

梵净山冷杉球果性状、生态位特征及其保育初探^{*}

吴先亮,陈 胜,刘盈盈[▲]

(贵州科学院 贵州省生物研究所,贵州 贵阳 550009)

摘 要: 为保护近年来濒危珍稀植物梵净山冷杉,加强对梵净山冷杉生长环境的认识,采用重要值、生态位宽度以及生物多样性对梵净山冷杉生长环境进行样地研究。同时,本研究还考察了不同时期球果及种子的发育及形态变化,并利用4种不同处理方式初探梵净山冷杉育种效果。结果表明,2021年到2023年间的调查,梵净山冷杉样地的生物多样性和生态位宽度在降低。梵净山冷杉球果的成长周期从8月初至11月初,历时约3个月。不同的土壤基质及遮阳情况均会影响梵净山冷杉种子的出苗数量及其植株高度。建议对梵净山冷杉生长情况进行年限跨度更大的长期调查,同时加大对梵净山冷杉真实环境的模拟,以加强梵净山冷杉育种的成功率。

关键词: 梵净山冷杉,生态位宽度,生物多样性,球果

中图分类号:X63 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0001-05

Preliminary study on cone traits, niche characteristics, and conservation of *Abies fanjingshanensis*^{*}

WU Xianliang, CHEN Sheng, LIU Yingying[▲]

(Guizhou Institute of Biology, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550009, China)

Abstract: In order to protect the endangered *Abies fanjingshanensis* and enhance the understanding of the growth environment of *Abies fanjingshanensis*, a sample plot study on the growth environment of *Abies fanjingshanensis* was conducted based on importance values, niche width, and biodiversity. The development and morphological changes of the cones and seeds at different stages were examined. The breeding effect of *Abies fanjingshanensis* using four different treatment methods was explored. The results showed that from 2021 to 2023, the biodiversity and niche width of the plot of *Abies fanjingshanensis* decreased. The growth cycle of cones of *Abies fanjingshanensis* lasted for about three months from early August to early November. Different soil substrates and shading conditions would affect the emergence rate and plant height of *Abies fanjingshanensis*. It is necessary to conduct a long-term investigation on the growth of *Abies fanjingshanensis*, and simulate the real growth environment of *Abies fanjingshanensis* to improve the success rate of its breeding.

Keywords: *Abies fanjingshanensis*, niche width, biodiversity, cones

0 引言

随着人类活动的加剧以及环境的变化,特别是全球气候变暖,一些本就濒危的植物面临消亡的风险^[1]。许多国家针对本国的实际情况制定了一系

列保护措施,其中林木育种技术受到国内外科研人员的高度重视。国外在育种领域取得了重大进展,Urban 等^[2]对计算种植转基因幼苗将如何影响瑞典森林生长和伐木进行了研究。近年来,梵净山冷杉遭遇大规模死亡,许多学者对其死亡机制与梵净山冷杉保育进行了研究,但收效甚微^[3-4]。王志学

等^[5]评估了 2006 年至 2011 年间梵净山冷杉样地生态位宽度、重要性以及梵净山冷杉样地的多样性,梵净山冷杉在样地中的重要性越来越高,但生态位宽度及生物多样性在降低。谭廷鸿等^[6]调查了不同采种期梵净山冷杉的球果、种鳞和种子。其球果从发育初期至成熟历时约 3 个月,10 月下旬为最适宜采种时间。张玉武等^[7]采集了 2014 年秋季的梵净山冷杉种子进行育苗实验,发现播种时间、基质和遮阳方式对梵净山冷杉的出苗时间、出苗率和苗木保存率均有显著影响。尽管前人对梵净山冷杉做了不少工作,但均为过去的研究,梵净山冷杉经过多年的保护,目前的现状急需探明。因此,本研究在前人的基础上,拟对 2021—2023 年间样地中梵净山冷杉平均胸径、树高、冠幅、重要性、生态位宽度及多样性指数等指标展开调查,描述当下不同时期球果及种子的发育及形态变化,并初探了 4 种不同处理方式的育种效果,以期对梵净山保育工作提供一些建议和参考。

1 材料和方法

1.1 梵净山冷杉样点设置

于梵净山冷杉聚集处设置 20 m×20 m 的梵净山冷杉样方,样地采用红色尼龙绳带围住,四角处放置界碑,利于长期定位。在大样地内,随机选择 3 个 5 m×5 m 的小样方,调查其小生境物种多样性。在每个样方内做好标记,采用红色尼龙绳围住,同时在样点 4 个边角用木棍插入 30 cm 作为标记,便于今后识别。于 2021 年至 2023 年间,每年约在 11 月中旬,在大样方内,采用编号按照顺序标记梵净山冷杉数目,并随机挑选 5 棵梵净山冷杉做好标记,测定其胸径、树高、冠幅。

1.2 球果样品采集

球果的跟踪与采集样点区域设置于 28°1'30"N, 108°48'30"E,样点内选取 5 株相近海拔且树龄相近的梵净山冷杉,将其球果作为追踪及采果对象。梵净山冷杉球果采集集中于 2021 年,共采集 3 次,分别在 8 月 1 日(标记为 A),9 月 27 日(标记为 B)以及 11 月 3 日(标记为 C)。每棵树下采集 3 个果球,每期共 15 个。采集的 15 个果球用于测定其长、宽、干重、鲜重、长宽比、相对含水量。最长和最宽的部

位作为球果的长和宽,经过风干至恒温后,测定球果干重。

1.3 种子处理及梵净山冷杉繁育过程

种子处理采用生根粉(浓度为 400~600 倍有液的盛宁宝-高效生根粉)浸泡 1.5 h;梵净山冷杉繁殖以播种为主,10 月果熟后果下曝晒使果鳞开裂,种子脱出后晒干,除去杂物。苗床整理与播种则采用覆盖 1~2 cm 的黄土(松林下的),然后覆盖 1~2 cm 的松针腐殖土;将处理的种子均匀的撒播在苗床上,并覆盖 1~2 cm 的黄土(松林下的),在苗床上方采用遮阳棚控制透光率为 50%,最后浇透水,标记为 D 处理。D1 处理的土壤基质与 D 处理相同,但无遮光。E 处理土壤基质为普通菜园土,在苗床上方采用遮阳棚控制透光率为 50%。E1 处理土壤基质为普通菜园土,但无光照。

1.4 评价方法

梵净山冷杉平均胸径采用如下公式计算:

$$D = \sqrt{\left(\sum_{k=1}^m d_k^2\right)/m} \quad (1)$$

式中: D 、 d_k 和 m 分别为样木树种平均胸径(cm)、第 k 株的胸径(cm) 及总株数。

梵净山冷杉的重要值采用以下公式计算:

$$IV = (RA + RP + RF)/3 \quad (2)$$

式中: IV 为梵净山冷杉的重要值; RA 、 RP 和 RF 分别为相对密度、相对优势度和相对频度,其值分别为梵净山冷杉在样方中的多度与所有物种多度总和之比、梵净山冷杉在样方中的胸高断面积之和与所有物种胸高断面积总和之比、梵净山冷杉在样方中出现的频度与所有物种频度总和之比,单位均为 %。

1.5 生态位宽度及生物多样性评价方法

采用 Shannon - Wiener 指数公式计算群落物种的生态位宽度:

$$H = -\sum_{i=1}^n p_{ij} \times \ln p_{ij} \quad (3)$$

$$\ln p_{ij} = n_{ij}/N_i \quad (4)$$

$$N_i = \sum_{j=1}^r n_{ij} \quad (5)$$

公式中, H 为梵净山冷杉的生态位宽度; p_{ij} 为单个样方梵净山冷杉对单个样方资源位利用占该梵净山冷杉对所有样方资源位利用的比例; n_{ij} 为梵净山冷杉

对单个样方内资源位 j 的利用, r 为资源总位数即样方总数^[8]。

群落物种多样性参考文献[5]的研究方法,包括 Shannon-Wiener 多样性指数、Pielou 均匀度指数、Simpson 优势度指数、Margalef 丰富度指数、Patrick 丰富度指数。

2 结果与分析

2.1 梵净山冷杉平均胸径、树高、冠幅、重要性及多样性指数

与 2021 年和 2022 年相比,2023 年梵净山冷杉的胸径、树高及冠幅持续增加,但涨幅不大(图 1(a))。图 1(b)中显示了调查的样本中梵净山冷杉中重要性逐年增加,其值由 2021 年的 0.38 ± 0.17 增长至 0.45 ± 0.01 。从增长率来看,梵净山冷杉的重要性在 2021 年至 2022 年增长比 2022 年至 2023 年增长较快。以上的指标可初步认为多年对梵净山冷杉的保护已见成效。

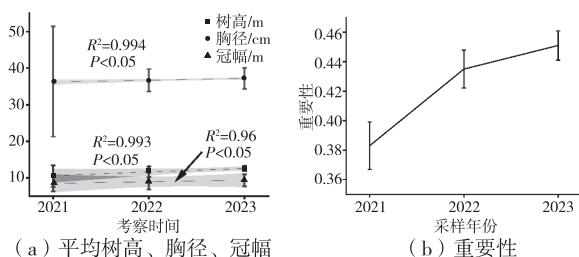


图 1 2021—2023 年间梵净山冷杉平均树高、胸径、冠幅和重要性

图 2 展示了 2021—2023 年梵净山冷杉的生态位宽度,总体而言,3 年的生态位宽度值差异不大,2021 年梵净山冷杉的生态位宽度值要比今后两年较高,其中 2021 年为 1.63,2022 年为 1.51 和 2023 年为 1.48(图 2(a))。梵净山冷杉样地多样性指数在 2021 年至 2023 年之间差异不大,其中 2021 年的 Shannon 多样性指数较高,其值为 1.63,2023 年最低,其值为 1.60(图 2(b))。Shannon 多样性指数综合考虑了物种均匀度和丰富度,这表明梵净山冷杉样地的丰富度在缓慢下降。Pielou 指数可反映出梵净山冷杉样地的分布均匀性,梵净山冷杉样地的物种均匀度差异较小,其值在 2021 年最小(0.83),在 2023 年最大(0.86)(图 2(c))。Simpson 指数反映了群落多样性高低,3 年的调查中 Simpson 指数值差

距不大,但 2021 年的 Simpson 指数值较高(0.20)(图 2(d))。Margale 指数越大,表明生物群落中的物种多样性越高,2022 年的 Margale 指数较高(图 2(e))。Patrick 指数差异较低,2023 年的 Patrick 指数值最大(图 2(f))。总体而言,2021 年到 2023 年间,梵净山冷杉样地的生物多样性在降低,梵净山冷杉的生态位宽度也在降低。

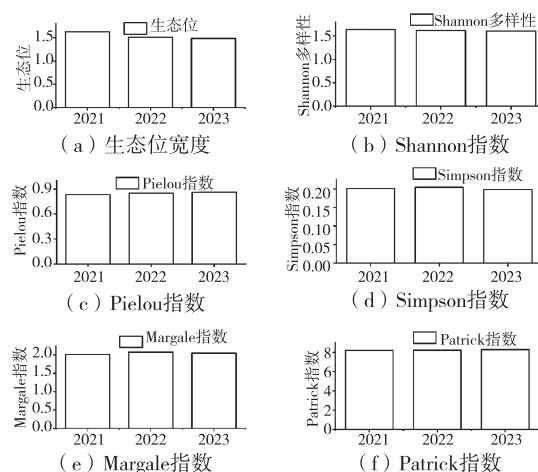


图 2 2021—2023 年间梵净山冷杉生态位宽度

2.2 不同时期球果及种子的发育及形态变化

图 3 展示了发育梵净山冷杉球果发育前期、中期及后期的生长情况。在对梵净山冷杉进行追踪,结合实地考察,发现梵净山球果约于 2021 年 8 月初形成,8 月中旬至 10 月中旬处于关键发育期,约 11 月初开始成熟并陆续掉落,其球果从形成至成熟掉落约历时 3 个半月(表 1)。7 月中旬,球果形成时为青色,呈圆锥状,此时球果长为 $3.64 \text{ cm} \pm 0.12 \text{ cm}$,宽为 $2.25 \text{ cm} \pm 0.11 \text{ cm}$,长宽比较小,为 1.62 ± 0.07 。此时处于发育初期,单颗球鲜重为 $21.8 \text{ g} \pm 1.47 \text{ g}$,球果相对含水率为 $71.56\% \pm 3.76\%$ 。底部发育长大后,约在 9 月中旬,颜色逐渐变为深灰色,底部和顶部的宽度逐渐增加,长宽比也持续增大,达到 1.80 ± 0.07 。此时,球果的长度约为 $5.12 \text{ cm} \pm 0.11 \text{ cm}$,宽度约为 $2.84 \text{ cm} \pm 0.13 \text{ cm}$ 。单颗球的鲜重增加至 $28.13 \text{ g} \pm 1.31 \text{ g}$,其干重增加至 $12 \text{ g} \pm 1.21 \text{ g}$,球果相对含水率为 $57.34\% \pm 6.45\%$ 。在 11 月初成熟后,球果呈圆柱状,颜色为棕褐色,其长宽比达到 1.90 ± 0.01 。球果长度和宽度分别为 $7.51 \text{ cm} \pm 0.39 \text{ cm}$ 和 $3.95 \text{ cm} \pm 0.06 \text{ cm}$,单颗梵净山冷杉球果鲜重为 $32.53 \text{ g} \pm 1.36 \text{ g}$,其干重为 $17.2 \text{ g} \pm 1.33 \text{ g}$ 的球果相对含水率为 $47.04\% \pm 4.52\%$ 。

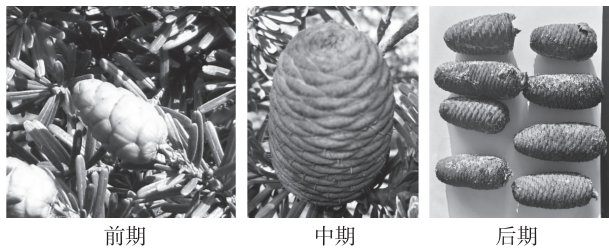


图 3 梵净山冷杉发育情况

从种子饱满率来看,单球果种子总数在发育初期仅为 67 ± 3 个,其中未饱满的种子数为 64 ± 3 个,

饱满种子数为 3 ± 1 ,单球果种子饱和率仅为 $4.47\%\pm 2.04\%$ 。发育中期,单球果种子总数达到 163 ± 4 个,但单球果种子饱和率并未明显增加($4.30\%\pm 0.63\%$)。待到球果成熟后,单球果种子总数、单球果种子饱和率达到最大值,分别为 108 ± 1 个和 $44.63\%\pm 1.32\%$ 。综上,从球果发育初期到成熟后,其形态发生明显变化,体现在外貌颜色、球果质量、球果大小以及种子发育等多方面,但球果成熟后,其变化将会变缓。

表 1 梵净山冷杉不同发育时期种子性状

采样时间 (<i>n</i> =15)	长/cm	宽/cm	长/宽	单球果鲜重 /g	单球果干重 /g	球果相对 含水率/%	未饱满种 子数/个	饱满种 子数/个	单球果种子 总数/个	单球果种子 饱和率/%
A	3.64 ± 0.12	2.25 ± 0.11	1.62 ± 0.07	21.8 ± 1.47	6.2 ± 0.91	71.56 ± 3.76	64 ± 3	3 ± 1	67 ± 3	4.47 ± 2.04
B	5.12 ± 0.11	2.84 ± 0.13	1.80 ± 0.07	28.13 ± 1.31	12 ± 1.21	57.34 ± 6.45	156 ± 4	7 ± 1	163 ± 4	4.30 ± 0.63
C	7.51 ± 0.39	3.95 ± 0.06	1.90 ± 0.01	32.53 ± 1.36	17.2 ± 1.33	47.04 ± 4.52	134 ± 3	108 ± 1	242 ± 8	44.63 ± 1.32

2.3 两种不同处理方式的育种效果

采用不同基质处理梵净山冷杉种子,就出苗的情况而言,50%遮阳处理梵净山冷杉种子下,松林土加腐殖土处理(D组)出苗数量比菜园土(E组)多,前者出苗数量为4株,后者为1株,其植株的高度也明显高于F处理(表2),在无遮光且相同土壤基质下也发现类似现象。在相同基质不同遮阳情况下,50%遮阳且松林土加腐殖土处理下D组(4株)梵净山冷杉出苗数量高于D1组(1株),植株高度前者也远大于后者,类似的现象也在E组和E1组中发现。总之,不同的土壤基质及遮阳情况均会影响梵净山冷杉种子的出苗数量及其植株高度。

表 2 不同处理方式下梵净山冷杉出苗情况

处理方式	出苗数量	发芽率/%	年底均高/cm
D	4	4.00	5.9 ± 1.01
D1	1	1.00	4.3
E	1	1.00	3.7
E1	0	-	-

3 讨论

根据 2021 年到 2023 年间的调查,梵净山冷杉样地的生物多样性在降低,梵净山冷杉的生态位宽度也在降低。生态位宽度反映了一个生物种群在其

所处的生态系统中,能够利用和占据的资源范围和空间大小,其大小直接影响到一个种群在生态系统中的地位和生存状况。较宽的生态位宽度,意味着这个物种可以利用和占据更多的资源,其种群在生态系统中的地位也相对较高^[9]。尽管政府多年的保护提升了梵净山冷杉在研究区内的重要性,但多方面的因素及梵净山冷杉的生态位宽度的降低也表明梵净山冷杉的生存情况面临比较堪忧的局面。王志学等^[5]的研究同样发现了类似现象,2006 年至 2011 年间梵净山冷杉样地的生态位宽度在不断降低。一般而言,生物多样性越丰富,生态系统的营养结构越复杂,自我调节能力越强,生态系统越稳定^[10]。政府部门对梵净山冷杉的保护虽然提升了梵净山冷杉在研究区内的重要性,但同样也降低了梵净山冷杉样地的生物多样性,从某种程度来说降低了梵净山冷杉抵御外界环境压力的能力。

球果发育初期到成熟后,其形态发生明显变化,体现在外貌颜色、球果质量、球果大小以及种子发育等多方面,但球果成熟后,其变化将会变缓。梵净山冷杉球果的成长周期从 8 月初至 11 月初,历时 3 个月。遗传主导了梵净山冷杉属球果的形态发育和成熟过程,独特的地理及气候环境对梵净山球果生长发育有极大的影响^[6]。谭廷鸿等^[6]认为海拔、温度、生长期和光周期主要影响了梵净山冷杉属球果的遗传分化,本研究也认可这一观点。梵净山冷杉球果成熟后,其长宽比达到 1.90 ± 0.01 ,长度和宽度

分别为 $7.51\text{ cm}\pm 0.39\text{ cm}$ 和 $3.95\text{ cm}\pm 0.06\text{ cm}$, 单颗梵净山冷杉球果鲜重为 $2.53\text{ g}\pm 1.36\text{ g}$, 其干重为 $17.2\text{ g}\pm 1.33\text{ g}$ 球果的相对含水率为 $47.04\%\pm 4.52\%$, 和其他冷杉属树种比较, 本研究的球果大小居中。有研究表明, 冷杉属植物的球果在生长过程会出现种子败育或发育异常等现象^[6], 尤其是空粒、涩粒和虫粒, 本研究也发现这一情况, 导致了后面的组培实验的失败。

不同的土壤基质及遮阳情况均会影响梵净山冷杉种子的出苗数量及其植株高度。本研究结果显示, 太过充足的阳光并不能对梵净山冷杉种子发育起到正反馈作用, 反而适当的遮阳能够促进梵净山冷杉种子的出苗数量及其植株高度。梵净山冷杉生长常年处于阴天, 高海拔且低温环境, 梵净山冷杉已经适应了当地气候, 当在低海拔、温度略高及阳光充足的实验基地时反而不适应。此外, 基质土的不同也造成了梵净山冷杉出苗数量少, 这可能与菜园土的土壤理化指标含量低于松林土和腐殖土有关。尽管梵净山冷杉真实的生长环境是表面腐殖土和松林土混合的, 但其根际大多是岩石, 梵净山冷杉实质上是生长于岩石缝隙中, 其土壤营养很可能较低, 但这需要进一步研究。吴先亮等^[11]研究了梵净山冷杉根际表层和底土在高海拔、中海拔和低海拔的微生物碳利用效率, 并调查了它们的理化指标、土壤酶活性、细菌、真菌和微生物生物量, 发现土壤 pH 值是影响微生物碳利用率的主要因素, 较低的微生物碳利用率可能是导致大量梵净山冷杉死亡的另一个重要因素。本研究也认可这一结果, 但更深入的机制应该得到研究以验证这一猜想。

4 结论

本研究重点调查了 2021—2023 年间梵净山冷杉平均胸径、树高、冠幅、重要性、生态位宽度及多样性指数等指标, 也描述了不同时期球果及种子的发育及形态变化, 并初探了 4 种不同处理方式的育种效果。结果表明, 2021 年到 2023 年间的调查, 梵净山冷杉样地的生物多样性和生态位宽度在降低。梵净山冷杉球果的成长周期从 8 月初至 11 月初, 历时约 3 个月。不同的土壤基质及遮阳情况均会影响梵净山冷杉种子的出苗数量及其植株高度。根据结果, 尽管调查期间, 梵净山冷杉样地的生物多样性和生态位宽度也在降低, 但仅仅 3 年的观察实验数据

可能说服力不够, 建议对梵净山冷杉的生长情况进行年限跨度更大的长期调查, 同时加大对梵净山冷杉真实环境的模拟, 以加强梵净山冷杉育种的成功率。

参考文献【REFERENCES】

- [1] ROBBINS Z J, XU C, AUKEMA B H, et al. Warming increased bark beetle-induced tree mortality by 30% during an extreme drought in California[J]. *Global change biology*, 2022, 28(2):509–523.
- [2] URBAN N, NILS F, ULF J. Simulation of the effect of intensive forest management on forest production in Sweden[J]. *Forests*, 2011, 2(1):373–373.
- [3] 张珍明, 黄冬福, 张家春. 梵净山冷杉与珙桐产地土壤碳、氮、磷分布特征[J]. *北方园艺*, 16, 40(6):163–168.
- [4] 颜秋晓, 李相楹, 王科. 珍稀濒危植物梵净山冷杉林土壤养分及酶活性分析[J]. *北方园艺*, 2016, 40(17):167–171.
- [5] 王志学, 刘方正, 李海波. 基于目标对照样本的自然保护地保护成效评估: 以梵净山冷杉群落为例[J]. *环境科学研究*, 2022, 35(2):519–529.
- [6] 谭廷鸿, 王卓, 吴礼佳, 等. 濒危植物梵净山冷杉的球果与种子性状研究[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(10):1671–1681.
- [7] 张玉武, 刘盈盈, 张珍明, 等. 濒危植物梵净山冷杉的种子育苗试验研究[J]. *种子*, 2017, 36(1):125–127.
- [8] BHUSAL P, GHIMIRE B, KHANAL S. Assessing link between on farm agro-biodiversity and food self-sufficiency in two agro-ecological regions of Nepal[J]. *Environment and ecosystem science*, 2021, 5(2):78–84.
- [9] 宋维敏, 郭良芝, 翁华, 等. 青海省祁连县不同作物生境杂草群落组成生态位特征[J]. *草业科学*, 2023, 40(6):1541–1550.
- [10] 俞昀, 白小军, 王志一. 大兴安岭次生林区不同龄级落叶松 (*Larix gmelinii*) 生态位特征和竞争关系[J]. *生态学报*, 2022, 42(12):4912–4921.
- [11] WU X, ZHANG Z, ZHANG J, et al. Multiple factors jointly lead to the lower soil microbial carbon use efficiency of *Abies fanjingshanensis* in a typical subtropical forest in southwest China[J]. *Forests*, 2023, 14:1716–1722.

收稿日期: 2023-11-06; 修回日期: 2023-11-06

基金项目: 贵州科学院青年基金(黔科院 J 字[2024]15 号); 贵州科学院青年基金(黔科院 J 字[2021]13 号)。

作者简介: 吴先亮(1995-), 男, 硕士研究生, 主要从事森林培育、环境新型污染物研究。

▲通讯作者: 刘盈盈, 女, 山东潍坊人, 博士, 副教授, 主要从事森林培育方向研究。

青钱柳速溶茶制备工艺优化及其抗氧化研究*

吴超群, 张国辉, 张文华, 罗艳梅

(凯里学院, 贵州 凯里 556000)

摘要: **目的:**研究青钱柳速溶茶的制备工艺及其抗氧化性。**方法:**以青钱柳为原料,采用超声辅助酶法制备茶汤,进一步冷冻干燥制得速溶茶,以得率为指标,通过单因素试验和 Box-Behnken 设计-效应面法优化青钱柳速溶茶的制备工艺,同时考察了青钱柳速溶茶的抗氧化性。**结果:**青钱柳速溶茶的最佳工艺条件为:料液比 1:31,酶浓度 0.8%,酶解温度 46℃,酶解时间 29 min,青钱柳速溶茶得率为 18.21%;其对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率 IC_{50} 分别为 14.23 mg/mL 和 13.07 mg/mL。**结论:**该工艺制备的青钱柳速溶茶得率好,冲泡后为浅黄色,澄清度高,清爽香醇,饮后甘甜,且对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基具有一定的清除作用。

关键词: 青钱柳,速溶茶,抗氧化

中图分类号:TS272.5 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0006-06

Preparation process optimization and antioxidant activity analysis of *Cyclocarya paliurus* instant tea*

WU Chaoqun, ZHANG Guohui, ZHANG Wenhua, LUO Yanmei

(Kaili University, Kaili 556000, China)

Abstract: In this study, the preparation process of *Cyclocarya paliurus* instant tea was optimized, and its antioxidant activity was analyzed. Using *Cyclocarya paliurus* as the raw material, tea soup was prepared by using ultrasound assisted enzyme method, and then freeze-dried to obtain *Cyclocarya paliurus* instant tea. The yield was used as the indicator, and the preparation process of *Cyclocarya paliurus* instant tea was optimized through single factor experiments and Box Behnken design-response surface methodology. At the same time, the antioxidant activity of *Cyclocarya paliurus* instant tea was investigated. The optimal process conditions were determined as follows: solid-liquid ratio 1:31, enzyme concentration 0.8%, enzymatic hydrolysis temperature 46℃, enzymatic hydrolysis time 29 min. Under the above conditions, the yield of *Cyclocarya paliurus* instant tea was 18.21%, and the IC_{50} of its DPPH and ABTS radical scavenging rate was 14.23 mg/mL and 13.07 mg/mL, respectively. The *Cyclocarya paliurus* instant tea prepared by this process was light yellow after brewing, with high clarity, refreshing and mellow taste, and sweet after-taste. The instant tea had a certain scavenging effect on DPPH and ABTS free radicals.

Keywords: *Cyclocarya paliurus*, instant tea, antioxidant

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)又名青钱李、摇钱树等,广泛分布于我国各地,且在贵州省黔东南地区有大量野生资源^[1-3]。青钱柳叶中含有黄酮、多糖等生物活性成分,且具有降血糖、降血脂、降血压、抗氧化和抗菌等药理作用 and 低毒性的特点,成为国内

外天然药物研究的热点^[4-6]。目前青钱柳上市产品主要是袋泡茶,其技术含量低,使用不方便,严重阻碍其产业化发展。速溶茶是一种能够迅速溶解于水的固体饮料茶,与传统茶相比,具备方便、卫生、快捷的优点,并且能够适应和满足现代人们快节奏、高效

率的生活需要^[7-8]。超声能利用粉碎、空化特性破坏植物细胞,纤维素酶能分解细胞壁,加速有效成分的溶出^[9-10]。为了饮用方便和保证有效成分的溶出,本研究以青钱柳为原料,采用超声辅助酶法制备茶汤,进一步冷冻干燥成速溶茶,以得率为指标,采用 Box-Behnken 法优化制备工艺,并考察其抗氧化活性,以期提高其市场竞争力,为青钱柳产业化研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黔东南州地区青钱柳叶(采集于黔东南剑河县,经凯里学院龙杰凤副教授鉴定为胡桃科青钱柳属植物青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)的叶子,实验样品现保存于凯里学院黔东南民族特色食品发展研究中心),纤维素酶(5 万 U/mg,和氏璧生物科技有限公司),乙醇(95%,重庆万盛川东化工有限公司),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH 试剂,合肥博美生物科技有限公司),ABTS 试剂盒(苏州科明生物科技有限公司),过硫酸钾、甲醇、无水乙醇(天津市博迪化工有限公司),均为分析纯,实验用水(纯净水)。

1.2 仪器与设备

冷冻干燥机(SJIA-10N-50A,宁波双嘉仪器有限公司),RE52CS-1 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器有限公司),恒温水浴锅 B-260(上海亚荣生化仪器厂),数显恒温超声仪器(北京普析通用仪器有限公司),电子天平(AR224CN,奥豪斯仪器有限公司),粉碎机(姜堰区康达实验器材厂)。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程(图 1)

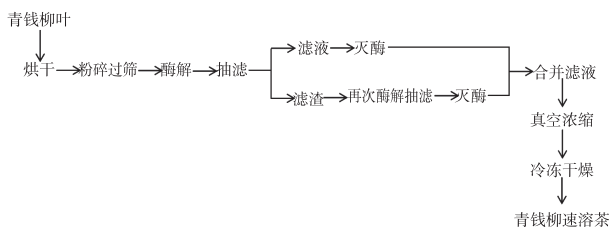


图 1 工艺流程

1.3.2 操作要点

青钱柳叶经干燥、粉碎过筛,称取 2.0 g 青钱柳叶粉末,按料液比加入酶溶液,固定温度下超声酶解,进行真空抽滤,滤液在 85 ℃ 水浴锅中灭酶 1 h,重复两次,合并滤液,于旋转蒸发仪浓缩(0.09 MPa、70 ℃),经真空冷冻干燥,即得青钱柳速溶茶粉。

1.3.3 青钱柳速溶茶得率计算

根据固体饮料得率的计算方法,计算青钱柳速溶茶的得率^[11],计算公式如下:

$$\text{速溶茶得率}(\%) = m/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m —所制茶粉的质量; m_0 —投入的原材料质量。

1.3.4 单因素实验

以得率为指标,考察料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35)、酶解温度(20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃)、酶浓度(0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%)、酶解时间(20 min、30 min、40 min、50 min、60 min)对青钱柳速溶茶得率的影响。

1.3.5 Box-Behnken 法优化试验

根据前期预实验结果,选取料液比(A)、酶浓度(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)为因素,以青钱柳速溶茶的得率(Y)为响应值,响应值越大越好。采用 Box-Behnken 设计-效应面法设计优化青钱柳速溶茶制备工艺,实验因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

水平	A/(g · mL ⁻¹)	B/%	C/℃	D/min
-1	1:25	0.7	40	20
0	1:30	0.8	45	30
1	1:35	0.9	50	40

1.3.6 青钱柳速溶茶抗氧化活性研究

1.3.6.1 DPPH 自由基清除率

参考文献[12]的方法,配置不同浓度的速溶茶溶液,取适量溶液分别置于不同试管中,每支试管加 0.2 mmol/L DPPH 溶液混匀,避光静置 30 min,以样品溶剂为空白于 517 nm 处测定吸光度值 A_1 ,样品溶液吸光度 A_2 与 DPPH 甲醇溶液吸光度 A_0 。平行测定 3 次,取平均值。按公式(2)进行计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0]$$

$\times 100\%$ (2)

1.3.6.2 ABTS 自由基清除率

参考文献[13]的方法,将 ABTS 和过硫酸钾混合,静置 12 h,稀释后在 734 nm 处测吸光度,为 0.7 ± 0.02 ;取一支试管,加 2 mL 溶液、2 mL ABTS 工作液,静置 6 min,测吸光度 A_1 ;另取一支试管,加 2 mL 无水乙醇,按同样方式处理测定吸光度 A_0 ,按公式(3)计算。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100\% \quad (3)$$

1.4 数据分析

采用 Design-Expert 10.0.3 软件进行响应面分析及数据方差分析,采用 Excel 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 料液比对青钱柳速溶茶得率的影响

由图 1 可知,随着料液比的不断增大,青钱柳速溶茶得率呈现先增加后减少的变化趋势,当料液比为 1:30 时,得率最高,而后随着料液比的增加,得率降低。可能是由于料液比的增加对溶质有稀释作用,使得溶质的含量下降,青钱柳速溶茶得率也随之降低。

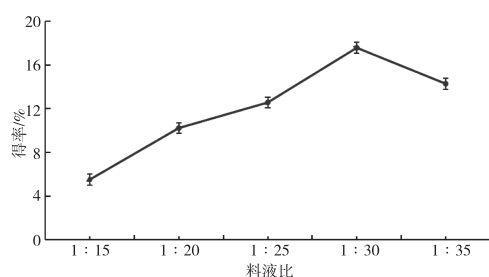


图 1 料液比对青钱柳速溶茶得率的影响

2.1.2 酶浓度对青钱柳速溶茶得率的影响

由图 2 可知,在一定范围内,青钱柳速溶茶得率随酶浓度的增加而增加,在 0.8% 条件下得率最高,而超过 0.8% 时,随着酶浓度的增加,得率逐渐降低。其原因可能是:由于酶浓度过高,对青钱柳速溶茶溶质的溶出造成了影响。

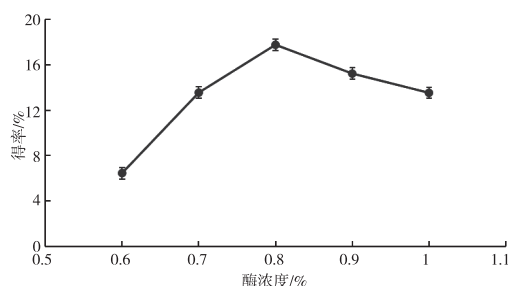


图 2 酶浓度对青钱柳速溶茶得率的影响

2.1.3 酶解温度对青钱柳速溶茶得率的影响

由图 3 可知,随着酶解温度的升高,青钱柳速溶茶得率呈现先增加后减少的变化趋势,当酶解温度为 45 °C 时,得率最高。主要是由于温度影响了酶的活性,过低过高的温度都会使酶的活性降低,从而影响到青钱柳速溶茶的得率。

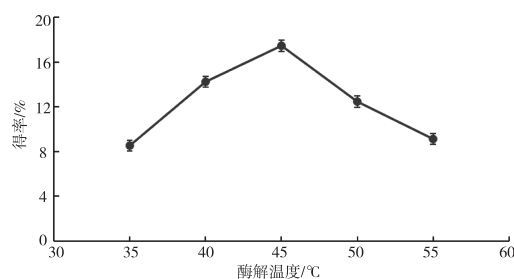


图 3 酶解温度对青钱柳速溶茶得率的影响

2.1.4 酶解时间对青钱柳速溶茶得率的影响

由图 4 可知,随着酶解时间的增加,青钱柳速溶茶得率呈现升高趋势,当酶解时间为 30 min 时,得率最高,之后随着酶解时间的增加,得率变化不大。可能是在酶解过程中溶质的析出需要时间,当到达一定时间后,青钱柳速溶茶的得率趋于平稳。食品工业中时间是考虑生产成本的重要因素,因此为了提高效率需尽可能缩短时间。

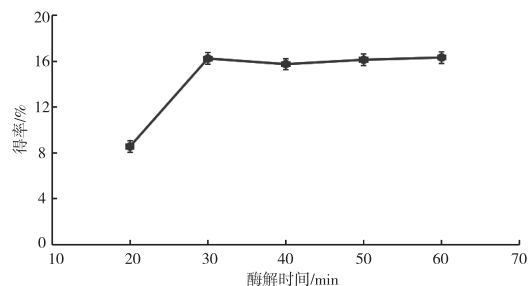


图 4 酶解时间对青钱柳速溶茶得率的影响

2.1.5 Box-Behnken 法优化结果

2.1.5.1 Box-Behnken 设计-响应面的设计与结果

根据前期预实验结果,选取料液比(A)、酶浓度(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)为因素,以青钱柳速溶茶的得率(Y)为响应值,采用 Box-Behnken 设计-响应面法设计了四因素三水平实验,结果见表 2。利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行二次多元回归拟合,得到模型的二次多项回归方程:

$$Y = 18.07 + 0.72A + 1.17B + 0.85C + 0.049D + 1.09AB - 0.25AC - 0.40AD + 0.57BC - 0.29BD - 0.85CD - 2.96A^2 - 3.56B^2 - 2.15C^2 - 2.22D^2。$$

表 2 Box-Behnken 试验设计方案与结果

序号	A	B	C	D	Y
1	1	-1	0	0	10.25
2	0	0	1	-1	16.12
3	0	0	-1	-1	12.71
4	1	1	0	0	14.28
5	-1	0	0	1	13.24
6	0	1	-1	0	12.48
7	0	-1	0	-1	10.48
8	0	0	-1	1	13.21
9	-1	0	-1	0	10.65
10	0	0	0	0	17.58
11	0	-1	-1	0	11.45
12	1	0	-1	0	12.46
13	1	0	0	1	14.25
14	0	0	0	0	17.46
15	0	0	1	1	13.24
16	0	1	1	0	14.45
17	-1	0	1	0	13.73
18	0	0	0	0	18.25
19	0	0	0	0	18.94
20	1	0	0	-1	13.35
21	0	1	0	-1	14.08
22	0	-1	0	1	10.86
23	0	-1	1	0	11.12
24	0	1	0	1	13.28
25	0	0	0	0	18.14
26	-1	0	0	-1	10.75
27	-1	1	0	0	10.91
28	1	0	1	0	14.56
29	-1	-1	0	0	11.25

方差分析见表 3。由表 3 可知,该模型 $P < 0.0001$,表明回归方程模型达到高度显著水平,失拟

项 $P = 0.2637 > 0.05$, R^2 为 0.95406, R_{Adj} 为 0.9081,表明失拟项不显著,方程拟合度好,实验误差小,可以用回归方程对青钱柳速溶茶制备工艺参数进行分析和预测。在所选取因素水平内,对青钱柳速溶茶得率的影响程度为:酶浓度(B) > 酶解温度(C) > 料液比(A) > 酶解时间(D)。

表 3 方差分析

异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	174.91	14	12.49	20.75	< 0.0001	* *
A	6.19	1	6.19	10.29	0.0063	* *
B	16.5	1	16.5	27.4	0.0001	* *
C	8.77	1	8.77	14.57	0.0019	* *
D	0.029	1	0.029	0.048	0.8294	
AB	4.77	1	4.77	7.93	0.0137	*
AC	0.24	1	0.24	0.4	0.5379	
AD	0.63	1	0.63	1.05	0.3229	
BC	1.32	1	1.32	2.2	0.1605	
BD	0.35	1	0.35	0.58	0.4596	
CD	2.86	1	2.86	4.74	0.047	*
A ²	56.78	1	56.78	94.32	< 0.0001	* *
B ²	82.09	1	82.09	136.36	< 0.0001	* *
C ²	29.88	1	29.88	49.63	< 0.0001	* *
D ²	32.04	1	32.04	53.22	< 0.0001	* *
残差	8.43	14	0.6			
失拟项	7.02	10	0.7	2	0.2637	
纯误差	1.41	4	0.35			
总差	183.33	28				

注: P 值小于 0.01 代表极显著,以“* *”表示; P 小于 0.05 代表显著,以“*”表示。

2.1.5.2 响应面图形分析

根据回归方程建立响应面图,分析料液比、酶浓度、酶解温度、酶解时间对响应值青钱柳速溶茶得率的影响,结果见图 2,响应面图形状体现了两个因素交互效应强度,响应曲面陡峭,表明交互作用越显著。因此料液比与酶浓度存在显著交互作用($P < 0.05$),料液比与酶解温度、酶解时间的交互作用不显著($P > 0.05$),酶浓度与酶解温度、酶解时间的交互作用不显著($P > 0.05$),酶解温度与酶解时间存在显著交互作用($P < 0.05$),该结论与表 3 中的结果一致。

2.1.5.3 最佳优化结果及验证实验

经过响应面优化,最优参数为:料液比 1 : 30.77,酶浓度 0.82%,酶解温度 46.15℃,酶解时

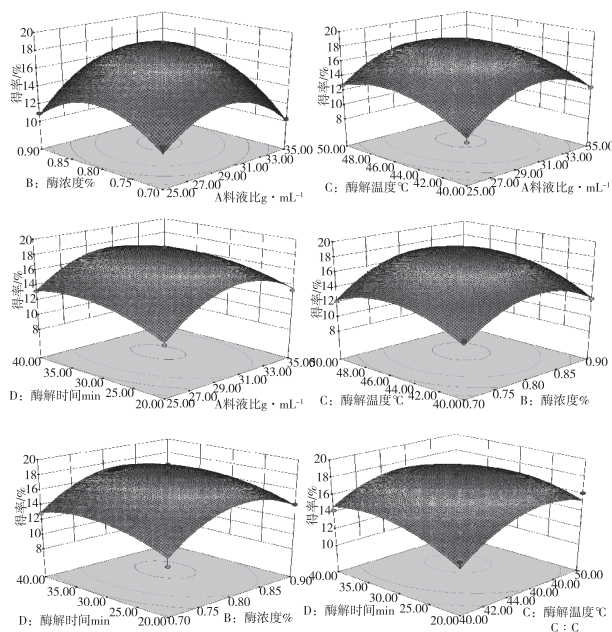


图2 两两因素交互作用对青钱柳速溶茶得率影响的响应曲面图

间 29.40 min, 得率理论值为 18.35%。考虑实际操作, 修正为: 料液比 1 : 31, 酶浓度 0.8%, 酶解温度 46 ℃, 酶解时间 29 min, 在此条件下, 进行了 3 组平行的验证试验, 青钱柳速溶茶得率为 18.21%, 冲泡后为浅黄色, 澄清度高, 清爽香醇, 饮后甘甜, 与理论值相比, 其相对误差约为 0.769%, 说明该模型与实际情况拟合度高, 模型预测效果好, 可运用 Box-Behnken 响应面法优化青钱柳速溶茶制备工艺。

2.2 青钱柳速溶茶抗氧化功能研究

由图 3 可知, 青钱柳速溶茶对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基具有一定的清除作用, 自由基清除率与青钱柳速溶茶浓度呈现正相关。随着青钱柳速溶茶质量浓度的增加, 其自由基清除率也随之增加, 当青钱柳速溶茶质量浓度达到 20 mg/mL 时, 青钱柳速溶茶对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率分别达到了 65.82% 和 70.35%, 其清除率 IC_{50} 分别为 14.23 mg/mL 和 13.07 mg/mL。

3 结论

青钱柳于冰川世纪保存至今, 是国家重点保护的濒危植物之一。青钱柳在黔东南苗族自治州有大量的野生资源, 这为当地的青钱柳种质的研究和种植提供了丰富的资源。但随着青钱柳种植面积的扩

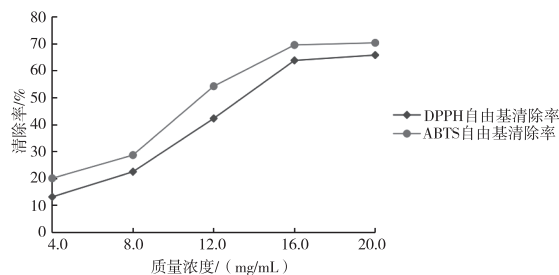


图3 青钱柳速溶茶对自由基的清除率

大, 青钱柳的规范化种植、产地加工及其产业化研究等技术亟待解决。通过浸提、过滤、浓缩、干燥制备的速溶茶不仅具备传统茶中的营养成分与风味, 并且具有方便、高效等优点, 能够满足现代年轻人快速冲饮的需求, 具有一定的市场前景。

本研究以青钱柳为原料, 采用超声辅助酶法制备青钱柳茶汤, 通过冷冻干燥工艺制备青钱柳速溶茶, 以得率为指标优化了制备工艺, 最优工艺参数为: 料液比 1 : 31, 酶浓度 0.8%, 酶解温度 46 ℃, 酶解时间 29 min, 在此条件下制备的青钱柳速溶茶得率为 18.21%, 冲泡后为浅黄色, 澄清度高, 清爽香醇, 饮后甘甜, 经抗氧化研究发现, 青钱柳速溶茶对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基具有一定的清除作用。今后将对青钱柳系列产品的开发进行研究, 以期青钱柳产业化加工提供技术支撑, 促进资源的开发利用。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 21 卷[M]. 北京: 科学技术出版社, 1979.
- [2] SHIN S O, SEO H J, PARK H, et al. Effects of mulberry leaf extract on blood glucose and serum lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review[J]. Eur j integr med, 2016, 8(5): 602-608.
- [3] 谢洪. 青钱柳成分研究概况[J]. 中国食品工业, 2021(17): 104-107.
- [4] 华春秀. 青钱柳多糖对糖尿病大鼠肾脏损伤保护作用的研究[J]. 中医临床研究, 2020, 12(28): 6-10.
- [5] 江新涓, 林秋雄, 何国东, 等. 青钱柳降糖组方对 2 型糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(10): 1794-1800.
- [6] 李燕, 蔡儒安, 潘如梨, 等. 青钱柳水提物降血糖及抗炎功效研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 102-109.
- [7] 宋如, 李晓娅, 尹成男. 中国速溶茶市场发展现状及趋势[J]. 茶业通报, 2019, 41(4): 153-157.

基于网络药理学探讨三子养亲汤治疗非小细胞肺癌的作用机制*

戴伟民^{1,2,3}, 孙燕旭^{1,2,3}, 汪鸣霄^{1,2,3}, 李若尘^{1,3}, 周 洵^{1,2,3}▲

(¹ 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550005; ² 朱祝生全国名老中医药专家传承工作室, 贵州 贵阳 550003; ³ 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 目的: 基于网络药理学探讨三子养亲汤治疗非小细胞肺癌的作用机制。方法: 运用中药系统药理数据库与分析平台(TCMSP)收集三子养亲汤的主要化学成分, 根据药物口服利用度和类药性筛选药物活性成分, 并获取对应靶点; 从 Drug-bank、GeneCards 和 OMIM 数据库获取非小细胞肺癌(NSCLC)的相关靶点, 并去除重复值, 使用 STRING 数据库进行蛋白质相互作用分析, 构建 PPI 网络; 利用 Cytoscape3.7.1 构建“三子养亲汤-非小细胞肺癌靶点-通路”网络。并利用 Cytoscape3.7.1 软件筛选出排名靠前的核心靶点; 使用微生信平台对三子养亲汤与 NSCLC 共同靶点进行基因本体(GO)功能及京都基因和基因组(KEGG)信号通路富集分析。结果: 获得 106 个三子养亲汤药物靶点, 4083 个非重复的非小细胞肺癌疾病靶点, 两者取交集, 共获得 84 个交集靶点。通过 Cytoscape3.7.1 获取排名前 5 的核心药物靶点, 分别为木犀草素、 β -谷甾醇、 β -胡萝卜素、(+)-儿茶素、青风藤碱, 通过 STRING 数据库分析确立 TP53、ESR1、CASP3、AKT1、TNF 为关键的靶点。结论: 三子养亲汤通过多靶点、多途径发挥治疗非小细胞肺癌的作用。

关键词: 三子养亲汤, 网络药理学, 非小细胞肺癌, 全国名老中医

中图分类号: 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563(2025)01-0011-06

Action mechanism of Sanziyangqin Decoction in the treatment of non-small cell lung cancer based on network pharmacology*

DAI Weimin^{1,2,3}, SUN Yanxu^{1,2,3}, WANG Mingxiao^{1,2,3}, LI Ruochen^{1,3}, ZHOU Xun^{1,2,3}▲

(¹ Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550005, China; ² ZHU Zhusheng National Famous Old Chinese Medicine Expert Inheritance Studio, Guiyang 550003, China; ³ The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

[8] 徐悦, 张阳光, 董若霞, 等. 速溶茶加工中酶技术应用研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2019(4): 50-53.

[9] 赫金凤, 吴翠平. 高良姜茎叶总黄酮超声提取工艺优化及生物活性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(12): 79-82.

[10] 邓永蓉, 马贺, 韩丽娟, 等. 超声辅助酶法提取黄刺浆果总黄酮的工艺优化及其生物活性研究[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(9): 105-110.

[11] 吴杰. 青钱柳复合速溶茶的制备及生产车间设计[D]. 南昌: 江西农业大学, 2012.

[12] 万超超, 王东东, 郭敬宇, 等. 新疆沙枣花抗氧化活性研究及总黄酮测定[J]. 化学工程师, 2022, 36(4): 15-19.

[13] 杨艳俊, 杨秀东, 张艳. 山里红总黄酮超声提取及抗氧化活性研究[J]. 吉林化工学院学报, 2022, 39(1): 1-9.

收稿日期: 2024-04-29; 修回日期: 2024-07-20

基金项目: 黔东南州科技计划项目(黔东南科合 J 字[2022]48 号); 校级一般课题(2025 YB017); 凯里学院“十四五”学科专业平台团队一体化建设规划项目(YTH-XM2024027); 凯里学院 2022 年教学内容和课程体系改革项目(JG202223); 贵州省教育厅青年人才成长项目(黔教合 KY 字[2019]195)。

作者简介: 吴超群(1992-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 食物营养与健康, 中药新剂型、新技术。

Abstract: In this study the action mechanism of Sanziyangqin Decoction in the treatment of non-small cell lung cancer was explored based on network pharmacology. The main components of Sanziyangqin Decoction were collected by using the TC MSP database, the active ingredients were screened out by oral bioavailability and drug-likeness, and the related targets were obtained. NSCLC targets were obtained from the Drugbank, GeneCards and OMIM database, and the duplicate values were removed. PPI network was constructed by using the STRING database. The decoction-NSCLC targets-pathways network was constructed in Cytoscape 3.7.1 software, and the core targets were screened out. Gene ontology (GO) function and Kyoto genes and genomes (KEGG) signaling pathway enrichment were performed by online bioinformatics analysis platform. A total of 106 targets of Sanziyangqin Decoction and 4083 non-duplicated NSCLC targets were obtained, and 84 intersection targets were acquired. The top 5 core ingredients were luteolin, beta-sitosterol, beta-carotene, (+)-catechin, and sinoacutine. The core gene targets were TP53, ESR1, CASP3, AKT1, and TNF. In conclusion, Sanziyangqin Decoction exerts its therapeutic effect on NSCLC through multiple targets and pathways.

Keywords: Sanziyangqin Decoction, network pharmacology, non-small cell lung cancer, national famous old Chinese medicine expert

肺癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤,近年来发病率呈上升趋势^[1-2]。根据组织病理学依据,肺癌分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。在临床中非小细胞肺癌更为常见,占肺癌患者的比例达85%~90%^[3]。目前常用的治疗方法包括放疗、化疗和手术疗法;大多数患者确诊肺癌时已经处于晚期,通常失去手术治疗机会,因此只能选择副作用大的放射、化学等疗法。这些治疗措施易造成患者肝肾功能损害、骨髓抑制、消化道反应等各种不良后果,且对患者造成严重的经济负担^[4]。而中药具有副作用小、能够提高机体免疫力等优势。研究表明,中医中药在肿瘤中晚期对于患者有着良好的治疗效果,能够显著提高患者的生活质量^[5-6]。现今,中医药综合疗法已成为治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的新途径。

祖国医学无“小细胞肺癌”病名,本病属中医学“肺积”“咳嗽”“息贲”等范畴^[7],是一种由于机体正气不足,邪气侵袭,影响肺气宣发、肃降,致痰浊瘀阻的肺系疾病。全国名老中医朱祝生教授认为^[8],肺脾肾三脏与水液代谢及输布紧密相关;肺为水之上源,输布津液;脾主运化水液;肾者水脏,主水和水化。肺脾肾三脏功能失常,致津液代谢输布障碍,水液停聚而生痰湿,临床表现为咳嗽、痰多、胸痞等。朱老对于肺积有独特见解,善用三子养亲汤治疗痰湿蕴肺型肺积病。

三子养亲汤首次见于《韩氏医通》,该方具有温

肺化痰、降气止咳之效,主要用于痰盛气逆之证。方中白芥子具有温肺化痰、利气散结的功效;紫苏子具有降气消痰、止咳平喘的功效;莱菔子具有下气祛痰的功效^[9]。三药相伍,可使气顺痰消、咳喘自平。

相关研究表明,三子养亲汤对于肺癌有抑制作用,且对于痰湿蕴肺型肺积病的治疗具有较好的效果^[10-13],故广泛应用于临床。此外,莱菔子中的成分莱菔子素(SFN)能够在肿瘤各个阶段发挥抑癌作用^[14],且能对肺癌干细胞的自我更新及肺癌细胞的增殖产生抑制作用^[15]。紫苏子中多种活性成分对肺癌等恶性肿瘤均具有明显的抑制作用^[16-17],其中紫苏甲氧基黄烷酮衍生物能激活p53,从而诱导肺癌细胞周期停滞于G2/M期,同时诱导其凋亡^[18]。既往研究表明,白芥子能抑制多种肿瘤细胞增殖分化,并诱导肿瘤细胞发生凋亡^[19-21]。

网络药理学是基于系统生物学理论,分析生物系统网络,选择特定信号节点进行多靶点药物分子设计的一门新兴学科^[22]。它将中药靶点信息和疾病靶点信息作为一个整体进行分析,符合中医药的整体观念。其方法是以“疾病-基因-靶点-药物”网络为根基,分析中药多成分、多靶点、多途径的特点,在整体上观察药物对疾病的作用,为深化中药在疾病中的研究提供了新的途径。

本研究应用网络药理学结合名老中医常用方探索三子养亲汤治疗非小细胞肺癌的作用机制。

1 材料和方法

1.1 三子养亲汤药物靶点筛选

运用 TC MSP (<https://tcmsp-e.com/>) 数据库对莱菔子、白芥子、紫苏子活性成分进行收集,将药物的 OB 值取大于等于 30%,DL 值取大于等于 0.18 作为筛选活性成分条件,TC MSP 数据库未检索到靶点的药物活性成分通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取其 2D 分子结构,再利用 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测作为补充^[23]。获得的药物靶点去除重复后利用 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库将其名称标准化。

1.2 非小细胞肺癌疾病靶点收集

将“non-small cell lung cancer”分别检索于 Drugbank、GeneCards、OMIM 数据库,并将获取到的 NSCLC 疾病靶点去掉重复项。

1.3 药物-成分-靶点网络图的制作

把疾病与药物相同靶点传入 STRING (version 11.0, <https://string-db.org/>) 数据库,构建 PPI 网络图。然后导入 Cytoscape 3.7.1 软件绘制药物-成分-靶点网络关系图,根据 Degree 值筛选出排名前 5 的关键化合物。

1.4 生物富集分析

利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对交集靶点进行 GO、KEGG 富集分析,其筛选阈值为 $P\text{-value}<0.05$, $Q\text{-value}<0.05$ 。GO 富集结果根据 P 值排序,各取 P 值前 10 条进行可视化并绘制柱状图。

2 结果

2.1 三子养亲汤化合物结果

得到 19 种符合筛选条件且靶点数大于 0 的三子养亲汤化合物(表 1)。

表 1 满足筛选条件(口服利用度、类药性)的药物化学成分

MOL ID	成分名称	口服利用度 /%	类药性	成分归属
MOL001697	Sinoacutine	63.39	0.53	白芥子
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	紫苏子
MOL006209	cyanin	47.42	0.76	紫苏子
MOL007179	Linolenic acid ethyl ester	46.1	0.2	紫苏子
MOL010672	icosa-8,11,14-trienoic acid methyl ester	44.81	0.23	莱菔子
MOL003975	icosa-11,14,17-trienoic acid methyl ester	44.81	0.23	莱菔子
MOL006202	LAX	44.11	0.2	紫苏子
MOL001749	ZINC03860434	43.59	0.35	紫苏子
MOL006210	eugenyl- β -D-glucopyranoside (citrusic)	40.52	0.23	紫苏子
MOL007514	methyl icoso-11,14-dienoate	39.67	0.23	紫苏子
MOL000953	CLR	37.87	0.68	紫苏子
MOL002773	beta-carotene	37.18	0.58	紫苏子
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	紫苏子
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	莱菔子
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	紫苏子
MOL001506	Supraene	33.55	0.42	紫苏子
MOL013037	2-(2-phenylethyl)-6-[[[(5S,6R,7R,8S)-5,6,7-trihydroxy-4-keto-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromen-8-yl]oxy]chromone	31.31	0.61	白芥子
MOL005030	gondoic acid	30.7	0.2	紫苏子
MOL010690	Uniflex BYO	30.13	0.25	白芥子

2.2 获得的靶点结果

经过筛选,共获得三子养亲汤各药物的靶点数:紫苏子 101 个,白芥子 18 个,莱菔子 3 个,删除重复值后共得到 106 个靶点; GeneCards、Drugbank、OMIM 分别获得非小细胞肺癌疾病靶点数为 3683 个、52 个、469 个,共 4202 个疾病基因靶点,删除重复值后得到 4083 个疾病基因靶点。

2.3 PPI 结果

应用韦恩图将删除重复值后的疾病与药物靶点取交集,得到 84 个相同基因靶点,将其传入到 STRING 数据库;确立物种:人类(Homo sapiens),置信度:0.900。并根据度值(Degree)将化合物由大到小排列,隐藏游离靶点,通过 PPI 分析,确定 TP53、

ESR1、CASP3、AKT1、TNF 为核心基因靶点并制作蛋白互作图(图1)。

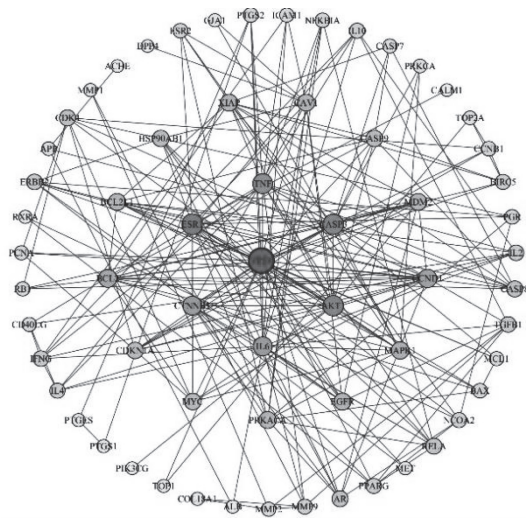


图1 蛋白互作关系图

2.4 绘制三子养亲汤药物-成分-靶点网络图

将得到的化合物与交集靶点导入 Cytoscape3.7.1 软件,构建“三子养亲汤药物-成分-靶点”网络图(图2),并根据 Degree 值将药物成分依次排序,得到网络中前5种起到关键治疗作用的药物成分(表2)。

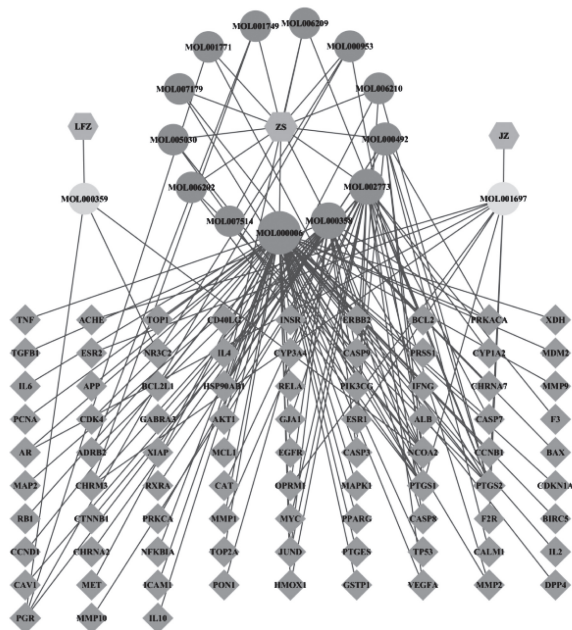


图2 三子养亲汤药物-成分-靶点网络关系图

表2 排列 Degree 值前5的药物成分

MOL ID	Degree	核心药物成分	来源
MOL000006	54	木犀草素	紫苏子
MOL000358	24	β -谷甾醇	紫苏子
MOL002773	22	β -胡萝卜素	紫苏子
MOL000492	10	(+)-儿茶素	紫苏子
MOL001697	10	青风藤碱	白芥子

2.5 GO 分析结果

将交集基因靶点导入微生信平台,并制作分子功能(MF)、生物过程(BP)、细胞组成(CC)前10位的分析结果柱状图(图3)。三子养亲汤治疗非小细胞肺癌的分子功能(MF):肽结合(peptide binding)、无序结构域特异性结合(disordered domain specific binding)、核受体活性(nuclear receptor activity)等10个;生物过程(BP):对类固醇激素的反应(response to steroid hormone)、细胞对化学应激的反应(cellular response to chemical stress)、对金属离子的反应(response to metal ion)、上皮细胞增殖(epithelial cell proliferation)等10个;细胞组成(CC):膜筏(membrane raft)、膜微域(membrane microdomain)、膜域(membrane region)等10个。

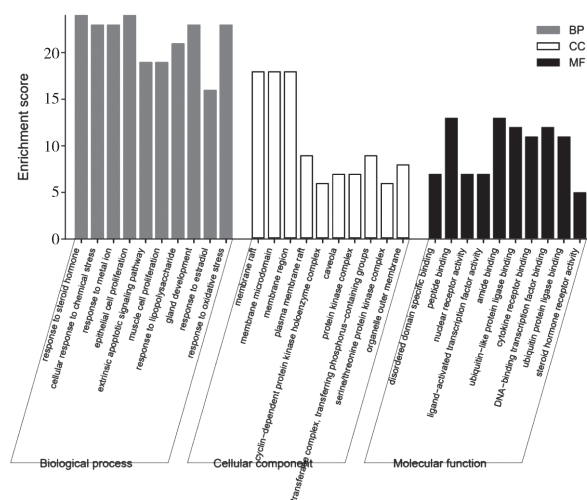


图3 GO 分析 BP、CC、MF 前10位的分析结果柱状图

2.6 KEGG 富集分析结果

结果涉及到165条通路,关键包括PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、细胞凋亡(Apoptosis)等,预示三子养亲汤能够作用于上述通路从而对NSCLC产生作用,详见图4。

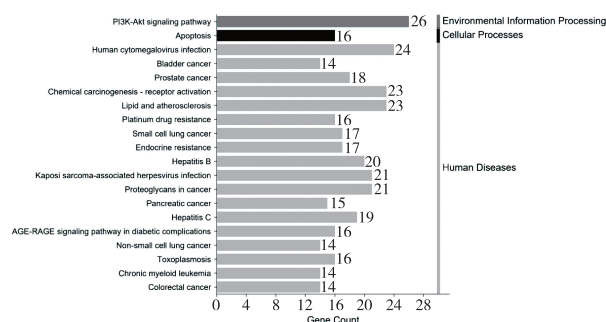


图4 KEGG富集分析

3 讨论

研究发现,PI3K-Akt 信号通路活化与非小细胞肺癌发展有着密切关联,此信号通路激活后能够加快肿瘤细胞生长增殖、促进肿瘤细胞侵袭和转移以及诱导肿瘤细胞耐药等^[24]。另有研究表明^[25],PI3K-Akt 信号通路在 NSCLC 中发挥关键作用,此通路被抑制后可进一步抑制 NSCLC 细胞增殖,并促进 NSCLC 细胞凋亡。针对性使用抑制 PI3K-Akt 信号通路活化的药物能够有效地阻碍此通路的过度活化而减弱对细胞凋亡的抑制作用,且能够抑制肿瘤细胞的生长^[26]。现今通过中药调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗 NSCLC 已成为新途径。

本研究基于网络药理学技术发现,木犀草素、 β -谷甾醇、 β -胡萝卜素、(+)-儿茶素、青风藤碱可能是三子养亲汤治疗非小细胞肺癌的关键化合物。杨朋等^[27]研究发现,木犀草素能通过抑制 PI3K-Akt-mTOR 通路,从而促进非小细胞肺癌细胞自噬斑点形成和凋亡。有学者研究表明^[28], β -谷甾醇能明显抑制非小细胞肺癌细胞的分裂增殖,能够让其周期停滞于 G2/M 期,从而引起细胞凋亡。朱相展研究发现^[29], β -胡萝卜素能够抑制多种肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡,此作用可能与抑制 PI3K/Akt 通路活性有关; β -胡萝卜素还能降低五氟尿嘧啶的用量,与之产生协同作用。研究发现,(+)-儿茶素对肺癌细胞有较为显著的抑制作用^[30]。攀真真等^[31]发现,青风藤碱联合紫杉醇(PT)能产生协同抗肿瘤作用,可减轻 PT 所致的病理性疼痛且能在不影响疗效的前提下减少 PT 的用量,其机制可能与抑制 PI3K-Akt 通路有关。

通过网络药理学分析:TP53、ESR1、CASP3、AKT1、TNF 等核心靶点对非小细胞肺癌有着较为关

键的调控作用。Zhang 等^[32]研究表明,TP53 基因突变能导致 p53 蛋白的抑癌功能丧失,同时使 p53 蛋白获得新的致癌活性,从而促进 NSCLC 发展。李琳等^[33]研究发现,ESR1 参与调节控制非小细胞肺癌细胞的生长周期,并能通过诱导癌细胞凋亡从而抑制其增殖。梁红玲^[34]研究发现,在肺癌细胞系中,CASP3 可被诱导凋亡的 CASP3 激活剂胱抑素原激活为 C-CASP3 而发挥加速肺癌细胞凋亡的作用,同时协同铂类产生抗肿瘤细胞增殖作用。胡祥坤等^[35]发现,AKT 作为一种原癌基因是通过使多种转录因子磷酸化,从而促使细胞凋亡。李彦等^[36]发现,TNF- α 通过激活 NF- κ B 通路诱导 Th9 细胞分化,继而加快肺癌细胞凋亡、抑制肺癌细胞增殖。故推断三子养亲汤对 NSCLC 基因的作用主要与诱导癌细胞凋亡与抑制其增殖有关。

此研究通过网络药理学技术发现三子养亲汤作用于非小细胞肺癌的相关成分及作用靶点,研究结果表明,三子养亲汤可能通过 PI3K-Akt 信号通路发挥诱导癌细胞凋亡及抑制其增殖的作用。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-13.
- [2] 江国军,邱艳,任菁菁. 1990-2019 年中国气管、支气管和肺癌疾病负担变化趋势及地域分析[J]. 癌症,2022,41(7):336-344.
- [3] 周永慧,陈鸿志. 免疫检查点抑制剂联合化疗在晚期非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2021,26(10):947-954.
- [4] 任迪莎,唐蔚,潘博. 潘博教授纯中药治疗肺癌验案 2 则[J]. 中外医学研究,2022,20(11):23-26.
- [5] 贾海生. 中医中药在肿瘤综合治疗中的应用[J]. 名医,2019(9):257.
- [6] 玄鸿雁,朱振胜. 浅谈中医中药在肿瘤姑息治疗中的作用[J]. 临床医药文献电子杂志,2019,6(60):25-28.
- [7] 连粉红,夏小军,郭炳涛,等. 原发性支气管肺癌中医病名探析[J]. 甘肃医药,2020,39(7):644-646.
- [8] 陈路军,孙智玲,陈文静,等. 从“津液代谢”探讨变通小青龙汤在慢性阻塞性肺疾病急性期的应用[J]. 中医临床杂志,2022,34(10):1811-1814.
- [9] 祁云霞,吴美萍,邓顺娟,等. 二陈汤合三子养亲汤治疗慢阻肺急性加重期疗效观察[J]. 世界中医药,2016,11(11):2278-2280.
- [10] 马香菊. 三子养亲汤治疗痰湿蕴肺型肺癌临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育,2023,21(6):104-106.

- [11] 赵媛媛. 加味三子养亲汤治疗晚期肿瘤合并难治性肺炎 30 例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(5): 100-102.
- [12] 欧章松, 赵媛媛, 张启周, 等. 自拟加味三子养亲汤在晚期肿瘤患者伴难治性肺炎中的临床疗效[J]. 心电图杂志(电子版), 2017(4): 96-97.
- [13] 闻彬, 蒋霁鹏. 二陈汤合三子养亲汤治疗痰湿蕴肺型肺癌咳嗽疗效观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(24): 162-163.
- [14] 赵婧, 霍青, 李运伦. 莱菔子的现代研究及临床应用[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(2): 294-296.
- [15] WANG F, SUN Y, HUANG X, et al. Sulforaphane inhibits self-renewal of lung cancer stem cells through the modulation of sonic Hedgehog signaling pathway and polyhomeotic homolog 3[J]. AMB express, 2021, 11(1): 121.
- [16] HE Y K, YAO Y Y, CHANG Y N. Characterization of anthocyanins in *Perilla frutescens* var. *acuta* extract by advanced UPLC-ESI-IT-TOF-MSn method and their anticancer bioactivity[J]. Molecules, 2015, 20(5): 9155-9169.
- [17] 刘行仁, 白义凤, 梁良, 等. 紫苏醇对肺癌 A549 细胞增殖和侵袭的抑制作用机制的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 859-863.
- [18] ABD E A, FUJIMURA T, KAMEI R, et al. A methoxyflavanone derivative from the Asian medicinal herb (*Perilla frutescens*) induces p53-mediated G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma[J]. Cytotechnology, 2018, 70(3): 899-912.
- [19] 吴圣曦, 吴国欣, 何珊, 等. 白芥子挥发油对小鼠肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤的抑制作用及其机制研究[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3024-3029.
- [20] 黄治伟. 芥子酸通过 AKT/GSK-3 β 信号通路对胰腺癌的抑制作用研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.
- [21] 苏羽岫. 芥子碱硫氰酸盐对皮肤鳞癌细胞的影响及其机制研究[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2021.
- [22] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [23] GFELLER D, MICHIELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules[J]. Bioinformatics, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [24] 魏文海, 李兴芳, 赵琼, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路抗非小细胞肺癌的机制及中药干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 218-226.
- [25] 王天雨, 唐旭东. PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关 lncRNA 在非小细胞肺癌发展中的最新进展[J]. 医学综述, 2022, 28(4): 692-699.
- [26] 韦柳婷, 冯洁, 莫书荣. PI3K-Akt 信号通路肿瘤相关性的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(4): 331-336.
- [27] 杨朋, 钱军, 陈文飞, 等. 木犀草素对人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及自噬的影响[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2667-2671.
- [28] 周玲玉. β -谷甾醇对人肺癌细胞增殖、凋亡影响的初步研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [29] 朱相展. β -胡萝卜素协同五氟尿嘧啶对食管鳞癌的抗肿瘤作用及机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [30] CADONA F C, DANTAS R F, DE MELLO G H, et al. Natural products targeting into cancer hallmarks: an update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin[J]. Crit rev food sci nutr, 2022, 62(26): 7222-7241.
- [31] 樊真真. 青藤碱对紫杉醇致痛作用和抗肿瘤效应的影响[D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2019.
- [32] ZHANG C, LIU J, XU D, et al. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy[J]. J mol cell biol, 2020, 12(9): 674-687.
- [33] 李琳, 王晖, 杜俊, 等. 雌激素受体 α 和 β 及表皮生长因子受体的表达与非小细胞肺癌临床病理特点关系[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(3): 539-543.
- [34] 梁红玲. CASP3/PARP1 等凋亡分子在肺癌中的表达分析及其促凋亡实验研究[D]. 广州: 广州医学院, 2012.
- [35] 胡祥坤, 潘春香, 孙如坤, 等. Akt、mTOR 和 PD-L1 表达与肺癌临床病理特征的相关性[J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(4): 547-551.
- [36] 李彦, 顾泽鑫, 孟祥茹, 等. TNF- α 通过 NF- κ B 增强 Th9 细胞分化抑制肺癌细胞生长[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(3): 228-233.

收稿日期: 2023-11-09; 修回日期: 2024-06-28

基金项目: 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药办人教函[2022] 75 号); 贵州省科技厅支撑计划项目(黔科合支撑[2021]一般 012)。

作者简介: 戴伟民(1999-), 男, 硕士在读, 主要研究方向: 中西医结合呼吸系统疾病防治。

▲通讯作者: 周 洵(1974-), 女, 博士, 硕士研究生导师, 主任医师。

猪牙皂挥发油组分平衡溶解度和油水分配系数的相似性分析*

陈磊¹,陈晓兰^{1▲},董娜娜²,谢树才¹,胡娟¹,邓琴¹,黄耀磊¹,范耕齐¹

(¹ 贵州中医药大学药学院,国家苗药工程技术研究中心,贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心,贵州 贵阳 550025;² 玉屏侗族自治县中医院,贵州 铜仁 554000)

摘要: **目的:**研究猪牙皂挥发油各代表性成分的平衡溶解度和油水分配系数的相似性,为猪牙皂挥发油组分整体水溶性和脂溶性的表征奠定基础。**方法:**摇瓶法结合 HPLC 法测定猪牙皂有效组分的溶解性和油水分配系数(P_{app}),运用向量余弦法(cosine)、欧氏距离系数、格鲁布斯法(Grubbs)评价其相似性。**结果:**猪牙皂挥发油代表性成分丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、茴香脑在不同 pH 值缓冲液及水中的平衡溶解度和 P_{app} 均具有一定的相似性。**结论:**相似性分析客观地反映了组分内各成分性质的离散程度,可增加组分性质评价的科学性,为中药组分的制剂设计提供依据。

关键词: 相似性分析,向量余弦法,欧氏距离系数,格鲁布斯法,猪牙皂挥发油

中图分类号:R286 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0017-06

Similarity analysis of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of volatile oil of *Gleditsiae Fructus Abnormalis**

CHEN Lei¹,CHEN Xiaolan^{1▲},DONG Nana²,XIE Shucan¹,HU Juan¹,DENG Qin¹,HUANG Yaolei¹,FAN Gengqi¹

(¹ Guizhou Engineering Research Center of Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine, National Engineering Research Center of Miao Medicine, School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ² Yuping Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tongren 554000, China)

Abstract: We studied the similarity of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of each representative volatile oil component of *Gleditsiae Fructus Abnormalis*. The solubility and oil-water partition coefficient of the effective components of *Gleditsiae Fructus Abnormalis* were determined by flask shaking method combined with HPLC. The similarity was evaluated by vector cosine method, Euclidean distance coefficient and Grubbs method. The equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of paeonol, eugenol, methyl eugenol, linalool and anethole in buffer solutions with different pH values and water were similar. The similarity analysis objectively reflects the statistical dispersion of the properties of each component, which can improve the scientificity of the component property evaluation, and provides a basis for the preparation design of the components of traditional Chinese medicine.

Keywords: similarity analysis, vector cosine method, Euclidean distance coefficient, Grubbs method, volatile oil of *Gleditsiae Fructus Abnormalis*

猪牙皂(*Gleditsiae Fructus Abnormalis*)来源于豆科植物皂荚(*Gleditsia sinensis* Lam.)的小荚果^[1]。

根据《中国药典》2020 版收载,其性温,味辛、咸;有小毒;归肺经、大肠经;具有祛痰开窍,消肿散结的功

效^[2];主产于河北、四川、贵州、山东等地^[3]。猪牙皂中含有黄酮类、挥发油类以及多种类型三萜皂苷等化学成分,猪牙皂的皂苷具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、改善心肌缺血等多种药理作用^[4]。杨敬鸿等研究发现,猪牙皂挥发性成分对小鼠常压缺氧和急性缺血缺氧及生理病理状态下的血脑屏障有较大的影响^[5]。周力等采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术对猪牙皂挥发油进行分析,发现其主要成分为右旋大根香叶烯、芳樟醇、 δ -杜松烯、 α -古巴烯、 α -芹子烯、正己醛、 α -衣兰油烯^[6]。

平衡溶解度和油水分配系数(P_{app})是判断一个物质/成分是否存在成药性的 2 个不可或缺的方面^[7]。相似性评价能够增加组分性质评价和表征的科学性和合理性^[8]。本研究前期采用大鼠脑缺血损伤再灌注模型实验证明猪牙皂挥发油对治疗脑缺血有较好的效果且毒副作用低;通过 GC-MS 结合网络药理学筛选出猪牙皂挥发油有效组分为丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、茴香脑、芳樟醇,且通过实验证明其作用好^[9]。因此选择这 5 个成分作为指标性成分进行平衡溶解度和油水分配系数研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);DKZ-5 型水浴恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司);TD5A-120 型台式低速离心机(常州金坛良仪器有限公司);AUW12D 型分析天平(日本 Shimadzu 公司)。

1.2 材料

猪牙皂有效组分对照品丹皮酚(GZDD-0046),丁香酚(GZDD-0401),甲基丁香酚(C102127),芳樟醇(GZDD-0244),茴香脑(C100243),均购自贵州迪大科技有限责任公司,纯度>98%。甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:UN1230),正辛醇(上海试四赫维化工有限公司,批号:1607101),PBS 磷酸盐缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1003),纯水。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、茴香脑对照品,置于干燥的 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度配制成母液,再从母液中吸取 2 mL 稀释至 10 mL 容量瓶中,配置成质量浓度分别为 66 $\mu\text{g/mL}$ 、14 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、28 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

2.2 HPLC 测定方法的建立

2.2.1 色谱条件

色谱条件为色谱柱:Welchrom C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(68:32);流速:1 mL/min;检测波长:200 nm;进样量:10 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 专属性考察

取空白溶剂和猪牙皂有效组分对照品,按“2.2.1”项下色谱条件进样,所得色谱图见图 1。结果表明,各成分分离度良好,相互间无干扰,方法专属性好。

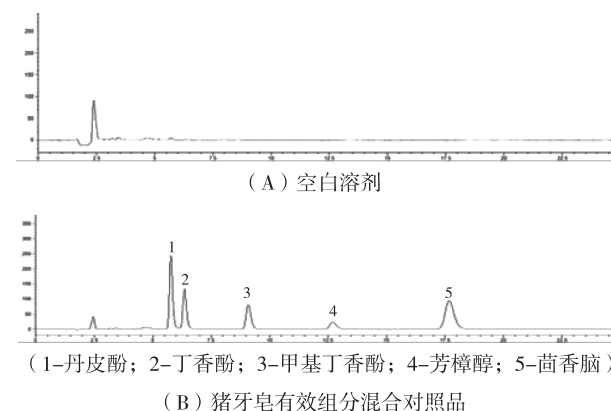


图 1 空白溶剂和猪牙皂有效组分对照品的色谱图

2.2.3 标准曲线的制备

精密称取丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、茴香脑对照品,置于干燥的 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度配制成母液。精密量取母液中 0.0625 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度线,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,进行线性回归分析,结果见表 1,各成分在试验线性范围内线性关系良好。

表 1 丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、
茴香脑的线性关系考察

成分	回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)
丹皮酚	$y=36691x-19.361$	0.9997	2.0625 ~ 83.000
丁香酚	$y=108172x-40.038$	0.999	0.4375 ~ 18.000
甲基丁香酚	$y=153506x-32.328$	0.9999	0.250 ~ 10.000
芳樟醇	$y=16981x-3.2301$	0.9997	0.875 ~ 35.000
茴香脑	$y=80935x-54.266$	0.9999	1.000 ~ 40.000

2.2.4 精密度考察

制备 50%、100%、150% 三种不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件考察日间精密度和日内精密度。以同一样品在一日内的 4 次测定结果计算日内精密度,以同一样品连续 4 天的测定结果计算日间精密度。结果表明,日内精密度与日间精密度均小于 2,表明仪器精密度良好。

2.3 不同缓冲盐溶液的配制

参考 2020 版《中国药典》第四部附录,分别配制不同 pH 值(2.0、2.5、5.0、5.8、6.5、6.8、7.0、7.2、7.4、7.8)的 PBS 溶液,4℃放置储存备用^[10]。

2.4 油相和水相的制备

分别量取油相(正辛醇)和水相(不同 pH 值(2.0、2.5、5.0、5.8、6.5、6.8、7.0、7.2、7.4、7.8)的 PBS 溶液)各 100 mL 于 250 mL 锥形瓶中,超声 30 min 后,恒温震荡 24 h,取出静置过夜、分液。4℃放置储存备用。

2.5 猪牙皂有效组分平衡溶解度的测定

称取过量有效组分于 2.0 mL 离心管中,加入水或不同 pH 值(2.0、3.0、4.0、5.6、6.8、7.4、8.0)的磷酸盐缓冲溶液 200 μL ,恒温震荡 24 h,取出放置 1 h。离心(12000 r/min,10 min)后,取上清液 150 μL 于 5 mL 容量瓶中,定容至刻度线,用 0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液进样 10 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件进样,平行测定 3 次,计算平衡溶解度,结果见表 2。由表 2 可知,随着介质 pH 值的变化,5 个成分的溶解性也随之变化,但变化趋势相同。其中在 pH 值为 4.0 时 5 个成分的平衡溶解度较大。整体的平衡溶解度由大到小分别为丹皮酚、丁香酚、芳樟醇、甲基丁香酚、茴香脑。5 个成分在不同 pH 值缓冲液及水中的平衡溶解度介于 0.0338 ~ 1.6051 mg/mL

之间,属于极微溶。

表 2 猪牙皂有效组分平衡溶解度测定结果 (mg/mL)

成分	水	pH=2.0	pH=3.0	pH=4.0	pH=5.6	pH=6.8	pH=7.4	pH=8
丹皮酚	0.9596	0.8210	1.3684	1.6051	0.7664	0.7397	0.5737	0.5680
丁香酚	0.3132	0.2074	0.4420	0.5620	0.2054	0.2531	0.2161	0.2266
甲基丁香酚	0.1213	0.1223	0.1329	0.1234	0.0722	0.1075	0.0806	0.0748
芳樟醇	0.1339	0.0844	0.1080	0.1658	0.1137	0.1337	0.1343	0.1535
茴香脑	0.1965	0.0338	0.0694	0.1049	0.0471	0.0493	0.0602	0.0457

2.6 猪牙皂有效组分油水分配系数测定

精密称取猪牙皂有效组分 4.0 mg 于 10 mL 容量瓶中,用水相饱和的正辛醇溶液定容至刻度线,超声后过微孔滤膜,取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样,得到各指标成分的质量浓度 $C_{\text{总}}$ 。精密吸取 5 mL 猪牙皂有效组分的正辛醇溶液于 10 mL 离心管中,再分别加入正辛醇饱和的水及正辛醇饱和的 pH=2.0、3.0、4.0、5.6、6.8、7.4、8.0 的磷酸盐缓冲液 5 mL,超声后,恒温振摇 24 h,取出室温静置 1 h 后,将上层油相离心后取上清液过微孔滤膜,取续滤液进样,计算得到各指标成分的质量浓度 C_0 ,平行测定 3 次。按公式(1)计算猪牙皂有效组分各组分的油水分配系数。

$$P_{\text{app}} = \frac{C_0 V_0}{C_{\text{总}} V_{\text{总}} - C_0 V_0} \quad (1)$$

式中, P_{app} 为表观油水分配系数, $C_{\text{总}}$ 为初始质量浓度(mg/mL), $V_{\text{总}}$ 为被水饱和的正辛醇体积, C_0 为在油相中测得的质量浓度(mg/mL), V_0 为油相体积。

测定结果见表 3。由表 3 可知,各成分的 P_{app} 介于 1.1554 ~ 2.7147 之间。一般认为,lg P 在 0 ~ 3 之间,药物较容易在肠道中被吸收。 $-1 < \lg P < 2$ 最佳,是具有良好的溶解性和透膜性的药物,易透过细胞膜吸收和转运^[11-12]。5 个有效成分在不同条件下的 lg P 值均在 0 ~ 3 之间,较容易在肠道中吸收,且表现出一定的脂溶性。

表 3 猪牙皂有效组分油水分配系数测定结果 ($\bar{x} \pm SD$)

成分	水	pH=2.0	pH=3.0	pH=4.0	pH=5.6	pH=6.8	pH=7.4	pH=8
丹皮酚	1.2065	1.7307	1.7803	1.5772	1.7196	2.0569	1.5260	1.8406
丁香酚	1.2046	1.6335	1.7839	2.5556	1.4228	2.7147	2.0840	1.7771
甲基丁香酚	1.6831	1.3233	1.3590	2.1537	1.6396	1.5787	1.8492	1.6861
芳樟醇	1.4395	1.2573	1.5671	1.9087	1.6802	1.6477	1.7363	1.8938
茴香脑	1.1554	1.5507	2.2726	1.4770	1.9001	2.0505	1.5866	1.8744

2.7 猪牙皂有效组分的相似性分析

2.7.1 相似性分析的方法

(1) 向量夹角余弦法 (cosine): 设定 $X(X_1, X_2, \dots, X_n)$ 、 $Y(Y_1, Y_2, \dots, Y_n)$ 分别为不同指标成分在不同溶剂中的性质值的向量, 按公式(2) 计算不同成分之间的 $\cos\theta$ 值^[13]。

$$\cos\theta = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n X_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n Y_i^2}} \quad (2)$$

(2) 欧式距离系数: 设定 $X(X_1, X_2, \dots, X_n)$ 、 $Y(Y_1, Y_2, \dots, Y_n)$ 分别为不同指标成分在不同溶剂中的性质值的向量, 按公式(3) 计算, 获得不同成分间的平衡溶解度和油水分配系数的相似系数 d ^[14]。

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)^2} \quad (3)$$

(3) 格鲁布斯法离散分析各代表性成分的平衡溶解度和油水分配系数。设定 $E(E_1, E_2, \dots, E_n)$ 为各代表性成分的性质值的向量, 计算平均值 $\bar{E}$ 、标准差 S , 按公式(4) 计算, 将偏移值最大的向量进行 G 检验, 并与临界值 $G_{0.95}(n)$ 比较^[15]。

$$G_i = \frac{E_i - \bar{E}}{S} \quad (4)$$

(4) 相似性判断标准见表 4^[16]。

表 4 相似性和离散程度的判断

项目	较强的相似性	一定的相似性	不具有相似性
Cosine 趋势分析	$\cos\theta > 0.99$	$0.90 < \cos\theta < 0.99$	$\cos\theta < 0.90$
欧式距离分析	$d < 10$	$10 < d < 100$	$d > 100$
Grubbs 离散分析	$G_i > G_{0.95}(n)$		$G_i < G_{0.95}(n)$

2.7.2 猪牙皂有效组分平衡溶解度相似性分析

按“2.7.1”项下方法对丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、茴香脑、芳樟醇平衡溶解度用 cosine、欧式距离系数和 Grubbs 进行分析, 结果见表 5、表 6、表 7。由表 5 可知, 在不同 pH 值介质中丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇 4 个成分平衡溶解度的 cosine 值均大于 0.9, 表明该 4 种成分之间溶解性的变化趋势具有相似性; 而茴香脑平衡溶解度的 cosine 值小于 0.9, 表明其溶解性的变化趋势与其余四者不具相似性。由表 6 可知, 丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、茴香脑、芳樟醇 5 个成分平衡溶解度的欧式距离

系数均小于 10, 表明各成分之间的溶解度性质均具有较强的相似性。由表 7 可知, 丹皮酚始终是其中偏移值最大的成分, 其 Grubbs 检验值均超过临界值 1.672, 说明丹皮酚与丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、茴香脑在不同介质中表现出来的溶解度性质差别较大。

表 5 猪牙皂挥发油有效组分平衡溶解度的 cosine 值

成分	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑
丹皮酚					
丁香酚	0.9943				
甲基丁香酚	0.9697	0.9570			
芳樟醇	0.9302	0.9395	0.9542		
茴香脑	0.8527	0.8571	0.8635	0.8545	

表 6 猪牙皂有效组分平衡溶解度的欧式距离分析

成分	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑
丹皮酚					
丁香酚	1.8806				
甲基丁香酚	2.5041	0.6402			
芳樟醇	2.4582	0.5920	0.1206		
茴香脑	2.5828	0.7177	0.1537	0.2008	

表 7 猪牙皂有效组分平衡溶解度 Grubbs 检验

pH 值	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑	$\bar{X}$	S	G_i
水	0.9596	0.3132	0.1213	0.1339	0.1965	0.3449	0.3519	1.7467
2	0.8210	0.2074	0.1223	0.0844	0.0338	0.2538	0.3234	1.7541
3	1.3684	0.4420	0.1329	0.1080	0.0694	0.4242	0.5483	1.7221
4	1.6051	0.5620	0.1234	0.1658	0.1049	0.5122	0.6391	1.7099
5.6	0.7664	0.2054	0.0772	0.1137	0.0471	0.2420	0.2992	1.7532
6.8	0.7397	0.2531	0.1075	0.1337	0.0493	0.2567	0.2801	1.7249
7.4	0.5737	0.2161	0.0806	0.1343	0.0602	0.2130	0.2105	1.7139
8	0.5680	0.2266	0.0784	0.1535	0.0457	0.2144	0.2097	1.6863

注: $G_{0.95}(5) = 1.672$ 。

2.7.3 猪牙皂有效组分 P_{app} 相似性分析

按“2.7.1”项下方法对丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、茴香脑、芳樟醇的 P_{app} 用 cosine、欧式距离系数和 Grubbs 进行分析。结果见表 8、表 9、表 10。由表 8 可知, 在不同 pH 值介质中丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、茴香脑、芳樟醇的 P_{app} 的 cosine 值均大于 0.9, 表明各成分的 P_{app} 之间的变化趋势具有相似性。由表 9 可知, 5 个成分的欧式距离系数均小于 10, 表明各成分之间的溶解度性质均具有较强的相似性。由表 10 可知, Grubbs 检验结果均未超过临界值 1.672, 表明猪牙皂组分中这 5 个代表性成分在不同

pH 值介质中反映出的 P_{app} 是具有一定的相似性,均上下波动在一个离散程度较小的范围内。

表 8 猪牙皂有效组分油水分配系数的 Cosine 分析

成分	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑
丹皮酚					
丁香酚	0.9766				
甲基丁香酚	0.9722	0.9728			
芳樟醇	0.9858	0.9758	0.9949		
茴香脑	0.9940	0.9632	0.9587	0.9789	

表 9 猪牙皂有效组分油水分配系数的欧式距离分析

成分	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑
丹皮酚					
丁香酚	1.3428				
甲基丁香酚	1.1254	1.4381			
芳樟醇	0.8061	1.4147	0.4788		
茴香脑	0.5699	1.5288	1.4205	1.0413	

表 10 猪牙皂有效组分油水分配系数 Grubbs 检验

pH 值	丹皮酚	丁香酚	甲基丁香酚	芳樟醇	茴香脑	$\bar{X}$	S	G_i
水	1.2065	1.2046	1.6831	1.4395	1.1554	1.3378	0.2224	1.5525
2	1.7307	1.6335	1.3233	1.2573	1.5507	1.4991	0.2023	1.1950
3	1.7803	1.7839	1.3509	1.5671	2.2726	1.7526	0.3396	1.5310
4	1.5772	2.5552	2.1537	1.9087	1.4770	1.9344	0.4392	1.4143
5.6	1.7196	1.4228	1.6396	1.6802	1.9001	1.6725	0.1714	1.4566
6.8	2.0569	2.7147	1.5787	1.6477	2.0505	2.0097	0.4521	1.5593
7.4	1.5260	2.0840	1.8492	1.7363	1.5866	1.7564	0.2227	1.4714
8	1.8406	1.7771	1.6861	1.8938	1.8744	1.8144	0.0843	1.5214

注: $G_{0.95}(5)=1.672$ 。

3 结论

中药有效组分是中药复方中具有相近化学性质的一大类化合物^[17]。中药有效组分配伍符合传统中药方药中多组分的特点,对于中药有效组分配伍的研究能更好地解释方药中药物组分作用的机理。如何表征中药有效组分配伍后的理化性质是中药有效组分制剂设计的难题。

本次实验得到丹皮酚、丁香酚、甲基丁香酚、芳樟醇、茴香脑为极微溶,其平衡溶解度由大到小为丹皮酚、丁香酚、芳樟醇、甲基丁香酚、茴香脑,在 pH 为 4 时整体平衡溶解度最大;猪牙皂有效组分的 P_{app} 均在 0~3 之间,较易在肠道吸收,表现为一定的脂溶性,且 pH 值能影响其平衡溶解度和油水分配

系数。通过 Cosine 分析得出茴香脑的溶解性的变化趋势与其余四者不具相似性,通过 Grubbs 检验得出丹皮酚与其余四者在不同介质中表现出来的溶解度性质差别较大;说明猪牙皂有效组分内丹皮酚、茴香脑与其他三个成分的平衡溶解度变化趋势的相似性差别较大;通过相似性分析得出各成分油水分配系数的变化趋势均具有一定的相似性。本次实验为猪牙皂挥发油新剂型开发提供一定的实验基础。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 高秋美,任丽华,孟庆峰,等.邹城地区猪牙皂的发展历史与现状分析[J].农业科技通讯,2019(1):124-126.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:331.
- [3] 高峥贞,夏玉凤,王强,等.猪牙皂的化学成分和药理活性研究进展[J].中国野生植物资源,2008(1):1-4.
- [4] 董娜娜,陈晓兰,邓铨莉,等.猪牙皂化学成分及药理作用研究进展[J].贵州中医药大学学报,2022,44(5):72-76.
- [5] 杨敬鸿,陈晓兰,杨晓梅,等.基于信息熵理论和方差分析比较猪牙皂不同组分对小鼠缺血缺氧及血脑屏障通透性影响[J].中药药理与临床,2018,34(6):83-86.
- [6] 周力,黎明,李凤,等.猪牙皂挥发性成分 GC-MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(24):156-159.
- [7] 杨群,徐英楠,张锴,等.基于相似性分析山楂叶总黄酮组分平衡溶解度和油水分配系数的研究[J].中草药,2017,48(14):2883-2888.
- [8] 郁丹红,贾晓斌.相似性分析用于丹参二萜醌组分平衡溶解度和油水分配系数的研究[J].中国中药杂志,2013,38(12):1860-1864.
- [9] 董娜娜,陈晓兰,邓铨莉,等.GC-MS 结合网络药理学及实验验证挖掘猪牙皂挥发油有效组分及其抗脑缺血再灌注的作用机制[J].中国中药杂志,2023,48(4):1076-1086.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [11] 张敏敏,刘冲,陈文.金合欢素平衡溶解度、油水分配系数和解离常数的测定[J].时珍国医国药,2020,31(5):1084-1087.
- [12] 张慧慧,施洋,张晓霞,等.安石榴苷平衡溶解度与油水分配系数的测定[J].新疆医科大学学报,2018,41(2):225-228.
- [13] 吴德智,张文秀,孙振,等.相似性分析用于白头翁皂苷组分表观溶解度和油水分配系数的研究[J].广东化工,2016,43(2):29-30.
- [14] 闫艳,孟庆华,李广超,等.色谱指纹图谱欧式距离法的一种改进[J].中成药,2014,36(5):1012-1020.

吊石苣苔野生资源调查*

陆 祥¹, 孙庆文^{2▲}, 万晓霞¹, 杨 烨²

(¹ 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550009; ² 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: 目的: 摸清吊石苣苔野生资源量、分布范围及生长环境。方法: 结合标本、文献的查阅整理, 制定六条样线, 对贵州全省、云南东部、广西西部及北部野外资源进行实地调查和走访。结果: 吊石苣苔在贵州南部、西南部, 广西西北部分布最密集。在海拔 1100~1500 m 之间出现频度最高, 主要附生在有苔藓覆盖的石灰岩上, 常生长在阴湿环境, 主要伴生植物为江南星蕨、肾蕨、抱石莲等蕨类植物。结论: 本次通过对吊石苣苔野生资源分布情况及生长环境进行调查, 为吊石苣苔野生资源合理利用、资源保护及人工栽培提供参考依据。

关键词: 吊石苣苔, 资源, 调查, 生境

中图分类号: Q9 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563(2025)01-0022-04

Survey of wild resources of *Lysionotus pauciflorus**

LU Xiang¹, SUN Qingwen^{2▲}, WAN Xiaoxia¹, YANG Ye²

(¹ Guizhou Food and Drug Inspection Institute, Guiyang 550004, China; ² Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: To investigate the quantity, distribution and habitat of the wild resources of *Lysionotus pauciflorus*, field survey was carried out in Guizhou, Yunnan and Guangxi by line transect method combined with specimen and literature study. The results show that *Lysionotus pauciflorus* most densely distributes in southern Guizhou, southwestern Guizhou and northwestern Guangxi. It occurs most frequently between 1100 m and 1500 m above sea level, mainly epiphytes on limestone covered with moss, and often grows in damp environment. The main associated plants are *Lepisorus fortunei*, *Nephrolepis cordifolia*, *Lemmaphyllum drymoglossoides* and other ferns. Through investigation and study on the distribution and habitat of wild resources of *Lysionotus pauciflorus*, this study provides reference for the rational utilization, resource protection and artificial cultivation of wild resources of *Lysionotus pauciflorus*.

Keywords: *Lysionotus pauciflorus*, resource, survey, habitat

[15] 郁丹红, 贾晓斌. 相似性分析用于丹参二萜醌组分平衡溶解度和油水分配系数的研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1860-1864.

[16] 柯仲成. 防治心肌缺血的赤芍萜苷组分代表性成分发现和生物药剂学性质表征[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.

[17] 刘丽梅, 陈曦, 岳广欣, 等. 关于界定“中药组分”概念的若干思考[J]. 中草药, 2018, 49(11): 2489-2495.

收稿日期: 2023-07-26; 修回日期: 2023-10-24

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81860705); 国家苗药工程技术研究中心能力提升, 编号: 黔科合中引地[2023]006; 贵州省高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心, 合同编号: 黔教技[2022]022。

作者简介: 陈 磊, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药新剂型与新制剂。

▲通讯作者: 陈晓兰(1976-), 女, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为中药及民族药新剂型与新制剂。

吊石苣苔 *Lysionotus pauciflorus* Maxim. 又名岩豇豆、石吊兰,为苦苣苔科 Gesneriaceae 吊石苣苔属 *Lysionotus* 植物,常为小灌木或亚灌木,分布于云南东部、广西、广东、福建、台湾、浙江、江苏南部、安徽、江西、湖南、湖北、贵州、四川、陕西南部等地。主要生长于喀斯特地貌地区的岩石上或树上,海拔 300 ~ 2000 m^[1]。据 2020 版《中国药典》记载,吊石苣苔具有化痰止咳、软坚散结的功效,用于治疗咳嗽痰多、瘰癧痰核等疾病^[2]。民间常用于治疗慢性支气管炎、骨结核、淋巴结核、无名肿毒、跌打损伤、风湿等疾病^[3]。吊石苣苔成分复杂,含有黄酮类、苯乙醇苷类及挥发油等化学成分^[4-6]。现代药理学研究表明,吊石苣苔具有抗结核杆菌、抗炎、抗肝毒、降血压、降血脂等药效作用^[7-12]。

前期实地调研及市场走访发现,目前市场上吊石苣苔药材主要来源于野生资源,由于其良好的疗效,临床需求越来越大,导致其野生资源量锐减。同时吊石苣苔多生长于喀斯特地貌的岩石上,过度的采摘会导致石漠化的加重,对环境造成严重的破坏。基于此,本研究通过野生资源调查对吊石苣苔分布情况、生态环境、民间用药情况进行了解,为更好地保护吊石苣苔野生资源及人工栽培提供参考依据。

1 调查内容与方法

1.1 调查内容

通过对贵州省、云南省及广西壮族自治区三地的典型喀斯特地貌地区吊石苣苔野外资源进行调查,了解吊石苣苔在该区域野外资源分布及使用情况,包括各地区分布资源量、不同海拔分布频度、分布生境、常见伴生植物以及地方用药习惯。

1.2 调查方法

1.2.1 样线设计

通过文献及标本查阅,了解吊石苣苔资源分布区域以及分布生境,制定样线调查路线。本次样线主要有 6 条:①花溪区-惠水县-长顺县-镇宁县-六枝特区-水城县;②兴义市-兴仁市-安龙县-册亨县-望谟县-罗甸县-独山县-荔波县-三都县;③花溪区-惠水县-罗甸县-乐业县-凌云县-田林县-西林县-隆林县-安龙县;④兴义市-罗平县-师宗县-广

南县-富宁县-那坡县-乐业县-望谟县-镇宁县;⑤丘北县-砚山县-文山市-西畴县-麻栗坡县-马关县-河口县-屏边县-蒙自市;⑥贵阳市-黔西县-金沙县-播州区-湄潭县-凤冈县-绥阳县-正安县-德江县-思南县-石阡县-镇远县-三穗县-剑河县-雷山县。调查区域覆盖 3 个省、50 个县、150 余个乡镇。通过样线调查,记录吊石苣苔分布点经纬度、海拔、生境、分布密度、伴生植物。

1.2.2 走访调查

对吊石苣苔分布区域进行走访调查,内容主要包括吊石苣苔野生资源量、资源分布变化、民间用药习惯等。

2 结果与分析

2.1 吊石苣苔主要分布区

从 6 条样线调查结果来看,吊石苣苔在贵州中部、南部、西南部,广西西北部与贵州相邻地区分布密度最高。主要包括贵阳市、惠水县、长顺县、镇宁县、关岭县、兴义市、安龙县、册亨县、望谟县、罗甸县、独山县、荔波县、三都县、乐业县、隆林县。而云南省河口县、丘北县、蒙自市、砚山县在调查中未见吊石苣苔分布,其余地区均有分布,但分布稀疏,资源量少。

2.2 不同海拔梯度下吊石苣苔分布情况

对调查的 101 个样点海拔数据进行梯度分类,以 100 m 为一个梯度进行划分。调查结果如表 1 所示,吊石苣苔主要分布范围在 300 ~ 1900 m,其中 1000 ~ 1100 m 范围内吊石苣苔数量最多,随着海拔逐渐低于 800 m 或高于 1500 m 时,吊石苣苔分布数量明显减少。

表 1 不同海拔吊石苣苔资源调查分布频数表

海拔/m	频数	等级
300 ~ 400	1	低
400 ~ 500	1	低
500 ~ 600	1	低
600 ~ 700	2	低
700 ~ 800	2	低
800 ~ 900	7	中

续表 1

海拔/m	频 数	等 级
900 ~ 1000	9	中
1000 ~ 1100	23	高
1100 ~ 1200	10	高
1200 ~ 1300	13	高
1300 ~ 1400	14	高
1400 ~ 1500	9	中
1500 ~ 1600	4	低
1600 ~ 1700	1	低
1700 ~ 1800	3	低
1800 ~ 1900	1	低

2.3 生境特点和伴生植物

吊石苣苔主要附生在石灰岩上或树上,根部附着大量苔藓,本次调查的 101 个样点中,有 97 批生长在岩石上,4 批生长于树上;吊石苣苔生长环境生态类型:落叶乔木林中出现 4 次,灌丛出现 24 次,林缘出现 63 次,针叶林缘出现 3 次,草坡出现 2 次,耕地边缘出现 10 次,小溪边出现 2 次;吊石苣苔生长环境水分含量:其中有 2 个生长在小溪边的样点湿度较高,有 63 个样点属于阴湿,36 个样点属于中生;光照类型:有 90 个样点属于阴生,有 11 个样点属于阳生。伴生植物如图 1 所示;伴生乔木类型多样不固定,主要有朴树 *Celtis sinensis* Pers.、枫香树 *Liquidambar formosana* Hance、亮叶桦 *Betula luminifera* H. Winkl. 等阔叶乔木,马尾松 *Pinus massoniana* Lamb. 等针叶林下少见;伴生灌木类型多而复杂,主要有火棘 *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li,常春藤 *Hedera nepalensis* var. *Sinensis*(Tobl.) Rehd.,崖爬藤 *Tetrastigma obtectum* (Wall.) Planch.,黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr.,粉叶羊蹄甲 *Bauhinia glauca* (Wall. Ex Benth.) Benth. 等;伴生草本主要与蕨类为主,主要有抱石莲 *Lemmaphyllum drymoglossoides* (Baker) Ching、江南星蕨 *Neolepisorus fortune* (T. Moore) Li Wang、中越石韦 *Pyrrosia tonkinensis* (Gies.) Ching、肾蕨 *Nephrolepis cordifolia* (Linnaeus) C. Presl、江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron.,槲蕨 *Drynaria roosii* Nakaike,牛耳朵 *Chirita eburnea* Hance 等。

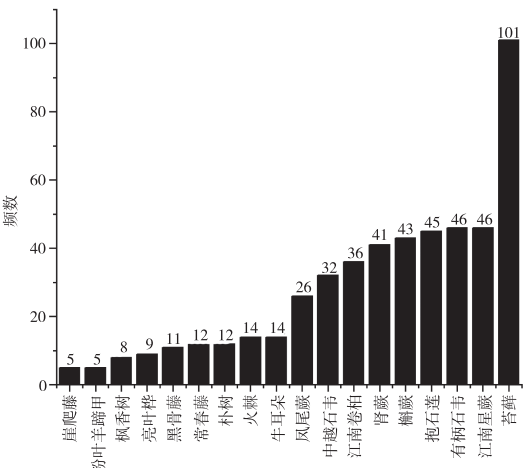


图 1 吊石苣苔伴生植物频数图

2.4 走访调查

通过对吊石苣苔资源进行走访调查了解到,吊石苣苔在云南、贵州、广西民间大多称为岩豇豆、石豇豆。民间使用非常广泛,通常用于治疗咳嗽、支气管炎、跌打损伤,贵州北部部分地区也作为滋补药使用,贵州南部部分地区把其作为野菜食用。而对各地区资源量走访发现,各地区资源均受到一定的程度破坏,以贵州铜仁地区、遵义部分地区及云南文山州等地区资源破坏最为明显。

3 总结与讨论

3.1 吊石苣苔野生资源

本次资源调查区域主要为贵州全省、云南东部、广西西北部的典型喀斯特地貌地区,地理环境多为石灰岩山地。调查结果表明,在黔桂滇三省交界处喀斯特岩溶地区吊石苣苔分布密度最大。吊石苣苔最适宜生长于海拔 1000 ~ 1500 m 的林缘阴湿岩石上,常有大量苔藓植物覆盖,空气中水分含量较大。走访调查结果表明,吊石苣苔在民间使用量大,资源量减少明显,因此对吊石苣苔资源保护工作刻不容缓,应加强吊石苣苔人工引种驯化研究,减缓市场的压力。

3.2 野生资源持续减少的原因

植物资源量的减少往往受多个因素的影响,通过吊石苣苔野生资源调查,从植物自身和外界因素

分析吊石苣苔资源量减少的原因。自身因素:吊石苣苔主要生长在喀斯特地貌地区的岩石或树上,土壤层较薄,生态环境一旦破坏,便难以恢复^[13-14]。吊石苣苔种子多却非常的细小,野外萌发率低,其幼苗小脆弱,对环境适应力较差^[15],且野外吊石苣苔主要以分株繁殖为主,繁殖速度慢。外界因素:随着人类活动范围越来越广,加大了对吊石苣苔生长环境的破坏,严重缩小其分布范围^[16-17]。近年来以吊石苣苔药材为原料的中成药越来越多,例如石吊兰片已在中国多家药企生产上市销售,其药材主要来源于野生采挖,加之民间大量使用,对吊石苣苔野生资源造成进一步破坏,导致吊石苣苔野生资源大幅减少。

3.3 保护策略

喀斯特地貌存在石漠化、干旱溶岩、土地瘠薄、高 pH 值、高钙等限制因素^[18],导致喀斯特地貌小生境具有高度异质性和生境脆弱性。高度异质性使得群落和物种多样性丰富^[19]。生境脆弱性使得小生境一旦受到破坏,必然引起群落和物种多样性快速衰退与丧失。因此,保护吊石苣苔野生资源,应对喀斯特地貌上植物保育和植被恢复,保证小生境群落生态稳定性。根据喀斯特地貌特点采取措施,通常有自然恢复和人工恢复,自然恢复优势在生态平衡维持机制一旦建立,较为稳定,自然群落演替不会出现较大偏差,但自然恢复周期长,不确定因素多,不利于药材开发利用。人工恢复是基于原有群落的演替规律,在该生态系统引入关键种和建群种,促使其加速重建^[20]。在喀斯特地貌地区可以把吊石苣苔作为关键种或建群种进行定向引种,不仅解决石漠化问题,也可缓解吊石苣苔资源问题。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 69 卷[M]. 北京:科学出版社,1985:529.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:92-93.
- [3] 贵州省中药资源普查办公室,贵州省中药研究所. 贵州中药资源[M]. 北京:中国医学科技出版社,1992:835.
- [4] 冯卫生,李倩,郑晓珂,等. 吊石苣苔中的化学成分[J]. 天然产物研究与开发,2006(18):617-620.
- [5] 张瑜,杨健,詹志来,等. UPLC-MS/MS 测定不同产地吊石苣苔中苯乙醇苷类成分含量[J]. 中国现代中药,2017,

19(4):504-508.

- [6] 李计龙,刘建华,等. 石吊兰挥发油成分的研究[J]. 中国药房,2011,22(27):2560-2562.
- [7] 汪志勇,江峰,徐红,等. 苗药吊石苣苔的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(22):64-65.
- [8] 宋杰云,何修译,陈秀芬,等. 石吊兰素的降压作用[J]. 中国药理学报,1985,6(2):99.
- [9] 孙安盛,石京山,吴芹,等. 石吊兰素对麻醉猫血流动力学的影响[J]. 遵义医学院学报,1996,19(1):5-7.
- [10] 廖伟锋,王振昌,李桂华,等. 石吊兰素降压效应及其机制的实验研究[J]. 临床医学工程,2012,19(12):2120-2122.
- [11] 苟体忠,唐文华,任永权,等. 石吊兰总多酚体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2015,36(5):73-77.
- [12] 宋杰云,刘亚平,胡菊英,等. 石吊兰素对心脏的作用[J]. 贵州医药,1985(6):30.
- [13] 苏广实. 喀斯特土地利用系统演变机制与优化调控模式研究[D]. 福州:福建师范大学,2008.
- [14] 葛玉珍,辛子兵,黎舒,等. 广西苦苣苔科植物濒危程度和优先保护序列研究[J]. 广西植物,2020,40(10):1491-1504.
- [15] 屠玉麟. 贵州喀斯特地区生态环境问题及其对策[J]. 贵州环保科技,2000,6(1):1-6.
- [16] 龚勤林,陈说. 西南喀斯特地区资源环境保护与生态文明建设研究[J]. 西部发展评论,2014(7):68-72.
- [17] YAN J, LI J, YE Q, et al. Concentrations and exports of solutes from surface runoff in Houzhai Karst Basin, southwest China[J]. Chemical geology, 2012, 304:1-9.
- [18] 梁莹,韦坤华,张占江,等. 中国南方喀斯特地貌药用植物保育策略[J]. 中国现代中药,2017,19(2):226-231.
- [19] 文丽,宋同清,杜虎,等. 中国西南喀斯特植物群落演替特征及驱动机制[J]. 生态学报,2015,35(17):5822-5833.
- [20] 陆宇惠,马克坚,赵景云,等. 人工引种重建喀斯特山地适生野生药用植物群落研究的意义及应用前景分析[J]. 云南中医中药杂志,2012,33(11):11-12.

收稿日期:2024-03-11;修回日期:2024-04-11

基金项目:国家自然科学基金(82004064);贵州省国内一流学科(中药学)建设项目(GNYL[2017]008);贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合 KY 字[2017]018);贵州省优秀青年科技人才项目(黔科合平台人才[2019]5658);贵州省国内一流学科建设项目研究生工作站(GNYL[2017]008-7-Y)。

作者简介:陆 祥(1996-),男,彝族,贵州晴隆人,贵州省食品药品检验所主管药师,硕士,主要从事中药及民族药资源分类鉴别与质量控制。

▲通讯作者:孙庆文(1978-),男,汉族,贵州普安人,贵州中医药大学教授,硕士生导师,主要从事中药资源和栽培的教学和科研工作。

隆平高科种业 11 个玉米杂交种在贵州中部适应性鉴定试验

李 婷

(贵定县种植业发展中心, 贵州 贵定 551300)

摘 要: 本试验是隆平高科种业西南区玉米审定“绿色通道”试验,采用完全随机区组设计,于 2017 年春在贵州省平坝区天龙玉米育种基地种植。试验材料是隆平高科种业提供的 11 个玉米杂交种。通过对 11 个玉米杂交种的产量性状和生物学性状的调查,分析其产量、产量性状、植株性状和抗性的综合表现,鉴定 11 个玉米杂交种在贵州中部地区的适应性,为品种审定提供参考。试验结果表明:11 个杂交种的抗倒性、抗病性表现都比较好。隆平 18、隆平 15、隆平 20、隆平 14、隆平 21、隆平 17、隆平 16、隆平 22、隆平 12、隆平 19 在产量上没有显著差异。其中隆平 18、隆平 14、隆平 12、隆平 16、隆平 22 在产量、产量性状和植株性状等方面表现较好,特别是隆平 18 的折合亩产达到 578.68 kg/亩,比 CK1(渝单 8 号)增产 1.57%,比 CK2(荃玉 9 号)增产 19.69%,所以建议进入下一年的生产试验和多点试验。由于隆平 13 的产量最低,与其余 10 个杂交种、CK1、CK2 相比差异显著,且产量性状表现不佳,因此建议淘汰。

关键词: 玉米杂交,产量性状,植株性状,适应性鉴定

中图分类号:S513 文献标识码:B 文章编号:1003-6563(2025)01-0026-05

Adaptability test of 11 corn hybrids in central Guizhou by Longping High-Tech Agriculture

LI Ting

(Guiding Planting Industry Development Center, Guiding 551300, China)

Abstract: The experiment is a “green passage” test for corn from Longping High-Tech Agriculture. The experiment was completely randomized designed, and the 11 corn hybrids provided by Longping High-Tech Agriculture were planted in the spring of 2017 at Tianlong Corn Breeding Base in Pingba District, Guizhou Province. Through the investigation of the yield and the biological traits of the 11 corn hybrids, the comprehensive performance of yield, yield traits, plant traits and resistance were analyzed to determine the adaptability of the 11 corn hybrids in central Guizhou. The test results show that the 11 corn hybrids have good lodging resistance and disease resistance. Longping 18, Longping 15, Longping 20, Longping 14, Longping 21, Longping 17, Longping 16, Longping 22, Longping 12, and Longping 19 show no significant difference in yield. Longping 18, Longping 14, Longping 12, Longping 16, and Longping 22 perform well in terms of yield, yield traits and plant traits. The yield of Longping 18 has reached 578.68 kg/mu, which is higher than that of CK1 (Yudan 8) by 1.57% and that of CK2 (Quanyu 9) by 19.69%. Longping 18 is recommended to enter the next year's production test. The yield of Longping 13 is the lowest, significantly different from the other 10 hybrids, CK1 and CK2, and the yield traits are not good, so it is recommended that the variety be eliminated.

Keywords: corn hybrids, yield traits, plant traits, adaptability test

玉米是我国重要的粮食、经济和饲料作物,在我国农业生产和国民经济发展中具有重要的地位^[1]。玉米品种鉴定试验是通过对玉米新品种的丰产性、抗逆性、稳定性和适应性进行鉴定,以筛选出适宜当地种植的优良品种^[2]。主要以玉米产量结果为依据,对与产量相关的农艺性状进行直观分析或平均数统计,筛选出一些产量高、品质好、抗病抗倒性强的杂交种,而淘汰产量低和综合性状较差的杂交种^[3]。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

试验材料是隆平高科种业西南区玉米“绿色通道”试验 B 组的 11 个玉米杂交种,设两个对照,分别为渝单 8 号(CK1)、荃玉 9 号(CK2)。试验材料的编号和杂交种名称见表 1。

表 1 试验材料的编号和杂交种名称

编 号	杂交种名称
1	隆平 12
2	隆平 13
3	隆平 14
4	隆平 15
5	隆平 16
6	隆平 17
7	隆平 18
8	隆平 19
9	隆平 20
10	隆平 21
11	隆平 22
12	CK1(渝单 8 号)
13	CK2(荃玉 9 号)

1.2 田间试验设计

试验采用完全随机区组设计,设 3 个重复,每个杂交种种 5 行,四周设保护行 2 行,收获时选择中间 3 行计产,行长 5 m,行距为 70 cm,穴距为 50 cm,双株留苗,密度为 3811 株/亩。于 2017 年春在贵州省平坝区天龙玉米育种基地进行田间鉴定试验,海拔为 1250 m。田间管理按照当地大田生产水平进行,各项栽培管理措施一致,治虫不治病。

1.3 调查记载项目及方法

1.3.1 植株性状调查

表 2 植株性状调查的项目与测定方法

性状	测定方法
株高	选取乳熟期正常的植株 10 株,测量地表到雄穗顶端的高度,以 cm 表示。
穗位高	测量植株从地表至最上部果穗着生节的高度,以 cm 表示。
倒伏率	乳熟末期,植株倾斜度大于 45 度但未折断的植株占该试验小区总株数的百分率。
倒折率	乳熟末期,果穗以下部位折断的植株占该试验小区总株数的百分率。

1.3.2 田间病害调查

参照《玉米田间病虫害鉴别与抗性鉴定手册》进行各病害的记载、分级。试验主要调查的病害与病情分级见表 3。

表 3 试验主要调查的病害与病情分级表

病害名称	症状描述	病情分级	抗性评价
玉米纹枯病	果穗下第 4 叶鞘及以下叶鞘发病;	1	HR
	果穗下第 3 叶鞘及以下叶鞘发病;	3	R
玉米大、小斑病	叶片上无病斑或仅在穗位下部叶片上有少量病斑,病斑占叶面积少于或等于 5% ;	1	HR
	穗位下部叶片上有少量病斑,占叶面积 6% ~ 10% ,穗位上部叶片有零星病斑;	3	R
玉米茎腐病	全株青枯叶片不足 1/ 4 ,茎基部 1 ~ 2 节呈水浸状,稍软;	1	HR
	全株青枯叶片 1/ 4 ~ 1/ 2 ,茎基部 1 ~ 2 节呈水浸状凹陷,手感较软;	2	R
	全株青枯叶片 1/ 2 ~ 3/ 4 ,茎基部 1 ~ 2 节明显发软,果穗包叶褪色或下垂;	3	R
玉米灰斑病	叶片上无病斑或仅有少量病斑,病斑占叶面积少于或等于 5% ;	1	HR
	叶片上有少量病斑,占叶面积 6% ~ 10% ;	3	R
玉米锈病	叶片上无病斑或仅有无孢子堆的过敏性反应;	1	HR
	叶片上有少量孢子堆,占叶面积少于 25% ;	3	R

注:HR:高抗;R:抗。

1.3.3 产量性状调查

表 4 产量性状调查的项目与测定方法

性状	测定方法
穗数	中间 3 行全部果穗的数量。
穗长	测量从穗基部到顶端的长度,求平均值,以 cm 表示。
穗粗	果穗头尾相间排成一行,测量果穗中部长度,求平均值,以 cm 表示。
秃尖长	测量果穗顶端不结实部分的长度,求其平均值,以 cm 表示。
穗行数	果穗中部的籽粒行数,求平均值。
行粒数	每穗数一行中中等长度的粒数,求其平均值。
穗粒重	将小区内收获的中间 3 行果穗烘干至恒重,取平均数,以 kg 为单位。
总粒重	中间 3 行果穗脱粒后,称其籽粒干重,以 kg 为单位。
百粒重	随机取 100 粒籽粒称重,重复取样 3 次,取相近两个数的平均数,以 g 为单位。

1.4 数据统计方法

试验数据采用 Excel2010 统计整理,对参试杂交种的产量和产量性状进行方差分析。可利用的计算公式有:

小区产量=(穗数×穗行数×行粒数×百粒重)/100×1000

折合亩产=(小区亩产/小区面积)×667

出籽率=籽粒干重/果穗干重×100%

穗位系数=穗位高/株高

穗位高标准差= $\sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}}$ (y 为各个杂交

种的穗位高, $\bar{y}$ 为穗位高的平均值, n 为杂交种数)

2 结果与分析

2.1 不同杂交种的产量分析

由表 5 可以看出,CK1 的折合亩产为 569.74 kg/亩,CK2 的折合亩产为 483.47 kg/亩。11 个玉米杂交种中只有隆平 18 比对照 CK1 增产 1.57%,折合亩产为 578.68 kg/亩。其余 10 个杂交种都比对照 CK1 减产,隆平 13 减产达到 32.58%,折合亩产低于 400 kg/亩。但与对照 CK2 相比就有 10 个杂交种增产,产量大小依次为隆平 18、隆平 15、隆平 20、隆平 14、隆平 21、隆平 17、隆平 16、隆平 22、隆平 12、隆平 19。其中隆平 18 比对照 CK2 增产 19.69%,增产最多。为验证参试杂交种之间是否存

在真实差异,进一步进行方差分析。

表 5 不同杂交种的产量结果

杂交种名称	小区产量/kg				折合亩产/kg	位次	比 CK1 增减/%	比 CK2 增减/%
	I	II	III	平均				
隆平 18	12.66	12.20	11.58	12.15	578.68	1	1.57	19.69
CK1	11.86	10.59	13.42	11.96	569.74	2		
隆平 15	12.40	11.56	10.71	11.56	550.59	3	-3.36	13.88
隆平 20	12.52	8.38	13.18	11.36	541.31	4	-4.99	11.96
隆平 14	12.35	11.21	10.47	11.34	540.49	5	-5.13	11.79
隆平 21	10.79	10.95	11.94	11.23	534.92	6	-6.11	10.64
隆平 17	11.75	9.81	12.03	11.20	533.44	7	-6.37	10.34
隆平 16	10.59	12.32	10.66	11.19	533.25	8	-6.40	10.30
隆平 22	11.17	10.34	11.39	10.96	522.29	9	-8.33	8.03
隆平 12	10.74	11.44	9.50	10.56	503.10	10	-11.70	4.06
隆平 19	8.27	10.98	11.80	10.35	493.10	11	-13.45	1.99
CK2	10.34	9.85	10.25	10.15	483.47	12		
隆平 13	8.75	7.53	7.91	8.06	384.11	13	-32.58	-20.55

通过表 6 的产量方差分析表,做 F 测验可看出,在区组间 F 值小于 $F_{0.05}$,即在区组间没有显著差异;而 11 个杂交种之间的 F 值大于 $F_{0.05}$,但小于 $F_{0.01}$,故在杂交种间产量存在显著差异。因此,11 个杂交种间的产量表现还需进一步做多重比较分析。

表 6 产量的方差分析表

变异来源	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组间	2	2.8	1.4	0.97	3.4	5.61
品种间	12	38.48	3.21	2.23	2.18	3.03 *
误差	24	34.51	1.43			
总变异	38	75.8				

利用新复极差法 (SSR 法) 得到表 7,验证参试杂交种与对照品种 CK1 与 CK2 的差异显著性。

表 7 杂交种平均产量的差异显著性

杂交种名称	平均产量/kg	差异显著性	
		5%	1%
隆平 18	12.15	a	A
CK1	11.96	ab	A
隆平 15	11.56	ab	A
隆平 20	11.36	ab	A
隆平 14	11.34	ab	A
隆平 21	11.23	ab	A
隆平 17	11.20	ab	A
隆平 16	11.19	ab	A
隆平 22	10.96	ab	A
隆平 12	10.56	ab	A
隆平 19	10.35	ab	A
CK2	10.15	ab	A
隆平 13	8.06	b	A

结果表明,隆平 13 与 CK1、CK2 和其余 10 个杂交种在产量上差异显著,而隆平 18、隆平 15、隆平 20、隆平 14、隆平 21、隆平 17、隆平 16、隆平 22、隆平 12、隆平 19 之间产量差异不显著。因此综合产量因素分析,这 10 个杂交种产量表现较好。

2.2 不同杂交种的产量性状表现

由表 8 的产量性状表现可知:穗长最长的是对照 CK1,为 19.44 cm;其次是隆平 14,穗长为 19.07 cm;第三是 CK2,穗长为 18.79 cm;最短的是隆平 21,穗长为 16.70 cm。穗粗在 4.62~5.48 cm 之间,隆平 21、隆平 16、隆平 13、隆平 14 的穗粗低于对照 CK1,隆平 22、隆平 18、隆平 19、隆平 17 的穗粗高于对照 CK2。秃尖长在 0~0.55 cm 之间,11 个杂交种的秃尖长都低于对照 CK1 和 CK2,其中隆平 16 和隆平 18 无秃尖长。

表 8 不同杂交种的产量性状调查表

杂交种 名称	总重 /kg	总粒重 /kg	穗数 /穗	穗长 /cm	穗粗 /cm	穗行数 /行	行粒数 /粒	秃尖长 /cm	百粒重 /g	出籽率 /%
隆平 12	12.02	10.19	46	18.19	5.25	15.33	41.13	0.38	36.19	84.75
隆平 13	10.61	8.77	47	16.88	4.80	14.93	35.40	0.38	32.53	82.65
隆平 14	13.35	11.35	53	19.07	4.90	15.40	37.20	0.37	37.58	85.06
隆平 15	13.47	10.47	53	17.26	5.16	16.13	38.97	0.23	34.50	77.68
隆平 16	13.49	11.20	59	17.84	4.74	15.93	36.87	0.00	32.21	83.00
隆平 17	13.05	10.65	51	16.82	5.48	17.80	35.70	0.31	34.53	81.66
隆平 18	13.96	12.04	56	16.98	5.38	16.20	39.53	0.00	34.06	86.25
隆平 19	14.64	11.37	54	16.71	5.43	15.27	30.97	0.47	40.59	77.69
隆平 20	11.91	10.37	57	17.29	5.18	21.40	36.77	0.20	25.00	87.07
隆平 21	12.48	10.54	65	16.70	4.62	14.73	36.63	0.34	32.07	84.46
隆平 22	13.11	10.99	50	17.82	5.35	16.33	33.33	0.40	40.03	83.83
CK1	12.55	10.67	58	19.44	4.97	15.20	41.27	0.48	33.22	85.02
CK2	11.83	10.06	45	18.79	5.28	16.33	41.00	0.55	33.89	85.06

在穗行数表现上,隆平 21 和隆平 13 低于对照 CK1,隆平 21 的穗行数最少,为 14.73 行;隆平 17 和隆平 20 的穗行数高于对照 CK2,其中隆平 20 的穗行数最多,为 21.40 行,与其他 10 个杂交种相差较明显。行粒数在 30.97~41.27 粒之间,隆平 19 的行粒数最少,为 30.97 粒;行粒数最多的是 CK1,其次是隆平 12。

百粒重在 25.00~40.59 g 之间,百粒重最小的是隆平 20,为 25.00 g,隆平 22 和隆平 19 的百粒重高于 40.00 g,其余 8 个杂交种与对照 CK1 和 CK2 相差不大。出籽率在 77.68%~87.07% 之间,与对照 CK1 和 CK2 相差不明显,且隆平 14 与对照 CK2

的出籽率相同,都为 85.06%。出籽率最高的是隆平 20,最低的是隆平 15。

2.3 不同杂交种的产量性状的方差分析

对 13 个杂交种的各个产量形状进行方差分析,得到如表 9 所示的 F 值列表,可知:在区组之间,穗粗、穗行数、百粒重表现没有显著差异,而在行粒数表现上 F 值大于 $F_{0.05}$,小于 $F_{0.01}$,说明达到了显著水平,存在显著差异。在杂交种间,穗粗、穗行数、行粒数、百粒重的表现均呈现极显著差异。

表 9 不同杂交种的产量性状的方差分析

变异来源	自由度 DF	穗粗	穗行数	行粒数	百粒重
区组间	2	1.30	0.03	4.49	0.28
品种间	12	15.66	31.14	9.98	12.67
误差	24				

注:区组间: $F_{0.05}=3.4, F_{0.01}=5.61$;品种间: $F_{0.05}=2.18, F_{0.01}=3.03$ 。

2.4 不同杂交种的植株性状表现

观察表 10 可发现,11 个参试杂交种的株高和穗位高有明显的差异。隆平 13、隆平 21、隆平 20、隆平 19 的株高比对照 CK1 和 CK2 低;隆平 22 和隆平 16 的株高介于 CK1 与 CK2 之间;而其他参试杂交种比 CK2 高,其中隆平 18 和隆平 12 的株高较高,分别达到了 303.60 cm 和 307.90 cm。在穗位高表现上,隆平 18 的穗位高也很高,为 139.50 cm;隆平 13、隆平 14、隆平 22 的穗位高比对照 CK2 和 CK1 都低,最低的是隆平 13,仅有 99.23 cm;介于 CK1 和 CK2 之间的杂交种有隆平 20、隆平 15、隆平 12,与对照 CK1 和 CK2 相差不大。

表 10 不同杂交种的植株性状调查结果

杂交种名称	株高 /cm	穗位高 /cm	穗位 系数	穗位 高标准差	穗位 高标准差位次
隆平 12	307.90	117.20	0.38	3.29	2
隆平 13	250.20	99.23	0.40	11.00	8
隆平 14	285.53	103.13	0.36	12.25	9
隆平 15	274.17	115.87	0.42	15.00	12
隆平 16	269.77	121.60	0.45	5.69	3
隆平 17	279.37	122.63	0.44	16.54	13
隆平 18	303.60	139.50	0.46	14.03	11
隆平 19	267.93	126.57	0.47	9.13	7
隆平 20	261.23	111.27	0.43	12.67	10
隆平 21	258.13	123.73	0.48	8.14	4
隆平 22	268.40	104.63	0.39	9.10	6
CK1	268.10	118.93	0.44	2.61	1
CK2	270.20	109.90	0.41	8.88	5

通过计算分析,11 个杂交种的穗位系数表现较低的是隆平 14 和隆平 12。穗位系数是由株高和穗位高两个因素决定的,穗位系数对产量性状也有一定的影响。穗位系数较低的杂交种,重心较低,植株的抗倒性会较好。由于隆平 12 的穗位系数为 0.38,穗位高标准差为 3.29,因此综合分析 11 个杂交种的植株性状表现,穗位系数较合适的杂交种是隆平 12。

另外,在穗位高标准差方面,CK1 的穗位标准差最小,为 2.61;CK2 的穗位标准差为 8.88;高于对照 CK2 的杂交种有 8 个,其中隆平 22 与隆平 19 的穗位标准差相差不大,隆平 17 的穗位标准差最大,为 16.54。由于穗位标准差是衡量植株穗位一致性的标准,因此,综合分析 11 个杂交种,穗位标准差较合适的杂交种是隆平 12、隆平 16、隆平 21,即这 3 个杂交种的穗位一致性在 11 个杂交种中较合适。

2.5 不同杂交种的抗性表现

由表 11 可知,11 个杂交种的倒伏率和倒折率都为 0,说明 11 个杂交种的抗倒性很好。在抗病性方面,CK1 对大斑病的抗性为抗水平,对纹枯病、小斑病、茎腐病、灰斑病、锈病的抗性都为高抗水平。对 11 个杂交种的抗性鉴定得出,11 个杂交种对大斑病的抗性优于对照 CK1,达到高抗水平。对小斑病、茎腐病、灰斑病、锈病的抗性均达到高抗水平,与对照 CK1、CK2 相当。隆平 15、隆平 19、隆平 21、隆平 22 对纹枯病的抗性介于高抗与抗之间,其他 7 个杂交种对纹枯病均达到高抗水平。总体来说,11 个杂交种的抗病性都达到高抗水平。

表 11 不同杂交种的抗倒性与抗病性调查结果

杂交种名称	倒伏率 /%	折断率 /%	纹枯病	大斑病	小斑病	茎腐病	灰斑病	锈病
隆平 12	0	0	0.7	1	1	1	1	1
隆平 13	0	0	0.7	1	1	1	1	1
隆平 14	0	0	0.7	1	1	1	1	1
隆平 15	0	0	2.3	1	1	1	1	1
隆平 16	0	0	1.3	1	1	1.7	1	1
隆平 17	0	0	1	1	1	1	1	1
隆平 18	0	0	0.7	1	1	1	1	1
隆平 19	0	0	2.3	1	1	1	1	1
隆平 20	0	0	1	1	1.7	1	1	1
隆平 21	0	0	1.7	1	1	1	1	1
隆平 22	0	0	1.7	1	1	1	1	1
CK1	0	0	0.3	3	1	1	1	1
CK2	0	0	0.7	1	1	1	1	1

3 总结

1)分析 11 个玉米杂交种与对照 CK1、CK2 比较得出,在产量方面,隆平 18 的产量最高,其次是 CK1,隆平 13 的产量最低,其余 9 个杂交种产量相差不大,低于 CK1 而高于 CK2,在 483.47 ~ 569.74 kg/亩之间。

2)在产量性状方面,隆平 12、隆平 14、隆平 16、隆平 18、隆平 22 的各个产量性状表现良好,出籽率较高。其中隆平 14 的穗长较长;隆平 18 和隆平 22 的穗粗较粗,穗行数也较高;隆平 12 的行粒数较多;隆平 16 和隆平 18 无秃尖,结实性好;隆平 14 和隆平 22 的百粒重较高。隆平 20 的出籽率最高,但是百粒重较低,与其他 10 个杂交种相差较大。隆平 13 的各个产量性状均较差。

3)在植株性状方面,隆平 12、隆平 14、隆平 22 的穗位系数均比 CK1、CK2 低,隆平 12、隆平 16、隆平 21 的穗位一致性较好。

4)在抗性方面,11 个杂交种抗倒性和抗病性都很好。

因此,综合评价 11 个杂交种的性状表现得出结论:隆平 18、隆平 14、隆平 12、隆平 16、隆平 22 的综合性状表现良好,建议进入下一年的生产试验和多点试验。隆平 13 的产量比对照 CK1 和 CK2 减产较明显,与其他 10 个杂交种有显著差异,产量性状和植株性状表现都较差,因此建议淘汰。

参考文献【REFERENCES】

[1] 葛凤梅. 玉米杂交新品种适应性鉴定试验研究[J]. 农业科技通讯,2013(7):62.

[2] 张元慧. 杂交玉米新品种适应性鉴定试验[J]. 农民致富之友,2015(22):158-162.

[3] 周旭梅,高旭东. 玉米杂交种鉴定试验中的灰色关联度分析及综合评价[J]. 种子世界,2012(1):35.

收稿日期:2024-01-20;修回日期:2024-03-06

作者简介:李 婷(1997-),女,贵州盘州人,助理农艺师,主要从事基层农业技术推广工作。

基于网络药理学及分子对接探究脊蛇祛湿胶囊君药金毛狗脊与乌梢蛇治疗 KOA 的作用机制*

张 翠¹, 喻 杨¹, 姚血明², 黄 聪¹, 罗进芳^{1,3}▲

(¹ 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025; ² 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵州 贵阳 550025; ³ 贵州中医药大学贵州省道地药材性效用一致性研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: **目的:**通过构建“药物-成分-疾病-靶点”的相互作用网络,探讨脊蛇祛湿胶囊中君药治疗膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的作用机制。**方法:**通过 Herb 数据库及文献报道对金毛狗脊与乌梢蛇的化合物进行筛选,接着在 PubChem 数据库中下载化合物的分子结构式,把它们导入 SwissTargetPrediction 数据库得到化合物对应靶点,在 GeneCards、OMIM 数据库得到疾病有关靶点;应用在线作图软件 Venny2.1.0 得到药物与 KOA 的交集靶点;运用 Cytoscape3.10.0 软件建立“药物-成分-交集靶点”网络图;利用 String 平台和 Cytoscape3.10.0 软件作出蛋白与蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图;在 DAVID 数据库对交互靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析;最后运用 CB-DOCK2 对主要成分和关键靶点进行分子对接。**结果:**共得到药物靶点 562 个, KOA 靶点 1244 个, 两个交互靶点 126 个;药物的主要成分是亚油酸、亚油酸甲酯、山柰酚、brachystemidines A;关键靶点是 IL-6、STAT3、CTNNA1、AKT1、MMP9;KEGG 富集分析一共得到 157 条通路,与 KOA 有关的通路是脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路、癌症通路。分子对接得出,主要成分皆能与关键靶点结合,且都有很好的结合能力。**结论:**本研究利用网络药理学方法揭示了金毛狗脊和乌梢蛇对 KOA 的多靶点、多通路治疗机制,为 KOA 临床治疗提供了理论基础。

关键词: 膝骨关节炎, 金毛狗脊, 乌梢蛇, 脊蛇祛湿胶囊, 分子对接

中图分类号:R593 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0031-07

Action mechanism of *Cibotium barometz* and *Zaocys dhumnades* in the treatment of KOA based on network pharmacology and molecular docking*

ZHANG Cui¹, YU Yang¹, YAO Xueming², HUANG Cong¹, LUO Jinfang^{1,3}▲

(¹ Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; ² Department of Rheumatism and Immunology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; ³ Guizhou Genuine Herbs Utility Consistency Research Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: By constructing the drug-component-disease-target interaction network, the action mechanism of *Cibotium barometz* and *Zaocys dhumnades* in the treatment of knee osteoarthritis (KOA) was discussed. The compounds of *Cibotium barometz* and *Zaocys dhumnades* were screened out from Herb database and literature reports. The molecular structures of the compounds were downloaded from PubChem database, and were imported into SwissTargetPrediction database to obtain the corresponding targets of the compounds. The disease-related targets were obtained in GeneCards and OMIM databases. The intersection targets of drug and KOA were obtained by using software Venny2.1.0. Cytoscape3.10.0 software was used to establish the drug-component-intersection target network. String platform and Cytoscape 3.10.0 software were used to construct the protein-protein interaction (PPI) network. GO and KEGG enrichment analysis was performed on the interactive targets in DAVID database. Finally, CB-DOCK2

was used to perform molecular docking of the main components and key targets. A total of 562 drug targets, 1244 KOA targets and 126 interactive targets were obtained. The main components of the drug were linoleic acid, linoleic acid methyl ester, kaempferol and brachy stemidines A. The key targets were IL-6, STAT3, CTNBN1, AKT1 and MMP9. A total of 157 pathways were obtained by KEGG enrichment analysis. The pathways related to KOA were lipid and atherosclerosis, AGE-RAGE signaling pathway, and cancer pathway. Molecular docking showed that the main components could bind to the key targets and had good binding ability. This study reveals the multi-target and multi-pathway treatment mechanism of *Cibotium barometz* and *Zaocys dhumnades* on KOA by using network pharmacology method, which provides a theoretical basis for the clinical treatment of KOA.

Keywords: knee osteoarthritis, *Cibotium barometz*, *Zaocys dhumnades*, Jishe Qushi Capsule, molecular docking

膝关节骨关节炎(KOA)是以关节软骨退变为特征的慢性退行性骨关节疾病。该病多见于中老年人,且妇女患病机率多于男子^[1]。KOA以膝关节痛、功能不全为特点,严重者可造成关节变形,乃至致残,不仅对病人的生活产生很大的影响,还会对其家人及社会造成很大的经济压力^[2]。近年来,随着我国人口老龄化程度的提高,其发病率也在逐年上升。目前,KOA的治疗以西药为主,大部分的NSAIDs及糖皮质激素均为首选,这些药物能够在一定程度上暂时缓解膝关节的局部症状。然而,长期使用这些药物往往会对胃肠道黏膜造成刺激,引发不良影响,部分患者不能耐受,依从性较差^[3]。KOA属于中医学“痹证”范畴^[4]。

脊蛇祛湿胶囊(Jishe Qushi capsule)是一种苗药复方药,常用于治疗KOA。该方药以金毛狗脊与乌梢蛇为君药,臣药有千年健、小花青风藤、黑骨藤,三七、姜黄都为佐药,白芍则为使药^[5]。君药中的金毛狗脊在《神农本草经》中出现最早,其性温和,味苦而甘,能补肝肾,强筋骨,舒经脉,祛湿止痛,利尿,是较为常见的一味中药,在中医临床上广泛应用,用于各种病症的治疗^[6]。乌梢蛇的主要作用是祛风、通络、止痉等。《本草纲目》中有“入脏腑、入皮、入骨搜风”的记载。用于关节肿胀畸形,屈伸困难者,效果更佳^[7]。同时在本草纲目中另载道:乌梢蛇肉,味甘平,可治疗“诸风顽痹”,其作用与白花蛇一样,但其性温和,无毒性^[8]。当前对脊蛇祛湿胶囊中的君药金狗脊与乌梢蛇抗KOA的机理仍不清楚。因此,本研究采用网络药理学方法对该胶囊中的君药进行分析,以期阐明其抗KOA的分子机理及干预靶标,为进一步的临床及基础研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 药物有效成分及对应靶点的收集

本研究综合 HERB 数据库(<http://herb.ac.cn/>)及查阅相关文献收集金毛狗脊与乌梢蛇的化学成分信息,把重复出现和结构不明的化学成分删掉。在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)搜寻有效成分对应的 SMILES 号,将获得的 SMILES 号导入 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)预测靶标,对一些找不到 SMILES 号的成分在 SwissTargetPrediction 数据库中直接画出它的结构式来进行靶点预测,导出结果并保存,将存好的结果以可能性>0 进行筛选,将得到的结果整合去重,从而获得活性成分所对应的关键靶点。

1.2 膝关节炎相关靶点的搜集和潜在治疗靶点的获取

以“keen osteoarthritis”作为关键词分别在 GeneCards(<http://www.genecards.org/>)数据库和 OMIM(<https://www.omim.org>)数据库中进行检索,把从 GeneCards 数据库中获取到的结果以 Score>1 进行筛选,把 2 个数据库得到的结果整合去重后得到最终的靶点。将 1.1 项中药物活性成分对应靶点与疾病有关靶点导入 Venny2.1.0,得到药物与疾病的共同靶点。

1.3 “药物-成分-交集靶点”网络的构建

把药物和疾病的交集靶点与所有化合物以及药物名称,上传到 Cytoscape3.10.0 软件中来构建“中药-成分-交集靶点”网络图,再利用 Cytoscape3.10.0 软件中的分析工具 Analyze Network 计算网络中各个节点之间的拓扑参数,并通过分析相关的网络参数来推测药物发挥治疗 KOA 作用的可

能成分。

1.4 蛋白互作(PPI)网络的构建

在 STRING (<https://string-db.org>) 数据库中,选择物种为“Homosapiens”,给药物和疾病的交集基因进行 PPI 网络分析,得到 PPI 网络图,并导出与此图相关的数据,运用 Cytoscape3. 10.0 软件做出清晰蛋白互作可视化图。

1.5 功能富集

把获得的共有靶点输入到 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库中,并限定物种为“Homosapiens”^[9],进行基因功能注释和功能富集分析,然后导出相关数据并借助微生信平台进行气泡图及条形图的构建。

1.6 分子对接评估

在 PPI 网络中我们选择了度数排在前五的靶蛋白,通过访问 PDB 官网 (<https://www.rcsb.org/>) 下载这些靶蛋白的三维晶体结构信息,并将文件以 pdb 格式保存下来。同时,从 PubChem 数据库下载得到小分子的三维结构数据,并以 sdf 格式保存。在 CB-DOCK2 平台 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>) 通过导入预先下载的小分子和靶蛋白进行分子对接。在此过程中,我们选取 Vina 评分最低的对接位点,作为最优的对接方式。如果亲和力得分 Affinity 小于 $-4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,这意味着该小分子能够与其靶标蛋白发生相互作用。当得分低于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,说明小分子与靶标蛋白有较好的结合能力。若得分低于 $-7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,则表示二者之间能够强烈结合。

2 结果

2.1 药物活性成分及对应靶标

运用 HERB 数据库检索及查阅相关文献得到金毛狗脊活性成分 11 个,乌梢蛇活性成分 8 个,见表 1。然后利用 PubChem 数据库获取药物活性成分对应的 SMILES 号,将获得的 SMILES 号上传至 SwissTargetPrediction 数据库来预测靶点,找不到 SMILES 号的成分在 SwissTargetPrediction 数据库中直接画出它的结构式来进行靶点预测,将得到的所

有结果以可能性>0 进行筛选,并且整合去重,从而获得活性成分所对应的关键靶点 562 个。

表 1 金毛狗脊与乌梢蛇的活性成分

药物	标记	化合物名称	中文名称
金毛狗脊	JMGJ1	protocatechuic acid	原儿茶酸
金毛狗脊	JMGJ2	Caffeic acid	咖啡酸
金毛狗脊	JMGJ3	kaempferol	山柰酚
金毛狗脊	JMGJ4	linoleic acid	亚油酸
金毛狗脊	JMGJ5	palmitic acid	棕榈酸
金毛狗脊	JMGJ6	linolenic acid methyl ester	亚油酸甲酯
金毛狗脊	JMGJ7	onitin	金粉蕨素
金毛狗脊	JMGJ8	Pterosin R	蕨素 R
金毛狗脊	JMGJ9	Isohistopterosin A	异组织蕨素 A
金毛狗脊	JMGJ10	cibotinoside	金毛狗脊皂苷
金毛狗脊	JMGJ11	n-butyl-β-D-fructopyranoside	正丁基-O-β-D-吡喃果糖苷
乌梢蛇	WSS1	4-hydroxybenzaldehyde	4-羟基苯甲醛
乌梢蛇	WSS2	beta-sitosterol	β-谷甾醇
乌梢蛇	WSS3	brachystemidines A	
乌梢蛇	WSS4	butyl isobutyl phthalate	邻苯二甲酸正丁基异丁基酯
乌梢蛇	WSS5	collagen	胶原蛋白
乌梢蛇	WSS6	dihydroferulic acid	二氢阿魏酸
乌梢蛇	WSS7	thymine	胸腺嘧啶
乌梢蛇	WSS8	adenosine	腺苷

2.2 膝骨关节炎靶点和药物的潜在治疗靶点

通过 GeneCards 和 OMIM 数据库以“keen osteoarthritis”为关键词进行检索,经过合并和去重处理,总共确定了 1244 个 KOA 疾病的靶点。采用在线软件 Venny2. 1.0 对 KOA 疾病靶点和 2.1 项中药物相应靶点取交,得到药物有效成分靶点和疾病靶点 Venn 图,见图 1。得到药物与 KOA 共同作用靶点 126 个,作为金毛狗脊与乌梢蛇对 KOA 的潜在治疗靶点。

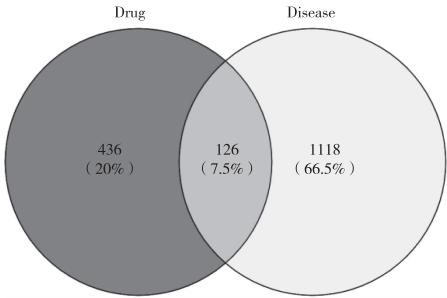
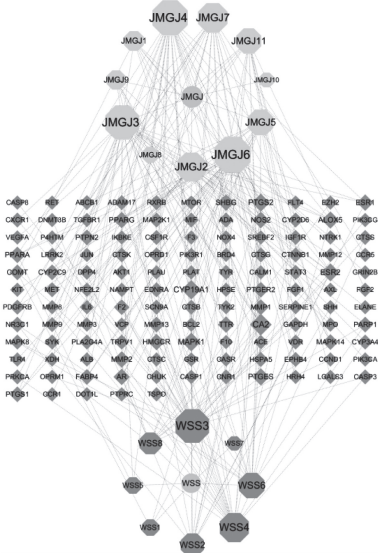


图 1 药物与 KOA 靶点基因 Venn 图

2.3 “中药-成分-交集靶点”网络

将相关数据传入 Cytoscape3. 10. 0 软件,生成“中药-成分-交集靶点”网络图,见图 2。图中共存在 147 个节点(2 个中药节点,19 个活性成分节点,126 个治疗靶点),274 条边,再基于 Cytoscape3. 10. 0 软件中的“Analyze Network”功能,并综合利用度值、接近中心和介度中心三个指标来进行分析,预测出金毛狗脊与乌梢蛇治疗 KOA 的核心成分(表 2)。



注:圆圈代表中药名称,灰色八边形代表金毛狗脊对应成分,黑色八边形代表乌梢蛇对应成分,菱形代表作用靶点。

图 2 “药物-成分-交集靶点”网络图

表 2 核心成分分析结果

排名	标记	化合物名称	度值	接近中心性	介度中心性
1	JMGJ6	亚油酸甲酯	30	0.401099	0.192663
2	JMGJ4	亚油酸	29	0.398907	0.145232
3	JMGJ3	山柰酚	27	0.396739	0.190828
4	WSS3	brachy stemidines A	27	0.392473	0.178668
5	WSS4	邻苯二甲酸正丁基异丁基酯	21	0.390208	0.149328

2.4 PPI 网络

将 126 个交集基因上传到 STRING 平台,把物种设成“Homo sapiens”,进行 PPI 网络的构建,见图 3;然后将从 PPI 网络中导出的相关数据导入 Cytoscape3. 10. 0 软件绘制出药物与 KOA 关联的蛋白交互网络图,见图 4;接着使用 Cytoscape3. 10. 0 软件

中的“Analyze Network”插件功能分析网络,并综合利用度值、接近中心和介度中心三个指标来进行分析,得出 IL-6、STAT3、CTNNB1、AKT1、MMP9 为核心靶蛋白,其具体的分析数值如表 3 所示。

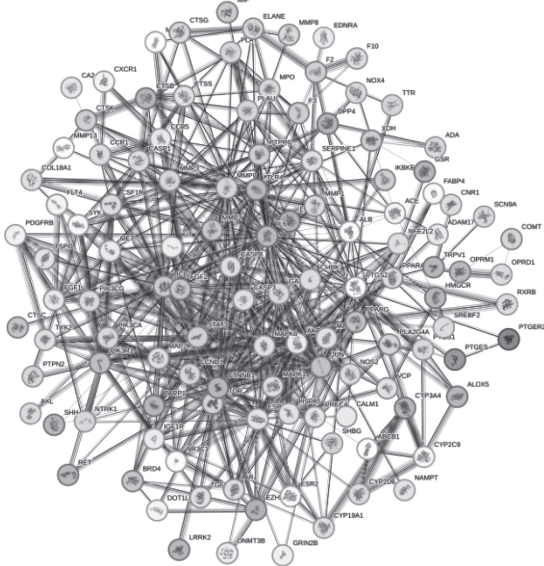
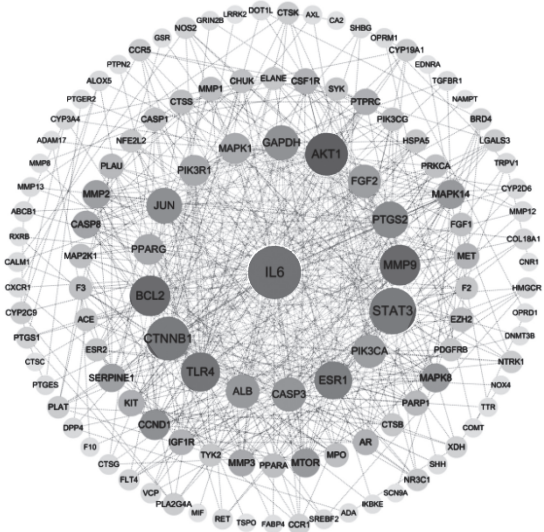


图 3 金毛狗脊乌梢蛇治疗 KOA 关键靶点蛋白相互作用网络



注:图中圆圈的大小及颜色的深浅代表 degree 值,degree 值越大代表靶基因越重要。

图 4 金毛狗脊乌梢蛇治疗 KOA 关键靶点蛋白相互作用网络分析图

表 3 核心靶点拓扑分析结果

核心靶点	基因名称	度值	接近中心性	介度中心性
IL-6	白细胞介素 6	53	0.611399	0.220141
STAT3	信号转导和转录激活因子 3	43	0.551402	0.090833
CTNNB1	连环蛋白 B1	39	0.543779	0.091895

续表 3

核心靶点	基因名称	度值	接近中心性	介度中心性
AKT1	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸	37	0.559242	0.069167
	蛋白激酶			
MMP9	基质金属蛋白酶 9	34	0.536363	0.064406

2.5 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对药物与疾病的共同靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析,GO 分析确定了生物学过程 BP (556 条)、细胞成分 CC (63 条)、分子功能 MF (106 条);根据 Count 值来进行排序,分别筛选出前十位,利用微生信平台绘制成气泡图,见图 5。GO 分析结果显示,在生物过程中,涉及蛋白水解、细胞外基质拆解、炎症应答等;在细胞组分中,细胞内膜结合的细胞器、细胞表面和细胞质位列前三;从分子功能上看,它主要与丝氨酸型内肽酶的活性,蛋白丝氨酸-苏氨酸-酪氨酸激酶的活性和内肽酶的活力有关。

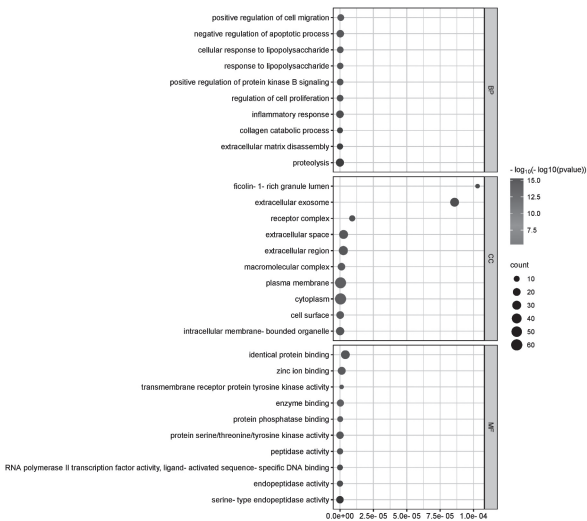


图 5 GO 功能富集分析

对这 126 个共同的靶点进行 KEGG 富集分析后,得到了 157 个通路。根据 P 值挑选了前 20 个信号通路进行了微生物组数据的可视化分析,见图 6,在这些结果中,主要涉及到脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路、癌症通路等。

2.6 分子对接结果

对金毛狗脊和乌梢蛇治疗骨关节炎 (KOA) 的主要活性成分 (亚油酸、亚油酸甲酯、山柰酚、brachy

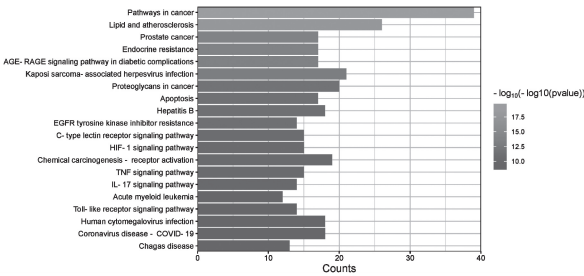


图 6 KEGG 信号通路

stemidines A、邻苯二甲酸正丁基异丁基酯) 以及 5 个核心靶蛋白 IL-6 (PDB ID: 5SFK)、STAT3 (PDB ID: 6NJS)、CTNNB1 (PDB ID: 1JDH)、AKT1 (PDB ID: 8R5K)、MMP9 (PDB ID: 4XCT) 进行了分子对接。总共得到了 25 组对接结果,结果见表 4。在这些结果当中,活性组分与靶标蛋白的作用能都低于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明活性组分与靶标蛋白具有很好的结合作用。在这些化合物中,有 8 种结合能低于 $-7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。如图 7 所示。

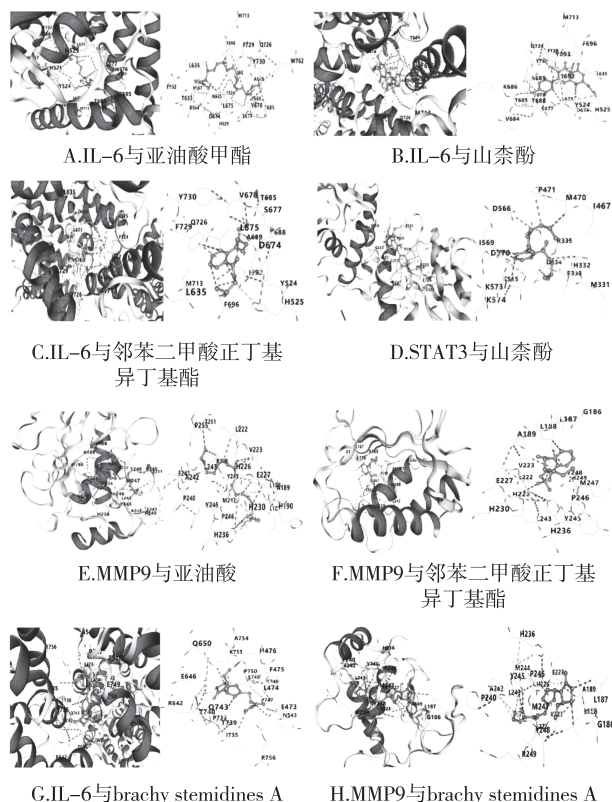
表 4 主要有效成分与关键靶蛋白间的对接情况

基因	亚油酸	亚油酸甲酯	山柰酚	brachy stemidines A	邻苯二甲酸正丁基异丁基酯
IL-6	-6.6	-7.1	-9.3	-7.6	-7.3
STAT3	-5.2	-5.3	-7.3	-6.9	-5.7
CTNNB1	-5.6	-5.9	-6.8	-6.1	-5.4
AKT1	-6.0	-6.3	-6.6	-6.9	-6.6
MMP9	-7.1	-6.9	-6.6	-8.1	-7.2

3 讨论

KOA 是一种退行性关节疾病,它给患者的生活带来重大影响。中医药因其辨证论治的诊疗特点,可在发挥药物功效的同时降低药物不良反应,在临床治疗中已得到广泛应用^[10]。但中药成分复杂,药性发挥存在多靶点多通路的特点,这影响了中药治疗 KOA 机制的研究。网络药理学将药物-基因-通路以线性关系呈现,既能促进药物有效成分的筛选,又能阐述疾病的发病机制及药物的作用机制,为中医药防治 KOA 提供科学依据。

本研究指出金毛狗脊与乌梢蛇治疗 KOA 的主要有效成分有亚油酸、亚油酸甲酯、山柰酚等。作为一种具有广泛应用前景的多不饱和脂肪酸—亚油酸,对多种慢性炎症都有影响,多种免疫细胞都能受



注:左边配体-受体的相互作用图中靶点以条带状呈现,配体以球棒状展示;右边是相互作用的模式图,配体周围是发生相互作用的靶点残基结构。

图 7 分子对接模式图

到它的调节;研究表明,亚油酸能够加速伤口愈合,并且在创面修复时炎性细胞数目下降。同时,亚油酸对炎症因子 IL-6、TNF- α 等有明显的抑制作用,从而抑制炎症因子水平^[11]。亚油酸甲酯对炎症也有一定的抑制作用,亚油酸甲酯能有效减轻完全弗氏佐剂所致大鼠慢性关节炎的炎症反应,降低其血清中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平,能够抑制 THP-1 细胞中 IL-1 β 基因的表达^[12]。山柰酚是一种存在于多植物中的黄酮类化合物,具有显著的抗炎作用^[13];山柰酚能抑制 IL-1、TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达,发挥抗炎作用。Jiang R 等人^[15]的研究表明,山柰酚预处理细胞可以阻止由 LPS 引发的促炎细胞因子的释放;山柰酚处理后 miR-146a、Decorin 表现出沉默,激活了 P13K/AKT/mTOR 信号通路,从而发挥潜在的抗骨关节炎作用。

PPI 网络分析揭示,IL-6、STAT3 和 CTNNB1 是排名前三的靶点。IL-6 是一种可溶解的炎性因子,当受到感染或受到伤害时迅速升高。IL-6 持续合成失调可能对慢性炎症产生负面影响^[16]。Wang 等

人^[17]通过构建大鼠 KOA 模型发现,降低血清中 IL-6 的水平可以抑制炎症和氧化应激反应。STAT 是存在于人体中的一类脱氧核糖核苷酸结合蛋白,共有 7 种 STATs,但 STAT3 则最为活跃,最初 STAT3 作为反应因子在 IL-6 的炎症反应中出现^[18]。Jo S 等人^[19]发现磷酸化的 STAT3 与 VEGF 结合,促进骨关节炎的发展,引发异位骨化 BMP 的产生和血管新生,使异位骨化快速发生。在骨关节炎的进程中,CTNNB1 的地位不可撼动^[20]。已有研究证实,CTNNB1 活化是 OA 发病的重要环节,可促进关节软骨细胞向终端分化,并与其活化的相关基因及基质降解有关。此外,前期研究发现,CTNNB1 通路活化可诱导软骨细胞提早分化,并最终形成骨性关节炎样的表型出现^[21]。

从通路富集结果可知,主要通路有脂质和动脉粥样硬化、AGE-RAGE 信号通路、癌症通路等。在这些通路中,脂质和动脉粥样硬化通路能够减少脂肪组织分泌的脂肪因子,可以减少血液中的致炎性因子,从而缓解 KOA 的临床症状^[22]。在 AGE-RAGE 信号通路中,RAGE 作为 AGE 的受体而存在,当二者结合发挥作用后,可激活多种因子产生炎症反应或细胞凋亡等,如 AGE 和 RAGE 的结合可激活 NF- κ B,从而促进炎症因子 IL-6 等的表达,引发炎症反应^[23-24]。另一项研究指出,随着 AGE 水平的上升,通过激活 RAGE,可能触发分解代谢途径,从而导致软骨细胞和滑膜细胞释放金属蛋白酶 BMP,促进异位骨化,进而加重 KOA^[25-26]。

综合以上结果,本次研究基于网络药理学的分析方法探讨了金毛狗脊与乌梢蛇治疗 KOA 的物质基础以及作用机制,从而表明金毛狗脊与乌梢蛇治疗 KOA 具有多种成分、多个靶点、多条通路、多种机制共同作用的特点,也为金毛狗脊与乌梢蛇临床上用于治疗 KOA 提供一定的科学参考依据。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 韦星成,农国勇,李颖,等.温针灸结合刺络拔罐疗法对膝骨性关节炎疗效及血清 IL-1 β 含量影响[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):111-115.
- [2] 刘春红,吴斌.中医治疗膝骨性关节炎的研究进展[J].风湿病与关节炎,2021,10(9):73-76.
- [3] 傅永升,谭茗月,王卫国,等.中药调控膝骨性关节炎相关信号通路的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(22):231-243.

- [4] 陈卫衡. 膝关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.
- [5] 李宇, 唐芳, 马武开, 等. 脊蛇祛湿胶囊治疗膝关节炎的临床疗效及对血清中炎症因子表达的影响[J]. 广东医学, 2019, 40(2): 234-237.
- [6] 岑村红, 何吉, 支太发, 等. 基于网络药理学探究脊蛇祛湿胶囊君药金毛狗脊治疗 RA 的作用机制[J]. 医学信息, 2023, 36(13): 1-7.
- [7] 丁久力, 郭小静, 刘维, 等. 基于络病理理论探讨虫类药物在类风湿关节炎中的应用[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(11): 1499-1504.
- [8] 岳跃兵, 沈杰, 唐小蓉, 等. 乌梢蛇祛风片治疗早期类风湿关节炎的临床观察[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2019, 21(7): 1512-1517.
- [9] 赵梦涵, 俞琦. 基于网络药理学和分子对接探讨虎杖调控铁死亡治疗动脉粥样硬化作用机制[J]. 贵州科学, 2023, 41(6): 33-39.
- [10] 尹鹏开, 侯德才. 中医治疗膝关节炎研究进展[J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(5): 55-59.
- [11] 谭建扬. 共轭亚油酸对果糖诱导代谢综合征大鼠的干预作用研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2020.
- [12] 陆彩鹏, 赵敏, 喻凯, 等. 亚油酸及亚油酸甲酯对巴豆油致小鼠耳肿胀的抑制作用[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(5): 609-610.
- [13] 贾奕奕. 山柰酚在小鼠烟曲霉菌性角膜炎中抗菌和抗炎作用的实验研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [14] 姜瀚, 陈金润, 王倩雯, 等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨参苓白术颗粒治疗特应性皮炎的作用机制[J]. 安徽中医药大学学报, 2025, 44(01): 96-102.
- [15] JIANG R, HAO P, YU G, et al. Kaempferol protects chondrogenic ATDC5 cells against inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through down-regulating miR-146a[J]. International immunopharmacology, 2019, 69: 373-381.
- [16] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2014, 6(10): a016295.
- [17] WANG S, DING P, XIA X P, et al. Bagan Rongjin decoction alleviates inflammation and oxidative stress to treat the postmenopausal knee osteoarthritis through Wnt signaling pathway[J]. Biomed eng online, 2021, 20(1): 103.
- [18] 王芳, 李峰, 徐丽婷, 等. 基于网络药理学分析黄柏-苍术药对治疗强直性脊柱炎的作用机制[J]. 中国药物与临床, 2023, 23(4): 214-219.
- [19] JO S, WON E J, KIM M J, et al. STAT3 phosphorylation inhibition for treating inflammation and new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology, 2021, 60(8): 3923-3935.
- [20] BOUAZIZ W, FUNCK-BRENTANO T, LIN H, et al. Loss of sclerostin promotes osteoarthritis in mice via β -catenin-dependent and-independent Wnt pathways[J]. Arthritis research & therapy, 2015, 17: 1-11.
- [21] 王楚瑶. miRNA-330-3p 调控 CTNFB1 在颞下颌关节骨关节炎软骨退变中的作用研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [22] 侯佳瑶, 张亚奇, 王小钢, 等. 淫羊藿与附子治疗膝关节炎的网络药理学作用机制研究[J]. 重庆医学, 2023, 52(9): 1390-1398.
- [23] 杨超茅, 杨志新, 马晓玲. AGEs-RAGE 信号通路在糖尿病肾病中的作用机制及中医药研究进展[J]. 中医学报, 2019, 34(9): 1864-1868.
- [24] XUE J F, SHI Z M, ZOU J, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis[J]. Biomed pharmacother, 2017, 89: 1252-1261.
- [25] MENDEZ M E, SEBASTIAN A, MURUGESH D K, et al. LPS-induced inflammation prior to injury exacerbates the development of post-traumatic osteoarthritis in mice[J]. J bone miner res, 2020, 35(11): 2229-2241.
- [26] TERAMACHI J, INAGAKI Y, SHINOHARA H, et al. PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo[J]. Oraldis, 2017, 23(2): 181-188.
-
- 收稿日期: 2024-04-11; 修回日期: 2024-06-18
- 基金项目: 贵州省基础研究(自然科学)项目(项目编号: 黔科合基础-ZK[2022]一般 477); 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(贵中医 TD 合字[2022]004 号); 贵州省科技计划项目(编号: 黔科合基础-ZK[2021]一般 537); 贵州省普通高等学校重点实验室(编号: 黔教合 KY 字[2017]006)。
- 作者简介: 张 翠(1997-), 女, 硕士, 研究方向: 中药抗炎免疫药理研究。
- ▲通讯作者: 罗进芳(1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药抗炎免疫药理研究。

国家Ⅱ级保护植物岩生翠柏贵州地理新分布

胡元华, 李从瑞[▲], 杨卓城

(贵州省林业科学研究院, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 岩生翠柏(*Calocedrus rupestris*)是2004年在越南发现的新种,其形态特征与翠柏接近。其亦在中国广西、贵州被发现。2021年,岩生翠柏被列为国家Ⅱ级保护植物。本文报道了岩生翠柏在贵州的一个新分布点,即平塘县塘边镇,整合分析了岩生翠柏的分布特征、保护价值并提出了保护措施,为岩生翠柏的保存、开发利用等提供了科学依据。

关键词: 柏科,翠柏属,喀斯特,贵州植被,新物种,国家重点保护野生植物

中图分类号:Q949 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0038-03

A new occurrence of *Calocedrus rupestris* in Guizhou, China

HU Yuanhua, LI Congrui[▲], YANG Zhuocheng

(Guizhou Academy of Forestry, Guiyang 550005, China)

Abstract: *Calocedrus rupestris* is a new species firstly found in Vietnam in 2004, and morphologically similar to *Calocedrus macrolepis*. It also occurs in Guangxi and Guizhou, China. It is listed as a wild plant under special state protection (category II) in China in 2021. Here, a new occurrence of *Calocedrus rupestris* is reported, viz. Tangbian Town, Pingtang County, Guizhou, China. The distribution characteristics and conservation value of *Calocedrus rupestris* are analyzed and conservation measures are proposed, providing a scientific basis for the preservation, development, and utilization of *Calocedrus rupestris*.

Keywords: Cupressaceae, *Calocedrus*, karst, flora of Guizhou, new species, wild plant under special state protection

翠柏属 *Calocedrus* Kurz 隶属于柏科 Cupressaceae, 现有被接受的物种 4 个, 即北美翠柏 *Calocedrus decurrens* (Torr.) Florin (分布在美国和墨西哥)、台湾翠柏 *Calocedrus formosana* (Florin) Florin (分布在中国台湾)、翠柏 *Calocedrus macrolepis* Kurz (分布在中国南部、中南半岛北部) 以及岩生翠柏 *Calocedrus rupestris* Aver. , T. H. Nguyễn & L. K. Phan (分布在中国、越南)^[1]。

该属由 Kurz Wilhelm Sulpiz (1834–1878) 于 1873 年建立, 模式种为翠柏^[2]。翠柏属的主要识别特征是常绿乔木, 鳞叶较大, 长 2~4 mm, 种鳞 3 对, 扁平, 木质或革质, 熟时张开, 球果仅中间 1 对种鳞有种子, 种子上部具两个不等长的翅^[3]。

本文通过野外调查, 新发现岩生翠柏在贵州的一个分布点, 整合分析了岩生翠柏的形态特性、分布特性、保护价值并提出了保护措施, 为岩生翠柏的保存、开发利用等提供了科学依据。

1 形态特征

岩生翠柏(图 1)是由 Averyanov Leonid Vladimirovich, Nguyễn Tiên Hiệp, Pham Van The 以及 Phan Kê Lôc 于 2004 年发表的新种, 其模式产地在越南 Vietnam, 北干省 Bac Kan, 那夷县 Na Ri, 21°56'44" N, 106°05'09" E, 海拔高度 650~700 m, 生于靠近山脊的针阔混交林以及山脊的针叶林中; 模式标本保

存在隶属于越南科学技术院 Vietnam Academy of Science and Technology 的标本馆(代码为 HN);形态特征简要描述:乔木,高 25 m,鳞叶两对交叉对生,长(1)2~6(7)mm,宽(0.3)0.5~2.5 mm,先端钝(非急尖,也不渐尖),球果卵圆形,长 4~6(7)mm,宽 2.5~3(4)mm,种鳞 2 对,交叉对生,下面一对种鳞可育,先端向内弯曲,圆钝(非渐尖,也没有短尖头),上面一对种鳞结合而生,不育^[4]。岩生翠柏与翠柏在形态上相近却又不同,主要差别是叶的形态和球果种鳞数量,具体形态比较见表 1^[5]。



图 1 岩生翠柏墨线图(引自:Averyanov et al. 2004)

表 1 岩生翠柏与翠柏形态差异(Averyanov et al. 2005)

形态特征	岩生翠柏	翠 柏
叶先端	钝	急尖
球果着生位置	球果直立,近无柄	球果下垂,具明显的柄,柄弯曲
球果形状和大小	阔卵形,4~6(7)×2.5~4 mm	圆柱形,7~8(12)×3.5~4(5)mm
球果柄和柄上的鳞片	长 0.5~1(1.5)mm,柄上有 6~8(12)枚覆瓦状的鳞片,鳞片先端钝。	长 3~5 mm,柄上有 16~20 枚覆瓦状的鳞片,鳞片先端急尖。
球果种鳞数量	4 枚(罕见 6 枚)	6 枚
可育种鳞先端	先端向内弯曲,圆形	先端向外弯曲,具明显的短尖头
可育种鳞内种子数量	2 枚(罕见 1 枚)	1 枚或 2 枚

2 分布特性

据现有资料显示,岩生翠柏主要分布在越南以及中国广西(环江、乐业、巴马、东兰、都安和凤山),贵州南部、西南部(荔波、平塘、望谟、罗甸)^[6-7]。由

于人类活动对石灰山地的破坏与乱砍滥发,岩生翠柏大部分适生生境遭受严重破坏^[2],种群呈零星分布且分布区萎缩,少见成片植株,加上岩生翠柏生长缓慢、繁殖率低、成活率低等特点难以自然繁衍和种群更新^[8]。在贵州喀斯特林区、石灰岩山顶、山脊、陡峭悬崖中可见,零星分布^[6],2017 年 4 月,在荔波茂兰国家级自然保护区发现岩生翠柏(图 2)。



图 2 岩生翠柏的枝叶、球果和种鳞(摄于贵州荔波)

2021 年 6 月,在贵州省平塘县发现一株岩生翠柏(图 3)。具体地点:贵州省平塘县塘边镇新风村党牙寨牛坪组,25°41'00.88"N,106°44'51.32"E,海拔高度 989 m,生长在公路边。树高约 12 m,胸径约 65 cm。当地人称其为“柏木”,据当地人讲述,附近的石灰岩山顶上还有此树。平塘可能是此树种的分布北界,该分布点岩生翠柏资源量需进一步调查。新分布记录可为分析岩生翠柏在贵州的种群大小和动态、分布面积提供依据。



图 3 岩生翠柏全株和枝叶(嵌入的小图)(摄于贵州平塘)

3 保护价值

由于岩生翠柏与翠柏形态极相似,过去对翠柏的研究中一部分岩生翠柏被误鉴定为翠柏,两者长时间被相互混淆为同一物种,直到 2010 年岩生翠柏才被报道为我国新纪录种^[8]。早在 1999 年翠柏被列为二级保护野生植物,2021 年修订后的《国家重点保护野生植物名录》新增岩生翠柏为国家二级保护野生植物^[9]。岩生翠柏的保护价值主要表现在科学研究、园林观赏、珍贵用材、药用等方面。

科学研究:翠柏属是第四纪冰川时期留下来的古老孑遗植物,对古地质、古气候及古植物演化的研究有重要科研价值。

园林观赏:岩生翠柏叶色苍翠,树形美观,木材清香,是极好的庭园观赏树种。

珍贵用材:岩生翠柏心材材质坚硬,可作建筑、板料、桥梁、家具等用材^[10]。

药用价值:经对岩生翠柏的化学成分分析表明,该种含有萜类、木脂素成分,具有抗菌、抗炎、抗氧化、细胞毒等活性^[11],具备作为药物开发的物质基础。

4 保护措施

4.1 开展就地保护

针对已发现的濒危岩生翠柏,采取相应的保护修复措施,保持和改善其生存条件,恢复岩生翠柏所在地的生态功能,同时加强周边环境保护,避免城市扩张、土地利用、项目建设等人类活动的干扰破坏。

4.2 开展相关信息系统建设

建立岩生翠柏档案数据库,如濒危程度、濒危机制、分布地点、数量、种群数量、生境特点、群落动态变化等,定期进行巡查和评估,为其保护提供科学依据^[12]。

4.3 建立岩生翠柏繁育基地

翠柏属植物主要以种子繁殖为主,人工繁殖主

要采用靠接、扦插的方法,扦插容易生根,采取异地保护可用此方法大量繁殖,扩大其种群分布及数量。

参考文献【REFERENCES】

- [1] Plants of the World Online[DB/OL]. [2022-02-09]. <http://powo.science.kew.org>.
- [2] KURZ W S. *Calocedrus macrolepis*[J]. Journal of botany, British and foreign, 1873, 11: 196.
- [3] 中国植物志编委会. 中国植物志: 第 7 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 324.
- [4] AVERYANOV L V, NGUYÊN T H, PHAM V T, et al. *Calocedrus rupestris* (Cupressaceae): a new relict conifer species from limestone areas of northern Vietnam [C]//Proceedings of the 2004 National Conference on Life Sciences. Ha Noi: Vietnam Science and Technology Publishing House, 2004: 40-44.
- [5] AVERYANOV L V, NGUYEN T H, PHAN K L. Distribution, ecology and habitats of *Calocedrus rupestris* (Cupressaceae) in Vietnam [J]. Turczaninowia, 2005, 8(4): 19-35.
- [6] 农东新, 吴望辉, 蒋日红, 等. 广西翠柏属(柏科)植物小志[J]. 广西植物, 2011, 31(2): 155-159.
- [7] 杨成华, 李鹤, 陈志萍. 10 种贵州种子植物新记录[J]. 西部林业科学, 2017, 46(1): 17-25.
- [8] 蒋裕良. 亟待保护的岩生翠柏[J]. 大自然, 2023(2): 76-80.
- [9] 中华人民共和国中央人民政府. 国家重点保护野生植物名录[EB/OL]. (2021-09-07) [2024-01-12]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content_5636409.htm.
- [10] The IUCN Red List. *Calocedrus rupestris* [EB/OL]. (2012-01-18) [2024-01-12]. <https://www.iucnredlist.org/species/133722/512509>.
- [11] 宁德生, 邹芷琪, 符毓夏, 等. 岩生翠柏枝叶化学成分的研究[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2131-2135.
- [12] 李从瑞, 李洪青, 姜霞, 等. 贵州省石阡县珍稀濒危植物资源初步研究[J]. 种子, 2017, 36(7): 60-63.

收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-01-15

作者简介: 胡元华(1973-), 男, 本科, 林业工程师, 主要从事林业资源保护及规划利用。

▲通讯作者: 李从瑞(1981-), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事植物资源开发利用研究。

一株贵州本土黑曲霉的筛选与鉴定*

夏婷婷¹, 杨仕钰^{1,2}, 张晶¹, 曹秀兰¹, 邱雪松¹, 兰立伟¹, 燕志宏^{2▲}

(¹ 贵州煜宏生物科技有限公司, 贵州 贵阳 550014; ² 贵州大学 动物科学院, 贵州 贵阳 550014)

摘要: 为筛选出一株能应用于发酵床的贵州本土黑曲霉, 试验从贵州当地种植的发霉大蒜蒜瓣中筛选分离出一株菌株, 通过对菌株形态特征和 ITS 序列进行分析鉴定, 确定其分类地位, 定性研究该菌株酶谱, 并测定相关酶活性。结果显示, 菌株与黑曲霉(*Aspergillus niger*)有高度同源性, 确定为黑曲霉, 命名为 GZUAS951015, 其内切葡聚糖酶酶活为 $538.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 36.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, α -淀粉酶酶活为 $39.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 滤纸酶酶活为 $29.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 3.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 脂肪酶酶活为 $8.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.49 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 黑曲霉, 本土微生物, 筛菌, 酶谱

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563(2025)01-0041-05

Screening and identification of an indigenous *Aspergillus niger* strain from Guizhou*

XIA Tingting¹, YANG Shiyu^{1,2}, ZHANG Jing¹, CAO Xiulan¹, QIU Xuesong¹, LAN Liwei¹, YAN Zhihong^{2▲}

(¹ Guizhou Yuhong Biotechnology Co. Ltd., Guiyang 550014, China; ² School of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550014, China)

Abstract: In order to screen out a strain of *Aspergillus niger* indigenous to Guizhou that can be applied to fermentation beds, a strain was isolated from the moldy garlic cloves grown in Guizhou, and its taxonomic status was determined by morphological characteristics and ITS sequencing. The zymogram of the strain was qualitatively studied, and the relevant enzyme activities were determined. The results showed that the strain had high degree of homology with *A. niger* and was identified as *A. niger*, named GZUAS951015. Its endoglucanase enzyme activity was $538.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 36.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, α -amylase enzyme activity was $39.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, filter-paper enzyme activity was $29.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 3.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, and lipase enzyme activity was $8.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.49 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Keywords: *Aspergillus niger*, indigenous microorganisms, screening of bacteria strain, zymogram

0 引言

随着畜牧养殖业的发展, 其大量排放的粪污也成为农业的主要污染源之一^[1]。中共中央、国务院《关于深入打好污染防治攻坚战的意见》明确提出, 到 2025 年畜禽废弃物利用率达 80%, 规模化养殖场氨总量降 5%。微生物发酵床技术利用有益功能微生物菌群, 通过其自身的生命活动将垫料、粪便合

成相关糖类、蛋白质、维生素等畜禽可利用的营养物质, 除臭, 抑制害虫、病菌, 增强畜禽抗病能力^[2]。从而构建发酵床养殖循环经济产业模式, 利用农业废弃物作为发酵床垫料, 复合发酵粪污, 形成高标准微生物有机肥, 让养殖业绿色健康可持续地发展。

目前常用于发酵床的微生物菌株有枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、黑曲霉等^[3]。黑曲霉(*Aspergillus niger*)是曲霉属中一种常见的丝状真菌, 广泛分布于世界各地的粮食、土壤及植物产品中。由于

黑曲霉不产生毒素,中国人早就利用其制作酱油^[4]、米酒等可食用产品,美国 FDA 也认证其黑曲霉为安全菌种(GRAS)之一。作为常见的工业微生物,黑曲霉也是重要的酶制剂生产菌种^[5],能产生高达 16 种酶类^[6],在畜牧发酵床中承担了十分重要的作用。然而由于贵州特殊的地貌、环境、气候,来源于日本、韩国等地的高效菌种应用效果不佳,研究表明,与外源微生物相比,本土微生物适应性更强、代谢水平更高、发酵效果更优异^[7]。因此,筛选一株本土多功能黑曲霉对于贵州发酵床技术的发展有着重要的研究意义。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌源样品

样品来源于贵州省贵阳市白云区所种植的发霉大蒜蒜瓣。

1.1.2 培养基和试剂

PDA 液体培养基:土豆(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然;

察氏培养基:蔗糖 30 g,氯化钾 0.5 g,七水合硫酸亚铁 0.1 g,七水合硫酸镁 0.5 g,磷酸氢二钾 1 g,硝酸钠 2 g,溴甲酚绿 0.05 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1000 mL;

淀粉酶定性固体培养基: α -可溶性淀粉 20 g,氯化钠 0.5 g,硝酸钾 1 g,氯化钠 0.5 g,磷酸氢二钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,硫酸亚铁 0.5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL;

油脂同化平板培养基:氯化钾 0.5 g,七水合硫酸亚铁 0.01 g,七水合硫酸镁 0.5 g,硫酸铵 2 g,磷酸二氢钾 1 g,乳化橄榄油 120 mL,0.04% 溴甲酚紫指示剂 10 mL,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 mL,pH=7.0;

纤维素酶定性固体培养基:羧甲基纤维素钠 10 g,氯化钙 0.1 g,七水合硫酸镁 0.2 g,硫酸铵 2 g,磷酸氢二钾 2 g,磷酸二氢钾 0.5 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然;

半纤维素酶定性固体培养基:木聚糖 3 g,氯化钠 0.5 g,七水合硫酸镁 0.2 g,硫酸铵 2 g,磷酸二氢钾 1 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然;

愈创木酚-PDA 培养基:愈创木酚 0.4 mL,土豆

(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然;

苯胺蓝-PDA 培养基:苯胺蓝 0.1 g,土豆(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1000 mL,pH 自然;

乳化橄榄油:2% 的聚乙烯醇溶液 75 mL,橄榄油 25 mL;

磷酸盐缓冲液的配制:磷酸二氢钾 0.68 g,0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 29.1 mL,蒸馏水 100 mL;

刚果红染色液:刚果红 1 g,蒸馏水 100 mL。

1.1.3 实验仪器

高压灭菌锅,博科 BKQ-B100II;

微生物培养箱,博科 BJPX-B100;

双人超净工作台,博科 BioBase BBS-SDC;

光学显微镜,奥林巴斯 CX43;

72 型分光光度计,上海济成分析仪器;

恒温摇床,苏州捷美 IS-RDV1;

电热恒温干燥箱,达斯卡特 DGT-G70S。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的富集培养

取大蒜蒜瓣皮置于 10 mL 生理盐水中,在振荡器上振荡 10 min,制成样品悬液,用移液枪取 100 μ L 样品悬液接入 PDA 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、160 r·min⁻¹ 摇床培养 2~3 d。

1.2.2 菌株的分离纯化

将培养好的 PDA 液体培养基进行梯度稀释,稀释倍数为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵,用移液枪吸取各梯度稀释液 100 μ L 到察氏培养基中并均匀涂布,置于培养箱中 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d。若菌落周围形成黄色变色圈,则表明该菌株可以产酸,疑似黑曲霉。将察氏培养基中菌落周围形成黄色变色圈的菌落编号,并将菌落点接入察氏培养基中,置于培养箱中 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d。重复此操作 2~3 次,直至纯化完全。将分离纯化的菌株保存于含 30% 甘油的保藏管中,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.3 显微镜观测

用接种环挑取纯化菌株的少量孢子置于载玻片上,并用乳酸酚棉兰染色液染色,放置在显微镜下观测菌株菌丝和孢子的形态,并参照《中国真菌志》和《常用与常见真菌》^[8]中的描述进行鉴定,判断是否

为黑曲霉。

1.2.4 菌株鉴定

将筛选到的疑似菌株送到北京擎科生物科技有限公司进行 DNA 提取和 ITS 区序列扩增,将得到的测定结果在 NCBI 上进行同源性对比,并构建系统发育树。

1.2.5 功能测定实验

将筛选到的菌株分别点样在 α -淀粉酶定性培养基、油脂同化平板培养基、纤维素酶定性固体培养基、半纤维素酶定性固体培养基、愈创木酚-PDA 培养基、苯胺蓝-PDA 培养基上,置于 30 ℃ 培养箱中培养 2~3 d。观察 α -淀粉酶定性培养基、油脂同化平板培养基、愈创木酚-PDA 培养基、苯胺蓝-PDA 培养基是否发生显色反应;纤维素酶定性固体培养基、半纤维素酶定性固体培养基用刚果红染色液染色 10 min, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液冲洗后观察是否有透明圈。通过游标卡尺测量培养基上的黑曲霉菌落直径 $r(d)$ 和变色圈(透明圈)的直径 $R(D)$,并记录。

1.2.6 酶活测定方法

将黑曲霉 GZUAS951015 置于 30 ℃ 摇床培养 120 h 后,离心过滤,取上清粗酶液进行 α -淀粉酶、脂肪酶、内切葡聚糖酶和滤纸酶酶活测定。 α -淀粉酶酶活、内切葡聚糖酶酶活、滤纸酶活测定方法按 DNS 显色法测定,脂肪酶酶活测定方法按氢氧化钠滴定法测定。

酶活定义:在一定条件下,每分钟水解底物生成 $1 \mu\text{g}$ 还原糖($1 \mu\text{mol}$ 脂肪酸)所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

通过 PDA 液体培养基富集培养后,根据察氏培养基的显色结果筛选出一株黑曲霉,并命名为 GZUAS951015。

2.2 菌株的鉴定

菌株 GZUAS951015 在 PDA 培养基上的菌落形态及显微镜下菌丝和孢子的形态特征见图 2。由图

2 可以看出,菌株 GZUAS951015 菌落圆形紧密,不透明,绒毛状,菌丛颜色有数环,由黑褐色到褐色再到黄色,有大量黄色、黑褐色孢子产生。在显微镜下菌丝细长透明,有分支和横隔,分生孢子的顶囊为黑褐色球状或近球状。

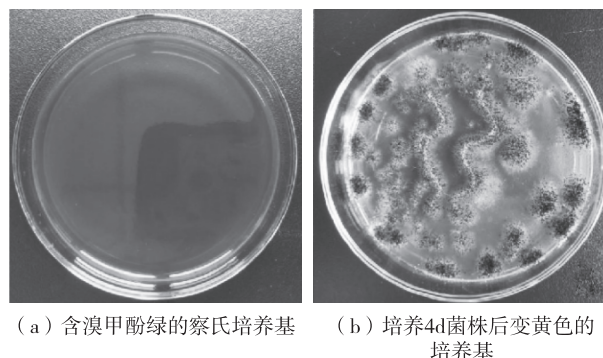


图1 菌株在溴甲酚绿的察氏培养基的生长情况

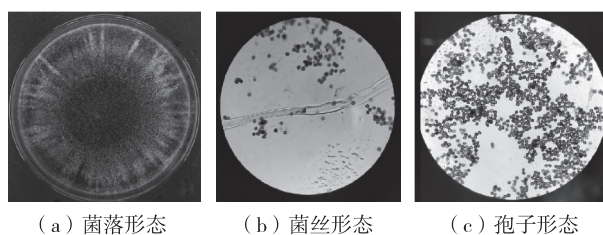


图2 菌株不同形态

对菌株 GZUAS951015 进行 DNA 提取和 ITS 测序。将所得序列在 NCBI 的数据库中进行对比,发现菌株 GZUAS951015 与黑曲霉(*Aspergillus niger*)同源性最高。并与 NCBI 数据库中匹配度较高的序列进行多序列对比构建系统发育树(图 3)。由图 3 可知,菌株 GZUAS951015 与黑曲霉(*Aspergillus niger*)亲缘关系最近,同属于一支,因此可以确定菌株 GZUAS951015 为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

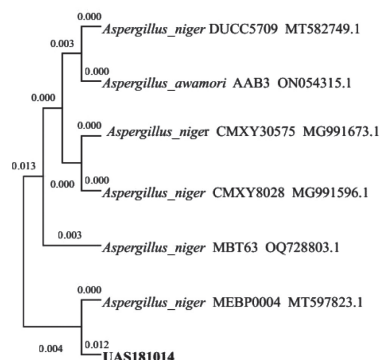


图3 根据黑曲霉 GZUAS951015 的 ITS 序列构建的发育树

2.3 黑曲霉的生长曲线

由图 4 可知,黑曲霉在 0~16 h 期间生长缓慢,16~144 h 为对数生长期,144 h 后开始趋于平稳,达到稳定生长期。

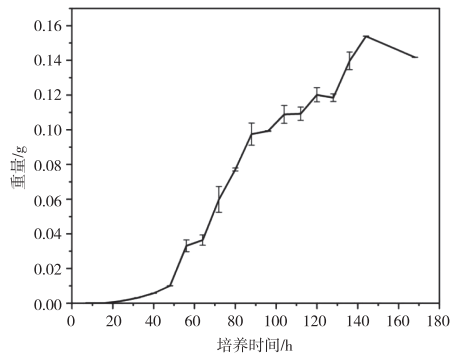


图 4 黑曲霉生长曲线

2.4 功能测定结果

α -淀粉酶定性固体培养基菌落产生透明圈,黑曲霉菌落半径 r 为 $18.83 \text{ mm} \pm 0.22 \text{ mm}$,透明圈的半径 R 为 $25.19 \text{ mm} \pm 0.23 \text{ mm}$,其比值 R/r 为 1.34 ± 0.03 。

油脂同化平板培养基菌落产生黄色的变色圈,黑曲霉菌落直径 d 为 $35.27 \text{ mm} \pm 1.89 \text{ mm}$,黄色变色圈的直径 D 为 $55.03 \text{ mm} \pm 0.21 \text{ mm}$,其比值 D/d 为 1.57 ± 0.08 。

纤维素定性固体培养基菌落产生透明圈,黑曲霉菌落半径 r 为 $15.44 \text{ mm} \pm 0.73 \text{ mm}$,透明圈的半径 R 为 $28.88 \text{ mm} \pm 1.10 \text{ mm}$,其比值 R/r 约为 1.87 ± 0.05 。

半纤维素定性固体培养基和愈创木酚-PDA 培养基无显色反应,苯胺蓝-PDA 培养基中只有菌落底部由蓝色变透明,菌落周围无显色反应。

结果表明,黑曲霉 GZUAS951015 可产 α -淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶,不能降解半纤维素和木质素。

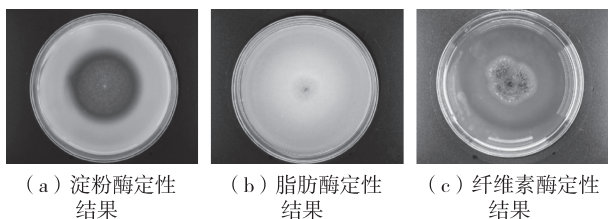


图 5 功能鉴定平板

2.5 葡萄糖标准曲线绘制

如图 6,葡萄糖标准曲线拟合方程为 $y = 0.404x + 0.0063$, $R^2 = 0.999$,符合拟合预期,曲线可用。

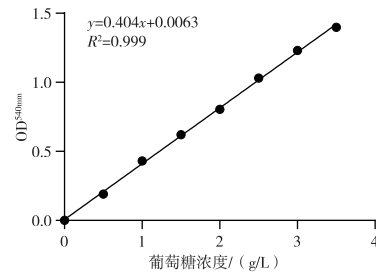


图 6 葡萄糖标准曲线

2.6 酶活测定结果

由图 7 可知,黑曲霉 GZUAS951015 的内切葡聚糖酶活最高,为 $538.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 36.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,其次是 α -淀粉酶酶活和滤纸酶酶活,分别为 $39.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $29.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 3.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低的是脂肪酶酶活,为 $8.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.49 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

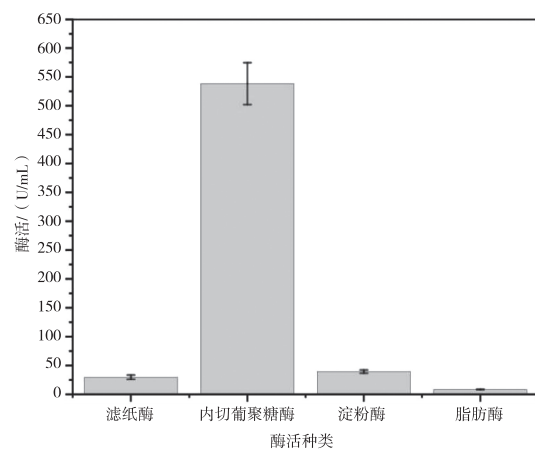


图 7 黑曲霉 GZUAS951015 4 种酶酶活情况

3 讨论

朱玉霞等^[9]人通过诱变选育筛选出一株突变菌黑曲霉 X1U4-1,在其最适发酵条件,纤维素酶活性达到 $93.80 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。田长城等^[10]将黑曲霉和芽孢杆菌纤维素发酵液混合,发现内切葡聚糖酶活性比单一黑曲霉提高 24.4%,酶活为 $273.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。马旭光等^[11]在对航空诱变的黑曲霉筛选过程中,获

得一株遗传稳定的纤维素酶高产突变株 ZM-8,其内切葡聚糖酶酶活为 $489.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。本试验筛选分离出的黑曲霉酶活达 $538.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

刘杰凤等^[12]从东海的海底泥中分出一株耐盐高产纤维素酶的黑曲霉,其滤纸酶酶活为 $0.75 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。钟苏川等^[13]从发酵的饲料中筛选出一株黑曲霉,能高效降解纤维素,其滤纸酶活性为 $15.26 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。郑渊洁等^[14]将两株黑曲霉混合发酵,优化发酵条件后滤纸酶酶活高达 $156.262 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验得到的黑曲霉 GZUAS951015 滤纸酶活为 $29.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

吴茜茜等^[15]等优化黑曲霉 PZ301 的固态发酵条件,发现酶活力为 $19.6 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。Kahalaf 等^[16]优化黑曲霉菌株 O103A 的培养基成分,以木薯为底物的培养基中, α -淀粉酶活性最高,为 $42 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验的 α -淀粉酶酶活为 $39.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

何茹等^[17]从新疆酿酒的葡萄中筛选出一株内生黑曲霉菌株 C216,其最适产酶条件下脂肪酶活力达到 $18.75 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验脂肪酶活性为 $8.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 结论

本试验从贵州本土环境中采集的大蒜中筛选分离出一株菌株,命名为 GZUAS951015,并通过对其进行 ITS 基因序列分析,以及系统发育树的构建,确定其为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)。对黑曲霉 GZUAS951015 进行 α -淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、半纤维素酶和木聚糖酶定性定量实验,测得内切葡聚糖酶酶活为 $538.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 36.4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, α -淀粉酶酶活为 $39.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 2.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 滤纸酶酶活为 $29.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 3.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 脂肪酶酶活为 $8.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 0.49 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 刘守梅. 畜牧养殖业生产对生态环境的污染及其防治[J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(2): 19-20.
- [2] 刘慧, 于颀, 崔省委, 等. 微生物发酵床技术在畜禽养殖中的应用[J]. 甘肃畜牧兽医, 2022, 52(10): 41-46.
- [3] 熊飙, 李英姣, 俸祥仁, 等. 肉牛发酵床垫料筛选的研究[J]. 畜禽业, 2023, 34(6): 1-5.

- [4] 张智宏, 陈嘉琳, 黄鑫, 等. 酱油的历史及原酿造酱油发展趋势[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 302-309.
- [5] 张熙, 韩双艳. 黑曲霉发酵产酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(1): 13-16.
- [6] 姚兵莉, 张继宁, 蓝娜娜, 等. 黑曲霉在生物质废弃物资源化中的应用[J]. 生物加工过程, 2019, 17(4): 392-401.
- [7] LIANG S, LI H, WU H, et al. Microorganisms in coastal wetland sediments: a review on microbial community structure, functional gene, and environmental potential[J]. Frontiers in microbiology, 2023, 14: 1163896.
- [8] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [9] 朱玉霞, 张铁鹰, 高爱琴, 等. 高产纤维分解酶黑曲霉诱变选育与发酵条件优化[J]. 动物营养学报, 2019, 31(3): 1396-1404.
- [10] 田长城, 许晖, 曹柯柯, 等. 黑曲霉和芽孢杆菌混合纤维素酶液的活性研究[J]. 中国饲料, 2008(9): 26-28.
- [11] 马旭光, 张宗舟, 蔺海明, 等. 黑曲霉产高酶活纤维素酶突变株 ZM-8 的筛选[J]. 饲料工业, 2006(24): 11-13.
- [12] 刘杰凤, 薛栋升, 何可可, 等. 一株耐盐纤维素酶海洋曲霉的筛选及产酶条件研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(7): 711-718.
- [13] 钟苏川, 樊振, 黄晓瑜, 等. 1 株饲用黑曲霉的分离鉴定及其纤维素酶活性检测[J]. 饲料研究, 2023, 46(16): 77-81.
- [14] 郑渊洁, 郝建宇, 侯红萍. 黑曲霉产纤维素酶混合发酵条件的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(12): 118-122.
- [15] 吴茜茜, 王红梅, 张增辉, 等. 黑曲霉耐酸性 α -淀粉酶的固态发酵条件研究[J]. 包装与食品机械, 2012, 30(3): 18-22.
- [16] KHALAF A I, ALAM Z, SALLEH H M, et al. Optimization of media composition for α -amylase production in liquid state fermentation of bitter cassava by *Aspergillus niger*[J]. Journal of pure and applied microbiology, 2014(8): 719-724.
- [17] 何茹, 刘娅, 谢晓霞, 等. 内生黑曲霉产脂肪酶条件研究及其粗酶酶学特性[J]. 中国酿造, 2014, 33(3): 52-56.

收稿日期: 2024-01-04; 修回日期: 2024-01-12

基金项目: 基于生猪粪污生物降解地方微生物资源的研究(黔科合[2023]一般 474); 农业秸秆发酵床养猪技术推广应用(黔南科合[2023]24 号)。

作者简介: 夏婷婷(1998-), 女, 本科, 研究方向: 畜牧技术研究推广。

▲通讯作者: 燕志宏(1961-), 男, 本科, 教授, 研究方向: 动物遗传育种与种质资源创新。

基于口腔溃疡用药部位的载药系统研究^{*}

——以金喉健涂膜剂为例

邵涵聪¹, 潘亚林¹, 杨 艳¹, 张艳焱^{1,2,3▲}, 徐 剑^{1,2,3}

(¹ 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; ² 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025; ³ 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: **目的:** 对口腔溃疡用药部位的载药系统进行研究, 将贵州民族药金喉健喷雾剂剂型改进为涂膜剂。**方法:** 以性状评价、成膜时间、延展性、柔韧性、黏附时间构成的综合评分为指标, 通过响应面试验优选最佳工艺, 并对最优处方进行验证及稳定性试验。**结果:** 金喉健涂膜剂的最佳工艺为 PVA 1788 17 g, 甘油 0.7 g, 乙醇浓度 65%。所制涂膜剂性状、涂展性良好, 成膜时间短, 黏附时间长。**结论:** 本研究研制的金喉健涂膜剂处方设计合理, 成膜性好, 质量稳定均一。剂型优化后更符合制剂需求, 延长药物在创面的停留时间, 增强药效, 保护创面。

关键词: 口腔溃疡, 涂膜剂, 制备工艺, 处方筛选

中图分类号: R29 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563(2025)01-0046-06

Research on drug delivery system based on drug application position of oral ulcer: a case study on Jinhoujian Coating Agent^{*}

SHAO Hancong¹, PAN Yaling¹, YANG Yan¹, ZHANG Yanyan^{1,2,3▲}, XU Jian^{1,2,3}

(¹ School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ² National Engineering Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China; ³ Guizhou Engineering Research Center of Processing and Preparation of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: We studied the drug delivery system based on the drug application position of oral ulcer, and improved the Jinhoujian Spray into a coating agent. With the comprehensive scores of trait evaluation, film-forming time, ductility, flexibility, and adhesion time as the indexes, the optimal process was determined by response surface method, and the optimal prescription was verified and tested for stability. The optimal process for the coating agent was PVA 1788 17 g, glycerol 0.7 g, and ethanol concentration 65%. The prepared coating agent had good trait and ductility, short film-forming time, and long adhesion time. The coating agent developed in this study was reasonable in prescription design, and had good film-forming property and stable and uniform quality. The optimized coating agent could better meet the demands for the drug, with prolonged adhesion time and enhanced efficacy.

Keywords: oral ulcer, coating agent, preparation process, prescription screening

口腔溃疡俗称“口疮”, 是一种常见的发生于口腔黏膜的溃疡性损伤病症, 发作时疼痛剧烈, 局部灼痛明显, 严重者还会影响饮食、说话等^[1-2]。目前, 治疗口腔溃疡的传统剂型主要有散剂、喷剂、软膏等, 使用过程中还存在以下问题: ①粘附性较差, 口

腔停留时间短^[3]; ②易被口腔唾沫稀释, 降低药物的有效浓度^[4]; ③药物易被食用, 口腔充满药物的味道; ④无法中断给药^[5-6]。

针对临床使用过程中存在的问题, 一些学者利用高分子材料的特性从制剂工艺的角度, 研制更适

合口腔粘膜使用的新剂型,如膜剂、涂膜剂。李杰^[7]等人筛选并优化成膜基质处方,将美洲大蠊提取物冻干粉与基质混合制成美洲大蠊口腔贴膜剂,所制得的涂膜剂使用便捷、药理作用明显,提高了患者用药的依从性与临床疗效。聂小雨^[1]等人,探讨柿叶黄酮膜剂与桂林西瓜霜喷剂治疗口腔溃疡的效果,发现使用柿叶黄酮膜剂的总有效率和复发率均高于使用桂林西瓜霜喷剂。因此,与传统剂型相比,膜剂、涂膜剂具有一定的优势:①直接黏附于创面,提高黏膜病损区的药物浓度,使药物作用的时间大大延长^[8-9];②保护创面,舒适、无刺激性^[10];③膜的形成促进水合作用,溶解角质,使药物透过角质缓慢释放,增强药效^[11];④可中断给药;⑤提高患者服用药物的依从性^[12]。

金喉健喷雾剂是已获批上市的贵州民族药,在长期临床应用中治疗口腔疾病疗效显著,特别是对于治疗复发性口腔溃疡具有一定的特点^[13],但在使用过程中仍存在剂型缺陷。因此,课题组结合涂膜剂的特点与优势,按照《药品注册管理办法》中改良型新药的管理要求和技术指标原则,在不改变提取工艺的条件下,按照涂膜剂的成型工艺流程开展相关研究工作,以期通过改变给药形式来提高产品使用的顺应性和疗效,丰富剂型规格,满足临床的不同需求,对同类产品的开发具有一定的指导意义。

1 材料

1.1 仪器

78-1 磁力加热搅拌器(常州澳华仪器有限公司);GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);FA2204N 电子天平(上海菁海仪器有限公司);DK-98-II 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂

聚乙烯醇(PVA)1788 型(上海易恩化学技术有限公司,批号:RH391709);艾纳香油(江西恒诚天然香料油有限公司);大果木姜子油(江西恒诚天然香料油有限公司);甘草酸单铵盐(西安瑞盈生物科技有限公司,批号:RY20221006);薄荷脑(西安瑞盈生物科技有限公司);丙三醇(上海申博化工有限公司,批号:1806101);二氧化钛(天津市科密欧化学

试剂有限公司,批号:20150404);尿素(康普汇维科技有限公司,批号:20221025);乳酸(上海贤鼎生物科技有限公司);氯化钠(西陇股份有限公司,批号:1702081);氯化钾(天津市凯通化学试剂有限公司,批号:20200920);硫酸钠(上海贤鼎生物科技有限公司);氯化铵(上海易恩化学技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 人工唾液的制备

参考文献[14],按照表1的配制比例,制备10 L 人工唾液。

表1 人工唾液的配制比例

成分	含量/(g/L)
$C_3H_6O_3$	3.0
$CO(NH_2)_2$	0.2
NaCl	4.5
KCl	0.3
Na_2SO_4	0.3
NH_4Cl	0.4

2.2 金喉健涂膜剂处方与制法

根据《药品注册管理办法》改良型新药的相关要求,不改变原处方和提取工艺。原处方与制法:艾纳香油 20 g、大果木姜子油 5 g、薄荷脑 5.75 g、甘草酸单胺盐 4.92 g、乙醇 780 mL,以上四味除甘草酸单胺盐外,其余三味加乙醇 780 mL 使其溶解,另取甘草酸单胺盐,加水适量加热使其溶解,与上述乙醇溶液合并,搅匀,加水至 1000 mL,搅拌均匀,灌装,即得。由于制法中无提取工艺,因此按原方比例,加入成型辅料,选用适当溶剂溶解,即可制得涂膜剂。

称取适量的 PVA 1788,加 60% 乙醇溶胀过夜(1 g PVA 溶胀于 3 mL 60% 乙醇),置于 70 ℃ 烘箱,加热至完全溶胀。称取处方量的 PVA 1788,按金喉健原处方加入艾纳香油、大果木姜子油、薄荷脑、甘草酸单胺盐,加入处方量的增塑剂甘油、填充剂二氧化钛,用一定浓度的乙醇定容至 20 mL,充分搅拌,即得成品。

2.3 金喉健涂膜剂的成型性评价标准

金喉健涂膜剂的成型性评价标准包括性状评价、成膜时间、延展性、柔韧性、黏附时间。

2.3.1 性状评价

通过成膜前液体分散均匀性与产生颗粒或气泡的程度、成膜后表面光滑程度与产生气泡程度进行评分。具体评价方法见表 2^[15]。

表 2 性状评价评分方法

评分	成膜前	成膜后
10	液体分散均匀,无气泡	表面光滑,无气泡产生
7	液体分散较均匀,有颗粒或气泡出现	表面较为光滑,产生 1~3 个气泡
3	液体分散较不均匀,有大量颗粒或气泡出现	表面较为粗糙,产生 4~7 个气泡
0	分散不均匀,甚至出现分层	表面很粗糙,产生大量气泡

2.3.2 成膜时间

将 0.1 g 成品均匀涂抹于 37 ℃ 的玻璃板上(直径为 1 cm),以成品表面干燥无粘腻为准,记录成膜时间。测 3 次求平均值。

2.3.3 延展性

将 0.5 g 成品涂抹于玻璃板上(直径为 2 cm),静置 2 min,加盖同样大小的玻璃板固定,上面放同一质量的重物,重压 1 min,测量直径。测 3 次求平均值。

2.3.4 柔韧性

将 0.5 g 成品涂抹于宽为 2 cm,长为 5 cm 的玻璃板上,待完全成膜后撕下。一端固定 1 cm,另一端用夹具夹住 1 cm,匀速拉伸至膜断裂,记录断裂长度,计算断裂伸长率,测 3 次取平均值^[16]。

断裂伸长率=(断裂时的长度-原始长度)/原始长度

2.3.5 黏附时间

将 0.1 g 成品涂抹于玻璃板上(直径为 1 cm),静置 2 min,放入装有 350 mL 人工唾液的烧杯中,用磁力搅拌器搅拌,至膜完全溶解,记录黏附时间。测 3 次取平均值^[7]。

2.3.6 综合评分(满分 5 分)

成膜时间(Y_2)的数值越小越好,性状评价(Y_1)、延展性(Y_3)、柔韧性(Y_3)、黏附时间(Y_4)的数值越大越好,评价指标方法不一,因此将每个指标标准化为 0~1 之间。对取值越大越好的因素和取值越小越好的因素分别进行数学转换,求 $d_{\max}$ 和 $d_{\min}$ 。

$$d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

式中, Y_i 为单列具体的指标值, $Y_{\min}$ 为单列指标值极小值, $Y_{\max}$ 为单列指标值极大值,综合评价 = $d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + d_5$ 。

2.4 响应面试验优选金喉健涂膜剂的最优处方

2.4.1 试验设计

聚乙烯醇具有良好的成膜性、流动性、附着性等性能,黏度适宜,成膜时间短,成膜后药物分布均匀并缓慢释放,有持久而显著的疗效,无毒无味,具有良好的生物相容性,对皮肤无刺激性,是涂膜剂中应用最广泛的成膜材料^[17];甘油具有较强吸湿性,易涂布于皮肤或黏膜上,使药物停留患处,具有延效的作用。除此之外,甘油可增加膜的柔韧性,是良好的增塑剂、保湿剂^[18-19];二氧化钛化学性质稳定,无毒,成本低,可作为填充剂使用;乙醇属于亲水性有机溶液,对各类化学成分的溶解度较好,且毒性较小。

经预试验初步筛选,以 PVA 1788 用量(A)、甘油用量(B)、乙醇浓度(C)为考察因素,以性状评价、成膜时间、延展性、柔韧性、黏附时间构成的综合评分为指标,确定 3 种辅料的最佳用量,优化制备工艺。因素与水平见表 3,响应面试验安排与结果见表 4。

表 3 辅料用量响应面试验因素水平表

水平	PVA 1788(A)/g	甘油(B)/g	乙醇(C)/%
-1	16	0.6	60
0	18	0.7	70
1	20	0.8	80

表 4 响应面试验安排与结果表

实验号	PVA 1788/g	甘油/g	乙醇/%	性状评价	成膜时间/s	延展性/cm	柔韧性	黏附时间/min	综合评分
1	16	0.6	70	16	14.67	4.22	2.07	51.67	3.08
2	20	0.6	70	16	2.67	3.87	1.6	63.67	2.80
3	16	0.8	70	16	22	4.28	2.2	56.33	3.16
4	20	0.8	70	12.5	3	3.78	1.74	69.7	2.16
5	16	0.7	60	15	18.67	4.28	2.12	59.33	3.08
6	20	0.7	60	13	3	3.87	1.83	80	2.94
7	16	0.7	80	14	8.33	4.17	1.97	53.67	2.74
8	20	0.7	80	12	2.33	3.73	1.5	70.67	1.67

续表 4

实验号	PVA 1788/g	甘油 /g	乙醇 /%	性状 评价	成膜时间 /s	延展性 /cm	柔韧性	黏附时间 /min	综合评分
9	18	0.6	60	15	7.67	4.17	1.97	60.67	3.27
10	18	0.8	60	14	9.33	4.17	2.03	59.33	2.97
11	18	0.6	80	12.5	3.67	3.97	1.73	59.67	2.10
12	18	0.8	80	12	3.33	4.03	1.53	61.67	1.89
13	18	0.7	70	14	7.67	4.25	2.03	65	3.40
14	18	0.7	70	14	7.33	4.22	1.97	64.33	3.26
15	18	0.7	70	14.5	7	4.22	1.83	67	3.29
16	18	0.7	70	14.5	6.33	4.28	1.7	66.67	3.24
17	18	0.7	70	14	6.33	4.28	1.8	64	3.16

2.4.2 响应面试验结果与方差分析

利用 Design Expert 10.0.1 软件,对表 3 中的结果进行回归拟合、方差分析,得到模型的二次多项回归方差为: $Y = +3.27 - 0.31A - 0.13B - 0.48C - 0.18AB - 0.23AC + 0.022BC - 0.21A^2 - 0.26B^2 - 0.45C^2$ 。各因素交互作用对金喉健涂膜剂综合评分影响的响应面图见图 1。响应面数据结果见表 5。

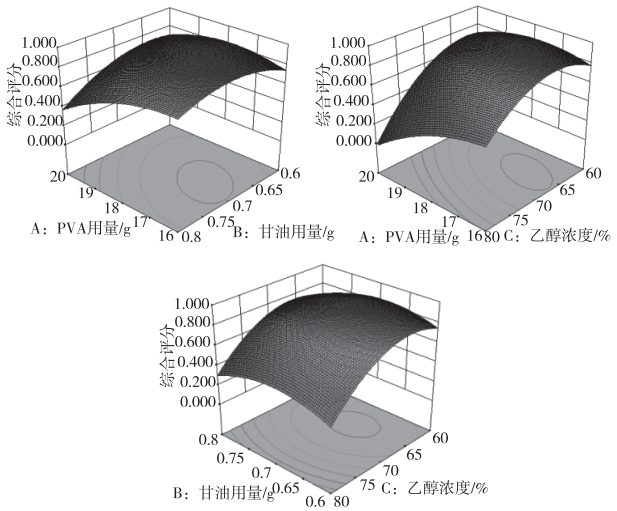


图 1 各因素交互作用对金喉健涂膜剂综合评价影响的响应面图

由图 1 得,当 PVA 1788(A)、甘油(B)和乙醇浓度(C)两两交互作用时,对金喉健涂膜剂的综合评价均有影响。响应面图坡度的陡峭程度体现了影响的显著程度,AC、BC 坡面陡峭,AB 坡面较陡峭,说明 A 与 C、B 与 C 之间具有良好的交互作用,A 与 B 之间具有较好的交互作用。

由表 5 可知,模型整体表现极显著 ($P < 0.0001$),失拟项不显著 ($P = 0.2206 > 0.05$),表明该

模型可信度高,方程拟合良好。一次项中,A、C 的偏回归系数达到极显著 ($P < 0.01$),B 的偏回归系数达到显著 ($P < 0.05$),影响因素大小为:C-乙醇浓度、A-PVA>B-甘油。二次项中,AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 的偏回归系数达到极显著 ($P < 0.01$),AB 的偏回归系数达到显著 ($P < 0.05$)。决定系数 $R^2 = 0.9824$,调整决定系数 $R^2_{adj} = 0.9597$,变异系数 CV% 为 3.83%,回归模型与实际试验拟合良好,模型的变异性低。综上所述,该回归模型可用于金喉健涂膜剂最佳制备工艺的预测筛选。

表 5 响应面数据结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	4.59	9	0.51	43.30	<0.0001	**
A-PVA	0.78	1	0.78	65.74	<0.0001	**
B-甘油	0.14	1	0.14	12.14	0.0102	*
C-乙醇	1.86	1	1.86	157.98	<0.0001	**
AB	0.13	1	0.13	10.99	0.0128	*
AC	0.22	1	0.22	18.34	0.0036	**
BC	2.025E-003	1	2.025E-003	0.17	0.6910	
A^2	0.19	1	0.19	15.75	0.0054	**
B^2	0.28	1	0.28	24.14	0.0017	**
C^2	0.86	1	0.86	73.13	<0.0001	**
残差	0.083	7	0.012			
失拟项	0.052	3	0.017	2.29	0.2206	
纯误差	0.030	4	7.600E-003			
总和	4.68	16				
相关系数			$R^2 = 0.9824$	$R^2_{adj} = 0.9597$		
CV/%			3.83			

注:“*”表示对结果的影响显著 ($P < 0.05$);“**”表示对结果的影响极显著 ($P < 0.01$)。

2.4.3 验证实验

利用 Design Expert 10.0.1 软件预测涂膜剂最佳制备工艺为:PVA 1788 17.080 g,甘油 0.688 g,乙醇浓度 65.823%,此时的综合评价达到 3.450。为方便实际操作,对其工艺稍加处理:PVA 1788 为 17 g,甘油 0.7 g,乙醇浓度 65%。按此工艺平行制备 3 份金喉健涂膜剂,按“2.3”项下的评分标准进行评分并计算综合评分,结果见表 6。

表 6 验证实验结果

实验号	性状 评价	成膜时间 /s	延展性 /cm	柔韧性	黏附时间 /min	综合评分	SD /%	RSD /%
1	15.5	9.67	4.22	1.80	68.00	3.40		
2	15.0	9.33	4.28	1.87	67.67	3.49	6.24%	1.80%
3	15.5	9.67	4.15	1.97	68.33	3.52		
平均值	15.33	9.56	4.22	1.88	68.00	3.47		

3 份金喉健涂膜剂平均性状评分为 15.33, 平均成膜时间为 9.56 s, 平均延展性为 4.22 cm, 平均柔韧性为 1.88, 平均黏附时间为 68.00 min, 平均综合评分为 3.47, *SD* 为 6.24%, *RSD* 为 1.80%。实际综合评分与预测值相差不大, 制剂组方科学合理。

2.5 稳定性试验

2.5.1 耐寒稳定性试验

取 3 批成品 1.5 mL, 加入西林瓶中并密封, 置于 -4 ℃ 的冰箱 24 h, 取出, 恢复至室温, 检查涂膜剂是否出现油水分层及颜色等外观变化^[20]。

2.5.2 耐热稳定性试验

取 3 批成品 1.5 mL, 加入西林瓶中密封, 置于 50 ℃ 的电热鼓风干燥箱 24 h, 取出, 恢复至室温, 检查涂膜剂是否出现油水分层现象及颜色等外观变化^[20]。

2.5.3 离心稳定性试验

取 3 批成品 1.5 mL, 加入离心管中, 以 3000 r/min 离心 30 min, 取出, 检查涂膜剂是否有气泡、油水分层及颜色等外观变化^[21]。

2.5.4 稳定性试验结果

经检查, 3 批金喉健涂膜剂经耐寒、耐热、离心稳定性试验后, 无分层和颜色等外观变化现象, 且无气泡产生。说明金喉健涂膜剂外观性状良好, 较为稳定。

3 讨论

本实验将金喉健喷雾剂原药与成膜材料结合制备得到金喉健涂膜剂, 以实现对口腔溃疡创面局部长效的治疗。前期考察了性状、成膜时间、延展性、柔韧性、黏附时间 5 个因素, 包含了使用前、使用时、使用后的 3 个阶段, 是实现高效、长效的主要影响因素。同时, 本文研究发现辅料用量和溶剂的浓度对涂膜剂的质量影响较大。PVA 1788 用量过少, 无法成膜且黏附时间短, 过多则粘稠度太高, 影响涂膜剂的涂展性; 甘油用量过少, 则柔韧性差易断裂, 过多则延长成膜时间; 乙醇浓度过小, 成膜时间长甚至无法溶解药液中的挥发油, 多大则性状较差, 不易涂抹。因此, 有必要对辅料及溶剂的组成比例进行优化。此外, 加入少量填充剂二氧化钛, 有利于涂膜剂

的成型, 改善性能。

综上所述, 基于对口腔溃疡用药部位的载药系统研究, 将金喉健喷雾剂改为涂膜剂是以临床需求为导向, 按照相关法规要求进行剂型改进, 延长金喉健在溃疡面的保留时间, 充分发挥药效, 缓慢释放药物, 并形成一层保护膜, 减少外界对溃疡面的刺激, 具有较好的临床应用前景和同类产品开发的指导意义。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 聂小雨, 王敏, 张宝良, 等. 柿叶黄酮膜剂与西瓜霜喷剂治疗口腔溃疡疗效对比[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(16): 88-89.
- [2] 颜璐璐. 冰穿膜剂的制备及对大鼠口腔溃疡的治疗作用[D]. 郑州: 河南大学, 2020.
- [3] 龚琴琴, 王倩, 郭玲, 等. 雷公藤红素口腔溃疡膜剂的制备及其质量初步评价[J]. 中国药房, 2020, 31(21): 2574-2578.
- [4] 黄浩天, 朱嘉贤, 谭慧琳, 等. 响应面优化复方茶多酚口腔溃疡喷膜剂制备处方[J]. 生物化工, 2023, 9(1): 35-42.
- [5] 王建滨, 关晓兵, 刘萍, 等. 金喉健喷雾剂局部治疗复发性口腔溃疡近期疗效观察[J]. 北京口腔医学, 2007(1): 42-43.
- [6] 李好, 刘金来, 李笑慧, 等. 复方奥硝唑壳聚糖口腔溃疡药膜的制备及其质量控制[J]. 中国药房, 2014, 25(17): 1595-1597.
- [7] 李杰, 陈哲杰, 石金凤, 等. 美洲大蠊口腔贴膜剂的制备及其抗口腔溃疡作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 29-36.
- [8] 邓言欢, 陈贵. 中药膜剂研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(8): 78-81.
- [9] 杨坤. 敦煌古方“治喉痹方”结合西医治疗老年口腔黏膜病的临床疗效观察[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2019.
- [10] 何群, 李湘璐, 王适, 等. 响应面设计试验法优化复方左旋肉碱涂膜剂的制剂处方[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(8): 655-660.
- [11] 金玲, 王锦玉, 仝燕, 等. 涂膜剂研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 277-280.
- [12] 王颖, 何亚楠, 车逸豪, 等. 川芎嗪涂膜剂的制备及其体外经皮渗透特性研究[J]. 中国药房, 2020, 31(2): 160-164.
- [13] 王俣瓯. 金喉健喷雾剂质量标准提升研究[D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2016.
- [14] 王珊, 安英花, 高德东, 等. 医用 TC4 钛合金在模拟人体环境中的耐腐蚀行为研究[J]. 青海大学学报, 2016, 34(5): 75-79.

基于网络药理学与体外实验探讨木犀草素治疗乳腺炎的作用机制

李月平,陈晓兰[▲],谢树才,姜林丽,谌文元

(贵州中医药大学 药学院,贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的:**基于网络药理学与体外验证实验探讨木犀草素防治乳腺炎(Mastitis)的相互作用机理。**方法:**依托 TCMSP、Swiss Target Prediction、Gene Cards 等数据库系统对木犀草素与乳腺炎相关的靶点做出预测,在 STRING 数据库系统中取两者交叉靶点构建蛋白相互作用(PPI)网络系统,并借助于 Cytoscape3.7. 软件系统开展可视化数据分析,检测出核心靶点。使用 David 数据库经过 GO 和 KEGG 富集解析,预测木犀草素防治乳腺炎的功能机理,经过分子对接技术和牛乳腺上皮细胞(BMECS)实验验证。**结果:**预测发现,有 314 个木犀草素潜在靶点和 186 个乳腺炎潜在靶点,两者有 16 个交叉靶点,涉及 ICAM1、ERBB、EGFR、ESR1、IL6、TNF 等 6 个重要核心基础靶点。根据 GO 的分析结果,涉及生物过程的有负调节的凋亡进程、正调节的 RNA 聚合酶 II 启动子转录、基因组表现的正调节等,这些都是生物过程的重要组成部分。研究表明,DNA 结合是一种特殊的分子机制,它可以影响蛋白质、酶、细胞因子、蛋白激酶、雌激素反应元件以及 RNA 聚合酶 II 转录因子等多种生物学功能,而且它们之间还可以通过配体调节 DNA 的激活序列,从而发挥出其独特的作用。细胞外空间、细胞表面、线粒体基质等涉及细胞组分。在 KEGG 途径中,主要有癌症途径、脂质及动脉粥样硬化信号途径、甲型流感途径、JAK-STAT 信号途径、PI3K-AKT 信号途径、蛋白聚糖、乳癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗药性信号途径等。分子对接结果显示,木犀草素与 ICAM1、ERBB2、EGFR、ESR1、IL6、TNF 等 6 个核心靶点均具有良好的结合活性。经过实际应用,我们发现,DMSO 的浓度为 0.5% 时,可以使细胞的生存率提升至 95.04%。相比之下,LPS 的浓度降至 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,可以使其生长受限。我们还发现,在 24 h 的情况下, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 可以有效地影响 BMEC 细胞,并使其产生更多的 TNF- α 。低、中、高剂量木犀草素分别为: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,阳性药物地塞米松浓度 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与 LPS 模型组相比,木犀草素高、中、低剂量对 TNF- α 、IL-1 β 生成均具有显著的抑制作用($P < 0.01$),且有剂量依赖性。**结论:**网络药理学结合细胞实验表明木犀草素对乳腺炎有一定的抗炎活性,该作用与其调控 JAK-STAT 信号通路密切相关。

关键词: 木犀草素,乳腺炎,网络药理学,分子对接,Janus 激酶-转录激活因子信号通路

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-6563(2025)01-0051-10

[15] 王雅蕾,郭鹏杰,王铁涵,等. 小檗木蹄口腔溃疡药膜的研制与药效学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):20-24.

[16] 刁宇,肖刚,刘玉婷. 复方丹参口溶膜剂制备工艺研究[J]. 中国处方药,2021,19(8):31-33.

[17] 于雯霞,党春蕾,何艺琳,等. 聚乙烯醇共混薄膜研究进展[J]. 中国塑料,2022,36(11):164-173.

[18] 武新亮,孙景生,白子霞,等. 除湿通络涂膜剂成膜材料工艺优选与体外透皮试验[J]. 中药材,2019,42(1):156-160.

[19] 舒洁倩,梁盈军,李子行,等. 响应面法优选山藿香涂膜剂成膜工艺条件[J]. 中医药导报,2020,26(2):13-15.

[20] 赵珂,李秀敏,张俊清,等. 黎药裸花紫珠涂膜剂制备

及质量标准研究[J]. 海南医学院学报,2020,26(21):1611-1616.

[21] 江敏瑜,闫丹,陈娇,等. 三七跌打软膏的制备及体外透皮特性研究[J]. 中草药,2017,48(22):4639-4647.

收稿日期:2023-10-22;修回日期:2023-11-21

基金项目:贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目(贵中大创合字[2022]82号)。

作者简介:邵涵聪(2002-),女,汉族,本科在读,研究方向为中药及民族药药物新制剂及新剂型。

▲通讯作者:张艳焱(1978-),女,汉族,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为中药、民族药活性成分和新药开发。

Action mechanism of luteolin in the treatment of mastitis based on network pharmacology and in vitro experiments

LI Yueping, CHEN Xiaolan[▲], XIE Shucui, JIANG Linli, CHEN Wenyuan

(School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: In this study we investigated the interaction mechanism of luteolin in the prevention and treatment of mastitis based on network pharmacology and in vitro validation experiments. The targets related to luteolin and mastitis were predicted by using TCMSP, Swiss Target Prediction, Gene Cards and other databases, and the protein interaction (PPI) network was constructed by taking the cross-targets of the two in STRING database. The visual data analysis was carried out with the help of Cytoscape 3.7. software to detect the core targets. GO and KEGG enrichment analysis were performed by using David database, and the functional mechanism of luteolin in the prevention and treatment of mastitis was predicted. The results were verified by molecular docking and bovine mammary epithelial cell (BMECS) experiment. It was predicted that there were 314 potential targets of luteolin and 186 potential targets of mastitis, and 16 cross-targets were found, involving 6 important core basic targets, including ICAM1, ERBB, EGFR, ESR1, IL6 and TNF. According to GO results, the negatively regulated apoptosis process, positively regulated RNA polymerase II promoter transcription, and positively regulated genomic expression were involved. Among the KEGG pathways, there were mainly cancer pathway, lipid and atherosclerotic signaling pathway, influenza A pathway, JAK-STAT signaling pathway, PI3K-AKT signaling pathway, proteoglycan, breast cancer, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance signaling pathway, etc. The molecular docking results showed that luteolin had good binding activity with six core targets, including ICAM1, ERBB2, EGFR, ESR1, IL6 and TNF. After practical application, we found that 0.5 % DMSO could increase the survival rate of cells to 95.04 %. In contrast, 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS could limit its growth. We also found that at 24 h, 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS could effectively affect BMEC cells and cause them to produce more TNF- α . Low-, medium-, and high-dose luteolin were 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, and 20 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the concentration of the positive drug dexamethasone was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Compared with the LPS model group, low-, medium-, and high-dose luteolin had significant inhibitory effect on TNF- α and IL-1 β production ($P < 0.01$), and the effect was dose-dependent. Network pharmacology combined with cell experiments showed that luteolin had certain anti-inflammatory activity against mastitis, and this effect was closely related to its regulation of JAK-STAT signaling pathway.

Keywords: luteolin, mastitis, network pharmacology, molecular docking, Janus kinase-activator transcription pathway

0 引言

乳腺炎是指乳腺的急性化脓性感染,是女性产褥期的常见病,最常见于哺乳妇女,尤其是初产妇。常见的主要有两种类型,一是急性单纯乳腺炎,二是急性化脓性乳腺炎,其中急性化脓性乳腺炎最为常见。乳腺出现急性化脓感染,使乳腺管内与周边结缔组织发生炎症,常伴有乳汁排泄不畅、局部结块、

红肿热痛等症状^[1]。炎症是人体对组织损伤的反应,由身体损伤、缺血性损伤(器官供血不足引起)、感染、接触毒素或其他类型的创伤引起^[2]。急性化脓性乳腺炎就是其一。目前西医临床上主要使用抗生素和切开引流治疗该疾病,但若初期大量使用抗生素,可能会导致病程迁延,切开引流存在手术创伤大、创面愈合慢及影响乳房外形等问题,易增加患者心理负担^[3]。而中医方面将内治与外治相结合,避免抗生素的大量使用^[4]。本研究结合网络药理学

是基于中医上的整体观念和辨证论治的特点,针对急性化脓性乳腺炎,初步探讨木犀草素对其的治疗效果。

木犀草素(luteolin, LUT)是一种天然的黄酮类化合物,具有抗炎、抑菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性^[5]。研究^[6-8]发现木犀草素能够抑制小鼠乳腺炎。网络药理学是从生物网络的整体角度阐释疾病机制和药物作用机制的一门新兴学科,可多靶点、多途径阐述复杂疾病的发病机制^[9]。因此,这项研究利用网络药理学和分子对接技术,对木犀草素与乳腺炎潜在靶点之间的关联进行预测,并对这些靶点和路径进行体外实验验证,为以后对木犀草素治疗乳腺炎的研究提供了新研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物

木犀草素纯化物(96% O14HS197800,源叶生物)、木犀草素对照品(批号 S08GB160295,源叶生物),地塞米松。

1.1.2 试剂

脂多糖 LPS (0000189847, SIGMA 公司);牛 TNF- α 试剂盒(202212,深圳子科生物科技有限公司);牛 IL-1 β 试剂盒(202212,深圳子科生物科技有限公司)。

1.1.3 数据库及软件

软件:网络拓扑数据分析软件 Cytoscape3.7.2。

表 1 数据库及软件

数据库	网 址
OMIM	https://www.omim.org/
TSMSP	https://old.temsp-e.com/temsp.php
Pubchem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
CheMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
Pharmmapper	https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/
SEA	https://sea.bkslab.org/
Swiss Target Prediction	http://swisstargetprediction.ch/help_mol.php
Uniprot	https://www.uniprot.org/
GeneCards	https://www.genecards.org/

续表 1

数据库	网 址
DAVID	https://david.ncicrf.gov/
Venny 2.1.0	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html
STRING	https://cn.string-db.org/
RCSB PDB	https://www.rcsb.org/
微生信	https://www.bioinformatics.com.cn/
CB-Dock	https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php

1.1.4 细胞株

牛乳腺上皮细胞(BMECS,广州吉尼欧生物)。

1.1.5 仪器

欧司朗超净工作台(SWCJ-2FD,上海博讯);恒温二氧化碳保温箱(USA3131,美国热电公司);液态氮储存罐(GBSXC47/11,美国品牌);台式低速离心机(L600,湖南湘仪实验室仪器仪表发展有限公司);智能恒温水浴锅(HH-2S,常州恩培仪器制造有限公司);IX81 倒置显微镜(Olympus)。

1.2 网络药理学

1.2.1 木犀草素靶点预测

根据木犀草素 CAS 号(491-70-3)于 PubChem 检索其 SMILES 号和 2D 结构,然后通过 TCMSP、Swiss Target Prediction、CheMBL、SEA、Pharmmapper 数据库预测相关靶点,并于 UniProt 数据库对相关靶点进行 Gene Symbol 标准化注释。对 5 个数据库的靶点数据进行汇总,去除重复的目标资料 and 无法进行注释的靶点数据。

1.2.2 乳腺炎靶点预测

在 Gene Cards 和 OMIM 数据库中搜索关键词“Mastitis”,对与乳腺炎相关的靶点进行预测。

1.2.3 蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络

利用 jvenn 平台绘制韦恩图,筛选出木犀草素、乳腺炎两者交集靶点。将交集靶点上传至 STRING 数据库中创建 PPI 网络,使用默认参数,将结果导出为 TSV 格式文件,然后在 Cytoscape3.7.2 软件中进行可视化,利用 CytoNCA 插件进行拓扑分析,对全部共有靶点的度中心性(Degree centrality, DC)、特征向量中心性(Eigenvector centrality, EC)、中介中心

性(Betweenness centrality, BC)、紧密中心性(Closeness centrality, CC)的中位值筛选出核心靶点^[10]。

1.2.4 GO 与 KEGG 富集分析

将“1.2.3”所得交集靶点导入 DAVID 数据库,并选择分析的生物体为人类(Homo Sapiens),依次进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,根据文献[11]显示,显著性富集的标准是 $P < 0.05$, P 值越小,表示显著性程度越高。并按照 P 值由小到大顺序排列后,选择前 10 位数据,利用微生信在线工具,制作 GO 功能富集柱状图和 KEGG 通路富集气泡图。

1.2.5 分子对接验证

下载用于分子对接验证的木犀草素 SDF 格式文件,数据来自 Pubchem 数据库,根据文献选择 ICAM1、ERBB2、EGFR、ESR1、IL6、TNF 等核心靶点的晶体结构^[12-16],从 RCSB PDB 数据库中下载,然后在 CB-Dock 平台上输入木犀草素和核心靶点进行对接操作,根据 VinaScore 值对木犀草素与核心靶点之间的结合力与活性进行评估。

1.3 体外验证试验

1.3.1 BMEC 细胞的复苏

将 BMEC 细胞从液氮中取出,立即转移到 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴中快速解冻,待细胞完全解冻后,置于 1000 rpm 的低温离心机中离心 5 min,迅速移至超净台中将上层冻液吸出,并加入适量的完全培养基进行重悬细胞,吹匀即可。再将细胞悬液移至 T25 培养瓶中,加入 5 mL 完全培养基,置于恒温培养箱饱和湿度条件下培养($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$)。

1.3.2 BMEC 细胞的传代

当细胞生长到 80% 以上时,可以进行细胞传代操作。抛弃原有的培养液,加入 2~3 mL PBS 缓冲液进行 2~3 次洗涤,吸出多余的 PBS 缓冲液,加入 2 mL 胰酶(含 EDTA)消化液进行消化,置于显微镜下观察细胞的消化情况。当细胞层松动时,立即吸出胰酶消化液,加入 2 mL 完全培养基,吹打细胞,当吹打分散均匀时,即为 1:2 进行传代,在培养条件下,在培养瓶中加入 5 mL 完全培养基进行培养。

1.3.3 CCK-8 法测定各处理组的细胞存活率

采集对数生长期细胞计数,加入完全培养基使细胞密度达到 3×10^6 个/mL,接于 96 个孔板上,以空白组为基础,每孔加 100 μL 完全培养基,其余各组

每孔加 100 μL 细胞悬液。并在细胞孔周围的孔洞内加入 100 μL 无菌 PBS 溶液,在培养箱内过夜培养;细胞贴壁后,按实验分组更换含有 DMSO 的 100 μL 细胞培养基,继续培养 24 h 后,弃去原有的培养基,每孔加入 10% CCK-8 基础培养基 100 μL ,继续孵育 2 h,测定 450 nm 处吸光度 OD 值,计算细胞成活率。

细胞存活率 = (加药组 OD 值 - 空白组 OD 值 / 正常组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.4 检测 TNF- α 分泌情况

采集对数生长期细胞计数,将细胞密度调整到 3×10^6 个/mL,再接种于 96 孔培养板。在空白组各孔加 100 μL 完全培养基,其他组各孔加 100 μL 细胞悬液,各孔周围加 100 μL 无菌 PBS。在培养箱中培养一夜;细胞生长贴壁后,将其替换成含有 LPS 的 100 μL 细胞完全培养基,并按实验分组持续 24 h 进行培养。然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 1000 rpm 的速度离心,将上清液清除并收集起来。置于离心机中离心 10 min 后,再根据牛 TNF- α 试剂盒中说明书进行检测。

1.3.5 ELISA 检测炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量

采集对数生长期细胞计数,加入培养液,调整细胞密度为 3×10^6 个/mL,置于培养箱内培养过夜,96 孔培养板内接种,每孔接种 100 μL 。弃去各组旧的培养基,换上各实验组所需的 100 μL 培养基,放入培养箱内孵育 24 h 后,按照 ELISA 试剂盒的操作步骤,收集细胞上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1000 rpm 离心 10 min,收集上清液去检测。

1.3.6 DMSO 用量考察

因为所用药物不能直接溶于完全培养基和 PBS 缓冲液,而 DMSO 是最常用的溶剂,但由于其有毒性,用量太大易对细胞造成损伤,所以需对 DMSO 的用量进行考察。实验分组为空白组:无细胞(仅有培养基);正常组:细胞+培养基;DMSO 组:DMSO 浓度为 0.1%、0.125%、0.25%、0.5%、1%、2%;每组做 3 个平行,重复 3 次。不同浓度的 DMSO 作用于 BMEC 细胞 24 h 后,照“1.3.3”项下测定各组细胞存活率。

1.3.7 LPS 浓度的筛选

以细胞存活率及 TNF- α 分泌量为评价指标筛选出适宜的 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型浓度。实验分组为空白组:无细胞(仅有培养基);正常细

胞组:不加 LPS;LPS 组:在细胞培养液中加入 LPS 溶液,LPS 浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;每组做 3 个平行,重复 3 次。照“1.3.3”项下测定各组细胞存活率,并按照“1.3.4”项下测定 TNF- α 分泌量。

1.3.8 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型时间的筛选

根据“1.3.7”项下确定的 LPS 造模浓度,以 TNF- α 分泌量为评价指标筛选适宜的 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型的时间。LPS 造模时间分组:0 h、6 h、12 h、24 h、48 h。每组做 3 个平行,重复 3 次。按照“1.3.4”项下测定 TNF- α 分泌量。

1.3.9 木犀草素给药浓度的筛选

实验分组为:空白组:无细胞(仅有培养基);正常组:不加 LPS 和木犀草素(细胞+单纯培养基);木犀草素组:药物浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;阳性药物地塞米松:药物浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;每组做 3 个平行,重复 3 次。按照“1.3.3”项下测定各组细胞的存活率。

1.3.10 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症因子 TNF- α 的影响

实验分组为:空白组:无需添加 LPS 和药液(细胞+培养基);LPS 模型组:细胞+每孔加入含有 LPS 的培养基;给药组:木犀草素浓度不等($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);阳性对照组:地塞米松(给予药物浓度: $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);每组并列 3 次,重复 3 次。按照“1.3.4”项下测定 TNF- α 分泌量。

1.3.11 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症因子 IL-1 β 的影响

实验分组为:空白组:无需添加 LPS 和药液(细胞+培养基);LPS 模型组:细胞+每孔加入含有 LPS 的培养基;给药组:木犀草素浓度不等($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);阳性对照组:地塞米松(给予药物浓度: $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);每组并列 3 次,重复 3 次。按照“1.3.4”项下测定 IL-1 β 分泌量。

2 结果

2.1 网络药理学预测结果

2.1.1 木犀草素靶点

通过 TCMSP、ChEMBL、SEA、Swiss Target Prediction、PharmMapper 数据库分别预测出木犀草素靶点 47、139、25、100、76 个,合并去除重复靶点后获得潜在靶点 314 个。

2.1.2 乳腺炎靶点

通过 GeneCards、OMIM 数据库分别获得 185 个、2 个乳腺炎靶点,然后对重复靶点进行合并和去除,共挖掘出 185 个潜在靶点,可能与乳腺炎有关。

2.1.3 PPI 网络

将木犀草素、乳腺炎等靶标引用至 jvenn 平台,绘制出韦恩图,其结果为 16 个相似的靶标(图 1)。随后,这些相似的靶标被引用至 STRING 数据库,从而构建出 PPI 网络的 16 个节点以及 81 条边(图 2)。通过 Cytoscape3.7.2 软件,我们可以把产生的 PPI 网络转换为图像,图像中的圆形和颜色会表明它们的靶点相关性较强(图 3)。接着,使用 CytoNCA 插件来进一步研究这些 ppi 的拓扑结构,并根据中位值(DC ≥ 11 、EC ≥ 0.27116898 、BC ≥ 3.2630955 、CC ≥ 0.7894737)来筛选出具有较强相关性的核心靶点。如表 2 所示。

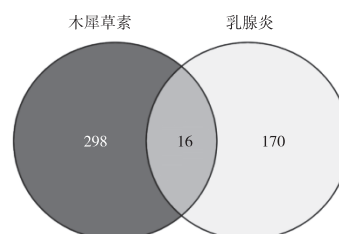


图 1 木犀草素-乳腺炎交集靶点韦恩图

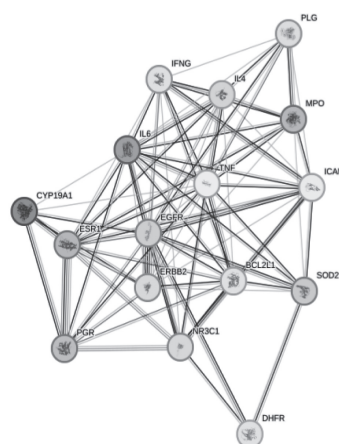


图 2 PPI 网络图

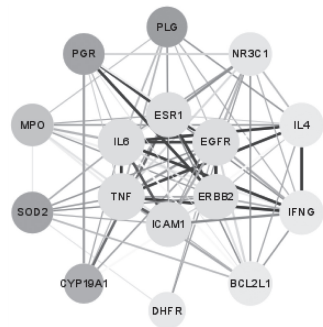


图 3 Cytoscape 转化的 PPI 网络图

表 2 核心靶点网络拓扑学参数

基因	DC	EC	BC	CC
<i>TNF</i>	14	0.31718335	9.880158	0.9375
<i>IL6</i>	14	0.31718335	9.880158	0.9375
<i>EGFR</i>	14	0.30453265	19.74127	0.9375
<i>ESR1</i>	12	0.2863057	4.818254	0.8333333
<i>ERBB2</i>	12	0.2821798	5.619841	0.8333333
<i>ICAM1</i>	12	0.287416	3.8563492	0.7894737

2.1.4 GO 与 KEGG 富集分析

我们发现了 16 个相关的靶标,并获取了 149 个 GO 的解读,以及 52 条 KEGG 信号。这些 GO 解读涵盖了 112 个重要的生理过程,包括:抑制凋亡、促进 RNA 聚合酶 II 启动的正向调节,以及促进基因表达的正向调节等。分子功能(molecular function)是一类多样的生物学过程,它们涵盖了 11 个不同的方面,例如:蛋白质的结合、酶的作用、细胞因子的激活、蛋白激酶的作用、雌激素的激发、RNA 聚合酶的作用和 DNA 的激发。研究表明,共存在 26 种不同的细胞结构,包括:外部环境、表面结构和线粒体基质等。在 52 条的 KEGG 途径中,主要有癌变途径、脂质和动脉粥样硬化信号途径、甲型流感途径、JAK-STAT 信号途径、PI3K-AKT 信号途径、蛋白聚糖、乳腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等。图 4 根据 $P<0.05$ 列出 BP、MF 前 10 个和 CC 功能的 8 个条目,KEGG 通路则列出了前 20 条通路。

2.1.5 分子对接验证

通过“2.1.3”项下筛选,我们确定了 6 个中心靶点,它们的蛋白质构成已从 RCSB 数据库中加载导出,并与木犀草素在 CB-Dock 平台上进行了分子对接。结果见表 3。通常认为,活性成分与核心靶点的结合能力较强,越适用于结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 的蛋白质配体复合物。分子对接结果显示,木犀草

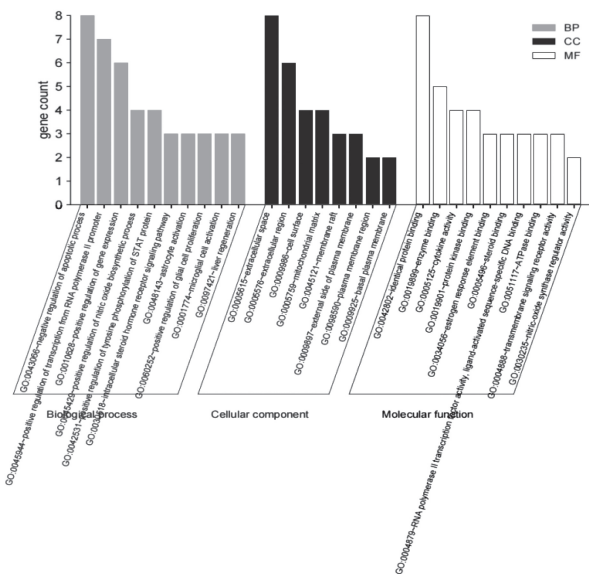


图 4 GO 分析(BP、CC、MF)

素与 6 个核心靶点的结合能量均小于 -5.0 kJ/mol,表明两者结合活性良好。分子对接的可视化图如图 5 所示。

表 3 分子对接靶点信息及结果

基因	Vina Score /(kJ/mol)	Cavity score	Center (x,y,z)	Size (x,y,z)	PDB ID
<i>ICAM1</i>	-6.0	447	-38,-37,-17	21,21,21	6S8U
<i>ERBB2</i>	-7.1	484	203,222,209	21,21,21	7MN8
<i>EGFR</i>	-7.0	1269	100,49,40	29,21,21	1IVO
<i>ESR1</i>	-6.8	648	-13,27,38	21,21,21	7UJW
<i>IL6</i>	-6.6	1240	-49,183,59	21,21,21	1P9M
<i>TNF</i>	-7.5	630	46,0,-21	21,21,30	5CIR

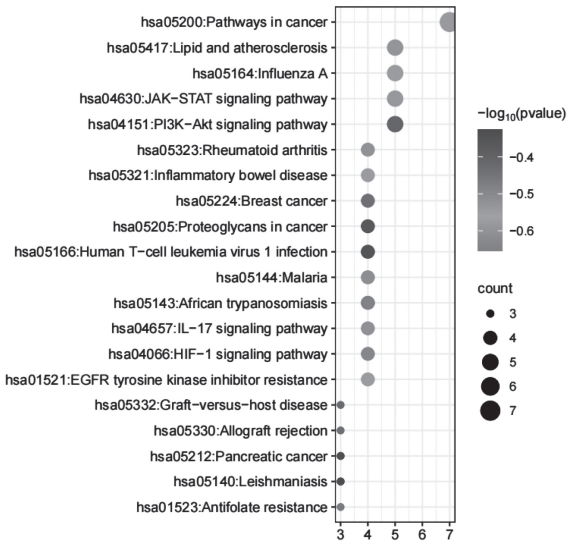


图 5 KEGG 富集分析

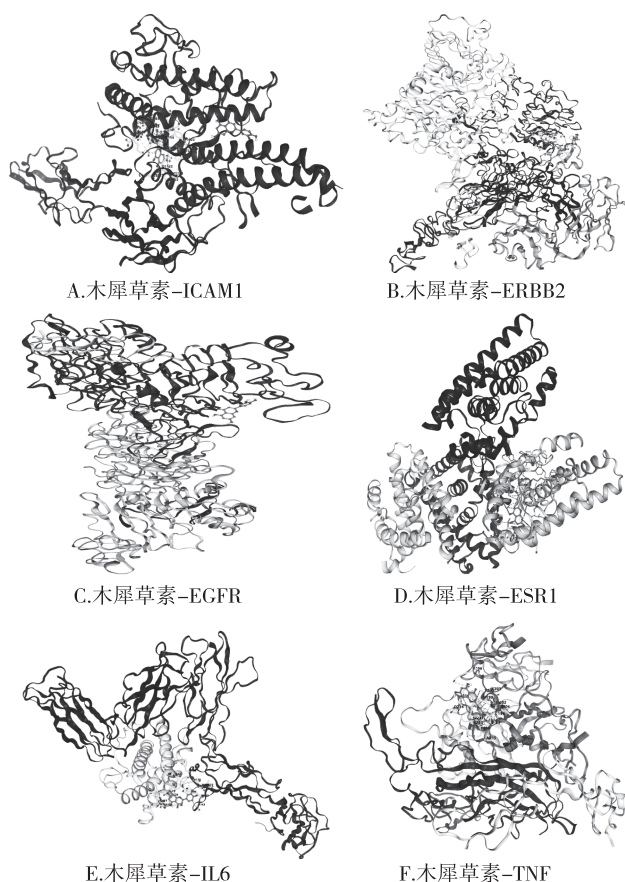
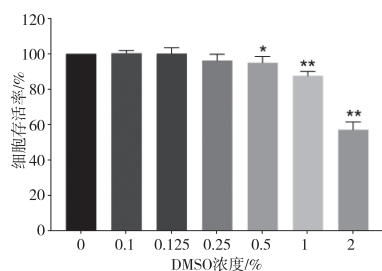


图6 木犀草素与6个核心靶点分子对接结果

2.2 体外验证实验结果

2.2.1 DMSO 用量考察

不同浓度的 DMSO 作用于 BMEC 细胞 24 h 后,按照“1.3.3”项下测定各组细胞存活率。结果如图 7 所示。



注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

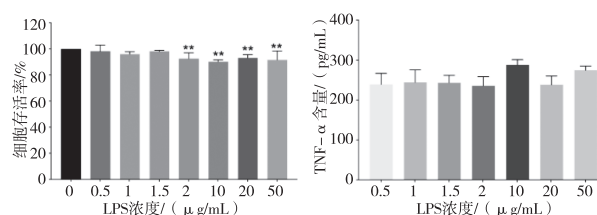
图7 不同浓度 DMSO 对 BMEC 细胞活性的影响

与空白对照组相比,DMSO 浓度为 0.5% 时,细胞的存活率为 95.04% ($P<0.05$);当 DMSO 浓度超过 1% 时,细胞存活率与对照组相比明显下降($P<$

0.01),表明 DMSO 浓度过高会对 BMEC 细胞造成危害。所以选择 DMSO 的浓度是 0.1%。

2.2.2 LPS 浓度的筛选

不同浓度的 LPS 作用于 BMEC 细胞 24 h 后,LPS 的浓度大于 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率显著降低;当 LPS 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞存活率最低。且在此浓度下分泌的 TNF- α 的量最多,因只是简单说明在此浓度下炎症因子的分泌量,这块并未设置对照组, $P>0.05$,所以不具有统计学意义。因此,综合考虑选择 LPS 造模浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果如图 8 所示。



(a) 不同浓度 LPS 刺激下 BMEC 细胞存活率 (b) 不同浓度 LPS 刺激细胞分泌 TNF- α 的含量

注:与空白对照组相比,** $P<0.01$ 。

图8 LPS 浓度筛选图

2.2.3 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型时间的筛选

以 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 作用于 BMEC 细胞不同时间,LPS 作用 24 h 时 TNF- α 分泌量最多,因只是说明在此造模时间下,炎症因子的分泌量,并未设置对照组, $P>0.05$,因此不具有统计学意义。最终选择 LPS 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用于细胞 24 h。结果如图 9 所示。

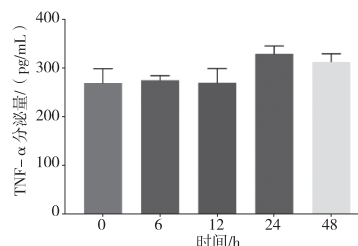
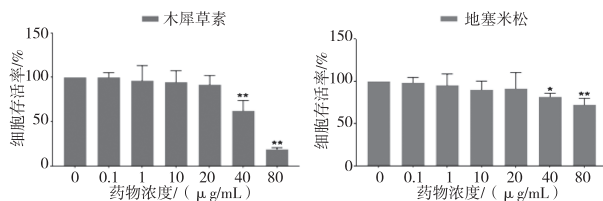


图9 LPS 不同作用时间 BMEC 细胞分泌 TNF- α 的含量

2.2.4 木犀草素给药浓度的筛选

不同药物浓度的木犀草素作用于 BMEC 细胞 24 h 后,结果如图 10 所示。

木犀草素在 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的剂量下,对细胞没有显著毒性;然而,当木犀草素的剂量升至 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其细胞存活率达到 62.39% ($P<0.01$),



注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

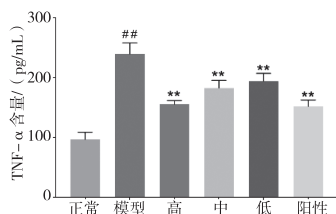
图 10 各药物对 BMEC 细胞存活率的影响

而当剂量升至 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其细胞存活率则降至 18.91% ($P<0.01$),与空白组相比有显著性差异。阳性药物地塞米松浓度在 $0.1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,对细胞活性无明显影响。

因此,选择 3 种浓度不同的木犀草素进行细胞实验,分别是低剂量 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中剂量 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和高剂量 ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),其中地塞米松的浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.5 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症因子 TNF- α 的影响

按照“1.3.4”项下测定 TNF- α 分泌量。结果如图 11 所示。



注:与空白对照组相比,## $P<0.01$,与模型组相比,** $P<0.01$ 。

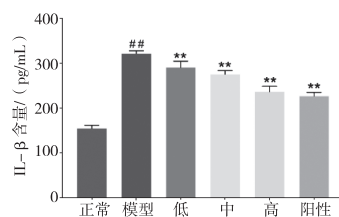
图 11 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞生成 TNF- α 的影响

与空白组比较,LPS 模型组释放的 TNF- α ($P<0.01$) 含量显著提高,表明造模成功。与 LPS 模型组相比,在存在剂量依赖性的同时,高、中、低剂量的木犀草素对 TNF- α 的生成有显著的抑制作用 ($P<0.01$)。

2.2.6 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症因子 IL-1 β 的影响

按照“1.3.5”项下检测 IL-1 β 含量。结果如图 12 所示。

与空白组比较,LPS 模型组释放出 IL-1 β ($P<0.01$) 含量显著增加,表明造模成功。高、中、低剂量的木犀草素对 IL-1 β 生成的抑制作用 ($P<0.01$) 与 LPS 模型组相比十分显著,且对剂量有一定的依赖性。



注:与空白对照组相比,## $P<0.01$,与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图 12 木犀草素对 LPS 诱导 BMEC 细胞生成 IL-1 β 的影响

3 结论与讨论

急性化脓性乳腺炎(乳痈)作为哺乳期妇女的多发病和常见病,它会引起乳房剧烈的疼痛、局部的灼热感以及红肿,甚至会使得乳汁分泌减少,从而给哺乳期妇女带来巨大的负担,并且会给孩子的成长及发育带来不利的后果。其发病机制错综复杂。研究证实,乳腺炎的发生与乳汁淤积和细菌入侵等密切相关^[17]。查阅文献资料发现,并未发现有木犀草素对治疗乳腺炎的作用机制研究。

该研究通过网络药理学分析,共筛选出 ICAM1、ERBB2、EGFR、ESR1、IL6、TNF 等 6 个核心蛋白靶点。相关研究表明,ICAM1 为细胞间黏附分子-1,可溶于血液中,在脂多糖的诱导下,其可呈现出高表达,它具有强大的促炎作用^[18]。ERBB2 为酪氨酸激酶受体 2,为表皮生长因子受体 EGFR 的家族成员之一,酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2) 则可促进肿瘤细胞的发育及增殖^[19]。EGFR 是表皮生长因子受体 (HER) 家族的成员。EGFR 的二聚化启动了它的细胞内激酶通路,调控下游信号通路磷酸化主要有 MAPK、Akt、JNK 通路,不仅能发挥其免疫功能,还能引起乳腺上皮细胞增殖,增加炎症修复因子的表达^[20]。TNF(肿瘤坏死因子)主要由活化的巨噬细胞组成,NK 细胞和 T 淋巴细胞生成。它参与了多种肿瘤发生和发展过程。TNF- α 与结核分枝杆菌的感染进程及疾病的发生发展有关,高水平 TNF- α 对肉芽肿感染及患者发展均有潜在促进作用^[21]。TNF- α 对免疫细胞发育,稳态具有调控作用、启动控制炎症反应^[22],还可以促进炎症和自身免疫性疾病的发生。IL-6 亦称 B 细胞刺激因子-2 或 B 细胞分化因子,是由 Th2 细胞所分泌的,是一种具有广泛生物学活性的多功能的细胞因子,同时 IL-6 能促进 CRP 生成^[23],IL-6 亦称 B 细胞刺激因

子-2 或 B 细胞分化因子,是由 Th2 细胞所分泌的,是一种具有广泛生物学活性的多功能的细胞因子,同时 IL-6 能促进 CRP 生成^[24]。以上提示木犀草素可能通过调节多个靶点,抑制炎症的发生。

本研究对网络药理学筛出的核心靶点进行分子对接验证,发现木犀草素与 6 个核心靶点的对接结合能量均小于 0,表明配体与受体可自发结合。能量越低结合能力越强^[25-26],表 3 中结合能量均小于 -5 kJ/MOL,并形成氢键,这表明它与相应的化学物质具有良好的结合活性,从而提供了可靠的交互作用。因此,我们推断木犀草素可能具有治疗乳腺炎的疗效。

为了阐明木犀草素与核心靶点的相关性,本研究进一步进行了功能富集分析。经 GO 富集分析证实,木犀草素对乳腺炎的治疗作用受到多种生理机制的影响,包括:细胞凋亡的抑制作用、RNA 聚合酶 II 启动子的激活作用以及基因表达的促进作用。根据网络药理学 KEGG 结果显示,木犀草素治疗乳腺炎的主要作用路径包括癌症路径、脂质及动脉粥样硬化信号路径、甲型流感路径、JAK-STAT 信号路径等。JAK 和 STAT 是 IL-6(GP130)受体家族中涉及的许多调控细胞生长、分化、存活和抗病原体信号传导途径的重要组成部分。B 细胞的分化可以被调节,这有助于促进浆细胞的生成,并且能够调节急性炎症反应。有助于调节 IL-6 结合在激活与自身磷酸化的同时,使受体发生二聚化,从而激活与自身结合的 JAK 蛋白。通过 JAK-STAT 途径,我们能够调节细胞因子的功能,从而使 IL-6 成为一种有效的抗病毒和抗增殖剂。此外,IL-1 β 也参与调节 IL-6 和 TNF- α ,并促进血管黏附分子 ICAM1 的活性。IL-1 β 被认为是典型常见的多功能细胞因子,由此本研究选择了 IL-1 β 和 TNF- α 两种细胞因子进行验证。

进行体外细胞实验,是进一步验证网络药理学靶点预测的重要方向。作为大肠杆菌细胞壁的重要组成部分,LPS 是内毒素中较为经典的一种。当 LPS 进入宿主生物体时,它会刺激效应细胞产生多种细胞因子,例如 TNF- α 和 IL-1 β ^[27]。此前,已有研究^[28-29]利用 LPS 诱导牛乳腺上皮细胞和小鼠乳腺上皮细胞,成功建立乳腺炎模型。经过实验,我们发现,当 LPS 的浓度超过 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对 BMEC 细胞的影响会显著减弱。特别是当浓度达到 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,这种影响会变得更加明显,并且在这

个浓度下,TNF- α 的分泌量也会增加。经过多次研究,我们最终决定采用 LPS 造模浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以便更好地评估木犀草素对 TNF- α 和 IL- β 的抑制效果。结果表明,不论是高、中、低剂量,木犀草素均能够显著降低这些物质的产生($P < 0.01$),且剂量之间存在一定的相关性。进一步验证了对 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症因子有一定作用的是木犀草素。

综上所述,我们基于网络药理学与细胞实验相结合的方法,研究了木犀草素治疗乳腺炎的机理。研究表明,通过 JAK-STAT 信号途径,木犀草素能调节 B 细胞分化,促使浆细胞生成,并控制急性反应,对抑制乳腺炎可能有一定帮助。木犀草素是治疗乳腺炎必不可少的重要物质基础之一。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 刘佳丽. 理气清热通乳汤治疗急性乳腺炎的疗效观察[J]. 中医临床研究, 2020, 12(11): 114-116.
- [2] SINGH N, BABY D, RAJGURU J P, et al. Inflammation and cancer[J]. Annals of African medicine, 2019, 18(3): 121-126.
- [3] 王蓉, 张馨月, 李思雨, 等. 薛晓红教授治疗急性乳腺炎经验[J]. 山西中医药大学学报, 2022, 23(6): 574-577.
- [4] 胡慧文, 韩钦瑜, 任传鑫, 等. 中医药治疗急性乳腺炎的研究进展[J]. 中国中医急症, 2023, 32(12): 2237-2240.
- [5] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素的药理活性及其制剂研究进展[J]. 中医临床研究, 2022, 14(10): 141-145.
- [6] 牟瑞营, 马国成, 郭光礼, 等. 木犀草素对 LPS 诱导的小鼠乳腺炎保护作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(3): 181-184.
- [7] 郭赢芳. 木犀草素通过阻断 NF- κ B 和 MAPK 活化抑制奶牛乳腺炎的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [8] GUO Y, XU N, SUN W, et al. Luteolin reduces inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis by inhibiting NF- κ B activation and MMPs expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 28481.
- [9] 涂亮星, 杨如月, 刘佳丽, 等. 不同剂量木犀草素在大鼠体内药动学的比较[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3753-3757.
- [10] 王丹, 王肖龙. 基于网络药理学、分子对接与实验验证揭示薯蓣皂苷元治疗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中草药, 2022, 53(24): 7783-7794.
- [11] 吴婉婉, 魏科东, 丁芮, 等. 基于网络药理学与体外实验探讨茯苓酸治疗心肌纤维化的作用机制[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(10): 747-761.

- [12] YANG L, XU H, CHEN Y, et al. Melatonin: multi-target mechanism against diminished ovarian reserve based on network pharmacology[J]. *Frontiers in endocrinology*, 2021, 12: 630504.
- [13] XIANG C, LIAO Y, CHEN Z, et al. Network pharmacology and molecular docking to elucidate the potential mechanism of *offligusticum chuanxiong* against osteoarthritis[J]. *Frontiers in pharmacology*, 2022, 13: 854215.
- [14] ROSETTE C, ROTH R B, OETH P, et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(5): 943–950.
- [15] MA Y, REN Y, DAI Z J, et al. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients[J]. *Advances in clinical and experimental medicine*, 2017, 26(3): 421–426.
- [16] ALOKAIL M S, AL-DAGHRI N M, MOHAMMED A K, et al. Increased TNF α , IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from breast cancer patients[J]. *Medical oncology*, 2014, 31: 1–6.
- [17] 章玉丹, 刘蓉. 逍遥散加味治疗哺乳期急性乳腺炎 39 例[J]. *中国中医药科技*, 2024, 31(3): 547–549.
- [18] 龚英峰. 感染性肺炎新生儿血清 sICAM1、sTREM-1 变化及与免疫和炎症反应的相关性研究[J]. *昆明医科大学学报*, 2020, 41(3): 121–127.
- [19] 申越, 贺丽, 李华, 等. 2-脱氧葡萄糖对乳腺癌 MCF7/ErbB2 细胞增殖迁移和侵袭的影响[J]. *西部医学*, 2018, 30(11): 1564–1569.
- [20] 廖明霞. 基于数据挖掘和网络药理学探讨浆细胞性乳腺炎中医治疗处方用药规律[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023.
- [21] TOBIN D M, VARY J C, RAY J P, et al. The *lta4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans[J]. *Cell*, 2010, 140(5): 717–730.
- [22] WALSH M C, LEE J E, CHOI Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system[J]. *Immunological reviews*, 2015, 266(1): 72–92.
- [23] TAKA Č B, MIHALJEVIĆ S, ŠTEFANIĆ M, et al. Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Collegium antropologicum*, 2014, 38(2): 659–664.
- [24] 赵慧朵, 程旭峰, 郭迎树. 活血解毒丸对急性乳腺炎患者炎症细胞因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 163–166.
- [25] 赖思佳, 王达洋, 李天力, 等. 基于分子对接和网络药理学的五指毛桃一贯叶金丝桃治疗微血管性心绞痛的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(24): 6474–6483.
- [26] 黄明月, 王真真, 龙江兰, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨金芪二甲双胍保护胰岛 β 细胞的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20): 5341–5350.
- [27] SUN W J, WU E Y, ZHANG G Y, et al. Total flavonoids of *Abrus cantoniensis* inhibit CD14/TLR4/NF- κ B/MAPK pathway expression and improve gut microbiota disorders to reduce lipopolysaccharide-induced mastitis in mice[J]. *Frontiers in microbiology*, 2022, 13: 985529.
- [28] CHE H Y, ZHOU C H, LYU C C, et al. Allicin alleviated LPS-induced mastitis via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in bovine mammary epithelial cells[J]. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(4): 3805.
- [29] KAN X, HU G, HUANG B, et al. Pedunculoside protects against LPS-induced mastitis in mice by inhibiting inflammation and maintaining the integrity of blood-milk barrier[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(15): 19460.

收稿日期: 2024-05-08; 修回日期: 2024-06-26

作者简介: 李月平(1999-), 女, 贵州中医药大学 2023 级研究生, 研究方向: 中药及民族药新剂型与新制剂。

▲通讯作者: 陈晓兰(1976-), 女, 贵州中医药大学教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药及民族药新剂型与新制剂。

新工艺炮制黄精调血脂、预防动脉粥样硬化的作用研究*

代欣,袁荣献[▲],封帆,刘廷江,陈礼大,杨仁惠

(贵州中医药大学第二附属医院,贵州 贵阳 550003)

摘要: **目的:**探讨新工艺炮制黄精调血脂、预防动脉粥样硬化的作用。**方法:**取 SD 雄性大鼠,随机分成 5 组,即空白对照组、模型组、阿托伐他汀钙组(0.0009 g/kg)、新工艺炮制黄精组(1.35 g/kg)、旧黄精组(1.35 g/kg),每组 10 只大鼠。除空白对照组外,其余各组大鼠均灌胃高脂乳剂造模,连续 4 周。造模 1 周后,开始灌胃给药,连续 3 周,空白对照组、模型组灌胃等容量蒸馏水。给药结束,腹主动脉采血,检测血脂四项,并计算动脉粥样硬化指数和肝脏指数,HE 染色观察肝组织病理变化。**结果:**与空白对照组比较,模型组大鼠的体重明显减轻,动脉粥样硬化指数、肝脏指数显著升高,血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)明显增加,高密度脂蛋白胆固醇(HDL)显著降低($p<0.05$, $p<0.01$);大鼠肝细胞脂肪变性明显。与模型组比较,各给药组大鼠体重显著增加,动脉粥样硬化指数、肝脏指数显著降低,血清 TG、TC、LDL 明显降低, HDL 显著升高($p<0.05$, $p<0.01$);大鼠肝细胞脂肪变性明显改善。旧黄精和新工艺炮制黄精的作用无明显的差异。**结论:**新工艺炮制黄精可调节脂质代谢紊乱,预防动脉粥样硬化,改善肝脏脂肪变性,且作用与旧黄精相当。

关键词: 黄精,高脂血症,动脉粥样硬化,高脂乳剂,大鼠

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0061-06

Hypolipidemic and anti-atherosclerotic effects of *Polygonatum* processed by a new technique*

DAI Xin, YUAN Rongxian[▲], FENG Fan, LIU Tingjiang, CHEN Lida, YANG Renhui

(The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

Abstract: In this study we explored the hypolipidemic and anti-atherosclerotic effects of *Polygonatum* processed by a new technique. Male SD rats were randomly allocated to five groups: blank control group, model group, atorvastatin calcium group(0.0009 g/kg), new-technique *Polygonatum* group(1.35 g/kg), and traditionally-processed *Polygonatum* group(1.35 g/kg), with 10 rats in each group. Except for the blank control group, all other groups received oral administration of high-fat emulsion for 4 continuous weeks to induce hyperlipidemia. One week after modeling, drug administration via oral gavage began for another 3 weeks. The blank control group and model group received equal volumes of distilled water. Upon completion of treatment, blood was collected from the abdominal aorta, and serum lipid profiles (four items) were analyzed. The atherosclerosis index and liver index were calculated, and HE staining was performed to assess histopathological changes in liver tissue. Compared with the blank control group, rats in the model group displayed significant weight loss, obvious rising in atherosclerosis index and liver index, significant increasing in serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL), and significant decreasing in high-density lipoprotein cholesterol (HDL) ($p<0.05$, $p<0.01$); severe hepatocellular steatosis was evident in these rats. In contrast to the model group, rats in all treatment groups showed significant weight gain, significant decreasing in atherosclerosis index, liver index, serum TG, TC and LDL levels, and significant increasing in HDL levels ($p<0.05$, $p<0.01$); hepatocellular steatosis was significantly ameliorated in these rats. There was no significant difference between the traditionally-processed *Polygonatum* group and

the new-technique *Polygonatum* group. In conclusion, *Polygonatum* processed by the new technique can effectively regulate dyslipidemia, prevent atherosclerosis, and improve hepatic steatosis, with efficacy comparable to that of traditionally-processed *Polygonatum*.

Keywords: *Polygonatum*, hyperlipidemia, atherosclerosis, high-fat emulsion, rats

黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 的干燥根茎。制黄精,具有补肾益血、润肺生津的功效,用于肾虚精亏、气血亏损、头晕目眩等症的治疗^[1]。黄精酒制后,能助其药势,使之滋而不腻,增强补气养阴的作用,降低滋腻之性,更好地发挥补益作用^[2]。传统制黄精是由生黄精加黄酒炮制而成,反复蒸制表面黑色,内外均匀,即九蒸九晒^[3]。传统酒制黄精的方法,在实际操作中,制备工艺比较繁琐,而且用于临床的增强滋补肝肾、生血益精之功效不及熟地汁制黄精,因熟地汁与黄精共制,取其双补之义^[4]。传统用熟地汁制黄精,需熬制熟地汁,取黄精和加蒸熟地的汁与药平,用微火煮至药汁被吸尽,内外呈黑色,用时再切片^[6-7];本文中将该方法炮制的黄精称为传统炮制的制黄精,即旧黄精;但是此工序中熟地汁的制备比较耗时、耗力、耗能源。且传统制备熟地汁后消耗的熟地只能当废渣丢弃,浪费药材资源,且不环保。因此,本研究将黄精和地黄两药联合炮制,蒸汽池的上层放黄酒拌润的地黄,下层放黄酒拌润的黄精,利用蒸制酒熟地黄时流出的汁蒸制黄精,使达到两药共蒸制的效果。在本文中,将此炮制方法的黄精称为新工艺炮制的黄精,此炮制方法克服现有技术熟地制酒黄精和酒熟地黄分别炮制所带来的弊端,工艺省时、省力、省能源,最大限度节省了药用资源,并利于环保^[5]。

传统炮制的制黄精、地黄与黄精联合炮制的制黄精在药理作用上是否有差异尚未做相关研究。现代研究表明,黄精及其成分具有降血脂、抗动脉粥样硬化、抗氧化抗衰老、降血糖、免疫调节、抗骨质疏松等作用^[8]。基于此,本研究拟利用高脂乳剂制备高脂血症模型,比较地黄与黄精联合炮制的制黄精和传统炮制的制黄精的调节血脂、预防动脉粥样硬化的作用,以期地黄与黄精联合炮制的制黄精的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量 180 ~ 220 g,购于斯贝福(北京)生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0004。动物饲养环境 23 °C ± 2 °C,相对湿度为 50% ~ 70%。本实验获得贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物

黄精(黄精 *Polygonatum sibiricum* Red., 批号: Y220525, 产地: 河南), 地黄(地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 批号: Y220411), 规格均为统货, 由贵州同济堂中药饮片有限公司提供。经本项目组按黄精和地黄两药联合炮制后得到的制黄精, 在文中称新工艺炮制黄精(地黄和黄精联合炮制的制黄精), 按传统炮制方法炮制得到的制黄精, 在文中称旧黄精(传统炮制的制黄精)。

新工艺炮制黄精水提物的制备: 取一个处方量黄精 15 g, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 30 min, 过滤, 合并滤液并浓缩至 13.50 g/100mL, 4 °C 冰箱保存备用。临用时从冰箱中取出, 放置至室温后, 进行给药。旧黄精水提物的制备同新工艺炮制黄精。

阿托伐他汀钙片, 乐普制药有限公司, 批号: 202205105C(口服, 一次一片, 一日一次。规格, 10 mg/片)。

1.3 试剂

甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)试剂盒, 批号分别为: 20221025、20220908、20221025、20221123, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; 吐温-80, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 7181011; 胆固醇, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: O14HS196991; 1,2-丙二醇, 上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C15097150; 丙硫氧嘧啶, 上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C14425015; 胆酸钠, 上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C14608272; 猪油自备。

1.4 仪器

TG16-W 型离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;1512 型轮转式切片机,德国产 Leitz 牌;CKX53 型倒置相差显微镜,日本奥林巴斯;JE502 型电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;Chemray 800 型全自动生化分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;K3 Plus 型酶标仪,上海宝予德科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模、给药

参考文献[9-11]的方法,稍加改进,取健康合格的 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雄性,体重 180 ~ 220 g,随机分为 5 组,即空白对照组、模型组、阳性对照组(阿托伐他汀钙片,0.0009 g/kg)、新工艺炮制黄精组(1.35 g/kg)、旧黄精组(1.35 g/kg),每组 10 只大鼠。

除空白对照组大鼠灌胃蒸馏水外,其余各组大鼠灌胃高脂乳剂(高脂乳剂的配制:①在 1 号烧杯中加入猪油 100 g 加热熔化,依次不断搅拌加入 40 g 胆固醇,10 g 胆酸钠,100 mL 吐温-80,5 g 丙硫氧嘧啶,混匀,制成油相;②在 2 号烧杯中加入 100 mL 的 1,2-丙二醇,500 mL 的蒸馏水,水浴加热 60 ℃ 混匀,制成水相;③待油相降至常温,分别将 2 号烧杯中的水相和 1 号烧杯中的油相混合,搅拌混匀。制成含 20% 猪油、10% 胆固醇、2% 胆酸钠、1% 丙基硫氧嘧啶的高脂乳剂),10 mL/kg,每天一次,连续 28 天,制备高脂血症模型。每天上午灌胃高脂乳剂造模。

造模第 8 天开始,灌胃给予相应的药物,10 mL/kg,每天一次,连续 21 天。空白对照组和模型组灌胃等容量蒸馏水。每天下午灌胃药物。

2.2 取材

末次给药后,禁食不禁水 24 h,20% 乌拉坦麻醉后,腹主动脉取血,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,置于-80 ℃ 冰箱备用。处死大鼠,取肝、心,称重,计算脏器指数。取部分肝脏组织,4% 多聚甲醛固定,用于切片病理分析。

脏器指数=脏器质量(g)/体质量(g)×100%

2.3 检测

2.3.1 血清 TG、TC、LDL、HDL 的含量测定

取出部分冻存的血清样本,全自动生化仪检测 TG、TC、LDL、HDL 含量。计算动脉粥样硬化指数(AI)。

$$AI = (TC - HDL) / HDL$$

2.3.2 HE 染色肝脏病理形态观察

取 4% 多聚甲醛固定的肝脏,酒精梯度脱水,包埋,冰冻切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水后入蒸馏水,按照试剂盒说明操作,进行 HE 染色,光学显微镜下观察肝脏病理形态。

2.4 统计学方法

采用 SPSS26.0 软件,所有数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 新工艺炮制黄精对模型大鼠外观体征、体重的影响

实验期间观察各组大鼠的外观体征,空白对照组大鼠毛发柔顺,饮水量及进食量正常,活动灵敏,二便如常,体质量增长规律。高脂乳剂灌胃造模后各组大鼠的进食及活动量明显减少,大便稀,精神萎靡,体重较空白对照组明显偏低;给药干预后,饮水及进食量、活动量较模型组改善,大便趋向正常。

与空白对照组相比,模型组大鼠的体重明显减轻,从第 2 周开始,差异有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠的体重均有所增加,到第 4 周给药结束时,差异有统计学意义(# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 新工艺炮制黄精对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	第 1 周/g	第 2 周/g	第 3 周/g	第 4 周/g
空白对照组	—	245.52±9.27	278.82±14.78	315.92±14.13	333.03±14.95
模型组	—	237.52±14.09	254.77±16.96	261.21±13.88*	264.27±15.31**
阿托伐他汀钙片组	0.0009	238.25±11.23	262.10±12.84	270.97±10.52	277.45±10.61#

续表 1

组 别	剂量 /(g/kg)	第 1 周/g	第 2 周/g	第 3 周/g	第 4 周/g
新工艺炮制黄精组	1.35	236.83±11.07	257.25±15.72	271.85±9.68	283.11±8.54 ^{##}
旧黄精组	1.35	236.37±13.52	260.73±13.31	275.81±11.65	280.71±6.14 ^{##}

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.2 新工艺炮制黄精对模型大鼠肝脏外观形态的影响

空白对照组大鼠肝脏呈红褐色,表面光滑,无脂肪黏着,无颗粒感,质柔;模型组大鼠肝脏呈淡红色微偏黄,表面有明显颗粒感,质较脆;与模型组比较,各给药组大鼠肝脏颜色、外观等均有所改善。

3.3 新工艺炮制黄精对模型大鼠肝组织病理形态的影响

空白对照组大鼠肝组织被膜完整,肝细胞分叶不明显,形态正常,肝索排列较为整齐;中央静脉内皮完整,胞核居中,胞浆红染;模型组大鼠肝组织可见肝细胞胞质内含不着色、边缘光滑,细小圆形脂滴,胞核偏于一侧,肝索排列较为紊乱。与空白组相比,模型组大鼠肝细胞脂肪变性明显;与模型组相比,各给药组大鼠肝细胞脂肪变性均有改善(图 1)。

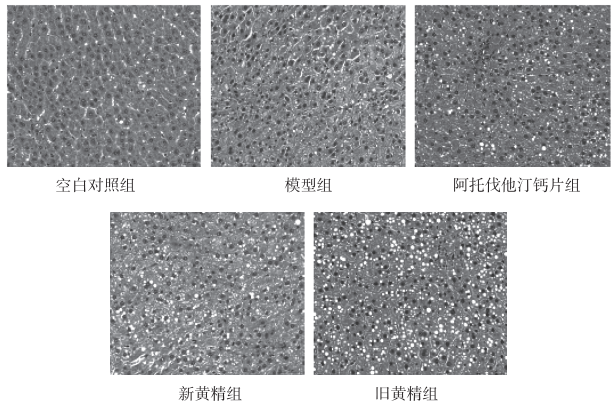


图 1 新工艺炮制黄精对模型大鼠肝组织病理形态的影响(HE,×400)

3.4 新工艺炮制黄精对模型大鼠血脂四项的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠血清 TG、TC、LDL 水平明显升高,HDL 含量显著降低(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠血清 TG、TC、LDL 水平明显降低,HDL 含量显著增

加([#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 新工艺炮制黄精对模型大鼠血清 TG、TC、HDL、LDL 水平的影响($\bar{x}\pm S,n=10$)

组 别	剂量 /(g/kg)	TG /(mmol/L)	TC /(mmol/L)	HDL /(mmol/L)	LDL /(mmol/L)
空白对照组	—	0.73±0.15	1.52±0.38	0.55±0.08	0.38±0.09
模型组	—	1.21±0.35 [*]	9.95±1.14 ^{**}	0.21±0.11 [*]	3.81±0.75 [*]
阿托伐他汀钙片组	0.0009	0.86±0.42 [#]	4.23±0.88 ^{##}	0.46±0.07 [#]	2.32±0.86 [#]
新工艺炮制黄精组	1.35	0.74±0.13 ^{##}	5.02±1.21 ^{##}	0.39±0.06 [#]	2.77±0.75 [#]
旧黄精组	1.35	0.76±0.36 [#]	5.38±1.37 ^{##}	0.41±0.08 [#]	2.53±0.92 [#]

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.5 新工艺炮制黄精对模型大鼠肝脏指数、动脉粥样硬化指数的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠肝脏指数、动脉粥样硬化指数均明显升高(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠肝脏指数、动脉粥样硬化指数均显著降低([#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 新工艺炮制黄精对模型大鼠肝脏指数、动脉粥样硬化指数的影响($\bar{x}\pm S,n=10$)

组别	剂量/(g/kg)	肝脏指数/%	AI
空白对照组	—	2.53±0.24	4.28±1.73
模型组	—	3.42±1.16 [*]	65.38±12.62 ^{**}
阿托伐他汀钙片组	0.0009	2.76±0.98 [#]	32.85±15.37 ^{##}
新工艺炮制黄精组	1.35	2.81±0.89 [#]	41.85±17.83 ^{##}
旧黄精组	1.35	2.95±0.63 [#]	38.96±14.73 ^{##}

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

4.1 病理

高脂血症主要是以血清中血脂高于正常值的病症,主要以低密度脂蛋白胆固醇血症、高甘油三酯血症为主^[12]。高脂血症的治疗以他汀类西药为主,作用靶点单一,通过抑制内源性胆固醇合成限速酶 HMG-CoA 还原酶,阻断细胞内羟甲戊酸代谢途径,使细胞内胆固醇合成减少^[13];同时他汀类药物还可以提高脂肪酸合成酶的活性,减少脂肪酸的合成并促进脂肪酸的代谢,降低甘油三酯水平,因此本实验

选择阿托伐他汀钙作为西药对照组。

本研究采用灌胃高脂乳剂的方法建立高脂血症大鼠模型,尽可能与高脂血症病情吻合。在给予新工艺炮制黄精水提物的同时,继续给予高脂乳剂灌胃,避免大鼠的自愈性对实验造成干扰^[14-16]。根据大鼠血脂四项结果对比,TC、TG、LDL 含量显著升高,而 HDL 含量降低,肝脏指数、动脉粥样硬化指数明显升高,说明成功建立高脂血症大鼠模型,且有发展成为动脉粥样硬化的可能^[17]。

4.2 实验结果

1)高脂乳剂灌胃造模后,空白对照组、模型组、各给药组之间进行比较,各造模组大鼠的进食及活动量明显减少,大便稀,精神萎靡,体重较空白对照组明显偏低。给空白对照组、模型组灌胃等容量蒸馏水,各给药组对应给予阿托伐他汀钙片、新工艺炮制黄精、旧黄精等药物后,再观察大鼠的饮水及进食量、活动量,给药组均较模型组改善,大便趋向正常。说明高脂乳剂灌胃造模后的大鼠,在给予药物干预后,治疗是有效的。

2)各给药组与模型组比较,阿托伐他汀钙片组、新工艺炮制黄精组、旧黄精组大鼠体重均显著增加,动脉粥样硬化指数、肝脏指数显著降低,血清 TG、TC、LDL 明显降低,HDL 显著升高;说明在给药后,无论是阿托伐他汀钙片组、还是新工艺炮制黄精组、旧黄精组大鼠肝细胞脂肪变性明显改善。说明新工艺炮制黄精、旧黄精均可降低大鼠血清 TG、TC、LDL 含量,增加 HDL 含量,降低肝脏指数、动脉粥样硬化指数。

3)从肝脏外形表现分析,模型组较空白对照组大鼠肝脏颜色偏淡,略显土黄色,质地较脆,肝细胞脂肪变性明显;各给药组完成给药后,模型组与新工艺炮制黄精组、旧黄精组比较,大鼠肝脏外观及脂肪变性程度均较模型组得到改善;旧黄精和新工艺炮制黄精的作用无明显的差异。从肝组织 HE 病理学结果来看,旧黄精和新工艺炮制黄精均可通过调控血脂代谢水平,减轻甚至避免肝细胞脂肪变性,从而起到保护肝脏的作用。

实验结果表明,旧黄精和新工艺炮制黄精对高脂血症模型大鼠具有显著的调血脂、预防动脉粥样硬化作用,通过调节血脂中 TG、TC、LDL、HDL 的水平,维持体内脂质代谢平衡,避免肝出现脂肪样变性和动脉粥样硬化,其具体产生效应的机制可进一步

深入研究;且新工艺炮制黄精与旧黄精作用相当,表明新工艺炮制黄精的炮制工艺是可行的。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:319.
- [2] 常晖,靳鹏博,马存德,等. 不同方法炮制黄精后其化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(21):3125-3135.
- [3] 欧阳国庆,尹肖莉,张韵,等. 黄精的炮制方法研究及其对黄精化学成分和药理活性的影响[J]. 食品安全导刊,2024(1):145-147.
- [4] 常艾馨,曹蓉,李芳菲,等. 黄精提取物的体外模拟消化特性及对肠道菌群的影响[J]. 食品工业科技,2024,45(15):342-350.
- [5] 刘天翔. 制黄精与熟地黄炮制工艺改进优胜研究[J]. 现代养生,2014(6):246-247.
- [6] 冉懋雄,郭建民. 现代中药炮制手册[M]. 北京:中国中药出版社,2002:428-429.
- [7] 中医研究院中药研究所,北京药品生物制品检定所. 中药炮制经验集成[M]. 北京:人民卫生出版社,1974:140-141.
- [8] 高凤凤,裴艳玲,任越,等. 基于网络药理学与分子对接技术研究黄精抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 药学报,2020,55(11):2642-2650.
- [9] 杨奕樱,潘春,张秋方,等. 双白半水浸提膏对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 河南中医,2017,37(7):1190-1192.
- [10] 俞静静,杜宇忠,苏洁,等. 陈皮对高胆固醇血症大鼠的预防作用及其机制[J]. 中成药,2021,43(11):2982-2988.
- [11] 杨春梅,张小如. 降脂方调血脂、预防动脉粥样硬化的作用及对肝脏转氨酶的影响[J]. 中医研究,2022,35(9):74-78.
- [12] 李剑虹,王丽敏,李镒冲,等. 2010 年我国成年人血脂异常流行特点[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(5):414-418.
- [13] 李军,杨小月,鲍玲. 普伐他汀联合依折麦布治疗冠心病合并高胆固醇血症的临床研究[J]. 中国医药指南,2012,10(17):142-143.
- [14] 王青虎,敖苏日古嘎,包文林,等. 柳蒿脂溶性部位对高脂血症大鼠脂质代谢及肝脏的影响[J]. 中草药,2022,53(11):3402-3409.
- [15] 王瑞生,李德华,张振凌,等. 部颁方建曲发酵炮制对高脂血症大鼠的降脂作用机制研究[J]. 中药药理与临床,2023,39(10):1-13.
- [16] 余成馨,王海帆,王鹏,等. 杜仲叶提取物对高脂血症模型大鼠降脂作用及肠道菌群影响研究[J]. 中药药理与临床,2023,39(9):55-61.

生态问题调查中的土壤污染生态风险评价研究^{*}

钟 响^{1,2}, 罗 林^{1,2}, 宋小庆^{1,2}, 王万金^{1,2}

(¹ 贵州省地质矿产勘查开发局 111 地质大队, 贵州 贵阳 550008; ² 贵州地质工程勘察设计院, 贵州 贵阳 550008)

摘 要: 分别采用地累积指数法、潜在生态危险指数法对长江流域乌江源头三岔河流域的土壤重金属指标进行了污染评价, 并通过重金属污染元素分布特征结合流域地质背景, 对流域生态问题的影响因素进行了识别, 认为研究区内土壤重金属污染与区内进行土法炼锌活动有较大关系。通过地累积指数法评价了研究区内土壤重金属污染为: As、Cr、Zn 污染程度为无-轻度, Cd、Ni、Pb 污染为无-轻度-偏中, Cu、Hg 污染程度为无; 通过潜在生态危险指数法, 评价了研究区内土壤重金属污染的综合潜在生态风险水平为: A、G、H 分区综合污染程度中等, 其余分区轻微。

关键词: 重金属污染评价, 地累积指数法, 潜在生态危险指数法

中图分类号: X4 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563(2025)01-0066-04

Evaluation of soil pollution ecological risk^{*}

ZHONG Xiang^{1,2}, LUO Lin^{1,2}, SONG Xiaoqing^{1,2}, WANG Wanjin^{1,2}

(¹No. 111 Geological Team, Bureau of Geology and Mineral Exploration and Development of Guizhou Province, Guiyang 550008, China; ²Guizhou Geological Engineering Investigation Design and Research Institute, Guiyang 550008, China)

Abstract: In this paper, the geo-accumulation index method and potential ecological risk index method were used to evaluate the pollution of heavy metals in the soil of Sancha River Basin at the source of Wujiang River, and the influencing factors of ecological problems in the basin were identified by combining the distribution characteristics of heavy metals with the geological background of the basin. It is concluded that the soil heavy metal pollution in the study area has close relationship with the indigenous zinc smelting activities in the region. The geo-accumulation index method revealed that the pollution degree of As, Cr and Zn in the study area was none to mild, the pollution degree of Cd, Ni and Pb was none to mild to moderate, and the pollution degree of Cu and Hg was none; The potential ecological risk index method showed that the comprehensive potential ecological risk level of soil heavy metal pollution in zone A, G and H was moderate, and that of the other zones was mild.

Keywords: evaluation of heavy metal pollution, geo-accumulation index, potential ecological risk index

[17] 杜宇忠, 苏洁, 颜美秋, 等. 陈皮醇提物对高脂血症模型大鼠甘油三酯的改善作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 190-195.

2023 年度贵州省中医药、民族医药重点学科建设学科(项目编号: QZYYZDXK(JS)-2023-04)。

作者简介: 代 欣, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 专业: 中药学, 研究方向: 中药质量标准研究及品种鉴定。

▲通讯作者: 袁荣献, 女, 副主任药师, 研究方向: 中药炮制及质量标准研究, 中药医院制剂质量标准研究。

收稿日期: 2024-04-03; 修回日期: 2024-05-23

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 504);

0 引言

乌江源是长江流域重要补给源,本文选取的乌江源三岔河流域下藤桥-出水洞段研究区,在乌江流域生态系统中具有非常重要的地位^[1]。历史上,研究区存在较长时期的矿业活动,使得该区域的生态环境遭受了一定破坏,主要表现在土壤重金属污染方面^[2]。

目前较为常用的土壤重金属污染评价方法有内梅罗指数法、地积累指数法、潜在生态危害指数法等。其中,内梅罗指数法因未考虑研究区域重金属元素背景值,其评价结论不能很好地反映区域污染程度。相较而言,地积累指数法、潜在生态危害指数法均考虑了研究区背景条件,更能反映其面域污染程度^[3-6]。为了解研究区土壤重金属污染程度,本文采用地积累指数法、潜在生态危害指数法分别对研究区内土壤重金属污染进行污染评价。

1 研究区概况

研究区范围主要包括乌江源三岔河干流下藤桥-水洞段流域范围,总面积 920.56 km²。行政区划包括钟山区、赫章县部分区域。为便于研究,以研究区各小流域为基础,结合研究区内产业发展格局情况,将研究区划分为 10 个生态功能区:A 区-城市发展生态功能区、B 区-大河能源供应水土保持、C 区-干流下藤桥-水洞段水、D 区-害奈河水源涵养水土保持、E 区-连山河上游水源涵养区、F 区-连山河下游水土保持区、G 区-双戛水源涵养区、H 区-水城河上游水源涵养区、I 区-汪家寨能源供应水土保持、J 区-吴家寨水源涵养水土保持^[2](图 1)。

2 研究方法及数据来源

2.1 地积累指数法

地积累指数由德国海森堡大学科学家 Muller (1969) 提出,因其考虑了岩石差异导致的地质背景值差异影响,在沉积物重金属污染评价中应用较广^[3]。其公式为:

$$I_{geo} = \log_2(C_n/kB_n) \quad (1)$$

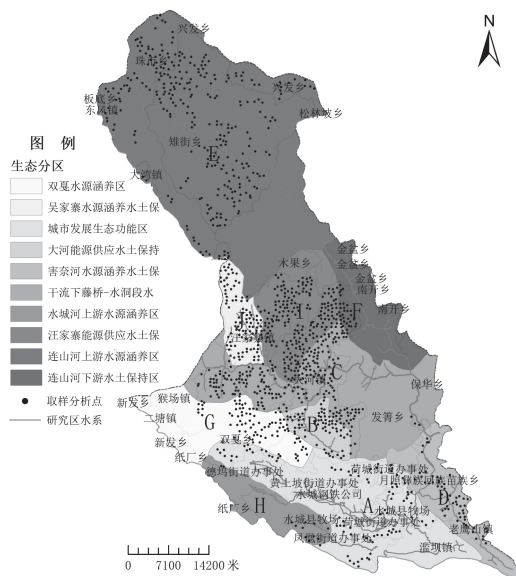


图 1 采样分布及生态分区略图

式中: C_n 为实测重金属含量; k 为考虑成岩作用引起的背景值变化常数,常取 1.5; B_n 为评价元素的背景值。

根据地质积累指数 I_{geo} 的计算值: ≤ 0 、 $0 \sim 1$ 、 $1 \sim 2$ 、 $2 \sim 3$ 、 $3 \sim 4$ 、 $4 \sim 5$ 、 ≥ 5 ,将污染程度分别划分为:无、轻度、偏中、中度、偏重、重度、严重共七个级别。

2.2 潜在生态危害指数法(RI)

瑞典地球化学家 Hakanson (1980) 提出潜在生态危害指数法,该方法的一大特点是考虑了重金属元素的毒性。我国学者自陈静生开始,多次研究了常见重金属元素的毒性系数^[4-6]。其计算公式为:

$$RI = \sum_{i=1}^n T_r^i C_{si} / C_{ni} \quad (2)$$

式中: T_r^i 为重金属元素的毒性响应系数, C_{si} 为重金属元素实测含量, C_{ni} 为该重金属元素评价标准。其中, $T_r^i C_{si} / C_{ni} = E_i$ 为某重金属元素的潜在生态危险系数。 E_i 分别 < 40 、 $40 \sim < 80$ 、 $80 \sim < 160$ 、 $160 \sim < 320$ 、 ≥ 320 ,对应该元素潜在生态风险轻微、中等、强、很强、极强。 $RI < 150$ 、 $150 \sim < 300$ 、 $300 \sim < 600$ 、 ≥ 600 ,对应污染程度轻微、中等、强、很强。

2.3 数据来源

本次分析评价的数据来源为调查研究过程中 2020 年 1 月至 3 月在区内耕地中采集的 10 ~ 20 cm 深度范围土样。其中,Cd、Pb 采用了石墨炉原子吸收分光光度法,Hg、As 采用了原子荧光光谱法,Zn、

Cr、Ni、Cu 采用了火焰原子吸收分光光度法进行了样品分析,pH 值采用了电位法进行分析。

3 数据分析

3.1 地积累指数法评价结果

该方法需要依据研究区内各评价金属元素背景值,本次参照《中国土壤元素背景值》^[7]及《中国西南地区 76 种元素地球化学图集》^[8]。其中,As、Cd、Cr、Cu、Hg、Ni、Pb、Zn 分别取 28.5 mg/kg、1.244 mg/kg、133.3 mg/kg、94 mg/kg、0.188 mg/kg、66.7 mg/kg、86 mg/kg、204 mg/kg。

表 1 研究区各生态功能区土壤样品重金属元素检测值

分区	数量	As/ /件	Cd/ (mg/kg)	Cr/ (mg/kg)	Cu/ (mg/kg)	Hg/ (μg/kg)	Ni/ (mg/kg)	Pb/ (mg/kg)	Zn/ (mg/kg)
A	95	42.420	5.161	138.521	65.978	202.253	63.656	338.777	605.434
B	67	17.721	2.119	143.172	127.368	131.820	67.694	56.827	183.636
C	236	20.414	2.666	157.594	100.381	145.741	64.819	69.627	203.254
D	59	17.451	2.425	140.409	79.426	171.703	50.709	55.630	218.722
E	311	46.532	2.651	131.301	52.271	229.788	51.567	164.563	288.986
F	31	23.264	1.622	140.787	65.255	99.578	56.752	44.253	137.736
G	83	18.301	3.796	165.879	94.006	207.483	64.599	61.207	212.226
H	12	31.564	4.814	137.657	35.884	173.833	53.475	306.074	581.996
I	211	13.838	2.089	176.846	108.953	102.601	75.168	56.083	185.342
J	100	13.358	3.186	134.879	196.894	135.405	74.658	55.307	226.642

表 2 研究区各生态功能区土壤样品重金属元素地累积值(I_{geo})及污染程度划分结果

分区	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
A	0.0 无	1.5 偏中	-0.5 无	-1.1 无	-0.5 无	1.0 偏中	1.4 偏中	1.0 轻度
B	-1.3 无	0.2 轻度	-0.5 无	-0.1 无	-1.1 无	0.4 轻度	-1.2 无	-0.7 无
C	-1.1 无	0.5 轻度	-0.3 无	-0.5 无	-1.0 无	0.5 轻度	-0.9 无	-0.6 无
D	-1.3 无	0.4 轻度	-0.5 无	-0.8 无	-0.7 无	0.8 轻度	-1.2 无	-0.5 无
E	0.1 轻度	0.5 轻度	-0.6 无	-1.4 无	-0.3 无	1.2 轻度	0.4 轻度	-0.1 无
F	-0.9 无	-0.2 无	-0.5 无	-1.1 无	-1.5 无	0.0 无	-1.5 无	-1.2 无
G	-1.2 无	1.0 偏中	-0.3 无	-0.6 无	-0.4 无	1.1 偏中	-1.1 无	-0.5 无
H	-0.4 无	1.4 偏中	-0.5 无	-2.0 无	-0.7 无	0.8 轻度	1.2 偏中	0.9 轻度
I	-1.6 无	0.2 轻度	-0.2 无	-0.4 无	-1.5 无	0.0 轻度	-1.2 无	-0.7 无
J	-1.7 无	0.8 轻度	-0.6 轻度	0.5 无	-1.1 无	0.4 轻度	-1.2 无	-0.4 无

根据地积累指数法评价结果可以看到:①E 区内 As 存在轻度污染;②除了 F 区外,其余 9 个分区的 Cd 均存在轻度-偏中污染;③J 区的 Cr 存在轻度污染;④所有分区 Cu、Hg 均无污染;⑤除了 F 区外,

其余 9 个分区的 Ni 均存在轻度-偏中污染;⑥A、H 区内存在 Pb 偏中污染,E 区内 Pb 轻度污染;⑦A、H 区内的 Zn 轻度污染。

3.2 潜在生态危害指数法

利用该方法评价中,根据相关文献研究成果^[4-6],As、Cd、Cr、Cu、Hg、Ni、Pb、Zn 毒性响应系数 T_r 分别取 10、30、2、5、40、5、5、1;重金属元素评价标准 C_{ni}取背景值。

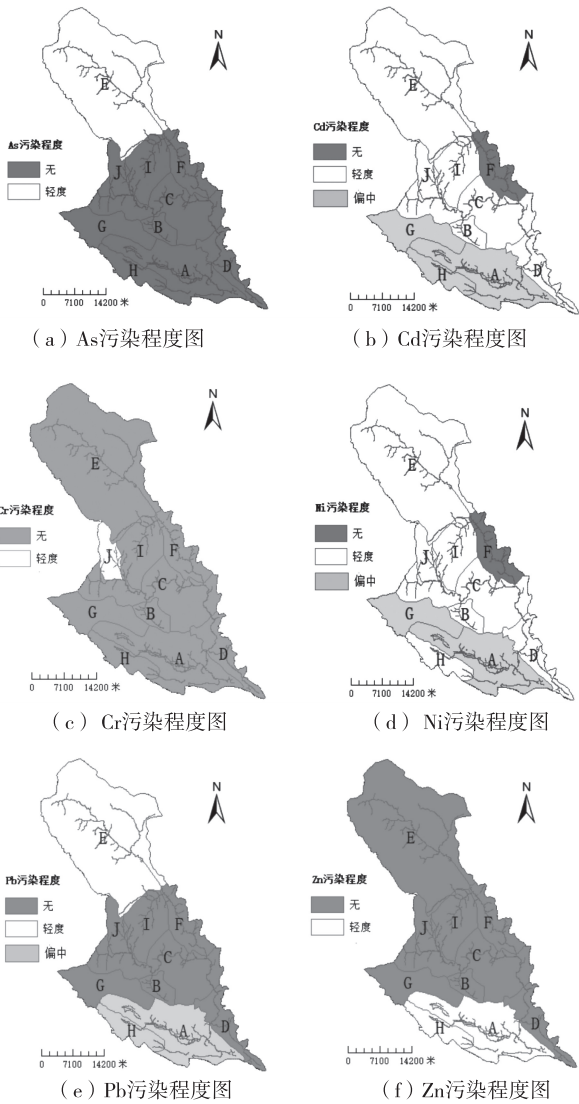


图 2 重金属污染程度图

根据潜在生态危害指数法评价可以看到:①所有分区 As 潜在污染风险轻微;②A、H 区 Cd 潜在污染风险强,F 区 Cd 潜在污染风险轻微,其余分区 Cd 潜在污染风险中等;③所有分区 Cr、Cu、Ni、Pb、Zn 潜在污染风险轻微;④A、E、G 区 Hg 潜在污染风险

中等,其余分区轻微;⑤A、G、H 分区综合污染程度中等,其余分区轻微。

表 3 研究区各生态功能区土壤样品重金属元素潜在生态危险系数及潜在生态风险结果

分区	潜在生态危险系数(E_i)								Ri	污染程度
	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn		
A	14.9	124.5	2.1	3.5	43.0	4.8	19.7	3.0	215.4	中等
B	6.2	51.1	2.1	6.8	28.0	5.1	3.3	0.9	103.6	轻微
C	7.2	64.3	2.4	5.3	31.0	4.9	4.0	1.0	120.1	轻微
D	6.1	58.5	2.1	4.2	36.5	3.8	3.2	1.1	115.6	轻微
E	16.3	63.9	2.0	2.8	48.9	3.9	9.6	1.4	148.7	轻微
F	8.2	39.1	2.1	3.5	21.2	4.3	2.6	0.7	81.6	轻微
G	6.4	91.5	2.5	5.0	44.1	4.8	3.6	1.0	159.0	中等
H	11.1	116.1	2.1	1.9	37.0	4.0	17.8	2.9	192.8	中等
I	4.9	50.4	2.7	5.8	21.8	5.6	3.3	0.9	95.3	轻微
J	4.7	76.8	2.0	10.5	28.8	5.6	3.2	1.1	132.8	轻微

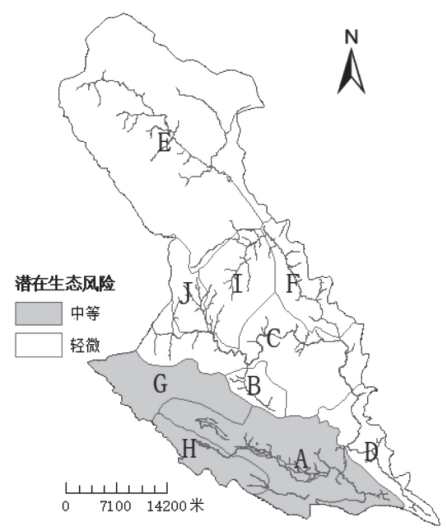


图 3 研究区土壤重金属污染潜在风险评价结果图

4 研究结论及讨论

(1)研究区属于贵州省土法炼锌的较为集中地带^[9-10],根据调查研究^[2],历史上区内土法炼锌活动主要分布于滥坝、水城、汪家寨、木果、雉街、朱市等区域,这与本次分析评价得到的 Pb 污染 A、H 区“偏中”,E 区“轻度”,在空间上吻合;土法炼锌等历史矿业活动中的铅锌废渣随意堆弃历史遗留问题,

导致了废渣中的重金属元素向周边环境扩散,造成了研究区内部分区域存在重金属污染;

(2)土壤污染潜在风险评价表明,A、G、H 分区综合污染程度中等;建议在这三个分区进行城市建设时增加场地污染专项评价工作,农业种植过程中选择对 Cd、Hg 吸附作用轻微或者不吸附的农作物;

(3)总体来看,大部分研究区土壤重金属污染潜在风险轻微,下一步土壤污染生态修复工程措施应重点部署在 A、G、H 分区。

参考文献【REFERENCES】

[1] 焦树林,刘丽,孙婷,等. 三岔河流域水文特征与化学风化碳汇效应[J]. 地理研究,2013,32(6):1025-1032.

[2] 宋小庆,曹振东,钟响,等. 长江流域乌江源头三岔河流域生态环境调查报告[R]. 贵阳:贵州地质工程勘察设计院,2020:180-184.

[3] 李志萍,马超振,李珊珊. 太子河沉积物重金属污染地积累指数法评价[J]. 长江科学院院报,2012(10):37-40.

[4] 徐争启,倪师军,庾先国,等. 潜在生态危害指数法评价中重金属毒性系数计算[J]. 环境科学与技术,2008(2):112-115.

[5] 代雅建,崔健,郭常来,等. 辽宁锦州城区土壤环境质量及潜在生态危害评价[J]. 地质通报,2021,40(10):1671-1679.

[6] 李小红,刘正实,徐龙君. 渝北区农村土壤重金属污染及生态风险评价[J]. 安徽大学学报(自然科学版),2022,46(4):94-101.

[7] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.

[8] 谢学锦. 中国西南地区 76 种元素地球化学图集[M]. 北京:地质出版社,2008.

[9] 吴攀,刘丛强,张国平,等. 黔西北炼锌地区河流重金属污染特征[J]. 农业环境保护,2002(5):443-446.

[10] 彭益书. 黔西北土法炼锌区炉渣、土壤与植物系统中重金属分布及迁移研究[D]. 贵阳:贵州大学,2018.

收稿日期:2023-08-04;修回日期:2023-08-24

基金项目:贵州省地矿局科研项目“乌江源山水林田湖草生命共同体要素关联性分析及保护修复工程研究”(项目编号:黔地矿科合[2020]13 号)。

作者简介:钟 响(1986-),男,贵州余庆人,工程师,从事水工环地质研究工作。

高原地区高锰酸盐指数测定方法优化

吴玉萍,傅成诚,申慧滢,严 军,李海英[△]

(贵州省生态环境监测中心,贵州 贵阳 550081)

摘 要: 高锰酸盐指数是反映水体中有机及无机可氧化物质污染的常用指标。根据高锰酸盐指数测定的分析原理,结合高原地区的沸点情况,对样品测定的加热时间进行改进优化。当延长加热时间至 35 min(水浴沸腾,开始计时),标准样品测定结果接近真值。因此对原有方法进行了改良,提高了样品的检测效率,具有较高的准确度,可用于实际分析工作中。

关键词: 高锰酸盐指数,方法优化,检测方法,改良

中图分类号:X832 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0070-03

Optimization of determination method for permanganate index in plateau areas

WU Yuping, FU Chengcheng, SHEN Huiying, YAN Jun, LI Haiying[△]

(Guizhou Ecological Environment Monitoring Center, Guiyang 550081, China)

Abstract: The permanganate index is a commonly used indicator to reflect the pollution of organic and inorganic oxidizable substances in water bodies. This article improves and optimizes the heating time for sample determination based on the analysis principle of permanganate index and the boiling point in plateau areas. When the heating time is extended to 35 minutes(start timing when water bath boils), the measurement results of the standard sample are close to the true value. The optimized method has improved the detection efficiency and accuracy, and can be used in practical analysis work.

Keywords: permanganate index, method optimization, detection method, improvement

0 引言

根据国标 GB 11892—1989 酸性高锰酸钾滴定法^[1-2],沸水浴中加热时间为 30 min(水浴沸腾,开始计时),高锰酸钾将样品中的某些有机物和无机还原性物质氧化,反应后加入过量的草酸钠还原剩余的高锰酸钾,再用高锰酸钾标准溶液回滴过量的草酸钠,对测定结果进行分析^[3-7]。但由于贵阳高原地区海拔高度约 1100 m,沸点温度约 96 ℃,样品放入水浴锅时水浴已经沸腾,会使测定的样品值略偏低。对原有方法进行改良,延长加热时间为 35 min,结果表明,测定值接近真值,准确度较高。

1 实验分析

1.1 仪器与试剂

1.1.1 试剂

不含还原性物质的蒸馏水;硫酸(1.84 g/mL);硫酸(1+3)溶液;草酸钠标准贮备液(0.10 mol/L);草酸钠标准溶液(0.0100 mol/L);高锰酸钾标准贮备液(0.10 mol/L);高锰酸钾标准溶液(0.0100 mol/L)。

1.1.2 仪器

酸式滴定管(25.00 mL)、锥形瓶(250 mL)、恒

温水浴锅(DRHH-S6)。

1.2 分析步骤

吸取 100.0 mL 经充分摇动、混合均匀的样品置 250 mL 锥形瓶中,加入(5±0.5) mL 硫酸(1+3),用滴定管加入 10.00 mL 高锰酸钾标准溶液摇匀,把锥形瓶放入沸水浴内 30 min(水浴沸腾,开始计时)。取出后用滴定管加入 10.00 mL 草酸钠标准溶液至溶液变为无色。趁热用高锰酸钾溶液滴定至刚出现粉红色,并保持 30 s 不退。记录消耗的高锰酸钾溶液体积。

空白试验:用 100.0 mL 蒸馏水代替样品,按上述步骤测定,记录下回滴的高锰酸钾溶液体积。向空白试验滴定后的溶液中加入 10.00 mL 草酸钠溶液。如果需要,将溶液加热至 80 ℃,用高锰酸钾溶液继续滴定至刚出现粉红色,并保持 30 s 不退。记录下消耗的高锰酸钾溶液的体积。标定参考见表 1。

表 1 K 值的标定

高锰酸钾标准溶液 消耗量/mL	标准溶液平均消耗量 /mL	高锰酸钾校正系数
10.01		
10.01	10.01	0.999
10.02		

1.3 比照分析实验

1.3.1 标准样品比照分析

用改良后的方法分析 4 个高锰酸盐指数标准样品,加热时间分别为 30 min、35 min、40 min,测定结果和样品真值做比对。结果表明,加热时间 30 min 时结果比真值偏低,加热时间 40 min 时结果比真值偏高,加热时间为 35 min 时其准确度较高。结果如表 2、图 1 所示。

表 2 标样测定结果比对表

样品名	取样量 /mL	消解温 度时间 T/min	消耗高 锰酸盐 体积/ V/mL	高锰酸 盐指数 浓度/ (mg/L)	消解温 度时间 T/min	消耗高 锰酸盐 体积/ V/mL	高锰酸 盐指数 浓度/ (mg/L)	消解温 度时间 T/min	消耗高 锰酸盐 体积/ V/mL	高锰酸 盐指数 浓度/ (mg/L)	标样 真值
标样 1	100	30	4.35	3.47	35	4.55	3.63	40	4.90	3.91	3.65
标样 2	100	30	2.10	1.67	35	2.48	1.97	40	2.80	2.23	1.98
标样 3	100	30	5.23	4.17	35	5.56	4.44	40	6.10	4.87	4.37
标样 4	100	30	4.95	3.95	35	5.25	4.19	40	5.65	4.51	4.19

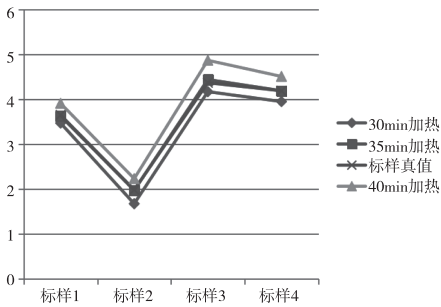


图 1 标样测定结果比对图

1.3.2 实际样品比照分析

对同一水样用标准方法进行测定,加热时间分别为 30 min 和 35 min,其结果表明,标准方法加热 30 min 与改良后的方法相比,高锰酸盐指数测定值会偏低。结果如表 3 和图 2 所示。

表 3 一般样品测定结果比对表

样品名	取样量 /mL	消解温 度时间 T/min	消耗高 锰酸盐 体积/ V/mL	高锰酸 盐指数 浓度/ (mg/L)	消解温 度时间 T/min	消耗高 锰酸盐 体积/ V/mL	高锰酸 盐指数 浓度/ (mg/L)	标准 偏差 /%	相对标准 偏差 /%
空白 1	100	30	0.28	< 0.5	35	0.30	< 0.5	/	/
空白 2	100	30	0.30	< 0.5	35	0.30	< 0.5	/	/
样品 1	100	30	0.28	< 0.5	35	0.28	< 0.5	/	/
样品 2	100	30	2.00	1.59	35	2.15	1.71	8.48	5.14
样品 3	100	30	2.50	1.99	35	2.65	2.11	8.48	4.15
样品 4	100	30	2.20	1.75	35	2.30	1.83	5.66	3.16
样品 5	100	30	1.80	1.43	35	2.00	1.59	11.31	7.49
样品 6	100	30	2.10	1.67	35	2.20	1.75	5.66	3.31
样品 7	100	30	1.95	1.55	35	2.10	1.67	8.49	5.27
样品 8	100	30	2.05	1.63	35	2.25	1.79	11.31	6.61
样品 9	100	30	2.70	2.15	35	2.90	2.31	11.31	5.07
样品 10	100	30	2.35	1.87	35	2.50	1.99	8.49	4.40

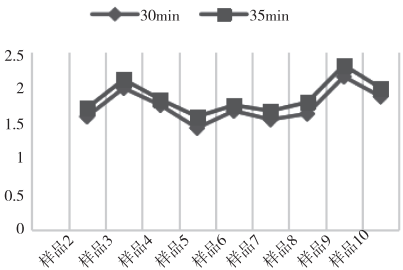


图 2 一般样品测定结果比对图

2 结论

试验结果表明,测定高锰酸盐指数时使用改良后的方法延长加热时间至 35 min,测定标准样品和

典型区域地质灾害风险评价及管控对策研究*

张华湘,曾牡丹[▲],孙乾征

(贵州省地质矿产勘查开发局 104 地质大队,贵州 都匀 558000)

摘要: 为实现县域范围内地质灾害风险区精准评价,同时服务于研究区内国土空间规划及重要工程项目建设,并为政府防灾减灾、风险决策、风险控制及风险管理提供技术支撑。以贵州省长顺县为例,基于对该县域范围内地质灾害的数量、类型、规模、发育特征及分布规律的详细调查,进一步采用“信息量法”系统地进行了全县 1:50000 的地质灾害风险评价,并对全县地质灾害的易发性、危险性、易损性及风险性进行了综合性的评价,其主要结果如下:易发性评价包含极高、高、中、低四个易发等级,危险性评价包含极高、高、中、低四个危险区,易损性评价包含低、中、高、极高易损性四个等级,地质灾害风险确定为极高、高、中、低四个等级;极高易发区和极高危险区均主要集中在长寨街道中部,该地区地质构造复杂,人类活动频繁,存在多处崩塌隐患,在极端降雨天气或者人类工程活动诱发下,极易发生地质灾害;地质灾害隐患管控与风险斜坡管控是一个动态过程,应加强区域风险管理体系建设。评价结果可为研究区内的地质灾害的减灾防灾和风险管控提供科学依据。

关键词: 地质灾害,信息量法,风险评价,管控对策

中图分类号:P642 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0072-06

Risk assessment and control measures of typical regional geological disasters*

ZHANG Huaxiang,ZENG Mudan[▲],SUN Qianzheng

(No. 104 Geological Team, Bureau of Geology and Mineral Exploration and Development of Guizhou Province, Duyun 550008, China)

Abstract: To achieve precise evaluation of geological disaster risk areas within a county, to serve the spatial planning and important engineering projects within the study area, and to provide technical support for government disaster prevention, risk decision making, risk control, and risk management, this paper takes Changshun County in

水样,均能到达较好的准确度和精密度,可应用于实际分析工作中,提高分析效率。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 中华人民共和国卫生部. 生活饮用水标准检验方法 总则:GB/T 5750.1—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [2] 国家环境保护局标准处. 水质 高锰酸盐指数的测定:GB 11892—1989[S]. 北京:中国标准出版社,1989.
- [3] 李莉,李晓,肖溶,等. 高锰酸盐指数(酸性法)测定方法的探讨[J]. 河北农业科学,2009,13(8):165-166.
- [4] 周艺蓉. 水质高锰酸盐指数的测定方法探讨[J]. 农业与技术,2021,41(9):91-93.

[5] 江韬,雷晓玲,牛芸芜. 加热条件对高锰酸盐指数测定的影响[J]. 安徽农业科学,2013,38(19):10192-10193.

[6] 陈丽琼,茹婉红,胡勇,等. 影响高锰酸盐指数准确测定的因素探讨[J]. 安徽农业科学,2013,41(1):284-287.

[7] 樊文艳. 浅谈水质高锰酸盐指数的测定方法[J]. 中国标准化,2021(12):190-193.

收稿日期:2023-12-20;修回日期:2024-03-21

作者简介:吴玉萍(1991-),女,助理工程师,主要从事生态环境监测工作。

▲通讯作者:李海英(1981-),女,高级工程师,主要从事生态环境监测工作。

Guizhou Province as the research area. Based on a detailed investigation on the number, types, scale, development characteristics, and distribution patterns of geological disasters within the county, the information value method was used to conduct a systematic 1 : 50000 geological disaster risk assessment of the entire county. A comprehensive evaluation of the susceptibility, hazard, vulnerability, and risk of geological disasters in the county was conducted. The main results are as follows: the susceptibility evaluation includes four levels, i. e. very high, high, medium, and low; the hazard evaluation includes four risk zones, i. e. very high, high, medium, and low; the vulnerability evaluation includes four levels, i. e. low, medium, high, and very high; the risk of geological disasters includes four levels, i. e. very high, high, medium, and low. The very high susceptibility and very high hazard zones are mainly concentrated in the central part of Changzhai Street, where the geological structure is complex, human activities are frequent, and there are multiple collapse hazards. Under extreme rainfall or human engineering activities, geological disasters are very likely to occur. The control of geological disaster risk and risk slopes is a dynamic process, and a regional risk management system should be constructed. The evaluation results can provide a scientific basis for reduction, prevention, and risk control of geological disasters in the study area.

Keywords: geological disaster, information value method, risk assessment, control measures

0 引言

在城镇建设和经济发展中,地质灾害由于其突发性、隐蔽性、滞后性、破坏巨大性等特点已经成为发展过程中不容忽视的安全隐患,各级自然资源主管部门对此也是高度重视,如何提前预防和降低潜在地质灾害风险,对社会经济健康发展具有重要的意义^[1-2]。田尤等^[3]提出了藏东察雅县城地质灾害风险评价及源头管控对策建议,并给出了具体的防治措施和建议。曾凡秋^[4]研究了湖南省保靖县的地质灾害风险评价与防治对策,强调了风险评估的重要性和实用性。田德志等^[5]进行了山西省文水县的地质灾害风险评价研究,以区域泥石流、崩塌和滑坡为例,展示了综合评价方法的应用。安全等^[6]人展示了贵州省纳雍紫岭煤矿区基于多源遥感数据的地质灾害风险评价,展示了遥感技术在地质灾害评估中的应用。张铎等^[7]人进行了中外地质灾害风险评价的研究文献综述,比较了国内外的研究方法和成果。聂启英^[8]探讨了太原市迎泽区的地质灾害风险调查与评价方法,提出了改进的评价方法。兰中孝等^[9]基于信息量法与斜坡单元进行了贵州省三都县打鱼镇的地质灾害风险评价,提供了一种新的评价视角。此外,一些研究强调了地质灾害管理的重要性,并提出了针对性的策略来减轻这些灾害的影响。孙立军等^[10]人研究了山西省吉县的地质灾害风险特征,并指出,该地区地质灾害频发,主要包括滑坡、泥石流等;同时提出了一系列管控对

策,如加强监测预警系统的建设和提高公众的防灾意识。胡胜华等^[11]人探讨了宜昌市旅游景区的地质灾害发展规律及其风险管控对策;研究通过分析历史数据,识别了高风险区域,并提出了针对性的管控措施,如制定紧急疏散计划和加强地质灾害点的固定监测。郭富赞^[12]的研究集中在兰州市的地质灾害特征及其风险管理,强调了城市规划在防灾减灾中的重要性,并建议通过科技手段提高预警系统的效率和准确性。上述研究显示,通过多源遥感数据、信息量法等先进技术,可以有效评估和管控地质灾害风险。

长顺县位于贵州省中南部,黔南州西北部,近年来,为发展经济,县境内各种人类工程活动增加,受此影响,各类地质灾害有不断增加之势,除了已发生的灾害外,还存在着不少的隐患。本文以该县风险评价为例,探讨地方主管部门在日常管理中应注意的关键问题,旨在为长顺县地质灾害防治、国土空间规划和政府决策提供基础依据,同时为相似地区的地质灾害风险管控提供参考。

1 研究区地质灾害概况

本次地质灾害风险调查共核实 72 处地质灾害隐患点,其中滑坡 15 处,占灾点总数的 21.83%;崩塌 57 处,占灾点总数的 79.17%。地质灾害的孕育是内因和外因共同作用结果。研究区工程地质岩组和地形地貌是区内地质灾害发育的主要控制因素,大气降雨是诱发滑坡的主导性因素,降雨、卸荷作

用、根劈作用等又是诱发崩塌的主导性因素。同时,切坡建房、道路边坡开挖与改造、城镇基础设施扩建等人类工程活动也在不同程度的影响着地质灾害的发生。其具体空间分布特征总体为:北部地势平坦且人口密度低,地质灾害不发育;中部长寨街道峰丛、峰林地貌明显,斜坡高陡且人口密度高,人类工程活动强烈,因此地质灾害分布较多;南部鼓扬镇、代化镇、敦操乡由于人口密度较小,地质环境条件较简单,地质灾害发育一般。县域地质灾害隐患点分布如图 1 所示。

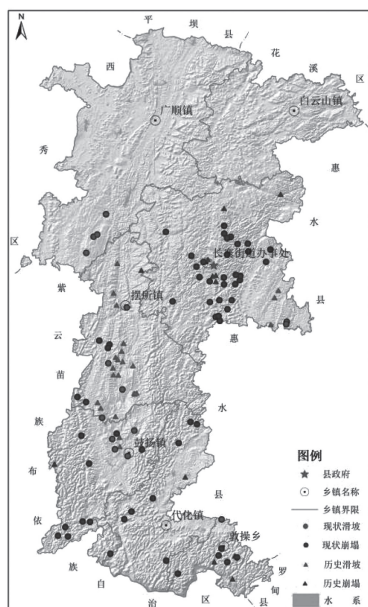


图 1 长顺县地质灾害隐患点分布图

2 地质灾害风险评价方法

本次县域地质灾害风险评价(1:50000)采用信息量模型,以栅格为单元进行评价,栅格大小为 5 m×5 m。信息量模型反映了一定地质环境下最易致灾因素及其细分区间的组合,通过特定评价单元内某种因素作用下地质灾害发生频率与调查区地质灾害发生频率相比较实现的。对应某种因素特定状态下的地质灾害信息量为:

$$I_{Aj \rightarrow B} = \ln \frac{N_j/N}{S_j/S}$$

式中: $I_{Aj \rightarrow B}$ —对应因素 A_j 状态(或区间)下地质灾害 B 发生的信息量; N_j —对应因素 A_j 状态(或区间)下地质灾害分布的单元数; N —调查区已知有地质灾害分布的单元总数; S_j —因素 A_j 状态(或区间)分布的单元数; S 为调查区单元总数。

当 $I_{Aj \rightarrow B} > 0$ 时,反映了对应因素 A_j 状态(或区间)下地质灾害发生倾向的信息量较大,地质灾害发生的可能性较大,或者说利于地质灾害发生;当 $I_{Aj \rightarrow B} < 0$ 时,表明因素 A_j 状态(或区间)条件下,不利于地质灾害发生;当 $I_{Aj \rightarrow B} = 0$ 时,表明因素 A_j 状态(或区间)不提供有关地质灾害发生与否的任何信息,即因素 A_j 状态(或区间)可以剔除掉,排除其作为地质灾害预测因子。

由于每个评价单元受众多因素的综合影响,各因素又存在若干状态,各状态因素组合条件下地质灾害发生的总信息量为:

$$I = \sum_{i=1}^n \ln \frac{N_i/N}{S_i/S}$$

式中: I —对应特定单元地质灾害发生的总信息量,指示地质灾害发生的可能性,可作为地质灾害易发性指数; N_i —对应特定因素、第 i 状态(或区间)条件下的地质灾害面积或地质灾害点数; S_i —对应特定因素、第 i 状态(或区间)的分布面积; N —调查区地质灾害总面积或总地质灾害点数; S —调查区总面积。

3 研究区地质灾害风险评价结果与分析

地质灾害易发性评价是对区域基础地质环境条件的评判,根据地质灾害发育特征一般区风险评价,主要对不同灾种选取评价因子,采用统计模型方法以 5 m×5 m 栅格单元开展。将易发性评价结果按照自然断点法分为极高、高、中、低四个等级。地质灾害危险性评价是在易发性评价基础上考虑降雨因素,降雨按照 50 年一遇工况考虑,评价结果分为低、中、高、极高四个等级。地质灾害易损性评价是在承灾体数据收集、现场调查的基础上,进行人员与财产易损性计算。按均值法将易损性计算值分为低、中、高、极高四个等级。将地质灾害危险性和易损性评价结果进行叠加分析,将地质灾害风险确定为极高、高、中、低四个等级,综合得到区域地质灾害风险等级分布图。

3.1 地质灾害易发性评价

通过对同一个评价单元内的滑坡和崩塌易发性进行比较,将两者易发性进行叠加,取两者之间的较高等级作为该栅格单元的综合易发性等级。通过对

县域易发性进行综合叠加,得到长顺县地质灾害易发性评价分区图(图2)。由图2可知,研究区共划分出极高易发区(I)1处,分区面积110.1 km²,占县域总面积的7.10%,共有各类地质灾害隐患点28处,占总调查点的38.89%,主要分布在长寨街道集镇,与人口密度有高度相关性;高易发区(II)4处,分区面积443.4 km²,占县域总面积的28.61%,共有各类地质灾害隐患点34处,占总调查点的47.22%,主要分布在长寨街道东南角及摆所河两岸鼓扬镇与代化镇相接处、敦操乡;中易发区(III)2处,分区面积227.8 km²,占县域总面积的14.69%,共有各类地质灾害隐患点4处,占总调查点的5.56%,主要分布在长寨街道边界区和代化镇南部;低易发区(IV)1处,分区面积769.00 km²,占县域总面积的49.60%,共有各类地质灾害隐患点6处,占总调查点的8.33%,主要分布在广顺镇与白云山镇、长寨街道西部、摆所镇东部、鼓扬镇中部及南部。

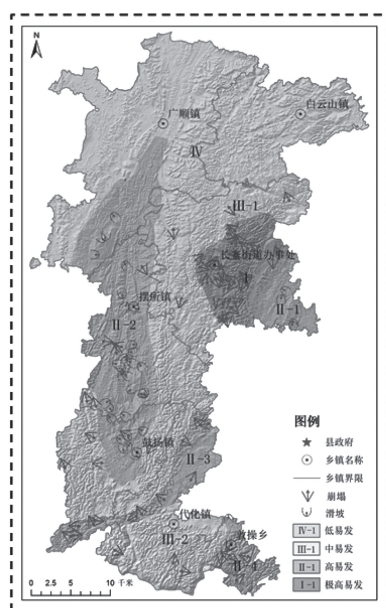


图2 长顺县地质灾害易发性评价分区图

值得注意的是,低易发区(IV)广泛分布于整个工作区,主要分布于广顺镇与白云山镇、长寨街道西部、摆所镇东部、鼓扬镇中部及南部。该区以溶蚀、地中山峰丛地貌为主,主要为碳酸盐岩硬质岩分布区,北部广顺镇区域地质构造强烈,地表水系发育,出露地层主要为石炭系(C_2h 、 Cb 、 C_2p_1m)岩性主要为灰岩、白云岩、泥晶灰岩;二叠系(P_3w-c 、 P_2q-m);泥盆系(D_3gp)白云岩,岩性为灰岩、燧石灰岩。工程岩组主要为硬质岩组,广顺镇靠近贵安新

区,也是长顺县的重点规划区,是长顺重要的工业区、农业区,人口密度较低,人类工程活动较强,但多平地、低山,土层较厚,因此低易发。北部白云山镇区地质环境条件简单,地貌主要为地中山溶蚀峰丛地貌,地质构造少,该区大部分出露地层为泥盆系(D_3gp)白云岩,岩性主要以硬质岩类为主,硬夹软质岩组极少,白云山镇地广人稀,植被覆盖率高,人类工程活动微弱,人类工程活动破坏地质环境弱,因此低易发^[13]。该区现有崩塌地质灾害隐患点6处,规模等级皆为小型,地质灾害造成民房受损,共威胁54户281人,受威胁经济损失335万元。

3.2 地质灾害危险性评价

地质灾害危险性评价是在易发性评价的基础上叠加降雨、灾害密度以及人类工程活动因子叠加得到,本次地质灾害危险性评价计算公式:地质灾害危险性=0.55×易发性数据+0.15×灾点密度+0.15×人类工程活动+0.15×降雨数据。它代表了该区域发生地质灾害的相对危险性的大小。

最终得到长顺县地质灾害危险性评价结果,如图3所示。由图3可知:长顺县地质灾害风险分布呈现高中低不同等级,极高危险区和高危险区占全县面积的12.8%,中危险区占27.11%,低危险区占60.09%。其具体特征如下:(1)地质灾害极高危险区:该区地质灾害发育,集中分布在长寨街道中部。总面积36.43 km²,占全区总面积的2.35%。其孕灾条件好,人类工程活动较强烈,对区域内地质环境造成的影响大,在极端降雨天气或者人类工程活动诱发下,极易发生地质灾害,遭受地质灾害的危险性极高;(2)地质灾害高危险区:该区内地质灾害较发育,该区在全县内分布广泛。主要分布于长寨街道、摆所镇、鼓扬镇、代化镇、敦操乡等区域。总面积

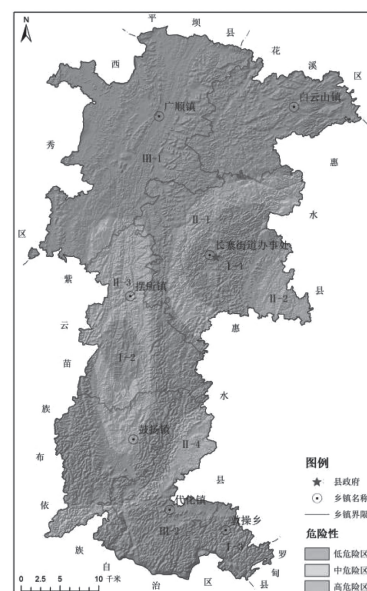


图3 长顺县地质灾害危险性评价分区图

162.03 km², 占全区总面积的 10.45%。人类工程活动较强烈, 对区域内地质环境造成的影响较大, 容易发生工程活动诱发的地质灾害, 受地质灾害的危险性高; (3) 地质灾害中危险区: 该区内地质灾害较少, 多呈零星分布。该区在全县分布较广, 主要分布于长寨街道、摆所镇、鼓扬镇、代化镇、敦操乡等区域。总面积 420.34 km², 占全区总面积的 27.11%。其孕灾条件一般, 人类工程活动程度一般, 地质环境受人类工程活动的影响相对较小, 遭受地质灾害的危险性中等^[14]; (4) 地质灾害低危险区: 该区域地质灾害一般发育, 其分布区域广, 涵盖整个长顺县, 与地质灾害中危险区大量交替嵌合出现, 长顺县域低风险区大致连片分布, 主要分布除上述区域以外的区域。总的分布面积较广, 总面积 931.50 km², 占全区面积的 60.09%。人类工程活动程度较弱, 区域地质环境良好, 遭受地质灾害的危险性较低^[15]。

3.3 地质灾害易损性评价

根据易损性评价的方法、指标选取依据、指标体系的建立以及指标权重内容的确定, 依据公式计算得到长顺县的综合易损性指数值, 按照自然断点法, 将研究区易损性指数分为低易损性、中易损性、高易损性以及极高易损性四个等级。研究区地质灾害易损性评价结果见图 4 及表 1。由表 1 不难看出, 根据易损性分区标准, 极高易损区、高易损区、中易损区和低易损区分别占全区面积的 1.08%、17.94%、28.92% 和 52.04%。其中, 低易损区面积最大, 占比超过半数, 而极高易损区面积最小。整体来看, 易损性逐渐减小, 从极高到低易损区呈递减趋势。同时由图 4 可知: 极高易损区主要分布在长寨街道办事处及广顺镇镇政府, 其次为各个乡镇镇政府附近; 高易损区主要分布于各个乡镇镇中心外围以及鼓扬镇北部、摆所镇中南部, 中易损区广泛分布于整个长顺县域, 主要为各个村中心; 低易损区主要分布在区域内无人和少人区域。需要说明的是, 按照其潜在威胁对象的人口数量及财产, 对照地质灾害险情等级划分表, 高易损性斜坡 3 处、中易损性斜坡 67 处、低易损性斜坡 19 处。综合风险斜坡潜在危险性与易损性结果, 按风险斜坡潜在风险类别表, 其中 I 类风险斜坡点 3 处, II 类风险斜坡点 10 处, III 类风险斜坡点 76 处。评价结果与现场实地调查结果基本相符。

表 1 长顺县易损性分区表

易损性分区	面积/km ²	占全区的面积/%
极高易损区	16.68	1.08
高易损区	278.20	17.94
中易损区	448.33	28.92
低易损区	806.79	52.04

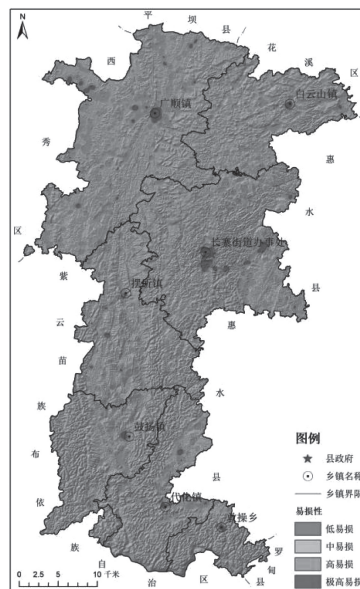


图 4 长顺县易损性分区图

3.4 地质灾害风险性评价

综合地质灾害危险性和易损性评价结果, 确定地质灾害风险为极高、高、中、低四个等级, 得到区域地质灾害风险区划图 (图 5)。由图可知, 地质灾害极高风险区 (I) 1 个, 面积为 23.58 km², 占县域总面积的 1.52%; 地质灾害高风险区 (II) 3 个, 面积

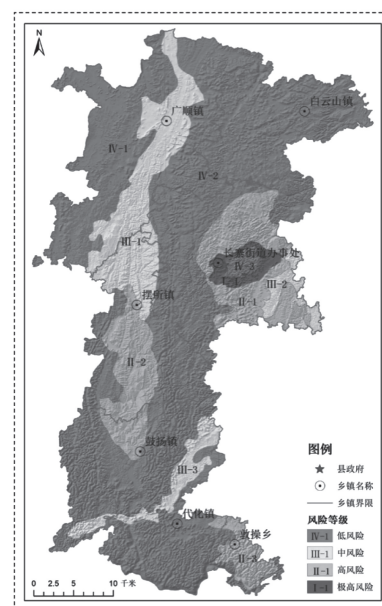


图 5 长顺县风险评价分区图

为 239.48 km², 占县域总面积的 15.45%; 地质灾害中风险区 (III) 3 个, 面积为 230.08 km², 占县域总面

积的 14.84%;地质灾害低风险区(Ⅳ)3 个,面积为 1057.16 km²,占县域总面积的 68.19%。其中,区内村寨及集镇密集,人类工程活动强烈。现分布地质灾害隐患点 14 处,皆为崩塌;目前较稳定 13 处、稳定 1 处;按灾害规模等级分类,小型 12 处、中型 1 处、特大型 1 处。按险情等级分类,小型 7 处、中型 4 处、特大型 3 处,威胁 181 户 8508 人,潜在经济损失 14260 万元;风险斜坡 19 处,其中低危险性风险斜坡 17 处、中危险性风险斜坡 2 处,潜在威胁 159 户 694 人,威胁财产 1790 万元。现状地质灾害发育,风险极高。而低风险区,区内村寨及集镇较分散,人类工程活一般。现分布各类地质灾害隐患点 10 处,皆为崩塌,占总调查点的 13.89%。目前较稳定 9 处、不稳定 1 处;按灾害规模等级分类,皆为小型,按险情等级分类,小型 9 处、中型 1 处,共威胁 99 户 499 人,潜在经济损失 560 万元。风险斜坡 18 处,其中低危险性风险斜坡 14 处、中危险性风险斜坡 4 处,潜在威胁 146 户 663 人,威胁财产 1990 万元。现状地质灾害发育程度低,风险低。

4 结论

(1)长顺县域极高风险区集中分布于长寨街道办事处,总面积 23.58 km²,占县域总面积的 1.52%。区内人类工程活动强烈,地质环境差,在极端降雨天气或者人类工程活动诱发下,极易发生地质灾害,遭受地质灾害的危险性极高,再加上区内人口基数大、密集程度高,发生地质灾害时所造成的人员伤亡和经济损失极大,地质灾害风险极高。

(2)易发性评价分为四个等级:极高、高、中、低;危险性评价同样分为四个等级:极高、高、中、低;易损性评价则分为低、中、高、极高四个等级,地质灾害风险确定为极高、高、中、低四个等级。极高易发区和极高危险区主要位于长寨街道中部,该区域地质结构复杂,频繁的人类活动导致多处崩塌隐患。在极端降雨或工程活动的诱发下,该区域极易发生地质灾害。

(3)应加强区域风险管理体系建设,在工程建设之前,必须由资质单位对建设场地进行地质灾害危险性评估。同时地质灾害隐患管控与风险斜坡管控是一个动态过程,随着经济发展与城市建设,地质灾害隐患与风险斜坡级别会发生变化,建议进一步加强加强对地质灾害有关管理、监测人员的技术培训,加

强对群众地质灾害防治知识的宣传讲解,强化防灾意识及责任意识。

参考文献[REFERENCES]

- [1] 张业成,胡景江,张春山.中国地质灾害危险性分析与灾变区划[J].海洋地质与第四纪地质,1995(3):55-67.
- [2] 刘民生.浅议地质灾害风险调查评价有关问题[J].四川地质学报,2023,43(4):687-692.
- [3] 田尤,陈龙,黄海,等.藏东察雅县城地质灾害风险评价及源头管控对策建议[J].中国地质灾害与防治学报,2024,35(2):146-154.
- [4] 曾凡秋.湖南省保靖县地质灾害风险评价与防治对策研究[J].中国减灾,2024(8):54-55.
- [5] 田德志,焦娜,王晓娅,等.山西省文水县地质灾害风险评价及风险管控研究:以区域泥石流、崩塌和滑坡为例[J].地质找矿论丛,2024,39(1):134-138.
- [6] 安全,李亮,邢愿,等.基于多源遥感数据的区域地质灾害风险评价——以贵州省纳雍彝山煤矿区为例[J].贵州地质,2024,41(1):80-91.
- [7] 张铎,冯东梅,王来贵,等.中外地质灾害风险评价研究文献综述[J].防灾减灾学报,2024,40(1):85-94.
- [8] 聂启英.区域地质灾害风险调查与评价方法探讨——以太原市迎泽区为例[J].华北自然资源,2024(1):146-149.
- [9] 兰中孝,郑冰,廖德武,等.基于信息量法与斜坡单元的贵州省三都县打鱼镇地质灾害风险评价[J].地下水,2023,45(5):160-163.
- [10] 孙立军,邸建雷,程丹艺.山西省吉县地质灾害风险特征及管控对策浅析[J].华北自然资源,2023(5):64-67.
- [11] 胡胜华,黄维,许汇源,等.宜昌市旅游景区地质灾害发育规律及风险管控对策[J].资源环境与工程,2022,36(6):749-757.
- [12] 郭富赞.兰州市地质灾害特征与风险管控对策[J].城市与减灾,2019(3):59-63.
- [13] 龚芯磊,张斌,高金利,等.基于斜坡单元尺度 AHP-信息量模型的重点区域地质灾害风险评价——以贵州省紫云县中部重点区为例[J].贵州地质,2023,40(3):310-320.
- [14] 高永应.贵州省盘州市乌蒙镇一坪地乡重点区域地质灾害风险评价研究[J].内蒙古煤炭经济,2022(8):181-183.
- [15] 周超,常鸣,徐璐,等.贵州省典型城镇矿山地质灾害风险评价[J].武汉大学学报(信息科学版),2020,45(11):1782-1791.

收稿日期:2024-05-17;修回日期:2024-07-18

基金项目:贵州省地质矿产勘查开发局地质科学技术研究项目([2021]21)。

作者简介:张华湘(1985-),男,湖南邵阳人,高级工程师,硕士,主要从事地灾防治工作。

▲通讯作者:曾牡丹(1991-),女,贵州罗甸人,高级工程师,学士,主要从事地灾防治工作。

QuEChERS 法净化联用 UPLC-MS/MS 分析鸡肉、蛋中 22 种药物的残留

于霞¹, 马凯², 简银池¹, 吴新文¹, 黄永桥¹, 王乾丽¹, 王莉娜¹, 曹俊杰¹▲

(¹ 贵州省检测技术研究应用中心, 贵州 贵阳 550014, ² 贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550014)

摘要: 创建了 QuEChERS 法净化联用 UPLC-MS/MS 分析鸡肉、蛋中磺胺类、喹诺酮类和四环素类 22 种药物残留量的方法。样品经 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液和 6% 甲酸乙腈提取、盐析和净化后上机分析。以 C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸乙腈和 0.1% 甲酸水含 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液为流动相, 梯度洗脱, 电喷雾离子源 (ESI⁺) 扫描, 结合动态多重反应监测 (MRM) 模式, 用外标法定量。22 种兽药的线性范围好, 相关系数 (*r*) 全都大于 0.995, 检出限 (LOD) 在 0.5 ~ 1.0 μg · kg⁻¹ 范围, 定量限 (LOQ) 在 1.5 ~ 3.0 μg · kg⁻¹ 范围; 高、中、低 3 个浓度水平下开展加标回收试验, 其中回收率在 76.6% ~ 107.2% 范围, 相对标准偏差 (*RSD*) 在 1.8% ~ 11.6% 范围。通过对实际样品的检测, 本方法高效、快捷、灵敏、可靠、经济和通量高, 适合对鸡肉和鸡蛋中的磺胺类 (Sulfonamides)、喹诺酮类 (Quinolones) 及四环素类 (Tetracyclines) 兽药残留进行分析检测。

关键词: QuEChERS 法, UPLC-MS/MS, 鸡肉, 鸡蛋, 22 种兽药 Quinolones

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 1003-6563 (2025) 01-0078-08

Simultaneous determination of residues of 22 kinds of veterinary drugs in chicken and egg by QuEChERS combined with UPLC-MS/MS

YU Xia¹, MA Kai², JIAN Yinchu¹, WU Xinwen¹, HUANG Yongqiao¹, WANG Qianli¹, WANG Lina¹, CAO Junjie¹▲

(¹ Guizhou Testing Technology Research and Application Center, Guiyang 550014, China; ² Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550014, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of the residues of 22 kinds of veterinary drugs in chicken and eggs was established by QuEChERS combined with UPLC-MS/MS. The samples were dissolved in Na₂EDTA-McIlvaine buffer and extracted by 6 % formate acetonitrile, and salination and purification were performed before analysis. C₁₈ column was used for separation, with 0.1 % formic acid acetonitrile and 0.1 % formic acid 2 mmol/L ammonium acetate water solution as the mobile phase for gradient elution. The samples were scanned by high voltage electrospray ionization mass spectrometry (ESI⁺) under dynamic multiple response detection (MRM) mode, and quantified by external standard method. The 22 kinds of veterinary drugs had good linear relationship, with correlation coefficients greater than 0.995. The detection limits were between 0.5 μg/kg and 1.0 μg/kg, and the quantitative limits were between 1.5 μg/kg and 3.0 μg/kg. The spiked recovery rates were between 76.6 % and 107.2 %, and the relative standard deviation (*RSD*) was between 1.8 % and 11.6 %. Through the detection of actual samples, the method was proved to be efficient, fast, sensitive, reliable, and economical, suitable for the determination of veterinary drugs in chicken and eggs such as sulfonamides, quinolones, and tetracyclines.

Keywords: QuEChERS method, UPLC-MS/MS, chicken, egg, 22 kinds of veterinary drugs

鸡肉和鸡蛋作为人们日常营养供应的食物之一,备受人们的认可和接收,但部分养殖场为提高鸡肉和鸡蛋的产量,超限量使用各类抗生素和激素药物,长时间使用抗病毒药物会使病毒和细菌的抗药性增加,而抗生素和激素残留是直接导致儿童性早熟及发育异常的主要原因之一,而磺胺类、喹诺酮类、四环素类是常检出的兽药残留类别^[1-2]。发达国家在动物性食品中磺胺类、喹诺酮和四环素类最大限量为 0.10 ~ 1.90 mg · kg⁻¹^[3-4]。在食品动物中,2015 年农业部第 2292 号公告中规定,禁止使用喹诺酮类中洛美、培氟、氧氟和诺氟沙星 4 种抗生素,标志着我国“饲料禁抗”迈出了第一步^[5]。

高灵敏度、良好重现性和广选择性等是液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法具有的优势,已经成为复杂的动植物组织样品中多兽药和多农药残留同时检测的主要分析方法^[25]。其中王炼等^[6]、方从容等^[7]、郭海霞等^[8]、郭黎明等^[9]以畜禽肉及其副产品、蛋奶和水产品作为研究对象,同时测定多兽药残留;郭爱静等^[10]、王帅等^[11]、胡彧娴等^[12]、韦誉等^[13]和陈磊等^[14]以油料、牛乳、水果、蔬菜和茶叶为研究对象,同时测定多农药残留。

本方法通过优化 QuEChERS 方法中提取、盐析和净化样品等步骤,结合超高效液相-串联质谱仪优势,利用 UPLC-MS/MS 分析鸡肉和禽蛋中磺胺、喹诺酮、四环素等兽药残留,为鸡肉和禽蛋中兽药残留的快速测定方法提供技术支撑。

1 分析方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 材料

鸡肉和鸡蛋购买于本地区超市和农贸市场,取鸡肉约 1000 g 和鸡蛋 30 枚分别于匀浆机中均质,在-18 ℃条件下存放备用。11 种磺胺类药物混合标准溶液(纯度≥96%),7 种喹诺酮类药物混合标准溶液(纯度≥97%),4 种四环素类药物混合标准溶液(纯度≥98%),浓度均为 100 μg · mL⁻¹,所有标准溶液从 First Standard 购得。

1.1.2 试剂

表 1 主要试验试剂

试剂名称	规格型号	公司	试剂名称	规格型号	公司
甲醇	HPLC	ANPEL	无水硫酸镁	AR	科密欧
乙腈	HPLC	ANPEL	柠檬酸	AR	科密欧
甲酸	HPLC	ANPEL	磷酸氢二钠	AR	科密欧
无水硫酸钠	AR	科密欧	Na ₂ EDTA	AR	科密欧
氯化钠	AR	科密欧	C ₁₈ 十八烷基键合硅胶	40 ~ 63 μm	ANPEL
PSA	40 ~ 63 μm	ANPEL	乙酸乙腈	AR	科密欧

1.2 试验仪器

表 2 试验开展的主要仪器设备

设备名称	规格型号	公 司
三重四级杆串联质谱仪(配有 ESI 源)	Agilent 6470	美国安捷伦
超高效液相色谱仪	Agilent 1290	美国安捷伦
多管涡旋混合器	UMV-2	泰科仪器
型氮吹仪	N-EVAP12	美国 Organomation 公司
PTFE 滤膜	0.22 μm	ANPEL
搅拌机	Blixer3	法国 ROBOT COUPA
高速离心机	L-500 型	湘仪集团
电子天平	LT2002	常熟市天量仪器有限公司
实验室超纯水制备系统	Milli-Q Integra115	美国 Millipore

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液

将磺胺类、喹诺酮类和四环素类标准溶液精确取出并与甲醇混合制成 10.0 μg · mL⁻¹ 的磺胺类标准储备液、喹诺酮类 10.0 μg · mL⁻¹ 的标准储备液、四环素类 10.0 μg · mL⁻¹ 的标准储备液,冷冻避光保存(-18 ℃以下)。

1.3.2 兽药混合标准溶液

准确移取 3 类所需量的标准储备液,用 20% 乙腈水(20 : 80, v/v)定容,其中:磺胺类、喹诺酮类为 100 ng · mL⁻¹,四环素类(现配现用)为 200 ng · mL⁻¹ 的标准溶液。分别吸取 0.10 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.80 mL、1.60 mL、2.00 mL 于 10 mL 的容量瓶中,用 20% 乙腈水(20 : 80, v/v)混匀,并定容至刻度。

1.3.3 Na₂EDTA-McIlvaine 溶液

磷酸氢二钠 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 将 71.63 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 加入水中, 使其溶于水中, 使其体积为 1 L; 柠檬酸 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 将柠檬酸按重量计 21.04 g, 溶解在水中, 定体积到 1 L; McIlvaine 缓冲液溶: 将 McIlvaine 625 mL ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与柠檬酸 1000 mL ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合, 混合均匀; Na_2EDTA -McIlvaine ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 用 McIlvaine 缓冲剂将 60.5 g 的 Na_2EDTA 溶于 McIlvaine ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 混合均匀。调节 pH 值至 4.0, 保存备用 (冷藏温度 4°C)。

1.4 样品前处理

将 2 g 所制得的试样置于 50 mL 的螺纹式离心管内, 接着添加 1 粒均匀的陶瓷质子及 2 mL 的 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲剂; 另外, 向其中添加甲酸乙腈 (6% 甲酸) 10 mL, 涡旋, 向其中添加盐析包 (Na_2SO_4 4 g, NaCl 1 g), 立刻进行涡流搅拌 1 min, 然后进行 5 min (旋转速度 4000 r/min) 的离心。将 6 mL 的乙腈层放入净化管 (900 mg 硫酸钠和 150 mg C_{18} 粉) 中, 旋流 1 min, 再离心 5 min (转速 4000 r/min), 取出 4 mL 的上清液到 15 mL 的离心管中, 水浴 (温度 45°C), 吹至近干, 定容 (乙: 腈水 = 2: 8) 至 1 mL, 然后转移至 2 mL 离心管中, 离心 (转速 10000 r/min) 2 min, 移取上清液过膜, 上机测试。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, $1.8 \mu\text{m}$); 流动相: B 相是 0.1% 甲酸乙酸铵溶液 (浓度 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), A 相是 0.1% 甲酸乙腈溶液; 流速: 0.3 mL/min ; 柱温: 40°C ; 进样量: $5.0 \mu\text{L}$; 后运行时间 1.5 min; 梯度洗脱程序: 0 ~ 0.5 min (10% B), 0.5 ~ 2.0 min (10% ~ 25% B), 2.0 ~ 2.5 min (25% ~ 50% B), 2.5 ~ 3.0 min (50% ~ 80% B), 3.0 ~ 4.2 min (80% B), 4.2 ~ 4.5 min (80% ~ 10% B)。

1.5.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI^+), 多反应监测 (MRM), 正离子扫描模式, 毛细管电压为 3500 V, 雾化气压力 40 psi, 干燥气流速 5 L/min , 干燥气温度 300°C , 鞘气流速 11 L/min , 鞘气温度 250°C , 喷嘴电压 500 V。

2 结果与分析

2.1 样品前处理优化

2.1.1 提取溶剂的选择

对于磺胺类、喹诺酮类、四环素类兽药, 有机溶剂作为较好的提取剂, 农药常用乙腈, 兽药常用乙酸乙酯、乙腈和甲醇等^[26], 同时增加提取剂酸度, 容易破坏样品的自身结构, 增加提取效率。李宁等在牛奶中测定磺胺类、喹诺酮类、甾体激素类及四环素类兽药残留^[15]时用 5% 乙酸 (V/V) 乙腈, 李娜等在动物源食品中测定 4 类 29 种禁限用兽药时用 5% 乙酸 (V/V) 乙腈^[16], 方从容等^[17]在鸡蛋中测定 125 种兽药残留和郭海霞等^[18]在测猪肉中 121 种兽药时用乙腈, 罗辉泰等^[19]在测定畜肉中 63 种兽药残留时, 用 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液及乙腈提取。

本实验用 1 (80% 乙腈水溶液)、2 (纯乙腈)、3 (1% 乙酸乙腈) 和 4 (1% 甲酸乙腈) 作为提取剂优化方案, 如图 1 所示, 1% 甲酸乙腈回收率较高。又对甲酸乙腈的体积比从 1% ~ 10% 进行对比, 如图 2 所示, 喹诺酮和沙星影响不太大, 四环素类得出 6% 甲酸乙腈回收率最高。故选择 6% 甲酸乙腈作为样品的提取剂。超声也能增加提取率, 同时实验考察超声时间和提取率的关系, 如图 3 所示。结果表明

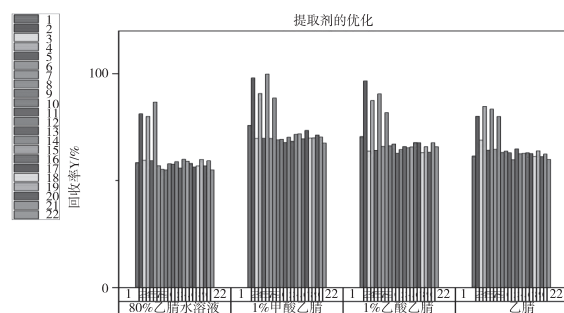


图 1 提取剂的优化-1

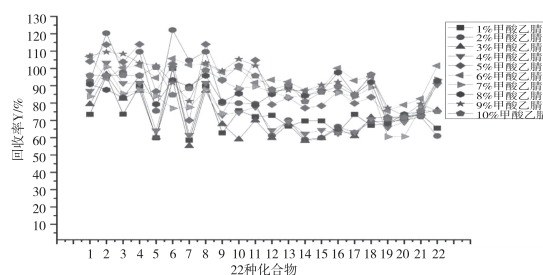


图 2 提取剂的优化-2

10 min 左右提取效率最好。其中 1-22 号化合物名称见表 3。

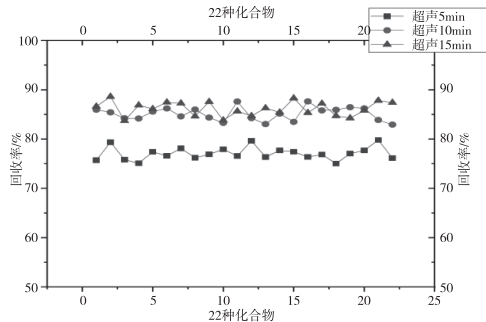


图 3 超声时间优化

表 3 1-22 号化合物名称

序号	化合物名称	序号	化合物名称
1	磺胺间甲氧嘧啶(JJYMD)	12	恩诺沙星(ENSX)
2	磺胺甲基嘧啶(JJMD)	13	环丙沙星(HBSX)
3	磺胺二甲嘧啶(EJMD)	14	培氟沙星(PFSX)
4	磺胺间二甲氧嘧啶(JEJYMD)	15	氧氟沙星(YFSX)
5	磺胺嘧啶(MD)	16	沙拉沙星(SLSX)
6	磺胺甲噁唑(JWZ)	17	达氟沙星(DFSX)
7	磺胺氯哒唑(LDQ)	18	诺氟沙星(NFSX)
8	磺胺邻二甲氧嘧啶(LEJYMD)	19	四环素(SHS)
9	磺胺甲噁二唑(JSEZ)	20	土霉素(TMS)
10	磺胺噻唑(SZ)	21	金霉素(JMS)
11	磺胺二甲异噁唑(EJYWZ)	22	多西环素(DXHS)

2.1.2 分散固相萃取条件的优化

鸡肉和鸡蛋中含有大量的蛋白质和脂肪等杂质,既要减少杂质对目标物的影响,又要增加目标物的回收。QuEChERS 法具有前处理周期短、操作简单、安全和高性价等优势,一般的吸附剂有 C₁₈、PSA、GCB 等^[27]。PSA 可吸附金属离子、色素、脂肪酸和其他极性有机酸等杂质^[20],C₁₈可以吸附脂肪等弱极性杂质^[21,27]。本研究对四种方法进行对比(表 4)。

表 4 四种前处理方法的主要成分

组名	盐析组成分	净化组成分
Q1	4g 硫酸镁、1g 氯化钠、1g 柠檬酸钠、0.5g 柠檬酸二氢钠	1200mg 硫酸镁和 400mgPSA
Q2	4g 无水硫酸镁、1g 乙酸钠	1200mg 硫酸镁和 400mgPSA
Q3	4g 无水硫酸钠、1g 乙酸钠	900mg 硫酸钠,150mgC ₁₈ ,50mgPSA
Q4	4g 无水硫酸钠、1g 乙酸钠	900mg 硫酸钠和 150mgC ₁₈

四组对磺胺和喹诺酮的回收率影响不大,但 Q1 组和 Q2 组的四环素类回收率几乎没有,因为 Mg²⁺和四环素类络合成沉淀。由图 4 可知,Q4 组的回收率整体高于 Q3 组,变量为 PSA。因此,盐析净化选取 Q4 组。

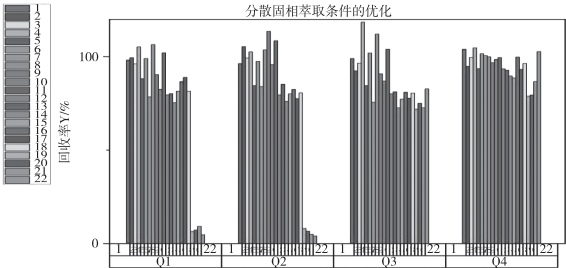


图 4 分散固相萃取条件的优化

2.2 色谱条件优化

磺胺类、喹诺酮类、四环素类兽药化学结构差异非常大,为酸碱两性化学物质,化学性质截然不同。本方法运用超高效液相色谱质谱联用仪,选择了 1.8 μm 填料为 C₁₈ 柱,此柱为超高压反相色谱柱对目标物进行分离。少量的乙酸铵能增大流动相对色谱柱的保留能力,提高分离效果。分别考察了 50 mm 和 100 mm 的 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,以 A 为有机相:甲醇、乙腈、0.1% 甲酸乙腈溶液;B 为水相:0.1% 甲酸水、0.2% 甲酸水、0.1% 甲酸水含 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液等的分离能力^[28,31]。结果表明,在 100 mm 色谱柱上,各化合物的分离度较好,B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液和 A 为 0.1% 甲酸水含 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵为流动相时,分离效果较好,具有较好的响应值。最终确立了使用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,试样单针完成分析的时间在 6 min 内,适合样品的批处理。图 5 和图 6 为磺胺类、喹诺酮类和四环素类总离子流图和 MRM 色谱图。

2.3 质谱条件优化

为提高采集效率,保证目标物的响应值最好。在正离子多反应监测模式下对 22 种兽药进行一级全扫,找到母离子([M+H]⁺),母离子和子离子共同扫描,获得子离子,优化锥孔和毛细管的电压,最后选择高响应、基线噪声低的碎片离子的两对离子作为定性离子和定量离子,继续优化子离子的碰撞能量^[29],让丰度比达到最大,配合其他质谱参数,得到

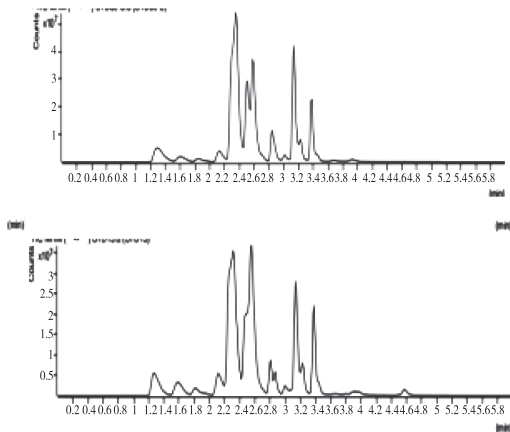


图 5 磺胺类、喹诺酮类和四环素类总离子流图

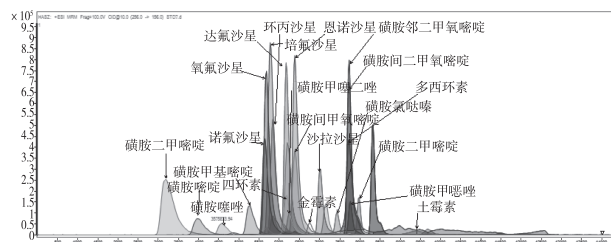


图 6 磺胺类、喹诺酮类和四环素类 MRM 图

最佳的质谱条件(表 5)。

表 5 22 种兽药的 MRM 质谱法采集参数

目标化合物	保留时间 /min	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
磺胺间甲氧嘧啶	2.910	281.1	92.0/156.1 [*]	100	15/28
磺胺甲基嘧啶	2.143	265.1	92.0 [*] /156.0	110	15/25
磺胺二甲嘧啶	1.293	279.0	92.0/186.0 [*]	120	15/25
磺胺间二甲氧嘧啶	3.383	311.0	92.0/156.0 [*]	141	16/28
磺胺嘧啶	1.608	251.1	92.0/156.0 [*]	100	10/22
磺胺甲噁唑	3.154	254.0	92.0 [*] /156.0	100	10/25
磺胺氯吡嗪	3.017	285.0	92.0 [*] /156.0	100	10/25
磺胺邻二甲氧嘧啶	3.141	311.1	92.0/156.0 [*]	130	20/25
磺胺甲噻二唑	2.536	271.0	92.0/156.0 [*]	90	15/25
磺胺噻唑	1.867	256.0	92.0/156.0 [*]	100	10/21
磺胺二甲异噻唑	3.242	268.0	92.0/156.0 [*]	100	10/20
恩诺沙星	2.594	360.2	245.0/316.1 [*]	120	20/30
环丙沙星	2.372	332.1	231.0/314.1 [*]	135	20/42
培氟沙星	2.345	334.1	290.2/316.2 [*]	130	20/16
氧氟沙星	2.308	362.0	261.1/318.1 [*]	130	15/26
沙拉沙星	2.843	386.2	299.1/342.1 [*]	130	20/27
达氟沙星	2.469	358.2	340.2/96.0 [*]	140	25/25
诺氟沙星	2.292	320.0	233.0/302.1 [*]	130	20/25
四环素	2.512	445.0	427.0/410.0 [*]	125	8/16
土霉素	2.306	461.2	426.0 [*] /443.0	130	8/16
金霉素	3.083	479.1	462.0/444.0 [*]	130	16/19
多西环素	3.138	445.1	410.2/428.2 [*]	105	20/25

注：^{*} 为定量离子。

2.4 方法有效性评价

2.4.1 线性关系、检出限和定量限

本实验采用空白基质匹配标作为混合标准曲线(其中喹诺酮类为 2.00 ~ 40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,磺胺类为 1.00 ~ 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,四环素类为 5.00 ~ 50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),在所选的色谱和质谱条件下确定,对于其浓度(x , $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),用峰面积(y)作校正曲线。如表 6 所示,22 种磺胺类、四环素类和喹诺酮类药物在各自的线性区间中具有较好的线性相关性,其相关系数 r 都在 0.995 以上。在此基础上,通过加入空白试样,将每种成分的含量测定值与信噪比(S/N)= 3 作为检测下限,利用信噪比(S/N)= 10 进行测定,最后获得 22 种兽药的最高限量(0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),定量分析下限在 1.5 ~ 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间。

表 6 22 种兽药的线性方程、相关系数(r)、检出限及定量限

目标药物	回归方程	线性 范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	相关 系数 r	LODs/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	LOQs/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
磺胺二甲嘧啶	$Y=1231969.44X-12706.24$	1~20	0.999	0.5	1.5
磺胺嘧啶	$Y=307292.65X-27017.59$	1~20	0.998	0.5	1.5
磺胺噻唑	$Y=183903.13X-10557.47$	1~20	0.998	0.5	1.5
磺胺甲基嘧啶	$Y=462191.03X+35687.91$	1~20	0.998	0.5	1.5
诺氟沙星	$Y=1040956.93X+302182.87$	1~20	0.996	0.5	1.5
土霉素	$Y=102163.61X$	2~40	0.996	1	3
氧氟沙星	$Y=1672645.55X+855306.53$	1~20	0.996	0.5	1.5
培氟沙星	$Y=2064270.17X+984260.24$	1~20	0.995	0.5	1.5
达氟沙星	$Y=1858270.2X-1625939.8$	1~20	0.995	0.5	1.5
环丙沙星	$Y=1163844.19X+441054$	1~20	0.997	0.5	1.5
四环素	$Y=402069.66X$	2~40	0.995	1	3
磺胺甲噻二唑	$Y=212691.54X-69012.41$	1~20	0.999	0.5	1.5
恩诺沙星	$Y=1726245.08X+782455.81$	1~20	0.998	0.5	1.5
沙拉沙星	$Y=602613.57X+72332.91$	1~20	0.997	0.5	1.5
磺胺间甲氧嘧啶	$Y=286034.51X+56225.93$	1~20	0.997	0.5	1.5
磺胺氯吡嗪	$Y=187261.18X-31213.24$	1~20	0.999	0.5	1.5
多西环素	$Y=502274.73X$	2~40	0.999	1	3
磺胺邻二甲氧嘧啶	$Y=2517770.66X+1442687.98$	1~20	0.996	0.5	1.5
磺胺甲噁唑	$Y=400645.94X+103959.44$	1~20	0.997	0.5	1.5
磺胺二甲异噻唑	$Y=249303.44X-27500.61$	1~20	0.999	0.5	1.5
磺胺间二甲氧嘧啶	$Y=1522308.04X+929091.54$	1~20	0.996	0.5	1.5
金霉素	$Y=409906.93X-334064.03$	2~40	0.996	1	3

2.4.2 加标回收率及精密度考察

在此基础上,以高、中、低 3 个不同的含量,分别加入低、中、高 3 种含量,每一种添加水平重复 6 次,

按 1.4 程序进行仪器检测,并分别求出其平均加标回收率及平均相对标准差。磺胺类、喹诺酮类和四环素类抗生素在肉鸡中的含量分别为 5 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、5 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、25 ~ 250 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,线性良好, $r \geq 0.995$;所有级别上的标化平均回收率为 79.9% ~ 108.2%,相对标准偏差(RSDs)为 1.6% ~ 10.6%。鸡蛋中磺胺类、喹诺酮类及四环素类药物分别为 5 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、5 ~ 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、25 ~ 250 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,线性相关性良好, $r \geq 0.990$;加标在各级

表 7 22 种兽药的平均回收率和精密度

样品类别	目标药物	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 /%	RSDs /%	目标药物	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 /%	RSDs /%
鸡肉	磺胺间甲氧嘧啶	1	83.7	5.1	恩诺沙星	1	94.3	9.8
		4	98.9	8.1		4	98.8	7.6
		10	108.2	3.3		10	88.8	2.9
	磺胺甲基嘧啶	1	81.2	9.4	环丙沙星	1	106.2	8.0
		4	88.1	7.6		4	97.4	7.8
		10	96.7	5.4		10	88.8	2.9
	磺胺二甲嘧啶	1	84.8	6.1	环丙沙星	1	85.5	5.4
		4	99.1	9.0		4	96.1	9.1
		10	97.0	3.6		10	92.8	1.6
	磺胺间二甲氧嘧啶	1	85.1	8.9	氧氟沙星	1	97.5	6.7
		4	87.3	9.0		4	96.0	7.4
		10	99.7	2.2		10	93.5	2.8
	磺胺嘧啶	1	96.3	9.4	沙拉沙星	1	88.2	5.0
		4	98.3	5.5		4	93.8	9.1
		10	106.4	4.2		10	95.6	3.0
	磺胺甲噁唑	1	86.1	5.9	达氟沙星	1	90.4	7.9
		4	87.7	7.3		4	90.2	6.7
		10	100.4	3.7		10	95.3	4.0
	磺胺氯哒嗪	1	89.4	7.2	诺氟沙星	1	96.1	6.7
		4	89.1	6.9		4	98.9	8.7
		10	98.5	2.1		10	97.1	4.7
	磺胺邻二甲氧嘧啶	1	85.5	9.0	四环素	2	85.6	10.6
		4	95.9	2.9		4	98.9	9.3
		10	98.5	3.1		20	86.6	5.3
	磺胺甲噁二唑	1	82.3	6.7	土霉素	2	89.2	8.9
		4	92.2	8.2		4	94.3	3.7
		10	86.8	2.7		20	89.9	3.1
	磺胺噻唑	1	92.2	9.1	金霉素	2	91.5	7.6
		4	97.8	4.8		4	87.6	6.2
		10	85.7	4.9		20	79.9	2.7
	磺胺二甲异噁唑	1	95.3	7.7	多西环素	2	86.8	9.5
		4	86.3	5.5		4	100.2	8.7
		10	96.2	3.9		20	86.1	3.4

续表 7

样品类别	目标药物	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 /%	RSDs /%	目标药物	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 /%	RSDs /%
鸡蛋	磺胺间甲氧嘧啶	1	91.4	7.3	恩诺沙星	1	97.5	6.4
		4	99.5	6.5		4	93.7	6.0
		10	107.2	5.1		10	98.3	2.6
	磺胺甲基嘧啶	1	81.3	9.0	环丙沙星	1	89.2	4.5
		4	99.6	6.0		4	87.2	8.3
		10	106.9	1.9		10	90.8	2.6
	磺胺二甲嘧啶	1	87.8	7.3	环丙沙星	1	98.5	7.6
		4	96.4	7.8		4	96.7	3.9
		10	100.2	2.2		10	100.3	3.2
	磺胺间二甲氧嘧啶	1	77.1	7.0	氧氟沙星	1	92.5	7.4
		4	87.7	7.4		4	92.3	4.8
		10	93.9	2.7		10	96.6	2.9
	磺胺嘧啶	1	81.3	7.8	沙拉沙星	1	94.8	7.3
		4	83.9	7.6		4	86.4	8.5
		10	86.5	3.5		10	87.0	2.8
	磺胺甲噁唑	1	89.8	6.5	达氟沙星	1	81.9	7.0
		4	90.2	9.1		4	90.4	5.6
		10	95.0	2.0		10	88.2	5.7
	磺胺氯哒嗪	1	96.3	8.6	诺氟沙星	1	91.4	4.9
		4	94.9	8.6		4	83.6	6.6
		10	95.8	1.8		10	98.7	6.9
	磺胺邻二甲氧嘧啶	1	86.4	9.7	四环素	2	80.2	9.8
		4	100.1	5.3		4	95.6	6.3
		10	92.6	2.1		20	78.2	7.8
	磺胺甲噁二唑	1	99.5	8.1	土霉素	2	83.2	8.9
		4	92.8	5.8		4	94.6	8.3
		10	87.0	2.9		20	76.9	8.9
	磺胺噻唑	1	89.8	9.5	金霉素	2	85.9	11.5
		4	93.9	9.1		4	98.4	8.9
		10	92.7	2.6		20	76.5	6.4
	磺胺二甲异噁唑	1	100.3	7.6	多西环素	2	91.4	9.3
		4	90.9	7.0		4	92.3	8.1
		10	95.9	3.0		20	78.9	9.0

水平展现的平均回收率为 76.6% ~ 107.2%,相对标准偏差为 1.8% ~ 11.6%,检出限和定量限分别为 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 1.5 ~ 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,均满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的规定^[30,32]。

2.4.3 基质效应

基质效应 (ME)^[22] 是影响结果的重要因素之一,化合物的绝对基质效应定义为基质效应因子 (MF)。分别采用溶剂配标和基质加标曲线,相同条

件下比较目标化合物的离子强度,再用两种曲线斜率通过离子抑制率进行判断。当 $MF^{[23]}$ 等于 1 时,不存在基质影响;大于 1 的情况下,基体作用加强;小于 1 时,为抑制。得出磺胺类和喹诺酮类为增强,四环素类为抑制。 MF 为基质匹配标准曲线的斜率与纯溶剂标准曲线的斜率比值^[24]。

2.5 样品实际测试

依照本方法,对市场在售的鸡肉 30 批次,鸡蛋 30 批次进行检测,结果鸡肉中有 2 批次检出甲氧苄啶,含量为 $180 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $152 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;鸡蛋中有 1 批次检出恩诺沙星,含量为 $130 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其余样品及指标均未超检出限。

3 结论

本文采取 $\text{Na}_2\text{EDTA}-\text{Mcllvaine}$ 溶液进行分散,6% 甲酸乙腈溶液提取,加入 4 g 硫酸钠和 1 g 氯化钠盐析,用 900 mg 硫酸钠和 150 mg C_{18} 吸附剂净化,本项目拟利用 UPLC-MS/MS 对肉鸡和禽蛋中磺胺、喹诺酮和四环素类药物进行快速、准确的检测。建立一种用于 3 种动物药物残留的高效、同步提取、盐析、纯化及检测的新技术,其回收率、精密度及检测限均符合我国兽药残留检测标准。结果准确可靠,缩短检测周期,降低实验成本。因此提高了对鸡肉和鸡蛋检验检测效率,为质量安全监控提供技术支持。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 兰建丽,粘靖祺,杨晓波. 乳与乳制品中雌激素的分析与控制[J]. 中国乳业,2014(6):45-46.
- [2] YE A, YANG Y, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in fish by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Journal of chromatography A, 2013, 1278: 126-132.
- [3] Code of federal regulations title 21, chapter I, subchapter E, part 556: tolerances for residues of new animal drugs in food [EB/OL]. [2023-12-18]. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-E/part-556?toc=1>.
- [4] Commission Regulation (EC) No 508/1999 amending Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [EB/OL]. [2023-12-18]. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/699d9aa5-b7e0-48cc>

-ac41-926b9a1e8b4b.

- [5] 中华人民共和国农业部公告第 2292 号 [EB/OL]. [2023-12-18]. http://www.moa.gov.cn/nybg/b/2015/jiuqi/201712/t20171219_6103873.htm.
- [6] 王炼,黎源倩,王海波,等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉和牛奶中 20 种兽药残留[J]. 分析化学, 2011, 39(2): 203-207.
- [7] 方从容,高洁,王雨昕,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119-1131.
- [8] 郭海霞,肖桂英,张禧庆,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 121 种兽药[J]. 色谱, 2015, 33(12): 1242-1250.
- [9] 郭黎明,朱奎,丁双阳,等. 鸡肌肉组织中四环素类和氟喹诺酮类药物多残留检测[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(5): 98-102.
- [10] 郭爱静,花中霞,辛佳,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定油料作物中 8 种苯胺类除草剂[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 204-209.
- [11] 王帅,赵海涛,闫艳华,等. 自动 QuEChERS 前处理方法结合 HPLC-MS/MS 测定生牛乳中 112 种农药残留[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(6): 51-55.
- [12] 胡彧娴. QuEChERS 结合 HPLC-MS/MS 同时测定瑯溪蜜柚中 36 种农药残留[J]. 农药科学与管理, 2021, 42(6): 16-25.
- [13] 韦誉. QuEChERS 结合 HPLC-MS/MS 法同时测定菜心中 38 种农药残留[J]. 中国食品, 2020(24): 116-117.
- [14] 陈磊,上官良敏,付凤富. QuEChERS 预处理结合 HPLC-MS/MS 同时检测茶叶中 7 种农药残留[J]. 中国科学: 化学, 2016, 46(3): 302-308.
- [15] 李宁,张玉龙,林涛,等. UPLC-MS 法同时测定牛奶中磺胺类、喹诺酮类、甾体激素类及四环素类兽药残留[J]. 分析测试学报, 2016, 35(6): 714-718.
- [16] 李娜,张玉婷,刘磊,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中 4 类 29 种禁限用兽药残留[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1313-1319.
- [17] 方从容,高洁,王雨昕,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119-1131.
- [18] 郭海霞,肖桂英,张禧庆,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 121 种兽药[J]. 色谱, 2015, 33(12): 1242-1250.
- [19] 罗辉泰,黄晓兰,吴惠勤,等. 快速高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 5 类 33 种药物残留[J]. 分析化学, 2012, 40(2): 273-279.
- [20] 胡海山,赵淑娥,芦慧,等. QuEChERS-超高效液相色谱法快速测定果蔬中 4 种植物激素残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 2995-2999.
- [21] 李丽春,刘书贵,尹怡,等. QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 测定水产品中 9 种除草剂残留及基质效应[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 258-266.

基于微变形控制对武器装备用 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金时效行为的影响研究*

韩盼盼¹, 冀宣名^{2▲}

(¹ 江南机电设计研究所, 贵州 贵阳 550009; ² 贵州大学 材料与冶金学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: Ti-3.5Al-5Mo-4V 作为一种轻质高强结构材料, 已逐步应用在武器装备, 以满足武器装备轻量化需求。为进一步提高其综合性能, 促进其在航空航天及武器领域的开发利用, 指导装备的加工生产。本研究结合装备材料处理加工过程, 采用 X 射线衍射 (XRD)、扫描电子显微镜 (SEM)、透射电子显微镜 (TEM)、显微硬度测定等分析测试方法研究了微变形态 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金 500 °C 等温时效过程中组织与性能的变化规律。结果表明: 微变形态 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金时效处理后的组织均为 β 基体和基体上析出的次生 α 相; 微变形有效的促进时效过程 α 相析出, 时效 15 min 后, α 相体积分数约为 40.8%。在时效 15 min 后, 微变形 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金的显微硬度已基本达到峰值, 随着时效时间的进一步增加, 显微硬度逐渐减小。

关键词: 武器装备, Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金, 热处理, 力学性能

中图分类号: TJ04 TG166.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-6563(2025)01-0085-05

Effect of micro-deformation control on the aging behavior of Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy for weapon equipment*

HAN Panpan¹, JI Xuanming^{2▲}

[22] 穆应花, 邢家溧, 沈坚, 等. QuEChERS-气相色谱-质谱法检测鱼肉中 19 种氯酚类化合物[J]. 色谱, 2022, 40(5): 477-487.

[23] 杨军, 孙小杰, 胡文彦, 等. 基于 QuEChERS 提取的超高效液相色谱-串联质谱法测定小麦粉中 5 种镰刀菌毒素[J]. 分析测试学报, 2017, 36(7): 882-886.

[24] 熊超平. 江苏省小麦中呕吐毒素的影响因素研究及污染预警模型的建立[D]. 南京: 南京财经大学, 2021.

[25] 王静静, 苏敏, 巩志国, 等. 多效唑、烯效唑、矮壮素和缩节胺色谱分析方法研究进展[J]. 化学分析计量, 2014, 23(5): 135-138.

[26] 臧国栋, 黄子敬, 陈孟君, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测水产品中 49 种农兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2147-2153.

[27] 黄永桥, 宋光林, 毛敏霞, 等. QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 法测定畜肉中 8 种抗真菌药物残留[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 334-340.

[28] 王乾丽, 毛敏霞, 黄永桥, 等. QuChERS-UHPLC-MS/MS 法测定畜中双氯芬酸钠残留量[J]. 食品工业, 2020, 41

(9): 329-333.

[29] 《环渤海色质谱绿色新技术》[J]. 分析化学, 2016, 44(12): 1858.

[30] 邱小凤, 肖豪杰, 杨玉玲. 柱后光化学衍生法测定婴幼儿食品中的叶酸的方法开发与验证[J]. 江西化工, 2021, 37(4): 63-67.

[31] 李占彬, 王正强, 黄永桥, 等. PRiME 净化-UHPLC-MS/MS 法测定鸡蛋中金刚烷胺类药物残留[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 305-309.

[32] 张健玲, 黄慧贤, 王志林, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鳊鱼中 32 种兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9013-9020.

收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-01-11

作者简介: 于 霞 (1990-), 女, 汉族, 辽宁庄河人, 大学本科, 贵州省检测技术研究应用中心中级工程师, 主要研究方向: 食品检验检测。

▲通讯作者: 曹俊杰 (1989-), 女, 汉族, 贵州正安人, 大学本科, 贵州省检测技术研究应用中心高级工程师, 主要研究方向: 食品检验检测。

(¹ Jiangnan Design & Research Institute of Machinery & Electricity, Guiyang 550009, China; ² School of Materials and Metallurgy, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: As a lightweight and high-strength structural material, Ti-3.5Al-5Mo-4V has been gradually applied to weapon equipment to meet the lightweight requirements. In order to further improve its comprehensive performance, promote its development and utilization in the field of aerospace and weapons, and guide the processing and production of equipment, in this study, X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and microhardness measurement were used to study the microstructure and properties of Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy during isothermal aging at 500 °C. The results showed that the microstructure of Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy after aging treatment was β matrix and secondary α phase precipitated on the matrix. The micro-deformation effectively promoted the precipitation of α phase during the aging process. After aging for 15 min, the volume fraction of α phase was about 40.8 %. After aging for 15 min, the microhardness of Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy had reached the peak value. With the increase of aging time, the microhardness decreased gradually.

Keywords: weapon equipment, Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy, heat treatment, mechanical properties

0 引言

地面武器装备轻量化就是在满足战技指标和生存能力的前提下,解决军方对装备体积和重量的要求,提高装备的机动性能,实现装备的快速转移。地面武器装备的轻量化是提高其机动性的主要措施之一,机动性能的提升可显著提升装备部署运输的能力与运输方式的适配性,可提升武器装备快速部署战场与打击敌人,同时在完成打击后装备迅速转移阵地提升自身战场生存能力^[1-2],轻量化是武器系统发展的重要方向,也是各国争相研究的目标^[3-5]。 β 型钛合金因其比强度高、弹性模量低、耐腐蚀等优异性能在飞机结构件、火箭、卫星等航空航天领域及武器系统得以广泛应用^[6-8]。但随着社会的快速发展,对高强 β 钛合金强度和塑性的综合性能匹配要求越来越高,改善其综合性能匹配势在必行^[9-10]。

Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金是西北有色金属研究院根据临界钼当量研制的高强亚稳 β 型钛合金^[11]。前期在 Ti-3.5Al-5Mo-4V 材料处理中研究发现, Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金在冷轧过程中形成了大量位错,在较大变形时还出现了一定亚结构,引起合金点阵畸变和晶格扭曲,在晶体内部存储大量的晶格畸变能^[12]。塑性变形过程中形成的晶体缺陷在时效过程中可以成为析出相形核基点,同时也降低 α 相在形核过程中需要越过的能垒,促进 α 相析出,提高了 α 相析出相形核率^[13-14]。但 Ti-3.5Al-5Mo-

4V 合金的相关研究是以大应变板材为研究对象的,而微小塑性变形过程中,原始晶粒基本没有发生变化,变化主要集中在晶粒内部,其对后续时效析出行为是否有影响还有待探索。因此,本文主要采用 XRD、TEM、SEM 等分析检测手段研究微塑性变形对 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金后续时效析出行为的影响进行探索,以期获得调控 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金组织的方法,为 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金应用在武器装备提供一定的理论支撑。

1 实验材料及方法

实验所采用的材料为高强亚稳 β 型 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金,其实际合金成分如表 1 所示,相变温度约为 820 °C $\pm$ 5 °C^[15]。

表 1 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金的化学成分(质量分数,%)

Element	Al	Mo	V	Cr	Sn	Zr	Fe	C	O	Ti
wt. %	3.67	4.57	3.74	1.86	1.96	1.82	1.02	0.05	0.07	Bal.

为了保证初始组织的单一化均匀化,采用线切割从锻棒上切取 10 cm $\times$ 10 cm $\times$ 15 cm 的块状试样,根据前期研究结果,将块状试样在 850 °C 下保温 1 h 然后进行水冷,以获得具有均匀单一固溶态 β 相组织的固溶态试样。在室温下对固溶板材进行 10% 的塑性变形,然后从上面切取 ϕ 6 mm $\times$ 8 mm 的热处理试样,在热处理炉中进行不同时间的时效处理。热处理后试样经磨抛光后制备成表面光滑的试样备

用,用配比为 $V(HF):V(HNO_3):V(H_2O)=1:2:7$ 的金相腐蚀剂侵蚀,采用奥林巴斯 GX51 光学显微镜(OM)和扫描电镜(SEM)进行组织观察。物相测试采用 X 射线衍射仪进行,测试过程中,辐射源为 Cu 靶($\lambda=1.5406\text{\AA}$),测试电压为 40 kV,扫描速度为 $2^\circ/\text{min}$,测试角度范围为 $25^\circ\sim90^\circ$ 之间,测试完成后采用 MDI-Jade6 软件对测试结果进行分析,TEM 观察在 FEI Talos F200X 透射电镜上进行。使用 HVS-1000 数字式硬度计测量维氏硬度,采用金刚石压头施加 500 g 的力,持续 20 s,在进行每组试验之前,在标准化测量块上进行校准。

2 实验结果与分析

2.1 微变形合金的组织形貌

图 1 为固溶态 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金经室温下 10% 塑性变形后的 XRD 图谱。由图可知,XRD 图谱中无 α 相衍射峰,只有典型 β 相衍射峰,对应于 $(110)_\beta$ 、 $(200)_\beta$ 和 $(211)_\beta$ 。XRD 图中衍射峰的种类说明微小塑性变形过程中合金没有发生相变,合金依然由单一 β 相组成。

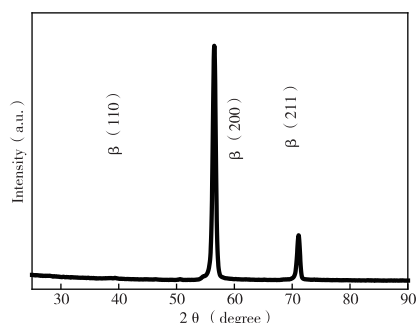


图 1 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金经 10% 室温塑性变形后的 XRD 图谱

2.2 微变形板材 500 °C 等温时效过程中物相与组织演化规律

2.2.1 微变形板材 500 °C 等温时效处理过程中的相变规律

图 2 为微变形样品在 500 °C 下经不同时间等温时效处理后的 X 射线衍射图谱。由图可知,微变形样品在时效 15 min 后,与固溶态试样相比较,图谱中除了 β 相 (110) 、 (200) 和 (211) 晶面所对应的衍射峰外,还出现了 α 相 (100) 、 (101) 、 (102) 及

(110) 所对应的衍射峰,说明此时冷轧板材 β 基体中已明显的析出 α 相,当时效时间延长至 30 min 时,出现了 α 相 (112) 晶面所对应的衍射峰^[10]。随着时效时间的进一步延长, α 相 (103) 及 (002) 晶面所对应的衍射峰逐渐出现,图谱中包含了钛合金中常见的所有 α 相晶面衍射峰,同时 α 相衍射峰的强度有所增强。时效过程中衍射峰种类和强度的变化,表明微变形试样在随后的时效过程中有 α 相从 β 基体中析出,同时 α 相所对应衍射峰种类和强度的增加,可以间接说明随着时效时间的延长, α 析出相含量增加。

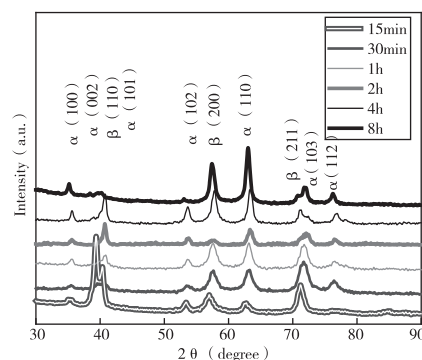


图 2 微变形板材在 500 °C 等温时效不同时间后的 XRD 图谱

2.2.2 微变形板材 500 °C 等温时效处理过程中组织演化规律

图 3 为微变形板材在 500 °C 时效不同时间后的形貌。由图可以发现,当时效时间为 15 min 时(图 3 (a)),大量的次生 α 相从 β 晶粒内部及晶界处析出,整个晶粒不存在明显的析出区,析出相分布较为均匀,同时也不存在明显的朝晶内生长的 α_{WGB} ,根据 XRD 结果通过比较法测得此时次生 α 相体积分数为 40.8%。当时效时间延长至 2 h 时,次生 α 相析出更加明显,含量明显增加,均匀地分布在 β 基体上,次生 α 相体积分数为 67.1%。Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金在 10% 压下量的冷轧变形过程中,虽然其固溶处理过程形成的晶粒基本未发生变形,依然保持等轴晶的形态,但是其晶粒内部存在一定量的滑移带,这些晶体缺陷引起合金点阵畸变和晶格扭曲,在晶体内部存储一定量的晶格畸变能,在随后的时效过程中,成为析出相形核的驱动力,同时,这些晶体缺陷会成为次生 α 相析出的形核点,降低异质形核所需越过的形核势垒,增加形核率,进而促进了 α 相析出。再者,由于缺陷分布于晶粒内部,故冷轧变

形样品时效时析出相不再局限于晶界处优先析出,而是均匀析出。

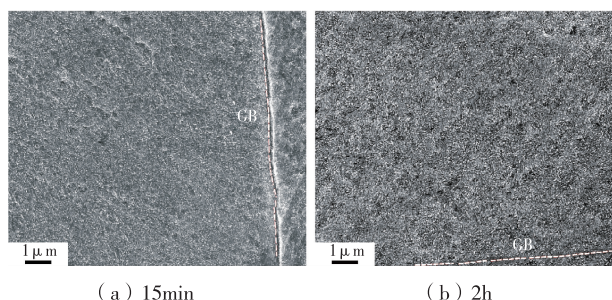


图 3 微变形试样在 500℃ 时效不同时间后的低倍 SEM 显微组织

为了进一步对 CR10 样品的时效行为进行分析,获取了高倍下的 SEM 形貌,如图 4 所示。当时效 15 min 时,析出相呈片层状,长度约为 100 ~ 200 nm,随着时效时间的延长,析出相的形态变化不大,依然呈片层状,但是其尺寸有所增大。与固溶样品时效处理后的析出相比较,在相同的时效条件下,经过微变形的样品其析出相的尺寸较为细小,微变形样品在 2 h 时效处理后形成的析出相的长度约为 200 ~ 300 nm,明显比固溶样品时效后所形成的析出相的长度短^[12]。微变形试样时效后析出相较为细小的原因如前文所提到的,冷轧变形增加了 β 相到 α 相转变的形核率,降低了转变形核壁垒,促进了析出相的形成,更多的成核位点将有利于抑制沉淀物的粗化,对析出相的形貌产生一定的影响。

微变形样品在 500 °C 时效 2 h 后的形貌及元素分布如图 5 所示。其相组成为片状的析出相和基体组成。析出相的宽度约为 20 nm,与固溶试样的接近,但是其长度明显的有所减小,为 300 ~ 500 nm,证实了冷轧变形能有效的细化析出相的尺寸。由于微变形试样冷轧变形程度较低,固溶晶粒基本没有发生变形,同时位错密度相对较低,其衍射斑点与固溶试样的基本一致,没有呈现衍射环(图 5(b)),同时, α 析出相和 β 基体的 SAED 图像显示, α 相和 β 相不服从 Burgers 取向关系,并且晶带轴取向关系是 $[11-20]_{\alpha} // [111]_{\beta}$ 。

其元素分布表现为,Al 元素在 α 相上富集,而 Mo、Cr 和 V 元素在 β 相上富集。此外相邻的片状 α 相和 β 相之间没有元素偏析(图 5(d)),这是因为相邻相界面的元素扩散在时效 2 h 后达到平衡,从而形成稳定的纳米($\alpha+\beta$)双相。

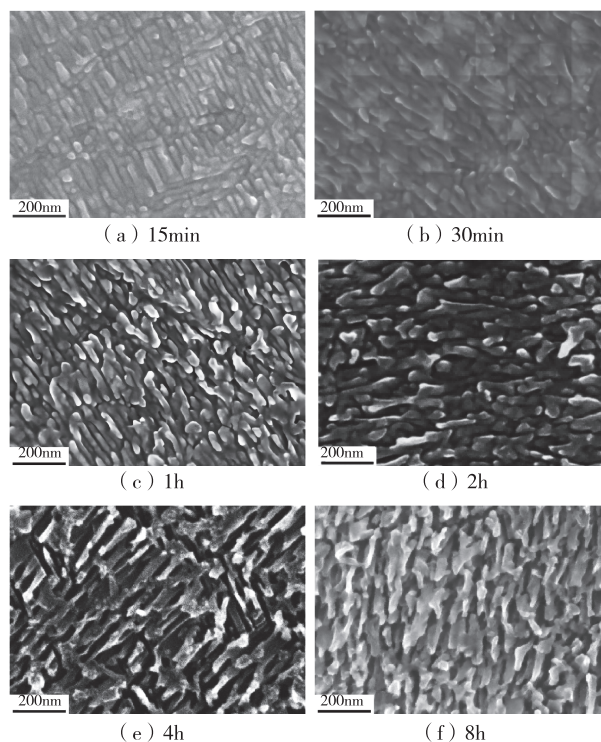
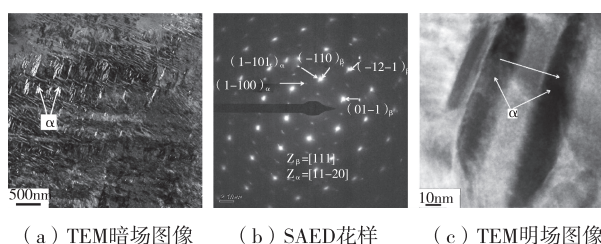
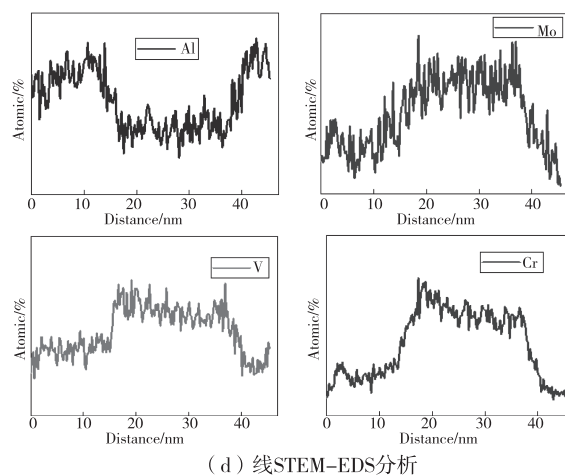


图 4 微变形试样在 500℃ 时效不同时间后的晶粒内部 SEM 显微组织



(a) TEM 暗场图像 (b) SAED 花样 (c) TEM 明场图像



(d) 线 STEM-EDS 分析

图 5 微变形试样在 500℃ 时效 2h 后的 TEM 形貌

2.3 微变形 Ti-3.5Al-5Mo-4V 合金板材 500 °C 等温时效过程中显微硬度变化

图6为微变形Ti-3.5Al-5Mo-4V合金在500℃下保温不同时间后的显微硬化对比图。由图可知,微变形试样在时效处理前的平均硬度值为300HV,时效15min后硬度为482HV,接近于峰值,随着时效时间的延长,硬度有下降的趋势,时效8h后,微变形试样的硬度约为470HV。由组织分析可知,微变形可以有效地促进 α 相的析出,使得试样在15min后, α 相已大量析出,进而导致硬度快速增加。随着时效时间的进一步延长,析出相有所长大,使得硬度降低,同时变形过程形成的畸变能在时效过程中也会得到消耗,使得硬度进一步降低。

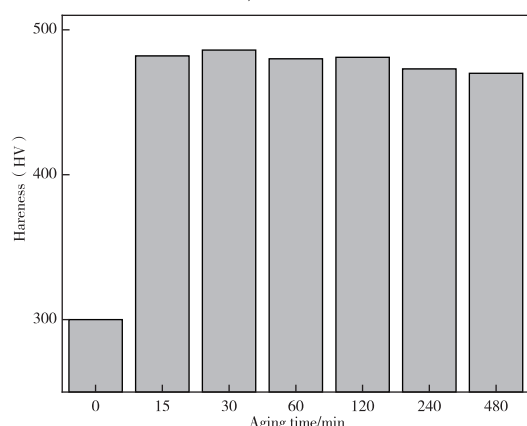


图6 微变形试样在500℃时效过程中硬度变化规律

3 结论

通过在实验室环境下对Ti-3.5Al-5Mo-4V合金结构性能研究发现,微变形Ti-3.5Al-5Mo-4V合金在500℃等温时效过程后组织组成为 β 基体和从基体中析出的次生 α 相;微变形有效地促进时效过程 α 相的析出,时效15min后, α 相体积分数约为40.8%;在时效15min后,微变形Ti-3.5Al-5Mo-4V合金的显微硬度已基本达到峰值,随着时效时间的进一步延长,显微硬度逐渐减小。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 《世界火炮手册》编辑部. 世界火炮手册[M]. 北京:兵器工业出版社,1991.
- [2] 张相炎. 新概念火炮技术[M]. 北京:北京理工大学出版社,2014.
- [3] 柯林达,张小龙,崔哲,等. 面向增材制造的导弹结构优化设计综述[J]. 空天防御,2023,6(2):28-34.

- [4] 张蓉. 某防空火箭炮发射动力学分析与结构轻量化研究[D]. 南京:南京理工大学,2008.
- [5] 王金梅,钟险峰,王万朋,等. 武器系统轻量化设计技术研究[J]. 兵器装备工程学报,2017,38(12):131-134.
- [6] 金和喜,魏克湘,李建明,等. 航空用钛合金研究进展[J]. 中国有色金属学报,2015,25(2):280-292.
- [7] 刘全明,张朝晖,刘世锋,等. 钛合金在航空航天及武器装备领域的应用与发展[J]. 钢铁研究学报,2015,27(3):1-4.
- [8] 张应鹏,祁宇星. 钛合金助力航空海工装备新发展——先进钛合金结构材料分论坛侧记[J]. 中国材料进展,2021,40(10):790-791.
- [9] IVASISHIN O M, MARKOVSKY P E, SEMIATIN S L, et al. Aging response of coarse- and fine-grained β titanium alloys[J]. Materials science and engineering: A, 2005, 405(1/2):296-305.
- [10] 王安东,相志磊,周宗熠,等. 高强 β 钛合金的研究现状与展望[J]. 钢铁钒钛,2023,44(6):46-57.
- [11] GE P, XIANG S, TAN Y, et al. Studies on the $\beta \rightarrow \alpha$ phase transition kinetics of Ti-3.5Al-5Mo-4V alloy under isothermal conditions by X-ray diffraction[J]. Metals, 2020, 10(1):90.
- [12] JI X M, XIANG S, TAN Y B, et al. Microstructure, texture evolution, and aging behavior of a cold-rolled Ti-B20 alloy[J]. Advanced engineering materials, 2023, 25(11):2201776.
- [13] LI T, KENT D, SHA G, et al. Precipitation of the α -phase in an ultrafine grained beta-titanium alloy processed by severe plastic deformation[J]. Materials science and engineering: A, 2014, 605:144-150.
- [14] KARTHIKEYAN T, DASGUPTA A, KHATIRKAR R, et al. Effect of cooling rate on transformation texture and variant selection during $\beta \rightarrow \alpha$ transformation in Ti-5Ta-1.8Nb alloy[J]. Materials science and engineering: A, 2010, 528(2):549-558.
- [15] 冀宣名,胡爽. 时效处理对不同热轧Ti-3.5Al-5Mo-4V钛合金组织与性能的影响[J]. 材料热处理学报,2022,43(10):27-33.

收稿日期:2024-07-01;修回日期:2024-07-08

基金项目:贵州省科技支撑计划(2022-050)。

作者简介:韩盼盼(1988-),女,硕士,高级工程师,研究方向:制导控制、武器装备材料性能调控。

▲通讯作者:冀宣名(1989-),男,博士,高级实验师,研究方向:材料结构与性能、材料腐蚀与防护。

某高速公路 M 型门式墩的设计研究

洪一樽

(中铁二院贵阳公司, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 以某高速公路跨越市政道路的桥梁为设计背景,通过建立空间有限元模型,对比分析了 M 型门式墩两个边墩刚性连接与释放约束两种情况的内力状况,得出在墩高较矮的情况下,温度变化对刚性连接体系的影响非常大,释放边墩墩顶约束可以大大改善边墩墩底内力状况,从而可减小结构尺寸,降低工程造价;同时指出在上部结构荷载较大时,设计中应该结合具体施工顺序,模拟桥墩在各阶段的应力状况,从而确定横梁钢束张拉顺序。研究结果可为今后同类 M 型门式墩提供一定的借鉴和参考意义。

关键词: 门式墩,超静定,分批张拉,温度,对比分析

中图分类号:U443.2 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0090-04

Design of M-type portal pier for highway

HONG Yizun

(Guiyang Filiale of China Railway Eryuan Engineering Group Co. Ltd., Guiyang 550002, China)

Abstract: Targeting on the design of a highway bridge over a municipal road, a finite element model was established to compare and analyze the internal forces between two side piers of the M-type portal pier under rigid connection and release constraint conditions. It is concluded that the temperature change has a great influence on the rigid connection system when the height of the pier is low, and releasing the top constraint of the side piers can greatly improve the internal force conditions at the bottom of the side piers. Thus, the structure size and engineering cost can be reduced. It is pointed out that when the superstructure load is large, the stress conditions of the piers at each stage should be simulated according to the construction sequence, so as to determine the tension sequence of the beam steel bundle. The research results can provide reference for the design of similar M-type portal piers.

Keywords: portal pier, statically indeterminate, tension sequence, temperature, comparative analysis

0 引言

随着城市基础建设的高速发展,新建高速公路与既有道路的立体交叉次数与难度越发增加,在跨越等级较高,路基宽度较宽的市政道路时,高速公路标准圆柱形墩往往不能满足被交道路的需求,此时桥下空间较大的门式墩往往成为桥梁下部结构的主要结构型式^[1],影响门式墩设计的主要因素有上部结构型式、被交道路净空、桥下控制性地物以及现场

地质条件等。本文结合工程实践,总结设计经验,探讨在门式墩设计过程中应注意关注几个方面。

1 工程概况

普定特大桥位于普定县南侧,本桥主要为跨越规划的工业园区而设,桥梁荷载等级:公路-I 级;桥面宽度为 2×16.55 m,桥梁孔跨样式为 $3 \times 40 + 4 \times 40 + (40 + 68 + 40)$ m 连续箱梁 + $3 \times 40 + 3 \times 40 + (40 + 68 + 40)$ m 连续箱梁 + $4 \times 40 + 3 \times 30 + (39 + 68 + 39)$ m 连续

箱梁+(30+40)m 桥面连续+(40+40)m 转体 T 构+4×40,桥梁全长 1535.5 m,由于此路段北二路两侧密布工厂,同时尚存在公交车站、路灯、管线、交叉口等设施,为尽量减小对工业园区的影响,遂该路段桥梁下部结构采用 M 型门式墩,墩高 9~14 m。

2 M 型门式墩设计

2.1 原初步设计

由于线位与既有道路的切入角度较小,影响路段的门式墩跨径有(18+18)m、(20.5+20.5)m、(14+19)m、(18+18+9)m 等 9 种,本文仅以(18+18)m 跨径为例来探讨相关问题。初步设计 M 型门式墩墩柱采用 2.2 m×3 m 矩形截面,横梁采用 3 m×3 m 矩形截面,横梁与墩柱之前刚性连接,边墩布设于下方人行道外侧,中墩布设于中央分隔带内,以避免既有道路下的管线,具体构造型式如图 1 所示。

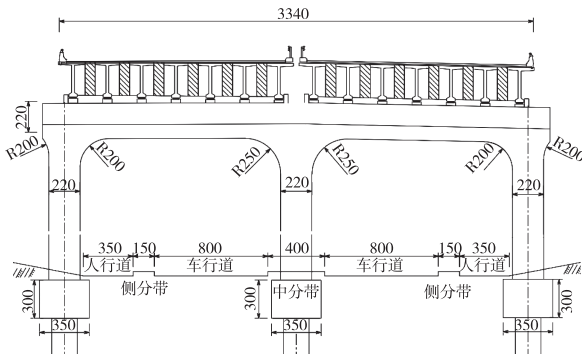


图 1 M 型门式墩初步设计构造图

施工图阶段先以初步设计构造为基础,采用大型通用有限元软件进行验算,桥墩模型由墩柱、承台及横梁等组成,墩柱与横梁的连接采用刚性连接,上部结构恒载、桥面系及附属设施作为外荷载,活载采用横向移动荷载形式进行模拟,横梁内布设 N1、N2、N3 三排预应力刚束,结构离散如图 2 所示。

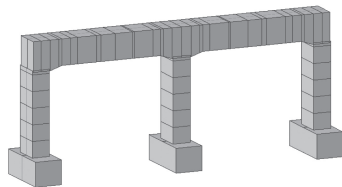


图 2 门式墩结构离散图

在确保横梁承载能力满足要求的情况下,单独对墩柱进行分析,提取墩底内力进行墩柱配筋计算,

墩柱内力图如图 3、图 4 所示。

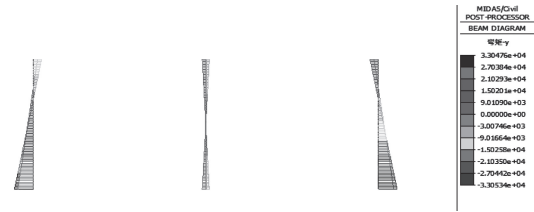


图 3 初步设计方案墩柱弯矩图

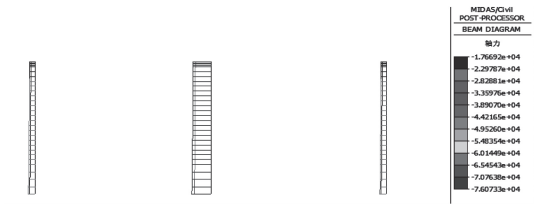


图 4 初步设计方案墩柱轴力图

其中,在整体升降温工况下,桥墩弯矩图如图 5 所示。



图 5 初步设计方案墩柱弯矩图(温度影响下)

可见在最不利组合下,两个边墩墩底弯矩非常大,以墩底截面提取轴力及弯矩进行截面配筋设计,计算结果见表 1。

表 1 最不利截面配筋结果(初步设计方案)

墩柱编号	截面轴力	截面弯矩	计算所需纵筋面积	配筋结果
1	22605	33047	23365.4	30D32
2	66652	6308	13200	35D22
3	22601	33053	23378.6	30D32

因为本桥桥高较矮,上部荷载较大,仅在温度作用下,两侧边墩墩底会产生约 20000 kN·m 的弯矩,若根据初步设计构造进行计算配筋,两侧边墩需要配置大量纵向钢筋,且所需截面也较大,非常不经济且不美观。

2.2 施工图设计

对于上述 M 型刚架墩,由于结构本身为多次超静定结构^[2],加上墩高较矮,混凝土的收缩徐变,以

及升降温对结构的影响非常明显。从而使墩柱底部产生巨大的弯矩,虽然混凝土徐变效应在一定程度上能对其产生一定的抵消作用,但三者的综合作用仍是墩柱设计的控制因素。同时,M 型门式墩本身也受上部结构收缩徐变及汽车制动力等纵向力的作用,从而使墩底处于一个双向受力的状态。在桥墩设计中若没有考虑完备,很容易导致墩柱底部截面不能满足规范要求。为了解决此类问题,施工图阶段将原设计 M 型刚架墩边墩约束释放,保持中间墩柱尺寸,两边边墩墩顶设置多向移动支座,边墩尺寸由原设计 2.2 m×3 m 优化为 1.5 m×2 m,具体构造如图 6 所示。

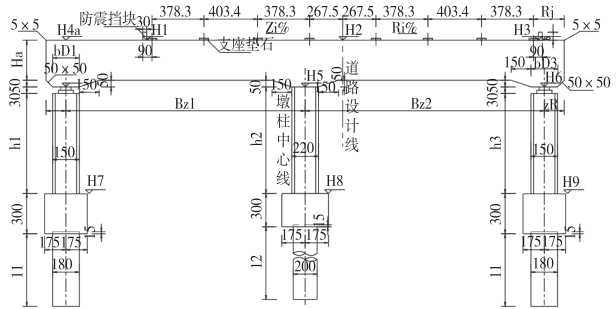


图 6 M 型门式墩构造图

释放边墩约束后,边墩近似作为轴心受压构件参与受力,通过有限元软件对优化后 M 型门式墩进行验算,结果如下。

表 2 最不利截面配筋结果(施工图方案)

墩柱编号	截面轴力	截面弯矩	计算所需纵筋面积	配筋结果
1	20742	/	按构造配筋	19D25
2	64934	3277	13200	28D25
3	20722	/	按构造配筋	19D25

优化后边墩墩底弯矩基本可以忽略,墩底轴力随着边墩尺寸的减少也同样得到了改善,边墩混凝土减少 55%,钢筋量减少 68%,由此可见,优化后结构整体钢筋及混凝土用量大大减少,并且将承台埋置与人行道下,上露墩身较初步设计而言尺寸减小较多,视觉上较美观,受力合理。

3 M 型门式墩钢束分批张拉

当确定好结构形式以后,对于上部结构为预制 T 梁的 M 型门式墩,由于梁片较多,重量较大,根据计算,若在未架设上部 T 梁的情况下将钢束完全张

拉,则会引起横梁顶部拉裂,反之,若先架设 T 梁后再进行张拉,则张拉之前横梁下缘已出现裂缝,同

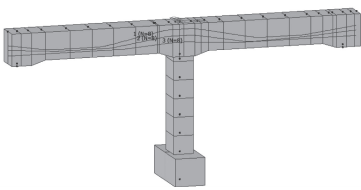


图 7 优化后结构离散图

样,若先架设单幅两孔 T 梁,会导致中墩墩底弯矩增大,所以设计中必须考虑架桥机架设顺序与横梁钢束张拉的衔接。以本桥(18+18)m 的 M 型门式墩为例,有限元计算模型如下。

对每个阶段横梁及桥墩的应力状态进行分析,调整对应阶段钢束张拉批次,最终确定 T 梁架设与钢束张拉顺序为:横梁浇筑完毕→张拉 N1 钢束→架设左幅后退侧 T 梁→架设右幅后退侧 T 梁→张拉 N2 钢束→架设右幅前进侧 T 梁→架设左幅前进侧 T 梁→张拉 N3 钢束。每个阶段对应跨中及支点处应力如表 3 所示。

表 3 各阶段跨中及支点应力

施工阶段	左侧跨中底部	支点顶部应力	右侧跨中底部
	应力/MPa	/MPa	应力/MPa
盖梁施工张拉 N1 钢束	-1.9	-1.6	-1.9
架设左幅后退侧 T 梁	-2.3	-0.8	-0.3
架设右幅后退侧 T 梁	-0.9	0.2	-1
张拉 N2 钢束	-3.6	-2.2	-4.3
架设右幅前进侧 T 梁	-2.1	-0.7	-4.5
架设左幅前进侧 T 梁	-2.8	0.1	-2.8
张拉 N3 钢束	-4.7	-2.6	-4.5

4 结束语

本文对在净空受限、墩高较矮情况下的 M 型门式墩结构进行分析,对比了刚架体系与释放边支座体系对桥墩受力状态的影响,同时对横梁钢束张拉顺序的确定进行了讨论,主要结论如下:

(1)对于墩高较矮的 M 型门式墩,刚架体系虽然整体性较好,但是边墩由于受温度影响较大,墩底内力较大,从而导致桥墩截面及配筋增大,一方面增加了工程投资,另一方面一定程度的影响了结构的美观。

(2)释放边支座约束虽然增加了支座数量,但是结构整体受力状态明显得到了改善,边墩尺寸得到了较大优化,同时在相同中墩高度的情况下,也能适应不同的边墩墩柱高度,减少结构设计中的计算工作量。

基于贴近摄影测量技术在高层建筑外墙饰面层缺陷检测中的应用*

聂晓鹏,高文艺,涂开胜,石文凤

(贵州中建建筑科研设计院有限公司,贵州 贵阳 550006)

摘要: 利用大疆 M300RTK 无人机搭载禅思 P1 云台获取超高分辨率的数据影像,精准还原地表和物体精细纹理、结构和特征优势,为实现高层建筑外墙饰面层缺陷检测提供技术支撑。为获得高精度的三维实景模型,首先使用 WayPoint Master 软件对被测建筑周边设定仿地环绕飞行航线,采用大疆智图软件对影像数据构建三维粗模,然后在粗模中提取被测建筑 KMZ 信息,建立精细化航线,利用无人机和贴近摄影测量技术,最终可生成分辨率为 0.63 cm 的高精度三维模型。实践证明,贴近摄影测量技术能够实现对建筑外墙饰面层缺陷面积、裂缝等数据的准确测量。

关键词: 贴近摄影测量,三维实景模型,大疆智图,饰面层缺陷

中图分类号:TU198+.3 文献标识码:A 文章编号:1003-6563(2025)01-0093-04

Application of close-range photogrammetry in defect detection of exterior decorative layer of high-rise buildings*

NIE Xiaopeng, GAO Wenyi, TU Kaisheng, SHI Wenfeng

(Guizhou Construction Science Research & Design Institute Limited Company of CSCEC, Guiyang 550006, China)

Abstract: Using the DJI M300RTK drone equipped with the Zenmuse P1 gimbal, ultra-high-resolution images are obtained to accurately restore the fine texture, structure, and features of the ground and objects, so as to provide technical support for the defect detection of the exterior decorative layer of high-rise buildings. To obtain the high-precision 3D real-scene model, the WayPoint Master software is used to set up a pseudo-ground orbit flight route around the measured building, and the DJI Smart software is used to construct a 3D rough model based on the image data. Then, the KMZ information of the measured building is extracted from the rough model, and a refined flight route is established. Finally, a 3D model with a resolution of 0.63 cm can be generated by using the drone and close-range photogrammetry. Practice has proved that close-range photogrammetry can accurately measure the defect areas and cracks on the exterior decorative layer of buildings.

(3) 对于路幅宽度较宽、上部结构荷载较大的 M 型门式墩,应该结合其具体的荷载加载顺序,对各施工阶段下横梁及墩柱进行分析计算,严格控制施工阶段中应力状态,保证结构在施工过程中的安全。

洪,2013(3):104-105.

[2] 聂细锋. 两种大跨度门式墩方案设计比较分析[J]. 城市道桥与防洪,2017(12):60-62.

参考文献【REFERENCES】

[1] 王永超. 浅议门式墩的发展与应用[J]. 城市道桥与防

收稿日期:2024-07-16;修回日期:2024-07-23

作者简介:洪一樽(1992-),男,汉族,贵州遵义人,硕士,工程师,研究方向:大跨度桥梁。

Keywords: close-range photogrammetry, 3D real-scene model, DJI Smart software, exterior decorative layer defects

0 引言

高层建筑拥有利用率高、视野开阔和经济效益显著等优点,其建造数量在一定程度上可以侧面反映城市的经济发展水平。高层建筑通常具有独特的外观设计和雄伟的建筑高度,给人一种视觉冲击力和震撼感,因此更容易吸引人的目光,在此情况下,投资方不仅要求建筑外形上设计新颖,而且还要考虑外墙装饰具有特色,力求做到外墙装饰与整栋建筑风格和環境相协调,并具备良好的视觉效果。同时,在满足美观条件下,还应兼顾安全性、耐久性、维护性和环保的要求。目前,高层建筑外墙饰面层基本构造做法主要有饰面砖构造、水性涂料构造、外保温构造和钢筋构造四类^[1-2]。

在外界条件的影响下,随着服役期的延长,外墙饰面层受到气候、材料、施工等多种因素的影响,外墙饰面层与基层墙体抗剪能力、抗拉能力变差,无法抵抗垂直和平行于墙面的应力^[3],继而出现开裂、空鼓甚至脱落。近年来,高层建筑外墙饰面层出现脱落事故较多,2023 年 8 月辽宁省沈阳市某小区高层外墙饰面层大面积脱落,对周边店铺带来严重财产损失;2023 年 7 月湖南娄底新化县天河新村小区高层外墙饰面层脱落造成多人受伤;2023 年 4 月贵州省贵阳市某小区高层建筑外墙饰面层大面积脱落,2021 年上海市黄浦区某小区高层外墙立面抹灰层脱落。因此,预防外墙饰面层脱落成为社会亟待解决的问题。

随着无人机和摄影技术的高速发展,无人机倾斜摄影技术逐渐在城市实景三维建模中得到应用^[4],并且采用该技术构建的三维空间模型精度可以达到毫米级^[5]。随着精细化对地观测的需求与旋翼无人机相结合,发展出一种新的测量方式——贴近摄影测量,它利用无人机贴近被测物获取超高分辨率影像,进行精细化地理信息提取,因此可以高度还原被测物的精细结构^[6]。本文以贵州某高层建筑为背景,利用无人机贴近摄影测量技术对外墙饰面砖脱落区域和裂缝大小进行精确测量,为后续维修提供重要的有效参考。

1 工程背景

贵州某高层建筑层高约 99 m,上部主体结构形式为框架核心筒结构,外墙饰面层材料为纸皮砖,主要规格尺寸为 45 mm×95 mm,颜色为浅灰色。按照建筑节能设计图纸要求,采用外墙外保温系统,根据墙体材料类型不同,外墙装饰做法分为两类,第一类墙体材料为钢筋混凝土,构造做法由内到外依次是石灰水泥砂浆(混合砂浆)20 mm+钢筋混凝土 120 mm+石灰水泥砂浆(混合砂浆)20 mm+中空玻化微珠无机保温砂浆 30 mm+抗裂砂浆 5 mm(图 1);第二类是墙体材料为蒸压加气混凝土砌块,构造做法由内到外依次是石灰水泥砂浆(混合砂浆)20 mm+加气混凝土砌体 200 mm+石灰水泥砂浆(混合砂浆)20 mm(图 2)。该建筑投入使用 2 年后开始出现外墙饰面砖脱落,建设单位为初步了解外墙饰面砖脱落位置、面积和缺陷特征,为后续编写修缮方案和报价提供数据支撑。为此本文就建设单位所提供的,采用贴近测量新技术,将无人机搭载禅思 P1 云台按照规划好的精细航线对目标建筑物进行拍摄(图 3),然后利用大疆智图软件建立三维模型,最后在模型上提取长度、面积等缺陷数据。

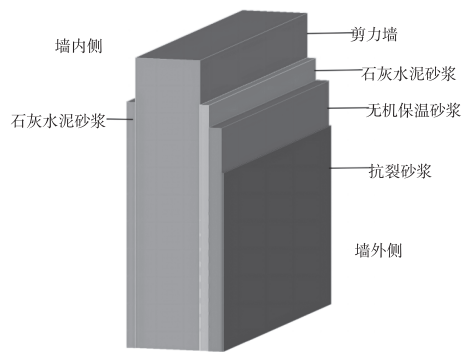


图 1 钢筋混凝土外墙装饰做法

2 无人机和云台设备

本次航拍无人飞行器为大疆经纬 M300RTK(图 4),飞行器尺寸长×宽×高=810mm×670mm×430

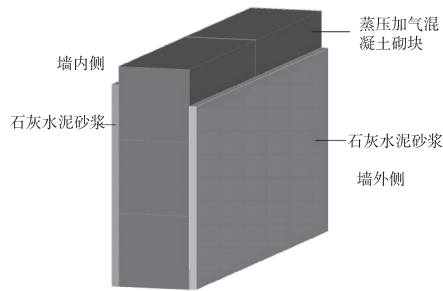


图2 蒸压加气混凝土砌块墙体装饰做法



图3 目标建筑物

mm,最大上升速度 6 m/s,最大垂直下降速度为 5 m/s,最大水平飞行速度为 23 m/s,最大飞行海拔高度 7000 m,可承受风速达到 15 m/s(7 级风),空载最大飞行时间为 55 min,信号有效距离为 15 km。

无人机搭载的云台设备型号禅思 P1(图 5),禅思 P1 集成 4500 万像素全画幅图像传感器与三轴云台,支持多款定焦镜头,是一款高性能、多用途的航测负载,可以拍摄 8192×5460 分辨率的照片,与经纬 M300RTK 和大疆智图软件进行搭配,可满足高精度、高效率、一体化的航测要求。



图4 大疆经纬 M300RTK



图5 禅思 P1

3 外业采集和建模

3.1 航线规划

为保证测量精度,首先采用 WayPoint Master(航迹大师)对被测建筑物周边进行仿地环绕飞行,

环绕飞行区域东西长约 600 m,南北长约 640 m,平均飞行高度为 191.23 m,航向重叠率 80%,旁向重叠率 75%,航线自动生成后显示,飞行时间为 8 min,照片数量 110 张(图 6),能够实现地面影像分辨率达到 3.53 cm。依托于建立的粗模,然后进入航迹大师界面选择结构建模菜单,导入被测高层建筑 KML,设定水平重叠率 80%,垂直重叠率 70%,低点高程 22 m,高点高程 100 m,正射影像建筑覆盖面积 0.016365 km²,飞行 3 架次 54 min,总计拍摄正射影像照片 2894 张(图 7)。

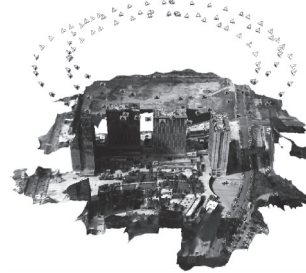


图6 环绕飞行航线

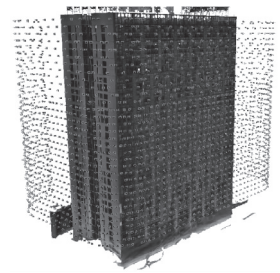


图7 贴近摄影测量航线

3.2 三维建模

采用大疆智图软件进行三维建模,导入航拍照片,分辨率设定为高,场景为普通场景。使用工作站进行三维建模,工作站 CPU 型号:intel 13th Gen intel(R) Core(TM) i9-13900KF 32 cores,显卡型号:NVIDIA GeForce RTX 4090,空三耗时 16min30s,三维重建耗时 5h31min31s,生成模型分辨率为 0.63 cm。三维模型见图 8,大疆智图质量报告见图 9。

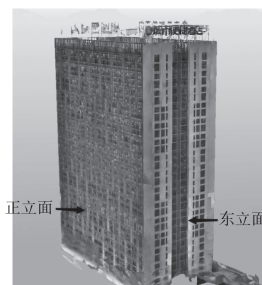


图8 三维模型

任务参数	
飞行参数	
平均飞行高度	0.48 m
照片分辨率	0.03 cm/pix
照片覆盖面积(估算)	0.016365 km ²
照片	3 bands, 4090
空三重建质量报告	
三维模型	
模型分辨率	1
最大地面分辨率(估算)	2840
模型大小(估算)	684281
模型大小	728660
模型分辨率(MPS)	0.003 pix
模型分辨率(MPS)	0.128 m

图9 大疆智图质量报告相关参数

4 模型分析

采用无人机搭载云台利用贴近摄影测量技术获取被测建筑外墙三层至顶层的影像数据,通过对被测建筑三维模型分析,其墙外饰面砖脱落主要发生在正立面和东立面。

4.1 正立面

正立面航拍范围长度为 64.08 m,高度为 77.71 m,总面积为 4979.65 m²,正立面采用较大窗墙比设计,窗户分为百叶窗和铝合金窗,铝合金窗的开启方式为平开式,窗户总面积为 4131.21 m²,其他部位为外墙,其面积为 848.44 m²。详细查看三维模型,得出饰面砖脱落界面主要发生在中空玻化微珠无机保温砂浆层,经统计饰面砖脱落的部位有 44 处,总面积为 9.89 m²,最大面积为 3.03 m²,最小面积为 0.03 m²(图 10-13),占总面积的 1.17%,多数饰面砖脱落面积集中在 0.03~0.63 m² 范围内,占比为 77.27%,其次为 0.63~1.23 m²,占比为 18.18%。



图 10 正立面饰面砖脱落



图 11 饰面砖脱落面积测量



图 12 饰面砖脱落面积测量



图 13 饰面砖脱落面积测量

4.2 侧立面

被测建筑西立面外墙饰面砖已进行改造,将饰面砖改造为饰面砂浆(图 14),通过检查三维模型未发现墙体出现开裂、空鼓等缺陷。被测建筑东立面存在饰面砖填缝不饱满或未勾缝、空鼓和脱落等严重质量缺陷,经查看三维模型饰面砖与墙体脱离甚至成片出现脱落,脱落界面主要发生在中空玻化微珠无机保温砂浆层(图 15-17),统计缺陷区域共 11 处,总面积为 194.68 m²,其中最大面积为 43.97 m²,最小面积为 4.45 m²,饰面砖与墙体脱开最大距离为 12 cm。



图 14 改造后的西立面外墙

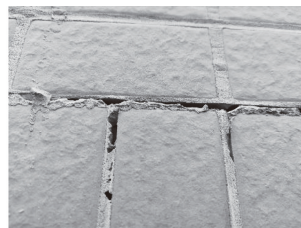


图 15 饰面砖勾缝不饱满



图 16 饰面砖脱开距离测量



图 17 饰面砖空鼓

随着无人机技术越来越成熟,搭载的云台精度越来越高,采用贴近摄影测量技术,能够对被测建筑获取超高分辨率影像,进行精细化地理信息提取,从而保证模型的精度达到毫米级。通过对模型进行分析可以得到缺陷的准确位置并精确计算出缺陷的长度和面积,为后续修缮工作提供技术支撑。

参考文献【REFERENCES】

- [1] 唐超,卢文胜,商登峰,等.某高校建筑外墙饰面层损伤特征分析[J].结构工程师,2023,39(4):52-59.
- [2] 中华人民共和国住房和城乡建设部.建筑装饰装修工程质量验收标准:GB 50210—2018[S].北京:中国建筑工业出版社,2018.
- [3] 陈宁,王娟,董庆广.无人机搭载红外热像仪检测外墙外保温系统缺陷影响因素及案例分析[J].施工技术,2020,49(9):12-15.
- [4] 彦明捷.无人机倾斜摄影技术在城市实景三维建模中的应用[J].科技创新与应用,2023(10):173-176.
- [5] 朱勇,程海翔.基于倾斜摄影技术的城市实景三维建模研究[J].经纬天地,2022(6):27-30.
- [6] 言司.独辟蹊径,不断创新 贴近摄影测量:第三种摄影测量方式的诞生——专访武汉大学遥感信息工程学院张祖勋院士[J].中国测绘,2019(10):31-37.

收稿日期:2024-02-02;修回日期:2024-02-02

基金项目:中建四局科技研发项目(CSCEC4B-2022-KTA-7)。

作者简介:聂晓鹏(1987-),男,硕士,高级工程师,主要从事智能检测、仿真分析和建筑材料研究。

5 结语