

蒙荨麻 HPLC 特征图谱建立与抗高尿酸血症质量标志物 (Q-Marker) 筛选

苏日娜¹, 钟国跃², 罗维早³, 奥·乌力吉¹, 胡格吉勒图¹, 喜杰¹, 辛颖¹, 红艳¹

1. 内蒙古民族大学 蒙医药学院 蒙药研发国家地方联合工程研究中心 内蒙古自治区蒙药工程研究中心, 内蒙古 通辽 028000
2. 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004
3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要: **目的** 建立蒙荨麻的 HPLC 特征图谱, 结合化学计量学分析、体外实验验证及含量测定, 筛选其抗高尿酸血症的质量标志物 (Q-Marker)。 **方法** 采用 HPLC 法建立 15 批蒙荨麻的特征图谱; 结合层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 及偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 筛选不同产地样品的差异成分; 利用 Discovery studio 2016 Client 软件将潜在 Q-Marker 与抗高尿酸血症相关靶蛋白 [黄嘌呤氧化酶 (XOD)、葡萄糖转运蛋白 9 (GLUT9)] 进行分子对接验证; 通过体外 XOD 酶活力抑制实验及 HK2 细胞 GLUT9 蛋白表达检测验证其生物活性; 并建立目标成分含量测定方法, 测定 15 批次样品中 Q-Marker 的含量。 **结果** 从 HPLC 特征图谱中指明绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷 3 个特征成分; 化学计量学分析将 15 批次样品分为 2 类, 其中新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对质量差异的贡献最显著; 分子对接显示, 指认的 3 个特征成分均能通过氢键、疏水键、 π - π 键等与 XOD、GLUT9 稳定结合, 绿原酸与 GLUT9 结合能最低 ($-36.00 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 新西兰牡荆苷 2 与 XOD 结合能最低 ($-45.61 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); 体外实验证实, 3 个成分均呈浓度相关性地抑制 XOD 活力, 且不同浓度给药组可显著下调 HK2 细胞 GLUT9 蛋白表达 ($P < 0.01$); 含量测定显示, 15 批次样品中绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷的质量分数分别为 $0.144 3 \sim 4.234 6$ 、 $0.118 6 \sim 2.581 2$ 、 $0.056 9 \sim 3.670 0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。 **结论** 建立的 HPLC 特征图谱及含量测定方法准确、可靠, 绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷可作为蒙荨麻抗高尿酸血症的 Q-Marker, 为其药材质量评价与控制提供依据。

关键词: 蒙荨麻; 高尿酸血症; 质量标志物; 绿原酸; 新西兰牡荆苷 2; 异牡荆苷; 黄嘌呤氧化酶; 葡萄糖转运蛋白 9

中图分类号: R285.5; R291.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)05-1621-11

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.013

Establishment of HPLC characteristic spectrum of mongolian medicine *Urtica cannabina* and screening of quality markers (Q-Markers) for anti-hyperuricemia

SU Rina¹, ZHONG Guoyue², LUO Weizao³, AO Wuliji¹, HUgejiletu¹, XI Jie¹, XIN Ying¹, HONG Yan¹

1. Traditional Mongolia Medicine, Inner Mongolia Autonomous Region Research Center of Engineering Technology Mongolian Medicine, College of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China
2. Research Center of Natural Resources of Chinese Meteria Medica and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
3. Chongqing Academy of Chinese Meteria Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic fingerprint of mongolian medicine *Urtica cannabina*, combined with chemometrics analysis, *in vitro* experiments, and content determination, to screen the quality markers (Q-Markers) for its anti-hyperuricemia effect. **Methods** The HPLC method was used to establish the characteristic fingerprint of 15 batches of *U. cannabina*; hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to screen the different components of samples from different origins; the potential Q-Markers was verified by molecular docking with anti-hyperuricemia related target proteins [xanthine oxidase (XOD), glucose transporter 9 (GLUT9)]; *in vitro* XOD

收稿日期: 2025-12-07

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2019YFC1712300); 内蒙古自然科学基金博士项目 (2020BS08006); 内蒙古民族大学博士科研启动基金项目 (BS629); 内蒙古民族大学蒙医药研发教育部重点实验室开放课题项目 (MDK2023075, MDK2024044); 内蒙古民族大学国家药品监督管理局中药 (蒙药) 质量控制实验室开放课题 (MDK2025025)

作者简介: 苏日娜, 博士, 讲师, 研究方向为蒙药药效物质基础及机制。E-mail: surina8234@163.com

enzyme activity inhibition experiments and HK2 cell GLUT9 protein expression detection were used to verify its biological activity; and the content determination method of the target components was established to determine the content of Q-Markers in 15 batches of samples. **Results** Three characteristic components, namely chlorogenic acid, vicenin-2, and isovitexin, were identified from the HPLC characteristic fingerprint; chemometrics analysis divided the 15 batches of samples into two categories, among which vicenin-2, and isovitexin had the most significant contribution to the quality differences; molecular docking showed that the three identified characteristic components could stably bind to XOD and GLUT9 through hydrogen bonds, hydrophobic bonds, and π - π bonds, with the binding energy of chlorogenic acid being the lowest ($-36.00 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), and that of vicenin-2 to XOD being the lowest ($-45.61 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); *in vitro* experiments confirmed that all three components inhibited XOD activity in a concentration-dependent manner, and different concentration administration groups could significantly down-regulate the expression of GLUT9 protein in HK2 cells ($P < 0.01$); content determination showed that the quality fractions of chlorogenic acid, vicenin-2, and isovitexin in 15 batches of samples were 0.144 3—4.234 6, 0.118 6—2.581 2, and 0.056 9—3.670 0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The established HPLC characteristic fingerprint and content determination method are accurate and reliable. chlorogenic acid, vicenin-2, and isovitexin can be used as Q-Markers for the anti-hyperuricemia effect of *U. cannabina*, providing a basis for the quality evaluation and control of the medicinal material.

Key words: *Urtica cannabina* L.; hyperuricemia; quality markers; chlorogenic acid; vicenin-2; isovitexin; xanthine oxidase (XOD); glucose transporter 9 (GLUT9)

蒙荨麻为荨麻科荨麻属多年生草本植物麻叶荨麻 *Urtica cannabina* L. 的干燥地上部分, 蒙药名为哈辣盖, 味苦、辛, 性温, 效重, 具有镇赫依、调胃温、解毒、破痞之功效, 用于头晕、耳鸣、失眠、心慌、食积不消、暖气、吐泻、关节疼痛、胃痞、肝痞、皮肤瘙痒及蛇毒咬伤^[1-5]。该药材尚无国家标准, 仅收录于《内蒙古蒙药材标准(2021年版)》及《内蒙古蒙药饮片炮制规范(2020年版)》, 且现有检测项目仅以常规理化鉴别为主, 缺乏与药效关联的专属检测指标, 难以实现对药材质量的精准把控。质量标志物(Q-Marker)是刘昌孝院士提出的中药质量评价的核心概念^[6-7], 为中药及民族药质量标准的完善提供了科学的理论依据和研究方法。当前对蒙荨麻的研究多集中于药效评价及化学成分鉴别^[8-10], 尚未基于 Q-Marker 理论开展其药效物质基础的系统研究, 无法为其建立与临床功效相契合的质量评价体系, 制约了蒙荨麻的临床合理应用及产业化发展。因此, 基于 Q-Marker 五原则筛选蒙荨麻的特征性药效成分, 建立专属、精准的质量评价方法, 对完善其质量标准具有重要意义。

随着饮食结构日益多样化, 代谢性疾病患病率居高不下且呈年轻化趋势, 严重威胁人们的身心健康。痛风作为常见代谢性疾病, 近年来患病率逐年攀升, 临床治疗以化学药物为主, 主要包括抑制尿酸生成药(如别嘌醇、非布司他)和促尿酸排泄药(如苯溴马隆)^[11]。但此类药物长期服用易引发头痛、皮疹、转氨酶升高、胃肠道反应等不良反应, 部分药

物还存在肾功能不全者禁用的使用局限^[12]。蒙医学将痛风归属于“关节黄水病”范畴, 认为其由饮食起居失宜导致“三根七素”失调, 赫依紊乱、黄水偏盛, 与血相搏后壅聚关节, 致使局部气血运行不畅而发病^[13]。文献报道显示, 蒙荨麻提取浸膏具有抗炎、镇痛作用^[14], 但其发挥作用的物质基础及机制尚并不十分明确。

因此, 本研究收集 15 批次蒙荨麻样品, 建立能反映其整体质量的 HPLC 特征图谱, 结合相似度评价及层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)筛选不同批次蒙荨麻质量差异成分; 再基于 Q-Marker 有效性原则, 借助分子对接技术、体外黄嘌呤氧化酶(XOD)活性测定及 HK2 细胞模型, 验证潜在 Q-Marker 与抗高尿酸血症相关靶点的相互作用及生物活性, 明确蒙荨麻抗高尿酸血症的关键 Q-Marker; 最终建立 Q-Marker 的含量测定方法, 分析不同产地样品中 Q-Marker 的含量差异。本研究旨在为蒙荨麻抗高尿酸血症的药效物质基础提供实验依据, 同时构建特征图谱结合 Q-Marker 含量测定的蒙荨麻质量评价体系, 为完善蒙荨麻质量标准、实现其质量精准控制提供科学支撑。

1 材料

1.1 仪器

KQ-5200DB 型超声清洗机、KQ-600DB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声波仪器公司; LC-2030CN 型高效液相色谱仪、HPLC-IT-TOF-MS 液

质联用系统 (CBM-20A 系统控制器、LC-20ADXR 高压泵、LC-20AD 高压泵、DGU-20A5 自动脱气机、SIL-20ACXR 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20A 光电二极管阵列检测器、SPD-20A 紫外检测器、IT-TOF-MS 质谱仪、LC-MS Solution 工作站), 日本岛津公司; PTY-323/423 型十万分之一电子天平、PT-124/85S 型万分之一电子天平, 美国康州 HZ 电子科技有限公司; BUCHI 旋转蒸发仪, 瑞士步琪公司; FW177 中草药粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; BJ-2CD 超净工作台, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 3951-CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; Epoch 全自动酶标检测仪, 美国 Biotek 公司; Fusion Fx7 Edge 多功能凝胶成像仪, 法国 Vilber 公司。

1.2 试剂

乙腈 (色谱纯), 美国 TEDIA 公司; 甲酸 (色谱纯), 上海晶纯生化科技股份有限公司; 无水乙醇 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 娃哈哈纯净水。对照品绿原酸 (质量分数 $\geq 99.82\%$, 批号 MUST-20032310)、异牡荆苷 (质量分数 $\geq 99.42\%$, 批号 MUST-20070110), 购自于成都曼思特生物科技有限公司; 新西兰牡荆苷 2 (质量分数 $\geq 99.25\%$, 批号 P01F9F54173)、黄嘌呤 (批号 S18024)、XOD (批号 S10113), 上海源叶生物科技有限公司; 氢氧化钠 (批号 10019718)、磷酸二氢钾 (批号 10017628), 国药集团化学试剂有限公司。HK2 细胞专用培养基 (批号 CM-0109), 武汉普诺赛生命科技有限公司; CCK-8 (批号 CA1210)、BCA 试剂盒 (PC0020) 购自于北京索莱宝科技有限公司; 别嘌呤醇 (批号 A8003), 美国 Sigma 公司; Anti-GAPDH antibody (批号 T0004), Affinity Biosciences 公司; Anti-葡萄糖转运蛋白 9 (GLUT9) antibody (批号 Ab223470), Abcam 公司; Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Conjugated (批号 S004F), 天德悦 (北京) 生物科技有限责任公司; PMSF (批号 ST506), 上海碧云天生物技术有限公司; Prestained Protein Ladder (批号 26616), Fermentas 公司; PVDF 膜 (批号 IPVH00010)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 WBKLS0050), Merck Millipore Corporation。

1.3 药材

所用药材均采自内蒙古地区, 由内蒙古民族大学蒙医药学院红艳副教授鉴定为荨麻科荨麻属多

年生草本植物麻叶荨麻 *Urtica cannabina* L. 的干燥地上部分。所采药材产地与批次如表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample Information

编号	批号	产地
S1	2020071902	赤峰市克什克腾旗宇宙地镇
S2	2020071903	赤峰市林西县 G303
S3	2020071904	赤峰市阿鲁科尔沁旗赛罕塔拉苏木高欣嘎查
S4	2020071905	赤峰市阿鲁科尔沁旗巴音温都苏木拉嘎赛花嘎查
S5	2020071906	赤峰市阿鲁科尔沁旗赛罕塔拉苏木
S6	2020071907	赤峰市阿鲁科尔沁旗巴音温都苏木拉嘎赛花嘎查
S7	2020071908	赤峰市阿鲁科尔沁旗罕苏木苏木巴音呼舒嘎查
S8	2020071909	赤峰市阿鲁科尔沁旗赛罕塔拉苏木
S9	2020081610	内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗巴嘎吉嘎斯台
S10	2020072611	内蒙古锡林郭勒盟东乌珠穆沁旗巴彦胡硕镇
S11	2020071912	通辽市扎鲁特旗乌力吉牧仁苏木
S12	2020062113	通辽市后旗朝鲁吐
S13	2020062115	兴安盟西哲里木
S14	2020071916	内蒙古锡林郭勒盟东乌珠穆沁旗巴彦胡硕镇
S15	2020071918	通辽市罕山林场

1.4 细胞

人肾近曲小管上皮细胞 HK2 (批号 CL-0109) 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 特征图谱的建立

2.1.1 色谱条件 采用 Inert Sustain C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 (A) -0.4% 甲酸水 (B), 梯度洗脱 0~10 min, 10%→15% A; 10~25 min, 15%→20% A; 25~35 min, 20%→35% A; 35~37 min, 35%→90% A; 37~42 min, 90% A; 42~44 min, 90%→10% A; 44~59 min, 10% A; 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 271 nm。

2.1.2 供试品溶液的制备 将 15 批次药材粉碎, 过 60 目筛, 精密称取 1.0 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 70%乙醇 25 mL, 称质量, 超声提取 30 min (功率 600 W, 频率 50 Hz), 用 70%乙醇补足减失的质量, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清, 经 0.22 μm

微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 取绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷对照品适量，精密称定，用 70%乙醇溶液制成质量浓度分别为 32.80、45.12、59.52 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.4 精密度考察 取蒙荨麻(S7)样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱峰峰面积。以 3 号峰为参照峰，各共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.98%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性考察 取蒙荨麻(S7)样品 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件分别进样，记录峰面积。以 3 号峰为参照峰，各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.03%，表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性考察 取蒙荨麻(S7)样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件，分别在 0、6、12、14、16、18、20、22、24 h 进样，记录峰面积。以 3 号峰为参照峰，各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.07%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 HPLC 特征图谱的建立及相似度评价 取 15 批次蒙荨麻样品(S1~S15)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，照“2.1.1”项下色谱条件进样测定。采用《中药指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)》对记录图谱的 AIA 文件进行分析，以 S1 为参照图谱，设置时间窗宽度为 0.5 min，对色谱峰进行

多点校正及全峰匹配，生成 15 批样品的特征图谱匹配图与对照特征图谱(R)，共标定 7 个共有峰(图 1)。通过与混合对照品溶液色谱图比对，指认其中 3 个色谱峰，分别为绿原酸(3 号峰)、新西兰牡荆苷 2(4 号峰)和异牡荆苷(6 号峰)(图 2)。因 6 号峰分离度良好且保留时间居中，故选定为参照峰，计算 S1~S15 特征图谱与对照特征图谱的相似度，结果依次为 0.753、0.975、0.954、0.987、0.969、0.948、0.982、0.914、0.945、0.953、0.844、0.759、0.967、0.967、0.815。结果显示，除 S1 和 S12 外，其余样品相似度均较高，表明各批次样品化学成分整体基本一致。

2.2 化学计量学分析

2.2.1 HCA 以 7 个特征峰峰面积为观测量，采用 SPSS 19.0 软件进行分析。运用组间连接法，以平方欧式距离作为分类依据，生成聚类树状图，见图 3。结果显示，当平方欧氏距离为 15 时，15 批样品划分成 2 类，S1、S7、S8、S9、S11、S12、S15 为第 1 类；S2、S3、S4、S5、S6、S10、S13、S14 为第 2 类，表明各批次样品质量存在一定差异。

2.2.2 PCA 为了进一步分析造成不同批次样品之间差异的化学成分，将 7 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 PCA。所建立模型的 2 个主成分对原始数据的方差解释率依次为 66.1% 和 14.8%，累积方差贡献率达到 80.9%，表明模型预测性能良好。由图 4 可知，15 批样品分别聚为 2 组，结果与 HCA 基本一致。

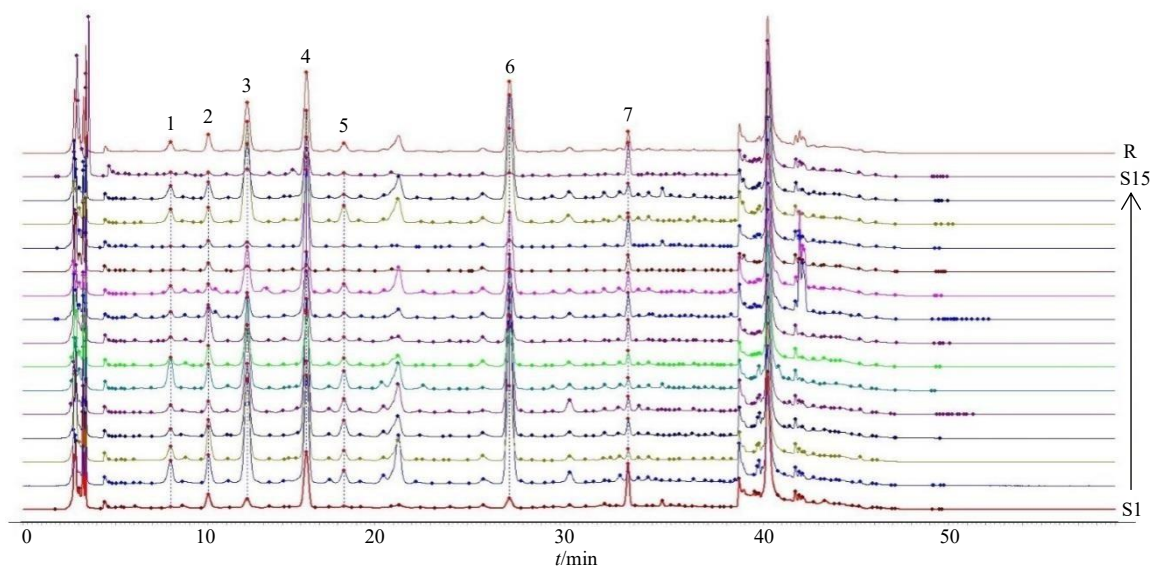
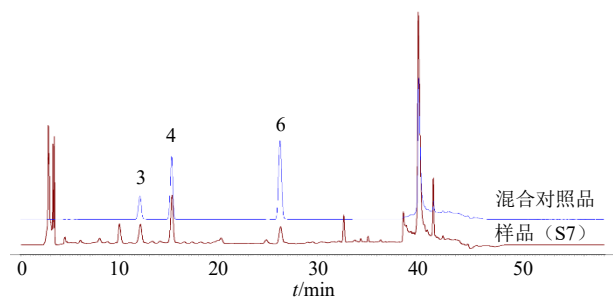


图 1 15 批蒙荨麻样品的 HPLC 图谱及其对照特征图谱 (R)

Fig. 1 HPLC chromatograms of 15 batches of *U. cannabina* samples and reference fingerprint chromatogram (R)



3-绿原酸; 4-新西兰牡荆苷; 6-异牡荆苷。
3-chlorogenic acid; 4-vicenin 2; 6-isovitexin.

图 2 混合对照品和蒙荨麻样品溶液的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substances and *U. cannabina* sample solution

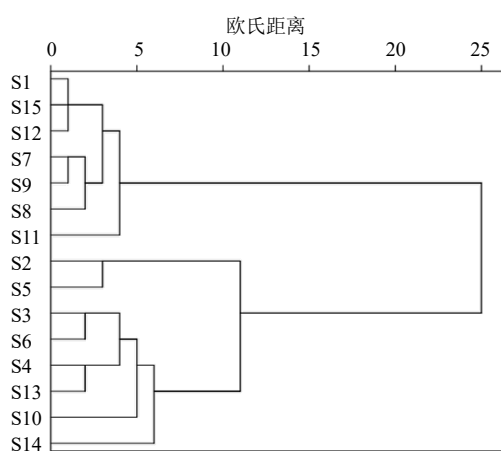


图 3 15 批蒙荨麻样品 HCA 树状图

Fig. 3 HCA dendrogram of 15 batches of *U. cannabina*

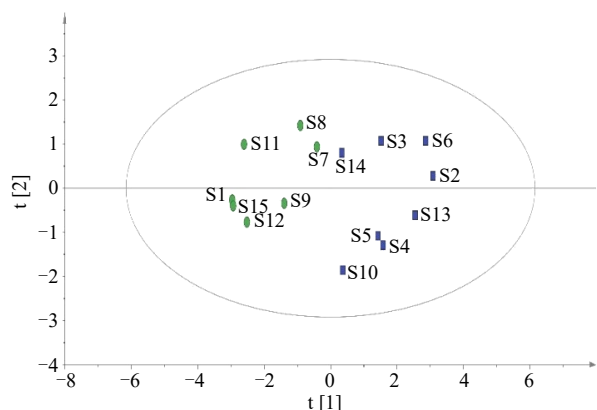


图 4 15 批蒙荨麻样品的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of 15 batches of *U. cannabina*

2.2.3 PLS-DA 为进一步识别蒙荨麻质量差异的标志性成分, 采用 SIMCA 14.1 软件对 15 批样品进行 PLS-DA。将 15 批样品中 7 个共有峰的标准化峰面积数据导入软件后, PLS-DA 结果显示 (图 5), 15 批样品可被清晰区分为 2 类。变量投影重要性 (VIP)

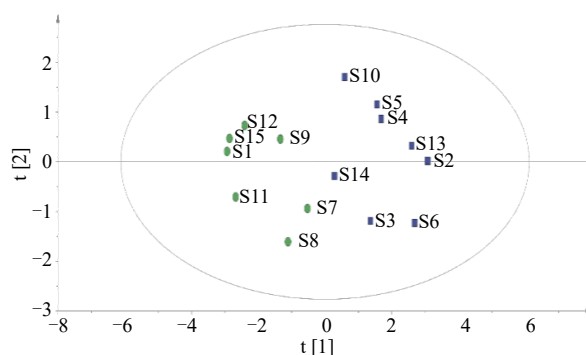


图 5 15 批蒙荨麻样品 PLS-DA 图

Fig. 5 PLS-DA plots of 15 batches of *U. cannabina*

值反映了各成分对样品分类的贡献程度, 以 $VIP > 1.0$ 为阈值, 筛选出绿原酸 (3 号峰) 和异牡荆苷 (6 号峰) 为对不同批次样品质量差异贡献较大的特征成分 (图 6)。提示在建立蒙荨麻质量标准时, 应对这 2 个成分进行重点监测以减小批次差异, 同时为其 Q-Marker 的筛选提供参考。

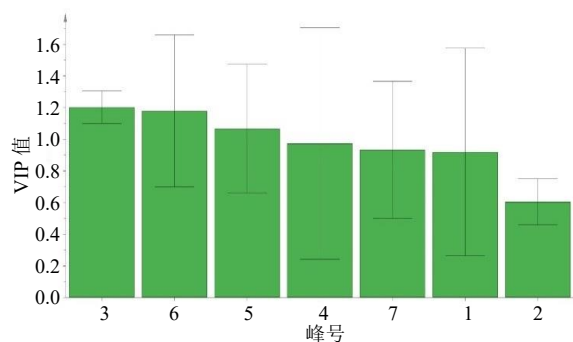


图 6 15 批蒙荨麻样品的 VIP 得分图

Fig. 6 VIP score plots of 15 batches of *U. cannabina*

2.3 分子对接

为探究蒙荨麻治疗高尿酸血症的 Q-Marker, 本研究选取高尿酸血症关键靶点蛋白黄嘌呤氧化酶 XOD (PDB ID: 1FIQ)、GLUT9 (PDB ID: 4YGB) 作为对接靶标, 与已指认的 3 个共有成分分别进行分子对接, 以验证其相互作用活性。XOD 的 3D 结构 PDB 文件从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载, GLUT9 靶蛋白则采用课题组前期构建的同源模型^[15]; 化合物配体的 2D 结构 (.sdf 格式) 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取。将预处理后的靶点蛋白与化合物导入 Discovery Studio 2016 Client 软件, 采用 LibDock 模块进行分子对接。

对接结果显示, 3 个化合物均通过氢键、 π -Alkyl

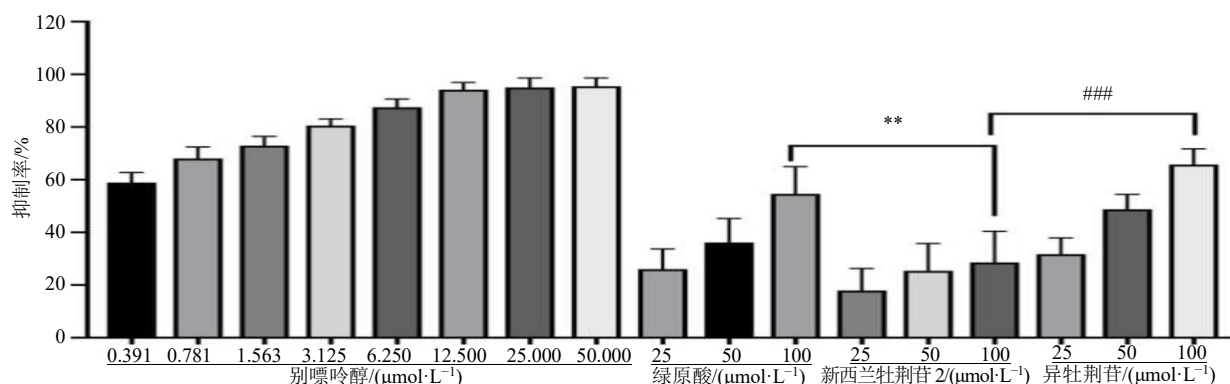
3.125、6.250、12.500、25.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列溶液。

2.4.3 XOD 的抑制作用结果 实验设置样品组(含样品、酶及底物)、对照组(含底物和样品或阴性对照,不含酶)、阳性对照组(含别嘌呤醇、酶及底物)、酶组(含酶和底物,不含样品)4组。向96孔板中依次加入40 μL 不同质量浓度的样品溶液、80 μL 20 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 XOD 溶液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 30 min; 随后加入 80 μL 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄嘌呤底物溶液,继续在 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育 15 min,最后在 292 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。各组均设 3 个

复孔,重复 3 次,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{酶}} - A_{\text{对照}})$$

由图 8 可知,别嘌呤醇组的抑制活力随质量浓度升高而增强,且各浓度组的抑制率均高于绿原酸、新西兰牡荆苷 2 及异牡荆苷各质量浓度组;绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对体外 XOD 的抑制率均随浓度升高而增强,呈现浓度相关性;此外,在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下,新西兰牡荆苷 2 组的抑制率显著低于绿原酸组 ($P < 0.01$),而异牡荆苷组的抑制率显著高于新西兰牡荆苷 2 组 ($P < 0.01$)。



与 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸比较: ** $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 新西兰牡荆苷 2 比较: ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ vs 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chlorogenic acid; ### $P < 0.001$ vs 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vicenin-2.

图 8 绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对 XOD 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Inhibition effect of chlorogenic acid, vicenin-2 and isovitexin on XOD ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对 HK2 细胞尿酸转运体 GLUT9 蛋白表达的影响

2.5.1 CCK-8 法检测细胞活力 为筛选最佳给药时间与浓度,将 HK2 细胞以 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养 12 h 后弃去旧培养液。实验孔加入 90 μL 新鲜培养液与 10 μL 目标化合物药液(绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷)。药液终浓度设置为 0、10、20、40、80、100、120、160、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照孔与空白孔(不加细胞)均加入 100 μL 新鲜培养液,每组设 3 个复孔。置于细胞培养箱中分别培养 12、24、48 h 后取出,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 2.5 h,采用酶标仪在 450 nm 波长下测定 A 值。计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

图 9 结果显示,与对照组相比,绿原酸各质量浓度组分别作用 HK2 细胞 12、24、48 h 后,细胞存活率均无显著差异 ($P > 0.05$);与对照组相比,随着作用时间延长至 48 h,新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷的 80~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均对 HK2 细胞存活率

表现出显著抑制作用 ($P < 0.01$)。综上,确定最佳给药时间为 12 h,后续实验中绿原酸给药浓度设为 50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,新西兰牡荆苷 2 设为 20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,异牡荆苷设为 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5.2 Western blotting 法测定 HK2 细胞尿酸转运体 GLUT9 蛋白表达 实验共设 10 组,每组 3 复孔,包括对照组和实验组。对照组采用无血清 DMEM 培养液继续培养;实验组分为绿原酸组、新西兰牡荆苷 2 组及异牡荆苷组,各组终浓度分别为:绿原酸组 50、100、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,新西兰牡荆苷 2 组 20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,异牡荆苷组 25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

细胞经分组干预后,用预冷 0.9%氯化钠溶液轻柔冲洗 2~3 次,弃去残留液体;每孔加入 100 μL 2%十二烷基硫酸钠(SDS)裂解液,收集裂解液至 1.5 mL 预冷 EP 管中,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 15~20 min 以充分裂解细胞,提取总蛋白。参照 BCA 试剂盒测定方法检测蛋白浓度,根据浓度调整所有样品至相同体积和蛋白量。样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,以 250 mA 恒流转移至 PVDF 膜(转膜 60 min)。

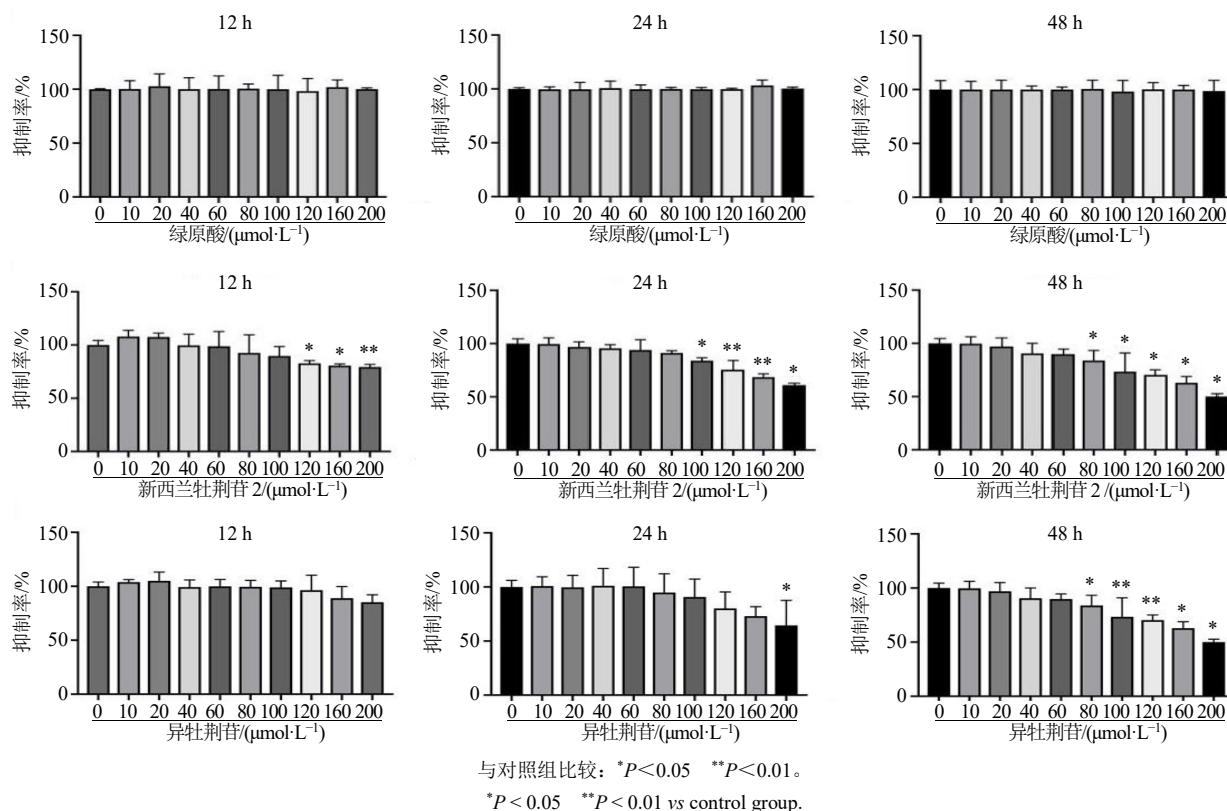


图 9 绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对 HK2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of chlorogenic acid, vicenin-2 and isovitexin on cell viability of HK2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3%脱脂奶粉封闭膜 1 h 后, 分别加入一抗 GLUT9 (1 : 1 000) 和内参 GAPDH (1 : 5 000), 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 溶液洗涤膜 5 次 (每次 5 min); 随后与 HRP 标记的二抗 (1 : 3 000) 室温摇床孵育 1 h, 再次用 TBST 洗涤 5 次 (每次 5 min)。采用

ECL 发光显色, 凝胶成像系统采集图像并分析。图 10 结果显示, 与对照组相比, 绿原酸各剂量组、新西兰牡荆苷 2 的 40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及异牡荆苷各剂量组均能显著下调 HK2 细胞中尿酸转运体 GLUT9 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。

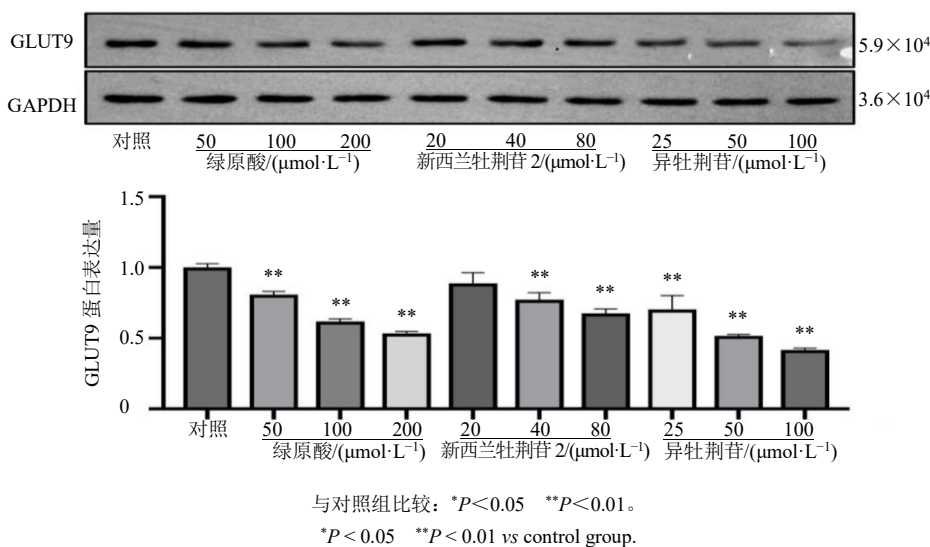


图 10 绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对 HK2 细胞 GLUT9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effects of chlorogenic acid, vicenin-2 and isovitexin on expression of GLUT9 protein in HK2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 蒙荨麻抗高尿酸血症多成分含量测定

2.6.1 线性关系考察 精密称取绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶解, 定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 2.253 2、0.946 4、0.598 0 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液, 储备液用 70%乙醇依次稀释成系列质量浓度的对照品溶液。按“2.1.1”项下方法进行分析, 记录色谱峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标拟合回归方程, 绿原酸: $Y=20\ 829\ 056.82 X-223\ 567.27$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 88.00~2135.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 新西兰牡荆苷 2: $Y=34\ 372\ 775.968\ 0 X-93\ 465.518\ 3$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围在 3.90~946.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 异牡荆苷 $Y=56\ 840\ 041.98 X-768\ 888.41$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围在 2.40~598.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6.2 精密度考察 取蒙荨麻(S3)样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱峰峰面积。测得 3 种成分峰面积 RSD 均小于 1.31%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性考察 取蒙荨麻(S3)样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别进样分析。测得 3 种成分含量的 RSD 均小于 1.45%, 表明方法重复性良好。

2.6.4 稳定性考察 取蒙荨麻(S3)样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别在 0、6、12、14、16、18、20、22、24 h 进样, 记录色谱峰峰面积。测得 3 种成分峰面积 RSD 均小于 2.43%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收考察 取蒙荨麻样品(S3) 6 份, 每份 0.5 g, 按照样品中绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷含量的 50%添加 3 种成分的对照品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算各成分的加样回收率。结果表明, 绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷的平均回收率分别为 109.61%、92.07%、100.01%, RSD 分别为 3.24%、1.02%、2.21%, 表明方法的准确度良好。

2.6.6 样品测定结果 取 15 批次(S1~S15)的蒙荨麻, 按“2.1.2”项下制备供试品溶液, “2.1.1”项下色谱条件依次进样测定, 计算样品中 3 个成分的质量分数, 结果见表 3。15 批蒙荨麻药材中绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷含量分别为 0.144 3~4.234 6、0.118 6~2.581 2、0.056 9~3.670 0 mg·g⁻¹。

表 3 15 批蒙荨麻中绿原酸、新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Determination results of chlorogenic acid, vicenin-2 and isovitexin contents in 15 batches of *U. cannabina* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	绿原酸	新西兰牡荆苷 2	异牡荆苷
S1	0.200 6±0.001 8	0.787 6±0.006 7	0.154 2±0.007 3
S2	4.234 6±0.143 4	2.112 4±0.104 4	3.670 0±0.013 0
S3	2.241 4±0.050 1	1.347 1±0.041 7	1.054 9±0.005 2
S4	2.507 1±0.023 6	2.447 5±0.022 4	2.242 8±0.010 3
S5	2.946 7±0.149 5	1.814 2±0.012 4	2.945 2±0.013 5
S6	3.402 1±0.165 8	1.322 2±0.013 0	1.628 6±0.008 2
S7	1.405 2±0.053 2	0.893 3±0.006 5	0.734 3±0.002 8
S8	0.594 4±0.013 6	1.287 2±0.006 5	0.536 0±0.002 3
S9	0.729 0±0.028 7	1.077 3±0.054 3	0.851 8±0.008 4
S10	1.751 8±0.024 3	2.581 2±0.015 2	1.609 9±0.006 4
S11	0.184 4±0.008 7	0.118 6±0.000 7	0.056 9±0.000 4
S12	0.144 3±0.001 5	1.840 2±0.027 8	0.245 3±0.001 8
S13	3.689 8±0.109 1	2.123 1±0.014 1	1.944 8±0.008 3
S14	2.219 2±0.087 5	1.060 7±0.002 0	2.288 1±0.009 6
S15	2.105 5±0.111 7	0.376 6±0.065 8	0.688 6±0.046 5

3 讨论

为科学筛选蒙荨麻抗高尿酸血症的 Q-Marker, 本研究首先建立蒙荨麻特征图谱, 结合化学计量学分析、体外实验验证及含量测定, 确定其抗高尿酸血症的 Q-Marker。该过程严格保障了 Q-Marker 需具备的特有性、可溯性与可测性, 为后续筛选工作奠定物质基础。在此基础上, 结合 HCA、PCA、PLS-DA 等化学计量学方法确认新西兰牡荆苷 2 和异牡荆苷对蒙荨麻质量差异的贡献度最高, 需作为重点关注对象; 同时已有研究表明, 新西兰牡荆苷 2 具有抗炎^[16-17]、解痉^[18]、保肝作用^[19]。异牡荆苷具有抗炎、抗氧化^[20-21]、抗肿瘤^[22]、保肝^[23]等的生物活性, 二者均符合 Q-Marker 与药效关联的核心筛选原则。

为验证候选成分与蒙荨麻抗高尿酸血症药效的关联性, 本研究构建了“分子-酶学-细胞”三维验证体系: 在分子层面, 将 3 个候选成分与高尿酸血症关键靶点蛋白(XOD、GLUT9)进行分子对接, 结果显示绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷均能通过氢键、疏水键、 π - π 键等作用力与靶点蛋白稳定结合, 且 LibDock 得分较高, 证实 3 者具备潜在的抗高尿酸血症分子作用基础; 在酶学层面, 针对尿酸生成关键环节开展体外 XOD 活性抑制实验, 发

现 3 个候选成分均能剂量相关性地抑制 XOD 活力, 与分子对接结果相互印证, 明确其可通过抑制尿酸生成发挥作用; 在细胞层面, 以 HK2 为模型考察成分对 GLUT9 蛋白表达的影响, 结果显示不同浓度的绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷均能显著下调 GLUT9 蛋白表达, 而 GLUT9 作为调控尿酸重吸收的关键转运体, 其表达下调可直接减少尿酸在体内的蓄积, 进一步关联蒙荨麻“促尿酸排泄”的潜在药效, 最终确认绿原酸、新西兰牡荆苷 2、异牡荆苷为蒙荨麻抗高尿酸血症的 Q-Marker。

为实现对 Q-Marker 的精准定量及蒙荨麻整体质量的有效控制, 本研究对样品前处理方法与色谱检测条件进行系统优化: 在提取方法优化中, 通过单因素变量实验系统考察不同溶剂 (甲醇、70%甲醇、50%甲醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇)、提取方式 (超声、回流)、溶媒用量 (25、50、100 mL) 及提取时间 (15、30、60 min) 对成分提取效率的影响, 最终确定“25 mL 70% 乙醇超声提取 30 min”为最佳方案, 确保 Q-Marker 的充分提取; 在色谱条件优化中, 对比 254、271 nm 检测波长下的色谱图基线、峰形及成分分离度, 选定 271 nm 作为检测波长以兼顾各 Q-Marker 的最大吸收特征与检测灵敏度, 同时比较甲醇-水与乙腈-0.4%甲酸水溶液的分 离效果, 发现乙腈-0.4%甲酸水溶液可使 3 个 Q-Marker 达到最佳分离度且基线平稳, 最终确定该体系为流动相。

综上所述, 本研究成功建立蒙荨麻 HPLC 特征图谱及 3 个 Q-Marker 的含量测定方法, 对 15 批次蒙荨麻样品的检测结果显示, 不同产地样品的 Q-Marker 含量存在差异, 提示在制订蒙荨麻药材质量标准时, 需充分考虑产地等因素, 本研究构建了“成分识别-筛选优化-活性验证-方法确立”的蒙荨麻 Q-Marker 研究方法, 为同类民族药 Q-Marker 筛选提供思路, 有效提升了蒙荨麻质量控制的科学性与精准性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会编制. 中华本草·蒙药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 286-287.
Compiled by the Editorial Committee of “Compendium of Materia Medica” of the State Administration of Traditional

Chinese Medicine. *Compendium of Materia Medica-Volume of Mongolian Medicine* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2004: 286-287.

[2] 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 849-851.
Jia M R, Zhang Y. *Dictionary of Chinese Ethnic Medicine* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2016: 849-851.

[3] 伊希巴拉珠尔. 认药白晶鉴 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1995: 7.
Yi X. *Identification Guide to Medicinal Substances (A Clear Crystal-like Reference)* [M]. Hohhot: Inner Mongolia People’s Publishing House, 1995: 7.

[4] 内蒙古自治区药品监督管理局. 内蒙古蒙药材标准 (2021 版) [S]. 2021: 299.
Inner Mongolia Autonomous Region Drug Administration. *Standards for Mongolian Medicinal Materials in Inner Mongolia (2021 Edition)* [S]. 2021: 299.

[5] 内蒙古自治区药品监督管理局. 内蒙古蒙药饮片炮制规范 (2020 版) [S]. 2020: 473.
Inner Mongolia Autonomous Region Drug Administration. *Processing Specifications for Mongolian Medicinal Decoction Pieces in Inner Mongolia (2020 Edition)* [S]. 2020: 473.

[6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
Liu C X, Chen S L, Xiao X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia Medica: Quality control for Chinese medicinal products [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(9): 1443-1457.

[7] 中华中医药学会《中药质量标志物研究技术指南》编写组. 中药质量标志物研究技术指南 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2249-2252.
The Compilation Group of the Technical Guide for Research on Quality Markers of Traditional Chinese Medicine. *Technical guide for research on quality markers of traditional Chinese medicine* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(7): 2249-2252.

[8] 蔡鹏, 孙小燕, 阿迪莱·艾力, 等. 荨麻皮刺水提液对小鼠离体肠平滑肌运动的影响 [J]. 新疆农业科学, 2022, 59(3): 767-773.
Cai P, Sun X Y, Adilai A L, et al. Effects of aqueous extract of *Urtica prickly* on the motility of isolated intestinal smooth muscle in mice [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 2022, 59(3): 767-773.

[9] 李亚楠. 新疆地产麻叶荨麻抗氧化作用及质量标准初步研究 [D]. 伊宁: 伊犁师范大学, 2023.

- Li Y N. Preliminary study on quality standards and antioxidant effect of *Urtica Cannabina* L. in Xinjiang [J]. Yining: Yili Normal University, 2023.
- [10] 陈艳, 郭子娴, 李晓波, 等. 麻叶荨麻中抑制 5 α -还原酶活性木脂素研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3846-3852.
- Chen Y, Guo Z X, Li X B, et al. Lignans with inhibitory effect on 5 α -reductase from *Urtica cannabina* [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(15): 3846-3852.
- [11] 姜溪, 只德广, 赵秀义, 等. 痛风康宁片对高尿酸血症的预防作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(7): 1595-1603.
- Jiang X, Zhi D G, Zhao X Y, et al. Study on prophylactic effects and mechanism of Tongfeng Kangning Tables on hyperuricemia [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(7): 1595-1603.
- [12] 何丽, 张楠, 陈磊, 等. 基于 CiteSpace 的中药治疗高尿酸血症肾病的研究现状及趋势 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1344-1357.
- He L, Zhang N, Chen L, et al. Analysis of research status and trend of traditional Chinese medicine in treatment of hyperuricemia nephropathy by CiteSpace [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(6): 1344-1357.
- [13] 白青云. 中华医学百科全书 (蒙医学) [M]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 1986: 763.
- Bai Q Y. *Chinese Medical Encyclopedia (Mongolia medicine)* [M]. Hohhot: Inner Mongolia Scientific & Technical Publishers, 1986: 763.
- [14] 张珩. 麻叶荨麻浸膏的抗炎和镇痛作用 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(21): 50-51, 54.
- Zhang H. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Urtica Cannabina* L. extract [J]. Clin Res Pract, 2018, 3(21): 50-51, 54.
- [15] 任玲玲. 藏药短管兔耳草调控 XOD 和尿酸转运体活性成分及其机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- Ren L L. Study on the active components and their mechanism of *Lagotis breviflora* Maxim regulating XOD and urate transporters [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [16] Gobbo-Neto L, Santos M D, Kanashiro A, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucoflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) [J]. Planta Med, 2005, 71(1): 3-6.
- [17] Marrassini C, Davicino R, Acevedo C, et al. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis* [J]. J Nat Prod, 2011, 74(6): 1503-1507.
- [18] Verspohl E J, Fujii H, Homma K, et al. Testing of *Perilla frutescens* extract and Vicenin 2 for their antispasmodic effect [J]. Phytomedicine, 2013, 20(5): 427-431.
- [19] Wada S, He P, Watanabe N, et al. Suppression of D-galactosamine-induced rat liver injury by glycosidic flavonoids-rich fraction from green tea [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(3): 570-572.
- [20] Huang S T, Chen C T, Chieng K T, et al. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1042: 387-395.
- [21] 李慧, 潘思轶, 徐晓云. 芹菜素黄酮氧苷、黄酮碳苷同分异构体抗炎活性评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 345-352.
- Li H, Pan S Y, Xu X Y. Anti-inflammation activity evaluation of apigenin-O-glycosides and apigenin-C-glycosides [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(13): 345-352.
- [22] 赵富周, 丁成智, 李晓明. 异牡荆素对非小细胞性肺癌细胞自我更新和凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(3): 219-223.
- Zhao F Z, Ding C Z, Li X M. Effect of isovitexin on self-renewal and apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(3): 219-223.
- [23] 乔倩. 基于 PI3K/Akt 和 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨异牡荆素抗急性肝损伤的作用机制 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2020.
- Qiao Q. Isovitexin from hydrocotyle sibthorpioides ameliorates acute liver injury by suppressing PI3K/Akt and TLR4/NF- κ B signaling pathways [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2020.

[责任编辑 孙英杰]