

基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS及谱效学的坤宁颗粒抗凝血活性质量标志物预测

钟林江¹, 杨放², 吴建雄³, 谢志伟¹, 雷燕莉¹, 田佩灵¹, 贾利军⁴, 刘涛^{1*}

(1. 成都大学药学院, 食品与生物工程学院,

四川省抗病毒中药产业化工程技术研究中心, 成都 610106;

2. 成都天河中西医科技保育有限公司, 成都 610000;

3. 宿州亿帆药业有限公司, 安徽 宿州 234000; 4. 太极集团四川太极制药有限公司, 成都 610207)

[摘要] 目的:对坤宁颗粒发挥抗凝血活性的质量标志物(Q-Marker)进行预测分析。方法:采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)对坤宁颗粒的化学成分进行分析,检测条件为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-25 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~22%A; 5~10 min, 22%~30%A; 10~15 min, 30%~95%A; 15~20 min, 95%~5%A; 20~30 min, 5%A),流速 0.2 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 1 μL;电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式。通过网络药理学方法对化学成分的靶点与异常子宫出血(AUB)的靶点进行交互分析,利用网络拓扑分析筛选出关键成分;通过高效液相色谱法(HPLC)建立 10 批坤宁颗粒的指纹图谱,采用血液凝固法及纤维蛋白原平板法测定坤宁颗粒的抗凝血活性,建立其谱效关系;选择拓扑分析与谱效关系中固有的成分作为 Q-Marker,并对其抗凝血活性进行验证和确认。结果:坤宁颗粒含 475 个化学成分,丹酚酸 B、芍药苷、柚皮苷和新橙皮苷等 22 个关键成分是针对 AUB 的潜在物质基础;谱效分析结果表明,峰 7(芍药苷)、峰 9(柚皮苷)、峰 10(新橙皮苷)和峰 11(丹酚酸 B)为最优主成分,体外活性实验表明这 4 个成分可较好地表征其抗凝血活性。结论:丹酚酸 B、芍药苷、新橙皮苷和柚皮苷可能是坤宁颗粒发挥抗凝血活性的 Q-Marker。

[关键词] 坤宁颗粒;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS/MS);网络药理学;谱效学;抗凝血活性;质量标志物(Q-Marker);异常子宫出血(AUB)

[中图分类号] R22;R28;R94;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)07-0168-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230353 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20221220.1357.002.html>

[网络出版日期] 2022-12-22 16:51:55

Predictive Analysis of Quality Markers of Anticoagulant Activity of Kunning Granules Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and Spectral Efficacy

ZHONG Linjiang¹, YANG Fang², WU Jianxiong³, XIE Zhiwei¹, LEI Yanli¹,
TIAN Peiling¹, JIA Lijun⁴, LIU Tao^{1*}

(1. School of Pharmacy, School of Food and Biological Engineering, Sichuan Engineering Research Center of Antiviral Traditional Chinese Medicine Industrialization, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Chengdu Tianhe Sino-Western Medical Conservation Co. Ltd., Chengdu 610000, China;

3. Suzhou Yifan Pharmaceutical Co. Ltd., Suzhou 234000, China;

4. Sichuan Taiji Pharmaceutical Co. Ltd., Taiji Group, Chengdu 610207, China)

[收稿日期] 2022-09-30

[基金项目] 四川省 2021—2023 年高等教育人才培养质量和教学改革项目(JG2021-1106);四川省科技创新苗子工程项目(2021054);新药中试四川省重点实验室开放课题(XYZS2022-01);成都大学 2021-2023 年研究生人才培养质量和教学改革立项项目(cd-jgy2022004)

[第一作者] 钟林江,在读硕士,从事中成药再评价及中药资源综合利用研究,E-mail:3374435278@qq.com

[通信作者] *刘涛,博士,研究员级高级工程师,从事中药新药研发及再评价研究,E-mail:liutao0578@sina.com

[Abstract] Objective: To perform a predictive analysis of the quality marker (Q-Marker) for the anticoagulant activity of Kunming granules. **Method:** The chemical components of Kunming granules were analyzed by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with the mobile phase of acetonitrile(A)-25 mmol·L⁻¹ ammonium acetate aqueous solution(B) for gradient elution (0-5 min, 5%-22%A; 5-10 min, 22%-30%A; 10-15 min, 30%-95%A; 15-20 min, 95%-5%A; 20-30 min, 5%A), flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, column temperature at 30 °C, injection volume of 1 μL, electrospray ionization(ESI), positive and negative ion detection modes. Interaction analysis between the targets of chemical components and the targets of abnormal uterine bleeding(AUB) was performed by network pharmacology, and the key components were screened through network topology analysis. The fingerprints of 10 batches of Kunming granules were established by high performance liquid chromatography(HPLC), the anticoagulant activity of the granules was determined by blood coagulation method and fibrinogen plate method, and the spectrum-effective relationship was established. The components co-occurring in the topological analysis and spectrum-effective relationship were selected as Q-Markers, and their anticoagulant activities were verified and confirmed. **Result:** A total of 475 chemical components were identified from Kunming Granule, of which 22 key components such as salvianolic acid B, paeoniflorin, naringin and neohesperidin, were the potential material basis for the treatment of AUB. The spectrum-effective analysis showed that peaks 7(paeoniflorin), 9(naringin), 10(neohesperidin) and 11(salvianolic acid B) were the optimal principal components, and *in vitro* activity test showed that these four components could better characterize their anticoagulant activity. **Conclusion:** Salvianolic acid B, paeoniflorin, neohesperidin and naringin may be Q-Markers for the anticoagulant activity of Kunming granules.

[Keywords] Kunming granules; ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS); network pharmacology; spectral efficacy; anticoagulant activity; quality marker(Q-Marker); abnormal uterine bleeding(AUB)

坤宁颗粒源自24代中医世家岷山杨氏妇科方,由益母草、当归和赤芍等11味中药组成,具活血祛瘀、调经补血的功效^[1],临床主要用于治疗气滞血瘀所致妇女月经过多、经期延长及子宫出血等^[2]。该制剂为已上市品种,其现行质量标准为国家药品标准YBZ29972005-2015Z,该标准采用薄层色谱法进行定性、通过指标性成分含量进行定量^[3],然而其处方药味多、化学成分复杂,现有标准不能反映成分与活性之间的量效关系,质量控制指标难以完全保障坤宁颗粒产品的安全性和有效性,也无法反映该制剂的临床疗效,有待进一步完善。文献研究发现,目前对坤宁颗粒的研究主要集中于单一成分的含量测定和指纹图谱研究,尚无对其体内活性的研究报道^[4]。本课题组前期研究发现坤宁颗粒在体外表现出了一定的抗凝血活性,但未对其物质基础进行研究。

中药质量标志物(Q-Marker)是指存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的与中药功能属性密切相关的化学物质,在药物质量控制过程中可将其作为反映中药安全性和有效性

的标示性物质,为中药质量控制方式提供了一种新方法和新思路^[5-6]。谱效学是建立在中药指纹图谱研究基础上,最大限度地获取有用的化学信息,将标示性物质与药效结果相关联,可间接反映产品成分与疗效之间内在联系的一种分析方法,可用于探索Q-Marker与药物活性的相关性^[7-9]。

综上所述,本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)对坤宁颗粒中间体进行化学成分分析,在此基础上利用网络药理学将化学成分与疾病相关联,初步预测坤宁颗粒治疗异常子宫出血(AUB)的潜在药效成分;同时,通过高效液相色谱法(HPLC)建立10批坤宁颗粒中间体指纹图谱,采用血液凝固法及纤维蛋白原平板法测定坤宁颗粒中间体的抗凝血活性,建立其谱效关系;此外,选择网络拓扑分析与谱效分析中的共有成分作为Q-Marker,并对其抗凝血活性进行验证和确认,以期完善坤宁颗粒的质量控制体系提供参考。

1 材料

TripleTOF 6600型四极杆串联飞行时间高分辨

质谱仪(美国 AB SCIEX 公司), e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), FA2004 型 1/1 万电子天平(上海良平仪器仪表有限公司), SQP 型 1/10 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], DZF-6050A 型真空干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司), XFS-280MB 型手提式压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司), JJ-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州市金净净化设备科技有限公司), XN06-IV 型全自动凝血测定仪(武汉景川诊断技术股份有限公司)。

丹酚酸 B、橙皮苷、柚皮苷、丹参素钠、芍药内酯苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号分别为 wkq21010705、wkq20030407、wkq21020606、wkq21070504、wkq21022202, 纯度均 $\geq 98\%$), 芍药苷、新橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110736-201842、111857-201703, 纯度均 $\geq 97\%$), 凝血酶时间(TT)测定试剂盒(武汉中太生物技术有限公司, 批号 520111), 凝血酶(批号 T20210701)、牛纤维蛋白原(批号 B20210502)试剂(安徽经科生物技术有限公司); 益母草、当归、郁金、木香、枳壳、丹参、荆芥炭、姜炭、牛膝、赤芍、茜草饮片(宿州亿帆药业有限公司, 批号分别为 200901-1~200901-11), 经成都大学食品与生物工程学院刘涛教授鉴定, 均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)相应品种项下规定; 水为纯净水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

SPF 级新西兰家兔, 体质量 1.0~2.0 kg, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(川)2020-030。饲养条件为环境温度(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 光照时间 12 h, 自由饮食饮水。本文涉及的动物实验经成都大学伦理委员会审查批准, 批准号 20210620。

2 方法与结果

2.1 坤宁颗粒中间体的制备

依据国家药品标准 YBZ29972005-2015Z 坤宁颗粒制法项下要求, 取益母草、当归、郁金等饮片按规定工艺制备 11 批坤宁颗粒中间体(批号分别为 20210407-1~20210407-10、20220410)。

2.2 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 检测

2.2.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 流动相选择乙腈(A)-25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~22%A; 5~10 min, 22%~30%A; 10~15 min, 30%~95%A; 15~20 min, 95%~5%A; 20~30 min, 5%A), 流速 0.2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL 。

2.2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式检测, 喷雾电压 5.5、-4.5 kV, 气帘气压力 35 psi (1 psi \approx 6 894.8 Pa), 辅助气压力和雾化气压力均为 55 psi, 离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$, 簇裂解电压 80 V, 碰撞能量 35 V, 碰撞能量滚动区间 15 V, 检测模式为信息关联数据采集模式(IDA), 多重质量亏损过滤(MMDF)和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件, 符合该条件优先进行二级扫描。

2.2.3 供试品溶液的制备^[4]

取坤宁颗粒中间体约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密封, 超声 30 min(240 W, 40 kHz), 滤纸滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 定性分析

取坤宁颗粒中间体(批号 20210407-1)按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 和 2.2.2 项下方法进行数据采集, 获得坤宁颗粒在正、负离子模式下的总离子流图(TIC), 见增强出版附加材料。将质谱数据导入 PeakView 2.0 软件, 获得满足质量误差 < 5 ppm (1 ppm = 1×10^{-6}) 的目标化合物, 通过参考文献信息^[10-12]、数据库[美国国家标准与技术研究院(NIST)14.0]匹配分析及二级碎片裂解规律, 从坤宁颗粒供试品溶液中鉴别出 475 个化合物(化合物信息见增强出版附加材料), 部分化合物信息见表 1。

2.3 网络药理学预测

2.3.1 数据库及软件

UniProt (<https://www.uniprot.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、Venny 2.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>)、STRING 11.5 (<https://string-db.org/>)、DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PharmMapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)、OmicShare (<http://www.omicshare.com>) 数据库及 GraphPad Prism 6、Cytoscape 3.7.2 软件。

2.3.2 药物活性成分筛选

为进一步明确 MS 分析所得化学成分与疾病的相关性, 选择同位素与 MS 得分平均值前 100 的化学成分, 通过 PubChem 数据库, 下载化学成分的 3D 结构, 在 PharmMapper 数据库中检索成分对应靶点的 UniProt ID, 运用 DAVID 数据库, 导入 UniProt ID, 将靶点转化为基因名; 以“Abnormal uterine bleeding”为关键词在 GeneCards 数据库中检索与治疗 AUB 疾病相关的基因, 建立疾病基因集。同时, 利用 Venny 2.0 网站找出成分基因与疾病基因的交集基因, 并进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 将 STRING 分析结果

表1 坤宁颗粒部分化学成分的定性鉴别

Table 1 Qualitative identification of some chemical constituents in Kunning granules

No.	t_R /min	分子式	化合物	δ /ppm	相对分子质量/Da	二级碎片离子 m/z
1	0.66	C ₇ H ₁₃ NO ₂	水苏碱	1.2	143	144, 84
2	6.99	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₅	益母草碱	4.0	311	275, 257
3	10.98	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	川陈皮素	2.1	402	403, 373
4	7.26	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	橙皮素	3.4	302	300, 163
5	7.91	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	新橙皮苷	2.6	610	303, 449, 345
6	7.91	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷	2.6	610	303, 449, 345
7	0.60	C ₅ H ₁₁ NO ₂	L-缬氨酸	0.4	117	116
8	11.62	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	橘皮素	2.3	372	373, 343
9	8.34	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	乌药醚内酯	2.7	260	261, 173
10	7.73	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	野漆树苷	0.4	578	271, 153
11	6.93	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	沉香四醇	2.4	318	319, 301, 255, 91
12	7.73	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	牡荆素鼠李糖苷	0.4	578	577, 413
13	7.72	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素	1.9	272	270, 118
14	9.11	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	6-羟基大豆苷元	2.6	270	252, 222
15	10.38	C ₁₂ H ₈ O ₄	佛手苷内酯	1.3	216	145
16	8.32	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	丹酚酸B	0.6	718	339, 185
17	7.07	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	木通苯乙醇苷B	-0.1	478	315, 281, 179, 161, 135
18	10.35	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	山柰素	1.9	300	268, 136
19	6.56	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷	0.8	480	525, 327
20	7.25	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	柚皮苷	1.6	580	545, 419, 435, 401, 315, 273, 129

导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析, 构建成分-靶标-通路相互作用网络, 见图 1, 根据网络拓扑参数分析筛选出槲皮素、染料木素、丹酚酸 B、芹菜素、雷公藤内酯醇、芍药苷、大黄素、柚皮苷、黄芩

素、新橙皮苷、橙皮苷等 22 个关键成分作为坤宁颗粒治疗 AUB 潜在的药效物质基础。网络药理学相关分析图表详见增强出版附加材料, 部分关键成分见表 2。

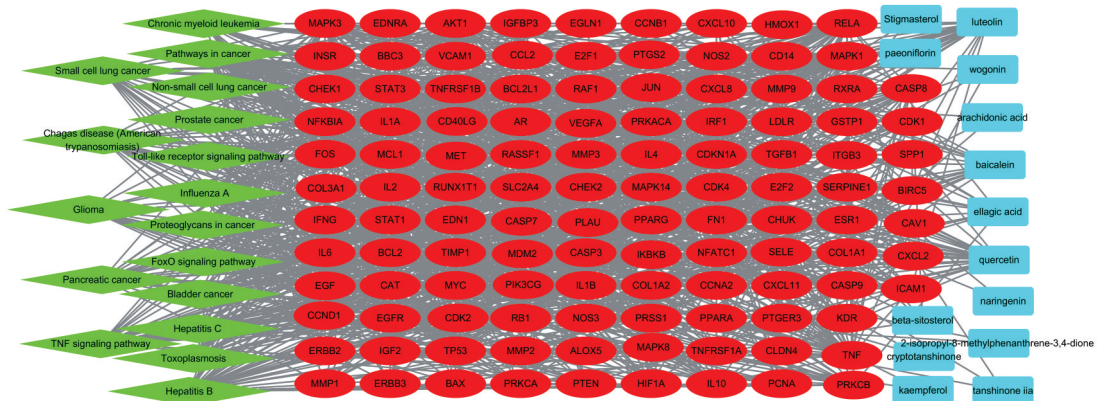


图1 坤宁颗粒抗AUB的成分-靶点-通路网络

Fig. 1 Component-target-pathway network of Kunning granules against AUB

2.4 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 采用 Supersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.2% 磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~22 min, 5%~22%A; 22~40 min,

22%~30%A; 40~60 min, 30%~95%A; 60~65 min, 95%~5%A; 65~70 min, 5%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL, 梯度检测波长 (0~19 min, 220 nm; 19~70 min, 240 nm), 柱温 30 °C。

表2 坤宁颗粒部分关键活性成分网络拓扑参数

Table 2 Network topology parameters of some key active ingredients in Kunning granules

成分	平均最短路径长度(ASPL)	中心度(BC)	聚类系数(CC)	度值
槲皮素	1.665	0.171	0.600	54
染料木素	1.853	0.052	0.540	29
芹菜素	1.936	0.023	0.517	27
雷公藤内酯醇	1.972	0.020	0.507	15
大黄素	2.041	0.015	0.490	14
黄芩素	2.119	0.027	0.472	11
去甲斑蝥素	2.083	0.009	0.480	6
橙皮苷	2.119	0.007	0.472	5
新橙皮苷	2.239	0.002	0.447	3
柚皮苷	2.257	0.002	0.443	3
香草酸	2.142	0.003	0.467	2
丹酚酸B	2.173	0.003	0.416	2
丁香醛	2.266	0.002	0.441	2
槐定碱	2.298	0.001	0.435	2
芍药苷	2.367	0.002	0.422	2

2.4.2 供试品溶液的制备 同2.2.3项。

2.4.3 对照品溶液的制备 取丹酚酸B、丹参素钠、芍药苷、芍药内酯苷、橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇稀释并定容至25 mL,配制成单一对照品溶液。取各对照品溶液1.0 mL混合后加甲醇定容至10 mL,得上述成分质量浓度分别为0.101、1.060、0.105、0.568、0.111、0.070、0.063 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4.4 稳定性考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、4、8、12、24、48 h按2.4.1项下色谱条件测定,计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差(RSD)分别为3.0%和2.6%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.4.5 精密度考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件连续进样6次,计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD分别为2.9%和0.9%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)适量,按2.4.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.4.1项下色谱条件测定,计算各共有峰相对峰面积及相对保留时间RSD分别为2.8%和2.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.7 坤宁颗粒HPLC指纹图谱的建立 取10批坤宁颗粒中间体,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件测定,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对数据进行多点校正,采用中位数法生成对照指纹图谱,确定13个共有色谱峰。经对照品比对,确认2号峰为丹参素钠、6号峰为芍药内酯苷、7号峰为芍药苷、9号峰为柚皮苷、10号峰为新橙皮苷、11号峰为丹酚酸B。对照指纹图谱及混合对照品图谱见图2。

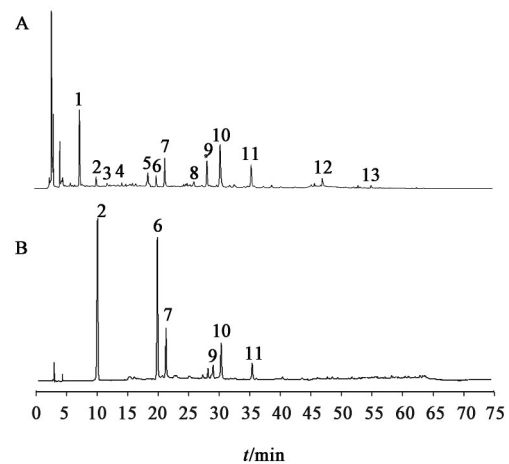
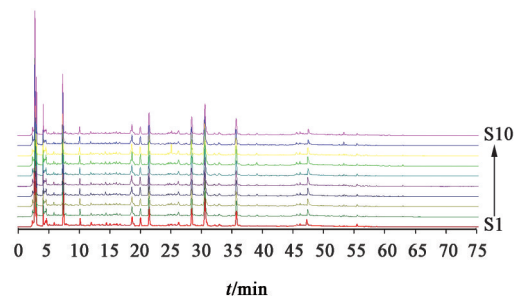


图2 坤宁颗粒中间体的HPLC对照指纹谱(A)及混合对照品HPLC(B)

Fig. 2 HPLC control fingerprint spectrum of intermediates of Kunning granules(A) and HPLC of mixed references(B)

2.4.8 相似度分析 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对10批坤宁颗粒中间体(批号20210407-1~20210407-10)的指纹图谱进行相似度分析,结果这10批中间体与对照指纹图谱的相似度分别为0.974、0.997、0.997、0.997、0.995、0.994、0.992、0.996、0.995和0.994,各批次间相似度良好。见图3。



注:S1~S10.批号20210407-1~20210407-10

图3 坤宁颗粒中间体的HPLC指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of intermediates of Kunning granules

2.5 坤宁颗粒中间体的TT测定

2.5.1 血浆的制备 使用一次性负压采血管(装有

0.109 mol·L⁻¹枸橼酸钠)取正常雄兔耳缘静脉血液^[21],混匀后转至10 mL离心管中,于3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径15 cm),取上清液,即得。

2.5.2 供试品溶液的制备 取坤宁颗粒中间体约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入纯化水25 mL,密封,超声处理15 min,滤纸滤过,取续滤液,即得。

2.5.3 测定方式 取血浆100 μL于半自动凝血测定仪中37 °C保温180 s,加入供试品溶液100 μL,在“准备就绪”模式下,加入凝血酶试剂100 μL,以纯化水为对照组进行测定。

2.5.4 稳定性考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)按2.5.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、10、30、60、120 min按2.5.3项下方法进行测定,计算TT的RSD 1.0%,表明供试品溶液在120 min内稳定。

2.5.5 精密度考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)按2.5.2项下方法制备供试品溶液,按2.5.3项下方法连续测定6次,计算TT的RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.5.6 重复性考察 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1)按2.5.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.5.3项下方法进行测定,计算TT的RSD 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.5.7 样品测定 取10批坤宁颗粒中间体适量,精密称定,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,按2.5.3项下方法测定TT,见表3。

表3 10批坤宁颗粒中间体的TT

Table 3 TT of 10 batches of intermediates of Kunning granules

批号	取样量/g	TT/s	单位TT/s
20210407-1	1.015 8	9.8	9.6
20210407-2	1.146 1	14.0	12.2
20210407-3	1.109 4	12.5	11.3
20210407-4	1.081 2	10.7	9.9
20210407-5	1.056 0	12.7	12.0
20210407-6	1.011 0	12.9	12.8
20210407-7	1.006 9	12.2	12.1
20210407-8	1.019 0	13.5	13.2
20210407-9	1.124 7	14.6	13.0
20210407-10	1.005 6	13.0	13.0

2.6 坤宁颗粒中间体抗凝血活性的测定

2.6.1 纤维蛋白原平板的制备 取直径为9 cm的培养皿,经高压蒸汽灭菌后,依次加入约90 °C的1%

琼脂溶液20 mL、0.3%纤维蛋白原溶液15 mL,摇匀,盖上皿盖,冷却凝固后,用打孔器打出直径约3.5 mm的孔,备用。

2.6.2 对照品溶液的制备 取活性为1 000 U的凝血酶,置10 mL量瓶中,加生理盐水定容至刻度,得100 U·mL⁻¹凝血酶溶液。分别量取该凝血酶溶液5、4、3、2、1 mL置于10 mL量瓶中,加生理盐水稀释,制成凝血酶浓度分别为50、40、30、20、10 U·mL⁻¹的溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 取坤宁颗粒中间体约1.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入纯化水25 mL,密封,超声处理15 min,滤纸滤过,取续滤液与100 U·mL⁻¹凝血酶溶液按照1:1的比例混合均匀,即得。取纯化水和生理盐水制备阴性样品,以分别消除供试品和凝血酶溶媒对结果的干扰。

2.6.4 标准曲线的建立 分别精密吸取10、20、30、40、50 U·mL⁻¹凝血酶溶液各25 μL点样于纤维蛋白原平板上,置37 °C下恒温培养15 h,取出,测定其沉淀圈面积的大小,见表4。以凝血酶浓度为横坐标,沉淀圈面积(沉淀圈面积=π×长径/2×短径/2)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程Y=4.844 9X+22.517(r=0.995),线性范围10~50 U·mL⁻¹。

表4 凝血酶的线性关系考察

Table 4 Linear investigation of thrombin

凝血酶浓度/U·mL ⁻¹	长径/mm	短径/mm	沉淀圈面积/mm ²
10	9.47	9.12	67.80
20	13.19	11.59	120.00
30	15.01	14.38	169.44
40	16.97	16.82	224.07
50	18.28	17.98	258.01

2.6.5 同板精密度试验 分别精密吸取50 U·mL⁻¹凝血酶溶液25 μL,进行同板点样6次,置37 °C下恒温培养15 h,取出,测定其沉淀圈面积,计算RSD 4.5%,表明该方法同板精密度良好。

2.6.6 异板精密度试验 分别精密吸取50 U·mL⁻¹凝血酶25 μL点样于6个不同的纤维蛋白原平板上,置37 °C下恒温培养15 h,取出,测定其沉淀圈面积,计算RSD 3.4%,表明该方法异板精密度良好。

2.6.7 稳定性试验 取坤宁颗粒中间体(批号20210407-1),按2.6.3项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、0.5、1、1.5、2、4 h点样25 μL,同时点阴性样品及阳性对照品溶液(50 U·mL⁻¹凝血酶溶液),置37 °C下恒温培养15 h,取出,测定其沉淀圈

面积,计算供试品与 $50\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 凝血酶溶液的沉淀圈面积差的RSD 2.9%,表明供试品溶液在4 h内稳定性良好。

2.6.8 重复性试验 取同一批坤宁颗粒中间体(批号20210407-1),按2.6.3项下方法平行制备供试品溶液6份,分别精密吸取 $25\ \mu\text{L}$ 点样于纤维蛋白原平板,并取阴性样品和阳性对照品溶液($50\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 凝血酶溶液)点样,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温培养15 h,取出,测定其沉淀圈面积,计算单位质量样品所产生供试品与 $50\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 凝血酶溶液的沉淀圈面积差的RSD 3.9%,表明该方法重复性良好。

2.6.9 样品测定 取10批坤宁颗粒中间体适量,按2.6.3项下方法制备供试品溶液,精密量取供试品溶液 $25\ \mu\text{L}$ 点样于纤维蛋白原平板上,每板均另点阴性样品和阳性对照品溶液($10、50\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 凝血酶溶液), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养15 h,取出,测定沉淀圈面积,计算单位质量活性值,见表5和增强出版附加材料。

表5 坤宁颗粒中间体的抗凝血活性测定

Table 5 Determination of anticoagulant activity of intermediates of Kunning granules

批号	取样量/g	沉淀圈减少面积/ mm^2	单位质量减少面积/ mm^2	活性值/U
20210407-1	1.617 5	99.15	61.30	210.66
20210407-2	1.614 9	84.35	52.23	179.79
20210407-3	1.647 5	76.68	46.54	157.05
20210407-4	1.632 9	86.83	53.18	181.03
20210407-5	1.629 6	77.77	47.72	162.79
20210407-6	1.672 6	73.95	44.21	146.97
20210407-7	1.629 8	82.96	50.90	168.11
20210407-8	1.627 8	95.06	58.40	199.43
20210407-9	1.664 7	74.99	45.05	150.43
20210407-10	1.673 0	84.03	50.23	166.90

注: $X=(Y-b)/k$,式中 X 为凝血酶浓度, Y 为沉淀圈减少面积, b 为标准曲线常数, k 为标准曲线斜率

2.7 坤宁颗粒中间体的谱效相关性分析

2.7.1 最优主成分的确定 以10批坤宁颗粒中间体确定的13个共有峰标准化峰面积为基础,采用SPSS 21.0中“Reduction”的“Factor”考察最优主成分分析,根据解释数据变异的的比例和碎石图检验,确定最优主成分,见表6和图4。结果发现当主成分数为4个时,前4位主成分解释数据变异的总比例93.97%,且陡坡图在第4主成分之后趋于平缓,因此该分析模型的最优主成分数为4个,分别为共有峰7、9、10、11。

表6 坤宁颗粒中间体HPLC指纹图谱共有峰的主成分分析解释的总方差

Table 6 Total variance explained by principal component analysis of common peaks in HPLC fingerprint of intermediates of Kunning granules

峰号	方差比例	累积比例	峰号	方差比例	累积比例
1	60.600	60.62	8	0.241	99.95
2	17.150	77.77	9	0.051	100
3	12.150	89.93	10	1.021×10^{-13}	100
4	4.040	93.97	11	1.009×10^{-13}	100
5	3.100	97.06	12	-1.004×10^{-13}	100
6	1.780	98.84	13	-1.012×10^{-13}	100
7	0.870	99.71			

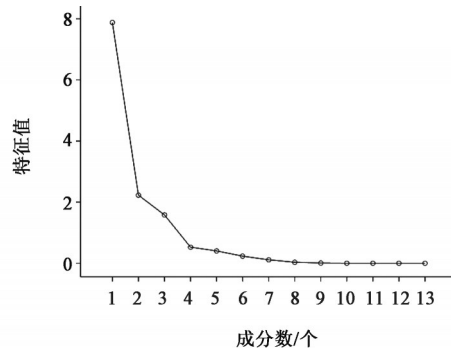


图4 坤宁颗粒中间体HPLC指纹图谱共有峰的主成分碎石分析
Fig. 4 Principal component fragmentation analysis of common peaks in HPLC fingerprint of intermediates of Kunning granules

2.7.2 相关性分析 以10批坤宁颗粒中间体抗凝血活性指标(TT和抗凝血活性值)为因变量,共有峰峰面积为自变量,利用SPSS 21.0进行相关性分析,分析各共有峰与抗凝血活性的相关性。结果表明坤宁颗粒中间体HPLC指纹图谱中的8个共有峰与TT呈正相关,分别为1、2、5~7、9~11号峰;7个共有峰与抗凝血活性值呈正相关,分别为4、6、7、9~12号峰。其中7、9~11号峰与TT及抗凝血活性值均为正相关,与主成分分析结果一致。各共有峰与抗凝血活性指标相关系数见表7。结果发现7、9~11号峰与抗凝血活性有较大相关性,网络药理学筛选结果也表明丹酚酸B、芍药苷、柚皮苷及新橙皮苷是坤宁颗粒治疗AUB的关键成分,推测这4个成分为该制剂在治疗AUB过程中发挥抗凝血作用的Q-Marker。

2.8 坤宁颗粒抗凝血活性Q-Marker的验证 通过UHPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学对坤宁颗粒的Q-Marker进行理论初筛,结合谱效学分析结果,初步将丹酚酸B、芍药苷、柚皮苷及新橙皮苷作为坤宁颗粒抗凝血活性的Q-Marker,依据Q-Marker确定

表7 10批坤宁颗粒中间体与抗凝血活性指标的相关性分析
Table 7 Correlation analysis of 10 batches of intermediates of Kunning granules with anticoagulant activity indexes

峰号	TT相关系数	抗凝血活性值相关系数	峰号	TT相关系数	抗凝血活性值相关系数
1	0.494 ¹⁾	-0.111	8	-0.135	-0.111
2	0.180	-0.067	9	0.270	0.220
3	-0.225	-0.022	10	0.270	0.111
4	-0.449	0.556 ¹⁾	11	0.315	0.244
5	0.494 ¹⁾	-0.200	12	-0.315	0.156
6	0.045	0.200	13	-0.090	-0.156
7	0.449	0.156			

注:¹⁾P<0.05

的原则,测定了坤宁颗粒中上述4个成分的含量并进行了药效验证。

2.8.1 对照品储备液的制备 分别取丹酚酸B、芍药苷适量,精密称定,置于量瓶中,加水定容至刻度,得质量浓度分别为0.67、2.06 g·L⁻¹的对照品溶液;分别取柚皮苷、新橙皮苷适量,精密称定,置于量瓶中,加10%二甲基亚砷定容至刻度,得质量浓度分别为1.70、1.00 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.8.2 抗凝血活性验证 取坤宁颗粒中间体(批号20220410)适量,精密称定,分别按2.5.2和2.6.3项下方法制备供试品溶液。根据坤宁颗粒中间体中上述4个成分的含量,取2.8.1项下对照品储备液,加入对应溶媒制成与供试品溶液中含量一致的4种对照品溶液,测定其抗凝血活性,见表8。结果发现在丹酚酸B、芍药苷、柚皮苷、新橙皮苷与样品含量一致的情况下,4个Q-Marker都表现出一定的抗凝血活性,但这4个成分的抗凝血作用之和大于样品,说明坤宁颗粒中除了这4种成分具有抗凝血作用外,可能还存在具有凝血作用的其他成分,提示坤宁颗粒的抗凝血活性是多种物质共同作用的最终结果。

表8 坤宁颗粒Q-Marker抗凝血活性的验证试验(n=5)
Table 8 Validation test of anticoagulant activity of Q-Marker in Kunning granules (n=5)

组别	TT/s	活性值/U
坤宁颗粒水溶液	9.3	360.45
丹酚酸B对照品溶液	2.3	379.27
芍药苷对照品溶液	2.0	302.70
坤宁颗粒二甲基亚砷溶液	11.5	374.20
柚皮苷对照品溶液	7.0	209.90
新橙皮苷对照品溶液	4.4	228.07

3 讨论

Q-Marker的确定可以从基于植物亲缘学与化学成分的特有性、有效性和可测性等方面进行预测分析,主要包括谱效相关、网络药理学和代谢组学等技术手段^[13-19]。目前网络药理学主要采用现有数据库中的化学成分筛选药材中的活性成分^[20-21],然而对于中成药而言,采用该方法筛选得到的成分只是各味原药材所含活性成分的简单加和,未考虑中成药生产过程中各成分变化及药材相互作用等问题,也未考虑各活性成分在中成药中的含量差异。本实验从理论研究和实验验证两方面共同确证了坤宁颗粒抗凝血作用的Q-Marker,能够更好地揭示Q-Marker与临床疗效的相关性。本研究通过UHPLC-Q-TOF-MS/MS定性鉴别坤宁颗粒中475个成分,在此基础上,通过网络药理学研究坤宁颗粒治疗AUB的活性成分,弥补了网络药理学在筛选坤宁颗粒中化学成分的不足,也将化学成分与疾病相关联,更加清晰地确证了坤宁颗粒治疗AUB过程中发挥抗凝血作用的潜在物质基础。为了进一步明确坤宁颗粒实际发挥抗凝血作用的关键物质基础,本文还通过建立坤宁颗粒HPLC指纹图谱与抗凝血活性的谱效关系,利用主成分和相关性分析2种方法分析了坤宁颗粒HPLC指纹图谱的13个共有峰与TT、抗凝血活性值的关联性;结合网络药理学与谱效相关结果,推测丹酚酸B、芍药苷、柚皮苷及新橙皮苷4个成分可作为坤宁颗粒的Q-Marker。据报道,丹酚酸B可通过舒张冠状动脉、抗血小板聚集来发挥活性效应^[22]。坤宁颗粒现行标准中含量测定项下只建立了盐酸水苏碱和柚皮苷的检测标准,但本文经过活性验证,确认丹酚酸B和芍药苷等4个成分为坤宁颗粒的主要Q-Marker,其含量水平可以初步表征坤宁颗粒的抗凝血活性。因此在生产工艺及质量控制过程中,应对这4个成分进行重点关注,建议纳入坤宁颗粒企业内控质量标准中。

药效指标的选择是谱效学研究的关键^[6],本研究采用纤维蛋白原平板法和血液凝固法测定坤宁颗粒的体外抗凝血活性。纤维蛋白原平板法通过扩散反应产生的沉淀圈面积大小来表征样品抗凝血活性的强弱,而TT则通过样品与纯化水凝固时间差异体现,2个指标从不同角度表征了坤宁颗粒的体外活性。在本实验中,因柚皮苷和新橙皮苷不溶于水,难以测定其活性,故对其溶媒进行了考察。文献研究表明,柚皮苷和新橙皮苷可溶解于二甲基亚砷中,但在实验过程中发现高浓度二甲基亚砷会

影响TT测定结果,故对二甲基亚砷浓度进行了考察,结果表明10%二甲基亚砷能溶解相应对照品且对结果无干扰^[23]。10批坤宁颗粒中间体之间的抗凝血活性存在差异,其原因可能是由于制备中间体的10批原药材内在质量存在差异。此外,本文研究结果发现筛选得到的4个Q-Marker的抗凝血活性之和高于坤宁颗粒样品,表明该制剂中还存在其他具有凝血活性的成分,从侧面证明中药具有双向调节作用。然而,由于体外活性研究有一定局限性,后续将建立相关动物模型测定坤宁颗粒的体内活性,多方面阐明其发挥作用的物质基础。综上所述,本文采用UHPLC-Q-TOF-MS/MS、网络药理学并结合谱效分析最终确定了坤宁颗粒发挥抗凝血活性的主要Q-Marker,对该制剂的质量标准提升具有较为重要的参考价值,也可为中药复方制剂的质量标准再评价研究提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杨胜华,杨君. 坤宁颗粒联合米非司酮治疗围绝经期功能性子宫出血的临床研究[J]. 药物评价研究, 2021,44(5):1066-1070.
- [2] 张凡. 探讨坤宁颗粒治疗功能异常性子宫出血的临床研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019,19(98):269-270.
- [3] 郑倩,毕雪艳,李晓敏. HPLC法测定坤宁颗粒中盐酸水苏碱的含量[J]. 中国药事, 2010,24(4):392-393.
- [4] 吴建雄,秦建平,刘峰,等. 坤宁颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2020,35(3):447-449.
- [5] 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.
- [6] 于蓓蓓,闫雪生,周洪雷. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS谱-效相关的柴胡-黄芩药对解热质量标志物筛选及含量测定方法的建立[J]. 中草药, 2022,53(7):1983-1992.
- [7] 伍利华,钟林江,刘涛,等. 基于体外抑菌作用的金莲花系列制剂谱-效关系研究[J]. 中国测试, 2019,45(11):51-56.
- [8] 钟林江,杨俊莉,奉梅,等. 基于数据挖掘的金莲花系列制剂治疗上呼吸道感染的作用机制[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2021,40(1):1-7,30.
- [9] 姜文月,韩淑丽,唐明哲,等. 贞芪扶正颗粒HPLC指纹图谱与其增强免疫功能的谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(8):123-130.
- [10] XIANG Z, CHEN Y Y, QIU J Y. An integrated

chemical analysis and network pharmacology approach to identify quality markers of *Actinidia eriantha* Benth radix on gastric cancer[J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(6):851-868.

- [11] FANG L L, ZHANG J B, LI F Q, et al. A strategy for rapid discovery and validation of active diterpenoids as quality markers in different habitats of Langdu using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multivariate statistical analysis[J]. *J Sep Sci*, 2022,45(13):2118-2127.
- [12] 刘谊民,许婷,张黄琴,等. 基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021,27(16):177-184.
- [13] 刘昌孝. 发展中药质量标志物(Q-marker)理论方法和策略,研究提升中药科学技术水平[J]. 药学报, 2019,54(2):185-186.
- [14] 邓小芳,陈鸿,王爽,等. 基于UPLC-QTOF-MS/MS和TCMIP v2.0辨识胆南星防治中风的质量标志物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(12):174-182.
- [15] 王慧,梁燕青,于兴泰,等. 基于指纹图谱和网络药理学的江枳壳质量标志物预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(13):198-208.
- [16] 张宽永,沈焱,张璐,等. 基于UPLC-Triple-TOF-MS和网络药理学快速建立郁金潜在中药质量标志物成分库[J]. 中草药, 2022,53(9):2612-2622.
- [17] 杨慧,刘晓凤,刘钱,等. Q-marker思路下的黄连花萼抗菌作用及机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022,15(5):1-6.
- [18] 吴磊,贾利军,钟林江,等. 茵陈质量标志物的预测[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2021,40(2):113-118.
- [19] 郑荣蕾,戴静,何勇志,等. 质量标志物(Q-Marker)预测分析途径研究进展[J]. 中草药, 2021,52(9):2566-2574.
- [20] 姚运秀,潘春晖,王晨,等. 网络药理学在中药复方的研究进展与应用策略[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2020,39(3):257-263.
- [21] 曾鹏,周航. 网络药理学“异病-异方”关键成分筛选同质化现象思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(18):177-191.
- [22] 阿瓦古丽·达吾提,方莲花,杜冠华. 丹酚酸对缺血性心脏病的作用及作用机制研究进展[J]. 药学报, 2021,56(2):368-373.
- [23] 张宇航,杨静,吴宿慧,等. 基于抗凝血活性的丹红注射液生物效价测定方法的建立[J]. 中草药, 2022,53(8):2348-2355.

[责任编辑 刘德文]