

基于多元统计分析和网络药理学的五味子醋制前后质量标志物预测分析

苏联麟¹, 李 昱¹, 徐 祯¹, 王吓长¹, 郝 敏², 黄紫炎¹, 陆兔林^{1*}, 季 德¹, 童黄锦³, 毛春芹¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

3. 南京中医药大学附属江苏省中西医结合医院, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 基于多元统计分析和网络药理学分析预测五味子醋制前后潜在的质量标志物。方法 采用 UPLC-Q/TOF-MS 解析生、醋五味子饮片中主要的木脂素类成分, 并运用多元统计方法筛选出炮制前后潜在的差异化学成分, 即化学标记物。进一步通过网络药理学以及生物信息学分析显著差异成分相关的主要作用靶点和通路, 构建“成分-靶点-通路”网络关系, 预测生、醋五味子潜在的质量标志物。结果 筛选了五味子醋制前后差异性成分 40 个, 其中 8 个为生、醋五味子之间显著性差异成分(即化学标记物)。鉴定并确认了其中的 5 个化学成分, 分别是 5-羟甲基糠醛、五味子甲素及其同分异构体、五味子乙素和五味子酯丁。而其余 3 个化学标记物通过解析一级、二级质谱信息, 推测它们很可能也属于木脂素类成分。网络药理学分析结果表明, 鉴定并确认的 5 个潜在质量标志物与五味子的主要药理作用密切相关。最终五味子乙素和 5-羟甲基糠醛被确定为最具代表性的潜在质量标志物。结论 五味子醋制前后其化学成分发生了一系列复杂的变化, 经研究分析确定五味子乙素和 5-羟甲基糠醛可作为五味子醋制前后代表性的潜在质量标志物, 并推测木脂素类成分可能为五味子醋制保肝的重要效应物质基础。

关键词: 五味子; 醋制; 质量标志物; UPLC-Q/TOF-MS; 多元统计分析; 网络药理学; 木脂素; 生物信息学; 成分-靶点-通路; 5-羟甲基糠醛; 五味子甲素; 五味子乙素; 五味子酯丁

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4643-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.017

Prediction and analysis of Q-markers between crude and vinegar *Schisandrae Chinensis Fructus* based on multivariate statistical analysis and network pharmacology

SU Lian-lin¹, LI Yu¹, XU Zhen¹, WANG Xia-zhang¹, HAO Min², HUANG Zi-yan¹, LU Tu-lin¹, JI De¹, TONG Huang-jin³, MAO Chun-qin¹

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. College of Pharmacy, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

3. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To explore the potential Q-markers between crude *Schisandrae Chinensis Fructus* (SCF) and vinegar-processed *Schisandrae Chinensis Fructus* (VSCF) based on multivariate statistical analysis and network pharmacology. **Methods** UPLC-Q/TOF-MS was used to analyze the main lignans in SCF and VSCF, and the potential differences of chemical components (Q-markers) between SCF and VSCF were screened out by using multiple statistical methods. Furthermore, through network pharmacology and bioinformatics, the main action targets and pathways related to significantly different components were analyzed to construct the “component-target-pathway” network relationship and predict the potential quality markers between SCF and VSCF. **Results** In this study, 40 different constituents of *Schisandra chinensis* between SCF and VSCF were screened, among which eight chemical markers had significant differences between SCF and VSCF. Five chemical constituents were identified and

收稿日期: 2019-08-27

基金项目: 国家重点研发计划资助(2018YFC1707000); 国家自然科学基金资助项目(81873008); 南京中医药大学研究生创新工程项目(KYCX19_1250)

作者简介: 苏联麟, 男, 在读博士, 主要从事中药炮制及其机制研究。Tel: 15895975126 E-mail: sulianlin1989@163.com

*通信作者 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: (025)85811835 E-mail: lutuling2005@126.com

confirmed, namely 5-HMF, deoxyschizandrin and its isomer, schisandrin B, and schisantherin D. The other three chemical markers were speculated to be lignans by analyzing the first-and second-order mass spectrometry information. The results of network pharmacological analysis showed that the five potential quality markers identified were highly related to the main pharmacological effects of SCF. Finally, schisandrin B and 5-hydroxymethyl furfural were identified as the most representative potential quality markers. **Conclusion** The results showed that the chemical composition of SCF had a series of complex changes. It was determined that schisandrin B and 5-hydroxymethyl furfural could be used as representative potential quality markers between SCF and VSCF. It is speculated that lignans may be the basis of the important effect of VSCF on liver protection.

Key words: *Schisandrae Chinensis Fructus*; vinegar-processing; Q-markers; UPLC-Q/TOF-MS; multivariate statistical analysis; network pharmacology; lignans; bioinformatics; component-target-pathway; 5-HMF; deoxyschizandrin; schisandrin B; schisantherin D

五味子为木兰科五味子属植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的成熟干燥果实, 始载于《神农本草经》, 是我国常用传统中药。五味子酸、苦、甘、辛、咸五味俱全, 故具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效, 用于久咳虚喘、梦遗滑精、自汗、盗汗、津伤口渴、内热消渴、心悸失眠等症^[1]。在传统中医的临床用药中, 五味子生品与炮制品用来治疗不同的疾病, 即“生熟异用”。目前, 临床应用以生品和醋制品为多, 生五味子以敛肺止咳止汗为主, 用于咳喘、自汗、盗汗等; 醋制后酸涩收敛之性增强, 长于涩精止泻。现代研究认为, 中药炮制的主要机制是有效成分的组成或活性发生了改变^[2]。醋制是中药炮制中的一个典型, 其科学性已经被现代植物化学、毒理学及药理学研究所证明^[3-5]。

近十几年来, 大量的研究报道了关于中药材质量控制的成果, 并成功地收载于《中国药典》。相比之下, 中药饮片的质量控制却进展甚微。原因有很多, 但主要原因可能是目前尚未有深入系统的研究以揭示中药炮制过程引起成分的化学变化或物理变化从而影响其药效、药性的科学内涵以及制定中药饮片的质控指标。显然, 目前依靠有限化学成分的测定进行饮片的质量控制是不够的。基于上述中药产业发展中存在的问题, 为促进中医药产业健康发展, 完善质量标准体系, 健全以《中国药典》为核心的国家药品标准体系, 提升中药及产品质量标准, 在研究现有质量评价与控制方法及存在问题的基础上, 刘昌孝院士团队^[6-7]提出了中药质量标志物(Q-marker)的新概念。因此, 寻找适当的 Q-marker 来对生、醋五味子加以区分是非常有必要的。在本研究中, 建立了利用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)与多元统计分析相结合的方法, 迅速地筛选出潜在的差异化学成分, 即化学标记物, 并运用网络药理学方法对这些潜在

的化学标记物进行验证, 预测潜在的 Q-marker^[8-12]。该方法不仅可以被用来探索化学标记, 也可用于研究中药炮制过程中的化学转化机制。

1 材料

UPLC 系统, 日本岛津公司; Triple TOF 5600 串联飞行时间质谱仪、电喷雾离子源(ESI)、Analyst® TF 1.6 工作站软件, 美国 AB SCIEX 公司; Milli-Q Intaqual-3 超纯水净化系统, 美国 Millipore 公司。

高效液相色谱纯的乙腈和甲酸分别购买自美国 EMD Millipore 公司、上海凌峰化学试剂股份有限公司; 分析纯甲醇由山东禹王化学试剂股份有限公司提供; 镇江香醋, 批号 20170220A2, 江苏恒顺醋业集团有限公司。对照品五味子甲素(批号 20140112)、五味子乙素(批号 PA0414RA14)、五味子丙素(批号 SJ0710RA12)、五味子醇甲(批号 Y17M8H31887)、五味子醇乙(批号 PM0303SA14)、五味子酯甲(批号 SO1030KA12)、五味子酯乙(批号 P07M6S1)、戈米辛 G(批号 M05J9S65019)、戈米辛 J(批号 M05J9S65021)及五味子酚(批号 PJ0607SA13)均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数≥98%(HPLC)。

从吉林、辽宁和黑龙江五味子主产地及中药材公司或市场收集、购买了 10 批五味子药材样品, 具体批号及产地等信息见表 1, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定, 样品的植物来源为木兰科五味子属植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 生、醋五味子间差异成分发现

2.1.1 生五味子、醋五味子的制备 生五味子除去杂质, 用时捣碎。

醋五味子: 取净五味子, 加入 20%醋拌匀, 润透, 置适宜的容器内, 用蒸汽加热至黑色或深褐色,

表 1 五味子药材来源

Table 1 Origin of SCF

批次	产地	生产时间
生五味子-1	辽宁沈阳	2016-04-10
生五味子-2	黑龙江延寿	2015-09-15
生五味子-3	黑龙江伊春	2015-09-15
生五味子-4	辽宁铁岭	2016-04-10
生五味子-5	吉林通化	2016-04-10
生五味子-6	吉林抚松	2016-04-10
生五味子-7	黑龙江加格达奇	2016-04-10
生五味子-8	吉林长白山	2016-03-02
生五味子-9	吉林郭化	2016-03-02
生五味子-10	山东潍坊临朐	2016-03-02

醋五味子 1~10 批的样品均由生五味子 1~10 批样品经醋制得到，且编号一一对应

Samples from 1 to 10 batches of VSCF were processed from 1 to 10 batches of SCF, and their numbers corresponded one by one

取出，晾干，干燥〔醋五味子以《中国药典》2015 版一部五味子【炮制】项下收载的炮制方法（醋蒸法），加工炮制即得〕。

2.1.2 生、醋五味子供试品溶液的制备 取生五味子及炮制得的醋五味子打粉，过 3 号筛，精密称取约 1.0 g，置 50 mL 量瓶中，加甲醇约 20 mL，超声（功率 250 W，频率 20 kHz）处理 20 min，然后继续加入水约 20 mL，相同条件下处理 20 min，取出滤过，加 50% 甲醇定容至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，3 600 r/min 离心 10 min。离心所得试液进行固相萃取（SPE）前处理，本实验中采用的 SPE 柱为 SupelcleanTM LC₁₈ 柱（500 mg，3 mL，美国 Supelco 公司）。柱活化过程为 6 mL（2 倍柱体积）甲醇活化，而后 6 mL 去离子水（即超纯水）平衡。待 SPE 柱平衡完成，精密吸取试液 1 mL 上柱后，用 6 mL 去离子水洗涤小柱。而后用 2 mL 洗脱溶剂（80% 甲醇-20% 水）洗脱，洗脱液涡旋 30 s 后离心（12 000 r/min，10 min），取上清液进样分析。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取五味子醇甲、戈米辛 J、五味子醇乙、戈米辛 G、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素的对照品适量，用甲醇配成质量浓度分别为 1.026、0.260、0.406、0.234、0.522、0.396、0.678、0.250 mg/mL 的上述各单一对照品储备液；另精密吸取各单一对照品储备液适量，配制成质量浓度分别为 205.20、15.84、60.90、11.70、10.44、59.40、94.92、10.00 μg/mL 的混合对照品溶液，保存于 4 ℃ 冰箱中，备用。

2.1.4 色谱-质谱条件 本实验研究建立的 UPLC-Q-TOF/MS 分析是基于岛津 UPLC 系统串联四极杆飞行时间串联质谱仪进行的，并配备离子喷雾接口（AB Sciex Triple TOF 5600）。色谱分离采用 C₁₈ 反相色谱柱（Agilent ZorBax SB-C₁₈ 50 mm×2.1 mm，1.8 μm），柱温控制在 25 ℃；流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈。梯度洗脱程序：0~2 min，25%~40% 乙腈；2~3 min，40%~45% 乙腈；3~8 min，45%~55% 乙腈；8~10 min，55%~65% 乙腈；10~15 min，65%~75% 乙腈；15~17 min，75%~100% 乙腈；17~18 min，100% 乙腈；18~20 min，100%~25% 乙腈；体积流量 0.3 mL/min，进样量 1 μL。

在本研究中，质谱仪采用正离子电喷雾模式用于质量检测（预试验研究结果显示：负离子模式下的响应值普遍较低，而且碎片离子信息缺乏，因此最终选择正离子模式用于分析）。质谱检测器的条件为离子喷雾电压 5.5 kV，涡轮喷射温度 550 ℃，分布电位（DP）60 V，碰撞能量（CE）35 eV。雾化气体为氮气（N₂），雾化气（gas1）、辅助气（gas2）压力均设定为 379.21 kPa（55 psi），气帘气（CUR）压力为 241.32 kPa（35 psi）。正离子模式全波长扫描，质量扫描范围设置为 m/z 100~1 000，质谱图像采集累计时间为 200 ms。根据国际协会的标准，每个分析物超过 50 cps 计数被选定为生产扫描最激烈的 8 个碎片离子和离子扫描范围 m/z 50~1 000，具有 70 ms 的累积时间。在本研究中，碰撞能量扩散（CES）是定性分析中的重要参数，有提高灵敏度，减少片段信息的遗漏的作用。运行参数设置：CES 为 10 eV，当 CE 为 35、45、60 eV 时得到平均 EPI 扫描光谱。质量亏损过滤（MDF）和动态背景扣除（DBS）新技术由 AB SCIEX 公司的分析软件提供，筛选轮廓并进行生产扫描以避免轻微代谢产物的遗漏。数据采集通过 Analyst[®] TF 1.6 软件（AB SCIEX 公司）获得。

2.1.5 多元统计分析 本研究对建立的 UPLC-Q-TOF/MS 所有确定的样本数据进行分析，利用 peakview 和 markerview 软件（Sciex 公司，美国马萨诸塞州）确定生、醋五味子潜在的化学标记。在数据采集方面，方法参数设置如下：保留时间范围 0.5~20 min；质量范围 m/z 100~1 200；保留时间误差限 0.01 min；质量误差限 0.01。对于峰积分，5% 的峰宽为 1 s，峰-峰基线噪声为 0.1，峰值强度阈值为 10。对数据的分析，列出了检测到的峰强度

并以保留时间 (t_R) 和产生的质量数据 (m/z) 对各峰进行标识。然后, 一个任意的身份被分配到每个 t_R - m/z 对其超高效液相色谱洗脱顺序的数据对齐, 重复每次运行, 直到最后的样本。数据批量处理如下: 每 1 个样品, 峰值强度数据为每个 t_R - m/z 对表格中的峰进行对齐; 然后, 使用 markerview 软件对样品中检测到的峰进行离子强度归一化处理。不同样品的离子被认为是相同的离子时, 他们表现出同样的 t_R (0.01 min 的误差) 和 m/z 值 (0.01 误差)。如果样品中未检测到峰, 则将离子强度记录为零。在这一点上, 所得到的 3 维数据由峰编号 (t_R - m/z)、样品名称和离子强度构成。本研究使用 SIMCA-P 14.0 软件进行数据分析, 包括主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等。

2.2 潜在质量标志物的作用靶标及网络预测

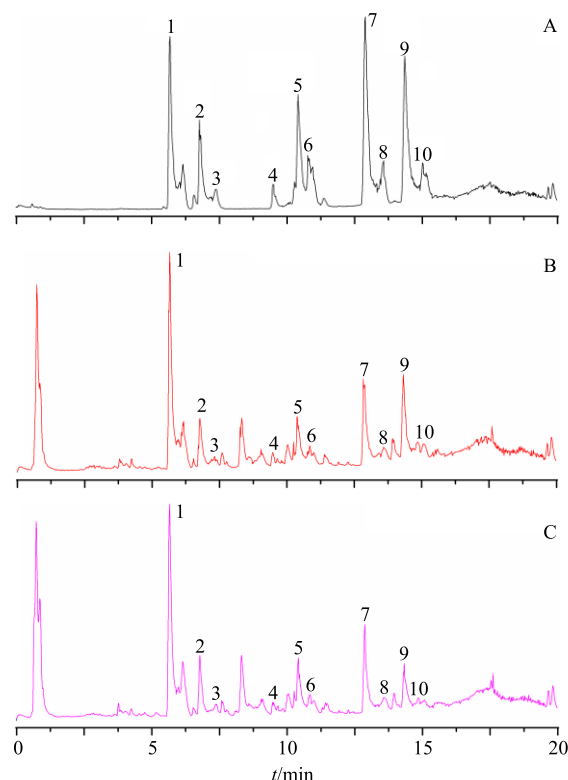
通过 Pubchem 化合物数据库查询分析得到的潜在质量标志物的 Canonical SMILES 编号, 将其 SMILES 号输入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 以获得化合物对应靶标蛋白的 Uniprot ID。然后, 将 Uniprot ID 导入京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 以预测相关代谢通路。最后, 通过 Cytoscape 3.6.1 软件 (Bethesda, MD, USA) 分别建立化学成分及入血成分的“成分-靶标-通路”网络关系, 并对结果进行综合分析。

3 结果与讨论

3.1 潜在质量标志物的筛选

采用 UPLC-Q-TOF/MS 分析, 分别得到对照品、生五味子及醋五味子的总离子流图 (TIC), 代表性图谱见图 1。为了比较生、醋五味子之间的区别, 本实验对数据进行了无监督的 PCA 和有监督的 OPLS-DA。数据处理结果得分图 (scores plot) 见图 2。结果显示生、醋五味子能得到较好的分离趋势, 说明五味子醋制后其化学成分发生了显著变化。

为确定生、醋五味子之间的差异成分, 进一步进行统计分析, 生成 1 个 S-plot 图 (图 3)。在 S-plot 图上, 每个点代表 1 个离子 t_R - m/z 对。同时, X 轴表示变量的贡献值, 距离零点越远的 t_R - m/z 对 2 组之间的差异贡献值越大。Y 轴表示变量的可信度, 同样距离零点越远的点被认为对 2 组之间的差异具有较高的置信水平。因此, “S” 两端的点为最具代表的特征标记物。筛选出的差异特征成分的详细信息见表 2, 化学结构见图 4。



1-戈米辛 G 2-五味子醇甲 3-戈米辛 J 4-五味子醇乙 5-五味子酚 6-五味子酯甲 7-五味子酯甲 8-五味子甲素 9-五味子乙素 10-五味子丙素
1-gomisin G 2-schizandrol 3-gomisin J 4-schizandrol B 5-schisanhenol 6-schisantherin 7-schisantherin B 8-deoxyschizandrin 9-schizandrin B 10-schizandrin C

图 1 正离子模式下对照品 (A)、生五味子 (B) 及醋五味子 (C) 的总离子流图

Fig. 1 TIC of mixed reference (A), SCF group (B), and VSCF group (C)

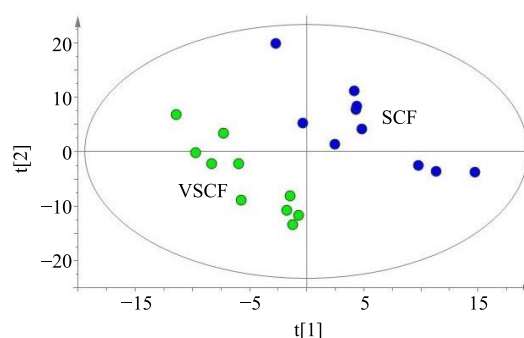


图 2 生、醋五味子 PCA 得分图

Fig. 2 PCA/Scores plot of SCF and VSCF samples

位于“S”左下角的第 3 象限的 4 个差异成分 (a~d) 对生、醋五味子组之间的差异贡献值最大。这些差异成分在分析样品中的离子强度趋势统计分析见表 3。结果发现, 差异成分 a (化学标记物 a, CM-a, t_R 2.64 min, m/z 149.021 8) 在 10 批醋五味

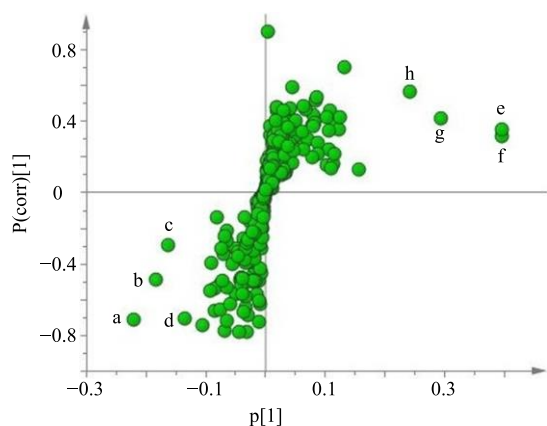


图 3 生、醋五味子 S-plot 图

Fig. 3 OPLS-DA/S-Plot of SCF and VSCF samples

子样品中离子强度都较高,然而,在所有的 10 批生五味子样品中含量均较醋五味子显著降低。其余 3 个差异成分: CM-b (t_R 10.37 min, m/z 560.281 6)、CM-c (t_R 16.89 min, m/z 301.139 8) 以及 CM-d (t_R 11.32 min, m/z 460.266 9) 在所有醋五味子样品中均显示较高的响应值,而生五味子样品中响应值很低。因此,本实验将这 4 个显著特征成分标记为醋五味子区别于生五味子的潜在化学标记物。

同样的,位于“S”右上角的第 1 象限的 4 个差异成分: CM-e (t_R 14.34 min, m/z 401.194 7)、CM-f (t_R 12.85 min, m/z 417.225 6)、CM-g (t_R 13.58 min, m/z 417.225 6) 以及 CM-h (t_R 15.56 min, m/z

表 2 生、醋五味子中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 质谱数据及鉴定

Table 2 Mass spectrometry data and identification of SCF and VSCF samples

编号	t_R /min	化学成分名称	分子式	加合离子	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	质量误差/ ($\times 10^{-6}$)
1	2.64 [#]	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	[M+Na] ⁺	149.021 8	149.021 5	2.0
2	4.51	[4- $\{$ (1S)-3-[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]-1-hydroxy-2-oxopropyl $\}$ -9-hydroxy-2,2-dimethyl-6-oxo-1,3,7-trioxaspiro[4.4]nonane-8,9-diyl]bis(methylene)bis(2,2-dimethylpropanoate)	C ₂₈ H ₄₄ O ₁₃	—	588.277 0	588.277 6	-1.0
3	5.58	—	C ₂₃ H ₄₂ O ₁₀	—	478.277 6	478.277 3	0.6
4	5.66	1,10-bis(4-carboxyphenoxy)decane	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	415.210 5	415.211 5	-1.5
5	5.66 [*]	五味子醇甲	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	[M+H] ⁺	433.222 1	433.220 1	4.5
6	6.73	anatoside	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₀	—	462.246 1	462.246 4	-0.6
7	6.77	allyl 2-O-benzoyl-3-O-benzyl- α -L-rhamnopyranoside or isomer	C ₂₃ H ₂₆ O ₆	[M+H] ⁺	399.178 2	399.178 7	-1.2
8	7.32	allyl 2-O-benzoyl-3-O-benzyl- α -L-rhamnopyranoside or isomer	C ₂₃ H ₂₆ O ₆	[M+H] ⁺	399.178 1	399.178 7	-1.5
9	8.26	—	C ₃₇ H ₃₆ O ₃	[M+NH ₄] ⁺	546.302 0	546.300 3	3.1
10	8.30	hydrocortisone aceponate	C ₂₆ H ₃₆ O ₇	[M+Na] ⁺	483.235 3	483.234 7	1.2
11	8.31 [#]	戈米辛 N	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	[M+H] ⁺	401.194 8	401.195 8	2.5
12	8.97	—	C ₂₅ H ₄₃ N ₃ O ₁₀	—	546.302 8	546.302 1	1.2
13	9.06 [#]	β -榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	[2M+Na] ⁺	431.365 2	431.365 3	-0.2
14	9.98 [#]	戈米辛 K ₁	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	403.209 9	403.211 5	-3.9
15	10.37	—	C ₂₆ H ₃₇ N ₇ O ₇	[M+H] ⁺	560.282 0	560.281 6	1.3
16	10.37	—	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₄	[2M+NH ₄] ⁺	416.176 3	416.176 7	-0.9
17	10.39	—	C ₃₈ H ₃₂ N ₂ O	—	532.251 1	532.250 9	0.3
18	10.41	2-propenoic acid, [1,1'-biphenyl]-4,4'-diylbis(oxy-2,1-ethanediyl)ester	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	415.173 5	415.173 8	-0.7
19	10.41 [*]	五味子酯甲	C ₃₀ H ₃₂ O ₉	[M+H] ⁺	537.211 2	537.211 9	1.3
20	10.78 [*]	五味子酚	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	403.211 5	403.210 6	2.4

续表 2

编号	t_R/min	化学成分名称	分子式	加合离子	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	质量误差/ $(\times 10^{-6})$
21	10.98 [#]	戈米辛 E	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	532.254 1	532.251 5	-4.90
22	11.32	—	C ₂₃ H ₄₀ O ₉	—	460.267 0	460.266 7	0.70
23	11.34	—	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₂	[2M+H] ⁺	415.209 6	415.208 8	1.90
24	11.43 [*]	五味子酯乙	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	[M+H] ⁺	515.227 6	515.225 8	3.50
25	11.49	—	C ₃₁ H ₂₈ O	—	416.213 3	416.213 5	-0.50
26	12.27	—	C ₂₂ H ₁₈ N ₆ O	[M-H+NH ₄] ⁺	399.179 6	399.180 2	1.50
27	12.69	—	C ₆ H ₁₃ N ₇ O ₆	—	279.092 2	299.092 2	0
28	12.85 [*]	五味子甲素	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417.227 2	417.227 2	0
29	12.89	—	C ₂₃ H ₄₂ O ₉	—	462.282 0	462.282 3	-0.70
30	13.42 [#]	恰米醛	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H] ⁺	219.174 0	219.1734	2.74
31	13.58	五味子甲素或其异构体	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	[M+H] ⁺	417.225 9	417.227 2	-3.00
32	14.32 [#]	戈米辛 T	C ₂₃ H ₃₀ O ₇	—	418.199 4	418.199 1	0.70
33	14.34 [*]	五味子乙素	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	[M+H] ⁺	401.194 7	401.195 9	-3.00
34	14.38 [#]	β -谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	[M+H] ⁺	415.393 6	415.393 4	0.50
35	14.84	—	C ₂₈ H ₃₆ O ₇	[M+H] ⁺	485.251 6	485.253 4	-3.70
36	15.56 [#]	五味子酯丁	C ₂₉ H ₂₈ O ₉	[M-C ₆ H ₆ O ₂ +H] ⁺	399.178 7	399.178 7	0
37	16.12	当归酰戈米辛 M ₁	C ₂₈ H ₃₆ O ₆	[M+H] ⁺	469.258 5	469.258 4	0.20
38	16.34 [#]	枸橼酸三丁酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	[M+K] ⁺	399.178 4	399.178 0	1.00
39	16.89	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	[M+Na] ⁺	301.139 8	301.141 0	-3.90
40	17.63	myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[2M+H] ⁺	637.302 8	637.300 7	3.30

*经对照品鉴定确认; #通过文献报道化学成分比对确认; —未鉴定确认

*Identified with standard products; #Identified with reference compounds; —Unidentified

399.178 2) 对生、醋五味子之间差异的贡献值最大。离子强度趋势显示, 这 4 个化学标记物在生五味子样品中均较高, 醋五味子样品中几乎检测不到, 尤其是 CM-e。因此, 本研究将这 4 个显著特征成分标记为生五味子显著区别于醋五味子的潜在质量标志物。

3.2 化学标记物的分析鉴定

用 CNKI 和 Medline 等工具检索五味子化学成分文献。将文献化合物分子式、化学名等信息录入 Excel 表。对每个化合物分子式用软件进行元素拆解计数, 并计算出 ESI⁺下常见离子 [M+H]⁺、[M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺、[M+K]⁺、[2M+H]⁺、[2M+H+K]²⁺等共计 10 余种离子形态的精确质荷比数值, 从而建立位于 Excel 表中的可用于预鉴别的五味子化学成分文献数据库。

将待鉴别的潜在显著特征成分 CM-a~CM-h 的 t_R 和 m/z 数据与数据库数据进行对比, 偏差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ 认定为相匹配。对获得数据库匹配的特征成分进行二级质谱 (MS/MS) 碎片离子分析, 根据碎片

离子质荷比信息, 对预鉴别提示的化学结构进行验证。对化学标记物的鉴别包括与对照品比较、一级质谱精确质荷比与文献化合物数据库比较和二级质谱碎片离子信息分析 3 个方面。对照品比较考察了五味子甲、乙、丙素, 五味子醇甲、醇乙等对照品。一级质谱精确质荷比比较运用了上述本实验室自建的五味子化合物数据库。在没有对照品的情况下, 二级质谱碎片分析可以在一定程度上验证一级质谱精确质荷比的结构预判结果。鉴别结果得到的化合物的化学结构见图 4, 化合物的二级质谱图见图 5 (由于 CM-c 的二级质谱信息提取效果较差, 故并未在图中列出)。

本实验中以特征性最强的 CM-a 与 CM-e 为例, 阐述差异化学标志物的鉴定过程:

正离子模式下潜在的标志物的质谱和准确的去质子化的分子式如图 5 所示, 质谱信息表明其经验分子式最有可能为 C₆H₆O₃ (质量偏差 2×10^{-6}), 通过文献及在线数据库匹配, 鉴定为 5-羟甲基糠醛(5-HMF)。实验室前期研究结果显示, 五味子经醋蒸

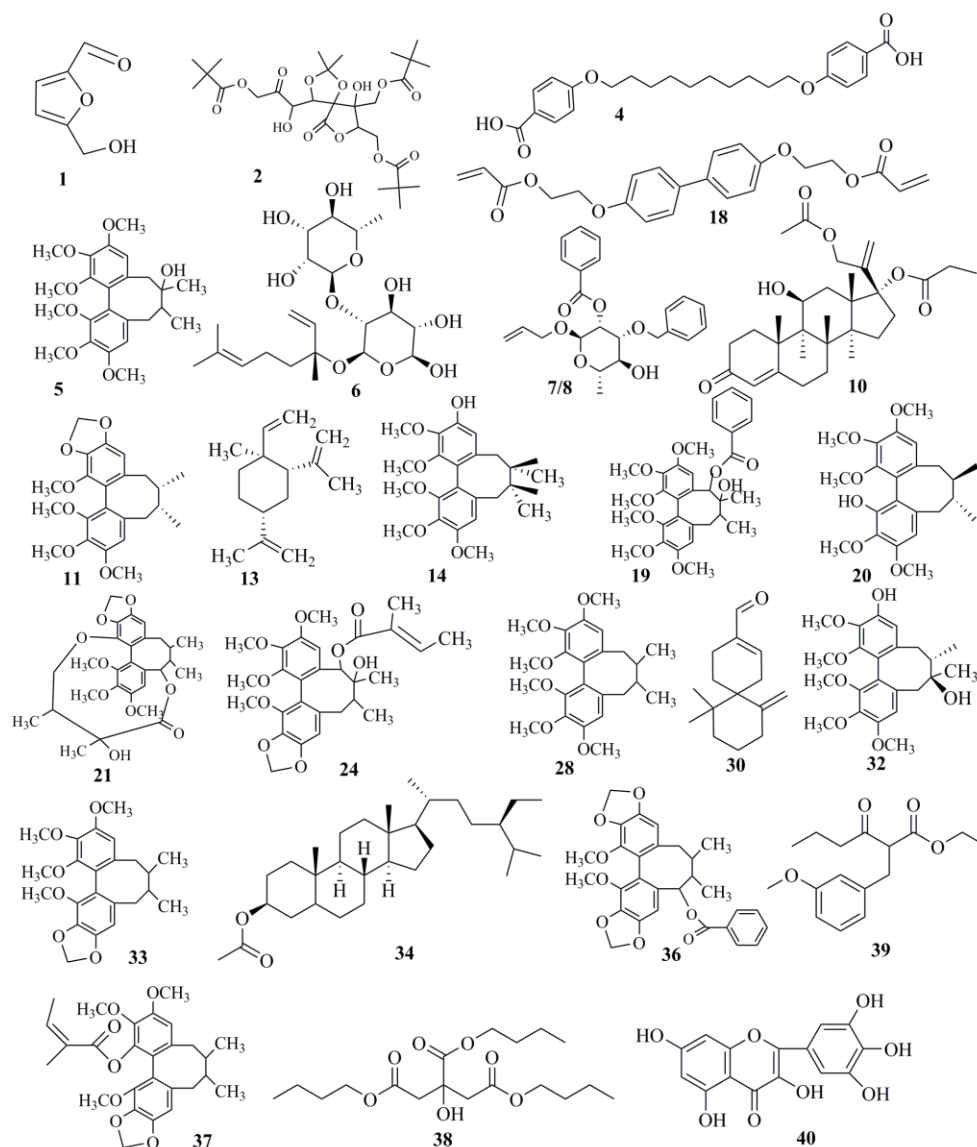


图 4 生、醋五味子间差异化学成分的化学结构 (编号与表 2 中对应)

Fig. 4 Chemical structures of identified components different between SCF and VSCF (compound numbers represent same meanings as those in Table 2)

表 3 生、醋五味子中筛选出的 8 个差异化学标志物离子强度趋势分析

Table 3 Analysis of ion intensity trends of eight differential chemical markers from SCF and VSCF

样品	CM-a	CM-b	CM-c	CM-d	CM-e	CM-f	CM-g	CM-h
生五味子	712.836±154.66	5 180.34±1 490.08	1 350.33±371.83	241.85± 99.81	46 781.00±17 732.26	50 312.60±16 294.35	17 040.17±6 752.09	5 015.88±2 457.44
醋五味子	1 501.30±884.62	6 431.84±1 971.43	1 979.94±314.68	589.96±247.97	21 788.70± 8 796.57	27 864.40±11 272.98	9 737.77±4 743.43	2 871.92±1 865.12
P 值	0.012 5	0.126 7	0.000 7	0.000 7	0.000 9	0.002 1	0.011 9	0.041 3

后会生成糠醛衍生物, 如 5-HMF。通过解析正离子模式下质谱信息, m/z 121.028 1 $[M+Na]^+$ 、 m/z 89.059 8 $[M+Na]^+$ 分别表示碎片离子 CO (28) 和 CH_3OH (32), 这进一步证明了鉴定结果, 该成分极有可能就是 5-HMF。然后, 本实验进一步通过比较文献中该化合物的 MS 分析数据 (保留时间、质

谱数据), 最终确认其为 5-HMF^[13]。

5-HMF 是由葡萄糖或果糖脱水生成, 其结构中含有呋喃环、醛基和羟基, 具有重要的生物活性。五味子的醋制过程中, 葡萄糖或果糖易受金属元素、酸、氧气、温度等的影响而生成 5-HMF, 它是炮制过程中发生变化一个特征成分。因此, 本实验将

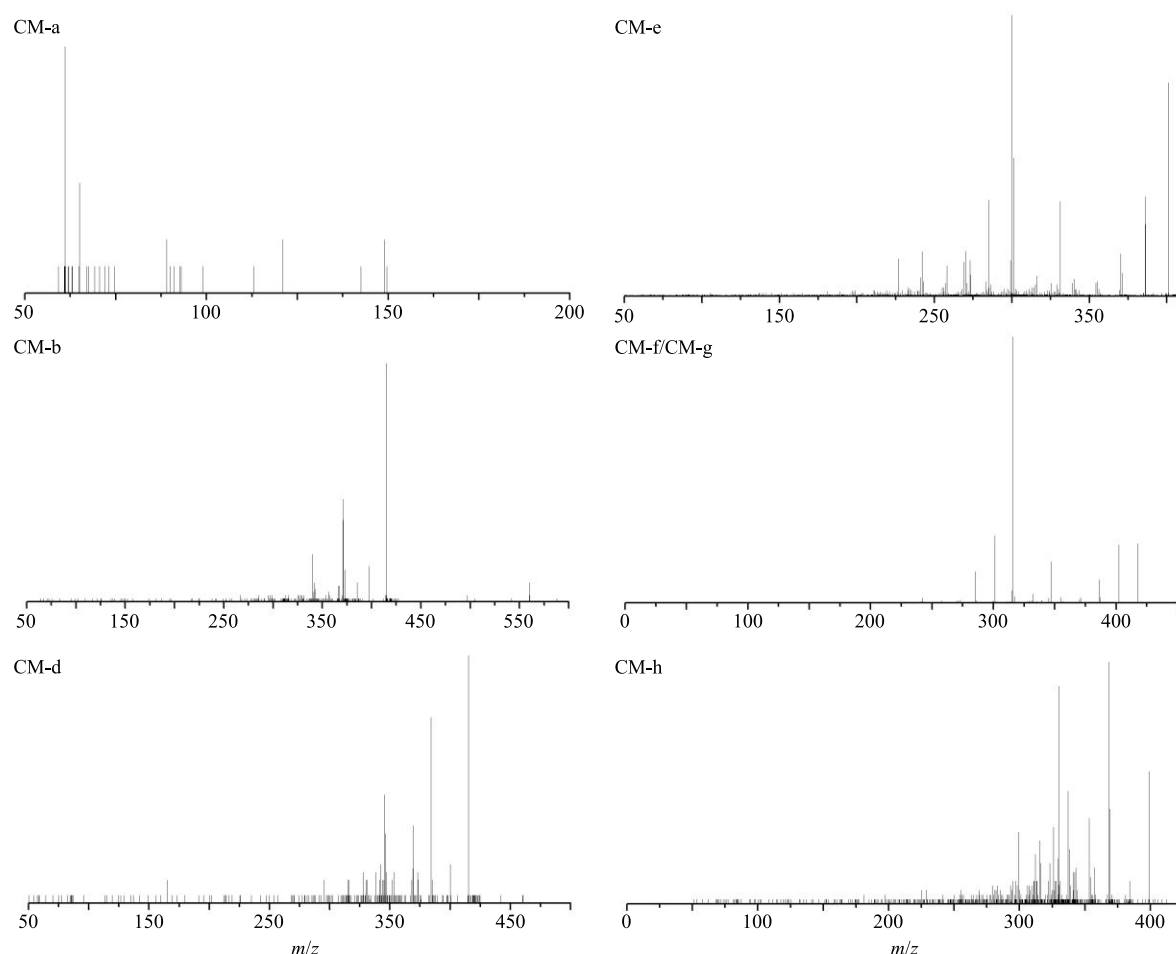


图 5 在正离子模式下检测到的潜在化学标记物的二级代表性质谱

Fig. 5 Representative mass spectra of potential chemical markers detected in positive mode

5-HMF 作为考察指标评价五味子醋制过程的炮制程度, 这将成为醋五味子区别于生五味子的重要特征物质^[14]。

同样的, 化学标记物 CM-e 的二级质谱信息如图 5 所示, 其中有 4 个主要的分子离子峰和碎片离子峰: m/z 401.194 7, 386.171 7, 370.176 1, 331.117 6, 分别鉴定为 $[M+H]^+$ 、 $[M-CH_3+H]^+$ 、 $[M-CH_3O+H]^+$ 和 $[M-C_3H_{10}+H]^+$ 的加合离子。通过比对数据库及文献, 该物质的经验分子式符合 $C_{23}H_{28}O_6$, 即五味子乙素^[15-17]。5-HMF、五味子乙素被鉴定为生、醋五味子中最显著差异成分。因此, 这 2 个成分可作为生、醋五味子的潜在化学标记物, 同时也能作为五味子炮制过程中一个较好的评价指标。

综合上述结果, 本研究分析筛选出生、醋五味子间的 8 个差异化学标记物, 鉴定并确认了其中的 5 个化学成分, 分别为 5-HMF、五味子甲素及其同分异构体、五味子乙素和五味子酯丁。其余 3 个化学标记物通过分析其一级、二级质谱信息, 发现其

碎片离子与木脂素成分极其相似, 因此推测它们很可能也属于木脂素类成分。五味子在醋制(醋蒸)过程中受长时间的高温、高湿及酸性等复杂环境的影响, 其化学成分发生了转化, 如 5-HMF 是由葡萄糖或果糖受金属元素、酸、氧气、温度等的影响脱水而生成, 属于五味子醋制过程中产生的成分。虽然, 5-HMF 在一些含糖或苷类成分较高的药材经热制后均会产生, 但作为五味子醋制过程的一个质控指标还是具有积极意义的。此外, 醋五味子样品中五味子酯丁的含量显著下降的原因也可能是由于在酸性条件下其发生了水解或其他化学反应。同样, 五味子甲素、乙素等成分也发生了复杂的化学转化(如脱甲基、氧化还原甚至酯化等)。因此, 五味子醋制前后其化学成分发生了一系列复杂的变化, 尤其是木脂素类成分, 推测五味子醋制的效应物质基础变化与木脂素成分的变化密切相关。

3.3 潜在质量标志物的作用靶标及网络预测

通过 Pubchem 及 Swiss Target Prediction 数据库

获得上述鉴定得到的 4 个潜在质量标志物（同分异构体无法区分开）对应靶标蛋白共 40 个，主要包括花生四烯酸盐-脂氧合酶、腺苷受体 A1、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ATR 及 PI3 激酶等。然后，运用 KEGG 数据库预测其相关代谢通路共 49 条，其中高度相关的包括 PI3K/Akt 信号通路、花生四烯酸代谢、氨基

酸代谢以及脂质代谢。进一步分析表明，上述靶点、通路与炎症的发生发展密切相关，换言之，即和五味子的主要药理作用相一致。最后，通过 Cytoscape 3.6.1 软件建立“成分-靶标-通路”网络关系（图 6），并对结果进行综合分析。

结果显示，五味子甲素、五味子乙素和 5-HMF

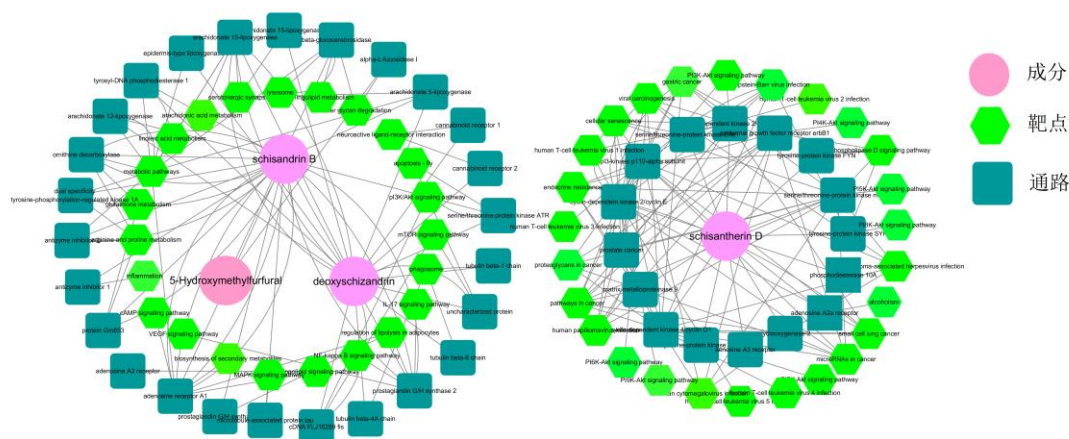


图 6 基于潜在质量标志物构建的“成分-靶标-通路”网络关系图

Fig. 6 Component-target-pathway network diagram based on potential quality markers

三者的靶点、通路呈高度相关，而五味子酯丁具有相对独立靶点和通路。上述结果表明，通过本实验的研究方法筛选出的潜在质量标志物的确为五味子主要药理作用的效应物质基础；此外，由于五味子甲素、五味子乙素和 5-HMF 三者的靶点、通路高度相关，推测其在功效上存在叠加效应；五味子酯丁受醋蒸这一炮制过程的影响，其在醋五味子中含量呈下降趋势，但推测部分五味子酯丁水解转化成了其他类木脂素（具有相同的母核结构的次级产物）成分，这也正好解释了为何醋五味子中的类木脂素成分较生五味子中有显著升高。

本课题组前期基于代谢组学对生、醋五味子抗酒精性肝损伤的效用机制进行了初步研究^[18]，结果表明：醋五味子通过调节胆汁酸、氨基酸、脂质代谢水平以及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来增强抗肝损伤效应。

3.3.1 胆酸代谢与脂质代谢 在脂质代谢出现紊乱的同时，部分胆汁酸的代谢也出现了显著上调或下调。比如模型组大鼠胆汁中 12-酮基脱氧胆酸（12-ketodeoxycholic acid）、3b,17a-dihydroxy-5a-androstane（一种类固醇激素）、taurohyocholate（一种胆汁酸）、牛磺胆酸（taurocholic acid）、牛磺去氧胆酸（taurodeoxycholic acid）、牛黄鹅脱氧胆酸、7-

硫代-甘氨酸脱氧胆酸（glycochenodeoxycholate 7-sulfate）浓度较空白组均有不同程度的上调或者下调，提示酒精性肝损伤模型大鼠体内胆汁酸代谢受到明显干扰，从而引起脂代谢功能障碍。由于肝功能损伤，胆红素分泌增加，肝细胞合成初级胆汁酸增加，促进了 12-酮基脱氧胆酸和 3b,17a-dihydroxy-5a-androstane 的排出量，使得其在胆汁中检测到的量也增加。因此，肝脏损伤越严重，其在胆汁中含量也越高^[19]。

3.3.2 花生四烯酸与甘油磷脂代谢通路 甘油磷脂代谢通过 PC（磷脂酰胆碱类）这一桥梁纽带与花生四烯酸代谢紧密相连，诸如 HETEs、PE、PC、PG、LysoPE 及 CYP450 酶参与其中。研究显示，酒精性肝损伤大鼠的脂质代谢发生严重紊乱，绝大多数脂质（三酰甘油、磷脂、固醇、类固醇等）呈现高表达^[20-21]。

3.3.3 活性氧簇（ROS）与 CYP450 酶 乙醇经过 CYP 2E1 代谢产生 ROS，导致氧化损伤；其次，长期乙醇暴露会损伤线粒体功能，可通过改变线粒体的结构影响线粒体的功能，抑制氧化磷酸化和三羧酸循环，导致生物能量减少，ROS 增加，谷胱甘肽（GSH）减少，线粒体 DNA 损伤和蛋白质合成被抑制，线粒体通透性敏感性增加，通过坏死和细胞凋

亡途径引起肝损伤 ROS 促发脂质过氧化,直接损伤细胞胞质和细胞内膜。通过对相关代谢通路的分析,发现 LysoPE 与 ROS 的生成直接相关,并且在花生四烯酸代谢通路中,许多 CYP450 酶(如 CYP2E、CYP2U、CYP4A 等)都参与了 ROS 的生成^[22]。

3.3.4 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 PI3K 是一种癌基因,由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成的异源性二聚体,主要存在于细胞质内。Akt 又称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),是一种在进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要存在胞浆中,是 PI3K 下游分子。mTOR 是 Akt 信号分子下游雷帕霉素作用的靶点。研究表明,PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活可以明显抑制细胞凋亡^[23],并且激活的 PI3K 可以引起 Akt 的突变使细胞失去正常的生理功能,并诱发肿瘤的生成,达到抑制肿瘤细胞凋亡的作用^[24]。而肝损伤是许多肝脏疾病的病理前期所要经历的一个必要阶段。因此,PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肝损伤过程中被高度激活,从而导致肝损伤的加剧。

4 讨论

本实验研究中,通过建立的 UPLC-Q-TOF/MS 结合多元统计分析,能较为快速地筛选鉴别生、醋五味子中潜在的化学标记物,以期用于五味子药材及饮片的质量控制标准研究。本方法具有高通量、高检测限、高灵敏度的优点,能尽可能多地提取生、醋五味子中的成分,甚至是痕量成分。此外,利用大量的样本的多变量统计分析所确定的标记物更具代表性。最后对筛选得到的差异标志物进行网络建模分析,构建“成分-靶点-通路”网络关系图,进一步明确其为五味子的主要药效物质。

而研究至此,还只能将这些差异标志物称为潜在的质量标志物,其体内吸收及代谢过程还需要进一步深入研究(此项研究课题组正在进行,已取得初步成果)。本研究也为五味子醋制机制研究提供了理论及物质基础,初步明确了五味子醋制前后木脂素类等成分发生了显著变化,为五味子醋制保肝的效应物质基础研究指明了方向。这对于与中药炮制前后物质基础的变化以及中药饮片质量控制研究等具有很好的借鉴意义。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 蔡宝昌, 龚千锋. 中药炮制学专论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.

[3] Tang B W, Ding J J, Yang Y X, *et al.* Systems biochemical responses of rats to Kansui and vinegar-processed Kansui exposure by integrated metabolomics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(2): 511-520.
[4] 陈海鹰, 曹雨诞, 颜晓静, 等. 醋制降低京大戟对人正常肝细胞 LO2 的毒性及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 866-870.
[5] Zhang Y, Li K W, Yang K, *et al.* Optimization of vinegar-steaming process for Wuweizi (*Fructus Schisandrae Chinensis*) with response surface method [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(5): 682-685.
[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): 1443-1456.
[7] 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.
[8] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2775-2785.
[9] Li S L, Song J Z, Qiao C F, *et al.* A novel strategy to rapidly explore potential chemical markers for the discrimination between crude and processed *Radix Rehmanniae* by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(4): 812-823.
[10] Liu M Y, Zhao S H, Wang Z Q, *et al.* Identification of metabolites of deoxyschizandrin in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2014, 949/950: 115-126.
[11] 白隆博, 马逍遥, 常念伟, 等. 基于整合网络药理学和化学物质组学的灯台叶片的抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3861-3867.
[12] 李伟, 刘亚丽, 宋永贵, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E 结合 OPLS-DA 模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2212-2218.
[13] Lin A S, Qian K D, Usami Y, *et al.* 5-Hydroxymethyl-2-furfural, a clinical trials agent for sickle cell anemia, and its mono/di-glucosides from classically processed steamed *Rehmanniae Radix* [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(2): 164-167.
[14] 李英华, 吕秀阳, 朱晓慧. 炮制对北五味子中 5-羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 992-995.
[15] Mocan A, Schafberg M, Crisan G, *et al.* Determination of lignans and phenolic components of *Schisandrae Chinensis Fructus* (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-TOF-

- MS and HPLC-online TEAC: Contribution of individual components to overall antioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays [J]. *J Funct Foods*, 2016, 24: 579-594.
- [16] Zhu L J, Li B, Liu X Y, *et al.* Purification of six lignans from the stems of *Schisandrae Chinensis Fructus* by using high-speed counter-current chromatography combined with preparative high-performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2015, 186: 146-152.
- [17] Zhang Q, Zhu W Q, Guan H, *et al.* Development of a matrix solid-phase dispersion extraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of five lignans from the *Schisandrae Chinensis Fructus* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1011: 151-157.
- [18] 苏联麟, 李 平, 程 雪, 等. 基于 UPLC-Q/TOF/MS 的醋制五味子对酒精性肝损伤大鼠胆汁代谢物的影响研究 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 114-120.
- [19] Adachi Y, Nanno T, Itoh T, *et al.* Determination of individual serum bile acids in chronic liver diseases: Fasting levels and results of oral chenodeoxycholic acid tolerance test [J]. *Gastroenterol Jpn*, 1988, 23: 401-407.
- [20] 袁成凌, 姚建铭, 余增亮. 花生四烯酸及其代谢物的生物学作用 [J]. 中国药物化学杂志, 2000, 10(1): 75-78.
- [21] 段 荟, 付成效, 邹 瑾. 黄芪对酒精性肝损伤小鼠 MDA、GSH 和 TG 的影响及肝脏保护作用的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2010, 39(3): 271-273.
- [22] Leung T M, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(2): 395-398.
- [23] Guertin D A, Sabatini D M. An expanding role for mTOR in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(8): 353-361.
- [24] Banumathy G, Cairns P. Signaling pathways in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(7): 658-664.