

补气通络胶囊调控孕甾烷X受体活性成分的筛选及液相色谱-串联质谱同时测定研究

黄楚燕^{1,2}, 杨棣华^{1,2}, 陈彭龙^{1,2}, 梁宏宇^{1,3}, 李庆国¹, 任辉^{1,4}

(1. 广州中医药大学, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院药学部, 广东广州 510405; 3. 广东省第二中医院心血管科, 广东广州 510095; 4. 广州中医药大学第一附属医院骨科, 广东广州 510405)

摘要:【目的】寻找补气通络胶囊中具有调控孕甾烷X受体(PXR)活性的成分, 建立含量同时测定方法以评价该制剂的增效物质基础。【方法】根据补气通络胶囊内容物超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)图谱及数据库分析结果, 确定候选成分。将这些化合物的单体溶液加入PXR mRNA质粒转染的骨骼肌细胞中, 孵育后采用聚合酶链式反应(PCR)法测定PXR mRNA表达, 筛选出其中对比空白组产生明显变化且具有量效关系的化合物作为活性成分。以上述活性成分为指标, 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS)含量同时测定的方法, 根据结果选择活性、含量均适宜发挥功效的成分作为药效物质并评价其作用程度。【结果】补气通络胶囊中, 有丹参酮II A、欧当归内酯A、藜本内酯、川芎嗪、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb3、人参皂苷Rd、人参皂苷Re、姜黄素等成分在UPLC-TOF-MS测定中信号较强且具有明显的PXR调控活性。UPHLC-MS含量测定结果显示, 上述各成分除人参皂苷Rb3和人参皂苷Rd外, 在全方制剂中的含量均符合发挥功效主治所需限度, 可视为补气通络胶囊的药效物质。【结论】建立UPLC-TOF-MS含量同时测定的方法。补气通络胶囊中含有多种成分, 主要涉及黄酮、皂苷、香豆素、萜类等。

关键词: 补气通络胶囊; 孕甾烷X受体; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 质量控制

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)03-0638-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.03.029

Screening of Active Components of Pregnane X Receptor Regulated by *Buqi Tongluo* Capsules and Simultaneous Determination by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrum

HUANG Chu-Yan^{1,2}, YANG Di-Hua^{1,2}, CHEN Peng-Long^{1,2},
LIANG Hong-Yu^{1,3}, LI Qing-Guo¹, REN Hui^{1,4}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Dept. of Cardiovasology, Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 4. Dept. of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To find the components with progesterone X receptor (PXR) regulatory activity in *Buqi Tongluo* Capsules, and establish a simultaneous determination method to evaluate the efficacy of the preparation functional material basis. **Methods** The candidate constituents of *Buqi Tongluo* Capsules were determined by ultra-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrum (UPLC-TOF-MS) and database analysis. The monomer solution of these compounds was added into the skeletal muscle cells transfected with PXR mRNA plasmids, and the PXR mRNA expression was determined by polymerase chain reaction (PCR) after incubation. The compounds with significant changes compared with the blank group and dose-effect relationship were selected as the active ingredients. Using the above active ingredients as indicators, a method for simultaneous determination of the content was established by ultra-performance liquid chromatography-tandem

收稿日期: 2021-06-23

作者简介: 黄楚燕(1982-), 女, 主管中药师; E-mail: 1061850484@qq.com

基金项目: 广东省中医药管理局科研项目(编号: 20211123)

mass spectrometry (UPLC-MS). According to the results, the ingredients suitable for both activity and content were selected as pharmacodynamic substances and their effects were evaluated. **Results** In *Buqi Tongluo* Capsules, tanshinone II A, levistilide A, ligustilide, ligustrazine, astragaloside, Calycosin-7-glucoside, verbascoside, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb3 ginsenosides RD, ginsenosides Re, curcumin and other components in the determination of UPLC-TOF-MS signal was stronger and had obvious activity of PXR regulation. UPLC-MS content determination results showed that the contents of all the above ingredients except ginsenoside Rb3 and ginsenoside Rd in the whole preparation met the required limit of efficacy and indication, and could be regarded as medicinal substances of *Buqi Tongluo* Capsules. **Conclusion** A method for simultaneous determination of UPLC-TOF-MS is established. There are many components in *Buqi Tongluo* Capsules, involved in flavonoids, saponins, coumarins and terpenoids.

Keywords: *Buqi Tongluo* Capsules; pregnane X receptor (PXR); ultra-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrum(UPLC-TOF-MS); quality control

肌骨损伤在临床上除使用手术、康复治疗外,也可以配合中药促进机体特别是损伤部位的恢复^[1-4]。补气通络胶囊为广州中医药大学第一附属医院根据临床验方——补气通络方开发出的专科制剂,具有补气生肌、活络止痛的功效,主治神经损伤、气滞血瘀所致的各种瘫软、疼痛、损伤等病症,广泛应用于骨伤、康复、神经外科相关疾病的治疗和恢复^[5-7]。该药处方量较大,病患及医护人员评价较好,有广阔开发和深入研究前景。但目前补气通络胶囊的主要治疗机制尚不明确,也未有针对性功效、机制建立科学、准确、量化的工艺和质量评价标准,严重制约了该制剂的研发和使用。

研究中药特别是复方中药的功效机制,通常通过找到与疾病和/或其发生发展机制相关的信号通路、关键作用靶标,研究药物干预下上述通路/靶标及其上下游基因的表达变化,探寻中药的主要作用机制。孕甾烷X受体(PXR)是广泛分布于肝、肾等器官中的核受体,具有较强的外源性物质敏感性,因此能够在机体生理病理变化或药物干预的情况下,对体内物质、能量代谢、炎症反应等生物学活动产生显著的调控作用。同时,PXR是多条糖脂、能量和炎症递质代谢的关键调控位点,其表达变化能够调控多种上下游基因的表达,进而影响相关脏器的功能,其为近年来较多受到分子生物学、药理学相关研究者重视的内源性核受体。该靶标具有明显的体内能量、营养物质代谢调控能力,能够促进损伤修复和肌肉再

生^[8-10],此与补气通络胶囊的功效主治内容基本吻合,故认为PXR可以作为解释该制剂相关功效的分子生物学基础。

补气通络胶囊由丹参、川芎、当归、黄芪、红参、姜黄等药味组成,其中丹参为君药,川芎、当归为臣药。文献报道,上述中药材中有多个化学成分具有促进损伤修复、增强体质和免疫力、促进机体能量生成和物质代谢等方面的功效,可能是补气通络胶囊发挥治疗作用的物质基础^[11-16]。然而,该制剂药味较多,各味药材中含有多项功能、含量、理化性质均有较大差异的化学成分,因此本研究采用UPLC-TOF-MS^[17-22]等高分辨率仪器分析方法进行化合物快速鉴别,并根据结果确定候选成分进行PXR调控活性筛选,进而建立含量同时测定方法,以期明确该药的调控机制和主要活性成分,为研究该制剂的治疗功效机制和物质基础提供科学依据。现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器 AB SCIEX TripleTOF 5600+超高效液相色谱-飞行时间质谱(美国AB SCIEX公司);ABI StepOnePlus PCR仪(美国Applied Biosystems公司);Dual-Glo荧光检测仪(美国PerkinElmer公司);Aquity-UPLC-X-class-Xevo-TQ-MS超高效液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司);Waters BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);Millipore自动净水仪。

1.2 药物、细胞与试剂 补气通络胶囊(由本院制剂室生产,批号:20190101-20200901);对照品:丹酚酮ⅡA(批号:110766-202022)、丹酚酸B(批号:111562-201917)、欧当归内酯A(批号:111826-201806)、藁本内酯(批号:111737-201910)、阿魏酸(批号:110773-201915)、川芎嗪(批号:100845-201603)、黄芪甲苷(批号:110781-202118)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号:111920-201907)、毛蕊花糖苷(批号:111530-201914)、人参皂苷Rb1(批号:110704-202028)、人参皂苷Rb3(批号:111686-202005)、人参皂苷Rg1(批号:110703-202034)、人参皂苷Rd(批号:111818-201603)、人参皂苷Re(批号:110754-202028)、姜黄素(批号:110823-201706),由中国食品药品检定研究院提供。

骨骼肌细胞,由美国ATCC公司提供。SuperScript™ VILO™ cDNA逆转录、TaqMan基因表达试剂盒(美国Applied Biosystems公司);甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯级,德国Merck公司);超纯水由Milli-Q制备。

2 方法

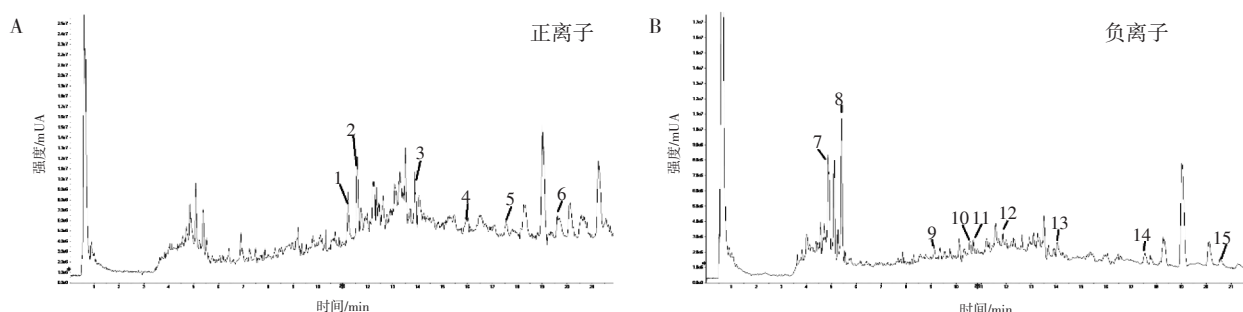
2.1 液相色谱及质谱条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱采用Waters BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);柱温为35 ℃;流速0.3 mL/min;流动相:0.1%甲酸(A)-乙腈(B);梯度洗脱程序:0~3 min, 5%~60% B; 3~12 min, 60%~80% B; 12~14 min, 80%~90% B; 14~15 min, 90%~100% B; 15~18 min, 100% B; 18~22 min, 100%~5% B。

2.1.2 质谱条件 正负离子同时扫描,质荷比范围为50~1 500 Da;喷雾电压为4 500 V;汽化温度500 ℃;碰撞能35 eV;解离电压100 V;离子源气压55 psi;气帘压力35 psi;其余设定均为仪器预设值。所得图谱和数据导入AB Sciex Analyst Software 1.6软件中进行分析,图谱见图1,各组分离子对信息见表1。根据所得结果,选择已知且信号强度适宜的成分作为活性候选。

2.2 候选成分PXR调控活性研究 使用LanthaScreen (TR)-FRET PXR试剂盒(#PV4839,购自美国Invitrogen公司),按说明书方法进行细胞转染:吸取20 μL上述试液,转移至含PXR配体结合域、荧光标记PXR激动剂和GST抗体,IMP(6.25~25 μmol/L),SR12813(10 μmol/L)或PCN(10 μmol/L)的96孔板中,混匀后室温(25 ℃)反应20 min。向上述溶液中加入各化合物单体溶液(25 μg/mL,溶剂为DMSO)10 μL,孵育后使用TRIzol试剂盒提取总RNA,再使用SuperScript™ VILO™ cDNA逆转录试剂盒处理,所得溶液测定荧光值。根据结果选出与参比组(加DMSO)存在明显差异者,继续考察不同浓度(12.5、50 μg/mL)各成分的PXR调控活性。结果显示,加入丹酚酮ⅡA、欧当归内酯A、藁本内酯、川芎嗪、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷Rb1、人参皂苷Rb3、人参皂苷Rd、人参皂苷Re、姜黄素等单体溶液的组别与参比组比较PXR活性变化明显,且上述活性与给药剂量存在显著相关性,因此,可以将这些成分列为补气通络胶囊的PXR调控活性成分。结果见图2。

2.3 活性成分含量测定方法 质谱检测条件:使



A. 正离子全扫描图谱; B. 负离子全扫描图谱

1. 丹酚酸B; 2. 川芎嗪; 3. 黄芪甲苷; 4. 姜黄素; 5. 丹酚酮ⅡA; 6. 藁本内酯; 7. 毛蕊花糖苷; 8. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 9. 欧当归内酯A; 10. 人参皂苷Re; 11. 人参皂苷Rg1; 12. 阿魏酸; 13. 人参皂苷Rb1; 14. 人参皂苷Rb3; 15. 人参皂苷Rd

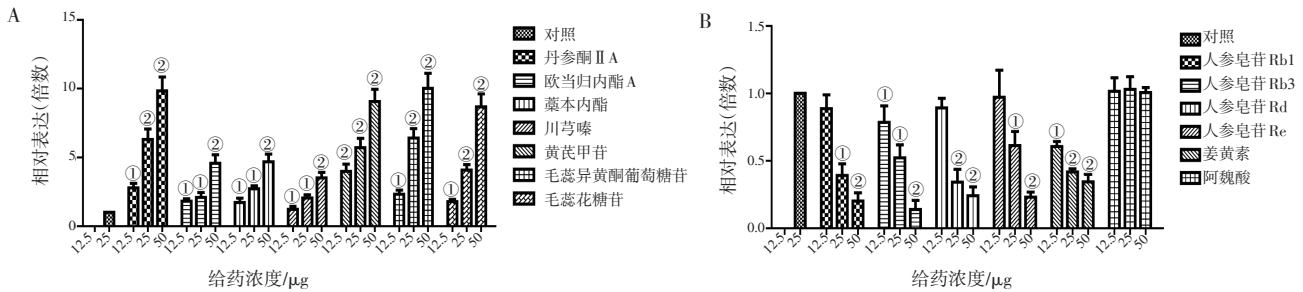
图1 补气通络胶囊UPLC-TOF-MS图谱

Figure 1 UPLC-TOF-MS chromatogram of Buqi Tongluo Capsules

表1 补气通络胶囊各成分LC-MS参数

Table 1 LC-MS parameters of each component of *Buqi Tongluo Capsules*

化合物	保留时间/min	分子式	质荷比/Da	碎片离子/Da	离子
丹酚酸B	11.305	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.113 2	320.886 9, 519.013 2	+
川芎嗪	11.612	C ₈ H ₁₂ N ₂	136.194 0	136.194 0	+
黄芪甲苷	14.002	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	808.802 2	627.305 3	+
姜黄素	16.000	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	369.001 1	179.014 9	+
丹参酮ⅡA	17.513	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	295.112 3	277.083 1, 249.002 2, 191.097 8	+
藁本内酯	19.732	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	191.104 4	173.004 0	+
毛蕊花糖苷	4.835	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.198 1	161.050 2	-
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	5.371	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.401 2	268.517 2	-
欧当归内酯A	9.244	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	380.803 1	191.209 8	-
人参皂苷Re	10.704	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.509 5	945.498 8, 783.503 5	-
人参皂苷Rg1	10.821	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	991.511 7	945.498 8, 783.503 5	-
阿魏酸	11.973	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	197.702 2	162.910 4, 160.883 3	-
人参皂苷Rb1	14.095	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1153.601 1	1 108.302 2	-
人参皂苷Rb3	17.528	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078.097 2	1 078.097 2	-
人参皂苷Rd	20.626	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.548 3	945.498 8, 783.503 5	-



A. 激动活性成分; B. 抑制活性成分

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与对照组比较

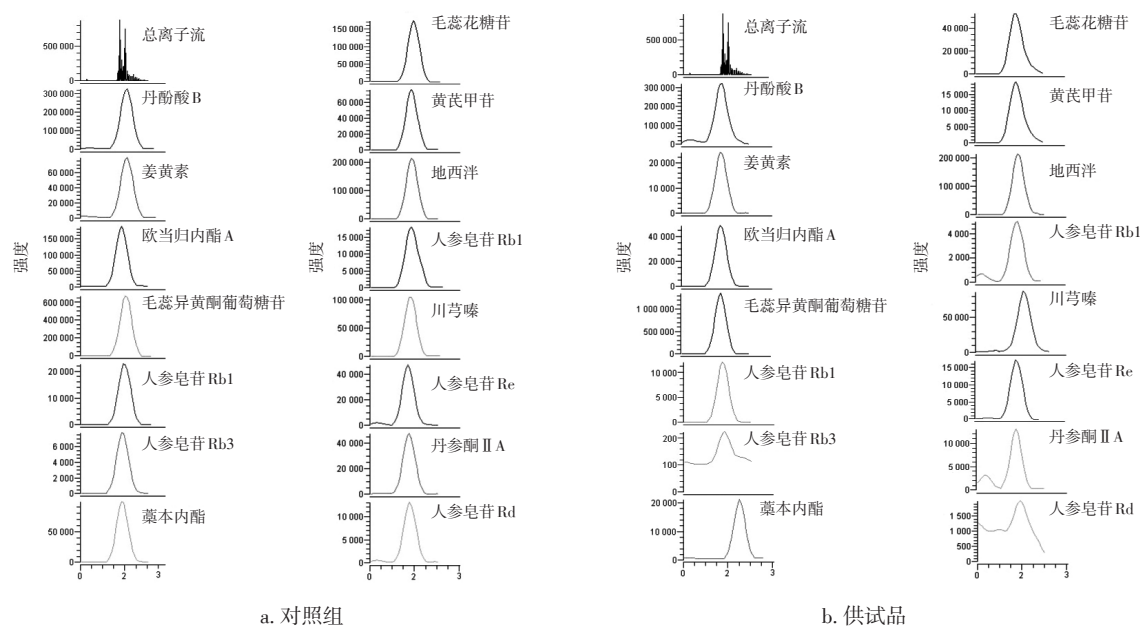
图2 补气通络胶囊各化学成分对PXR表达的影响

Figure 2 Effects of chemical components of *Buqi Tongluo Capsules* on PXR expression

用电喷雾离子源(ESI源), 正负离子同时扫描, 毛细管温度设定为120℃, 吹扫气(氮气)流速设置为50 L/h, 毛细管电压设置为3 kV, 碰撞气(氩气)流速0.16 mL/min, 汽化流速650 L/h, 汽化温度350℃, 扫描使用多反应监测模式(MRM), 监测离子对见表1。碰撞能量均为正离子35 eV, 负离子30 eV。色谱条件: Waters BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相为0.1%甲酸(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 5%~5% B; 0.5~1.0 min, 5%~90% B; 1.0~2.5 min, 90%~90% B; 2.5~3.0 min, 90%~5% B; 流速0.3 mL/min, 柱温30℃, 进样量1 μL。混合对照品和供试品UPLC-MS图谱见图3。由于人参皂苷Rb3和人参皂苷Rd在

供试品中未测到, 因此, 方法学考察中未将此2个成分列入指标。

2.4 多批次样品含量测定 取补气活血胶囊内容物, 精密称取约0.2 g, 置于25 mL量瓶中, 加50%甲醇(每mL含地西洋100 ng)至刻度, 密塞; 超声30 min后, 取出, 放冷, 加前述50%甲醇定容至刻度; 精密吸取所得溶液0.1 mL, 转移至10 mL量瓶中, 加前述50%甲醇定容至刻度, 所得溶液使用0.22 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。另取丹参酮ⅡA、欧当归内酯A、藁本内酯、川芎嗪、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷Rb1、人参皂苷Re、姜黄素对照品, 分别精密称取5 mg, 置于同一10 mL量瓶



注：对照品中各成分浓度均为100 ng/mL，横坐标单位为min，纵坐标单位为 μA

图3 补气通络胶囊各成分对照品和供试品UPLC-MS图谱

Figure 3 UPLC-MS chromatogram of reference substance and test substance of each component in *Buqi Tongluo Capsules*

中，加甲醇(每mL含地西洋100 ng)溶解并定容至刻度，即得上述成分浓度均为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。分别吸取上述溶液，按“2.3”项下方法检测，记录供试品和对照品溶液中各成分、内标峰面积，计算供试品溶液中各成分的含量。

2.5 含量测定方法学考察

2.5.1 标准曲线和线性关系 取“2.4”项下配制的对照品溶液，加含内标的甲醇溶液(每mL含地西洋100 ng，下同)稀释，配制成浓度为10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 ng/mL的溶液，所得溶液使用“2.3”项下方法测定，记录各目标成分和内标峰面积，计算上述成分与内标的峰面积比。以峰面积比为横坐标 x ，对应化合物浓度为纵坐标 y ，代入Excel进行线性回归。各待测组分的回归方程及相关系数结果见表2。结果表明，方法在5~1 000 ng/mL范围内对补气通络胶囊各组分含量测定准确度良好。

2.5.2 精密度考察 取供试品溶液，使用“2.3”项下方法测定，连续测定6次，记录各目标成分和内标峰面积，计算上述成分与内标的峰面积比，计算峰面积比的相对标准偏差(RSD)。结果显示，各组分峰面积比的RSD为0.40%~2.90%(备注：因供试品溶液中未测到人参皂苷Rb3和人参皂苷

Rd，故精密度及后续考察中未列入上述2个成分)，经检索2020年版《中国药典》，结果符合相关规定，表明检测方法精密度良好。

2.5.3 重复性考察 取补气通络胶囊内容物，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，共平行制备6份，再按“2.3”项下方法测定，计算上述成分

表2 补气通络胶囊各待测组分的回归方程及相关系数
Table 2 Regression equation and correlation coefficient of each undetermined group in *Buqi Tongluo Capsules*

化合物	标准曲线	相关系数 R^2
丹酚酸B	$y = 62.192x - 3.3987$	$R^2 = 0.9997$
川芎嗪	$y = 189.36x + 7.6844$	$R^2 = 0.9995$
黄芪甲苷	$y = 253.21x - 1.4149$	$R^2 = 0.9996$
姜黄素	$y = 266.75x + 6.4786$	$R^2 = 0.9995$
丹参酮II A	$y = 451.83x - 8.0556$	$R^2 = 0.9993$
藜本内酯	$y = 210.3x - 8.9225$	$R^2 = 0.9998$
毛蕊花糖苷	$y = 127.6x + 6.9112$	$R^2 = 0.9994$
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$y = 32.97x - 10.0560$	$R^2 = 0.9996$
欧当归内酯A	$y = 115.99x - 8.7242$	$R^2 = 0.9991$
人参皂苷Re	$y = 490.48x - 5.1700$	$R^2 = 0.9995$
人参皂苷Rg1	$y = 971.18x - 8.8466$	$R^2 = 0.9996$
人参皂苷Rb1	$y = 1334x - 5.42030$	$R^2 = 0.9997$

(续表3)

化合物	含量/ (ng·mL ⁻¹)	加入对照品/ (ng·mL ⁻¹)	测定结果/ (ng·mL ⁻¹)	回收 率/%	平均 /%	RSD /%	化合物	含量/ (ng·mL ⁻¹)	加入对照品/ (ng·mL ⁻¹)	测定结果/ (ng·mL ⁻¹)	回收 率/%	平均 /%	RSD /%
藁本内酯	121.823 9	60.911 9	179.351 9	94.44			欧当归内酯A	135.104 2	135.104 2	265.095 9	96.22	99.91	3.98
	121.823 9	60.911 9	184.478 9	102.86				135.104 2	135.104 2	278.897 4	106.43		
	121.823 9	60.911 9	178.543 5	93.12				135.104 2	202.656 3	341.096 4	101.65		
	121.823 9	121.823 9	237.993 7	95.36				135.104 2	202.656 3	346.803 0	104.46		
	121.823 9	121.823 9	238.636 9	95.89	97.37	4.71		135.104 2	202.656 3	341.255 8	101.72		
	121.823 9	121.823 9	234.179 8	92.23				44.900 6	22.450 3	66.314 5	95.38		
	121.823 9	182.735 8	304.625 0	100.04				44.900 6	22.450 3	68.252 0	104.01		
	121.823 9	182.735 8	315.153 4	105.80				44.900 6	22.450 3	66.808 7	97.59		
	121.823 9	182.735 8	297.291 1	96.02				44.900 6	44.900 6	89.230 1	98.73		
	183.234 2	91.617 1	280.073 9	105.70			人参皂苷 Re	44.900 6	44.900 6	91.613 5	104.04	101.26	3.61
183.234 2	91.617 1	276.691 3	102.01				44.900 6	44.900 6	91.101 2	102.90			
183.234 2	91.617 1	272.905 6	97.88				44.900 6	67.350 9	112.265 6	100.02			
183.234 2	183.234 2	365.215 9	99.32				44.900 6	67.350 9	116.953 7	106.98			
毛蕊花糖苷	183.234 2	183.234 2	380.028 2	107.40	99.57	4.65		44.900 6	67.350 9	116.912 5	106.92		
	183.234 2	183.234 2	356.704 2	94.67				36.410 0	18.205 0	54.301 0	98.28		
	183.234 2	274.851 3	454.559 1	98.72				36.410 0	18.205 0	53.624 7	94.56		
	183.234 2	274.851 3	442.727 2	94.41				36.410 0	18.205 0	53.192 2	92.18		
	183.234 2	274.851 3	469.624 6	104.20				36.410 0	36.410 0	73.657 7	102.30		
	329.534 4	164.767 2	486.128 6	95.04			人参皂苷 Rg1	36.410 0	36.410 0	73.882 1	102.92	99.06	5.39
	329.534 4	164.767 2	504.221 6	106.02				36.410 0	36.410 0	74.518 5	104.66		
	329.534 4	164.767 2	482.860 2	93.06				36.410 0	54.615 0	89.206 8	96.67		
	329.534 4	329.534 4	651.708 4	97.77				36.410 0	54.615 0	87.234 1	93.06		
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	329.534 4	329.534 4	656.909 3	99.34	99.96	4.28		36.410 0	54.615 0	91.372 1	100.64		
	329.534 4	329.534 4	659.365 7	100.09				30.921 3	46.381 9	78.167 2	101.86		
	329.534 4	494.301 6	842.370 3	103.75				30.921 3	46.381 9	79.834 9	105.46		
	329.534 4	494.301 6	825.829 9	100.40				30.921 3	46.381 9	75.557 2	96.24		
	329.534 4	494.301 6	807.073 9	96.61				30.921 3	46.381 9	75.6230	96.38		
	135.104 2	67.552 1	202.761 7	100.16			人参皂苷 Rb1	30.921 3	46.381 9	76.440 5	98.14	99.82	3.64
	135.104 2	67.552 1	198.980 5	94.56				30.921 3	46.381 9	79.638 4	105.03		
	135.104 2	67.552 1	203.628 3	101.44				30.921 3	46.381 9	75.633 1	96.40		
	135.104 2	135.104 2	267.102 9	97.70				30.921 3	46.381 9	76.496 4	98.26		
	121.823 9	60.911 9	179.351 9	94.44				30.921 3	46.381 9	77.763 1	100.99		

表4 补气通络胶囊10批供试品含量测定结果(已换算为给药剂量)

Table 4 Content determination results of 10 batches of *Buqi Tongluo Capsules* tested products[化合物含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)]

批号	丹酚 酸B	川芎嗪	黄芪 甲苷	姜黄素	丹参 酮II A	藁本 内酯	毛蕊 花糖苷	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	欧当归 内酯A	人参 皂苷 Re	人参 皂苷 Rg1	人参 皂苷 Rb1
20190101-1	39.763 6	46.953 7	20.156 4	25.682 2	13.165 2	26.062 5	38.348 4	63.459 3	26.801 1	5.476 2	11.325 3	5.529 7
20190101-2	37.381 9	45.757 5	17.743 1	24.255 8	15.657 8	23.804 5	38.166 8	67.983 2	28.087 8	8.479 5	8.212 0	6.403 4
20190401-1	35.359 2	58.209 8	18.647 5	23.572 2	14.115 3	24.188 4	31.759 7	59.916 9	27.009 4	7.580 4	12.750 5	6.736 0
20190401-2	47.375 6	51.210 2	15.930 7	26.035 7	13.202 5	24.364 8	36.646 8	65.906 9	27.020 8	8.980 1	7.282 0	6.184 3
20191001-1	35.247 2	45.060 7	20.701 6	23.765 7	16.074 0	26.196 2	38.242 5	66.306 2	38.421 7	6.220 2	8.999 7	7.276 7
20191001-2	43.458 2	47.005 8	17.135 4	25.795 3	15.568 4	23.893 1	34.042 8	56.737 4	26.346 0	6.335 8	11.856 7	6.414 8
20200201-1	38.888 3	48.842 2	16.858 7	23.285 4	13.009 8	25.627 9	37.831 9	72.071 9	37.194 1	5.591 0	8.495 5	6.649 4
20200201-2	42.859 4	52.600 9	15.933 0	25.089 8	14.943 5	24.596 8	28.094 9	66.863 1	29.629 6	8.532 7	7.493 0	7.852 0
20200901-1	36.017 5	40.451 0	20.752 0	26.976 7	15.396 8	23.810 1	33.807 2	72.333 6	33.540 2	5.568 8	8.223 7	5.203 3
20200901-2	39.609 0	46.571 8	21.517 9	24.893 9	14.645 0	24.834 7	38.760 4	60.117 7	35.356 9	6.058 7	7.395 9	7.923 6

3 讨论

本研究 UPLC-TOF-MS 测定完成后,经 AB Sciex Analyst Software 1.6 软件比对检索,发现补气通络胶囊中含有多种成分,主要涉及黄酮、皂苷、香豆素、萜类等。其中,多个成分虽在检测中具有较高的信号强度,但这些成分的化学结构目前尚未明确,且经检索中国食品药品检定研究院等对照品供应商网站,并未找到这些化合物的市售对照品,因此,本研究未将它们列入候选成分进行下一步考察。为更好、广泛地获取补气通络胶囊的成分信息,建议在后续研究中,对上述未知成分进行更加精细的提取、分离、纯化,并采用核磁共振等技术获取上述成分的结构信息,为深入研究该制剂的治疗功效和药效物质提供科学依据。

研究表明,PXR 被激活呈高表达时,会刺激 AMPK、ERK 等下游靶标,增强其活性,进而加速细胞的生成和能量、代谢物的转运。同时,PXR 作为核受体,也能够对机体 ATP 合成以及靶器官血流量起到显著的调控作用。在补气通络胶囊中 PXR 激动活性成分的作用下,机体基础代谢率升高,细胞分裂、损伤组织修复所需的氨基酸、蛋白、ATP 等内源性成分加速向损伤部位转运和富集,加速了这些部位的修复和组织再生。

目前为止,尚未见到补气通络胶囊方中各药味的 PXR 调控活性研究。其原因主要是,PXR 的研究报道集中于糖脂、胆固醇代谢及与之相关的炎症、氧化应激、肝损伤等领域^[23-24]。研究表明,三七皂苷对药物代谢酶 CYP3A 具有抑制作用^[25]。三七所含化学成分与红参具有一定的相似性,能够从间接角度证明以 PXR 为切入点研究补气通络胶囊功效机制的科学性。关于复方中药 PXR 调控活性的研究,则表明多种黄酮类成分也有较强的 PXR 调控活性^[26]。上述研究成果虽不能作为补气通络胶囊中所含成分通过影响 PXR 表达发挥功效的直接证据,但能够为同一类型或类似结构成分的活性筛选以及功效机制研究提供方向以及间接证据,即通过比较功效相似的药味、成分或复方制剂,找到研究其机制和药效物质的切入点,进而明确化学成分与相关靶标间的作用。

本研究的 PXR 调控活性考察结果显示,除阿魏酸外,其余所有在飞行时间质谱中鉴定出并被

列为候选的成分,均能够显著调控 PXR 表达。但是,这些成分对 PXR 的影响呈两极分化的趋势,即部分成分具有明显的 PXR 表达抑制活性,另一部分成分则具有明显的 PXR 激动活性。具体而言,皂苷和部分黄酮类成分,如人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb3、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、姜黄素等成分能够显著抑制 PXR 表达,而丹参酮 II A、欧当归内酯 A、藁本内酯、川芎嗪、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷等成分则能够明显刺激 PXR 表达。研究表明,PXR 低表达时,生物体内脂质、胆固醇等物质的含量显著下降,其原料、前体物质,如脂肪酸、胆汁酸则呈现明显的分解、代谢、外排等情况,胆固醇代谢相关上下游基因的活性产生明显改变,机体能量代谢也呈上升趋势。反之,PXR 高表达时,能量消耗减少,脂质、胆汁酸合成量增加,同时,体内炎症因子水平和氧化应激反应明显下降,炎症反应受到抑制,损伤肝组织一定程度得到恢复。因此,药物特别是复方中药发挥 PXR 调控作用时,其具体功效可能会因为该药所含化学成分的这种相抵触的活性而受到影响。换言之,为更好地发挥目标功效,在设定药物工艺和质量评价指标时,除应设定具有目标活性的成分的含量下限外,还需对具有无关甚至相反功效的成分的含量上限进行控制。

本研究的含量测定结果显示,绝大部分批次的补气通络胶囊中对 PXR 起激动活性的成分含量均大于 25 $\mu\text{g/mL}$,表明这些成分具备足够发挥功效活性所需的体内药量的可能性;而 PXR 抑制活性成分中,只有姜黄素基本达到活性测试的最低浓度,表明大多数抑制活性成分不具备达到发挥其功效所需的药物浓度。综合两方面成分含量测定结果,可知补气通络胶囊所含化学成分主要发挥 PXR 激动活性,抑制活性因相关成分含量较低而不明显表现,且无法与前者形成对冲。PXR 激动活性成分主要来自于丹参、川芎、当归和黄芪,抑制活性成分则主要来自红参、姜黄。含量测定结果表明,前 4 种药味中各活性成分含量较高,而后 4 种药味中活性成分含量较低,这可能是由于补气通络胶囊为全方水提,部分成分可能未被有效提取或在提取过程中水解。但是,上述结果并不能表明红参、姜黄对疗效无贡献或存在破

坏性。这是因为红参具有增强免疫力、补气血的功效，而姜黄的活血化瘀功效也较强。上述2个药味对补气通络胶囊药效的贡献机制及其具体药效成分，有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 赵淋淋. 小鼠骨骼肌挫伤修复过程中肌再生因子、炎症因子及趋化因子的表达规律研究[D]. 上海: 上海体育学院, 2017.
- [2] 唐国根, 卢建华, 陆超峰. 健骨愈折汤改善桡骨远端骨折掌侧钢板内固定术后旋前方肌损伤30例[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(11): 841.
- [3] 朱蓉雪, 姜迎萍. 梨状肌损伤综合征中医治疗进展概况[J]. 新疆中医药, 2018, 36(5): 99-100.
- [4] 罗琳, 伍光辉, 杨杰翔, 等. 丹参川芎嗪注射液结合低分子肝素钙对脊柱骨折后下肢深静脉血栓的预防效果观察[J]. 世界中医药, 2019, 14(8): 2073-2076, 2082.
- [5] 杨志东, 韩清明, 梁笃, 等. 补气通络方对大鼠坐骨神经急性挤压伤功能恢复的影响[J]. 中医正骨, 2003, 15(6): 3-4, 63.
- [6] 姚珍松, 梁德. 补气通络方对大鼠坐骨神经急性挤压伤后功能恢复的干预效应[J]. 中国临床康复, 2005, 9(41): 96-98.
- [7] 杨志东, 江晓兵, 梁德, 等. 补气通络胶囊对颈前路减压植骨融合钢板内固定术治疗脊髓型颈椎病疗效的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(4): 301-303, 310.
- [8] 程永菲, 余年, 狄晴. 下调孕酮X受体表达对谷氨酸诱导的小鼠脑微血管内皮细胞P-糖蛋白表达和功能的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2018, 31(6): 450-455.
- [9] HOGLE B C, GUAN X, FOLAN M M, et al. PXR as a mediator of herb-drug interaction[J]. J food Drug Anal, 2018, 26(2S): S26-S31.
- [10] HUDSON G, FLANNIGAN K L, VENU V K P, et al. Pregnane X receptor activation triggers rapid ATP release in primed macrophages that mediates NLRP3 inflammasome activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370(1): 44-53.
- [11] 李伟霞, 王晓艳, 唐进法, 等. 基于PLS-DA和多指标综合指数法研究当归-川芎药对对急性血瘀大鼠血清中血管活性物质和黏附分子的影响[J]. 药学学报, 2019, 54(11): 1909-1917.
- [12] 吴作敏, 郭丽娜, 王单单, 等. 黄芪-川芎药对治疗脑卒中的网络药理学研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1749-1756.
- [13] 思志强, 张莹, 贾英杰. 中药黄芪防治骨质疏松研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(10): 211-214.
- [14] 高立霞, 潘韦韦, 金美英, 等. 当归的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2019, 39(8): 1013-1016, 1020.
- [15] 屈勇, 李慧琴, 李玉娥, 等. 复方当归注射液穴位注射治疗血瘀型腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(5): 742-744.
- [16] 孙亮亮, 章煌杰, 鲁琛, 等. 补肾活血中药“杜仲-当归”治疗骨性关节炎的作用及机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2639-2644, 2826-2828.
- [17] 马兆臣, 陈奎奎, 李月婷, 等. 丹荷颗粒25种特征性成分LC-MS测定及制剂一致性分析[J]. 中草药, 2019, 50(24): 5970-5979.
- [18] 王慧卓, 彭代银, 陈卫东, 等. LC-MS/MS鉴定大鼠血浆中桃红四物汤有效成分[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(3): 69-73.
- [19] 贺敏, 王猛猛, 吴雨, 等. 补中益气汤6个成分在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(11): 159-163.
- [20] 陈蓬, 印晓红, 王建方, 等. 三七药酒HPLC指纹图谱研究及共有峰LC-MS鉴定[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 2090-2097.
- [21] 王若柳, 王海强, 范晓辉, 等. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS分析参麦注射液中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 555-564.
- [22] 方旖旎, 王雅丽, 陈惠琴, 等. 不同产地姜黄甲醇和石油醚部位化学成分的比较分析[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1989-1995.
- [23] 陈群, 徐喆, 孙华, 等. 孕酮X受体生物特性及其在药物代谢中的作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(3): 241-246.
- [24] 付冉, 王小楠, 丁琮洋, 等. 孕酮X受体在药物性肝损伤中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 892-896.
- [25] 杨子明, 杨秀芬. 三七总皂苷对大鼠肝组织内药物代谢酶CYP3A的抑制作用及其动力学分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3486-3489.
- [26] CHEN Z, LI D, LI X Y, et al. The anti-hyperlipidemia effect of Yinlan capsule via regulation of PXR activity [J]. Phytomedicine Plus, 2021, 1(3): 100086.

【责任编辑: 侯丽颖】