

# 基于HPLC指纹图谱、化学计量学结合网络药理学预测补肾痹通丸质量标志物

杨艳丽<sup>1,2</sup>, 舒合拉·朱马别克<sup>2#</sup>, 谭梅娥<sup>2</sup>, 于宁<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832003; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所/新疆维吾尔药重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830000)

**摘要:** 目的 预测补肾痹通丸质量标志物(Q-Marker)。方法 建立HPLC指纹图谱, 通过聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析对共有成分进行筛选, 结合网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络, 分析潜在Q-Marker。结果 10批样品指纹图谱中有14个共有峰, 相似度0.864~0.999。各批样品聚为4类, 4个主成分累积方差贡献率为87.5%。松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷度值较高, 满足“有效性”原则, 其中松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷含量分别为0.128 4~0.172 9、0.344 6~0.434 7、0.122 8~0.276 5 mg/g, 满足“可测性”原则。结论 该方法安全高效, 可用于补肾痹通丸的质量控制, 也能为该制剂治疗膝关节炎机制研究提供参考。松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷可作为肾痹通丸发挥临床疗效的Q-Marker。

**关键词:** 补肾痹通丸; 质量标志物(Q-Marker); HPLC指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 网络药理学

中图分类号: R927.2; R966

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0946-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.033

膝关节炎是一种筋骨共病、痿痹共存的疾病, 其病在筋骨, 病位在肝肾, 在中老年人群中的发病率高<sup>[1-2]</sup>, 目前临床治疗相关中药较少。补肾痹通丸是新疆维吾尔自治区中医医院基于“补益肝肾, 通督祛邪通络”理论创立的临床保膝经验方, 疗效良好, 由烫骨碎补、黄芪、盐杜仲、川芎、防风等11味中药组成, 方中烫骨碎补具有活血散瘀、续筋接骨功效, 为君药; 盐杜仲在《本草汇言》记载有“腰膝之痛非杜仲不除”, 黄芪配伍川芎有间接以健脾达补肾之功, 二药通过滋肝益肾、壮骨强筋、化瘀通络等协同机制实现培本固元与邪实疏解的动态平衡, 共为臣药; 防风用于治疗风湿痹痛, 为佐药, 诸药合用, 共奏补益肝肾、活血化瘀作用, 用于治疗肝肾亏虚型早中期膝关节炎。

本实验将指纹图谱与化学计量学相结合来对补肾痹通丸化学信息进行了全方位、定量化的质量评价<sup>[3-4]</sup>, 再根据网络药理学与中药多成分、多靶点、整体性特性高度契合的特点<sup>[5]</sup>, 分析该制剂

发挥临床疗效的潜在质量标志物(Q-Marker), 以期为其质量控制奠定基础, 同时也为其治疗膝关节炎机制研究提供参考。

## 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); AB135-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); BS110S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; JA2003B型电子天平(上海越平科学仪器有限公司); TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂); KDM型电热套(山东省鄄城永兴仪器厂); 101型电热鼓风干燥箱(北京市永光明医疗仪器有限公司); DZ-20A型中药制丸机(吉首市中诚制药机械有限公司); RE-2000A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); WP-UP-WF-20型超纯水机(四川沃特水处理设备有限公司); KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 松脂醇二葡萄糖苷(批号

收稿日期: 2024-09-24

基金项目: 自治区重点研发计划项目(2021B03006-3)

作者简介: 杨艳丽(1998—), 女, 硕士生, 从事药物制备、质量控制研究。E-mail: 490402567@qq.com

#共同第一作者: 舒合拉·朱马别克(1988—), 女, 实验师, 从事中药民族药新药研究。E-mail: 726146076@qq.com

\*通信作者: 于宁(1982—), 女, 硕士, 研究员, 从事中药新药开发及其新制剂、新剂型研究。E-mail: ynjy798@163.com

111537-202107, 纯度 93.4%)、阿魏酸 (批号 110773-201915, 纯度 99.4%)、升麻素苷 (批号 111522-201913, 纯度 94.6%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201907, 纯度 96.8%)、5-O-甲基维斯阿米醇苷 (批号 111523-202212, 纯度 97.8%)、柚皮苷 (批号 110722-202116, 纯度 93.5%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。补肾痹通丸共 10 批 (编号 S1~S10), 均由新疆维吾尔自治区药物研究所自制 (批号 YFBSW230902、YFBSW230822、YFBSW230823、YFBSW231002、YFBSW230901、YFBSW230825、YFBSW230826、YFBSW230827、YFBSW230828、YFBSW230829)。甲醇为色谱纯; 甲醇、磷酸均为分析纯。补肾痹通丸组方药材经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为正品, 具体见表 1。

表 1 补肾痹通丸组方药材信息

名称	批号	规格	产地	生产企业
黄芪	220401	统货	甘肃岷县	安徽济善堂中药科技有限公司
川芎	220401	统货	四川敖平	安徽济善堂中药科技有限公司
熟地黄	210801	统货	河南武陟	安徽济善堂中药科技有限公司
烫骨碎补	220301	统货	贵州遵义	安徽济善堂中药科技有限公司
牛膝	220201	统货	河南焦作	安徽济善堂中药科技有限公司
盐杜仲	210101	统货	四川巴中	安徽济善堂中药科技有限公司
防风	210802	统货	内蒙赤峰	安徽济善堂中药科技有限公司
独活	220401	统货	湖北十堰	安徽济善堂中药科技有限公司
地龙	210301	统货	广东高州	安徽济善堂中药科技有限公司
鸡血藤	211201	统货	云南昆明	安徽济善堂中药科技有限公司
红花	210801	统货	新疆伊犁	安徽济善堂中药科技有限公司

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) - 0.4% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~65 min, 21%~26% A; 65~70 min, 26%~30% A; 70~110 min, 30% A; 110~114 min, 30%~34% A; 114~125 min, 34% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 227 nm (松脂醇二葡萄糖苷)、250 nm (升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷)、260 nm (毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、283 nm (柚皮苷)、321 nm (阿魏酸); 进样量 10 μL。

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品 精密称取松脂醇二葡萄糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品适量, 置于量瓶中, 甲醇制成质量浓度分别为 0.265 6、0.222 4、0.340 3、0.247 2、0.245 7 mg/mL 的母液; 精密称取阿魏酸对照品适量, 置于量瓶中, 70% 甲醇制成质量浓度

为 0.020 8 mg/mL 的母液。分别精密吸取上述母液 2.00、1.20、2.20、5.00、3.40、8.00 mL, 置于同一 25 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 制成松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷质量浓度分别为 21.250 4、6.666 9、10.686 7、29.947 2、49.442 8、33.411 7 μg/mL 的溶液, 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.2 供试品 取本品适量, 粉碎, 过 60 目筛。精密称取粉末 2.0 g, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 70% 甲醇将瓶颈粉末全部冲入底部, 再定容至刻度以下 2~3 cm 处, 超声处理 60 min, 静置至室温, 70% 甲醇定容, 摇匀, 8 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性样品 按处方和工艺, 分别制成缺盐杜仲, 缺黄芪、川芎、红花, 缺黄芪, 缺防风, 缺烫骨碎补的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.2.4 单味饮片 按处方和工艺, 分别制成 1/5 处方量的烫骨碎补、熟地黄、盐杜仲、牛膝、防风、独活、地龙、红花、鸡血藤提取液, 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液; 将川芎、黄芪粉碎, 过 100 目筛, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

### 2.3 HPLC 指纹图谱建立与化学计量学研究

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (S5) 适量, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 以升麻素苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.5%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.8%, 表明仪器精密度良好。

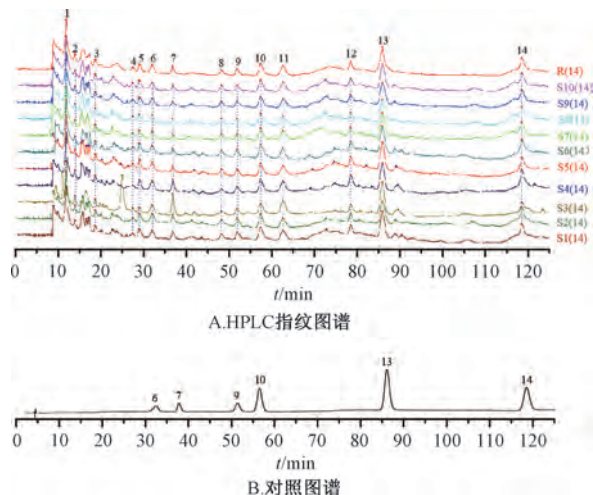
2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液 (S5) 适量, 于 0、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以升麻素苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.8%, 相对峰面积 RSD 均小于 4.5%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批本品 (S5), 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以升麻素苷为参照, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.9%, 相对峰面积 RSD 均小于 3.8%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 图谱生成 取“2.2.1”项下对照品溶液及 10 批样品按“2.2.2”项下方法制备的供试品溶液适量, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 将

相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以S5为参照,中位数法生成对照图谱(R),设定时间窗宽度为0.6 min,选择多点校正及手动标记共有峰后进行Mark峰匹配,见图1,可知共有14个共有峰,与对照品比对后,确定6号峰为松脂醇二葡萄糖苷,7号峰为阿魏酸,9号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷,10号峰为升麻素苷,13号峰为柚皮苷,14号峰为5-O-甲基维斯阿米醇苷。再测定相似度,结果见表2,可知在0.864~0.999之间,表明不同批次样品质量略有不同,但所含成分基本一致。

2.3.5 色谱峰归属 取“2.2”项下供试品(S5)、阴性样品、单味饮片溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,色谱峰归属结果见图2。由此可知,6号峰(松脂醇二葡萄糖苷)归属于杜仲,1、



6. 松脂醇二葡萄糖苷 7. 阿魏酸 9. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷  
10. 升麻素苷 13. 柚皮苷 14. 5-O-甲基维斯阿米醇苷

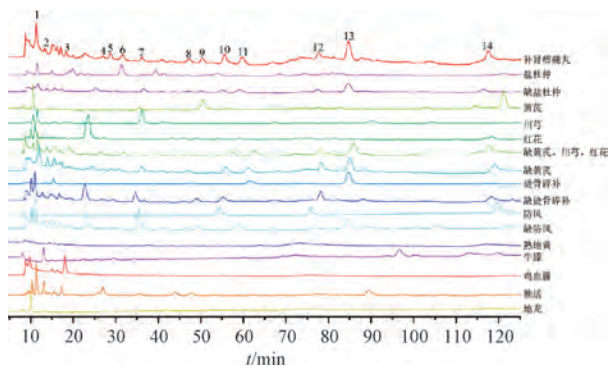
图1 10批补肾痹通丸HPLC指纹图谱及对照图谱

表2 10批补肾痹通丸相似度测定结果

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.999	0.924	0.987	0.962	0.948	0.990	0.980	0.994	0.994	0.996
S2	0.999	1.000	0.919	0.987	0.960	0.948	0.991	0.982	0.995	0.993	0.996
S3	0.924	0.919	1.000	0.915	0.943	0.902	0.909	0.864	0.896	0.932	0.936
S4	0.987	0.987	0.915	1.000	0.969	0.964	0.981	0.975	0.983	0.982	0.992
S5	0.962	0.960	0.943	0.969	1.000	0.989	0.948	0.919	0.948	0.965	0.977
S6	0.948	0.948	0.902	0.964	0.989	1.000	0.934	0.915	0.938	0.947	0.965
S7	0.990	0.991	0.909	0.981	0.948	0.934	1.000	0.991	0.995	0.995	0.992
S8	0.980	0.982	0.864	0.975	0.919	0.915	0.991	1.000	0.994	0.981	0.979
S9	0.994	0.995	0.896	0.983	0.948	0.938	0.995	0.994	1.000	0.993	0.992
S10	0.994	0.993	0.932	0.982	0.965	0.947	0.995	0.981	0.993	1.000	0.996
R	0.996	0.996	0.936	0.992	0.977	0.965	0.992	0.979	0.992	0.996	1.000

7(阿魏酸)、9(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)号峰归属于黄芪,1、7(阿魏酸)号峰归属于川芎,1、2、4、8号峰归属于红花,11、13(柚皮苷)号峰归属于骨碎补,10(升麻素苷)、12、14(5-O-甲基维斯阿米醇苷)号峰归属于防风,2号峰归属于牛膝,3号峰归属于鸡血藤,2、4、5、8号峰归属于独活,1号峰归属于地龙,表明所指认成分具有可追溯性和特有性。

2.3.6 聚类分析 由于共有峰在227 nm波长处的吸收均较理想,故本实验以10批样品共有峰在该波长处的峰面积为指标,通过SPSS 22.0软件进行分析,分别以组间连接和平方欧氏距离为聚类方法和测量区间,结果见图3。由此可知,平方欧氏距离为10时,10批样品聚为4类,第1类为S1~S2、S4,第2类为S5~S6,第3类为S7~S10,第4类为S3,表明不同批次样品存在细微差别,可能与取样差异或配方制备工艺有关。



6. 松脂醇二葡萄糖苷 7. 阿魏酸 9. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷  
10. 升麻素苷 13. 柚皮苷 14. 5-O-甲基维斯阿米醇苷

图2 补肾痹通丸色谱峰归属

2.3.7 主成分分析 将10批样品共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件进行分析,发现均在95%置信区间内,主成分1~4的特征值均大于1,四者累积贡献率达87.5%,表明模型预测良好,可反映指纹图谱的共有峰信息<sup>[6]</sup>;10批样品分为4类,与

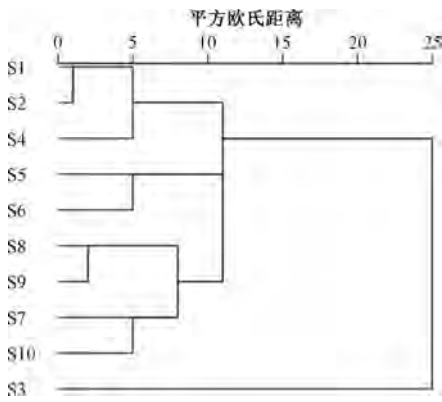


图3 10批补肾痹通丸聚类分析图

聚类分析结果一致,见图4。载荷图见图5,可知1、2、6(松脂醇二葡萄糖苷)、7(阿魏酸)、9(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、10(升麻素苷)、11、13(柚皮苷)、14(5-O-甲基维斯阿米醇苷)号峰距离载荷图原点距离较远,对样品整体质量起到主要作用,可能是标志性成分<sup>[6]</sup>。

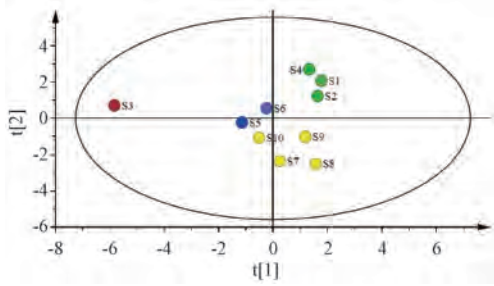


图4 10批补肾痹通丸主成分分析图

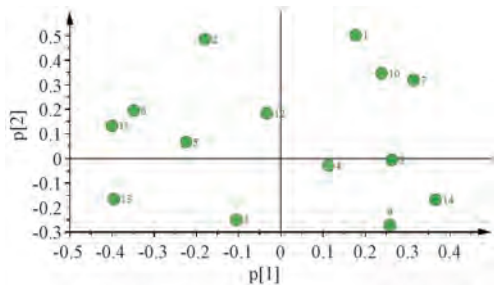


图5 10批补肾痹通丸主成分分析载荷图

2.3.8 正交偏最小二乘判别分析 将10批样品共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件,建立OPLS-DA模型,  $R^2X=0.594$ ,  $R^2Y=0.639$ ,表明模型预测能力理想,稳定性良好,见图6。以VIP值大于1为条件,筛选出8种成分,见图7,由大到小依次为2、1、7(阿魏酸)、11、13(柚皮苷)、6(松脂醇二葡萄糖苷)、14(5-O-甲基维斯阿米醇苷)、10(升麻素苷)号峰,这些可能是引起质量差异的主要成分<sup>[7]</sup>。结合主成分分析,松脂醇二葡萄糖

苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷可能是引起分类差异的主要标志物。

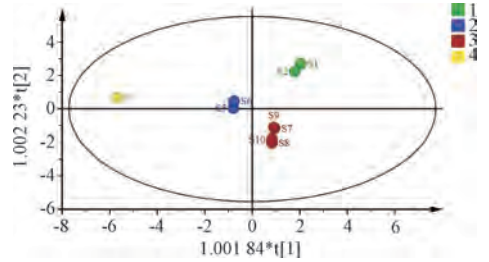


图6 10批补肾痹通丸正交偏最小二乘判别分析得分图

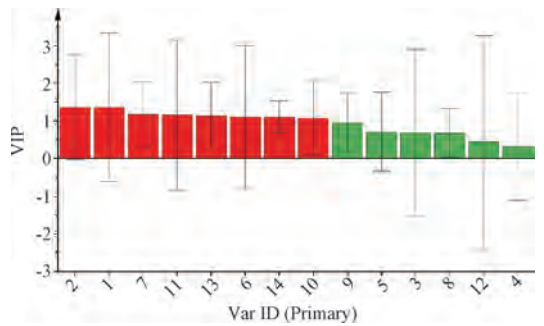


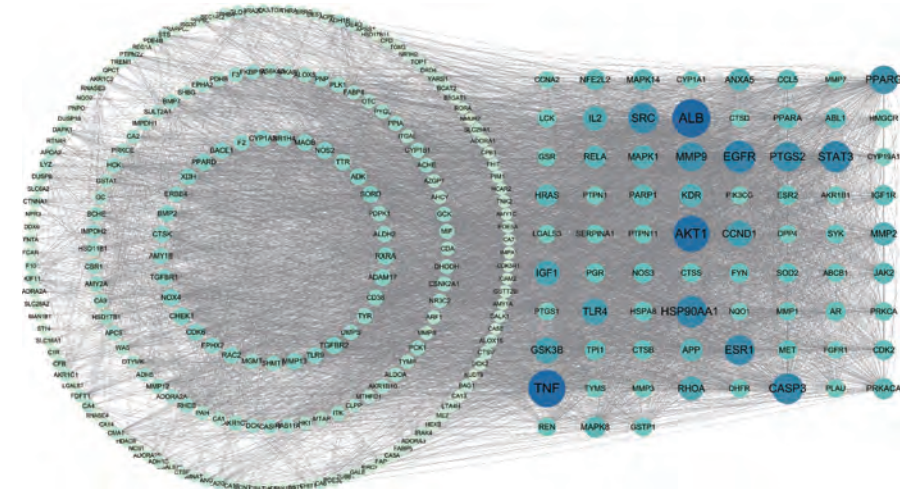
图7 10批补肾痹通丸正交偏最小二乘判别分析VIP值图

## 2.4 网络药理学研究

2.4.1 基于可行和可追溯性的活性成分筛选 文献调研显示,补肾痹通丸中烫骨碎补主要成分为二氢黄酮类、黄烷-3-醇及其衍生物类、苷类等,其中二氢黄酮类的柚皮苷对关节软骨有保护作用<sup>[8-9]</sup>;黄芪主要成分为黄酮类、皂苷类、多糖类,其中异黄酮类的毛蕊异黄酮葡萄糖苷能改善骨衰退疾病,促进骨再生<sup>[10-11]</sup>;盐杜仲主要成分为木脂素类、环烯醚萜类等<sup>[12]</sup>,其中木脂素类的松脂醇二葡萄糖苷可促进成骨细胞形成<sup>[13]</sup>;川芎主要成分为挥发油类、酚酸类等<sup>[14]</sup>,其中酚酸类的阿魏酸对关节软骨有保护作用<sup>[15]</sup>;防风主要成分为挥发油类、色原酮类、香豆素类,其中色原酮类的升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷及相关提取物可通过降低大鼠关节滑膜和软骨中细胞因子水平来发挥抗炎作用<sup>[16-17]</sup>;骨碎补中的柚皮苷、黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、川芎中的阿魏酸、杜仲中的松脂醇二葡萄糖苷、防风中的升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷均为2020年版《中国药典》相关药材质量控制指标<sup>[18]</sup>,并且具有代表性,符合处方配伍要求。由此,选择松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷作为活性成分。

2.4.2 蛋白-蛋白相互作用网络构建 通过 TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获取 6 种活性成分的 mol2 文件和 2D Structure SDF 文件, 导入 PharmMapper (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 平台, 提取 Norm Fit 和 Probability \* 大于中位数的靶点进行靶点预测, 并在 Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点进行校正、

去重后得到 297 个潜在靶点, 导入数据库 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 中, 设置物种为 “*Homo sapiens*”, 以 “medium confidence>0.4” 为筛选条件, 得到 293 个节点、3 408 条边的蛋白-蛋白相互作用网络图。再采用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 “Network Analyzer” 功能进行处理, 基于网络拓扑学参数的整合性筛选策略, 设定节点连接度、中介调控权重、拓扑邻近度均超越样本分布中位值、满足连接度阈值  $\geq 64$  的多级筛选标准, 最终得到 75 个核心靶点, 见图 8。



注: 节点越大、颜色越深, 点越重要。

图 8 蛋白-蛋白相互作用网络图

2.4.3 GO 功能、KEGG 富集分析 将 75 个核心靶点导入 David 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 中, 选择物种为 “*Homo sapiens*”。

结果, GO 功能富集分析中得到 269 个条目, 包括生物过程 (biological process, BP) 194 条, 主要涉及磷酸化、对异生物刺激的反应、肽基酪氨酸磷酸化、一氧化氮生物合成过程的正向调节、

ERK1 和 ERK2 级联的正向调节等过程; 细胞组成 (cell composition, CC) 24 条, 主要涉及富含 ficolin-1 的颗粒内腔、细胞外基质和细胞间隙、细胞溶质、膜筏等区域; 分子功能 (molecular function, MF) 51 条, 主要涉及酶结合位点、蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白激酶结合等功能, 各类别前 10 条见图 9。

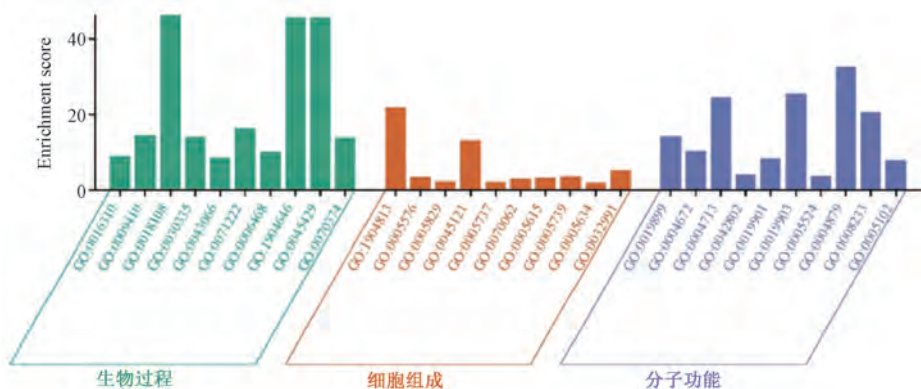


图 9 GO 功能富集分析图

将 KEGG 富集得到的前 35 条通路与补肾痹通丸相关联, 筛选出相关度较高的前 20 条通路, 见

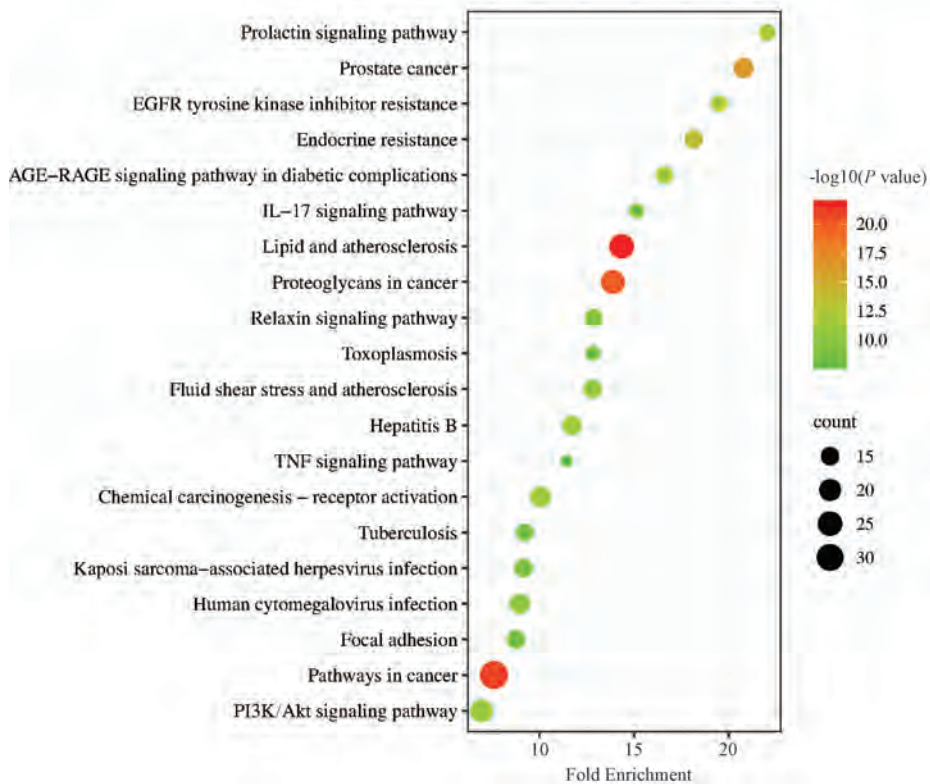


图 10 KEGG 富集分析图

图 10, 可知主要涉及癌症信号通路、化学致癌-受体活化、脂质和动脉粥样硬化信号通路、人巨细胞病毒感染、PI3K/Akt 信号通路、前列腺癌、乙型肝炎等。

2.4.4 “成分-靶点-通路”网络构建及整合分析 以75个核心靶点为6种活性成分和20条信号通路的关联信息,制作网络表格,采用 Cytoscape 3.9.1 软件进行分析,构建“成分-靶点-通路”网络关系图,见图 11。由此可知,松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷度值较高, Akt1、MAPK1、MAPK8、MAPK14、SRC、RELA、MMP9、CASP3、GSK3B 靶点连接度较高,癌症信号通路,癌症中的蛋白聚糖、脂质和动脉粥样硬化信号通路, PI3K-Akt 信号通路,化学致癌作用-受体激活, IL-17 信号通路连接度较高。

膝关节炎进展的中心环节是软骨细胞基质合成和分解代谢功能紊乱,炎症因子对软骨基质代谢的影响是不容忽视的<sup>[19]</sup>,其中 Akt1 可通过调控相关下游蛋白,进行促炎、抗炎反应平衡和免疫应答,最终影响炎症性疾病<sup>[20]</sup>; MAPK8 在骨关节炎软骨退变过程中上调,是骨关节炎软骨退变的潜在生物标志物<sup>[21]</sup>; MAPK1 是调节细胞分化、增殖和存活的

关键,可通过调控 MAPK 信号通路来有效治疗骨关节炎<sup>[22]</sup>;细胞中的 Src 基因被称为 c-Src,是骨代谢中的关键信号分子,在调节生长、存活、增殖、粘附和运动中发挥重要作用<sup>[23]</sup>;雌激素可抑制破骨细胞表达 MMP-9,从而调控破骨细胞的迁移及骨吸收,在骨质疏松的发生与发展中具有重要作用<sup>[24]</sup>。

20 条信号通路主要包括癌症、炎症因子介导的信号通路,其中 PI3K/Akt 信号通路是调节炎症因子产生的经典信号通路,活化 c-Src 蛋白可激活下游 PI3K 蛋白表达,后者通过 PIP2 来完成 Akt 活化,该信号通路刺激 TNF- $\alpha$ 、IL-17 等细胞因子生成,进而参与到破骨细胞的分化过程中,还会诱导破骨细胞迁移,对骨质和关节软骨造成破坏,最终致使关节畸形<sup>[23]</sup>; IL-17 为前炎症细胞因子,其炎症作用来自其招募能力及与其他细胞因子的协同影响,能诱导成纤维细胞、巨噬细胞、软骨细胞和骨细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平升高,加重滑膜炎症和骨破坏,导致软骨降解和组织损伤<sup>[25]</sup>,还可升高软骨细胞和滑膜成纤维细胞中 MMP 表达,从而加速膝关节炎软骨细胞的降解进程,并且在膝关节炎中通过激活 NF- $\kappa$ B、MAPK、JAK/STAT、PI3K/Akt、IL-17 等信号通路共同促进疾病的发生

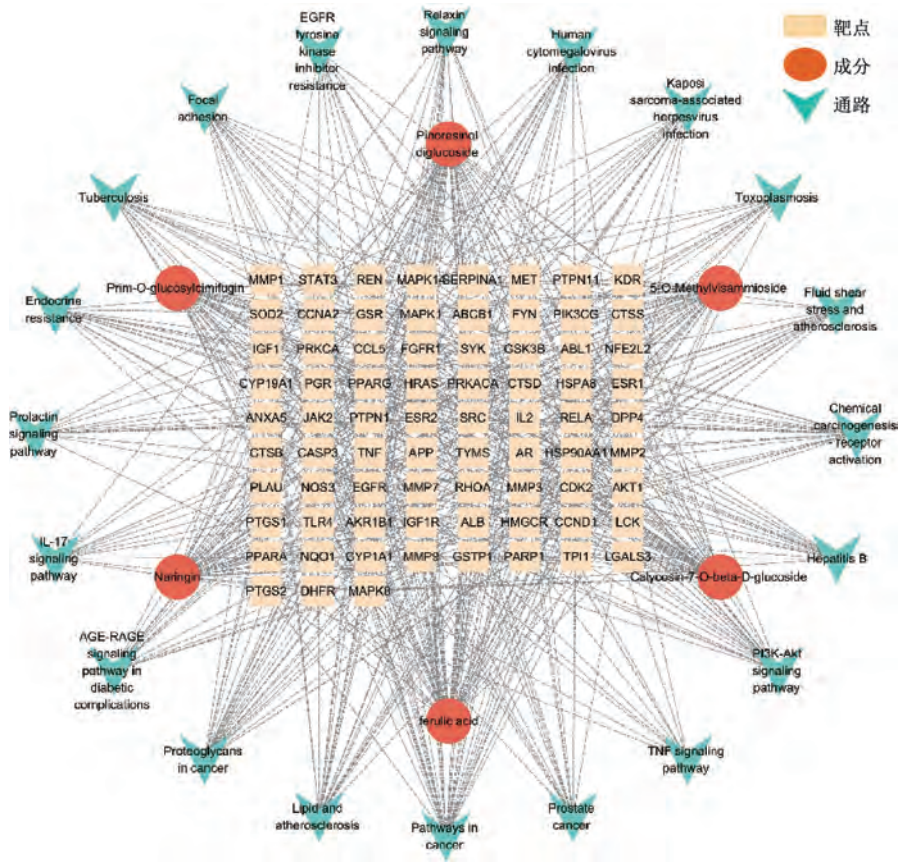


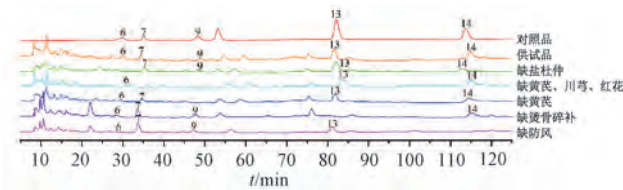
图 11 “成分-靶点-通路”网络图

发展<sup>[25]</sup>。

综上所述，“成分-靶点-通路”网络说明松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷度值较高，具有有效性。

### 2.5 含量测定

2.5.1 专属性试验 取“2.2”项下对照品、供试品、各阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，色谱图见图 12。由此可知，各成分分离度理想，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。



6. 松脂醇二葡萄糖苷 7. 阿魏酸 9. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷  
13. 柚皮苷 14. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷

图 12 各成分 HPLC 色谱图

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 1.00、2.00、3.00、5.00、7.50、

10.00 mL，置于 5 个 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，0.2 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 3，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 3 各成分线性关系

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
松脂醇二葡萄糖苷	$Y = 16.884X + 9.104$	0.999 4	2.13~21.25
阿魏酸	$Y = 52.498X + 6.133$	0.999 8	0.67~6.67
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 34.738X + 12.328$	0.999 8	1.07~10.69
柚皮苷	$Y = 18.894X + 13.243$	0.999 4	4.94~49.44
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y = 24.013X - 4.036$	0.999 8	3.34~33.41

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液 (S5) 适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积 RSD 分别为 2.0%、1.2%、1.5%、1.9%、2.0%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下供试溶液 (S5) 适量，于 0、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得松脂醇二葡

葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇含量 RSD 分别为 3.7%、1.8%、3.8%、1.6%、3.4%，表明溶液 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 精密称取本品 (S5) 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇含量 RSD 分别为 3.1%、2.7%、2.0%、1.2%、3.3%，表明该方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取本品 (S5) 6 份，每份 1.0 g，置于 50 mL 量瓶中，分别加入“2.2.1”项下母液 0.54、2.40、0.23、1.40、0.70 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在

“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇平均加样回收率分别为 106.2%、100.6%、100.9%、103.8%、102.7%，RSD 分别为 2.0%、2.0%、2.0%、1.9%、1.4%。

2.5.7 样品含量测定 取 10 批样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 4。由此可知，各成分含量 RSD 均大于 7.4%，表明具有一定差异；阿魏酸、5-*O*-甲基维斯阿米醇含量差异较大，松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷的较小；松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇含量整体上较高，平均值分别为 0.148 7、0.363 3、0.202 1 mg/g，具有可测性。

表 4 各成分含量测定结果 (mg/g)

编号	松脂醇二葡萄糖苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	柚皮苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷
S1	0.148 7	0.073 2	0.069 5	0.346 8	0.176 3
S2	0.156 2	0.071 6	0.071 7	0.344 6	0.223 0
S3	0.159 6	0.187 9	0.047 5	0.434 7	0.122 8
S4	0.172 9	0.098 3	0.061 6	0.361 0	0.276 5
S5	0.128 4	0.049 3	0.056 5	0.376 8	0.244 2
S6	0.151 2	0.049 5	0.053 7	0.363 1	0.264 9
S7	0.140 4	0.050 0	0.049 2	0.359 8	0.187 9
S8	0.155 2	0.050 6	0.047 5	0.348 4	0.172 7
S9	0.140 2	0.050 9	0.049 7	0.348 0	0.171 9
S10	0.134 3	0.052 8	0.056 5	0.350 2	0.180 4

### 3 讨论与结论

膝关节炎是一种严重影响中老年人生活质量的慢性退行性疾病<sup>[1]</sup>。补肾痹通丸在膝关节炎患者里反馈甚佳，但其质量控制体系并不完备。本实验通过 HPLC 指纹图谱从宏观整体上描述了补肾痹通丸化学信息，HPLC 指纹图谱共标定 14 个共有峰，其中松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷满足“处方配伍”“特有性”“可追溯性”原则，而且是影响制剂质量的特征差异性成分。网络药理学研究结果显示，松脂醇二葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷与补肾痹通丸功效密切相关，主要通过 SRC、MMP9 等靶点和 PI3K/Akt、IL-17 等通路发挥防治作用，满足“有效性”原则。含量测定结果显示，松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量较高，满足“可测性”原则。因此，确定松脂醇二葡萄糖苷、柚皮苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷作为补肾痹通丸的 Q-Marker。

综上所述，本实验结合指纹图谱、化学计量学

和网络药理学，将质量差异性成分与药理有效性成分相关联，预测补肾痹通丸质量标志物，为该制剂质量控制提供了新思路，也为其后续作用机制研究提供了参考。但仍有一定局限性，如未对指认出的成分作进一步验证，故后期可通过分子对接和体内外实验为补肾痹通丸防治膝关节炎作用研究提供更全面的参考。

#### 参考文献：

[1] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南 (2020 年版) [J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 1-14.

[2] 李西海, 张翼, 叶蕻芝, 等. 独活寄生汤治疗风寒湿痹型膝骨关节炎的机制[J]. 中医正骨, 2012, 24(1): 68-71.

[3] 徐妍, 杨华蕊, 杨永寿, 等. 中药指纹图谱研究现状及展望[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(76): 91-94.

[4] Li Y, Shen Y, Yao C L, et al. Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113215.

[5] 庄延双, 蔡宝昌, 张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1):

- 156-160.
- [ 6 ] 廖嘉穗, 付娟, 张日美, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痛通胶囊质量评价研究[J]. 中草药, 2024, 55(8): 2579-2588.
- [ 7 ] 刘伟朋, 邱智东, 石羽文, 等. 参莲草颗粒成型工艺优化及其理化指纹图谱建立[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1110-1118.
- [ 8 ] 朱晓峰, 王廷春, 张荣华, 等. 骨碎补总黄酮对晚期糖基化终末产物作用下成骨细胞分化及 p38 和 ERK1/2 蛋白激酶表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(3): 412-417.
- [ 9 ] 唐琪, 王维情, 王仁飞, 等. 柚皮苷对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖功能的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(2): 171-172.
- [ 10 ] 戴瑜婷, 张雪燕, 王艺璇, 等. 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7): 1754-1764.
- [ 11 ] Jian J, Sun L J, Cheng X, *et al.* Calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside stimulates osteoblast differentiation through regulating the BMP/WNT signaling pathways[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 454-460.
- [ 12 ] 张敏, 梁凤妮, 孙延文, 等. 杜仲化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4740-4761.
- [ 13 ] 吴思敏, 孙薇, 高玉海, 等. 松脂醇二葡萄糖苷促进体外培养成骨细胞骨形成的作用研究[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(5): 9-12.
- [ 14 ] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 川芎的研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(9): 3307-3314.
- [ 15 ] Chen M P, Yang S H, Chou C H, *et al.* The chondroprotective effects of ferulic acid on hydrogen peroxide-stimulated chondrocytes: inhibition of hydrogen peroxide-induced pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase gene expression at the mRNA level[J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(8): 587-595.
- [ 16 ] 胥爱丽, 钟惠娴, 孙冬梅, 等. 基于 HPLC 指纹图谱成分含量和化学模式识别不同产地防风与水防风[J]. 中成药, 2023, 45(5): 1557-1565.
- [ 17 ] Kong X Y, Liu C F, Zhang C, *et al.* The suppressive effects of *Saposhnikovia divaricata* (Fangfeng) chromone extract on rheumatoid arthritis *via* inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 842-850.
- [ 18 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 302.
- [ 19 ] Makolinetz K V, Makolinetz V I, Morozenko D V, *et al.* Dynamics of biochemical markers of connective tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis during conservative treatment with laser therapy[J]. *Wiad Lek*, 2019, 72(5 cz 1): 802-806.
- [ 20 ] 赵青婷. ISOC1 通过 AKT1/PEX11B/过氧化物酶体途径调节巨噬细胞的炎症反应[D]. 重庆: 重庆大学, 2022.
- [ 21 ] 杨明义, 苏亚妮, 许珂, 等. MAPK8、AR、RARA 和 FGF13 是骨关节炎软骨退变过程中的潜在生物标志物[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(15): 3762-3769.
- [ 22 ] 童文婷, 何莲花. 紫草素通过 MAPK1/MAPK 通路对小鼠胶原诱导型关节炎中滑膜炎的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(22): 56-63.
- [ 23 ] 黄凤玉, 郭婉怡, 陈沛萍, 等. 基于 Src/PI3K/Akt 信号通路研究草乌甲素抑制类风湿关节炎软骨破坏的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1438-1445.
- [ 24 ] 魏海英, 宋立文. 健脾益肾壮骨汤治疗原发性骨质疏松症的疗效及对血清 IGF-1/MMP-9/ET-1 水平的影响[J]. 河北医学, 2021, 27(12): 2101-2105.
- [ 25 ] 张续, 郑洁, 赵莉平, 等. IL-17 在骨性关节炎发病机制中的作用及研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(12): 1138-1142.