

基于指纹图谱和网络药理学的白术质量标志物预测分析

李晴¹, 朱香梅¹, 石雨荷¹, 朱珏¹, 王智^{1,2,3}, 刘湘丹^{1,2,3}, 周日宝^{1,2,3}, 童巧珍^{1,2,3*}

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室, 长沙 410208; 3. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208)

摘要 目的: 基于指纹图谱和网络药理学分析白术中潜在质量标志物(Q-Marker)并测定其含量。方法: 采用 Waters Sun Fire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以水(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长切换测定, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 建立白术药材指纹图谱, 对 32 批白术药材进行相似度评价, 确认共有峰并进行指认, 再通过网络药理学方法构建“活性成分-靶点-通路”网络图, 预测 Q-Marker, 并测定其含量。结果: 建立了 32 批白术药材指纹图谱, 确认了 28 个共有峰, 通过白术对照品指认 4 个色谱峰, 分别为白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮; 经网络药理学确认以上 4 种成分为活性成分, 可作用于 16 个核心靶点、20 条关键通路发挥抗癌、抗炎、改善胃肠道疾病作用, 初步预测白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮为潜在 Q-Marker, 白术药材中其总质量分数不低于 1.79 mg·g⁻¹。结论: 白术潜在 Q-Marker 预测分析为建立一整套质量控制评价体系提供参考, 为阐明其药效物质基础的作用机制奠定基础。

关键词: 白术; 质量标志物; 指纹图谱; 网络药理学; 白术内酯 I; 白术内酯 II; 白术内酯 III; 苍术酮

中图分类号: R95; R961.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)04-0404-13

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.04.006

Prediction and Analysis of Quality Markers of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma Based on Fingerprints, and Network Pharmacology

Li Qing¹, Zhu Xiangmei¹, Shi Yuhe¹, Zhu Jue¹, Wang Zhi^{1,2,3}, Liu Xiangdan^{1,2,3}, Zhou Ribao^{1,2,3}, Tong Qiaozen^{1,2,3*} (1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.

Key Research Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Genuine Regional Medicinal Materials Produced in Hunan Province, Changsha 410208, China; 3. Key Laboratory of Modern Research on TCM, Colleges and Universities of Hunan Province, Changsha 410208, China)

Abstract Objective: To analyze the potential quality marker (Q-Marker) in *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma and determine its content based on fingerprints and network pharmacology. **Methods:** Waters Sun Fire C₁₈ chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with water (A) - acetonitrile (B) as

基金项目: 湖南省科技厅中央引导地方科技发展专项资金项目(编号 2019XF5069); 湖南省科技厅科技特派员服务乡村振兴项目(编号 2021NK4240); 湘产大宗道地药材平木高品质生态种植及精准扶贫示范研究(编号 19A367)

作者简介: 李晴 Tel: 15111035793; E-mail: 984912094@qq.com

通信作者: 童巧珍 Tel: 18173001279; E-mail: qztong88@126.com

mobile phase, gradient elution, flow rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detection wavelength switching measurement, column temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and injection volume of $10 \text{ }\mu\text{L}$ to establish the fingerprints of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*. of 32 batches of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* were evaluated, the common peaks were confirmed and identified, and the “active ingredient-target-pathway” network was subsequently constructed with network pharmacological method to predict Q-Marker and determine its content. **Results:** The fingerprints of 32 batches of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* were established, and 28 common peaks were confirmed. Four chromatographic peaks were identified by comparing the reference substances of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, which were Atractylenolide I, Atractylenolide II, Atractylenolide III and Atractylone, respectively; It is also confirmed by network pharmacology that the above four components are active components, that can act on 16 core targets and 20 key pathways to play the roles of anti-cancer, anti-inflammatory and improving gastrointestinal conditions. It is preliminarily predicted that Atractylenolide I, Atractylenolide II, Atractylenolide III and Atractylone are potential Q-Markers, and the total mass fraction of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* is not less than $1.79 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The prediction and analysis to potential Q-Markers of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* will provide references for the establishment of a set of quality control evaluation system and will lay a foundation for clarifying the material basis and mechanism of its efficacy.

Keywords: *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; quality markers; fingerprints; network pharmacology; Atractylenolide I; Atractylenolide II; Atractylenolide III; Atractylone

白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 始载于《神农本草经》，列为上品^[1]，是我国高配伍度的大宗常用中药材之一，有健脾补中、燥湿、利水止汗之功效；主治脾虚食少，腹胀泄泻，痰饮眩悸，水肿，自汗，胎动不安等症。我国含白术的中成药品种超过500个^[2]，因其药用价值和良好的临床疗效，一直被广泛应用。白术基原为菊科苍术属多年生异花授粉的草本植物，以干燥根茎入药，已有上百年的栽培历史，种质资源丰富，主要在浙江新昌、天台、东阳、于潜，湖南平江，江西修水种植较多，湖北、河北、四川、贵州、江苏等地也有引种栽培^[3]。白术优良品种的引种栽培，促进了种质资源的交流，但长期不同区域间的移植、杂交，以及种间、居群间的杂交繁殖^[4]，造成白术的种质混乱，品种不明，药材质量严重下降。尽管人们通过多种手段对白术品种真伪和质量优劣进行鉴别，但成效不佳。2020年版《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）仅以醇浸出物作为白术质量控制指标，而单一指标难以完全满足白术药材的质量控制与评价要求^[5]。

刘昌孝院士^[6]于2016年提出的中药质量标志物（Quality Marker, Q-Marker）概念，是指将中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分相关联，为中药的质量控制研究指明了方向^[7]。基于中药是依靠其所含的多种化学成分发挥药效作用，本研究建立能体现白术化学成分整体性的指纹图谱，对药效显著的4个倍半萜类成分进行指认，再运用网络药理学方法确定活性成分，发现潜在的Q-Marker^[8-9]，并预测其治疗疾病的作用靶点及机制，进一步测定潜在Q-Marker的含量，为建立白术品种优劣评价标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260型高效液相色谱仪（安捷伦公司）；ME204/02型电子分析天平（梅特勒-托利多公司）；KQ-800DE型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 药材与试剂

白术药材分别来自河北（S1~S6）、安徽（S7~S11）、湖南（S12~S22）、浙江

(S23~S28)、湖北(S29~S31)、江西(S32) 6个产地,经湖南中医药大学药学院童巧珍教授鉴定为菊科植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)的干燥根和根茎。

对照品白术内酯Ⅰ(批号PS010510)、白术内酯Ⅱ(批号PS010511)、白术内酯Ⅲ(批号PS010512)、苍术酮(批号PS011118)均购自成都普思生物科技股份有限公司,对照品质量分数均 $\geq 98\%$;乙腈、甲醇(色谱纯)购自Merck公司;水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白术高效液相色谱(HPLC)指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

Waters Sun Fire C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~6 min, 40% B; 6~10 min, 40% B→60% B; 10~11 min, 60% B→65% B; 11~15 min, 65% B→68% B; 15~20 min, 68% B; 20~25 min, 68% B→76% B; 25~30 min, 76% B→84% B; 30~40 min, 84% B→95% B; 40~45 min, 95% B→100% B; 45~47 min, 100% B→60% B; 47~48 min, 60% B→40% B; 48~60 min, 40% B);检测波长为切换波长(0~21 min, 220 nm; 21~25 min, 276 nm; 25~60 min, 220 nm);体积流量1 mL·min⁻¹;柱温30℃;进样量10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备

取各对照品适量,加甲醇配制成含白术内酯Ⅰ 29.1 μg·mL⁻¹、白术内酯Ⅱ 25.5 μg·mL⁻¹、白术内酯Ⅲ 38.6 μg·mL⁻¹、苍术酮35.7 μg·mL⁻¹的混合溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取白术粗粉0.5 g,置10 mL锥形瓶中,精密量取甲醇8 mL加入,密塞,称量,超声处理(功率250 W,频率50 kHz)35 min,取出,放冷,用甲醇补足减失的量,摇匀。取适量,离心(12 000 r·min⁻¹)5 min,取上清液,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度试验

取S18号白术样品,精密称定,按“2.1.3”节方

法制备供试品溶液,按“2.1.1”节色谱条件连续进样6次,记录色谱图,以苍术酮峰作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积。结果各特征峰相对保留时间的RSD均 $< 0.12\%$,相对峰面积的RSD均 $< 0.24\%$,将所得图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版),计算各样品HPLC图谱的相似度,指纹图谱的相似度均 ≥ 0.995 ,表明该仪器精密度良好。

(2) 重复性试验

取S18号白术样品6份,分别按“2.1.3”节方法制备供试品溶液,平行制备6份,按照“2.1.1”节色谱条件进样,记录色谱图,以苍术酮峰作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积。结果各特征峰相对保留时间的RSD均 $< 0.06\%$,相对峰面积的RSD均 $< 3.0\%$,将所得图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版),计算各样品HPLC图谱的相似度,指纹图谱的相似度均 ≥ 0.995 ,表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性试验

取S18号白术样品的供试品溶液,按“2.1.1”节色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进样分析,记录色谱图,以苍术酮峰作为参比峰,计算共有峰的相对保留时间和相对保留面积。结果各特征峰相对保留时间的RSD均 $< 0.25\%$,相对峰面积的RSD均 $< 1.35\%$,将所得图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012版),计算各样品HPLC图谱的相似度,指纹图谱的相似度均 ≥ 0.995 ,表明该供试品在24 h内稳定性良好。

(4) 指纹图谱的建立及评价

将32批白术的色谱图依次导入国家药典委员会研制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723版本)中,进行Mark峰匹配,确定共有峰并进行分析,所建立的指纹图谱见图1,其相似度分析结果见表1,各批次白术与对照指纹图谱相似度均 > 0.900 。

(5) 指纹图谱共有峰指认

通过对32批白术药材指纹图谱分析,进行各色谱峰保留时间以及色谱行为的比较,确认28个共有峰,采用对照品比对方式共指认了4个共有峰,见图2。

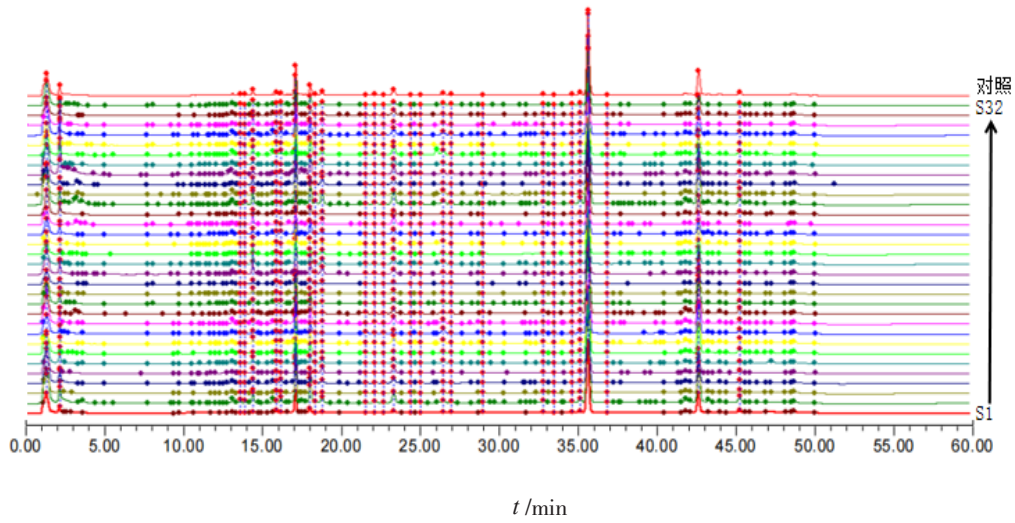
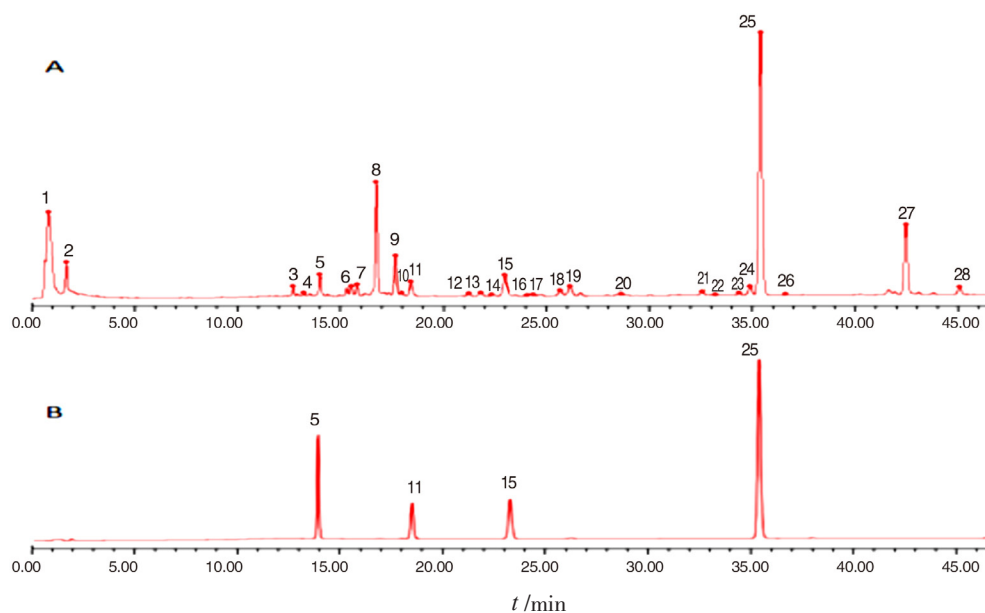


图1 32批白术药材指纹图谱

表1 白术药材相似度结果

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S12	0.989	S23	0.965
S2	0.993	S13	0.966	S24	0.993
S3	0.991	S14	0.991	S25	0.992
S4	0.999	S15	0.992	S26	0.960
S5	0.969	S16	0.962	S27	0.988
S6	0.954	S17	0.990	S28	0.985
S7	0.992	S18	0.971	S29	0.987
S8	0.985	S19	0.994	S30	0.983
S9	0.964	S20	0.998	S31	0.911
S10	0.992	S21	0.990	S32	0.992
S11	0.997	S22	0.937		



5. 白术内酯Ⅲ; 11. 白术内酯Ⅱ; 15. 白术内酯Ⅰ; 25. 苍术酮。

图2 白术指纹图谱共有模式图(A)及混合对照色谱图(B)

2.2 成分-靶点-通路网络药理学分析

2.2.1 数据库与软件

中药系统药理学数据库与分析平台TCMSP (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>), PubChem数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Swiss Target Prediction 服务器 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>), Pharm Mapper数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>), Uniprot数据库 (<http://www.uniprot.org/>), David 6.8数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路数 (<http://www.genome.jp/kegg/>), Cytoscape 3.8.2软件。

2.2.2 中药靶点预测

通过检索中药系统药理学数据库TCMSP (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、PubChem数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)、Pharm Mapper数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>)、Swiss Target Prediction服务器 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>) 查找4个活性成分的作用靶点; 利用 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 将预测出的靶点名称转换为对应的基因名。

将各数据库筛选出的靶点合并, 除去重复靶点, 最终得到与4个活性成分相关的靶点共56个。

2.2.3 靶点蛋白与蛋白互作 (PPI) 网络分析

将获得的56个靶点蛋白导入在线STRING 11.0 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 数据库, 物种选择为智人 (Homo Sapiens), 最高置信度蛋白交互参数评分值 >0.9 , 其他参数设置不变, 去掉网络中的单一节点, 获得PPI网络 (见图3)。对PPI进行拓扑特征分析, 选取在“度中心性” (Degree)、“中介中心性” (Betweenness)、“接近中心性” (Closeness) 3个参数均大于中位数且Degree ≥ 10 的点作为核心靶点, 经筛选后共得到16个重要核心靶点, 具体包括ALB (Degree=34)、EGFR (Degree=27)、HSP90AA1 (Degree=27)、ESR1 (Degree=23)、MAPK1 (Degree=21)、CASP3 (Degree=20)、MAPK14 (Degree=20)、SRC (Degree=19)、MAPK8 (Degree=18)、AR (Degree=17)、PPARG (Degree=15)、PGR (Degree=15)、NOS3 (Degree=13)、CDK2 (Degree=12)、CHEK1 (Degree=11)、GSK3B (Degree=10)。

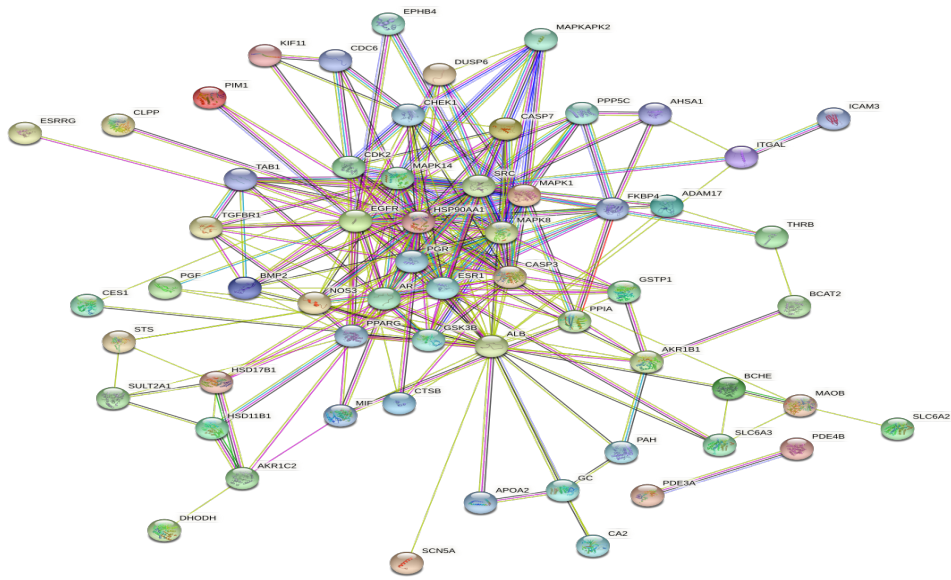


图3 PPI网络图

2.2.4 基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析

利用 DAVID数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 对获得的16个核心靶点进行GO富集分析。选取智人 (Homo Sapiens) 物种的“Gene-Ontology”项, 得到GO条目, 包含79个生物过程

(Biological Process, BP) 条目, 14个细胞组成 (Cellular Component, CC) 条目, 以及34个分子功能 (Molecular Function, MF) 条目, 分别占 62.2%、11.0%、26.7%。设置 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$, 得到图4, 选取组分排名前20的条目, 得到图5。

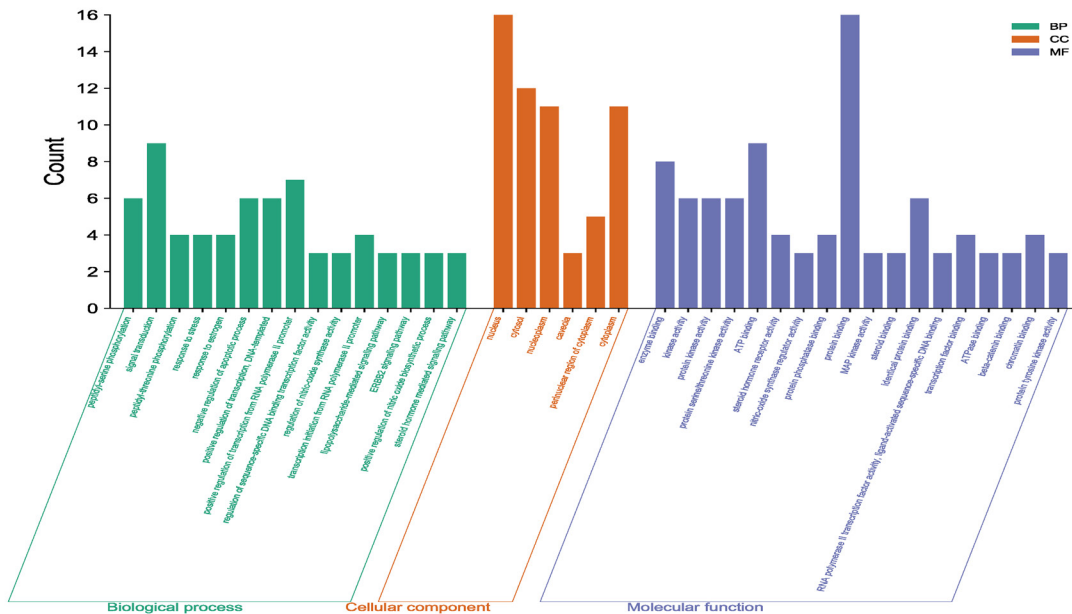


图4 GO 功能富集分析

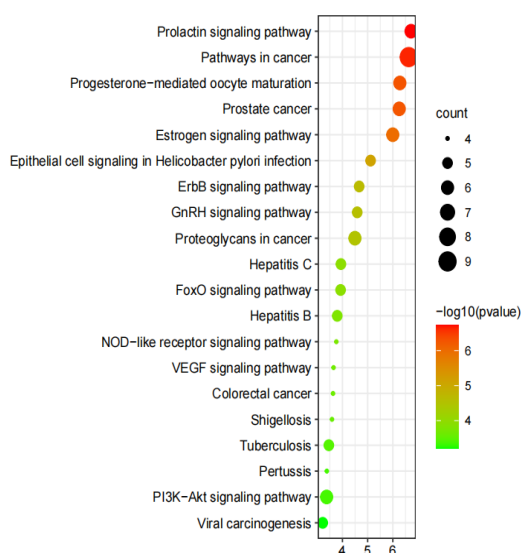


图 5 KEGG 富集分析 (前 20 条)

结果显示, 以上靶点主要参与的生物过程包括应激反应过程、肽基丝氨酸磷酸化、应激反应、对雌激素的反应、凋亡过程的负调控、肽基苏氨酸磷酸化、信号传导等生物过程, 涉及胞质溶胶、细胞

核、核质等细胞组分, 具有酶结合、类固醇激素受体活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、一氧化氮合酶调节活性、蛋白质结合、蛋白激酶活性、三磷酸腺苷结合等分子功能, 具体结果见表 2。

表 2 基因生物学过程

类别	基因功能	数目/个	P	FDR
BP	应激反应 (Response to Stress)	4	2.01×10^{-5}	2.64×10^{-3}
BP	对雌激素的反应 (Response to Estrogen)	4	2.44×10^{-5}	2.64×10^{-3}
BP	肽基苏氨酸磷酸化 (Peptidyl-threonine Phosphorylation)	4	4.77×10^{-6}	8.63×10^{-4}
BP	凋亡过程的负调控 (Negative Regulation of Apoptotic Process)	6	3.43×10^{-5}	3.10×10^{-3}
BP	信号传导 (Signal Transduction)	9	2.12×10^{-5}	5.73×10^{-3}
BP	肽基丝氨酸磷酸化 (Peptidyl-serine Phosphorylation)	6	5.97×10^{-8}	3.23×10^{-5}
BP	转录的正调控 (Positive Regulation of Transcription)	6	6.19×10^{-5}	4.79×10^{-3}
CC	胞质溶胶 (Cytosol)	12	4.70×10^{-6}	2.05×10^{-4}
CC	细胞核(Nucleus)	16	1.23×10^{-8}	1.07×10^{-6}
CC	核质(Nucleoplasm)	11	9.75×10^{-6}	2.83×10^{-4}
MF	酶结合 (Enzyme Binding)	8	6.13×10^{-9}	7.30×10^{-7}
MF	激酶活性 (Kinase Activity)	6	1.52×10^{-6}	9.05×10^{-5}
MF	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (Protein Serine/threonine Kinase Activity)	6	1.33×10^{-5}	3.03×10^{-4}
MF	类固醇激素受体活性 (Steroid Hormone Receptor Activity)	4	1.53×10^{-5}	3.03×10^{-4}
MF	一氧化氮合酶调节活性 (Nitric-oxide Synthase Regulator Activity)	3	2.06×10^{-5}	3.25×10^{-4}
MF	蛋白激酶活性 (Protein Kinase Activity)	6	1.07×10^{-5}	3.03×10^{-4}
MF	蛋白磷酸酶结合 (Protein Phosphatase Binding)	4	2.18×10^{-5}	3.25×10^{-4}
MF	三磷酸腺苷结合 (ATP Binding)	15	1.35×10^{-5}	9.46×10^{-3}
MF	蛋白质结合 (Protein Binding)	16	5.53×10^{-5}	7.31×10^{-4}
MF	MAP激酶活性 (MAP Kinase Activity)	3	6.67×10^{-5}	7.93×10^{-4}

2.2.5 京都基因与基因组百科全书 (Kyotoencyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析

利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 对获得的 16 个核心靶点进行 KEGG-PATHWAY 富集分析。富集得到 KEGG 信号通路共 49 条, 通过设定 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$, 排名前 20 条目如图 5 所示。这些通路主要包括癌症途径、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导、催

乳素信号通路、MAPK 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、前列腺癌、雌激素信号通路、血管内皮生长因子信号通路、大肠癌、百日咳、FoxO 信号通路、ErbB 信号通路、乙型肝炎、GnRH 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NOD 样受体信号通路等, 具体结果见表 3。表明这 16 个核心靶点可能主要通过调控这些通路达到干预疾病的目的。

表 3 核心靶点的 Pathway 富集分析

类别	代谢通路	数目/个	P	FDR
hsa05200	癌症途径 (Pathways in Cancer)	9	2.35×10^{-7}	7.97×10^{-6}
hsa05120	幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 (Epithelial Cell Signaling in Helicobacter Pylori Infection)	5	7.65×10^{-6}	8.67×10^{-5}
hsa04917	催乳素信号通路 (Prolactin Signaling Pathway)	6	1.89×10^{-7}	7.97×10^{-6}
hsa05205	癌症中的蛋白多糖 (Proteoglycans in Cancer)	6	3.19×10^{-5}	2.41×10^{-4}
hsa04914	孕酮介导的卵母细胞成熟 (Progesterone-mediated Oocyte Maturation)	6	5.28×10^{-7}	9.50×10^{-6}
hsa05215	前列腺癌 (Prostate Cancer)	6	5.59×10^{-7}	9.50×10^{-6}
hsa04915	雌激素信号通路 (Estrogen Signaling Pathway)	6	1.10×10^{-6}	1.37×10^{-5}
hsa04370	血管内皮生长因子信号通路 (VEGF Signaling Pathway)	4	2.25×10^{-4}	1.07×10^{-3}
hsa05210	大肠癌 (Colorectal Cancer)	4	2.36×10^{-4}	1.07×10^{-3}
hsa05133	百日咳 (Pertussis)	4	4.16×10^{-4}	1.52×10^{-3}
hsa04068	FoxO 信号通路 (FoxO Signaling Pathway)	5	1.18×10^{-4}	7.32×10^{-4}
hsa04012	ErbB 信号通路 (ErbB Signaling Pathway)	5	2.17×10^{-5}	2.11×10^{-4}
hsa05161	乙型肝炎 (Hepatitis B)	5	1.61×10^{-4}	9.11×10^{-4}
hsa04912	GnRH 信号通路 (GnRH Signaling Pathway)	5	2.59×10^{-5}	2.20×10^{-4}
hsa05160	丙型肝炎 (Hepatitis C)	5	1.15×10^{-4}	7.32×10^{-4}
hsa05131	细菌性痢疾病 (Shigellosis)	4	2.60×10^{-4}	1.10×10^{-3}
hsa04621	NOD 样受体信号通路 (NOD-like Receptor Signaling Pathway)	4	1.75×10^{-4}	9.13×10^{-4}
hsa05152	肺结核 (Tuberculosis)	5	3.47×10^{-4}	1.39×10^{-3}
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt Signaling Pathway)	6	4.24×10^{-4}	1.52×10^{-3}
hsa05203	病毒致癌 (Viral Carcinogenesis)	5	6.06×10^{-4}	2.00×10^{-3}

2.2.6 “活性成分-靶点-通路”网络构建与分析
网络药理学是通过将现有数据导入可视化网络软件，并进行多种运算规则，在现有的相关数据库中

化合物成分、靶点、信号通路相互作用数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件，构建“成分-靶点-通路图”网络图，结果见图 6。

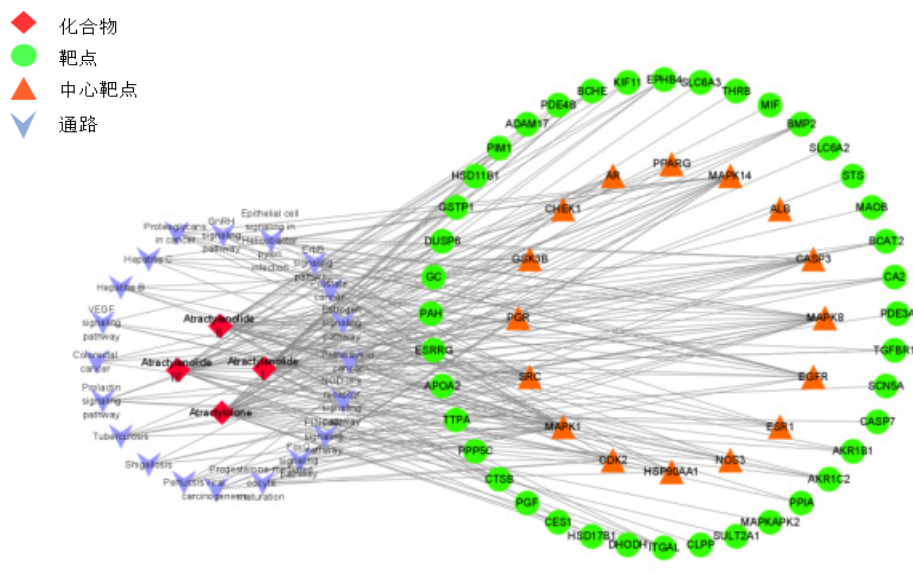


图 6 “成分-靶点-通路”网络图

2.3 白术中倍半萜类成分的含量测定

2.3.1 线性关系考察

精密称取白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮的对照品适量，用甲醇制备成质量浓度分别为 0.08、0.03、0.1、1.5 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯

III、苍术酮的对照品溶液各 1 mL，加入甲醇进行逐级稀释，吸取上述溶液适量，0.45 μm 微孔滤膜过滤，按“2.1.1”节色谱条件依次进样，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 4。

表 4 标志性成分的线性回归方程

化合物	回归方程	R ²	线性范围 / (mg·mL ⁻¹)
白术内酯 I	$y=2.6661 \times 10^7 x + 3.8617 \times 10^4$	0.9993	0.0050 ~ 0.0800
白术内酯 II	$y=4.3525 \times 10^7 x + 3.3374 \times 10^3$	0.9997	0.0005 ~ 0.0300
白术内酯 III	$y=2.5184 \times 10^7 x - 2.2630 \times 10^4$	0.9999	0.0010 ~ 0.1000
苍术酮	$y=1.6529 \times 10^7 x + 1.5675 \times 10^6$	0.9995	0.1500 ~ 1.5000

2.3.2 方法学考察

(1) 精密度试验

取 S18 号白术样品的供试品溶液，按“2.1.1”节色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮保留时间的 RSD 分别为 0.08%、0.07%、0.06%、0.09%；峰面积的 RSD 分别为 0.05%、0.20%、0.80%、0.08%，

表明仪器精密度良好。

(2) 稳定性试验

取 S18 号白术样品的供试品溶液，按“2.1.1”节色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮保留时间的 RSD 分别为 0.16%、0.20%、0.23%、0.05%；峰面积的 RSD 分别为 0.08%、0.18%、1.4%、0.08%，

表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

(3) 重复性试验

平行制备 S18 号白术样品的供试品溶液 6 份, 分别按“2.1.1”节色谱条件进行测定, 并计算含量。结果白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮平均含量分别为 0.39、0.11、0.25、5.41 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 保留时间的 RSD 分别为 0.10%、0.08%、0.06%、0.07%; 峰面积 RSD 分别为 2.25%、1.61%、2.59%、2.82%, 表明该方法重复性良好。

(4) 加样回收率试验

精密称定 6 份已知 4 个成分含量的 S18 号白术样品粉末, 每份约 0.25 g, 根据样品中各成分含量, 按 1 : 1 比例精密加入相应对照品溶液, 按“2.1.2”

节方法制备供试溶液, 按“2.1.1”节色谱条件进行测定。白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮的加样回收率分别为 100.4%、100.3%、99.6%、99.4%, RSD 分别为 0.64%、2.1%、1.1%、2.1%, 表明试验结果准确。

(5) 样品含量测定

分别精密称取 32 批白术药材粉末, 按“2.1.2”节方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”节色谱条件进样, 测定峰面积, 计算样品中白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮的质量分数及总质量分数, 得到结果见表 5。32 批白术药材中 4 个内酯类成分总质量分数为 1.79 ~ 17.22 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 5 32 批白术药材含量测定结果

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批次	质量分数				总质量分数
	白术内酯 I	白术内酯 II	白术内酯 III	苍术酮	
S1	0.11	0.02	0.06	4.77	4.96
S2	0.11	0.02	0.07	6.14	6.34
S3	0.38	0.20	0.21	5.96	6.75
S4	0.21	0.08	0.20	6.00	6.49
S5	0.09	0.08	0.15	1.55	1.87
S6	0.32	0.09	0.20	2.37	2.98
S7	0.14	0.03	0.09	7.88	8.14
S8	0.20	0.04	0.16	9.18	9.58
S9	0.28	0.04	0.13	15.36	15.81
S10	0.21	0.09	0.24	4.08	4.62
S11	0.33	0.14	0.23	4.54	5.24
S12	0.48	0.17	0.36	4.97	5.98
S13	0.18	0.10	0.23	3.36	3.87
S14	0.89	0.40	0.65	15.28	17.22
S15	0.45	0.08	0.18	7.86	8.57
S16	0.50	0.07	0.25	10.04	10.86
S17	0.23	0.14	0.27	3.85	4.49
S18	0.30	0.11	0.27	5.21	5.89
S19	0.66	0.20	0.54	14.04	15.44
S20	0.27	0.05	0.13	4.41	4.86

续表 5

批次	质量分数				总质量分数
	白术内酯 I	白术内酯 II	白术内酯 III	苍术酮	
S21	0.43	0.10	0.24	7.19	7.96
S22	0.48	0.09	0.26	7.71	8.54
S23	0.27	0.22	0.51	4.09	5.09
S24	0.31	0.13	0.33	2.99	3.76
S25	0.32	0.15	0.41	3.70	4.58
S26	0.48	0.17	0.37	1.96	2.98
S27	0.33	0.17	0.24	5.75	6.49
S28	0.22	0.09	0.18	4.33	4.82
S29	0.23	0.10	0.22	4.18	4.73
S30	0.25	0.08	0.16	9.02	9.51
S31	0.28	0.16	0.22	1.13	1.79
S32	0.30	0.12	0.22	3.57	4.21

3 讨论

中药以及中药制剂成分复杂,具有多成分、多靶点、多通路的特点,使其作用机制研究困难。中药指纹图谱是建立在中药化学成分系统研究的基础上,分析中药的化学成分类型,对中药进行整体性质量控制;网络药理学是基于疾病、基因、靶点、中药相互作用网络的基础上,进一步阐释中药的作用机制;质量标志物是中药质量评价与控制的指标,为建立中药系统化质量控制体系提供了新思路。

3.1 HPLC指纹图谱的建立

白术化学成分主要是倍半萜、三萜、香豆素、苯丙素、黄酮、多糖、氨基酸等多类成分,其中倍半萜类含量最多,是白术发挥药效的物质基础^[12-14]。本研究首先对其化学成分进行表征,通过利用HPLC分析来自全国6个白术主产区的共32批药材,建立了白术药材的指纹图谱,选择白术主要成分苍术酮峰作为参照峰,其峰面积适中,色谱峰保留时间稳定,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间,确立了28个共有峰,并对其中4个色谱峰(白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、苍术酮)进行了指认;方法学

考察结果显示该方法精密度、稳定性和重复性良好,表明此方法准确可靠,可作为白术药材定性鉴别的依据。

3.2 网络药理学分析

本研究采用网络药理学方法对指认出的4个白术倍半萜类成分进行药效成分筛选与靶点预测。根据Cytoscape3.8.2软件对网络图进行分析,以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度(Degree)为参考,发现靶点丝裂原活化蛋白激酶-MAPK1(Mitogen-activated Protein Kinase, Degree=21)、MAPK8(Degree=16)、MAPK14(Degree=16)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶-SRC(Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase Src, Degree=14)、表皮生长因子受体-EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor, Degree=11)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3-CASP3(Caspase 3, Degree=11)的连接度较高,可能是白术发挥药理作用的关键靶点;除肿瘤通路(Pathways in Cancer, Degree=9)信号通路的连接度较大,其余通路连接度一致,均可能是白术发挥作用的关键信号通路。现代药理研究^[15-17]表明,白术倍半萜类具有抗肿瘤、抗炎、对胃肠功能的作用、抑制血小板聚集以及

改善神经系统性疾病等作用。而MAPK1、SRC、EGFR、CASP3等关键靶点在肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[18-20]；在白术的关键信号通路中，FOXO信号通路、PI3K-Akt信号通路等是作为治疗和预防人类癌症的潜在靶标^[21-23]，而部分文献^[24-25]均展示了白术内酯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ是抗肿瘤的有效成分，例如治疗胃癌、肺癌、卵巢癌等，可能是成分调控相关靶标的作用。炎症会激活PI3K-Akt等多条信号通路^[26]，Yasukawa等^[27]报道苍术酮能抑制12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 诱导的小鼠耳部炎症，发挥抗炎作用，可能与调控PI3K-Akt通路有关。幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 (Epithelial Cell Signaling in Helicobacter Pylori Infection) 是胃肠道疾病重要的生物通路^[28]；王晶等^[29-31]研究发现，内酯类成分具有调节胃肠道功能和促进营养物质吸收、健脾运脾的作用，其中以白术内酯Ⅰ作用最为显著，也表明作为补气健脾类中药的白术在胃肠道疾病治疗中具有重要地位。此外有研究^[32]表明，白术内酯Ⅲ能够抑制血栓烷类似物U46619诱导的人血小板聚集，通过抑制血小板活化进程中的信号靶点MAPK发挥抑制血小板聚集的作用，白术内酯Ⅲ临床可以作为血液的抗凝剂，白术内酯Ⅱ也能影响整合素，从而实现抗血小板聚集的功效^[33]。通过构建“成分-靶点-通路”网络图，说明了白术不同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，恰好符合中药多成分、多靶点和多途径协同作用的特点。白术化学成分的药理作用尚处于研究的初步阶段，网络药理学仍具有一定的局限性，后续仍需通过药效实验进行验证，以进一步确定本研究预测结果的准确性。

3.3 活性成分含量测定

本研究对32批次白术药材进行了含量测定，各产地各批次含量不一，充分说明了市场上白术质量优劣不一。通过收集全国多个白术主产地的药材进行分析，如安徽“徽术”、湖南“平术”、浙江“於术”“浙术”是传统白术道地药材，而河北、湖北、江西是白术人工引种栽培重要产地代表，具有全面性和多样性，建立HPLC多波长切换模式测定4个倍半萜类成分含量方法，也为白术道地药材质量研究提供了科学参考。目前，市场上已有大量白术商品，《中国药典》仅以苍术酮定性鉴别作为参考标准，存在缺陷和不足，提高白术质量标准仍

是今后工作的重点方向。

综上，本研究基于指纹图谱和网络药理学，确定白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅲ、苍术酮为白术的潜在Q-Marker，进一步完善了白术的质量控制体系，为白术质量评价标准的提升及含白术药材的相关复方制剂的质量控制提供参考。

参考文献：

- [1] 张晓娟, 左冬冬. 白术化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中医药信息, 2018, 35(6): 101-106.
- [2] 谢明, 宗可欣, 富波, 等. 中药白术的研究综述[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(2): 299-301.
- [3] 岳美颖, 潘媛, 敖慧. 白术化学、药理与临床研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(5): 66-68.
- [4] 杨成前, 雷美艳, 杨天建, 等. 白术栽培群体的主要农艺性状相关性及其聚类分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(17): 5852-5859.
- [5] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020.
- [6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [7] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196, 186.
- [8] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [9] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 1-8.
- [10] Luo TT, Lu Y, Yan SK, et al. Network Pharmacology in Research of Chinese Medicine Formula: Methodology, Application and Prospective[J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(1): 72-80.
- [11] Kibble M, Saarinen N, Tang J, et al. Network Pharmacology Applications to Map the Unexplored Target Space and Therapeutic Potential of Natural Products[J]. Nat Prod Rep, 2015, 32(8): 1249-66.
- [12] Zhu B, Zhang QL, Hua JW, et al. The Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Atractylodes Macrocephala* Koidz.: A Review[J]. J Ethnopharmacol, 2018(226): 143-167.
- [13] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 白术化学成分、药理作用及

- 临床应用的研究进展[J]. 甘肃医药, 2018, 37(1): 23-26.
- [14] 曾星星, 鹿爱娟, 高晓慧, 等. 白术化学成分的检测方法及其研究进展[J]. 农产品加工, 2019(23): 83-85, 89.
- [15] Zhang WJ, Zhao ZY, Chang LK, et al. Atractylodis Rhizoma: A Review of its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, Toxicology and Quality Control[J]. J Ethnopharmacol, 2021(266): 113415.
- [16] 顾思浩, 孔维崧, 张彤, 等. 白术的化学成分与药理作用及复方临床应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 69-73.
- [17] 姚兆敏, 陈卫东, 仰忠华, 等. 白术研究进展及其质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4796-4807.
- [18] Rajaram P, Chandra P, Ticku S, et al. Epidermal Growth Factor Receptor: Role in Human Cancer[J]. Indian J Dent Res, 2017, 28(6): 687-694.
- [19] 张静晓, 刘晓洁, 杨春, 等. 几种天然产物与CASP3靶点的相互作用机制探索[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(11): 1824-1828.
- [20] Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors[J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(10): 815-834.
- [21] De Kock L, Freson K. The (Patho) Biology of SRC Kinase in Platelets and Megakaryocytes[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(12): 633.
- [22] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(7): 815-827.
- [23] Shi X, Wang J, Lei Y, et al. Research Progress on the PI3K/AKT Signaling Pathway in Gynecological Cancer (Review) [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(6): 4529-4535.
- [24] 龙家英, 李小芳, 王娴, 等. 白术抗肿瘤活性成分及其抗肿瘤机制研究进展[J]. 中药与临床, 2021, 12(1): 65-71.
- [25] Bailly C. Atractylenolides, Essential Components of Atractylodes-based Traditional Herbal Medicines: Antioxidant, Anti-inflammatory and Anticancer Properties[J]. Eur J Pharmacol, 2021(891): 173735.
- [26] 嵇莹莹, 龚国清. PI3K/Akt/mTOR通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(4): 226-229.
- [27] Yu S, Yasukawa K, Takido M. Atractylodis Rhizoma Extract and Its Component, Atractylon, Inhibit Tumor Promotion in Mouse Skin Two-stage Carcinogenesis[J]. Phytomedicine, 1994, 1(1): 55.
- [28] Baghy K. Proteoglycans in Liver Cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 379-93.
- [29] 王晶, 张世洋, 盛永成, 等. 白术治疗胃肠道疾病药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 2854-2858.
- [30] 姜亚欣. 白术内酯 I 对慢传输型便秘大鼠结肠水通道蛋白3、4表达的调节作用和机制[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [31] Song HP, Hou XQ, Li RY, et al. Atractylenolide I Stimulates Intestinal Epithelial Repair Through Polyamine-mediated Ca^{2+} Signaling Pathway[J]. Phytomedicine, 2017(28): 27-35.
- [32] Chen Y, Yang W, Guo L, et al. Atractylodes Lactone Compounds Inhibit Platelet Activation[J]. Platelets, 2017, 28(2): 194-202.
- [33] 陈一竹, 杨文龙, 郭玲玉, 等. 白术内酯 II 抗血小板作用及对血小板中蛋白激酶B磷酸化水平的影响[J]. 中国医药导报, 2016, 13(11): 18-21, 26.

(收稿日期 2021年12月1日 编辑 郑丽娥)