

基于电化学生物传感技术构建黄柏抗痛风生物效价检测方法及其在质量评价中的应用研究

李婧荣^{1,2,3}, 朱育卓^{1,2,3}, 王雪琦^{1,2,3}, 程朝明^{1,2,3}, 张传浚^{1,2,3}, 刘伯实^{1,2,3}, 张迪^{1,2,3*} (1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 天津市中药智能制药与绿色制药重点实验室, 天津 301617; 3. 现代中医药海河实验室, 天津 301617)

摘要:目的 采用电化学生物传感技术测定黄柏的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)抑制生物活性, 建立抗痛风生物效价检测方法, 同时结合化学含量测定以评价黄柏药材品质差异, 为探索黄柏整体质量评控新模式提供科学依据。方法 采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定各批次黄柏中小檗碱和黄柏碱含量; 建立电化学生物传感技术测定黄柏抗痛风生物效价; 运用 Pearson 相关分析法计算黄柏抗痛风生物效价与化学成分的相关度。结果 各批次黄柏成分含量符合现行药典规定但差异较大, 小檗碱含量为 5.09% ~ 34.76%, 黄柏碱含量为 2.56% ~ 4.76%; 黄柏样品的 XO 抑制活性存在差异, 抗痛风生物效价为 25.60 ~ 337.96 U · mg⁻¹; 相关性分析表明小檗碱和黄柏碱含量与抗痛风生物效价无显著性相关($P > 0.05$)。结论 综上, 所建立生物效价检测方法可用于黄柏质量评价, 采用化学成分测定和生物效价检测联用的模式有望更全面、合理评判黄柏质量。

关键词:黄柏; 黄嘌呤氧化酶; 电化学生物传感器; 抗痛风生物效价; 黄柏碱; 小檗碱

doi:10.11669/cpj.2025.07.010 中图分类号:R932 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)07-0747-08

Development of Anti-gout Biological Potency Determination Method for Phellodendri Chinensis Cortex Based on Electrochemical Biosensing Technology and Its Application in Quality Evaluation

LI Jingrong^{1,2,3}, ZHU Yuzhuo^{1,2,3}, WANG Xueqi^{1,2,3}, CHENG Zhaoming^{1,2,3}, ZHANG Chuanjun^{1,2,3}, LIU Boshi^{1,2,3}, ZHANG Di^{1,2,3*} (1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Intelligent and Green Pharmaceuticals for Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the xanthine oxidase (XO) inhibitory activity of Phellodendri Chinensis Cortex based on electrochemical biosensor to establish the evaluation method for anti-gout biological potency and compare the quality combined with chemical content determination, thus to provide a new model of overall quality assessment of Phellodendri Chinensis Cortex. **METHODS** The contents of berberine and phellodendrine in Phellodendri Chinensis Cortex samples were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The anti-gout biological potency was investigated by electrochemical biosensor. And Pearson correlation analysis was used to calculate the correlation between biological potency and chemical components of Phellodendri Chinensis Cortex. **RESULTS** The chemical content of Phellodendri Chinensis Cortex in each batch met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia 2020; the content of berberine was 5.09% to 34.76%, and the content of phellodendrine was 2.56% to 4.76%. The XO inhibitory activity of Phellodendri Chinensis Cortex samples varied greatly, and their biological potency ranged from 25.60 to 337.96 U · mg⁻¹. In addition, Pearson correlation analysis showed that there was no significant correlation between berberine and phellodendrine contents and their anti-gout biological potency ($P > 0.05$). **CONCLUSION** The established biological potency evaluation method with electrochemical biosensor can be used for the quality test of Phellodendri Chinensis Cortex, and the combination of chemical composition and biological potency can reflect the quality difference among Phellodendri Chinensis Cortex batches more objectively and reasonably.

KEY WORDS: Phellodendri Chinensis Cortex; xanthine oxidase; electrochemical biosensor; anti-gout biological potency; phellodendrine; berberine

基金项目:天津市教委科研计划项目资助(2021KJ122)

作者简介:李婧荣,女,硕士研究生 研究方向:生物传感技术在中药质量控制中的应用 * 通讯作者:张迪,男,博士,助理研究员,硕士生导师 研究方向:生物传感技术在中医药领域中的应用 Tel: (022)59791816

黄柏(*Phellodendri Chinensis Cortex*)为芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之功效,是中医临床治疗痛风的常用药材^[1-4]。现代药理学研究表明,黄柏中多种活性成分如小檗碱、二氢小檗碱以及巴马汀等可特异性抑制体内黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)活性,阻断次黄嘌呤向黄嘌呤和尿酸转化以降低血尿酸浓度,从而发挥抗痛风作用^[5-6]。而《中国药典》2020年版规定,黄柏中含小檗碱以盐酸小檗碱计,不得少于3.0%,含黄柏碱以盐酸黄柏碱计,不得少于0.34%^[7]。可以推测,仅以小檗碱和黄柏碱这2个指标性成分可能难以客观、合理地体现中药黄柏的临床疗效及整体质量。

中药质量生物效应检测,是以中药临床功效为导向,采用定量药理学和药物分析学方法,定量表征中药的功效、活性或生物学效应,从而评价和控制中药质量的方法^[8]。中药质量生物效应检测方法符合中药多成分、多靶点、整体性的特点,可与常规理化质检方法相互补充,用于完善中药质量控制体系^[9-11]。2020年12月,国家药品监督管理局药审中心发布实施了《中药生物效应检测研究技术指导原则(试行)》,鼓励探索研究建立符合中药特点的生物效应检测方法,主要用于中药的质量控制,同时与现有理化检测方法相互补充,完善中药质量控制体系^[12]。鉴于此,本研究基于电化学生物传感技术特异性强、灵敏度高、操作简便等优点,拟以黄柏抗痛风功效为切入点,以XO抑制活性为指标,构建一种新型的抗痛风生物效应检测方法;同时结合高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对黄柏化学成分进行分析,以期实现对中药黄柏功效-成分相关联的综合质量评价。

1 材料

1.1 仪器

CHI-760E型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);Vanquish Core高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);FW100型高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);SHB-III循环水式多用真空泵(天津科诺仪器设备有限公司);N-1300型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);FDU-2110型冷冻干燥机(日本东京理化器械株式会社);XS205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多国

际股份有限公司)。

1.2 试剂

XO、黄柏对照药材(上海源叶生物科技有限公司);次黄嘌呤[迈瑞尔实验设备(上海)有限公司];别嘌呤(美国Sigma-Aldrich公司);聚乙烯亚胺功能化氧化石墨烯(PEI@GO,江苏先丰纳米材料科技有限公司);京尼平(南通飞宇生物科技有限公司);盐酸黄柏碱标准品(批号:E-0966,纯度:≥98%,坛墨质检科技股份有限公司);盐酸小檗碱标准品(批号:1ST40203A,纯度:≥98%,天津阿尔塔科技有限公司);乙腈为色谱纯;三氯化铁六水合物、乙醚、氯化钠、盐酸、铁氰化钾、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾均为分析纯;工作电极(棒状金电极,Ø=3 mm,天津艾达恒晟科技发展有限公司)、银/氯化银参比电极(型号:R0305,饱和KCl,天津艾达恒晟科技发展有限公司)、对电极(铂片电极,天津艾达恒晟科技发展有限公司)。

1.3 试药

黄柏样品收集于多个渠道,共20批,分别来自四川、湖南、湖北等不同产地,经天津中医药大学中药学院李先宽副教授鉴定为芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮,见表1。

表1 不同产地、不同批次、不同炮制处理的各黄柏样品信息

Tab. 1 Informations of *Phellodendri Chinensis Cortex* samples from different origins, batches, and processing methods

Number of samples	Processing method	Sample amount	Sources (in Chinese)
1-6	Raw	6	Sichuan(四川)
7-9	Raw	3	Hunan(湖南)
10-12	Raw	3	Hubei(湖北)
13-14	Raw	2	Anhui(安徽)
15-16	Raw	2	Yunnan(云南)
17-20	Salt-water processed	4	Sichuan(四川)

2 方法

2.1 黄柏提取物制备

分别取各批次黄柏药材,粉碎,过3号筛,加盐酸-体积分数70%乙醇(1:100),料液比1:20,于50℃超声处理50 min。滤过,将滤液用旋转蒸发仪减压浓缩至无试剂蒸出,加少量乙醇复溶,并

将溶液置于 60 ℃ 水浴锅上挥至呈浸膏状,将浸膏冷冻干燥,即得黄柏提取物,并于 -20 ℃ 保存备用。

2.2 黄柏样品中小檗碱和黄柏碱含量测定

2.2.1 标准品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱标准品和盐酸黄柏碱标准品各 10 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加入适量乙腈溶解并定容,得浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品储备液。使用时采用乙腈为稀释剂。

2.2.2 供试品溶液制备 小檗碱供试品溶液的制备:精密称取黄柏提取物 500 mg,加入盐酸-甲醇(1:100)溶液 25 mL,混匀,超声处理 30 min,并于 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液,使用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,备用。

黄柏碱供试品溶液的制备:精密称取黄柏提取物 100 mg,加入乙腈-体积分数 0.1% 磷酸水溶液 20 mL,摇匀,超声处理 30 min,于 $8\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件离心 10 min,收集上清液,使用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,备用。

2.2.3 色谱条件 小檗碱测定色谱条件^[7]:色谱柱选取 Agilent- C_{18} (4.6 mm × 250 mm, $5 \mu\text{m}$),以乙腈-体积分数 0.1% 磷酸溶液(40:60)作为流动相,柱温 30 ℃,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 $10 \mu\text{L}$,检测波长 265 nm。

黄柏碱测定色谱条件^[7]:色谱柱选取 Agilent- C_{18} (4.6 mm × 250 mm, $5 \mu\text{m}$),以乙腈-0.1% 体积分数磷酸溶液(36:64)作为流动相,柱温 40 ℃,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 $10 \mu\text{L}$,检测波长 284 nm。

2.3 电化学生物传感技术构建及方法学考察

2.3.1 溶液配制 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)配制:分别称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63 g, KH_2PO_4 0.24 g, NaCl 8 g, KCl 2 g,精密称定,共同置于 1 L 量瓶中,加超纯水定容,得 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS, pH 值为 7.4。

XO 溶液配制:取 XO (500 U),缓慢打开管盖,加 0.4 mL PBS,充分混匀,得浓度为 $1\,250 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XO 母液,于 -20 ℃ 条件保存。使用时,待恢复至室温后,用 PBS 稀释至所需浓度。

次黄嘌呤溶液配制^[13]:精密称取 NaOH 6 mg,加入 0.8 mL 超纯水使溶解。精密称取次黄嘌呤 5.7 mg,置于上述 NaOH 溶液中,得 NaOH 次黄嘌呤溶液(A 液);其次精密称取 KH_2PO_4 27 mg,加入 1 mL 超纯水使溶解,得 KH_2PO_4 溶液

(B 液);将 A 液和 B 液混合,加超纯水稀释至 4 mL,再加 PBS 稀释至 10 mL,超声使溶解,得 $3.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 次黄嘌呤溶液。使用时用 PBS 稀释至所需浓度。

别嘌醇溶液配制:精密称取别嘌醇 2 mg,加 PBS 5 mL,超声使溶解,得 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 别嘌醇溶液,使用时用 PBS 稀释至所需浓度。

2.3.2 电化学生物传感检测 传感器制备:①电极预处理:工作电极在人工鹿皮磨抛机上抛光,至表面呈镜面清洁;用无水乙醇和超纯水冲洗,晾干备用;②电沉积普鲁士蓝纳米颗粒(prussian blue, PB):将电极置于含有浓度均为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯化铁和铁氰化钾的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液中,基于循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)扫描以使 PB 电沉积于电极表面。扫描条件:电压范围 -0.2 ~ 0.4 V,扫描速率 $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$,扫描圈数 3。完成后,电极用超纯水冲洗,室温避光干燥;③活化 PB:将电极置于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 除氧溶液中, CV 扫描以使 PB 活化。扫描条件:电压范围 -0.2 ~ 0.4 V,扫描速率 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$,扫描圈数 50。完成后,电极用超纯水冲洗,100 ℃ 避光干燥 1 h;④修饰 PEI@GO:取以上电极,表面滴加 $5 \mu\text{L}$ PEI@GO ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),室温避光干燥 1 h;⑤固定化 XO:量取含有 $3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ XO 的京尼平溶液 $5 \mu\text{L}$,滴加于电极表面,室温避光干燥 1 h,避光保存,备用。

抑制剂抑制活性检测:使用适量 PBS 作为反应溶液,溶液中同时加入次黄嘌呤和不同浓度别嘌醇/黄柏对照药材提取物,使得次黄嘌呤终浓度为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,别嘌醇和黄柏的浓度范围分别为 $0 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将上述电极置于检测溶液中,基于 Amperometric i-t Curve 法,检测电压 0.05 V,考察检测体系的电流响应变化。固定于电极表面的 XO 可以催化次黄嘌呤生成尿酸和 H_2O_2 , H_2O_2 在电压作用下分解发生电荷转移,即产生电化学信号。XO 抑制剂(别嘌醇等)能够特异性抑制 XO 活性,其在体系中的加入可以降低电化学响应信号强度,且信号降低程度与抑制剂浓度在一定范围内呈线性相关。XO 活性抑制率由 Y 表示,并根据文献所记载的公式 1 进行计算^[14]:

$$Y = (I_0 - I_i) / I_0 \quad \text{公式(1)}$$

其中, I_0 代表体系中没有抑制剂时的电流信号; I_i 表示不同浓度抑制剂存在时, XO 活性被抑制时体

系的电流信号。

2.3.3 方法学考察 采用紫外-可见分光光度法 (UV-Vis) 对电化学生物传感检测方法进行方法学考察对比。首先将 100 μL 不同浓度的别嘌醇/黄柏对照药材提取物溶液、50 μL XO 溶液 ($0.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 依次加入 96 孔板内, 混合均匀并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 然后将 50 μL 次黄嘌呤溶液 ($0.56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加入上述反应溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。每组平行制备 3 个复孔。其中别嘌醇终浓度范围为 20 ~ 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄柏终浓度范围为 1.2 ~ 2.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此外分别取各个不同浓度的别嘌醇/黄柏溶液 100 μL 置于 96 孔板中, 并加入 100 μL PBS 补足体积, 以考察不同浓度别嘌醇/黄柏溶液对吸光度值的影响。此外, 以 PBS 缓冲液代替检测体系中的别嘌醇/黄柏溶液作为空白对照, 于 290 nm 处考察各反应体系的吸光度值。

2.4 黄柏样品抗痛风生物效价测定

取各批次黄柏样品, 基于电化学生物传感检测方法, 对黄柏实际样品的 XO 抑制活性进行测定, 同时利用 Graphpad Prism 8 软件计算其半数抑制浓度 (IC_{50})。由于目前尚无用于抗痛风生物效价测定的对照品, 本实验暂以国际公认的 XO 活性抑制药物别嘌醇作为参照物质, 根据《生物检定统计法》指导原则^[15], 对其抗痛风生物效价赋值为 1 000 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。根据黄柏样品的浓度及相应抑制率, 采用生物效价计算软件, 对不同产地、不同批次、不同炮制工艺的黄柏样品的抗痛风生物效价进行计算。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 26 统计软件对不同产地、不同批次、不同炮制工艺的黄柏样品抗痛风生物效价与其小檗碱、黄柏碱含量进行统计学分析, 考察其相关性。

3 结果

3.1 黄柏样品中小檗碱和黄柏碱含量测定

3.1.1 标准曲线建立 取浓度范围为 1 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品溶液, 分别按照盐酸小檗碱和盐酸黄柏碱色谱条件进行检测, 记录其色谱峰面积。以标准品浓度标记横坐标 x , 其对应的峰面积标记纵坐标 y , 进行线性拟合。其中, 盐酸小檗碱的回归方程为 $y = 0.4808x + 0.3794$ ($r^2 = 0.9994$); 盐酸黄柏碱的回归方程为 $y = 0.1799x - 0.1443$ ($r^2 = 0.9998$)。结果表明, 该方法在 1 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内表现出良好的线性关系, 可实现对盐酸小檗碱及盐酸黄柏碱的定量测定。

3.1.2 小檗碱和黄柏碱含量测定 取各批次黄柏样品适量, 分别制备小檗碱和黄柏碱供试品溶液, 并对其含量进行测定。含量测定结果见表 2, 所有黄柏样品中小檗碱与黄柏碱含量均符合《中国药典》2020 年版规定^[7], 但各样品的成分含量表现出显著的差异性, 其中小檗碱的含量范围为 5.09% ~ 34.76%, 而黄柏碱的含量在 2.56% ~ 4.76% 范围内。基于此, 本研究进一步对黄柏的 XO 抑制生物效应进行分析, 考察各黄柏样品的抗痛风药效活性差异。

表 2 高效液相色谱法 (HPLC) 检测的各黄柏样品中小檗碱与黄柏碱的含量。%

Tab. 2 Contents of berberine and phellodendrine in Phellodendri Chinensis Cortex samples detected by HPLC. %

Number of samples	Berberine	Phellodendrine	Number of samples	Berberine	Phellodendrine
1	7.49	3.45	11	11.53	3.87
2	8.40	3.14	12	8.80	3.51
3	13.45	4.53	13	11.77	3.86
4	12.95	3.32	14	12.86	3.96
5	34.76	3.48	15	6.64	3.33
6	8.04	4.52	16	10.38	3.97
7	13.30	3.71	17	18.61	3.05
8	10.64	3.39	18	15.50	2.97
9	5.09	2.56	19	6.80	3.96
10	10.31	3.64	20	6.12	4.76

3.2 电化学生物传感技术构建及方法学考察

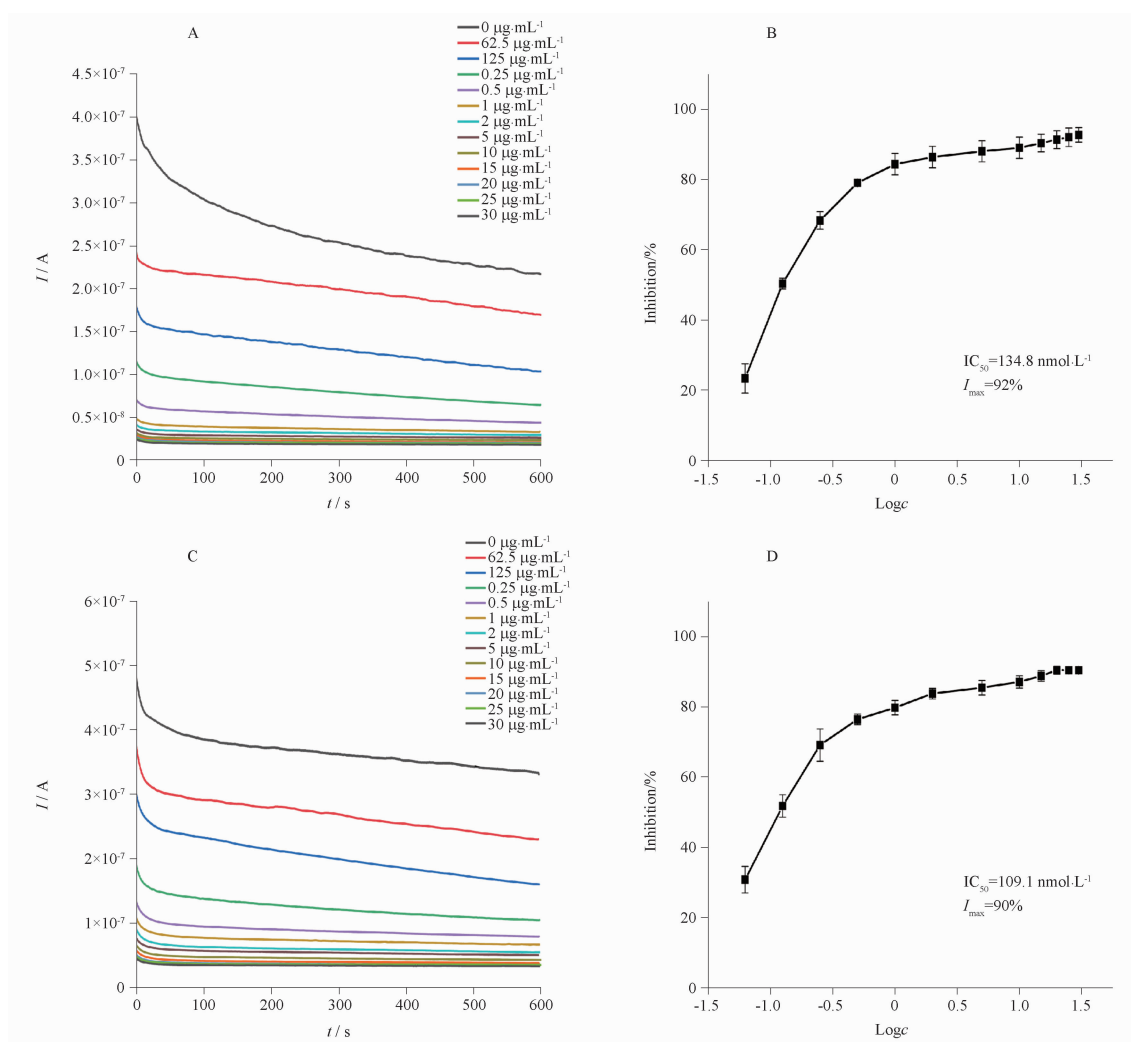
3.2.1 电化学生物传感检测

· 750 ·

学生物传感检测体系对不同浓度别嘌醇 ($0.0625 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及黄柏对照药材提取

物($0.0625 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 XO 抑制活性进行检测。根据图 1A 和图 1C,检测体系的电流信号随抑制剂浓度的增加而逐渐降低,电流信号与别嘌醇及黄柏浓度成反比。图 1B 和图 1D 显示

了该传感器用于别嘌醇及黄柏检测的 XO 活性抑制曲线,其对别嘌醇的检测限为 $62.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, IC_{50} 为 $134.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$;对黄柏的检测限为 $62.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $109.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



A - 别嘌醇抑制电流信号; B - 别嘌醇对黄嘌呤氧化酶(XO)活性抑制曲线; C - 黄柏抑制电流信号; D - 黄柏对 XO 活性抑制曲线。

A - amperometric responses of biosensor with allopurinol; B - XO activity inhibition curve with allopurinol; C - amperometric responses of biosensor with Phellodendri Chinensis Cortex; D - XO activity inhibition curve with Phellodendri Chinensis Cortex.

图 1 电化学生物传感检测方法对于不同浓度别嘌醇及黄柏的检测。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Detection of allopurinol and Phellodendri Chinensis Cortex at different concentrations by electrochemical biosensor. $n = 5, \bar{x} \pm s$

3.2.2 方法学考察 采用 UV-Vis 对别嘌醇及黄柏对照药材的 XO 抑制活性进行检测当别嘌醇浓度范围为 $20 \sim 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,吸光度值随别嘌醇浓度增加而逐渐降低,抑制率随别嘌醇浓度的增加而线性增加,线性方程为 $y = 0.56x - 4.6557, r^2 = 0.9985$ 。同理,随着体系中黄柏浓度的增加,吸光度值降低,抑制率逐渐增大,其线性方程为 $y = 78.62x - 92.1484, r^2 = 0.9972$ 。该检测体系对别嘌醇的检测限为

$20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, IC_{50} 为 $90.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;对黄柏的检测限为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围为 $1.2 \sim 2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $1.814 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

将 UV-Vis 检测法与所构建电化学生物传感检测法进行对比,见表 3。从结果可以明显看出,虽然两种方法均具有对 XO 抑制剂别嘌醇及黄柏的检测能力,但与 UV-Vis 相比,所构建的电化学生物传感检测方法具有更低的检测限及 IC_{50} 值,

表明其检测更加灵敏,这可能是由于固定化酶相较游离态酶具有更高的催化活性,同时纳米复合材料的应用也进一步提高了整体检测性能。此

外,电化学生物传感检测方法基本不受中药材本身所带颜色的干扰影响,更适用于中药实际样品的快速测定。

表3 紫外-可见分光光度法(UV-Vis)与电化学生物传感检测法检测黄柏样品的检测性能对比

Tab. 3 Comparison of detection performance of Phellodendri Chinensis Cortex samples between UV-Vis and electrochemical biosensor

Performance parameter	UV-Vis		Electrochemical biosensor detection	
	Allopurinol	Phellodendri Chinensis Cortex	Allopurinol	Phellodendri Chinensis Cortex
Limit of detection	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	62.5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	62.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
IC ₅₀	90.66 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.814 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	134.8 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	109.1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

重复性:相同条件下制备的生物传感器对于XO催化底物次黄嘌呤反应的检测表现出相似的电化学反应信号,相对标准偏差(RSD)为2%,表明本研究所制备的电化学生物传感器具备良好的重复性。

稳定性:将所制备电化学生物传感器置于4℃避光条件下储存,通过其对相同浓度范围底物的检测灵敏度考察其稳定性。结果表明该生物传感器在3d内保持对底物良好的催化性能,灵敏度仅降低6%;而5d之后,灵敏度显著降低。这表明该传感器在3d内的稳定性相对较好。

3.3 黄柏样品抗痛风生物效价测定

基于本研究所构建的电化学传感检测方法对黄柏样品的XO抑制活性进行检测,IC₅₀值见表4。以别嘌醇为对照,并对其原始生物效价赋值1000 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。采用生物效价计算软件,对各批次黄柏样品XO抑制活性的可信限率(FL)及生物效价(PT)进行计算。各黄柏样品的抗痛风生物效价存在明显的差异,其范围在25.60~337.96 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 之间,平均效价为125.73 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (表4)。表明黄柏样品对于XO活性有一定的抑制作用,但各样品的抗痛风药效作用存在显著的差异性。

表4 电化学生物传感技术检测的各黄柏样品抗痛风生物效价

Tab. 4 Anti-gout biological potency of Phellodendri Chinensis Cortex samples detected by electrochemical biosensor

Number of samples	IC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	r	FL/%	PT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
1	0.520	0.384	1.824	30.78
2	0.210	1.051	2.030	84.08
3	0.134	2.134	2.324	170.79
4	0.721	0.320	1.708	25.60
5	0.197	0.852	2.227	68.21
6	0.083	4.224	2.926	337.96
7	0.149	1.863	2.189	149.10
8	0.331	0.519	1.997	41.53
9	0.132	2.152	2.348	172.17
10	0.122	2.506	2.472	200.48
11	0.198	1.288	1.992	103.07
12	0.090	2.689	2.822	215.13
13	0.123	1.910	2.412	152.86
14	0.151	1.424	2.306	113.93
15	0.240	1.044	1.817	83.54
16	0.234	0.860	1.981	68.80
17	0.127	1.356	2.581	108.54
18	0.149	1.863	2.189	149.11
19	0.136	2.055	2.359	164.40
20	0.251	1.030	1.821	82.42

注:PT-效价;FL-可信限。

Note:PT-potency; FL-confidence limit.

3.4 黄柏抗痛风活性与化学成分之间的相关性分析

采用 SPSS 统计软件,对各批次黄柏样品的抗痛风生物效价与其化学成分含量进行 Pearson 相关性分析。分析结果见表 5,其中 $P > 0.05$,表明黄柏样品抗痛风生物效价与小檗碱及黄柏碱的含量不存在显著性相关。

表 5 黄柏样品小檗碱及黄柏碱含量与抗痛风生物效价相关性分析

Tab. 5 Correlation analysis of berberine and phellodendrine contents with anti-gout biological potency in Phellodendri Chinensis Cortex samples

Pearson	Berberine	Phellodendrine	Anti-gout biological potency
Berberine	1		
Phellodendrine	-0.124 ¹⁾	1	
Anti-gout biological potency	-0.206 ¹⁾	0.278 ¹⁾	1
	0.602	0.235	

注:¹⁾三者均无显著性相关。

Note:¹⁾None of the three were significantly correlated.

4 讨论

作为中医药临床疗效的根本保障,中药质量的评价与控制一直是中药现代化研究中的重中之重。随着现代中医药理论体系的发展与完善,多种分析方法已建立并应用于中药的质量评价,包括性状鉴定、理化鉴定、显微鉴别、浸出物测定、含量测定等^[16-18]。中药中含有众多药效活性成分可以通过不同的作用方式对多种疾病产生疗效。当前以个别指标性化学成分检测为核心的中药质量评价方法常表现出与中药临床疗效关联不紧密的局限,无法合理客观地评判中药的整体品质差异^[19-21]。针对上述问题,在现有中药质量评价模式的基础上,补充构建以临床疗效为导向且符合中药多成分、多靶点、整体性特点的中药质量生物效应检测方法及体系,已成为中药质量标准化重要发展方向之一^[22-24]。

电化学生物传感技术可将酶-底物反应、抗原-抗体相互作用等生化反应转化为可测量的电信号,具有成本低、灵敏度高、选择性好、样品预处理简单等优点,已成为近年来中医药领域广泛应用的分析检测手段^[25-27]。在本研究中,通过将酶固定于纳米材料修饰的工作电极表面,成功构建了一种用于 XO 抑制剂别嘌醇及黄柏检测的电化学生物传感方

法。与 UV-Vis 结果相比,本研究所构建的电化学生物传感技术具有更高的检测灵敏度及更低的检测限,且不受中药材本身所带颜色的干扰影响,更适用于中药样品的实际测定。此外,统计学相关性结果表明,黄柏样品的抗痛风生物效价与其小檗碱及黄柏碱的含量无显著性相关,可能是因为黄柏还通过其他化学活性成分如二氢小檗碱、巴马汀等发挥治疗痛风及高尿酸血症的作用,亦或者为黄柏整体成分的协同功效。

本研究将电化学生物传感技术创新性地应用于中药质量生物效应检测,突出不同领域、不同学科、不同技术之间的交叉融合,后期应进一步优化制备条件,有效提高固定化酶在电极表面的长时间稳定性,同时因实验条件所限,目前尚未能采用一次性丝网印刷电化学试纸条代替常规棒状电极,在一定程度上限制了该方法的推广转化应用。综上,本研究结果为建立更加完备的黄柏品质评控体系提供了一定的科学依据,也为其他中药材的整体质量评价提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] DONG Y, HE X, ZHONG G. Research status and problems discussion of Cortex Phellodendri quality[J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2007, 96(3): 58-60.
- [2] LI R, MA L, WANG D, et al. Study on *in vitro* inhibitory activity of the extracts from 9 kinds of TCM for dredging collaterals and dispelling wind on xanthine oxidase[J]. *J China Pharm* (中国药房), 2020, 31(6): 677-682.
- [3] YANG H, LUO G, XIONG Z, et al. Anti-inflammatory effect of Huangbai Cangzhu Decoction on acute gouty arthritis model[J]. *J Med Res* (医学研究杂志), 2020, 49(1): 104-107.
- [4] LIN B. Comparison of the Nourishing Yin effect and Anti-gout effect of unprocessed and different processed products of Cortex Phellodendri Chinensis[J]. *J Med Theory Pract* (医学理论与实践), 2016, 29(19): 3304-3305, 3308.
- [5] LI S N, LIU C M, GUO L P, et al. Ultrafiltration liquid chromatography combined with high-speed countercurrent chromatography for screening and isolating potential alpha-glucosidase and xanthine oxidase inhibitors from Cortex Phellodendri[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(18): 2504-2512.
- [6] XU L Q, LIN G S, YU Q X, et al. Anti-Hyperuricemic and nephroprotective effects of dihydroberberine in potassium oxonate-and hypoxanthine-induced hyperuricemic mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12, 645879. DOI: 10.3389/fphar.2021.645879.
- [7] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典 2020 年版.一部) [S]. 2020: 318.
- [8] XIAO X, WANG J, LIU C. *Biological Assay for TCM Quality Control* (中药质量生物评价) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018: 41.
- [9] LI H, WU S, TANG J, et al. Research progress on Q-biomarker of Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50(19): 4556-4561.

- [10] LI H, ZHU J, YANG P. Interpretation of guidance on biological assay of traditional Chinese medicine[J]. *China Food Drug Adm Mag* (中国食品药品监管), 2021, 212(9): 88-93.
- [11] ZHANG X, REN X, WANG H, *et al.* Application progress on biological effect evaluation in quality control and evaluation of Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2018, 49(11): 2686-2691.
- [12] NMPA. Notice on issuing the technical guidelines for biological effect detection of traditional Chinese medicine (Trial) by Center for Drug Evaluation, NMPA. [EB/OL]. (2020-12-17). <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/e75dfd0a4cfc10fb44e25f860c41b7d0>.
- [13] ZHONG J, XIE Y, CAI H, *et al.* *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activities of Qindunqutongfeng Capsule[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2021, 30(13): 33-38.
- [14] AMINE A, EL HARRAD L, ARDUINI F, *et al.* Analytical aspects of enzyme reversible inhibition[J]. *Talanta*, 2014, 118: 368-374. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.10.025.
- [15] *Ch. P* (2020) Vol IV (中国药典 2020 年版. 四部) [S]. 2020; 206.
- [16] CHEN L, XIAO F, HUANG S, *et al.* Research ideas and innovation development trends of quality evaluation of Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2021, 52(9): 2541-2547.
- [17] ZHANG B, XIN J, LIU Y, *et al.* Application of bioassay in quality evaluation of Chinese medicine: a review[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2022, 47(23): 6264-6270.
- [18] MA S, WANG Y, WEI F. Progress and exploration of quality control model of traditional Chinese medicine in the past decade [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2023, 58(1): 1-9.
- [19] LIN C, LI B, HAN L. Analysis of projects funded by NSFC in field of Chinese materia medica quality evaluation in recent five years[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51(2): 281-286.
- [20] CHEN E, LI X, WU S, *et al.* Study on quality evaluation of *Angelica sinensis* based on biological titer of activating blood[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2019, 42(4): 818-821.
- [21] CHEN G, WU Q, WANG X, *et al.* Study on quality evaluation of *Sparganii Rhizoma* by biopotency determination method [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37(19): 2913-2916.
- [22] XIAO X. Toward precise quality evaluation and control of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54(12): 2139-2140.
- [23] YAN D. Bio-characteristic profiling related to clinic: thought and practice or quality evaluation of Chinese materia medica [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(3): 409-414.
- [24] ZHANG T. Technology strategy for high-quality development of traditional Chinese medicine industry based on quality markers of traditional Chinese medicine[J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2024, 26(2): 234-239, 233.
- [25] CHO I H, KIM D H, PARK S. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis[J]. *Bio-mater Res*, 2020, 24, 6. DOI: 10.1186/s40824-019-0181-y.
- [26] MONTEIRO T, ALMEIDA M G. Electrochemical enzyme biosensors revisited: old solutions for new problems[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2019, 49(1): 44-66.
- [27] TALAGAIEVA N V, KLEINIKOVA S A, GOR'KOV K V, *et al.* Electrochemical and electrocatalytic stability of Prussian blue/Berlin green redox transformation in Prussian blue-polypyrrole composite films[J]. *J Solid State Electr*, 2020, 24(11/12): 2935-2941.

(收稿日期:2024-12-26)