

基于“谱-效-代”关联的参枝苓口服液质量标志物的初步研究

刘肖雁¹, 姜文文¹, 蒋海强², 苏美¹, 孙越¹, 臧恒昌^{1,3}, 曾英姿⁴, 聂磊^{1*}

1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012

2. 山东中医药大学 实验中心, 山东 济南 250300

3. 国家糖工程技术研究中心, 山东 济南 250012

4. 山东沃华医药科技股份有限公司, 山东 潍坊 261000

摘要:目的 建立基于“谱-效-代”关联的参枝苓口服液(SZL)质量标志物(Q-marker)研究策略。方法 测定 12 批次 SZL 的 HPLC 指纹图谱和乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制活性, 采用正交信号校正-偏最小二乘回归(OSC-PLSR)分析方法建立 HPLC 指纹图谱和 AchE 抑制作用之间的谱效关系, 结合网络药理学, 确定药效相关成分; 通过血清药物化学鉴定入血成分, 确定药效活性成分; 关联整合药效相关成分和药效活性成分, 综合分析, 挖掘 Q-marker。结果 OSC-PLSR 分析结果确定了 3 个药效相关成分与 AchE 抑制作用密切相关; 网络药理学映射与阿尔茨海默病(AD)相关的疾病靶点确定了 61 个药效相关成分; 通过 UHPLC-Q Exactive 高分辨液质联用技术鉴定了血浆中 11 个药效活性成分; 关联整合综合分析初步确定 SZL 的 Q-marker 为芹糖甘草苷、芍药内酯苷和壬二酸。结论 谱效关系、网络药理学和入血成分鉴定的结合是一种快速分析及发现 SZL Q-marker 的有效方法, 对于完善中药质量控制和评价方法, 保证中药的安全和有效具有重要意义。

关键词:参枝苓口服液; 质量标志物; 谱效关系; 网络药理学; 血清药物化学; 芹糖甘草苷; 芍药内酯苷; 壬二酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4603-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.012

Preliminary discovery of quality marker (Q-marker) of Shenzhiling Oral Liquid based on “fingerprint-efficacy-pharmacokinetics” correlation

LIU Xiao-yan¹, JIANG Wen-wen¹, JIANG Hai-qiang², SU Mei¹, SUN Yue¹, ZANG Heng-chang^{1,3}, ZENG Ying-zi⁴, NIE Lei¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

2. Experiment Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China

3. National Glycoengineering Research Center, Jinan 250012, China

4. Shandong Wohua Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Weifang 261000, China

Abstract: Objective To establish a research strategy for discovering quality marker (Q-marker) of Shenzhiling Oral Liquid based on the “fingerprint-efficacy-pharmacokinetics” correlation. **Methods** HPLC fingerprints and acetylcholinesterase (AchE) inhibitory activities of 12 batches of Shenzhiling Oral Liquid were analyzed. The correlation analysis between the HPLC fingerprints and AchE inhibitory effects were carried out with orthogonal signal correction-partial least squares regression (OSC-PLSR) method. Combined with network pharmacology, efficacy-related components were determined. By identifying the compounds absorbed and exposed *in vivo*, pharmacologically active components were determined. Finally, Q-marker could be preliminarily discovered by the comprehensive analysis associated with the integration of efficacy-related components and pharmacologically active ingredients. **Results** The results of OSC-PLSR analysis showed that three efficacy-related components were closely related to AchE inhibitory activities. According to mapping the targets of diseases, 61 efficacy-related components were determined. Eleven active compounds in plasma were identified by UHPLC-quadrupole-orbitrap-MS. The Q-markers of Shenzhiling Oral Liquid were liquiritin apioside, albiflorin and azelaic acid preliminarily determined by integrated and comprehensive analysis. **Conclusion** The combination of fingerprint-efficacy relationship, network pharmacology and components absorbed in plasma could be an effective way for rapid

收稿日期: 2019-08-08

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201010); 山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1405); 山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1411)

作者简介: 刘肖雁(1995—), 女, 在读硕士, 从事中药现代质量控制方法研究。Tel: 15064087590 E-mail: 770831774@qq.com

*通信作者 聂磊 Tel: (0531)88382330 E-mail: nielei2004@sdu.edu.cn

analysis and discovery of Q-marker in Shenzhiling Oral Liquid, which will be of great significance both to improve the quality control and evaluation, and ensure the safety and effectiveness of traditional Chinese medicines.

Key words: Shenzhiling Oral Liquid; Q-marker; fingerprint-effect relationship; network pharmacology; serum pharmacochimistry; liquiritin apioside; albiflorin; azelaic acid

中药用于预防和治疗疾病已有几千年的历史, 由于其可靠的治疗效果, 极小的副作用和罕见的药物耐受性, 在国际范围内受到越来越多的关注和重视^[1]。在近期召开的“重大新药创制”科技重大专项新闻发布会上, 中药现代化是重要组成部分。中药发挥疗效是多成分、多靶点共同作用的结果, 仅用一种或几种已知的指标成分来评价由数百种甚至更多化学成分组成的中药的质量是不全面的。中药的质量控制是制约中药现代化发展的关键问题^[2]。中药质量标志物(Q-marker)的提出^[3], 为中药质量控制研究指明了方向, 为此提出一种基于“指纹图谱-药效-药物代谢(谱-效-代)”关联挖掘 Q-marker 的研究策略。中药指纹图谱能比较全面地反映中药所含化学成分的种类与数量, 在现阶段绝大多数有效成分没有明确的情况下, 能更好地从整体上反映中药的内在质量^[4-5]。谱效关系研究侧重于指纹图谱特征和药效学数据之间的相关性, 同时考虑用化学成分和生物活性来评估中药的质量。通过谱效关系模型, 可以确定中药中各成分对药效贡献的大小, 从而发现真正反映中药内在质量的药效相关成分^[6]。网络药理学利用数据库寻找与疾病相关的靶点并预测中药化学成分的作用靶点, 将 2 组靶点关联映射, 找到治疗疾病可能的作用靶点对应成分, 这些成分即可能为药效相关成分^[7]。然而, 上述研究并未包

括药物的体内过程分析, 多数情况下, 只有能被机体吸收, 能够足浓度、足时间作用于靶点的成分才是真正起治疗作用的成分^[8], 因此需要分析、鉴定入血成分, 确定潜在的药效活性成分。通过关联整合药效相关成分和潜在的药效活性成分, 挖掘 Q-marker 的候选成分, 对这些候选成分的药效活性及作用机制进一步验证和阐释, 最终确定评价中药质量代表性的 Q-marker。

参枝苓口服液(SZL)由党参、桂枝、白芍、甘草(蜜炙)、茯苓、干姜、远志(制、炒)、石菖蒲、龙骨、牡蛎 10 味药组成, 具有益气温阳、化痰安神之功, 用于治疗轻中度阿尔茨海默病(AD)心气不足证^[9]。目前 SZL 的质量标准中只有肉桂酸和芍药苷作为定量指标^[10], 质控指标单一、与药效关联性不强, 难以全面反映其质量, 需要建立与安全性和有效性密切相关的质量控制方法和标准。近年来, 斑马鱼在研究 AD 的病因及发病机制方面成为新型流行的模式生物。研究发现, AD 模型斑马鱼中乙酰胆碱酯酶(AchE)活性会增强, 使得乙酰胆碱水平降低, 从而影响中枢胆碱能神经系统功能, 导致记忆力减退, 因此本研究选择 SZL 的 AchE 抑制活性作为药效指标进行谱效关系研究。根据 Q-marker 的概念与核心理论, 提出一种基于“谱-效-代”关联的挖掘 SZL Q-marker 的研究策略(图 1),

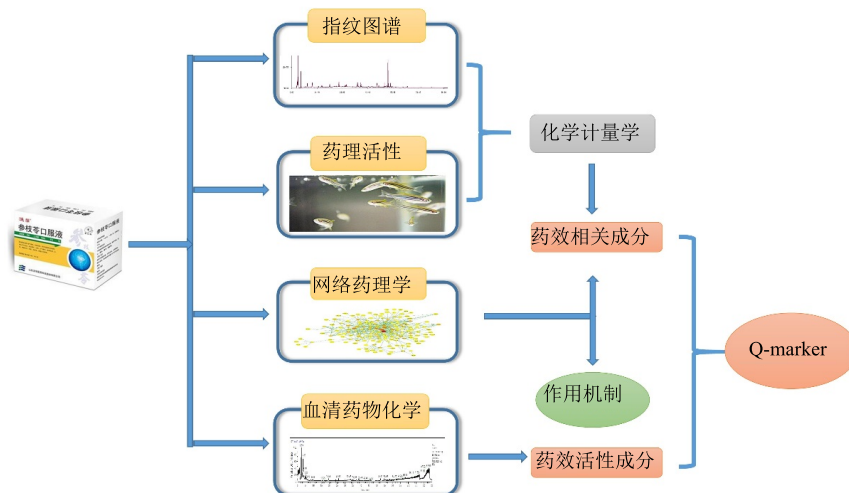


图 1 SZL Q-marker 的研究策略

Fig. 1 Strategy of discovery of Q-marker of SZL

即基于谱效关系和网络药理学发现药效相关成分, 基于血清药物化学研究发现潜在的药效活性成分, 通过谱效关系模型验证及网络药理学的作用机制阐释, 综合分析初步确定该药的 Q-marker, 为该药质量标准的提升和完善提供依据, 同时也为中药 Q-Marker 的研究提供思路。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱、Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SZX7 型解剖显微镜, 日本 Olympus 公司; CP214 型精密电子天平, 美国 Ohaus 公司; Mithras LB940 型多功能酶标仪, 德国 Berthold Technologies 公司; KQ2200DB 型超声波清洗器, 中国昆山超声仪器有限公司。

1.2 药品与试剂

12 批 SZL (10 mL/支), 山东沃华医药科技股份有限公司生产, 批号分别为 5230301 (S1)、5250101 (S2)、5250102 (S3)、5250403 (S4)、5250404 (S5)、5250705 (S6)、5250706 (S7)、5260503 (S8)、5270102 (S9)、5271204 (S10)、5280201 (S11)、5280502 (S12); 乙腈和甲醇为色谱纯 (美国 Tedia 公司); 色谱纯甲酸 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 其他试剂为分析纯; 盐酸多奈哌齐片 (中国卫材药业有限公司, 批号 1702012); 六水合氯化铝 (上海晶纯实业有限公司); 二甲基亚砜 (法国 Sigma 公司)。

1.3 实验动物

健康 Wistar 雄性大鼠 12 只, 体质量 250~300 g, 购自山东大学实验动物中心, 使用许可证号 SYXK (鲁) 2013-0001。野生型 AB 品系斑马鱼 690 尾, 年龄受精后 4 d (4 dpf), 为杭州环特生物科技股份有限公司提供, 使用许可证号 SYXK (浙) 2012-0171。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密量取 SZL 0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至近刻度, 超声处理 (功率 500 W, 频率 50 kHz) 5 min, 4 °C 放置 30 min, 恢复至室温后滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 HPLC 指纹图谱的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Synergi Hydro-RP 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 4 μm); 流动

相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱条件为 0~10 min, 5%~10%乙腈; 10~30 min, 10%~25%乙腈; 30~45 min, 25%~35%乙腈; 45~52 min, 35%~45%乙腈; 52~65 min, 45%~60%乙腈; 65~70 min, 60%~70%乙腈; 70~80 min, 70%~95%乙腈; 80~90 min, 95%~5%乙腈; 体积流量为 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 15 μL; 检测波长为 254 nm。

2.2.2 指纹图谱的测定 取 12 批 SZL (S1~S12), 按照“2.1”项下方法制备供试品溶液, 以“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 记录 HPLC 指纹图谱。

2.3 SZL 对 AchE 的抑制作用

2.3.1 最大检测浓度 (MTC) 确定 随机选取斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 30 尾, 用 140 μmol/L AlCl₃ 诱导斑马鱼 AD 模型, 分别给予由超纯水稀释的 SZL (S11) 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2 μL/mL, 加入培养用水至 3 mL, 同时设置对照组和模型组。药物处理斑马鱼 2 d 后, 观察记录斑马鱼的死亡情况, 以斑马鱼无死亡时的最大浓度为 SZL 对斑马鱼 AchE 抑制作用的 MTC。

2.3.2 SZL 对 AchE 抑制作用评价 随机选取斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 30 尾, 用 140 μmol/L AlCl₃ 诱导斑马鱼 AD 模型, 分别给予 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12 样品 0.25 μL/mL 和 8 μmol/L 多奈哌齐, 加入培养用水至 3 mL, 同时设置对照组和模型组。给药 2 d 后, 利用 AchE 试剂盒检测 AchE 荧光强度, 评价 SZL 对 AchE 的抑制作用。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{样品组荧光强度}}{\text{模型组荧光强度}}$$

2.4 网络药理学研究

2.4.1 SZL 化学成分及其靶点的确定 课题组前期工作已通过 GC-MS 和 HPLC-MS 共鉴定 64 个化合物^[11], 通过 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测这些化合物的作用靶点。

2.4.2 疾病靶点的确定 通过 TTD 数据库 (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、Drugbank 数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 和 DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) 收集与 AD 相关的疾病靶点。

2.4.3 化合物-靶点网络的构建 将 2 组靶点映射, 找到化合物作用于与 AD 相关的疾病靶点, 这些成分即可能为药效相关成分。将化合物与 AD 相关的

靶点上传至 Cytoscape 3.2.1 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 生成体现化合物-靶点相互作用的网络, 以探究 SZL 的药理作用机制。

2.4.4 基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 采用 ClueGO 插件对靶点进行 KEGG 通路富集分析, 说明化合物的靶点在信号通路中的作用, 以 P 值 < 0.01 筛选得到 SZL 在治疗 AD 中的主要作用通路, 通过 R 软件 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 对富集分析结果进行可视化处理。

2.5 入血成分分析

2.5.1 给药及采血方法 取 12 只雄性大鼠, 对照组 6 只, 给药组 6 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮水, 给药组 ig 给予 SZL (S12) 20 mL/kg, 对照组 ig 给予等量蒸馏水, 分别于给药后 0.25、0.5、1、2、3 h 颈静脉采血, 置于肝素化管内, 5 000 r/min 离心 5 min 分离血浆, 上清液储存在 -80°C 至分析。

2.5.2 血浆样品的制备 取血浆 100 μL , 加入乙腈 200 μL , 涡旋混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.6 成分鉴定

2.6.1 色谱条件 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 其他色谱条件与“2.2.1”项下条件一致。

2.6.2 质谱条件 离子源为 HESI 源, 负离子检测模式, 鞘气体积流量 45 L/min; 辅助气体流量 10 L/min; 喷雾电压 3.00 kV; 离子传输管温度 350°C ; 辅助气温度 350°C ; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 80~1 200。MS/MS 模式时, 所用碰撞能为阶梯能量 10、30、70 eV。

成分鉴定 取 SZL (S12) 样品和“2.5.1”项制得的血浆样品, 以“2.6.1”和“2.6.2”项下条件分析, 进行化合物鉴定。

2.7 数据分析

采用 SPSS 16.0 统计软件处理统计资料数据, 采用 SIMCA 12.0 (Umetrics) 进行 OSC-PLSR 分析, 采用 Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific) 进行化合物鉴定。

3 结果

3.1 SZL 的指纹图谱

在前期的工作中, 本课题组已开发了 SZL 指纹图谱的构建方法并进行了验证^[12]。本研究将得到的指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年版), 以 S1 为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1 min, 2 点校正后, 根据匹配结果确定 21 个共有峰, 并生成对照指纹图谱, S1~S12 指纹图谱及对照指纹图谱 (R) 见图 2。比对对照品和对应的紫外光谱, 确定 12、13、14、18、20 号色谱峰分别为芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、肉桂酸和甘草酸铵。

3.2 SZL 对 AchE 抑制作用

3.2.1 MTC 的确定 采用 S11 样本 0.062 5、0.125、0.25 $\mu\text{L/mL}$ 进行实验, 并未引起斑马鱼死亡; 在 0.5 $\mu\text{L/mL}$ 时, 斑马鱼死亡 19 尾, 死亡率为 63.3%; 在 1、2 $\mu\text{L/mL}$ 时, 斑马鱼全部死亡。故确定 SZL 对斑马鱼 AchE 抑制作用的 MTC 为 0.25 $\mu\text{L/mL}$ 。

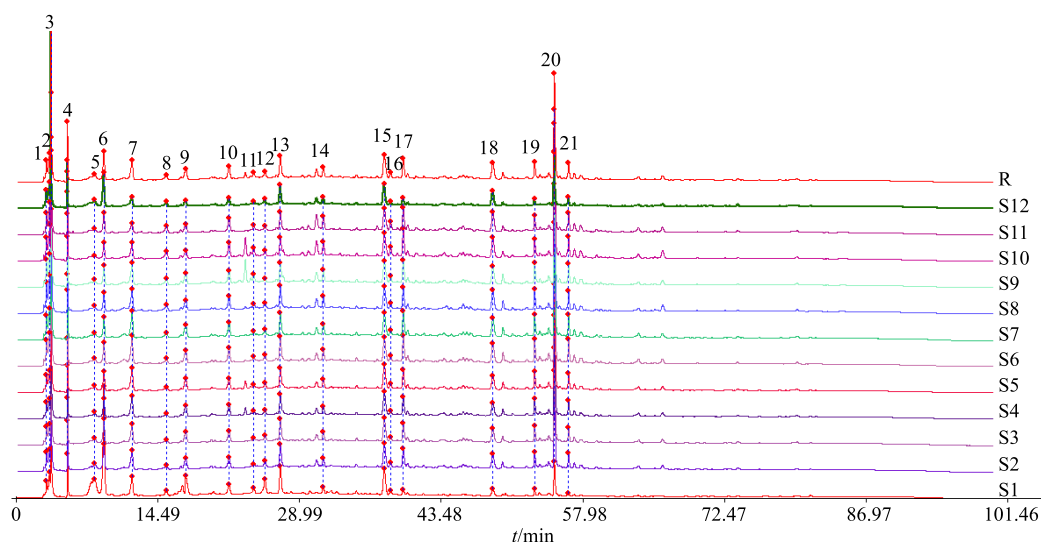


图 2 12 批次 SZL 的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 12 batches of SZL and reference fingerprint

3.2.2 SZL 对 AchE 抑制作用评价 12 批次 SZL 对 AchE 的抑制作用结果见表 1, 各实验组的荧光强度均小于模型组, 表明 SZL 对 AD 斑马鱼的 AchE 具有抑制作用。同时, 各批次样本的 AchE 抑制作用也不相同, 存在一定差异。

表 1 SZL 对 AchE 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Inhibitory effects of SZL on AchE activity ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度	荧光强度	抑制率/%
对照	—	43 914 ± 1 695	—
模型	—	66 285 ± 2 644 ^{##}	—
多奈哌齐	8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	49 936 ± 4 963 [*]	24.7
S1	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	38 744 ± 3 680 ^{***}	41.5
S2	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	38 664 ± 1 853 ^{***}	41.7
S3	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	44 484 ± 4 556 ^{***}	32.9
S4	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	37 557 ± 1 998 ^{***}	43.3
S5	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	48 719 ± 4 760 ^{**}	26.5
S6	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	41 224 ± 1 683 ^{***}	37.8
S7	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	42 150 ± 7 294 ^{**}	36.4
S8	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	35 394 ± 1 780 ^{***}	46.6
S9	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	48 044 ± 4 085 ^{**}	27.5
S10	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	49 781 ± 4 897 [*]	24.9
S11	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	40 331 ± 2 000 ^{***}	39.2
S12	0.25 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$	44 830 ± 4 205 ^{***}	32.4

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

3.3 SZL 谱效关系模型的建立与验证

要建立 SZL 谱效关系模型, 需要将 12 批次 SZL 样本进行划分。SPXY 是一种性能较好的样本集划分方法^[13], 采用该法选择 9 个批次样本作为校正集, 剩余 3 个批次作为验证集用于验证。采用 SIMCA-P 12.0 处理软件将 SZL 指纹图谱 21 个共有峰的峰面积与药效指标 AchE 抑制率先通过偏最小二乘回归 (PLSR) 进行关联分析, Q^2 均小于 0, 表明建立的

谱效关系模型无统计学意义。这可能是因为 SZL 体系复杂, 其指纹图谱中包含了较多的干扰信息。正交信号校正 (orthogonal signal correction, OSC) 是一种数据预处理方法, 可以滤出与 AchE 抑制活性无关的信息。通过 OSC 处理后, 采用 PLSR 方法建立 SZL 指纹图谱与 AchE 抑制作用的谱效关系, 利用交叉验证方法 (cross validation) 对模型参数进行优化, 结果见表 2。 R^2 表示模型与数据的拟合程度, 通常 R^2 越大 (接近 1) 表明越可能得到一个较好的模型。 Q^2 表示模型的交叉验证预测性能, 其值越大 (一般 > 0.5) 表明模型的预测性能越好。当 OSC 成分数为 2 且 PLS 成分数为 2 时, 模型的 Q^2 值较大, 且累计的 R^2_Y 也最大, 此时模型的参数最优。

基于优化的 OSC-PLSR 模型计算的指纹图谱各共有峰的标准化回归系数和变量投影重要性 (VIP) 结果见图 3 和 4。由图 3 可知, SZL 指纹图谱中 3、4、5、6、8、9、12、13、14 号色谱峰与 AchE 抑制作用呈正相关, 说明这些色谱峰的峰面积增加, 样品的 AchE 抑制作用将会增强。其中 4、5、6、12 号峰更具有统计学意义, 而 3、8、9、13、14 号峰因置信区间过零点, 无显著性意义。1、2、7、10、11、15、16、17、18、19、20 和 21 号色谱峰与 AchE 抑制作用呈负相关, 其中 2、17、20 和 21 号峰具有统计学意义。VIP 是用于评价模型自变量对因变量重要性的指标, 其值越大表示该变量与因变量的贡献越大。一般将 VIP 值大于 1 作为变量选择的标准, 认为该变量 (指纹图谱色谱峰) 对因变量 (AchE 抑制作用) 具有显著性影响^[14-15]。由图 4 可知, 6、20 和 5 号色谱峰的 VIP 值大于 1, 这些峰对 AchE 抑制作用有显著影响。综合标准化回归系数图和 VIP 图, 色谱峰 5 和 6 与 AchE 抑制作用呈显著正相关作用, 色谱峰 20 与 AchE 抑制作用呈显著负相关作用。

将建立的优化 OSC-PLSR 模型用于验证集样本的 AchE 抑制活性预测, 结果见图 5。

表 2 OSC-PLS 模型优化结果
Table 2 Optimized results of OSC-PLS model

分析方法	OSC 成分数	PLS 成分数	累计 R^2_X	累计 R^2_Y	Q^2	统计学意义
PLSR	0	5	0.986	0.812	-0.484	无
OSC-PLSR	1	3	0.890	0.965	0.856	有
	2	2	0.658	0.975	0.900	有

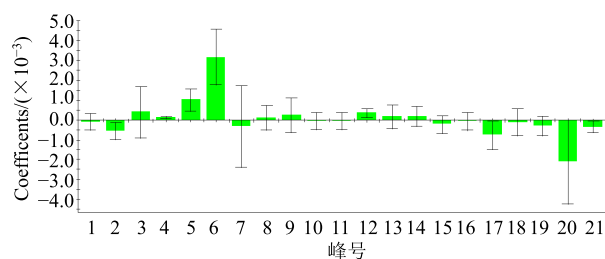


图 3 OSC-PLSR 标准化回归系数图

Fig. 3 Coefficient plot of OSC-PLSR model

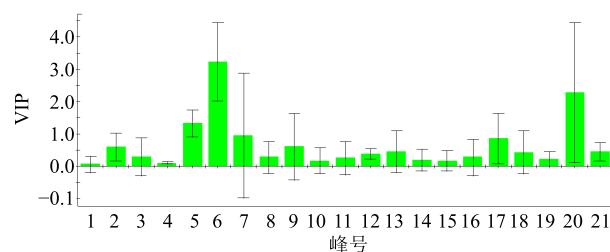


图 4 OSC-PLSR 分析的变量重要性

Fig. 4 VIP plot of OSC-PLSR model

由图 5 可见, 校正集及验证集样本 (S2、S7 和 S9) 的模型预测值与参考值相关性均较好 ($R^2_Y =$

0.843), 说明建立的模型能够通过样本的指纹图谱预测 AchE 抑制活性。

比对对照品和对应的紫外光谱, 确定 20 号峰为甘草酸铵, 甘草酸铵可以提高 AchE 的活性^[16], 与谱效关系得到的结果一致。由此可见, 通过 OSC-PLSR 模型能够找到与 AchE 活性相关的成分, 使得 SZL 的质量评价与药效的关联性增强, 对 SZL 质量标准的完善具有参考意义。

3.4 基于网络药理学筛选药效相关成分

3.4.1 药效相关成分的确定 将已鉴定的 64 个化合物的作用靶点与 AD 相关的 183 个疾病靶点进行映射, 找到 61 个化合物作用于该疾病的靶点, 这 61 个化合物即可能为药效相关成分, 见表 3。

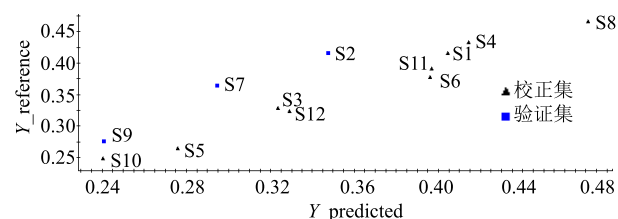


图 5 OSC-PLSR 的模型预测结果

Fig. 5 Predicted results of OSC-PLSR model

表 3 SZL 中 61 个药效相关成分

Table 3 Sixty-one efficacy-related components of SZL

编号	化合物名称	编号	化合物名称	编号	化合物名称
SZL-1	芍药内酯苷	SZL-22	2-庚醇	SZL-43	1,6-二羟基-3,7-二甲氧基吡喃
SZL-2	肉桂酸	SZL-23	醋酸丁酯	SZL-44	甘草查耳酮 B
SZL-3	甘草苷	SZL-24	异甘草酚	SZL-45	壬二酸
SZL-4	芍药苷	SZL-25	甘草香豆素	SZL-46	苯乙醛
SZL-5	细叶远志苷 A	SZL-26	甘草素	SZL-47	邻苯二甲酸丁基 2-戊基酯
SZL-6	lobetyolinin	SZL-27	芹糖甘草苷	SZL-48	柏木烯-9-醇
SZL-7	邻苯二甲酸二丁酯	SZL-28	熏衣草醇	SZL-49	β -倍半水芹烯
SZL-8	没食子酸	SZL-29	9-十八碳烯酸乙酯	SZL-50	肉桂醛
SZL-9	5-甲基-2-(1-甲基乙基)环己酮	SZL-30	α -细辛脑	SZL-51	氧化芳樟醇
SZL-10	3-甲基环己酮	SZL-31	姜烯	SZL-52	2-乙酰基呋喃
SZL-11	棕榈酸乙酯	SZL-32	β -石竹烯	SZL-53	苯甲醛
SZL-12	甲基丁香酚	SZL-33	顺式香芹酮	SZL-54	2,2'-亚甲基双(6-叔丁基对甲酚)
SZL-13	丹皮酚	SZL-34	[1R-(1 α ,2 β ,5 α)]-5-甲基-2-(1-甲乙烯基)环己醇	SZL-55	D-柠檬烯
SZL-14	1-甲基-4-(1-甲基乙基)环己醇	SZL-35	戊酸叶醇酯	SZL-56	芳樟醇
SZL-15	左薄荷脑	SZL-36	α -松油醇	SZL-57	亚油酸乙酯
SZL-16	3-甲基苯乙酮	SZL-37	芳樟醇 3,7-二甲-1,6-辛二烯-3-醇沉香醇胡荽油醇	SZL-58	乙酸龙脑
SZL-17	异龙脑	SZL-38	桉叶油醇	SZL-59	糠醇
SZL-18	薄荷酮	SZL-39	甲基庚烯酮	SZL-60	3,7,11-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇
SZL-19	苯乙酮	SZL-40	夏佛塔苷	SZL-61	糠醛
SZL-20	3-辛醇	SZL-41	2-甲基-1-庚烯		
SZL-21	2-甲基-1-庚烯	SZL-42	6-甲基-5-庚烯-2-酮		

3.4.2 SZL 化合物-靶点相互作用网络 利用 Cytoscape 3.2.1 软件将 61 个化合物与其靶点建立化合物-靶点相互作用网络, 结果见图 6。化合物-靶点网络共包括 61 个化合物节点和 109 个靶点节点。其中菱形节点代表化合物, 圆形节点代表化合物对应的作用靶点, 节点颜色按自由度大小由黄到红渐变, 每条边表示化合物与靶点之间的相互作用关系。有 14 个化合物的作用靶点 ≥ 10 个; 在 109 个潜在靶点中, 有 35 个靶点与 3 个以上化合物连接, 体现了 SZL 多成分与多靶点共同作用的机制, 符合中药的作用特点。

3.4.3 KEGG 通路富集分析 对 SZL 化合物-靶点网络涉及的 109 个靶点蛋白进行 KEGG 通路富集分析, 以 P 值 <0.01 筛选得到 18 条 SZL 治疗 AD 的主要作用通路, 表明 SZL 的有效成分可能通过作用于这些信号通路来治疗 AD。R 软件富集分析结果见图 7, 图中气泡大小表示该条通路上的富集基因数, 气泡越大越说明富集的基因数越多。气泡颜色差异表示靶点在该条通路的富集程度, 颜色越红表明富集程度越高。富集程度高且富集基因数较多的通路是神经配体-受体相互作用的信号通路 (neuroactive ligand-receptor interaction)。

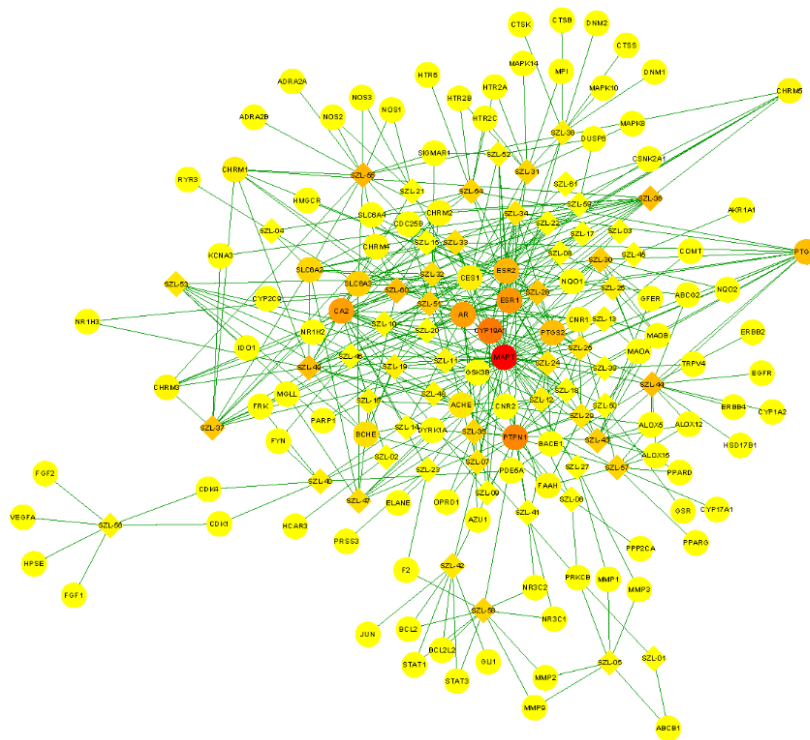


图 6 化合物-靶点相互作用网络
Fig. 6 Compound-target network of SZL

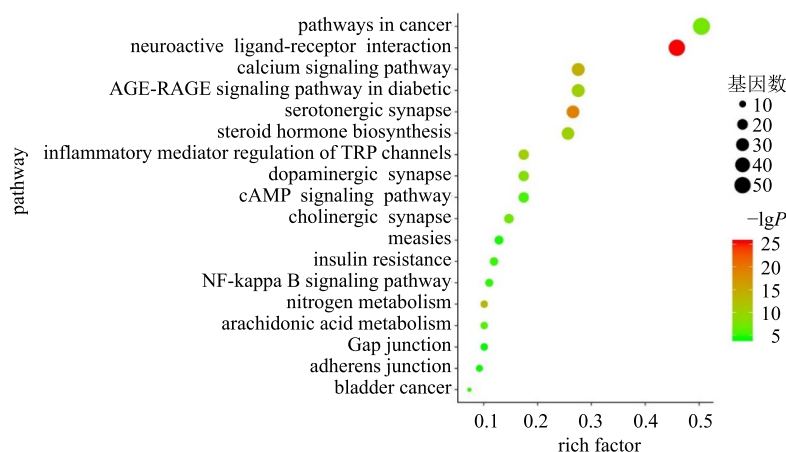


图 7 KEGG 作用机制分析
Fig. 7 KEGG mechanism analysis

3.5 指纹图谱和入血成分的质谱分析

采集 SZL 质谱信息,通过 Compound Discoverer 对指纹图谱中的 5 和 6 号色谱峰进行匹配,初步判断 10.01 min 的 5 号色谱峰为 5-羟甲基-2-糠醛,匹配度为 88.7%; 13.96 min 的 6 号色谱峰为 *L*-天冬氨酸基-*L*-苯丙氨酸,匹配度为 91%。

通过对 5 个采血时间点的血浆样品进行分析,发现大鼠 ig 给予 SZL 0.25 h 时血浆样品的总离子流图离子强度最大,故采用给药后 0.25 h 的血浆样品进行入血成分分析。通过比对 SZL、大鼠给药血浆及空白血浆样品的色谱图(图 8),筛选 ig 给予 SZL

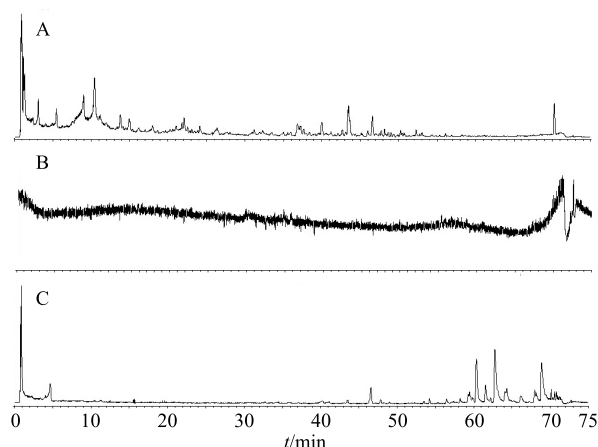


图 8 SZL 样品 (A)、空白血浆 (B) 及含药血浆 (C) HPLC-MS 总离子流图

Fig. 8 Total ion chromatogram of SZL (A), blank plasma (B), and plasma containing drug (C)

后大鼠血浆中吸收的成分。结合文献信息^[11,17-20],血浆样品中共鉴定 11 个化合物,包括 1 个糖类、2 个酯类、5 个酚酸类、1 个氨基酸、1 个苷类和 1 个黄酮类,结果见表 4,这些成分可能为 SZL 潜在的活性成分,并与药理作用直接相关。

以芹糖甘草苷为例来说明鉴定过程,化合物 **10** 以 m/z 549.161 9 $[M-H]^-$ 为准分子离子峰,经裂解后丢失 1 分子木糖 (m/z 132) 生成碎片离子 m/z 417 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$,再丢失 1 分子葡萄糖 (m/z 162) 生成碎片离子 m/z 255 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$,推测该化合物的相对分子质量为 550,拟合出的分子式为 $C_{26}H_{30}O_{13}$,鉴定该化合物为芹糖甘草苷。

3.6 整合分析

通过建立 SZL 指纹图谱和 AchE 抑制作用之间的谱效关系模型并结合质谱的鉴定结果,初步确定 3 个药效相关成分,5-羟甲基-2-糠醛和 *L*-天冬氨酸基-*L*-苯丙氨酸与 AchE 抑制作用呈显著正相关,甘草酸铵与 AchE 抑制作用呈显著负相关。这些成分与 AchE 抑制作用密切相关,是该药物的固有成分且可以用现代分析技术进行测定。基于指纹图谱质谱分析,结合网络药理学确定芹糖甘草苷、芍药内酯苷和壬二酸等 61 个与 AD 相关的药效相关成分,这些成分与 AD 的靶点关联性强,同时也是该药物的固有成分。整合 2 类实验,共确定 64 个药效相关成分。

通过血清药物化学鉴定芹糖甘草苷、芍药内酯

表 4 入血成分鉴定结果

Table 4 Identification of compounds absorbed and exposed *in vivo*

编号	t_R/min	化合物	分子式	母离子 (m/z)	理论值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	子离子 (m/z)
1	0.85	<i>D</i> -(+)-甘露糖	$C_6H_{12}O_6$	179.056 3 $[M-H]^-$	179.056 1	1.12	161 $[M-H-H_2O]^-$
2	1.40	原儿茶酸-3- <i>O</i> -硫酸酯	$C_7H_6O_7S$	232.977 1 $[M-H]^-$	232.976 1	4.29	153 $[M-H-SO_3]^-$
3	3.00	原儿茶酸	$C_7H_6O_4$	153.019 2 $[M-H]^-$	153.019 3	-0.65	109 $[M-H-CO_2]^-$
4	3.20	3,4-二- <i>O</i> -甲基没食子酸硫酸酯	$C_9H_{10}O_8S$	277.002 4 $[M-H]^-$	277.002 4	0	197 $[M-H-SO_3]^-$
5	4.04	色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	203.083 1 $[M-H]^-$	203.082 6	2.46	186 $[M-H-NH_3]^-$, 159 $[M-H-CO_2]^-$, 142 $[M-H-NH_3-CO_2]^-$, 116 $[C_8H_6N]^-$
6	6.41	芍药内酯苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.161 8 $[M+HCOO]^-$	525.160 3	2.86	449 $[M-HCH_2O]^-$, 121 $[C_7H_6O_2-H]^-$
7	8.04	4-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	163.039 8 $[M-H]^-$	163.040 1	-1.84	119 $[M-H-CO_2]^-$
8	11.09	对羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	137.023 9 $[M-H]^-$	137.024 4	-3.65	93 $[M-H-CO_2]^-$
9	11.75	丹皮酚	$C_9H_{10}O_3$	165.055 7 $[M-H]^-$	165.055 3	2.42	122 $[M-H-CH_3CO]^-$
10	16.35	芹糖甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.161 9 $[M-H]^-$	550.169 2	-0.91	417 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$, 255 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$
11	18.06	壬二酸	$C_9H_{16}O_4$	187.097 6 $[M-H]^-$	187.097 6	0	169 $[M-H-H_2O]^-$, 125 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$

苷和壬二酸等 11 个入血成分是从体内药物分析的角度挖掘药效活性成分。将入血成分与上述 64 个药效相关成分关联取交集,初步确定 SZL 的 Q-marker 为芹糖甘草苷、芍药内酯苷和壬二酸。这些成分与 AchE 抑制作用密切相关,具有药效活性,且是可测的固有成分,同时也包含了与 AD 靶点相互作用的关联信息。由此可见,基于“谱-效-代”关联方法发现 SZL 的 Q-marker 具有较好的可行性。

4 讨论

本实验通过建立 SZL 指纹图谱和 AchE 抑制作用之间的谱效关系模型确定 3 个药效相关成分;采用网络药理学方法结合前期工作基础确定了与 AD 疾病靶点相关的 61 个药效相关成分;通过 UHPLC-Q Exactive 高分辨液质联用技术鉴定了 11 个入血成分。综合分析药效相关成分及入血成分,除了现行 SZL 质量标准中的指标成分外,初步确定 SZL 的 Q-marker 为芹糖甘草苷、芍药内酯苷和壬二酸。通过对药材、复方制剂及入血成分的系统辨识,明确了质量属性的传递过程,芹糖甘草苷、芍药内酯苷和壬二酸分别来源于甘草、白芍和党参。芹糖甘草苷、芍药内酯苷分别为甘草、白芍的特征性成分。研究表明,氧化应激反应中的自由基可以促进 A β 、tau 蛋白磷酸化的产生并能使神经元 DNA 和 RNA 发生突变,并且氧化应激是最早发现与 AD 相关的致病因素之一,在该病的发病机制和疾病进展中作为重要介质^[17]。芹糖甘草苷和壬二酸具有抑制自由基产生、抗氧化的活性,在治疗 AD 中发挥一定作用。同时,芍药内酯苷对 AD 模型小鼠的学习记忆功能有明显改善作用,以上结果证实初步确定的 Q-marker 的有效性。上述分析表明本研究初步发现的 Q-marker 符合“五原则”,即有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍。

通过谱效关系研究可以挖掘药效相关成分,使指纹图谱的特征与药效活性关系更加明确。由谱效关系及网络药理学判定的药效相关成分为 SZL 中固有的或者加工制备过程中形成的药效相关物质成分,通过入血成分的分析能够发现机体内暴露的潜在药效活性成分;将二者关联整合综合分析,得到的共有物质成分既是药物原型成分,又是药效活性成分,契合中药 Q-marker 的定义要求^[3]。

中药药效发挥来自中药所含物质成分群的整体综合作用,本研究采用未参与建模的 3 个批次样本的测定结果验证谱效关系模型的有效性,符合生产

实际情况,因为这些药效相关成分是在和其他成分共存的情况下整体体现出的 AchE 抑制作用。课题组后续将对 SZL 的成分库进行扩充以确定更完善的 Q-marker 并对 Q-marker 的药效活性及作用机制进一步采用药理学实验进行验证和阐释,以不断完善 SZL 的 Q-marker 研究工作。

通过“谱-效-代”关联的 SZL 的 Q-marker 研究,能够真实地反映质量属性成分与药效活性的内在联系,使质量评价指标与功能属性密切相关,克服现有质量标准“唯成分论”存在的不足,提高质量一致性、可控性和溯源性,有利于该药物生产过程的质量管控,对于 SZL 的质量控制及评价具有重要意义。同时,本研究提供了一种新颖实用的挖掘中药 Q-marker 的研究策略,对于其他中药的质量控制及评价研究也具有借鉴意义。

参考文献

- [1] Drasar P, Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines [J]. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Life Sci*, 2004, 812(1): 3-21.
- [2] 熊亮,彭成. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [3] 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.
- [4] 褚莉,段树卿,宋佳,等. 复方石韦片 HPLC 指纹图谱的建立及其在制剂过程中的应用 [J]. *中草药*, 2019, 50(2): 396-401.
- [5] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [6] 李莉莉,马宁宁,范姗姗,等. 杜仲不同提取物对帕金森病小鼠的治疗作用及谱效关系研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1400-1406.
- [7] 谢盈或,刘璐,李渊芳,等. 基于网络药理学的四妙勇安汤在血管新生中的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4319-4330.
- [8] 王晶娟,刘洋,赵保胜,等. 中药“质效代关联”研究方法 with 理论的建立 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1507-1510.
- [9] 乜红磊,张丹璐,聂磊,等. 参枝苓口服液的 HPLC 指纹图谱构建及质量评价 [J]. *药学研究*, 2016, 35(7):

- 386-389.
- [10] 张 慧, 胡 甜, 臧恒昌. 近红外光谱分析技术在白芍水提过程中的在线控制研究 [J]. 药学研究, 2015, 34(5): 272-275.
- [11] 姜文文. 参枝苓口服液的质量分析方法研究 [D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [12] Jiang W W, Liu X Y, Su M, *et al.* Chromatographic fingerprint based on serially coupled columns combined with multiplecomponent quantitation with a single reference standard for quality evaluation of Shen-Zhi-Ling oral liquid [J]. *Anal Methods*, 2019, 11(3): 367-374.
- [13] Galvao R K H, Araujo M C U, Jose G E, *et al.* A method for calibration and validation subset partitioning [J]. *Talanta*, 2005, 67(4): 736-740.
- [14] Zhu C S, Lin Z J, Xiao M L, *et al.* The spectrum-effect relationship-a rational approach to screening effective compounds, reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(3): 177-184.
- [15] Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS) [J]. *J Chemometr*, 2014, 28(8): 623-632.
- [16] 孟雅坤, 柴 焯, 赵宏伟, 等. 甘草酸铵联合苦参素抗大鼠肝纤维化作用及初步机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 110-115.
- [17] 许 文, 吴 献, 黄鸣清, 等. 栝楼桂枝汤的血清药物化学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2033-2043.
- [18] 李 芳, 朱付全, 宋春红, 等. HPLC-ESI-MSⁿ 法鉴定大鼠口服白芍提取物后血清及脑内的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2475-2481.
- [19] 陈永财, 钱江辉, 王彬辉, 等. “桂枝与白芍”药对入血成分 UPLC-Q/TOF-MS 分析 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1707-1711.
- [20] 任 娟, 刘 晓, 李伟东, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的白芍炒制前后化学成分研究 [J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 268-273.