

引用:许春,左文松,张纯,茶亚飞,郑兰平.基于HPLC指纹图谱和分子对接技术探讨复方南板蓝根片抗炎抗病毒的物质基础及作用机制[J].中医导报,2025,31(3):70-76.

# 基于HPLC指纹图谱和分子对接技术探讨 复方南板蓝根片抗炎抗病毒的 物质基础及作用机制\*

许春<sup>1</sup>,左文松<sup>2</sup>,张纯<sup>3</sup>,茶亚飞<sup>1</sup>,郑兰平<sup>4</sup>

(1.红河州检验检测院,云南 蒙自 661199;

2.云南省食品药品监督检验研究院,云南 昆明 650106;

3.云南天佑熊业制药有限公司,云南 蒙自 661199;

4.云南中医药大学,云南 昆明 650500)

[摘要] 目的:基于指纹图谱和网络药理学,分析预测复方南板蓝根片抗炎抗病毒潜在的质量标志物及作用机制。方法:采用HPLC指纹图谱结合化学计量学分析复方南板蓝根片潜在的质量标志物。通过网络药理学分析和预测复方南板蓝根片的质量标志物,结合京都基因与基因组百科全书(KEGG)和基因本体论(GO)富集分析,探讨复方南板蓝根片质量标志物的作用机制。结果:建立了复方南板蓝根片指纹图谱,标记28个共有峰,对其进行峰归属及峰确认,并指认了9个共有峰,分别是秦皮乙素、菊苣酸、尿苷、没食子酸、原儿茶酸、秦皮甲素、咖啡酸、芦丁和槲皮素。10批次供试品的相似度0.943~1.000,聚类分析显示复方南板蓝根片生产工艺稳定,各生产企业存在一定差异。主成分分析和正交偏最小二乘判别分析得到7个潜在活性成分,分别是秦皮乙素、菊苣酸、尿苷、没食子酸、秦皮甲素、咖啡酸和芦丁。采用网络药理学分析得到秦皮乙素、咖啡酸为潜在质量标志物,其通过多靶点、多通路发挥抗炎抗病毒作用,且核心靶点与潜在质量标志物的分子对接结合能均小于-5.9 kcal/mol。结论:复方南板蓝根片可调控SRC、STAT3、PIK3CA、PIK3R1、PIK3CB等核心靶点,调节信号通路发挥抗炎抗病毒作用;秦皮乙素、咖啡酸为复方南板蓝根片的核心药效成分。

[关键词] 复方南板蓝根片;抗炎;抗病毒;指纹图谱;网络药理学;秦皮乙素;咖啡酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)03-0070-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.03.012

## Exploring the Material Basis and Mechanism of Anti-inflammatory and Antiviral Effects of Compound Nanbanlangen Tablets Based on HPLC Fingerprint and Molecular Docking Technology

XU Chun<sup>1</sup>, ZUO Wensong<sup>2</sup>, ZHANG Chun<sup>3</sup>, CHA Yafei<sup>1</sup>, ZHENG Lanping<sup>4</sup>

(1.Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture Research Institute of Inspection and Testing, Mengzi Yunnan 661199, China; 2.Yunnan Institute of Food and Drug Supervision and Inspection, Kunming Yunnan 650106, China; 3.Yunnan Tianyou Bear Industry Pharmaceutical Co., LTD, Mengzi Yunnan 661199, China;

4.Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] Objective: To analyze and predict the potential quality markers and mechanisms of anti-inflammatory and antiviral effects of Compound Nanbanlangen Tablets based on fingerprinting and network pharmacology. Methods: HPLC fingerprinting combined with chemometric analysis was used to identify potential quality markers in Compound Nanbanlangen Tablets. Network pharmacology was employed to predict the quality markers, and the mechanisms were explored using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and

\*基金项目:云南省科技厅科技计划项目(202301AT070254,202101AZ070001-056)

通信作者:郑兰平,女,副研究员,研究方向为中药资源开发与利用

Gene Ontology (GO) enrichment analyses. Results: A fingerprint of Compound Nanbanlangen Tablets was established, with 28 common peaks marked. Among these, 9 common peaks were identified, including aesculetin, chicoric acid, uridine, gallic acid, protocatechuic acid, fraxin, caffeic acid, rutin, and quercetin. The similarity of 10 batches of samples ranged from 0.943 to 1.000. Cluster analysis indicated stable production processes, though some differences existed among manufacturers. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) identified 7 potential active components: aesculetin, chicoric acid, uridine, gallic acid, fraxin, caffeic acid, and rutin. Network pharmacology analysis suggested aesculetin and caffeic acid as potential quality markers, which exert anti-inflammatory and antiviral effects through multiple targets and pathways. The molecular docking binding energies of core targets with these potential quality markers were all less than  $-5.9$  kcal/mol. Conclusion: Compound Nanbanlangen Tablets can regulate core targets such as SRC, STAT3, PIK3CA, PIK3R1, and PIK3CB, modulating signaling pathways to achieve anti-inflammatory and antiviral effects. Aesculetin and caffeic acid are the core active components of Compound Nanbanlangen Tablets.

[Keywords] Compound Nanbanlangen Tablets; anti-inflammatory; antiviral; fingerprint; network pharmacology; aesculetin; caffeic acid

复方南板蓝根片组方为南板蓝根、紫花地丁和蒲公英, 收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第五册。复方南板蓝根片具有清热解毒的功效, 主要用于治疗腮腺炎、咽炎、乳腺炎、疮疖肿痛<sup>[1]</sup>等疾病。近年来复方南板蓝根片常作为抗病毒药使用。目前, 复方南板蓝根片的现行标准仅有君药南板蓝根的薄层鉴别反应, 以及酚类、萘类化合物的显色反应; 其研究方向也停留在靛蓝、靛玉红、秦皮乙素和菊苣酸的含量测定方面<sup>[2-4]</sup>, 缺乏对药物整体性的研究。网络药理学<sup>[5]</sup>多成分、多靶标、多通路的思路, 为中药及成方制剂全程质量控制及质量溯源体系提供了新的研究方向。本研究采用中药指纹图谱结合化学计量学研究, 从化学成分上筛选复方南板蓝根片的潜在质量标志物, 并通过网络药理学大数据的分析和支持, 全面评价药物作用的有效性, 旨在为中药质量标准的制定提供依据。

## 1 材料

1.1 主要仪器 岛津LC-20A高效液相色谱仪(日本岛津公司); 色谱柱为Thermo 120A C<sub>18</sub>键合硅胶柱(250.0 mm×4.6 mm, 5.0 μm)(美国赛默飞世尔公司); BP-221S万分之一电子分析天平(德国赛多利斯公司); PM4-1800TL超声波清洗机(英国PRIMA公司)。

1.2 药物与试剂 甲醇(色谱纯, 默克股份有限公司, 批号: 1245707240); 磷酸(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: A2108279); 水为超纯水; 对照品木犀草素(批号: 111520-200504)、秦皮甲素(批号: 740-9403)、秦皮乙素(批号: 741-9404)、原儿茶酸(批号: 110809-200604)、槲皮素(批号: 100081-200406)、没食子酸(批号: 110831-200302)、尿苷(批号: 887-200202)、咖啡酸(批号: 110885-200102)、芦丁(批号: 100080-201408)、大黄酚(批号: 110796-201922)、菊苣酸(批号: 111752-202105)、阿魏酸(批号: 110773-201012)、齐墩果酸(批号: 110709-200304)、靛蓝(批号: 110716-200610)、靛玉红(批号: 110717-202106)、对照药材南板蓝根(批号: 120971-201507)及紫花地丁(批号: 121429-202106)均购自

中国食品药品检定研究院; 蒲公英(宁坤生物科技有限公司, 批号: 190801); 复方南板蓝根片(云南白药集团股份有限公司, 批号: ZCB2304, ZAB2304, ZAB2305, ZCA2303); 复方南板蓝根片(云南金柯制药有限公司, 批号: 20221201, 20230106, 20230104, 20230211, 20230102, 20230113)。

## 2 方法与结果

### 2.1 复方南板蓝根片的HPLC指纹图谱研究

2.1.1 供试品溶液的制备 取复方南板蓝根片20片, 糖衣片和薄膜衣片除去包衣, 研细, 取约0.5 g, 精密称定, 精密加入50%甲醇40 mL, 称定质量, 超声处理40 min, 放冷, 再称定质量, 用50%甲醇补足减失的质量, 摇匀后过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成1 mg/mL的单一对照品储备液。分别吸取以上对照品储备液适量, 加甲醇制成混合对照品溶液。

2.1.3 单味对照药材溶液的制备 南板蓝根、蒲公英、紫花地丁药材粉碎过3号筛, 按“2.1.1”项下方法分别制备单味对照药材溶液。

2.1.4 色谱条件 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液; 梯度洗脱条件: 0~10 min, 2%~5%甲醇; 10~75 min, 5%~60%甲醇; 75~85 min, 95%甲醇; 85~95 min, 2%甲醇。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 ℃; 进样体积: 10 μL; 紫外检测波长: 258 nm。

2.1.5 精密度试验 取同一批次复方南板蓝根片供试品(批号: ZCB2304), 按“2.1.4”项下色谱条件测定, 连续进样6次, 以秦皮乙素为参照峰, 28个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于2.0%。说明仪器和实验方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一批次复方南板蓝根片供试品(批号: ZAB2304), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液1份, 分别于室温放置3、6、9、12、24 h后, 按“2.1.4”项下色谱条件测定, 以秦皮乙素为参照峰, 28个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于2.0%。说明供试品在室温24 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批次复方南板蓝根片供试品(批号:ZAB2305),按“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液6份,按“2.1.4”项下色谱条件测定,以秦皮乙素为参照峰,28个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 $RSD$ 值均小于2.0%。说明提取方法的重复性良好。

2.1.8 指纹图谱的建立及相似度分析 取10批次复方南板蓝根片S1~S10,对应批号分别为ZCB2304、ZAB2304、ZAB2305、ZCA2303、20221201、20230106、20230104、20230211、20230102及20230113,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1.4”项下色谱条件测定,记录HPLC图。(见图1)采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版本)”对HPLC图进行处理分析,设置谱图单位:Volts,1Volts=1 000 mAU。以S1为参照图谱,采用平均数对照图谱生成方法,时间窗宽度0.1 min,对10批次复方南板蓝根片的指纹图谱进行Mark峰匹配,拟合生成对照指纹图谱(R),根据峰的稳定性和分离度标定28个共有峰,以秦皮乙素为参照峰,其相似度(参照)为0.943~1.000。(见表1)

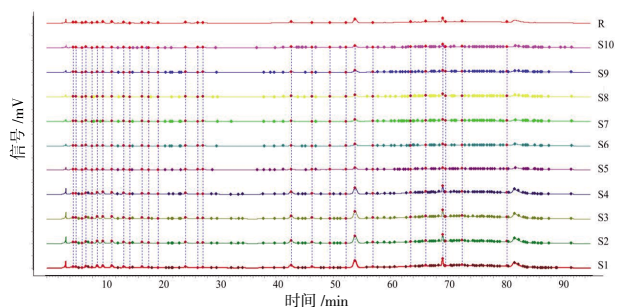


图 1 10 批次复方南板蓝根片(S1~S10)的 HPLC 指纹图谱和对照图谱(R)

表 1 10 批次复方南板蓝根片指纹图谱相似度计算结果

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	1.000	1.000	0.995	0.966	0.943	0.953	0.967	0.960	0.967	0.997
S2	1.000	1.000	1.000	0.995	0.966	0.943	0.953	0.966	0.959	0.966	0.997
S3	1.000	1.000	1.000	0.995	0.966	0.943	0.953	0.967	0.960	0.966	0.997
S4	0.995	0.995	0.995	1.000	0.973	0.949	0.959	0.978	0.964	0.980	0.998
S5	0.966	0.966	0.966	0.973	1.000	0.977	0.982	0.982	0.982	0.975	0.980
S6	0.943	0.943	0.943	0.949	0.977	1.000	0.997	0.948	0.994	0.948	0.961
S7	0.953	0.953	0.953	0.959	0.982	0.997	1.000	0.959	0.997	0.957	0.969
S8	0.967	0.966	0.967	0.978	0.982	0.948	0.959	1.000	0.959	0.992	0.980
S9	0.960	0.959	0.960	0.964	0.982	0.994	0.997	0.959	1.000	0.956	0.974
S10	0.967	0.966	0.966	0.980	0.975	0.948	0.957	0.992	0.956	1.000	0.979
R	0.997	0.997	0.997	0.998	0.980	0.961	0.969	0.980	0.974	0.979	1.000

2.1.9 共有峰的归属与指认 取“2.1.3”项下单味药材溶液HPLC图及“2.1.8”项下对照指纹图谱(R)进行对比分析,通过相对保留时间,确定了复方南板蓝根片中26个共有峰在3味药材中的归属。结果显示,峰9、28来自南板蓝根,峰10、12、13、14、15、16、17来自蒲公英,峰20、21、26来自紫花地丁,峰1、2、3、4、8、11、18、22、24、25、27为紫花地丁和蒲公英共有,峰6、7、8、23为南板蓝根、紫花地丁和蒲公英共有。(见图2)通过与“2.1.2”项下混合对照品溶液HPLC图比对保留时间,确定了其中9个成分,即峰7(尿苷)、峰10(没食子酸)、峰15(原

儿茶酸)、峰18(秦皮甲素)、峰21(秦皮乙素)、峰22(咖啡酸)、峰25(菊苣酸)、峰27(芦丁)及峰28(槲皮素)。(见图3)

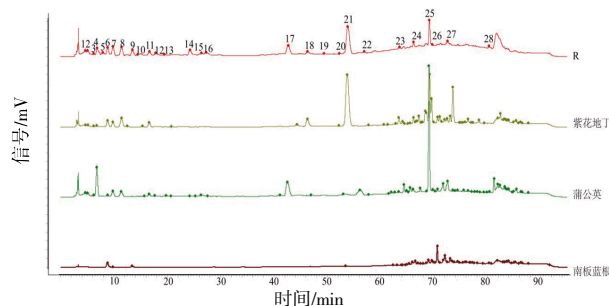
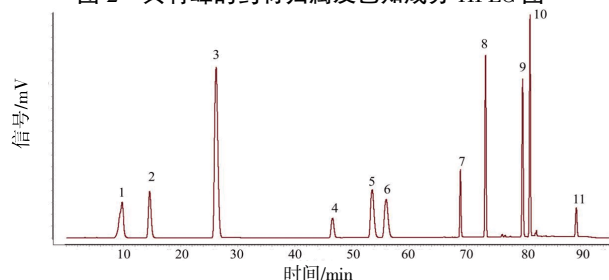


图 2 共有峰的药材归属及已知成分 HPLC 图



注:1.尿苷;2.没食子酸;3.原儿茶酸;4.秦皮甲素;5.秦皮乙素;6.咖啡酸;7.菊苣酸;8.芦丁;9.槲皮素;10.木犀草素;11.大黄酚。

图 3 混合对照品溶液的 HPLC 图

2.2 聚类分析(CA) 采用IBM SPSS Statistics 26.0软件标准化处理数据,以组间连接法对10批复方南板蓝根片进行集中聚类分析。当判定距离大于2时,样本被分为两大类,即云南白药集团股份有限公司生产的复方南板蓝根片(S1~S4)聚为一类,云南金柯制药有限公司生产的复方南板蓝根片(S5~S10)聚为一类。(见图4)

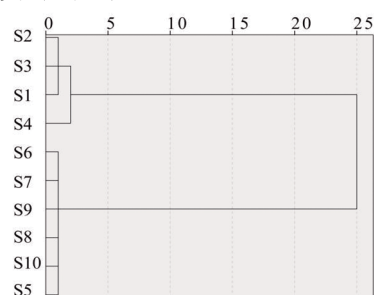


图 4 10 批次复方南板蓝根片聚类分析图

2.3 主成分分析(PCA) 以10批次复方南板蓝根片指纹图谱匹配共有峰面积为变量,导入IBM SPSS Statistics 26.0软件,以特征值大于1为提取标准, $KMO=0.905>0.600$ ,巴特利特球形度检验 $P=0.000<0.05$ ,符合主成分分析标准,降维分析提取得到1个主成分,累积方差贡献率为95.425%。根据因子得分系数矩阵计算综合得分,综合得分排名在前的9个成分分别为峰21(秦皮乙素)、峰25(菊苣酸)、峰27(芦丁)、峰17、峰24、峰7(尿苷)、峰8、峰23和峰26,综合得分值分别为3.89、1.92、1.33、0.68、0.67、0.12、0.11、0.05和0.05。

2.4 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA) 在Metabo Analyst 6.0软件中导入10批次复方南板蓝根片指纹图谱匹配共有峰面积,并进行OPLS-DA拟合。结果显示, $R^2X=0.938$ , $R^2Y=$

0.980,  $Q^2=0.974$ , 数值均接近1, 表明建立的拟合模型稳定可靠。筛选VIP值>1的7个共有峰, 包括峰13、峰10(没食子酸)、峰18(秦皮甲素)、峰22(咖啡酸)、峰3、峰20、峰19。上述成分可作为复方南板蓝根片差异的关键化合物。综合PCA和O-PLS-DA分析, 复方南板蓝根片的潜在活性成分为秦皮乙素、菊苣酸、芦丁、尿苷、没食子酸、秦皮甲素和咖啡酸。(见图5)

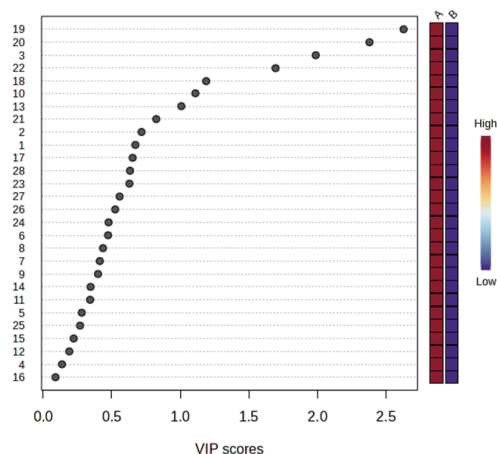


图5 10批次复方南板蓝根片指纹图谱共有峰 OPLS-DA VIP图

## 2.5 基于物质-效应关联的复方南板蓝根片潜在质量标志物筛选分析

2.5.1 成分与疾病交集靶点的获取 综合考虑复方南板蓝根片的HPLC指纹图谱结合化学计量学结果, 以及可测性和可追溯性原则, 选择秦皮乙素、菊苣酸、尿苷、没食子酸、原儿茶酸、秦皮甲素、咖啡酸、芦丁、槲皮素9个已知指标性成分作为潜在质量标志物。通过CAS号, 在Pubchem数据库查询结构式, 将结构式SMILES号导入Swiss target prediction数据库获取目标, 再经过Uniprot数据库统一校正(物种选择human)去重后得到成分靶点207个。

查询GeneCards数据库, 选择腮腺炎(mumps)、咽炎(pharyngitis)、乳腺炎(mastitis)、疮疖肿痛(sore, swelling and pain)、抗病毒(antivirotic)进行检索并筛选, 获取到复方南板蓝根片靶点8 710个, 去重后得到疾病靶点5 422个。将上述5种效应靶点取交集制作韦恩图。最终将成分靶点与上述效应靶点取交集, 得到相关疾病的潜在作用靶点150个。(见图6)。

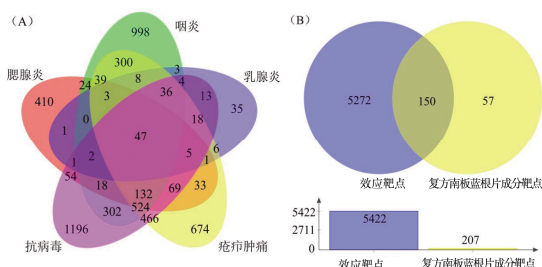


图6 复方南板蓝根片临床适应证疾病靶点(A)与复方南板蓝根片成分和临床适应证相关共同靶点(B)韦恩图

2.5.2 蛋白与蛋白之间的互作分析(PPI) 将“2.5.1”项下150个潜在作用靶点导入String数据库中进行PPI分析, 物种限定为“Homo sapiens”, 置信度medium confidence为0.900, 得到PPI网络图。(见图7)将网络图导入Cytoscape 3.9.1软件, 去除不关联的10个基因靶点, 共筛选出115个节点, 628条边。其

中节点代表蛋白, 边代表功能相关性, 选择度中心性(Degree)进行可视化分析。采用中位数筛选, 获得5个核心靶点, 包括SRC (Degree: 36.0)、PIK3R1 (Degree: 32.0)、PIK3CA (Degree: 32.0)、PIK3CB (Degree: 30.0)及STAT3 (Degree: 28.0)。

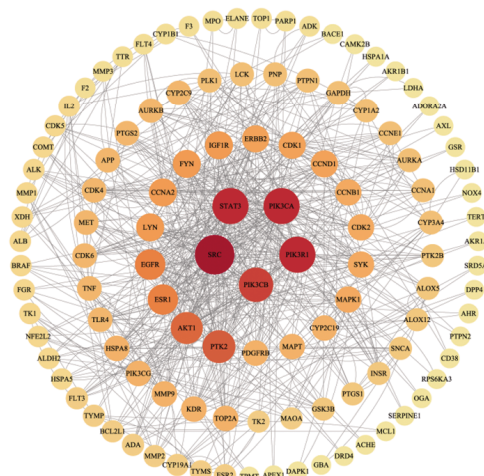


图7 作用靶点 PPI 网络图

2.5.3 关键作用通路的筛选 将“2.5.2”筛选出的54个潜在核心作用蛋白信息导入David数据库进行功能和信号通路筛选分析, 选择Homo sapiens, 得到KEGG富集通路143条, 按P值由大到小排序, 筛选出前20条通路。(见图8)结果显示, 复方南板蓝根片的临床作用靶点主要富集在PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、表皮生长因子受体抑制(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、癌症蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、前列腺癌(prostate cancer)及内分泌阻力(endocrine resistance)等通路, 除去与癌症相关通路, 复方南板蓝根片抗炎抗病毒与PI3K-Akt信号通路、表皮生长因子受体抑制及内分泌阻力有关。

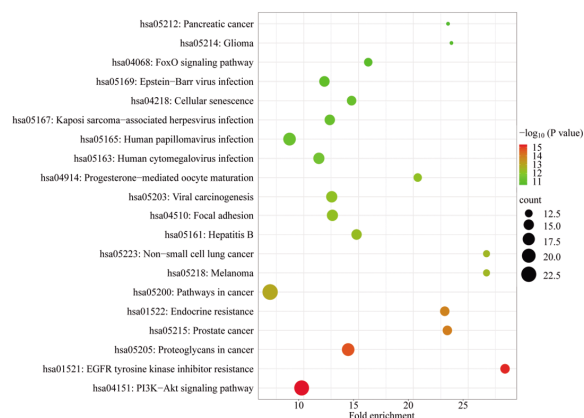


图8 KEGG 富集分析-核心靶点-通路作用图

GO富集分析获得生物学过程(BP)455条、细胞组分(CC)82条、分子功能(MF)109条。其中BP主要参与蛋白质磷酸化(protein phosphorylation), 跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路(transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway), 以及蛋白质自身磷酸化(protein autophosphorylation)等过程; CC主要涉及全酶复合物(cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex), 胞质(cytosol)及细胞质(cytoplasm)等; MF主要包括蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶



活性(protein serine/threonine/tyrosine kinase activity),蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity),以及ATP结合(ATP binding)等功能。(见图9)

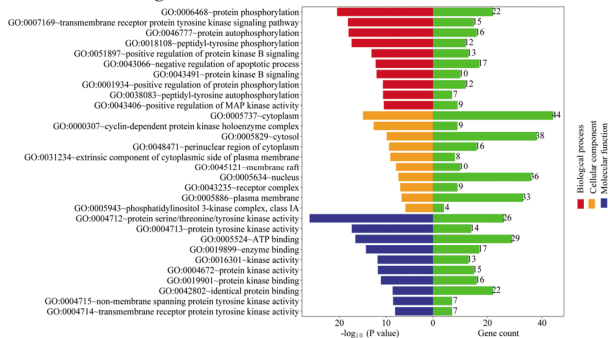


图9 GO富集分析图

2.5.4 物质-效应网络的构建 将“2.5.3”项下筛选的前5条作用通路,与相匹配的作用靶点及对应的成分导入Cytoscape 3.9.1,制作“成分-靶点-通路”网络图,即物质-效应图,从中明确复方南板蓝根片中重要的成分和相互的作用力度。(见图10)数据显示复方南板蓝根片主要通过槲皮素、秦皮乙素、咖啡酸、秦皮甲素和尿苷等物质调控IGF1R、CA2、ERBB2、EGFR和CA12等靶点,调节前5的富集通路。

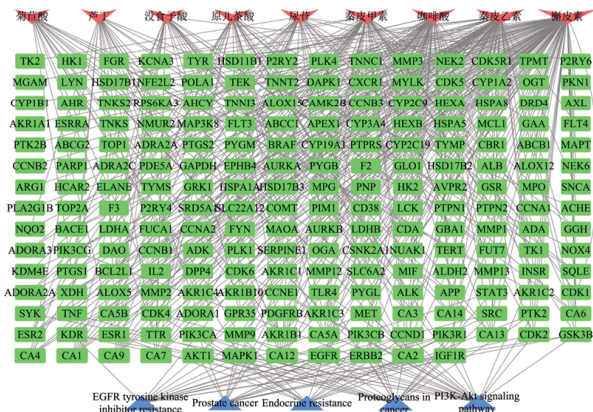


图10 复方南板蓝根片“成分-靶点-通路”网络图

2.5.5 Q-Markers的分析 通过“2.1”实验及数据分析,综合PCA及OPLS-DA分析结果,共筛选出尿苷、没食子酸、秦皮甲素、秦皮乙素、咖啡酸、菊苣酸和芦丁7个潜在活性成分。收集“2.5.3”项下筛选出的5个核心靶点(SRC、STAT3、PIK3CA、PIK3R1、PIK3CB),分别查询对应成分。其中SRC对应槲皮素、秦皮乙素,PIK3R1对应槲皮素,PIK3CA对应咖啡酸,PIK3CB对应咖啡酸,STAT3对应咖啡酸。且“2.5.4”项下数据显示,槲皮素、秦皮乙素、秦皮甲素、咖啡酸及尿苷等物质有很强的效应。综合以上分析确定秦皮乙素、咖啡酸为复方南板蓝根片的潜在质量标志物。

2.6 分子对接验证 通过分子对接验证“2.5”项下确定的潜在质量标志物秦皮乙素和咖啡酸。将“2.5”项下筛选出的5个核心蛋白导入PDB数据库,通过“homo sapiens”和“X-RAY”选项再次筛选时间最近的、最新发表的蛋白结构,包括SRC、STAT3、PIK3CA、PIK3R1、PIK3CB共5个核心靶点。其中PIK3CB靶点未查询到对应蛋白结构,其余4个靶点蛋白结构分别为STAT3 (PDB ID:6TLC)、SRC (PDB ID:8BJL)、PIK3CA (PDB

ID:8EXL)、PIK3R1 (PDB ID:8AM0)。将可查询的4个蛋白结构及秦皮乙素、咖啡酸小分子结构导入CB-Dock2数据库进行分子对接<sup>[6-7]</sup>,采用“基于结构的盲对接”,对接结果见表2和图11。分子对接结合能小于0时说明蛋白和小分子成分具有自发结合能力,分子对接结合能小于-1 kcal/mol,则表明蛋白和小分子结合良好<sup>[8]</sup>,所以秦皮乙素、咖啡酸和受体蛋白之间有很好的结合能力。

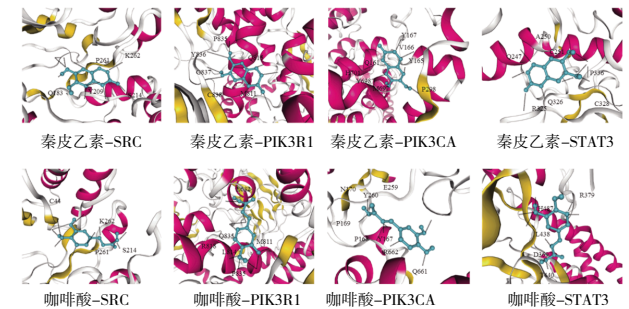


图11 活性成分与靶点受体蛋白之间分子对接图

表2 活性成分与靶点受体蛋白之间的结合能

化合物	结合能/(kcal/mol)			
	SRC	PIK3R1	PIK3CA	STAT3
秦皮乙素	-8.2	-6.8	-7.0	-5.9
咖啡酸	-8.0	-6.8	-7.2	-6.3

### 3 讨 论

3.1 指纹图谱 本研究基于质量标志物的可测、特有、有效、传递和配伍“五原则”,并查阅文献<sup>[9-11]</sup>,选取了蒲公英化学成分菊苣酸、没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、阿魏酸、芦丁和槲皮素,紫花地丁化学成分秦皮甲素、秦皮乙素、齐墩果酸和木犀草素,以及南板蓝根化学成分靛蓝、靛玉红、尿苷和大黄酚等15种成分进行分析。复方南板蓝根片君药南板蓝根的主要成分为靛蓝和靛玉红,提取试剂为二氯甲烷或氯仿等。本品制法南板蓝根为水煎煮提取。供试品中靛蓝、靛玉红的含量低,无法满足检测要求,且其他化学成分均可以用50%甲醇提取。预试验结果显示,10批次供试品用50%甲醇未提取检测到该成分;齐墩果酸在运用甲醇-0.1%磷酸为流动相时,各比例运行100 min后均未检测到该成分。为保证尽可能检测出多个成分,并综合考虑其余各个成分的波长,本研究采用258 nm开展检测。检测出的成分最多,且各成分峰面积最大,所以本研究放弃齐墩果酸的检测。阿魏酸在检测过程中出峰时间(68.614 min)与菊苣酸出峰时间(69.134 min)相近,经多种流动相比比例调节色谱峰均未完全分开,且预实验结果显示,10批次供试品均未检出阿魏酸。因菊苣酸是蒲公英的主要有效成分<sup>[12]</sup>,预试验中,10批次供试品均检出较高含量的菊苣酸,所以本研究放弃阿魏酸的检测。最终本研究选择没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、槲皮素、秦皮甲素、秦皮乙素、木犀草素、尿苷、芦丁、菊苣酸和大黄酚进行分析。

本研究建立的复方南板蓝根片HPLC指纹图谱,分别考察了乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%磷酸2种不同流动相下色谱峰的分离情况。结果显示,流动相为乙腈-0.1%磷酸时,色谱峰较少,且色谱峰分离效果不佳。故本研究选择甲醇-0.1%磷酸作为流动相,同时采用200~400 nm全波长扫描。结果显

示,258 nm处色谱峰数目较多。故此方法可以作为复方南板蓝根片HPLC条件。本研究取各供试品0.5 g,分别加入50%甲醇、50%乙醇、80%甲醇、甲醇、无水乙醇、水超声处理。结果显示,50%甲醇溶剂色谱峰分离效果最佳。本研究取各供试品0.5 g,加入50%甲醇20 mL,分别超声10 min、20 min、40 min、60 min,以秦皮乙素为参照。结果显示,超声40 min,秦皮乙素峰面积最大。本研究取各供试品0.5 g,分别加入50%甲醇20 mL、40 mL、60 mL,超声10 min,以秦皮乙素为参照。结果显示,溶剂体积为40 mL时,秦皮乙素峰面积最大。以上试验结果最终确定了供试品处理条件。

3.2 化学计量学分析 指纹图谱共筛选出28个共有峰,以参照图谱(S1)共有峰计算相对含量占比。峰1~28:0.48%、0.84%、0.20%、2.00%、1.18%、3.23%、3.71%、3.91%、2.47%、0.25%、2.06%、1.37%、0.71%、3.28%、1.56%、1.75%、7.34%、3.55%、1.13%、0.90%、19.21%、2.77%、5.59%、5.35%、11.35%、3.28%、7.35%、3.18%。峰21含量最高,其次是峰25、峰27等。本研究指认了26个共有峰在3味药材中的归属,其中9个为候选质量标志物,分别是没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸、槲皮素、秦皮甲素、秦皮乙素、木犀草素、尿苷和芦丁。10批供试品的9个候选质量标志物峰面积占比均为51%以上,表明9个候选质量标志物可以反映该药物的整体质量水平,为复方南板蓝根片的主要成分。聚类分析结果显示云南白药集团股份有限公司生产的复方南板蓝根片(S1~S4)聚为一类,云南金柯制药有限公司生产的复方南板蓝根片(S5~S10)聚为一类。云南白药集团股份有限公司原料来源于云南(南板蓝根、蒲公英)、山东(紫花地丁);云南金柯制药有限公司原料来源于云南(南板蓝根)、陕西(蒲公英)、山东(紫花地丁)。上述分析表明同一生产企业生产的不同批次复方南板蓝根片具有一定的稳定性,但不同生产企业生产的复方南板蓝根片因原料产地的不同,存在一定的差异。PCA分析得出综合得分在前的9个成分分别为峰21(秦皮乙素)、峰25(菊苣酸)、峰27(芦丁)、峰17、峰24、峰7(尿苷)、峰8、峰23和峰26;OPLS-DA分析中VIP值>1的7个共有峰为峰13、峰10(没食子酸)、峰18(秦皮甲素)、峰22(咖啡酸)、峰3、峰20和峰19。结合PCA和OPLS-DA分析,指纹图谱中的峰13、10、18、22、3、20、19、21、25、27、17、24、7、8、23、26是关键色谱峰,指认的化学成分分别是秦皮乙素、菊苣酸、尿苷、芦丁、没食子酸、秦皮甲素和咖啡酸。

3.3 网络药理学 在网络药理学研究中,经TCMSP数据库查询“南板蓝根”“紫花地丁”“蒲公英”,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(drug-likeness, DL)≥0.18筛选活性成分,结果无符合条件的数据,故采用本研究方法查询筛选成分靶点。本研究将已知成分作为潜在质量标志物筛选成分靶点,按照复方南板蓝根片说明书中的功能主治及日常生活中常用的临床适应证筛选疾病靶点,取交集得到150个抗炎抗病毒潜在作用靶点。本研究利用54个潜在核心作用蛋白,筛选复方南板蓝根片的关键作用通路,即PI3K-AKT信号通路、表皮生长因子受体抑制和内分泌阻力。PPI可视化分析筛选出5个核心蛋白,即STAT3、SRC、PIK3CA、PIK3R1及PIK3CB。该靶点对应槲皮素、咖啡酸、秦皮乙素3个活性成分。化学计量学分析和网络药理学分析结果表明,秦

皮乙素、咖啡酸为复方南板蓝根片的潜在质量标志物,其通过核心蛋白调控PI3K-Akt信号通路、表皮生长因子受体抑制和内分泌阻力等信号通路发挥抗炎抗病毒的作用。

在蛋白与蛋白互作分析中,秦皮乙素作用于类固醇受体辅激活因子(steroid receptor coactivator, SRC)。SRC广泛存在于人体细胞中,可调节细胞分裂、运动、黏附、血管生成和存活多种过程,对人体具有重要的维持作用<sup>[13]</sup>。抑制SRC,可阻止PI3K-AKT信号通路的过表达或磷酸化,抑制炎症或恶性肿瘤细胞的异常增殖<sup>[14]</sup>。咖啡酸可作用于磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基α(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene, PIK3CA)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基β(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta gene, PIK3CB)和信号转导及转导激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)。PIK3CA和PIK3CB均是PI3K的分型,参与细胞代谢、基因表达等重要生物学过程,是PI3K-Akt信号通路的关键分子<sup>[15-16]</sup>。STAT3可参与细胞生长、恶性转化、凋亡等生理功能的调控<sup>[17]</sup>。

研究显示,5个核心靶点中有3个均作用于PI3K-Akt信号通路<sup>[18]</sup>,说明PI3K-Akt信号通路是复方南板蓝根片抗炎抗病毒的潜在关键通路。秦皮乙素具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗血管粥样硬化及免疫调节作用<sup>[19]</sup>,可通过抑制PI3K-Akt信号通路途径来抑制血小板衍生生长因子(PDGF)诱导的气道平滑肌细胞(ASMCs)表型转换,发挥抗炎抗病毒作用。咖啡酸具有抗癌、抗氧化、抗炎作用,可通过灭活PI3K-Akt途径和损害经脂多糖刺激的巨噬细胞的核因子κB(NF-κB)<sup>[20]</sup>转录,协同抑制炎症反应<sup>[21]</sup>。此外,PI3K-Akt信号通路可参与炎症中丙酮酸的代谢,也可能是其发挥抗炎抗病毒的作用机制<sup>[22-24]</sup>。

综上所述,复方南板蓝根片的质量标志物秦皮乙素、咖啡酸,可通过作用于PI3K-Akt信号通路,调控血小板衍生生长因子、巨噬细胞核因子或丙酮酸等发挥抗炎抗病毒作用。但本研究仍存在不足,如识别活性成分较少,无法全面表征氨基酸、多肽、糖类等大分子物质。因此后续研究还需要应用液质联用等分析技术,获得更全面的成分图谱。此外,网络药理学和分子对接虽然可以从理论上推测制剂的作用机制,但还需要动物实验加以验证。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂第5册:WS3-B-0931-91[S].北京:中华人民共和国卫生部,1992:108.
- [2] 禄美云,杨汝琪,杨艺妹,等.高效液相色谱法同时测定复方南板蓝根片中秦皮乙素和菊苣酸[J].化学分析计量,2023,32(5):63-67.
- [3] 甘勇强.复方南板蓝根片中靛玉红的含量测定[J].广西中医药,1999,22(6):34-35.
- [4] 许刚.HPLC法测定复方南板蓝根片中靛蓝的含量[J].云南中医中药杂志,2010,31(9):70-71.
- [5] 翟文静,揣强,赵蒙蒙,等.基于数据挖掘和网络药理学分析国医大师李佃贵治疗复发性阿弗他溃疡的用药规律及

- 作用机制[J].中医导报,2024,30(6):105-112.
- [6] LIU Y, YANG X C, GAN J H, et al. CB-Dock2: Improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting[J]. Nucleic Acids Res,2022,50(W1):W159-W164.
- [7] YANG X C, LIU Y, GAN J H, et al. FitDock: Protein-ligand docking by template fitting[J]. Brief Bioinform, 2022,23(3):bbac087.
- [8] 刘鑫澜,朱朋艳,马金蓉,等.基于网络药理学及体外实验探究野蚕豆根抗氧化活性及其作用机制[J].天然产物研究与开发,2024,36(1):155-166.
- [9] 洪博,刘荣宏,侯玉娇,等.蒲公英药材UPLC指纹图谱及10个成分含量测定研究[J].药物分析杂志,2023,43(11):1858-1865.
- [10] 崔雪,郑重飞,李莹,等.紫花地丁化学成分分析及其体外抗氧化活性考察[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):117-123.
- [11] 徐志琴,赵志敏,马庆,等.南板蓝根化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(9):3365-3375.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].中国医药科技出版社,2020:367.
- [13] BAGNATO G, LEOPIZZI M, URCIUOLI E, et al. Nuclear functions of the tyrosine kinase src[J]. Int J MolSci,2020,21(8):2675.
- [14] 陈烨,王智,傅浩栋,等.Src蛋白激酶的研究进展[J].辽宁大学学报(自然科学版),2023,50(4):359-365.
- [15] ALQAHTANI A, AYESH H S K, HALAWANI H. PIK3CA gene mutations in solid malignancies: Association with clinicopathological parameters and prognosis [J]. Cancers,2019,12(1):93.
- [16] XU W, WANG Z Q, ZHANG Z, et al. PIK3CB promotes oesophageal cancer proliferation through the PI3K/AKT/mTOR signalling axis[J]. Cell BiolInt,2022,46(9):1399-1408.
- [17] HILLMER E J, ZHANG H, LI H S, et al. STAT3 signaling in immunity[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016,31:1-15.
- [18] XIANG Z F, YU S Q, XU Y X, et al. CH25H promotes autophagy and regulates the malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma through the PI3K-AKT pathway[J]. Cancer medicine,2024,13(20):e70312.
- [19] 储正达,蔡彬.秦皮甲素和秦皮乙素的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2024,35(2):291-298.
- [20] NGUYEN D P, LI J Y, YADAV S S, et al. Recent insights into NF- $\kappa$ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer[J]. BJU Int, 2014,114(2):168-176.
- [21] 张雯,孙雅丽,王琳,等.咖啡酸及其衍生物药理作用研究进展[J].动物医学进展,2021,42(8):103-106.
- [22] 郭静,尚海,马丽炎,等.芦荟大黄素衍生物AE-YJ通过PI3K-Akt/NF- $\kappa$ B和MAPK/NF- $\kappa$ B途径抑制LPS诱导RAW264.7细胞炎症介质的释放[J].中国药理学通报,2021,37(12):1700-1708.
- [23] 张文强,文亮,李慧,等.儿茶素经PI3K-Akt-eNOS信号通路对冠心病大鼠心肌损伤及抗炎作用分析[J].现代生物医学进展,2023,23(9):1619-1623.
- [24] 程扬,宾东华,尹园缘,等.参苓白术散对克罗恩病大鼠肠道炎症及PI3K/Akt信号通路的影响[J].中医导报,2024,30(4):30-34.

(收稿日期:2024-06-17 编辑:蒋凯彪)

(上接第69页)(7):826-835.

- [16] 李红,李波,李晨阳,等.大孔树脂纯化苜蓿总黄酮及纯化前后抗氧化能力比较[J].草地学报,2022,30(3):750-757.
- [17] 向雪黎,宦振州,何天赐,等.大孔吸附树脂纯化天山莖菜中总黄酮的工艺研究[J].海峡药学,2019,31(5):23-25.
- [18] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良,等.AICl<sub>3</sub>显色分光光度法测定香椿叶中总黄酮[J].分析试验室,2006,25(12):91-94.
- [19] 王晓华,韦汉燕,桂劲松,等.大孔树脂纯化蒺藜茎总黄酮的工艺研究[J].中国民族民间医药,2020,29(24):34-38.
- [20] 高彦宇,刘思宇,沈芳玲,等.木蝴蝶药理作用及临床应用研究进展[J].中医药学报,2021,49(5):102-106.
- [21] 吴茵,白万军,魏欣.基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析木蝴蝶中化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(2):196-200.
- [22] PENG Q, SHANG X Y, ZHU C C, et al. Qualitative and quantitative evaluation of *Oroxylum indicum* (L.) Kurz by HPLC and LC-qTOF-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr,2019,33(11):e4657.
- [23] ZHU X H, LANG H D, WANG X L, et al. Synergy between dihydromyricetin intervention and irinotecan chemotherapy delays the progression of colon cancer in mouse models[J]. Food Funct,2019,10(4):2040-2049.
- [24] 王大勇,匡晓睿,余志丹.木蝴蝶苷A对肝细胞癌细胞侵袭增殖的抑制作用及机制[J].西部医学,2023,35(7):976-981.
- [25] WEI L B, YAO Y Y, ZHAO K, et al. Oroxylum A inhibits invasion and migration through suppressing ERK/GSK-3 $\beta$  signaling in snail-expressing non-small-cell lung cancer cells[J]. MolCarcinog,2016,55(12):2121-2134.
- [26] 鲁冰冰.木蝴蝶苷A对食管鳞癌增殖的抑制作用及其机制的研究[D].郑州:郑州大学,2020.

(收稿日期:2024-08-21 编辑:蒋凯彪)