

· 药 学 基 础 ·

## 贞芪扶正颗粒 HPLC 指纹图谱与其增强免疫功能的谱效关系分析

姜文月<sup>1,2</sup>, 韩淑丽<sup>1</sup>, 唐明哲<sup>1</sup>, 赵贵芳<sup>1</sup>, 高陆<sup>2</sup>, 缪经纬<sup>1</sup>, 李鹏东<sup>1\*</sup>

(1. 广州医科大学附属第六医院, 清远市人民医院, 广东 清远 511518;

2. 吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春 130012)

**[摘要]** 目的:通过谱效相关性分析探究贞芪扶正颗粒增强免疫功能的药效物质成分,为提升其质量标准提供实验依据。方法:收集6个厂家18批贞芪扶正颗粒产品,采用高效液相色谱法(HPLC)建立其指纹图谱,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 5%A; 15~23 min, 5%~8%A; 23~30 min, 8%~11%A; 30~45 min, 11%~18%A; 45~60 min, 18%~21%A; 60~67 min, 21%~23%A; 67~90 min, 23%~37%A),检测波长220 nm,通过相似度分析及层次聚类分析评价不同厂家产品的质量差异性,采用环磷酸腺苷诱导小鼠免疫低下模型考察不同厂家产品的免疫增强药效,采用 Spearman 双变量相关性分析进行指纹图谱与免疫增强功能的谱效学研究,利用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS<sup>n</sup>)对谱效相关色谱峰进行鉴定,采用电喷雾离子源,正、负离子模式,扫描范围  $m/z$  100~1 500。结果:建立了贞芪扶正颗粒的 HPLC 指纹图谱,确定了20个共有峰。质量分析及药效考察结果显示,不同厂家产品共有峰峰面积及药效作用差异明显;谱效相关性分析结果显示,指纹图谱中的12个色谱峰与该制剂具有免疫增强功能呈明显正相关,鉴定了其中8个色谱峰,分别为2号峰(红景天苷)、5号峰(松果菊苷)、6号峰(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、7号峰(特女贞苷异构体)、9号峰(异女贞苷)、11号峰(毛蕊异黄酮)、14号峰(女贞苷 G<sub>13</sub> 或 oleonuezhenide)和18号峰(刺芒柄花素)。结论:不同厂家生产的贞芪扶正颗粒产品质量及药效存在一定差异,通过谱效相关性分析阐明了该制剂具有免疫增强功能的主要药效物质基础,可为其质量标准提升提供有益借鉴。

**[关键词]** 贞芪扶正颗粒; 免疫调节; 高效液相色谱法(HPLC); 指纹图谱; 质谱法(MS); 谱效学; 物质基础

**[中图分类号]** R22;R28;R9;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)08-0123-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211853 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210806.0959.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-08-06 11:14

### Spectrum-effect Relationship Analysis Between HPLC Fingerprint and Immunomodulatory Activity of Zhenqi Fuzheng Granules

JIANG Wen-yue<sup>1,2</sup>, HAN Shu-li<sup>1</sup>, TANG Ming-zhe<sup>1</sup>, ZHAO Gui-fang<sup>1</sup>,

GAO Lu<sup>2</sup>, MIAO Jing-wei<sup>1</sup>, LI Peng-dong<sup>1\*</sup>

(1. *The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University,*

*Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China;*

2. *Jilin Modern Chinese Medicine Engineering and Research Center Co. Ltd., Changchun 130012, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To explore the pharmacodynamic ingredients of Zhenqi Fuzheng granules (ZFG) for immunomodulatory through spectrum-effect relationship analysis, which provides experimental basis for improving the quality standard of ZFG. **Method:** Eighteen batches of ZFG from six manufacturers were collected for analysis. The fingerprints were established by high performance liquid chromatography (HPLC). Acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) were adopted as the mobile phase with gradient elution

**[收稿日期]** 2021-05-09

**[基金项目]** 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JL-26);吉林省科技发展计划项目(YYZX201503)

**[第一作者]** 姜文月,博士,高级工程师,从事中药物质基础及作用机制研究,E-mail:jiangwenyue1987@126.com

**[通信作者]** \*李鹏东,在读博士,助理研究员,从事干细胞及中药研究,E-mail:lipengdongwww@163.com

(0-15 min, 5%A; 15-23 min, 5%-8%A; 23-30 min, 8%-11%A; 30-45 min, 11%-18%A; 45-60 min, 18%-21%A; 60-67 min, 21%-23%A; 67-90 min, 23%-37%A), the detection wavelength was 220 nm. Chemometric analysis such as similarity analysis and hierarchical cluster analysis (HCA) were subsequently used to analyze the similarities and chemical differences among these samples. A cyclophosphamide-induced immunodeficiency mouse model was used to evaluate the immune-enhancing effects of the products from different manufacturers. The spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and the immunomodulatory effects was examined using Spearman bivariate correlation analysis. HPLC coupled with mass spectrometry (HPLC-MS<sup>n</sup>) was used to identify the spectrum-effect related peaks with electrospray ionization, positive and negative ion modes, and scanning range of  $m/z$  100-1 500. **Result:** The HPLC fingerprint of ZFG was established, and twenty peaks with good resolution were selected as common peaks. The results of quality analysis and pharmacodynamic test showed there were significant differences in both ingredients content and immune-enhancing effects of ZFG from different manufacturers. Through spectrum-effect relationship study, twelve peaks were screened as bioactive ingredients peaks. Thereafter, eight peaks among them were subsequently identified by HPLC-MS<sup>n</sup>. They were salidroside (peak 2), echinacoside (peak 5), calycosin-7-glucoside (peak 6), isomer of specnuezhenide (peak 7), isonuezhenide (peak 9), calycosin (peak 11), nuezhenide G<sub>13</sub> or oleonuezhenide (peak 14), and formononetin (peak 18), respectively. **Conclusion:** There are differences in quality and efficacy of ZFG produced by different manufacturers. Through spectrum-effect relationship analysis, the medicinal ingredients of ZFG for immune-enhancing effects are screened, which can provide reference for the improvement of its quality standard.

**[Keywords]** Zhenqi Fuzheng granules; immune regulation; high performance liquid chromatography (HPLC); fingerprint; mass spectrometry (MS); chromatographic pharmacodynamics; material basis

贞芪扶正颗粒是由黄芪、女贞子2味中药经提取、浓缩、干燥、加入辅料制粒等现代生产工艺制备而成的复方中药制剂,具有提高人体免疫、保护骨髓和肾上腺皮质的功能,用于各种疾病引起的虚损。近年来,较多研究报道贞芪扶正颗粒用于放疗、化疗及癌症术后患者的临床疗效显著<sup>[1-6]</sup>。目前,贞芪扶正颗粒有多家企业生产,但产品质量存在一定差异。SHI等<sup>[7]</sup>采用高效液相色谱法(HPLC)对市售贞芪扶正颗粒中腺苷、红景天苷、绿原酸、毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、黄芪甲苷6个成分进行含量测定,发现不同厂家产品间存在显著差异;任承涛等<sup>[8]</sup>利用HPLC对市售贞芪扶正颗粒中红景天苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷6个成分进行含量测定,同样发现不同厂家产品间化学成分含量的差异性。此外,康凯等<sup>[9]</sup>运用HPLC-可变波长扫描紫外检测器法(VWD)进行贞芪扶正颗粒的指纹图谱研究,标定了8个共有峰,发现7个厂家产品中有2个指纹图谱相似度差异较大。

本课题组近年一直致力于贞芪扶正颗粒质量标准提升及药效物质基础研究,前期已采用HPLC-蒸发光散射检测器法(ELSD)建立了贞芪扶正颗粒指纹图谱<sup>[10]</sup>,标定了13个共有峰,发现不同厂家产

品ELSD指纹图谱相似度存在明显差异。之后又对各厂家产品进行红景天苷、特女贞苷、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷4个成分含量测定及免疫增强药效研究,发现不同厂家产品的4个指标成分含量及药效存在显著差异<sup>[11]</sup>。

在前期研究及文献报道基础上,针对贞芪扶正颗粒产品存在普遍质量差异的现状,笔者拟采用谱效相关分析开展其药效物质基础研究,探究显著影响其产品质量及药效的主要化学成分,为贞芪扶正颗粒质量标准提升提供支持。中药谱效学是以中药指纹图谱为基础,以效应及效应体学为主要内容,应用生物信息学方法,找出中药“谱”与“效”之间科学规律,谱效相关分析可为阐明中药药效物质基础、制定中药质量评价体系、优化中药或复方的提取工艺提供科学依据<sup>[12-18]</sup>。基于此,本研究收集了市场上6家主要生产企业的贞芪扶正颗粒产品共18批,采用HPLC-紫外检测器法(UV)建立该制剂的指纹图谱,通过指纹图谱共有峰峰面积差异性分析、相似度分析及层次聚类分析(HCA)全面考察不同厂家产品的质量差异性,并开展谱效相关分析及HPLC串联质谱法(HPLC-MS<sup>n</sup>)分析,以期探究贞芪扶正颗粒具有增强免疫功能的谱效成分。

## 1 材料

UltiMate3000型高效液相色谱仪(美国戴安公司),ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪(美国沃特斯公司),LTQ XL型线性离子阱质谱仪(美国赛默飞世尔公司),ME204E型双量程电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],SpectraMax Plus 384型酶标仪(美国分子仪器公司)。

贞芪扶正颗粒产品购自各药房或网上药店,共收集6个厂家18批产品(每个厂家3批,厂家A,批号61102120、61102124、61102131;厂家B,批号K20160305、K20161220、K20161185;厂家C,批号074161007002、074160403039、036161001044;厂家D,批号20160307、20160601、20160611;厂家E,批号170305、170410、170801;厂家F,批号160507、161102、170801),分别记录为样品A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3、D1、D2、D3、E1、E2、E3、F1、F2、F3。红景天苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、刺芒柄花素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110818-201206、111920-201505、111926-201404、111703-200501,纯度分别为93.4%、97.6%、93.3%、98.8%),小鼠白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及免疫球蛋白G(IgG)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20181204、20170116、20181203),注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号16093025),氯化钠注射液(吉林康乃尔药业有限公司,体积分数0.9%,批号S17031625-1),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级ICR小鼠共96只,雌雄各半,体质量18~22 g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,合格证号SCXK(吉)2016-0003。动物饲养于放有垫料的聚碳酸酯盒中,自由饮用蒸馏水及进食标准颗粒饲料,饲养间温度20.0~26.0℃,相对湿度40.0%~70.0%,换气数 $\geq 15$ 次/h;动物照明,昼夜明暗交替时间12 h/12 h。本研究涉及的动物实验经吉林省现代中药工程研究中心有限公司动物实验伦理委员会批准,批准号B201803-01。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立与质量分析

**2.1.1 供试品溶液的制备** 取贞芪扶正颗粒粉末(过80目筛,下同)3.0 g,精密称定,加甲醇25 mL,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,定量滤纸滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至5 mL

量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,过孔径为0.22  $\mu\text{m}$ 的微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取红景天苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、刺芒柄花素对照品适量,精密称定,制成每1 mL分别含红景天苷44.5  $\mu\text{g}$ 、毛蕊异黄酮葡萄糖苷46.7  $\mu\text{g}$ 、特女贞苷53.4  $\mu\text{g}$ 、刺芒柄花素52.3  $\mu\text{g}$ 的混合对照品溶液,即得。

**2.1.3 色谱条件** 采用ACE 5 C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,5%A;15~23 min,5%~8%A;23~30 min,8%~11%A;30~45 min,11%~18%A;45~60 min,18%~21%A;60~67 min,21%~23%A;67~90 min,23%~37%A),流速1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,柱温30℃,进样量5  $\mu\text{L}$ ,检测波长220 nm。

**2.1.4 方法学考察** 取同一供试品溶液,按2.1.3项下条件连续进样6次,以峰6(选择依据为峰面积较大、保留时间适宜且有对照品作为对照的谱效相关色谱峰)为参照,计算各共有峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)0.05%~0.2%,相对峰面积的RSD 0.9%~1.9%,表明仪器精密度良好。取同一样品,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、4、8、12、16、20、24 h按2.1.3项下条件测定,以峰6的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰相对保留时间RSD 0.06%~0.8%,相对峰面积RSD 0.3%~1.9%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。取同一批号样品(样品F1),按2.1.1项下方法制备供试品溶液6份,按2.1.3项下条件测定,以峰6为参照,计算各共有峰相对保留时间RSD 0.04%~0.2%,相对峰面积RSD 1.1%~2.7%,表明该方法重复性良好。

**2.1.5 指纹图谱的建立** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对18批样品的HPLC图谱进行分析,建立对照图谱,通过与红景天苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、刺芒柄花素对照品色谱峰保留时间及紫外最大吸收波长比对,完成部分色谱峰指认,见增强出版附加材料。结果在指纹图谱中共标定了20个共有峰(18批样品共有峰面积占比均 $>95\%$ ),设定6号峰为指纹图谱参照峰。

**2.1.6 相似度分析** 计算各样品图谱与对照指纹图谱之间的相似度值,进行相似度分析,结果显示,18批样品(A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3、D1、D2、D3、E1、E2、E3、F1、F2、F3)与对照指纹图谱的相似度分别为0.857、0.903、0.931、0.986、0.811、0.949、0.884、0.852、0.977、0.933、0.937、0.925、0.983、0.985、0.977、0.983、0.987、0.989,其中有4批样品的

相似度<0.90,且以样品B2的相似度为最低。

**2.1.7 峰面积差异性分析** 通过计算指纹图谱各共有峰峰面积的RSD,进行峰面积差异性分析,见

表1。结果发现RSD处于38.10%~129.74%,表明来自6个生产厂家的贞芪扶正颗粒各色谱峰成分差异显著,尤其是3、4、5、10、11号峰,RSD均>90%。

表1 18批贞芪扶正颗粒的共有峰峰面积及其RSD

Table 1 Peak areas and relative standard deviations of common peaks from 18 batches of Zhenqi Fuzheng granules

峰号	t/min	共有峰峰面积																		RSD/%
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3	
1	10.65	6.66	13.74	1.59	10.61	16.51	10.54	44.89	31.72	36.17	2.83	7.80	4.35	7.83	6.54	12.33	14.32	6.62	5.83	89.99
2	13.93	8.26	17.79	4.06	34.03	81.29	52.05	87.81	58.52	102.54	11.98	14.57	12.91	12.34	11.87	11.56	60.61	29.84	34.26	85.47
3	15.86	10.53	9.71	3.79	7.11	7.77	6.21	36.23	40.94	41.47	1.61	2.93	2.34	10.37	10.15	10.34	14.87	6.65	7.16	100.09
4	24.75	1.33	2.20	0.04	6.92	9.61	5.05	4.38	0.72	0.80	0.63	1.43	0.24	2.60	1.60	1.79	2.29	1.51	1.68	100.46
5	29.44	4.06	13.99	2.78	34.74	98.49	54.65	7.39	10.97	20.12	2.55	5.30	3.92	5.56	4.99	4.94	26.19	16.31	17.34	129.74
6	34.17	35.67	48.61	11.80	38.28	34.37	39.95	40.74	69.95	53.23	15.33	22.29	21.68	17.38	16.96	16.18	34.26	28.16	29.15	47.92
7	37.40	1.58	2.71	0.77	7.50	4.14	4.12	8.01	8.30	11.85	3.25	11.88	5.51	4.62	3.40	4.33	14.17	3.87	3.70	65.19
8	41.11	33.46	54.13	22.18	111.49	95.65	106.03	94.62	76.35	192.74	111.48	180.15	175.14	72.89	61.99	76.73	238.11	128.54	123.56	52.83
9	46.63	4.98	13.34	1.82	22.83	49.75	31.99	14.11	7.93	20.87	5.13	9.83	7.07	4.80	4.06	4.73	24.27	12.84	13.59	86.21
10	51.93	0.85	2.42	0.51	2.02	1.99	0.98	7.92	8.38	10.86	0.91	2.46	1.59	3.84	4.01	3.72	3.11	1.08	0.98	92.15
11	53.47	0.80	2.26	1.55	3.82	5.30	11.23	3.05	12.97	17.37	2.71	2.79	4.12	1.30	1.19	1.29	5.96	4.33	4.38	94.75
12	56.76	7.92	12.00	0.13	5.65	1.98	3.90	6.26	1.01	0.89	1.38	8.28	1.94	4.11	4.02	2.90	11.09	1.80	3.58	79.93
13	60.34	4.77	4.16	0.38	16.48	4.39	11.83	20.10	11.97	6.19	4.93	7.64	6.87	4.69	4.42	7.24	8.77	6.55	1.58	67.33
14	61.71	11.19	15.20	9.49	7.73	17.45	12.23	5.30	31.80	18.37	5.45	5.57	9.30	2.59	2.43	3.60	6.95	6.15	7.29	73.01
15	64.32	11.32	11.97	5.44	26.61	7.36	20.41	12.78	6.39	29.46	49.26	68.73	76.62	15.87	11.41	19.38	40.00	19.81	16.41	83.49
16	66.94	1.59	2.79	0.31	6.96	2.30	2.85	2.52	0.44	1.01	1.34	7.30	2.01	1.48	1.09	1.95	6.10	1.35	1.22	85.45
17	67.65	1.14	0.91	1.28	2.35	4.33	5.79	1.94	1.82	5.99	6.97	8.69	11.18	3.53	2.99	4.04	6.05	5.14	4.42	63.63
18	79.83	1.12	1.00	2.22	3.33	3.82	2.84	4.25	6.69	6.05	2.29	2.60	3.40	1.15	1.10	1.53	1.70	2.35	2.39	58.77
19	81.81	1.43	0.90	1.81	3.78	2.03	2.05	3.19	3.86	3.22	2.12	2.05	3.03	1.75	1.65	2.39	1.14	1.83	1.99	38.10
20	82.94	4.80	4.11	2.64	4.24	5.27	5.50	5.90	7.83	6.53	1.64	2.54	2.14	2.36	2.23	3.04	4.79	5.60	5.57	41.57

**2.1.8 HCA** 采用SPSS 22.0对18批样品进行HCA,聚类方法为组间链接,以平方欧氏距离为测度、20个共有峰峰面积为变量,见图1。结果发现当类间距离为15时,18批样品可分成3个聚类,聚类1包含了13批样品、聚类2仅含有1批样品、聚类3包含4批样品。该结果与相似度分析结果具有一定的相关性。根据HCA结果,将从每个厂家的3批样品中选择1批开展后续的增强免疫功能药效试验,选择依据为具有厂家代表性或在指纹图谱HCA中具有代表性,共选取6批样品。A和E厂家的3批产品聚类性较好,可选其中任意1批作为代表样品,故选择A1和E1;B厂家样品中B2单独聚类,可代表差异性样品,故选择其进行谱效相关研究;C、D和F厂家的3批产品均有2批样品聚类性较好,而另外1批与其他2批归属于2个聚类簇,综合考虑到HCA的3个聚类中都有适宜数量样品参与后续药效试验,因

此选择C3、D2、F2作为C、D、F厂家样品代表。

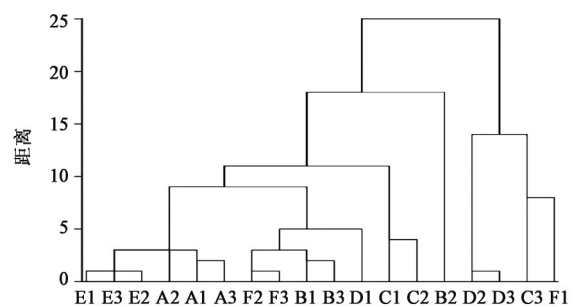


图1 18批贞芪扶正颗粒共有峰峰面积HCA

Fig. 1 HCA of peak area of common peaks from 18 batches of Zhenqi Fuzheng granules

**2.2 增强免疫功能药效试验** 小鼠适应性饲养1周后随机等分为8组(n=12,每组雌雄各半),即正常组、模型组和A~F组(样品分别为A1、B2、C3、D2、E1、F2)。A~F组小鼠每天灌胃对应贞芪扶正颗粒

溶液1次(根据人临床使用剂量折算为 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,用水配制,给药体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),正常组及模型组每天灌胃等体积水1次,持续21 d。从第17天起,除正常组外,模型组及A~F组小鼠按剂量 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射环磷酰胺(用氯化钠注射液配制,给药体积 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),连续4 d<sup>[19-22]</sup>。通过检测脾脏指数、胸腺指数及血清中IL-2、TNF- $\alpha$ 、IgG水平判断造模是否成功,这5项指标均低于正常组且差异具有统计学意义视为造模成功。第21天末次给药1 h后,称定小鼠体质量,摘除眼球取血,室温静置2 h,于转速 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(半径13 cm),收集血清,按试剂盒说明书操作测定血清IL-2、TNF- $\alpha$ 、IgG含量。取血后处死小鼠,无菌条件下分离胸腺和脾脏,称

定质量,按公式胸腺(脾脏)指数=胸腺(脾脏)质量/体质量计算相应指数,见表2。结果与正常组比较,模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数及IL-2、TNF- $\alpha$ 、IgG水平显著降低( $P<0.01$ ),表明模型复制成功。与模型组比较,B组、C组、D组、F组胸腺指数明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),B组、C组、F组脾脏指数明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),B~F组IL-2水平明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),B~D组TNF- $\alpha$ 水平明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),A~F组IgG水平显著增加( $P<0.01$ )。表明贞芪扶正颗粒具有增强免疫功能的药效作用,且6个厂家的样品在改善免疫抑制小鼠胸腺指数、脾脏指数及血清IL-2、TNF- $\alpha$ 、IgG水平上的药效作用存在一定差异性。

表2 贞芪扶正颗粒对小鼠免疫功能的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 2 Effect of Zhenqi Fuzheng granules on immune function of mice ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	胸腺指数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	脾脏指数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	IL-2/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IgG/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组	2.49±0.50	3.84±0.35	59.45±3.39	213.28±5.53	16.85±1.75
模型组	0.85±0.11 <sup>1)</sup>	2.92±0.42 <sup>1)</sup>	45.86±4.81 <sup>1)</sup>	189.49±7.36 <sup>1)</sup>	8.35±2.14 <sup>1)</sup>
A组	0.75±0.21	3.28±0.78	49.84±5.21	192.44±9.07	10.89±1.63 <sup>3)</sup>
B组	1.19±0.14 <sup>3)</sup>	3.78±1.21 <sup>2)</sup>	52.34±3.95 <sup>3)</sup>	201.95±13.88 <sup>2)</sup>	15.17±2.32 <sup>3)</sup>
C组	1.26±0.15 <sup>3)</sup>	4.12±0.66 <sup>3)</sup>	50.27±4.63 <sup>2)</sup>	228.22±9.65 <sup>3)</sup>	15.52±2.25 <sup>3)</sup>
D组	1.04±0.22 <sup>2)</sup>	3.06±0.51	50.36±4.52 <sup>2)</sup>	222.48±7.43 <sup>3)</sup>	14.46±2.51 <sup>3)</sup>
E组	0.88±0.38	2.87±0.62	50.76±3.83 <sup>2)</sup>	195.68±12.65	12.43±2.82 <sup>3)</sup>
F组	1.11±0.13 <sup>3)</sup>	3.59±0.77 <sup>2)</sup>	51.56±7.73 <sup>2)</sup>	185.70±8.85	12.28±2.27 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05, ^3)$  $P<0.01$

**2.3 谱效相关分析** 采用Spearman双变量相关分析对样品HPLC指纹图谱与其增强免疫药效的谱效相关性进行分析。将20个共有峰峰面积设置为自变量(X),胸腺指数、脾脏指数、IL-2水平、TNF- $\alpha$ 水平、IgG水平均设置为因变量(Y),计算相关系数,见表3。结果发现1号峰与血清TNF- $\alpha$ 、IgG水平呈明显正相关( $P<0.05$ ),2号峰与胸腺指数、脾脏指数及IgG水平呈明显正相关( $P<0.05, P<0.01$ ),4号峰与IL-2水平呈明显正相关( $P<0.05$ ),5号峰与胸腺指数呈明显正相关( $P<0.05$ ),6号峰与脾脏指数呈明显正相关( $P<0.05$ ),7号峰与TNF- $\alpha$ 水平呈明显正相关( $P<0.05$ ),9号峰与胸腺指数、脾脏指数呈明显正相关( $P<0.05$ ),11号峰与胸腺指数、脾脏指数、IgG水平呈明显正相关( $P<0.05, P<0.01$ ),14号峰与脾脏指数呈显著正相关( $P<0.01$ ),18号峰与胸腺指数、IgG水平呈显著正相关( $P<0.01$ ),19号峰与胸腺指数、TNF- $\alpha$ 及IgG水平呈明显正相关关系( $P<0.05$ ),20号峰与脾脏指数呈显著正相关( $P<0.01$ )。

综上所述,1、2、4~7、9、11、14、18~20号峰是贞芪扶正颗粒增强免疫功能的谱效相关色谱峰。

#### 2.4 谱效相关成分的鉴定

**2.4.1 色谱条件** 色谱条件同2.1.3项。

**2.4.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),负离子模式下喷雾电压4.5 kV,毛细管电压-35 V,透镜电压为-180 V,毛细管温度250 °C,鞘气流速50 arb,辅助气流速3 arb,扫描范围 $m/z$  100~1 500,MS<sup>n</sup>碎裂方式为碰撞诱导解离,碰撞能量20~25 eV。正离子模式下喷雾电压5 kV,毛细管电压35 V,透镜电压110 V,毛细管温度275 °C,鞘气流速50 arb,辅助气流速1 arb,扫描范围 $m/z$  100~1 500,MS<sup>n</sup>碎裂方式为碰撞诱导解离,碰撞能量20~25 eV。采用HPLC-MS<sup>n</sup>对谱效相关的12个色谱峰进行成分鉴定,推测化合物结构,并与现有文献对比<sup>[23-24]</sup>,见表4。结果确定2号峰为红景天苷、5号峰为松果菊苷、6号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、7号峰为特女贞苷异构体、9号峰为异女贞苷、11号峰为毛蕊异黄酮、14号峰为

表3 贞芪扶正颗粒共有峰峰面积与药效指标的相关系数  
Table 3 Correlation coefficients between peak area of common peaks and pharmacodynamic indexes of Zhenqi Fuzheng granules

峰号	胸腺指数	脾脏指数	IL-2	TNF- $\alpha$	IgG
1	0.600	0.429	0.029	0.829 <sup>1)</sup>	0.886 <sup>1)</sup>
2	1.000 <sup>2)</sup>	0.829 <sup>1)</sup>	0.371	0.543	0.829 <sup>1)</sup>
3	0.086	0.371	-0.543	0.200	0.143
4	-0.029	-0.257	0.886 <sup>1)</sup>	-0.314	-0.029
5	0.886 <sup>1)</sup>	0.714	0.657	0.314	0.714
6	0.429	0.829 <sup>1)</sup>	-0.429	0.257	0.257
7	0.371	-0.086	-0.029	0.829 <sup>1)</sup>	0.714
8	0.771	0.486	0.029	0.657	0.714
9	0.886 <sup>1)</sup>	0.886 <sup>1)</sup>	0.429	0.371	0.657
10	0.486	0.086	-0.029	0.771	0.771
11	1.000 <sup>2)</sup>	0.829 <sup>1)</sup>	0.371	0.543	0.829 <sup>1)</sup>
12	-0.771	-0.771	-0.257	-0.086	-0.429
13	0.029	-0.086	-0.314	0.086	-0.086
14	0.657	0.943 <sup>2)</sup>	-0.143	0.371	0.486
15	0.200	-0.086	-0.314	0.429	0.257
16	-0.371	-0.429	0.143	0.086	-0.086
17	0.600	0.257	0.086	0.600	0.600
18	0.943 <sup>2)</sup>	0.714	0.257	0.771	0.943 <sup>2)</sup>
19	0.829 <sup>1)</sup>	0.543	0.086	0.829 <sup>1)</sup>	0.886 <sup>1)</sup>
20	0.771	0.943 <sup>2)</sup>	0.029	0.143	0.371

注: <sup>1)</sup>P<0.05, <sup>2)</sup>P<0.01

女贞苷 G<sub>13</sub> 或 oleonuezhenide、18号峰为刺芒柄花素,其中2、6、18号峰通过与对照品比对后确认。

### 3 讨论

在建立贞芪扶正颗粒 HPLC 指纹图谱的过程中,对色谱条件进行了系统优化,包括流动相体系(乙腈-0.1%甲酸和甲醇-0.1%甲酸)、洗脱梯度、色谱柱(Ultimate XB-C<sub>18</sub>色谱柱和 ACE 5 C<sub>18</sub>色谱柱)、柱温(25、30、35 °C)、流速(0.8、1.0、1.2 mL·min<sup>-1</sup>)、检测波长(200~400 nm)和进样量(5、10、20  $\mu$ L)。根据谱峰数量、分离度及峰面积,最终选择了 2.1.3 项下条件。在选择参照峰时,峰6(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)和峰8(特女贞苷)均较为适合,两者分别来自黄芪和女贞子,考虑到贞芪扶正颗粒目前执行的质量标准设定了黄芪甲苷为含量测定项;此外,谱效相关性研究显示,峰6为谱效正相关色谱峰,而峰8不是,故选择峰6作为参照峰。本文在贞芪扶正颗粒 HPLC 指纹图谱中标定了20个共有峰,采用该图谱进行质量评价,较前期研究<sup>[7-10]</sup>更为全面。

HCA 结果显示,类间距离为15时,6个厂家的

18批贞芪扶正颗粒被分为3个聚类,且各厂家产品中A和E厂家聚类性较好,表明批间稳定性较好,其余4个厂家的3批产品均存在1批与另外2批聚类性较差。原因可能有两方面:①现行产品质量标准未涵盖女贞子药材的定量检测项,各厂家女贞子投料质量层次不齐,从而造成厂家间甚至同一厂家产品批间差异性明显;②产品生产工艺为热水回流提取3次,每次1~3 h,各厂家提取时间及提取过程控制存在差异,使得黄芪、女贞子中成分提取率及受热转化不一致,从而导致产品质量的差异性。根据 HCA 结果,本文选择 A1、B2、C3、D2、E1、F2 共6批样品开展药效试验,其中样品 A1、D2、E1、F2 具有厂家代表性;而样品 B2、C3 不具有厂家代表性,是根据 HCA 结果选择的具有质量差异性的样品。

采用腹腔注射环磷酰胺诱导建立小鼠免疫抑制模型,该模型是研究药物免疫增强功能的经典动物模型<sup>[25-28]</sup>,胸腺指数、脾脏指数、IL-2、TNF- $\alpha$  和 IgG 是考察免疫调节功能的常用检测指标。胸腺是机体的中枢免疫器官,是T细胞分化成熟的场所;脾脏是最大的外周免疫器官,是参与机体细胞免疫和体液免疫的T细胞、B细胞和巨噬细胞大量增生场所,免疫器官指数增加是由于器官自身细胞的生长发育和分裂增殖所致,代表机体免疫增强,反之则为机体免疫器官受到损伤,免疫能力降低<sup>[29]</sup>。IL-2 和 TNF- $\alpha$  作为常见的具有免疫调节作用的细胞因子,参与机体的细胞免疫<sup>[30]</sup>。IgG 在免疫应答中激活补体,在中和病毒、抗细菌方面起着重要作用,具有重要的免疫效应<sup>[31]</sup>。

本研究采用多个厂家生产的贞芪扶正颗粒作为研究样品开展谱效相关分析,同时本课题组还采用了不同比例的黄芪-女贞子药对提取物作为样品进行谱效相关研究。黄芪-女贞子药对比例设置为 0.5:0.5、0.5:1、0.5:1.5、1:0.5、1:1、1:1.5、1.5:0.5、1.5:1、1.5:1.5、1:0 和 0:1,经过 HPLC 指纹图谱分析确定了13个共有峰(色谱条件与本研究存在差异),而后进行免疫增强药效试验及谱效相关性分析,结果发现所有色谱峰均被确定为谱效相关色谱峰。笔者认为这可能是由于采用不同比例黄芪-女贞子药对作为研究样品,在投料药材质量和制备工艺一致的前提下,即便提取过程中因投料比例导致共有峰成分溶出存在差异,但共有峰峰面积存在关联,从而导致部分色谱峰筛选结果假阳性。故本研究选择市售贞芪扶正颗粒产品为研究样品,不同厂家产品存在原料质量差异,生产工艺也可能存在一些

表4 贞芪扶正颗粒中谱效相关成分的HPLC-MS<sup>n</sup>鉴定

Table 4 Identification of spectrum-effect related ingredients in Zhenqi Fuzheng granules by HPLC-MS<sup>n</sup>

峰号	t/min	相对分子质量	正离子模式 m/z		负离子模式 m/z		化合物
			MS	MS <sup>n</sup>	MS	MS <sup>n</sup>	
1	10.77	-	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	389	MS <sup>2</sup> [389]: 345, MS <sup>3</sup> [389~345]: 225, 183, 165, 119, 113	未知
2	13.29	300	301	- <sup>1)</sup>	345	MS <sup>2</sup> [345]: 299, MS <sup>3</sup> [345~299]: 281, 270, 254, 239	红景天苷
4	25.07	-	360, 343	MS <sup>2</sup> [360]: 343, 325, 307, 289, 247, 205, MS <sup>3</sup> [360~325]: 307, 247, 229, 187	387	MS <sup>2</sup> [387]: 341, MS <sup>3</sup> [387~341]: 299, 281	未知
5	30.15	786	787	- <sup>1)</sup>	785	MS <sup>2</sup> [785]: 623, MS <sup>3</sup> [785~623]: 477, 461, 315	松果菊苷
6	33.58	446	447	MS <sup>2</sup> [447]: 285, MS <sup>3</sup> [447~285]: 270, 253, 229, 225	491	MS <sup>2</sup> [491]: 445, 283, MS <sup>3</sup> [491~283]: 268	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
7	38.65	686	704, 687	MS <sup>2</sup> [704]: 687, 525, 507, 489, 369, MS <sup>3</sup> [704~507]: 489, 475, 457, 369, 351, 345, 337, 303, 225	731, 685	MS <sup>2</sup> [731]: 713, 685, 569	特女贞苷异构体
9	46.30	686	704, 687	MS <sup>2</sup> [704]: 525, 507, 489, 387, 225	731, 685	MS <sup>2</sup> [731]: 685	异女贞苷
11	53.87	284	285	MS <sup>2</sup> [285]: 270, 253, 229, 225	328, 283	MS <sup>2</sup> [328]: 283, MS <sup>2</sup> [283]: 268, MS <sup>3</sup> [283~268]: 240, 224, 211	毛蕊异黄酮
14	60.21	1 072	1 090, 1 073	MS <sup>2</sup> [1 090]: 875, 755, 713, 695, 693, 575	1 117, 1 071	MS <sup>2</sup> [1117]: 1085, 730	oleonuezhenide 或女贞苷 G <sub>13</sub>
18	78.85	268	269	- <sup>1)</sup>	313, 267	MS <sup>2</sup> [313]: 267, MS <sup>2</sup> [267]: 252, MS <sup>3</sup> [267~252]: 223, 208, 132	刺芒柄花素
19	82.12	-	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	未知
20	83.08	-	301	- <sup>1)</sup>	345	MS <sup>2</sup> [345]: 299, MS <sup>3</sup> [345~299]: 179, 161, 143, 119	未知

注:<sup>1)</sup>信号弱;中括号内为进行碎裂的母离子 m/z

区别<sup>[32]</sup>,更适合进行谱效学研究。通过谱效相关性分析筛选出贞芪扶正颗粒的12个药效物质成分,其中红景天苷、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、刺芒柄花素5个成分有免疫增强功能的研究报道<sup>[33-37]</sup>,这在一定程度上佐证了本文研究结果。

综上所述,本研究初步阐明了贞芪扶正颗粒具有免疫增强功能的药效物质成分,并发现市场上其产品质量及药效存在明显差异,建议该制剂应建立针对药效物质成分的多指标控制的质量标准体系,以改善产品质量稳定性和药效一致性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 周熙祥,伍志伟,张录梅,等. 贞芪扶正颗粒联合奥沙利铂对H22荷瘤小鼠的抑制效果及对MyD88、NF-κB p65的影响[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 166-170.

[2] 初秋博. 基于免疫调控的贞芪扶正颗粒促进造血及抗结直肠癌活性的研究[D]. 长春:吉林大学, 2020.

[3] 王楠,尹立杰,丁田贵. 乳腺癌保乳术后调强放疗联

合贞芪扶正颗粒治疗的临床分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(6): 113-115.

[4] 杨蕴,邓建华. 贞芪扶正颗粒联合GP化疗方案对晚期非小细胞肺癌患者免疫功能的影响[J]. 世界复合医学, 2019, 5(10): 99-102.

[5] 李萌,尚进,杨波,等. 贞芪扶正颗粒对乳腺癌术后化疗患者疗效及T淋巴细胞亚群的影响[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(9): 12-15.

[6] 郭金仓. 贞芪扶正颗粒联合化疗治疗肺结核合并肺癌患者疗效及对免疫功能、生活质量的影响研究[J]. 四川解剖学杂志, 2018, 26(4): 159-161.

[7] SHI Y K, CUI F, HU F D, et al. Quantification of six bioactive compounds in Zhenqi Fuzheng preparation by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and evaporative light scattering detector [J]. J Pharm Anal, 2011, 1(1): 20-25.

[8] 任承涛,田莲超,李云,等. 基于多成分测定的贞芪扶正颗粒质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 150-158.

[9] 康凯,张静娇,赵月然,等. 贞芪扶正颗粒(无糖型)

- HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药物评价, 2017, 34(1):25-29, 35.
- [10] 魏晓雨, 姜国栋, 陈泓, 等. 贞芪扶正颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2017, 28(33):4691-4694.
- [11] 王美慧, 姜文月, 高陆, 等. 不同厂家贞芪扶正颗粒质量评价与药效研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2):330-333.
- [12] 周昱杉, 梁洁, 黄光强, 等. 基于化学模式识别方法分析止咳颗粒的抗炎谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22):156-163.
- [13] WANG Y L, ZHANG Q, YIN S J, et al. Screening of blood-activating active ingredients from Danshen-Honghua herbal pair by spectrum-effect relationship analysis[J]. *Phytomedicine*, 2019, 54:149-158.
- [14] CHENG J, HE S, WAN Q, et al. Multiple fingerprinting analyses in quality control of Cassiae Semen polysaccharides [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1077:22-27.
- [15] WANG L J, JIANG Z M, XIAO P T, et al. Identification of anti-inflammatory ingredients in *Sinomenii Caulis* based on spectrum-effect relationship and chemometric methods[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 167:38-48.
- [16] CHEN Y R, PAN G J, XU W F, et al. Spectrum-effect relationship study between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Sabia parviflora* [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1140:121970.
- [17] 王莹, 吴红杰, 管庆霞, 等. 基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠脑保护作用的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16):56-62.
- [18] 张小艺, 刘久石, 高石曼, 等. 中药谱效关系的研究方法及应用进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20):4405-4411.
- [19] CHEN Z B, LIU J J, KONG X, et al. Characterization and immunological activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(6):959-967.
- [20] 刘喜雨, 曹荣昌, 陈富珍, 等. 紫锥菊与黄芪多糖对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠的影响[J]. 中国畜禽种业, 2020, 16(4):37-40.
- [21] 董升, 梁哈业, 王禹捷, 等. 车前草粗多糖对环磷酰胺所致免疫低下小鼠的免疫增强作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18):289-293.
- [22] 刘长江, 叶亚龙, 孙凤祥, 等. 环磷酰胺诱导小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J]. 潍坊医学院学报, 2015, 37(1):4-6.
- [23] 占方玲, 张学兰, 蒋海强, 等. 女贞子生制品化学成分
- 的 HPLC-ESI/MS 分析[J]. 中成药, 2013, 35(12):2707-2710.
- [24] JIANG W Y, KAN H, LI P D, et al. Screening and structural characterization of potential  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from radix astragali flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup> [J]. *Anal Methods*, 2015, 7:123-128.
- [25] 王兰芳, 吴晶, 刘鸿雁, 等. 芝芪康艾颗粒对免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(12):1129-1136.
- [26] ZHOU Y, CHEN X, YI R, et al. Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(2):239-244.
- [27] 伍维高, 钟金凤. 环磷酰胺构建动物免疫抑制模型的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(2):87-89.
- [28] 李燕华, 梁月琴, 夏洪颖, 等. 单次大剂量、多次小剂量环磷酰胺腹腔注射构建小鼠免疫抑制模型对比观察[J]. 山东医药, 2020, 60(3):42-46.
- [29] 阳帆, 康丹菊, 陈志宝, 等. 飞机草总黄酮对小鼠免疫调节功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5):56-60.
- [30] 王金梅, 高慧倩, 王慧. 蟹味菇多糖的提取及对小鼠免疫增强作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(2):61-64.
- [31] 张海全, 黄勤英, 郑广进, 等. 罗汉果多糖对环磷酰胺所致的免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 广西植物, 2019, 39(11):1573-1582.
- [32] 刘俊有, 胡景莲, 英锡相. 特女贞苷含量对贞芪扶正颗粒质量评价的意义[J]. 中国药品标准, 2015, 16(5):350-352.
- [33] 王娜, 谢磊. 红景天苷调节免疫及抑制宫颈癌 U14 荷瘤小鼠肿瘤生长作用的研究[J]. 中药材, 2020, 43(7):1736-1740.
- [34] 霍艳萍, 焦安德, 刘玉梅, 等. 松果菊苷通过调控 JAK1/STAT3 信号通路改善老年心肌梗死大鼠的免疫功能[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(8):676-682.
- [35] 李亮亮, 黄金智. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷药理作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(2):156-160.
- [36] 张彦平, 邓康, 贾宁, 等. 芒柄花素对免疫抑制小鼠免疫功能影响的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(3):922-930.
- [37] GONG G W, ZHENG Y Z, YANG Y, et al. Pharmaceutical values of calycosin: One type of flavonoid isolated from *Astragalus* [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2021, 2021:9952578.

[责任编辑 刘德文]