

吴茱萸水煎液肝毒质量标志物确认研究

王 亮¹, 孙凯滨², 吴晓文¹, 孙 蓉^{3,4*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

3. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

4. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要: **目的** 对吴茱萸水煎液的肝毒质量标志物(Q-marker)进行确认研究。**方法** 通过体外肝毒性指标和流式细胞分析对目标化合物的肝毒性进行初步研究,通过网络药理学对其作用靶点和靶器官进行预测,通过LC-MS对目标化合物3-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(1)、4-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(2)、2-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(3)的吸收入血情况进行定性分析,通过Q-marker属性的系统研究,对吴茱萸水煎液的肝毒Q-marker进行确认。**结果** 化合物1、2、3主要通过直接毒性影响肝脏L02细胞的活力和G₀/G₁期的阻滞作用影响L02细胞的增殖,从而产生肝毒性;网络药理学分析结果表明作用的靶器官可能为肝脏;给药后化合物1、2、3可以原型形式吸收入血;化合物1、2、3具有结构确认、毒性确认、可测性、传递性的特点,可能不具有专属性。**结论** 化合物1、2、3可确认为吴茱萸水煎液的肝毒Q-marker。

关键词: 吴茱萸;肝毒质量标志物;入血分析;网络药理学;可测性;传递性;3-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸;4-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸;2-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4547-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.004

Confirmation study of hepatotoxic quality marker in *Euodiae Fructus* decoction

WANG Liang¹, SUN Kai-bin², WU Xiao-wen¹, SUN Rong^{3,4}

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

4. School of Advanced Medical Science, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: **Objective** To confirm the hepatotoxic Q-marker of *Euodiae Fructus* decoction. **Methods** The hepatotoxicity of target compounds was studied by hepatotoxicity index and flow cytometry. The targets and target organs were predicted by network pharmacology. The qualitative absorption analysis of 3-*O*-trans-caffeoylgluconic acid (1), 4-*O*-trans-caffeoylgluconic acid (2), 2-*O*-trans-caffeoylgluconic acid (3) was performed by LC-MS. Through the systematic study of Q-marker properties, the confirmation study of hepatotoxicity Q-marker in *Euodiae Fructus* decoction was performed. **Results** Compounds 1, 2, and 3 inhibited the growth of L02 cells in G₀/G₁ phase and had direct toxicity to L02 cells, which led to hepatotoxicity. The target organ may be the liver by the network pharmacology analysis. After drug administration, compounds 1, 2, and 3 could be absorbed into the blood by prototype. Compounds 1, 2, and 3 had properties of structural confirmation, toxicity confirmation, measurability, and transmissibility. **Conclusion** Compounds 1, 2, and 3 could be confirmed as hepatotoxic Q-marker of *Euodiae Fructus* decoction.

Key words: *Euodiae Fructus*; hepatotoxic quality marker; absorption analysis; network pharmacology; measurability; transferability; 3-*O*-trans-caffeoylgluconic acid; 4-*O*-trans-caffeoylgluconic acid; 2-*O*-trans-caffeoylgluconic acid

安全、有效、质量可控是药物的三大基本属性, 有效性直接相关, 一直备受关注^[1-2], 加上近年来中
在临床实际中, 中药的毒性与临床用药的安全性和 药中毒事件时有发生^[3-5], 严重影响了中医药事业的

收稿日期: 2019-07-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”中医基础理论专项资助项目课题2(2009CB522802); 山东省中医药科技发展计划(2013-120); 山东省重大科技创新工程(2017CXGC1308); 山东省自然科学基金青年基金(ZR2016HQ17); 泰山学者工程专项经费资助(NS201511107)

作者简介: 王 亮(1981—), 男, 山东淄博人, 博士, 副研究员, 主要从事中药质量控制研究。Tel: 18615201331 E-mail: wliang81@gmail.com

*通信作者 孙 蓉, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理与毒理研究。Tel: 13605311799 E-mail: sunrong107@163.com

发展。有研究表明,在我国导致肝损伤的药物中,中药和草药膳食补充剂占有一定比例^[6]。因此,随着中医药发展战略的展开及更加广泛的应用,中药安全性已经成为中医药发展不能忽视的重要问题。

中药多来源、多产地、采收时间不同以及中药特有的炮制加工等复杂情况,使中药产品的质量差异悬殊,如何科学有效地控制中药质量,从而确保中药的安全性和有效性成为亟待解决的问题。为解决这一问题,刘昌孝院士^[7]于 2016 年提出了以中医理论为基础的,代表中药安全性和有效性的中药质量标志物(Q-marker)新概念。本课题组在前期研究的基础上,提出了基于“效-毒”相关的 Q-marker 合理辨识与科学控制的研究思路^[8],并以吴茱萸传统用法为切入点,对其肝毒 Q-marker 进行了探索性研究。

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,归肝、脾、胃、肾经,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效^[9]。吴茱萸始载于《神农本草经》,列为中品,味辛、苦,性热。自古以来吴茱萸即被记载为有小毒,针对其毒性,衍生出了汤洗和久煎的特殊用法。基于吴茱萸传统用法中的久煎,本课题组前期开展了吴茱萸的谱毒相关研究,结果发现咖啡酰葡萄糖酸可能为吴茱萸水煎液的肝毒性物质基础^[10]。随后对目标成分进行了定向富集和分离,进行了结构解析,分别鉴定为 3-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(1)、4-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(2)、2-*O*-反式-咖啡酰葡萄糖酸(3),由于化合物 1、2、3 单体存在时稳定性极差,故本课题组按照其在吴茱萸水提液中的比例,对其混合物(MIX1-3, 325 nm 波长下的峰面积比为 1.00:1.45:2.59)进行了人肝脏 L02 细胞的体外肝毒性初步验证^[11]。

中药的化学成分复杂,其中的药效或毒性成分只有进入血液循环才能发挥相应的作用。因此,本研究首先对 MIX1-3 肝毒性机制进行初步研究,其次采用网络药理学对其作用靶点、组织定位进行预测分析,然后分析化合物 1、2、3 的吸收入血情况,最后对其可测性、专属性和传递性等中药 Q-marker 的属性进行系统研究,实现吴茱萸肝毒 Q-marker 的最终确认。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1200 系列高效液相色谱系统、6320 离子阱质

谱检测器(美国安捷伦公司);e2695 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);LC-20AT 高效液相色谱系统(日本岛津公司);BP211D 型电子天平(德国赛多利斯集团);台式离心机(上海安亭科学仪器厂);KDM 电加热套(山东华鲁仪器公司);Simplicity 超纯水系统(美国密理博公司);Rotavapor R-300 旋转蒸发仪(瑞士步琦公司);XH-D 型涡旋混匀器(江苏康健医疗用品有限公司);HF90 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);XSZ-D 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);超净台(美国赛默飞世尔公司);Multiskan Go 型酶标仪(芬兰雷勃公司);超低温冰箱(中国海尔集团);96 孔培养板、6 孔培养板(美国康宁公司)。

1.2 药材和试剂

吴茱萸样品购自山东百味堂中药饮片有限公司,批号 20150625,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为芸香科植物石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。乙腈(色谱纯,德国 Fisher 公司),磷酸、甲酸等其他所使用试剂均为分析纯(天津北辰方正试剂厂);DMEM 培养基(批号 AD18376282)和胎牛血清(批号 42F7674K)购于美国 Gibco 公司;CCK-8 溶液(批号 091918181104)和胰酶消化液(批号 052518180803)购于碧云天生物技术研究;乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(批号 20180711)、天冬氨酸转氨酶(AST)测试盒(批号 20180908)和丙氨酸转氨酶(ALT)测试盒(批号 20180916)购于南京建成生物工程研究所;PI/Rnase 染液(批号 8019561)购于美国 BD 公司;新绿原酸对照品(批号 CHB170828,质量分数 98%)购于成都曼斯特生物科技有限公司。

1.3 动物

SPF 级 Wistar 大鼠,雄性,体质量 160~200 g,适龄、健康,购自山东大学实验动物中心,动物许可证号 SYXK(鲁)20140001。实验动物配合饲料(鼠),生产许可证号 SCXK(鲁)20140014。

1.4 细胞系

L02 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所),培养于含 10%胎牛血清和 1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养液中,培养箱条件为 5% CO₂、37 °C,当细胞汇合至 85%时用胰蛋白酶将其消化并传代,实验均在细胞生长对数期进行。

2 方法与结果

2.1 化合物 1、2、3 对 L02 细胞的毒性指标测定和流式细胞实验

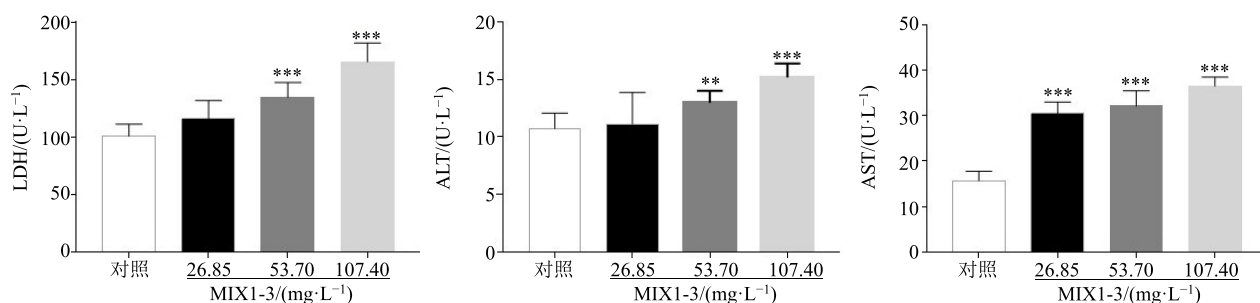
前期研究发现, MIX1-3 具有抑制 L02 细胞增殖作用^[1], 本实验对 MIX1-3 肝毒性机制进行初步探讨。

2.1.1 供试品制备 由于化合物 1、2、3 单体不稳定, 但混合后较为稳定, 故化合物 1、2、3 的肝毒性验证实验采用其在吴茱萸水提液中同比例的混合物 MIX1-3 进行, MIX1-3 由化合物 1、2、3 的制备溶液分别按照其在吴茱萸水提液中的比例进行混合后浓缩冻干制得^[1], 由面积归一化法计算, 该混合物中化合物 1、2、3 的总质量分数为 94.2%。

2.1.2 对 L02 细胞上清液 LDH、ALT、AST 水平的影响 化合物 1、2、3 的相对分子质量均为 358, 根据预试验结果和本研究中目标化合物的稳定性, 采用含 MIX1-3 26.85、53.70、107.4 mg/L (75、150、300 $\mu\text{mol/L}$) 处理 L02 细胞 12 h; 按照 LDH、ALT、AST 试剂盒操作说明进行检测。实验重复 3 次, 结果见图 1。由图 1 可知, MIX1-3 (26.85、53.7、107.40 mg/L) 处理 L02 细胞 12 h 后发现细胞上清液中 LDH、ALT 和 AST 水平随给药质量浓度的增加而升高, 与剂量

呈现正相关, 其中, LDH 水平在含 MIX1-3 53.70 mg/L 时与对照组比较差异显著 ($P < 0.001$), ALT 水平在 MIX1-3 为 53.70 mg/L 时与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), AST 水平在 MIX1-3 为 26.85 mg/L 时与对照组比较差异显著 ($P < 0.001$)。结果表明, 化合物 1、2、3 可通过直接毒性影响 L02 细胞的活力。

2.1.3 细胞周期实验 为探讨 MIX1-3 导致的 L02 细胞生长抑制的分子机制, 采用流式细胞仪分析细胞周期分布情况。取对数生长期 L02 细胞, 接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞。待细胞贴壁后, 对照组给予无血清培养基, 实验组给予含 107.40 mg/L MIX1-3 的无血清培养基, 培养 12 h。收集细胞, 用预冷的 PBS 清洗, 加 70%乙醇固定过夜; 以 1 000 r/min 离心 10 min, 细胞以 PBS 清洗 2 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件用 PI/RNase 染色 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。结果见图 2, 107.40 mg/L MIX1-3 可诱导 L02 细胞 G_0/G_1 期阻滞。与对照组比较, 107.40 mg/L 的 MIX1-3 使细胞群在 G_0/G_1 期的比例从对照组的 $(56.817 \pm 0.833)\%$ 增加至 $(79.087 \pm 4.166)\%$ ($P < 0.001$), MIX1-3 可通过 G_0/G_1 期的阻滞作用影响 L02 细胞的增殖。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 2 同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as figure 2

图 1 MIX1-3 对 L02 细胞上清液 LDH、ALT 和 AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of MIX1-3 on activities of LDH, ALT, and AST in supernatant of L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

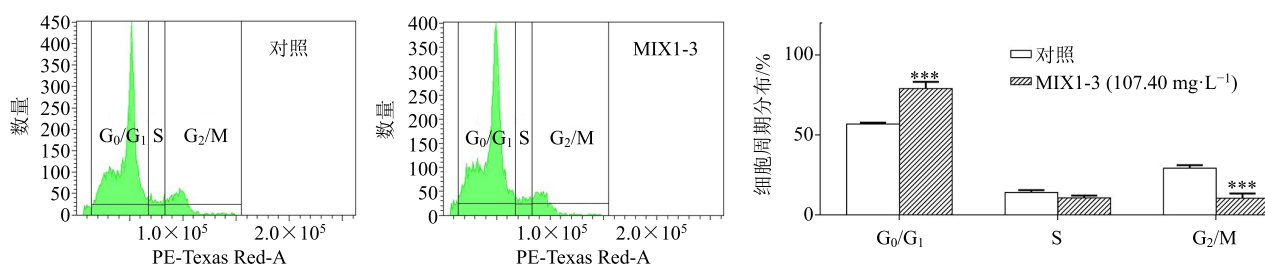


图 2 MIX1-3 对 L02 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of MIX1-3 on cell cycle of L02 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

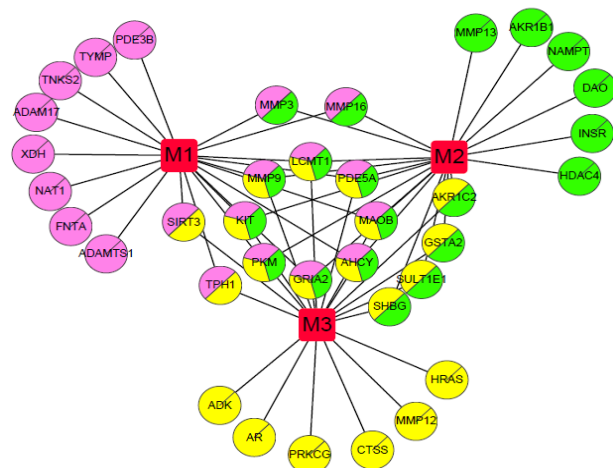
2.2 化合物 1、2、3 的网络药理学预测

体外实验结果表明化合物 1、2、3 具有肝毒性, 随后通过网络药理学对其体内的靶器官进行预测。通过 High-Throughput Docking (<https://www.cbligand.org/>, HT-Docking) 进行分子对接, 对目标化合物作用的靶点进行预测^[12]。将化合物的结构文件(.mol2) 上传至靶点预测网站, 进行靶点预测。根据 Docking score 的大小将预测的靶蛋白排序。通

过 UniProt (<http://uniprot.org>) 数据库将靶蛋白名称转换为基因名。采用 BioGPS (<http://biogps.org/>) 在线基因注释工具, 根据化合物 1、2、3 在 HT-Docking 中预测的靶蛋白基因在不同组织中的表达量, 对作用的组织器官定位进行排序^[13-15], 见表 1。采用 Cytoscape 软件对预测结果进行可视化, 分别绘制化合物-靶点和化合物-组织定位网状图, 见图 3、4。

表 1 化合物 1、2、3 的预测结果
Table 1 Prediction of compounds 1, 2 and 3

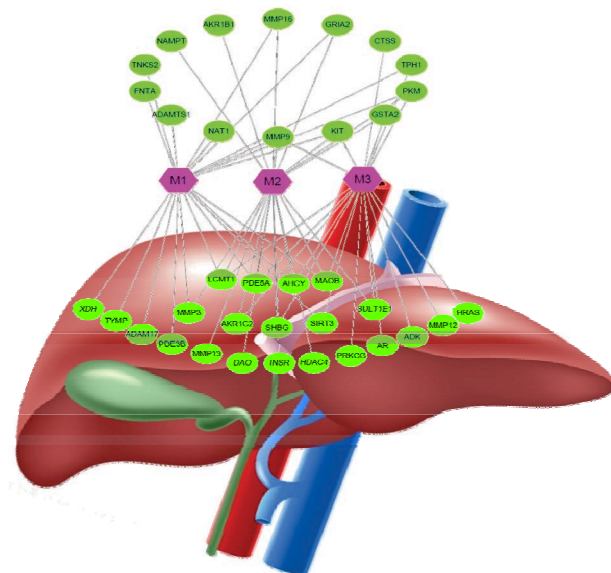
编号	蛋白	化合物	基因	组织定位
1	glutamate receptor 2	1、2、3	GRIA2	垂体、大脑
2	adenosylhomocysteinase	1、2、3	AHCY	肾、甲状腺、肝脏
3	GTPase HRas	3	HRAS	甲状腺、肺、肝脏、心脏
4	amine oxidase [flavin-containing] B	1、2、3	MAOB	子宫、小肠、肝脏
5	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase	1、2、3	PDE5A	肝脏、心脏
6	leucine carboxyl methyltransferase 1	1、2、3	LCMT1	胸腺、垂体、胰、肺、肝脏
7	matrix metalloproteinase-9	1、2、3	MMP9	扁桃体、淋巴结、全血
8	macrophage metalloelastase	3	MMP12	扁桃体、胸腺、垂体、肝脏、心脏
9	mast/stem cell growth factor receptor	1、2、3	KIT	甲状腺
10	adenosine kinase	3	ADK	肝脏
11	glutathione S-transferase A2	2、3	GSTA2	无特定组织
12	pyruvate kinase isozymes M1/M2	1、2、3	PKM	平滑肌、气道上皮细胞
13	estrogen sulfotransferase	2、3	SULT1E1	心肌细胞、肝脏
14	aldo-keto reductase family 1 member C2	2、3	AKR1C2	脂肪细胞、肝脏
15	sex hormone-binding globulin	3	SHBG	肝脏、心脏
16	androgen receptor	3	AR	肝脏、心脏
17	protein kinase C gamma type	3	PRKCG	肝脏、心脏
18	NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial	1、3	SIRT3	肝脏、心脏
19	tryptophan 5-hydroxylase 1	1、3	TPH1	无特定组织
20	cathepsin S	3	CTSS	结肠、小肠
21	D-amino-acid oxidase	2	DAO	肝脏、肾脏
22	matrix metalloproteinase-16	1、2	MMP16	心肌细胞
23	histone deacetylase 4	2	HDAC4	结肠、小肠、胰、肺、肝脏
24	insulin receptor	2	INSR	骨骼肌、肝脏、心脏、肺
25	collagenase 3	2	MMP13	心脏、肝脏
26	stromelysin-1	1、2	MMP3	心脏、肝脏
27	aldose reductase	2	AKR1B1	无特定组织
28	nicotinamide phosphoribosyltransferase	2	NAMPT	无特定组织
29	ADAM 17	1	ADAM17	肝脏、心脏
30	tankyrase-2	1	TNKS2	胎盘
31	thymidine phosphorylase	1	TYMP	肺、肝脏
32	cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase B	1	PDE3B	肝脏、心脏
33	xanthine dehydrogenase/oxidase	1	XDH	肝脏、心脏
34	protein farnesyltransferase/geranyl-geranyltransferase type-1 subunit alpha	1	FNTA	无特定组织
35	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	1	ADAMTS1	卵巢
36	arylamine N-acetyltransferase 1	1	NAT1	结肠、小肠



M1-化合物 1 M2-化合物 2 M3-化合物 3, 图 4 同
M1-compound 1 M2-compound 2 M3-compound 3, same as figure 4

图 3 化合物 1、2、3 的化合物-靶点网络图

Fig. 3 Compound-target network of compounds 1, 2, and 3



化合物下方为肝脏相关定位, 上方为其他组织定位
below compounds: liver-related localization, above: the other organs
localization

图 4 化合物 1、2、3 的化合物-组织定位网状图

Fig. 4 Compound-organ network of compounds 1, 2, and 3

图 3 共有 39 个节点、60 条边。3 个红色方形节点代表化合物 1、2、3, 36 个圆形饼状图节点代表 3 个化合物作用的靶点, 粉色、绿色和黄色节点分别代表与化合物 1、2、3 作用的靶点, 其中与 3 个化合物共同作用的有 8 个靶点, 与其中 2 个化合物共同作用的有 8 个靶点, 其余 20 个靶点只与其中 1 个化合物作用。

图 4 表明, 化合物 1、2、3 作用的 36 个靶点中有 22 个靶点 (图中化合物下方的绿色节点) 在肝

脏有较高的表达, 其中 4 个靶点为 3 个成分的共同作用靶点, 4 个靶点为 2 个成分的共同作用靶点, 14 个靶点为 1 个成分的作用靶点。说明肝脏可能为化合物 1、2、3 作用的主要靶器官之一。

2.3 化合物 1、2、3 的入血分析

以上结果表明, 化合物 1、2、3 在体外具有肝毒性, 且体内作用的主要靶器官可能为肝脏。因此, 随后对其吸收入血情况进行研究。

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Thermo Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.3% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~25 min, 4%~6.5% A; 25~32 min, 6.5% A; 32~37 min, 6.5%~8% A; 37~56 min, 8% A; 56~75 min, 8%~17% A; 75~90 min, 17%~20% A; 90~120 min, 20%~50% A; 120~135 min, 50% A, 柱温 30 °C, 检测波长 325 nm, 体积流量 1.0 mL/min。

2.3.2 质谱条件 将流动相中的磷酸替换为同浓度甲酸, 质谱采用 ESI 离子源; 负离子扫描模式; 扫描深度为 5 级; 扫描速度 m/z 26 000/s; 检测范围 m/z 50~1 000; 干燥气体积流量 9 L/min; 喷雾压力 241.325 kPa (35 psi); 毛细管电压 4 000 V, 干燥气温度 350 °C; 分流比 4:1。

2.3.3 吴茱萸水煎液的制备 取吴茱萸样品 30 g, 加入 1 500 mL 水, 回流提取 1 h, 滤过, 滤液旋转蒸发浓缩至 50 mL, 即得大鼠 ig 给药样品, 给药剂量为药典规定最大剂量的 13.3 倍。取吴茱萸样品 0.5 g, 加入 25 mL 水, 回流提取 1 h, 滤过, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得药材对比样品。

2.3.4 动物分组和给药 实验大鼠分为给药组和对对照组, 参考文献方法^[16-17], 给药组按照 10 mL/kg (6.0 g/kg) 剂量 ig 给药, 2 次/d, 连续 2 d, 对照组 ig 同体积蒸馏水。

2.3.5 质谱分析样品制备 末次给药后 2 h 将大鼠处死, 取血, 室温放置, 3 500 r/min 离心 10 min, 取血清。取 200 μL 血清, 加入 600 μL 色谱纯乙腈, 涡旋混匀 1 min, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.6 质谱数据处理 使用 DataAnalysis 软件从药材对比样品总离子流 (TIC) 图中提取目标化合物特征离子, 见图 5。图中可见, 化合物 1、2、3 的特征离子均为 m/z 455。对药材对比样品、给药组大鼠血清、对照组大鼠血清的 TIC 图分别提取 m/z 455 特征离子的提取离子流 (EIC) 图, 进行对比分析, 见图 6。由图 6 可见, 大鼠经 ig 给药后, 吴茱萸水

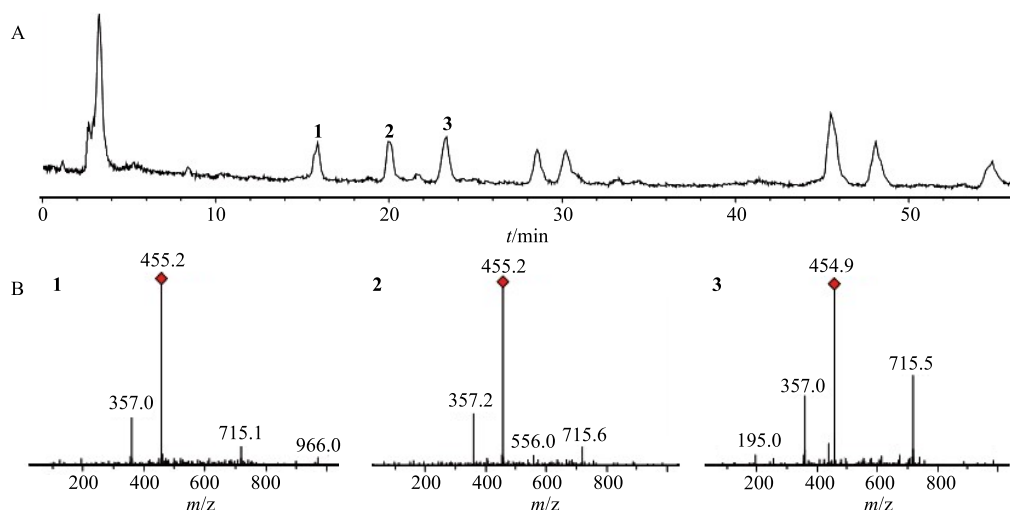
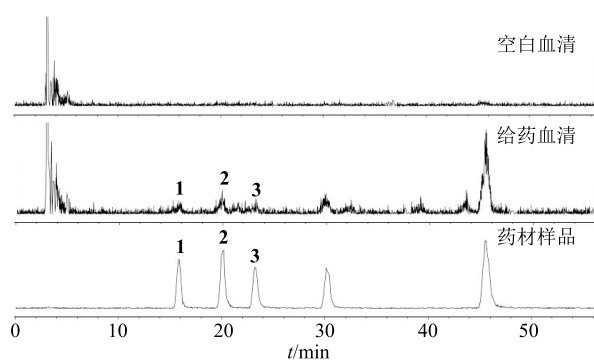


图 5 吴茱萸水提液 TIC 图 (A) 和化合物 1、2、3 的质谱图 (B)

Fig. 5 TIC of *Euodiae Fructus* decoction (A) and MS spectra of compounds 1, 2, and 3 (B)图 6 吴茱萸水提液中化合物 1、2、3 入血分析质谱 EIC (m/z 455) 图Fig. 6 Absorption analysis EIC (m/z 455) of compounds 1, 2, and 3 in *Euodiae Fructus* decoction

煎液中的化合物 1、2、3 均可以原型形式吸收入血，经血液循环到达肝脏后，能够直接作用于肝脏。

2.4 化合物 1、2、3 的可测性研究

2.4.1 吴茱萸水提液和对照品溶液制备 取吴茱萸样品（过 3 号筛）0.25 g，加入 12.5 mL 水，35 kHz 超声提取 30 min，溶液过 0.45 μ m 微孔滤膜，即得吴茱萸样品溶液。取 MIX1-3 和新绿原酸对照品适量，用水溶解，超声 30 min，过 0.45 μ m 微孔滤膜，即得对照品溶液。

2.4.2 MIX1-3 的稳定性 取 MIX1-3 溶于水中，精密称定，配成 418.2 μ g/mL 的水溶液，超声 10 min，自动进样器恒温 25 $^{\circ}$ C。由于化合物 1、2、3 的单体稳定性较差，为较准确获知其混合物 MIX1-3 的稳定时间，采用了 24 h 内连续进样的方式，每针 70

min，计算化合物 1、2、3 的峰面积，其峰面积的 RSD 分别为 2.3%、0.9%、1.3%。说明 MIX1-3 的水溶液室温下 24 h 内稳定。

2.4.3 吴茱萸水提液的稳定性 取吴茱萸样品（过 3 号筛）0.25 g，精密称定，按照“2.4.1”中方法提取样品，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进行 HPLC 检测，计算化合物 1、2、3、4（新绿原酸）的峰面积，其 RSD 分别为 0.71%、3.20%、1.50%、0.23%，说明吴茱萸样品中化合物 1、2、3、4 在 24 h 内稳定。

2.4.4 提取方法重复性 取同一份吴茱萸样品（过 3 号筛）0.25 g，平行 6 份，精密称定，按照“2.4.1”中方法提取样品，进行 HPLC 检测，计算化合物 1、2、3、4 的峰面积，其 RSD 分别为 1.1%、3.2%、1.9%、0.43%。说明样品提取方法的重复性良好。

2.4.5 仪器精密度 取同一份吴茱萸水提液，连续进样 6 次，计算化合物 1、2、3、4 峰面积，其 RSD 分别为 0.69%、1.40%、0.65%、0.10%，保留时间 RSD 为 0.41%、0.56%、0.49%、0.34%，说明仪器精密度良好。

2.4.6 线性关系考察 取“2.4.1”项中 MIX1-3 溶液，按“2.3.1”项方法进行 HPLC 检测，分别进样 3、6、9、12、15 μ L，记录峰面积。以化合物 1、2、3 峰面积之和 (Y) 为纵坐标，MIX1-3 的量 (X) 为横坐标，计算回归方程为 $Y=940.68 X+15.42$ ，线性范围 1.25~6.27 μ g， $r=1.000$ 。

2.4.7 MIX1-3 加样回收率试验 取吴茱萸样品（过 3 号筛）0.05 g，平行 6 份，加入对照品适量，按“2.4.1”

项方法提取样品, 进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 计算回收率为 78.38%、81.36%、76.39%、75.46%、77.79%、82.05%, 平均值为 78.57%, RSD 为 3.4%。回收率较低可能是由于加入化合物 1、2、3 之后, 打破了样品溶液中该系列咖啡酰葡萄糖酸异构体之间原有的转化平衡, 从而互相转化所导致, 超声过程的温度上升可能会加快这种转化。回收率较低会影响定量结果的准确性, 更准确的定量方法仍需进一步研究。

2.4.8 相对保留时间 以化合物 4 (新绿原酸) 为内参物 (图 7), 化合物 1、2、3 相对于新绿原酸的相对保留时间见表 2。

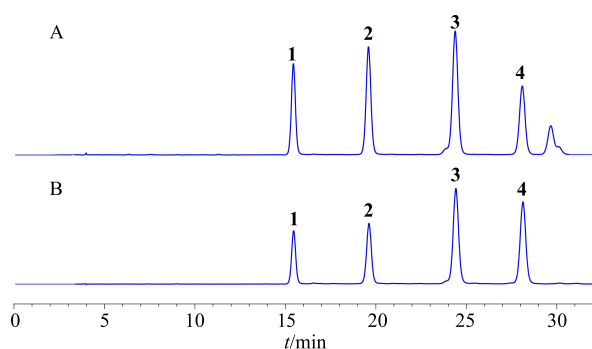


图 7 吴茱萸水煎液 (A) 和混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图 (325 nm)

Fig. 7 HPLC chromatograms (325 nm) of *Euodiae Fructus* decoction (A) and mixed standards (B)

表 2 化合物 1、2、3 对新绿原酸的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of compounds 1, 2, and 3 to neochlorogenic acid

液相系统	色谱柱	相对保留时间		
		化合物 1	化合物 2	化合物 3
Agilent 1200	A	0.570	0.720	0.877
	B	0.527	0.681	0.846
	C	0.554	0.716	0.869
Waters e2695	A	0.561	0.710	0.874
	B	0.521	0.671	0.841
	C	0.546	0.707	0.868
Shimadzu LC-20AT	A	0.560	0.709	0.873
	B	0.523	0.673	0.842
	C	0.552	0.712	0.870
均值		0.546	0.700	0.862
RSD/%		3.3	2.7	1.7

A-Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

B-Scienc home Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

C-Agela Venusil MP-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

由表 2 可见, 以新绿原酸 (4) 为内参物, 化合物 1、2、3 的相对保留时间分别为 0.546、0.700、0.862, 根据相对保留时间和 UV 光谱即可对化合物 1、2、3 进行定性。

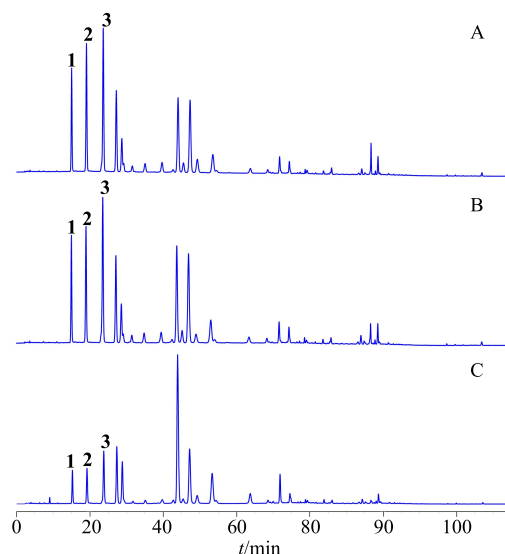
2.5 MIX1-3 传递性研究

2.5.1 吴茱萸水提液制备方法 同“2.4.1”项。

2.5.2 汤洗方法 将吴茱萸药材于沸水中浸泡约 15 s, 使用纱布迅速滤过, 为 1 次汤洗。

2.5.3 吴茱萸汤制备 按照《伤寒论》中记载: “吴茱萸一升 (洗), 人参 (三两), 生姜 (六两), 大枣 (十二枚, 擘), 右四味, 以水七升, 煮取二升”, 制备吴茱萸汤。根据汉代一升为现代 200 mL, 一两为现代 15.6 g, 计算药量^[18-19], 吴茱萸汤洗 3 次后, 将各药味混合, 加水 1 400 mL, 煎煮至减失质量约 1 000 g, 纱布滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.5.4 化合物 1、2、3 的传递性考察 考虑到化合物 1、2、3 的不稳定性, 吴茱萸提取液采用超声提取, 吴茱萸汤严格按照经方记载方法制备。考察了化合物 1、2、3 在吴茱萸药材→汤洗 3 次后吴茱萸→吴茱萸汤中的传递性, 见图 8。可见, 化合物 1、2、3 贯穿吴茱萸药材、炮制 (汤洗) 吴茱萸、吴茱萸汤的整个过程, 显示出质量传递的特性, 从而具有传递性和溯源性。根据峰面积计算, 吴茱萸汤洗 3 次后, 化合物 1、2、3 分别下降了



A-吴茱萸水提液 B-汤洗 3 次后吴茱萸水提液 C-吴茱萸汤

A-water extract of *Euodiae Fructus* B-water extract of *Euodiae*

Fructus washed 3 times with hot water C-*Euodiae Fructus* decoction

图 8 化合物 1、2、3 的传递性 HPLC 图 (325 nm)

Fig. 8 Transmissibility HPLC chromatograms (325 nm) of compounds 1, 2, and 3

18.04%、26.66%、18.40%，说明古籍中记载的吴茱萸需汤洗具有合理性。

2.6 化合物 1、2、3 的专属性研究

目前，成功分离并确定结构的咖啡酰葡萄糖酸异构体皆出自吴茱萸^[11,20-21]。此外，有报道通过质谱鉴定，在艾叶中发现了咖啡酰葡萄糖酸异构体^[22]，但没有成功分离鉴定的报道，因此，化合物 1、2、3 可能并非吴茱萸的专属性成分。同时，艾叶在《中国药典》2015 年版中同样记载为“小毒，归肝、脾、肾经”，此类成分可能为艾叶与吴茱萸共同的小毒物质基础。

3 讨论

3.1 基于网络药理学和入血分析的毒性确证

本课题组的前期研究采用体外 L02 细胞模型对吴茱萸水煎液的肝毒性进行评价，将吴茱萸水煎液的小毒物质基础指向了化合物 1、2、3^[10-11]。但是，化合物 1、2、3 能否被吸收入血，在体内是否能以原型存在，并作用于肝脏尚不可知。本研究通过网络药理学预测，发现肝脏可能为化合物 1、2、3 的靶器官；对化合物 1、2、3 的入血情况进行了定性分析，发现化合物 1、2、3 可以原型吸收入血。因此，化合物 1、2、3 可以在体内产生肝毒性。由于化合物 1、2、3 的分离难度较大，样品量较小，因此本研究采用体外细胞验证与入血分析相结合的方式对其肝毒性进行确证。

3.2 基于 Q-marker 属性的肝毒 Q-marker 确认

中药 Q-marker 是存在于中药中作为反映中药安全性和有效性的标示性物质，需要经过结构分析确定其化学结构，并可进行定性定量的特有的化学成分^[7]。基于中药 Q-marker 的定义，对化合物 1、2、3 进行了 Q-marker 属性的系统研究。在前期研究中，对化合物 1、2、3 进行了分离和结构确认以及体外的毒性确认^[11]，本研究对其混合物 MIX1-3 进行了毒性机制的初步研究，通过网络药理学和入血分析确证了其体内的肝毒性；通过一测多评法定性和总体定量的方式实现了 Q-marker 定性定量的要求；从药材→炮制→汤剂的应用过程，证明了其具有传递性和溯源性的特点。因此，可确认化合物 1、2、3 为吴茱萸水煎液的肝毒 Q-marker。

虽然化合物 1、2、3 可能不是吴茱萸的特有成分，从而不具有专属性或特有性，但是，由于基于专属性或特有性的中药 Q-marker 与中药的安全性和有效性并不直接相关，因此化合物 1、2、3 仍可

确认为吴茱萸的肝毒 Q-marker。由于单体的不稳定性，本研究通过外标法对化合物 1、2、3 作为整体进行了定量研究。但是，由于化合物 1、2、3 的吸收系数可能不同，对照品与待测样品中化合物 1、2、3 的比例不同时会产生偏差，更准确的定量方法仍需进一步研究。

3.3 基于传统用法的中药毒性 Q-marker 发现和确认策略

从吴茱萸传统用法入手，本研究 and 前期研究^[10-11]，共同构建了吴茱萸肝毒 Q-marker 的发现和确认的研究策略，通过“用法-预测-分离-验证-用法”的研究思路（图 9），准确获知了吴茱萸水煎液的肝毒性物质基础。通过吴茱萸不同用法之间的互相印证，增强了研究结果的可信度，完善了研究过程的证据链。

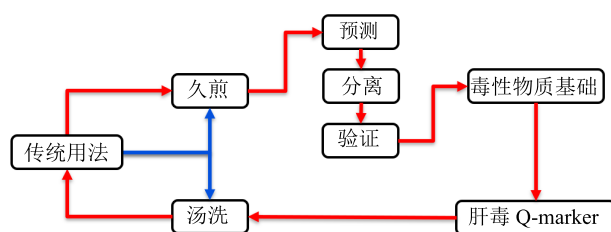


图 9 吴茱萸肝毒 Q-marker 研究策略

Fig. 9 Hepatotoxic Q-marker research strategy of *Euodiae Fructus*

本研究对吴茱萸中 3-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸（1）、4-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸（2）、2-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸（3）进行了入血分析和作用靶器官的网络药理学预测，确认为吴茱萸水煎液的肝毒物质基础。并对其 Q-marker 属性进行了系统研究，最终确认为吴茱萸水煎液的肝毒 Q-marker。吴茱萸自古有水煎煮、全粉入药、外敷 3 种用法^[10]，且有文献报道表明^[23-25]，除水煎液外，吴茱萸醇提物、挥发油均具有一定的肝毒性，加之吴茱萸水煎液、醇提物和挥发油的成分差异较大，因此，吴茱萸肝毒物质基础并非单一，其他极性部位的肝毒物质基础仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 高月. 基于临床的中药安全性及合理用药策略 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(2): 140-143.
- [2] 肖小河. “健康中国”战略下的中药安全性研究与思考 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 857-860.
- [3] 黄欣. 日本有关小柴胡汤引起间质性肺炎的研究近况 [J]. 国外医学中医中药分册, 1999, 21(5): 20-24.

- [4] 周冠强, 李元峰, 张肇勋. 鱼腥草注射液致过敏反应 63 例文献分析 [J]. 中国药房, 2013, 24(36): 3436-3439.
- [5] 张威, 黄文政, 甄仲. 含马兜铃酸中药致肾损害特征的研究现状 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 189-192.
- [6] Shen T, Liu Y X, Shang J, *et al.* Incidence and etiology of drug-induced liver injury in mainland China [J]. *Gastroenterol*, 2019, 156(8): 2230-2241.
- [7] 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.
- [8] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Deugs*, 2017, 9(1): 3-13.
- [9] 孙蓉, 李晓宇, 王亮, 等. 基于“效-毒”相关的 Q-marker 合理辨识与科学控制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(8): 1224-1231.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 王亮, 窦立雯, 郭威, 等. 基于中药传统用法的毒性 Q-Marker 发现: 以吴茱萸为例 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1159-1166.
- [12] Wang L, Wang D L, Guo W, *et al.* Four new caffeoylgluconic acid positional isomers from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, doi: 10.1080/10286020.2019.1621854.
- [13] Liu H, Wang L, Lv M, *et al.* AlzPlatform: An Alzheimer's disease domain-specific chemogenomics knowledgebase for polypharmacology and target identification research [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54(4): 1050-1060.
- [14] Wu C, Jin X, Tsueng G, *et al.* BioGPS: Building your own mash-up of gene annotations and expression profiles [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): 313-316.
- [15] Wu C, MacLeod I, Su A I. BioGPS and MyGene. info: Organizing online, gene-centric information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1): 561-565.
- [16] Wu C, Orozco C, Boyer J, *et al.* BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources [J]. *Genom Biol*, 2009, 10(11): R130.
- [17] 赵娟娟. 吴茱萸汤化学物质基础和对偏头痛大鼠的代谢组学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [18] 张红梅, 王长虹, 王峥涛. 基于大鼠体内吸收分布的吴茱萸指标成分选择及测定 [J]. 中成药, 2016, 38(7): 1538-1544.
- [19] 郝万山. 汉代度量衡制和经方药量的换算 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2005, 3(3): 48-51.
- [20] 仝小林, 穆兰澄, 姬航宇, 等. 《伤寒论》药物剂量考 [J]. 中医杂志, 2009, 50(4): 368-372.
- [21] Zhao M Y, Yang X W. Two new acylgluconic acids from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(8): 769-773.
- [22] He Y, Li J, Wu H H, *et al.* A new caffeoylgluconic acid derivative from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(13): 1243-1248.
- [23] Ren D, Ran L, Yang C, *et al.* Integrated strategy for identifying minor components in complex samples combining mass defect, diagnostic ions and neutral loss information based on ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry platform: *Folium Artemisiae Argyi* as a case study [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1550(18): 35-44.
- [24] 李波, 李莉, 赵军宁, 等. 吴茱萸乙醇提取物对大鼠急性毒性及肝毒性的影响 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 120-124.
- [25] 孙蓉, 黄伟, 吕丽莉. 吴茱萸挥发油单次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国药理与临床, 2012, 28(3): 55-58.