

NDM-1 抑制剂筛选平台建立及 120 种中药材抑制活性评价

徐佳楠, 马东娃, 苟强强, 赵 雪, 王文娣, 杜文韬, Omer Hassan Ali Hassan, 冯再平, 张新国\*

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃省中藏药筛选评价及深加工重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:** **目的** 建立新德里金属 b-内酰胺酶 (NDM-1) 抑制剂筛选平台, 并以其评价 120 种中药材抑制活性。**方法** 以 NDM-1 为催化酶, 美罗培南为反应底物, EDTA-2Na 为阳性对照, 紫外-可见分光光度法检测反应体系吸光度随时间的变化, 计算各中药材对 NDM-1 的抑制作用, 并优化底物质量浓度、酶浓度、温度、pH、有机溶剂、反应时间。**结果** 最佳体系为底物质量浓度 0.16 mg/mL, 酶浓度 800 U/mL, 检测波长 298 nm, 温度 25 ℃, 检测时间 300 s, PBS 或体积分数 10% 以下的甲醇或 DMSO 作为溶剂。在 120 种中药材中, 有 16 种抑制率在 60% ~ 80% 之间, 占比 13.33%; 4 种抑制率大于 80%, 分别为夏枯草 (85.11%)、秦艽 (87.32%)、石榴皮 (89.11%)、岗稔根 (91.39%), 占比 3.33%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于 NDM-1 抑制剂的筛选。中药材是抗耐药菌感染药物的重要来源。

**关键词:** 中药材; 新德里金属 b-内酰胺酶 (NDM-1) 抑制剂; 筛选平台; 抑制活性; 抗耐药菌感染; 紫外-可见分光光度法

**中图分类号:** R284.1      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3497-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.049

抗生素的长期广泛使用导致细菌耐药问题日趋严重<sup>[1]</sup>, 已成为威胁人类健康的重大挑战。b-内酰胺类因其优良的抗菌活性和选择性, 成为目前使用最广泛的一类抗生素<sup>[2]</sup>, 但细菌耐药性也随之出现<sup>[3]</sup>。研究显示, 它能水解药物中的 b-内酰胺环而使药物失活, 是细菌耐药的重要机制<sup>[4]</sup>, 根据氨基酸序列可分为 A、B、C、D (Ambler 分类)<sup>[5]</sup>。

新德里金属 b-内酰胺酶 (NDM-1) 于 2009 年被首次发现, 属于 B 类 b-内酰胺酶<sup>[6]</sup>, 并且所产生的微生物被称为“超级细菌”<sup>[7]</sup>, 在全球范围内流行并引发多种感染<sup>[8]</sup>。它具有广谱底物范围, 能水解几乎所有的 b-内酰胺类抗生素, 但现有的相关抑制剂 (如舒巴坦等) 对其无效<sup>[9]</sup>。目前, 尽管有较多关于 NDM-1 抑制剂的研究<sup>[10]</sup>, 但真正有效并能用于临床者仍缺失<sup>[8]</sup>。

研究表明, 许多天然化合物 (如酚类、黄酮类、生物碱类等) 具有增强 b-内酰胺类抗生素对耐药细菌抑制作用的潜力<sup>[11]</sup>, 故在中药中筛选出有效的 NDM-1 抑制剂以应对由耐药菌引起的临床感染具有重要意义。本实验建立了一种便捷、高效、稳定的 NDM-1 抑制剂筛选方法, 并应用于 120 种中药材抑制活性的评价中, 以期挖掘抗耐药活

性物质提供新的思路和依据。

**1 材料**

1.1 仪器、试剂与药材 UV2102PC 型紫外可见分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司]。美罗培南 (MEM) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); NDM-1 (杭州北望生物技术有限公司)。中药材共 120 种, 均购于甘肃省兰州市黄河药材市场, 经兰州理工大学生命科学与工程学院杨林副教授鉴定为正品, 具体见表 1。Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、甲醇、DMSO、EDTA-2Na 等试剂均为分析纯。

1.2 溶液 PBS 缓冲液 [即 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7), 4 ℃ 保存]; 底物溶液 (准确称取美罗培南 10 mg, PBS 缓冲液制成 0.2 mg/mL 溶液, 4 ℃ 保存); 酶溶液 (准确称取 NDM-1 10 mg, PBS 缓冲液制成 1.0 mg/mL 溶液, 4 ℃ 保存); EDTA-2Na (准确称取 EDTA-2Na 10 mg, 制成 1.0 mg/mL 溶液, 4 ℃ 保存)。

**2 方法**

2.1 水提物制备 称取 120 种中药材各 100 g, 粉碎, 按料液比 1:5 加入蒸馏水, 水浴回流提取 1 h, 共 3 次, 趁热过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 置于 50 ℃ 烘箱中干燥至恒重, 即得, 充分研磨成粉末备用。

收稿日期: 2025-03-05

基金项目: 国家自然科学基金 (32160021); 甘肃省重点研发计划项目 (22YF7NA176); 甘肃省自然科学基金 (23JRRA792); 温州市科技局项目 (2022Y0883)

作者简介: 徐佳楠 (2000—), 女, 硕士生, 研究方向为中药活性成分分离鉴定。Tel: 15193694819, E-mail: 15193694819@163.com

\* 通信作者: 张新国 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药发酵、微生物新药。Tel: (0931) 2976001, E-mail: biodrug@163.com

表 1 中药材信息

| 名称   | 所属科名 | 使用部位      | 名称   | 所属科名  | 使用部位       | 名称     | 所属科名 | 使用部位   |
|------|------|-----------|------|-------|------------|--------|------|--------|
| 半枝莲  | 唇形科  | 干燥全草      | 凤尾草  | 凤尾蕨科  | 全草         | 青藏龙胆   | 龙胆科  | 花      |
| 八角茴香 | 木兰科  | 干燥成熟果实    | 桑椹   | 桑科    | 干燥果穗       | 当归     | 伞形科  | 干燥根    |
| 刀豆   | 豆科   | 干燥成熟种子    | 老鹳草  | 牻牛儿苗科 | 干燥地上部分     | 西红花    | 鸢尾科  | 干燥柱头   |
| 白前   | 萝藦科  | 干燥根茎和根    | 橘红   | 芸香科   | 干燥外层果皮     | 党参     | 桔梗科  | 干燥根    |
| 秦艽   | 龙胆科  | 干燥根       | 桔梗   | 桔梗科   | 干燥根        | 石榴皮    | 石榴科  | 干燥果皮   |
| 椿皮   | 苦木科  | 干燥根皮或干皮   | 益智仁  | 姜科    | 干燥成熟果实     | 芦荟     | 百合科  | 浓缩干燥物  |
| 山药   | 薯蓣科  | 干燥根茎      | 木贼   | 木贼科   | 干燥地上部分     | 灵芝     | 多孔菌科 | 干燥子实体  |
| 绵萆薢  | 薯蓣科  | 干燥根茎      | 荷叶   | 睡莲科   | 干燥叶        | 白花蛇舌草  | 茜草科  | 全草     |
| 山楂   | 蔷薇科  | 干燥成熟果实    | 升麻   | 毛茛科   | 干燥根茎       | 杜仲叶    | 杜仲科  | 干燥叶    |
| 通草   | 五加科  | 干燥茎髓      | 莱菔子  | 十字花科  | 干燥成熟种子     | 白及     | 兰科   | 干燥块茎   |
| 火麻仁  | 桑科   | 干燥成熟果实    | 山慈菇  | 兰科    | 干燥假鳞茎      | 黄芩     | 唇形科  | 干燥根    |
| 地肤子  | 藜科   | 干燥成熟果实    | 合欢皮  | 豆科    | 干燥树皮       | 苏木     | 豆科   | 干燥心材   |
| 大蓟   | 菊科   | 干燥地上部分    | 茯神   | 多孔菌科  | 干燥菌核松根白色部分 | 赤芍     | 毛茛科  | 干燥根    |
| 白果   | 银杏科  | 干燥成熟种子    | 厚朴   | 木兰科   | 干燥干皮、根皮    | 乌头     | 毛茛科  | 干燥块根   |
| 柠檬   | 芸香科  | 干燥成熟果实    | 紫苏籽  | 唇形科   | 干燥成熟果实     | 重楼     | 百合科  | 干燥根茎   |
| 龙眼肉  | 无患子科 | 假种皮       | 天花粉  | 葫芦科   | 干燥根        | 穿山龙    | 薯蓣科  | 干燥根茎   |
| 决明子  | 豆科   | 干燥成熟种子    | 葛根   | 豆科    | 干燥根        | 红景天    | 景天科  | 干燥根和根茎 |
| 败酱草  | 十字花科 | 干燥全草      | 女贞子  | 木犀科   | 干燥成熟果实     | 红藤     | 木通科  | 干燥藤茎   |
| 肉桂   | 樟科   | 干燥树皮      | 菊花   | 菊科    | 干燥头状花序     | 半枫荷    | 金缕梅科 | 根或茎枝   |
| 余甘子  | 大戟科  | 干燥成熟果实    | 黑芝麻  | 脂麻科   | 干燥成熟种子     | 阿尔泰狗娃花 | 菊科   | 根、花或全草 |
| 冬葵果  | 锦葵科  | 干燥成熟果实    | 白芍   | 毛茛科   | 干燥根        | 牛蒡子    | 菊科   | 成熟果实   |
| 佛手   | 芸香科  | 干燥果实      | 黄精   | 百合科   | 干燥根茎       | 菟丝子    | 旋花科  | 干燥成熟种子 |
| 甘遂   | 大戟科  | 干燥块根      | 榆树皮  | 榆科    | 干燥树皮或根皮    | 楮实子    | 桑科   | 干燥成熟果实 |
| 芡实   | 睡莲科  | 干燥成熟种仁    | 陆英   | 忍冬科   | 干燥茎叶       | 番泻叶    | 干燥小叶 | 干燥叶    |
| 没药   | 橄榄科  | 干燥树脂      | 蒲公英  | 菊科    | 干燥全草       | 络石藤    | 夹竹桃科 | 干燥带叶藤茎 |
| 骆驼蓬  | 蒺藜科  | 干燥全草      | 榧子   | 红豆杉科  | 干燥成熟种子     | 金荞麦    | 蓼科   | 干燥根茎   |
| 罗汉果  | 葫芦科  | 干燥果实      | 延胡索  | 罂粟科   | 干燥块茎       | 王不留行   | 石竹科  | 干燥成熟种子 |
| 侧柏叶  | 柏科   | 干燥枝梢和叶    | 谷精草  | 谷精草科  | 干燥带花茎的头状花序 | 地锦草    | 大戟科  | 干燥全草   |
| 沙苑子  | 豆科   | 干燥成熟种子    | 鲜白茅根 | 禾本科   | 干燥根茎       | 蝴蝶果    | 大戟科  | 果实     |
| 白术   | 菊科   | 干燥根茎      | 半边莲  | 桔梗科   | 干燥全草       | 枳椇子    | 鼠李科  | 成熟种子   |
| 秦皮   | 木犀科  | 干燥枝皮或干皮   | 藿香   | 唇形科   | 干燥地上部分     | 川木通    | 毛茛科  | 干燥藤茎   |
| 金银花  | 忍冬科  | 干燥花蕾或初开的花 | 薄荷   | 唇形科   | 干燥地上部分     | 银柴胡    | 石竹科  | 干燥根    |
| 防己   | 防己科  | 干燥根       | 车前子  | 车前科   | 干燥成熟种子     | 青皮     | 芸香科  | 干燥幼果   |
| 鱼腥草  | 三白草科 | 新鲜全草      | 覆盆子  | 蔷薇科   | 干燥果实       | 岗稔根    | 桃金娘科 | 干燥根    |
| 苍耳子  | 菊科   | 干燥成熟果实    | 丹参   | 唇形科   | 干燥根和根茎     | 柏子仁    | 柏科   | 干燥成熟种仁 |
| 薰衣草  | 唇形科  | 干燥叶和花     | 山银花  | 忍冬科   | 干燥花蕾或带初开的花 | 卷柏     | 卷柏科  | 干燥全草   |
| 枳椇子  | 鼠李科  | 成熟种子      | 吴茱萸  | 芸香科   | 干燥近成熟果实    | 桑白皮    | 桑科   | 干燥根皮   |
| 莪术   | 姜科   | 干燥根茎      | 石刁柏  | 百合科   | 幼茎         | 川木香    | 菊科   | 干燥根    |
| 梔子   | 茜草科  | 干燥成熟果实    | 钩丁   | 茜草科   | 带钩或不带钩的茎枝  | 荆芥     | 唇形科  | 干燥地上部分 |
| 威灵仙  | 毛茛科  | 干燥根和根茎    | 夏枯草  | 唇形科   | 干燥果穗       | 葶苈子    | 十字花科 | 干燥成熟种子 |

2.2 检测波长筛选 底物美罗培南在 NDM-1 型 b-内酰胺酶的作用下生成相应产物，美罗培南中的 b-内酰胺环被水解破坏<sup>[12]</sup>，导致其吸光度发生改变。本实验基于上述原理，将 0.16 mg/mL 美罗培南底物溶液加到 400 U/mL NDM-1 型 b-内酰胺酶溶液中，混匀，完全反应后全波长扫描记录底物、产物特征吸收峰，绘制图谱，筛选出干扰最小者。

2.3 酶浓度筛选 设置反应总体积 300 μL，依次加入 PBS 缓冲液，200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800 U/mL NDM-1 溶液，0.2 mg/mL 美罗培南溶液各 100 μL，采用紫外分光光度计测定在 298 nm 波长处 600 s 内吸光度，计算酶促反应初速率 *K* 和线性相关系数 *R*<sup>2</sup>，确定最适酶浓度。

2.4 底物质量浓度筛选 固定酶浓度 800 U/mL，反应体系不变，设定美罗培南质量浓度分别为 0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mg/mL，按“2.3”项下方法测定吸光度，确定最适底物质量浓度。

2.5 反应时间筛选 固定酶浓度 800 U/mL，美罗培南质量浓度 0.16 mg/mL，反应体系不变，依次加入 PBS 缓冲液、NDM-1 溶液各 100 μL，最后加入 100 μL 美罗培南溶液启动反应，按“2.3”项下方法测定吸光度，确定最适反应时间。

2.6 反应温度筛选 固定酶浓度 800 U/mL，美罗培南质量浓度 0.16 mg/mL，反应体系不变，分别在 10、15、20、25、30、35、40 ℃下孵育 15 min 后，最后加入美罗培南溶

液启动反应，按“2.3”项下方法测定吸光度，确定最适反应温度。

2.7 反应 pH 筛选 固定酶浓度 800 U/mL，美罗培南质量浓度 0.16 mg/mL，反应体系不变，调节 PBS 缓冲液 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0，按“2.3”项下方法测定吸光度，确定最适反应 pH。

2.8 有机溶剂筛选 固定反应体系不变，取 5%、10%、30%、50%、70% 甲醇，甲醇，DMSO，丙酮各 100 μL 代替 PBS 缓冲液，以 PBS 缓冲液为对照，按“2.3”项下方法测定吸光度，确定最适有机溶剂。

2.9 验证试验 在反应体系中加入 NDM-1 酶溶液及 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL EDTA-2Na 溶液各 100 μL，在 25 ℃下孵育 10 min，加入 100 μL 0.16 mg/mL 美罗培南溶液启动反应，按“2.3”项下方法测定吸光度。以时间为横坐标，吸光度为纵坐标进行回归，计算抑制率  $I$ ，公式为  $I = [(K_0 - K_1) / K_0] \times 100\%$ ，其中  $K_0$  为酶速率回归方程斜率， $K_1$  为样品回归方程斜率<sup>[13]</sup>。

2.10 NDM-1 抑制剂筛选平台评价

2.10.1 稳定性 确定最优条件后，按“2.3”项下方法测定 300 s 内 EDTA-2Na 抑制率，在不同时间点每天连续进行 6 次，按“2.9”项下方法计算抑制率。

2.10.2 S/N、S/B、Z 计算信号与噪音比值 (S/N)、信号与背景比值 (S/B)、仪器和人为相关的随机误差引起的扰动因子 ( $Z'$ )<sup>[14-16]</sup>，公式分别为  $S/N = \frac{\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值}}{\text{阴性对照标准偏差}}$ 、 $S/B = \frac{\text{阳性对照平均值}}{\text{阴性对照平均值}}$ 、 $Z' = 1 - \frac{3 \times \text{阳性对照标准偏差} + 3 \times \text{阴性对照标准偏差}}{\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值}}$ 。

3 结果

3.1 检测波长筛选 由图 1 可知，与 NDM-1 反应前后，组成体系中底物、产物特征吸收峰分别出现，其中前者在 206、298 nm 波长处的底物有特征吸收，而后者在 206 nm 左右处出现。为了避免吸光度相互干扰而影响结果准确性，本实验选择 298 nm 作为检测波长。

3.2 酶浓度筛选 由表 2 可知，当底物质量浓度不变时，酶促反应初速率  $K$  先随着 NDM-1 浓度增加而不断升高，为 800 U/mL 时呈现较好的线性关系，而高于 1 400 U/mL 时虽然酶促反应初速率更高，但线性关系反而较差，故选择

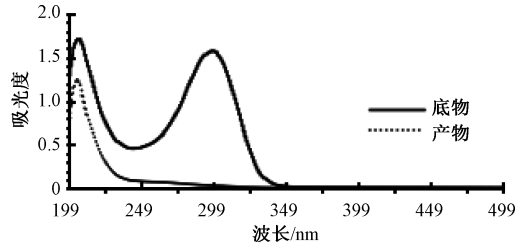


图 1 底物、产物全波长扫描图

表 2 不同酶浓度对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 序号 | 底物质量浓度/<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | NDM-1/<br>(U·mL <sup>-1</sup> ) | $K$              | $R^2$           |
|----|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------|
| 1  | 0.2                               | 200                             | -0.001 2±0.002 5 | 0.985 2±0.014 4 |
| 2  | 0.2                               | 400                             | -0.003 5±0.000 2 | 0.999 2±0.001 1 |
| 3  | 0.2                               | 600                             | -0.006 5±0.000 1 | 0.999 8±0.000 1 |
| 4  | 0.2                               | 800                             | -0.013 1±0.000 3 | 0.998 9±0.000 6 |
| 5  | 0.2                               | 1 000                           | -0.012 3±0.002 3 | 0.996 7±0.000 4 |
| 6  | 0.2                               | 1 200                           | -0.011 9±0.001 7 | 0.998 5±0.001 2 |
| 7  | 0.2                               | 1 400                           | -0.016 0±0.001 7 | 0.985 9±0.001 6 |
| 8  | 0.2                               | 1 600                           | -0.336 5±0.546 9 | 0.971 7±0.003 5 |
| 9  | 0.2                               | 1 800                           | -0.020 9±0.000 7 | 0.939 7±0.024 4 |

800 U/mL 作为最适酶浓度。

3.3 底物质量浓度筛选 由表 3 可知，当 NDM-1 浓度不变时， $K$  随着底物质量浓度增加不断升高，为 0.16 mg/mL 时达到最大值，线性关系也较好，故选择 0.16 mg/mL 作为最适底物质量浓度。

表 3 不同底物质量浓度对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 序号 | 底物质量浓度/<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | NDM-1/<br>(U·mL <sup>-1</sup> ) | $K$              | $R^2$           |
|----|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------|
| 1  | 0.10                              | 800                             | -0.008 4±0.000 5 | 0.996 4±0.001 1 |
| 2  | 0.12                              | 800                             | -0.009 1±0.000 7 | 0.998 0±0.000 6 |
| 3  | 0.14                              | 800                             | -0.009 4±0.000 8 | 0.999 0±0.000 4 |
| 4  | 0.16                              | 800                             | -0.009 5±0.000 9 | 0.999 5±0.000 3 |
| 5  | 0.18                              | 800                             | -0.008 5±0.000 8 | 0.999 7±0.000 4 |
| 6  | 0.20                              | 800                             | -0.009 0±0.000 5 | 0.999 8±0.000 3 |

3.4 反应时间筛选 由表 4 可知，NDM-1 浓度为 800 U/mL，底物质量浓度为 0.16 mg/mL 时，300 s 内线性关系较好， $K$  稳定，产物等因素对酶活性的反馈抑制较小，考虑到酶促反应的稳定性及样品的筛选效率，最终选择 300 s 作为最适反应时间。

表 4 不同反应时间对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 序号 | 底物质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | NDM-1/(U·mL <sup>-1</sup> ) | 反应时间/s | $K$              | $R^2$           |
|----|-------------------------------|-----------------------------|--------|------------------|-----------------|
| 1  | 0.16                          | 800                         | 120    | -0.009 6±0.000 6 | 0.999 3±0.000 4 |
| 2  | 0.16                          | 800                         | 180    | -0.009 4±0.000 2 | 0.999 5±0.000 4 |
| 3  | 0.16                          | 800                         | 300    | -0.009 7±0.000 1 | 0.999 5±0.000 4 |
| 4  | 0.16                          | 800                         | 420    | -0.009 2±0.000 1 | 0.999 4±0.000 4 |
| 5  | 0.16                          | 800                         | 600    | -0.008 9±0.000 4 | 0.999 2±0.000 4 |

3.5 反应温度筛选 由表 5 可知，在温度 15~45 ℃范围内线性关系较好，为 25 ℃时酶活性最高，与文献 [17] 报道一致，故选择 25 ℃作为最适反应温度。

3.6 反应 pH 筛选 由表 6 可知，在 pH 6.0~8.0 范围内酶活性良好，为 7.0 时达到最大值，与文献 [18] 报道一致，并且  $K$  最高，线性关系最好，故选择 pH 7.0 作为最适

表 5 不同反应温度对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 序号 | 底物质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | NDM-1/(U·mL <sup>-1</sup> ) | 反应温度/℃ | <i>K</i>         | <i>R</i> <sup>2</sup> |
|----|-------------------------------|-----------------------------|--------|------------------|-----------------------|
| 1  | 0.16                          | 800                         | 15     | -0.008 3±0.000 5 | 0.999 3±0.000 1       |
| 2  | 0.16                          | 800                         | 20     | -0.009 6±0.001 0 | 0.999 4±0.000 4       |
| 3  | 0.16                          | 800                         | 25     | -0.010 5±0.000 5 | 0.999 4±0.000 1       |
| 4  | 0.16                          | 800                         | 30     | -0.009 6±0.001 1 | 0.996 3±0.000 1       |
| 5  | 0.16                          | 800                         | 35     | -0.009 1±0.000 7 | 0.999 2±0.000 5       |
| 6  | 0.16                          | 800                         | 40     | -0.008 9±0.001 0 | 0.998 2±0.000 3       |
| 7  | 0.16                          | 800                         | 45     | -0.009 1±0.000 3 | 0.997 3±0.000 4       |

表 6 不同反应 pH 对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 序号 | 底物质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | NDM-1/(U·mL <sup>-1</sup> ) | 反应 pH | <i>K</i>         | <i>R</i> <sup>2</sup> |
|----|-------------------------------|-----------------------------|-------|------------------|-----------------------|
| 1  | 0.16                          | 800                         | 6.0   | -0.007 9±0.000 1 | 0.999 6±0.000 3       |
| 2  | 0.16                          | 800                         | 6.5   | -0.007 5±0.000 8 | 0.998 9±0.000 7       |
| 3  | 0.16                          | 800                         | 7.0   | -0.008 6±0.000 2 | 0.999 2±0.000 3       |
| 4  | 0.16                          | 800                         | 7.5   | -0.007 8±0.000 7 | 0.998 8±0.000 3       |
| 5  | 0.16                          | 800                         | 8.0   | -0.008 3±0.000 3 | 0.998 6±0.000 6       |

反应 pH。

3.7 不同体积分数溶剂对 NDM-1 抑制率的影响 由表 7 可知,反应体系中不同体积分数甲醇、DMSO、丙酮对 NDM-1 均表现出一定的抑制作用,并且其体积分数越大,对平台影响越大,其中体积分数 10% 以下的 DMSO 或甲醇对 NDM-1 抑制率较低,影响较小;5% 丙酮抑制率达 14.87%,影响较大。另外,虽然 NDM-1 为锌离子依赖型酶,但水中的金属离子对其影响也较小,故选择体积分数 10% 以下的甲醇或 DMSO 来溶解难溶于 PBS 缓冲液的样品。

表 7 不同体积分数溶剂对 NDM-1 抑制率的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 序号 | 体积分数/% | 抑制率/%     |             |            |             |
|----|--------|-----------|-------------|------------|-------------|
|    |        | 水         | 甲醇          | DMSO       | 丙酮          |
| 1  | 5      | —         | 0.10±0.02   | 2.26±0.04  | 14.87±0.02  |
| 2  | 10     | —         | 5.03±0.03   | 7.64±0.03  | 38.95±0.09  |
| 3  | 30     | —         | 16.21±0.02  | 23.01±0.03 | 100.03±0.01 |
| 4  | 50     | —         | 31.66±0.02  | 37.52±0.03 | 100.26±0.01 |
| 5  | 70     | —         | 49.62±0.06  | 51.64±0.02 | 101.06±0.01 |
| 6  | 100    | 5.27±0.02 | 100.94±0.23 | 80.77±0.02 | 104.32±0.02 |

3.8 验证试验 由图 2 可知,随着 EDTA-2Na 质量浓度增加抑制率升高,两者线性关系较好,方程为  $Y=9.354X+15.031$  ( $R^2=0.993 1$ ) ( $Y$  为抑制率,  $X$  为 EDTA-2Na 质量浓度),在 0.1~1.0 mg/mL 范围内线性关系良好,并通过 GraphPad Prism 软件测得其 IC<sub>50</sub> 值为 0.38 mg/mL,说明所建立的 NDM-1 抑制剂筛选方法具有较好的可靠性和可行性。另外,EDTA-2Na 质量浓度为 0.6 mg/mL 时,对 NDM-1 的抑制率达 60.57%,故将 0.6 mg/mL 作为阳性对照质量浓度。

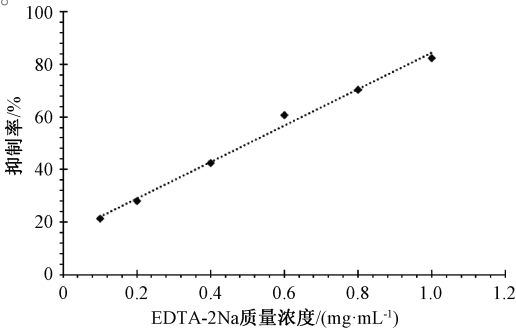


图 2 不同质量浓度 EDTA-2Na 对 NDM-1 抑制率的影响

3.9 NDM-1 抑制剂筛选平台评价

3.9.1 稳定性 在上述优化条件下进行评价,每天平行 6 次,连续 3 d,结果见表 8,可知变异系数均小于 2%,表明该方法重复性良好,反应体系稳定。

表 8 稳定性评价结果 (% ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 序号     | 第 1 天      | 第 2 天      | 第 3 天      |
|--------|------------|------------|------------|
| 1      | 59.53      | 60.28      | 62.69      |
| 2      | 58.15      | 59.43      | 62.98      |
| 3      | 60.16      | 58.91      | 63.75      |
| 4      | 59.32      | 61.03      | 60.93      |
| 5      | 60.69      | 59.52      | 61.17      |
| 6      | 59.53      | 60.89      | 62.45      |
| 平均值    | 59.56±0.86 | 60.01±0.86 | 62.33±1.09 |
| 变异系数/% | 1.44       | 1.43       | 1.74       |

注:变异系数=(标准偏差/平均值)×100%。

3.9.2 S/N、S/B、Z' 本实验测得三者分别为 15.09、6.75、0.63,而模型的一般要求分别为>10、>3、>0.5 且<1,即均符合标准,表明所建立的模型具有较高的可靠性,可用于 NDM-1 抑制剂筛选。



3.10 中药材 NDM-1 抑制活性筛选 由表 9 可知,抑制率低于 40% 中药材的有 81 种,占比 67.5%;抑制率介于 40%~50% 的中药材有 9 种,占比 7.5%;抑制率介于 50%~60% 的中药材有 10 种,占比 8.34%;抑制率介于 60%~70% 的中药材有 9 种,占比 7.5%;抑制率介于 70%~80% 的中药材有 7 种,占比 5.83%;抑制率大于 80% 的中药材有 4 种,分别为夏枯草、秦艽、石榴皮、岗稔根,占比 3.33%,表明中药是 NDM-1 酶抑制剂药物的良好来源。

表 9 中药材 NDM-1 抑制活性筛选结果

| 名称   | 抑制率/% | 名称     | 抑制率/% | 名称   | 抑制率/% |
|------|-------|--------|-------|------|-------|
| 半枝莲  | 34.90 | 白芍     | 50.45 | 木贼   | —     |
| 八角茴香 | 42.27 | 黄精     | 32.00 | 荷叶   | —     |
| 刀豆   | 66.16 | 榆树皮    | 63.91 | 升麻   | 61.00 |
| 白前   | 31.14 | 陆英     | 64.49 | 莱菔子  | —     |
| 秦艽   | 87.32 | 蒲公英    | 42.16 | 山慈菇  | —     |
| 椿皮   | 39.11 | 榧子     | 17.63 | 合欢皮  | 39.63 |
| 山药   | 14.37 | 延胡索    | 15.49 | 茯神   | 36.90 |
| 绵萆薢  | —     | 谷精草    | 52.63 | 厚朴   | 50.27 |
| 山楂   | —     | 鲜白茅根   | 43.26 | 紫苏籽  | —     |
| 通草   | —     | 半边莲    | 15.95 | 天花粉  | 64.23 |
| 火麻仁  | —     | 藿香     | —     | 葛根   | —     |
| 地肤子  | 15.22 | 薄荷     | 70.98 | 女贞子  | 70.29 |
| 大蓟   | —     | 车前子    | 44.05 | 菊花   | 22.69 |
| 白果   | —     | 覆盆子    | 64.46 | 黑芝麻  | —     |
| 柠檬   | —     | 丹参     | 58.75 | 王不留行 | 36.50 |
| 龙眼肉  | 23.79 | 山银花    | 39.49 | 地锦草  | —     |
| 决明子  | —     | 吴茱萸    | 17.25 | 蝴蝶果  | —     |
| 败酱草  | 33.29 | 石刁柏    | 44.51 | 枳椇子  | 75.10 |
| 肉桂   | —     | 钩丁     | 78.39 | 川木通  | —     |
| 余甘子  | 53.99 | 夏枯草    | 85.11 | 银柴胡  | —     |
| 冬葵果  | —     | 青藏龙胆   | 73.70 | 青皮   | 56.44 |
| 佛手   | 38.14 | 当归     | 33.26 | 岗稔根  | 91.39 |
| 甘遂   | —     | 西红花    | 29.41 | 柏子仁  | 26.70 |
| 芡实   | —     | 党参     | 14.20 | 卷柏   | 18.80 |
| 没药   | —     | 石榴皮    | 89.11 | 桑白皮  | —     |
| 骆驼蓬  | 59.17 | 芦荟     | 55.02 | 川木香  | —     |
| 罗汉果  | —     | 灵芝     | 15.53 | 荆芥   | 19.67 |
| 侧柏叶  | 28.15 | 白花蛇舌草  | 11.29 | 葶苈子  | —     |
| 沙苑子  | 46.19 | 杜仲叶    | 47.95 | 楮实子  | 14.43 |
| 白术   | 22.25 | 白及     | 26.27 | 番泻叶  | —     |
| 秦皮   | 20.68 | 黄芩     | 67.59 | 络石藤  | —     |
| 金银花  | 49.12 | 苏木     | 67.32 | 金荞麦  | —     |
| 防己   | —     | 赤芍     | 11.97 | 老鹳草  | 10.09 |
| 鱼腥草  | 77.80 | 乌头     | 6.74  | 橘红   | —     |
| 苍耳子  | 35.51 | 重楼     | —     | 桔梗   | —     |
| 薰衣草  | 51.12 | 穿山龙    | —     | 益智仁  | —     |
| 枳椇子  | 23.31 | 红景天    | 55.27 | 凤尾草  | 60.27 |
| 莪术   | 27.04 | 红藤     | 70.07 | 桑椹   | —     |
| 梔子   | 11.27 | 半枫荷    | 40.18 | 牛蒡子  | 34.04 |
| 威灵仙  | 33.70 | 阿尔泰狗娃花 | 13.08 | 菟丝子  | 34.64 |

注：—表示无抑制作用或未检测到显著抑制活性。

4 讨论与结论

由于 NDM-1 能水解大多数 b-内酰胺类抗生素,故筛选

高效抑制剂辅助治疗成为对抗耐药细菌的关键<sup>[19-21]</sup>。本实验以美罗培南为 NDM-1 底物,结合紫外吸收情况选用 298 nm作为反应体系检测波长,可确保反应特征性强且无干扰,能精准用于相关抑制剂筛选。另外,由于 NDM-1 是以金属离子为活性中心的酶<sup>[22]</sup>,故试剂用高纯水配制以排除水中金属离子干扰,并以已知抑制剂 EDTA 为阳性对照<sup>[23]</sup>,验证反应体系稳定性。

为了避免待测样品紫外吸收对检测结果的干扰,本实验通过比较其初始、空白吸光度来对有较大变化者进行复筛,并扣除样品本底吸光度,从而保证结果的准确性,再观察底物消耗量与时间的线性关系,以期排除假阳性或假阴性结果,确保筛选结果可靠。在平台优化环节,调整底物、酶浓度以确保前者过量但不产生反馈抑制,避免后者太高而导致反应速率过快或过慢,由于 600 s 内酶促反应线性关系良好,考虑到其稳定性及样品筛选效率,将时间控制在 300 s 内以减少误差。针对样品溶解问题,本实验考察了不同有机溶剂对筛选体系的影响,发现丙酮影响较大,而体积分数低于 10% 的甲醇和 DMSO 影响较小,故难溶于 PBS 缓冲液的样品可用后两者来溶解。

本实验应用上述方法,对 120 种中药材进行 NDM-1 抑制活性评价,筛选出 39 种抑制率高于 40% 者,其中夏枯草、秦艽、石榴皮、岗稔根均大于 80%。鉴于我国中药资源丰富,未来有必要扩大筛选范围,以期挖掘更多高抑制活性者。

综上所述,本实验基于紫外-可见分光光度法对 120 种中药材进行 NDM-1 抑制活性考察,旨在为相关抑制剂筛选提供简便、稳定、高效的检测平台。

参考文献:

[ 1 ] 赵留明,刘志鑫,赵国江,等. β-内酰胺类抗生素的研究进展[J]. 国外医药 ( 抗生素分册), 2018, 39(5) : 450-455.

[ 2 ] Rotondo C M, Wright G D. Inhibitors of metallo-β-lactamases[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 39: 96-105.

[ 3 ] Docquier J D, Mangani S. An update on β-lactamase inhibitor discovery and development[J]. *Drug Resistance Updates*, 2018, 36: 13-29.

[ 4 ] Wong D, van Duin D. Novel beta-lactamase inhibitors: Unlocking their potential in therapy[J]. *Drugs*, 2017, 77(6) : 615-628.

[ 5 ] Ambler R P, Baddiley J, Abraham E P. The structure of β-lactamases[J]. *Philos T R Soc B*, 1997, 289( 1036) : 321-331.

[ 6 ] Wang T, Xu K J, Zhao L Y, *et al.* Recent research and development of NDM-1 inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 223: 113667.

[ 7 ] 马玉茹,赵红霞,高清志. 新德里金属 β-内酰胺酶 NDM-1 的研究进展[J]. 药学报, 2018, 53(1) : 28-36.

[ 8 ] 胡晓丰,邱少富,张传福,等. 产新德里金属 β-内酰胺酶耐药菌感染治疗的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(2) : 162-168.

[ 9 ] 刘 振. 新德里金属 β-内酰胺酶抑制剂的设计、合成与活

性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.

[ 10 ] Linciano P, Cendron L, Gianquinto E, *et al.* Ten years with New Delhi metallo-β-lactamase-1 (NDM-1): From structural insights to inhibitor design[J]. *ACS Infect Dis*, 2019, 5(1): 9-34.

[ 11 ] 刘海宾. NDM-1 天然产物抑制剂的筛选与体外抗菌活性评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.

[ 12 ] Tripathi R, Nair N N. Mechanism of meropenem hydrolysis by New Delhi metallo β-lactamase[J]. *Acs Catal*, 2015, 5(4): 2577-2586.

[ 13 ] 罗满平, 孟瑛瑛, 李德民, 等. AmpC 酶抑制剂筛选方法的建立及 136 种中药材活性评价[J]. *中草药*, 2023, 54(19): 6351-6361.

[ 14 ] Zhang J H, Chung T D, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays[J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2): 67-73.

[ 15 ] 王斯文, 陈向东, 汪 辉, 等. β-内酰胺酶抑制剂高通量筛选模型的建立[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(2): 102-105.

[ 16 ] 王 颖, 刘忆霜, 李兴华, 等. 新型 NDM-1 酶抑制剂的筛选与研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(6): 401-406.

[ 17 ] Li T, Wang Q, Chen F H, *et al.* Biochemical characteristics of New Delhi metallo-β-lactamase-1 show unexpected difference to other MBLs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61914.

[ 18 ] Kim S K, Sims C L, Wozniak S E, *et al.* Antibiotic resistance in bacteria: novel metalloenzyme inhibitors[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2009, 74(4): 343-348.

[ 19 ] Wei W J, Yang H F, Ye Y, *et al.* New Delhi metallo-β-lactamase-mediated carbapenem resistance: Origin, diagnosis, treatment and public health concern[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(14): 1969-1976.

[ 20 ] 赵雨佳, 廖焱毅, 范培蕾, 等. 超级细菌 NDM-1 及其检测方法的研究进展[J]. *化学试剂*, 2021, 43(8): 1077-1082.

[ 21 ] 崔 灿, 杨海涛, 王泽方. NDM-1 结构功能及抑制剂的抑制机理[J]. *微生物学报*, 2021, 61(1): 41-57.

[ 22 ] Sharma S, Sharma S, Singh P P, *et al.* Potential inhibitors against NDM-1 type metallo-β-lactamases: An overview[J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 26(12): 1568-1588.

[ 23 ] 庞 丽, 丁 蕊, 韩静娴. 不同浓度乙二胺四乙酸对产 ESBLs 多重耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性的影响[J]. *江苏预防医学*, 2023, 34(1): 102-104.

# 基于 QuEChERS-色谱-质谱联用法分析 21 种含人参中成药农药残留状况

郑冠鑫<sup>1,2</sup>, 苏 建<sup>2</sup>, 袁 浩<sup>2</sup>, 侯晓梦<sup>2,3</sup>, 石迎梅<sup>2,4</sup>, 王晓蕾<sup>2\*</sup>, 刘永利<sup>2\*</sup>  
(1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省药品医疗器械检验研究院, 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 河北省中药质量评价与标准研究重点实验室, 河北 石家庄 050227; 3. 河北大学, 河北 保定 071002; 4. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050200)

**摘要:** **目的** 分析 21 种含人参中成药的农药残留状况。**方法** 样品以 1.0% 乙酸浸泡后乙腈提取, 提取液经 QuEChERS 法净化, 采用 GC-MS/MS、LC-MS/MS 法筛查农药残留情况, 结合农药限量、工艺转移等评价安全性风险。**结果** 共检出 23 种农药残留, 各农药在各自线性范围内线性关系良好 ( $r>0.990$ ), 加样回收率 62.1%~103.6%, RSD<20%。各中成药农药残留水平较低, 1 批人参健脾丸中五氯硝基苯残留量超标, 1 批参桂鹿茸丸中甲拌磷超过定量限。**结论** 21 种中成药整体安全性风险较低, 但投料用人参存在五氯硝基苯超标风险, 而且从饮片转移到制剂, 建议生产企业加强饮片管理以全面提升制剂安全性。

**关键词:** 中成药; 人参; 农药残留; QuEChERS; GC-MS/MS; LC-MS/MS; 安全性

**中图分类号:** R927.2      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3502-08

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.050

收稿日期: 2025-03-11  
基金项目: 河北省科技研发平台专项 (24462503D); 河北省中医药管理局科研计划 (2021207)  
作者简介: 郑冠鑫 (2000—), 男, 硕士生, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18830909016, E-mail: 1196382159@qq.com  
\* 通信作者: 王晓蕾 (1985—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18603318068, E-mail: 18603318068@163.com  
刘永利 (1973—), 男, 硕士, 主任药师, 研究方向为中药质量评价及其安全性。Tel: 13932166206, E-mail: liuyongli2008@126.com