

· 药物代谢 ·

## 基于药物动力学和多元统计方法解析瓜蒌祛痰止咳 相关质量标志物

马建超, 郭庆梅\*

(山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** 目的:基于药物动力学对香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸和肉桂酸进行瓜蒌祛痰止咳相关质量标志物(Q-marker)的筛选,并利用多元统计方法对筛选出的候选Q-marker进行评价。**方法:**随机选取6只健康大鼠,灌胃给予瓜蒌70%乙醇提取物(剂量 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )后,于不同时间点从眼眶静脉采血,采用高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(HPLC-QqQ-MS/MS)同时检测血浆中5个瓜蒌活性成分(香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸、肉桂酸)的血药浓度,主要检测条件为流动相0.2%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 6%~23%B; 4~5 min, 23%~59.5%B; 5~10 min, 59.5%~60%B),流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长254 nm,电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,多反应监测(MRM)模式扫描,扫描范围 $m/z$  50~1 500;选择药物动力学规律较为明确的成分为瓜蒌祛痰止咳相关候选Q-marker,测定这些成分在9批药材中的含量,主要检测条件与药物动力学研究相同,以含量测定的结果为基础,使用SPSS 21.0进行系统聚类分析和主成分分析(PCA)。**结果:**药物动力学结果显示,香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸4个成分的药-时曲线下面积( $\text{AUC}_{0-t}$ )分别为 $(111.28\pm 9.94)$ ,  $(27.08\pm 2.76)$ ,  $(1\ 376.12\pm 101.86)$ ,  $(631.32\pm 64.72)\ \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ ;系统聚类分析将9批瓜蒌聚为3类,聚类结果与瓜蒌的品种相关,但也受产地的影响;PCA结果显示,高唐瓜蒌、山西瓜蒌和河北笨瓜蒌的综合评分分别为1.919, 1.356, 0.299,在所有瓜蒌样品中位于前3位,农科院1号、河北瓜蒌和农科院2号的综合评分分别为-0.804, -1.085, -1.120,在所有瓜蒌样品中位于后3位。**结论:**香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸4个成分在药物动力学特征和质量评价等方面符合瓜蒌祛痰止咳相关Q-marker的要求。

**[关键词]** 瓜蒌; 药物动力学; 高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(HPLC-QqQ-MS/MS); 系统聚类分析; 主成分分析(PCA); 质量标志物(Q-marker); 指标成分

[中图分类号] R22;R94;R28;O657.7 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)19-0132-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211247

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210324.1740.005.html>

[网络出版日期] 2021-03-26 9:30

### Analysis of Quality Markers Related to Expelling Phlegm and Arresting Coughing of Trichosanthis Fructus Based Pharmacokinetics and Multivariate Statistical Methods

MA Jian-chao, GUO Qing-mei\*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** Based on pharmacokinetics, the antitussive and expectorant related quality markers (Q-marker) of Trichosanthis Fructus were screened from diosmetin-7-*O*-glucopyranoside, diosmetin, apigenin, vanillic acid and cinnamic acid, and the candidate Q-marker was evaluated by multivariate statistical method. **Method:** Six healthy rats were randomly selected and the 70% ethanol extract of Trichosanthis Fructus (dose of  $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was given by intragastric administration. Blood was collected from the orbital vein at

[收稿日期] 20210116(006)

[基金项目] 山东省重点研发计划项目(2018GSF119004);全国中药资源普查项目(财社[2019]39号)

[第一作者] 马建超,在读硕士,从事中药活性物质与资源开发研究, Tel:0531-89628081, E-mail: jianchaom@sina.com

[通信作者] \*郭庆梅,博士,教授,从事中药活性物质与资源开发研究, Tel:0531-89628081, E-mail: qmguo@sina.com

different time points, and the plasma concentrations of 5 components (diosmetin-7-*O*-glucopyranoside, diosmetin, apigenin, vanillic acid and cinnamic acid) from *Trichosanthis Fructus* were detected simultaneously by high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS/MS). The main detection conditions were as following: mobile phase of 0.2% formic acid aqueous solution (A) - acetonitrile (B) for gradient elution (0-4 min, 6%-23%B; 4-5 min, 23%-59.5%B; 5-10 min, 59.5%-60%B), flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength at 254 nm, electrospray ionization (ESI), positive ion mode detection, multiple reaction monitoring (MRM) mode scanning, scanning range of *m/z* 50-1 500. Diosmetin-7-*O*-glucopyranoside, diosmetin, apigenin and vanillic acid with clear pharmacokinetic behaviors were selected as candidate Q-marker about antitussive and expectorant of *Trichosanthis Fructus*. The contents of these components in 9 batches of medicinal materials were determined and the main detection conditions were the same as the pharmacokinetic study. SPSS 21.0 was used for cluster analysis and principal component analysis (PAC) based on the results of determination. **Result:** The pharmacokinetic results showed that the area under concentration-time curve (AUC<sub>0-t</sub>) of 4 components (diosmetin-7-*O*-glucopyranoside, diosmetin, apigenin and vanillic acid) were (111.28±9.94), (27.08±2.76), (1 376.12±101.86), (631.32±64.72) μg·h·L<sup>-1</sup>, respectively. The 9 batches of *Trichosanthis Fructus* samples were clustered into 3 groups by systematic cluster analysis. The clustering results were related to the variety of *Trichosanthis Fructus* and also affected by the origin. The PCA results showed that the comprehensive scores of Gaotang *Trichosanthis Fructus*, Shanxi *Trichosanthis Fructus*, Hebei Ben *Trichosanthis Fructus* were 1.919, 1.356 and 0.299, respectively, ranking in the top 3 among all samples. The comprehensive scores of Nongkeyuan No. 1, Hebei *Trichosanthis Fructus* and Nongkeyuan No. 2 were -0.804, -1.085, -1.120, respectively, which were in the last 3 positions among all samples. **Conclusion:** The pharmacokinetic characteristics and quality evaluation of diosmetin-7-*O*-glucopyranoside, diosmetin, apigenin and vanillic acid meet the requirements about antitussive and expectorant related Q-marker of *Trichosanthis Fructus*.

**[Key words]** *Trichosanthis Fructus*; pharmacokinetics; High performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS/MS); systematic cluster analysis; principal component analysis (PCA); quality markers (Q-marker); index ingredients

瓜蒌为葫芦科植物栝楼或双边栝楼的干燥成熟果实,具有清热涤痰、宽胸散结、润燥滑肠的功效。临床上常将瓜蒌与其他中药配伍<sup>[1]</sup>用于治疗肺癌胸腔积液<sup>[2]</sup>、小儿慢性支气管炎<sup>[3]</sup>、慢性阻塞性肺病<sup>[4]</sup>等呼吸系统疾病,具有重要的药用价值。2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)收录瓜蒌的质量标准仍然以水分、总灰分和水溶性浸出物的检查为主,没有具体的含量测定指标,缺乏切实可行的质量控制方法。众多学者对瓜蒌的质量控制进行了大量的研究,一些以5-羟基糠醛<sup>[5]</sup>、总糖和总还原糖<sup>[6]</sup>、氨基酸类成分<sup>[7]</sup>、生物碱类成分<sup>[8]</sup>为指标的质量控制方法陆续被报道,分别从炮制、传统经验、药理活性和指纹图谱等方面对瓜蒌的质量控制进行了研究,还有部分学者提出了将瓜蒌功能主治和物质基础相结合的质量控制思路<sup>[9]</sup>,为瓜蒌质量控制方法的研究提供了数据支持和思路引导。

刘昌孝院士在中医药理论的基础上,根据中药的特点,提出以“性-效-物”关联为基础的中药质量控制概念——中药质量标志物(Q-marker)<sup>[10]</sup>。“性-效-物”指的分别是“药性”“药效”和“物质基础”,“药性”和“药效”通过“物质基础”即有效成分相关联<sup>[11]</sup>。一般认为,有效成分入血后的原型成分及其代谢产物才是具有疗效的“效应成分”,而效应成分的药物动力学规律不仅对其药效学研究有重要意义,也是将“药性”和“药效”连接起来的关键纽带,因此,药物动力学的研究是中药Q-marker寻找和确定过程中不可缺少的一环。HE等<sup>[12]</sup>提出,可以通过药物动力学研究对中药的Q-marker进行反向追踪,并利用现代分析技术和方法对中药进行综合质量控制,但碍于中药成分的复杂性,常常需要对多个变量进行研究。多元统计方法能够提取多种变量的有效信息,适用于多成分对药材质量的评价,目前系统聚类分析、主成分分析(PCA)等多元统

计方法已被应用于桑叶<sup>[13]</sup>、人参<sup>[14]</sup>等药材 Q-marker 的研究。

本课题组在前期瓜蒌研究中,得到15个原型入血的祛痰止咳成分<sup>[15]</sup>;预试验发现瓜蒌中的香叶木素和芹菜素也可以原型入血,且有文献报道二者具有祛痰止咳的功效<sup>[16-18]</sup>。本研究拟从中筛选易得到的单体成分,利用药物动力学对瓜蒌中祛痰止咳相关的 Q-marker 做进一步筛选,筛选出的成分作为瓜蒌祛痰止咳相关候选 Q-marker,建立高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(HPLC-QqQ-MS/MS)的定量分析方法,测定9批瓜蒌样品中 Q-marker 的含量,并应用系统聚类分析和 PCA 对候选 Q-marker 与瓜蒌质量的相关性进行考察,以期为瓜蒌祛痰止咳相关 Q-marker 的研究提供参考。

## 1 材料

1260型高效液相色谱仪[配二极管阵列检测器(DAD)]和6470型三重四极杆质谱仪[配电喷雾离

子源(ESI),Agilent MassHunter Qualitative Analysis 色谱工作站]均购自美国 Agilent 公司,TGL-16 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),TDZ5-WS 型台式低速离心机(湖南平凡科技有限公司),DC150-2 型氮吹仪和 Mix-S 型迷你涡旋仪(杭州佑宁仪器有限公司),SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

瓜蒌药材购自山东、山西和河北,经山东中医药大学药学院郭庆梅教授鉴定为栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 的干燥成熟果实,样品信息见表1;肉桂酸、香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、甘草素、香草酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 AA0806LB14, Y25D6H8203, T22F7X9844, T04S8F43072, C26A10Q87040, H11J9Z65318, 纯度分别为 96%, 98%, 98%, 98%, 98%, 97%),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

表1 瓜蒌药材的样品信息

Table 1 Sample information of *Trichosanthis Fructus*

编号	品种	产地	采集时间	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$			
				香叶木素-7-O-葡萄糖苷	香叶木素	芹菜素	香草酸
S1	山西瓜蒌	山西新绛	2020-12	30.63	16.94	0.13	75.90
S2	高唐瓜蒌	山东聊城	2020-10	18.85	16.45	0.33	158.45
S3	地跑9号	山东聊城	2020-10	2.25	4.10	0.28	95.26
S4	江苏9号	山东聊城	2020-10	-	2.23	-	182.77
S5	安徽9号	山东济南	2020-11	23.84	5.32	-	11.89
S6	农科院1号	山东济南	2020-10	23.06	-	-	4.22
S7	农科院2号	山东济南	2020-10	2.17	-	-	44.95
S8	河北笨瓜蒌	河北安国	2020-12	9.77	3.69	0.34	63.54
S9	河北瓜蒌	河北安国	2020-12	5.76	0.81	-	19.70

注:“-”表示成分在该样品中的含量低于最低定量限。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 220~230 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号 SCXK(鲁)2019-0003。本文涉及的动物实验经山东中医药大学动物伦理委员会批准,批准号 SDUTCM20200713002。大鼠饲养 7 d 后,随机选取 6 只健康大鼠为健康组进行实验,给药前禁食 12 h,自由饮水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 灌胃用药 取样品 S2 粉末(过五号筛,下同) 300.06 g,精密称定,加 70% 乙醇 3 L,浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h,趁热抽滤;合并滤液,于温

度 60 °C 减压浓缩至无醇味,冷冻干燥得瓜蒌冻干粉 112.34 g。取瓜蒌冻干粉 100.03 g,加适量水,38 °C 加热使溶解,得 2.67 g·mL<sup>-1</sup> 灌胃用药(AET)。

2.1.2 定量用药 取瓜蒌样品粉末 10.01 g,精密称定,加入 70% 乙醇 100 mL,浸泡 30 min,共回流提取 2 次,每次 1 h,趁热抽滤;合并滤液,60 °C 减压浓缩至 50 mL 左右,于水浴锅 60 °C 蒸干,将所得浸膏转移至 25 mL 量瓶中,用 70% 乙醇定容,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,得定量用药。

### 2.2 对照品溶液的配制

2.2.1 系列标准血浆的配制 分别精密称取香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸对

照品 1.040, 1.005, 1.040, 1.080 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得各对照品的储备液, 于 4 °C 冰箱保存; 分别精密吸取香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸对照品储备液 0.1, 0.1, 1, 2.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得混合对照品溶液。取混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 得到系列混合对照品溶液(香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷质量浓度 1.63, 3.25, 6.50, 26.00, 52.00, 104.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香叶木素质量浓度 1.52, 3.14, 6.28, 25.12, 50.25, 100.50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 芹菜素质量浓度 16.30, 32.50, 65.00, 260.00, 520.00, 1 040.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香草酸质量浓度 42.18, 84.37, 168.75, 675.00, 1 350.00, 2 700.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。吸取上述溶液 100  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 37 °C 氮气吹干, 加入空白血浆 100  $\mu\text{L}$ , 涡旋 1 min 后, 得系列标准血浆。

**2.2.2 药物动力学质控(QC)样品和内标(IS)溶液的配制** 分别吸取香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸对照品储备液适量, 用甲醇稀释为低、中、高 3 个质量浓度(香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷质量浓度 3.46, 10.40, 104.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香叶木素质量浓度 2.51, 10.05, 40.20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 芹菜素质量浓度 30.40, 304.00, 1 216.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香草酸质量浓度 216.00, 432.00, 1 728.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。分别吸取上述不同质量浓度对照品溶液 100  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 37 °C 氮气吹干, 加入空白血浆 100  $\mu\text{L}$ , 涡旋 1 min, 即得 QC 样品。精密称取甘草素对照品 1.075 mg, 加甲醇稀释并定容, 制成质量浓度为 40.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IS 储备液, 于 4 °C 冰箱保存; 取 IS 储备液适量, 加甲醇稀释为 403.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IS 溶液。

**2.2.3 定量分析系列对照品溶液的配制** 分别精密称取香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸对照品 0.98, 1.01, 0.98, 1.02 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得各对照品的储备液, 于 4 °C 冰箱保存; 分别精密吸取各对照品储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得混合对照品储备溶液。取混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 得系列混合对照品溶液(香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷质量浓度 122.5, 245, 490, 980, 1 960.00, 3 920.00  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香叶木素质量浓度 126.25, 252.50, 505, 1 010, 2 020, 4 040  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 芹菜素质量浓度 122.5, 245, 490, 980, 1 960, 3 920  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 香草酸质量浓度 127.5, 255, 510, 1 020, 2 040, 4 080  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

**2.3 检测条件** 药物动力学分析条件为 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ),

流动相 0.2% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~4 min, 6%~23%B; 4~5 min, 23%~59.5%B; 5~10 min, 59.5%~60%B), 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 检测波长设定 254 nm, 流速 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。检测模式为正离子模式, 扫描方式为多反应监测(MRM)模式, 扫描范围  $m/z$  50~1 500, 电喷雾离子源(ESI), 干燥气温度 300 °C, 干燥气体流速 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 雾化气压力 30 psi (1 psi≈6.895 kPa), 毛细管电压 4 kV。各成分的质谱信息见表 2。定量分析中使用 ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 其他条件同上。

表 2 瓜蒌中 4 个活性成分及内标的 MRM 检测参数

Table 2 MRM detection parameters of 4 active components in *Trichosanthis Fructus* and internal standard

成分	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
香叶木素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	463.1	301.1	120	16
香叶木素	301.0	286.0	120	36
芹菜素	271.1	153.0	175	45
甘草素	257.1	137.0	160	26
香草酸	169.1	151.1	100	18

**2.4 血浆样品前处理** 趁热给大鼠灌胃给予 AET (20.00  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 以生药量计), 给药前(0 h)及给药后 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 分别从大鼠眼眶静脉采血, 肝素钠抗凝, 室温放置 30~45 min, 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min (离心半径 18.7 cm), 取上清液, 得血浆, 置于 -20 °C 冰箱中储存, 备用。将血浆样品从 -20 °C 冰箱中取出, 室温放置融化, 取血浆 100  $\mu\text{L}$ , 精密加入 IS 20  $\mu\text{L}$  和乙腈 200  $\mu\text{L}$ , 涡旋 1 min, 4 °C 离心(转速 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min, 离心半径 6.15 cm, 下同), 取上清液在 37 °C 氮气中吹干, 残渣用甲醇 100  $\mu\text{L}$  复溶, 涡旋 1 min, 4 °C 离心, 取上清液于内插管中, 进样分析。

**2.5 方法学验证** 药物动力学实验中所有成分检测时精密度试验的 RSD 均 < 12.6%, 准确度(RE)处于 -14.9%~14.0%, 基质效应 92.1%~118.1%, 提取回收率 80.8%~116.2%, 稳定性试验的 RSD 均 < 14.1%, RE 处于 -14.9%~14.9%, 表明建立的方法符合要求。大鼠灌胃 AET 30 min 后指标成分的标准曲线信息见表 3; 血浆样品 HPLC-QqQ-MS/MS 色谱图见图 1。在定量分析实验中, 香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸精密度的 RSD 分别为 5.3%, 5.3%, 4.9%, 3.0%, 稳定性试验的 RSD 分别为 4.3%,

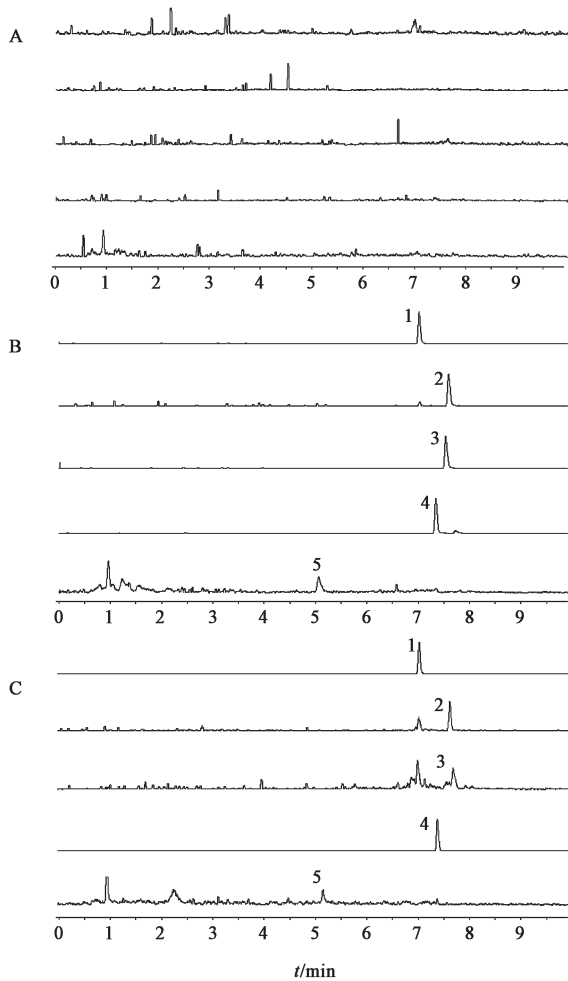
4.3%, 5.5%, 4.7%, 重复性试验的RSD分别为4.2%, 5.1%, 4.0%, 5.4%; 加样回收率分别处于89.02%~103.49%, 90.79%~109.33%, 91.48%~104.52%, 101.58%~115.46%, RSD分别为6.0%, 6.7%, 6.1%, 4.7%; 参照2020年版《中国药典》<sup>[19]</sup>(四部)通则9101“分析方法验证指导原则”, 瓜蒌样品中香草酸

质量分数158.45  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 其重复性试验的RSD 5.4%, 稍大于规定值4%, 其他成分则均符合要求。香草酸重复性试验RSD较大的原因可能是由于其离子化程度较低, 虽然该成分含量较高, 但其峰面积在4个成分中是最小的。HPLC-QqQ-MS/MS色谱图见图2, 指标成分标准曲线信息见表4。

表3 瓜蒌中4个活性成分在大鼠血浆中含量测定的回归方程、线性范围和最低定量限

Table 3 Regression equations, linear ranges and limits of quantification of 4 active components of Trichosanthis Fructus in rat plasma

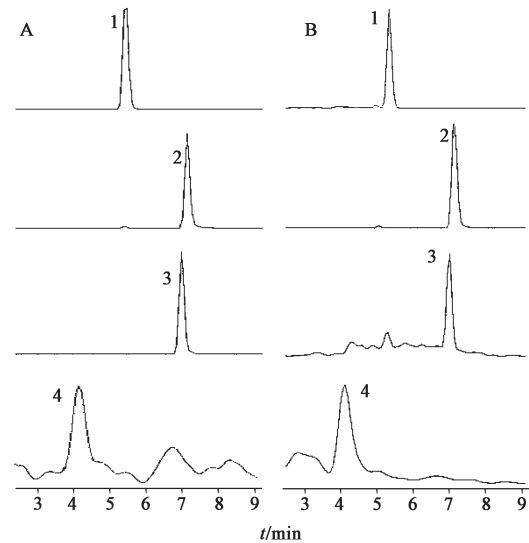
成分	回归方程	$R^2$	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	最低定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
香叶木素-7-O-葡萄糖苷	$Y=0.018\ 529X-0.013\ 726$	0.997	3.25~104.00	1.65
香叶木素	$Y=0.004\ 762X-0.001\ 129$	0.998	3.14~100.50	1.65
芹菜素	$Y=0.000\ 795X-0.006\ 228$	0.995	32.50~1\ 040.00	20.00
香草酸	$Y=0.000\ 046X-0.000\ 503$	0.994	84.37~2\ 700.00	80.00



A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 供试品; 1. 香叶木素-7-O-葡萄糖苷; 2. 香叶木素; 3. 芹菜素; 4. 甘草素(IS); 5. 香草酸

图1 大鼠灌胃AET 30 min后血浆样品的HPLC-QqQ-MS/MS  
Fig. 1 HPLC-QqQ-MS/MS chromatograms of plasma samples after intragastric administration of AET for 30 min

2.6 数据处理 采用DAS 2.0非房室模型对血药浓度-时间数据进行处理, 计算药物动力学参数, 包



A. 供试品; B. 对照品; 1. 香叶木素-7-O-葡萄糖苷; 2. 香叶木素; 3. 芹菜素; 4. 香草酸

图2 瓜蒌的HPLC-QqQ-MS/MS

Fig. 2 HPLC-QqQ-MS/MS of Trichosanthis Fructus

括药-时曲线下面积( $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ), 平均滞留时间( $MRT_{0-t}$ ), 半衰期( $t_{1/2\alpha}$ ), 达峰时间( $t_{max}$ )和药峰浓度( $C_{max}$ ), 见表5。4个成分的药-时曲线见图3。

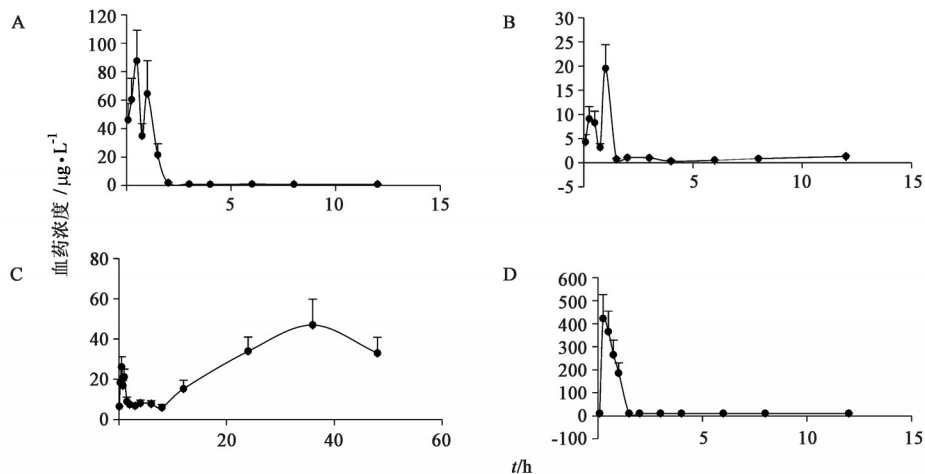
2.6.1 药物动力学分析 香叶木素是一个难溶于水的成分, 其绝对生物利用率较低; 香叶木素-7-O-葡萄糖苷的吸收速度较快, 0.5 h即可在血液中的药峰浓度<sup>[20]</sup>; 这类成分在胃肠道中有较高的水解活性。有研究表明<sup>[21]</sup>, 当香叶木素-7-O-葡萄糖苷进入胃肠道后, 有很大一部分会在胃肠道中被肠道菌群的 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶水解为香叶木素。芹菜素是一种吸收速度慢、消除速度慢的成分, 完全消除可能需要好几天的时间<sup>[22-23]</sup>, 可以长时间发挥药效, 但因为实验条件的限制, 本研究取血周期为48 h, 故未完

表4 瓜蒌中4个活性成分含量测定的回归方程、线性范围和最低定量限

成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	最低定量限/mg·L <sup>-1</sup>
香叶木素-7-O-葡萄糖苷	Y=21 684 305.17X+3 629 700.81	0.999 8	0.122 50~3.920 0	0.003 3
香叶木素	Y=5 156 208.75X+1 031 255.26	0.999 9	0.126 25~4.040 0	0.003 5
芹菜素	Y=1 130 687.89X+148 604	0.999 2	0.122 50~3.920 0	0.040 0
香草酸	Y=14 289X+4 588.9	0.999 5	0.127 50~4.080 0	0.120 0

表5 大鼠灌胃给予AET后4个活性成分的动力学参数

成分	AUC <sub>0-∞</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	AUC <sub>0-∞</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	MRT <sub>0-∞</sub> /h	t <sub>1/2α</sub> /h	t <sub>max</sub> /h	C <sub>max</sub> /μg·L <sup>-1</sup>
香叶木素-7-O-葡萄糖苷	111.28±9.94	142.25±13.35	4.43±0.53	35.90±3.71	0.50	87.55±8.07
香叶木素	27.08±2.76	29.72±2.69	5.46±0.46	8.26±0.80	1.50	19.53±1.80
芹菜素	1 376.12±101.86	3 293.45±241.85	29.76±0.13	15.97±0.44	36.00	46.94±3.82
香草酸	631.32±64.72	631.32±64.72	8.10±1.60	0.51±0.03	0.25	422.32±69.08



A. 香叶木素-7-O-葡萄糖苷; B. 香叶木素; C. 芹菜素; D. 香草酸

图3 瓜蒌中4个活性成分在大鼠体内的药-时曲线( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Plasma concentration-time curves of of 4 active components in Trichosanthis Fructus ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

全体现出芹菜素的消除过程。香草酸是一个吸收速度特别快的化学成分,其 $t_{max}$ 仅0.25 h,几乎观察不到吸收相<sup>[24]</sup>,是一个潜在的起到速效作用的成分。另外,在实验过程中发现,肉桂酸可能存在内源性干扰,虽然其血药浓度会随着时间的推移而发生变化,但这变化起伏不定、不成规律,且在方法学验证过程中,同组数据之间相差太大,无法用来进行准确度和精密度的计算,故未计算其药物动力学参数。香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸的AUC<sub>0-∞</sub>均≥29.72 μg·h·L<sup>-1</sup>,说明这4个成分在血液中均具有比较可观的暴露量,结合图3可知,四者均具有较好的体内过程,可作为基于药动-药效的Q-marker候选物。因此,可以测定这4个成分在瓜蒌中的含量,并以含量测定结果为基础,

进行系统聚类分析和PCA,以评价香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素和香草酸含量与瓜蒌质量的相关性。

**2.6.2 系统聚类分析** 9批样品的含量测定结果见表1,利用SPSS 21.0对9批瓜蒌样品中4个成分含量进行标准化处理,变换过后的数据均值为1,同时选用组间连接法,以欧氏距离为度量标准,考察样品的相似程度,见图4。结果发现当欧氏距离为10时,可将样品分为三类,一类为样品S2,S3和S8,分别为高唐瓜蒌、地跑9号和河北笨瓜蒌,均为药用瓜蒌品种;单独聚为一类的样品S1为山西瓜蒌,也属于药用瓜蒌品种,与上一类存在产地差异;另一类为样品S4~S7和S9,分别为江苏9号、安徽9号、农科院1号、农科院2号和河北瓜蒌,其中江苏9号和

安徽9号为籽用瓜蒌,农科院1号和农科院2号为育种中的瓜蒌,还没成功培育为预期中的优良品种,河北瓜蒌虽然是药用瓜蒌,但为种子繁殖,一般用于生产天花粉<sup>[25]</sup>,这一类瓜蒌与药用瓜蒌确实存在一定区别。从聚类结果上看,药用瓜蒌品种可与非药用瓜蒌品种分别聚类。若以欧氏距离为13进行聚类分析,结果9批样品可聚为两类,山西瓜蒌归入了非药用瓜蒌品种中,说明产地也可能是影响聚类结果的因素之一。综上分析,以9批瓜蒌样品中4个成分含量为基础的系统聚类分析,可在一定程度上将瓜蒌的药用和非药用品种聚为不同类别,说明这4个成分的含量与9批瓜蒌的药用价值存在一定的相关性。

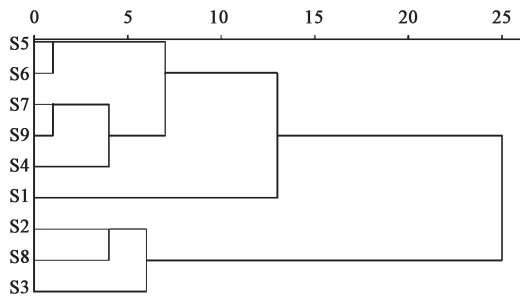


图4 9批瓜蒌药材的系统聚类分析树状  
Fig. 4 Cluster dendrogram of 9 batches of Trichosanthis Fructus

**2.6.3 PCA** 将9批瓜蒌样品中4个成分的含量导入SPSS 21.0软件,对导入的数据进行标准化处理,计算主要成分的特征值、累计贡献率和PCA结果,见表6,其中主要成分的特征值和积累方差贡献率以特征值>1为提取标准。结果发现只有2个因子的特征值>1,分别为1.94和1.41,累计方差贡献率84.00%,符合因子提取的条件,故选取前2个因子进行评价。特征向量为各自主成分载荷因子除以各自主成分特征值的算术平方根,根据特征向量矩阵建立PCA模型,得到方程 $F=0.579\ 37F_1+0.420\ 62F_2$ , $F_1=-0.122X_1+0.430X_2+0.563X_3+0.625X_4$ , $F_2=0.815X_1+0.636X_2+0.157X_3-0.177X_4$ ,式中 $X_1, X_2, X_3, X_4$ 分别为香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸含量标准化后的变量。 $F_1$ 和 $F_2$ 为主成分1和主成分2的得分。以主成分贡献率在2个主成分总贡献率中的权重对主成分得分进行加权,得综合评分 $F$ 。

按照传统经验,瓜蒌以糖味浓者为佳<sup>[26]</sup>,这里的糖味是一种泛指,准确来说应该是焦糖味,可能与还原糖类成分有关。9批瓜蒌的PCA综合评分见表7。结果发现样品S2,S1和S8的综合评分位于前3位,表明这3批瓜蒌样品的质量相对较好,且这3

表6 9批瓜蒌样品的PCA参数

Table 6 PCA parameters of 9 batches of Trichosanthis Fructus

成分	旋转后的因子载荷矩阵		特征向量	
	因子1	因子2	向量1	向量2
香叶木素-7-O-葡萄糖苷	-0.171	0.969	-0.122	0.815
香叶木素	0.601	0.756	0.430	0.636
芹菜素	0.786	0.187	0.563	0.157
香草酸	0.873	-0.211	0.625	-0.177

种瓜蒌均具有很重的焦糖味,子与子之间相互黏连,难以分开,一层暗红色黏手的胶状物包裹在瓜蒌子上,几乎看不到瓜蒌瓢,与传统经验认为的优质瓜蒌性状一致;样品S6,S9和S7在所有样品中的综合评分位于后3位,表明这3批瓜蒌样品的质量相对较差,农科院1号焦糖味小,瓢较多,不黏手;河北瓜蒌焦糖气味小,子和瓢均泛白色;农科院2号焦糖味小,瓢泛白色,子大易分离,相对于优质瓜蒌,这3批瓜蒌的品质较差<sup>[6]</sup>。从收集到的信息来看,以4个成分含量为基础的PCA与根据传统形状特征对瓜蒌质量进行评价的结果基本一致。

表7 9批瓜蒌样品PCA的综合评分

Table 7 Comprehensive scores of 9 batches of Trichosanthis Fructus by PCA

样品	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$F_1$	$F_2$	$F$	排序
S1	1.561	1.730	0.064	0.046	0.618	2.374	1.356	2
S2	0.522	1.656	1.361	1.350	2.258	1.453	1.919	1
S3	-0.941	-0.212	1.037	0.352	0.827	-0.801	0.142	4
S4	-1.140	-0.495	-0.778	1.735	0.572	-1.673	-0.372	6
S5	0.962	-0.027	-0.778	-0.965	-1.170	0.815	-0.334	5
S6	0.893	-0.833	-0.778	-1.086	-1.583	0.268	-0.804	7
S7	-0.948	-0.833	-0.778	-0.442	-0.956	-1.346	-1.120	9
S8	-0.278	-0.274	1.426	-0.148	0.626	-0.150	0.299	3
S9	-0.632	-0.710	-0.778	-0.841	-1.191	-0.939	-1.085	8

### 3 讨论

中药Q-marker的提出是要建立一个综合性的中药质量控制体系,这就意味着在寻找和确认中药Q-marker的同时,需要解决如何进行质量评价及用哪些成分进行质量评价的问题<sup>[10]</sup>。在中药Q-marker的体系中,药物动力学的研究不仅是关联“药性”与“药效”的重要依据,也是质量评价中含量测定指标成分选择的重要依据,一般认为入血成分及其代谢产物为机体内起效的效应成分,而一般体内具有一定暴露量的成分,在药材中的含量也会相

对较高,因此要实现中药综合性的质量评价,需要将药物动力学研究纳入考量<sup>[27]</sup>。另外,药物动力学研究虽然是中药Q-marker体系中的一个重要部分,但与一般意义上的药物动力学研究的不同点在于,中药Q-marker更加侧重于研究中药原型成分的变化规律,而不考虑代谢产物及其在体内产生的生物活性,只有当二者均指向同样的成分时,才会被作为中药Q-marker的目标成分进行研究<sup>[28-30]</sup>。

目前对于中药质量评价比较认可的方法,是测定药材中主要成分的含量,但在2020年版《中国药典》中,瓜蒌只有水分、总灰分和水溶性浸出物等检查指标,并无一般性成分含量测定指标,这其实与瓜蒌提取物中成分比较复杂且含量普遍较低有关。本研究参考刘昌孝院士关于中药Q-marker的研究思路及文献<sup>[12]</sup>,在确定了入血成分和药物动力学目标后,采用70%乙醇作为提取溶剂对目标成分进行提取,筛选出香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸4个药物动力学规律和参数较为明确的成分;并以这4个成分为Q-marker候选物进行HPLC-QqQ-MS/MS定量分析,选择定量结果为数据蓝本进行系统聚类分析和PCA。结果表明这4个成分可能与瓜蒌的药用价值具有一定的相关性;PCA评价结果与传统经验评价结果基本一致,进一步说明这4个成分与瓜蒌的质量存在一定相关性,因此,可考虑将香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸4个成分作为瓜蒌祛痰止咳相关的Q-marker。中药Q-marker的质量控制方法是一个涉及多个方向的研究,只有实现多方向的协同合作,不断尝试新的思路和方法,才能将这个体系逐渐完善,本研究将药物动力学和药材质量评价相结合,提出了一种研究Q-marker可供借鉴的思路和方法,但仍然有许多问题尚未解决,后期还需结合药理学和药效学实验进行验证和阐释。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 赵生慧,张莉莉,安学冬,等. 瓜蒌的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药,2020,40(4):536-538.  
[2] 张维维,徐力. 中医药治疗肿瘤并发症验案3则[J]. 江苏中医药,2018,50(12):52-53.  
[3] 闫书文. 贝母瓜蒌散在儿童燥咳辨治中的应用[J]. 中医杂志,2017,58(17):1510-1511.  
[4] 管昱鑫. 顾群主任瓜蒌薤白半夏汤加减诊治经验[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(A2):282,285.

[5] 孙文,巢志茂,王淳,等. HPLC对市售瓜蒌中5-羟甲基糠醛的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):73-76.  
[6] 孙文,巢志茂,王淳,等. 瓜蒌饮片中总糖及还原糖的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):96-99.  
[7] 王明娟,吴宿慧,李寒冰,等. 基于体外化痰活性制定瓜蒌质量控制新方法[J]. 中医学报,2020,35(2):374-378.  
[8] 邹纯才,吕文雅,鄢海燕,等. 瓜蒌提取物的化学指纹特征及5种成分的定量分析[J]. 通化师范学院学报,2019,40(2):39-42.  
[9] 鄢海燕,邹纯才. 基于功能主治及其物质基础的中药多元化质量控制模式探讨[J]. 国际药学研究杂志,2019,46(4):266-269.  
[10] 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.  
[11] 张铁军,白钢,刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学学报,2019,54(2):187-196.  
[12] HE J, FENG X C, WANG K, et al. Discovery and identification of quality markers of Chinese medicine based on pharmacokinetic analysis[J]. Phytomedicine, 2018,44:182-186.  
[13] 曲永胜,王亮,郭威. 基于成分特征的桑叶经霜质量标志物探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):145-150.  
[14] 赵幻希,王秋颖,孙秀丽,等. HPLC-MS结合多元统计分析区分人参产地及筛选皂苷类标志物[J]. 高等学校化学学报,2019,40(2):246-253.  
[15] 和焕香. 瓜蒌祛痰止咳功效相关的Q-Marker的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2020.  
[16] GE A, MA Y, LIU Y N, et al. Diosmetin prevents TGF- $\beta_1$ -induced epithelial-mesenchymal transition via ROS/MAPK signaling pathways[J]. Life Sci, 2016, 153: 1-8.  
[17] GE A, LIU Y N, ZENG X N, et al. Effect of diosmetin on airway remodeling in a murine model of chronic asthma[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2015, 47(8): 604-611.  
[18] PATIL R H, BABU R L, KUMAR M N, et al. Anti-inflammatory effect of apigenin on LPS-induced pro-inflammatory mediators and AP-1 factors in human lung epithelial cells[J]. Inflammation, 2016, 39(1): 138-147.  
[19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

- [20] LI J, YU Z, HAN C, et al. Determination of diosmetin-7-O- $\beta$ -D-glucoside in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. *Acta Chromatogr*, 2019, 32(4): 1-5.
- [21] ZHAO M, DU L Y, TAO J H, et al. Determination of metabolites of diosmetin-7-O-glucoside by a newly isolated *Escherichia coli* from human gut using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(47): 11441-11448.
- [22] CHEN Z J, TU M J, SUN S Y, et al. The exposure of luteolin is much lower than that of apigenin in oral administration of *Flos Chrysanthemi* extract to rats [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27(1): 162-168.
- [23] GRADOLATTO A, BASLY J P, BERGES R, et al. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(1): 49-54.
- [24] TAO Y, XU X, YAN J Z, et al. A sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of polyphenols in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of dispensing granule and standard decoction of *Cinnamomum cassia* twigs [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(7): e4534.
- [25] 吴翠, 巢志茂. 瓜蒌质量的过程控制系统 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(2): 230-234.
- [26] 江苏新医学院. *中药大辞典* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1781.
- [27] 孙宇飞, 甄晓宇, 刘天舒, 等. 基于“体外-体内”多维化学物质组关联网络的茯苓质量标志物发现及质量评价研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4562-4568.
- [28] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 1-8.
- [29] QI Y Q, ZHAO X P, LIU H, et al. Identification of a quality marker (Q-Marker) of Danhong injection by the zebrafish thrombosis model [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1443.
- [30] GAO X, DU X, AN L J, et al. Wilforine, the Q-marker and PK-marker of *Tripterygium* glycosides tablet: based on preparation quantitative analysis and PK-PD study [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 357-364.

[责任编辑 刘德文]

·书讯·

## 规范内镜诊断早期胃癌的放射治疗 ——评《肿瘤放射治疗学》

胃癌是人体消化道最常见的肿瘤疾病之一,发病率和死亡率较高。早期胃癌最有效诊疗策略为内镜诊断与放射治疗。随着以染色内镜、放大内镜为核心的新型内镜检验技术的开发与应用,内镜诊断的综合效果有了明显的提升,而放射治疗作为肿瘤最有效的治疗手段,已经具有多年的历史。而在早期胃癌的诊疗中,放射治疗也极易取得良好效果。

《肿瘤放射治疗学》由李晔雄主编,中国协和医科大学出版社2018年出版,该书对现代肿瘤放射治疗具有重要医学指导意义。是全国范围内被广泛采用和学习的肿瘤放射治疗学参考书,对于现代肿瘤放射治疗具有重要的医学指导价值。客观总结了传统放射治疗以及同领域相关诊疗理论的基础上,有效汲取了国内外肿瘤放射治疗的先进经验,构建了新时期更加完善的肿瘤放射治疗框架。全书共包括二十篇内容,主要包括总论部分、放射物理学基础备份、肿瘤临床放射与生物学知识、热疗以及各部分肿瘤放射治疗的相关医疗技术方法,具体包括放射外科立体定向治疗以及术中肿瘤放射治疗等内容。全书内容详尽,知识体系鲜明,囊括了肿瘤放射治疗的全部知识点,不仅适合国内外高等医疗专业学生、相关专业研究生学习阅读,同时也可以作为肿瘤理论研究人员以及相关科室医护人员的学习参考书。

针对早期胃癌放射治疗问题,本书不仅详细介绍了围术期胃癌放射治疗的核心过程,同时也对未来胃癌放疗相关医疗技术进行的展望与分析。现代早期胃癌的围术期放疗一般包括术前放疗、术中放疗以及术后放疗三个部分。作者在书中充分借鉴国内外消化道肿瘤技术研究结果后,在书中通过数据分析明确指出,术前的新辅助放疗可以有效提高癌症手术的切除率,提高患者治疗收益,对放疗的局空与患者生存均有较大帮助。从综合统计结果来看,术前放疗与单纯手术治疗相比,可以降低患者3到5年的死亡率,且更具有安全性;而术中放疗可以有效加强患者局部病灶的控制,降低癌症复发率,同时也可以有效缓解癌细胞的进一步扩散,但是术中放疗技术较为复杂,其可行性与安全性乃至操作性还存在一定风险;而术后放疗同样具有较为鲜明的临床医疗效果。在《肿瘤放射治疗学》中,作者通过对比相应的案例数据,明确表示与传统手术相比,术后放疗可以有效提高患者50%左右的无病生存率和30%左右的总生存率,且相关治疗收益具有一定持续性。

除了上述临床治疗以外,作者在书中对早期胃癌放疗的发展也进行了总结。基于早期胃癌的综合发病特征可以肯定,术前放疗具有更高的医疗价值,同时随着现代化疗药物的科学研究,有关医护工作人员可以将肿瘤个体化放射治疗策略与各类其他治疗方法相结合,寻找更有效的胃癌治疗技术。《肿瘤放射治疗学》一书,不仅记录了现阶段国内外最先进的肿瘤放射治疗相关技术,还提供了大量的案例资料,可以作为现代肿瘤放射医学的有效参考,具有鲜明的实用价值。

(作者胡延伟,付超,范晓彬,邢台市第三医院,河北 邢台 054099)