

基于指纹图谱结合网络药理学的知母质量标志物预测分析

常鑫鑫¹, 陈香茗¹, 李倩¹, 崔文华¹, 薛紫鲸¹, 许晴¹, 郑玉光², 宋军娜^{1*} (1. 河北中医学院药学院/河北省中药炮制技术创新中心, 河北 石家庄 050200; 2. 河北化工医药职业技术学院, 河北 石家庄 050026)

摘要: 目的 基于指纹图谱及化学计量法综合分析不同产地知母质量差异, 根据质量标志物的理论依据, 进一步结合网络药理学对知母质量标志物进行预测分析。方法 采用 HPLC 建立 6 个产地 20 批知母药材的指纹图谱, 对其进行相似度评价, 结合聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)筛选组间主要差异成分; 基于质量标志物“五原则”, 对差异性成分进行分析, 进一步利用网络药理学方法筛选知母药材成分的相关靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测知母药材的质量标志物。结果 建立了 20 批知母药材的指纹图谱, 标定 10 个共有峰, 共指认出 7 个共有峰, 分别为新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 I、知母皂苷 AIII, 相似度均>0.934。HCA、PCA 和 OPLS-DA 将 20 批样品分为 2 类, 河北、内蒙古为一类, 山西、安徽、陕西、山东为一类。OPLS-DA 筛选出新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 AIII 为不同产地知母药材的差异性成分。运用网络药理学分析预测芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 可能通过 NFKB1、TNF、PPP1CC、IL1B、ATP1A3、ATP1A2、ATP1A1 等靶点, 调控神经活动配体-受体相互作用、缝隙连接、钙信号通路、cAMP 信号通路、cGMP-PKG 信号通路发挥治疗神经系统疾病、心脑血管疾病和癌症的作用。结合质量标志物理论分析, 芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 可作为知母药材潜在的质量标志物。结论 建立的知母药材指纹图谱能够直观反映出不同产地知母化学成分信息, 结合网络药理学筛选出芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 3 个化学成分可作为知母的质量标志物。

关键词: 知母; 质量标志物; 指纹图谱; 多成分定量; 网络药理学; 芒果苷; 知母皂苷 BII; 知母皂苷 AIII

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)05-0603-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20213190

引用本文: 常鑫鑫, 陈香茗, 李倩, 等. 基于指纹图谱结合网络药理学的知母质量标志物预测分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 603-612.

Q-marker Prediction Analysis of Anemarrhenae Rhizoma Based on Fingerprint and Network Pharmacology

CHANG Xinxin¹, CHEN Xiangming¹, LI Qian¹, CUI Wenhua¹, XUE Zijing¹, XU Qing¹, ZHENG Yuguang², SONG Junna^{1*} (1. College of Pharmacy, Hebei Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the quality differences of Anemarrhenae Rhizoma from different areas based on the fingerprint and chemometrics, according to the theoretical basis of the quality marker(Q-Marker) of traditional Chinese medicine, and further combined with network pharmacology, the preliminary prediction analysis of the Q-Marker of Anemarrhenae Rhizoma decoction. **METHODS** HPLC was used to establish the fingerprints of 20 batches of Anemarrhenae Rhizoma from 6 areas and evaluate their similarity. At the same time, hierarchical cluster analysis(HCA), principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were used to screen the main difference components between the groups. Based on the “five principles” of Q-Marker, analyze the different components, and further through the network pharmacology to screen the relevant targets and pathways of the ingredients of Anemarrhenae Rhizoma, construct a “component-target-pathway” network diagram, and predict Anemarrhenae Rhizoma Q-Marker. **RESULTS** The fingerprint of 20 batches of Anemarrhenae Rhizoma materials were established, 10 common peaks were calibrated, and 7 common peaks were identified, namely, neomangiferin, mangiferin, isomangiferin, timosaponin BII, timosaponin BIII, timosaponin I, timosaponin AIII. Their similarity was >0.934. Twenty batches of samples were clustered into two groups by HCA, PCA and OPLS-DA. Hebei and Inner Mongolia as one category. Shaanxi, Anhui, Shanxi and Shandong as one category. The OPLS-DA screened out neomangiferin, mangiferin, timosaponin AIII as the main marker components for the differences of Anemarrhenae Rhizoma. Using network pharmacology analysis to predict that mangiferin, timosaponin BII, timosaponin AIII may regulate neural activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803762); 河北省自然科学基金项目(H2022423317); 河北省高校百名优秀创新人才支持计划项目(SLRC2019044); 河北省高层次人才资助项目(A201901037); 河北中医学院大学生创新创业训练项目(202114432146)

作者简介: 常鑫鑫, 女, 硕士生 E-mail: 949049932@qq.com **通信作者:** 宋军娜, 女, 硕士, 副教授 E-mail: junnasong@163.com

ligand-receptor interactions, gap junctions, calcium signaling pathway, cAMP signaling pathway, and cGMP-PKG signaling pathway through NFKB1, TNF, PPP1CC, IL1B, ATP1A3, ATP1A2, ATP1A1 and other targets, played a role in the treatment of neurological diseases, cardiovascular, cerebrovascular diseases and cancer. Combined with Q-Marker theoretical analysis, mangiferin, timosaponin BII, timosaponin AIII could be used as potential Q-Markers in Anemarrhenae Rhizoma. **CONCLUSION** The established fingerprint of Anemarrhenae Rhizoma can directly reflect the chemical composition information of Anemarrhenae Rhizoma from different areas. Combining with network pharmacology, the three chemical components of mangiferin, timosaponin BII, timosaponin AIII can be used as the Q-Marker of Anemarrhenae Rhizoma.

KEYWORDS: Anemarrhenae Rhizoma; quality marker(Q-marker); fingerprints; multi-components determination; network pharmacology; mangiferin; timosaponin BII; timosaponin AIII

中药知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.的干燥根茎,始载于《神农本草经》,列为中品^[1]。《名医别录》中记载:“知母生河内川谷。”^[2]《图经本草》载:“今濒河怀卫(河南荥阳)、彰德(河南安阳)诸郡及解州、滁州亦有之用,濒河诸郡为古之黄河两岸地区。”^[3]现今市场上流通的知母主要产于河北、安徽、内蒙古、山西等省。知母具有清热泻火,滋阴润燥之功^[4]。现代研究表明,知母中含有双苯吡酮类、甾体皂苷类、多糖类等成分^[5],具有抗炎、抗肿瘤、抗抑郁、保护心血管系统等药理活性^[6-10]。

中药是一个典型的复杂物质系统,其科学、综合的质量控制与评价是现代中医药研究的热点与难点^[11]。中药质量标志物是由刘昌孝院士提出的新概念、新理论,基于成分有效性、特有性、可测性、质量传递与溯源性、处方配伍五原则对成分进行分析,在中药质量评价中已广泛应用^[12]。指纹图谱是一种用来评价多组分复杂体系中化学成分的方法,具有整体性和模糊性,可在尚不明确中药整体化学成分的前提下,全面准确地描述中药内在质量的真实性和稳定性^[13-14]。网络药理学是一种以系统生物学和网络生物学为基础的研究方法,以“网络靶标”为核心,对中药成分、靶点、通路进行梳理分析,揭示中药多成分协同发挥药效作用的机制^[15]。同时,网络药理学整体性、系统性的特点与中医药整体观念和辨证论治的思想相契合^[14]。

基于质量标志物的研究思路与方法,本研究通过建立知母药材指纹图谱,结合化学计量法对不同产地知母样品进行可测性和特有性分析,再运用网络药理学对知母候选质量标志物进行有效性研究,从分析化学角度和生物信息角度分析预测知母的质量标志物,为知母整体质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪及其配套的 G4260B 型蒸发光散射检测器(美国 Agilent);

InertSustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); ME204E 型十万分之一电子天平、SQP 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); JP-060S 超声波清洗仪(深圳洁盟清洗设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

新芒果苷(批号:19072315;含量≥98%)、芒果苷(批号:19040123;含量≥98%)、异芒果苷(批号:19072905;含量≥98%)、知母皂苷 BII(批号:21012010;含量≥98%)、知母皂苷 BIII(批号:19052209;含量≥96%)、知母皂苷 I(批号:20052405;含量≥98%)、知母皂苷 AIII(批号:19040108;含量≥98%)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司;甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级)均购自赛默飞世尔科技公司;甲酸(美国 ROE 有限公司);超纯水(美国 Millipore 公司);其他试剂为分析级(天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.3 药材

收集的不同产地 20 批知母药材来源见表 1,经河北化工医药职业技术学院郑玉光教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge.的干燥根茎。

表 1 知母样品信息

Tab. 1 Sources of Anemarrhenae Rhizoma

样品编号	产地	样品编号	产地
S1	河北石家庄灵寿	S11	山西太原
S2	河北保定易县	S12	陕西延安
S3	河北保定满城	S13	陕西延安
S4	河北张家口尚义	S14	陕西延安
S5	河北张家口尚义	S15	内蒙古赤峰
S6	安徽亳州	S16	内蒙古赤峰
S7	安徽亳州	S17	内蒙古赤峰
S8	安徽亳州	S18	山东烟台
S9	山西大同	S19	山东烟台
S10	山西大同	S20	山东烟台

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用色谱柱 InertSustain C₁₈(250 mm×4.6 mm,

5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水(B), 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 20 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL , 梯度洗脱(0~5 min, 5%→7% A; 5~12 min, 7%→15% A; 12~20 min, 15%→20% A; 20~23 min, 20%→23% A; 23~36 min, 23% A; 36~40 min, 23%→29% A; 40~43 min, 29%→35% A; 43~51 min, 35%→46% A; 51~60 min, 46%→95% A), 漂移管温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 雾化温度 90 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速 1.6 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 B II、知母皂苷 B III、知母皂苷 I、知母皂苷 A III对照品适量, 以 70%乙醇配成每 1 mL 含新芒果苷 1.720 mg、芒果苷 0.008 mg、异芒果苷 0.100 mg、知母皂苷 B II 2.360 mg、知母皂苷 B III 0.304 mg、知母皂苷 I 0.264 mg、知母皂苷 A III 0.434 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取本品粉末(3 号筛)0.50 g, 于具塞锥形瓶中, 加入 70%乙醇 20 mL, 精密称定, 超声提取(360 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 再次称定, 用 70%乙醇补足损失重量, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (14 549 $\times$ g)离心 10 min 后, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.4 不同产地知母药材指纹图谱研究

2.4.1 方法学考察

2.4.1.1 仪器精密度试验 称取知母样品(S1)粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 连续进样 6 次, 以知母皂苷 B II 为参照峰 S, 考察 7 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各项 RSD 均<3%。由精密度考察结果可知, 仪器精密度良好。

2.4.1.2 稳定性试验 称取知母样品(S1)粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以知母皂苷 B II 为参照峰 S, 考察 7 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各项 RSD<3%。结果表明, 7 个待测成分在 24 h 内稳定性良好。

2.4.1.3 重复性试验 平行称取 6 份知母样品(S1)粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下进样分析, 以知母皂苷 B II 为参照峰 S, 考察 7 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示各项 RSD 均<3%。结果表明所建立方法重复性良好。

2.4.2 不同产地知母药材指纹图谱建立及共有峰指认

20 批知母药材样品按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下条件进样分析, 得到 20 批样品色谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 版)软件, 以 S1 样品色谱图作为参照, 将时间窗设为 0.2 min, 匹配色谱峰, 中位数法生成知母药材对照指纹图谱。标定了 10 个共有峰, 比对照品, 共指认出 7 个共有峰, 分别为新芒果苷(1 号峰)、芒果苷(2 号峰)、异芒果苷(3 号峰)、知母皂苷 B II(7 号峰)、知母皂苷 B III(8 号峰)、知母皂苷 I(9 号峰)以及知母皂苷 A III(10 号峰)。20 批知母药材的指纹图谱及对照指纹图谱见图 1。

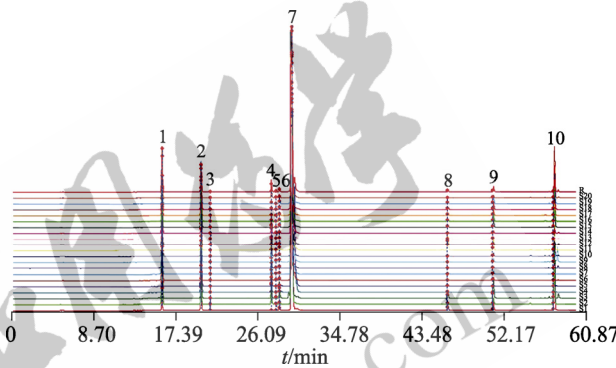


图 1 20 批知母药材 HPLC 指纹图谱的叠加图(S1~S20)及对照指纹图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 20 batches of Anemarrhenae Rhizoma(S1-S20) and control fingerprints(R)

2.4.3 指纹图谱相似度评价 将 20 批知母药材样品色谱图与对照指纹图谱进行相似度评价。各批次知母药材样品色谱图相似度>0.934, 说明不同产地间知母药材质量相对稳定, 具有良好的一致性, 结果见表 2。

表 2 20 批知母药材指纹图谱相似度评价

Tab. 2 Similarity of 20 batches of Anemarrhenae Rhizoma

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.993	S11	0.994
S2	0.997	S12	0.993
S3	0.998	S13	0.993
S4	0.934	S14	0.992
S5	0.935	S15	0.998
S6	0.990	S16	0.997
S7	0.984	S17	0.998
S8	0.990	S18	0.996
S9	0.992	S19	0.996
S10	0.993	S20	0.995

2.5 不同产地知母药材多成分含量测定

2.5.1 线性关系考察 用 70%乙醇将混合对照品溶液等比稀释成不同浓度溶液, 按“2.1”项下条

件进样分析,以待测化合物峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标进行线性回归,得各对照品标准曲线,结果见表3,表明各化合物在一定浓度范围内线性关系良好($R^2>0.999\ 0$)。

2.5.2 仪器精密度试验 称取知母样品(S1)粉末,按“2.3”项下方法处理样品,按“2.1”项下色谱条件进样测定,连续进样6次,以知母皂苷BII为参照峰S,记录知母7个共有峰的峰面积。结果显示7个共有峰峰面积的RSD分别为0.98%,1.61%,1.61%,1.70%,2.18%,2.54%,0.39%。由精密度考察结果可知,仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 称取知母样品(S1)粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别放置0,2,4,8,12,24 h后按“2.1”项下色谱条件进样分析,以知母皂苷BII为参照峰S,记录7个共有峰的峰面积。结果显示7个共有峰峰面积的RSD分别为2.15%,1.24%,2.20%,2.57%,2.65%,2.59%,1.34%。结果表明,各待测成分在24 h内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 平行称取6份知母样品(S1)粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录7个共有峰的峰面积,计算得出7个共有峰的RSD分别为2.83%,2.72%,2.95%,1.33%,2.89%,2.74%,1.84%,结果表明,所建立方法的重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 平行精密称定6份知母药材(S1)粉末约0.25 g,分别加入与知母药材粉末各成分相等含量的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算平均加样回收率,得到新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷BII、知母皂苷BIII、知母皂苷I、知母皂苷AIII 7个共有峰的平均加样回收率分别是99.37%,100.97%,97.05%,95.59%,101.57%,98.73%,97.59%。RSD分别为1.87%,1.96%,1.75%,1.04%,2.46%,2.94%,2.77%,结果见表4。

表3 7种成分的保留时间、回归方程、相关系数、线性范围

Tab. 3 Retention time, regression equation, correlation coefficients and linear ranges of 7 constituents

峰号	成分	t_R/min	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	新芒果苷	15.923	$Y=1.562\ 6X+8.804\ 7$	0.999 0	0.108~1.720
2	芒果苷	20.075	$Y=1.568\ 6X+9.202\ 2$	0.999 6	0.049~0.778
3	异芒果苷	21.035	$Y=1.745\ 7X+9.041\ 4$	0.999 1	0.006~0.100
4	知母皂苷 BII	29.614	$Y=1.679\ 7X+9.360\ 5$	0.999 8	0.148~2.360
5	知母皂苷 BIII	46.225	$Y=1.814\ 3X+8.830\ 6$	0.999 1	0.019~0.304
6	知母皂苷 I	51.027	$Y=1.758\ 5X+9.852\ 7$	0.999 1	0.017~0.264
7	知母皂苷 AIII	57.457	$Y=1.576\ 9X+9.852\ 7$	0.999 0	0.013~0.434

2.5.6 样品含量测定 取20批知母药材,按“2.3”项下方法制备样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算不同产地知母药材中新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷BII、知母皂苷BIII、知母皂苷I、知母皂苷AIII的含量。知母药材样品和混合对照品色谱图见图2,20批知母药材样品含量测定结果见表5。由含量测定结果可知,不同产地样品所测的7种成分含量有显著差异。

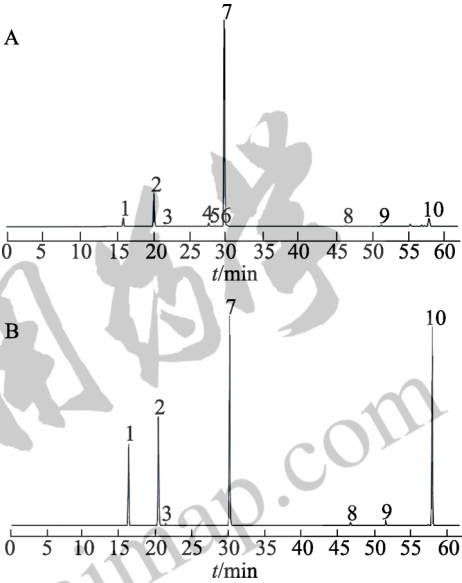


图2 知母高效液相色谱图
A-供试品溶液; B-混合对照品溶液; 1-新芒果苷; 2-芒果苷; 3-异芒果苷; 7-知母皂苷BII; 8-知母皂苷BIII; 9-知母皂苷I; 10-知母皂苷AIII。

Fig. 2 HPLC chromatogram of Anemarrhenae Rhizoma
A-sample solution; B-mixed reference solution; 1-neomangiferin; 2-mangiferin; 3-isomangiferin; 7-timosaponin BII; 8-timosaponin BIII; 9-timosaponin I; 10-timosaponin AIII.

2.6 化学计量法研究

2.6.1 聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA) 用SPSS 24.0软件对6个不同产地知母样品进行聚类分析,以测定的10个共有峰的峰面积为变量,

表 4 加样回收考察结果

Tab. 4 Recovery test results of the samples

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
新 芒 果 苷	2.740	2.700	5.341	96.33	99.37	1.87
	2.716	2.700	5.438	100.81		
	2.718	2.700	5.462	101.63		
	2.703	2.700	5.395	99.70		
	2.744	2.700	5.403	98.48		
	2.762	2.700	5.442	99.26		
芒 果 苷	4.925	5.021	9.993	100.94	100.97	1.96
	4.964	5.021	9.940	99.10		
	5.063	5.021	10.255	103.41		
	5.105	5.021	10.283	103.13		
	5.134	5.021	10.182	100.54		
	5.182	5.021	10.137	98.69		
异 芒 果 苷	0.299	0.305	0.589	95.08	97.05	1.75
	0.265	0.305	0.540	96.72		
	0.301	0.305	0.600	98.03		
	0.312	0.305	0.612	98.36		
	0.304	0.305	0.594	95.08		
	0.306	0.305	0.608	99.02		
知 母 皂 苷 BII	22.156	21.030	42.153	95.09	95.59	1.04
	21.472	21.030	41.464	95.06		
	21.444	21.030	41.432	95.05		
	21.395	21.030	41.441	95.32		
	21.506	21.030	42.030	97.59		
	21.031	21.030	41.094	95.40		
知 母 皂 苷 BIII	0.765	0.703	1.482	101.99	101.57	2.46
	0.834	0.703	1.562	103.56		
	0.863	0.703	1.601	104.98		
	0.884	0.703	1.594	101.00		
	0.779	0.703	1.480	99.72		
	0.864	0.703	1.554	98.15		
知 母 皂 苷 I	0.990	1.040	1.984	95.58	98.73	2.94
	1.06	1.040	2.102	100.19		
	1.03	1.040	2.043	97.40		
	1.04	1.040	2.058	97.88		
	1.10	1.040	2.180	103.85		
	1.15	1.040	2.164	97.50		
知 母 皂 苷 AIII	2.906	2.895	5.864	102.18	97.59	2.77
	3.004	2.895	5.883	99.45		
	2.946	2.895	5.722	95.89		
	2.899	2.895	5.651	95.06		
	2.904	2.895	5.686	96.10		
	2.990	2.895	5.794	96.86		

数据经标准化后,采用组间联接法,选用平方欧氏距离对不同批次的知母药材样品进行聚类分析。由聚类分析结果可知,当组间距为 25 时,20

批样品分为 2 类,其中河北、内蒙古为一类,山西、安徽、陕西、山东为一类。结果见图 3。

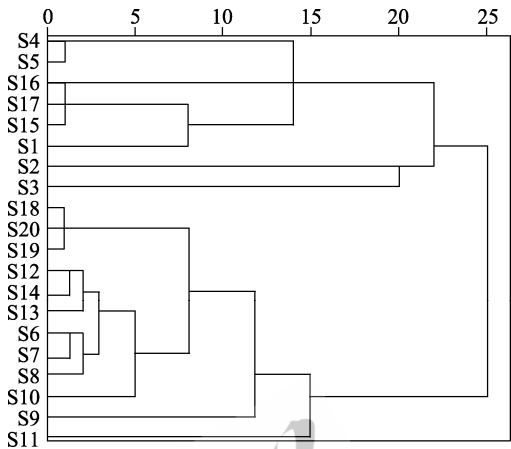


图 3 不同产地知母药材聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of Anemarrhenae Rhizoma

2.6.2 主成分分析(principal component analysis, PCA)

PCA 是一种重要的化学计量学方法,PCA 在不丢失太多信息的基础上,将原始众多相关性的指标重新组合成新的相互无关的综合指标(主成分)来代替原始指标充分反映原始数据的信息。该方法被广泛用于中药材比较与区分中。因此,在聚类分析的基础上,进一步采用 PCA 对知母药材进行分析。由 PCA 结果可知,主成分 1 贡献率是 0.55,主成分 2 的贡献率是 0.15,累积贡献率达到 0.70,预测能力参数 Q^2 为 0.998,说明所建立的模型的区分度较好。不同产地知母药材样品明显分布于 2 个区域,河北、内蒙古为一类,山西、安徽、陕西、山东为一类。综合 HCA 和 PCA 结果,提示不同产地知母药材在化学成分的含量上存在明显的差异,结果见图 4。

2.6.3 正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)

为更好观察不同产地知母间的差异,采用 OPLS-DA 对不同产地知母样品进行分析。所建立 OPLS-DA 模型的 $R^2X=1$, $R^2Y=0.993$, $Q^2=0.837$ 。由 OPLS-DA 得分图可知(图 5),20 批知母样品可以被分为 2 类,与 HCA 及 PCA 结果一致,说明不同产地知母化学成分含量存在差异。结合变量权重重要性排序(VIP)预测值(图 6),在 0.95 的置信区间内,选取 $VIP>1.0$ 的化合物作为差异性化合物。新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 AIII 的 VIP 值分别为 1.99, 1.70, 1.22, 均 >1 。因此,新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 AIII 是不同产地知母的差异性化合物。

表 5 知母药材 7 种成分含量测定($n=3$)

Tab. 5 Contents of 7 constituents in Anemarrhenae Rhizoma($n=3$)

编号	新芒果苷	芒果苷	异芒果苷	知母皂苷 BII	知母皂苷 BIII	知母皂苷I	知母皂苷 AIII	总量
1	5.46	9.44	1.28	38.32	5.34	3.41	11.39	74.64
2	15.07	12.83	0.99	42.23	6.00	7.14	10.53	94.79
3	16.97	7.08	0.84	47.36	2.86	3.24	10.64	88.99
4	12.43	17.77	1.50	41.04	2.06	1.94	5.09	81.83
5	12.38	17.85	1.52	40.87	2.03	1.98	5.15	81.78
6	19.78	2.05	0.57	40.96	1.04	2.14	0.91	67.45
7	23.33	2.82	0.50	41.46	1.01	2.08	0.54	71.74
8	19.45	2.04	0.41	39.03	1.33	1.66	2.18	66.10
9	18.00	4.71	0.82	41.28	0.98	2.21	4.34	72.34
10	16.36	5.19	0.79	40.47	1.07	2.13	7.14	73.15
11	16.30	4.00	0.71	40.30	1.01	2.01	3.96	68.29
12	17.47	2.94	0.67	41.14	1.09	1.88	1.84	67.03
13	17.12	2.56	0.67	40.80	1.00	2.28	1.36	65.79
14	17.92	2.95	0.60	41.39	1.21	1.99	1.88	67.94
15	8.27	12.40	1.25	42.50	3.27	3.71	7.98	79.38
16	8.20	12.54	1.27	41.90	3.45	3.46	7.91	78.73
17	8.22	12.41	1.21	42.21	3.47	3.52	8.09	79.13
18	16.41	5.35	0.61	38.83	1.49	1.87	10.16	74.72
19	16.03	5.09	0.67	38.71	1.30	1.86	10.09	73.75
20	16.32	5.33	0.66	38.93	1.64	1.90	10.20	74.98

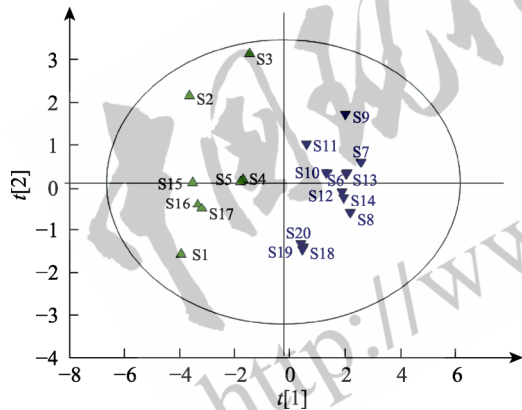


图 4 不同产地知母药材主成分分析

Fig. 4 Principal component analysis of Anemarrhenae Rhizoma from different habitats

2.7 质量标志物预测分析

知母具有清热泻火, 滋阴润燥的作用, 可用于外感热病, 高热烦渴, 肺热燥咳, 骨蒸潮热, 内热消渴, 肠燥便秘^[1]。《神农本草经》云: “主消渴热中, 除邪气, 肢体浮肿, 下水, 补不足, 益气”, 《证类本草》载有 “主治伤寒久疟烦热, 胁下邪气, 膈中恶, 及风汗内疸”^[16]。新芒果苷、芒果苷为知母双苯吡酮类的主要成分, 知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 为知母甾体皂苷的主要成分^[17],

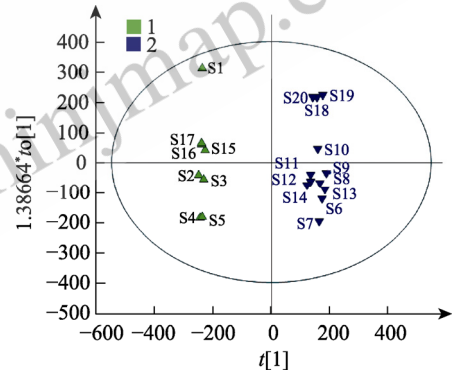


图 5 不同产地知母样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA scores of Anemarrhenae Rhizoma samples from different habitats

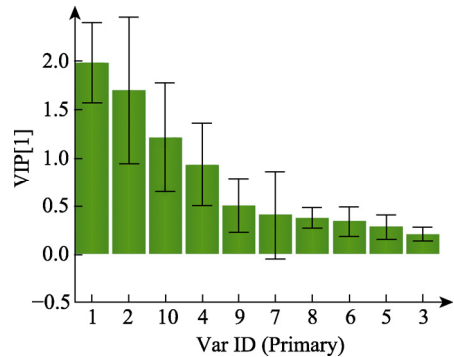


图 6 知母药材 7 个色谱峰的重要性变量

Fig. 6 VIP value of 7 chromatographic peak of Anemarrhenae Rhizoma samples

其中知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII是知母中特有成分。现代药理学研究表明,知母双苯吡酮类、甾体皂苷类成分具有抗炎、解热、抗肿瘤等药理作用,与知母的传统药效不谋而合^[18-19]。从传统药性来看,知母味苦、甘,寒。归肺、胃、肾经。文献研究表明,黄酮类和甾体类化合物是苦寒类中药发挥药效的主要物质基础^[20]。

药物经体内吸收入血才发挥疗效,因此,分析中药成分给药入血后其体内代谢产物对中药质量标志物的预测分析具有重要意义。梁均乐等^[21]通过电喷雾质谱法分析口服知母皂苷后大鼠的血清,发现知母皂苷 BII能够以还原型进入血液中。刘艳萍等^[22]通过对体外大鼠肠道菌群对知母皂苷 BII代谢的研究,初步确定知母皂苷 AIII为其代谢产物。王可人^[23]通过 HPLC-MS 测定新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 为 SD 大鼠体内的入血成分。

基于复方配伍环境分析,桂枝芍药知母汤^[24]、白虎加桂枝汤^[25]等中药复方通过芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII在内的知母特有性成分对复方进行质量控制。在预测酸枣仁汤的质量标志物的研究中发现,酸枣仁汤的质量标志物知母皂苷元、芒果苷来源于知母,体现了“药材-饮片-复方”的传递和溯源性^[26]。

中国药典 2020 年版中规定了知母中芒果苷和知母皂苷 BII 的含量测定方法和限度。对其他成分的含量测定方法目前也有相关研究,例如张烨子等^[27]使用 HPLC-UV-ELSD 测定了新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII的含量,该方法简便可行,可用于知母质量控制,体现了成分的可测性。

综上所述,新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII可作为研究知母质量标志物的目标,将进一步通过网络药理学预测其质量标志物。

2.8 网络药理学分析

2.8.1 活性成分靶点筛选 通过检索中药系统药理学数据库与分析平台(<https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中医药整合药理学研究平台(<http://www.tcmip.cn/TCMIP/>)、TCMID(<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>)、Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),对新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII进行检索,

筛去重复靶点共得到 4 个化合物、48 个相关靶点。

2.8.2 靶点蛋白与蛋白互作 (protein protein interaction, PPI)网络分析 将获得的 48 个靶点蛋白导入在线 STRING 11.0 软件(<https://string-db.org/cgi/input.pl>),物种选择为人类(homo sapiens),其他参数设置不变,去掉网络中的单一节点,导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建 PPI 网络图,结果见图 7。

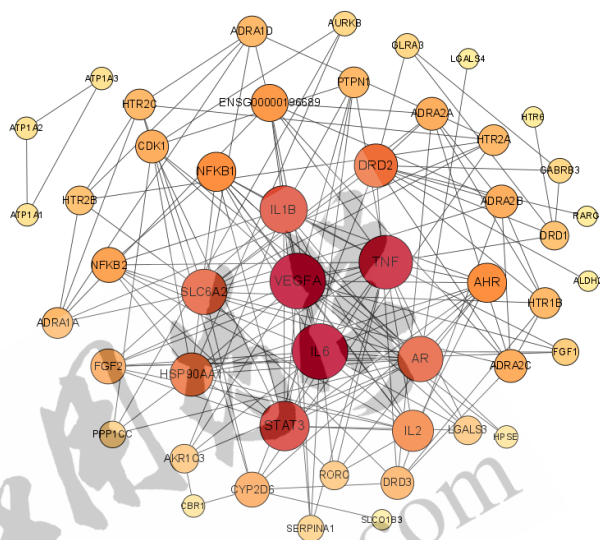


图 7 靶点 PPI 网络图
Fig. 7 Target PPI network

2.8.3 GO 功能富集分析与 KEGG 通路分析 利用 R 语言对获得的 48 个作用靶点进行 GO 功能富集分析。选取“Homo sapiens”物种的“Gene_Ontology”项,得到 GO 条目,包含 73 个生物过程,53 个细胞功能以及 1 015 个分子功能。并按照参与该功能基因的数量与显著性(P 值)进行排序,取前 20 条结果,进行可视化分析,见图 8。G protein-coupled amine receptor activity(G 蛋白偶联胺受体活性)、neurotransmitter receptor activity(神经递质受体活性)、catecholamine binding(儿茶酚胺结合)、drug binding(药物结合)、amine binding(胺结合)等功能涉及的基因最多,显著性最高。

运用 R 语言对 48 个靶点进行 KEGG 通路富集分析,分析得到 52 条通路,设定 $P < 0.05$,选取排名前 20 的通路进行 KEGG 通路富集分析气泡图的绘制,见图 9。其中参与最多的通路是 neuroactive ligand-receptor interaction(神经活动配体-受体相互作用),共有 15 个基因参与该通路,分别为 DRD2、ADRA2A、ADRA2B、ADRA2C、DRD3、ADRA1A、

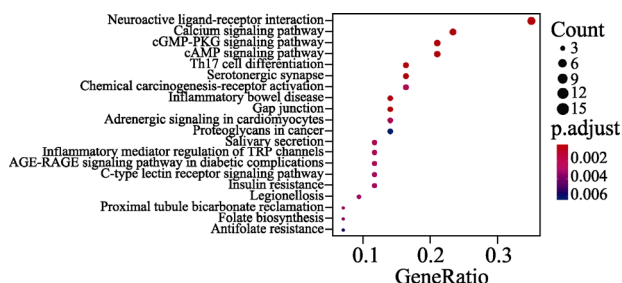


图 8 GO 富集分析(前 20 条)

Fig. 8 Enrichment analysis result of GO(top 20)

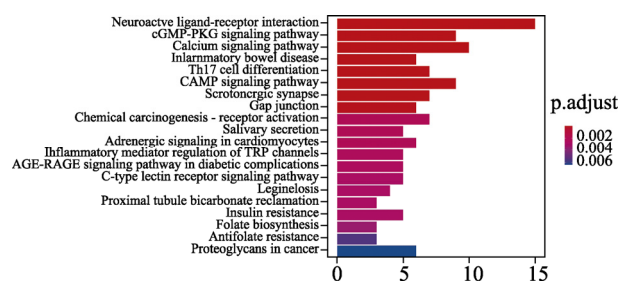


图 9 KEGG 富集分析(前 20 条)

Fig. 9 Enrichment analysis result of KEGG(top 20)

ADRA1D、HTR1B、HTR2A、HTR2C、DRD1、HTR2B、GABRB3、GLRA3、HTR6。

2.8.4 “成分-靶点-通路”网络构建 将 4 个化合物、48 个靶点蛋白以及 20 条信号通路导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制“成分-靶点-通路”网络图(图 10)。通过构建“成分-靶点-通路”网络图，

说明了知母不同化学成分对应的不同靶点在不同的信号通路中发挥不同的作用，符合中药多成分、多靶点和多途径协同作用的特点。以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度为参考，发现知母皂苷 BII(degree=37)、知母皂苷 AIII(degree=35)、芒果苷(degree=6)的连接度相对较高，提示这 3 个成分可能是知母发挥药效的主要活性成分。靶点 NFKB1(degree=11)、TNF(degree=9)、PPP1CC(degree=9)、IL1B(degree=8)、ATP1A3(degree=8)、ATP1A2(degree=8)、ATP1A1(degree=8)、STAT3(degree=8)、ADRA1D(degree=8)、ADRA1A(degree=8)连接度较高，提示这些靶点可能是知母发挥药效的关键靶点；neuroactive ligand-receptor interaction(神经活动配体-受体相互作用)、gap junction(缝隙连接)、calcium signaling pathway(钙信号通路)、cAMP signaling pathway(cAMP 信号通路)、cGMP-PKG signaling pathway(cGMP-PKG 信号通路)等的信号通路连接度较大，可能是知母发挥作用的关键信号通路。

3 讨论

中药质量是中药临床安全有效的基础，直接影响中药的品质与临床疗效。知母药用价值高，为临床广泛使用的药材，因此建立客观准确、全面有效的知母药材质量评价方法具有重大意义^[28]。

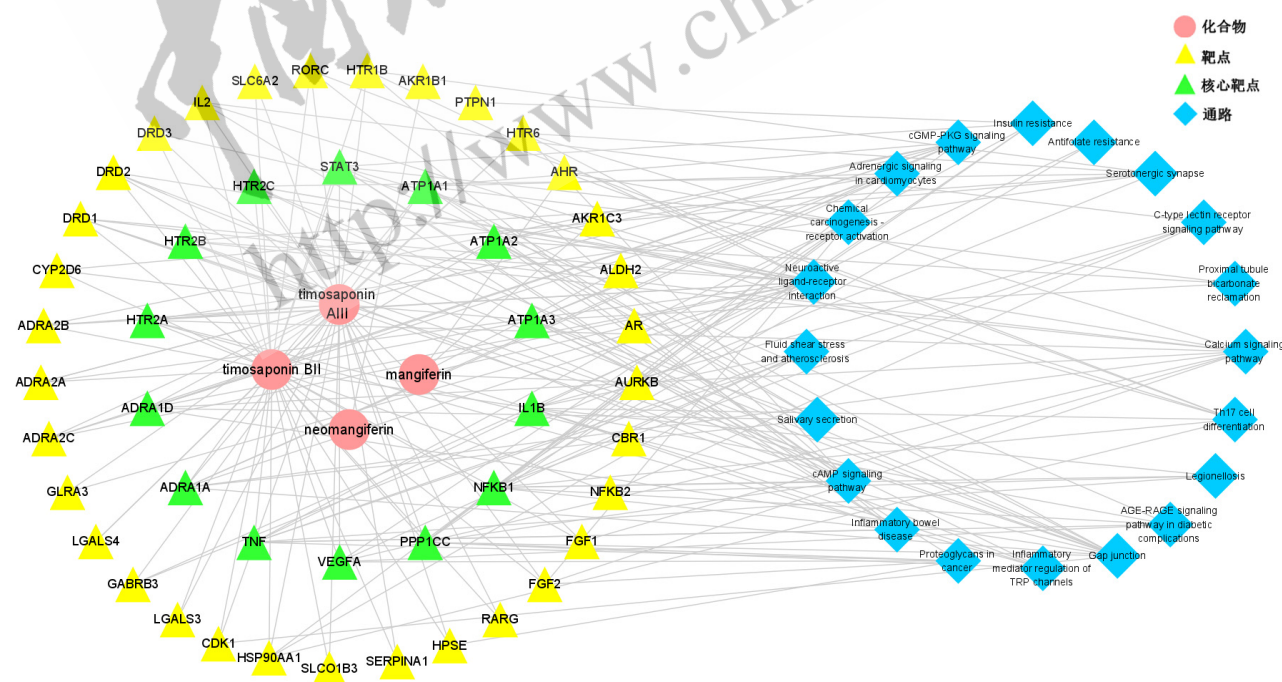


图 10 知母“成分-靶点-通路”网络图

Fig. 10 “Compound-target-pathway” network diagram of Anemarrhenae Rhizoma

为完善中药质量标准,克服现行指标性成分单一,与药效关联性不强等问题,刘昌孝院士提出了中药产品质量控制的新概念——中药质量标志物。质量标志物有利于阐明中药有效物质基础,且对控制中药总体质量具有重要作用^[28-29]。

基于质量标志物的核心要素,分析发现新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 4 个成分符合成分可测性、成分特有性、生源途径、传统药效及药性、复方配伍环境^[29-30]五原则,可作为知母质量标志物研究对象。从可测性角度,本研究通过建立 20 批知母药材指纹图谱,对不同产地知母进行定性及定量分析,指认出新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 BIII、知母皂苷 I、知母皂苷 AIII 7 个成分,并通过正交偏最小二乘判别分析筛选出新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 AIII 3 个差异性标志成分。从有效性角度,进一步运用网络药理学筛选 4 个成分的核心靶点和主要通路,发现芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 连接度较高,三者可能作用于 NF- κ B、TNF、PP1CC、IL1B、ATP1A3、ATP1A2、ATP1A1 靶点,通过神经活动配体-受体相互作用、缝隙连接、钙信号通路、cAMP 信号通路、cGMP-PKG 信号通路,从而发挥治疗神经系统疾病、心脑血管疾病和癌症的作用。中国药典 2020 年版以芒果苷、知母皂苷 BII 为知母的质控成分。因此,芒果苷、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 可作为知母药材潜在的质量标志物,为后期深入研究知母药材药效机制提供参考,有助于建立和完善知母的质量控制体系,提高质量控制水平。本研究初步对知母进行质量标志物预测,后期可以此为基础利用分子对接技术对以上化合物与核心靶点进一步分析,其体内吸收及代谢过程还需通过药理实验进行深入研究。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 222.
- [2] (清)顾观光重辑本. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955: 58.
- [3] (梁)陶弘景. 名医别录[M]. 尚志钧辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 122.
- [4] (宋)苏颂. 本草图经[M]. 尚志钧辑校. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 163.
- [5] YAN L, WU Y, GAO H. Determination of 4 kinds of saponins in *Rhizoma Anemarrhenae* before and after processing by HPLC-CAD[J]. *Res Pract Chin Med(现代中药*

研究与实践), 2019, 33(1): 46-49.

- [6] SUN Y G, DU Y F, YANG K, et al. A comparative study on the pharmacokinetics of a traditional Chinese herbal preparation with the single herb extracts in rats by LC-MS/MS method[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013(81/82): 34-43.
- [7] XIN T T, LIAO C P, MENG Y M, et al. Effects of Mangiferin on spontaneously hypertensive rats T lymphocyte subsets and inflammatory factors[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志)*, 2020, 47(3): 194-197.
- [8] ZHANG L. Inhibition effect of Mangiferin on human thyroid papillary carcinoma TPC-1 cells and its anti-tumor mechanism [D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [9] DU M J, CHEN J P, YU J X, et al. Study on vascular protection effect and mechanism of timosaponin B II based on Zebrafish model[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2020, 31(7): 811-815.
- [10] LI F L, YAN D, ZHANG J L, et al. Research progress on chemical composition and action mechanism of Alzheimer's disease in *Rhizoma Anemarrhenae*[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报)*, 2016, 18(1): 164-168.
- [11] YANG W N, XU W H, XU X M, et al. Mechanism research of *Radix Salviae-Radix Paeoniae Rubra* on treating acute myocardial infarction based on network pharmacology[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志)*, 2020, 47(1): 141-146, 223.
- [12] LIU T L, DONG C M, QI D M, et al. Establishment idea of *Lonicerae Japonicae Flos* fingerprint system based on Q-marker of Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2020, 51(1): 229-235.
- [13] 张颖. 中药谱效关系在中药研究中的现状与展望[J]. *黑龙江医药*, 2010, 23(5): 755-758.
- [14] MEI X, XIA J X, GUO S, et al. Q-marker prediction analysis of *Paeoniae Radix Alba* based on fingerprint and network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2020, 51(10): 2627-2633.
- [15] WEN J, XUE R, JI D, et al. Predictive analysis of quality markers of *Trichosanthis Fructus* decoction pieces based on fingerprint and network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021, 52(9): 2687-2695.
- [16] 代涛. 知母名称、来源及性味功效考证[J]. *中药材*, 2019, 42(1): 226-229.
- [17] ZHU J X, LI W. Research progress of *Anemarrhena Rhizome*[J]. *J Hebei North Univ Nat Sci Ed(河北北方学院学报: 自然科学版)*, 2018, 34(2): 56-60.
- [18] WENG L L, CHEN L, XU Y, et al. Chemical composition and pharmacological action of *Rhizome Anemarrhena*[J]. *Jilin J Chin Med(吉林中医药)*, 2018, 38(1): 90-92.
- [19] LIU Y P. Progress on pharmacological activities and mechanism of *Anemarrhena saponin*[J]. *J Pharm Pract(药学实践杂志)*, 2018, 36(1): 24-29.
- [20] LI M, CHEN S J, WANG X H, et al. UPLC fingerprint of *Pogostemonis Herba* and prediction of its potential quality markers based on network pharmacology[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021, 52(9): 2665-2677.
- [21] LIANG J L, HAN L P, JIANG L L. Identification of

- constituents in rat serum by HPLC-MS following oral administration of saponins from *Anemarrhena asphodeloides* [J]. Guangzhou Med J(广州医药), 2010, 41(3): 69-72.
- [22] LIU Y P, YU Z C, CHEN H J. Study on metabolism and transformation of timosaponin B II *in vitro* based on metabolism of intestinal flora[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2018, 25(5): 66-70.
- [23] WANG K R. Studies on chemical constituents and pharmacokinetics of Zimu Baihe herb-pair[D]. Shanghai: Naval Medical University, 2011.
- [24] QIN Y, ZENG H R, WANG L, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and free radicals scavenging in Guizhi Shaoyao Zimu decoction[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(14): 3042-3048.
- [25] GUO M Q, YAN Z H, WU H, et al. Chemical material basis of extract of Baihu Jia Guizhi Tang by UFLC-triple-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(10): 134-141.
- [26] WANG Y, YANG X, XIA P F, et al. Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of Suanzaoren decoction and prediction and analysis of Q-markers[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(12): 2765-2771.
- [27] ZHANG Y Z, HE Z J, JIANG H, et al. Study on quality control method for simultaneous analysis of fingerprint and multi-characteristic components of Anemarrhenae Rhizoma by HPLC-UV-ELSD[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2020, 36(2): 252-258.
- [28] REN W G, GUO L L, ZHANG C Y, et al. The research progress and predictive parsing for Q-marker of Gegenqinlian decoction[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(18): 1675-1679.
- [29] ZHANG T J, BAI G, CHEN C Q, et al. Research approaches of quality marker(Q-marker) of Chinese materia medica formula based on "five principles"[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(1): 1-13.
- [30] YANG C M, YANG P, LIU L H, et al. Research progress on Q-Marker of traditional Chinese medicine and thoughts on quality research of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2021, 52(9): 2519-2526.

收稿日期: 2022-02-22

(本文责编: 蔡珊珊)