

DOI:10.3724/zdxbyxb-2022-0347

中药现代化

· 专题报道 ·

基于HPLC-Q-Exactive MS的补阳还五汤化学成分快速识别及多成分含量测定

郑留燕, 万浩芳, 鲁一航, 丁志山, 李 畅, 万海同

浙江中医药大学 浙江省中医脑病重点实验室, 浙江 杭州 310053

[摘要] 目的:建立一种基于高效液相色谱串联四极杆轨道阱质谱(HPLC-Q-Exactive MS)的分析方法,对补阳还五汤中的化学成分进行快速鉴定,并以高效液相色谱紫外检测(HPLC-UV)对其中含量较高的成分进行定量检测。方法:通过文献检索建立补阳还五汤相关化合物数据库;使用HPLC-Q-Exactive MS系统在全扫描/数据依赖性二级质谱(dd-MS²)负离子模式下采集质谱信息;借助Compound Discoverer 3.0软件分析推断补阳还五汤中的化学成分;进一步建立HPLC-UV含量测定方法,对其芍药苷、没食子酸、羟基红花黄色素A、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素等8种活性成分进行定量分析。结果:通过定性分析,共鉴定出补阳还五汤中178个化合物。HPLC-UV定量分析方法学考察结果显示,8个主要成分在各自浓度范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.9990$),精密度和稳定性相对标准偏差(RSD)均小于15%,加样回收率RSD为1.6%~2.4%。结论:本研究所建立的方法体系实现了补阳还五汤中成分的快速识别和主要成分的精确定量,其中芍药苷、羟基红花黄色素A和没食子酸含量较高,有望作为质控标志物。



[关键词] 补阳还五汤;化学成分;高效液相色谱法;高效液相色谱串联四极杆轨道阱质谱;定量分析

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A

Rapid identification and quantitative determination of chemical compositions in Buyang Huanwu decoction based on HPLC-Q-Exactive mass spectrometry

ZHENG Liuyan, WAN Haofang, LU Yihang, DING Zhishan, LI Chang, WAN Haitong
(Zhejiang Provincial TCM Key Laboratory of Encephalopathy, Zhejiang Chinese Medical

收稿日期:2022-06-25 接受日期:2022-08-28

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC1708600,2019YFC1708604);浙江省中医药科技计划(2021ZQ025);浙江省自然科学基金(LR19H280001)

第一作者:郑留燕,硕士研究生,主要从事中药药效物质基础研究;E-mail:zhengliuyan@zcmu@126.com;https://orcid.org/0000-0001-7543-4047

通信作者:万海同,教授,博士生导师,主要从事中医药防治心脑血管疾病研究;E-mail:whtong@126.com;https://orcid.org/0000-0001-5726-7214 李 畅,副研究员,硕士生导师,主要从事中药药效物质基础研究;E-mail:lichang@zcmu.edu.cn;https://orcid.org/0000-0003-4681-0191

University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding authors: WAN Haitong, E-mail: whitong@126.com, <https://orcid.org/0000-0001-5726-7214>; LI Chang, E-mail: lichang@zcmu.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-4681-0191>

[**Abstract**] **Objective:** To establish an analytical method for rapid identification of chemical compositions and quantitative determination of major compositions in Buyang Huanwu decoction (BYHWD) based on high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap mass spectrometry (HPLC-Q-Exactive MS) and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV). **Methods:** The mass spectrometry information was collected in Full MS/dd-MS² negative ion mode with HPLC-Q-Exactive MS system; the chemical compositions of BYHWD were subsequently annotated with Compound Discoverer 3.0 software and a self-built in-house compound library. Eight major compositions (paeoniflorin, gallic acid, hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, calycosin-7-glucoside, ononin, calycosin, formononetin) were picked out and their contents were quantitatively determined with HPLC-UV analysis. **Results:** A total of 178 compounds in BYHWD were tentatively identified. The results of HPLC-UV quantitative analysis showed that 8 compositions had a good linear relationship in their respective concentration range ($R^2 \geq 0.9990$), the relative standard deviations (RSD) of precision and stability were all less than 15%, and the recovery rate RSD was between 1.6% and 2.4%. **Conclusions:** The method established in this study can realize the rapid identification and accurate quantification of the major compositions in BYHWD. Paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and gallic acid may be used as quality control markers.

[**Key words**] Buyang Huanwu decoction; Chemical composition; High performance liquid chromatography; HPLC-Q-Exactive MS; Quantitative analysis

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(5): 534-543.]

[**缩略语**] 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC); HPLC串联四极杆轨道阱质谱(HPLC-quadrupole orbitrap mass spectrometry, HPLC-Q-Exactive MS); HPLC紫外检测(HPLC-ultraviolet detection, HPLC-UV); 数据依赖性二级质谱(data-dependent secondary mass spectrometry, dd-MS²); 质荷比(mass-to-charge ratio, m/z); 中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP); 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)

补阳还五汤出自清代王清任《医林改错》^[1], 为益气活血的经典代表方, 由黄芪、当归、赤芍、红花、川芎、桃仁、地龙等七味中药组成。临床常用于气虚血瘀型中风患者。临床研究表明, 补阳还五汤对于脑卒中治疗有显著疗效^[2-4], 基于补阳还五汤研发的中成药脑心通胶囊等对缺血性脑卒中也有显著疗效^[5-6]。现代药理学研究表明, 补阳还五汤可以通过抗脑水肿、减少神经凋亡、促神经再

生、抗氧化应激、抗炎、促血管新生等多个途径发挥防治缺血性脑卒中的作用^[7]。

作为经典的益气活血类方药, 补阳还五汤含有丰富的化学成分, 包括黄酮、皂苷、生物碱、多糖、酚酸、苯酞等多类生物活性物质。对中药复方进行定性和定量分析是保证其安全性和有效性的重要手段。目前, 国内外关于补阳还五汤有效成分的定性^[8]或定量^[9]研究仅局限于少数成分, 不

能反映复方的整体功效。由于缺乏系统的定性分析以及多指标成分含量的同时测定,补阳还五汤的质量评价仍存在困难。近年来,HPLC和高分辨质谱在中药分析中应用广泛,适用于大多数成分的分析。本研究在前期研究的基础上,利用HPLC-Q-Exactive MS对补阳还五汤进行定性分析,全局性表征补阳还五汤中的化学成分;同时建立HPLC-UV含量测定方法,对补阳还五汤中含量较高的特征成分进行定量分析,以期完善补阳还五汤的药效物质基础及质量控制评价。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

补阳还五汤浓缩颗粒(批号200603)由陕西步长制药有限公司提供;没食子酸、阿魏酸、芍药苷为上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素为成都埃法生物科技有限公司产品;羟基红花黄色素A为上海源叶生物科技有限公司产品。所有对照品纯度均不低于98%。甲醇、乙腈(均为HPLC级)为美国TEDIA公司产品;甲酸(88%,分析纯)为国药集团试剂有限公司产品;去离子水取自Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司)。

CAPCELL PAK C₁₈ MG II色谱柱为日本Osaka Soda公司产品;UltiMate 3000型液相色谱仪串联Q-Exactive四级杆-高分辨质谱仪、高速冷冻离心机为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪为美国Agilent Technologies公司产品;微量分析天平为瑞士Mettler Toledo公司产品;KQ-300DE数控超声波清洗器为昆山市超声仪器有限公司产品。

1.2 供试品溶液和对照品溶液制备

1.2.1 供试品溶液的制备 取补阳还五汤浓缩颗粒约0.5 g溶于2 mL去离子水。45 ℃、40 kHz、200 W超声60 min,13 800×g离心10 min,收集上清液待测。

1.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品适量于5 mL容量瓶中,以甲醇为溶剂定容,配制成以下浓度对照品储备液:没食子酸(2.8 mg/mL)、阿魏酸(2.8 mg/mL)、毛蕊异黄酮苷(0.56 mg/mL)、芍药苷(5.6 mg/mL)、芒柄花苷(0.56 mg/mL)、毛蕊异黄酮(0.56 mg/mL)、芒柄花素(0.56 mg/mL)、羟基红花黄色素A(2.8 mg/mL)。

混合对照品溶液均由各对照品储备液配制而成,对照品储备液与混合对照品溶液均置于4 ℃避光保存。

1.3 采用HPLC-Q-Exactive MS进行定性分析

1.3.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ MG II色谱柱(4.6 mm×150 mm, 3 μm),流动相:0.5%甲酸水(A)与甲醇-乙腈(B)1:1(v/v),梯度洗脱(0~10 min,2%B;10~35 min,2%~10%B;35~50 min,10%~15%B;50~80 min,15%~25%B;80~100 min,25%~60%B;100~110 min,60%~90%B;110~120 min,90%B),流速为0.4 mL/min,柱温30 ℃,进样量10 μL。检测波长为254 nm。

1.3.2 质谱条件 采用配备加热电喷雾电离的Q-Exactive质谱,数据采集使用全扫描/dd-MS²负离子模式。全扫描参数:扫描范围(100~1500 m/z),分辨率70 000,自动增益控制为 3×10^6 ;dd-MS²参数:分辨率17 500,自动增益控制为 1×10^5 。鞘气流量50 psi,辅助气流量14 psi,吹扫气流量3 psi,喷雾电压2.5 kV,毛细管温度300 ℃,S-lens RF水平55,辅助加热器温度500 ℃。

1.3.3 化学成分数据库的建立及数据处理 补阳还五汤供试品溶液按1.3.1和1.3.2进行数据采集,并通过Compound Discoverer 3.0软件进行化合物鉴定。首先,通过中国知网和Web of Science等数据库查阅相关文献^[10-24]或搜索TCMSP(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)^[25]、HERB(<http://herb.ac.cn/>)^[26]等平台收集化合物信息,建立补阳还五汤中七味中药的化合物数据库。将数据库整合并导入Compound Discoverer 3.0软件中,对先前采集的数据文件进行分析。质量数误差设置为 -5×10^{-6} ~ 5×10^{-6} 。根据一级质谱图中的准分子离子峰以及加合离子信息推测精确相对分子质量并拟合相应分子式。将负离子模式下采集到的质谱数据与自建库中的成分进行比对,结合二级碎片信息进行成分鉴定。对于响应排名前三十但未与数据库匹配成功的峰,根据其一级质谱图和二级质谱图并结合SciFinder数据库自行鉴定。所有鉴定结果通过E Venn网站(<http://www.ehbio.com/test/venn/>)^[27]作维恩图表示其来源。

1.4 采用HPLC-UV进行定量分析

Agilent 1260 Infinity II高效液相色谱仪上进行定量分析,色谱条件同1.3.1。将三份补阳还五汤试药按1.2.1方法处理,并用1.3.1中的色谱条件

分析。根据随行标准曲线和样品峰面积计算各成分的含量。

1.5 定量分析的方法学考察

方法学考察参照《中华人民共和国药典(2020版)》^[28]。

1.5.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品储备液适量,逐级稀释成七个系列浓度的混合对照品溶液。没食子酸和羟基红花黄色素A浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL,阿魏酸浓度为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mg/mL,毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮浓度为0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 mg/mL,芍药苷浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL,芒柄花素浓度为0.002、0.004、0.006、0.008、0.010、0.012、0.014 mg/mL。按1.3.1中的色谱条件进样分析,以峰面积为纵坐标(Y),浓度作为横坐标(X)做线性回归,计算回归方程及线性相关系数 R^2 。参照《中华人民共和国药典(2020版)》分析方法验证指导原则中的检测限测定方法,基于响应值标准偏差和标准曲线斜率计算检出限和定量限,以信噪比=3为检出限,信噪比=10为定量限。

1.5.2 专属性试验 按1.2.1平行制备补阳还五汤供试品溶液,分别将去离子水、8个成分混合对照品溶液和供试品溶液按1.3.1中的色谱条件进样检测,观察是否存在干扰峰。

1.5.3 精密度和稳定性试验 按1.2.1平行制备六份补阳还五汤供试品溶液,按1.3.1中的色谱条件进样检测,以八个成分的RSD评价重复性;不同日期由另一分析人员进行相同实验操作,以12份供试品溶液检测结果计算RSD,考察中间精密

度。另外,将同一供试品溶液置于4℃冰箱中保存,分别于0、2、4、6、8、10 h时进样检测,以八个成分在各个时间点的峰面积计算RSD,考察样品的稳定性。

1.5.4 加样回收率试验 精密称取九份同批供试品粉末,每份约0.25 g,每三份为一组,分别加入八个成分混合对照品溶液(各成分加入量分别为供试品相应成分含量的80%、100%和120%),按1.2.1制备供试品溶液,计算八个成分在药液中的含量,并计算三个浓度的平均回收率和RSD。

2 结果

2.1 补阳还五汤定性分析结果

2.1.1 补阳还五汤样品中的成分 补阳还五汤负离子模式下采集的基峰离子流图如图1所示。用Compound Discoverer 3.0软件共鉴定出了178个化合物,来源于黄芪、当归、赤芍、红花、川芎、桃仁、地龙的成分分别有71、17、24、47、24、30、11个,其中黄酮类30个,皂苷类27个,见图2和附表1。

2.1.2 补阳还五汤代表性成分质谱特征裂解过程 黄酮类成分芒柄花苷的裂解过程见图3。在负离子模式下,芒柄花苷分子被离子化,产生准分子离子峰 m/z 429.1188[M-H]⁻,该离子糖苷键断裂,失去-C₆H₁₀O₅,生成特征碎片 m/z 267.0668[M-H]⁻,该碎片丢失甲基(-CH₃)生成 m/z 252.0431[M-H]⁻。没食子酰芍药苷裂解过程如图4所示,没食子酰芍药苷分子在负离子模式下生成准分子离子峰 m/z 631.1671[M-H]⁻,该离子失去-C₁₉H₂₀O₇的碎片后生成碎片离子 m/z 271.0463[M-H]⁻(路径A),或失去-C₂₃H₂₆O₁₀碎片生成 m/z 169.0136[M-H]⁻(路径

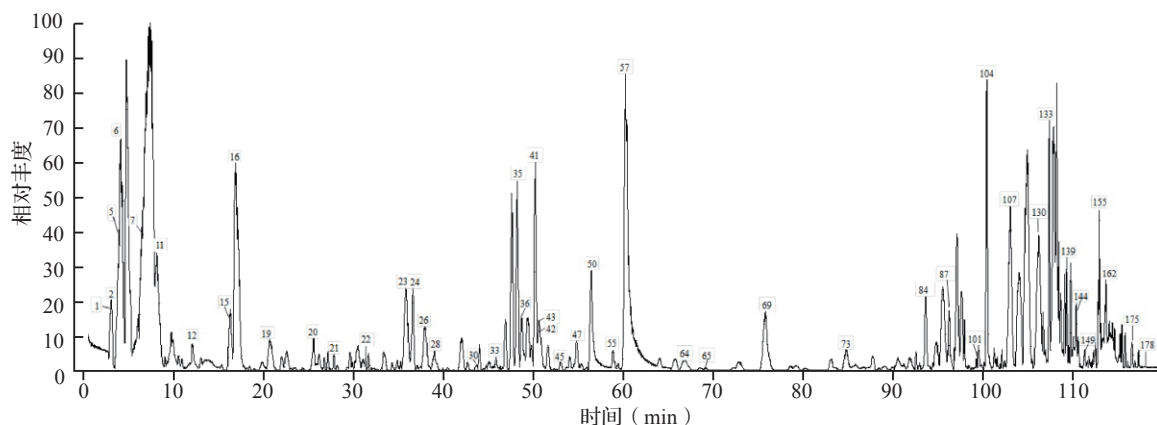
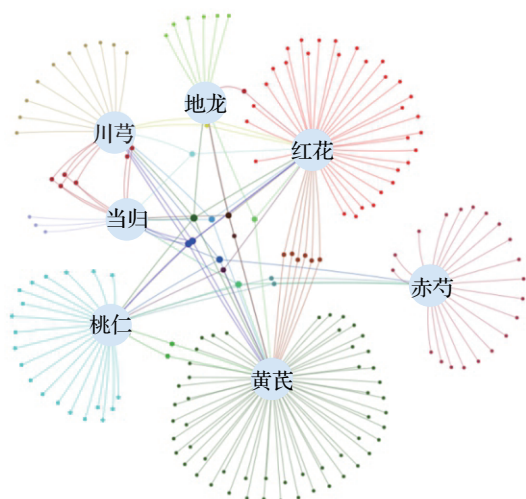


图1 补阳还五汤负离子模式下的基峰离子流图

Figure 1 Base peak ion flow chromatogram of Buyang Huanwu decoction in negative mode



每个小节点代表一个成分, 每个蓝色大节点表示一味中药。

图2 补阳还五汤中178种成分来源维恩图

Figure 2 The source of compositions in the qualitative results of Buyang Huanwu decoction

B); 准分子离子峰 m/z 631.1671 $[M-H]^-$ 还可以丢失一分子 H_2O 生成碎片离子 m/z 613.1567 $[M-H]^-$ (路径 C), 该离子有两种裂解方式, 一种是丢失 $-C_{10}H_{14}O_5$ 后生成 m/z 399.0936 $[M-H]^-$, 另一种是先丢失一分子苯甲酸生成 m/z 491.1201 $[M-H]^-$, 继而丢失 $-C_{10}H_{10}O_3$ 生成 m/z 313.0570 $[M-H]^-$ 。

2.2 补阳还五汤主要成分定量分析结果

结合定性分析结果与色谱峰强度, 发现补阳还五汤中含量较高的八个主要成分分别为芍药苷、羟基红花黄色素 A、没食子酸、阿魏酸、毛蕊异

黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素, 其含量测定结果见表1。

2.3 补阳还五汤主要成分定量分析方法学验证

2.3.1 线性关系 八个成分的标准曲线如表2所示, R^2 均在 0.9990 及以上, 表明线性关系良好且线性范围均能满足检测要求。检出限为 0.18~4.66 $\mu g/mL$, 定量限为 0.55~14.11 $\mu g/mL$ 。

2.3.2 专属性 溶剂、八个成分的混合对照品溶液及供试品溶液的色谱图如图5, 八个定量成分在 254 nm 的色谱峰分离度均大于 1.5, 色谱峰分离效果理想, 提取溶剂中不存在干扰峰, 表明本研究建立的检测方法专属性良好。

2.3.3 精密度和稳定性 八个主要成分的重复性及中间精密度考察结果如表3所示, 重复性 RSD 为 0.9%~4.3%, 中间精密度为 0.7%~5.0%, 表明该方法精密度良好。稳定性 RSD 除没食子酸 (12.7%) 外, 其他成分均小于 5%, 表明八个成分在储存条件下稳定性良好。

2.3.4 加样回收率 芍药苷、羟基红花黄色素 A、没食子酸、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的平均回收率分别为 98.7%、101.9%、101.3%、98.8%、98.2%、101.8%、97.2%、102.6%, 其 RSD 值分别为 1.6%、2.1%、1.7%、2.4%、1.7%、1.6%、2.0%、1.9%, 表明方法准确度良好。

3 讨论

中药所含的化学成分是其发挥药效的基础,

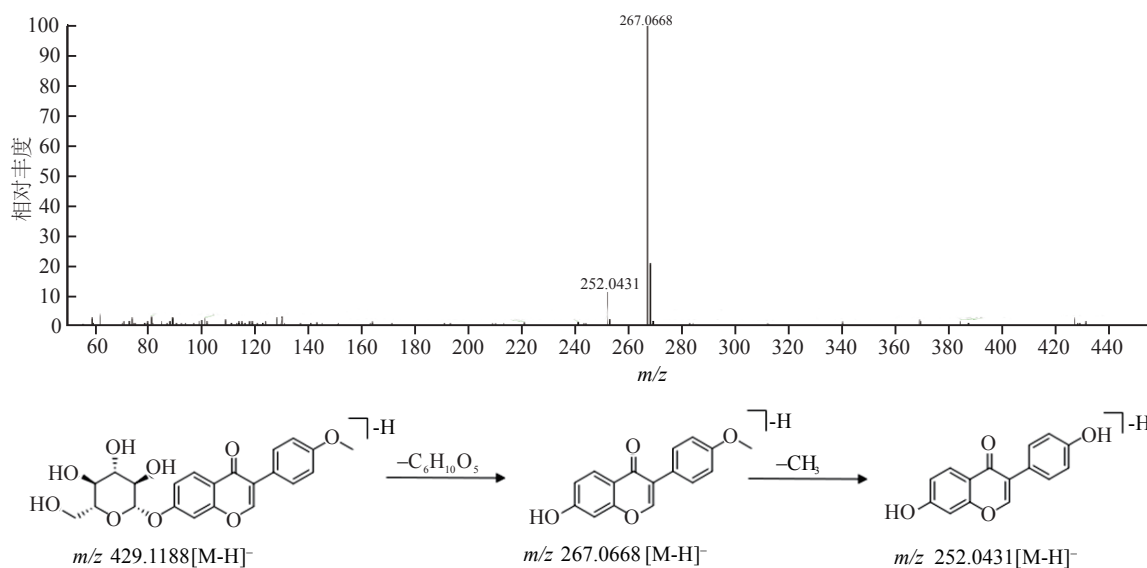


图3 芒柄花苷的二级质谱图和可能的裂解过程

Figure 3 The mass spectrum and possible fragmentation pathway of ononin

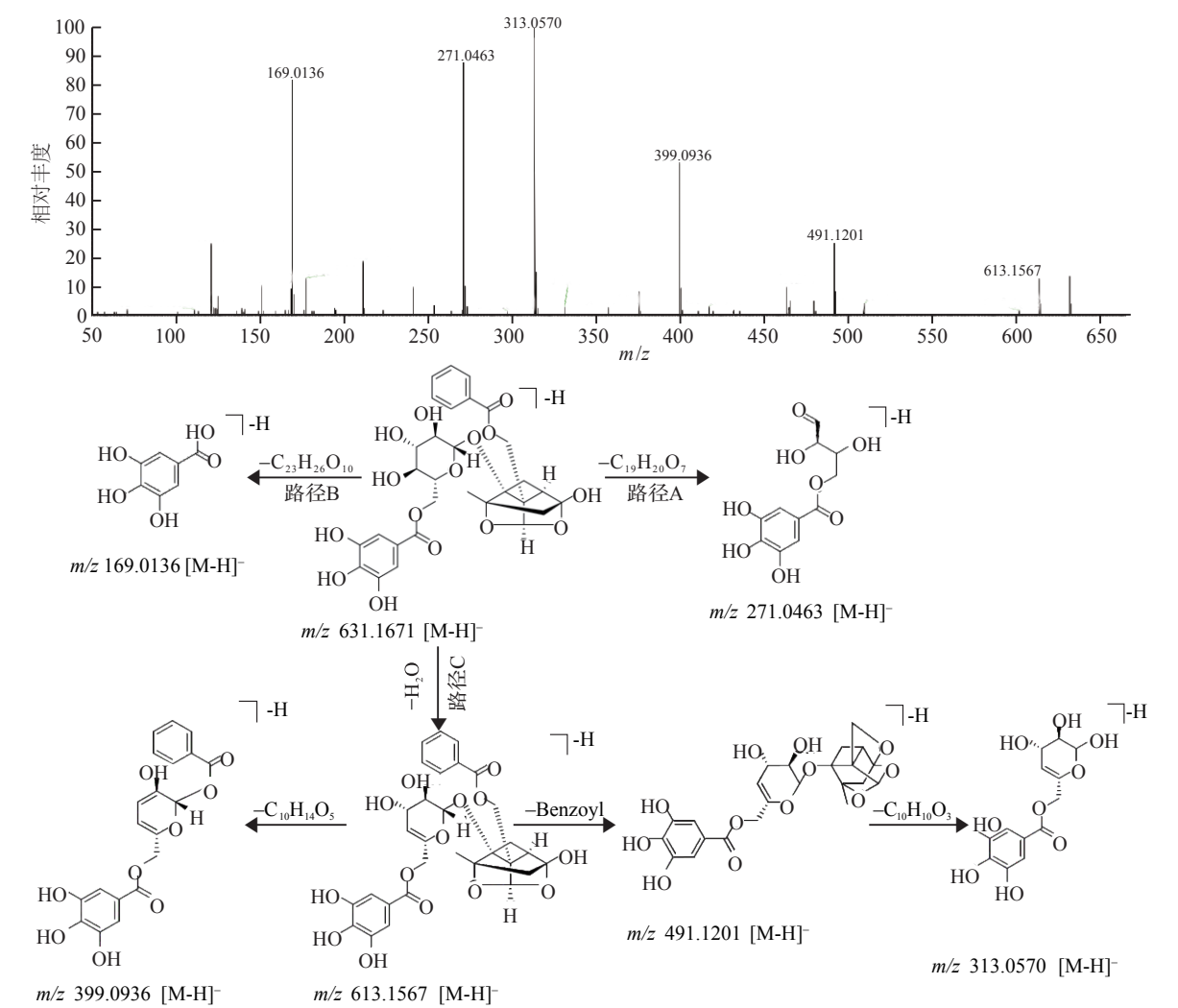


图 4 没食子酰芍药苷的二级质谱图及可能的裂解过程
Figure 4 The mass spectrum and possible fragmentation pathway of galloylpaeoniflorin

表 1 补阳还五汤中八个主要成分的含量
Table 1 The content of 8 major compositions in Buyang Huanwu decoction

成 分	(mg/g)		
	样品1	样品2	样品3
芍药苷	2.636	2.616	2.561
羟基红花黄色素 A	1.191	1.196	1.214
没食子酸	0.838	0.835	0.796
阿魏酸	0.345	0.349	0.331
毛蕊异黄酮苷	0.276	0.280	0.283
芒柄花苷	0.266	0.270	0.287
毛蕊异黄酮	0.184	0.186	0.188
芒柄花素	0.042	0.042	0.043

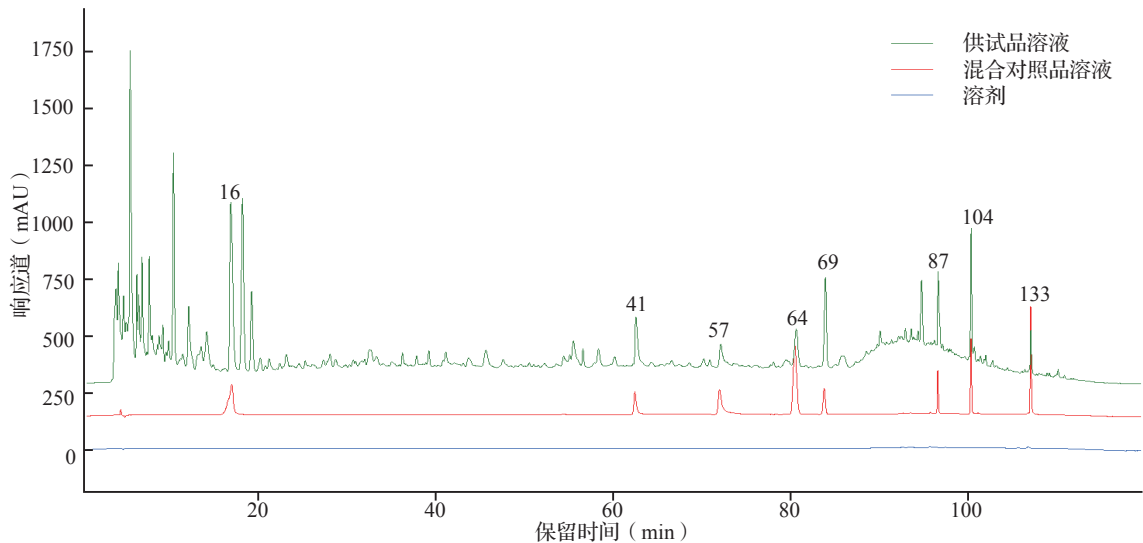
中药复方的物质基础研究对于揭示临床用药规律

至关重要。中药材来源不一,不同产地的中药在化学成分组成和有效成分含量上可能差异较大,且易受运输、储存、加工炮制等过程影响,因此中药复方的质量控制存在许多困难^[29]。面对中药产品质量评价的问题,建立可靠的成分快速识别和含量测定方法有助于质控物质的筛选。目前,关于补阳还五汤成分分析的报道存在鉴定的成分不够全面、定量分析的指标较少等问题。本研究采用 HPLC-Q-Exactive MS 对补阳还五汤中化学成分进行快速分析,通过条件优化,得到较好的灵敏度、分离度及较高的质谱响应,定性鉴定出 178 种成分。同时对其中八个主要活性成分进行定量分析,所建立的 HPLC-UV 含量测定方法灵敏度、准确度均符合实际需求,可用于补阳还五汤的质量控制和评价,为其临床应用提供理论依据。

表 2 补阳还五汤八个主要成分定量测定方法的线性、检出限和定量限

Table 2 Linearity, limit of detection and limit of quantitation of 8 major compositions in Buyang Huanwu decoction

成 分	回归方程	线性范围(mg/mL)	R ²	检出限(μg/mL)	定量限(μg/mL)
芍药苷	y = 3339.1x + 169	0.2~1.4	0.9990	4.66	14.11
羟基红花黄色素 A	y = 16255x-8.7	0.1~0.7	0.9995	1.28	3.88
没食子酸	y = 48823x + 135.14	0.1~0.7	0.9995	1.38	4.19
阿魏酸	y = 42804x + 41.5	0.05~0.35	0.9997	0.55	1.65
毛蕊异黄酮苷	y = 75349x-6.8286	0.02~0.14	0.9995	0.18	0.55
芒柄花苷	y = 38839x + 99.4	0.02~0.14	0.9990	0.45	1.38
毛蕊异黄酮	y = 103824x + 205.49	0.02~0.14	0.9991	0.75	2.28
芒柄花素	y = 143088x + 54.243	0.002~0.014	0.9991	0.19	0.57



16:没食子酸;41:羟基红花黄色素 A; 57:芍药苷;64:阿魏酸;69:毛蕊异黄酮苷;87:芒柄花苷;104:毛蕊异黄酮;133:芒柄花素.

图 5 空白溶剂、混合对照品溶液、补阳还五汤供试品溶液的高效液相色谱图

Figure 5 High performance liquid chromatogram of solvent, mixed reference solution and Buyang Huanwu decoction solution

表 3 补阳还五汤八个主要成分定量测定方法的精密度和稳定性

Table 3 Relative standard deviation for the precision and stability of quantitative determination method of 8 major compositions in Buyang Huanwu decoction

成 分	精密度		稳定性
	重复性 (n=6)	中间精密度(n=12)	
芍药苷	3.2	3.6	0.5
羟基红花黄色素 A	1.5	3.7	2.2
没食子酸	1.7	2.0	12.7
阿魏酸	1.7	4.2	2.0
毛蕊异黄酮苷	1.6	1.3	1.0
芒柄花苷	1.5	2.8	2.5
毛蕊异黄酮	0.9	0.7	1.0
芒柄花素	4.3	5.0	0.4

研究前期考察了不同色谱柱对补阳还五汤成分的分离效果,包括SunFire C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 爱尔兰 Waters 公司)、Hypersil ODS C₁₈(4.0 mm×250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司)、CAPCELL PAK C₁₈ MG II (4.6 mm×150 mm, 3 μm, 日本 Osaka Soda 公司)等,最终选择CAPCELL PAK C₁₈ MG II 色谱柱,因其具有良好的分离度和重现性,灵敏度较高,目标分析物峰形较好。为了提高补阳还五汤成分的提取效率,筛选了水、甲醇、50%甲醇等不同的提取溶剂,发现用水作为提取溶剂时没食子酸、羟基红花黄色素 A 等主要成分的含量更高且与实际应用更加接近,故选择水作为提取溶剂。

本研究定性检测结果发现补阳还五汤中主要化学成分包括黄酮类、皂苷类、单萜糖苷类、酚酸

类、有机酸类、氨基酸类、核苷酸类成分。同类成分具有相似的裂解过程,芒柄花苷和没食子酰芍药苷是补阳还五汤中含量较高且结构有代表性的成分,本研究总结了芒柄花苷和没食子酰芍药苷的裂解规律,可为补阳还五汤中同类成分的快速筛查提供参考。芍药苷、羟基红花黄色素A和没食子酸在补阳还五汤提取液中的含量较高,符合药典中赤芍和红花的含量测定标准,已有许多药理学研究证实了这三种化合物抗脑缺血的显著药效^[30-32],有望作为补阳还五汤及相关方剂的质控物质。

本文附表见电子版。



利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 229.
- LI Ji, LIAN Jianwei. **Pharmacology of traditional Chinese medical formulae**[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2016: 229. (in Chinese)
- [2] 黄志强, 曹朝霞, 崔晓娟, 等. 补阳还五汤治疗气虚血瘀证急性缺血性脑卒中的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(1): 24-28.
- HUANG Zhiqiang, CAO Zhaoxia, CUI Xiaojuan, et al. Clinical application and mechanism of Buyang Huanwu Decoction in acute ischemic stroke patients with Qi deficiency blood stasis syndrome[J]. **Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, 2022, 42(1): 24-28. (in Chinese)
- [3] 袁磊, 杨进平, 闻瑛, 等. 补阳还五汤治疗缺血性中风恢复期(气虚血瘀)的临床疗效及对Hcy影响的临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 195-197.
- YUAN Lei, YANG Jinping, WEN Ying, et al. Clinical curative effect of Buyang Huanwu Decoction for ischemic stroke recovery (deficiency blood stasis syndrome) patients and its influence on Hcy[J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**, 2016, 34(1): 195-197. (in Chinese)
- [4] 吴玉芳, 刘晓红, 郭伟成, 等. 补阳还五汤对气虚血瘀型脑梗死患者脑血管储备功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 162-167.
- WU Yufu, LIU Xiaohong, GUO Weicheng, et al. Effect of Buyang Huanwu Tang on cerebral vascular reserve function in patients with Qi deficiency and blood stasis type cerebral infarction[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2017, 23(12): 162-167. (in Chinese)
- [5] 张艳萍, 蒋超, 李珂. 脑心通胶囊辅助rt-PA静脉溶栓治疗中风气虚血瘀证疗效及对微循环、氧化应激、肢体运动功能的改善作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 74-77.
- ZHANG Yanping, JIANG Chao, LI Ke. Effect of Naointong capsule combined with rt-PA intravenous thrombolysis on stroke of Qi deficiency and blood stasis syndrome and its improvement effect on microcirculation, oxidative stress and limb motor function[J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**, 2022, 40(5): 74-77. (in Chinese)
- [6] 黄启勇, 覃瑞明, 文润嘉, 等. 脑心通胶囊对脑卒中气虚血瘀证rt-PA静脉溶栓后静脉血S100b蛋白表达、学习记忆及肢体运动功能的影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 237-240.
- HUANG Qiyong, QIN Ruiming, WEN Runjia, et al. Effect of Naointong capsule on expression of S100b protein in venous blood, learning and memory and limb motor function after rt-PA intravenous thrombolysis of stroke of Qi deficiency and blood stasis syndrome[J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**, 2022, 40(7): 237-240. (in Chinese)
- [7] 刘婉沂, 张英丰, 周欣, 等. 补阳还五汤抗脑缺血的作用机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 411-418.
- LIU Wanyi, ZHANG Yingfeng, ZHOU Xin, et al. Research progress on the mechanism of Buyang Huanwu decoction against cerebral ischemia[J]. **Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology**, 2022, 33(3): 411-418. (in Chinese)
- [8] LIU E H, QI L W, PENG Y B, et al. Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS[J]. **Biomed Chromatogr**, 2009, 23(8): 828-842.
- [9] 王玎, 王利胜, 巴文强, 等. HPLC同时测定补阳还五汤提取液中4种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 46-49.
- WANG Ding, WANG Lisheng, BA Wenqiang, et al. Simultaneous determination of four components in Buyang Huanwu Tang extract by HPLC[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2015, 21(9): 46-49. (in Chinese)
- [10] 周熙, 谢斌, 黄晓兰, 等. 基于高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法的苦杏仁与桃仁化学成分差异研究[J]. 分析测试学报, 2021, 40(6): 940-946.
- ZHOU Xi, XIE Bin, HUANG Xiaolan, et al. Study on chemical constituents differences between *Armeniacae Amarum Semen* and *Persicae Semen* based on high-performance liquid chromatography-quadrupole time-

- of-flight mass spectrometry[J]. **Journal of Instrumental Analysis**, 2021, 40(6): 940-946. (in Chinese)
- [11] 张清清, 冯媛, 李春花, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术快速鉴定当归中苯酐类和有机酸类成分[J]. **中国药房**, 2022, 33(5): 579-585, 591.
- ZHANG Qingqing, FENG Yuan, LI Chunhua, et al. Rapid identification of phthalides and organic acids in *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. **China Pharmacy**, 2022, 33(5): 579-585, 591. (in Chinese)
- [12] 裴科, 宁燕, 蔡皓, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS和整合网络药理学的川芎酒制后增强抗脑缺血损伤作用机制分析[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2022, 28(12): 164-173.
- PEI Ke, NING Yan, CAI Hao, et al. Mechanism analysis of strengthening anti-cerebral ischemia injury of Chuanxiong Rhizoma processed with wine based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and integrated network pharmacology[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2022, 28(12): 164-173. (in Chinese)
- [13] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J]. **中国中药杂志**, 2015, 40(9): 1762-1770.
- LIU Jie, CHEN Lin, FAN Cairong, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents of *Paeoniae Radix Alba* and *Paeoniae Radix Rubra* by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2015, 40(9): 1762-1770. (in Chinese)
- [14] KOPRIVICA M R, TRIFKOVIĆ J Đ, DRAMIĆANIN A M, et al. Determination of the phenolic profile of peach (*Prunus persica* L.) kernels using UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS technique[J]. **Eur Food Res Technol**, 2018, 244(11): 2051-2064.
- [15] 蒋虎刚, 赵信科, 蔺文燕, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析当归中多种香豆素类成分[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2019, 25(13): 157-162.
- JIANG Hugang, ZHAO Xinke, LIN Wenyan, et al. Qualitative analysis of multiple coumarins in *Angelica Sinensis Radix* based on HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2019, 25(13): 157-162. (in Chinese)
- [16] ZHU M, DUAN J A, TANG Y P, et al. Identification of chemical constituents in SiWu decoction by UHPLC-DAD-TOF/MS[J]. **Acta Chromatogr**, 2014, 26(3): 517-537.
- [17] LU M, HU Q, ZHANG Y, et al. Comparative chemical profiling of three TCM drugs in the *Paeoniaceae* family by UPLC-MS/MS combined with chemometric methods[J]. **Biochem Systatics Ecol**, 2019, 83: 121-129.
- [18] XIAO M, CHEN H, SHI Z, et al. Rapid and reliable method for analysis of raw and honey-processed astragalus by UPLC/ESI-Q-TOF-MS using HSS T3 columns[J]. **Anal Methods**, 2014, 6(19): 8045-8054.
- [19] GUO Z, LOU Y, KONG M, et al. A systematic review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics on *Astragali Radix*: implications for *Astragali Radix* as a personalized medicine[J]. **Int J Mol Sci**, 2019, 20(6): 1463.
- [20] MA X, LV B, LI P, et al. Identification of “multiple components-multiple targets-multiple pathways” associated with Naoxintong capsule in the treatment of heart diseases using UPLC/Q-TOF-MS and network pharmacology[J]. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2016, 2016: 1-15.
- [21] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的广地龙化学成分分析[J]. **中草药**, 2017, 48(2): 252-262.
- ZHANG Yu, DONG Wenting, HUO Jinhai, et al. Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2017, 48(2): 252-262. (in Chinese)
- [22] CAO T, LIU J, ZHANG X, et al. Metabolomics characterization of different geographical origins of *Flos Carthami* using UPLC-QTOF/MS and their correlation with climate factors[J]. **Anal Methods**, 2019, 11(20): 2700-2711.
- [23] WANG S S, XU H Y, MA Y, et al. Characterization and rapid identification of chemical constituents of Nao-XinTong capsules by UHPLC-linear ion trap/Orbitrap mass spectrometry[J]. **J Pharm Biomed Anal**, 2015, 111: 104-118.
- [24] ZHANG L L, TIAN K, TANG Z H, et al. Phytochemistry and pharmacology of *Carthamus tinctorius* L[J]. **Am J Chin Med**, 2016, 44(2): 197-226.
- [25] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. **J Cheminform**, 2014, 6(1): 13.
- [26] FANG S, DONG L, LIU L, et al. HERB: a high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine[J]. **Nucleic Acids Res**, 2021, 49(D1): D1197-D1206.
- [27] CHEN T, ZHANG H, LIU Y, et al. EVen: easy to create repeatable and editable Venn diagrams and Venn networks online[J]. **J Genet Genomics**, 2021, 48(9): 863-866.
- [28] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020, 480-483.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia 2020 edition[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020, 480-483. (in Chinese)
- [29] 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.
- LIU Changxiao, CHEN Shilin, XIAO Xiaohe, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: quality control for Chinese medicinal products[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2016, 47(9): 1443-1457. (in Chinese)
- [30] 吴莹, 谭立伟, 梁晨, 等. 没食子酸改善脑缺血再灌注损伤大鼠的药效评价[J]. **中药药理与临床**, 2018, 34(2): 28-32.
- WU Ying, TAN Liwei, LIANG Chen, et al. Evaluation on ameliorative effect of GA on cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. **Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica**, 2018, 34(2): 28-32. (in Chinese)
- [31] ZHAO Y, WAN H, YANG J, et al. Ultrasound-assisted preparation of 'Ready-to-use' extracts from *Radix Paoniae Rubra* with natural deep eutectic solvents and neuroprotectivity evaluation of the extracts against cerebral ischemic/reperfusion injury[J]. **Ultrason Sonochem**, 2022, 84: 105968.
- [32] SUN Y, XU D P, QIN Z, et al. Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on ischemic stroke[J]. **Eur J Pharmacol**, 2018, 818: 604-609.
- [本文编辑 余方 刘丽娜]

· 学术动态 ·

黄河教授团队与刘明耀教授团队合作采用非病毒定点整合嵌合抗原受体T细胞治疗复发/难治B细胞淋巴瘤患者获重大突破

浙江大学医学院附属第一医院黄河教授与上海邦耀生物科技有限公司和华东师范大学刘明耀教授团队合作报道了一种新型嵌合抗原受体(CAR)T细胞制备策略:应用CRISPR/Cas9基因编辑技术精确敲除T淋巴细胞中的PD1位点,定点插入针对肿瘤细胞的靶向CD19的CAR分子,构建全新的非病毒定点整合CAR-T细胞(PD1-19bbz),并开展I期临床试验。研究成果以“Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL”(DOI: 10.1038/s41586-022-05140-y)为题,于2022年8月31日在线发表在《自然》(Nature)。

CAR-T细胞在难治复发恶性血液病治疗中取得突破,但传统CAR-T产品还存在着一些问题:用病毒转染方法制备CAR-T细胞靶点随机插入导致CAR-T细胞质量良莠不齐;随机插入基因片段有导致肿瘤基因改变的风险;目前的CAR-T细胞产品对复发/难治淋巴瘤的完全缓解率约为50%,疗效还有待提高;淋巴瘤治疗中由于肿瘤细胞的快速杀灭和细胞因子释放易导致细胞因子释放综合征和免疫效应细胞相关的神经毒性综合征。CRISPR/Cas9介导的非病毒定点整合CAR-T细胞技术可以有效解决使用病毒载体带来的几大难题:定点整合可以让每个CAR序列都精确地插入到基因组的特定位点,能避免随机插入导致的致癌风险,最大程度保证了CAR-T产品的安全性和有效性;只需一步制备,即可同时实现CAR的持续性表达和T细胞内源基因的调控,大大缩短了整个CAR-T产品的制备时间,得以让更多患者受益;另外,使用非病毒生产工艺还可以极大降低高昂成本。

研究者使用同源臂长度为800 bp的线性双链DNA作为模板,通过同源介导修复机制获得最多数量的CAR整合细胞;PD1-19bbz CAR-T细胞在PD-L1高表达和低表达的肿瘤细胞中都显示出强大、持久的杀伤效果,小鼠存活率也显著提高。临床研究表明,在接受治疗的患者中未观察到CAR-T治疗相关的神经毒性和2级以上细胞因子释放综合征,可见PD1-19bbz CAR-T细胞的临床安全性较好。通过聚合酶链反应技术和流式细胞术发现,PD1-19bbz CAR-T细胞在患者体内可快速扩增并长时间维持。在复发/难治B细胞淋巴瘤患者中,客观缓解率高达100%,完全缓解率达87.5%。单细胞测序研究结果表明,PD1-19bbz CAR-T细胞产品中存在高比例的记忆性T细胞,体内PD1-19bbz CAR-T细胞具有更强的杀伤肿瘤作用,长期存续的CAR-T细胞具有记忆性细胞的特征。该研究全面阐明了非病毒PD1定点整合CAR-T细胞优越的临床疗效背后的作用机制。

这项工作的成功意味着全新CAR-T细胞技术平台的建立,也是迄今为止全球CAR-T细胞治疗难治复发淋巴瘤患者获得高缓解率和低毒副作用的最好临床结果。

华东师范大学张辑钦副研究员、浙江大学医学院附属第一医院胡永仙主任医师和华东师范大学杨佳璇硕士研究生为论文的共同第一作者。研究工作得到国家自然科学基金和浙江省重点研发计划等资助。