

基于 DASS-RTCA 法的经典名方当归补血汤质量一致性评价初步研究

高武锋^{1,2}, 张佳^{1,2}, 卞海雯^{1,2}, 江悦^{1,2}, 卞雅丽^{1,2}, 石德志^{1,3}, 毕蕾⁴, 顾玲⁴, 严国俊^{1,2,3*} (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江苏省中医外用开发与应用工程研究中心, 南京 210023; 3. 江苏省经典名方工程研究中心, 南京 210023; 4. 南京中医药大学中医学·中西医结合学院, 南京 210023)

摘要: **目的** 建立一种反映多批次中药复方制剂整体药效特征的质量一致性评价方法。 **方法** 以外翻肠囊模型建立药物吸收仿生系统 (drug absorption simulating system, DASS) 标准化吸收仿生系统模块, 制备不同来源、批次的当归补血汤 (Danggui buxue tang, DBT) 肠吸收样品; 借鉴生物药一致性评价思路, 以实时细胞分析 (real-time cell analysis, RTCA) 建立细胞生物效应表征模块, 监测 15 批 DBT 样品细胞反应曲线。 **结果** 联合 DASS-RTCA 法, 对 15 批 DBT 样品时间剂量依赖性细胞反应曲线 (time-dependent cell response patterns, TCRPs) 的特征参数进行提取, 各特征参数的相对标准偏差 (RSD) 均 < 5.1%, 表明各批次 DBT 细胞效应表征差异较小, TCRPs 图相似度高。通过相似度分析、聚类分析、雷达图等分析, 均反映不同批次 DBT 的质量具有较高的一致性。 **结论** 联合 DASS-RTCA 法建立的质量一致性评价方法可反映制剂的整体质量, 为中药批次间质量一致性评价提供新的思路和方法。

关键词: 当归补血汤; 药物吸收仿生系统; 实时细胞分析; 生物评价; 一致性评价

doi: 10.11669/cpj.2024.12.006 中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)12-1110-10

Preliminary Study on the Quality Consistency Evaluation of the Classic Prescription Danggui Buxue Tang based on DASS-RTCA Method

GAO Wufeng^{1,2}, ZHANG Jia^{1,2}, BIAN Haiwen^{1,2}, JIANG Yue^{1,2}, QI Yali^{1,2}, SHI Dezhi^{1,3}, BI Lei⁴, GU Ling⁴, YAN Guojun^{1,2,3*} (1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine External Medication Development and Application, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Provincial Engineering Research Center of Classical Formula, Nanjing 210023, China; 4. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quality consistency evaluation method reflecting the overall pharmacodynamic characteristics of multi-batch Chinese medicine compound preparations. **METHODS** Establish a drug absorption simulating system (DASS) standardized absorption biomimetic system module using a flipped intestinal sac model, and prepare intestinal absorption samples of Danggui buxue tang from different sources and batches; Drawing on the concept of consistency evaluation of biopharmaceuticals, a cell biological effect characterization module was established using Real-time cell analysis (RTCA) to monitor the cell response curves of 15 batches of Danggui buxue tang samples. **RESULTS** The combination of DASS-RTCA was used to extract the characteristic parameters of time-dependent cell response patterns (TCRPs) maps from 15 batches of Danggui buxue tang samples. The RSD of each characteristic parameter was less than 5.1%, indicating that the differences in cell effect characterization of Danggui buxue tang (DBT) were small and the similarity of TCRPs maps was high. Through similarity analysis, cluster analysis, radar chart analysis, etc., it is reflected that the quality of different batches of DBT has high consistency. **CONCLUSION** The quality consistency evaluation method established by DASS-RTCA can reflect the overall quality of the preparations and provide new ideas and methods for the evaluation of batch-to-batch quality consistency of traditional Chinese medicines.

KEY WORDS: Danggui buxue tang; drug absorption simulating system; real time cell analysis; biological evaluation; consistency evaluation

当归补血汤 (Danggui buxue tang, DBT) 出自金 由黄芪和当归两种中药组成, 主治血虚阳浮发热
代李东垣编撰的《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》, 证, 肌热面红, 烦渴欲饮, 脉洪大而虚, 重按无

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (82074004, 81773910)

作者简介: 高武锋, 男, 硕士研究生 研究方向: 中药药剂学 * 通讯作者: 严国俊, 男, 博士, 博士研究生导师 研究方向: 中药饮片及制剂品质传递过程的评价与控制 Tel: (025) 85811517

力^[1]。现代研究表明, DBT 具有抗炎、抗肿瘤、治疗贫血、调节免疫功能、保护心脑血管系统等药理作用, 其药效明确, 化学成分清楚^[2-5]。目前, 大多采用色谱指纹图谱及具体指标用于中药复方制剂的质量控制, 考察制剂质量一致性。然而, 中药复方通过多成分协同作用, 发挥整体药效, 选取的特定指标是否代表中药复方制剂质量的整体特征及药效, 都存在不确定性。

药物吸收仿生系统(DASS)是目前较为常用的一种药物基于肠道吸收建立的体外仿生系统, 减少了药物吸收的影响, 常以 Caco-2 细胞、肠管或人工渗透膜为仿生介质模拟肠道黏膜分析药物在肠道的吸收特征, 已用于中药单体、单味中药和中药复方制剂的有效成分吸收规律或相互作用研究^[6-8]。实时细胞电子分析(RTCA)技术是建立在阻抗基础上的瞬时细胞电感应连续记录系统。通过监测药物作用于细胞而产生的生理状态, 记录细胞的动态变化过程(细胞增殖与分化、凋亡与衰老、黏附等多种细胞生理状态), 并将阻抗值经软件处理转换成电信号细胞指数, 从而描绘形成时间剂量依赖性细胞反应曲线(TCRPs), 直观全面地表达药物对细胞的作用(促进或抑制), 通过细胞指数的大小反映其对细胞作用的强弱^[9]。

基于上述, 本研究以 DBT 为研究对象, 从中医药理论的整体观念出发, 将 DBT 经过 DASS 标准化吸收后, 再以 RTCA 系统进行药液的细胞检测, 将 DASS 与 RTCA 系统联合, 建立细胞指数(cell index, CI)-给药时间(time, *t*)对应的细胞效应曲线, 形成 TCRPs, 采用不同产地、不同批次饮片制备的 DBT 进行细胞生物表征确定方法的一致性, 建立了体现 DBT 质量一致性的细胞生物评价方法, 为中药经典名方制剂的科学评价提供一种新的思路和方法。

1 材料

1.1 药材与试剂

黄芪 5 批药材购于甘肃岷县(3 批)、山西五寨县(1 批)、民乐县(1 批), 当归 4 批药材购于甘肃岷县(2 批)、漳县(1 批)、临潭县(1 批), 经南京中医药大学中药鉴定学教研室严辉教授鉴定分别为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 的干燥根、伞形科植物当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 的干燥根, 并依据 2020 年版《中国药典》一部黄芪、当归项

下规定检测, 均符合要求。黄芪饮片(ypHQ-001 ~ 005)、当归饮片(ypDG-001 ~ 004)均依据前期建立的饮片炮制方法^[10]由实验室自制, 饮片批号与上述药材相对应。DBT 组合信息见表 1。

磷酸二氢钾、氢氧化钠(分析纯); 胎牛血清(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号 BC20221108); MEM α 基础培养基(南京翼飞雪生物科技有限公司, 批号 WH1021D041); RPMI Medium 1640 培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司, 批号 8122231]; DMEM 高糖培养基(上海源培生物科技股份有限公司, 批号 A211003); PBS(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号 BC20220830); 青链霉素混合溶液(100 \times)、胰酶细胞消化液(0.25% 胰酶)(上海碧云天生物技术有限公司, 批号 092622221214; 批号 102022221108); 无血清非程序冻存液(武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号 WH06121D161)。

1.2 仪器

FA1104N 万分之一电子分析天平(上海菁海仪器有限公司); X025-12DTD 超声波清洗机(南京先欧仪器制造有限公司); Allegra X-30R 高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司); MZY-U20V 纯水仪(南京妙之仪电子科技有限公司); F2-Standard 便携式 pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; HJ-4A 数显恒温磁力搅拌器(江苏金怡仪器科技有限公司); YSK-3AW 医用分子筛制氧机(安徽皖舒医疗设备有限公司); TDZ4B-WS 台式低速自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); xCELLigence RTCA DPRTCA 实时无标记细胞分析仪(杭州艾森生物有限公司)。

1.3 细胞与动物

小鼠骨髓基质细胞 OP9(体积分数 20% FBS 的 MEM α 培养基培养), 人脐静脉内皮细胞 HUVEC(体积分数 10% FBS 的 1640 培养基培养), 小鼠骨髓间充质干细胞 BMSC(体积分数 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养), 均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度环境下培养。3 种细胞均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量(220 \pm 10)g, 南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 合格证号: SCXK(浙)2019-0002。实验经过南京中医药大学动物伦理审核通过, 批准号 202204A004。动物饲养环境: SPF 级环境, 温度 22~24 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~55%, 明暗交替 12 h, 实验期间动物自由摄食饮水。

表 1 当归补血汤(DBT)组合信息表

Tab. 1 Combination information of Danggui Buxue Tang(DBT)

No.	Angelicae Sinensis Radix	Astragali Radix	Combination
DBT01	ypDG-003	ypHQ-001	D03H01
DBT02	ypDG-004	ypHQ-002	D04H02
DBT03	ypDG-003	ypHQ-005	D03H05
DBT04	ypDG-001	ypHQ-003	D01H03
DBT05	ypDG-001	ypHQ-001	D01H01
DBT06	ypDG-003	ypHQ-004	D03H04
DBT07	ypDG-004	ypHQ-001	D04H01
DBT08	ypDG-004	ypHQ-005	D04H05
DBT09	ypDG-001	ypHQ-004	D01H04
DBT10	ypDG-001	ypHQ-002	D01H02
DBT11	ypDG-002	ypHQ-003	D02H03
DBT12	ypDG-002	ypHQ-002	D02H02
DBT13	ypDG-004	ypHQ-004	D04H04
DBT14	ypDG-002	ypHQ-001	D02H01
DBT15	ypDG-001	ypHQ-005	D01H05

2 方法

2.1 溶液配置

2.1.1 人工肠液 取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 溶解,用 0.1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.8。

2.1.2 DBT 参照《内外伤辨惑论》DBT 原文记载,基于文献考证及前期研究基础,确定该方剂量为黄芪 40 g、酒洗当归 8 g。按处方比例称取当归(ypDG-001)、黄芪(ypHQ-001)饮片共 48 g,置砂锅中,加水 400 mL,武火煮沸后转文火煮至 200 mL(生药量 0.24 g · mL⁻¹),纱布滤过,放冷,备用。

2.2 DASS 样品制备

依据前期建立的外翻肠囊模型^[10],自肠段放入含有供试药液(DBT)的自制试管中开始计时,于 120 min 从肠段中取出全部肠吸收液,离心,取上清液。精密吸取适量上清液,再用空白人工肠液稀释成不同质量浓度的供试样品,混匀,0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得。将 120 min DBT 肠吸收液样品标记为 S(sample),其对应的稀释样品标记为 S_n(n 为稀释倍数)。依据文献[11-13]报道,结合前期研究基础,考虑各个细胞对药物的承受能力不一,故各细胞筛选过程将肠吸收液样品稀释成不同浓度梯度的样品。其中,用于骨髓基质细胞的样品分别为 S₁₈、S₉、S₆、S_{4.5}、S_{3.5}、S₃、S_{2.5},人脐静脉内皮细胞为 S₄₅、S₉、S_{4.5}、S₃、S_{2.5}、S,骨髓间充质干细胞为 S₃₆、S₁₈、S₉、S_{4.5}、S_{2.5}、S_{1.5}、S。

2.3 RTCA 测定样品

测定样品作用于细胞的 TCRPs,取正常培养的处于对数生长期的细胞,接种细胞密度为每 1 mL

4 × 10⁴个,加入 100 μL 细胞悬液及 50 μL 对应的完全培养基于 E-Plate 16 孔板中,室温下放置 30 min 后放入 RTCA 中,平衡 24 h,加入对应的供试样品溶液 50 μL,放入 RTCA 中,检测 72 h,测出各药液作用于细胞后所产生的 TCRPs 图,筛选出与 DBT 肠吸收液存在浓度依赖关系的细胞。RTCA 测定不同批次样品作用于 OP9 的 TCRPs 方法一致,平衡 24 h 后,检测 28 h。

3 结果

3.1 细胞的筛选

3.1.1 RTCA 测定样品作用于不同细胞的 TCRPs

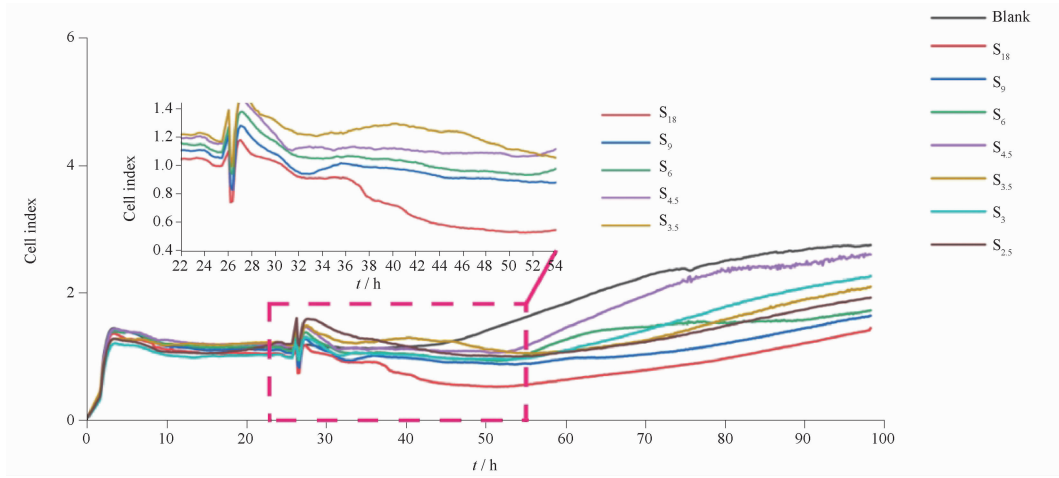
依据前期研究基础和文献[11-13]报道,DBT 具有补气生血、治疗贫血、改善血虚动物的造血功能等功效,具有影响骨髓有核细胞、造血干细胞集落水平效应,增加骨髓基质细胞数目、促进人脐静脉内皮细胞分裂增殖和骨髓间充质干细胞增殖的作用。因此,本研究以骨髓基质细胞、人脐静脉内皮细胞、骨髓间充质干细胞这 3 种细胞为研究对象,以 CI 值为指标,筛选与 DBT 肠吸收液存在浓度依赖关系的特定细胞。

采用 SPSS 27.0 软件对各细胞 RTCA 检测数据进行分析,并结合“Orgin 2023”软件进行绘图,结果见图 1~3。

由图 1~3 可见,3 种细胞在一定监测时间内对不同质量浓度的样品反应灵敏,给药后 CI 值均出现明显波动。给药初期,在一定浓度范围内,各细胞的 CI 值在不同质量浓度样品所对应的曲线呈现较好的分离,且样品稀释倍数越小,CI 值越高,存在一定的浓度依赖性。根据 CI 值的变化可知,骨髓基质细胞与稀释 3.5~18 倍的肠吸收液样品存在浓度依赖关系,样品可监测时间范围为 24~52 h;人脐静脉内皮细胞与稀释 1~4.5 倍的肠吸收液样品存在浓度依赖关系,样品可监测时间范围为 24~52 h;骨髓间充质干细胞与稀释 2.5~36 倍的肠吸收液样品存在浓度依赖关系,样品可监测时间范围为 24~32 h。

3.1.2 特定依赖性细胞的筛选

不同细胞对 DBT 肠吸收液的敏感度存在一定差异,选择各细胞浓度依赖范围内的 3 个相同检测时间点,针对不同浓度 DBT 肠吸收液作用于各个细胞的 CI 值进行比较。采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析(表 2~4),并用“Orgin 2023”软件进行绘图,结果见图 4~6。



S_n - 不同稀释倍数的样品, 下同。

S_n - different dilutions of the sample, the same below.

图1 DBT 作用于骨髓基质细胞的时间剂量依赖性细胞反应曲线(TCRPs)图

Fig. 1 Time-dose-dependent cellular response curves (TCRPs) plots of DBT action on bone marrow stromal cells

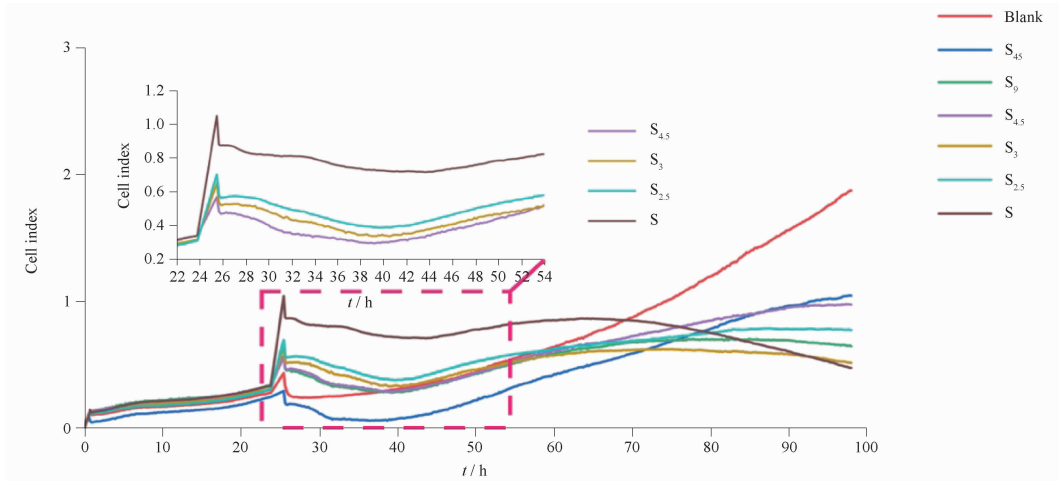


图2 DBT 作用于人脐静脉内皮细胞的 TCRPs 图

Fig. 2 TCRPs diagram of DBT on human umbilical vein endothelial cells

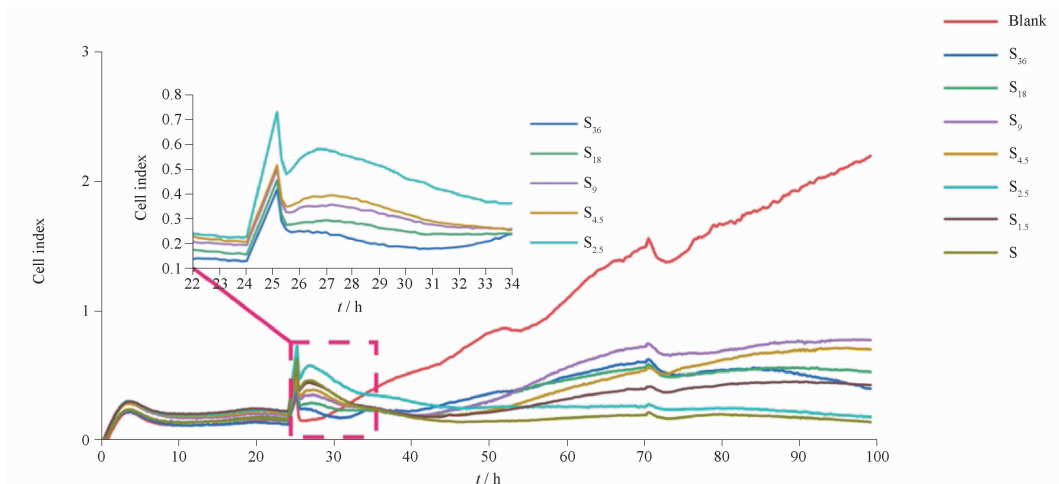


图3 DBT 作用于骨髓间充质干细胞的 TCRPs 图

Fig. 3 TCRPs diagram of DBT on bone marrow mesenchymal stem

表2 DBT 肠吸收液不同时间点作用于骨髓基质细胞的细胞指数(CI)值。n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on bone marrow stromal cells at different time points. n=3, $\bar{x} \pm s$

t/h	Blank	S ₁₈	S ₉	S ₆	S _{4.5}	S _{3.5}
26	1.11 ± 0.09	1.05 ± 0.08	1.20 ± 0.04	1.31 ± 0.06	1.39 ± 0.07	1.39 ± 0.08
28	1.09 ± 0.05	0.95 ± 0.03	1.11 ± 0.03	1.27 ± 0.07	1.39 ± 0.05	1.37 ± 0.06
30	1.05 ± 0.06	0.93 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.15 ± 0.08	1.21 ± 0.05	1.31 ± 0.14

表3 DBT 肠吸收液不同时间点作用于人脐静脉内皮细胞的 CI 值。n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on human umbilical vein endothelial cells at different time points.

n=3, $\bar{x} \pm s$

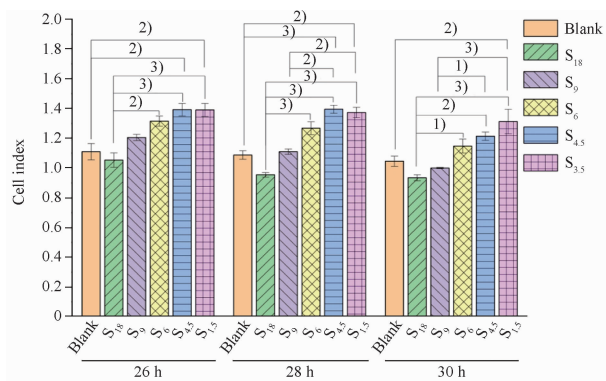
t/h	Blank	S _{4.5}	S ₃	S _{2.5}	S
26	0.31 ± 0.11	0.47 ± 0.15	0.52 ± 0.09	0.57 ± 0.14	0.88 ± 0.25
28	0.24 ± 0.10	0.46 ± 0.14	0.52 ± 0.07	0.57 ± 0.15	0.84 ± 0.24
30	0.23 ± 0.10	0.41 ± 0.12	0.49 ± 0.08	0.54 ± 0.13	0.82 ± 0.23

表4 DBT 肠吸收液不同时间点作用于骨髓间充质干细胞的 CI 值。n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 4 CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on bone marrow mesenchymal stem cells at different time points.

n=3, $\bar{x} \pm s$

t/h	Blank	S ₃₆	S ₁₈	S ₉	S _{4.5}	S _{2.5}
26	0.16 ± 0.06	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.34 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.54 ± 0.04
28	0.17 ± 0.06	0.22 ± 0.09	0.29 ± 0.08	0.34 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.55 ± 0.04
30	0.23 ± 0.07	0.19 ± 0.09	0.25 ± 0.08	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.06	0.46 ± 0.04



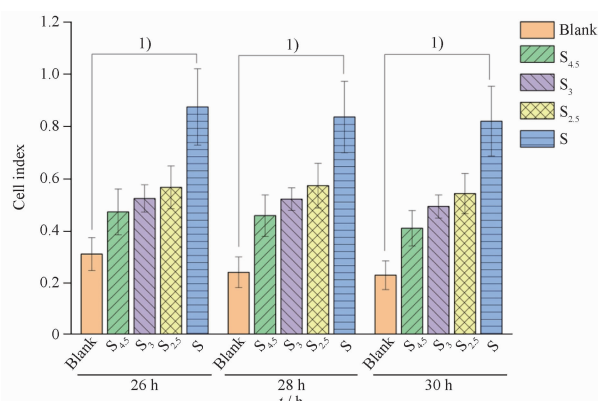
S - 样品; n - 样品稀释倍数; 与空白组比较, ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, ³⁾P < 0.001。

S - the sample; n - the sample dilution; ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, ³⁾P < 0.001, vs blank group.

图4 DBT 肠吸收液不同时间点作用于骨髓基质细胞的 CI 值比较。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 Comparison of CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on bone marrow stromal cells at different time points. n=3, $\bar{x} \pm s$

经综合分析比较,在不同时间点,样品浓度的变化对人脐静脉内皮细胞影响较小,组间差异不明显,而样品浓度的变化对骨髓基质细胞和骨髓间充质干细胞影响较明显,组间差异显著,加之骨髓基质细胞可检测时间(24~52 h)比骨髓间充质干细胞(24~32 h)



S - 样品; n - 样品稀释倍数; 与空白组比较, ¹⁾P < 0.01。

S - the sample; n - the sample dilution; ¹⁾P < 0.01, vs blank group.

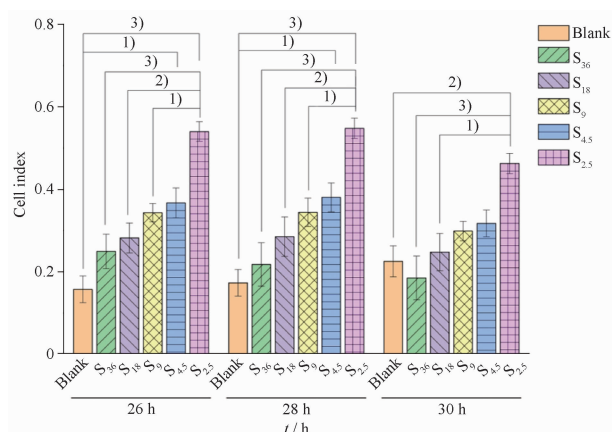
图5 DBT 肠吸收液不同时间点作用于人脐静脉内皮细胞的 CI 值比较。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 5 Comparison of CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on human umbilical vein endothelial cells at different time points. n=3, $\bar{x} \pm s$

较长,综合考虑后选择骨髓基质细胞用于细胞生物评价后续实验,样品范围为稀释倍数 3.5~18 的 DBT 肠吸收液,样品检测时间为 24~52 h。

3.2 RTCA 检测方法学考察

RTCA 检测的细胞指数(CI)值是药物作用于细胞形成的生物电变化的定量表达,是一种间接检测



Sn - 不同稀释倍数的样品; 与空白组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

Sn - different dilutions of the sample; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$, vs blank group.

图6 DBT 肠吸收液不同时间点作用于骨髓间充质干细胞的 CI 值比较。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Comparison of CI values of the intestinal absorption solution of DBT acting on bone marrow mesenchymal stem cells at different time points. $n = 3, \bar{x} \pm s$

指标, 方法学考察目的主要涉及检测指标的精密性、重复性等。

3.2.1 精密性 分别加入供试样品 $S_{3.5}$ 、 S_9 、 S_{18} 各 $50 \mu\text{L}$, 在 RTCA 仪器中进样 6 次, 形成 TCRPs 图, 计算 3 种样品在不同时间段 CI 值的 RSD 范围, 结果见表 5。

表5 实时细胞分析(RTCA)检测精密性实验结果。 $n = 3$

Tab. 5 Experimental results of real time cell analysis (RTCA) detection precision. $n = 3$

Sample	Stage	t/h	RSD/%
$S_{3.5}$	Cell stable phase	2.35 - 12.01	0.09 - 9.41
		12.01 - 25.68	0.07 - 11.07
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	0.10 - 7.87
S_9	Cell stable phase	2.35 - 12.01	0.23 - 9.97
		12.01 - 25.68	0.07 - 8.32
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	0.24 - 6.96
S_{18}	Cell stable phase	2.35 - 12.01	0.11 - 8.96
		12.01 - 25.68	0.11 - 7.08
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	0.24 - 7.97
		38.08 - 52.08	0.23 - 2.49

3.2.2 重复性 分别加入供试样品 $S_{3.5}$ 、 S_9 、 S_{18} 各 $50 \mu\text{L}$, 每份样品平行 6 份, 分别在 RTCA 仪器中进行监测, 形成 TCRPs 图, 计算出各 6 份平行样品在

不同时间段 CI 值的 RSD 范围, 结果见表 6。

表6 RTCA 检测重复性实验结果。 $n = 3$

Tab. 6 Experimental results of RTCA detection repeatability. $n = 3$

Sample	Stage	t/h	RSD/%
$S_{3.5}$	Cell stable phase	2.35 - 12.01	4.69 - 11.42
		12.01 - 25.68	3.43 - 6.21
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	3.06 - 7.70
S_9	Cell stable phase	2.35 - 12.01	5.87 - 11.24
		12.01 - 25.68	2.59 - 6.81
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	0.70 - 10.25
S_{18}	Cell stable phase	2.35 - 12.01	2.50 - 13.32
		12.01 - 25.68	5.45 - 13.10
	Sample testing phase	26.25 - 38.08	0.78 - 9.71
		38.08 - 52.08	1.09 - 6.01

由表 6 可知, 在 52 h 内, 各 6 份平行样品检测得到的 CI 值 RSD 均 $< 15\%$, 表明该方法在 52 h 内重复性良好, 符合 RTCA 的方法要求。

3.3 DBT 质量一致性评价

由“3.1.2”项下可知, 骨髓基质细胞与稀释倍数 3.5 ~ 18 倍的 DBT 肠吸收液样品存在明显的浓度依赖关系, 选择范围内浓度居中的 S_9 样品作为一致性评价样品。同时提取曲线下面积 (AUC)、最高细胞指数 (CI_{\max})、最大细胞指数所对应的时间 (t_{\max})、达到一半曲线面积所需要的时间 ($t_{1/2AUC}$)、各 TCRPs 图之间的相似因子 (f_2) 等特征参数, 结合聚类分析、雷达图等分析方法, 进行多参数综合分析。

由表 5 可知, 在 52 h 内, 各样品连续 6 次检测得到的 CI 值 RSD 均 $< 15\%$, 表明该仪器 52 h 内精密性良好, 符合 RTCA 的方法要求。

3.3.1 基于 RTCA 测定不同批次吸收样品的 TCRPs 利用 Excel 软件中 RANDBETWEEN 函数生成随机数, 将 5 批黄芪饮片、4 批酒洗当归饮片的不同批次随机组合, 制备出 15 批 DBT, 编号为 DBT01 ~ DBT15。将 15 批样品曲线数据导入“Origin 2023”软件, 根据多批次样品曲线数据拟合生成平均趋势图 (R), 见图 7。

3.3.2 各 TCRPs 图的特征参数 在 15 批以上 DBT 基准样品细胞效应表征的基础上, 对 AUC、 CI_{\max} 、 t_{\max} 、 $t_{1/2AUC}$ 等特征参数的提取, 确定特征参数的范围, 见表 7。结果表明, 15 批 DBT 的 AUC 范围为 55.63 ~ 65.47, 平均 AUC 为 60.81, RSD 为 4.95%; CI_{\max} 范围为 1.37 ~ 1.67, 平均 CI_{\max} 为 1.48,

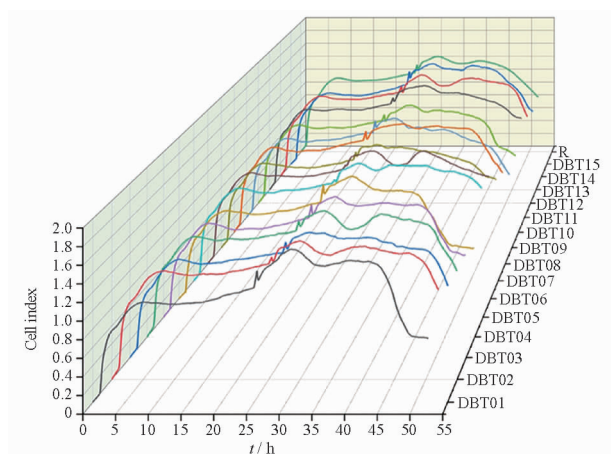


图7 15批DBT的TCRPs图

Fig. 7 TCRPs diagram of 15 batches of DBT

表7 15批DBT的TCRPs曲线特征参数汇总表

Tab. 7 Summary of characteristic parameters of TCRPs curve of 15 batches of DBT

No.	AUC	CI _{max}	t _{max} /h	t _{1/2AUC} /h
DBT01	62.05	1.67	30.75	29.12
DBT02	65.47	1.55	29.89	28.92
DBT03	60.69	1.44	29.39	28.79
DBT04	62.25	1.49	29.79	28.37
DBT05	59.08	1.46	29.62	28.41
DBT06	56.31	1.52	30.38	27.79
DBT07	64.17	1.49	29.85	29.30
DBT08	62.36	1.47	29.72	28.61
DBT09	57.93	1.37	29.29	28.27
DBT10	62.37	1.47	32.47	28.88
DBT11	55.63	1.38	29.15	27.50
DBT12	56.77	1.39	30.68	28.00
DBT13	62.74	1.51	31.97	29.29
DBT14	63.44	1.51	29.72	28.88
DBT15	60.92	1.52	30.55	29.35
Average	60.81	1.48	30.21	28.63
Stdev	3.01	0.07	0.95	0.57
RSD/%	4.95	5.05	3.16	1.98

f_2 ,以考察其相似性,结果见表8。

$$f_2 = 50 \times \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (CI_1 - CI_2)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{公式(1)}$$

其中,CI₁和CI₂分别代表某一批次DBT和其他批次在某个时间t的细胞指数值,n为时间点的个数。由表8可知,15批DBT与R之间的 f_2 均>99.7,各批次样品TCRPs图之间的 f_2 也均>99.2,说明DBT的制备工艺稳定,品质相近,细胞效应表征也相近。 f_2 法具有自身便捷的优势,但单个指标考察中药品质的一致性仍存在一定的局限性,还需要在此基础上结合其他的指标综合分析把握细胞生物

RSD为5.05%; t_{max} 范围为29.15~32.47h,平均 t_{max} 为30.21h,RSD为3.16%; $t_{1/2AUC}$ 范围为27.50~29.35h,平均 $t_{1/2AUC}$ 为28.63h,RSD为1.98%。各特征参数的RSD均<5.1%,表明各批次DBT细胞效应表征差异较小,TCRPs图相似度高,各批次之间的差异性还需要结合其他手段加以分析。

3.3.3 各TCRPs图之间的相似度比较 采用非模型依赖法中的相似因子(f_2)法考察各批次TCRPs图的效应趋势是否一致,通过测定同一时间点2批次之间CI值计算 f_2 ,若 $f_2 \geq 50$ 便可认为2批次DBT的细胞效应趋势一致。将15批DBT生成的平均趋势图(R)与各批次DBT的TCRPs数据导入“DSSolver1.0”软件,根据公式1计算曲线间的

评价方法,更为全面地考察中药品质的变化。

3.3.4 聚类分析 通过聚类分析可以反映出不同样本间的相近程度,组间分类距离越大代表样本间的差异越明显,“距离”越小的个体(变量)越具有相似性。采用将15批DBT的AUC、CI_{max}、 t_{max} 、 $t_{1/2AUC}$ 、各批次DBT的TCRPs图与平均趋势图(R)之间的 f_2 等各参数导入“Origin 2023”软件,通过计算不同类别数据点间的相似度进行层次聚类分析,结果见图8。

由图8可知,当距离在0.0005~0.0010时,15批DBT样品被分为3类,第一类为DBT02、DBT07、DBT14,第二类为DBT05、DBT09、DBT06、DBT12、

表 8 15 批 DBT 的 TCRPs 图之间相似因子汇总表

Tab. 8 Summary of similarity factors between TCRPs of 15 batches of DBT

No.	DBT01	DBT02	DBT03	DBT04	DBT05	DBT06	DBT07	DBT08	DBT09	DBT10	DBT11	DBT12	DBT13	DBT14	DBT15	R
DBT01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT02	99.641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT03	99.736	99.890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT04	99.763	99.921	99.955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT05	99.870	99.711	99.905	99.902	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT06	99.721	99.291	99.646	99.582	99.839	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT07	99.621	99.977	99.912	99.898	99.724	99.309	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT08	99.691	99.938	99.956	99.960	99.846	99.536	99.947	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT09	99.680	99.713	99.944	99.881	99.937	99.785	99.758	99.881	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT10	99.839	99.916	99.960	99.970	99.915	99.594	99.912	99.935	99.872	-	-	-	-	-	-	-
DBT11	99.568	99.464	99.808	99.745	99.879	99.862	99.490	99.693	99.936	99.706	-	-	-	-	-	-
DBT12	99.747	99.542	99.841	99.800	99.960	99.904	99.573	99.751	99.946	99.802	99.955	-	-	-	-	-
DBT13	99.774	99.935	99.971	99.953	99.877	99.606	99.938	99.969	99.892	99.967	99.716	99.784	-	-	-	-
DBT14	99.696	99.979	99.950	99.970	99.812	99.428	99.969	99.967	99.819	99.959	99.614	99.681	99.959	-	-	-
DBT15	99.884	99.848	99.947	99.927	99.930	99.676	99.865	99.899	99.876	99.967	99.728	99.825	99.928	99.910	-	-
R	99.834	99.869	99.982	99.968	99.961	99.735	99.877	99.951	99.948	99.974	99.829	99.893	99.971	99.933	99.967	-

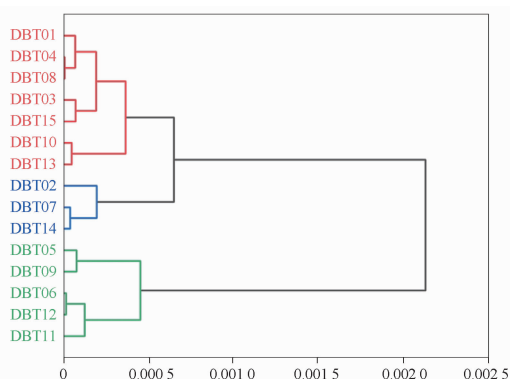


图 8 15 批 DBT 的聚类谱系

Fig. 8 Cluster pedigree of 15 batches of DBT

DBT11,其余为第三类;当距离在 0.001 0~0.002 0 时,15 批 DBT 样品被分为 2 类,第一类为 DBT05、DBT09、DBT06、DBT12、DBT11,其余为第二类。表明不同配伍组合的 DBT 之间存在一定的差异,可能与环境、气候、产地等因素有关。但各批次差异较小,可大体聚为一类,可见不同批次 DBT 品质较为相似。

3.4 雷达图

雷达图是以从同一点开始的轴上表示的 3 个或多个定量变量的二维图表的形式显示多变量数据的图形方法,可以将抽象的数据用图形表达出来,提取图形特征的同时,刻画数据样本的内部数据结构以及样本间的各种关系,形象的图形特征有利于视觉上的分类或聚类,可用来表达整体评价。根据公式 2 计算 15 批 DBT 的 AUC、CI_{max}、t_{max}、t_{1/2AUC}、

TCRPs 曲线图与平均趋势图(R)的 f₂ 等参数的相对值,结果见表 9。

$$\text{相对值} = \frac{X_i}{X_{\max}} \quad \text{公式(2)}$$

其中, X_i 是 DBT 的某一参数值, X_{max} 是 15 批次 DBT 中对应参数的最大值。

将各批次参数的相对值导入“Origin 2023”软件绘制雷达图,见图 9。通过 TCRPs 图各特征参数聚类分析可有效地对不同批 DBT 进行分类,从 15 批 DBT 的 TCRPs 图对应各特征参数相对值的雷达图可以看出,不同批次的 DBT 所呈现出的各参数相对值均 >0.8,整体趋势大致一致,反映不同批次 DBT 的质量具有较高的一致性。其中,各批次 f₂ 值最为接近,而 CI_{max} 值相对离散,结合聚类分析结果,可进一步推测 CI_{max} 对各批次分类影响较大, f₂ 影响较小。不同批次 DBT 的 TCRPs 图特征参数的具体数值大小存在差异,不同产地的药材在品质上存在差异,但并不明显,进而也证实了雷达图作为整体质量一致性评价的可行性。

4 讨论

中药质量一致性一般从安全性和有效性两个角度出发。安全性评价主要从确保中药安全的角度出发,对中药农药残留、溶剂残留、重金属、微生物限度等进行监测和控制,上述评价指标已形成标准化,并广泛应用于中药质量评价;而有效性质量评价则侧重于保证中药品质与疗效的一致性,尚无统一的

表 9 15 批 DBT 的 TCRPs 曲线图不同特征参数的相对值汇总表

Tab. 9 Summary of the relative values of different characteristic parameters in the TCRPs curve of 15 batches of DBT

No.	AUC	CI _{max}	t _{max} /h	t _{1/2AUC} /h	f ₂
DBT01	0.95	1.00	0.95	0.99	1.00
DBT02	1.00	0.93	0.92	0.99	1.00
DBT03	0.93	0.86	0.91	0.98	1.00
DBT04	0.95	0.89	0.92	0.97	1.00
DBT05	0.90	0.87	0.91	0.97	1.00
DBT06	0.86	0.91	0.94	0.95	1.00
DBT07	0.98	0.89	0.92	1.00	1.00
DBT08	0.95	0.88	0.92	0.97	1.00
DBT09	0.88	0.82	0.90	0.96	1.00
DBT10	0.95	0.88	1.00	0.98	1.00
DBT11	0.85	0.83	0.90	0.94	1.00
DBT12	0.87	0.83	0.94	0.95	1.00
DBT13	0.96	0.90	0.98	1.00	1.00
DBT14	0.97	0.90	0.92	0.98	1.00
DBT15	0.93	0.91	0.94	1.00	1.00

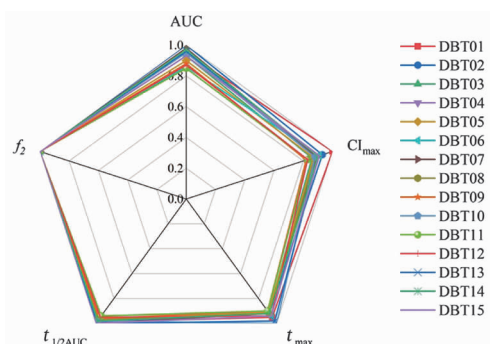


图 9 15 批 DBT 的 TCRPs 曲线图不同特征参数的相对值雷达图

Fig. 9 Relative value radar of different characteristic parameters of TCRPs curve of 15 batches of DBT

评价标准。中药成分较为复杂,其质量一致性尤其是多批次间质量一致性评价不能简单套用化学药的相关评价手段,需结合中药自身的特点,从整体的角度出发,建立与药效相关联的质量一致性评价方法,才能更好地保证中药疗效的一致性。

RTCA 克服了传统方法中时间长、干扰多以及对细胞造成损伤等局限性,能够在较短的时间内检测到微孔中的大部分细胞,检测数据准确性高、重复性高,具有操作简单、无须标记、实时动态、无损伤的特点,可灵敏地反馈出细胞药理作用^[14-15]。目前,RTCA 通过自带软件实时记录整个微孔板中细胞的活动状态,提供细胞动态信息及细胞效应图谱,对活细胞全程质量监控,不仅保证实验细胞质量,同时捕捉细胞瞬时及长时效反应特征,便于实验设计与优化^[16]。

基于外翻肠囊模型建立 DASS,形成标准化吸收

仿生系统模块,并与 RTCA 系统联合形成 DASS-RT-CA 系统,针对 DBT 补血造血功能,筛选出的骨髓基质细胞对 DBT 肠吸收液反应敏感、与药物浓度梯度呈明显依赖且信号稳定,确定了 DBT 浓度依赖范围为稀释 3.5 ~ 18 倍的肠吸收液样品,确定了样品可监测时间范围为 24 ~ 52 h。并针对骨髓基质细胞,选择浓度依赖范围内的 3 种 DBT 肠吸收液浓度样品进行 RTCA 方法学考察,为建立 DBT 生物评价方法提供参考。

中药临床应用多为复方,现行研究标准多不能反映中药复方整体质量^[17]。本研究采用不同产地、不同批次的饮片配伍制备多批次 DBT 并进行细胞生物表征,提取 AUC、CI_{max}、t_{max}、t_{1/2AUC}、各 TCRPs 图之间的 f₂ 等特征参数,结合多种分析方法进行综合处理,证明多批次 DBT 之间质量的一致性,初步建立 DBT 生物评价方法,既体现了 DBT 整体药效,又突破了复方制剂多以成分为指标的品质评价局限。中药复方因其功效具有多样性的特点,一般以临床常用治法开展研究,DBT 临床常用于气血两虚型贫血症,现代药理研究也证明其具有明确的促进造血功效,本研究筛选出与该功效相关联的骨髓基质细胞,基于临床疗效对中药质量进行评价,从而反映中药功效这一关键质量属性,可作为中药质量评价的补充,为中药复方制剂的质量评价提供新的思路。

REFERENCES

- [1] YANG F X, WANG Y, XIA P F, *et al.* Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of Dan-

- ggui buxue decoction and prediction and analysis of its Q-markers [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46(11): 2677-2685.
- [2] GONG A G, LI N, LAU K M, *et al.* Calycosin orchestrates the functions of Danggui buxue tang, a Chinese herbal decoction composing of Astragali Radix and Angelica Sinensis Radix; an evaluation by using calycosin-knock out herbal extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168:150-157.
- [3] CHAI G S, GONG J, WU J J, *et al.* Danggui buxue decoction ameliorates mitochondrial biogenesis and cognitive deficits through upregulating histone H4 lysine 12 acetylation in APP/PS1 mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313:116554. DOI: 10.1016/j.jep.2023.116554.
- [4] GAO Y, ZHANG Y, LIU W, *et al.* Danggui buxue decoction alleviates cyclophosphamide-induced myelosuppression by regulating β -hydroxybutyric acid metabolism and suppressing oxidative stress[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1):710-721.
- [5] GONG G, ZHOU X, HUANG D, *et al.* Danggui buxue tang: a review of its major components [J]. *Altern Ther Health Med*, 2023, 29(5):54-64.
- [6] MICHIIYA K, NORIAKI S, MITSURU S, *et al.* Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract [J]. *Int J Pharm*, 2001, 221(1-2):87-94.
- [7] XU X F, LI C, WANG Y Y, *et al.* Study on dissolution characteristics of isoimperatorin using drug dissolution /absorption simulating system and its correlation analysis with pharmacokinetics [J]. *J Jinzhou Med Univ*(锦州医科大学学报), 2018, 39(4): 1-4.
- [8] LI Z Q, LIU Z D, GU H, *et al.* Evaluation on the release discipline of salvianolic acid B sustained-release tablets using a drug dissolution and absorption simulating system[J]. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2010, 33(5): 367-373.
- [9] LEI F F, WANG J C, ZHANG C M, *et al.* Preliminary study on the application of real time cellular electronic analysis in quality evaluation of compound Danshen Dropping Pills[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2015, 37(5): 1119-1123.
- [10] ZHANG J, GAO Y, ZHOU X J, *et al.* Investigation of intestinal absorption characteristics of multi-index components of Danggui buxue tang based on drug absorption simulating system[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2022, 28(16):188-195.
- [11] BEI H K. Preliminary study on erythropoiesis promoting pathway of Danggui buxue tang based on network pharmacology [D]. Guangzhou; Guangdong Pharmaceutical University, 2020.
- [12] HE J H. Adhesion mechanism of Danggui buxue tang on bone marrow stromal cells and its effect on hematopoietic function[D]. Guangzhou; Guangdong Pharmaceutical University, 2018.
- [13] BO B. Molecular mechanisms of Danggui buxue decoction on regulating erythroid progenitor cell differentiation[D]. Guangzhou; Southern Medical University, 2015.
- [14] YAN G, DU Q, WEI X, *et al.* Application of real-time cell electronic analysis system in modern pharmaceutical evaluation and analysis[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3280.
- [15] OTERO-GONZÁLEZ L, SIERRA-ALVAREZ R, BOITANO S, *et al.* Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(18): 10271-10278.
- [16] FRANCK A A, KAREN T, HELGA H G, *et al.* The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models[J]. *J Biomol Screen*, 2011, 16(6):575-587.
- [17] HE F Y, NIE L Z, ZHENG X W, *et al.* Quality analysis of Xinnaojing tablets based on multi-index comprehensive evaluation [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2024, 59(4): 346-352.

(收稿日期:2024-02-26)