基于指纹图谱和网络药理学预测经典名方温胆汤中枳实的质量标志物

李航飞，朱志军*，李明明，王婉怡(河南中医药大学，郑州 450046)

摘要：目的 基于指纹图谱和网络药理学预测经典名方温胆汤(Wendan decoction，WDD)中药材枳实的质量标志物(Q-Marker)。**方法** 建立枳实药材和 WDD 基准样品的指纹图谱，使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 年 A 版)进行相似度分析和共有成分指认；采用网络药理学筛选共有成分的相关靶点和关键通路，并建立成分-靶点-通路网络，预测枳实发挥祛痰止呕，清胆和胃功效潜在的 Q-Marker，并测定其含量。**结果** 建立了 15 批枳实药材和 15 批 WDD 基准样品的指纹图谱，15 批枳实药材和 WDD 基准样品指纹图谱相似度>0.9，指认出 5 个化学成分，分别为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素；网络药理学筛选分析得到 5 个化合物的 TP53、MAPK8、EGFR、JUN、MMP9 等 32 个核心靶点和癌症通路、内分泌抵抗通路等 10 条关键通路，构建了“成分-靶点-通路”网络图，预测柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素为 WDD 中枳实的 Q-Marker。WDD 中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量≥0.011 7%，0.025 3%，0.025 7%，0.010 4%，0.010 7%。**结论** WDD 中枳实的 Q-Marker 预测分析为建立完整的 WDD 质量评价体系提供参考，也为阐明其药效物质基础的作用机制奠定了基础。

关键词：温胆汤；枳实；指纹图谱；网络药理学；质量标志物

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2023)16-2216-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222713

引用本文：李航飞，朱志军，李明明，等. 基于指纹图谱和网络药理学预测经典名方温胆汤中枳实的质量标志物[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(16): 2216-2223.

Q-Marker Pediction Analysis of Aurantii Fructus Immaturus in Famous Classical Formula Wendan Decoction Based on Fingerprint and Network Pharmacology

LI Hangfei, ZHU Zhijun*, LI Mingming, WANG Wanyi(*Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To predict the quality marker(Q-Marker) of Aurantii Fructus Immaturus in Wendan decoction (WDD) based on fingerprint and network pharmacology. **METHODS** Establish the fingerprint of Aurantii Fructus Immaturus and WDD reference samples, use Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation Software(2012A Edition)for similarity analysis and common component identification; use network pharmacology to screen the related targets and key pathways of common components, and establish the composition-target-pathway network. Predict the potential Q-marker of expectorant stop vomiting, clear gallbladder and stomach of Aurantii Fructus Immaturus in WDD, and determine its content. **RESULTS** The fingerprints of 15 batches of Aurantii Fructus Immaturus and 15 batches of WDD reference samples were established, and the similarity of fingerprints between 15 batches of Aurantii Fructus Immaturus and WDD reference sample >0.9. Five chemical components were identified, which were naringin, hesperidin, neohesperidin, nobiletin and tangerine. Network pharmacologic screen analysis to getTP53, MAPK8, EGFR, JUN, MMP9 and other 32 core targets of the five compounds and Endocrine resistance, pathways in cancer, and 10 other key pathways. Construct the "component-target-pathway" network diagram. It was predicted that naringin, hesperidin, neohesperidin, nobiletin and tangerine were Q-markers of Aurantii Fructus Immaturus in WDD. The contents of naringin, hesperidin, neohesperidin, nobiletin, tangerine in WDD were not less than 0.011 7%, 0.025 3%, 0.025 7%, 0.010 4%, 0.010 7%. **CONCLUSION** Q-Marker prediction analysis of Aurantii Fructus Immaturus in WDD provides a reference for establishing a complete WDD quality evaluation system, and also lays a foundation for elucidating the mechanism of its pharmacodynamic material basis.

KEYWORDS: Wendan decoction; Aurantii Fructus Immaturus; fingerprint; network pharmacology; quality marker

温胆汤始载于唐代孙思邈的《备急千金药方》，由半夏、枳实、竹茹、陈皮、生姜、甘草 6 味药组成，具有祛痰止呕，清胆和胃的功效[1]。温胆汤作为历代医家治疗“痰郁内扰”等原因所致疾病的常用方，迄今依旧广泛应用于临床。

枳实是芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L.及

作者简介：李航飞，硕士生　E-mail: 975483662@qq.com　***通信作者：**朱志军，男，硕士，副教授　E-mail: zzjun63@126.com

其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis* Osbeck 的干燥幼果[2]，为常见的理气药，临床常用于由痰滞气阻引起的胸痹、结胸等，且具有良好疗效。研究表明，枳实中黄酮类成分具有较强的保胃作用，可改善功能性消化不良患者的胃排空，加速小肠推进[3]。对于氨水所致的小鼠咳嗽，枳实水煎液也可促进小鼠气管段酚红排出量的增加，减少痰液生成。

中药的化学成分关系着中药的安全性和有效性。中药指纹图谱能够反映药材和制剂质量的稳定性，网络药理学能够从理论上证明化学成分的有效性。为真正反映中药质量与疗效的关系，保证其“质”和“量”，弥补现今中药质量评价方法的不足，刘昌孝院士提出了质量标志物(quality marker，Q-Marker)的概念，后总结有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍为预测中药 Q-Marker 的五项原则[4]。

本研究以 Q-Marker 概念为基础，遵循 Q-Marker 五项原则，预测温胆汤中枳实的 Q-Marker，并采用指纹图谱和网络药理学为预测温胆汤中枳实 Q-Marker 提供物质基础和理论支撑。

1　仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)；ME204E 万分之一天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]；N-1000VW 旋转蒸发仪(埃朗科技国际贸易有限公司)。

甲醇(色谱纯，天津市四友精细化学品有限公司)；乙腈(色谱纯，安徽天地高纯溶剂有限公司)，磷酸(色谱纯，郑州派尼化学试剂厂)；水为超纯水；对照品：柚皮苷(批号：wkq20020603)、橙皮苷(批号：wkq20020503)、新橙皮苷(批号：wkq20020402)、川陈皮素(批号：wkq20031701)、桔皮素(批号：wkq20041611)均购自四川省维克奇生物科有限公司，纯度均≥98%。

实验收集来自包含道地产区或主产区在内的不少于 3 个产地至少 15 批药材、饮片，药材、饮片信息见表 1，所有药材、饮片均由河南中医药大学董诚明教授鉴定为正品。按照《备急千金药方》记载与中国药典 2020 年版质量要求，将半夏“汤洗”7 次；竹茹切段或揉成小段；枳实、陈皮、生姜、甘草净制，切制后，根据随机数表法对 6 种药材饮片的不同批次进行随机分组及排序制备 15 批温胆汤基准样品，分组结果见表 2。研究前期通过查阅大量文献及实验研究确定温胆汤基准样品的制备方法为取处方量药材饮片(半夏 6 g、竹茹 6 g、枳实 6 g、陈皮 9 g、生姜 12 g、甘草 3 g)，粉碎成最粗粉，加水 1 600 mL，开盖煎煮 90 min，趁热过 9 号筛过滤，得到滤液约 400 mL，–50 ℃冷冻干燥 24 h，得温胆汤基准样品。

表 1　药材来源与批号表

Tab. 1　Source and batch number of medicinal materials

编号	半夏		竹茹		陈皮		枳实		生姜		甘草	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
1	BX190901	贵州大方	ZR191201	浙江	CP191001	浙江衢州	ZS191001	江西清江	SJ190801	贵州黔南	GC190801	甘肃
2	BX191001	河北保定	ZR191202	浙江	CP191002	浙江衢州	ZS190901	湖南沅江	SJ190802	贵州黔南	GC190802	甘肃
3	BX191101	甘肃西和	ZR191203	浙江	CP191003	广东新会	ZS190905	四川西充	SJ190701	贵州贵阳	GC190901	新疆
4	BX191002	河北保定	ZR191206	浙江	CP191004	浙江衢州	ZS190907	浙江衢州	SJ190702	贵州贵阳	GC190902	新疆
5	BX190902	贵州赫章	ZR191207	浙江	CP191005	重庆江津	ZS191002	江西新干	SJ190804	山东潍坊	GC190904	新疆
6	BX191102	甘肃西和	ZR191208	浙江	CP191006	浙江衢州	ZS191003	江西新干	SJ190805	山东潍坊	GC190803	甘肃
7	BX191103	甘肃西和	ZR191209	浙江	CP191007	江西新干	ZS191004	江西新干	SJ191002	四川犍为	GC190905	甘肃
8	BX191015	甘肃西和	ZR191210	浙江	CP191009	湖南沅江	ZS190902	湖南沅江	SJ191003	四川犍为	GC190804	甘肃
9	BX191017	贵州赫章	ZR191211	浙江	CP191010	江西清江	ZS191005	江西清江	SJ191004	四川犍为	GC190805	新疆
10	BX191018	甘肃西和	ZR191212	浙江	CP191011	浙江衢州	ZS190911	浙江衢州	SJ190807	山东济宁	GC190906	内蒙古
11	BX191020	甘肃西和	ZR191215	浙江	CP191013	浙江衢州	ZS191007	江西清江	SJ190808	山东济宁	GC190907	甘肃
12	BX191003	河北保定	ZR191217	浙江	CP191014	江西清江	ZS191010	江西清江	SJ190910	河南焦作	GC190908	新疆
13	BX191022	贵州大方	ZR191218	浙江	CP191015	江西新干	ZS191012	江西清江	SJ190911	河南焦作	GC190909	新疆
14	BX190903	贵州大方	ZR191220	浙江	CP191018	江西清江	ZS190912	江西新干	SJ190912	河南焦作	GC190806	甘肃
15	BX191104	甘肃西和	ZR191222	浙江	CP191020	广东化州	ZS190915	江西新干	SJ190913	河南焦作	GC190811	新疆

表 2 15 批温胆汤基准样品药材批次信息

Tab. 2 Batch information of 15 batches of Wendan decoction reference samples

编号	半夏	竹茹	枳实	陈皮	生姜	甘草
S1	BX190903	ZR191210	ZS190902	CP191005	SJ190701	GC190805
S2	BX191020	ZR191206	ZS191003	CP191004	SJ190805	GC190902
S3	BX191102	ZR191218	ZS191010	CP191003	SJ191002	GC190802
S4	BX191017	ZR191222	ZS191012	CP191010	SJ190804	GC190801
S5	BX191101	ZR191203	ZS190915	CP191014	SJ190910	GC190904
S6	BX191015	ZR191217	ZS191002	CP191020	SJ190912	GC190901
S7	BX191002	ZR191201	ZS191007	CP191001	SJ190911	GC190908
S8	BX191003	ZR191209	ZS191001	CP191002	SJ190802	GC190906
S9	BX191001	ZR191211	ZS191004	CP191013	SJ190808	GC190907
S10	BX191103	ZR191207	ZS191005	CP191018	SJ190807	GC190806
S11	BX190902	ZR191202	ZS190912	CP191011	SJ191003	GC190905
S12	BX191104	ZR191208	ZS190901	CP191006	SJ190702	GC190811
S13	BX191018	ZR191215	ZS190911	CP191009	SJ190801	GC190804
S14	BX191022	ZR191220	ZS190907	CP191007	SJ190913	GC190909
S15	BX190901	ZR191212	ZS190905	CP191015	SJ191004	GC190803

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素适量，加甲醇溶解，配制成质量浓度分别为 0.390 1，0.303 0，0.305 0，0.032 6，0.180 0 mg·mL^{-1} 的对照品溶液[5]。

2.2 温胆汤基准样品供试品溶液的制备

取温胆汤基准样品约 0.5 g，加入 20 mL 50% 甲醇复溶(先加入 10 mL 水使基准样品冻干粉完全溶解，再加入 10 mL 甲醇调节浓度为 50%)，静置 3 h，1 998 ×*g* 离心 5 min 后取上清液，过 0.22 μm 滤膜即得。

2.3 枳实药材供试品溶液的制备

取枳实药材约 12 g(2 倍处方量)，按照基准样品制备方法制备枳实药材冻干粉，按“2.2”项下方法制备枳实药材供试品溶液[6]。

2.4 色谱条件

Waters Symmetry® C_{18} 色谱柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)，检测波长为 202 nm；流速为 1 mg·mL^{-1}；柱温为 30 ℃；以乙腈(A)-0.05%磷酸水(B)为流动相，梯度洗脱(0~5 min，10%→15%A；5~16 min，15%→17%A；16~22 min，17%→18%A；22~25 min，18%→20%A；25~50 min，20%→40%A；50~65 min，40%→65%A；65~85 min，65%→10%A；85~100 min，10%A)；进样量为 10 μL；

2.5 枳实药材及温胆汤基准样品指纹图谱研究

2.5.1 仪器精密度试验 取同一温胆汤基准样品(S15)供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，以新橙皮苷(13 号峰)为参照峰，结果显示，共有峰相对保留时间的 RSD 值均<0.4%，相对峰面积的 RSD 值均<3.0%，表明仪器精密度良好[7]。

2.5.2 稳定性试验 取同一温胆汤基准样品(S15)供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件，分别在 0，2，4，8，12，24 h 进样，记录各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，以新橙皮苷(13 号峰)为参照峰，结果显示，共有峰相对保留时间的 RSD 值均<0.4%，相对峰面积的 RSD 值均<3.0%，表明温胆汤基准样品的供试品溶液在 24 h 内保持稳定[8]。

2.5.3 重复性试验 取同一温胆汤基准样品(S15)，按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件进样，记录各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，以新橙皮苷(13 号峰)为参照峰，结果显示，共有峰相对保留时间的 RSD 值均<0.5%，相对峰面积的 RSD 值均<4.0%，表明该测定方法重复性良好[9]。

2.5.4 指纹图谱的建立与分析 按“2.2”项下供试品溶液的制备方法，分别制备 15 批枳实药材(按批次编号为 Z1~Z15)和 15 批温胆汤基准样品(S1~S15)供试液以“2.4”项下色谱条件分别进样测定，得 15 批枳实药材和 15 批基准样品的 HPLC 指纹图谱叠加图，见图 1。由图可知，枳实药材共确定 16 个共有峰，温胆汤基准样品共确定了 23 个共有峰。

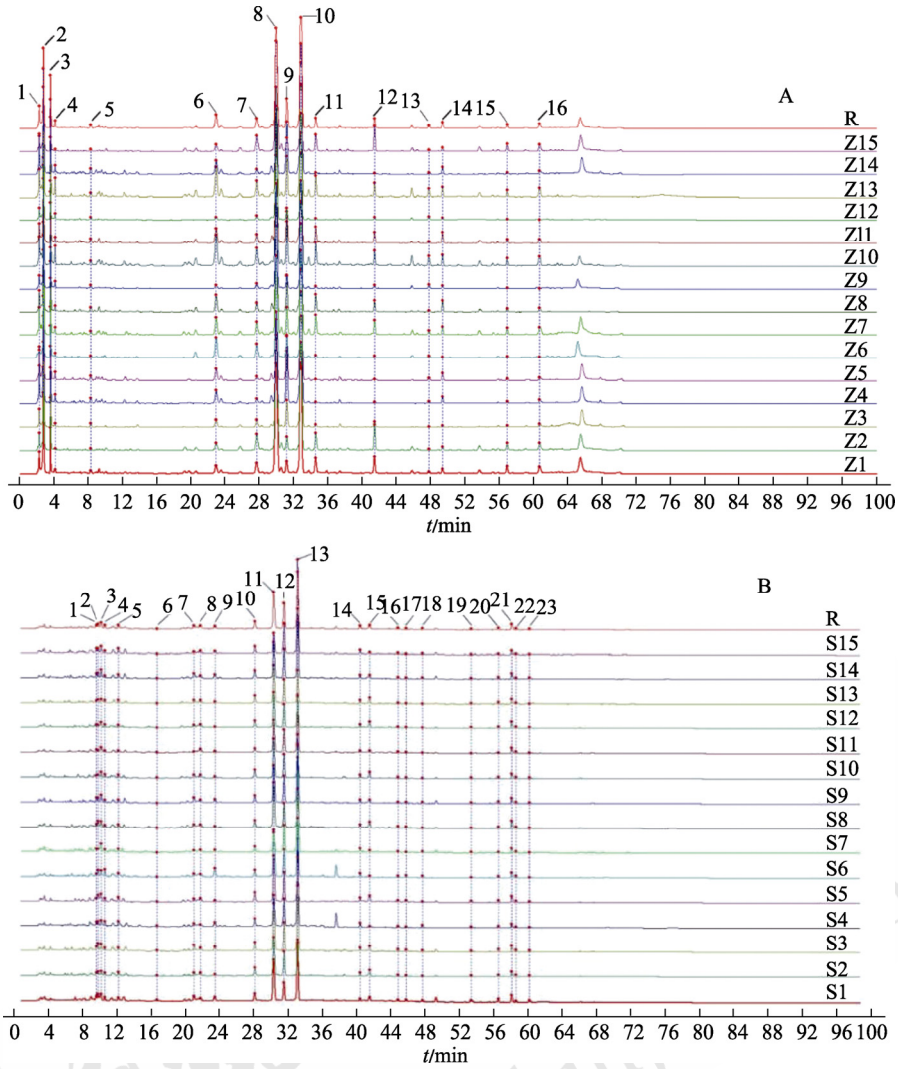

图 1 HPLC 指纹图谱叠加图

A–15 批枳实药材(Z1~Z15)叠加图谱；B–15 批温胆汤基准样品(S1~S15)叠加图谱。

Fig. 1 HPLC fingerprint overlay map

A–overlay map of 15 batches of Aurantii Fructus Immaturus(Z1–Z15); B–overlay map of 15 batches of Wendan decoction reference samples(S1–S15).

2.5.5 相似度分析 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012A 版)对 15 批枳实药材和 15 批温胆汤基准样品的指纹图谱进行相似度计算，15 枳实药材和 15 批温胆汤基准样品的指纹图谱相似度均>0.9，表明枳实药材和温胆汤基准样品的制备工艺比较稳定，批次间差异较小。

2.5.6 共有峰的指认及相关分析 将温胆汤基准样品、枳实药材、阴性样品、对照品溶液的图谱进行叠加，结果见图 2。温胆汤基准样品的 23 个共有峰中，1，2，3，4，9，10，11，12，13，14，20，22，23 号峰来自于枳实，且 9，10，11，12，13，15，20，23 号峰也为 15 批枳实指纹图谱的共有峰，可以看出化学成分从药材到复方的传递性。通过与对照品比对，指认出了 8 个共有峰中的 5 种成分，依次为 11 号峰柚皮苷、12 号峰橙皮苷、13 号峰新橙皮苷、20 号峰川陈皮素、23 号峰桔皮素。以此为基础，遵循五项原则，初步确定这 5 种成分为温胆汤中枳实的 Q-Marker。对 5 个成分进一步开展网络药理学研究，预测其发挥祛痰止呕，清胆和胃效果的作用机制。

2.6 基于成分-靶点-通路的网络药理学分析

2.6.1 化合物潜在靶点预测 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)[10]和 Swiss Target Prediction 数据库对柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素 5 个化合成分的靶点进行检索和预测，删除重复靶点后，最终得到 171 个潜在靶点[11]。

2.6.2 蛋白互作(protein-protein interaction，PPI)网络构建与核心靶点筛选 将筛选得到的 171 个靶点，导入 STRING 数据库，进行 PPI 分析，将

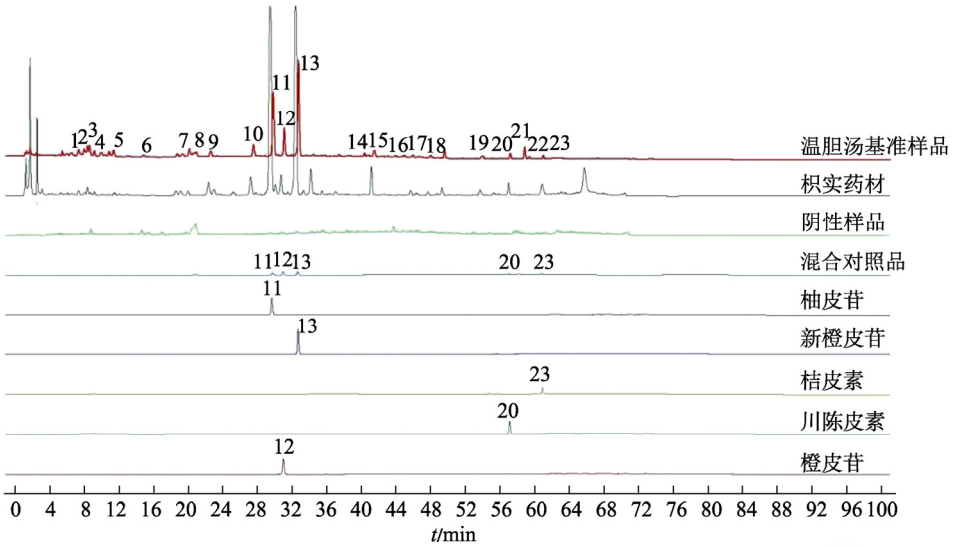

图 2 温胆汤基准样品、枳实药材、对照及阴性图谱

Fig. 2 Wendan decoction reference sample, Aurantii Fructus Immaturus, reference and negative chromatograms

结果导入 Cytoscape3.7.2 软件进行可视化分析[12]，并进行权重分析，计算 Degree 值，以 Degree>7 为标准，得到核心靶点的 PPI 网络，见图 3。核心靶点 Degree 从大到小依次为 TP53、SRC、AKT1、PIK3R1、HRAS、JUN、ESR1、CDKN1、CDK1、EGFR、MAPK8、AR、CCNB2、CCNB1、CDK5、NOS2、CREB1、CDK4、CASP3、PTK2、GSK3B、NOS3、CDK2、JAK1、PTPN1、IGFIR、MCL1、PLK1、MMP9、CYP1A1、BCL2、PLG。

2.6.3 GO 富集分析　将潜在靶点导入到 DAVID 数据库进行 GO 分析[13]。温胆汤主要通过参与蛋白质磷酸化，调节碳酸脱水酶活性，负向调控基因表达等生物过程发挥祛痰止呕，清胆和胃的功效。根据 *P* 值将排名前 10 的条目利用微生信平台绘制柱状图，见图 4。

2.6.4 KEGG 通路分析　KEGG 富集得到 100 条相关通路($P<0.01$)，选取 *P* 值排名前 10 的通路，利用微生信网站进行可视化分析，见图 5，温胆汤主要通过参与内分泌抵抗通路、癌症通路、乙型肝炎通路、松弛素信号通路等发挥治疗疾病的作用。

2.6.5 成分-靶点-通路网络构建　将得到的 5 个成分、潜在靶点和 10 条关键通路，导入 Cytoscape3.7.2 软件，构建成分-靶点-通路网络图[14]，见图 6。CDKN1A、PIK3R1、EGFR、MAPK8、AKT1、HRAS、TP53、SRC 等靶点的连接度排名靠前，柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素主要通过调控这些关键靶点发挥祛痰止呕，清胆和胃功效的活性物质。

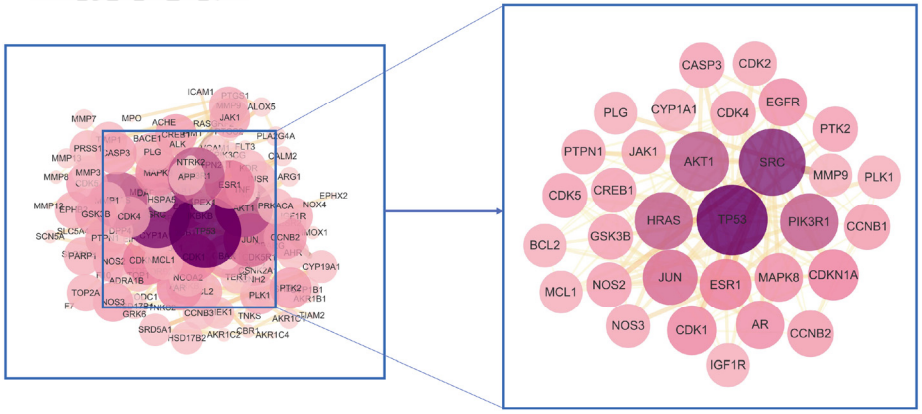

图 3 作用靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of action targets

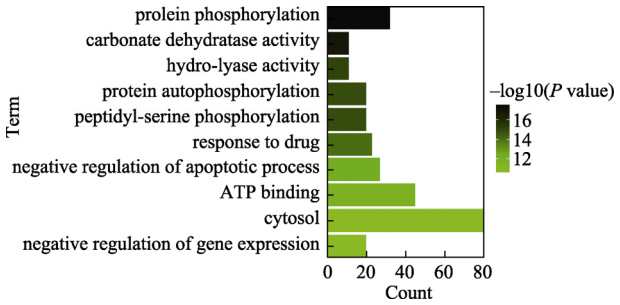

图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

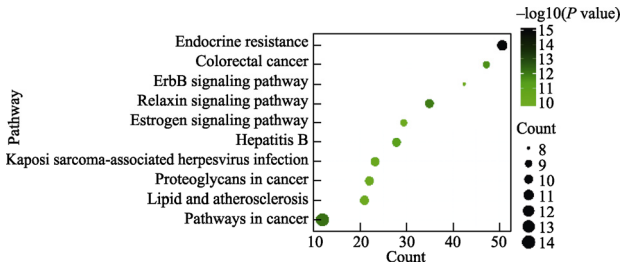

图 5 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

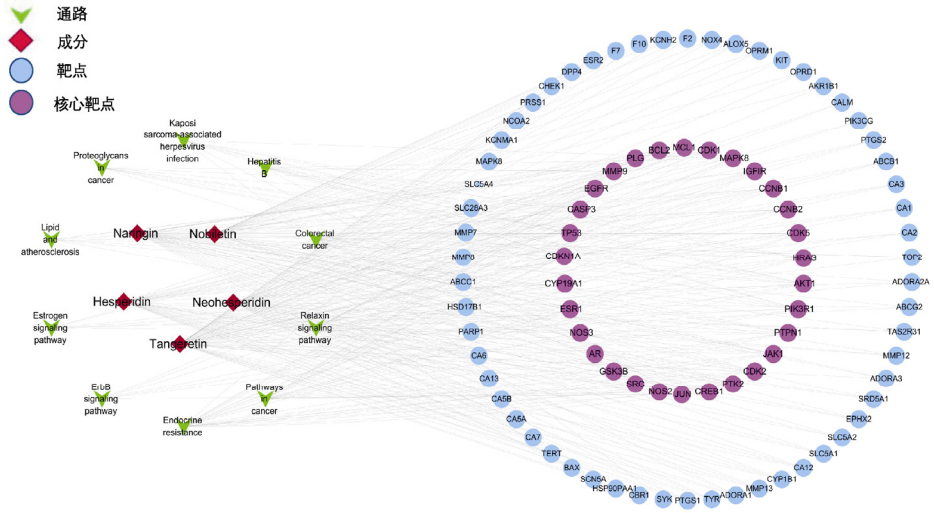

图 6 成分-靶点-通路网络图

Fig. 6 Component-target-pathway network diagram

2.7 温胆汤中 5 种成分的含量测定

2.7.1 线性关系考察 精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的对照品适量，分别制备不同浓度的对照品溶液，过 0.22 μm 滤膜后按“2.4”项下色谱条件进样，记录色谱图。以进样浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)，绘制标准曲线，计算回归方程，结果见表 3。

表 3 线性回归方程

Tab. 3 Linear regression equations

化合物	回归方程	r^2	线性范围/μg·mL^{-1}
柚皮苷	Y=36 463X–499 041	0.999 2	33.76~374.22
橙皮苷	Y=14 402X–115 074	0.999 1	23.52~314.88
新橙皮苷	Y=9 725X–1 855.1	0.999 7	53.21~873.26
川陈皮素	Y=16 297X+33 776	0999 8	3.42~140.01
桔皮素	Y=4 229X+13 228	0.999 7	6.45~150.37

2.7.2 仪器精密度试验 精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素对照品适量，分别配置成浓度为 0.257，0.168，0.639，0.087，0.133 mg·mL^{-1} 的对照品溶液，按“2.4”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素保留时间的 RSD 分别为 0.03%，0.11%，0.17%，0.08%，0.09%，峰面积的 RSD 分别为 0.44%，0.38%，0.29%，0.63%，0.86%，表明仪器精密度良好。

2.7.3 稳定性试验 取 S15 号温胆汤基准样品供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件分别于 0，2，4，8，12，24 h 进样，记录色谱图，柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素保留时间的 RSD 分别为 0.32%，0.47%，0.26%，0.37%，0.29%，峰面积的 RSD 分别为 2.34%，1.64%，1.82%，1.73%，1.55%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7.4 重复性试验 取 S15 号温胆汤基准样品供试品溶液 6 份，按“2.4”项下色谱条件分别进样，记录峰面积并计算含量。结果柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素保留时间的 RSD 分别为 0.28%，075%，0.34%，0.52%，0.47%，峰面积的 RSD 分别为 1.87%，2.23%，1.48%，1.16%，1.94%，表明该方法重复性良好。

2.7.5 加样回收率试验　称取 15 份已知 5 个成分含量的 S15 号温胆汤基准样品(S15)，每份约 0.50 g，分别加入 50%，100%，150%的各对照品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件分别进样测定。柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素 5 种成分的加样回收率结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果(n=5)

Tab. 4 Experimental results of sample recovery rate(n=5)

成分	称样量/g	含有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均/%	RSD/%
柚皮苷	0.499 8	0.119 5	0.059 8	0.176 2	98.28	99.24	0.89
	0.499 5	0.119 4	0.199 4	0.237 4	99.43		
	0.500 1	0.119 5	0.179 3	0.298 8	100.01		
橙皮苷	0.500 4	0.169 1	0.084 6	0.249 7	98.43	99.43	1.44
	0.499 9	0.168 9	0.168 9	0.334 6	99.04		
	0.499 6	0.168 8	0.253 2	0.426 3	101.02		
新橙皮苷	0.499 8	0.218 9	0.109 5	0.327 9	99.86	101.57	1.53
	0.499 6	0.218 8	0.218 8	0.446 2	101.96		
	0.499 7	0.218 8	0.328 2	0.562 8	102.89		
川陈皮素	0.500 2	0.096 0	0.048 0	0.146 7	101.85	102.11	0.74
	0.500 6	0.096 1	0.096 1	0.195 1	101.52		
	0.499 6	0.095 9	0.143 9	0.244 9	102.96		
桔皮素	0.500 1	0.058 0	0.029 0	0.086 7	99.71	1.1.631.64	
	0.499 9	0.058 0	0.058 0	0.119 0	102.57		
	0.500 5	0.058 1	0.087 2	0.149 1	102.61		

2.7.6 15 批温胆汤 5 种成分含量测定　分别称取 15 批(S1~S15)温胆汤基准样品约 0.5 g，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，“2.4”项下色谱条件进样，测定峰面积，计算样品中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的含量，结果见表 5。

表 5 15 批温胆汤 5 种成分含量测定结果

Tab. 5 Determination results of 5 kinds components in 15 batches in Wendan decoction　%

批次	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	川陈皮素	桔皮素
S1	0.022 8	0.027 3	0.038 4	0.010 4	0.013 3
S2	0.013 1	0.031 6	0.047 5	0.018 9	0.015 2
S3	0.016 5	0028 9	0.053 6	0.015 3	0.014 7
S4	0.022 9	0.029 2	0.045 5	0.014 7	0.013 9
S5	0.011 7	0027 4	0.025 7	0.013 6	0.014 8
S6	0.014 4	0.031 6	0.036 6	0.016	0.012 5
S7	0.023 9	0.033 8	0.043 8	0.019 2	0.011 6
S8	0.028 8	0.029 7	0.048 8	0.012 9	0.010 7
S9	0.021 6	0.032 9	0.052 9	0.016 4	0.012 6
S10	0.025 3	0.029 4	0.039 6	0.011 2	0.015 4
S11	0.017 6	0.026 9	0.045 2	0.013 4	0.010 8
S12	0.025 4	0.028 4	0.047 9	0.015 4	0.018 4
S13	0.013 5	0.034 6	0.033 5	0.018 8	0.012 9
S14	0014 8	0.025 3	0.039 7	0.015 9	0.015 3
S15	0.024 7	0.034 8	0.044 8	0.016 6	0.014 6

3　讨论

温胆汤指纹图谱的共有峰中，9，10，11，12，13，15，20，23 号峰也为枳实指纹图谱的共有峰，通过与对照品比对，确认了 11，12，13，20，23 号峰依次为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素。研究发现，陈皮中也含有橙皮苷、川陈皮素和桔皮素 3 种成分，但含量相对较低，温胆汤 3 种成分的来源主要为枳实，基本符合“特有”原则。基于刘昌孝院士提出的 Q-Marker 理念，通过建立枳实药材、温胆汤基准样品的指纹图谱，从特有、传递与溯源、可测和处方配伍的角度对温胆汤化学成分展开分析，确认柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、桔皮素、川陈皮素 5 个成分为温胆汤中枳实的 Q-Marker。

研究表明，柚皮苷能够显著改善百草枯导致的大鼠肺损伤，减轻炎细胞浸润和渗透，减少胶原蛋白的形成，改善大鼠肺功能[15]；橙皮苷可降低炎症细胞和 Th2 细胞因子的数量，抑制卵清蛋白诱导的气道炎症[16]；新橙皮苷可通过减少胃酸分泌，增加胃 pH 的方式，对胃具有保护作用；川陈皮素能够显著减少卵蛋白诱导的嗜酸性粒细胞的增加，也能显著降低血中嗜酸细胞活化趋化因子和减少支气管肺泡灌洗液，抑制哮喘大鼠的支气管炎症[17]。且相比于橙皮苷，川陈皮素提高胃蛋白酶活性，促进蛋白酶排出量，增强肠蠕动的能力更强[18]。

进一步运用网络药理学方法分析 5 种成分的有效性；由 PPI 网络和“成分-靶点-通路”网络可知，温胆汤 5 种成分主要通过 TP53、SRC、AKT1、PIK3R1、HRAS、JUN、ESR1、CDKN1、CDK1、EGFR、NOS2、CAPS3 等靶点影响内分泌抵抗信号通路、EGFR 信号通路等关键通路发挥治疗祛痰止呕，清胆和胃的作用。JUN、NOS2、CAPS3 可通过对胃黏膜稳态环境进行免疫及凋亡相关调节以维持其完整性进而治疗慢性胃炎。EGFR 信号通路是许多炎性介质诱导气道黏蛋白过度表达的共同通路，气道黏液高分泌现象多与此通路有关，阻断此通路，可减少患者痰液潴留[19]。柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、川陈皮素、桔皮素均可作用于上述靶点与通路发挥作用。

综上，预测柚皮苷、橙皮苷、新橙皮素、川陈皮素、桔皮素 5 个成分为温胆汤中枳实潜在的 Q-Marker。中药成分繁多且作用机制复杂。本研

究采用指纹图谱方法结合现代网络药理学研究，基于有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍“五原则”开展温胆汤中枳实 Q-Marker 的系统鉴别与确定，为控制枳实质量、温胆汤整体质量以及提高中药产业质量控制水平提供参考。

REFERENCES

[1] ZHANG Q, WANG J L, GAO X M. Study on HPLC fingerprint and multi-component content determination of classical prescriptions Wendan decoction[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2021, 37(6): 930-937.

[2] QU Z Y, FENG X M, ZOU X. Research progress in Aurantii Fructus Immaturus[J]. Food Drug(食品与药品), 2017, 19(6): 455-459.

[3] GUO W Q. Clinical analysis of 231 cases of bile reflux gastritis[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.

[4] WANG L, ZHANG L X, JIA A M, et al. Q-marker prediction analysis of Puerariae Lobatae Radix in Zhuru decoction based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(20): 6197-6207.

[5] 沈虹, 邓可众, 钟志奎, 等. HPLC 法同时测定酸橙花的多成分含量及不同花期的质量分析[J]. 中药材, 2018, 41(8): 1914-1917.

[6] 徐勤, 白先群, 刘布鸣, 等. 四叶参药材鉴别及其多糖含量测定研究[J]. 广西中医药, 2009, 32(1): 59-61.

[7] NI S R, LIAN Y L, ZHAO S J, et al. Establishment of fingerprint and Q-marker prediction of Qiangli Naoqingsu tablets[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(4): 1011-1019.

[8] 张肖建, 李军山, 郝磊, 等. 独活配方颗粒高效液相色谱特征图谱研究[J]. 现代中医药, 2017, 37(2): 81-83.

[9] XIA J X, MEI Q, GUO S, et al. Q-marker prediction analysis of Cinnamomi Ramulus in Danggui Sini decoction based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(10): 2634-2641.

[10] YANG H Z, HE R Y, LI Y, et al. Prediction of quality markers and fingerprint analysis of Aquilariae Lignum Resinatum[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(3): 285-293.

[11] YU J X, WANG A N, ZHENG Y, et al. Mechanism of Pinelliae Rhizoma-Citri Exocarpium Rubrum in treatment of metabolic syndrome based on network pharmacology[J]. China J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(21): 118-128.

[12] LI Z, YANG H, CHEN B L. Q-marker prediction analysis of Shujin Huoxue tablets based on fingerprint and network pharmacology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(13): 1703-1708

[13] YAO Y X, HE Z X, LIU X F, et al. Potential material basis of Kangbingdu granules for treatment of coronavirus disease 2019(COVID-19) based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(6): 1386-1396.

[14] ZHANG X J, ZHAO L Y, LI J H, et al. Research review on Fructus Aurantii Immaturus[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报), 2021, 49(1): 94-100.

[15] YAO M Y, LIU C, SUN Z R, et al. Study on the protective effect of naringin on paraquat-induced lung injury in rats[J]. Chin J Crit Care Med(中医急救医学), 2022, 42(3): 255-259.

[16] ZHAO X Y, TANG Z Z, YUE C, et al. Hesperidin regulates Jagged1/ Notch1 pathway to promote macrophage polarization and alleviate lung injury in mice with bronchiolitis[J]. Acta Acad Med Sin(中国医学科学院学报), 2022, 44(5): 777-784.

[17] WANG J X, YU H W, HU R X. Research progress of nobiletin[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2011, 39(13): 7731-7733.

[18] FU M Q, XIAO G S, WU J J, et al. Studies on chemical basis of digestion promoting function of Pericarpium Citri Reticulatae(*Citrus reticulate* ‘chachi’)[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报), 2018, 18(1): 56-64.

[19] PAN J F, WU S W, TU X W, et al. A case-control study on prognosis between EGFR gene mutant- and wild-type nonsmall cell lung cancer with brain metastasis[J]. Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗杂志), 2020, 27(11): 1272-1277.

收稿日期：2022-08-01

(本文责编：陈怡心)