

基于“功效成分群”动态传递规律的盘龙七片质量标志物（Q-Marker）筛选

刘妍, 赵艳婷¹, 刘妍如^{1*}, 唐志书^{1,2*}, 宋忠兴¹, 游雪莲¹, 周蜜¹, 张德柱³

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

2. 中国中医科学院, 北京 100700

3. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 陕西 商洛 711400

摘要: 目的 基于盘龙七片“祛风除湿”抗炎功效, 通过分析盘龙七片“功效成分群”在“饮片-成药-入血成分”间传递的动态规律, 筛选出质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。方法 采用超高效液相-四极杆-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对盘龙七片化学成分群进行表征, 根据前期网络药理学分析结果, 筛选候选“功效成分群”并以多重反应监测 (MRM) 模式建立同时定量测定方法。进一步通过评估功效成分群在“饮片-成药-入血成分”间转移规律确定“功效成分群”组成, 然后以虚拟分子对接技术筛选候选 Q-Marker, 最后以“成分-体外活性”关联算法分析候选 Q-Marker 与关键靶点的结合活性, 确定能代表盘龙七片“祛风除湿”抗炎作用的 Q-Marker。结果 成分表征鉴定并确定得到 44 个化学成分, 结合网络药理学分析选择其中 24 个成分作为候选“功效成分群”。进一步评估“饮片-成药-入血”间动态传递规律筛选出 7 个转移率较高成分。最后通过分子对接及“成分-活性”关联算法确定了 6 个成分作为盘龙七片“祛风除湿”抗炎功效的 Q-Marker。结论 综合盘龙七片化学成分表征、“饮片-成药-入血”间转移规律、关键靶点结合能力和体外活性关联分析结果, 将去氢木香内酯、龙胆苦苷、木香烯内酯、 β -蜕皮甾酮、迷迭香酸和染料木素 6 个化合物作为盘龙七片 Q-Marker。

关键词: 盘龙七片; 质量标志物; 功效成分群; 祛风除湿; 抗炎; “饮片-成药-入血成分”动态传递规律; 偏最小二乘回归; 去氢木香内酯; 龙胆苦苷; 木香烯内酯; β -蜕皮甾酮; 迷迭香酸; 染料木素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5470-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.010

Screening of Panlongqi Tablets quality markers based on “functional component group” dynamic transmission pattern

LIU Yan¹, ZHAO Yanting¹, LIU Yanru¹, TANG Zhishu^{1, 2}, SONG Zhongxing¹, YOU Xuelian¹, ZHOU Mi¹, ZHANG Dezhu³

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shangluo 711400, China

Abstract: Objective To screen quality markers (Q-Marker) of Panlongqi Tablets (盘龙七片, PT) by analyzing the dynamic law of the transmission of its “functional component group” between “decoction piece-prescription medicine-blood component”, based on its anti-inflammation effects of “dispelling wind and dampness”. **Methods** The UPLC-QTOF-MS/MS technique was used to analyze the chemical constituents of PT, then according to our previous study of network pharmacologic analysis, the “functional component group” was pre-selected. After that, an MRM scan mode of UPLC-MS/MS was employed for the simultaneous quantitative methodology. Moreover, the “functional component group” was selected based on their dynamic transmission pattern in “decoction

收稿日期: 2024-02-11

基金项目: 陕西省科技厅重点产业创新链(群)项目: 基于多维整合分析策略的盘龙七片质量标志物发现与大品种技术提升研究(2020ZDLSF05-08)

作者简介: 刘妍(1999—), 女, 硕士研究生, 专业方向为中药质量控制及物质基础研究。Tel: 18391042885 E-mail: 1134006738@qq.com

*通信作者: 唐志书, 男, 教授, 博士研究生导师, 从事中药资源开发与中药质量分析研究。Tel: (010)64089180 E-mail: tzs6565@163.com

刘妍如(1985—), 女, 博士, 研究生导师, 从事中药质量控制及物质基础研究。Tel: (029)31382207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

piece-prescription medicine-blood component". Furthermore, the the virtual molecular docking technique was used to screen candidate Q-markers. Finally, the combination activity of candidate Q-markers and key targets was analyzed using the "compose-*in vitro* activity" association algorithm to identify Q-markers that can represent the anti-inflammatory effect of PT. **Results** A total of 44 components were characterized and identified. Aline with previously network pharmacologic prediction, 24 components were selected as candidate "functional component group". After "decoction piece-prescription medicine-blood component" transmission analysis, seven components were screened with high transmission rate. Following the molecular docking and "compose-activity" regression calculation, six components were screened as the final Q-Marker that can represent the anti-inflammatory effect of "dispelling wind and dampness" of PT. **Conclusion** Based on the chemical composition characterization of PT, the transfer rule between "decoction piece-prescription medicine-blood component", the binding ability of key targets and the correlation analysis results of *in vitro* activities, the dehydrocostus lactone, gentiopicoside, costunolide, β -ecdysone, rosmarinic acid and genistein were selected as Q-Marker of PT.

Key words: Panlongqi Tablets; Q-Marker; functional component group; dispelling wind and dampness; anti-inflammation; dynamic transmission law of "decoction piece-prescription medicine-blood component"; partial least squares regression; dehydrocostus lactone; gentiopicoside; costunolide; β -yecdysone; rosmarinic acid; genistein

盘龙七片是著名老中医、骨伤科专家王家成老先生所献祖传秘方，由盘龙七、壮筋丹、五加皮等29味中药组成，其具有活血化瘀、祛风除湿、消肿止痛的功效^[1]。临床常用于治疗风湿性关节炎、腰肌劳损、软组织损伤、外伤性骨折等疾病。近年的研究显示，类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis, RA）是盘龙七片目前治疗的主要疾病。盘龙七片曾被《卫生部药品标准中药成方制剂》收载（1998年版第二十册），其中列出了盘龙七片复方组成配比和制法以及性状、鉴别检查，且被中成药治疗类风湿关节炎临床应用指南推荐为治疗RA的临床用药。盘龙七片作为功效相对单一且临床疗效突出的中药复方代表，当前仍然存在一定质量控制方面的问题，《中国药典》2020年版也未收载对盘龙七片的质量控制方法。可见，当前盘龙七片质量控制方法需要进一步提升。因此，本研究根据质量标志物（quality markers, Q-Marker）的研究内涵^[2-6]，从中药成分与功效相关性角度，针对盘龙七片“祛风除湿”抗炎的主要功效，进行盘龙七片Q-Marker筛选。首先采用超高效液相-四极杆-飞行时间质谱联用（UPLC-QTOF-MS/MS）技术对盘龙七片化学成分进行表征，采用UPLC-MS/MS的MRM扫描模式建立化学成分同时定量方法；进一步结合前期网络药理学预测结果，分析候选“功效成分群”从“药材-成药”到“成药-入血”的动态转移情况，从中筛选转移率较高成分。然后采用分子对接技术，评价“功效成分群”与盘龙七片“祛风除湿”抗炎关键靶点的结合活性，最后通过偏最小二乘回归对“功效成分-体外活性”结果进行关联分析，将关联系数较高成分作为Q-Marker，以期为盘龙七片质量控制提

供具有特有性、有效性、传递性的质控指标，保障其质量的有效追踪、溯源。

1 材料与仪器

1.1 试药与试剂

对照品 11-羧基- β -乙酰乳香酸（批号 MUST-21062501, 质量分数98%）、Z-藁本内酯（批号 MUST-22122711, 质量分数98%）、表儿茶素（批号 MUST-21070418, 质量分数98%）、二氢白屈菜红碱（批号 MUST-20121310, 质量分数98%）、络石苷（批号 MUST-21042512, 质量分数98%）、25-S-牛膝甾酮（批号 MUST-21060111, 质量分数98%）、瑞香素（批号 MUST-20112303, 质量分数98%）、羟基红花黄色素A（批号 MUST-18082905, 质量分数98%）、桃叶珊瑚苷（批号 MUST-22092410, 质量分数98%）、迷迭香酸（批号 MUST-20220301, 质量分数97.6%）、鸢尾黄素（批号 MUST-20092209, 质量分数98%）、原阿片碱（批号 MUST-20120511, 质量分数98%）、重楼皂苷I（批号 MUST-21110718, 质量分数98%）、竹节参皂苷IVa（批号 MUST-20102710, 质量分数98%）、表儿茶素（批号 MUST-21070418, 质量分数98%）、二氢白屈菜红碱（批号 MUST-20121310, 质量分数98%）购自成都曼斯特生物科技有限公司；对照品 α -玉柏碱，批号51938-32-0, 质量分数98%，购自上海源叶生物有限公司；对照品 β -蜕皮甾酮（批号 HE078338198, 质量分数98%）、山柰酚（批号 HR1832W2, 质量分数97.9%）、芦丁（批号 HR17513S1, 质量分数98.3%），购自宝鸡辰光生物科技有限公司；对照品阿魏酸（批号 110773-201614, 质量分数97.4%）、姜状三七皂苷R₁（批号 110772-202011, 质量分数97.9%）、丹参酮II_A

(批号 110766-201721, 质量分数 98.5%)、丹酚酸 B (批号 111562-201716, 质量分数 98%)、龙胆苦苣 (批号 110770-201918, 质量分数 98%)、绿原酸 (批号 110753-202018, 质量分数 98.9%)、没食子酸 (批号 110831-201605, 质量分数 98.6%)、木香烃内酯 (批号 110777-201912, 质量分数 98.6%)、去氢木香内酯 (批号 111801-201601, 质量分数 98.4%)、染料木素 (批号 111704-201302, 质量分数 99.3%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号 111801-201602, 质量分数 99%)、隐丹参酮 (批号 110852-200806, 质量分数 98.9%)、鸢尾苷 (批号 MUST-21102204, 质量分数 98.2%)、重楼皂苷 VI (批号 111592-201604, 质量分数 99.4%)、重楼皂苷 VII (批号 111593-201604, 质量分数 98.8%), 购自中国食品药品检定研究院; 对照品苯甲酰乌头原碱 (批号 220001-202101, 质量分数 97.8%)、别隐品碱 (批号 210001-202106, 质量分数 98.5%), 购自广州博越生物科技有限公司; 对照品二氢血根碱 (批号 wkq21082617, 质量分数 97.8%)、断氧化马钱子苷 (批号 wkq-20182611)、木犀草素 (批号 wkq18032905, 质量分数 98.8%)、齐墩果酸 (批号 wkq19030901, 质量分数 98.3%), 购自四川维克奇生物科技有限公司; 对照品松脂醇二葡萄糖苷 (批号 20140618, 质量分数 99.1%) 购自宝鸡市辰光科技有限公司; 对照品乌头碱 (批号 230001-202105, 质量分数 96.9%)、新乌头碱 (批号 240007-202104, 质量分数 97.2%) 购自广州博越生物科技有限公司; 对照品原儿茶酸 (批号 wkq20110807, 质量分数 98%) 购自四川维克奇生物科技有限公司; 人源 PIK3CA Elisa 试剂盒 (批号 202211)、人源 GSK-3 β Elisa 试剂盒 (批号 202301)、人源 AKT3 Elisa 试剂盒 (批号 202301) 购自江苏酶免生物科技有限公司。

甲醇, 分析级, 质量分数 $\geq 99.5\%$, 购自成都市科隆化学品有限公司; 甲酸, 质谱级, 质量分数 $\geq 99.99\%$, 购自赛默飞世尔科技有限公司; 乙腈, 色谱级, 质量分数 $\geq 99.99\%$, 批号 10207-2339, 购自西格玛奥德里奇上海贸易有限公司。

1.2 仪器

Triple TOFTM 5600+型三重四级杆飞行时间质谱仪、AB Sciex 4500 Qtrap 型三重四级杆线性离子阱质谱仪, 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司; Waters Acquity H-Class 型超高效液相色谱, 沃特世科技(上海)有限公司; KQ-300DE 型超声清洗器,

昆山市超声仪器有限公司; Agilent 1290 Infinity II 型高效液相色谱, 安捷伦科技(中国)有限公司; CPA225D 型十万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; Milli-Q 型纯水/超纯水一体化系统, 默克密理博(上海)贸易有限公司; 1510 型全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 样品收集

盘龙七片样品来源于陕西盘龙药业集团股份有限公司, 共 11 批 (S1~S11), 样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	生产日期	批号	编号	生产日期	批号
S1	2021-03-21	20210329	S7	2021-06-24	20210621
S2	2021-05-10	20210506	S8	2021-08-04	20210801
S3	2021-05-14	20210510	S9	2021-08-05	20210802
S4	2021-05-20	20210521	S10	2021-08-06	20210804
S5	2021-05-31	20210530	S11	2021-08-07	20210805
S6	2021-06-11	20210614			

盘龙七片中 29 味饮片均由陕西盘龙药业有限公司提供, 经陕西中医药大学药学院白吉庆教授鉴定, 盘龙七为蓼科大海蓼属植物盘龙七 *Polygonum milletii* Levl. 的干燥根茎, 壮筋丹为石竹科石生蝇子草属植物壮筋丹 *Silene tatarinowwii* Regel 的干燥块根, 五加皮为五加科细柱五加属植物细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 的干燥根皮, 杜仲为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 珠子参为五加科珠子参属植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk) C. Y. Wu et K. M. Feng. 的干燥根茎, 青蛙七为鸢尾科鸢尾属植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的根状茎, 过山龙为葡萄科蛇葡萄属葎叶蛇葡萄 *Ampelopsis humulifolia* Bge. 的干燥根皮, 秦艽为龙胆科龙胆属植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 的干燥根, 木香为菊科毛茛属植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根, 祖司麻为瑞香科瑞香属植物黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche 的干燥茎皮和根皮, 络石藤为夹竹桃科络石属植物络石 *Trachelospermum jasminoides* (Lindl.) Lem. 的干燥带叶藤茎, 川乌为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根, 白毛七为金粟兰科金粟兰属植物多穗金粟兰 *Chloranthus multistachys* Pei. 的干燥根及根茎, 铁棒锤为毛茛科乌头属植物

铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch. 的干燥块根, 草乌为毛茛科乌头属植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根, 老鼠七为罂粟科荷包青花属植物荷包青花 *Hylomecon japonica* (Thunb.) Prantf. 的根和根茎, 支柱蓼为蓼科蓼属植物支柱蓼 *Polygonum suffultum* Maxim. 的根状茎, 红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 没药为橄榄科没药属植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂, 竹根七为百合科开口箭属植物开口箭 *Tupistra chinensis* Baker. 的干燥根茎, 缬草为败酱科缬草属植物缬草 *Valeriana officinalis* Linn. 的干燥根茎及根, 伸筋草为石松科石松属植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb. 的干燥全草, 牛膝为苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的干燥根, 丹参为唇形科丹参属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 羊角七(火焰子)为毛茛科乌头属植物松潘乌头 *Aconitum sungpanense* Hand. -Mazz. 的干燥根, 接骨草(八里麻)为忍冬科接骨木属植物接骨草 *Sambucus chinensis* Lind. 的干燥根, 重楼为百合科重楼属植物云南重楼 *Pairs polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎, 乳香为橄榄科乳香属植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 树皮渗出的树脂。

1.4 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 180~220 g, 由西安交通大学医学部提供, 许可证号: SCXK(陕)2020-001。大鼠饲养于陕西省中医药协同资源中心 SPF 级实验室动物房, 环境温度 (23±2) °C, 湿度 (50±19) %, 12 h 光/暗循环(光照时间 8:00~20:00), 自由进食饮水。本实验所有试验程序均经过陕西中医药大学伦理委员会批准, 批准号: SUCMDL20210429001。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件处理数据。两样本组间数据的比较采用独立样本 *t* 检验, 多样本组间数据的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 中的 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 所有数据均以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 和平均值±标准误 ($\bar{x} \pm e$) 来表示。

2 方法与结果

2.1 盘龙七片化学成分表征

2.1.1 盘龙七片供试品溶液的制备 取本品 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取 0.25 g, 精密称定,

置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min (功率 300 W、频率 30 kHz), 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

2.1.2 对照品储备液的制备 取“1.1”项下各对照品粉末适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成质量浓度为 ng 至 mg 级别的溶液, 即得。

2.1.3 分析条件

(1) 液相条件: 采用 Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱程序为 0~2 min, 0.2% 乙腈; 2~8 min, 12% 乙腈; 8~14 min, 13% 乙腈; 14~24 min, 30% 乙腈; 24~35 min, 45% 乙腈; 35~42 min, 70% 乙腈; 42~46 min, 90% 乙腈; 46~50 min, 0.2% 乙腈; 体积流量为 0.2 mL/min; 进样量 2 μL; 柱温 40 °C。

(2) 质谱条件: 参考前期研究, 离子源为电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI), 正、负离子模式 (ESI^{+/−}) 下, 采用信息依赖采集 (information dependent acquisition, IDA)、动态背景扣除 (dynamic background deduction, DBS) 和高灵敏度模式采集数据。离子扫描范围为 *m/z* 100~2 000, 正、负离子模式下源喷射电压分别为 +5 500 V 和 -4 500 V, 裂解电压 (declustering potential, DP) 为 80 V, 碰撞能量 (collision energy, CE) 为 10 eV, 正、负离子模式下, 雾化气 (ion source gas 1, GS1) 和辅助气 (ion source gas 2, GS2) 为氮气, 均为 344.738 kPa (50 psi), 气帘气 (curtain gas, CUR) 为 241.317 kPa (35 psi), 雾化温度 (temperature, TEM) 500 °C, 数据的获取使用 Analyst TF 软件 (版本 1.7.1, AB Sciex 公司)。

2.1.4 UPLC-Q-TOF-MS/MS 成分表征 取“2.1.1”和“2.1.2”项下制备所得供试品溶液与对照品溶液 (对照品储备液稀释 100 倍), 按照“2.1.3”项下分析条件进样。结合文献检索, 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 获取化合物的精准的分子离子峰和质量数等信息。基于 AB Sciex Master view 1.1 中药成分数据库 (Natural Product HR-MS/MS Spectral Library 1.0), 采用 Peakview 2.2 对数据库获得供试品溶液成分的保留时间、分子离子峰及二级质谱等信息, 初步确定盘龙七片供试品溶液中所含的化学成分, 后取初步确定的化合物的对照品溶液进样分析并匹

表3 盘龙七片成分表征结果 (ESI⁻)

Table 3 Components characterization results of PT (ESI⁻)

峰号	t _R /min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	相对分子质量	分子式	化合物名称	文献	峰号	t _R /min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	相对分子质量	分子式	化合物名称	文献
1	4.46	169.000	125.000	170.021	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	17	12	15.41	549.100	387.000	550.551	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	络石苷	22
2	5.19	152.900	107.900	154.026	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸	18	13	15.95	717.000	519.000	718.153	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	丹酚酸 B	10
3	5.38	353.100	191.100	354.095	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	8,15,18-19	14	16.72	285.000	151.000	286.047	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	23
4	5.99	289.100	108.700	290.079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素	15	15	20.17	269.000	133.000	270.052	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	染料木素	24
5	6.09	289.000	136.900	290.079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素	15	16	22.07	793.400	631.400	794.445	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	竹节参皂苷 IVa	25
6	6.33	176.800	120.900	178.026	C ₉ H ₆ O ₄	瑞香素	20	17	22.49	793.300	569.300	794.445	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	姜状三七皂苷 R ₁	25
7	12.69	609.100	301.100	610.153	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁	19	18	26.71	737.400	59.000	738.419	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₃	重楼皂苷 VI	14
8	13.48	479.300	319.200	480.308	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	25-S-牛膝甾酮	9	19	29.49	853.400	721.200	900.471	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₈	重楼皂苷 I	14
9	13.74	461.200	299.000	462.116	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	鸢尾苷	13	20	39.44	455.400	407.400	456.360	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	齐墩果酸	26
10	14.07	593.100	285.001	594.158	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3-O-芸香糖苷	19	21	44.76	511.300	255.000	512.350	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	11-羧基-β-乙酰乳香酸	27
11	15.01	359.200	160.800	360.084	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸	21								

2.2 盘龙七片功效成分群同时测定方法建立

根据前期网络药理学预测建立的“成分-疾病-靶点”关联网中的核心功效成分，再进行筛选候选“功效成分群”，并以多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式建立同时定量测定方法学^[28]。

2.2.1 液相条件 按“2.1.3 (1)”项液相色谱条件进行测定。

2.2.2 质谱条件 定量分析采用 ESI 正、负离子模式进行扫描，检测模式为 MRM 模式。离子化参数为离子喷雾电压，正离子模式+5 500 V，负离子模式-4 500 V；雾化气 (ion source gas 1, GS1) 和辅助气 (ion source gas 2, GS2) 为氮气，均为 413.685 kPa (60 psi)，气帘气 (CUR) 为 206.843 kPa (30 psi)，离子源温度 550 °C，离子扫描范围为 m/z 100~1 000，扫描速率 200 Da/s。使用 Analyst 1.6.3 软件获取数据，使用 Multi Quant 3.0 软件对数据进行分析。化合物离子对优化的采集参数：去簇电压 (declustering potential, DP)、碰撞能量 (collision energy, CE) 和碰撞池出口电压 (collision cell exit potential, CXP) 等信息见表 4。

2.2.3 系统适用性考察 按“2.1.3”项下色谱条件，将混合对照品溶液、供试品溶液分别进样 2 μL 进行色谱分析。空白样品、混合对照品溶液和供试品溶液图谱结果显示各成分分离度符合测定要求，说明系统适应性良好，结果见图 2。

2.2.4 线性关系考察、检出限和定量限 按“2.1.3 (1)”项下色谱条件，精密吸取“2.1.1”项下混合对

照品储备液，按 9 个质量浓度梯度体积稀释，同体积 2 μL 进样，进行色谱分析。以对照品的峰面积为纵坐标 (Y)，进样溶液质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准工作曲线，且 X 和 Y 线性关系良好。以空白样品为检测对象，添加不同体积的混合对照品溶液，按照选定的最优分析条件进行测定并分别计算检出限 (LOD, S/N≥3) 和定量限 (LOQ, S/N≥10)，具体 44 种化合物的线性方程、r、线性范围、检出限和定量限见表 5。

2.2.5 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1) 按“2.1.3”项下方法连续测定 6 次，记录峰面积。结果显示正离子模式下各成分峰面积 RSD 值为 0.18%~2.99%，负离子模式下各成分峰面积 RSD 值为 0.89%~2.96%，结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S1)，分别于制备后 2、4、6、8、12、24 h，按“2.1.3”项下方法进样测定，记录峰面积。结果显示正离子模式下各成分峰面积 RSD 值为 0.38%~2.87%，负离子模式下各成分峰面积 RSD 值为 0.48%~2.95%，结果表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品 (S1)，制备 6 份供试品溶液，精密吸取各供试品溶液，按“2.1.3”项下方法进行测定，记录峰面积并计算质量分数。结果显示，正离子模式下各成分质量分数 RSD 值为 0.69%~2.96%，负离子模式下各成分质量分数 RSD 值为 0.19%~2.99%，结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密称取同一批已测定各成分含量的盘龙七片样品 (S1) 粉末，平行称取 6

表 4 盘龙七片中 44 种化合物 MRM 参数

Table 4 Optimized MS parameters for 44 components from PT

编号	名称	t _R /min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V	离子模式	编号	名称	t _R /min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	CE/eV	CXP/V	离子模式
1	羟基红花黄色素 A	5.47	613.000	451.000	109.8	18.8	11.00	ESI ⁺	23	松脂醇二葡萄糖苷	43.22	683.400	353.300	71.0	17.4	3.90	ESI ⁺
2	α-玉柏碱	6.02	275.100	244.100	95.7	29.2	8.70	ESI ⁺	24	没食子酸	4.03	169.000	125.000	-105.0	-19.0	-13.00	ESI ⁻
3	阿魏酸	7.16	195.000	177.000	68.8	13.0	5.20	ESI ⁺	25	原儿茶酸	4.59	152.900	107.900	-52.9	-27.4	-8.20	ESI ⁻
4	龙胆苦苷	7.22	357.200	148.900	119.9	28.4	5.10	ESI ⁺	26	绿原酸	5.53	353.100	191.100	-50.5	-19.0	-6.40	ESI ⁻
5	山柰酚	12.90	287.101	153.100	120.3	42.1	8.00	ESI ⁺	27	儿茶素	5.56	289.100	108.700	-85.9	-31.3	-21.20	ESI ⁻
6	β-蜕皮甾酮	13.02	481.300	445.200	99.0	20.0	14.00	ESI ⁺	28	表儿茶素	5.58	289.000	136.900	-84.1	-24.5	-15.90	ESI ⁻
7	原阿片碱	13.46	354.100	188.100	95.0	40.0	5.00	ESI ⁺	29	瑞香素	11.11	176.800	120.900	-77.8	-30.6	-9.20	ESI ⁻
8	别隐品碱	14.23	370.100	188.100	99.4	37.2	9.00	ESI ⁺	30	芦丁	12.04	609.100	301.100	-107.8	-38.0	-5.77	ESI ⁻
9	断氧化马钱子苷	14.65	405.100	397.100	5.3	11.2	41.00	ESI ⁺	31	25-S-牛膝甾酮	13.01	479.300	319.200	-180.0	-36.0	-13.00	ESI ⁻
10	苯甲酰乌头原碱	15.69	604.300	572.300	24.0	45.0	13.00	ESI ⁺	32	鸢尾苷	13.17	461.200	299.000	-180.0	-18.0	-13.00	ESI ⁻
11	新乌头碱	17.99	632.130	572.200	24.6	45.7	6.10	ESI ⁺	33	山柰酚-3-O-芸香糖苷	13.33	593.100	285.001	-151.9	-40.4	-4.90	ESI ⁻
12	乌头碱	19.34	646.400	586.300	17.1	45.4	16.00	ESI ⁺	34	迷迭香酸	14.51	359.200	160.800	-90.0	-20.0	-13.00	ESI ⁻
13	鸢尾黄素	20.17	301.100	286.000	52.0	26.0	13.00	ESI ⁺	35	络石苷	14.85	549.100	387.000	-81.4	-16.3	-13.00	ESI ⁻
14	重楼皂苷 VII	25.82	739.400	721.400	197.1	21.1	27.10	ESI ⁺	36	丹酚酸 B	15.33	717.000	519.000	-90.0	-27.0	-11.00	ESI ⁻
15	桃叶珊瑚苷	28.73	347.000	328.900	264.1	11.0	10.90	ESI ⁺	37	染料木素	16.46	269.000	133.000	-70.6	-39.0	-9.00	ESI ⁻
16	Z-藜本内酯	28.84	191.001	77.000	70.4	56.6	12.20	ESI ⁺	38	木犀草素	18.04	285.000	151.000	-101.2	-35.0	-11.50	ESI ⁻
17	木香烃内酯	29.66	233.100	187.000	65.0	15.0	7.00	ESI ⁺	39	姜状三七皂苷 R ₁	22.33	793.300	569.300	-150.0	-65.0	-15.00	ESI ⁻
18	去氢木香内酯	30.32	231.100	185.100	110.0	17.0	9.00	ESI ⁺	40	竹节参皂苷 IV _a	22.35	793.400	631.400	-130.0	-77.0	-14.00	ESI ⁻
19	二氢白屈菜红碱	33.27	350.137	334.106	70.0	35.0	13.00	ESI ⁺	41	重楼皂苷 VI	26.81	737.400	59.000	-141.1	-103.5	-8.90	ESI ⁻
20	丹参酮 II _A	34.11	293.000	265.300	105.0	40.0	13.00	ESI ⁺	42	重楼皂苷 I	31.76	853.400	721.200	-175.0	-41.6	-20.50	ESI ⁻
21	二氢血根碱	34.54	334.100	318.075	92.0	44.0	13.00	ESI ⁺	43	齐墩果酸	39.75	455.400	407.400	-206.9	-54.5	-12.00	ESI ⁻
22	隐丹参酮	35.78	294.900	267.000	120.0	38.0	13.00	ESI ⁺	44	11-羰基-β-乙酰乳香酸	43.65	511.300	255.000	-10.6	-16.1	-16.80	ESI ⁻

份，分别加入适量对照品，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法检测进行含量测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，正负离子模式下各成分加样回收率结果平均加样回收率均大于 95%，RSD 值均小于 3%。

2.2.9 多组分含量测定结果 取 11 批盘龙七片样品，分别制备 3 份供试品溶液，精密吸取对照品和供试品溶液 2 μL，UPLC-Q-TOF-MS/MS 进行测定，并记录峰面积。含量检测结果选取不同化合物响应更好的模式下的峰面积进行含量计算分析，结果见表 6。

2.3 功效成分群“饮片-成药-入血”传递规律分析

2.3.1 组方饮片供试品溶液制备

(1) 样品与对照品溶液：取“2.1.1”和“2.1.2”项下制备所得样品与对照品。

(2) 组方饮片供试品溶液：取各味饮片粉末精密称量 0.25 g，放置于 100 mL 锥形瓶中，加入 70% 甲醇 50 mL，超声处理 30 min（功率 300 W、频率

30 kHz），随后用 70% 甲醇补足减少的质量，混合均匀后取续滤液，过 0.22 μm 滤膜，作为组方饮片供试品溶液。

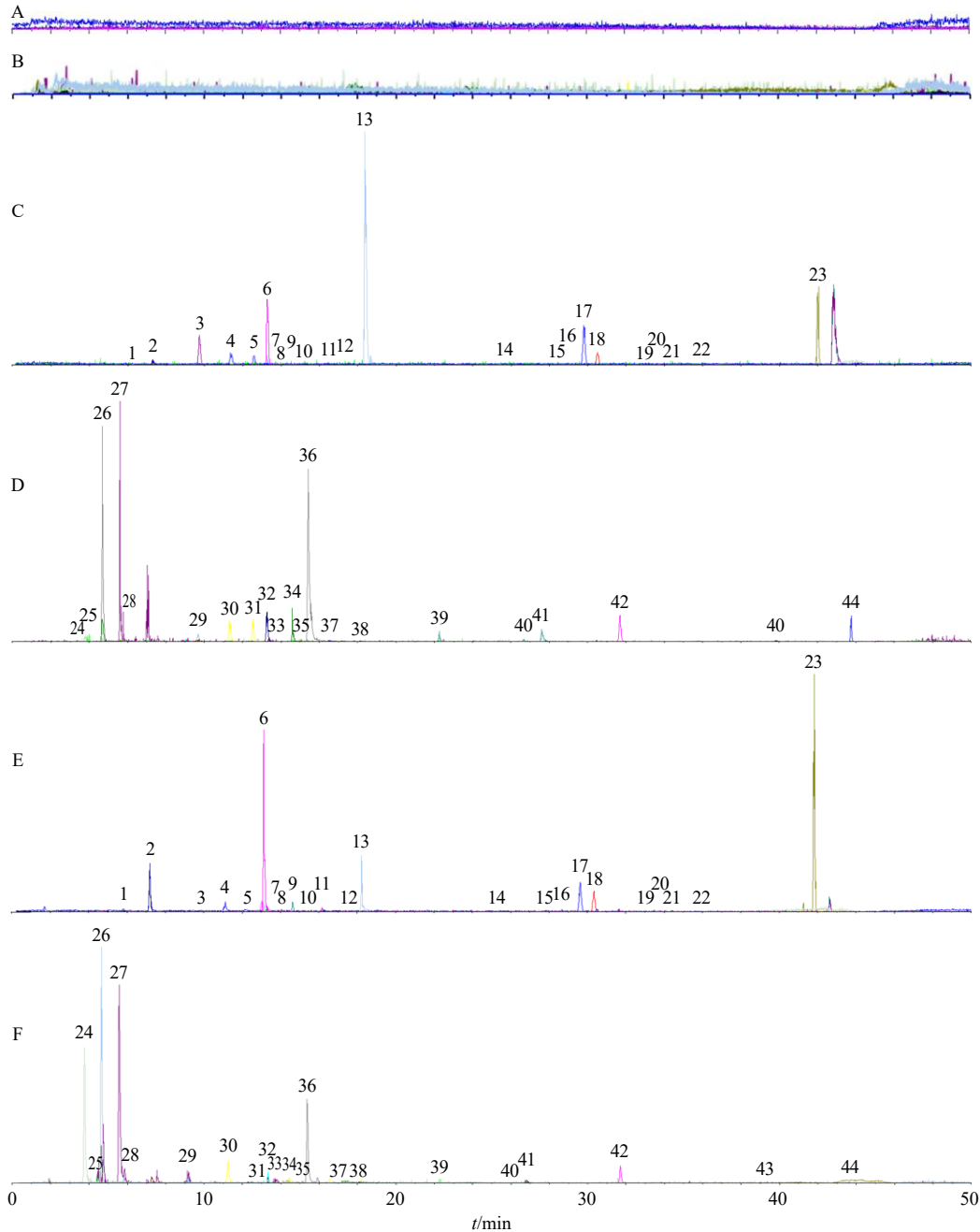
2.3.2 “饮片-成药”转移率计算 取组方 29 味原饮片供试品溶液和盘龙七片成药制备的供试品溶液，按“2.1.3”项下方法检测，对比分析各种成分从原饮片到盘龙七片内容物的移行情况。11 批盘龙七片各成分“饮片-成药”转移率及来源饮片见表 7。结果显示 44 个成分中转移率大于 30% 的成分有 24 个。其中转移率较高的是木香中的木香烃内酯、去氢木香内酯和杜仲中的松脂醇二葡萄糖苷。

$$\text{转移率} = B / (A / 900) \tag{1}$$

A 为盘龙七片复方中 29 味药材中某成分的总量，B 为盘龙七片中某成分含量，900 为盘龙七片复方中所有饮片总质量

2.4 “成药-入血”转移率分析

为了进一步筛选与盘龙七片 Q-Marker，建立佐剂性关节炎（adjuvant arthritis, AA）大鼠模型，模拟盘龙七片的功效成分在 RA 状态下的血中移行情



A-空白样品 (ESI⁺); B-空白样品 (ESI⁻); C-混合对照品 (ESI⁺); D-混合对照品 (ESI⁻); E-盘龙七片 (ESI⁺); F-盘龙七片 (ESI⁻)。 A-blank solution (ESI⁺); B-blank solution (ESI⁻); C-mixed reference solution (ESI⁺); D-mixed reference solution (ESI⁻); E-PT sample solution (ESI⁺); F-PT sample solution (ESI⁻)。

图2 盘龙七片功效成分群 MRM 提取离子流图

Fig. 2 MRM chromatograms of blank solution (A, B), mixed reference solution (C, D) and PT sample solution (E, F)

况^[29]。选取 SD 大鼠 12 只, 随机分为空白组和给药组, 每组 6 只, 给药剂量参考临床给药剂量 (0.32 g/kg), 给药组给予盘龙七片溶液 (0.1 g/mL, 生理盐水溶解), 空白组给予同体积生理盐水。给药后分别在 5、10、15、30 min 及 1.0、1.5、2.0、24.0 h 后对 2 组大鼠从眼眶取血 0.5 mL/次, 制备大鼠血浆样品。萃取液为水-甲醇 (20 : 80), 于 -80 °C 预冻 30 min。

按 1 : 3 比例加入萃取液 (200 μL 血浆 + 600 μL 萃取液), 涡旋 15 s, 于 4 °C 冰箱静置 4 h 后, 12 000 r/min, 离心 10 min (4 °C)。取含有代谢物的上清液 600 μL, 将 600 μL 的上清液分装至 3 个 EP 管中, 每管 200 μL 进样。取空白及给药后大鼠血浆样品按“2.3.2”项下方法检测分析, 计算各时间点下血浆中各原型成分含量, 并根据公式 (2) 计算分析样品从

表5 44种化合物的线性方程、 r 、线性范围、检出限和定量限

Table 5 Linearity, regressions coefficients, limits of quantification, limits of detection of 44 standards

成分	化合物	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	Z-藜本内酯	$Y=510\ 410 X-1\ 319.3$	0.999 9	$1.10\times 10^{-4}\sim 4.50\times 10^{-4}$	5.93×10^{-4}	2.38×10^{-3}
2	桃叶珊瑚苷	$Y=338.9 X-25\ 682$	0.999 9	184.00~472.00	27.00	36.02
3	断氧化马钱苷	$Y=5\ 003.5 X-49\ 923$	0.999 9	29.70~122.00	9.68	15.62
4	龙胆苦苷	$Y=25\ 416 X-435\ 854$	0.999 9	82.00~337.00	0.85	1.70
5	重楼皂苷 VII	$Y=24\ 803 X-571.8$	0.999 9	0.78~3.19	4.81×10^{-3}	0.385
6	别隐品碱	$Y=2\times 10^6 X-2\ 260.7$	0.999 9	$3.70\times 10^{-3}\sim 0.015\ 0$	3.00×10^{-6}	3.50×10^{-6}
7	苯甲酰乌头原碱	$Y=53\ 185 X-1\ 461.1$	0.999 9	0.057 2~0.24	6.67×10^{-5}	0.146
8	阿魏酸	$Y=57\ 419 X+156\ 513$	0.999 9	1.90~7.60	2.75×10^{-3}	0.027 5
9	β -蜕皮甾酮	$Y=400\ 728 X-61\ 220$	0.999 9	0.44~1.82	3.40×10^{-4}	1.70×10^{-3}
10	α -玉柏碱	$Y=746\ 171 X-2\ 672.1$	0.999 9	$4.84\times 10^{-3}\sim 0.019\ 9$	8.01×10^{-3}	5.85×10^{-3}
11	山柰酚	$Y=2\ 100 X-144.86$	0.999 9	0.19~0.57	2.06×10^{-3}	0.448
12	去氢木香内酯	$Y=543\ 392 X-107\ 382$	0.999 9	1.42~5.84	3.20×10^{-5}	6.40×10^{-5}
13	羟基红花黄色素 A	$Y=6\times 10^6 X-1\ 667.1$	0.999 9	0.045 2~0.19	0.090 0	0.183
14	二氢血根碱	$Y=1.67\times 10^6 X-25\ 200$	0.999 9	0.016~0.064	1.87×10^{-6}	4.50×10^{-5}
15	二氢白屈菜红碱	$Y=5.98\times 10^6 X+3\ 490$	0.999 9	$4.79\times 10^{-3}\sim 0.019\ 7$	1.28×10^{-5}	1.70×10^{-4}
16	原阿片碱	$Y=4\times 10^6 X-17\ 718$	0.999 9	$5.00\times 10^{-3}\sim 0.020\ 3$	5.50×10^{-3}	0.010 3
17	木香炔内酯	$Y=1\ 731.7 X+122\ 866$	0.999 9	75.00~308.00	2.11×10^{-3}	7.03×10^{-3}
18	鸢尾黄素	$Y=117\ 031 X+69\ 589$	0.999 9	2.21~9.09	1.82×10^{-3}	0.018 2
19	隐丹参酮	$Y=1\ 874.6 X-109.45$	0.999 9	0.62~2.30	3.87×10^{-3}	0.077 4
20	新乌头碱	$Y=817\ 344 X-794.96$	0.999 9	$1.49\times 10^{-3}\sim 6.14\times 10^{-3}$	1.50×10^{-3}	5.27×10^{-3}
21	乌头碱	$Y=876\ 240 X-630.54$	0.999 9	$1.80\times 10^{-3}\sim 7.40\times 10^{-3}$	4.50×10^{-4}	4.50×10^{-3}
22	丹参酮 II _A	$Y=28.315 X-135.24$	0.999 9	7.37~30.30	8.62	11.80
23	松脂醇二葡萄糖苷	$Y=5\ 155 X-537\ 487$	0.999 9	400.00~1 645.00	1.70×10^{-4}	3.40×10^{-4}
24	11-羰基- β -乙酰乳香酸	$Y=4\ 496.8 X-830\ 177$	0.999 9	293.22~1 204.68	4.25×10^{-6}	8.50×10^{-6}
25	姜状三七皂苷 R ₁	$Y=1\ 028.4 X+28\ 000$	0.999 9	18.02~74.04	0.47	0.93
26	络石苷	$Y=44.961 X+972.04$	0.999 9	8.87~36.43	5.23	10.47
27	齐墩果酸	$Y=478.08 X-127.32$	0.999 9	2.99~12.30	1.65	3.50
28	绿原酸	$Y=85\ 320 X-24\ 918$	0.999 9	3.25~13.35	1.30×10^{-4}	4.29×10^{-4}
29	25-S-牛膝甾酮	$Y=2\ 644.9 X-2\ 898.6$	0.999 9	1.92~8.79	1.55	5.45
30	重楼皂苷 I	$Y=50\ 084 X+3\ 947.7$	0.999 9	1.65~6.8	9.00×10^{-3}	0.054 0
31	原儿茶酸	$Y=357\ 636 X+25\ 195$	0.999 9	1.18~4.86	4.40×10^{-3}	0.044 0
32	重楼皂苷 VI	$Y=5\ 970.7 X-19.104$	0.999 9	0.80~3.29	0.012 6	0.126
33	芦丁	$Y=159\ 250 X-1\ 312.4$	0.999 9	0.03~0.12	2.00×10^{-3}	0.020 5
34	竹节参皂苷 IV _a	$Y=3\ 092.8 X+3\ 086.4$	0.999 9	1.62~10.64	2.28	2.66
35	山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=429\ 206 X-8\ 275.2$	0.999 9	0.08~0.33	6.67×10^{-3}	0.020 0
36	表儿茶素	$Y=9\ 078.5 X-114.77$	0.999 9	0.03~0.13	0.04	0.28
37	儿茶素	$Y=4\ 864.9 X-2\ 649.5$	0.999 9	0.86~3.52	0.08	0.32
38	木犀草素	$Y=2\ 120.3 X-606.39$	0.999 9	0.93~3.82	0.038 4	0.071 9
39	染料木素	$Y=72\ 419 X-197.58$	0.999 9	0.24~1.0	2.44×10^{-5}	4.88×10^{-5}
40	丹酚酸 B	$Y=17\ 615 X-73\ 496$	0.999 9	17.88~73.44	0.26	1.00
41	瑞香素	$Y=577\ 694 X-917.61$	0.999 9	0.007~0.032	1.85×10^{-5}	0.070 0
42	迷迭香酸	$Y=919\ 272 X-77\ 669$	0.999 9	0.22~0.89	0.012 0	0.044 0
43	没食子酸	$Y=381\ 742 X-191\ 671$	0.999 9	0.93~3.81	1.00×10^{-4}	0.829
44	鸢尾苷	$Y=46\ 257 X-22\ 033$	0.999 9	2.67~10.96	7.50×10^{-6}	0.045 0

表6 盘龙七片中44个成分同时定量测定结果
Table 6 Simultaneous quantification results for 44 components of PT

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	松酯醇二 葡萄糖苷	隐丹参酮	桃叶珊瑚苷	去氢木香 内酯	断氧化 马钱苷	重楼皂苷 VII	龙胆苦苷	丹参酮 II _A	阿魏酸	木香炔 内酯	二氢白屈 菜红碱
S1	228 178.41	299.81	52 920.13	703.06	16 766.09	428.25	31 876.21	1 672.16	882.23	33 212.79	1.45
S2	87 964.19	438.73	31 448.54	673.25	16 118.76	251.91	37 924.87	1 730.01	816.47	31 736.61	2.63
S3	75 194.78	138.73	20 709.14	558.65	13 867.64	337.02	31 966.15	1 543.38	731.12	27 434.84	2.56
S4	113 949.85	439.64	47 552.98	753.47	11 459.97	224.34	39 333.00	2 940.77	798.77	30 809.51	1.60
S5	127 871.29	437.73	29 337.87	481.22	12 653.76	334.46	39 448.65	5 475.41	909.75	26 424.24	2.46
S6	26 351.50	145.95	29 147.44	480.71	9 348.67	318.29	43 927.63	2 120.27	907.57	28 984.93	2.65
S7	51 894.90	136.46	39 883.76	444.49	10 861.30	245.78	33 115.23	2 520.27	697.14	21 555.00	1.85
S8	157 758.20	301.88	40 648.32	554.00	11 245.28	268.60	35 050.41	1 705.32	662.06	26 331.16	2.02
S9	91 952.65	136.74	57 524.32	527.62	9 145.07	234.56	38 523.36	1 680.64	825.39	28 503.30	1.98
S10	104 381.76	619.18	32 980.53	413.04	13 015.11	269.96	15 964.87	1 680.64	422.16	21 334.49	2.43
S11	214 411.43	576.50	60 595.43	407.89	10 539.94	241.36	16 868.51	1 670.59	428.79	23 478.55	2.32

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	山柰酚	二氢血根碱	别隐品碱	β -蜕皮 甾酮	原阿片碱	鸢尾黄素	苯甲酰乌 头原碱	羟基红花 黄色素 A	α -玉柏碱	Z-藁本 内酯	新乌头碱
S1	105.60	0.43	0.90	260.73	1.60	1 670.20	17.99	2.81	2.26	4.38	0.30
S2	98.36	0.58	2.07	223.72	3.08	1 432.39	24.07	10.35	2.14	4.66	0.58
S3	84.92	0.40	2.73	236.32	3.32	1 203.71	17.29	10.35	3.70	2.90	0.46
S4	81.26	0.56	2.96	207.38	3.73	1 209.92	30.61	14.98	1.79	8.85	0.68
S5	63.66	0.57	2.57	267.64	3.11	1 329.26	36.11	16.86	3.67	4.95	0.64
S6	60.63	0.75	2.20	302.93	4.03	1 422.95	28.28	22.37	3.42	3.10	0.60
S7	60.01	0.59	1.55	100.57	1.42	1 305.50	26.41	29.75	1.03	3.23	0.83
S8	53.21	0.96	1.79	209.29	1.15	1 298.04	22.90	25.67	1.14	3.17	0.35
S9	45.85	0.63	1.08	267.23	1.45	1 261.29	27.57	25.67	1.23	3.48	0.47
S10	43.55	0.84	1.19	285.30	1.06	1 249.37	15.42	13.11	1.06	3.39	0.85
S11	41.16	0.79	1.01	160.48	1.21	1 023.31	15.42	29.20	1.29	3.27	1.13

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	乌头碱	11-羧基- β - 乙酰乳香酸	重楼皂苷 I	重楼皂苷 VI	瑞香素	原儿茶酸	鸢尾苷	儿茶素	没食 子酸	迷迭 香酸	染料木素
S1	0.41	180 285.91	638.44	377.26	22.30	363.12	1 056.30	585.21	288.12	51.52	6.56
S2	0.55	67 040.35	620.13	249.43	30.35	406.96	1 073.49	591.57	380.67	97.83	9.44
S3	0.43	261 577.04	878.04	372.92	47.07	284.58	1 038.92	303.16	339.18	54.69	8.06
S4	1.23	32 071.47	941.04	260.06	47.07	308.44	1 112.05	592.78	478.70	89.26	6.39
S5	1.09	284 420.89	1 135.27	513.72	20.88	288.25	1 372.18	576.65	556.53	101.98	3.52
S6	1.44	30 687.67	1 235.30	258.67	57.79	321.72	1 186.89	598.57	688.81	68.64	12.32
S7	1.25	343 573.32	1 167.72	394.12	29.94	310.82	1 091.98	363.15	548.18	73.73	7.57
S8	7.53	284 375.87	913.24	377.88	26.69	331.60	994.66	580.15	410.65	73.79	8.42
S9	1.03	254 481.63	965.11	345.57	32.95	292.98	927.42	347.72	438.32	68.58	4.53
S10	0.91	102 376.27	720.03	627.99	27.52	285.98	1 126.25	599.50	262.25	76.45	8.82
S11	0.61	95 931.66	250.14	67.75	24.37	275.09	1 175.90	367.55	284.00	92.17	5.35

表 6 (续)

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	25-S-牛膝甾酮	木犀草素	姜状三七皂苷 R ₁	齐墩果酸	丹酚酸 B	竹节参皂苷 IVa	绿原酸	络石苷	芦丁	山柰酚-3-O-芸香糖苷	表儿茶素
S1	754.03	27.09	5 894.95	775.78	4 317.84	769.41	804.96	6 548.00	13.90	25.63	7.28
S2	798.47	29.15	5 873.15	911.45	7 157.54	833.99	1 174.74	3 556.53	10.86	32.27	14.51
S3	887.23	27.23	7 409.67	784.34	6 233.38	1 095.19	829.55	4 850.70	14.15	39.06	19.79
S4	443.58	28.05	6 850.24	775.70	9 393.29	982.23	959.24	4 851.60	9.18	40.85	23.56
S5	510.24	38.22	6 796.17	881.09	10 045.03	1 177.93	1 746.02	6 548.73	14.01	48.56	9.96
S6	887.35	29.71	6 926.18	919.35	8 550.07	1 020.97	804.91	7 033.71	15.67	45.29	23.08
S7	665.44	22.41	7 995.64	1 172.26	9 610.19	1 345.54	856.60	2 668.58	16.97	46.98	11.77
S8	587.86	25.85	7 620.89	1 037.39	8 910.22	1 053.29	1 342.24	2 548.26	15.23	48.71	13.58
S9	488.02	24.06	7 642.59	1 054.25	7 346.40	1 038.20	1 423.94	2 335.94	13.70	40.14	13.61
S10	776.36	24.07	5 037.23	902.49	8 705.77	965.08	1 494.13	2 182.48	14.29	49.23	23.60
S11	676.59	23.52	7 088.82	987.02	10 280.55	934.97	1 169.48	1 864.81	15.99	58.11	14.51

表 7 24 个成分“饮片-成药”转移率结果

Table 7 Transmission rate of “decoction piece-prescription medicine” for 24 components

序号	成分	“饮片-成药”转移率/%	来源药材	序号	成分	“饮片-成药”转移率/%	来源药材
1	去氢木香内酯	98.24	木香	13	没食子酸	94.11	盘龙七、过山龙、支柱蓼
2	松脂醇二葡萄糖苷	96.39	杜仲	14	染料木素	93.43	杜仲
3	木香炔内酯	93.13	木香	15	鸢尾苷	90.00	青蛙七
4	二氢血根碱	83.85	老鼠七	16	重楼皂苷 I	79.98	重楼
5	阿魏酸	71.49	当归、秦艽、丹参	17	络石苷	66.10	络石藤
6	鸢尾黄素	68.00	青蛙七	18	11-羧基- β -乙酰乳香酸	60.49	乳香
7	龙胆苦苷	61.83	秦艽	19	绿原酸	50.23	盘龙七、缬草、支柱蓼
8	隐丹参酮	59.24	丹参	20	瑞香素	47.04	祖司麻
9	断氧化马钱子苷	48.70	秦艽	21	迷迭香酸	46.64	丹参
10	苯甲酰乌头原碱	42.57	川乌、草乌、铁棒锤	22	齐墩果酸	39.32	八里麻、过山龙、铁棒锤
11	β -蜕皮甾酮	39.36	牛膝、重楼、壮筋丹	23	山柰酚-3-O-芸香糖苷	37.80	红花、当归、丹参
12	木犀草素	95.48	缬草、盘龙七	24	芦丁	33.15	盘龙七、竹根七、缬草

盘龙七片到大鼠血浆中移行成分情况。

$$F=A/D \quad (2)$$

F 为入血转移率, A 为进入体循环的药量, D 为服药剂量

不同时间血中成分移行结果显示, 在血液中检测到盘龙七片中的 44 种主要活性成分中的 24 种原型成分。分析结果显示阿魏酸、龙胆苦苷、绿原酸在给药 10 min 后血药浓度最大; 齐墩果酸、表儿茶素、儿茶素以及原儿茶酸在给药 15 min 后血药浓度最大; 桃叶珊瑚苷、木香炔内酯、丹参酮 II_A、乌头碱、新乌头碱、重楼皂苷 VII、染料木素、丹酚酸 B、山柰酚-3-O-芸香糖苷、鸢尾苷在给药 30 min 后血药浓度最大; 去氢木香内酯、蜕皮甾酮、木犀草素、芦丁、重楼皂苷 I、重楼皂苷 VI、山柰酚、瑞香素、

原阿片碱、竹节参皂苷 IVa、 α -玉柏碱在给药 1 h 后血药浓度最大; 断氧化马钱子苷、羟基红花黄色素 A、没食子酸、络石苷、迷迭香酸在给药 90 min 后血药浓度最大; 松脂醇二葡萄糖苷、11-羧基- β -乙酰乳香酸在给药 2 h 后血药浓度最大。

“成药-入血”转移率计算结果(表 8)显示, “饮片-成药”转移率较高的 24 个化合物中有 7 个化合物(木香炔内酯、龙胆苦苷、迷迭香酸、染料木素、没食子酸、去氢木香内酯、 β -蜕皮甾酮)入血转移率较高, 将这 7 个化合物选定为“功效成分群”。

2.5 虚拟分子对接

基于前期研究计算得到的盘龙七片“祛风除湿”抗炎作用的关键蛋白(GSK-3 β 、PI3KCA、AKT3),

表 8 候选 Q-Marker 分子对接打分结果

Table 8 Molecular docking results for candidate Q-Marker

名称	“药材-成药” 血药浓度达 C _{max}		分子对接打分		
	转移率/%	时生物利用度/%	GSK-3β	PIK3CA	AKT3
木香烃内酯	93.13	2.98	-7.428	-6.718	-5.422
龙胆苦苷	61.83	5.05	-6.827	-7.021	-5.603
迷迭香酸	46.64	9.49	-7.573	-6.231	-4.967
染料木素	93.43	93.29	-7.986	-7.777	-5.152
没食子酸	94.11	1.87	-4.913	-5.837	-1.957
去氢木香内酯	98.24	1.66	-7.081	-6.316	-5.433
β-蜕皮甾酮	39.36	1.96	-5.570	-4.098	-3.684

使用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 对关键蛋白搜索, 然后下载 3D 结构文件, 同时利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性化合物的 3D 结构文件^[28]。使用 Schrödinger2021 软件的 Protein Preparation wizard 模块对蛋白进行预处理, 以蛋白共结晶配体为空间坐标参考, 未有配体的采用 Sit Map 板块预测参考空间坐标, 使用 Receptor Grid Generation 模块生成 Grid 文件; 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载盘龙七片中活性成分配体的 SDF 文件, 经 LigPrep 模块处理后, 采用 Glide 模块对上述 7 个成分与关键靶点的结合程度进行打分评价, 对接结果显示见表 8。综合 3 个靶点对接打分结果, 将木香烃内酯、龙胆苦苷、迷迭香酸、染料木素、没食子酸、去氢木香内酯和 β-蜕皮甾酮 7 个化合物选定为候选 Q-Marker 组。

2.6 体外活性评价

将各批次盘龙七片醇提液冷冻干燥, 备用。按照 GSK-3β、PIK3CA、AKT3 的 ELISA 试剂盒使用说明分别配制溶液。称取制备得到的盘龙七片冻干粉适量, 加样品稀释液溶解为 0.5 mg/mL 的母液, 用样品稀释液将母液分别稀释为不同比例, 经最佳取样浓度摸索之后, 选择 0.1 mg/mL 为最佳上样质量浓度。取中间浓度的标准品作为与饮片提取

液结合的载体蛋白, 在 96 孔板上先准确加入 25 μL 标准品, 然后再分别加入各批次 25 μL 饮片稀释液, 晃动混匀。用封板膜封板后, 37 °C 条件孵育 20 min, 使蛋白与饮片充分结合后作为供试品溶液。将标准品和各批次饮片稀释液分别加样 50 μL 作为对照, 按照 ELISA 试剂盒使用说明书进行操作, 于 96 孔板酶标仪 450 nm 测定 A 值。每份样品平行测定 3 次, 取平均值, 代入标准曲线的直线回归方程式计算样品质量浓度。根据公式 (3) 计算蛋白抑制率。

$$\text{蛋白抑制率} = 1 - A_1 / (A_2 + A_3) \quad (3)$$

A₁ 为饮片与蛋白等体积孵育吸光度值, A₂ 为蛋白与 1 倍体积 PBS 缓冲液孵育吸光度值, A₃ 为饮片与 1 倍体积 PBS 缓冲液孵育吸光度值

各批次盘龙七片体外活性结果见表 9。结果显示, 11 个批次中 S6 批样品对 3 个关键蛋白的表达抑制能力最强, S5 与 S1 次之。

2.7 “候选 Q-Marker-体外活性” 关联分析

将上述候选 Q-Marker 含量测定数据、对靶点抑制率数据导入 Simca-p14.1 软件进行 PLS 关联分析。标准化预处理数据后, 以前 2 个主成分建立 PLS 回归模型。以变量投影重要指标 (variable importance in projection, VIP) 描述各成分对体外生物活性的影响程度。进一步以 Correlation matrix 模块对“候选 Q-Marker 组-体外活性”进行关联分析。综合 VIP > 1 和相关系数结果确定 Q-Marker。结果 (表 10) 显示, VIP > 1 的化合物有: 去氢木香内酯 (GSK-3β, VIP 1.445 76; PIK3CA, VIP 1.417 36; AKT3, VIP 1.310 31), 龙胆苦苷 (GSK-3β, VIP 1.473 40; PIK3CA, VIP 1.435 52; AKT3, VIP 1.460 96), 木香氢内酯 (GSK-3β, VIP 1.562 86; PIK3CA, VIP 1.547 76; AKT3, VIP 1.471 21), β-蜕皮甾酮 GSK-3β, VIP 1.539 45; PIK3CA, VIP 1.293 33; AKT3, VIP 1.483 17), 迷迭香酸 (GSK-3β, VIP 1.497 92; PIK3CA, VIP 1.376 72; AKT3, VIP 1.479 53) 和 染料木素 (GSK-3β, VIP 1.513 95; PIK3CA, VIP

表 9 各批次盘龙七片提取物对关键蛋白抑制率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Inhibition rate of PT extracts against key proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	蛋白抑制率/%			样品	蛋白抑制率/%			样品	蛋白抑制率/%		
	GSK-3β	PIK3CA	AKT3		GSK-3β	PIK3CA	AKT3		GSK-3β	PIK3CA	AKT3
S1	83.55 ± 5.56	90.43 ± 0.96	76.64 ± 1.12	S5	83.92 ± 3.66	90.73 ± 1.00	76.96 ± 0.25	S9	75.59 ± 4.63	85.09 ± 5.80	66.40 ± 2.72
S2	74.67 ± 8.06	84.60 ± 6.20	53.39 ± 0.16	S6	85.12 ± 1.10	90.90 ± 2.53	78.84 ± 2.65	S10	81.21 ± 3.11	89.34 ± 1.83	72.81 ± 5.48
S3	72.75 ± 1.35	84.69 ± 5.15	68.72 ± 7.46	S7	81.89 ± 8.87	89.52 ± 1.62	76.27 ± 5.84	S11	82.07 ± 6.28	90.12 ± 0.83	76.51 ± 4.95
S4	80.91 ± 1.27	89.12 ± 1.62	71.96 ± 0.78	S8	79.09 ± 3.35	87.53 ± 3.07	71.69 ± 6.04				

表 10 盘龙七片候选 Q-Marker-体外抗炎活性成分关联分析结果

Table 10 Association analysis of “candidate Q-Marker - anti-inflammation bioactivity” of PT

化合物名称	相关系数			VIP 值		
	GSK-3 β	PIK3CA	AKT3	GSK-3 β	PIK3CA	AKT3
去氢木香内酯	0.90	0.87	0.75	1.445 76	1.417 36	1.310 31
龙胆苦苷	0.91	0.88	0.83	1.473 40	1.435 52	1.460 96
木香炔内酯	0.92	0.95	0.84	1.562 86	1.547 76	1.471 21
β -蜕皮甾酮	0.90	0.91	0.73	1.539 45	1.293 33	1.483 17
迷迭香酸	0.90	0.91	0.79	1.497 92	1.376 72	1.479 53
染料木素	0.91	0.91	0.76	1.513 95	1.477 78	1.336 08

1.477 78; AKT3, VIP 1.336 08)。PLS 关联性分析结果显示,去氢木香内酯、龙胆苦苷、木香炔内酯、 β -蜕皮甾酮、迷迭香酸和染料木素与体外生物活性呈正相关,相关系数分别为(GSK-3 β 靶点关联系数均值:0.91;PIK3CA靶点关联系数均值:0.91;AKT3靶点关联系数均值:0.78),说明上述化合物水平的高低对于盘龙七片的生物活性和疗效有重要影响。

综合 VIP 和关联系数结果,将 6 个化合物(去氢木香内酯、龙胆苦苷、木香炔内酯、 β -蜕皮甾酮、迷迭香酸和染料木素)选定为盘龙七片“祛风除湿”抗炎作用的 Q-Marker。

3 讨论

本研究从盘龙七片 44 种化学成分中筛选出在“饮片-成药-入血”间转移能力较好,和“祛风除湿”关键靶点结合活性较高的 6 个化合物作为盘龙七片主要功效相关的 Q-Marker:去氢木香内酯、龙胆苦苷、木香炔内酯、 β -蜕皮甾酮、迷迭香酸和染料木素。其中,去氢木香内酯是木香的主要成分,具有显著的抗炎活性,可以通过调控抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/MAPK 和 Nrf2-Hmox-1 通路,抑制白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平^[16]。龙胆苦苷是秦艽的主要成分,可以通过调控 CD147/p38/NF- κ B 通路抑制金属蛋白酶(metalloproteinases, MMP)分泌,从而减轻胶原诱导关节炎小鼠的滑膜炎症和软骨破坏程度^[30]。 β -蜕皮甾酮是牛膝、重楼、壮筋丹的主要成分,有研究表明,以 β -蜕皮甾酮为主的组合物可显著恢复骨关节炎(osteoarthritis, OA)大鼠模型中的关节粘连、软骨损伤、滑膜组织病变,其机制与其对花生四烯酸通路中的炎症因子 PGE2, COX-2 水平的调控作

用有关,同时,该组合物对关节液中的炎症因子 CHI3L1 和 IL-1 β 也有较明显的抑制作用^[31]。迷迭香酸是丹参的主要成分,具有广泛的药理作用,包括抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤和抗炎等。迷迭香酸可通过抑制炎症因子 IL-1b、IL-6、IL-17 分泌;调控 ADAMTS-4、ADAMTS-5、ACAN、COL2 基因的表达来达到治疗 RA 和 OA 的作用^[32]。

另外,迷迭香酸还可以通过独立于 Fas/Fas-配体(FasL)相互作用的线粒体途径诱导活化 T 细胞(靶向 T 细胞亚群 CD3⁺、CD25⁺和 CD4⁺、CD25⁺ T 细胞)和 NK 细胞凋亡,进一步抑制炎症因子 IL-17 释放,达到 RA 治疗作用^[33]。染料木素是杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的主要成分,可以通过抑制 NF- κ B、前列腺素(prostaglandin, PGs)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、促炎细胞因子和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等多种信号通路具有较强的抗炎活性^[34]。另有研究表明染料木素能通过 Janus kinase 2 (JAK2)/转录激活因子 3 (transcription activator 3, STAT3) 通路呈剂量依赖性地抑制 IL-6 和 VEGF 的表达和分泌,从而抑制信号转导因子和 STAT3 的核易位。此外,染料木素还能抑制 IL-6 诱导的血管内皮细胞的迁移和血管形成,起到抗关节炎的作用^[35]。

本研究通过探索盘龙七片“功效成分群”在“饮片-成药-入血成分”间的动态循环规律,采用“Q-Marker-体外生物活性”关联算法,建立从“功效成分群”到 Q-Marker 的筛选策略。所选定的 Q-Marker 可从“成分-功效”角度为其整体质量提升及临床安全用药提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张德柱. 盘龙七片质量标准的研究 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(4): 218-219.
- [2] 白钢, 张铁军, 刘昌孝. 基于监管科学的中药质量评价方法的整合研究思路和发展方向 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6313-6318.
- [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] 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.
- [5] 覃柳莹, 梁丽金, 胡懿, 等. 基于 UPLC 指纹图谱和网络药理学的当归炮制前后差异质量标志物研究 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 5892-5903.

- [6] 王美丹, 胡扬, 宋辉, 等. 灵芝孢子粉化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(23): 7918-7933.
- [7] 闫亚峰, 宋忠兴, 刘妍如, 等. 基于“生物活性-质量标志物”关联的红花等级评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4683-4690.
- [8] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 以药效成分群-活性-功效关联作用筛选当归质量标志物[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2626-2637.
- [9] 常爱冰, 刘妍如, 王梅, 等. 基于“甾酮类化学成分-抗氧化生物活性”关联分析评价牛膝药材商品等级[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1737-1746.
- [10] 杨宁娟, 刘妍如, 唐志书, 等. 基于“质量标志物-生物活性”关联分析评价丹参的等级[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1135-1142.
- [11] 何姬, 刘妍如, 段金殿, 等. 盘龙七片中抗炎镇痛生物碱类成分同时测定的方法学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(2): 291-301.
- [12] Chen Q L, Shi Z Y, Wang Y D, *et al.* Study on effects of sweating treatment and different drying methods on the quality of *Gentianae Macrophyllae Radix* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9717.
- [13] 代文胜, 徐金波, 孙静. 中药材青蛙七的质量标准研究[J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(12): 1122-1124.
- [14] 李早慧, 都晓伟. 滇重楼药材的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(9): 3032-3048.
- [15] 向智, 李焕杰, 谌鑫阳, 等. 药食同源植物杜仲化学成分、药理作用及产品开发生态研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(2): 190-202.
- [16] Chen Y, Miao Z W, Sheng X J, *et al.* Sesquiterpene lactones-rich fraction from *Aucklandia lappa* Decne. alleviates dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis through co-regulating MAPK and Nrf2/Hmox-1 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115401.
- [17] 蒋桂华, 贾敏如. 四川产九牛造中总鞣质和没食子酸的含量测定[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(4): 306-307.
- [18] Bnlgantuya B. 红花化学成分分离、鉴定、定量和药代动力学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015.
- [19] 王好清. 混合模式凝胶-反相联用色谱体系的构建与红花化学成分研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- [20] 胡伊力格其, 曹萨丽, 林龙飞, 等. LC-MS/MS同时测定大鼠血浆中瑞香素、西瑞香素和瑞香新素及其药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1964-1970.
- [21] 丁昕瑶, 包永睿, 王帅, 等. 基于“质-量”双标的丹参质量分析方法研究[J]. 中草药, 2023, 54(22): 7287-7292.
- [22] 赵泽丰, 年梦, 姬晓彤, 等. 络石藤中COX-2抑制成分的虚拟筛选与抗癫痫活性评价[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3863-3875.
- [23] 郭琴, 高焕, 李小锋, 等. HPLC-MS/MS法同时测定杜仲饮片及其单方制剂中11种成分的含量[J]. 中国药师, 2022, 25(2): 369-372.
- [24] 李艳艳. 高效液相色谱法测定杜仲中主要成分和食品中大豆异黄酮[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [25] 刘妍如, 史鑫波, 陈永琴, 等. HPLC-ESI-MS/MS法同时测定珠子参中15种皂苷类化合物[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3502-3507.
- [26] 马延. 陕西地方习用药材八里麻质量标准研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [27] 张嘉慧, 张林林, 郝艳琦, 等. 醋乳香现代研究进展及质量标志物的预测[J]. 中国现代中药, 2024, 26(2): 240-251.
- [28] 赵艳婷, 刘妍如, 唐志书, 等. 盘龙七片治疗膝骨关节炎有效性和安全性的系统性评价及作用机制分析[J]. 中国现代中药, 2023, 25(2): 314-325.
- [29] 赵丽军, 石磊. 类风湿关节炎实验动物模型研究进展[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(18): 3115-3117.
- [30] Jia N, Ma H H, Zhang T J, *et al.* Gentiopicroside attenuates collagen-induced arthritis in mice via modulating the CD147/p38/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108854.
- [31] Li Z Z, Ma D J, Peng L P, *et al.* Compatibility of *Achyranthes bidentata* components in reducing inflammatory response through arachidonic acid pathway for treatment of Osteoarthritis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1746-1757.
- [32] Luo C X, Zou L, Sun H J, *et al.* A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 153.
- [33] Hur Y G, Suh C H, Kim S, *et al.* Rosmarinic acid induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients via mitochondrial pathway [J]. *J Clin Immunol*, 2007, 27(1): 36-45.
- [34] Goh Y X, Jalil J, Lam K W, *et al.* Genistein: A review on its anti-inflammatory properties [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 820969.
- [35] Cheng W X, Huang H, Chen J H, *et al.* Genistein inhibits angiogenesis developed during rheumatoid arthritis through the IL-6/JAK2/STAT3/VEGF signalling pathway [J]. *J Orthop Translat*, 2020, 22: 92-100.