

• 药理与临床 •

基于 UHPLC-MS-MS 高通量分析的蜂胶影响 PXR/CYP3A4 调控血脂质量标志物筛选和评价

陈 昭^{1,2}, 张靖年^{1,2}, 胥爱丽^{1,2}, 陈伟韬^{1,2}, 李希远³, 江洁怡^{1,2}

1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510095
2. 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095
3. 纽约州立大学布法罗分校药学院, 纽约 布法罗 14214

摘要: 目的 采用精准、可量化的方法筛选蜂胶影响 PXR/CYP3A4 通路调控血脂的质量标志物。方法 采用人结肠癌 LS174T 细胞给予一定浓度的咪达唑仑注射液, 同时给予不同浓度的蜂胶已知成分对照品溶液, 孵育后提取样品, 采用 UHPLC-MS 法测定生成的 1'-羟基咪达唑仑含量, 根据测定结果筛选出对 PXR/CYP3A4 通路有显著调控作用的成分, 以这些成分为指标, 建立同时定量方法, 根据结果初步确定蜂胶中影响 PXR/CYP3A4 通路调控血脂代谢的质量标志物。结果 所评价的蜂胶成分中, 白杨素、高良姜素、异绿原酸 A、槲皮素、咖啡酸苯乙酯均能够显著提高或降低 1'-羟基咪达唑仑的量 (与对照组和阳性对照组比较), 提示上述成分能够显著影响 PXR/CYP3A4 表达; UHPLC-MS-MS 含量测定结果显示, 蜂胶中上述成分除异绿原酸 A 和乔松素外, 均具有适宜的含量以达到显效。结论 白杨素、高良姜素、咖啡酸苯乙酯和槲皮素可能是蜂胶影响 PXR/CYP3A4 通路调控血脂的质量标志物, 且均具有抑制相关靶标表达, 进而调节血脂水平的活性; 同时, 本研究所用质量标志物筛选、评价方法快速、高效、可量化, 能够适应基于 PXR/CYP3A4 的大通量活性成分筛选研究。

关键词: 蜂胶; PXR/CYP3A4; 质量标志物; 白杨素; 高良姜素; 咖啡酸苯乙酯; 槲皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0662-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.016

UHPLC-MS-MS high throughput analysis-based screening and evaluation of PXR/CYP3A4-induced lipid-regulating quality marker in propolis

CHEN Zhao^{1,2}, ZHANG Jing-nian^{1,2}, XU Ai-li^{1,2}, CHEN Wei-tao^{1,2}, LI Xi-yuan³, JIANG Jie-yi^{1,2}

1. The Fifth College of Clinic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China
3. The School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University at Buffalo, the State University of New York, Buffalo, 14214, US

Abstract: Objective To screen and evaluate PXR/CYP3A4-induced lipid-regulating quality marker in propolis with precise and quantitative method. **Methods** The LS174T cell was given certain amount of midazolam injection, along with different dosage of known components found in propolis, after incubation and extraction, the samples were determined for 1'-OH-midazolam, and each compound was evaluated to discover the PXR/CYP3A4 pathway regulatory activity according to the results; Then, compounds selected were used as indexes for UHPLC-MS-MS content determination, and their own values were regarded as a preliminary step of confirming PXR/CYP3A4-induced lipid-regulating quality markers of propolis. **Results** In all components tested, chrysin, galangin, heterochlorogenic acid A, quercetin, and caffeic acid phenethyl ester significantly affected the 1'-OH-midazolam yield compared with blank and positive control, indicating their obvious influence on PXR/CYP3A4 expression; The UHPLC-MS-MS

收稿日期: 2019-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903761); 国家重大科技专项 (2016ZX09101076); 广东省科技计划项目: 创新中药研发平台建设 (2017A070701017); 广东省中医药局课题 (20192006)

作者简介: 陈 昭, 副主任药师, 从事药物/中药作用机制和药效物质研究。Tel: (020)83482098 E-mail: cz20081331@126.com

determination showed that except galangin, heterochlorogenic acid A, and quercetin, all the other compounds had adequate content in propolis to take effect. **Conclusion** Chrysin, galangin, caffeic acid phenethyl ester, and quercetin were probably defined as PXR/CYP3A4-induced lipid-regulating quality marker in propolis, which inhibited the expression of such targets to down-regulate blood lipid level; Additionally, the method used for quality marker screening and evaluation in this study was fast, effective and quantitative, and capable of carrying out high throughput active component screening for PXR/CYP3A4 regulatory activities.

Key words: propolis; PXR/CYP3A4; quality markers; chrysin; galangin; caffeic acid phenethyl ester; quercetin

蜂胶及其提取物常用于制作调血脂类保健品或作为高脂血症患者的辅助用药, 蜂胶具有较好的调血脂活性, 但市面上的蜂胶类产品普遍存在功效差异较为显著的问题^[1-3]。究其原因, 主要是《中国药典》2015 年版所规定的指标性成分与其目标活性间的联系尚不清楚, 也缺乏相关活性成分的筛选和评价研究^[4-6]。蜂胶中所含主要成分为黄酮类、酚酸类、萜类等, 可能是该药材发挥调血脂活性的物质基础。

质量标志物 (Q-marker) 是近年来兴起的药物特别是中药质量评价新概念, 即通过一系列筛选和验证研究, 找到与该药物目标活性相关的成分作为质量评价指标^[7-9]。Q-marker 的筛选通常以药效学和靶标亲和活性成分筛选为切入点。孕甾烷 X 受体 (PXR) 是调控糖脂代谢和胆汁酸外排的关键靶标之一, 能够抑制该受体的化合物, 则可能成为潜在的血脂调控活性成分^[10-12]。此外, PXR 的表达对下游细胞色素 P450 3A4 酶 (CYP3A4) 的功能也存在显著调控作用, 后者作为药物代谢酶, 其活性可以通过测定特定药物的产量进行评价。因此, 建立基于 UHPLC-MS-MS 等分析技术的精准、可量化的 CYP3A4 活性测定方法, 对于评价蜂胶介导 PXR 靶标调控血脂的机制与物质基础有巨大的推动意义。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Fisher TSQ-Quantum 高效液相色谱-质谱联用仪 (三重四极杆, ESI 离子源, Accela 型高压泵, Accela 型自动进样器, 美国 Thermo Fisher 公司); Phenomenex-C₁₈ 柱 (50 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 A Phenomenex 公司); XS205DU 型十万分之一电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 低温高速离心机、涡旋混合仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 恒温数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

1'-羟基咪达唑仑 (批号 200-659-6, 质量分数 100%) 对照品购自 Sigma-Aldrich 公司 (德国); 胡椒碱 (批号 110775-201405, 质量分数 98.9%)、

白杨素 (批号 111701-200501, 质量分数 100%)、高良姜素 (批号 1199-200501, 质量分数 99.6%)、乔松素 (批号 111829-201703, 质量分数 99.5%)、槲皮素 (批号 100081-201509, 质量分数 99.1%)、咖啡酸苯乙酯 (批号 112024-201601, 质量分数 99.7%)、山柰酚 (批号 110-861-201611, 质量分数 93.8%) 均购自中国食品药品检定研究院; 芹黄素 (批号 Q-002-161216, 质量分数 98%)、异绿原酸 A (批号 Y-068-160726, 质量分数 98%) 对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; UHPLC-MS 分析、样品处理和细胞实验用乙腈、甲酸、甲醇、二甲基亚砜 (DMSO) 等试剂均购自 Merck 公司 (德国); 咪达唑仑注射剂 (批号 20171205, 规格 10 mg/2 mL), 购自江苏恩华药业股份有限公司; 15 批 (批号 fj-20170711-05~fj-201807007) 蜂胶购自山东博康蜂业有限公司, 经广东省中医药工程技术研究院崔景朝主任中药师鉴定为蜜蜂科昆虫意大利蜂 *Apis mellifera* L. 工蜂采集的植物树脂与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的具有黏性的固体胶状物; 利福平胶囊 (批号 1801101, 规格 0.15 g/粒) 购自成都锦华药业有限责任公司。

1.3 细胞

人结肠癌 LS174T 细胞购自美国 ATCC 公司。

2 方法与结果

2.1 PXR-CYP3A4 亲和活性成分筛选实验

取 LS174T 细胞, 加入 96 孔板中 (每孔 30 000 个), 分为对照组、阳性对照组、给药组, 对照组加入 DMSO, 阳性对照组加入利福平 (25 μmol/L), 给药组分别加入不同浓度 (12.5、25、50 μmol/L) 的对照品溶液, 孵育 48 h; 取所得细胞液, 去除培养基, 再加入含咪达唑仑 30 μmol/mL 的培养基, 震荡混匀后, 孵育 4 h, 即得测定用细胞液样品。

2.2 样品制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取 1'-羟基咪达唑仑对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 即得 1'-羟基咪达唑仑 100

μg/mL 的对照品溶液；另取白杨素、高良姜素、异绿原酸 A、乔松素、槲皮素、咖啡酸苯乙酯、山柰酚、芹黄素对照品适量，精密称定，置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，即得质量浓度均为 10 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 PXR-CYP3A4 亲和活性评价样品的制备 取“2.1”项下所得细胞液，每孔取 100 μL，置于 1.5 mL 离心管中，精密加入含有内标（胡椒碱 100 ng/mL）的乙腈 300 μL，4 °C 下以 13 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液 200 μL，置于带内衬管的液相色谱进样瓶中，即得。

2.2.3 蜂胶 PXR-CYP3A4 亲和活性成分含量测定样品的制备 取蜂胶样品，精密称定，取约 1 g，置

于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇 25 mL，密塞，称定质量，加热回流 1 h，放冷后以 50% 乙醇补足减失质量，以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，精密吸取续滤液 100 μL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释并定容至刻度，取所得溶液 100 μL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释并定容至刻度，即得。

2.3 UHPLC-MS 测定条件

2.3.1 质谱条件 ESI 离子源，喷雾电压 3 500 V（正离子）和 3 000 V（负离子），汽化室温度 350 °C，鞘气（N₂）压力 206.85 kPa（30 psi），辅气（Ar）压力 68.95 kPa（10 psi），离子传输管温度 300 °C；各待测组分及内标质谱参数见表 1。

表 1 待测组分质谱参数

Table 1 Mass parameters of components detected

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	管径补偿电压/V	碰撞电压/V	离子模式
1'-羟基咪达唑仑	342.2	324.2	105	21	+
胡椒碱（内标）	286.0	201.0	100	21	+
白杨素	253.0	253.0	100	0	-
高良姜素	271.0	153.0	105	33	+
异绿原酸 A	515.2	353.1	105	20	-
乔松素	255.0	151.0、171.0、213.0	105	24、10、20	+
槲皮素	303.0	153.0	105	33	+
咖啡酸苯乙酯	283.0	135.2、179.1	105	28、28	-
山柰酚	287.0	153.0	105	39	-
芹黄素	271.0	153.0	105	33	+

2.3.2 色谱条件 采用 Phenomenex-C₁₈ 柱（50 mm×4.6 mm，5 μm），以 0.1% 甲酸（A）-乙腈（B）为流动相，梯度洗脱程序：0~0.3 min，15% B；0.3~1.0 min，15%~90% B；1.0~2.5 min，90%~15% B；体积流量 700 μL/min，柱温 25 °C，进样量 10 μL。1'-羟基咪达唑仑及其内标 UHPLC-MS 离子流图见图 1。

2.4 细胞液测定方法学考察

2.4.1 标准曲线、线性和灵敏度 取空白细胞液，分别置于不同 1.5 mL 离心管中，每管 100 μL，分别精密加入 1'-羟基咪达唑仑对照品溶液适量，即得每毫升细胞液中分别含 1'-羟基咪达唑仑对照品 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1 000 ng 的溶液，每个质量浓度平行配制 3 份（除 0.5 ng/mL 配制 6 份外）。取上述溶液，按“2.3”项下条件测定 1'-羟基咪达唑仑和内标峰面积，计算二者峰面积比。以 1~1 000 ng/mL 的样品测定所得峰面积比为纵坐标，1'-羟基咪达唑仑质量浓度为横坐标，将数据导入 LC-Quan 软件（美国 Thermo-Fisher

公司）中，得标准曲线方程为 $Y=1\ 553.6X-1.209\ 3$ ($r^2=0.997\ 5$)，表明方法线性关系良好，能够在 1~1 000 ng/mL 质量浓度内对 1'-羟基咪达唑仑进行准确测定。将 0.5 ng/mL 样品测定结果代入标准曲线中，计算回收率和 RSD，结果显示平均回收率为 93.92%，RSD 为 15.36%，表明方法灵敏度良好。

最低定量限（LLOQ）和检测限（LOD）的测定方法：取“2.4.1”项下标准添加溶液，加入空白细胞液逐级稀释，将 UHPLC-MS 测定所得数据导入 Xcalibur 软件（美国 Thermo-Fisher 公司）中，根据系统给出的信噪比（S/N）确定 LLOQ 和 LOD，结果显示，当药物质量浓度在 0.5 ng/mL 及以上时， $S/N>10$ ，当药物质量浓度在 0.1 ng/mL 以上时， $S/N>3$ ；此外，所检测质量浓度（0.05~0.5 ng/mL）范围内未见 S/N 等于 10 或等于 3 的浓度点，故将 LLOQ 定为 0.5 ng/mL，LOD 定为 0.1 ng/mL。

2.4.2 精密度和准确度 取空白细胞液，分别置于不同 1.5 mL 离心管中，每管 100 μL，分别精密加

入 1'-羟基咪达唑仑对照品溶液适量, 即得每毫升细胞液中分别含 1'-羟基咪达唑仑对照品 2、50、800 ng/mL 的溶液, 记为 QCL、QCM 和 QCH, 每种质量浓度平行配制 6 份。取上述溶液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下 UHPLC-MS 条件测定 1'-羟基咪达唑仑和内标峰面积, 计算含量、回收率和 RSD。结果显示(表 2), 方法精密度、准确度良好。

2.4.3 稳定性 取空白细胞液, 按“2.4.2”项下方

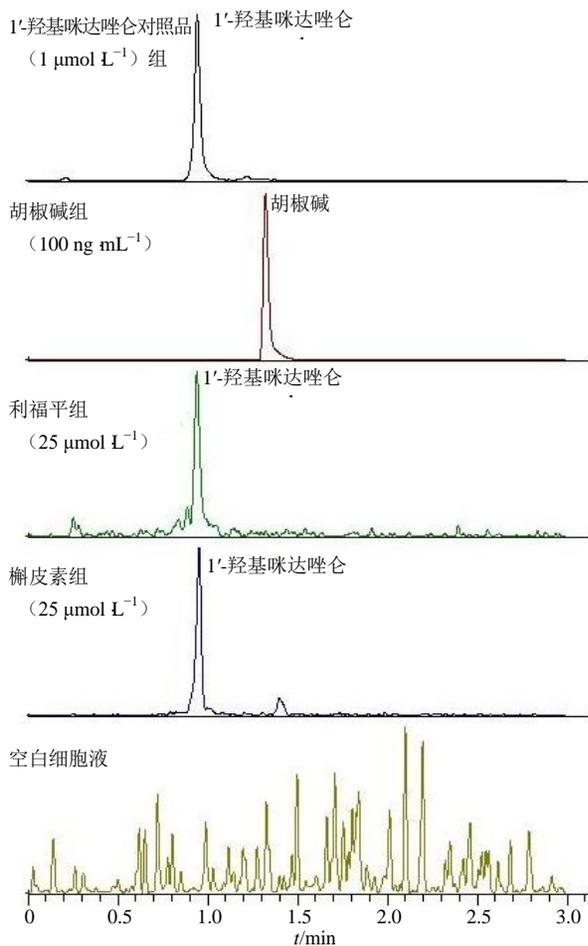


图 1 PXR-CYP3A4 亲和活性测定 UHPLC-MS 图谱
Fig. 1 UHPLC-MS chromatogram for PXR-CYP3A4 affinity tests

表 2 精密度和准确度试验结果 (n = 6)

Table 2 Results of precision and accuracy (n = 6)

组别	标示质量浓度/(ng mL ⁻¹)	实测质量浓度/(ng mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%
QCL	2.000	2.011 ± 0.204	0.55	10.17
QCM	50.000	50.627 ± 4.794	1.25	9.47
QCH	800.000	820.711 ± 63.932	2.59	7.79

法制备溶液, 再分别按下述方法处理: (1) 取所得溶液, 置于-20 °C 冻存, 经过 3 个冻融循环后, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 即得冻融稳定性样品; (2) 取所得溶液, 在常温下放置 8 h, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 即得常温稳定性样品; (3) 取所得溶液, 在 4 °C 下于自动进样器中放置 8 h, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 即得进样器稳定性样品; (4) 取所得溶液, -20 °C 下冻存 30 d 后, 取出, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 即得长期稳定性样品。上述样品每种方法每个质量浓度分别平行制备 6 份, 取所得供试品溶液, 按“2.3”项下 UHPLC-MS 条件测定 1'-羟基咪达唑仑和内标峰面积, 计算含量、回收率和 RSD。结果显示(表 3), 方法所制备供试品在考察范围内稳定性良好。

表 3 稳定性试验结果 (n = 6)

Table 3 Results of stability tests (n = 6)

组别	标示质量浓度/(ng mL ⁻¹)	实测质量浓度/(ng mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%
冻融	2.000	2.126 ± 0.105	6.33	4.96
	50.000	50.878 ± 3.353	1.76	6.59
	800.000	788.435 ± 56.911	-1.44	7.22
常温	2.000	1.943 ± 0.136	-2.87	7.00
	50.000	49.898 ± 4.405	-0.20	8.83
	800.000	804.827 ± 94.312	0.60	11.72
进样器	2.000	2.019 ± 0.153	0.94	7.59
	50.000	51.387 ± 4.804	2.77	9.35
	800.000	799.335 ± 68.237	-0.08	8.54
长期	2.000	2.056 ± 0.176	2.81	8.58
	50.000	50.368 ± 5.604	0.74	11.13
	800.000	805.510 ± 73.871	0.69	9.17

2.4.4 基质效应 取空白细胞液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 所得溶液精密加入 1'-羟基咪达唑仑对照品溶液适量, 即质量浓度分别为 2、50、800 ng/mL 的溶液; 另取 1'-羟基咪达唑仑对照品溶液适量, 分别置于不同 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 即得质量浓度分别为 2、50、800 ng/mL 的溶液。取上述供试品溶液, 按“2.3”项下条件测定 1'-羟基咪达唑仑和内标峰面积, 计算含量、回收率和 RSD。结果显示(表 4), 样品基质对测定的干扰在可接受范围内。

2.5 蜂胶 PXR-CYP3A4 亲和活性成分的筛选和评价

取“2.1”项下所得样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下条件测定 1'-羟基咪达唑仑和内标峰面积, 计算含量, 根据含量计

表 4 基质效应考察结果 (n = 6)
Table 4 Results of matrix effects (n = 6)

组别	标示质量浓度/(ng mL ⁻¹)	实测质量浓度/(ng mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%
溶剂	2.000	2.553 ± 0.042	27.66	1.64
	50.000	60.688 ± 1.500	1.76	2.47
	800.000	1 000.843 ± 29.313	25.10	2.93
细胞液	2.000	2.381 ± 0.099	19.06	4.18
	50.000	61.146 ± 2.446	22.29	4.00
	800.000	973.829 ± 50.064	21.73	5.14

算 1'-羟基咪唑啉相对值 (给药组 1'-羟基咪唑啉含量/对照组 1'-羟基咪唑啉含量), 所得结果代入 SPSS 6.2 中分析, 结果显示 (图 2), 与对照组 (DMSO) 比较, 芹黄素、山柰酚、高良姜素、白杨素和咖啡酸苯乙酯具有较好的 PXR-CYP3A4 抑制活性, 异绿原酸 A 和槲皮素具有较好的 PXR-CYP3A4 激动活性, 上述成分均呈现较为明显的浓度依赖性, 乔松素则作用不明显, 故剔除。此外, 与利福平组比较, 起抑制作用的成分效果更明显。综合上述结果, 可将芹黄素、山柰酚、高良姜素、白杨素、咖啡酸苯乙酯以及异绿原酸 A 和槲皮素列为候选亲和活性成分。

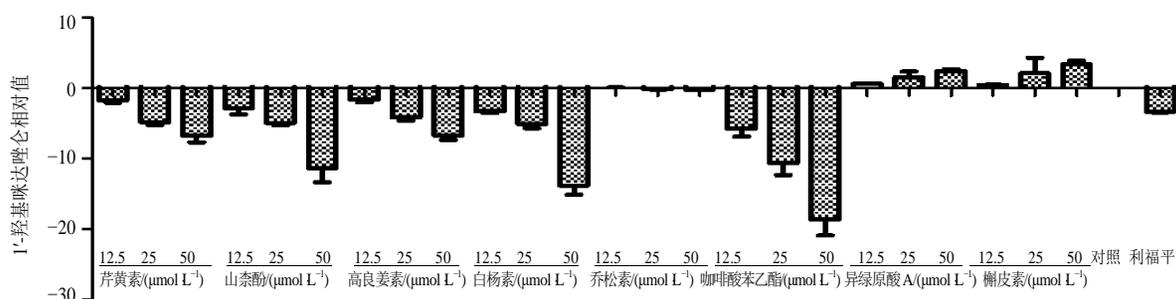


图 2 PXR-CYP3A4 亲和活性成分筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Result of PXR-CYP3A4 affinity selection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 蜂胶中候选亲和活性成分含量测定方法学考察

2.6.1 标准曲线和线性关系考察 取“2.2.1”项下制备的芹黄素、山柰酚、高良姜素、白杨素、咖啡酸苯乙酯、异绿原酸 A 和槲皮素混合对照品溶液适量, 置于不同 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 即得上述成分质量浓度均为 10、20、50、100、200、500、1 000 ng/mL 的溶液, 吸取上述溶液, 按“2.3”项下条件测定候选亲和活性成分和内标峰面积, 将数据代入 LC-Quan 软件中, 所得各成分标准曲线和 r^2 见表 5。结果表明, 方法线性关系良好, 能够在 10~1 000 ng/mL 内对候选成分进行准确定量。

表 5 各候选成分线性关系考察结果

Table 5 Results of linearity tests for each candidate compound

化合物	回归方程	r^2
芹黄素	$Y = 6\,790.4 X - 3.669\,5$	0.999 8
山柰酚	$Y = 2\,164.4 X - 10.003$	0.999 6
高良姜素	$Y = 965.11 X - 1.201\,5$	0.999 6
白杨素	$Y = 8\,470.7 X - 10.987$	0.999 4
咖啡酸苯乙酯	$Y = 2\,365.7 X - 5.746\,3$	0.999 7
异绿原酸 A	$Y = 248\,510 X - 3.116\,1$	0.999 7
槲皮素	$Y = 2\,448.4 X - 6.767\,8$	0.999 7

2.6.2 LLOQ 和 LOD 取“2.6.1”项下质量浓度为 10 ng/mL 的溶液, 逐级稀释, 将 UHPLC-MS 测定结果代入 Xcalibar 软件中, 根据软件给出的 S/N 确定 LLOQ 和 LOD, 结果显示, 芹黄素、白杨素、咖啡酸苯乙酯的 LLOQ 为 0.05 ng/mL, LOD 为 0.01 mg/mL; 槲皮素、高良姜素、白杨素的 LLOQ 为 0.1 ng/mL, LOD 为 0.05 ng/mL; 山柰酚的 LLOQ 为 0.5 ng/mL, LOD 为 0.1 ng/mL; 异绿原酸 A 的 LLOQ 为 0.5 ng/mL, LOD 为 0.2 ng/mL。上述结果表明, 本研究用 UHPLC-MS 测定方法灵敏度良好。

2.6.3 精密度考察 取“2.2.3”项下制备的供试品溶液, 按“2.3”项下条件重复进样 6 次, 记录各成分和内标峰面积, 计算 RSD。结果显示, 各候选成分峰面积比的 RSD 在 0.77%~2.88%, 表明方法精密度良好。

2.6.4 加样回收率考察 取蜂胶样品 0.05 g, 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 按照表 6 最终质量浓度精密加入“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液, 按“2.2.3”项下方法自“精密加入 50%乙醇 25 mL”起制备供试品溶液, 每个质量浓度平行制备 3 份, 按“2.3”项下条件进样, 记录各成分和内标峰面积, 计算含量、回收率和 RSD。结果显示 (表 6),

表 6 各组分加样回收率考察结果 (n = 6)

Table 6 Results of recoveries (n = 6)

成分	含有量/(mg g ⁻¹)	加入量/(mg g ⁻¹)	测得量/(mg g ⁻¹)	回收率/%
芹黄素	7.140	3.570	10.786±0.122	102.13±3.43
	7.140	7.140	14.295±0.063	100.21±0.88
	7.140	10.710	17.705±0.360	98.65±3.36
山柰酚	1.176	0.588	1.176±0.022	100.51±3.69
	1.176	1.176	2.325±0.029	97.68±3.32
	1.176	1.764	3.000±0.027	103.38±1.53
高良姜素	2.918	1.459	4.375±0.057	99.86±3.90
	2.918	2.918	5.785±0.026	98.26±0.90
	2.918	4.377	7.421±0.086	102.89±1.97
白杨素	2.668	1.334	3.984±0.036	98.62±2.73
	2.668	2.668	5.324±0.115	99.56±4.30
	2.668	4.002	6.739±0.069	101.72±1.72
咖啡酸苯乙酯	1.818	0.909	2.733±0.044	100.66±4.85
	1.818	1.818	3.656±0.069	101.07±3.78
	1.818	2.727	4.551±0.097	100.22±3.55
异绿原酸 A	0.233	0.117	0.350±0.003	100.75±2.86
	0.233	0.233	0.466±0.007	99.90±3.18
	0.233	0.350	0.577±0.010	98.48±2.78
槲皮素	0.324	0.162	0.486±0.006	99.71±3.48
	0.324	0.324	0.642±0.010	98.27±3.07
	0.324	0.486	0.819±0.013	101.94±2.62

各候选成分的平均加样回收率在 97.68%~103.38%，RSD 在 0.88%~4.85%，表明方法准确度良好。

2.6.5 稳定性考察 取“2.2.3”项下制备的供试品溶液，置于自动进样器中，分别于 0、2、4、6、8、12 h 按“2.3”项下条件进样，记录各成分和内标峰面积，计算含量和 RSD。结果显示，各候选成分的含量 RSD 在 0.90%~2.41%，表明所制备供试品在 12 h 内稳定性良好。

2.6.6 重复性考察 取同一批次蜂胶样品（批号 fj-20170727-2），按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下条件进样，记录各成分和内标峰面积，计算含量和 RSD。结果显示，各候选成分的含量 RSD 在 0.73%~2.47%，表明方法重复性良好。

2.6.7 基质效应考察 取同一批次蜂胶样品（批号 fj-20170727-2），按“2.2.3”项下方法（至“精密吸取续滤液 100 μL”为止）处理，置于 10 mL 量瓶中，加流动相（乙腈-0.1%甲酸，50：50）稀释并定容至刻度，共平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下方法进样，记录各成分和内标峰面积，计算含量并与供试品溶液对比，结果显示，基质效应样品中各组分含量分别为供试品溶液的 93.51%~105.77%，表明本方法不存在明显的基质干扰。

2.7 多批次蜂胶药材候选成分含量测定

取 15 批蜂胶药材，每份样品按“2.2.3”项下方

法平行制备 2 份供试品溶液，按“2.3”项下方法进样，记录各成分和内标峰面积，计算质量分数。结果显示（表 7），除异绿原酸 A 外，其余各候选成分均具有发挥相关活性所需必要质量分数，故最终将芹黄素、山柰酚、白杨素、高良姜素、咖啡酸苯乙酯和槲皮素初步定为蜂胶影响 PXR/CYP3A4 调控血脂的质量标志物；其中，白杨素、高良姜素、咖啡酸苯乙酯可能起调血脂作用，槲皮素可能起升血脂作用。

3 讨论

3.1 基于代谢物产量评价 PXR/CYP3A4 调控活性的特点和优势

CYP3 酶系是生物体内常见的药物代谢酶，CYP3A4 的表达受到 PXR 的显著调控。因此，研究药物干预下 CYP3A4 表达的变化，可以间接证明上述药物对 PXR 靶标的调控作用。此外，由于咪达唑仑经 CYP3A4 代谢后生成的 1'-羟基咪达唑仑能够找到市售对照品，使本研究所设计的筛选和评价方法较 Western blotting 等传统分子生物学方法更为快速、高效，定量也更为精确，适宜于对中药等多组分复杂体系进行高通量筛选和评价研究。

3.2 蜂胶血脂调控质量标志物筛选结果分析

根据筛选和含量测定结果，可知蜂胶中具有 PXR/CYP3A4 抑制活性的 Q-marker 为白杨素、高良姜素、

表 7 各批次蜂胶药材含量测定结果 ($n = 2$)Table 7 Content determination results for propolis of different batches ($n = 2$)

批号	质量分数/(mg g ⁻¹)						
	芹黄素	山柰酚	高良姜素	白杨素	咖啡酸苯乙酯	异绿原酸 A	槲皮素
fj-20170711-05	13.086	4.761	12.554	11.633	10.839	0.064	1.139
fj-20170711-08	19.155	5.236	16.873	14.237	13.913	0.030	1.840
fj-20170711-09	15.351	6.090	14.314	12.922	11.076	0.023	1.559
fj-20170711-10	14.464	4.937	13.132	12.568	10.747	0.029	1.618
fj-20170727-1	14.741	7.153	20.320	18.788	10.152	0.080	1.098
fj-20170727-2	14.280	2.352	5.836	5.337	3.635	0.466	0.647
fj-20170727-3	12.941	6.313	17.652	15.688	8.736	0.051	1.078
fj-20170727-4	11.285	5.733	16.554	13.466	8.431	0.031	0.896
fj-20170727-5	11.607	5.056	15.798	13.618	7.378	0.053	0.790
fj-20170727-8	5.054	1.088	2.278	3.071	0.637	0.019	0.224
fj-20170727-9	11.086	6.226	17.732	13.282	8.600	0.064	1.092
fj-20170803-1	8.204	3.577	10.618	10.935	6.076	0.042	0.935
fj-20170803-2	15.636	8.617	19.655	17.158	8.560	0.071	1.573
fj-20170803-3	12.412	9.234	22.328	16.688	8.310	0.145	1.412
fj-201807007	11.016	23.645	41.017	16.338	9.960	0.000	0.280

咖啡酸苯乙酯, 激动活性的 Q-marker 为槲皮素。即当 PXR 受到抑制时, 胆汁酸和脂肪酸合成减少, 能量代谢加速, 进而导致总体血脂水平的下降; 而当 PXR 受到激动时, 则出现与之相反的作用。与此同时, PXR 靶标表达上调时, 会促进胆汁酸外排, 减轻肝胆相关炎症反应, 可能也会起到调血脂的功效。因此, 为更加全面、准确评价蜂胶中活性成分对血脂调控的作用, 还需结合中药整体、全面的作用机制, 结合网络药理学相关知识, 从更多脂代谢相关靶点或 PXR/CYP3A4 上下游基因进行更为深入的分析。

本研究以药物代谢产物为指标, 对蜂胶中具有 PXR/CYP3A4 亲和活性的成分进行了筛选和评价, 初步找到了蜂胶影响 PXR/CYP3A4 调控血脂的质量标志物。根据筛选和评价结果, 初步确定白杨素、高良姜素、咖啡酸苯乙酯具有抑制活性的成分在蜂胶中应规定最低限量, 即筛选所用中间剂量 (25 $\mu\text{mol/mL}$) 的 80%; 槲皮素等激动活性成分在蜂胶中则应规定最高限量, 即筛选所用中间剂量 (25 $\mu\text{mol/mL}$) 的 80%。本研究所用方法快速、高效、可量化, 为研究蜂胶影响 PXR/CYP3A4 调控血脂的机制和物质基础提供了科学依据, 所筛选得出的质量标志物相较传统指标性成分, 更能够表征蜂胶的调血脂功效。

参考文献

[1] 喻建辉, 高荫榆. 蜂胶软胶囊调节血脂作用研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(7): 260-262.

- [2] 陈璇, 任泽明, 童晔玲, 等. 蜂胶配伍姜黄降血脂功能实验研究 [J]. 新中医, 2016, 48(3): 227-229.
- [3] 何嘉莉, 孙晓泽, 罗广波, 等. 高脂血症中医药治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(3): 195-197.
- [4] 金平, 张宇, 王会, 等. 蜂胶的化学成分及药理作用 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(4): 432-434.
- [5] 黄晓其, 吴晓丽, 颜思珊, 等. 蜂胶对 Triton-WR1339 所致高脂血症小鼠的降脂作用及调控脂代谢机制 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(8): 1020-1024.
- [6] 周先汉, 张秀喜, 朱稀霖, 等. 蜂胶提取物抑菌活性及其抑菌机理的研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(5): 233-236.
- [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] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [9] 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.
- [10] Hogle B C, Guan X D, Folan M M, et al. PXR as a mediator of herbdrug interaction [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 26(2S): 1-6.
- [11] Jonkera J W, Liddle C, Downes M. FXR and PXR: Potential therapeutic targets in cholestasis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 130(3/5): 147-158.
- [12] Ihunnah C A, Jiang M X, Xie W. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(8): 956-963.