROS 水平增加,48 h 后细胞毒性作用才出现,该实验表明 ROS 损伤是青蒿琥酯对抗肿瘤作用的起点。Greenshields 等<sup>[23]</sup>发现青蒿琥酯处理的卵巢癌细胞表现出强烈的 ROS 诱导和细胞增殖周期阻滞。其中 ROS 依赖性细胞增殖周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,而非 ROS 依赖性细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期。不同的细胞周期阻滞取决于卵巢癌细胞暴露的青蒿琥酯浓度。Wang 等<sup>[24]</sup>发现,双氢青蒿素可以通过诱导 ROS 的产生,使 K562 细胞内线粒体功能紊乱并引发细胞自噬。然而 Lu 等<sup>[25]</sup>的研究表明双氢青蒿素诱

导 HL-60 细胞线粒体损伤和细胞凋亡是通过激活 p38 MAPK 信号通路,而与 ROS 无关,因为细胞内 ROS 的含量没有变化,并且双氢青蒿素在不同细胞内不一定都能产生 ROS,可能与细胞的不同生物学背景有关,青蒿素及其衍生物的活性氧机制仍在研究中。

### 1.2 诱导肿瘤细胞周期阻滞

细胞周期紊乱和失控性生长几乎是所有肿瘤的共同特征<sup>[26]</sup>。青蒿素及其衍生物能够调控细胞周期相关基因的表达,阻断细胞周期进程,从而发挥抗肿瘤作用。Mondal 等<sup>[27]</sup>研究发现,青蒿素可诱导宫颈癌细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期阻滞,并推测这可能是通过下调 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 CDK4 的表达,上调周期蛋白 p21Waf1/Cip1 的表达,从而影响细胞有丝分裂,抑制肿瘤细胞的增殖。双氢青蒿素在体内外显著抑制 HCT116、DLD1 和 RKO 细胞的增殖,全基因组 RNA-seq 分析发现双氢青蒿素诱导的差异表达基因主要富集在细胞周期途径中,包括 CDK1、CCNB1 和 PLK1。分子对接结果表明双氢青蒿素与 CDK1/CCNB1 复合物之间存在较强的结合<sup>[28]</sup>。青蒿琥酯可以通过下调 CDK2、CDK4、Cyclin D1、Cyclin B1 的表达,将胶质母细胞瘤细胞系 A172、U87、U251 的细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[29]</sup>。青蒿琥酯剂量依赖性地抑制 BRL-3A 和 AML12 小鼠肝细胞的增殖,使得其细胞增殖周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。Western blot 结果显示青蒿琥酯可诱导 CDK2、CDK4、Cyclin D1 和 Cyclin E1 显著下调<sup>[30]</sup>。上述研究显示,青蒿素类衍生物在不同的肿瘤细胞系中可以导致细胞周期阻滞发生在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 或 G<sub>2</sub>/M 期,具体取决于细胞系的差异。

### 1.3 诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的死亡过程,旨在维持内环境稳定。青蒿素类衍生物主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡,其敏感性与肿瘤细胞中抗凋亡基因和促凋亡基因的表达水平相关。大量研究已经报道,青蒿素类衍生物在多种肿瘤细胞中具有显著的凋亡诱导作用。Jamalzadeh 等<sup>[31]</sup>发现经青蒿琥酯处理的乳腺癌细胞中, caspase-8、caspase-9、caspase-3 的水平显著升高,表明青蒿琥酯通过内源性和外源性半胱氨酸蛋白酶依赖途径诱导细胞凋亡,从而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的生长。另外, Xiao 等<sup>[32]</sup>的研究发现,在 A-253 细胞中,青蒿素上调了 Bax、Bim、Bad、Bak 蛋白的表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL 的表达,并释放

了细胞色素 C 进入细胞质。此外,青蒿素还可以增加 ROS 的生成,进一步激活促凋亡蛋白 PARP1 和 caspase-3,从而引发细胞凋亡。双氢青蒿素对 Jurkat 淋巴瘤细胞具有明显的增殖抑制作用,细胞凋亡率与药物浓度成正相关。Western blot 分析结果显示,凋亡相关基因 p53、c-caspase3、Bax 和 cPARP 的蛋白表达显著增加, Bcl-2 蛋白表达则降低<sup>[33]</sup>。青蒿素衍生物诱导肿瘤细胞发生凋亡可能是其有效的作用机制之一。

### 1.4 诱导肿瘤细胞自噬

自噬是细胞为清除功能失调的细胞器或错误折叠的蛋白质而进行的进化保守过程<sup>[34]</sup>。自噬通过清除受损细胞和细胞器,发挥机体对肿瘤细胞的抑制作用,从而限制细胞增殖。在恶性肿瘤发生的早期阶段,自噬发挥抑制肿瘤的作用。Li 等<sup>[35]</sup>的研究发现,在上皮性卵巢癌中,青蒿素可通过诱导自噬来干预细胞周期相关的 NF- $\kappa$ B 信号通路,使肿瘤细胞周期停滞于 G<sub>2</sub>/M 期,从而抑制其生长。双氢青蒿素可促进人舌鳞肿瘤细胞发生自噬,经双氢青蒿素处理后的肿瘤细胞中,自噬体形成标志蛋白 (LC3-III) 和自噬起始因子 (Beclin-1) 的表达明显增加<sup>[36]</sup>。经青蒿琥酯处理的恶性淋巴瘤细胞中,可以观察到自噬小体出现,并且自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3-I/II 的表达也增加<sup>[37]</sup>。PI3K/AKT/mTOR 信号通路是自噬的经典负调控途径,双氢青蒿素通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,来促进 SMMC-7721 细胞自噬,并抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖<sup>[38]</sup>。青蒿素类衍生物能诱导多种肿瘤细胞发生自噬性细胞死亡,如脑胶质瘤细胞和结肠癌细胞等<sup>[39-40]</sup>。

### 1.5 抑制肿瘤血管生成

血管生成在肿瘤的生长和转移中起重要作用。青蒿素类衍生物能够通过调节不同癌细胞株的血管内皮生长因子 (VEGF) 来抑制血管生成。在血管生成调节因子中, VEGF 及其受体 (VEGFR2 和 VEGFR1) 都是生理和病理条件下最有效的血管生成刺激因子。Verma 等<sup>[41]</sup>通过动物模型实验证明,青蒿琥酯能下调  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号传导,降低 VEGF 及基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9) 等血管生成标志物的水平,抑制血管生成,发挥抗肿瘤作用。双氢青蒿素通过上调 ETS-1 转录因子抑制 VEGFR1 介导的促血管生成反应,诱导 VEGFR1 的表达<sup>[42]</sup>。因此,青蒿素类衍生物通过抑制血管生成相关基因的表达,进而抑制肿瘤细胞的促血管生成作用。因此,青蒿素类衍生物通



过抑制血管生成相关基因的表达, 进而抑制肿瘤细胞的促血管生成作用。

### 1.6 降低肿瘤细胞耐药性

肿瘤化疗受到药物毒性和肿瘤耐药性的限制, 其中多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 最为常见。MDR 表现为细胞内游离的细胞毒性药物浓度较低, 这通常与蛋白膜转运蛋白有关, 如 P-糖蛋白 (ABCB1/MDR1/P-gp)、多药耐药相关蛋白 (MRPs)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2) 和肺耐药蛋白等, 它们通过三磷酸腺苷 (ATP) 将药物排出细胞外, 从而降低药物功效<sup>[43]</sup>。青蒿素与传统的抗肿瘤药物作用机制不同, 不会出现交叉耐药, 并且可逆转肿瘤细胞的多重耐药。Zhang 等<sup>[44]</sup>研究发现, 双氢青蒿素可以抑制肿瘤细胞中 P-糖蛋白的表达, 增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性。青蒿素类衍生物还可以增加多药耐药的肿瘤细胞中吡柔比星和阿霉素的细胞毒性<sup>[45]</sup>。食管癌组织中 ABCG2 的异常高表达与食管癌的多药耐药有关。研究显示青蒿琥酯可以调节肿瘤细胞中 ABCG2 的表达, 逆转食管癌的耐药性<sup>[46]</sup>。青蒿素衍生物还可抑制转运蛋白的表达, 当与其他化疗药物联合使用时, 可增加细胞内药物的浓度, 从而在一定程度上缓解肿瘤细胞对化疗药物的耐药性。青蒿素类衍生物显示出降低肿瘤细胞耐药性的潜力, 可通过抑制耐药相关蛋白的表达, 增强化疗药物的疗效, 有可能为肿瘤治疗提供新的策略和途径。

### 1.7 免疫调节作用

肿瘤免疫治疗旨在激发或调动机体的免疫系统, 增强肿瘤微环境中免疫细胞对肿瘤的活性, 以控制和杀伤肿瘤细胞。然而, 近年来部分肿瘤免疫治疗的效果并不理想, 其中一部分原因是机体未能产生免疫应答或免疫抑制<sup>[47]</sup>。有研究表明, 青蒿素在不同的疾病模型可能具有双向调节免疫系统的作用<sup>[48]</sup>。青蒿素通过促进 T 细胞活化和抑制肿瘤中调节性 T 细胞 (Tregs) 及髓系抑制细胞 (MDSCs) 的免疫抑制来抑制 4T1 肿瘤细胞在体内的生长<sup>[49]</sup>。适当浓度的双氢青蒿素有助于 T 细胞的增殖, 增强 T 细胞介导的对胰腺癌细胞的杀伤活性, 其机制可能是通过增加细胞内穿孔素、颗粒酶 B 和 IFN- $\gamma$  的分泌来提高 T 细胞的抗肿瘤活性<sup>[50]</sup>。双氢青蒿素-熊去氧胆酸偶联物可以抑制多种肿瘤细胞的增殖, 并且在裸鼠的 A549 异种移植瘤和小鼠的 Lewis 肺癌模型中也显示出体内抗肿瘤活性<sup>[51]</sup>。进一步的研究表明该化

合物可以抑制 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路, 进而抑制 T 细胞的增殖与激活, 抑制 IFN- $\gamma$  的产生, 表现出强烈的免疫抑制活性, 因而具有治疗自身免疫性疾病的潜力<sup>[52]</sup>。由于 PI3K/Akt、NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路不仅与细胞免疫相关, 也与肿瘤的发生和发展密切相关。因此, 青蒿素类化合物有可能是与上述信号通路共同的调节因子结合, 而表现出肿瘤抑制和免疫抑制的双重活性。同样, 青蒿琥酯可抑制 NF- $\kappa$ B、PI3K/Akt、JAK/STAT 和 MAPK 通路, 具有治疗类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和溃疡性结肠炎等自身免疫性疾病的潜力<sup>[53]</sup>。双氢青蒿素对系统性红斑狼疮小鼠的 Treg/Th17 具有免疫调节作用, 通过恢复 Treg/Th17 平衡来减轻系统性红斑狼疮症状<sup>[54]</sup>。因此, 通过对青蒿素作用机制的深入研究, 有可能开发出治疗肿瘤及自身免疫性疾病的新型青蒿素类药物<sup>[55]</sup>。

## 2 总结

青蒿素类化合物在体内外抗肿瘤实验中, 展现出高效和广谱的抗肿瘤效果。然而, 关于青蒿素类化合物的抗肿瘤作用机制存在众多且复杂的观点, 有些观点甚至相互矛盾。综合文献报道, 青蒿素类化合物主要的抗肿瘤作用机制包括产生 ROS 损伤、阻滞肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡和抑制肿瘤细胞血管生成, 从而减少肿瘤细胞的侵袭和转移。至于青蒿素类化合物究竟是以某种特定作用机制为主, 还是通过多种作用机制共同发挥抗肿瘤作用, 仍需进一步研究。与传统化疗药物相比, 青蒿素类化合物具有降低肿瘤耐药性和调节肿瘤免疫的潜力, 这可能成为未来研究的重点。然而, 在临床实践中, 青蒿素类化合物作为抗肿瘤药物的使用案例相对较少。此外, 青蒿素类化合物产生抗肿瘤效应的靶蛋白尚未明确, 通过结合化学生物学与蛋白质组学的研究, 可以更好地了解青蒿素类化合物的细胞和分子机制, 有可能发现青蒿素类化合物治疗肿瘤的真正作用靶点, 这对于进一步开发青蒿素类抗肿瘤药物具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Miller LH, Su XZ. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden [J]. Cell, 2011, 146 (6): 855-858.
- [2] Wong YK, Xu C, Kalesh KA, et al. Artemisinin as an anticancer drug: recent advances in target profiling and mechanisms of action [J]. Med Res Rev, 2017, 37 (6): 1492-1517.

- [3] Dai XS, Zhang XY, Chen W, et al. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (2): 603-622.
- [4] Das AK. Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds [J]. *Ann Med Health Sci Res*, 2015, 5 (2): 93-102.
- [5] Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, et al. A randomised, double blind, placebo-controlled pilot study of oral artesunate therapy for colorectal cancer [J]. *EBioMedicine*, 2015, 2 (1): 82-90.
- [6] Singh NP, Panwar VK. Case report of a pituitary macroadenoma treated with artemether [J]. *Integr Cancer Ther*, 2006, 5 (4): 391-394.
- [7] Ho WE, Peh HY, Chan TK, et al. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142 (1): 126-139.
- [8] Li Z, Li Q, Wu J, et al. Artemisinin and its derivatives as a repurposing anticancer agent: what else do we need to do? [J]. *Molecules*, 2016, 21 (10): 1-14.
- [9] O' Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues [J]. *Molecules*, 2010, 15 (3): 1705-1721.
- [10] Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, et al. Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2009, 274: 290-298.
- [11] Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2005, 9 (5): 995-1007.
- [12] Zhang SM, Gerhard GS. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (10): 7472.
- [13] Stockwin LH, Han B, Yu SX, et al. Artemisinin dimer anticancer activity correlates with heme-catalyzed reactive oxygen species generation and endoplasmic reticulum stress induction [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125 (6): 1266-1275.
- [14] Wang J, Zhang CJ, Chia WN, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111.
- [15] Wang JG, Zhang JB, Shi Y, et al. Mechanistic investigation of the specific anticancer property of artemisinin and its combination with aminolevulinic acid for enhanced anti-colorectal cancer activity [J]. *ACS Cent Sci*, 2017, 3 (7): 743-750.
- [16] Zhou YQ, Li WC, Xiao YL. Profiling of multiple targets of artemisinin activated by hemin in cancer cell proteome [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11 (4): 882-888.
- [17] Zhang CJ, Wang JG, Zhang JB, et al. Mechanism-guided design and synthesis of a mitochondria-targeting artemisinin analogue with enhanced anticancer activity [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55 (44): 13770-13774.
- [18] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 160 (1): 1-40.
- [19] Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, et al. Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2009, 274: 290-298.
- [20] Efferth T. Artemisinin—second career as anticancer drug? [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2015, 1 (4): 2-25.
- [21] Ooko E, Saeed MEM, Kadioglu O, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22 (11): 1045-1054.
- [22] Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, et al. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (2): 987-996.
- [23] Greenshields AL, Shepherd TG, Hoskin DW. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56 (1): 75-93.
- [24] Wang Z, Hu W, Zhang JL, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity [J]. *FEBS Open Bio*, 2012, 2: 103-112.
- [25] Lu JJ, Meng LH, Cai YJ, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis in HL-60 leukemia cells dependent of iron and p38 mitogen-activated protein kinase activation but independent of reactive oxygen species [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7 (7): 1017-1023.
- [26] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835): 342-348.
- [27] Mondal A, Chatterji U. Artemisinin represses telomerase subunits and induces apoptosis in HPV-39 infected human cervical cancer cells [J]. *Cell Biochem*, 2015, 116 (9): 1968-81s.
- [28] Yi YC, Liang R, Chen XY. Dihydroartemisinin suppresses the tumorigenesis and cycle progression of colorectal cancer by targeting CDK1/CCNB1/PLK1 signaling [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 768879.
- [29] 翁熊, 祝顺琴, 崔红娟. 青蒿琥酯通过阻滞细胞周期抑制胶质母细胞瘤细胞增殖 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (4): 772-778.
- [30] Yin S, Yang H, Zhao X, et al. Antimalarial agent artesunate induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest and apoptosis via increasing intracellular ROS levels in normal liver cells [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39 (12): 1681-1689.
- [31] Jamalzadeh L, Ghafoori H, Aghamaali M, et al. Induction of apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells by a semi-synthetic derivative of artemisinin: a caspase-related mechanism [J]. *Iran J Biotechnol*, 2017, 15 (3): 157-165.
- [32] Xiao P, Liang QJ, Chen QQ, et al. Artemisinin poten-

- tiates apoptosis and triggers cell cycle arrest to attenuate malignant growth of salivary gland tumor cells [J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69: 177-187.
- [33] 孙维栋, 余醒醒, 安依涵, 等. 双氢青蒿素通过激活氧化应激诱导人急性 T 淋巴细胞白血病细胞凋亡 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28 (3): 753-757.
- [34] Saha S, Panigrahi DP, et al. Autophagy in health and disease: a comprehensive review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 485-495.
- [35] Li BN, Bu SX, Sun JY, et al. Artemisinin derivatives inhibit epithelial ovarian cancer cells via autophagy-mediated cell cycle arrest [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2018, 50 (12): 1227-1235.
- [36] Shi XL, Wang L, Li XM, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy-dependent death in human tongue squamous cell carcinoma cells through DNA double-strand break-mediated oxidative stress [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (28): 45981-45993.
- [37] Wang ZC, Liu Y, Wang H, et al. Research on the relationship between artesunate and Raji cell autophagy and apoptosis of Burkitt's lymphoma and its mechanism [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (9): 2238-2243.
- [38] 朱海洋, 孙会卿, 张淑凤, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究双氢青蒿素对人肝癌 SMMC-7721 细胞的自噬作用 [J]. *中医学报*, 2022, 37 (4): 830-836.
- [39] Huang ZY, Gan S, Zhuang XR, et al. Artesunate inhibits the cell growth in colorectal cancer by promoting ros-dependent cell senescence and autophagy [J]. *Cells*, 2022, 11 (16): 2472.
- [40] Zhang ZS, Wang J, Shen YB, et al. Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10 (1): 379-383.
- [41] Verma S, Das P, Kumar VL. Chemoprevention by artesunate in a preclinical model of colorectal cancer involves down regulation of  $\beta$ -catenin, suppression of angiogenesis, cellular proliferation and induction of apoptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 278: 84-91.
- [42] Niu N, Yu C, Li L, et al. Dihydroartemisinin enhances VEGFR1 expression through up-regulation of ETS-1 transcription factor [J]. *J Cancer*, 2018, 9 (18): 3366-3372.
- [43] Kort A, Durmus S, Sparidans RW, et al. Brain and testis accumulation of regorafenib is restricted by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and p-glycoprotein (P-GP/ABCB1) [J]. *Pharm Res*, 2015, 32 (7): 2205-2216.
- [44] Zhang SY, Feng R, Yuan F, et al. The therapeutic effects of dihydroartemisinin on cisplatin-resistant gastric cancer cells [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2022, 23: 276-286.
- [45] Reungpatthanaphong P, Mankhetkorn S. Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/ADR and GLC4/ADR resistant cell lines [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25 (12): 1555-1561.
- [46] Wang L, Liu L, Chen YT, et al. Correlation between adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporter G2 (ABCG2) and drug resistance of esophageal cancer and reversal of drug resistance by artesunate [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214 (9): 1467-1473.
- [47] Galon J, Bruni D. Tumor immunology and tumor evolution: inter-twined histories [J]. *Immunity*, 2020, 52: 55-81.
- [48] Shakir L, Hussain M, Javeed A, et al. Artemisinins and immune system [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668 (1-2): 6-14.
- [49] Cao Y, Feng YH, Gao LW, et al. Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 110-116.
- [50] Zhou ZH, Chen FX, Xu WR, et al. Enhancement effect of di-hydroartemisinin on human  $\gamma\delta$  T cell proliferation and killing pan-creatic cancer cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17 (3): 850.
- [51] Zou XS, Liu C, Li CC, et al. Study on the structure-activity relationship of dihydroartemisinin derivatives: discovery, synthesis, and biological evaluation of dihydroartemisinin-bile acid conjugates as potential anticancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113754.
- [52] Yu JF, Sheng SH, Zou XS, et al. Dihydroartemisinin-ursodeoxycholic acid conjugate is a potential treatment agent for inflammatory bowel disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 109918.
- [53] Gu JS, Xu YS, Hua DH, et al. Role of artesunate in autoimmune diseases and signaling pathways [J]. *Immunotherapy*, 2023, 15 (14): 1183-1193.
- [54] Chen Y, Tao TJ, Wang WL, et al. Dihydroartemisinin attenuated the symptoms of mice model of systemic lupus erythematosus by restoring the Treg/Th17 balance [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021, 48 (4): 626-633.
- [55] Xu W, Zou XS, Zha YF, et al. Novel Bis-Artemisinin-Phloroglucinol hybrid molecules with dual anticancer and immunomodulatory activities: synthesis and evaluation [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 139: 106705.

(收稿日期: 2023-08-31; 修回日期: 2023-10-10)



## 衢枳壳主要化学成分及药效学作用和机制研究进展

李锦荣<sup>1, 2</sup>, 陈国玉<sup>2</sup>, 虞立<sup>2</sup>, 吕万强<sup>2</sup>, 张立将<sup>1, 2</sup>, 尹来<sup>2\*</sup>, 邵金金<sup>2\*</sup> (1. 浙江工业大学 长三角绿色制药协同创新中心, 杭州 310014; 2. 杭州医学院 (浙江省医学科学院) 安全性评价研究中心, 杭州 310053)

**摘要:** 衢枳壳作为浙江地区道地中药材, 在 2018 年入选新“浙八味”中药材培育品种后, 其药理作用得到愈来愈多的关注。研究发现, 衢枳壳及其活性成分具有抗炎、平喘、降血糖、保肝、抗氧化、降血脂、调节肠道菌群、抑菌和免疫调节等多种药理作用, 具有良好的药用开发前景。本研究归纳总结了衢枳壳及其主要化学成分的药理作用和机制研究进展, 为衢枳壳的进一步药用开发利用提供参考。

**关键词:** 衢枳壳; 化学成分; 药理作用

**中图分类号:** R283, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0459-07  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.028

### Pharmacological effects of Quzhou *Aurantii Fructus* extract and its active components and related mechanism

LI Jin-rong<sup>1, 2</sup>, CHEN Guo-yu<sup>2</sup>, YU Li<sup>2</sup>, LYU Wan-qiang<sup>2</sup>, ZHANG Li-jiang<sup>1, 2</sup>, YIN Lai<sup>2\*</sup>, SHAO Jin-jin<sup>2\*</sup> (1. Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014; 2. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Center of Safety Evaluation and Research, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053)

**Abstract:** Quzhou *Aurantii Fructus*, an authentic medicinal material in Zhejiang, has been selected as one of new “Zhejiang 8 Famous Kinds Herbal Medicines” in 2018, whose pharmacological effects have been paid much attention. Quzhou *Aurantii Fructus* extract and its active components have many pharmacological effects, such as anti-inflammation, relieve asthma, hypoglycemic, hepatoprotective, anti-oxidation, hypolipidemic, regulation of intestinal flora, bacteriostasis and immune regulation, etc. This review summarized the research progress in pharmacological effects and mechanism of Quzhou *Fructus Aurantii* and its main chemical components, to provide reference for further development and utilization of Quzhou *Aurantii Fructus*.

**Key words:** Quzhou *Aurantii Fructus*; chemical component; pharmacological effect

衢枳壳 (Quzhou *Aurantii Fructus*) 为芸香科植物常山胡柚 (*Citrus Changshan-huyou* Y. B. Chang) 的干燥未成熟果实 (习称胡柚片)<sup>[1]</sup>, 主产地为浙江省衢州市常山县。《中国药典》中枳壳为酸橙及其栽培变种的干燥未成熟果实。研究表明, 常山胡柚是柚和酸橙的杂交变种<sup>[2-3]</sup>, 胡柚片各项检测指标均符合《中国药典》2020 年版中枳壳的规定。民间用胡柚片入药和治疗疾病历史悠久, 胡柚皮煮水有明显止咳化痰之效。胡柚片自 20 世纪 80 年

代起开始一直作为枳壳在药材市场、医院中药用。2016 年, 胡柚片被正式定名为“衢枳壳”, 载入新版《浙江省中药炮制规范 (2015 版)》<sup>[1-3]</sup>。2018 年, 衢枳壳凭借药用价值高、带动农民增收显著等优势被评为新“浙八味”中药材培育品种之一<sup>[4]</sup>。现代研究表明, 除具有与枳壳一致的理气宽中、行滞消胀等功效外, 衢枳壳还具有抗炎、抗氧化、抗菌、保肝、降血糖、降血脂和免疫调节等多种药理作用。目前, 围绕衢枳壳的药理学相关研究不断深入, 新

**基金项目:** 浙江省重点研发计划项目 (No.2020C03053)。

**作者简介:** 李锦荣, 男, 硕士, 主要从事药理学研究, email: 1099004329@qq.com \* **通信作者:** 尹来, 男, 主任医师, 主要从事新药研发, email: 2019000066@hmc.edu.cn; 邵金金, 女, 主要从事药理毒理学研究, email: shaojinjin@zju.edu.cn

的研究成果不断涌现。基于此,本文对衢枳壳及其成分的药理作用进行综述,旨在为研究和开发衢枳壳的药用价值提供参考。

## 1 衢枳壳的化学成分

目前,衢枳壳的化学成分已被广泛研究,已从衢枳壳中分离鉴定出 104 种成分,主要包括黄酮类、香豆素类、三萜类和挥发油类化学成分。

### 1.1 黄酮类

黄酮类组分是衢枳壳指纹图谱中的特征指纹峰,其中含量最高的 2 个成分柚皮苷( $C_{27}H_{32}O_{14}$ )和新橙皮苷( $C_{28}H_{34}O_{15}$ ),为《衢枳壳药材质量标准》中的含量指标成分(柚皮苷含量不得少于 4.0%,新橙皮苷含量不得少于 3.0%)。现已从衢枳壳中分析鉴定出 26 种黄酮类化合物,主要包括柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素等<sup>[5-10]</sup>,详见表 1 和图 1。

表 1 衢枳壳黄酮类成分

Tab 1 Flavonoids in Quzhou Aurantii Fructus

编号	化合物	化学式	文献
1	vicenin-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[5]
2	圣草次苷	$C_{27}H_{32}O_{15}$	[5-7]
3	新圣草次苷	$C_{27}H_{32}O_{15}$	[5]
4	柚皮苷 -6"-鼠李糖苷	$C_{33}H_{42}O_{18}$	[5]
5	橙皮素 -5-O-葡萄糖苷	$C_{22}H_{24}O_{11}$	[5]
6	芸香柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	[5-9]
7	橙皮素 -7- (2, 6-二鼠李糖苷)	$C_{34}H_{44}O_{19}$	[5]
8	橙皮苷	$C_{28}H_{34}O_{15}$	[5-9]
9	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	[5-10]
10	新橙皮苷	$C_{28}H_{34}O_{15}$	[5-6, 8-10]
11	柚皮苷 -6"-丙二酸	$C_{30}H_{34}O_{17}$	[5]
12	brutieridin	$C_{34}H_{42}O_{18}$	[5]
13	枸橼苷	$C_{28}H_{34}O_{14}$	[5]
14	蜂毒苷	$C_{33}H_{40}O_{17}$	[5]
15	柚皮素	$C_{15}H_{12}O_5$	[5, 7]
16	橙皮素	$C_{16}H_{14}O_6$	[5]
17	异橙黄酮	$C_{20}H_{20}O_7$	[5]
18	3'-去甲基川陈皮素	$C_{20}H_{20}O_8$	[5]
19	甜橙黄酮	$C_{20}H_{20}O_7$	[5]
20	6-去甲氧基桔皮素	$C_{19}H_{18}O_6$	[5]
21	川陈皮素	$C_{21}H_{22}O_8$	[5-7, 9]
22	4', 5, 6, 7-四甲氧基黄酮	$C_{19}H_{18}O_6$	[5]
23	3-甲氧基川陈皮素	$C_{22}H_{24}O_9$	[5]
24	桔皮素	$C_{20}H_{20}O_7$	[5-7, 9]
25	5-去甲基川陈皮素	$C_{20}H_{20}O_8$	[5]
26	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	[6-7]

### 1.2 香豆素类

Zhang 等<sup>[5]</sup>从衢枳壳提取物中鉴定出橙皮内酯和异橙皮内酯(27~28)。冯敬骞等<sup>[6]</sup>从衢枳

壳甲醇提取物中鉴定出橙皮内酯、异橙皮内酯、橙皮油内酯和水合橙皮内酯,详见表 2 和图 2。

表 2 衢枳壳香豆素类成分

Tab 2 Coumarins in Quzhou Aurantii Fructus

编号	化合物	化学式	文献
27	橙皮内酯	$C_{15}H_{16}O_4$	[5-7]
28	异橙皮内酯	$C_{15}H_{16}O_4$	[5]
29	橙皮油内酯	$C_{19}H_{22}O_3$	[6-7]
30	水合橙皮内酯	$C_{15}H_{18}O_5$	[6-7]

### 1.3 三萜类

衢枳壳中还含有多种高氧三萜化合物,是衢枳壳苦味的物质基础。目前已从衢枳壳中鉴定出 8 个三萜类化合物,详见表 3 和图 3。

表 3 衢枳壳三萜类成分

Tab 3 Triterpene in Quzhou Aurantii Fructus

编号	化合物	化学式	文献
31	黄柏酮酸 -17-β-D-葡萄糖苷	$C_{29}H_{32}O_{17}$	[5]
32	诺米林葡萄糖苷	$C_{34}H_{46}O_{15}$	[5]
33	诺米林酸 -17-β-D-葡萄糖苷	$C_{34}H_{48}O_{16}$	[5]
34	黄柏酮酸	$C_{26}H_{32}O_8$	[5]
35	诺米林酸	$C_{28}H_{36}O_{10}$	[5]
36	诺米林	$C_{28}H_{34}O_9$	[5]
37	黄柏酮	$C_{26}H_{30}O_7$	[5]
38	柠檬苦素	$C_{26}H_{30}O_8$	[5]

### 1.4 挥发油类

Zhang 等<sup>[5]</sup>使用气相色谱结合质谱从衢枳壳提取物中共分析鉴定出 66 种挥发性化合物(见表 4),其中柠檬烯为最主要的挥发性成分,在 42 批样品中的挥发性化合物的面积百分比中,柠檬烯的平均占比为 65.76%,其他高占比(>1%)的挥发性成分还包括 γ-蒎品烯(8.86%)、大牛儿烯 D(7.99%)、大牛儿烯 B(1.91%)、β-月桂烯(1.13%)和 α-毕澄茄醇。

### 1.5 其他成分

除了上述化学成分外,衢枳壳中还含有膳食纤维、天然色素、多糖及镁、钾、钙等多种微量元素<sup>[11-12]</sup>。

### 1.6 衢枳壳与枳壳成分比较

Zhang 等<sup>[5]</sup>使用超高效液相色谱结合电子喷雾电离和四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)以及气相色谱结合质谱(GC-MS)对衢枳壳和枳壳成分进行鉴定分析,采用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和层次聚类分析(HCA)等方法进一步分析、筛选和验证潜在的化学标志物,结果表明衢枳壳和枳壳的主要成分相似,圣草次苷(2)、新圣

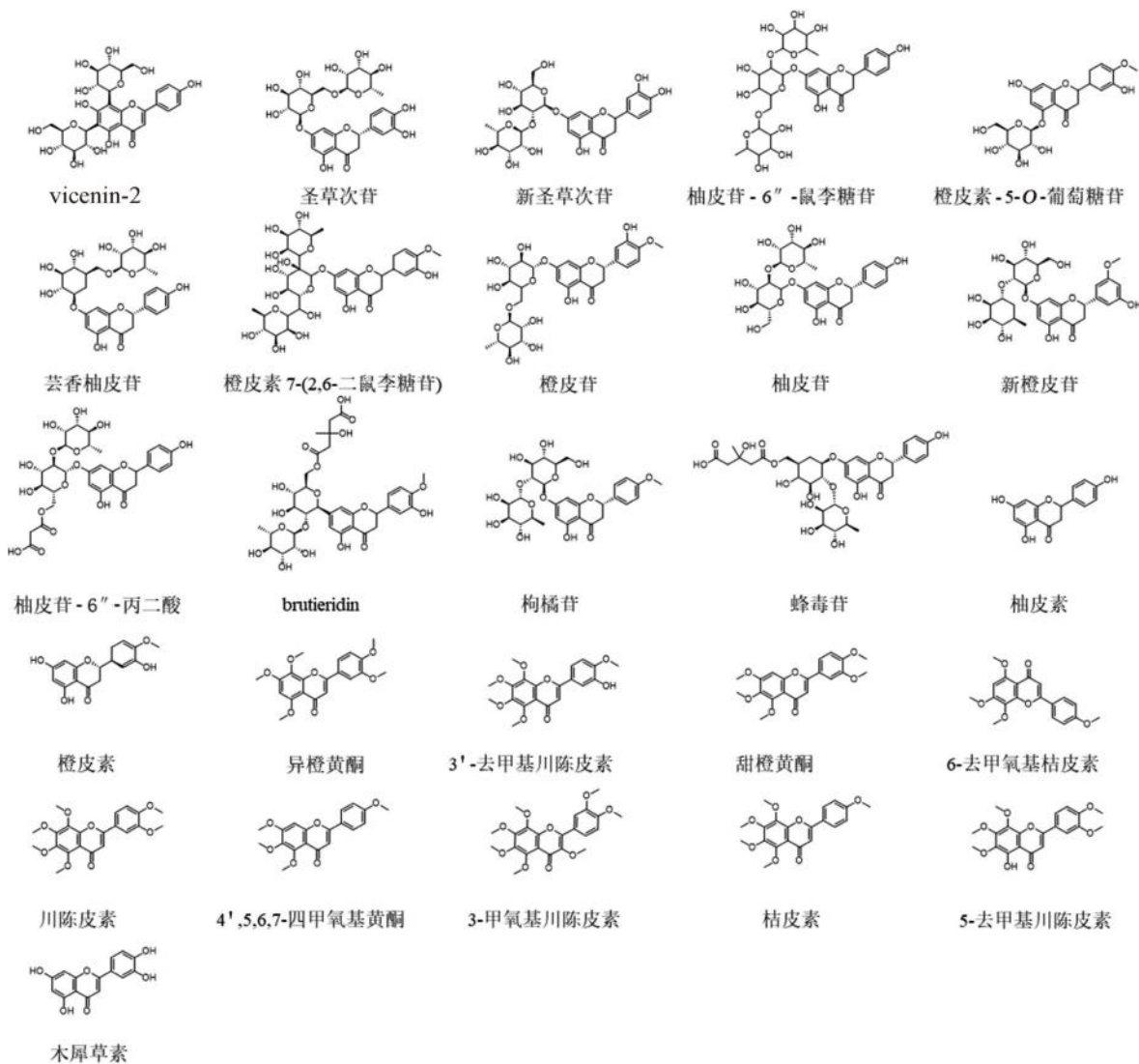


图 1 衢枳壳黄酮类成分

Fig 1 Flavonoids in Quzhou *Aurantii Fructus*

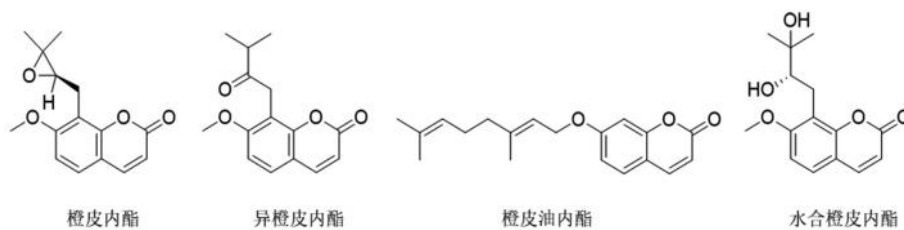


图 2 衢枳壳香豆素类成分

Fig 2 Coumarins in Quzhou *Aurantii Fructus*

草次苷 (3)、橙皮素-5-O-葡萄糖苷 (5)、枸橼苷 (13)、蜂毒苷 (14)、橙皮素 (16)、甜橙黄酮 (19)、6-去甲氧基桔皮素 (20)、4',5,6,7-四甲氧基黄酮 (22)、橙皮内酯 (27)、异橙皮内酯 (28)、黄柏酮酸-17-β-D-葡萄糖苷 (31)、黄柏酮酸 (34)、诺米林酸 (35)、诺米林 (36) 和黄柏酮 (37) 为衢枳壳和枳壳的差异化化合物, 包括 9 种黄酮类化合物、2 种香豆素化合物、5 种三萜

类化合物; 此外, 倍半萜侧柏烯 (70)、γ-榄香烯 (72)、α-愈创烯 (73)、β-金合欢烯 (74)、α-布藜烯 (82)、β-倍半水芹烯 (85)、δ-葎澄茄烯 (86)、榄香醇 (87)、(-)-蓝桉醇 (90)、愈创醇 (91)、γ-桉叶油醇 (93)、异桉油烯醇 (95)、葎澄茄-4-烯-10-醇 (97)、十氢二甲基乙烯基萘酚 (99)、isointermedeol (100)、β-甜橙醛 (101)、刺柏脑 (102)、棕榈酸 (103)、叶绿醇 (104) 等 19



表 4 衢 枳 壳 挥 发 油 类 成 分

Tab 4 Volatile compounds in Quzhou *Aurantii Fructus*

编号	化合物	化学式	文献	编号	化合物	化学式	文献
39	乙苯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	[5]	72	γ- 榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
40	对二甲苯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	[5]	73	α- 愈创烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
41	间二甲苯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	[5]	74	β- 金合欢烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
42	α- 侧柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	75	蛇麻烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
43	(+)-α- 蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	76	γ- 衣兰油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
44	β- 侧柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	77	乙酸香叶酯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
45	β- 蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	78	δ- 芹子烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
46	β- 月桂烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	79	凡伦橘烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
47	辛醛	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	[5]	80	大牛儿烯 D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
48	α- 水芹烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	81	α- 衣兰油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
49	α- 蒎品烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	82	α- 布藜烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
50	邻伞花烃	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	[5]	83	γ- 毕澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
51	柠檬烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	84	dysoxylonene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
52	β- 水芹烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	85	β- 倍半水芹烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
53	罗勒烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	86	δ- 葶澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
54	γ- 蒎品烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	87	榄香醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
55	蒎品油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	[5]	88	大牛儿烯 B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]
56	芳樟醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	89	桉油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	[5]
57	壬醛	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	90	(-)- 蓝桉醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
58	β- 蒎品醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	91	愈创醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
59	(-)- 蒎品-4- 醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	92	刺柏烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
60	α- 蒎品醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	93	γ- 桉叶油醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
61	癸醛	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	[5]	94	苍术醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
62	乙酸辛酯	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	[5]	95	异桉油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	[5]
63	香芹醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	[5]	96	叔依兰油醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
64	橙花醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	[5]	97	葶澄茄-4- 烯-10- 醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
65	香茅醇	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	[5]	98	α- 葶澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
66	δ- 榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]	99	十氢二甲基乙烯基萘酚	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
67	乙酸橙酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	[5]	100	isointermedeol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
68	古巴烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]	101	β- 甜橙醛	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	[5]
69	(-)-β- 榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]	102	刺柏脑	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	[5]
70	倍半蒎侧柏烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]	103	棕榈酸	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	[5]
71	石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	[5]	104	叶绿醇	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	[5]

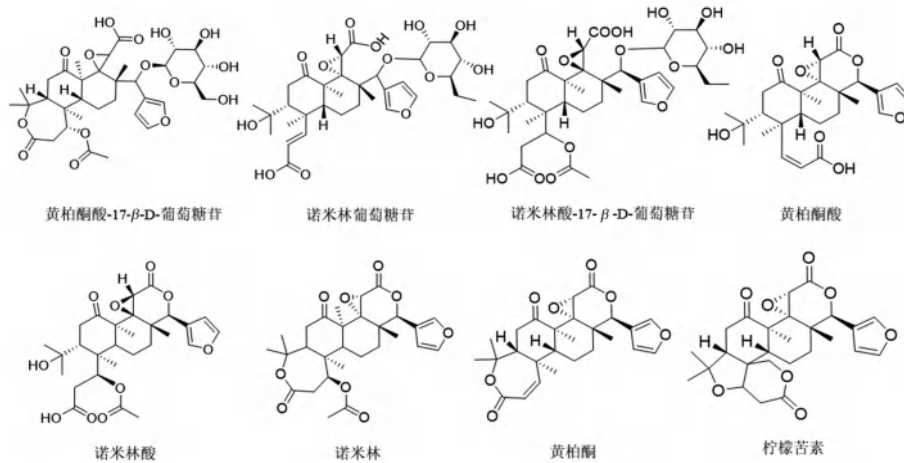


图 3 衢 枳 壳 三 萜 类 成 分

Fig 3 Triterpene in Quzhou *Aurantii Fructus*

种挥发性物质仅在衢枳壳中被检测到, 以上化合物可作为区分衢枳壳和枳壳的标志物。

## 2 药理活性及作用机制

### 2.1 抗炎、平喘作用

衢枳壳提取液能够减少炎症部位的中性粒细胞数量, 在五水合硫酸铜诱导的斑马鱼炎症模型中具有显著的抗炎作用, 并且能够通过调控 MAPK、NF- $\kappa$ B 及 AMPK 信号通路来改善脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠急性肺损伤<sup>[13-14]</sup>。

衢枳壳中的黄酮类化合物可抑制 RAW264.7 细胞炎症模型中 p65 活化及核转移, 并抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子的表达<sup>[15]</sup>。对过敏性哮喘小鼠模型进行衢枳壳总黄酮给药处理后, 炎性细胞因子 (IL-4、IL-5、IL-13)、黏蛋白 (MUC5AC、MUC5B) 和基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 等相关物质水平显著降低, 其机制可能与抑制 Smad2/3 蛋白磷酸化从而抑制该信号通路活化、改变其下游靶点以及气道重塑有关<sup>[16]</sup>。

### 2.2 治疗糖尿病作用

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病, 其并发症可波及全身重要器官, 严重影响患者生活质量。通过体外实验发现衢枳壳总黄酮可促进 HepG2 细胞葡萄糖的消耗, 并可在一定程度上抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶从而降低血糖, 作用效力与黄酮含量成正相关<sup>[17]</sup>。糖尿病肾病 (DN) 是 2 型糖尿病最严重的并发症之一, 发病率高达 20% ~ 40%<sup>[18]</sup>。不同剂量的衢枳壳提取物可使 db/db 模型小鼠血肌酐和血尿素氮水平降低, 肾组织抗氧化基因 *Gclm*、*Nqo1*、*Gclc* mRNA 表达显著提高, db/db 小鼠肾组织抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 (GSH) 活性提高从而改善氧化应激, 显著修复 2 型糖尿病 db/db 小鼠的肾脏氧化损伤<sup>[19]</sup>。

### 2.3 肝脏保护作用

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种与胰岛素功能障碍、遗传密切相关的代谢性肝脏损伤, 目前尚未有获批用于治疗 NAFLD 的药物<sup>[20]</sup>。研究表明, 用衢枳壳提取物处理肥胖引起的大鼠非酒精性脂肪肝模型后, 肝脏病变减轻, NAFLD 活动度积分明显降低, 其能通过抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  和干扰素 (IFN)  $\gamma$  从而抑制全身和肝内炎症, 作用机制与抑制磷酸化的 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路有关<sup>[21]</sup>。此外, 衢枳壳提取物的黄酮类化合物能通过增强肝脏抗氧化能力、减少脂肪酸代谢

过程中活性氧的损伤来抑制 NAFLD 小鼠的疾病进展<sup>[22]</sup>。从衢枳壳中分离出芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷 4 种成分用于 NAFLD 小鼠模型的治疗, 发现这 4 种化学成分能够调控 Nrf2-ARE 信号通路, 对预防和治疗 NAFLD 起到重要的作用<sup>[23]</sup>。

### 2.4 抗氧化作用

研究表明, 癌症、衰老或其他疾病大都与过量自由基的产生有关, 黄酮类化合物是一种优秀的自由基清除剂, 具有良好的抗氧化活性<sup>[24]</sup>。将衢枳壳的总黄酮溶液中分别加入 DPPH 和 ABTS 溶液处理后在波长 517 nm 处测定其吸光度, 结果 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率与总黄酮质量浓度成正比, 最高可达 99.054%, 清除能力与维生素 C 相当<sup>[25]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup>采用 DPPH、ABTS 和 FRAP 方法测定衢枳壳提取液和枳壳提取液总抗氧化活性, 结果衢枳壳提取液和枳壳提取液的清除 DPPH 自由基的平均值分别为 1.212  $\mu\text{g Trolox} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.965  $\mu\text{g Trolox} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 清除 ABTS 自由基平均值分别为 0.335  $\mu\text{mol Trolox} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.268  $\mu\text{mol Trolox} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 衢枳壳提取液对于 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力显著高于枳壳提取液, 这表明衢枳壳比枳壳有更强的抗氧化能力。

### 2.5 降血脂作用

高脂血症通常由不健康的生活方式造成, 是心脑血管疾病等多种疾病的重要危险因素。衢枳壳提取物可以提高高脂血症动物模型肝脏和脂肪中脂质代谢相关因子 (PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$  等) mRNA 以及其他脂质代谢相关基因的表达水平; 显著降低血清脂质总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平; 减少血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和血清、肝脏中丙二醛 (MDA) 的含量; 提高 SOD 活性, 对高脂血症金黄地鼠脂质代谢具有明显改善作用, 但其作用机制有待进一步研究<sup>[26]</sup>。

### 2.6 胃肠道调节作用

黄酮类化合物可以调节肠道菌群, 在预防肥胖和相关代谢疾病方面发挥重要作用。经衢枳壳干预后, 功能性消化不良模型大鼠的体重、24 h 饮水量与摄食量、胃排空率及小肠推进率、血浆胃泌素 (GAS)、胃动素 (MTL) 含量明显升高, 生长抑素 (SS) 含量明显降低, 这表明衢枳壳能够有效调节胃肠道动力, 与衢枳壳理气宽中、行滞消胀的论述相符合<sup>[27]</sup>。衢枳壳提取物可调节高脂饮食喂养小鼠模型肠道微生物群, 显著降低肥胖、炎症和肝脏脂肪变性, 还能提高紧密连接蛋

白的表达,减少代谢性内毒素血症的发生<sup>[28]</sup>。此外,衢枳壳提取物治疗可逆转由高脂饮食引起的肠道菌群失调<sup>[29]</sup>,表现为厚壁菌门与拟杆菌门的比例降低,*Akkermansia*属和*Alistipes*属的增加,以及*Dubosiella*属、粪肠球菌属和乳酸杆菌属的减少。某些黄酮类化合物如橙皮苷等还可以通过增加益生菌和减少病原本来调节肠道微生物群的组成。如新橙皮苷可有效逆转小鼠高脂饮食引起肠道的菌群失衡,肠道菌群组成(细菌和厚壁菌的相对丰度)发生改变、多样性增加,这对于预防肥胖和相关代谢疾病具有重要意义<sup>[30]</sup>。

### 2.7 免疫调节作用

免疫调节是指机体识别和排除抗原性异物,维持自身生理动态平衡与相对稳定的生理功能,是维持机体内环境稳定的关键。常山胡柚皮提取物柠檬苦素、柚皮素等能抑制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖作用,尤其对于 T 淋巴细胞的抑制作用比较强烈,由此发挥免疫调节的作用<sup>[31]</sup>。

衢枳壳提取物含有的橙皮苷、柚皮素、柠檬苦素以及枳壳多糖等化学成分也被证实具有一定的免疫调节作用<sup>[32-34]</sup>。橙皮苷能够在一定程度上促进小鼠特异性细胞免疫和非特异性免疫<sup>[32]</sup>。通过小鼠乳腺癌手术切除模型证实了柚皮素可以发挥免疫调节作用——通过减少 TGF- $\beta$  诱导产生的调节性 T 细胞、提高 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抗肿瘤能力<sup>[33]</sup>。分离纯化枳壳粗多糖后得到的精制枳壳多糖(CALB-1)同样可以发挥较好的免疫调节作用<sup>[34]</sup>。

### 2.8 抗肿瘤作用

衢枳壳提取物及其化学成分在众多类型肿瘤的治疗策略中作为潜在抗肿瘤药物被广泛研究,可参与调节多种肿瘤细胞的细胞周期阻滞、凋亡、抗血管生成、抗转移和 DNA 修复、改变与肿瘤发生相关的分子靶点等多种途径发挥作用<sup>[35]</sup>。

衢枳壳中的挥发油类物质 D-柠檬烯可使膀胱癌细胞停滞在 S 期从而诱导其凋亡,提示衢枳壳可通过改变肿瘤细胞的周期,干扰细胞信号传导等途径诱导细胞凋亡从而起到杀灭肿瘤细胞作用<sup>[36]</sup>。除此之外,橙皮苷可促使细胞线粒体紊乱、增加钙负荷以及激活 ERK1/2 等作用机制来诱发肝癌 HepG2 细胞凋亡<sup>[37-38]</sup>。柠檬苦素可降低 TNF- $\alpha$  水平,增强适应性免疫应答,上调氧化防御关键蛋白 Nrf2 和 SOD2,从而减轻小鼠结直肠癌的发生发展<sup>[39]</sup>,此外,还可使 MFC 胃癌荷瘤模型小鼠的 IL-10 表达水平、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分比、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比

值、脾指数和胸腺指数、IL-2 和 IFN- $\gamma$  的表达水平、Cyt-C 及 Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,并能在一定程度上抑制胃癌<sup>[40]</sup>。

### 3 讨论与展望

浙江衢州常山胡柚资源丰富,以常山县为主的许多地区都有种植,但是人们往往会更多地关注其食用价值,而忽略其干燥青果(衢枳壳)的药用价值。随着 2018 年入选新“浙八味”中药材培育品种,衢枳壳药用价值的研究有了很大的进展。研究表明,衢枳壳富含黄酮类、香豆素类和三萜类等物质,具有抗炎、平喘、降血脂、护肝、抗氧化、降血糖、胃肠道调节、免疫调节、抗肿瘤等多种药理作用。虽然衢枳壳有较大的药用潜力,但目前上述药理学作用研究尚属起步阶段,衢枳壳的生物活性主要体现在对粗提取物的研究,对衢枳壳中新的单体化合物成分的生物活性研究较少,尚未有相关新药研发上市,因此,关于衢枳壳化学成分及其生物活性的研究需进一步深入。相信在不久的将来,随着越来越多研究成果的发布,一定能推动更多的衢枳壳相关医药产品的开发利用,为生命健康产业注入新的动力。

### 参考文献

- [1] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.
- [2] 郭增喜, 赵维良, 戚雁飞, 等. 《浙江省中药炮制规范》2015 年版收载品种的变化情况[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(6): 790-792.
- [3] 赵维良, 黄琴伟, 张文婷, 等. 中药材衢枳壳的基源植物研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1652-1655.
- [4] 徐小忠, 杨波, 张志慧, 等. 常山胡柚功能性产品开发现状及对策[J]. 浙江柑橘, 2020, 37(2): 8-10.
- [5] Zhang QX, Song WY, Tao GQ, et al. Comparison of chemical compositions and antioxidant activities for the immature fruits of *Citrus changshan-huyou* Y. B. Chang and *Citrus aurantium* L[J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 5057.
- [6] 冯敬骞, 宋剑锋, 赵四清, 等. 衢枳壳黄酮类成分调节胃肠动力的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2241-2245.
- [7] 冯敬骞, 胡卫南, 徐礼萍, 等. HPLC 法同时测定不同采集地衢枳壳中 12 种黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2020, 31(5): 571-575.
- [8] 王笑笑, 王思为, 方月娟, 等. 衢枳壳不同组分体外降糖活性研究及 4 种黄酮组分含量分析[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1418-1423.
- [9] 黄文康, 岳超, 宋剑锋, 等. HPLC 同时测定衢枳壳中 7 种指标成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 404-407.



- [10] 严晓丽, 闫倩倩, 刘晓政, 等. 高效液相色谱法测定衢枳壳中新橙皮苷及柚皮苷[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 161-166.
- [11] 徐小忠, 赵四清, 汪丽霞. 常山胡柚果皮中所含功能性成分与作用[J]. 浙江柑橘, 2014, 31(1): 10-12.
- [12] 郑明, 金情政, 王也, 等. ICP-MS 测定衢枳壳中 26 种无机元素[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(12): 1493-1497.
- [13] 李丽丽. 衢枳壳提取液在呼吸道炎症中的保护作用与抗炎机制研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
- [14] Li LL, Chen JT, Lin L, et al. Quzhou Fructus Aurantii extract suppresses inflammation via regulation of MAPK, NF- $\kappa$ B, and AMPK signaling pathway[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1593.
- [15] 徐霄, 汪洋, 王思为, 等. 衢枳壳黄酮组分抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的作用机制研究[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(4): 529-532.
- [16] Wang JP, Li T, Cai HY, et al. Protective effects of total flavonoids from Qu Zhi Qiao (fruit of *Citrus paradisi* cv. Changshanhuoyou) on OVA-induced allergic airway inflammation and remodeling through MAPKs and Smad2/3 signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111421.
- [17] 王笑笑, 王思为, 方月娟, 等. 衢枳壳不同组分体外降糖活性研究及 4 种黄酮组分含量分析[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1418-1423.
- [18] Chen HW, Yang MY, Hung TW, et al. Nelumbo nucifera leaves extract attenuate the pathological progression of diabetic nephropathy in high-fat diet-fed and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(3): 736-748.
- [19] 郑慧, 王思为, 钟松阳, 等. 衢枳壳提取物改善 2 型糖尿病 db/db 模型小鼠肾脏氧化损伤的作用研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(2): 105-108, 178.
- [20] Friedman SL, Neuschwander-Tetri A, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-922.
- [21] Jiang JP, Yan L, Shi Z, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of *Citrus changshan-huyou*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153082.
- [22] 陈芝芸, 李剑霜, 蒋剑平, 等. 胡柚皮黄酮对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝组织 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 100-105.
- [23] Shi Z, Li T, Liu YW, et al. Hepatoprotective and anti-oxidative effects of total flavonoids from Qu Zhi Qiao (Fruit of *Citrus Paradisi* cv. Changshanhuoyou) on nonalcoholic steatohepatitis in vivo and in vitro through Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 483.
- [24] Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 2774-2779.
- [25] 刘小娟, 方月娟, 夏道宗, 等. 衢枳壳总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1687-1691.
- [26] 叶爱琴, 蒋剑平, 李润, 等. 衢枳壳黄酮对高脂血症金黄地鼠降血脂作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 1938-1946.
- [27] 马永力, 陈红梅, 方新华, 等. 衢枳壳与其他三大主产区枳壳对功能性消化不良大鼠理气作用的比较研究[J]. 中国中医药科技, 2021, 28(5): 722-726.
- [28] Bai YF, Wang SW, Wang XX, et al. The flavonoid-rich Quzhou *Fructus Aurantii* extract modulates gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed mice[J]. Nutr Diabetes, 2019, 9(1): 30.
- [29] Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 5): 1469-1476.
- [30] Lu JF, Zhu MQ, Zhang H, et al. Neohesperidin attenuates obesity by altering the composition of the gut microbiota in high-fat diet-fed mice[J]. Faseb J, 2020, 34(9): 12053-12071.
- [31] 赵雪梅. 胡柚皮化学成分及其活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [32] 李荣, 李俊, 胡成穆, 等. 橙皮苷对免疫功能低下小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 169-172.
- [33] 曾文峰, 张发云, 杜刚军, 等. 柚皮素: 新一代免疫调节剂[J]. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45(9): 915-925.
- [34] 邢娜, 舒尊鹏, 徐炳清, 等. 枳壳多糖 CALB-1 的提取、分离纯化及免疫调节活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 639-644.
- [35] Pandey P, Khan F. A mechanistic review of the anticancer potential of hesperidin, a natural flavonoid from citrus fruits[J]. Nutr Res, 2021, 92: 21-31.
- [36] 徐耀庭, 李劲松, 顾炜, 等. D-柠檬烯诱导人膀胱癌细胞周期阻滞及凋亡的研究[J]. 中国医学工程, 2010, 18(3): 6-9.
- [37] Yumnam S, Park HS, Kim MK, et al. hesperidin induces paraptosis like cell death in hepatoblastoma, HepG2 Cells: involvement of ERK1/2 MAPK[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e101321.
- [38] Yumnam S, Hong GE, Raha S, et al. Mitochondrial dysfunction and Ca<sup>2+</sup> overload contributes to hesperidin induced paraptosis in hepatoblastoma cells, HepG2[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(6): 1261-1268.
- [39] Ishak NIM, Mohamed S, Madzuki IN, et al. Limonin modulated immune and inflammatory responses to suppress colorectal adenocarcinoma in mice model[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(9): 1907-1915.
- [40] 熊伟, 韩华, 陈华敏, 等. 柠檬苦素对 MFC 胃癌荷瘤模型小鼠免疫功能及凋亡相关因子表达的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(7): 845-850.

(收稿日期: 2023-09-12; 修回日期: 2023-10-20)

# 中药防治乙型病毒性肝炎作用机制研究进展

李盼盼<sup>1,2</sup>, 张凯悦<sup>1</sup>, 呼欣怡<sup>1</sup>, 韩玉晓<sup>1</sup>, 吴昱铮<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 刘梦扬<sup>1,2\*</sup> (1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617)

**摘要:** 乙型病毒性肝炎 (HBV) 是全球最主要的公共卫生问题之一, 目前临床上通常以抗病毒药物治疗为主。近年来, 中药制剂在治疗 HBV 上疗效显著, 特别是在联合抗病毒药物共同治疗时能够有效增强相关药物的药效, 降低不良反应, 大大提高疾病的治愈率。本文从抑制病毒复制、调节免疫、保肝降酶及抗纤维化等方面对中药复方及中药活性成分的作用机制最新研究进行综述, 以期在 HBV 的防治中发挥中医药的优势, 为 HBV 及其并发症相关临床治疗药物的开发提供方向, 为中药联合西药共同治疗 HBV 提供参考和理论依据。

**关键词:** 乙型病毒性肝炎; 中药复方; 活性成分; 调节免疫

**中图分类号:** R512.6 + 2, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0466-07  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.029

## Research progress in mechanism of traditional Chinese medicine for viral hepatitis B

LI Pan-pan<sup>1,2</sup>, ZHANG Kai-yue<sup>1</sup>, HU Xin-yi<sup>1</sup>, HAN Yu-xiao<sup>1</sup>, WU Yu-zheng<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, LIU Meng-yang<sup>1,2\*</sup> (1. *Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*)

**Abstract:** Viral hepatitis B is a major public health problem worldwide. For now, antiviral drugs are commonly used in clinical treatment. In recent years, traditional Chinese medicine (TCM), especially combined with antiviral drugs, can effectively enhance the clinical efficacy, reduce adverse reactions and increase curative rate. This review summarized TCM compounds and their active ingredients from virus replication inhibition, immunoregulation, liver protection, enzymes reduction or fibrosis inhibition. We aim to reveal the advantages of TCM in the prevention and treatment of viral hepatitis B, provide direction for the development of clinical drugs for viral hepatitis B and its complications and provide theoretical basis for the combined treatment of TCM and Western medicine for viral hepatitis B.

**Key words:** viral hepatitis B; compound herbal formulae; active ingredient; immune regulation

病毒性肝炎 (viral hepatitis) 是指由单个或多种肝炎病毒引起的肝脏炎症反应。据估计, 每年有 140 万人死于肝炎病毒所致的急性感染及相关的肝硬化和肝癌, 其中乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 导致的死亡人数约占 96%。2021 年世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 公布的报告数据显示, 全球约有 2.96 亿慢性 HBV 感染者, 但在被确诊患者中只有 22% 的慢性乙型肝炎 (chronic

hepatitis B, CHB) 患者接受了抗病毒治疗<sup>[1]</sup>。目前, 抗病毒首选药物以核苷 (酸) 类似物 [nucleos (t) ide analogues, NAs] 和干扰素 (interferon, IFN) 为主。恩替卡韦、替诺福韦等 NAs 可强效抑制 HBV 复制并减轻肝脏炎症, 但患者需要长期服药且面临耐药风险。聚乙二醇干扰素 (Peg-IFN- $\alpha$ ) 和 IFN- $\alpha$  治疗表现出较好的病毒学应答, 却存在不良反应较多等不足<sup>[2]</sup>。因此, 寻找安全高效的病毒性肝炎治疗药物仍是当前研究的重点和热点。

**基金项目:** 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (No.2021-QNRC2-B12)。

**作者简介:** 李盼盼, 女, 硕士, 主要从事中药调控慢性肝病研究, email: penny\_570916@163.com \* **通信作者:** 刘梦扬, 男, 副研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药脂质 - 炎症代谢调控研究, email: liumengyang0212@tjutcm.edu.cn

我国《慢性乙型肝炎预防和治疗指南（2022 版）》指出<sup>[3]</sup>，CHB 的治疗目标是最大限度地持续抑制 HBV 复制，缓解肝脏坏死炎症和纤维化，延缓和减少肝功能衰竭、失代偿性肝硬化、肝癌等并发症的发生。除抗病毒治疗外，抗炎、抗氧化、保肝降酶、抗纤维化和免疫调节等治疗途径目前已成为 CHB 患者的重要治疗策略，且临床实践皆证明了中药在这些方面对治疗 HBV 为代表的病毒性肝炎具有突出的调控作用和优势<sup>[4]</sup>。本文从抑制病毒复制、免疫调节、保肝降酶及抗纤维化等作用方面对中药及其有效组分治疗 HBV 的最新机制研究进展进行综述，以期揭示中药防治 HBV 的主要靶点和调控机制，为病毒性肝炎的临床治疗和药物开发提供方向。

### 1 抑制病毒复制

近年来，临床上已出现一些抗病毒的中药制剂，尽管其效果相比于化学药物还有一定差距，但基于抗肝炎病毒复制的有效中药及其组分的筛选和开发仍是抗病毒药物及其先导化合物获取的重要途径。

#### 1.1 中药复方

灵猫方提取物处理 HBV 模型细胞发现，细胞中乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）、乙型肝炎 E 抗原（HBeAg）和 HBV DNA 水平明显下调，其主要通过上调 INF 水平和抑制自噬相关蛋白表达来发挥抗病毒作用<sup>[5]</sup>。miR-122 表达水平与 CHB 患者肝损伤的发生之间存在统计学上的显著关系<sup>[6]</sup>。miR-122 的过表达会导致 HBV 表达受限，而内源性 miR-122 的缺失导致体外脂毒性肝细胞中 HBV 表达增强<sup>[7]</sup>。通过 miRNA 表达谱筛选发现，壮药白花香莲解毒颗粒干预可逆转 HBV 模型细胞中 miR-122 的下调，而过表达 miR-122 能够明显降低 HBeAg、HBsAg 和 HBV DNA 水

平，提示白花香莲解毒颗粒可能是通过增强 miR-122 的表达来抑制 HBV 复制活性<sup>[8]</sup>。

#### 1.2 中药活性成分

五味子丙素能够通过促进 HBV 感染小鼠体内干扰素基因刺激因子（STING）与 TANK 结合激酶 1（TBK1）的相互作用，激活 STING 通路，进而降低小鼠乙型肝炎核心抗原（HBcAg）、HBeAg 和 HBsAg 以及 HBV DNA 水平，表现出良好的抗病毒效果<sup>[9]</sup>。Xu 等<sup>[10]</sup>验证了鸢尾的活性成分——当药黄素对 HepG2.2.15 细胞株、HepG2-NTCP 细胞及 HBV 转基因小鼠的抗病毒作用，在三种模型中，当药黄素均可以显著抑制 HBV 复制，降低 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平。来源于土荆皮的土荆皮乙酸可以延缓 HepG2.2.15 细胞进入 G<sub>2</sub>/M 期，诱导细胞周期阻滞，并促进 HepG2.2.15 细胞发生细胞凋亡，进而减少 HBV 的分泌<sup>[11]</sup>。经体内及体外实验发现，牛防风素通过与乙肝病毒 X（HBx）蛋白结合，可使 HBx 蛋白降解增加，导致 cccDNA 的转录水平降低，HBsAg 表达减少，提示牛防风素可以成为靶向 HBx 蛋白的新型抗病毒药物<sup>[12]</sup>。常凯等<sup>[13]</sup>发现黄芪甲苷能够降低 Hep3B 细胞的 HBsAg 和 HBeAg 水平，这依赖于黄芪甲苷对线粒体翻译起始因子 2（MTIF2）和核糖体蛋白 L10（RPL10）的抑制，在翻译水平上减少 HBV 复制。此外，柴胡皂苷 C 也被发现在 HepG2.2.15 细胞中对病毒复制具有较好的抑制作用，进一步机制研究表明柴胡皂苷 C 可以通过促进白细胞介素（IL）-6 分泌来调控肝细胞核因子 1 $\alpha$ （HNF1 $\alpha$ ）和肝细胞核因子 4 $\alpha$ （HNF4 $\alpha$ ）的蛋白表达，抑制病毒启动子，阻断 HBV 转录过程，以降低 HBV RNA 的水平<sup>[14]</sup>。

具有抗病毒作用的中药复方及中药活性成分的汇总情况见表 1。

表 1 具有抗病毒作用的中药复方及中药活性成分

Tab 1 TCM compounds and active components with antiviral activity

类别	名称	复方组成或来源	通路及作用机制	文献
中药复方	灵猫方提取物	黄芪、女贞子、仙灵脾、猫爪草、胡黄连、醋青皮	促进干扰素和干扰素效应蛋白的表达；抑制自噬相关蛋白的表达	[5]
	白花香莲解毒颗粒	白花蛇舌草、三叶香茶菜、黄花倒水莲、排钱草	增强 miR-122 的表达来抑制 HBV 复制活性	[8]
中药活性成分	五味子丙素	五味子	促进 STING 与 TBK1 的相互作用，激活 STING 通路	[9]
	当药黄素	鸢尾	抑制 HBV 复制	
	土荆皮乙酸	土荆皮	诱导细胞周期阻滞，增加细胞凋亡	[11]
	牛防风素	平卧黄芩	增加 HBx 蛋白降解，降低 cccDNA 的转录水平	[12]
	黄芪甲苷	黄芪	抑制 MTIF2 和 RPL10 表达	[13]
	柴胡皂苷 C	柴胡	调控 HNF1 $\alpha$ 和 HNF4 $\alpha$ ，阻断 HBV 转录过程	[14]

### 2 调节机体免疫

肝炎病毒入侵机体后诱发的过度免疫应答和

炎症反应是造成肝脏细胞损伤和功能失衡的重要因素。近年来研究表明，靶向机体免疫系统，通



过免疫调节，增强机体的抗炎功能可能是治疗病毒性肝炎的有效手段之一。中医药以调理身体素质，强化人体功能见长，在系统性改善机体免疫功能抗病毒性肝炎方面具有重要优势。

### 2.1 中药复方

黄虎方对 HBV 模型小鼠有明显的治疗作用，给予黄虎方处理后，小鼠肝组织及血清中 HBsAg 以及 HBV DNA 数量显著降低，这可能与黄虎方上调 TBK1 和干扰素调节因子 7 (IRF7) 水平，增强 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  表达有关<sup>[15]</sup>。临床发现小柴胡汤可以逆转 HBV 患者血清中异常的 T 细胞亚群，并增加调节性 T 细胞 (Treg) 数量，促进相关调节因子 IL-10、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 的分泌，减少辅助性 T 细胞 (Th) 17 数量，降低 IL-17 和 IL-23 的表达<sup>[16]</sup>。小柴胡汤处理 HCV 感染的小鼠及细胞后，T 淋巴细胞增殖也明显增多，提示小柴胡汤可能能够通过调节免疫细胞改善 HCV 与 HBV 的合并感染<sup>[17]</sup>。补肾方与恩替卡韦联合用药治疗可显著下调 CHB 患者血清 HBsAg 和 HBeAg 的水平，分析发现补肾方处理可以增加患者体内 Th1 和树突状细胞 (DC) 的细胞数量，减少 Treg 细胞，并下调 DC 细胞上的细胞程序性死亡-配体 1 (PD-L1) 的水平。表明补肾方能够通过调节免疫细胞亚群，增强 CHB 患者免疫功能，从而解决恩替卡韦应答不全的问题<sup>[18]</sup>。此外，有研究报道芪术汤提取物干预能显著抑制感染 HBV 小鼠的核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路，下调肿瘤坏死因

子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 IL-1 $\beta$  的表达，进而抑制 HBV 复制，降低 HBsAg 和 HBeAg 水平<sup>[19]</sup>。

### 2.2 中药活性成分

大量研究证实甘草提取物及活性成分具有免疫调节作用。其中甘草素可以显著抑制刀豆蛋白 A 诱导的急性肝炎小鼠肝脏中自然杀伤 T 细胞 (NKT) 和 Th17 细胞的激活，导致 IL-17 表达下调，同时诱导髓样细胞 Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> 亚群的增加来促进 IL-25 的表达上调，从而抑制病毒性肝炎引起的过度免疫反应，减轻肝损伤<sup>[20]</sup>。而甘草酸则能通过抑制小鼠肝炎病毒 (MHV) -A59 毒株感染模型小鼠的高迁移率族蛋白 B (HMGB) 和 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路，减少 IL-17 和 IL-22 水平，促进 IL-25 的产生，显著改善急性病毒性肝炎引起的肝损伤<sup>[21]</sup>。研究发现，丹参多糖可以通过抑制 TLR4/髓样分化因子 88 (MyD88) 通路和 NF- $\kappa$ B 通路的激活，进而减少 C-X-C 基序趋化因子 10 (CXCL-10)、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的合成与释放，明显减轻急性肝损伤小鼠的肝细胞坏死和炎症细胞浸润<sup>[22]</sup>。苦杏仁苷被报道可以抑制 HBV 相关肝癌的进展，体外实验证明苦杏仁苷可以恢复 HBV 患者来源的 T 细胞活力，促进 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的产生，进而诱导 HepG2.2.15 细胞凋亡，表明苦杏仁苷可以通过 T 细胞介导的免疫细胞调节在 HBV 相关肝癌的发展中发挥作用<sup>[23]</sup>。

具有免疫调节作用的中药复方及中药活性成分的汇总情况见表 2。

表 2 具有免疫调节作用的中药复方及中药活性成分

Tab 2 TCM compounds and active components with immunoregulation effect

类别	名称	复方组成或来源	通路及作用机制	参考文献
中药复方	黄虎方	虎杖、扯根菜、龙芽草、叶下珠、苦参、郁金、薏苡仁、猪苓	上调 TBK1 和 IRF7 水平，增强 IFN- $\alpha$ 和 IFN- $\beta$ 表达	[15]
	小柴胡汤	柴胡、黄芩、人参、半夏、炙甘草、生姜、大枣	增加 Treg、IL-10、TGF- $\beta$ 1；减少 Th17、IL-17、IL-23；促进 T 淋巴细胞增殖	[16-17]
	补肾方	巴戟天、肉苁蓉、枸杞子、生地、苦参、青皮、田三七	增加 Th1 和 DC 细胞数量，减少 Treg 细胞，下调 DC 细胞上的 PD-L1 水平	[18]
	芪术汤	黄芪、白术、莢术、丹参、桃仁、茵陈、郁金、北豆根、柴胡、甘草	抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路，下调 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的表达	[19]
中药活性成分	甘草素	甘草	抑制 NKT 细胞和 Th17 细胞的激活，下调 IL-17，上调 IL-25	[20]
	甘草酸	甘草	抑制小鼠 HMGB 和 TLR4 信号通路，减少 IL-17 和 IL-22 水平，促进 IL-25 的产生	[21]
	丹参多糖	丹参	抑制 TLR4/MyD88 通路和 NF- $\kappa$ B 通路的激活，减少 CXCL-10、TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的合成与释放	[22]
	苦杏仁苷	苦杏仁	恢复 T 细胞活力，促进 IFN- $\gamma$ 和 TNF- $\alpha$ 的产生	[23]

### 3 保肝降酶

在我国，原发性肝癌致死率居于恶性肿瘤致死的第二位，而乙型肝炎是原发性肝癌的主要致病因素<sup>[24]</sup>。有研究表明，通过治疗维持血清中谷丙转氨酶 (ALT) 等转氨酶的正常水平，能够显

著降低原发性肝癌的发生率<sup>[25]</sup>。因此，保护肝脏功能，减轻 HBV 引发的肝酶水平失调，对于降低 HBV 的进一步发展和恶化具有重要意义。近几年，临床上将保护和提高患者自身肝胆功能视为治疗 HBV 的不可或缺的环节。中药在保肝降

酶、利胆退黄等方面具有明显优势，临床常用中成药有五灵丸（组成为柴胡、灵芝、丹参、五味子）、甘草酸二铵（甘草酸的 18 $\alpha$ - 立体异构体的二铵盐）肠溶胶囊和当飞利肝宁胶囊（组成为水飞蓟、当药）等<sup>[26]</sup>，这些中药制剂与抗病毒药物联合使用对乙型肝炎患者的治疗及预后都具有一定的改善效果。因此，深入研究具有保肝降酶功效相关中药的作用机制，有助于进一步开发药效显著、安全性高、作用机制及活性成分明确的新型护肝降酶中药制剂。

### 3.1 中药复方

用小柴胡汤含药血清处理 HepG2.2.15 细胞能够显著降低 HBsAg 的表达，并上调信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 的表达水平，表明小柴胡汤能够通过调节 Janus 激酶 2 (JAK2) /STAT3 信号通路来促进肝细胞增殖和再生，延缓 HBV 发展<sup>[27]</sup>。龙柴方可以增强恩替卡韦对乙型肝炎的治疗作用，实验结果发现，与单独使用恩替卡韦组相比，加入龙柴方可以有效下调胞内磷脂酰肌醇激酶 / 丝氨酸 / 苏氨酸激酶 (PI3K/Akt) 信号通路相关蛋白的表达，降低 P-糖蛋白水平，增加磷酸酶张力蛋白同源物 (PTEN) 含量，显著改善了肝细胞的代谢功能失衡<sup>[28]</sup>。Xu 等<sup>[29]</sup> 观察到茵陈蒿汤能够明显降低肝脏损伤小鼠血清 ALT 和谷草转氨酶 (AST)。结合网络药理学发现，茵陈蒿汤可以通过上调法尼醇 X 受体 (FXR) 和载脂蛋白 A1 (APOA1) 在 RNA 和蛋白水平上的表达来调节脂质代谢，恢复小鼠肝功能。此外，茵陈蒿汤还可以通过沉默调节蛋白 1/AMP 依赖的蛋白激酶 (SIRT1/AMPK) 信号通路来调控大鼠肝脏的抗氧化应激能力和脂代谢稳态，改

善急性肝损伤，保护肝脏功能<sup>[30]</sup>。

### 3.2 中药活性成分

水飞蓟素具有显著的保肝降酶作用，对药物性急性肝损伤、肝纤维化、酒精性及非酒精性脂肪肝病等有明显的改善作用。水飞蓟素制剂在临床中与恩替卡韦等抗病毒药物联合使用具有明显的治疗效果，可有效改善肝功能，减少不良反应的发生<sup>[31-32]</sup>。研究发现，水飞蓟素主要通过调控内质网应激、减少脂质过氧化、抑制脂质合成等方面发挥肝保护作用<sup>[33]</sup>。甘草酸二铵肠溶胶囊多用于病毒性肝炎的联合用药治疗，比起常规治疗能更有效地改善肝功能，降低 ALT、AST 和胆红素 (TBil) 等水平，提高总有效率<sup>[34]</sup>。作用机制上，甘草酸二铵可以上调核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 和谷胱甘肽半胱氨酸连接酶催化亚基 (GCLC)，降低氧化应激水平，从而改善小鼠肝损伤<sup>[35]</sup>。黄芩苷可促进肝损伤小鼠的肝脏再生。经黄芩苷处理的小鼠肝脏增殖细胞核抗原 (PCNA) 和细胞周期素 D1 (cyclinD1) 表达增多，可能与黄芩苷激活肝脏中核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)，进而诱导 IL-18 表达上调，促进肝细胞增殖相关<sup>[36]</sup>。研究表明五味子具有明显的保肝功能。作为五味子活性成分之一，五味子醇乙可以激活孕烷 X 受体 (PXR) 和 Yes 相关蛋白 (YAP) 信号通路，显著提高肝细胞增殖能力，促进肝脏再生，改善肝脏功能<sup>[37]</sup>。

具有保肝降酶作用的中药复方及中药活性成分的汇总情况见表 3。

## 4 抗纤维化

肝纤维化处于乙型肝炎向肝硬化和肝癌发展

表 3 具有保肝降酶作用的中药复方及中药活性成分

Tab 3 TCM compounds and active components with hepatoprotection effect

类别	名称	复方组成或来源	通路及作用机制	文献
中药复方	小柴胡汤	柴胡、黄芩、人参、半夏、炙甘草、生姜、大枣	调节 JAK2/STAT3 信号通路，促进肝细胞增殖和再生	[27]
	龙柴方	龙葵、柴胡、白花蛇舌草、垂盆草、女贞子、焦栀子、生甘草	下调 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达，降低 P-糖蛋白水平，增加 PTEN 含量	[28]
	茵陈蒿汤	茵陈、栀子、大黄	上调 FXR 和 APOA1 的表达；调控 SIRT1/AMPK 信号通路，调节氧化应激和脂代谢稳态	[29-30]
中药活性成分	水飞蓟素	水飞蓟	增加肝糖原、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性	[31-33]
	甘草酸二铵	甘草	上调 Nrf2、HO-1 和 GCLC 的表达，降低氧化应激水平	[35]
	黄芩苷	黄芩	诱导 Nrf2 的积累，上调 IL-18 表达，上调 PCNA 和 cyclinD1 表达，提高肝细胞增殖能力	[36]
	五味子醇乙	五味子	激活 PXR 和 YAP 信号通路，促进肝细胞增殖	[37]

的初期阶段。改善肝脏纤维化，延缓乙型肝炎的进一步恶化已成为当下防治乙型肝炎相关肝癌发生的重要方向之一。目前仍缺乏有效的抗纤维化化学药物，临床上多使用中药制剂，如复方苦参注射液（主要成分为苦参碱）、逍遥丸（散）、异

甘草酸镁注射液（主要成分为异甘草酸镁）等予以治疗，且效果明显<sup>[26]</sup>。因此，深入探究中药活性成分抗纤维化的作用机制，开发高效安全的抗纤维化药物，对于防治病毒性肝炎新药的研发和临床治疗都具有重要意义。



#### 4.1 中药复方

研究表明,对乙型肝炎患者给予茵陈蒿汤治疗可以明显减轻 HBV 相关肝纤维化<sup>[38-39]</sup>。茵陈蒿汤可以通过上调 Takeda G 蛋白偶联受体 5 (TGR5) 和 FXR 的表达,抑制 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平,改善大鼠的纤维化程度,减轻肝损伤。作用机制分析发现,茵陈蒿汤能够通过调控 TNF、PI3K/Akt 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路促进肝星状细胞 (HSCs) 的凋亡,同时减少肝实质细胞的损伤,减轻肝纤维化程度<sup>[40]</sup>。实验发现高剂量的逍遥散给药可有效降低肝纤维化大鼠肝纤维化指标。肝脏转录组学分析表明,逍遥散治疗可以显著降低肝纤维化大鼠肝脏 Smad3 和 Akt 的磷酸化水平,可能通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 Akt/FoxO 信号通路来抑制肝纤维化<sup>[41]</sup>。临床试验表明,抗纤软肝颗粒可以增强恩替卡韦对 CHB 相关肝纤维化的消退效果,进一步降低肝细胞癌 (HCC) 发生的风险<sup>[42]</sup>。抗纤软肝颗粒对肝纤维化的治疗作用可能是通过下调 Hedgehog 通路中核转录因子 Gli1 水平,以及调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制 HSCs 活化来实现的<sup>[43-44]</sup>。此外,复方苦参注射液也被证实具有良好的抗纤维化作用,并能有效降低肝癌的发生风险。机制研究发现,复方苦参注射液可以促进 Smad7 与 TGF- $\beta$  受体的相互作用,下调 TGF $\beta$ R1 表达,并抑制活化 HSCs 中 TGF- $\beta$ /Smad2/3 信号传导,进而阻断细胞外基质的积累,抑制慢性肝纤维化发展,最终减少肝癌的发生风险<sup>[45]</sup>。

#### 4.2 中药活性成分

HSCs 的活化和增殖是肝脏纤维化进程的重要起始。Lang 等<sup>[46]</sup>的实验结果显示,经红景天苷处理后的肝纤维化小鼠肝细胞外泌体中 miR-146a-5p 增多,miR-146a-5p 能够通过抑制真核翻译起始因子 2 $\alpha$  亚基 (EIF5A2) 和上皮-间充质转化过程来诱导 HSCs 的失活。甘草的活性成分甘草酸与异甘草素均被证明可以有效减轻肝纤维化,甘草酸主要通过调控 CUG 结合蛋白 1 (CUGBP1) 介导的 IFN- $\gamma$ /STAT1/Smad7 信号通路来抑制 HSCs 的活化<sup>[47]</sup>,而异甘草素则通过上调微囊蛋白 1 (caveolin-1) 表达来增加铁内流,减少铁的储存和输出,从而诱导 HSCs 的铁死亡<sup>[48]</sup>。作为第四代甘草酸制剂,异甘草酸镁注射液多用于病毒性肝炎相关肝纤维化的治疗<sup>[49]</sup>。异甘草酸镁改善 HBV 相关肝纤维化的机制研究表明,其可以上调 HO-1 的表达,促进铁和脂质过氧化物的积累,诱导 HSCs 铁死亡,降低肝脏纤维化水平<sup>[50]</sup>。研究发现,姜黄醇也能够诱导活化的 HSCs 发生铁死亡。它可以通过增强 HSCs 自噬来介导核受体共激活因子 4 (NCOA4) 和铁蛋白 (FTH1) 复合物的降解,从而促进铁离子的释放,引起铁过载,最终导致 HSCs 铁死亡的发生<sup>[51]</sup>。此外,丹酚酸 A 被发现对小鼠的肝纤维化也具有明显的改善作用,其通过调节 Nrf2/HO-1、NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38 MAPK 和 JAK1/STAT3 信号通路,抑制炎症和氧化应激,从而减轻小鼠肝纤维化<sup>[52]</sup>。

具有抗纤维化作用的中药复方及中药活性成分的汇总情况见表 4。

表 4 具有抗纤维化作用的中药复方及中药活性成分

Tab 4 TCM compounds and active components with anti-fibrosis activity

类别	名称	复方组成或来源	通路及作用机制	文献
中药复方	茵陈蒿汤	茵陈、栀子、大黄	调控 TNF、PI3K/Akt 和 MAPK 等信号通路,促进 HSCs 的凋亡	[40]
	逍遥散	甘草、当归、茯苓、白芍、白术、柴胡	调控 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 Akt/FoxO 信号通路,抑制 Smad3 和 Akt 的磷酸化	[41]
	抗纤软肝颗粒	海藻、鳖甲、生牡蛎、莪术、生山楂、地骷髅、丹参	下调 Hedgehog 通路中 Gli1 水平,调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制 HSCs 活化	[43-44]
	复方苦参注射液	苦参、白土苓	调节 Smad7 与 TGF- $\beta$ 1 的相互作用,阻断细胞外基质积累	[45]
中药活性成分	红景天苷	红景天	增加外泌体 miR-146a-5p 的分泌,抑制 EIF5A2 和上皮-间充质转化	[46]
	甘草酸	甘草	调控 CUGBP1 介导的 IFN- $\gamma$ /STAT1/Smad7 信号通路,抑制 HSCs 活化	[47]
	异甘草素	甘草	增加铁内流,减少铁的储存和输出,诱导 HSCs 发生铁死亡	[48]
	异甘草酸镁	甘草	上调 HO-1 表达,诱导 HSCs 发生铁死亡	[50]
	姜黄醇	姜黄	降解 NCOA4 和 FTH1 复合物,释放铁离子,引起铁过载,发生铁死亡	[51]
	丹酚酸 A	丹参	调节 Nrf2/HO-1、NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38 MAPK 和 JAK1/STAT3 信号通路	[52]

#### 5 讨论

近年来给予疫苗干预和及时诊断治疗后,全球罹患乙型肝炎的患者数量增长率明显下降,但距离实现 WHO 肝炎进展报告提出的 2030 年的目标还有一定距离<sup>[1]</sup>。当前,临床上针对乙型肝炎

主要还是以抗病毒药物治疗为主,但这些药物长期使用存在着诱发肝损伤、易产生耐药性以及停药后易复发等不足,因此,迫切需要找到新的药物治疗乙型肝炎并减轻单纯抗病毒药物使用引发的不良反应。



我国传统医学在治疗黄疸等肝脏疾病方面已有千余年的历史,特别是在对乙型肝炎的治疗上具有独特的治疗思路。近年来研究发现某些中药方剂或中药活性成分可以明显改善乙型肝炎患者的病理状况,且中药制剂与抗病毒药物联合用药能够取得更好的治疗效果。最新药理研究表明这些中药及其有效组分往往具有免疫调节、抗病毒、保肝降酶或减轻肝纤维化等药理学功能。其中,调节免疫、保肝降酶及抗纤维化可能是中医药治疗乙型肝炎的重要治疗环节和优势作用方面。如在免疫调节上,甘草等中药制剂可作用于固有免疫或特异性免疫途径,通过调节 Kuffer 细胞、NK 细胞或 Treg 细胞等免疫细胞,抑制过度炎症反应或调节基础免疫功能,从而有效改善肝脏炎症反应,减轻肝损伤。此外,部分中药及有效组分还兼具多重功效,在抗病毒的同时又能护肝降酶或抑制纤维化,弥补了单一性抗病毒类药物在治疗乙型肝炎及其并发症上的不足,有效提高了临床治疗效果。如茵陈蒿汤、甘草及水飞蓟制剂等能够通过促进肝细胞增殖、抑制 HSCs 活化等作用,恢复正常的肝酶水平,改善 HBV 相关的肝纤维化。因此,在 HBV 的不同病程阶段,可根据病症适时更换或加减中药组成,进而充分发挥中药的独特药效优势。

然而,目前关于中药治疗 HBV 的研究仍存在一些不足。目前用于 HBV 治疗的中药复方多停留在临床试验及疗效观察阶段,基础研究还不充分,有效组分、作用机制等仍待进一步探究。此外,防治 HBV 的中药缺乏完整系统的有效组分及作用机制研究,且动物实验中筛选出的有效成分应用于临床的治疗效果及安全性还不明确。相信随着非化学修饰药物靶点发现技术等现代技术的发展以及临床研究的深入,中药及其有效组分改善 HBV 的相关功效和机制将更加清晰明确,从而进一步推动新型 HBV 临床治疗药物的发现和中医药诊疗方案的完善。

## 参考文献

- [1] 崔富强, 庄辉. 解读《2021 年艾滋病病毒、病毒性肝炎和性传播感染全球进展报告》: 消除病毒性肝炎进展 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2021, 13 (10): 1-4.
- [2] 朱萍. 慢性乙型肝炎患者该如何抗病毒治疗 [J]. 肝博士, 2020 (2): 41-42.
- [3] You H, Wang FS, Li TS, et al. Guidelines for the prevention and treatment of chronic hepatitis B (version 2022) [J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11 (6): 1425-1442.
- [4] 高月求. 中医药治疗慢性乙型肝炎的困境与出路 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29 (3): 201-202.
- [5] 张雪. 灵猫方体外调节 HepG2 细胞的干扰素表达和自噬抗 HBV 的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [6] Tabar ALR, Sharifi Z, Pourfathollah AA. Correlation of serum microRNA-122 level with the levels of alanine aminotransferase and HBV-DNA in chronic HBV-infected patients [J]. Med J Islam Repub Iran, 2021, 35: 137.
- [7] Yang HL, Rui FJ, Li R, et al. ADAR1 inhibits HBV DNA replication via regulating miR-122-5p in palmitic acid treated HepG2.2.15 cells [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2022, 15: 4035-4047.
- [8] 朱玖霜, 邱华, 李旺, 等. 白花香莲解毒颗粒调控 miR-122 对 HepGA14 细胞表达 HBV 标志物活性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34 (4): 822-824.
- [9] Zhao J, Xu G, Hou XR, et al. Schisandrin C enhances cGAS-STING pathway activation and inhibits HBV replication [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 311: 116427.
- [10] Xu HY, Ren JH, Su Y, et al. Anti-hepatitis B virus activity of swertisin isolated from *Iris tectorum* Maxim [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 257: 112787.
- [11] Yu JH, Wang ZY, Ren PY, et al. Pseudolaric acid B inhibits the secretion of hepatitis B virus [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (1): 519-525.
- [12] Ren F, Hu JC, Dang YJ, et al. Sphondin efficiently blocks HBsAg production and cccDNA transcription through promoting HBx degradation [J]. J Med Virol, 2023, 95 (3): e28578.
- [13] 常凯, 王艳艳, 那琬琳, 等. 黄芪甲苷通过调控宿主核糖体翻译开关抑制 HBV 复制的机制 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38 (7): 1495-1502.
- [14] Pan YC, Ke ZY, Ye H, et al. Saikosaponin C exerts anti-HBV effects by attenuating HNF1alpha and HNF4alpha expression to suppress HBV pgRNA synthesis [J]. Inflamm Res, 2019, 68 (12): 1025-1034.
- [15] 廖婷婷, 黄群, 张传涛, 等. 黄虎方对 HBV 转基因小鼠病毒复制及 TKB1-IRF7-IFN $\alpha/\beta$  通路的影响 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43 (12): 1574-1577.
- [16] 宋银芳, 赫伟丽, 韩安晖. 基于 Th17/Treg 细胞失衡探讨小柴胡汤治疗慢性乙肝的机制 [J]. 世界中医药, 2020, 15 (17): 2593-2597.
- [17] 田昆仑, 杨志华, 苏娟, 等. 小柴胡汤抗丙型肝炎病毒机制的实验研究 [J]. 当代医学, 2021, 27 (4): 68-70.
- [18] Ji LS, Gao QT, Guo RW, et al. Immunomodulatory effects of combination therapy with Bushen formula plus entecavir for chronic hepatitis B patients [J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 8983903.
- [19] Wan LF, Shen JJ, Wang YH, et al. Extracts of Qizhu decoction inhibit hepatitis and hepatocellular carcinoma in vitro and in C57BL/6 mice by suppressing NF-kappaB signaling [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 1415.
- [20] Zhang YY, Li LY, Qi C, et al. Glycyrrhizin alleviates Con A-induced hepatitis by differentially regulating the production of IL-17 and IL-25 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110: 692-699.
- [21] Shi XD, Yu LJ, Zhang YL, et al. Glycyrrhetic acid alleviates hepatic inflammation injury in viral hepatitis disease via a HMGB1-TLR4 signaling pathway [J]. Int Immunophar

- macol, 2020, 84: 106578.
- [22] Wang X, Han C, Qin JJ, et al. Pretreatment with *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides protects from lipopolysaccharides/d-galactosamine-induced liver injury in mice through inhibiting TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, 39 (8): 495-505.
- [23] Wang R, Zhang D, Sun K, et al. Amygdalin promotes the activity of T cells to suppress the progression of HBV-related hepatocellular carcinoma via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21 (1): 56.
- [24] 杨猛, 浦润. 乙肝相关性肝癌发生机制的研究进展 [J]. *右江医学*, 2022, 50 (8): 561-565.
- [25] Wong GL, Chan HL, Tse YK, et al. Normal on-treatment ALT during antiviral treatment is associated with a lower risk of hepatic events in patients with chronic hepatitis B [J]. *J Hepatol*, 2018, 69 (4): 793-802.
- [26] 慢性乙型肝炎中医诊疗指南 (2018 年版) [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2019, 29 (1): 97-102.
- [27] Chen S, Wang Z, Wan S, et al. Effect of modified Xiaochaihu decoction-containing serum on HepG2.2.15 cells via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (5): 7416-7422.
- [28] 郑雪, 严展鹏, 李堃, 等. 龙柴方含药血清联合恩替卡韦对 HepG2.2.15 肝癌细胞中 P-糖蛋白和 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2022, 63 (23): 2272-2278.
- [29] Xu L, Cui HL. Yinchenhao Tang alleviates high fat diet induced NAFLD by increasing NR1H4 and APOA1 expression [J]. *J Tradit Complement Med*, 2023, 13 (4): 325-336.
- [30] 杨焘, 宋厚盼, 陈哲, 等. 基于 SIRT1/AMPK 信号通路探讨茵陈蒿汤治疗急性酒精性肝损伤的效应及机制 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38 (1): 36-40.
- [31] 林锦清, 林伟国. 替卡韦联合水飞蓟素葡甲胺对慢性乙型肝炎合并非酒精性脂肪性肝病者肝功能指标的影响 [J]. *黑龙江医药*, 2023, 36 (1): 134-136.
- [32] 孙翠琴. 恩替卡韦与水飞蓟素联合治疗慢性乙型肝炎患者的疗效 [J]. *当代临床医刊*, 2023, 36 (3): 50-51.
- [33] Sahin E, Bagci R, Bektur AN, et al. Silymarin attenuated nonalcoholic fatty liver disease through the regulation of endoplasmic reticulum stress proteins GRP78 and XBP-1 in mice [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44 (6): e13194.
- [34] 蔡建民. 甘草酸二铵联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的临床效果 [J]. *临床合理用药*, 2023, 16 (29): 98-101.
- [35] 段丽杰, 王立新. 甘草酸二铵对四氯化碳诱导肝纤维化模型小鼠氧化应激损伤的保护作用 [J]. *天津药学*, 2022, 34 (1): 1-7.
- [36] Shi L, Zhang SB, Huang ZL, et al. Baicalin promotes liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury by inducing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 163-177.
- [37] Zhao YY, Yao XP, Jiao TY, et al. Schisandrol B promotes liver enlargement via activation of PXR and YAP pathways in mice [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153520.
- [38] 杨庆宇, 赵松伟. 茵陈蒿汤应用于慢性乙型病毒性肝炎的效果观察 [J]. *实用中西医结合临床*, 2021, 21 (10): 11-12.
- [39] 黄勇, 陈玲, 饶娟, 等. 加味茵陈蒿汤联合西药治疗对慢性乙型肝炎胆湿热证患者肝功能的影响 [J]. *当代医学*, 2021, 27 (22): 143-145.
- [40] Cai FF, Bian YQ, Wu R, et al. Yinchenhao decoction suppresses rat liver fibrosis involved in an apoptosis regulation mechanism based on network pharmacology and transcriptomic analysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108863.
- [41] Zhou Y, Wu R, Cai FF, et al. Xiaoyaosan decoction alleviated rat liver fibrosis via the TGFbeta/Smad and Akt/FoxO3 signaling pathways based on network pharmacology analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113021.
- [42] 徐俊, 戚璐, 周涛, 等. 从肠道菌群探讨抗纤软肝颗粒防治慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2021, 31 (9): 776-780.
- [43] 张爽, 江诗怡, 高翔, 等. 抗纤软肝颗粒对肝纤维化大鼠 Hedgehog 通路核转录因子 Gli1 的影响 [J]. *中西医结合研究*, 2023, 15 (1): 24-29.
- [44] 徐俊, 戚璐, 郑新平, 等. 抗纤软肝颗粒对肝纤维化小鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的作用 [J]. *中医药导报*, 2020, 26 (14): 4-8.
- [45] Yang Y, Sun MY, Li WD, et al. Rebalancing TGF-beta/Smad7 signaling via compound Kushen injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11 (7): e410.
- [46] Lang ZC, Li YF, Lin LF, et al. Hepatocyte-derived exosomal miR-146a-5p inhibits hepatic stellate cell EMT process: a crosstalk between hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 (1): 304.
- [47] Guo MM, Wang ZD, Dai JY, et al. Glycyrrhizic acid alleviates liver fibrosis in vitro and in vivo via activating CUGBP1-mediated IFN-gamma/STAT1/Smad7 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154587.
- [48] Huang S, Wang YH, Xie SW, et al. Isoliquiritigenin alleviates liver fibrosis through caveolin-1-mediated hepatic stellate cells ferroptosis in zebrafish and mice [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154117.
- [49] 吕新建, 石贵福, 王学群. 异甘草酸镁注射液联合还原型谷胱甘肽治疗慢性病毒性肝炎的效果观察 [J]. *实用中西医结合临床*, 2022, 22 (20): 9-11.
- [50] Sui M, Jiang XF, Chen J, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 125-133.
- [51] Zheng Y, Zhao TJ, Wang JR, et al. Curcumol alleviates liver fibrosis through inducing autophagy and ferroptosis in hepatic stellate cells [J]. *FASEB J*, 2022, 36 (12): e22665.
- [52] Li SN, Wang R, Song FX, et al. Salvianolic acid A suppresses CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis through regulating the Nrf2/HO-1, NF-kappaB/IkappaBalpha, p38 MAPK, and JAK1/STAT3 signaling pathways [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2023, 46 (2): 304-313.

(收稿日期: 2023-09-20; 修回日期: 2023-11-15)

# 基于真实世界数据的药品临床综合评价研究进展

程瑶瑶<sup>1, 2</sup>, 宋沧桑<sup>1, 2\*</sup>, 李兴德<sup>1, 2</sup>, 刘璐<sup>2</sup>, 邓雨琴<sup>2</sup>, 毛盼盼<sup>2</sup> (1. 昆明医科大学附属甘美医院, 昆明 650000; 2. 昆明市第一人民医院药学部, 昆明 650000)

**摘要:** 高质量的真实世界研究是药品临床综合评价的重要证据来源。目前我国基于真实世界数据的临床综合评价仍然较少, 医疗卫生机构应当从临床实际用药需求出发, 充分利用真实世界数据, 积极开展药品临床综合评价工作。基于此, 本文结合指南和相关文献, 汇总基于真实世界数据开展的临床综合评价, 并梳理其评价方法, 旨在为开展基于真实世界数据的药品临床综合评价提供参考。

**关键词:** 药品临床综合评价; 真实世界研究; 真实世界数据; 文献回顾

**中图分类号:** R95      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0473-04  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.030

## Research progress in clinical comprehensive drug evaluation based on real world data

CHENG Yao-yao<sup>1, 2</sup>, SONG Cang-sang<sup>1, 2\*</sup>, LI Xing-de<sup>1, 2</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>, DENG Yu-qin<sup>2</sup>, MAO Pan-pan<sup>2</sup> (1. Calmette Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650000; 2. Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650000)

**Abstract:** High-quality real world research is an important source of evidence for clinical comprehensive drug evaluation. At present, there are still few clinical comprehensive evaluations based on real world data in China. Hospitals and healthcare institutions should consider the actual clinical drug needs, make use of real world data to actively conduct clinical comprehensive drug evaluation. This paper combined guidelines and relevant literatures to summarize clinical comprehensive evaluation and evaluation methods based on real world data.

**Key words:** clinical comprehensive drug evaluation; real world research; real world data; literature review

近年来, 为提高药事服务质量, 保障临床基本用药的供应与合理使用, 国家卫生健康委发布多项政策性文件, 鼓励医疗卫生机构组织开展药品临床综合评价工作<sup>[1-2]</sup>。2020年发布的《药品临床综合评价管理指南》(简称“管理指南”), 提出应当充分利用真实世界数据 (real world data, RWD), 在恰当、准确的分析后, 形成真实世界证据 (real world evidence, RWE), 进行药品临床综合评价<sup>[2]</sup>。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, 高质量的RWE是形成综合评价结果的重要前提。基于此, 本文结合指南和相关文献, 汇总基于RWD开展的临床

综合评价, 并梳理其评价方法, 旨在为开展基于RWD的药品临床综合评价时提供参考。

### 1 药品临床综合评价

药品临床综合评价是近年来我国兴起的一个新概念, 与卫生技术评估 (healthcare technology assessment, HTA) 均是对选定的评价主题, 运用多学科方法, 进行多维度的综合评判。在评价方法上两者较为一致, 均可通过现有的定性或定量证据进行评价, 当证据缺乏、相互矛盾或过于不确定时, 可收集高质量数据进行原始研究<sup>[3]</sup>。与药品临床综合评价不同的是, HTA不局限于对药品的评价, 还涉及医疗器械、诊疗和康复手段

**基金项目:** 云南省临床药学中心建设项目; 云南省卫生健康委员会医学领军人才培养项目 (No. L-2018012); 昆明市医学科技领军人才培养项目 [No. 2023-SW (领军)-04]。

**作者简介:** 程瑶瑶, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1812432577@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



等<sup>[4]</sup>。此外,评价维度上也有差别,管理指南推荐从安全性、有效性、经济性、适宜性、创新性、可及性六个维度开展药品临床综合评价;HTA 的评价维度则更广泛,包括安全性、有效性、经济性、通用性、可接受性、可行性、伦理、可负担性及依从性等<sup>[5]</sup>。HTA 在欧美国家的发展较早,目前评价方法和技术都较为成熟,因此研究者在开展药品临床综合评价时可以借鉴<sup>[5]</sup>。

## 2 真实世界研究

在管理指南出台后,相继发布的心血管病、抗肿瘤、儿童药品临床综合评价技术指南(简称“技术指南”)<sup>[6]</sup>,均强调了运用真实世界研究(real world research/study, RWS)进行药品临床综合评价的重要性。RWS 是指针对预设的临床问题,在真实世界环境下收集与研究对象健康有关的数据或基于这些数据衍生的汇总数据(即 RWD),通过分析,获得药物的使用情况及潜在获益-风险的临床证据(即 RWE)的研究过程<sup>[7]</sup>。RWS 逐渐成为国内外科研人员及医务工作者的

研究热点,在卫生保健决策及医疗健康管理等领域发挥着重要作用<sup>[8-9]</sup>。RWS 包括试验性研究和不施加干预措施的观察性研究。前者是实用临床试验,用于评估真实诊疗环境下干预措施的效果<sup>[10]</sup>;后者包括横断面调查、病例对照研究和队列研究等,所使用的数据更接近真实世界,其中队列研究对因果推断的论证强度较高,因此是观察性研究中应用最多的设计类型<sup>[11]</sup>。

## 3 基于 RWD 的药品临床综合评价研究现状

### 3.1 研究现状

笔者以“药品临床综合评价”和各维度为主题在中国知网、万方及 PubMed 等中英文数据库进行检索。发现综合六个维度进行评价的研究占少部分,安全性和有效性的研究居多,其次是经济性,其他三个维度的研究相对欠缺。其中 RWS 占比较少,多数是基于文献的研究。自管理指南发布至今,基于 RWD 且以“临床综合评价”或“综合评价”为题的研究仅有 8 篇,本文对这些文献进行梳理,见表 1。

表 1 基于 RWD 的临床综合评价  
Tab 1 Comprehensive clinical evaluation based on real world data

文献	评价维度	RWS 方法	评价内容	研究结果
曹旺等 <sup>[12]</sup>	安全性、有效性、经济性	单中心回顾性队列研究	达沙替尼治疗儿童费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病	达沙替尼在有效性、经济性方面均优于伊马替尼,且安全性相当
张雪莹 <sup>[13]</sup>	安全性、有效性、经济性、可及性、适宜性	单中心回顾性队列研究	集采中选苯磺酸氨氯地平 and 厄贝沙坦治疗高血压	集采苯磺酸氨氯地平 and 厄贝沙坦与其原研药相比,安全性、有效性和适宜性相当,可及性在不同方面各有优劣,但集采药品更具经济优势
万慕溪等 <sup>[14]</sup>	安全性、有效性、适宜性	单中心回顾性研究	阿奇霉素干混悬剂治疗 0~3 个月婴儿百日咳及类百日咳综合征	阿奇霉素干混悬剂在有效性和适宜性方面优于环酯红霉素干混悬剂,且安全性相当
申芳丽 <sup>[15]</sup>	安全性、有效性、经济性、创新性	单中心回顾性队列研究	罗沙司他治疗慢性肾性贫血	罗沙司他具有较好的安全性、有效性、经济性、创新性
王园惠等 <sup>[16]</sup>	安全性、有效性、经济性、适宜性、创新性、可及性	多中心回顾性研究	阴道用乳杆菌活菌胶囊治疗细菌性阴道病	阴道用乳杆菌活菌胶囊在安全性、经济性、适宜性、创新性和可及性方面均优于乳酸菌阴道胶囊,且两个药在有效性方面相当
耿鑫等 <sup>[17]</sup>	安全性、有效性、经济性、适宜性、社会效益性	多中心回顾性队列研究	贝达喹啉治疗耐药多药结核	贝达喹啉在有效性、安全性及社会效益维度方面优于利奈唑胺,但在经济性和适宜性方面利奈唑胺更优
Wang 等 <sup>[18]</sup>	安全性、有效性、经济性、适宜性、创新性、可及性	单中心回顾性研究	仿制莫西沙星氯化钠注射液(莫可欣)治疗非重症社区获得性肺炎	仿制药和原研莫西沙星氯化钠注射液(百福乐)相比,安全性、有效性、适宜性、创新性和可及性相当,但仿制药更具经济优势
董艳珍 <sup>[19]</sup>	安全性、有效性、经济性、适宜性	多中心回顾性研究	集采注射用头孢曲松治疗细菌感染	集采和原研注射用头孢曲松相比,安全性、有效性、适宜性相当,但集采药品更具经济优势

### 3.2 思考和建议

**3.2.1 合理选择评价维度** 现有研究多是选择部分维度开展药品临床综合,亦有研究评价了指南推荐以外的维度,如耿鑫等<sup>[17]</sup>的研究对象为结核患者,考虑疾病的特殊属性,额外增加了一个维度——社会效益,以传染病控制率作为评价指标。技术指南指出可选择全部或部分进行评价,

因此笔者认为若有必要也可纳入额外的维度,不一定局限于六个维度的评价。维度的选择既要保证全面性又要考虑可实施性,应根据研究目的、研究药品特性、疾病特征以及评价数据的可获得性等因素综合考虑,但必须包含安全性和有效性两个核心维度<sup>[20]</sup>。此外,若不评价某个维度或纳入额外维度,应尽量说明理由。

**3.2.2 推进 RWD 共享平台的建设与发展** RWD 来源广泛,包括但不限于:卫生信息系统、出生死亡及疾病登记系统、药品不良反应/事件监测、患者自报或自评及医学研究队列产生的数据<sup>[7]</sup>。尽管如此,研究者对数据的访问和获取有限,目前基于 RWD 的药品临床综合评价以单中心的回顾性研究为主,这很大程度上与各医疗和/或其他相关专业机构之间数据共享机制缺失有关。加之患者到多家医疗机构就诊的情况在我国普遍存在,诊疗数据的独立和封闭也不利于研究者对其随访。相比之下,一些发达国家的数据共享平台相对完善,且设有中央伦理审查委员会,很大程度上提高了 RWD 的可及性<sup>[9]</sup>。国内医疗大数据的发展尚处于初级阶段,应当借鉴他国经验,结合国内实际情况,推进我国 RWD 共享平台的建设与发展。

**3.2.3 转变数据采集模式** 传统数据采集模式向信息化数据采集模式转变,能够促进 RWD 在药品临床综合评价中的应用。许多数据系统建立的初衷不是为了进行研究,其中储存的数据大多是非结构化的,研究者仅依靠手工采集和整理数据,会耗费大量的人工和时间成本<sup>[21-22]</sup>。而运用自然语言处理和机器学习等信息化采集技术可将非结构化的数据转化为可供研究分析的结构化数据<sup>[21-22]</sup>。晋菲斐等<sup>[23]</sup>对传统人工录入和自然语言处理两种数据采集模式进行了比较,自然语言处理技术在显著缩减了人工和时间成本的同时还保证了数据的准确性。

**3.2.4 充分运用研究分析工具提高 RWS 质量** 在开展基于 RWD 的观察性研究时,常由于数据缺失以及各种偏倚和混杂因素的存在,使得研究结论具有很大的不确定性。这些问题往往无法避免,尤其是回顾性研究,因此应充分运用研究分析工具提高 RWS 质量。数据缺失的处理方法包括完全数据法、成对删除法、单一填补法、基于似然法及多重填补法等,应当根据数据缺失机制和比例选择<sup>[24]</sup>。RWS 中最常见的偏倚包括选择偏倚、观察偏倚、失访偏倚、信息偏倚及回忆偏倚<sup>[25]</sup>。可采用目标试验模拟的方法来控制这些偏倚,将临床随机试验的设计和分析原则应用于观察性研究,即设定严格的纳排标准、治疗分配方案、因果对比、结局测量指标和随访时间,并对基线混杂因素进行控制<sup>[26-27]</sup>。混杂因素是与暴露和结果相关的变量,分为已知和未知的混杂因素。常见的已知混杂因素包括疾病严重程度、共

病和合并用药等,可通过倾向评分匹配、分层分析、多元线性回归模型分析或逆概率加权等统计方法控制<sup>[27-28]</sup>。未知的混杂因素可用敏感性分析(也称偏倚分析)来推断研究结果的稳健性,评估因果关系证据的强度,方法有混杂函数法、边界因子法等<sup>[29-30]</sup>。

**3.2.5 药品综合价值决策分析** 目前基于 RWD 的药品临床综合评价均仅对各评价维度的证据进行了罗列和综合叙述,并未得出综合价值排序。其实在得出各维度证据后,若条件允许还可将证据进行整合分析作出综合判断。多准则决策分析(multi-criteria decision analysis, MCDA)在技术指南中均被提及,是指通过一定的方法,为选择的维度和指标赋予权重,计算综合得分,并形成推荐意见,以帮助研究者在多种准则中对药品的综合价值进行排名<sup>[6]</sup>。指标赋权方法包括层次分析法、德尔菲法、摇摆赋权法、离散选择实验、直接赋权法、MACBETH 及离差最大化法等<sup>[31]</sup>。这些方法各有优劣,因此需要结合评价主题、RWD 的特点和研究目的加以选择。有专家提出采用的方法不同可能会产生不同的结果,故同时选择多种方法可能会更有利于解读结果<sup>[32]</sup>。

董名扬等<sup>[33]</sup>采用问卷调查的方式向专家咨询评价指标体系的意见与建议,再应用层次分析法确定各指标权重,最终成功构建药品临床综合评价指标体系和量化分级。司天梅等<sup>[34]</sup>制订的抗抑郁药品临床综合评价专家共识,采用德尔菲法,经三轮线上会议讨论收集了 18 名临床和药学等领域的专家意见;第一轮会议后确定评价主题、维度和各维度权重,第二轮会议后确定评价指标和权重,第三轮后形成共识。

#### 4 结语

RWS 能为药品临床综合评价提供证据支持,且较单纯的文献研究有不可替代的优势。药品临床综合评价为国家药物政策制定与调整、保障临床基本用药供应与规范使用提供循证证据,因此如何充分利用 RWD 开展药品临床综合评价,更高质量保障人民健康和满足国家药物政策决策需求,是近年来的热点和难点问题。本文结合指南和相关文献,梳理基于 RWD 的药品临床综合评价方法。就现有研究来看,基于 RWD 的临床综合评价仍然较少,且或多或少存在一定的不足。还需研究者尽可能多地开展基于 RWD 的药品临床综合评价,并在实践中总结经验,不断完善评价方法和标准。



## 参考文献

- [1] 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) [2023-11-21]. <http://www.nhc.gov.cn/yaozs/pqt/201904/31149bb1845e4c019a04f30c0d69c2c9.shtml>.
- [2] 国家卫生健康委药政司. 关于药品临床综合评价管理指南公开征求意见的公告 [EB/OL]. (2020-11-04) [2023-11-21]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=d11ddc32fae84121a0dfca36b015a31d>.
- [3] O'Reilly D, Audas R, Campbell K, et al. Evidence-based decision making 3: health technology assessment [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2249: 429-454.
- [4] 王怡, 陈嘉琦, 胡秀静, 等. 不同国家卫生技术评估应用现状及对“健康中国”建设启示 [J]. *中国公共卫生*, 2021, 37(11): 1713-1717.
- [5] 刘雅诗, 卢玫, 李萍萍, 等. 英国和加拿大卫生技术评估报告对中国药品临床综合评价的启示 [J]. *世界临床药物*, 2023, 44(5): 445-450, 520.
- [6] 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) [2023-11-21]. <http://www.nhei.cn/nhei/znfb/202112/9e350a54d2ea4c3ab9a0237ee4eab9f0.shtml>.
- [7] 国家药监局. 国家药监局关于发布真实世界证据支持药物研发与审评的指导原则(试行)的通告(2020年第1号) [EB/OL]. (2020-01-03) [2023-11-21]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtg/20200107151901190.html>.
- [8] Schad F, Thronicke A. Real world evidence-current developments and perspectives [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(16): 10159.
- [9] Xie J, Wu EQ, Wang S, et al. Real world data for health-care research in China: call for actions [J]. *Value Health Reg Issues*, 2022, 27: 72-81.
- [10] 秦雪妮, 陈维生, 邵华, 等. 真实世界研究在医药领域的应用及研究方法 [J]. *药学进展*, 2021, 45(7): 512-523.
- [11] Taur SR. Observational designs for real world evidence studies [J]. *Perspect Clin Res*, 2022, 13(1): 12-16.
- [12] 曹旺, 尉耘翠, 刘璐, 等. 达沙替尼治疗儿童费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病的临床综合评价 [J]. *中国药物评价*, 2021, 38(3): 183-190.
- [13] 张雪莹. 集采苯磺酸氨氯地平 and 厄贝沙坦的临床综合评价 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- [14] 万慕媛, 徐晗, 李岚. 阿奇霉素和红霉素治疗 0~3 个月婴儿百日咳及类百日咳综合征的综合评价研究 [J]. *药品评价*, 2022, 19(23): 1439-1442.
- [15] 申芳丽. 罗沙司他治疗肾性贫血的临床综合评价 [D]. 大理: 大理大学, 2022.
- [16] 王园惠, 林腾飞, 张田甜, 等. 阴道用乳杆菌活菌胶囊治疗细菌性阴道病临床综合评价 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(5): 500-508.
- [17] 耿鑫, 杨莹, 文小桐, 等. 贝达喹啉治疗耐药药结核的临床综合评价: 基于真实世界数据研究 [A]/ 中国防痨协会 2023 年第 34 届全国学术大会暨结核病防治新技术推广应用论坛 [C]. 2023: 220-226.
- [18] Wang HL, Liu HQ, Lou MM, et al. Comprehensive clinical evaluation of moxifloxacin: a retrospective study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(22): e33896.
- [19] 董艳珍. 基于多中心真实世界数据的集采与非集采注射用头孢曲松钠临床综合评价 [D]. 大理: 大理大学, 2023.
- [20] 王舒, 董名扬, 陈朋军, 等. 药品临床综合评价技术方法的质量控制 [J]. *中国药房*, 2023, 34(3): 275-279.
- [21] Adamson B, Waskom M, Blarre A, et al. Approach to machine learning for extraction of real world data variables from electronic health records [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1180962.
- [22] Estevez M, Benedum CM, Jiang C, et al. Considerations for the use of machine learning extracted real world data to support evidence generation: a research-centric evaluation framework [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(13): 3063.
- [23] 晋菲斐, 姚晨, 马军, 等. 高效可行的临床真实世界数据采集模式探索——海南博鳌乐城国际医疗旅游先行区的实践 [J]. *中国食品药品监管*, 2020(11): 21-31.
- [24] 褚建利. 临床研究中分类变量缺失数据处理的统计学方法研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2020.
- [25] Vetter TR, Mascha EJ. Bias, Confounding, and interaction: lions and tigers, and bears, oh my! [J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(3): 1042-1048.
- [26] Liu F, Demosthenes P. Real world data: a brief review of the methods, applications, challenges and opportunities [J]. *BMC Med Res Methodol*, 2022, 22(1): 287.
- [27] Hernán MA, Robins JM. Using big data to emulate a target trial when a randomized trial is not available [J]. *Am J Epidemiol*, 2016, 183(8): 758-764.
- [28] 柏柳安宁, 夏结来, 王陵, 等. 真实世界研究中的常见偏倚及其控制 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(12): 1422-1428.
- [29] Togo K, Yonemoto N. Real world data and data science in medical research: present and future [J]. *Jpn J Stat Data Sci*, 2022, 5(2): 769-781.
- [30] VanderWeele TJ, Ding P. Sensitivity analysis in observational research: introducing the E-value [J]. *Ann Intern Med*, 2017, 167(4): 268-274.
- [31] 聂智峰, 田夏, 汪阳, 等. 药品临床综合评价中 MCDA 赋权方法比较 [J]. *世界临床药物*, 2023, 44(5): 437-444.
- [32] 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.
- [33] 董名扬, 陈朋军, 王舒, 等. 应用层次分析模型构建药品临床综合评价指标体系与量化分级 [J]. *中国药房*, 2023, 34(11): 1298-1301.
- [34] 司天梅, 王振, 李凌江. 抗抑郁药品临床综合评价专家共识 [J]. *中国药房*, 2023, 34(13): 1547-1554.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-12-08)



# miRNAs 对食管癌发生发展的影响及中医药的干预作用

李晨辉<sup>1</sup>, 彭孟凡<sup>2</sup>, 孔小莉<sup>1</sup>, 白明<sup>1\*</sup>, 苗明三<sup>1\*</sup> (1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 黄淮学院, 河南 驻马店 463000)

**摘要:** 食管癌是常见的上消化道恶性肿瘤, 在我国食管癌的总患病数和死亡数占全球的一半, 极大地加重了我国癌症防治及医疗保障体系的负担。食管癌早期发病隐匿、不易察觉, 导致多数患者在确诊时已处于中晚期, 不利于治疗和预后。微小 RNA (miRNAs) 作为新型生物标志物, 在肿瘤的诊断、病情监测和预后评估中发挥着重要作用。近年研究表明, miRNAs 在食管癌微环境的形成, 放化疗抵抗, 肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭、自噬等过程中扮演着抑癌基因和抗癌基因的双重角色, 是食管癌潜在的干预靶点, 具有较高的研究价值和意义。但 miRNAs 在食管癌进展中的作用机制尚不明确, 限制其作为肿瘤标志物应用于食管癌的临床诊断、治疗和预后。基于此, 文章就 miRNAs 在食管癌发生发展中的双重调控机制及中医药干预研究进行系统综述, 旨在明确 miRNAs 如何影响食管癌的发生与发展及潜在治疗策略, 以期为食管癌的临床防治提供新思路。

**关键词:** 食管癌; miRNAs; 调控机制; 肿瘤细胞; 中医药

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0477-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.031

## Impact of miRNAs on the development of esophageal cancer and intervention role of traditional Chinese medicine

LI Chen-hui<sup>1</sup>, PENG Meng-fan<sup>2</sup>, KONG Xiao-li<sup>1</sup>, BAI Ming<sup>1\*</sup>, MIAO Ming-san<sup>1\*</sup> (1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 2. Huanghuai University, Zhumadian Henan 463000)

**Abstract:** Esophageal cancer is a common upper gastrointestinal malignant tumor. The total number of cases and deaths of esophageal cancer accounts for half of the world, greatly increasing the burden of cancer prevention and medical insurance in China. The early onset of esophageal cancer is insidious and hard to detect, resulting in most patients being in the middle and advanced stages at the time of diagnosis, and delayed the treatment and unsatisfactory prognosis. As novel biomarkers, microRNAs (miRNAs) play an important role in tumor diagnosis, disease monitoring, and prognosis assessment. Recent studies have shown that miRNAs play the dual roles of tumor suppressor genes and anti-cancer genes in the formation of esophageal cancer microenvironment, radiotherapy and chemotherapy resistance, cancer cell proliferation, apoptosis, invasion, and autophagy, etc., and are also potential intervention targets for esophageal cancer. However, the mechanism of miRNAs in the progression of esophageal cancer remains unclear, which limits their application as tumor markers in clinical diagnosis, treatment and prognosis of esophageal cancer. This paper systematically reviewed the dual regulatory mechanism of miRNAs in the occurrence and development of esophageal cancer and intervention with traditional Chinese medicine.

**Key words:** esophageal cancer; miRNAs; regulatory mechanism; tumor cell; traditional Chinese medicine

**基金项目:** 岐黄学者 (国中医药人教函 2022-6); 河南省重大公益专项 (No. 201300310100); 国家中医药管理局联合开放课题 (No. GZY-KJS-2022-040-1)。

**作者简介:** 李晨辉, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: lch\_0215@163.com \*通信作者: 苗明三, 男, 教授, 主要从事中药药理教学与研究, email: miaomingsan@163.com; 白明, 女, 教授, 主要从事中药药理教学与研究, email: baiming666@126.com

食管癌是常见恶性肿瘤, 统计显示, 其患病率和死亡率在全球恶性肿瘤中分别居第七位和第六位<sup>[1]</sup>。早期的食管癌症状不明显, 且病灶局限, 影像学检查检出率及准确性有限, 肿瘤标志物检测 (CYFRA21-1、CEA、SCCA、p53 蛋白抗体等) 的特异性与灵敏度也不高, 不利于早期食管癌的诊断和治疗<sup>[2]</sup>。MicroRNAs (miRNAs) 是由 18 ~ 24 个核苷酸组成的内源性非编码小分子 RNA, 是近年来肿瘤检测标志物和肿瘤研究领域的一大热点。miRNAs 可通过与长链非编码 RNA (lncRNA)、环状 RNA (circRNA)、信使 RNA (mRNA)、蛋白分子等相互作用, 参与调控细胞的增殖、周期、分化、凋亡等生理过程, 介导包括食管癌在内的多种恶性肿瘤的发生与发展<sup>[3]</sup>。

中医药在食管癌的防治、预后等方面效果明显, 可增强临床疗效, 提高患者生活质量<sup>[4]</sup>。近年来, 中医药通过 miRNAs 干预肿瘤进展的研究日益增多, 因此, 文章就 miRNAs 在食管癌发生发展中的双重调控机制及中医药经 miRNAs 干预食管癌的作用机制进行系统综述, 旨在为食管癌的临床诊断、治疗和预后评估等提供新思路。

## 1 miRNAs 的概述

miRNAs 是在动物、植物和一些病毒中发现的一类非编码 RNA, 第一个人类 miRNAs *let-7* 于 2000 年被发现, 目前已有 2000 多种人类 miRNAs 在数据库中被注释<sup>[5]</sup>。miRNAs 可通过与特定的功能蛋白形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 来调控细胞的生物过程, 其调控途径主要为与 mRNA 碱基、靶片段互补配对, 抑制靶基因翻译, 以及调控靶基因启动子 CpG 岛 (CpG island) 的甲基化来影响靶基因的转录<sup>[6]</sup>。miRNAs 在恶性肿瘤中发挥着重要作用, miRNAs 既可作为促癌基因参与食管癌的发生, 诱导肿瘤细胞化疗抵抗, 减弱临床治疗效果, 促进肿瘤细胞无限增殖、侵袭和转移等多种恶性生物学行为; 又可作为抑癌基因降低食管癌的发生率, 阻断其恶性发展<sup>[7]</sup>。部分参与的 miRNAs 如表 1 所示。

## 2 miRNAs 对食管癌发生发展的影响

### 2.1 miRNAs 对食管癌动物模型的影响

体内动物实验表明, 过表达 *miRNAs-200c* 的 Eca109 细胞皮下成瘤的肿瘤的体积和重量与 Eca109 细胞相当, 放疗可以降低皮下瘤的体积和瘤重。*miRNAs-200c* 可通过抑制细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1)、细胞分裂周期基因 *cdc2* (cell division cycle gene, *cdc2*) 和促进 P21 蛋白表达抑制体内肿瘤进展, 具体表现为, 过表达 *miRNAs-*

*200c* 的 Eca109 细胞皮下成瘤的肿瘤的体积和重量经放射治疗后均显著低于 Eca109 细胞皮下瘤<sup>[8]</sup>。Yang 等<sup>[9]</sup>发现, 与顺铂抵抗食管癌细胞株 OE19/CDDP 相比, 过表达 *miR-181a-5p* 的细胞株 OE19/CDDP 具有更小的肿瘤体积和瘤重, 且经顺铂治疗后, 后者肿瘤体积减小和瘤重降低更为显著。Li 等<sup>[10]</sup>发现, 过表达 *miR-29c* 的细胞株 KYSE410FR 皮下成瘤能力较 KYSE410 弱, 且经氟尿嘧啶 (5-FU) 治疗后, 前者皮下瘤体积显著减小, 表明 *miR-29c* 可在体内水平促进肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性, 增强抗肿瘤效果, 且该作用是通过靶向结合 FBXO31mRNA 进而升高肿瘤组织 cleaved caspase-3、p-p38 和降低 Ki67 蛋白实现的。Wu 等<sup>[11]</sup>发现, 顺铂干预可抑制食管癌细胞 Eca109 的皮下成瘤能力, 减小肿瘤体积和降低瘤重。与顺铂比, 干扰 Eca109 细胞 *miR-10b* 表达后联合顺铂治疗更能显著减小肿瘤体积和降低瘤重。

### 2.2 miRNAs 对离体食管癌的影响

**2.2.1 miRNAs 对食管癌细胞的影响** 分化抑制因子 3 (ID3) 在食管癌中扮演致癌基因的角色, 可通过激活 ERK/MAPK 通路诱导食管癌细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为<sup>[12]</sup>。体外实验表明, *miRNAs-340-5p* 能通过结合 ID3 3'-UTR 端在转录和翻译水平降低 ID3 表达, 从而抑制食管癌 Eca109 细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[13]</sup>。GEPIA 数据库中临床数据表明, lncRNA DLEU2 在食管癌组织中高表达, 并与患者不良预后相关, 还可在体外促进食管癌细胞 Eca-109 和 KYSE-150 恶性表型。*miR-30e-5p* 可通过内源性结合 lncRNA DLEU2 解除其对转录因子 -7 (E2F7) 的正调控作用, 抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭, 增加细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

相反, 部分研究表明 miRNAs 在食管癌中发挥抑癌作用。*miR-301a-3p* 参与多种肿瘤的疾病, 包括食管癌, 其在正常食管黏膜细胞系 Het-1A 中的表达显著低于食管癌细胞 Eca109 和 TE-1, 过表达 *miR-301a-3p* 则可显著增强 Eca109 细胞增殖能力和克隆形成率, 该作用是通过 *miR-301a-3p* 靶向 *PTEN* 基因的 3'-UTR 端, 进而抑制 PTEN/PI3K/AKT 通路实现的。而抑制 *miR-301a-3p* 表达, 则可抑制 PTEN/PI3K/AKT 通路、降低 Bcl-2 蛋白、升高 Bax 蛋白, 从而抑制 Eca109 细胞的增殖<sup>[15]</sup>。高栋才<sup>[16]</sup>发现, 食管癌 TE-1 细胞中 *miR-103a-2-5p* 的表达低于 KYSE-150 细胞, 在 TE-1 细胞中过表达 *miR-103a-2-5p* 可增加其增殖、侵袭和迁移能力, 而敲低 KYSE-150 细胞 *miR-103a-2-5p* 可抑制其增殖、侵袭和迁移能力。



进一步研究表明, 与高水平 *miR-103a-2-5p* 的外泌体共培养也可促进食管癌细胞 TE-1 和 KYSE150 的增殖、侵袭和迁移。

**2.2.2 miRNAs 对肿瘤相关巨噬细胞的影响** 肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 是在肿瘤组织中浸润的巨噬细胞, 具有异质性, 常具有 M1 型和 M2 型两种分化状态, 一般而言, M1 型具有抗肿瘤作用, M2 型具有促肿瘤作用。现有研究表明, miRNAs 在巨噬细胞的分化和活性维持中具有重要作用。*miR-21-5p* 在 EC109 及其外泌体中高表达, 同时 *miR-21-5p* 可由外泌体作为传递介质, 被巨噬细胞摄取, 抑制巨噬细胞吞噬功能, 促进巨噬细胞增殖和极化为 M2 型。EC109 细胞转染 *miR-21-5p mimic* 与巨噬细胞共培养可增加转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、白细胞介素 (IL)-10、CD206 mRNA、CD209 mRNA 等 M2 型巨噬细胞标志物表达, 促进其向 M2 型极化。此外, 抑制 M2 型巨噬细胞 *miR-21-5p* 可抑制其表型 M2 型。而且外泌体 *miR-21-5p* 诱导的 M2 型巨噬细胞可通过释放 TGF- $\beta$ , 进而激活食管癌细胞 TGF- $\beta$ /Smad2/EMT 通路, 促进其迁移、侵袭能力<sup>[17]</sup>。

相反, *miR-34a*、*miR-543*、*miR-765* 等可通过抑制巨噬细胞 M2 型极化, 发挥抗食管癌作用。如盖宇等<sup>[18]</sup>发现, *miR-34a* 在 M2 型巨噬细胞中的表达显著低于 M1 型, 过表达 *miR-34a* 可显著降低 M2 型巨噬细胞标志物 CD206、CD163、CCL18、CCL22 等的表达, 抑制巨噬细胞向 M2 型极化。将过表达 *miR-34a* 的 M2 型巨噬细胞与食管癌细胞共培养后, 可显著抑制 EC109 细胞的迁移能力, 增加其早期和晚期凋亡率。过表达 *circRNA TCFL5* 可通过诱导巨噬细胞向 M2 型极化促进食管癌细胞 Eca109 和 KYSE150 的增殖、侵袭和迁移, 而 *miR-543 mimics* 则可通过靶向结合 *circRNA TCFL5*, 抑制巨噬细胞向 M2 型极化, 最终抑制食管癌细胞的恶性生物学行为<sup>[19]</sup>。*lncRNA RP11-465B22.8* 参与食管癌的发生和发展, 在食管癌组织中高表达。在食管癌细胞 TE-1 和 KYSE150 中转染 *miR-765 mimics* 可通过靶向吸附 *lncRNA RP11-465B22.8* 减弱其对 M2 型巨噬细胞的极化作用, 消除其对食管细胞增殖、迁移和微管形成的增强作用<sup>[20]</sup>。

**2.2.3 miRNAs 对食管癌细胞放疗抵抗的影响** miRNAs 通过调节细胞凋亡、与放射相关的通路和细胞周期进程等方式, 参与对肿瘤细胞放射敏感性的调控。其中, 调控细胞周期是 miRNAs 影响肿瘤细胞对放疗敏感性的主要方式。研究表明, 相比正常 KYSE150 细胞, 放疗抵抗性食管癌

KYSE150 细胞 (KYSE150R) 的细胞周期在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期受阻、Cyclin D1 蛋白水平降低, 而 *miR-193b* 水平升高。免疫荧光素酶报告实验表明, *miR-193b* 可通过靶向结合 Cyclin D1 的 3'-UTR 端使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 进而降低食管癌细胞的敏感性<sup>[21]</sup>。

相反, *miRNAs-200c* 在放疗抵抗食管癌患者肿瘤组织及 Eca109 细胞中低表达, 过表达 *miRNAs-200c* 可通过下调 Cyclin B1、P21 和升高 P21 蛋白诱导细胞周期阻滞, 尤其是 G<sub>2</sub>/M 期和亚 G<sub>1</sub> 期阻滞, 从而增强 Eca109 细胞放射敏感性<sup>[8]</sup>。*miRNAs-30a-3p* 在 EC9706 和 EC109 细胞株中表达显著低于食管正常上皮细胞, 并与肿瘤细胞的放射敏感性有关, 即 *miRNAs-30a-3p* 可通过靶向食管癌细胞 IGF-1R 的 3'-UTR 端降低 IGF-1R mRNA 和蛋白表达提高 EC9706 和 EC109 对射线的敏感性, 从而降低基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 蛋白表达, 使细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 抑制细胞增殖, 降低 EMT 标志蛋白 N-cadherin 和 vimentin 表达, 升高 E-cadherin 蛋白表达, 发挥抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力<sup>[22]</sup>。过表达 *miR-301a* 介导的 WNT1 抑制能通过降低转录因子 4 (TCF4) 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达干扰细胞周期, 从而增强 KYSE150R 细胞对放射线的敏感性, 抑制细胞活力和侵袭能力。反之, 干扰 *miR-301a* 可降低放射敏感性 KYSE150 细胞对放射线的敏感性, 增强其增殖和迁移能力<sup>[23]</sup>。

**2.2.4 miRNAs 对食管癌细胞化疗抵抗的影响** 食管癌在诊断时多处于中晚期, 错过手术治疗的时机, 临床多采用化疗结合放疗的手段进行治疗。然而, 在持续性治疗中, 机体常产生一定的耐药性, 肿瘤细胞对药物的敏感性降低, 难以维持治疗。miRNAs 作为肿瘤治疗的新兴靶点, 在食管癌化疗抵抗中发挥重要作用。彭洁<sup>[24]</sup>研究发现, 紫杉醇处理的耐药食管癌 TE-1 细胞中 18 个 miRNAs 上调, 28 个 miRNAs 下调。沉默 *miR-378d* 后的细胞系 TE-1、KYSE150 较对照组细胞均有显著的 5-FU 和顺铂耐药性, 表现为细胞半数致死量升高、克隆形成能力增强、细胞骨架重排 (肌动蛋白丝骨架以及更延展的形态)、以 TE-1 细胞系差异最显著。双荧光素酶基因报告表明, 沉默 *miR-378d* 而导致的细胞化疗药物抵抗是由于 *miR-378d* 水平降低, 其靶向结合 AKT 基因的 3'-UTR 抑制 AKT- $\beta$ -catenin 通路作用减弱而导致的。*miR-29c* 在 5-FU 耐药食管癌细胞 (KYSE150FR、KYSE410FR) 水平较亲本细胞 KYSE150、KYSE410 显著降低, 过表达 *miR-29c* 可逆转 KYSE150FR 和 KYSE410FR 细胞对 5-FU 的耐药性, 抑制细胞增殖和活性。相反, 敲低



*miR-29c* 可进一步加重 KYSE150、KYSE410 细胞对 5-FU 的抵抗性，增强细胞活力和增殖能力<sup>[10]</sup>。

相反，*miR-21* 在食管癌细胞株 TE-1 和 Eca109/CDDP（顺铂抵抗细胞株）中表达显著高于正常食管上皮细胞 Het-1A，且在顺铂抵抗的癌细胞株中表达更高。过度表达 *miR-21* 可降低食管癌细胞对顺铂的敏感性，抑制 *miR-21* 可增强 TE-1 对顺铂的敏感性，双荧光素酶报告证实，*miR-21* 降低食管癌细胞对顺铂的敏感性是通过靶向程序化细胞死亡 4（PDCD4）基因的 3'-UTR 端进而抑制其转录和翻译产物实现

的<sup>[25]</sup>。较之正常食管上皮细胞和组织，*miR-10b* 在食管癌细胞 EC109、TE10 和组织中高表达，且 *miR-10b* 介导的 PPAR $\gamma$  抑制能通过激活 AKT/mTOR/P70S6K 信号通路，增强肿瘤细胞的顺铂抵抗。干扰 *miR-10b* 表达可增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性，从而抑制 EC109 和 TE10 细胞活力和克隆形成能力、降低顺铂的半抑制浓度（ $IC_{50}$ ）值、抑制 Bcl-2 蛋白表达、升高 Bax 蛋白表达，最终促进肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

综上，部分参与的 miRNAs 对食管癌的影响的汇总情况见表 1。

表 1 部分 miRNAs 对食管癌的影响  
Tab 1 Impact of part of miRNAs on esophageal cancer

miRNAs	信号通路 / 调控	对食管癌的影响
<i>miRNAs-200c</i>	抑制 Cyclin B1、cdc2 和促进 P21 蛋白	抑制体内肿瘤 <sup>[8]</sup>
<i>miR-29c</i>	靶向结合 <i>FBXO31mRNA</i> 进而升高 cleaved caspase-3、p-p38 和降低 Ki67 蛋白 <sup>[10]</sup>	促进肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性，增强抗肿瘤效果
<i>miR-301a-3p</i>	抑制 PTEN/PI3K/AKT 通路、降低 Bcl-2 蛋白、升高 Bax 蛋白	抑制 Eca109 细胞的增殖 <sup>[15]</sup>
<i>miR-103a-2-5p</i>	降低 <i>miR-103a-2-5p</i> 表达	抑制 KYSE-150 细胞的增殖、侵袭和迁移能力 <sup>[16]</sup>
<i>miR-34a</i>	过表达 <i>miR-34a</i> 可显著抑制巨噬细胞向 M2 型极化	抑制 EC109 细胞的迁移能力，增加凋亡率 <sup>[18]</sup>
<i>miR-543</i>	靶向结合 <i>circRNA TCFL5</i>	抑制巨噬细胞 M2 型极化 <sup>[19]</sup>
<i>miR-765</i>	靶向吸附 <i>lncRNA RP11-465B22.8</i>	减弱对 M2 型巨噬细胞的极化作用 <sup>[20]</sup>
<i>miR-21-5p</i>	外泌体作为传递介质，抑制巨噬细胞吞噬功能	促进巨噬细胞增殖和极化为 M2 型的能力（促癌） <sup>[17]</sup>
<i>miR-193b</i>	靶向结合 Cyclin D1 的 3'-UTR 端使细胞阻滞于 G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	降低食管癌细胞的放疗敏感性 <sup>[21]</sup>

### 3 中医药经 miRNAs 干预食管癌的作用机制

食管癌属中医学“噎膈”范畴，是“风、癆、臃、膈”四大顽症之一。“噎膈”病因复杂，体虚外感、七情内伤、饮食不节等致气、痰、瘀、热交阻，津气耗伤，食管梗阻成病。中医药防治食管癌以辨证论治为主，在应用方面涉及单味中药及有效成分、中药复方等，多从清热解毒、化痰散瘀、益气活血、解毒散结等方面入手，结合手术、放疗或化疗，以降低术后不良反应、减轻放疗抵抗和相应不良反应的发生率<sup>[26]</sup>。

#### 3.1 中药单味药及提取物

藤梨根是猕猴桃科植物中华猕猴桃植物的干燥根，首次记载于《开宝本草》。现代研究表明，藤梨根活性成分对多种恶性肿瘤有防治作用，其抗肿瘤机制主要包括抑制肿瘤细胞增殖生长、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期，抑制肿瘤血管生成等<sup>[27]</sup>。研究显示，藤梨根提取物在一定浓度范围内可以上调 *miR-451* 的表达水平，从而对细胞株内 *CDKN2D*、*AKT*、*BCL-2* 等 DNA 表达基因进行调节，肿瘤细胞的分裂多停留在 DNA 合成前期，进而削减细胞的侵袭能力，促使肿瘤细胞凋亡速度加快<sup>[28-29]</sup>。

毛叶香茶菜是一种少见的小草药，其活性提取物表诺多星（epinodosin, EP）是具有抗肿瘤活性的五环二萜类化合物。李亚妹<sup>[30]</sup>发现，EP 在

4 种食管鳞癌细胞中均可诱导 *miR-143-3p* 的表达，降低靶向基因 *Bcl-2* 的表达量；此外，还可显著抑制 MAPKs 信号通路蛋白 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 的表达，抑制 MAPKs 信号通路的激活，抑制食管鳞癌细胞的增殖、迁移与侵袭。

南蛇藤是我国传统中药，在我国分布广泛，其根、茎、叶均可入药，具有活血、解毒、祛风、消肿的功效。于耀洋等<sup>[31]</sup>将 *miR-302* 体外转染至食管癌 TE-1 细胞，与南蛇藤提取物（COE）联合作用于 TE-1 细胞，发现 COE 和过表达 *miR-302* 可抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活，从而抑制 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移，且两者联合使用效果强于单一因素作用。提示 COE 联合 *miR-302* 能够协同抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移。

丹参酮 II A（tanshinone IIA, TS II A）是丹参的主要有效成分之一，向文杰<sup>[32]</sup>发现将其与硒-甲基硒代半胱氨酸（se-methylselenocysteine, MSC）联合使用能显著上调抑癌基因 *miR-203a-3p* 的表达水平，且相比于同等剂量的丹参酮 II A 差异有统计学意义，*miR-203a-3p* 能调控 GATA6 从而抑制 ESCC 细胞的增殖和侵袭，而 MSC 显著有效地放大了丹参酮 II A 对肿瘤细胞增殖活力的抑制能力，*miR-203a-3p* 很有可能是发挥该作用的重要因子。

#### 3.2 中药复方

启膈散记载于《医学心悟》，为治疗“噎膈”之名方，临床常用于食管癌的治疗，其药方含丹参、沙参、川贝母、茯苓、砂仁、郁金，为行气化痰法代表方剂。miR-133a/PI3K/Akt 等信号通路是影响食管鳞癌发生、发展的重要信号通路。研究显示，启膈散能通过调控食管癌 EC9706 细胞 miR-133a/PI3K/Akt 信号环路甲基化，促进 miR-133a 在肿瘤细胞的表达，抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活；下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的蛋白表达，抑制食管癌 EC9706 细胞的增殖<sup>[33-34]</sup>。启膈散与顺铂联用在抑制食管癌细胞 EC9706 增殖方面具有协同作用，其机制可能与抑制 miR-21 表达从而升高 PDCD4 和 PTEN 基因表达相关<sup>[35]</sup>。

六君子汤作为健脾和胃的经典代表方，临床应用广泛，是治疗和辅助治疗食管癌的有效方药，其搭配营养管理能够减轻患者放化疗毒副作用，改善患者的营养和免疫状态<sup>[36]</sup>。miR-34a/STAT3/

IL-6R 反馈环在多种类型肿瘤中存在，与癌症的侵袭与转移、免疫抑制等相关，六君子汤可通过提高 miR-34a 的表达，逆转 IL-6R/STAT3 信号通路介导的 miR-34a 抑制，从而抑制免疫检查点 PD-L1 的表达，抑制免疫逃逸，调节机体免疫反应，介导肿瘤的发生发展，参与肿瘤微环境免疫抑制<sup>[37]</sup>。

消癌解毒方是国医大师周仲瑛教授结合多年临床经验总结而形成的有效验方，抗肿瘤效果显著，该方与化疗药联用，有提高肿瘤化疗疗效的作用。丁艳<sup>[38]</sup>发现，食管癌患者血清中 miR-223-3p 和 miR-151a-5p 高表达，并与淋巴结转移和肿瘤浸润深度有关，中药消癌解毒方联合放疗可降低患者血清中 miR-223-3p 和 miR-151a-5p 水平，减轻临床症状，提高生活质量。

综上，不同中药抑制食管癌的作用机制归纳总结见表 2。

表 2 不同中药通过 miRNAs 抑制食管癌的作用机制

Tab 2 Mechanism of different Chinese medicines in inhibiting esophageal cancer via miRNAs

中药 / 复方	miRNAs	作用机制 / 调控通路
藤梨根提取物	miR-451	上调 miR-451 的表达水平，调节 CDKN2D、AKT、BCL-2，阻滞肿瘤细胞 DNA 合成，削减细胞的侵袭能力，加快肿瘤细胞凋亡 <sup>[28-29]</sup>
EP (毛叶香茶菜提取物)	miR-143-3p	过表达 miR-143-3p，降低靶向基因 Bcl-2 的表达量；显著抑制 MAPKs 信号通路蛋白 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 的表达，抑制食管鳞癌细胞增殖、迁移与侵袭 <sup>[30]</sup>
南蛇藤提取物	miR-302	过表达 miR-302，可抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活，从而抑制 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移 <sup>[31]</sup>
丹参酮 II A	miR-203a-3p	过表达 miR-203a-3p，能调控 GATA6 从而抑制 ESCC 细胞的增殖和侵袭 <sup>[32]</sup>
启膈散	miR-133a	调控 miR-133a/PI3K/Akt 信号环路甲基化，促进 miR-133a 在肿瘤细胞的表达，抑制 PI3K/Akt 信号通路；下调哺乳动物 mTOR 蛋白表达，抑制食管癌 EC9706 细胞的增殖 <sup>[33-34]</sup>
六君子汤	miR-21	与顺铂联用抑制 miR-21 表达从而升高 PDCD4 和 PTEN 基因表达，抑制食管癌细胞 EC9706 增殖 <sup>[35]</sup>
	miR-34a	提高 miR-34a 的表达，逆转 IL-6R/STAT3 信号通路介导的 miR-34a 抑制，从而抑制免疫检查点 PD-L1 的表达，抑制免疫逃逸，参与肿瘤微环境免疫抑制 <sup>[36]</sup>
消癌解毒方	miR-223-3p、 miR-151a-5p	降低血清中 miR-223-3p 和 miR-151a-5p 水平，减少淋巴结转移和肿瘤浸润深度，减轻临床症状 <sup>[37]</sup>

#### 4 总结和展望

食管癌发病隐匿、早期症状不典型，是导致其确诊时已处于中晚期的主要原因，因此有必要寻找敏感性高的生物标志物，以便在食管有癌变趋势或肿瘤早期进行干预，降低食管癌发病率和减缓恶性进展速度。miRNAs 在基因表达调控中起着至关重要的作用，更是肿瘤诊断、治疗和预后的潜在标志物和治疗靶点。中医药作为我国传统医学中的特色，可调控相关 miRNAs 影响 Bax/Bcl-2、ERK/MAPK、AKT/mTOR/P70S6K、PTEN/PI3K、TGF-β/Smad2/EMT 等信号通路，肿瘤微环境中巨噬细胞与肿瘤细胞交叉通路等参与食管癌的发生发展，为临床治疗提供新方法、新思路。

#### 参考文献

- [1] 彭孟凡, 李鸣, 苗晋鑫, 等. lncRNA 在食管癌中的双重调控机制及其临床价值 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (11): 121-127.
- [2] 王华光, 刘心娟, 雷圆圆, 等. 食管癌相关生物标志物的代谢组学研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29 (14): 1080-1086.
- [3] Zhao Y, Xu L, Wang XY, et al. A novel prognostic mRNA/miRNAs signature for esophageal cancer and its immune landscape in cancer progression [J]. Mol Oncol, 2021, 15 (4): 1088-1109.
- [4] 陈鑫. 中医药防治食管癌的研究进展 [J]. 光明中医, 2023, 38 (8): 1609-1612.
- [5] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. J Cell Physiol, 2019, 234

- (5): 5451-5465.
- [6] 金玮娜, 陈蒙蒙, 彭天娇, 等. 食管癌相关外泌体 miRNAs 的研究进展 [J]. 食管疾病, 2022, 4 (3): 193-197.
- [7] Sakai NS, Samia-Aly E, Barbera M, et al. A review of the current understanding and clinical utility of miRNAs in esophageal cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2013, 23 (6 Pt B): 512-521.
- [8] Zheng RZ, Liu YH, Zhang XL, et al. miRNAs-200c enhances radiosensitivity of esophageal cancer by cell cycle arrest and targeting P21 [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 517-523.
- [9] Yang S, Wang P, Wang SH, et al. miRNAs-181a-5p enhances the sensitivity of cells to cisplatin in esophageal adenocarcinoma by targeting CBLB [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 4981-4990.
- [10] Li B, Hong P, Zheng CC, et al. Identification of miR-29c and its target FBXO31 as a key regulatory mechanism in esophageal cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance [J]. Theranostics, 2019, 9 (6): 1599-1613.
- [11] Wu K, Hu YM, Yan KL, et al. microRNA-10b confers cisplatin resistance by activating AKT/mTOR/P70S6K signaling via targeting PPAR $\gamma$  in esophageal cancer [J]. J Cell Physiol, 2020, 235 (2): 1247-1258.
- [12] Wang XY, Zhao Y, Fei X, et al. LEF1/Id3/HRAS axis promotes the tumorigenesis and progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16 (13): 2392-2404.
- [13] 王新宇, 费翔, 李春光, 等. 微 RNA-340-5p 靶向分化抑制因子 3 抑制人食管鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移及侵袭 [J]. 上海: 第二军医大学学报, 2021, 42 (10): 1091-1097.
- [14] Lu TY, Wang R, Cai HF, et al. Long non-coding RNA DLEU2 promotes the progression of esophageal cancer through miR-30e-5p/E2F7 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109650.
- [15] 张难. MiR-301a-3p 在食管鳞癌组织和细胞中的表达及调节细胞增殖的功能和作用机制 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [16] 高栋才. 外泌体来源 miR-103a-2-5p 在促进食管癌细胞增殖迁移中的作用和机制研究 [D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.
- [17] Song J, Yang PY, Li XW, et al. Esophageal cancer-derived extracellular vesicle miR-21-5p contributes to EMT of ESCC cells by disorganizing macrophage polarization [J]. Cancers (Basel), 2021, 13 (16): 4122.
- [18] 盖宇, 汪美华. miR-34a 调控的 M2 型巨噬细胞极化对食管癌细胞迁移和凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38 (2): 139-144.
- [19] Lin CB, Xi Y, Yu HY, et al. circRNA TCFL5 promote esophageal cancer progression by modulating M2 macrophage polarization via the miR-543-FMNL2 axis [J]. J Oncol, 2022, 2022: 5075615.
- [20] Hu R, Bi R, Jiang LY, et al. lncRNA RP11-465B22.8 triggers esophageal cancer progression by targeting miR-765/ KLK4 axis [J]. Cell Death Discov, 2021, 7 (1): 262.
- [21] 董晓平. 缺锌环境下 miR-193b 在调节食管癌细胞放射敏感性中的作用及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [22] Fan YX, Bian XH, Qian PD, et al. miRNAs-30a-3p inhibits metastasis and enhances radiosensitivity in esophageal carcinoma by targeting insulin-like growth factor 1 receptor [J]. Mol Med Rep, 2019, 20 (1): 81-94.
- [23] Su HF, Wu YY, Fang Y, et al. MicroRNA-301a targets WNT1 to suppress cell proliferation and migration and enhance radiosensitivity in esophageal cancer cells [J]. Oncol Rep, 2019, 41 (1): 599-607.
- [24] 彭洁. miR-378d-AKT- $\beta$ -catenin 信号通路调控食管鳞癌恶性表型的分子机制研究 [D]. 济宁: 济宁医学院, 2020.
- [25] Yang YC, Liu GJ, Li CQ, et al. Influence of exosome-derived miR-21 on chemotherapy resistance of esophageal cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol, 2019, 23 (4): 1513-1519.
- [26] 苏菲, 贾立群, 程志强, 等. 中医药干预食管癌前病变转癌相关研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (9): 242-247.
- [27] 郭世威, 陈锦芳, 胡兵. 藤梨根抗癌成分及其作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (5): 160-163.
- [28] 朱国胜. 藤梨根干预食管鳞癌细胞 miR-451 的研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.
- [29] 王涛, 关徐涛, 王冰, 等. 藤梨根提取物通过调控 miR-451 干预人食管鳞癌 EC9706 细胞的增殖 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (7): 1666-1669.
- [30] 李亚妹. Epinodosin 通过调控 miR-143-3p/Bcl-2 轴抑制食管鳞癌增殖、迁移与侵袭 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [31] 于耀洋, 赵佳, 李向楠. 南蛇藤提取物联合 miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (10): 2371-2376.
- [32] 向文杰. 丹参酮 II A 联合硒 - 甲基硒代半胱氨酸对食管鳞癌细胞增殖、凋亡及 miR-203a-3p 表达作用的研究 [D]. 恩施: 湖北民族大学, 2023.
- [33] 王蕊, 高小玲, 李丹丹, 等. 启膈散对食管癌 EC9706 细胞 miR-133a/PI3K/Akt 信号通路甲基化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34 (3): 516-520.
- [34] 高小玲, 刘陆, 李墨颜, 等. 启膈散对人食管癌 EC9706 细胞增殖、凋亡及 miR-133a/Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (22): 1-6.
- [35] 杨联河, 赵雪艳, 郭彬, 等. 启膈散与顺铂对食管癌细胞 EC9706 低氧下生长抑制及其 miR-21, PDCD4 和 PTEN 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (15): 134-138.
- [36] 韩辰燕, 蔡霄月, 刘晓芯. 六君子汤联合全程营养管理对食管癌同步放化疗毒副作用、营养及免疫状态的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24 (4): 103-106.
- [37] 韩懿存. 基于 miR-34a/STAT3/IL-6R 反馈环探讨六君子汤调节食管癌 EC109 细胞 PD-L1 表达的机制研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- [38] 丁艳. 消癌解毒方联合放疗治疗痰瘀郁毒气阴两虚型食管癌的临床观察及对血清 miRNAs 的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-08-10)



## 药物分析与检验

## 蒙药三子散多指标成分的含量测定

许佳琦<sup>1</sup>, 刘妍妍<sup>2</sup>, 白云霞<sup>3</sup>, 刘宏<sup>1</sup>, 夏慧敏<sup>1</sup>, 张慧文<sup>1\*</sup>, 王焕芸<sup>1\*</sup> (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 濮阳市安阳地区医院药学部, 河南 安阳 455000; 3. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014010)

**摘要:** **目的** 基于多指标成分含量测定结合灰色关联度分析 (GRA) 和逼近理想解排序法 (TOPSIS) 对蒙药三子散进行整体质量评价。**方法** 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定 15 批三子散样品中诃子次酸、没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷、jasminoside B、咖啡酸、柯里拉京、京尼平苷、诃子鞣酸、1, 2, 3, 4, 6-*O*-没食子酰葡萄糖、诃子林鞣酸、鞣花酸的含量, 并对 12 种活性成分含量建立 GRA 和 TOPSIS 质量评价模型。**结果** 12 种指标成分在各自质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,  $r$  均不小于 0.9995, 平均回收率为 96.72% ~ 104.07%,  $RSD$  为 1.4% ~ 2.6%。GRA 和 TOPSIS 分析结果基本一致, 根据 TOPSIS 分析所得  $C_i$  值和 GRA 分析所得  $r_i$  值可知, 样品 S1、S3、S4、S6、S10、S12、S14、S15 排名前 8。**结论** GRA-TOPSIS 法排除了人为因素的干扰, 提高了多指标决策分析的科学与准确性, 精确地反映了各评价方案之间的差距, 可对三子散进行整体质量评价及优质资源筛选。

**关键词:** 三子散; 含量测定; 质量控制; 灰色关联度分析; 逼近理想解排序法

**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0483-07  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.032

## Determination of multi-index components in Mongolian medicine Sanzi powder

XU Jia-qi<sup>1</sup>, LIU Yan-yan<sup>2</sup>, BAI Yun-xia<sup>3</sup>, LIU Hong<sup>1</sup>, XIA Hui-min<sup>1</sup>, ZHANG Hui-wen<sup>1\*</sup>, WANG Huan-yun<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 2. Department of Pharmacy, Anyang District Hospital in Puyang City, Anyang Henan 455000; 3. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia 014010)

**Abstract: Objective** To conduct an overall quality evaluation of Mongolian medicine Sanzi powder based on multi-index component content determination combined with grey relational analysis (GRA) for order preference by similarity to ideal solution (TOPSIS) method. **Methods** The contents of chebulic acid, gallic acid, punicalin, punicalagin, jasminoside B, caffeic acid, corilagin, geniposide, chebulagic acid, 1, 2, 3, 4, 6-*O*-pentagalloylglucose, chebulinic acid and ellagic acid were determined by HPLC, and the overall quality evaluation model was established by GRA combined with TOPSIS. **Results** Totally 12 indicator components showed a good linearity within their respective mass concentration ranges, with correlation coefficients  $r$  no less than 0.9995. The average recovery was 96.72% ~ 104.07%, and the  $RSD$  was 1.4% ~ 2.6%. The results of GRA and TOPSIS analysis were basically the same. According to the values from TOPSIS and GRA analysis, the sample S1, S3, S4, S6, S10, S12, S14, and S15 ranked the top 8 of all samples. **Conclusion** GRA-TOPSIS method eliminates the interference of human

**基金项目:** 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No.2022MS08023); 内蒙古医科大学科技百万工程联合项目 [No.YKD2020KJBW (LH) 054]; 内蒙古自治区关键技术攻关计划项目 (No.2021GG0176)。

**作者简介:** 许佳琦, 女, 硕士研究生, 主要从事中蒙药药效物质基础研究, email: 3121184420@qq.com \*通信作者: 张慧文, 女, 副教授, 主要从事中蒙药药效物质基础研究, email: bjlemonzhw@126.com; 王焕芸, 女, 教授, 主要从事中蒙药药物分析, email: whuanyn999@163.com

factors and transforms the multi-dimensional problem into one-dimension one, improves the science and accuracy of multi-index decision analysis, accurately reflects the gap between evaluation schemes, and the evaluates overall quality and screens high-quality resources of Sanzi powder.

**Key words:** Sanzi powder; content determination; quality control; grey relational analysis; technique for order preference by similarity to ideal solution

中蒙药复方制剂的成分复杂,且发挥作用的并非单一的化学成分,而是多种成分相互作用的结果。近年来,中蒙药的质量评价已经从单一指标的检测发展到基于多指标成分的综合质量评价,伴随着数据量的增加,需要借助更科学的化学计量学方法进行分析。灰色关联度分析(grey relational analysis, GRA)是一种多因素统计分析的方法,此方法对数据要求较低,且计算量小,常用于中药质量控制、谱效分析中。逼近理想解排序法(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)是一种综合评价方法,通过将多个指标计算整合为一个综合指标,把多维问题转化为一维问题,降低了分析过程中不同类型指标对决策的干扰及实验过程中人为因素产生的干扰,从而提高多目标决策分析的科学性和准确性<sup>[1]</sup>。TOPSIS方法与中药指纹图谱技术和多维分析技术的合理整合是一种综合鉴别、客观量化和精准评价中蒙药质量<sup>[2-3]</sup>、药效<sup>[4]</sup>、临床应用<sup>[5]</sup>的有效方法,更能清晰、准确地揭示中蒙药复杂系统的真实本原。

三子散现收载于2020年版《中国药典》一部,为蒙古族传统方剂之一,由诃子、栀子、川楝子三味药材等量配比混合而成<sup>[6]</sup>。现行的三子散含量测定仅以单指标测定有效成分没食子酸<sup>[7]</sup>、川楝素<sup>[8]</sup>、还原糖<sup>[9]</sup>的含量为主,本课题组前期对三子散进行研究<sup>[10-12]</sup>,发现其入血成分为酚酸类、鞣质类、环烯醚萜类等化学成分。基于此,为了更系统地评价三子散质量,本试验在前期HPLC指纹图谱研究的基础上,纳入了更多能反映蒙药三子散整体质量属性、与药效关联性较强的化合物作为复方含量测定指标,即酚酸类(没食子酸、咖啡酸)、环烯醚萜类(京尼平苷)、鞣质类(诃子次酸、石榴皮鞣素、安石榴苷、柯里拉京、诃子鞣酸、1, 2, 3, 4, 6-*O*-没食子酰葡萄糖、诃子林鞣酸、鞣花酸)、单萜苷类(jasminoside B)。采用HPLC技术建立上述12种成分的含量测定方法,结合GRA-TOPSIS法建立15批三子散的质量评价模型,以期对不同批次、不同产地中蒙药

材的质量评价提供更加全面、科学的参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2030C 3D型高效液相色谱仪(日本株式会社岛津制作所),PX225DZH型十万分之一天平(奥豪斯仪器有限公司),JJ224BC型万分之一电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),WK-1000A型小型高速粉碎机(潍坊市北方制药设备制造有限公司),PF3XXXXM1型一体化超纯水系统(英国ELGA公司)等。

### 1.2 试药

对照品没食子酸(批号:D2016091,纯度:99%)、京尼平苷(批号:J2027132,纯度 $\geq$ 98%)、咖啡酸(批号:I2002097,纯度:98%)、鞣花酸(批号:K1813148,纯度:96%)(阿拉丁试剂有限公司);石榴皮鞣素(批号:M23J11S119104,纯度 $\geq$ 98%)、诃子次酸(批号:M30GB150105,纯度 $\geq$ 95%)、柯里拉京(批号:P25A11S122217,纯度 $\geq$ 98%)、安石榴苷(批号:Y11S11Y124050,纯度 $\geq$ 98%)、诃子鞣酸(批号:M29GB143373,纯度 $\geq$ 98%)、1, 2, 3, 4, 6-*O*-没食子酰葡萄糖(批号:P16M11F113433,纯度 $\geq$ 99%)、诃子林鞣酸(批号:P24J9F53640,纯度 $\geq$ 98%)(上海源叶生物科技有限公司);jasminoside B(批号:P16A9F58571,纯度 $\geq$ 98%,北京谱析科技有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯,甲酸、磷酸为分析纯,水为超纯水。

诃子、栀子、川楝子单味药饮片各15批,经内蒙古医科大学生药教研室张慧文博士鉴定,诃子为使君子科植物诃子*Terminalia chebula* Retz.的干燥成熟果实,栀子为茜草科植物栀子*Gardenia jasminoides* Ellis的干燥成熟果实,川楝子为楝科植物川楝*Melia toosendan* Sieb.et Zucc.的干燥成熟果实,均符合2020年版《中国药典》一部标准。将各批次诃子、栀子、川楝子单味药饮片使用粉碎机粉碎成粗粉,过40目筛,取三味药材等比等量混匀,随机取样组合,即得15批三子散样品(编号S1~S15),各单味药饮片来源信息详见表1。

表 1 15 批三子散中各单味药饮片来源

Tab 1 Source of each single medicine piece in 15 batches of Sanzi powder

编号	诃子			栀子			川楝子		
	批号	产地	生产企业(简称)	批号	产地	生产企业(简称)	批号	产地	生产企业(简称)
S1	200701	江西	广东天诚中药饮片	8200101702	江西	河北百合中药饮片	C20121201	四川	安国润德药业
S2	8170903901	云南	河北百合中药饮片	2009002	江西	河北全泰药业	210101221	新疆	河北济鑫堂药业
S3	1705001	广东	内蒙古瑞泰药业	201201	江西	广州南北行中药饮片	1910001	四川	内蒙古瑞泰药业
S4	19022802	云南	安徽金国源中药	201202201	江西	康美药业	20070604	四川	江西彭氏国药堂饮片
S5	200920	广西	安徽广和中药	200702	江西	亳州市京皖中药饮片厂	1811018	四川	内蒙古宝芝林药业
S6	190500201	广东	康美药业	200929	江西	浙江桐君堂中药饮片	20112904	四川	安徽金国源中药
S7	200200451	广东	康美药业	20072602	江西	内蒙古慕昕药业	190301	四川	安徽益生源中药饮片
S8	20190201	云南	广东汇群中药饮片	8191112401	江西	河北百合中药饮片	200512	四川	浙江省桐君堂中药饮片
S9	190606313	广西	河北美康药业	1902001	江西	内蒙古瑞泰药业	200401	四川	广东天诚中药饮片
S10	C19111209	云南	安国润德药业	201101	江西	安徽道源堂中药饮片	20210301	广西	广东汇群中药饮片
S11	170701	广西	酒泉市培丰中药材	210102	江西	安国市安兴中药饮片	200701	四川	安徽惠丰国药
S12	8181009901	云南	河北百合中药饮片	200804	江西	安徽广和中药	19052306	四川	安国市久旺药业
S13	191001	云南	广东源森泰药业	20200301	江西	安徽桐花堂中药饮片	200901621	四川	康美药业
S14	200901	云南	洪雅县瓦屋山药业	20093001	江西	安国市久旺药业	190101760	四川	河北济鑫堂药业
S15	C176-19080601	湖南	内蒙古启明中药饮片	210201	江西	广东天诚中药饮片	191001	四川	广东源森泰药业

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate LP-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 1% → 5%B; 5 ~ 10 min, 5% → 13%B; 10 ~ 24 min, 13% → 23%B; 24 ~ 56 min, 23% → 35%B; 56 ~ 78 min, 35% → 47%B; 78 ~ 90 min, 47% → 85%B; 90 ~ 100 min, 85% → 90%B; 100 ~ 105 min, 90% → 100%B); 柱温为 30 °C; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品储备液** 精密称取对照品诃子次酸、没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷、jasminoside B、咖啡酸、柯里拉京、京尼平苷、诃子鞣酸、1, 2, 3, 4, 6-*O*-没食子酰葡萄糖、诃子林鞣酸、鞣花酸适量, 置于同一量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 混匀, 制备成质量浓度分别为 470、250、94、1030、1320、154、540、1800、2870、450、2610、550 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取三子散样品 1.0 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 摇匀, 称量, 超声提取 30 min, 放至室温后再次称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 4 °C 条件避光保存, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 缺味阴性样品溶液** 以 1.2 g 为处方总量, 分别配制不含诃子或栀子或川楝子的缺味阴性样品处方, 并按“2.2.2”项下方法处理, 即得各缺

味阴性样品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 取混合对照品、供试品、缺味阴性样品、空白溶液适量, 进样测定, 记录色谱图, 结果见图 1。供试品溶液中 12 种成分的色谱峰分离度良好, 理论板数较高; 供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间处有对应色谱峰, 供试品溶液及各缺味阴性样品溶液中其他成分色谱峰对 12 种成分测定均无干扰, 空白溶液于相同保留时间处无干扰, 表明该方法专属性良好。

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品储备液适量, 置于不同量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得一系列浓度对照品溶液, 进样测定, 记录各色谱峰峰面积值 (其中, 安石榴苷峰面积为安石榴苷 A 与安石榴苷 B 峰面积之和)。以对照品溶液质量浓度 (μg·mL<sup>-1</sup>) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 2, 12 种成分在各自质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”混合对照品溶液适量, 连续进样测定 6 次, 结果 12 种成分峰面积的 RSD 均在 0.11% ~ 0.46%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取三子散样品 (S14), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积并根据外标法计算 12 种待测成分的含量, 结果 12 种成分含量的 RSD 在 0.80% ~ 2.8% (n = 6), 表明该方法重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取同一份三子散样品 (S14),



表 2 12 种成分的回归方程及线性范围

Tab 2 Linear regression equation and linear range of 12 components

成分	回归方程	r	线性范围 / (μg · mL <sup>-1</sup> )
诃子次酸	$Y = 3.121 \times 10^3 X + 6.446 \times 10^4$	0.9995	9.40 ~ 376.00
没食子酸	$Y = 2.496 \times 10^4 X + 4.043 \times 10^4$	0.9996	5.00 ~ 200.00
石榴皮鞣素	$Y = 4.053 \times 10^4 X - 1.849 \times 10^4$	0.9997	1.88 ~ 75.20
安石榴苷	$Y = 3.805 \times 10^4 X - 1.888 \times 10^5$	0.9996	20.60 ~ 824.00
jasminoside B	$Y = 8.714 \times 10^3 X + 4.057 \times 10^4$	0.9995	26.40 ~ 1056.00
咖啡酸	$Y = 1.988 \times 10^4 X + 1.941 \times 10^4$	0.9995	3.08 ~ 123.20
柯里拉京	$Y = 1.862 \times 10^4 X + 1.858 \times 10^4$	0.9996	10.80 ~ 432.00
京尼平苷	$Y = 8.771 \times 10^3 X + 9.945 \times 10^4$	0.9996	36.00 ~ 1440.00
诃子鞣酸	$Y = 1.831 \times 10^4 X + 2.873 \times 10^4$	0.9996	57.40 ~ 2296.00
1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖	$Y = 1.238 \times 10^4 X - 1.479 \times 10^3$	0.9996	9.00 ~ 360.00
诃子林鞣酸	$Y = 1.216 \times 10^4 X + 5.142 \times 10^4$	0.9995	52.20 ~ 2088.00
鞣花酸	$Y = 9.688 \times 10^4 X + 3.185 \times 10^5$	0.9996	11.00 ~ 440.00

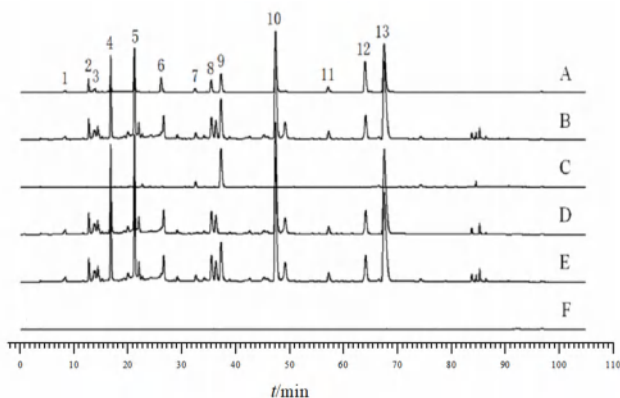


图 1 三子散 HPLC 图

Fig 1 HPLC of Sanzi powder

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 三子散 (S1) [Sanzi powder (S1)]; C. 缺诃子阴性样品 (negative sample without *Terminalia chebula*); D. 缺栀子阴性样品 (negative sample without *Gardenia jasminoides*); E. 缺川楝子阴性样品 (negative sample without *Melia toosendan*); F. 空白溶液 (blank solution); 1. 诃子次酸 (chebulic acid); 2. 没食子酸 (gallic acid); 3. 石榴皮鞣素 (punicalin); 4. 安石榴苷 A (punicalagin A); 5. 安石榴苷 B (punicalagin B); 6. jasminoside B; 7. 咖啡酸 (caffeic acid); 8. 柯里拉京 (corilagin); 9. 京尼平苷 (geniposide); 10. 诃子鞣酸 (chebulagic acid); 11. 1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖 (1, 2, 3, 4, 6-O-pentagalloylglucose); 12. 诃子林鞣酸 (chebulinic acid); 13. 鞣花酸 (ellagic acid)

按“2.2.2”项下方法制备, 分别于室温下放置 0、3、6、9、12、24、48 h 进样测定, 计算得到 12 种成分峰面积的 RSD 在 1.2% ~ 2.8% (n = 7), 表明供试品溶液于室温下放置 48 h 内稳定性良好。

**2.3.6 加样回收试验** 精密称取各成分已知含量的三子散样品约 0.50 g, 平行称定 9 份, 分别精密加入相当于该样品中各待测成分含量 0.8、1.0、1.2 倍量的单一成分对照品溶液, 每个质量浓度平行操作 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备, 进样测定, 计算 12 种成分的平均加样回收率及 RSD。结果显示 12 种

成分的平均回收率为 96.72% ~ 104.07%, RSD 为 1.4% ~ 2.6% (n = 3), 表明本方法的准确度良好。

**2.4 样品含量测定**

取 15 批三子散样品 (S1 ~ S15), 按“2.2.2”项下方法制备, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 以外标法计算 12 种待测成分的含量, 每份样品平行操作 3 次, 取平均值, 结果见表 3。15 批三子散样品中诃子次酸、没食子酸、石榴皮鞣素、安石榴苷、jasminoside B、咖啡酸、柯里拉京、京尼平苷、诃子鞣酸、1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖、诃子林鞣酸、鞣花酸的平均含量分别为 2.977 ~ 7.763、0.8465 ~ 2.487、0.2872 ~ 1.208、3.897 ~ 11.68、2.356 ~ 16.46、0.7995 ~ 1.444、2.492 ~ 4.870、13.28 ~ 21.39、14.50 ~ 26.46、1.766 ~ 4.165、3.406 ~ 27.50、3.064 ~ 7.078 mg · g<sup>-1</sup>。

**2.5 化学模式识别分析**

**2.5.1 TOPSIS 分析**<sup>[13-14]</sup> 设有 m 个评价对象, n 个评价指标 (m = 1, 2, …, i; n = 1, 2, …, j), 本试验中 m = 15, n = 12, 将其检测数据构成矩阵 V, 由于样品中各测量成分含量不一, 需要按照公式 (1) 将矩阵 V 进行归一化处理, 得到矩阵 Z。

$$z_{ij} = x_{ij} / \sqrt{\sum_{i=1}^n x_{ij}^2} \quad (1)$$

注: z<sub>ij</sub> 表示第 i 个评价对象在第 j 个指标上的取值。

根据归一化矩阵结构选出最优方案和最劣方案, 最优方案 Z<sup>+</sup> 为 n 个评价指标对应样品的最大值最优方案; Z<sup>-</sup> 为 n 个评价指标对应样品的最小值, 具体见公式 (2)、(3)。

按照公式 (4)、(5) 计算各评价对象与最优方案和最劣方案之间的距离。

表 3 12 种成分的含量测定结果 (mg · g<sup>-1</sup>, n = 6)  
Tab 3 Content of 12 components (mg · g<sup>-1</sup>, n = 6)

编号	诃子 次酸	没食 子酸	石榴皮 鞣素	安石 榴苷	jasminoside B	咖啡酸	柯里 拉京	京尼 平苷	诃子 鞣酸	1, 2, 3, 4, 6-O- 没食子 酰葡萄糖	诃子林 鞣酸	鞣花酸
S1	6.111	1.804	1.030	9.013	7.665	1.326	3.928	14.77	22.52	2.013	6.750	4.781
S2	4.696	0.9835	0.5693	8.655	7.051	1.122	3.804	18.04	23.49	2.161	8.234	4.174
S3	4.124	1.770	0.6999	6.710	3.910	1.232	3.370	15.49	24.36	3.878	27.50	6.278
S4	3.838	2.408	0.4803	4.324	2.356	1.227	2.755	16.50	17.16	4.017	25.36	6.184
S5	3.828	2.487	0.4776	4.520	2.674	1.011	3.420	14.60	18.26	3.068	18.33	6.482
S6	6.320	1.262	0.8809	11.68	10.02	1.444	4.611	17.73	26.29	2.209	5.521	4.360
S7	3.654	1.116	0.5397	5.953	3.895	0.8995	2.492	17.05	14.50	1.786	9.362	3.548
S8	3.992	0.8757	0.5768	9.086	10.87	1.189	3.592	15.94	18.29	1.766	4.062	3.064
S9	3.633	1.980	0.5167	4.384	4.161	0.7995	2.902	13.28	16.40	3.007	22.83	6.647
S10	5.107	1.038	0.5405	8.519	6.121	1.397	3.959	16.82	26.46	4.165	12.38	3.728
S11	2.977	1.257	0.2872	3.897	4.350	1.028	2.863	17.08	15.57	2.504	17.09	4.804
S12	5.926	0.8465	0.7105	9.262	16.46	1.174	4.870	15.47	24.41	2.374	5.288	3.895
S13	4.200	1.475	0.3394	4.594	2.531	0.8428	3.363	14.81	18.83	1.945	19.79	6.292
S14	7.763	2.084	0.9840	9.255	4.376	1.067	4.148	17.08	24.41	1.873	3.845	5.371
S15	6.626	2.320	1.208	9.960	6.739	1.260	4.020	21.39	22.68	1.970	3.406	7.078

$$Z^+ = (Z_1^+, Z_2^+, \dots, Z_n^+) \tag{2}$$

$$= (\max\{z_{11}, z_{21}, \dots, z_{m1}\}, \max\{z_{12}, z_{22}, \dots, z_{m2}\}, \dots, \max\{z_{1n}, z_{2n}, \dots, z_{mn}\})$$

$$Z^- = (Z_1^-, Z_2^-, \dots, Z_n^-) \tag{3}$$

$$= (\min\{z_{11}, z_{21}, \dots, z_{m1}\}, \min\{z_{12}, z_{22}, \dots, z_{m2}\}, \dots, \min\{z_{1n}, z_{2n}, \dots, z_{mn}\})$$

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_j^+ - z_{ij})^2} \tag{4}$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^n (Z_j^- - z_{ij})^2} \tag{5}$$

按照公式 (6) 计算各评价对象与最优方案的相对接近程度 (C<sub>i</sub>), 0 < C<sub>i</sub> < 1

$$C_i = \frac{D_i^-}{D_i^+ + D_i^-} \tag{6}$$

按照大小将各评价对象排序, C<sub>i</sub> 值越大, 说明评价对象综合质量越好, 结果见表 4。

**2.5.2 GRA<sup>[15]</sup>** 基于 15 批次三子散 12 种成分的含量, 建立灰色模式识别数据集, 由于其量纲不统一, 对原始数据进行规格化处理。设有 m 个样品, 每个样本有 n 项评价指标, 组成评价单元序列 {X<sub>ik</sub>} (i = 1, 2, ..., m; k = 1, 2, ..., n), 本试验按照公式 (7) 对不同批次三子散数据进行规格化处理。

$$Y_{ik} = \frac{X_{ik}}{X_k} \tag{7}$$

其中, Y<sub>ik</sub> 为规格化处理后的数据, X<sub>ik</sub> 为原始数据, X<sub>k</sub> 为 m 个样品第 k 个指标的均值。

采用 GRA 进行评价时, 需要考虑最优参考序列和最差参考序列。最优参考序列为 {X<sub>sk</sub>} (k = 1, 2, ..., n) 是 m 个样品对应指标的最大值; 最差参考序列为 {X<sub>ik</sub>} (k = 1, 2, ..., n), 是 m 个样品对应指标的最小值。

最优参考序列关联系数见公式 (8):

$$\xi_{k(s)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho\Delta_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{sk}| + \rho\Delta_{\max}} \tag{8}$$

式中, Δ<sub>min</sub> = min|Y<sub>ik</sub> - Y<sub>sk</sub>|, Δ<sub>max</sub> = max|Y<sub>ik</sub> - Y<sub>sk</sub>|, Y<sub>ik</sub> 为各个成分对应的 Y<sub>ik</sub> 的最大值, ρ 为分辨系数, 通常取值 0.5。

最差参考序列关联系数见公式 (9):

$$\xi_{k(t)}^i = \frac{\Delta'_{\min} + \rho\Delta'_{\max}}{|Y_{ik} - Y_{tk}| + \rho\Delta'_{\max}} \tag{9}$$

式中, Δ<sub>min</sub>' = min|Y<sub>ik</sub> - Y<sub>tk</sub>|, Δ<sub>max</sub>' = max|Y<sub>ik</sub> - Y<sub>tk</sub>|, Y<sub>ik</sub> 为各个成分对应的 Y<sub>ik</sub> 的最小值, ρ 为分辨系数, 通常取值 0.5。

最优参考序列关联度见公式 (10):

$$r_{i(s)} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{k(s)}^i \quad (10)$$

最差参考序列关联度见公式 (11):

$$r_{i(t)} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{k(t)}^i \quad (11)$$

相关关联度见公式 (12):

$$r_i = \frac{r_{i(s)}}{r_{i(s)} + r_{i(t)}} \quad (12)$$

计算各样品的相对关联度, 并且按  $r_i$  大小排序, 排序结果见表 4。

表 4 15 批次三子散 GRA 与 TOPSIS 分析结果  
Tab 4 GRA and TOPSIS analysis of 15 batches of Sanzi powder

样品	GRA		TOPSIS	
	$r_i$	$r_i$ 排序	$C_i$	$C_i$ 排序
S1	0.4976	7	0.4625	5
S2	0.4431	10	0.3343	12
S3	0.5282	3	0.4931	3
S4	0.4753	8	0.4370	6
S5	0.4464	9	0.3816	10
S6	0.5581	2	0.4903	4
S7	0.3255	15	0.3965	15
S8	0.3852	12	0.4104	11
S9	0.4016	11	0.2713	9
S10	0.5191	4	0.5158	8
S11	0.3554	14	0.3168	14
S12	0.5019	6	0.4259	1
S13	0.3815	13	0.5001	13
S14	0.5123	5	0.3965	7
S15	0.5803	1	0.4104	2

由表 4 所示, GRA 和 TOPSIS 分析结果基本一致, 根据 TOPSIS 分析所得  $C_i$  值以及排序可知, 排在前 8 位的是 S12、S15、S3、S6、S1、S4、S14、S10, GRA 分析所得  $r_i$  值以及排序可知, 排在前 8 位的是 S15、S6、S3、S10、S14、S12、S1、S4。两种分析结果均表明,  $C_i$  值及  $r_i$  值排名均靠后的样品是 S13、S11、S7, 表明这 3 批样品的综合质量相对较差。

### 3 讨论

#### 3.1 含量测定指标的选择

蒙药三子散由诃子、栀子、川楝子三味药材等量配比混合而成。研究表明酚酸类没食子酸、莽草酸, 鞣质类诃子酸、鞣花酸、黄酮类、三萜类等是诃子的主要活性成分<sup>[16]</sup>。栀子的化学成分包括环烯醚萜类京尼平苷、栀子苷, 单萜苷类 jasminoside B, 有机酸类咖啡酸等多种化合物, 其中环烯醚萜是栀子主要的生物活性成分<sup>[17]</sup>。川楝子中含有多

种类型的化合物, 包括三萜、木脂素、黄酮及其他类成分<sup>[18]</sup>, 三萜类化合物是其发挥药效主要的活性成分, 但三萜类化学成分紫外吸收较弱或存在末端吸收, 因此在本试验条件下诃子和栀子中的化学成分对其干扰大, 难以对其准确定量, 同时, 考虑到方中三味药材均含有黄酮类成分, 成分专属性不强。在课题组前期三子散 HPLC 指纹图谱研究的基础上, 结合化学模式识别分析结果<sup>[12]</sup>, 选定诃子中没食子酸、诃子次酸、石榴皮鞣素、安石榴苷、柯里拉京、诃子鞣酸、1, 2, 3, 4, 6-O-没食子酰葡萄糖、诃子林鞣酸、鞣花酸, 栀子中京尼平苷、jasminoside B、咖啡酸这 12 种含量较高的成分作为三子散含量测定的指标成分。

#### 3.2 结果评价

从 15 批三子散样品中 12 种待测成分的含量测定结果来看, 各成分含量均存在一定的批间差异, 分析其原因可能是中蒙药含量易受药材产地、生长环境、采收期等影响, 导致其内在质量产生了很大差异。15 批三子散中诃子鞣酸、京尼平苷含量较高, jasminoside B、诃子林鞣酸含量差距较大, GRA 和 TOPSIS 分析结果基本一致, 根据 TOPSIS 分析所得  $C_i$  值和 GRA 分析所得  $r_i$  值可知, 样品编号为 S1、S3、S4、S6、S10、S12、S14、S15 在所有样品中排名前 8, 这为区分不同批号的产品提供了一种有效的方法。

综上所述, 本研究采用 HPLC 法同时测定三子散中 12 种活性成分的含量, 并尝试将 GRA 分析法与 TOPSIS 数学模型结合对不同批次三子散含量检测数据进行综合评价。该方法准确、简便, 具有多重质量控制效果, 可以为三子散在生产、储存及检验等过程中的质量控制提供方法和依据, 为进一步完善三子散的质量标准提供参考。

### 参考文献

- [1] 李运, 张霖, 徐福荣, 等. 多指标决策分析 TOPSIS 对三七的质量评价研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (22): 4764-4771.
- [2] 顾志荣, 王亚丽, 孙宇靖, 等. 熵权 TOPSIS 模型在甘肃产当归药材综合质量评价中的应用 [J]. 中药材, 2014, 37 (9): 1549-1553.
- [3] 段彦, 李顺祥, 黄丹, 等. 湖南产不同油茶资源的综合评价 [J]. 中医药导报, 2021, 27 (12): 28-33.
- [4] 吴励萍, 卢有媛, 李海洋, 等. 不同干燥方法对枸杞子药材多类型功效成分的影响及其分析评价 [J]. 中草药, 2022, 53 (7): 2125-2136.
- [5] 朱玲娜, 宋佳伟, 庞颖, 等. 基于加权逼近理想解的排序法评价丹参多酚酸盐的应用合理性 [J]. 医药导报, 2021, 40 (1): 105-108.



- [6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 512-513.
- [7] 王思文, 娜仁图雅, 籍学伟. HPLC 法测定蒙成药三子散中没食子酸的含量 [J]. 北方药学, 2021, 18 (1): 21-24.
- [8] 杜文亚, 云冠群, 张建平. HPLC-ELSD 法测定蒙成药“三子散”中川楝素含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27 (5): 38-41.
- [9] 李艳春, 胡志忠, 罗素琴, 等. 蒙药三子散中还原糖的含量测定 [J]. 内蒙古医学院学报, 2010, 32 (6): 551-553.
- [10] 刘宏, 雷露静, 白玉琴, 等. 一测多评法同时测定蒙药三子散中 7 种指标成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (18): 58-63.
- [11] 张慧文, 夏慧敏, 刘宏, 等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速分析三子散的人血成分及代谢产物 [J]. 色谱, 2022, 40 (7): 653-660.
- [12] 刘妍妍, 张慧文, 白云霞, 等. 蒙药三子散 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (3): 319-325.
- [13] 冯晓莉, 李成义, 魏舒畅, 等. 基于主观赋值结合熵权 TOPSIS 法综合评价不同产地黄花菜质量 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (22): 2927-2934.
- [14] 李运, 张霁, 徐福荣, 等. 多指标决策分析 TOPSIS 对三七的质量评价研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (22): 4764-4771.
- [15] 陈佳丽, 谈梦霞, 邹立思, 等. 不同加工竹节参中多元活性成分同时测定及灰色关联度分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (21): 4274-4282.
- [16] 李华爽, 刘永建, 杨洪柳, 等. 诃子化学成分、药理作用机制、质量控制及炮制研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (12): 2130-2141.
- [17] 陈冠宁. 椴子的药物成分及药理作用研究进展 [J]. 特种经济动植物, 2022, 25 (11): 20-22, 32.
- [18] 李海波, 马森菊, 石丹枫, 等. 川楝子的化学成分、药理作用及其毒性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51 (15): 4059-4074.

(收稿日期: 2023-05-08; 修回日期: 2023-07-20)

## 高效液相色谱法测定地氯雷他定口溶膜的溶出度和溶出曲线

李国相<sup>1</sup>, 车颜婷<sup>1</sup>, 高迪<sup>1</sup>, 苗晓莉<sup>1</sup>, 张成宇<sup>1</sup>, 林彬<sup>1</sup>, 张威风<sup>1, 2, 3</sup>, 何淑旺<sup>1, 3\*</sup> (1. 北京达因高科儿童药物研究院有限公司, 北京 100176; 2. 山东大学, 济南 250100; 3. 山东达因海洋生物制药股份有限公司, 山东 威海 264300)

**摘要:**目的 采用高效液相色谱法测定地氯雷他定口溶膜的溶出度和溶出曲线。方法 色谱柱: Agilent C<sub>8</sub> 柱 (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.003 mol·L<sup>-1</sup> 的十二烷基硫酸钠水溶液 (47:53); 流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL; 柱温 35℃。采用浆法以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、0.2 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钠水溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质。结果 地氯雷他定在 0.6~6.7 μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好的线性关系, 回收率在 100.0%~100.5%, RSD 小于 2.0%。地氯雷他定口溶膜在 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中累计溶出度均在 85% 以上, 并且有较好的均一性。结论 该方法简单快速、准确度高且重现性好, 可实现快速测定地氯雷他定口溶膜的溶出度和溶出曲线, 满足大批量样品质量控制需求。

**关键词:** 地氯雷他定; 高效液相色谱法; 溶出度; 溶出曲线

中图分类号: R94, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0489-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.033

### Determination of dissolution and dissolution profile of desloratadine oral soluble film by HPLC

LI Guo-xiang<sup>1</sup>, CHE Yan-ting<sup>1</sup>, GAO Di<sup>1</sup>, MIAO Xiao-li<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-yu<sup>1</sup>, LIN Bin<sup>1</sup>, ZHANG Wei-feng<sup>1, 2, 3</sup>, HE Shu-wang<sup>1, 3\*</sup> (1. Beijing DYNE High-tech Pediatric Pharmaceutical Research & Development Institute Co., Ltd., Beijing 100176; 2. Shandong University, Jinan 250100; 3. Shandong DYNE Marine Biopharmaceutical Limited Corporation, Weihai Shandong 264300)

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (No. 2020M672078); 山东省自然科学基金青年项目 (No. ZR2021QH360)。

作者简介: 李国相, 女, 硕士, 初级工程师, 主要从事化学药品质量研究, email: liguoxiang@dynemed.com \*通信作者: 何淑旺, 男, 博士, 高级工程师, 主要从事化学药品研究管理工作, email: heshuwang@dynemed.com

**Abstract: Objective** To determine the dissolution and dissolution profile of desloratadine in desloratadine oral soluble film by HPLC. **Methods** HPLC was performed on Agilent C<sub>8</sub> column (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.003 mol·L<sup>-1</sup> aqueous sodium dodecyl sulfate solution (47 : 53) at a flow rate of 1.5 mL·min<sup>-1</sup>. The analytes were detected at 280 nm. The injection volume was 10 μL and the column temperature was 35 °C. In the dissolution experiment, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> hydrochloric acid, acetate buffer pH 4.0, 0.2 mol·L<sup>-1</sup> sodium chloride solution and phosphate buffer pH 6.8 as dissolution media with paddle manipulation were used. **Results** The desloratadine showed good linearity at 0.6 ~ 6.7 μg·mL<sup>-1</sup>. The recovery ranged 100.0% ~ 100.5%, and the RSD was less than 2.0%. The cumulative dissolution of desloratadine oral soluble film in 0.1 mol·L<sup>-1</sup> hydrochloric acid solution and phosphate buffer pH 6.8 was over 85% with good uniformity. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reproducible. It can rapidly determine the dissolution and dissolution profile of desloratadine in desloratadine oral soluble film.

**Key words:** desloratadine; HPLC; dissolution; dissolution profile

地氯雷他定是先灵葆雅公司于 1988 年开发上市的三环长效型第 3 代组胺拮抗剂。本品为氯雷他定的活性代谢物，可通过选择性地拮抗外周 H<sub>1</sub> 受体，快速缓解季节性过敏性鼻炎的相关症状，如打喷嚏、流涕和鼻痒、鼻黏膜充血、鼻塞；还用于缓解慢性特发性荨麻疹的相关症状如瘙痒，并可减少荨麻疹的数量及大小<sup>[1-3]</sup>。

地氯雷他定口溶膜为改良型新药，还未上市，各国药典中均未收载该品种。《美国药典》(USP-NF)<sup>[4-5]</sup>、国家食品药品监督管理局标准<sup>[6]</sup>、国家药典委公示稿<sup>[7]</sup>及相关文献<sup>[8-13]</sup>中均是关于地氯雷他定片和地氯雷他定口崩片的溶出度和溶出曲线测定，分别采用紫外分光光度法和 HPLC 法检验剂片或口崩片的溶出度和溶出曲线。紫外分光光度法专属性差、操作烦琐、耗时长，USP 中地氯雷他定口崩片采用 HPLC 法测定溶出度，但流动相中磷酸二氢钾浓度较高，对色谱柱寿命影响较大。陈承贵等<sup>[11-12]</sup>采用 HPLC 法测定溶出度，但流动相用三乙胺调 pH 值，操作难且三乙胺有强烈氨臭，刺激性强，对色谱柱寿命影响也较大。严一铭<sup>[13]</sup>采用 HPLC 法测定溶出曲线，该方法与地氯雷他定片公示稿的有关物质测定方法一致，流动相盐浓度较低、无害环保且便于制备，但地氯雷他定保留时间在 21 min 左右，耗时长。本研究拟优化色谱条件，使地氯雷他定保留时间缩短至 2.5 min 左右，提高检测效率，进而满足样品大批量快速测定的质量控制需求。

## 1 仪器与试剂

1260 液相色谱仪 (美国安捷伦公司)，860DL 药物溶出仪 (LOGAN)，分析天平 (梅特勒托利

多，精度：0.01 mg)，地氯雷他定对照品 (含量：99.9%，批号：100919-202105，中国食品药品检定研究院)，地氯雷他定口溶膜 (规格：5 mg，批号：230301、230302、230303，均为自制)，乙腈和三氟乙酸为色谱纯，十二烷基硫酸钠、盐酸、醋酸钠、冰醋酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氯化钠为化学纯，水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱：采用 Agilent C<sub>8</sub> (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) 柱，流动相：乙腈-0.003 mol·L<sup>-1</sup> 的十二烷基硫酸钠水溶液 (称取十二烷基硫酸钠 0.865 g，加 1000 mL 水溶解，加三氟乙酸 1 mL) (47 : 53)；检测波长 280 nm；流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>；进样量 10 μL；柱温 35 °C。

### 2.2 溶出试验方法

取本品 6 片，照溶出度测定法 (2020 年版《中国药典》四部通则 0931 第二法)，以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 900 mL 为溶出介质，转速为 50 r·min<sup>-1</sup>，依法操作，经 30 min 后取样。另取地氯雷他定对照品适量，精密称定，用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液溶解并定量稀释成每 1 mL 约含 5 μg 的溶液。同法测定，计算每片溶出量。

### 2.3 溶出介质

根据《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》<sup>[14]</sup>并参考日本“药品品质再评价”工程<sup>[15-16]</sup>，采用不同 pH 的 4 种溶出介质，分别为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 (取 9 mL 盐酸，加水稀释至 1000 mL，混匀)、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 (取醋酸钠 1.22 g，冰醋酸 2.46 g，用水溶解并稀释至 1000 mL，冰醋酸调节 pH 值为

4.0)、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液(取 11.7 g 的氯化钠,用水溶解并稀释至 1000 mL)和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.805 g, 氢氧化钠 0.896 g, 加水稀释至 1000 mL, 混匀, 氢氧化钠调节 pH 值为 6.8)。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性** 按处方比例配制空白辅料, 用溶出介质溶解、稀释, 滤过, 取续滤液, 测定。结果 4 种溶出介质中, 空白辅料均不干扰本品溶出度的测定。色谱图见图 1。

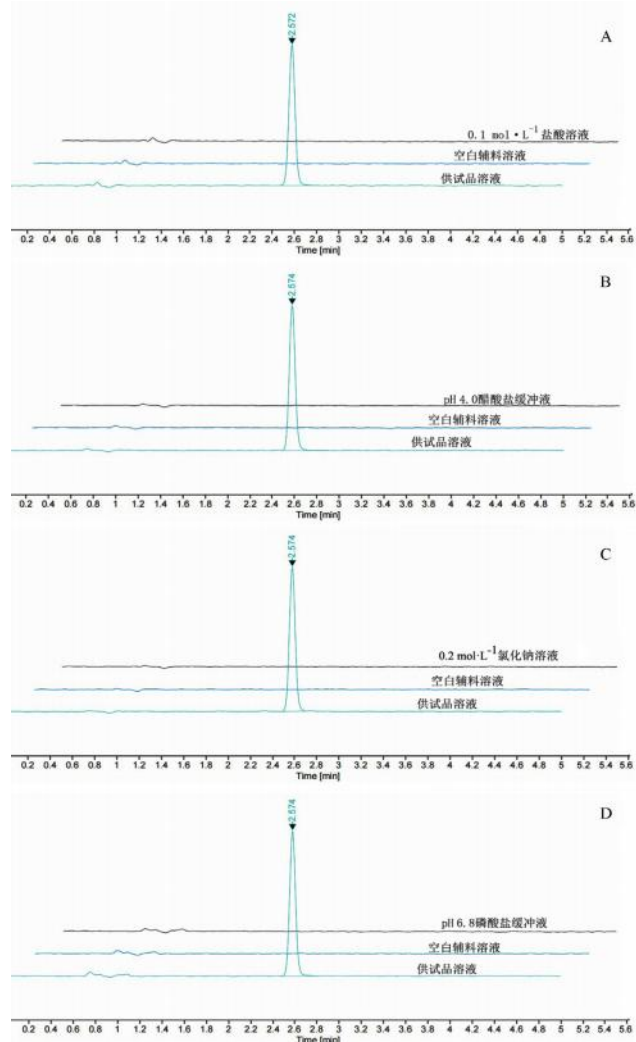


图 1  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 (A)、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 (B)、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液 (C) 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (D) 专属性色谱图

Fig 1 Chromatogram of specificity test in  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydrochloric acid (A), acetate buffer pH 4.0 (B),  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sodium chloride aqueous solution (C), and phosphate buffer pH 6.8 (D)

**2.4.2 线性关系考察** 精密称取地氯雷他定对照品 14 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加溶出介质溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液适量, 用溶出介质稀释制成每 1 mL 中含地氯雷他定分别为 0.6、1.7、2.8、4.5、5.6、6.7  $\mu\text{g}$  的溶液。分别

进样 10  $\mu\text{L}$ , 以地氯雷他定质量浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 求得回归方程, 结果见表 1。地氯雷他定在  $0.6 \sim 6.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 地氯雷他定在不同溶出介质中的线性试验结果

溶出介质	方程	r
$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液	$y = 12.273x - 0.1207$	0.9999
pH 4.0 醋酸盐缓冲液	$y = 12.052x - 0.4115$	0.9998
$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液	$y = 12.297x + 108.11$	1.000
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	$y = 12.137x - 0.2691$	0.9999

**2.4.3 精密度考察** 取对照品溶液 ( $5.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 连续进样 5 次, 结果在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 地氯雷他定峰面积的 RSD 分别为 0.15%、0.56%、0.070%、0.050%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.4 重复性考察** 取样品 6 份 (批号: 230301), 按“2.2”项下方法分别配制溶液, 在同一色谱条件下进样, 结果在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 地氯雷他定峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.71%、0.37%、0.67%, 表明该方法具有良好的重复性。

**2.4.5 回收试验** 精密称取已知量的辅料细粉适量, 置 100 mL 量瓶中, 加溶出介质溶解并稀释至刻度; 精密量取 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 共量取 12 份, 3 份一组, 各组分别精密加入地氯雷他定对照品溶液 ( $0.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 0.2、2.0、2.4 mL, 加溶出介质溶解并稀释至刻度, 进样测定, 并采用外标法计算回收率, 结果显示在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液中平均回收率为 100.4%, RSD 为 0.14%; 在 pH 4.0 醋酸盐缓冲液中平均回收率为 100.5%, RSD 为 0.72%; 在  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液中平均回收率为 100.0%, RSD 为 0.61%; 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中平均回收率为 100.3%, RSD 为 0.57%。

**2.4.6 稳定性考察** 取供试品溶液, 在同一色谱条件下, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定 8 次, 结果在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 地氯雷他定峰面积的 RSD 分别为 0.71%、1.2%、0.22%、1.2%。

**2.4.7 滤膜吸附** 取不同浓度供试品溶液, 在同一色谱条件下, 分别弃去 0、1、2、3、4、6、8、10 mL, 考察峰面积的 RSD, 结果见表 2。结



果显示：50% 浓度、100% 浓度时本品均无滤膜吸附；10% 浓度在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液中无滤膜吸附；在  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液中弃去 1 mL 后，本品无滤膜吸附；在 pH 4.0 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中弃去 2 mL 后，本品无滤膜吸附。

表 2 滤膜吸附试验结果

Tab 2 Filtration membrane adsorption

溶出介质	浓度	结果
$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液	10%	RSD 为 1.2%
	50%	RSD 为 0.65%
	100%	RSD 为 0.55%
pH 4.0 醋酸盐缓冲液	10%	弃去 2 mL 后, RSD 为 1.3%
	50%	RSD 为 0.86%
	100%	RSD 为 1.5%
$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液	10%	弃去 1 mL 后, RSD 为 1.2%
	50%	RSD 为 1.4%
	100%	RSD 为 1.5%
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	10%	弃去 2 mL 后, RSD 为 1.9%
	50%	RSD 为 1.7%
	100%	RSD 为 0.77%

## 2.5 样品含量测定

以 4 种不同溶出介质，按拟订溶出试验方法，转速为  $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，分别于 5、10、15、30、45、60 min ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液) 或 5、10、15、30、45、60、90、120 min (pH 4.0 醋酸盐缓冲液、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液)，取溶液 1.5 mL，取续滤液作为供试液品溶液。另取地氯雷他定对照品适量，精密称定，用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液溶解并定量稀释成每 1 mL 约含  $5 \mu\text{g}$  的溶液，计算每片溶出量并绘制溶出曲线。溶出量结果见表 3 及图 2。

## 3 讨论

### 3.1 三氟乙酸用量考察

三氟乙酸用量分别为 0.05%、0.1%、0.15% 时，考察主峰拖尾因子，结果用量为 0.05% 时，主峰前延；用量为 0.1% 和 0.15% 时，主峰峰形较好，拖尾因子分别为 1.12 和 0.98，保留时间分别为 12 min 和 10 min，考虑三氟乙酸对柱子的影响，故选择用量为 0.1%。

表 3 3 批样品在不同介质中的累计溶出度

Tab 3 Cumulative dissolution of 3 batches of samples in different dissolution media

溶出介质	批号	每片溶出量 /%						均值 /%	RSD /%
		1	2	3	4	5	6		
$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液	230301	103.5	96.1	106.0	99.1	101.6	100.5	101.11	3.5
	230302	100.8	101.9	103.7	105.0	105.1	101.3	102.98	1.9
	230303	100.6	101.6	100.8	100.6	101.6	100.2	100.90	0.56
pH 4.0 醋酸盐缓冲液	230301	78.26	82.02	78.89	77.53	76.21	79.79	78.78	2.6
	230302	85.99	79.75	82.44	79.64	81.50	81.00	81.72	2.9
	230303	77.80	80.74	79.11	80.13	82.66	76.79	79.54	2.7
$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液	230301	59.27	70.91	70.97	70.92	73.21	71.11	69.40	7.3
	230302	65.22	62.74	64.54	70.95	62.59	73.50	66.59	6.9
	230303	59.40	56.62	57.22	54.30	56.29	60.86	57.45	4.1
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	230301	88.13	87.34	85.29	92.16	86.64	89.12	88.11	2.7
	230302	90.58	84.14	91.10	88.71	91.52	86.63	88.78	3.3
	230303	88.14	86.92	85.58	80.29	86.84	86.71	85.75	3.3

### 3.2 不同色谱柱考察

更换不同品牌、不同规格  $\text{C}_8$  色谱柱，最后选择 Agilent ( $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ,  $3.5 \mu\text{m}$ ) 色谱柱，保留时间为 6 min，快速出峰。

### 3.3 考察流动相比例

先后考察了乙腈和  $0.003 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  十二烷基硫酸钠水溶液的比例为 44 : 56、45 : 55、46 : 54、47 : 53、48 : 52、50 : 50 的影响，最终选用乙腈 -  $0.003 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  十二烷基硫酸钠溶液 (47 : 53) 作为流动相等度洗脱，主峰拖尾因子 1.1，保留时间为 2.5 min，满足要求。

### 3.4 溶出介质的筛选

根据日最大剂量 5 mg 推算，地氯雷他定可完全溶解在小于 250 mL 的 pH 1.0 ~ 6.8 范围水溶性介质中，属于高溶解性药物，故采用常规的 4 种介质作为其溶出介质，即  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、水、pH 6.8 磷酸盐缓冲液，但由于水介质中没有离子，无法使地氯雷他定从包覆辅料中置换出来，故选择在水介质中加入氯化钠，同时考察不同氯化钠浓度对溶出曲线的影响。结果选择  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液作为溶出介质。

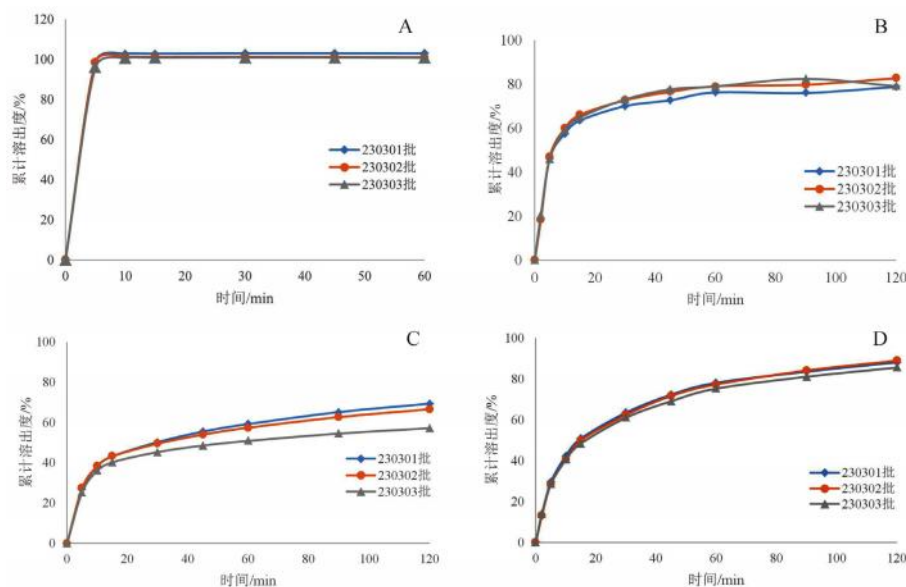


图 2 地氯雷他定口服溶膜在  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 (A)、pH 4.0 醋酸盐缓冲液 (B)、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液 (C) 及 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (D) 的溶出曲线

Fig 2 Dissolution of desloratadine oral soluble film in  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydrochloric acid (A), acetate buffer pH 4.0 (B),  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sodium chloride aqueous solution (C), and phosphate buffer pH 6.8 (D)

### 3.5 溶出装置的选择

参照各国药典<sup>[4-5]</sup>及标准<sup>[6-7]</sup>收载的地氯雷他定片或地氯雷他定口服崩片溶出度项目规定, 设置地氯雷他定口服溶膜的溶出条件为浆法。考察采用铜丝作为沉降装置固定药膜和采用沉降篮固定药膜两种不同投样方法对本品溶出结果的影响。结果采用沉降篮固定药膜时 5 min 内溶出杯中已无漂浮的肉眼可见的口溶膜, 而采用铜丝固定药膜时 5 min 时溶出杯内仍有少量肉眼可见的口溶膜, 两种投样方式累计溶出度无明显差异, 但沉降篮作为沉降方式投样测得的溶出结果 RSD 相对更好, 故选择沉降篮作为沉降装置。

### 4 结论

本试验建立了一种 HPLC 法测定地氯雷他定口服溶膜溶出度和溶出曲线的方法, 专属性、线性范围、精密度、稳定性和回收试验结果均满足要求, 且有耗时短、准确度高、重现性好等优点, 提高检验工作效率的同时为大批量快速测定溶出曲线提供了可能。

### 参考文献

- [1] 徐道华. 第三代抗组胺药地氯雷他定 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14 (12): 1486-1488.
- [2] 周宏艳, 王菁, 罗斌. 地氯雷他定片溶出曲线测定方法的建立 [J]. 中国药业, 2015, 24 (12): 67-69.
- [3] 陈应富, 黄靖涵. 地氯雷他定片的制备及一致性评价 [J]. 科技视界, 2014 (10): 319-320.
- [4] 美国药典委员会. USP-NF Desloratadine Tablets [EB/OL]. 2023, [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M1374\\_02\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M1374_02_01).

- [5] 美国药典委员会. USP-NF Desloratadine Orally Disintegrating Tablets [EB/OL]. 2023, [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M1407\\_05\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M1407_05_01).
- [6] 国家食品药品监督管理局标准 [S]. WS1-(X-401)-2004Z. 2004.
- [7] 国家药典委员会. 关于地氯雷他定片国家药品标准草案的公示 [EB/OL]. [2021-09-29]. <https://www.chp.org.cn/gjyjw/hxyp/16481.jhtml>.
- [8] 龚春燕, 申国庆, 郭静. 3 个药厂地氯雷他定片的溶出度考察 [J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13 (2): 56-58.
- [9] 李美芳, 蔡锦雄, 陈承贵, 等. 国家评价性抽验地氯雷他定制剂质量分析 [J]. 中国药物评价, 2018, 35 (1): 16-20.
- [10] 刘颖, 王伟, 郑雅楠, 等. 地氯雷他定自乳化释药系统的制备及质量评价 [J]. 药物评价研究, 2020, 43 (11): 2193-2200.
- [11] 陈承贵, 李美芳, 庞发根, 等. 国产地氯雷他定片溶出度方法的建立 [J]. 中国药品标准, 2018, 19 (6): 437-441.
- [12] 陈承贵, 李美芳, 庞发根, 等. 国产地氯雷他定片的溶出曲线考察 [J]. 中国药业, 2019, 28 (1): 24-27.
- [13] 严一铭. 自制和原研地氯雷他定片溶出曲线的比较和评价 [J]. 上海医药, 2018, 39 (17): 68-71.
- [14] 国家食品药品监督管理局, 关于发布普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则和化学药物 (原料药和制剂) 稳定性研究技术指导原则的通告 (2015 年第 3 号) [EB/OL]. [2015-02-05]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypqgtg/ypqgtg/20150205120001100.html>.
- [15] 谢沐风. 简介日本“药品品质再评价”工程 (溶出度研究系列一) [J]. 中国药品标准, 2005, 6 (6): 42-46.
- [16] 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.

(收稿日期: 2023-08-07; 修回日期: 2023-09-26)

## 不同处方美沙拉秦(噻)肠溶片中相关杂质的分析

吴琦琦, 刘轶, 周明, 李帅, 李晓燕, 刘雁鸣, 文亮\* (湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001)

**摘要:** **目的** 考察国内 3 个生产企业的 115 批次美沙拉秦(噻)肠溶片的杂质情况, 并对其主要杂质进行初步定性及来源分析。**方法** 采用液相色谱法及液质联用法对 3 个生产企业的 115 批次样品进行相关杂质的定量及定性分析, 并采用费休氏法对含特定杂质的样品进行水分的测定, 考察该杂质与水分的关联性。**结果** 共检出 4 个主要杂质, 杂质 1、杂质 2 和杂质 4 为企业 1 样品的特有杂质, 其中杂质 1、杂质 2 为处方中辅料与原料发生反应产生的杂质; 杂质 4 与水分相关, 处方中的辅料可能会促进杂质 4 的产生。杂质 3 为欧洲药典中杂质 G, 3 个企业样品均有检出。**结论** 不同处方的美沙拉秦(噻)肠溶片中的相关杂质差异较大, 企业 1 处方中的原辅料存在不相容的问题, 建议企业 1 对处方进行变更。

**关键词:** 美沙拉秦(噻)肠溶片; 处方; 杂质; 原辅料相容性

**中图分类号:** R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0494-05

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.034

### Related impurities in different prescriptions of mesalazine enteric-coated tablets

WU Qi-qi, LIU Yi, ZHOU Ming, LI Shuai, LI Xiao-yan, LIU Yan-ming, WEN Liang\* (*Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001*)

**Abstract: Objective** To determine the impurities in 115 batches of mesalazine enteric-coated tablets from 3 domestic manufacturers, and to conduct preliminary qualitative and source analysis of the main impurities. **Methods** The related impurities were quantitatively and qualitatively analyzed by liquid chromatography (LC) and LC-MS. The water content of samples containing specific impurities was determined by Fisher's method. The correlation between the impurities and water was studied. **Results** Totally 4 main impurities were detected. Impurities 1, 2 and 4 were the specific impurities of the sample produced by enterprise 1, among which impurities 1 and 2 were the impurities produced by the reaction between the auxiliary materials and the raw materials in the prescription. Impurity 4 was a hydrolyzed impurity, and excipients in the prescription promoted the production of impurity 4. Impurity 3 was impurity G in the European Pharmacopoeia, which was detected in all samples from 3 companies. **Conclusion** The related impurities in mesalazine enteric-coated tablets in different prescriptions vary, and the raw materials in the prescription of enterprise 1 are incompatible, so enterprise 1 should modify related prescription.

**Key words:** mesalazine enteric-coated tablet; prescription; impurity; compatibility of raw and auxiliary material

美沙拉秦(噻), 化学名为 5-氨基-2-羟基苯甲酸<sup>[1-2]</sup>, 是临床治疗溃疡性结肠炎和克罗恩病的一线药物<sup>[3-4]</sup>。由瑞典 PharmaciaAB 公司开发, 于英国 TillotsLabs 公司 1985 年首次上市。目前国内共有 3 家企业生产。本品已知杂质共有 16 种<sup>[5]</sup>,

大多含有硝基苯或氨基苯结构片段, 具有潜在的基因毒性。通过基因毒性预测软件 Derek 和 Sarah 分析, 其杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 E、杂质 I、杂质 J、杂质 M、杂质 N、杂质 S 均为阳性, 其中杂质 A 为对氨基酚, 因可诱导 DNA 的断裂

**基金项目:** 湖南省自然科学基金科药联合基金 (No.2021JJ80041)。

**作者简介:** 吴琦琦, 女, 硕士, 主任药师, 主要从事药物分析及质量评价研究, email: 348351232@qq.com \* **通信作者:** 文亮, 男, 主管药师, 主要从事药物分析及质量评价研究, email: 279956013@qq.com



而具有明确的遗传毒性。《欧洲药典》对这些杂质进行了严格的控制；而国内现行质量标准有 3 个，部分标准缺失有关物质项，部分标准杂质检出能力差，可能会存在质量风险。溃疡性结肠炎和克罗恩病根治困难、易反复发作，一旦患病，往往需要长期服药<sup>[6]</sup>。因此，亟须对其首选药物——美沙拉秦（噁）肠溶片上市后的安全性、有效性及质量可控性进行相关的评价性研究<sup>[7]</sup>。

### 1 仪器与试药

Agilent1260 高效液相色谱仪、Agilent 1260 2D-6120 二维液质联用仪（美国安捷伦公司）；梅特勒托利多 V20 水分测定仪（瑞士梅特勒托利多公司）；瑞士万通 XP205 电子天平（精度 0.01 mg）。

美沙拉秦（噁）肠溶片：企业 1（51 批次样品）、企业 2（32 批次样品）、企业 3（32 批次样品）；甲醇为色谱纯，磷酸氢二钾、10% 四丁基氢氧化铵水溶液为分析纯，水为纯化水。

### 2 方法

#### 2.1 液相色谱条件

色谱柱为 Agilent1 C18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为磷酸盐缓冲液（取磷酸氢二钾 4.35 g，加水溶解并稀释至 1000 mL，用磷酸调 pH 值至 7.2）-TBAH 溶液 [取 10% 四丁基氢氧化铵水溶液 80 mL，加水稀释至 200 mL，用硫酸溶液（1→2）调节 pH 值至 7.5]- 甲醇 - 水（250：50：100：600）；流动相 B 为磷酸盐缓冲液 -TBAH 溶液 - 甲醇 - 水（250：50：500：200），按表 1 梯度洗脱，流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>；柱温为 40℃；检测波长为 240 nm；进样量为 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序  
Tab 1 Gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
25	0	100
40	0	100
42	100	0
47	100	0

#### 2.2 质谱参数

采用 ESI 离子源、正离子及负离子全扫描模式，*m/z* 范围为 70～1000，扫描时间 0.2 s，喷雾电压 2.5 kV，去溶剂温度 500℃，去溶剂气体 800 L·h<sup>-1</sup>。

#### 2.3 溶液的制备

取供试品 10 片，研细，精密称取细粉适量（约相当于美沙拉秦 40 mg），置 100 mL 量瓶中，

加甲醇 20 mL 和 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，作为供试品溶液；精密量取供试品溶液 0.5 mL，置 500 mL 量瓶中，用 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。临用时新制。

### 3 结果

#### 3.1 杂质谱

采用“2.1”项下条件对 115 批美沙拉秦（噁）肠溶片样品进行了分析，结果如图 1 所示。主要检出 4 种杂质，杂质 3 为欧洲药典中杂质 G，3 家企业样品均有检出，其余为未知杂质，且均为企业 1 生产的样品特有。各杂质含量测定结果如表 2 所示。

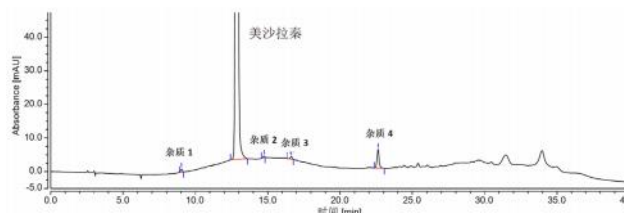


图 1 美沙拉秦（噁）肠溶片杂质谱

Fig 1 Impurity spectrum of mesalazine enteric-coated tablets

表 2 各杂质含量测定结果 (%)

Tab 2 Content of impurities (%)

生产单位	批数	含量平均值			
		杂质 1	杂质 2	杂质 3	杂质 4
企业 1	51	0.25	0.01	0.04	0.28
企业 2	32	0	0	0.04	0
企业 3	32	0	0	0.05	0

#### 3.2 杂质 1、杂质 2 来源分析

首先考虑是否为原辅料引入。各企业所用原辅料如表 3 所示。将企业 1 所用原辅料分别采用“2.1”项下条件测定，结果如图 2 所示，均无该 3 个杂质峰，证明不是原辅料直接引入。

从该企业的留样库里调取了 5 批留样（均为本次研究涉及的批次），采用“2.1”项下条件进样测定，结果与市售样品一致。提示该杂质可能在出厂时已经存在，不由储存产生。

取处方量的原辅料进行压片前工艺的模拟，分别于原辅料混合、制粒、60℃干燥 3 h 3 个步骤取样测试。结果如图 3 所示，从原辅料混合后，杂质 1 就开始出现，并在制粒、干燥后该杂质逐渐增多。

对比 3 家企业所用辅料，发现乳糖、微晶纤维素和滑石粉是企业 1 所特有，分析乳糖的结构发现，乳糖是由葡萄糖及半乳糖所组成的双糖，即由葡萄糖的第四个碳原子上的羟基与半乳

表 3 美沙拉秦 ( 噻 ) 肠溶片处方

Tab 3 Prescription of mesalazine enteric-coated tablets

所用原辅料	生产企业		
	企业 1	企业 2	企业 3
美沙拉秦	✓	✓	✓
羧甲淀粉钠	✓		✓
乳糖	✓		
聚维酮 K30	✓	✓	
微晶纤维素	✓		
滑石粉	✓		
淀粉		✓	
预胶化淀粉		✓	✓
低取代羟丙纤维素		✓	✓
硬脂酸镁		✓	✓
羟丙甲纤维素		✓	
乙醇		✓	
玉米淀粉			✓
二氧化硅			✓
薄膜包衣剂	✓	✓	✓

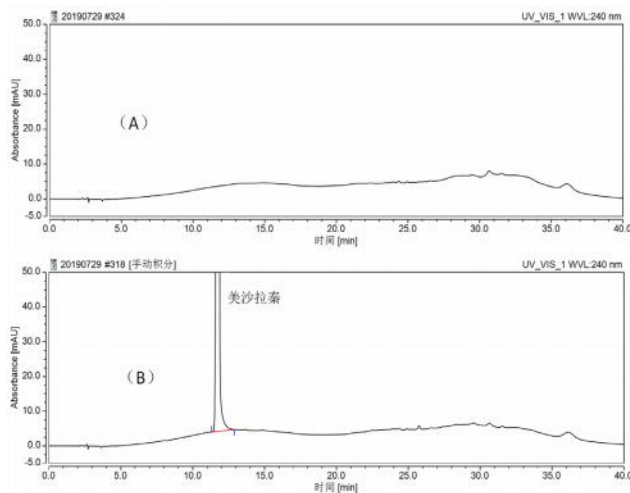


图 2 企业 1 原辅料色谱图

Fig 2 API and excipients chromatograms of enterprise 1

A. 空白辅料 ( blank excipients ); B. 原料 ( API )

糖中第一个碳原子的β-半缩醛羟基失水成苷键而得。因此仍然保持着葡萄糖分子上所含醛基的还原性。如图 4 所示, 美沙拉秦结构中含有伯胺基, 在加热的条件下能与还原糖发生羰氨反应 ( Maillard 反应 ), 氨基与羰基缩合生成席夫碱。温度 20 ~ 25 °C 即可发生 Maillard 反应, 一般每相差 10 °C, 反应速度相差 3 ~ 5 倍, 30 °C 以上速度加快, 高于 80 °C 时, 反应速度受温度和氧气影响小。水分含量在 10% ~ 15% 时, 反应易发生。该企业工艺参数显示, 本品为湿法制粒, 干燥温度为 60 °C, 均利于 Maillard 反应的发生。

用“2.2”项下方法测试杂质 1 的分子量, 如图 5 所示, 在负离子模式下, 分子离子峰质荷比

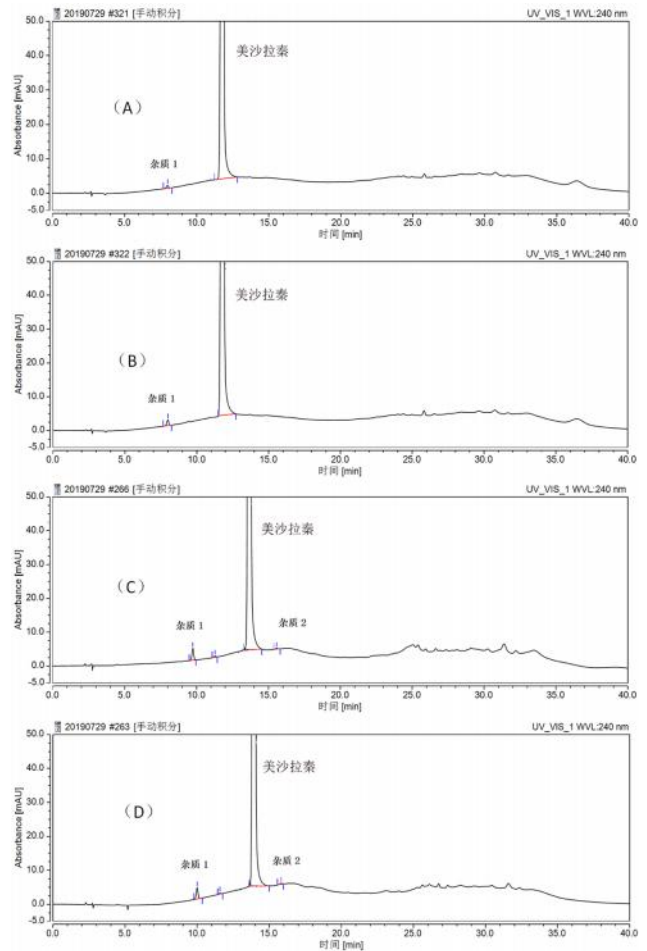


图 3 企业 1 制粒过程样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of sample pelletizing process from enterprise 1

A. 原辅料混合后样品 ( API mixed with excipients ); B. 湿法制粒后样品 ( sample after the wet granulation ); C. 湿颗粒 60 °C 干燥 3 h 后样品 ( sample after the drying at 60 °C for 3 h ); D. 原料与乳糖湿法制粒 60 °C 干燥 3 h 样品 ( API and lactose wet granule drying at 60 °C for 3 h )

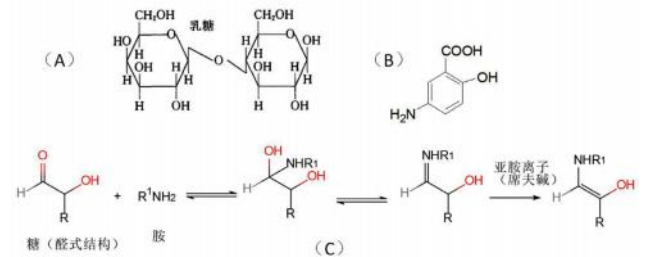


图 4 乳糖与美沙拉秦的反应

Fig 4 Reaction of lactose with mesalazine

A. 乳糖 ( lactose ); B. 美沙拉秦 ( mesalazine ); C. 伯胺与还原糖的反应 ( reaction of primary amine with reducing sugar )

为 476, 正离子模式下, 分子离子峰的质荷比为 478, 证明该杂质的分子量为 477。乳糖的分子量为 342, 美沙拉秦的分子量为 153, 两者缩合脱水后的分子量恰好就是 477。杂质 2 与杂质 1 质荷比相同, 可能为杂质 1 的异构体。

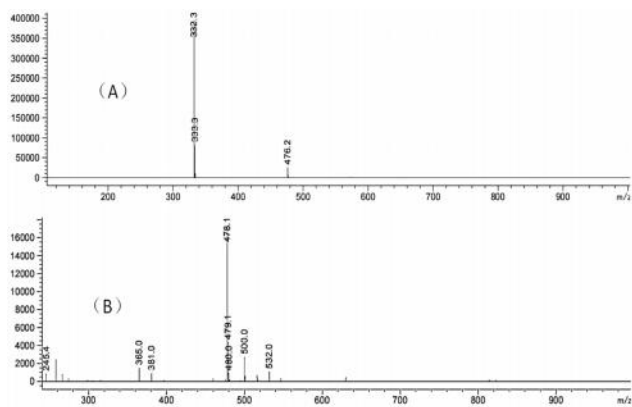


图 5 杂质 1 质谱图

Fig 5 Mass spectrum of impurity 1

A. 负离子模式 (negative ion mode); B. 正离子模式 (positive ion mode)

综上所述, 杂质 1 可能为辅料乳糖与美沙拉秦原料在生产过程中发生了 Maillard 而产生的。

### 3.3 杂质 4 来源分析

与同企业未检出杂质 4 批次的样品比较, 检出杂质 4 的样品除去包衣后的片芯颜色都偏深, 且片子硬度偏软, 其水分分别为 3.24% 与 3.41%。于企业 1 留样库里调取了同批次的留样进行测定, 结果如表 4 所示。从企业留样库里调取的同样批次的样品均未检出杂质 4, 片芯颜色均显类白色, 且片子硬度较大, 水分值分别为 1.94% 与 2.08%。提示样品在流通储存过程中发生了变化 (硬度变小, 水分增加), 该杂质可能于流通储存环节中产生。

将美沙拉秦原料及 3 个企业的样品分别进行高温、高湿、光照、高温+高湿四种条件的影响因素试验, 结果如表 5 所示。在单独的光照、高温及高湿的条件下, 本品的性状及杂质 4 没有改变, 但在高温及高湿的共同作用下, 企业 1 样品的性状发生了改变, 同时产生了杂质 4 (见图 6)。企业 2 及企业 3 样品的性状均未发生改变, 也未产生杂质 4。

表 4 不同来源美沙拉秦样品中杂质 4 的检测情况

Tab 4 Detection of impurity 4 in mesalazine samples from different sources

批号	本次抽取到的样品			企业留样库里调取的样品		
	性状	杂质 4 含量 /%	水分含量 /%	性状	杂质 4 含量 /%	水分含量 /%
20180506	微红色	0.12	3.24	类白色	未检出	1.94
20180806	微红色	0.44	3.41	类白色	未检出	2.08

表 5 各因素对不同来源美沙拉秦样品中杂质 4 的影响

Tab 5 Effect of various factors on impurity 4 in mesalazine samples from different sources

影响因素	原料		企业 1		企业 2		企业 3	
	性状	杂质 4	性状	杂质 4	性状	杂质 4	性状	杂质 4
光照	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出
高温	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出
高湿	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出	类白色	未检出
高温+高湿	类白色	未检出	褐色	0.21%	类白色	未检出	类白色	未检出

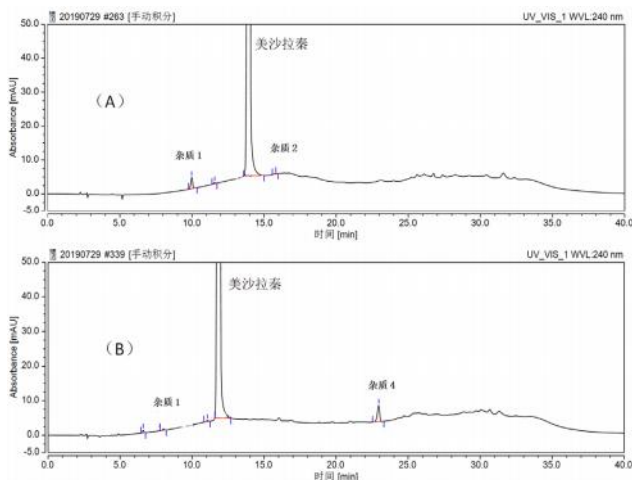


图 6 企业 1 杂质色谱图

Fig 6 Impurity chromatogram of enterprise 1

A. 留样库样品 (sample kept in the sample warehouse); B. 高温高湿放置 7 d 后样品 (sample after being placed at high temperature and humidity for 7 days)

分析各企业处方发现, 企业 1 使用了辅料微晶纤维素。微晶纤维素吸湿性强, 在高湿度下会吸湿增加水分, 水分作为反应介质, 增加了系统的塑性和分子流动性, 同时形成水膜, 反应就在此发生, 进一步引起美沙拉秦降解, 杂质显著增加。

企业 2 和企业 3 的处方未使用微晶纤维素, 其样品比较稳定, 高温高湿放置 7 d 后, 性状未发生变化, 杂质未见增加。

用 LC-MS 测试杂质 4 的分子量, 结果如图 7 所示, 负离子模式下, 分子离子峰质荷比为 260; 正离子模式下, 分子离子峰的质荷比为 262。证明该杂质的分子量为 261。

根据其分子量初步推测, 杂质 4 的结构可能为图 8 所示。具体情况还有待进一步研究证实。

## 4 讨论

### 4.1 不同处方的样品杂质谱有较大差异



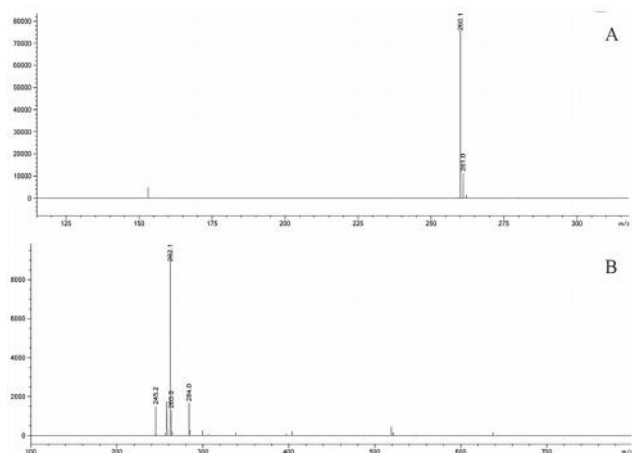


图 7 杂质 4 质谱图

Fig 7 Mass spectrum of impurity 4

A. 负离子模式 (negative ion mode); B. 正离子模式 (positive ion mode)

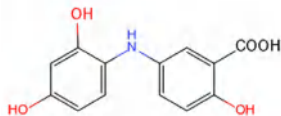


图 8 杂质 4 可能的结构图

Fig 8 Possible structure of impurity 4

本文对市售各企业多批样品进行了有关物质考察,共检出 4 个主要杂质,其中杂质 1、杂质 2 和杂质 4 为企业 1 生产的样品的特有杂质,杂质 3 为所有样品的共有杂质。提示不同处方的样品杂质谱有较大差异。

#### 4.2 企业 1 处方不合理,应对其进行变更

杂质 1、杂质 2 为企业 1 处方中辅料与原料发生反应产生的,同时,企业 1 处方中的辅料还可能会促进杂质 4 的生成。提示企业 1 处方不合理,应对其进行变更。

#### 4.3 原辅料相容性应引起重视

《药用辅料与药物相容性研究指导原则》指出:药物制剂中各种药用辅料、药用辅料的杂质及药物活性成分之间不得发生化学反应,不产生

新化学成分或杂质,进而不影响药物的疗效。乳糖与美沙拉秦会产生 Maillard 反应,生成杂质,含美沙拉秦的制剂中应避免使用乳糖作为辅料。

微晶纤维素吸湿性强,在高湿度下会吸湿增加水分,可能会引起美沙拉秦降解速率的增大,使制剂杂质显著增加,含美沙拉秦的制剂中也应避免使用微晶纤维素作为辅料。

#### 4.4 小结

本文对目前市售的不同处方的美沙拉秦(噁)肠溶片的杂质进行全面分析,通过建立新的杂质检测方法及杂质谱,从杂质种类、杂质个数、杂质来源、不同处方样品的稳定性等方面进行分析,从而对其产品质量及生产工艺进行评价,同时,使各企业对自身产品质量状况、同品种质量现状以及产品质量改进等各方面有客观的认识和了解,为药品监督管理部门今后对美沙拉秦(噁)肠溶片的监督管理提供了参考。

#### 参考文献

- [1] 杨志欣,杜素美.5-氨基水杨酸制剂研究现状及展望[J].安徽医药,2010,14(2):125-126.
- [2] 范一楠.抗结肠炎药美沙拉秦的合成改进研究[J].科技向导,2015(2):213.
- [3] 林晔.美沙拉秦栓和美沙拉秦肠溶片在溃疡性左半结肠炎的疗效比较[J].临床医学工程,2015,22(6):771-772.
- [4] 李小兵,吴卫东,瞿礼强.美沙拉秦缓释片治疗缓解期溃疡性结肠炎的随机对照研究[J].中外医疗,2015,36(9):104-105.
- [5] European Pharmacopoeia [M]. 11.0. Strasbourg France: EDQM: 3350-3353.
- [6] 杨维良,张好刚.论肠结核的诊治现状[J].临床外科杂志,2008,16(1):57-58.
- [7] 陈雷,肖艳红.美沙拉秦生产过程中重氮反应及萃取过程的工艺研究[J].医药工程设计杂志,2002,23(2):45-48.

(收稿日期:2023-11-21;修回日期:2023-12-25)

## 维胺酯原料药的有关物质分析

李钰鑫<sup>1, 2</sup>, 兰文<sup>1, 2\*</sup>, 刘雁鸣<sup>1, 2</sup> (1. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001)

**摘要:** **目的** 建立测定维胺酯原料药中有关物质的高效液相色谱法, 对其主要杂质的结构及毒理性质进行分析。**方法** 采用安捷伦 Eclipse XDB C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (93:7) 为流动相, 检测波长 370 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 主要未知杂质采用液质联用进行结构分析, 并采用 ADMET Predictor 软件对维胺酯及主要杂质进行毒性预测。**结果** 在选定色谱条件下, 维胺酯与各杂质峰均能良好地分离, 方法学考察符合分析检测要求。根据质谱数据初步确认主要未知杂质为维胺酯的同分异构体, 软件预测维胺酯及其主要杂质对肝脏可能产生的毒性损伤。**结论** 该方法操作简单、准确度高、重现性好, 可同时测定维 A 酸和相关杂质, 通过对杂质的结构鉴定和毒性分析, 为维胺酯的质量控制提供了数据支撑。

**关键词:** 维胺酯; 有关物质; 液质联用; ADMET Predictor 软件

**中图分类号:** R927      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0499-05  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.035

### Residual substances in viaminate raw materials

LI Yu-xin<sup>1, 2</sup>, LAN Wen<sup>1, 2\*</sup>, LIU Yan-ming<sup>1, 2</sup> (1. Hunan Institute for Drug Control and Testing, Changsha 410001; 2. NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001)

**Abstract: Objective** To determine the residual substances in viaminate raw materials by high-performance liquid chromatography, identify the structure of unknown impurities, and determine the toxic properties of viaminate and major impurities. **Methods** Viaminate and major impurities were separated by Agilent Eclipse XDB C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol-water (93:7) as the mobile phase. The detection wavelength was 370 nm and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. ADMET Predictor software was used to predict the toxicity of viaminate and major impurities. **Results** Under the selected chromatographic conditions, the peaks of viaminate and impurities were well separated. The methodology met the requirements of analysis and detection. The unknown impurity was an isomer of viaminate according to the mass spectrometry data. The software predicted that viaminate and the major impurities were toxic to the liver. **Conclusion** The method has simple operation, high accuracy and good reproducibility, and can simultaneously determine the major impurities in viaminate raw materials. Identification of the unknown impurity and toxicity analysis of major impurities provide data for the quality control of viaminate.

**Key words:** viaminate; related substance; LC-MS; ADMET Predictor software

维胺酯, 化学名为 *N*-(4-乙氧碳基苯基) 维甲酰胺, 因结构与全反式维 A 酸类似, 其作用机制与 13-顺维 A 酸及芳香维 A 酸较相似, 但刺激性低于维 A 酸, 不良反应比维 A 酸少, 治疗指数

为维 A 酸的 10 倍<sup>[1-2]</sup>。维胺酯能够调节和控制上皮细胞分化与生长, 减少皮脂分泌, 抑制角质形成细胞的角化过程, 使角化异常恢复正常, 发挥抗雄激素、抗炎、调节免疫及预防瘢痕形成等作

**基金项目:** 湖南省自然科学基金科药联合基金 (No.2021JJ80035)。

**作者简介:** 李钰鑫, 女, 主管药师, 主要从事化学药品分析检验和质量研究, email: 591843590@qq.com \*通信作者: 兰文, 女, 主任药师, 主要从事化学药品分析检验和质量研究, email: 316367111@qq.com

用, 用于治疗各种痤疮、角化异常性皮肤病等, 同时对鱼鳞病、银屑病(牛皮癣)、苔藓类皮肤病、黏膜病及结缔组织等疾病也有一定疗效<sup>[3-5]</sup>。维胺酯为我国自行研制的维 A 酸类药物, 维 A 酸作为起始原料与三氯化磷反应转化为维 A 酰氯, 再与苯佐卡因反应生成维胺酯, 反应路线如图 1 所示。目前国内仅 3 家维胺酯原料生产企业, 国内外药典均未收载该品种<sup>[6-7]</sup>, 现行标准为《国家药品标准》化学药品地标升国标第二册 [WS-10001-(HD-0164)-2002] 和原国家食品药品监督管理局标准 YBH14602008, 与《国家药品标准》化学药品地

标升国标第二册标准比较, 原国家食品药品监督管理局标准 YBH14602008 增订了有关物质及残留溶剂检查, 有关物质方法仅对杂质总量进行控制。本文在现行标准基础上, 结合《中国药典》2020 年版四部指导原则<sup>[8]</sup>, 首次建立了同时测定维胺酯中维 A 酸和其他杂质的 HPLC 方法; 并采用液质联用技术<sup>[9-10]</sup>结合强制降解试验, 对主要未知杂质峰进行定性分析并推测杂质来源。采用 ADMET Predictor 软件<sup>[11]</sup>对维胺酯及其主要杂质进行毒性预测, 为制订维胺酯原料药的质量标准提供参考。

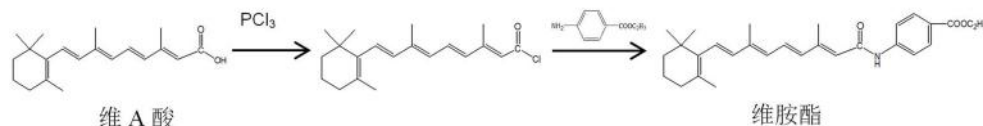


图 1 维胺酯的合成路线

Fig 1 Synthetic route of viaminol ester

## 1 材料

Ultimate3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司); 十万分之一 MS205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 1290-6550 型高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(美国安捷伦公司)。

维胺酯对照品(纯度: 99.03%, 批号: 190303, C 公司, 湖南省药品检验研究院标定); 维 A 酸对照品(纯度: 99.4%, 批号: 100307-200902, 中国食品药品检定研究院); 甲醇(色谱纯, Burdick & Jackson); 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯; 15 批维胺酯原料药(A 公司, 批号分别为 170101、170102、170103、181002; B 公司, 批号分别为 161205、161206、190303、190304、190305; C 公司, 批号分别为 V2A20160501、V2A20160502、V2A20160503、VIA-20190401、VIA-20190402、VIA-20190403)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(93:7); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长: 370 nm; 进样量: 20 μL。

### 2.2 溶液的准备

**2.2.1 供试品溶液的准备** 取维胺酯约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量超声使溶解, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取维 A 酸对照品约 12.5 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇适量超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 对照溶液的制备** 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.4 系统适用性溶液的制备** 取维胺酯对照品适量, 加甲醇超声溶解并稀释成每 1 mL 中约 0.5 mg 的溶液, 取溶液适量, 于 (2500 ± 500) lx 光照强度下照射 30 min, 即得。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 专属性** 取“2.2”项下系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液及稀释剂(甲醇)各 20 μL 进样测定, 结果显示维胺酯的出峰时间约 15.6 min, 维 A 酸的出峰时间约 6.363 min, 峰形对称性较好, 维 A 酸理论塔板数在 11 000 以上, 主峰与已知杂质维 A 酸及其他未知杂质峰均有效分离。空白溶剂对测定无干扰, 结果见图 2。

**2.3.2 强制降解试验** 采用光照、酸、碱、氧化、高温等剧烈条件对本品(批号: 170101)进行破坏性降解处理。取本品 25 mg, 平行 5 份, 分置 50 mL 量瓶中, 经以下条件进行破坏处理: ①光照破坏[于照度 (2500 ± 500) lx 下放置 5 d]; ②酸破坏 (1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 0.5 mL, 放置 4 h, 加 5 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调至中性); ③碱破坏 (1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 0.5 mL, 放置 4 h, 加 5



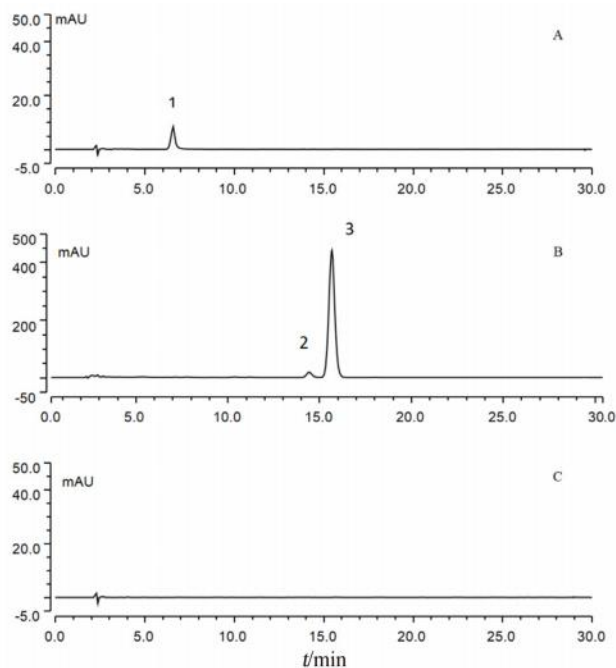


图 2 HPLC 测定维胺酯的专属性色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram for specificity test of viaminate

A. 对照品溶液 (reference solution); B. 系统适用性溶液 (system solution); C. 溶剂 (solvent); 1. 维 A 酸 (retinoic acid); 2. 未知杂质 A (unknown impurity A); 3. 维胺酯 (viaminate)

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液调至中性); ④ 氧化破坏 (3% 过氧化氢溶液 1 mL, 放置 4 h); ⑤ 高温破坏 (置 150 °C 烤箱中放置 4 h, 放冷)。结果表明: 光照破坏试验中, 在主峰相对保留时间 0.9 处的未知杂质峰面积明显增加, 命名该杂质为杂质 A, 说明本品易被光破坏, 后期试验均采用避光操作; 其他破坏试验产生了少量杂质, 各杂质均能与主峰完全分离, 表明本色谱系统专属性良好。在各破坏试验记录的色谱图中, 主峰保留时间 2 倍以后的基线平稳且没有检测出其他杂质峰, 故供试品溶液的采集时间拟定为主峰保留时间的 2 倍, 见图 3。

**2.3.3 维 A 酸的线性关系考察** 取维 A 酸对照品 20.43 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为维 A 酸对照品储备液。分别精密量取维 A 酸对照品储备液适量, 用甲醇依次稀释配成质量浓度约为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液。精密量取上述溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 依法测定, 以质量浓度 ( $X$ ) 为横坐标, 峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程:  $Y = 136.34X - 15.255$ ,  $r = 1.000$ , 结果表明, 维 A 酸在 0.1015 ~ 50.76  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积线性关系良好。

**2.3.4 进样精密度试验** 取“2.3.3”项下第 4 份溶液, 精密量取 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 连续

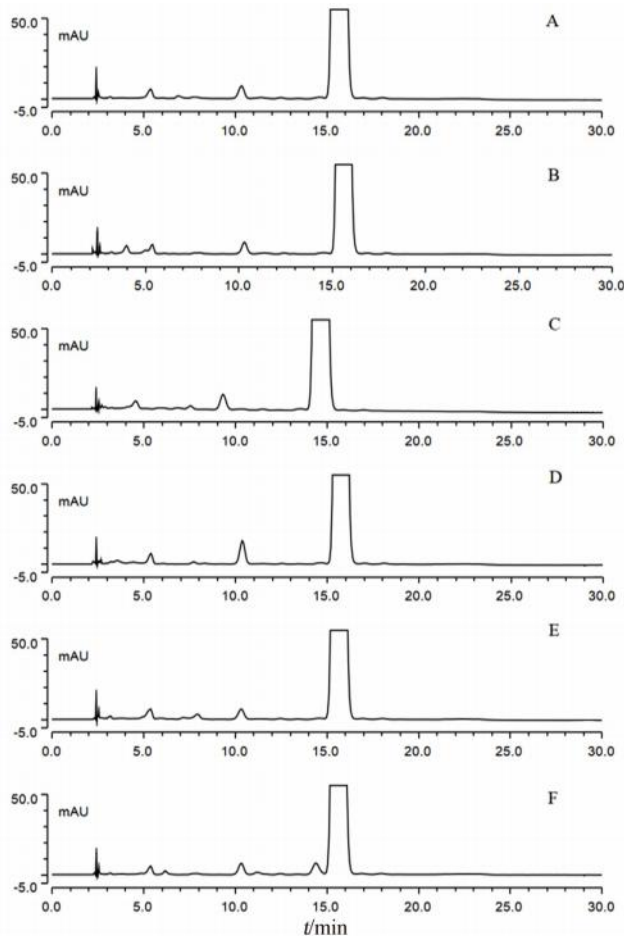


图 3 维胺酯强制降解试验色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram for forced degradation test of viaminate

A. 未破坏 (non-destroyed); B. 酸破坏 (destroyed by acid); C. 碱破坏 (destroyed by alkali); D. 氧化破坏 (destroyed by oxidation); E. 高温破坏 (destroyed by high temperature); F. 光照破坏 (destroyed by light)

进样 6 次, 记录色谱图, 结果  $RSD$  为 0.67%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.5 回收试验** 精密称取已知维 A 酸杂质质量 (0.052%) 的样品 (批号: 170101) 约 25 mg 6 份, 分别置 50 mL 棕色量瓶中, 各精密加入维 A 酸对照品溶液 (质量浓度为 0.1244  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1 mL, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率, 平均回收率为 98.12%,  $RSD$  为 0.53%。

**2.3.6 定量限及检测限考察** 取维胺酯和维 A 酸对照品各适量, 逐级稀释, 各取 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。设定量限  $S/N = 10$ , 检测限  $S/N = 3$ , 得维胺酯和维 A 酸的定量限依次为 0.058  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.074  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 检测限依次为 0.020  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.039  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,

**2.3.7 重复性试验** 取“2.3.5”项下 6 份供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 测得

维 A 酸的量为 0.59%，RSD 为 1.0%；其他单个杂质质量为 0.28%，RSD 为 1.0%；各杂质总量为 1.0%，RSD 为 1.2%。

**2.3.8 稳定性试验** 取“2.2”项下供试品溶液，分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 后，进样测定，结果供试品溶液中维 A 酸、其他单个杂质及各杂质的总峰面积的 RSD 分别为 1.3%、0.88% 及 0.60%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.9 耐用性试验** 使用 3 个品牌色谱柱 [Agilent Eclipse XDB C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Welch Ultimate X C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、CAPCELL TYPE MG II (4.6 mm×250 mm, 5 μm)] 调整柱温、流速、流动相比比例等色谱条件进行耐用性考察，结果峰形和分离均较好，精密称取维胺酯 (批号：170101) 约 25 mg 依法测定有关物质，结果见表 1。

表 1 维 A 酸的耐用性试验结果

Tab 1 Durability of retinoic acid

色谱柱	相邻杂质峰与主峰 A 分离度	理论塔板数	维 A 酸量 / %	杂质 A 量 / %	最大单杂量 / %	总杂质量 / %
Agilent Eclipse XDB C18	2.17	11 123	0.11	0.10	0.30	1.10
Welch Ultimate X C18	2.13	16 933	0.11	0.10	0.30	1.10
CAPCELL TYPE MG II	1.62	13 105	0.10	0.10	0.29	1.11

**2.4 样品含量的测定**

取 3 家公司的 15 批样品依法测定有关物质，维 A 酸含量以外标法按峰面积计算，其他杂质含量采用主成分自身对照法计算，结果见表 2。

表 2 样品有关物质测定结果 (%)

Tab 2 Related substances of samples (%)

企业	批号	维 A 酸	杂质 A	最大单杂	总杂
A 公司	170101	0.06	0.10	0.28	1.10
	170102	0.003	0.07	0.27	0.79
	170103	0.003	0.09	0.29	0.78
	181002	0.05	0.06	0.31	0.74
B 公司	161205	0.02	0.08	0.14	0.78
	161206	0.004	0.08	0.14	0.88
	190303	0.01	0.04	0.35	1.24
	190304	0.009	0.05	0.28	1.00
	190305	0.01	0.05	0.26	1.08
C 公司	V2A20160501	0.003	0.08	0.14	0.58
	V2A20160502	0.005	0.08	0.13	0.59
	V2A20160503	0.004	0.08	0.11	0.74
	VIA-20190401	未检出	0.09	0.09	0.26
	VIA-20190402	未检出	0.10	0.10	0.27
	VIA-20190403	未检出	0.08	0.08	0.26

**2.5 未知杂质质谱分析**

样品的测定结果表明，3 家公司的 15 批样品均检出降解杂质 A，且含量达 0.1%，可能存在安全隐患，有必要对未知杂质进行归属。本文采用高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间液质联用仪<sup>[10]</sup>，在 ESI 负离子模式下，得到该未知杂质的一、二级质谱信息，结果显示杂质 A 与维胺酯的分子离子峰和离子碎片几乎相同，结果见图 4。

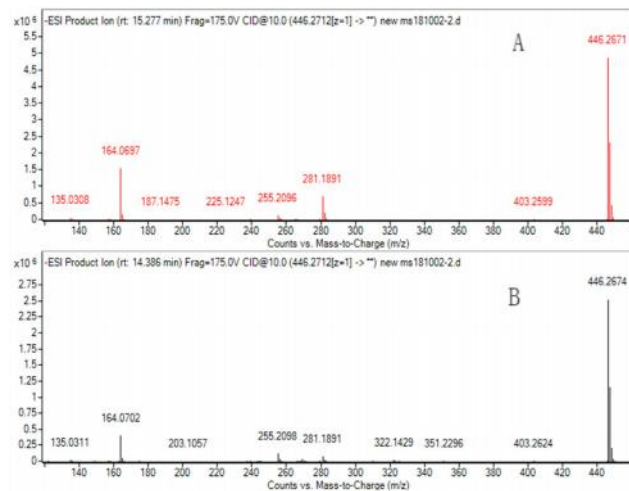


图 4 维胺酯和杂质 A 的 MS<sup>2</sup> 质谱图

Fig 4 MS<sup>2</sup> spectrum of viaminatate and impurity A

A. 维胺酯 (viaminatate); B. 杂质 A (impurity A)

**2.6 杂质毒性预测和评价**

使用 Chemdraw 软件画出维胺酯及杂质的结构式并保存为“.mol”格式，导入 ADMET Predictor 软件，对维胺酯及维 A 酸、杂质 A 的毒理性参数进行全面预测。结果显示三者主要毒性为肝脏毒性，另外还有潜在致敏性和生殖毒性，维 A 酸的预测毒性低于维胺酯，杂质 A 与维胺酯的毒性预测结果基本一致，结果见表 3。

表 3 ADMET Predictor 软件预测结果

Tab 3 Predict outcomes by ADMET Predictor software

名称	毒性	毒性风险系数
维胺酯	致敏性 (皮肤、呼吸)、生殖毒性、肝脏毒性 (4 种酶)	1
维 A 酸	致敏性 (皮肤)、生殖毒性、肝脏毒性 (4 种酶)	1
杂质 A	致敏性 (皮肤、呼吸)、生殖毒性、肝脏毒性 (4 种酶)	1

注：对于大多数药物分子毒性风险系数的打分应该小于 2。

Note: For most drugs, the molecular toxicity risk factor score should be less than 2.

**3 讨论**

**3.1 色谱柱的选择**

维胺酯脂溶性较强，且遇光易变质，产生的降解杂质与主峰较难达到基线分离，故选择光破坏溶液作为系统适用性溶液。现行标准 YBH14602008 有关物质检查方法采用 C18 柱，采

用不同品牌、不同型号的 C18 柱, 适当调整流动相比例, 均能将维胺酯与光降解杂质有效分离。

### 3.2 溶剂的选择

分别考察用流动相、甲醇及水作为溶剂时对有关物质测定的影响, 结果显示当使用水为溶剂时, 样品几乎不溶解; 当使用流动相为溶剂时, 样品很难溶解。最终选择甲醇作为稀释剂, 供试品溶解完全, 且稀释剂与主成分维胺酯对待测组分无干扰。

### 3.3 波长的选择

截取系统适用性溶液 DAD 图中维胺酯的紫外光谱图、对照品溶液 DAD 图中维 A 酸的紫外光谱图、供试品溶液 DAD 图中主要杂质的紫外光谱图及破坏试验 DAD 图中主要降解杂质的紫外光谱图, 结果显示: 维胺酯在 370 nm 波长处有最大吸收, 特殊杂质维 A 酸、杂质 A 及其他主要杂质在该波长处都有一定的吸收, 故选择 370 nm 作为有关物质的检测波长。

### 3.4 杂质 A 的来源分析

强制降解试验表明, 维胺酯光照敏感, 在强光条件下降解产物杂质 A 的峰面积明显增加, 进一步对该杂质进行质谱分析, 其质谱图与维胺酯质谱图一致, 经企业调研和文献查阅, 维胺酯为全反式维 A 酸的衍生物, 其为全反式维 A 酸的酸根经酰化后, 与氨基反应生成的衍生物, 因此也为全反式结构, 且维 A 酸见光易转化为其顺式异构体异维 A 酸, 推断其为维胺酯的同分异构体(或顺式维胺酯)。杂质 A 来源分析见图 5。

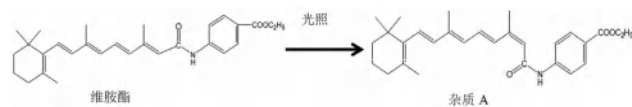


图 5 杂质 A 可能来源

Fig 5 Formation mechanism of impurity A

### 3.5 限度拟订

维 A 酸为维胺酯合成的起始原料, 直接反映维胺酯生产工艺的优劣; 杂质 A 为维胺酯的主要降解杂质, 反映其储存条件下质量的优劣, 故对杂质维 A 酸及杂质 A 进行质量控制。现行标准有关物质项中仅对总杂质量进行控制, 限度为 2.0%; 参考 ADMET Predictor 软件毒性分析结果: 维 A 酸、杂质 A 同维胺酯的毒性相当; 同时考虑维胺酯相关制剂的治疗周期为 4~6 周, 非长期用药; 结合各企业近效期样品的试验考察结

果以及工艺控制情况, 暂拟订限度为维 A 酸不得过 0.5%, 杂质 A 不得过 0.5%, 其他单杂不得过 0.5%, 各杂质总和不得过 2.0%。

### 3.6 维胺酯的质量现状

根据对国产 3 家主要生产企业的有关物质检查结果, 工艺杂质维 A 酸含量均小于 0.1%, 说明国内企业对该杂质控制均较好; 各企业均检出光降解杂质 A, 说明在样品储存过程中, 企业应严格控制储存条件, 避免其光照降解。

## 4 结论

本文建立了一种有效检测维胺酯原料药中有关物质的高效液相色谱法。基于质谱数据, 结合强制降解试验结果以及维胺酯的处方和生产工艺, 推测维胺酯中主要杂质的结构与来源, 并用计算机软件预测杂质的毒性, 为维胺酯的质量控制奠定了基础, 为该品种的处方和生产工艺、质量控制及储存条件提供了参考依据。

## 参考文献

- [1] 张民阔, 宋智敏, 孙青. 维 A 酸类药物在皮肤科中的应用 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2022, 38 (9): 653-657.
- [2] 苏腾良. 维胺酯胶囊联合维 A 酸霜治疗寻常性痤疮的疗效观察 [J]. 华夏医学, 2015, 18 (6): 10-11.
- [3] 王传龙. 维胺酯胶囊联合吡美莫司乳膏治疗脂溢性皮炎研究进展 [J]. 皮肤病与性病, 2021, 43 (2): 188-189.
- [4] 张蔚军. 维胺酯胶囊内服联合他克莫司软膏外用治疗脂溢性皮炎的临床疗效 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15 (18): 169-172.
- [5] 黄杰鸿. 米诺环素与维胺酯胶囊联合 LED 红蓝光交替照射治疗寻常型痤疮患者的临床观察 [J]. 中国现代药物应用, 2021, 15 (14): 23-25.
- [6] 郎俊. 维胺酯胶囊中维胺酯的含量及有关物质的 HPLC 法研究 [J]. 安徽医学, 2012, 16 (1): 42-43.
- [7] 陈欢, 马玲, 黄钰馨, 等. 维胺酯胶囊有关物质和含量的研究及测定 [J]. 宁夏医科大学学报, 2019, 41 (12): 1297-1299.
- [8] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 通则 0521.
- [9] 张忠立, 李淑琪, 左月明. 酸橙花和甜橙花的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析及 HPLC 含量测定 [J]. 中南药学, 2022, 11 (20): 2480-2489.
- [10] 彭耀文, 申兰慧, 王丽, 等. 液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术在药物分析中的应用 [J]. 中南药学, 2015, 13 (9): 962-965, 992.
- [11] 王立萍, 刘英, 宋汉敏, 等. 青霉胺片的有关物质分析 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (4): 684-692.

(收稿日期: 2023-10-29; 修回日期: 2023-12-25)



# 高效液相色谱法测定新型促性腺激素释放激素拮抗剂 LPM7100328 原料药中的有关物质

李丽霞<sup>1,2</sup>, 王旭东<sup>3</sup>, 马树芝<sup>3</sup>, 闫娜娜<sup>1,2,3</sup>, 周凤梅<sup>3</sup>, 车鑫<sup>1,2,3\*</sup> (1.烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2.烟台大学分子药理和药物评价教育部重点实验室, 山东 烟台 264005; 3.山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 山东 烟台 264670)

**摘要:** **目的** 建立 HPLC 法测定新型促性腺激素释放激素 (GnRH) 拮抗剂 LPM7100328 原料药中的有关物质。**方法** 采用 ACE Excel Super C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾水溶液 (用磷酸调节 pH 值至 2.5) 为流动相 A, 乙腈-甲醇 (80:20) 为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 248 nm, 柱温为 40℃。**结果** LPM7100328 和各杂质峰能够有效分离, 在研究浓度范围内与峰面积线性关系良好; LPM7100328 及杂质 A、B、C 的检测限分别为 0.0746、0.0714、0.0740、0.0741 μg·mL<sup>-1</sup>。**结论** 该方法专属性好, 灵敏度高, 可准确测定 LPM7100328 原料药中的有关物质, 为 LPM7100328 的后续研究及质量控制提供参考。

**关键词:** 促性腺激素释放激素拮抗剂; LPM7100328; 有关物质; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)02-0504-05  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.036

## Determination of related substances in the raw materials of novel GnRH antagonist LPM7100328 by HPLC

LI Li-xia<sup>1,2</sup>, WANG Xu-dong<sup>3</sup>, MA Shu-zhi<sup>3</sup>, YAN Na-na<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Feng-mei<sup>3</sup>, CHE-Xin<sup>1,2,3\*</sup> (1.College of Pharmacy, Yantai University, Yantai Shandong 264005; 2.Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Yantai University, Yantai Shandong 264005; 3. State Key Laboratory of Long-acting and Targeting Drug Delivery System, Shandong Luye Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai Shandong 264670)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the determination of related substances in the raw drug substance of novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist LPM7100328. **Methods** An ACE Excel Super C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 3 μm) column was used. The mobile phase A consisted of 0.01 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate aqueous solution (adjusting pH to 2.5 with phosphoric acid), while acetonitrile-methanol (80:20) was used as the mobile phase B, with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 248 nm, and the column temperature was 40℃. **Results** The peaks of LPM7100328 and each impurity were well separated, with good linearity in the linear self-concentration range. The detection limits for LPM7100328, and impurities A, B, and C were 0.0746, 0.0714, 0.0740, and 0.0741 μg·mL<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion** The method is specific, sensitive and accurate, which is suitable for the determination of related substances in LPM7100328, and can provide a reference for subsequent study and quality control of LPM7100328.

**Key words:** gonadotropin-releasing hormone antagonist; LPM7100328; related substance; HPLC

作者简介: 李丽霞, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与质量控制研究, email: 1303670146@qq.com \*通信作者: 车鑫, 女, 博士, 副教授, 主要从事药品质量及长效缓释制剂研究, email: chexin-1979@163.com

促性腺激素释放激素 (GnRH) 是由下丘脑分泌的一种十肽, 可通过反馈控制垂体分泌促卵泡素和促黄体素, 特异性和选择性地作用于 GnRH 的拮抗剂或激动剂, 可用于性激素依赖性失衡相关疾病的治疗, 其用于前列腺癌的治疗一直备受关注<sup>[1]</sup>。前列腺癌是男性常见恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率仅次于肺癌。雄激素剥夺治疗 (ADT) 是局部晚期、复发性和转移性前列腺癌标准治疗的关键组成部分, 其中 GnRH 激动剂 (如戈舍瑞林、亮丙瑞林等) 的使用最为常见<sup>[2-4]</sup>, 但 GnRH 激动剂在结合受体初始会暂时性促进促性腺激素的分泌, 进而存在短暂性病情恶化的可能性, 必要时还需联用抗雄激素药物<sup>[5]</sup>; 与激动剂不同, GnRH 拮抗剂立即快速可逆性地抑制促性腺激素的分泌<sup>[6]</sup>, 可避免“点火效应”的发生<sup>[7]</sup>, 降低心血管疾病的发生风险<sup>[8]</sup>。目前有两种 GnRH 拮抗剂适用于晚期前列腺癌的治疗, 分别是地加瑞克 (注射用多肽药物)<sup>[9]</sup> 和瑞卢戈利 (Relugolix) (口服活性非肽类小分子药物)<sup>[10-11]</sup>。在研的具有 GnRH 拮抗活性的化合物多为肽类化合物, 鉴于肽类 GnRH 拮抗剂存在口服吸收性、稳定性差等相关问题, 仍需要继续研究开发临床效果更佳的口服非肽类小分子 GnRH 拮抗剂。

LPM7100328 是山东绿叶制药有限公司针对瑞卢戈利进行结构改造, 设计合成的新化合物, 是一种新型的口服小分子 GnRH 受体拮抗剂, 可用于晚期前列腺癌的治疗<sup>[12]</sup>。其结构式见图 1。LPM7100328 于药物研发早期的体外及动物实验表明, 其对入源 GnRH 受体有明显的结合能力和抑制作用, 与 Relugolix 相比, 具有更高的口服生物利用度以及更小的心脏毒性。作为正处于 I 期临床研究的 1 类新药, LPM7100328 具有良好的临床前景。

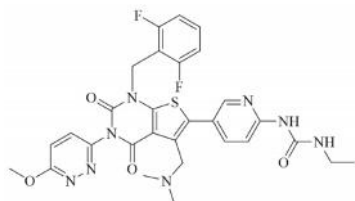


图 1 LPM7100328 化学结构式

Fig 1 Chemical structure of LPM7100328

在 LPM7100328 合成过程中, 参与反应的物料以及引入的副产物未能在精制过程中随母液去除而残留在原料药中, 即杂质 A、B、C。本研究首次建立了 LPM7100328 原料药中有关物质检查的 HPLC 分析方法, 并针对杂质 A、B、C 进行了全面的方法学验证, 现报道如下。

## 1 仪器与试剂

Agilent1260 系列液相色谱仪 (配有四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、二极管阵列检测器和 ChemStation 工作站, 美国 Agilent 公司); XS105 电子天平、S400-K pH 计 (梅特勒-托利多公司); SK7210HP 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司)。

LPM7100328 原料药 (批号: 2209281、2209282、2209283)、LPM7100328 对照品 (批号: 2203301, 纯度: 99.2%)、杂质 A 对照品 (批号: 2200517, 纯度: 95.2%)、杂质 B 对照品 (批号: 2200621, 纯度: 98.8%)、杂质 C 对照品 (批号: 2204301, 纯度: 98.9%) (山东绿叶制药有限公司); 乙腈、甲醇均为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ACE Excel Super C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 3 μm), 杂质捕集小柱: Welch C<sub>18</sub> (4.6 mm×50 mm); 流动相 A 为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾水溶液 (用磷酸调节 pH 值至 2.5), 流动相 B 为甲醇-乙腈 (20:80); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C; 检测波长: 248 nm; 进样量: 5 μL; 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%
0	95
10	80
15	70
45	65
60	60
70	40
75	40
76	95
85	95

### 2.2 溶液配制

**2.2.1 溶剂** 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈 (1:1) 为溶剂, 将溶剂作为空白对照溶液。

**2.2.2 对照品溶液** 取 LPM7100328 对照品约 12.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品储备液; 精密量取对照品储备液 0.5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 杂质对照品储备液** 分别取杂质 A、B、C 对照品约 10 mg、15 mg 和 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.4 系统适用性溶液** 取 LPM7100328 对照品约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解, 加入杂质对照品储备液 0.5 mL, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.5 供试品溶液** 取 LPM7100328 原料药约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下空白对照溶液和系统适用性溶液, 进样测定, 记录色谱图, 见图 2。空白对照溶液无干扰, 系统适用性溶液中各色谱峰间分离度均大于 1.5, 各杂质均能得到良好分离。

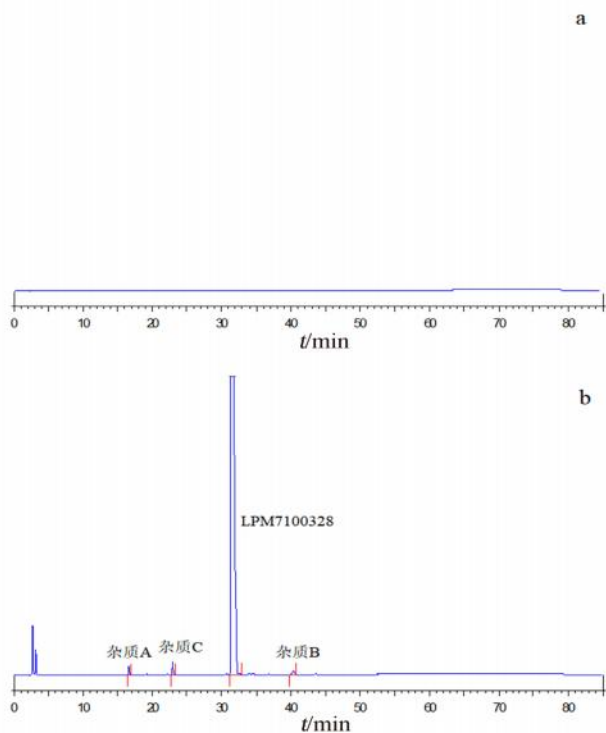


图 2 空白对照溶液 (a) 和系统适用性溶液 (b) 色谱图

Fig 2 Chromatograms of blank control solution (a) and system suitability solution (b)

### 2.4 强制降解试验

称取 LPM7100328 原料药 (批号: 2209281) 约 20 mg 于 10 mL 量瓶中, 共 8 份, 分别进行以下试验。

① 未破坏: 加适量溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得; ② 酸破坏: 加 4 mL 溶剂超声溶解, 加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 1 mL,  $80^\circ\text{C}$  烘箱中放置 30 min, 冷却, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液中和, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得; ③ 碱破坏: 加 4 mL 溶剂超声溶解, 加  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 10 min, 用  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液中和, 加溶剂稀

释至刻度, 摇匀, 即得; ④ 氧化破坏: 加适量溶剂超声溶解, 加 3.0% 的过氧化氢溶液 1 mL, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀,  $80^\circ\text{C}$  烘箱中放置 24 h, 冷却, 即得; ⑤ 固体高温破坏: 封口置于  $80^\circ\text{C}$  烘箱中, 10 d 后取出, 冷却, 加适量溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得; ⑥ 液体高温破坏: 加适量溶剂超声溶解,  $80^\circ\text{C}$  烘箱中放置 24 h, 冷却, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得; ⑦ 高湿破坏: 开口置于相对湿度为 92.5% 的干燥器内, 10 d 后取出, 加适量溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得; ⑧ 光照破坏: 在  $(4500 \pm 500) \text{ lx}$  照度下放置 10 d 后取出, 加适量溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

通过考察 LPM7100328 的降解途径及杂质峰 (尤其是降解杂质) 与主峰的分离度, 验证该方法的专属性<sup>[13]</sup>。取上述破坏溶液进样分析, 记录色谱图, 结果见图 3。LPM7100328 在酸、碱、氧化和液体高温破坏条件下不稳定, 在其他条件下具有一定的稳定性。在各降解条件下杂质峰及主峰均能得到良好的分离, 主峰纯度均大于 0.990; 物料守恒均在 98% ~ 101%, 表明该方法具有良好的专属性。

### 2.5 检测限与定量限试验

取杂质 A、B、C 对照品各约 2.5 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为定量限杂质储备液, 取定量限杂质储备液和“2.2.2”项下对照品溶液配制定量限溶液 (相当于 0.05% 供试品溶液浓度), 平行配制 6 份, 依法进样, 计算信噪比 ( $S/N$ ) 及峰面积  $RSD$  值, 以  $S/N \geq 10$  为定量限, 结果 LPM7100328 及杂质 A、B、C 的定量限分别为  $0.2486$ 、 $0.2380$ 、 $0.2468$ 、 $0.2471 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

取定量限溶液 3 mL 置 10 mL 量瓶中, 加溶剂稀释至刻度, 依法进样分析, 记录色谱图, 以  $S/N \geq 3$  为检测限, 结果 LPM7100328 及杂质 A、B、C 的检测限分别为  $0.0746$ 、 $0.0714$ 、 $0.0740$ 、 $0.0741 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 表明本方法灵敏度良好。

### 2.6 线性关系考察

分别配制 LPM7100328 及各杂质限度浓度为 50%、100%、150%、200% 和定量限浓度的线性溶液, 进样测定, 记录色谱图。以 LPM7100328 及杂质 A、B、C 的质量浓度 ( $X$ ) 为横坐标, 其对应的峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 进行线性回归, 并按  $F = k_{\text{主}}/k_{\text{杂}}$  计算杂质 A、B、C 的校正因子, 结果如表 2 所示。



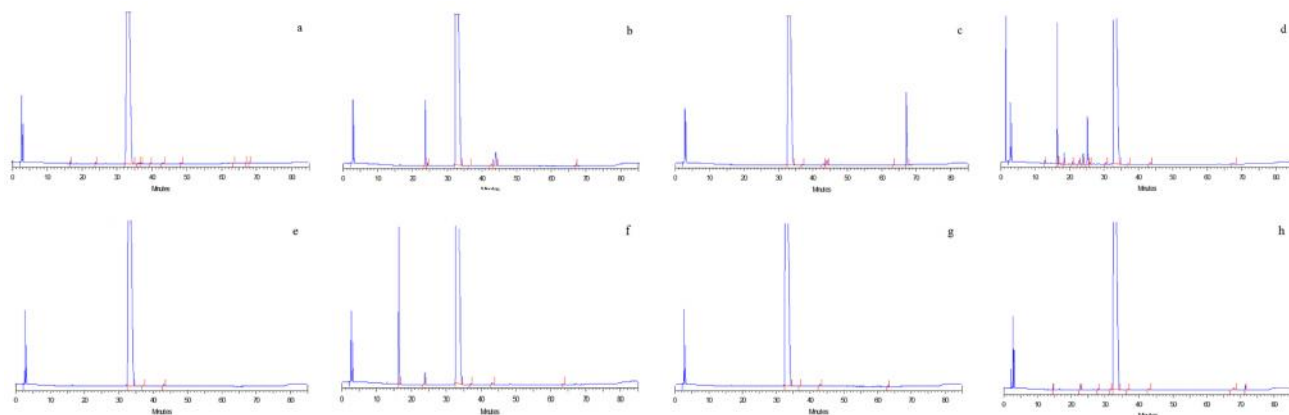


图 3 LPM7100328 强制降解试验色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of forced degradation tests of LPM7100328

a. 未破坏 (non-destroyed); b. 酸破坏 (destroyed by acid); c. 碱破坏 (destroyed by base); d. 氧化破坏 (destroyed by oxidation); e. 固体高温破坏 (solid destroyed by temperature); f. 液体高温破坏 (liquid destroyed by temperature); g. 高湿破坏 (destroyed by humidity); h. 光照破坏 (destroyed by light)

表 2 线性试验结果

Tab 2 Linearity test

化合物	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	回归方程	<i>r</i>	<i>F</i>
LPM7100328	0.2486 ~ 4.9719	$Y = 1.8001 \times 10^5 X + 1.896 \times 10^4$	0.9994	/
杂质 A	0.2380 ~ 1.8964	$Y = 1.5737 \times 10^5 X - 4.406 \times 10^2$	0.9976	1.14
杂质 B	0.2468 ~ 3.0332	$Y = 2.0308 \times 10^5 X + 1.690 \times 10^3$	0.9994	0.89
杂质 C	0.2471 ~ 4.9984	$Y = 2.0375 \times 10^5 X + 2.126 \times 10^3$	0.9994	0.88

## 2.7 准确度试验

取 LPM7100328 原料药 (批号: 2209281) 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加适量溶剂溶解后, 分别加入定量限杂质储备液 0.5 mL、杂质对照品储备液 0.5、0.75 mL, 制成 LOQ ( $n = 3$ )、100% ( $n = 6$ )、150% ( $n = 3$ ) 各杂质限度水平的加标溶液, 进样测定, 计算平均回收率。杂质 A、B、C 的平均回收率范围为 97.0% ~ 107.1%, *RSD* 为 2.2% ~ 4.7%, 表明该方法准确度良好。

## 2.8 精密度试验

**2.8.1 重复性试验** 取“2.7”项下限度浓度为 100% 的 6 份准确度溶液作为重复性溶液, 进样测定, 计算各杂质及总杂含量的 *RSD*。结果显示, 杂质 A、B、C 及最大未知单杂含量的 *RSD* 分别为 2.5%、0.90%、1.1%、0%, 总杂含量的 *RSD* 为 0.60%, 表明该方法重复性良好。

**2.8.2 中间精密度试验** 两人分别取同一批 LPM7100328 原料药样品, 按“2.7”项下方法平行配制 6 份 100% 浓度的加标供试品溶液, 于同一实验室不同日期, 按“2.1”项下色谱条件在不同仪器上分别进样测定, 并计算各杂质及总杂含量的 *RSD*。结果杂质 A、B、C 及最大未知单杂含量的 *RSD* 分别为 8.4%、0.90%、1.8%、0%, 总杂含量的 *RSD* 为 1.3%, 表明本方法可满足精

密度要求。

## 2.9 稳定性试验

取 LPM7100328 原料药 (批号: 2209281) 约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量溶剂溶解, 加入杂质对照品储备液 0.5 mL, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得加标供试品溶液; 将加标供试品溶液和“2.2.2”项下对照品溶液室温下放置 72 h, 分别于 0、12、24、48、72 h 进样测定, 记录色谱图, 并计算 LPM7100328 及各杂质与 0 h 相比的峰面积回收率。结果表明, 72 h 内 LPM7100328 回收率在 99.6% ~ 100.6%, 杂质 A、B、C 和未知单杂的回收率在 98.5% ~ 112.3%, 且无其他杂质产生。表明对照品溶液及加标供试品溶液室温放置 72 h 内稳定。

## 2.10 耐用性试验

按“2.2.5”项下方法配制供试品溶液, 分别考察适当调节流动相 pH ( $\pm 0.2$ )、柱温 ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )、有机相组成比例 ( $\pm 5\%$ ) 以及不同仪器对 LPM7100328 与杂质分离效果及样品含量测定的影响。结果表明, 在不同色谱条件下, 各色谱峰间分离度均大于 1.5, 各有关物质的检出情况基本无变化, 表明该方法耐用性良好。

## 2.11 样品含量测定

取 3 批 LPM7100328 原料药, 按“2.2.5”项

下方法配制供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 按加校正因子的主成分自身对照法计算杂质 A、B、C 含量, 未知杂质含量按不加校正因子的主成分自身对照法计算, 结果如表 3 所示。杂质 A、B、C, 其他最大单杂及总杂检出量均符合限度标准(杂质 A 限度为 0.20%, 杂质 B 限度为 0.30%, 杂质 C 限度为 0.50%, 其他单杂限度为 0.50%, 总杂限度为 1.5%)。

表 3 有关物质的含量 (%)

Tab 3 Content of related substances (%)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C	最大未知单杂	总杂
2209281	0.02	0.15	0.01	0.07	0.30
2209282	0.02	0.15	0.02	0.07	0.32
2209283	0.02	0.15	0.01	0.07	0.31

### 3 讨论

用二极管阵列检测器(DAD)对各个物质在 200 ~ 400 nm 内进行扫描, 结果表明, 主成分及已知杂质的吸收峰均在 228 nm 及 248 nm 附近, 各已知杂质在 248 nm 波长下紫外吸收较强且基线平稳。最终选择 248 nm 作为 LPM7100328 有关物质的检测波长。

本研究对流动相进行了优化, 尝试了磷酸水-乙腈、磷酸缓冲盐-乙腈、磷酸缓冲盐-乙腈-甲醇的流动相体系, 筛选并优化了体系中各流动相组分的组成及比例, 考察了 LPM7100328 及其有关物质的分离度、峰形和保留时间, 最终确定的流动相 A 为 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾水溶液(用磷酸调节 pH 值至 2.5), 流动相 B 为乙腈-甲醇(80:20)。

为了更好地分离主峰与其相邻杂质峰, 本试验选择了 Waters XBridge C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm)(I)、YMC Triart C<sub>18</sub>(3 mm × 150 mm, 3 μm)(II)和 ACE Excel Super C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 3 μm)(III)3 根不同型号的色谱柱。相较于色谱柱 I 和 II, 色谱柱 III 具有主峰与其相邻杂质峰的分离情况最佳以及主峰保留时间最稳定的优势, 最终选择 ACE Excel Super C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 3 μm)为色谱柱, 并使用了 Welch C<sub>18</sub> 杂质捕集小柱, 有效地排除了空白溶剂的干扰, 提高了分析结果的准确度<sup>[14]</sup>。

LPM7100328 为正处于 I 期临床研究的 1 类新药, 本研究首次建立了一种 LPM7100328 原料药中有关物质测定的 HPLC 分析方法, 并对其进行了

全面的方法学验证, 结果表明该方法专属性好, 灵敏度高, 可实现 LPM7100328 中有关物质的有效分离, 为 LPM7100328 质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 张艺欣, 高英. 促性腺激素释放激素类似物化学合成研究进展[J]. 中国处方药, 2021, 19(2): 28-31.
- [2] Parker C, Castro E, Fizazi K, et al. Prostate cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2020, 31(9): 1119-1134.
- [3] Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, et al. EAU-EANMESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer. Part II -2020 update: treatment of relapsing and metastatic prostate cancer[J]. Eur Urol, 2021, 79(2): 263-282.
- [4] Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, et al. EAU-EANMESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer-2020 update. Part I: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent[J]. Eur Urol, 2021, 79(2): 243-262.
- [5] Tsushima T, Nasu Y, Saika T, et al. Optimal starting time for flutamide to prevent disease flare in prostate cancer patients treated with agonadotropin-releasing hormone agonist[J]. Urol Int, 2001, 66: 135-139.
- [6] 王汝龙, 姚元庆. 促性腺激素释放激素拮抗药的药学研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(11): 1221-1224.
- [7] 施晓磊, 周铁, 礼嵩, 等. GnRH 拮抗剂在前列腺癌内分泌治疗中的临床应用和发展前景[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(12): 1506-1511.
- [8] Margel D, Peer A, Ber Y. Cardiovascular morbidity in a randomized trial comparing GnRH agonist and GnRH antagonist among patients with advanced prostate cancer and preexisting cardiovascular disease[J]. J Urol, 2019, 202: 1199-1208.
- [9] Carter NJ, Keam SJ. Degarelix: a review of its use in patients with prostate cancer[J]. Drugs, 2014, 74(6): 699-712.
- [10] 夏训明. 美国 FDA 批准瑞卢戈利(Relugolix)用于治疗晚期前列腺癌[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 114.
- [11] 陈本川. 靶向激素依赖性失衡所致晚期前列腺癌治疗新药-瑞卢戈利(Relugolix)[J]. 医药导报, 2021, 40(7): 984-991.
- [12] 田京伟, 邹方霞, 于大伟, 等. 促性腺激素释放激素拮抗剂及制备方法和应用: WO, 2023072284 [P]. 2023-05-04.
- [13] 刘珍, 梁丰, 康志娇, 等. 抗肿瘤活性化合物 SM-1 的有关物质检查方法研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(3): 279-284.
- [14] 尹秀娥, 胡小燕, 侯德粉, 等. 利伐沙班有关物质的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(12): 1487-1491.

(收稿日期: 2023-09-05; 修回日期: 2023-11-01)

## 麻石清肺合剂 HPLC 指纹图谱的建立及 7 种成分含量测定

王博, 吴茱萸, 裴媛, 于晓涛, 王瑞\* (漯河市中心医院, 河南 漯河 462000)

**摘要:** 目的 建立麻石清肺合剂 HPLC 指纹图谱及测定盐酸麻黄碱等 7 种成分的含量。方法 应用 HPLC 法构建 12 批麻石清肺合剂的指纹图谱同时进行了相似度评价, 通过模式识别筛选差异性成分, 对盐酸麻黄碱等 7 种成分进行含量测定。结果 12 批麻石清肺合剂样品中标定 16 个共有峰, 相似度均 > 0.900, 指认 7 个化学成分。12 批样品被分为 4 类, 筛选出 8、7 (苦杏仁苷)、3 (盐酸麻黄碱)、9、10 (甘草苷)、4 (盐酸伪麻黄碱)、6 号峰为差异性成分。12 批麻石清肺合剂中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷、甘草苷、甘草酸、和厚朴酚、厚朴酚的含量分别为 29.620 ~ 156.274、12.504 ~ 85.355、245.089 ~ 643.440、20.357 ~ 79.625、35.117 ~ 108.893、0.310 ~ 5.556、1.777 ~ 10.382  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 建立的指纹图谱和含量测定方法能够更加全面地评价麻石清肺合剂的品质。

**关键词:** 麻石清肺合剂; 指纹图谱; 化学模式识别; 高效液相色谱法; 质量评价

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0509-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.037

## Fingerprints of Mashi Qingfei mixture and content determination of 7 components

WANG Bo, WU Zhu-yu, PEI Yuan, YU Xiao-tao, WANG Rui\* (Central Hospital of Luohe, Luohe Henan 462000)

**Abstract: Objective** To establish the fingerprints of Mashi Qingfei mixture and determine 7 components such as ephedrine hydrochloride. **Methods** The fingerprints of 12 batches of Mashi Qingfei mixture were established by HPLC and its similarity was evaluated. Different components were screened by chemical pattern recognition, and the content of 7 components such as ephedrine hydrochloride was determined. **Results** Totally 16 common peaks were identified, and the similarity was higher than 0.900. Meanwhile 7 components were identified. The 12 batches of samples were divided into four categories, and peak 8, 7 (amygdalin), 3 (ephedrine hydrochloride), 9, 10 (liquiritin), 4 (pseudoephedrine hydrochloride), and 6 were screened as the differential components. The contents of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, amygdalin, liquiritin, glycyrrhizic acid, honokiol, magnoliol in the 12 batches of Mashi Qingfei mixture were 29.620 ~ 156.274, 12.504 ~ 85.355, 245.089 ~ 643.440, 20.357 ~ 79.625, 35.117 ~ 108.893, 0.310 ~ 5.556, and 1.777 ~ 10.382  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. **Conclusion** The fingerprint and content determination method can comprehensively evaluate the quality of Mashi Qingfei mixture.

**Key words:** Mashi Qingfei mixture; fingerprint; chemical pattern recognition; high performance liquid chromatography; quality evaluation

麻石清肺合剂来源于《伤寒论》“麻杏石甘汤”<sup>[1]</sup>, 由麻黄、厚朴、甘草、苦杏仁等中药组成, 具有清肺热、化浊痰的功效, 主要用于肺炎、慢性

支气管炎等肺病患者痰热郁肺证。中药饮片由于产地不同、炮制加工方式不同等多方面因素的影响, 导致品质参差不齐<sup>[2]</sup>。中药复方制剂受制剂生

基金项目: 河南省中医药科研专项 (No.2022ZY1196); 中央引导地方科技发展专项 (No. 漯财预指 [2020]309 号)。

作者简介: 王博, 女, 主管药师, 硕士, 主要从事中药质量评价, email: 496690274@qq.com \*通信作者: 王瑞, 男, 主任药师, 主要从事中药新制剂开发, email: wangrui56116@163.com



产多个环节的影响,加之其本身成分的复杂性,其质量的均一稳定直接影响药效,因此对其进行整体质量控制尤为重要<sup>[3]</sup>。指纹图谱能够对中药及中药复方中化学成分进行系统、整体的表征,呈现专属性强、稳定性高等特点<sup>[4]</sup>,在中药材、饮片及复方制剂的品质评价中得到了广泛应用<sup>[5-7]</sup>。结合化学模式识别,可以简化数据结构,更加直观深入地评判样本的质量,筛选差异化合物<sup>[8]</sup>。本文将通过 HPLC 法建立麻石清肺合剂指纹图谱,联合聚类分析等多元统计方法对其进行分析,同时测定麻石清肺样品中盐酸麻黄碱等 7 种成分的含量,为麻石清肺合剂全方位的品质评价提供基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC 色谱仪 (Agilent 科技公司, 1260 型), 电子天平 (日本岛津公司, AYW-120D 型), CJ-020S 型超声机 (深圳市超洁有限公司), 超纯水过滤系统 (密理博公司)。

### 1.2 试药

对照品盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、甘草苷、和厚朴酚、厚朴酚 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 171241-201809、171237-201510、111610-201908、110730-201915、110729-202015, 纯度均大于 95%), 苦杏仁苷 (批号为 DST190829-004)、甘草酸 (批号为 MUST-19052407)(纯度均大于 98%, 成都曼思特公司)。乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 磷酸 (色谱纯, 天津科密欧公司); 水为自制超纯水。

12 批麻石清肺合剂为漯河市中心医院自制 (批号分别为 20220120、20220217、20220314、20220407、20220428、20220518、20220613、20220705、20220801、20220906、20220929、20221018, 编号 S1 ~ S12)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.1% 磷酸 - 水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 检测波长 210 nm; 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 精密称取各对照品适量, 加 50% 甲醇分别配制成盐酸麻黄碱 292.600 μg · mL<sup>-1</sup>、盐酸伪麻黄碱 175.480 μg · mL<sup>-1</sup>、苦杏仁苷 1248.000 μg · mL<sup>-1</sup>、甘草苷 192.000 μg · mL<sup>-1</sup>、甘草酸 298.080 μg · mL<sup>-1</sup>、和厚朴

表 1 梯度洗脱方法

Tab 1 Gradient elution method

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	96	4
15	96	4
20	93	7
35	92	8
60	85	15
70	85	15
85	79	21
100	70	30
110	55	45
125	10	90
130	10	90
135	96	4
145	96	4

酚 14.826 μg · mL<sup>-1</sup>、厚朴酚 25.338 μg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取麻石清肺合剂 100 μL, 加 80% 甲醇 900 μL 稀释 10 倍, 摇匀后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

**2.2.3 阴性样品溶液** 按麻石清肺合剂处方工艺制备缺麻黄、厚朴、苦杏仁、甘草的阴性样品, 并稀释 10 倍制备阴性样品溶液。

### 2.3 麻石清肺合剂 HPLC 指纹图谱的建立

**2.3.1 方法学考察** 取 S1 麻石清肺样品 100 μL 制备成供试品溶液, 连续 6 次进样考察精密度; 平行制备 6 份麻石清肺样品 S1 供试品溶液, 进样检测考察重复性; 取麻石清肺样品 S1 供试品溶液, 放置 0、3、6、9、12、24 h 分别进样测定, 考察样品 24 h 内稳定性。结果精密度试验、重复性试验、稳定性试验得到的各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 1.8%, 相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%。

**2.3.2 指纹图谱的构建** 取 12 批麻石清肺合剂供试品溶液, 进样检测并采集数据。运用 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》以 S1 样品为参照图谱, 生成对照指纹图谱, 见图 1, 共标定 16 个共有峰。得到样品 S1 ~ S12 的相似度分别为 0.982、0.900、0.986、0.992、0.976、0.937、0.968、0.980、0.989、0.975、0.979、0.991。

### 2.4 化学模式识别分析

**2.4.1 聚类分析** 将 12 批麻石清肺合剂的 16 个共有峰数据导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间联结法聚类分析, 以平方欧氏距离为区间, 见图 2。当平方欧氏距离为 10 时 12 批样品分为 4 类, 第 1 类为 S2, 第 2 类为 S5、S6, 第 3 类为 S3、S12, 第 4 类为 S1、S4、S7 ~ 11。

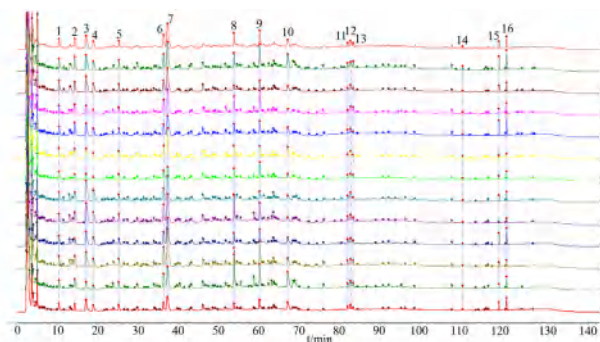


图 1 12 批麻石清肺合剂的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprints of 12 batches of Mashi Qingfei mixture

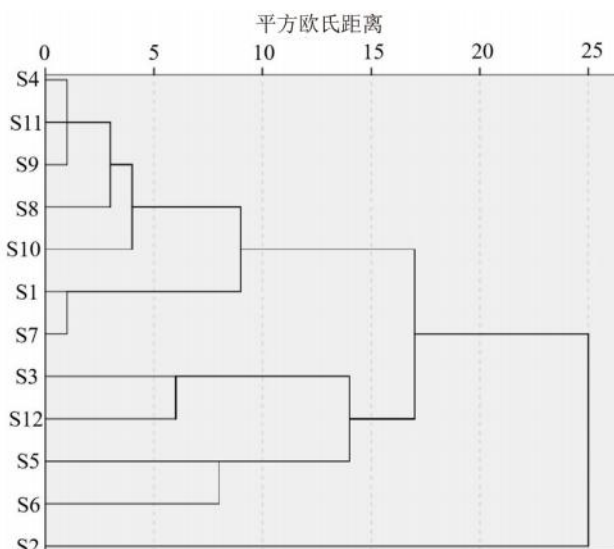


图 2 麻石清肺合剂样品聚类分析树状图

Fig 2 Mashi Qingfei mixture sample clustering analysis

**2.4.2 主成分分析** 对 12 批麻石清肺合剂中 16 个共有峰数据采用 SPSS 25.0 软件进行因子分析。结果见表 2，有 4 个主成分的特征值大于 1，方差贡献率累计达到 85.6%，表明其包含了 85.6% 的色谱图信息。峰 2、5~7、9、13 在主成分 1 上具有较高的载荷（分别为 0.812、0.768、0.875、0.807、0.791、0.750），其代表了主成分 1 的主要信息；主成分 2 主要代表了峰 1、15、16（分别为 0.787、0.967、0.941）；主成分 3 主要代表了峰 3、4、11、12（分别为 0.923、0.928、0.513、0.679）；主成分 4 主要代表了峰 8、10、14（分别为 0.766、0.880、0.850）。

表 2 12 批麻石清肺合剂中的主成分特征值及方差贡献率

Tab 2 Characteristic value and contribution rate of 12 batches of Mashi Qingfei mixture

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	5.921	37.006	37.006
2	3.813	23.830	60.836
3	2.745	17.158	77.994
4	1.217	7.606	85.6

**2.4.3 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)**

以 12 批麻石清肺合剂中 16 个共有峰峰面积为变量，构建 12×16 的原始数据矩阵，采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析，结果见图 3、4。8、7（苦杏仁苷）、3（盐酸麻黄碱）、9、10（甘草苷）、4（盐酸伪麻黄碱）、6 号峰的 VIP 值均大于 1.0，这 7 种成分可能为麻石清肺样品的差异性成分。

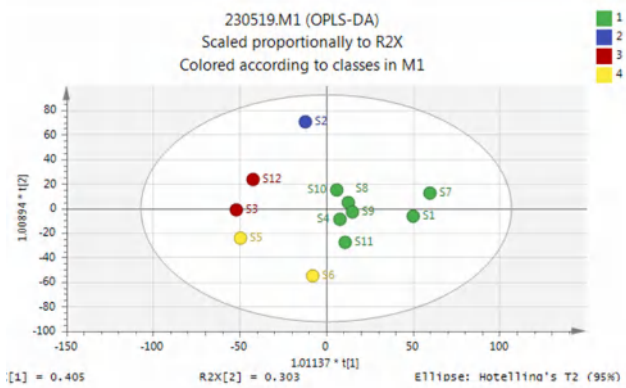


图 3 正交偏最小二乘法判别分析得分矩阵图

Fig 3 OPLS-DA score plot

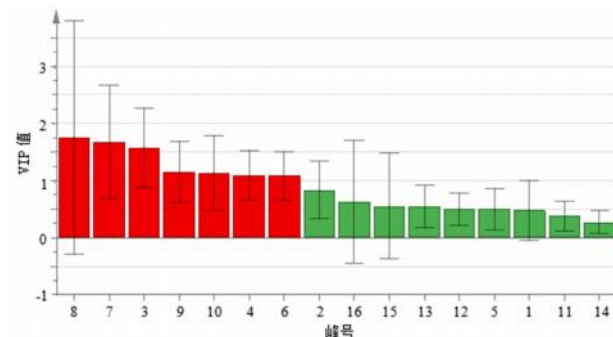


图 4 麻石清肺合剂样品中 16 个共有峰的 VIP 图

Fig 4 VIP of 16 common peaks of Mashi Qingfei mixture

**2.5 多成分含量测定**

**2.5.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相 A 为 0.1% 磷酸 - 水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱程序见表 3；流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>；柱温 30℃；进样量 5 μL。检测波长：0~47 min，210 nm（盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苦杏仁苷）；47~75 min，237 nm（甘草苷）；75~95 min，251 nm（甘草酸）；95~125 min，210 nm（和厚朴酚、厚朴酚）。

**2.5.2 专属性考察** 取混合对照品溶液、S1 供试品溶液、阴性样品溶液适量进样，得到各色谱图见图 5，结果显示阴性样品不干扰样品中 7 种成分的测定。

**2.5.3 线性关系考察** 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，分别用 50% 甲醇稀释成系列对照品溶液，进样并记录各浓度下色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y)、各成分的质量浓度为横坐

表 3 梯度洗脱方法

**Tab 3 Gradient elution method**

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	96	4
15	96	4
20	93	7
35	92	8
60	85	15
70	85	15
90	60	40
105	10	90
110	10	90
115	96	4
125	96	4

标 ( $X$ ) 进行线性拟合。同时测定盐酸麻黄碱等 7 种成分的定量限 [LOQ, 信噪比 ( $S/N$ ) = 10] 和检测限 (LOD,  $S/N$  = 3), 结果见表 4。

**2.5.4 方法学考察** 用 50% 甲醇稀释“2.2.1”项下

表 4 7 种成分的回归方程与线性范围

**Tab 4 Regressive equations and linear ranges of 7 components**

成分	回归方程	$r$	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOQ / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOD / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
盐酸麻黄碱	$Y = 12.656X - 16.109$	0.9994	5.852 ~ 292.600	0.127	0.040
盐酸伪麻黄碱	$Y = 11.001X + 8.243$	0.9998	3.510 ~ 175.480	0.428	0.128
苦杏仁苷	$Y = 4.564X - 1.130$	0.9999	24.960 ~ 1248.000	0.896	0.256
甘草苷	$Y = 8.933X + 4.851$	0.9999	3.840 ~ 192.000	0.260	0.078
甘草酸	$Y = 3.834X + 4.003$	0.9999	5.962 ~ 298.080	0.083	0.025
和厚朴酚	$Y = 46.496X + 2.698$	0.9999	0.297 ~ 14.826	0.035	0.011
厚朴酚	$Y = 37.195X + 2.619$	0.9999	0.507 ~ 25.338	0.086	0.035

混合对照品溶液, 稀释 5 倍后连续进样 6 次考察仪器精密度。取 S1 样品溶液 6 份, 平行制备成供试品溶液, 进样测定, 并计算 7 种成分含量考察方法重复性。取 S1 样品溶液, 制备后于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定考察稳定性。取 S1 样品溶液 6 份, 精密加入含盐酸麻黄碱  $63.840 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、盐酸伪麻黄碱  $35.096 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、苦杏仁苷  $265.600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草苷  $38.400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草酸  $57.960 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、和厚朴酚  $3.163 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、厚朴酚  $5.562 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备, 进样测定, 计算回收率。结果精密度试验中 7 种成分的峰面积  $RSD$  均在 1.0% ~ 1.3%; 重复性试验中 7 种成分含量的  $RSD$  均在 0.49% ~ 2.8%; 稳定性试验中 7 种成分峰面积的  $RSD$  均在 1.2% ~ 2.8%。7 种成分的平均加样回收率为 98.12% ~ 101.55%,  $RSD$  为 1.8% ~ 2.9%。

**2.5.5 含量测定** 取 12 批麻石清肺合剂样品, 制备成供试品溶液进样, 并计算 12 批样品中各

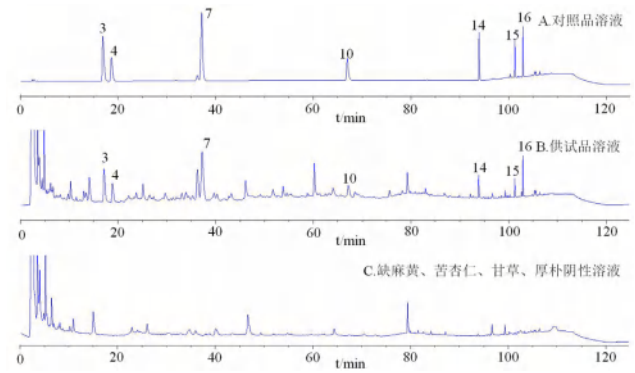


图 5 对照品溶液、S1 供试品溶液和阴性样品溶液 (缺麻黄、苦杏仁、甘草、厚朴) 色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of reference solution, S1 sample solution and negative sample solution (without *Ephedrae Herba*, *Armeniacae Semen Amarum*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*, or *Magnoliae Officinalis Cortex*)

3. 盐酸麻黄碱 (ephedrine hydrochloride); 4. 盐酸伪麻黄碱 (pseudoephedrine hydrochloride); 7. 苦杏仁苷 (amygdalin); 10. 甘草苷 (liquiritin); 14. 甘草酸 (glycyrrhizic acid); 15. 和厚朴酚 (honokiol); 16. 厚朴酚 (magnolol)

成分的含量, 结果见表 5。

**3 讨论**

本研究考察了水、甲醇、80% 甲醇等不同类型提取溶剂对样品的影响, 发现 80% 甲醇为提取溶剂时色谱峰响应较大、峰数较多。考察了 Inertsil ODS-3 C18、Shimadzu shim-pack GIST C18、Agilent ZORBAX SB C18 不同色谱柱, 结果显示 Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱峰形最好。比较 210、230、254、280 nm 不同检测波长, 发现样品在 210 nm 下出峰数目最多, 故选择指纹图谱的检测波长为 210 nm, 同时在多成分含量测定方法中分别选择化合物各自的最大吸收波长, 盐酸麻黄碱、和厚朴酚、盐酸伪麻黄碱、厚朴酚、苦杏仁苷为 210 nm, 甘草苷为 237 nm, 甘草酸为 251 nm, 多波长切换进行检测。同时由于指纹图谱在 210 nm 下色谱峰较多, 因此其色谱条件梯度变化较缓, 时间较长, 考虑到后续的多成分含量测定需进行方法学考察及样品含量的



表 5 7 种成分的含量测定结果 ( $n = 3, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
 Tab 5 Content of 7 components ( $n = 3, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

编号	盐酸麻黄碱	盐酸伪麻黄碱	苦杏仁苷	甘草苷	甘草酸	和厚朴酚	厚朴酚
S1	69.852	42.998	320.047	46.164	65.880	3.749	6.593
S2	37.451	16.695	391.675	79.625	85.643	1.681	5.368
S3	85.963	47.525	643.440	35.683	43.117	1.501	2.811
S4	100.261	61.100	595.382	39.772	63.489	5.556	9.605
S5	139.273	78.925	538.260	25.242	39.978	0.310	1.987
S6	156.274	85.355	457.941	22.354	40.613	2.359	4.521
S7	29.620	12.504	245.089	27.637	42.378	1.397	3.459
S8	55.342	33.893	540.524	51.911	60.802	0.843	1.777
S9	61.534	42.868	365.235	33.873	35.117	5.446	10.382
S10	43.553	27.127	448.833	20.357	41.873	1.790	4.422
S11	96.487	53.791	433.430	28.746	41.722	2.588	4.367
S12	86.745	49.522	518.262	71.091	108.893	4.927	8.883

测定,为节约分析时间,在保证 7 种成分分离度的前提下对色谱条件的梯度进行了调整。

本研究建立了 12 批麻石清肺合剂的指纹图谱,相似度以对照指纹图谱为参考在 0.900 ~ 0.992,表明这 12 批样品质量相对稳定。结合聚类分析、OPLS-DA 等化学计量学方法对其进行分析,结果不同批次样品呈现一定的差异,筛选出 7 个共有峰 VIP 值大于 1,分别为 8、7 (苦杏仁苷)、3 (盐酸麻黄碱)、9、10 (甘草苷)、4 (盐酸伪麻黄碱)、6 号峰。本方中麻黄指标成分为盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱,具有止咳平喘、抗病毒、抗炎等功效<sup>[9-10]</sup>;苦杏仁中主要成分为苦杏仁苷,在体内缓慢分解为氢氰酸,从而舒张支气管平滑肌,发挥止咳平喘的作用<sup>[11]</sup>;甘草中的甘草苷、甘草酸抗病毒、抗肿瘤、免疫保护等活性较强<sup>[12-13]</sup>;厚朴中的和厚朴酚、厚朴酚具有肠道保护、抗病毒等作用<sup>[14-15]</sup>;依据本方君臣佐使配伍原理及主要药效成分选择此 7 种成分进行定量。12 批麻石清肺合剂的含量测定结果表明不同批次间 7 种成分含量存在一定的差异,考虑到与所用饮片产地、批次、厂家、制剂加工等因素有关,提示在今后的生产中可以固定饮片产地、厂家,控制生产参数等因素的影响,以保证制剂质量的均一稳定。

综上所述,本研究所建立的指纹图谱和含量测定方法稳定可行,联合模式识别可为麻石清肺合剂的质量评价提供依据。

## 参考文献

[1] 熊曼琪. 伤寒论 (第 2 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 143.  
 [2] 张佳, 杨怀瑾, 马丽霞, 等. 中药品质传递过程评价技术

与方法研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52 (15): 4711-4721.  
 [3] 伍振峰, 林瑞华, 王学成, 等. 基于中药制药工程质量观的质量控制模式研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (1): 271-278.  
 [4] 李天娇, 包永睿, 王帅, 等. 中药质量控制与评价创新方法研究进展及应用 [J]. 中草药, 2022, 53 (20): 6319-6327.  
 [5] 赵美奇, 武慧敏, 徐丽芝, 等. 基于指纹图谱及多成分含量测定的泽泻汤单煎及共煎差异性研究 [J]. 中中药学, 2023, 21 (4): 963-968.  
 [6] 杨悦, 刘颖, 冯伟红, 等. 中药山楂核 HPLC 指纹图谱和 3 个主成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (11): 3000-3006.  
 [7] 王静, 朱春璐, 袁子民, 等. 都梁丸指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定研究 [J]. 中中药学, 2023, 21 (6): 1630-1634.  
 [8] 王帅, 包永睿, 李天娇, 等. 中药质量评价关键问题与分析方法探讨 [J]. 分析测试学报, 2021, 40 (1): 132-138.  
 [9] 刘丛颖, 丛竹凤, 贺梦媛, 等. 麻黄治疗呼吸系统疾病的研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (10): 175-181, 277.  
 [10] 王宏, 刘月, 杨梁钰, 等. 生物碱类化合物抗病毒活性及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (9): 2839-2850.  
 [11] 赵玉升, 胡杰, 吴佳妹, 等. 苦杏仁炮制方法及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27 (3): 175-180.  
 [12] 李泽宇, 郝二伟, 李卉, 等. 甘草配伍应用的药理作用及机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (14): 270-282.  
 [13] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7680-7692.  
 [14] 王锋, 姜宁, 罗颖, 等. 和厚朴酚药理作用研究新进展 [J]. 中药材, 2021, 44 (5): 1273-1277.  
 [15] 谭珍媛, 邓家刚, 张彤, 等. 中药厚朴现代药理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (22): 228-234.  
 (收稿日期: 2023-07-28; 修回日期: 2023-08-23)

## 低分子肝素致血小板增多症的临床特点分析

彭理, 何阳, 樊志强, 龙远雄, 陈镇, 欧阳林旗, 邓桂明\* (湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**摘要:** **目的** 探讨低分子肝素致血小板增多症的临床特点。**方法** 检索中英文数据库(截至 2023 年 5 月), 收集低分子肝素致血小板增多症的病例报道, 提取患者相关信息, 进行描述性统计分析。**结果** 共检索到低分子肝素致血小板增多症的病例报道 11 篇, 涉及 13 例患者, 中位年龄为 57 岁 (0.1, 67)。低分子肝素主要用于治疗或预防静脉血栓栓塞。7 例患者同时合并了其他疾病, 6 例患者描述了合并其他药物。血小板增多症发生的中位时间为 8 d (3, 28), 患者均无相关的临床表现, 血小板增多的中位值为  $836 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  ( $596 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ,  $1234 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ )。13 例患者停用低分子肝素后血小板均恢复到正常水平, 恢复到正常范围的中位时间为 8 d (2, 34)。**结论** 低分子肝素致血小板增多症可发生在用药后 3 ~ 28 d, 仅表现为血小板升高, 无相关临床症状, 停用低分子肝素后血小板均可恢复至正常水平。临床医师和药师应关注低分子肝素致血小板增多症的不良反应。

**关键词:** 血小板增多症; 低分子肝素; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0514-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.038

## Clinical characteristics of thrombocytosis induced by low molecular weight heparin

PENG Li, HE Yang, FAN Zhi-qiang, LONG Yuan-xiong, CHEN Zhen, OU YANG Lin-qi, DENG Gui-ming\* (*The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007*)

**Abstract: Objective** To determine the clinical characteristics of thrombocytosis caused by low molecular weight heparin. **Methods** We searched both Chinese and English databases (as of May 2023), collected case reports of low molecular weight heparin-induced thrombocytosis, collected patient-related information, and described the statistics. **Results** Totally 11 case reports of low molecular weight heparin-induced thrombocytosis were retrieved, involving 13 patients, with a median age of 57 years (0.1, 67). Low molecular weight heparin was mainly used to treat or prevent venous thromboembolism. Seven patients had other diseases at the same time, and six patients described the combination use of other drugs. The median time of the occurrence of thrombocytosis was 8 d (3, 28). There were no clinical manifestations in all patients. The median platelet count was  $836 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  ( $596 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ,  $1234 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ). After the low molecular weight heparin was discontinued in 13 patients, the platelets recovered to normal levels, and the median time to return to the normal range was 8 days (2, 34). **Conclusion** Thrombocytosis caused by low molecular weight heparin may occur between 3 to 28 days, manifested as an increase in platelets. After discontinuing the low molecular weight heparin, the platelets return to normal levels.

**Key words:** thrombocytosis; low molecular weight heparin; adverse reaction

**基金项目:** 湖南省卫健委科研计划课题 (No.C202313057956); 湖南中医药大学中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目 (No.21PTKF1024); 湖南中医药大学科研基金项目 (No.2019XJJ033); 国家中医药管理局中医药部门公共专项 (No.2100409)。

**作者简介:** 彭理, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: 781970851@qq.com \***通信作者:** 邓桂明, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药效机制及特色中药制剂研究, email: guimingd1004@163.com

根据世界卫生组织确定的原发性血小板增多症阈值,将血小板计数超过  $450 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  定义为血小板增多症<sup>[1]</sup>。血小板增多症分为原发性或继发性。继发性血小板增多症最常见的病因是炎症、组织损伤、感染、脾功能减退、缺铁、溶血、药物反应和其他诱发急性期反应的因素<sup>[2]</sup>。药物反应是继发性血小板增多症的原因之一,如抗菌药物、低分子肝素(low molecular weight heparin, LMWH)类药物、吉西他滨、长春花生物碱与氯氮平等药物<sup>[3]</sup>。约 1% 的继发性血小板增多症患者可能会出现出血风险或过度血栓形成<sup>[4]</sup>。

LMWH 是通过化学或酶学解聚的方法从普通肝素中衍生出来的片段,是分子量在 3000 ~ 30 000 道尔顿范围内的肝素分子的混合物。常见的 LMWH 有依诺肝素钠、低分子肝素钠、低分子肝素钙、那曲肝素钙、达肝素钠等<sup>[5]</sup>。LMWH 抑制凝血活性因子 Xa 与抑制凝血酶的比值是 (2 ~ 4) : 1, 从而引起溶解血栓和抗血栓作用<sup>[6]</sup>。LMWH 被认为是预防和治疗静脉血栓栓塞性疾病(VTE)的首选药物<sup>[7-8]</sup>。LMWH 最常见的不良反应包括出血、注射部位瘀点和血小板减少症<sup>[9]</sup>。目前已经报道的 LMWH 诱导的血小板增多症(heparin-induced thrombocytopenia, HIT) 病例较少,因而,对于 HIT 的发病率、临床特征及预后尚不清楚。本研究通过收集 HIT 的病例,进行回顾性分析,探讨 HIT 的临床特征,为 LMWH 的合理使用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 资料来源

分别以“那屈肝素钙”“达肝素钠”“依诺肝素钠”“亭扎肝素钠”“低分子肝素钠”“低分子肝素钙”“血小板增多症”“不良反应”和“nadroparin calcium”“dalteparin”“enoxaparin sodium”“tinzaparin sodium”“low molecular weight heparin sodium”“low molecular weight heparin calcium”“thrombocytosis”“adverse reactio”为中、英文关键词,检索中文数据库(中国知网、万方、生物医学、维普数据库)和英文数据库(PubMed、Ovid、Web of Science、Embase、Springer-link、Wiley Oline Librar),截至 2023 年 5 月。收集 HIT 的文献。

### 1.2 文献纳入和排除标准

纳入标准:① 那屈肝素钙、达肝素钠、依诺肝素钠、亭扎肝素钠、低分子肝素钠或低分子肝素钙导致血小板增多症的病例报道;② 血小板计数大于  $500 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  且被作者判定为与 LMWH 相关;③ 报道的病例包含完整的治疗过程、临床表现、LMWH 使用情况、实验室检查和

处置及转归等临床资料。排除标准:综述、动物研究、机制研究、重复发表的病例、会议论文、毕业论文等非公开发表的文献,或病例资料不完整的文献。

### 1.3 方法

由不同研究者按照纳入与排除标准分别对文献进行初步筛选,再由小组讨论决定纳入分析的文献。提取纳入的文献中患者的相关信息(年份、国籍、性别、年龄、合并疾病、合并用药、用药目的、LMWH 使用情况、实验室检查、处置及转归等)。

根据诺氏(Naranjo's)评估量表提出的评估标准评估 LMWH 与血小板增多症的相关性。将这种因果关系明确划分为“确定”“很可能”“可能”“可疑”等,总分值分别为  $\geq 9$  分,5 ~ 8 分,1 ~ 4 分,  $\leq 0$  分<sup>[10]</sup>。根据血小板增多症的情况分类:血小板计数为  $(500 \sim 700) \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 属于轻度血小板增多症;血小板计数为  $(700 \sim 900) \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 属于中度血小板增多;血小板计数为  $(900 \sim 1000) \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 属于重度血小板增多症;血小板计数为  $> 1000 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 属于极重度血小板增多症<sup>[11]</sup>。对提取的各类数据进行描述性统计分析。

## 2 结果

### 2.1 患者基本情况

如图 1 所示,共检索到 HIT 11 篇文献<sup>[12-22]</sup>,包括 13 例患者(男性 5 名,女性 8 名),其中法国 5 例,中国 3 例,美国 2 例,印度 1 例,土耳其 1 例,卡塔尔 1 例。这些患者的中位年龄为 57 岁(0.1, 67);8 例患者用于预防静脉血栓栓塞,4 例患者用于治疗静脉血栓栓塞,1 例患者用于急性冠脉综合征。7 例患者同时合并了其他疾病:原发性血小板增多症 2 例,真性红细胞增多症 1 例,高血压 2 例,肾上腺皮质癌 1 例,急性重症胰腺炎和急性呼吸窘迫综合征 1 例。详见表 1。

### 2.2 用药情况

10 例患者使用了依诺肝素,2 例患者使用了那屈肝素,1 例患者使用了亭扎肝素。2 例患者再次使用了依诺肝素,再次出现血小板增多症。9 例患者描述了 LMWH 的剂量,其中依诺肝素剂量为 40 mg qd 者 3 例;40 mg bid 者 2 例;2000 U bid 者 1 例;1.5 mg · kg<sup>-1</sup> bid 者 1 例。那屈肝素剂量 2850 U qd 者 1 例;4100 U qd, 然后 4100 U 静脉滴注, bid 者 1 例。只有 1 例患者给药途径为静脉滴注,其余均为皮下注射。6 例患者描述了合并其他药物,主要包括抗菌药物(头孢曲松钠、莫西沙星、美罗培南),抑制胃酸分泌药物(埃索美拉唑、奥美拉唑、雷尼替丁、



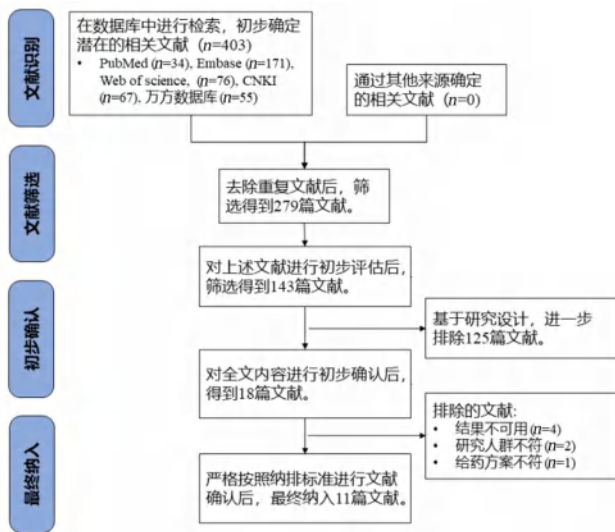


图 1 文献检索与入排流程图  
Fig 1 Flowchart of literature retrieval and inclusion

甲氧氯普胺), 降压药物 (氨氯地平、替米沙坦), 降脂药物 (阿托伐他汀) 等。

### 2.3 血小板增多症发生情况

**2.3.1 发生时间** 13 例患者出现血小板增多症的中位时间为 8 d (3, 28), 5 例患者发生在用药 7 d 内, 7 例患者为 8 ~ 11 d, 1 例患者为 4 周。2 例患者再次使用依诺肝素后, 第 8 日出现血小板增多。

**2.3.2 临床表现及检查结果** 所有患者均没有出现血小板增多症的相关临床表现, 仅有 1 例患者出现了注射部位的皮肤坏死。患者使用 LMWH 前血小板中位值为  $264.5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  ( $166 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ,  $748 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ), 2 例患者血小板基础值高于正常水平。患者使用 LMWH 后血小板中位值为  $836 \times 10^9 \cdot L^{-1}$  ( $596 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ,  $1234 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ), 其中 4 例患者属于轻度血小板增多症, 3 例患者属于中度血小板增多症, 2 例患者属于重度血小板增多症, 3 例患者属于极重度血小板增多症。

### 2.4 血小板增多症临床处置及转归

13 例患者出现血小板增多后均停用了 LMWH, 其中各有 2 例患者改用利伐沙班和普通肝素, 1 例改为华法林, 2 例患者改为其他 LMWH (分别改为达肝素和达那肝素)。所有患者的血小板均恢复到正常水平, 恢复到正常范围的中位时间为 8 d (2, 34), 其中 5 例患者在 1 周内恢复到正常水平, 3 例患者在 8 d ~ 2 周, 2 例患者在 3 ~ 5 周。

### 2.5 关联性评价

根据诺氏评估量表, 对 13 例患者 LMWH 与血小板增多症的关联性进行评价, 结果为肯定的 1 例 (9 分), 很可能有关者 9 例 (5 ~ 7 分), 可能者 3 例 (2 ~ 4 分)。

## 3 讨论

LMWH 主要通过肾脏途径清除, 肾功能衰竭患者的生物半衰期延长。根据病情, LMWH 使用剂量有预防剂量和治疗剂量<sup>[23]</sup>。法国药物警戒数据库报告了 143 例血小板增多症, 其中 51 例与 LMWH 相关。血小板计数  $> 500 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 所有患者均无症状。怀疑的 LMWH 包括依诺肝素 (23 例), 那屈肝素 (17 例), 达肝素 (7 例), 瑞维肝素 (4 例)<sup>[22]</sup>。在一项针对 LMWH 药物不良反应的回顾性研究中, 95 例接受 LMWH 治疗的患者有 29 例出现血小板增多症 [ $(587 \pm 102) \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ], 患者均未发生血栓事件<sup>[24]</sup>。在波兰进行的依诺肝素预防术后血栓栓塞的有效性和安全性多中心前瞻性研究发现, 290 例患者术前和术后接受依诺肝素  $20 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$  或  $40 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , 术后第 5、7、11 和 15 日进行血小板计数, 结果发现术后血小板计数在大多数情况下增加, 差异具有统计学意义, 但在这些患者中并未发生血栓<sup>[25]</sup>。

HIT 是一种由 IgG 抗体介导的免疫反应, 严重时可能危及生命<sup>[26]</sup>。LMWH 是一种糖胺聚糖, 可与血小板因子 4 (PF4) 形成 LMWH-PF4 复合物, 该复合物被呈递给免疫系统, 5 d 后机体产生对应的 IgG 抗体。IgG 抗体进一步与血小板结合, 形成血小板-抗体复合物, 并在网状内皮系统中被清除, 从而导致严重的血小板减少, 甚至出血<sup>[26]</sup>。

本文聚焦于 HIT 这一罕见的不良反应, 该事件的发生与给药途径、剂量及血清浓度的关系尚不清楚。1 例患者接受那屈肝素钙减量治疗时血小板升高并不明显, 增加剂量并改变给药途径后出现了血小板增多, 停药后逐渐恢复<sup>[12]</sup>。HIT 血小板计数从轻度升高到极重度升高, 血小板计数的中位增加是重度的。患者在使用 LMWH 的同时可能暴露于其他可能导致血小板增多的危险因素, 如感染、药物、手术以及相关的失血等, 但根据时间相关性及停药后血小板恢复到正常水平, 可确立 LMWH 与血小板增多症的因果关系。

然而, HIT 的机制尚不清楚, 可能与促进巨核细胞 (MK) 形成有关。Shen 等<sup>[27]</sup>研究发现 HIT 的机制可能与 MK 增殖有关。把那屈肝素添加到血浆凝块培养基和无血清培养基中, 发现那屈肝素在血浆凝块培养基显著增强了 MK 集落的生长。体外和体内研究中发现那屈肝素能抵消 PF4 对 MK 集落生长的抑制。此外, 与普通肝素相比, 那屈肝素与肝素辅因子 II 和抗凝血酶 III 协同作用, 促进 MK 集落形成。Han 等<sup>[28]</sup>研究显示肝素能显著增强血小板生成素受体 (c-Mpl)

表 1 13 例 HIT 的患者临床资料  
Tab 1 Clinical data of 13 patients with HIT

文献	性别 / 年龄 (岁)	合并疾病	合并用药	用药目的	药物名称	剂量	血小板升高时 间 /d	用药前 / 后 血小板计数 ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	处理及预后	Naranjo's 评分
赵飘飘 <sup>[12]</sup>	男 /64	—	头孢曲松钠、莫西沙星	治疗静脉血栓 塞(下肢静脉 血栓+肺栓 塞)	那屈 肝素	4100 U, 皮下, 1 次 · d <sup>-1</sup> , 5 d; 4100 U ivgtt q12h	11	166/800	停药, 改用利伐沙 班, 34 d 恢复正 常	5
杜春辉 <sup>[13]</sup>	女 /67	急性胰腺炎, 急性呼吸窘 迫综合征	美罗培南、埃 索美拉唑、 奥曲肽	治疗静脉血栓	依诺 肝素	2000 U q12h, 皮 下	8	279/650	停药, 14 d 后恢复 正常	5
Meenpidiyil <sup>[14]</sup>	女 /57	—	—	治疗急性冠脉综 合征	依诺 肝素	剂量未知, 皮下	3	376/596	停药, 2 d 恢复正常	5
Rizzieri <sup>[15]</sup>	女 /67	肾上腺皮质 癌	雷尼替丁、胃 复安、地塞 米松	治疗肺动脉血栓	依诺 肝素	—	28	285/1114	停药, 改为华法林, 7 d 恢复正常	2
Jabira <sup>[16]</sup>	男 /47	高血压	—	预防静脉血栓	依诺 肝素	40 mg qd, 皮下	3	748/1213	停药, 改用普通肝 素, 7 d 恢复正常	6
Tonbul <sup>[17]</sup>	女 /35	—	—	治疗肾静脉血栓	依诺 肝素	1.5 mg · kg <sup>-1</sup> q12h, 皮下	10	320/954	停药, 改为达肝素, 5 d 恢复正常	6
Hummel <sup>[18]</sup>	男 /42	—	促红细胞生成 素	预防深静脉血栓	依诺 肝素	40 mg q12h, 皮下	8/8	250/1005 或 920	停药, 使用普通肝 素, 6 d 恢复正常	9
Xiang <sup>[19]</sup>	女 /78	高血压, 心房颤动	氨氯地平、替 米沙坦、阿 司匹林和阿 托伐他汀	预防骨科手术后 的静脉血栓	依诺 肝素	40 mg q12h, 皮下	7	228/836	停药, 改用利伐沙 班, 16 d 恢复正 常	7
Perbet <sup>[20]</sup>	男 /35	—	芬太尼、咪达 唑仑、奥美 拉唑	预防静脉血栓形 成	那屈 肝素	2850 U qd, 皮下	5	211/1234	停药, 改为达那肝 素, 8 d 恢复到 正常	5
Camou <sup>[21]</sup>	女 /42	原发性血小板 增多症	—	预防静脉血栓形 成	依诺 肝素	40 mg · L <sup>-1</sup> , 皮 下	3	250/722	未描述	4
Camou <sup>[21]</sup>	男 /65	真性红细胞增 多症	—	预防骨科手术后 的静脉血栓	依诺 肝素	剂量未知, 皮下	10	240/663	停药, 8 d 恢复正常	6
Camou <sup>[21]</sup>	女 /30	原发性血小板 增多症	—	预防分娩后静脉 血栓	依诺 肝素	40 mg qd, 皮下	10	500/905	停药, 2 d 恢复正常	4
Liautard <sup>[22]</sup>	女 /63	—	—	预防骨科手术后 的静脉血栓	依诺 肝素	—	9/8	— /614 或 621	停药, 完全恢复	6

和白细胞介素 (IL) -6 的巨核细胞生成活性, 但不增强 IL-3、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干细胞因子 (SCF)、红细胞生成素 (EPO)。

既往研究发现, 反应性血小板增多症不一定导致血栓形成, 且患者很少出现反应性血小板增多症的症状或临床表现<sup>[29-31]</sup>。对于使用低剂量阿司匹林是否能预防反应性血小板增多症患者血栓形成, 尚未得出结论。英国血液学标准委员会 (BCSH) 指南建议对于反应性血小板增多症患者可考虑使用 75 mg 阿司匹林<sup>[32]</sup>。临床医师应根据具体情况评估血栓形成和出血风险, 为每位患者制订个体化方案。HIT 在停用相关 LMWH 后均恢复到正常水平。如患者仍需要抗凝治疗, 建议不要再次使用相同的

LMWH 治疗, 因其可能再次诱发血小板增多症的可能<sup>[18, 22]</sup>, 普通肝素可能是一种安全的替代, 也可以尝试选择另一种 LMWH, 如达肝素。临床医师和药师应关注 HIT 的不良反。

### 参考文献

- [1] Spivak JL, Silver RT. The revised world health organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal [J]. Blood, 2008, 112 (2): 231-239.
- [2] Harrison CN, Bareford D, Butt N, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis [J]. Br J Haematol, 2010, 149 (3): 352-375.
- [3] Vo QT, Thompson DF. A review and assessment of drug-in-

- duced thrombocytosis [J]. *Ann Pharmacother*, 2019, 53 (5): 523-536.
- [4] Aydogan T, Kanbay M, Alici O, et al. Incidence and etiology of thrombocytosis in an adult Turkish population [J]. *Platelets*, 2006, 17: 328-331.
- [5] Wolf H. Low molecular weight heparin [J]. *Med Clin North Am*, 1994, 78 (3): 733-743.
- [6] Mismetti P, Laporte S, Darmon JY, et al. Meta-analysis of low molecular weight heparin in the prevention of venous thromboembolism in general surgery [J]. *Br J Surg*, 2001, 88 (7): 913-930.
- [7] Wein L, Wein S, Haas SJ, et al. Pharmacological venous thromboembolism prophylaxis in hospitalized medical patients: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Arch Intern Med*, 2007, 167 (14): 1476-1486.
- [8] Hovanessian HC. New-generation anticoagulants: the low molecular weight heparins [J]. *Ann Emerg Med*, 1999, 34 (6): 768-779.
- [9] Cestac P, Bagheri H, Lapeyre-Mestre M, et al. Utilisation and safety of low molecular weight heparins: prospective observational study in medical inpatients [J]. *Drug Saf*, 2003, 26 (3): 197-207.
- [10] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.
- [11] Chiarello P, Magnolia M, Rubino M, et al. Thrombocytosis in children [J]. *Minerva Pediatr*, 2011, 63 (6): 507-513.
- [12] 赵飘飘, 王欣, 方飞美. 那屈肝素钙致血小板增多症 [J]. *药物不良反应杂志*, 2021, 23 (3): 150-151.
- [13] 杜春辉, 李佳, 赵庆国, 等. 1 例疑似依诺肝素钠致血小板增多症的病例分析 [J]. *中南药学*, 2017, 15 (5): 697-699.
- [14] Meenpidiyil SS, Azeez S, Kumar VP, et al. Enoxaparin induced reactive thrombocytosis: a rare adverse drug reaction [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2020, 31 (5): 20190312.
- [15] Rizzieri DA, Wong WM, Gockerman JP. Thrombocytosis associated with low molecular weight heparin [J]. *Ann Intern Med*, 1996, 125 (2): 157.
- [16] Jabira S, Mitwally H, Saad M, et al. Unfractionated heparin as a safe alternative in a case of low molecular weight heparin-induced thrombocytosis: a case report [J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2021, 65: 102370.
- [17] Tonbul A, Uras N, Tayman C, et al. Thrombocytosis associated with enoxaparin: a very rare cause in newborns [J]. *Platelets*, 2010, 21 (4): 300-302.
- [18] Hummel MC, Morse BC, Hayes LE. Reactive thrombocytosis associated with enoxaparin [J]. *Pharmacotherapy*, 2006, 26 (11): 1667-1670.
- [19] Xiang T, Cheng M. Enoxaparin-induced reactive thrombocytosis: a case report [J]. *Thromb J*, 2021, 19 (1): 34.
- [20] Perbet S, Trouiller P, Paugam-Burtz C, et al. Nadroparin-induced skin necrosis then thrombocytosis in intensive care unit: difficulty in diagnosis [J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2007, 26 (9): 791-794.
- [21] Camou F, Viillard JF, Caubet O, et al. Thrombocytosis: adverse effect of heparin treatment [J]. *Presse Med*, 2006, 35: 58-60.
- [22] Liautard C, Nunes AM, Vial T, et al. Low molecular weight heparins and thrombocytosis [J]. *Ann Pharmacother*, 2002, 36 (9): 1351-1354.
- [23] Clemens A, van Ryn J, Sennewald R, et al. Switching from enoxaparin to dabigatran etexilate: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety profile [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68 (5): 607-616.
- [24] Wautrecht JC. Thrombocytosis in patients treated with low molecular weight heparin: more common than imagined? [J]. *J Mal Vasc*, 2011, 36 (1): 1-2.
- [25] Ziája K, Simka M, Krupowies A, et al. Thrombocytosis after prophylactic administration of enoxaparin: unexpected findings in a Polish prospective multicenter trial on the efficacy and safety of enoxaparin in the prevention of postoperative thromboembolism [J]. *Int Angiol*, 1999, 18: 65-69.
- [26] Prince M, Wenham T. Heparin-induced thrombocytopenia [J]. *Postgrad Med J*, 2018, 94 (1114): 453-457.
- [27] Shen ZX, Basara N, Xi XD, et al. Fraxiparin, a low molecular weight heparin, stimulates megakaryocytopoiesis in vitro and in vivo in mice [J]. *Br J Haematol*, 1994, 88 (3): 608-612.
- [28] Han ZC, Bellucci S, Shen ZX, et al. Glycosaminoglycans enhance megakaryocytopoiesis by modifying the activities of hematopoietic growth regulators [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 168 (1): 97-104.
- [29] Scharf RE. Do we need antiplatelet therapy in thrombocytosis? Contra. Proposal for an individualized risk-adapted treatment [J]. *Hämostaseologie*, 2016, 36 (4): 241-260.
- [30] Buss DH, Stuart JJ, Lipscomb GE. The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: an analysis of 129 cases [J]. *Am J Hematol*, 1985, 20 (4): 365-372.
- [31] Randi ML, Stocco F, Rossi C, et al. Thrombosis and hemorrhage in thrombocytosis: evaluation of a large cohort of patients (357 cases) [J]. *J Med*, 1991, 22 (4-5): 213-323.
- [32] Harrison CN, Bareford D, Butt N, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis [J]. *Br J Haematol*, 2010, 149: 352-375.

(收稿日期: 2023-09-21; 修回日期: 2023-11-03)



# 氨基葡萄糖的药品临床快速综合评价

孔维崧, 贾婷婷, 张立超\* (上海中医药大学附属市中医医院药学部, 上海 200071)

**摘要:** **目的** 对氨基葡萄糖进行药品临床快速综合评价, 为医疗机构遴选氨基葡萄糖提供依据。**方法** 结合上海中医药大学附属市中医医院与上海市的实际情况, 参照《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南(第二版)》, 从药学特性、有效性、安全性、经济性及其他属性评价盐酸氨基葡萄糖胶囊(商品名三康, 0.75 g×30 粒/瓶、0.75 g×60 粒/瓶)和硫酸氨基葡萄糖胶囊(商品名伊索佳, 0.314 g×12 粒×2 板/盒)。**结果** 盐酸氨基葡萄糖胶囊 30 粒/瓶的评分为 71.74 分, 60 粒/瓶的评分为 71.5 分, 硫酸氨基葡萄糖胶囊的评分为 71.5 分。**结论** 三款氨基葡萄糖药品的药学特性、安全性及其他属性较一致, 盐酸氨基葡萄糖胶囊的经济性较好, 硫酸氨基葡萄糖胶囊的有效性证据更充分。

**关键词:** 氨基葡萄糖; 药品评价; 药品遴选; 合理用药

中图分类号: R969.3, R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0519-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.039

## Rapid clinical comprehensive evaluation of glucosamine

KONG Wei-song, JIA Ting-ting, ZHANG Li-chao\* (Department of Pharmacy, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071)

**Abstract: Objective** To rapidly and comprehensively evaluate clinical use of glucosamine as a basis for medical institutions to select glucosamine. **Methods** Based on the reality of Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine and Shanghai, the pharmacological properties, effectiveness, safety, economy and other indicators of Glucosamine hydrochloride capsules (SANKANG, 0.75 g×30 capsules/bottle and 0.75 g×60 capsules/bottle) and Glucosamine sulfate capsules (YISUOJIA, 0.314 g×12 capsules×2 plates/kit) were evaluated by referring to *A Rapid Guideline for Drug Evaluation and Selection in Chinese Medical Institutions (the 2nd Edition)*. **Results** Glucosamine hydrochloride capsules 30 capsules/bottle scored 71.74, while 60 capsules/bottle scored 71.5. Glucosamine sulfate capsules scored 71.5. **Conclusion** The pharmaceutical properties, safety, and other indicators are consistent for all three glucosamines. Glucosamine hydrochloride capsules displays economic advantage. The evidence for the effectiveness of Glucosamine sulfate capsule is more sufficient than that of Glucosamine hydrochloride capsule.

**Key words:** glucosamine; drug evaluation; drug selection; rational administration

氨基葡萄糖是一种由葡萄糖合成的内源性氨基单糖, 作用于糖蛋白的生物合成以修复关节软骨损伤。在临床上, 氨基葡萄糖作为缓解骨关节炎症状的慢作用药物, 用于治疗因关节变性和代谢功能衰退而导致的原发性或突发性的关节疾病。氨基葡萄糖的口服制剂主要有盐酸盐和硫酸盐形式, 其中硫酸氨基葡萄糖在制备时需要氯化钠作为稳定剂, 故

其原料药为硫酸氨基葡萄糖氯化钠。意大利罗达公司(Rottapharm)于1982年研制上市首个硫酸氨基葡萄糖胶囊(商品名Viartril-S/维固力), 并于1996年获批进口我国<sup>[1]</sup>。国内也有多个厂家生产氨基葡萄糖类药品。然而, 目前尚无对氨基葡萄糖开展临床综合评价的文献报道, 医疗机构在遴选此类药品、优化药品目录时也缺乏标准。2023年4月更

基金项目: 上海市中医药三年行动计划项目 [No.ZY (2021-2023) -0203-04]。

作者简介: 孔维崧, 男, 硕士, 药师, 主要从事医院药学工作, email: kws2009@126.com \*通信作者: 张立超, 男, 博士, 主任药师, 主要从事药事管理工作, email: changhaiskin@163.com

新的《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南(第二版)》(简称《二版快速指南》)为医疗机构药品临床综合评价与遴选提供了参考,并修订与细化了评价体系<sup>[2]</sup>。本文参照《二版快速指南》,针对氨基葡萄糖的药学特性、有效性、安全性、经济性及其他属性五大方面,结合上海中医药大学附属市中医医院(简称我院)与上海市的实际情况进行快速评价,旨在为医疗机构遴选氨基葡萄糖提供依据,也为有关部门开展氨基葡萄糖的药品临床综合评价提供参考。

## 1 资料与方法

选择 2023 年 7 月上海阳光医药采购平台上挂网采购有效的氨基葡萄糖类药物作为评价对象,见表 1。当特指该厂家生产的药品时,以商品名描述评价对象。参照《二版快速指南》<sup>[2]</sup>,采用百分制的评价体系,评价工具和数据来源见表 2;药学特性权重体系与评分细则见表 3;有效性方面收录指南包括国家卫生行政部门出台的指

导文件与权威学会发布的指南、共识等见表 4;有效性、安全性、经济性及其他属性权重体系与评分细则见表 5~8。OA 多发生于中老年人,且老年人可能合并其他疾病需限制钠摄入,故调整安全性方面特殊人群项的指标系数,儿童由 2 分改为 1 分,加入需限制钠摄入人群 1 分,见表 6。其余指标体系及权重系数与《二版快速指南》保持一致。为了保证药品评价的公正、客观,所有评价数据均来源于可公开获取的信息渠道。

表 1 评价对象

Tab 1 Evaluation objects

商品名	通用名	规格	厂家
三康	盐酸氨基葡萄糖胶囊	0.75 g×30 粒/瓶	浙江诚意药业股份有限公司
三康	盐酸氨基葡萄糖胶囊	0.75 g×60 粒/瓶	浙江诚意药业股份有限公司
伊索佳	硫酸氨基葡萄糖胶囊	0.314 g×12 粒×2 板/盒	浙江海正药业股份有限公司

表 2 评价工具和数据来源

Tab 2 Evaluation tools and data source

评价体系	评价工具和数据来源
药学特性: 药理作用、体内过程、药剂学和使用方法、贮藏条件、药品有效期	药品说明书、国家药品监督管理局(NMPA)官网、药智数据、丁香园用药助手、《中国药典》
有效性: 适应证、指南推荐、临床疗效	国家卫健委官网、医脉通临床指南、中国知网、万方、PubMed
安全性: 不良反应、特殊人群、药物相互作用所致不良反应、其他(不良反应可逆性,致畸、致癌,特别用药警示)	药品说明书、NMPA 官网、丁香园用药助手、中国知网、万方、PubMed、欧洲药监局(EMA)官网、爱尔兰药监局官网
经济性: 同通用名药品、主要适应证可替代药品	上海阳光医药采购网
其他属性: 国家医保、基本药物、国家集中采购药品、原研/参比/一致性评价、生产企业状况、全球使用情况	国家卫健委官网、上海市卫健委官网、国家医保局官网、药品说明书、国家药品审评中心(CDE)官网、中国医药统计网、药智数据

## 2 结果

### 2.1 药学特性

**2.1.1 药理作用** 根据药品说明书所述“骨关节炎是关节软骨蛋白多糖生物合成异常而呈现退行性变的结果。氨基葡萄糖是一种天然的氨基单糖,是蛋白多糖合成的前体物质,可以刺激软骨细胞产生有正常多聚体结构的蛋白多糖,提高软骨细胞的修复能力,抑制损伤软骨的酶如胶原酶和磷脂酶 A2,并可防止损伤细胞的超氧化自由基的产生,可以促进软骨基质的修复和重建,从而可延缓骨关节疼痛的病理过程和疾病的进程,改善关节活动,缓解疼痛”。氨基葡萄糖的作用机制明确,评分为 4 分。

**2.1.2 体内过程** 三康(修订日期 2021 年 02 月 10 日)和伊索佳(修订日期 2020 年 12 月 24 日)的说明书未写。而在过往版本的说明书中提及了药动学参数,体内过程基本明确。仿制药不能提供药动学参数的视为参数缺失,评分均为 3 分。

**2.1.3 药剂学与使用方法** 盐酸氨基葡萄糖胶囊每粒含盐酸氨基葡萄糖 0.75 g,未添加辅料;硫酸氨基葡萄糖胶囊每粒含硫酸氨基葡萄糖氯化钠 0.314 g(相当于硫酸氨基葡萄糖 0.25 g),辅料为二氧化硅和羧甲淀粉钠,主要成分与辅料均明确,评分均为 2 分。盐酸氨基葡萄糖胶囊和硫酸氨基葡萄糖胶囊均为口服剂型,评分均为 2 分。氨基葡萄糖为甲类 OTC,患者可在药师指导下购买服药,使用方便,评分均为 2 分。盐酸氨基葡萄糖胶囊为每次 1 粒、每日 2 次给药,给药频次评分为 1.5 分;硫酸氨基葡萄糖胶囊为每次 2 粒、每日 3 次服用,给药频次评分为 1 分。给药剂量均固定,评分均为 2 分。根据说明书的用法用量,氨基葡萄糖通常以 6 周为一个疗程。三康 30 粒/瓶为 15 日量,每疗程需 3 瓶,规格与包装评分为 2 分;三康 60 粒/瓶为 30 日量,每疗程需 1.5 瓶,规格与包装评分为 1.5 分;伊索佳 24 粒/盒为 4 日量,每疗程大约需要 11 盒,规格与包装评分为 1 分。

**2.1.4 贮存条件** 盐酸氨基葡萄糖胶囊和硫酸氨基葡萄糖胶囊均要求 25℃ 以下干燥处保存, 2020 年版《中国药典》四部要求阴凉处为 ≤ 20℃, 常温处为 10 ~ 30℃<sup>[3]</sup>, 该药品贮藏温度要求介于阴凉与常温之间, 故评分均为 2.5 分。盐酸氨基

葡萄糖胶囊还要求遮光保存, 评分为 0 分; 硫酸氨基葡萄糖胶囊无此要求, 评分为 1 分。

**2.1.5 药品有效期** 药品有效期为 24 个月。评分均为 1 分。

药学特性的具体评分情况见表 3。

表 3 氨基葡萄糖药学特性具体评分情况 (分)

Tab 3 Scores of pharmaceutical properties of glucosamine (point)

指标体系及权重系数	指标信息与参考评分细则	三康 (30 粒 / 瓶)	三康 (60 粒 / 瓶)	伊索佳
药理作用 (5)	临床疗效确切、作用机制明确、作用机制或作用靶点有创新性 5, 临床疗效确切、作用机制明确 4, 临床疗效尚可、作用机制尚不十分明确 2, 临床疗效一般、作用机制不明确 1	4	4	4
体内过程 (5)	体内过程明确、药动学参数完整 5, 体内过程明确、药动学参数不完整 3, 体内过程尚不明确或无药动学相关研究 1	3	3	3
药剂学和使用方法 (多选)(12)	主要成分与辅料 2 (均明确 2, 一项明确 1)	2	2	2
	规格与包装 2 (均适宜临床应用 / 剂量调整 2, 一项适宜 1)	2	1.5	1
	剂型 2 (口服 / 吸入 / 外用制剂 2, 皮下 / 肌内注射剂 1.5, 静脉滴注 / 静脉注射剂 1)	2	2	2
	给药剂量 2 (固定剂量 2, 使用过程中需调整用药剂量 1.5, 根据体重或体表面积计算用药剂量 1)	2	2	2
	给药频次 2 (≤ 1 次 · d <sup>-1</sup> 2, 2 次 · d <sup>-1</sup> 1.5, ≥ 3 次 · d <sup>-1</sup> 1)	1.5	1.5	1
使用方便 2 (无需辅助、可自行给药 2, 无需辅助、在他人帮助或训练后自行给药 1.5, 医务人员给药 1)	2	2	2	
贮藏条件 (多选)(4)	贮藏 3 (常温 3, 阴凉 2, 冷藏 / 冷冻 1)	2.5	2.5	2.5
	无需避光或遮光 1	0	0	1
药品有效期 (2)	≥ 60 个月 2, 36 (含) ~ 60 个月 1.5, 24 (含) ~ 36 个月 1, 12 (含) ~ 24 个月 0.5, < 12 个月 0.25	1	1	1
药学特性 (28)	/	22	21.5	21.5

**2.2 有效性**

检索国内数据库发现, 近十年有 1 项临床路径、4 篇临床指南、1 篇专家共识和 1 篇诊疗规范提及氨基葡萄糖, 见表 4。其中多数推荐选择

性使用氨基葡萄糖用于 OA, 有 1 篇指南明确不推荐氨基葡萄糖用于 OA 镇痛。与之相比, 非甾体抗炎药 (NSAIDs) 用于 OA 的推荐级别更高, 且外用 NSAIDs 多推荐为一线首选。

表 4 氨基葡萄糖在国内的临床路径、诊疗指南与专家共识中的推荐情况

Tab 4 Recommendation of glucosamine in clinical pathways, guidelines and consensus in China

临床路径 / 指南 / 共识	主要制定者	主要内容
骨关节炎临床路径 (2016 年版) <sup>[4]</sup>	国家卫生计生委办公厅	硫酸氨基葡萄糖和盐酸氨基葡萄糖的含量有所差异, 但生物学作用相似; 常用剂量 1500 mg · d <sup>-1</sup> , 分 2 ~ 3 次服用, 持续 8 周以上显效, 使用 1 年以上疗效更稳定, 可联合 NSAIDs 使用
中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) <sup>[5]</sup>	中华医学会骨科学分会关节外科学组	可根据患者情况酌情使用缓解 OA 症状的慢作用药物
骨关节炎诊疗指南 (2018 年版) <sup>[6]</sup>	中华医学会骨科学分会关节外科学组	氨基葡萄糖的临床疗效尚存争议, 对有症状的 OA 患者可选择性使用
中国骨关节炎疼痛管理临床实践指南 (2020 年版) <sup>[7]</sup>	中华医学会骨科学分会关节外科学组	不推荐氨基葡萄糖用于 OA 患者镇痛
骨关节炎中西医结合诊疗指南 (2023 年) <sup>[8]</sup>	中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会	选择性推荐对 OA 患者足量使用氨基葡萄糖, 若症状改善推荐继续使用, 若改善不明显则推荐停药
骨关节炎临床药物治疗专家共识 (2021 年) <sup>[9]</sup>	中华医学会运动医疗分会	氨基葡萄糖对有症状的 OA 患者可选择性使用; 轻度 OA 持续应用 1500 mg 氨基葡萄糖 8 周以上, 而使用 1 年以上疗效更稳定; 终末期 OA 疗效不佳; 硫酸氨基葡萄糖对胃肠道刺激更小, 更易吸收
骨关节炎诊疗规范 (2022 年) <sup>[10]</sup>	中华医学会风湿病学分会	循证医学证据不一致; 硫酸氨基葡萄糖 (1500 mg · d <sup>-1</sup> ) 对轻度 OA 患者可能有缓解疼痛和改善功能的作用

国外指南与共识中, 2019 年欧洲骨质疏松及骨关节炎临床与经济学会 (ESCEO) 强烈推荐处方级硫酸氨基葡萄糖作为 OA 的第一步基础治疗药物, 在仍有症状的情况下, 再逐步加用外用或口

服 NSAIDs, 其证据来源于多项高质量 meta 分析与 RCT 研究结果<sup>[11]</sup>。其中, 一项发表于 2018 年的 meta 分析纳入了 33 种药物干预对膝骨关节炎 12 个月以上的研究, 结果表明, 对于主要疗效终点指



标——疼痛而言，硫酸氨基葡萄糖和塞来昔布与疼痛减轻有关，在排除高偏倚风险研究后，仅有硫酸氨基葡萄糖与疼痛改善有关，而塞来昔布不相关；硫酸氨基葡萄糖与次要疗效终点指标——改善身

体功能和关节结构也有关，而包括塞来昔布在内的 10 种 NSAIDs 与改善关节间隙变窄均无关；盐酸氨基葡萄糖的疗效仍需高质量研究以进一步分析<sup>[12]</sup>。综合考虑，有效性的具体评分情况见表 5。

表 5 氨基葡萄糖有效性具体评分情况 (分)  
Tab 5 Scores of effectiveness of glucosamine (point)

指标体系及权重系数	指标信息与参考评分细则	三康 (30 粒/瓶)	三康 (60 粒/瓶)	伊索佳
适应证 (5)	临床必需、首选 5, 临床需要、次选 3, 可选药品较多 1	3	3	3
指南推荐 (12)	诊疗规范 / 临床路径、国家卫生行政机构发布共识 / 管理办法等、指南 I 级推荐 12 (A 级证据 12, B 级证据 11, C 级证据及其他 10), 指南 II 级及以下推荐 9 (A 级证据 9, B 级证据 8, C 级证据及其他 7), 专家共识推荐 6 (由学会组织基于系统评价发布的共识 6, 学会组织发布的共识 5, 其他 4), 系统评价 / meta 分析 3 (大样本、高质量 3, 小样本、低质量 2, 非 RCT 研究 1)	5	5	9
临床疗效 (10)	以主要疗效终点指标评分 6	3	3	6
	以次要疗效终点指标评分 4	3	3	4
有效性 (27)	/	14	14	22

### 2.3 安全性

**2.3.1 不良反应** 根据药品说明书所述，常见轻度的胃肠不适、头痛、乏力和困倦，偶见轻度嗜睡，有可能出现皮肤过敏反应，还有视觉障碍、脱发、支气管哮喘和血糖升高的报道。现有的系统评价与 meta 分析均认为，氨基葡萄糖的安全性良好，与安慰剂无明显差异<sup>[13]</sup>。因此，此项评分均为 8 分。

**2.3.2 特殊人群** 根据说明书所述，18 岁以下儿童及青少年不可用，妊娠期与哺乳期妇女禁用，以上评分均为 0 分。严重肝肾功能不全者慎用；国外药品说明书提到，氨基葡萄糖经肾消除有限，且代谢产物为内源性物质，故未开展该类人群研究，鉴于其良好的安全性与耐受性，无剂量调整建议，但严重者应在医疗监护下使用<sup>[14-15]</sup>；评分均为 2.5 分。老人为 OA 主要发病人群，视为可用，评分均为 1 分。需限制钠摄入的患者应考虑每日 1500 mg 硫酸氨基葡萄糖胶囊中含 151 mg 钠，故硫酸氨基葡萄糖胶囊评分为 0.5 分，盐酸氨基葡萄糖胶囊评分为 1 分。此外，由于氨基葡萄糖提取自蟹等甲壳类，对甲壳类过敏者禁用<sup>[16-17]</sup>。糖尿病或心血管疾病风险患者需在医师指导下使用氨基葡萄糖并监测血糖或血脂。哮喘患者初始使用氨基葡萄糖出现症状恶化应停药并就医。

**2.3.3 药物相互作用所致不良反应** 根据说明书所述，氨基葡萄糖可增加四环素类药物在胃肠道的吸收，减少口服青霉素或氯霉素的吸收；同时服用 NSAIDs 的患者可能需降低氨基葡萄糖或 NSAIDs 的服用剂量；氨基葡萄糖与利尿药可能存在相互作用，两药同服时可能需增加利尿药的服用剂量。有文献提到氨基葡萄糖与华法林可能存在相互作用，但缺乏直接证据，联用时需注意

出血征兆<sup>[18]</sup>。未检索到氨基葡萄糖与中药存在相互作用的信息。此项评分均为 2 分。

**2.3.4 其他** 不良反应可逆，评分均为 1 分。未在 NMPA 官网检索到氨基葡萄糖致畸、致癌或特别用药警示，以上评分均为 1 分。

安全性的具体评分情况见表 6。

### 2.4 经济性

**2.4.1 同通用名药品** 在上海阳光医药采购网查找到 10 项“盐酸氨基葡萄糖胶囊”，最低日均费用为 1.46 元。其中，三康 30 粒 / 瓶零售价为 22.52 元，日均治疗费用为 1.50 元；三康 60 粒 / 瓶零售价为 43.91 元，日均治疗费用为 1.46 元。查找到 6 项“硫酸氨基葡萄糖胶囊”，最低日均费用为 4.56 元。其中，伊索佳零售价为 43.52 元，日均治疗费用为 10.88 元。三康 30 粒 / 瓶评分为 2.92 分，60 粒 / 瓶评分为 3 分，伊索佳评分为 1.26 分。

**2.4.2 主要适应证可替代药品** 查找到“盐酸氨基葡萄糖胶囊”“盐酸氨基葡萄糖片”“硫酸氨基葡萄糖胶囊”“硫酸氨基葡萄糖钾胶囊”“硫酸氨基葡萄糖片”共 26 项，最低日均费用为 1.46 元。三康 30 粒 / 瓶评分为 6.82 分，三康 60 粒 / 瓶评分为 7 分，伊索佳评分为 0.94 分。经济性的具体评分情况见表 7。

### 2.5 其他属性

**2.5.1 国家医保** 氨基葡萄糖在《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录 (2022 年)》中为无支付限制的乙类药品<sup>[19]</sup>。评分均为 2 分。

**2.5.2 基本药物目录** 氨基葡萄糖不在《国家基本药物目录 (2018 年版)》<sup>[20]</sup>，但在《上海市基层医疗卫生机构增补药物目录 (2010 版)》<sup>[21]</sup>，评分均为 1.5 分。

**2.5.3 国家集中采购药品** 三康和伊索佳均为

表 6 氨基葡萄糖安全性具体评分情况 (分)  
Tab 6 Scores of safety of glucosamine (point)

指标体系及权重系数	指标信息与参考评分细则	三康 30 粒/瓶	三康 60 粒/瓶	伊索佳
不良反应 (多选)(8)	中度不良反应 3 (发生率 < 1% 3, 发生率 1% ~ < 10% 2, 发生率 ≥ 10% 1, 未提供 ADR 发生数据 0)	3	3	3
	重度不良反应 5 (发生率 < 0.01% 5, 发生率 0.01% ~ < 0.1% 4, 发生率 0.1% ~ < 1% 3, 发生率 1% ~ < 10% 2, 发生率 ≥ 10% 1, 未提供 ADR 发生数据 0)	5	5	5
特殊人群 (多选)(11)	儿童 1 (可用 1, 慎用 0.5)	0	0	0
	老人 1 (可用 1, 慎用 0.5)	1	1	1
	妊娠期妇女 1 (妊娠早期可用 1, 妊娠中期可用 0.8, 妊娠晚期可用 0.5)	0	0	0
	哺乳期妇女 1 (可用 1, 慎用 0.5)	0	0	0
	肝功能异常 3 (重度可用 3, 中度可用 2, 轻度可用 1)	2.5	2.5	2.5
	肾功能异常 3 (重度可用 3, 中度可用 2, 轻度可用 1)	2.5	2.5	2.5
需限制钠摄入 1 (可用 1, 慎用 0.5)	1	1	0.5	
药物相互作用所致不良反应 (3)	无需调整用药剂量 3, 需要调整剂量 2, 禁止在同一时段使用 1	2	2	2
其他 (多选)(3)	不良反应均为可逆性 1	1	1	1
	无致畸、致癌 1	1	1	1
	无特别用药警示 1	1	1	1
安全性 (25)	/	20	20	19.5

表 7 氨基葡萄糖经济性具体评分情况 (分)  
Tab 7 Scores of economy of glucosamine (point)

指标体系及权重系数	指标信息与参考评分细则	三康 30 粒/瓶	三康 60 粒/瓶	伊索佳
同通用名药品 (3)	评价药品评分 = 最低日均治疗费用 / 评价药品日均治疗费用 × 3	2.92	3	1.26
主要适应证可替代药品 (7)	评价药品评分 = 最低日均治疗费用 / 评价药品日均治疗费用 × 7	6.82	7	0.94
经济性 (10)	/	9.74	10	2.2

2020 年国家第三批集采中选药品<sup>[22]</sup>, 而三康为供应上海品种, 评分为 1 分。伊索佳评分为 0.5 分。

**2.5.4 一致性评价** 三康和伊索佳均为通过一致性评价的仿制药品, 评分为 0.5 分。

**2.5.5 生产企业状况** 浙江海正药业股份有限公司在工信部医药工业信息中心发布的 2021 年中

国医药工业百强榜上居第 40 位<sup>[23]</sup>, 评分为 0.8 分; 浙江诚意药业股份有限公司未上榜, 评分为 0 分。

**2.5.6 全球使用情况** 氨基葡萄糖在美国、欧洲、日本均上市, 评分均为 1 分。

其他属性的具体评分情况见表 8。

表 8 氨基葡萄糖其他属性具体评分情况 (分)  
Tab 8 Scores of other indicators of glucosamine (point)

指标体系及权重系数	指标信息与参考评分细则	三康 30 粒/瓶	三康 60 粒/瓶	伊索佳
国家医保 (3)	甲类无支付限制 3, 甲类有支付限制 2.5, 乙类无支付限制 2, 乙类有支付限制 1.5, 不在国家医保目录 1	2	2	2
基本药物 (3)	国家基本药物无要求 *3, 国家基本药物有要求 *2, 不在国家基本药物目录 1	1.5	1.5	1.5
国家集中采购药品 (1)	国家集采中选药品 1	1	1	0.5
原研 / 参比 / 一致性评价 (1)	原研药品 / 参比药品 1, 通过一致性评价仿制药品 0.5	0.5	0.5	0.5
生产企业状况 (1)	企业排名 1 (世界销量前 50 的制药企业 1 ~ 10 名 1, 11 ~ 20 名 0.8, 21 ~ 30 名 0.6, 31 ~ 40 名 0.4, 41 ~ 50 名 0.2; 工信部医药工业百强榜企业 1 ~ 20 名 1, 21 ~ 40 名 0.8, 41 ~ 60 名 0.6, 61 ~ 80 名 0.4, 81 ~ 100 名 0.2)	0	0	0.8
全球使用情况 (1)	中国、美国、欧洲、日本均已上市 1, 国内外均有销售 0.5	1	1	1
其他属性 (10)	/	6	6	6.3

注: “\*” 表示药品应在具备相应处方资质的医师或在专科医师指导下使用, 并加强使用监测和评价。

Note: “\*” indicates that the drug should be used under the guidance of qualified clinicians or specialist, and the monitoring and evaluation should be strengthened.

**2.6 总体评价结果**

从上述五大方面进行评价的总体情况见表 9。根据《二版快速指南》, 评价对象用于新药引

进时, 70 分以上者为强推荐; 评价对象用于药品调出时, 70 分以上者为建议保留<sup>[2]</sup>。评价过程中所得的药学信息均交由我院药事会参考。三康 30

粒/瓶为我院现有唯一氨基葡萄糖品种,且为带量采购药品。在其约定采购量完成前,暂不考虑调出或引进氨基葡萄糖类药品。

表 9 氨基葡萄糖总体评分情况(分)  
Tab 9 General scores of glucosamine (point)

指标体系	权重系数	三康 30 粒/瓶	三康 60 粒/瓶	伊索佳
药学特性	28	22	21.5	21.5
有效性	27	14	14	22
安全性	25	20	20	19.5
经济性	10	9.7	10	2.2
其他属性	10	6	6	6.3
总分	100	71.74	71.5	71.5

### 3 讨论

所评价的三款氨基葡萄糖药品总分较为接近。其中,药学特性、安全性和其他属性的得分均较接近。由于安全性良好,氨基葡萄糖在我国按甲类 OTC 管理,其说明书提供了充足信息以满足患者购买与服用时的需求。作者参考药品说明书,并结合相关资料,评价了氨基葡萄糖的药学特性与安全性,结果显示其药学特性与安全性评分均较高。氨基葡萄糖目前为国家医保乙类药品、上海基本药物,属于临床广泛应用的药物。

盐酸氨基葡萄糖胶囊和硫酸氨基葡萄糖胶囊的有效性与经济性的评分差异较大。与伊索佳相比,三康的经济性评分极高,原因在于三康为供应上海的集采带量药品,价格较低,而伊索佳在上海并无价格优势。作者注意到伊索佳在湖南等省为集中带量采购药品<sup>[22]</sup>,在当地可能得到更高的经济性评分。

多个指南与共识均提到氨基葡萄糖的疗效目前仍有争议,循证医学证据不一致。有观点认为,争议的来源与地区和厂家有关。氨基葡萄糖在北美地区作为膳食补充剂销售,缺乏类似药品的严格质量控制体系,但在欧洲,硫酸氨基葡萄糖以处方药管理<sup>[16]</sup>。一项 2005 年的系统评价发现,罗达公司生产的氨基葡萄糖在缓解 OA 疼痛和改善功能方面效果优于安慰剂,而非罗达公司制备的氨基葡萄糖在这两方面差异没有统计学意义<sup>[24]</sup>。该系统评价也被列入《中国骨关节炎疼痛管理临床实践指南(2020 年版)》中作为不推荐氨基葡萄糖用于 OA 镇痛的循证依据之一<sup>[7]</sup>。国内学者开展的随机对照研究结论认为,山西中远威药业有限公司的盐酸氨基葡萄糖胶囊与意大利罗达公司的硫酸氨基葡萄糖胶囊在疗效与安全性上相似<sup>[25]</sup>。2019 版 ESCEO 指南提到,处方级结晶硫酸氨基葡萄糖的有效性明确,但盐酸氨基葡萄糖与硫酸盐混合物的有效性证据不充分<sup>[11]</sup>。在 NMPA《仿

制药参比制剂目录(第六批)》中,硫酸氨基葡萄糖胶囊的参比制剂(序号 6-11)为意大利罗达公司原研进口的 0.25 g(以硫酸氨基葡萄糖计)规格药品<sup>[26]</sup>。而在 NMPA 发布的 2018 年第 136 号通告却提到,氨基葡萄糖类口服固体制剂可豁免人体生物等效性试验,不推荐参比制剂<sup>[27]</sup>。2021 年 CDE 发布的《第一批拟不推荐参比制剂化药品种药学研究技术要求(征求意见稿)》中,对于硫酸氨基葡萄糖氯化钠原料药,要求证明结构为共晶体复盐而非盐酸氨基葡萄糖与相应硫酸盐的简单物理混合物<sup>[1]</sup>。作者未在 CDE 官网查询到公开的上市仿制药审批材料,根据以上文件,推测伊索佳的原料药为结晶型,其参比制剂为 Viartil-S。故在评价其有效性时,采纳了 2019 版 ESCEO 指南所列的循证依据。

临床疗效是《二版快速指南》新增的评分项目,旨在根据现有的循证医学证据,评价药品对同一适应证主次要疗效指标的改善情况<sup>[2]</sup>。作者根据 2018 年的一篇高质量 meta 分析<sup>[12]</sup>,以缓解疼痛、改善身体功能和关节结构分别作为 OA 的主次要疗效指标,评价了氨基葡萄糖治疗 OA 的临床疗效。此外,一篇 2022 年的综述概括到,氨基葡萄糖的摄入与 27% 的全因死亡率降低和 58% 的心血管疾病死亡率降低相关<sup>[13]</sup>。对死亡率的影响也是遴选 OA 治疗药物时需要考虑的因素之一。例如,多个指南均不推荐阿片类作为 OA 的一线药物,原因之一在于有研究显示曲马多可显著升高 OA 患者的全因死亡率、心肌梗死发生率和髋关节骨折发生率<sup>[5, 7]</sup>。

在实际工作中,所评价的药品是否为基本药物、集中带量采购药品往往是药事会在药品遴选时的重要考量因素。目前,国内的 OA 诊疗指南与共识多采用国外的循证依据,国内的高质量证据较少。有鉴于氨基葡萄糖在不同地区采取不同的药品注册政策,质量存在差异,根据国内的临床研究结果进行药品临床综合评价,才更能反映我国氨基葡萄糖药品的应用现状。在我国,氨基葡萄糖已上市多年,且常与 NSAIDs 或中药联用<sup>[28-30]</sup>,积累了大量真实世界数据。建议开展大规模真实世界研究考察我国氨基葡萄糖药品的有效性、安全性、经济性,在研究设计中可对盐酸氨基葡萄糖与硫酸氨基葡萄糖分类研究,将不同厂家、不同疗效指标、药物联合使用等因素纳入考量,以获得更充分的证据。在此基础上,开展药品临床综合评价,作为有关部门制订基本药物目录、集中带量采购药品目录等政策的依据,供医疗机构遴选药品与优化药品目录时参照执行。



## 参考文献

- [1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于公开征求《第一批拟不推荐参比制剂化药品种药学研究技术要求》(征求意见稿)意见的通知[EB/OL]. (2021-02-20) [2023-07-31]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/c5d5ca3085b6b23924d71d97c6a417e2>.
- [2] 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(第二版)[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 447-456.
- [3] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: XII.
- [4] 国家卫生计生委办公厅. 国家卫生计生委办公厅关于实施有关病种临床路径的通知: 国卫办医函[2016]1315 号[EB/OL]. (2016-12-08) [2023-07-31]. <https://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/201612/e02b9324fc344f45979b6c20d7497b71.shtml>.
- [5] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心, 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2021, 41(18): 24.
- [6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 骨关节炎诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(12): 705-715.
- [7] 中华医学会骨科学分会关节外科学组. 中国骨关节炎疼痛管理临床实践指南(2020 年版)[J]. 中华骨科杂志, 2020, 40(8): 469-476.
- [8] 中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会. 骨关节炎中西医结合诊疗指南[J]. 风湿病与关节炎, 2023, 12(6): 70-80.
- [9] 中华医学会运动医疗分会, 中国医师协会骨科医师分会运动医学学组, 中国医师协会骨科医师分会关节镜学组. 骨关节炎临床药物治疗专家共识[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(7): 32-43.
- [10] 赵彦萍, 林志国, 林书典, 等. 骨关节炎诊疗规范[J]. 中华内科杂志, 2022, 61(10): 1136-1143.
- [11] Bruyère O, Honvo G, Veronese N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2019, 49(3): 337-350.
- [12] Gregori D, Giacobelli G, Minto C, et al. Association of pharmacological treatments with long-term pain control in patients with knee osteoarthritis [J]. *JAMA*, 2018, 320(24): 2564.
- [13] Conrozier T, Lohse T. Glucosamine as a treatment for osteoarthritis: what if it's true? [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 820971.
- [14] European Medicines Agency. Glucomed [EB/OL]. (2006-12-21) [2023-08-18]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/glucomed>.
- [15] Health Products Regulatory Authority. Dona 500mg Capsules [EB/OL]. (2021-01-20) [2023-08-21]. <https://www.hpra.ie/homepage/medicines/medicines-information/find-a-medicine/results/item?pano=PA2010/022/001>.
- [16] 张伟滨. 氨基葡萄糖治疗骨关节炎的专家共识[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(18): 1437-1438.
- [17] 刘康妍, 凌龙, 胡海澜. 氨基葡萄糖在骨关节炎中的应用疗效及安全性分析[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2017, 11(6): 673-675.
- [18] 黎晓亮, 宋柳全, 伍黎芳. 华法林与氨基葡萄糖具有潜在相互作用的文献回顾分析[J]. 北方药学, 2018, 15(7): 181-183.
- [19] 国家医保局, 人力资源社会保障部. 国家医保局人力资源社会保障部关于印发《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2022 年)》的通知: 医保发[2023]5 号[EB/OL]. (2023-01-18) [2023-07-31]. [https://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art\\_104\\_10078.html](https://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art_104_10078.html).
- [20] 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 关于印发国家基本药物目录(2018 年版)的通知: 国卫药政发[2018]31 号[EB/OL]. (2018-10-25) [2023-07-31]. <https://www.nhc.gov.cn/yaozs/s7656/201810/c18533e22a3940d08d996b588d941631.shtml>.
- [21] 上海市卫生局, 上海市发展和改革委员会, 上海市经济和信息化委员会, 等. 关于印发《上海市实施国家基本药物制度工作方案(试行)》的通知: 沪卫医政[2010]100 号[EB/OL]. (2010-12-31) [2023-07-31]. <https://wsjkw.sh.gov.cn/yzgl/20180815/0012-60867.html>.
- [22] 国家组织药品集中采购和使用联合采购办公室. 关于公布全国药品集中采购中选结果的通知[EB/OL]. (2020-08-24) [2023-07-31]. <https://www.smpaa.cn/gjstd-cg/2020/08/24/9560.shtml>.
- [23] 中国医药统计网. 2021 年度中国医药工业百强企业榜单[EB/OL]. (2022-12-18) [2023-07-31]. <https://www.yytj.org.cn/enterpriseTop.aspx>.
- [24] Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP, et al. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005, 2005(2): CD2946.
- [25] 邱贵兴, 翁习生, 张克, 等. 盐酸/硫酸氨基葡萄糖治疗骨关节炎的平行对照临床研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(43): 49-52.
- [26] 国家食品药品监管总局. 总局关于发布仿制药参比制剂目录(第六批)的通告(2017 年第 88 号)[EB/OL]. (2017-06-09) [2023-07-31]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20170609143201332.html>.
- [27] 国家药监局. 国家药品监督管理局关于发布可豁免或简化人体生物等效性(BE)试验品种(第二批)的通告(2018 年第 136 号)[EB/OL]. (2018-12-29) [2023-07-31]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20181229154501633.html>.
- [28] 王晓琳, 李晓东, 郭敏, 等. 中药内服外敷联合氨基葡萄糖治疗骨关节炎临床疗效研究进展[J]. 西部中医药, 2022, 35(1): 149-152.
- [29] 韩丽华. 硫酸氨基葡萄糖临床应用的研究进展[J]. 中国医药指南, 2019, 17(12): 42.
- [30] 韩丽华. 盐酸氨基葡萄糖胶囊治疗骨关节炎的现状 & 进展研究[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(8): 232-233.

(收稿日期: 2023-08-03; 修回日期: 2023-10-20)

## 地中海贫血造血干细胞移植患儿霉酚酸药时曲线下面积及药物不良反应影响因素分析

牛露露, 伍云, 黄天敏, 吴廷庆, 肖洋, 刘滔滔\* (广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021)

**摘要:** **目的** 探讨地中海贫血造血干细胞移植儿童患者霉酚酸 (MPA) 药时曲线下面积 (AUC) 及发生药品不良反应 (ADR) 的影响因素。**方法** 收集我院 2022 年 10 月至 2023 年 4 月行造血干细胞移植术并监测 MPA 血药浓度的地中海贫血儿童患者临床资料。采用高效液相色谱法测定血浆 MPA 浓度并计算其 AUC, 统计患者用药期间发生 ADR 的信息。多元回归方法分析 MPA-AUC 影响因素, 同时探究 ADR 与 MPA-AUC 及患者生理指标之间的相关性。**结果** 白蛋白 (ALB) 是 MPA-AUC 的独立影响因素 ( $P < 0.05$ ), ALB 水平  $< 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 患儿 AUC 最低, 提示低蛋白血症对 MPA-AUC 有影响; 并且患儿缺乏肝肠循环, 故 MPA-AUC 偏低。患儿用药后 ADR 发生率为 84.2%, 以感染为主。多元回归分析显示: 年龄与 ADR 的发生有相关性 ( $P < 0.05$ )。**结论** ALB 以及缺乏肝肠循环对 MPA-AUC 有影响; 患儿 ALB  $< 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时应适当增加给药剂量。患儿用药后 ADR 发生率较高, 年龄是其主要影响因素, 有必要进行治疗药物监测, 实现精准用药。

**关键词:** 造血干细胞移植; 地中海贫血; 药时曲线下面积; 霉酚酸; 影响因素

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0526-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.040

### Factors influencing the area under the concentration-time curve of mycophenolic acid and adverse drug reactions in children with thalassemia after hematopoietic stem cell transplantation

NIU Lu-lu, WU Yun, HUANG Tian-min, WU Ting-qing, XIAO Yang, LIU Tao-tao\* (Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021)

**Abstract: Objective** To determine the factors influencing the area under the concentration-time curve (AUC) of mycophenolic acid (MPA) and the occurrence of adverse drug reactions (ADR) in children with thalassemia after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** Clinical data were collected from pediatric patients with thalassemia after HSCT with monitoring of MPA blood levels from October 2022 to April 2023 in our hospital. The plasma MPA was measured by high-performance liquid chromatography. The MPA-AUC was calculated and information on the occurrence of ADR during the patients' medication was recorded. Multiple regression analysis was used to analyze the factors affecting MPA-AUC and to determine the correlation between ADR and MPA-AUC and the patients' physiological indicators. **Results** Albumin (ALB) was an independent influence on MPA-AUC in children with thalassemia undergoing HSCT ( $P < 0.05$ ). The lowest AUC was observed in children with an ALB level  $< 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , suggesting that hypoproteinemia might affect MPA-AUC, and the lack of hepatic and intestinal circulation in the children resulted in low MPA-AUC. The incidence of ADR in children after the medication was 84.2%, mainly infections. Multiple regression analysis showed a correlation between age and the occurrence of ADR ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ALB and lack of hepatic

作者简介: 牛露露, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学相关工作, email: 1600818029@qq.com \*通信作者: 刘滔滔, 女, 主任药师, 博士, 主要从事临床药学相关工作, email: liutaotao@gxmu.edu

and intestinal circulation affect MPA-AUC. Dose should be increased appropriately for children with  $ALB < 35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The incidence of ADR after drug administration is fairly high in children, and age is the main influencing factor. Therapeutic drug monitoring is necessary.

**Key words:** hematopoietic stem cell transplantation; thalassemia; area under the concentration-time curve; mycophenolic acid; influencing factor

地中海贫血是由于一个或多个珠蛋白基因发生缺失或突变使珠蛋白链合成不足, 导致溶血性贫血的疾病; 造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 是目前治疗地中海贫血的有效手段<sup>[1]</sup>。但其治疗效果受到移植物抗宿主病相关发病率和死亡率的限制<sup>[2]</sup>。吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil, MMF) 是霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA) 的酯前药, 通过抑制鸟嘌呤的合成选择性阻断 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖来发挥免疫抑制作用, 临床上广泛用于预防各种实体器官移植免疫排斥反应的发生<sup>[3]</sup>, 因其良好的口服吸收性, 已广泛用于 HSCT 术后免疫排斥反应的发生<sup>[4]</sup>。药时曲线下面积 (area under the concentration-time curve, AUC) 是体现 MPA 体内暴露量的最佳药代动力学参数, 且与临床治疗移植物抗宿主病效果有一定关系<sup>[5]</sup>。MPA 治疗窗窄, 据报道 MMF 的药品不良反应 (adverse drug reaction, ADR) 与药物体内暴露量密切相关<sup>[6]</sup>, 但目前有关地中海贫血 HSCT 儿童患者 MPA-AUC 影响因素的研究较少, 无法为此类患者临床用药提供参考。

本研究选取我院 38 名地中海贫血 HSCT 术后使用 MMF 的儿童患者进行前瞻性研究, 探索影响 HSCT 儿童患者 MPA-AUC 的因素, 并分析 MPA-AUC 与 ADR 的相关性, 为临床个体化安全用药提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2022 年 10 月至 2023 年 7 月于广西医科大学第一附属医院行造血干细胞移植的地中海贫血儿童患者。纳入标准: ① 年龄  $< 18$  岁; ② 首次行造血干细胞移植术; ③ 术后服用 MMF  $\geq 4$  d。排除标准: ① 肝肾功能不全者; ② 临床资料缺失者。本研究获得广西医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (批件号: 2023-K130-01), 所有患儿家属已签署知情同意书。

### 1.2 数据收集

收集患儿人口统计学资料: 性别、年龄、身高、体重、体质量指数、体表面积。血样采集当日临床

检验生化指标: 白蛋白 (ALB)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、肌酐、血红蛋白、白细胞计数、中性粒细胞绝对值、血小板计数、红细胞压积、总胆红素 (TB)、直接胆红素、尿素、肌酐清除率、总蛋白。MMF 用药信息: 给药剂量及合并用药。

### 1.3 用药方案

由于药品说明书并未推荐地中海贫血 HSCT 儿童患者给药剂量, 参考肾移植儿童患者, 所有患者均在 HSCT 术前 4 d 服用 MMF 胶囊 (规格:  $0.25 \text{ g} \times 40$  粒, 上海罗氏制药有限公司) 或 MMF 分散片 (规格:  $0.25 \text{ g} \times 40$  片, 杭州中美华东制药有限公司), 初始给药剂量  $600 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ , 每日两次。

### 1.4 血样采集及测定

由于伦理学及实际操作的限制, 无法对儿童患者进行密集采血, 因此本研究中血样采集分为两部分: ① 所有患儿在服用 MMF 4 d 达稳态后, 在下一剂给药前 30 min ( $C_0$ ) 及给药后 0.5、2、4 h ( $C_{0.5}$ 、 $C_2$ 、 $C_4$ ) 采血用于 MPA-AUC 计算; ② 按照患儿及家属意愿从 38 名患儿中选取一部分患者在用药前及用药后 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 采血用于探究肝肠循环。所有血样均采集静脉血样 2 mL 于 EDTA 抗凝管中,  $4000 \times \text{g}$  离心 5 min, 取上层血浆进行检测。使用高效液相色谱仪 (苏州艾迪迈公司) 测定 MPA 血药浓度, 色谱柱包括在线分析柱 C1: TDM core-C1 ( $50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ )、在线分析柱 C2: TDM core-C2 ( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ )、在线萃取柱 Z02: Pureflow-Z02 ( $20 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ )、在线萃取柱 S01: Pureflow-S01 ( $20 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ); 测定试剂所用流动相、质控样品均来自苏州艾迪迈医疗科技有限公司。

### 1.5 数据计算

根据患儿服药前 0.5 h ( $C_0$ ) 及服药后 0.5、2、4 h ( $C_{0.5}$ 、 $C_2$ 、 $C_4$ ) 血药浓度值计算 MPA-AUC。

### 1.6 ADR 评价标准

根据药品说明书, MMF 用药后易出现的 ADR 包括胃肠道系统疾病 (腹泻, 恶心, 呕吐)、血液和淋巴系统疾病 (贫血, 败血症) 及各种原因导致的感染。ADR 的具体评判标准参考《常见严



重药品不良反应技术规范及评价标准》，其中：① 单次检测 ALT > 2×ULN (正常值上限) 或 TB > ULN；② 连续 2 次 ALT > 40 U·L<sup>-1</sup> 或 / 和 TB > 1×ULN；符合上述 2 项内容之一则定义为肝功能损害。准确记录患儿用药期间发生的 ADR，并且分析其与 MPA-AUC 和患儿生理生化指标之间的相关性。

### 1.7 统计分析

采用 SPSS 软件进行数据分析，正态分布数据用均数 ± 标准差表示，非正态分布数据用中位数 (四分数) 表示，分类变量用百分比表示。

连续性变量与 MPA-AUC 间相关性采用 Spearman 或 Pearson 相关性分析，组间计量资料比较采用两独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验，将  $P < 0.25$ <sup>[7]</sup> 纳入回归分析，多元回归分析检验水准  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 患者一般情况

总共纳入 38 名符合条件的地中海贫血 HSCT 患者 (男 18 例, 女 20 例), 平均年龄为 (10.08 ± 3.25) 岁; 38 例次 MPA 初始用药剂量为 (561.142 ± 133.894) mg·m<sup>-3</sup>, 患者人口学及临床资料见表 1。

表 1 人口学资料及生理病理学信息

Tab 1 Demographic data and physiopathological information

参数	值	参数	值
患者病例数	38	直接胆红素 / (μmol·L <sup>-1</sup> )	3.37 ± 1.40
MPA-AUC 数量	38	尿素 / (mmol·L <sup>-1</sup> )	4.90 ± 1.27
AUC 浓度值 / (mg·L <sup>-1</sup> )	28.37 ± 6.00	肌酐清除率 / (mL·min <sup>-1</sup> )	200.71 ± 71.58
男性 [n (%)]	18 (47.4)	总蛋白 / (g·L <sup>-1</sup> )	66.78 ± 4.48
女性 [n (%)]	20 (52.6)	合用药物 [n (%)]	
年龄 / 岁	10.08 ± 3.25	兰索拉唑	30 (78.9)
体重 / kg	24.77 ± 7.83	他克莫司	26 (68.4)
身高 / cm	125.55 ± 16.36	环孢素	12 (31.5)
体表面积 / m <sup>2</sup>	0.93 ± 0.20	基础疾病 [n (%)]	
ALB / (g·L <sup>-1</sup> )	39.70 (37.75, 41.85)	继发性铁过载	30 (78.9%)
ALT / (U·L <sup>-1</sup> )	37.00 (23.75, 77.50)	蚕豆病	1 (2.6%)
AST / (U·L <sup>-1</sup> )	31.50 (21.00, 42.50)	脾切除术后	3 (7.9%)
肌酐 / (μmol·L <sup>-1</sup> )	19.29 ± 5.82	乙肝	1 (2.6%)
白细胞计数 / (×10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	0.11 (0.09, 0.18)	出血性膀胱炎	1 (2.6%)
中性粒细胞绝对值 / (×10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	0.08 (0.04, 0.11)	用药信息	
血小板计数 / (×10 <sup>9</sup> ·L <sup>-1</sup> )	35.20 (21.60, 71.35)	霉酚酸初始用药剂量 / (mg·m <sup>-3</sup> )	561.142 ± 133.894
血红蛋白 / (g·L <sup>-1</sup> )	89.57 ± 14.01	分散片使用例数	12
TB / (μmol·L <sup>-1</sup> )	12.95 ± 5.29	胶囊使用例数	26

### 2.2 MPA-AUC 影响因素

患儿生理生化连续性变量单因素分析结果见表 2, 结果表明血红蛋白、AST、ALB、总蛋白和肌酐清除率与 MPA-AUC 具有相关性 ( $P < 0.25$ )。患儿性别、药物剂型、合并用药等变量组间 MPA-AUC 比较结果见表 3, 结果显示: 性别差异具有统计学意义 ( $P < 0.25$ )。最终多元回归分析结果表明: ALB 是 MPA-AUC 的独立影响因素 ( $P < 0.05$ ) (见表 4)。

### 2.3 血浆 ALB 水平对 MPA-AUC 的影响

根据患者 ALB 水平不同分为三组: A 组 (< 35 g·L<sup>-1</sup>)、B 组 (35 ~ 41.8 g·L<sup>-1</sup>)、C 组 (> 41.8 g·L<sup>-1</sup>)。单因素 ANOVA 分析显示, 三组间 AUC 值存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), ALB 水平各组间均值呈现出 C 组 > B 组 > A 组的趋势 (见表 5)。以 MPA-AUC 有效浓度范围 (30 ~ 60

mg·L<sup>-1</sup>) 为目标值<sup>[5]</sup>, A 组的 MPA-AUC 大多低于 30 mg·L<sup>-1</sup>, 未达到参考范围。A、B、C 三组患儿达标率分别为 11.1%、55.6%、66.7%; C 组 MPA-AUC 均值可达 (32.91 ± 7.30) mg·L<sup>-1</sup>。

由图 1 可知, MPA-AUC 随 ALB 增加而上升趋势明显; 当 ALB < 35 g·L<sup>-1</sup> 时, MPA-AUC 最低 (见图 2), 可定义为低蛋白血症<sup>[8-9]</sup>, 提示低蛋白血症对 MPA-AUC 有影响。

### 2.4 ADR 发生情况

38 名患儿发生 ADR 情况如下: 共 32 名患儿出现 ADR, 发生率为 84.2%, 其中男性 14 名, 女性 18 名。AUC 监测期间共发生 41 例次 ADR, 主要涉及消化系统、呼吸系统、血管与淋巴系统以及感染。具体情况见表 6。

### 2.5 各类 ADR 与 MPA-AUC 及患者生理病理状况相关性分析

表 2 患儿生理生化指标与 MPA-AUC 相关性分析

Tab 2 Correlation analysis of physiological and biochemical indexes with MPA-AUC in children

项目	相关系数	P 值
年龄	-0.154	0.355
体重	-0.040	0.811
身高	-0.104	0.536
体表面积	-0.062	0.710
白细胞计数	0.190	0.252
中性粒细胞绝对值	0.153	0.359
血小板计数	0.060	0.722
血红蛋白	0.375	0.021
ALT	0.047	0.780
AST	0.286	0.082
TB	-0.075	0.654
直接胆红素	-0.005	0.977
ALB	0.391	0.015
肌酐	0.263	0.111
尿素	0.109	0.514
总蛋白	0.194	0.242
肌酐清除率	-0.306	0.062

表 3 组间 MPA-AUC 值比较

Tab 3 MPA-AUC values between groups

项目	AUC 浓度数量 (n)	浓度值 / (mg · L <sup>-1</sup> )	P 值
性别			
男	18	29.75 ± 6.94	0.183
女	20	0.571 (0.250, 1.180)	
他克莫司			
合用	27	28.41 ± 6.03	0.947
否	11	28.27 ± 6.19	
环孢素			
合用	12	28.04 ± 5.96	0.819
否	26	28.53 ± 6.12	
剂型			
分散片	12	26.65 ± 5.59	0.575
胶囊	26	29.17 ± 6.11	

表 4 线性回归方程中 MPA-AUC 影响因素

Tab 4 MPA-AUC influencing factors in linear regression equations

模型	非标准化系数		标准系数	t 值	95%CI	P 值	共线性	
	B	标准误					容差	VIF
(常量)	-12.027	19.278		-0.624	-51.398 ~ 27.343	0.537		
ALB	0.842	0.354	0.440	2.380	0.120 ~ 1.564	0.024	0.631	1.585
血红蛋白	0.122	0.085	0.285	1.443	-0.051 ~ 0.295	0.159	0.550	1.818
AST	0.033	0.038	0.143	0.885	-0.043 ~ 0.110	0.383	0.825	1.211
肌酐清除率	0.017	0.019	0.207	0.917	-0.021 ~ 0.056	0.366	0.423	2.362
肌酐	0.253	0.204	0.246	1.242	-0.163 ~ 0.669	0.224	0.551	1.816
总蛋白	-0.181	0.239	-0.135	-0.758	-0.669 ~ 0.307	0.454	0.675	1.482
性别	-3.194	1.962	-0.270	-1.628	-7.202 ~ 0.813	0.114	0.785	1.274

的发生, 提高患者生存率。MMF 在实体器官移植中的成功推动了其在 HSCT 中的应用<sup>[10]</sup>。然而 MPA 治疗窗窄, 血药浓度过高易出现白细胞减少、病毒感染及贫血等不良反应<sup>[11-13]</sup>, 而浓

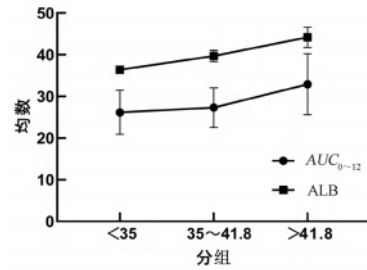


图 1 MPA-AUC 与 ALB 水平整体趋势

Fig 1 Overall trend of MPA-AUC and ALB levels

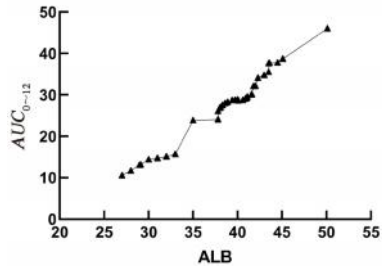


图 2 ALB 与 MPA-AUC 对应值

Fig 2 Corresponding values of ALB and MPA-AUC

38 名患儿用药期间共发生 41 例次 ADR, 对患儿各项生理因素、合并用药及 MPA-AUC 相关性进行探索, 结果发现 ADR 的发生与年龄有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 7。

### 2.6 患儿肝肠循环

为探究患儿体内 MPA 肝肠循环情况, 对 30 名患儿用药后血浆药物浓度 - 时间曲线图进行拟合, 结果如图 3。所有患儿中仅 3 位 (10%) 在服药 6 h 后血药浓度增加, 说明患儿缺乏肝肠循环故 MPA 体内暴露量低。

### 3 讨论

HSCT 是地中海贫血的常规治疗方法, 术后免疫抑制剂的使用有助于预防移植物排斥反应

度过低则增加移植术后急性排斥反应风险<sup>[13-14]</sup>, 因此有必要进行治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 以保障临床用药安全。AUC 反映了药物在体内的暴露量, 是目前 MPA 临床

表 5 不同 ALB 水平对 MPA-AUC 的影响

Tab 5 Effect of different ALB levels on MPA-AUC

ALB 水平分组	AUC 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	F 检验	
		F	P
< 35 g · L <sup>-1</sup> (A 组)	26.16 ± 5.26	4.086	0.025
35 ~ 41.8 g · L <sup>-1</sup> (B 组)	27.32 ± 4.76		
> 41.8 g · L <sup>-1</sup> (C 组)	32.91 ± 7.30		

表 6 患儿 ADR 情况

Tab 6 ADR status of the children

ADR 涉及器官及系统	临床表现 (n)	n (%)
肝功能损害	单次检测 TB > ULN (3)	3 (7.32)
胃肠道系统	腹痛腹泻 (4)、恶心呕吐 (2)	6 (14.63)
感染	口腔黏膜炎感染 (1)、细菌感染 (9)、 口腔溃疡感染 (13)、真菌感染 (1)	24 (58.54)
其他	巨细胞病毒血症 (1)、出血性膀胱炎 (1)、院内获得性肺炎 (1)	3 (7.32)
呼吸系统	急性上呼吸道感染 (5)	5 (12.19)

表 7 患儿 ADR 与各项指标相关性

Tab 7 Correlation between ADR of children and various indicators

变量 1	变量 2	相关系数	95%CI	t 值	P 值
ADR	体重	-0.451	-0.008 ~ 0.043	1.434	0.162
	性别	0.122	-0.180 ~ 0.249	0.329	0.744
	年龄	-0.615	-0.162 ~ -0.043	-3.498	0.001
	剂型	-0.016	-0.298 ~ 0.161	-0.608	0.548
	合用他克莫司	-0.241	-0.599 ~ 0.348	-0.541	0.592
	合用环孢素	0.241	0.380 ~ 0.599	0.457	0.651
	AUC	0.083	-0.017 ~ 0.020	0.172	0.864

本研究纳入我院 38 名 HSCT 地中海贫血患儿计算其 MPA-AUC, 对可能影响 AUC 的因素进行分析。结果发现: ALB 是 MPA-AUC 的独立影响因素 ( $P < 0.05$ ), 两者成正相关性, AUC 水平随 ALB 的增加而增加; 并且患儿缺乏肝肠循环, 所以 MPA-AUC 偏低。

MPA 是一种与蛋白高度结合的药物, 结合指数为 97%, 在体内可与血浆 ALB 可逆性结合, 而其未结合游离部分是 MPA 发挥免疫排斥反应的主要因素<sup>[15-16]</sup>。MPA 的代谢物 7-O-葡萄糖苷酸霉酚酸 (7-O-MPA-glucuronide, MPAG) 与蛋白结合率高达 82%<sup>[16]</sup>。研究发现, 体内 ALB 水平降低与 MPA-AUC 降低有关系<sup>[17]</sup>。有研究发现, MPA 清除率与 ALB 浓度有关: 当 ALB 浓度增加时, MPA 与蛋白结合水平增加, 此时游离 MPA 水平下降可被清除的数量减少, 清除率降低, 故 AUC 值降低<sup>[18-19]</sup>。本研究多元回归分析发现: ALB 是 AUC 的独立影响因素, 两者成正相关, 与文献报道一致<sup>[20-21]</sup>。本研究还发现 AUC 随 ALB 的增加而呈上升趋势, 且低蛋白血症是影响 AUC 的主要原因。

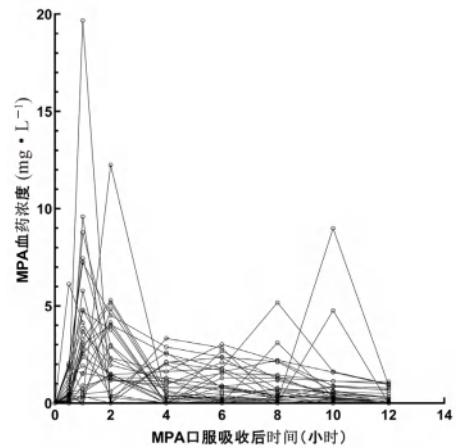


图 3 患儿 MPA 时间浓度折线图

Fig 3 Time concentration profile of MPA in children

TDM 的首选指标。然而影响 MPA-AUC 的因素较多, 如肝肾功能、药物合用等, 目前有关地中海贫血 HSCT 儿童患者 MPA-AUC 影响的研究较少。

MPA 在体内经尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶代谢为 MPAG 与少量酰基葡萄糖苷酸, 后者参与了 MPA 肝肠循环过程: MMF 口服给药 4 ~ 6 h 后, MPA 时间浓度曲线上出现第二个血药浓度特征峰。据报道 40% (10% ~ 61%) 的 AUC 来自肝肠循环<sup>[16]</sup>。本研究选取 30 名患儿探究肝肠循环过程, 然而仅 3 位 (10%) 患儿在服药 6 h 后出现第二个特征峰, 提示患儿缺乏肝肠循环。这可能是由于 HSCT 患者治疗过程中使用大量广谱抗菌药物, 肠道菌群遭到破坏, 导致肝肠循环受损的缘故<sup>[22]</sup>。

本文对可能影响 ADR 发生的各项因素进行分析, 结果发现: 年龄是 ADR 发生的独立影响因素。有研究报道称<sup>[23]</sup>: HSCT 术后儿童患者 ALB 水平的增加呈现时间依赖性, 随术后时间的增加而增加; ALB 水平增加与 MPA 结合率增加, 可被清除的游离 MPA 减少, 故血药浓度增加。与文献<sup>[24]</sup>提及的 MPA 血药浓度增加时, ADR 发生率增加相符。需指出的是, 患儿 ADR 发生受治疗过程, 药物合用等多种因素影响, 且本文纳入患者数量较少, 故 ADR 分析具有一定局限性。

综上所述, ALB 是影响 AUC 的独立影响因



素, 低蛋白血症影响 MPA-AUC; HSCT 地中海贫血患儿缺乏肝肠循环; 对于此类患者建议适当增加给药剂量以达到良好的治疗效果; 对于肝肾功能不全患者应减少用药剂量。ADR 的发生与患儿年龄存在密切相关性, 临床使用 MMF 时可根据患者年龄制订不同给药方案, 同时需密切监测 MPA 血药浓度以防 ADR 的发生。

## 参考文献

- [1] Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, et al. Marrow transplantation for thalassaemia [J]. *Lancet*, 1982, 2: 227-229.
- [2] Vogelsang GB, Arai S. Mycophenolate mofetil for the prevention and treatment of graft-versus-host disease following stem cell transplantation: preliminary findings [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27 (12): 1255-1262.
- [3] Kaufman DB, Shapiro R, Lucey MR, et al. Immunosuppression: practice and trends [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4 (Suppl 9): 38-53.
- [4] Royer B, Larosa F, Legrand F, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid administered 3 times daily after hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity regimen [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15 (9): 1134-1139.
- [5] Carlone G, Simeone R, Baraldo M, et al. Area-under-the-curve-based mycophenolate mofetil dosage may contribute to decrease the incidence of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation in pediatric patients [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (3): 406.
- [6] Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (1): 13-58.
- [7] Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation [J]. *Am J Epidemiol*, 1989, 129 (1): 125-137.
- [8] 王毅, 单培仁, 黄伟温, 等. 乳清蛋白对急诊脓毒症合并低蛋白血症患者血清白蛋白及相关炎症因子的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (5): 590-593.
- [9] 华晓芳, 沈艳芳. 口服支链氨基酸对心力衰竭合并低蛋白血症患者血清白蛋白水平和心功能的影响 [J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39 (9): 1966-1970.
- [10] Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases [J]. *Blood*, 2003, 101 (4): 1620-1629.
- [11] Kiberd BA, Lawen J, Fraser AD, et al. Early adequate mycophenolic acid exposure is associated with less rejection in kidney transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4 (7): 1079-1083.
- [12] Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RE, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 64 (6): 672-683.
- [13] Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for total and free mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients: a report of the German study group on mycophenolate mofetil therapy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13 (3): 759-768.
- [14] Atcheson BA, Taylor PJ, Mudge DW, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2005, 59 (3): 271-280.
- [15] Cox VC, Ensom MH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? [J]. *Ther Drug Monit*, 2003, 25 (2): 137-157.
- [16] Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 34 (6): 429-455.
- [17] van Hest RM, van Gelder T, Vulto AG, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44 (10): 1083-1096.
- [18] de Winter BC, Mathot RA, Sombogaard F, et al. Differences in clearance of mycophenolic acid among renal transplant recipients, hematopoietic stem cell transplant recipients, and patients with autoimmune disease [J]. *Ther Drug Monit*, 2010, 32 (5): 606-614.
- [19] de Winter BC, van Gelder T, Sombogaard F, et al. Pharmacokinetic role of protein binding of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in renal transplant recipients [J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2009, 36 (6): 541-564.
- [20] 郭苗, 王源园, 张宏文, 等. 肾移植患者霉酚酸暴露量的影响因素分析及其对血液系统不良反应的预测价值 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43 (21): 2419-2423.
- [21] 黄凌斐. 血浆白蛋白水平对霉酚酸药-时曲线下面积的影响 [A]// 第十三届江浙沪儿科学术会议暨 2016 年浙江省医学会儿科学术年会论文汇编 [C]. 浙江省医学会儿科学分会, 江苏省医学会儿科学分会, 上海市医学会儿科学分会, 浙江省科学技术协会, 2016: 912.
- [22] Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, et al. The magnitude and time course of changes in mycophenolic acid 12-hour predose levels during antibiotic therapy in mycophenolate mofetil-based renal transplantation [J]. *Ther Drug Monit*, 2007, 29 (1): 122-126.
- [23] Zhang D, Renbarger JL, Chow DS. Pharmacokinetic variability of mycophenolic acid in pediatric and adult patients with hematopoietic stem cell transplantation [J]. *J Clin Pharmacol*, 2016, 56 (11): 1378-1386.
- [24] Hubner GI, Eismann R, Sziegoleit W. Relationship between mycophenolate mofetil side effects and mycophenolic acid plasma trough levels in renal transplant patients [J]. *Arzneimittelforschung*, 2000, 50 (10): 936-940.

(收稿日期: 2023-09-11; 修回日期: 2023-10-11)

# 2022 年北京冬奥会延庆赛区定点医院 药学服务体系的构建与实践

马康<sup>1,2</sup>, 纪永军<sup>2</sup>, 王新歌<sup>2</sup>, 帅瑛慧<sup>2</sup>, 赵凤龙<sup>1\*</sup> (北京市延庆区医院(北京大学第三医院延庆医院)医务处, 1. 医务处; 2. 药剂科, 北京 102100)

**摘要:** 北京市延庆区医院为 2022 年北京冬奥会延庆赛区唯一定点医院, 通过多个方面进行药学服务体系建设, 并在冬奥会医疗保障期间开展实践工作, 包括在药学人员根据不同岗位执行对应防疫策略等方面, 通过全方位培训、完善药品储备、建立运动员药品禁忌查询系统、加强处方审核、开展药学监护、参与多学科诊疗及远程药学服务等措施圆满完成定点医院药学服务工作, 为今后国内其他大型赛事定点医院的药学服务工作提供借鉴。

**关键词:** 冬奥会; 药学服务; 新型冠状病毒感染; 体育赛事

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)02-0532-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.041

## Construction and practice of pharmaceutical service system of designated hospitals in Yanqing District of Olympic Winter Games Beijing 2022

MA Kang<sup>1,2</sup>, JI Yong-jun<sup>2</sup>, WANG Xin-ge<sup>2</sup>, SHUAI Ying-hui<sup>2</sup>, ZHAO Feng-long<sup>1\*</sup> (1. Medical Service Division; 2. Department of Pharmacy, Beijing Yanqing District Hospital (Yanqing Hospital, Peking University Third Hospital), Beijing 102100)

**Abstract:** Beijing Yanqing District Hospital is the only designated hospital of Yanqing Division for the Olympic Winter Games Beijing 2022. It has put into practice a pharmaceutical care system for the medical support of the Olympic Winter Games Beijing 2022 through various measures. These measures included: taking corresponding prevention measures against COVID-19 according to different spots, running all-round professional trainings, optimizing the stock of medications, setting up a search system of taboo medications for athletes, intensifying prescription review, providing pharmaceutical care, participating in multidisciplinary cooperation in diagnosis and treatment, and offering remote pharmaceutical care services. All these measures help successfully completion the pharmaceutical service in the designated hospital, providing reference for other designated hospitals during big sporting events in the future.

**Key words:** Olympic Winter Games ; pharmaceutical service; novel coronavirus infection; sport game

2022 年北京冬奥会延庆赛区承担了冬奥会高山滑雪、雪车、钢架雪车、雪橇项目及冬残奥会高山滑雪项目, 共有近 800 名运动员参赛。北京市延庆区医院(北京大学第三医院延庆医院)作为延庆赛区唯一的定点医院, 承担了此次冬奥会、冬残奥会延庆赛区近 2 万人的医疗保障工作。

本文主要探讨在新型冠状病毒感染疫情防控下, 冬奥会定点医院如何开展药学服务, 更好地

为冬奥会提供医疗保障是本文的主要探讨内容。

### 1 定点医院基本情况

北京市延庆区医院依据冬奥会医疗保障服务疫情防控的规定<sup>[1]</sup>将就诊的涉冬奥人员, 如运动员、奥组委技术官员、保障人员分为“闭环内管理就诊人员(简称环内患者)”和“闭环外参与后勤保障工作就诊人员(简称环外患者)”。环内患者均在我院封闭独立区域“冬奥医疗保障中心”

**基金项目:** 冬奥会创伤急救体系及保障医院绿色通道的建立(系统和现场, 定点医院和网络单位建设)(No. 2018YFF0301102)。

**作者简介:** 马康, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事药事管理和临床药学研究, email: makang0707@163.com \*通信作者: 赵凤龙, 男, 硕士, 主任医师, 主要从事医政管理研究, email: 309538812@qq.com

就诊。环外患者主要在门诊、急诊、发热门诊区域专设诊室就诊。在整个冬奥会医疗保障服务期间(2022年1月23日至2月21日),我院共接诊涉冬奥人员311名,基本情况见表1。

表1 冬奥延庆赛区定点医院接诊患者基本情况

Tab 1 Basic information of patients received by designated hospitals in Yanqing District of the Olympic Winter Games

基本信息	环内就诊患者	环外就诊人数
人数	268	43
外国籍	45	0
中国籍	223	43
平均年龄/岁	38.37±12.23	33.45±11.26
男女比例	3.79:1	2.07:1
门诊人数	245	42
住院人数	23	1
运动员人数	11	0

## 2 构建保障模式

### 2.1 建立冬奥药学服务管理组织

依据新型冠状病毒感染疫情防控及冬奥组委相关文件,结合我院实际工作需求,在我院药事管理与药物治疗学委员会下设立冬奥会赛事药学服务管理工作组,负责冬奥会、冬残奥会期间的药学服务工作。工作组由主管院长任组长,医务处处长、药剂科主任任副组长,下设药事管理、药品供应、药品调剂管理、合理用药、药学人员防护五个小组,并明确各小组工作职责。该工作组架构及各小组职责详见图1。

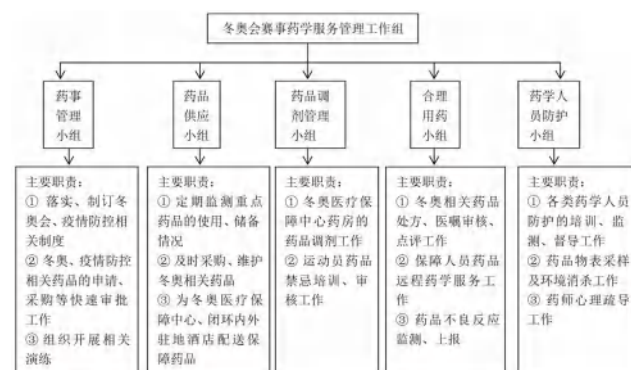


图1 冬奥会赛事药学服务管理工作组架构图

Fig 1 Structure diagram of the pharmaceutical service management working group for the Olympic Winter Games

### 2.2 加强应急预案建设及演练

总结我院在2020年国家雪车雪橇预认证赛、2021/2022雪车和钢架雪车计时赛、2021/2022雪橇世界杯期间开展的药学服务经验,并依据不断调整的新型冠状病毒感染防控政策,我院制订了各项药学服务应急预案并开展多次演练,确保冬奥会期间相关药学服务工作顺利开展。预案主要

涉及药品的配送、保存、使用及人员岗位管理各个方面。其中重点制订了《药学在岗人员核酸阳性应急处置预案》《药品配送人员及药品外包装物表阳性应急处置预案》《急救药品短缺处置预案》《突发公共卫生事件药品保障工作预案》《各驻点酒店医疗保障药品配送、收回处理流程》等12项预案,并逐一进行了演练,在后续冬奥会保障药学服务实践中发挥了明显作用。

### 2.3 规范药学人员防护措施

依据新型冠状病毒感染疫情防控规定<sup>[2]</sup>及冬奥组委对赛事保障工作的相关安排<sup>[3]</sup>,我院药学人员按照各岗位的不同风险等级,采取对应防护策略:

① 冬奥医疗保障中心:调剂药师采取二级防护,穿防护服,戴医用防护口罩、帽子、手套、靴套、防护面屏;

② 发热门诊:调剂药师采取一级防护,穿隔离衣,戴医用防护口罩、帽子、手套、靴套、防护面屏;

③ 普通门急诊:调剂药师采取穿工作服,戴一次性医用外科口罩、帽子、手套。

另外由药学人员防护小组通过线上、线下相结合方式,组织所有药学人员进行疫情防控下冬奥相关人员就诊知识培训<sup>[2-5]</sup>,加强工作场所消毒、医疗废弃物管理。

通过“金数据”平台,设计调查问卷,每日对所有药学人员进行体温监测及家庭成员流行病学史调查、上报。并由心理科协助制订心理评估问卷,定期对药学人员进行心理评估、干预,提高心理应对能力<sup>[6]</sup>。

### 2.4 优化药品储备工作

2.4.1 落实基本药品保障功能 药品储备是冬奥会期间药学服务的基础工作。我院药剂科根据冬奥会赛事相关规定及疫情防控文件要求,在保障全区及周边患者治疗用药需求前提下,及时优化医院药品基本供应目录,淘汰23个滞销药品(包括缬沙坦氢氯噻嗪分散片、洛索洛芬钠分散片、盐酸氨溴索氯化钠注射液、羟苯磺酸钙分散片等),增加64个赛事需求药品(如利多卡因氯己定气雾剂、氟比洛芬凝胶贴膏、湿润烧伤膏等)。确保满足冬奥会赛事期间疫情防控、服务保障人员及运动员治疗需求。

另外通过ABC分类库存管理法<sup>[7]</sup>对药品库存进行优化管理,加强呼吸系统、外伤类药品的储备,同时提升全院其他药品周转效率,在保障



冬奥会医疗保障及疫情防控的前提下,有效提升了药品周转频次。其中药库的药品周转天数由 21.64 d 下降至 14.45 d, 门诊、急诊药房的药品周转天数由 19.21 d 下降至 13.33 d。

**2.4.2 冬奥药房门急诊、病区服务一体化** 通过建立冬奥医疗保障中心药房(简称“冬奥药房”),实现了住院药房、门诊药房、急诊药房功能集成化、一体化。冬奥药房设立赛事保障专用药品目录,共储备药品 195 种,涵盖整个赛事期间的治疗用药。所有环内患者就诊所需药物均在冬奥药房完成调剂、审核、发放。

**2.4.3 制订各服务酒店药品保障目录** 除冬奥村参赛人员外,另有国内外万余名赛事服务人员,分布在延庆赛区 28 家赛事保障酒店。此类人员由我院承担药学服务保障工作。我院根据前期赛事药学服务经验,考虑此类服务人员存在着不同用药需求。提前建立了“赛事保障酒店用药目录”,并在保障期间不断调整药品目录种类及基数,确保各保障酒店的药品满足日常需求。

**2.5 拓展药学服务内容**

**2.5.1 建立“运动员药品禁忌查询系统”** 我院依据世界反兴奋剂机构发布的 2022 年《世界反兴奋剂条例国际标准禁用清单》<sup>[8]</sup> 及国家体育总局印发的《运动员治疗药物使用指南》<sup>[9]</sup>,通过药师查阅其他文献材料,建立了“运动员药品禁忌数据库”。该数据库不仅涵盖冬奥医疗保障中心所有药品的说明书内容,同时增加了运动员禁用、适用建议及依据。并进一步通过互联网平台及线下办公软件的 Offset 函数功能实现了联网查询及医院系统内网查询功能。

该查询功能相较于中国反兴奋剂中心的“用药查询系统”(网址: <http://yyex.chinada.cn/p>)

及全球药品在线查询系统(网址: [www.globaldro.com](http://www.globaldro.com)) 优点在于: ① 药品信息更精炼、更适用于冬奥会医疗保障工作; ② 融合了药品说明书与运动员适用禁忌查询功能; ③ 实现了内网、外网均可使用,同时手机端、电脑端均可便捷查询; ④ 根据国内外文献新增加了注射用矛头蝮蛇血凝酶、天麻素注射液、湿润烧伤膏、注射用尿激酶等 19 种药品运动员是否禁用提示功能,上述药品在目前运动员药品查询系统是无法查询到的。

例如注射用矛头蝮蛇血凝酶能缩短止血时间,减少出血量,不影响凝血功能,广泛应用于临床<sup>[10]</sup>。在赛事医疗救治中是否可以用于运动员救治,目前国内外查询系统均未记录。经查询该药中含有的辅料甘露醇为运动员禁用药品,我院将其收入数据库查询功能,用于辅助临床医师选择治疗方案。

**2.5.2 加强处方/医嘱审核工作** 我院药剂科组建冬奥处方审核专班。由经过运动员药品相关知识的副主任及以上药师开展专项审核。主要通过处方前置审核提前点评所有运动员处方/医嘱,并将发现的问题随时与接诊医师沟通,及时杜绝不合理处方。另外采取处方/医嘱点评进行再次审核,同时将处方中常用药品进行在线培训。最终冬奥药房处方 604 张、医嘱 1005 条,合理率达到 100.00%。

**2.5.3 参加多学科诊疗** 药师通过参加多学科诊疗(multi-disciplinary team, MDT)对运动员的救治工作提供积极帮助。在冬奥会期间我院临床药师共参加 3 次 MDT,主要涉及急性肾衰竭患者药物剂量调整、术后发热患者抗菌药物遴选、感染患者抗菌药物联用的 3 名患者提供药学会诊建议,并得到临床采纳,具体见表 2。

表 2 临床药师参与多学科诊疗情况

Tab 2 Participation of clinical pharmacist participate in MDT

序号	MDT 主题	会诊意见	结果
1	急性肾衰竭抗菌药物剂量调整	患者血液滤过,肌酐清除率 20 mL · min <sup>-1</sup> , 调整亚胺培南西司他汀为 500 mg, q6h ~ q8h, 临时增加一次剂量	建议被采纳, 患者感染指标下降
2	术后发热患者抗菌药物遴选	建议将头孢呋辛调整为头孢他啶	建议被采纳, 患者发热症状缓解
3	感染患者抗菌药物遴选	既往青霉素、头孢、磺胺类药物过敏, 调整抗菌药物为阿奇霉素	建议被采纳, 患者感染指标下降

**2.5.4 建立远程药物咨询服务** 我院通过远程会议中心为 28 家保障酒店开展远程药物咨询服务,主要面对服务酒店保障医师及护士,为其医疗保障中提供药物相关咨询。在整个冬奥会期间共解决药物问题 52 个,主要类别如表 3 所示。

**2.5.5 开展药学监护工作** 我院临床药师对冬奥

医疗保障中心住院患者实行药学监护。主要工作为: 开展药学会诊; 辅助临床医师为患者制订药学监护诊疗计划; 为患者开展用药教育。24 名住院患者全部开展了药学监护,具体见表 4。

**2.5.6 开展兴奋剂知识培训** 在冬奥会药学服务筹备前期,我院针对体育赛事涉及的药品及政策

表 3 远程药物咨询服务种类

咨询种类	数量
用法用量	10
药理作用	9
药物溶媒	6
不良反应	6
药品适应证	5
药品遴选	4
特殊人群用药	3
其他	3
药品禁忌	2
药效学	2
给药方式	1
药物经济学	1
合计	52

表 4 冬奥医疗保障中心住院患者药学监护情况

药学监护内容	开展数量	采纳数量	采纳比例 /%
开展药学会诊	6	5	83.33
制订药学诊疗计划	24	24	100.00
开展用药教育	35	35	100.00

进行了 12 次专项培训。主要包括两方面：① 针对医务人员进行兴奋剂管理、使用培训，特别是兴奋剂药品开具条件，治疗用药豁免（therapeutic use exemptions, TUE）申请的适用范围及使用流程；② 针对酒店保障人员进行含兴奋剂药品及食品科普培训，减少误用含兴奋剂情况的发生。

### 3 运行中存在的问题及解决经验

#### 3.1 提前筹划赛事保障专用药品目录

与冬奥村综合诊所药房配备药品的机制不同，定点医院在筹备赛事保障药品目录时需要提前考虑到两点：① 冬奥组委相关部门是否会下发定点医院保障药品目录；② 应结合定点医院接诊运动员病情特点准备相应的药品。特别是冬奥会期间我院接诊的运动员多为外伤、骨折患者，在冬奥组委未下发定点医院医疗保障药品目录的前提下，我院药品目录筹备前期充分借鉴了北京大学第三医院、积水潭医院赛事保障用药目录，同时结合我院前期在各赛事期间接诊用药情况，完成了冬奥会期间保障专用药品目录。

#### 3.2 动态调整服务酒店保障药品的种类及数量

冬奥会期间，我院承担 28 家闭环内保障酒店内工作人员的日常用药。在运行期间，发现存在以下现象：① 用于清热解毒的中成药需求量增加幅度较大；② 对于前期准备的非甾体解热镇痛药物

使用数量相对较少。根据用药记录分析，主要为赛事保障的工作人员因疲劳或环境影响出现流涕、咽痛等上呼吸道症状增多。新型冠状病毒感染情况并未出现明显增加情况。因此在疫情防控措施到位情况下，对于闭环内的工作人员，在日常保障中需要根据赛事环境及工作情况预留相应治疗药物。

#### 3.3 关注闭环内工作人员的情绪

针对环内患者，我院药师开展现场用药教育及线上药物咨询服务，其间发现部分闭环内患者在赛事中、后期出现一定程度的焦虑、烦躁情绪，导致患者用药依从性下降。这不排除因长期闭环管理及工作压力较大所致。因此建议在赛事保障筹备期间提前为药师开展相关心理方面知识培训。药师在药学服务过程中融入心理疏导等服务措施，减轻患者的焦虑心情，提高患者用药依从性，减少患者非必要就诊次数。

#### 3.4 医、护、药紧密配合，提高药学服务质量

医务人员接诊环内患者均着二级防护服，存在患者无法直观识别医务人员，交流不顺畅的客观情况。因此医师、护士、药师在接诊流程中衔接紧密，相互帮助，能够快速、高效地完成诊疗工作，极大地提升患者就医感受。药师在通过与医师、护士相互协作的过程中不仅高效地完成了现场用药指导，还增进了医师、护士对药物的了解，促进了团队凝聚力，为后续药学服务提升打下了良好基础，获得就诊患者好评。

#### 3.5 畅通应急药物院外调拨转运衔接

药学服务的对象除参赛运动员外，还包括奥组委技术官员、赛场工作人员、志愿者、媒体人员等。部分患者有长期服用某种固定药物的情况。此类患者收入院治疗后，出现携带药物不足问题，为确保治疗的延续性及稳定性，经专家组会诊后需要继续服用原厂家药物。针对此类个体化患者的用药需求，需要定点医院提前做好预案，并在实际运行中加强配送企业、院内药库药房的衔接，确保此类临时应急药品及时配送到位，满足患者个体化的用药需求。

## 4 讨论

#### 4.1 新型冠状病毒感染疫情下实行适宜防护措施

在全球新型冠状病毒感染背景下，2022 年北京冬奥会各赛区施行了闭环内与闭环外管理的措施。我院作为冬奥会延庆赛区唯一的定点医疗保障单位。所有参加此次保障的药学人员根据工作岗位及保障内容不同制订了不同的防护措施。冬奥会赛区闭环内药房实行二级防护，闭环外药房实行一级



防护。在不过度防护前提下,严格落实人员培训、考核制度。整个冬奥会期间实现零感染。

**4.2 开展丰富的药学服务保障大型体育赛事医疗**  
冬奥会医疗保障期间,我院构建的药学服务体系主要包括:①药品供应全流程保障工作,通过完善药品供应目录,加强配送、调剂环节监管,满足了院内药品需求,同时兼顾满足了各保障酒店人员的药品需求<sup>[1]</sup>;②多环节提升合理用药,药房病区的处方/医嘱前置审核、病区内药学监护、远程咨询、赛前药品专项培训等工作提升了药物的合理使用;③开展个性化药学服务,临床药师通过参与重症复杂患者的MDT在临床治疗方面取得良好成效。通过开发运动员药品禁忌查询系统,为医师、药师以及运动员及教练组提供药品遴选及合理使用的帮助。

**4.3 根据体育赛事类别及工作重点优化药学服务内容**

2022年冬奥会延庆赛区的医疗保障药学服务工作主要分为延庆赛区内医疗保障(奥运村综合诊所)及延庆赛区外定点医院医疗保障(我院冬奥医疗保障中心)。我院针对的患者主要为奥运村综合诊所初诊后需来我院进一步检查、治疗的患者。因此在构建药学服务体系过程中不同于冬奥村综合诊所药房的药品管理、处方调剂及审核工作<sup>[12]</sup>,我院更侧重于危重及病情复杂患者的药学监护、处方前置审核及服务酒店的远程药物咨询工作,并且在医疗保障实践中发挥了积极作用。

**4.4 药学服务实践过程中逐步改进存在的问题**

冬奥会赛事药学服务体系的构建主要依托于我院的日常药学服务工作,并以赛事保障作为工作方向。整个实践过程中也存在不足,但是前期预案的制订及演练工作为发现的各项问题修订提供了更好的解决方案,同时节约时间,提高效率。除药剂科外,全院各职能科室、临床、医技科室的相互配合,医师、护士、药师、技师的齐心协力也为问题持续改进打下了良好基础。

## 参考文献

- [1] 北京冬奥组委.北京2022年冬奥会和冬残奥会医疗卫生保障总体指导方案[S].2020:1-48.
- [2] 国家卫生健康委办公厅.国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒感染的肺炎防控方案(第3版)的通知.国卫办疾控函〔2020〕80号[EB/OL].(2020-01-28)[2020-02-28].[http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/29/content\\_5472893.html](http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/29/content_5472893.html).
- [3] 国际奥委会,国际残奥委会,北京冬奥组委.北京2022年冬奥会和冬残奥会其他利益相关方防疫手册(第二版)[EB/OL].(2021-12-13)[2022-05-10].<https://new.inews.gtimg.com/tnews/825259da/5a88/825259da-5a88-4d0b-b20e-f202598c0d52.pdf>.
- [4] 国际奥委会,国际残奥委会,北京冬奥组委.北京2022年冬奥会和冬残奥会运动员和随队官员防疫手册(第二版)[EB/OL].(2021-12-13)[2022-05-10].<https://new.inews.gtimg.com/tnews/969be216/a803/969be216-a803-4b7d-b8dc-eb7b58c6e363.pdf>.
- [5] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)的通知[EB/OL].(2021-04-15)[2021-03-01].<http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202104/7de0b3837c-8b4606a0594aeb0105232b.shtml>.
- [6] 袁冬冬,陈永妍,王本军,等.新型冠状病毒肺炎疫情防控下发热调剂室的药学实践[J].中国医院药学杂志,2020,40(8):869-872.
- [7] 林锐娜.优化药品库管理方法对提升管理水平的价值[J].中医药管理杂志,2020,28(1):217-218.
- [8] 葛雨琦,陈佩杰.2022版《禁用清单》与《兴奋剂目录》解读[J].中国体育教练员,2022,30(1):19-21.
- [9] 中国田径协会.运动员常用治疗药物使用指南(2020版)[EB/OL].(2020-11-02)[2022-01-24].<http://www.athletics.org.cn/anti-doping/jyqd/2020/1102/363599.html>.
- [10] 潘波波,严梦霞,俞萍萍,等.注射用矛头蝮蛇血凝酶的临床应用综合评价[J].中国医院药学杂志,2022,42(11):1152-1155.
- [11] 朱运贵,邓紫薇,刘丽华,等.新型冠状病毒感染诊疗方案治疗药物信息汇编(第一版)[J].中南药学,2020,18(3):345-358.
- [12] 叶昕,史香漪,徐姗姗,等.基于4M1E管理法的2022北京延庆冬(残)奥村综合诊所药房建设与管理[J].中国药房,2022,33(20):2433-2438.

(收稿日期:2023-07-31;修回日期:2023-08-17)



# 基于数据挖掘探讨《类证治裁》治疗淋浊的用药规律

马干辉<sup>1, 2</sup>, 赵佳柱<sup>1, 2, 4</sup>, 祝雨辰<sup>1, 2</sup>, 杨岩涛<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学中医药超分子机理与数理特征化实验室, 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学湘杏学院, 湖南 岳阳 410500)

**摘要:** **目的** 基于数据挖掘探讨《类证治裁》治疗淋浊的用药规律。**方法** 按照纳入标准收集整理《类证治裁》中治疗淋浊的处方, 采用中医传承辅助平台 V2.5 软件、IBM SPSS Moderler18.0 及 IBM SPSS Statistics 23.0 对所收集整理的处方进行分析整合。**结果** 《类证治裁》中治疗淋浊的方剂共 71 首, 专治五淋、二浊方剂共 22 首。71 首方剂包含 164 味中药, 主要药性为寒、温、平; 主要药味为甘、苦、辛; 主入肾、脾、心经; 主要功效为补虚类、利水渗湿类及清热类; 药物出现频次在 7 次及以上 (1.5%) 的中药共有 20 味, 其中频次在 10 次及以上 (2%) 的中药共有 13 味; 支持度个数  $\geq 7$ , 基于关联规则置信度  $\geq 0.6$  的药物组合 7 对, 包含 6 味中药。**结论** 在治疗淋浊方面, 《类证治裁》治疗淋浊病以利水渗湿为主, 兼以清利湿热、滋阴补肾、温中补虚、活血祛瘀、健脾养胃等, 为现代中医学诊疗淋浊提供了充分的理论依据。

**关键词:** 淋浊; 数据挖掘; 类证治裁; 茯苓; 利水渗湿

**中图分类号:** R283

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2024)02-0537-06

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.042

淋浊病是成年男性的常见病、多发病。《黄帝内经》首次描述此病名, 有“淋”“淋洩”“淋满”等<sup>[1]</sup>。中医将淋浊病分为“淋”与“浊”, 其中“淋”出溺窍, 病在肝脾; “浊”出精窍, 病在心肾。现代医学认为淋浊病表现为前列腺疾病、泌尿道感染、泌尿系肿瘤、性传播疾病中的淋病等。《类证治裁》是清代医家林佩琴晚年所著的一部具有较高学术价值的综合性医书, 其对淋浊分类沿用五淋及二浊分法, 如石淋、劳淋、血淋、气淋、膏淋、赤白浊、溺浊。本研究借助中医传承辅助平台等软件对《类证治裁》有关于淋浊处方进行数据挖掘, 进而总结治疗淋浊处方的学术思想及组方规律。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源与处理

收集《类证治裁》中的淋浊方剂, 参照 2020 年版《中国药典》对药物名称、性味做规范处理<sup>[2]</sup>, 如“姜”规范为“生姜”; “芍药”规范为“白芍”; “枣”规范为“大枣”; “丹皮”规范为“牡丹皮”等。同时, 为了避免相同中药因炮制方式不同, 导致性味、归经、功效的不同, 区分“生

甘草”与“炙甘草”, “地黄”与“熟地黄”。为了保证原配伍的完整性, 将“蜜”规范为“蜂蜜”。

### 1.2 分析软件

采用中医传承辅助平台 V2.5 软件、IBM SPSS Moderler18.0、IBM SPSS Statistics 23.0 及 Excel 2019。

### 1.3 数据录入与核对

由 2 名及 2 名以上工作人员同时进行数据输入及校准。

### 1.4 数据分析

总结五淋和二浊的对应处方、处方数以及处方中的共用药和针对性用药; 药性、药味、功效和归经角度对纳入的所有中药进行统计分析。对中药所出现的频次进行统计; 对用方规律及药物联系进行聚类分析; 对药物之间相关性进行关联规则分析。

## 2 结果

### 2.1 五淋与二浊、药性、药味、归经及功效

通过整理《类证治裁》, 收集到淋浊附方方剂共 71 首, 共 164 味中药。其中针对性治疗五淋、二浊方剂共 22 首, 相关疾病对应附方、附方数、共用药 (频次  $\geq 2$  次) 及针对性用药见表 1。

**基金项目:** 湖南省自然科学基金项目 (No.2021JJ30512); 长沙市自然科学基金资助项目 (No.kq2014091); 湖南省教育厅一般项目 (No.19C1406); 湖南省研究生教育创新工程和专业能力提升工程项目 (No.CX20200759); 湖南省研究生科研创新项目 (No.CX20210710); 湖南中医药大学化学工程与技术一流学科建设项目。

**作者简介:** 马干辉, 男, 硕士研究生, 主要从事中药制剂学相关研究, email: 285660062@qq.com \***通信作者:** 杨岩涛, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药剂学、中药药理学、中药制药工程与工艺方面的教学与科研工作, email: xdyt1@163.com

表 1 五淋与二浊对应附方、附方数、共用药 (频次 ≥ 2 次) 及针对性用药

淋浊证型 (五淋、二浊)	附方	附方数	共用药 (频次 ≥ 2 次)	针对性用药
石淋 (沙淋)	神圣湖泊散、如圣散、加味葵子散、二神散	4	车前子、冬葵果、滑石、麦冬、木通	琥珀、海金沙
劳淋	生地黄丸、肾气丸	2	车前子、蜂蜜	地黄、牛膝
血淋	鸡苏散、四物汤、六味丸、八珍汤、益元散、大分清饮、柿蒂汤	7	白芍、川芎、当归、地黄、茯苓、滑石、牡丹皮、木通、熟地黄、泽泻	白芍、茯苓、木通、泽泻
气淋	沉香散、瞿麦汤	2	当归、瞿麦	沉香、瞿麦
膏淋	海金沙散、鹿角霜丸、菟丝子丸、大沉香散	4	滑石、黄芪	海金沙、鹿角霜、菟丝子、沉香
赤白浊	远志丸 (赤浊)、加味清心饮 (赤浊)、猪苓汤 (赤浊)	3	茯苓、益智、远志、泽泻	茯苓、猪苓、泽泻
溺浊	/	/	/	/

对 71 首方剂中 164 味中药利用中医传承辅助平台 V2.5 进行药性、药味、归经及功效分析, 结果显示, 药性中最多为寒性药物, 其次是温性药物及平性药物; 药味中最多为甘味药物, 其次是苦味和辛味; 归经中最多为归肾经的药物, 其次为脾经及心经; 功效中最多为补虚类的药物, 其次为利水渗湿类及清热类 (见表 2~4 及图 1~2)。

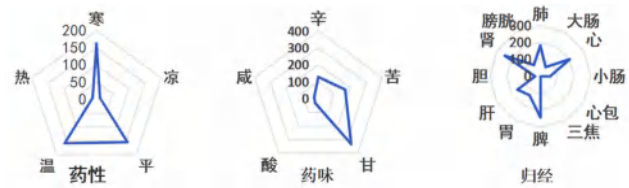


图 1 淋浊附方药性、药味、归经雷达图

表 2 淋浊附方药性、药味分析

药性	频次/次	占比/%	药味	频次/次	占比/%
寒	162	32.46	辛	127	18.49
凉	11	2.20	苦	168	24.45
平	155	31.06	甘	333	48.47
温	159	31.86	酸	33	4.80
热	12	2.40	咸	26	3.78

表 3 淋浊附方归经分析

归经	频次/次	占比/%	归经	频次/次	占比/%
肺	181	12.99	脾	242	17.37
大肠	63	4.52	胃	129	9.26
心	202	14.50	肝	157	11.27
小肠	58	4.16	胆	32	2.30
心包	5	0.36	肾	243	17.44
三焦	3	0.22	膀胱	78	5.60

表 4 淋浊附方功效分析

功效	频次/次	占比/%	功效	频次/次	占比/%
补虚类	183	35.06	化湿类	6	1.15
利水渗湿类	121	23.18	泻下类	6	1.15
清热类	64	12.26	止血类	6	1.15
安神类	27	5.17	攻毒杀虫止痒类	4	0.77
理气类	21	4.02	开窍类	4	0.77
收涩类	19	3.64	平肝息风类	4	0.77
温里类	16	3.07	拔毒化腐生肌类	1	0.19
活血化瘀类	13	2.49	驱虫类	1	0.19
解表类	13	2.49	祛风湿类	1	0.19
化痰止咳平喘类	11	2.11	消食类	1	0.19

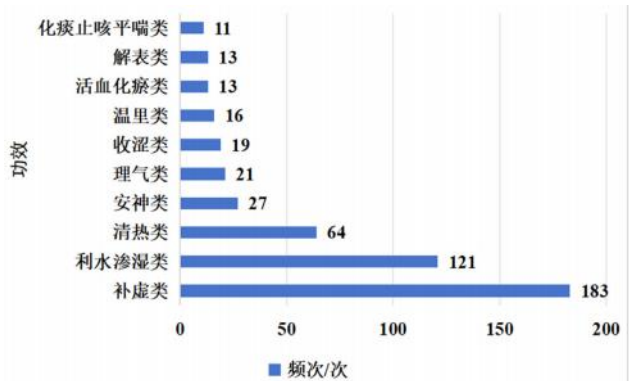


图 2 淋浊附方功效分析图

## 2.2 药物使用频次分析

对收集的 164 味中药进行药物频次分析, 结果显示, 药物出现总频次为 522 次, 其中频次在 7 次及以上 (1.5%) 的中药共 20 味, 且频次在 10 次及以上 (2%) 的中药共 13 味, 分别为茯苓、甘草、泽泻、蜂蜜、滑石、人参、白术、木通、车前子、山药、当归、麦冬、黄芪, 均以利水渗湿类、补虚类药物为主, 见表 5。

## 2.3 聚类分析

对所收集的方剂中出现频次前 20 的中药利用 IBM SPSS Statistics 23.0 聚类分析, 将聚类个数设置为“5”最能代表《类证治裁》用方规律。结果显示, 第 1 类共 6 味中药, 分别是泽泻、猪苓、茯苓、白术、陈皮、甘草; 第 2 类共 5 味中药, 分别是车前子、黄芩、麦冬、木通、地黄; 第 3 类是单独一味中药: 滑石; 第 4 类共 4 味中药, 分别是人参、

表 5 淋浊附方中药物使用的频次分析 (频次 ≥ 5 次)

序号	药物	频次/次	占比/%	序号	药物	频次/次	占比/%
1	茯苓	32	6.13	19	猪苓	8	1.53
2	甘草	21	4.02	20	菟丝子	7	1.34
3	泽泻	17	3.26	21	山茱萸	6	1.15
4	蜂蜜	13	2.49	22	灯心草	6	1.15
5	滑石	13	2.49	23	白芍	6	1.15
6	人参	13	2.49	24	牡丹皮	6	1.15
7	白术	12	2.30	25	牛膝	6	1.15
8	木通	12	2.30	26	肉桂	6	1.15
9	车前子	11	2.11	27	黄芪	5	0.96
10	山药	11	2.11	28	半夏	5	0.96
11	当归	10	1.92	29	冬葵果	5	0.96
12	麦冬	10	1.92	30	茯神	5	0.96
13	黄芩	10	1.92	31	黄柏	5	0.96
14	地黄	9	1.72	32	瞿麦	5	0.96
15	陈皮	9	1.72	33	生姜	5	0.96
16	熟地黄	8	1.53	34	酸枣仁	5	0.96
17	远志	8	1.53	35	益智	5	0.96
18	炙甘草	8	1.53	36	栀子	5	0.96

远志、炙甘草、当归；第 5 类共 4 味中药，分别是蜂蜜、山药、菟丝子、熟地黄（见表 6 及图 3）。

表 6 淋浊附方中中药的聚类分析

聚类	成员数	药物	主要功效
1	5	泽泻、猪苓、茯苓、白术、陈皮、甘草	利水渗湿；化浊降脂
2	5	车前子、黄芩、麦冬、木通、地黄	利尿通淋；清热祛痰
3	1	滑石	利尿通淋；清热解暑
4	4	人参、远志、炙甘草、当归	大补元气；健脾益肺
5	4	蜂蜜、山药、菟丝子、熟地黄	健脾益胃；补益肝肾

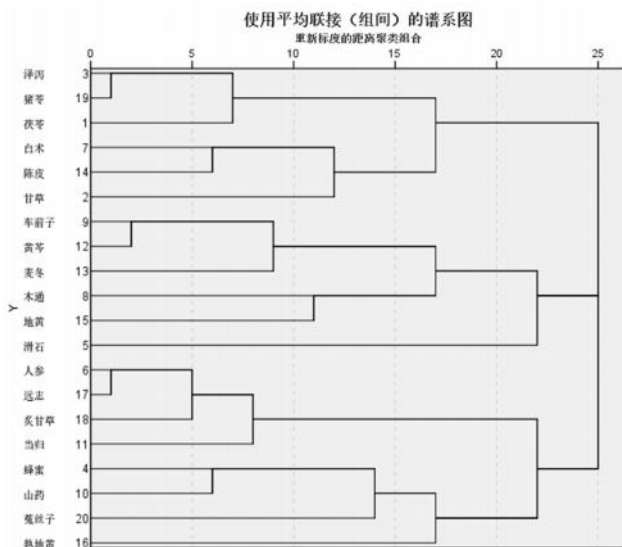


图 3 淋浊附方中中药的聚类分析图

## 2.4 药物关联规则分析

对所收集的方剂及中药利用 IBM SPSS

Moderler18.0 进行药物关联规则分析，出现频次前 5 的药对分别为茯苓-泽泻、茯苓-甘草、白术-茯苓、茯苓-山药以及茯苓-猪苓，见表 7。

表 7 淋浊附方中高频中药组合分析 (频次 ≥ 6)

序号	药物组合	频次/次	序号	药物组合	频次/次
1	茯苓-泽泻	13	11	白术-甘草	6
2	茯苓-甘草	11	12	白术-人参	6
3	白术-茯苓	9	13	陈皮-甘草	6
4	茯苓-山药	8	14	甘草-人参	6
5	茯苓-猪苓	8	15	人参-远志	6
6	泽泻-猪苓	7	16	蜂蜜-山药	6
7	陈皮-茯苓	7	17	蜂蜜-泽泻	6
8	茯苓-人参	7	18	茯苓-牡丹皮	6
9	车前子-黄芩	6	19	山药-山茱萸	6
10	甘草-滑石	6	20	甘草-泽泻	6

在此基础上，将最低条件支持度设置为 10，将置信度设置为 60%，最大前项数设置为 6，并分析药物之间的相关性，可得到方剂的用药规律，结果见表 8、图 4。

表 8 淋浊附方中中药关联规则分析 (置信度 ≥ 60%)

后项	前项	支持度/%	置信度/%
茯苓	猪苓	11.268	100.0
泽泻	猪苓	11.268	87.5
泽泻	茯苓、猪苓	11.268	87.5
茯苓	陈皮	12.676	77.8
茯苓	泽泻	23.944	76.5
人参	远志	11.268	75.0
茯苓	白术	16.901	75.0
茯苓	山药	15.496	72.7
甘草	陈皮	12.676	66.7
人参	炙甘草	11.268	62.5
车前子	黄芩	14.085	60.0

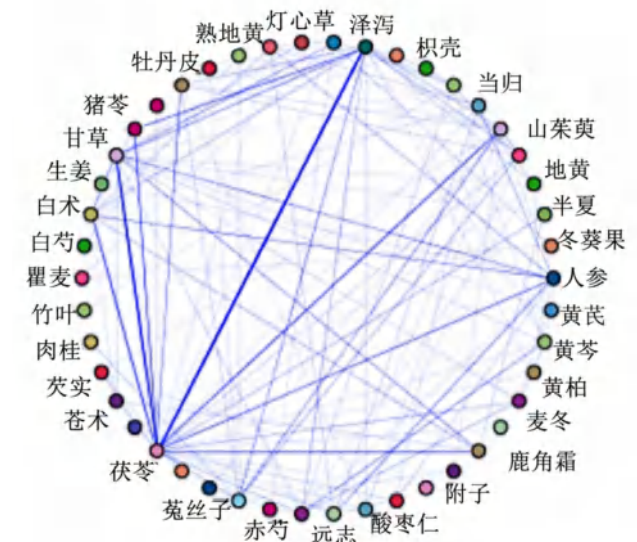


图 4 淋浊附方中中药关联规则的网络拓扑图



### 3 讨论

#### 3.1 淋浊病证型分布、用药规律分析

《类证治裁》所纳淋浊方剂以治疗五淋、二浊为主，即石淋、劳淋、血淋、气淋、膏淋以及赤白浊、溺浊。其中共有 22 首方剂专治五淋二浊。

石淋系膀胱蓄热，溺则茎中急痛，频下沙石，症重则为石，轻则为沙<sup>[3]</sup>。《类证治裁》所纳方剂专治石淋 4 首，其中 1 首为治疗沙淋。共用药 5 味，分别为车前子、冬葵果、滑石、麦冬、木通，其中滑石使用频次最高。而琥珀、海金沙作为石淋专药。这些药物的使用较充分地说明了利尿渗湿为石淋常用药物，《类证治裁》也沿袭了利尿通淋的核心治法。劳淋有二，一为劳于脾者，二为劳于肾者。所纳方剂专治劳淋 2 首，共用药为车前子和蜂蜜，且 2 首处方分别以地黄、牛膝为主药，生地滋养心脾，牛膝滋补肝肾，配伍车前子的通淋功效与蜂蜜的补中功效，更加体现了需治劳淋必先补脾或补肾，从根本调理身体，治疗劳淋。血淋热甚刺痛，尿色深红，夹有血块。所纳专治血淋方剂数量最高，为 7 首。共用药分别为白芍、川芎、当归、地黄、茯苓、滑石、牡丹皮、木通、熟地黄、泽泻，而白芍、茯苓、木通、泽泻使用频率最高，治疗血淋需辨别血瘀、血虚、血热及血冷。白芍、当归、熟地治疗血虚；川芎治疗血瘀；地黄治疗血热；牡丹皮清热凉血兼以活血化瘀；茯苓、滑石、木通、泽泻起到通淋、渗湿功效。林佩琴善于辨证论证，根据不同疾病和症状选择不同药物和方剂来治疗血淋。气淋者气化不足，州都膀胱也，胞中气胀，少腹满痛，溺有余沥。所纳方剂专治气淋 2 首，共用药为当归、瞿麦，针对性用药为沉香、瞿麦。瞿麦清热利湿，古代医家常用其配伍不同中药治疗小便不利<sup>[4]</sup>。沉香行气止痛，可用于治疗气淋中出现的气滞、胸腹胀满疼痛。膏淋即为小便有脂腻如膏，浮于漩面，为肾虚不能约制脂液而下流。所纳方剂专治膏淋 4 首，共用药为滑石、黄芪，针对性用药为海金沙、鹿角霜、菟丝子、沉香，其用药规律为利尿通淋药配伍补阳药或补气、理气药，利用补阳药补肾阳，治肾虚而引起制约脂液下流的作用，且兼用补气药补益肾气虚、理气药纳气暖肾，缓解肾脏功能失调、气化不利引起的膏淋。

二浊分为赤白浊和溺浊。赤白浊分为赤浊和白浊，溺血赤则为赤浊，溺如甘浆白则为白浊。赤伤血分，白伤气分。《类证治裁》所纳方剂专治赤白浊 3 首，且皆为赤浊，共用药为茯苓、益

智、远志、泽泻，针对性用药为茯苓、猪苓、泽泻。赤浊治疗法则与血淋类似，若溺为黄赤，则多火症；若为劳倦伤中气，酒色伤肾阴，则需借助益智暖肾固精缩尿之效，或用远志交通心肾，通肾气而强志。茯苓、猪苓、泽泻便起到利尿渗湿、化浊降脂之功效。白浊为湿热内生。溺浊为胃中湿热下流，或心脾肾虚遗浊。《类证治裁》尚未收纳专治白浊及溺浊之方剂，因其细分为治疗湿痰、肾亏、心虚等症状，便于后世及现代研究根据不同病因，分析重点证候及辨证要点。

#### 3.2 性味、归经、功效分析

《类证治裁》所纳淋浊方剂药性以寒、温、平为主。《素问·至真要大论篇》曰“诸转反戾，水液浑浊，皆属于热”<sup>[5]</sup>。可见，淋浊病多可见湿热相关证型，故治疗多用寒性药，且寒性药具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、解热以及利尿等药理功效<sup>[6]</sup>，对治疗湿热症状颇有疗效，但为了避免寒性过于峻利，佐以温性之药调和寒凉之性。温性药多具温经助阳、通络活血、补虚散寒等作用<sup>[7]</sup>，可使血脉通达，气机调畅，则可使体内有形之邪得以化消，体现了中医理论“祛邪而不伤正”的治疗原则。平性药则药性平和，不显寒热，药性调和，可随证配伍，寒证热证均可使用<sup>[8]</sup>。

所纳淋浊方剂药味以甘、苦、辛为主，甘味药配伍温性药能健脾燥湿、助心阳、温肾阳，甘味药配伍寒性药能养胃阴清胃火、泻心火；苦味药配伍温性药能泻寒湿、温寒水、泻肺燥，苦味药配伍寒性药能泻湿热、坚肾、泻心肺火<sup>[9]</sup>。甘苦共用，配伍能散、能行的辛味药，用药平和而不伤脾胃，能达到补利结合、刚柔相济的效果。

所纳淋浊方剂归经以肾、脾、心经为主，与淋浊病在肝脾与心肾如出一辙。疾病的发生与脏腑功能失调密切相关，中医认为，肾虚是淋浊发病的重要因素之一<sup>[10]</sup>，由于劳累损耗、体质虚弱或久病耗伤等因素导致下焦空虚，从而损伤与肾脏相为表里的膀胱的气化与开合等功能，湿热上侵，故为发病。《类证治裁》记载：石淋由膀胱蓄热，溺则茎中急痛，频下沙石；劳淋因思虑烦扰，负重远行，劳于脾者；血淋热甚搏血，失其常道，以心主血，血渗胞中；气淋者，气化不及，州都膀胱也，胞中气胀，少腹满痛，溺有余沥；膏淋浮于漩面，为肾虚不能约制脂液而下流；溺浊，如泔，为胃中湿热下流。故，肾、肝、脾和胃均在人体水液代谢中作用甚大，可见林佩琴用药归经切合淋浊病机。

《类证治裁》所纳淋浊方剂药效以补虚药、利水渗湿药、清热药为主,其中补虚药使用频次最多,达到 35.06%,气、血、阴及阳(肾)“虚”为淋浊致病之根本,故使用补虚药以补充人体不足之气血阴阳,平衡阴阳,增强体质,改善脏腑功能。补虚药能分为补气药、补血药、补阴药、补阳药。其中,补气药是使用最多的补虚药。补气药以甘草、人参为代表。南朝医学家陶弘景将甘草尊为“国老”<sup>[11]</sup>,善于补脾气,人参为补气第一圣药,善于大补元气,复脉固脱<sup>[12]</sup>。两者皆甘,皆善补脾,共同配伍奏健脾益气之功效。补血药以当归、熟地黄为代表。“医方之祖”张仲景善用当归与熟地黄,相须配伍,共奏滋补阴精,养血调经之功<sup>[13]</sup>。补阳药则以菟丝子、益智为代表,两者皆入肾经,补肾经益肾阳,肾阳足则全身阳气皆足。补阴药以麦冬为代表,其功效为滋阴润肺、清热解毒、涩精化除,且“能入胃以养胃液,开胃进食,更能入脾以助脾散精于肺”<sup>[14]</sup>。利水渗湿药、清热药辅助补虚药,共同达到治病纠偏的目的,利水渗湿药为淋证症状的专项用药,以茯苓、泽泻为代表,此两味药在利水渗湿药中不可或缺,茯苓利水渗湿兼能健脾,泽泻利水渗湿兼能泻热。配合地黄等清热药发挥清热凉血,泻火燥湿,利尿通淋的作用。安神药能缓解淋浊疼痛引起的焦虑抑郁与失眠,帮助其入睡。理气药配伍补气药可使补气功效更甚,补而不滞,可缓解气机不畅奇脉所治淋浊病也。收涩药配伍补虚药则使补虚扶正之力更强。

### 3.3 用药频次分析

《类证治裁》中治疗淋浊方剂中使用频次在 10 次及以上的中药共 13 味,分别为茯苓、甘草、泽泻、蜂蜜、滑石、人参、白术、木通、车前子、山药、当归、麦冬、黄芪,诸药合用,共奏补气健脾、利水渗湿之功效。现代医学研究发现,茯苓具有利尿、抗炎等作用<sup>[15]</sup>;甘草具有抗肿瘤、抗炎杀菌及抗病毒等作用<sup>[16]</sup>;泽泻具有利尿、抗草酸钙结石及抗肾炎等作用<sup>[17]</sup>;蜂蜜具有抗菌、抗炎和抗氧化等作用<sup>[18]</sup>;滑石具有利尿、抗菌等作用<sup>[19]</sup>;人参具有抗氧化及抗心肌缺血等作用<sup>[20]</sup>。从药理学角度分析,这些中药通过抗炎等多种药理作用,使得中医表现为淋浊病症的疾病得以缓解及治愈。

### 3.4 药物的聚类分析

本研究利用前 20 个高频药物,共分析出 5 个聚类,第 1 类分别是泽泻、猪苓、茯苓、白术、

陈皮、甘草,以利水渗湿、化浊降脂功效为主;第 2 类分别是车前子、黄芩、麦冬、木通、地黄,以利尿通淋、清热祛痰功效为主;第 3 类是滑石,其功效为利尿通淋、清热解暑;第 4 类分别是人参、远志、炙甘草、当归,其功效以大补元气、健脾益肺为主;第 5 类分别是蜂蜜、山药、菟丝子、熟地黄,其功效以健脾益胃、补益肝肾为主。由此可知,林佩琴治疗淋浊以“利水渗湿”为主药法则,兼以“健脾益胃,补肝益肾,清热化浊”。

### 3.5 药物的关联规则分析

排名前 3 位的药对为茯苓-泽泻、茯苓-甘草、白术-茯苓,茯苓与化浊降脂泽泻相配伍,兼有利水渗湿之功效,水道通调,水湿之气从上顺下出于膀胱之府,治疗淋浊之本;茯苓与益气补脾甘草相配伍,调和脾胃,在甘淡渗利的同时,祛除“气虚”这一诱因,标本兼治;茯苓与燥湿健脾白术相配伍,共达健脾祛湿之效。从药物的关联规则上发现,治疗淋浊之证善用茯苓这一味中药,茯苓用药频次居榜首,前 5 高频组合药对均有茯苓,可见,《类证治裁》中治疗淋浊始终围绕着先利用茯苓“利水渗湿,健脾”等功效,再兼以其他中药的“气血双补、阴阳调和、清热”等功效,标本兼治,既切除病灶,也铲除病根。

### 3.6 现代应用分析

结合《类证治裁》治疗淋浊组方与用药规律,可应用于现代医学中泌尿系统疾病研究。如探析张春和基于《临证指南医案》淋浊病的用药规律,将草虎汤方用于治疗湿热瘀毒证慢性前列腺炎<sup>[21]</sup>。而《类证治裁》借鉴前人经验,总结多年临床经验,对其淋浊的用药规律总结,可为临床治疗淋浊甚至泌尿系统疾病研究提供参考。如作为《类证治裁》淋浊组方用药频次最高的中药茯苓,在现代临床应用中,可促进水液代谢,对肾病防治及免疫功能发挥重要作用<sup>[22]</sup>。而药对为历代医家在长期遣方用药积累起来的简约和精妙的经验总结,茯苓-泽泻为《类证治裁》淋浊组方用药频次最高的药对茯苓-泽泻,研究表明此药对水煎液可明显改善肾间质炎性细胞浸润作用<sup>[23]</sup>,也可通过三萜类成分参与组织的抗炎,参与氧化应激等过程治疗前列腺炎<sup>[24]</sup>。这与《类证治裁》淋浊方剂的治疗准则相一致,提示其临床应用于改善肾功能来发挥治疗淋浊的作用。

## 4 结论

本研究采用中医传承辅助平台 V2.5 等软件对《类证治裁》治疗淋浊处方进行了数据挖掘并

做了深层次解析, 分析了《类证治裁》治疗淋浊的组方及用药规律, 充分展现了以茯苓“利水渗湿”为主, 兼以“补虚、清热”的治疗原则, 为临床治疗淋浊病提供了思路。

### 参考文献

- [1] 陈梦璐, 李来来, 田丹, 等. 基于数据挖掘研究中成药治疗尿路感染的用药规律[J]. 贵州中医药大学学报, 2022, 44(6): 37-41.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 75.
- [3] 刘菡, 张耀圣, 商建伟, 等. 石淋复方治法和用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 193-199.
- [4] 段莹莹, 王青, 韦宇, 等. 瞿麦的临床应用及其量效探究[J]. 吉林中医药, 2021, 41(11): 1506-1509.
- [5] 佚名. 黄帝内经素问[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2017: 146, 179, 182.
- [6] 寇仁博, 郭玫, 郭亚菲, 等. 中药药性化学研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(3): 142-146.
- [7] 吕春艳, 吕邵娃, 李国玉, 等. 中药性味拆分与组合药理效应的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2892-2898.
- [8] 穆兰澄, 顾成娟, 徐立鹏, 等. 平性药药性及应用特点[J]. 中医杂志, 2017, 58(1): 23-26, 45.
- [9] 刘晓燕, 崔亚东, 田合禄. 中医四气五味理论与脏腑补泻关系的探讨[J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 121-124, 129.
- [10] 张力文, 张静宇, 曹畅, 等. 叶天士论治淋浊特色探析[J]. 中国中医急症, 2021, 30(11): 2031-2032, 2040.
- [11] 刘萍. 甘草功效和临床用量的本草考证[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(1): 73-77.
- [12] 张美玉, 吴泳锡, 王一竹, 等. 补气中药通过调节肠道菌群治疗脾虚证的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5430-5436.
- [13] 刘文博, 孙永康, 宋研博, 等. 仲景应用地黄规律探析[J]. 吉林中医药, 2022, 42(9): 1087-1091.
- [14] 范明明, 张嘉裕, 张湘龙, 等. 麦冬的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(4): 130-134.
- [15] 马艳春, 范楚晨, 冯天甜, 等. 茯苓的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(12): 108-111.
- [16] 胡泊, 孟祥云, 丁瑞洁. 中药甘草中主要皂苷类成分研究进展[J]. 海峡药学, 2021, 33(1): 180-182.
- [17] 张维君, 韩东卫, 李冀. 泽泻的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(12): 98-102.
- [18] 王琪琦, 杜欣玥, 高西贝, 等. 蜂蜜功能活性及药用价值研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5849-5854.
- [19] 朱禹, 岳仁宋. 滑石的历史沿革、化学成分及其致癌性的研究进展[J]. 中药材, 2021, 44(5): 1278-1283.
- [20] 李贵明, 李燕. 人参皂苷药理作用研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(8): 1024-1027.
- [21] 郭付祥. 基于《临证指南医案》淋浊病用药规律组方革虎汤治疗慢性前列腺炎湿热瘀毒证的临床研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2022.
- [22] 左军, 祁天立, 胡晓阳. 茯苓化学成分及现代药理研究进展[J]. 中医药学报, 2023, 51(1): 110-114.
- [23] 刘明, 王慧森, 梁瑞峰, 等. 茯苓-泽泻药对配伍研究及其标准煎液对肾病模型大鼠的影响[J]. 中国药师, 2022, 25(8): 1317-1323.
- [24] 严张仁, 潘俊卿, 胡香君, 等. 基于网络药理学分析“茯苓-泽泻”治疗前列腺炎作用机理研究[J]. 江西中医药, 2021, 52(5): 58-62.

(收稿日期: 2023-07-20; 修回日期: 2023-10-13)



# 临床药师参与 1 例新型抗肿瘤药物洛拉替尼致血脂异常的药学实践

李杨, 梁灿华, 蒙光义, 王广钊, 冯紫薇\* (玉林市第一人民医院药学部, 广西 玉林 537000)

**摘要:** 为探讨临床药师在肿瘤患者药物不良反应诊治过程中的作用, 以 1 例肺腺癌 *ALK* 突变患者使用洛拉替尼后出现药物相关性血脂异常为例, 临床药师查阅相关资料和文献, 参与临床患者诊治, 同时评估疗效和不良反应, 并在治疗过程中进行药物监护与教育。临床药师参与到临床治疗团队中, 有利于提高临床药物治疗水平, 为患者提供安全、有效、经济的治疗方案。

**关键词:** 洛拉替尼; 临床药师; 血脂异常; 药学实践; 肺腺癌

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0543-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.043

肺癌是全球死亡率第一的癌症<sup>[1]</sup>, 也是我国发病率和死亡率最高的肿瘤。肺癌中 80%~85% 为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)<sup>[2]</sup>, 69% 的 NSCLC 患者携带可靶向的基因突变, 其中间变形淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, *ALK*) 融合基因是排名第二的肿瘤驱动基因, 占 3%~7%<sup>[3]</sup>。洛拉替尼是第三代 *ALK*-酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 其大环分子结构设计, 使其对第一、二代 *ALK*-TKI 药物治疗期间出现的耐药突变仍具有广谱且高效的活性<sup>[4]</sup>。高脂血症是洛拉替尼治疗时最常见的药物不良反应之一, 中国患者的发生率超过 90%<sup>[4-6]</sup>。在抗肿瘤治疗中, 除洛拉替尼外, 来曲唑、他莫昔芬、比卡鲁胺、卡培他滨、帕博利珠单抗等多种常用药物都有可能引起血脂异常<sup>[7]</sup>。心血管事件死亡逐渐成为肿瘤患者的主要死亡原因。除此之外, 血脂异常还会诱发肿瘤恶病质, 增加肿瘤侵袭、转移风险。因此, 在肿瘤治疗过程中应密切监测患者血脂水平, 避免药物相关性血脂异常, 降低心血管事件发生率, 提高肿瘤患者预后。本文通过分析 1 例洛拉替尼相关性高脂血症, 旨在探讨临床药师在药物相关性血脂异常诊治中的作用, 并为临床药师在此类疾病中的工作内容提供参考。

## 1 病历资料

患者, 女, 28 岁, 2022 年 1 月 10 日因“确

诊肺腺癌 1 年余”, 返院治疗。患者 2020 年 8 月 21 日因“咳嗽、咳痰伴午后低热 2 周, 发现左肺占位 2 d”首次就诊我院, 诊断为肺腺癌 [左肺下叶 (IV<sub>B</sub> 期)]; ① 双肺转移; ② 多发淋巴结转移 (右颈部、左肺门、纵隔); ③ 胸膜转移 (左侧); ④ 多发脑转移; ⑤ 全身多发骨转移。免疫组化提示 *ALK*-D5F3 (+), 遂于 2020 年 8 月 27 日开始予阿帕替尼 0.25 g qd 联合阿来替尼 600 mg bid 治疗, 治疗期间疗效评价部分缓解 (PR)。2021 年 3 月 10 日复查 CT 及 MRI, 疗效评价疾病进展 (PD)。再次行病理活检, *ALK* 基因检测结果: p.L1171T Exon 22 0.05%, *ALK*-*EML4* 基因重排 0.07%, *EML4*-*ALK* 基因重排 0.04%, 恩沙替尼、塞瑞替尼、Brigatinib、洛拉替尼治疗敏感, 阿来替尼、克唑替尼治疗耐药。由于药物可及性原因, 患者口服洛拉替尼 100 mg qd 治疗。

2021 年 3 月 6 日患者入院复查, 血脂提示: 三酰甘油 (TG) 1.91 mmol·L<sup>-1</sup> (参考值 0.56~1.71 mmol·L<sup>-1</sup>), 总胆固醇 (TC) 4.33 mmol·L<sup>-1</sup> (参考值 3.6~5.67 mmol·L<sup>-1</sup>), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 1.05 mmol·L<sup>-1</sup> (参考值 0.8~1.98 mmol·L<sup>-1</sup>), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 2.52 mmol·L<sup>-1</sup> (参考值 < 3.13 mmol·L<sup>-1</sup>), 极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDL-C) 0.76 mmol·L<sup>-1</sup> (参考值 0.21~0.78 mmol·L<sup>-1</sup>), 无明显异常, 且无其他不适。5 月 6 日患者服用一个疗程洛拉替尼后再

作者简介: 李杨, 女, 主管药师, 主要从事临床用药肿瘤方向研究, email: 1055008116@qq.com \* 通信作者: 冯紫薇, 女, 主管药师, 主要从事临床用药抗感染方向研究, email: 798720791@qq.com

次入院复查, 血脂提示: TG  $5.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , TC  $11.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , HDL-C  $2.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , LDL-C  $7.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , VLDL-C  $2.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , 腹部彩超提示脂肪肝, 无特殊不适。对患者进行饮食、运动等教育, 其余无特殊处理。8月26日患者服用约两个疗程洛拉替尼后再次入院复查, 血脂检查提示 TG  $8.95 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , TC  $12.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , HDL-C  $0.86 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , LDL-C  $7.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , VLDL-C  $4.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$ , 腹部彩超提示脂肪肝。患者平素身体健康, 无高血脂病史, 结合患者疾病情况、饮食情况及用药史, 临床药师查阅文献后分析为洛拉替尼引起的血脂异常, 建议予瑞舒伐他汀钙片  $10 \text{ mg qd}$  降脂治疗, 医师采纳该意见。2022年1月患者复查血脂, 各项指标均恢复到正常范围。

## 2 治疗过程

2020年8月27日患者诊断左肺下叶腺癌(IVB期) *ALK* 基因突变型, 既往使用抗肿瘤方案: 阿帕替尼 ( $0.25 \text{ g qd po}$ ) 联合阿来替尼 ( $600 \text{ mg bid po}$ ) 治疗后疾病进展。2021年3月10日再次行活检, 根据病理基因检测结果选择敏感药物洛拉替尼 ( $100 \text{ mg qd po}$ ) 治疗。2021年5月6日入院复查血脂提示异常, 腹部彩超提示脂肪肝, 当时仅做口头宣教, 未予特殊处理; 8月26日患者再次入院复查, 血脂异常加重, 腹部彩超提示脂肪肝。入院后嘱继续洛拉替尼治疗, 予瑞舒伐他汀钙片 ( $10 \text{ mg qd po}$ ) 降脂处理, 并予瑞舒伐他汀出院带药长期服用; 2022年1月复查血脂各项均恢复到正常范围, 评估肿瘤控制尚可。

## 3 讨论

### 3.1 洛拉替尼致高脂血症的分析

患者因肺恶性肿瘤使用洛拉替尼, 既往无高血压、高血脂病史及相关家族史, 初次入院查血常规、肝肾功能、血脂等均正常, 使用洛拉替尼约1月余后出现血脂异常, 腹部B超提示脂肪肝, 予瑞舒伐他汀钙降脂处理后血脂恢复正常。排除其他疾病原因, 考虑该患者可能为药源性高脂血症。由于该患者仅长期服用洛拉替尼一种药物, 并且相关资料提示洛拉替尼可能会引起血脂异常, 因此, 将造成血脂异常的可疑药物锁定为洛拉替尼。采用Naranjo等<sup>[8]</sup>提出的药物不良反应概率量表评估疑似药物与不良反应之间的关联性。因肿瘤患者的特殊性, 对于停药试验、再激发试验或安慰剂试验的确认往往受到肿瘤进展速度及伦理学等方面的制约, 难以作出判断<sup>[9]</sup>。此外, 我院尚未开展洛拉替尼血药浓度的监测, 因

此对于此项标准评定为未知。虽然肿瘤本身因素可导致患者体内物质代谢发生明显变化, 主要改变为VLDL-C、TG升高<sup>[10]</sup>, 但该患者血脂异常的发生时间与罹患肿瘤时间无相关性, 故在“其他原因是否也可引起该不良反应”此项标准中, 仍评价为否。综上, 对该患者洛拉替尼致高脂血症因果关联性得分为6分, 评定为“很可能有关”, 见表1。洛拉替尼的使用与本例患者血脂异常之间的关联性强, 有客观证据或定量检测结果支持, 应引起临床高度重视。按照常见不良事件评价标准(CTCAE) 5.0版, 评估该患者血脂异常不良反应分级为3级<sup>[11]</sup>。

表1 洛拉替尼引起患者血脂异常的Naranjo评估结果

评价标准	是	否	未知
该不良反应之前是否有结论性报告	+1		
该不良反应是否在使用可疑药物后出现	+2		
停药或使用拮抗剂, 不良反应是否改善			0
再次用药, 不良反应是否复现			0
其他原因是否也可引起该不良反应		+2	
给予安慰剂, 不良反应是否复现			0
血药浓度是否为中毒浓度			0
不良反应轻重程度是否与剂量增减有关			0
患者之前使用该类药物或相似药物是否发生类似的不良反应			0
该不良反应是否经过客观检查证实		+1	
总分值	6		

洛拉替尼引起高脂血症的机制仍并不明确。少量的研究认为, 长期服用洛拉替尼可能导致微小病变肾病等慢性肾损伤, 从而导致肝脏合成脂蛋白增加, 周围循环中脂蛋白分解减少, 继发高脂血症<sup>[12-13]</sup>。洛拉替尼相关的高胆固醇血症和高三酰甘油血症发生中位时间均为15d, 持续时间分别为451d和427d<sup>[14]</sup>。在洛拉替尼治疗NSCLC的II期临床试验中, 高胆固醇血症的发生率为81%, 高三酰甘油血症的发生率为60%<sup>[15]</sup>。Shaw等<sup>[4]</sup>对洛拉替尼的III期临床研究中显示, 洛拉替尼引起任何级别高胆固醇血症的发生率为70%, 高三酰甘油血症的发生率为64%, 3~4级不良反应中最常见的是高三酰甘油血症和高胆固醇血症, 发生率分别为20%、17%。此外, 一项分析洛拉替尼在亚洲与非亚洲人群中疗效和安全性差异的研究显示, 亚洲和非亚洲患者中最常见的任何级别的治疗相关的不良事件为高胆固醇血症(83.3% vs 83.9%)、高三酰甘油血症(75.9% vs 57.1%)发生率相似<sup>[16]</sup>。虽然洛拉替尼引起血脂异常的发生率高, 但缺乏相关个案报道, 仅收集

到 1 例相关报道, 该病例为一名 63 岁肺腺癌女性, 接受洛拉替尼后出现明显的高脂血症, 使用阿托伐他汀钙、依折麦布治疗后血脂得到控制<sup>[12]</sup>。

### 3.2 洛拉替尼致高脂血症的管理

洛拉替尼所致的高脂血症是常见的不良反应, 大多为 1 级或 2 级, 多数是无症状的<sup>[17]</sup>。但长期的高血脂状态不仅会诱发多种心血管疾病, 还与肿瘤的发生发展、转移等密切相关<sup>[18]</sup>。异常的脂质代谢使得脂类合成增强, 为肿瘤细胞恶性增殖提供适宜的微环境。因此对洛拉替尼引起高脂血

症的管理工作十分重要。

洛拉替尼的抗肿瘤治疗与其所致的高脂血症的降脂治疗可以是并行的, 降脂治疗的目标是保障抗肿瘤治疗的有效进行。洛拉替尼相关不良反应的管理研究中指出, 应按照高脂血症发生的严重程度给予相应处理<sup>[10]</sup>, 见表 2。轻中重度高脂血症可以通过有效的血脂管理, 避免调整洛拉替尼的用量。而对于危及生命的, 建议暂停使用洛拉替尼, 直至胆固醇降至  $\leq 400 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  和 TG 降至  $\leq 500 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  ( $\leq 2$  级)。

表 2 洛拉替尼相关高脂血症的剂量调整 (按严重程度)

分级	建议
轻度: 胆固醇 $\text{ULN} \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或三酰甘油 $150 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$	开始降脂治疗或改变原降脂方案 继续洛拉替尼原剂量
中度: 胆固醇 $> 300 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或三酰甘油 $> 300 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$	同轻度
重度: 胆固醇 $> 400 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或三酰甘油 $> 500 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$	开始降脂治疗或增加降脂强度或使用不同机制的降脂治疗 继续洛拉替尼原剂量, 无需停药
危及生命: 胆固醇 $> 500 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 或三酰甘油 $> 1000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$	开始降脂治疗或增加降脂强度或使用同机制的降脂治疗 暂停洛拉替尼, 直至血脂降至中度或轻度, 然后以相同剂量重新开始洛拉替尼治疗, 同时最大化降脂治疗 最大强度降脂后无缓解的患者, 减少洛拉替尼剂量 (按 25 mg)

注: ULN 表示正常上限。

临床上供选的降脂药物包括两大类。一类以降低 TG 为主: 贝特类、烟酸、鱼油; 另一类以降低胆固醇为主: 他汀类、胆固醇吸收剂。选择他汀类药物时应重点关注药物相互作用, 洛拉替尼的口服有效性主要受到 CYP3A4 活性的显著影响<sup>[19-20]</sup>, 而他汀类药物中阿托伐他汀、辛伐他汀主要经 CYP450 酶代谢, 而普伐他汀不通过 CYP450 酶代谢, 瑞舒伐他汀有 10% 经 CYP450 代谢, 与其他药物相互作用相对少见。因此, 初始治疗应优先选择普伐他汀、瑞舒伐他汀等预估与洛拉替尼相互作用较小的药物。若单纯使用他汀类药物治疗不佳, 可在他汀类药物的基础上加用非诺贝特、依折麦布、鱼油或烟酸<sup>[21]</sup>, 其中参与非诺贝特代谢的 CYP450 酶较少, 可优先选择<sup>[22]</sup>; 其次, 除了要注意洛拉替尼和降脂药物的相互作用, 也要注意降脂药物之间的相互作用, 有研究显示吉非贝齐会增加辛伐他汀的浓度及其不良反应, 应避免联合使用<sup>[23-24]</sup>; 非诺贝特和辛伐他汀联合使用也有增加横纹肌溶解症发生风险的理论基础, 但是否能转化为临床风险仍缺乏证据<sup>[25]</sup>。在关注药物相互作用的同时也要重视患者的个体化用药, 根据肝肾功能选择药物、调整剂量。根据说明书, 对于 1 ~ 3 期慢性肾功能不全的患者,

辛伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀无需调整剂量, 对于 4 期慢性肾功能不全的患者, 阿托伐他汀无需减量, 辛伐他汀需减量且慎用, 瑞舒伐他汀禁用<sup>[26]</sup>。针对肝功能不全的患者, 应尽可能选择瑞舒伐他汀、普伐他汀等水溶性且经肝脏代谢少的降脂药物。本例患者肝肾功能无异常, 但考虑肿瘤肝内多发转移且合并脂肪肝, 为减少肝脏负担建议优先选用瑞舒伐他汀, 临床医师同意并采纳该意见, 予每日口服 10 mg 瑞舒伐他汀钙片。

除给予口服降脂药物的建议外, 临床药师还对患者进行了健康生活的教育。包括建议患者减少脂肪和胆固醇摄入, 均衡营养; 适当运动; 避免烟酒; 同时强调高脂血症可能会导致动脉粥样硬化、急性胰腺炎等危及生命疾病的风险。

### 3.3 瑞舒伐他汀钙降脂的药物监护

**3.3.1 瑞舒伐他汀给药剂量的药学监护** 该患者为年轻女性, 其肝肾功能指标基本正常。临床药师指导患者可按正常剂量服用瑞舒伐他汀钙片 (10 mg qd po) 降脂治疗, 同时教育患者瑞舒伐他汀钙可在一日中任意时间服用, 且不受食物的影响。轻中度肾功能不全患者无需调整剂量, 重度肾功能患者禁用, 活动性肝病禁用。临床药师分析病史, 患者自发病以来肝肾功能均无异



常, 因此暂时不需调整瑞舒伐他汀钙剂量, 但后续应密切监测肝肾功能以便及时调整用药。临床医师和患者接受了此建议, 患者每日定时服用瑞舒伐他汀钙片 10 mg 进行降脂治疗。

**3.3.2 瑞舒伐他汀钙不良反应的药学监护** 瑞舒伐他汀在临床应用中已充分证实其安全性, 是降脂治疗的重要药物之一。但该药所致的不良反应也不容忽视, 常见的不良反应累及肝脏系统、骨骼和肌肉系统、神经系统、内分泌系统、生殖系统等。其中肝脏系统的不良反应发生率约为 37.50%, 主要表现为肝损伤、肝毒性、梗阻性黄疸等; 骨骼肌和肌肉系统的不良反应发生率为 21.43%, 临床表现为横纹肌溶解、肌炎等<sup>[27]</sup>。因此, 临床药师建议患者服用瑞舒伐他汀钙片期间, 需要定期检测肝脏转氨酶、肌酸激酶等指标, 当指标出现异常或出现不明原因的乏力、食欲减退、肌肉酸痛、血尿等症状时应及时咨询医师或药师, 指导后续药物的治疗。值得注意的是, 该患者为育龄期女性, 在用药教育时需特别提醒瑞舒伐他汀具有一定的生殖毒性, 禁止用于孕妇及哺乳期妇女, 因此有可能怀孕的妇女应当采取适当的避孕措施。药师为该患者制订了全面的用药教育, 整个治疗过程中, 患者未出现瑞舒伐他汀相关的不良反应。

#### 4 总结

本例为 1 例 ALK 阳性的肺腺癌患者, 使用新型抗肿瘤药物洛拉替尼治疗后出现血脂异常, 临床药师通过查阅相关文献和指南, 结合患者个体情况提出继续使用洛拉替尼治疗, 加用瑞舒伐他汀钙降脂治疗的建议, 并制订了全面的瑞舒伐他汀用药教育, 临床医师及患者采纳该建议。肿瘤患者药学监护的内容通常比较繁杂, 难以抓住重点。临床药师结合肿瘤患者特征, 以肿瘤药物不良反应为切入点开展工作, 为患者提供优质的药学服务。此外, 临床药师还需利用专业的药学知识, 从药效学、药动学等方面协助医师诊治药物不良反应, 共同探讨个体化的药物选择, 综合评价治疗方案, 从而全方位提高肿瘤患者的治疗效果。

#### 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] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肺癌诊疗

规范 (2018 年版) [J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2019, 5 (3): 100-120.

[3] Xue XY, Asuquo I, Hong L, et al. Catalog of lung cancer gene mutations among Chinese patients [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1251.

[4] Shaw AT, Bauer TM, De Marinis F, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer [J]. *Engl J Med*, 2020, 383 (21): 2018-2029.

[5] Ando K, Manabe R, Kishino Y, et al. Comparative efficacy and safety of lorlatinib and alectinib for ALK-rearrangement positive advanced non-small cell lung cancer in asian and non-Asian patients: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Cancers*, 2021, 13 (15): 3704.

[6] Wu KL, Chen HL, Tsai YM, et al. First-line anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors for ALK-positive lung cancer in asian populations: systematic review and network meta-analysis [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (19): 4376.

[7] 中国抗癌协会整合肿瘤心脏病学分会专家组. 恶性肿瘤患者血脂管理中国专家共识 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2021, 43 (10): 1043-1053.

[8] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.

[9] 郑飞跃, 吴燕, 饶跃峰, 等. 诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及实例分析 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47 (8): 650-652.

[10] 中国抗癌协会整合肿瘤心脏病学分会专家组. 恶性肿瘤患者血脂管理中国专家共识 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2021, 43 (10): 1043-1053.

[11] 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*, 2021, 112 (1): 90-92.

[12] Mcgee K, Stone NJ, Wadhvani S, et al. A possible mechanism of hyperlipidemia in a patient with metastatic non-small cell lung cancer on lorlatinib therapy [J]. *JOPP*, 2021, 27 (8): 2010-2013.

[13] Verdura S, Encinar JA, Fernández-Arroyo S, et al. Silibinin suppresses the hyperlipidemic effects of the ALK-tyrosine kinase inhibitor lorlatinib in hepatic cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (17): 9986.

[14] European Medicines Agency. Lorviqua: EPAR-Product Information. (2022-04) [2022-06-26] [Z].

[15] Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19 (12): 1654-1667.

[16] Soo RA, Huat TE, Hayashi H, et al. Efficacy and safety of lorlatinib in Asian and non-Asian patients with ALK-positive advanced non-small cell lung cancer: subgroup analysis of a global phase 2 trial [J]. *Lung Cancer*, 2022, 169:

- 67-76.
- [17] Bauer TM, Felip E, Solomon BJ, et al. Clinical management of adverse events associated with lorlatinib [J]. *Oncologist*, 2019, 24 (8): 1103-1110.
- [18] Cheng CM, Geng F, Cheng X, et al. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer [J]. *Cancer Commun*, 2018, 38 (1): 27.
- [19] Li W, Sparidans RW, Wang Y, et al. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) restricts brain accumulation and cytochrome P450-3A (CYP3A) limits oral availability of the novel ALK/ROS1 inhibitor lorlatinib [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143 (8): 2029-2038.
- [20] Chen J, Xu HP, Pawlak S, et al. The effect of rifampin on the pharmacokinetics and safety of lorlatinib: results of a phase one, open-label, crossover study in healthy participants [J]. *Adv Ther*, 2020, 37 (2): 745-758.
- [21] Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32 (14): 1769-1818.
- [22] Chapman MJ. Pharmacology of fenofibrate [J]. *Am J Med*, 1987, 83 (5b): 21-25.
- [23] Nemeth A, Szakmary K, Kramer J, et al. Apolipoprotein E and complement C3 polymorphism and their role in the response to gemfibrozil and low fat low cholesterol therapy [J]. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, 33 (11): 799-804.
- [24] Noé J, Portmann R, Brun ME, et al. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35 (8): 1308-1314.
- [25] Winsemius A, Ansquer JC, Olbrich M, et al. Pharmacokinetic interaction between simvastatin and fenofibrate with staggered and simultaneous dosing: does it matter? [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54 (9): 1038-1047.
- [26] 中华医学会, 中华医学会临床药学会, 中华医学会杂志社, 等. 血脂异常基层合理用药指南 [J]. *中华全科医师杂志*, 2021, 20 (1): 29-33.
- [27] 邓震, 向云洁. 52 例瑞舒伐他汀不良反应文献分析 [J]. *医药导报*, 2018, 37 (S1): 125-127.

(收稿日期: 2023-05-06; 修回日期: 2023-07-08)

## 陕西省药物临床试验机构现状分析

张娟利<sup>1</sup>, 刘美佑<sup>1</sup>, 樊婷婷<sup>1</sup>, 张迪<sup>1</sup>, 周军红<sup>2</sup>, 王婧雯<sup>1</sup>, 文爱东<sup>1\*</sup> (1.空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; 2.陕西省药品技术审核查验中心, 西安 710065)

**摘要:** **目的** 了解备案制实施后, 陕西省内药物临床试验机构的现状。**方法** 从药物临床试验机构备案管理信息平台 and 药物临床试验登记与信息公开平台收集陕西省药物临床试验机构相关数据, 从机构发展、地域分布、备案专业、主要研究者、承接项目数量等方面进行统计分析。**结果** 备案制实施以来, 陕西省药物临床试验机构数量增至 42 家, 增幅为 110.0%, 且主要分布在西安、咸阳、汉中、宝鸡、延安、安康; 备案专业由 82 个增至 158 个, 增幅为 92.68%; 承接药物临床试验项目由 910 项增至 2173 项, 增幅为 138.79%; 各临床机构累计接受各类监督检查 66 次, 直接通过率为 60.61%。**结论** 备案制实施后, 陕西省药物临床试验机构发展形势良好, 但存在资源分配不均、研究人员能力水平参差不齐、I 期临床研究平台相对匮乏等情况, 应进一步整合临床研究资源、储备临床试验专业人才, 全面提升我省临床试验规范化水平。

**关键词:** 机构备案制; 药物临床试验机构; 现状分析

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)02-0548-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.02.044

### Current situation of drug clinical trial institutions in Shaanxi province

ZHANG Juan-li<sup>1</sup>, LIU Mei-you<sup>1</sup>, FAN Ting-ting<sup>1</sup>, ZHANG Di<sup>1</sup>, ZHOU Jun-hong<sup>2</sup>, WANG Jing-wen<sup>1</sup>, WEN Ai-dong<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032; 2. Shaanxi Drug Technology Review and Inspection Center, Xi'an 710065)

**Abstract: Objective** To understand the current situation of drug clinical trial institutions in Shaanxi province after the implementation of registration system. **Methods** Data related to drug clinical trial institutions of Shaanxi province were collected from the Drug Clinical Trial Institutions Registration System and the Drug Clinical Trial Registration and Information Disclosure Platform. We systematically analyzed the institutional development, geographical distribution, speciality for recording, principal investigators, and number and stages of drug clinical trials. **Results** After the implementation of registration system, the number of drug clinical trial institutions in Shaanxi province increased to 42, with an increase of 110.0%, and the registration institutions were mainly located in Xi'an, Xianyang, Hanzhong, Baoji, Yan'an and Ankang. The number of recorded specialties increased from 82 to 158, with an increase of 92.68%. The number of registered drug clinical trials increased from 910 to 2173, with an increase of 138.79%. Clinical trial institutions received 66 various inspections, with a first time passing rate of 60.61%. **Conclusion** After the implementation, drug clinical trial institutions develop well in Shaanxi province, but problems exist such as uneven distribution of resources and professional levels of researchers, shortage of phase I clinical research platforms, etc.. It is necessary to further integrate clinical research resources, reserve clinical trial professionals, and improve the standardization of clinical trials.

**Key words:** institution registration system; drug clinical trial institution; situation analysis

基金项目: 西京医院学科助推计划项目 (No.XJZT18D07)。

作者简介: 张娟利, 女, 主管药师, 助理研究员, 主要从事药物 I 期临床研究, email: zhangjuanli0812@163.com \* 通信作者: 文爱东, 男, 主任药师, 主要从事药物 I 期临床研究, email: 18991397171@163.com



药物临床试验作为医药产业发展的重要环节,不仅是药物上市的必经之路,更是把好药品质量安全的“第一关”<sup>[1]</sup>。为了更好地满足药物研发对药物临床试验的需求,2019 年 11 月国家卫生健康委和国家药品监督管理局(NMPA)联合发布《药物临床试验机构管理规定》,明确规定药物临床试验机构由资质认定改为备案管理,自 2019 年 12 月 1 日正式实施<sup>[2]</sup>。这并非放松了对临床试验的监管力度,而是将管理理念从以往的“严进宽出”逐渐转变为“宽进严出”模式,监管重点从事前监管转变为事中、事后监管。备案制的实施虽然极大地简化了药物临床试验审评、审批流程,缓解了以往药物临床试验机构数量严重不足的突出矛盾,但同时也带来可能影响药物临床试验质量的潜在风险<sup>[3-5]</sup>。因此,如何有效防范这些风险将成为新的议题。

陕西省作为西北地区药物临床试验资源大省,积极响应国家“备案制”号召,出台了多项鼓励政策,致力于推动我省药物临床试验的发展。本文通过查询 NMPA 网站,以及药物临床试验登记与信息公示平台,收集药物临床试验相关数据,对陕西省药物临床试验机构的发展历程、资格认定、专业认定及参与开展药物临床试验项目情况进行回顾性分析。结合最新出台的药品相关法律法规和工作实施的实际情况,本研究将对我省现阶段药物临床试验机构存在的问题及在备案制实施后将面临的问题进行思考并提出相应对策,以期推动我省药物临床试验实现更快更好的发展。

## 1 材料

国家药品监督管理局网站(<https://www.nmpa.gov.cn/>); 药物临床试验机构备案管理信息平台(<https://beian.cfdi.org.cn/CTMDS/apps/pub/drugPublic.jsp>); 药物临床试验登记与信息公示平台(<http://www.chinadrugtrials.org.cn/index.html>)。

## 2 方法

登录 NMPA 和药物临床试验机构备案管理信息平台,分别收集备案制实施前后陕西省通过药物临床试验资格认定的医疗机构信息,对陕西省药物临床试验机构的资格认定时间、地区分布情况、认定专业及主要研究者(Principal Investigator, PI)等信息进行统计;通过登录药物临床试验登记与信息公示平台收集陕西省各医疗机构药物临床试验项目注册相关信息,对项目的药物类型、试验分期及专业属性进行统计,其

中 2013 年 1 月 1 日至 2019 年 11 月 30 日为备案制实施前周期,2019 年 12 月 1 日至 2023 年 7 月 10 日为备案制实施后周期。比较陕西省在备案制实施前后机构备案和承接项目的变化,分析现阶段该省药物临床试验的改革成果及存在的问题。

## 3 结果

### 3.1 陕西省药物临床试验机构的发展

自 2004 年《药物临床试验机构资质认定办法(试行)》颁布以来,2005 年陕西省首批通过药物临床试验机构资格认定的医疗机构为空军军医大学第一附属医院、第二附属医院,2006 年以来,陕西省肿瘤医院、陕西省中医医院、西安市精神卫生中心、西安交通大学第一附属医院和第二附属医院等相继完成药物临床试验机构资格认定。由图 1 可以看出,2019 年以前,陕西省资格认定的机构数量呈稳定上升的趋势,至 2019 年底陕西省药物临床试验机构资格认定医疗机构增至 20 家。自 2019 年备案制实施以来,陕西省药物临床试验机构数量迅速上升,至 2023 年 7 月已发展到 42 家,增幅为 110.0%。

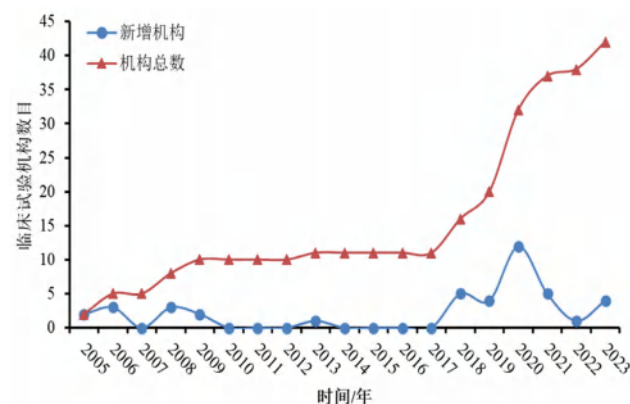


图 1 2005 年以来陕西省每年药物临床试验机构资格认定情况

Fig 1 Annual qualification of drug clinical trial institutions in Shaanxi province since 2005

### 3.2 备案制后陕西省药物临床试验机构分布情况

截至 2023 年 7 月 10 日,陕西省共备案药物临床试验机构 42 家,除备案制实施前通过资格认定的 20 家机构外,新增备案 22 家。除省疾病预防控制中心和西安宝石花长庆医院外,其余 40 家均为三级甲等医疗机构,包括三级甲等专科医院 10 家(如西北妇女儿童医院、西安市精神卫生中心、陕西省肿瘤医院、西安市胸科医院等);三级甲等综合医院 30 家,其中包括中医医院 5 家(新增 1 家)。从地域分布来看,备案机构主要集中在省会城市西安(30 家),少部分分布于教育、经济、医疗等较完善的城市如咸阳、汉中、宝鸡、延安、

安康，无机构分布的 4 个地级市分别为铜川、渭南、榆林和商洛，机构具体分布如图 2 所示。由此可见，药物临床试验的发展与经济、教育、医疗资源的分布等密切相关。

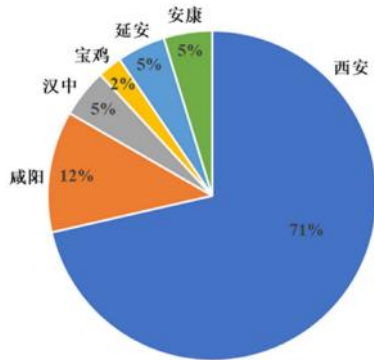


图 2 陕西省药物临床试验机构的分布  
Fig 2 Distribution of the number of registered institutions in Shaanxi province

### 3.3 陕西省药物临床试验机构备案专业情况

截至 2023 年 7 月 10 日，陕西省药物临床试验机构备案专业种类共 158 个，较备案制实施前 (82 个) 新增 76 个，增幅 92.68%。我省备案专业种类较为齐全，其中含西医专业 123 个，占全部备案的 77.85%，包括外科专业 20 个，内科专业 19 个，口腔专业 11 个，医学影像学 and 儿科专业各 10 个，疾病预防控制中心 8 个，传染科和耳

鼻咽喉科专业各 7 个，妇产科专业 5 个，皮肤科和精神科专业各 4 个、肿瘤科专业 3 个等；中医相关专业 35 个，占全部备案专业的 22.15%。备案专业种类数较多的有西安交通大学第一附属医院 (46 个)、空军军医大学第一附属医院 (38 个)、空军军医大学第二附属医院 (27 个)、西安交通大学第二附属医院 (24 个)、陕西中医药大学第二附属医院 (23 个) 等 (见图 3)。如表 1 所示，备案数量较多的专业为神经内科、内分泌科、呼吸内科、心血管内科、肿瘤科、消化内科、血液内科、妇科、肾病学和骨科等，与这些疾病发病率较高，相关药物市场需求较大有关 [6-8]。

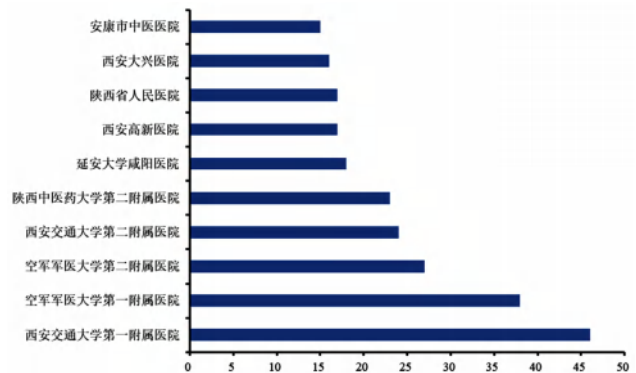


图 3 陕西省备案专业种类数量前 10 的药物临床试验机构  
Fig 3 Number of professional types of top 10 drug clinical trial institutions in Shaanxi province

表 1 陕西省药物临床试验机构备案专业 (n = 158)  
Tab 1 Record-keeping specialties of drug clinical trial institutions in Shaanxi province (n = 158)

编号	备案专业	备案机构数量 / 个
1	神经内科	23
2	内分泌科	20
3	呼吸内科、心血管内科	19
4	肿瘤科	18
5	消化内科	17
6	血液内科、妇科	13
7	肾病学、骨科	12
8	眼科、麻醉科	9
9	普通外科、泌尿外科、I 期药物临床试验	7
10	神经外科	6
11	皮肤科、老年病、免疫学、重症医学科、胸外科、I 期生物等效性试验、生殖健康与不孕症、咽喉科、耳科、鼻科	4
12	康复医学科、急诊医学科、结核病科、产科	3
13	中医科 - 骨伤科、中西医结合科、中医肿瘤科、中医肝病科、中医科 - 皮肤科、中医科 - 肛肠科、核医学、超声诊断、医疗美容科、整形外科、烧伤外科、肝胆外科、胃肠外科、皮肤、感染性疾病科、牙周病、精神病、小儿血液病、小儿神经病学、小儿内分泌	2
14	肿瘤内科、肿瘤放疗、中医科 - 眼科、中医科 - 外科、中医科 - 中医、中医科 - 心血管、中医科 - 消化、中医科 - 肾病、中医血液、中医心血管、中医心血管、中医消化、中医肾病专业、中医肾病、中医内分泌、中医脑血管、医学影像 (诊断)、超声影像、疼痛科、肿瘤内科、风湿免疫、牙体牙髓病、精神科、精神卫生、获得性免疫缺陷综合征、呼吸道传染病、病理科等	1

### 3.4 陕西省药物临床试验机构备案主要研究者情况

根据 2019 年 12 月 1 日实施的《药物临床试验机构管理规定》要求, PI 应当具有高级职称并参加过 3 个以上药物临床试验。陕西省药物临床试验机构备案的 PI 共 947 人。其中, 高级职称 597 人, 副高级职称 350 人, 分别占 PI 总人数的 63.04% 和 36.96%。陕西省药物临床试验机构备案 PI 分布严重不均, 集中分布于医疗水平较高的医院, 其中西安交通大学第一附属医院备案 PI 人数高达 132 人, 占备案 PI 总人数的 13.94%; 空军军医大学第一附属医院和第二附属医院分别备案 PI 人数为 104 人和 74 人, 分别占备案总人数的 10.98% 和 7.81%。由图 4 可知, 备案 PI 数量排名靠前的机构为资格认定的机构且大部分也是陕西省开展临床试验较早的医疗机构<sup>[9]</sup>。

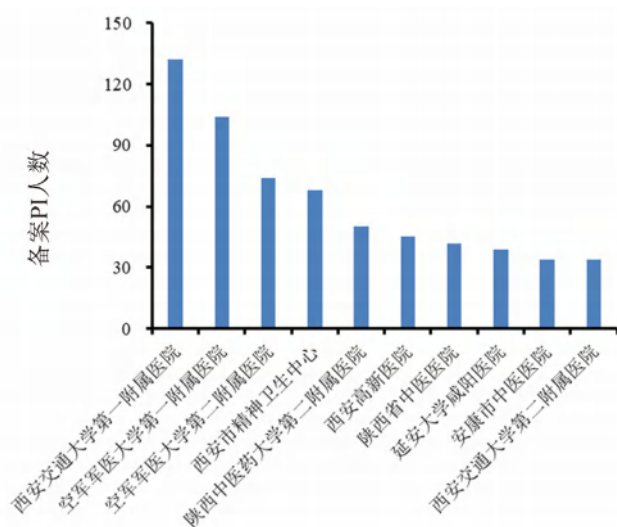


图 4 陕西省备案 PI 数量前 10 的药物临床试验机构  
Fig 4 Number of principal investigators of top 10 drug clinical trial institutions in Shaanxi province

### 3.5 承接临床试验项目情况

截至 2023 年 7 月 10 日, 陕西省临床试验机构共承接临床试验项目 2173 项, 登记日期为备案制实施后的项目为 1263 项。从试验状态来看, 已完成 641 项, 进行中 1427 项, 主动暂停或终止 105 项。从药品分类来看, 化学药物 1226 项, 中药/天然药物 130 项, 生物制品 817 项。从试验分期来看, I 期 124 项, I / II 期 81 项, II 期 541 项, II / III 期 53 项, III 期 1183 项, IV 期 113 项, 生物等效性 44 项, 其他类 34 项。其中, 承接临床试验项目较多的科室为呼吸科、血液内科、肿瘤科、消化内科、消化外科、心血管内科、神经内科、皮肤科、内分泌科等, 承接项目较多的临床试验机构为西安交通大学第一附属医院 (796

项)、空军军医大学第二附属医院 (449 项)、空军军医大学第一附属医院 (432 项)、西安交通大学第二附属医院 (212 项)、延安大学咸阳医院 (159 项)、陕西省人民医院 (142 项) 等。这与这几家药物临床试验资格认定时间较长有关, 也与我省卫生资源配置现状有关。

### 3.6 监督检查情况

根据国家药监局综合司发布的《药物临床试验机构监督检查办法(试行)(征求意见稿)》, 省级药品监督管理部门负责省内试验机构的监督检查, 包括备案后的首次监督检查、日常监督检查、有因检查, 并负责对试验机构问题的整改情况进行跟踪检查<sup>[10-11]</sup>。备案制实施至 2023 年 7 月 10 日, 陕西省 34 家药物临床试验机构累计共接收 66 次监督检查, 包括注册核查 12 次 (均未发现真实性问题)、新机构首次检查 18 次、新增专业首次检查 20 次, 日常监督检查 16 次。其中, 新机构首次检查结果为“通过”的机构数量有 1 家, 即咸阳市第一人民医院; 结果为“部分专业进行整改, 经省局现场检查合格后再承接临床试验项目”的有 2 家; 结果为“基本符合规定, 现场发现问题已提交整改报告”的机构数量有 14 家; 结果为“整改后通过”的有 1 家。新增专业首次检查结果为“基本符合备案要求, 或已提交整改报告”的机构有 16 家; 结果为“基本符合备案要求, 经省局现场检查合格后再承接临床试验项目”的有 2 家; 结果为“部分专业整改后再查”的有 2 家。日常监督检查结果为“基本符合 GCP 要求, 通过”的有 12 家, “整改后通过”的有 4 家。

## 4 讨论

备案制实施后, 陕西省积极响应政策号召, 出台了多项鼓励政策, 促使越来越多的医疗机构及研究人员加入到临床试验的队伍中来。截至 2023 年 7 月 10 日, 我省备案的药物临床试验机构数量已增至 42 家, 增幅为 110.0%; 备案专业种类 158 个, 增幅为 92.68%; 承接药物临床试验项目由 910 项增至 2173 项, 增幅为 138.79%; 累计接受各类监督检查 66 次, 直接通过率为 60.61%。总之, 备案制的实施有力推动了我省临床试验的发展, 有效缓解了我省临床试验资源紧缺的局面, 但同时也为我省临床试验监管带来了新的挑战 and 诸多风险因素。

省内药物临床试验机构地区分布不均衡: 陕西省内药物临床试验机构大都集中在经济、医疗水平较为发达的城市, 其中西安和咸阳机构数量



占比 83.0%，其他地级市多数在 1~2 家，部分地级市甚至尚无一家医疗机构具备药物临床试验资格。这种发展及分布极不均衡，在一定程度上反映了各地医疗资源优势未得到充分发挥。究其原因，与部分地级市经济不够发达、临床试验认知程度低以及政府支持力度弱有关。建议我省在资源分配的过程中给予欠发达地级市政策上的倾斜，加大对资金和技术等方面的支持，引导和帮扶具有二级甲等以上资质的机构也投入到药物临床试验机构的建设中来，使我省医疗资源配置更为合理。

临床试验研究人员能力水平参差不齐：由于我省新增备案的机构处于新生和成长阶段，大多数机构及专业组存在承接项目数量少、运行时间短等情况，随之造成研究人员经验不足、缺乏团队合作和风险把控能力等诸多问题。因此，临床试验机构及研究团队应从不同层面加大研究人员培训力度，除开展基本的 GCP 培训外，所有研究者还需定期对国家最新法律法规及相关政策等开展日常培训，让他们在质量保证、流程把控、试验条件支撑、项目设计实施和研究能力培训等方面充分发挥作用。其次，各临床试验机构应当注重人才引进，解决他们的职称、编制以及待遇问题，积极推动和落实相关激励措施，调动研究人员的工作积极性。

省内 I 期临床研究平台相对匮乏：I 期临床试验机构有别于 II、III、IV 期临床试验，需要独立的区域、设施设备、人员等，这就需要投入大量的资金、人力、物力<sup>[12]</sup>。目前，陕西省能开展 I 期药物临床试验的机构仅有 7 家，占备案总机构 16.67%。I 期药物临床平台仍然较为匮乏，提示省内丰富的优势医疗资源未得到充分利用，需要政府和医疗机构给予充足的资金支持和政策倾斜，加快省内 I 期临床试验平台的搭建。若医疗机构自筹资金建设 I 期临床试验研究室存在较大困难，也可与医药企业、合同研发服务（CRO）公司等联合投资，由机构提供平台、管理等服务，这种新形式的合作模式可集中企业、医疗机构的优势，促进 I 期临床研究平台的建设。

总之，机构备案制的实施，既为临床试验的发展带来了机遇，同时也提出了新的挑战。备案制的落地还需配套政策的保驾护航，需要来自多

方的支持和配合。包括陕西省药品监督管理局作为全省药物临床试验机构的监管部门，除了日常监督检查工作，还应充分挖掘省内临床试验资源，加强全省的新机构建设，使优质临床试验资源最大化共享。其次，还应做好临床试验产业的培育与引导工作，增强过程质控、出台针对临床试验平台和人才的鼓励措施，切实提高全省临床试验的规范化水平。

## 参考文献

- [1] 夏伟瑜, 彭华山, 章怀奋, 等. 开展药物临床试验以促进临床科研工作的发展[J]. 中南药学, 2015, 13(8): 884-885, 896.
- [2] 国家药品监督管理局, 国家卫生健康委员会. 关于发布药物临床试验机构管理规定的公告(2019年第101号)[EB/OL]. (2019-11-29) [2023-8-16]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/20191129174401214.html>.
- [3] 石真玉, 霍乐淳, 周姚, 等. 中国新备案药物临床试验机构及其临床试验开展情况分析[J]. 中国食品药品监管, 2023(3): 50-57.
- [4] 张莹莹, 李晶, 李明, 等. 机构备案制下临床试验工作开展的几点思考[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(6): 586-589.
- [5] 宁靖, 吴昊, 高荣. 药物临床试验机构备案要求及常见问题分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 3-7.
- [6] 尤玉芳, 高菲菲, 许璇, 等. 备案制后我国药物临床试验机构现状分析[J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42(3): 170-174.
- [7] 杨雅莉, 李娟. 备案制后四川省药物临床试验机构现状分析[J]. 中国药事, 2021, 35(9): 988-993.
- [8] 潘晓艳, 伦新强, 凌峰. 广西药物临床试验发展情况分析[J]. 中国药业, 2022, 31(12): 10-14.
- [9] 陕西省药品监督管理局. 陕西省药物临床试验机构资格认定公告[EB/OL]. (2017-2-16) [2023-8-16]. <https://mpa.shaanxi.gov.cn/info/1204/19616.html>.
- [10] 国家药品监督管理局. 国家药监局综合司公开征求《药物临床试验机构监督检查办法(试行)(征求意见稿)》意见[EB/OL]. (2023-6-29) [2023-8-16]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20230703165737175.html>.
- [11] 陕西省药品监督管理局. 陕西省药品监督管理局办公室关于印发《陕西省药物临床试验机构监督检查管理办法》的通知(陕药监办发[2022]19号)[EB/OL]. (2022-3-18) [2023-8-16]. <https://mpa.shaanxi.gov.cn/info/1006/43697.html>.
- [12] 广东省药学会. 广东省药学会 I 期临床试验研究室建设规范(试行版)[J]. 今日药学, 2023, 33(1): 1-5.

(收稿日期: 2023-08-16; 修回日期: 2023-09-04)