

胡日查六味丸药效物质基础及其机制研究

李聪明¹, 包红英¹, 敖苏日古嘎¹, 孔梦梦¹, 李桂花^{1,2}, 红艳^{1,2}, 辛颖^{1,2*}

(1. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 蒙药研发国家地方联合工程研究中心, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 目的 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术结合网络药理学探究蒙药胡日查六味丸的药效物质基础及其作用机制。方法 分析采用 Waters CORTECS UPLC T3 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm) 色谱柱; 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱, 检测胡日查六味丸化学成分及其大鼠含药血清中的原型成分。运用网络药理学分析入血原型成分的靶向作用, 并通过 Western blot 实验验证。结果 从中鉴定得到 61 种化学成分, 20 种入血原型成分。网络药理学分析表明, 关键成分(没食子酸乙酯、木香烃内酯、甘松香酮 A 和甘松新酮)可通过作用于 SLC6A4、5-HT2A、IL6、HTR2A、SLC6A3、COMT、TNF、ALB、DRD2、HTR1A、IL1β 等核心靶点, 调节神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、血清素能突触、多巴胺能突触等信号通路, 从而发挥作用。Western blot 实验表明, 胡日查六味丸可显著抑制硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠海马组织 5-HT2A、SLC6A4 蛋白表达。结论 本研究明确了胡日查六味丸的入血原型成分及其作用靶点, 从分子水平揭示了其潜在的治疗优势, 为扩大其临床应用提供了科学依据。

关键词: 胡日查六味丸; 蒙药; 化学成分; 药效物质基础; 分子机制; UPLC-Q-TOF/MS; 网络药理学

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)08-2598-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.018

Pharmacodynamic material basis and mechanisms of Huricha Liuwei Pills

LI Cong-ming¹, BAO Hong-ying¹, AO Suri-guga¹, KONG Meng-meng¹, LI Gui-hua^{1,2},
HONG Yan^{1,2}, XIN Ying^{1,2*}

(1. Mongolian medical college of Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China; 2. National and Local Joint Engineering Research Center for Mongolian Medicine Research and Development, Tongliao 028000, China)

KEY WORDS: Huricha Liuwei Pills; Mongolian medicine; chemical constituents; pharmacodynamic material basis; molecular mechanism; UPLC-QTOF-MS/MS; network pharmacology

蒙药胡日查六味丸, 别名满朝-6、闹朝格-6、六锐丸, 始载于《蒙医金匱》^[1], 《哲兑》^[2] 和《蒙医百科全书》^[3] 中也有相关记载。胡日查六味丸由诃子、红花、闹羊花、黑云香、木香、甘松六味蒙药组成, 具有清热解毒、除粘止痛、通血利窍、散赫依祛湿等功效, 主治粘热、血热、亚麻引起的头痛以及翳障、砂眼等疾病。方中, 红花和闹羊花为君药, 诃子为臣药, 木香、黑云香、甘松为佐使药。胡日查六味丸于 1984 年被载入《内蒙古蒙成药标准》^[4], 1988 年被载入《中华人民共和国

卫生部药品标准·蒙药分册》^[5], 临床疗效显著。目前, UPLC-Q-TOF/MS 和网络药理学技术已成为研究中药药效物质基础与分子水平机制的有效方法^[6-7]。本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 高效、准确地分析胡日查六味丸成分的相对分子质量、元素组成和裂解碎片等信息, 有效识别复杂成分及其化学结构; 同时结合网络药理学, 构建“多成分-多靶点-多途径”的多层次网络, 用于胡日查六味丸药效物质的筛选及其作用机制分析, 以期为其现代研究提供技术支撑。

收稿日期: 2025-04-02

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1712303); 蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放基金项目(MDK2023041)

作者简介: 李聪明(1997—), 男, 硕士生, 从事蒙药及复方质量标准研究。E-mail: 2405169657@qq.com

*通信作者: 辛颖(1980—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事蒙药药效物质基础及质量评价研究。E-mail: xinying20081115@163.com

1 材料

1.1 仪器 H-Class 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AB Sciex Triple TOF[®] 4600 高分辨质谱 (美国 SCIEX 公司); ME104 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-300 BD 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); Sigma 3K15 高速离心机 (美国 Sigma 公司)。

1.2 试剂 乙腈、甲醇 (质谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸 (质谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 纯净水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (辽) 2020-0001], 在恒温 (24±2)℃ 条件下 12 h 光暗循环饲养。实验方案经内蒙古民族大学实验动物伦理委员会论证通过 (伦理号 MD-DW-2024-11-46)。

2 方法

2.1 胡日查六味丸成分分析

2.1.1 供试品溶液制备 取本品适量, 研磨成粉, 取 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10 mL 20% 甲醇, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得。

2.1.2 对照品溶液制备 取鞣花酸、羟基红花黄色素 A、闹羊花毒素 II、木香烃内酯、甘松新酮对照品适量, 分别置于 5 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 甲醇定容至刻度, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得。

2.2 胡日查六味丸入血成分分析

2.2.1 灌胃液制备 取胡日查六味丸适量, 研细、研匀, 加入适量 CMC-Na 配制成 0.144 g/mL 的灌胃液 (20 mL/kg)。

2.2.2 血清样品采集与处理 6 只 SD 雄性大鼠, 分为给药组与空白组, 每组 3 只。给药组灌胃给予胡日查六味丸 (按临床等效剂量换算, 2.16 g/kg), 给药体积 15 mL/kg, 空白组给予等体积 CMC-Na (20 mL/kg), 每天 1 次, 连续 3 周。第 2 周及第 4 周给药后, 大鼠颈背部皮下注射 5 mg/mL 硝酸甘油 (10 mg/kg) 造模, 观察大鼠一般行为, 常规饲养。最后一次硝酸甘油造模后观察大鼠一般行为 2 h 后, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血。合并各组空白血清 (5 mL)、含药血清 (5 mL), 加入 3 倍

量甲醇沉淀蛋白, 涡旋混匀 5 min, 静置 20 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 氮吹至干燥, -80℃ 保存。分析前, 残渣加 200 μL 50% 甲醇复溶, 涡旋混匀 3 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱 Waters CORTECS UPLC T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.6 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 0% A; 5~10 min, 0%~5% A; 10~28 min, 5%~20% A; 28~38 min, 20%~35% A; 38~48 min, 35%~60% A; 48~56 min, 60%~90% A; 56~59 min, 90% A; 59~59.1 min, 90%~0% A; 59.1~62 min, 0% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30℃; 检测波长 190~400 nm; 进样量 5 μL。

2.3.2 质谱 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子扫描。MS 参数: 扫描范围 m/z 50~1 700; 离子源气体压力 50 psi (1 psi=6.895 kPa), 帘气 35 psi; 离子源喷雾电压 -0.9V, 温度 500℃; 去簇电压 100 V; 碰撞能量 10 eV; 碰撞能量扩展 20 eV; 离子释放延迟 30 ms; 离子释放宽度 15 ms。MS/MS 参数: 扫描范围 m/z 50~1 250; 去簇电压 100 V; 碰撞能量±40 eV; 离子释放延迟 (30 ms); 离子释放宽度 (15 ms)。

2.4 化合物鉴别与结构分析 采用 Analyst TF

1.7.1 软件采集信息, Peakview 1.2 软件进行数据处理, 鉴定时优先将质谱数据与 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 数据库和相关文献进行匹配, 根据各色谱峰得分信息对化合物进行初步筛选, 进一步根据各色谱峰一级、二级信息以及对照品比对对化合物进行鉴定, 并按照化合物归属总结归纳; 入血原型成分的鉴定方法同上, 含药血清中与方剂提取液中离子峰保留时间、质荷比一致的化合物, 则确认为胡日查六味丸中的入血原型成分, 并对其中特征成分的代谢产物进行鉴别。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 胡日查六味丸入血原型成分靶点 将经 UPLC-Q-TOF/MS 分析鉴定后的胡日查六味丸入血原型成分, 通过 PubChem 数据库确定其化学结构式, 并通过 Swiss Target Prediction 数据库检索其靶蛋白, 通过公共生物医学数据库 (GeneCards、DisGeNet、OMIM 等), 以“偏头痛” (migraine) 为关键词检索与偏头痛相关的疾病靶点。

2.5.2 网络构建 在 Uniprot 数据库中查找“2.5.1”项下靶蛋白对应的基因名称和编号,将活性成分及相关靶点基因名导入 Cytoscape 3.8.2 软件中进行可视化分析,构建入血原型成分-靶点-通路网络。将疾病和成分靶点导入 Venny 2.1.0 平台取交集,交集靶点导入 STRING 数据库,设置生物体为“*Homo sapiens*”,置信度为 0.7,结果以 tsv 格式导出,并导入 Cytoscape 3.8.2 软件,绘制 PPI 网络,利用 Cytoscape 3.8.2 插件进行节点度 (Degree) 分析,筛选 degree 高于平均值的靶点作为关键核心靶点。

2.5.3 数据分析与处理 构建的“成分-靶点-通路”网络图,运用 Cytoscape 软件中的工具来分析中介中心度和 Degree 这两个重要的网络拓扑参数;利用 DAVID 数据库对获得的靶基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。以 $P < 0.01$ 为标准,筛选相关的生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及主要通路。

2.6 Western blot 法检测大鼠海马组织 SLC6A4、5-HT2A 蛋白表达 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出海马组织,称取 20 mg,提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量,加入蛋白上样缓冲液煮沸,制成蛋白上样样本。通过电泳、转膜、5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,分别加 SLC6A4 (1 : 1 000)、5-HT2A (1 : 1 000) 及 GAPDH (1 : 1 000) 抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤后,加入二抗 (1 : 2 000) 孵育 1 h,再次洗涤。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间采用 t 检验,两组及以上比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 胡日查六味丸化学成分鉴定 共鉴定出 61 种化学成分,见表 1,正、负离子模式总离子流图见图 1~2,其中来源于诃子的有 19 种,红花 22 种,闹羊花 6 种,木香 14 种,黑云香 4 种,甘松 9 种;类型包括萜类 17 种,有机酸 7 种,酚酸类 4 种,黄酮类 8 种,多酚类 7 种,氨基酸及衍生物类 8 种,多羟基酸类 1 种,香豆素类 1 种,脂肪酸类 1 种,其他类 7 种。代表性化合物的裂解规律如下,20 号色谱峰在负离子模式下,准分子离子峰 m/z : 611.161 9 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$,碎片离子 m/z : 491.120 7,与

准分子离子峰分子量相差 120 Da,推测可能丢失一分子 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$;碎片离子 m/z : 403.104 1 为碎片离子 m/z : 491.120 7 丢失一分子 $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ 产生;碎片离子 m/z : 385.094 1 为碎片离子 m/z : 403.104 1 脱去一分子 H_2O 产生;碎片离子 m/z : 325.072 5 为 m/z : 385.094 1 丢失 $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ 产生,结合参考文献 [8] 及数据库,推测 20 号峰为羟基红花黄色素 A。33 号色谱峰在负离子模式下,准分子离子峰 m/z : 300.999 8 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$,碎片离子 m/z : 283.996 9 与准分子离子峰分子量相差 18 Da,推测可能丢失一分子 H_2O 产生;碎片离子 m/z : 229.014 2 为碎片离子 m/z : 300.999 8 丢失一分子 CO_2 和一分子 CO 产生;碎片离子 m/z : 201.019 9 为碎片离子 m/z : 229.014 2 丢失一分子 CO 产生,结合文献 [9] 及数据库,推测 33 号色谱峰为鞣花酸。38 号色谱峰在负离子模式下,分子离子峰 m/z : 455.229 3 $[\text{M} + \text{FA}-\text{H}]^{-}$;碎片离子 m/z : 367.211 9 与 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ m/z : 409.199 4 相差 42 Da,推测可能通过丢失乙酰基产生;碎片离子 m/z : 277.162 1 为碎片离子 m/z : 367.211 9 连续丢失五分子 H_2O 产生,结合文献 [10] 及数据库,推测 38 号色谱峰为闹羊花毒素 II。52 号色谱峰在正离子模式下,准分子离子峰 m/z : 251.164 2 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$,碎片离子 m/z : 219.139 2 与准分子离子峰分子量相差 32 Da,推测可能丢失一分子 O_2 产生;碎片离子 m/z : 177.091 0 为碎片离子 m/z : 219.139 2 丢失一分子 C_3H_6 产生;碎片离子 m/z : 135.080 8 为碎片离子 m/z : 177.091 0 相继丢失一分子 CH_2 和一分子 C_2H_4 产生;碎片离子 m/z : 107.085 6 为碎片离子 m/z : 135.080 8 丢失一分子 CO 产生,结合数据库,推测 52 号色谱峰为甘松新酮。59 号色谱峰在正离子模式下,准分子离子峰 m/z : 233.153 4 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$,碎片离子 m/z : 187.148 7 与准分子离子峰分子量相差 46 Da,推测可能丢失一分子 H_2O 和一分子 CO 产生;碎片离子 m/z : 159.116 4、145.100 9、131.085 5 为碎片离子 m/z : 187.148 7 连续丢失四分子 CH_2 产生,结合文献 [11] 及数据库,推断 59 号色谱峰为木香烯内酯。

3.2 胡日查六味丸入血原型成分鉴定 共鉴定出 20 种入血原型成分,见表 2,血清样品正负离子流图见图 3~4,其中包括萜类 10 种,酚酸类 2 种,黄酮类 2 种,香豆素类 1 种,多酚类 1 种,其他类 4 种。

表1 胡日查六味丸化学成分鉴定结果

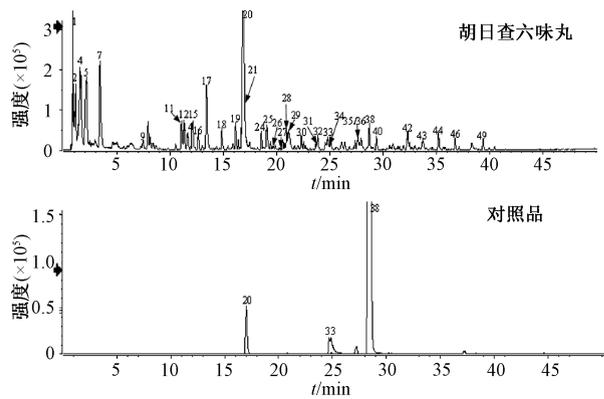
Tab. 1 Identification results of chemical constituents from Huricha Liuwei Pills

序号	t_R / min	加合离子	m/z 实际值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	名称	MS/MS 数据	归属	文献
1	0.89	[M-H] ⁻	191.056 9	191.056 1	4.1	奎宁酸	191.056 3; 173.045 9; 93.034 4; 85.029 3	诃子、红花	[12]
2	1.13	[M-H] ⁻	173.045 7	173.045 5	0.9	莽草酸	137.024 4; 93.035 0; 73.0299	诃子	[13]
3	1.30	[M+H] ⁺	280.138 9	280.139 1	-0.6	果糖缬氨酸	262.128 9; 244.118 3; 216.123 4; 198.112 4; 180.101 7	—	
4	1.57	[M-H] ⁻	355.031 0	355.030 7	0.9	诃子次酸	337.018 9; 249.039 7; 205.049 7; 193.013 5; 163.039 4	诃子	[14]
5	2.14	[M-H] ⁻	499.167 6	499.166 8	1.5	—	191.056 6; 173.045 9; 93.035 3	红花	[15]
6	2.90	[M+H] ⁺	294.154 8	294.154 7	0.2	果糖亮氨酸	276.144 4; 258.133 5; 230.138 9; 212.127 9; 161.068 8; 86.096 4	—	
7	3.44	[M-H] ⁻	169.014 8	169.014 2	3.3	没食子酸	169.014 4; 125.024 4; 79.018 7	诃子	
8	5.23	[M+H] ⁺	166.086 0	166.086 3	-1.5	苯丙氨酸	120.081 3; 103.054 5; 91.054 3; 77.038 9	红花	[12]
9	7.59	[M+H] ⁺	328.139 0	328.139 1	-2.0	果糖苯丙氨酸	310.127 9; 292.117 4; 264.123 7; 246.112 3; 166.086 2	红花	
10	11.08	[M-H] ⁻	325.056 4	325.056 5	-0.3	3-没食子酰莽草酸	325.054 3; 169.013 9; 125.024 8; 93.034 8	诃子	
11	11.30	[2M-H] ⁻	651.121 2	651.120 3	1.4	4-没食子酰莽草酸	325.054 8; 169.013 4	诃子	
12	11.39	[M+H] ⁺	205.096 1	205.097 2	1.6	色氨酸	188.069 5; 146.059 2; 118.064 4; 115.053 7; 91.053 6	红花	
13	11.65	[M-H] ⁻	325.056 4	325.056 5	-0.3	5-没食子酰莽草酸	325.055 5; 169.014 0; 125.024 4	诃子	
14	12.12	[M-H] ⁻	611.163 3	611.161 8	2.5	羟基红花黄色素 B	611.165 4; 491.121 4; 328.059 8; 323.056 9; 283.061 2	红花	[16]
15	12.64	[M-H] ⁻	353.089 0	353.087 8	3.4	新绿原酸	353.090 1; 191.056 5; 179.035 6; 135.045 1; 85.029 2	诃子、红花、 木香	[17]
16	13.43	[M-H] ⁻	183.029 9	183.029 9	0.0	没食子酸甲酯	183.028 7; 168.004 7; 124.016 1; 78.010 2	诃子、红花	
17	14.86	[M-H] ⁻	337.092 9	337.092 9	1.8	3- <i>p</i> -对香豆酰奎宁酸	191.057 0; 163.040 7; 119.050 3	诃子	
18	16.15	[M-H] ⁻	353.087 6	353.087 8	-0.6	绿原酸	191.055 4; 161.023 9; 93.033 8	诃子、红花、 木香	[14]
19	16.84	[M-H] ⁻	611.163 2	611.161 8	2.4	羟基红花黄色素 A	611.161 9; 491.120 7; 403.104 1; 325.072 5; 283.061 7	红花	[18]
20	16.89	[M-H] ⁻	353.088 4	353.089 0	1.7	隐绿原酸	191.056 9; 179.035 8; 173.046 2; 135.045 6	诃子、红花、 木香	[17]
21	17.12	[M+H] ⁺	803.187 3	803.187 7	-0.5	—	641.136 8; 479.083 8; 303.050 9	红花	
22	17.35	[M+H] ⁺	789.209 3	789.208 4	1.1	—	627.160 1; 465.105 9; 303.051 5	红花	[18]
23	18.56	[M+FA-H] ⁻	431.228 8	431.228 7	0.3	闹羊花毒素 VI	431.120 0; 385.221 6; 367.213 6; 265.143 1	闹羊花	[19]
24	19.09	[M-H] ⁻	197.046 4	197.045 5	4.3	没食子酸乙酯	197.046 2; 169.014 6; 124.016 8; 78.010 8	红花、诃子	
25	19.71	[M-H] ⁻	633.075 3	633.073 3	3.1	柯里拉京	633.076 3; 463.053 8; 301.000 1; 275.020 9	诃子	[13]
26	20.41	[M-H] ⁻	515.120 7	515.119 5	2.3	异绿原酸 B	515.122 1; 353.087 9; 335.077 1; 191.055 5; 179.065 2	诃子、红花、 木香	[17]
27	20.95	[M+FA-H] ⁻	413.218 5	413.218 1	1.0	羊躑躅素 I	413.217 9; 367.204 5; 349.200 8; 331.200 4; 149.097 0	闹羊花	[19]
28	21.15	[M-H] ⁻	611.163 0	611.161 8	2.0	—	521.129 3; 445.112 5; 313.070 6; 287.054 8	红花	[16]
29	22.21	[M+H] ⁺	773.211 9	773.213 5	-2.1	6-羟基山柰酚-3-芸香糖-6-葡萄糖苷	627.155 2; 465.101 8; 303.049 6	红花	
30	23.66	[M+H] ⁺	611.159 7	611.160 7	-1.6	芦丁	465.101 9; 303.050 4; 147.065 2	红花	[15]
31	23.87	[M-H] ⁻	463.088 6	463.088 2	0.9	金丝桃苷	463.089 9; 301.036 0; 300.028 8; 271.024 4; 243.029 0	闹羊花	[20]
32	24.77	[M-H] ⁻	300.998 5	300.999 0	-1.6	鞣花酸	300.998; 283.996 9; 229.014 2; 245.009 7;	诃子	
33	24.97	[M-H] ⁻	463.088 8	463.088 2	1.3	异槲皮苷	463.091 8; 301.036 8; 300.028 8; 271.025 3; 255.029 7	闹羊花	[21]
34	27.62	[M-H] ⁻	1 043.270 9	1 043.266 9	3.8	脱水红花黄色素 B	1043.270 4; 102.5.256 8; 923.224 8; 593.151 4; 449.107 9	红花	
35	27.62	[M-H] ⁻	515.120 8	515.119 5	2.5	异绿原酸 A	353.087 5; 191.056 9	诃子、红花、 木香	[17]
36	27.80	[M+H] ⁺	625.175 9	625.176 3	-0.7	水仙苷	317.065 1; 302.041 3; 85.027 9	红花	
37	28.70	[M+FA-H] ⁻	455.229 3	455.228 7	1.4	闹羊花毒素 II	455.228 1; 367.211 9; 277.162 1	闹羊花	[21]
38	28.73	[M+H] ⁺	193.122 6	193.122 3	1.5	去氧甘松醇	151.111 6; 141.069 9; 105.070 0; 91.054 0; 79.053 8	甘松	
39	29.37	[M-H] ⁻	515.120 9	515.119 5	2.7	异绿原酸 C	515.125 1; 353.088 3; 191.056 6; 179.035 1; 173.045 9; 135.045 4	诃子、红花、 木香	[17]
40	32.13	[M+H] ⁺	233.153 4	233.153 6	-0.9	土木香内酯	233.153 7; 205.158 3; 191.107 1; 177.091 6; 149.096 6; 131.085 0; 109.101 1; 91.053 6	木香	
41	32.30	[M+FA-H] ⁻	455.192 3	455.192 3	0.1	毛连菜苷	455.193 6; 409.187 6; 247.134 9; 229.124 8; 203.144 5	木香	[22]
42	33.71	[M-H] ⁻	261.112 6	261.113 2	-2.4	—	261.111 2; 217.122 4; 201.090 9; 189.091 3; 175.111 3	黑云香	[23]
43	35.19	[M-H] ⁻	293.139 9	293.139 5	1.5	—	293.138 1; 249.149 5; 217.123 0; 199.113 1; 183.081 3	木香	
44	36.20	[M+H] ⁺	247.133 8	247.132 9	3.8	姜黄醇酮	247.132 7; 229.122 0; 214.099 0; 183.116 7; 153.070 2	黑云香	[23]

续表 1

序号	t_R / min	加合离子	m/z 实际值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	名称	MS/MS 数据	归属	文献
45	36.74	[M-H] ⁻	327.217 7	327.218 0	0.9	三羟基十八碳二烯酸	327.218 7; 229.144 6; 221.118 1; 211.134 3; 171.102 9	—	
46	37.41	[M+H] ⁺	235.169 5	235.169 3	1.0	甘松香酮 A	235.169 8; 217.152 0; 175.113 8; 137.095 4; 105.068 7	甘松	[24]
47	38.55	[M+H] ⁺	235.169 0	235.169 3	-1.1	甘松香酮 1	235.170 9; 217.160 6; 199.146 6; 189.163 0; 119.086 5; 111.080 9; 105.070 4	甘松	
48	39.37	[M+FA-H] ⁻	549.344 0	549.343 3	1.3	阿江榄仁素	503.338 0; 453.299 7; 441.336 0; 409.309 9	诃子	
49	39.96	[M+H] ⁺	229.122 2	229.122 3	-0.5	没药酮	229.124 2; 196.086 8; 159.080 3; 129.071 0; 91.052 9	黑云香	[23]
50	41.79	[M+H] ⁺	235.170 1	235.169 3	3.6	甘松香酮 1 或异构体	235.163 3; 202.138 7; 177.126 3; 161.095 9; 135.077 6; 105.069 0	甘松	
51	42.22	[M+H] ⁺	251.164 2	251.164 2	0.1	甘松新酮	219.137 2; 191.107 1; 177.091 3; 107.085 5; 105.069 3; 91.053 9	甘松	
52	42.39	[M+H] ⁺	217.159 4	217.158 7	3.3	甘松香酮 H	217.161 1; 175.149 2; 147.116 9; 133.101 2; 119.086 0	甘松	[24]
53	43.44	[M+H] ⁺	217.159 0	217.158 7	1.4	—	217.158 7; 175.111 6; 141.069 0; 107.085 4; 105.069 8	甘松	
54	44.56	[M+H] ⁺	231.138 0	231.138 0	0.2	去氢木香内酯	231.139 0; 213.127 8; 198.104 0; 159.080 4; 141.069 1; 128.061 9	木香	
55	44.86	[M+H] ⁺	229.122 9	229.122 3	2.6	—	229.122 5; 211.114 0; 181.065 4; 159.081 0; 153.070 0; 128.062 6	黑云香	[25]
56	45.12	[M+H] ⁺	219.174 9	219.174 3	2.5	马兜铃酮	177.127 6; 163.111 5; 159.117 1; 121.064 8; 91.053 3	闹羊花、甘松	[26]
57	45.24	[M+H] ⁺	217.158 7	217.158 7	0.0	—	217.157 3; 161.095 0; 157.100 4; 142.077 3; 141.069 7; 133.100 4	甘松	[27]
58	45.79	[M+H] ⁺	233.154 0	233.153 6	1.7	木香烃内酯	233.153 4; 187.148 7; 145.100 9; 105.069 6; 91.053 9	木香	
59	46.33	[M+H] ⁺	231.138 0	231.138 0	0.2	去氢木香内酯	231.138 1; 213.128 7; 198.104 4; 141.070 6; 128.062 5	木香	
60	46.61	[M+H] ⁺	231.138 1	231.138 0	0.6	异去氢木香内酯	231.139 4; 213.129 6; 198.104 7; 141.060 6; 128.062 2; 91.054 0	木香	
61	47.20	[M+H] ⁺	231.138 0	231.138 0	0.2	去氢木香内酯或异构体	231.139 6; 213.126 8; 141.070 0; 128.062 7; 91.054 1	木香	

注：—表示该成分未查到确定碎片或未找到药材归属。



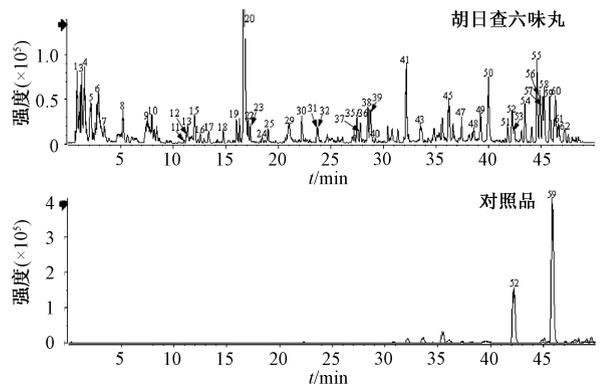
20. 羟基红花黄色素 A 33. 鞣花酸 38. 闹羊花毒素 II
20. hydroxy-safflor yellow A 33. ellagic acid 38. rhodojaponin II

图 1 胡日查六味丸负离子模式总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagrams of Huricha Liuwei Pills in negative ion mode

3.3 网络药理学分析

3.3.1 胡日查六味丸入血原型成分靶点及疾病靶点预测 将胡日查六味丸 20 种入血原型成分导入 PubChem、Swiss Target Prediction 数据库, 共得到成分相关靶点 443 个。在 GeneCards、DisGeNet、OMIM 等数据库搜索并删除重复项共得到偏头痛疾病靶点 273 个; 两者取交集得到 54 个靶点, 见 2602



52. 甘松新酮 59. 木香烃内酯
52. nardosinone 59. costunolide

图 2 胡日查六味丸正离子模式总离子流图

Fig. 2 Total ion current diagrams of Huricha Liuwei pills in positive ion mode

图 5。

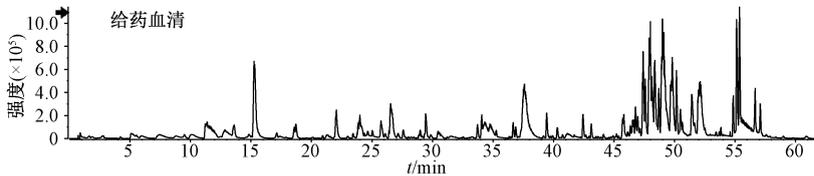
3.3.2 PPI 网络构建 将交集靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 构建 PPI 网络, 设置节点的颜色、大小随 degree 值变化, 节点越大、颜色越深, 表示 degree 值越大, 见图 6。由此可知, 该网络共有 54 个节点, 127 条边, 关键核心靶点为 SLC6A4、IL6、HTR2A、SLC6A3、COMT、TNF、ALB、DRD2、HTR1A、IL1B。

表2 胡日查六味丸入血原型成分鉴定结果

Tab. 2 Identification results of prototype components in blood of Huricha Liuwei Pills

序号	t_R /min	加合离子	m/z	m/z	误差 (10^{-6})	名称	MS/MS	归属
			实际值	理论值				
P1	12.37	[M-H] ⁻	611.166 0	611.161 8	6.9	羟基红花黄色素 B	611.165 3; 491.124 8; 473.109 1; 382.102 4; 307.048 8	红花
P2	13.23	[M-H] ⁻	183.029 6	183.029 9	-1.6	没食子酸甲酯	—	诃子/红花
P3	18.49	[M+FA-H] ⁻	431.229 5	431.228 7	2.0	闹羊花毒素Ⅳ	—	闹羊花
P4	20.41	[M-H] ⁻	197.046 5	197.045 5	4.8	没食子酸乙酯	182.022 6; 167.000 7; 162.838 8; 123.009 6	诃子/红花
P5	20.71	[M+FA-H] ⁻	413.219 5	413.218 1	3.4	羊躑躅素 I	413.216 9; 300.135 6; 206.918 5; 87.008 2	闹羊花
P6	21.44	[M-H] ⁻	611.165 4	611.161 8	6.0	—	—	红花
P7	28.04	[M+FA-H] ⁻	455.230 6	455.228 7	4.3	闹羊花毒素Ⅱ	455.230 9; 417.133 4; 175.024 8; 113.022 6	闹羊花
P8	28.72	[M+H] ⁺	193.122 0	193.122 3	-1.6	去氧甘松醇	151.110 7; 142.077 5; 105.068 9	甘松
P9	30.22	[M-H] ⁻	515.123 2	515.119 5	7.2	异绿原酸 C	—	诃子/红花/木香
P10	32.04	[M+H] ⁺	233.153 3	233.153 6	-1.3	土木香内酯	217.084 9; 177.088 5; 149.094 2; 115.053 5; 91.053 2	木香
P11	33.72	[M-H] ⁻	261.114 0	261.113 2	2.9	—	261.113 8; 217.124 4; 202.100 2; 187.076 9; 172.053 1	黑云香
P12	37.88	[M+H] ⁺	235.168 7	235.169 3	-2.4	甘松香酮 A	161.127 7; 133.100 0; 105.068 8; 91.052 4; 79.053 5	甘松
P13	38.53	[M+H] ⁺	235.168 4	235.169 3	-3.6	甘松香酮 I	192.114 1; 147.116 9; 105.069 3; 91.052 5	甘松
P14	38.77	[M+FA-H] ⁻	549.346 7	549.343 3	6.2	阿江榄仁素	554.318 8; 503.342 0; 485.303 8; 441.338 9; 421.314 4; 409.314 0	诃子
P15	40.95	[M+H] ⁺	229.122 0	229.122 3	-1.3	没药酮	195.078 3; 183.116 1; 153.069 1; 141.070 2; 128.062 3	黑云香
P16	41.99	[M+H] ⁺	251.164 1	251.164 2	-0.3	甘松新酮	—	甘松
P17	45.18	[M+H] ⁺	217.158 1	217.158 7	0.0	—	157.101 3; 142.076 5; 119.083 8; 91.053 3	甘松
P18	46.02	[M+H] ⁺	231.137 4	231.138 0	-2.4	去氢木香内酯	—	木香
P19	46.34	[M+H] ⁺	231.138 1	231.138 0	0.6	异去氢木香内酯	—	木香
P20	46.36	[M+H] ⁺	233.153 1	233.153 6	-2.2	木香烯内酯	251.145 1; 197.133 1; 167.084 9; 142.076 1; 91.052 5	木香

Intensity BPC from 20230901-TS23C154-GYXQ-neg.wiff (sample 1...xperiment 1, -TOF MS (50 - 1700): 100.0 - 900.0 Da



Intensity BPC from 20230901-TS23C154-KBXQ-neg.wiff (sample 1...xperiment 1, -TOF MS (50 - 1700): 100.0 - 900.0 Da

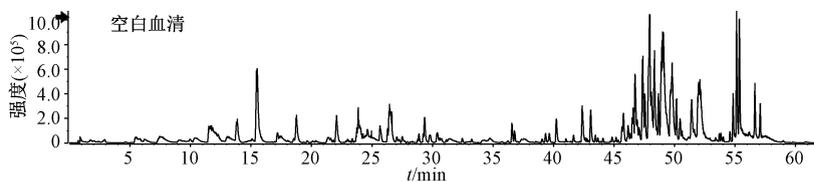


图3 胡日查六味丸含药血清负离子模式基峰离子流图

Fig. 3 Base peak ion current diagrams of Huricha Liuwei Pills containing serum in negative ion mode

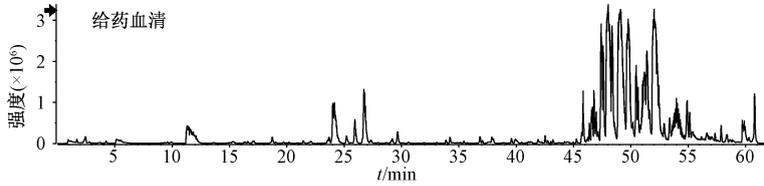
3.3.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 平台进行 GO 功能分析, 结果生物学过程 (BP) 条目共 280 条, 主要涉及间隙接合组件的负调节、对组胺的反应、热感受等; 细胞组成 (CC) 条目共 40 条, 主要集中在枝晶膜、GABA-A 受体复合物、神经元细胞体膜等区域; 分子功能 (MF) 条目共 59 条, 主要涉及多巴胺神经递质受体活性、单胺氧化酶活性、内皮素受体活性等。KEGG 通路注释富集到 13 条通路, 主要涉及神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、血清素能突触、多巴胺能突触等, 上述通路可能是胡日查六味丸发挥治疗偏头痛作用的重要机制, 各取前 10

个条目绘制富集分析条形图及气泡图, 见图 7~8。

3.3.4 “成分-靶点-通路”网络构建 由图 9 可知, 以 degree、中介中心度、接近中心性为参考值, 结果显示, 没食子酸乙酯、木香烯内酯、甘松香酮 A 和甘松新酮等成分与这 11 条通路连线紧密, 提示胡日查六味丸中抗偏头痛的主要成分为萜类。

3.4 胡日查六味丸对偏头痛大鼠海马组织中关键蛋白表达水平的影响 由图 10 可知, 与空白组比较, 模型组大鼠海马组织 SLC6A4 和 5-HT2A 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 给药组大鼠海马组织 SLC6A4 和 5-HT2A 蛋白表达

Intensity BPC from 20230901-TS23C154-GYXQ-pos.wiff (sample 1...xperiment I, +TOF MS (50 - 1700): 100.0 - 900.0 Da



Intensity BPC from 20230901-TS23C154-KBXQ-pos.wiff (sample 1...xperiment I, +TOF MS (50 - 1700): 100.0 - 900.0 Da

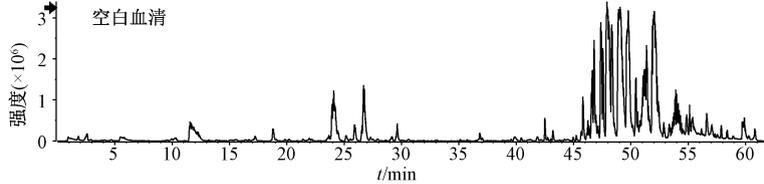


图4 胡日查六味丸含药血清正离子模式基峰离子流图

Fig. 4 Base peak ion current diagrams of Huricha Liuwei Pills containing serum in positive ion mode

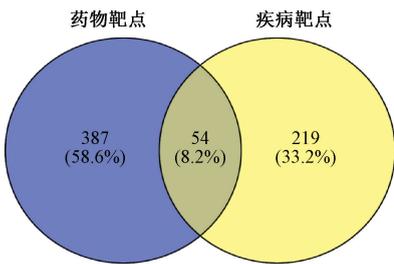


图5 交集靶点 Venn 图

Fig. 5 Venn diagram of the intersection targest

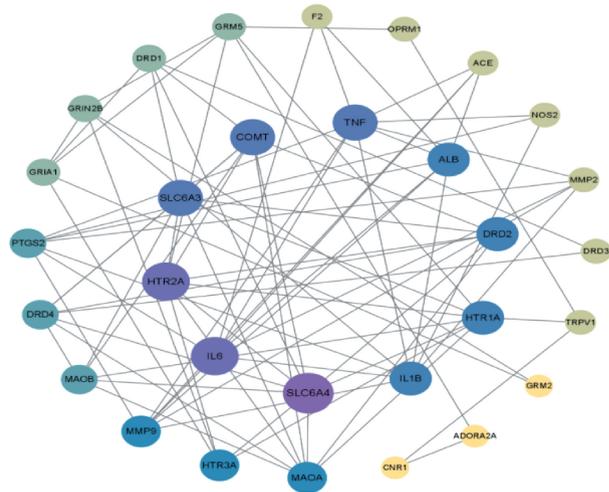


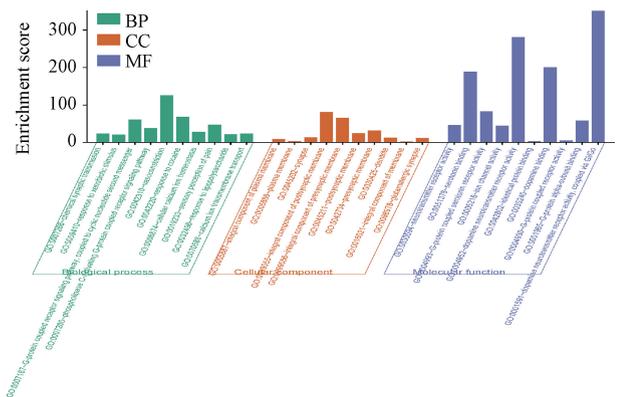
图6 交集靶点 PPI 网络图

Fig. 6 PPI network diagram of intersection targets

降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明胡日查六味丸可显著降低硝酸甘油诱导的偏头痛模型大鼠海马组织 5-HT2A、SLC6A4 表达, 抑制偏头痛发作状态下 5-HT2A、SLC6A4 靶点介导的 cAMP 及 Calcium 信号通路活化。

4 讨论

化合物鉴别方法中的色谱、质谱条件等与含药



注: BP 为生物学过程, CC 为细胞组分, MF 为分子功能。

图7 GO 功能富集分析图

Fig. 7 Diagram of GO functional enrichment analysis

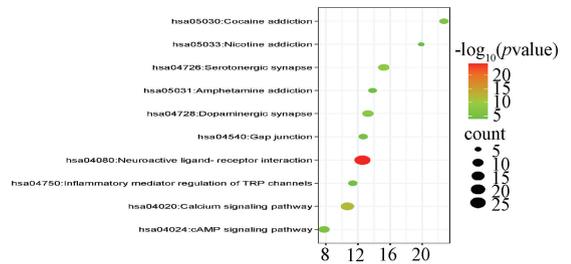


图8 KEGG 通路富集分析图

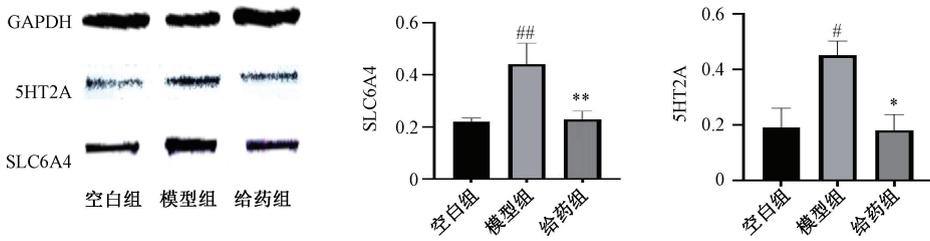
Fig. 8 Diagram of KEGG pathway enrichment analysis

血清入血原型成分的分析条件一致, 故胡日查六味丸化学成分保留时间及特征离子与入血原型成分相关数据高度一致。本研究基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析胡日查六味丸的化学成分及其入血原型成分, 并结合网络药理学和 Western blot 实验探讨其治疗偏头痛的作用机制。本研究从胡日查六味丸中共鉴定出 61 种化学成分, 包括萜类、有机酸、酚酸类、黄酮类、多酚类、氨基酸、衍生物类等, 其中萜类 (尤其是倍半萜类) 在治疗偏头痛中发挥



图9 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 9 Network diagram of components-target-pathway



注：与空白组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图10 胡日查六味丸对大鼠海马组织 SLC6A4、5-HT2A 蛋白表达的影响

Fig. 10 Effects of Huricha Liuwei Pills on the expression of SLC6A4 and 5-HT2A protein in hippocampus of rats

重要作用，具有抗炎、抗神经毒性等生物活性；鉴定得到 20 种原型成分，包括萜类、酚酸类、黄酮类等。网络药理学分析显示，胡日查六味丸通过没食子酸乙酯、木香烃内酯、甘松香酮 A、甘松新酮等关键成分通过作用于 SLC6A4、5-HT2A、IL6、HTR2A、SLC6A3、COMT、TNF、ALB、DRD2、HTR1A、IL1B 等核心靶点，调节 cAMP 和 Calcium 信号通路发挥药效作用。其中，5-HT2A 受体是调节情绪的重要物质基础，激活该受体可导致失眠、焦虑和性功能抑制；而 SLC6A4 的多态性短等位基因会降低转录活性，导致 5-HT 水平失调。这两种靶点在核心靶点中排名靠前，因此选择 SLC6A4 和 5-HT2A 进行验证实验。Western blot 实验结果表明，硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠海马组织中 SLC6A4 和 5-HT2A 蛋白表达升高，而胡日查六味丸给药组大鼠海马组织 SLC6A4 蛋白表达明显降低，进一步证实其可通过激活 cAMP 和 Calcium 信号通路发挥抑制偏头痛的作用。

综上所述，本研究通过 UPLC-Q-TOF/MS 技术明确了胡日查六味丸的入血原型成分，结合网络药理学和 Western blot 实验揭示其通过作用于 SLC6A4、5-HT2A 等核心靶点，激活 cAMP 和 Calcium 信号通路，从而抑制偏头痛，可为胡日查六味丸的临床应用及开发提供科学依据。

参考文献：

- [1] 占布拉却吉丹赞颇日米. 蒙医金匱[M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，1977：477-478.
- [2] 罗布桑泉布勒. 蒙医药选编（哲兑·蒙古文版）[M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，1974：3464.
- [3] 蒙医药编辑委员会. 中国医学百科全书·蒙医药版[M]. 上海：上海科学技术出版社，1992：261.
- [4] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙成药标准[S]. 赤峰：内蒙古科学技术出版社，1984：145-146.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册[S]. 1998：130.
- [6] 张雅莉, 韩建勋, 图尔荪托合提·托合提萨伊普, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱和分子对接技术筛选藿香正气水抗新冠病毒潜在质量标志物[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6023-6034.
- [7] 许雅婧, 乐心逸, 葛一蒙, 等. 复方芩兰口服液的体内外成分分析和网络药理学研究[J]. 中草药, 2022, 53(9): 2623-2632.
- [8] Qian Y X, Zhao D X, Wang H D, et al. An ion mobility-enabled and high-efficiency hybrid scan approach in combination with ultra-high performance liquid chromatography enabling the comprehensive characterization of the multicomponents from *Carthamus tinctorius*[J]. J Chromatogr A, 2022, 1667: 462904.
- [9] Liu Y Q, Seeram N P. Liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry for comprehensive phenolic characterization of pomegranate fruit and flower extracts

- used as ingredients in botanical dietary supplements[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(15): 3022-3033.
- [10] Zou H Y, Luo J, Xu D R, *et al.* Tandem solid-phase extraction followed by HPLC-ESI/QTOF/MS/MS for rapid screening and structural identification of trace diterpenoids in flowers of *Rhododendron molle*[J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(3): 255-265.
- [11] 董世奇, 赵 鹿, 张东旭, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1546-1557.
- [12] Saito K, Daimon E, Kusaka K, *et al.* Accumulation of a novel red pigment in cell suspension cultures of floral meristem tissues from *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Z Naturforsch C*, 1988, 43(11-12): 862-870.
- [13] 简 平, 亓 旗, 周 坤, 等. 藏药诃子化学成分的高效液相色谱-质谱联用技术快速鉴定研究[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2018, 20(9): 1627-1637.
- [14] Pfundstein B, El Desouky S K, Hull W E, *et al.* Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(10): 1132-1148.
- [15] 王松松, 马 艳, 张 毅, 等. UHPLC-MS/MS 快速鉴别红花中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1347-1354.
- [16] Yue S J, Tang Y P, Xu C M, *et al.* Two new quinochalcone C-glycosides from the florets of *Carthamus tinctorius*[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 16760-16771.
- [17] Liu Z B, Du L X, Liu N, *et al.* Insights into chlorogenic acids' efficient biosynthesis through *Carthamus tinctorius* cell suspension cultures and their potential mechanism as α -glucosidase inhibitors. [J]. *Ind Crop Prod*, 2023, 194: 116337.
- [18] Kazuma K, Takahashi T, Sato K, *et al.* Quinochalcones and flavonoids from fresh florets in different cultivars of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(8): 1588-1599.
- [19] Wang X, Fu H Z. Chemical constituents from the flowers of *Rhododendron molle* G. Don[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(2): 94-98.
- [20] 冯靖雯. 闹羊花质量标准提升研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [21] 冯靖雯, 郭小红, 李 丹, 等. HPLC-CAD 法测定不同产地和花期闹羊花中闹羊花毒素 II、III、V [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7624-7629.
- [22] 周 颖, 杨 孔, 吴 涛, 等. 云木香根茎中的倍半萜类成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1876-1881.
- [23] Bao S, Li C H, Li H, *et al.* Myrrh terpenes A and B, anti-inflammatory cadinane sesquiterpenes from the resin of *Commiphora myrrha*[J]. *Phytochem Lett*, 2021, 44: 190-194.
- [24] 李 莹, 钟海蓉, 丰日落, 等. 基于 LC-MS 和 GC-MS 的仿野生栽培与野生甘松药材的主要成分分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1218-1228.
- [25] Ge J L. Bioactive sesquiterpenoids and steroids from the resinous exudates of *Commiphora myrrha*[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(3): 309-315.
- [26] Jiang S, Ding Q Z, Wu Y W, *et al.* Comparison of the chemical compounds and antioxidant activities of essential oil and ethanol extract from *Rhododendron tomentosum* Harmaja. [J]. *J Essent Oil Bear Pl*, 2017, 20(4): 927-936.
- [27] Qian J, Fang X, Pei Q, *et al.* Identification of volatile oil components of *Nardostachys jatamansi* DC. root and rhizome, herb[J]. *Med Pl*, 2018, 9(2): 11-15; 21.