

基于 UPLC-QqQ-MS/MS 测定人参属中药对 甲亢大鼠类固醇激素含量的影响

金墨竹, 刘琳琳, 窦德强

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 本研究利用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)联用技术定量测定甲亢大鼠血清中肾上腺素和多种类固醇激素, 探讨血清中类固醇激素含量与甲状腺功能亢进的相关性, 以及不同药性人参属中药红参和人参叶对甲亢高代谢的改善作用。采用主成分分析(PCA)、Spearman 检验进行肾上腺素和类固醇激素与甲状腺功能的相关性分析。结果表明, UPLC-QqQ-MS/MS 能够快速检测待测物的含量和变化, 灵敏度高、重现性好、准确率高且分析速度快。与空白组相比, 甲亢大鼠血清中类固醇激素含量均有不同程度的降低, 给予不同药性人参属中药后均出现升高。类固醇激素水平异常在一定程度上与甲状腺激素有关, 皮质酮和肾上腺素可作为中药调节类固醇激素代谢的关键指标; 睾酮可作为寒性中药调节类固醇激素的生物标志物; 肾上腺素和雄烯二酮可作为温性中药调节类固醇激素的生物标志物。该方法能够系统、快速、准确、高效地完成大鼠血清中类固醇激素含量的测定, 为类固醇激素的分析测定提供方法参考。

关键词: 甲亢; 肾上腺素; 类固醇激素; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS); 红参; 人参叶; 定量测定

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)04-0540-12

doi: 10.7538/zpxb.2024.0004

Quantitative Analysis of Steroid Hormones to Explore the Effects of Ginseng Medicines Base on UPLC-QqQ-MS/MS

JIN Mo-zhu, LIU Lin-lin, DOU De-qiang

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: The medicinal nature of traditional Chinese medicine (TCM) mainly plays a role in regulating the energy and material metabolism of the body. The energy metabolism of the body is also regulated by the nervous and endocrine systems, and the hormones are an important component of the endocrine system to realize the coordinated action. Therefore, the medicinal nature of TCM is inextricably linked with the metabolism of hormones. Hyperthyroidism, *qi-yin* deficiency syndrome is regarded as the classic heat syndrome category in Chinese medicine, which can be used as model to reflect the mechanism and difference of *qi* tonifying of ginseng herbs with different medicinal natures. Steroid hormones are synthesized in the adrenal cortex, mitochondria of placental cells, smooth endoplasmic reticulum, and gonads of the human body by the participation of various

metabolic enzymes. Meanwhile, most of the patients with hyperthyroidism have adrenocortical dysfunction in the clinic, and the corresponding clinical symptoms are closely related to the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (HPT), the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG). When hyperthyroidism occurs, the production and release of steroid hormones will be affected to a certain extent. To explore the correlation between the level of steroid hormones and hyperthyroidism, and the ameliorative effects of red ginseng and ginseng leaves of different types of the genus *Ginseng* on hypermetabolism of hyperthyroidism and the changes of related indexes, a method of ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS) was established for rapid identification and quantification of chemical components, including adrenaline, androstenedione, testosterone, dehydroepiandrosterone, estriol, progesterone, 17 α -hydroxypregnenolone, corticosterone, and cortisol in rat serum. Then, multivariate analysis method, principal component analysis (PCA), and Spearman test were used to analyze the correlation among adrenaline, steroid hormones, and thyroid function. The results showed that the contents of steroid hormone in the serum of the model group of rats decrease to different degrees, compared with the control group, and increase after the administration of different types of ginsengs. Meanwhile, it was proved that the established method has high sensitivity, good reproducibility, high accuracy, and fast analysis, which can screen a large number of steroid hormones in complex samples in a short time, for accurately investigation of the effects of ginsengs on the content of 9 types of steroid hormones in hyperthyroidism rats. The abnormal levels of steroid hormones are related to thyroid hormones. Corticosterone and adrenaline can serve as key indicators for regulating steroid hormone metabolism of TCMs like ginsengs. Testosterone can be used as the biomarker for regulating steroid hormones of the cold nature herbs. Adrenaline and androstenedione can be used as biomarkers for regulating steroid hormones of the warm nature herbs. This method can conveniently, quickly, accurately, and efficiently complete the analysis of target components in samples. The average recoveries of steroid hormones in rat serum range from 88.75% to 106.94%, and the relative standard deviation is less than 1.99%. This can be used for the determination of steroid hormones in rat serum systematically, rapidly, accurately and efficiently, and provides a methodological reference for the analysis and determination of steroid hormones.

Key words: hyperthyroidism; adrenaline; steroid hormone; ultra-performance liquid chromatography tandem triple quaternary mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS); red ginseng; ginseng leaves; quantitative analysis

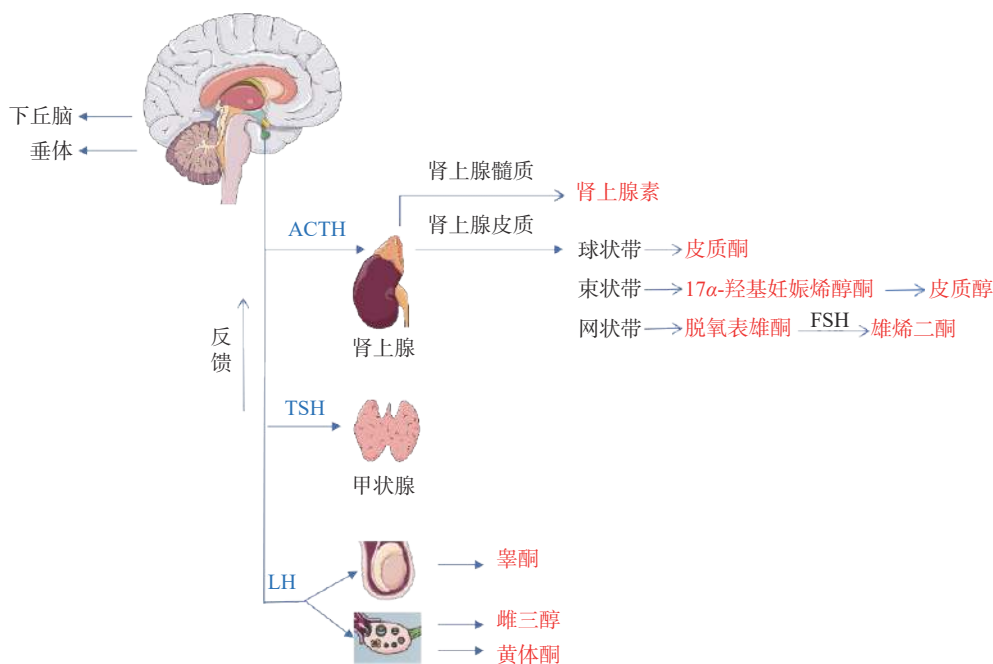
甲状腺功能亢进症(甲亢)是一种常见的内分泌疾病,由于甲状腺处于高功能状态,合成、释放过多甲状腺激素,引发机体代谢亢进及交感神经兴奋^[1]。临床上主要表现为物质和能量的代谢旺盛,属于中医热证范畴^[2]。人参为五加科人参属植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根及根茎,红参为人参单次蒸制后的加工品,人参叶是人参的干燥叶子。据《中国药典》记载,红参和人参叶均为补气药,且皆以人参皂苷为主要有效成分,但皂苷的种类和比例不同,性

味为其主要差别,经炮制后,红参药性温补作用更强,属温^[3],人参叶属寒^[4]。甲亢为评价中药寒热药性的经典虚热症模型^[5],气阴两虚为其主要的病理基础,更能反映出不同药性人参类中药补气的机制和差别。

现代研究表明^[6],中药药性与物质代谢、能量代谢相关,机体的能量代谢又受神经和内分泌等系统的调节,内分泌系统主要包含下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT),下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG)。甲亢患者

绝大多数存在肾上腺皮质功能紊乱,临床症状与HPA的功能紊乱密切相关。肾上腺皮质分为球状带、束状带和网状带3部分,其中球状带分泌皮质酮,束状带主要分泌 17α -羟基妊娠烯醇酮和皮质醇,网状带分泌雄烯二酮和脱氢表雄酮。垂体分泌的促性腺激素会促使睾丸和卵巢分

泌、睾酮和雌二醇,而雌三醇是雌二醇的代谢产物,同时肾上腺也会分泌一部分、睾酮和雌三醇。当发生甲亢时,以上激素的生成和释放都会受到一定程度的抑制^[7],HPA轴通过反馈调节通路参与控制应激反应、免疫等多种生理反应,示于图1^[8]。



注: ACTH. 促肾上腺皮质激素; TSH. 促甲状腺激素; LH. 促黄体生成素; FSH. 促卵泡生成素

图1 HPA轴与肾上腺皮质类固醇激素合成代谢途径

Fig. 1 Anabolic pathway of HPA axis with the adrenocortical steroid hormone

目前,用于检测中药及其代谢产物的方法有核磁共振波谱法、气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法等^[9]。其中,核磁共振波谱法对于化合物成分的定性和定量分析效果均较差;GC-MS/MS仅适用于分析挥发性待测物;LC-MS/MS具有特异性强、灵敏度高、分析速度快、检测范围广等优点,广泛用于医药分析领域^[10-12]。而超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(UPLC-QqQ-MS/MS)法的分辨率更高、分析时间更短,可实现更加精准的定性和定量分析^[13],且三重四级杆质谱的定量选择性高^[14],能避免其他物质的干扰,以其高特异性、分离能力和灵敏性的技术优势解决了临床诊断指标分析中生物样本成分复杂的问题^[15-18]。

本研究拟采用UPLC-QqQ-MS/MS检测大鼠血清中肾上腺素和多种类固醇激素,阐明甲亢状态下肾上腺素和类固醇激素的代谢过程。同时,

以典型寒性中药黄柏为参照,通过比较正常大鼠、优甲乐所致甲亢大鼠和给予不同药性人参属中药的甲亢大鼠的肾上腺素和多种类固醇激素含量的差异,探讨类固醇激素代谢产物与甲状腺功能的相关性,以及不同药性人参属中药对甲亢高代谢的改善作用。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

ACQUITY I-CLASS型超高效液相色谱仪、XEVO G2-XS型超高效液相色谱-质谱联用仪:美国Waters公司产品;AE240型十万分之一分析天平:瑞士Mettler-Toledo公司产品。

1.2 样品与试剂

牛血清白蛋白(CR2101013):赛维尔生物科技有限公司产品;甲酸、甲醇、乙腈:均为色谱纯,美国TEDIA公司产品;皮质醇(C-106-1ML)、

皮质酮(C-117-1ML)、脱氢表雄酮(D-063-1ML): 德国 Sigma 公司产品; 雄烯二酮(SA5430)、睾酮(ST-8940)标准品: 索莱宝公司产品; 雌三醇(50-27-1)、肾上腺素(CDCT-C13177900)标准品: 上海安谱实验科技股份有限公司产品; 黄体酮(57-83-0)、17 α -羟基妊娠烯醇酮(G986202)标准品: DR 生物科技股份有限公司产品; 扑热息痛(A1125AS)标准品: 美仑生物科技有限公司产品; 三碘甲状腺原氨酸(20210711)、甲状腺素(20210711)试剂盒: 南京建成生物科技有限公司产品; 水为超纯水。

1.3 动物分组及给药方法

购入 45 只雄性 SD 大鼠, 实验前, 将所有大鼠在实验室条件下适应喂养 3~4 天。按照随机分配原则, 将大鼠分成空白组(CON)、甲亢模型组(MOD)、黄柏 8 倍水煎液组(HB)、红参 8 倍水煎液组(RG)、人参叶 8 倍水煎液组(GL)共 5

组, 每组 9 只。除空白组外, 各组大鼠每日灌胃生理盐水配制的优甲乐混悬液(含药量 12 mg/L, 给药量 240 μ g/kg)。造模第 8 天, 给予优甲乐 4 h 后, 给予中药灌胃(红参组和人参叶组折合生药量为 6.64 g/kg、黄柏组折合生药量为 8.88 g/kg), 按照大鼠体重 10 mL/kg 给药, 空白组及模型组按 10 mL/kg 给予蒸馏水, 连续灌胃给药 14 天。

2 实验方法

2.1 溶液配制

2.1.1 标准工作溶液的配制 标准工作液 1: 由 6.25 μ g/L 皮质醇、皮质酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮、睾酮、17 α -羟基妊娠烯醇酮, 62.5 μ g/L 黄体酮和 12.5 μ g/L 雌三醇、肾上腺素的标准储备液混合而成。精密量取标准工作液 1, 将其逐级稀释至 16、64、128、640、1 024 倍, 其具体浓度列于表 1。

表 1 标准品浓度
Table 1 Concentration of the standard sample

化合物 Compound	浓度 Concentration/(μ g/L)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
肾上腺素	12.500	0.781	0.195	0.098	0.020	0.012
雄烯二酮	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006
睾酮	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006
脱氢表雄酮	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006
雌三醇	12.500	0.781	0.195	0.098	0.020	0.012
黄体酮	62.500	3.906	0.977	0.488	0.098	0.061
17 α -羟基妊娠烯醇酮	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006
皮质酮	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006
皮质醇	6.250	0.391	0.098	0.049	0.010	0.006

注: C1 为标准工作液 1; C2~C6 为标准工作液 1 分别稀释 16、64、128、640、1 024 倍后的标准工作液

标准内标溶液: 取适量的内标物扑热息痛, 用甲醇定容至 1 mg/L。

2.1.2 质控样品的制备 将 2 g 牛血清白蛋白(BSA)溶于 50 mL 磷酸盐缓冲液中, 制备 BSA 溶液, 即得空白血清。

2.2 样品处理

精密吸取 300 μ L 血清于 2 mL EP 管中, 加入 10 μ L 标准内标溶液, 按体积比 1 : 4 加入预冷的甲醇-乙腈溶液(1 : 1, V/V), 在 4 $^{\circ}$ C 高速冷冻机中以 8 000 r/min 离心 15 min; 取 1 300 μ L 上清

液, 用氮气吹干; 再用 75 μ L 乙腈-水溶液(1 : 1, V/V)将其复溶; 在相同条件下, 将复溶溶液再次在冷冻离心机中离心 15 min, 取上清液, 直接进样。

标准曲线工作溶液的制备: 精密吸取 300 μ L 标准工作液于 300 μ L 空白血清中, 其他步骤同上。

2.3 实验条件

2.3.1 色谱条件^[19] ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.8 μ m); 进样量 10 μ L; 流速 0.4 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 流动相: A 为 0.1%甲

酸乙腈溶液, B 为 0.1%甲酸水溶液;梯度洗脱程序: 0~1 min(5%A), 1~2 min(5%~60%A), 2~3 min(60%A), 3~7 min(60%~90%A), 7~9 min(90%A), 9~10 min(90%~100%A), 10~11 min(100%A), 11~12 min(100%~5%A), 12~16 min

(5%A)。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源正离子模式(ESI^+), 多重反应监测(MRM), 干燥气温度 350 °C; 针对每种目标化合物优化的 UPLC-QqQ-MS/MS 检测条件列于表 2。

表 2 监测离子对优化参数

Table 2 Optimal parameters of monitoring ion pairs

化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	母离子 Precursor ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z)	离子对 Ion pair (m/z)	锥孔电压 Cone voltage/V	碰撞电压 Collision energy/eV
肾上腺素	0.74	184.09	184.09>166.14	16	10
扑热息痛(内标)	2.71	152.07	152.07>110.06	32	16
17 α -羟基妊娠烯醇酮	2.97	332.24	332.24>314.17	40	32
皮质醇	3.39	363.21	363.21>121.10	34	22
皮质酮	3.61	347.22	347.22>121.10	32	28
睾酮	3.96	289.21	289.21>109.09	42	22
脱氢表雄酮	3.96	289.21	289.21>97.08	36	32
雌三醇	4.00	289.16	289.16>97.08	36	26
雄烯二酮	4.20	287.20	287.20>97.08	34	34
黄体酮	5.19	315.23	315.23>109.07	42	20

2.4 方法学考察

2.4.1 检测限与定量限 精密吸取适量的标准工作溶液, 按 2.2 节方法处理后进样分析, 重复进样 6 次, 记录峰面积。分别以 3 倍和 10 倍信噪比得到检测限和定量限。

2.4.2 线性关系 将标准工作溶液逐级稀释成 10 个浓度, 分别精密吸取 300 μL 各标准工作溶液于 300 μL 空白血清中, 按 2.2 节方法处理后进样分析, 以标准品浓度为横坐标, 不同浓度标准品峰面积与对应内标峰面积的比值为纵坐标绘制标准曲线, 得到拟合回归方程。

2.4.3 精密度 精密吸取适量的标准工作溶液, 按 2.2 节方法处理后进样分析, 对同一标准工作液连续进样 6 次, 分别计算各目标峰面积与内标峰面积比值的相对标准偏差。

2.4.4 稳定性 精密吸取同一供试品溶液, 在室温下放置 0、4、8、12、24 h 后, 按 2.2 节方法处理后进样分析, 测定日内稳定性; 在 -80 °C 冰箱中存放 1、2、4、7 天后, 测定日间稳定性。记录各目标峰面积与内标峰面积的比值, 根据当日工作曲线计算各类固醇激素含量, 用质量浓度的相对标准偏差评价稳定性。

2.4.5 加样回收率及基质效应 各取 300 μL 已知类固醇激素含量的血清样品, 按照该样品中各类固醇激素含量的 80%、100%、120% 分别加入适量的对照品储备液, 再加入内标溶液, 按 2.2 节方法处理后进样分析。根据当日工作曲线计算各类固醇激素含量, 按照回收率%=(对照品检出量-已知对照品含量)/加入对照品含量 $\times$ 100%计算回收率及相对标准偏差。

取覆盖标准曲线范围的低、中、高 3 种浓度标准工作液, 按 2.2 节方法处理后进样分析得到峰面积(A), 低、中、高浓度的标准品(以乙腈-水溶液(1:1, V/V)为溶剂)直接进样分析得到峰面积(B), A 与 B 的比值即为基质效应。

2.4.6 大鼠甲状腺功能检测 取各组大鼠血清, 按照试剂盒说明书操作步骤进行三碘甲状腺原氨酸(T3)和甲状腺素(T4)含量的测定。

2.4.7 大鼠血清中肾上腺素和类固醇激素含量测定 取各组大鼠血清, 按 2.2 节方法处理后进样分析, 根据随行工作曲线计算肾上腺素和类固醇激素含量。

2.4.8 不同药性人参属中药在类固醇激素代谢中生物标志物的识别 利用 SIMCA-P 分析软

件, 在 OPLS-DA 模型下计算相应主成分的变量投影重要性(VIP)分析值偏最小二乘, 一般选取阈值大于 1 的物质作为经模式识别分析后的生物标志物, 探究不同药性人参属中药的差异。

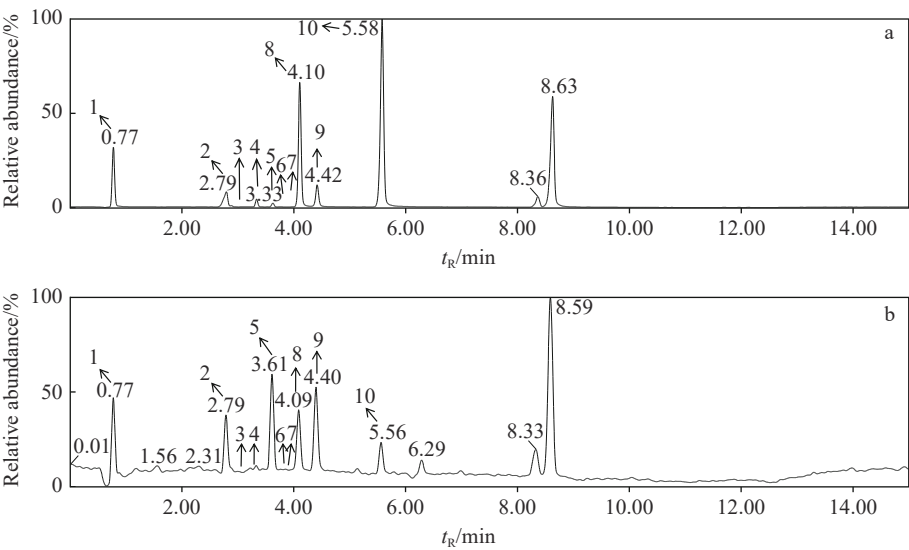
2.4.9 统计学分析 使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示实验结果, SPSS 17.0 软件统计分析。对于满足正态性及方差齐性的组别采用最小显著差异(LSD)法进行多组之间的差异比较; 方差不齐的组别采用 Dunnett T3 方法进行多组之间的

两两差异比较。采用 Sperman 检验分析差异类固醇激素代谢物浓度与甲状腺功能的相关性, $P<0.05$ 被认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 液相色谱-质谱检测结果

对甲亢大鼠血清样品中的 9 种类固醇激素进行分析, 总离子流图示于图 2, 各成分的分离度及离子化程度均较好, 各峰保留时间适中、峰形较好。



注: a. 类固醇激素混标; b. 血清中肾上腺素和各类固醇激素; 1. 肾上腺素; 2. 扑热息痛(内标); 3. 17 α -羟基妊娠烯醇酮; 4. 皮质醇; 5. 皮质酮; 6. 脱氢表雄酮; 7. 睾酮; 8. 雌三醇; 9. 雄烯二酮; 10. 黄体酮

图 2 类固醇激素总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of steroid hormones

3.2 线性回归方程、检出限和定量限

标准曲线的线性回归方程、相关系数(R^2)、

线性范围以及检测限、定量限结果列于表 3, 成分在一定浓度范围内的线性关系良好。

表 3 类固醇激素的线性回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限
Table 3 Linear ranges, linear regression equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of steroid hormones

化合物 Compound	线性回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linear range/($\mu\text{g/L}$)	检测限 LOD/($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ/($\mu\text{g/L}$)
肾上腺素	$y=1.747x-33.36$	0.998 8	12.5~0.012	1.37×10^{-3}	4.57×10^{-3}
雄烯二酮	$y=1.581x+19.55$	0.984 7	6.25~0.006	7.15×10^{-4}	2.38×10^{-3}
睾酮	$y=2.494x-19.63$	0.991 4	6.25~0.006	3.69×10^{-4}	1.22×10^{-3}
脱氢表雄酮	$y=2.181x-15.93$	0.983 4	6.25~0.006	3.51×10^{-4}	1.17×10^{-3}
雌三醇	$y=1.442x-20.56$	0.988 2	12.5~0.012	1.14×10^{-3}	3.79×10^{-3}
黄体酮	$y=13.417x-112.07$	0.995 1	62.5~0.061	7.10×10^{-3}	2.37×10^{-2}
17 α -羟基妊娠烯醇酮	$y=0.009x-0.57$	0.985 3	6.25~0.006	5.50×10^{-4}	1.83×10^{-3}
皮质酮	$y=0.221x-1.72$	0.986 8	6.25~0.006	5.30×10^{-4}	1.75×10^{-3}
皮质醇	$y=0.312x-1.46$	0.994 2	6.25~0.006	4.64×10^{-4}	1.53×10^{-3}

3.3 精密度、稳定性、加样回收率及基质效应

采用精密度、加样回收率及稳定性评价方法的稳定性及可靠性,其中,精密度包括日内精密度和日间精密度。结果表明,本实验各类固醇激素测定的准确度和精密度均小于15%^[20],列于表4。各激素加样回收率在92.50%~101.67%之间,低、中、高3种浓度下的基质效应均在(99.2±4.3)%~(100.5±4)%范围内,基质效应可忽略不计,结果列于表5。

3.4 各组大鼠血清中甲状腺功能

各组大鼠血清中甲状腺功能相关指标含量示于图3。与空白组相比,模型组的T3和T4均出现升高,且T3的变化有统计学意义($P<0.01$),表明甲亢大鼠造模成功。与模型组相比,当使用寒性中药时,黄柏组的T3和T4有降低趋势,且

表4 9种固醇激素的精密度及稳定性

Table 4 Precision and stability of 9 steroid

化合物 Compound	精密度 Precision/%		稳定性 Stability/%	
	日内 Intra-day	日间 Inter-day	−80 °C	室温 Room temperature
肾上腺素	10.61	11.45	1.34	6.69
雄烯二酮	8.51	12.17	4.77	6.16
睾酮	9.33	10.51	3.50	3.59
脱氢表雄酮	12.46	13.76	4.34	6.55
雌三醇	8.04	9.24	5.92	6.59
黄体酮	9.27	5.60	7.45	7.52
17 α -羟基妊娠烯醇酮	11.20	12.33	6.16	8.97
皮质酮	12.41	12.89	4.56	4.42
皮质醇	11.03	13.22	5.34	7.1

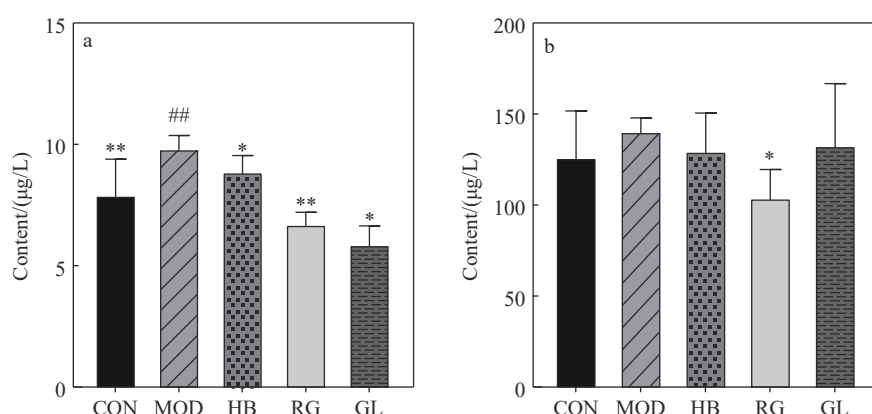
表5 9种固醇激素的加样回收率($n=3$)

Table 5 Spiked recoveries of 9 steroid hormones ($n=3$)

化合物 Compound	加样率 Added rate/%	样品含量 Content/ μg	加样量 Added/ μg	检出量 Detected/ μg	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
肾上腺素	80	1.50	1.20	2.72	101.67	1.99
	100	2.90	2.90	5.76	98.62	
	120	2.00	2.40	4.35	97.92	
雄烯二酮	80	0.90	0.72	1.60	97.22	0.79
	100	0.80	0.80	1.59	98.75	
	120	1.00	1.20	2.18	98.33	
睾酮	80	0.90	0.72	1.60	97.22	1.39
	100	0.95	0.95	1.90	100.00	
	120	1.20	1.44	2.62	98.61	
脱氢表雄酮	80	0.90	0.72	1.61	98.61	1.36
	100	1.10	1.10	2.21	100.91	
	120	1.10	1.32	2.40	98.48	
雌三醇	80	1.30	1.04	2.29	95.19	0.70
	100	1.80	1.80	3.52	95.56	
	120	2.30	2.76	4.90	94.20	
黄体酮	80	7.60	6.08	13.50	97.04	1.27
	100	10.10	10.10	20.08	98.81	
	120	12.10	14.52	26.09	96.35	
17 α -羟基妊娠烯醇酮	80	0.78	0.62	1.39	97.76	1.68
	100	0.98	0.98	1.92	95.92	
	120	1.15	1.38	2.52	99.28	
皮质酮	80	0.75	0.60	1.31	93.33	1.70
	100	0.98	0.98	1.91	94.90	
	120	1.12	1.34	2.42	96.73	

续表

化合物 Compound	加样率 Added rate/%	样品含量 Content/ μg	加样量 Added/ μg	检出量 Detected/ μg	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
皮质醇	80	0.67	0.54	1.18	95.15	1.56
	100	1.20	1.20	2.31	92.50	
	120	0.98	1.18	2.10	95.24	



注: a. T3; b. T4; CON 为空白组; MOD 为模型组; HB 为黄柏组; RG 为红参组; GL 为人参叶组; #表示与空白组相比 $P<0.05$; ##表示与空白组相比 $P<0.01$; *表示与模型组相比 $P<0.05$; **表示与模型组相比 $P<0.01$; 如数据同时满足正态性和方差齐性, 采用 LSD 检验检测; 若数据满足正态性, 不满足方差齐性, 采用 Dunnett's T3 检验, 以下同

图3 各组大鼠血清中甲状腺功能相关指标含量

Fig. 3 Contents of thyroid function related indicators in serum of rats in each group

T3 有统计学意义 ($P<0.05$); 人参叶组的 T3 和 T4 含量降低, 且 T3 含量降低有统计学意义 ($P<0.05$); 温性中药红参组 T3 和 T4 有降低趋势且有统计学意义 ($P<0.05$)。

3.5 各组大鼠血清中类固醇激素含量

各组大鼠血清中类固醇激素含量示于图4。与空白组相比, 模型组的激素含量均降低, 其中肾上腺素、雄烯二酮、雌三醇、黄体酮、 17α -羟基妊娠烯醇酮和皮质酮明显降低, 且具有统计学意义 ($P<0.05$), 虽然皮质醇、睾酮和脱氢表雄酮无显著性意义, 但其含量明显下降, 表明甲状腺功能的变化对垂体-肾上腺皮质激素轴的影响很大。与模型组相比, 当使用寒性中药时, 黄柏组的肾上腺素、皮质酮、皮质醇、雄烯二酮、雌三醇和黄体酮有增高趋势但无统计学意义, 睾酮、脱氢表雄酮和 17α -羟基妊娠烯醇酮有降低趋势且也无统计学意义; 人参叶组的类固醇激素全部出现回升, 其中肾上腺素、皮质酮、皮质醇、雄烯二酮、睾酮、脱氢表雄酮和 17α -羟基妊娠烯醇酮显著升高且有统计学意义 ($P<0.05$); 温性中药红参组的肾上腺素和雄烯二酮有升高趋势且有统计学意义 ($P<0.01$), 皮质酮、皮质醇、睾

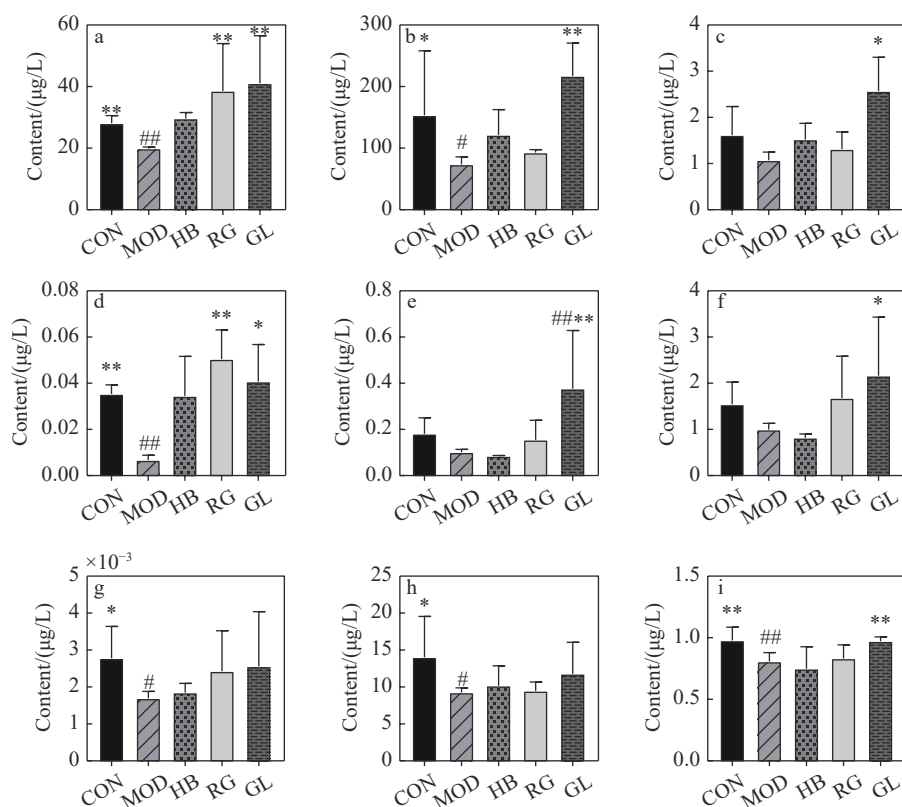
酮、脱氢表雄酮和雌三醇有升高趋势但无统计学意义。

3.6 中药药性与各类固醇激素含量的关联性

为了探究不同药性的中药对各类固醇激素的影响, 利用 SIMCA-P 软件在 OPLS-DA 模型下计算相应主成分的变量投影重要性 (VIP) 分析值偏最小二乘, 各组大鼠血清中各类固醇激素成分的 VIP 值示于图5。结果表明, 各组大鼠血清中皮质酮和肾上腺素的 VIP 值分别为 2.074 91、2.032 4, 二者的阈值大于 1, 表明在黄柏、红参和人参叶 3 种不同药性中药的作用下, 大鼠血清中皮质酮和肾上腺素差异显著, 可作为区分不同中药药性的参考指标。

3.7 血清中类固醇激素浓度与甲状腺功能的相关性分析

Spearman 相关性分析结果示于图6。促甲状腺激素释放激素 (TRH) 水平与雄烯二酮 ($r=-0.355$, $P=0.021$)、黄体酮 ($r=-0.332$, $P=0.032$) 呈显著负相关; T3 水平与雄烯二酮 ($r=-0.362$, $P=0.018$) 呈显著负相关; 促甲状腺激素 (TSH) 水平与雌三醇 ($r=0.422$, $P=0.005$)、黄体酮 ($r=0.418$, $P=0.006$) 呈显著正相关。



注: a. 肾上腺素; b. 皮质酮; c. 皮质醇; d. 雄烯二酮; e. 睾酮; f. 脱氢表雄酮; g. 雌二醇; h. 黄体酮; i. 17 α -羟基妊娠烯醇酮

图4 各组大鼠血清中类固醇激素含量

Fig. 4 Contents of steroid hormone in the serum of rats in each group

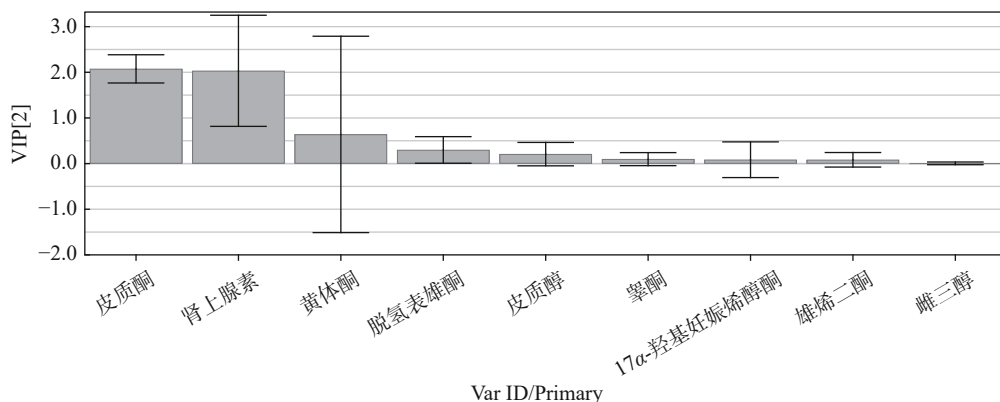


图5 各组大鼠血清中各类固醇激素成分VIP值

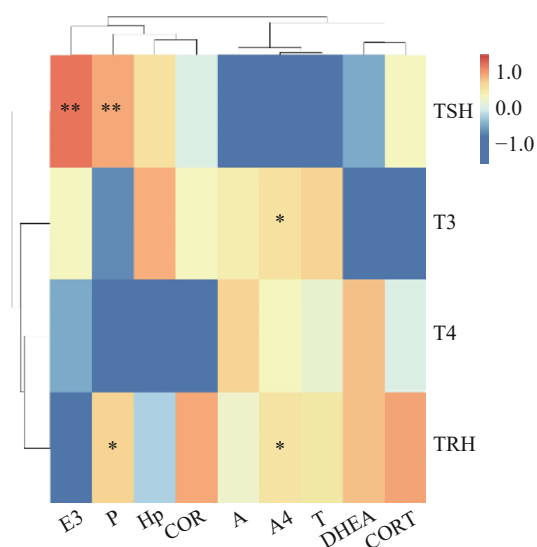
Fig. 5 VIP values of each steroid hormone component in the serum of rats in each group

4 讨论

研究表明^[21-22], 绝大多数甲亢患者存在肾上腺皮质功能紊乱, 导致皮质醇、促肾上腺皮质激素(ACTH)水平偏低, 甲亢越严重, 肾上腺皮质功能受抑制程度越大。因此, 肾上腺皮质激素含量与甲状腺功能亢进密切相关。然而, 血清成分复杂、背景干扰因素较多, 为皮质激素(甾体激

素)的定量分析带来挑战。

本研究采用UPLC-QqQ-MS/MS技术测定甲亢大鼠和给药大鼠血清中肾上腺素和类固醇激素含量。通过分析甲亢大鼠血清类固醇激素成分, 发现T3和T4含量与对照组相比出现明显上升, 表明造模成功。当给予红参、人参叶和黄柏时, T3和T4含量均出现回调趋势, 黄柏组和人参



注: E3. 雌三醇; P. 黄体酮; Hp. 17 α -羟基妊娠烯醇酮; COR. 皮质醇; A. 肾上腺素; A4. 雄烯二酮; T. 睾酮; DHEA. 脱氢表雄酮; CORT. 皮质酮

图6 9种类固醇激素代谢物与 TSH、T3、T4 和 TRH 的 Spearman 相关性分析热图

Fig. 6 Heat map of Spearman correlation analysis of 9 steroid hormones metabolites with TSH, T3, T4 and TRH

叶组使甲亢指标回调,表明甲亢模型属于热证模型,寒性中药可缓解甲亢。同时,红参给药组可以缓解甲亢症状,表明补气中药能够缓解甲亢。与空白组相比,红参组和人参叶组肾上腺素等皮质激素也出现了不同程度的升高,且有统计学差异,表明人参中药可能通过调节 HPT 和 HPA 发挥补气作用,从而缓解甲亢。

对 9 种类固醇激素进行主成分分析和 Spearman 相关性分析,结果表明,各类固醇激素浓度异常与甲状腺激素水平异常有关,证实了甲状腺功能的变化对垂体-肾上腺皮质激素含量的影响很大。与模型组相比,黄柏组和人参叶组的睾酮水平升高,且有统计学差异,提示寒性中药对睾酮的影响较强;而当使用温性中药红参时,肾上腺素和雄烯二酮有升高趋势且有统计学意义,表明温性中药红参可能与这 2 个指标升高有一定的关系。

5 结论

本实验利用 UPLC-QqQ-MS/MS 技术建立了血清中类固醇激素含量的测定方法。结果表明,9 种类固醇激素在一定浓度范围内具有良好的线

性关系,相关系数均大于 0.983 4,精密度、重复性、稳定性良好,平均加样回收率为 88.75%~106.94%,相对标准偏差(RSD)均小于 1.99%,定量限均低于 4.57 ng/L,检测限最低可达 1.37 ng/L。同时,考察了人参属中药对甲亢大鼠体内 9 种类固醇激素的影响。

此外,本研究还建立了基于甲亢的典型热综合征模型,利用 HPA、HPT、HPG 揭示了不同性质人参中药对甲亢(气阴虚)的影响。结果表明,人参中药可能通过调节 HPT 和 HPA 表现出补气作用。本研究首次将肾上腺素、雄激素和孕激素作为鉴别人参药性的重要指标,可为后续其他中药药性的探索 and 解析提供新思路。

参考文献:

- [1] 倪青. 甲状腺功能亢进症病证结合诊疗指南 (2021-01-20)[J]. 世界中医药, 2021, 16(2): 193-196.
NI Qing. Guideline for diagnosis and treatment of hyperthyroidism based on combination of disease and syndrome (2021-01-20)[J]. World Chinese Medicine, 2021, 16(2): 193-196(in Chinese).
- [2] 周旭升, 杨婧, 沈慧, 司昆. 六味地黄汤合加味逍遥散治疗阴虚阳亢型甲亢的疗效及对患者中医证候积分、动脉血流指标的影响[J]. 四川中医, 2022, 40(2): 119-122.
ZHOU Xusheng, YANG Jing, SHEN Hui, SI Kun. Curative effect of Liuwei Dihuang Decoction combined with Jiawei Xiaoyao Powder on hyperthyroidism with Yin deficiency and Yang hyperactivity and its influence on TCM syndrome integral and arterial blood flow index of patients[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(2): 119-122(in Chinese).
- [3] 李萌萌, 王一凯, 盛艳华, 黄鑫, 越皓, 刘淑莹. UPLC-QTOF-MS 非靶向代谢组学技术在人参和西洋参药性差异作用机制研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5 930-5 935.
LI Mengmeng, WANG Yikai, SHENG Yanhua, HUANG Xin, YUE Hao, LIU Shuying. Application of UPLC-QTOF-MS non-targeted metabolomics in mechanism study of property differences of ginseng and American ginseng[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(22): 5 930-5 935(in Chinese).
- [4] 纪瑞锋, 袁媛, 刘娟. 人参叶与人参化学及药理活性差异分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2 269-2 272.
JI Ruifeng, YUAN Yuan, LIU Juan. Difference analysis of chemical composition and pharmacological activity of

- ginseng leaf and ginseng[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 32(5): 2 269-2 272(in Chinese).
- [5] 赵金椽, 南洋, 陈平平, 刘树民. 知母多糖对甲亢热证大鼠肝脏代谢的影响[J]. 中医药信息, 2022, 39(4): 31-35. ZHAO Jinchuan, NAN Yang, CHEN Pingping, LIU Shumin. Effect of RAPS on liver metabolism in rats with hyperthyroidism of heat syndrome[J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2022, 39(4): 31-35(in Chinese).
- [6] LIU L, HAN X, SHAN G, FU L, DOU D. Mechanism difference of ginseng medicines with different natures on hyperthyroidism[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 319: 117-194.
- [7] 曹真虎, 陈青. 甲亢与血皮质醇和促肾上腺皮质激素含量水平的研究[J]. 中国性科学, 2020, 29(6): 24-27. CAO Zhenhu, CHEN Qing. Relationship between hyperthyroidism and serum cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels[J]. Chinese Journal of Human Sexuality, 2020, 29(6): 24-27(in Chinese).
- [8] 王文健, 沈自尹, 张新民, 陈素珍, 张玲娟, 吴波水. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究[J]. 中医杂志, 1986, 27(4): 32-36. WANG Wenjian, SHEN Ziyin, ZHANG Xinmin, CHEN Suzhen, ZHANG Lingjuan, WU Boshui. Clinical and experimental study on the effect of tonifying kidney on hypothalamus-pituitary-gonad axis in elderly men[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 1986, 27(4): 32-36 (in Chinese).
- [9] 姜文, 田璐肖, 智静驿, 甄晓兰, 李挥, 哈婧. 液质联用技术在肿瘤诊断与监测中的应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(15): 1 752-1 757. JIANG Wen, TIAN Luxiao, ZHI Jingyi, ZHEN Xiaolan, LI Hui, HA Jing. Application progress of LC-MS/MS in tumor diagnosis and monitoring[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2023, 43(15): 1 752-1 757(in Chinese).
- [10] 李文兰, 孙向明, 陈晨, 刘悦, 宋辉, 丁晶鑫, 徐蓓蓓, 阎新佳. 基于 UPLC-Q-TOF MS 的吴茱萸致肝毒性部位及入血成分分析[J]. 质谱学报, 2017, 38(3): 282-293. LI Wenlan, SUN Xiangming, CHEN Chen, LIU Yue, SONG Hui, DING Jingxin, XU Beilei, YAN Xinjia. Analysis of *Euodia rutaecarpa* hepatotoxic part and absorbed Components in rat serum based on UPLC-Q-TOF MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(3): 282-293(in Chinese).
- [11] 李伟, 冯育林, 黎田儿, 吴欢, 李艳, 钟国跃, 吴蓓, 何明珍. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物[J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 504-516. LI Wei, FENG Yulin, LI Tianer, WU Huan, LI Yan, ZHONG Guoyue, WU Bei, HE Mingzhen. Rapid analysis on flavonoids in *Glechoma longituba* (nakai) Kupr by UPLC-Q-TOF/MS couple with diagnostic ions[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2016, 37(6): 504-516(in Chinese).
- [12] 张文君, 李敏敏, 张凤. 液质联用技术及其应用[J]. 山东化工, 2014, 43(11): 121-122. ZHANG Wenjun, LI Minmin, ZHANG Feng. Liquid mass coupling technique and its application[J]. Shandong Chemical Industry, 2014, 43(11): 121-122(in Chinese).
- [13] 刘平香, 邱静, 翁瑞, 许彦阳, 钱永忠. 大蒜中主要功效成分分析研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2021(2): 67-73. LIU pingxiang, QIU Jing, WENG Rui, XU Yanyang, QIAN Yongzhong. Advances in the analysis of garlic functional components[J]. Quality and Safety of Agro-products, 2021(2): 67-73(in Chinese).
- [14] 欧爱芬, 黄嘉乐, 董杨静, 赵肃清. 超高效液相色谱-串联三重四极杆串联质谱法测定细辛中的 4 种马兜铃酸[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 296-303. OU Aifen, HUANG Jiale, DONG Yangjing, ZHAO Suqing. Determination of four aristolochic acids in asarum by ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 296-303(in Chinese).
- [15] 秦慧彬, 田翔, 王海岗, 王君杰, 乔治军, 杨洪江. 超高效液相色谱法测定传统发酵酸粥的游离氨基酸含量[J]. 食品科技, 2021, 46(4): 273-280. QIN Huibin, TIAN Xiang, WANG Haigang, WANG Junjie, QIAO Zhijun, YANG Hongjiang. Determination of free amino acids in traditional fermented acidic-gruel by ultra-high performance liquid chromatography[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(4): 273-280(in Chinese).
- [16] 施丽娟, 陈宁, 王丹, 范晓伟, 胡永丹, 易伦朝, 任达兵. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法定量分析云南大叶种茶酚类成分[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 271-280. SHI Lijuan, CHEN Ning, WANG Dan, FAN Xiaowei, HU Yongdan, YI Lunzhao, REN Dabing. Quantitative and comparative studies on phenolic constituents in dif-

- ferent types of Yunnan large leaf tea based on validated ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2022, 43(8): 271-280(in Chinese).
- [17] 吴鹏, 刘平香, 王玉涛, 高瑞, 江育茨, 毕京秀, 王正荣. 基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法的黑蒜加工过程中特征成分变化规律[J]. *食品科学*, 2024, 45(1): 82-90.
- WU Peng, LIU Pingxiang, WANG Yutao, GAO Rui, JIANG Yuying, BI Jingxiu, WANG Zhengrong. Changing pattern of characteristic components in black garlic during processing analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2024, 45(1): 82-90(in Chinese).
- [18] 方春雪, 位鸿, 何蕊, 冷向阳. 液相色谱串联质谱临床应用进展[J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(2): 405-406, 440.
- FANG Chunxue, WEI Hong, HE Rui, LENG Xiangyang. Advances in clinical application of LC-MS/MS[J]. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine*, 2016, 32(2): 405-406, 440(in Chinese).
- [19] 刘琪. UPLC-MS/MS 法定量分析类固醇激素及其在临床检测中的应用研究[D]. 武汉: 中南民族大学, 2019.
- [20] BRODIE R R, HILL H M. Validation issues arising from the new FDA guidance for industry on bioanalytical method validation[J]. *Chromatographia*, 2002, 55(1): S91-S94.
- [21] 陈红, 李阳, 何旭梅, 王婧, 吴秋莲, 余晶晶. 甲状腺功能亢进症患者血皮质醇、促肾上腺皮质激素含量水平与疾病程度相关性研究[J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49(9): 1 168-1 171.
- CHEN Hong, LI Yang, HE Xumei, WANG Jing, WU Qiulian, YU Jingjing. Correlation between serum cortisol, adrenocorticotrophic hormone levels and disease severity in hyperthyroidism patients[J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2020, 49(9): 1 168-1 171(in Chinese).
- [22] 王莉, 邢影, 王琼, 付建芳, 张娜娜, 翟文松, 姬秋和, 李晓苗. 甲状腺功能亢进症与肾上腺皮质功能的关系[J]. *中国地方病防治杂志*, 2014, 29(增刊 1): 123.
- WANG Li, XING Ying, WANG Qiong, FU Jianfang, ZHANG Nana, ZHAI Wensong, JI Qiuhe, LI Xiaomiao. Relationship between hyperthyroidism and adrenal cortex function[J]. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*, 2014, 29(Suppl 1): 123(in Chinese).

(收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-03-15)