



第五届全国药物分析大会

论文集

主办单位： 全国药物分析大会理事会

承办单位： 中国药科大学

协办单位： 药物质量与安全预警教育部重点实验室

中国药科大学药物分析学国家重点学科

中国药科大学科学技术协会

江苏省食品药品监督检验研究院

江苏省药学会药物分析专业委员会

2015年11月4-6日 南京·中国药科大学

目 录

药品标准与质量控制

1. 指纹图谱结合一测多评模式对中药牛膝质量控制的系统性研究 孙亮亮, 吴虹 (2)
2. 对叶百部质量标准研究 张亚中, 陶冶, 班永生, 黄丽丹, 金斌 (3)
3. 定量核磁共振在中药质量控制中的应用 伍建林, 李娜 (4)
4. 一测多评法在山楂叶质量控制中的应用 杨明宇, 李艳荣, 潘海峰 (4)
5. 美国药典 USP<232>无机杂质元素检测的解决方案 宋晓红, 杨乐, 冯旭, 段伟亚, 杨桂香 (5)
6. 岛津便携式拉曼光谱仪快速鉴定药物成分及测试药包材对药物鉴定的影响 王娟娟, 孙友宝, 郑伟, 马晓玲, 盖荣银, 黄涛宏, 马俪 (6)
7. 石墨炉原子吸收法测定降压化药中的残留钯含量 钟跃汉 (6)
8. GC-MS/MS 法测定中药材中 74 种农药残留含量 杨卉彦 (7)
9. ASE-LC-TOF/MS 法同时测定清肝散结方中 29 个化学成分的含量 赵亮, 李云青, 李洋, 钱跣, 张国庆, 柴逸峰 (7)
10. 拉曼光谱与药品快检 陆峰, 柴逸峰 (10)
11. TLC-SERS 法快速鉴别弱主药信号药品中结构类似药品 李晓, 柴逸峰, 陆峰 (11)
12. 拉曼光谱法快速鉴别雷贝拉唑钠的晶型研究 陈辉, 孙宁云, 陆峰 (12)
13. 元胡止痛片中染色物金胺 O 的 TLC-SERS 研究 王磊, 柴逸峰, 陆峰 (12)
14. 纸基-表面增强拉曼光谱法检测染色掺伪的红花药材 李丹, 朱青霞, 柴逸峰, 陆峰 (13)
15. 芬太尼双层口颊片 UHPLC 快速分析方法的建立 何京亚, 张雨, 杨铁虹, 吴红 (15)
16. 他克莫司异构体的制备及质量研究 傅慧灵 (16)
17. 采用超声辅助提取毛细管电泳电化学发光同步测定红花石蒜中加兰他敏、石蒜伦碱、高石蒜碱及多花水仙碱 孙双姣, 韦艳芬, 隆婵娟, 邓必阳 (17)

18. 藤茶的产地加工方法对二氢杨梅素含量的影响
..... 王淼, 覃洁萍, 奉艳花, 黄志飘, 刘鹏飞 (17)
19. Systematic study on QAMS method for simultaneously determination of
triterpenoid saponins in *Ilex Pubescens* by HPLC and UPLC.....
..... Guojun Kuang, Jie Zhou, Meicun Yao, Qing
long Tan, Longkai Qi, Jianhui Liang, Yu Li, Zhongxiang Zhao, Lei Zhang (18)
20. 一测多评法测定咽立爽口含滴丸中 4 种成分含量
..... 游正琴, 罗奕, 吴琳琳, 茅向军, 苏菊 (19)
21. 在线高效液相色谱-生物化学检测快速筛选中药药效成分
..... 丁晓萍, 定天明 (20)
22. 湖北省药品近红外光谱快速检验技术的应用及展望 张立 (21)
23. UPLC 法测定香连制剂中木香烃内酯、去氢木香内酯的含量..... 陈晓颢 (22)
24. 一种能同时鉴别人参、西洋参、三七的多重 PCR 方法
..... 刘丽, 肖炳焱, 罗晖明, 聂平, 李文莉 (22)
25. 含乳香没药血竭的中成药中松香酸的检测方法初探 刘卉 (24)
26. UPLC-Q-TOF MS 法分析泽兰中化学成分. 任强, 王云龙, 聂其婷, 王慧云 (26)
27. 超临界流体色谱结合质谱联用技术快速分离三萜皂苷
.... 黄洋, 张婷婷, 周海波, 冯颖, 范春林, Jacques Crommen, 江正瑾 (27)
28. 高效液相色谱法测定创新药 SHR4640 的有关物质
..... 王菊, 武乖利, 李语如, 杭太俊, 卢韵 (28)
29. 运用液质联用技术对连翘中四种黄酮醇类化合物抗氧化活性进行定量研究
..... 黄荣清, 李一鸣, 杨建云, 肖炳坤 (30)
30. 非衍生化毛细管电泳测定啤酒中的氨基酸 罗添, 柯静, 董钰明 (31)
31. 消白颗粒的质量标准提升研究 苏华, 廖欣, 江静怡, 陆崧, 乔立业 (31)
32. 结构选择性 SERS 衬底的构建及其对青霉素药物中青霉噻唑酸的快速检测
..... 张丽颖, 都述虎 (32)
33. 飞行时间串联质谱分析不同干燥方法对蟾酥质量的影响 牛会霞 (34)
34. 铁皮石斛指纹图谱及化学成分研究
..... 邵自星, 梁晓萍, 王义明, 罗国安, 梁琼麟 (35)
35. 基于液质联用技术的骨刺胶囊多维指纹图谱分析
..... 冯燕燕, 谢媛媛, 王义明, 罗国安 (36)
36. 糖肾方化学物质基础研究 连琦, 谢媛媛, 王义明, 梁琼麟, 罗国安 (37)

37. 二羟二丁基醚及其手性杂质的毛细管 GC 法分离
 张玉霞, 谢红英, 王梦丽, 冯亚男, 陈芙蓉, 宁欣, 徐小平 (38)
38. 肿瘤血管抑制剂 DX-1002 结构的 NMR 确证
 陈芙蓉, 宁欣, 张玉霞, 李丹, 林洁, 雍智全, 徐小平 (38)
39. 响应面法优化连翘苷超声提取工艺研究 由鹏飞, 郭伟良, 张桂荣 (39)
40. 基于凝胶电泳技术黄芪多糖指纹图谱分析方法的建立与应用
 郝霞, 李科, 高凡茸, 王桂臻, 秦雪梅 (40)
41. 流动注射-离子交换-电感耦合等离子体发射光谱法在线分离检测胶囊中六价铬
 李丹, 俞晓峰, 韩双来, 许旭 (41)
42. 高含糖量样品痕量挥发性成分的低温顶空捕集阱气相色谱-质谱分析方法研究 .
 苏越, 陈房姣 (42)
43. 花椒局麻成分分离及其药动学研究
 荣荣, 张启丽, 张美燕, 于治国, 赵云丽 (43)
44. 分子印迹聚合物掺杂碳糊电极用于雌酮硫酸钠的检测
 李迎春, 宋含, 罗俊, 张路, 刘杰 (44)
45. 丹参中酚酸类成分亲水色谱保留行为研究
 黄竞怡, 佟玲, 孙万阳, 宋云飞, 苗敬茁, 谢秀满 (45)
46. 中药大复方质量生物评控方法研究—以养血清脑颗粒为例
 李晓稳, 佟玲, 李东翔 (46)
47. 养血清脑颗粒超高效液相色谱数字化定量指纹图谱研究
 李东翔, 佟玲, 李晓稳 (47)
48. 化学发光免疫分析法检测中药中重金属和农药残留
 欧阳辉, 舒棋, 杨诗嘉, 王雯雯, 付志锋 (48)
49. 苦木注射液总生物碱含量测定的显色光度法研究
 郝盛源, 刘卉, 周亚楠, 李方悦, 许卉 (49)
50. 同时测定新疆紫草中 7 种主要羟基萘醌成分含量的 RP-HPLC 方法研究
 李方悦, 刘卉, 郝盛源, 李红, 许卉 (50)
51. 硫代脯氨酸结构新型质谱手性衍生生化试剂的开发及分离效能的研究
 李喜玲, 闵俊哲 (50)
52. UPLC-MS/MS 法同时测定益智仁中 25 种活性成分
 孙志, 侯蕾, 孔祥祯, 康建, 张晓坚 (51)
53. 拉曼光谱无损快速筛查液体制剂的方法 赵瑜, 尹利辉 (52)

54. 低分子量肝素 ^{13}C 核磁共振波谱法定性鉴别方法研究
 张琪, 王爱法, 李慧义, 范慧红, 杨化新, 肖新月, 李晓东 (53)
55. 国际药典中阿苯达唑咀嚼片质量标准修订 朱俐, 刘洋, 尹利辉 (55)
56. 桑叶中生物碱类成分定性和定量分析研究 沈小月, 宋敏, 杭太俊 (56)
57. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 法的兴安杜鹃叶多成分的定性定量研究
 王丽娟, 朱小雨, 娄心薇, 郑枫, 柳文媛, 冯锋, 谢宁 (58)
58. 基于超快速液相-离子阱/飞行时间质谱的大黄不同炮制品代谢组学研究
 王敏, 付金凤, 郭慧敏, 田媛, 许风国, 宋瑞, 张尊建 (58)

药物一致性评价

59. LCMS 直接检测磷酸盐体系下磺胺类药物中的杂质
 郝红元, 李强, 宋玉玲, 姚劲挺, 黄涛宏 (62)
60. 盐酸氨溴索片在 4 种溶出介质中的体外溶出研究
 余佃宝, 申玲玲, 郝红元, 詹松, 姚劲挺, 黄涛宏 (62)
61. 兰索拉唑肠溶胶囊有关物质检测不同色谱柱的比较实验 孙仲葆 (63)
62. 硫酸奈替米星有关物质 HPLC-PED 法的建立
 赵卫, 吴宇宁, 陈达, 袁耀佐, 张玫, 樊夏雷 (65)
63. 杂质 4-表多西环素的制备及其在质量标准中的应用研究
 张娅, 张锦琳, 赵述强, 袁耀佐, 张玫, 樊夏雷, 王亚楼 (67)
64. 高效液相色谱法测定杯芳烃磺酸钠及其有关物质
 杨建云, 邹磊, 肖炳坤, 黄荣清 (68)
65. 利用 UPLC-TQ-MS 比较蟾酥鲜品和蟾酥商品化学成分
 王子月, 周婧, 马宏跃 (69)
66. 药物透皮吸收系数试验测定及其应用 孙晓迪, 张伟, 宋静, 刘建芳 (70)
67. HPLC-MS/MS 分析葛根芩连汤发酵前后化学成分的变化
 杜晨晖, 闫艳, 苗艳琴, 冯红霞, 宋强 (70)
68. 贝伐单抗仿制药电荷异构体的分离表征、体外活性和大鼠体内药代动力学评价
 王宁, 赵燕燕, 刘万卉 (71)
69. LC-MS 法分析盐酸西那卡塞有关物质... 胡钟芳, 曾雪芳, 宋敏, 杭太俊 (72)
70. 高效液相色谱法测定依普利酮原料药有关物质的方法学研究
 陈静, 潘春燕, 宋敏, 杭太俊 (74)

71. 头孢妥仑匹酯有关物质的色谱-质谱结构鉴定 李曼琳, 张梦悦, 宋敏, 杭太俊 (76)
72. 衍生化方法测定 L-鸟氨酸盐酸盐中有关物质研究 张梦悦, 宋晓妮, 殷潇雅, 宋敏, 杭太俊 (78)
73. 糖尿病新药 G004 的含量测定和有关物质研究 洪春艳, 乔洲, 郭亚辉, 周金培, 柳文媛, 张惠斌 (80)
74. 液质联用技术鉴定阿哌沙班有关物质 吕广云, 杭太俊, 宋敏 (81)
75. 中药注射液中 5-羟甲基糠醛二聚体的 LC-MS/MS 定量分析方法及其在市售药品中的筛查 高杨, 黄罗娇, 臧清策, 林生, 靳洪涛, 贺玖明, 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜 (82)
76. Comparison of three kinds of Citri Reticulate Pericarpium based on DNA barcoding and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with chemometrics analysis XiaoXue Yu, RongWei Yan, WanLin Zhong, DongMei Wang, Lin Jiang, Xinjun Xu (83)

药物活性分析

77. 雷公藤相杀、相偎配伍后雷公藤内酯甲的研究 许坡, 孟楣, 张静, 江莹, 唐利宇 (86)
78. 基于微透析技术及 LC-MS/MS 测定 AA 大鼠关节腔透析液中槲子苷的浓度 王伟, 吴虹, 孙亮亮, 李淑萍, 汪蓉, 王文宇, 张峥嵘, 戴丽 (87)
79. 槲子苷在佐剂型关节炎大鼠体内代谢产物的研究 汪蓉, 吴虹, 王伟, 孙亮亮, 李淑萍 (87)
80. 以心肌细胞线粒体为靶点的中药复杂体系活性成分快速筛选新方法构建 杨兴鑫, 徐风, 王丹, 杨志伟, 谭焕然, 尚明英, 王璇, 蔡少青 (88)
81. 基于表面等离子共振原理的中药中抗炎活性成分的筛选及其初步作用研究 曹岩, 李英华, 吕狄亚, 谢斐, 张俊平, 柴逸峰 (89)
82. 基于 LC-MS 技术的代谢组学研究慢性肾脏病-矿物质骨代谢异常相关的代谢通路变化 吴琼, 赖学莉, 朱臻宇, 洪战英, 董昕, 郭志勇, 柴逸峰 (90)
83. 基于纳米氧化铜修饰电极的生地中地黄苷 D 含量测定 .. 孙照霞, 余丽双 (91)
84. 研究药物与蛋白质相互作用的新策略 邓必阳 (92)
85. Systematic study on the absorption characterization effects and mechanism of saponins in *Ilex pubescens* Hook. Et Arn in rats using single pass intestinal

- perfusion model and UPLC method... Guojun Kuang, Chenchen Zhu, Shixia Guan, Li Lin, Jie Zhou, Zhongxiang Zhao, Lei Zhang (92)
86. 基于多种质谱采集技术和数据分析策略的紫菀次级代谢产物快速鉴定 孙宇鹏, 万昶宸, 刘艳艳, 杨浩天, 张兰桐 (94)
87. 高效液相色谱法测定健骨口服液中补骨脂素的含量 孙亮, 郑巍, 倪东杰, 韦庆, 孔飞飞, 王翔, 郭良君 (94)
88. 基于 LC-MS 技术探究半夏厚朴汤对大鼠抗抑郁的作用机制 沈淑洁, 黄荣清, 肖炳坤, 杨建云 (95)
89. 基于 LC-MS 的尼克酰胺心肌保护机制亚细胞比较研究 王赫, 梁晓萍, 罗国安, 梁琼麟 (97)
90. 人工血管的构建并用于经血管转移癌症的模型研究 徐培迪, 罗国安, 梁琼麟 (98)
91. 辣椒碱的提取方法及生物活性研究进展 .. 李双双, 李倩, 李双, 郭春燕 (99)
92. UHPLC-Q-TOF-MS 技术用于栀子大黄汤抗酒精性肝损伤的配伍谱效关系研究.... 张晓书, 韩飞, 朱鹤云, 尹然 (101)
93. 肉苁蓉中松果菊苷、毛蕊花糖苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究 崔庆玲, 白雪薇, 曲宝, 潘英妮, 刘晓秋 (102)
94. 肉苁蓉中松果菊苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究 敖奇波, 潘英妮, 崔庆玲, 曹馨月, 王东影, 张雪妮, 王会良, 刘晓秋 (103)
95. 基于大分子表面交链的荧光聚合物纳米粒的信号放大及其核酸适体标记和癌细胞成像分析..... 谢洪平, 宋天梅, 魏同洪 (103)
96. 厚朴酚与和厚朴酚通过阻断 EGFR 信号通路抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长 张平, 贺晓双, 陈亮, 展颖转, 侯晓芳 (105)
97. 磁性分子印迹材料用于中药活性成分的分离分析 解笑瑜, 卜羽思, 王嗣岑 (106)
98. 细胞色谱法-研究药物与细胞作用的新方法 王嗣岑, 黄静, 魏芬 (106)
99. 血脂康抑制 HMG-CoA 还原酶活性的定量测定研究 王晶, 王晴, 孙吉叶, 沙春洁, 段震文, 刘万卉 (107)
100. 气相色谱法测定生物样品中短链脂肪酸的含量 王艳芳, 林佩, 陆建美, 俞捷 (108)
101. Antitumor effects and molecular mechanisms of DYC-160 on HepG-2 Cells.... Chunyun Lu, Lifeng Niu, Feifei Zuo, Ke Yao, Shaobo Xu, Xia Xu (109)

102. The effect of anti-tumor drug delivery carrier fullerene modified by hyaluronic acid on phase I enzymes and Peroxiredoxin II antioxidant enzymes Shaobo Xu, Ke Yao, Zhiyuan Tan, Xiaoyang Xu, Shuangyan Wei, Lifeng Niu, Chunyun Lu, Feifei Zuo, Xia Xu (109)
103. 荸荠多糖 BQ-I 的制备表征及活性分析研究 马湘炜, 戚程程, 张嵩, 阳娇娇, 王秋萍, 葛建 (110)
104. 葡萄籽原花色素 (GSP) 对胆汁酸吸附能力及调控脂质代谢机制分析 邱作洪, 何倩慧, 刘彩婧, 姜慧文, 杨斌英, 葛建 (112)
105. 尿样中儿茶酚胺类物质及其代谢物的 HPLC-ECD 含量测定研究 廖雪琴, 蔡婉玲, 谭梦茹, 刘琳, 陶凯丽, 冯芳, 杨功俊 (113)
106. 钩藤散抗阿尔兹海默症活性部位及成分研究 魏梦琳, 陈垒, 赵娇娇, 柳文媛, 冯锋 (114)
107. 无对照品辅助的 HPLC-DAD-ESI/MS (TOF) 和 HPLC-DAD-ESI/MS/MS (QQQ) 鉴别栀子大黄汤中 85 种化合物 邹玲玲, 罗凯文, 谢瑞, 史清水, 杨功俊, 冯芳 (115)
108. P-糖蛋白对石杉碱甲跨血脑屏障转运的影响 汪胡芳, 冯超, 张峻颖, 吴春勇 (116)
109. 抗肿瘤药物组织微区分布的质谱成像定量分析方法研究 宋肖炜, 罗志刚, 贺玖明, 李铁钢, 夏学军, 刘玉玲, 再帕尔·阿不力孜 (117)

药物安全性分析

110. 基于雷公藤配伍前后雷公藤内酯酮的含量变化探讨其减毒的理论机制 唐利宇, 孟楣, 张贺, 江莹, 许坡, 张静, 王芳 (120)
111. 液质联用测定佐剂性关节炎大鼠血浆中芍药苷浓度及其药代动力学研究 李淑萍, 吴虹, 王伟, 孙亮亮, 汪蓉, 王文宇, 张峥嵘, 戴丽 (121)
112. LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽 李长坤, 李月琪, 杨桂香, 黄涛宏 (121)
113. LCMS 测定毛发中的甲基苯丙胺含量.. 马超, 李月琪, 杨桂香, 黄涛宏 (122)
114. TLC-Dynamic SERS 法快速检测止咳平喘类中成药中非法添加的化学药物 方芳, 朱青霞, 柴逸峰, 陆峰 (123)
115. 投影二维相关光谱快速检测中药中非法添加的化学药品 苗丽, 柴逸峰, 陆峰 (124)

116. 氟西汀对文拉法辛大鼠体内药代动力学的影响研究
 宋林, 梁晨, 张润生, 洪战英, 柴逸峰 (125)
117. UPLC-MS/MS 法测定人血浆中左乙拉西坦浓度及药代动力学研究.....
 胡岚岚, 周娟, 徐颖, 刘丹, 张惠静, 汤建林 (126)
118. 钩藤碱兔体内代谢动力学及小鼠组织分布初步研究
 胡岚岚, 李晶晶, 徐颖, 周娟, 曹雯, 刘欢, 汤建林, 张惠静 (127)
119. 超声微透析与毛细管电泳-电化学发光联用用于研究苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的相互作用.....
 韦艳芬, 孙双姣, 汪浩, 唐莉福, 邓必阳 (128)
120. Simultaneous qualitative and quantitative determination of compounds in *Turkish galls* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high performance liquid chromatography-photo-diode array Jing Gong, QiongFeng Liao, ZhiYong Xie (129)
121. HPLC-DAD 法测定牛奶中 6 种氟喹诺酮类药物残留的研究.....
 杨勇, 罗奕, 吴琳琳, 杨娟艳, 茅向军, 许乾丽, 游正琴 (129)
122. 强阳离子型超高交联树脂的制备及用于痛风标志物的前处理分析
 章弘扬, 徐雅婷, 张田丽, 胡坪 (131)
123. 基于细胞膜色谱技术的药物诱发磷脂沉积风险筛选模型研究
 江正瑾, 赵祥龙, 王启钦 (132)
124. 液相色谱质谱串联法同时测定大鼠血浆中对乙酰氨基酚及其代谢产物的方法学研究... 杨方秀, 汪玉馨, 刘霞飞, 陆益红, 汤道权, 杨冬芝, 樊夏雷 (132)
125. 手性柱色谱-串联质谱联用法同时测定人血浆中左旋和右旋兰索拉唑的浓度 ...
 孙鲁宁, 方云茜, 焦慧文, 李玥琦, 杨志成, 张宏文, 王永庆 (133)
126. 采用分子印记纳米磁珠“多靶垂钓-定向捕集”-LC/ESI-QTOF-MS/MS 技术对大鼠血样中蒽类和蒽醌类活性代谢物质群的选择性富集与快速鉴定研究.....
 洪俊丽, 杨载月, 蔡奇志, 朱婉莹, 王溪, 周学敏 (134)
127. 三重四级杆串联质谱分析杀虫剂和重金属污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平 ...
 王佳佳 (135)
128. 四级杆串联质谱分析苯嘧磺隆污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平
 周婧, 马宏跃, 吴启南 (137)
129. 模拟肿瘤组织缺氧微环境的单细胞阵列彗星电泳芯片及其应用于抗肿瘤药物细胞毒性与基因毒性分析.....
 李莉莉, 罗国安, 梁琼麟 (137)

130. 吡嗪酮对映体的代谢分析.....王海钠, 房中则, 郑阳, 周昆, 胡长艳, Kristopher W Krausz, 孙德群, Jeffrey R. Idle, Frank J Gonzalez (138)
131. Ultra-trace analysis of 12 β_2 -agonists in food animal muscles by UHPLC-Q-Orbitrapihigh resolution mass spectrometry Changchuan Guo, Feng Shi, Liping Gong, Su Zeng (139)
132. 气相色谱法测定人血白蛋白中辛酸钠含量的优化研究 戚瑞卿, 石峰, 巩丽萍, 邢晟, 梁翠荣 (140)
133. 基于代谢组学技术的柴胡醋制前后毒性作用的比较研究 范玛莉, 孙慧敏, 李震宇, 秦雪梅 (141)
134. 手性 LC-MS/MS 分析大鼠血清中的利伐沙班 闫茜, 王会琳, 于一文, 徐娜, 高建平, 潘仙华, 许旭 (141)
135. 反相超效液相色谱-质谱联用分离分析食用油中的甘油三酯 何榕, 山晓琳, 董方圆, 韩璐, 许旭 (142)
136. UPLC/Q-TOF-MS 鉴定大鼠灌胃盐酸小檗碱后体内的代谢产物..... 刘欢, 阎家齐, 韩方辉, 于丽颖, 刘中博 (143)
137. UPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 4 种成分及其药代动力学研究..... 魏岚, 王小波, 美丽丽, 孙立新 (144)
138. 注射用丹参多酚酸在大鼠体内代谢产物及途径分析 苗敬茁, 佟玲, 孙万阳, 刘小琳, 孙国祥 (145)
139. 固相萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定养血清脑颗粒中 99 种农药残留 刘小勤, 孟文婷, 张永志, 佟玲 (146)
140. 肿瘤血管抑制剂 XY-02 与 CA4P 的组织分布比较研究 宁欣, 雍智全, 张玉霞, 陈芙蓉, 徐小平 (147)
141. 细胞膜色谱用于中药注射液致敏组分筛选的研究及应用 韩省力, 张涛, 贺浪冲 (148)
142. 应用二维液相色谱方法快速测定血必净注射剂中潜在致敏与有效成分的含量..... 林园园, 马维娜, 张杰, 卢闻, 孙萌 (149)
143. Effects of Follicle-stimulating Hormone (FSH) on Metabolism of Cholesterol in vitro..... Ke Yao, Zhiyuan Tan, Xiaoyang Xu, Shuangyan Wei, Lifeng Niu, Chunyun Lu, Feifei Zuo, Shaobo Xu, Xia Xu (151)

144. Pharmacokinetic interaction between simvastatin and flavonoids extracted from hawthorn fruits, a kind of plant with anti-hyperlipidemia function Feifei Zuo, Lifeng Niu, Chunyun Lu, Ke Yao, Shaobo Xu, Xia Xu (151)
145. Pharmacokinetics, tissue distribution and metabolism studies of Flavokawain A, a novel anti-bladder cancer chalcone compound. Lifeng Niu, Feifei Zuo, Ke Yao, Shaobo Xu, Luchun Yun, Xia Xu (152)
146. 紫堇灵在大鼠体内药动学及其在中药复方双花百合片中潜在相互作用研究 刘瑞娟, 丁黎 (153)
147. 梔子大黄汤中 4 种蒽醌成分在大鼠体内的组织分布研究 姜悦, 孟瑾, 王丹, 王淼, 许淑珍, 史清水, 杨功俊, 冯芳 (154)
148. HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中重酒石酸卡巴拉汀及其代谢物 NAP226-90 的浓度. 俞彬滨, 朱碧楠, 陈静, 宋敏, 杭太俊 (155)
149. 采用液相色谱串联质谱法同时定量测定两种苦木生物碱在大鼠体内的药动学 侍媛媛, 洪春艳, 徐建, 杨晓玲, 谢宁, 柳文媛, 冯锋 (158)
150. 梔子厚朴汤配伍对厚朴酚与和厚朴酚的药代动力学和脑组织分布的影响 刘媛, 王娟, 闫艳, 史清水, 杨功俊, 冯芳 (159)
151. 盐酸度洛西汀在健康人体内的药代动力学研究 吴莎, 王双双, 杭太俊, 宋敏 (160)
152. 肠道菌 NR 酶与小檗碱的转化和吸收 寿伽文, 蒋建东, 王琰 (162)
153. Metabolic Dynamic Responses of Rats to the aqueous extract of Cinnamomi Cortex Exposure Wei lin, Deng Xuejiao, Zhang PeiTing, Lin Manna, Xie Zhiyong, Liao Qiongfeng (163)
154. Simultaneous determination of four furostanol glycosides in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to PK study after oral administration of Dioscorea nipponica extracts Min Liao, Meicun Yao (164)

组学与药物分析信息学

155. 知母百合协同抗抑郁的代谢组学研究 杜红丽, 赵红霞, 董昕, 娄子洋 (167)
156. 基于 NMR 与 LC/MS 分析技术的肝细胞肝癌与肝硬化血清代谢组学研究 刘悦, 赵亮, 张国庆, 柴逸峰 (168)

157. 炎症性肠病及雷公藤红素治疗作用的脂质组学研究..... 王仁萍, 辜雪琴, 戴蔚
荃, 叶隽, 陆峰, 柴逸峰, 范国荣, Frank J. Gonzalez, 段更利, 亓云鹏 (169)
158. 反卷积法研究酒石酸唑吡坦双层缓释片体内外相关性
..... 张倩倩, 柴逸峰, 陆峰 (170)
159. 基于概率神经网络分析的石斛药材 HPLC 图谱鉴别
..... 马骁, 姚泽炳, 王建, 江舟 (171)
160. 基于化学蛋白组技术的脂质过氧化产物修饰谱动态定量分析 杨靖 (171)
161. 基于 UHPLC-QTOF-MS 技术的血清鞘脂组学分析新方法研究
..... 章弘扬, 仰贤莉, 万幸, 胡坪 (172)
162. 基于药物代谢组学对健康受试者体内阿托伐他汀药代动力学个体差异性的预测
..... 黄青, 阿基业, 王广基, 周国华 (173)
163. 金铃子散镇痛作用的代谢组学初步研究 黄荣清, 水素芳, 沈淑洁 (174)
164. 半夏厚朴汤在慢性应激大鼠模型中抗抑郁效应的代谢组学研究
..... 黄荣清, 胡秋菊, 杨建云, 肖炳坤 (176)
165. ¹H NMR 技术用于金铃子散抗炎标记物的探索.....
..... 沈淑洁, 肖炳坤, 杨建云, 黄荣清 (177)
166. 基于 ¹H-NMR 及 LC-MS 代谢组学技术研究贯叶连翘对自然更年期(衰老)大鼠模
型的影响..... 沈淑洁, 黄荣清, 肖炳坤, 杨建云 (179)
167. 蛋白质-代谢物组相互作用的代谢组学新方法研究
..... 梁晓萍, 罗国安, 梁琼麟 (181)
168. 基于定量代谢组学的多囊卵巢综合征机制探讨
..... 范雪梅, 龚菊梅, 蒋建发, 王义明, 孙爱军, 罗国安 (182)
169. 基于网络药理学的糖肾方靶点预测和机制探究
..... 黄志强, 范雪梅, 王义明, 罗国安 (184)
170. 基于网络药理学方法探讨阿帕替尼治疗乳腺癌的作用机制
..... 朱婉婷, 范雪梅, 位华, 陈万生, 王义明, 罗国安 (185)
171. 组分新药益气养阴方干预中动脉栓塞(MCAO)大鼠的代谢组学研究
..... 谢媛媛, 王义明, 罗国安 (186)
172. 泽泻特征图谱保留时间重现性的研究 巩丽萍, 李玉杰, 丁勃 (187)
173. ¹H NMR-based metabolomics study of Huangqi injection on cyclophosphamide-
induced leucopenia in mice
..... TingLi Qu, ZhenYu Li, SiJun Zhao, AiPing Li, XueMei Qin (187)

174. 基于核磁代谢组学结合心肌超声综合评价方法研究黄芪水提物对心衰的生物作用效应..... 熊一峰, 刘月涛, 秦雪梅 (188)
175. GC-MS 法研究镉中毒对小鼠心脏脂肪酸轮廓的影响..... 龚频, 白晓换, 陈福欣 (189)
176. 头孢哌酮致酒精双硫仑样反应的代谢组学研究 刘林生, 缪丽燕 (190)
177. 大黄酸的网络药理学研究 孙浩, 陈大茜, 蔡小军, 向铮 (191)
178. 靶向氨基官能团带正电荷质谱手性衍生化试剂的合成及有效性评价 金美娜, 闵俊哲 (193)
179. 非靶标代谢组学方法快速“识译”栀子大黄汤入血成分及代谢物 吴欢, 李茜茜, 严雪梅, 史清水, 杨功俊, 冯芳 (193)
180. 基于小分子代谢轮廓分析方法预测法罗培南钠的药物代谢动力学参数 邢晓清, 宋沁馨, 周国华 (194)
181. 基于 GC-MS 技术的雄黄毒性作用机制代谢组学研究 黄寅, 郭慧敏, 彭灿, 张墨翰, 李瑞婷, 高一乔, 田媛, 许风国, 张尊建 (196)
182. 基于色谱-质谱联用技术的长春新碱所致麻痹性肠梗阻大鼠血清代谢组学进程动力学分析..... 郭慧敏, 黄寅, 田媛, 许风国, 张尊建 (197)
183. 整合代谢组学和基于主成分的面积计算策略发现顺铂肾损伤时间和剂量依赖性潜在生物标志物..... 张培, 田媛, 张尊建, 许风国 (198)
184. 针对乳腺癌潜在生物标志物的靶向代谢组学研究 高妍, 陈艳华, 贺玫明, 白进发, 高杨, 宋肖炜, 再帕尔·阿不力孜 (199)
185. A Strategy for the Targeted Metabolomics Analysis of 11 Gut Microbiota-host Co-metabolites in Rat Serum, Urine and Feces by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry..... Danmin Zhong, Peiting Zhang, Manna Lin, Waner Hou, Zhiyong Xie (200)

药物分析新材料与新技术

186. 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材金银花和山银花..... 李丽潇, 董露, 李胜男, 黄涛宏, 端裕树, 郭怀忠 (202)
187. 基于二维亲水-桥流-反相色谱-飞行时间质谱的磷脂检测新方法 朱超, 谢媛媛, 梁琼麟, 王义明, 罗国安 (202)
188. 一种基于全二维 HepG2 细胞膜色谱系统的中药体内活性代谢组分快速筛选分析 陈啸飞, 贾丹, 吴循循, 丁璇, 朱臻宇, 柴逸峰 (203)

189. 自制 SPME 涂层顶空萃取-GC-MS 分析中药佩兰中挥发性成分.....
..... 高佳, 林艺芬, 张兰 (204)
190. 自组装超顺磁胶体微囊及其载药探索 张兰, 高佳 (205)
191. 高灵敏赭曲霉毒素 A 电化学传感器的构建 童萍, 李恒, 张兰 (206)
192. 不同金属离子对磷酸化肽选择性富集效果的系统比较
..... 孙雪妮, 冯嘉楠, 王心莹, 李嫣, 邓春晖 (207)
193. 大孔混合作用模式聚合物吸管整体柱的制备及其用于人生理体液中的柯诺辛的
富集研究..... 张红武 (207)
194. 壳聚糖-石墨烯复合膜修饰电极对岩白菜素的的电化学分析
..... 王大成, 闫丽君, 程勇, 李小宝, 牛学良, 孙伟 (208)
195. 木犀草素在纳米金/三维石墨烯复合材料修饰电极上的电化学研究与分析
..... 王大成, 闫丽君, 程勇, 李小宝, 牛学良, 孙伟 (209)
196. LSER 在新型磷脂微乳电动色谱预测药物 logP 及 logKp 中应用.....
..... 宋静, 张伟, 孙晓迪, 刘建芳 (211)
197. 基于络合萃取原理的逆流色谱分离亲水氨基酸的研究
..... 李颀, 张敏, 章弘扬, 王月荣, 胡坪 (212)
198. 纸基微流控芯片检测血液中的黄嘌呤和尿酸
..... 赵甜甜, 张敏, 章弘扬, 王月荣, 胡坪 (213)
199. 反相/阴离子交换混合模式磁性纳米材料的制备及其在生物样品中血管紧张素
II 受体拮抗剂检测中的应用 薛舒文, 徐丽 (214)
200. 一种分离手性氨基酸的新型奎尼丁整体色谱柱的制备
..... 韩海, 王启钦, 吴慧慧, 朱培杰, 江正瑾 (215)
201. 新型奎宁丁整体柱对酸性化合物的手性拆分研究
..... 朱培杰, 王启钦, 吴慧慧, 阮梦, 彭坤, 江正瑾 (215)
202. 间隔臂长度对一锅法制备环糊精整体柱手性分离能力的影响
..... 肖媛, 郭嘉亮, 林苑靖, 江正瑾 (216)
203. 基于新型奎尼丁整体柱的 Nano-LC/FLD 系统在手性氨基酸分析中的应用研究 .
..... 吴慧慧, 韩海, 王启钦, 朱培杰, 阮梦, 彭坤, 江正瑾 (217)
204. 抗菌药物氧氟沙星和四氰基乙烯荷移反应及其荧光特性的研究
... 杜浩然, 杜梦圆, 宋笛, 高蕙冰, 姚文斌, 石春卉, 李莹, 吕玉光 (217)
205. 磁控自组装的胰岛素仿生电化学传感软膜的研究及应用
..... 朱婉莹, 周学敏 (218)

206. 基于金纳米粒构建的三磷酸腺苷比色传感器研究 江郭一, 周学敏 (219)
207. 聚集诱导发光型金纳米簇作为发光增强纳米传感器选择性检测痕量银离子的研究 李昂之, 周学敏 (221)
208. 一步合成新型 β -氨基醇功能化碳点用于铜离子选择性双缩脲反应的传感界面研究 王溪, 周学敏 (222)
209. 亲水相互作用色谱-串联质谱联用法同时测定人血清中 5 种氨基酸的含量 孙鲁宁, 焦慧文, 高贝贝, 元子青云, 张宏文, 欧宁, 周红文, 王永庆 (223)
210. 单细胞微阵列彗星电泳芯片及其应用于 DNA 交联分析 李莉莉, 罗国安, 梁琼麟 (224)
211. 基于 3D 肿瘤微球的抗癌药物分析 . 邹丹丹, 李文新, 罗国安, 梁琼麟 (225)
212. 基于近红外有机染料纳米光热治疗剂的研究 周炳江, 罗国安, 梁琼麟 (226)
213. 基于微流控的细胞载负水凝胶纤维的制备及其在药物筛选中的应用 梁哲, 刘晨光, 徐培迪, 罗国安, 梁琼麟 (227)
214. 基于微流控技术的多响应生物纤维的生成及其在药物筛选中的应用 刘晨光, 梁哲, 罗国安, 梁琼麟 (228)
215. 基于微流控技术研究不同氧气浓度对肿瘤血管新生的影响 李雅琼, 罗国安, 梁琼麟 (229)
216. 基于微流控浓度梯度芯片技术构建用于模拟胶质瘤细胞体外 3D 微环境的水凝胶系统 王为星, 罗国安, 梁琼麟 (230)
217. 基于微流控芯片的缺氧微环境及芯片上的细胞代谢物质谱分析平台构建 谢若箫, 刘正晓, 罗国安, 梁琼麟 (231)
218. Rapid screening of aminopeptidase N inhibitors by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis Hairong Wang, Wenfang Xu, Jiangying Cao, Weihong Wang (232)
219. 多功能适体探针介导的生物传感器用于蛋白质和小分子的灵敏检测 李伟, 孙杰威, 姜玮, 王磊 (232)
220. 新型 PEG 桥联量子点示踪药物靶向探针的设计制备及 α_{1B} -肾上腺素受体在活细胞中内吞的动态全过程示踪和药物筛选研究马婧, 吴李娜, 刘小亭, 王磊 (233)
221. 配体交换毛细管电泳法分离测定手性金鸡纳生物碱 赵文燕, 杨敏, 张红芬, 陈安家 (234)

222. 荧光银纳米簇用于配体-RNA 相互作用研究.....
..... 亢亮, 霍圆, 王欢, 张静, 张志琪 (236)
223. MALDI-TOF MS 新基质研究及其在小分子药物分析中的应用.....
..... 张静, 魏河, 孟丽娜 (236)
224. 玻片表面喷雾电离直接质谱进样及其用于药物直接分析.....
..... 韩玉良, 黄煜宇, 张耀利, 龚灿, 许旭 (238)
225. 聚苯乙烯-石墨烯-铂纳米微球的制备及过氧化氢的快速检测研究.....
... 刘伟祿, 邓佳音, 张晴, 孙国祥, 刘中博, 马迪迪, 石敏, 张建青, 张玉静 (238)
226. 基于 3D 石墨烯-碳纳米管-分子印迹聚合物复合膜修饰的 电化学传感器的制备
及性能研究..... 李迎春, 刘杰, 宋含, 黄彬铜, 张路, 王佳, 刘江 (239)
227. 基于分子印迹聚合物和纳米多孔金膜的电化学传感器用于华法林钠的检测 ...
..... 李迎春, 张路, 宋含, 刘杰, 王佳, 黄彬铜, 刘江 (240)
228. 基于分子印迹聚合物修饰的电化学传感器高灵敏的检测卡马西平.....
..... 李迎春, 王佳, 黄彬铜, 宋含, 刘杰, 张路, 刘江 (242)
229. 纳米金修饰的 3D 石墨烯泡沫-碳纳米管传感器同时检测多巴胺、抗坏血酸及尿
酸..... 李迎春, 黄彬铜, 刘杰, 宋含, 刘江, 张路, 王佳 (243)
230. 蒸馏沉淀伪模板聚合法制备麻黄碱印迹聚合物及在毒品检测中的应用.....
..... 李迎春, 刘江, 刘杰, 宋含, 张路, 王佳, 黄彬铜 (244)
231. 基于近红外荧光成像技术的脑内 A β 斑块分析方法的基础研究 .. 程妍 (244)
232. Preparation and Characterization of Micro-column Cell Membrane
Chromatography.....
..... Xinchao Zhao, Shuai Cheng, Cheng Tang, Linyi Dong, Liang Xu (245)
233. 新型毛细管电色谱技术及其在药物分析中应用 .. 陈子林, 包涛, 张娟 (246)
234. Surface modification and preliminary application of silica gel with 5-
hydroxymethylfurfural ... Cheng Wang, Yuanyuan Lin, Meng Sun, Huaizhen He (247)
235. β -环糊精固定化生物质基磁性介孔碳的制备及在磁固相提取-荧光分析人血清
与药物废水中吉非罗齐的应用.....
..... 刘瑞林, 张志琪, 马进, 景王慧, 王璐, 曾爱国, 杜伟, 傅强 (247)
236. 靶向 HDACs 纳米粒在 MCF-7 细胞内示踪分析.....
..... 师亚玲, 邵晓玮, 杨晓莹, 张杰, 卢闻 (249)
237. N-连接糖链分析用带正电荷新型质谱衍生化试剂的开发.....
..... 闵俊哲, 李喜玲, 永井 啓裕, 丰冈 利正 (251)

238. 羧基手性代谢物标记新型质谱衍生化试剂的开发及特性研究 李卢萍, 闵俊哲 (252)
239. HER2 抗体偶联 2-甲氧基雌二醇白蛋白纳米粒的制备及其性质研究 王培, 侯瑞瑞, 李佳, 张疆楠, 张楠 (252)
240. Tanikolide 关键中间体在新型键合纤维素手性固定相上的拆分 周婕, 杜秋争, 孙芳, 裴文娟 (253)
241. 新型 NO 荧光探针的设计及其用于 NO 供体药物释放活性的测定 王秋花, 何兰 (254)
242. 基于手性离子液体的毛细管电泳新拆分体系研究 杜迎翔 (255)
243. 金丝桃苷在碳纳米管修饰玻碳电极上的电化学行为研究 刘琳, 蔡婉玲, 姚舒愉, 冯芳, 杨功俊 (258)
244. 油橄榄叶中电活性物质的高效液相色谱-电化学分析 张蓉, 廖雪琴, 蔡婉玲, 谭梦茹, 刘琳, 陶凯丽, 冯芳, 杨功俊 (258)
245. 亲和毛细管杂化整体柱的制备及其在手性拆分中的应用 杨茜, 季一兵 (259)
246. 手性药物与蛋白质的相互作用的亲和毛细管电泳法研究 陈学萍, 季一兵 (260)
247. 碳纳米管修饰的胃蛋白酶亲和有机聚合物毛细管整体柱的制备及其在手性药物拆分中的应用研究 苗春月, 季一兵 (261)
248. 新型纳米复合手性膜的制备及其在色氨酸对映体拆分中的应用 段飞飞, 陈建秋, 季一兵 (262)
249. 氧化石墨烯纳米颗粒修饰的亲和毛细管硅胶整体柱在手性拆分中的应用研究 洪婷婷, 季一兵 (263)
250. 应用聚敛乙炔荧光法评价药物膜亲和力 魏梦琳, 刘佳佳, 夏园园, 冯锋, 柳文媛, 郑枫 (264)
251. 有机阳离子/质子逆向转运蛋白介导的苦参碱肝脏转运研究 孙晓敏, 冯超, 张峻颖, 吴春勇 (265)
252. 基于碳纳米角的新型甲氨蝶呤载药体系 王冉, 崔红静, 周英, 王俊玲, 钟文英 (266)
253. 基于高灵敏核酸侵入反应和可视化纳米金技术的免疫分析方法 宋沁馨, 周国华 (267)
254. 小分子光学探针 R6GM 检测生物巯基及蛋白变性 陈金龙, 李小娟 (268)
255. 用于疾病标志物检测的微流控纸基芯片技术研究 慕轩, 辛晓磊, 郑直 (269)

精准医疗分析

256. COX-2 和 HERV-K 基因联合检测在乳腺癌临床诊断中的应用.....
..... 李小芳, 范雪梅, 王义明, 罗国安 (271)
257. 整合生物标志物体系在精准医疗中的应用 王义明, 罗国安 (272)
258. *Aspergillus niger* 基因启动子结构对糖苷酶表达顺序的影响.....
..... 邢晟, 石峰, 巩丽萍, 郭常川, 王禄山, 陈冠军 (273)
259. 代谢酶基因多态性对塞来昔布及其代谢物在中国人体内药动学特征影响的探讨
..... 刘瑞娟, 龚楚婷, 马鹏程, 丁黎 (273)
260. 基质金属蛋白酶敏感响应的乳腺癌早期诊断探针的研究
..... 丁娅, 陈玉峰, 吴冬燕 (274)
261. 高灵敏核酸侵入信号放大反应定量检测 EGFR 用药相关突变位点
..... 项铮, 宋沁馨, 周国华 (275)
262. 大鼠对内毒素敏感性个体差异的代谢组学研究
..... 代蝶, 田媛, 郭慧敏, 张培, 许风国, 张尊建 (276)
263. 基于固定化酶的 I 型 17 β 羟类固醇脱氢酶抑制剂体外筛选模型的建立
..... 柏印, 周雯迪, 穆先敏, 苏梦翔, 狄斌 (277)

药品标准与质量控制

指纹图谱结合一测多评模式对中药牛膝质量控制的系统性研究

孙亮亮, 吴虹

(安徽中医药大学)

牛膝为苋科植物牛膝 (*Achyranthes bidentata* Bl.) 的根, 具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨、利尿通淋、引血下行的功效, 始载于《神农本草经》: “味苦、酸平, 无毒, 主寒湿痰痹, 四肢拘挛, 膝痛不可屈, 逐血气, 伤热火烂, 堕胎; 久服轻身耐老”。广泛应用于临床各类病症。牛膝含有甾酮类、皂苷类、多糖类以及微量元素等多种成分, 其中 β -蜕皮甾酮和齐墩果酸型三萜皂苷是其发挥药理药效的主要活性成分。

目前牛膝中药材质量控制与品质评价的方法主要有两类: 一类是反映牛膝化学成分整体模糊信息的指纹图谱方法, 另一类是对牛膝活性成分含量的精确测定。如赵变等对怀牛膝药材的 HPLC 指纹图谱研究; 郁红礼等对中药怀牛膝的液相色谱指纹图谱研究。闫文静等通过 HPLC-ELSD 法测定川牛膝中两种三萜皂苷的含量; 张翠英通过不同产地牛膝中 β -蜕皮甾酮的含量测定; 刘姣等同时对怀牛膝 β -蜕皮甾酮的含量测定。但是, 这些研究并没有将反映牛膝整体模糊信息的指纹图谱与活性成分含量的精确测定结合起来, 因而不能全面科学的控制与评价牛膝药材质量; 同时, 多个活性成分的含量控制, 对对照品提出了更高的要求。

一测多评法(Quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)是指以样品中某一典型组分为内标, 建立该组分与其他组分之间的相对校正因子(Relative correction factor, RCF), 通过 RCF 计算其他组分的含量, 适用于对照品难得或制备成本高或不稳定的情况下同类多成分的同时测定。指纹图谱和 QAMS 相结合可以相互取长补短, 为更全面合理科学地评价中药质量提供技术支撑。

目的: 建立中药牛膝 UPLC 指纹图谱, 并应用 QAMS 对药材中 β -蜕皮甾酮, 竹节皂苷 Iva, 三七皂苷 R₁, 5-羟甲基糠醛, 杯苋甾酮, 齐墩果酸的含量进行同时测定, 验证该方法在牛膝药材质量控制中的可行性和技术适用性。

方法: 通过以牛膝药材为研究对象, 以 β -蜕皮甾酮为内参物, 采用 Waters BEH C₁₈ (1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)进行梯度洗脱(0~1 min, 90% B; 1~2 min, 90% \rightarrow 70% B; 2~5 min, 70% B; 5~6 min, 70% \rightarrow 68% B; 6~8 min, 68% B; 8~9 min, 68% \rightarrow 62% B; 9~12 min, 62% B), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.2 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 250 nm, 建立竹节参皂苷 Iva, 三七皂苷 R₁, 5-羟甲基糠醛与 β -蜕皮甾酮的相对校正因子, 并进行含量计算, 实现 QAMS。同时以外标法(External standard method,

ESM) 测定 10 批牛膝药材中竹节参皂苷 Iva, 三七皂苷, 5-羟甲基糠醛, 齐墩果酸与 β -蜕皮甾酮的含量, 比较计算值与实测值的差异, 以验证 QAMS 的准确性和可行性。

结果: 建立了牛膝多指标 UPLC 指纹图谱, 标定了 12 个共有指纹峰, 指认了 4 个特征峰, 10 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度大于 0.980。建立的相对校正因子的重现性良好, QAMS 校正因子计算的含量与外标法实测值之间无显著性差异。

结论: 本研究建立了牛膝药材多指标 UPLC 指纹图谱和 QAMS 法对牛膝 4 种活性成分同时定性定量的测定方法, 该方法操作简单, 灵敏度高, 检测时间段短, 实现了一个对照品完成多个成分的含量测定, 将指纹图谱技术和 QAMS 含量测定技术相结合, 为牛膝药材质量控制和评价提供更好的技术手段, 为更全面合理科学地对牛膝药材质量的评价提供了技术支撑。

关键词: 指纹图谱; QAMS; 牛膝; 质量控制; 系统性研究

对叶百部质量标准研究

张亚中^{1, 2*}, 陶冶¹, 班永生², 黄丽丹², 金斌²

(1. 安徽中医药大学; 2. 安徽省食品药品检验与研究院, 合肥 230051)

摘要: **目的:** 为控制对叶百部药材的质量, 建立对叶百部药材的显微和薄层鉴别、水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物以及含量测定标准。**方法:** 从全国范围内收集 10 批对叶百部药材, 采用横切面及粉末进行显微鉴别; TLC 法对生物碱类成分进行薄层鉴别; 采用中国药典附录方法, 对水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物进行测定; HPLC-ELSD 法测定对叶百部中对叶百部碱三氟乙酸盐的含量, 色谱条件: 色谱柱为 Thermo Acclaim™ 120 C₁₈(4.6mm×150mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.5%三氟乙酸溶液, 梯度洗脱, 柱温为 35℃, 流速为 1.0mL/min, 载气流量为 3.0L/min, 漂移管温度为 105℃。**结果:** 与中国药典 2010 年版一部相比增加了质地、断面、气味、根被细胞的特征、中柱中韧皮部束与木质部束的个数和粉末特征等内容。增加的薄层色谱鉴别色谱斑点清晰, 分离度较好。含量测定中对叶百部碱三氟乙酸盐在 3.3386~33.386 μ g 范围内线性关系良好 ($r=0.9968$), 平均回收率为 97.06%, (RSD 为 1.16%, $n=6$)。**结论:** 本文采用的方法操作简便, 准确, 重复性好, 可用于控制对叶百部药材的质量。

关键词: 百部; 对叶百部; 对叶百部碱三氟乙酸盐; 质量标准; 定性分析; HPLC

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1408085MH199)

***通讯作者:** 张亚中 Tel: 0551-63368775, E-mail: yazhongzhang@hotmail.com

定量核磁共振在中药质量控制中的应用

伍建林, 李娜*

(澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室)

定量核磁共振 (quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR) 作为一种定量分析方法具有以下优点: (1) 无需标准品; (2) 分析速度快; (3) 通量高, 无需分离即可同时对多种成分进行定量; (4) 不破坏样品; (5) 适用性广泛, 只要分子中有氢、碳等元素的化合物即可进行分析, 适用于绝大多数的有机化合物。基于以上优点, 定量核磁共振方法在西药的质量控制中已被采用, 但是在中药的质量研究中应用还较少。本文以土茯苓为例研究了定量核磁共振在中药质量控制中的应用。

土茯苓为常用中药, 其活性成份为二氢黄酮醇苷类化合物, 主要有落新妇苷及其三个立体异构体新落新妇苷、异落新妇苷和新异落新妇苷、黄杞苷, 由于它们的结构非常相似, 使用常规的 LC-UV 或 LC-MS 进行定量分析时, 即使是在超高效液相色谱上也需要相当长的分析时间; 而且, 这些异构体很难分离纯化做为标准品用于定量分析。而在核磁共振氢谱中, 落新妇苷及其异构体鼠李糖的甲基信号可以得到很好地分离, 且基质干扰信号较少, 适合于定量分析。尽管黄杞苷鼠李糖的甲基信号与落新妇苷基本重叠, 但是它们的 2 位氢信号可以完全分离并不被其他信号所干扰。基于上述氢谱特征建立了上述 5 个化合物的定量核磁共振分析方法。应用该方法测定了产地不同的土茯苓样品中这 5 种成分的含量, 所获得的结果与采用《中国药典》中的高效液相色谱分析方法的结果基本一致。采用该方法, 每个样品的采集时间在 2 分钟以内, 而且不需要任何标准品, 提示定量核磁共振方法在中药的质量控制方面有着独特的优势。

关键词: 定量核磁共振 (qNMR); 土茯苓; 落新妇苷及其异构体; 黄杞苷

一测多评法在山楂叶质量控制中的应用

杨明宇, 李艳荣, 潘海峰*

(承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

摘要: 目的: 建立同时测定山楂叶中 6 种有效成分的一测多评 (QAMS) 质量控制方法。**方法:** 以山楂叶为研究对象, 建立牡荆素葡萄糖苷与绿原酸、牡荆素鼠李糖苷、

牡荆素、芦丁、金丝桃苷间的相对校正因子 (RCF)，并利用 RCF 计算其他 5 种成分的含量,同时采用外标法进行比较。**结果:** 一定线性范围内, 牡荆素葡萄糖苷与绿原酸、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷间的 RCF 分别为 1.119、1.009、0.706、1.063、0.830, 且在不同实验条件下重现性良好; 计算值与实测值无显著性差异。**结论:** 本研究建立的 QAMS 可以作为一种新的模式用于山楂叶多成分定量分析和质量评价。

关键词: 山楂叶; 一测多评法; 相对校正因子; 质量控制

第一作者: 杨明宇, 女, 在读硕士研究生, Tel: 13131499108,

E-mail: 18518093839@163.com。

***通讯作者:** 潘海峰, 女, 硕士, 教授, 从事中药分析工作, Tel: 0314-2291186,

E-mail: phf2301@163.com

美国药典 USP<232>无机杂质元素检测的解决方案

宋晓红 杨乐 冯旭 段伟亚 杨桂香

(岛津企业管理(中国)有限公司)

摘要: 美国药典 (USP) 是美国政府对药品质量标准和检定方法做出的技术规定, 也是药品生产、使用、管理和检验的重要法律依据。USP<232>根据元素的毒理学数据, 规定了药品和原料药、辅料中需要检测的15种元素及其限量。其中包含4种高毒性必测元素As、Hg、Cd和Pb, 以及Cu、Cr、Mo、Ni、V、Pd、Pt、Os、Ir、Rh和Ru等11种选测元素。USP<233>对元素杂质的检测方法以及样品前处理方法做了规定。

本文参考美国药典USP<232>对无机杂质元素的限量要求和USP<233>对杂质元素的测定方法及验证要求, 利用电感耦合等离子体光谱法 (ICP-AES) 结合附件氢化物发生器 (HVG) 及超声波雾化器 (UAG) 测定了口服药、原料药和注射药样品中的重金属元素和其它杂质元素的含量, 并对该分析方法进行了准确度、精密度和重现性实验。实验结果表明: 各元素的相关系数 $r > 0.9998$, 加标回收率在90.0%~110%之间, 精密度实验RSD<5%, 长期稳定性实验RSD<4%。附件氢化物发生器和超声波化器的使用, 大大降低了方法的检出限, 提高了仪器的灵敏度。该方法操作简便、快速, 样品前处理简单, 可以满足美国药典对药品中杂质元素限量值的测定要求。

关键词: ICP-AES ; USP<232> USP<233> ; 口服药; 原料药; 注射药

岛津便携式拉曼光谱仪快速鉴定药物成分及 测试药包材对药物鉴定的影响

王娟娟 孙友宝 郑伟 马晓玲 盖荣银 黄涛宏 马俐

(岛津企业管理(中国)有限公司 分析中心 上海 200052)

摘要: 拉曼光谱是研究化合物分子受光照后产生的散射, 散射光与入射光能级差和化合物振动频率、转动频率关系, 对化合物进行定性、定量分析的一种方法。该技术主要特点有: 快速、准确、测量时通常不破坏样品(固体、半固体、液体或者气体), 可以直接对带有药包材的药物进行测试分析, 样品制备简单甚至不需要制备样品。目前, 拉曼光谱已经成功应用于制药、食品安全、生物医学、考古鉴定、材料科学、环境保护等领域, 特别在医药及原材料的鉴定中非常方便和快捷。2015版《中国药典》通则目录及增修订征求意见稿增订了拉曼光谱法。在相同的测定条件下, 测试供试品与对照品的拉曼光谱进行比对, 若相同, 即可鉴别为同一化合物。使用岛津便携式拉曼光谱仪 RM-3000 对西药阿莫西林进行了成分鉴定, 相同测试条件下, 阿莫西林样品和方法中阿莫西林拉曼谱图进行比较, 谱图完全一致。同时测试了药包材厚度对药物影响, 根据包材种类不同, 影响程度有差异, 但是一般随着药包材厚度增加, 样品谱峰强度整体降低, 但是仍然能得到药物本身的拉曼光谱图, 可以对药物进行鉴定。岛津便携式拉曼光谱仪 RM-3000 对药物原辅料鉴定、药物快检与打假、中药中添加的西药检测等是一种快捷、方便、有效的检测仪器。

关键词: 拉曼光谱仪; 药物; 药包材; 成分鉴定

通讯作者: 王娟娟 上海分析中心 Email:sshwjj@shimadzu.com.cn

石墨炉原子吸收法测定降压化药中的残留钯含量

钟跃汉

(岛津企业管理(中国)有限公司 广州 510010)

摘要: 贵金属钯作为催化剂由于催化活性高、选择性好和产生三废少的特点, 经常应用在药物合成领域中。研究表明, 在药品生产原辅料合成中可能用到钯炭催化剂或含钯试剂, 这些试剂很可能在原料药中残留。残留的钯可能以各种不同的形式存在, 被摄入人体后引起接触性皮炎、鼻炎、结膜炎、气喘和风疹等过敏性疾病。基于安全性和质量控制的严格要求, EMEA/CHMP 也颁布了金属催化剂或金属试剂残留量限度

的指导文件。指导文件规定，口服药物残留钯限度为 10 mg/L，静脉注射药物残留限度为 1 mg/L。

药物中痕量钯测定的主要手段有石墨炉原子吸收光谱法（GFAAS）、电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）、全反射 X 射线荧光法（TXRF）、中子活化分析法（INAAS）和离子交换树脂比色法等。相比较其它方法，石墨炉原子吸收法具有运行成本低、样品用量少和基质要求相对较低的优点。本文建立直接用 0.12 mol/L HCl 溶解降压化药样品，使用石墨炉原子吸收法测定了降压化药样品中的残留钯含量的方法。实验结果表明，该方法灵敏度高，样品空白连续测定 11 次，计算得方法检出限为 0.28 $\mu\text{g/L}$ ；线性关系良好，标准曲线拟合相关系数 $r=0.9996$ ；定量准确，通过样品加标回收实验验证，加标回收率在 90%~110%之间。干扰少、操作简单，可满足水溶性好的降压化药中残留的痕量钯元素测定，适用于大批量样品的分析，为药品中的痕量钯监测提供了一种新的途径。

关键词：化药；钯炭催化剂；石墨炉；原子吸收

GC-MS/MS 法测定中药材中 74 种农药残留含量

杨卉彦*

（岛津企业管理（中国）有限公司，上海分析中心）

摘要：本文利用岛津 GCMS-TQ8040 三重四极杆气质联用仪建立了 74 种农药残留的检测方法。该方法在 1~50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内建立内标法标准曲线，线性关系良好，相关系数 r 均大于 0.995，同时灵敏度高，精密度良好，多数组分检出限低于 1 $\mu\text{g/L}$ ，5 $\mu\text{g/L}$ 标准样品 6 次平行测定 RSD 小于 10%，加标回收率在 60%~120%之间。此方法适用于 2015 版药典中对中药材中农药残留量的快速定量测定。

关键词：GC-MS/MS；中药材；农药残留；中国药典

***通讯作者：**杨卉彦 上海分析中心 E-mail:sshhy@shimadzu.com.cn

ASE-LC-TOF/MS 法同时测定清肝散结方中 29 个化学成分的含量

赵亮¹，李云青¹，李洋¹，钱跣¹，张国庆¹，柴逸峰^{2*}

（1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科，上海 200438；

2. 第二军医大学药学院，上海 200433）

Optimal extraction and simultaneous determination of 29 chemical constituents in QingGanSanJie decoction by accelerated solvent extraction and high-performance liquid chromatography coupled with electrospray time-of-flight mass spectrometry

Liang Zhao¹, Yunqing Li¹, Yang Li¹, Xian Qian¹, Guoqing Zhang¹, Yifeng Chai^{2*}

(1 Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2 School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC), the fifth common cancer in the worldwide, has become the third largest cancer killer due to its high mortality rate and high recurrence rate. Traditional Chinese medicine (TCM) has accumulated valuable information for healing the liver cancer because of their synergistic therapeutic effect to western medicine, it also has certain advantages in improving patient symptoms and enhancing the survival rate. QingGanSanJie decoction (QGSJ) is a multi-herbs prescription based on the long-term clinical practice experience against liver cancer. It is composed of fourteen herbs. The efficacy of QGSJ is generally determined by its chemical composition, it is highly important to develop a sensitive and effective method for qualitative and quantitative analysis of chemical constituents in QGSJ.

The traditional liquid chromatographic separation method could identify only one or several components, which has been unable to meet the requirements of the multiple components analysis in the prescription. With its excellent advantages of accurate mass measurement and abundant fragmentation ion information, the time-of-flight mass spectrometry (TOF/MS) has received increasing attention. Besides, TOF/MS also has a high sensitivity for each test compound in TCM. Combining HPLC with TOF/MS is such an appropriate method for qualitative and quantitative studies of Traditional Chinese multi-herbs Medicine.

Accelerated Solvent Extraction (ASE), offering higher extraction efficiency with low solvent volumes and a short extraction time in comparison with some conventional extraction technologies such as liquid-liquid extraction and Soxhlet extraction, is believed to be the most efficient extraction procedure. In addition, the high pressure and temperature conditions enable a better penetration of the solvent into the matrix. The current review has reported that ASE is considered as an attractive and preferred extraction method due to its variable parameters, including extraction temperature, static extraction time, extraction cycle, extraction volume, flush volume and nitrogen purge time. In the recent years, it has been reported for extraction of a variety of compounds, and a considerable number of applications have been reported in environmental and food areas, but fewer research reported its combination with modern analytical techniques in TCM analysis.

In this study, ASE was used to extract the multi-components from QGSJ. 29 components standards, including chlorogenic acid, rosmarinic acid, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, catechin hydrate,

epicatechin, catechin gallate, oleanolic acid, ursolic acid, asiatic acid, quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, naringin, naringenin, bergenin, baicalin, wogonoside, scutellarin, baicalein, wogonin, saikosaponin A, saikosaponin B₂, saikosaponin C, saikosaponin D, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, liquiritin and isoliquiritin, and the three internal standards puerarin, ginsenoside Re, ginsenoside R_{b1} were purchased from Chengdu Must Bio-Technology Co., Ltd, Sichuan, China, all purity $\geq 98\%$. The 5g QGSJ mixed powder was placed into a 66-ml stainless steel ASE vessels, and a cellulose fiber filter was capped at either end. The sample was extracted with 70% ethanol using the preset conditions: 1700psi pressure; 5min static extraction time; 100 °C extraction temperature; 2 cycles; 60% flush; 90s purge. The extracted solution was diluted to 100ml with 70% ethanol and then filtered through a 0.22 μm microporous membrane. 9.5ml filtrated solution was mixed homogeneously with 0.5ml internal standard solution as a sample to inject into the HPLC system. Chromatographic separation was achieved under the following conditions: the separation column was Chromasil-C₁₈ (2.1 \times 100mm, 3.5 μm) maintained at 25 °C. Mobile phase was composed with A (0.1% formic acid in water) and B (0.1% formic acid in methanol) with a solvent flow rate of 0.2 mL/min. LC gradient condition was as follows: 0~4min, 85%~60% A; 4~30min, 60%~17% A. The injection volume was 1 μL and 10 min re-equilibration duration was allowed between individual runs. TOF mass spectrometer conditions for detection were set as follows: 40psi nebulizer, 10L/min drying gas flow rate, 350 °C drying gas temperature, 3500v capillary voltage, and 200v fragmentor voltage. The MS spectra were acquired in the full scan mode over a m/z range of 110–1000 using an extended dynamic range in negative ion mode, and mass axis was calibrated by the reference solution including m/z 112.9855 and 1033.9881.

To explore the different extracting factors of ASE, PASW 18 was used for designing orthogonal experiments, evaluating the effects of factors and searching optimum conditions of factors. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to evaluate significant differences ($p < 0.05$) existed between parameters effecting ASE. Principal component analysis (PCA) was applied to investigate the variations within a large data set (content of 29 chemical constituents in QGSJ extract) by reducing raw sample data into a smaller one. The results obtained from PCA analysis for the 29 variables and 18 samples showed that the four principal components explained 89.77 of the total variance, component 1 explained 58.08, component 2 explained 18.63, component 3 explained 8.19, and component 4 explained 4.86, indicated that triterpenoid acids and flavonoids may be the main medicinal ingredients in QGSJ decoction, and these bioactive substances were all quantified in our study.

ASE-LC-TOF/MS methods were simple, sensitive and reliable for the determination of 29 chemical compounds in the extract of QGSJ with a good linearity ($r > 0.994$), intra-day and inter-day precisions (relative standard deviation, RSD) $< 5\%$. The extraction recoveries of the 29 chemical compounds were from 97.6 to 103.7%. ASE-LC-TOF/MS can be utilized as a rapid and reliable method for the multi-components assay and quality evaluation of traditional Chinese multi-herbs medicine, and very helpful for pharmacology research.

Keywords: ASE; HPLC-TOF/MS; QingGanSanJie decoction; Simultaneously determination

拉曼光谱与药品快检

陆峰, 柴逸峰

(第二军医大学药学院, 上海, 200433)

自 1928 年印度科学家 C.V Raman 发现拉曼散射效应以来, 拉曼光谱逐渐发展成为一种与红外光谱互称“姐妹谱”的成熟分析技术。1974 年英国科学家 M. Fleischmann 等又发现了表面增强拉曼散射(SERS)现象, 使其信号强度提升了 $10^5 \sim 10^{12}$ 倍, 一举突破了灵敏度限制, 加之其快速、无损、特异性强、信号受水干扰小、制样简单等优势, 拉曼光谱(含 SERS)已经成为一个非常活跃的研究领域, 并在化学、环境、材料、生物医药等领域获得了非常深入广泛的应用。

在药物分析领域, 拉曼光谱(含 SERS)却仍是一门“较新”的分析技术, 这与它在国际上比 UHPLC 研究更热的情形是很不相称的。纵观拉曼光谱(含 SERS)在药物分析中的应用, 目前主要集中在(1)药厂进料上架前的化学原料药和辅料的鉴别;(2)片剂均匀度等制剂工艺质量研究;(3)药物晶型研究等。上述应用研究, 与国内药物分析学术界(学院派)热衷的“组学”、“生物标志物”等相去甚远, 因此不是很受学院派的待见; 而对药监-药检机构(药检所派)而言, 由于拉曼光谱至今尚未收入中国药典, 也无法进入药检所派的主流视线。拉曼光谱(含 SERS)在国内的药物分析界左右不是, 颇为尴尬。

基于此, 我们探索了一条学院派与药检所派相结合的“中间道路”: 基于拉曼光谱的药品快检的基础与应用研究。在这条中间道路上, 我们已经开展了(1)SERS 纳米基底材料研制;(2)快检相关算法、软件与网络化平台构建;(3)色谱-光谱接口技术研发;(4)自主 IPR 仪器工程化;(5)非药品仿冒药品快检;(6)低价药品仿冒高价药品快检;(7)非品牌药仿冒品牌药快检;(8)过期药仿冒未过期药快检;(9)低含量药品快检;(10)中药饮片非法染色快检;(11)中成药掺杂违禁化药快检;(12)未知衍生物掺伪快检等一系列相关的基础与应用研究。

在上述研究基础上, 本课题组在国家重大科学仪器设备开发专项项目“便携式薄层色谱-拉曼光谱联用仪及其药品快检支撑系统”(2012YQ180132)资助下, 构建了基于拉曼光谱的药品快检体系(包括硬件、软件、数据库、网络化平台、实验方案、SOP 等), 目前正在开展联用仪联调与工程化样机试制, 并已实现药品快检支撑系统的网络化试运行, 正在与众多合作单位努力把专项目标一步步变为现实, 力争为我国的药品安全事业添砖加瓦。

关键词: 拉曼光谱; 表面增强拉曼光谱; 药品快检体系

TLC-SERS 法快速鉴别弱主药信号药品中结构类似药品

李晓, 柴逸峰, 陆峰*

(第二军医大学, 上海 200433)

摘要: 随着人们安全意识的提高, 高效低毒-低剂量强药效的药品已成为药企生产的新方向, 且市场占有率也逐年上升, 通常这类药品中主药成分 (API) 的含量越来越低, 而辅料用量远高于主药含量, 由此导致主药基本被辅料掩埋, 而在检测时, 就很难快速获得主药成分的信息。研究发现这类药品中还存在化学结构类似、化学性质相似的现象, 此时对鉴别检测能力就提出了更高的要求。目前, 常用的检测方法主要有色谱, 液质联用, 光谱成像等技术, 但这些方法前处理复杂、专业知识要求强、分析周期较长、检测成本高、无法满足现场快检的需求。庆幸的是, 近年来不断发展的薄层色谱-表面增强拉曼光谱 (TLC-SERS) 联用技术, 结合 TLC 的分离能力与 SERS 高灵敏性等优势, 在毒品现场检测、环境检测、中药材非法染色检测等领域已有初步的应用, 而对本文所研究的弱主药信号药品中结构类似药品的鉴别未见报道。故拟采用 TLC 作为 SERS 载体, 通过对 SERS 检测中银溶胶类型及检测条件进行优化, 对格列吡嗪、格列本脲、格列美脲三种格列类结构类似的弱主药信号药品进行检测, 并利用化学计量学手段进行初步判别, 获得三者相关系数分别为 0.76、0.74、0.71, 均在 0.7 以上, 通过 SERS 图谱 (图 1A) 仅能判断上述待测药品为格列类药品, 但难以实现对三种结构类似药品的区分鉴别。在此基础上, 通过对薄层分离中薄层板种类、展开剂的选择、展开方式的选择等条件进行筛选, 经薄层分离后 (图 1B), 三者比移值 (R_f) 分别为 0.37、0.49、0.59, 可准确的实现三种结构类似药品的鉴别, 因此, TLC-SERS 技术较好的实现对三者的鉴别。由此可见, 本文建立了用于弱主药信号药品中结构类似药品的快检方法, 为药品监管部门和生产企业等提供了有力的技术保障。

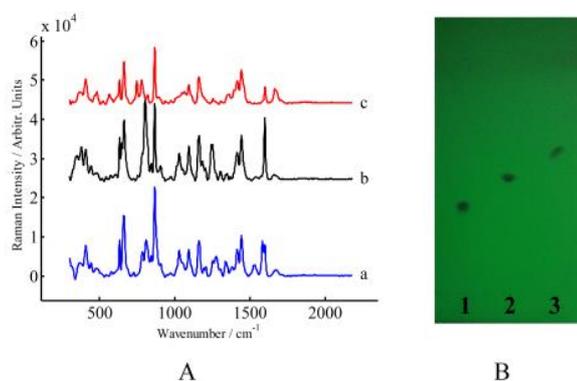


图 1 待测药品的 SERS 图 (A) 与薄层展开图 (B)

关键词: 弱主药信号药品; 结构类似物; 化学计量学; 薄层色谱 (TLC); 表面增强拉曼光谱 (SERS)

摘要：今年 5 月份河北省药监局公布的抽检结果中，广西世彪药业的元胡止痛片被检出含有工业染色物金胺 O。金胺 O 别名盐基淡黄 O、碱基淡黄 O，对皮肤有轻微的刺激作用，可引起皮炎、结膜炎及上呼吸道刺激等症状，工业上常用于皮革、纸、人造纤维等物品的染色。近年来不法商贩用金胺 O 对蒲黄、黄芩、延胡索等中药材染色非法染色的现象屡见报导，长期接触或使用金胺 O 染色的黄芩会对人体器官造成损害甚至致癌。因此，建立一种快速、准确鉴别元胡止痛片中非法染色物金胺 O 的方法十分必要。

本文采用了高效薄层色谱法（TLC）与表面增强拉曼光谱法（SERS）联用技术对中成药元胡止痛片中非法染色物金胺 O 进行快速检测。将购自药店的各剂型元胡止痛片首先用 70% 乙醇提取，提取物通过 TLC 进行分离，在紫外灯下检视定位，并对 TLC 结果进行初步的判断。采用分离斑点上滴加银胶的检测方法用于检测真实样品中是否含有金胺 O，将 DMF 有机相银胶滴加于与金胺 O 阳性对照品相同 R_f 处，后使用便携式拉曼仪进行动态检测，得到的 SERS 谱图与金胺 O 原位 SERS 谱图的主要特征峰进行比对，于六种元胡止痛系列制剂中检出一种掺有非法染色物金胺 O。文章对实验使用的 SERS 基底进行考察，以金胺 O cm^{-1} 处峰强作为标尺，对 Lee 法银胶、DMF 有机相银胶以及乙二醇还原法制备的银胶等三种纳米材料进行考察，结果表明 DMF 有机相银胶增强效果明显优于其他两种银胶。还对激光强度、检测限等因素进行了考察，根据信噪比 S/N 为 3 时确定的最低检测限（LOD）为 0.005mg/mL。本文建立了 TLC-SERS 联用技术用于快速检测元胡止痛片中非法染色物金胺 O 的方法。该方法相比于单一的 TLC 法，具有准确性更好、灵敏度更高的优点，相比于常用的 HPLC、HPCE 等方法，具备简便、快速、经济等优势，可以为药品监管部门监控中药材的安全质量提供强有力的支持。

关键词：元胡止痛片；金胺 O；高效薄层色谱法（TLC）；表面增强拉曼光谱法（SERS）

纸基-表面增强拉曼光谱法检测染色掺伪的红花药材

李丹，朱青霞，柴逸峰，陆峰*

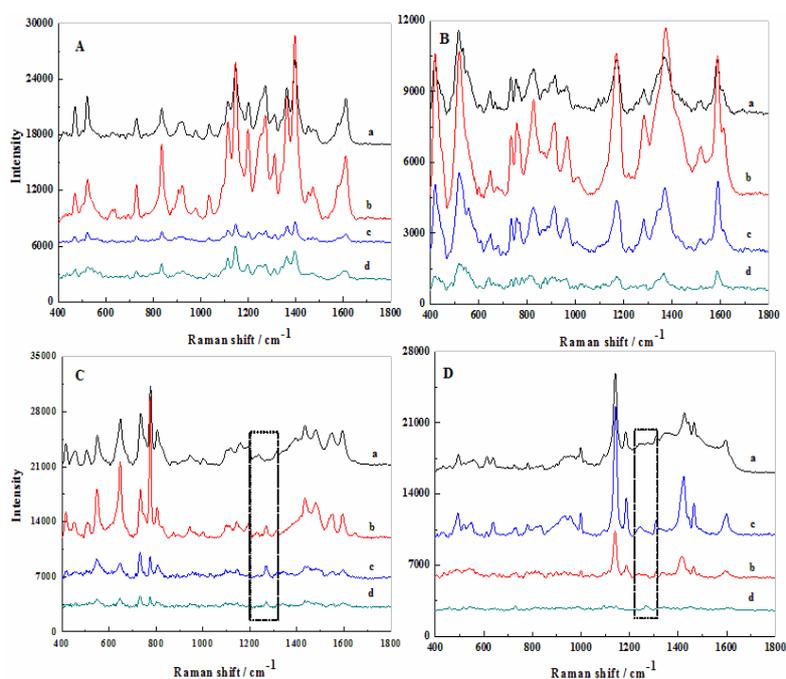
（第二军医大学药学院，上海，200433）

摘要：近年来，国家食品药品监督管理总局组织对中药材进行抽样检验，证实多批次

红花等药材存在染色问题。不法商贩选用颜色相近且便宜易得的染料进行染色掺伪，以改善外观，提高售价；所使用染料多为非食用色素，具有过敏性和致癌性，此现象的出现严重地威胁着人们的用药安全。目前，国内外对染料以及染色中药材鉴别的方法包括经验鉴别、一般理化鉴别、色谱法及其联用技术、光/波谱法等。这些方法存在灵敏度低、操作复杂或仪器成本高等缺点不能满足快速检测要求。建立染色红花的快速、简单和准确的检测方法迫在眉睫。近些年表面增强拉曼光谱（SERS）技术不断发展，其灵敏、快速、简便、特异性较好等优点，有望成为染色红花快速检测的新方法。

本文以染色红花为研究对象，选用浸泡法制备的银胶拭子作为 SERS 基底，擦拭润湿的染色药材后进行 SERS 检测。本文先后对银胶拭子的浸泡时间、干燥方式及润湿试剂的浓度等实验因素进行了选择和优化。取甲基红、碱性品红、金胺 O、对氨基偶氮苯 4 种常见染料，配置不同浓度的染料溶液，对红花进行染色，染色后烘干。取润湿试剂滴加在染色红花表面，用银胶拭子擦拭后进行 SERS 检测，检测结果如图所示，通过特征峰比较可以快速判断染料类型，且经 $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 染料染色后的红花无颜色变化，因此最低检测浓度可满足现场检测的需求。这一结论为纸基-表面增强拉曼光谱法满足现场染色检测的需求奠定了基础。

关键词：纸基-SERS；中药染色掺伪；红花；染料



图：4 种染料的标准图及染色红花的擦拭检测结果

A. 甲基红 B. 碱性品红 C. 金胺 O D. 对氨基偶氮苯

a. 标准图谱 染料浓度：b. $10^{-3} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ c. $10^{-4} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d. $10^{-5} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$

芬太尼双层口颊片 UHPLC 快速分析方法的建立

何京亚, 张雨, 杨铁虹, 吴红*

(第四军医大学药学系药物分析学教研室, 陕西 西安, 710032)

枸橼酸芬太尼是一种强效麻醉性镇痛药, 临床上常用其透皮贴剂和注射剂。本课题在已有芬太尼剂型的基础上, 利用口腔黏膜给药的优势, 研制了芬太尼双层口颊片, 具有速释层快速镇痛, 缓释层持久释药的作用, 有效降低芬太尼的耐受性与成瘾性。芬太尼为近紫外区吸收药物, 药典与文献报道采用的检测波长有 200nm, 220nm, 230nm, 分析中发现芬太尼在近紫外区的吸光度为流动相的 15000-40000 倍; 且远大于 230nm 处吸光度 (50 倍以上)。本研究在综合文献、药典分析方法基础上, 建立了枸橼酸芬太尼双层口颊片 UHPLC 快速分析的新方法并测定了体外释放特性。选取 195nm 为检测波长, 此检测波长专属性较好、灵敏度高。采用安捷伦 1260 高效液相色谱系统, 流动相乙腈:缓冲液(0.1mol/L 磷酸-三乙胺, pH4), 30 : 70; 流速: 0.5ml/min; 柱温: 30℃, 进样体积 20 μ l。分析时间与常规药典 HPLC 分析方法相比, 单个样品分析时间缩短至 2-3 分钟。方法学验证实验表明 10~1000 μ g·mL⁻¹(r=0.9993)线性良好, 最低检测限为 5 μ g/ml, 日内精密度 0.9-1.3%, 日间精密度 1.87-2.2%, 平均提取回收率为(94.59 \pm 0.76)%。将空白辅料、枸橼酸芬太尼对照品、枸橼酸芬太尼双层口颊片 (图 1) 快速分析, 比较三组图谱可知选用的辅料对枸橼酸芬太尼双层口颊片主药的含量测定无干扰, 表明此方法专属性良好。进一步用所建立的方法测定了药物释放度 (图 1)。

关键词: 枸橼酸芬太尼; 双层口颊片; UHPLC

基金项目: 国家重大新药创制 (2014ZX09J14107-04B)

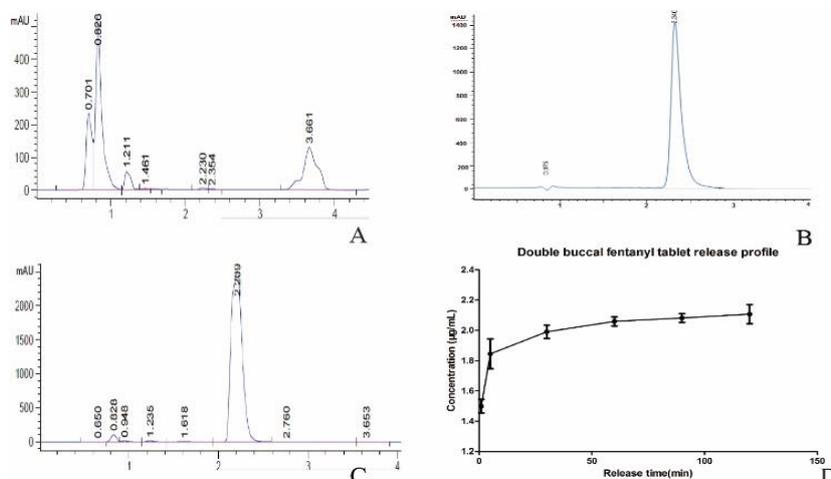


图 1 枸橼酸芬太尼双层口颊片 HPLC 图谱与释药曲线 (A 空白辅料, B 枸橼酸芬太尼对照品, C 枸橼酸芬太尼双层口颊片待测品, D 枸橼酸芬太尼双层口颊片释放度曲线)

他克莫司异构体的制备及质量研究

傅慧灵

(福州大学石油化工学院, 福建 福州 350108)

摘要: 目的: 研究他克莫司异构体的制备方法, 并进行质量研究。方法: 采用高效液相色谱方法, 对原料药中的他克莫司互变异构体I和互变异构体II进行制备, 通过检测多批次的他克莫司原料药, 制定他克莫司质量标准, 并进行方法学验证。结果: 通过考察他克莫司在不同溶液中的稳定性, 比较了不同条件下他克莫司和互变异构体的变化情况, 筛选适宜的溶媒或混合溶媒, 促使他克莫司原料药在该溶媒系统中有效产生异构体, 并稳定于一定比例, 获得异构体组分, 并使该异构体稳定, 制备得到异构体单体, 建立相应的质量标准, 并进行方法学验证。结论: 该方法专属性好, 可用于他克莫司异构体的测定。

关键字: 他克莫司 异构体 质量研究

The preparation and quality research for isomer of tacrolimus

Huiling Fu

(School of Chemical Engineering, Fuzhou University,
Fuzhou 350108, P. R. China)

Abstract: Objective: This study was aimed at research the method of preparing the isomer of tacrolimus, and conducting the quality research.. **Methods:** Tacrolimus isomer were prepared by high performance liquid chromatography methods of API, then by detecting multiple batches of API, and developed quality standards of tacrolimus, and method validation. **Result:** By examining the stability of tacrolimus in different solutions' stability, comparing the changes in different conditions among tacrolimus and isomers, then selected suitable solvent or mixing solvent, and prompted tacrolimus API producing isomers in the solvent system effectively, and made isomer component, stabilized at a certain percentage, making the isomers stablely, prepare the isomer monomer, establishing the appropriate quality standards. and then Methodological verification. **conclusion:** the specificity of this method was well, and can be used for determination of tacrolimus isomers.

Key Words: tacrolimus isomer Quality Research

采用超声辅助提取毛细管电泳电化学发光同步测定红花石蒜中加兰他敏、石蒜伦碱、高石蒜碱及多花水仙碱

孙双姣, 韦艳芬, 隆婵娟, 邓必阳*

(药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西师范大学化学与药学院)

摘要: 红花石蒜为石蒜科石蒜属草本植物, 又名龙爪花, 是一种传统的药用植物和观赏植物, 含有丰富的生物碱^[1]。石蒜中的加兰他敏用于治疗小儿麻痹后遗症、肠麻痹、重症肌无力时疗效显著, 同时加兰他敏既能选择性地抑制乙酰胆碱酯酶活性, 又能调节脑内的烟碱受体, 从而提高类胆碱的效能, 因而优于其他乙酰胆碱酯酶抑制剂, 是用于治疗阿尔兹海默病的特效药。高石蒜碱在 MT4 细胞上对 HIV-1 的复制具有强的抑制活性, 同时对癌细胞具有抗增殖活性, 并可诱导人体慢性髓性白血病, 急性淋巴细胞白血病, 恶性黑色素瘤等凋亡。石蒜伦碱具有减缓心率和降低血压作用。多花水仙碱对小鼠淋巴瘤细胞具有明显的生长抑制活性。超声提取速度快、成本低及操作简便^[2]。本实验以聚乙烯吡咯烷酮为分离缓冲溶液添加剂, 首次应用毛细管电泳-电化学发光同步测定了红花石蒜中多花水仙碱、石蒜伦碱、高石蒜碱和加兰他敏四种生物碱。在优化实验条件下, 四种生物碱在 11 min 内能实现较好分离。多花水仙碱、石蒜伦碱、高石蒜碱和加兰他敏四种生物碱的线性范围分别为 8.0-2500 ng/mL, 5.0-1500 ng/mL, 40-8000 ng/mL 和 60-8000 ng/mL, 检出限分别为 3.1 ng/mL、1.8 ng/mL、11.3 ng/mL 和 14.0 ng/mL。将本方法应用于石蒜中上述四种生物碱的测定, 多花水仙碱、石蒜伦碱、高石蒜碱和加兰他敏的回收率分别为 102.6%, 98.15%, 97.25% 和 98.34%。该法具有试剂简单、环境污染少、分离速度快等特点, 可广泛应用于其他植物中生物碱的测定。

关键词: 生物碱; 毛细管电泳; 电化学发光; 石蒜; 超声提取

藤茶的产地加工方法对二氢杨梅素含量的影响

王淼 覃洁萍* 奉艳花 黄志飘 刘鹏飞

(广西中医药大学)

摘要: 目的: 藤茶为葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedetata*)的嫩茎叶经传统炮制加工制成的保健茶, 民间常用于治疗咽喉炎, 皮肤炎, 风寒感冒, 黄疸

肝炎等症。藤茶中主要化学成分为黄酮类化合物。其中二氢杨梅素为其主要成分。本文通过采用不同产地加工方法对新鲜采集的藤茶进行加工处理，并测定其中二氢杨梅素含量的变化，探讨不同的产地加工方法对藤茶药材质量的影响，为藤茶的炮制规范化及其开发应用提供实验基础和科学依据。**方法：**分别采用低温烘干、高温杀青、微波处理、自然晒干、自然阴干几种不同产地加工方法对藤茶鲜叶进行加工，并模拟阴雨天将藤茶置于阴暗潮湿环境放置数天；然后采用高效液相色谱法测定不同方法加工处理的藤茶中二氢杨梅素的含量。**结果：**高温杀青、微波干燥法、低温烘干法处理的藤茶中二氢杨梅素含量均较高，自然晾晒法较低，而置于阴暗潮湿环境放置数天的藤茶中二氢杨梅素损失严重低至 3% 以下。本文对广西壮族自治区内三个不同产地的藤茶进行研究。含量对比发现藤茶经高温杀青、微波干燥、低温烘干方法处理后，其二氢杨梅素含量可达 21%~39%，自然晾晒法炮制的藤茶中二氢杨梅素含量为 14.43%~18.30%，而放置于阴湿环境中的藤茶含量则为 0.59%~2.42%。**结论：**藤茶的产地加工对其中主要活性成分的含量有很大影响，采摘后立刻杀青烘干、低温干燥或用微波处理可有效提高藤茶中二氢杨梅素的含量，从而保证藤茶药材的质量。

关键词：藤茶；产地加工；二氢杨梅素；含量对比；HPLC

Systematic study on QAMS method for simultaneously determination of triterpenoid saponins in *Ilex Pubescens* by HPLC and UPLC

Guojun Kuang¹, Jie Zhou¹, Meicun Yao², Qinglong Tan¹, Longkai Qi¹, Jianhui Liang¹, Yu Li¹,
Zhongxiang Zhao^{1,**}, Lei Zhang^{1,*}

(1. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, P. R. China 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, Guangdong, P. R. China)

Abstract: Quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) method was firstly established for simultaneous determination of six triterpenoid saponins (ilexgenin A (C₁), ilexsaponin A1 (C₂), ilexsaponin B1 (C₃), ilexsaponin B2 (C₄), ilexsaponin B3 (DC₁), ilexoside O (DC₂)) in *Ilex Pubescens* by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), respectively. Using C1 as the internal reference, the relative correction factors (RCF) of the other five triterpenoid saponins were calculated and statistically evaluated. The durability of the method was verified with five different LC instruments and five different C₁₈ columns under various chromatographic conditions. External standard method after methodology verification was chosen to check the accuracy and feasibility of QAMS method.

The results showed that RCFs of all compounds with good reproducibility (RSD<5.0%) were obtained whether on different chromatography instruments or under various chromatographic conditions. The relative retention value method could be adopted for accurately position the chromatographic peak of the six constituents, with their values of RSD ranging between 0.5%~1.6%. Meanwhile, no significant differences were found in the quantitative results of the six saponins in 9 batches of medicines calculated by the QAMS method and external standard method, whether on HPLC system or UPLC system. The QAMS method established in our research for simultaneous determination of the six saponins is accurate and feasible to evaluate the quality of *Ilex pubescens*, especially when the standard substance is inconvenient to obtain.

Keywords: QAMS, *Ilex Pubescens*, UPLC, HPLC, triterpenoid saponins

First Corresponding author*: Lei Zhang, Professor

E-mail:zhanglei261291@aliyun.com

Second Corresponding author**: Zhongxiang Zhao, Professor

E-mail:z zx37@163.com

一测多评法测定咽立爽口含滴丸中 4 种成分含量

游正琴^{1,2}, 罗奕¹, 吴琳琳¹, 茅向军^{2*}, 苏菊¹

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的: 建立一测多评法(QAMS)同时测定咽立爽口含滴丸中薄荷酮、樟脑、薄荷脑和龙脑含量, 验证此方法在咽立爽口含滴丸中应用的准确性、适应性和可行性。

方法: 采用 DB-WAX 毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm), 载气为氮气, FID 检测器, 升温程序为初始柱温 55℃, 以 1℃ min⁻¹ 升至 75℃, 再以 5℃ min⁻¹ 升至 105℃, 维持 10 min。以龙脑为内参物, 建立其与薄荷酮、樟脑、龙脑的相对校正因子, 并用相对校正因子进行计算, 同时采用内标法对 4 种成分进行含量测定, 通过比较两种方法的结果以验证一测多评法的准确性。**结果:** 薄荷酮在浓度 0.0568~0.5111 mg/mL、樟脑在浓度 0.0587~0.5280 mg/mL、薄荷脑在浓度 0.3992~1.9958 mg/mL、龙脑在浓度 0.7248~3.6241 mg/mL 的范围内线性关系良好; 薄荷酮、樟脑、薄荷脑和龙脑的平均回收率 (n=3) 分别为 97.07%(RSD=1.23%)、96.68% (RSD=1.38%)、98.57% (RSD=1.82%) 99.5%(RSD=1.21%); 龙脑与薄荷酮、樟脑、薄荷脑的相对校正因子分别为 1.0241、1.0185、1.0130; 一测多评法的计算结果与内标法的测定结果无显著性差异。**结论:** 该方法可靠, 结果准确, 一测多评法可应用于咽立爽口含滴丸中四种指标成分的含量测定, 能全面控制该制剂的质量。

关键词：一测多评法(QAMS)；咽立爽口含滴丸；相对校正因子 (RCF)；薄荷酮；樟脑；薄荷脑；龙脑

项目基金：贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目（黔科合中药字 20125030），贵阳市科技计划项目（筑科合同 2012204-1）

第一作者：游正琴，研究生，初级药师，研究方向：药品质量标准研究，
电话：18275629973，E-mail：2640437537@qq.com

***通讯作者：**茅向军，博士，主任药师，研究方向：药品质量研究。
电话：0851-86808857，E-mail: 1074459931@qq.com

在线高效液相色谱-生物化学检测快速筛选中药药效成分

丁晓萍 定天明

（湖北省食品药品监督检验研究院）

目的：本文综述了 84 篇采用在线 HPLC-BCD（高效液相色谱-生物化学检测）分析方法筛选中药活性成分的学术论文，旨在对目前这些中药有效成分快速筛选的分析技术和方法进行评价，论述目前分析技术存在的优缺点及仪器系统在线连接需改进的技术问题。

方法：采用在线 HPLC-DAD-DPPH/ABTS（高效液相色谱-二极管阵列-DPPH/ABTS 自由基）、HPLC-DAD-MS-DPPH/ABTS、HPLC-MS-CL（MS：质谱；CL：化学发光）、HPLC-DAD-CL-NMR（NMR：核磁）方法筛选自由基清除活性成分；采用 HPLC-MS-FL/DAD-EAD（FL：荧光检测；EAD：enzyme activity/affinity，酶活性/结合检测）方法筛选乙酰胆碱酯酶、 α -葡萄糖苷酶、血管紧张素 I 转换酶、P450 酶、谷胱甘肽-S-转移酶、丝氨酸转移酶、HIV 蛋白酶、磷酸二酯酶、激酶/磷酸酶、MAP-激酶抑制剂或受体结合剂；采用 HPLC-MS-FL/DAD-RAD（RAD，receptor affinity detection，受体结合检测）筛选雌激素受体、尿激酶型纤溶酶原激活剂受体配体结合剂等。

结果：HPLC-DAD/MS-DPPH/ABTS、HPLC-MS-CL 自由基清除活性成分筛选方法仪器系统连接简单、检测信号稳定、便于操作，已经实现了稳定的在线分析系统，并有柱后衍生商品化仪器。

DPPH 在线分析因受其溶媒甲醇及流动相中有机溶剂和酸的影响易产生基线漂移，ABTS 溶媒为缓冲液使得在线分析基线稳定、灵敏度略高于 DPPH，HPLC-MS-

CL 方法的灵敏度较 DPPH/ABTS 方法高，流动相易引起柱后氧自由基反应检测基线的漂移。

HPLC-MS-FLD/DAD-EAD/RAD 方法要求色谱分离流动相的有机相适于酶和受体的生物反应体系（甲醇低于 10%，乙腈低于 5%），研究采用低流速、柱或检测器后分流、柱后附加反比例流动相、高温色谱柱分离随机冷却装置等方法，以达到色谱分离系统和生物反应体系的兼容性，由此产生的生物活性峰分离度低、检测灵敏度低、峰展宽等问题是目前现代分析技术及仪器发展期待解决的难题。

结论： 通过汇总各种在线 HPLC-BCD 分析技术及研究对象，客观评价各种方法的研究结果及特点，阐明目前在线联用分析技术存在的问题及其发展趋势，为快速筛选作用疾病不同靶点的中药有效成分和解析中药整体效应提供研究方法。此外，在线分析仪器系统的柱后/检测器后有机溶剂去除装置的开发研究，将提高现代分析技术在生物化学领域中的应用前景。

关键词： HPLC-DAD/MS-DPPH/ABTS；HPLC-DAD-MS-CL；
HPLC-FLD/DAD-MS-EAD/RAD；自由基；酶/受体

湖北省药品近红外光谱快速检验技术的应用及展望

张立

（湖北省食品药品监督检验研究院）

摘要： **目的** 对湖北省近年来近红外光谱快速检验技术在药品中的应用进行总结，为湖北省快速检验研究体系的完善和快检技术的发展提供理论和应用基础。**方法** 结合湖北省抽样计划和中央转移支付任务中近红外光谱快检方法研究部分的任务，对湖北省辖区内生产的基本药物建立近红外快速定性模型。并对下一步近红外快速鉴别模型的应用和发展进行探讨。**结果** 湖北省内基本药物近红外快速定性模型基本达到全覆盖。**结论** 快速检验技术的研究有着重要的意义，符合中国食品药品监管的国情，而快速检验技术的发展和推广不仅需要科研人员的研究，更需要国家制度和新型监管模式的保障。

关键词： 快速检验技术；近红外光谱；基本药物

UPLC 法测定香连制剂中木香烯内酯、去氢木香内酯的含量

陈晓颀

(湖北省食品药品监督检验研究院)

摘要: **目的:** 建立超高效液相色谱法测定香连制剂中木香烯内酯、去氢木香内酯的含量。**方法:** 采用 BEH C18 色谱柱(50mm×2.1mm, 1.7 μm), 以甲醇-水(55:45)为流动相, 流速 0.2mL·min⁻¹, 检测波长 225nm, 柱温 30℃, 进样量 1~2 μL。**结果:** 木香烯内酯和去氢木香内酯线性范围分别为 48.96~1.244ng、44.80~1.12ng (r>0.999)。不同厂家、相同厂家不同批次的香连制剂中 2 个成分的含量参差不齐, 各剂型间 2 个成分的含量也存在差距。**结论:** 采用 UPLC 法测定香连制剂中 2 个成分的含量, 分析速度快, 溶剂用量少, 重复性好, 为香连制剂的质量评价提供参考。

关键词: 香连; 木香烯内酯; 去氢木香内酯; 超高效液相色谱法

一种能同时鉴别人参、西洋参、三七的多重 PCR 方法

刘丽, 肖炳燚, 罗晖明, 聂平, 李文莉

(湖南省食品药品检验研究院)

目的: 建立一种能同时鉴别人参属人参、西洋参、三七三种药材的多重 PCR 方法。

材料: 本实验所用样本为野外采集或购自药材市场, 收集后放置硅胶中常温干燥保存备用。样品共计 89 批: 人参 33 批 (R1~R33); 西洋参 15 批 (X1~X15); 三七 13 批 (S1~S13); 其它中药材 28 批 (Z1~Z28) (详见附图说明) 及其它药材样品 14 批。均经过专家鉴定。

方法: 通过分析人参、西洋参、三七的 *psbA-trnH* 基因序列(登录号: HQ112864; HQ112888; HQ112884)的差异设计了特异性引物对 1

(1-UP: 5'-GTTTTTTTAAAAAGAAAAGATAAAAATG-3',

1-LO: 5'-CCCTACTATTCTTTTCCTTACGTT-3';)

利用 RAPD 标记筛选获得特异性片段的基因序列, 设计了特异性引物对 2

(2-UP: 5'-CGCCCTTCTCATAAGATGTTG-3',

2-LO: 5'-CCCTTCATCGAAAGAGTAGGC-3')。

实验阳性对照为购自中国食品药品检定研究院的人参(编号为 R1)、西洋参(编

号为 X1)、三七(编号为 S1)对照药材,空白对照为灭菌双蒸水。同时,采用通用引物 ITS2 对所有用于 PCR 鉴别的样本 DNA 进行扩增,均得到约 500bp 左右的扩增条带,以确保本实验的模板 DNA 质量均符合要求。利用上述引物建立了用于鉴别人参属人参、西洋参、三七的多重 PCR 方法,并对耐受性和特异性进行考察和验证。

结果:

1. 特异性引物对 1 在人参或西洋参中能扩增获得约 150bp 的特异性片段,特异性引物对 2 在西洋参或三七中可扩增获得约 400bp 的特异性片段。

2. 建立了多重 PCR 扩增方法

反应体系: 5×Primer STAR Buffer (Mg²⁺ plus) 5.0 μL, dNTPs mixture(2.5mM) 3μL, 鉴别引物对 1 (2μM) 2μL, 引物对 2 (2.5μM) 1μL, PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara, 2.5U/μL) 0.25μL, DNA 模板 1.0μL, 无菌双蒸水补充体系至 25 μL。反应参数: 95℃预变性 3 min, 98℃变性 10 s, 50℃退火 15s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环后, 72℃延伸 7 min, 4℃保存。

3. 耐受性考察结果

使用 ABI Veriti、ABI SimPliamp、BIORAD T100 以及 SensQuest GmbH 等品牌的 PCR 仪,所得扩增条带亮度基本一致,均不影响 PCR 鉴别结果的判定。

分别使用普通 Taq (TIANGEN 公司),高度保真的 PrimeSTAR HS 酶 (Takara 公司)普通缓冲液、高度保真的 PrimeSTAR HS 酶 (Takara 公司)GC 缓冲液、High Fidelity PCR Master (Roche 公司)和 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme 公司)进行试验,结果表明,除使用普通国产 Taq 酶 (TIANGEN 公司)不能获得有效的扩增条带外,其它品牌均能获得特异性带型,扩增条带的亮度稍有差异,其中以 PrimeSTAR HS 酶 (Takara 公司)普通缓冲液为最佳。

4. 特异性鉴别结果

使用收集的 89 批样品对所建立的多重 PCR 鉴别体系进行特异性考察和验证,结果表明,所有人参样本可扩增出片段大小约为 150bp 的特异性条带(见图 1-A、B),西洋参样本可扩增片段大小出约为 400bp 和 150bp 两条特异性片段(见图 1-C),三七样本可扩增出片段大小约为 400bp 的特异性产物(见图 1-D),在所研究的其它 28 种药材均为阴性扩增(见图 1-E、F)。因此,本多重 PCR 方法能够成功地鉴别人参、西洋参、三七。

结论：本多重 PCR 鉴别体系特异性好，适用性强，只通过一次 PCR 扩增即可准确、可靠的鉴别人参、西洋参、三七原植物及其药材和饮片，PCR 鉴别结果与形态学生药鉴定结果完全吻合，值得推广和应用。

关键词：人参属；人参；西洋参；三七；多重 PCR；分子鉴别；

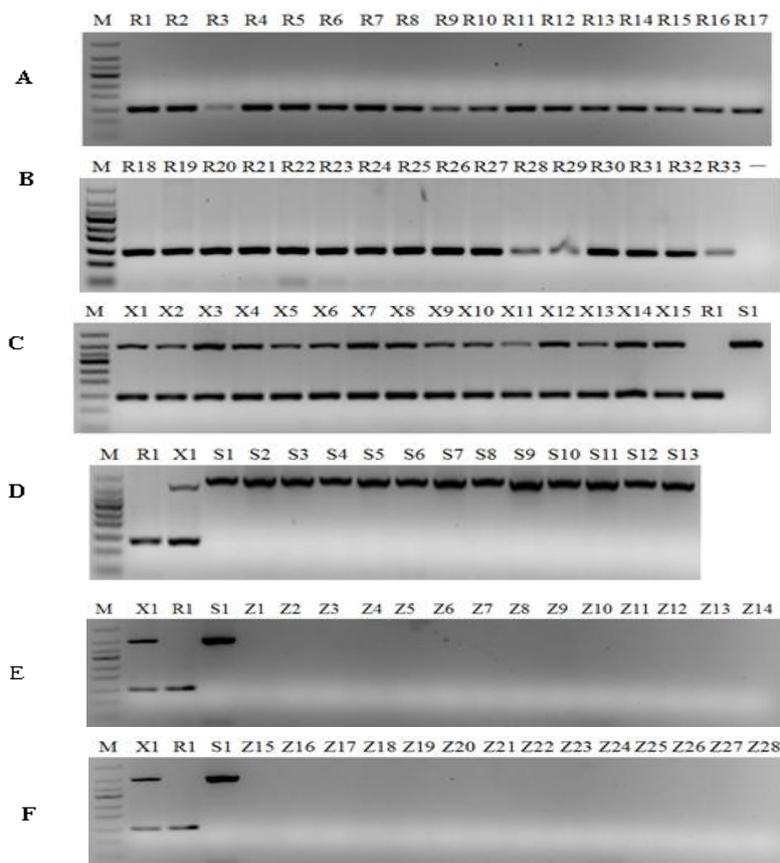


图 1：特异性引物对所有样本的 PCR 鉴别结果

（图 1-A 中 R1~ R17、图 1-B 中 R18~ R33 为 33 批不同来源的人参；图 1-C 中 X1~X15 为 15 批不同来源的西洋参；图 1-D 中 S1~S13 为 13 批不同来源的三七；图 1-E 中药材为：Z1 景天三七，Z2 栝兰，Z3 水田七，Z4 姜黄，Z5 竹节参，Z6 商陆，Z7 紫茉莉，Z8 莪术，Z9 板蓝根，Z10 厚朴，Z11 杜仲，Z12 玄参，Z13 何首乌，Z14 甘草；图 1-F 中药材为：Z15 积雪草，Z16 满山红，Z17 布渣叶，Z18 络石藤，Z19 救必应，Z20 西河柳，Z21 青椒，Z22 急性子，Z23 火麻仁，Z24 胡芦巴，Z25 紫苏子，Z26 韭菜子，Z27 莲子，Z28 花椒。M：凝胶电泳 DNA 分子标记（DNA ladder 50bp），从上至下依次为：500bp、400bp、350bp、300bp、250bp、200bp、150bp、100bp、50bp。空白对照标为“—”）

含乳香没药血竭的中成药中松香酸的检测方法初探

刘卉*

（黄石市食品药品检验检测中心 435000）

摘要：采用一种薄层色谱和高效液相色谱法对 6 种剂型 17 个品种的 20 个含乳香没药血竭的中成药中松香酸进行检测，得到了满意的结果。

关键词：松香酸 乳香 没药 血竭 薄层色谱 高效液相色谱

目前市场上的乳香、没药、血竭等树脂类药材中常掺有松香，根据规定药用松香一定要经过严格的质量检测，各类有毒物质的含量都必须符合一定标准才能入药，而工业用的松香中常常含有铅等重金属和有毒化合物，以及氧化后产生的过氧化物会严重损害人体肝、肾等器官。国家局颁布了相关补充检验方法和检验项目批准件，用于日常监督检查。目前我国已批中成药品种中，含乳香的约 400 个，含没药的约 340 个，含血竭的约 160 个，而目前国家局只颁布了一个含这类药材的中成药的补充检验方法和检验项目批准件，不能满足监督检查需要。笔者尝试借鉴现有的检验方法对 6 种剂型 17 个品种的 20 个含乳香没药血竭的中成药中松香酸进行检测，得到了满意的结果。

1. 样品与来源

样品来源于黄石市场抽样，分别为大活络丸、活血止痛散、骨筋丸胶囊、风湿关节炎片、舒筋丸、腰痛片、颈腰康胶囊、伤科接骨片、复方三七胶囊、骨筋丸胶囊、大七厘散、颈复康颗粒、舒筋丸、痹痛宁胶囊等 17 个品种 20 个样品。

2. 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪；CAMAG 紫外灯箱；松香酸对照品（中国药品生物制品检定所 111938-201201）；乙腈为色谱纯，水为重蒸馏水。

3. 方法与结果

3.1 对照品溶液制备 精密称取松香酸对照品，加乙醇溶解制成 1mg/ml 的溶液（供薄层色谱鉴别用）；取上述对照品溶液 5ml，置 100ml 量瓶中，加乙醇稀释至刻度，作为液相色谱测定的对照品溶液。

3.2 供试品溶液制备 散剂取 0.3g、搽剂 1ml、胶囊 1 粒的内容物、片剂 1 片，研细，加乙醇 10ml，超声处理 20 分钟，滤过，滤液作为供试品溶液。

3.3 试验方法

3.3.1 薄层色谱法 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板，供试品溶液和对照品溶液各点样 5 μl，以石油醚（60~90℃）-乙酸乙酯-冰乙酸（9:1:0.1）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯（254nm）下检视。观察供试品色谱中，在与松香酸对照品色谱相应的位置上显示的荧光淬灭斑点。阳性结果以高效液相色谱法验证。

3.3.2 高效液相色谱法 (HPLC-DAD 法)

色谱柱: Waters sunfire C18(4.6mm×250mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸(75:25); 流量 1.0mL·min⁻¹; 检测波长 241; 柱温 25℃; 进样量 10 μl. 理论板数按松香酸色谱峰计算应不低于 2000。

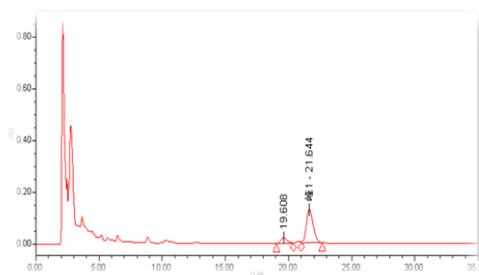


图1 阳性样品供试品溶液 HPLC 图谱

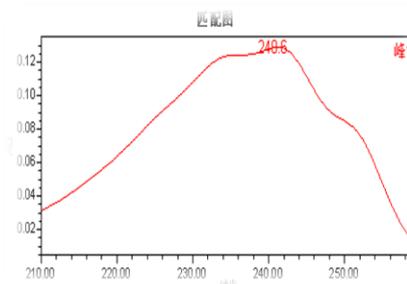


图2 3号供试品溶液峰1紫外吸收图谱

3.4 结果

从薄层色谱法初步检测出 1 号、2 号、3 号样品中有松香酸的斑点。

用高效液相色谱法验证:

供试品色谱中, 出现与松香酸对照品色谱峰保留时间相同的色谱峰。采用二极管阵列检测器比较相应色谱峰在 210~260nm 波长范围的紫外-可见吸收光谱后, 发现供试品与对照品色谱峰均在 241nm 处显示最大吸收。

4. 讨论

我们对薄层色谱法未检出松香酸的样品也都进行了高效液相色谱法检测, 结果样品色谱图中未出现与松香酸对照品色谱峰保留时间相同的色谱峰。17 个含松香处方品种 20 个样品, 有 3 批检出松香酸。由于要得到 17 个品种的阴性样品很困难, 我们将未检出松香酸的样品拟作阴性样品, 拟将处方中含松香的样品作为阳性样品, 方法学还需有待进一步完善。

UPLC-Q-TOF MS 法分析泽兰中化学成分

任强 王云龙 聂其婷 王慧云

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

Analysis of the chemical constituents from *Lycopus lucidus* Turcz by UPLC-Q-TOF MS

Qiang Ren Yunlong Wang Qiting Nie Huiyun Wang

Abstract: An UPLC-Q-TOF MS method was established to characterize and identify chemical compounds of *Lycopus lucidus* Turcz. The retention time, maximum UV absorption wavelength, accurate mass weight and characteristic fragment ions were obtained and a total of 37 compounds were elucidated including 15 phenolic acid, 12 flavonoids, 3 triterpenoids and 7 organic acid by a single run on the basis of mass data. The research enriched the chemical information of *Lycopus lucidus* Turcz.

Key words: UPLC-Q-TOF MS; *Lycopus lucidus* Turcz; chemical constituents

作者简介: 任强, 男 (汉族), 从事药物分析研究。Email: ren2323@163.com

超临界流体色谱结合质谱联用技术快速分离三萜皂苷

黄洋, 张婷婷, 周海波, 冯颖, 范春林, Jacques Crommen, 江正瑾

(暨南大学药学院, 广州, 510632)

摘要: 三萜皂苷是传统中药中的一类发挥药效的常见成分, 其有着广泛的药理作用。本文采用超临界流体色谱结合质谱联用技术 (supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometer, SFC-MS) 对苦丁茶冬青皂苷、野木瓜皂苷、人参皂苷进行快速、高效的分析。通过筛选 8 种不同种类固定相后, 发现 9 种苦丁茶冬青皂苷在 ZORBAX RX-SIL (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱上得到合适的保留和较好的分离。此外, 通过对分离条件的系统优化发现, 当加入适量水 (10% 或者 5%) 和 0.05% 甲酸作为流动相添加剂后, 质谱灵敏度和色谱分离表现均得到明显改善; 柱温为 20 °C 时, 各组分均达到基线分离。补充液乙酸铵浓度为 10 mM 时各化合物的质谱离子化程度最高。在优化的色谱条件下, 较之于传统高效液相色谱法, SFC 具有较好的分离度和更短分析时间。同时, 为了验证方法的实用性, 将 SFC-MS 法应用于苦丁茶、西洋参、生晒日参实际样品中的三萜皂苷的分析, 9 种苦丁茶冬青皂苷和 11 种人参皂苷均得到较好的分析检测。结果表明, 该法能高效、快速鉴定天然产物中的三萜皂苷类成分, 同时为该类成分的质量控制提供一种优化思路。

关键词: 三萜皂苷; 超临界流体色谱; 中草药

高效液相色谱法测定创新药 SHR4640 的有关物质

王菊^{1,2}, 武乖利¹, 李语如¹, 杭太俊^{2*}, 卢韵¹

(1 江苏恒瑞医药股份有限公司, 连云港 222047, 2 中国药科大学, 南京, 210009)

摘要: SHR4640(1-((6-溴喹啉-4-基)硫基)环丁基)甲酸钠(图 1), 是江苏恒瑞医药股份有限公司自主研发的 1.1 类新药, 是一种新型的 URAT1 选择性抑制剂。其通过抑制尿酸在肾近曲小管的重吸收而促进尿酸排泄, 降低血尿酸水平。对应的药物制剂 SHR4640 片临床上可用于治疗高尿酸血症和痛风。目前, SHR4640 已经完成临床前研究, 同时 SHR4640 片已经获得国家食品药品监督管理局批准, 正在进行 I 期临床试验。

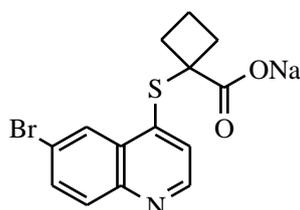


图 1 SHR4640 结构式

与目前处于临床研究阶段的选择性的 URAT1 抑制剂相比, SHR4640 活性明显强于 RDEA-594 (体外对 URAT1 转运体的抑制活性约为 RDEA594 的 200~500 倍)。临床前试验数据表明 SHR4640 是一个高效低毒的降尿酸药物, 临床上将显现出理想的降血尿酸作用和较大的安全范围, 具有很大的开发价值。

本文结合 SHR4640 合成工艺以及破坏试验、进行定性分析, 建立了 SHR4640 有关物质分析方法。色谱条件采用色谱柱 Agilent Eclipse Plus-XDB C18 (100×4.6mm, 3.5μm); 流动相 A 为 0.02mol/L 磷酸二氢钠 (0.1% 三乙胺, 磷酸调节 pH2.70), 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱; 检测波长 230nm; 柱温 30℃; 流速 1.0 mL min⁻¹;

此外, 结合多批次样品的有关物质检测结果及本品的工艺和降解途径, 研究了本品中可能存在的杂质/降解物有三个, 分别标示为杂质 A、杂质 B、杂质 C, 其中杂质 A 为工艺中未反应的中间体与二氯甲烷反应的副产物, 杂质 B 为光照降解杂质, 杂质 C 为第二步反应中的工艺杂质, 3 个杂质均进行了 HPLC 定位及 MS、NMR、IR 结构确证。

起始物料、各步中间体、定性杂质 A、B、C 与本品粗品混合进样的 HPLC 图见下图 2。

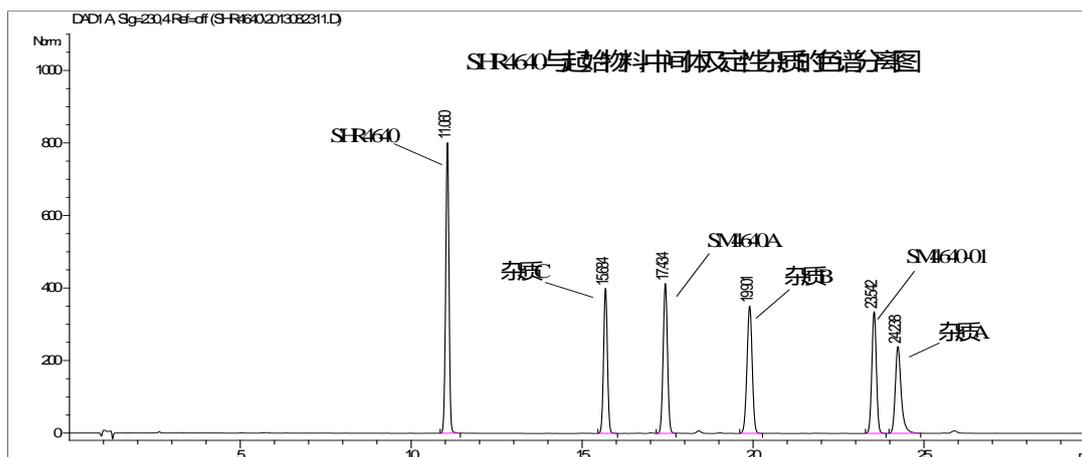


图 2 SHR4640 与起始物料、中间体、定性杂质混合进样色谱分离图

采用上述色谱条件对本品进行酸、碱、加热、光照、氧化破坏试验，结果表明在酸加热，氧化及光照破坏条件下，SHR4640 均产生明显降解，在加热及碱加热破坏条件下 SHR4640 相对基本稳定。比较 205nm、230nm 波长下的杂质检出量、杂质数目，在 230nm 波长条件下，杂质量及杂质数目均相对较多。根据本品及主要杂质、中间体的吸收情况及主要降解杂质的紫外吸收均在 230nm 附近，最终确定检测波长为 230nm。

SHR4640 的定量限约为 1.00ng，检测限约为 0.30ng。因可检出供试品中约 0.015% 的微量杂质。杂质 A、B、C 的定量限分别约为 1.00ng、0.39ng、0.40ng；检测限分别约为 0.30 ng、0.12ng、0.12 ng。

考察样品溶液在 0、2、4、6、8、12 小时内的稳定性，供试品溶液随着放置时间的延长，杂质 A、C、最大未知单杂及总杂峰面积基本不变，说明供试品溶液在室温下放置 12h 比较稳定。

通过色谱条件进行微小的改变，如柱温（ $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 、 $\pm 2^\circ\text{C}$ ）、缓冲溶液的 pH 值（ ± 0.5 和 ± 0.05 ）、有机相比比例（ $80 \pm 2\%$ ）、流速（ $1.0 \pm 20\%$ 和 $\pm 10\%$ ），同时换用不同品牌及同一品牌不同批号的色谱柱，对本品有关物质测定的系统适用性溶液以及同一批样品测定结果进行了耐用性考察。研究结果表明，本品有关物质测定色谱条件对流动相 pH，柱温等要求均较高。已知杂质的相对保留时间会随 pH 的变化略有不同。为了保证结果的准确性，我们需要对流动相的 pH 等测定条件进行了严格的控制，并采用含有已知杂质的系统适用性溶液进行准确的定位方式进行计算。

我们采用标准曲线法测定了可能存在的工艺及降解杂质 A、B、C 的校正因子。各杂质相对于 SHR4640 的校正因子分别为 0.57、0.68、0.85，超出 0.9~1.1 的范围，测定误差较大，所以采用加校正因子的自身对照法计算有关物质，更能准确反映药品中的杂质真实含量。

综上, 本文建立了灵敏度高, 专属性强的有关物质分析方法, 为创新药 SHR4640 原料药的生产工艺过程和质量控制提供了重要依据。

关键词: 创新药; SHR4640; 高效液相色谱法; 有关物质

***通讯作者:** 杭太俊, 男, 教授 研究方向: 现代药物分析

Tel / Fax: 86-25-83271090, E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

运用液质联用技术对连翘中四种黄酮醇类化合物抗氧化活性进行定量研究

黄荣清*, 李一鸣, 杨建云, 肖炳坤

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 本文在前期研究的基础上, 通过建立液质联用方法对提取自连翘中的化合物芦丁、金丝桃苷、槲皮素和槲皮苷抗氧化活性进行定量分析。该方法的优点是测定结果准确, 避免了 ABTS⁺与四种黄酮醇类化合物的反应加合物源内裂解对测定结果造成的影响, 并且能够对富含不同构型黄酮醇类化合物的抗氧化活性进行区分和评价。方法: ABTS 自由基 (ABTS⁺) 反应是最常用的抗氧化活性评价系统, 通过该系统分别与连翘提取物芦丁、金丝桃苷、槲皮素和槲皮苷在合适的条件下避光反应 30 min, 最后测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素和槲皮苷化合物反应后的浓度。用 Masshunter quantitative Analysis (B.04.00) 软件分析, 按下述算式计算样品对 ABTS⁺的清除活性。清除 ABTS⁺活性 (%) = $(1 - C_1/C_0) \times 100\%$; C_0 为反应前化合物的浓度, C_1 为反应后化合物的剩余浓度。用甲醇作为溶剂, 采用 Agilent ODS Hypersil C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm), 0.1% 甲酸水-甲醇为流动相梯度洗脱, 流速 0.6 mL min⁻¹, 柱温 25 °C; 电喷雾源, 负离子模式多反应选择离子检测 (MRM), 母离子和子离子分别为 m/z 609 → 300 (芦丁)、 m/z 463 → 300 (金丝桃苷)、 m/z 301 → 151 (槲皮素)、 m/z 447 → 300 (槲皮苷), 采用外标法进行定量分析。结果: 芦丁、金丝桃苷、槲皮苷在 0.5~1000 ng mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r > 0.998$), 定量限为 0.5 ng mL⁻¹, 槲皮素在 100~1600 ng mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r > 0.998$), 定量限为 30 ng mL⁻¹, 仪器精密度良好 (RSD < 3.0%), 芦丁、金丝桃苷及槲皮苷化合物供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。结论: 本方法具有灵敏度高, 分析时间短等特点, 相对于其它检测方法, 提高了检测的准确性, 且能够对化合物进行定性, 适用于对富含不同构型黄酮醇类化合物的抗氧化活性进行区分和评价。经计算, 芦丁、金丝桃苷、槲皮素和槲皮苷四种化合物对 ABTS⁺的清除率

分别为 18.35%，36.28%，41.50%和 37.18%。

关键词：ABTS 自由基；液质联用；芦丁；金丝桃苷；槲皮苷；槲皮素

基金项目：国家自然科学基金(No.21375147，81072613)；国家科技重大新药创制专项课题(No.2013ZX09102-016)

***通讯作者：**黄荣清 E-mail: hrongqing@163.com Tel: (010)66930217

非衍生化毛细管电泳测定啤酒中的氨基酸

罗添，柯静，董钰明*

(兰州大学药学院药物分析研究所，甘肃 兰州 730000)

摘要：氨基酸是自然界重要的生命物质，对于氨基酸的分离在食物、化工、医药等行业有重大的意义。通常氨基酸的测定有纸色谱法、高效液相色谱、毛细管电泳等，较其他的分析方法，毛细管电泳法能够快速、精确的测定氨基酸，而且用量少，分离效率高。因此在氨基酸的分离测定中发挥了重要作用。大多数氨基酸由于不含芳香基团从而很难用毛细管电泳直接紫外吸收测定法进行分析。因此需将氨基酸进行衍生化提高灵敏度来检测。但这种方法对衍生试剂要求较高，且操作过程复杂，有时所得的衍生产物不稳定将造成结果的不准确。因此，使用未衍生化的方法是非常有必要的。

在该研究中我们利用 Cu^{2+} 与氨基酸的配位作用，形成不同的配位化物。在高电场的的作用下具有不同的迁移能力，从而实现了氨基酸的有效分离。此外结合一种有效的在线扫描富集技术，将样品聚集在毛细管的区带中，从而大大提高了被分析物的灵敏度。在 50mmol/LCuSO_4 的缓冲体系中，通过时间为 70s 的样品在线扫描富集，利用 20 kv 的电压可以实现啤酒中氨基酸的有效分离。

关键词：氨基酸；毛细管电泳；配位相互作用；在线扫描

消白颗粒的质量标准提升研究

苏华 廖欣 江静怡 陆崧 乔立业

(南京军区南京总医院制剂科，江苏，南京 210002)

摘要：目的：消白颗粒是南京军区南京总医院的医院制剂，由黄芪、当归、玄参、首

乌、蒺藜等 13 味中药组成,原质量标准仅对黄芪,首乌和补骨脂进行薄层色谱鉴别,质量标准提升研究工作拟在原有的基础上对黄芪、何首乌、补骨脂的薄层鉴别进行改进,同时增加臣药地黄的薄层色谱鉴别;另采用高效液相色谱法对制剂中君药黄芪有效成分进行定量研究,以提升制剂的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对消白颗粒中的黄芪、地黄、首乌、补骨脂进行定性鉴别;采用 HPLC-ELSD 法定制剂中黄芪甲苷的含量,使用 Lichrospher-C18 柱(4.6×250mm,5μm)色谱柱,以乙腈-水(32:68)为流动相,流速 1.0 mL min⁻¹,柱温 25 °C,蒸发光散射检测器检测。**结果:**消白颗粒中黄芪、地黄、首乌、补骨脂的 TLC 斑点清晰,分离度良好,阴性无干扰。黄芪甲苷在 0.3115~2.8039μg (r=0.9999) 呈良好的线性关系,平均回收率为 99.42% (RSD=2.67%)。**结论:**实验研究发现,当归薄层鉴别中供试品与对照药材在相应的位置不显斑点,玄参薄层鉴别中供试品与对照药材及对照品哈巴俄苷的斑点颜色不一致,且有疑似阴性斑点,颜色与供试品斑点颜色一致,可能因为制剂生产中的前处理水提液中,玄参中的哈巴俄苷未被提取完全。在研究地黄的薄层鉴别时^[4],根据原有薄层条件进行展开,发现以正己烷-丙酮-乙酸乙酯(5:2:1)为展开剂,喷以 1% 香草醛乙醇溶液-3% 高氯酸水溶液(1:1)溶液显色后,供试品与对照品的斑点不清晰且斑点的 Rf 值偏高。后改用正己烷-丙酮-乙酸乙酯(10:2:1)为展开剂,5% 的香草醛硫酸溶液为显色剂,结果供试品与对照品在相应位置上显相同颜色斑点,阴性样品无干扰。

黄芪有效成分黄芪甲苷的测定采用蒸发光散射检测器方法测定,本文对甲醇-水、乙腈-水等流动相进行考察,结果发现甲醇-水(20:80)对照品出峰时间较晚,乙腈-水(80:20)对照品出峰太快且分离度不佳,最终选择乙腈-水(32:68)为流动相,结果所测目标成分出峰时间、分离度较好。所建立方法简便、准确,重复性好,可作为消白颗粒的质量标准。

关键词: 消白颗粒; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器

结构选择性 SERS 衬底的构建及其对青霉素类药物中 青霉噻唑酸的快速检测

张丽颖, 都述虎*

(南京医科大学药学院, 南京 211166)

摘要: 青霉素类抗生素是目前临床上最常用的一类抗感染药物, 具有高效、低毒等特点, 但其用药后所引发的过敏性反应因为发生迅速、后果严重, 严重威胁着患者的生命安全。研究表明, 青霉素类药物本身并没有抗原性, 其生产或贮存过程中降解产生的小分子杂质青霉噻唑酸是引起过敏反应发生的主要原因。因此快速灵敏检测青霉素药物中青霉噻唑酸对于控制过敏反应的发生具有重要意义。表面增强拉曼光谱 (SERS) 因具有灵敏度高、信息含量丰富、能够实现快速无损检测等特点, 在化学、生物和药物分析领域被认为是一种优良的检测工具。为达到快速高效检测青霉噻唑酸的目的, 本研究小组分别构建了核壳型金属溶胶和二维分子印记单层两种衬底材料, 并对其检测机理进行了探索。

核壳型 Au@Ag 纳米溶胶作为一种复合纳米材料, 充分利用了 Au 纳米粒子高度的均匀性和银纳米粒子强的拉曼增强能力这两种特性, 并且相对原有单粒子的共振吸收, 形成更宽的等离子共振吸收带。我们以 Au@Ag 纳米粒子为拉曼增强衬底, 探索了该粒子对青霉素类药物中青霉噻唑酸的选择性识别过程与拉曼信号的放大输出机制和规律; 建立了青霉素类药物中微量杂质分析的技术平台; 实现了对青霉素类药物中青霉噻唑酸的快速鉴定与检测。实验结果显示, 青霉素和青霉噻唑酸与 Au@Ag 纳米粒子相互作用方式和拉曼增强效果具有明显的差异, 青霉噻唑酸分子通过两个羧酸基团很容易将不同 Au@Ag 纳米粒子连接在一起形成“热点”, 使其拉曼信号得到极大增强。且增强效果是青霉素的 60,000 倍。采用 Au@Ag 纳米粒子溶胶对青霉噻唑酸溶液进行 SERS 检测, 检测限达到 0.1 μM , 而对青霉素药物中青霉噻唑酸进行 SERS 检测, 检测限为 0.1% (w/w)。

尽管 Au@Ag 纳米溶胶表现出较高的拉曼增强能力和识别特性, 但是溶胶体系的不稳定性以及弱的抗干扰能力制约了在实际检测中的应用。为了克服这些缺点, 我们将分子印记技术(MIT)与拉曼光谱相结合, 在 Ag 膜表面构建了具有高选择性的二维分子印记单层, 并用于青霉素类药物中青霉噻唑酸的快速检测。在 Ag 膜(衬底)制备的过程中, 为了增加固相基底的均匀性, 我们将卤素离子引入到银镜反应过程中, 系统地考察了卤素离子种类对银镜反应速率以及生成银纳米粒子形貌的影响。在此基础上, 将模板分子青霉噻唑酸-对苯二胺复合物修饰在 Ag 膜的表面, 然后将其浸没在烷基硫醇溶液中, 自组装成单层, 最后通过溶剂洗脱, 除去模板分子, 形成二维分子印记单层 SERS 衬底。在制备过程中, 我们重点对复合模板分子构建、烷基硫醇以及 4-氨基苯硫酚(探针分子)浓度选择等进行了优化, 并对这一高选择性二维分子印记单层衬底的 SERS 检测机理进行了探讨。在实际样本检测中, 我们通过检测探针

分子拉曼信号强度的变化,间接实现对水溶液中青霉噻唑酸进行 SERS 检测,检测限达到 0.1 nM。而针对青霉素药物中青霉噻唑酸 SERS 检测,检测限为 0.01% (w/w)。与 Au@Ag 溶胶相比,检测限分别提高 1000 倍和 10 倍,由此可知这一新颖的 SERS 衬底将在生物免疫检测、环境污染物监测和药物分析等方面具有广阔的应用前景。

关键词: 表面增强拉曼光谱,核-壳型复合纳米粒子,二维分子印记单层,青霉素,青霉噻唑酸

飞行时间串联质谱分析不同干燥方法对蟾酥质量的影响

牛会霞

(南京中医药大学)

摘要:干燥是影响药物采收后天然药物保存的一个关键性因素。干燥能抑制微生物生长防止药物变质的同时导致药物中其他物质发生含量变化,影响药物质量。本实验通过 UPLC-TOF/MS 技术和多变量统计分析方法研究比较四种干燥方法(常温干燥、60℃烘干、60℃真空和冷冻干燥)对药物质量的影响。

首先用 MarkerLynx XS 软件进行数据的组间比较,用主成分分析法对四种不同干燥方法进行模式识别,其中,PCA 图显示,五组样本基本分离,且各组内样本点聚集较好。两组间距离越大,说明组间差异越大,为不同干燥方法分类提供了依据,但两组间具体差异细节仍不清楚。随后利用有监督的 OPLS-DA 模式排除与样品分类无关的信息,得到变量权重值(VIP)。VIP>1 的变量具有统计学意义,同时筛选含量差异为 1.5 倍以上的甾体物质作为组间标志物。结果显示:常温干燥与鲜品组比较,游离型和结合型甾烯类物质呈现明显降低趋势且倍数较高;60℃真空干燥与鲜品比较,部分游离型物质含量呈下降趋势,但倍数明显小于常温与鲜品组;此外部分结合型物质呈现升高趋势等等。此结果提示蟾酥甾烯常温下大量损失,原因很可能是干燥过程中酶发生了作用。60℃真空干燥蟾酥甾烯总体含量偏高,很可能是高温环境下酶失活。总之,在干燥过程中,选择适宜的温度至关重要,这对于抑制酶的生物转化和维持蟾酥甾烯的稳定性起关键性作用。

关键词: 干燥方法;蟾酥甾烯;UPLC-TOF/MS;多变量统计分析

铁皮石斛指纹图谱及化学成分研究

邵自星, 梁晓萍, 王义明, 罗国安, 梁琼麟*

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 铁皮石斛是一种常用的滋补中药, 主要为石斛属兰科植物。在临床上, 铁皮石斛被用于治疗多种疾病, 它具有抗氧化、抗衰老、提高免疫力、抗辐射、扩张血管和抗凝血, 抗癌等药理活性。2015 版《中国药典》只对铁皮石斛中糖类成分和毛兰素进行了质量控制, 而中药指纹图谱技术克服了依赖一种或几种指标成分的物理化学性质鉴别评价中药质量的缺点, 可以从整体层面全面、准确地体现中药质量, 液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 已在复杂体系化学成分快速分离和鉴定方面得到广泛应用, 因此借鉴中药指纹图谱和液质联用技术可以对铁皮石斛进行全面、整体的质量品质评价。

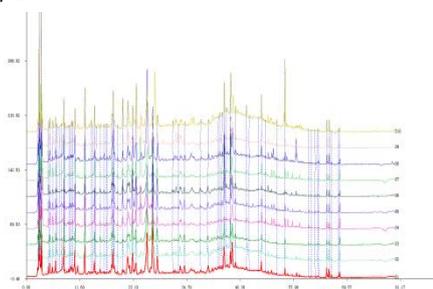


图 1 铁皮石斛 HPLC 色谱图

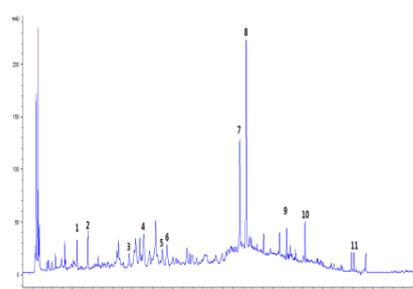


图 2 10 批铁皮石斛指纹图谱

本研究采用 HPLC 法建立铁皮石斛指纹图谱并结合两种 LC/MS 联用技术进行多成分结构鉴定。指纹图谱的建立以 Grace Alltima C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 0.4% 乙酸水溶液+20mmol 醋酸铵-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 280nm, 质谱定性采用 TOF-MS 结合 on-trap/MSn, 正、负两种离子模式扫描。在铁皮石斛指纹图谱中, 以夏佛托苷色谱峰作为参照物峰, 确定了 11 个共有峰 (图 1 所示), 10 批不同产地的铁皮石斛 HPLC 指纹图谱相似度大于 0.907 (图 2 所示), 通过两种质谱鉴定了铁皮石斛中 13 个化学成分, 分别为腺苷、夏佛托苷、异夏佛托苷、铁皮石斛素 L、芦丁、铁皮石斛素 J、N-p-香豆酰酪胺、反-N-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺、4,4'-二羟基-3,5-二甲氧基联苯、柚皮素、铁皮石斛素 H、3,4-二羟基-5,4'-二甲氧基联苯、钩状石斛素。本研究所建立铁皮石斛指纹图谱分析方法简单准确, 稳定可靠, 可用于其质量评价。

关键词: 铁皮石斛; 化学成分; 指纹图谱; 质量控制

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21175080); 重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005).

*通讯联系人: 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于液质联用技术的骨刺胶囊多维指纹图谱分析

冯燕燕, 谢媛媛, 王义明, 罗国安*

(清华大学化学系)

骨刺胶囊由昆布、骨碎补、白芍、党参、马钱子粉、鸡血藤、桂枝、延胡索、杜仲、牡蛎(煅)等组成, 具有散风邪, 祛寒湿, 舒筋活血, 通络止痛的功效, 用于颈椎、胸椎、腰椎、跟骨等骨关节增生性疾病, 对风湿性、类风湿性关节炎有一定疗效。通过在国家食品药品监督管理局官方网站上检索, 目前全国共有 3 家骨刺胶囊生产企业, 此外市场上还有处方组成不同, 药品名称相同或相似的中成药。为避免原料来源、生产工艺等众多因素影响刺胶囊药品质量的一致性和稳定性, 正本清源, 保障其临床合理、安全、有效应用, 亟需“合理、全面、可行”的骨刺胶囊质量控制标准。罗国安教授等提出的多维多息指纹图谱, 运用液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用等色谱和光谱手段的联用技术, 综合色谱的成分分离、分析和光谱的结构鉴定, 获取多维指纹图谱, 体现分析对象的整体成分信息、结构信息和中药指标成分的定量信息, 系统、完整地实现中药复方制剂化学特征整体性和特征性的综合分析。可弥补目前大多数中药指纹图谱研究采用单一分析仪器获取(如 HPLC-UV 等), 难以充分刻画中药复方制剂整体化学特征的缺陷。

本研究针对骨刺胶囊复方体系, 采用 HPLC-DAD-MS 联用技术建立骨刺多维指纹图谱, 采用 HPLC-TOF/MS 及 HPLC-ion-trap/MSⁿ 两种质谱信息组合分析的策略对骨刺胶囊中的化学成分进行了快速鉴别, 共解析鉴定了骨通贴膏色谱图中 75 个化学成分的结构信息, 分别归属于昆布、白芍、杜仲、党参、马钱子、鸡血藤、骨碎补、附片、川乌、草乌、威灵仙、延胡索、三七和桂枝等 14 味药材。除牡蛎中主要成分为蛋白质和碳酸钙等, 难于采用高效液相色谱-质谱联用鉴定其主要成分外, 对于正、负离子扫描下总离子流图中其他来源药材的成分均有指认, 基本讲清了骨刺胶囊的化学物质基础。本研究为骨刺胶囊多波长多指标成分定量指纹图谱的建立提供了研究基础, 以期从整体表征与局部特征相结合实现其质量全面管理控制。

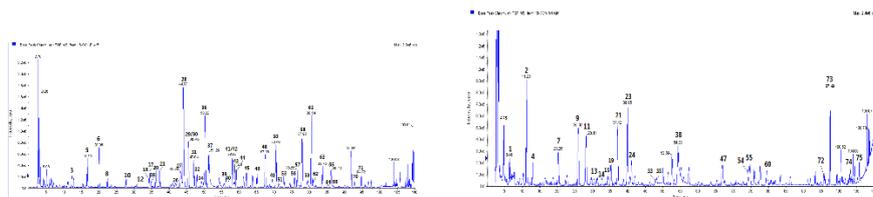


图 1 骨刺胶囊化学物质基础研究总离子流图(左图: 正离子模式; 右图: 负离子模式)

关键词: 骨刺胶囊; 物质基础; HPLC-TOF/MS; HPLC-ion-trap/MqISⁿ

糖肾方化学物质基础研究

连琦, 谢媛媛, 王义明, 梁琼麟, 罗国安*

(清华大学化学系)

糖肾方 (Tangshen formula, TSF) 是由黄芪、三七、生地黄、枳壳、熟大黄、山茱萸等七味中药组成的复方制剂, 主要用于治疗糖尿病肾病。糖肾方为临床经验方, 临床研究发现糖肾方具有益气、养阴、活血等作用, 药效学及系统生物学研究证明糖肾方可改善血流动力学异常、纠正磷脂代谢、脂肪酸代谢等多种代谢异常, 调节糖尿病肾病相关基因及蛋白表达等药理作用。

高效液相色谱串联质谱技术在中药复杂体系化学成分快速分离和鉴定中扮演了重要角色, 利用高效液相色谱对复杂样品进行色谱分离, 结合多种质谱手段进行化学成分鉴定, 飞行时间质谱 (TOF/MS) 与离子阱质谱 (Ion-trap/MSⁿ) 联合应用是复杂样品成分鉴定的有效方法, TOF/MS 可通过提供精确质量数用于分子式的预测, Ion-trap/MSⁿ 则可提供丰富的结构碎片信息, 在中药缺少标准品的情况下, 较准确地获得复方中化学成分信息。

本研究建立了糖肾方化学指纹图谱, 并通过高效液相色谱-飞行时间质谱 (HPLC-TOF/MS) 及高效液相色谱-离子阱质谱 (HPLC-Ion-trap/MSⁿ) 联合定性技术, 结合文献信息及对照品比对, 对糖肾方整体化学物质组进行结构解析, 共分析鉴定了 73 个化学成分, 其中来源于黄芪 4 个、山茱萸 8 个成分、熟大黄 15 个、生地黄 22 个、三七 13 个、卫矛 1 个和枳壳 10 个。包括有黄酮及其苷类、蒽醌类、有机酸及其苷类、环烯醚萜苷类、三萜皂苷类及醛类的 6 大类成分。将指纹图谱所鉴定出的 73 个化合物, 通过 ChemBioOffice 2010 软件、CloP 4.0 program 软件和互联网 Molinspiration Property Calculation Services 计算, 预测糖肾方可能的吸收成分。根据 molinspiration 预测结果, 糖肾方中鉴定出来的 73 个化合物中, 来源于 7 个药材, 6 大类共计 14 个化合物可能会吸收入血, 提示它们可能是糖肾方的药效物质基础。此研究为糖肾方的药效物质基础及作用机理研究提供了方向。

关键词: 糖肾方; 糖尿病肾病; 指纹图谱; 高效液相色谱串联质谱

基金项目: 国家自然科学基金重点基金 (81130066)。

二羟二丁基醚及其手性杂质的毛细管 GC 法分离

张玉霞, 谢红英, 王梦丽, 冯亚男, 陈芙蓉, 宁欣, 徐小平*

(四川大学华西药学院, 成都, 610041)

摘要 目的 由于 DHDB 结构中的两个手性碳和潜在的多位取代杂质, 使得 DHDB 及其杂质的检查和测定尤为困难。采用毛细管气相色谱法 (CGC) 分别对二羟二丁基醚 (DHDB) 及手性杂质的分离条件进行了考察, 建立了二羟二丁基醚 (DHDB) 的含量测定方法。**方法** PEG-20M (30m×0.53mm×1.0 μm) 毛细管柱为色谱柱, FID 为检测器, 正辛醇作为内标, DHDB 手性杂质程序升温条件为: 初温 120℃, 以 0.5℃/min 升温至 180℃, 保持 40min; DHDB 含量测定程序升温条件为: 140℃ 保持 1min, 以 20℃/min 升至 200℃; **结果** DHDB 及其手性异构体得到了完全分离; DHDB 在 66.70~800.1 μg/ml 的范围具有良好的线性关系 ($y = 0.0070x + 0.0554$; $r = 0.9996$); 平均回收率为 99.54%, 重复性 RSD 为 0.68%, 中间精密密度 RSD 为 1.33%, 样品的平均含量为 100.6% (RSD=0.25%); **结论** 本文针对二羟二丁基醚手性化合物具有几何异构杂质和光学异构杂质的特性, 采用 PEG-20M 的毛细管柱的程序升温 GC 法, 同时为了满足二羟二丁基醚含量测定中需要单峰检出的要求, 分别筛选适合分离二羟二丁基醚手性异构杂质和二羟二丁基醚含量测定的色谱条件, 所建立的分离手性异构的条件和分离二羟二丁基醚单峰用于含量测定色谱条件, 具有简便、快速、准确的特点, 能够满足二羟二丁基醚的质量研究, 为二羟二丁基醚及其制剂的进一步质量研究提供较好的分析方法。

关键字: 毛细管 GC; 二羟二丁基醚; 手性杂质; 含量测定

作者: 张玉霞, 女, 硕士研究生, 专业方向药物质量控制与药物代谢分析;

***通讯作者:** 371748507@qq.com

肿瘤血管抑制剂 DX-1002 结构的 NMR 确证

陈芙蓉¹, 宁欣¹, 张玉霞¹, 李丹¹, 林洁¹, 雍智全^{2*}, 徐小平^{1*}

(1.四川大学华西药学院 四川成都 610041

2.东莞达信生物技术有限公司 广东东莞 523808)

目的 DX-1002 是一种新型的肿瘤血管抑制剂, 是 Compretastatin 类化合物的新衍生物, 它以其溶解性更好替代了溶解性不好的 CA4P, 不仅药理活性更优且毒副反应更低。

由于增加了活性母体的溶解性，使 DX-1002 化合物适合于制备各种剂型，特别是口服制剂，成为一个极具开发价值的肿瘤血管靶向抑制剂。本实验的目的就是为了明确该结构的化学结构及分子式，为进一步的研究与开发奠定基础。**方法** 本文采用核磁共振的氢谱、碳谱和相关谱技术，同时结合质谱和红外光谱等技术，对 DX-1002 的化学结构进行解析。**结果 1.** DX-1002 的氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 和碳谱 ($^{13}\text{C-NMR}$) 各个化学位移值与 DX-1002 各个氢原子和碳原子的归属一致；**2.** 同核化学位移相关谱 (gCOSY)、异核多量子关系谱 (gHMQC)、核欧佛豪瑟效应频谱 (NOESY) 等综合分析，确定了分子的空间结构；**3.** 质谱和红外光谱辅助验证了该分子的化学结构。**结论** 综上所述，根据 DX-1002 的 NMR 谱的结果，同时结合 DX-1002 质谱碎片特征、IR 光谱特征和元素分析，证明 DX-1002 的化学结构为 (E)-3-(3''-羟基-4''-甲氧苯基)-2-(3',4',5'-三甲氧苯基)丙烯酸正丁铵盐，分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ ，分子量为 433.21。分子结构如图 1。

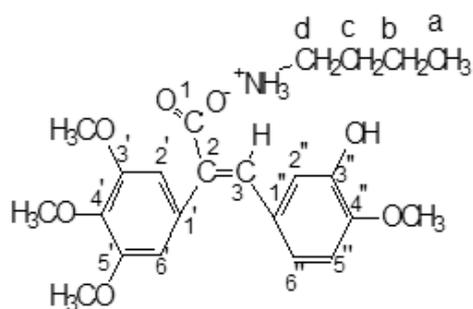


图 1 DX-1002 的结构图

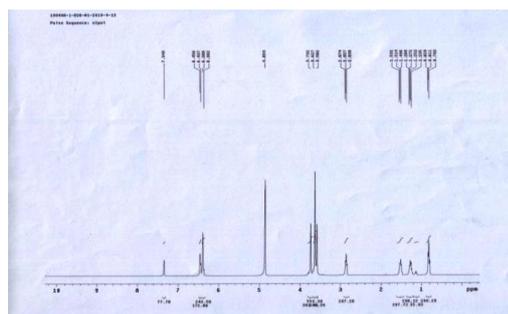


图 2 DX-1002 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱

关键词：核磁共振，DX-1002，结构确证；

***通讯作者：**xuxp319@scu.edu.cn

响应面法优化连翘苷超声提取工艺研究

由鹏飞¹，郭伟良²，张桂荣³

(1. 山东省食品药品检验研究院，山东济南 250101；2. 吉林大学生命科学学院，吉林长春 130012；3. 吉林大学白求恩医学院，吉林长春 130021)

摘要：连翘苷 (forsythin) 是常用中药材连翘的主要有效成分，具有抑菌、抗病毒、抗氧化和降血脂的作用，可用于预防动脉粥样硬化和冠心病等疾病。以连翘为原料的常见中成药制剂有银翘解毒片、双黄连注射液、抗病毒口服液等。在中成药生产中，

连翘常以原粉，或用水煎煮、渗漉等多种工艺提取后入药。目前提取的方法为水提法、半仿生法、醇提法、回流法、渗漉法及甲醇超声法等，工艺在不断增新。本试验利用超声波提取技术，提取经甲醇浸泡的连翘壳中的连翘苷，并用高效液相色谱法测定，方法简便，结果可靠，回收率及灵敏度高，重现性好。在单因素试验的基础上，采用响应面分析优化的超声提取工艺条件，以提高得率。响应曲面方法 (response surface methodology, RSM) 是 20 世纪 50 年代提出的优化方法，以多元二次回归模型作为函数估算的工具，研究考察因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系，在优化发酵、提取工艺等方面得到广泛应用。

本研究在单因素实验的基础上，进行四因素三水平的 Box Behnken 中心组合设计试验，采用多元二次回归模型对试验结果进行分析，并采用 F 检验对模型中各项进行统计分析，结果表明各影响因子的显著性如下：提取时间 (X2)> 超声波功率 (X3)>提取溶剂中甲醇浓度 (X1)> 液料比 (X4)，其中提取时间 (X2) 和超声波功率 (X3) 之间存在显著的交互影响作用。对多元二次回归方程取一阶偏导数得零，求出最优的提取条件：提取溶剂中甲醇浓度为 100%，超声时间为 27 min，超声功率为 416 W，液料比为 12:1。连翘苷提取率的理论值为 0.082%。按最优条件进行了 3 次平行验证试验，连翘苷提取率为 0.080%，与理论值的相对误差为 2.39%。

关键词：响应面法；超声提取；连翘苷；高效液相色谱

基于凝胶电泳技术黄芪多糖指纹图谱分析方法的建立与应用

郝霞^{1,2}，李科*，高凡茸^{1,2}，王桂臻^{1,2}，秦雪梅^{1*}

(1. 山西大学 中医药现代研究中心，山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院，山西 太原 030006)

摘要：目前黄芪质量的评价是通过测量黄芪中黄芪甲苷及毛蕊异黄酮苷的含量来确定黄芪质量的优劣，该指标尚不能全面准确的评价黄芪品质。糖类成分是黄芪发挥免疫调节的主要物质，不同的糖类物质具有不同的免疫调节活性。因此，黄芪多糖应该作为黄芪质量控制与品质评价的标准。目前研究者曾以总多糖含量、多糖的单糖组分、总多糖的红外光谱来对不同生长年限、不同种属的黄芪进行比较，然而这些指标缺乏专属性特征，限制了中国药典对这一标准的收载。为了探讨不同生长方式及不同种属黄芪多糖的差异性及相关性，本研究采用三氟乙酸 (TFA) 将黄芪多糖水解，然

后用 8-氨基萘-1,3,6-三磺酸 (ANTS) 对水解产物衍生化, 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (PACE) 对衍生化产物进行分离和检测, 将结果导入 Quantity One 软件进行分析, 建立不同生长方式及不同种属黄芪建立黄芪多糖指纹图谱, 再结合聚类分析 (HCA), 主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法 (PLS-DA) 分析, 及 Pearson 相关分析等多种统计分析方法找出不同种属、不同栽培方式黄芪多糖的差异成分, 并对差异成分进行分析。结果显示, 速生蒙古黄芪的多糖之间具有明显相关性的样本数量最多, 速生膜荚黄芪和野生膜荚黄芪的多糖之间具有明显相关性的样本数量次之, 野生蒙古黄芪的多糖之间具有明显相关性的样本数量最少; 同时, 不同生长方式或不同种属黄芪之间是存在差异的, 比如, 分子量范围在 540 - 900 Da (三糖和四糖) 之间的黄芪多糖片段, 是区分黄芪生长方式的主要差异性片段; 分子量范围在 360 - 720 Da (二糖和三糖) 之间的黄芪多糖片段, 是区分黄芪种属的主要差异性片段。该结果不仅为黄芪品质评价指标的筛选提供了依据, 同时为以糖类化合物为主要活性物质的中药材质量评价标准的研究提供了思路与方法。

关键词: 黄芪; 凝胶电泳; 多糖指纹图谱; 质量评价

流动注射-离子交换-电感耦合等离子体发射光谱法在线分离检测 胶囊中六价铬

李丹^{1*}, 俞晓峰², 韩双来², 许旭¹

(1, 上海应用技术学院, 化学与环境工程学院 上海 201418

2, 聚光科技(杭州)股份有限公司 杭州 310012)

Cr^{3+} 和 Cr^{6+} 在一定的条件下极易发生相互转化, 建立特异性好、灵敏度高的 Cr^{6+} 分离分析检测技术具有重要的现实意义。传统的分析检测方法(如分光光度法、原子吸收光谱法和离子色谱法等)具有操作过程烦琐、受外界干扰大等特点^[1-3]。流动注射分析(FIA)是一种全自动化的流体分析技术, 具有高效、操作简便、准确度和精密度高等特点。离子交换技术(IE)可将不同电荷的离子进行分离富集, 具有检测灵敏度高等特点。基于 FIA 和 IE 的联用分析技术不仅可同时实现被分析物的分离、分析和检测, 还可实现分析过程的自动化控制, 因而在复杂分析体系中具有重要的应用前景。

本文针对胶囊样品组分复杂、 Cr^{6+} 浓度低且易发生价态转化等特点, 设计了 Cr^{6+} 的 FIA-IE-ICP 全自动分析系统(图 1), 该系统通过设计流动注射系统的操作程序, 可

实现 Cr^{6+} 的在线提取分离、吸附洗脱和在线检测，将其应用于实际胶囊样品中 Cr^{6+} 的分离检测，获得了较好的效果。

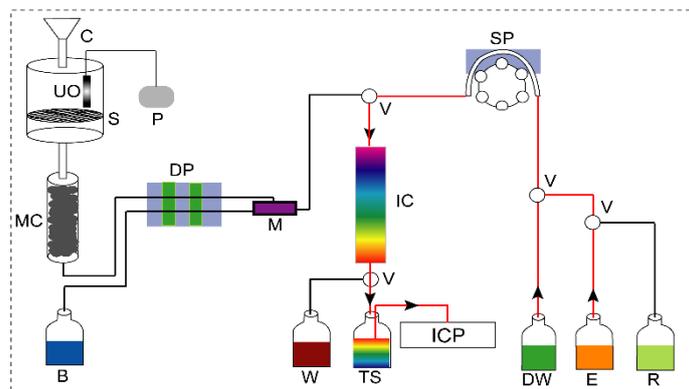


图1 胶囊样品中 Cr^{6+} 的FIA-IE-ICP全自动分析系统框图 (C.胶囊; UO.超声振子; P.控制电源; S.筛网; MC.微柱; B.缓冲液; DP.双通道蠕动泵; SP.单通道蠕动泵; M.混合器; V.切换阀; IC.离子交换柱; W.废液; TS.待测液; DW.去离子水; E.洗脱剂; R.再生液)

关键词： 离子交换分离；流动注射；电感耦合等离子体发射光谱；胶囊；铬(VI)

基金项目： 国家自然科学基金(21507089)

高含糖量样品痕量挥发性成分的低温顶空捕集阱 气相色谱-质谱分析方法研究

苏越*, 陈房姣

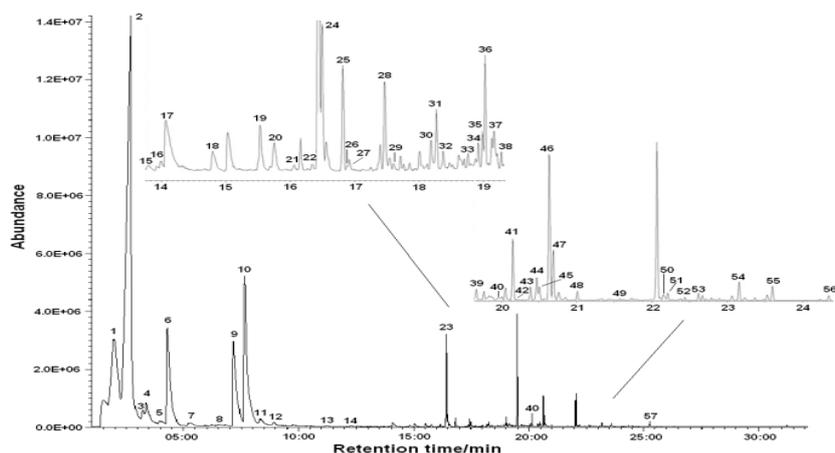
(上海中医药大学中医方证与系统生物学研究中心, 上海, 201203)

摘要： 对于含糖量高的样品，高温导致糖热解，同时生成大量水，进而导致呋喃类化合物急剧增加，从而不能真实反应样本挥发性成分的组成，并且影响痕量挥发性成分分析。本文开发了一种基于低温富集和多次顶空萃取(Multiple Headspace Extraction, MHE)技术的顶空-捕集阱-气相色谱-质谱(HS-trap-GC-MS)方法，这个方法在显著提高分析的LOD的同时避免了糖分解对分析造成的影响可用于热不稳定样品中的挥发性成分分析。与HS-loop方法相比，HS-trap方法能获得更窄的峰型及更低的检测限，通过MHE条件的优化，即使在30℃条件下仍然能够提高仪器检测限。在30℃条件下对枸杞挥发性成分进行多次提取(17次)，每次提取的组分都富集在捕集阱中(Tenax TA and Tenax GR, 1:1)，最后所有富集到的组分经热解析进入色谱柱进行分离；经谱图检索，保留指数确证及准确质量测定，共定性得57个化合物。该方法提

高了检测灵敏度及定性准确性，并且是在接近室温的条件下完成的，从而更加符合枸杞挥发性成分的实际组成。基于低温富集和 MHE 技术的 HS-trap-GC-MS 方法是分析热不稳定样品中挥发性成分的有效方法，顶空捕集阱气相色谱质谱法在高糖样品痕量挥发性成分分析中极具优势。

关键词：低温富集；顶空多次提取；气相色谱质谱；高含糖量样品；挥发性成分

***通讯作者：**苏越 Email: suyue@shutcm.edu.cn



图：枸杞挥发性成分总离子流图。该结果由 HS-trap GC-MS 分析获得，经谱图检索，保留指数确证及准确质量测定，共定性出 57 个化合物。

花椒局麻成分分离及其药动力学研究

荣荣，张启丽，张美燕，于治国，赵云丽

(沈阳药科大学 药学院)

花椒为芸香科植物青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 或花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果皮，具有温中止痛,杀虫止痒之功效。

本文采用活性追踪法分离花椒局麻成分。首先利用豚鼠皮内丘疹浸润麻醉实验，确定乙醇提取物浸润麻醉效果最佳；进而对醇提物进行分离，通过量效关系确定活性最强流分；最后采用制备液相色谱获得 3 个化合物，分别为羟基- α -山椒素(HAS)、羟基- β -山椒素(HBS)和羟基- γ -山椒素(HRS)。

对花椒局麻成分在大鼠体内的药物动力学进行研究。首先建立了测定大鼠皮下和静脉注射给予花椒乙醇提取物后血浆中 HAS、HBS 和 HRS 含量的 UHPLC-MS/MS 法。以胡椒碱为内标，采用乙酸乙酯液-液萃取法处理样品。色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.9 μ m)，流动相为乙腈-0.05% 甲酸水，流速 0.4 mL/min；

质谱条件为正离子模式检测,扫描方式为选择反应监测。分析结果表明三种化合物线性关系良好, HAS、HBS 和 HRS 的定量下限分别为 6.0 ng/mL, 3.0 ng/mL 和 1.0 ng/mL; 日内和日间精密度不大于 13.6%, 提取回收率, 基质效应和稳定性均符合要求。HAS、HBS 和 HRS 的皮下绝对生物利用度分别为 100.2%, 76.23%和 90.3%。该方法成功应用于大鼠皮下和静脉注射给予花椒乙醇提取物后血浆中 HAS、HBS 和 HRS 在大鼠体内的药动学研究, 为花椒的制剂设计及临床应用研究提供参考依据。

关键词: 花椒; 山椒素; 药动学; 生物利用度; UHPLC-MS/MS

分子印迹聚合物掺杂碳糊电极用于雌酮硫酸钠的检测

李迎春^{1*} 宋含¹ 罗俊² 张路¹ 刘杰¹

(1 新疆特种植物药资源教育部重点实验室 石河子大学药学院, 新疆 石河子, 832000

2 新疆新姿源生物制药有限公司 新疆 伊犁, 835803)

结合雌激素是从孕马尿中提取的一种天然混合雌激素, 临床上主要用于激素替代疗法, 缓解因雌激素不足引起的临床症状, 治疗和预防女性生理或人工绝经后出现的更年期综合征, 骨质疏松症、冠心病以及老年痴呆症。孕马尿中富含多种雌激素, 主要以硫酸钠盐结合形式存在, 其中以雌酮硫酸钠 (estrone sulfate, ESS) 为主。目前, 检测孕马尿中雌激素含量的方法主要是高效液相色谱法和气相色谱法, 但由于这两种方法样品的前处理复杂, 费力耗时, 仪器昂贵, 且操作复杂, 不能用于现场监控, 因而建立简单、快速、适合大样本筛选, 野外检测、灵敏度高的方法非常必要并且有极高的实用价值^[1]。本研究采用传统的本体聚合方法, 制备了雌酮硫酸钠分子印迹聚合物^[2] (molecularly imprinted polymer, MIP), 并优化了制备条件。将ESS-MIP和石墨烯混合, 加入少量液体石蜡进行研磨, 填充到PVC管中, 成功制备了能对目标分子ESS进行选择识别和检测的碳糊电极 (carbon paste electrode, CPE)。该传感器具有较低检测限 (1.18×10^{-12} M, S/N=3) 和宽的线性范围 ($4.0 \times 10^{-12} \sim 6.0 \times 10^{-9}$ M), 并对ESS有较好的选择性。此外, 传感器被成功应用于实际孕马尿样品中ESS的检测, 与高效液相色谱法进行比对发现, 结果准确可信, 重复性好, 检测迅速, 成本低廉, 有望在实时检测中发挥作用。

关键词: 孕马尿; 雌酮硫酸钠; 分子印迹聚合物; 碳糊电极; 实时检测

基金项目: 国家自然科学基金 (基金号 81260487, 81460543)、人社部留学回国人员启动项目 (基金号 RSLX201301)、千人计划项目。

***通讯联系人:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

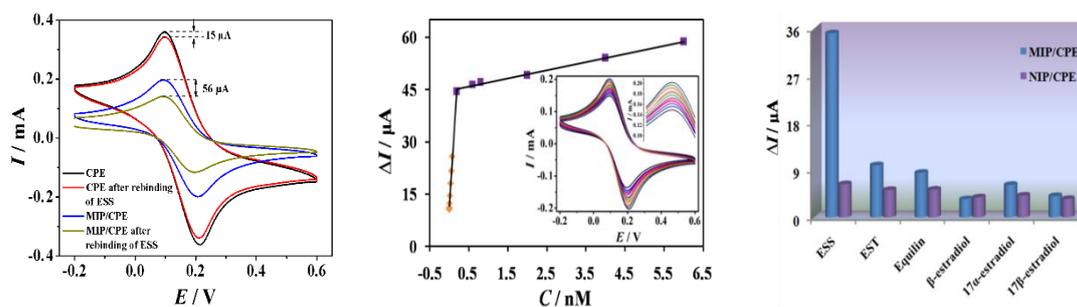


Fig. 1 (a) Cyclic voltammograms of two different electrodes before and after binding with ESS; (b) calibration curves for ESS detection correlating reduction peak current shift (ΔI) with ESS concentration by the use of MIP/CPE.; (c) comparison of the sensor response towards ESS and its structural analogues by using MIP/CPE and NIP/CPE.

丹参中酚酸类成分亲水色谱保留行为研究

黄竞怡, 佟玲, 孙万阳, 宋云飞, 苗敬茁, 谢秀满

(天津天士力控股集团研究院药物分析研究所)

摘要: 亲水色谱法 (HILIC) 是二十世纪九十年代提出的色谱分离技术, 特别适用于强极性成分的分, 流动相中含有高比例的有机相, 与电喷雾质谱联用 (ESI-MS) 离子化效率较高。丹参水溶性有效成分主要是酚酸类化合物, HILIC 为其分离提供了新的途径。本研究首先评价了几种 HILIC 固定相 (silica, diol, amine, cyanopropyl 和 amide) 分离酚酸类成分的效果 (图 1)。接下来, 利用 van Deemter 曲线阐述酚酸类成分在 HILIC 模式下化学动力学特点 (图 2)。最后, 使用 LC-ESI-MSⁿ 鉴定丹参药材不同结构的酚酸类成分, 并总结它们的色谱保留行为差异 (图 3), 进一步阐明 HILIC 保留机制的特点。

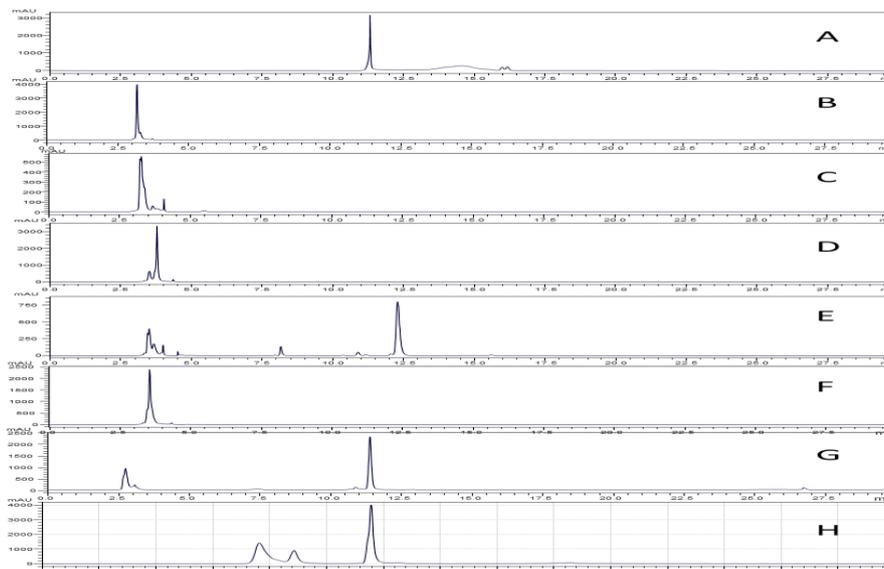


图 1 280nm 处丹参样品在不同 HILIC 柱上色谱图。(A: CN; B: Silica; C: Amino; D: Diol; E: Amide; F: Silica; G: Silica; H: BEH Amide)

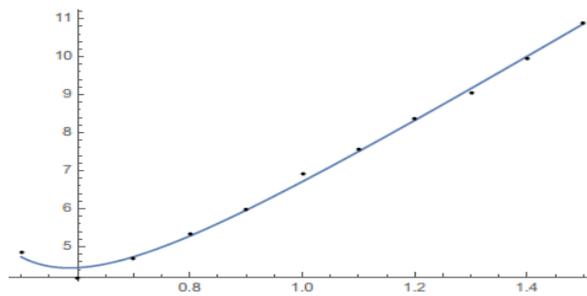


图2 丹参素在 Unitary Amide 色谱柱 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6\times 250\text{mm}$) 上的 van Deemter 曲线

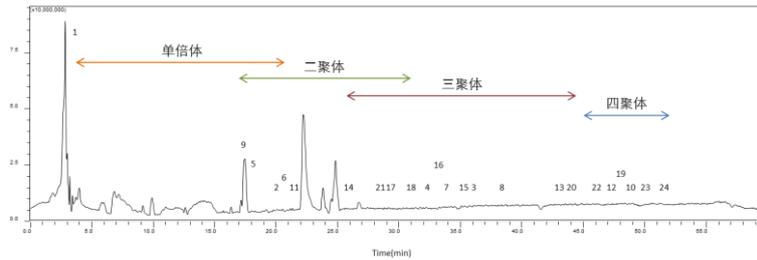


图3 LC-ESI-IT-TOF/MSⁿ 鉴定丹参中不同结构的酚酸类成分在 Unitary Amide 色谱柱 ($5\ \mu\text{m}$, $4.6\times 250\text{mm}$) 上的分布

中药大复方质量生物评控方法研究—以养血清脑颗粒为例

李晓稳, 佟玲, 李东翔

(天津天士力控股集团研究院药物分析研究所)

摘要: 背景: 中药质量控制一直是中药现代化一大难题, 也是中药走向世界的瓶颈; 单味中药材本身已是一个复杂体系, 那么由多味中药组成的复方制剂, 其系统的复杂程度更不言而喻, 这使得复方制剂的质量控制变得愈加困难。中药质量控制的最终目的是保证中药的安全性和有效性; 而现行中药制剂质量控制方法如常规鉴别检查、少数几个指标性成分含量测定以及化学指纹图谱相似性评价等则主要用于评价其表观成分的一致性, 不仅无法关联药效或毒副作用, 且存在被勾兑的风险。同时, 表观化学成分的重现也可能导致对样品质量合格与否的误判, 其潜在风险更大。生物活性测定方法因具有整体可控、药效相关等技术优势, 作为符合中医药特点的适用质量控制模式及方法, 渐已成为中药质量控制和评价的重要发展方向之一。因此, 生物活性测定方法可有效地弥补现行化学成分层面难以全面监控中药复方质量的局限。**目的:** 本研究以养血清脑颗粒复方为例, 选用指标明确、模型稳定的斑马鱼神经元损伤模型作为生物模型载体, 对不同批次的养血清脑颗粒的生物活性进行检测, 初步探索中药复方质量标准中建立“生物活性测定”项目的可行性。**方法:** 斑马鱼神经元损伤模型作为

神经细胞保护药物生物活性质控方法具有较好的精密度（日内 RSD 为 2.2~3.7%，日间 RSD 为 1.2%）、重复性（RSD 为 4.9%）和稳定性（RSD 为 8.4%）；且在 100~1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 范围内，养血对神经细胞保护率成良好的线性关系($P\%=0.082C + 4.439$, $r=0.995$)，方法学考察符合生物活性测定指导原则的要求。**结果：**应用该方法测定不同生产批次的养血清脑颗粒制剂，包括在有效期内的 6 批制剂，3 批过期制剂，3 批经破坏后的制剂（分别为高温、光照、10% H_2O_2 破坏后样品）。结果表明不同条件下的养血样品对斑马鱼神经细胞保护药效有明显差异，其中合格制剂神经保护率在 55.8~61.3%之间，具有显著的神经细胞保护作用 ($P<0.01$)；过期制剂神经保护率在 26.7~46.3%之间，神经细胞保护率较低，与合格批次相比显著性 ($P<0.01$)；特殊破坏后的制剂神经保护效率差异较大；以上结果表明通过斑马鱼神经细胞保护药效活性测定可以定性的表征养血清脑颗粒质量的优劣。**结论：**采用斑马鱼神经元损伤模型评价养血的神经细胞保护作用，方法快速、稳定可靠；可作为现有质量控制方法的有效补充，并为中药的生物活性质量控制研究提供一定的技术参考。

关键词：养血清脑颗粒；斑马鱼神经元损伤模型；生物活性测试；质量控制；

养血清脑颗粒超高效液相色谱数字化定量指纹图谱研究

李东翔，佟玲，李晓稳

（天津天士力控股集团研究院药物分析研究所）

摘要：背景：养血清脑颗粒由当归、川芎、白芍、熟地黄、钩藤、鸡血藤、夏枯草、决明子、珍珠母、延胡索、细辛 11 味中药组成，有养血平肝、活络止痛的功效，主要用于血虚肝旺所致头痛，眩晕眼花，心烦易怒，失眠多梦，是受国家重点保护的中药品种。其药效作用近年来得到了广泛的研究，研究表明绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸在心血管保护、抗诱变抗癌、抗血栓、抗炎、抗菌、抗病毒、利胆止血及抗氧化等方面都有明显作用。对养血清脑颗粒中的酚酸性成分进行测定和控制可以有效保障其临床用药的安全和有效。虽然已有文献报道了养血清脑颗粒中酚酸的高效液相色谱分析方法，但只是对有毒成分的控制，或相比本文方法更长耗时且灵敏度更低的高效液相色谱分析方法，制约了方法的实用性。数字化定量指纹图谱能从整体出发和用多维参数定量评价中药质量。**目的：**本实验建立养血清脑颗粒数字化定量 UPLC 指纹图谱，用 6 级系统指纹定量法（6-SFQM）评价其质量，从多维定量信息反映批间质量差异。**方法：**采用 Waters Acquity 超高效液相色谱仪 RP-UPLC 法，以色谱指纹图谱相对统一化特征判据指数 Fa/t 优化试验条件，选择绿原酸为参照物峰，

确定 82 个共有指纹峰，建立了养血-UPLC 数字化定量指纹图谱。**结果：**对 30 批养血血清脑颗粒制剂进行 UPLC 指纹图谱超信息特征进行评价，用 6-SFQM 有效地鉴定其整体质量。结果 1 批质量很好，14 批质量好，2 批质量良好，4 批质量中，9 批质量不合格。**结论：**本文所建立的数字化和定量化 UPLC 指纹图谱为养血血清脑颗粒质量控制提供了全新参考。

关键词：养血血清脑颗粒；UPLC 数字化定量指纹图谱；6 级系统指纹定量法

化学发光免疫分析法检测中药中重金属和农药残留

欧阳辉 舒棋 杨诗嘉 王雯雯 付志锋*

(西南大学, 药学院, 400716)

首先，我们采用一种双功能抗体作为分子识别试剂，该新型抗体能同时特异性结合甲基对硫磷和吡虫啉，用于免疫检测中药中的农药残留。研究中采用了辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶作为信号探针，分别标记甲基对硫磷和吡虫啉的半抗原，完成竞争免疫结合反应后，加入共反应剂，在 0.6 s 和 500 s 分别采集甲基对硫磷和吡虫啉的检测信号(Fig. 1A)，甲基对硫磷和吡虫啉的检测范围均为 $1.0\text{-}500\text{ ng mL}^{-1}$ ，检出限均为 0.33 ng mL^{-1} (S/N=3)。另外，本文基于 Cu^{2+} 对 luminol- H_2O_2 化学发光体系的增敏效果，免标记免疫检测中药中的铜。本方法采用一种 Cu^{2+} 单克隆抗体作为分子识别试剂，免疫结合待检物中的 Cu^{2+} 后，用尿素破坏抗体，加入共反应剂，采集 Cu^{2+} 的检测信号(Fig. 1B)， Cu^{2+} 检测范围是 $1.0\text{-}1000\text{ ng mL}^{-1}$ ，检出限为 0.33 ng mL^{-1} (S/N=3)。这两种方法已成功用于人参、西洋参、丹参等中药材的质量控制。

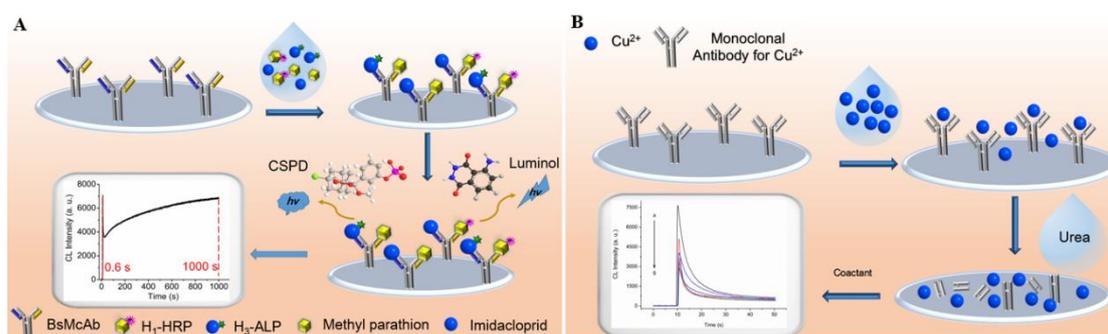


Fig. 1 (A) Schematic illustration of the multianalyte immunoassay method for methyl parathion and imidacloprid. (B) Schematic illustration of label-free immunoassay method for Cu^{2+} .

关键词：化学发光免疫分析；中药；农药残留；重金属残留

***通讯作者：**付志锋教授，主要从事免疫分析和发光分析方面的研究工作，

Email: fuzf@swu.edu.cn

苦木注射液总生物碱含量测定的显色光度法研究

郝盛源, 刘 卉, 周亚楠, 李方悦, 许 卉

(烟台大学)

摘要: **目的:** 苦木注射液为《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂》第 20 册收载的品种, 有清热、解毒、消炎的功效, 生物碱是其中的主要有效成分。在现行的部颁标准中规定, 采用重量法测定其中的总生物碱含量。重量法具备无需对照品的优势, 但因检测灵敏度低、专属性差, 不适用于微量组分的定量分析, 尽管取样量大, 仍因操作过程繁琐, 影响因素众多, 导致分析结果的精密度和重现性差, 亟待改进和提高。本文根据生物碱的特征呈色反应, 研究建立一种简便的显色光度分析法, 应用于苦木注射液中总生物碱含量测定。**方法:** 取苦木注射液供试溶液, 上反相聚合物 SPE 柱, 水洗脱, 分离去除其中对显色反应有干扰的增溶剂吐温-80, 继续以甲醇洗脱, 得总生物碱溶液, 以通用的生物碱显色剂改良碘化铋钾试液为显色剂, 在酸性条件下进行显色。以注射液中含量最高的生物碱单体成分 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮为对照, 同法进行显色。根据供试品和对照品溶液在显色产物最大吸收 505 nm 处的吸光度值, 计算供试品中总生物碱含量, 结果以 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮计。**结果:** 反相聚合物柱固相微萃取方法可有效分离苦木注射液中的增溶剂吐温-80 和生物碱, 从而消除吐温-80 对后续显色反应的干扰。以水作为洗脱剂, 对吐温-80 的清除率 > 99%; 甲醇则可以快速洗脱生物碱, 平均洗脱回收率 $98.2 \pm 1.3\%$ ($n=6$)。在酸性条件下, 苦木生物碱与改良碘化铋钾试液迅速显色, 所得显色产物在 505 nm 处有特征的最大吸收, 且吸光度值在显色后 20 min 内保持稳定 ($RSD < 5\%$), 显色体系中生物碱浓度在 4.0~45.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度值间的线性关系良好 ($R^2 > 0.995$), 平行测定结果的 $RSD < 1.0\%$ ($n=6$), 加标回收率 $100.4 \pm 1.2\%$ ($n=9$), 与重量法测定结果的相对偏差 < 5%。**结论:** 本文将高灵敏度的显色光度法和快速分离目标成分与干扰组分的固相微萃取技术相结合, 研究建立了一种适用于苦木注射液中微量总生物碱含量测定的方法。该方法操作简便、快速, 所得结果与重量法无显著差异, 灵敏度、专属性和重现性均较重量法均显著改善, 为苦木注射液质量标准的修订和提高提供了研究基础, 适于进一步的推广应用。

关键词: 苦木注射液; 总生物碱; 显色光度法; 改良碘化铋钾试液; 固相微萃取

同时测定新疆紫草中 7 种主要羟基萘醌成分含量的 RP-HPLC 方法研究

李方悦, 刘卉, 郝盛源, 李红, 许卉*

(烟台大学)

摘要: **目的:** 羟基萘醌化合物是紫草中主要的有效成分, 但是目前尚未见文献报道采用 C₁₈ 柱分离测定 α -甲基丁酰阿卡宁和异戊酰阿卡宁含量的 HPLC 方法。本研究旨在建立同时测定紫草中 7 种羟基萘醌成分含量的 RP-HPLC 方法, 同时测定紫草 7 种羟基萘醌色素的校正因子, 比较校正因子法测定结果与外标法测定结果的差异性。**方法:** 对羟基萘醌 7 个化合物分离的的色谱条件进行优化, 最终达到良好的分离度, 以紫草中的 7 个羟基萘醌类化合物: 阿卡宁 (AK)、乙酰阿卡宁(ACAK)、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁(AOAK)、去氧阿卡宁(DOAK)、 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁(DAAK)、 α -甲基丁酰阿卡宁(MLAK)、异戊酰阿卡宁(IVAK), 配成混合对照品, 利用外标法, 测定紫草中 7 种主要羟基萘醌化合物的含量。并参照药典对方法的系统适用性、线性范围、专属性、精密度、准确度、重复性进行了验证。**结果:** 7 个羟基萘醌化合物配制成的混合对照品相互间无明显干扰, 7 个化合物达到了有效分离($R > 1.5$), 专属性良好, 在测定范围内呈良好的线性, 回收率、重复性、精密度良好。实验测定了紫草 7 个化合物成分的单体含量, 以及 7 个化合物成分相对于 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁的校正因子: AK(1.18), ACAK(0.85), AOAK(1.30), DOAK(1.26), DAAK(1), MLAK(0.82), IVAK(0.84)。分别用外标一点法和校正因子法测定了三批紫草药材的 7 个羟基萘醌化合物的含量, 两种测量结果之间 $RSD < 5\%$ 。**结论:** 本实验给出的 HPLC 法可以同时测定紫草中 7 种羟基萘醌化合物的含量, 在该条件下, 以 β, β' -二甲基丙烯酰阿卡宁作为标准品, 利用给出的校正因子, 测定 7 种羟基萘醌化合物含量, 测得结果 $RSD < 5\%$, 认为两种方法无明显差异。

关键词: 新疆紫草; 羟基萘醌; HPLC 测定; 校正因子

硫代脯氨酸结构新型质谱手性衍生生化试剂的开发及分离效能的研究

李喜玲, 闵俊哲*

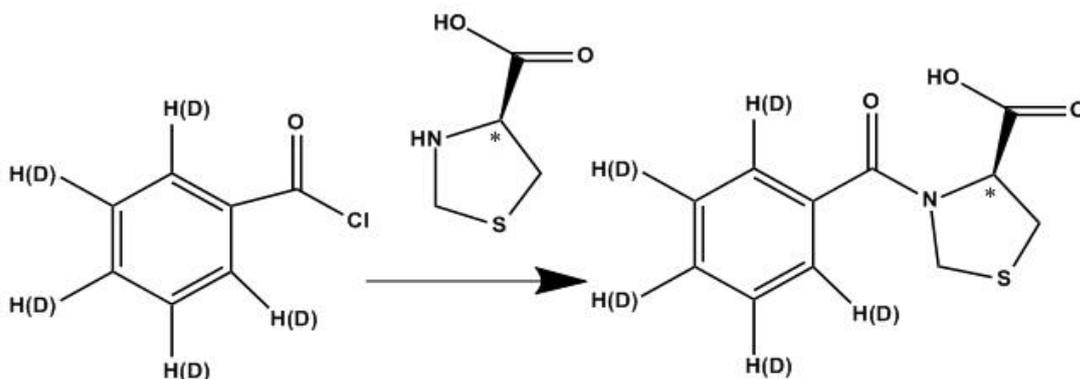
(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 药学院药物分析学

吉林, 延吉, 133002)

手性是生物内源性代谢物的一个重要特征, 在药学领域研究中尤为突出。然而代谢组学生物标志物的鉴别研究尚未考虑到手性因素。因此, 手性生物标志物的鉴别是

代谢组学研究领域必将面临的重要课题。LC-MS 是一种高选择性、高灵敏度、进样量少且可多通道分析的代谢组学的有力工具，但有些代谢物因离子化效率低而无法被质谱高灵敏度地检测，并且因手性代谢物的 m/z 相同，无法在质谱分析中进行鉴别。在诸多手性分离分析方法中柱前衍生化法，可使手性代谢物形成非对映异构体结构，可在普遍使用的 ODS 柱达到手性分离，并且可以提高检测灵敏度。本研究中我们以带同位素苯甲酰氯(d0,d5)为质谱手性试剂的母体，与硫代脯氨酸进行反应，合成具有靶向氨基官能团手性代谢物新型质谱手性试剂 d0/d5-BZC-TZD。考察了在质谱中的最佳轰击能量以及裂解规律。最佳轰击能量为 40eV 时，获得高强度的特征碎片离子 m/z 为 77。本手性试剂还可以利用同位素 d0 和 d5 在质谱中离子化效率相同且 m/z 比不同的特点，可筛选各种疾病的生物标志物。本方法将为手性代谢组学分析及手性生物标志物的筛选提供新的分析手段。

关键词：手性生物标志物，氨基官能团，LC-MS，质谱手性衍生化试剂。



基金项目：国家自然科学基金 (No.81360487)

***通讯作者：**闵俊哲 E-mail: junzhemin23@163.com; TEL: 0433-243-6079

UPLC-MS/MS 法同时测定益智仁中 25 种活性成分

孙志，侯蕾，孔祥祯，康建，张晓坚

(郑州大学第一附属医院药学部)

摘要：益智仁为姜科山姜属植物益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.) 的干燥果实，是中国四大南药之一，具有温脾止泻，摄唾涎，暖肾，固精缩尿的功效。现代药理学研究表明益智仁在神经保护、抗癌、强心、舒张血管和抗氧化等方面发挥重要作用。虽然已从益智仁中分离得到多种具有生物活性的化合物，但目前鲜有益智仁的质量控制的报

道。本文建立了一种简便、快捷、准确的同时测定益智仁多成分的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,为益智仁的质量控制提供了依据。本文采用快速、环保的微波萃取法提取益智仁的活性成分,与超声萃取和热回流萃取等萃取方法相比,微波萃取具有萃取效率高、能源消耗少的优势。对微波萃取条件进行优化,发现在功率为300 W、温度为80℃、时间为480 s和溶剂-固相比为30 mL/g的条件下,萃取效率较高。对色谱条件进行优化,发现在色谱柱为Waters ACQUITY UPLC® HSS C18 SB (2.1×50 mm, 1.8 μm),流动相为乙腈和1 mM 醋酸铵,梯度洗脱,流速0.2 mL/min,柱温40℃的条件下,可获得较好的分离效果。质谱定量采用MRM模式,在3.5 kV的毛细电压、30 V的锥孔电压和正负离子两种模式下进行检测。在优化的色谱和质谱条件下,采用外标法测定了25种益智仁活性成分,线性关系考察表明 $r \geq 0.98$,回收率96.46%~112.50%,精密度、稳定性、重复性和回收率的RSD范围分别为1.56%~3.24%、1.37%~4.70%、1.32%~4.64%和2.57%~7.89%。在建立的UPLC-MS/MS法基础上,对16批益智仁(8批产地为海南,4批产地为广东,4批产地为广西)进行含量分析,结果表明所检测的25种活性成分在不同批次中含量差异较大。以25种活性成分的含量为变量,对不同批次的益智仁进行聚类分析后发现益智仁样品可按产地分为两个大类和四个亚类,其中海南(两个亚类)、广东和广西分别为四个亚类,而广东和广西又是一个大类,这说明产地在益智仁的活性成分含量中占据重要地位。本文首次采用UPLC-MS/MS法同时测定益智仁中25种活性成分,为益智仁的质量控制提供了简便和科学的指导,为进一步研究益智仁的生物活性成分奠定基础。

关键词: 益智仁; 质量控制; 活性成分; UPLC-MS/MS; 微波萃取

拉曼光谱无损快速筛查液体制剂的方法

赵瑜, 尹利辉

(中国食品药品检定研究院)

药品安全是目前国际社会共同关注的问题,本论文展示了一种拉曼光谱无损检测液体制剂的方法,既可以筛查假药,又能够检测药品质量,为液体制剂尤其是贵重制剂的质量监管提供一种更加经济、合理,且行之有效的手段。

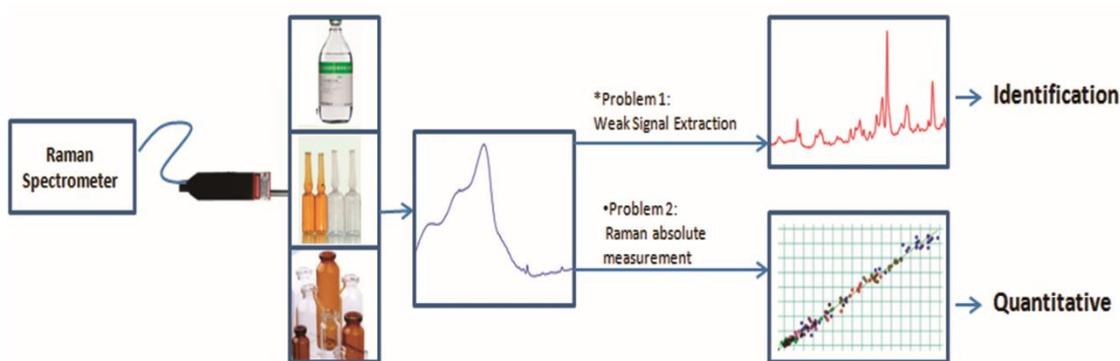
本研究首先使用消除拉曼光谱仪台间差的方法,对拉曼光谱仪进行校正,以保证

采集的拉曼光谱可同时用于信号的分离和量化；并对性能指标进行量化，用于模型转移的计算。其次，使用化学计量学方法分别解决了拉曼光谱无损定性和定量分析的两大瓶颈问题：使用改进的主成分分析-经典最小二乘（PCA-CLS）法实现了从无损光谱中弱信号（API 信号 $\leq 1\%$ ）的有效提取；使用液体制剂中的溶剂作为内标解决拉曼光谱绝对测量的问题。

用本研究方法建立的 148 种液体制剂拉曼无损定性模型中，根据正向验证和反向验证相结合的方式设定定性判断阈值，当阈值设定为 0.95 时，能较好的实现 API 的定性鉴别。同时，也能够对液体制剂中添加量相对较高的辅料（如丙二醇、苯甲醇等）进行鉴别。定量结果准确度，相对于 HPLC 检测结果，能够达到高浓度-安瓿瓶（如多索茶碱注射液，浓度 1%）相对误差 5% 以内，低浓度大输液（如左氧氟沙星氯化钠注射液，浓度 1‰）相对误差 10% 以内。另外，定性定量结果能够在三台以上同型号的拉曼光谱仪上重现。

我们将所建立的无损快速筛查方法编制形成“拉曼快速检测软件”并加载模型数据库，能够满足现场检测的要求，实现液体制剂的无损筛查。尽管目前的数据库品种主要是化学药品液体制剂，也可进一步扩展实现贵重药品、生物制品的无损筛查，目前已用本方法实现了人血白蛋白的无损检测。

关键词：拉曼光谱；液体制剂；无损筛查；PCA-CLS 法；现场检测



低分子量肝素 ^{13}C 核磁共振波谱法定性鉴别方法研究

张琪¹，王爱法¹，李慧义²，范慧红¹，杨化新¹，肖新月¹，李晓东^{1*}

（1 中国食品药品检定研究院，北京，100050

2 国家药典委员会，北京，100061）

肝素是一种黏多糖硫酸脂类抗凝剂，在体内外都有抗凝血作用，有一定的不良反

应。低分子肝素是以肝素为原料，用物理、化学或生物的方法将其分级或降解，得到的具有较低分子量的组分或片段，其既保持了肝素的抗血栓作用又降低了出血的危险。目前国内外已有十多种不同类型的低分子肝素产品，按生产工艺的不同常见的有：依诺肝素钠，那曲肝素钙，达肝素钠，帕肝素钠和亭扎肝素钠等。《欧洲药典》^[1]现已收录了上述五种低分子肝素产品，《美国药典》^[2]也收录了依诺肝素钠。由于不同生产工艺低分子量肝素产品在分子结构，理化和生物学特性等方面的确定和潜在差异性。美国 FDA、欧洲药品局和世界卫生组织等机构，把不同低分子量肝素作视为单独的产品，临床疗效不同。《美国药典》和《欧洲药典》收录的低分子肝素质量标准中主要包括了重均分子量、抗 Xa 效价、抗 Xa/抗 IIa、钠盐与钙盐的鉴别等。此外，还增加了核磁共振一维碳谱定性鉴别低分子量肝素类型的方法，要求样品与标准物质的 ¹³C-NMR 谱相似（The spectra are similar）。通过大量文献[3]和实验比较，目前核磁共振法能很好的区别鉴别不同类型的低分子肝素，而《中国药典》尚无相关方法的收录。本工作对不同类型低分子量肝素标准品进行了 ¹³C-NMR 初步研究，对其碳谱精细结构信息解析发现，不同类型的低分子量肝素都有其特征的碳谱信号，可以通过碳谱特征信号对低分子量肝素进行区分。

一维 ¹³C-NMR 实验是在装配 5mm BBO 探头的 Bruker 500MHz 核磁共振谱仪上采集。采样时间 (AQ) 1.1 秒，弛豫时间 (D1) 1 秒，测量温度 (T) 40°C，谱宽 (SW) δ (ppm)236.6，采样点数 (data point) 64k，扫描次数 (NS) 32768 次 (约 20 小时)，线展宽因子 (line-broadening factor) 0.3Hz。用氘代甲醇定标，甲醇碳的化学位移为 50ppm。

本研究首先对 ¹³C 谱进行了归属，其中 δ (ppm)23.8 处为末端 CH₃ 信号， δ (ppm)50 处为内标物氘代甲醇的信号， δ (ppm)50~90 之间为糖环上 C2,C3,C4,C5 的 ¹³C 信号， δ (ppm)90~110 处为之间为糖环上 C1 的 ¹³C 信号， δ (ppm)170-180 处为葡糖醛酸糖环上 C6 的 ¹³C 信号。然后对不同低分子量肝素的碳谱进行精细的比较。通过比较不同低分子量肝素的碳谱，我们得出不同低分子量肝素的特征图谱峰。研究表明，在控制好工艺参数的条件下，不同厂家可以生产出 ¹³C 谱差异很小的肝素，可以通过厂家产品与标准品 ¹³C 谱比较来确定是否属于同类低分子量肝素。比较 6 种不同低分子量肝素 ¹³C 谱精细结构信息发现，不同类型的低分子量肝素都有其特征的 ¹³C 谱信号。在不同厂家样品检测中，可以通过样品特征信号对其低分子量肝素的类型进行区分。中国药典中目前还未加入低分子量肝素 ¹³C 谱定性鉴别项，本文的研究可以为低分子量肝素产品的质量标准的提升打下先期基础。

关键词：低分子肝素；碳谱；定性鉴别

国际药典中阿苯达唑咀嚼片质量标准修订

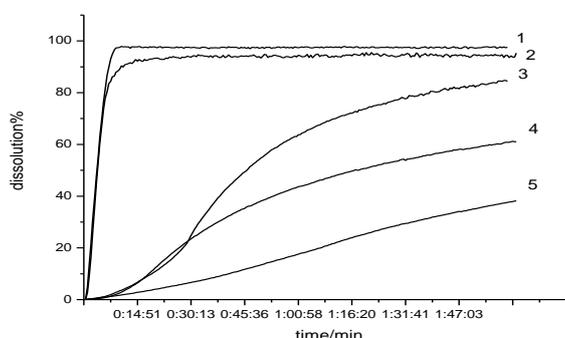
朱俐 刘洋 尹利辉*

(中国食品药品检定研究院, 100050 北京)

摘要:《国际药典》(The International Pharmacopoeia)是由世界卫生组织编纂,旨在为所选药品、辅料和剂型的质量标准达成一个全球范围的统一的标准性文献。阿苯达唑咀嚼片是用于儿科的驱虫药,目前为止,仅《国际药典》收录了阿苯达唑咀嚼片质量标准,标准内容包括鉴别、有关物质和含量测定。阿苯达唑 BCS 分类为第二类(低溶出、高渗透),体外溶出影响该药物的临床疗效。考虑到病人在服用该药品时,整片吞下或者没有完全咀嚼碎服下,可能存在未达到疗效的可能,提出在标准中增设溶出度项目,以达到更好的保证该药品质量要求。通过对阿苯达唑咀嚼片原研药和四种仿制药在 3 种溶出介质中的溶出规律,评价原研药和仿制药溶出效果。最终采用浆法,溶出介质为 0.1mol/L HCL,转速为 75r/min,在 15min 内容出 80%为标准方法,该方法对不同厂家的产品有较好的区分力,该结果已被《国际药典》专家委员会采纳,修订后的标准目前已正式发布。

咀嚼片剂一直被认为是一种特殊的剂型,关于咀嚼片剂质量标准是否需要设定溶出度项目一直没有明确的权威说明。中国药典(Ch.Ph)、印度药典(Ph.Ind)、国际药典(Ph.Int)以及英国药典(BP)均未提及咀嚼片是否需要设定溶出度,仅美国药典附录说明咀嚼片要求溶出度实验,但正文中关于咀嚼片药品的标准未见有溶出度项目。本次研究首次提出咀嚼片需设定溶出度项目,修订后的国际药典阿苯达唑咀嚼片标准是唯一设定溶出度项目的咀嚼片质量标准。该研究被《国际药典》专家委员会认为是一个“里程碑”,对咀嚼片这一特殊剂型药品的质量标准研究具有特殊意义。

关键词: 国际药典; 咀嚼片; 标准; 溶出度



注:《国际药典阿苯达唑咀嚼片质量标准研究》是中国食品药品检定研究院与世界卫生组织的合作项目。

桑叶中生物碱类成分定性和定量分析研究

沈小月^{1,2}, 宋敏^{1,2}, 杭太俊^{1,2*}

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏 南京 210009; 2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: **目的:** 桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶, 具有疏散风热, 清肺润燥、清肝明目的功能。现有研究表明桑叶中生物碱是桑叶中主要的降血糖活性成分, 为了阐明生物碱类降血糖活性的物质基础, 对其进行化学成分研究。本文建立了桑叶中生物碱类的定性和定量分析方法。**方法:** 本试验共建立了生物碱直接定性分析、生物碱衍生化定性分析和生物碱衍生化定量分析三种分析方法: (1) 采用 0.05 mol/L HCl 为溶剂提取桑叶中生物碱, 以 0.1% 醋酸铵溶液, 甲酸调节 pH(2.6)为 A 相, 乙腈为 B 相; 按 0min(10%B)-10min(10%B)-40min(30%B)-60min(80%B)-61min(10%B)-65min(10%B) 梯度洗脱; 色谱柱: Hypersil SCX (4.6mm×250mm, 5 μ m); 流速为 1mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L, 对生物碱提取物进行色谱分离, 电喷雾正离子化高分辨 TOF/MS 检测、并结合 MS/MS 和对照品对照鉴定各成分的结构。(2) 采用 FMOC-Cl 对生物碱提取物进行衍生化; 以 0.1% 甲酸溶液为 A 相, 0.1% 甲酸乙腈溶液为 B 相; 按 0min(20%B)-3min(35%B)-17min(42%B)-19min(85%B)-21min(56%B)-25min(20%B) 梯度洗脱; 色谱柱: Phenomenex Fusion-RP 80A (250mm×4.60mm, 4 μ m); 流速为 1mL/min; 柱温 15 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L, 对生物碱衍生化产物进行色谱分离, 通过对照品保留时间比对, 再结合液质联用中的一级与二级质谱信息鉴定各衍生化产物结构。(3) 将生物碱成分中的 1-DNJ 和 D-ABL 列为定量分析的指标性成分, 为桑叶中生物碱的质量控制提供科学依据。按生物碱衍生化定性分析的色谱分离条件, 采用 HPLC-UV 检测, 建立 1-DNJ 和 D-ABL 的定量分析方法, 同时进行方法学验证, 并将其应用于桑叶碱提取物中 1-DNJ 和 D-ABL 的含量测定。**结果:** 桑叶中生物碱的定性分析方法分为两种, 一种为直接分析方法, 即通过阳离子交换色谱柱分离生物碱类各成分; 另一种为衍生化法, 即对生物碱进行 FMOC-Cl 衍生化, 对衍生化产物进行分离分析。按两种方法, 通过对照品保留时间比对, 再结合液质联用中的一级质谱精密分子质量与二级碎片信息, 可以确定桑叶中生物碱含有 1-DNJ 与 D-ABL, 可能含有成分 1 推测为 Gal-DNJ、成分 2 推测为 fagomine (典型图如 1-4); 将 1-DNJ 和 D-ABL 作为定量测定的指标性成分, 建立定量分析方法, 方法准确可靠, 专属性好 (典型图如图 5), 测得四批生物碱提取物中 1-DNJ 的平均含量为 8.28%, D-ABL 平均含量为 0.32%。**结论:** 本实验建立的桑叶中生物碱的定性和定量分析方法, 方法可靠, 可应用于桑叶中生物碱的质量控制。

关键词: 桑叶; 生物碱; 色谱-质谱联用; 质量控制; 定性分析; 定量分析

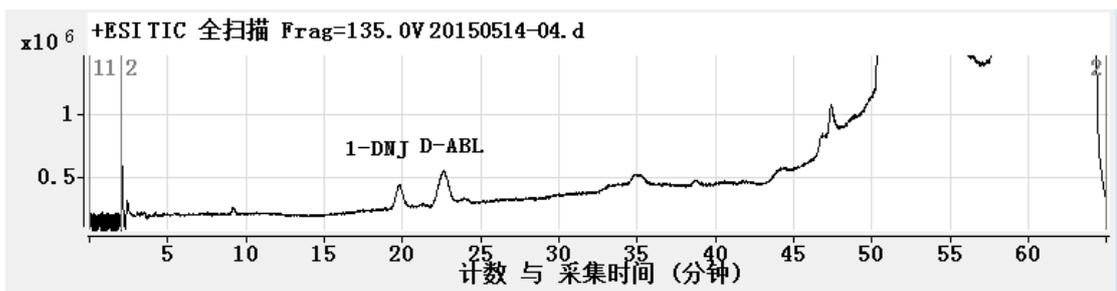


图1 生物碱混合对照直接分析 LC-TOF/MS 色谱图-成分编号图

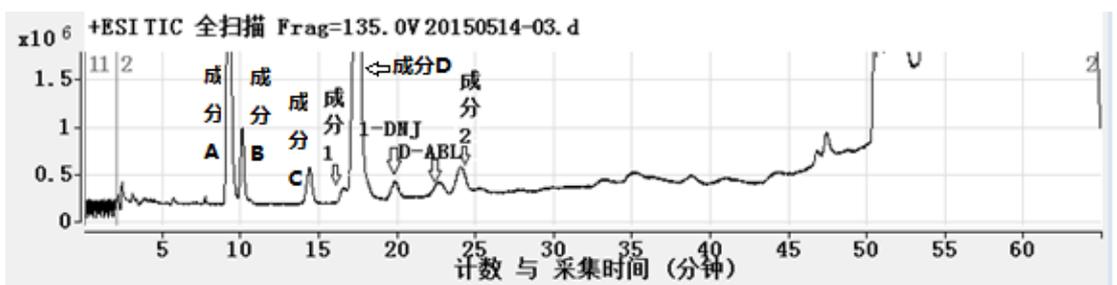


图2 生物碱提取物直接分析 LC-TOF/MS 色谱图-成分编号图

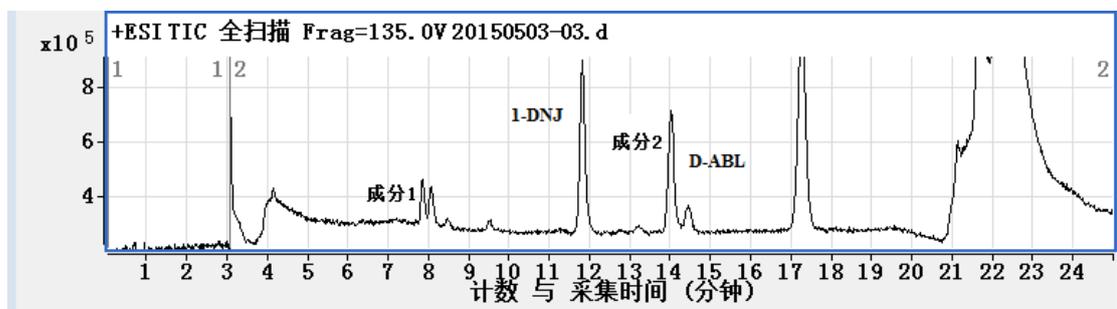


图3 生物碱混合对照衍生生化分析 LC-TOF/MS 色谱图-成分编号图

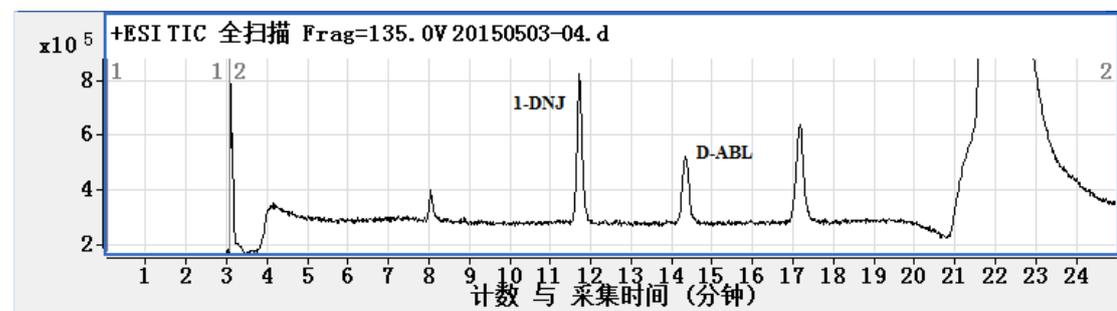


图4 生物碱提取物衍生生化分析 LC-TOF/MS 色谱图-成分编号图

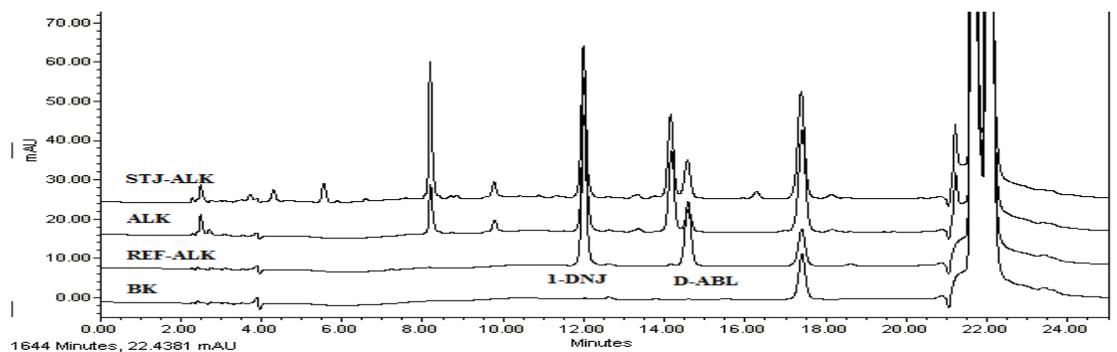


图5 空白衍生化 (BK)、生物碱对照液衍生化 (REF-ALK)、生物碱衍生化 (ALK)、桑酮碱 (桑叶提取物中黄酮与生物碱的混合物) 衍生化 (STJ-ALK) 样品液相色谱比较图

基于 HPLC-Q-TOF-MS 法的兴安杜鹃叶多成分的定性定量研究

王丽娟 朱小雨 娄心薇 郑枫 柳文媛* 冯锋* 谢宁

(中国药科大学)

摘要: 作为传统中药, 兴安杜鹃叶常用于治疗咳嗽、哮喘, 并缓解痰多及支气管炎等症状。兴安杜鹃在大兴安岭地区资源丰富, 药用价值较高, 且具有极高的经济价值。然而, 中药成分复杂, 为了获得良好的疗效并且保证用药安全, 必须对其质量进行控制。因此, 鉴别兴安杜鹃中的多种成分以及对主要活性成分的定量研究是首要的。本研究首次建立高效液相色谱串联二级质谱法对兴安杜鹃叶的多组分进行定性定量研究。一共鉴别了 33 种化合物, 包括 24 种黄酮、6 种酚酸类化合物、2 种香豆素类以及 1 种萜类化合物。此外, 用高效液相色谱法对 7 种活性成分(没食子酸、东莨菪亭、二氢槲皮素、槲皮素、山萘酚、8-去甲基杜鹃素、杜鹃素)进行定量研究。其中, 黄杉苷、杜鹃素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷和 syzalterin 首次从该植物中分离得到; 槲皮素-3- β -D-(6-p-羟基-苯甲酰基)半乳糖苷、槲皮素-3- β -D-(6-p-香豆酰基)半乳糖苷和 myrriacetin 首次从该属植物中分离得到。本研究还通过 HPLC-ESI-MS 方法对兴安杜鹃中的黄酮类化合物的裂解途径进行研究, 并对其裂解方式进行归纳总结, 为兴安杜鹃中的黄酮类化合物的定性分析提供了依据。该方法经过验证, 成功地分析了购于河北省的 10 批兴安杜鹃样品, 建立兴安杜鹃的指纹图谱, 用于兴安杜鹃质量控制的初步检测。本研究所建立的方法不仅为兴安杜鹃的质量控制提供了一定的参考意义, 而且为将来进一步研究兴安杜鹃的药效物质基础提供了参考。

关键词: 裂解途径; 兴安杜鹃; 定性分析; 定量分析。

基于超快速液相-离子阱/飞行时间质谱的大黄不同炮制品代谢组学研究

王敏¹, 付金凤¹, 郭慧敏¹, 田媛¹, 许风国^{1,2}, 宋瑞^{1,2*}, 张尊建^{1**}

(1.中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

2.中国药科大学药物分析教研室, 江苏 南京 210009)

大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根和根茎, 有攻积导滞、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经之功效, 然易伤胃气。经酒制后, 熟大黄和酒大黄泻下力缓, 活血化瘀作用增强。大黄炭照炒炭法炒至表面焦黑色、内部焦褐色, 泻

下之力极弱，善收敛止血生肌。

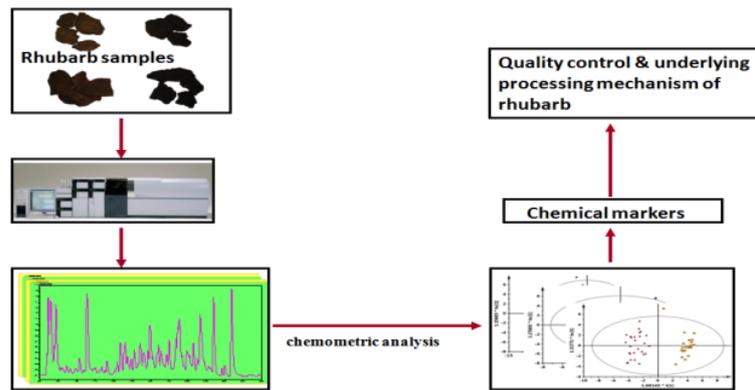


图1 基于超快速液相-离子阱/飞行时间质谱的大黄不同炮制品代谢组学试验流程图。

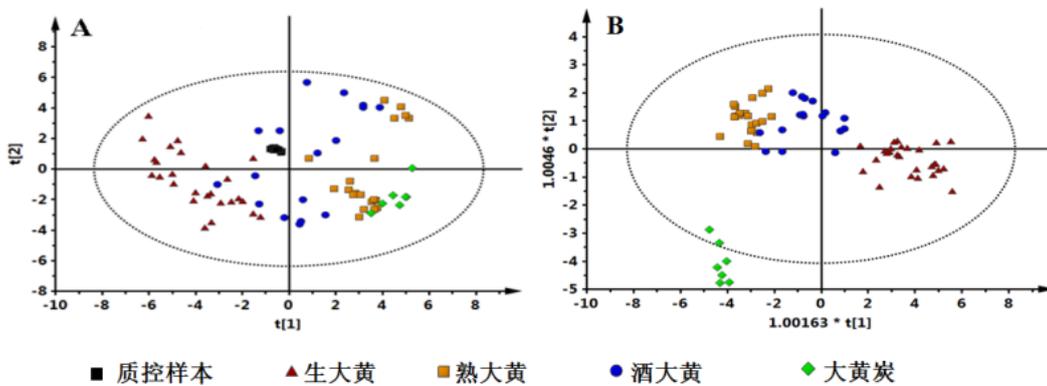


图2 大黄不同炮制品的PCA得分图(A)和OPLS-DA得分图(B)。

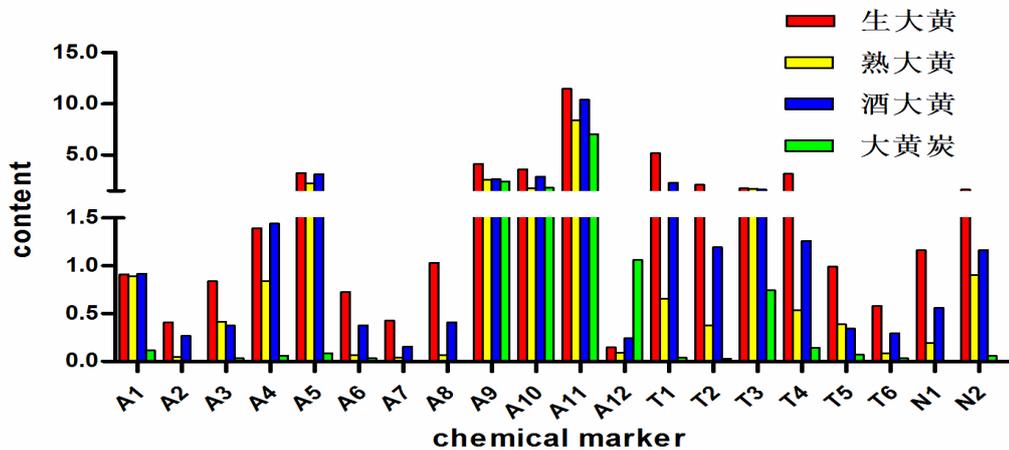


图3 差异性化学成分在不同大黄炮制品中含量比较(A1:chrysophanol-O-glucoside; A2: acetyl-chrysophanol-O-glucoside; A3: 6-dehydroylaccaeic acid D-glucoside; A4, A5: emodin-O-glucoside; A6: acetyl-emodin -O-glucoside; A7 : acetyl-rhein-O-glucoside; A8: emodin-O-(6'-O-malonyl)-glucoside; A9: 6-dehydroylaccaeic acid D; A10:rhein; A11: emodin; A12: physcion; T1:(+)-catechin; T2: (epi)catechin-O-gallate; T3: gallic acid; T4, T5: cinnamoyl-O -glucose-O-galloyl; T6: cinnamoyl-O -glucose-O-galloyl; N1: 6-hydroxyrumicin-8-O-glucoside ; N2: torachryson-8-O-glucoside)

大黄炮制前后药效差异显著，如何全面地评价大黄不同饮片的质量至关重要。本课题利用超快速液相-离子阱/飞行时间质谱仪（日本岛津公司）采集大黄四种炮制品的全谱，所采集的原始数据文件经峰提取、峰匹配，共有峰筛选（“80%规则”）、缺失值填补、归一化和标尺化等处理后，导入 SIMCA-P 软件进行多元统计分析(图 1)。主成分分析 (PCA) 得分散点图显示生品与炮制品具有一定的分离趋势 (图 2A)。为了进一步明确大黄炮制前后的化学组成差异，本试验构建正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 模型，并根据变量的投影重要性 (Variable importance in projection, VIP) 筛选差异变量。如 OPLS-DA 散点图所示 (图 2B)，除熟大黄和酒大黄因炮制工艺相近，散点图中分布有交叉外，大黄四种炮制品分布在不同的区域。基于 VIP 值筛选出的差异变量与标准品比对准确质量数、保留时间、多级质谱信息或依据 IT/TOF 提供的精确分子质量和多级质谱碎片信息，确证或初步鉴定了 20 种炮制后显著变化的成分，且多数成分炮制后含量显著性下降 (图 3)。本研究从整体上比较了炮制对大黄化学成分的影响，结果显示炮制显著影响大黄中多种成分的含量，代谢组学分析方法能够较为全面地揭示这种变化。

药物一致性评价

LCMS 直接检测磷酸盐体系下磺胺类药物中的杂质

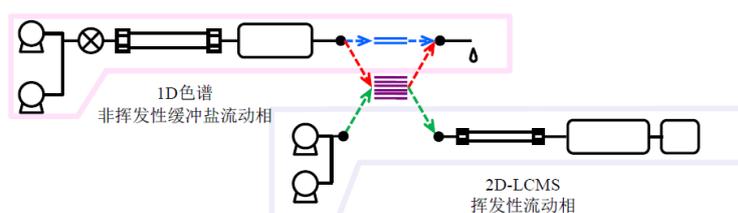
郝红元 李强 宋玉玲 姚劲挺 黄涛宏

岛津企业管理（中国）有限公司 分析中心 上海 200052

摘要: 有关物质检查是药品质量控制的重要内容。合成药物中的有关物质通常来源于合成原料，中间体和副反应产物。对于药物中的这些杂质（含量>0.1%）通常应进行鉴定。目前这些检查也是新药报批的必须项目。液质联用技术是药物杂质检测的不可或缺的手段。世界各地药典的方法多是 LC 的方法，常常使用到磷酸盐、草酸盐等无机盐及这些盐类的缓冲溶液，甚至使用离子对试剂，以调节药物及杂质的保留时间。然而，非挥发性的缓冲盐作为流动相是无法应用到质谱中，因此，如果使用质谱对杂质进行定性，通常需要将非挥发性的缓冲盐换成挥发性的来进行。但是，更换过流动相后，杂质的保留时间往往会发生变化，这使得目标杂质的定位产生困难。

本文建立了使用 Trap free 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统（见下图）定性检测磺胺间二甲氧嘧啶中 4 个杂质（磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺喹噁啉）的方法。该方法使用非挥发性的磷酸缓冲盐对药物主成分和杂质进行了分离，一维分离后确定主成分和杂质的保留时间，根据设定的保留时间捕集目标杂质，然后通过二维 LCMS 系统对目标杂质进行 MS 定性分析。该系统由于无需将非挥发性缓冲盐转换为挥发性缓冲盐，大大节省了方法开发人员的时间，并且保证了定性的准确度。

关键词: 磺胺间二甲氧嘧啶；杂质；磷酸盐；Trap free 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统



盐酸氨溴索片在 4 种溶出介质中的体外溶出研究

余佃宝 申玲玲 郝红元 詹松 姚劲挺 黄涛宏

岛津企业管理（中国）有限公司 分析中心 广州 510010

摘要: 盐酸氨溴索(Ambroxol Hydrochloride) 化学名称为反式-4-[(2-氨基 3,5-二溴苄

基)氨基]环己醇盐酸盐,于20世纪80年代在德国上市,后在法国、日本等国家陆续上市,是目前临床作用较强的祛痰药。其作用机理为增加呼吸道黏膜浆液腺的分泌,减少粘液腺分泌,促进肺表面活性物质分泌,增加支气管纤毛运动,使痰液易于咳出。盐酸氨溴索片为固体制剂,其体外溶出度的考察不仅是评价产品质量的一个重要指标,也是我国食品药品监督管理局规定的仿制药一致性评价中需要与原研药对比的一个重要指标。

本文建立了一种使用岛津溶出度仪SNTR-8400配合液相色谱方法测定盐酸氨溴索片溶出率的方法。根据国食药监注[2013]34号文《国家食品药品监督管理局关于开展仿制药质量一致性评价工作的通知》要求制定的仿制药质量一致性评价—盐酸氨溴索片一致性评价参比制剂/溶出曲线测定(草案)制定实验方案,采用桨板法,盐酸氨溴索片分别在四种溶出介质(分别是0.1 mol/L HCl, pH 4.5, pH 6.8和水溶液)中溶出,取各介质续滤液,用超高效液相色谱LC-30A系统进行含量测定。实验结果显示四种溶出曲线与国家药品质量监督局仿制药一致性评价草案中规定的盐酸氨溴索溶出曲线相似,在15分钟时,盐酸氨溴索片的平均溶出量不低于85%,表明使用岛津SNTR-8400溶出度仪以及岛津LC-30A超高效液相色谱系统在测定盐酸氨溴索片体外溶出曲线时具有良好的适应性和重复性,能够满足国家规定药物体外溶出曲线测定的相关要求。

关键词: 盐酸氨溴索 溶出度仪 仿制药质量一致性评价 高效液相色谱

兰索拉唑肠溶胶囊有关物质检测不同色谱柱的比较实验

孙仲葆

(黄石市食品药品监督管理局检验检测中心 435000 0714-6229662)

摘要: 采用十八烷基硅烷键合硅胶柱和酰胺基十六烷基色谱柱等两种高效液相色谱柱对兰索拉唑肠溶胶囊中含有的杂质 A、B、D、E 等杂质成分进行分离试验的比较。实验结果表明,十八烷基硅烷键合硅胶柱相比酰胺基十六烷基色谱柱具有更好的分离效果,两柱检测限、定量限和耐用性相同。

关键词: 兰索拉唑; 有关物质 ; 色谱柱

兰索拉唑中含有杂质 A、B、D、E 等较多杂质成分,英国药典 2012 年版兰索拉唑肠溶胶囊质量标准“有关物质”项下采用酰胺基十六烷基色谱柱。其在非极性烷基

相上嵌入极性基团而兼有正相色谱和反相色谱的特性，但此色谱柱常常柱压高、使用寿命较短且国内罕见，难以购买。而美国药典 34 版则采用 L1 色谱柱即十八烷基硅烷键合硅胶柱。为此，我们用同一兰索拉唑供试品溶液在酰胺基十六烷基柱与常用的十八烷基硅烷键合硅胶柱二种色谱柱上的分离情况进行了比较实验。方法如下：

1、仪器与试药

仪器：美国戴安高效液相色谱仪,P680 低压四元泵、ASI-100 自动进样器、TCC-100 柱温箱、PDA-100 二极管阵列检测器、Chromeleon 6.80 色谱工作站。

色谱柱：月旭 Ultimate Polar-RP 酰胺基十六烷基柱（Welch Materials,Inc.5 μm , 4.6mm \times 250mm）；美国热电 Synchronis C18 色谱柱(Thermo,5 μm , 4.6mm \times 250mm)。

对照品：兰索拉唑杂质 E(2-Mercaptobenzimidazole)对照品(Toronto Research Chemicals Inc. Catalogue# M225190)，兰索拉唑杂质 B（Lansoprazole Sulfone）对照品(TLC Pharma Chem.,Inc，批号：1184-025A2)，杂质 A（Lansoprazole N-Oxide）对照品(LGC Standards GmbH,Catalogue:MM0474.07,批号：11831)，兰索拉唑杂质 D (1H-Benzimidazol-2-ol)对照品(LGC Standards GmbH,Catalogue:MM0474.03,批号：14604)。

试剂：乙腈、三乙胺为色谱纯，磷酸为分析纯，水为重蒸水。

2、样品与来源 兰索拉唑肠溶胶囊（批号：20120301），湖北欧立药业有限公司生产。

3、方法与结果

3.1 供试品溶液的制备：取含量测定项下的粉末适量(约相当于兰索拉唑 25mg),精密稳定，置 50ml 量瓶中，加溶液 A（1ml 三乙胺与 60ml 水混合，用磷酸调 pH 至 10.5，与 40ml 的乙腈混匀）溶解并稀释至刻度，摇匀。

3.2 对照品溶液的制备：杂质 D、A、E、B 对照品溶液浓度分别为(1.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

3.3 色谱条件：乙腈-水（1ml 三乙胺与 60ml 水混合，用磷酸调 pH 至 6.2）(40:60)为流动相，检测波长为 285nm。

3.4 分离情况对比

结果表明：两色谱柱均能有效分离各杂质峰，且以 C18 柱分离情况为优，柱效较高；杂质 A、杂质 E 在两柱的出峰顺序发生颠倒现象。

3.5 检测限、定量限与耐用性

以杂质 E 为代表在两种色谱柱上进行对比研究。取杂质 E 对照品溶液（0.00170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）进样 10 μl ，以信噪比 ≥ 3 计算，最低检出量两柱一致，检测限 1.7 $\times 10^{-5}$ μg ；以信噪比 ≥ 10 计算，两柱得到的定量限均约为 5.65 $\times 10^{-5}$ μg ，进样各 5 次，峰面

积平均值为 441, 10 次结果 RSD 为 6.3%; 采用两种色谱柱并 3 次微调变换流动相比例 (乙腈比例由 40%, 调整至 38% 及 42%), 结果两柱对同一样品中杂质 E 含量测定结果无变化。

4、**结论:** 实验结果表明, 十八烷基硅烷键合硅胶柱相比酰胺基十六烷基色谱柱具有更好的分离效果, 两柱检测限、定量限和耐用性相同。

参考文献: USP34 BP2012

硫酸奈替米星有关物质 HPLC-PED 法的建立

赵卫、吴宇宁、陈达、袁耀佐、张玫、樊夏雷

(江苏省食品药品监督检验研究院)

摘要: 硫酸奈替米星是一种半合成的氨基糖苷类抗生素, 通过在西索米星 1-N 位上引入乙基, 提高了对耐药菌的抗菌稳定性, 同时增加了抗菌活性, 在临床上应用广泛。因硫酸奈替米星结构中含有双键, 硫酸奈替米星及其有关物质具有紫外末端吸收, 可用紫外法直接对其进行分析。目前, 《美国药典》就采用 HPLV-UV 法测定其有关物质。但是奈替米星脱去 A 环后产生的杂质即硫酸奈替米星中的主要杂质 1-N-乙基加洛糖胺不具有紫外吸收, 因此无法直接用紫外法对其含量进行控制。《中国药典》中采用 HPLC-ELSD 的方法, 但该方法检测灵敏度低, 流动相受限 (必须具有挥发性), 计算较为复杂。《欧洲药典》采用反相高效液相色谱-脉冲安培电化学 (HPLC-PED) 法测定有关物质, 但需使用特殊色谱柱 (苯乙烯-二乙烯基苯聚合物柱) 且流动相中含有大量的缓冲盐 (20g L^{-1} 硫酸钠), 所用的三电位波形易损耗电极。本文新建立了硫酸奈替米星原料药有关物质检查用的 HPLC-PED 法, 通过 Design-Expert 软件进一步对流动相进行了优化。色谱条件为: 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相为 21 mL L^{-1} 三氟乙酸溶液 (含 $500\ \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 五氟丙酸, 7 mL L^{-1} 50% 氢氧化钠溶液, 用 50% NaOH 调节 pH 值至 1.2) - 乙腈 (97:3), 流速 1.0 mL min^{-1} ; 柱后碱溶液为 0.8 mol L^{-1} 氢氧化钠溶液, 流速 0.4 mL min^{-1} ; 脉冲安培电化学检测器, 检测电极为金电极, 参比电极为银-氯化银电极, 四电位波形检测电位; 柱温 40°C , 检测器温度 40°C 。该方法中奈替米星在 $0.15\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r=0.9991$); 方法的 LOD (S/N=3) 为 0.75 ng , LOQ (S/N=10) 为 1.875 ng ; 进样精密度 RSD (n=6) 为 1.5%; 有关物质的杂质总量重复性的 RSD (n=8) 为 1.7%; 杂质总量中间精密度

RSD(n=18)为 1.7%。新建立的硫酸奈替米星有关物质检查用 HPLC-PED 法使用常规的 C18 色谱柱, 稳定性好, 未使用缓冲盐, 降低了对色谱柱和色谱管路的损害; 采用四电位检测波形, 金电极的耐用性大大提高; 灵敏度高分离能力强, 在典型样品中分离得到 27 个杂质峰, 分离得到的杂质个数多于现行《欧洲药典》、《中国药典》方法。用于新建立的色谱条件的流动相与 LC-MS 不兼容, 研究过程采用手动收集组分, 在另外 LC-MS 系统中采集质谱信息的方法, 对部分杂质的结构进行了推定。新建该方法专属性好, 线性范围宽, 灵敏度高, 重复性优, 有望成为硫酸奈替米星有关物质检查的法定方法。

关键词: 硫酸奈替米星、反相高效液相色谱-脉冲安培电化学法、有关物质

Abstract: Netilmicin sulfate is one type of semi-synthetic aminoglycoside antibiotic. Through introduction ethyl on 1-N of sisomicin, netilmicin sulfate improved the stability of antibiotics against resistant bacteria, increased the antimicrobial activity and widely used in clinical applications. Because of the double bonds in the structure of netilmicin sulfate, netilmicin sulfate and the related substances have the end ultraviolet absorption, which can be directly analyzed by UV method. At present, HPLV-UV method was adopted to control related substances of netilmicin in USP38. But the impurity of netilmicin off A ring, 1-N-ethylgaramine, the main impurity in netilmicin sulfate does not have UV absorption. Therefore, UV method cannot be directly used to control the content of impurities. In Chp2010, the method of HPLC-ELSD was used, but the detection sensitivity was low, the mobile phase was limited (must be volatile), and the calculation was complex. HPLC-PED was used to determine the related substances in EP8.0, but special column (styrene-divinylbenzene copolymer as stationary phase) must be used, the mobile phase containing a large number of buffer salt (20g L^{-1} sodium sulfate), the three potential waveform damaged electrode easily. In this paper, a new method of HPLC-PED is used to examine the material of the raw material of the netilmicin sulfate was established, the mobile phase is optimized by Design-Expert software too. Chromatographic conditions: The column is packed with Octadecylsilane. The mobile phase is composed of 21 mL L^{-1} trifluoroacetic acid solution (containing $500\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ pentafluoropropionic acid as the mobile phase, 7 mL L^{-1} sodium hydroxide solution(50%), adjusting the pH value to 1.2 with the sodium hydroxide solution(50%)) - acetonitrile (97:3) at a flow rate of 1.0 ml min^{-1} . 0.8 M NaOH was added post column at a flow rate of $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A pulsed electrochemical detector, which was kept in at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a hot air oven was adopted. The electrochemical cell consisted of a working electrode, a pH-Ag/AgCl reference electrode and a titanium counter electrode. The working electrode was a gold 3 mm diameter electrode and a quadruple-potential waveform (QPW) was selected as detection waveform. The linearity of netilmicin ranges from $0.15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a coefficient of determination equal to 0.9991. The injection repeatability RSDs (n=6) was 1.5%. The LOD and LOQ of netilmicin were found to be 0.75ng and 1.875ng respectively. The repeatability RSDs (n=6) of the total

impurities in a sample were 1.7%. The inter-day repeatability RSDs (n=18) of the total impurities in a sample were 1.7%. The new HPLC-PED method used ordinary C18 column and the result was very stable. The damage of chromatographic column and chromatographic lines has been avoided for not using buffer salt. The durability of gold electrode has been improved by using QPW. The method had higher sensitivity, better separation ability and 27 impurities could be separated. The number of separated impurities was more than the impurities number of EP8.0 and Chp2010. For newly established mobile phase is not compatible to LC-MS, manual collection is used in the research process. Collect information of mass spectrometry, structure of the some part of impurities was estimated. The new method has good specificity, wide linear range, high sensitivity, good repeatability, and can be expected to be a legal method for detecting the related substances in netilmicin sulfate.

Key words: Netilmicin sulfate; HPLC-PED; Related substances

杂质 4-表多西环素的制备及其在质量标准中的应用研究

张娅^{1,2}, 张锦琳¹, 赵述强¹, 袁耀佐¹, 张玫¹, 樊夏雷¹, 王亚楼²

(1 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏 南京 210008; 2 中国药科大学药物化学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 自“9·11”事件后,世界各国,特别是美国高度重视生物恐怖性疾病,而炭疽杆菌为生物恐怖性疾病病原体之一,盐酸多西环素作为次选药物对治疗炭疽有显著疗效,因此对其质量的深入研究也随之得到重视。2014 年国家评价性抽验品种“盐酸多西环素片”的探索性研究过程中,从来源于不同企业的盐酸多西环素片检出 4-表多西环素、美他环素、 β -多西环素、2-乙酰-6-脱碳酰胺多西环素四种共性杂质,有必要对这四种杂质进行系统研究。其中,美他环素、 β -多西环素对照品可从中检院购买;2-乙酰-6-脱碳酰胺多西环素目前无杂质对照品;市售的 4-表多西环素的纯度仅 70%,且目前并无文献报道 4-表多西环素的毒性及体外抗菌活性。为了制备高纯度 4-表多西环素并测定其毒性及体外抗菌活性,本课题利用盐酸多西环素热破坏溶液,经高效制备液相色谱仪分离,再通过旋转蒸发、调节 pH、冷冻干燥等步骤制备高纯度的 4-表多西环素,采用高效液相色谱法测定纯度,运用紫外光谱、红外光谱、质谱及核磁共振等手段确证其结构,比较 4-表多西环素与多西环素、美他环素、 β -多西环素等有关物质对中国仓鼠肺细胞(CHL)的细胞毒性和遗传毒性、斑马鱼胚胎发育毒性以及体外抗菌活性。结果表明新建方法制备的产物经结构确证为 4-表多西环素,其纯度达到 90.1%,为目前报道最高。4-表多西环素、多西环素、美他环素、 β -多西环素对 CHL

细胞均有一定的细胞毒性,在-S₉mix 试验中毒性大小依次为:多西环素>4-表多西环素> β -多西环素>美他环素,在+S₉mix 试验中毒性大小依次为:多西环素> β -多西环素>4-表多西环素>美他环素;CHL 细胞染色体畸变率均小于 5%,未见明显的遗传毒性;在斑马鱼胚胎发育毒性实验中,4-表多西环素致畸性与致死性最强;在体外抗菌活性实验中,4-表多西环素抗菌活性较弱,其强弱顺序为美他环素>多西环素>4-表多西环素> β -多西环素。安全性和有效性试验提示 4-表多西环素属于毒性较大且无效的杂质,需要在质量标准中进行单独控制,建议修订现行《中国药典》中盐酸多西环素及其制剂的质量标准。

关键词: 4-表多西环素; 制备; 毒性; 体外抗菌活性

***通讯作者:** 袁耀佐, 主任药师; 研究方向: 现代药物分析与抗生素质量控制

Tel: 86631609; E-mail: yyzyz7256@sina.cn

高效液相色谱法测定杯芳烃磺酸钠及其有关物质

杨建云 邹磊 肖炳坤 黄荣清*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 杯芳烃是由苯酚单元通过亚甲基在酚羟基邻位连接而形成的一类环状低聚物; 由于其具有独特的空穴结构和分子识别特性, 引起了国内外科研工作者广泛的重视。杯芳烃具有一个很有规则的空穴, 可以进行衍生化, 以调节空腔尺寸, 利用功能化的基团进行取代后的化合物可以选择性的形成包合物。Gutsche 的进一步研究发现杯芳烃的圆环面可能具有模拟酶的能力, 在生物体系中酶具有很高的催化活性和反应选择性。本研究建立杯芳烃磺酸钠的液相分析方法, 为其进一步研究提供了试验依据。

实验方法: 色谱柱: SHISEIDO CAPCELL ADME S5 (250mm×4.6mm, 5 μ m); 流动相: A 相为乙腈, B 相为 10mmol/L(NH₄)₂HPO₄+10mmol/L NH₄H₂PO₄, pH=7; A 相 (0-30min, 2%-21.5%; 30-35min,

21.5%-2%); 检测波长为 208nm; 流速 1.0mL/min; 柱温 35℃; 进样体积为 20 μ L。

实验结果: 实验中系统地优化了检测波长、色谱柱、流动相、流速及柱温等参数, 对杯芳烃磺酸钠及其杂质实现了有效分离 (各杂质间分离度 \geq 1.5; 杂质与主峰间分离度 \geq 2.0), 并对本方法进行了方法学验证, 为杯芳烃磺酸钠原料药的有关物质测定提供了较为便捷的分析方法。**结论:** 杯芳烃磺酸钠水溶性强, 但采用一般的反相 C18 色

谱柱分析，色谱柱保留弱，难以与有关物质分离；若采用 HILIC 模式分析，能够实现较好的分离效果，但水相或缓冲液比例不得超过 40%，在较高有机相色谱条件下，样品极易析出对色谱柱造成损坏，其色谱条件仍需进一步优化；而采用 ADME（金刚烷）色谱柱，其表面具有特殊的立体笼状结构的新型官能团，有较高表面极性和一定疏水性，适用于具有高极性的杯芳烃磺酸钠分析，使样品具有较强的保留并与杂质能够得到有效的分离。

关键词：杯芳烃磺酸钠；资生堂 ADME 色谱柱；含量测定；高效液相色谱法

项目资助：国家科技重大新药创制专项（2013ZX09102-016）、十二五国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术大平台（2012ZX09301003-001-010）、国家自然科学基金项目(21375147)、北京自然科学基金（7142125）资助

第一作者简介：杨建云（1965- ），女，高级实验师。研究方向：药物分析。

E-mail: 3032006zl@sina.com

利用 UPLC-TQ-MS 比较蟾酥鲜品和蟾酥商品化学成分

王子月¹，周婧²，马宏跃^{1,2}

(1. 南京中医药大学药学院 南京 210023； 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 南京 210023)

摘要：蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍（*Bufo bufo gargarizans* Cantor）或黑框蟾蜍（*Bufo melanostictus* Schneider）等近缘种的耳后腺分泌的白色浆汁加工而成，近年来多用于治疗各种癌症，有一定的攻毒抗癌、消肿止痛作用。研究表明其主要抗肿瘤成分为蟾蜍二烯酸内酯类。蟾蜍二烯酸内酯有游离型和结合型两种结构。该文通过超高效液相色谱质谱联用技术(UPLC-TQ-MS)对中华大蟾蜍的蟾酥鲜品中蟾蜍二烯酸内酯类成分进行研究。采用 UPLC-TQ-MS 的正离子多反应监测(MRM)模式。研究发现蟾酥的部分化学成分经加工处理后有很大的变化，22 种结合型蟾蜍二烯酸内酯大量减少，12 种游离型蟾蜍二烯酸内酯含量也随之明显改变，猜测可能是在加工处理过程中蟾蜍二烯酸内酯部分结合型转化成了游离型。

关键词：蟾酥；LC-MS；蟾毒配基

药物透皮吸收系数试验测定及其应用

孙晓迪¹, 张伟², 宋静², 刘建芳*

(白求恩国际和平医院*, 山西医科大学¹, 河北医科大学²)

摘要: 目的 研究多种药物对离体小鼠腹部皮肤渗透系数 K_p , 探究药物的理化性质、分子结构对透皮行为的影响。经对药物的 $M_r, m_p, \lg K, \lg K_p$ 与微乳毛细管电泳 (MEEKC) 系统下的保留因子 k 进行多元线性拟合, 预测 $\lg K$ 与 $\lg K_p$ 间的相关性。
方法 取 20g 左右昆明小鼠, 用 1% 戊巴比妥钠溶液将小鼠麻醉, 取 8% Na_2S 溶液均匀涂抹到小鼠腹部, 待到鼠毛变黄, 轻轻刮除, 并用清水洗净小鼠腹部, 自然恢复两天, 使角质层自我恢复。两天后, 小鼠脱颈处死, 迅速剥离腹部皮肤, 刮除皮下组织及结缔组织, 并用生理盐水冲洗至无血色, 置于 -20°C 下冷冻保存, 七天内用完。使用前注意检查鼠皮完整性, 确保皮肤没有任何损伤。本实验采用 Franz 扩散池作为体外透皮试验模型。将皮肤平整置于接受池上, 真皮层面向接受池, 角质层面向供给池, 样品加入到供给池中, 接受液为 $\text{PH}=7.4$ PBS 溶液, 使用前超声脱气。用保鲜膜将供给池表面密封, 防止实验过程中样品水分流失, 恒温 37°C 。接收池内搅拌子转速为 300rpm, 分别在 2,4,6,8,10h 内取点, 用 HPLC 测定药物含量, 计算渗透系数。利用本实验数据对 MEEKC 数据的多元线性拟合曲线进行外部验证。
结果 本实验已测定苯海拉明的透皮吸收系数, 供给池药物浓度对实验结果影响较大, 通过多次测定, 最终确定 K_p 为 0.04364。
结论 药物渗透系数在不同药物浓度下测得的数据不同, 而且实验中个体差异性较大, 需扩大样本量, 注意实验平行原则。该实验的模型提出, 旨在建立微乳电动色谱系统预测药物皮肤渗透系数, 通过该模型, 可在药物设计初期进行药物大批量筛选, 指导分子结构改造获得更好地油水分配系数, 也可为药物剂型的改变提供参考。该理论的提出, 有利于 MEEKC 的进一步发展, 其实用性大大加强。MEEKC 可用于药物油水分配系数的测定; 生物样品中目标成分的测定; 环境污染与食品安全的分析; 手性化合物的分离。
关键词: 透皮吸收系数; MEEKC

HPLC-MS/MS 分析葛根芩连汤发酵前后化学成分的变化

杜晨晖¹, 闫艳², 苗艳琴¹, 冯红霞¹, 宋强^{1*}

(1.山西中医学院中药学院, 2.山西大学中医药现代研究中心)

摘要：目的 建立一种 HPLC-MS/MS 分析方法鉴定中药复方葛根芩连汤的化学成分，并鉴定该复方经两种酵母菌发酵后化学成分，比较变化情况。方法 采用 HPLC-MS/MS 分析方法，以 Agela venusil MP-C₁₈ 柱为色谱柱，乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱；流速 1.0 mL min⁻¹；检测波长：250 nm，300nm，276nm；柱温 35 °C；质谱条件：ESI 源，PDA 检测器与 MS 检测器的分流比为 2:1；采用氮气作为去溶剂气（去溶剂温度 400 °C，毛细管电压 3.0 kV，锥孔电压 50 V），氦气作为碰撞裂解气（碰撞能量 30V），正、负离子两种模式同时进行扫描，数据采集范围为 *m/z* 50~1000。结果 在上述分析条件下，表征了葛根芩连汤发酵前后的化学成分，从葛根芩连汤中共鉴定出 27 个化合物，其中包括 18 个黄酮类化合物，8 个生物碱类化合物和 1 个皂苷类化合物；经过 SJZ 和 HJ 两种菌发酵后，96h 样品中共鉴定出 25 个化合物，大豆苷与甘草苷的质谱峰消失。大豆苷和甘草苷峰面积在不同发酵时间呈动态减少趋势，而大豆苷元和甘草素峰面积呈增加趋势。表明 SJZ 和 HJ 两种酵母菌可以催化黄酮类化合物发生糖基水解反应，大豆苷和甘草苷分别被转化成为大豆苷元和甘草素。生物碱类和皂苷类成分未发生相应的糖基水解反应。结论 该 HPLC-MS/MS 分析方法简便、快速、准确可靠，可作为分析葛根芩连汤发酵前后化学成分变化的有效手段。本研究中酵母菌可以催化葛根芩连汤中黄酮苷类成分发生糖基水解反应，其过程与黄酮类成分在人体肠道内发生的反应有相似之处，因此酵母菌在一定程度上可以作为研究中药复方有效成分在体外代谢过程的实验模型。微生物发酵方法简便易行、专属性强，为中药复方研究提供了新的方法与思路，为中药复方药效物质基础研究注入了新的元素。

关键词：葛根芩连汤；酵母菌；HPLC-MS/MS；化学成分；糖基水解反应

贝伐单抗仿制药电荷异构体的分离表征、体外活性和大鼠体内药代动力学评价

王宁¹ 赵燕燕^{1,2} 刘万卉^{1,2}

(1.烟台大学药学院；2.山东绿叶制药有限公司)

摘要：本文主要研究贝伐单抗仿制药的电荷分布的差别是否会影响其体外活性和体内药代动力学。贝伐单抗仿制药的电荷异构体使用强阳离子交换柱 Sepharose high performance (SP-HP) 层析柱得到酸性变体，然后使用 MonoS 层析柱通过梯度洗

脱获得碱性变体和主体蛋白。使用弱阳离子交换色谱 (CEX-HPLC)、分子尺寸排阻色谱 (SEC-HPLC)、成像毛细管等电点聚焦电泳 (iCIEF) 以及 Biacore X100 分别测定纯度、单体含量、等电点和动力学常数。然后将分离得到的电荷异构体、贝伐单抗仿制药与原研药贝伐单抗体外活性和体内药代动力学进行比较。体内活性使用人脐静脉血管内皮细胞进行研究, 体内药代采用雄性大鼠进行评价。弱阳离子交换色谱结果表明酸性变体、碱性变体、主体蛋白的纯度均大于 90%, 分别为 95%、90% 和 92%; SEC-HPLC 分析结果酸性变体的单体比例最高达到 99.9%, 碱性变体的单体比例最低为 98.2%, 主体蛋白、贝伐单抗仿制药的单体比例稍高于原研药贝伐单抗, 三者的单体比例介于酸性变体和碱性变体之间; 酸性变体、碱性变体以及主体蛋白的等电点主要色谱峰区域分别为 7.9-8.0、8.3-8.6 和 8.2-8.3, 贝伐单抗仿制药的等电点结果与原研药贝伐单抗结果是一致的 (7.8-8.4); 体外活性结果, 以原研药贝伐单抗作为参照, 酸性变体、碱性变体、主体蛋白以及仿制药体外相对活性分别为 97%、100%、103% 和 100%, 结果表明以上研究对象之间无统计学差异。酸性变体、碱性变体、主体蛋白以及贝伐单抗仿制药与原研药贝伐单抗的体内药代动力学结果无统计学差异。

关键词: 贝伐单抗; 生物仿制药; 电荷异构体; 体外活性; 体内药代动力学

作者简介: 王宁, 女, 硕士在读 E-mail: 294316576@qq.com

通讯作者: 刘万卉, 男, 教授 E-mail: wanhui@luye.cn

LC-MS 法分析盐酸西那卡塞有关物质

胡钟芳, 曾雪芳, 宋敏, 杭太俊*

(中国药科大学药物分析教研室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京)

摘要: **目的** 盐酸西那卡塞为结构中含有烷基苯胺骨架的新型化合物, 可作用于 G-蛋白共轭型受体的钙受体, 临床上主要用于治疗维持性透析患者的继发性甲状旁腺功能亢进。目前国内外标准均未收载该品种的检验方法, 且少有对其有关物质研究方法的报道。本研究应用 LC-MS 法对盐酸西那卡塞原料药和片剂中原有以及强制破坏试验中降解产生的有关物质进行分离和鉴定, 为该药的质量控制提供技术支持。**方法** 采用 Thermo BDS HYPERSIL C18 (100×4.60mm, 2.4 μ m) 色谱柱, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.5ml/min, 检测波长 260nm, 进样量 20 μ l, 以 0.1% 乙酸铵水溶液: 乙睛 (93: 7) (pH 约

6.5)为 A 相, 乙腈为 B 相, 0min(25%B)-30min(80%B)-35min(80%B)-36min(25%B)-43min(25%B)进行梯度洗脱。在此色谱条件下, 对各成分进行电喷雾正离子化高分辨 TOF/MS 分析, 提取其中具有质谱响应或质谱响应灵敏度足够杂质的精密质量, 再由 LC-MS/MS 获取杂质成分的碎片离子信息。结合已知杂质的精密质量和碎片离子等信息, 对各杂质可能的结构进行推测。**结果** 在所建立的 LC-MS 条件下, 盐酸西那卡塞及其各类杂质得到有效的分离。各供试品溶液中共检测到 10 个有关物质, 其中 2 个为起始原料杂质, 5 个为合成副产物, 在图 1 中按保留时间顺次编号为 1~7; 3 个为降解产物, 在图 2 中按保留时间顺次编号为 8~10。各有关物质结构鉴定结果见表 1。**结论** 本研究根据 HPLC 杂质对照品法和 LC-TOF/MS 获得准确质量以及分子式, 二级质谱裂解特征获得结构信息, 结合合成路线, 推测各有关物质结构, 为盐酸西那卡塞的质量控制和稳定性研究提供了科学依据。

关键词: LC-MS 法; 西那卡塞; 有关物质

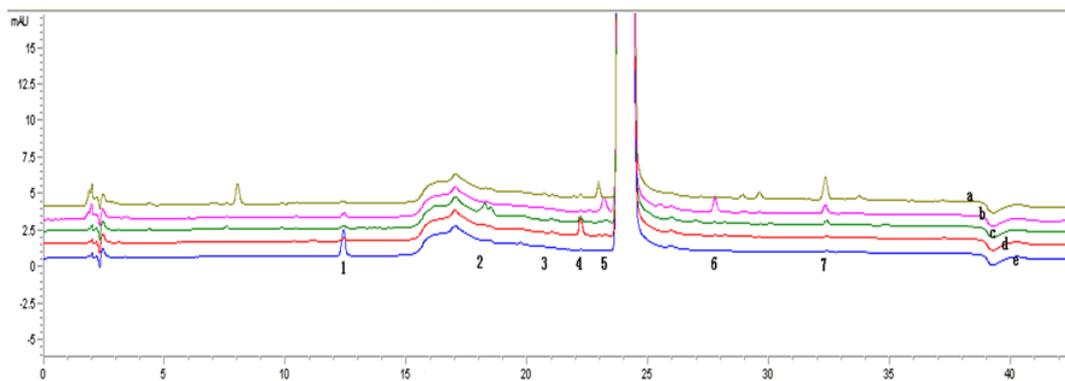


图 1 盐酸西那卡塞各批供试品高效液相色谱图 (a:片剂 TXN140601;b:原料药 AXN140501;c:原料药 AXN140502;d:原料药 001;e:原料药 002)

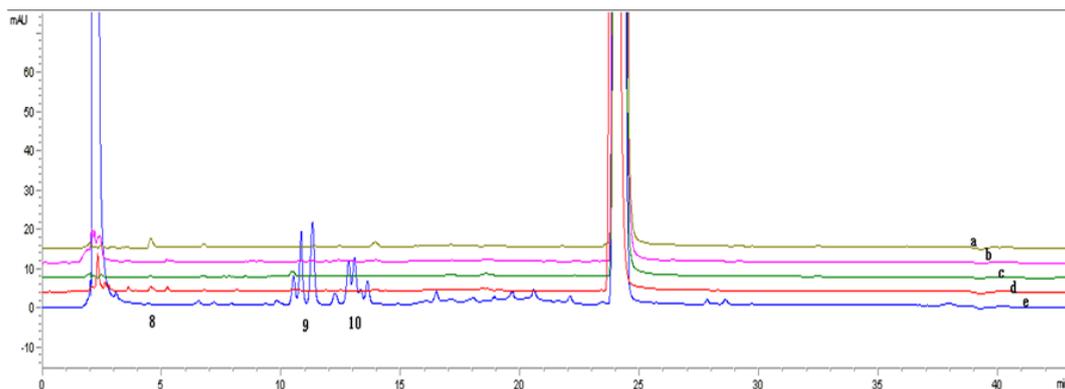


图 2 盐酸西那卡塞强制降解样品的高效液相色谱图 (a:热破坏;b: 酸破坏;c:碱破坏;d:光破坏;e:氧化破坏)

高效液相色谱法测定依普利酮原料药有关物质的方法学研究

陈静^{1,2}, 潘春燕^{1,2}, 宋敏^{1,2}, 杭太俊^{1,2*}

(中国药科大学药物分析教研室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京)

目的 依普利酮的化学结构为 9, 11-环氧-17-羟基-3-氧代- γ -内酯-4-孕烯-7, 21-二羧酸甲酯, 是第一个获准上市的选择性醛固酮受体阻断剂, 对盐皮质激素受体具有高度选择性, 对雄激素和孕酮受体作用较小, 有效降低血压, 且不良反应较少药物中含有杂质会降低疗效和影响稳定性, 有的甚至对人体健康有害或产生其他不良反应。本研究建立了适用于依普利酮(eplerenone)原料药有关物质检查的高效液相色谱分析法。

方法 本试验比较了三种色谱条件:(1)以 10mM 乙酸铵溶液-甲醇-乙腈(70:15:15)为 A 相, 10mM 乙酸铵溶液-甲醇-乙腈(20:40:40)为 B 相, 梯度洗脱[时间 t:0~8min,B :0→0%(体积分数, 下同; t:8~45min,B :0→100%; t:45~53min,B :100→100%; t:53~55min,B :100→0%; t:55~65min,B :0→0%]; (2) 10mM 乙酸铵溶液-甲醇-乙腈(90:7:3)为 A 相, 甲醇-乙腈(7:3)为 B 相, 梯度洗脱[时间 t:0~3min,B :25→25%; t:3~50min,B :25→85%; t:50~58min,B :85→85%; t:58~60min,B :85→25%; t:60~65min,B :25→25%]; (3) 10mM 乙酸铵溶液(冰乙酸调节 pH 至 4.5)为 A 相, 甲醇-乙腈(1:9)为 B 相, 梯度洗脱[时间 t:0~15min,B :28→28%; t:15~40min,B :28→70%; t:40~42min,B :70→70%; t:42~45min,B :70→28%]。试验采用添加杂质对照品的依普利酮溶液在以上色谱条件下实现分离, 比较了各个色谱峰的分度、保留时间、柱效、峰形等色谱参数, 并且考察了在不同型号色谱柱上的耐用性, 最终选择色谱条件 3 作为最终的有关物质分析方法。色谱柱: Phecda C18 (150mm×4.6mm, 5 μ m); 检测波长: 241nm; 流速: 1mL min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μ l。

结果 本试验对八种杂质进行考察, 其中杂质 G 和 11 α -羟基坎利酮来源于起始原料 SM1, 此外, 还有一系列工艺杂质, 共 6 个(分别为杂质 A、D、F、J、K 和 L), 列为潜在的有关物质进行考察(图 1)。系统适用性溶液色谱图(图 2)表明在本实验建立的色谱条件下, 依普利酮与各杂质峰能够有效分离, 峰形良好。由依普利酮原料药在酸、碱、氧化、高温和光照条件下的色谱峰叠加图(图 3)可见各未知杂质与主峰分离良好, 方法适用于依普利酮原料药有关物质的检出。各有关物质的回收率在 99.03%-102.79%之间, RSD 为 1.79%-7.07% (n = 3)。供试溶液在 4℃贮存条件下 24 小时内稳定(保留时间的 RSD<2.0%, 峰面积的 RSD<5.0%)。在 0.40~24.00 μ g/mL 范围内, 线性关系良好, 相关系数 R> 0.9990。

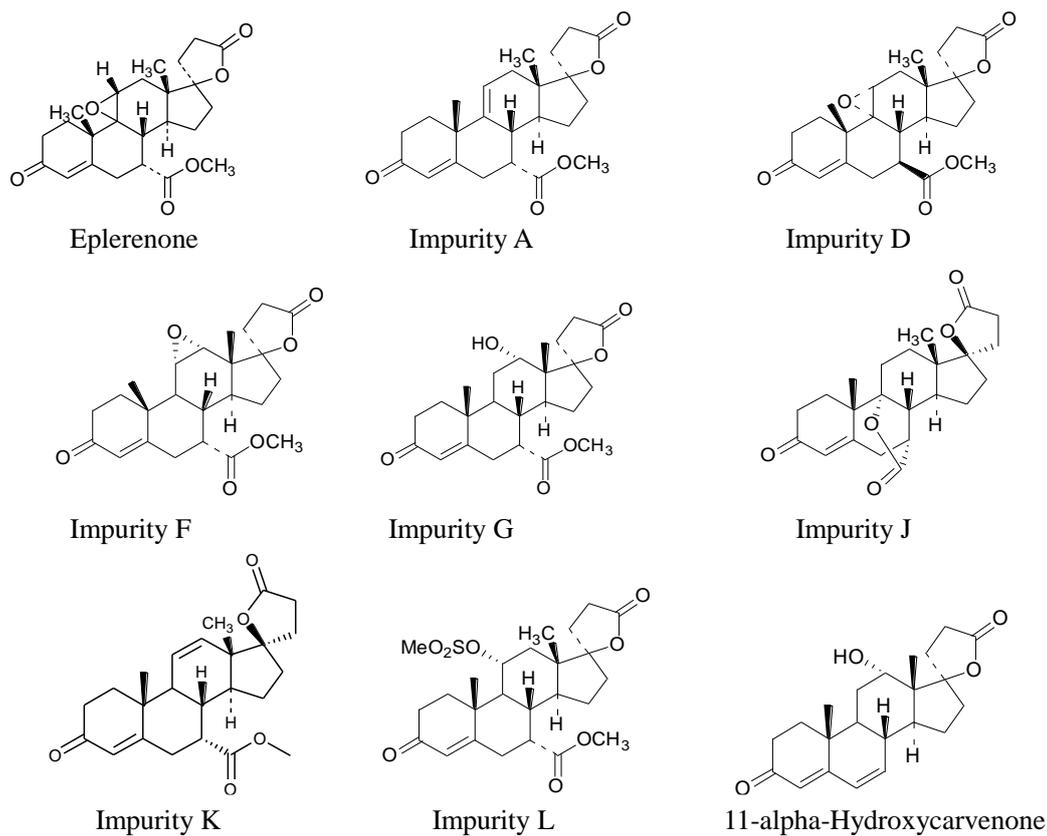


图 1 依普利酮及杂质的结构式

Fig. (1). The chemical structures of eplerenone and its eight impurities A, D, F, G, J, K, L and 11- α -Hydroxycarvenone

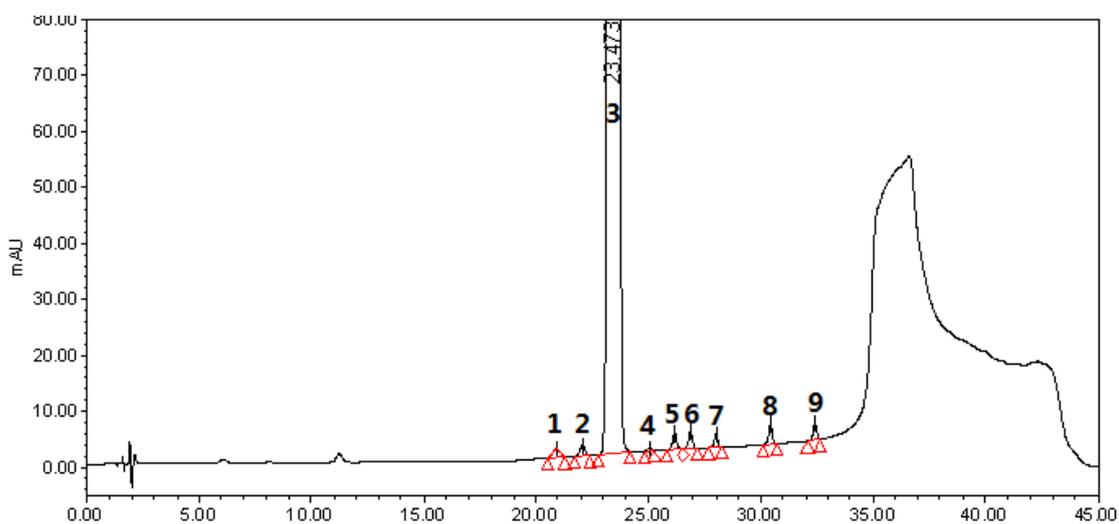


图 2 系统适用性溶液的液相色谱图

Fig. (2). Chromatograms of system suitability of standards: 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity J (peak 1), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity G (peak 2), 800 $\mu\text{g/mL}$ eplerenone (peak 3), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 11- α -Hydroxycarvenone (peak 4), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity F (peak 5), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity D (peak 6), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity L (peak 7), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity A (peak 8), 0.8 $\mu\text{g/mL}$ impurity K (peak 9).

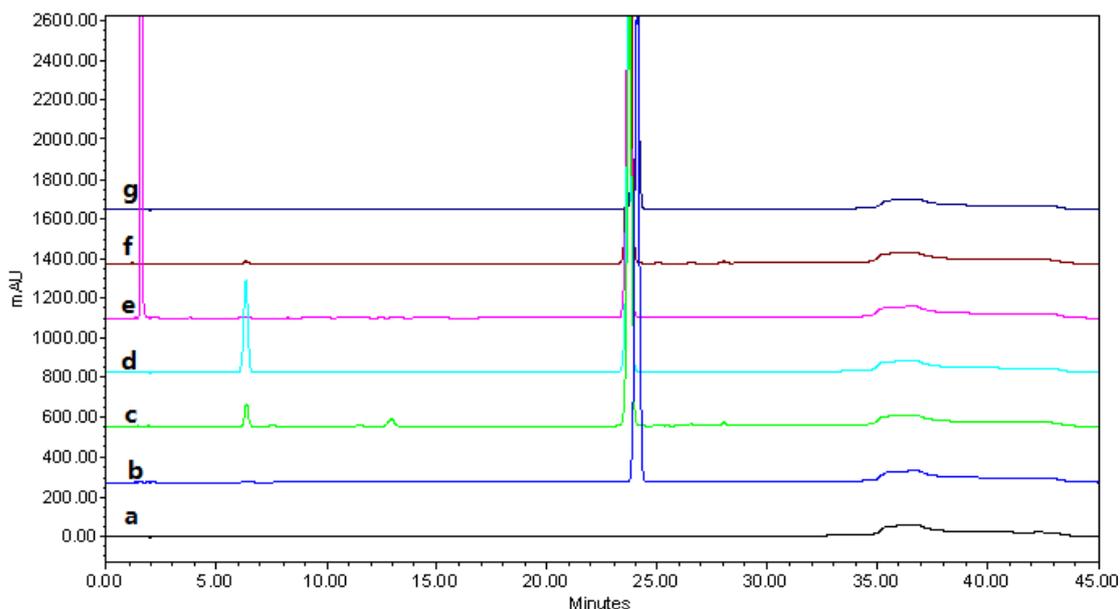


图 3 依普利酮破坏试验的液相色谱图

Fig. (3). HPLC chromatograms of eplerenone stressing test solution: a. 空白溶剂 (blank s-olvent) b. 依普利酮样品溶液 (test solution) c. 依普利酮酸破坏溶液 (acid degradation) d. 依普利酮碱破坏溶液 (alkali degradation solution) e. 依普利酮氧化破坏溶液 (oxidation degradation solution) f. 依普利酮高温破坏溶液 (thermal degradation solution) g. 依普利酮光照破坏溶液 (photo degradation solution)

结论 1、方法简便、灵敏、属性好，可定量分析依普利酮原料药中潜在杂质，可用于依普利酮的质量控制。

2、依普利酮原料药在碱性条件下极不稳定，加 0.1M 氢氧化钠水溶液室温放置 45 秒即在 6min 左右产生了一个较大的杂质峰，经推测该杂质可能是由依普利酮水解得到的依普利酮酸，要进一步确证，需借助 LC-TOF-MS 和 LC-MS-MS 等手段。

3、为了使有关物质定量准确，本试验测定了各杂质在 241nm 波长处的相对校正因子，但由于提供的杂质对照品纯度不够，在计算之前需进行纯度测定和换算。

关键词：依普利酮；高效液相色谱法；有关物质测定

头孢妥仑匹酯有关物质的色谱-质谱结构鉴定

李曼琳，张梦悦，宋敏，杭太俊*

(中国药科大学药物分析教研室，药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京)

目的 头孢妥仑匹酯 (cefditoren pivoxil, 结构式见图 1) 是第四代口服用头孢烯类制剂。头孢妥仑匹酯口服后经肠管内酯酶水解成具有抗菌活性的头孢妥仑而发挥抗菌

力，作用机制为抑制细菌细胞壁合成，具有广谱、高效的抗菌活性，临床主要用于治疗各种感染症如呼吸道感染、皮肤感染、尿路感染等。最新的欧洲药典、英国药典、美国药典和中国药典均未收载该品种。日本药局方收载了该品种，采用高效液相色谱法对头孢妥仑匹酯进行有关物质检查。国内外文献对头孢妥仑匹酯有关物质测定方法及有关物质分析鉴定研究的相关报道较少。本研究建立了头孢妥仑匹酯有关物质的 HPLC-DAD 检查法，并通过 TOF/MS 和 MS/MS 分别测定了主要有关物质的精密质量和二级质谱，经解析推测它们的结构，为其生产工艺和质量控制提供参考依据。

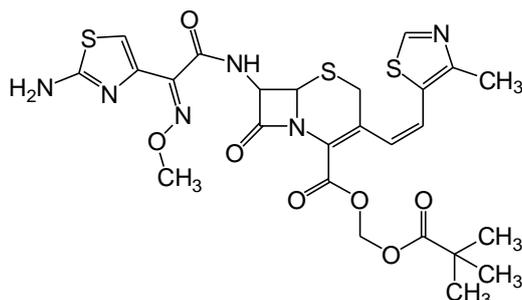


图 1 头孢妥仑匹酯的化学结构

方法 采用 YMC-Pack ODS-AM (150×4.6mmI.D., S-5 μ m, 12nm) 色谱柱，流速 1 mL min⁻¹，柱温 25 °C，检测波长为 254 nm，乙腈-甲醇(50:50)为流动相 A，0.1% 乙酸铵缓冲溶液 (取乙酸铵 1.0 g，加水 900 mL 溶解后，用甲酸调节至 pH 3.0，加水稀释至 1L) 为流动相 B，线性梯度洗脱程序如下：0 min (25% A-75% B) → 5 min (30% A-70% B) → 15 min (50% A-50% B) → 35min (50% A-50% B) → 50 min (85% A-15% B) → 55 min (85% A-15% B) → 60 min (25% A-75% B) → 70 min (25% A-75% B)，对头孢妥仑匹酯关物质进行分离；采用电喷雾正离子化-飞行时间质谱法 (ESI-TOF/MS) 测定各有关物质离子的精密质量和元素组成，三重四极质谱 (ESI-MS/MS) 测定子离子特征，并进行结构解析。根据对照品比对、质谱裂解分析，结合合成工艺与强制降解实验，检测并鉴定了头孢妥仑匹酯原料药中的 10 个主要有关物质。

结果 对原料药供试品溶液分别进行 HPLC-DAD，TOF/MS 和 MS/MS 检测。获得头孢妥仑匹酯有关物质检查的 DAD 图和全扫描总离子流质谱图 (见图 2)，根据 HPLC-DAD 测得各有关物质保留时间从小到大顺次编号，依次编号为杂质 A、杂质 B、……、杂质 J。

根据所测得各有关物质的 DAD 谱、TOF 母离子组成及其二级质谱碎片离子，通过与头孢妥仑匹酯二级质谱碎片的比对分析和解析，从而推测相应结构见表 1，并总结各有关物质 MS/MS 谱的裂解规律和可能来源。

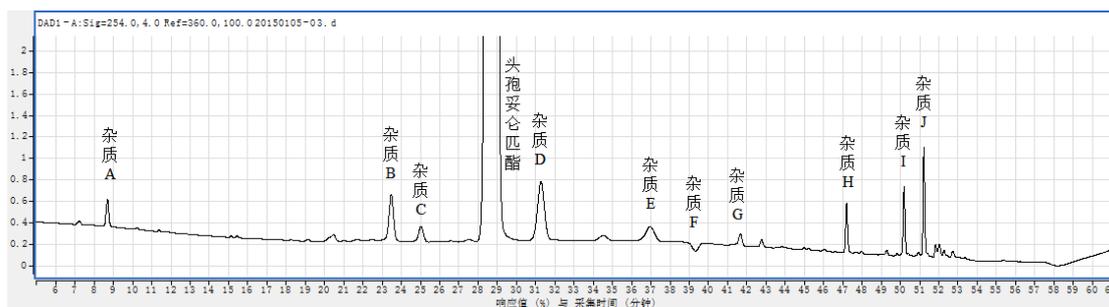


图 2-a 头孢妥仑匹酯有关物质检查的 DAD 色谱图

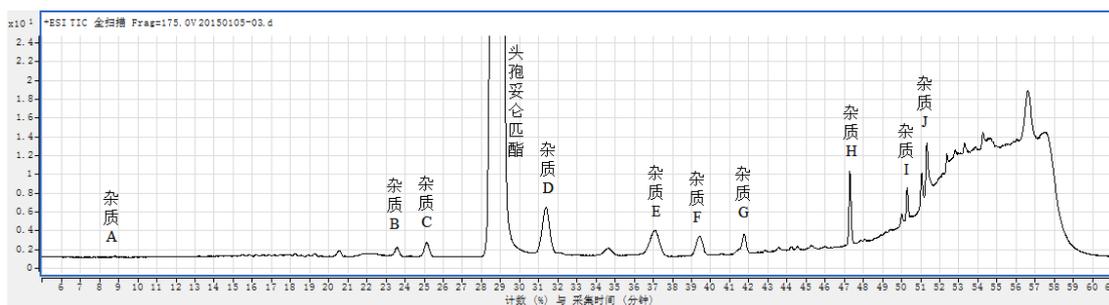


图 2-b 头孢妥仑匹酯有关物质检查的 LC-ESI-MS 正离子扫描总离子流色谱图

结论 本研究建立了适合 LC-MS 分析的挥发性流动相条件，该条件下，头孢妥仑匹酯及其有关物质能有效分离。本研究检出并鉴定了头孢妥仑匹酯原料中的 10 个主要有关物质（8 个合成副产物、2 个降解产物），为头孢妥仑匹酯生产工艺控制和质量研究提供了参考依据。

关键词：头孢妥仑匹酯；有关物质；结构鉴定；LC-TOF/MS；LC-MS/MS

衍生化方法测定 L-鸟氨酸盐酸盐中有关物质研究

张梦悦，宋晓妮，殷潇雅，宋敏，杭太俊*

(中国药科大学药物分析教研室，药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京)

目的 L-鸟氨酸是一种重要的非蛋白质组成氨基酸，以游离形式存在于组织和细胞中，具有重要的生理活性和功能，有较强的研究开发价值。L-鸟氨酸盐酸盐兼具营养和治疗功能，在医疗保健领域有广泛应用。由于，L-鸟氨酸盐酸盐的结构简单，不含有苯环等发色基团，故非衍生化方法 HPLC-UV 或氨基酸自动分析仪测定 L-鸟氨酸盐酸盐时灵敏度低，不适用与有关物质检查。L-鸟氨酸盐酸盐的合成工艺较为简单，可能存在的有关物质均与氨基有关。9- 芴甲氧羰酰氯(FMOC)是一种反应条件温和的衍生化试剂，可以与伯胺及仲胺反应，反应快速，反应产物稳定，丹酰氯丹磺酰氯也可

同时衍生化伯胺和仲胺，但是衍生化反应速度慢，衍生化产物对紫外光比较敏感，反应要在避光条件下进行，故分别建立应用 9-芴甲氧羰酰氯和丹酰氯将 L-鸟氨酸盐酸盐柱前衍生化后进行有关物质定量分析的高效液相色谱法。

方法 采用 HPLC 法，流动相 A 为 0.1mol/L 的醋酸铵缓冲盐（用冰醋酸调节 pH=5.0）-乙腈（90:10），流动相 B 为乙腈；流速：1.0ml/min；柱温：35℃；9-芴甲氧羰酰氯衍生化法的检测波长为 265nm，色谱柱为 Agilent C₁₈ (250mm*4.6mm, 5 μm)，线性梯度程序洗脱[0min(81%A-19%B)→5min(81%A-19%B)→18min

(61%A-39%B)→26min(61%A-39%B)→50min(17%A-83%B)→55min(17%A-83%B)→56min(81%A-19%B)→60min(81%A-19%B)]；丹酰氯衍生化法的检测波长为

254nm, 色谱柱为 Inertsil C₁₈ 柱(250mm*4.6mm, 5 μm)，线性梯度程序洗脱[0min(91%A-9%B)→4min(91%A-9%B)→30min(56%A-44%B)→40min(28%A-

72%B)→45min(28%A-72%B)→46min(91%A-9%B)→52min(91%A-9%B)]。9-芴甲氧羰酰氯衍生化过程：先后加入 200 μl 样品溶液、600 μl 硼砂缓冲盐溶液、600 μl 9-芴甲氧羰酰氯乙腈溶液，涡旋 2min 后，静置 30min，加入 600 μl 正己烷，涡旋 1min，弃去上层正己烷层，重复操作一次，加入 15 μl 4M 盐酸溶液，涡旋 1min 即得；丹酰氯衍生化过程：先后加入 200 μl 样品溶液、1ml 碳酸钠溶液、200 μl 丹酰氯丙酮溶液，涡旋 2min，静置 30min，加入 10 μl 4M 盐酸溶液，涡旋 1min，离心 10min 即得。

结果 9-芴甲氧羰酰氯衍生化法加入的 12 种其它氨基酸和丹酰氯衍生化法加入的 9 种其它氨基酸均与 L-鸟氨酸盐酸盐的衍生化峰有很好的分离（见图 1、2）；线性范围均在 0.001mg/ml~0.02mg/ml 呈良好线性，r 均大于 0.9995；检测限均低于 0.5 μg/ml；定量限均低于 2 μg/ml；每个其它氨基酸的供试品浓度为 5 μg/ml；平均加样回收率均在 80%~120%；重复性和中间精密度的其它氨基酸的含量均在 80%~120%；日内与日间的精密度 RSD 均小于 10%。

结论 这两种方法可有效分离鸟氨酸与其它氨基酸，且鸟氨酸的降解产物与鸟氨酸在该法下也能有效分离，灵敏度高，专属性强，可用于 L-鸟氨酸盐酸盐有关物质及降解产物检查。

关键词: L-鸟氨酸盐酸盐；有关物质；高效液相色谱法；衍生化法；9-芴甲氧羰酰氯；丹酰氯

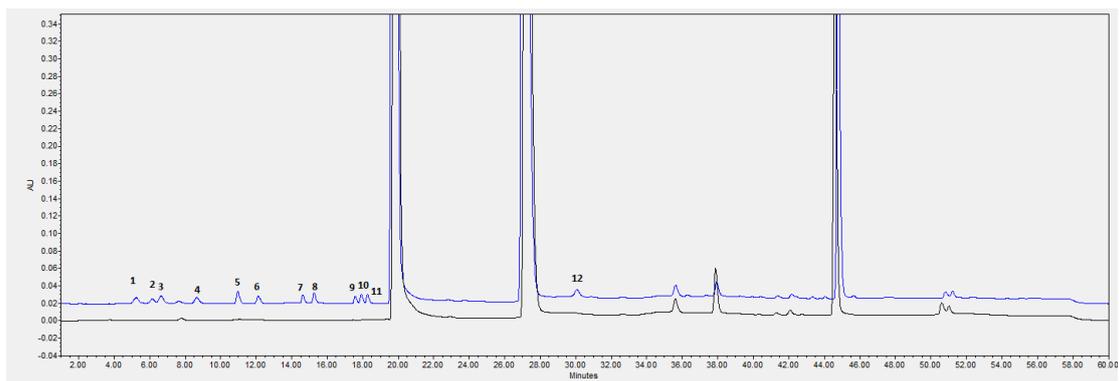


图1 9-苄甲氧羰酰氯衍生化法的 HPLC-UV 色谱图, 1: Asp; 2: Arg; 3: Ser; 4: Thr; 5: Ala; 6: Pro; 7: Met; 8: Val; 9: Try; 10: Ile; 11: Leu; 12: Lys;

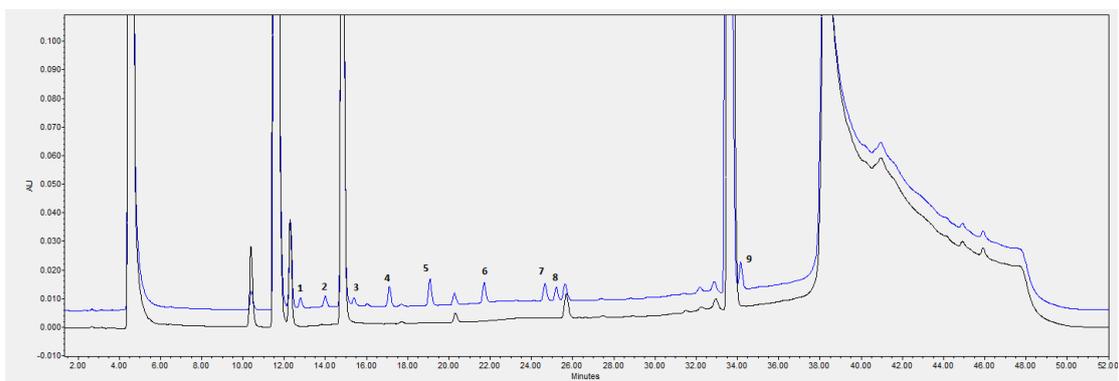


图2 丹酰氯衍生化法的 HPLC-UV 色谱图, 1: Arg; 2: Ser; 3: Thr; 4: Ala; 5: Pro; 6: Val; 7: Leu; 8: Phe; 9: Lys;

糖尿病新药 G004 的含量测定和有关物质研究

洪春艳 乔洲 郭亚辉 周金培 柳文媛* 张惠斌*

(中国药科大学药物分析教研室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京)

摘要: 糖尿病是全世界几大患病率最高的疾病之一, 糖尿病并发症是糖尿病致残或致死的主要原因。磺酰脲类药物是许多国家和国际组织中制定的糖尿病指南中推荐的控制 II 型糖尿病患者高血糖的主要用药。目前降血糖药物虽然有较好的降糖作用, 但对糖尿病的并发症作用很小。新型磺酰脲类化合物 G004 是运用拼合原理, 以具有降糖活性的磺酰脲结构为母核连接抗血小板聚集活性的化学基团设计而成。已有文献报道, G004 其作用具有明显的第三代磺酰脲类药物特点, 但机制并不完全相同。G004 能显著促进胰岛素抵抗细胞模型 HepG2 细胞耗糖, 增加糖原合成, 促进糖代谢。此外, G004 还具有抗实验性血栓和保护血管内皮细胞的作用, 对糖尿病动脉粥样硬化和肾脏并发症都可能有的治疗作用。G004 作为应用于 II 型糖尿病将会是一个很有

希望的候选药物。作为一类新药，有必要对其原料药的质量进行较为全面的研究，为临床试验的安全有效提供保障。本文建立了测定 G004 原料药含量和有关物质的高效液相色谱法。有关物质测定中共检出 2 个有关物质（Imp-2 和 Imp-3）和 1 个降解产物（Imp-1）。分别采用 LC-MS/MS 法、杂质对照品峰位对比法鉴定了主要有关物质，并进一步通过杂质合成法、制备液相色谱分离与核磁共振法对其进行结构确证。在此基础上对各个有关物质进行定量测定。含量测定和有关物质测定均采用 C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）柱，以 0.025 mol/L 醋酸铵-甲醇（35:65）为流动相系统，检测波长为 233 nm，柱温 30℃，流速为 1 ml/min 的等度洗脱。用加校正因子的主成分自身稀释对照法对杂质进行了定量测定。通过方法学的考察，并对三批中试样品的含量和有关物质进行测定，建立了本品含量测定和有关物质的检查的方法与限度。

关键词：G004；制备液相；含量测定；有关物质。

液质联用技术鉴定阿哌沙班有关物质

吕广云^{1,2}，杭太俊^{1,2}，宋敏^{1,2*}

（1. 中国药科大学药物分析教研室，江苏 南京 210009；2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京 210009）

目的 阿哌沙班（1-(4-甲氧苯基)-7-氧基-6-[4-(2-哌啶酮-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡啶[3,4-c]吡啶-3-甲酰胺，图 1），是一种口服的选择性活化 Xa 因子抑制剂，由辉瑞与百时美施贵宝联合开发，能预防血栓，但出血的不良反应低于老药华法林，用于接受过髋部或膝部置换手术患者的血栓预防[1, 2]。美国药典、欧洲药典、英国药典等均未收载该品种，国外文献也未对阿哌沙班的有关物质检查进行报道。国内文献[3, 4]报道均采用高效液相色谱法研究阿哌沙班的有关物质，但未见阿哌沙班有关物质的系统鉴定研究报道。本文旨在建立适用于阿哌沙班及其制剂中有关物质检查的高效液相色谱-质谱联用分析方法，对阿哌沙班中有关物质进行结构鉴定，为其生产工艺控制和质量保障提供参考依据。

方法 采用 HITACHI C18 柱（4.6mm×150mm，5μm），30mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈（90:10）为流动相 A，乙腈为流动相 B，线性梯度洗脱（A:B）：0 min(90:10)→5 min(90:10)→25 min(45:55)→35 min(20:80)→35.1 min(90:10)→41 min(90:10)，流速 1 mL/min，检测波长为 280 nm，进样量 20 μL，对阿哌沙班及其强制降解产生的有关物质进行分离；电喷雾正离子化高分辨 TOF/MS 检测、并结合 MS/MS 和对照品对照

鉴定各有关物质的结构。

结果 建立了阿哌沙班有关物质检查的挥发性流动相 HPLC 分析法,并适用于有关物质的联用质谱鉴定。该色谱条件下阿哌沙班原料药、制剂以及强制降解实验供试溶液中的各有关物质均分离良好(图2)。

结论 结合阿哌沙班的合成工艺、强制降解试验以及有关物质对照品比对,研究鉴定出了阿哌沙班的 18 个有关物质。根据鉴定结果,阿哌沙班的有关物质可分为三类:合成起始原料或由起始原料引入的有关物质(有关物质 17 和 18)、合成副产物(有关物质 8 和 12-16)和降解产物(有关物质 1-3、4-6、7 和 9-11)。

关键词: 阿哌沙班; 有关物质; 降解产物; 色谱-质谱联用

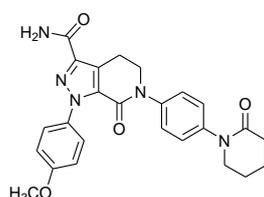


Figure 1 Chemical structure of apixaban

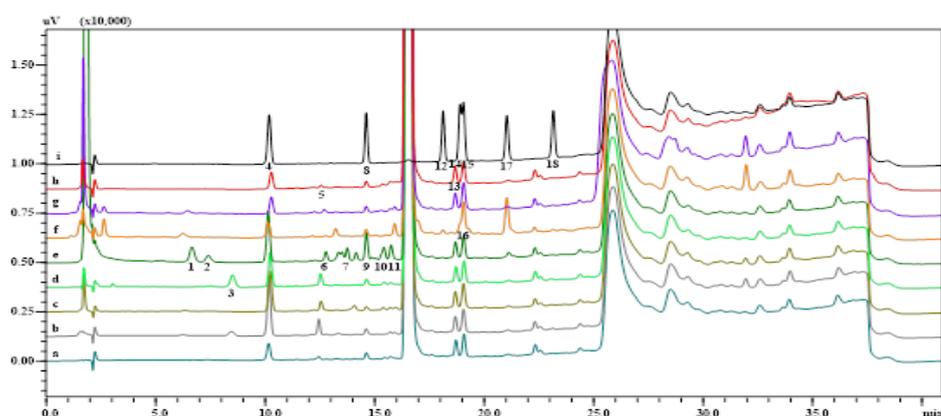


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of apixaban test and its stress solutions a. Photolysis; b. Thermal; c. Acid; d. Alkaline; e. Oxidation; f. Apixaban tablet (3C83767); g. Apixaban tablet (TAP140815); h. Apixaban API (active pharmaceutical ingredient); i. Mixture of reference

中药注射液中 5-羟甲基糠醛二聚体的 LC-MS/MS 定量分析 方法及其在市售药品中的筛查

高杨, 黄罗娇, 臧清策, 林生, 靳洪涛, 贺玖明, 张瑞萍, 再帕尔·阿不力孜*

(中国医学科学院/北京协和医学院 药物研究所,

天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

中药注射液中广泛存在有害物质5-羟甲基糠醛^[1]，5-羟甲基糠醛在一定条件下可生成二聚体。为了探究中药注射液中是否存在二聚体及了解其含量情况，本研究针对中药注射液中可能存在的5-羟甲基糠醛二聚体，建立灵敏、快速的含量测定方法，并对市售相关药品进行筛查，为中药注射液的质量控制提供参考依据。

采用液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）分析技术，以多反应监测（MRM）模式进行5-羟甲基糠醛二聚体的定量分析。在正离子检测模式下，选择 m/z 235.1作为母离子进行MS/MS谱分析，选取相对强度最高的子离子 m/z 109.0作为监测离子对，建立定量分析方法，考察方法的可靠性。峰面积Y与浓度X在0.3-30 ng/mL内线性良好（ $r = 0.9998$ ），检测限为0.1 ng/mL。精密度试验低、中、高浓度三份QC样品的日内RSD（ $n = 5$ ）分别为1.4%、1.8%、1.5%，日间RSD（ $n = 5$ ）分别为9.5%、1.7%、1.7%，表明仪器精密度良好。低、中、高浓度QC样品24 h内短期稳定性的RSD($n=6$)分别为5.9%、2.8%、3.4%，15 d内长期稳定性的RSD($n=6$)分别为12.3%、1.92%、0.95%。回收率试验平均加样回收率为99.8%，RSD($n = 9$)为5.8%。重复性试验RSD（ $n = 6$ ）为1.6%。方法学验证结果表明方法准确可靠。

采用上述方法对59批市售的20种中药注射液和葡萄糖注射液中5-羟甲基糠醛二聚体进行定量分析和筛查。在其中8批中检出5-羟甲基糠醛二聚体，最低含量为 0.121 ng mL^{-1} ，最高含量为 127 ng mL^{-1} ，其他未检出。结果表明，不同中药注射液中5-羟甲基糠醛二聚体含量存在明显差异。分析其可能原因是使用不同原材料、不同生产工艺、不同存储条件等所致。同时，也说明市售中药注射液中存在5-羟甲基糠醛二聚体，且含量较高，因而需要切实关注和评估5-羟甲基糠醛二聚体的毒性，从而提高中药注射液的质控标准与用药安全。

关键词 LC-MS/MS；5-羟甲基糠醛二聚体；中药注射液；多反应监测

Comparison of three kinds of Citri Reticulate Pericarpium based on DNA barcoding and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with chemometrics analysis

Xiao-Xue Yu^{1,2}, Rong-Wei Yan^{1,2}, Wan-Lin Zhong^{1,2}, Dong-Mei Wang^{1,2},
Lin Jiang^{1,2}, Xinjun Xu^{1,2*}

(¹School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, People's Republic of China. ²Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, People's Republic of China.)

Abstract: Citri Reticulate Pericarpium is the dried mature pericarp of *Citrus reticulata* Blanco. Citri Reticulate Pericarpium can be divided into ‘Chenpi’ and ‘Guangchenpi’. ‘Guangchenpi’, which is the genuine Chinese medicinal material of Xinhui, Guangdong province, is the best, fewest and most expensive one compared with other. This study aims to develop an efficient and accurate method to separate *Citrus reticulata* ‘Chachi’ from other Citri Reticulate Pericarpium. The Chinese Pharmacopoeia 2010 used hesperidin as the chemical marker to identify Citri Reticulate Pericarpium. However, both ‘Guangchenpi’ and ‘Chenpi’ contained hesperidin so that they cannot be differentiated. Therefore, it is important to develop an efficient and accurate method to separate *Citrus reticulata* ‘Chachi’ from other Citri Reticulate Pericarpium. In this study, DNA barcoding and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with chemometrics analysis were applied to comparing three kinds of Citri Reticulate Pericarpium. The 22 samples were classified into 3 groups by chemometrics analysis. The results of DNA barcoding were in accordance with principal components analysis and hierarchical clustering analysis. 8 compounds were identified by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. This combined method is a reliable and effective tool for the differentiation of the three Citri Reticulate Pericarpium.

Keywords: DNA barcoding; Citri Reticulate Pericarpium; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; chemometrics analysis

***Correspondence:** xxj2702@sina.com

药物活性分析

雷公藤相杀、相偎配伍后雷公藤内酯甲的研究

许坡¹, 孟楣^{1, 2*}, 张静¹, 江莹¹, 唐利宇¹

(安徽中医药大学)

摘要: **目的** 研究雷公藤配伍黄芪前后雷公藤内酯甲的成分变化, 探讨其可能的理论机制。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱: welch material Inc C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水溶液 (85 : 15); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C。**结果** 雷公藤内酯甲与其他组分分离良好, 进样量在 0.4—2.4 μg 范围内线性 ($r=0.9999, n=6$), 平均加样回收率为 97.20%, 相对标准差 (RSD) 为 0.76。**结论** 雷公藤与黄芪配伍后雷公藤内酯甲的含量降低、毒性减轻, 其可能降低毒性的理论机制为相杀、相偎。依据

关键词: 相杀、相偎; 雷公藤内酯甲; 黄芪; 雷公藤

To study Wilforlide A before and after compatibility according to “conteract the toxicity of another drug”

XU Po, MENG Mei^{1, 2}, ZHANG Jing¹, JIANG Ying¹, TANG Li-Yu

Abstract: Objective To discuss the synergistic mechanism of compatibility of Tripterygium Wilfordii and Astragalus, and to determine Wilforlide A before and after compatibility.

Method Welch material Inc C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was methanol (A) and water (B). The flow rate was 1 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm. The column temperature was 30°C. **Results** The calibration curve was linear ($r=0.9999, n=6$) in range of 0.4-2.4 ug of Wilforlide A. The recoveries were 97.20% with RSDs of

0.76. **Conclusion** The content of Wilforlide A was decreased before and after compatibility and toxicity can be reduced. The synergistic mechanism of the compatibility of Tripterygium Wilfordii and Astragalus is “conteract the toxicity of another drug” in posse.

Keyword: conteract the toxicity of another drug; Wilforlide A; Astragalus; Tripterygium Wilfordii

作者简介: 许坡 (1989-), 男, 硕士在读, 研究方向为中药新药研究与开发. Tel:15255107034, E-mail:www.xupo@qq.com.

***通讯作者:** 孟楣 (1962-), 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 从事中药新药研发工作. Tel:0551-2838558, E-mail:ahzyymm@163.com.

基于微透析技术及 LC-MS/MS 测定 AA 大鼠关节腔透析液中 梔子苷的浓度

王伟, 吴虹*, 孙亮亮, 李淑萍, 汪蓉, 王文宇, 张峥嵘, 戴丽

(安徽中医药大学药学院, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥, 230012)

目的:利用微透析技术为采样平台, 以梔子苷为工具药, 建立超高效液相色谱-电喷雾离子源-质谱串联法 (Ultra-high performance liquid chromatography-Electrospray ionization-MS/MS, UHPLC-ESI-MS/MS), 检测佐剂性关节炎 (Adjuvant arthritis, AA) 大鼠膝关节腔透析液中梔子苷的浓度。

方法:将微透析探针植入炎症模型大鼠关节腔中, 口服灌胃给药后采集透析液, 采用 UHPLC-ESI-MS/MS 方法测定关节透析液中梔子苷的浓度, 考察关节腔中梔子苷的浓度随时间变化情况。

结果:建立了 LC-MS 法测定 AA 大鼠关节微透析液中梔子苷含量的方法, 以梔子苷与芍药苷 (内标) 浓度的比值 (X) 为横坐标, 各浓度峰面积与内标峰面积比率 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 经计算得梔子苷回归方程为 $Y = 0.00246 X + 1.83896e^{-4}$ ($R = 0.99945$), 表明梔子苷的浓度在 5-4000 ng/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系; 方法专属性良好; 低、中、高三个浓度(5、250、4000 ng/ml)的精密度 RSD(%)分别为 6.53%、7.87%、3.77%, 表明仪器的精密度良好; 梔子苷及内标室温下 8h 内稳定性良好, RSD(%)分别为 9.07%、3.49%、3.14%、5.45%; 低、中、高三个浓度及内标的基质效应分别为 96.95%、92.49%、94.43%、113.04%, 表明本方法符合要求。

结论:本实验成功的将微透析技术引入到大鼠关节腔部位的取样过程中, 建立的 AA 大鼠关节透析液中梔子苷的 UHPLC-ESI-MS/MS 测定方法快速, 灵敏。两者的结合有助于实现对梔子苷靶部位的取样及其药动学研究。

关键词: 梔子苷; 微透析; UHPLC-MS/MS; 关节腔微透析液

梔子苷在佐剂型关节炎大鼠体内代谢产物的研究

汪蓉; 吴虹*; 王伟; 孙亮亮; 李淑萍

(安徽中医药大学药学院, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥, 230012)

目的:研究表明梔子苷 (Geniposide, GE) 对佐剂性关节炎 (Adjuvant arthritis, AA) 模型

大鼠的足爪肿胀、关节炎评分、关节滑膜的病理形态学具有改善作用，作为抗炎候选药物具有良好的开发前景。然而，目前国内外对于 GE 在大鼠及人的体内代谢产物研究的文献较少，采用超高效液相色谱-电喷雾离子源-质谱串联法 (Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)-Electrospray ionization (ESI)-MS/MS) 技术，建立信息依赖扫描 Information-Dependent Acquisition (IDA)-UHPLC-ESI-MS/MS 方法，检测 AA 大鼠血浆、肝脏、脾脏、肠系膜淋巴结、关节滑膜及尿液中的 GE 药物原型成分和代谢产物，旨在揭示 GE 在 AA 大鼠体内的代谢产物及其分布，探讨 GE 在 AA 大鼠体内的药物代谢动力学行为，为 GE 的临床前药物代谢动力学研究提供实验依据。

方法：大鼠足趾皮下注射弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)，关节炎评分并建立 AA 大鼠模型。通过灌胃给予 AA 大鼠高、中、低剂量的 GE，建立 UHPLC-IDA-ESI-MS/MS 方法，检测 GE 在 AA 大鼠体内血浆、肝脏、脾脏、肠系膜淋巴结、关节滑膜及尿液中的代谢产物及分布。

结果：通过体内代谢研究，在大鼠血浆、关节滑膜、肝脏、脾脏、肠道、尿液中共发现了 4 个代谢产物，并分别命名为 G1、G2、G3 及 G4，对未知代谢产物的结构分别进行了鉴定和推测；在血浆中检测到了 GE、G1 及 G2；在肠系膜淋巴结中检测到了 GE 和 G2；在脾脏中检测到了 GE、G2、G3 及 G4；在尿液中检测到了 GE、G1、G2 及 G4，在肝脏和关节滑膜中只检测到了 GE。

结论：GE 在 AA 大鼠体内的代谢部位可能是大鼠的肠道，推测 GE 发挥抗炎作用可能通过 GE 的直接作用或者 GE 及代谢产物通过肠粘膜免疫耐受信号通路转导的作用。

关键词：栀子苷；佐剂性关节炎；UHPLC-IDA-ESI-MS/MS；代谢产物

以心肌细胞线粒体为靶点的中药复杂体系活性成分快速筛选新方法构建

杨兴鑫^{1,2,4}，徐凤¹，王丹^{1,2}，杨志伟²，谭焕然³，尚明英¹，
王璇^{2,*}，蔡少青^{1,*}

(¹北京大学 药学院 天然药物与仿生药物国家重点实验室，北京 100191；²北京大学 药学院 化学生物学系，北京 100191；³北京大学 基础医学院 药理学系，北京 100191；⁴云南中医学院 药学院 药物分析教研室，云南 昆明 650500)

线粒体是细胞“发动机”部分，其不仅是细胞内能量生成的关键细胞器，还在细胞凋亡、细胞内钙平衡、氧化应激、脂质代谢等多项过程的调节中起着决定性作用。线粒体功能障碍将导致多种疾病发生，而阻止线粒体损伤或调节线粒体功能已成为

当前疾病治疗的有效途径之一。因此，线粒体已成为重要的细胞内药物作用靶点。研究表明许多中药可通过影响线粒体功能而发挥其治疗作用，但其作用于线粒体的活性物质仍基本不清楚，制约中药药理机制深入探讨及中药新药研发。目前筛选中药等复杂体系中作用于线粒体的活性成分的效率较低（只能先制备单体化合物，再进行药理实验确认）。

为快速发现中药中作用于线粒体的天然活性化合物，我们将亲和超滤与 LC/MS 联用，首次构建了一种不经分离纯化的、以线粒体为靶点的集“识别-分离-鉴定”于一体的中药活性成分快速筛选新方法。采用已优化的线粒体分离方法（用玻璃匀浆器将组织破碎后，依次进行差速离心及密度梯度离心分离）从大鼠心脏组织中获取纯度较高，且结构和功能均完整的线粒体；采用噻苯咪唑、鱼藤酮、曲美他嗪及胺碘酮作为阳性对照系统验证筛选方法可行性后，利用所建方法筛选、鉴定虎杖和黄芩中作用于线粒体的活性成分。结果从 2 味中药材中共筛选到 19 种活性成分（其中 17 种为首次发现），并采用离体药理实验验证了其中 9 种被筛选化合物对线粒体功能的调节作用。结果表明，所建方法具有操作简洁、快速，样品用量少、筛选命中率高及分析成本低等优点，可实现中药等复杂体系中作用于线粒体的活性成分的快速、有效筛选，筛选结果将有助于中药药效机制的深入探讨及中药先导化合物的快速发现。

【关键词】 线粒体；活性成分；离心超滤；高效液相色谱-质谱联用；筛选方法

***通讯作者：** 王璇，Tel: (010)82806818；Email: xuanwang6818@bjmu.edu.cn；

蔡少青，Tel: (010)82801693；Email: sqcai@bjmu.edu.cn

基于表面等离子共振原理的中药中抗炎活性成分的筛选及其初步作用研究

曹岩，李英华，吕狄亚，谢斐，张俊平，柴逸峰*

（第二军医大学药学院，上海 200433）

摘要：如何准确快速寻找中药中的活性成分，即从复杂的中药体系中直接鉴定出活性成分，始终是中药研究的热点问题。本研究基于表面等离子共振（surface plasmon resonance, SPR）原理，建立了一种灵敏、有效、简便的方法，利用分子相互作用技术从 5 种中药（大黄、丹参、大青叶、甘草、黄芪）中筛选能够与肿瘤坏死因子受体 I（tumor necrosis factor receptor type 1, TNFR1）特异性结合的抗炎活性成分。首先，

采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS) 测定 5 种药材提取液的相对浓度, 并将其调整至相近浓度; 其次, 采用 SPR 测定 5 种药材提取液与传感芯片表面 TNFR1 的结合情况, 发现大黄提取液具有显著的响应信号。再次, 建立 SPR 进样与回收方法, 回收和富集结合在传感芯片表面的活性成分, 通过 UPLC-QTOF/MS 鉴定, 该活性成分为大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷 (physcion-8-O- β -D-monoglucoside, PMG), 并采用标准品进行确证。最后, 采用 SPR 动力学实验测定 PMG 与 TNFR1 结合的亲和常数 K_D 值为 376 nM, CCK8 实验证明 PMG 与 TNFR1 结合后, 能够抑制 TNF- α 对细胞的杀伤作用, 流式细胞技术证明 PMG 对 TNF- α 诱导的细胞凋亡具有抑制作用。本研究表明, 尽管 PMG 是大黄中的微量成分, 但是其具有理想的药理活性, 是首次从中药中发现 PMG 是与 TNFR1 结合的小分子配体。综上, 本研究初步建立了基于 SPR 的活性成分筛选技术, 是中药等其他复杂药物体系活性分析的有效手段。

关键词: 表面等离子共振, 分子相互作用, 中药, 抗炎, 活性成分

***通讯作者:** Email: yfchai@smmu.edu.cn; 电话: 021-81871201。

基金项目: 国家自然科学基金 (81202496)。

基于 LC-MS 技术的代谢组学研究慢性肾脏病-矿物质骨代谢异常相关的代谢通路变化

吴琼[#], 赖学莉, 朱臻宇, 洪战英, 董昕, 郭志勇, 柴逸峰^{##}

(第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

摘要: 目的: 采用基于质谱技术的代谢组学方法鉴别与甲状旁腺激素水平相关的尿毒症患者体内内源性代谢信号的变化。方法: 本研究是一个横断面研究, 对 19 个疾病对照组患者 (DC: iPTH: 150-300 pg/ml) 和 19 个继发性甲旁亢组患者 (SHPT: iPTH > 300 pg/ml) 的血清进行基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术代谢组学轮廓分析继而鉴别慢性肾脏病矿物质骨代谢异常 (CKD-MBD) 的生物标志物; 然后, 再次纳入 19 个疾病对照组患者 (DC: iPTH: 150-300 pg/ml) 和 19 个继发性甲旁亢组患者 (SHPT: iPTH > 300 pg/ml), 采用 10 倍交叉验证的方法验证上述轮廓分析筛选的潜在生物标志物构建模型的预测效能。结果: 代谢物轮廓分析共鉴别 32 个 CKD-MBD 潜在生物标志物, 与

疾病对照组相比, 其中 30 个代谢物在 SHPT 患者中呈上调趋势, 胞苷和苯丙氨酸在 SHPT 患者中呈下调趋势。潜在生物标志物构建的模型内部验证结果准确度高达 91.4%, 外部验证结果准确度、灵敏度及特异性分别为 71.1%、73.7%和 68.4%。结论: 基于质谱技术的代谢轮廓分析可促进 SHPT 患者的早期诊断和治疗监测。我们的结果表明 CKD-MBD 的发生发展与蛋白合成及代谢, 氨基酸代谢, 能量代谢和甾体激素类代谢通路相关, 而本研究的发现可促进对这一疾病病因更深入的理解。

关键词: 代谢类疾病; 代谢组学; 代谢轮廓分析; 质谱技术

基于纳米氧化铜修饰电极的生地中地黄苷 D 含量测定

孙照霞, 余丽双*

(福建中医药大学)

摘要: **目的:** 地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 为玄参科 Scrophulariaceae 地黄属 *Rehmannia* 多年生草本植物, 是我国主要的中药材, 具有治疗心脑血管疾病、调节内分泌系统、提高免疫力、抗肿瘤、降血糖以及抗炎等功效。地黄中主要活性成分为环烯醚萜苷类, 主要含梓醇、地黄苷 A 和地黄苷 D 等其中地黄苷 D 化学稳定性较好。地黄苷 D 的含量测定主要有 HPLC 法, 本文欲建立一种分析速度快、灵敏度高、仪器简单的电化学分析方法, 通过建立地黄苷 D 电化学传感器而对生地中地黄苷 D 进行含量测定。**方法:** 以氧化铜纳米颗粒修饰金电极, 制备地黄苷 D 电化学传感器。循环伏安法考察地黄苷 D 的电化学行为, 差分脉冲伏安法进行定量测定。**结果:** 循环伏安法实验显示, 裸电极测定地黄苷 D 无氧化还原现象, 修饰电极测定地黄苷 D 有较好的循环伏安特性, 且空白溶液对样品测定无影响, 结果表明纳米氧化铜对地黄苷 D 的电化学氧化还原均有催化作用。差分脉冲伏安法实验表明, 在 pH 值为 6.0 的 5 mM 硼砂-10 mM 磷酸二氢钠缓冲溶液中, 地黄苷 D 的峰电流值最大, 当地黄苷 D 的浓度在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时, 峰电流值与其浓度成良好的线性关系, 线性方程为 $I_p(\mu\text{A}) = 3.5952 + 0.2847 c (\mu\text{g/mL})$, 相关系数为 0.9990, 检测限为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。将本方法应用于生地药材中地黄苷 D 的含量测定, 测得生地中地黄苷 D 的含量为 9.87 mg/g, RSD 为 1.79%, 加样回收率为 101.8%, RSD 为 3.46%。**结论:** 本实验自制氧化铜纳米颗粒, 采用滴涂法制备膜修饰金电极, 将其应用于地黄苷 D 的电化学测定, 相对于裸金电极, 修饰电极具有更好的电化学信号。将修饰电极用于生地药材中地黄苷 D 的含量测定, 所测结果比较理想。该修饰电极制作简单、灵敏度

高、重复性好，具有广阔的应用前景。

关键词：氧化铜；修饰电极；地黄苷 D；含量测定

研究药物与蛋白质相互作用的新策略

邓必阳

(药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室，广西师范大学化学与药学学院，桂林 541004)

蛋白质是一类关键的生物大分子，在生物体内起着重要的作用，是生命现象的物质基础^[1]。血清白蛋白是血浆中含量最丰富的重要载体蛋白。药物进入人体后，总要通过血浆的贮存和运输，达到受体部位发生药理作用，多数有机药物在血浆中都或多或少地与血浆蛋白(主要是白蛋白)结合，结合后的药物不易穿透毛细血管壁，限制其进一步运输，这对药物在体内的代谢和分布产生重要影响。另外，药物与白蛋白结合后，使药物储留于血浆中，以减弱药物的最大作用强度，防止作用大幅度波动以及延长药物的作用时间。因此，研究药物与白蛋白的结合是药物动力学及临床药理学的重要内容，也引起药物分析工作者的兴趣。

研究药物与白蛋白的结合较常用的样品处理方法是平衡透析方法。此方法存在透析时间长、透析液多及样品用量大等不足。本文介绍一种新的样品处理技术——超声微透析法^[2,3]。从超声微透析装置的研制、实验原理、影响因素到在药代动力学中的应用以及以后的发展将进行介绍。

Systematic study on the absorption characterization effects and mechanism of saponins in *Ilex pubescens Hook. Et Arn* in rats using single pass intestinal perfusion model and UPLC method

Guojun Kuang^a, Chenchen Zhu^a, Shixia Guan^a, Li Lin^a, Jie Zhou^a,
Zhongxiang Zhao^{a,**}, Lei Zhang^{a,*}

(^aCollege of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, P. R. China)

Abstract: With powerful and wide pharmacological activities, *Ilex pubescens Hook. Et Arn* (MDQ) is well-known Chinese herbal medicine commonly used in South China for treatment of cardiovascular disease and hypercholestaemia. Saponins are considered to be the main active components. On the contrary of its extensively reported therapeutic activities, there is far less attention being paid upon the intestinal absorption and transport mechanism. This study aims to investigate the intestinal absorption features of 6 saponins, namely ilexgenin A (C1), ilexsaponin A1 (C2), ilexsaponin B1 (C3), ilexsaponin B2 (C4), ilexsaponin B3 (DC1), ilexoside O (DC2) extracted from MDQ. In situ single-pass perfusion model was used, and a sensitive and specific ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method was applied for simultaneous determination of the 6 saponins by using digoxin as internal reference.

The absorption rate and permeability of the tested saponins showed concentration-dependent trend in jejunum, ileum and duodenum at dosage of the extract less than 2.5 mg mL⁻¹ and consistent at dosage of 2.5 mg mL⁻¹ and 5.0 mg mL⁻¹ with no significant absorption priority in tested intestinal segment. Compared with monomers, the six saponins administered in extract form exhibited a unique absorption characteristic different from that of monomer administration. Absorption promoting effect by coexistence components could be observed, and nonabsorbent components of C4, DC1 and DC2 unexpectedly showed appropriate intestinal permeability when administrated in extract form. Verapamil was found to improve the absorption of C2, C3 and DC1 dramatically, which meant an active transport mechanism was probably involved in the absorption process. The results that promoting effect of EDTA and inhibition function of amantadine for the gastrointestinal transport of almost all the target saponins were confirmed inferred that Endocytosis and passive transport were mainly counted for the mechanism of the 6 saponins. Combined with the results of apparent oil-water partition coefficient test that K_{ow} were in the range of -1 to 2, the poor bioavailability of these components administrated in extract form should not be ascribed to the lipophilicity and permeability.

Key words: *Ilex pubescens Hook. Et Arn*, saponins, single pass intestinal perfusion, absorption characterization, UPLC

First Corresponding author*: Lei Zhang, Professor

Second Corresponding author** : Zhongxiang Zhao, Professor

College of Chinese Traditional Medicine

Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine

232 East of Waihuan Road, University Town

Guangzhou 510006, Guangdong, P. R. China

TeL: +86-20-39358081

E-mail address: *¹ zhanglei261291@aliyun.com; **² E-mail: zzx37@163.com

基于多种质谱采集技术和数据分析策略的紫菀次级代谢产物快速鉴定

孙宇鹏, 万昶宸, 刘艳艳, 杨浩天, 张兰桐*

(河北医科大学药学院药物分析教研室, 石家庄 050017)

摘要: 紫菀是一种具有止咳平喘功效的常用中药材, 其化学成分丰富。现有紫菀组分研究大多仍遵循传统的分离-制备-鉴定模式, 处理过程繁琐, 通量较低。本研究采用超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱技术 (UHPLC-Q-TOF/MS), 基于多种质谱数据采集技术和数据后处理策略, 对紫菀次级代谢产物进行快速分析和鉴定。依照2015版药典处理方法, 获得紫菀药材提取液, 旋蒸蒸干, 残渣用少量甲醇复溶, 即得供试品溶液; 应用数据依赖性采集 (data-dependent acquisition, DDA) 和数据非依赖性采集 (data-independent acquisition, DIA) 技术获得相关质谱数据; 采用如下四种数据分析模式, 对采集到的数据进行分析, 并结合所得到的化合物精确分子量和相关高分辨二级碎片离子信息, 鉴定紫菀次级代谢产物的结构: 1. 依照本课题组建立的紫菀组分数据库, 采用Peakview™软件, 进行靶向性筛选。2. 借助本课题组采用Libraryview™软件建立的标准品质谱谱库, 对采集数据进行靶向性筛选。3. 采用Masterview™软件, 在线搜索ChemSpider数据库, 对采集数据进行非靶向性筛选。4. 针对紫菀中可能存在的“次级产物代谢”过程, 选择紫菀酮、表木栓醇等丰度较高, 药理活性显著的次级代谢产物作为“活性化学标志物”, 将上述物质作为代谢母体模板, 采用MetabolitePilot™软件, 进行非靶向性筛选。通过以上步骤, 鉴定出紫菀药材中萜类、肽类、甾醇类、黄酮类、香豆素类、有机酸及生物碱等共计70种次级代谢产物。综上所述, 该研究提供了一种快速鉴定紫菀次级代谢产物的方法, 对其药效物质基础研究及质量控制提供了依据。

关键词: 紫菀; 次级代谢产物鉴定; 超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱; 数据依赖性采集; 数据非依赖性采集

高效液相色谱法测定健骨口服液中补骨脂素的含量

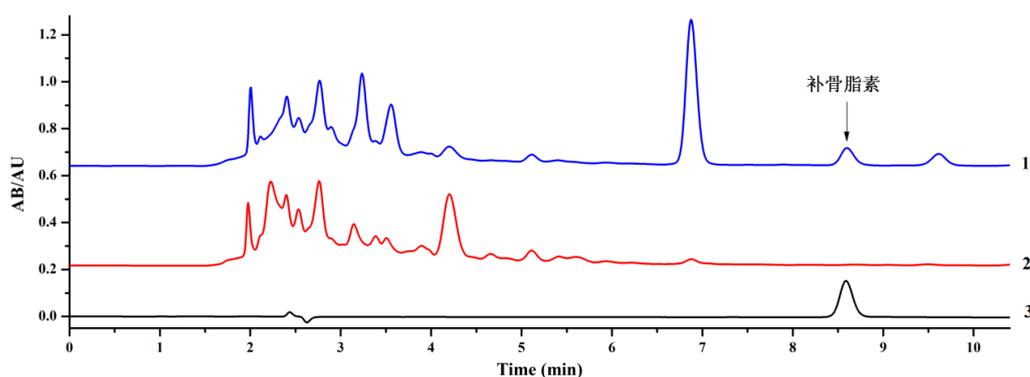
孙亮, 郑巍, 倪东杰, 韦庆, 孔飞飞, 王翔, 郭良君

(解放军第98医院, 浙江湖州 313000)

摘要: 健骨口服液为我院配制的纯中药口服液, 由淫羊藿、黄芪、丹参、补骨脂、地黄、吴茱萸和牡丹皮7味药材组成, 具有益肾健骨、舒筋活血之功效, 适用于骨

关节损伤、软组织伤、慢性骨关节疼痛及骨质疏松症等。在现行的质量标准中对淫羊藿苷进行了含量测定以控制健骨口服液的质量，本着提高标准的原则，我们增加了补骨脂素的含量测定，以进一步完善质量标准，确保该产品质量稳定可靠。经试验，在 Waters Alliance 液相系统中（Waters e2695 高效液相色谱仪，Waters 2489 双波紫外可见光长检测器，Empower 3 工作站），色谱条件以色谱柱 Waters Symmetry C18 柱（5 μ m，4.6 \times 250mm），流动相甲醇-1%甲酸（48：52），检测波长 245nm，流速 1.0mL/min，柱温 30 $^{\circ}$ C 为佳。补骨脂素在 8.5min 左右出峰，前后无杂峰干扰，分离度大于 1.5，理论塔板数按补骨脂素峰计算不低于 5000。对不同提取方法、不同提取时间以及不同提取溶剂的种类和浓度进行考察，结果表明健骨口服液以 80% 甲醇超声提取 15min 效果较好。补骨脂素在 2.5~30 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系，直线回归方程为 $Y=85752X-34013$ ， $r=0.9991$ ($n=3$)，精密度实验中 RSD 均小于 2%，重复性实验中 RSD 小于 1%，加样回收率在 95%~100% 之间，提取样品在 24h 以内稳定。本文所建立的测定方法简便、准确，分离效果好，可用于健骨口服液的质量控制。

关键词： 高效液相色谱法；健骨口服液；补骨脂素；含量测定



健骨口服液色谱图

(1: 健骨口服液；2: 缺补骨脂健骨口服液；3: 补骨脂素对照品)

基于 LC-MS 技术探究半夏厚朴汤对大鼠抗抑郁的作用机制

沈淑洁；黄荣清；肖炳坤；杨建云

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所)

目的：半夏厚朴汤原出自汉代张仲景的《金匱要略》，由半夏、厚朴、茯苓、生姜和紫苏叶组成，具有行气散结，降逆化痰的功效，临床应用时发现其可使抑郁症患者抑

郁心境转为舒畅愉快，故现在又用于抑郁症的治疗。半夏厚朴汤作为复方药物在生物体内的代谢分析可利用代谢组学的方法，对其在生物体内的内源性小分子代谢产物的组成、含量及其随时间的变化进行检测和确定，并利用模式识别方法对这种变化进行分类和预测，进而确定相关的生物标志物，对机体的整体的生物学状况和功能做出评价。这种动态观察机体的整体代谢变化，与传统中医药的整体理论有异曲同工之妙，所以利用代谢组学研究复方半夏厚朴汤具有一定的可行性。尤其以LC-MS 的高灵敏度、高精密度以及良好的重现性应用最为广泛。

方法：本实验正是基于 LC-MS 的代谢组学研究方法，观察给予半夏厚朴汤提取物后对慢性诱导抑郁大鼠实验中，各组大鼠血清中代谢物的变化，探讨半夏厚朴汤对各组大鼠之间的代谢影响以及潜在性的作用机制。。通过采集大鼠血清进行核磁数据检测，利用主成分分析法（PCA）对大鼠血清内源性小分子代谢产物进行分析处理。并运用 Simca-p(11.5)软件对质谱图和相关代谢产物进行鉴定和分类。实验期间各组大鼠每天给药且给药组和模型组每天束缚 6 小时，连续束缚 24 天。实验前进行一次行为绝望实验(强迫游泳试验)，之后实验过程中每隔一周进行一次，至实验结束。收集各组大鼠的血清并进行 QQQ HPLC-ESI/MS 分析，在负离子扫描模式下各组大鼠的质谱图，如图 1。将大鼠血清在 QQQ HPLC-ESI/MS 分析检测的质谱信息于 Simca-p(11.5)软件上进行主成分（PCA）分析和偏最小二乘法分析(PLS-DA)，并结合 VIP 值大于 1 的数据寻找差异性代谢物。

结果：将实验所得的差异性代谢物与 KEGG 匹配 ID 值后，结合 HMDB 和 Metlin 标准代谢物谱图库对大鼠血清中的代谢物进行指认与归属。将标准化合物和生物体液样本的特征信号逐一匹配，能够鉴定出血清样本中共 15 个代谢物。如 2-酮戊二酸，柠檬酸，肌酸，琥珀酸，LPCs 等。这些潜在的生物标记物与半夏厚朴汤的抗抑郁机制有很大的联系。在能量代谢过程中扮演着重要角色的柠檬酸、2-酮戊二酸均为三羧酸循环(TCA)的中间产物，一旦这些中间产物出现异常，便可能引起 TCA 功能缺失或者出现紊乱。2-酮戊二酸水平下降，TCA 减弱，能量生成减少，使机体出现疲劳倦怠。TCA 是机体内重要的循环代谢途径，这种循环受到抑制也可能引起器官损伤 [1-3]。能量不足、倦怠和疲劳均是抑郁症的典型症状 [4]。半夏厚朴汤给药组在一定程度上可以逆转以上机体功能的异常改变。给药后，半夏厚朴汤通过综合作用于各种途径，产生抗抑郁样效果有待进行更全面的研究，以明确半夏厚朴汤确切抗抑郁作用机制。

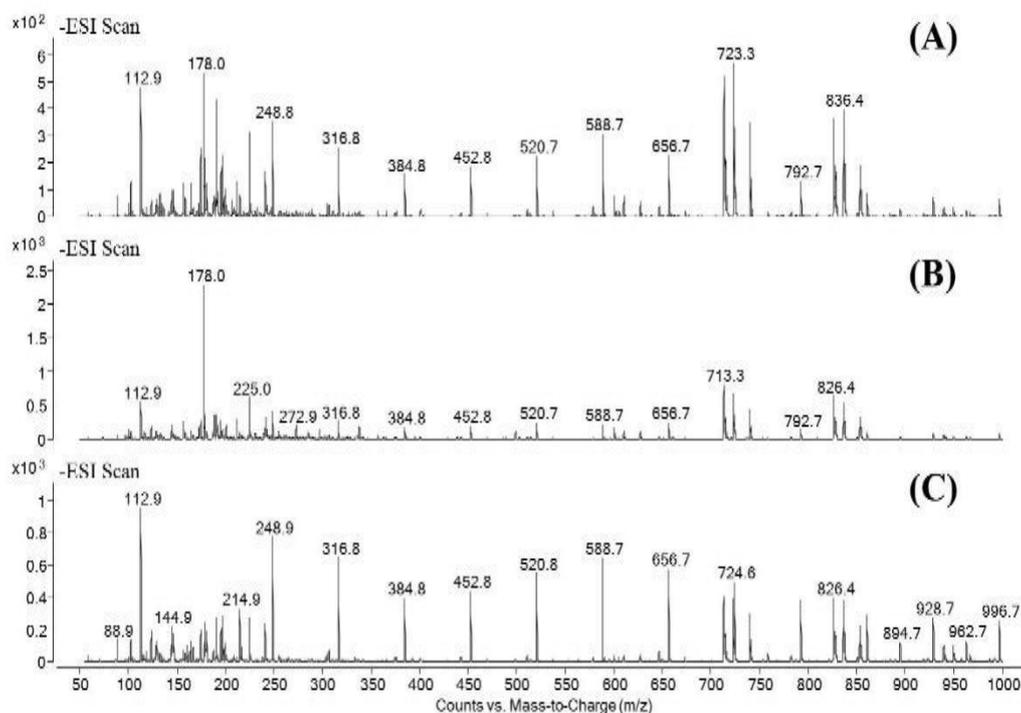


图1 半夏厚朴汤组 (A) 束缚组 (B) 以及空白组 (C) 大鼠血清于LC-MS分析中质谱图

结论: 简单的说, 半夏厚朴汤可通过调节氨基酸代谢和能量代谢显著改善对大鼠慢性不可知抑郁的影响。同时也为半夏厚朴汤的抗抑郁机制提供代谢组学实验依据。此外依据高通量, 高灵敏度的LC-MS代谢组学研究半夏厚朴汤在大鼠体内的内源性小分子的变化分析方法也同样适用于半夏厚朴汤的其它作用机制的研究。

关键词: 半夏厚朴汤; LC-MS技术; 代谢组学

基金项目: 国家自然科学基金 (21375147) 、北京自然科学基金 (7142125) 、十二五国家科技重大专项 “重大新药创制” 综合性新药研究开发技术大平台 (2012ZX09301003-001-010)

通讯联系: 北京市海淀区太平路27号军事医学科学院 邮编:100850

电话: 010-66930217 Email: hrongqing@163.com

基于 LC-MS 的尼克酰胺心肌保护机制亚细胞比较研究

王赫, 梁晓萍, 罗国安, 梁琼麟

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 缺血性心脏病是近年来威胁人类生命的首要杀手, 由于缺血缺氧后细胞正常代谢受到明显抑制, 蛋白装配与转运过程、DNA 转录与翻译无法正常进行, 线粒体呼

吸链断裂导致氧自由基产生、钙超载、能量生成不足,进一步诱发细胞凋亡和坏死。因此细胞能量代谢障碍是缺血缺氧损伤的重要原因。尼克酰胺作为一种水溶性维生素(维生素 B3),也是辅酶 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的前体。既往研究中表明尼克酰胺治疗能够改善脑缺血大鼠神经病变、减小梗死面积,同时尼克酰胺作为合成 NAD^+ 的前体,能提供能量合成底物促进能量修复保护受损神经细胞。本研究对尼克酰胺在心肌细胞缺氧损伤干预过程中的能量代谢调控机制进行研究,通过高效液相色谱-三重四极杆质谱联用对药物干预前后的大鼠心肌细胞及所提取的线粒体代谢物进行测定。

我们利用大鼠心肌细胞 H9c2 构建了缺氧复氧损伤模型并对其进行了尼克酰胺给药保护。通过细胞增殖-毒性检测 CCK-8 进行分析,表明尼克酰胺对心肌细胞缺氧复氧损伤具有保护作用,且给药浓度 10mM 时保护作用最强。同时确定缺氧 24h 复氧 4h 作为损伤模型。对于正常组、损伤组、给药组的细胞和线粒体分别进行代谢提取,并使用高效液相色谱-三重四极杆质谱测定其中的能量代谢物及三羧酸循环代谢物。不给药组缺氧后 NADH/NAD^+ 比值上升,能量代谢底物减少,三羧酸循环代谢物多数下调;给药后 NADH/NAD^+ 比值减小,三羧酸循环代谢物大多维持在基线附近,表明给药很好地维持了正常代谢;缺氧后细胞水平的苹果酸下降,但线粒体内部苹果酸无显著变化,说明缺氧导致苹果酸消耗,但消耗是通过苹果酸先转移至线粒体内发生的;给药后细胞内富马酸、苹果酸增多,推测由尼克酰胺通过尿素循环转化而来,而线粒体内富马酸并未增多,这是由于苹果酸可直接通过苹果酸/天冬氨酸穿梭进入线粒体,但线粒体内富马酸需通过三羧酸循环产生。通过本研究我们建立了一种亚细胞水平的线粒体与细胞代谢变化比较方法,并对尼克酰胺心肌保护的代谢机制得到了初步结论。

关键词: 尼克酰胺 三重四极杆 缺氧复氧损伤 线粒体

项目资助: 国家自然科学基金(No. 21175080)

重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005).

***通讯联系人:** 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

人工血管的构建并用于经血管转移癌症的模型研究

徐培迪, 罗国安, 梁琼麟

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 近几年来, 虽然疾病的诊断和治疗有了很大的进步, 癌症组织的侵袭和转移依旧是导致癌症病死的主要原因。其主要原因是癌症侵袭-转移级联过程还远远没有被研究透彻, 现有的体外模拟手段无法真实的还原体内微环境。所以这个过程在体外的真实模拟变得尤为重要。本文基于前人在人工血管搭建的基础上, 设计了一种不依靠模板生成的血管。这种人工血管有望更真实的还原体内微环境, 并模拟癌症转移过程。

血管的制作使用拉制过的玻璃毛细管和PDMS芯片, 采用微流控手段, 挤出一个核层-壳层结构。其中壳层为2%w/w的海藻酸钠溶液, 内层为0.5%w/w的CaCl₂溶液。在挤出的时候能形成一个中空的管状结构, 再通入浓度较高的2%w/w的CaCl₂溶液中, 从而形成机械强度较好的管状结构。这个管状结构能够自由弯曲成为想要的形状, 并且具有较好的生物相容性。

最后我们预计在构建的管状结构中通入上皮细胞培养, 能够形成人工模拟的血管结构。通过观察癌细胞在血管内和血管外的生理和行为状态来研究癌症的转移机理。

关键词: 微流控芯片; 人工血管; 癌症侵袭-转移; 人工组织

项目资助: 国家自然科学基金(No. 21175080)

国家重大科技专项(2013ZX09507005)

通讯联系: E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

辣椒碱的提取方法及生物活性研究进展

李双双^{1,2}, 李倩², 李双¹, 郭春燕^{1*}

(1.河北北方学院 药学系, 河北 张家口 075000; 2.清华大学, 北京 100084)

摘要: 辣椒属于茄科一年生或多年生草本植物, 辣椒果实中的辣味成分是辣椒碱类物质, 以辣椒碱为主。辣椒碱是一种香草酰胺类生物碱, 其提取方法有溶剂萃取法、离子交换法、超临界CO₂流体萃取法、超声波提取法、闪式提取法、微切助互作技术辅助提取法。其中闪式提取技术具有耗时短、节能、操作简单的优点, 但提取率还有待提高; 微切助互作技术辅助提取法具有工艺简单、操作方便, 且成本低等优点。辣椒碱具有多种生物活性, 如镇痛抗炎、保护心血管系统、消化系统、抗癌等作用。除此之外, 辣椒碱在军事领域是制造催泪弹、催泪枪以及防身武器的主要成分。在生物农

药领域作为一种新型环保型生物杀虫剂,具有药效高、持效长、可降解等特点。在饲料工业辣椒碱能改善动物的消化功能、促进食欲、增强血液循环,可作为食品健胃剂。在食品行业,人们经常将辣椒碱作为优良的食品添加剂。同时,实验表明辣椒碱对细菌有较强抑制作用,但对霉菌的抑制作用弱。所以辣椒碱可作为食品的抗菌剂。其机制涉及选择性的激动TRPV1通道、活性氧诱导、AMPK依赖性信号通路(p53和mTORC1)和AMPK非依赖性信号通路(JNK)的活化,钙选择性通道TRPV-5和TRPV-6等。今后需要研究出一个既能大量生产辣椒碱单体,又能降低生产成本的生产工艺,并对其作用机制进行深入研究。

关键词: 辣椒; 辣椒碱; 提取方法; 药理作用; 生物活性

Advances in Extraction Methods and Biological activity of Capsaicin

LI Shuang-shuang^{1,2}, LI Qian², LI Shuang¹, GUO Chun-yan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Capsicum frutescence L., annual or perennial herbs, belongs to solanaceae. Capsaicinoids is the principle pungent in peppers. Capsaicin is a vanilla amides alkaloid, which is the major ingredient of capsaicinoids. The ways of capsaicin production was reported, including extract by solvent extraction, ion exchange method, supercritical CO₂ fluid extraction (SFE-CO₂), ultrasonic extraction, flash extraction/smashing tissue extraction, pressure-shear induced chemical transitions (PICT) assisted extraction. Flash extraction method is time-saving and energy-efficient method, with low extraction rate. PICT has advantages such as simple process, easy operation, and low cost, etc. Capsaicin has very extensive pharmacological activities-the activities of analgesia, anti-inflammation, anticancer, anti-obesity as well as cardiovascular, gastrointestinal, ect. Besides, in the military field, capsaicin is the main component of tear gas, tear gun and self-defense weapons. In the field of biological pesticide, capsaicin that is a new environmental protection biological pesticides has advantages of high efficacy and degradable. In the feed industry, capsaicin can improve animals' digestive function, promote appetite, enhance the blood circulation, therefore, capsaicin can be used as food stomachic. In the food industry, capsaicin often acts as food additives. At the same time, the results indicate that capsaicin has stronger inhibition to the bacteria, but weak inhibitory effect of mold. So capsaicin can be used as antibacterial agent of food. The mechanisms involve the selective excited TRPV1 channels, reactive oxygen species induced, AMPK dependency signaling pathways (p53 and mTORC1) and AMPK not dependency signaling pathways (JNK) activated, calcium channel selectivity TRPV-5 and TRPV-6, etc. That we need to do is to develop a production technology which not just can produce increasingly capsaicin monomer, but reduce the production cost. In addition, we will further research its mechanism of action.

Keywords: Pepper; Capsaicin; Extraction method; Pharmacological effects; Biological activity

UHPLC-Q-TOF-MS 技术用于栀子大黄汤抗酒精性肝损伤的配伍谱效关系研究

张晓书¹, 韩飞¹, 朱鹤云², 尹然^{1*}

(1 沈阳药科大学药学院 辽宁沈阳 110016; 2 吉林医药学院药学院 吉林吉林 132013)

摘要:目的 研究栀子大黄汤配伍-化学成分-药效之间的相关性, 从而阐释栀子大黄汤抗酒精性肝损伤的药效物质基础。方法 对栀子大黄汤进行拆方设计, 得到包括全方在内的 16 个配伍组方, 按前期已经优化的色谱-质谱条件进行 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS 测定, 建立各配伍方的指纹图谱。采用 Shim-pack XR-ODS C18 column (75 × 3.0 mm, 2.2 μm) 色谱柱, 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.6 mL/min, 柱温 35℃; 采用电喷雾电离源、全扫描正负离子方式检测。记录所测得化学成分的提取离子色谱图 (EIC), 获得各鉴定成分的峰面积。考察各配伍组方对乙醇诱导肝损伤大鼠的谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和甘油三酯 (TG) 的影响, 评价抗酒精性肝损伤作用。利用相关分析 (CCA) 和回归分析 (MLR) 的统计学方法对 EIC 峰面积和药理指标数据进行谱效相关研究。结果 栀子大黄汤全方共检测到 82 种成分, 与其他配伍组方中成分比较, 确认有 31 种成分来源于栀子, 10 种成分来源于大黄, 33 种成分来源于枳实以及 8 种成分来源于淡豆豉, 与课题组之前的化学成分研究结果一致。不同配伍的药效结果显示: 全方组、栀子-大黄-枳实组、栀子-大黄-淡豆豉组对酒精性肝损伤大鼠的 ALT、AST 和 TG 水平均具有非常显著的改善作用 ($p < 0.01$); 栀子-大黄组和栀子-枳实-淡豆豉组亦可不同程度的改善 ALT、AST 和 TG 三指标水平 ($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$); 栀子单方组和栀子-枳实组与模型组相比显著改善了 TG 水平 ($p < 0.05$)。上述结果说明了栀子是本方药理药效的主导药物, 从而确立栀子在方中的主药地位。栀子大黄汤全方是最佳药效组方, 4 味药材在方中相互协调共同发挥作用。综合相关分析和回归分析结果, 在 82 个成分中, 确定了 31 个化学成分与药理作用密切相关, 分别为环烯醚萜苷类 (11 个)、单萜类 (7 个)、黄酮类 (6 个)、有机酸类 (3 个)、蒽醌类 (2 个)、西红花苷类 (1 个) 以及单宁类 (1 个), 确定为栀子大黄汤抗酒精性肝损伤的药效物质基础。结论 本研究利用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术的高分辨率和高灵敏度, 获得了尽可能多的化学成分信息, 并与药理指标相关联, 通过配伍谱效关系分析为揭示栀子大黄汤的配伍规律和药效物质基础提供科学依据, 为该传统方剂的进一步深入研究奠定基础。

关键词: 栀子大黄汤; UHPLC-Q-TOF-MS; 指纹图谱; 酒精性肝损伤; 配伍; 谱效关系

肉苁蓉中松果菊苷、毛蕊花糖苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究

崔庆玲, 白雪薇, 曲宝, 潘英妮, 刘晓秋*

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 肉苁蓉是具有补肾壮阳, 填精补髓, 养血润燥, 悦色延年等功效的一味传统中药, 在抗老防衰类方剂中仅次于人参占第 2 位, 素有“沙漠人参”之美称。其主要活性成分为苯乙醇糖苷类化合物, 其中具有代表性的成分为松果菊苷和毛蕊花糖苷。大量研究表明二者具有非常好的神经保护、抗衰老和改善记忆的药理活性。但二者大鼠体内生物利用度只有 0.83%、0.12%, 提示二者可能在胃肠道及体循环中发生了严重降解与代谢。本实验通过对松果菊苷和毛蕊花糖苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究来探讨口服后二者在人体胃肠道中是否会被破坏, 是否出现降解产物, 其降解产物又是什么。**方法** 人工胃液、肠液按中国药典 2010 版附录配制。取松果菊苷和毛蕊花糖苷各 3mg 分别加到 10mL 人工胃液、肠液中, 37℃、130 r / min 水浴振荡, 36h 取样。样品采用体积比 1:3 甲醇沉淀蛋白。采用 UPLC/Q-TOFMS 方法, 电喷雾电离源(ESI), 阴离子方式进行检测。**结果与讨论** 毛蕊花糖苷在人工胃液 36h 降解 30%, 经鉴定降解产物为异毛蕊花糖苷, 而在人工肠液 36h 降解 48%, 降解产物经鉴定为咖啡酸、去咖啡酸毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷及毛蕊花糖苷另一同分异构体。松果菊苷在人工胃液 36h 降解 25%, 在人工肠液到 36h 降解 18%, 降解产物均为其同分异构体。通过以上实验结果, 发现松果菊苷在人工胃液、肠液中较毛蕊花糖苷稳定。毛蕊花糖苷在人工肠液中几乎降解一半。**结论** 松果菊苷和毛蕊花糖苷在人体胃肠道中会遭到不同程度的破坏, 并产生降解产物, 这是二者口服生物利用度低的原因之一, 进一步的实验将研究肠道菌群、肠道酶对二者的影响。

关键词: 松果菊苷 毛蕊花糖苷 人工胃液 人工肠液 降解

基金项目: 国家自然科学基金(81202892); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2013397)

第一作者: 崔庆玲, 女, 黑龙江, 研究方向: 中药药效物质基础。E-mail: cuiqingling0305@163.com

***通信作者:** 刘晓秋, 教授, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及中药新药的研发。电话: 024-23986469。E-mail: liuxiaoqi3388@163.com。

肉苁蓉中松果菊苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究

敖奇波¹, 潘英妮^{1*}, 崔庆玲¹, 曹馨月¹, 王东影¹, 张雪妮¹,
王会良², 刘晓秋¹

(1. 沈阳药科大学 中药学院; 2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 松果菊苷为苯乙醇苷类化合物, 在植物中广泛存在, 是较为代表性的苯乙醇苷化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、保护神经、保护肝脏、改善学习记忆以及免疫调节等药理作用。由于松果菊苷广泛的药理作用, 近年来其倍受关注, 有关松果菊苷的研究也迅速发展, 目前已有研究机构将其作为中药 I 类新药开发。但松果菊苷大鼠口服生物利用度只有 0.83%, 提示其可能在胃肠道及体循环中发生了降解与代谢。本实验通过对松果菊苷在模拟人体胃肠环境中的稳定性研究来探讨口服后松果菊苷在人体胃肠道中的降解过程和降解产物。**方法** 人工胃液、肠液按中国药典 2010 版附录配制。取松果菊苷 3mg 分别加到 10mL 人工胃液、肠液中, 37℃、130 r/min 水浴振荡, 分别于 6、12、24、36h 取样。样品采用体积比 1:3 甲醇沉淀蛋白。采用 UPLC/Q-TOF MS 方法, 电喷雾电离源 (ESI), 阴离子方式进行检测。**结果与讨论** 松果菊苷在人工胃液 6h 时降解 25%, 之后保持不变, 在人工肠液 6h 降解 10%, 到 36h 降解 18%, 降解产物均为其同分异构体。以上实验结果表明: 松果菊苷在人工胃液和肠液中均发生降解反应。**结论** 松果菊苷在人体胃肠道中会遭到不同程度的破坏, 并产生降解产物, 推测这是其口服生物利用度低的原因之一。

关键词: 松果菊苷 人工胃液 人工肠液 降解

基金项目: 国家自然科学基金 (81202892); 辽宁省教育厅科学研究一般项目

(L2013397); 沈阳药科大学 2015 年大学生创新创业训练计划项目

第一作者: 敖奇波, 女, 本科生。E-mail: 862833390@qq.com

***通信作者:** 潘英妮, 副教授, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及中药质量标准研究。电话: 024-23986469。E-mail: panyingni@163.com。

基于大分子表面交链的荧光聚合物纳米粒的信号放大及其核酸适体标记和癌细胞成像分析

谢洪平 宋天梅 魏同洪

(苏州大学医学部药学院)

利用合成的水溶性极好的多氨基聚合物与荧光小分子羧基荧光素通过碳二亚胺交联法, 将羧基荧光素化学连接到聚合物上, 由于该荧光聚合物中既有大量油溶性的

荧光基团又有大量水溶性的氨基基团，在水溶液中在超声条件下，利用疏水相互作用，组装制备了“内核疏水外壳亲水”的水溶性荧光聚合物纳米粒。对于该纳米粒子构建的荧光信号放大体系，由于是通过疏水相互作用形成，故稳定性不是太好，而且该纳米粒子表面带有大量的正电荷这也不利于生物标记。利用聚丙烯酸（PAA）大分子中大量的羧基，与荧光纳米粒子表面的大量氨基进行化学交联，制备了大分子表面交链的荧光聚合物纳米粒。该类荧光纳米粒，不但具有大量的荧光体，表现出了极强的信号放大能力，而且还表现出了结构稳定性和生物标记及其生物识别的优势。这种在纳米粒表面进行聚合物交联，不仅在荧光纳米粒表面形成了化学交联的外壳，极大地提高了纳米粒子的稳定性，同时存在大量的 PAA 残余链，这种残余链上的大量羧基不但使荧光纳米粒子表面带上大量的负电荷，而且在纳米粒的“刚性结构”表面还形成了一个由残余链构成的“柔性结构”，在生物标记和生物识别过程中，极大地减少了由静电作用导致的非特异性吸附，同时增加了刚性的荧光纳米粒与被标记的生物大分子及其被识别的生物大分子或细胞之间的“柔性距离”，有效地减小了荧光纳米粒与识别体之间的空间位阻，增强了生物识别的能力和检测灵敏度。

该纳米粒子在 TEM 下的大小为 15nm 左右，呈球形，分布均一，其在水合条件下的粒径为 153nm，分布也很均一。PAA 修饰过后的纳米粒子表面带上负电荷为-16.51mV。该纳米粒子具有很好的荧光时间稳定性、pH 稳定性、血浆稳定性以及具有很好的抗光漂白能力。

利用本文构建的荧光纳米粒，标记A549腺癌细胞的核酸适体，分别识别靶细胞人源腺癌细胞系A549和对照细胞人胰腺癌PANC-1。结果表明，同人源胰腺癌细胞PANC-1比较，荧光纳米粒标记的核酸适体能够特异性识别人源腺癌细胞系A549；与羧基荧光素分子标记的核酸适体比较（图1），荧光纳米粒标记的核酸适体与靶细胞特异性作用后，细胞表面有明显的荧光增强作用。因此，本文构建的荧光纳米粒标记的细胞核酸适体，对靶细胞识别具有更好的荧光增强作用，能实现对靶细胞的高灵敏检测。

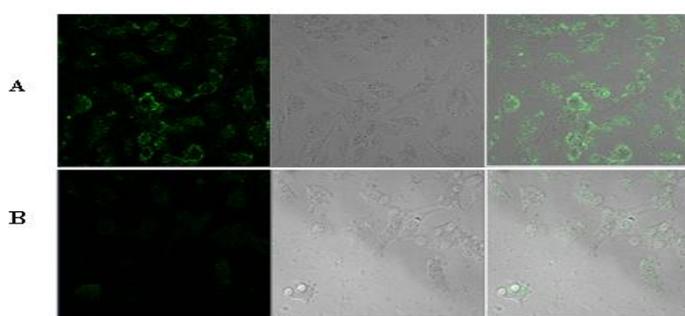


图 1 适体修饰的荧光纳米粒子（A）、适体修饰的羧基荧光素（B）与靶细胞孵育后的激光共聚焦显微镜荧光成像。

关键词： 荧光聚合物纳米粒，大分子表面交链，核酸适体，细胞成像。

厚朴酚与和厚朴酚通过阻断 EGFR 信号通路抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长

张平, 贺晓双, 陈亮, 展颖转, 侯晓芳*

(西安交通大学药学院, 天然血管药物筛选与分析国家地方联合工程研究中心, 西安, 710061)

乳腺癌是女性最为常见的恶性肿瘤之一。大量研究表明, EGFR 与乳腺癌发生发展密切相关, EGFR 基因拷贝数增加或者过度表达, 能促进乳腺癌的发生和转移^[1]。前期通过细胞膜色谱法筛选、分离和鉴定出厚朴中具有抑制乳腺癌细胞增殖的两种有效成分厚朴酚与和厚朴酚^[2], 本文进一步研究两种有效成分对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的影响, 并对两种有效成分干预后的细胞信号转导通路如 EGFR、MAPK/ERK 和 PI3K/AKT 等进行分析, 初步探讨这两种有效成分抗乳腺癌的作用机理, 为深入研究其作用机制奠定基础。首先通过 MTT 法测定厚朴酚与和厚朴酚作用 MDA-MB-231 的吸光度值, 计算细胞抑制率; 其次通过 Western blot 法测定厚朴酚与和厚朴酚作用 MDA-MB-231 细胞后细胞中 EGFR, p-EGFR, ERK1/2, p-ERK1/2, AKT, p-AKT 的表达量。结果表明和厚朴酚和厚朴酚均能够抑制 MDA-MB-231 的增殖, 和厚朴酚能够下调 MDA-MB-231 细胞中 EGFR、p-EGFR、p-ERK1/2 的表达; 厚朴酚对 EGFR、p-EGFR 的表达具有下调作用, 而对 p-ERK1/2 和 p-AKT 无明显的抑制作用。因而得出以下结论: 和厚朴酚能够抑制 EGFR 的活性, 阻断了 EGFR 通路下游的 MAPK 信号通路的作用, 表现出对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制。厚朴酚也通过抑制 EGFR 活性发挥抗乳腺癌细胞增殖的作用。

关键词: 厚朴酚, 和厚朴酚, MDA-MB-231 细胞, 表皮生长因子受体

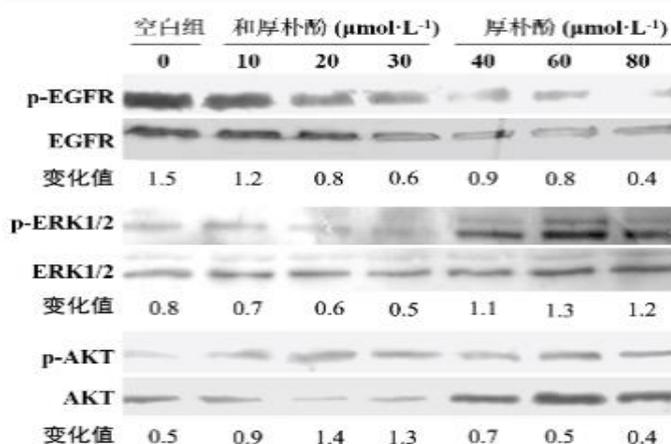


图 1 和厚朴酚与厚朴酚对 MDA-MB-231 细胞蛋白表达的影响

通讯联系人: E-mail: houxiaofang@mail.xjtu.edu.cn

磁性分子印迹材料用于中药活性成分的分离分析

解笑瑜, 卜羽思, 王嗣岑*

(西安交通大学药学院, 天然血管药物筛选与分析国家地方联合工程技术研究中心, 陕西
西安, 710061, E-mail: wangsc@mail.xjtu.edu.cn)

分子印迹技术, 是指以某一特定目标分子为模板, 制备对该分子具有特异选择性聚合物的过程。所制备的分子印迹聚合物 (molecularly imprinting polymers, MIPs) 具有构效预定型、特异识别性和广泛适用性等特点, 因此在固相萃取、色谱分离分析、膜分离、模拟酶、仿生传感器等方面得到了广泛应用^[1]。磁性纳米粒子具有较大的比表面积和独特的物理化学性质, 研究学者们将其与 MIPs 材料相结合, 制备出磁性分子印迹聚合物 (magnetic MIPs, MMIPs)。MMIPs 不但具有 MIPs 的分子识别特性, 同时还可以在外加磁场作用下, 实现吸附材料与基质的快速分离^[2]。中药作为我国的传统医药已经有上千年的历史, 由于其复杂的成分组成, 以及缺乏选择性吸附材料, 传统提取中药中有效化学成分的方法通常耗时较长、效率较低。近年来, 基于 MIPs 材料良好的亲和性和专一选择性能, 将其作为固相萃取材料选择性分离纯化中药复杂体系中的有效生物活性成分, 取得了良好的效果。

本课题组以原儿茶酸 (protocatechuic acid, PA) 为模板, 功能化 Fe_3O_4 磁性粒子为载体, 合成 PA-MMIPs 材料。并对该材料进行物理表征, 同时其吸附性和选择性。然后将 PA-MMIPs 与 HPLC 技术相结合, 在外加磁场作用下, 快速将吸附剂从基质中分离, 可用于中药千年健和锁阳中微量 PA 的富集检测。结果表明, 所建立的分析方法对于中药中的 PA 化合物有良好的分离纯化及提取效果。

关键词: 分子印迹技术; 磁性纳米粒子; 中药; 原儿茶酸

项目资助: 国家自然科学基金 (批准号: 81227802)

中国博士后科学基金 (2014M550501)

细胞色谱法-研究药物与细胞作用的新方法

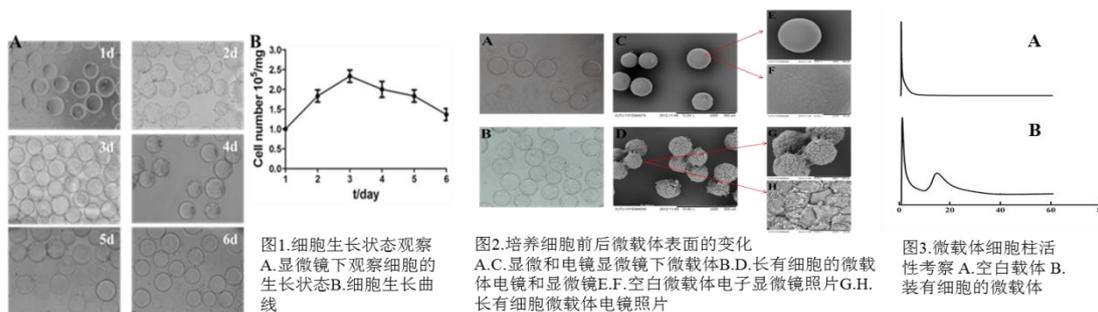
王嗣岑*, 黄静, 魏芬

(西安交通大学药学院, 天然血管药物筛选与分析国家地方联合工程研究中心, 西安)

本文利用药物与细胞作用原理, 将细胞生物学技术、免疫细胞化学固定和色谱技术相结合, 提出一种新的色谱方法-细胞色谱法 (cell chromatography, CC)。以微

载体培养成纤维细胞生长因子受体(Fibroblast growth factor receptor 4, FGFR4)高表达细胞,经多聚甲醛固定后,以微载体培养的细胞连同支撑其生长的微载体作为固定相,利用扫描电镜、表面能谱分析以及免疫细胞化学方法对固定相进行表征。将制备好的细胞固定相湿法装入细胞色谱柱,利用溶质分子与细胞表面的特异性作用力不同进行分离分析的液相色谱方法。以空白微载体柱为对照,考察 FGFR4 选择性拮抗剂 PD173074 在 CC 色谱柱上的色谱行为。结果表明 PD173074 在 FGFR4 细胞柱上有保留,在空白微载体柱上无明显保留。细胞色谱法是在细胞膜(CMC)的基础上建立细胞固定相的制备方法,以贴壁生长的细胞代替 CMC 法中的细胞膜,微载体培养的细胞连同支撑其生长的微载体作为固定相。制备操作简单,反应条件温和,且易于放大。该固定相具有单一完整细胞的特性,保持了细胞原有的基本特性,细胞表面受体也保持基本的空间结构,可用于研究药物与细胞的相互作用。其色谱保留机理和应用方法等研究正在进行中。该方法已申请国家发明专利(公开号:CN 103525801 A)。

关键词: 细胞色谱, FGFR4, 药物与细胞作用



• 通讯联系人: E-mail: wangsc@mail.xjtu.edu.cn

血脂康抑制 HMG-CoA 还原酶活性的定量测定研究

王晶¹, 王晴¹, 孙吉叶², 沙春洁², 段震文³, 刘万卉^{1*}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 绿叶制药集团有限公司, 山东 烟台 264003; 3. 北大维信生物技术有限公司, 北京 10080)

摘要: **目的:** 建立血脂康的活性测定方法,用于血脂康的质量控制研究。**方法:** 建立 HMG-CoA 还原酶酶促反应,即 HMG-CoA 还原酶量为 3.125×10^{-4} U, NADPH 量为 160 nM, HMG-CoA 量为 5 nM, 反应时间为 50 min 的反应体系,加入洛伐他汀酸系列工作溶液,采用 LC/MS/MS 方法测定体系中产物甲羟戊酸的量,计算抑制率,得到洛伐他汀酸溶液浓度-抑制率曲线。加入血脂康样品溶液于酶促反应体系中,根据

抑制率计算血脂康活性成分的含量。**结果:**洛伐他汀酸系列工作溶液浓度为 10~500 ng/mL 范围内抑制效应显著稳定, 准确度和精密度范围分别为 95.28% ~101.53%, 7.08% ~10.51%; 平均加样回收率为 100.25%, RSD 为 2.27%。检测得到血脂康胶囊活性成分的含量以洛伐他汀酸标准品计分别为 4.86 mg/粒、4.71 mg/粒、4.56 mg/粒。**结论:**建立的方法精密度好, 准确度高, 可用于血脂康胶囊的生物活性测定, 酶法测定结果显著高于 HPLC 法的测得值, 推测血脂康中可能有其他成份在同时发挥抑制 HMG-CoA 还原酶的作用。本研究结果对血脂康的质量控制具有指导意义。**关键词:** 血脂康; 活性测定; HMG-CoA 还原酶; 竞争性抑制; 洛伐他汀酸; 洛伐他汀

气相色谱法测定生物样品中短链脂肪酸的含量

王艳芳, 林佩, 陆建美, 俞捷*

(云南中医学院, 昆明, 650500, 云南省)

摘要:建立了用气相色谱仪检测生物样品中短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸)的定性定量方法。结果表明, 该方法在 16min 内可以分离出生物样品中 3 中短链脂肪酸, 稳定性相对标准偏差 2.89%~3.80%; 回收率 93.26%~101.89%, 相对标准偏差 4.00%~4.88%。该方法分析短链脂肪酸快速、准确, 无需对样品进行衍生化, 为 SCFA 的研究领域提供可靠的技术手段。

关键词: 短链脂肪酸; 生物样品; 气相色谱法

Gas Chromatography determination the content of Short-chain Fatty Acids in Biological Samples

WANG Yan-fang, LIN Pei, LU Jian-mei, YU Jie*

(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: In this paper, a gas chromatographic method was developed for the determination of SCFA(acetic acid, propionic acid, butyric acid) in biological samples. Results show that three SCFA in biological samples were separated in 16.0 min. The stability of relative standard deviation is 2.89% ~ 2.89%; The recoveries were 93.26% ~ 93.26%, relative standard deviation is 4.00% ~ 4.88%. The method is rapid and accurate analysis of short chain fatty acids, don't need to make derivatives, provide reliable technology for research field of SCFA.

KEY WORDS: Short-chain Fatty Acids; biological samples; Gas Chromatography

Antitumor effects and molecular mechanisms of DYC-160 on HepG-2 Cells

*Chunyun Lu, Lifeng Niu, Feifei Zuo, Ke Yao, Shaobo Xu, Xia Xu**

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the predominant type of liver cancer which is the sixth most common cancer in the world. Due to the complexity of the pathogenesis of liver cancer, little is known, so currently there is no effective treatment strategies for hepatocellular carcinoma. Surgical resection, liver transplantation, and radiofrequency ablation are still the first line therapeutic strategies for HCC. However, these therapies are not suitable for patients with advanced HCC. Moreover, among all factors resulting in the ultimate failure of cancer treatment, drug resistance is a significant player. Thus, an urgent goal is to find new molecules with novel mechanisms of action as most anticancer drugs are ineffective due to drug resistance for the treatment of HCC. DYC-160 is one of the newly synthesized 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids which have potent anti-tumor effects on HepG-2 cells. This study was designed to investigate its antitumor effect and underlying mechanisms in HepG-2 cells. The anti-proliferation effects of DYC-160 on HepG-2 cells were detected by MTT assay method, and flow cytometric analysis was used to detect apoptosis for cultured cells. To further investigate the molecular basis for DYC-160-induced apoptosis in HepG-2 cells, the related proteins were assayed by western-blotting. The study results showed that DYC-160 could inhibit the proliferation of HepG-2 cells in a dose- and time-dependent manner and cause cell-cycle arrest in the G2/M phase. In the treatments with DYC-160, the IC50 at 24 hour was 8.98 μ g/mL while the IC50 was obtained at a concentration of 5.58 μ g/mL at 48 hour, and 3.69 μ g/mL at 72h. To investigate the mechanism behind this cell cycle arrest, proteins involved in regulating cell cycles were assayed by Western blot. Treatment induced an accumulation of cyclinB1 and p-cdc2 and a decreased of cyclinD1 expression. Analysis of apoptosis proteins indicated that DYC-160 significantly up regulated the expressions of caspase9 and Bax/Bcl-2. These results suggested that DYC-160 has potent anti-tumor effects on HepG-2 and the apoptosis induced by DYC-160 may be mediated by the intrinsic mitochondrial pathway.

Key words: antitumor effect, apoptosis, molecular mechanisms, metabolic enzymes

The effect of anti-tumor drug delivery carrier fullerene modified by hyaluronic acid on phase I enzymes and Peroxiredoxin II antioxidant enzymes

Shaobo Xu, Ke Yao, Zhiyuan Tan, Xiaoyang Xu, Shuangyan Wei, Lifeng Niu, Chunyun Lu, Feifei Zuo, Xia Xu

Abstract: Recently, fullerenes have attract more and more attention form people of pharmaceutical

field as a drug transport carrier, which also arouses a matter of safety evaluation in vivo, because of the influence of fullerenes on phase I enzymes CYP450 or antioxidant enzyme involved in drug resistance in tumour cell. There are three major P450 enzymes gene families, CYP1, CYP2 and CYP3, and the amount of enzyme associated with drug-metabolizing is closed to 90% of the total enzymes. Hence, it is essential to research the impact of fullerene on three gene families. Peroxiredoxin II antioxidant enzyme, as a peroxidase, is belonging to the antioxidant protein superfamily, and exists widely among eukaryotes and prokaryotes. Prx II antioxidant enzymes more expressed in certain tumor cells, but nothing to the expression and prognosis of tumor. Prx II gene is related to the drug resistance of tumor cells, for example, tumor cells are able to resist the damage of cis-platinum after transfecting the Prx II gene into them. That is to say, Prx II is closely related to the formation of tumors and its drug resistance. The effect of antitumor deliver medication carrier fullerenes modified by hyaluronic acid (C60-HA) on CYP450 and antioxidant enzymes Peroxiredoxin II were studied in this page. The interactions between the fullerenes modified by hyaluronic acid (C60-HA) or by artemisinin (C60-HA-ART) and Peroxiredoxin II were researched by ultraviolet spectrophotometry, fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. Meanwhile, the rat liver microsome in vitro was incubated as a model to imitate the drug metabolic reaction in vivo to study the effects of different concentrations of functional fullerene on CYP450 enzymes. The activity of CYP450 enzymes was valued by determining the change of substrate concentration. The results show that the effect of endogenous fluorescent fluorescence quenching of Peroxiredoxin II could be produced by C60-HA. And two fluorescence quenching model- dynamic quenching and static quenching may be existed at same time. The result of static quenching of the C60-HA-ART against the Peroxiredoxin II owned to the complex formed by them when the fullerene was in certain range concentration. And the results of effect on the CYP450 by fullerenes revealed that the activity of CYP450 enzymes was not varied after the interaction with the functional fullerene within proper concentrations, which lay a solid foundation for assessment of toxicity and application of fulleneres in nanomedicine.

Key words: functional fullerene; CYP450 enzymes; metabolic activity; Peroxiredoxin II

荸荠多糖 BQ-I 的制备表征及活性分析研究

马湘炜 戚程程 张嵩 阳娇娇 王秋萍 葛建*

(中国计量学院 药学系 杭州 310018)

摘要 目的: 提取和纯化荸荠多糖, 并研究荸荠多糖的单糖组成以及平均分子量, 进而阐明荸荠多糖对酒精体内过程的影响。**方法:** 用纯水提取荸荠球茎粗多糖, 经 Sevage 法反复去除蛋白, 95%乙醇沉淀多糖; 经 DEAE-52 和 Sephadex G-100 层析柱

纯化后得纯化荸荠多糖 BQ-I；经完全酸水解、PMP 衍生化后进 RP-HPLC 检测，利用单糖标准品定性和定量 BQ-I 的单糖组成；利用配有十八角度激光散射仪和示差检测器的 HPLC 检测其平均分子量；分别利用瓦勒—霍赫法于体外和体内检测了 BQ-I 对乙醇脱氢酶的激活率，最后开展了 BQ-I 对小鼠体内乙醇代谢动力学的影响。结果：检测结果表明 BQ-I 是由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成，其组成摩尔百分比分别为 0.71%、10%、0.71%、82.56%、3.99%以及 2.04%。其 M_n （数均分子量）为 1.137×10^7 ， M_w （重均分子量）为 1.461×10^7 ，其多分散指数为 1.285。BQ-I 对乙醇脱氢酶体外激活率为 62.78%，体内大剂量灌胃后 1.5h 酶激活率为 41.17%，BQ-I 预防给药组乙醇消除半衰期为 2.31h，模型对照组为 3.79h。结论：本研究结果表明 BQ-I 主要由葡萄糖、鼠李糖、半乳糖以及阿拉伯糖组成，其多分散指数较小说明分子量分布范围较窄；对乙醇代谢酶和消除半衰期具有显著影响。

关键词 荸荠；多糖；结构分析；乙醇代谢

通讯作者：葛建，男，汉族，（1979-），安徽蚌埠人，博士后，副教授，硕士生导师，从事天然提取物及其活性相关研究，E-mail:gejian16888@163.com

课题资助：国家级大学生创新创业训练计划项目资助（201410356011）

Separation, structural analysis and antialcoholism activity of BQ-I polysaccharide from *Chinese water chestnut*

Ma Xiangwei, Qi Chengcheng, Zhang He, Yang Jiaojiao, Wang Qiuping, Ge Jian*
(Department of Pharmacy, China Jiliang University, Hangzhou, 310018)

Abstract: Objective: This study aimed to extract and purify polysaccharide from Chinese water chestnut and determine the monosaccharide composition and the average molecular weight of polysaccharide. Then the alcohol excretion was also clarified in rat after oral administration by polysaccharide from Chinese water chestnut. **Methods:** The coarse polysaccharide was extracted from water chestnut corm by pure water. And the protein was removed repeatedly by the method of Sevage and coarse polysaccharide was precipitated by 95% ethanol. Then the purified polysaccharide (BQ-I) was separated by DEAE-52 and Sephadex G-100 column chromatography. On the basement of complete acid hydrolysis and PMP derivatization, the BQ-I composition was qualified and quantified by RP - HPLC according to monosaccharide standards. And the average molecular weight of BQ-I was detected by the HPLC equipped with Eighteen Angle laser scattering apparatus and refractometer. The improved Valle & Hoch method was used to detect the effect of BQ-I on alcohol dehydrogenase (ADH) activity in vitro and in vivo, respectively. At last, the effect of BQ-I on the kinetics of ethanol elimination in mice. **Results:** The detected results showed that

BQ-I was mainly composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. And its molar percentages were 0.71%, 10%, 0.71%, 82.56%, 3.99% and 2.04%, respectively. Its number-average molar mass (M_n) and weight-average molar mass (M_w) were 1.137×10^7 and 1.461×10^7 , respectively. So the dispersion index was 1.285. The ADH activation rate by BQ-I in vitro was 62.78% and enzyme activation rate in vivo was 41.17% at 1.5h after oral administration with the large dose of BQ-I. And the ethanol elimination half-life was 2.31h in the BQ-I pre-treated group, while it is 3.79h in the model control group. **Conclusion:** The study results showed that BQ-I mainly consisted of glucose, rhamnose, galactose and arabinose and its small dispersion index suggested the molecular weight distribution range was narrow. The BQ-I had significant influence on the metabolism enzyme and the elimination of alcohol.

Key words: Chinese water chestnut, Polysaccharide, Structural analysis, Alcohol metabolism

葡萄籽原花色素 (GSP) 对胆汁酸吸附能力及调控脂质代谢机制分析

邱作洪 何倩慧 刘彩婧 姜慧文 杨斌英 葛建*

(中国计量学院 药学系 杭州 310018)

摘要: 在葡萄籽原花色素(GSP)结构表征基础上, 利用体外模拟人体消化环境, 以考来烯胺作为阳性对照, 测定了 GSP 对人体 6 种胆酸盐的体外结合能力及其影响因素, 同时检测了 GSP 血清代谢产物及对胆汁酸跨膜转运的影响, 最后分析了 GSP 对高血脂模型大鼠血脂代谢的调控机制。研究结果显示, GSP 纯度 95% 以上, 以儿茶素表征的平均聚合度为 4.19, UPLC-TOF/MS 检测显示 GSP 主要由儿茶素 C 或 EC 聚合而成; 除胆酸钠(SC)外, GSP 对其他 5 种胆酸盐吸附率均较高, 平均吸附率 >60%; 当溶液 pH 值为 7.38 时, GSP 对结合型胆酸盐的结合能力最强, 不同基质影响较小, 其中 GSP 对牛磺胆酸钠 (STC)、甘氨酸胆酸钠 (SGC)、甘氨酸鹅脱氧胆酸 (GCDA)、牛磺脱氧胆酸 (ST) 和牛磺石胆酸 (EA) 的平均吸附率分别是考来烯胺的 78.99%、90.14%、62.47%、93.48% 及 82.00%; UPLC-TOF/MS 检测显示大鼠血清未鉴定出 GSP 降解产物; RP-HPLC 检测显示 GSP 能够显著抑制胆汁酸在 Caco-2 细胞的跨膜转运; 高脂模型大鼠脂质代谢结果显示血清中 TC、TG 及 LDL-C 含量与模型组相比显著下降 ($P < 0.05$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$), 肝脏组织 HE 染色显示 GSP 组肝细胞脂肪变性明显改善, 肝细胞排列整齐。因此, 上述研究结果表明 GSP 调控脂质代谢的机制可能为对肠道中胆汁酸的吸附, 抑制胆汁酸重吸收, 从而发挥对脂代谢调控功能, 至于 GSP 影响胆汁酸代谢的深层次分子信号通路机制, 将进一步探索。

关键词: 葡萄籽原花色素 (GSP); 胆汁酸; 结合能力; 转运抑制; 脂质代谢调控机制

课题资助：国家自然科学基金资助（31100499）；国家级大学生创新创业训练计划项目资助（201410356011）

Binding ability of grape seed proanthocyanidin (GSP) to bile salts and its regulation mechanism on the lipids metabolism in rats

Qiu Zuohong He Qianhui Liu Caijing Jiang Huiwen Yang Binying Ge Jian*
(Department of Pharmacy, China Jiliang University, Hangzhou, 310018)

Abstract: Basing on the structural characterization of GSP and using the simulation system of human digestive environment in vitro and the cholestyramine as a positive control reagent, the adsorption capacities of GSP to six bile acids was detected and evaluated by spectrophotometric method (UV-Vis). Then rat serum metabolites were detected by LC-TOF/MS method after oral administration of GSP at the dose of 2g/kg body weight. And on the basement of using Caco-2 cell, the permeability of bile acids was determined and evaluated with GSP. Lastly, the regulation mechanism of GSP to lipid metabolism was analyzed in the rats with high-fat diet during 30 days. The study results showed that total proanthocyanidin content and average degree of polymerization calculated as catechin equivalent were 95% and 4.19, respectively. And the structural units of GSP identified by UPLC-TOF/MS mainly consisted of catechins. Then the average adsorption rates of GSP to six bile acids were all more than 60%, except for sodium cholate (SC). And the adsorption rate to conjugated bile acids was highest in the reactive system with pH values of 7.38 and no effect from food matrix was exhibited. Compared to cholestyramine, the relative adsorption rates of GSP with STC, SGC, GCDA, ST and EA were 78.99%, 90.14%, 62.47%, 93.48% and 82.00%, respectively. Then no metabolites were identified in rat serum after oral GSP. The Caco-2 experiment results showed that the transmembrane transport of bile acids was partly inhibited by GSP. At last, the lipid metabolism results revealed that the rat serum TC, TG and LDL-C levels in GSP-treated group were significantly decreased than the levels in high-fat diet group, while the serum HDL-C level was markedly increased. And the H&E staining showed that hepatic steatosis was attenuated and hepatocyte arranged orderly. All the above research results showed that regulation mechanism of lipid metabolism by GSP was at least partly attributed to their binding capacity to bile acids in small intestine. So the bile acid reabsorption was prevented and exhibited the regulation function on the lipid metabolism. And the in-depth molecule mechanism about the effect of GSP on the bile acid metabolism need more study.

Key words: Grape seed proanthocyanidin; Bile salts; Binding capacity; Transportation inhibition; Regulation mechanism of lipid metabolism

尿样中儿茶酚胺类物质及其代谢物的 HPLC-ECD 含量测定研究

廖雪琴, 蔡婉玲, 谭梦茹, 刘琳, 陶凯丽, 冯芳*, 杨功俊*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室,
江苏 南京 210009)

嗜铬细胞瘤是由肾上腺髓质嗜铬细胞病变引起的，会分泌大量的儿茶酚胺类物质，临床表现有阵发性或持续性高血压、头痛、心悸、焦虑、出汗和高血糖症。去甲变肾上腺素（normetanephrine）和间甲肾上腺素（metanephrine）是儿茶酚胺类物质（如多巴胺、甲肾上腺素和肾上腺素）的甲氧基代谢产物。因此，测定血样或尿样中的茶酚胺类物质及其代谢物的含量是作为诊断嗜铬细胞瘤的重要手段之一。由于儿茶酚胺及其代谢产物具有氧化还原活性，检测器可以采用灵敏度和专属性较高的电化学检测器（ECD）。传统的液相方法采用离子对色谱延长保留时间使各类化合物得到分离，但由于离子对色谱有平衡时间过长，对色谱柱和仪器的损伤较大，不适用于梯度洗脱，以及后出峰的峰型不佳等缺点，因此本论文通过改进方法建立了尿样中儿茶酚胺及其代谢物的 SPE-HPLC-ECD 测定方法。采用阳离子交换固相萃取柱对尿样进行预处理，色谱分离使用 XCharge-C₁₈ 改性色谱柱，以 0.2% 三氟乙酸水溶液为流动相，流速 1.0mL/min，检测电压为+0.8V。在最佳实验条件下，甲肾上腺素、肾上腺素、去甲变肾上腺素和间甲肾上腺素均得到良好的分离，各组分浓度与其峰面积呈良好线性关系，相关系数均大于 0.99，回收率在 75.22%~116.35% 之间，该方法具有良好的准确度和重现性，灵敏度高。采用 HPLC-ECD 的方法实现了尿样中电活性物质测定，获得满意结果，可以为嗜铬细胞瘤临床诊断提供依据。

关键词：高效液相色谱，电化学检测，嗜铬细胞瘤，间甲肾上腺素

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 21275162)，江苏省“青蓝工程”资助，江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通讯联系：E-mail: yanggongjun888@163.com, gjyang@cpu.edu.cn,
fengfang1@126.com

钩藤散抗阿尔兹海默症活性部位及成分研究

魏梦琳 陈垒 赵娇娇 柳文媛* 冯锋*

（中国药科大学）

摘要：钩藤散由钩藤、陈皮、半夏、麦冬、茯苓、人参、菊花、防风、甘草和生姜共 11 味中药材构成，是一种传统中药复方，用于治疗头痛、晕眩和高血压等。现代临床和药理学研究证明钩藤散对于各种类型的痴呆症均有显著疗效。虽然已经有文献对于钩藤散治疗缺血、糖尿病和衰老等因素引起的痴呆症的原理和机制进行报道，但

对其治疗阿尔兹海默症的物质基础还尚不清楚。本研究的目的在于简化复杂的钩藤散处方,并对钩藤散中抗阿尔兹海默的活性成分做出鉴定。我们首先采用系统溶剂提取法对药材混合物进行提取,水层使用不同比例的乙醇经大孔树脂洗脱将其按照极性顺序分为若干个部位。由于 β 淀粉样蛋白($A\beta$)的异常沉积是阿尔茨海默病主要发病机制之一,我们通过PC12细胞建立 $A\beta$ 损伤模型,以MTT法测定细胞存活率,来筛选钩藤散各部位的神经保护活性。结果发现钩藤散乙酸乙酯部位预防性给药后,细胞存活率最高,活性最好。进一步测定钩藤散乙酸乙酯部位对细胞内活性氧产生的作用,发现钩藤散乙酸乙酯部位的神经保护作用可能来自于其抗氧化能力。最终通过高效液相色谱法联用三重四级杆串联飞行时间质谱法,对钩藤散乙酸乙酯部位进行定性分析,鉴定出其中来自7味中药材的51种成分,活性成分可能主要为钩藤中的生物碱类、菊花中的酚酸类、陈皮和甘草中的黄酮和黄酮苷类化合物。

关键词: 钩藤散; 阿尔兹海默症; β 淀粉样蛋白; PC12细胞; 液质联用

无对照品辅助的 HPLC-DAD-ESI/MS (TOF)和 HPLC-DAD-ESI/MS/MS (QqQ)鉴别栀子大黄汤中 85 种化合物

邹玲玲, 罗凯文, 谢瑞, 史清水*, 杨功俊*, 冯芳*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏南京 210009)

栀子大黄汤在我国已经使用了近两千年。由于方剂中共存成分复杂,人们对其化学成分的认识需要经历一个由浅入深、逐渐完善的过程。本研究通过有机组合 HPLC-DAD-ESI/MS (TOF)及 HPLC-DAD-ESI/MS/MS (QqQ)技术,在无需对照品的情况下,对栀子大黄汤中的 85 种化合物进行了有效的分离鉴定和结构解析。首先通过 TOF/MS 正/负离子模式获得化合物的准分子离子及精密质量,然后通过 QqQ/MS 的产物离子扫描和/或调解 TOF/MS 毛细管出口处的电压获得相应化合物的碎片离子;在此基础上,结合各化合物的色谱保留时间、紫外吸收特征和质谱信息,对栀子大黄汤中的化合物进行了鉴别归属。对 6 类化合物的裂解行为的研究,进一步验证了质谱鉴定结论。当采用 TOF/MS 对黄烷酮 7-O-二糖苷类化合物进行质谱裂解时, B 环 4'位有羟基取代的化合物容易在 C 环键 1 和键 3 处发生逆狄尔斯-阿德尔反应,生成特征的碎片离子;当环 B 环 4'位被甲基取代时,检测不到相应的特征离子。实验同

时比较了四味组方药材（栀子、大黄、枳实、淡豆豉）与栀子大黄汤的化学成分，发现 3-sinapoyl-5-caffeoylquinic acid, 4-sinapoyl-3-caffeoylquinic acid 和 sinapylglucoside 这三种化合物只出现在栀子大黄汤的图谱中，说明四味组方药材在合煎过程中产生了化合物组成的变化。本研究的结果为栀子大黄汤的临床合理给药及后续体内研究提供了基础和依据。

关键词：栀子大黄汤；成分鉴别；TOF/MS；QqQ/MS；裂解规律

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 81274063)，江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通讯联系：E-mail: fengfang1@126.com, yaoxuefengfang@163.com,
yanggongjun888@163.com

P-糖蛋白对石杉碱甲跨血脑屏障转运的影响

汪胡芳^{1,2}，冯超^{1,3}，张峻颖²，吴春勇^{1,3}

(1. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京 210009；2. 中国药科大学中药制剂教研室，江苏 南京 211198；3. 中国药科大学药物分析教研室，江苏 南京 210009)

石杉碱甲是石松科植物蛇足石杉中的主要活性成分，临床上用于治疗阿尔兹海默症、血管性痴呆及改善患者的认知功能和记忆能力。本文旨在从细胞和动物水平分析探讨石杉碱甲的跨血脑屏障转运机制。试验建立了 HPLC-MS/MS 法测定转运缓冲液、小鼠血浆和脑组织中石杉碱甲的浓度，方法灵敏度高、准确性好、符合生物样品的分析要求。采用高表达 P-糖蛋白 (P-gp) 的细胞 (MDR1-MDCKII) 及阴性对照细胞 (MOCK-MDCKII) 分别构建体外细胞单层跨膜转运模型，测定石杉碱甲的双向转运，结果表明石杉碱甲在 MDR1-MDCKII 细胞中的外排率 (B→A 转运/A→B 转运) 是 MOCK-MDCKII 细胞的 4.96 倍；同时加入 P-gp 抑制剂环孢菌素 A 后，外排率明显下降。ICR 小鼠分别灌胃 100 mg kg⁻¹ P-gp 抑制剂 GF120918 (抑制组) 和空白溶剂 (对照组) 2 h 后，灌胃给药石杉碱甲 (2 mg kg⁻¹)，结果表明给药 60, 90, 120, 180 和 240 min 后，抑制组小鼠脑组织中石杉碱甲的浓度分别是对照组的 2.03, 2.69, 2.78, 3.92 和 2.85 倍；抑制组的脑/血分配系数 $K_{p,brain}$ 是对照组的 2.05 倍。采用小鼠原位脑灌注技术灌注给药石杉碱甲 (2 μmol·L⁻¹) 1 min，石杉碱甲可跨过血脑屏障进入脑实质；灌注液中加入 GF120918 (10 μmol·L⁻¹) 后石杉碱甲向脑组织的转运显著增加。

本研究首次发现石杉碱甲是 P-gp 的底物,小鼠血脑屏障上的 P-gp 对石杉碱甲的脑分布有明显的阻碍作用,可能是限制石杉碱甲在中枢神经系统发挥药效的关键因素。研究不仅阐明了石杉碱甲与 P-gp 相互作用的分子机制,同时为预测药物相互作用、指导临床安全合理用药、及针对药代特性进行新药结构改造提供了科学依据。

关键词: 石杉碱甲; 血脑屏障; P-糖蛋白

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202989, 81102819); 江苏省自然科学基金项目(BK2012358); 药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题(DQCP2015MS07)

抗肿瘤药物组织微区分布的质谱成像定量分析方法研究

宋肖炜 罗志刚 贺玖明 李铁钢 夏学军 刘玉玲 再帕尔·阿不力孜*

(中国医学科学院/北京协和医学院 药物研究所,
天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 100050)

提高药物向靶器官组织的转运,延长其在靶区域作用时间,是研制新型靶向抗肿瘤药物的重要目标。探究药物在体内组织微区的分布、消除等过程,对分析技术方法提出了更高的挑战。LC-MS/MS 方法针对生物组织进行匀浆、萃取、富集等预处理,所测药物含量是该药物分子在某一器官组织中的“平均水平”,丢失了药物在器官亚结构层次的分布和含量信息。空气动力辅助离子化质谱成像技术(AFAI-MSI)可获取药物在整体动物中不同器官组织中的相对含量及空间分布信息,但仅通过离子强度难以准确反映药物在组织中的绝对含量。

在前期研究基础上,本研究采用“生物组织沉积法”制备已知浓度的模拟生物组织样品,以建立基于成像分析的标准曲线;同时在进行检测时尽可能缩小质荷比采集窗,增加离子注入数目、离子注入时间等,提高低含量、低响应药物的检出灵敏度;利用质谱的高分辨性能排除内源性代谢物的干扰;并通过降低载样平台移动速度和提高质量分析器的谱图采集速度,提高成像分析的空间分辨率。通过本项研究,建立了一种定量质谱成像方法(QMSI),可获取实际生物样本中组织微区的药物绝对含量和分布信息。

利用上述方法对基于 LipEmul 载药脂肪乳技术构建的紫杉醇新型乳剂、市售紫杉醇普通注射液(紫素)、紫杉醇注射用混悬液(白蛋白结合型)、紫杉醇脂质体 4 种药物制剂在裸鼠移植肿瘤模型中分布变化进行了考察。结果表明:在器官水平,紫杉

醇主要分布于肿瘤、肝、肾、肺、脾；在组织亚区域水平，可观察到紫杉醇集中分布于肿瘤新生组织区，肾脏中主要分布于肾皮质区，而在肝、肺、脾中未出现明显的微区分布差异。注射给药后，药物在 15 min 时即可达到肿瘤组织，在 3 h 附近达峰，5 天时仍未在肿瘤组织内彻底清除，4 种紫杉醇制剂均能迅速达到靶组织且具有缓释效果。肿瘤组织中紫杉醇检出量由高到低依次为：乳剂、白蛋白、紫素、脂质体。

建立的质谱成像定量分析方法，在一定程度上解决了质谱成像技术的定量分析难题，可获得药物在组织微区的分布或作用机制研究的定量信息，有望为新型抗肿瘤药物研发提供一种新型检测手段。

关键词 空气动力辅助离子化技术 质谱成像 定量分析 紫杉醇 组织微区分布

药物安全性分析

基于雷公藤配伍前后雷公藤内酯酮的含量变化探讨其减毒的理论机制

唐利宇¹, 孟楣^{1,2*}, 张贺¹, 江莹¹, 许坡¹, 张静¹, 王芳¹

(1.安徽中医药大学, 安徽合肥 230031 ; 2.安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽合肥 230031)

摘要: **目的** 以雷公藤内酯酮为指标, 考察黄芪配伍雷公藤前后的雷公藤毒性成分的含量变化, 以期推断其可能配伍减毒机制。 **方法** 利用高效液相色谱法(HPLC)比较分析黄芪配伍雷公藤前后毒性成分雷公藤内酯酮含量变化, 从化学成分层次分析其减毒的物质基础变化, 并结合中药七情中“相畏相杀”理论, 推断其可能配伍减毒机制。 **结果** 临床以黄芪配伍雷公藤, 使其共同形成一种相互对立、相互依存、缺一不可的相畏相杀关系, 达到相制相成、存利除弊、调偏、制毒的目的。 **结论** 黄芪与雷公藤配伍可降低雷公藤毒性。

关键词: 雷公藤内酯酮; 黄芪; 高效液相色谱法; 相畏相杀

Discussion on the Mechanism of Reducing Poison Based on the Content Changes of Triptonide Before and After Compatibility

TANG Li-yu¹, MENG Mei^{1,2*}, ZHANG He¹, JIANG Ying¹, XU Po¹,
ZHANG Jing¹, WANG Fang¹,

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China 2. The First Hospital Affiliated to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

ABSTRACT: Objective Investigate the contents of the toxic constituents of the Astragalus in the compatibility of Radix Astragalus and radix in order to infer the possible compatibility of the mechanism. **Method** Using high-performance liquid phase chromatography (HPLC), We compare to analysis the content changes of Triptonide before and after Compatibility, base on the chemical component level to analysis the reduction of toxic material foundation for change, combined with traditional Chinese medicine “The Fear to Death” Theory to infer the possible compatibility attenuated mechanism. **Results** When Astragalus mongholicus compatibility with the hook, it forms a kind of relationship which is mutual antagonism and interdependence, fear to death to achieve the purpose of reducing poison. **Conclusion** The compatibility of and Tripterygium wilfordii can decrease the toxicity of the hook.

KEY WORDS: Triptonide; astragalus; HPLC; The fear to death

液质联用测定佐剂性关节炎大鼠血浆中芍药苷浓度及其药代动力学研究

李淑萍, 吴虹*, 王伟, 孙亮亮, 汪蓉, 王文字, 张峥嵘, 戴丽

(安徽中医药大学药学院, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥, 230012)

目的: 建立超高效液相色谱-电喷雾离子源-质谱串联法 (ultra-high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass/mass spectrometric, UHPLC-ESI-MS/MS) 测定佐剂性关节炎 (Adjuvant arthritis, AA) 大鼠血浆中芍药苷 (Paeoniflorin, Pae) 浓度, 研究 Pae 在 AA 大鼠体内的药代动力学特征。**方法:** 以栀子苷 (Geniposide, GE) 为内标 (Internal standard, IS), 采用 ACQUITY UPLC™ HSS C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (0.1% 甲酸) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 25 °C; 使用电喷雾离子源 (ESI), 在多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 负离子模式下, Pae 和 IS 的离子对分别为 m/z 479.4 → 449.0, m/z 387.4 → 122.4。考察高 (120 mg/kg)、中 (60 mg/kg)、低 (30 mg/kg) 三个剂量的 Pae 口服灌胃给药后各个时间点的血药浓度, 将血药浓度-时间 (C-t) 数据经 DAS 2.0 软件拟合, 进行房室模型的判别及其药代动力学参数的计算。**结果:** AA 大鼠血浆中 Pae 在 2~2500 ng/mL 范围内线性关系良好 ($R^2=0.9992$), 定量下限为 2 ng/mL, Pae 在高、中、低 3 个浓度的日间、日内精密度 (RSD) 均 < 8.6%, 血浆样品的冻融、短期和长期稳定性 (RSD) 均 < 5.7%, Pae 与 IS 的平均提取回收率分别为 98.4% 和 95.1%, 平均基质效应为 101.5% 和 97.3%, 即 AA 大鼠血浆中内源性物质对测定无干扰。Pae 的血药浓度-时间曲线符合二室模型, 且 C_{max} 和 AUC_{0-24 h} 显示良好的剂量相关性。**结论:** 建立的以 GE 为 IS 的 UHPLC-ESI-MS/MS 方法, 操作简便、快速、专属性强, 灵敏度高, 可应用于 Pae 在 AA 大鼠体内血药浓度的测定及其药代动力学研究。**关键词:** 芍药苷; UHPLC-ESI-MS/MS; 佐剂性关节炎大鼠; 药代动力学

LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽

李长坤 李月琪 杨桂香 黄涛宏

(岛津企业管理 (中国) 有限公司分析中心北京 100050)

摘要: 糖尿病, 尤其是 II 型糖尿病是威胁人类健康的重大疾病, 传统的治疗药物磺酰脲类和双胍类不仅副作用较大, 而且对某些患者治疗效果有限; 人体分泌的胰高

血糖素样肽(GLP-1)在血糖浓度较高的情况下能促进胰岛素分泌,而在血糖正常时则无此作用,而且其很容易被体内的二肽酶降解,体内半衰期不足2分钟,因此其作为临床药物使用受到了限制。后来人们发现一种从墨西哥巨蜥的毒液中分离得到的含39个氨基酸的多肽艾塞那肽与胰高血糖素样肽具有同源性,而且有同样的促胰岛素分泌的功能,稳定性好,在II型糖尿病治疗方面具有良好的临床应用前景。

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中艾塞那肽的方法。该多肽化合物的线性良好,判定系数大于 0.993;重复性实验结果表明:其保留时间和峰面积相对标准偏差分别为 0.03% 和 4.21~4.67%之间,仪器精密度良好;其仪器检出限为 0.01 ng/mL,定量限为 0.03 ng/mL;样品加标相对回收率在 30.4 ~ 34.8%之间。该方法在血浆基质中灵敏度高分析速度快可以快速、灵敏地测定大鼠血浆中的艾塞那肽。

关键词: 超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪;艾塞那肽;大鼠血浆

LCMS 测定毛发中的甲基苯丙胺含量

马超 李月琪 杨桂香 黄涛宏

(岛津企业管理(中国)有限公司分析中心北京 100050)

摘要: 甲基苯丙胺俗称冰毒,是苯丙胺类毒品中重要的一种。苯丙胺类毒品是一类具有强烈兴奋作用、食欲抑制作用以及温和致幻作用的物质,属于违禁毒品。近年来苯丙胺类物质的滥用成增长趋势,超过了传统的海洛因及可卡因等非法精神活性物质,且滥用苯丙胺类毒品易引发许多社会问题。检验一个人是否吸食苯丙胺类毒品,通常是通过毛发和体液。过去研究较多的是血、尿等生物检材,但是血和尿检材只能反映收集样品前的1~3天中的毒品服用情况,而毛发则具有易获取、稳定、易保存及不易作假等优点,而且它可提供吸毒者的毒品使用史及使用程度的信息,因此毛发检材的使用越来越受到法庭科学以及药物分析工作者的重视。

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定毛发中的甲基苯丙胺含量的方法。样品制成碎屑后在浓盐酸中水解,乙酸乙酯萃取后,经过净化浓缩上机分析。实验结果表明:在 1.0 ng/mL~500.0 ng/mL 的线性范围内,校准曲线相关系数为 0.9999;低浓度下标样连续 6 次进样,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别 0.186%和 4.072%;标准样品的仪器检出限和定

量限分别为 0.05 ng/mL 和 0.17 ng/mL。该方法简便快速，且易操作，可用于公安系统对吸毒人员头发中毒品的含量测定及痕量分析。

关键词：超高效液相色谱仪；三重四极杆质谱仪；毛发；甲基苯丙胺

TLC-Dynamic SERS 法快速检测止咳平喘类中成药中非法添加的化学药物

方芳，朱青霞，柴逸峰，陆峰*

（第二军医大学药学院，上海，200433）

摘要：近年来，一些不法商家为了追求经济利益在中成药中违法添加化学药物，不仅对人民群众身体健康带来很大威胁，更是扰乱了药品市场的秩序。因此，急需建立一种快速有效的方法对中成药中违法添加的化学药物进行现场快速检测。本研究提出了一种高灵敏的薄层色谱与动态表面增强拉曼光谱联用(TLC-Dynamic SERS)方法，并用于快速检测止咳平喘类中成药中违法添加的化学药物。先将中成药中可能添加的化学药物在薄层板上进行分离，再在紫外灯下定位斑点，以新型的 50%甘油银胶为动态表面增强拉曼检测基底，然后用便携式拉曼光谱仪进行动态检测。我们以盐酸苯乙双胍作为探针分子考察了不同溶剂对动态 SERS 效应的影响，结果表明 50%甘油能产生更强的 SERS 增强效果，而且 SERS 信号更为稳定。之后，我们将新建立的 TLC 与 Dynamic SERS 联用的方法应用于实际检测，对从市面上收集到的十种止咳平喘类中成药样品进行检测，结果发现其中有一种样品非法添加止咳平喘类化学药物磷酸苯丙哌林。为了进一步确认，将十种止咳平喘类中成药样品用经典的超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱（UPLC-QTOF/MS）方法进行检测，结果发现确实是此样品中添加有磷酸苯丙哌林，此结果与新建立的 TLC-Dynamic SERS 方法一致。通过对比，一方面，TLC-Dynamic SERS 技术与经典的 UPLC-QTOF/MS 技术相比，大大缩短了分析检测的时间，另一方面，TLC-Dynamic SERS 与已有的 TLC-SERS 技术相比，灵敏度提高了 1-2 个数量级。这种高灵敏和稳定性的检测方法对其他类型的掺假药物的检测有很好的借鉴意义，且可以为其他基于 SERS 的实际检测应用提供一定的参考。

关键词：薄层色谱法；动态表面增强拉曼光谱法；甘油；中药非法添加

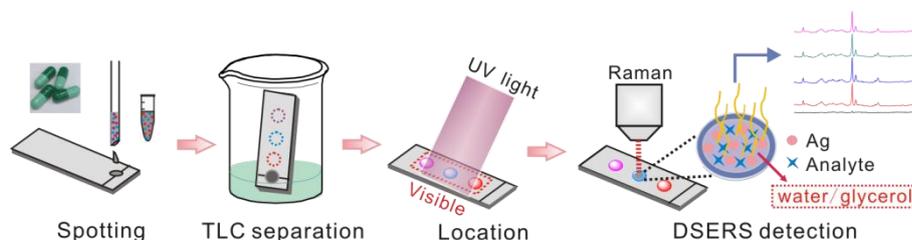


Fig. 1 Schematic illustration of TLC-Dynamic SERS for on-site detection of antitussive and antiasthmatic drugs adulterated in BDS.

投影二维相关光谱快速检测中药中非法添加的化学药品

苗丽，柴逸峰，陆峰*

(第二军医大学药学院，上海，200433)

摘要: 近年来，一些中药生产厂家为了加快其疗效，以谋求高额利益，在中药中非法添加化学药品，这类药品虽然短期内对疾病有一定的治疗效果，但长期服用将严重危害健康。因此，鉴定中药中是否非法添加了化学药品，是药监部门的一项重要工作。相比 HPLC-MS, GC-MS, CE 等传统的方法，红外光谱法因其简单、快速、成本低，在中药非法掺伪的快速检测中具有独特的优势。二维相关分析法与红外光谱相结合，能提高光谱的分辨率，有望实现不分离即分析。但是中药复杂的化学成份导致高度拥挤的二维相关图谱，对判别造成了一定的困难。投影二维相关分析，通过运用矩阵投影与零空间投影操作，能够有效的提取原始二维相关光谱矩阵中的特征信息，简化高度拥挤的二维相关光谱。这里以减肥类中药(SHM)中添加的麻黄碱(Ep)为例，阐述投影二维相关光谱在中成药非法添加化学药品的快速检测中的应用，展示部分实验结果。

以一种阴性减肥类中药（经 LC-MS 检测确实不含麻黄碱）为中药基质，配制含有麻黄碱<10%的模拟阳性药品。分别对标准品，阴性中药与模拟阳性中药进行 KBr 压片，对 KBr 片施加温度扰动，在不同的温度下采集红外光谱图，对数据进行预处理后，选择合适的波数范围和等高线参数作二维相关图。由麻黄碱的一维红外光谱可知 749cm^{-1} 为苯环振动产生的特征峰，在二维相关同步谱中也有体现 Figure 1.(a)，中药基质在 730cm^{-1} 有一个大的峰 Figure 1.(b)，运用投影二维相关分析以后 Figure 1.(c)，麻黄碱的峰被提取出来。作为对照，也对阴性中药基质进行投影二维相关分析 Figure 1.(d)，可以看出没有麻黄碱的特征峰。

关键词: 投影二维相关；红外光谱；中药掺伪

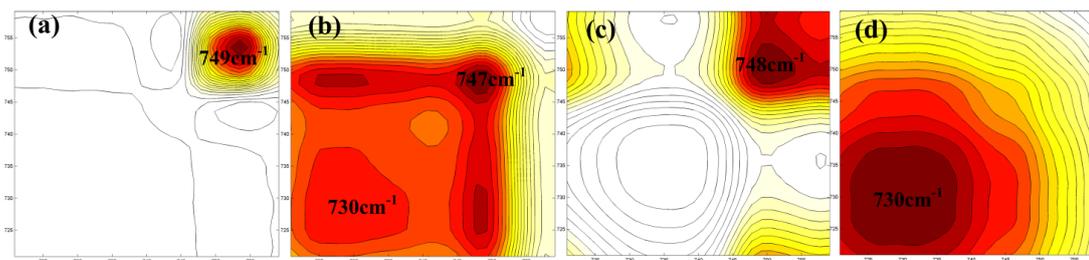


Figure 1. Syn-2DCOS of Ep (a), Syn-2DCOS of 5% positive SHM (b), Syn-Pro-2DCOS of 5% positive SHM (c), Syn-Pro-2DCOS of negative SHM (d)

氟西汀对文拉法辛大鼠体内药代动力学的影响研究

宋林¹, 梁晨², 张润生^{2*}, 洪战英^{1*}, 柴逸峰¹

(1. 中国人民解放军第二军医大学药学院 上海市药物代谢产物研究重点实验室, 上海 200433; 2. 上海市公安局物证鉴定中心, 上海市现场物证重点实验室, 上海 200083)

摘要: 文拉法辛(venlafaxine)是一种新型抗抑郁药, 与传统的三环类抗抑郁药相比, 文拉法辛有相似的药理治疗作用, 且起效快、不良反应少。氟西汀(flouxetine)是一种 5-HT 再摄取抑制剂, 其药效与三环类抗抑郁药类似, 特别适合体衰患者及老年人。有文献报道临床上使用两者联合治疗抑郁症, 由于氟西汀对 CYP2D6 有抑制作用, 如果与文拉法辛联用, 理论上可以增加后者的血药浓度。本研究首先建立了 SPE-GC/MS 法测定大鼠血样中的文拉法辛浓度。血样加 2%氨水碱化后上样预先活化的 C₁₈ 固相萃取柱, 用甲醇洗脱, GC-MS 选择离子监测模式定量。在优化条件下, 内源性物质不影响目标物的定量检测, 文拉法辛在 10~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好 ($r^2=0.9994$), 最低定量限为 10 ng/mL; 该方法的相对回收率在 85~110%之间, 提取回收率大于 50%; 日内、日间精密度 RSD 为 5.0%~10.7%。

通过已建立的 SPE-GC/MS 法, 对大鼠体内文拉法辛的药代动力学特征以及合用氟西汀的影响进行了研究。两组大鼠 (每组六只、雌雄各半) 分别灌胃给药 20mg/kg 文拉法辛、20mg/kg 文拉法辛+10mg/kg 氟西汀, 分别于给药前、给药后 10, 20, 30min 以及 1, 1.5, 2.5, 3.5, 5, 8, 12h 眼眶取血, 所取血样离心取血浆保存于 -20℃。血浆样品经固相萃取后采用 GC/MS 进行分析。结果药-时曲线显示联合给药组的血药浓度均高于单一给药组, 药动学参数显示联合给药组的 C_{max} (0.069 mg/L)、

AUC_{0→∞}(0.291 mg h/L)均大于单一给药组 C_{max}(0.046 mg/L)、AUC_{0→∞}(0.181 mg h/L), 且 *t* 检验结果表明两组数据具有显著性差异, 表明氟西汀对文拉法辛在大鼠体内的药代动力学有显著影响。提示在临床上文拉法辛与氟西汀联用时, 应关注其药物相互作用, 对两者的血药浓度进行监测, 进而合理调整剂量, 以避免药物中毒或产生其他不良反应。

关键词: SPE-GC/MS; 文拉法辛; 氟西汀; 药代动力学; 药物相互作用

基金资助: 上海市刑事科学技术研究院与第二军医大学科研协作项目 (2014)

UPLC-MS/MS 法测定人血浆中左乙拉西坦浓度及药代动力学研究

胡岚岚¹, 周娟¹, 徐颖¹, 刘丹¹, 张惠静², 汤建林¹

(1. 第三军医大学新桥医院临床药理基地, 重庆, 400037; 2. 第三军医大学药学院药物分析与分析化学教研室, 重庆, 400038)

左乙拉西坦是一种相对较新的广谱抗癫痫药物, 由于其结构中有一个不对称的碳原子和两个对映体, 所以与传统的抗癫痫药物不同, 具有全新的治疗机制。虽然左乙拉西坦的确切机制尚不清楚, 但研究表明, 其药理作用与它对神经突触囊泡蛋白的亲合性有重要联系^[1]。左乙拉西坦药代动力学特性与剂量线性相关, 生物利用度接近 100%, 蛋白结合率低于 10%, 在人体肝细胞组织中, 左乙拉西坦无酶诱导作用, 因此它被认为是一种具有理想药代动力学特性的药物^[2]。然而, 在一些特殊人群 (如肾功能不全、孕妇、老年人或儿童) 服用左乙拉西坦时, 临床医生还是推荐通过监测其血药浓度来优化治疗方案。

由于左乙拉西坦紫外吸收良好, 所以目前国内测定其血药浓度的方法主要是紫外检测法, 但这些方法往往出峰时间长, 血浆处理方法繁琐, 且灵敏度较低。本文通过对分析方法的优化, 以 3-氨基-2-萘甲酸为内标, 甲醇沉淀蛋白法处理血浆。色谱柱采用 Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)柱, 流动相: 乙腈和 0.01 mol L⁻¹ 甲酸铵 (pH=3.6), 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL min⁻¹, 分析时间 4min。质谱条件: 电喷雾离子化(ESI)源; 正离子检测模式, 待测物左乙拉西坦和内标的质荷比分别为 m/z 171.3→126.3 和 m/z 188.1→170.2。左乙拉西坦药代动力学采用人体内血药浓度测定法研究。结果表明, 左乙拉西坦在 0.5-128.0 μg mL⁻¹ 的浓度范围内呈线性, 日内、日间精密度分别小于 13.11% 和 11.72%, 基质效应影响较小, 相对回收率在 95.88%-

106.80%之间。口服左乙拉西坦片剂后达峰浓度和达峰时间分别为 $18.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ 和 1.31 h。本法样品处理简单，内标定量准确，线性范围广，且方法学各项指标均通过验证。左乙拉西坦的血浆药动学特征表明，该药口服后吸收迅速，给药后约 1.3 小时达峰，成人血浆半衰期约为 7.38h，该方法可应用于成人或新生儿癫痫发作，给予左乙拉西坦后对其血药浓度的研究。

关键词：左乙拉西坦；抗癫痫药物；UPLC-MS/MS；血浆；药代动力学

钩藤碱兔体内代谢动力学及小鼠组织分布初步研究

胡岚岚¹，李晶晶¹，徐颖¹，周娟¹，曹雯²，刘欢²，汤建林¹，张惠静²

(1.第三军医大学新桥医院临床药理基地，重庆，400037；2.第三军医大学药学院药物分析与分析化学教研室，重庆，400038)

钩藤碱是中药钩藤中的活性成分，主要作用于心血管系统和中枢神经系统，包括降压、保护脑缺血及镇静等功效，近年来发现一定剂量的钩藤碱具有显著的抗焦虑作用^[1]。对于其代谢动力学的研究，目前主要是以大鼠为研究对象^[2]，由于临床前不同种属动物体内代谢动力学研究对设计人体的给药方案均具有重要意义，所以本文对新西兰大白兔的钩藤碱药动学进行了实验，并初步揭示了其在小鼠体内的分布。本试验将为后期的临床研究提供有关依据和参考。

本文以 UPLC 为分离手段，三重四级杆串联质谱为检测方式，建立专属、准确的生物基质中钩藤碱测定的分析方法，通过方法学的专属性、精密度、回收率、稳定性和基质效应等的考察，验证所建方法的可行性。通过测定兔经时血药浓度和小鼠体内各主要脏器组织钩藤碱浓度，考察了该活性物在兔体内代谢动力学特征和小鼠体内的分布。结果表明：18 只新西兰大白兔以三个剂量（20，40，80 mg/kg）灌胃钩藤碱后，血浆中的消除相 $T_{1/2}$ 分别为 $1.19 \pm 0.06\text{h}$ 、 $1.49 \pm 0.20\text{h}$ 和 $1.37 \pm 0.31\text{h}$ ，达峰浓度 C_{max} 分别为 $1.02 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.92 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ 和 $3.50 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$ ，达峰时间 T_{max} 分别为 $0.96 \pm 0.26\text{h}$ 、 $0.92 \pm 0.13\text{h}$ 和 $1.25 \pm 0.87\text{h}$ ，曲线下的面积 AUC_{∞} 分别为 $2.27 \pm 0.27 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、 6.35 ± 2.08 、 $2.27 \pm 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 和 $12.41 \pm 2.82 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 。在 20~80 mg/kg 的范围内曲线下的面积 AUC_{∞} 和达峰浓度 C_{max} 与给药剂量的线性分别为 0.9939 ($P < 0.01$) 和 0.9989 ($P < 0.01$)，表明线性呈正相关。昆明小鼠灌胃给钩藤碱 40mg/kg 后，在心、肝、脾、肺、肾、脑组织均有分布，且在 20 或 30min 时达到最高值，在

给钩藤碱后不同时间点该活性物的组织分布情况有所不同,从整个分布情况来看,钩藤碱在肝脏中含量较其它的高,其次是肾脏和脾脏,浓度较低的为心脏和脑组织。

本文建立了生物样本中钩藤碱的浓度的 UPLC-MS/MS 的测定方法。钩藤碱的兔血浆动力学特征表明,该活性物吸收和消除均较快,且清除率低。灌胃后钩藤碱在小鼠肝脏中的浓度最高,提示该活性物可能主要在肝脏中代谢;其次是肾脏,提示肾脏可能会是钩藤碱主要排泄器官;在脑中的浓度相对较少,但是有一定的分布,说明该活性物能透过血脑屏障。

关键词: 钩藤碱; 代谢动力学; 组织分布; UPLC-MS/MS

超声微透析与毛细管电泳-电化学发光联用用于研究苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的相互作用

韦艳芬, 孙双姣, 汪浩, 唐莉福, 邓必阳*

(药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西师范大学化学与药学院, 桂林 541004)

摘要: 药物与蛋白质的相互作用对药物的药效学和药代动力学起着关键性的作用^[1]。苯磺酸氨氯地平 (Amlodipine besylate) 是一种钙离子抗结剂, 主要用于治疗高血压和心绞痛^[2]。本文采用超声微透析与毛细管电泳-电化学发光联用用于研究苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的相互作用。苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白常规结合时间为 220 min, 超声辅助结合时间为 50 min。常规透析时间为 340 min, 超声微透析时间为 60 min。对比常规结合和透析, 采用超声辅助结合和透析大大缩短了实验时间。实验考察了工作电极电位、检测池缓冲溶液 pH、分离缓冲液浓度和 pH 等对发光强度的影响。在最优条件下, 得出苯磺酸氨氯地平的线性范围为 $1.8 \times 10^{-7} \sim 2.7 \times 10^{-5}$ mol/L ($r^2=0.9963$), 检出限为 5.0×10^{-8} mol/L (3σ , $n=11$), 对 0.90×10^{-6} mol/L 苯磺酸氨氯地平的的标准溶液进行 6 次连续测定, 峰高和迁移时间的 RSD 分别为 1.9% 和 1.8%。用超声微透析-毛细管电泳-电化学发光研究苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的相互作用, 得出苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的结合位点数为 1.28, 结合常数为 6.21×10^4 L/mol, 该结果与荧光光谱法的研究结果相当吻合。此方法简单快速, 成本低, 为研究苯磺酸氨氯地平与人血清白蛋白的相互作用提供了一种新方法。

关键词: 超声微透析; 毛细管电泳; 电化学发光; 苯磺酸氨氯地平; 白蛋白

Simultaneous qualitative and quantitative determination of compounds in *Turkish galls* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high performance liquid chromatography-photo-diode array

Jing Gong^a, Qiong-Feng Liao^{a,*}, Zhi-Yong Xie^{b,*}

(^aSchool of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China. ^bSchool of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, PR China.)

ABSTRACT: *Turkish galls* is a dry cecidium of young wattle on *Quercus infectoria* Oliv. It is formed by the parasitoid of young *Cynips gallae-tinctoriae* Oliv. An extract of *Turkish galls* has been developed to treat chronic ulcerative colitis. However, little is known on the chemical composition of *Turkish galls*, so far. In this study, an effective and comprehensive method was developed for the simultaneous analysis of compounds in the *Turkish galls* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/qTOF-MS) and high performance liquid chromatography-Photo-Diode Array (HPLC-PDA). Qualitative analysis of all the compounds presented in *Turkish galls* was performed on UHPLC/qTOF-MS, a total of 24 compounds were characterized from *Turkish galls*, including Turkish gallotannin and gallic acid. Under the optimal HPLC-PDA chromatographic conditions, quantification of gallic acid of *Turkish galls* was achieved on an Synergi Hydro RP-C18 column (4.6×250 mm, 4μm) using gradient elution with a solvent system of methanol and 10mmol/L ammonium formate at a flow rate of 0.8mL min⁻¹ and detected at 275 nm. This is the first simultaneous characterization and quantitative determination of multiple compounds in *Turkish galls* from Pakistan by UHPLC/qTOF-MS and HPLC-PDA, which can be applied to standardize the quality of *Turkish galls* and the future design of nutraceutical preparations.

KEYWORDS: *Turkish galls*; Turkish gallotannin; gallic acid; UHPLC/qTOF-MS; HPLC-PDA ;Chemical constituents.

HPLC-DAD 法测定牛奶中 6 种氟喹诺酮类药物残留的研究

杨勇^{1,3}, 罗奕², 吴琳琳², 杨娟艳¹, 茅向军³, 许乾丽^{*3}, 游正琴²

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002 2. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004 3. 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的 建立高效液相色谱(HPLC)串联紫外检测器(DAD)测定牛奶中6种氟喹诺酮类药物残留量的方法。方法 样品经5%乙酸乙腈提取,经改进的QuEChERS方法净化,使样品溶液澄清,便于进样和保护色谱柱。结果 6种氟喹诺酮类成分均达到基线分离,具有良好的线性($R=0.9999$),重复性、稳定性、精密度较好(RSD%均小于4%),回收率试验低、中和高三个浓度的回收率均较好(RSD%均小于1%),其回收率均大于95%。结论 本法专属性强,操作简单,灵敏度高,适用于牛奶中6种氟喹诺酮类药物残留的检测。

关键词: 高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-DAD); 牛奶; 氟喹诺酮类;
药物残留

基金项目: 1. 贵州省食品、保健食品和化妆品监测检测平台(黔科平台[2012]4001);
2. 贵州省科技计划 黔科合SY字[2012]3061号;

通信作者: 许乾丽,女,主任药师,研究方向为食品药品质量控制关键技术研究。E-mail:1500368608@qq.com。

Study on the determination of 6 Fluoroquinolones Residues in milk by HPLC-DAD

Yang Yong^{1,3}, Luo Yi², Wu Linlin², Yang Juanyan¹, Mao Xiangjun³, Xu Qianli³, You Zhengqin²
(1 Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou 5500022 Guizhou
Medical University, Guiyang Guizhou 5500043 Guizhou province food and Drug Inspection
Institute, Guiyang Guizhou 550004)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) series UV detection (DAD) method for the determination of six Fluoroquinolones Residues in milk. **Methods** the samples were extracted with 5% acetic acid and purified by the improved QuEChERS method, which made the sample solution clear and easy to be in the sample and protect the column. Results of six fluoroquinolones components have reached the baseline separation, has a good linearity ($r = 0.9999$), repeatability and stability, precision (RSD were less than 4%), recycling rate test of low, middle and high concentration of recovery rate were also good (RSD were less than 1%), the recovery rate was greater than 95%. **Conclusion** this method has high specificity, simple operation, high sensitivity, is suitable for the detection of 6 Fluoroquinolones Residues in milk.

Keywords: high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-DAD); milk; fluoroquinolones; drug residues

强阳离子型超高交联树脂的制备及用于痛风标志物的前处理分析

章弘扬, 徐雅婷, 张田丽, 胡坪*

(华东理工大学, 化学与分子工程学院, 上海, 200237, E-mail:

Huping@ecust.edu.cn)

本文制备了一种具有强吸附能力和选择性富集效果的强阳离子型超高交联树脂 (HXLPP-SCX), 并将其作为 SPE 填料, 用于人血清中痛风相关嘌呤标志物的前处理分析。主要研究内容如下: (1) 通过超高交联反应和浓硫酸磺化, 制备出单分散的、粒径为 2~6 μm 、孔径为 2.1 nm 以及比表面积达 801 m^2/g 的 HXLPP-SCX 树脂 (图 1 上), 与文献方法相比步骤更为简单, 同时避免了剧毒物的使用; (2) 将其与同类型 Waters Oasis MCX 填料比较, 结果发现, 所制备的树脂拥有更高的阳离子交换容量 (2 倍) 和吸附容量 (2~5 倍), 且对碱性物质的选择性吸附效果更佳; (3) 将该树脂结合 HPLC 用于人血清中次黄嘌呤、黄嘌呤和肌苷三种碱性嘌呤物质的分析, 结果发现能有效去除大量样品基质的干扰 (图 1 下), 方法学验证显示, 高、中、低三个浓度下加标回收率为 83.1~94.6%、日内、日间重复性分别低于 4.9% 和 6.6%, 检出限 (LOD) 范围为 4-18 ng/mL , 完全满足实际检测的需要 (无需质谱、内标等昂贵仪器和试剂); (4) 将该方法用于痛风研究, 结果表明, 所有痛风病人血清中三种嘌呤物质的含量均明显高于正常人 ($P < 0.01$), 尽管其中急性痛风期及药物治疗期病人的血尿酸水平仍处于正常范围内 (图 1 下)。因此, 与单凭血尿酸水平进行诊断相比, 结合上述三种嘌呤标志物可能更有助于痛风确诊。

关键词: 强阳离子型超高交联树脂; SPE 填料; 痛风; 嘌呤标志物; 前处理分析

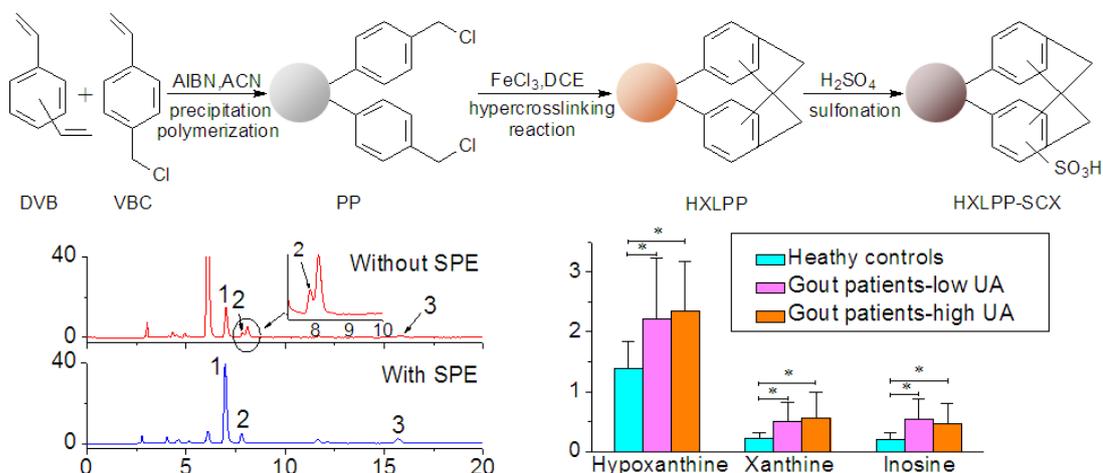


图 1. 强阳离子型超高交联树脂的制备 (上图) 及用于血清中痛风相关嘌呤标志物的分析 (下图)

基于细胞膜色谱技术的药物诱发磷脂沉积风险筛选模型研究

江正瑾, 赵祥龙, 王启钦

(暨南大学药学院, 黄埔大道西 601 号, 510632, 广州)

药物诱发磷脂沉积 (Drug-induced phospholipidosis, PLD) 是一种药物诱发的磷脂代谢异常现象, 主要表现为大量磷脂在细胞内过度聚集产生多层小体。目前, 已有几百种药物或候选药物被报道在人或动物体内具有不同程度磷脂沉积诱发风险, 而这些化合物基本都属于阳离子两亲性药物。在 PLD 诱发过程中, 药物与细胞膜之间的静电作用, 疏水或亲水作用与其诱发 PLD 的风险密切相关 [1, 2]。近年来, 基于色谱技术的 PLD 风险筛选模型被广泛报道, 如固定化人工膜色谱, 表面活性剂囊泡电动色谱 [3], 脂质体电动色谱 [4], 磷脂膜整体柱 [5]等。这些色谱模型能有效模拟出药物与细胞膜之间的多种相互作用, 而且相比较传统的动物模型, 色谱法具有操作简单、快速准确、通量高、成本低等诸多优点, 作为 PLD 风险预测模型在药物研发早期具有巨大的应用前景。研究结果表明, 随机选取的 70 多个药物在上述四种色谱模型中的保留参数与其诱发 PLD 的风险均呈现良好的相关性, 同时带负电的磷脂磷脂酰丝氨酸(PS)含量对预测模型的准确性存在显著影响; 通过考察不同 PS 含量的 LEKC 和磷脂整体柱对预测准确度的影响, 发现 PS 含量为 20%的模型呈现出最佳的预测效果。与已报道的其他体外预测方法相比, 混合磷脂膜整体柱重现性好, 准确度高, 具有进一步开发的研究前景。

液相色谱质谱串联法同时测定大鼠血浆中对乙酰氨基酚及其代谢产物的方法学研究

杨方秀^{1,2}, 汪玉馨², 刘霞飞^{1,2}, 陆益红², 汤道权¹, 杨冬芝¹,

樊夏雷^{1,2Δ}

(1. 徐州医学院江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 徐州 221004; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008)

摘要: **目的** 建立测定大鼠血浆中对乙酰氨基酚 (APAP) 及其代谢产物葡萄糖醛酸结合物 (APG) 和半胱氨酸结合物 (APC) 浓度的高效液相色谱-串联质谱定量检测方法, 并将其应用于大鼠体内对乙酰氨基酚药物代谢动力学的研究。 **方法:** 本文采

用沉淀蛋白法处理血浆样品，茶碱为内标。色谱柱为 Waters Xselect™ HSS T3 柱 (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)，流动相为乙腈-0.01% 甲酸水溶液 (10:90, v:v)，等度洗脱，流速为 0.2 mL min⁻¹，柱温为 35 °C，进样体积为 5 μL。质谱条件采用电喷雾电离源 (ESI) 正离子扫描，喷雾电压值：3800 V，离子传输毛细管温度：350 °C，鞘气压力：35 psi，辅助气流量：5 arb，多级反应离子监测模式 (MRM)，APAP、APC、APG 和内标茶碱的检测离子对分别为 152.2→110.2、271.1→182.1、328.1→152.2、180.93→124.2。结果 血浆中 APAP、APG 和 APC 的线性范围分别为 0.046~142.86 μg mL⁻¹ (r=0.9998)、0.023~71.43 μg mL⁻¹ (r=0.9982) 和 0.457~2385.71 ng mL⁻¹ (r=0.9985)，检测限分别为：3.7 ng mL⁻¹、14 ng mL⁻¹ 和 0.73 ng mL⁻¹。血浆基质对乙酰氨基酚及其代谢产物的测定均无干扰，APAP、APG 和 APC 的萃取回收率分别大于 89.1%，75.6%，74.5%。APAP、APG 和 APC 的方法回收率分别为 100.9%~105.2%、98.4%~100.7% 和 95.4%~100.0%。日内和日间精密度 (RSD) 均小于 8%。在 4 °C 条件下中放置 72h APAP、APG、APC 稳定性良好。结论 本研究建立方法专属性强、准确度高能够快速准确地同时定量测定大鼠血浆中 APAP 及其两种代谢产物 APG 和 APC，适用于 APAP 及其代谢产物的血药浓度检测以及药代和毒代动力学研究。

关键词： 对乙酰氨基酚；对乙酰氨基酚半胱氨酸结合物；对乙酰氨基酚葡萄糖醛酸结合物；液相色谱-质谱联用

手性柱色谱-串联质谱联用法同时测定人血浆中左旋和右旋兰索拉唑的浓度

孙鲁宁，方云茜，焦慧文，李玥琦，杨志成，张宏文，王永庆³

(南京医科大学第一附属医院药研室，南京，210029)

摘要：目的 右旋兰索拉唑是兰索拉唑的右旋对映异构体，药效学和药动学均优于左旋兰索拉唑和兰索拉唑。在本实验中，我们通过建立手性柱色谱-串联质谱联用法 (Chiral LC-MS/MS) 同时测定人血浆中左旋和右旋兰索拉唑的浓度，用于注射用右旋兰索拉唑和注射用兰索拉唑静脉给药人体药代动力学研究。方法 血浆样本经乙腈沉淀蛋白后，取上清液稀释后进行 Chiral LC-MS/MS 分析。色谱条件：色谱柱为 CHIRALPAK IC (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)，柱温为 30 °C；流动相为乙腈：10 mM 乙酸铵 (含 0.05% 乙酸) = 50 : 50 (v/v)；流速为 0.6 mL/min；进样量为 1 μL。质谱条

件：离子检测方式，多重反应监测（MRM），电喷雾离子化（ESI），离子极性为正离子，碰撞气为 Medium，气帘气为 35.0 psi；雾化气为 45.0 psi，涡轮气为 45.0 psi，离子化电压为 5500 V，温度为 450 ℃。兰索拉唑对映异构体和内标（埃索美拉唑）的去簇电压、入口电压、碰撞室出口电压和碰撞电压分别为 70 V，10 V，22 V 和 15.5 V。MRM 监测离子对兰索拉唑对映异构体为 370.1→252.1，内标为 346.1→198.1。结果本实验中，血浆中杂质均不干扰样本的测定；血浆中左旋兰索拉唑、右旋兰索拉唑和内标均无介质效应；左旋兰索拉唑的提取回收率为 93.9%~106.8%，右旋兰索拉唑的提取回收率为 96.2%~105.8%，内标的提取回收率为 105.2%；左旋及右旋兰索拉唑的线性范围均为 5.00-3000 ng/mL，线性关系良好；高、中、低三种浓度的批内和批间精密度均小于 15.0%，LLOQ 浓度的批内和批间精密度均小于 20%；左旋兰索拉唑及右旋兰索拉唑血浆样本在室温放置 24 h 稳定，-80 ℃ 冰冻 59 天稳定，反复冻融 3 次稳定；待测溶液在自动进样器中放置 26 h 稳定性良好。在血浆样本保存，处理和分析过程中未检测到兰索拉唑对映异构体间发生相互转化。结论 建立了同时测定人血浆中左旋和右旋兰索拉唑浓度的 Chiral LC-MS/MS 法，该方法可用于注射用右旋兰索拉唑和注射用兰索拉唑在健康志愿者体内的药代动力学研究。在血浆样本保存，处理和分析过程中未检测到兰索拉唑对映异构体间发生相互转化，在右旋兰索拉唑人体药代动力学研究中也未发现右旋兰索拉唑向左旋兰索拉唑转化。

关键词：手性柱色谱-串联质谱联用法；右旋兰索拉唑；兰索拉唑；药代动力学。

***通讯作者：**王永庆，主任药师，wyqjsph@163.com。

采用分子印记纳米磁珠“多靶垂钓-定向捕集”-LC/ESI-QTOF-MS/MS 技术对大鼠血样中蔗糖类和蒽醌类活性代谢物质群的选择性富集与快速鉴定研究

洪俊丽，杨载月，蔡奇志，朱婉莹，王溪，周学敏*

（南京医科大学药学院，南京 210029）

中药药效物质基础分析的难点之一是其体内代谢物质群组复杂、含量低、基质效应干扰大、分离繁琐。本研究以中药整体作用为理论基础，采用具有选择性识别、专属富集和广泛实用性的分子印记技术（MIPs）为手段，开展代谢物质群的分离富集研究。以传统中药虎杖的体内代谢物质群为研究对象，以甲基丙烯酸作为功能单

体，乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂，偶氮二异丁腈为引发剂，以虎杖苷（PD）和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷（EG）为模板分子，分别合成 PD-MIPs 和 EG-MIPs。大鼠灌胃虎杖提取物(4.0gkg⁻¹)后，于吸收、分布、代谢、排泄相各时间点收集血浆样品。采用 MIPs 磁性分散固相萃取（MSPD）结合 LC/ESI-QTOF-MS/MS 技术，对混和血样中蒽类代谢物质群和蒽醌类代谢物质群进行选择性的富集和快速鉴定。结果表明，合成的 MIPs 具有仿生识别、目标靶向、磁响应强，比表面积高，吸附容量大的特点。磁性材料使得分离迅速，30s 内完成磁性分离，免去传统方法的离心、过滤等操作，简化操作过程。表面印记使得 MIPs 在 20min 内达到吸附、解析平衡，表明其具有良好的吸附动力学与解析动力学。表面树枝状接枝使得 PD-MIPs 与 EG-MIPs 吸附容量分别达到 144.5130 mg g⁻¹ 与 79.4709 mg g⁻¹，表明具有较大的吸附容量。选择性试验表明，PD-MIPs 与 EG-MIPs 分别对蒽类化合物与蒽醌类化合物具有良好的选择性。重复性试验 RSD<4.16%，稳定性试验 RSD<10%，表明 MIPs 具有良好的重现性与稳定性。此外，与传统分离富集方法（蛋白沉淀，液液萃取，固相萃取）比较，PD-MIPs 和 EG-MIPs 分别获得蒽类与蒽醌类代谢产物数量最多；相对含量最高，基质效应最低（1.52 - 29.47%）。本试验首次合成 PD-MIPs 和 EG-MIPs，并实现对中药代谢物质群的“多靶垂钓”和“定向捕集”。本研究充分考虑中药整体（包括复杂的基质背景）作用特点，为中药微量活性代谢物质的发现和药效物质基础的阐明提供新思路和新方法。

关键词：分子印记；代谢物质群；虎杖；多靶垂钓；选择性富集

通讯作者：周学敏，E-mail: xueminzhou001_001@hotmail.com

Tel.: +86 25 86868476. Fax: +86 25 86868476.

三重四级杆串联质谱分析杀虫剂和重金属污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平

王佳佳

（南京中医药大学）

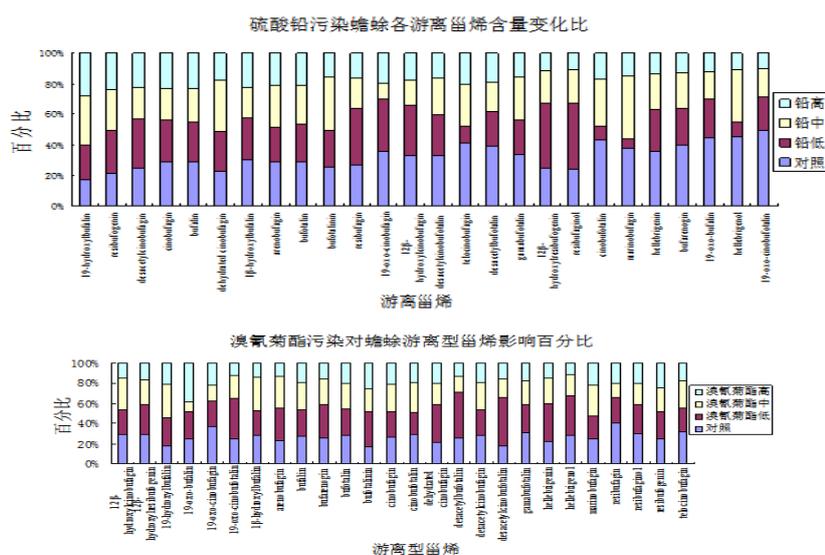
蟾酥为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺的干燥分泌物，主要化学成分为强心苷类蟾蜍甾烯化合物。研究表明蟾酥化学质量有较大不同，主要受遗传和环境影响。蟾蜍皮肤具有通透性，对环境重金属、农药、生活（工业）污水敏感并能产生蓄积，关于污染物与蟾蜍耳后腺分泌物关系的研究甚少。

蟾酥含量测定方法大体可分为有 LC-UV 和 LC-MS 两类。国内外已有学者采用 Q-tof 和 LTQ-Orbitrap 对多种蟾蜍甾烯的质谱二级裂解模式进行特征和含量分析。本文在此基础上，采用三重四级杆串联质谱对蟾酥中 26 种游离型蟾蜍甾烯进行检测，以质谱积分面积表示每一个蟾蜍甾烯化合物在不同样本组间的相对含量（化合物自身比较），并结合数学模式识别方法，评估污染前后蟾蜍分泌蟾酥的化学品质变化。

实验每 2 天给予各组蟾蜍不同浓度的硫酸铅（1、4、8mg/L）或溴氰菊酯（0.5、0.75、1g/L），同时准备一组未污染组为对照组，记录生活状态并于半个月后收集每只蟾酥，经冻干、醇提、过膜后进行检测，结果使用 Analyst Software 1.5.2 导出原始数据，用 Excel 进行分析。

计算不同条件污染结果与正常组的比值发现：铅低浓度时，大多游离型甾烯含量变化不明显，有 7 种物质含量出现下调，而铅高浓度时可以发现 17 种物质含量出现明显下调；溴氰菊酯高剂量组中 15 种物质含量明显下调，其余多数略有下调，而低剂量组中有 7 种出现明显上调，仅 2 种明显下调，多数含量变化很小，中等剂量组和正常组差别不大。

蟾酥是受到外界刺激合成并分泌的具有自我保护作用的毒性物质，其化学质量波动影响临床用药的有效与安全性。实验结果表明，正常组和污染组中大部分甾烯类物质可以被定性检测和相对定量分析，高浓度污染组中蟾蜍甾烯表达模式出现明显改变，增加用药风险。本文所建立的三重四级杆串联质谱测定蟾蜍甾烯类成分的方法具有灵敏、快速、稳定特点，能有效满足不同条件下蟾蜍耳后腺分泌物中蟾蜍甾烯成分的质量评价要求。



四级杆串联质谱分析苄嘧磺隆污染蟾蜍耳后腺中蟾蜍甾烯水平

周婧, 马宏跃, 吴启南

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化协同创新中心, 南京 210023)

摘要: 目的 研究除草剂苄嘧磺隆皮肤接触污染对中华大蟾蜍分泌蟾酥化学品质的影响。方法 蟾酥样品经甲醇提取, 以乙腈-1%甲酸水溶液为流动相, 液相色谱(反相 C18 柱)分离, 串联质谱分析检测。质谱条件为: MRM 模式, 脱溶剂温度 500 °C, 碰撞电压 30 eV, 锥孔电压为 30.00 V。结果 所建立 LC-MS/MS 测定方法对 6 种蟾蜍甾烯标准物质的检出限为 0.42~4.86 ng/ml, 相关系数 $R^2 = 0.9953 \sim 0.9992$, 日内和日间 RSD 为 3.8%~6.8%和 4.0%~8.8%; 加样回收率在 96.9%~109.6%, 相对标准偏差为 2%~8.1%。应用此方法检测了 36 种蟾蜍甾烯化合物, 有 20 余种化合物自身质谱积分面积在苄嘧磺隆污染前后发生改变, 苄嘧磺隆皮肤接触污染可以改变蟾蜍耳后腺蟾蜍毒素的表达模式。结论 所建立方法有效检测蟾蜍甾烯类物质。

关键词: 中药资源学; 蟾蜍; 苄嘧磺隆; 皮肤污染; 蟾酥品质

模拟肿瘤组织缺氧微环境的单细胞阵列彗星电泳芯片及其应用于抗肿瘤药物细胞毒性与基因毒性分析

李莉莉, 罗国安, 梁琼麟*

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 肿瘤微环境为肿瘤生长提供了必需的生存条件, 同时影响着肿瘤的增殖、侵袭和转移。肿瘤缺氧环境的普遍存在是实体瘤组织的重要特性之一。缺氧条件下的肿瘤细胞有其独特的生物学特性, 易对化疗药物产生耐药性。研究表明, 通过造成 DNA 损伤来诱导细胞凋亡是当前临床上大多数抗肿瘤药物的分子作用机制, 利用低氧肿瘤细胞的特异性靶向诱导低氧区域癌细胞 DNA 损伤已成为近年来抗肿瘤药物的重要发展方向之一, 因此, 迫切需要建立更为简便有效的药物研究平台以分析氧气浓度对其疗效的影响, 为阐明药物作用机理及耐药性产生原因提供实验依据。

本研究利用微流控芯片技术的集成性和可控性模拟了肿瘤组织氧气梯度微环境, 并将微阵列芯片与荧光检测和单细胞凝胶电泳等技术相结合, 对细胞三维培养条件下药物的细胞毒性和基因毒性进行原位检测, 建立了更接近于体内环境 DNA 靶向性

抗肿瘤药物活性分析系统。首先采用典型的肿瘤细胞为研究对象，结合单细胞凝胶电泳技术构建高通量基因毒性检测芯片。再基于微流控技术模拟氧气梯度，在芯片上构建药物细胞毒性和基因毒性检测分析平台，并在同一芯片上对不同氧气浓度下药物作用后的肿瘤细胞存活率和 DNA 损伤程度进行数据采集和统计分析，阐明氧气含量对于药物抗癌活性发挥以及细胞耐药性产生的重要影响。该分析系统克服了传统方法存在的众多不足，为研究氧气分布对药抗癌活性影响及细胞耐药性等相关研究提供了更为简便集成的研究平台，在高通量药物分析及筛选中具有重要的应用价值。

关键词：缺氧微环境；抗肿瘤药物；基因毒性；细胞毒性；微流控芯片

基金项目：本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯联系人：**梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

吡喹酮对映体的代谢分析

王海纳，房中则，郑阳，周昆，胡长艳，Kristopher W Krausz，孙德群，Jeffrey

R. Idle，Frank J Gonzalez

(山东大学)

摘要：吡喹酮 (PZQ) 是临床上常用的用于血吸虫病治疗的药物，尽管其分子结构中存在一个手性中心，但目前临床上仍然以消旋体给药。本研究以代谢组学方法为基础，采用超高效液相色谱-电喷雾四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-ESI-QTOFMS) 联用技术阐明了 PZQ 的代谢途径及其立体选择性代谢差异。小鼠给药后 24 小时收集小鼠尿液及粪便样品，6 种单氧化代谢物、2 种去氢单氧化代谢物、3 种双氧化代谢物和 4 种新的葡萄糖醛酸苷结合物被检测到，揭示 PZQ 的主要代谢途径包括氧化、脱氢及葡萄糖醛酸苷化。此外，还考察了 (R)-PZQ 和 (S)-PZQ 单体给药后小鼠体内生成这些代谢产物的差异。在体外一相孵育系统中，PZQ 代谢过程中涉及到的一相代谢酶主要有 CYP3A、CYP2C9 和 CYP2C19，这三种 CYP 酶对 PZQ 单体均表现出了不同的催化活性。其中，CYP2C9 和 CYP3A4 对三种单氧化代谢产物的生成表现出了不同的表观 K_m 和表观 V_{max} ，进一步证实了 PZQ 单体之间存在的立体选择性代谢差异。分子对接结果表明单体在空间位置构象上的不同可能导致了其代谢上的差异。总之，本研究较为完整地揭示了吡喹酮的代谢途径，采用体内、体外及计算

机模拟手段分别揭示了吡喹酮消旋体及两种单体的立体选择性代谢差异，为（R）-PZQ 单体在临床治疗中的应用提供了进一步的理论依据。

关键词：吡喹酮；代谢组学；立体选择性代谢；计算机模拟

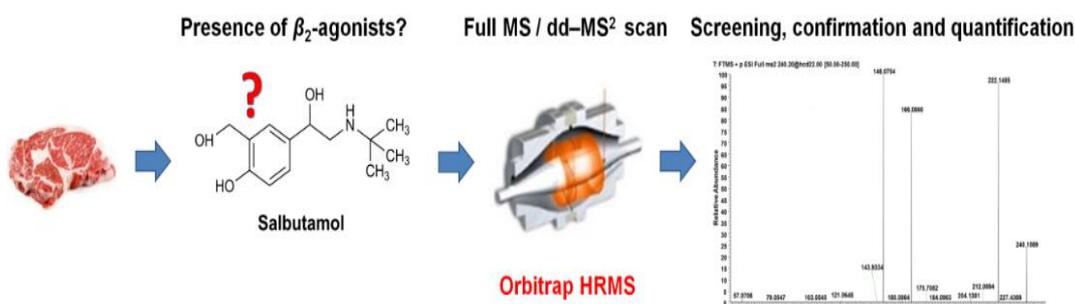
Ultra-trace analysis of 12 β_2 -agonists in food animal muscles by UHPLC–Q–Orbitrap high resolution mass spectrometry

Changchuan Guo ^{a,*}, Feng Shi ^a, Liping Gong ^a, Su Zeng ^b

(^aShandong Institute for Food and Drug Control, Jinan, 250101, China ^b College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

Here we applied the ultrahigh-performance liquid-chromatography - quadruple - orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC–Q–Orbitrap HRMS) for the ultra-trace analysis of 12 β_2 -agonists (salbutamol, terbutaline, ractopamine, clenbuterol, brombuterol, cimaterol, cimbuterol, mapenterol, bromchlorbuterol, isoxsuprine, mabuterol and clorprenaline) in pork, beef, mutton and chicken meat. The mass spectrometer was operated in Full MS/dd-MS² (data-dependent MS²) mode, under which a full MS scan was followed by a dd-MS² scan with a fragmentation energy. The quantification was achieved using matrix-matched standard calibration curves with salbutamol-d₃ and clenbuterol-d₉ as the internal standards. The method validation included assessment of selectivity, sensitivity, calibration curve, accuracy, precision, recovery, matrix effect and stability. The results show an exceptional linear relationship with the concentrations of the analytes over wide concentration ranges (e.g., 0.01-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for clenbuterol) as all the fitting coefficients of correlations r^2 are >0.9986 . The detection limits (LODs) were in the range of 0.0033-0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which was much lower than the current reported methods. In our method, the recoveries were able to reach 73.0% ~ 88.7%, while the matrix effects ranged from 83.7% to 92.8%. Analysis of 400 pork, beef, mutton and chicken samples reveal that only 4.25% samples were positive for β_2 -agonists. The detected β_2 -agonists involved salbutamol, clenbuterol, ractopamine and clorprenaline.

KEYWORDS: Orbitrap; β_2 -agonist; Food animal muscles; Residues; Analysis; Detection



气相色谱法测定人血白蛋白中辛酸钠含量的优化研究

咸瑞卿, 石峰, 巩丽萍, 邢晟, 梁翠荣*

(山东省食品药品检验研究院, 济南, 250101)

在人血白蛋白的生产过程中,为防止病毒灭活时蛋白质发生高温变性,需加入适量的辛酸钠作稳定剂。但如果加入的辛酸钠量不够,会降低白蛋白的热稳定性,形成过多的聚合物,进而引起过敏反应;而辛酸钠含量太高,则有可能产生抑制血小板凝聚、引起低血糖症、抑制肝脏对长链脂肪酸的消除等不良反应。因此,应选择合适的方法对人血白蛋白制品中的辛酸钠含量进行准确而快速的测定,是保证其安全性的重要手段。

目前,人血白蛋白制品中辛酸钠的测定方法主要有气相色谱法、柱前衍生-液相色谱法、萃取滴定法及离子色谱法。气相色谱法作为一种高效、快捷的通用分析方法,一直作为人血白蛋白制品中辛酸钠含量测定的法定方法,被《中国药典》沿用至今。但该方法以高毒性的氯仿(易制毒试剂)为稀释液和萃取液,不利于环境保护和实验人员身体健康;萃取液离心后需去除上层水层和中间蛋白沉淀层,取氯仿层挥干浓缩,操作繁琐;萃取液挥干时间过长,不适于生产过程半成品的质量控制;复溶体积(100 μ L)和进样量(0.1 μ L)均太小,导致方法可操作性差;存在对照品及内标选择不够合理等问题。

本研究针对药典方法存在的问题,对前处理方法及色谱条件进行了优化。优化的方法以庚酸钠替代庚酸为内标,试样经高氯酸溶液酸化后,用正己烷萃取辛酸,萃取液离心后上清液不经浓缩直接上机测定,前处理简便快捷。此外以辛酸钠替代辛酸为对照品,用水溶解后与样品同法处理,消除因供试品与对照品处理方法不同带来的误差,同时减少有机溶剂的使用量。通过优化柱温(180 $^{\circ}$ C)、柱流量(3mL/min)、进样量(1 μ L)、分流比(10:1)等色谱条件,在保证系统适应性实验符合药典要求的条件,缩短了分析时间,提高了检测灵敏度。

结果表明:辛酸钠在17.12 μ g/mL~205.44 μ g/mL范围内呈良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率($n=9$)为99.2%,RSD为0.23%。该方法结果准确、操作简单、分析迅速,即适用于人血白蛋白制品也适用于生产过程半成品中辛酸钠含量的快速测定,为药典方法的修订和提高提供了合理的科学依据。

关键词: 气相色谱法; 人血白蛋白; 辛酸钠; 含量; 优化

基于代谢组学技术的柴胡醋制前后毒性作用的比较研究

范玛莉^{1,2}, 孙慧敏^{1,2}, 李震宇¹, 秦雪梅¹

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 山西 太原 030006)

摘要: **目的** 比较柴胡醋制前后的毒性作用, 通过内源性代谢物的变化分析探讨其毒性作用机制, 同时比较炮制用醋对醋制柴胡的毒性作用的影响, 为柴胡及醋制柴胡的临床应用的安全性和有效性提供理论依据。 **方法** 用两种醋进行柴胡(陈醋和米醋)的炮制, 实验 SD 大鼠分为柴胡生品组、陈醋制柴胡组、米醋制柴胡组三组, 以 15g/kg 剂量连续灌胃给药 30 天后, 测定生化指标 (ALT、AST、ALB、ALP、TBIL、BUN、CR) 和并进行病理切片分析, 并用 ¹H NMR 代谢组学技术结合多元统计分析手段研究柴胡及其醋制品对大鼠血清、肝脏及肾脏组织液的影响。 **结果** 柴胡生品和醋制柴胡均表现出一定的毒性作用, 表现为 ALT、AST 和 ALP 的升高, 以及病理切片的改变。¹H NMR 代谢组学分析结果显示肝脏中甲硫氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸可以被认为是肝损伤的潜在生物标志物, 牛磺酸、鸟氨酸、肌醇可以作为肾功能异常的潜在生物标志物。这些差异代谢物可能参与氨基酸代谢、能量代谢、牛磺酸代谢和脂质代谢等。综合生化指标及代谢组学分析结果, 两种醋制柴胡的毒性作用小于柴胡生品, 两种醋制柴胡的毒性作用也有一定的不同, 由差异代谢物的趋势上看, 陈醋制柴胡的毒性略小。 **结论** 柴胡醋制后毒性减弱, 且不同炮制用醋对柴胡醋制有重要影响。本研究从代谢组学角度解释了柴胡及其醋制品对大鼠的肝肾毒性机制, 为其临床应用的安全性和有效性提供了依据。

关键词: 柴胡; 醋制; 陈醋; 米醋; 毒性; 代谢组学

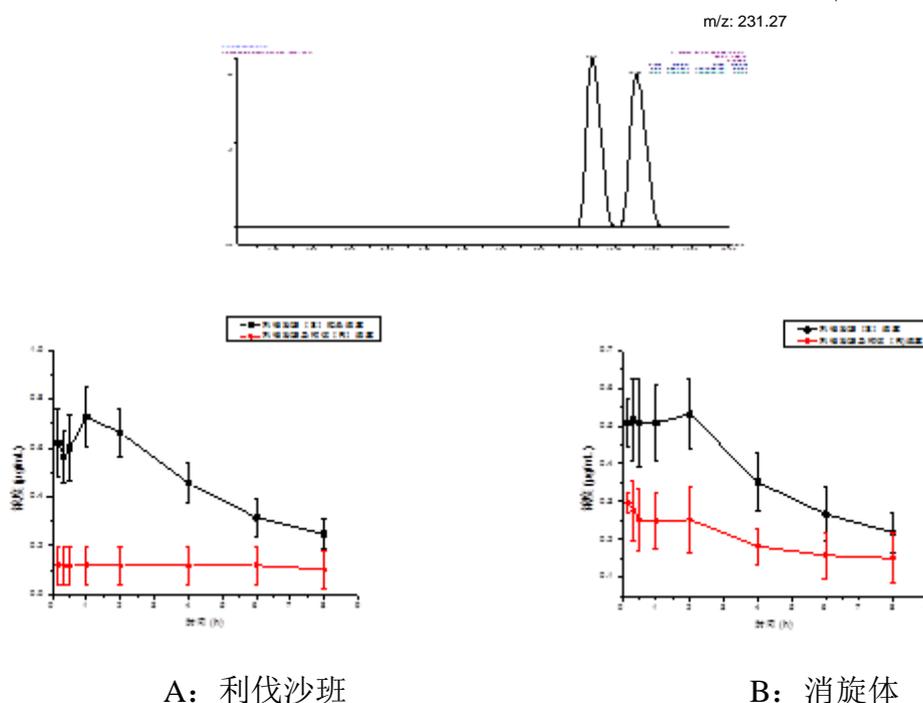
手性 LC-MS/MS 分析大鼠血清中的利伐沙班

闫茜^{1,2}, 王会琳³, 于一文², 徐娜², 高建平³, 潘仙华^{2*}, 许旭^{1*}

(1. 上海应用技术学院, 化学与环境工程学院, 上海 201418 2. 上海应用技术学院, 香料香精技术与工程学院, 上海 201418 3. 上海中医药大学, 中药学院, 上海 201203)

建立了大鼠血清样品中利伐沙班的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 定量分析方法, 使用键合多糖型手性柱 Chiralpak IC (4.6 × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水-甲酸 (97:3:0.1, v/v/v) 为流动相, 采用柱后分流的方法, 在匹配质谱流速需求的同时缩短手性 HPLC 分析的时间, 通过考察实验条件对分离分析的影响, 在 ESI 正离子模式下

选择 436/145 离子进行 MS/MS 检测, 分析时间 13min, 在 0.01~10 μ g/mL 的浓度范围内, 利伐沙班峰面积对浓度的线性方程为 $y=32506.58x-1603.50$, 相关系数 $R^2=0.9963$; 利伐沙班对映异构体的线性方程为 $y=31809.36x-1379.32$, 相关系数 $R^2=0.9964$, 检测限为 3ng/mL, 定量限为 10ng/mL, 实际测定了灌胃给药利伐沙班及其消旋体后大鼠血清中利伐沙班及其对映异构体的浓度, 得到了利伐沙班在大鼠体内的药时曲线。



反相超效液相色谱-质谱联用分离分析食用油中的甘油三酯

何榕 山晓琳 董方圆 韩璐 许旭*

(上海应用技术学院 化学与环境工程学院, 上海 201418)

甘油三酯作为食用油的主要成分, 对其进行分离分析是研究食用油掺杂问题值得注意的研究方向。LC-MS 在分离分析甘油三酯方面具有独特的优势, 不同的液相色谱柱可以对甘油三酯形成不同程度的分离, 高灵敏质谱检测器的定性能力为分离后的定性识别与定量分析提供了重要的条件。根据甘油三酯在质谱 APCI 离子源中主要形成的三种类型的碎片离子, 酰基离子(RCO)⁺、单酰基甘油离子(M+H-RCOOH-RCO)⁺和二酰基甘油离子(M+H-RCOOH)⁺, 可以确定甘油三酯的结构。通过对总离子流谱图中峰面积的积分可以估计甘油三酯的相对含量。

本文使用反相超效液相色谱质谱联用的方法分离分析食用油中的甘油三酯。使用总长 40cm 的串联超效 C18 色谱柱(10cm+ 15cm+ 15cm), 以乙腈-异丙醇 (50: 50) 为流动相, 流速 0.2ml/min、柱温 25℃, 在大约 74MPa 的高柱压下分离, APCI 离子化-质谱检测。食用油以异丙醇溶解后直接进样。实现了对食用油中甘油三酯组分的更精细区分, 获得了玉米油、大豆油、花生油、葵花籽油、稻米油、橄榄油和芝麻油等市售食用油中甘油三酯组成的谱图。结果显示, 甘油三酯在相同食用油中的组成相似, 而在不同食用油中的组成存在差异。实验中通过差异的色谱峰直接识别出大豆油中掺入的 5% 猪油。该方法为识别掺假食用油提供有价值的途径。

关键词: 超效液相色谱-质谱联用; 反相; 甘油三酯; 食用油

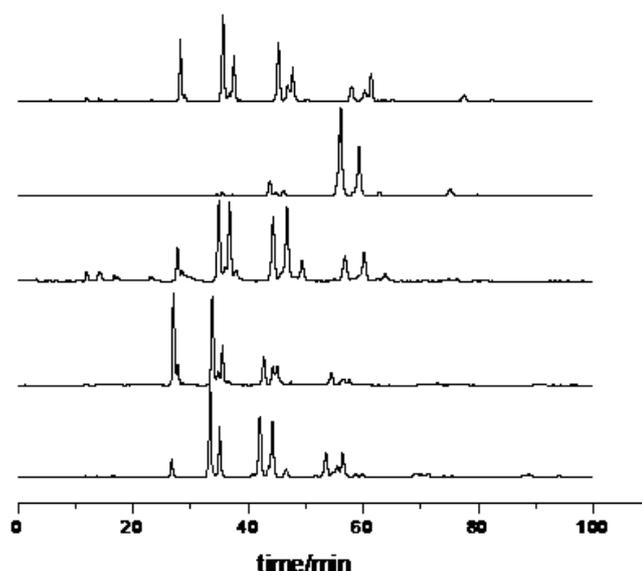


图1 不同类型食用油的分析结果

UPLC/Q-TOF-MS 鉴定大鼠灌胃盐酸小檗碱后体内的代谢产物

刘欢¹, 阎家齐¹, 韩方辉², 于丽颖², 刘中博^{1*}

(1.沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2.沈阳药科大学 制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 本文采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC/Q-TOF-MS) 检测方法, 鉴定大鼠灌胃给予盐酸小檗碱后尿液、粪便和血浆中代谢物。 **方法** 利用碰撞能量梯度 (MSE) 和质量亏损过滤 (MDF) 技术, 在大鼠尿液、粪便和血浆中共检测到 25 种代谢产物。 **结果** 尿液、粪便和血浆中存在形式主要为原形、二氢

小檗碱、去甲基产物、去连氧二甲基产物、O-甲基结合物及葡萄糖醛酸和硫酸结合物, 包括 I 相代谢产物 13 种, II 相代谢产物 12 种。 **结论** 盐酸小檗碱在大鼠体内原形含量较低, 代谢广泛, 有必要对代谢产物的药理活性进行深入研究。

关键词: 盐酸小檗碱; UPLC/Q-TOF-MS; 结构鉴定; 代谢产物

Identification of the metabolites of Berberine hydrochloride in rat by UPLC/Q-TOF-MS

ABSTRACT:OBJECTIVE An ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS) method was applied to identify the metabolites of berberine hydrochloride in rat urine, feces and plasma. **METHODS** Using MSE and mass defect filter techniques, a total of 25 metabolites were detected in urine, feces and plasma. **RESULTS** The major metabolites in urine, feces and plasma are parent drug, dihydroberberine, demethylation product, dimethyloxygen product, O-methyl-berberine and glucuronide conjugates, sulfation conjugates, including 13 phase I and 12 phase II metabolites. **CONCLUSION** The above evidences suggested that the absorbed alkaloids were extensively metabolized in vivo, and the metabolites should also be investigated on their corresponding pharmacological activities.

KEY WORDS: Berberie hydrochloride; UPLC/Q-TOF-MS; structural identification; metabolite

UPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 4 种成分及其药代动力学研究

魏岚, 王小波, 美丽丽, 孙立新*

(沈阳药科大学 药学院 沈阳 110016)

摘要: **目的** 了哥王为瑞香科堇花属植物南岭堇花[*Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey.]的干燥根茎。具有清热解毒, 消肿散结, 止痛等功效。本研究拟建立 UPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 4 种成分(伞形花内酯、芹菜素、西瑞香素、芫花素)的含量, 并将其应用于大鼠灌胃给予了哥王提取物后的药代动力学研究。 **方法:** 血浆样品采用乙腈沉淀蛋白后再用乙酸乙酯萃取的方法进行处理。以 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 ×50 mm, 1.7μm, Waters) 为色谱柱; 以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相, 流速为 0.2mL/min; 选择 ESI 正离子扫描方式, 多反应检测 (MRM) 进行测定, 检测离子对分别是 m/z 163.3→107.2 (伞形花内酯)、 m/z 271.5→153.1 (芹菜素)、 m/z 353.6→179.1 (西瑞香素)、 m/z 285.6→242.1 (芫花素) 和 m/z 187.2→131.2(内标, 补

骨脂素)。方法学验证包括专属性、精密度、准确度、提取回收率、基质效应和稳定性。将 6 只健康 SD 大鼠灌胃给予了哥王提取物后,以 UPLC-MS/MS 法测定不同时间点大鼠血浆中 4 种成分的浓度,并进行相关药代动力学参数的计算。结果:4 种成分在线性范围内线性关系良好($r > 0.99$),日内、日间精密度(RSD)均小于 15.0%,准确度(RE)在-1.1%~15.0%之间,提取回收率在 75.0%~101.4%之间,基质效应在 87.4%~110.8%之间。伞形花内酯、芹菜素、西瑞香素和芫花素的主要药代动力学参数如下: C_{max} 分别为(152.47±12.63)、(83.80±9.16)、(605.74±30.71)和(29.08±3.61) $\mu\text{g/L}$, T_{max} 分别为(0.83±0.25)、(1.15±0.12)、(2.42±1.09)和(6.46±2.07) h, $t_{1/2}$ 分别为(13.29±4.15)、(14.50±3.02)、(15.79±5.13)和(36.24±9.11) h。结论:本方法专属性强,灵敏度高,快速准确,可用于大鼠血浆中伞形花内酯、芹菜素、西瑞香素和芫花素的同时检测及其药代动力学研究。

关键词: UPLC-MS/MS; 大鼠; 了哥王; 方法学验证; 药代动力学

注射用丹参多酚酸在大鼠体内代谢产物及途径分析

苗敬茁^{1,2} 佟玲² 孙万阳^{1,2} 刘小琳² 孙国祥¹

(1 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2 天津天士力集团研究院, 天津 300410)

摘要:背景 注射用丹参多酚酸具有活血通络之功效,用于治疗轻中度脑梗死恢复期的淤血阻络症。丹参多酚酸是以迷迭香酸,丹酚酸 D,紫草酸,丹酚酸 B 等多种水溶性酚酸类成分组成。目前关于该方的体内代谢研究尚未见报道。目的 研究注射用丹参多酚酸在大鼠体内的代谢产物及途径分析。方法 采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF-MS)联用技术,对大鼠尾静脉注射注射用丹参多酚酸后血浆,胆汁,尿液和粪便中的代谢产物进行研究。结果 根据化合物质谱信息,保留行为结合相关文献报道,共表征 60 种成分,其中包括 8 种原型成分(原儿茶醛,咖啡酸,丹参素,丹酚酸 F,迷迭香酸,丹酚酸 D,紫草酸和丹酚酸 B)和相关的 52 种代谢产物。分别检测到 48, 48, 31, 8 种成分在胆汁,尿液,血浆和粪便样品中。代谢产物主要来自寡聚体的酚酸类成分,以迷迭香酸和丹酚酸 B 居多。其中 4 种丹酚酸 D 的代谢产物和 5 种丹酚酸 B 的代谢产物为首次报道。注射用丹参多酚酸在大鼠体内的主要代谢途径为甲基化,硫酸化和葡萄糖醛酸化反应。结论 本方

法灵敏度高,分辨率好,可用于注射用丹参多酚酸体内代谢产物分析。同时本研究可扩展于其他含有丹参多酚酸的提取物和中药制剂中。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 代谢产物; 大鼠; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱

固相萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定养血清脑颗粒中 99 种农药残留

刘小勤^{1,2}, 孟文婷², 张永志², 佟玲^{2*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 天津天士力集团研究院, 天津 300402)

摘要: 以由 11 味中药材组成的中药大复方养血清脑颗粒为研究对象, 建立了固相萃取(SPE)结合气相色谱-三重四级杆串联质谱(GC-MS/MS)同时测定 99 种农药的分析方法。考察了样品前处理过程中提取溶剂、固相萃取柱、淋洗液及用量对样品提取、净化方面的影响, 最终确定了采用乙酸乙酯提取, 氨基固相萃取柱净化, 15 mL 二氯甲烷-甲醇(100:1, v/v)淋洗。淋洗液浓缩后在 GC-MS/MS 多反应监测(MRM)模式下进行检测, 并采用基质匹配标准曲线内标法进行定量。结果表明, 99 种农药在 0.001~0.250 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)大于 0.975; 方法的定量限范围为 0.001~0.050 mg/kg; 加标水平为 0.05、0.10 和 0.20 mg/kg 时, 99 种农药的平均回收率范围为 66.7%~128.0%, 方法的相对标准偏差(RSD, $n=6$)小于 18.3%, 满足农药多残留的分析要求。对 5 批养血清脑颗粒样品进行测定, 99 种农药均未检出。建立的 SPE 净化和 GC-MS/MS 相结合的方法简单、方便、快捷, 具有检测灵敏度高、重现性好、结果准确可靠等优点, 适用于养血清脑颗粒中多农药残留的同时筛查检测。

关键词: 农药残留; 养血清脑颗粒; 固相萃取; 气相色谱-三重四级杆串联质谱

作者简介: 刘小勤, 女, 硕士研究生。 E-mail: liuxiaopi99@sina.com

***通信作者:** 佟玲, 博士, 硕士生导师。 Tel: (022)26736752

E-mail: tongling@tasly.com

肿瘤血管抑制剂 XY-02 与 CA4P 的组织分布比较研究

宁欣¹, 雍智全², 张玉霞¹, 陈芙蓉¹, 徐小平^{1*}

(1. 四川大学华西药学院 2. 东莞达信生物科技有限公司)

摘要 目的: 建立 HPLC 对肿瘤血管抑制剂 XY-02 与 CA4P 在大鼠体内组织分布规律进行研究, 揭示两种药物靶组织的差异与潜在的治疗特征和安全性。**方法:** SD 大鼠分别静脉注射 XY-02(80 mg/kg)或 CA4P(1 mg/kg), 于给药后 15, 40, 90 min 采集大鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、子宫、睾丸等组织进行含量测定, 以 C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 0.01% 乙酸-甲醇(50 : 50, V /V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 325 nm。结果: XY-02 和 CA4P 分别在 0.15~750 μg/mL 和 0.03~60 μg/mL 范围内线性关系良好($r > 0.9995$), 最低检测浓度分别为 17 ng/mL 和 4.93 ng/mL。由于 XY-02 与 CA4P 的安全范围不同, CA4P 的毒性较大, 所以实验中二者的给药剂量不同, 其中 XY-02 为 80mg/kg, 而 CA4P 为 1mg/kg。为了便于对两种药在同一剂量水平比较其组织中的分布规律, 通过换算各组织中 XY-02 或 CA4P 的含量分别占给药量的百分比 (%) 来体现二者的分布特点, 对静脉注射给药 15min 后, XY-02 与 CA4P 在大鼠各组织中的分布 (%) 结果进行比较, 如图 1 所示。结论: 两种肿瘤血管抑制剂均在大鼠组织中有广泛分布和快速消除的特点, 预示二者对各种组织肿瘤具有潜在的治疗作用且体内产生蓄积的可能性小。特别是 XY-02 在肾脏和肝脏中分布较多, 提示 XY02 可对临床上较难治疗的肾癌和肝癌有更好的治疗价值; XY-02 在心脏和肠道的分布较 CA4P 低, 表明 XY-02 的心脏毒性和肠道的不良反应比 CA4P 更小, 安全性更好。

关键词: XY-02; CA4P; 静脉给药; HPLC; 组织分布

本文作者: 宁欣, 女, 药物分析专业在读研究生;

***通讯作者:** xuxp319@scu.edu.cn

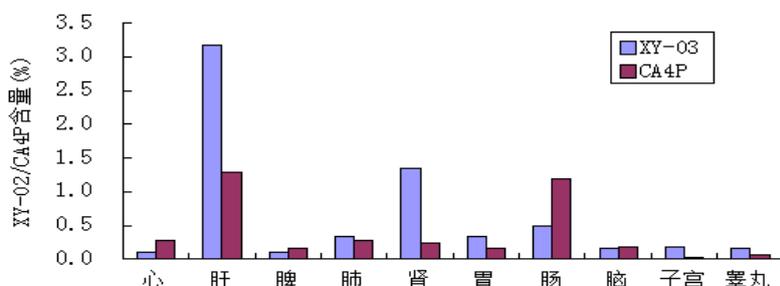


图 1. 15min 大鼠各组织中 XY-02 与 CA4P 含量 (%) 分布比较

细胞膜色谱用于中药注射液致敏组分筛选的研究及应用

韩省力, 张涛, 贺浪冲*

(西安交通大学药学院, 天然血管药物筛选与分析国家地方联合工程研究中心, 西安, 710061)

中药注射液 (traditional Chinese medicine injections, TCMI) 通过血管给药, 提高了中药对人身的药物有效供给和生物利用率, 进而提高了功效, 临床应用广泛^[1]。但由于中药注射液组分的多样性和复杂性, 导致临床应用的中药注射液除有效组分外还混杂着辅助成分、无效成分以及各种杂质等, 可直接刺激机体免疫系统产生免疫应答反应, 导致过敏和类过敏反应的发生, 严重影响中药注射液的安全应用^[2]。查找中药注射液不良反应发生的原因, 建立高效、灵敏的致敏组分筛查方法, 提高致敏组分筛选准确率, 是摆在中药注射液安全性评价研究面前重大而迫切的问题。细胞膜色谱 (cell membrane chromatography, CMC) 是由贺浪冲教授和他的团队于 1996 年发明的一种新型色谱技术。细胞膜色谱不仅具有色谱的分离能力, 同时兼具有生物活性, 已经证明细胞膜色谱技术是一种有效的从复杂体系中筛选目标组分的新方法^[3-5]。本研究利用 IgE 受体高表达的 RBL-2H3 细胞构建的 RBL-2H3/CMC 色谱模型, 并将 RBL-2H3 细胞膜色谱模型与 HPLC/MS 搭建成二维在线联用系统。并成功利用 RBL-2H3/CMC 与 HPLC/MS 的二维在线联用系统从双黄连注射液中“识别-分析-鉴定”出能够作用于 IgE 受体的潜在致敏组分黄芩苷。细胞增殖抑制实验表明在黄芩苷浓度在 0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时, 具有较低的细胞毒作用。因此, 在研究黄芩苷致 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用及黄芩苷致 RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率情况时, 黄芩苷浓度范围为 0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。RBL-2H3 细胞脱颗粒实验结果表明, 黄芩苷能够促进 RBL-2H3 细胞的脱颗粒作用, 且在浓度范围为 0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, RBL-2H3 细胞的脱颗粒作用与黄芩苷的浓度呈剂量依赖性。RBL-2H3 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率实验结果表明, 黄芩苷能够促进 RBL-2H3 细胞的 β -氨基己糖苷酶释放作用, 且在浓度范围为 0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, RBL-2H3 细胞的 β -氨基己糖苷酶释放率与黄芩苷的浓度呈剂量依赖性。本研究成功建立了一种从中药注射液复杂体系中“识别-分析-鉴定”特异性作用于 IgE 受体潜在致敏组分的二维在线联用系统, 该系统为中药注射液致敏组分筛选提供了新的思路, 该系统与 RBL-2H3 细胞的脱颗粒实验、 β -氨基己糖苷酶释放率实验、组胺释放率实验结合, 能够从中药注射剂中筛查致敏组分, 为中药注射液这一现代化

的剂型保驾护航。本研究将细胞膜色谱用于致敏组分的筛选，评价中药注射液的安全性，扩展了细胞膜色谱的应用范围。

关键词：细胞膜色谱；中药注射液；致敏组分

通讯联系人：E-mail: helc@mail.xjtu.edu.cn

致谢：感谢国家自然科学基金对本项目的支持（81230079, 81227802, and 81503032）。

应用二维液相色谱方法快速测定血必净注射剂中潜在致敏与有效成分的含量

林园园，马维娜，张杰，卢闻，孙萌

（西安交通大学医学部药学院，西安，710061）

摘要：**目的：**中药注射液在临床上应用非常广泛，然而随着应用的增加，不良反应也不断增加。质量控制问题一直是中药注射液面临的首要问题，血必净注射液是由王今达教授开发的复方中药制剂，由红花、赤芍、川芎、丹参、当归 5 味中药组成，其主要有效成分包括红花黄色素色素 A、山奈素、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B、等。没食子酸是一种鞣质，而鞣质可以使蛋白沉淀引起过敏反应、热源性反应及造成局部血管堵塞。实验发现在一定浓度下的没食子酸可使红细胞发生溶血反应。本文建立了快速测定血必净注射液剂中潜在致敏性组分没食子酸与有效性成分红花黄色素色素 A、山奈素、芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 含量的方法，为中药注射剂的质量控制的问题提供可能的解决方案。**方法：**血必净注射液无需前处理直接注入一维色谱柱（Merck RP-18endcapped 100×4.6 mm I.D，预柱：RP-18e 整体柱 5×4.6 mm I.D），进样量为 5 μL，经过含乙腈、0.1% 甲酸水的流动相初步分离后，目标流出物经过阀切换系统保留在捕集环中（200 μL），进入二维色谱柱（Agela Optimix C18/C8 4.6×100 mm I.D. 5 μm，100Å）进行进一步分离检测。二维流动相为有机相（A）：乙腈，水相（B）：0.1% 甲酸水。一维梯度为 0-2 min：95% A，2-6 min：95%-75% B，6-10 min：75%-15% B，10-12 min：15%-15% B。二维梯度为没食子酸：0-5 min：97%-97% B；羟红 A:0-8 min:95%-85% B；阿魏酸：0-2 min：90%-90% B，2-3 min：90%-85% B，3-10 min：85%-85% B。芍药苷：0-1min：5%-12% B，1-10 min：12%-12% B。丹酚酸 B:0-3min：15%-21% B，3-15min：21%-27% B。山奈素：0-1min：30%-30% B，1-10

min: 30%-40% B。一维的柱温 35℃，二维的柱温 35℃。一维流量: 1.0 ml/min，二维流量: 2.0 ml/min。一维的检测器为 PDA 检测器，二维的检测波长为 254 nm 与 272 nm。**结果:** 六种指标成分间的保留时间的相对标准偏差均小于 1%，指标成分从一维到二维的转移率不小于 83%；没食子酸的体外溶血限度为 20 μg/mL；色谱峰面积的相对标准偏差小于 3%，在 0.02~0.4 μg 范围内，峰面积与进样浓度的线性相关系数均大于 0.9993，加样回收率在 99.2~102.7%，其相对标准偏差小于 4.35% (n=3)。定量限分别是没食子酸 4.83×10^{-4} μg，羟基红花黄色素 A 4.50×10^{-3} μg，山奈素 1.84×10^{-3} μg，芍药苷 2.57×10^{-3} μg，阿魏酸 2.19×10^{-4} μg，丹酚酸 B 4.69×10^{-4} μg。定量测定结果为没食子酸 12.77 μg/mL，羟基红花黄色素 A 47.02 μg/mL，山奈素 0.44 μg/mL，芍药苷 99.05 μg/mL，阿魏酸 31.92 μg/mL，丹酚酸 B 23.59 μg/mL。**结论:** 本研究建立快速测定血必净注射液中潜在致敏和有效性组分的二维色谱方法，并测定了六种指标成分的含量。其中没食子酸的含量并没有超出其体外溶血限度。本方法为中药注射液的质量控制提供一种方法。

关键词 血必净注射液 二维液相色谱法 潜在致敏组分 有效性组分

第一作者: Tel: 18792712356; E-mail: shuangmuyuan@stu.xjtu.edu.cn

通讯作者: Tel:029-82657740; E-mail: sunmeng@mail.xjtu.edu.cn.

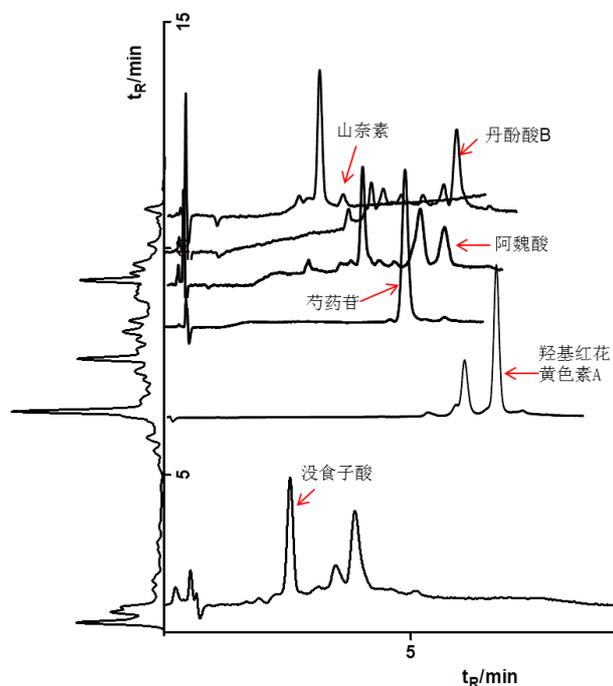


图 1 血必净注射液在二维色谱条件下的保留行为

Effects of Follicle-stimulating Hormone (FSH) on Metabolism of Cholesterol in vitro

Ke Yao, Zhiyuan Tan, Xiaoyang Xu, Shuangyan Wei, LifengNiu, Chunyun Lu, FeifeiZuo, Shaobo Xu, Xia Xu[#]

Abstract: Aim Follicle-stimulating Hormone (FSH) was a glycoprotein hormone weighting about 30KD which belongs to the family of glycoprotein hormones. As one of the main hormones of the hypothalamus - pituitary - gonadal axis, FSH could promote the proliferation of granulosa cells, stimulate the production of steroids, as well as regulate the development and maturation of gamete cells. Cholesterol is an important lipid in the body as well as the most abundant sterol in nature, which plays an important role in maintaining the fluidity and normal functions of membrane as well as converting to physiological active substances such as bile acids, steroid hormones, vitamin D and so on. The first and rateing-limiting step in the generation of steroid hormones was the conversion of cholesterol to pregnenolone which was catalysed by CYP11A1. The aim of this research is to explore the effect of FSH on metabolism of cholesterol in vitro. **Methods** Three kinds of FSH preparations were used in this research:Gonal-f®, Puregon® and Fostimon®. Studies were conducted in rat liver S9 incubation system combined with HepG2 cells. Different concentrations (0,25IU/L, 250IU/L,2500IU/L) of three kinds of follicle-stimulating hormone preparations were added in each incubation system and incubated different time (Rat liver S9 system:0, 20min, 40min, 80min, 100min. HepG2 cells:0, 8h, 24h, 48h).Ice-cold ethyl alcohol was used as extractant to extract cholesterol and pregnenolone from each incubation system. Cholesterol and pregnenolone content were measured by UPLC-MS/MS on multi-reactions monitoring(MRM) mode (m/z 369.22→95.10,m/z 369.22→147.15, and m/z 318.21→88.01, 318.21→256.22) with ESI⁺. **Results** Cholesterol level showed an increase after each of the three kinds of follicle-stimulating hormone were added in the incubations while pregnenolone level of the same system were lower than that of control to some degree. **Conclusion** Follicle-stimulating hormone may slow down the metabolism of cholesterol by inhibiting the activity of CYP11A1.

Key words: Follicle-stimulating hormone; Cholesterol; Metabolism; Liver S9; HepG2 cells; UPLC-MS/MS

Pharmacokinetic interaction between simvastatin and flavonoids extracted from hawthorn fruits, a kind of plant with anti-hyperlipidemia function

FeifeiZuo, LifengNiu, Chunyun Lu, Ke Yao, ShaoboXu, Xia Xu*

(Department of Pharmacy, Zhengzhou University, KeXue Road, Zhengzhou,41000, E-mail: xuxia@zzu.edu.cnTel:86-0371-67781908)

Flavonoids, the dominating active ingredient contained in hawthorn extracts, with a content exceeding 20% ,has been widely utilized in various prescriptions of traditional Chinese medicine. It was reported that the flavonoids have a number of pharmacological effects on digestive, cardiovascular, endocrine systems and neuro-protectivefunction, flavonoids alsohavefunctions such as cardiovascular regulation, hyperlipidemic, anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory effects. However, the effect of them on CYP450 and the pharmacological activity in hyperlipemia rats were still unclear, this study assessed the inhibitory effect of flavonoids on CYP450 in vitro and the therapeutic activity in hyperglycemia rats. The content of some certain flavonoids were simultaneously determined by ultra-performance liquid chromatography electrospray (UPLC-ESI-MS/MS), a sensitive and accurate method established in our laboratory, the inhibitory effects of hawthorn extract on CYPs activity were evaluated in rat liver microsomes , and then determined by HPLC based CYPs substrate assay; the SD rats were administrated hawthorn extract mixture for 15days at a dose of 400mg/kg ,quercetin, catechins, mignonette and puerarin are selected to serve as markers for the quantitation of hawthorn extracts because of their contents and physiological activities, then the samples were determined by HPLC.the content of quercetin , catechins, mignonette and puerarin contained in hawthorn extract were 1%,1.2%,1.86% and 1.82% respectively;The results showed that hawthorn extracts had no effects on the metabolic rate of diclofenac sodium and simvastatin. High dosage of hawthorn extracts can markedly inhibit the metabolism of dextromethorphan and chlorzaxone, while low dose of hawthorn extracts had inhibitory effect on the metabolic rate of phenacetin. Our results indicated that hawthorn extracts can be utilized as a subsidiary hyperlipidemic drug. This study demonstrated that herb-drug interaction should be considered between hawthorn extracts and drugs metabolized by CYP2D6 and CYP2E1. Hawthorn extracts has anti-hyperlipidemic activity, while its mechanism was not by affecting the activity of CYP3A2, a dominant metabolism enzyme of simvastatin.

Keywords: flavonoids;CYP450; UPLC-ESI-MS/MS; hawthorn extract

Pharmacokinetics, tissue distribution and metabolism studies of Flavokawain A, a novel anti-bladder cancer chalcone compound

LifengNiu, FeifeiZuo, Ke Yao,ShaoboXu, Luchun Yun, Xia Xu*

(School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, P.R. China)

ABSTRACT: Flavokawain A (FKA), the major chalcone in kava extracts, exhibits strong antiproliferative and apoptotic effects against human prostate and urinary bladder cancer cells. However, there are some toxic and side-effect of FKA, such as kava-inducing liver injury and regulating effect on enzyme activity. To examine the potential of FKA, we evaluated the pharmacokinetic property of FKA in rats after intravenous administration including plasma pharmacokinetics and tissue distribution. Besides, inhibition models of several major metabolic

enzymes were successfully established by rat liver microsome system in vitro. The pharmacokinetics results showed that the concentration versus time profile of FKA follows a two-compartment pharmacokinetic mode. Its half-life time($t_{1/2}$) was about 101.8min, the $AUC(0-t)$ was about 204.995($\mu\text{g/mL}$)*min and CL was 0.0169mg/kg/min($\mu\text{g/mL}$) which indicated plasma concentrations of FKA declined rapidly and the systemic clearance rate was high. For tissue distribution, the AUC_{0-8h} were 129.9($\mu\text{g/mL}$)*min, 80.66($\mu\text{g/mL}$)*min, 59.49($\mu\text{g/mL}$)*min, 52.43($\mu\text{g/mL}$)*min respectively for liver, kidney, prostate and spleen which revealed that highest level of FKA appeared in the liver. So we further studied the effects of FKA on CYP450 enzymes. In the metabolic study, FKA showed significant inhibition on the CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 and CYP3A2 activities with IC_{50} values of 102.23, 20.39, 69.95, 60.22 $\mu\text{mol/L}$. The inhibition model was competitive, mixed-inhibition, uncompetitive, and noncompetitive for CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 and CYP3A2 enzymes, respectively. Our results revealed that FKA significantly inhibited the activity of CYP2D6. To further understand the interaction of FKA to CYP2D6, molecular docking analysis was performed to confirm the drug binding conformation. Molecular docking study predicts that three residues (Phe120, Arg221 and Asp301) are critical for the binding of FKA. The hydrogen binding interaction and π - π stacking interaction between functional group of FKA and the major residues significantly increase the stability of FKA-CYP2D6 complex which would provide useful information on structure-activity relationships for the potent CYP2D6 inhibition by FKA. Cytochrome P450-mediated metabolism played a major role, suggesting that coadministration of P450 inhibitors or inducers may change the drug's PK profile, so this study laid a foundation for better understanding the absorption of FKA and also offered theory reference to rational administration which may be useful for the prediction of drug-drug interaction of FKA.

KEY WORDS: Flavokawain A; pharmacokinetics; tissues distribution; metabolism; molecular docking

紫堇灵在大鼠体内药动学及其在中药复方双花百合片中潜在相互作用研究

刘瑞娟, 丁黎

(中国药科大学药物分析教研室)

摘要: 紫堇灵是中药苦地丁中主要的异喹啉生物碱成分, 它因有多种药理作用而引起研究者的广泛关注。迄今, 有关紫堇灵及其在双花百合片中的药动学研究尚未见报道。本研究建立了 LC-MS/MS 测定大鼠血浆中紫堇灵浓度的方法。紫堇灵血浆浓度在 0.01-20 ng/mL 范围内线性良好。所建立的方法灵敏、准确, 适用于紫堇灵在大鼠体内的药动学及其在双花百合片中潜在相互作用研究。本试验将大鼠随机分成四组, 每组 6 只, 分别灌胃给药双花百合片 (SBT, 含有紫堇灵、小檗碱和其他成分),

紫堇灵和小檗碱纯品（与 SBT 中含有同等剂量的紫堇灵和小檗碱），紫堇灵纯品（与 SBT 中含有同等剂量的紫堇灵），静脉注射紫堇灵纯品。试验结果显示，紫堇灵纯品在大鼠体内生物利用度较低，消除速度快；与灌胃给予紫堇灵纯品相比，灌胃给予含有同等剂量紫堇灵的 SBT 时，紫堇灵的末端消除半衰期 $t_{1/2}$ 约延长 3 倍，达峰浓度 C_{max} 和血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-12} 分别增加了 46.5% 和 34.2%；结果表明与灌胃给予紫堇灵纯品相比，大鼠灌胃给予 SBT 时，紫堇灵的生物利用度增加和消除半衰期延长。与紫堇灵组相比，紫堇灵和小檗碱组中，紫堇灵的 C_{max} 和 AUC_{0-12} 分别增加了 11.1 倍和 5.0 倍。结果表明小檗碱可显著增加紫堇灵在大鼠体内血浆暴露量（ C_{max} 和 AUC_{0-12} ），小檗碱与紫堇灵之间存在药物-药物相互作用，这也警示紫堇灵与小檗碱合用时存在潜在毒性的风险。有趣的是，SBT 组中紫堇灵暴露量的增加量要小于紫堇灵和小檗碱组中紫堇灵暴露量的增加量，这表明小檗碱可以显著改变紫堇灵在大鼠体内的药动学特征，同时 SBT 中其他成分对紫堇灵药动学行为的影响也是不可忽略的，这也体现了中药复方中各组分之间增效减毒配伍机制的妙处。本研究为紫堇灵、中药复方 SBT 药物-药物或草药-药物相互作用的深入研究及 SBT 的临床应用具有较高的参考价值。

关键词：紫堇灵；双花百合片；小檗碱；相互作用；药动学；LC-MS/MS。

栀子大黄汤中 4 种蒽醌成分在大鼠体内的组织分布研究

姜悦，孟瑾，王丹，王淼，许淑珍，史清水*，杨功俊*，冯芳*

（中国药科大学药物分析教研室，中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏省食品药品监督检验研究院，江苏南京 210009）

栀子大黄汤(ZZDHD)收载于《金匱要略》，临床上主要用于治疗黄疸、酒精性肝炎、急性肝炎等；现代药理学研究表明，大黄中蒽醌类成分为其主要的药效物质。然而近年来国内外研究性结果表明大黄及其蒽醌成分具有肝、肾毒和胃肠道毒性，引发了人们对大黄安全性的质疑。ZZDHD 各药材配伍煎煮后，引起各成分溶出变化，导致各游离蒽醌成分含量与单味大黄有所区别，特别是大黄素含量急剧减少。本文建立大鼠灌胃 ZZDHD 后，心脏、肝脏、脾脏、肾脏中芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚的测定方法，考察了 4 种蒽醌在大鼠体内的分布、消除行为，科学地评价了 ZZDHD 中大黄蒽醌类成分的组织分布。35 只 SD 大鼠随机分为 7 组，称取 ZZDHD

冻干粉适量，配制生药浓度为 3.6 g mL^{-1} ，灌胃体积为 12 mL kg^{-1} ，于 7 个时间点分别股动脉放血处死大鼠后，取心脏、肝脏、脾脏、肾脏用于分析。采用 HPLC-FLD 法测定大鼠组织中 4 种蒽醌的浓度，组织样本通过液-液萃取进行处理。采用 Phecda C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 150mm, 5 μm)，流动相为 0.2% 乙酸-甲醇，梯度洗脱，流速 1.0 mL min^{-1} ，激发、发射波长分别为 430、525 nm，柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，进样体积 20 μL 。在该色谱条件下，4 种蒽醌成分与内源性物质分离良好，方法灵敏度高，可以准确地用于心、肝、脾、肾中的分布差异比较研究。研究表明各蒽醌成分在组织中的分布为：大黄酸>大黄酚>大黄素甲醚~芦荟大黄素。ZZDHD 中主要起保肝作用的活性成分之一为大黄酸，而其他几种蒽醌成分在肝脏中也有一定的分布，提示这些蒽醌与大黄酸发挥功效有一定协同作用。此外，本实验发现 ZZDHD 中大黄酸以及其他蒽醌成分在各组织，特别是肝、肾组织中消除完全，并无蓄积作用，说明经方栀子大黄汤配伍科学合理，为其临床安全用药及现代药物开发提供了新的依据。

关键词： 栀子大黄汤；蒽醌；组织分布；HPLC-FLD 法

基金项目： 国家自然科学基金项目(No. 81274063)，江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通讯作者： E-mail: fengfang1@126.com, yaoxuefengfang@163.com,
yanggongjun888@163.com

HPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中重酒石酸卡巴拉汀及其代谢物 NAP226-90 的浓度

俞彬滨^{1,2}，朱碧楠^{1,2}，陈静^{1,2}，宋敏^{1,2}，杭太俊^{1,2*}

(1. 中国药科大学药物分析教研室，江苏南京 210009；2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏南京 210009)

重酒石酸卡巴拉汀，(S)-N-乙基-N-甲基氨基甲酸-3-[(1-二甲氨基)乙基]苯酯酒石酸盐，是一种可逆性的氨基甲酸类胆碱酯酶抑制剂，结合胆碱酯酶可使其失活，通过水解作用重新释放胆碱酯酶。由于氨甲酰化的胆碱酯酶相比于正常情况下的乙酰化胆碱酯酶，水解作用变缓慢，因此能够延长胆碱作用时间，达到治疗轻、中度阿尔茨海默型痴呆的临床疗效^[1]。卡巴拉汀在人体代谢产生 NAP226-90，显然代谢物的浓度与胆碱酯酶抑制剂有关，因此它的定量检测十分有助于评价卡巴拉汀在体内的作用

效果,然而,目前国内的文章尚没有同时检测卡巴拉汀及其代谢物的报道,国外方面,Rommier 等^[2]在线性范围 0.2-30ng/ml 同时检测卡巴拉汀及 NAP226-90,但需要一个较为复杂的衍生化步骤,而 Albert Enz 等^[1]试验卡巴拉汀及 NAP226-90 的定量下限虽分别定为 0.13ng/ml 和 0.17ng/ml,但其线性范围不包含定量下限,且其变异系数要求定为不大于 30%,均不符合我国生物样品定量分析方法验证指导原则(2015 版)。因此,本文拟建立 LC-MS/MS 法同时测定血浆中的卡巴拉汀及其代谢物的浓度,为重酒石酸卡巴拉汀的临床应用提供参考。

LC-MS/MS 方法采用 Hitachi-C18 色谱柱(150 mm x 4.6 mm, 5 μ m),柱温为 35 $^{\circ}$ C,流速为 1.0mL/min,流动相为 0.1%甲酸 0.1%乙酸铵水溶液(A)和 0.1%甲酸甲醇溶液(B),采用梯度洗脱 0 min (90%A - 10%B) \rightarrow 1.0 min (90%A - 10%B) \rightarrow 1.5 min(20%A - 80%B) \rightarrow 4.5 min(20%A - 80%B) \rightarrow 4.6 min (90%A - 10%B) \rightarrow 6 min (90%A - 10%B)。质谱采用电喷雾正离子化三重四极杆质谱,SRM 检测,喷雾电压 5000V,雾化气压 35arb,离子吹扫气压 0.5 arb,辅助气压 10 arb,毛细管温度 350 $^{\circ}$ C,碰撞能量 22 eV。定量检测离子卡巴拉汀 m/z251.0 \rightarrow m/z206.0,代谢物 NAP226-90 m/z166.0 \rightarrow m/z121.0,内标托特罗定 m/z326.0 \rightarrow m/z147.0。

在本试验所采用的色谱条件下,代谢物 NAP226-90 的保留时间在 3.28 min 左右,卡巴拉汀保留时间在 4.19min 左右,内标托特罗定保留时间在 4.43 min 左右,无内源性物质干扰样品的测定。典型图谱见图 1。

建立的 LC-MS/MS 法,卡巴拉汀及 NAP226-90 的线性范围均为 0.1000~30.00ng/mL,线性良好;定量下限 0.1000ng/mL;重酒石酸卡巴拉汀及 NAP226-90 血浆样品绝对回收率 RSD 小于 15%;六种不同来源的空白血浆基质中,0.3ng/mL、6ng/mL 和 25ng/mL 三个血药浓度水平下的重酒石酸卡巴拉汀、NAP226-90 和内标托特罗定的基质效应均稳定重现,无浓度依赖性;分别配制重酒石酸卡巴拉汀和 NAP226-90 低、高(0.3000 和 25.00 ng/mL)两种浓度的血浆样品,分别置于不同的条件下考察其稳定性(n =3)。结果表明,重酒石酸卡巴拉汀、NAP226-90 标准溶液-4 $^{\circ}$ C 避光放置 4.5 个月,血浆样本-80 $^{\circ}$ C 冰箱长期冷冻保存 40 天,经 3 次反复冻融,血浆样品处理后室温放置 8 小时,处理后的血浆样本 4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时,血浆样品处理前实验台放置 8 小时,残渣室温放置 8 小时的条件下,均有良好稳定性(准确度在 85%~115%范围,精密度相应 RSD<15%)。

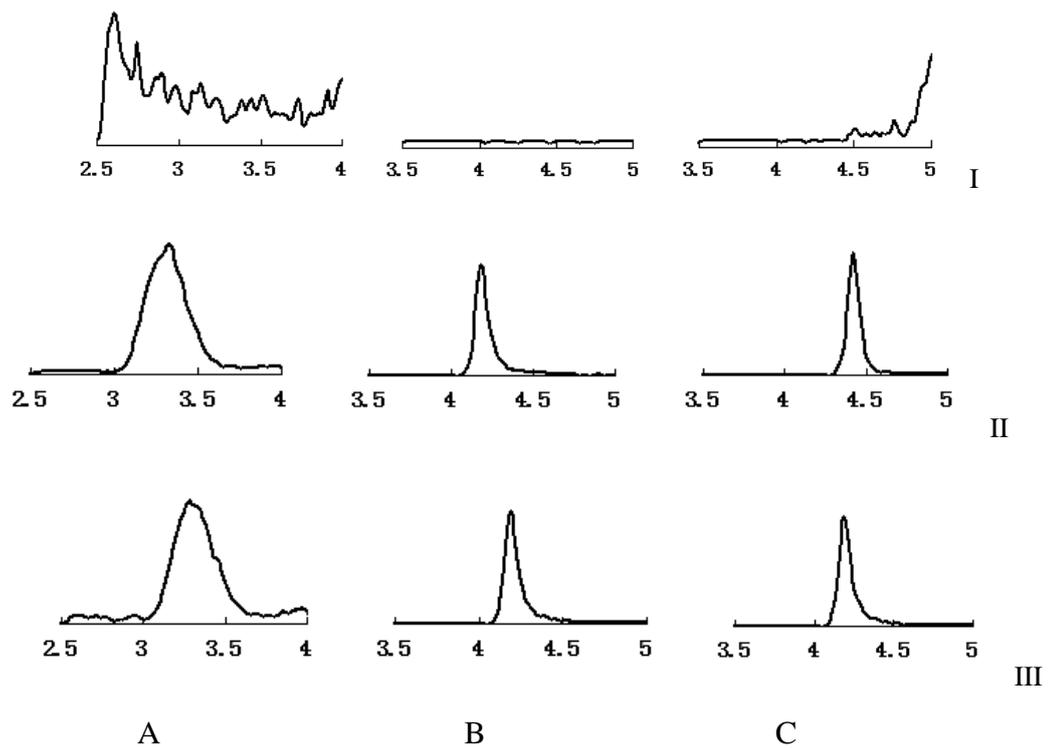


图 1 血浆样品卡巴拉汀、NAP226-90 及托特罗定的 LC-MS/MS 测定色谱图 (A. NAP226-90, B. 卡巴拉汀, C.托特罗定, I.空白血浆, II.空白加入卡巴拉汀、NAP226-90 及内标托特罗定, III.受试者服药后血样的典型图谱)

受试者单剂量口服受试制剂和参比制剂后，卡巴拉汀和代谢物 NAP226-90 的药-时曲线均完整体现吸收相、分布相和消除相。其典型血药浓度-时间曲线见图 2 和 3。

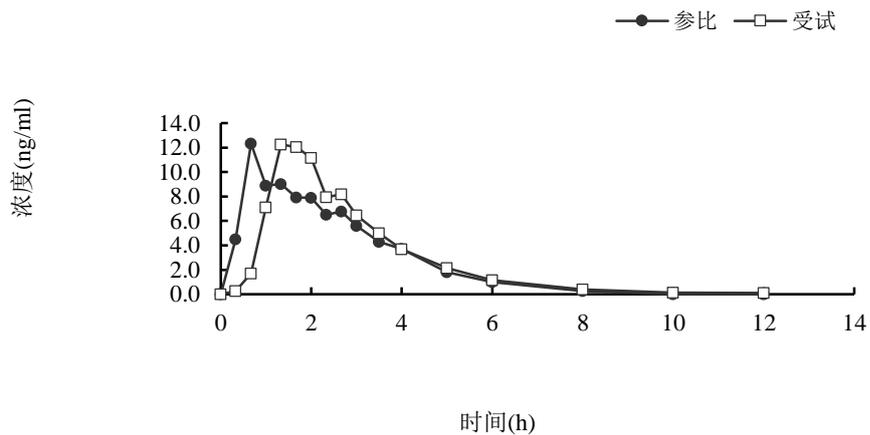


图 21 名受试者分别口服两种制剂后测得原型药卡巴拉汀的血药浓度(ng/mL)-时间(h)曲线

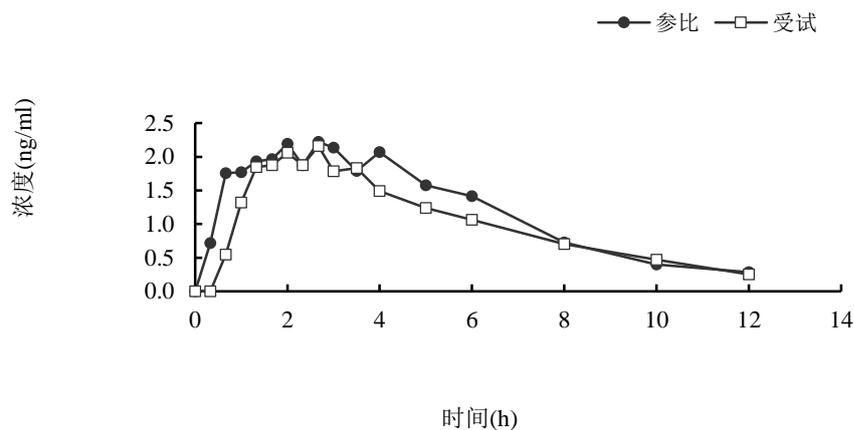


图 31 名受试者分别口服两种制剂后测得代谢物 NAP226-90 的血药浓度(ng/mL)-时间(h)曲线

结论：本试验所建立的同时测定人血浆中卡巴拉汀及其代谢物 NAP226-90 的 LC-MS/MS 方法专属、准确、灵敏度高，满足卡巴拉汀口服制剂人体药代动力学的定量分析要求。

关键词：重酒石酸卡巴拉汀；NAP226-90；血药浓度；液相色谱-串联质谱法；阿尔茨海默病

采用液相色谱串联质谱法同时定量测定两种苦木生物碱在大鼠体内的药动学

侍媛媛 洪春艳 徐建 杨晓玲 谢宁 柳文媛* 冯锋*

(中国药科大学)

摘要：苦木为一种传统中草药，主要分布于中国华南、韩国、日本。其具有抗炎、抗病毒、抗氧化活性，可治疗溃疡性结肠炎。通常临床上，被作为肠胃药、杀虫药剂，用于治疗喉咙痛、腹泻、湿疹、肠胃炎和蛇咬伤。现有药理研究表明，苦木可降低 Hep-2 细胞的存活率，诱导半胱天冬酶所引发的 Hep-2 细胞凋亡。从而证实其可作为作用于人体宫颈癌的潜在抗癌药物。

苦木的主要化学成分包括：生物碱（ β -咔吧啉类和铁屎米酮类）、苦味素、三萜类。铁屎米酮类生物碱作为其标志性成分，表现出解热、抗炎、抗菌和抗肿瘤等多种

药理活性。在苦木中, 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮和 4,5-二甲氧基铁屎米酮为其特征性生物碱成分。现有研究揭示此两种成分对肺炎球菌和猪中性粒细胞均有抑制性影响。

针对苦木中药和制剂中的 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮和 4,5-二甲氧基铁屎米酮的体外鉴别和定量测定已有多种文献报道。在这些报道的方法中, 多数采用高效液相色谱串联-紫外、质谱或二级阵列-质谱测定其含量。然而, 上述方法均尚未应用于其药物代谢动力学研究。

因此本研究中, 采用一种灵敏快速的液相色谱串联质谱分析方法同时定量测定其两种主要铁屎米酮类生物碱: 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮和 4,5-二甲氧基铁屎米酮, 在口服苦木提取物(200 mg/kg)后于大鼠血浆中的含量。方法采用 C18 柱, 以乙腈-水(0.1%甲酸)(90:10, v / v)为流动相进行色谱分离。以乙酸乙酯液液萃取作为样品前处理方法。串联质谱仪以正离子多反应监测模式测定待测分析物。方法学验证结果表明: 该方法在 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮 1.25-9000 ng/mL 和 4,5-二甲氧基铁屎米酮 0.5-800 ng / mL 范围, 线性良好。其批内批间精密密度、准确性以及回收率, 满足测定要求。样品在测试条件下稳定。以此新开发的方法, 本研究评价了该两种成分在大鼠血浆样品的药动学参数。结果表明: 两种待测组分皆可被快速吸收, 其中, 4,5-二甲氧基铁屎米酮消除速率快于 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮。

关键词: 苦木; 生物碱; HPLC-MS/MS; 药物代谢动力学; 方法验证。

梔子厚朴汤配伍对厚朴酚与和厚朴酚的药代动力学和脑组织分布的影响

刘媛, 王娟, 闫艳, 史清水*, 杨功俊*, 冯芳*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏省食品药品监督检验研究院, 210009)

摘要: 梔子厚朴汤是经典的抗抑郁中药复方, 由梔子、枳实和厚朴组成。来自厚朴的厚朴酚与和厚朴酚是该复方发挥抗抑郁疗效的主要活性成分。为进一步了解 ZZHPD 的抗抑郁作用机制, 有必要对厚朴酚及和厚朴酚的体内过程进行分析研究。本文首先建立了简便、专属、灵敏的 HPLC-FLD 方法, 通过乙腈一步沉淀处理, 色谱分析, 实现了对大鼠血浆和不同脑区样本中厚朴酚与和厚朴酚的测定。具体分析条件: Lichrospher C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 甲醇-水(79:21, v/v)洗脱, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 40 °C; 荧光检测器: 激发波长: 293 nm; 发射波长: 370 nm; 进样量: 20 μL。

线性范围：厚朴酚10-480 ng/ml（血浆）和60-900 ng/g（脑组织），和厚朴酚2.5-120 ng/ml（血浆）和15-225 ng/g（脑组织）；方法的精密度、准确度、提取回收率和稳定性均满足生物样本的测定要求。进一步，我们对大鼠口服栀子厚朴汤、缺味组方及厚朴水提液后厚朴酚与和厚朴酚的药代动力学及它们在不同脑区的分布进行了比较研究。结果显示：与厚朴组相比，栀子厚朴汤组和厚朴-栀子组中厚朴酚的 T_{max} 和 $AUC(0-\tau)$ 均显著增加，而在厚朴-枳实组中没有明显变化，表明栀子能增加厚朴酚的吸收程度并延缓吸收速率。大鼠经口服给药后，厚朴酚及和厚朴酚快速分布，进入大鼠脑组织，尤其是和厚朴酚。栀子厚朴汤的不同配伍对厚朴酚与和厚朴酚在不同脑区的浓度的影响程度不同：与厚朴组相比，厚朴-栀子组中厚朴酚的浓度显著增加而在厚朴-枳实组中减少，该现象可能是导致栀子厚朴汤组与厚朴组中的厚朴酚浓度变化不显著的原因。厚朴与其他中药尤其是与枳实配伍后使得和厚朴酚在脑中的浓度减少。

本研究为揭示栀子厚朴汤的配伍机制和指导临床合理用药提供了科学依据。

关键词：药代动力学；脑组织分布；厚朴酚；和厚朴酚；HPLC-FLD

基金项目：国家自然科学基金项目(NO.30973858, NO.81274063)，江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通讯作者：E-mail: fengfang1@126.com, yuanliu_cpu@163.com, gjyang@cpu.edu.cn

盐酸度洛西汀在健康人体内的药代动力学研究

吴莎^{1,2}，王双双^{1,2}，杭太俊^{1,2}，宋敏^{1,2*}

（1.中国药科大学药物分析教研室，江苏 南京 210009；2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京 210009）

盐酸度洛西汀（Duloxetine），化学名称为（+）-（S）-N-甲基- γ -（1-萘基氧）-2-噻吩丙醇胺盐酸盐，原创药由美国礼来公司研发，2002年美国FDA批准为抗抑郁药物上市，为选择性5-羟色胺（5-HT）和去甲肾上腺素（NE）再摄取抑制剂（SNRI）。该药通过提高中枢神经系统中的5-HT和NE的水平而发挥其抗抑郁作用^[1]。本论文采用LC-MS/MS法测定健康受试者体内的度洛西汀的浓度，为临床用药提供依据。

本文建立的HPLC-MS/MS法，以盐酸氟西汀为内标，色谱条件采用Waters symmetry[®] C18(150 mm×3.9 mm, 5 μ m)色谱柱分离，甲醇(A相)-含20%甲醇的0.1%甲酸0.1%醋酸铵水溶液(B相)为流动相洗脱，洗脱程序为：0min (A:B=30:70, v/v)

-1min (A:B=30:70, v/v) -1.5min (A:B=90:10, v/v) -4.0min (A:B=90:10, v/v) -4.1min (A:B=30:70, v/v) -6min (A:B=30:70, v/v), 流速为 0.9mL/min, 柱后分流 6:4 测定, 柱温: 40℃。质谱条件采用电喷雾离子化正离子 SRM 检测, 喷口电压 4000V, 雾化温度 150℃, 吹扫气压力 0.5psi, 鞘气压力 35psi, 辅助气压力 5psi, 毛细管温度 350℃, 碰撞气氩气压力 1.2mTorr。用于定量的离子反应为度洛西汀 (m/z 298.1/154.1), 内标氟西汀 (310.1/148.1)。

血浆样品经甲醇 (1:3, v/v) 沉淀后, 离心, 取上清直接进行 LC-MS/MS 分析, 在上述分析条件下, 度洛西汀的出峰时间为 3.91min 左右, 内标的出峰时间为 3.91min 左右, 与血浆中其他杂质洗脱峰分离良好, 无测定干扰, 典型色谱图见图 1。盐酸度洛西汀的线性范围为 0.5~100ng/mL, 定量下限为 0.5ng/mL, 回收率为 84.2%-92.8%, 无明显基质效应。血浆样品经过 3 次冻融、室温放置 8h 或 4℃放置 24h 的条件下, 均基本稳定。

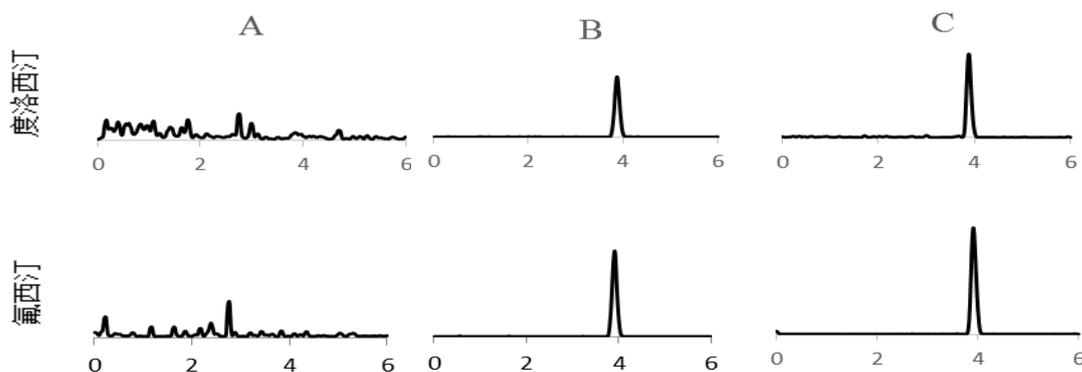


图 1: A.空白血浆中度洛西汀和氟西汀的响应 B.模拟生物样本中度洛西汀和氟西汀的响应 C.健康受试者血浆样品中度洛西汀和氟西汀的响应

受试者于服药前 (0.0 h) 和单剂量口服江苏恩华药业股份有限公司生产的盐酸度洛西汀溶片 (20mg/片×3 片) 后 1.0 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h、5.0 h、6.0 h、8.0 h、12 h、15 h、24 h、36 h、48 h 和 72 h 各抽取前臂静脉血 4ml, 分别置于肝素抗凝试管中, 试管提前置于冰上预冷。4℃, 4000 r/min 离心 5min。分离上层血浆, 进行测定。测定所得平均药物-时间曲线, 见图 2。

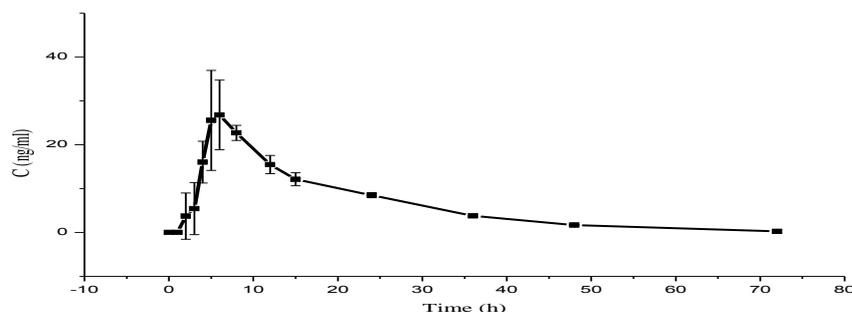


图 2.健康受试者单剂量 (60mg) 口服度洛西汀后的平均药时曲线图

国内已有文献报道测定血浆中度洛西汀的方法，有 HPLC^[2-3]法，HPLC-MS^[4]法及 HPLC-MS/MS^[5]法，但 HPLC 及 HPLC-MS 法灵敏度不高，内源性杂质干扰大，选择性较差。关于 HPLC-MS/MS 法的测定报道，采用液液萃取法^[6]，存在处理繁琐，回收率较低的缺点，虽有有机试剂沉淀法的报道，但灵敏度只为 0.89ng/ml，且血浆用量较大。本文采用甲醇直接沉淀的方法，配以高灵敏度，缩短了样品测定所用的时间，实现了盐酸度洛西汀在人体血浆中的快速有效测定。

关键词：盐酸度洛西汀；盐酸氟西汀；药动学；LC-MS/MS

肠道菌 NR 酶与小檗碱的转化和吸收

寿伽文，蒋建东，王琰

（中国医学科学院药物所）

肠道菌群被称为隐形器官，包含数目庞大的微生物，含有大量的代谢酶，主要有各类水解酶、硝基还原酶、偶氮还原酶、蛋白酶、各种碳水化合物酶等，能对多种类型的成分进行代谢处置。口服药物不可避免与肠道菌群发生接触，因此对口服药物的肠道菌群转化研究将有助于了解该药物药效作用机制。

肠道菌群在与代谢性疾病上的相互联系已越来越被重视。小檗碱能有效治疗代谢紊乱性疾病如 II 型糖尿病，但是小檗碱的溶解性很差，肠道吸收机制目前仍未阐述清楚。本研究中，我们发现大鼠和人肠道菌群能将小檗碱转化成它的可吸收形式——二氢小檗碱，二氢小檗碱在动物肠道的吸收速率是小檗碱的 5 倍。在 KK-Ay 小鼠体内实验中，口服抗生素造成伪无菌鼠模型口服小檗碱使得小檗碱向二氢小檗碱转化的程度降低，血中小檗碱的浓度亦降低，小檗碱的降脂降糖药效也减弱。所以小檗碱良好药理作用的挥发依赖于肠道菌群。

从小檗碱到二氢小檗碱的转化由肠道细菌的硝基还原酶催化进行。大鼠和人混合肠道菌群都能将小檗碱代谢成二氢小檗碱，进一步研究肠道菌群中 14 种单一菌株转化小檗碱生成二氢小檗碱的能力，包括 10 种共生肠道菌：金黄色葡萄球菌，屎肠球菌，粪肠球菌，阴沟肠杆菌，大肠杆菌，表皮葡萄球菌，铜绿假单胞菌，肺炎克雷伯菌，奇异变形杆菌，鲍曼不动杆菌，以及 4 种益生菌：干酪乳杆菌，嗜酸乳杆菌，长双歧杆菌和短双歧杆菌，并且测定 14 株细菌中硝基还原酶的活性。结果发现这 14 株菌的转化生成二氢小檗碱能力与其所含的 NR 酶的活性成正相关，其中阴沟肠杆

菌和屎肠球菌所含的硝基还原酶活性最高，所以二氢小檗碱含量也最多，而 4 种益生菌所含硝基还原酶活性很低，对应产生二氢小檗碱也很少。之后，我们比较正常人肠道菌群和高脂血症与糖尿病患者肠道菌群的硝基还原酶活性以及其转化生成二氢小檗碱的能力。结果表明高脂血症和糖尿病患者肠道菌群中的硝基还原酶活性和生成二氢小檗碱的含量明显高于正常人群的肠道菌群，这可能提示我们与高脂血症及糖尿病相关的细菌中硝基还原酶表达会有所增加，进而能将更多小檗碱吸收进入机体内发挥治疗作用。

所以，肠道菌群和口服药物之间可以发生相互作用，可能会改变药物结构和药效，在药物研发时，对于肠道菌丛和口服药物的作用研究也是十分必要的。

关键词：小檗碱 肠道菌群 二氢小檗碱 硝基还原酶 糖尿病 高脂血症

致谢：感谢国家自然科学基金（81573493），创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室（Z141102004414062）和国家 863 计划（2014AA020803）的支持。

Nitroreductase from gut microbiota affects transformation and absorption of berberine

Jia-Wen Shou, Jian-Dong Jiang, Yan Wang

Gut microbiota has been recently considered as a “hidden organ” of body, consisting of nitroreductase, azoreductase, hydroxylase, protease and many kinds of carbohydrase etc, which can metabolize lots of components. In this case, it cannot avoid that some constituents will interact with intestine bacteria, as a result of which, the structures or the pharmacological effects might be changed, thus it is necessary to consider how the changes will be.

Gut microbiota has been recently considered important in pathogenesis of diseases related to energy metabolism. Oral administration of berberine (BBR) effectively treats patients with metabolic disorders. However, as BBR exhibits poor solubility, its absorption mechanism in intestine remains unknown. Here, we show that rat and human gut microbiota converted BBR into its absorbable form of dihydroberberine (dhBBR), which had an intestinal absorption rate 5-fold that of BBR in animals. Diminution of intestinal bacteria via orally treating KK-Ay mice with antibiotics decreased BBR-to-dhBBR conversion and blood level of BBR; accordingly, BBR’s lipid- and glucose-lowering efficacy reduced. Thus we conclude that the pharmacological effects of BBR depends on the existence of gut microbiota.

Reduction from BBR to dhBBR was done by nitroreductase (NR) of gut microbiota. Both human and rat gut microbiota can metabolize BBR into dhBBR, we explore the reduction ability of 14 intestinal bacterial strains and detect their NR activity, including ten symbiotic bacetira:

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, four probiotics: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bidifobacterium longum*, and *Bidifobacterium breve*. As shown in results, the level of NR in bacteria positively correlates to the capacity of reducing BBR (into dhBBR). *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus faecium* have the highest level of NR, thus producing the most dhBBR. While the four kinds of probiotics own very little NR, they produce very little dhBBR. Then we compare the reducing ability from normal people and diabetes and hyperlipemia patients gut microbiota. Gut microbiota from patients have higher level of this enzyme and do generate more dhBBR, which may hint that bacteria from those patients may have potentials to have more NRe and more BBR can be absorbed to exert the pharmacological effects.

Thus, interaction between gut microbiota and chemical drugs giving through oral route might modify structure and function of chemicals and be important in drug investigation.

Key words: berberine, gut microbiota, dihydroberberine, nitroreductase, diabetes, hyperlipemia

Acknowledgments: The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (81573493), Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD study (Z141102004414062), National 863 Program of China (No. 2014AA020803).

Metabolic Dynamic Responses of Rats to the aqueous extract of Cinnamomi Cortex Exposure

Wei lin, Deng Xue-jiao, Zhang PeiTing, Lin Man-na, Xie Zhi-yong, Liao Qiong-feng
(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510006, People's Republic of China)

ABSTRACT: Cinnamomi cortex, which always used as a traditional Chinese medicine, has been commonly used for the treatment of dyspepsia and gastritic diseases.

While previous studies have paid more attention on pharmacological action of cinnamon, but time-specific endogenous metabolites changes after given the aqueous extract of cinnamomi cortex is still lacking. We conducted the investigation to assess the metabolic response of rats to cinnamomi cortex, which including NMR metabolic profiles of urine or fecal and metabolic data analysis.

The previous investigation had demonstrated that the Cinnamon could hence the fatty acid metabolism of obese rats in the liver, and play a major part in preventing and combating nutritional obesity of rats.

In this investigation, a broad range of metabolites, such as Butyrate, Threonine, Cadaverine, Acetate, Glutamate, were identified.

The data analysis methods performed in this analysis are NMR spectra of collected example.

The principal component analysis (PCA) and orthogonal projection to latent structure-discriminant analysis (OPLS-DA) were employed for further analysis. PCA displayed an overview of intrinsic similarity using the NMR data and check possible outliers and OPLS-DA aimed at maximize the difference between the changes found in the treated groups and the control group.

The metabolites changes of rats mainly happened in the Tricarboxylic Acid Cycle(glucose, taurine, ethylene dicarboxylic acid, citric acid and trimethylamine oxide), Amino acid (valine, alanine, glycine, lysine and phenylalanine, etc.), organic acids (lactic acid, formic acid and hippuric acid and other organic acids). These results suggest the aqueous extract of cinnamomi cortex linked to energy metabolism, and the disturbance of gut microbial activity.

Our work shows significant insights on the dynamic metabolic response of cinnamomi cortex.

KEYWORDS: Cinnamomi cortex; NMR; metabonomics; time effect; rats.

Simultaneous determination of four furostanol glycosides in rat plasma by UPLC–MS/MS and its application to PK study after oral administration of *Dioscorea nipponica* extracts

Min Liao, Meicun Yao*

(Laboratory of pharmaceutical analysis, School of pharmaceutical sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou Higher Education Mega Center, Guangzhou, China.)

ABSTRACT: A novel, sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric (UPLC–MS/MS) method for simultaneous quantification of four furostanol glycosides in rat plasma was established and validated. Ginsenoside Rb1 was used as an internal standard. Plasma samples were pretreated by liquid–liquid extraction with n-butanol and chromatographed on a C18 column (2.1×50 mm i.d., 2.6 μm) using a gradient elution program consisting of acetonitrile and water (containing 0.03% formic acid and 0.1 mM lithium acetate) at a flow rate of 0.4 mL/min. Lithium adduct ions were employed to enhance the response of the analytes in electrospray positive ionization mode and multiple reaction monitoring transitions were performed for detection. All calibration curves exhibited good linearity ($r > 0.999$) over the range of 10–20000 ng/mL for protodioscin and 2–4000 ng/mL for protogracillin, pseudoprotodioscin and pseudoprotogracillin. The recoveries of the whole analytes were more than 80.3% and exhibited no severe matrix effect. Meanwhile, the intra- and inter-day precisions were all less than 10.7% and accuracies were within the range of –8.1 to 12.9%. The four saponins showed rapid excretion and relative high plasma concentrations when the validated method was applied to the PK study of *Dioscorea nipponica* extracts by intragastric administration at low, medium and high dose to rats. Moreover, the $T_{1/2}$ and AUC_{0-t} of each compound turned out to behave in a dose-dependent pattern by comparing them at different dose levels.

KEY WORDS: *Dioscorea nipponica*; UPLC–MS/MS; Furostanol glycosides; Lithium adduct; Rat plasma; Pharmacokinetics

组学与药物分析信息学

知母百合协同抗抑郁的代谢组学研究

杜红丽, 赵红霞, 董昕, 娄子洋

(第二军医大学药学院, 上海, 200433)

摘要: 抑郁症是一种常见的精神类疾病, 其临床特征表现为情绪低落, 思维迟缓, 同时可能伴有食欲减少, 体重下降, 兴趣丧失, 疲劳感增加, 失眠等症状, 患者一般严重缺乏自信, 对自我评价过低, 严重者可出现自杀念头和自杀行为。抑郁症严重困扰患者的生活和工作, 给家庭和社会带来沉重的负担。由于其具有高发病率, 高复发率, 高自杀率的特点, 已经引起了广泛的关注。抑郁症的发病机制复杂, 病因并不十分清楚, 多方面的因素参与了抑郁症的发病过程, 例如生物、心理与社会环境等。目前临床上广泛应用的抗抑郁药物, 主要通过调节单胺类神经递质的含量发挥抗抑郁作用, 然而仅有 60-70% 的病人对这些药物敏感, 而且长时间的服用会产生一系列的副作用。因此, 探索寻求新的, 有效而可靠的抗抑郁药物是非常必要的。

目的 本研究以知母、百合总皂苷为研究对象, 研究其对慢性温和和不可预知的大鼠模型的作用, 并采用 UHPLC-Q-TOF-MS 方法对大鼠血液及海马代谢组学进行分析, 以寻求与该模型导致抑郁的相关潜在生物标志物并进一步探索知母、百合皂苷对该模型的治疗作用及其可能的作用机制。**方法** 1. 采用慢性温和和不可预知的抑郁模型, 该模型是目前国内外学者应用最为广泛的模型。2. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术对大鼠血液及海马组织代谢轮廓进行分析。3. 应用无监督分析及多元统计学分析方法对数据进行分析。**结果** 结果显示模型组与健康对照组显著分离, 并且筛选出 35 个与慢性刺激模型相关的潜在生物标志物。其主要涉及的代谢通路包括苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸生物合成, 谷氨酸, 谷氨酰胺代谢, 三羧酸循环及甘油磷脂代谢。基于筛选的 35 个代谢物质, 我们对知母总皂苷, 百合总皂苷, 知母百合总皂苷配伍组及阳性药氟西汀的治疗作用进行系统的评价, 结果显示这 4 种药物干预均能通过改变不同代谢通路进一步改善模型诱导的抑郁状态。而且结合大鼠在行为学实验中的结果, 知母百合配伍治疗大鼠慢性抑郁模型的疗效较单一知母或百合组给药的治疗效果好, 且其与氟西汀治疗组的效果并没有显著性的差异。**结论** 利用代谢组学的方法研究表明, 知母百合总皂苷配伍具有较好治疗大鼠抑郁的作用, 并主要通过调节氨基酸代谢, 三羧酸循环及甘油磷脂代谢等多个代谢通路起作用, 为知母百合总皂苷配伍作用靶点的研究提供一定的思路。

关键词: 抑郁; 知母总皂苷; 百合总皂苷; UHPLC-MS; 代谢组学

基于 NMR 与 LC/MS 分析技术的肝细胞肝癌与肝硬化 血清代谢组学研究

刘悦¹, 赵亮², 张国庆², 柴逸峰¹

(1. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433;

2. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

摘要: 肝细胞肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 发现能够区分早期肝细胞肝癌患者与其高危人群肝硬化患者的生物标志物十分重要, 然而这方面的研究却很少。因此, 为了实现肝癌的早期诊断和预后情况监测, 鉴定与验证新的肝细胞肝癌生物标志物并建立一种新的策略迫在眉睫。本研究着力于通过核磁共振和液质联用等分析方法同时结合随机森林算法来对早期肝细胞肝癌患者、肝硬化患者和健康志愿者的血清样本进行代谢轮廓分析, 以期发现相关的标志物。本研究鉴定了三十二个潜在生物标志物, 之后利用这些生物标志物建立的诊断模型来评估这些标志物区分早期肝细胞肝癌患者与肝硬化患者的能力与可信度, 结果表明该模型检测早期肝细胞肝癌患者时达到了 100% 的敏感性, 而且是在有很多肝细胞肝癌患者的 AFP 值低于 20 ng/mL 的情况下实现的。肝细胞肝癌引起的代谢通路改变包括了: 酮体合成代谢, 柠檬酸循环, 磷脂代谢, 鞘脂类代谢, 脂肪酸氧化, 氨基酸分解代谢和胆汁酸代谢通路。该结果表明, 这些鉴定的潜在生物标志物可能为肝细胞肝癌患者的早期诊断和预后评估带来新的契机, 当然这个方面还值得进行进一步的调查研究。此外, 本研究还证明了, 随机森林分类算法适合于筛选代谢组学的潜在生物标志物。

关键词: 肝细胞肝癌, 代谢组学, 液质联用, 核磁共振波谱

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors in the world. However, current biomarkers that discriminate HCC from liver cirrhosis (LC) are important but are limited. More reliable biomarkers for HCC diagnosis are therefore needed. Serum from HCC patients, LC patients and healthy volunteers were analyzed using NMR and LC/MS-based approach in conjunction with random forest (RF) analysis to discriminate their serum metabolic profiles. Thirty-two potential biomarkers have been identified, and the feasibility of using these biomarkers for the diagnosis of HCC was evaluated, where 100% sensitivity was achieved in detecting HCC patients even with AFP values lower than 20 ng/mL. The metabolic alterations induced by HCC showed perturbations in synthesis of ketone bodies, citrate cycle, phospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, fatty acid oxidation, amino acid catabolism and bile acid metabolism in HCC patients. Our results suggested that these potential biomarkers identified appeared to have diagnostic and/or prognostic values for HCC, which deserve to be further investigated. In addition,

it also suggested that RF is a classification algorithm well suited for selection of biologically relevant features in metabolomics.

Key words: hepatocellular carcinoma, metabolomics, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance

炎症性肠病及雷公藤红素治疗作用的脂质组学研究

王仁萍^{1,†}, 辜雪琴^{1,†}, 戴蔚荃¹, 叶隽², 陆峰¹, 柴逸峰¹, 范国荣¹, Frank J. Gonzalez³, 段更利^{4,*}, 亓云鹏^{1,4,*}

(¹第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海, 200433; ²上海市闸北区食品药品监督管理局, 上海, 200436; ³代谢研究室, 国立癌症研究中心, 美国国立卫生研究院, 20892; ⁴复旦大学药学院, 上海, 201203.)

摘要: 炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)是一组肠道炎症性疾病的统称, 目前我国特别是上海等地区发病率不断上升。IBD的发病原因未明, 临床也缺乏治疗IBD的有效药物。本研究首先通过给予C57BL/6J雄性小鼠硫酸葡聚糖(DSS), 建立了可模拟人类炎症性肠病(IBD)的动物模型, 并通过观察小鼠体重、结肠长度及病理变化、腹泻及结肠出血指数等相关指标来进行模型评价。接着, 为研究IBD的发病机制, 我们采用基于LC-MS的脂质组学手段研究IBD小鼠的代谢特征, 发现其体内鞘磷脂(SM)和神经酰胺类(CER)等代谢物的水平显著上调, 表明脂质如鞘磷脂可能为调节炎症反应的重要信号分子。雷公藤红素是从卫矛科植物中提取的三萜类单体, 具有明确的抗炎、抗肿瘤作用。我们基于DSS诱导的IBD小鼠模型, 对雷公藤红素治疗IBD的作用进行了评价, 发现雷公藤红素显示了良好的药效, 可显著缓解IBD症状, 并降低IBD小鼠血清中TNF- α 水平。在此基础上, 我们基于LC-MS技术, 开展了正常小鼠、IBD小鼠、雷公藤红素治疗IBD小鼠的脂质组学研究, 发现SM等与IBD及炎症密切相关的一些脂类代谢物的水平在IBD小鼠的血清和结肠中发生显著变化; 而雷公藤红素给药后, 上述脂类代谢物的水平得到了明显回调。基于上述代谢通路, 通过定量PCR分析, 我们测定了小鼠结肠以及肝组织中关键酶的表达情况, 结果表明雷公藤红素可显著回调IBD小鼠体内的关键酶的表达水平。本研究不仅确证了雷公藤红素治疗IBD的药效作用, 而且通过脂质组学分析, 进一步揭示了与IBD及雷公藤红素治疗作用密切相关的代谢通路和关键酶, 为进一步阐明雷公藤红素治疗IBD的作用机制提供了科学依据。

关键词: 雷公藤红素; 炎症性肠病; 脂质组学; 作用机制

反卷积法研究酒石酸唑吡坦双层缓释片体内外相关性

张倩倩, 柴逸峰, 陆峰*

(第二军医大学药学院, 上海, 200433)

摘要: **目的** 体内吸收特征研究方法有模型依赖法和反卷积法, 反卷积法不需要进行房室模型拟合, 直接用数学方法以真实的实验数据计算体内吸收分数, 尤其适用于房室模拟困难的药物和控缓释制剂的体内外相关性研究。本文采用反卷积法评价酒石酸唑吡坦双层缓释片体外释放与比格犬体内吸收相关性。为自制酒石酸唑吡坦缓释片体外释放数据预测体内药时数据提供一定的科学依据。**方法** 采用篮法, 100 转, 以 500ml, 0.01mol/L 盐酸为释放介质, 测定体外释放度; 采用 HPLC—MS/MS 法测定 Beagle 犬单剂量口服自制片后血浆中的药物浓度。**结果** 按照体外溶出度试验方法测定 3 批酒石酸唑吡坦双层缓释片样品 (n=6) 平均释放度结果如图 1 所示, 其中 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 9, 12h 的平均释放百分数为 51.79, 58.49, 63.99, 67.76, 75.42, 81.15, 85.95, 89.14, 93.75, 98.27, 99.46, 100.35。

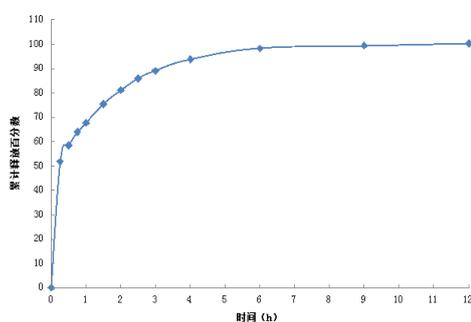


图 1: 原研样品平均释放曲线

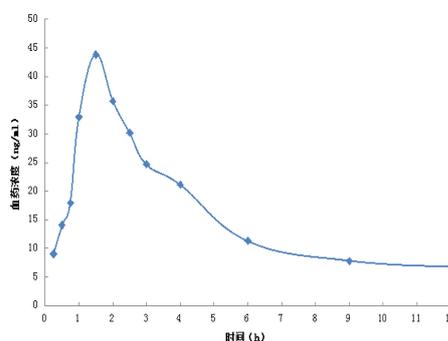


图 2: 口服给药比格犬体内药时曲线

单剂量口服给药酒石酸唑吡坦缓释片的比格犬体内药时曲线见图 2。根据反卷积公式计算出体内释放百分数并与相应时间点的体外释放进行回归, 回归方程为 $Y=0.4636x-12.507$ ($r=0.9319$), 表面酒石酸唑吡坦缓释片体内外相关性良好, 可用本法预测自制片的体内释放情况。**结论** 反卷积法合适酒石酸唑吡坦缓释片体内外相关性评价。

关键词: 反卷积法; 体内外相关; 酒石酸唑吡坦; 双层缓释片;

基于概率神经网络分析的石斛药材 HPLC 图谱鉴别

马骁¹, 姚泽炳², 王建³, 江舟³

(1. 福州大学石油化工学院, 福建 福州 350108; 2. 福州市食品药品检验所, 福建 福州 350007; 3. 福州大学化学学院, 福建 福州 350108)

摘要: 目的: 通过 HPLC 指纹图谱研究, 快速有效的辨别不同种属的石斛药材。方法: 选用各 10 批不同产地、不同批号的鼓槌石斛、金钗石斛和铁皮石斛作为研究对象, 采用高效液相色谱法建立三种石斛的指纹图谱后, 对色谱原始数据进行特征值提取, 进行聚类分析和概率神经网络的训练与预测。结果: HPLC 法的重现性、精密度、稳定性试验 RSD 均小于 5%, 聚类分析结果显示三种石斛之间存在显著差异, 结果准确。PNN 训练和预测的正确率高达 85% 以上, 说明使用 PNN 分析法对石斛种属的判别具有计算快速, 结果直观, 操作简单易行的优点。

关键词: 概率神经网络, 石斛, 高效液相色谱法

Using HPLC to Identify Dendrobium Based on Probabilistic Neural Network

Ma Xiao¹, Yao Zebing², Wang Jian³, Jiang Zhou³

(1. School of Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, P. R. China 2. Fuzhou Institute for Food and Drug Control, Fuzhou 350007, P. R. China 3. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, P. R. China)

Abstract: Objective: To identify different species of Dendrobium quickly and effectively by HPLC fingerprint method. **Methods:** To establish HPLC fingerprint of each ten batches *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, *Dendrobium nobile* Lindl and *Dendrobium officinale*. Wall. ex Lindl from different locations and batches, then analysis the data of chromatogram by cluster analysis and probabilistic neural network. **Result:** This method's reproducibility, precision, stability test RSD were less than 5%. The Cluster analysis showed that there were significant differences among the three Dendrobium. PNN training and prediction's accuracy rate was over 85%. The result showed that the PNN method can discriminate the different species of Dendrobium simply and rapidly.

Key Words: Probabilistic Neural Network, Dendrobium, HPLC

基于化学蛋白组技术的脂质过氧化产物修饰谱动态定量分析

杨靖^{1,2}

(1. 国家蛋白质科学中心 (北京) 2. 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室)

摘要：氧化应激产生的内源性脂质过氧化产物对蛋白质的共价修饰不仅会造成细胞毒性作用，还会对细胞内的诸多信号转导通路产生影响。鉴定细胞中脂质过氧化产物的修饰蛋白靶点对于了解其生物学效应至关重要。为此，我们开发了一种能够在整体水平上分析脂质过氧化产物蛋白靶点的新型定量化学蛋白组技术，该技术主要分为以下六个步骤：（1）用炔基标记的脂质过氧化产物类似物处理不同条件下的活细胞；（2）用胰蛋白酶将提取的细胞蛋白样品酶解为多肽；（3）通过铜催化叠氮-炔基环合反应（亦即“点击化学”）将稳定同位素标记的可光解生物素基团结合到修饰多肽上；（4）用链霉亲和素富集生物素化多肽；（5）液质联用分析；（6）蛋白组学数据处理与定量分析。我们运用该技术鉴定并定量测定了活细胞蛋白组中近 400 个脂质过氧化产物修饰位点及其动态变化水平（其中包括 386 个半胱氨酸残基位点和 12 个组氨酸残基位点）。该研究成果将现有数据库中脂质过氧化产物修饰靶蛋白的数目提高了整整一个数量级，为下游功能研究奠定了坚实的基础。出人意料的是，我们发现这些长期以来被认为是不可逆的共价修饰（主要通过迈克尔加成反应）在细胞中被快速消除而在体外体系中则较为稳定，而且这些修饰的动态变化存在一定的位点依赖性。这些发现说明脂质过氧化产物修饰是一种可逆性动态反应过程并且细胞中存在一些新型去共价修饰的酶学机制。本研究建立的定量化学蛋白组技术平台还可能广泛用于其它类型蛋白翻译后修饰研究或共价抑制剂的靶点鉴定。

关键词：化学蛋白组、质谱、脂质过氧化、共价修饰、点击化学

基于 UHPLC-QTOF-MS 技术的血清鞘脂组学分析新方法研究

章弘扬，仰贤莉，万幸，胡坪*

（华东理工大学，化学与分子工程学院，上海，200237，E-mail: Huping@ecust.edu.cn）

鞘脂（Sphingolipids）是一类极为重要的脂质分子，对体内鞘脂组的整体分析—鞘脂组学（Sphingolipidomics）研究，有望为相关疾病的早期诊断、生物标志物的发现和疾病发生机制的探索等提供新契机。我们采用改进的单相提取和 UHPLC-QTOF-MS 技术，建立了人血清中 10 大类鞘脂同时定性、定量分析的新方法。主要研究内容如下：（1）设计和比较了 4 种方案对血清鞘脂的提取效果（图 1 左），并最终确立了“甲醇/氯仿/水体系结合 37℃ 碱水解”的提取方法，较之以往报道具有处理时间短、基质干扰小和提取种类多等优点；（2）在优化的色、质谱条件下，从人血清中鉴

定出包括单唾液酸神经节苷脂（Ganglioside GM3）在内的 146 种鞘脂，尤其是通过 UHPLC 高效分离和 QTOF-MS 高分辨二级质谱检测，部分消除了常规分析中普遍存在的同位素以及同分异构体干扰，使得先前被掩盖的多种低丰度鞘脂能够被准确定性和定量（图 1 右）；（3）对所建立的鞘脂组学分析方法进行方法学验证，结果表明，10 种鞘脂内标的加标回收率为 83.9-100.4%，日内及日间重复性分别低于 8.6% 和 12.2%，检出限（LOD）范围为 1.56-33.52 pmol/mL。该方法是目前为止在血液中单次检测鞘脂数目最多的一种分析方法，将为我们开展老年痴呆、糖尿病等方向的深入研究提供良好的技术平台。

关键词：鞘脂组学；UHPLC-QTOF-MS；人血清；鞘脂提取；定性定量分析

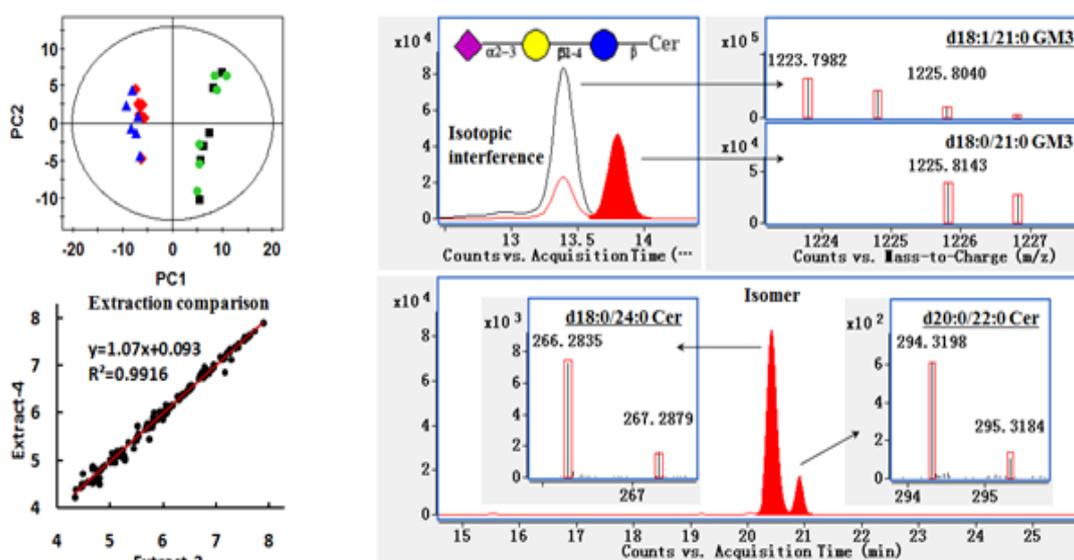


图 1. 血清鞘脂提取方法比较（左图）及鞘脂分析中同位素及同分异构体干扰的消除（右图）

基于药物代谢组学对健康受试者体内阿托伐他汀药代动力学个体差异性的预测

黄青^{1,2}, 阿基业¹, 王广基¹, 周国华^{1,3*}

- (1. 中国药科大学, 南京 210009; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008;
3. 南京军区南京总医院, 南京 210002)

个体差异影响药物的代谢和处置，并进一步影响药效及毒性。除基因多态性之外，多种因素如生活习惯、饮食偏好等均可能导致个体差异。然而，长期以来一直缺乏定量描述个体差异的方法，使得临床个体化给药难以实现。本研究选取了临床使用

范围广泛且存在较大个体差异的一线心血管用药阿托伐他汀作为研究对象，建立了快速灵敏的 LC-MS/MS 检测方法，系统评价了 48 名健康受试者血浆中阿托伐他汀及其代谢产物的药代动力学特征。试验结果显示，给药后个体阿托伐他汀的药动力学反应存在的巨大个体差异，48 名受试者 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、代谢率的最大值和最小值分别相差 15、12、21 倍，揭示了阿托伐他汀在临床合理用药方面存在的问题与挑战。进一步以 GC/MS 为检测平台，通过对受试者基础水平血浆代谢组的研究，结合多变量统计模型，筛选潜在的预测性生物标志物，以代谢表型对给药后阿托伐他汀的药动力学个体差异进行预测。最终我们以受试者血浆中 17、12 种小分子化合物给药前的基础水平值建模， C_{max} 预测模型可以解释 75%、预测 62% 的 C_{max} 个体差异；AUC 预测模型可以解释 77%、预测 64% 的 AUC 个体差异。对训练集 36 名受试者， C_{max} 与 AUC 实际值与预测值相关系数 r 分别为 0.863 与 0.87；对预测集 12 名受试者的 C_{max} 与 AUC 值实际值与预测值相关系数 r 分别为 0.825 与 0.872。预测集受试者中的高值与低值亚组也可通过基础代谢表型得到良好区分，指导临床个体化给药。此外，本研究还建立了可以预测受试者体内 CYP3A4 酶活性的 PLS 模型，模型可以解释 57%、预测 32% 的 CYP3A4 酶活性个体差异，酶活性实际值和模型预测值的相关系数 $r=0.753$ 。血浆基础代谢组水平，能够在一定程度上表征 CYP3A4 酶的体内活性，通过基础代谢表型，可以对实际慢代谢、快代谢的人群进行预测分型，为临床精准医疗中的亚型人群划分提供了可以借鉴的方法。最后，本研究对模型中涉及的预测性生物标志物的预测能力，与传统生理生化指标进行了对比，并对其涉及的生物通路和机制进行了探讨。

关键词：精准医疗，个体化给药，药物代谢组学，药物代谢动力学，阿托伐他汀

金铃子散镇痛作用的代谢组学初步研究

黄荣清 水素芳 沈淑洁

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所)

摘要 目的：观察金铃子散对小鼠的镇痛作用的影响。金铃子散出自《保命集》，由延胡索、川楝子（金铃子）两味中药组成，该复方活血行气止痛而不耗伤，气血并行，互为补用。金铃子散临床上辩证应用于各类疼痛性疾病，如：胸痛，胁痛，胃脘痛，头痛，痛经等疗效显著。利用代谢组学方法对进入体内的金铃子散水煎液的代谢产物变化或随时间变化进行分析，应用 LC/MS 法对鼠中金铃子散进行代谢轮廓分析，对其降解的生化途径作以阐述。本研究旨在观察金铃子散的镇痛功效并为临床治疗提供依据。

方法: 主要以醋酸扭体法、福尔马林和热板法等三批实验所建的疼痛模型来观察金铃子散的镇痛作用。将若干昆明小鼠按体重随机区组法分为空白组、对照组、金铃子组、阿司匹林组,除空白组外,其余各组均分别注射适当浓度的醋酸,福尔马林溶液及在55℃水浴玻璃板引致小鼠疼痛模型,以扭体次数(15min内)、舔足时间为动态测定指标来观察小鼠在给药前后的痛阈值变化,并记录。采用SPSS8.0统计软件,进行重复测量设计的方差分析,观察其药理学特征。收集给药后的血清,基于LC-MS液质联用技术建立适用于血清中光谱小分子代谢物分析的高通量强耐用的代谢组学方法,特别能满足大批次代谢组学研究的要求,对最终确定的前处理及分析方法进行方法学考察,结果重现性、精密度、稳定性均良好,再分别检测分析空白组与对照组、金铃子散组、阿司匹林组代谢物谱的差异性变化,筛选出具有标志代谢物组作用的若干关键代谢物,从整体性角度来探寻其止痛的生物学基础和病理生理机制。

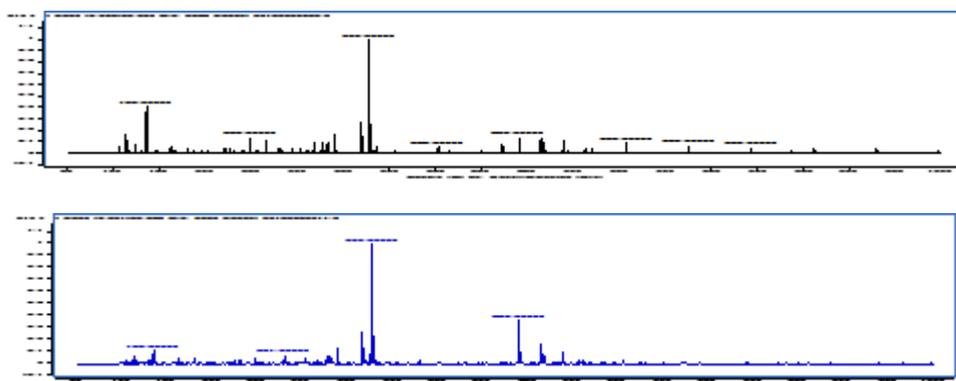
结果: (1) 行为学观察中,在醋酸扭体实验中,金铃子散组及阿司匹林组在给药后30min、60min、90min能明显提高小鼠的痛阈值,抑制小鼠的扭体次数相应缩短扭体时间;热板法及福尔马林法的实验中给药后舔足时间也明显缩短,表现出明显抑制作用。

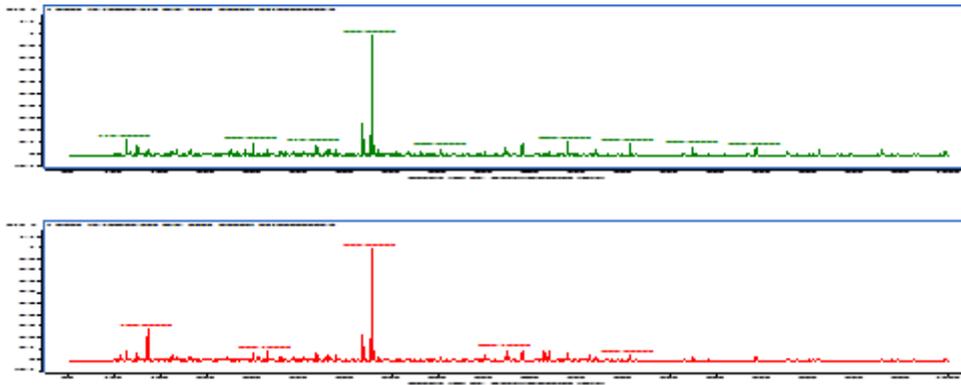
(2) 从对照组和模型组疼痛模型小鼠血液的比较代谢主成分分析来看,发现了疼痛模型血液表型的某些可鉴定的代谢产物标志物,利用多维分析和单维分析相结合的数理统计方法找到了差异性代谢物,与前面的行为学研究刚好相符,从而可以推断基本的代谢途径。

结论: 金铃子散水煎液具有镇痛作用。通过调节体内某些氨基酸等小分子的变化而发挥其镇痛作用。

关键词: 金铃子散 代谢组学 LC-MS联用 镇痛

通讯地址: 北京市海淀区太平路27号院军事医学科学院 邮编: 100850 电话: 010-66930217





各批次实验的标志性代谢物质谱图

半夏厚朴汤在慢性应激大鼠模型中抗抑郁效应的代谢组学研究

黄荣清, 胡秋菊, 杨建云, 肖炳坤

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所)

摘要: **目的:** 考察抑郁症的代谢特征, 探讨中药复方半夏厚朴汤的抗抑郁作用, 并研究其对各种生物途径的影响机制。

方法: 运用经典的慢性应激 (CRS) 模型, 以动物行为学和代谢组学的方法研究了中药复方半夏厚朴汤的抗抑郁效应。采用 $^1\text{H-NMR}$ 和 HPLC-MS/MS 联合的代谢组学分析技术, 结合主成分分析 (PCA) 与偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 法, 通过对空白组、模型组、半夏厚朴汤组 (高剂量组 (500mg/kg)、中剂量组 (200mg/kg) 和低剂量组 (50mg/kg)) 大鼠尿液、血液的代谢变化特征及生物标记物的分析, 探究空白组、模型组与半夏厚朴汤组大鼠尿液、血液的主要代谢物质差异, 寻找出抑郁症的潜在生物标志物, 构建半夏厚朴汤治疗机制的代谢网络。

结果: 中药复方半夏厚朴汤对慢性应激所致的抑郁大鼠行为学指标有改善趋势, 高剂量组和低剂量组大鼠与 CRS 组大鼠相比能够显著的减少大鼠的悬尾不动时间和强迫性游泳时间。通过模式识别, CRS 组与高剂量组和低剂量组相比, 大鼠血浆和尿液中的内源性产物的代谢轮廓显著不同, 犬尿喹啉酸、马尿酸、苯丙氨酸、尿素的呈上升趋势, 色氨酸、乳酸、乙酸、硬脂酸、柠檬酸、琥珀酸、2-酮戊二酸、尿酸、肌酸、磷酸肌酸、肌酸酐呈下降趋势, CRS 组与低剂量组相比无显著性差异。将这些代谢物进行代谢网络构建, 发现氨基酸途径、能量代谢途径、肠微生物代谢途径、尿素循环 (精氨酸及脯氨酸代谢)、其他途径 (胆碱及溶血磷脂酰胆碱和尿酸及甜菜碱) 与

抑郁症显著相关。与 CRS 模型组相比，高剂量组大鼠尿样和血清中各种代谢物含量表现出了较为显著的翻转作用，中剂量组作用次之，而低剂量组与模型组无显著性差异。

结论：半夏厚朴汤对 CRS 模型组大鼠有潜在的抗抑郁作用，并且存在着量效关系。CRS 模型组大鼠血浆和尿液中的硬脂酸、柠檬酸、琥珀酸、2-酮戊二酸、肌酸、磷酸肌酸、肌酸酐呈下降趋势，这与能量代谢途径的异常相关，苯丙氨酸、犬尿喹啉酸和色氨酸含量的变化与氨基酸代谢途径的异常相关，马尿酸含量的降低与肠微生物代谢途径的异常相关。因此，抑郁症可能与氨基酸途径、能量代谢途径、肠微生物代谢途径、尿素循环等代谢途径的异常有关系。

关键词：半夏厚朴汤；抗抑郁作用；¹H-NMR；HPLC-MS/MS；代谢组学ⁱⁱ

基金项目：国家自然科学基金（No.21375147，81072613）；

北京自然科学基金（No.7142125）；

国家科技重大新药创制专项（No.2013ZX09102-016）；

十二五国家科技重大专项重大新药创制综合性新药研究开发技术大平台（No.2012ZX09301003-001-010）。

¹H NMR 技术用于金铃子散抗炎标记物的探索

沈淑洁，肖炳坤，杨建云，黄荣清*

（军事医学科学院放射与辐射医学研究所）

目的：代谢组学（metabonomics 或 metabolomics）为在特定时间内系统性分析生物体液或生物组织中代谢物的差异性表达 [1]。在其应用分析技术中核磁共振技术以其高通量分析及样品无损性分析的特点而被广泛应用。[2-4] 中药方剂药物代谢组是药物代谢组学与传统的中药学和方剂学融合以及药物代谢组学在这些领域应用的一个新的成果 [5]。金铃子散方出自刘完素的《素问·病机气宜保命集》，由延胡索、川楝子（又名金铃子）两味中药组成，能够疏肝泻热，活血止痛。本实验以代谢组学的视角，通过研究金铃子散对 SD（sprague-dawley）大鼠角叉菜胶致炎模型的抗炎效果，并对不同组别的大鼠血清进行了 ¹H NMR 测定分析，通过比较各组代谢物的差异，以期探索金铃子散抗炎标记物。

方法：本实验选取雄性 SD 大鼠为实验动物，并分组为模型组、阳性对照组、金铃子

散（低、中、高）实验组。阳性对照组灌胃给予阿司匹林，给药 14 天后，自大鼠右后跖足皮内注射 1%角叉菜胶生理盐溶液致炎，记录抑制率（%）以反映药物抗炎作用强度。并将各组大鼠致炎后 3h 分别于大鼠腹主动脉收集血液，至室温下静置，离心，取上清，并添加内标 (TSP) 和 D_2O ，转入 5mm 样品管中进行 NMR 测试。在 VarianUNITY INOVA 600 超导脉冲傅里叶变换 NMR 谱仪上采集数据（图 1），并将所产生的所有积分数据归一化，并进行 PCA, PLS 等模式识别分析。

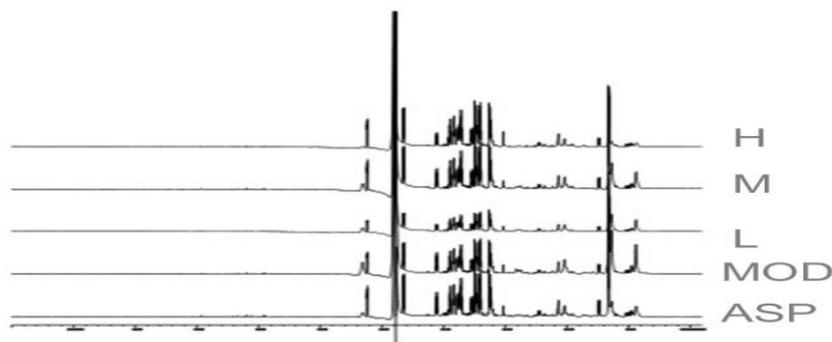


图 1:

结果: 在 1H NMR 技术分析金铃子散对角叉菜胶致炎模型的抗炎效果实验探索中，通过 Simca-p 软件进行 PLS 分析，从 PCA 荷载图和 VIP 值图得到差异性较大的代谢产物，分析体内小分子代谢物的变化得到 9 个差异性代谢物，分别为柠檬酸，苹果酸，琥珀酸，谷氨酸，天冬氨酸，赖氨酸，牛磺酸，2-酮戊二酸，甘氨酸。

结论:在这 9 个差异性代谢物中，2-酮戊二酸、柠檬酸，苹果酸，琥珀酸为三羧酸循环 (TCA) 的中间产物，在能量代谢过程中扮演着重要角色，它们在机体含量出现异常，便可能引起 TCA 功能缺失或紊乱。同时，2-酮戊二酸是体内多种转氨酶的受体，可以与体内代谢产生的氨结合，在哺乳动物体内，过量的氨会影响大脑代谢，改变了神经递质水平。因此 2-酮戊二酸、柠檬酸，苹果酸，琥珀酸含量的变化可能是由于大鼠体内氨水平变化所致，氨极易通过血-脑屏障，使得脑细胞中 2-酮戊二酸水平变化，三羧酸循环增强，能量生成增加，导致代谢出现异常。

关键词: 金铃子散； 1H NMR 技术；主成分分析；代谢组学

基金项目: 国家自然科学基金 (21375147)

北京自然科学基金 (7142125)

十二五国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术大平台 (2012ZX09301003-001-010)

***通讯作者:** 黄荣清，北京市海淀区太平路 27 号军事医学科学院，邮编:100850，电话: 010-66930217, Email: hrongqing@163.com

基于 ¹H-NMR 及 LC-MS 代谢组学技术研究贯叶连翘对自然更年期 (衰老) 大鼠模型的影响

沈淑洁; 黄荣清; 肖炳坤; 杨建云

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所)

目的: 在生物体衰老的过程中, 机体中维持自由基平衡的大分子酶类对自由基清除能力下降, 细胞内线粒体在氧化应激状态下导致蛋白质、脂质、核酸呈现年龄依赖性过氧化, 线粒体膜通透性被破坏, 氧呼吸链活性降低, 进而加速活性氧簇数量增加^[1-3]。过量的活性氧对机体的各个系统尤其是生殖系统产生病理性的影响, 最终导致各种疾病的产生^[4-5]。大鼠寿命约为 2.5 年左右, 在大约 12 月龄时进入与人类相似的更年期阶段。在这一阶段, 大鼠体内与生殖相关的脏器功能出现退行性变化, 血清雌激素水平及受体表达量降低并伴有高卵泡刺激素和低卵泡抑制素分泌水平变化, 氨基酸类神经递质如 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸等水平降低^[6]。由于目前, 对更年期退行性疾病的研究主要集中在氧化应激机制方面^[7]。12 月龄大鼠属于自然老龄化更年期动物模型, 在这一阶段大鼠机体器官自然凋亡, 内分泌功能下降, 内源性代谢物出现相应的“萎缩性”变化^[8], 巢摘除术 (OVX) 大鼠属于诱发型动物模型, 能够快速模拟出更年期雌激素水平衰退后引发的一系列综合病征的状态, 体内的内源性代谢物水平也呈现特异性的应答。本研究基于 LC-MS 技术, 运用发现和靶向代谢组学研究方法, 以巢摘除术 (OVX) 大鼠诱发型模型, 快速模拟更年期雌激素水平衰退后引发的一系列综合病征的状态, 分析老龄化大鼠代谢轮廓, 旨在获得全面的老龄更年期大鼠代谢组水平的变化特征, 发现并筛选与年龄相关的生物标记物。

方法: 本研究首先对 6 月、12 月和 18 月龄大鼠的尿样进行 NMR 发现代谢组学分析, 通过建立多元统计分析模型, 获得与大鼠年龄相关的代谢物组。以 NMR 靶向代谢组学方法对这些代谢物组进行进一步确证和统计学分析后, 获得潜在的生物标记物组。另外采用 LC-MS 发现代谢组学分析方法, 提取 LC-MS 正负离子数据, 经标度化预处理数据后, 以 XCMS 建立两种离子模式数据的 PCA 模型。如图 1 所示, 正负离子模式 PCA 分析提取前三个主成分方差贡献率(R2)及累计贡献率(Q2), 两种模式下的 PCA 模型有 99% 以上的变量可用于预测 6 月龄与 18 月龄大鼠之间 85% 以上的差异, 模型预测能力良好。由两种离子模式的 PCA 分析 TOP25 载荷图不仅可以确定代谢物变量间的相互关系, 还能指出不同年龄阶段雌性大鼠尿样代谢物中差异表达的内源性代谢物。

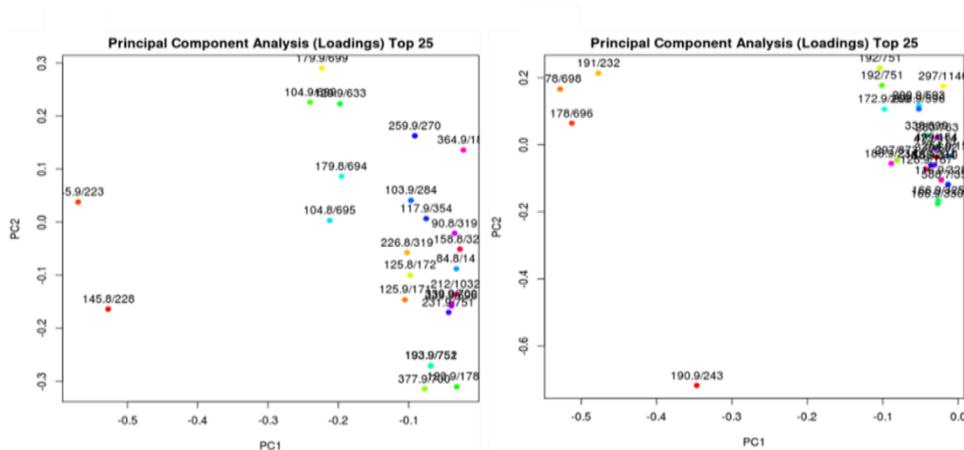


图 1 正负离子模式 PCA 拟合参数，散点图及载荷图

结果: 通过 XCMS 在线分析大鼠正负模式离子检测谱，对代谢谱 LC-MS 分析实验中标记的代谢物进行鉴定，对 NMR 实验的差异代谢物组进行补充，以 MetPA 对 NMR 及 LC-MS 实验中筛选出的代谢物组进行代谢通路分析，以期寻找与年龄和更年期退行性疾病相关的潜在重要分子靶标并进行通路富集和网络构建，最后根据得到的 MetPA 预测数据，进行代谢机制预测和解释。将 1H-NMR 及 LC-MS 筛选出的 29 个代谢物数据导入 MetPA 进行代谢通路查询。在给出的相关 30 条通路分析的详细结果，综合 Raw p、Holm p 和 FDR (false discovery rate) 和 Impact 值结果，对与衰老相关代谢通路的重要性进行评价。结果得到 3 条代谢通路：三羧酸循环、精氨酸和脯氨酸代谢和乙醛酸代谢通路。4 个代谢组集合分别对应着与老龄化相关的 4 个代谢通路：1.三羧酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)；2. 精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism；3.乙醛酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism；4.烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism；5. 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis

结论: 在本研究中，我们采用了基于核磁共振和液质联用的代谢组学研究方法，通过比较 6 月龄到 18 月龄三个不同生长阶段雌性大鼠代谢谱的差异，识别与年龄（衰老）相关的代谢物通路，并对老龄化可能出现的病征进行代谢通路识别和分析（图 2）。由代谢网络图可以看出，与年龄相关的代谢通路主要和生物氧化呼吸链反应以及尿素循环有关，这些代谢通路与肝脏线粒体功能相关性很大。

关键词: 贯叶连翘；LC-MS 技术；更年期；自然衰老

基金项目: 国家自然科学基金(21375147)

北京自然科学基金(7142125)

十二五国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术

大平台(2012ZX09301003-001-010)

通讯作者：北京市海淀区太平路 27 号军事医学科学院，邮编:100850，

电话： 010-66930217 Email: hrongqing@163.com

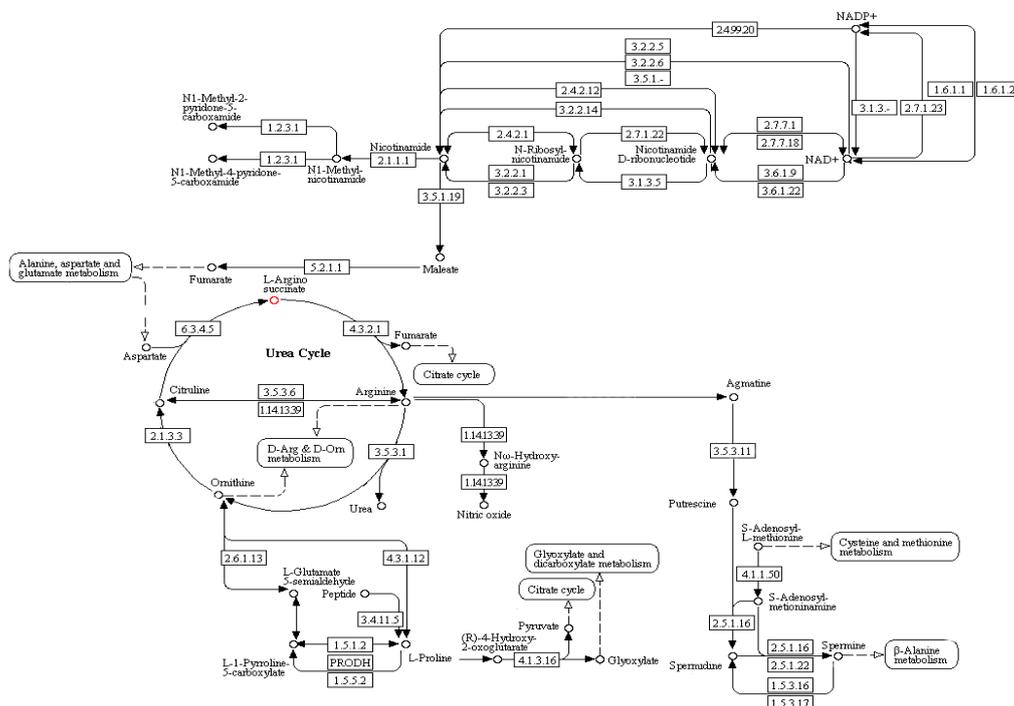


图 2 与年龄（衰老）相关代谢通路网络图

蛋白质-代谢物组相互作用的代谢组学新方法研究

梁晓萍，罗国安，梁琼麟

（清华大学化学系，北京市，邮编 100084）

摘要：代谢组学极大地促进了诸多生物、医学问题的研究，使其在临床疾病诊断、病理机制的探索、治疗新靶点的发现等研究中发挥了极为重要的作用，但同时也存在缺陷，其不足主要体现在以下几个方面：①寻找到的标志物往往集中在一些弱极性 or 含量较大的物质上（如脂类等），而遗漏了一些强极性 or 低浓度物质之间的变化，造成信息丢失；②绝大多数潜在的生物标志物对于不同的疾病和代谢网络缺乏特异性；③确认所有差异代谢物的功能面临巨大挑战；④绝大多数潜在的生物标志物都缺乏可靠的临床验证，能否在临床上得到应用还是未知数。代谢组学的发展迫切需要解决当

前面临的问题。因此,发展既能体现代谢组学特征又能克服以上缺陷的新方法具有重要意义。

心肌型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)是一种存在于心肌组织中的可溶性蛋白质,通过运输细胞内的长链脂肪酸进入人体的能量代谢体系,参与脂肪酸的代谢调节,从而对心肌细胞形成保护。心肌细胞受损时,H-FABP因其分子量小,能被迅速释放进入外周血液循环,因此被作为心肌损伤早期特异性标志物。本研究选择H-FABP为目标蛋白质,经交联剂将其固定于磁珠上,形成磁珠-交联剂-蛋白质,进而将磁珠-交联剂-蛋白质与细胞或组织裂解液共孵育,形成磁珠-交联剂-蛋白质-代谢物复合物,然后通过洗脱溶剂使蛋白质-代谢物(主要为脂类)从磁珠上解离下来,最后得到的蛋白质-代谢物直接进行LC-MS分析,通过代谢组学软件XCMS分析找出潜在生物标志物。相对于传统的临床代谢组学研究方法,该方法有以下优势:通过蛋白质对代谢物的富集能实现对低浓度(痕量)的代谢物的检测;找到的生物标志物具有特异性和临床应用性;不需要进一步的实验验证。将该方法应用于急性心肌梗死的研究,可为临床治疗提供依据,为新药开发提供靶标。

项目资助: 本文系国家自然科学基金(No. 81402897)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯联系人:** 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

关键词: 代谢组学; 蛋白质-代谢物相互作用; 蛋白质固定; 生物标志物

基于定量代谢组学的多囊卵巢综合征机制探讨

范雪梅¹, 龚菊梅¹, 蒋建发², 王义明¹, 孙爱军², 罗国安^{1,*}

(清华大学化学系, 北京 100084; 中国医学科学院北京协和医院妇产科, 北京 100730)

多囊卵巢综合征(PCOS)是以稀发排卵或无排卵、高雄激素或胰岛素抵抗、多囊卵巢为特征的内分泌和代谢紊乱的疾病。PCOS的发病机制至今尚不清楚,因此本研究采用定量代谢组学技术,对PCOS发病机制及相关的重要代谢标志物进行了探索研究。

应用UPLC/Q-TOF-MS(Waters)分析技术,建立血浆的代谢轮廓谱,通过对PCOS患者血浆代谢轮廓谱和健康志愿者的正常血浆代谢轮廓谱进行对比分析,探讨PCOS发生时患者体内代谢物的变化情况。PCOS患者和正常对照的血浆指纹谱数据的PLS-DA聚类分析结果(图1)显示,患者与正常对照完全分开,说明PCOS患者体内的

代谢状态发生紊乱。同时，从图 1 中也可以看出，PCOS 患者也明显分为两类（红色虚线表示），说明 PCOS 虽然均发生代谢紊乱，但紊乱状态并不一致，该结果可能是由于患者不同的致病机制导致的，同一种疾病可能存在两种发病机制。

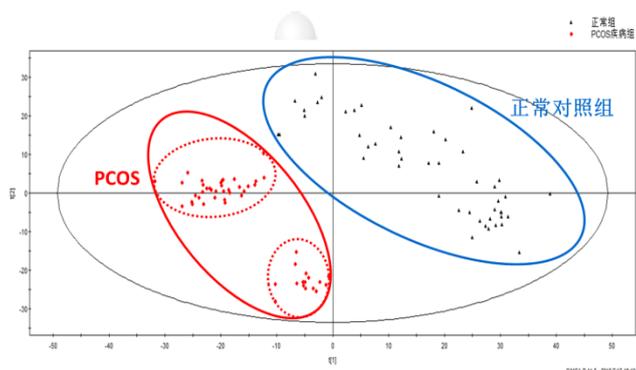


图 1 代谢数据的 PLS-DA 聚类图

代谢数据分析鉴定得到 34 个潜在的代谢标志物，不仅涉及甾体激素代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢，还涉及磷脂代谢、胆酸代谢等体内重要代谢循环。例如硫酸雄酮（甾体激素代谢）和鞘磷脂（磷脂代谢），在 PCOS 患者血液中的含量显著升高（图 2）。硫酸雄酮是一种重要的雄酮激素，其含量与 PCOS 关系紧密；鞘磷脂也是构成细胞膜的重要组成部分，其与毛细血管损伤、胰岛素抵抗、脂肪肝及肥胖等均存在重要联系。

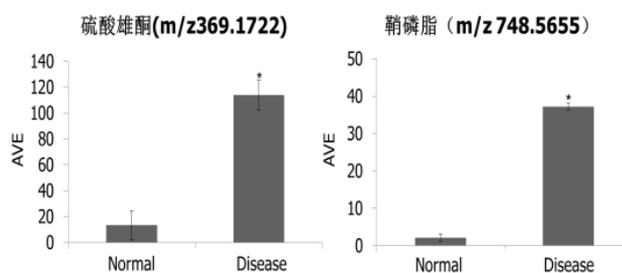


图 2 潜在代谢标志物表达变化情况

本研究采用定量代谢组学技术，从代谢层面探讨了 PCOS 的发病机制，发现甾体激素代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、磷脂代谢及胆酸代谢在疾病发生过程中发挥重要作用，可为 PCOS 的临床治疗提供研究数据和参考。

关键字：多囊卵巢综合征；定量代谢组学；UPLC/Q-TOF-MS；潜在生物标志物

项目资助：国家自然科学基金重点项目（编号：81130066）

青年基金项目（编号：81302731）

基于网络药理学的糖肾方靶点预测和机制探究

黄志强, 范雪梅, 王义明, 罗国安*

(清华大学化学系, 北京 100084)

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一, 其严重影响着患者的生命质量。糖肾方具有益气、养阴、活血作用, 实验表明其有效降低血脂、改善血液流变、减少尿蛋白排泄、减轻肾组织病理损害的功效对于 DN 的治疗具有明显的特色与优势, 但其治疗机制尚未完全阐明。网络药理学通过生物学网络中节点的连接和关系来分析网络特性, 进而阐明药物的作用机制, 为分析药物的作用提供了崭新的角度。

本研究基于网络药理学的思路对糖肾方指纹图谱鉴定的 73 个化合物成分进行靶点预测和验证, 并与糖尿病肾病相关的基因、西药治疗 DN 的靶点进行相关分析。糖肾方指纹图谱成分预测的靶点与 DN 疾病基因相关分析得到的 5 个共有靶点(图 1); 与治疗 DN 的西药作用靶点也存在 5 个共有靶点(图 2), 该结果也反映出作用于相同作用靶点的中药化合物和作用于该靶点的西药可能具有相同或相似的作用机制。经与西药和疾病相关性分析, 整合得到糖肾方作用的 9 个潜在重要的靶点: ACE、CASP3、CFTR、HMGCR、INSR、LGALS3、MMP2、SOD2、VDR。调节重要靶点的化合物来自糖肾方的不同药味, 其成分归属如图 3 所示, 可以看出糖肾方治疗 DN 时, 处方中的熟地黄和生地黄发挥最为重要的治疗调节作用。

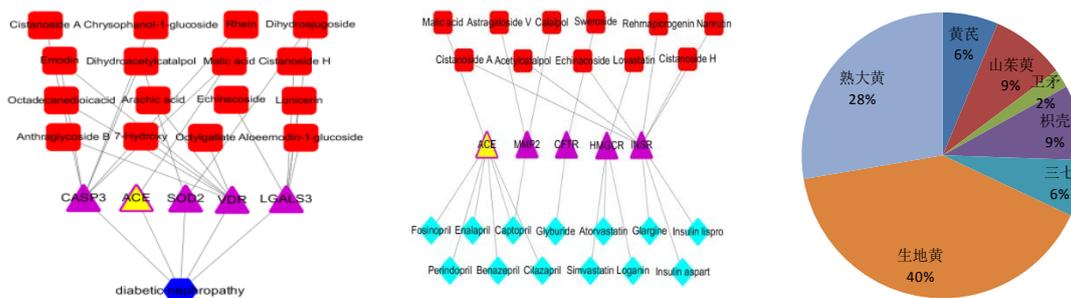


图 1 “成分-共有靶点-疾病”网络图 图 2 “成分-共有靶点-西药”网络图 图 3 共有靶点成分归属

本研究通过对糖肾方指纹图谱鉴定 73 个化合物成分进行潜在作用靶点预测和网络药理学分析, 最终筛选得到了 9 个潜在的重要靶点, 为糖肾方治疗 DN 活性成分的进一步确认和机制深入探讨提供了重要的研究线索。

关键字: 糖尿病肾病; 糖肾方; 活性成分; 网络药理学; 靶点预测

项目资助: 国家自然科学基金重点项目 (编号: 81130066)

基于网络药理学方法探讨阿帕替尼治疗乳腺癌的作用机制

朱婉婷¹, 范雪梅¹, 位华², 陈万生², 王义明¹, 罗国安^{1,*}

(1. 清华大学化学系, 北京 100084 2 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003)

基于网络药理学的药物潜在作用靶点识别对于早期药物分子研发、安全性评价、机制探讨及新适应症的发现等领域都有着重要的意义。阿帕替尼是我国自主研发的抗癌新药, 全球首个被证实在晚期胃癌标准化疗失败后, 安全有效的小分子抗血管生成靶向药物, 同时还可用于治疗晚期非小细胞肺癌, 肝癌, 乳腺癌。目前研究主要关注在阿帕替尼对胃癌治疗的研究, 对于乳腺癌的治疗研究较少。因此, 本研究采用网络药理学研究方法预测阿帕替尼治疗乳腺癌的潜在作用靶点, 探讨其可能的作用机制。研究采用 PharmMapper 反向分子对接预测阿帕替尼的潜在靶点, 通过与 SEPID 预测模型^[1]筛选得到的乳腺癌相关基因进行相关性分析, 得到阿帕替尼潜在作用靶点中与乳腺癌显著相关的靶点; 随后采用分子对接软件 Autodock 4.0 将蛋白靶点三维结构模型与阿帕替尼进行分子对接, 探讨蛋白靶点三维结构与阿帕替尼的结合模式。研究发现, Cell division protein kinase 2、GTPaseHRas、NONE 和 Cytochrome P450 2C9 蛋白可能是阿帕替尼治疗乳腺癌的潜在作用靶点, 参与调节癌细胞增殖与花生四烯酸代谢等相关通路。经分子对接分析发现, 阿帕替尼与 4 个潜在作用靶点之间均有较稳定的氢键结合, 结合自由能分别为: -9.20、-9.25、-10.19 及 -11.86 Kcal/mol, 结合自由能较低, 说明阿帕替尼与潜在作用靶点的结合较稳定。本研究可为阿帕替尼治疗乳腺癌的机制研究提供了理论依据。

关键词: 阿帕替尼; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; 靶点预测

项目资助: 国家自然科学基金重点项目 (编号: 81302731)

上海市科委产学研合作项目 (编号: 13DZ1930600)

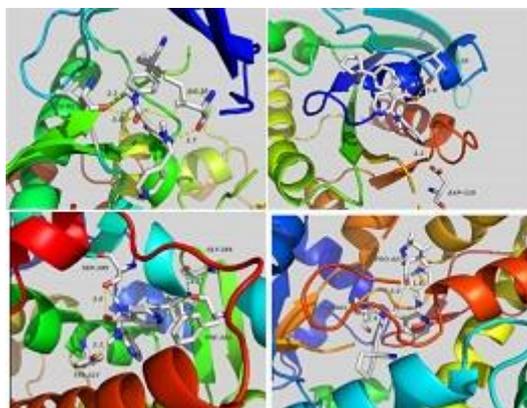


图1 Apatinib 与 Cell division protein kinase 2(2BHE, a)、 GTPase HRas(5P21, b)、NONE(3IA6, c)、 Cytochrome P450 2C9 (1OG5, d)的对接结果。

组分新药益气养阴方干预中动脉栓塞（MCAO）大鼠的代谢组学研究

谢媛媛，王义明，罗国安*

（清华大学化学系）

益气养阴方是在唯一经过国家批准用于缺血性脑中风二级预防中药复方药物基础上，基于“系统-系统”模式的整体系统生物学策略开发的组分新药。本研究前期通过多种质谱技术联用鉴定方中化学物质组成；采用 PharmMapper 和 KEGG 等生物信息学手段对其进行吸收、靶点及作用通路的预测分析，构建了益气养阴方干预缺血性中风的“分子-靶点-通路-药效”分子网络。研究结果表明，所鉴定的 29 种化学成分中有 29 种可被吸收，其中 15 种可能通过干预 16 个靶点分别作用于与抗氧化、抗炎、调节脂质代谢、调节糖代谢、抗凝血、降血压等相关的 7 条通路。

为阐明其药效物质基础及其作用机制，将经典药理学与代谢组学等系统生物学研究结合，采用大鼠中动脉栓塞（MCAO）进行疗效评价，通过神经肌肉功能及前庭运动功能等行为学评价、脑组织病理切片、脑水肿及梗死面积测定、脑组织匀浆和血清中 SOD、GSH-PX、MDA 和 NO 等生化指标测定，证实益气养阴方对缺血性中风呈剂量依赖性的良好预防作用。应用 UPLC-QTOF/MS 等现代分析技术和方法，通过对模型组疾病发展进程和药物干预后血清代谢轮廓谱及脑组织匀浆代谢轮廓谱进行分析，探讨益气养阴方作用于血清中内源性代谢物的影响，同时探讨其对脑组织缺血相关靶组织——脑组织匀浆的代谢组学特征和小分子标志化合物的相关作用。通过对大鼠血清代谢轮廓谱和脑匀浆代谢轮廓谱分析，从整体效应角度证实了益气养阴方具有防治缺血性中风的作用。从血清中寻找并鉴定了 11 个与脑组织缺血相关的潜在生物标志物，涉及到三羧酸循环、糖代谢、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、溶血磷脂酰胆碱类物质和脂肪酸代谢等 5 条代谢通路的紊乱，他们与脑组织的炎症反应密切相关。益气养阴方可显著调节这 11 个潜在生物标志物的异常变化，并通过调节磷脂代谢，花生四烯酸代谢，氨基酸代谢以及能量代谢等防治缺血性中风，代谢组学研究结果验证了反向分子对接对益气养阴方作用机制的预测。

关键词：“系统-系统”；组分中药；代谢组学；网络药理学；缺血性中风

基金支持：本研究系由国家自然科学基金面上项目（81473174），青年基金（81102766）和中国博士后科学基金（20100480341）资助完成。

泽泻特征图谱保留时间重现性的研究

巩丽萍, 李玉杰, 丁勃

(山东省药品检验研究院, 济南 250101)

摘要 目的: 研究泽泻特征图谱保留时间在不同实验室之间的重现性。**方法:** 采用已建立的泽泻高效液相色谱特征图谱条件在不同仪器及不同色谱柱上测定极性不同的化合物, 以它们在不同色谱仪(或柱)上的保留时间进行线性回归, 并用得到的线性方程对泽泻特征图谱中峰面积大于总峰面积 4% 的色谱峰的保留时间进行校正。

结果: 通过校正使保留时间的最大绝对误差由 12.719 min 减小为 0.161min。**结论:** 采用该方法可以校正不同实验室间特征图谱保留时间的漂移, 提高特征图谱的重现性。

仪器: 日本岛津公司 LC-10AT 高效液相色谱仪, Agilent 1200 系列高效液相色谱仪, 美国 Alltech2000 蒸发光散射检测器; Alltech C18 (4.6mmx250mm, 5 μ m) 色谱柱, Diamonsil C18 (4.6mmx250mm, 5 μ m) 色谱柱。

在同一液相色谱仪上, 即使流动相组成、梯度洗脱方法完全相同, 只是由于采用了不同的色谱柱, 就可以导致组分的保留时间存在较大差异, 即便采用相对保留时间效果也不理想, 这一问题一直困扰着色谱特征图谱的推广。国家药典委员会推荐使用的相似度计算软件采用人工多点校正时是根据保留时间选取匹配峰, 但由于不同实验室之间使用了不同色谱柱则可能导致保留时间发生漂移, 而保留时间的漂移可导致匹配峰的选择产生误差, 而所选匹配峰的差异对相似度计算结果影响较大。因此人工多点校正方法主观因素影响较大, 若不消除这种影响则色谱特征图谱难以在中药鉴别中推广使用。本文根据所建立的泽泻特征图谱的分离特点, 选择了极性适当的 5 个化合物, 使其在本实验所用方法的分析时间内达到基线分离且保留时间适当, 根据其保留时间之间的线性关系进行校准, 使泽泻在不同色谱系统上色谱峰保留时间的漂移得到很好的修正, 提高了特征图谱保留值的重现性。

关键词: 特征图谱; 特征图谱重现性; 泽泻

¹H NMR-based metabolomics study of Huangqi injection on cyclophosphamide-induced leucopenia in mice

Ting-Li Qu ^{a,b}, Zhen-Yu Li ^{a,*}, Si-Jun Zhao ^{a,c}, Ai-Ping Li ^a, and Xue-Mei Qin ^{a,*}

(^a Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, No.92, Wucheng Road, Taiyuan 030006, Shanxi, People's Republic of China ^b School of Pharmaceutical Science of Shanxi Medical University, No.56, Xinjian south Road, Taiyuan 030001, Shanxi, People's Republic of China ^c Shaixi institute for Food and Drug Control, No.12, Taoyuan south Road, Taiyuan 030001, Shanxi, People's Republic of China)

Abstract: Huangqi injection (HQI), derived from Astragali Radix root which is a typical Traditional Chinese Medicinal (TCM) herbal drug, can enhance myocardial contractility, improve circulation, protect myocardial cells and regulate immunity. In this study, the effect of HQI on cyclophosphamide-induced leucopenia in mice was investigated by NMR based metabolomics profiling technique coupled with multivariate statistical analysis. The results showed that HQI could increase body weight of cyclophosphamide treated mice, elevate the white blood cell (WBC), monocytes (MO), and neutrophils (NE) levels. After the HQI treatment, the mice metabolome (serum and spleen) showed a tendency of recovery to the normal controls, and the levels of most perturbed endogenous metabolites were reversed. The metabolic pathways related to the pharmacological effect of HQI on leucopenia were probably involved in energy metabolism, amino acids metabolism, disturbance of gut microbes, oxidative stress and choline metabolism. In conclusion, HQI showed effect on mice model of leucopenia, and the bioactive compounds responsible for the drug actions should be further investigated.

Keywords: Huangqi injection, metabolomics, leucopenia, nuclear magnetic resonance, Traditional Chinese Medicinal

基于核磁代谢组学结合心肌超声综合评价方法研究黄芪水提物对心衰的生物作用效应

熊一峰^{1,2}, 刘月涛^{1*}, 秦雪梅^{1*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006)

摘要: 为了探索黄芪水提物抗心衰的作用机制, 构建生物效应评价技术体系, 为黄芪的临床应用提供科学依据。我们利用超声心动技术检测大鼠心肌靶组织的生理功能, 将多项超声指标参数通过主成份法综合成心衰超声指数, 对黄芪水提物抗心衰的作用进行加权评估, 同时采用核磁共振技术检测大鼠血清内源性代谢产物的变化, 结合多元统计分析寻找心衰相关的代谢物, 探讨黄芪对机体代谢紊乱的调节作用。此外, 通过 bi-plot 相关性分析, 将心衰超声指数与血清代谢物关联, 进一步寻找能深入表征药物作用机制的潜在生物标志物, 揭示黄芪水提物抗心衰的作用机制和潜在靶点。血清代谢组学研究证实, 黄芪水提物对阿霉素诱导的大鼠代谢紊乱有良好的调节效果, 且优于阳性药地高辛。其心衰超声指数综合评分比阳性药地高辛也略高, 二者结果基本一致。研究还黄芪可能对心衰病变中多个关键进程均有显著调节作用, 尤其对心脏部分舒张功能异常有良好的调节作用, 主要通过影响机体能量代谢, 酮体合成与代谢, 氨基酸代谢, 三羧酸通路等途径, 调节心衰机体的生理功能。心衰超声指

数和代谢产物关联分析也显示血清中琥珀酸、磷脂酰胆碱、乙酰乙酸、谷氨酰胺、N-乙酰糖蛋白、甘氨酸和氧化三甲胺与心肌靶组织功能异常具有一定相关性，这些代谢物可具有评价心衰进程的潜在价值，也可作为黄芪水提物抗阿霉素诱导的心衰的潜在靶点。

关键词：黄芪水提物；阿霉素；心衰；综合指标；生物评价

通讯作者：刘月涛 yuetaoliu@sxu.edu.cn，秦雪梅 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

GC-MS 法研究镉中毒对小鼠心脏脂肪酸轮廓的影响

龚频，白晓换，陈福欣

（陕西科技大学）

重金属镉是一种常见的工业和环境污染物，生活中主要通过食物、饮水以及香烟燃烧进入机体，迅速分布在机体的各个器官。极低剂量的镉中毒能够引起心血管疾病（cardiovascular disease，CVD）的发生，但是其作用机制尚未明确。研究表明，CVD的发生与脂肪酸代谢的紊乱存在一定的相关性，本研究以脂肪酸组分和含量的变化为切入点，采用基于GC-MS/MS的脂质组学方法，分析镉中毒对小鼠心脏脂肪酸轮廓的影响，并采用具有抗炎、抗氧化等功能的天然中药活性成分姜黄素对其进行保护研究，探明镉中毒诱导CVD发生的可能作用机制，为阐明环境暴露相关的心血管类疾病的发生机制提供数据支持及理论依据。

本实验通过构建镉暴露小鼠模型（2mg/kg/day，14days，腹腔给药）以及姜黄素保护组（分为低中高三组，胃饲），建模完成后，收集血清以及组织样品，并根据国家授权专利（ZL. 201210247480）方法对样品进行前处理，GC-MS/MS分析（Agilent 7890A, Agilent 5975C, J&W VF-200MS, 30m× 250μm× 0.25μm），数据利用SIMCA-P11.0软件(瑞典Umetrics AB公司)进行模式识别分析，生物标记物利用标准品以及NIST08数据库进行鉴定。

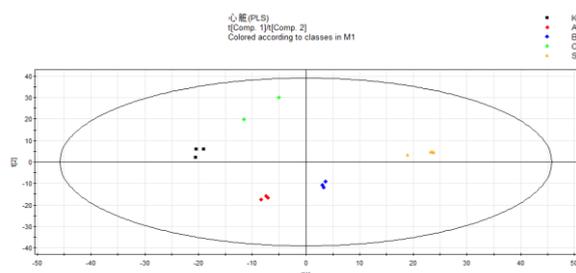


图 1 镉损伤小鼠心脏脂肪酸轮廓的 PLS 图（K：空白组；S，损伤组；A，低剂量保护组，B，中剂量保护组，C，高剂量保护组）

图 1 所示，空白组与损伤组相互分离，表明镉的毒性作用影响小鼠心脏组织的正常生理功能。给予姜黄素保护后，小鼠代谢物谱模式呈现出一定的变化规律：A 组偏离空白组较明显，B、C 组样本靠近对照组，说明姜黄素随浓度的增大，其保护作用也逐渐增强。

通过分析载荷矩阵投影图，并结合 SPSS 分析，筛选出代谢物与主要离子簇的位置距离越远，对样本类别分离的贡献越大的潜在的生物标志物。表 1 是可能的生物标志物。

Kudo 等人报道镉的毒性作用能够抑制 $\Delta 9$ 去饱和酶的活性，减少亚油酸的含量，增加了硬脂酸、花生酸的含量，从而升高了低密度脂蛋白的含量（LDL），而已有研究表明，镉能够促进自由基的产生，增加 LDL 的过氧化反应，诱导氧化应激的发生，结合本课题组已有的实验结果，镉的毒性作用还与炎症反应相关，可能是与花生四烯酸含量的增加有关，而与 CAT、SOD 等抗氧化酶活性相关的二十二碳六烯酸含量也相应的减少，具有自由基清除作用的姜黄素能够起到一定的保护作用；综上所述，镉对小鼠心脏的损伤作用可能是通过脂肪酸代谢途径介导的，其可能的作用机制如图 2 所示。

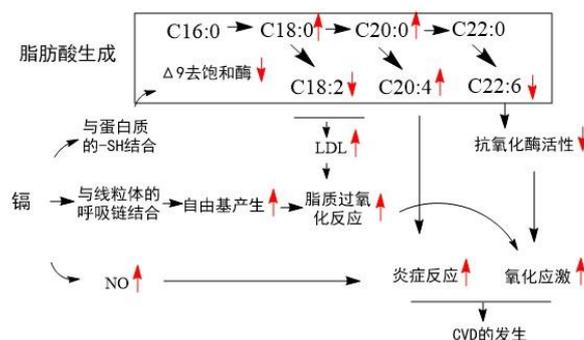


图 2 镉暴露诱导小鼠心脏损伤的可能作用机制

本研究为阐明镉诱导的小鼠心脏损伤提供了理论依据和数据支持，并为潜在的心脏保护药物的开发提供了新的作用靶点。

关键词：镉，心血管疾病，GC-MS，脂肪酸

头孢哌酮致酒精双硫仑样反应的代谢组学研究

刘林生 缪丽燕

（苏州大学附属第一医院 药学部 临床药理室）

摘要：某些抗生素使用后饮酒，会发生面部潮红、眼结膜充血、等双硫仑样反应，尽管发生双硫仑样反应的机制比较明确，但同时使用抗生素及饮酒导致体内的代谢物的变化尚无明确报道。本研究采用大鼠为模型动物，分为4组，每组8-10只，分别为对照组，乙醇组，头孢哌酮组，及头孢哌酮乙醇组，前两组尾静脉注射生理盐水，后两组注射1.0g/kg/day体重的头孢哌酮注射液，早晚各一次，连续3天，在末次后3组给予抗生素1h后口服灌胃10%的酒精(10ml/kg)，第一组给予相同剂量的纯水，灌胃2h后麻醉大鼠，并采取血清及脑脊液。基于GC-MS测定血清及脑脊液中的小分子代谢产物。血清结果显示头孢哌酮组甘氨酸、亮氨酸及胆固醇与正常组有显著差异，乙醇组中的甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等氨基及棕榈酸、油酸等脂肪酸均与正常对照组有显著差异；而同时血清结果显示给予头孢哌酮及酒精后丙酮酸的水平均低于头孢哌酮组及乙醇组；脑脊液结果显示头孢哌酮组丙氨酸、谷氨酸等氨基酸与正常组有显著差异，乙醇组中的亮氨酸等氨基及苹果酸、延胡索酸等TCA中间产物与正常对照组有显著差异；而同时给予头孢哌酮及酒精后脑脊液中的N-Acetylaspartate的水平显著高于头孢哌酮组及乙醇组；N-acetylaspartate是神经元损伤严重程度的一项生化指标，可反映大鼠饮酒后脑部受损的程度。由此可见，GC-MS平台可以用于大鼠饮酒、给予抗生素及两者合用的后血清及脑脊液中化合物的评价，为饮酒后双硫仑作用提供了新的理论依据。

关键词：代谢组学，头孢哌酮，酒精，双硫仑样反应

大黄酸的网络药理学研究

孙浩，陈大苟，蔡小军，向铮*

(温州医科大学药学院，浙江温州，325035)

目的：以大黄酸为研究对象，整合分子对接、网络分析及文献挖掘的方法，预测大黄酸作用靶点，进而应用生物信息学方法从系统角度讨论其可能的药理作用机制。

方法：从ZINC数据库下载大黄酸配体的三维分子结构，应用PharmMapper数据库进行反向分子对接，初步筛选大黄酸可能作用靶点；在此基础上，以阳性药物为对照，执行正向分子分子对接，进一步筛选大黄酸靶点。同时整合从STITCH、TTD、HIT、TCMSP、TCMID等数据库收集大黄酸已知靶点。用Cytoscape软件构建大黄酸作用靶点网络。将得到的网络进行扩展，网络分析确定关键的网络拓扑参数，筛选出潜在

靶点。然后,对这些靶点进行基因富集分析,构建富集通路基因网络及其最小子网络。最后,从富集的通路提取大黄酸潜在靶点涉及的生物过程,得到大黄酸作用机制通路图。

结果: 从数据库收集的大黄酸已知靶点共 24 个,其中直接作用靶点共 10 个。通过正反向对接,筛选出大黄酸可能的靶点 67 个。整合计算与直接的靶点,由此构建的网络共 77 个节点,60 条边。进一步扩展该网络,根据网络分析结果,确定以介数为关键网络拓扑参数,筛选出 23 个作用靶点,即为预测的大黄酸的作用靶点。富集分析结果显示其中 15 个潜在靶点被富集到 16 条通路。富集通路基因构建的最小子网络,共 190 个节点,2070 条边。大黄酸作用机制通路图显示(图 1),15 个被富集的潜在靶点参与了多个生物过程。

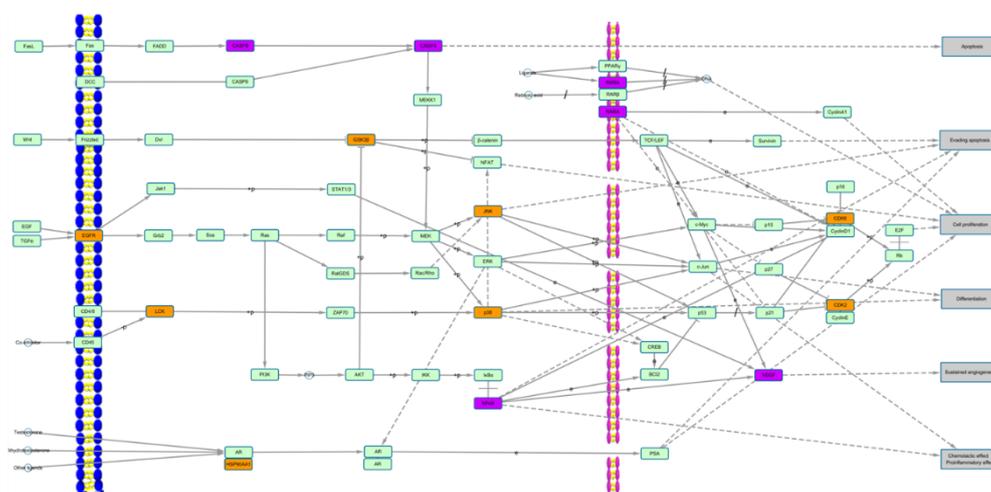


图1. 大黄酸作用机制通路图。紫色节点代表直接靶点,橙色节点代表计算靶点,绿色节点代表通路其他蛋白。

结论: 大黄酸通过调节多个靶点参与了多条通路,从而产生多种生物作用。我们的结果显示,大黄酸不仅能通过调节 CASP3、CASP8、LCK、EGFR、JNK 以及 p38 等靶点来阻断 MAPKs 激活,而且能通过调节 GSK3B、RARA、NF- κ B、CDK2 以及 CDK6 等靶点来阻断细胞周期进程。本文通过整合分子对接、网络分析及文献挖掘等多种的方法从系统的角度阐述了大黄酸的可能机制。

关键词: 大黄酸; 靶点网络; 分子对接; 富集分析

***通讯作者:** 向铮, 副教授/硕士生导师。研究方向: 中药药代动力学、网络药理学。E-mail: XZH007@126.com.

靶向氨基官能团带正电荷质谱手性衍生化试剂的合成及 有效性评价

金美娜, 闵俊哲*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 药学院药物分析学, 吉林, 延吉, 133002)

摘要: 代谢组学是定量描述生物内源性代谢物质的整体状况及其对内外环境变化做出应答的规律性科学, 而现在代谢组学研究还不能进行手性代谢物的分析。因此, 手性代谢组学研究是我们必将要面临的挑战性课题之一。具有高分离和高通量分析能力的 LC-MS 是现代代谢组学分析的有效工具。但因有些代谢物其含量甚微及离子化效率低, 难以得到高灵敏度的检测。鉴于此, 本研究开发了靶向氨基官能团识别带正电荷新型质谱手性衍生化试剂。本试剂以三苯基膦结构 (TPPP) 为母体, 与 L-硫代脯氨酸(TZD)反应, 再与 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行反应, 合成了一种靶向氨基官能团带正电荷质谱手性衍生化试剂 TPPP-TZD-NHS。利用 LC-MS 及 NMR 分析表征。为考察手性衍生化试剂的分离效能及其在质谱中的裂解规律并与丙氨酸为手性代谢物模型进行衍生化反应。利用 LC-MS 在 C18 分析柱进行了 D, L-氨基酸对映体分离度的考察和产物在质谱中离子化效率及在不同轰击能量下的结构裂解规律。结果表明, 本试剂因具有带正电荷和手性中心, 不仅能提高氨基官能团代谢物的疏水性, 而且可在反相柱延长保留时间并能提高分离度; 也可在质谱中提高检测灵敏度。本方法为推动手性代谢组学的研究提供一种新的分析方法。

关键词: 氨基官能团化合物, 代谢组学, LC-MS, 带正电荷, 手性质谱试剂。

***通讯作者:** 闵俊哲, E-mail: junzhemin23@163.com, Tel/Fax: 0433-2436079

非靶标代谢组学方法快速“识译”栀子大黄汤入血成分及代谢物

吴欢, 李茜茜, 严雪梅, 史清水*, 杨功俊*, 冯芳*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏省食品药品监督检验研究院, wuhuancpu@163.com, 江苏南京 210009)

栀子大黄汤 (ZZDHD) 组方经典, 但其发挥治疗作用的药效物质基础却不清楚。鉴别入血化学成分及其代谢物的研究将有助于揭示药效物质指标成分, 由于直接比对空白生物样本图与含药生物样本图并查找中药复方入血成分及代谢物过于繁

琐且耗时，因此建立一种快速、可靠、无偏方法，以提高外源性代谢研究的分析效率非常必要。本文研究建立了非靶标代谢组学方法，用于快速筛选和表征栀子大黄汤给药后大鼠血浆中外源性化学物质及代谢物。16只SD大鼠（180~220 g）随机分为两组，ZZDHD给药组（8只）灌胃给予ZZDHD（12 g/kg/day），对照组（8只）灌胃给予等剂量的生理盐水，连续给药两天。第三天给药后1 h取肝门静脉血，分离血浆。以基于LC-TOF/MS的非靶标代谢组学方法获取ZZDHD给药组和对照组的血浆指纹图谱，TOF/MS原始数据文件（.d）经Mass Hunter B.04.00软件转换为

（.mzData）后，导入XCMS online软件对两组离子进行保留时间校正并输出包括序号、 t_R - m/z 、离子强度的三维数据集；该三维数据集采用SIMCA-P 13.0进行正交偏最小二乘判别分析获取差异性变量，将存在于ZZDHD给药组但不存在于对照组的差异性变量作为候选变量。然后以LC-QqQ/MS的数据依赖采集方法获取候选变量的碎片离子信息，结合离子的精密质量和自建的ZZDHD化学成分库对候选变量进行结构表征。采用建立的非靶标代谢组学方法，快速筛选和表征出大鼠血浆中37个栀子大黄汤的原型成分及24个相关代谢物。其中，栀子中环烯醚萜苷类和单萜类、枳实中的黄酮类、大黄中的蒽醌类为ZZDHD主要入血原型成分；水解，葡糖醛酸化和硫酸化为ZZDHD的主要代谢途径。本文建立的非靶标代谢组学方法可以实现ZZDHD入血成分及其代谢物的快速、系统“识译”和表征，为中药复方药效成分的研究提供了不可或缺的依据。

关键词：非靶标代谢组学；栀子大黄汤；入血成分；代谢产物； LC-TOF/MS； LC-QqQ/MS

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 81274063)，江苏高校优势学科建设工程资助项目，江苏省普通高校研究生科研创新计划项目（No. KYLX-0619）。

*通讯作者：*冯芳，fengfang1@126.com, *杨功俊 yanggongjun888@163.com

基于小分子代谢轮廓分析方法预测法罗培南钠的药物代谢动力学参数

邢晓清¹，宋沁馨^{1*}，周国华^{1, 2}

（药物质量与安全预警教育部重点实验室，中国药科大学，南京 210009；

南京军区南京总医院药理科，南京 210002）

摘要：目的：人的遗传背景和所处的环境因素不同导致药物进入人体内的吸收和代

谢等情况各不相同,这种差异体现在每个人用药的药效和毒副反应各不相同。如果能够用药前预测服药后的个体差异,则能够实现个体化用药的目标。目前的研究主要集中在人的遗传因素对药物个体化差异的影响,而代谢组学处于基因组学的终端,包含了遗传、环境、生理、病理等各种因素,对指导临床个体化用药具有非常重要的意义。本文以法罗培南钠为研究对象,基于 GC/MS 分析平台,以健康受试者服药前血浆的小分子代谢物预测服药后的药物代谢动力学参数,为法罗培南钠的个体化用药提供依据。**方法:** 36 名健康受试者空腹服用法罗培南钠片 300 mg 后采集的血样,用 HPLC-MS/MS 法测定血浆中法罗培南浓度;服药前的血浆经历了小分子代谢物的提取和衍生化的过程,用 GC/MS 方法测定血浆内的小分子代谢物。将健康受试者的生理生化参数及各种血浆小分子代谢物设为自变量,以法罗培南在体内的 C_{max} 或 AUC 为响应变量,采用多变量统计分析方法建立模型进行预测,并筛选出对法罗培南钠的代谢影响较大的内源性小分子物质。**结果:** 36 名健康受试者服用法罗培南后的药动学行为有较大的差异,最高峰浓度 C_{max} 相差约 6 倍,而曲线下面积 AUC_{0-t} 在个体间差异高达 12 倍。以 GC/MS 分析平台对服药前血浆中的内源性小分子代谢物进行分析,共检测到 204 个峰,鉴定出约 80 种化合物。应用 SIMCA-P 软件建立模型分别筛选出 9 种和 17 种化合物预测 C_{max} 和 AUC,模型解释度分别为 57.1% 和 65.5%,模型预测度分别为 39.2% 和 35.5%。同时基于代谢组学还初步探讨了饮食对法罗培南代谢的影响。**结论:** 服药前血浆的代谢组轮廓分析能够预测法罗培南进入体内以后的药动学行为,所建立的偏最小二乘法模型具有良好的解释度和预测度,可以为法罗培南钠个体化用药提供依据。

关键词 代谢组学; 法罗培南钠; 个体化用药;

项目资助: 本论文由江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2012744); 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 项目 (No. BK20151445); 中国博士后科学基金面上资助项目 (No. 2012M512179); 中国博士后科学基金特别资助项目 (No. 2013T60962); 中央高校基本科研业务费重点项目 (No. 2015ZD008); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目 (No. DQCP2015MS02); 江苏省青蓝工程资助。

第一作者: 邢晓清, E-mail: zkymw2013@163.com

***通讯作者:** 宋沁馨, E-mail: songqinxin@sina.com

基于 GC-MS 技术的雄黄毒性作用机制代谢组学研究

黄寅¹, 郭慧敏¹, 彭灿², 张墨翰¹, 李瑞婷¹, 高一乔¹, 田媛¹,
许风国^{1,3*}, 张尊建^{1,3*}

(1.中国药科大学, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京, 210009 2.安徽中医药大学药, 药学院, 合肥, 230031 3.中国药科大学, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京, 210009)

摘要: 目的 运用代谢组学方法对雄黄导致的大鼠毒性作用机制进行研究。

方法 SD 大鼠随机分为对照组和雄黄染毒低、中、高剂量组 (20, 100, 500 mg/kg)。建立基于气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 的大鼠尿液代谢轮廓分析方法, 采用均匀设计优化尿液处理的关键影响因素, 并采用内标和质控样品验证方法的稳定性。

结果 通过模式识别和非参数检验, 筛选出独立变量 27 个; 经 NIST 谱库及标准品比对后, 鉴定出甘氨酸、丙氨酸、半乳糖等 19 个潜在生物标志物; 进而借助代谢网络分析, 构建出受雄黄毒性影响的、较为完整的代谢网络。

结论 雄黄毒性作用对大鼠体内能量代谢、胆碱代谢和氨基酸代谢影响最为显著, 尤其是甘氨酸和丝氨酸, 是整个网络的枢纽。该研究为深入阐释雄黄毒性作用的分子机制提供新的数据支撑。

关键词: 雄黄; 气相色谱-质谱联用; 代谢组学; 毒性; 生物标志物; 尿液

Metabolomics study on the toxicological mechanism of realgar using gas chromatography-mass spectrometry

HUANG Yin¹, GUO Hui-min¹, PENG Can², ZHANG Mo-han¹, TIAN Yuan¹,
XU Feng-guo^{1,2*}, ZHANG Zun-jian^{1,2*}

(1.Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009 2.Anhui University of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Hefei 230031 3.State Key Laboratory of Natural Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009)

Abstract: Objective This work investigated the toxicological mechanism of realgar in rat using metabolomics approach.

Methods The analysis of the metabolome in rat urine was obtained with gas chromatography coupled to mass spectrometry. The main parameters affecting sample preparation were optimized using uniform design. The platform stability of the GC-MS technique was evaluated by internal standard and QC samples.

Results Multivariate analyses were used for identification of marker candidates and development of

discriminative models. Nineteen metabolites were proposed as potential biomarkers related to disturbances caused by realgar. These results indicate significant perturbations in amino acid metabolism, alanine-glucose cycle and purine metabolism. Combined with the results of previous research, glycine and serine were expected to serve as the central contacts in the metabolic pathways related to realgar-induced disturbance.

Conclusion The GC-MS based metabolomics approach can contribute to evaluating the biochemical effects of realgar on rats and may provide new insight into its toxicity mechanisms.

Key words: Realgar; GC-MS; Metabolomics; Toxicity; Biomarker; Urine

资助项目: 国家自然科学基金项目 (81403181); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140664)

作者简介: 黄寅, 男, 博士, 讲师, 研究方向药物代谢组学, Email: huangyincpu@gmail.com

***通讯作者:** 许风国, Email: fenguo xu@gmail.com;

张尊建, Email: zunjianzhangcpu@hotmail.com

基于色谱-质谱联用技术的长春新碱所致麻痹性肠梗阻大鼠血清代谢组学进程动力学分析

郭慧敏¹, 黄寅¹, 田媛¹, 许风国^{1,2**}, 张尊建^{1,2**}

(1. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 中国药科大学, 南京, 210009

2. 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 中国药科大学, 南京, 210009)

摘要: 本文借助代谢组学的方法, 采用 UPLC-IT-TOF-MS 结合 GC-MS 的分析手段对长春新碱所致麻痹性肠梗阻的机制进行动态研究。本文首次采用隔天给予大鼠 0.2 mg/kg 长春新碱, 连续四次, 通过测定肠推进率和胃排空率, 建立麻痹性肠梗阻模型。实验动物分模型组和给药组, 分别于给药前和给药后第 4d、8d 和 11d 采血样进行 LC-MS 和 GC-MS 分析。利用 Profiling Solution 软件提取数据, 通过模式识别和非参数检验对独立变量进行筛选。经过网路数据库及标准品比对后, 共鉴定出 20 个与麻痹性肠梗阻病程发展有关的差异代谢物, 包括乳酸、色氨酸、丝氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、花生四烯酸等。进而借助代谢网路分析发现, 随着肠梗阻的发生, 大鼠体内色氨酸代谢、精氨酸-脯氨酸代谢、谷氨酸-谷氨酰胺代谢等代谢通路发生较大变化, 且变化程度与肠梗阻的发生进程呈现正相关。梗阻肠段病理切片及胃排空率和肠推进

率测定结果表明,在梗阻发生过程中肠粘膜、肠上皮细胞以及肠蠕动均发生了显著变化。而这些物质的变化与肠粘膜损伤、肠内菌群代谢异常以及长春新碱神经毒性导致的神经传导阻断有密切联系。研究表明,综合 LC-MS 和 GC-MS 技术获得的血清代谢轮廓可以用来寻找与肠梗阻发生发展相关的差异代谢物。为深入阐释长春新碱所致麻痹性肠梗阻的分子机制提供数据支持。

关键词: 麻痹性肠梗阻; 病程动态分析; 代谢组学; 血清;

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (SBK201321999);

通讯作者: *许风国, 教授, 从事药物代谢组学研究, Email:fenguo xu@gmail.com

**张尊建, 教授, 从事药物现代仪器分析研究,

Email:zunjianzhangcpu@hotmail.com

整合代谢组学和基于主成分的面积计算策略发现顺铂肾损伤时间和剂量依赖性潜在生物标志物

张培, 田媛, 张尊建, 许风国

(中国药科大学药学院 南京 21009)

摘要: 顺铂具有良好的抗肿瘤活性,临床上可用于治疗膀胱癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、头颈部扁平上皮癌和睾丸癌等多种实体瘤。但是严重的不良反应,尤其是肾毒性,常限制其临床应用。已有研究表明,顺铂肾损伤具有时间和剂量依赖性。为了寻找呈现时间和剂量依赖性的顺铂肾损伤相关生物标志物,本文提出了整合代谢组学和基于主成分的面积计算 (principal component-based area calculation, PCAC) 策略。该策略首先拟合偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 模型,得到主成分数值。然后绘制主成分-时间曲线 (PC-T),计算曲线下面积 (AUC_{PC-T})。最后,计算实验组相对于空白组的曲线下面积倍数 (FC_{AUC})。以 FC_{AUC} 为评价参数,本文首次从代谢组学的角度研究了顺铂肾损伤的时间和剂量依赖性,并以此为基础,筛选了相关潜在生物标志物。为了降低假阳性率且保证筛选出的生物标志物与顺铂肾损伤紧密相关,本文采用了“四步法”生物标志物筛选程序。最终发现了 27 个具有时间和剂量依赖性的潜在生物标志物。其中 22 个代谢物与肌酐或尿素氮呈显著负相关,即其浓度水平随时间和剂量呈现下降趋势。5 个代谢物与肌酐或尿素氮呈显著正相关,即其浓度水平随时间和剂量呈现上升趋势。代谢通路分析结果表明,顺铂引起的肾损伤与机

体能量代谢、脂质代谢和氨基酸代谢等密切相关。

关键词：顺铂；肾毒性；代谢组学；时间和剂量依赖性；代谢通路

针对乳腺癌潜在生物标志物的靶向代谢组学研究

高妍, 陈艳华, 贺玖明, 白进发, 高杨, 宋肖炜, 再帕尔·阿不力孜*

(中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

靶向代谢组学研究针对生物样本中少数特定感兴趣目标代谢物, 可进一步验证非靶向代谢组学研究得出的结论, 或针对特定代谢物网络或特定假说的代谢模型开展研究。靶向代谢组学方法需要事先已知分析目标, 并且需要获得目标化合物的标准品; 但可针对生物样品中含量低的代谢物建立高灵敏度且特异的分析方法。生物样本中的代谢物含量差别大, 对不同种类的代谢物同时进行定量分析存在挑战。

本研究针对文献和本课题组前期发现几十种乳腺癌潜在生物标志物, 采用高效液相色谱与高分辨串联质谱联用技术, 建立一种高选择性、高灵敏度的检测方法, 应用于 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠异体瘤模型的靶向代谢组学研究, 测定正常组、模型组、给药组血浆样本中相关代谢物的绝对浓度, 分别获得各组别的相关代谢物浓度范围, 期望为疾病的发生和发展及治疗进行预测和判断。

在本研究中, 采用 Q-Orbitrap 高分辨串联质谱仪 (QExactive, ThermoFisher) 的全扫描 (Full MS) 和目标选择离子监测 (targeted SIM, tSIM) 模式相结合进行质谱分析, 分别对样本中的高含量代谢物和低含量代谢物进行定量分析。结果表明, 与 Full MS 相比, tSIM 可有效改善烟尿酸、4-羟基苯乙酸、3-甲基尿苷和 N2-甲酰化鸟苷等低含量代谢物的峰形, 提高检测灵敏度。本方法可对 24 种代谢物进行靶向定量分析, 各代谢物标准曲线的线性良好 ($R^2 > 0.991$), 由于各代谢物在血浆中浓度差异较大, 根据测定需要, 各代谢物标准曲线最低浓度点的范围分别在 25.0 ng mL^{-1} - $4996.8 \text{ ng mL}^{-1}$, 其他方法学参数验证满足定量要求。

因采用全扫描的定量分析方法, 该方法还可同时进行非靶向代谢组学研究。因而该方法快速、准确、高通量, 有效提高了代谢组学研究的分析效率, 为乳腺癌的代谢组学研究提供了一种高效的分析手段。

关键词：UPLC-HRMS/MS; 高分辨质谱; 靶向代谢组学; 定量分析; 乳腺癌

A Strategy for the Targeted Metabolomics Analysis of 11 Gut Microbiota-host Co-metabolites in Rat Serum, Urine and Feces by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

Danmin Zhong¹, Peiting Zhang¹, Manna Lin², Waner Hou², Zhiyong Xie^{1*}

(¹School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University

² College of Chinese Traditional Medicines, Guangzhou University of Chinese Medicine)

The microbiota-host co-metabolites have proven to be of great importance in physiological studies and their dysregulation has been found to be closely related to various inflammation disorders and beyond. However, simultaneous determination of these endogenous metabolites represents a great challenge. We thus developed an original and feasible method using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC –MS/MS) which made it possible to rapidly quantify 11 metabolites spanning succinate, phenylacetylglutamine, hippurate and trimethylamine metabolic pathways within 10 min. With this method, we were able to simultaneously monitor inflammation induced alternations of all these metabolites in a rat serum, urine and feces matrix. The measured levels of this panel of endogenous metabolites ranged from 0.001 to 17280 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The developed method was fully validated in terms of the sensitivity, linear range, precision, accuracy and recovery and has been successfully applied to the real samples analysis of TNBS-induced Crohn's disease model rats. Based on these results, this method could be a novel and sensitive approach for simultaneously identifying a large panel of metabolites with diverse properties and a large range of concentration differences. This method is therefore ready for widespread use in clarifying the pathophysiological roles and mechanisms of these key microbiota-host co-metabolites, which reflects the function of the intestine, consequently offering novel opportunities for evaluating the occurrence, development and therapeutic effect of diseases related to their disturbances. Supported by the National Natural Science Foundation of China (Ref. No. 81173564, No. 81274028, No. 81473319 and No. 81473540) and Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Design and Evaluation (Ref. No. 2011A060901014).

药物分析新材料与新技术

应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定中药材金银花和山银花

李丽潇^{1*}, 董露², 李胜男², 黄涛宏¹, 端裕树¹, 郭怀忠²

(1. 岛津企业管理(中国)有限公司, 上海;

2. 河北大学药学院, 河北省保定市)

摘要: 提取中药材金银花和山银花基因组, 基于 GenBank 金银花和山银花的基因序列差异, 设计两者特异性 PCR 引物, PCR 扩增后, 用岛津高分辨率的微芯片电泳仪 MultiNA 检测扩增产物, 金银花和山银花 PCR 产物呈现尺寸不同的 DNA 条带。表明基于微芯片电泳仪 MultiNA 开发的方法成功实现了中药材金银花和山银花的鉴定。

关键词: 微芯片电泳仪 MultiNA; 中药材品种鉴定; 金银花; 山银花

***通讯作者:** 李丽潇, E-mail: sshllx@shimadzu.com.cn

基于二维亲水-桥流-反相色谱-飞行时间质谱的磷脂检测新方法

朱超^{1*}, 谢媛媛², 梁琼麟^{2*}, 王义明², 罗国安²

(1. 德州学院医药与护理学院, 山东 德州, 253023; 2. 清华大学化学系, 北京, 100084)

磷脂化合物是具有极性头部和疏水尾部的两性分子, 是细胞膜的主要组分, 有非常重要的生理功能。在不同的生理、病理条件下, 出现代谢差异, 少数差异磷脂代谢物可被认为是与某些疾病发生发展、诊断、治疗相关的潜在生物标志物。因此, 生物样本中磷脂化合物的定性和定量在生命分析研究领域被广泛关注, 并出现了磷脂组学的概念。磷脂化合物的定性和定量是实现磷脂组学研究的关键平台技术。在以往报道中, 磷脂化合物的分离鉴定多采用色谱及其联用技术。二维色谱能够同时实现磷脂化合物不同类别的分离和同类别中不同化合物分子的分离, 结合高分辨质谱提供的精确分子量信息和碎片信息, 实现磷脂化合物的结构确认。本研究采用亲水(HILIC)-桥流-反向(RP)色谱-飞行时间质谱在 100min 内实现了 9 大类磷脂化合物的分离鉴定, 包括: PG、PE/pPE、PI、PC、PS、SM、LPC、LPE。该色谱分离方法通过 3 组二元泵, 3 根色谱柱和 1 个可切换四通阀实现的(图 1 左), 流动相采用乙腈/水/甲醇体系。一维采用二醇基 HILIC 色谱柱实现类别间的分离(图 1 右上), 二维采用反相 C8 柱富集后分离, 实现类别内的分离(图 1 右下)。前 80min 每 10min 切换一次,

80-100min 不切换。本研究中桥流的主要作用就是降低一维 HILIC 洗脱相中的有机试剂成分，增加磷脂在二维 RP 色谱中的保留，且减少由于磷脂在亲水与反相的洗脱顺序相反等色谱行为对分离度的影响。此方法经过严格的方法学验证，满足定量分析要求。该方法为磷脂组学研究提供新的二维分析平台，已用于糖尿病及其冠心病合并症的临床研究。

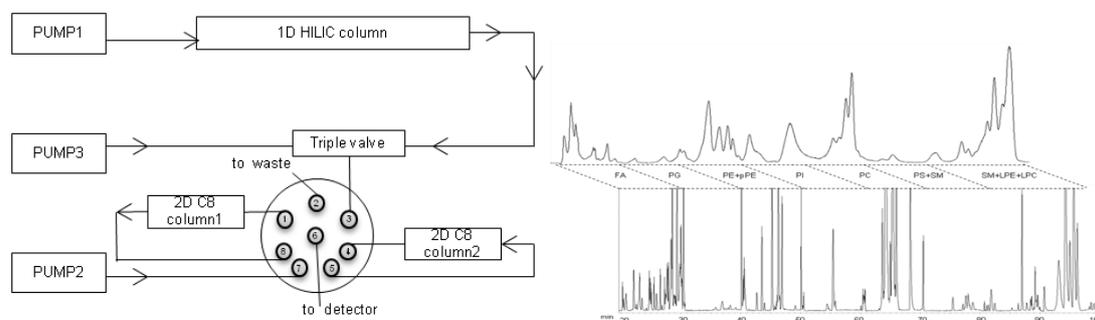


图 1. 二维亲水-桥流-反相色谱示意图（左图）及血浆磷脂轮廓（右图，上：一维图谱，下：二维图谱）

关键词： 磷脂；二维亲水-反相色谱；桥流；飞行时间质谱；磷脂组学

基金项目： 国家自然科学基金资助项目（批准号：81202502）

第一作者： 朱超，Email: zhuchao830111@163.com

***通讯作者：** 梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

一种基于全二维 HepG2 细胞膜色谱系统的中药体内活性代谢组分快速筛选分析

陈啸飞，贾丹，吴循循，丁璇，朱臻宇，柴逸峰*

（第二军医大学药学院）

细胞膜色谱是一种生物亲和色谱，应用于药物与膜受体相互作用的表征分析。目前已经广泛应用于中药等复杂体系中活性组分的筛选。然而，由于较高的检测限和体内基质的干扰，细胞膜色谱尚未应用于体内活性组分的分析。本研究构建了一种在线全二维 HepG2/细胞膜色谱/富集小柱/C₁₈柱/飞行时间质谱系统，从黄芩灌胃的大鼠血清中筛选抗肿瘤活性组分和代谢产物。我们同时利用 MATLAB 编写了一种血清基质干扰扣除程序成功用于消除血清中内源性成分的干扰。分析结果表明，在黄芩水液体液中，黄芩素、汉黄芩素、白杨素、木蝴蝶素 A，黄芩新素、半枝莲素 6 种组分在 HepG2

细胞膜色谱上呈现出显著的保留特性,但是在含药血清中仅筛选到汉黄芩素、木蝴蝶素 A 和黄芩新素 3 种潜在活性组分,其余组分均代谢成为活性较低的代谢产物,在 HepG2 细胞膜色谱模型上没有亲和行为。为了验证黄芩进入体内组分的活性,我们采用 CCK-8 方法测定汉黄芩素、木蝴蝶素 A、千层纸素对于 HepG2 细胞的增殖抑制作用,发现它们在 12.5-200 μM 的浓度范围内均呈现出剂量依赖性的抑制效应, IC_{50} 分别为 69.83, 16.66, 51.6 μM , 流式细胞分析表明三种成分均能有效诱导 HepG2 细胞的凋亡发生,呈现出与 CCK-8 测定相似的量效关系。汉黄芩素、木蝴蝶素 A 作为首次在体内筛选到的活性组分(千层纸素在体内代谢成为活性较低的组分),可作为抗肿瘤活性先导物进行进一步开发。本研究所构建的全二维细胞膜色谱系统和基质干扰的扣除策略非常适用于中药复杂体系进入体内的活性组分和代谢物快速筛选鉴定,对于其它生物色谱模型也具有适用性。

关键词: 全二维 HepG2 细胞膜色谱系统; 中药黄芩; 含药血清; 基质干扰消除; 抗肿瘤活性组分; 体内活性分析

自制 SPME 涂层顶空萃取-GC-MS 分析中药佩兰中挥发性成分

高佳¹, 林艺芬¹, 张兰^{1,2}

(1.福州大学食品安全分析与检测教育部重点实验室,福州,福建,350008

2.福州大学测试中心,福州大学运动科学研究中心,福建 福州 350002)

佩兰为菊科(Compositae)植物佩兰 *Eupatorium fortune Turcz* 的干燥地上部分,为多年生草本植物。佩兰气芳香,味微苦,性味辛、平,归脾、胃、肺经,芳香化湿、醒脾开胃、发表解暑。用于湿浊中阻,脘痞呕恶,口中甜腻,口臭,多涎,暑湿表证,湿温初起,发热倦怠,胸闷不舒^[1]。

已知佩兰中含有的化学成分主要是挥发油,《中国药典》(2010 版)一部将佩兰的质量控制指标定为测定其总挥发油含量。一般全草挥发油含量在 1.5%~2.0%。佩兰挥发油具有祛痰和消炎作用,对流感病毒有直接抑制作用^[1,2]。

对佩兰的挥发性成分已有一些研究,但是利用自制 SPME 涂层顶空萃取结合 GC-MS 联用仪萃取富集其挥发性成分的研究尚未见报道。本文采用原位生长法制备金属有机骨架 ZIF-90 纤维涂层,作为固相微萃取载体,对佩兰预热水溶液采用顶空萃取法富集其中的挥发性成分,然后用 GC-MS 分析定性出 35 种挥发性成分。该涂层制

备方法简单、重现性高，用于佩兰中挥发性成分萃取时耗时短，用药量少，富集倍数高。相对于水蒸汽蒸馏法具有缩短分析时间，节省溶剂，不污染环境等优势，为挥发性组分分析提供简单、快捷的提取检测方法。

关键词：SPME；ZIF-90；佩兰；挥发性成分；GC-MS

基金项目：本文由国家自然科学基金项目（21275029）、福建省自然科学基金项目（2015J01045）资助。

自组装超顺磁胶体微囊及其载药探索

张兰^{1,2}，高佳¹

(1. 福州大学食品安全分析与检测教育部重点实验室，福州，福建，350008

2. 福州大学测试中心，福州大学运动科学研究中心，福建 福州 350002)

胶体微囊因其可以有效提高药物、蛋白质、催化材料，甚至活细胞的包封和释放效果而成为研究热点之一。胶体微囊是由具有纳米多孔结构的纳米胶体在乳液液滴界面进行自组装而成为空腔微囊的过程，同时它还具有将药物包封在内的液态内腔。先前的胶体微囊载体研究主要集中在尺寸大于 $1\mu\text{m}$ ，且是单一类型的，具有不同物理性质或形态特征的胶体粒子材料上的，比如铁氧化物，聚合微米棒以及立体有机金属骨架等。^[1]而若将其作为抗肿瘤药物载体，其理想尺寸应介于 $8\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ ，这样既可以保证药物在肿瘤细胞内的保留效果，又可以防止扩散到正常组织中。因为载药粒子如果小于 8nm 将会失去对癌变组织的选择性。最近的研究进一步证明分层微载体在到达目标恶性肿瘤组织位点的时候可以自行解除组装，以便于能更深层的渗透到病灶组织。^[2]这将有利于提高各种类型的肿瘤的诊断和治疗。

本文将两种不同功能的纳米胶体：超顺磁 Fe_2O_3 和 SiO_2 纳米胶体按 1:10 体积比在含有一定浓度的秋水酰胺水/硬脂酸癸烷两相体系中实现胶体微囊的自组装。利用 SiO_2 纳米胶体的稳定性使其成为胶体微囊的支撑骨架，而利用 Fe_2O_3 胶体在 $\text{pH}3.5\sim 5.5$ 范围内可以稳定存在，但是当 pH 超过 6 就会自发沉降的性质，采用 pH 调控的方法对药物进行包封和释放的探索。通过紫外分光光度法测定形成胶体微囊前后药物秋水酰胺的紫外吸收变化，证明水溶性药物可以包裹在微囊中。

比较秋水酰胺在形成胶体微囊前后吸光度的变化并计算，可知胶体微囊的载药量为 5.21mg/g ，药物的释放率为 103.6% 。结果显示该法制备的纳米胶体微囊具有一

定的载药能力,且可通过 pH 调节可以将药物完全释放出来,具有一定的实际应用意义。

关键词: 超顺磁 Fe₂O₃; SiO₂ 纳米粒; 胶体; 胶体微囊; 载药; 秋水酰胺

基金项目: 本文由国家自然科学基金项目 (21275029)、福建省自然科学基金项目 (2015J01045) 资助。

高灵敏赭曲霉毒素 A 电化学传感器的构建

童萍^{1,2}, 李恒², 张兰^{1,2*}

(1. 福州大学测试中心, 福州大学运动科学研究中心, 福建 福州 350002

2. 食品安全分析与检测教育部重点实验室, 福州大学化学学院, 福建 福州 350108)

近年来,食品安全问题中有关毒素的痕量检测受到广泛关注。作为曲菌及青霉菌属的次级代谢产物,赭曲霉毒素 A (OTA) 因具有肾毒性、肝毒性、免疫抑制性以及致畸性^[1]等特点而受到重视。迄今为止,科学家已经提出了不同的检测思路和方法,但在特异性和灵敏度方面仍存在问题,因此,有必要寻求更简单、灵敏、快速的检测方法。目前,在电化学传感技术中最有应用前景的半导体材料是量子点,它可以通过 DPASV 技术实现检测^[2]将多个量子点负载到一个基底上可以有效的放大信号,常用的基底包括碳纳米管、金属纳米粒子以及 SiO₂ 纳米粒子等。其中 SiO₂ 纳米粒子具有良好的生物相容性和均一性,表面容易功能化等优点,是一种理想的基底材料。

本文利用改进的 Stober 法合成 CdS QDs/SiO₂ 纳米粒子作为电子媒介体,设计了一种高灵敏度的 OTA 电化学适配体传感器。CdS QDs/SiO₂ 纳米复合材料以 SiO₂ 纳米粒子作为惰性母体,保持了 SiO₂ 纳米粒子良好的生物相容性和均一性; SiO₂ 纳米粒子具有较大的比表面积,能增加量子点的固定量,与单独负载信号探针的量子点相比较,电化学信号大幅度增加,因此有助于提高 OTA 检测的灵敏度。在组装过程中,先将捕获探针 (cDNA) 固定在 GE 表面,适配体与捕获探针杂交形成双链,此时没有电化学信号;当 OTA 存在时,适配体会与 OTA 结合而从电极表面脱离,再将标记有 CdS QDs/SiO₂ 纳米复合材料的信号探针 (sDNA) 与电极上自由的 cDNA 杂交,产生电化学信号。最优条件下,传感器电化学信号强度与 OTA 浓度在 0.5 pg mL⁻¹~10.0 ng mL⁻¹ 呈现良好的线性关系,检测限低至 0.091 pg mL⁻¹。

关键词: CdS QDs/SiO₂ 纳米粒子; 适配体; 电化学; 赭曲霉毒素 A

基金项目: 本文由国家自然科学基金项目 (21275029)、福建省自然科学基金项目 (2015J01045) 资助。

不同金属离子对磷酸化肽选择性富集效果的系统比较

孙雪妮, 冯嘉楠, 王心莹, 李嫣*, 邓春晖

(复旦大学药学院)

摘要: 蛋白质的可逆磷酸化是最常见、最重要的蛋白质翻译后修饰之一, 调节着包括细胞生长、增殖、分化、凋亡及细胞信号传导等在内的几乎所有的生物过程。研究蛋白质磷酸化有助于全面理解蛋白质的生理功能及其机理。目前主要的磷酸化蛋白检测手段之一为质谱检测, 但由于磷酸化蛋白的固有含量低, 离子化效率差等原因导致直接质谱检测非常困难, 因此检测前需对磷酸化蛋白进行选择性的富集。IMAC (固定金属离子亲和色谱) 作为最重要的磷酸化蛋白富集技术之一, 近年来受到研究者的广泛青睐。应用 IMAC 富集磷酸化蛋白的原理主要是利用带正电的金属离子和带负电的磷酸基团间的静电相互作用。目前, 应用比较多的金属离子有 Ti、Zr、Ce 等, 根据之前的文献报道, 不同的金属离子具有不同的富集效果, 在单磷酸化肽和多磷酸化肽的选择性上也有一定的偏向性。为了更好的确定各个常用金属离子在磷酸化蛋白富集效果上的差异, 我们从富集能力、富集选择性及实际样品等方面着手, 应用 β -casein 和 BSA 两种标准蛋白及脱脂牛奶等实际样品系统比较了 8 种常用的金属离子 (Ti, Nb, Zr, Ce, In, Y, Ga, Fe), 综合比较出对磷酸化蛋白富集效果较好的金属离子, 并从单磷酸化肽和多磷酸化肽富集选择偏向性上对比较的金属离子进行简单划分。通过比较, 我们发现 Ti^{+4} 和 Nb^{+5} 从整体上 (选择性, 检测限及实际样品) 表现出比较好的富集效果, 并且 Ti^{+4} 更偏向于富集单磷酸化肽而 Nb^{+5} 对于多磷酸化肽具有更好的富集效果。此外, Ga^{+3} , Zr^{+4} 等与其他离子相比也表现出对多磷酸化肽具有一定的偏向性而 Ce^{+4} 则对单磷酸化肽富集后的质谱信号强度更高。该研究结果对于应用 IMAC 技术富集磷酸化肽具有一定的补充和借鉴意义。

关键词: 磷酸化蛋白; 固定金属离子亲和色谱; 离子比较; MALDI TOF MASS

大孔混合作用模式聚合物吸管整体柱的制备及其用于人生理体液中的柯诺辛的富集研究

张红武

(广东药学院, 广州)

近年来, 具有制备简易, 操作迅捷, 萃取效率高, 成本低廉, 消耗溶剂少或不消耗溶剂等一系列优势的小型固相萃取 (SPE)、以及固相微萃取 (SPME) 装置不断

涌现，并且已然成为前处理技术研究的热点之一。作为一种微型 SPE 技术，吸管固相萃取装置（pipette tip solid phase extraction, PT-SPE）应用于体内药物分析的价值引起人们的注意。研究人员在 PT-SPE 装置中尝试了多种萃取介质，包括：聚合物整体柱、硅胶整体柱，以及硅胶颗粒、石墨烯、分子印迹聚合物颗粒等。相比较而言，采用聚合物整体柱介质的 PT-SPE 装置制备简便、消耗溶剂少，而且整体柱材料通透性足够好时，可以直接安装到移液器上使用，实现生理体液样品中目标组分的快速前处理。

我们课题组以具有超大分子量的多糖溶液作为致孔剂，采用热引发聚合方式，制备了具有微米级大孔的聚合物 PT-SPE 的装置。相比以往的制备方法，该装置的通透性明显改善，可以直接安装到移液器上使用，而且制备方法简便、重现性好。整体柱采用甲基丙烯酸和甲基丙烯酸丁酯为功能单体，二甲基丙烯酸乙二醇酯为交联剂，因而具有疏水和弱阳离子交换混合作用功能，可以对样品中的疏水性、弱碱性、或同时具有疏水弱碱性的目标组分具有较好的萃取效率。

以具有疏水、弱碱性的中药活性成分柯诺辛碱（CNX）为目标成分，采用所制备的吸管整体柱为 SPE 装置，联合后续进行 HPLC-UV 检测，对该 PT-SPE 进行人血清、尿液样品的前处理效果进行了研究。PT-SPE 装置可对人尿样（事先加入缓冲液稀释）直接进行 SPE 处理，对尿样中的 CNX 成分绝对回收率达到 95.2~99.3%，相对回收率达到 86.0~110%（RSD1.4~4.6%）。对人血清样（事先经蛋白沉淀处理）的 SPE 处理效果良好，CNX 成分绝对回收率为 85.9~91.1%，相对回收率 96.2~105%（RSD3.8~5.0%）。

关键词：固相萃取；吸管整体柱；高效液相色谱；体液分析；柯诺辛

壳聚糖-石墨烯复合膜修饰电极对岩白菜素的的电化学分析

王文成，闫丽君，程勇，李小宝，牛学良，孙伟*

（热带药用植物化学教育部重点实验室，海南师范大学 化学与化工学院，海南 海口 571158）

摘要：以玻碳电极(GCE)为基底电极，将按一定比例混合的壳聚糖(CS)和石墨烯(GR)混合液修饰到 GCE 表面得到壳聚糖-石墨烯复合膜修饰电极(CS-GR/GCE)。以其为工作电极在电位窗口 0.4V ~ 1.0V 范围内对岩白菜素的电化学行为进行研究。循环伏安扫描表明岩白菜素在该修饰电极上出现了一个明显的氧化峰，峰电位为 0.163 V (vs. SCE)，没有出现还原峰，表明岩白菜素在该电极上发生的反应为不可逆过程。

与 GCE 相比在 CS-GR/GCE 上的氧化峰电流明显增大, 这说明 GR 的存在有效提高了电极的比表面积, 增强了电极界面的导电性能和催化性能, 因此岩白菜素的电化学反应得到了提高。应用电化学方法对岩白菜素在 CS-GR/GCE 上的电化学反应进行了详细的研究, 计算出相关电化学参数如电子传递系数(α)为 0.50, 反应速率常数(k_s)为 0.16 s^{-1} , 电子转移数(n)为 2。在最佳实验条件下记录了不同浓度的岩白菜素在 CS-GR/GCE 电极上的示差脉冲伏安图(图 1A)并求解了峰电流与浓度的关系图(图 1B)。在 $0.02\sim 8.0 \mu\text{mol/L}$ 范围内岩白菜素的氧化峰电流与浓度呈良好线性关系, 线性回归方程为 $I_{pa}(\mu\text{A})=0.280-0.098 C (\mu\text{mol/L})$ ($r=0.998$), 检测限为 3.6 nmol/L ($3S_0/S$)。将该修饰电极用于测定复方岩白菜素片中岩白菜素的含量, 利用标准加入法进行了回收率实验, 回收率在 $98.8 \sim 103.2\%$ 范围内, 表明该方法可以用于药物样品中岩白菜素的含量测定。

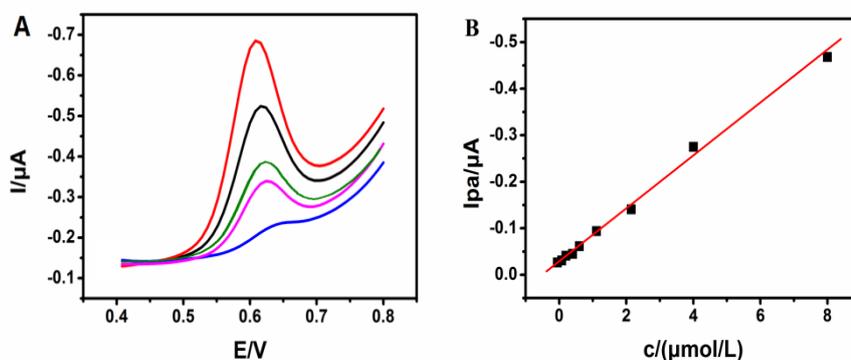


图 1(A) 不同浓度的岩白菜素在 CS-GR/GCE 上的示差脉冲伏安曲线叠加图; (B) 岩白菜素氧化峰电流和其浓度之间的关系。

关键词: 岩白菜素; 石墨烯; 壳聚糖; 电化学; 循环伏安法; 示差脉冲伏安法

基金项目: 国家自然科学基金(21365010), 海南省自然科学基金(20152016)与海南省科技合作项目(KJHZ2015-13)资助。

***通讯作者:** 孙伟, 男, 教授, 从事电分析化学研究。E-mail: swyy26@hotmail.com.

木犀草素在纳米金/三维石墨烯复合材料修饰电极上的电化研究与分析

王文成, 闫丽君, 程勇, 李小宝, 牛学良, 孙伟*

(热带药用植物化学教育部重点实验室, 海南师范大学 化学与化工学院, 海南 海口 571158)

摘要: 用离子液体正己基吡啶六氟磷酸盐为修饰剂与石墨粉按一定比例混合制备了

一种离子液体修饰碳糊电极(CILE), 并以此为基底电极, 利用电化学沉积法将三维石墨烯(3DGR)与纳米金沉积到 CILE 表面形成复合纳米材料修饰电极(Au/3DGR/CILE)。以该电极作为工作电极对木犀草素的电化学行为进行研究。实验结果表明随着纳米材料的修饰木犀草素的峰电流逐渐增加, 3DGR/CILE 上的氧化峰电流约为 CILE 的 1.5 倍, Au/3DGR/CILE 上氧化峰电流为 CILE 的 2 倍。这是由于三维石墨烯具有高比表面积和良好的导电性能, 高导电的纳米金的存在进一步增加了木犀草素在电极上的电化学响应。应用电化学方法求解出木犀草素电极反应的电子传递系数 $\alpha=0.48$, 反应速率常数 $k_s=2.1s^{-1}$, 电子转移数 $n=0.84$ 。在最佳实验条件下不同的浓度的木犀草素在 Au/3DGR/CILE 上的示差脉冲伏安图(图 1A)及浓度与峰电流的关系图(图 1B)如下图所示。在 $0.05 \sim 50.0 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内氧化峰电流与浓度呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $I_{pa}(\mu\text{A})=10.14 C (\mu\text{mol/L}) + 2.437 (\gamma = 0.983)$, 检测限为 7.59 nmol/L ($3S_0/S$)。将该修饰电极用于测定独一味胶囊中木犀草素的含量, 并用标准加入法进行回收率实验, 回收率在 $96.44 \sim 105.21\%$ 范围内, 该方法拓宽了石墨烯复合材料在药物分析中的应用。

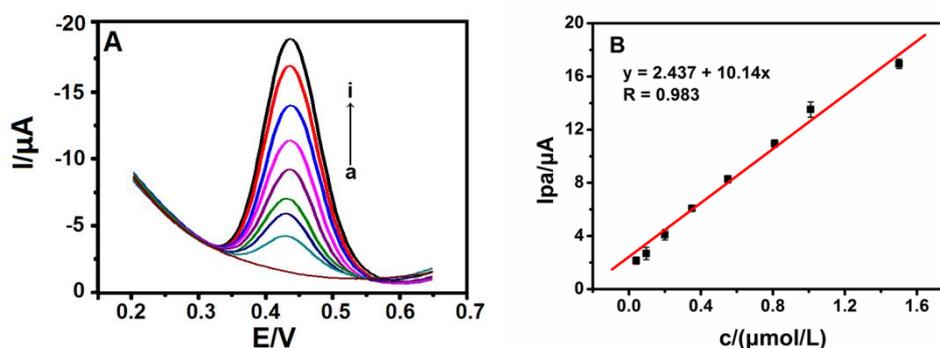


图 1 (A)不同浓度(a → i: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.35, 0.55, 0.8, 0.1, 1.5 $\mu\text{mol/L}$)的木犀草素在 Au/3DGR/CILE 上的示差脉冲伏安曲线; (B)木犀草素氧化峰电流和其浓度之间的关系。

关键词: 木犀草素; 石墨烯; 纳米金; 电化学; 循环伏安法; 示差脉冲伏安法

基金项目: 国家自然科学基金(21365010), 海南省自然科学基金(20152016)与海南省科技合作项目(KJHZ2015-13)资助。

***通讯作者:** 孙伟, 男, 教授, 从事电分析化学研究。E-mail: swyy26@hotmail.com.

LSER 在新型磷脂微乳电动色谱预测药物 logP 及 logKp 中应用

宋静¹, 张伟¹, 孙晓迪², 刘建芳*

(河北医科大学¹, 山西医科大学², 白求恩国际和平医院*)

摘要: 目的: 生物分配电动色谱法模拟药物膜相互作用是基于药物在电动色谱系统中的保留行为与其体内生物分配过程都由相同的分子作用力决定, 包括疏水、氢键、极性、空间和静电等作用力。本文将大豆磷脂和经典的表面活性剂相混合制备稳定的微乳体系, 检测药物在微乳电动色谱中的保留行为, 进而通过线性溶剂化能量关系 (LSER) 建立模型来预测药物的正辛醇/水分配系数及皮肤渗透系数。**方法:** 筛选出稳定的微乳体系组成成分, 用粒度仪检测外观稳定微乳的粒径和 Zeta 电位。收集 26 个具有不同 Abraham 描述符特征的化合物集合, 进行 MEEKC 保留因子 logK 的测定。将测得的 logK 与化合物的分子描述符进行多元线性回归, 得到该体 LSER 方程。**解析** LSER 方程中各种分子间作用力在溶质分配过程中的贡献, 再将该系统方程的系数进行标准化处理, 系数表征该系统特征, 系数间的相似度代表系统间的相似程度, 用距离参数 d 进行系统间的比较。收集已知 logKp 和 logP 的药物, 应用该微乳体系建立相关预测模型, 进行验证。**结果:** 经过处方筛选确定微乳系统为 2.0% 大豆磷脂-3.5% 胆酸钠-6.0% 正丁醇-0.7% 辛醇-87.8% 磷酸盐缓冲溶液。建立 26 种中性化合物的 LSER 的方程($\log P = 0.508 + 2.166V - 0.048S - 2.851B + 0.123A + 0.021E, R^2 = 0.921$)。收集具有透皮吸收系数的 33 种药物的 logk 与 logP 之间有良好的线性相关($y = 1.8681x + 1.1844, R^2 = 0.6527, n = 33$), 但是 logP 与 logKp 之间相关性不明显。将药物以酸、中、碱性集合分类后分析, 发现分类后药物的 logP 与 logk 之间能建立相关性良好, 其中以中性药物相关性最好($y = 1.6054x + 1.1846, R^2 = 0.934, n = 7$), 只有碱性药物的 logKp 与 logk 之间能建立相对较好的相关性($y = 1.9632x - 6.3632, R^2 = 0.6272, n = 15$)。**结论:** 筛选的新型磷脂微乳电动色谱体系, 测得溶质的保留特征为系统的空穴形成能力和氢键碱度对溶质的分配行为贡献较大; 将磷脂微乳电动色谱法得到的 LSER 方程特征与文献报道的皮肤渗透性系数的线性溶剂化方程特征做距离比较, 得到模拟药物皮肤渗透过程的微乳体系。所筛选的磷脂微乳测得的 logk 可用于预测药物的 logP, 同时也能很好地预测不同结构碱性药物的 logKp。

关键字: LSER; 微乳电动色谱; 磷脂; 皮肤渗透系数; 正辛醇-水分配系数

基于络合萃取原理的逆流色谱分离亲水氨基酸的研究

李颺¹, 张敏², 章弘扬¹, 王月荣¹, 胡坪^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海, 200237;

2. 华东理工大学上海市新药设计重点实验室, 上海, 200237)

摘要: 基于液液萃取原理的逆流色谱是一种高效的分离手段, 要求被分离成分在溶剂体系中具有较大差异的分配系数。极性较强的亲水性氨基酸在常用溶剂体系中的分配系数很小且十分接近, 因此其在逆流色谱中的分离是一个难点。为此, 本文提出一种基于络合萃取的逆流色谱法并将其应用于亲水氨基酸的分离。

研究选取了 5 种具有代表性的酸性氨基酸、中性氨基酸和碱性氨基酸进行分离研究。氨基酸在水溶液中存在多种电离平衡, 在不同的酸碱环境下以不同的离子状态存在。已有研究表明在 pH3.5-5.0 的范围内, 二(2-乙基己基)磷酸酯 (DEHPA) 可与中性氨基酸作用, 即主要与偶极离子、一价正离子作用 (图 1 (a))。由 K 值测定结果可见, 酸性氨基酸在 pH 值大于 2.0 后, K 值极低, 由此推测氨基酸负离子不与 DEHPA 作用。碱性氨基酸在 pH2.0-5.0 范围内的离子型态为一价和二价正离子, 其 K 值变化规律与偶极离子、一价正离子混合状态下的不同, 由此推测二价正离子可能与 DEHPA 形成络合状态。

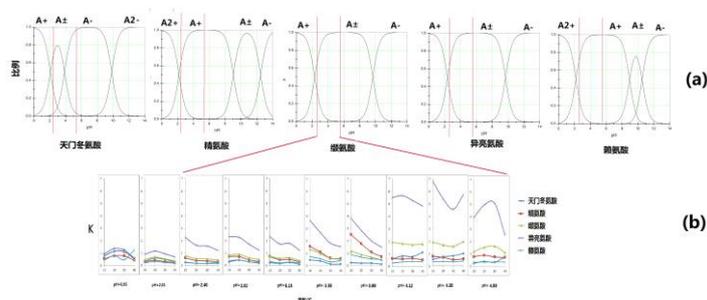


图 1 (a) 不同 pH 值下氨基酸的分布曲线

(b) 不同 pH 值下氨基酸在逆流色谱溶剂体系中的 K 值随温度变化图

从 K 值测定结果看出, 在 pH 2.0-5.0 的范围内, 所选 5 种氨基酸的 K 值基本随着温度升高而减小, 表明过程为放热反应 (图 1 (b))。为了提高分离度, 后续分离均选取较低温度进行。本研究选择以 DEHPA 作为萃取剂, 以环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水作为溶剂系统, 在温度为 5°C, pH 为 4.2 条件下, 对 5 种混合氨基酸进行反应萃取逆流色谱分离, 分离得到 5 种高纯度氨基酸, 分离前后的 HPLC 色谱图如图 2 所示。经 HPLC 检测, 所得的 5 种氨基酸纯度均大于 95%。本研究为用逆流色谱法解决亲水性氨基酸的分离提供了一个新的思路。

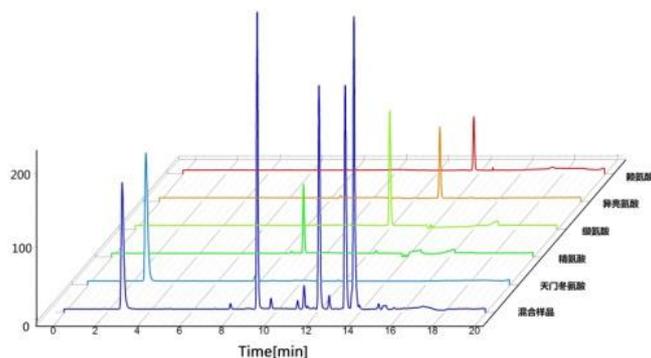


图 2 亲水氨基酸分离前后的 HPLC 色谱图

关键词：络合萃取；逆流色谱；亲水氨基酸；分离纯化

纸基微流控芯片检测血液中的黄嘌呤和尿酸

赵甜甜¹，张敏²，章弘扬¹，王月荣¹，胡坪^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院，上海，200237；

2. 华东理工大学上海市新药设计重点实验室，上海，200237)

摘要：人体的内源性黄嘌呤主要来源于两个代谢途径，而黄嘌呤最终经黄嘌呤氧化酶氧化为尿酸，因此，黄嘌呤和尿酸可作为多种临床疾病的潜在生物标志物。传统检测方法主要基于色谱法、电化学等方法，这些方法均需要昂贵的仪器，操作较复杂，样品准备及检测所需时间较长，不能作为黄嘌呤和尿酸的快速、低成本检测方法。为此，本文提出一种基于纸基微流控芯片快速检测血样中黄嘌呤和尿酸的方法。

金纳米颗粒检测黄嘌呤的原理如图 1 所示：利用柠檬酸三钠还原法制得的金纳米颗粒表面被柠檬酸根所覆盖，由于带有负电荷的柠檬酸根之间存在排斥力，使得纳米颗粒能够稳定地分散，并呈现红色。当加入黄嘌呤后，由于黄嘌呤含有多个氨基，而金纳米颗粒倾向于结合富含氨基的分子，使得黄嘌呤顶替表面的柠檬酸根，使金纳米颗粒之间的排斥力大大减小，以致发生聚集，溶液变为紫色。反应前后溶液的紫外可见吸收光谱的变化及金纳米颗粒的透射电镜图证实了此原理。尿酸的检测原理则是尿酸在尿酸酶的作用下生成 H_2O_2 ， H_2O_2 在过氧化物酶的作用下催化色源性物质 4-氨基安替比林和 3,5-二氯-2-羟基苯磺酸钠生成红色的醌亚胺类物质。

本研究中，在制备的金纳米溶液中加入 $NaHSO_4$ 溶液，使其浓度为 0.9mM，以此作为诱导剂提高了检测结果的灵敏度。检测时将处理后的痛风患者血清与金纳米

溶液混合一段时间后滴加至纸基芯片黄嘌呤检测区域，然后取另一份血清直接滴加在附有尿酸酶等试剂的纸基芯片尿酸检测区域。待检测区域干燥后拍照，如图 2 所示，用 ImageJ 处理照片获得相关的颜色强度，分别以比值 Blue/Red 和灰度值为纵坐标，以黄嘌呤和尿酸浓度为横坐标建立标准曲线，据此可以计算出样品 S1 中黄嘌呤含量为 0.36 ppm，尿酸含量为 36.5 ppm，样品 S2 中黄嘌呤含量为 0.60 ppm，尿酸含量为 51.2 ppm。

关键词：纸基微流控芯片；金纳米颗粒；黄嘌呤；尿酸；检测

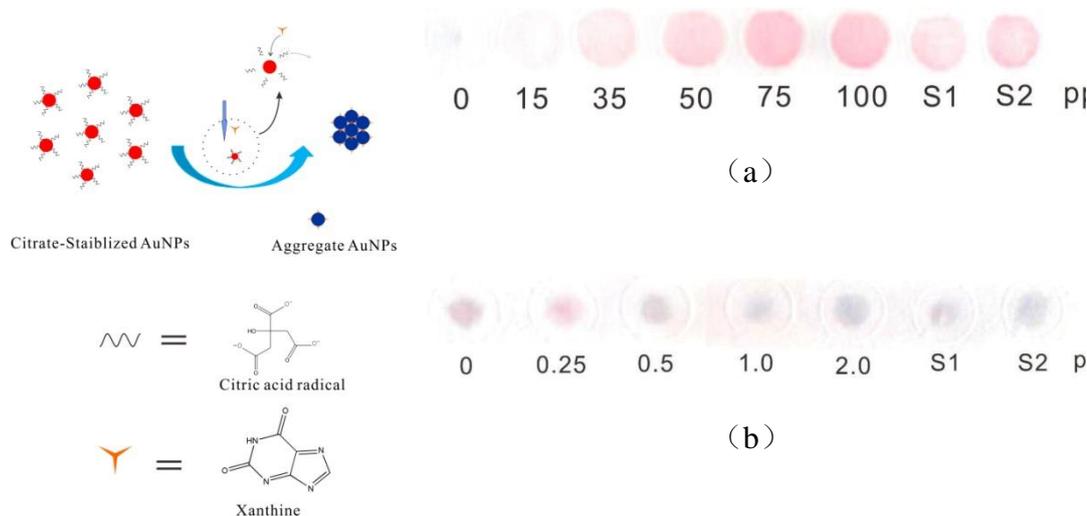


图 1 金纳米颗粒检测黄嘌呤原理示意图

图 2 纸基微流控芯片检测尿酸 (a) 和黄嘌呤 (b)

反相/阴离子交换混合模式磁性纳米材料的制备及其在生物样品中血管紧张素 II 受体拮抗剂检测中的应用

薛舒文，徐丽*

(华中科技大学同济医学院)

本文通过“硫醇-乙烯基”点击化学反应制备了二乙烯基苯(DVB)和磺酸盐(SO³⁻)改性的磁性纳米颗粒 Fe₃O₄-DVB-SO³⁻。并通过电子透射电镜、傅里叶变换红外光谱、热重分析、磁性及接触角实验等对其进行了详细的表征。该纳米粒在具有疏水性的同时，在水溶液中能够保持良好的分散性，有利于提高应用中的操作性和重现性。将此纳米颗粒作为磁固相萃取吸附剂，建立了磁固相萃取(MSPE)-液相色谱-荧光检测方法，用以分析人体尿液和血浆中的五种血管紧张素 II 受体拮抗剂，替米沙坦、奥美

沙坦酯、厄贝沙坦、洛沙坦钾、坎地沙坦酯。在最优的萃取条件下，该方法在人体尿样和血样中具有较好的重现性，日内 ($n=4$) 和日间 ($n=3$) 标准偏差为 1.1%-15.2%，检出限 ($S/N=3$) 为 0.01-5.74 ng/mL，加标回收率为 83.6%-119.5%。该方法具有稳定性高、检出限低、操作简便等优点，在复杂基质中痕量物质的富集具有很好的应用前景。
关键词：磁固相萃取；点击化学反应；反相/阴离子交换混合模式；血管紧张素 II 受体拮抗剂

一种分离手性氨基酸的新型奎尼丁整体色谱柱的制备

韩海, 王启钦, 吴慧慧, 朱培杰, 江正瑾

(暨南大学药学院, 广东广州, 510632)

摘要：现行分离手性氨基酸的 HPLC 柱以填充柱为主，均存在分析时间过长，氨基酸对映体分离度不高等缺点，本研究以奎尼丁型手性选择剂合成手性单体，制备出一种用于纳升液相色谱的新型奎尼丁手性整体毛细管色谱柱，对大部分 *N*-衍生化氨基酸具有较高的手性选择性和较短的手性分离时间。

关键词：D-氨基酸；手性分离；奎尼丁；整体毛细管柱

新型奎宁丁整体柱对酸性化合物的手性拆分研究

朱培杰, 王启钦, 吴慧慧, 阮梦, 彭坤, 江正瑾

(暨南大学药学院, 广州, 510632)

摘要：单一构型的化合物在医药、食品添加剂、杀虫剂、环境科学等领域起到重要的作用。近些年来，奎宁 (QN) 和奎宁丁 (QD) 基质的弱阴离子交换型手性固定相对酸性化合物表现出很高的手性拆分能力，受到了广泛的关注。整体柱作为一种连续床固定相，与普通的填充柱相比，具有柱效高、柱压低、制备简单、pH 适用范围广等优势，成为近年来的研究热点之一。本文以 QD 为原料合成出一种新型手性功能单体 *O*-9-叔丁基氨甲酰基-11-[(2-甲基丙烯酰氧基)乙巯基]-10,11-氢化奎宁丁 (MCQD)，通过共聚反应制备成相应的整体柱 poly(MCQD-co-HEMA-co-EDMA)，且对其机械强度、通透性、重现性和手性选择性进行系统评价。在最佳流动相下，57 种 *N*-衍生化氨基酸和 8 种 *N*-衍生化二肽的对映体均能在该整体柱上基线分离，较前期报道的 poly(MQD-co-HEMA-co-EDMA) 整体柱在分离酸性化合物方面表现出更高的手性选

择性。同时，利用 poly(MCQD-co-HEMA-co-EDMA)整体柱分别对两种除草剂（2,4-滴丙酸和 2,4,5-滴丙酸）进行手性拆分，结果发现二者的手性对映体在 10 min 内达到基线分离，与相应的硅胶基质整体柱对比，不仅分析时间更短，手性选择性也更高。综上所述，poly(MCQD-co-HEMA-co-EDMA)整体柱对酸性化合物表现出很高的手性识别能力，为酸性化合物的手性拆分及实际样品的质量控制等领域提供新的选择。

关键词：奎宁丁；整体柱；酸性化合物；手性

间隔臂长度对一锅法制备环糊精整体柱手性分离能力的影响

肖媛，郭嘉亮，林苑靖，江正瑾

（暨南大学药学院，广州，510632）

摘要：手性拆分一直是色谱分析研究领域里面的重要问题。环糊精(CD)独特的分子结构和主体特征使其具有良好的手性识别能力，因此成为了近年液相色谱手性固定相的研究热点。有机聚合物整体柱 (Monolithic column) 是由单体、交联剂和致孔剂等试剂通过原位聚合而成的连续床固定相。近年来，由于其良好的通透性，尤其是表面易于修饰的特点，因此被视为固定化环糊精的理想材料之一。设计制备新型的环糊精整体固定相，从而提高柱效和手性分离能力成为了目前环糊精有机聚合物基质整体柱研究的主要方向，并具有重要的实践价值。此前，我们发明了一种简易的“一锅法”制备得到新型环糊精有机聚合物整体柱，并进行了初步的考察。为了深入研究间隔臂长度对环糊精整体柱手性分离的影响，本文分别以三种可以具有不同间隔臂长度的环糊精单体(氨基环糊精(amino- β -CD)，乙二胺环糊精(EDA- β -CD)和己二胺环糊精(HDA- β -CD))与 GMA 为单体，EDMA 为交联剂，采用 DMSO 和甲醇为生孔剂，AIBN 为引发剂，通过原位聚合反应“一锅法”制备得到三种环糊精整体柱，根据间隔比由短至长分别为 poly(GMA-NH₂- β -CD-co-EDMA)、poly(GMA-EDA- β -CD-co-EDMA) 和 poly(GMA-HDA- β -CD-co-EDMA)。在系统优化了影响整体柱结构与分离能力的各个因素后，得到了最佳聚合比例；通过测试整体柱的通透性，重现性、结合元素分析、扫描电镜，对三根整体柱的理化性质进行表征与比较；同时，采用微径液相色谱的方法，考察了三根柱子在分离扁桃酸类，布洛芬类，衍生化氨基酸和苯氧羧酸类除草剂等 14 种酸性手性化合物效果。研究表明，在相同条件下，随着链长的增长，实际的手性分离效果有所下降，即相同条件下 poly(GMA-NH₂- β -CD-co-EDMA)> poly(GMA-EDA- β -CD-co-EDMA) > poly(GMA-HDA- β -CD-co-EDMA)。

关键词： β -CD；整体柱；链长；手性

基于新型奎尼丁整体柱的 Nano-LC/FLD 系统在手性氨基酸分析中的应用研究

吴慧慧, 韩海, 王启钦, 朱培杰, 阮梦, 彭坤, 江正瑾*

(暨南大学药学院, 广州, 510632)

摘要: 自然界中存在 20 种基本氨基酸, 除甘氨酸外均有手性, 长期以来人们认为 D 型氨基酸仅存在于微生物中, 参与构成细胞壁肽聚糖层。但随着分析方法的不断发展, 人们在多种生物体内发现了多种活性 D 型氨基酸的存在, 因此 D 型氨基酸测定及氨基酸的手性拆分引起了人们的高度重视。本文报道了一款新型氨基甲酰化的奎尼丁整体柱 poly(*O*-9-[2-(甲基丙烯酰)-乙氨基甲酰]-10,11-二氢奎尼丁-*co*-乙二醇二甲基丙烯酸酯 (poly(MQD-*co*-EDMA)), 并将其应用于微径液相 (nano-LC) 对 *N*-衍生化的氨基酸进行手性拆分。在最佳流动相下, 44 种不同衍生化的氨基酸化合物对映体均能手性分离, 其中 36 种氨基酸衍生物达到基线分离, 这些结果证明该整体柱具有良好的手性选择能力。为了分析生物样品中的微量 D-型氨基酸, 提高检测灵敏度, 该整体柱还被联用于自组装的激光诱导荧光检测器 (nano-LC/LIF), 对 4-氟-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD-F) 衍生化的 10 种重要体内氨基酸进行手性拆分, 其中精氨酸、脯氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺等能达到基线分离且 D 型出峰在前。同时, 测定发现精氨酸的绝对 RLOD 值和 RLOQ 值分别达到 2.4 fmol 和 3.6 fmol, 对比大部分文献报道的检测灵敏度具有一定的优势。综上所述, 该整体柱对 *N*-衍生化氨基酸表现出比较高的手性选择性, 与 LIF 检测器联用后具有很高的检测灵敏度, 可望应用于生物样品中的微量 D 型氨基酸的定量分析。

关键词: 奎尼丁整体柱; D 型氨基酸; LIF

抗菌药物氧氟沙星和四氰基乙烯荷移反应及其荧光特性的研究

杜浩然¹, 杜梦圆¹, 宋笛¹, 高蕙冰¹, 姚文斌¹, 石春卉², 李莹¹, 吕玉光^{1*}

(1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江, 佳木斯, 154007; 2. 佳木斯大学 临床医学院, 黑龙江佳木斯, 154002)

摘要: 提出了一种基于荷移反应简便可靠地测定氧氟沙星(OFLX)的荧光光谱法, 同时研究了电子受体四氰基乙烯(TCNE)与氧氟沙星电子给体之间的荷移络合物的光谱

性质。确立了形成电荷转移(CT)络合物的最佳条件,在丙酮-甲醇混合介质中,于 40 °C 水浴中恒温 40 min 即可形成 1:1 络合物,其激发波长为 331 nm。并对形成 CT 络合物的机理和检测抗菌药物氧氟沙星的方法进行了探讨。

关键词: 抗菌药物; 氧氟沙星; 四氰基乙烯; 荧光性质; 药物分析

基金项目: 国家自然科学基金项目(21346006), 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201510222035), 黑龙江省科技厅科研项目(B201506), 黑龙江省教育厅科研项目(12541783), 佳木斯大学交叉学科类科学研究项目(JC2014-005), 佳木斯大学校长创新创业基金(xzyf2014-18), 佳木斯大学研究生科技创新重点项目(LZR 2005_021)和佳木斯大学教育科研项目(JKA2014 - 042)。

作者简介: 杜浩然, 男, 药学本科学生, 主要研究方向药物分析和光谱分析。

***通讯作者:** 吕玉光, 博士, 教授, E-mail: yuguanglv@163.com; Tel.: +86-18697097060。

磁控自组装的胰岛素仿生电化学传感软膜的研究及应用

朱婉莹, 周学敏*

(南京医科大学)

摘要: 胰岛素由胰岛 β 细胞合成并分泌, 是 II 型糖尿病早期诊断及预后疗效的重要标志物, 测定生物样品中胰岛素的含量具有重要的临床意义。但由于生物样品中胰岛素的含量水平低, 分析易受共存物干扰, 难度较大。因此, 迫切需要建立更加灵敏、准确的快速检测方法, 这对相关疾病的临床诊疗具有重要意义和实用价值。电化学传感器 (Electrochemical sensors, ECS) 因具有重现性好、高灵敏度和低成本, 可实现实时监测等优点而被应用广泛, 但 ECS 缺乏选择性严重限制了它的发展与应用。分子印记技术(Molecular imprinting technology, MIT) 形成的印记孔穴的特定空间结构和识别位点对待测目标物可产生特异性结合作用, 已成为备受青睐和广泛研究的化学仿生分子识别元素。磁控诱导自组装作为一种新兴的自组装方式在电化学传感器研究领域具有潜在的应用前景, 在外磁场的作用下, 它可以快速驱动、定向有序地固定磁性纳米粒。

本研究运用电磁性三元复合 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{rGO-PANI}$ 纳米材料, 将分子印记技术、电化学传感技术与磁控自组装技术相结合, 制备用于检测胰岛素的仿生电化学传感软膜, 并成功用于生物样品中目标物的选择性检测。首先依次采用共沉淀法、化学还原法与化学氧化聚合法完成三元复合纳米材料的制备; 随后的印记过程中, 以三元复合纳米材

料为功能单体，胰岛素为模板分子，苯胺为共单体和交联剂，化学原位法一步聚合，洗脱后制得电磁性分子印记聚合物（Electrochemical and magnetical molecularly imprinted polymers, EMMIPs）。将 EMMIPs 分散于样品溶液中，分离富集胰岛素后，在磁性电极磁控诱导下，均匀、有序地排列在电极表面，形成磁控性电化学传感软膜（检测过程见图 1）。

本研究以电磁性三元复合纳米材料为功能单体，制备了集电、磁和分子识别元素为一体的 EMMIPs，利用磁控自组装技术构建高灵敏度高选择性的仿生纳米传感软膜；通过磁性电极与 EMMIPs 间的磁性相互作用成膜，操作简便，免去电极繁杂修饰，且可通过磁场强度的改变来控制软膜的微观结构；EMMIPs 可批量制备，目标物吸附与解吸过程可在测定前后独立进行，测定过程快速，适合临床大样本分析；电极自洁再生性强，使用率高，成本低。建立的该诊断体系将在临床糖尿病的诊疗中具有良好普适性。

关键词：磁控自组装；电化学传感软膜；电磁性分子印记聚合物；三元复合纳米材料；胰岛素

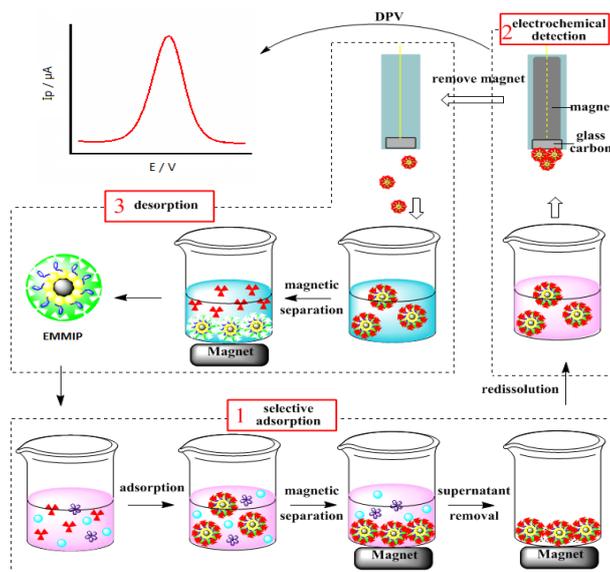


图 1 胰岛素检测全过程示意图

基于金纳米粒构建的三磷酸腺苷比色传感器研究

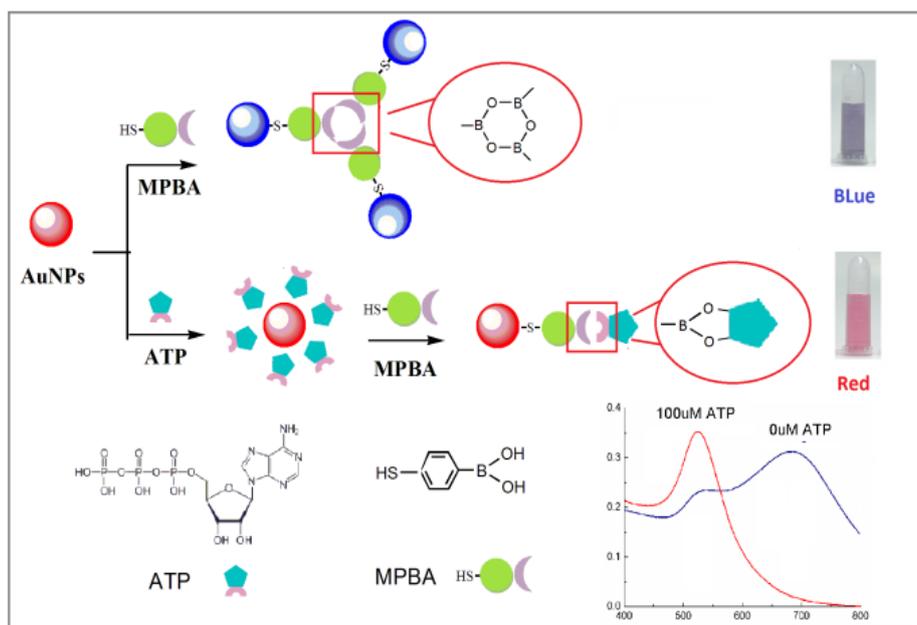
江郭一，周学敏*

（南京医科大学）

摘要：三磷酸腺苷(ATP)是一种高能磷酸化合物，是体内组织细胞一切生命活动所需

能量的直接来源,参与生物细胞体内各种新陈代谢活动,促使机体各种细胞的修复和再生。ATP 已作为肿瘤诊疗的重要标志物,因此,灵敏快速简便的 ATP 检测方法在临床诊疗有重要意义。金纳米粒(AuNPs)由于其具有独特的性质,比如生物相容性好、长期稳定性、消光系数比一般有机染料分子大 1000 倍以上,且有很强的距离依赖性光学特征。AuNPs 聚集后相邻颗粒间电子偶极-偶极耦合作用会引起等离子体共振吸收峰的位移,并伴随有明显的颜色变化,由此构建的比色探针广泛应用于金属离子、药物、DNA、生物小分子、生物大分子以及细胞成像等分析检测。本文研究表明 AuNPs 与 4-巯基苯硼酸(MPBA)的巯基通过 Au-S 键共价结合,进而硼酸基团自身三分子脱水缩合引起 AuNPs 团聚形成蓝色纳米交联复合物 (M-AuNPs); 在 pH 7.5 的磷酸钾缓冲介质中,含有顺式邻二醇结构的的目标物 ATP 分子与硼酸基团发生特异酯化反应而抑制其自缩合产生抗聚集作用,使 AuNPs 分散而显红色。AuNPs 的吸收峰在 520 nm, M-AuNPs 吸收峰在波长为 683 nm,以 A_{520}/A_{683} 吸收比值与 ATP 浓度进行线性拟合,其线性范围为 8.0~100 $\mu\text{mol/L}$,检测限为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ 。实际样品 T47D 乳腺癌细胞 ($\sim 10^7$ 个,稀释 50 倍)中 ATP 的含量为 $51.30 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$,加样回收率在 99.5%~102.3%之间,RSD 小于 4.2%。本文首次基于 AuNPs 和 M-AuNPs 构建的检测乳腺癌细胞中 ATP 含量的纳米比色传感分析方法具有简单快速、选择性高、成本较低等优点,在临床诊疗方面有着潜在的应用价值。

关键词: 三磷酸腺苷; 金纳米粒; 比色传感; 肿瘤细胞; 4-巯基苯硼酸



图：基于抗 AuNPs 聚集的比色法用于 ATP 检测原理图。

聚集诱导发光型金纳米簇作为发光增强纳米传感器选择性检测痕量银离子的研究

李昺之, 周学敏*

(南京医科大学)

摘要: 聚集诱导发光型金纳米簇(Aggregation induced emission gold nanoclusters, AIE-AuNCs)是一种粒径在 2 nm 以下的纳米材料, 其具有高量子产率、高稳定性、制备简便等特点。银由于具有出色的物理、化学性质而被广泛应用, 这也提高了人类暴露于银污染的几率。银离子(Ag^+)不仅会导致银沉着病, 也会对人体免疫系统、神经系统、消化系统等产生广泛的影响, 美国环境保护署(U.S Environmental Protection Agency)规定饮用水中 Ag^+ 的限量是 460 nmol/L, 有研究指出当水体中 Ag^+ 浓度高于 1.6 nmol/L 时就会对鱼类以及微生物产生明显毒性, 从而影响生态平衡并容易向人体富集, 因此建立快速、简便、高灵敏度的 Ag^+ 分析方法有很重要的现实意义。我们发现 Ag^+ 可以使 AIE-AuNCs 的发射峰红移 20 nm 的同时, 使其发光增强约 7.2 倍。基于此现象, 本研究首次将 AIE-AuNCs 作为发光增强纳米传感器用于 Ag^+ 的检测, 所构建的分析方法具有检测限低(0.2 nmol/L)、线性范围宽(0.5 nmol/L-20 $\mu\text{mol/L}$)、选择性高、反应迅速、成本低廉等优点, 并且成功应用于实际水样中 Ag^+ 的测定。本文通过紫外-可见吸收光谱、光致发光发射光谱、透射电镜、X 射线光电子能谱等手段对发光增强的机理进行了研究, 发现 AIE-AuNCs 与 Ag^+ 混合后, 在没有价态变化和宏观形态改变的情况下, 产生了金银复合纳米簇(hybrid nanoclusters)。将 Ag^+ 逐步从复合纳米簇中移除时, 其发光强度逐渐减弱, 最终恢复至原 AIE-AuNCs 的发光特性。通过加入对 Ag^+ 具有不同亲和力的化合物的观察表明: AIE-AuNCs 表面的富电子基团是结合 Ag^+ 主要位点, 此结合作用将 Ag^+ 固定在 AIE-AuNCs 的表面, 进一步引发了 Ag^+ 与纳米簇表面的 Au(I)的 d^{10} - d^{10} 作用, 诱发电荷转移, 从而产生了发光增强的现象(图 1)。综上, 本研究不仅提供了一种具有良好前景的痕量银离子的检测方法, 而且基于 Ag^+ 与 AIE-AuNCs 的结合作用, 对其发光增强现象的机理进行了合理的解释。

关键字: 金纳米簇; 聚合诱导发光; 发光增强; 银离子

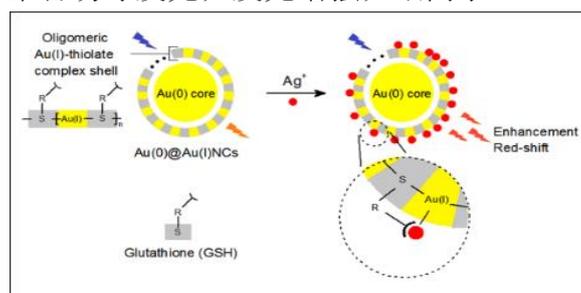


图 1: AIE-AuNCs 检测银离子的原理。

一步合成新型 β -氨基醇功能化碳点用于铜离子选择性双缩脲反应的传感界面研究

王溪, 周学敏*

(南京医科大学)

摘要: 碳点(Carbon dots, CDs)是一种近年发现的单分散、准球形、粒径小于 10 nm 的纳米碳材料。本文首次采用 L-苯丙氨酸作为单一前体, 无需进一步表面钝化及修饰, 经一步水热碳化法首次合成 β -氨基醇功能化 CDs, 采用透射电子显微镜、红外光谱、拉曼光谱、X 射线电子衍射等多种方法对 CDs 的结构和形态学特征进行表征。铜离子(Cu^{2+})是人体内第三丰富的过渡态金属离子, 缺乏或长期暴露于高浓度 Cu^{2+} 与一些疾病相关。美国环境保护署将其列为优先污染物, 制定其在饮用水中的限量为 1.3 ppm ($\sim 20 \mu\text{mol L}^{-1}$)。为控制 Cu^{2+} 污染及人类危害, 急需建立一种简单、可靠、灵敏的检测方法。Carunchio's 等发现在碱性条件下 β -氨基醇较其他离子易与 Cu(II) 配位形成稳定的 5-元螯合环产生双缩脲反应, 然而目前基于这种双缩脲反应的荧光检测 Cu^{2+} 方法尚未见报道。本文首次利用 β -氨基醇功能化的 CDs 与 Cu^{2+} 之间的双缩脲反应, 构建了一种新型传感器, 在碱性条件下用于 Cu^{2+} 的选择性测定。 Cu^{2+} 不仅使 CDs 表面两单元的 β -氨基醇产生特定交联形成蓝紫色复合物, 而且导致 CDs 聚集并产生荧光猝灭。该传感器的比色传感界面具有人肉眼可见 1 mmol L^{-1} 的检测限, 可用于 Cu^{2+} 可视化限度分析, 其荧光传感界面可抵抗其他金属离子的干扰, 并成功用于实际水样中微量 Cu^{2+} 的快速检测, 具有宽线性范围($0.01\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$)和低检测限(3.2 nmol L^{-1})。此外, 本文基于 CDs 表面 β -氨基醇单元与 Cu^{2+} 间的双缩脲反应构建了具有特异识别性的双信号传感界面, 操作简单, 反应快速, 不仅为 CDs 在分析化学中的应用提供了新思路, 而且为 Cu^{2+} 高灵敏和高选择性检测提供了新方法。

关键词: 功能化碳点; 氨基醇; 铜离子; 传感界面; 荧光猝灭; 双缩脲反应

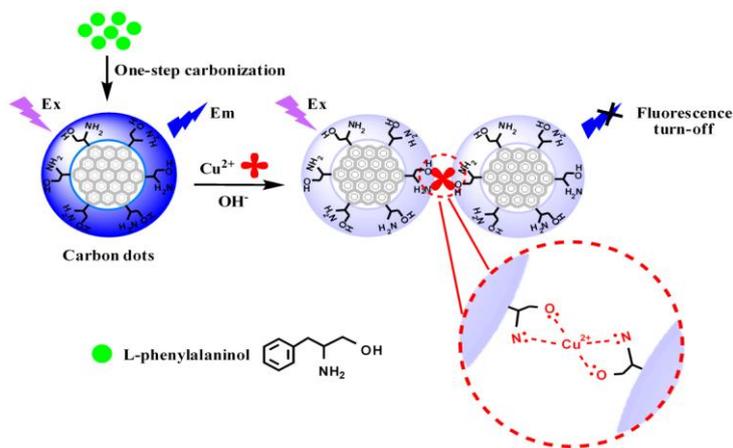


图 1 基于双缩脲反应的 Cu^{2+} 纳米传感检测流程图

亲水相互作用色谱-串联质谱联用法同时测定人血清中 5 种氨基酸的含量

孙鲁宁¹, 焦慧文¹, 高贝贝², 元子青云¹, 张宏文¹, 欧宁¹,
周红文^{2,*}, 王永庆^{1,*}

(1. 南京医科大学第一附属医院药研室, 南京, 210029; 2. 南京医科大学第一附属医院内分泌科, 南京, 210029)

摘要: 目的: II 型糖尿病是常见的代谢疾病, 但缺少该疾病早期诊断的生物标记物。代谢组学研究表明, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸在血清中的浓度可作为 II 型糖尿病早期诊断的生物标记物。为定量研究血清中这 5 种氨基酸与 II 型糖尿病疾病发生和发展的关系, 并验证这 5 种氨基酸是否可以作该疾病早期诊断的生物标记物, 我们建立并确证了以同位素标记氨基酸作为内标测定人血清中 5 种氨基酸浓度的亲水相互作用色谱-串联质谱联用法 (HILIC-MS/MS)。

氨基酸是具有高极性的两性化合物, 非衍生化在常规 C18 色谱柱上基本无保留, 且亮氨酸和异亮氨酸也无法分离。我们应用亲水相互作用色谱柱 (HILIC) 采用非衍生化方法对这 5 种氨基酸进行分离和分析。考虑到氨基酸是血清中内源性化合物, 很多 LC-MS 方法使用替代基质作为空白样本, 但替代基质与血清样本是有区别的, 基质效应对测定的影响未知, 我们提出在测定内源性化合物时, 使用对应化合物的同位素标记内标考察基质效应, 确认待测化合物在血清和替代基质的基质效应一致后, 再应用替代基质进行分析。

方法: 血清样本经乙腈沉淀蛋白后, 取上清液进行 HILIC-MS/MS 分析。色谱分离分析于岛津 20A 液相系统中进行, 色谱柱为 Thermo Synchronis HILIC 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm), 柱温为 35 °C, 流动相为乙腈:120 mM 醋酸铵 (89:11, v/v), 流速为 0.6 mL/min, 进样量为 1 μL, 分析时间为 11.0 min。质谱分析于 AB Sciex 5500 QTRAP 质谱仪上进行, 采用电喷雾离子化 (ESI), 正离子条件下的多重反应监测 (MRM) 模式, 离子化电压为 5500 V, 离子源温度为 550 °C, 雾化气为氮气 55 psi, 气帘气为氮气, 28 psi, 氨基酸及其同位素标记的内标的去簇电压和入口电压分别为 35 V 和 10 V。

结果: 分别考察了氨基酸及其相应同位素标记内标在替代基质及血清中的特异性, 相应化合物的峰位处均无干扰。应用相应同位素标记的氨基酸考察了在本实验条件下替代基质与血清的基质效应和提取回收率, 5 种同位素标记氨基酸在替代基质和血清中的基质效应为 98.7%-107.3%, 提取回收率为 92.7%-102.3%, 说明替代基质与血清基质效应情况一致, 提取回收率也一致, 故在本实验条件下可以用替代基质进行方

法学考察和样本测定。5种氨基酸的线性范围均为0.200-100 $\mu\text{g/mL}$ ，线性均良好。该方法的准确度，批内和批间精密度均小于10.2%。稳定性分别通过血清中加入同位素标记和临床实际样本重复测定两种方法考察。将同位素标记氨基酸加入血清后，于24 $^{\circ}\text{C}$ 放置10 h，经三次冻融和在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存6个月均稳定，处理好的同位素标记氨基酸样本在进样器放置14 h稳定。临床实际样本中，未标记氨基酸在于上述条件下均稳定。氨基酸及其相应的同位素标记内标的储备液在4 $^{\circ}\text{C}$ 放置1个月均稳定。该方法不存在残留效应。

结论：建立了用于测定人血清中5种氨基酸浓度的HILIC-MS/MS方法，使用相应的同位素标记氨基酸做为内标。HILIC色谱柱的使用，提高了氨基酸在色谱柱上的保留，并使得亮氨酸和异亮氨酸这对同分异构体得到分离。该方法的基质效应和提取回收率使用了同位素标记氨基酸进行考察了，并由考察结果证实了使用替代基质的可行性。该方法为内源性化合物的分析提供了新的思路，并可被用于II型糖尿病早期诊断的生物标记物研究。

关键词：亲水相互作用色谱；串联质谱法；氨基酸；II型糖尿病；生物标记物

***通讯作者：**王永庆，主任药师，wyqjosph@163.com；周红文，主任医师，drhongwenzhou@njmu.edu.cn。

单细胞微阵列彗星电泳芯片及其应用于DNA交联分析

李莉莉，罗国安，梁琼麟*

(清华大学化学系，北京市，邮编 100084)

摘要：DNA损伤与疾病的诊断、治疗以及药物筛选等研究密切相关。通过造成DNA损伤来杀伤肿瘤细胞是当前临床上电离辐射治疗及大多数抗肿瘤药物治疗的共同分子机制，深入研究和分析抗肿瘤药物细胞DNA作用机制，通过靶向诱导DNA损伤形成促使肿瘤细胞坏死与凋亡，已成为生物学领域的研究热点。单细胞凝胶电泳技术近年来迅速发展并得到广泛应用，是对细胞DNA损伤进行快速定量检测的重要手段，但其存在的检测通量低以及例如无效图形较多、细胞重叠和需多次调焦以获取单个细胞图像等诸多问题严重限制了该方法的进一步发展。微阵列芯片技术作为一种新型技术平台，可满足高通量筛选分析时微型化和自动化的需要，并能在极小单元内实现大量单个细胞样品信息的采集与分析。本研究结合微阵列芯片技术，建立了集成

化和系统化的 DNA 损伤分析平台，对尼莫司汀所导致的 DNA 交联率进行了定量研究。

单细胞微阵列芯片模具采用软光刻法制作，芯片基底使用可黏附琼脂糖的 GelBond 膜，不仅能避免常规制胶容易脱胶的缺点，还可减少使用盖玻片时造成的样品损失。细胞载入采用沉降法，细胞载入微阱后使用 0.6% 低熔点琼脂糖覆盖，形成单细胞微阵列芯片，单细胞捕获率可达 80% 以上。实验采用不同浓度尼莫司汀(0~2 mM)对人脑胶质瘤 SF767 单细胞阵列进行药物处理，再采用 H₂O₂ 溶液使其未交联的 DNA 发生断裂，随后依照常规单细胞电泳操作步骤进行细胞裂解、DNA 解旋、电泳以及染色等过程。数据分析结果表明，单细胞微阵列芯片电泳法和传统方法检测结果一致，均能观察到彗尾随药物浓度增加而变短的趋势，表明有 DNA 交联物的形成，且交联率与药物浓度成正比，测得微阵列法和传统方法交联率最大值分别为 21.0% 和 23.4%。微阵列芯片法所测得各数据点的相对标准偏差为~5%，较传统方法的~15%，其结果更加稳定可靠。本研究为抗肿瘤药物基因毒性高通量分析以及药物筛选应用提供了新的方法平台。

关键词：单细胞凝胶电泳；微阵列芯片；DNA 交联；基因毒性；药物筛选

基金项目：本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者：**梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于 3D 肿瘤微球的抗癌药物分析

邹丹丹，李文新，罗国安，梁琼麟*

(清华大学化学系，北京市，邮编 100084)

摘要：传统的抗癌药物筛选依赖于 2D（单层）培养，然而 2D 培养不能够模拟肿瘤的 3D 结构、无法模拟肿瘤的缺氧核心、肿瘤浓度梯度以及异质性，因而经过 2D 筛选的药物常常无效。3D 肿瘤微球跟传统的 2D 培养相比它们在细胞形态、肿瘤构建（细胞-细胞相互作用、细胞-基质细胞相互作用）、基因表达模式、营养代谢以及浓度梯度、对药物响应与体内肿瘤更为相似，能够更好的模拟肿瘤复杂的微环境，是癌症研究最好的体外模型。

在本研究中，我们建立 3D 肿瘤微球培养体系进行抗癌药物的筛选，通过低黏附

培养法得到了大小、性质均一的三维肿瘤微球，然后加入抗癌药物 5-氟尿嘧啶 5-FU 和顺铂 DDP 采用活死染色 Live/Dead Staining 和细胞增殖-毒性检测 CCK-8 进行分析，结果表明，随着药物浓度的增加，死亡的细胞也随之增多且药物主要导致外层细胞死亡，另外，3D 肿瘤微球模型比 2D 展现了更高的抗药性。

关键词： 三维肿瘤微球模型；抗肿瘤药物分析；抗药性

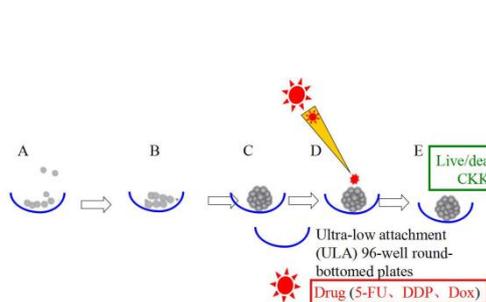


图 1 基于微球的药物筛选示意图

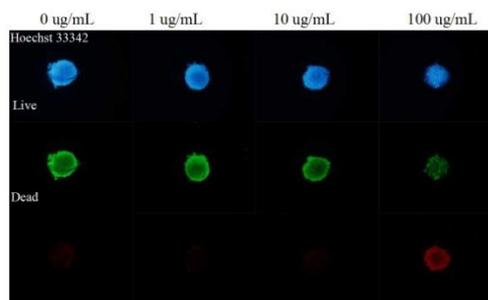


图 2 微球对药物 DDP 的响应（活死染色）

基金项目： 本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和“重大新药创制”国家重大专项课题(2013ZX09507005)资助。

*通讯作者：梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于近红外有机染料纳米光热治疗剂的研究

周炳江，罗国安，梁琼麟*

(清华大学化学系，北京市，邮编 100084)

摘要： 光热治疗技术是一种新型微创治疗技术，通过激光将肿瘤局部温度升高来杀死肿瘤细胞，能够实现定点杀伤，大大降低了全身系统毒性，已经在癌症治疗方面引起了全世界的高度关注，被看作是非常有潜力替代手术的治疗肿瘤的技术之一。目前的无机光热治疗剂具有较高的光热转换效率，但是由于表面修饰困难，导致其靶向性差、携载药物困难，同时不可降解性也令人担忧；此外，成功的光热治疗还需要借助于合适的成像技术。所以开发具有成像功能、高靶向性和载药能力、高的光热转换效率和光热稳定性、制备方法简单的新型光热治疗剂具有重要的研究意义。

目前的无机光热治疗剂虽具有较高的光热转换效率，但是由于表面修饰困难，导致其靶向性差、携载药物困难，同时不可降解性也令人担忧；此外，成功的光热治疗还需要借助于合适的成像技术。所以开发具有成像功能、高靶向性和载药能力、高的

光热转换效率和光热稳定性、制备方法简单的新型光热治疗剂具有重要的研究意义。有机光热转换纳米材料吸收范围容易调控、可生物降解的特点,已经成为了研究的热点。基于以上本研究设计合成一种具有近红外吸收的基于菁染料和罗丹明两个发色团共轭偶合的近红外染料,通过牛血清白蛋白包裹制备成有机纳米颗粒,实验结果表明该有机纳米材料具有较强的近红外吸收、低荧光量子产率和较高的光热转化效率,可用于光声成像制导光热治疗研究中。

关键词: 近红外; 有机染料; 纳米; 光热治疗剂

基金项目: 本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者:** 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于微流控的细胞载负水凝胶纤维的制备及其在药物筛选中的应用

梁哲, 刘晨光, 徐培迪, 罗国安, 梁琼麟*

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 因创伤和疾病造成的组织、器官功能障碍和丧失是一直威胁人类生命健康的主要因素之一, 其治疗手段的发展一直是生命科学和医学领域积极探索的重大课题。随着相关领域的发展, 组织工程成为解决这一难题的重要手段, 其核心因素, 是构建胞外基质与细胞构成的三维复合体。由于水凝胶具有可调节的物理、化学、生物性能, 良好的生物相容性等优势而被广泛的用作体外重建胞外基质。由于体内固有多种纤维状结构, 如血管、肌纤维和神经系统等, 细胞载负凝胶纤维的体外重构获得了极大的关注, 具备心血管及神经疾病相关疾病药物筛选的潜能。

本课题组制备了一种性能增强的复合水凝胶, 结合了天然提取材料和合成高分子凝胶的优点, 具备优异的生物相容性, 且机械强度和材料微观结构等均可根据实验需求进行调节。搭建了一套微流控气动装置, 采用标准化组件, 生成尺径可控的细胞载负复合凝胶纤维, 如心肌、内皮和胚胎干细胞载负的生物纤维等。制备的生物纤维可用于高阶组装, 如可制备双层螺旋管模拟血管结构等。该方法提供了更加真实的三维环境, 能够探究包埋于纤维中不同细胞对于不同药物的生物学响应。例如将得到的心肌纤维置于硝化甘油、单硝酸异山梨酸酯、尼克酰胺或其他待筛选药物培养体系中, 通过研究水凝胶纤维中心肌细胞的生物响应, 筛选可用于心血管治疗的药物。该

平台解决了传统方法面临的众多问题，在药物分析及筛选中具有重要的应用价值，在组织、器官功能障碍和丧失治疗中具有重要的应用前景。

关键词：微流控；水凝胶；纤维；药物筛

基金项目：本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者：**梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于微流控技术的多响应生物纤维的生成及其在药物筛选中的应用

刘晨光，梁哲，罗国安，梁琼麟*

(清华大学化学系，北京市，邮编 100084)

摘要：细胞水平的药物筛选模型具有药物作用机制明确、易于进行高通量筛选等优势，然而传统的体外细胞培养手段所提供的二维培养环境与体内真实的三维环境相去甚远，无法模拟细胞外基质以及体内细胞连接、信号传导等作用对细胞状态的影响。水凝胶材料在组织的体外模拟中具有重要意义，水凝胶材料的内部环境与生物体内的细胞外基质十分相似，凝胶骨架能够为细胞提供粘附位点，细胞能够粘附在骨架上，在网络骨架内进行正常的生命活动。微流控技术是利用微米级通道操纵微小流体的技术，微流控通道尺寸与体内血管接近，可用来构建体外仿生模型，为细胞提供三维的生活微环境。

本工作利用微流控技术，将复合水凝胶材料制备成具有优良生物相容性和一定机械强度的生物纤维。所得纤维能够模拟人体内微环境，研究药物刺激对纤维中细胞的影响，可提供更为简便的药物筛选、药效分析方法。首先将海藻酸钙和 PEG-PNIPAAm 两种水凝胶材料复合，得到了具有优良生物相容性与一定机械强度的复合水凝胶材料。利用微流控技术，我们将包埋人脐静脉内皮细胞的复合水凝胶溶液在 37 °C 的氯化钙溶液中交联，得到了内皮细胞生物纤维。扫描电镜结果表明水凝胶纤维表面具有多孔的网格结构，细胞镶嵌在孔中；活死双染和免疫荧光染色证明细胞在纤维中能够正常生存和增殖，并存在正常的细胞连接。该生物纤维与血管尺寸接近，可用于体外模拟人体内微环境，研究药物刺激在机械刺激、缺氧条件等不同环境下对内皮细胞的影响。纤维对 EDTA、海藻酸裂解酶等刺激具有响应，能够实现不同条件下的纤维裂解与内容物释放，便于后续细胞内代谢物的分析。

关键词：微流控技术；药物筛选；生物纤维；微环境模拟

基金项目：本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者：**梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于微流控技术研究不同氧气浓度对肿瘤血管新生的影响

李雅琼，罗国安，梁琼麟*

(清华大学化学系，北京市，邮编 100084)

摘要：在生物体内，氧气含量常常是低于大气中 21%氧气含量。体内一些细胞或者组织内的氧气在正常状态下的含量大约在 2-9%，而在一些氧气含量充足的器官，比如动脉、肝脏和肺在正常情况下的氧气含量也在 10-13%左右。在肿瘤微环境中，缺氧是最显著的特征之一。在不同类型的肿瘤组织中，局部氧气含量可低至 0.3%-2.1%，从而刺激肿瘤细胞会大量积累 HIF-1 α 因子，上调 VEGF 因子等促血管生长因子的转录表达，从而诱导肿瘤细胞周围的。目前普遍采用缺氧小室等方法来实现体外细胞缺氧环境的培养，但都不能够精确地实时调控氧气含量以及方便地监控细胞在不同氧气含量下的变化。而微流控芯片技术因其特有的流体特性从而可以更加精确地模拟体内的生理环境特征，对细胞的观察及检测更贴近体内生理环境。

在本研究中，我们设计了三层结构的芯片，第一层用于肿瘤细胞和血管细胞共培养，第二层为 PDMS 薄膜，第三层用于连苯三酚和氢氧化钠反应混合。该芯片可以利用邻苯三酚在碱性条件下吸收周围的氧气，产生氧气梯度，从而可以实时监测不同氧气浓度对于肿瘤细胞诱导血管新生的影响。

关键词：微流控芯片；共培养；肿瘤微环境；氧气梯度；血管新生

基金项目：本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者：**梁琼麟，E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

基于微流控浓度梯度芯片技术构建用于模拟胶质瘤细胞体外 3D 微环境的水凝胶系统

王为星, 罗国安, 梁琼麟*

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 随着肿瘤组织微环境对药物活性影响的阐明, 其在抗肿瘤药物筛选及细胞耐药性相关研究中的重要性逐渐被人们所关注。在体组织器官以其真实的组织微环境为该领域研究提供了直接有效的标本, 但组织内生物化学等因素的复杂性特点致使无法对微环境中某个特定因素进行深入研究。动物实验能获得终端结果, 但不易实时获取细胞生长和转移等方面的多种信息, 且耗时耗力, 费用较高。基于以上原因, 本研究利用微流控技术将复杂的微环境体系进行简化, 突出主要因素, 利用更为简单可行的操作技术建立体外肿瘤细胞三维培养平台, 模拟体内肿瘤组织的基质硬度梯度、生长因子分布梯度以及氧气浓度梯度, 使得到的药物分析结果能够真实反映肿瘤组织的在体状态。该装置可对其周围环境中单个或多个因素进行调控, 将传统研究中复杂实验方法微型化和集成化, 具有更强的可操作性。

微流控芯片装置采用了传统的圣诞树结构, 可产生线性范围宽、可控稳定且重现性好的浓度梯度, 并在此装置上进行了几种抗癌药物的筛选。为了模拟细胞的 3D 培养微环境, 我们构建了光聚合 PEGDA-HA(聚乙二醇-透明质酸)水凝胶系统, 利用对微流控的控制使其形成水凝胶硬度、HA 浓度、药物以及氧气浓度梯度, 以此探究细胞外基质对于胶质瘤细胞增殖以及迁移的影响。实验中, 我们优化了芯片通道的尺寸, 考察了不同流速下芯片中浓度梯度的分布情况, 并以罗丹明为荧光染料对生成的浓度梯度进行了荧光定量。结果显示, 微量注射泵以 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ 的流速向芯片内通入液体时, 形成的浓度梯度线性最好, 在 30 min 内可以达到稳定梯度。由此可见, 高度集成的微流控芯片设备在基础生物医学研究方面展现出极大潜力, 使得在更接近于肿瘤组织生理微环境的条件下进行药物筛选等研究成为可能, 具有重要的应用价值。

关键词: 微流控芯片; 浓度梯度; 水凝胶; 药物筛选

基金项目: 本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

***通讯作者:** 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

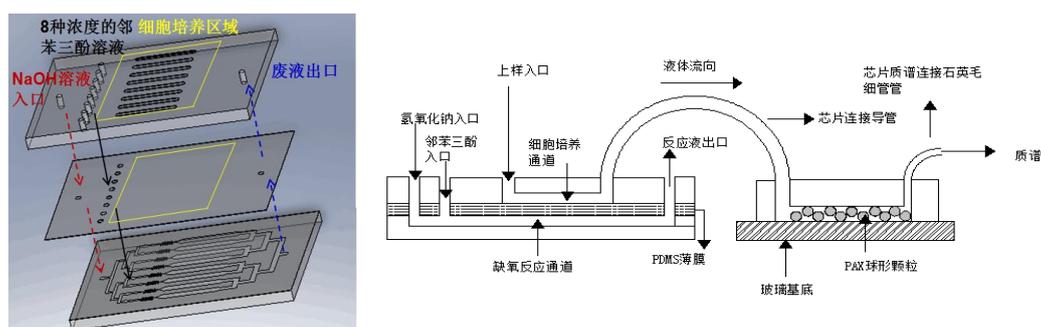
基于微流控芯片的缺氧微环境及芯片上的细胞代谢物质谱分析平台构建

谢若箫, 刘正晓, 罗国安, 梁琼麟*

(清华大学化学系, 北京市, 邮编 100084)

摘要: 细胞代谢物分析在癌症研究、药物发展、毒理学、生物医药及临床研究等方面都发挥着巨大作用。利用微流控芯片技术可以控制细胞生长环境, 模拟细胞在体内的微环境, 从而得到更符合体内真实代谢情况的样品, 且在微米尺度的微通道中对流体进行操控, 不仅有助于实现高通量, 还具有试剂消耗低、设备易于小型化等优势。

本研究构建了一种模拟肿瘤细胞缺氧微环境的双层微流控芯片, 并通过芯片上的固相微萃取装置搭建了芯片质谱联用平台, 实现了特定药物及环境刺激条件下, 细胞代谢行为的监控。芯片上层为细胞培养通道, 其缺氧环境通过下层通道中邻苯三酚和氢氧化钠的吸氧反应实现。氧气浓度梯度的定量实验结果表明, 该方法可以实现0.08%-21%范围内的氧气浓度梯度。随后抗癌药物对肿瘤细胞的作用实验表明, 低氧程度加强了抗癌药物替拉扎明产生的细胞毒性。通过芯片上的固相微萃取装置对细胞代谢物中乳酸进行纯化和预富集后, 将洗脱液直接通入质谱进行检测, 检测结果表明, 随着低氧程度加深, 细胞代谢物中乳酸含量增加。在八个通道中通入不同浓度的邻苯三酚溶液, 还可以同时考察细胞在不同氧气浓度下的应激响应。该平台的构建为建立高通量、自动化的疾病研究、药物筛选和代谢分析模型提供了有利的条件。



关键词: 微流控; 肿瘤; 缺氧微环境; 细胞代谢物; 质谱

基金项目: 本文系国家自然科学基金(No. 21175080)和重大新药创制国家重大科技专项课题(2013ZX09507005)资助。

*通讯作者: 梁琼麟, E-mail: liangql@tsinghua.edu.cn

Rapid screening of aminopeptidase N inhibitors by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis

Hairong Wang , Wenfang Xu, Jiangying Cao, Weihong Wang*

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan, P. R. China)

In this work, an electrophoretically mediated microanalysis (EMMA) method with a partial filling technique was setup to evaluate the inhibitory potency of novel compounds toward aminopeptidase N (APN). It was necessary to optimize the electrophoretic conditions with respect to the kinetic constraints and for attaining high sensitivity. In our setup, a part of the capillary was filled with the incubation buffer for the enzyme reaction, whereas the rest was filled with a suitable BGE for the separation of substrates and products. To monitor the performance of the newly developed method, the kinetic constants (K_m and V_{max}) for the catalyzed dissociation of L-Leucine-p-nitroanilide in the presence of APN as well as the inhibition constant (IC₅₀) of a known competitive inhibitor, that is bestatin, were determined and these results were compared with those obtained by a classical spectrophotometric assay. The developed EMMA method was subsequently applied to the screening of 30 APN inhibitors. Whereas the inhibition potency of these inhibitors (expressed in IC₅₀ values) were significantly underestimated by the EMMA method, the order of the inhibitory potential of these various compounds was found in agreement with the literature.

Keywords: Aminopeptidase N; Electrophoretically mediated microanalysis; Inhibitor screening; Kinetic constants

多功能适体探针介导的生物传感器用于蛋白质和小分子的灵敏检测

李伟, 孙杰威, 姜玮, 王磊*

(山东大学药学院 药物分析研究所 山东省济南市历下区文化西路 44 号, 邮编: 250012)

摘要: 适体 (Aptamer) 是从人工合成的寡核苷酸库中通过 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, 指数富集配体系统进化技术) 筛选得到的单链 DNA 或 RNA 分子, 能够通过自身特有的结合和空间构型与靶标分子结合。适体-靶标的结合具有亲和力高、特异性强的特点。另外, 适体易于合成且目标物广泛 (包括蛋白质、金属离子、小分子和病毒等), 其作为识别元素能够克服抗体等的不足, 为传统生物传感器的开辟了新的道路。本课题组利用适体与目标物结合时发生构象转化的特点, 构建了多功能的适体探针, 使其能够在识别目标物的同时触发下游反应, 产生可检测的信号。基于这种多功能探针, 结合等温信号放大技术, 我们构建了多个生物传感器, 实现了蛋白质和小分子的灵敏检测。

关键词: 多功能适体探针; 生物传感器; 蛋白质和小分子; 灵敏检测

基金项目: 本研究得到国家自然科学基金 (21375078 和 21475077) 的支持。

***通讯作者:** 王磊, Email: wangl-sdu@sdu.edu.cn

新型 PEG 桥联量子点示踪药物靶向探针的设计制备及 α_{1B} -肾上腺素受体在活细胞中内吞的动态全过程示踪和药物筛选研究

马婧, 吴李娜, 刘小亭, 王磊*

(山东大学药学院 药物分析研究所 山东省济南市历下区文化西路 44 号, 邮编: 250012)

摘要: α_1 -肾上腺素受体(α_1 -AR) 广泛分布于血管平滑肌、肺及中枢神经等系统中, 在调节心血管、神经等系统的生理和病理活动方面起着重要的作用, 同时也是许多药物的作用靶点。去氧肾上腺素 (PE) 是 α_1 -AR 的选择性激动剂, 可以特异性的与 α_1 -AR 结合, 激活受体, 产生肾上腺素样作用, 并引起受体介导的受体-配体复合物的内吞。内吞是一个复杂的多步过程, 尽管已经有很多关于 PE 作用下受体介导内吞过程的研究, 但其转运机制方面的许多重要细节特征仍不明确: 受体-配体复合物在活细胞转运的全过程是什么? 在转运过程的不同时期中, 受体-配体复合物是怎么运动的? 受体-配体复合物在活细胞中最终运动到哪里?

传统方法依赖于对细胞器的荧光标记或对可能的生物分子进行有机染料荧光标记。其光漂白性限制了其在活细胞领域的应用。因此, 为了能够长时间在活细胞中观测动态过程, 需要发展新的活细胞成像技术。量子点 (QDs) 优越的光学性质 (高荧光量子产量及耐光漂白性好等特点) 使灵敏的长时间示踪成为可能。针对 α_1 肾上腺素受体激动剂去氧肾上腺素及拮抗剂啞唑啉类药物的特点, 我们设计并合成了可以与量子点进行连接并形成特异性亲和 α_1 肾上腺素受体的荧光探针。为了使连接后的药物小分子更接近其本来的动力学特性, 减少量子点带来的空间位阻, 我们将药物小分子和量子点之间增加了一条 PEG 连接链。使用 PE-QDs 荧光探针, 结合单粒子示踪技术 (SPT), 成功的示踪了细胞内去氧肾上腺素的动态内吞全过程, 首次实现了激动剂药物内吞过程的可视化示踪, 为药物与受体相互作用的分子机制和动力学性质的研究提供新方法。此外, 我们利用肾上腺素受体拮抗剂啞唑啉的 PEG 衍生物-QDs 构成的荧光探针建立了一种荧光药物筛选方法用于活细胞中肾上腺素受体拮抗剂的筛选。

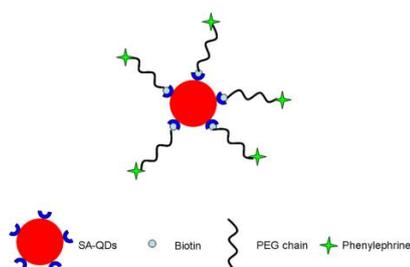


图1. PE-PEG-QDs探针示意图

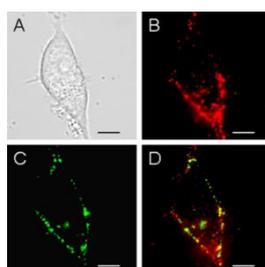


图2. 实时区分激动剂和拮抗剂

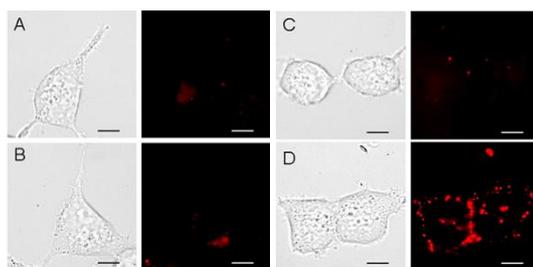


图3. 特异性结合实验的荧光图像

(A) 将HEK293 α_{1B} 细胞与含有1.35 nmol/L QDs的培养液；(B) 将预先用4.5 μ M乌拉地尔预处理过的HEK293 α_{1B} 细胞与含有45.0 nmol/L PE-PEG-QDs的培养液；(C) 将HEK293细胞与含有45.0 nmol/L PE-PEG-QDs 的培养液；(D) 将HEK293 α_{1B} 细胞与含有45.0 nmol/L PE-PEG-QDs的培养液中37 °C孵育15 min。然后获取TIRF图像。标尺=10 μ m。(左：明场成像，右：荧光成像)

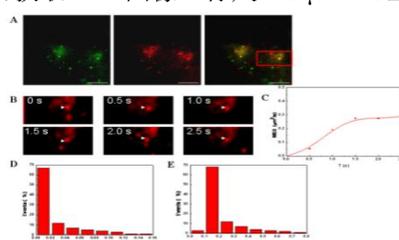


图5. PE-PEG-QDs在Lyso-GFP上运动的情况

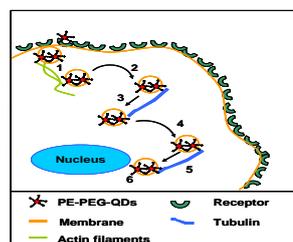


图6. PE-PEG-QDs细胞内吞过程

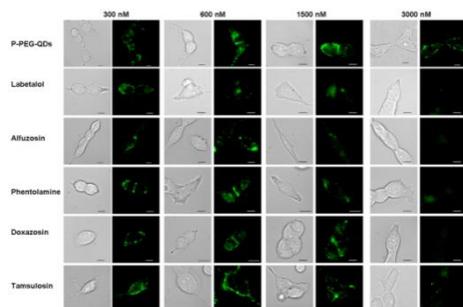


图7. 药物竞争筛选的TIRFM实验结果

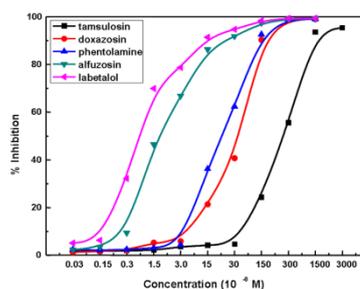


图8. 五种待筛选肾上腺素受体拮抗剂的抑制率

关键词： α_1 -肾上腺素受体；量子点；内吞；药物筛选

基金项目：本研究得到国家自然科学基金（21375078 和 21475077）的支持。

*通讯作者：王磊，Email: wangl-sdu@sdu.edu.cn

配体交换毛细管电泳法分离测定手性金鸡纳生物碱

赵文燕，杨敏，张红芬，陈安家*

(山西医科大学药学院，太原)

目的：建立配体交换毛细管电泳法分离测定奎宁/奎宁丁，辛可宁/辛可宁丁四种手性金鸡纳生物碱。方法：采用石英毛细管柱（50.2cm \times 50 μ m i.d., 375 μ m o.d, 有效长度40 cm），考察手性添加剂 L-赖氨酸与铜离子的浓度和比例、醋酸铵缓冲溶液的浓度、

pH 及分离电压等对手性金鸡纳生物碱分离效果的影响。① 在 30 mM 醋酸铵 (pH8.9), 运行电压为 15 kV 的条件下, 考察手性添加剂铜离子与 L-赖氨酸 (L-lys) 的比例及浓度对分离的影响: 即设定一系列比例 1:1.5, 1:1.75, 1:2, 1:2.25, 1:2.5, 取铜离子的浓度 1, 2, 3, 4, 5 mM, 分别测定四种生物碱的分离度和分析时间; ② 在 2 mM 铜离子, 4 mM L-赖氨酸, pH8.9, 运行电压为 15 kV 的条件下, 设定一系列浓度的醋酸铵缓冲溶液 (20, 25, 30, 35 mM), 考察缓冲液浓度对分离的影响; ③ 在 2 mM 铜离子, 4 mM L-赖氨酸, 30 mM 醋酸铵, 运行电压为 15 kV 的条件下, 设定一系列不同 pH 的醋酸铵缓冲体系 (pH8.5, pH8.7, pH8.9, pH9.2, pH9.5), 考察 pH 对分离的影响; ④ 在优化的最佳实验条件下 (2 mM 铜离子, 4 mM L-赖氨酸, 30 mM 醋酸铵 (pH8.9), 运行电压 15 kV), 以分析物浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制四种生物碱的线性关系曲线并测定四种金鸡纳生物碱测定的精密度, 检测限和定量限。结果: 四种手性金鸡纳生物碱在 2 mM 铜离子, 4 mM L-赖氨酸, 30 mM 醋酸铵 (pH8.9), 运行电压为 15 kV 的毛细管电泳介质条件下, 以较短的分析时间获得较好的分离度 (见图 1)。结论与讨论: 四种手性生物碱, 铜离子以及 L-赖氨酸可形成如图 2 所示的复合物, 增大其理化性质的差别, 从而得以在毛细管电泳体系中实现分离。本文所建立的配体交换毛细管电泳法可实现手性金鸡纳生物碱的分离测定, 并可用于实际样品分析, 操作简便、快速, 准确度较高。

关键词: 金鸡纳生物碱; 配体交换; 毛细管电泳法

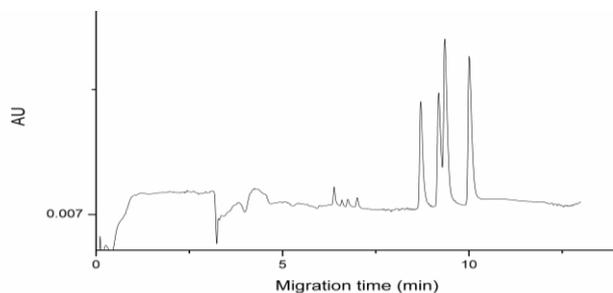


图 1 四种手性金鸡纳生物碱的毛细管电泳分离图谱 (2 mM 铜离子, 4 mM L-赖氨酸, 30 mM 醋酸铵 (pH8.9), 运行电压 15 kV)

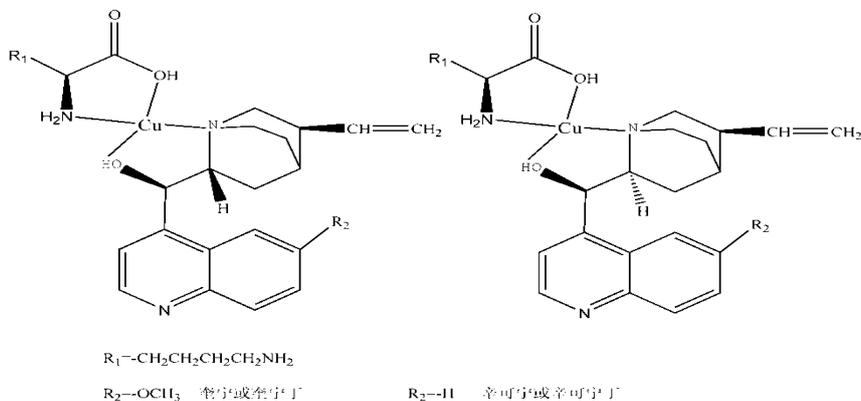


图 2 生物碱与铜离子及 L-赖氨酸生成的三元复合物结构图

荧光银纳米簇用于配体-RNA 相互作用研究

亢亮, 霍圆, 王欢, 张静, 张志琪*

(药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西师范大学, 西安 710062)

配体-生物大分子相互作用的研究为发展可有效调节特定生物过程的新化合物提供了机遇。自从发现 RNA 在调节基因表达方面的作用后, RNA 便成为有吸引力的药物靶标。然而到目前为止, 关于配体-功能性 RNA 相互作用的研究, 尤其是基于纳米材料的研究是相对少见的。本研究首次基于银纳米簇进行了配体-RNA 相互作用研究。本研究发现类似蒽环类抗癌药物米托蒽醌可有效猝灭 DNA 稳定银纳米簇的荧光, 依据米托蒽醌可以与 HIV-1 TAR RNA 和 RRE RNA 特异性地结合, 将这两种 RNA 加入到银纳米簇-米托蒽醌的猝灭复合物中后, 由于米托蒽醌和两种 RNA 相互作用导致银纳米簇被释放, 使得银纳米簇的荧光得以恢复。通过紫外、透射和圆二色谱等方法研究米托蒽醌猝灭银纳米簇荧光的机制, 米托蒽醌与 TAR 和 RRE RNA 作用结合常数和结合位点数均通过推导公式理论计算获得, 最后, 米托蒽醌-RNA 相互作用进一步通过质谱法和荧光偏振法进行了验证。本研究为其他配体-RNA 结合分析提供了新的研究策略。

关键词: 银纳米簇; 小分子配体; RNA; 相互作用;

***通讯作者:** 张志琪, zqzhang@snnu.edu.cn

MALDI-TOF MS 新基质研究及其在小分子药物分析中的应用

张静*, 魏河, 孟丽娜

(陕西师范大学化学化工学院, 陕西省生命分析重点实验室)

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱)是近年来发展起来的一种质谱方法, 相比其他质谱技术, MALDI 技术的样品预处理步骤简单, 极大地节省了时间和劳力而且其图谱简单, 易于分析。传统的 MALDI-TOF MS 基质, 如 CHCA, THAP, DHB 等在低分子量区域具有大量的基质离子峰, 严重干扰了 MALDI-TOF MS 对小分子有机物的检测。以石墨烯、氧化石墨烯以及碳纳米管等碳材料取代有机基质可以实现小分子的 MALDI-TOF MS 分析, 然而碳材料存在易团聚, 易污染仪器离子源的问题。

近年，多环芳烃类化合物的研究取得了重要成果，成功合成了纳米石墨烯（Nanographene）。我们采用具有 25 个苯环大共轭结构的纳米石墨烯 HBCCs 为 MALDI-TOF MS 基质，建立了小分子药物的 MALDI-TOF MS 分析方法。新基质在分子量低于 500 的范围内几乎没有背景干扰（Fig.1），可以实现小分子的灵敏检测（Fig.2）。同时，该纳米石墨烯易溶于三氯甲烷等有机溶剂中，因而与石墨烯等碳材料基质相比更易与小分子目标物共结晶，并且在靶板上的粘附性很好，不易飞离靶板，克服了碳材料基质对离子源污染的污染问题。

以此 Nanographene 作为 MALDI-TOF MS 基质，建立了包括磺胺类、喹诺酮类、甾体药物等多种药物小分子的 MALDI 分析方法(Fig.2)。与传统基质相比检测效果良好，具有明显的优势，通过 MES（Matrix Effect Score）方法评价该基质，得到了良好的分数，说明基质效果优秀。

关键词：MALDI-TOF MS；药物小分子；基质；纳米石墨烯

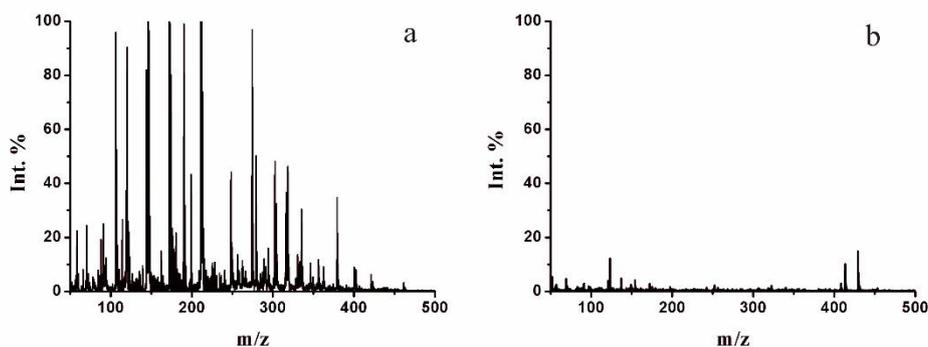


Fig. 1 HBCCs (a)和 CHACA (b)基质质谱图

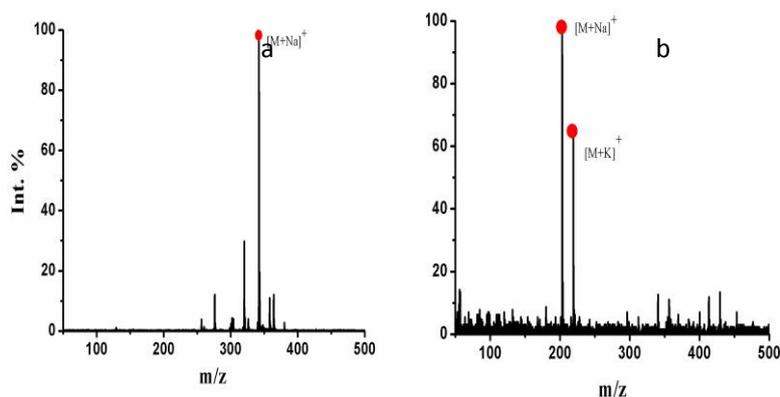


Fig.2 诺氟沙星(a)和恩曲他滨(b)质谱图

玻片表面喷雾电离直接质谱进样及其用于药物直接分析

韩玉良, 黄煜宇, 张耀利, 龚灿, 许旭*

(上海应用技术学院 化学与环境工程学院, 上海 201418)

直接质谱进样分析中, 纸喷雾电离技术是最近几年刚发展起来的新型敞开式电离技术, 不需要复杂的样品前处理, 且具有良好的重复性和准确性。在纸喷雾电离的基础上又发展出叶片喷雾电离、牙签喷雾电离、多孔聚合物针尖喷雾电离和不同材料的纤维喷雾电离技术等。本研究在这些方法的基础上, 结合实验室已有工作基础, 提出用载玻片表面做基底的直接电离进样方法。

使用傅里叶变换离子回旋共振质谱 (solariX 7.0 FT-MS, Bruker 公司), 载玻片尖端角度切成 60 度角, 将载玻片通过金属片接地, 并调节载玻片尖端与质谱仪进样口之间的距离在 2.0 mm, 使载玻片和质谱仪器之间形成高电场。由于质谱仪进样口处是负高压, 就会使样品中带有正电荷的物质向质谱仪进样口迁移, 并进入质谱仪的毛细管开始实时定性分析。进样时, 将液体样品滴加并均匀分布在载玻片表面, 并使液体接触载玻片上接地的金属片以构成电流通路。质谱仪内部电压选择 4500V, 以正离子模式检测。载玻片表面喷雾电离方法的结构和实际装置图如图 1 所示。

以 2 mg/ml 的桔皮素的甲醇/水溶液为样品, 考察了载玻片尖端角度、载玻片尖端与质谱仪进样口距离、质谱仪内部电压和酸碱性对出峰情况的影响。实验显示, 在选定的条件下, 载玻片尖端可观察到微小的喷雾现象。在考察溶液酸碱性的影响时, 发现酸碱性会对桔皮素的峰强度值没有明显影响。

使用该方法, 对盐酸普萘洛尔、氯化血红素、奎宁、醋酸氯己定和复方磺胺甲噁唑钠滴眼液等样品进行了直接分析。

关键词: 实时直接分析; 玻片喷雾; 装置; 质谱

*通讯作者: 许旭, E-mail: xuxu@sit.edu.cn

聚苯乙烯-石墨烯-铂纳米微球的制备及过氧化氢的快速检测研究

刘伟祿*, 邓佳音, 张晴, 孙国祥, 刘中博, 马迪迪, 石敏, 张建青, 张玉静

(沈阳药科大学, 药学院, 沈阳 110016)

摘要: 过氧化氢是一种重要的活性氧分子 (ROS), 它在药物代谢、血管再造、免疫

细胞激活、以及酶的作用等过程中均起着重要作用。因此，建立一种快速灵敏的分析方法，实现生物体内的过氧化氢含量的分析方法是十分必要的。电化学分析方法具有响应快速、操作简便、且仪器价廉等优点，因此受到了广大科学家的关注^[1,2]。但是对生物体内的过氧化氢检测过程中也存在一些问题，例如生物体内的过氧化氢浓度极低，传统的电化学分析手段难以满足要求，因此，有必要发展新型的电化学传感体系来解决此问题。

纳米材料由于其独特的小尺寸效应、量子尺寸效应、形貌效应、晶面效应、介电限域效应和宏观量子隧道效应，能够有效改善电化学分析方法的灵敏度、响应速度、检测限等性能。其中，石墨烯(GN)自从 2004 年被发现以来，就由于其优越的光，电，热性能，受到了广泛的关注^[3-6]。将石墨烯用于负载铂纳米粒子，能够得到比单一材料具有更高催化活性的复合纳米材料，有希望实现对多巴胺的高灵敏检测。但是在合成过程中往往需要使用一些表面活性剂实现石墨烯-铂纳米粒子纳米材料的稳定性，这些表面活性剂的使用会对纳米材料的导电能力以及催化能力有一定的影响，因此寻找无表面活性剂的合成方法来合成石墨烯-铂纳米材料具有切实意义。

本文以聚苯乙烯小球为模板，合成了聚苯乙烯-石墨烯-铂复合纳米微球。合成过程中没有使用任何表面活性剂以及其他保护剂，得到了具有较好分散能力的纳米微球，并将其作为电极材料催化过氧化氢的还原反应，实现了对过氧化氢的电化学检测。探讨了底液 pH 值，电位扫描速度，工作电位等因素对检测的影响。在最优实验条件下，其线性范围为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 8.0 \times 10^{-3}$ mol/L，线性相关系数为 0.995，检出限为 1.0×10^{-7} mol/L（信噪比 S/N=3），灵敏度为 $38.57 \mu\text{A}(\text{mmol/L})^{-1} \text{cm}^2$ 。此外，考察了方法的重现性，稳定性以及抗干扰能力，以及对人尿液和血清中过氧化氢的检测能力。

关键词：过氧化氢；电化学传感器；石墨烯；铂纳米粒子；聚苯乙烯微球

*通讯作者：刘伟禄，Tel.: +86 155-6608-8790，

E-mail address: liuweilulucky@163.com

基于 3D 石墨烯-碳纳米管-分子印迹聚合物复合膜修饰的电化学传感器的制备及性能研究

李迎春*，刘杰，宋含，黄彬铜，张路，王佳，刘江

（新疆特种植物药物资源教育部重点实验室 石河子大学药学院，新疆 石河子，832000）

摘要：本文以 3D 网状结构的石墨烯（Graphene foam, GF）与碳纳米管^[1]（Carbon

nanotube, CNT) 形成的复合材料作为工作电极, 修饰上分子印迹聚合物^[2-3] (Molecularly imprinted polymer, MIP) 之后构建了电化学传感器, 用于检测多巴胺 (Dopamine, DA)。GF 和 CNT 复合材料 (GF/CNT) 是以镍网为模板, 在其表面进行等离子体增强化学气相沉积, 继而去掉镍网制备而得。经过处理后, 在 GF/CNT 表面电聚合一层以 DA 为印迹分子的 MIP, 从而完成 GF/CNT/MIP 电化学工作电极的构建, 同时制备了 GF/CNT/NIP 作为非分子印迹聚合物修饰的复合电极做对比。该复合电极的突出优点有: 1) 不依赖于商品化的电极, 节约成本; 2) 拥有 3D 结构的 GF/CNT 电极作为 MIP 的基底具有扩大传感器表面积的作用, 从而降低了灵敏度; 3) MIP 为整个传感系统提供了优良的分子识别性能, 保证了检测的选择性。检测结果表明, DA 在 2×10^{-15} 到 1×10^{-12} M 浓度范围内与响应电流呈良好的线性关系, 检测限为 6.67×10^{-16} M (S/N=3)。此外, 该传感器表现出良好的选择性和抗干扰性, 可以在复杂样品检测中发挥重要作用。

关键词: 多巴胺; 3D 石墨烯; 碳纳米管; 分子印迹; 电化学传感器

基金项目: 感谢石河子大学重大项目 (基金号 gxjs2014-zdgg04)、国家自然科学基金 (基金号 81260487, 81460543)、人社部留学回国人员启动项目 (基金号 RSLX201301)、千人计划项目的资助。

作者简介: 刘杰, 1992 ~, 女, 在读硕士研究生, 石河子大学药学院

***通讯作者:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

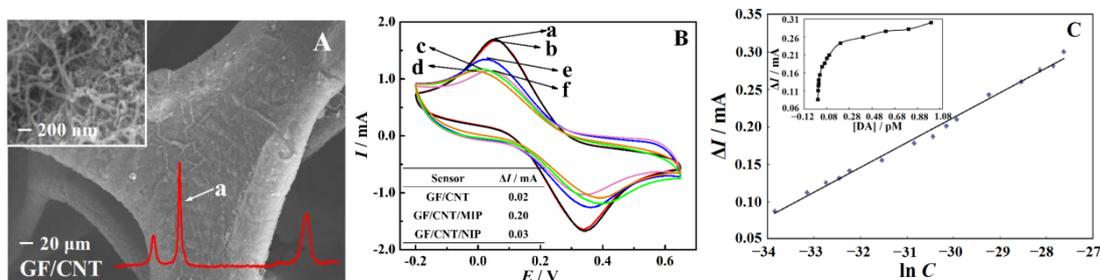


Fig. 1 Scanning electron microscopy (SEM) for GF/CNT (A), Raman spectra of GF/CNT(a). Cyclic voltammograms (B) in 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ and 0.1 M KCl of GF/CNT before (a) and after (b) DA binding, GF/CNT/NIP before (c) and after (d) DA binding, and GF/CNT/MIP before (e) and after (f) DA binding at the scan rate of 100 mV s^{-1} . The concentration of DA is 1.0×10^{-13} M. (C) Calibration curves for DA detection correlating reduction peak current shift (ΔI) with the natural logarithm of DA concentration by using GF/CNT/MIP.

基于分子印迹聚合物和纳米多孔金膜的电化学传感器用于华法林钠的检测

李迎春*, 张路, 宋含, 刘杰, 王佳, 黄彬铜, 刘江

(新疆特种植物药资源教育部重点实验室石河子大学药学院, 新疆石河子, 832000)

华法林钠 (warfarin sodium, WFS) 是一种香豆素类口服抗凝血药, 临床上用于多种疾病的抗凝治疗, 如瓣膜病、房颤、冠心病等。WFS治疗窗窄, 且影响其血药浓度的因素多, 在治疗过程中血药浓度不足易发生血栓栓塞, 使抗凝治疗失败, 而血药浓度过高则导致出血, 严重者将危及生命。目前, 检测WFS含量的方法主要是高效液相色谱法, 气相色谱-质谱联用法等, 但由于这些方法费力耗时, 依赖于贵重仪器, 且操作复杂, 因此建立一种准确、快速、低廉且环保的WFS血药浓度检测的方法十分必要。本工作在金电极 (gold electrode, GE) 表面修饰了纳米多孔金 (nanoporous gold leaf, NPGL) 和分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIP) 复合膜^[1], 制备得到电化学传感器 (WFS-MIP/NPGL/GE) 用于检测WFS。最外层的MIP对印迹分子WFS具有高特异识别能力, 而NPGL作为MIP的承载平台发挥了增加电极导电性和扩大电极表面积的作用^[2]。WFS的浓度在 $1 \times 10^{-10} \sim 8 \times 10^{-8}$ M范围内, 其浓度的对数与WFS-MIP/NPGL/GE的响应电流呈良好的线性关系, 检测限为 4.1×10^{-11} M (S/N=3)。此外, 该传感器具有良好的稳定性和选择性, 成功应用于实际血清样品中WFS的检测, 有望在临床实时检测中发挥作用。

关键词: 华法林钠; 纳米多孔金; 分子印迹聚合物; 电化学传感器; 治疗药物监测
基金项目: 感谢国家自然科学基金 (基金号 81260487, 81460543)、人社部留学回国人员启动项目 (基金号 RSLX201301)、千人计划项目的资助。

作者简介: 张路, 1992~, 男, 在读硕士研究生, 石河子大学药学院

***通讯作者:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

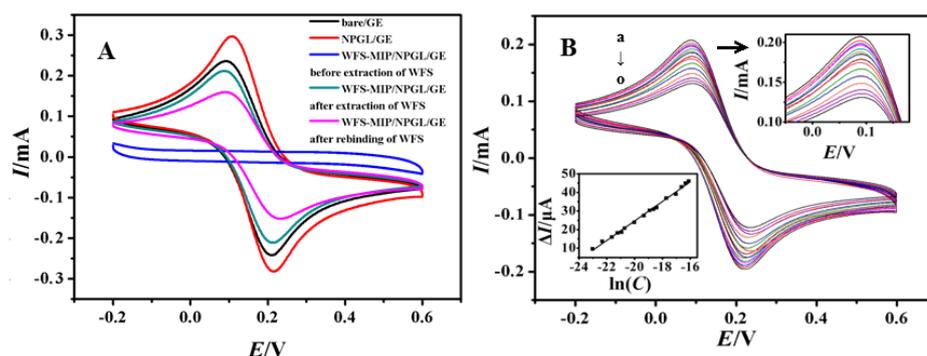


Fig. 1 (A) Cyclic voltammograms of different electrodes during preparation process; (B) cyclic voltammograms in 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ and 0.1 M KCl of WFS-MIP/NPGL/GE after binding with WFS at the concentration range of $1 \times 10^{-10} \sim 8 \times 10^{-8}$ M (a-o). The top-right inset shows partially amplified cyclic voltammograms. The bottom-left inset shows the calibration curves of WFS detection.

基于分子印迹聚合物修饰的电化学传感器高灵敏的检测卡马西平

李迎春*, 王佳, 黄彬铜, 宋含, 刘杰, 张路, 刘江

(新疆特种植物药资源教育部重点实验室 石河子大学药学院, 新疆 石河子, 832000)

摘要: 卡马西平 (Carbamazepine, CBZ) 是一种常见精神性药物, 被广泛地应用于癫痫、躁郁症、精神抑郁等疾病的治疗。卡马西平片口服后约 28% 以原形排出, 近年来其对土壤及地表水造成的污染引起了人们的普遍关注, 同时服用卡马西平后产生神经毒性等副作用具有显著的剂量依赖性, 因此对生物样品、药物制剂、环境样品中卡马西平的含量测定及其临床血药浓度监测具有重要意义。传统的检测方法如高效液相色谱法、气相色谱法、液相色谱联合质谱法等具有操作复杂、成本高、不能实时监测, 因而构建一种方便、快速且可以准确检测的方法是很有必要的。本实验以垂直生长有碳纳米管的石墨烯泡沫 (Graphene foam-Carbon nanotube, GF-CNT) 为电极, 并进一步采用分子印迹技术在其表面电聚合具有特异性识别功能的分子印迹聚合物 (Molecularly imprinted polymer, MIP), 从而成功制备了对目标分子进行选择性和检测的传感器 (MIP/GF-CNT) [1-3]。采用循环伏安法测得该传感器有较宽的线性范围 ($7.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) 和较低检测限 ($1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$, $S/N=3$)。此外, 该传感器被成功应用于市售卡马西平片的检测, 结果准确可信, 重复性好, 灵敏度高、选择性好, 有望用于卡马西平的临床血药浓度监测。

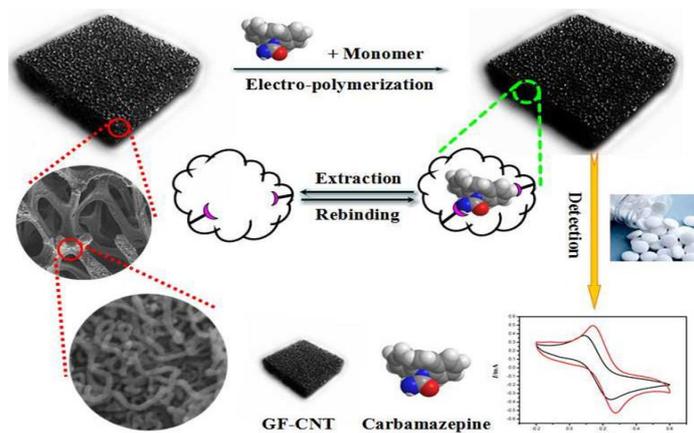


Fig. 1 Schematic representation of MIP/GF-CNT fabrication

关键词: 卡马西平; 分子印迹聚合物; 石墨烯泡沫; 碳纳米管; 电化学传感器

基金项目: 感谢国家自然科学基金 (基金号 81260487, 81460543)、人社部留学回国人员启动项目 (基金号 RSLX201301)、千人计划项目的资助。

作者简介: 王佳, 1993~, 女, 在读硕士研究生, 石河子大学药学院

***通讯作者:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

纳米金修饰的 3D 石墨烯泡沫-碳纳米管传感器同时检测多巴胺、抗坏血酸及尿酸

李迎春*, 黄彬铜, 刘杰, 宋含, 刘江, 张路, 王佳

(新疆特种植物药资源教育部重点实验室石河子大学药学院, 新疆石河子, 832000)

摘要: 3D 石墨烯泡沫-碳纳米管(Graphene foam-Carbon nanotubes, GF/CNTs), 是碳纳米管垂直生长在上石墨烯泡沫形成的蜂窝状材料。这种新的碳质材料具有极大的表面积, 高的电导率和宽的电化学电位窗, 非常适合作为电化学传感器的电极材料^[1]。本文以 GF/CNTs 为基底, 采用恒电位沉积法制备了纳米金颗粒(Gold nanoparticles, GNP)修饰的石墨烯泡沫-碳纳米管电极(GNP/GF/CNTs)。利用所构建的电极材料良好的催化性能, 采用循环伏安法和差示脉冲伏安法研究了抗坏血酸(Ascorbic acid, AA), 多巴胺(Dopamine, DA)和尿酸(Uric acid, UA)在该修饰电极上的电化学行为, 发展了一种新型的无支撑电化学传感器。结果表明, GF/CNTs 和 GNP/GF/CNTs 对 DA, AA, UA 均有良好的电催化作用, AA 与 DA, DA 与 UA 的氧化峰电位差分别为 192 mV 和 124 mV, 实现了三者的同时测定。DA, UA 和 AA 的线性范围分别为 0.10~20 μM 、0.50~32 μM 和 0.50~8.0 mM, 检出限分别为 0.035、0.216、80.670 μM (S/N=3)。该电化学传感器制备简单, 稳定性好, 重现性好, 有望在实时检测中发挥作用。

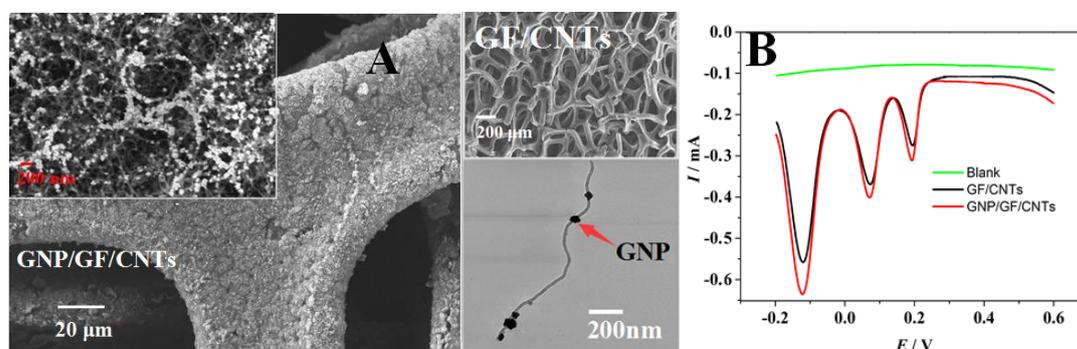


Fig. 1 (A) SEM images of GF/CNTs and GNP/GF/CNTs, and TEM image of GNP-deposited CNTs; (B) differential pulse voltammograms of GF/CNTs and GNP/GF/CNTs in 0.1 M PBS (pH 7.4) in the presence of 3.0 mM AA, 0.05 mM DA and 0.10 mM UA.

关键词: 石墨烯泡沫; 碳纳米管; 金纳米颗粒; 多巴胺

基金项目: 感谢国家自然科学基金(基金号 81260487, 81460543)、人社部留学回国人员启动项目(基金号 RSLX201301)、千人计划项目的资助。

作者简介: 黄彬铜, 1993~, 男, 在读硕士研究生, 石河子大学药学院

***通讯作者:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

蒸馏沉淀伪模板聚合法制备麻黄碱印迹聚合物及在毒品检测中的应用

李迎春*, 刘江, 刘杰, 宋含, 张路, 王佳, 黄彬铜

(新疆特种植物药资源教育部重点实验室 石河子大学药学院, 新疆 石河子, 832000)

蒸馏沉淀聚合法是杨新林、黄文强等在沉淀聚合的基础上发展起来的, 该方法的突出优点是聚合过程中通常不需要添加任何表面稳定剂或添加剂, 所制备的聚合物微球洁净, 单分散性良好, 且聚合过程可控。本课题组首次将蒸馏沉淀聚合法引入到印迹聚合物的制备中, 运用两步^[1]及一步^[2,3]蒸馏沉淀聚合法得到了粒径均一, 结合性能良好的印迹聚合物(MIPs)微球^[4]。在此基础上, 我们又引入伪模板印迹理论, 以麻黄碱(EPD)为伪模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 二乙烯基苯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂合成了分子印迹聚合物微球并用于甲基苯丙胺(MATM)(俗称“冰毒”)的检测。由于麻黄碱与甲基苯丙胺化学结构相似, 所制备的麻黄碱分子印迹聚合物对甲基苯丙胺也有较好的印迹效应。将印迹材料分别作为固相萃取材料和色谱柱填充料实现了对生物样品(大鼠尿液)中痕量甲基苯丙胺的检测, 回收率在 80%以上, 且精密度良好(RSD≤5.6, n=5)。两种方法的检测限分别为 0.7 μg/L 和 1.3 μg/L (S/N=3)。因此, 本研究所制备的分子印迹聚合物可应用于实际毒品的检测中。

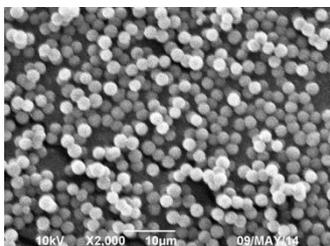


Fig. 1 (a): SEM photo of MIPs; (b): dynamic adsorption curves of MIPs and NIPs for EPD; (c): HPLC chromatograms of Rat urine spiked EPD and MATM before (A) and after extracted by MIPs (B) and NIPs (C) column, respectively.

关键词: 分子印迹聚合物; 蒸馏沉淀聚合; 甲基苯丙胺; 固相萃取; 毒品检测

基金项目: 感谢国家自然科学基金(基金号 81260487、81460543)、人社部留学回国人员启动项目(基金号 RSLX201204)和千人计划项目的资助。

***通讯作者:** 李迎春, E-mail: yingchunli@shzu.edu.cn

基于近红外荧光成像技术的脑内 A β 斑块分析方法的基础研究

程妍*

(四川大学华西药学院)

摘要: 阿尔茨海默病 (AD) 是仅次于心脏病、癌症、中风的导致老人死亡的第四大杀手, 然而目前 AD 的确诊仍只能通过患者死后尸检脑内的 A β 斑块等判断。利用体内成像技术在体观察并检测脑内 A β 斑块的沉积, 可为 AD 的早期诊断、疗效监测以及治疗药物的研究等提供极大便利。本研究利用近红外荧光成像技术, 建立同时满足在体动态观察与定量检测脑内 A β 斑块的方法。以脑内 A β 斑块为靶点, 设计一系列具有推-拉电子结构的近红外荧光探针, 并通过荧光染色、体外竞争结合、体内分布等方法筛选具备高亲和力与选择性的近红外荧光 A β 分子探针; 利用筛选的荧光探针, 对 AD 转基因小鼠进行脑内活体实时光学显像, 评价利用近红外荧光成像进行在体动态观察与定量检测脑内 A β 斑块的有效性。本研究利用近红外荧光成像在体观察并检测脑内的 A β 斑块, 避开了核医学的放射性辐射等缺点, 为临床研究脑内 A β 斑块的分布行为以及其分析方法的建立提供重要依据。

关键词: 阿尔茨海默病; 近红外荧光成像; A β 斑块; 体内分析; 分子探针

*通讯作者: 程妍, yancheng@scu.edu.cn

Preparation and Characterization of Micro-column Cell Membrane Chromatography

Xinchao Zhao, Shuai Cheng, Cheng Tang, Linyi Dong, Liang Xu*

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Tianjin Medical University)

ABSTRACT: Cell membrane chromatography (CMC) is a powerful tool to study membrane protein interactions and to screen active compounds extracted from natural products. Unfortunately, a large amount of cells are typically required for column preparation in order to carry out analyses in an efficient manner. Micro-column CMC (mCMC) has recently been developed by using a silica capillary as a membrane carrier. However, a reduced retention of analytes via mCMC was found due to a low ligand (cellular membrane) capacity. To solve this general problem, in this work a silica-based porous layer open tubular (PLOT) capillary was fabricated, and to the best of our knowledge, for the first time applied to mCMC. The mCMC column was prepared by physical adsorption of rabbit red blood cell (rRBC) membranes onto the inner surface of the PLOT capillary. The effects of the PLOT capillaries, fabricated with different feed compositions, on the immobilization amount of cellular membranes (represented by the fluorescence intensity of the capillary immobilized with fluorescein isothiocyanate isomer-labeled cellular membranes) and on the dynamic binding capacity (DBC) of verapamil (VP, the positive drug to rRBC) have been systematically investigated. The intensity of the mCMC column when combined with the PLOT capillary was found to be more than five times higher than the intensity with a bare capillary. This intriguing result indicates that the PLOT capillary exhibits a higher cellular membrane capacity. The DBC of VP in the PLOT column

was found to be more than nine times higher than that in the bare capillary. A rRBC/CMC column was also prepared for comparative studies. As a result, mCMC provides similar chromatographic retention factors with traditional CMC, however the cellular membrane consumption for mCMC was found to be more than 460 times lower than that for CMC.

Key words: cell membrane chromatography; micro-column cell membrane chromatography; porous layer open tubular capillary; red blood cell; affinity

新型毛细管电色谱技术及其在药物分析中应用

陈子林*, 包涛, 张娟

(武汉大学药学院, 湖北武汉, 430071)

毛细管电色谱(Capillary electrochromatography, CEC)技术是一种结合毛细管液相色谱(LC)及毛细管电泳(CE)技术发展起来的一种微柱分离分析技术,具有分离柱效高、分离选择性好、样品及流动相消耗少,与质谱检测技术兼容性好等优点。研究与开发新型毛细管电色谱柱技术是推动毛细管电色谱发展的有效途径。近年来,本课题组一直致力于新型毛细管电色谱柱技术及其在药物分析等领域中应用研究工作,取得了一定的进展,本报告拟介绍本课题组研发成功的几种毛细管电色谱柱技术及其在药物分析、环境分析等领域中应用,主要内容包括:(1)基于Sol-Gel及化学修饰技术相结合的手性硅胶整体柱技术及其在手性药物分析中应用^[1, 2]; (2)基于晶体外延生长技术及化学修饰技术相结合以金属骨架材料为固定相的毛细管开管柱研制及其性能与应用评价^[3]; (3)基于仿生聚多巴胺功能化及导电高分子聚合材料修饰以石墨烯等为固定相的毛细管电色谱柱研制及其性能与应用评价^[4, 5]。图1为基于金属有机骨架材料HKUST-1为固定相的毛细管电色谱柱示意图。

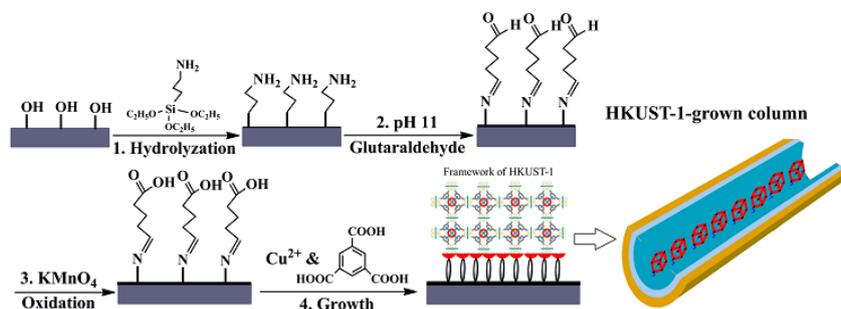


Fig. 1 Schematic demonstration for growth of HKUST-1 in capillary using LPE process

关键词: 金属有机骨架材料; 生物仿生; 聚多巴胺; 晶体外延生长; 毛细管电色谱
基金项目: 国家自然科学基金(Nos 21375101, 91417301)及湖北省自然科学基金(2014CFA)资助。

*通讯作者: 陈子林, Email: chenzt@whu.edu.cn

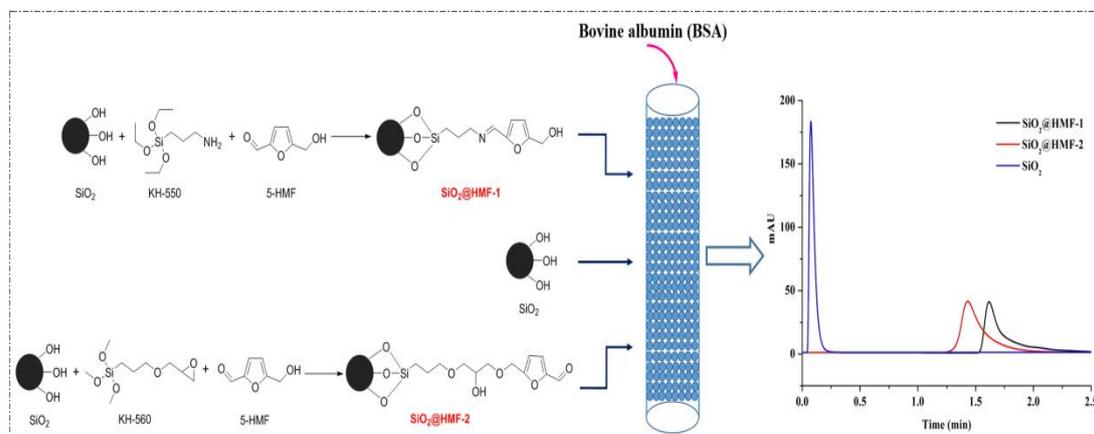
Surface modification and preliminary application of silica gel with 5-hydroxymethylfurfural

Cheng Wang, Yuanyuan Lin, Meng Sun, Huaizhen He*

(School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, No. 76, Yanta West Road, Xi'an, 710061)

Abstract: In this study, silica was surface-modified with 5-hydroxymethylfurfural, a platform chemicals with various pharmacological activities. Silane coupling agents 3-glycidoxypropyl-trimethoxysilane and 3-aminopropyl-triethoxysilane were utilized as linker to perform SiO₂@HMF hybrid particles. The prepared materials were confirmed by IR, elemental analysis and X-ray energy spectrum. The modified silica-based particles operated separately as new stationary phases to investigate its chromatographic property for retention behavior of bovine serum albumin. Retention time of bovine serum albumin on chromatographic columns with SiO₂@HMF as stationary phase remarkably prolonged compared to that of SiO₂ stationary phase, which are 1.64 min for SiO₂@HMF-1, 1.43 min for SiO₂@HMF-2 and 0.075 min for SiO₂, respectively. (Method: 2.5×10⁻⁵M BSA, 150mm×4.6mm column, flow rate: 1.00ml/min, mobile phase: 2.5×10⁻⁴TFA) The column with modified stationary phase even exhibited well reproducibility after serving for two weeks. Preliminary results indicated the prepared particles could be utilized as promising new-type stationary phase for separation, and the further research are also in process.

Keywords: 5-hydroxymethylfurfural; SiO₂; surface modification; stationary phase



*通讯作者: Huaizhen He, Tel/Fax: +86-29-82657740;

E-mail: hehuaizhen@mail.xjtu.edu.cn.

β-环糊精固定化生物质基磁性介孔碳的制备及在固相提取-荧光分析人血清与药物废水中吉非罗齐的应用

刘瑞林^{a,b}, 张志琪^b, 马进^b, 景王慧^a, 王璐^a, 曾爱国^a, 杜伟^a, 傅强^{a*}

(^a 西安交通大学医学部药学院, 西安 710061; ^b 陕西省生命分析重点实验室, 陕西师范大学化学化工学院, 西安 710062)

摘要: 功能化的磁性碳基纳米材料作为一类重要的分离介质材料,已在诸多领域引起了高度关注^[1,2]。本研究以中药石榴皮为前驱体,草酸高铁铵为磁源和气体造孔剂,通过一个简单的浸渍、活化与碳化过程制得磁性介孔碳材料 (Magnetic mesoporous carbon, MMC)。随后,采用悬浮分散法将 β -环糊精 (β -CD) 嫁接至 MMC 表面,即得 β -环糊精固定化的磁性介孔碳(MMC@ β -CD)复合材料(Figure 1)。结果表明,所制备的 MMC@ β -CD 具有高的比表面积($203 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$),大的孔容量($0.16 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$),相对宽的介孔尺寸(6.8 nm)以及高的饱和磁化强度(26.2 emu g^{-1})。这些结果显示所制备的复合材料不仅可以作为一种新型吸附剂的候选物,而且拥有良好的磁分离特性。目前,尽管吉非罗齐(Gemfibrozil)作为一种高效的降血脂药物已被广泛用于临床治疗高血脂症,但同时也被美国环保局列入污染物清单^[3]。由此可见,建立新颖的策略用于生物样品及环境基质中吉非罗齐的分析具有重要的科学意义和实用价值。基于吉非罗齐与环糊精的较强主客体作用机制,将所制备的 MMC@ β -CD 作为一种新颖的吸附剂用于磁固相提取(Magnetic solid-phase extraction, MSPE)-荧光分析降血脂药物吉非罗齐 (Figure 1)。在最佳实验条件下,所得线性范围为 $50\text{-}8000 \text{ pg mL}^{-1}$ ($R = 0.9984$),检出限与富集因子分别为 4 pg mL^{-1} 与 100, MMC@ β -CD 对吉非罗齐的最大吸附容量为 64.3 mg g^{-1} 。结果表明,所提出的分析方法可成功用于磁固相选择性提取-荧光分析人血清与药物废水中的吉非罗齐。通过加标回收率试验,获得实际样品分析的回收率范围在 85.0-103.5%。总之,目前的工作不仅提供了一个便宜、环境友好的策略去合成 MMC@ β -CD (或 MMC),而且也发展了一种稳健、高选择性的方法用于磁固相提取-荧光分析生物样品及环境基质中的降压药物吉非罗齐。

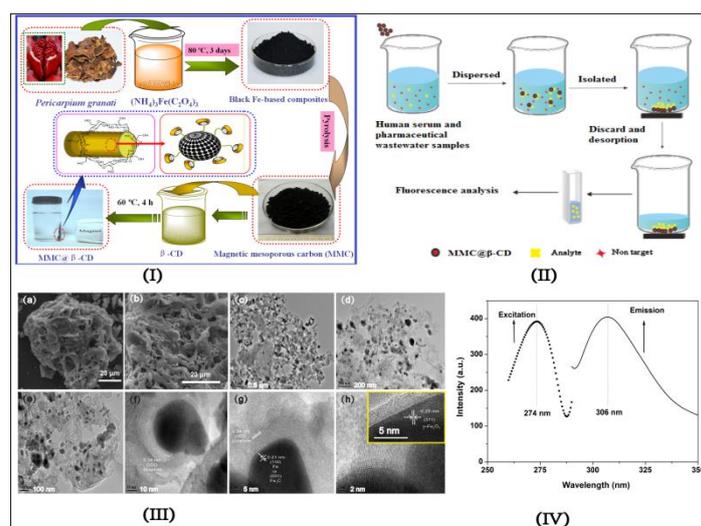


Figure 1. Schematic illustration of the fabrication procedure of MMC@ β -CD (I) and MSPE procedure (II). (III) SEM images of (a) MMC and (b) MMC@ β -CD, and TEM images of (c, d) MMC and (e-h) MMC@ β -CD, (inset) high-resolution TEM image of γ - Fe_2O_3 nanoparticle in (e), at different magnifications. (IV) Excitation and emission spectra of gemfibrozil.

关键词: 磁性介孔碳; 吉非罗齐; β -环糊精; 磁固相提取; 石榴皮

作者简介: 刘瑞林, 男, 西安交通大学医学部药学院讲师, 主要从事碳基纳米分离材料的制备及在毒物分离与药物控释中的应用研究。

Email: lrlxsd@snnu.edu.cn

***通讯作者:** 傅强, 男, 教授, 博士生导师, 西安交通大学医学部药学院院长, 主要从事分子印迹聚合物的合成及其在药物分析中的应用研究。

Email: fuqiang@mail.xjtu.edu.cn

靶向 HDACs 纳米粒在 MCF-7 细胞内示踪分析

师亚玲, 邵晓玮, 杨晓莹, 张杰, 卢闻¹

(西安交通大学医学部药学院 陕西 西安 710061)

摘要: **目的:** 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 是一类蛋白酶, 对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用。HDACs 的家族成员在乳腺癌, 宫颈癌等病症中过度表达。本实验设计具有 HDACs 靶向功能的化合物 F, 对聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 修饰, 用于制备靶向 HDACs 的纳米粒 (F-PLGA-NPs), 并与 PLGA 纳米粒 (PLGA-NPs) 对比分析在人乳腺癌 MCF-7 细胞内的行为。**方法:** 利用超声乳化-溶剂挥发法制备载香豆素-6 荧光剂的 F-PLGA-NPs 和 PLGA-NPs, 考察 2 种纳米粒的形态、粒径、包封率、载药量和稳定性; 建立荧光分析法表征 2 种纳米粒在 MCF-7 细胞内的行为。**结果:** 扫描电子显微镜下观察, PLGA-NPs 和 F-PLGA-NPs 为球形、表面光滑、圆整; 激光粒度分布仪测定体积平均粒径分别为 636 nm 和 679 nm (图 1); 荧光分光光度法测定 PLGA-NPs 和 F-PLGA-NPs 包封率分别为 97.8% 和 88.8%, 荧光载量分别为 1.63% 和 1.48%。稳定性研究 PLGA-NPs 和 F-PLGA-NPs 在 37°C、生理介质中持续释放 96 h, 香豆素-6 累积释放率分别为 0.3% 和 0.5%, 表明香豆素-6 可在 2 种纳米粒中稳定滞留 96 h, 能够用于表征纳米粒在细胞内的行为。细胞实验中, 建立了荧光分析法, 经方法学研究可用于细胞内载荧光纳米粒的示踪分析; 分别考察了 MCF-7 细胞对 2 种纳米粒摄入和排出的时间动力学行为和浓度动力学行为 (图 2), 结果表明随着时间延长, MCF-7 细胞对 2 种纳米粒的摄入量均增加, 而对 F-PLGA-NPs 的摄入量明显高于其对 PLGA-NPs 的摄入量; 随着纳米粒浓度的增加, MCF-7 细胞对 2 种纳米粒的摄入量亦增加, 对 F-PLGA-NPs 的摄入量稍高于其对 PLGA-NPs 的摄入量; MCF-7 细胞与 2 种纳米粒孵育一定时间后, 移除纳米粒,

测定纳米粒从细胞的排出量，结果 2 种纳米粒的排出量相近，排出行为相似。

结论： 建立荧光分析法用于细胞内纳米粒行为的示踪分析，F-PLGA-NPs 在 HDACs 高表达的 MCF-7 细胞内含量较高，具有靶向 HDACs 的功能。

关键词： 组蛋白去乙酰化酶；靶向性；纳米粒；荧光示踪分析

***通讯作者：** 卢闻，副教授。Tel: 029-82657740, E-mail: lvlu2004@mail.xjtu.edu.cn.

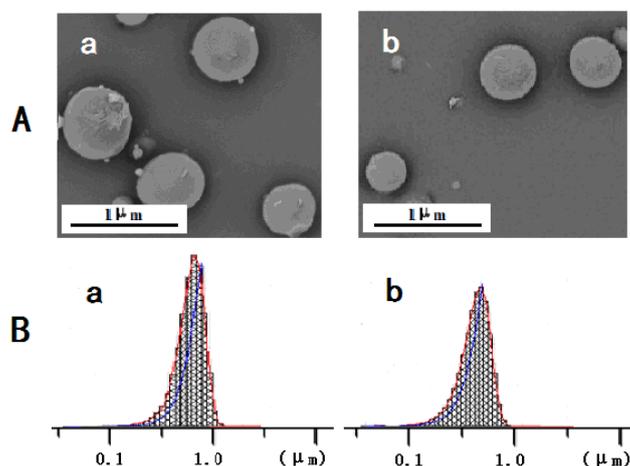


图 1 纳米粒形态和粒径分布图

A: F-PLGA-NPs (a) 和 PLGA-NPs (b) 扫描电镜图;
B: F-PLGA-NPs (a) 和 PLGA-NPs (b) 粒径分布图

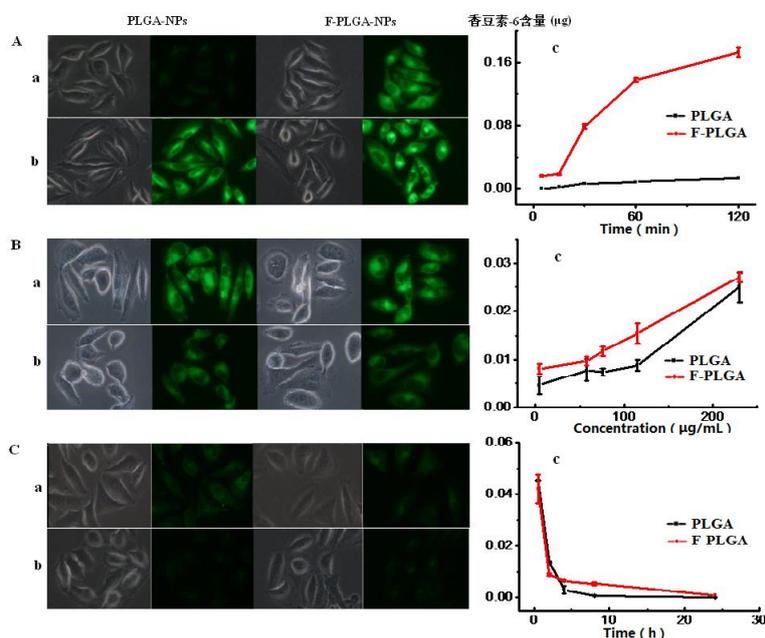


图 2 PLGA-NPs 和 F-PLGA-NPs 细胞实验结果

A: MCF-7 细胞与 2 种纳米粒孵育 5min (a)、2h (b) 的显微镜照片 (左侧为明场, 右侧为荧光场), 以及荧光分析法测定不同孵育时间细胞内香豆素-6 含量 (c); B: MCF-7 细胞与浓度为 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a)、76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) 的 2 种纳米粒孵育 15min 的显微镜照片 (左侧为明场, 右侧为荧光场), 以及荧光分析法测定 MCF-7 细胞与不同浓度纳米粒孵育后细胞内香豆素-6 含量 (c); C: MCF-7 细胞与 2 种纳米粒中断孵育 0.5h (a)、8h (b) 的显微镜照片 (左侧为明场, 右侧为荧光场), 以及荧光分析法测定中断孵育后不同时间香豆素-6 从细胞排出的含量 (c)。

N-连接糖链分析用带正电荷新型质谱衍生化试剂的开发

闵俊哲^{a,*}, 李喜玲^a, 永井 啓裕^b, 丰冈 利正^b

(^a延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 药学院药物分析学
吉林, 延吉, 133002; ^b静冈县立大学 药学部, 日本, 静冈, 4228526)

高灵敏、高选择性的糖链分析方法是蛋白质糖基化研究和探索筛选疾病糖生物标志物的瓶颈。因糖链本身不具有发色基团, 而且在质谱仪上不易离子化, 糖链的检测一般进行柱前衍生化的方法^[1]。该方法主要是使糖链带上紫外或荧光基团, 可在一定程度上能提高糖链分析的选择性和灵敏度, 但仍存在灵敏度不足和需反应多步程序其手续繁琐费时等问题。在此, 我们着眼于 *N*-糖苷酶 F (PNGase F) 将糖蛋白上的 *N*-糖链酶切成糖氨基结构, 合成了 6 种以三苯基膦 (Triphenylphosphine) 为母体的带正电荷新型质谱氨基类衍生化试剂。利用模型单糖 D-Glucamine, 及模型糖链 Sialylglycopeptide (SGP) 评价了衍生化试剂的效能, 筛选出不仅能提高检测灵敏度, 而且有利于选择反应监测 (SRM) 可提高质谱选择性的 [4-(1-Carboxyethyl)benzyl]triphenylphosphonium Bromide (4-CEBTPP) 衍生化试剂。获得特征碎片离子 m/z 120, 在模型单糖检测灵敏度为 0.3 amol, 模型糖链检测灵敏度为 30 fmol。本试剂带正电荷、易于质子化、并在电喷雾正离子化模式 (ESI⁺) 下能高灵敏地检测糖链, 可作为糖蛋白糖链分析的新型质谱衍生化试剂。

关键词: *N*-连接糖链; *N*-糖苷酶 F; LC-ESI-MS; 带正电荷; 质谱试剂。

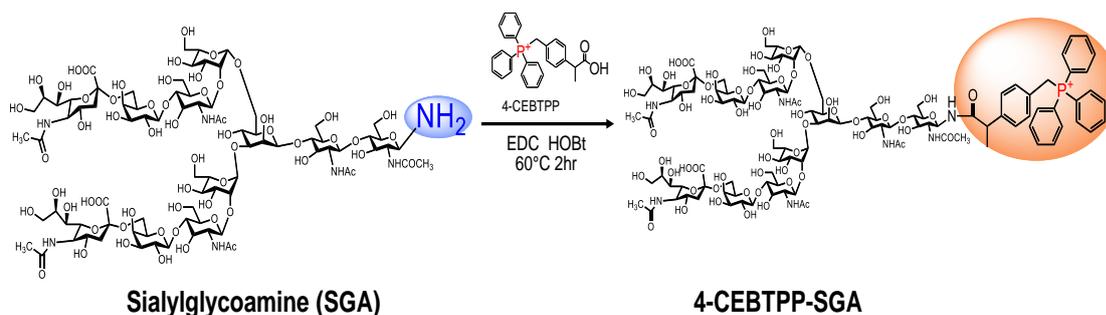


Fig.1. Derivatization reaction of SGA with 4-CEBTPP.

基金项目: 国家自然科学基金 (No.81360487)

*通讯作者: 闵俊哲, E-mail: junzhemin23@163.com; Tel/Fax: 0433-2436079

羧基手性代谢物标记新型质谱衍生化试剂的开发及特性研究

李卢萍, 闵俊哲*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 药学院药物分析学吉林, 延吉, 133002)

摘要: LC-MS 由于其高效灵敏准确等特点, 广泛应用于代谢组学研究中。人体代谢过程中会产生一系列带有羧基的产物或中间体, 如已有文献报道人体唾液中 D-乳酸可作为诊断糖尿病的新的生物标志物。手性是许多内源性代谢物的重要特征, 手性分析是现代代谢组学面临的主要问题。本研究以 4-羧丁基三苯基溴化磷 (TPPP) 为母体和(S)-3-(Boc-氨基)吡咯烷反应合成了一种带有正电荷结构靶向识别羧基手性代谢物的新型质谱衍生化试剂 TPPP-PRN。为了确定本试剂的有效性, 我们利用 D, L-乙酰化脯氨酸为羧基手性代谢物模型, 考察了本试剂的手性分离效果及在质谱中的裂解规律和检测灵敏度。本试剂因带有正电荷, 可在质谱中明显提高检测灵敏度; 且因结构中具有手性中心, 与 D, L-羧基官能团代谢物进行柱前衍生化得到非对映异构体产物, 可在廉价的 C18 色谱柱上进行 D, L-羧基官能团非对映异构体的良好的分离, 能在 MS 上进行 D, L-羧基官能团代谢物识别, 并进行含羧基官能团手性代谢物的代谢组学分析。本方法不仅可以靶向识别羧基官能团手性代谢物, 而且可以提高在质谱中的检测灵敏度, 为手性代谢组学的研究提供一种新的方法。

关键词: 羧基官能团代谢物; 手性代谢组学; 正电荷; LC-MS; 质谱手性试剂

基金项目: 国家自然科学基金 (No.81360487)

***通讯作者:** 闵俊哲, E-mail: junzhemin23@gmail.com; Tel/Fax: 0433-2436079

HER2 抗体偶联 2-甲氧基雌二醇白蛋白纳米粒的制备及其性质研究

王培¹, 侯瑞瑞¹, 李佳¹, 张疆楠¹, 张楠*

(郑州大学药学院, 河南省郑州市, 450001)

摘要: 近年来, 以抗体为靶向分子构建的载药体系已成为主动靶向治疗肿瘤的研究热点之一。HER2 受体高表达于乳腺癌细胞中, 以此作为靶头的给药系统具有高度的靶向性和特异性。本研究旨在建立一种以 HER2 抗体介导的肿瘤靶向纳米递药系统, 制备 HER2 抗体偶联的 2-甲氧基雌二醇白蛋白纳米粒 (HER2-2-ME-BSANPs), 使其

具有主动靶向作用,以期提高 2-ME-BSANPs 的肿瘤细胞摄取率,进而改善 2-ME 的半衰期,提高其药效,减小毒副作用。本研究采用去溶剂化-化学交联法制备 2-ME 白蛋白纳米粒(2-ME-BSANPs),进而利用 SPDP 交联剂将 HER2 抗体与 2-ME-BSANPs 进行偶联反应。通过采用 SDS-PAGE 电泳、凝集试验、免疫荧光实验、流式细胞术、MTT 法和活体成像技术,对该靶向给药体系进行表征及其体内外抗肿瘤活性的研究。研究表明,HER2 抗体与 2-ME-BSANPs 成功偶联且仍保持较高的免疫活性;HER2-2-ME-BSANPs 平均粒径和电位分别为 (225.6 ± 2.80) nm 和 (-26.70 ± 0.81) mV,该制剂均匀、稳定;该靶向载药体系 HER2-2-ME-BSANPs 在 HER2 抗体的介导作用下可以较快的进入 SK-BR-3 肿瘤细胞(高表达 HER2 受体)内部,且相对于 MCF-7 细胞(正常表达 HER2 受体),且对两种肿瘤细胞的抑制均呈现浓度与时间依赖性,且对 SK-BR-3 细胞的抑制作用高于 MCF-7 细胞 $19.8 \pm 2.6\%$;该体系主要将两种肿瘤细胞均阻滞在 G2/M 期,并没有改变 2-ME 的作用机制,且比非靶向组 2-ME-BSANPs 及 2-ME 对照组诱导更多 SK-BR-3 细胞发生凋亡。该靶向制剂的体内研究结果显示,与 2-ME 对照组相比,靶向制剂的消除半衰期明显延长;通过建立接种 SK-BR-3 细胞及 MCF-7 细胞的 BALB/c 裸鼠乳腺癌模型,结果表明,与 2-ME-BSANPs 相比,该靶向制剂对于高表达 HER2 受体的乳腺癌具有较好的靶向性及抗肿瘤效果。本研究制备的 HER2-2-ME-BSANPs 靶向纳米递药系统,通过对其进行表征及体内外研究表明,该靶向给药体系具有较好的主动靶向性,可以使药物选择靶向于特定肿瘤组织和细胞,显著延长半衰期,有效提高药物疗效,降低药物毒副作用。

关键词: HER2 抗体偶联物; 2-甲氧基雌二醇白蛋白纳米粒; 体内外研究; 活体成像

***通讯作者:** 张楠, E-mail: zhangnan@zzu.edu.cn

Tanikolide 关键中间体在新型键合纤维素手性固定相上的拆分

周婕*, 杜秋争, 孙芳, 裴文娟

(郑州大学药学院, 河南 郑州 450001)

摘要: Tanikolide 是从 Madagscan Tanikeli 岛的热带蓝藻细菌 *Lyngbyamajusclula* 分离出的抗真菌的内酯。研究表明(+)- Tanikolide 对白色念珠菌有抗真菌活性,而(-)-tanikolide 没有药理活性,所以(+)- tanikolide 已成为有机合成中一个具有吸引力的靶标。由于合成过程中中间体的纯度影响(+)- tanikolide 的纯度,因此, (+)- tanikolide 制

备中分离外消旋体并测定关键中间体的 e.e.值非常重要。

纤维素手性固定相(CSPs)已经成为采用 HPLC 方法拆分对映体最广泛使用的材料之一。第二代新型键合纤维素是键合在硅胶表面,克服了涂覆 CSPs 的局限性,并具有新的选择性特征,同时增强流动相中样品的溶解度等优点。目前还没有用新型键合纤维素手性固定相拆分 Tanikolide 中间体的报道。

本文首次在正相高效液相色谱(NP-HPLC)上使用 Chiralpak IC(250 × 4.6 mm,5μm)色谱柱拆分(+)-tanikolide 的关键中间体。与类似的柱子相比,Chiralpak IC 可能在稳定性和流动相溶剂方面占有优势。基于这些结果,进一步优化实验条件,建立了新型键合纤维素手性固定相拆分 tanikolide 中间体的方法。

通过考察流动相改性剂的含量、温度、以及流速对外消旋化合物分离度的影响,建立最优的色谱条件:流动相为正己烷 - 异丙醇(60/40, V/V),流速 0.8 mL min⁻¹,检测波长 230 nm,柱温 25 °C。Tanikolide 中间体在键合纤维素手性固定相上能达到基线分离,分离度为 3.58。此方法可方便地实现 tanikolide 中间体的拆分并通过比较中间体的外消旋体和关键对映体的色谱图,测定并计算出关键对映体 e.e.值。

关键词: HPLC; Tanikolide; 对映体分离; Chiralpak IC; e.e.值

***通讯作者:** 周婕,女,1978年08月生,博士,讲师,

E-mail: jie_0822@163.com

新型 NO 荧光探针的设计及其用于 NO 供体药物释放活性的测定

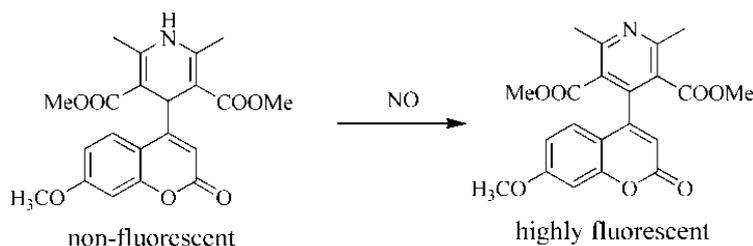
王秋花 何兰*

(中国食品药品检定研究院化药所化药室 北京 100050)

一氧化氮(NO)是一种血管内皮舒张因子(EDRF)^[1],具有松弛血管平滑肌的重要作用。因此,NO 供体药物的研究和开发备受关注,硝酸酯类药物是最常见的 NO 供体。NO 供体药物在体内、体外环境中的 NO 释放情况是评价它们活性的一个重要指标。然而,NO 是自由基,在有氧的条件下极不稳定,检测难度大。因此,建立一种灵敏度高、选择性好的 NO 检测方法是十分必要的。

我们课题组根据二氢吡啶氮和 NO 之间通过氢转移,形成吡啶自由基,然后自由基均裂生成芳香化吡啶产物^[2],其化学性质从非芳香性到有芳香性转变的特点,利用光诱导电子转移(PET)机理,将二氢吡啶作为新型 NO 荧光探针中的开关单元,设

计合成了一类含二氢吡啶结构单元的荧光探针^[3]。该类探针能够与 NO 定量反应生成具有芳香性的吡啶类产物，产物荧光强度明显增强。该类探针选择性好，灵敏度高，对氧化剂不敏感且细胞毒性小，已成功用于脂多糖诱导小鼠巨噬细胞内产生 NO 的检测，并用于 NO 供体硝普钠在 HeLa 细胞内释放 NO 的检测。新型探针大大提高了 NO 检测的灵敏度和选择性，为研究 NO 供体药物的释放活性提供了一个强有力的武器。



Scheme 1

关键词：一氧化氮；荧光探针；一氧化氮供体；硝酸酯类药物；检测

基金项目：国家自然科学基金资助课题(21272274)

***通讯作者：**何兰，E-mail: helan1961@aliyun.com, 电话: +86-010-67095301

基于手性离子液体的毛细管电泳新拆分体系研究

杜迎翔

(中国药科大学)

离子液体 (ILs) 是一类完全由阴阳离子组成的熔点接近室温或低于 100 °C 的熔融盐体系, 具有高热稳定性、高化学稳定性等一系列突出优点。手性离子液体 (CILs) 是具有手性阳离子或手性阴离子, 或同时具有手性阴阳离子的一类功能化离子液体。它不仅较大程度地保留了非手性离子液体的诸多优良理化性质, 还因手性部分的引入提供了额外的手性识别能力, 使其在手性拆分研究中具有很好的应用前景。目前在毛细管电泳 (CE) 手性拆分领域, 有关手性离子液体的研究处于起步阶段^[1-2], 存在很大的研究空白。本课题组近年来开展了基于手性离子液体的 CE 新拆分体系研究, 包括新型离子液体手性选择剂的研制, 新型手性离子液体协同拆分体系和手性离子液体配体交换拆分体系的构建, 基于手性离子液体拆分体系的机理研究等, 已取得了一定的研究进展^[3-8]。

1. 新型离子液体 CE 手性选择剂

目前国际上有关手性离子液体直接作为 CE 手性选择剂进行药物对映体拆分的报道仅有两篇，且拆分药物单一。本课题组研制了一种基于乳糖酸 (LA) 的离子液体手性选择剂——乳糖酸四甲基铵 (TMA-LA)。实验系统对比了单一 LA 体系、TMA-LA 体系、以及 LA+TMA-Cl (常规四甲基铵盐) 三个手性分离系统的拆分性能，发现以 TMA-LA 作为手性选择剂时，手性药物 (ATE、BIS、DUL、MET、NEF、PRO) 的分离度远远优于另外两个系统，峰型也得到明显改善，绝大多数模型药物对映体都获得理想的拆分。典型图谱见图 1。

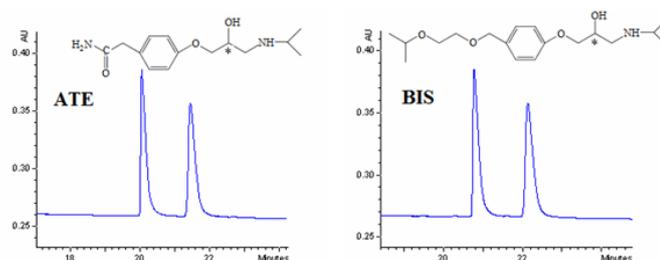


图 1 TMA-LA 体系优化条件下 2 个药物对映体的 CE 分离图谱

2. 基于传统手性选择剂的手性离子液体协同 CE 拆分体系

本课题组以万古霉素为手性选择剂，与手性离子液体 L-丙氨酸叔丁酯双三氟甲磺酰亚胺盐 (L-AlaC₄NTf₂)，首次构建了基于抗生素的 CE 手性离子液体协同拆分体系，与单一万古霉素手性选择剂拆分体系相比，代表性手性药物的分离大大改善。

此外，我们还构建了氨基酸离子液体四甲基铵-L-精氨酸 ([TMA][L-Arg]) 和环糊精类手性选择剂 HP- β -CD 联合使用的协同体系，相比于单一环糊精拆分体系，苯磺酸氨氯地平、普萘洛尔和盐酸奈福洋 3 种手性药物对映体的分离都得到了较大改善，在优化条件下都获得了完全分离，部分图谱见图 2。

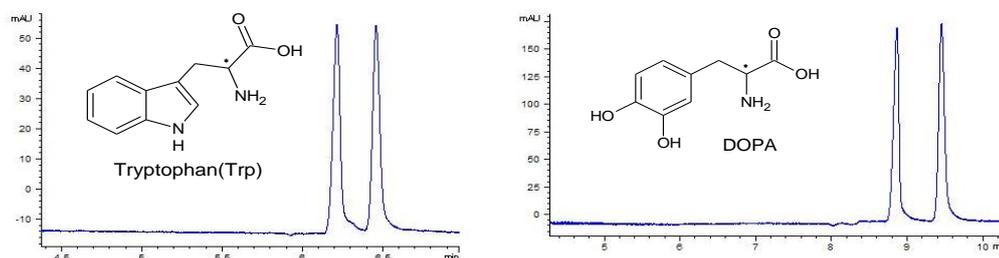


图 2 普萘洛尔在单独 HP- β -CD 体系，单独手性离子液 [TMA][L-Arg] 体系及 HP- β -CD/[TMA][L-Arg] 协同拆分体系中的电泳分离图谱

3. 手性离子液体配体交换 CE 拆分体系

在该体系中，手性离子液体充当手性配位体的角色，基于 D 型和 L 型的药物对映体与金属离子、手性离子液配体形成的非对映的三元配合物稳定性不同而实现分离。本课题组以氨基酸类离子液体四甲基铵-L-羟基脯氨酸 ([TMA][L-OH-Pro]) 作为

新型手性配体，首次研究了此配体交换拆分体系的手性选择性，对 5 个芳香族氨基酸进行了拆分。优化条件下，色氨酸和多巴对映体得到良好的分离，见图 3。

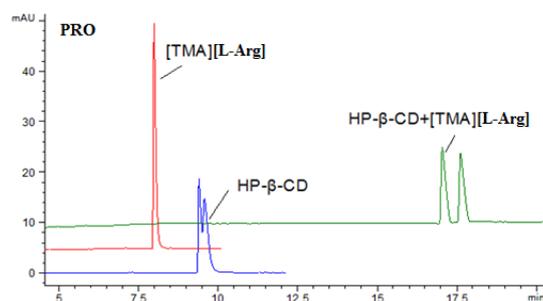


图 3 优化条件下色氨酸 (Trp) 和多巴 (DOPA) 的电泳分离图

4. 手性离子液体 CE 拆分体系机理研究

基于手性离子液体的 CE 拆分研究，目前国内外才刚刚起步，其机理研究更几乎是空白。本课题组以羟丙基-β-环糊精作为手性选择剂，与手性离子液体 1-butyl-3-methylimidazolium(T-4)-bis[(2S)-2-(hydroxy-κO) -3-methyl-butanoato-κO]borate 构建了新型手性离子液体 CE 协同拆分体系，成功分离了 5 个模型药物。我们进一步利用分子对接软件从分子水平对该协同拆分体系进行了手性识别机理研究。结果表明 (图 4)，与单独环糊精体系相比，手性离子液体的引入能够增大药物对映体与手性识别试剂间的结合自由能 ($|\Delta G|$) 以及两个药物对映体结合自由能之差 ($|\Delta\Delta G|$)。就缔合状态及解离状态两种不同的手性离子液体存在形式而言，缔合状态的手性离子液体表现出更为显著的协同效应。这些结果与 CE 实验数据达到了很好的一致，从而证实了使用离子液体的优势。

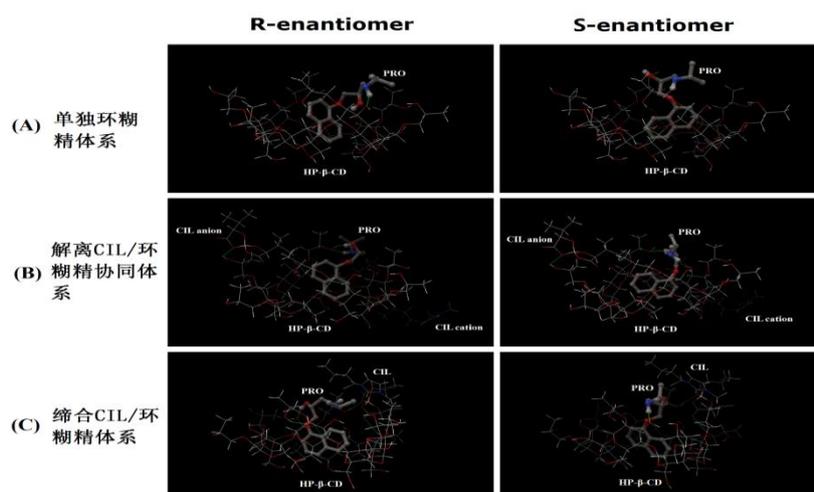


图 4 普萘洛尔在单独 HP-β-CD 体系 (A) 及手性离子液体协同体系 (B, C) 中的分子对接图 (绿线表示分子间氢键作用)

关键词: 手性离子液体 毛细管电泳 手性拆分

金丝桃苷在碳纳米管修饰玻碳电极上的电化学行为研究

刘琳, 蔡婉玲, 姚舒愉, 冯芳*, 杨功俊*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室,
江苏 南京 210009)

金丝桃苷是一种黄酮醇苷类化合物,对免疫系统、消化系统等具有明显的调节特性,引起了业界越来越多的关注。金丝桃苷也作为缺血性心肌细胞损伤的重要形式之一的心肌细胞凋亡,同时也是心肌细胞凋亡过程中的诱导者,所以当再灌注时对心肌细胞凋亡具有促进加速的作用。目前金丝桃苷测定的方法主要是高效液相色谱法、近红外漫反射光谱法、毛细管区带电泳-电化学检测法等。目前采用修饰电极对绿原酸进行电化学反应及测定研究的报道相对较少。本论文首先研究了金丝桃苷是在0.1mol/mL HAc-NaAc (pH4.7) 介质中于裸玻碳电极和碳纳米管修饰电极上的循环伏安曲线,实验结果表明:在100 mV/s 扫速条件下,圣草酚在裸电极上氧化峰电位与还原峰电位相差36mV,而在碳纳米管修饰电极上,其氧化峰电位与还原峰电位相差10mV,同时氧化峰电流增大了约8倍。采用循环伏安法并对金丝桃苷在电极表面的电化学反应机理进行了初步探讨。同时采用示差脉冲伏安法建立了测定金丝桃苷的电化学方法,在最佳实验条件下,氧化峰电流与圣草酚的浓度在0.50到 2.0×10^2 ng/mL范围内呈良好线性关系,检测限为0.1ng/mL,利用该修饰电极测定了鱼腥草样品中圣草酚的含量,获得了满意的实验结果。

关键词: 碳纳米管; 修饰电极; 金丝桃苷; 电化学反应

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21275162), 江苏省“青蓝工程”资助, 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

***通讯作者:** 杨功俊, E-mail: yanggongjun888@163.com, gjyang@cpu.edu.cn,
冯芳, fengfang1@126.com

油橄榄叶中电活性物质的高效液相色谱-电化学分析

张蓉, 廖雪琴, 蔡婉玲, 谭梦茹, 刘琳, 陶凯丽, 冯芳*, 杨功俊*

(中国药科大学药物分析教研室, 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室,
江苏 南京 210009)

油橄榄 (*Olea europaea*) 属于亚热带重要的经济型林木, 以其木本油料著称, 可为化妆品、食品补充剂和提药品供珍贵的原料, 经济价值较高, 被誉为“飘香的软黄金”, 而橄榄油更是有“植物油皇后”之称。目前, 国内外对于油橄榄叶的研究尚不深入, 导致大批量的油橄榄叶未被利用就被弃置, 当前的研究主要侧重于对其中的营养成分和抗氧化活性物质的结构分析研究, 提取纯化工艺研究, 药理活性研究, 而对于油橄榄叶所含的各种活性物质的含量测定的研究并不成熟, 有研究者针对油橄榄叶中活性化合物建立了分析方法对其进行了测定, 包括利用 Folin 试剂分光光度法对油橄榄叶中的多酚和总黄酮进行分析, 以及 HPLC 法对油橄榄叶中的橄榄苦苷含量季节变化规律进行研究。本论文建立油橄榄叶中电活性物质的 HPLC-ECD 测定方法。使用 C18 烷基键合相色谱柱, 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH4.5) - 甲醇为流动相, 采用梯度洗脱, 流速 1.0min/mL, 检测电压为+1.0V (vs. Ag/AgCl)。在最佳实验条件下, 油橄榄叶中的十种活性成分 3,4 二羟基苯甲酸、羟基酪醇、咖啡酸、酪醇、花旗松素、羟基酪醇醋酸酯、橄榄苦苷、槲皮素、木犀草素和芹菜素均得到很好的分离, 各组分浓度与其峰面积呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.998, 回收率在 82.00%~101.85% 之间, 该方法具有良好的准确度和重现性, 灵敏度高。采用 HPLC-ECD 的方法实现了油橄榄叶中十种电活性物质测定, 获得满意结果。

关键词: 高效液相色谱; 电化学检测; 油橄榄叶; 电活性物质

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21275162), 江苏省“青蓝工程”资助, 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

***通讯作者:** 杨功俊, E-mail: yanggongjun888@163.com, gjyang@cpu.edu.cn,

冯芳, fengfang1@126.com

亲和毛细管杂化整体柱的制备及其在手性拆分中的应用

杨茜, 季一兵*

(中国药科大学理学院分析化学教研室, 江苏 南京 210009)

毛细管电色谱 (Capillary electrochromatography, CEC) 是一种结合高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 的高选择性和毛细管电泳 (Capillary electrophoresis, CE) 的高效性的微分离分析方法。在毛细管电色谱整体柱的分类中, 有机-硅胶杂化整体柱是近年来发展较多的一类新型整体柱类型, 它结合了有机聚合

物整体柱和无机硅胶整体柱的优点，具有制备简单，机械强度高，后期修饰少等优点^[1]。本文以杂化整体柱为基质，蛋白为手性固定相构建的亲毛细管杂化整体柱电色谱是近年来手性分离色谱法中的一个研究热点^[2]。

本试验以四甲氧基硅烷(TMOS)和 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)为反应单体，制备新型有机-硅胶杂化整体柱^[3]，优化硅烷化试剂比例，总含量，陈化时间等制备出了性能良好的杂化柱基质，并将牛血清白蛋白(BSA)成功键合到该杂化整体柱基质上。以色氨酸为模板药物考察了蛋白含量，运行缓冲液 pH，运行电压，毛细管温度等对色氨酸手性拆分的应用并在最优条件下达到了基线分离。通过与键合有 BSA 的亲毛细管硅胶整体柱对比，本试验制备的杂化柱在制备工艺，手性拆分效果，亲和柱稳定性方面有较为明显的优势。

目前，以 TMOS 和 GPTMS 为反应单体的杂化柱报道较少，而以蛋白为手性固定相固载到该类型杂化柱上的文献尚未见报道。因此，该课题具有重要的研究意义和广阔的应用前景。

关键词：毛细管电色谱；杂化整体柱；牛血清白蛋白；手性拆分

手性药物与蛋白质的相互作用的亲和毛细管电泳法研究

陈学萍，季一兵*

(中国药科大学理学院分析化学教研室，江苏 南京 210009)

手性药物的分离分析是分析化学领域的重要研究课题，对药学研究具有重要意义。药物对映体的理化性质极为相近，分离难度很大，且有很高的要求。而手性药物口服或注射到人体内后，药物分子由血液转移到其作用靶点，药物对映体在血液中浓度的测定及与血清蛋白质结合常数的测定，对于手性药物的药理学和立体选择性药代动力学研究具有重要意义。未结合药物浓度比起总的药物浓度能更真实的反映药物在体内的活动。因此很有必要对手性药物进行对映体药物蛋白结合研究。亲和毛细管电泳法(ACE)作为一种新兴的研究药物与蛋白质相互作用的方法，具有方法建立以及优化简单，样品消耗量少，分析时间短等优势，受到越来越多的关注。

本实验选用亲和毛细管电泳技术，建立了以牛血清白蛋白(BSA)为拆分剂拆分手性药物奥美拉唑(OME)的高效，灵敏和选择性好的 ACE 分离检测方法，考察了缓冲液的浓度和 pH，有机添加剂的种类和含量，BSA 的浓度等条件对手性拆分的影

响,并在最佳条件下研究了其在线分离对映体与牛血清白蛋白的相互作用,得到奥美拉唑两个对映异构体 R-OME 和 S-OME 与 BSA 的结合常数分别为: 1.49×10^3 , 2.64×10^3 。实验结果表明 S-OME 与 BSA 作用强于 R-OME,这与实验得到的图谱结果一致。实验中建立的 ACE 法能够对手性药物进行很好的分离,因此后续实验中可以扩大其应用范围,研究其他手性药物与蛋白质的相互作用,更好的指导手性药物的研发和临床应用。

关键词: 亲和毛细管电泳; 手性拆分; 药物蛋白结合; 相互作用

碳纳米管修饰的胃蛋白酶亲和有机聚合物毛细管整体柱的制备及其在手性药物拆分中的应用研究

苗春月, 季一兵*

(中国药科大学理学院分析化学教研室, 江苏 南京 210009)

手性药物对映体的拆分一直以来受到全世界临床医药、药物分离分析领域的广泛关注,手性药物不同的光学异构体直接影响到临床用药的安全性问题,因此探索一种高效微分离技术应用于手性药物拆分具有很重要的实际意义。有机聚合物整体柱具有制备方法简单,内部结构均匀,固定相表面易于改性, pH 使用范围宽等诸多优点,近几年发展迅速,在手性药物的分离方面得到越来越多的关注。而碳纳米管(Carbon nanotubes, CNT)因机械强度高,热传导性好,性质稳定,比表面积大,吸附性强等诸多优点,使其在固相萃取或微萃取,以及气相色谱(Gas chromatography, GC)、高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电色谱(Capillary electrochromatography, CEC)等方面都得到了广泛的应用。本文拟将单壁碳纳米管(SWCNT)与有机聚合物整体柱相结合,并通过固载手性蛋白质制备出碳纳米管修饰的蛋白亲和有机聚合物毛细管整体柱,为手性药物的高效分离分析提供一种新方法。

本试验将一定量羧化的单壁碳纳米管(carboxylic single-wall carbon nanotubes, c-SWCNT)通过一定方法引入到有机聚合物整体柱的基质中,制备出含有 c-SWCNT 的有机聚合物毛细管整体柱。分别对上述两种整体柱基质进行性能表征,结果表明,引入 c-SWCNT 后的毛细管整体柱,内部结构保持均匀,但柱背压更小,且对烷基苯同系物等小分子物质的分离度和柱效都优于未加入 c-SWCNT 的整体柱。

进一步通过戊二醛桥联法将胃蛋白酶(pepsin)分别共价键合到上述两种基质柱上,以 CEC 模式为分离手段,使其对手性药物进行拆分。通过对比发现, c-SWCNT 的引入,使有机聚合物整体柱对奈福泮的分离度及柱效都有一定程度的提高,即在相同的条件下可以更好地实现对手性药物的分离分析。本实验表明, c-SWCNT 对于手性药物与整体柱基质的相互作用确实有一定积极作用,为手性药物的分离分析以及纳米材料的更广泛应用都奠定了一定的基础。

关键词: 碳纳米管; 整体柱; 毛细管电色谱; 手性拆分

新型纳米复合手性膜的制备及其在色氨酸对映体拆分中的应用

段飞飞, 陈建秋*, 季一兵*

(中国药科大学理学院分析化学教研室, 南京, 210009)

手性是自然界中广泛存在的一种现象。通常一种对映体具有相应的药理作用,而另一种对映体则具有相应的副作用甚至对人体产生毒理作用。因此,实现对映体的分离至关重要。传统的手性拆分方法如高效液相色谱法、毛细管电泳法等都无法进行大规模的拆分。手性膜拆分法以其能耗低、操作装置简单、批处理量大、可适用于大规模拆分引起了手性拆分工作者的广泛关注,其中又以手性固膜的研究最为广泛。大多数有机聚合物膜都有着自身的缺点,如水通量低、机械强度低、抗污染能力差等。通过在聚合物膜中加入适量的纳米材料可显著的提高膜的性能。

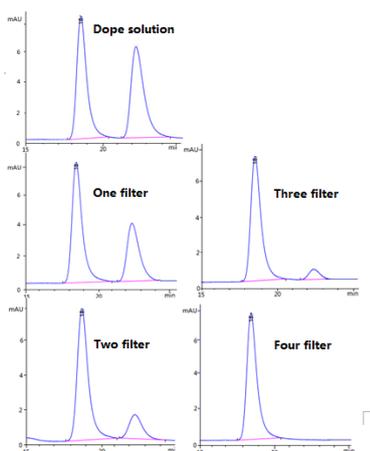


图 1.色氨酸对映体完全拆分色谱图

本实验制备了一种新型的环糊精即 GPTMS- β -CD (γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷 β -环糊精) 并将其键合到羧化多壁碳纳米管 (MWCNTs) 上。实验将

GPTMS- β -CD-MWCNTs 作为纳米改性材料以及手性拆分剂添加到聚砜铸膜液中制备纳米手性膜。实验分别制备了 GPTMS- β -CD-MWCNTs 含量为 0、0.1、0.5、1% 的手性膜考察其对手性拆分性能的影响，结果表明不添加 GPTMS- β -CD-MWCNTs 的聚砜膜不具备手性拆分性能，随着 GPTMS- β -CD-MWCNTs 含量的增加手性拆分效果显著提高，最大 ee%（对映体过剩值）可达 24.5%。以 1% GPTMS- β -CD-MWCNTs 聚砜手性膜作为拆分膜，采用多级过滤系统经过四次过滤后实现了对色氨酸对映体的完全拆分（图 1.）。

关键词：纳米复合膜；多级过滤；手性拆分；色氨酸

*通讯作者：季一兵，jiyibing@msn.com

氧化石墨烯纳米颗粒修饰的亲和毛细管硅胶整体柱在手性拆分中的应用研究

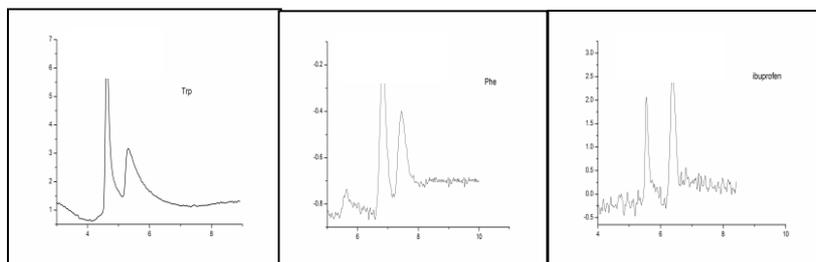
洪婷婷，季一兵*

（中国药科大学理学院分析化学教研室，江苏 南京 210009）

纳米颗粒（Nanoparticles, NPs）基于其特殊的物理、化学和电学性质已广泛应用于材料学、化学、医药学和电学等不同领域中。在多学科交叉融合的背景下，发展新型纳米材料修饰的毛细管电色谱固定相已成为药物分离分析领域的研究热点^[1]。手性药物的拆分基于其对临床安全用药重要的现实意义，是当今分析工作者研究的重要方向。在用于手性药物拆分的众多色谱技术中，亲和整体柱毛细管电色谱（Affinity monolithic capillary electrochromatography, AMCEC）全新体系结合了亲和整体色谱（Affinity monolithic chromatography, AMC）的高选择性及毛细管电色谱（Capillary electrochromatography, CEC）技术的高效性，在对映异构体的分离分析领域展现了其独特的优势^[2-3]。因此，本文将 NPs 引入 AMCEC 体系中用于手性药物的拆分具有重要的研究意义与广阔的应用前景。

本实验选用人血清白蛋白作为手性选择剂，通过氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)的桥联作用将其固定于毛细管硅胶整体柱内构建手性毛细管电色谱体系，该应用尚未有文献报道。GO 是由氧化石墨剥落获得的片层结构纳米材料，其表面富含羟基、羧基、环氧基等多类含氧活性基团，可实现进一步的固定化修饰。本文以色氨酸对映异构体为模板药物考察了 GO 的浓度对手性药物拆分的影响，并优化了缓冲液 pH 值、

样品体积、缓冲液浓度、运行电压等电色谱条件。同时，该手性整体柱也可实现色氨酸、苯丙氨酸、布洛芬手性药物的基线分离（图）。实验发现，与未加入 GO 的整体柱比较，GO 修饰的手性毛细管整体柱具有更优的手性分析能力，推测可能由于 GO 较高的比表面积可增加蛋白的固载量，增加药物与固定相之间的相互作用，从而进一步增加手性拆分性能。



关键词： 纳米颗粒；氧化石墨烯；整体柱；亲和色谱；手性拆分；毛细管电色谱

应用聚敛乙炔荧光法评价药物膜亲和力

魏梦琳，刘佳佳，夏园园，冯锋，柳文媛*，郑枫*

（中国药科大学）

摘要： 联乙炔脂肪酸分子在紫外光照射下自聚合生成聚联乙炔，聚联乙炔（PDA）在溶液中可自动形成具有双层膜结构的 PDA 囊泡。由于磷脂可以插入 PDA 囊泡表面构成脂质体，聚联乙炔成为一种可靠的膜筛选工具。早期文献报道证明 PDA 的色度信号可以用于评价药物和生物膜的相互作用。在本次研究中，我们应用 PDA 囊泡的荧光信号来测定药物的膜亲和力。当囊泡表面活性分子发生识别反应时，囊泡的荧光信号会发生相应的变化。基于 PDA 囊泡的在 485 nm 激发光下位于 560nm 处的发射光信号响应，我们引入了半数效应浓度（EC50）作为参数来评价药物和膜相互作用。为对本方法进行评价，选择局麻类药物和黄酮类药物作为指标药物，将他们的 log(EC50)值与其他经典方法测得的膜亲和力参数进行线性回归。其中黄酮类药物由于文献报道数据有限无法进行回归，但趋势一致；局麻类药物回归结果相关系数均大于 97%，相关性良好。进一步以局麻类药物盐酸丁卡因为指标药物，考察缓冲液 pH 和磷脂组成对膜亲和力的影响。随着 pH 的升高，盐酸丁卡因的 EC50 值减小，可见膜亲和力增强。在这一过程中，监测 PDA 囊泡的粒径分布和待测溶液的 zeta 电位变化，结果表明疏水作用的影响起主导作用，而静电作用影响不大。另一方面，磷脂组

成对实验结果影响不大，却会明显减弱荧光的响应值。综上，本项研究建立的聚联乙炔荧光法准确灵敏可重现，可应用于药物膜亲和力的评价。

关键词：药物膜亲和力；聚联乙炔囊泡；荧光；局麻类药物；黄酮。

有机阳离子/质子逆向转运蛋白介导的苦参碱肝脏转运研究

孙晓敏^{1,2}，冯超^{1,2}，张峻颖³，吴春勇^{1,2}

(1. 中国药科大学药物分析教研室，江苏 南京 210009；2. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，江苏 南京 210009；3. 中国药科大学中药制剂教研室，江苏 南京 211198)

苦参碱是苦参、苦豆子和广豆根等豆科植物的重要生物碱活性成分，对多种原因引起的肝损伤及肝纤维化有保护作用，并可有效抑制肝癌细胞的生长。本研究以源于人肝胚胎瘤细胞的HepG2细胞为体外模型，使用高效液相色谱与质谱联用技术（LC-MS/MS）测定HepG2细胞在不同条件下对苦参碱的摄取情况，首次分析探讨了苦参碱的肝脏摄取转运机制。结果表明，苦参碱的HepG2细胞摄取存在孵育时间依赖性、温度依赖性和浓度依赖性；加入代谢抑制剂叠氮化钠或鱼藤酮后，苦参碱的细胞摄取均显著降低；化学解偶联剂羰基氰对-三氟甲氧基苯腙（FCCP）可显著抑制苦参碱在HepG2细胞中的蓄积；与细胞外液pH 7.4相比，酸性孵育液（pH 6.4）下苦参碱的细胞摄取显著下降，碱性孵育液（pH 8.4）时摄取显著增加；细胞内碱化对苦参碱的摄取有明显的抑制效果，但细胞内酸化可显著促进HepG2细胞对苦参碱的摄取；有机阳离子药物如吡拉明、奎尼丁、维拉帕米、金刚烷胺、苯海拉明和西咪替丁均可显著抑制苦参碱在HepG2细胞中的蓄积，但已知的有机阳离子转运系统如有机阳离子转运蛋白（OCTs）、有机阳离子/肉毒碱转运蛋白（OCTNs）、多药及毒素外排转运蛋白（MATEs）及质膜单胺转运蛋白（PMAT）的典型底物/抑制剂对苦参碱的细胞摄取几乎无明显的抑制作用。本研究首次发现HepG2细胞上表达有某种新型有机阳离子/质子逆向转运蛋白，其介导的跨膜转运可能是苦参碱进入肝脏的主要途径。

关键词：苦参碱；肝脏转运；HepG2 细胞；有机阳离子/质子逆向转运蛋白

基金项目：国家自然科学基金项目（81202989）；江苏省自然科学基金项目（BK2012358）；药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题（DQCP2015MS07）

基于碳纳米角的新型甲氨蝶呤载药体系

王冉, 崔红静, 周英, 王俊玲, 钟文英*

(中国药科大学理学院分析化学教研室 医药生物功能材料重点实验室,
南京 210009)

肿瘤已取代心脑血管疾病成为威胁人类健康的头号杀手。传统的治疗手段存在一定缺陷,经常在杀死癌细胞的同时也会杀伤正常细胞,有较大的副作用。目前亟待研发针对肿瘤治疗的新型高效低毒靶向药物。寻找更为理想的载药系统,实现更加精确的靶向治疗,提高药物体内稳定性,进一步降低其不良反应并延长作用时间,是研究人员一直努力的方向。

单壁碳纳米角(oxSWNHs)应用于载药系统给肿瘤的治疗带来新的机遇。单根oxSWNHs一端为封闭的锥形结构,另一端开口,正常状态下以直径为80-100 nm的球形聚集体存在,表面积可达300 m²/g,对药物有很强的负载能力;oxSWNHs可耐受温度为1200-1400 °C,对酸碱耐受性也高于脂质体等其它药物载体;其外表面可以结合多种功能分子实现增溶、靶向、示踪等^[1]。oxSWNHs聚集体能增强渗透贮积效应(EPR),减少药物分子被网状内皮系统的摄取(RES),被动靶向于肿瘤组织和血管并蓄积,而且易被细胞膜通过内吞摄取^[2]。oxSWNHs优点众多,但其易聚集,水溶性差也成为其应用于医药领域时的巨大障碍。

本课题组针对单壁碳纳米角水溶性差的缺点,引入末端氨基化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG-NH₂)对其进行修饰。DSPE-PEG-NH₂为两亲性物质,疏水端DSPE可通过 π - π 作用与纳米角结合,亲水端NH₂可增强碳纳米角的水溶性。DSPE-PEG-NH₂不仅可以增强oxSWNHs的分散性,同时还可以减少网状内皮系统的非特异性摄入,延长血液中循环时间,增强生物相容性,完善oxSWNHs作为新型载药系统的属性。甲氨蝶呤为抗代谢类抗肿瘤药物,属于一类抗癌药,在临床上广泛应用于白血病、成骨肉瘤、头颈部肿瘤、肺癌及乳腺癌等的化学治疗。也正是由于其作用位点多,缺乏细胞选择性,产生一些毒副作用如神经毒性、骨髓抑制、黏膜反应等,使其临床效果大打折扣。

为了弥补这一缺陷,向纳米角载药体系中引入靶向剂转铁蛋白,以实现药物靶向释放。转铁蛋白(transferrin, Tf)是广泛存在于生物体液及细胞中由肝脏合成的一种单链糖蛋白家族。转铁蛋白受体在癌细胞表面高表达,其受体亲和力是正常细胞表面的10—100倍。转铁蛋白已被作为药物靶向剂成功的用于肿瘤的靶向治疗。

本文以单壁碳纳米角为药物载体,装载一线抗肿瘤药物甲氨蝶呤,利用二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG-NH₂)改善载药体系水溶性,增加生物相容性,

延长血液循环时间；引入靶向剂转铁蛋白，增加药物在病灶部位的浓度，减轻药物对正常组织的不良反应。对 oxSWNHs, MTX, MTX@oxSWNH, MTX@oxSWNH-PEG 进行热重分析，结果为每毫克的 oxSWNHs 负载 1.5 毫克的 MTX 及 0.54 毫克 PEG。粒度测试结果显示 MTX@oxSWNH-PEG/Tf 的粒径仅为 $180.6 \pm 0.0481 \text{ nm}$, zeta 电位为 $-16.93 \pm 0.404 \text{ mv}$ 。体外释放实验表明纳米角载药体系在 24 小时内累计释放 30.66%，其后可平稳释放 6 天，累计释放量为 55.66%，与纯药相比有明显的缓释效果。结论 oxSWNHs 能够作为一种潜在的甲氨蝶呤载体达到药物的缓释效果。因此，该载药体系的具有载药量高，水溶性好，生物相容性高，缓释明显等效果。

关键词：单壁碳纳米角；甲氨蝶呤；载药体系；体外释放

基金项目：本课题感谢国家自然科学基金项目(81173023)的资助。

***通讯作者：**钟文英，Email: wenyingshzhongnj@163.com

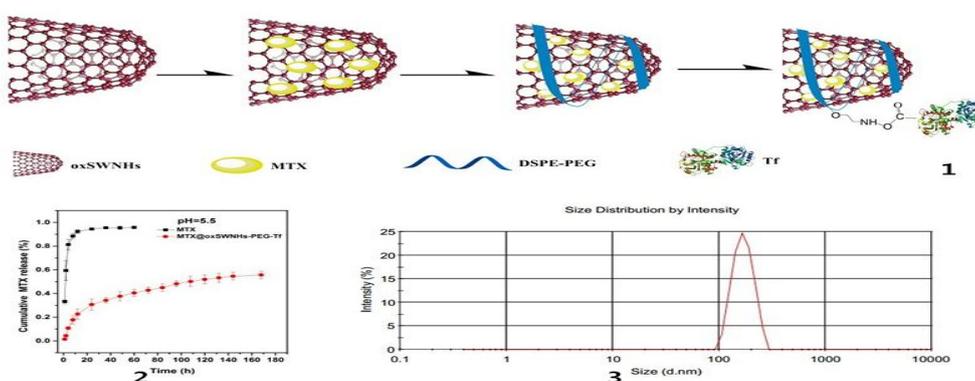


图 1: MTX@oxSWNH-PEG/Tf 载药体系合成过程图

图 2: MTX@oxSWNH-PEG/Tf 载药体系体外释放图

图 3: MTX@oxSWNH-PEG/Tf 载药体系粒径图

基于高灵敏核酸侵入反应和可视化纳米金技术的免疫分析方法

宋沁馨¹, 周国华^{1,2*}

(1. 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 中国药科大学, 南京 210009; 2. 南京军区南京总医院药理科, 南京 210002)

摘要：目的：目前酶联免疫分析方法（ELISA）广泛应用于临床诊断分析，除了传统的辣根过氧化物酶反应检测以外，高灵敏度的 ELISA 大都依赖于荧光检测，需要特殊荧光标记的探针而且检测设备昂贵。Invader 技术最近被提出应用于核酸检测，该方法不仅特异性好、灵敏度高且为恒温反应不需要复杂的温控装置，同时为信号放大体系而非传统的模板扩增体系，不易产生模板污染。纳米金在均匀分布和大量聚集时有显著的颜色差异，利用这一光学特性的可视化检测方法可以弥补 ELISA 这些缺点。

本课题以乙肝病毒 (HBV) 为检测对象, 旨在建立一种基于高灵敏核酸侵入反应和可视化纳米金技术的免疫分析方法。**方法:** 采用包被有抗乙肝表面抗原单克隆抗体的酶标板和生物素标记的抗乙肝表面抗原抗体夹心法捕获乙肝表面抗原 (HbsAg), 然后采用级联核酸侵入反应把抗原蛋白分子的检测转化为核酸信号放大反应, 最后采用纳米金进行可视化检测。分别设计两步核酸侵入反应引物放大信号, 制备两种不同寡核苷酸修饰的纳米金颗粒, 选择引物最优浓度并考察该方法的灵敏度及特异性。采用该方法对乙型肝炎患者和正常人的血清样本进行可视化检测, 并与传统 ELISA 和 HBV 核酸检测结果进行比对。**结果:** 运用该方法检测乙肝表面抗原的灵敏度为 0.024 ng/mL, 在 530 nm 处有最大吸收峰。进一步检测甲肝病毒 (HAV) 和 BSA, 530 nm 处无信号响应, 验证了该方法的特异性良好。共检测临床血清样本 24 例, 其中 HBV 感染患者样本 16 例, 正常样本 8 例, 对所有样本的检测结果均与传统 ELISA 和 HBV 核酸检测的结果一致。**结论:** 该方法特异性强, 灵敏度高, 操作简单, 通过肉眼观察能直接判断检测结果, 在临床疾病诊断中具有良好的应用前景。

关键词: 核酸侵入反应; 核苷酸修饰纳米金; 可视化免疫分析法; HBV 诊断

基金项目: 本论文由江苏省科技支撑计划社会发展项目 (No. BE2012744); 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 项目 (No. BK20151445); 中国博士后科学基金面上资助项目 (No. 2012M512179); 中国博士后科学基金特别资助项目 (No. 2013T60962); 中央高校基本科研业务费重点项目 (No. 2015ZD008); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目 (No. DQCP2015MS02); 江苏省青蓝工程资助。

第一作者: 宋沁馨, E-mail: songqinxin@sina.com

***通讯作者:** 周国华, E-mail: ghzhou@nju.edu.cn

小分子光学探针 R6GM 检测生物巯基及蛋白变性

陈金龙*, 李小娟

(药物质量与安全预警教育部重点实验室, 药物分析教研室, 药学院

中国药科大学, 南京, 210009)

摘要: 合成了一种新型罗丹明 6G 衍生物类小分子探针(R6GM), 研究了 R6GM-Cu²⁺ 预探针荧光和紫外双通道上检测巯基化合物和蛋白质变性。

1. 前言

铜兼有生命体必需微量元素和有潜在毒性的重金属元素双重身份。巯基 (-SH) 是一种化学性质活泼的官能团, 调控生物活性物质蛋白和多肽结, 可以和多种过渡金属离子发生络合^[1], 从而避免过高浓度的重金属离子引起细胞损伤。

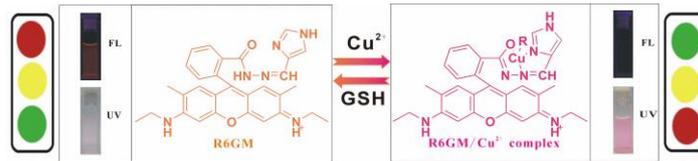


图 1. 在 pH=4.00 条件下, R6GM 探针与 R6GM/Cu²⁺络合物的可逆转化

2. 传感工作原理

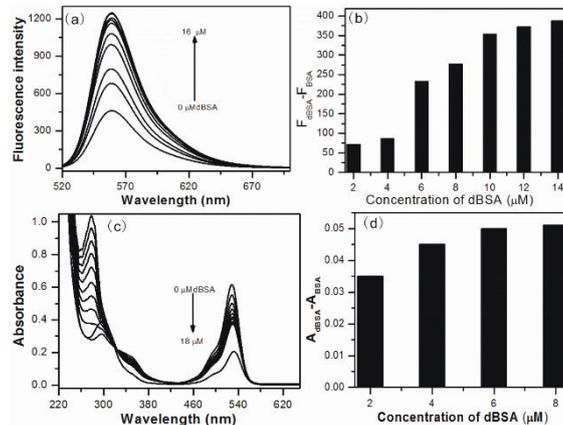


图 2. R6GM/Cu²⁺络合物预探针对 dBSA 定性测定的荧光、紫外响应

3. Cu²⁺-R6GM 预探针对蛋白变性的响应

项目资助: 国家自然科学基金资助项目 (NO. 21305161); 江苏省自然科学基金资助项目 (NO. BK20130643); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (NO. PT2014YX0045)

第一作者: 陈金龙, 男, 理学博士, 副教授, 硕士生导师。

E-mail: chenjl_4@hotmail.com

用于疾病标志物检测的微流控纸基芯片技术研究

慕轩*, 辛晓磊, 郑直

(中国医学科学院/北京协和医学院, 基础医学研究所北京市东城区东单三条 5 号, 100005)

摘要: 微流控纸基芯片技术是近年来微流控技术发展的前沿方向之一。该技术利用纸基代替传统的基质材料, 将纸基经过图案化处理后可以带来很多新颖的分析功能, 对疾病标志物、药物靶点和代谢物等的检测具有显著的技术优势和应用潜力。

关键词: 微流控; 纸基; 疾病标志物; 免疫检测; 丙型肝炎

基金项目: 感谢重大新药专项(2013ZX09507005)、国家自然科学基金(21305162)以及“协和新星”的资助。

*通讯作者: 慕轩, Muxuan2008@gmail.com

精准医疗分析

COX-2 和 HERV-K 基因联合检测在乳腺癌临床诊断中的应用

李小芳, 范雪梅, 王义明, 罗国安*

(清华大学化学系, 北京 100084)

乳腺癌是当今妇女中发病率最高的一种恶性肿瘤, 且逐年增高, 因此早期诊断发现乳腺癌是关键。环氧化酶-2 (COX-2) 和人内源性逆转录病毒 (HERV-K) 两个基因是乳腺癌相关基因, 在乳腺癌组织中高表达。本研究采用实时荧光 PCR (RT-PCR) 检测方法, 探讨 COX-2 和 HERV-K 在外周血单细胞中的表达情况。

研究测定了 70 例乳腺癌和 50 例正常人外周血单核细胞中 COX-2 和 HERV-K mRNA 的表达, 并通过受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC 曲线) 对两个基因用于乳腺癌的检测的特异性和灵敏度进行分析。测定结果表明, 乳腺癌患者外周血单核细胞中 COX-2 和 HERV-K 基因表达显著低于正常人。同时, 分别对 COX-2、HERV-K 及两个基因的组合进行 ROC 曲线分析 (结果见 Fig.1) 发现, 相比单一基因, 两个基因联合应用, 可提高乳腺癌检测的灵敏度和特异性, 最佳工作点 ROC 曲线 (Fig.1 所示) 的线下面积达到 0.922 ($P < 0.001$)。

本研究证实 COX-2 和 HERV-K mRNA 联合检测显著提高乳腺癌的检测准确率, 可作为临床辅助乳腺癌微创、早期诊断和疗效评价的分子生物学指标。

关键词: 乳腺癌; 早期诊断; RT-PCR; COX-2; HERV-K

项目资助: 国家自然科学基金重点项目 (编号: 81130066)

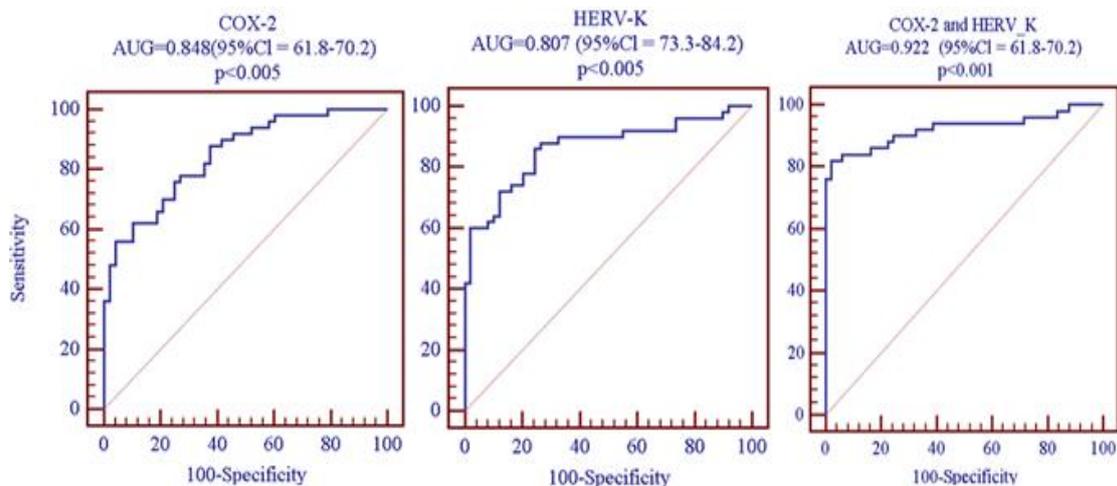


Fig.1 基因诊断 ROC 曲线

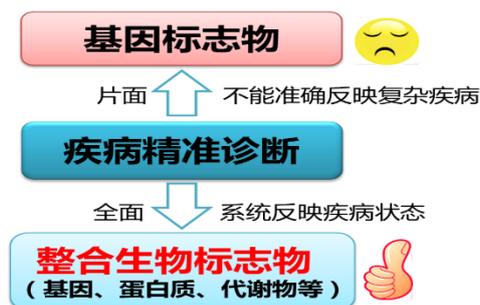
整合生物标志物体系在精准医疗中的应用

王义明, 罗国安

(清华大学化学系, 北京 100084)

精准医疗 (Precision Medicine) 是以个体化医疗为基础、随着基因组测序技术快速进步以及生物信息与大数据科学的交叉应用而发展起来的新型医学概念与医疗模式。精准医学公众的需求, 也是临床发展的要求: 对风险的“精准”预测; 对疾病的“精准”诊断; 对疾病的“精准”分类; 对药物的“精准”应用; 对疗效的“精准”评估; 对预后的“精准”预测。

基因组检测是精准医疗的重要组成部分, 进行基因组检测就不仅有利于人类遗传病找到病因, 也有利于治疗, 如: 遗传性耳聋。基因检测若在临床推广应用, 需解决乳腺问题: 1. 高风险≠一定有问题; 2. 基因变异检测只适用于人类遗传疾病; 3. 目前多数检测服务缺少有效临床证据。某种意义上讲, 精准医学仅仅是个方向, 是实验室成果向临床转化的开始。



针对上述现状, 我们课题组基于多年来对大量临床样本的研究结果, 提出了整合生物标志物体系并将其应用于多种复杂疾病的临床检测和研究。该整合的生物标志物体系包括中医证候指标、临床生化及影像学指标、系统生物学标志物群 (包含基因、蛋白质、代谢物) 多个层面。已经建立的整合生物标志物体系可应用于疾病早期预警、临床诊治、指导个性化用药、疾病预后以及药物评价。已将其应用于乳腺癌、肺癌、心肌梗死、糖尿病及糖尿病肾病等多种临床复杂疾病的机制研究及诊断, 可以显著的提高疾病的检测准确率。特别是在糖尿病肾病的研究中, 基于整合标志物体系研究发现, 肌酐结合肾小球滤过率估算值 eGFR 指标可以进行糖尿病肾病早期诊断 (1 期和 2 期)。

整合标志物体系可作为临床辅助疾病诊断和疗效评价的分子生物学指标, 为个体化诊疗提供了一种可行的技术手段, 助力精准医疗的实现。

项目资助: 973 计划课题 (编号: 2005CB523503; 2010CB530603)

国家自然科学基金重点项目 (编号: 81130066; 81230079)

***Aspergillus niger* 基因启动子结构对糖苷酶表达顺序的影响**

邢晟¹, 石峰¹, 巩丽萍¹, 郭常川¹, 王禄山², 陈冠军²

(1. 山东省食品药品检验研究院; 2. 山东大学微生物技术国家重点实验室)

在对 *Aspergillus niger* 的相关基因进行 ORFs 上游 1000bp 启动子序列分析后, 发现包括 XlnR, CreA 在内的多种转录调控因子的转录调控因子结合位点 (Transcription factor binding site, TFBS) 在不同基因中具有不同的分布特点及数量。为此我们对已经测序的 *A.niger* CBS 513.88 中的部分糖苷水解酶基因的启动子中的 TFBS 分布数量进行统计分析, 发现同工酶不同组分的编码基因的启动子具有完全不同的 TFBS 的种类与分布, 因此可以认为正是这种特异和个性化的 TFBS 分布为酶系的表达调控提供了转录水平上的物质基础。结合分批培养实验结果, 通过实验拟合并推导形成了可以反映糖苷水解酶系表达调控及底物敏感度差异的方程, 方程中的参数可以较好地描述及体现不同糖苷水解酶表达调控的差异。在经过简化假设后, 形成了以葡萄糖和木糖为胞外信号分子的信号输入输出模型。由于真核生物的启动子区含有大量调控序列及不同数目的 TFBS, 因此导致不同酶的表达具有一定时序性。不同种类及聚合度的诱导物分子激活相应的调控因子并通过影响调控因子与启动子中特异的 TFBS 的结合影响了基因的转录。由于不同 TFBS 在不同基因中存在数量差异, 当负调因子被激活的数目大于正调因子时基因的转录被阻遏, 反之则表现为转录, 因此, 诱导物的浓度是影响调控因子有效性的主要因素。

关键词: *Aspergillus niger*; ORFs; Transcription factor binding site;

Glycoside hydrolase

代谢酶基因多态性对塞来昔布及其代谢物在中国人体内药动学特征影响的探讨

刘瑞娟¹, 龚楚婷¹, 马鹏程², 丁黎¹

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 2. 中国医学科学院皮肤病研究所)

摘要: 塞来昔布是一种选择性环氧化酶-2 (COX-2) 的抑制剂, 主要用于治疗风湿病和骨关节炎。本研究是在塞来昔布人体生物等效性研究的基础上, 评价代谢酶 *CYP2C9*, *CYP2D6* 和 *CYP3A4* 基因多态性对塞来昔布及其两个主要代谢物 (羟基化

塞来昔布和羧酸化塞来昔布)在健康中国人体内的药动学特征的影响,为塞来昔布这一高变异药物在中国人体内的安全应用提供参考依据。试验采用单剂量、开放、两周期、双交叉自身对照试验设计方法,将 52 名中国健康受试者随机分为两组,随机交叉口服 200 mg 塞来昔布胶囊受试制剂和参比制剂,两周期间清洗期为一周。整个试验过程对其安全性和耐受性进行了监测,没有严重不良反应事件的发生。采用聚合酶链反应(PCR)对受试者进行 *CYP2C9*3*, *CYP2C9*13*, *CYP2D6*10* 和 *CYP3A4*18* 基因检测分型。因所有受试者都不携带突变的 *CYP3A4*18* 和 *CYP2C9*13* 等位基因,故本试验探讨了 *CYP2C9*3* 和 *CYP2D6*10* 等位基因对塞来昔布及其代谢物在人体内的药动学特征的影响。与 *CYP2C9*1/*1* 基因型组相比, *CYP2C9*1/*3* 基因型组塞来昔布血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-48} 和峰浓度 C_{max} , 分别增加了 90.6% 和 45.8%, 即原形药物血浆暴露量增加了约一倍;塞来昔布的消除半衰期 $t_{1/2}$ 增加了 21.8%, 表观机体总清除率 CL/F 减小了 51.1%, 即原形药物代谢消除速率减小了一半。*CYP2C9*1/*3* 基因型组羟基化塞来昔布血浆暴露量和 *CYP2C9*1/*1* 基因型组基本相同。与 *CYP2C9*1/*1* 基因型组不同的是, *CYP2C9*1/*3* 基因型组羟基化塞来昔布的 $t_{1/2}$ 延长了 42.1%, 表明 *CYP2C9*1/*3* 基因型组羟基化塞来昔布代谢消除比 *CYP2C9*1/*1* 基因型组慢。与 *CYP2C9*1/*1* 基因型组相比, *CYP2C9*1/*3* 基因型组羧酸化塞来昔布 AUC_{0-48} 增加了 25.2%, $t_{1/2}$ 延长了 16.1%, CL/F 减小了 21.2%。*CYP2C9*3* 基因减弱了 *CYP2C9* 活性,从而使塞来昔布代谢减弱,导致个体间差异。*CYP2D6*10* 杂合子、纯合子携带者和无 *CYP2D6*10* 受试者的塞来昔布及其代谢物药动学无显著差异, *CYP2D6*10* 对健康人体内塞来昔布的代谢几乎无影响。

关键词: 塞来昔布; 基因多态性; 药动学; 中国健康受试者

基质金属蛋白酶敏感响应的乳腺癌早期诊断探针的研究

丁娅*, 陈玉峰, 吴冬燕

(药物质量与安全预警教育部重点实验室, 中国药科大学, 南京 210009)

摘要: 乳腺癌 (breast cancer, breast carcinoma) 是一种严重影响女性身心健康甚至危及生命的恶性肿瘤, 已成为当前社会的重大健康问题之一。虽然乳腺并不是维持人体生命活动的重要器官, 原位乳腺癌不致命, 但由于乳腺细胞连接松散, 癌细胞很容易脱落游离, 随血液或淋巴液等播散全身, 形成早期的远端转移, 给乳腺癌的临床治愈

增加了很大困难。目前，临床上用于乳腺癌早期检查的方法和乳腺癌分期的界定都存在一定缺陷。因此，针对乳腺癌部位的特异性生物标记物设计、构建的癌症早期诊断分子是当前研究的一个热点。我们在已有研究基础上，设计和构建一类“具有荧光复燃性质”的纳米荧光开关。在金纳米粒子（GNPs）表面同时修饰乳腺癌细胞靶向适配体和标记有荧光分子的基质金属蛋白酶敏感小肽，利用适配体对人类表皮生长因子受体的特异性识别将粒子系统准确靶向至乳腺癌部位；通过 GNPs 对有机荧光分子的荧光能量转移作用，构建荧光熄灭的诊断探针；通过基质金属蛋白酶在乳腺癌不同分级的表达水平不同以及基质金属蛋白酶对小肽的酶切作用，测定荧光信号恢复的强度，从而实现了对肿瘤进行早期诊断和分期研究。

关键词：金纳米粒子；基质金属蛋白酶；荧光复燃；乳腺癌；纳米探针

高灵敏核酸侵入信号放大反应定量检测 EGFR 用药相关突变位点

项铮¹，宋沁馨^{1*}，周国华^{1, 2}

(1. 药物质量与安全预警教育部重点实验室，中国药科大学，南京 210009；

2. 南京军区南京总医院药理科，南京 210002)

摘要：目的：肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一，其中 80% 为非小细胞肺癌（NSCLC）。研究表明，对 NSCLC 患者 EGFR 基因突变位点的检测可用于指导靶向药物的使用及检测耐药反应的产生，对临床用药具有重要意义。由于存在大量的野生型背景作为干扰，对突变点的定性及定量检测都具有一定难度。目前常用的 EGFR 突变位点的检测方法包括 ARMS-PCR 方法、PCR-RFLP 分析、PNA-LNA PCR 方法等，但这些方法具有灵敏度偏低、无法对突变含量进行定量、实验条件复杂等缺点。其他高灵敏的检测方法如数字化 PCR 或大规模测序技术等又因其检测成本过高而无法广泛应用于临床。基于此，本课题建立了实时荧光 PCR 偶联核酸侵入信号放大反应定量检测 EGFR 突变位点的方法，该方法具有灵敏度高、价格低廉、操作简便、不易污染等优点，在临床基因突变检测指导用药及监测耐药突变并调整治疗策略等方面有很好的应用前景。**方法：**将实时荧光 PCR 扩增与连续核酸侵入信号放大反应相结合，利用 flap 核酸内切酶识别并切割三碱基重叠结构的原理，采用通用荧光共振转移发卡探针（FRET probe），将检测信号进行连续放大，并对荧光信号进行实时读取。通过对野生型和突变型检测模板设计不同的下游探针及相应的 FRET 荧光

探针,检测每个 PCR 循环中的荧光信号实现对野生型和突变型核酸序列的实时检测。利用两种模板循环数差值与突变含量的负对数呈线性关系对突变含量进行定量。根据检测位点分别设计了相应的引物和探针,选择引物、探针及酶的最优浓度,并考察了该方法的灵敏度、特异性、突变定量检测限及线性范围、定量检测精密度和准确性。

结果:利用该方法对 EGFR L858R 活性突变位点和 EGFR T790M 耐药突变位点进行了检测,两个位点对野生型和突变型分别检测的灵敏度均为 10 拷贝/管反应,对含有 L858R 突变的混合模板的检测灵敏度为 0.1%,对含有 T790M 突变的混合模板的检测灵敏度为 1%,检测含有不同突变比例的模拟样本,其定量准确性较好。

结论:该方法可对突变位点进行准确地定量检测,且具有灵敏度高、闭管反应不易污染、成本低廉等优点,在临床疾病诊断中具有良好的应用前景。

关键词:连续核酸侵入信号放大反应; EGFR 突变检测; 非小细胞肺癌

基金项目:本论文由江苏省科技支撑计划社会发展项目(No. BE2012744); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(No. BK20151445); 中国博士后科学基金面上资助项目(No. 2012M512179); 中国博士后科学基金特别资助项目(No. 2013T60962); 中央高校基本科研业务费重点项目(No. 2015ZD008); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目(No. DQCP2015MS02); 江苏省青蓝工程资助。

第一作者:项铮, E-mail:15261483434 @163.com

***通讯作者:**宋沁馨, E-mail: songqinxin@sina.com

大鼠对内毒素敏感性个体差异的代谢组学研究

代蝶, 田媛, 郭慧敏, 张培, 许风国*, 张尊建*

(中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要:内毒素(LPS)在临床上可诱发脓毒症、急性肺损伤等多种致死性感染性疾病,越来越多的证据表明机体对于 LPS 的反应存在明显的个体差异,我们前期运用基于 LC-MS 和 GC-MS 联用技术的药物代谢组学的方法证明大鼠对内毒素敏感性的差异主要与机体脂类代谢,尤其是鞘脂代谢的基础代谢水平有关。本文在此基础上,进一步研究不同敏感型的大鼠在给内毒素之后体内代谢水平的差异。文献报道,大鼠对内毒素的反应存在很明显的阶段特性,即急性渗出期(2h),炎症期(6~12h)和恢复期

(24~72h)。在给内毒素之后,在基础水平就有差异的脂类的水平在给 LPS 后这种差异仍然存在,其中鞘氨醇和二氢鞘氨醇在给 LPS 12h 后急剧增高,进一步证明鞘脂代谢在大鼠对内毒素敏感性差异上的重要作用。另外,在给内毒素 2h 后(急性渗出期),存活组与死亡组大鼠体内所有种类的氨基酸的水平全降低,与文献报道一致,推测是用于合成急性期反应蛋白。其中存活的大鼠在 2~12h 维持在较低水平,而死亡的大鼠在 2h 后体内氨基酸水平开始升高。而在 6~12h(炎症期,损伤最严重的时期),存活组与死亡组大鼠体内尿素、胆汁酸水平均增高,而蛋氨酸水平均降低,另外,在死亡组大鼠中与能量代谢有关的代谢物葡萄糖、柠檬酸和与氧化应激有关的代谢物吲哚酚硫酸盐急剧增高。提示死亡可能与能量代谢、氧化应激代谢的异常有关。本文的结果对大鼠对内毒素敏感性的差异的机制研究提供一定的参考。

关键词: 内毒素; 个体差异; 代谢组学

基于固定化酶的 I 型 17 β 羟类固醇脱氢酶抑制剂体外筛选模型的建立

柏印^{1,2}, 周雯迪^{1,2,#}, 穆先敏³, 苏梦翔^{1,2}, 狄斌^{1,2}

(1.中国药科大学药学院, 江苏南京 210009; 2.药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏南京 210009; 3. 南京医科大学第二附属医院)

摘要: 目前,乳腺癌严重威胁着女性的身体健康,影响着女性的正常生活。乳腺癌的发生与雌激素水平直接相关,控制雌激素的水平成为预防、治疗乳腺癌发生的有效方法之一。17 β -HSD1 是 17 β -HSDs 家族中最早发现以及研究最深入的酶,其催化雌酮 (estrone, E1) 的活性很高,是雌激素依赖性乳腺癌治疗的重要靶点。17 β -HSD1 最早由 Langer 和 Engel 从胎盘组织中分离并纯化。其最重要的作用是雌雄激素的转化,它能分别催化低活性的雌酮 (Estrone, E1) 和雄烯二酮 (Androstenedione, AD) 转化为相应更高活性的雌二醇 (Estradiol, E2) 和睾酮 (Testosterone, T)。针对其活性位点,现今已经筛选出了多种具有抑制作用的化合物。国内外新药开发对 17 β -HSD1 抑制剂的高通量筛选需求方兴未艾。游离酶不稳定、易失活、价格昂贵并且难以重复利用。为了克服这些缺点,固定化酶 (immobilized enzyme, IE) 的方法为药物高通量筛选带来了新的曙光。与游离酶相比,它具有易与底物、产物分离,可较长时间重复利用,提高酶的稳定性以及增加催化效率等优势。到目前为止,未见国内外报道 17 β -HSD1 的固定化研究。本研究以胎盘微粒体作为酶源,用于 I 型 17 β 羟类固醇脱氢酶

(17 Beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1, 17 β -HSD1) 在硅球表面的固定化, 建立快速、有效地酶抑制剂筛选模型, 用于雌激素依赖性乳腺癌潜在治疗药物的高通量筛选。

应用差速离心法从胎盘中提取得到微粒体作为 17 β -HSD1 的来源, 用 Bradford 法测得蛋白浓度为 4.67mg/ml。选用最为常见的 5 μ m 实心硅胶微球作为载体, 通过氨基化试剂氨基修饰后, 用戊二醛作为交联剂, 使载体表面的醛基与酶分子中的氨基进行席夫碱反应, 进而使酶固定在硅球上。通过比较实心硅球, 表面功能化修饰硅球和固定化酶的红外光谱图, 以及用扫描电镜观察氨基化修饰硅球和固定化酶硅球的形貌来表征固定化酶确证固定化的成功。以 AD 作为底物, 通过体外温孵反应并作空白对照实验, 通过是否产生 T 来鉴定固定化酶有无活性。反应体系中含有 5mg 固定化酶, 10 μ L PBS 缓冲液 (PH8.0), 150 μ L 雄烯二酮工作液 (35 μ M, PH8.0) 以及 20 μ L 的 NADPH 水溶液 (25mg/ml) (空白不加 NADPH, 改用 PBS 缓冲液), 37 $^{\circ}$ C 下温孵 10h, 离心, 上清液分别加入 50 μ L 乙腈, 涡旋, 离心 (12000rpm \times 5min), 沉淀蛋白, 取上清液 20 μ L 注入高效液相色谱系统分析。以 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 \times 150 mm i.d., 5 μ m) 为色谱柱, 以乙腈: 水 = 60 : 40 (含 0.1 % 甲酸) 为流动相, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 240nm, 图谱记录时间为 8min, 流速为 1ml/min。通过色谱图上出现睾酮峰位鉴定了固定化酶的活性。固定化酶室温下在 4 天内可以保持较高的活性, 在第四天相对保留酶活在 40% 左右, 但是游离酶在放置一天后, 酶活大幅度下降, 到第四天相对保留酶活降到不足 10%, 说明酶的固定化加强了游离酶的稳定性的。在重复利用三次后, 固定化酶的酶活仍然可保留 50%, 到第五次下降至 15%, 因此, 该固定化酶可至多重复使用 4 次。不同浓度的芹菜素溶液 (50nM-2 μ M) 用来对 17 β -HSD1 抑制剂筛选模型进行可行性验证。得出芹菜素的 IC₅₀ 值为 291nM, 符合文献中所报道的小于 300nM 的讨论, 因此, 证明该筛选模型具有实用性。

本研究紧紧抓住目前新药开发的热门领域-乳腺癌药物的研发需求。制备固定化 17 β -HSD1, 使该酶在稳定性和耐用性上均优于新鲜制备的游离酶。固定化酶的研发成功, 可以解决目前筛选模型中存在的酶来源获取不易, 且不稳定易失活, 检测手段具有放射性等问题。将固定化的 17 β -HSD1 与高特异性、高灵敏度的 HPLC 技术联用, 快速检测酶促反应的底物和产物的浓度变化, 从而可以从大量的药物前体分子库中高通量筛选出对 17 β -HSD1 的活性有抑制作用的药物分子, 为新药开发提供有力的工具。

关键词: I 型 17 β 羟类固醇脱氢酶 (17 β -HSD1); 固定化酶; 体外温孵反应; 抑制剂筛选; 高效液相色谱法

项目资助：江苏省自然科学基金（编号：BK20130654）；中国药科大学中央高校基本科研业务费专项资金（编号：JKQZ2013028）

作者简介：柏印，男，硕士 研究方向：药物分析

Email:baiyin125372@hotmail.com

周雯迪，女，硕士 研究方向：药物分析

Email:wendymusicgirl@126.com；#共同第一作者

通讯作者：苏梦翔，男，博士，讲师，研究方向：药物分析新材料

Tel:025-83271350 ； Email:sumengxiang@cpu.edu.cn