

基于体内暴露量的丹荷颗粒质量标志物研究

潘绮雪^{1,2}, 陈奎奎^{1,2#}, 马兆臣^{1,2}, 李月婷^{1,2}, 刘璐璐^{1,2}, 屈碧琼^{1,2}, 刘明妍^{1,2}, 刘洁^{2,3}, 贾志鑫^{2,3}, 肖红斌^{2,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药分析与转化研究中心, 北京 100029

3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 基于丹荷颗粒中 15 个特征性成分(丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、白藜芦醇、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、橙皮苷、川陈皮素、荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、去氢荷叶碱、乌药碱)在大鼠血浆暴露量的测定, 筛选丹荷颗粒中适于作为质量标志物(quality marker, Q-Marker)的成分。方法 以 EC-C₁₈ 柱为预柱、ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ 柱为色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 采用动态多反应监测扫描质谱, 建立高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法; 大鼠 ig 丹荷颗粒, 采集不同时间点的血浆样品, 并测定血浆样品中各特征性成分的质量浓度, 计算其血浆暴露量; 确定体内高暴露的成分, 对其进一步进行活性及制剂含量分析, 依据体内暴露量、高暴露成分活性、制剂相应成分含量确定 Q-Marker。结果 丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、白藜芦醇、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、橙皮苷、川陈皮素、荷叶碱、O-去甲基荷叶碱、N-去甲基荷叶碱、去氢荷叶碱、乌药碱在大鼠血浆中暴露量分别为(1340.45 $\pm$ 167.64)、(232.49 $\pm$ 37.05)、(677.51 $\pm$ 71.61)、(33.99 $\pm$ 20.74)、(281.53 $\pm$ 32.32)、(25.01 $\pm$ 4.90)、(16.85 $\pm$ 2.88)、(11.89 $\pm$ 2.69)、(113.71 $\pm$ 23.05)、(11.13 $\pm$ 1.94)、(168.69 $\pm$ 42.68)、(2595.00 $\pm$ 314.78)、(9.55 $\pm$ 1.36)、(1.29 $\pm$ 0.11)、(13.96 $\pm$ 0.88) ng·h/mL, 其中丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、金丝桃苷、紫云英苷、橙皮苷、荷叶碱具有调血脂活性且在制剂中质量分数均大于 0.1 mg/g。结论 丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、槲皮素、橙皮苷、柚皮苷和荷叶碱可作为丹荷颗粒的 Q-Marker。

关键词: 丹荷颗粒; 暴露量; 质量标志物; 高效液相色谱-串联质谱; 定量分析; 丹酚酸 B; 虎杖苷; 大黄素; 槲皮素; 橙皮苷; 柚皮苷; 荷叶碱

中图分类号: R285.5; R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)09-2608-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.012

Study on Q-Marker of Danhe Granules based on exposure *in vivo*

PAN Qi-xue^{1,2}, CHEN Kui-kui^{1,2}, MA Zhao-chen^{1,2}, LI Yue-ting^{1,2}, LIU Lu-lu^{1,2}, QU Bi-qiong^{1,2}, LIU Ming-yan^{1,2}, LIU Jie^{2,3}, JIA Zhi-xin^{2,3}, XIAO Hong-bin^{2,3}

1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To screen Danhe Granules for quality marker (Q-Marker) based on determination of plasma exposure of 15 characteristic components (salvianolic acid B, polydatin, emodin, emodin-8-O- β -D-glucoside, resveratrol, hyperin, isoquercitrin, astragalin, hesperidin, nobiletin, nuciferine, O-nornuciferine, N-nornuciferine, dehydronuciferin, and coclaurine) in Danhe Granules in rats. **Methods** EC-C₁₈ column was used as pre-column, ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ column was used as column, 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile was used as mobile phase, dynamic multiple response monitoring scanning mode was used for mass spectrometry and HPLC-MS/MS method was established. Rats were ig given Danhe Granules, plasma of rats at different

收稿日期: 2021-04-10

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项资助项目(2019ZX09201004-001-022)

作者简介: 潘绮雪(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制及质量标准研究。Tel: 13865950563 E-mail: paanhzz@163.com

*通信作者: 肖红斌, 男, 教授。Tel: (010)64286490 E-mail: hbxiao69@163.com

#共同第一作者: 陈奎奎(1990—), 男, 博士, 研究方向为中药物质基础及作用机制研究。Tel: 13121933979 E-mail: 1358632635@qq.com

time points were collected, concentration of each component in plasma samples of rats were determined, plasma exposure *in vivo* were calculated. Components with high exposure *in vivo* were determined, of which activity and preparation content were further analyzed. Q-Marker were determined according to amount of exposure *in vivo*, activity of high exposure ingredients, corresponding composition and content of the preparation. **Results** Plasma exposure levels of salvianolic acid B, polydatin, emodin, emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside, hyperin, astragalin, astragalin, hesperidin, nobiletin, nuciferine, *O*-nornuciferine, *N*-nornuciferine, dehydronuciferin, coclaurine were (1340.45 ± 167.64), (232.49 ± 37.05), (677.51 ± 71.61), (33.99 ± 20.74), (281.53 ± 32.32), (25.01 ± 4.90), (16.85 ± 2.88), (11.89 ± 2.69), (113.71 ± 23.05), (11.13 ± 1.94), (168.69 ± 42.68), (2595.00 ± 314.78), (9.55 ± 1.36), (1.29 ± 0.11), and (13.96 ± 0.88) ng·h/mL, salvianolic acid B, polydatin, emodin, hyperin, astragalin, hesperidin, and nuciferine showed lipid-lowering activity and their contents in preparations were all greater than 0.1 mg/g. **Conclusion** Salvianolic acid B, polydatin, emodin, quercetin, hesperidin, naringin, and nuciferine can be used as Q-Marker of Danhe Granules.

Key words: Danhe Granules; exposure; quality marker; HPLC-MS/MS; quantitative analysis; salvianolic acid B; polydatin; emodin; quercetin; hesperidin; naringin; nuciferine

丹荷颗粒来源于名老中医郭维琴经验方丹荷汤,由君药丹参及薏苡仁、臣药虎杖及山楂、佐药陈皮和使药荷叶 6 味中药配伍组成,具有活血消食、祛湿健脾的功效,临床用于治疗湿邪困脾型高脂血症。课题组前期确定了丹荷颗粒的制备工艺,并证实丹荷颗粒能够显著改善高脂血症金黄地鼠的各项指标^[1]。在丹荷颗粒质量控制方面,目前主要集中于对其指标性成分的含量测定上,尚缺乏有效可行的质量控制方法。

刘昌孝院士^[2]于 2016 年提出中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 概念,密切中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分的关联度,为中药质量控制提供了新的思路和方法。“有效性”是 Q-Marker“五原则”中的核心要素^[3],也是 Q-Marker 研究较传统质量控制的主要提升。中药复方给药途径多为口服给药,有效成分被吸收入血后的原型成分及其代谢产物才是具有疗效的“效应成分”。He 等^[4]提出,首先选择吸收入血的体内成分,确定药物在体内的暴露程度,然后将药物中与体内物质密切相关的成分(前药)或者与药效具有一致性的成分作为初步确定的 Q-Marker,之后应进一步结合网络药理学、在线生物活性指纹图谱和高通量筛选等药理学研究对初步确定的 Q-Marker 的生物活性进行评价,从而确定最终的 Q-Marker。马建超等^[5]利用药动学对瓜蒌中香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、香叶木素、芹菜素、香草酸和肉桂酸进行祛痰止咳 Q-Marker 的筛选,并采用多元统计方法系统聚类分析和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对筛选出的候选 Q-Marker 进行评价。

课题组前期基于网络药理学方法筛选丹荷颗粒的活性成分并经体外实验验证,对丹荷颗粒的

Q-Marker 进行了探索,初步确定虎杖苷、柚皮苷可作为丹荷颗粒的 Q-Marker^[8]。本研究在体内成分定性分析的基础上^[6],测定丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、白藜芦醇、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、橙皮苷、川陈皮素、荷叶碱、*O*-去甲基荷叶碱、*N*-去甲基荷叶碱、去氢荷叶碱、乌药碱 15 个特征性成分在大鼠体内的暴露量,将体内暴露量显著且具有增强药效作用的成分作为初步确定的 Q-Marker 的基本要素,并结合前期网络药理学结果,以实际检测到吸收入血的药源性成分为化学成分源,筛选出与丹荷颗粒调血脂机制密切相关的活性成分^[1],更加深入完整地确定丹荷颗粒的 Q-Marker,使其作为反映丹荷颗粒有效性的标示性物质进行质量控制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,10 周龄,体质量 200~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2016-0038。动物饲养于温度 23 ℃、湿度 50%~70%、换气速度约 15 次/h、人工光照 12 h/d 的环境中,自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 1117052400125)。

1.2 药品与试剂

对照品虎杖苷(批号 H-012-181216)、金丝桃苷(批号 J-012-170317)、异槲皮苷(批号 Y-076-171216)、紫云英苷(批号 Z-020-171205)、橙皮苷(批号 110721-201818)、丹酚酸 B(批号 D-012-170417)、白藜芦醇(批号 B-018-160928)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 D-018-160928)、大黄素(批号 Must-16031601)、乌药碱(批号 W-011-161212)、

N-去甲基荷叶碱(批号 D-008-180917)、*O*-去甲基荷叶碱(批号 DFZY-191227)、荷叶碱(批号 111566-201706)、川陈皮素(批号 C-015-170316)、去氢荷叶碱(批号 FZY-M1805230304)购自成都瑞芬思有限公司,质量分数均大于 98%;利血平对照品(批号 X04A9Y56856,质量分数>98%)购自上海源叶生物科技有限公司;淫羊藿苷对照品(批号 110737-201516,质量分数>98%)购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为质谱级,购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;甲酸为质谱级,购自美国 Sigma 公司;去离子水由 Milli-Q 纯水系统自制;其他试剂均为分析纯;丹荷颗粒由中日友好医院医院制剂室提供。

1.3 仪器

1260 HPLC-QQQ 6470 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Agilent 公司);KQ-500 E 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);Sigma3-18KS 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);Practum SQP 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);QQMD200-2 干式氮吹仪(上海启前电子科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

EC-C₁₈ 预柱(5 mm×3 mm, 2.5 μm)、ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm×3 mm, 1.8 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。正离子电离模式(ESI⁺),梯度洗脱:0~3 min, 15%~65% B;3~5 min, 65%~100% B;5~7 min,

100% B;体积流量为 0.5 mL/min;柱温为 45 °C;进样量为 5 μL。负离子电离模式(ESI⁻),梯度洗脱:0~0.5 min, 5%~15% B;0.5~7.0 min, 15% B;7.0~9.0 min, 15%~85% B;9.0~9.5 min, 85%~100% B;9.5~12.0 min, 100% B;体积流量为 0.5 mL/min;柱温为 45 °C;进样量为 5 μL。

2.2 质谱条件

正/负离子电离模式;干燥气温度为 300 °C;干燥气体积流量为 7 L/min;喷雾气压力为 35 psi(1 psi=6.895 kPa);鞘气温度为 300 °C,鞘气体积流量为 11 L/min;毛细管电压为 4000 V(ESI⁺)/3500 V(ESI⁻);监测模式为动态多反应监测模式(dynamic multiple reaction monitor, dMRM)。待测成分、内标化合物的离子对选择及相关参数见表 1。

2.3 对照品及内标溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品,置于 10 mL 量瓶,加入二甲基亚砜助溶,以甲醇定容,超声溶解,得到各对照品储备溶液。精密吸取各对照品储备液,以 80%甲醇配制成系列质量浓度的混合对照品溶液。

2.3.2 质控对照品溶液的制备 精密吸取各对照品储备溶液,以 80%甲醇稀释得到各质控对照品溶液,其中虎杖苷质量浓度分别为 0.8、50.0、350.0 ng/mL,金丝桃苷质量浓度分别为 0.8、20.0、80.0 ng/mL,异槲皮苷质量浓度分别为 0.8、20.0、80.0 ng/mL,紫云英苷质量浓度分别为 0.8、10.0、40.0 ng/mL,橙皮苷质量浓度分别为 0.8、50.0、350.0 ng/mL,丹酚酸 B 质量浓度分别为 7.5、100.0、400.0

表 1 待测成分、内标化合物的离子对及相关参数

Table 1 Ion pairs and related parameters of tested compounds and internal standard compounds

成分	<i>t</i> _R /min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	电离模式
虎杖苷	5.65	389.1	227.0	111	28	[M-H] ⁻
金丝桃苷	6.23	463.0	300.1	152	40	[M-H] ⁻
异槲皮苷	6.60	463.0	300.1	152	38	[M-H] ⁻
紫云英苷	9.33	447.2	284.0	151	32	[M-H] ⁻
橙皮苷	9.92	609.1	301.2	155	32	[M-H] ⁻
白藜芦醇	10.03	227.1	185.0	140	18	[M-H] ⁻
丹酚酸 B	10.13	717.0	519.2	145	15	[M-H] ⁻
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	10.32	431.1	269.0	190	30	[M-H] ⁻
大黄素	11.19	269.0	225.0	158	30	[M-H] ⁻
乌药碱	1.21	286.1	106.9	125	31	[M-H] ⁻
<i>N</i> -去甲基荷叶碱	3.07	282.1	251.1	95	20	[M+H] ⁺
<i>O</i> -去甲基荷叶碱	3.65	282.1	265.0	85	10	[M+H] ⁺
荷叶碱	3.70	296.1	265.0	110	15	[M+H] ⁺
川陈皮素	5.13	403.1	373.1	110	26	[M+H] ⁺
去氢荷叶碱	6.48	294.1	279.2	148	18	[M+H] ⁺
淫羊藿苷	10.28	721.2	513.0	135	10	[M-H] ⁻
利血平	4.39	609.3	195.0	195	40	[M+H] ⁺

ng/mL, 白藜芦醇质量浓度分别为 10.0、50.0、160.0 ng/mL, 大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷质量浓度分别为 0.8、50.0、350.0 ng/mL, 大黄素质量浓度分别为 5.0、50.0、350.0 ng/mL, 乌药碱质量浓度分别为 0.8、30.0、160.0 ng/mL, *N*-去甲基荷叶碱质量浓度分别为 0.3、30.0、160.0 ng/mL, *O*-去甲基荷叶碱质量浓度分别为 6.3、60.0、800.0 ng/mL, 荷叶碱质量浓度分别为 0.8、60.0、400.0 ng/mL, 川陈皮素质量浓度分别为 0.8、30.0、160.0 ng/mL, 去氢荷叶碱质量浓度分别为 0.1、3.0、80.0 ng/mL。

2.3.3 内标溶液的制备 分别精密吸取淫羊藿苷、利血平对照品储备溶液, 以 80% 甲醇稀释得到质量浓度分别为 40、5 ng/mL 的淫羊藿苷 (IS1) 和利血平 (IS2) 内标溶液。

2.4 丹荷颗粒溶液的制备

精密称取丹荷颗粒 20 g 置 50 mL 离心管中, 加入生理盐水 40 mL, 超声混匀, 得到质量浓度为 0.5 g/mL 的丹荷颗粒溶液。

2.5 分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组和丹荷颗粒 (3.33 g/kg, 相当于临床剂量的 3 倍) 组, 每组 6 只。实验前大鼠禁食 12 h, 自由饮水, 丹荷颗粒组 ig 2 mL 丹荷颗粒溶液, 对照组 ig 等体积生理盐水。分别于给药后 0.08、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、8.00、12.00、24.00 h, 大鼠眼底静脉丛采血, 每次取血量约 300 μ L, 血液置抗凝管中, 4 $^{\circ}$ C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 得血浆样品, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.6 血浆样品的处理

2.6.1 基质工作溶液的制备 精密吸取 100 μ L 对照组血浆, 加入 10 μ L 内标溶液, 加入 10 μ L 混合对照品溶液, 加入 400 μ L 冷乙腈, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 氮气吹干。残渣用 100 μ L 80% 甲醇复溶, 超声助溶, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.6.2 基质质控样品的制备 精密吸取 100 μ L 对照组血浆, 加入 10 μ L 内标溶液, 加入 10 μ L 质控对照品溶液, 加入 400 μ L 冷乙腈, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 氮气吹干。残渣用 100 μ L 80% 甲醇复溶, 超声助溶, 4 $^{\circ}$ C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液得到基质质控样品。

2.6.3 待测样品的制备 精密吸取丹荷颗粒组血浆 100 μ L, 加入 10 μ L 内标溶液, 加入 410 μ L 冷乙

腈, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 氮气吹干。残渣用 100 μ L 80% 甲醇复溶, 超声助溶, 4 $^{\circ}$ C、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性考察 分别对 6 组对照组血浆样品和丹荷颗粒组血浆样品, 按“2.6”项下方法处理, 按“2.1”“2.2”项下色谱及质谱条件进样检测。结果如图 1、2 所示, 血浆中内源性物质未对待测成分及内标化合物产生干扰, 该方法专属性良好, 可用于血浆中待测成分的含量测定。

2.7.2 线性关系及检测限的考察 对照组血浆样品按“2.6”项下方法处理, 平行制备 3 份基质工作溶液和基质质控样品, 按“2.1”“2.2”项下色谱及质谱条件进样检测。以各待测成分与内标化合物色谱峰峰面积之比为纵坐标 (*Y*), 各待测成分的质量浓度为横坐标 (*X*), 进行线性回归, 采用加权最小二乘法进行拟合分析, 得到标准曲线; 以信噪比 ≥ 3 时对应的待测成分质量浓度定义为检测限, 将线性范围的最低点定义为定量下限, 得到 15 种成分的标准曲线、*r*、线性范围及检测限见表 2, 结果表明各待测成分在相应的质量浓度范围内线性关系良好, 可用于待测样品的定量分析。

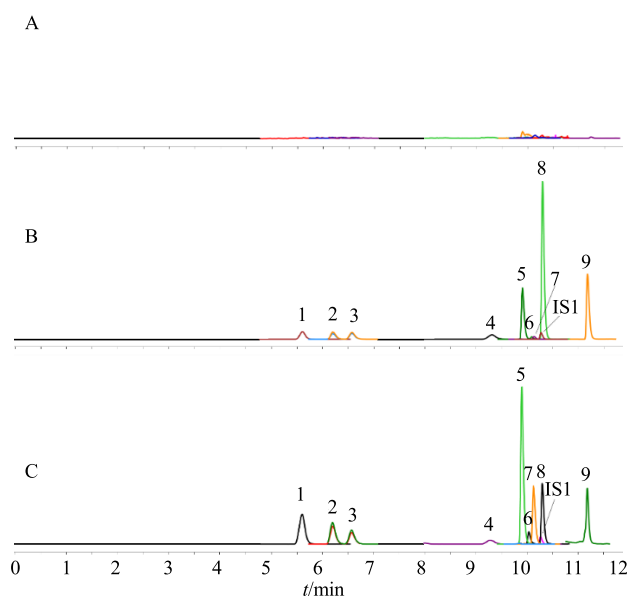


图 1 负离子模式下对照组血浆样品 (A)、基质工作溶液 (B) 和丹荷颗粒组血浆样品 (C) 的 dMRM 色谱图

Fig. 1 dMRM chromatograms of control plasma sample (A), matrix working solution (B), and Danhe Granules group plasma sample (C) in negative ion mode

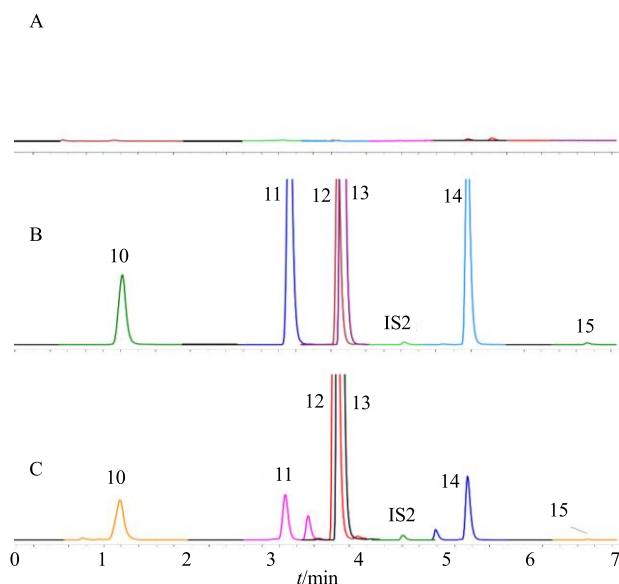


图 2 正离子模式下对照组血浆样品 (A)、基质工作溶液 (B) 和丹荷颗粒组血浆样品 (C) 的 dMRM 色谱图

Fig. 2 dMRM chromatograms of control plasma sample (A), matrix working solution (B), and Danhe Granules group plasma sample (C) in positive ion mode

表 2 15 个特征性成分的标准曲线、线性范围和检测限

Table 2 Standard curves, linear ranges and limits of detection for 15 characteristic components

序号	成分	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)
1	虎杖苷	$Y=4.01 X+0.026 8$	0.999 3	0.25~400.00	0.020
2	金丝桃苷	$Y=30.90 X-0.134 0$	0.999 3	0.31~100.00	0.100
3	异槲皮苷	$Y=30.00 X-0.107 0$	0.995 8	0.31~100.00	0.120
4	紫云英苷	$Y=13.40 X-0.005 9$	0.995 6	0.15~50.00	0.030
5	橙皮苷	$Y=13.30 X+0.245 0$	0.998 9	0.25~400.00	0.010
6	白藜芦醇	$Y=0.47 X+0.000 9$	0.999 2	0.63~200.00	0.100
7	丹酚酸 B	$Y=0.15 X+0.096 7$	0.996 5	3.10~500.00	0.300
8	大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=32.30 X+0.325 0$	0.997 8	0.25~400.00	0.100
9	大黄素	$Y=13.70 X+0.391 0$	0.997 8	1.25~400.00	0.050
10	乌药碱	$Y=38.80 X-0.601 0$	0.998 3	0.13~200.00	0.050
11	<i>N</i> -去甲基荷叶碱	$Y=104.70 X-1.200 0$	0.995 4	0.13~200.00	0.001
12	<i>O</i> -去甲基荷叶碱	$Y=32.78 X-0.632 0$	0.999 7	0.31~1 000.00	0.005
13	荷叶碱	$Y=166.80 X-1.970 0$	0.997 0	0.15~500.00	0.001
14	川陈皮素	$Y=74.10 X-0.525 0$	0.996 7	0.13~200.00	0.001
15	去氢荷叶碱	$Y=41.70 X-0.262 0$	0.997 0	0.03~10.00	0.005

中、高 3 个质量浓度，每个样品测定 6 次，计算基质效应及绝对回收率，结果显示 $RSD \leq 16.7\%$ 、准确度为 $83.6\% \sim 113.9\%$ ，表明该方法无基质干扰，且样品前处理方法可行，回收率较高。

2.8 血药浓度-时间曲线和血浆暴露量测定

采用经方法学验证的定量分析方法测定丹荷颗粒组血浆样品中待测成分的质量浓度，采用 GraphPad Prism 5 软件绘制血药浓度-时间曲线见

2.7.3 精密度及准确度考察 在基质工作溶液中选择高、中、低 3 个质量浓度作为质量控制样品，并进行日内、日间精密度考察，结果显示精密度 $RSD \leq 15\%$ 、准确度为 $85.07\% \sim 114.62\%$ ，符合要求，表明仪器状态较稳定，满足各待测成分的测定要求。

2.7.4 稳定性考察 在基质工作溶液中选择高、中、低 3 个质量浓度作为质量控制样品，从短期稳定性和冻融稳定性室温 24 h、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次 2 个方面进行考察。每个质量浓度的基质质控样品按“2.1”“2.2”项下色谱及质谱条件连续进样 6 次，结果显示稳定性 $RSD \leq 15\%$ 、准确度为 $85.2\% \sim 113.8\%$ ，表明样品在所考察的储存条件下稳定性良好，符合生物样品检测的需求。

2.7.5 基质效应及回收率考察 A 组样品为精密吸取 100 μL 去离子水，按“2.6”项下基质质控样品配制方法配制而成；B 组样品为精密吸取 100 μL 对照组血浆，加入 420 μL 冷乙腈，按“2.6”项下方法配制而成；C 组样品为精密吸取 100 μL 对照组血浆，按“2.6”项下方法配制而成。每组样品分为低、

图 3，15 个特征性成分的血浆暴露量见表 3，*O*-去甲基荷叶碱、丹酚酸 B、大黄素、白藜芦醇、虎杖苷、荷叶碱和橙皮苷血浆暴露量 (AUC_{0-12}) 均大于 100 ng·h/mL，表明其在体内暴露量较高，可能促进丹荷颗粒发挥调血脂作用。

3 讨论

3.1 测定成分的选择

在多种中药中广泛分布的成分难以反映中药材

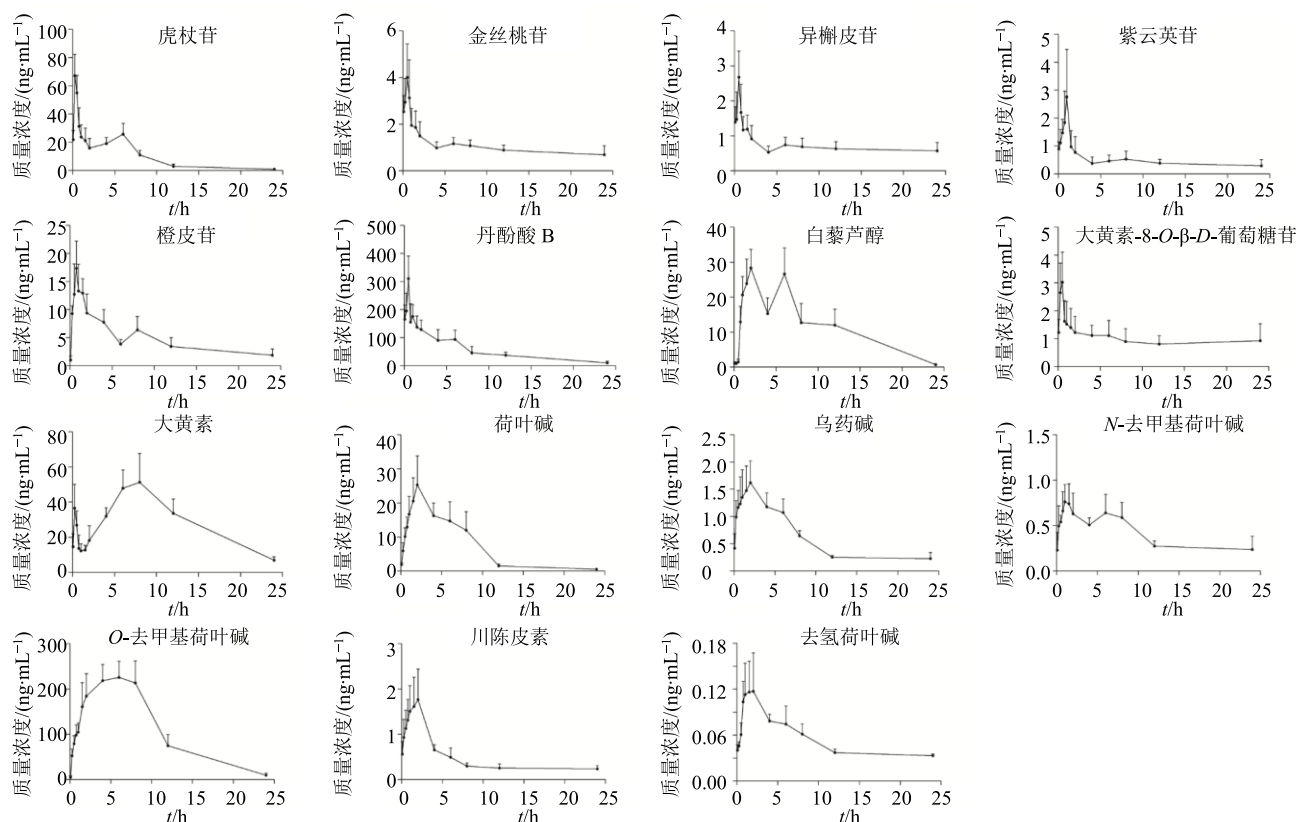


图 3 15 个特征性成分的血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curve of 15 characteristic components

表 3 15 个特征性成分的体内暴露量

Table 3 *In vivo* exposure of 15 characteristic components

成分	AUC ₀₋₂₄ /(ng·h·mL ⁻¹)	成分	AUC ₀₋₂₄ /(ng·h·mL ⁻¹)
O-去甲基荷叶碱	2595.00±314.78	金丝桃苷	25.01±4.90
丹酚酸 B	1340.45±167.64	异槲皮苷	16.85±2.88
大黄素	677.51±71.61	乌药碱	13.96±0.88
白藜芦醇	281.53±32.32	紫云英苷	11.89±2.69
虎杖苷	232.49±37.05	川陈皮素	11.13±1.94
荷叶碱	168.69±42.68	N-去甲基荷叶碱	9.55±1.36
橙皮苷	113.71±23.05	去氢荷叶碱	1.29±0.11
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	33.99±20.74		

的特有性，因此“特有性”也成为中药 Q-Marker 确定的重要原则。本研究基于丹荷颗粒 6 味药材的成分生源途径分析与药理活性对测定成分进行筛选。

3.1.1 丹参 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎，以丹参酮类为主的二萜类成分和以丹酚酸为主的酚酸类成分为丹参的特征成分，丹荷颗粒的制备工艺为水提醇沉，水溶性成分溶解性较好，因此重点对丹酚酸类成分进行阐述。酚酸的生物合成途径包括苯丙酸途径和酪氨酸衍生途径，苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 4-羟基化酶和 4-香豆酰辅酶 A 连接酶将苯丙氨酸转化为 4-香豆酰辅酶 A；酪氨酸氨基转移酶和 4-羟基苯基丙

酮酸还原酶将酪氨酸代谢为 4-羟基苯基乳酸，最终形成丹参素；4-香豆酰辅酶 A 和丹参素通过酯化酶迷迭香酸合成酶进一步偶联形成 4-香豆酰-3,4-二羟基苯基乳酸，并进一步被细胞色素酶 CYP98A14 氧化，引入 3-羟基形成迷迭香酸；迷迭香酸通过氧化转化为苯氧基，2 个苯氧基自发结合最终形成丹酚酸 B^[7]。《中国药典》2020 年版中，丹酚酸 B 仅用于控制丹参的质量；通过丹酚酸 B 生源合成途径可知，丹酚酸 B 直接来源于迷迭香酸，为丹参特有性成分，且是主要的丹酚酸类成分，因此丹酚酸 B 可作为丹参水溶性丹酚酸类的特征性成分。丹参临床上可用于治疗高脂血症、动脉粥样硬化等疾病。丹

多酚酸盐广泛用于冠心病的治疗^[8], 王斌^[9]发现丹酚酸 B 可有效清除高脂饮食诱导小鼠机体产生的过量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 提高机体抗氧化能力, 改善免疫功能。综上, 丹酚酸 B 既为丹参特征性成分, 在《中国药典》2020 年版中用于丹参的质控, 且具有调血脂作用, 为丹参中值得研究的成分。

3.1.2 虎杖 虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根及根茎, 主要包括蒽醌类及芪类成分。芪类成分如白藜芦醇为植物次生代谢物, 其在植物体内的生物合成途径通过苯丙氨酸-丙二酸途径完成。苯丙氨酸解氨酶合成肉桂酸, 肉桂酸在肉桂酸 4-羟基化酶催化下转化为对香豆酸, 继而在 4-香豆酸-辅酶 A 连接酶催化下转化为 4-香豆酸-辅酶 A; 二苯乙烯合酶或查尔酮合酶分别将 1 个 4-香豆酸-辅酶 A 和 3 个丙二酰辅酶 A 单位转化为白藜芦醇或柚皮素查尔酮; 白藜芦醇被白藜芦醇 O-甲基转移酶转化为紫檀芪或经糖基化转化为虎杖苷^[10-11]。白藜芦醇等芪类成分为蓼科植物特征成分, 白藜芦醇主要提取自虎杖的根、根茎, 《中国药典》2020 年版中虎杖苷仅用于控制虎杖的质量, 因此白藜芦醇、虎杖苷是虎杖的特征性成分。虎杖苷能明显降低高脂饮食诱导的家兔血清中三酰甘油 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平^[12]; 白藜芦醇可显著降低高脂血症大鼠血浆 LDL-C 水平和肝脏中 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA) 活性, 并提高载脂蛋白 (apolipoprotein A-I, Apo A-I) 与 Apo B 比例以及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平^[13], 为虎杖中值得研究的成分。

蒽醌类成分可分为大黄素型和茜草型 2 类, 其中大黄素型蒽醌如大黄素、大黄素甲醚、大黄酚等主要分布于蓼科、豆科等植物中, 其羟基分布在母核苯环两侧, 通过聚酮途径合成^[14], 乙酰辅酶 A 与丙二酸单酰辅酶 A 在植物查耳酮合成酶系催化下进行缩合^[15]。蓼科植物富含蒽醌类成分, 大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷能够显著降低膳食诱导的高脂血症大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平^[16-17], 为虎杖中值得研究的成分。

3.1.3 山楂 山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus*

pinnatifida Bge. var. *major* N.E.Br. 或山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 主要富含黄酮类成分。黄酮类成分的生物合成途径是复合型的, 由莽草酸途径提供 3 个丙二酰辅酶 A 环化形成黄酮 A 环, 1 个 4-香豆酰辅酶 A 形成 B 环, 3 个丙二酰辅酶 A 和 1 个香豆酰辅酶 A 在查耳酮合酶的作用下生成查耳酮; 查耳酮在异构酶的作用下形成二氢查耳酮, 然后在聚合酶、羟化酶、甲基转移酶、糖基转移酶等修饰酶催化下, 形成其他黄酮类成分^[18]。黄酮类成分是山楂的主要生物活性物质, 金丝桃苷可显著降低胆固醇并增强血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 可能是山楂治疗高脂血症潜在生物活性成分^[19]; 异槲皮苷能够抑制游离脂肪酸诱导的脂质过载和肝细胞内 ROS 水平, 抑制游离脂肪酸诱导的细胞内 SOD 活性以及 TG、丙二醛水平^[20]; 紫云英苷具有明显的心脏保护作用^[21], 为山楂中值得研究的成分。

3.1.4 陈皮 陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 主要含黄酮类、柠檬苦素类、生物碱类及挥发油类等成分。柑橘类黄酮的合成主要经过苯丙烷代谢途径, 由苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 4-羟基化酶、4-酰基辅酶 A 连接酶催化合成。首先, 苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸合成肉桂酸, 肉桂酸经肉桂酸 4-羟基化酶转化为对香豆酸, 三磷酸腺苷、辅酶 A 和 4-酰基辅酶 A 连接酶将对香豆酸转化为对香豆酰辅酶 A; 乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 复合物作用下生成丙二酰辅酶 A, 3 分子丙二酰辅酶 A 和 1 分子对香豆酰辅酶 A 在查耳酮合酶作用下缩合生成柚皮素查耳酮, 进一步通过查耳酮异构酶催化, 闭环形成柚皮素。柚皮素是生物合成途径的中心中间体, 经甲基化、酰基化、糖基化等修饰进一步转化为黄烷酮、黄酮醇和花青素等柑橘类黄酮成分^[22-24]。多甲氧基黄酮是柑橘属植物典型成分, 川陈皮素可作为柑橘属植物特征性成分, 且陈皮、青皮的化学成分主要以橙皮苷为主, 《中国药典》2020 年版中陈皮、青皮均将橙皮苷作为质控指标, 因此, 橙皮苷、川陈皮素可作为陈皮的特征性成分。橙皮苷和川陈皮素能够调节血脂水平、改善血糖浓度、抑制肥胖^[25-26], 并用于预防餐后高血糖^[27]。橙皮苷还可调节视黄醇结合蛋白 (retinal binding protein, RBP)、皮肤脂肪酸结合蛋白 (cutaneous fatty-acid binding protein, C-FABP) 和心脏型脂肪酸结合蛋白 (heart-type fatty-acid

binding protein, H-FABP) mRNA 表达, 抑制胆固醇的合成和吸收, 改善高胆固醇血症和脂肪肝^[28]。综上, 橙皮苷、川陈皮素为山楂中值得研究的成分。

3.1.5 荷叶 荷叶为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶, 主要富含阿朴菲型苜基异喹啉生物碱。阿朴菲类生物碱的共同生源前体为苯丙氨酸或酪氨酸, 属于苜基异喹啉生物碱。酪氨酸经脱羧、羟基化形成多巴胺, 也经转氨基、脱羧基生成 4-羟基苯乙醛, 再在去甲基乌药碱合酶催化下, 多巴胺和 4-羟基苯乙醛缩合形成苜基异喹啉生物碱的第 1 个前体 *S*-去甲乌药碱; *S*-去甲乌药碱经氧甲基化生成 *S*-乌药碱, 再经氮甲基化、羟基化、氧甲基化生成 *S*-番荔枝碱, 分子内 C-C 苯酚耦合转化成为紫堇块碱, 进一步合成阿朴菲生物碱^[29]; *S*-番荔枝碱也可在小檗碱桥酶的作用下进入小檗碱合成途径^[30]。阿朴菲类生物碱在番荔枝科、防己科、罂粟科、毛茛科、樟科、木兰科和小檗科植物中广泛分布, 荷叶碱、*N*-去甲荷叶碱作为荷叶中含量最丰富的生物碱成分, 在睡莲科莲属植物中的含量远高于其他科属, 且《中国药典》2020 年版中荷叶碱仅用于对荷叶的质量控制, 特征性明显。荷叶的主要活性成分如荷叶碱、*O*-去甲基荷叶碱、*N*-去甲基荷叶碱、去氢荷叶碱、乌药碱等具有调血脂作用^[31], 均为荷叶中值得研究的成分。

综上所述, 本研究基于制剂原药材的生源合成途径的特有性分析与药效两方面筛选得到丹荷颗粒中 15 种特征性成分, 分别为丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、白藜芦醇、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、橙皮苷、川陈皮素、荷叶碱、*O*-去甲基荷叶碱、*N*-去甲基荷叶碱、去氢荷叶碱、乌药碱, 测定其在大鼠体内的暴露量。

3.2 高暴露成分活性及制剂中相关成分含量分析

“有效性”是 Q-Marker 的核心要素, 也是质量控制的最终目的。本研究在前期基础上分析了 15 种特征性成分在大鼠血浆中的暴露量, 发现化学成分群丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、白藜芦醇、橙皮苷、荷叶碱和 *O*-去甲基荷叶碱具有较高的体内暴露量, 有利于丹荷颗粒发挥调血脂作用, 可以作为初步确定的 Q-Marker。

课题组前期采用网络药理学方法, 以实际检测到吸收入血的药源性成分为化学成分源, 发现槲皮素、大黄素、丹酚酸 B、丹参酮 II_A、柚皮素和川陈皮素可作用于固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol

regulatory element binding proteins, SREBP-1c)、SREBP-2、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 等靶点发挥调血脂作用^[1]。

“可测性”是建立质量评价方法和质量标准的必要条件, 需要成分不仅在体内有较高的暴露量, 且在制剂中具有一定的含量^[3]。课题组前期对丹荷颗粒中的 25 个特征成分进行定量分析, 发现其中 16 个成分满足成分“可测性”的要求^[32], 分别为丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸、虎杖苷、大黄素、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芦丁、柚皮苷、金丝桃苷、紫云英苷、没食子酸、槲皮素、绿原酸、橙皮苷、荷叶碱、乌药碱, 其在制剂中的质量分数均大于 0.1 mg/g。将特征性成分在制剂中的质量分数与体内暴露量和网络药理学结果结合, 筛选出制剂中质量分数和体内暴露量较高的 7 个活性成分, 分别为丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、槲皮素、橙皮苷、柚皮苷、荷叶碱, 其在制剂中的质量分数分别为 9.27、3.23、0.38、0.29、7.47、2.56、0.60 mg/g, 均符合 Q-Marker “可测性”的要求。

综上, 本研究依据体内暴露量、高暴露成分活性、制剂中相应成分含量的结果, 通过特征性成分多环节的传递和变化, 筛选制剂中含量较高、体内暴露量较好的特征性成分, 并验证这些成分是与药效相关的活性物质, 最终得出丹酚酸 B、虎杖苷、大黄素、槲皮素、橙皮苷、柚皮苷、荷叶碱可作为丹荷颗粒调血脂的 Q-Marker。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen K, Ma Z, Yan X, *et al.* Investigation of the lipid-lowering mechanisms and active ingredients of Danhe Granule on hyperlipidemia based on systems pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 528.
- [2] 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.
- [3] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. *药学报*, 2019, 54(2): 187-196.
- [4] He J, Feng X, Wang K, *et al.* Discovery and identification of quality markers of Chinese medicine based on pharmacokinetic analysis [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 182-186.
- [5] 马建超, 郭庆梅. 基于药物动力学和多元统计方法解析瓜蒌祛痰止咳相关质量标志物 [J/OL]. *中国实验方*

- 剂学杂志, 2021-04-09. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20211247>.
- [6] 马兆臣, 陈奎奎, 潘琦雪, 等. 丹荷颗粒治疗高脂血症质量标志物发现研究 [J]. 分析测试学报, 2021, 40(1): 43-49.
- [7] Ma X H, Ma Y, Tang J F, *et al.* The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 16235-16254.
- [8] Qi J Y, Yu J, Huang D H, *et al.* Salviaolate reduces murine myocardial ischemia and reperfusion injury via ERK1/2 signaling pathways *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(1): 40-47.
- [9] 王斌. 丹酚酸 B 改善高脂日粮饲喂小鼠抗氧化与免疫功能的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [10] Liu Z Y, Xu J X, Wu X, *et al.* Molecular analysis of UV-C induced resveratrol accumulation in *Polygonum cuspidatum* leaves [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6185.
- [11] Hasan M, Bae. An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 294.
- [12] 王亚运, 张琪. 虎杖苷的药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(5): 989-996.
- [13] 高越, 季倩. 白藜芦醇苷降血脂作用的实验研究 [J]. 药学实践杂志, 2013(4): 280-282.
- [14] 廖海, 周嘉裕. 高等植物蒽醌生物合成途径相关酶及其基因研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11388-11391.
- [15] Bringmann G, Irmer A. Acetogenic anthraquinones: Biosynthetic convergence and chemical evidence of enzymatic cooperation in nature [J]. *Phytochem Rev*, 2008, 7(3): 499-511.
- [16] 吴健虹, 卢留珠, 雷顺俊, 等. 大黄素对膳食诱导的高脂血症大鼠的血脂调节作用及其分子机制 [J]. 激光生物学报, 2019, 28(5): 445.
- [17] 李登科, 马清温, 孙震晓. 大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷药理作用研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(3): 493-497.
- [18] 郭丹丹. 红花黄酮类成分生物合成途径关键基因的特征和功能研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [19] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 50-52.
- [20] Hassan W, Rongyin G, Daoud A, *et al.* Reduced oxidative stress contributes to the lipid lowering effects of isoquercitrin in free fatty acids induced hepatocytes [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 313602.
- [21] 聂龙, 彭磊, 李钰芳, 等. 紫云英苷生物活性及其机制的研究进展 [J]. 热带农业科学, 2020, 40(6): 64-70.
- [22] 单杨, 刘娟, 王振, 等. 生物合成柑橘类黄酮研究进展 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 1-13.
- [23] Zhao C Y, Wang F, Lian Y H, *et al.* Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(4): 566-583.
- [24] Pfeiffer P, Hegedűs A. Review of the molecular genetics of flavonoid biosynthesis in fruits [J]. *Acta Aliment*, 2011, 40(1): 150-163.
- [25] Nichols L A, Jackson D E, Manthey J A, *et al.* Citrus flavonoids repress the mRNA for stearoyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 36.
- [26] Xiong H J, Wang J, Ran Q, *et al.* Hesperidin: A therapeutic agent for obesity [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3855-3866.
- [27] Shen W, Xu Y, Lu Y H. Inhibitory effects of citrus flavonoids on starch digestion and antihyperglycemic effects in HepG2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(38): 9609-9619.
- [28] Wang X H, Hasegawa J, Kitamura Y, *et al.* Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 117(3): 129-138.
- [29] 朱玲平. 荷叶生物碱代谢途径关键基因的挖掘 [D]. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉植物园), 2015.
- [30] Kang J P, Kim Y J, Singh P, *et al.* Biosynthesis of gold and silver chloride nanoparticles mediated by *Crataegus pinnatifida* fruit extract: *In vitro* study of anti-inflammatory activities [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1530-1540.
- [31] 范婷婷. 荷叶生物碱类物质降脂减肥活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [32] 马兆臣, 陈奎奎, 李月婷, 等. 丹荷颗粒 25 种特征性成分 LC-MS 测定及制剂一致性分析 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5970-5979.

[责任编辑 李亚楠]