

• 制剂与质量 •

多元统计及“成分-靶点-疾病”在线关联分析脑心通胶囊中质量标志物

刘妍如¹, 唐志书^{1*}, 宋忠兴¹, 刘峰², 陈衍斌², 胡梅玲¹, 阮增娥¹, 史鑫波¹, 吕杨¹, 段金彪³

1. 陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083

2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 710075

3. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 基于质量标志物(Q-marker)概念, 通过筛选脑心通胶囊 Q-markers, 构建活性化合物-靶点网络, 建立脑心通的整体质控方法。方法 采用多元统计方法找到多批次脑心通胶囊的特异性成分, 运用基于 BATMAN-TCM 网络药理学计算平台构建“Q-markers-靶点-通路-疾病”网络, 并进行生物学信息注释。进一步建立超高效液相色谱法(UPLC)同时质控 Q-markers 的分析方法。结果 多元统计分析将桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素和丹参酮 II_A 9 种成分初步确定为脑心通胶囊整体质控的 Q-markers。通过靶点网络构建和拓扑学分析结果推测, Q-markers 主要作用于 PTGIS、PTGS2、CHRNA10、ENPP1 和 ADORA2A 5 个关键靶点。针对 Q-markers 建立的 UPLC 质控方法, 线性关系良好($r < 0.999$), 重复性、稳定性、精密度试验 RSD 均 $< 3\%$ 。结论 基于多元统计, 网络药理学和 UPLC 多成分定量测定技术的 Q-markers 辨析方法, 可以初步建立有效成分群多角度的分析方法, 并用于脑心通胶囊的质量控制。

关键词: 脑心通胶囊; 质量标志物; 多元统计分析; BATMAN-TCM; 桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素、丹参酮 II_A

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2775-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.008

Q-markers in Naoxintong Capsules by using multivariable statistical and “components-targets-diseases” network analysis

LIU Yan-ru¹, TANG Zhi-shu¹, SONG Zhong-xing¹, LIU Feng², CHEN Yan-bin², HU Mei-ling¹, RUAN Zeng-e¹, SHI Xin-bo¹, LV Yang¹, DUAN Jin-ao³

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China

3. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medical Formula Research, Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective This study aimed to establish an integral quality control method for Naoxintong capsules based on the theory of quality markers (Q-marker) in traditional Chinese medicine via multivariable statistical calculation and “active compounds-targets” network construction. **Methods** Multi-statistical methods were firstly carried out to explore the specific components from different batches of Naoxintong Capsules. The “Q-markers-targets-pathways-diseases” network was constructed using the Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) online analysis tool, and biological information annotations were made. Moreover, a simultaneously determination method for Q-markers was established by using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). **Results** Nine compounds were chose as the Naoxintong Q-markers capsules including mulberroside A, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, calycosin-7-glucoside, rosemary acid, salvianolic acid B, formononetin, and tanshinone II_A. To verify the prediction, target network construction analysis was performed and indicated that the nine Q-markers mainly targeted five proteins which were PTGIS, PTGS2, CHRNA10, ENPP1, and ADORA2A. Methodological

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-QIN-45); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81501229); 陕西省科技厅“科技新星”培养计划(2017KJXX-71)

作者简介: 刘妍如(1985—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

*通信作者 唐志书, 男, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药制剂制备技术的研究。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

validation showed that the established UPLC method had good linear relationship ($r < 0.999$), and all RSD values were lower than 3% in the repeatability, stability, and precision test. **Conclusion** Based on the multivariate statistics, network pharmacology analysis, and UPLC multi-component quantitative analysis, a multi-angle analysis method for effective components can be established for the integral quality control of Naoxintong Capsules.

Key words: Naoxintong Capsules; Q-markers; multivariate statistical analysis; mulberroside A; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; calycosin-7-glucoside; rosemary acid; salvianolic acid B; formononetin; tanshinone II_A

脑心通复方 (Naoxintong capsule, NXT) 源自清代王清任《医林改错·卷下·瘫痪论》中经典名方补阳还五汤。基于“脑心同治”和“供血不足乃万病之源”两大医学理论,根据现代人的体质和发病特点,借鉴“桃红四物汤”成药规律,将黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、红花、醋乳香、醋没药、鸡血藤、牛膝、桂枝、桑枝、地龙、全蝎、水蛭共 16 味中药进行优化组合配伍而成,具有益气活血、化瘀通脉之功。临床上治疗气滞血瘀、脉络瘀阻所导致的冠心病、心绞痛、脑卒中等心脑血管疾病具有显著疗效。脑心通胶囊为 NXT 的主要剂型。基于 UPLC-MS/MS 等技术的化学物质基础研究结果显示,黄酮类、黄酮苷类、菲醌类、萜类 (180 余种可检测化合物) 是脑心通复方中的主要活性成分,主要来源于组方中的黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、红花、鸡血藤、牛膝、桂枝和桑枝药材。药效学研究表明,脑心通胶囊在治疗心血管疾病方面发挥着中药“多靶点”的干预功能^[1-2]。其通过抑制缺血再灌注损伤的炎症反应,减少脑组织黏附分子表达,抑制神经性毒性损伤,增加脑动脉抗氧化应激能力,减小脑梗死范围;其通过抑制脑组织 PI3K-Akt 信号通路和 JAK2/STAT3 信号通路介导的抑制线粒体和神经元凋亡,提高抗氧化能力,减少脑神经损伤;通过 PPAR γ 介导的细胞自噬抑制心肌细胞 H9c2 肥大,增强心脏干细胞 CXCR4 蛋白表达,促进心脏干细胞的迁移,还可增加心肌中血管内皮生长因子 (VEGF)、KDR、p-e NOS、p-Akt 表达,激活 VEGF/e NOS 信号传导增强新血管形成,减少心肌梗死范围;通过增加主动脉壁病灶的平滑肌/胶原含量,增加平滑肌 22 α m RNA 表达,影响血清脂质谱,减少动脉粥样硬化^[3]。以上研究皆为构建脑心通胶囊治疗心血管疾病的“疾病-成分-靶点”网络提供了重要的数据。

虽然通过指纹图谱分析能从整体上表征药材的真伪,但难以体现复方制剂的质量优劣。尽管化学成分鉴定及药效学研究能为脑心通胶囊的物质基础研究提供依据,但复方水提液中活性成分含量

对中药复方制剂的质量和疗效起着至关重要的影响,仅仅对单一药材或个别成分进行质控还无法达到物质基础研究全面性和准确性的目的。因此,如何将脑心通胶囊中的有效活性成分进行多维度、非线性分析,找到可以从整体表征脑心通胶囊质量的质量标志物 (Q-marker),并将这些 Q-marker 投影到脑心通胶囊治疗的“疾病-成分-靶点”网络,解决脑心通质控过程中指标成分和含量范围不确定的问题,建立脑心通胶囊“以成分为中心、药效为重心、质量为核心”的“物-量-效”群,用于脑心通胶囊的质量控制^[4-5]。

本实验以《中国药典》2015 年版一部收载的药材质控成分结合主成分分析结果,对 15 批次脑心通胶囊间差异显著的活性成分进行筛选,初步将选定的 9 个成分 (桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素、丹参酮 II_A) 作为脑心通胶囊质控 Q-marker。基于关联规则,采用软件 BATMAN-TCM (Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine) 在线分析工具预测脑心通胶囊“脑心同治”的作用靶点,通过挖掘组分间关系,构建 Q-markers-靶点-疾病网络,深化对心脑血管疾病与组分配伍的规律认识^[6]。最后,采用超高效液相色谱 (UPLC) 技术,以两峰分离度之和 ($\sum R_s$),归一化分离因子 [$r^* (\times 10^{-10})$]、色谱信息量 (Φ) 和色谱分层响应效能 (HCRF) 作为响应因子作为色谱洗脱优化评分指标,建立了同时测定脑心通胶囊 9 个 Q-marker 成分含量的测定方法,为制剂的后续研发提供科学实验数据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ACQUITY H-CLASS 型超高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司),包括二元超高压溶剂系统、FTN 自动进样管理器、PDA 检测器和 Empower 3 色谱工作站; Sartorius CPA225D 型十万分之一电子分析天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司);

GeneVacmiVac 低温离心浓缩仪 (英国 GeneVac 公司)。

1.2 材料

毛蕊异黄酮苷对照品 (批号 111920-201505, 质量分数 97.1%) 购于中国食品药品检定研究院; 对照品儿茶素 (批号 MUST-17060115, 质量分数 99.96%)、桑皮苷 A (批号 MUST-17060301, 质量分数 99.42%)、羟基红花黄色素 A (批号 MUST-16092910, 质量分数 99.88%)、苦杏仁苷 (批号 MUST-17042810, 质量分数 99.28%)、芍药苷 (批号 MUST-17031901, 质量分数 99.30%)、迷迭香酸 (批号 MUST-17040532, 质量分数 99.40%)、丹酚酸 B (批号 MUST-17040503, 质量分数 98.51%)、毛蕊异黄酮 (批号 MUST-16120911, 质量分数 99.84%)、丹参酮 II_A (批号 MUST-17022502, 质量分数 99.64%)、芒柄花素 (批号 MUST-17031005, 质量分数 99.03%) 购于成都曼思特生物科技有限公司; 阿魏酸 (批号 wkq17022303, 质量分数 >98%) 购于四川省维克奇生物科技有限公司。乙腈 (色谱纯, 韩国 Honeywell 公司); 甲酸 (色谱纯, Fluka 公司), 其他试剂均为分析纯。实验用水为屈臣氏蒸馏水。脑心通胶囊 (0.4 g/粒, 批号 2018032401~2018032415)、药材黄芪 *Astragali Radix* (批号 20180308)、赤芍 *Paeoniae Radix Rubra* (批号 20180305)、丹参 *Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (批号 20180305)、当归 *Angelicae Sinensis Radix* (批号 20180304)、川芎 *Chuanxiong Rhizoma* (批号 20180304)、桃仁 *Persicae Semen* (批号 20180307)、红花 *Carthami Flos* (批号 20180307)、鸡血藤 *Spatholobi Caulis* (批号 20180307)、牛膝 *Achyranthis Bidentatae Radix* (批号 20180304)、桂枝 *Cinnamomi Ramulus* (批号 20180305)、桑枝 *Mori Ramulus* (批号 20180305) 均由陕西步长制药有限公司提供, 药材经陕西省中药资源产业化协同创新中心刘世军高级工程师鉴定, 符合《中国药典》2015 年版一部有关规定。

2 方法与结果

2.1 Q-marker 筛选

2.1.1 供试品溶液的制备 取脑心通胶囊 20 粒, 精密称定, 研细, 取 2.0 g, 精密称定, 置 150 mL 具塞磨口锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 超声处理提取 45 min (功率 300 W, 频率 40 kHz), 摇匀, 滤过。残渣及滤器用 70% 乙醇 30 mL 分 3 次

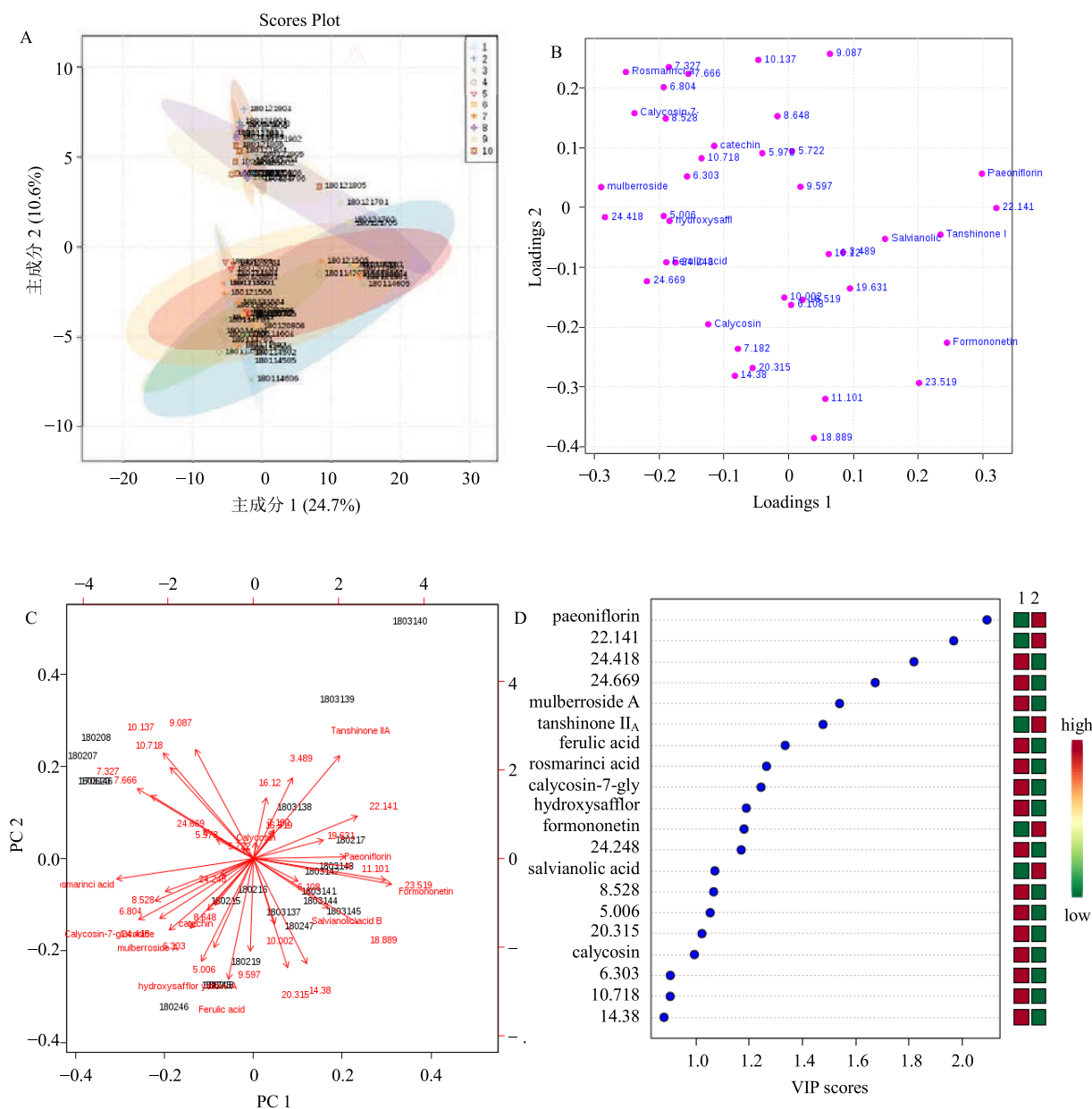
等量洗涤, 洗液合并入滤液中, 水浴蒸干滤液, 残渣加 70% 乙醇微热溶解, 并转移至 25 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得^[7]。

2.1.2 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为水溶液 (A)-乙腈溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~2 min, 2% B; 2~20 min, 2%~98% B; 20~25 min, 98% B; 25~26 min, 98%~2% B; 后运行 5 min; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 5 μL。

2.1.3 多元统计分析 将采集到的制剂的 UPLC 积分数据 (*.csv 格式) 上传至 MetaboAnalyst 数据处理平台进行特征峰评估以及偏最小二乘法 (PLS) 计算 (<http://www.metaboanalyst.ca>)。经标准化 (normalization), 对数转换 (log transformation) 及标度化 (autoscaling) 预处理数据后, 建立多元统计模型。PLS 是光谱分析建立线性定量校正模型的通用方法, 能够同时从光谱矩阵和浓度矩阵中提取载荷和得分, 克服 PCA 方法只利用光谱矩阵的缺点, 可有效降维, 并消除光谱间可能存在的复共线关系^[8]。由相关系数矩阵 (R) 得到特征值、方差贡献率 (R^2_Y) 和累积贡献率 (Q^2_{cum}) 结果。系统根据交叉有效性指标 (>0.097 5) 提取前 2 个主成分, 正交验证值为 81.1%。因此, 选取前 2 个主成分拟合 PLS 预测模型。结果以得分图表示。如图 1-A 所示, 前 2 个主成分的散点图中, 样本点都分布于 T² 椭圆图内, 且不存在特异样本点。从制剂的主成分散点图可以看出, 15 批制剂成分显示出一定的差异。

为了找到造成 2 组差异的成分信息, 根据生成的 PLS 结果, 绘制各成分关系的载荷图, 提取组间差别较大的化合物信息并根据其保留时间和 PDA 光谱特征进行鉴定。同时, 以变量投影重要性指标 (variable importance in projection, VIP) 描述各化合物在系统分析的重要性。选定 VIP 大于 1 的化合物作为潜在的 Q-marker。VIP 结果如图 1-D 所示, 在所有 47 个色谱峰中 VIP 值大于 1 的有 16 个色谱峰, 说明在 PLS 模型中, 这 16 个化合物对脑心通胶囊质量的影响是最大的。各色谱峰的保留时间 (VIP 值) 分别为 5.006 min (1.053)、5.47 min (1.539)、5.837 min (1.189)、6.972 min (2.092)、7.481 min (1.335)、7.984 min

素 A (红花, 400.3 nm)、芍药苷 (赤芍, 231.7 nm)、阿魏酸 (当归、川芎, 322.1 nm)、毛蕊异黄酮苷 (黄芪, 249.5 nm)、迷迭香酸 (丹参, 329.3 nm)、丹酚酸 B (丹参, 286.3 nm)、芒柄花素 (黄芪, 248.3 nm) 和丹参酮 II_A (丹参, 269.6 nm)。根据《中国药典》2015 年版一部收载的药材质控标准, 选定以上 9 种化合物作为脑心通胶囊质控的 Q-markers。



A-PLS 散点图 B-PLS 载荷图 C-二相散点图 D-VIP 得分图
A-PLS scores plot B-PLS loading plot C-PCA biplot D-Important features identified by PLS-DA

图 1 15 批脑心通胶囊成分差异 PLS 分析图

Fig. 1 Scores plot, biplot, loadings plot, and important features plot among 15 batches of Naoxintong capsules by PLS-DA

2.2 脑心通治疗心脑血管疾病“Q-markers-疾病-靶点”网络构建

2.2.1 单味药材预测结果分析 对于脑心通脑囊药理网络的构建,已有对其可吸收成分“多成分-多靶点-多通路”的初步研究^[2]。并得到治疗心血管疾病相关的靶点和通路。结合此项研究,根据“2.1”项下各化合物的VIP评分,将上述单味药材按照“君、臣、佐、使”及性效归类,分为4个分析组,分别为黄芪+丹参、川芎+当归、赤芍+红花和桑枝,将各单味药大写拼音输入BATMAN-TCM在线分析工具进行作用靶点预测(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>)^[5,9]。计算卡值设定为:得分 ≥ 20 , $P < 0.05$ 。结果共检索到化学成分670个,分别为丹参124个、黄芪70个、赤芍21个、桑枝39个、川芎182个、当归163个和红花71个。

2.2.2 Q-makers 疾病富集及潜在作用信号通路分析 分别输入代表单味药材及9种Q-markers的化合物PubChem_CID编号并将计算卡值设定为:得分 ≥ 10 , $P < 0.05$,进行“药材-Q-markers”潜在靶标,KEGG代谢途径及OMIM/TTD疾病富集分析。

靶点预测结果显示,除桑皮苷A和芍药苷无法得到有效靶点外,其他7种化合物可预测得到靶点共69个。对作用靶点进行关联分析发现脑心通Q-markers在诸多与脑部及心血管疾病相关通路上发挥重要作用,共富集通路8条,如花生四烯酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、脂肪细胞因子信号通路等(表1)。疾病表型丰度分析进一步表明以上Q-markers在脑心通胶囊治疗心脑血管疾病方面占有重要的地位,发挥了“多靶点-多功效”的作用,

表1 脑心通 Q-markers 相关代谢/信号通路与靶点蛋白

Table 1 Related metabolism/signal pathways and targeted proteins of Naoxintong Q-markers

单味药	化合物(PubMed_CID)	综合代谢/信号通路($P < 0.05$)	靶点蛋白
黄芪+丹参	毛蕊异黄酮苷(71571502)	steroid biosynthesis	SOAT1, SOAT2
	芒柄花素(5280378)	ubiquinone and other terpenoid-quinone	VKORC1
	迷迭香酸(5281792)	biosynthesis	
	丹酚酸B(6451084)	arachidonic acid metabolism	ALOX5, PTGIS, PTGS1, PTGS2
	丹参酮II _A (164676)	mRNA surveillance pathway	PPP2CA, PPP2CB
川芎+当归	阿魏酸(445858)	oocyte meiosis	PPP2CA, PPP2CB
		TGF- β signaling pathway	IFNG, PPP2CA, PPP2CB
		serotonergic synapse	ALOX5, PTGS1, PTGS2
		purine metabolism	IMPDH1, IMPDH2
		PPAR signaling pathway	RXRA, RXRB, RXRG
赤芍+红花	羟基红花黄色素A(6443665)	adipocytokine signaling pathway	RXRA, RXRB, RXRG
		fatty acid degradation	ACADM, ACADS, ACOX1, GCDH
		purine metabolism	ADK, ENPP1, IMPDH1, NT5C2, XDH
		pyrimidine metabolism	DPYD, NT5C2, TXNRD1
		glycine, serine and threonine metabolism	DAO, DLD, MAOA, MAOB
		valine, leucine and isoleucine degradation	ACAD8, ACADM, ACADS, DLD, IL4I1, IVD
		arginine and proline metabolism	DAO, MAOA, MAOB, NOS1
		histidine metabolism	MAOA, MAOB
		tyrosine metabolism	IL4I1, MAOA, MAOB
		phenylalanine metabolism	IL4I1, MAOA, MAOB
		tryptophan metabolism	GCDH, IL4I1, MAOA, MAOB
		phenylalanine, tyrosine and tryptophan	IL4I1
		biosynthesis	
		beta-alanine metabolism	ACADM, DPYD
		amino sugar and nucleotide sugar metabolism	CYB5R1, CYB5R3
桑枝	芍药苷(442534)	nicotinate and nicotinamide metabolism	ENPP1, NT5C2
		pantothenate and CoA biosynthesis	DPYD, ENPP1
		carbon metabolism	ACADM, ACADS, DLD
		fatty acid metabolism	ACADM, ACADS, ACOX1
		peroxisome	ACOX1, DAO, XDH
	桑皮苷A(5281792)	靶点数少于卡值	

如阿尔茨海默病、帕金森症、高血压、高脂血症、动脉粥样硬化、心肌梗死、心绞痛等，并与慢性炎症及代谢性疾病蛋白有较高相关性（表 2）。靶点重要性评价结果显示，共有 5 个靶点蛋白在解释脑心痛“脑心同治”作用机制方面较为重要：PTGIS（PubGene ID: 5740）、PTGS2（PubGene ID: 5743）、CHRNA10（PubGene ID: 57053）、ENPP1（PubGene ID: 5167）、ADORA2A（PubGene ID: 135），结果见图 2。亚细胞定位、分子功能和生物进程分析结果显示，5 个靶点蛋白行使的分子生物学功能与核

活性，酶结合功能，跨膜转运蛋白活性和离子结合有关，共涉及细胞形态发生、循环系统、碳水化合物代谢、细胞蛋白质修饰、脂质代谢、硫化化合物代谢、核质转运、信号转导、细胞死亡、跨膜转运等多个生物学途径。

2.3 Q-makers 定量测定

2.3.1 色谱条件优化 为了获得最佳的参数设置，对“2.1.1”项下条件进行优化。选择柱温（25~35℃），体积流量（0.1~0.4 mL/min），缓冲液浓度（0.1~0.2%甲酸、0.1%醋酸、0.05%磷酸）作为优化参数，以 $\sum R_s$ 、 $r^* (\times 10^{-10})$ 、 Φ 、HCRF 评价样

表 2 脑心痛胶囊 Q-markers 调控蛋白-疾病 (OMIM/TDD) 关联分析结果

Table 2 OMIM/TDD diseases regulated by Naoxintong Q-markers

相关疾病 (OMIM/TDD)	蛋白 (黄芪+丹参)	蛋白 (赤芍+红花)
OMIM 分类		
动脉钙化 (OMIM: 208000)		ENPP1
高血压 (OMIM: 145500)	PTGIS	
高脂血症 (OMIM: 200100)	MTTP	
脑部疾病 (OMIM: 172700)、帕金森-痴呆综合征 (OMIM: 260540) 和迟发型帕金森病 (OMIM: 168600)		MAPT
非胰岛素依赖性糖尿病 (OMIM: 125853)		ENPP1
腹型肥胖 (OMIM: 605552)	MTTP	
TTD 分类		
脑膜瘤 (meningioma)	PTGS2	
偏头痛 (migraine)	CNR1	
神经性疼痛 (neuropathic pain)	CACNA1G, CHRNA10	
缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injuries)、脑损伤 (brain injury)		ADORA2A
偏头痛和丛集性头痛 (migraine and cluster headaches)		NOS1
非特异性心血管疾病 (cardiovascular disease, unspecified)	CACNA1G, MTTP, PTGS1	
病理性血管生成 (pathological angiogenesis)、心肌梗死 (myocardial infarction) 和血管病变 (vascular lesion regression)	PTGS2	
心绞痛 (angina pectoris)、心脏性心律失常 (cardiac dysrhythmias)、高血压 (hypertension) 和心脏衰竭 (heart failure)	CACNA1G	
高脂血症 (hyperlipidemia)	MTTP	
血栓栓塞性疾病 (thromboembolic disease)	VKORC1	
动脉粥样硬化 (atherosclerosis)	MTTP	
炎症疾病 (inflammation)	PTGS2	ADK, ADORA2A
慢性炎症性疾病 (chronic inflammatory diseases)	PTGS1	
糖尿病 (diabetes mellitus)	PRKCB	ENPP1
肾脏疾病 (renal diseases)		ADORA2A
神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases)、帕金森病 (Parkinson's disease) 和阿尔茨海默病 (alzheimer's disease)	PTGS2	ADORA2A, MAOB
氧化和自由基损伤 (oxidative and free radical damage)		TXNRD1

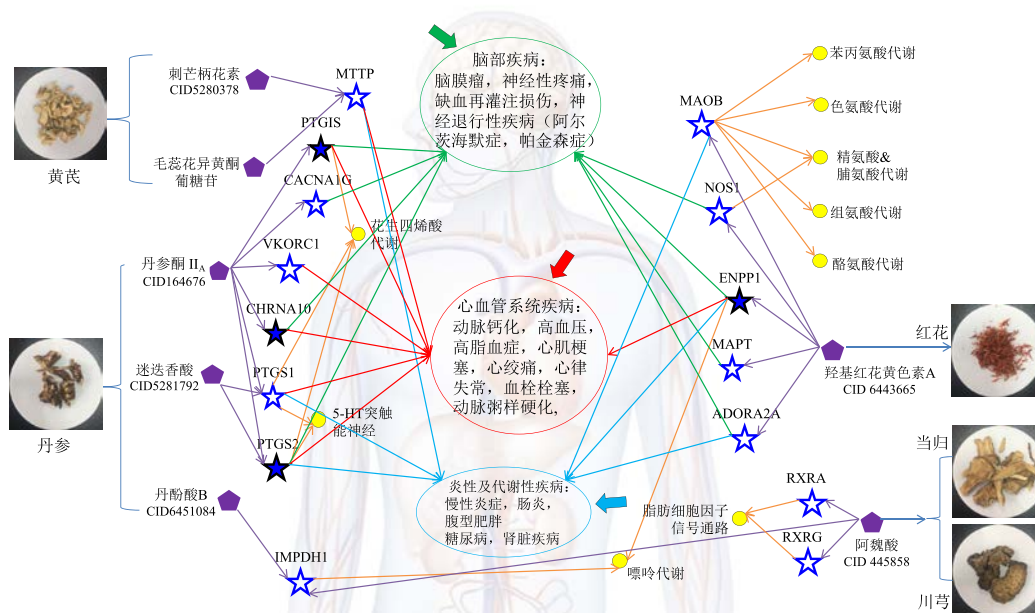


图 2 脑心通胶囊 Q-markers “药材-成分-靶点-通路-疾病” 关联网络图

Fig. 2 Ingredient-target-pathway/disease association network for Naixintong Capsules Q-markers

品的分离效能, 结果见表 3。

$$r^* (\times 10^{-10}) = \prod_{i=0}^{n-1} \left(\frac{R_{s_i, j+1}}{R_s} \right) \quad (1)$$

$$\Phi = \sum_{i=0}^n (\log 2A_i + 0.5 \times \log 2R_i + 0.25 \times \log 2n_i) \quad (2)$$

$$\text{HCRF} = 1\,000\,000n + 10\,000R_{\min} + (t_m - t_1) \quad (3)$$

R 为两峰间分离度、 n 为理论塔板数、 $R_{\min}$ 为最小分离度、 t_m 为最大保留时间、 t_1 为最小保留时间、 A 为色谱峰面积

优化结果显示, 缓冲系统为 0.2% 甲酸, 柱温为 35 °C, 体积流量为 0.2 mL/min 时, 各峰分离度, 塔板数参数优化结果较好, 因此将此作为固定条件进行样品测定。

2.3.2 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.2% 甲酸-水溶液 (A) -乙腈溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~2 min, 2% B; 2~7 min, 2%~14% B; 7~9 min, 14%~15% B; 9~11 min, 15%~16% B; 11~14 min, 16%~35% B; 14~16 min, 35% B; 16~21 min, 35%~70% B; 21~23 min, 70% B; 23~28 min, 70%~100% B; 28~30 min, 100% B; 30~32 min, 100%~2% B; 后运行 5 min; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 5 μL。对照品和脑心通胶囊样品的色谱图见图 3。

表 3 色谱条件优化结果

Table 3 Optimization results of chromatography parameters

优化条件		n	$\sum R_s$	r^*	Φ	HCRF
缓冲系统	0.1%甲酸	13	123.134	0.002 8	294.951	13 100 517
	0.2%甲酸	13	121.426	0.003 8	271.305	13 127 102
	0.05%乙酸	12	104.236	0.048 0	254.139	12 297 164
	0.1%乙酸	12	104.785	0.026 4	256.094	12 219 408
	0.05%磷酸	12	124.686	0.008 0	251.655	12 080 066
柱温	25 ℃	13	123.134	0.002 8	294.951	13 100 517
	30 ℃	13	124.169	0.003 0	273.084	13 119 317
	35 ℃	13	125.990	0.003 7	272.748	13 183 360
体积流量	0.1 mL/min	13	105.185	0.018 7	265.117	13 113 343
	0.2 mL/min	13	123.134	0.002 8	294.951	13 100 517
	0.3 mL/min	13	148.789	0.000 9	263.496	13 146 515
	0.4 mL/min	13	147.646	0.000 8	260.041	13 123 966

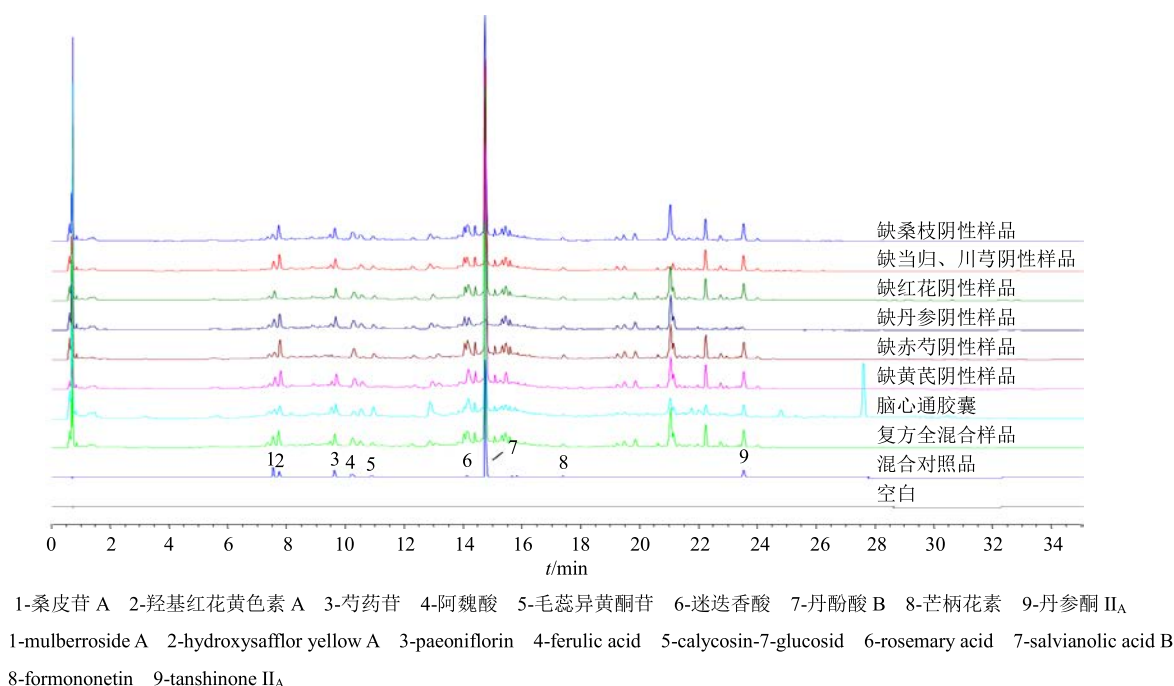


图 3 Q-markers 对照品、脑心通胶囊样品、复方混合样品及缺味阴性对照样品 UPLC 图谱

Fig. 3 UPLC of Q-markers reference sample, Naoxintong Capsules sample, compound mixed sample, and negative samples

2.3.3 混合对照品溶液的制备 精密称取桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素和丹参酮 II_A 对照品适量，加甲醇溶解，稀释至刻度，摇匀，0.22 μm 滤膜滤过，即得（含桑皮苷 A 68 μg/mL、羟基红花黄色素 A 83 μg/mL、芍药苷 350 μg/mL、阿魏酸 30 μg/mL、毛蕊异黄酮苷 5 μg/mL、迷迭香酸 115 μg/mL、丹酚酸 B 405 μg/mL、芒柄花素 4 μg/mL 和丹参酮 II_A 36 μg/mL）。

2.3.4 供试品溶液的制备方法 同“2.1.1”项。

2.3.5 线性关系、检出限和定量限 精密吸取 9 种 Q-markers 混合对照品工作液，按照“2.3.2”项下优化的分析条件进行测定，以峰面积为纵坐标（Y），进样溶液质量浓度（X）为横坐标绘制标准工作曲

线。得 9 种化合物线性范围为 0.38~380.00 μg/mL，且 X 和 Y 线性关系良好。

以阴性样品为检测对象，添加不同质量浓度的混合对照品溶液，按照 $S/N=3$ 计算检出限（LOD），按照 $S/N=10$ 计算定量限（LOQ）。本方法 LOD 在 0.06~3.79 μg/mL，LOQ 在 0.19~5.05 μg/mL。9 种 Q-markers 的线性方程、相关系数、方法 LOD 及 LOQ 见表 4。

2.3.6 精密度试验 精密吸取“2.3.3”项下混合对照品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件连续测定 6 次，记录保留时间和峰面积。结果显示结果显示 9 个成分的保留时间 RSD 在 0.03%~0.21%，峰面积 RSD 在 0.77%~1.57%，表明仪器精密度良好。

2.3.7 专属性试验 按“2.1.1”项下方法，分别制

表 4 脑心通胶囊 9 种 Q-markers 的线性方程、线性范围、 r 、LOD 和 LOQ

Table 4 Linear equation and range, regressions coefficients, and limits of detection and quantification of nine Naoxintong Capsules Q-markers standards

化合物	保留时间/min	线性方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	LOD/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(μg·mL ⁻¹)
桑皮苷 A	7.609	$Y=1\ 543.2 X-4\ 622.9$	0.999 6	5.05~37.86	3.79	5.05
羟基红花黄色素 A	7.822	$Y=2\ 276.9 X-5\ 151.2$	0.999 6	4.09~30.71	0.61	4.09
芍药苷	9.532	$Y=381.92 X-8\ 552.6$	0.999 6	50.67~380.00	1.90	7.60
阿魏酸	10.332	$Y=8\ 426.5 X-13\ 935$	0.999 5	1.93~14.46	0.29	1.93
毛蕊异黄酮苷	10.761	$Y=4\ 800.8 X+248.63$	0.999 6	0.38~9.38	0.06	0.19
迷迭香酸	13.211	$Y=4\ 115.6 X-14\ 667$	0.999 7	4.31~43.07	0.86	4.31
丹酚酸 B	13.867	$Y=3\ 343.4 X-14\ 380$	0.999 7	4.71~47.14	0.63	4.71
芒柄花素	17.105	$Y=12\ 241 X-35\ 194$	0.999 7	3.57~35.71	0.09	0.48
丹参酮 II _A	23.739	$Y=6\ 730.6 X-4\ 256.1$	0.999 8	1.19~8.93	0.18	1.19

成全复方混合样品溶液、缺黄芪阴性样品溶液，缺丹参阴性样品溶液，缺赤芍阴性样品溶液，缺红花阴性样品溶液，缺川芎、当归阴性样品溶液，缺桑枝阴性样品溶液。以“2.3.2”项下色谱条件，分别精密吸取空白对照溶液，混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液进样分析，9 种活性成分之间互不干扰，理论塔板数符合要求。如图 3 所示，缺黄芪溶液在相应位置上无毛蕊异黄酮苷和芒柄花素色谱峰，缺丹参样品溶液在相应位置上无丹参酮 II_A、丹酚酸 B 和迷迭香酸色谱峰，缺赤芍样品溶液在相应位置上无芍药苷色谱峰，缺红花阴性溶液在相应位置上未见羟基红花黄色素 A 色谱峰，缺川芎、当归样品溶液在相应位置无阿魏酸色谱峰，缺桑枝溶液在相应位置无桑皮苷色谱峰，说明各成分专属性良好。

2.3.8 重复性试验 按“2.1.1”项下供试品制备方法制备 6 份供试品溶液，标号 1~6，精密吸取各供试品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录保留时间和峰面积。结果显示 9 个成分的保留时

间 RSD 在 0.02%~0.30%，峰面积 RSD 在 0.89%~1.63%，表明该方法重复性良好。

2.3.9 稳定性试验 取“2.3.4”项下供试品溶液适量，分别于室温放置 0、3、6、12、18、24、36 h，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录保留时间和峰面积。结果显示 9 个成分保留时间 RSD 在 0.05%~0.82%，峰面积 RSD 在 1.51%~1.86%。

2.3.10 加样回收率试验 精密称定已测定指标成分含量的脑心通胶囊样品 6 份，按照低、中、高 3 个添加水平（80%、100%、120%）进行加标回收测定，以“2.3.2”项下色谱条件平行测定 6 次，记录峰面积并计算加样回收率。结果 9 个成分的 3 个水平的平均回收率范围在 99.28%~101.21%，其 RSD 值范围在 1.23%~1.96%。

2.3.11 含量测定 取 15 批脑心通胶囊样品，每批按“2.3.3”项下分别制备 3 份供试品溶液，进样 5 μ L，记录峰面积，按外标法计算各批样品中各成分的含量平均值，结果见表 5。

表 5 15 批脑心通胶囊样本测定结果 ($n = 3$)

Table 5 Determination results of 15 batches of Naoxintong samples ($n = 3$)

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	桑皮苷 A	羟基红花黄色素 A	芍药苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷	迷迭香酸	丹酚酸 B	芒柄花素	丹参酮 II _A
2018032401	0.345	0.339	3.981	0.261	0.047	0.867	3.908	0.028	0.621
2018032402	0.356	0.336	3.982	0.260	0.050	1.057	3.991	0.028	0.619
2018032403	0.360	0.336	3.926	0.258	0.048	0.866	3.856	0.028	0.612
2018032404	0.346	0.339	3.950	0.263	0.049	0.862	3.944	0.028	0.623
2018032405	0.372	0.334	3.887	0.259	0.049	1.050	3.951	0.027	0.611
2018032406	0.347	0.327	3.912	0.256	0.047	1.035	3.939	0.027	0.607
2018032407	0.243	0.164	3.407	0.232	0.048	1.035	3.710	0.027	0.536
2018032408	0.255	0.167	1.288	0.233	0.050	1.061	3.738	0.028	0.541
2018032409	0.313	0.183	3.241	0.221	0.048	1.033	3.561	0.028	0.516
2018032410	0.380	0.277	2.988	0.174	0.039	0.717	3.389	0.025	0.475
2018032411	0.399	0.286	3.038	0.179	0.041	0.620	3.332	0.025	0.486
2018032412	0.425	0.288	2.908	0.170	0.040	0.592	3.163	0.023	0.454
2018032413	0.399	0.285	3.035	0.177	0.041	0.720	3.434	0.023	0.484
2018032414	0.419	0.282	2.900	0.173	0.040	0.690	3.281	0.023	0.455
2018032415	0.409	0.287	3.025	0.179	0.040	0.608	3.268	0.023	0.476

3 讨论

3.1 脑心通胶囊 Q-markers 辨识技术

中药复方制剂的质量控制是影响临床用药安全的关键因素。由于中药复方的临床疗效是由多个成分控制，协同发挥治疗作用的，说明中药质量是保证中药产品安全有效的核心。而《中国药典》2015

年版一部对脑心通胶囊质量标准控制除了性状鉴定、显微鉴别、薄层色谱鉴别外，仅对其中的赤芍和丹参中的芍药苷、丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 进行了定量测定，说明现行标准测定指标还较为单一，对于其他与药效关联较强的成分未有质控说明，因此建立符合中药配伍理论、生物活性属性和药效学的

质量控制方法是有必要的。根据 Q-marker 的定义^[10], 找到存在于脑心通胶囊中的与其治疗的功能属性密切相关的化学物质, 进行质量控制。在实验研究的基础上, 采用多元统计分析的方法分析批次间的差异化合物, 选定桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素和丹参酮 II_A 作为指标成分, 符合中药复方多成分多靶点起效的特点。

现代药理研究表明, 黄芪中的黄酮类化合物毛蕊异黄酮苷和芒柄花素具有神经保护、血管内皮细胞保护、抗癌、抗氧化、抗骨质疏松、降血糖、抗病毒、改善疲劳等作用^[11-16]。丹参中的酚酸类成分丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参酮 II_A 具有抗炎、抗氧化、保护心血管、调节细胞凋亡、免疫调节、抗多种脏器纤维化等药理作用^[15-18]。赤芍具有保肝、止痛、抗血栓、调血脂等作用, 芍药苷是含量最高的活性成分, 是清热凉血的主要药效物质, 能通过调节花生四烯酸 (AA) 的代谢产物 PGI₂/TXA₂ 的平衡, 改善缺血部位血管的代偿能力, 具有脑保护作用^[19-20]。阿魏酸是当归和川芎中共有的活性成分, 具有较强的抗炎、抗氧化和抗凝作用, 可抑制 β -淀粉样蛋白 (A β_{1-40}) 对神经细胞的毒性和诱导小胶质细胞活化, 降低炎症细胞因子含量, 进改善 AD 患者的临床症状的^[21-24]。桑枝中的主要成分桑皮苷 A 可通过下调致炎系统的因子, 上调抗炎系统的表达, 起到抗炎作用^[25-26]。

3.2 脑心通胶囊 Q-markers “药材-化学成分-通路-靶点-疾病”网络构建

经 Q-markers 的体内靶点预测, 得到与靶点相关的通路, 选取与心脑血管疾病相关的通路进行网络构建, 得到桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素和丹参酮 II_A 为代表的脑心通质控标志物可以作用于 5 个关键蛋白靶点, 即 PTGIS (PubGene ID: 5740)、PTGS2 (PubGene ID: 5743)、CHRNA10 (PubGene ID: 57053)、ENPP1 (PubGene ID: 5167)、ADORA2A (PubGene ID: 135) 和 8 条信号通路, 如花生四烯酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、脂肪细胞因子信号通路等。基于“化合物-通路-疾病”网络构建结果发现, 这些靶点及通路多数都与心脑血管有关, 因此可确定这 9 种化合物作为脑心通胶囊质控的 Q-makers。

4 结论

中药复方的临床疗效是其多个活性成分交互

作用的综合体现, 而不是单一化学成分的单独作用。因此, 本研究采用多元统计分析结合网络药理学筛选脑心通胶囊质控成分。基于脑心通胶囊“脑心同治”的用药规律及潜在作用信号通路, 分析得出桑皮苷 A、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花素和丹参酮 II_A 这 9 个化合物为核心质控指标, 其作用的潜在信号靶点和脂质代谢、免疫应答、氧化应激等通路密切相关, 也是决定脑心通胶囊临床疗效的关键。另一方面, 基于 UPLC 技术所优选的同时定量方法, 能从“系统质效应”角度质控可靠的药效成分, 所建立的方法稳定可行, 为该方的进一步开发提供了数据支持。

综上所述, 本研究采用文献研究结合网络药理学的方法, 为中医药治疗胸痹用药规律和作用机制研究提供了一种新的研究策略。

参考文献

- [1] Song S W, Hai Y X, Yan M, *et al.* Characterization and rapid identification of chemical constituents of NaoXinTong capsules by UHPLC-linear ion trap/orbitrap mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111(1): 104-118.
- [2] Ma X, Lv B, Li P, *et al.* Identification of “multiple components-multiple targets-multiple pathways” associated with naoxintong capsule in the treatment of heart diseases using UPLC/Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. *Evid Based Compl Alt Med*, 2016, 2016(12): 1-15.
- [3] Ma Y, Zhao P, Zhu J Q, *et al.* Naoxintong protects primary neurons from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016(11): 1-12.
- [4] 江振作, 王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标志物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4127-4133.
- [5] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [6] 汤化琪, 梁瑞敏, 陈宇, 等. BATMAN-TCM 在线分析工具预测玄胡索散治疗骨关节炎作用及初步验证研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018(1): 142-145.
- [7] 李耿, 孟繁蕴, 杨洪军, 等. UPLC 法同时测定脑心通胶囊中 5 个成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(3): 414-418.

- [8] Eriksson L, Trygg J, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS[®] models [J]. *J Chem*, 2010, 22(11/12): 594-600.
- [9] Liu Z Y, Guo F F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(21146): 1-11.
- [10] Tian Z, Liu S B, Wang Y C, *et al.* Neuroprotective effects of formononetin against NMDA-induced apoptosis in cortical neurons [J]. *Phytotherapy Res*, 2013, 27(12): 1770-1775.
- [11] 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.
- [12] Wu J M, Xiao K, Na M, *et al.* Formononetin, an active compound of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge, inhibits hypoxia-induced retinal neovascularization via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Drug Design Devel Therapy*, 2016, 10 (1): 3071-3081.
- [13] Liu Q, Sun Y, Zheng J M, *et al.* Formononetin sensitizes glioma cells to doxorubicin through preventing EMT via inhibition of histone deacetylase 5 [J]. *Inter J Clin Exper Pathol*, 2015, 8(6): 6434-6441.
- [14] Li T, Zhao X, Mo Z, *et al.* Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem Inter J Exper Cell Phys Biochem Pharm*, 2014, 34(4): 1351-1358.
- [15] Adesso S, Russo R, Quaroni A, *et al.* *Astragalus membranaceus* extract attenuates inflammation and oxidative stress in intestinal epithelial cells via NF- κ B activation and Nrf2 response [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 800-814.
- [16] Li S, Dang Y, Zhou X, *et al.* Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor α -enhanced ROCK pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(16815): 1-17.
- [17] 闫俊, 冯娟, 杨雪, 等. 丹参酮 II_A 的药理作用及疾病治疗的最新进展 [J]. *实用药物与临床*, 2015(8): 972-977.
- [18] Li J, Zheng Y, Li M X, *et al.* Tanshinone II_A alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulating TRPM7 and pro-inflammatory factors [J]. *J Cell Molecul Med*, 2017, 22(1): 646-654.
- [19] Guo R B, Wang G F, Zhao A P, *et al.* Paeoniflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats via inhibiting MAPKs/NF- κ B-Mediated inflammatory responses [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49701.
- [20] 饶梦琳, 唐蜜, 何锦悦, 等. 芍药苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑血流量及 PGI₂/TXA₂ 平衡的影响 [J]. *药理学学报*, 2014, 49(1): 55-60.
- [21] 杨荣兵, 周惠芬, 张宇燕, 等. 葛根素与阿魏酸单用及联合应用在局灶性脑缺血模型大鼠体内药动学研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2759-2763.
- [22] Wang H, Sun X, Zhang N, *et al.* Ferulic acid attenuates diabetes-induced cognitive impairment in rats via regulation of PTP1B and insulin signaling pathway [J]. *Physiol Behav*, 2017, 182(1): 93-100.
- [23] Zhu J, Yang H, Chen Y, *et al.* Synthesis, pharmacology and molecular docking on multifunctional tacrine-ferulic acid hybrids as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33(1): 496-506.
- [24] 孟锐, 陈逸青, 陈勤. 阿魏酸对痴呆小鼠脑内胶质细胞活化与炎性细胞因子表达的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2018(1): 50-53.
- [25] 凌霜, 张洪平, 章丹丹, 等. 桑枝不同溶剂提取物对血小板聚集、血管舒张及巨噬细胞活化的不同作用 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(22): 3024-3028.
- [26] 章丹丹, 唐宁, 华晓东, 等. 桑枝提取部位及其组合对巨噬细胞炎症介质的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(2): 186-192.