

注射用益气复脉（冻干）的质量标志物研究

李德坤^{1,2}, 苏小琴^{1,2}, 李智^{1,2}, 李莉^{1,2}, 万梅绪^{1,2}, 周学谦^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}, 张铁军^{3*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 注射用益气复脉（冻干）是由红参、麦冬和五味子3味药材精制而成，临床上主要用于治疗冠心病劳累型心绞痛气阴两虚证及冠心病所致慢性左心功能不全 II、III 级气阴两虚证。根据质量标志物概念，从物质基础、药效、网络药理、药动学及药性等对注射用益气复脉（冻干）质量标志物进行预测分析，初步确定人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖、五味子醇甲 13 个成分为质量标志物，并以此为核心建立全程质量控制体系。基于质量标志物对注射用益气复脉（冻干）进行质控方法研究，可以为中药注射剂质量评价提供新的研究思路。

关键词: 注射用益气复脉（冻干）；质量标志物；质量控制；药性；人参皂苷 Rb₁；人参皂苷 Rg₁；人参皂苷 Rf；人参皂苷 Rh₁；人参皂苷 Rc；人参皂苷 Rb₂；人参皂苷 Ro；人参皂苷 Rg₃；麦冬皂苷 C；麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷；偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷；果糖；五味子醇甲

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)02-0290-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.004

Study on quality marker of Yiqi Fumai Lyophilized Injection

LI De-kun^{1,2}, SU Xiao-qin^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, LI Li^{1,2}, WAN Mei-xu^{1,2}, ZHOU Xue-qian^{1,2}, JU Ai-chun^{1,2}, ZHANG Tie-jun³

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Yiqi Fumai Lyophilized Injection is a modern preparation composed of *Panax ginseng*, *Ophiopogon japonicas*, and *Schisandra chinensis*. Clinically, it is mainly used for the treatment of cardiovascular diseases such as angina pectoris of coronary heart disease and chronic cardiac insufficiency. According to the concept of quality markers (Q-markers), the Q-markers of Yiqi Fumai Lyophilized Injection were predicted and analyzed from the aspects of chemical components, drug effect, network pharmacology, pharmacokinetics, and drug property. Based on the above studies, 13 components of ginsenosides Rb₁, Rg₁, Rf, Rh₁, Rc, Rb₂, Ro, Rg₃, ophiopogonin C, phiogenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, pennogenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside, fructose, and schisandrin A were identified as Q-markers. According to the Q-markers, we established quality system for process control. The study of Yiqi Fumai Lyophilized Injection based on Q-markers can provide new research ideas for quality assessment of traditional Chinese materia medica injection.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; quality marker (Q-marker); quality control; drug property; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rf; ginsenoside Rh₁; ginsenoside Rc; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Ro; ginsenoside Rg₃; ophiopogonin C; phiogenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside; pennogenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside; fructose; schisandrin A

收稿日期: 2018-12-11

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设 (17PTSJYC00090)

作者简介: 李德坤 (1973—), 男, 工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)26736712 E-mail: lidekun@tasly.com

*通信作者 鞠爱春, 高级工程师。E-mail: juach@tasly.com

张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tjpr.com

鉴于品种、栽培、采收、炮制、运输及储存等方面的影响,中药产品的质量存在一定差异,因此,中药质量控制对保障其临床使用的有效性及安全性具有重要意义。为探索中药质量控制新模式,刘昌孝院士提出“中药质量标志物(Q-marker)”的新概念^[1-3],并对 Q-marker 的定义进行了限定。中药 Q-marker 是指存在于中药材和中药产品(饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂等)中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质,作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制。在 Q-marker 概念提出以后,国内学者对中药复方制剂进行了相关研究,如元胡止痛滴丸、注射用丹参多酚酸、丹红注射液、双黄连制剂等,为质量标志物的研究提供了一些具体方法^[4-8]。

注射用益气复脉(冻干)(Yiqi Fumai Lyophilized Injection, YQFM)是由红参、麦冬及五味子组成,利用现代工艺精制而成的中药制剂,其功效为益气复脉、养阴生津,临床上主要用于治疗冠心病劳累型心绞痛及慢性心功能不全等心血管系统疾病。本文以 YQFM 为对象,进行质量标志物的探索分析。从物质基础、药效、网络药理、药动学及药性等方面对 YQFM 质量标志物进行预测分析,确定人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖、五味子醇甲 13 个成分为质量标志物,并据此建立 YQFM 全程质量控制体系。期望为研究中中药注射剂质量控制模式提供有益参考。

1 YQFM 化学物质基础研究

本研究团队对 YQFM 中所含的化学物质基础进行了系统的研究,已确定 YQFM 所含的化学成分包括皂苷类、糖类、木脂素类及其他类成分。采用 UFLC-IT-TOF/MS 方法对 YQFM 所含非糖类物质进行分析,包括人参皂苷类、木脂素类、麦冬皂苷类、高异黄酮类及其他类成分。通过与对照品和文献比对及碎片裂解规律推导分析,最终鉴定出 YQFM 中非糖类成分 65 个,其中 42 个成分来自红参,16 个成分来自五味子,7 个成分来自麦冬药材,并对其中 21 个化合物进行了定量分析^[9]。进一步采用 UPLC-Q-TOF/MS 方法对 YQFM 进行化学成分全解析,共鉴定出 145 个化合物,除了常规的皂苷、木

脂素及黄酮类物质,对其中 15 个糖类、38 种有机酸类及 22 个甾醇、多肽和脂类进行了分析,使其物质基础更加丰富^[10]。此外,还将强阳离子交换色谱柱(SCX)与蒸发光散射检测器(ELSD)结合,采用 HPLC-ELSD 方法对 YQFM 中钠元素进行了定量分析^[11]。

上述研究表明 YQFM 化学成分丰富,基本代表了其化学物质基础,目前在 YQFM 总固体中,结构明确的成分已达到不低于 60% 的要求,满足原国家食品药品监督管理局印发的《中药、天然药物注射剂基本技术要求》中“注射剂中所含成分应基本清楚”的规定。

2 基于有效性的 YQFM 的 Q-marker 发现研究

2.1 基于药效的 Q-marker 研究

YQFM 的药效作用主要是对心血管系统的作用,包括抗心衰、改善心肌功能、抗心肌缺血/缺氧损伤。心肌缺血再灌注损伤发病机制复杂,涉及能量代谢、氧化应激、炎症反应等多个病理环节,而 YQFM 能够增强心脏收缩功能、延缓心室重构,对缺血、缺氧造成的心肌损伤有较好的保护作用,其作用机制包括抗炎、抗氧化、改善相关的能量代谢、抑制心肌细胞凋亡、减少心肌组织胶原沉积和纤维化等,与此密切相关的信号通路主要有核转录因子- κ B(NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等。

2.1.1 药效学研究 中药复方具有通过多途径、多环节和多靶点发挥作用的特点,基于转化医学的研究模式,从临床疗效出发,采用模拟气阴两虚证心血管疾病整体动物模型(冠状动脉结扎诱导的心肌缺氧缺血、急性心肌缺血、慢性间歇性缺氧动物模型)及细胞模型,来验证 YQFM 功效和探索其作用机制。

(1) 抗心衰作用:采用结扎大鼠冠状动脉左前降支建立慢性心衰模型,考察 YQFM 对心脏保护、抗炎机制及活性成分。结果显示, YQFM 可以显著改善大鼠心脏功能,减少心电图 ST 段的明显下降,增加心率,降低脑利钠肽(BNP)水平,明显抑制血清及心肌组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 等炎症因子的释放。研究还发现 YQFM 中人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro 和 Rg₃ 具有抗炎作用,其中人参皂苷 Ro 是 NF- κ B 抑制剂。NF- κ B 信号通路及细胞因子

的抑制可能是 YQFM 改善慢性心衰大鼠的主要作用机制之一,而这些人参皂苷在治疗慢性心衰中起到很重要的作用^[12]。

采用结扎小鼠冠状动脉建立心肌重塑及心衰模型,考察 YQFM 的作用效果。结果显示, YQFM 可改善心衰小鼠的左心结构和功能,降低血清中的乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)、III 型前胶原 N-末端肽(PIIINP)、N 末端 B 型利钠肽原(NT-proBNP)及羟脯氨酸(HYP)的含量,减轻心肌组织的损伤、胶原沉积和纤维化。通过对相关信号通路的研究推测这可能与抑制 MAPKs 通路的磷酸化有关,说明 YQFM 可能通过调节 MAPKs 信号通路减轻冠状动脉结扎引起的心肌重塑和心衰^[13]。

结合以上研究推测 YQFM 中人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro 和 Rg₃ 可能为其抗心衰的药效成分。

(2) 心肌缺血/缺氧保护作用:采用异丙肾上腺素建立小鼠心肌缺血损伤模型,考察 YQFM 对心肌缺血损伤的保护作用及其活性成分。结果显示,与模型组相比, YQFM 能够显著降低心肌缺血损伤小鼠血清中 LDH、CK、MDA 及髓过氧化物酶(MPO)水平,增强 SOD 活力,改善心肌组织病理损伤状况。并发现 25 个人参皂苷和 3 个木脂素类物质可能是 YQFM 对心肌损伤起保护作用的活性成分^[14]。

采用人脐静脉内皮细胞(HUVECs)模型及 Q-TOF-MS/MS 法从 YQFM 中筛选出 8 个人参皂苷及五味子醇甲作为候选成分,研究发现五味子醇甲浓度在 10~100 mmol/L 时,能够减轻 HUVECs 的缺氧/复氧损伤,增加细胞活力和 NO 水平,降低 LDH、MDA 水平及环氧合酶(ROS)的生成。认为五味子醇甲有较好的血管内皮保护作用^[15]。结合以上推测人参皂苷类和木脂素类可能为 YQFM 对心肌缺血起保护作用的药效成分。

(3) 心肌缺氧-复氧保护作用:建立小鼠的慢性间歇性心肌缺氧损伤模型考察 YQFM 的抗缺氧性心肌损伤作用。结果显示,与模型组比较, YQFM 可以明显减轻低氧环境所致心脏组织内皮细胞的肿胀、空泡化,增加心脏收缩功能,此外, YQFM 可以抑制 CK、LDH 活性,降低 MDA 水平,改善 SOD 活性。说明 YQFM 可以明显提高心肌缺氧耐受性,抗心肌损伤^[16]。本研究团队进一步研究了 YQFM 对慢性间歇性缺氧小鼠心脏能量代谢的改善作用,发

现 YQFM 通过促进糖酵解限速酶果糖-6-磷酸激酶(6-PFK)和 M2 型丙酮酸激酶(PKM2)蛋白的表达,促进丙酮酸生成,为氧化磷酸化提供充足的底物,抑制酮酸脱氢酶激酶 4(PDK4)的蛋白水平,进一步促进糖代谢的氧化磷酸化过程,提高 ATP 酶活力,从而促进 ATP 的合成与利用,最终对受损心肌起到调节能量代谢的作用。采用慢性间歇性缺氧小鼠模型和大鼠 H9c2 细胞缺氧-复氧模型分别对麦冬的抗缺氧作用及能量代谢调节作用进行研究,发现麦冬能较好地保护心脏抵抗缺氧-复氧损伤,麦冬提取物的水部位(糖类)与醇部位(皂苷类)均能提高细胞活力、降低细胞 LDH 泄漏和改善细胞形态等,以及均能提高心脏收缩功能、降低 CK 泄漏、提高 SOD 活力等,说明麦冬中糖类与皂苷类成分皆能保护心肌细胞。麦冬水溶性部位能够调节葡萄糖转运蛋白 5(Glut5)的蛋白水平,2 个部位皆对 6-PFK、PKM2 和 PDK4 等关键能量代谢酶的蛋白水平有调节作用。进一步选择麦冬中含量较高的果糖及通过细胞膜色谱技术筛选的 3 个麦冬皂苷作为潜在活性成分进行缺氧-复氧模型的药效研究。采用大鼠 H9c2 细胞缺氧-复氧模型对其进行研究,发现果糖主要调节 6-PFK 和 PKM2 的蛋白水平,从而促进丙酮酸的生成,也能调节果糖转运体,促进细胞对底物果糖的利用,提高代谢效率。麦冬皂苷 C、麦冬皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷能显著提高细胞活力、降低 LDH 泄漏。3 个麦冬皂苷均具有对能量代谢限速酶 6-PFK、PKM2、PDK4 的蛋白水平的调节作用,进而提高丙酮酸含量。上述结果表明 YQFM 中的麦冬通过糖类与皂苷类成分共同调节心脏能量代谢限速酶蛋白及糖转运体蛋白的表达,从而促进多个底物利用的环节而发挥改善能量代谢的作用,其中果糖及 3 个麦冬皂苷可能为活性成分。

(4) 脑缺血再灌注及脑缺氧、缺糖保护作用:建立 C57BL/6J 小鼠脑缺血再灌注模型,考察 YQFM 对其血脑屏障功能的影响。发现小鼠脑缺血 1 h 再灌注 24 h 后, YQFM 能够显著减少脑组织梗死体积,减少脑水肿,增加血流量,改善脑部代谢和组织病变,同时,伊文思蓝渗出实验表明, YQFM 是通过上调脑部紧密连接蛋白表达,降低血脑屏障通透性从而发挥脑保护作用的。此外, YQFM 能够明

显抑制与内质网应激相关的蛋白表达和信号通路，其抗脑缺血机制可能与调节内质网应激介导的神经细胞凋亡有关。利用微血管内皮细胞氧糖剥夺实验模拟脑部血氧供应障碍的研究发现，YQFM 可以明显增加内皮细胞活力，增加紧密连接蛋白表达，减少伊文思蓝的渗出，通过调节 NF-κB/p65 和 ROCK1/MLC 信号通路改善脑缺氧、缺糖导致的脑微血管内皮细胞功能障碍^[17-19]。

2.1.2 网络药理学研究 网络药理学为阐明中药复方制剂多靶点作用机制及其相应的药效物质基础提供了一种研究手段。利用网络药理学的方法对 YQFM 治疗心脑血管缺血性疾病潜在的药物靶点进行研究，基于前期研究结果，选定 YQFM 中 28 个人参皂苷和木脂素类化合物，结果表明，这些物质

用于心脑血管缺血性疾病相关的通路有 12 条，包括 NF-κB、MAPK 和 mTOR 等信号通路，为后续深入的机制研究指明了方向。同时，表明人参皂苷 Rg₃、Rb₁、Rg₁ 和五味子醇甲是 YQFM 中最为重要的治疗心脑血管缺血性疾病的药效物质^[20]。

后期又选定 20(S)-原人参三醇、齐墩果酸、2'-羟基异麦冬黄酮 A、麦冬黄酮 B、麦冬皂苷元、五味子甲素、五味子乙素 7 个化合物母核，采用 DRAR-CPI 服务器、KEGG 数据库及 Cytoscape 3.6.0 软件，进行靶点及信号通路预测。结果表明，这些物质对应作用靶点有 127 个，相关通路有 40 条，其主要是通过保护心血管、抑制炎症、调节免疫功能及干预糖脂代谢等途径发挥治疗作用，体现了 YQFM 治疗心血管疾病多靶点作用机制^[21]（图 1）。

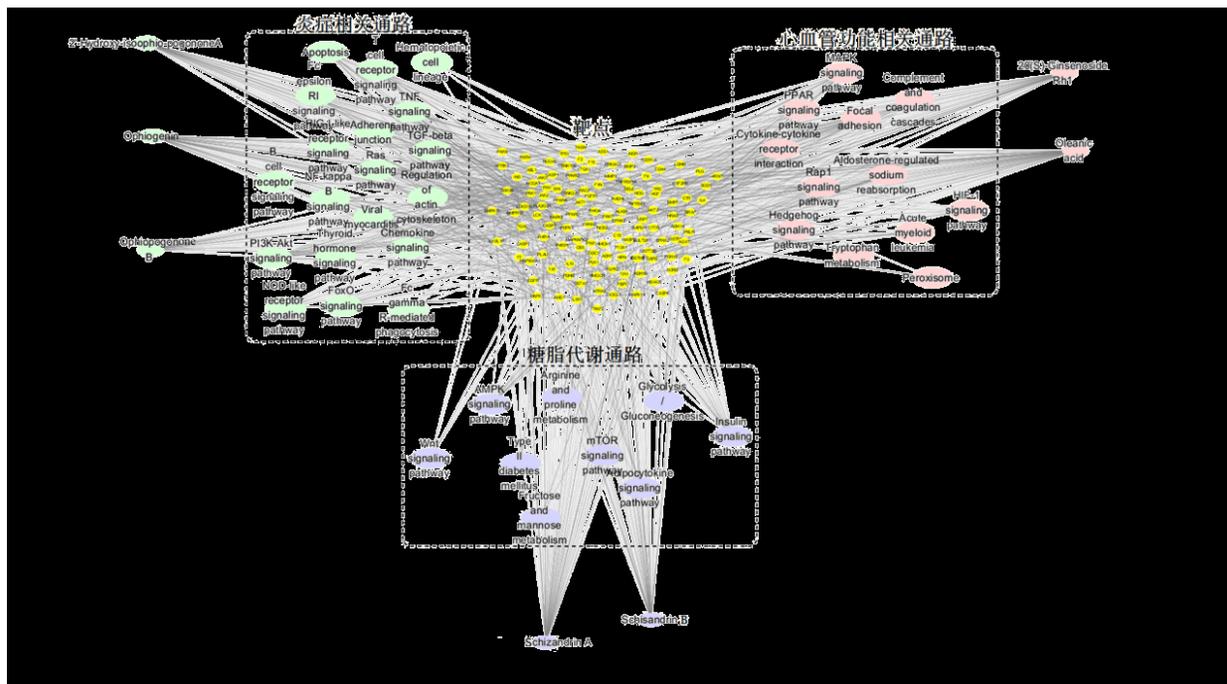


图 1 YQFM “化合物-靶点-通路”的调控网络

Fig. 1 Network of “compound-target-pathway” of YQFM

2.1.3 药动学研究 建立超高效液相色谱-质谱联用法，测定正常和慢性心力衰竭模型大鼠体内血浆中人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Rc、Rd、Re、Rf、Rg₃、Rh₁、Rb₂ 和 Rb₃ 10 个人参皂苷类成分，测定不同时间点各人参皂苷的血药浓度，绘制药-时曲线，计算药动学参数。实验结果表明 iv YQFM 后，各皂苷成分在对照组和慢性心力衰竭模型组大鼠体内的主要药动学参数半衰期 ($t_{1/2}$)、药-时曲线下面积 (AUC_{0-t})、 $AUC_{0-\infty}$ 、消除率 (CL) 等均没有显著性差异。说

明在慢性心力衰竭状态下，机体对 YQFM 中皂苷成分的代谢无明显影响。同时结果表明，在慢性心力衰竭大鼠血浆内，这 10 个人参皂苷具有较高的暴露量及较慢的消除 [$t_{1/2} = (24.70 \pm 3.61) h$]，该结果也更符合其药理作用^[22-23]。

通过整体动物、细胞水平、网络药理学、药动学等角度的实验结果发现，YQFM 中的成分可作用于多个靶点及多条通路，从而发挥治疗心血管疾病的功效。其中，人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、

Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃木糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖苷、果糖及五味子醇甲 13 个成分为主要药效物质基础，可以作为 YQFM 的 Q-marker。

2.2 基于药性的 Q-marker 研究

“药性”是中药功能属性，基于仿生学原理设计的电子舌 (astree) 对味的客观描述弥补了人类感官对中药“味”描述的主观性。利用仿生学原理和多元统计分析方法对 YQFM 的“味”与其物质基础和质量评价进行探索性研究。首先由进样系统采样，通过味觉传感器模拟生物系统中舌的功能对所采样品的“滋味”进行感应，并模拟神经感觉系统将被激发的信号传递到电脑数据处理 (模型识别) 系统中；模型识别系统 (AlphaSoft V14.2) 发挥生物系统中大脑的作用，对信号进行特征提取，建立识别模型，并对不同被测溶液进行区分辨识。

采用电子舌测定 YQFM 样品，以 0.01 mol/L 盐酸为校准溶液，以蒸馏水为稀释溶剂，样品采集时间和每次分析时间分别为 60 s 和 120 s，利用软件进行数据分析。6 批 YQFM 测定实验结果表明 YQFM 的 SRS (酸)、SWS (甜)、BRS (苦) 3 个滋味表现较明显，其结果与处方组成和工艺相吻合。中药的味与化学成分有一定关系，分析其酸味主要来自于方中五味子，主要成分为木脂素类。甜味主要来自于方中麦冬，少量来源于红参和五味子，与之对应的制剂中成分主要有葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖等。苦味主要来源于方中红参中的皂苷，其次来源于麦冬含有的皂苷。由此可知，3 味中药经历了复杂的工艺过程后仍可保留其各自的“味”，即保留了 3 味中药的功效，从“味”的量化角度证明其气味与功效的一致性。实验结果表明，利用主成分分析可以很好区分不同批次样品在味道上的差异，且不同样品间味道的相对强度不同。软独立建模分析 (SIMCA) 可以很好地对 YQFM 未知样品进行识别，SIMCA 法可以用于 YQFM 产品的鉴定^[24] (图 2、3)。通过上述研究，可以从药性物质基础角度为 YQFM 的 Q-marker 确定提供依据。

综合以上对 YQFM 物质基础、药效、网络药理学、药动学及药性研究，确定人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖

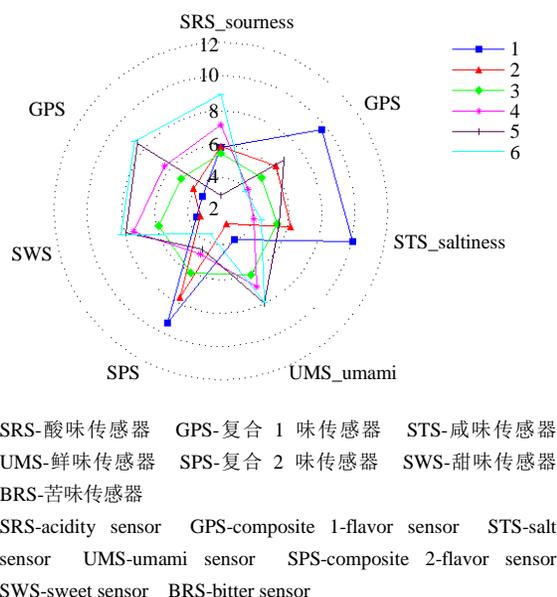


图 2 6 批 YQFM 样品的滋味雷达图
Fig. 2 Radar map of tastes of six batches of YQFM samples

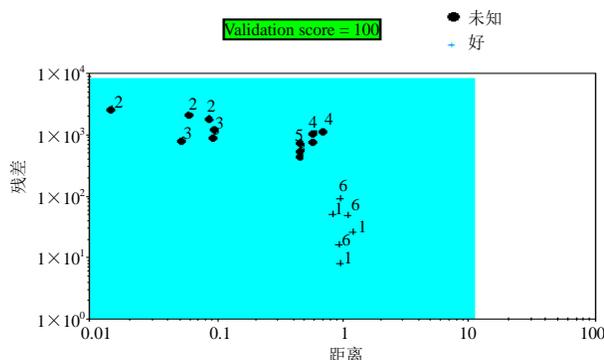


图 3 SIMCA 模型识别未知样品
Fig. 3 Identification of unknown samples by SIMCA model

苷、偏诺皂苷元-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃木糖基-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖苷、果糖及五味子醇甲 13 个成分为 YQFM 的 Q-marker。

3 Q-marker 的确定依据

根据 Q-marker 定义，其应为药物制备过程中药性与药效物质基础的传递和变化，反映复方整体功效的效应物质，其次应是代表性特异性成分，具有可测性。

通过原型化学物质组的辨识、化学成分的获取及结构确证，系统阐释 YQFM 的药效物质基础。YQFM 中主要化学成分类型为人参皂苷类、麦冬皂苷类、糖类、木脂素类及其他类，其中人参皂苷类物质主要来源于方中红参，麦冬皂苷和糖类物质来源于方中麦冬，木脂素类物质主要来源于方中五味

子。从整体动物模型、细胞等不同水平的药效学研究及药性研究结果表明 YQFM 中人参皂苷、麦冬皂苷、五味子醇甲及果糖为 YQFM 治疗心血管系统疾病的主要药效物质。进一步通过网络药理学研究系统阐释 YQFM 的多靶点作用机制,与此密切相关的蛋白分子信号通路主要有 NF- κ B、MAPK、CREB、AMPK 和 mTOR 等。药动学研究表明慢性心衰状态下,机体对 YQFM 中人参皂苷成分的代谢无明显影响。且在慢性心力衰竭大鼠血浆内,10 个人参皂苷具有较高的暴露量及较慢的消除。综合以上研究,确定 YQFM 的 Q-marker 为人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃、麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖及五味子醇甲 13 个成分。

4 基于 Q-marker 的全程质量控制体系建立

4.1 原料药材的质量控制

YQFM 的原料药材的质量控制是保障制剂产品的质量稳定性与均一性的关键之一。红参、麦冬及五味子均为《中国药典》2015 年版收录的药材,《中国药典》对其一般检查项及含量测定项做了明确要求。目前红参药材质量控制项目包括一般检查项和单体皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 的含量测定项,还针对人参皂苷类成分进行了人参总皂苷及指纹图谱控制。要求供试品色谱指纹图谱与参照药材指纹图谱比较,相似度应不小于 0.88。麦冬药材(饮片)除了一般检查项和鲁斯可皂苷元的含量测定项,还增加了总糖测定方法。采用高碘酸钠滴定法测定麦冬提取物中的总糖含量,规定每克麦冬含麦冬总糖以无水葡萄糖计,不得少于 95.0 mg。五味子药材及饮片,除了一般检查项和五味子醇甲的含量测定项,还增加了指纹图谱测定方法。要求供试品色谱指纹图谱与参照药材指纹图谱比较,相似度应为 0.90~1.00。

4.2 基于近红外光谱分析技术的 YQFM 生产过程的在线监测

近红外光谱分析技术以其快速、无损等优点在中药制剂的质量控制中受到很大关注,特别是在线监测可以避免传统离线检测手段无法及时反馈信息的弊端。本研究团队将近红外光谱分析技术与多变量统计分析方法结合,用于 YQFM 生产过程监控研究,针对 3 味组方药材提取过程进行了基于近红外

光谱技术的在线监测质量控制方法。在后续研究中,可将近红外光谱分析技术与多变量统计过程控制引入 YQFM 生产的其他工艺单元,如浓缩、纯化、干燥等,研究合适的在线监测手段,实现对 YQFM 生产过程的全面监控,保证药品的质量。

YQFM 原料药材红参采用醇提工艺,以人参皂苷 Rg₁、Re 和 Rb₁ 为含量监测指标,在线采集红参醇提过程的近红外光谱,通过光谱预处理和变量筛选,以 UPLC 法测定的 3 个人参皂苷含量为参考值,采用偏最小二乘法分别建立红参提取过程中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的定量校正模型,结果表明,定量模型的交叉验证决定系数分别为 99.40、99.44、99.41,交叉验证均方根误差分别为 5.18、2.77、11.00。并将所建模型应用于实际生产,3 个人参皂苷近红外预测结果和真实值吻合良好,可以实现对提取过程中此 3 个人参皂苷含量的快速检测^[25]。

针对麦冬提取过程的质量控制,基于近红外光谱建立麦冬水提过程的多变量统计过程控制(MSPC)模型。MSPC 是对采集到的近红外光谱数据进行整合,利用多向主成分分析(MPCA)和多向偏最小二乘(MPLS)等方法,提取出新的独立统计量代替原始变量,以正常操作批次建立过程监控模型来判断生产上的批次是否处于正常波动范围,以实现生产过程的质量监测。在建立 MSPC 模型时,常采用的过程控制图有主成分得分图、Hotelling T² 和 DModX 等。主成分得分图主要反映了整个过程中光谱的变化情况,Hotelling T² 主要用来检验主成分模型中某些变量的变动,DModX 表征了模型外部数据的变化。通过主成分得分、Hotelling T² 和 DModX 3 种控制图反映生产的过程轨迹,MSPC 模型能够反映批次生产过程中的变化,有利于对麦冬生产过程进行定性分析。

五味子醇甲为五味子中含量较大的成分,在五味子提取过程中引入近红外模型,建立提取过程中五味子醇甲的定量校正模型,并结合 MSPC 模型,应用于五味子提取过程的在线质量控制。采用偏最小二乘法建立五味子醇甲的定量校正模型,结果表明,模型的交叉验证决定系数(R²)为 74.11,交叉验证均方根误差为 2.60。基于定量模型的过程预测,模型的预测结果和测定值基本符合,所建模型能够反映提取过程中五味子醇甲含量的变化趋势。基于 MSPC 模型的过程监测,通过主成分得分、Hotelling T² 和 DModX 3 种控制图反映生产的过程轨迹,可

以了解生产过程中的变化。将 2 种模型相结合, 所建立的模型应用到实际生产中, 可以对五味子提取过程进行在线监测^[26]。

4.3 构建包括多指标成分定量与指纹图谱的 YQFM 全面质量评价体系

中药是通过多成分、多靶点共同发挥疗效, 单一化学成分并不能全面反映药品质量, 应采用能代表整体性的指纹图谱或多指标成分测定相结合来评价中药产品的质量。前期确定的 YQFM 质量标志物为人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 、 Rf 、 Rh_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Ro 、 Rg_3 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3- O - α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3- O - α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖及五味子醇甲 13 个成分, 以这些成分为核心, 采用多指标成分测定与指纹图谱技术相结合的方法, 全面评价 YQFM 的质量。

4.3.1 多指标成分定量分析 中药成分复杂性决定了采用单一成分或指标测定并不能反映其质量, 多指标质量控制和评价模式更能反映中药的特点, 而多指标质控要求必须有足够的对照品。一测多评法是以测定一个廉价易得的对照品, 实现其他多个成分同步测定的方法, 《中国药典》2015 年版也记载了一测多评的质控标准。实验室采用 HPLC-UV 法对 YQFM 中人参皂苷及五味子醇甲进行同时测定, 并探索建立一测多评法用于 YQFM 中人参皂苷及五味子醇甲的质量控制。以人参皂苷 Rb_1 为内参物, 建立与人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rf 、 Rc 、 Ro 、 Rb_2 、 Rd 及五味子醇甲 8 个成分的相对校正因子 (f), 在一定线性范围内, f 值为 1.970、0.929、1.196、0.870、0.830、0.786、0.906、12.082, 且不同条件下重复性良好。通过 25 批样品进行验证, 结果表明一测多评法与外标法测定结果无明显差异, 可用于 YQFM 多成分的质量控制^[27]。采用 HPLC-ELSD 对 YQFM 中果糖、葡萄糖、蔗糖及麦芽糖等进行测定, 并比较了一测多评法与外标两点法两种质量评价模式。以果糖为内参物, 建立其他 3 种糖类物质的 f , 并对 25 批样品测定结果进行验证, 结果表明可能由于蒸发检测器的原理所致, 外标两点法测定结果准确度要高于一测多评法, 采用 HPLC-ELSD 外标两点法更能准确测定 YQFM 中 4 个糖类成分的含量^[28]。

此外, 液相串联质谱技术在中药多成分定量分析中应用越来越广, 其具有灵敏度高、特异性好、分析速度快等优点。采用 UFLC-IT-TOF/MS 方法对

YQFM 中 3 个麦冬皂苷 [麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3- O - α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3- O - α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷]、15 个人参皂苷 (Re 、 Rg_1 、 Rf 、 Rb_1 、 S - Rg_2 、 Ro 、 Rh_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rb_3 、 Rd 、 F_2 、 R - Rg_3 、 Rk_1 、 R - Rh_2)、3 个木脂素 (五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙) 进行了含量测定。以地高辛为内标, 日内和日间精密度、重复性和稳定性均 $RSD < 4.9\%$, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.9952$, 回收率在 91.8%~104.2%, $RSD \leq 5.4\%$, 方法学符合规定, 并对 10 批 YQFM 样品进行了含量测定。结果表明该方法可用于定量 YQFM 中麦冬皂苷、人参皂苷和木脂素类成分, 特别是对 YQFM 中低含量的麦冬皂苷的测定^[9]。

4.3.2 指纹图谱研究 中药指纹图谱信息量丰富, 可以反映中药的整体物质群, 具有整体性和模糊性的特点, 可以全面反映中药的均一性和稳定性。前期对 12 批 YQFM 样品进行分析, 建立了 HPLC-UV 指纹图谱, 结果表明不同批次样品相似度大于 0.90, 确定了指纹图谱中 23 个共有峰, 并通过 LC-MS 联用技术指认了包括人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 、 Rf 、 Rh_1 、 Rc 、 Rb_2 、 Rg_3 、五味子醇甲等在内的 12 个成分^[29]。后期针对 YQFM 皂苷及木脂素类物质的指纹图谱进行了液相色谱方法的改进, 并采用 3 种指纹图谱相似度来评价 YQFM 指纹图谱的相似度, 结果表明采用夹角余弦法与相关系数评价方法差异不大, 均可以在一定程度上反映产品质量, 而欧氏距离法无法获得图谱的真实相似度, 不宜作为评价产品质量的方法^[30]。

超高效液相色谱串联四极杆飞行时间全息质谱 (UPLC-Q-TOF-MS^E) 可弥补 HPLC-UV 法无法体现无紫外吸收的化合物信息不足的缺点, 采用此技术对 28 批 YQFM 样本进行指纹图谱研究。选择基峰离子流色谱图进行指纹图谱研究, 采用中药指纹图谱相似度评价法进行评价, 同时将指纹图谱共有峰数据运用化学模式识别技术进行聚类分析及主成分分析, 最终将这 2 种方法所得结果综合起来可以更客观评价 YQFM 质量^[31]。

5 结语

中药质量控制研究的不完善一直是限制中药产业国际化的关键问题。近年来, 中药科技工作者为中药质量控制研究做了大量的工作, 随着新手段、新技术的应用, 带动了中药质量控制研究水平的提

升,但是依然存在许多问题,如质控指标与中药的安全性、有效性关联性不强等问题。Q-marker 的提出,可以为中药复方制剂的质量控制提供新的研究思路与方向。

中药复方制剂是一个复杂的物质体系,按照 Q-marker 的定义,复方中药 Q-marker 的研究需要满足“传递和溯源”“特有性”“有效性”“处方配伍环境”“可测性”5 个原则^[5]。在这 5 个原则基础上,基于张铁军研究员提出的“性-效-物”三元论的研究思路本课题组对 YQFM 中 Q-marker 进行了研究。利用现代科学技术手段,对 YQFM 化学物质组进行了深入研究,分析了包括人参皂苷、麦冬皂苷、糖、木脂素在内的 145 个化学成分,系统阐明 YQFM 的物质基础,并分析这些物质成分的药材归属,可以体现药材原有成分到制剂原型成分的传递和变化。其中人参皂苷类是红参的特征成分,木脂素类是五味子代表性成分,麦冬皂苷及糖类是麦冬的主要成分。基于成分与有效性的关联研究,通过药性和药效研究证明人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖、五味子醇甲可能为 YQFM 的主要药效和药性物质;通过网络药理学研究明确人参皂苷类等物质的多靶点作用机制,结合药动学的研究结果,确定人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖、五味子醇甲为药效成分。从成分可测性方面考虑,这些成分均可以通过 HPLC-ELSD、HPLC-UV 方法或者 LC-MS 法进行含量测定,在药材、提取物、制剂中均可以测定。通过以上研究结果,最终确定人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖及五味子醇甲 13 个成分为 YQFM 的 Q-marker。

在确定 Q-marker 的基础上进行质量控制方法的研究,可以使质量评价方法更有针对性。基于质量传递与溯源建立全程质量控制体系,提高中药注

射剂产品质量控制水平。以确定的人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rf、Rh₁、Rc、Rb₂、Ro、Rg₃ 及麦冬皂苷 C、麦冬苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、偏诺皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷、果糖、五味子醇甲为核心建立了从药材到制剂的质量控制方法,建立了近红外过程监测方法,所建立的全程质量控制体系可以全面评价 YQFM 质量,实现质量控制的目的。

建立科学、合理的质量评价方法,对控制中药注射剂的质量具有重要作用。Q-marker 的提出,为中药质量控制提出了新的研究模式与思路,有利于建立中药全程质量控制体系。本文针对 YQFM 的 Q-marker 研究,期望对中药注射剂的质量评价提供参考。在对 YQFM 化学物质组研究基础上,将药效和药性均纳入质量评价研究,将化学物质组及其有效性进行关联性分析,进而确定 Q-marker,并在此基础上,初步探索建立基于 Q-marker 的全程质量控制体系,可以更全面、合理地评价 YQFM 的质量,以期得到多方面的探讨。本文将目前 YQFM 的 Q-marker 研究成果进行归纳,其研究方法还需要进一步探索和完善,如代谢组学的研究,成分敲入、敲出研究,且若是建立复方制剂的质量标准,还应精简 Q-marker,优选最 Q-marker,满足实际产品需求。

参考文献

- [1] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [3] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [4] 张铁军,许浚,申秀萍,等. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [5] 张铁军,白钢,陈常青,等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [6] Li W, Polachi N, Wang X, et al. A quality marker study on salvianolic acids for injection [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 138-147.
- [7] 杨静,江振作,柴欣,等. 中药注射液“Q-markers”的辨析研究——丹红注射液研究实例 [J]. 世界科学技

- 术—中医药现代化, 2016, 18(12): 2056-2061.
- [8] 王琼琚, 谢伟容, 郜艳妮, 等. 基于 Q-Marker 成分定性与定量的双黄连制剂质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 36-46.
- [9] Liu C H, Ju A C, Zhou D Z, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple chemical constituents in YiQiFuMai injection by ultra-Fast liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 640-653.
- [10] 周垚垚, 焦燕婷, 王彦帅, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 446-450.
- [11] 李 莉, 李德坤, 鞠爱春. HPLC-ELSD 法测定注射用益气复脉 (冻干) 中钠元素 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 489-492.
- [12] Xing L, Jiang M, Dong L Y, *et al.* Cardioprotective effects of the YiQiFuMai injection and isolated compounds on attenuating chronic heart failure via NF- κ B inactivation and cytokine suppression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 239-245.
- [13] Pang L Z, Ju A C, Zheng X J, *et al.* YiQiFuMai powder injection attenuates coronary artery ligation-induced myocardial remodeling and heart failure through modulating MAPKs signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 202: 67.
- [14] Wang Y Q, Liu C H, Zhang J Q, *et al.* Protective effects and active ingredients of Yi-Qi-Fu-Mai sterile powder against myocardial oxidative damage in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 122(1): 17-27.
- [15] Li F, Tan Y S, Chen H L, *et al.* Identification of schisandrin as a vascular endothelium protective component in YiQiFuMai powder injection using HUVECs binding and HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 129(1): 1-8. .
- [16] Feng Y Q, Ju A C, Liu C H, *et al.* Protective effect of the extract of Yi-Qi-Fu-Mai preparation on hypoxia-induced heart injury in mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(6): 401-406.
- [17] Cao G, Ye X, Xu Y, *et al.* YiQiFuMai powder injection ameliorates blood-brain barrier dysfunction and brain edema after focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2016, 10(1): 315-325.
- [18] Cao G, Zhou H, Jiang N, *et al.* YiQiFuMai Powder Injection ameliorates cerebral ischemia by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5493279.
- [19] Cao G S, Chen H L, Zhang Y Y, *et al.* YiQiFuMai powder injection ameliorates the oxygen-glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial barrier function associated with the NF- κ B and ROCK1/MLC signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 183: 18-28.
- [20] Tan Y, Li F, Lv Y, *et al.* Study on the multi-targets mechanism of YiQiFuMai powder injection on cardio-cerebral ischemic diseases based on network pharmacology [J]. *J Proteom Computat Biol*, 2014, 1(1): 1-9.
- [21] 焦燕婷, 周垚垚, 陶 瑾, 等. 基于网络药理学的注射用益气复脉 (冻干) 作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 391-398.
- [22] Zheng H R, Chu Y, Zhou D Z, *et al.* Integrated pharmacokinetics of ginsenosides after intravenous administration of YiQiFuMai Powder injection in rats with chronic heart failure by UFLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1072: 282-289.
- [23] 赵利斌, 王 辉, 李 伟, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 在正常和慢性心衰大鼠体内的药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 439-445.
- [24] 李 莉, 杨 梅, 李德坤, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 味的测定 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 469-474.
- [25] 徐 敏, 张 磊, 岳洪水, 等. 基于近红外光谱分析技术的注射用益气复脉 (冻干) 红参醇提过程在线监测 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 462-468.
- [26] 徐 敏, 张 磊, 岳洪水, 等. 基于近红外光谱技术和多变量统计过程控制的五味子提取生产过程监测方法 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20): 3906-3911.
- [27] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉 (冻干) 中 9 种成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3537-3544.
- [28] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉 (冻干) 中糖类成分的质量控制研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 451-456.
- [29] 周丹丹, 王蕴华, 李 凡, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1900-1904.
- [30] 何珊珊, 岳洪水, 宋丽丽, 等. 注射用益气复脉 (冻干) HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 390-393.
- [31] 褚延斌, 苏小琴, 周学谦, 等. 基于液质指纹图谱和化学模式识别的注射用益气复脉 (冻干) 质量综合评价研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2410-2419.