

基于整合 UPLC/Q-TOF-MS 技术-网络药理学-蛋白质组学的坤心宁颗粒质量标志物 (Q-Marker) 研究

王雯爽¹, 刘凯昕¹, 李云鹃^{2,3}, 周桂荣^{2,3}, 张 曼^{1*}, 侯媛媛^{1*}, 白 钢¹

1. 南开大学药学院 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300353

2. 天士力医药集团股份有限公司 现代中药创制全国重点实验室, 天津 300410

3. 天津市组分中药重点实验室, 天津 300410

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用 (UPLC/Q-TOF-MS) 技术、网络药理学及蛋白质组学方法, 对坤心宁颗粒中的潜在质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 进行预测分析, 并建立坤心宁颗粒的质量评价方法。**方法** 采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对坤心宁颗粒及给药后大鼠血浆中的化学成分 (入血成分) 进行解析; 应用蛋白质组学技术挖掘坤心宁颗粒改善肾阴阳两虚型围绝经期综合征 (perimenopausal syndrome, PMS) 的关键信号通路; 通过网络药理学对入血成分进行靶点预测, 联合蛋白质组学差异通路分析, 确定坤心宁颗粒的潜在 Q-Marker; 基于 HPLC 技术建立坤心宁颗粒中 8 种 Q-Marker 的定量方法, 实现对坤心宁颗粒的质量评价。**结果** UPLC/Q-TOF-MS 检测结合质谱数据及文献数据分析, 鉴定出坤心宁颗粒中 20 种入血成分, 结合网络药理学和蛋白质组学技术最终确定梓醇、地黄苷 D、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、(-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷、仙茅苷、淫羊藿苷和宝藿苷 I 共 8 种成分为坤心宁颗粒的 Q-Marker; 建立 HPLC 分析方法对 15 批坤心宁颗粒样品进行定量测定, 结果显示各批样品中 8 种 Q-Marker 含量均保持稳定。**结论** 借助多维分析技术确定了坤心宁颗粒中的 8 种潜在 Q-Marker, 为其全面质量控制提供有效手段。

关键词: 坤心宁颗粒; 围绝经期综合征; 质量标志物; UPLC/Q-TOF-MS 技术; 网络药理学; 蛋白质组学; 梓醇; 地黄苷 D; 芍药苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 仙茅苷; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I
中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)03-0843-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.03.011

Quality markers of Kunxinling Granules based on UPLC/Q-TOF-MS technology, network pharmacology and proteomics

WANG Wenshuang¹, LIU Kaixin¹, LI Yunjuan^{2,3}, ZHOU Guirong^{2,3}, ZHANG Man¹, HOU Yuanyuan¹, BAI Gang¹

1. State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300353, China

2. State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. Tianjin Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** The potential quality markers (Q-Marker) of Kunxinling Granules (KG, 坤心宁颗粒) were studied by UPLC/Q-TOF-MS technology, network pharmacology and proteomics, and the quality evaluation method of KG was established. **Methods** UPLC/Q-TOF-MS technology was used to analyze the chemical components of KG and drug-containing plasma. The key signal pathway of KG in improving renal and yin-yang deficiency perimenopausal syndrome (PMS) was explored by proteomics. The potential Q-Marker of KG were determined by network pharmacology and proteomic differential pathway analysis. The quantitative method of eight Q-Marker in KG was established based on HPLC technology to realize the quality evaluation of KG. **Results** UPLC/Q-TOF-MS detection combined with mass spectrometry data and literature data analysis, identified 20 components in plasma from KG. Combined with network pharmacology and proteomics techniques, a total of eight components, including catalpol, rehmannioside D, paeoniflorin, calycosin-7-O-β-D-glucoside, (-)-syringaresinol-4-O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside,

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (63241465)

作者简介: 王雯爽, 硕士研究生, 研究方向为中医药系统生物学与化学生物学。E-mail: 13271319095@163.com

*通信作者: 侯媛媛, 教授, 博士生导师, 从事中医药系统生物学与化学生物学研究。E-mail: houyy@nankai.edu.cn

张 曼, 讲师, 从事中医药系统生物学与化学生物学研究。E-mail: manzhang@nankai.edu.cn

curculigoside, icariin and baohuoside I, were identified as the Q-Marker of KG. An HPLC analytical method was established to determine the contents of the eight Q-Marker in 15 batches of KG samples. The results indicated that the contents of the eight Q-Marker in each batch of samples remained stable. **Conclusion** With the aid of multi-dimensional analysis techniques, eight Q-Marker of KG were determined, providing an effective tool for its comprehensive quality control.

Keywords: Kunxinling Granules; perimenopausal syndrome; Q-Marker; UPLC/Q-TOF-MS technology; network pharmacology; proteomics; catalpol; rehmannioside D; paeoniflorin; calycosin-7-*O*- β -D-glucoside; (-)-syringaresinol-4-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside; curculigoside; icariin; baohuoside I

更年期综合征又名围绝经期综合征(perimenopausal syndrome, PMS),是指女性在绝经前后出现的以潮热出汗、烦躁易怒、倦怠乏力、失眠、骨质疏松等为特点的一组症候群^[1-2]。关于 PMS 的中医病因病机存在多种学说,其中,肾气亏虚被认为是本病的核心病机。中药多成分、多靶点、多途径协同作用的特点,不仅能较为全面地改善 PMS 症状,更因其药性温和、不良反应少、治疗方案多样化等特点,在 PMS 治疗中发挥着不可替代的作用。坤心宁颗粒(Kunxinling Granules, KG, 曾用名坤怡宁颗粒)由地黄、黄芪、仙茅、淫羊藿、赤芍、合欢皮和石决明 7 味中药组成,具有温阳养阴、益肾平肝的功效,是治疗中医辨证属肾阴阳两虚证型 PMS 的中药创新药(国药准字 Z20210006)^[3]。目前,坤心宁颗粒的质量标准中仅对臣药淫羊藿中的淫羊藿苷和佐药赤芍中的芍药苷进行定量测定,缺少其他药味的含测指标,因此,建立一种覆盖更为全面、药材专属性更强、与药物有效性关联度更高的坤心宁颗粒多指标定量测定方法,对保证坤心宁颗粒的疗效和安全性有重大意义。

本研究采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术,解析坤心宁颗粒的化学物质组成及其入血成分,通过肾脏蛋白质组学信息,明确坤心宁颗粒起效的核心信号通路,联合网络药理学预测入血成分的潜在靶点,通过关联分析构建“成分-靶点-通路”网络,确定坤心宁颗粒的潜在质量标志物(quality markers, Q-Marker);建立基于 HPLC 技术的 Q-Marker 定量测定方法,为坤心宁颗粒质量标准完善提供依据,也为其他中药复方 Q-Marker 的研究提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-20A 型检测器,日本岛津公司;Mikro 220R 型台式高速冷冻离心机,德国 Hettich 公司;Q-TOFG2-XS 型液质联用仪,美国 Waters 公司;XS105DU 型微量天平,美国 Mettler Toledo 公司。

1.2 数据库及软件

GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>); SuperPred (<https://prediction.charite.de/>); PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>); STRING (<https://string-db.org/>); Cytoscape 软件(3.8.0 版)。

1.3 药品与试剂

15 批坤心宁颗粒,批号 20230401、20230501、20231201、20231202、20231203、20231204、20231205、20240301、20240302、20240303、20240304、20240305、20240306、20240307、20240308,依次编号 S1~S15,由天士力医药集团股份有限公司提供,规格为 6 g/袋;对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷(货号 ST08820120,批号 6925,质量分数 99.1%)、地黄苷 D(货号 ST11190120,批号 13681,质量分数 99.5%)、梓醇(货号 ST03400120,批号 15267,质量分数 99.5%)、淫羊藿苷(货号 ST00800120,批号 15251,质量分数 99.6%)、仙茅苷(货号 ST02910120,批号 16345,质量分数 99.7%)、宝藿苷 I(货号 ST07960120,批号 15898,质量分数 98.7%)和(-)-丁香树脂酚-4-*O*- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷[(-)-syringaresinol-4-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside, SAG, 货号 ST16670120,批号 10807,质量分数 98.7%]购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;对照品芍药苷(货号 S31585,批号 M22HS179898,质量分数 99.0%)购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)和乙腈(色谱纯)购自天津康科德科技有限公司;大鼠血清雌二醇(货号 CEA461Ge,批号 L240611381)、孕酮(货号 CEA459Ge,批号 L230515673)、促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH, 货号 CEA830Ra,批号 L2310311698)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH, 货号 CEA441Ra,批号 L230622015)的 ELISA 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司。

1.4 动物

SPF 级 SD 雌性 8 周龄大鼠,购自北京维通利

华有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK(京) 2021-0006。实验动物均饲养于南开大学实验动物中心, 饲养环境温度 20~25℃, 相对湿度 40%~60%, 每 12 h 循环照明, 所有动物均正常饲养, 自由饮水、进食。本研究所开展动物实验得到南开大学动物伦理委员会批准, 批准号 2023-SYDWLL-000583。

2 方法与结果

2.1 坤心宁颗粒体内暴露成分解析

采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对坤心宁颗粒样品的化学成分和坤心宁颗粒给药后大鼠血浆样本进行分析。

2.1.1 坤心宁颗粒供试品溶液的制备 取坤心宁颗粒 2 袋, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 40 mL, 超声(功率 300 W、频率 50 kHz)处理 30 min, 取出, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得坤心宁颗粒供试品溶液。

2.1.2 血浆样本供试品溶液的制备 取适应性喂养 1 周后的 SPF 级 SD 雌性大鼠, 按 30 g/kg 的生药量 ig 给予坤心宁颗粒。分别在给药前以及给药后 0.5、1、2、4 h 对大鼠进行眼眶后静脉丛取血, 血样在 4℃、3 500 r/min 离心(离心半径为 8.5 cm) 15 min, 取上清液即得血浆。取给药后不同时间段的血浆各 200 μL, 混合均匀, 加入 3 倍体积的色谱纯甲醇, 涡旋 5 min 沉淀蛋白质, 混悬液在 4℃、12 000 r/min 离心(离心半径为 8.5 cm) 10 min。取上清液于 EP 管中, 37℃条件下氮气吹至干燥。残渣用 1 mL 50% 甲醇复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于进样瓶中, 即得血浆样本供试品溶液, 备用。空白血浆进行同样操作。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温为 30℃; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~3 min, 5%~10% 乙腈; 3~4 min, 10%~18% 乙腈; 4~10 min, 18%~22% 乙腈; 10~13 min, 22%~24% 乙腈; 13~18 min, 24%~26% 乙腈; 18~20 min, 26%~28% 乙腈; 20~23 min, 28%~45% 乙腈; 23~26 min, 45%~65% 乙腈; 26~29 min, 65%~95% 乙腈; 29~31 min, 95%~5% 乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2.0 μL。

2.1.4 质谱条件 采用正、负离子扫描模式, 扫描范围 m/z 100~1 500, 离子源采用电喷雾离子源(ESI), 离子源温度为 100℃, 离子源电压为 2.5 kV

(正)/-3.0 kV(负); 气帘气体积流量 50 L/h, 脱溶剂气温度 250℃, 脱溶剂气体积流量 600 L/h, 雾化器压力 310.264 kPa (45 psi), 源偏移电压 80 V, 锥孔电压 40 V, 补偿电压 80 V。全信息串联质谱(mass spectrometry with elevated energy, MSE)扫描模式检测, 低能量扫描时传输碰撞能量为 6 eV, 高能量扫描时传输碰撞能量为 20~50 eV。采用质量浓度为 500 ng/mL 的亮氨酸-脑啡肽进行质量数实时校正。亮氨酸-脑啡肽在 ESI⁺、ESI⁻模式下的 m/z 分别为 $[M+H]^+$ 556.277 1 和 $[M-H]^-$ 554.261 5。采用 Mass Lynx V4.2 软件对正、负离子模式下样本的质谱峰进行分析。

2.1.5 坤心宁颗粒样品中化学成分及其给药后大鼠血浆中成分(入血成分)的确定 正、负离子模式下坤心宁颗粒样品和给药后血浆样本的基峰离子强度(base peak intensity, BPI)色谱图如图 1、2 所示。经数据库匹配分析、化合物精确相对分子质量、碎片离子峰、色谱保留时间比对, 在血浆样本中共鉴定出 20 种成分(表 1), 其中愈创木酚、芍药苷、芒柄花苷、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、金丝桃苷、芒柄花黄素、丹皮酚、芍药新苷、朝藿苷丙、梓醇、黄芪甲苷、宝藿苷 I、对羟基肉桂酸、染料木苷和刺甘草查耳酮共 16 个原型成分, 以及(-)-丁香树脂酚、宝藿素、苔黑酚葡萄糖苷、去水淫羊藿素 4 个代谢产物(分别为 SAG、宝藿苷 I、仙茅苷、淫羊藿苷的体内代谢产物)。

2.2 坤心宁颗粒治疗 PMS 的蛋白质组学分析

2.2.1 坤心宁颗粒治疗 PMS 的药效学评价 取 SD 雌性大鼠 18 只, 适应性喂养 1 周后, 分为对照组、模型组和坤心宁颗粒组, 每组 6 只。对模型组和坤心宁颗粒组大鼠进行双侧卵巢摘除手术(ovariectomy, OVX), 对照组大鼠摘除等体积脂肪进行假手术。造模成功后, 对坤心宁颗粒组大鼠按 24 g/kg(生药量)的剂量连续 ig 28 d, 模型组和对照组大鼠给予等量饮用纯净水(娃哈哈)。实验末期, 大鼠禁食 12 h 后, 用 10% 水合氯醛溶液进行 ip 麻醉, 取腹主动脉血清, 应用 ELISA 检测试剂盒检测大鼠血清雌二醇、孕酮、FSH 和 LH 的水平。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学处理, 使用 t 检验对单次比较数据进行统计, $P<0.05$ 认为具有显著性差异。结果如表 2 所示。坤心宁颗粒有效逆转去势大鼠血清雌二醇和孕酮下降($P<0.05$ 、 0.001), 减少 FSH、LH 水平($P<0.01$ 、 0.001), 表明坤心宁

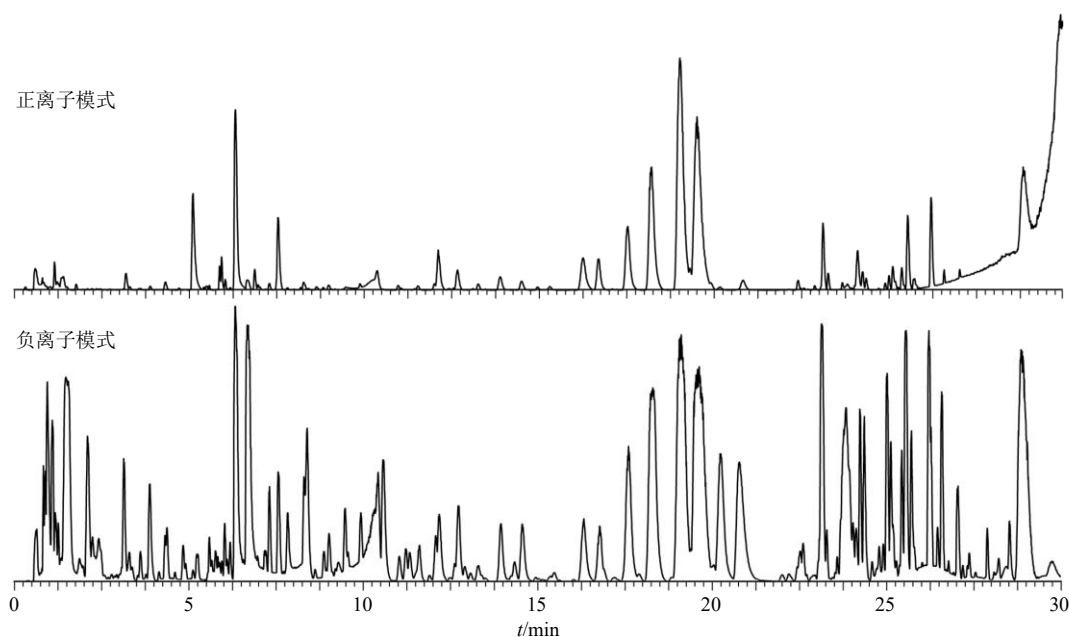
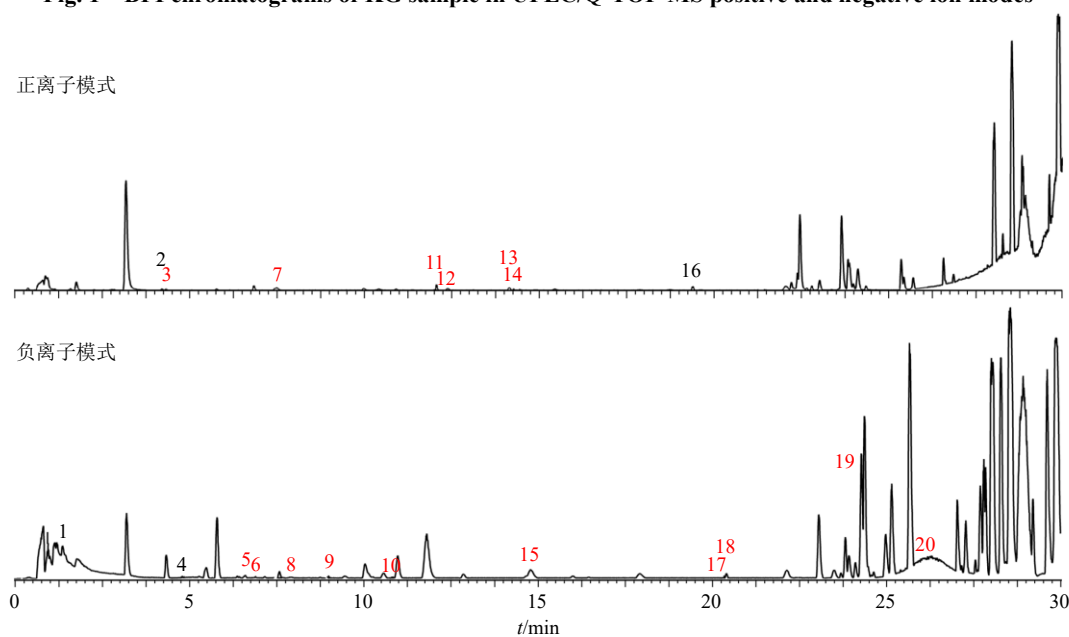


图 1 UPLC/Q-TOF-MS 正、负离子模式下坤心宁颗粒样品的 BPI 色谱图

Fig. 1 BPI chromatograms of KG sample in UPLC/Q-TOF-MS positive and negative ion modes



红色标注表示原型入血的成分。

Red marks indicate components of prototype into blood.

图 2 UPLC/Q-TOF-MS 正、负离子模式下坤心宁颗粒给药后血浆样本的 BPI 色谱图

Fig. 2 BPI chromatogram of plasma after KG administration in UPLC/Q-TOF-MS positive and negative ion modes

颗粒能够改善 PMS 性激素紊乱状态。

2.2.2 坤心宁颗粒治疗 PMS 的差异蛋白分析 为探索坤心宁颗粒治疗 PMS 的潜在机制,本研究对坤心宁颗粒治疗后的双侧 OVX 大鼠肾脏进行蛋白质组学检测。取大鼠左肾样本约 1 g,通过蛋白质提取、酶切、液相色谱-质谱串联分析、数据库检索分析、生物信息分析等技术的有机结合,对肾脏样本

采用四维数据独立采集 (four-dimensional data-independent acquisition, 4D-DIA) 蛋白质组学技术进行定量蛋白质组学分析研究 (由武汉迈维代谢生物科技股份有限公司完成)。正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 结果 (图 3-A) 显示,对照组、模型组及坤心宁颗粒组大鼠肾脏蛋白具有明显的组

表 1 坤心宁颗粒入血成分鉴定结果

Table 1 Identification results of absorption components in KG plasma										
序号	tr/ min	母离子	m/z 理论值	m/z 实测值	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子	来源	参考 文献
1	0.92	[M-H] ⁻	397.097 6	397.094 2	8.68	C ₂₂ H ₂₂ O ₇	宝藿素 baohuosu [◆]	268.804 0, 259.017 6, 191.019 3	淫羊藿	4
2	4.21	[M+Na] ⁺	309.095 0	309.071 4	7.64	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	苔黑酚葡萄糖苷 orcinol glucoside [◆]	125.057 3	仙茅	5
3	4.31	[M+H] ⁺	125.051 4	125.050 4	7.92	C ₇ H ₈ O ₂	愈创木酚 guaiacol	110.028 6	仙茅	6
4	4.84	[M-H] ⁻	417.144 9	417.143 8	2.66	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	(-)-丁香树酯酚(-)-syringaresinol [◆]	181.054 8	合欢皮	7
5	6.68	[M+HCOO] ⁻	525.168 0	525.168 8	1.52	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷 paeoniflorine	449.152 4, 327.111 9, 165.058 1, 121.030 5	赤芍	8
6	6.79	[M+HCOO] ⁻	475.124 0	475.123 1	1.89	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	芒柄花苷 ononin	267.064 9	黄芪	9
7	7.53	[M+H] ⁺	285.050 1	285.052 5	8.35	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	汉黄芩素 wogonin	270.033 4, 183.034 5	黄芪	10
8	7.56	[M-H] ⁻	283.062 9	283.061 8	3.90	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	毛蕊异黄酮 calycosin	268.039 1, 239.035 5, 211.040 3, 195.047 7	黄芪	11
9	9.02	[M-H] ⁻	463.091 5	463.089 6	4.10	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷 hyperoside	300.028 0, 271.027 7, 255.032 3, 151.004 0	淫羊藿	4
10	10.88	[M-H] ⁻	163.041 4	163.041 2	1.04	C ₉ H ₈ O ₃	对羟基肉桂酸 p-hydroxy-cinnamic acid	119.049 5	淫羊藿	4
11	12.11	[M+H] ⁺	269.060 4	269.062 3	7.09	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	芒柄花黄素 formononetin	254.039 0, 237.039 9	黄芪	11
12	12.41	[M+Na] ⁺	385.097 6	385.098 8	3.19	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	梓醇 catalpol	355.085 1, 223.087 9, 203.053 9	地黄	12
13	13.88	[M+H] ⁺	167.059 4	167.058 8	7.18	C ₉ H ₁₀ O ₃	丹皮酚 paeonol	149.006 1, 124.892 5, 121.029 7	赤芍	13
14	13.90	[M+Na] ⁺	485.105 3	485.101 2	8.49	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	芍药新苷 lactiflorin	105.028 5	赤芍	14
15	14.76	[M+HCOO] ⁻	477.106 5	477.104 7	3.98	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	染料木苷 genistin	477.142 2, 431.099 8, 301.037 6, 269.045 6, 167.763 4	黄芪	15
16	19.33	[M+H] ⁺	369.113 2	369.113 5	0.81	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	去水淫羊藿素 icaritin [◆]	313.237 8, 243.167 2, 135.107 5	淫羊藿	16
17	20.37	[M-H] ⁻	269.084 0	269.082 4	5.95	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	刺甘草查尔酮 echinatin	269.140 3, 225.149 4, 181.159 4, 125.096 1	黄芪	17
18	20.56	[M-H] ⁻	879.307 5	879.306 1	1.57	C ₄₁ H ₅₂ O ₂₁	朝藿苷丙 korepimidoside C	717.243 2, 367.123 2	淫羊藿	10
19	24.24	[M+HCOO] ⁻	829.458 6	829.465 0	7.72	C ₄₅ H ₅₆ O ₂₃	黄芪甲苷 astragaloside IV	783.366 1	黄芪	18
20	26.21	[M-H] ⁻	513.183 2	513.182 6	1.26	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	宝藿苷 I baohuoside I	366.115 6, 351.090 3, 323.094 9, 217.052 8	淫羊藿	4

◆表示坤心宁颗粒中成分的体内代谢产物。
◆ Representative metabolites *in vivo* of KG components.

表 2 坤心宁颗粒对 PMS 大鼠血清性激素水平的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Table 2 Impact of KG on serum sex hormone levels in PMS rats (x̄ ± s, n = 6)				
组别	雌二醇/(ng·L ⁻¹)	孕酮/(ng·mL ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(ng·mL ⁻¹)
对照	96.283 ± 9.071	25.745 ± 2.609	20.330 ± 1.375	2.431 ± 0.959
模型	25.752 ± 2.543 ^{###}	19.904 ± 2.040 ^{###}	39.756 ± 2.510 ^{###}	6.426 ± 1.034 ^{###}
坤心宁颗粒	58.789 ± 3.441 ^{***}	23.406 ± 2.255 [*]	24.478 ± 3.005 ^{***}	3.860 ± 0.620 ^{**}

与对照组比较: ^{###}*P* < 0.01 ^{####}*P* < 0.001; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001。
^{###}*P* < 0.01 ^{####}*P* < 0.001 vs control group; ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001 vs model group.

间差异。在大鼠肾脏中共定量检测到 11 385 种蛋白质;与对照组相比,模型组有 433 种蛋白质表达上调,379 种蛋白质表达下调;在给予坤心宁颗粒治疗后,有 325 种蛋白质相较于模型组上调,302 种下调(图 3-B)。

进一步的差异蛋白热图分析结果(图 4)显示,共有 301 种蛋白质在坤心宁颗粒干预后发生转归。

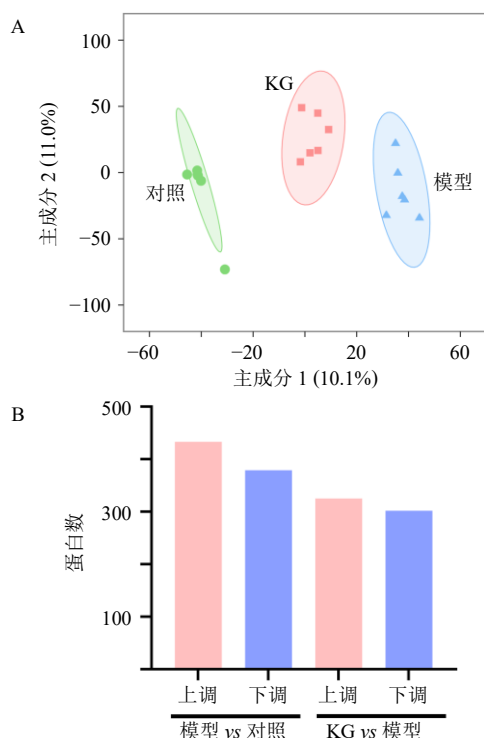
2.3 基于网络药理学和蛋白质组学的坤心宁颗粒的 Q-Marker 确定

2.3.1 基于网络药理学的坤心宁颗粒入血成分潜在靶点蛋白预测 利用 PubChem 检索入血成分的 SMILES,将检索到的 SMILES 导入 SuperPred 预测

各成分的潜在靶点,汇总可能性前 80%的靶点基因,使用 UniProt 数据库进行蛋白质基因名转换,得到 101 个坤心宁颗粒入血成分的潜在蛋白靶点。

2.3.2 疾病相关蛋白筛选 将在 GeneCards 中检索到的“syndrome of deficiency of both kidney yin and kidney yang”和“perimenopausal syndrome”相关性得分(relevance score) > 10 的蛋白取交集,得到 79 个肾阴阳两虚型 PMS 的疾病靶点(图 5)。将坤心宁颗粒预测的靶点和疾病靶点取交集并导入 STRING 数据库,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

2.3.3 坤心宁颗粒“成分-靶点-通路”多维网络分析



A-OPLS-DA 分析; B-各组差异蛋白统计图。

A-OPLS-DA analysis; B-statistical map of different proteins in each group.

图 3 蛋白质组学 OPLS-DA 和差异蛋白数量统计

Fig. 3 OPLS-DA and differential protein number statistics of proteomics

将蛋白质组学分析得到的前 20 条差异通路上的蛋白质, 与各成分可能调节肾阴阳两虚型 PMS 的靶点取交集, 得到各成分调节肾阴阳两虚型 PMS 的 22 个关键靶点 (图 6)。

2.3.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 利用 GO 数据库和 KEGG 数据库对坤心宁颗粒干预后发生转归的 301 种蛋白质进行富集分析。

GO 富集分析结果 (图 7) 显示, 坤心宁颗粒干预后, 在生物过程 (biological process) 方面主要影响信号转导 (signal transduction)、细胞黏附 (cell adhesion) 和 RNA 聚合酶 II 对转录的调节 (regulation of transcription by RNA polymerase II) 等; 在细胞组件 (cellular component) 方面主要调控谷氨酸能突触 (glutamatergic synapse)、细胞膜的组成部分 (integral components of plasma membrane)、神经元细胞体 (neuronal cell body)、锚定连接 (anchoring junction) 等; 在分子功能 (molecular function) 方面主要影响锌离子结合 (zinc ion binding)、钙离子结合 (calcium ion binding) 和蛋白质同二聚化活性 (protein

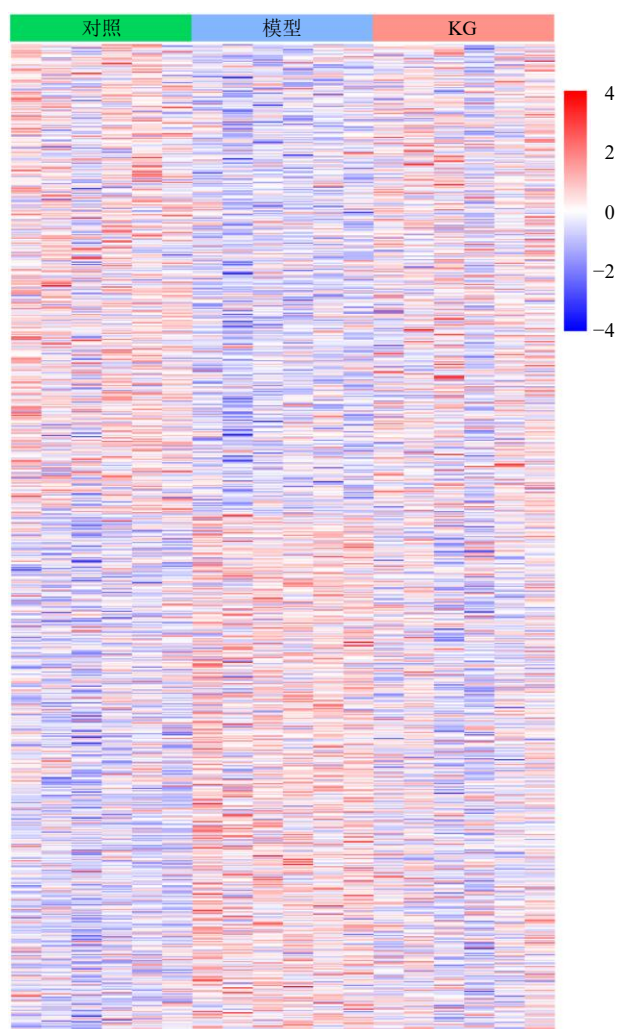


图 4 差异蛋白热图

Fig. 4 Heatmap of differential proteins

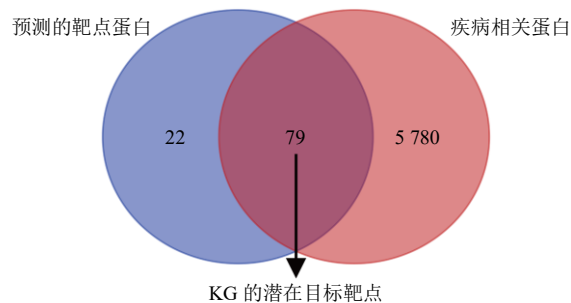


图 5 坤心宁颗粒治疗 PMS 潜在靶点韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of potential targets of KG in treating PMS

homodimerization activity) 等。

KEGG 通路富集分析结果 (图 8) 显示, 坤心宁颗粒干预后主要影响神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、谷氨酸能突触 (glutamatergic synapse)、钙信号通路 (calcium signaling pathway)、化学致癌作用-受体激活

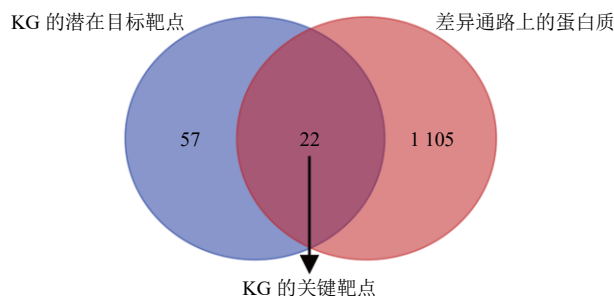


图 6 坤心宁颗粒治疗 PMS 关键靶点韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of key targets of KG in treating PMS

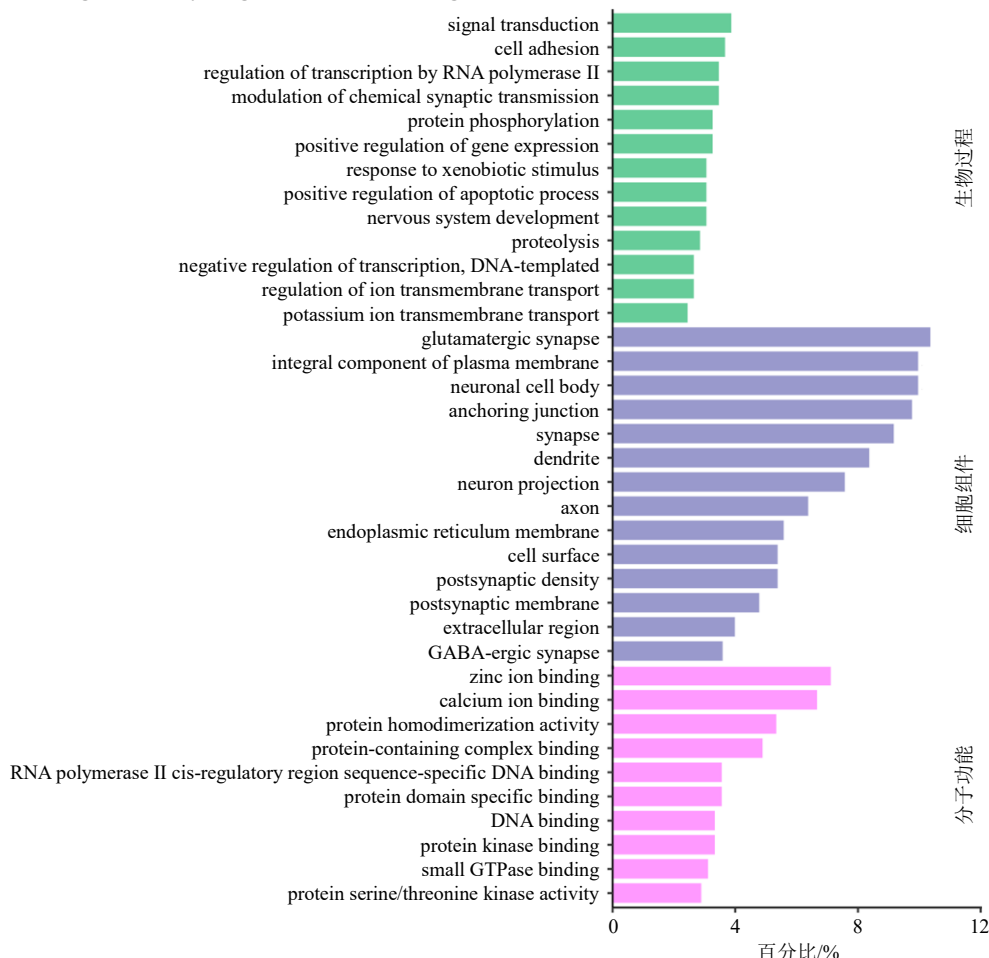


图 7 GO 功能富集分析

Fig. 7 GO functional enrichment analysis

皂苷、萜类和其他类)；第 2 层为 20 种成分预测得到的靶点蛋白以及 PPI 网络；第 3 层为蛋白质组学分析得到的受坤心宁颗粒影响的关键途径，主要涉及调控神经传导、能量代谢、内分泌和类固醇的生物合成 4 种功能。使用 Cytoscape 中 analyze network 功能对可视化网络中的入血成分进行拓扑参数筛选，将成分按照与 22 个关键靶点蛋白的连接度值进行排序，结果见表 3。度值越高表示该成分越有可能是坤心宁颗粒治疗肾阴阳两虚型 PMS 的主要活

(chemical carcinogenesis-receptor activation)、细胞黏附分子 (cell adhesion molecules) 等 20 条显著差异通路 ($P < 0.05$)。

2.3.5 坤心宁颗粒 Q-Marker 的确定 使用 Cytoscape 软件对网络药理学预测的靶点与蛋白质组学中坤心宁颗粒干预影响的 KEGG 通路进行可视化处理，结果如图 9 所示，整个可视化网络由 3 个层面组成，第 1 层为 20 种坤心宁颗粒入血成分，根据其结构类型分为 3 个不同组别 (黄酮类、酚酸和木脂素类，

性成分，结合《中国药典》2020 年版中规定的熟地黄药材含量测定成分^[19]，最终确定梓醇 (地黄)、地黄苷 D (地黄)、芍药苷 (赤芍)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (黄芪)、SAG (合欢皮)、仙茅苷 (仙茅)、淫羊藿苷 (淫羊藿) 和宝藿苷 I (淫羊藿) 共 8 种成分，为坤心宁颗粒中体现有效性、可溯源性、药材特有性的 Q-Marker。

2.4 坤心宁颗粒中 Q-Marker 定量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 分别取梓醇、地黄苷 D、

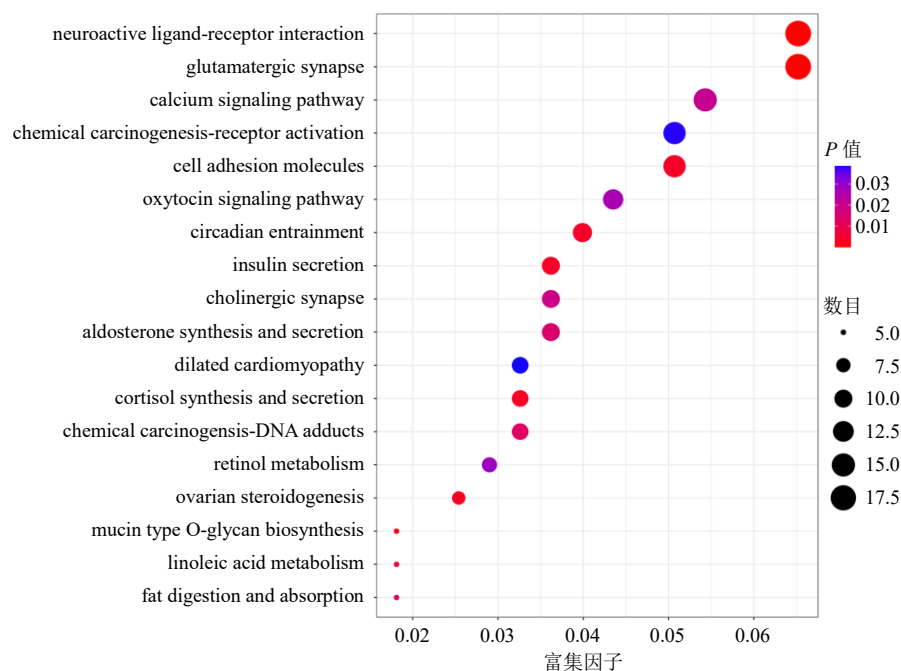


图 8 KEGG 通路富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis

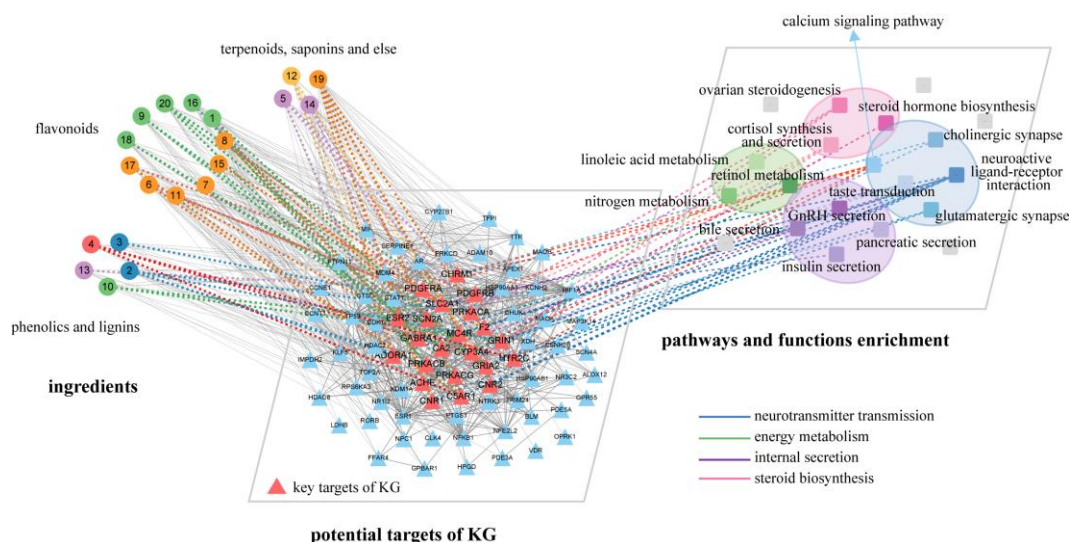


图 9 坤心宁颗粒“成分-靶点-通路”可视化网络

Fig. 9 “Component-target-pathway” visual network of KG

芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、SAG、仙茅苷、淫羊藿苷 7 种对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 2.000、2.000、4.125、0.100、0.240、0.100、1.000 mg/mL 的对照品储备液；取宝藿苷 I 对照品适量，精密称定，加乙腈制成质量浓度为 0.180 mg/mL 的对照品储备液。精密量取上述对照品储备液各 0.50 mL，混合均匀后得到混合对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 同“2.1.1”项下操作。

2.4.3 色谱条件 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪；

Phenomenex® NX-C₁₈ 110Å 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为水-乙腈，梯度洗脱：0~20 min, 3%~10%乙腈；20~25 min, 10%~20%乙腈；25~45 min, 20%~40%乙腈；45~55 min, 40%~50%乙腈；55~65 min, 50%~70%乙腈；65~70 min, 70%~85%乙腈；70~72 min, 85%~100%乙腈；进样量 20 μL；检测波长 210 nm；体积流量 1 mL/min；柱温 28 °C。

2.4.4 系统适用性考察 取“2.4.1”项下制备的混合对照品溶液和各单一成分对照品储备液，按照

表 3 入血成分与坤心宁颗粒关键靶点蛋白连接度值统计
 Table 3 Statistical analysis of connection degree between absorption components and key target proteins of KG

入血成分	连接度值	入血成分	连接度值
黄芪甲苷	8	芒柄花黄素	2
苔黑酚葡萄糖苷	4	芍药新苷	2
毛蕊异黄酮	4	去水淫羊藿素	2
(-)-丁香树酯酚	3	刺甘草查耳酮	2
芍药苷	3	朝藿苷丙	2
梓醇	3	愈创木酚	1
宝藿苷 I	3	丹皮酚	1
芒柄花苷	2	染料木苷	1
金丝桃苷	2	宝藿素	1
对羟基肉桂酸	2	汉黄芩素	0

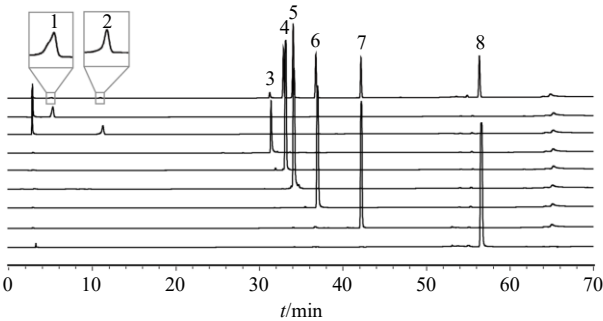
“2.4.3”项下色谱条件进行测定，色谱图如图 10、11 所示，结果表明 8 种成分分离度良好，保留时间适中，可用于后续分析。

2.4.5 线性关系考察 用色谱纯甲醇将“2.4.1”项下的混合对照品溶液配成系列质量浓度的混合对照品溶液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样分析。根据 HPLC 测定结果，对不同质量浓度下各对照品的峰面积进行积分，以各色谱峰峰面积 (Y) 对各成分的质量浓度 (X) 进行线性回归分析，结果见表 4。梓醇、地黄苷 D、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、SAG、仙茅苷、淫羊藿苷和宝藿苷 I 在各自线性范围内质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.4.6 精密度考察 取同一批次坤心宁颗粒样品 (S1)，按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 1 份，按照“2.4.3”项下色谱条件进行测定，连续进样 6 次，记录各 Q-Marker 的峰面积并计算其 RSD。结果 (表 4) 显示，8 个 Q-Marker 峰面积的 RSD 均 ≤ 2.83%，表明该仪器和实验方法精密度良好。

表 4 方法学验证数据
 Table 4 Data of methodological validation

成分	线性回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	RSD/%			加样回收率/%	
				精密度	稳定性	重复性	平均值	RSD
梓醇	Y=2 483.113 2 X+10 483.786 1	0.999 9	7.812 5~250.000 0	0.47	0.62	0.42	102.0	4.52
地黄苷 D	Y=2 297.325 4 X+29 827.696 5	0.999 9	7.812 5~250.000 0	2.76	2.85	0.74	103.3	3.51
芍药苷	Y=8 874.629 6 X+3 361.130 9	0.999 9	16.112 5~515.600 0	2.48	2.87	0.32	102.9	3.67
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	Y=95 886.523 7 X-7 239.418 3	0.999 9	0.390 6~12.500 0	2.83	2.67	0.49	96.5	2.96
SAG	Y=227 071.850 7 X-19 884.759 9	0.999 9	0.937 5~30.000 0	0.93	1.03	0.85	97.9	2.61
仙茅苷	Y=85 046.922 9 X-5 623.302 1	0.999 8	0.390 6~12.500 0	1.16	1.04	1.02	97.6	4.72
淫羊藿苷	Y=58 051.800 8 X-16 138.997 7	0.999 9	3.906 3~125.000 0	1.57	1.61	0.96	99.1	4.34
宝藿苷 I	Y=98 229.216 9 X-10 624.613 5	0.999 9	0.703 1~22.500 0	2.66	1.94	0.78	97.3	6.49



1-梓醇; 2-地黄苷 D; 3-芍药苷; 4-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 5-SAG; 6-仙茅苷; 7-淫羊藿苷; 8-宝藿苷 I; 图 11 同。
 1-catalpol; 2-rhmannioside D; 3-paeoniflorin; 4-calycosin glucoside; 5-SAG; 6-curculigoside; 7-icariin; 8-baohuoside I; same as figure 11.

图 10 混合对照品及各单一成分对照品 HPLC 图
 Fig. 10 HPLC chromatogram of mixed reference substance and single reference substance

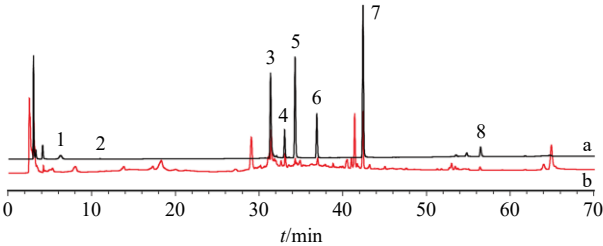


图 11 混合对照品 (a) 与典型坤心宁颗粒样品 (b) 的 HPLC 图
 Fig. 11 HPLC of mixed reference substances (a) and representative KG sample (b)

2.4.7 稳定性考察 取同一批次坤心宁颗粒样品 (S1)，按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液 1 份，分别于室温下放置 2、4、8、12、16、24 h 后，按照“2.1.4”项下色谱条件进样分析，记录各 Q-Marker 的峰面积并计算其 RSD。结果 (表 4) 显示，8 个 Q-Marker 峰面积的 RSD 均 ≤ 2.87%，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.4.8 重复性考察 按照“2.1.1”项下方法平行制

备 6 份供试品溶液,按照“2.4.3”项下色谱条件进行 HPLC 分析,计算样品中各 Q-Marker 质量分数的 RSD。结果(表 4)表明,各 Q-Marker 质量分数的 RSD 均 $\leq 1.02\%$,表明该方法重复性良好。

2.4.9 准确度考察 准确度考察采用加样回收试验进行评价。取同一批次已测定 8 种成分含量的样品(S1)6 份,每份 1 g,精密称定,分别加入具塞锥形瓶中,精密加入 1 mL 混合对照品溶液(与样品中 8 种待测成分相同含量的混合对照品溶液),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液。按“2.4.3”项下色谱条件进行 HPLC 测定,记录峰面积,计算得到各 Q-Marker 的平均加样回收率和 RSD 见表 4。结果表明,各 Q-Marker 的平均加样回收率在 96.5%~103.3%,RSD 均 $\leq 6.49\%$,表明该方法准确度良好。

2.4.10 不同批次坤心宁颗粒中 Q-Marker 定量测定 按照“2.1.1”项下方法制备各批坤心宁颗粒样品的供试品溶液,按照“2.4.3”项下色谱条件进行测定,按外标法计算 15 批坤心宁颗粒中各 Q-Marker 的含量。混合对照品和典型坤心宁颗粒样品的 HPLC 色谱图如图 11 所示,同一色谱条件下坤心宁颗粒中梓醇、地黄苷 D、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等 8 种成分分离度良好,8 种成分的定量测定结果见表 5。坤心宁颗粒中梓醇、地黄苷 D、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、SAG、仙茅苷、淫羊藿苷和宝藿苷 I 的质量分数分别在 3.585 4~4.914 1、0.386 9~0.824 7、9.320 1~15.761 4、0.387 9~0.603 9、0.080 2~0.139 5、0.353 8~0.652 0、1.988 6~2.946 7、0.092 9~0.128 9 mg/g。其中,梓醇、芍药苷和淫羊藿苷的含量相对较高,SAG 和宝藿苷 I 的含量相对较低。

表 5 15 批坤心宁颗粒中 Q-Marker 定量测定结果
Table 5 Content determination results of Q-Marker in 15 batches of KG

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	梓醇	地黄苷 D	芍药苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	SAG	仙茅苷	淫羊藿苷	宝藿苷 I
S1	4.019 7	0.424 7	7.234 0	0.364 7	0.110 2	0.289 0	2.246 2	0.095 4
S2	3.622 9	0.400 4	6.974 8	0.456 0	0.111 4	0.412 6	2.946 7	0.092 9
S3	4.106 9	0.449 5	7.102 2	0.503 3	0.092 7	0.451 6	2.747 3	0.115 0
S4	4.418 6	0.563 2	7.260 4	0.425 6	0.080 2	0.438 7	2.356 3	0.099 9
S5	4.647 8	0.449 5	7.173 1	0.492 8	0.092 7	0.451 6	2.744 2	0.115 0
S6	4.550 5	0.476 1	8.245 5	0.425 6	0.080 2	0.356 4	2.356 3	0.099 9
S7	3.688 5	0.563 3	7.594 8	0.387 9	0.094 1	0.430 9	2.160 3	0.094 4
S8	3.585 4	0.536 5	7.626 9	0.497 4	0.155 2	0.518 4	2.525 2	0.114 6
S9	4.173 2	0.386 9	6.616 2	0.468 3	0.107 4	0.469 5	2.295 1	0.099 4
S10	3.957 0	0.476 8	7.298 5	0.590 8	0.117 5	0.559 0	2.517 5	0.095 1
S11	3.713 7	0.530 3	7.174 5	0.512 4	0.112 2	0.652 0	2.302 4	0.103 5
S12	3.996 7	0.529 9	7.321 7	0.535 5	0.133 5	0.548 4	2.095 1	0.089 4
S13	3.858 8	0.584 4	7.754 8	0.571 2	0.120 9	0.494 6	2.053 1	0.128 9
S14	3.950 7	0.676 5	7.010 9	0.484 3	0.119 8	0.533 3	2.354 7	0.111 9
S15	4.914 1	0.450 5	6.799 2	0.551 8	0.129 0	0.524 4	1.988 6	0.106 9
平均值	4.080 3	0.499 9	7.279 2	0.484 5	0.110 5	0.475 4	2.379 3	0.104 1

3 讨论

坤心宁颗粒以地黄、黄芪为君药,养血滋阴、补气健脾,以补气阴之不足;以仙茅、淫羊藿为臣药,温补肾阳,与君药合用,达到肾脏阴阳双补之功;佐以赤芍、石决明,清肝热,敛肝阳;使药合欢皮安神解郁。现代药理学研究表明,坤心宁颗粒能明显降低去卵巢大鼠血清 FSH、LH、泌乳素(PRL)水平,逆转去卵巢大鼠血清雌二醇骤降的趋势,揭示了坤心宁颗粒对大鼠因去卵巢造成的生殖

内分泌紊乱,具有扶正作用^[20]。临床试验研究结果显示,坤心宁颗粒可显著改善潮热汗出、腰背冷痛等 10 个中医证候单项症状以及整体症状,对 PMS 不同阶段人群、不同严重程度(轻、中、重度)人群具有一致的有效性,可用于中医辨证属肾阴阳两虚证的女性 PMS 的治疗,然而现阶段对坤心宁颗粒质量控制领域的研究几乎空白。本研究基于 UPLC/Q-TOF-MS 检测,整合网络药理学及蛋白质组学分析,最终确定梓醇、地黄苷 D、芍药苷、毛蕊异黄

葡萄糖苷、SAG、仙茅苷、淫羊藿苷和宝藿苷 I 为坤心宁颗粒的 Q-Marker。本研究中“成分-靶点-通路”可视化网络预测的结果与现有相关文献报道具有一致性，证实了本研究中 Q-Marker 预测的准确性和可靠性。

根据网络药理学与蛋白质组学的整合分析结果，发现卵巢类固醇生成（ovarian steroidogenesis）及类固醇激素的生物合成（steroid hormone biosynthesis）是坤心宁颗粒改善体内雌激素生成的主要途径，而皮质醇的合成和分泌（cortisol synthesis and secretion）以及促性腺激素释放激素的分泌（GnRH secretion）也可反馈调节类固醇激素的生物合成^[21]。围绝经期妇女具有较高糖尿病易感性，坤心宁颗粒调节胰岛素分泌（insulin secretion）及胰腺分泌（pancreatic secretion），可以抑制围绝经期胰岛素抵抗，从而维持血糖稳态^[22-23]；胆碱能突触（cholinergic synapse）、谷氨酸能突触（glutamatergic synapse）以及神经活性配体-受体相互作用（neuroactive ligand-receptor interaction）在神经系统中扮演着至关重要的角色，钙信号通路（calcium signaling pathway）参与突触可塑性的调节和神经递质释放等过程，坤心宁颗粒通过影响这些通路缓解焦虑抑郁情绪^[24]；视黄醇的代谢（retinol metabolism）和亚油酸代谢（linoleic acid metabolism）参与脂质合成、转运及代谢过程，通过调节视黄醇的代谢和亚油酸代谢可降低围绝经期体质量和心脑血管疾病风险^[25-26]。研究报道，梓醇可以激活 AMPK 通路，抑制质子回流，干扰线粒体产热^[27]。地黄苷 D 通过调节环磷酸腺苷/环磷酸鸟苷（cyclic adenosine monophosphate/cyclic guanosine monophosphate, cAMP/cGMP）比值和造血功能，实现滋阴补血效果^[28]。毛蕊异黄酮葡萄糖苷的体内代谢活性产物毛蕊异黄酮、仙茅苷的代谢产物苔黑酚葡萄糖苷分别通过影响促分裂素原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路和 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1-核因子/E2 相关因子 2（Kelch-like ECH-associated protein 1/Nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Keap1/Nrf2）信号通路发挥抗骨质疏松作用^[29-30]。此外，宝藿苷 I（淫羊藿次苷 II）可能调节 γ -氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid, GABA）、谷氨酸（glutamic acid, Glu）平衡，增加 GABA 的合成、转运、释放以及调节相关受体的表达，改善 GABA 能神经系统功能^[31]。赤芍中的

活性成分芍药苷通过调节多肽 N-乙酰半乳糖氨基转移酶 2-血管生成素样蛋白 3-脂蛋白脂肪酶（polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2-angiopoietin-like protein 3-lipoprotein lipase, GALNT2-ANGPTL3-LPL）通路调节脂质代谢^[32]。SAG 的苷元(-)-丁香树脂酚可通过作用于沉默信息调节因子 1（silent information regulator 1, SIRT1）通路调节胶质细胞活性，减少活性氧（reactive oxygen species, ROS）积累和恢复线粒体膜电位，发挥抗焦虑和神经保护作用^[33-34]。本研究确定的 8 种 Q-Marker，可能通过调控以上关键信号通路改善潮热、焦虑抑郁、骨质疏松、肥胖等 PMS 症状。

综上所述，本研究通过 UPLC/Q-TOF-MS 技术对坤心宁颗粒中的化学成分及大鼠入血成分进行鉴定，揭示坤心宁颗粒治疗 PMS 的有效化学物质组；进一步利用蛋白质组学技术，结合网络药理学靶标预测，确定了与坤心宁颗粒功效密切相关的 8 种 Q-Marker；并在此基础上建立了一种可同时测定坤心宁颗粒中 8 种 Q-Marker 的 HPLC 方法，该方法操作简便、准确度高、适用性强，可全面客观地反映坤心宁颗粒的质量。本实验所提供的研究策略不仅为坤心宁颗粒的质量监控提供了有效手段，也为基于 Q-Marker 的中药质量^[35]的科学监管提供了成功的研究范式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Crandall C J, Mehta J M, Manson J E. Management of menopausal symptoms: A review [J]. *JAMA*, 2023, 329(5): 405-420.
- [2] Carter A E, Merriam S. Menopause [J]. *Med Clin North Am*, 2023, 107(2): 199-212.
- [3] 赵桂铃, 缪兴龙, 宋兆辉, 等. UPLC-Q-TOF/MS 法坤心宁颗粒化学成分分析 [J]. *中成药*, 2020, 42(4): 1074-1082.
- [4] 马文娟, 姚广哲, 贾琪, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分 [J]. *中药材*, 2019, 42(7): 1554-1559.
- [5] He Y J, Dong X, Jia X X, et al. Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from *Curculigo orchoides* using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 236-245.
- [6] Hu Y M, Wang Y T, Sze S C, et al. Identification of the

- major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Erxian Decoction (EXD) fraction by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(5): 479-489.
- [7] 黄碧珊. 合欢抗抑郁的分子基础以及作用机理的研究 [D]. 广州: 广州大学, 2022.
- [8] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(09): 1762-1770.
- [9] 袁航, 曹树萍, 陈抒云, 等. 淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630-3640.
- [10] 芮雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611.
- [11] 祁晓霞, 董宇, 单晨啸, 等. 基于 UFLC-Q-TOF/MS 分析黄芪-丹参药对化学成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 93-96.
- [12] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [13] 陈菲菲, 钱大玮, 郭盛, 等. 基于 UPLC-MS 的牡丹皮药材质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 609-617.
- [14] 夏忠庭, 鲍丽颖, 何毅, 等. 基于 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 方法分析郁舒片中脂溶性成分 [J]. 药学报, 2015, 50(5): 587-593.
- [15] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [16] 于雪娥, 秦建平, 李家春, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术快速分析淫羊藿总黄酮胶囊中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4587-4597.
- [17] 禹建芳, 赵江源, 杨智明, 等. 膜荚黄芪化学成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45(02): 341-345.
- [18] 练杭芸, 徐王彦君, 梁乾德, 等. UPLC-QTOF MS 法比较赤芍、白芍煎液化学成分差异 [J]. 质谱学报, 2014, 35(3): 269-278.
- [19] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 130.
- [20] 杨明华, 杨苏蓓, 龙森, 等. 坤怡宁对雌性去卵巢大鼠生殖内分泌-免疫的影响 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1107-1109.
- [21] Ghayee H K, Auchus R J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007, 8(4): 289-300.
- [22] 黄志英, 丁岩. 围绝经期女性代谢综合征的相关研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2020, 47(1): 84-87.
- [23] Cheng Y, Zhu H, Ren J, *et al*. Follicle-stimulating hormone orchestrates glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic islets [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6991.
- [24] 毛睿智, 赵国庆, 张晨, 等. 钙离子通道在双相障碍发病机制中的研究进展 [J]. 中华精神科杂志, 2017, 50(4): 308-311.
- [25] 王雪, 闫素梅. 维生素 A 对动物脂类代谢的调节作用与机制 [J]. 动物营养学报, 2017, 29(5): 1462-1468.
- [26] Horrobin D F, Huang Y S. The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease [J]. *Int J Cardiol*, 1987, 17(3): 241-255.
- [27] Shen F K, Yang W, Luan G Q, *et al*. Catalpolaglycone disrupts mitochondrial thermogenesis by specifically binding to a conserved lysine residue of UCP2 on the proton leak tunnel [J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155356.
- [28] 于震, 王军, 李更生, 等. 地黄甙 D 滋阴补血和降血糖作用的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(4): 240-242.
- [29] Quan G H, Wang H B, Cao J J, *et al*. Calycosin suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis through inhibition of MAPKs and NF- κ B [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29496-29507.
- [30] Gong W, Liu M Q, Zhang Q, *et al*. Orcinol glucoside improves senile osteoporosis through attenuating oxidative stress and autophagy of osteoclast via activating Nrf2/Keap1 and mTOR signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5410377.
- [31] 熊庭旺, 张珏, 孙成新, 等. 基于 GABA 能神经系统探究淫羊藿次苷 II 的抗抑郁作用及机制 [J]. 中国药房, 2024, 35(2): 145-149.
- [32] Xiao H B, Liang L, Luo Z F, *et al*. Paeoniflorin regulates GALNT2-ANGPTL3-LPL pathway to attenuate dyslipidemia in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 836: 122-128.
- [33] 吕跃玮. 丁香树脂酚糖苷 (SAG) 的抗焦虑药效学研究及机制初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [34] 严秋霞, 李艳梅, 范艳华, 等. 丁香脂素对谷氨酸钠诱导的 SH-SY5Y 细胞兴奋性损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 76-82.
- [35] 刘妍, 赵艳婷, 刘妍如, 等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5470-5483.

[责任编辑 郑礼胜]