

基于网络药理学及定性定量研究的甘草质量标志物预测分析

李欢欢, 林 丽, 郭 爽, 沈钱能, 毛春芹, 张科卫, 严国俊, 陆兔林*, 谢 辉*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要:目的 基于中药质量标志物(Q-marker)的理念,对甘草从化学成分有效性和可测性的角度进行Q-marker的初步预测。方法 基于文献整合及数据分析对甘草Q-marker的来源范围进行筛选,通过网络药理学进行成分有效性分析,采用高效液相色谱法对4个产地15批甘草药材进行定性和定量研究,运用模式识别方法筛选出造成组间差异的主要标志性成分,结合网络药理学结果进一步确定甘草的Q-marker。结果 文献研究确定黄酮类和三萜类成分为甘草Q-marker的主要来源范围;网络药理学结果表明甘草苷、甘草酸等成分在“成分-靶点-通路”网络中具有高连接度,是其主要活性成分;建立15批甘草样品的指纹图谱,通过偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)明确了甘草苷、蔗糖甘草苷等5个成分为主要标志性成分;甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸、甘草次酸4个成分含量测定结果表明不同产地间成分含量具显著差异,结合网络药理学分析结果进一步明确了甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸、甘草次酸可作为甘草Q-marker。结论 以黄酮类和三萜类成分作为甘草Q-marker的来源范围,通过网络药理学(有效性)结合多产地甘草药材定性定量(可测性)研究最终确定甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸和甘草次酸4个成分可作为甘草潜在Q-marker科学合理,为甘草的质量控制提供参考依据。

关键词:甘草;质量标志物;网络药理学;定性;定量;甘草苷;蔗糖甘草苷;甘草酸;甘草次酸

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-2670(2020)10-2680-09

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.011

Predictive analysis of Q-marker of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* based on network pharmacology combined with qualitative and quantitative research

LI Huan-huan, LIN Li, GUO Shuang, SHEN Qian-neng, MAO Chun-qin, ZHANG Ke-wei, YAN Guo-jun, LU Tu-lin, XIE Hui

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

Abstract: Objective To make a preliminary prediction of the Q-marker of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* from the perspective of the effectiveness and measurability of chemical components based on the concept of Q-marker of Chinese materia medica. **Methods** Based on literature integration and data analysis, the source range of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* Q-marker was screened, and the effectiveness of the ingredients was analyzed through network pharmacology. Qualitative and quantitative analysis of 15 batches of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* from four places of origin was performed by HPLC. The pattern recognition method was used to screen out the main marker components that caused the differences between groups, which were combined with network pharmacological results to further determine the Q-marker of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. **Results** Literature studies had determined that flavonoids and triterpenoids were the main source of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* Q-marker; Network pharmacology results showed that liquiritin, glycyrrhizic acid and other components had high connectivity in the “component-target-pathway” network and were the main active components; The fingerprints of 15 batches of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* samples were established, and five components, including liquiritin and liquiritin apioside, were identified as the main marker components by PLS-DA analysis; The content determination results of liquiritin, liquiritin apioside, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid showed that there were significant differences in the content of ingredients among different production areas. The qualitative and quantitative research on pharmacology combined with network pharmacology revealed that liquiritin, liquiritin apioside, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid can be used as *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* Q-marker. **Conclusion** Taking flavonoids and triterpenoids as the source of Q-marker for *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, the qualitative and quantitative (measurability) study of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* herbs from

收稿日期: 2020-03-05

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707000)

作者简介: 李欢欢, 女, 在读硕士, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: 18434371258 E-mail: 1499835232@qq.com

*通信作者 陆兔林, 男, 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。E-mail: lutuling2005@126.com

谢 辉, 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药制剂技术及质量评价研究。E-mail: njxh66@163.com

multiple producing areas combined with network pharmacology (effectiveness) revealed liquiritin, liquiritin apioside, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid as the potential Q-marker of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* are scientific and reasonable, which provide reference for quality control of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; quality marker (Q-marker); network pharmacology; qualitative analysis; quantitative analysis; liquiritin; liquiritin apioside; glycyrrhizic acid; glycyrrhetic acid

甘草来源于豆科甘草属 *Glycyrrhiza* L., 全属约 20 种, 我国有 8 种, 主要分布于黄河流域以北各省区, 个别种见于云南西北部^[1]。甘草作为大宗药材, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药之功。现代研究表明其化学成分种类多样, 包括三萜类、黄酮类、多糖、生物碱类及香豆素类等^[2-3], 具有抗病毒、抗炎、抑菌、抗癌、抗氧化、抗衰老、免疫调节等作用^[4-6]。《中国药典》2015 年版一部中甘草药材有甘草 *G. uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 3 个基原^[7], 其中以甘草这一基原分布最广、产量最大, 临床应用最为普遍。

中药质量标志物 (Q-marker) 是 2016 年刘昌孝院士^[8]提出的中药质量控制新理念, 基于有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍的“五原则”^[8-9], 现已广泛应用于中药质量的研究中, 对中药的质量控制具有重要意义。本课题组基于 Q-marker 理论, 运用网络药理学对甘草进行有效性研究, 并采用高效液相技术对 4 个产地 15 批甘草药材进行定性及定量的可测性研究, 从生物信息和化学角度分析预测甘草的潜在 Q-marker, 为其整体质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

15 批甘草药材分别采集于宁夏 (S1~S4)、内蒙古鄂尔多斯 (S5~S8)、甘肃陇西 (S9~S12)、新疆阿勒泰 (S13~S15) 4 个产地, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

对照品甘草苷 (批号 G-009-181216)、异甘草苷 (批号 Y-120-181216)、甘草素 (批号 G-036-180507)、异甘草素 (批号 Y-008-181216)、芹糖异甘草苷 (批号 Q-093-190812)、芹糖甘草苷 (批号 G-061-180108)、甘草查耳酮 B (批号 G-034-190903)、刺甘草查耳酮 (批号 C-050-180426) 和甘草次酸 (批号 G-032-180301) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 甘草酸 (批号 P29M6R7) 购自上海源叶生物科技有限公司; 芒柄花苷 (批号 486-62-4) 购自上海诗丹德生物技术有限公司, 所

有对照品质量分数均大于 98%。乙腈、磷酸均为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂为分析纯。

1.2 仪器

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司, DGC-20A 型在线脱气系统, SIL-20A 型自动进样系统, CTO-20AC 型柱温箱, SPD-M20A 型二极管阵列检测); MS-105D 型电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); FA1104N 型电子天平 (上海菁海仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 甘草潜在 Q-marker 的来源定位

相关药理研究表明黄酮类和三萜类^[10]是甘草属植物发挥抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用的主要药效物质基础, 且居于主要地位^[11-13]。黄酮类成分甘草苷、异甘草苷、甘草素和异甘草素是甘草的指标性成分^[14-17]; 在探索野生和栽培生态类型之间的差异研究中, 有学者选择甘草酸、甘草皂苷 J2/G2 和粗毛甘草素 D 等作为化学标记成分^[18]; 并有研究针对不同产地甘草中 13 种黄酮和甘草酸进行测定^[19]; Jiang 等^[20]发现选用三萜类成分甘草酸和甘草次酸能较好地地区分甘草片和蜜炙甘草。以上研究表明甘草的不同基原、栽培方式、炮制方式、产地间化学标志物均受黄酮类及三萜类成分影响, 故将黄酮类及三萜类成分作为甘草潜在 Q-marker 的来源范围。

2.2 基于网络药理学进行甘草 Q-marker 预测

2.2.1 甘草黄酮类和三萜类活性成分筛选 本研究运用 TCMSP (<http://tcmispw.com/tcmisp.php>)、BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 及 TCMID (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>) 数据库检索甘草黄酮类和三萜类化合物, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件, 提取到 27 个黄酮类成分和 10 个三萜类成分, 共计 37 个活性成分 (表 1)。将收集的活性成分输入 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索相应的分子结构, 记录 SMILE 值。

2.2.2 靶点预测及蛋白互作 (PPI) 网络构建 运用 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 结合 BATMAN-TCM 及 DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)

表 1 甘草中黄酮及三萜类有效成分

Table 1 Specific information of flavonoids and triterpenoids active components in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

编号	化合物	分子式	编号	化合物	分子式
1	甘草苷 (liquiritin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	20	甘草利酮 (licoricone)	C ₂₂ H ₂₂ O ₆
2	异甘草苷 (isoliquiritin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	21	甘草查耳酮 E (licochalcone E)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄
3	甘草素 (liquiritigenin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	22	芒柄花素 (formononetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
4	异甘草素 (isoliquiritigenin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	23	甘草宁 A (gancaonin A)	C ₂₁ H ₂₀ O ₅
5	新甘草苷 (neoliquiritin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	24	甘草宁 B (gancaonin B)	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
6	新异甘草苷 (neoisoliquiritin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	25	甘草宁 G (gancaonin G)	C ₂₁ H ₂₀ O ₅
7	甘草黄酮醇 (licoflavonol)	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	26	甘草宁 H (gancaonin H)	C ₂₅ H ₂₄ O ₆
8	异甘草黄酮醇 (isolico flavonol)	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	27	大豆异黄酮 (licogroisoflavone)	C ₂₀ H ₁₆ O ₅
9	芹糖甘草苷 (liquiritin apioside)	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	28	甘草酸 (glycyrrhizic acid)	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
10	芹糖异甘草苷 (isoliquiritin apioside)	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	29	甘草次酸 (glycyrrhetic acid)	C ₃₀ H ₄₆ O ₄
11	甘草查耳酮 A (licochalcone A)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	30	乌拉尔甘草皂苷 B (uralsaponin B)	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄
12	甘草黄酮醇 (glycyrrhiza flavonol A)	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	31	乌拉尔甘草皂苷 C (uralsaponin C)	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆
13	乌拉尔醇 (uralenol)	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	32	乌拉尔甘草皂苷 F (uralsaponin F)	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₉
14	乌拉尔宁 (uralenin)	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	33	甘草皂苷 A3 (licorice-saponin A3)	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁
15	甘草查耳酮 B (licochalcone B)	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	34	甘草皂苷 G2 (licoricesaponine G2)	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇
16	甘草查耳酮 C (licochalcone C)	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	35	甘草皂苷 J2 (licoricesaponine J2)	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆
17	甘草查耳酮 D (licochalcone D)	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	36	甘草皂苷 K2 (licoricesaponine K2)	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆
18	芒柄花苷 (ononin)	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	37	甘草次酸-3-阿拉伯糖葡萄糖醛酸苷 (araboglycyrrhizin)	C ₄₁ H ₆₂ O ₁₄
19	刺甘草查耳酮 (echinatin)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄			

drugbank.ca/) 查找 37 个活性成分活性潜在作用靶点。通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行靶点蛋白和基因信息校正, 筛选出物种为“homo sapiens”的靶点, 即为甘草潜在 Q-marker 的潜在靶点, 37 个化合物共涉及 158 个作用靶点蛋白 (共计 417 次)。将获得的 158 个靶点蛋白上传至 STRING 11.0 在线分析数据库 (<https://string-db.org>), 选择物种为“homo sapiens”, 选取最高置信度蛋白交互参数评分值>0.9 的蛋白互作数据, 导入 Cytoscape 3.7.1 构建 PPI 网络, 见图 1, 其中度 (degree) 值最高的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1) 能与 20 个蛋白发生相互作用。

2.2.3 通路注释和功能分析

(1) GO 富集分析: 采用 David v 6.7 数据库 (<https://david-d.ncifcrf.gov/home.jsp>) 对 158 个作用靶点在基因功能中的作用进行基因本体 GO 富集分析。本研究选择 GO 中生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个模块对基因进行功能注释 ($P<0.05$, $FDR<0.05$), 确定了 46 个 GO 条目 (图 2 根据 P 值列出前 20 个), 其中生物过程相关的条目最多, 共计 25 条, 主要涉及氧化还原、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢等过程; 分子功

能相关 16 条, 主要涉及氧化还原酶活性、类固醇结合、类固醇激素受体、铁离子结合等功能; 细胞组成相关 5 条, 主要富集在细胞膜和细胞液区域。

(2) KEGG 富集分析: 采用 David v 6.7 数据库对 158 个作用靶点进行 KEGG 生物通路富集分析, 根据 $P<0.05$ 、 $FDR<0.05$ 筛选出 8 条 (图 2), 包括癌症通路 (pathways in cancer)、卵巢类固醇生成信号通路 (ovarian steroidogenesis)、花生四烯酸代谢信号通路 (arachidonic acid metabolism)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、雌激素信号通路 (estrogen signaling pathway) 等, 表明 158 个靶点可能主要通过调控这些通路达到干预疾病的目的。

2.2.4 “成分-靶点-通路”网络构建及分析 将筛选到的甘草 37 个活性成分、158 个作用靶点、8 条信号通路运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“成分-靶点-通路”网络, 见图 3。由图 3 可知甘草中 37 个活性成分通过多靶点在不同的信号通路中发挥作用, 化合物、靶点、通路间存在错综复杂的关系, 符合中药“多成分、多靶点”的特点。以度 (degree) 为参考, 发现甘草次酸 (degree=37)、甘草素 (degree=22)、甘草苷 (degree=18)、异甘草苷 (degree=18)、甘草酸 (degree=15)、芹糖甘草苷

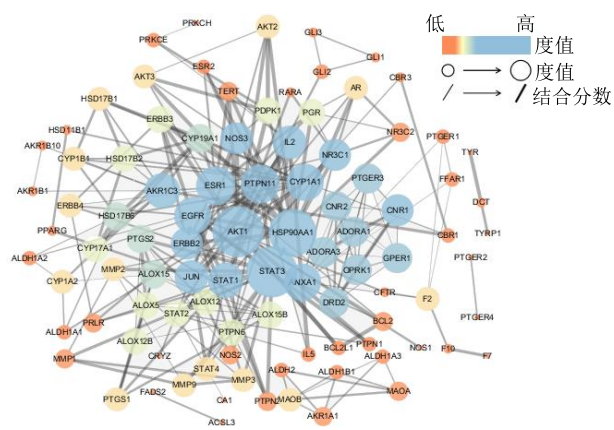


图 1 PPI 网络

Fig. 1 PPI network

(degree=10) 等化合物在网络中具有较高的连接度,提示这可能是甘草发挥药效的主要活性物质;以不小于 2 倍度值的中位数(度值中位数=5)为参考,AKT1 (degree=15)、HSD11B2 (degree=14)、MAPT (degree=12)、CYP19A1 (degree=14)、HSD11B1 (degree=14)、PTPN1 (degree=12)、HSD11B1L (degree=11)、ABCG2 (degree=11) 共 8 个靶点为核心靶点蛋白,提示这些可能是甘草中黄酮类及三萜类化合物作用于癌症、黏着连接、信号黏连等信号通路潜在的关键作用靶点。甘草黄酮类及皂苷类成分的网络药理学研究从成分有效性角度提示甘草次酸、甘草素、甘草苷、异甘草苷、甘草酸、芹糖甘草苷等成分可作为甘草潜在 Q-marker 进行深层次研究。

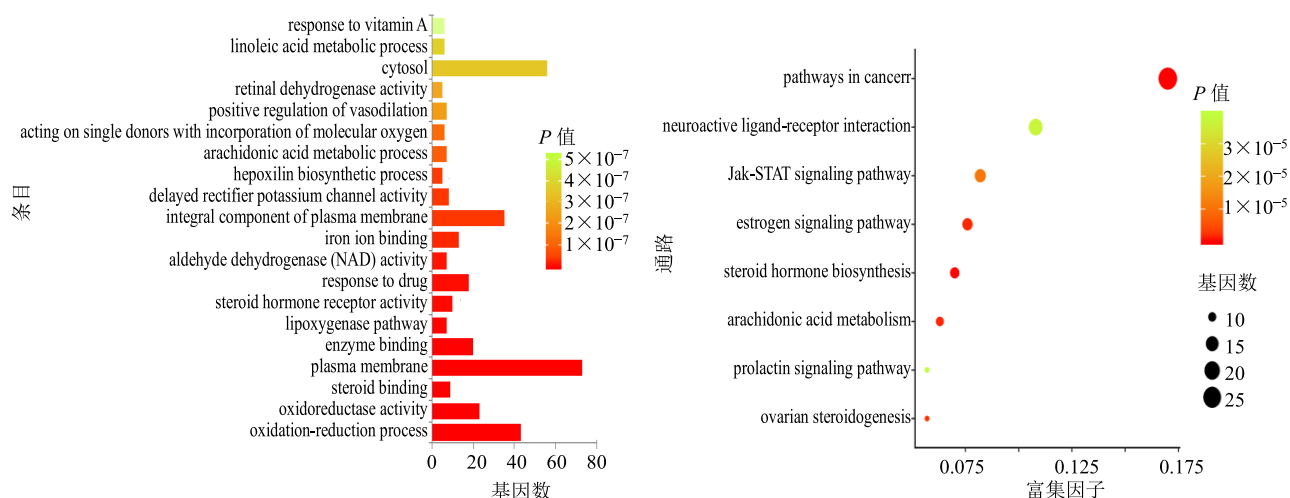


图 2 GO 富集分析 (前 20 条) 及 KEGG 富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis result of GO (top 20) and KEGG

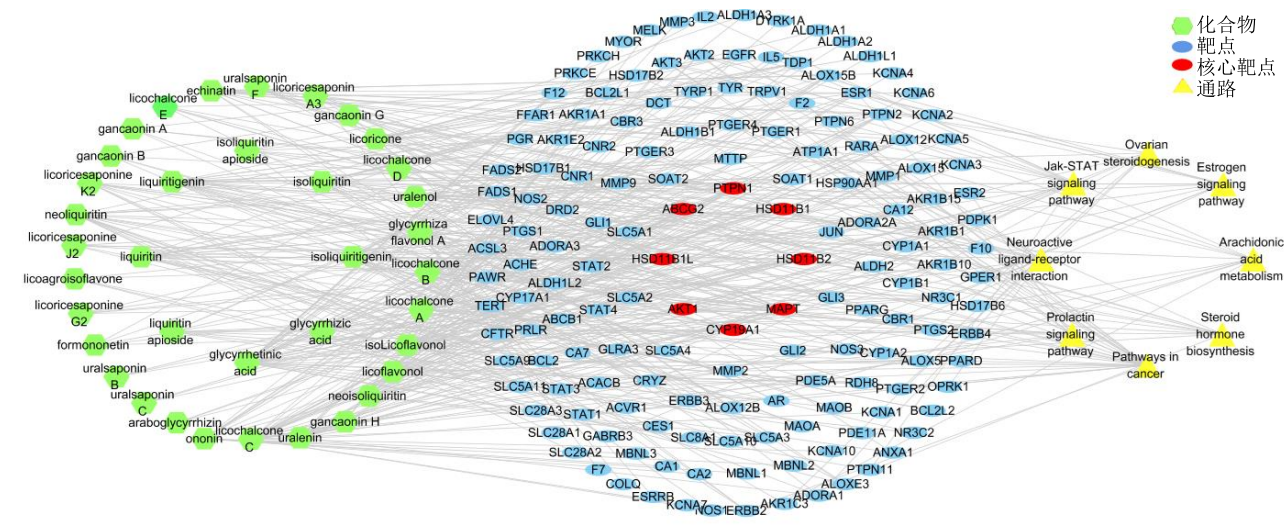


图 3 甘草成分-靶点-通路网络

Fig. 3 Network prediction of compound-target-pathway of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

2.3 甘草 Q-marker 的定性鉴别研究

2.3.1 色谱条件 汉邦科技 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A) -0.05%磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 19% A; 8~38 min, 19%~50% A; 38~40 min, 50% A; 40~42 min, 50%~19% A); 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 237 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 取各对照品精密称定, 加入 70%乙醇制得含甘草苷 18.30 μg/mL、异甘草苷 4.65 μg/mL、芹糖甘草苷 16.5 μg/mL、芹糖异甘草苷 6.32 μg/mL、芒柄花苷 8.82 μg/mL、刺甘草查耳酮 48.0 μg/mL、甘草查耳酮 B 17.0 μg/mL、甘草素 2.10 μg/mL、异甘草素 20.26 μg/mL、甘草酸 422.70 μg/mL、甘草次酸 15.30 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品粉末 (过 3 号筛) 精密称定 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 100 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 方法学考察

(1) 精密度试验: 取甘草样品 (S1), 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以甘草酸为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD, 结果各峰相对保留时间 RSD<0.27%, 相对峰面积 RSD<2.44%, 相似度≥0.999, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

(2) 重复性试验: 取甘草样品 (S1) 各 6 份, 按“2.3.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进行测定。以甘草酸为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果各峰相对保留时间 RSD<0.44%, 相对峰面积 RSD<2.58%, 相似度为 1, 表明该方法的重复性良好, 符合指纹图谱要求。

(3) 稳定性试验: 取甘草样品 (S1), 按“2.3.3”项下方法制备成供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进行测定。以甘草酸为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果各峰相对保留时间 RSD<0.29%, 相对峰面积 RSD<2.81%, 相似度为 1, 表明甘草供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.5 指纹图谱的建立及相似度评价 分别取 15 批

甘草药材, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件依次进样测定, 记录 HPLC 图。将 15 批供试品色谱图导入中药指纹图谱相似度评价系统 (2012A) 中, 用中位数法, 时间窗为 0.1, 生成对照图谱并进行相似度计算, 结果共标定 22 个共有峰, 得到甘草药材指纹图谱叠加图, 见图 4。经过与对照品的比对, 指认了其中 11 个色谱峰, 分别为芹糖甘草苷 (3 号峰)、甘草苷 (4 号峰)、芹糖异甘草苷 (5 号峰)、芒柄花苷 (7 号峰)、异甘草苷 (8 号峰)、甘草查耳酮 B (9 号峰)、甘草素 (10 号峰)、刺甘草查耳酮 (14 号峰)、异甘草素 (15 号峰)、甘草酸 (19 号峰)、甘草次酸 (20 号峰), 见图 5。运

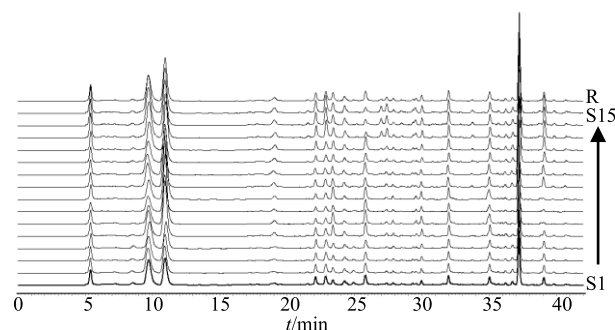
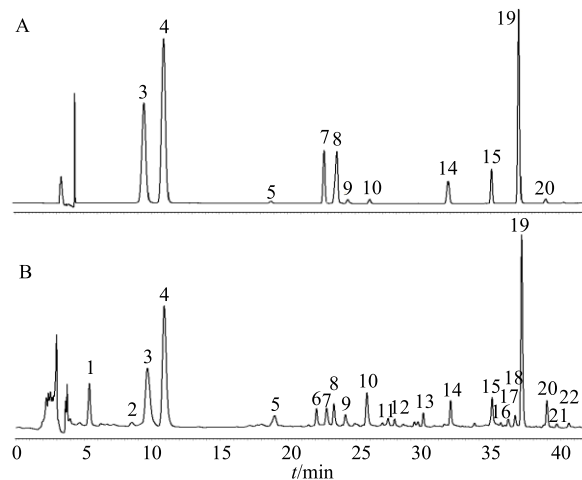


图 4 15 批甘草样品指纹图谱叠加图

Fig. 4 HPLC fingerprints of 15 batches of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*



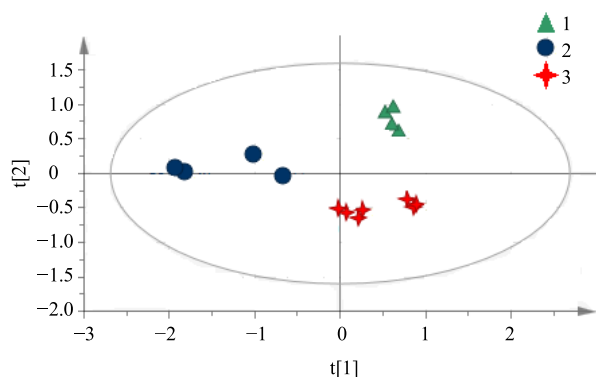
3-芹糖甘草苷 4-甘草苷 5-芹糖异甘草苷 7-芒柄花苷 8-异甘草苷 9-甘草查耳酮 B 10-甘草素 14-刺甘草查耳酮 15-异甘草素 19-甘草酸 20-甘草次酸
3-liquiritin apioside 4-liquiritin 5-isoliquiritin apioside 7-ononin 8-isoliquiritin 9-licochalcone B 10-glycyrrhizin 14-echinatin 15-isoliquiritigenin 19-glycyrrhizic acid 20-glycyrrhetinic acid

图 5 甘草混合对照品色谱图 (A) 及指纹图谱共有模式图 (B)
Fig. 5 Chromatogram of reference substances (A) and reference fingerprint of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (B)

用中药指纹图谱相似度评价系统 (2012A) 软件对 15 批甘草药材指纹图谱的相似度进行计算, 结果表明, 各产地甘草指纹图谱相似度在 0.937~0.998, 均>0.90, S1~S15 相似度依次为 0.980、0.982、0.982、0.976、0.989、0.940、0.980、0.937、0.998、0.995、0.997、0.997、0.983、0.982、0.981, 各批次甘草药材具有良好的一致性。

2.3.6 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 为更好地观察组间差异, 本实验在此基础上采用监督模式识别方法进行了各组间的 PLS-DA。结合评价 PLS-DA 模型的 3 个指标: 模型拟合参数 $R^2_X=0.884$, $R^2_Y=0.899$, 模型预测参数 $Q^2=0.868$, 均大于 0.5, 表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。

PLS-DA 得分矩阵图见图 6, 可看出 4 个产地甘草样品聚为 3 类, 新疆阿勒泰与甘肃陇西聚为 1 类; 不同产地的样品集中在不同区域, 宁夏产地分布在第 1 象限, 内蒙古鄂尔多斯产地的集中分布在第 2、3 象限, 甘肃陇西产地分布在第 3、4 象限, 新疆阿勒泰产地分布在第 4 象限。



1-宁夏 2-内蒙古鄂尔多斯 3-甘肃陇西、新疆阿勒泰
1-Ningxia 2-Inner Mongolia Ordos 3-Gansu longxi and Xinjiang aletai

图 6 15 批甘草样品的 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score plot for 15 batches of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

为明确引起各产地甘草差异的物质, 结合各变量的 VIP (variable importance in the projection) 值正态分布图 (图 7), 筛选出贡献较大的 5 个变量 ($VIP>1$), VIP 值由大到小依次为 4 号峰 (甘草苷)、19 号峰 (甘草酸)、3 号峰 (蔗糖甘草苷)、1 号峰、20 号峰 (甘草次酸), 这些成分在区分不同产地甘草时起到重要作用, 是甘草的主要标志性成分, 进而对甘草苷、甘草酸、蔗糖甘草苷、甘草次酸 4 个成分做进一步的定量分析。

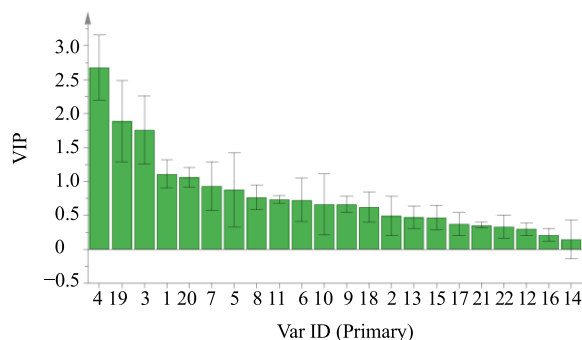


图 7 甘草药材的重要性变量

Fig. 7 VIP plot of PLS-DA of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

2.4 甘草 Q-marker 含量测定

2.4.1 色谱条件 同“2.3.1”项下色谱条件。

2.4.2 对照品溶液的制备 取各对照品精密称定, 加入 70%乙醇制得含蔗糖甘草苷 25.28 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 33.0 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸 57.50 $\mu\text{g/mL}$ 、甘草次酸 30.60 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 同“2.3.3”项下供试品溶液制备条件进行制备。

2.4.4 方法学考察

(1) 线性关系考察: 精密量取“2.4.2”项下混合对照品溶液, 用倍比稀释的方法以 70%乙醇制成系列对照品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样, 分别测定蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸、甘草次酸的峰面积, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归并绘制标准曲线, 结果见表 2。

表 2 4 个标志性成分的线性回归方程

Table 2 Linear regression equation for four labeled components

化合物	回归方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
蔗糖甘草苷	$Y=53\ 615\ X+6\ 961.7$	0.999 6	1.58~25.28
甘草苷	$Y=31\ 493\ X+43\ 337$	0.999 9	0.83~33.00
甘草酸	$Y=10\ 956\ X+894.75$	0.999 7	3.59~57.50
甘草次酸	$Y=8\ 925.8\ X+2\ 191.7$	0.999 8	1.91~30.60

(2) 精密度试验: 取甘草样品(S1), 按“2.4.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次。计算供试品溶液中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸和甘草次酸的峰面积 RSD 分别为 0.46%、1.00%、0.01%、1.63%, 表明仪器精密度良好。

(3) 重复性试验: 取甘草样品(S1) 各 6 份, 按“2.4.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 计算供试品溶液中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸和甘草次酸的峰面积 RSD 分别为 1.55%、1.20%、0.96%、1.04%, 表明该方法的重复性良好。

(4) 稳定性试验: 取甘草样品(S1), 按“2.4.3”项下方法制备成供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 计算供试品溶液中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸和甘草次酸的峰面积 RSD 分别为 0.36%、0.54%、0.32%、0.65%, 表明甘草供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(5) 加样回收率试验: 取已知含量的甘草粉末(S1) 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份。根据蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸和甘草次酸的含量按约 1:0.5、1:1、1:1.5 的量添加甘草苷、甘草酸、蔗糖甘草苷、甘草次酸对照品, 按“2.4.3”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算供试品中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸和甘草次酸的平均加样回收率分别为 99.76%、100.03%、98.97%、101.97%, RSD 分别为 1.35%、1.93%、1.99%、1.19%, 表明该方法的准确度良好。

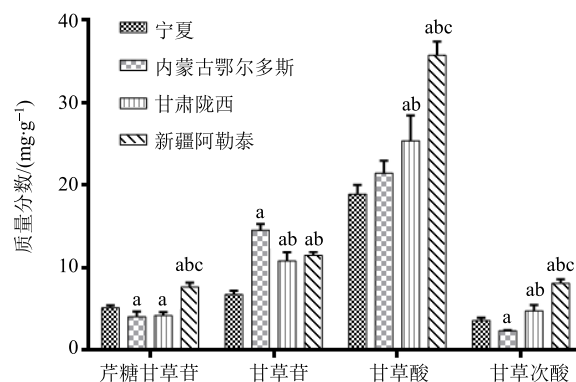
2.4.5 样品测定 取 15 批甘草样品, 按“2.4.3”项下的方法制备供试品溶液, 在“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 测定峰面积, 计算蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草酸、甘草次酸的含量, 并运用 SPSS 22.0 进行显著性分析, 结果见表 3、图 8。

结果表明, 不同产地甘草 4 个成分的含量差异明显, 蔗糖甘草苷、甘草酸和甘草次酸含量均以新疆阿勒泰产地最高, 蔗糖甘草苷和甘草次酸含量均以内蒙古鄂尔多斯最低, 甘草苷和甘草酸含量均以宁夏最低, 甘草苷含量以内蒙古鄂尔多斯最高, 可见不同产地甘草的成分含量各有高低; 且除甘肃陇西与内蒙古鄂尔多斯在蔗糖甘草苷、新疆阿勒泰与甘肃陇西在甘草苷、宁夏与内蒙古鄂尔多斯在甘草酸含量上无显著性差异外, 各产地间在 4 个成分含量上均存在显著性

表 3 15 批甘草样品含量测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination results of 15 batches of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* ($n=3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
	蔗糖甘草苷	甘草苷	甘草酸	甘草次酸
S1	4.98	6.61	19.10	3.80
S2	5.55	7.42	20.39	3.97
S3	4.84	6.47	17.88	3.40
S4	5.18	6.47	18.31	3.24
S5	4.99	14.21	23.67	2.41
S6	3.63	14.93	20.87	2.43
S7	3.86	13.75	20.84	2.16
S8	3.68	15.33	20.35	2.33
S9	4.74	11.25	24.46	4.59
S10	4.08	10.67	23.86	4.14
S11	4.17	9.41	23.22	4.44
S12	3.85	11.91	29.93	5.81
S13	7.28	11.22	34.26	7.66
S14	7.41	11.27	35.39	8.04
S15	8.26	11.98	37.54	8.63



与宁夏比较: ^a $P < 0.05$; 与内蒙古鄂尔多斯比较: ^b $P < 0.05$; 与甘肃陇西比较: ^c $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ vs Ningxia ^b $P < 0.05$ vs Inner Mongolia Ordos ^c $P < 0.05$ vs Gansu Longxi

图 8 不同产地甘草各指标成分的差异分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Analysis on differences of index components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in different areas ($\bar{x} \pm s, n=3$)

差异。4 个成分含量可测, 为主要化学标志物且对不同产地甘草差异具有显著影响, 因此, 最终明确甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸、甘草次酸可作为甘草的潜在 Q-marker。

3 讨论

本研究依据刘昌孝院士提出的 Q-marker 理念, 通过文献研究初步锁定甘草 Q-marker 的来源范围

为黄酮类和三萜类化合物,基于网络药理学从有效性的角度对其进行研究,发现甘草黄酮类及三萜类成分中 37 个活性成分可通过 AKT1、HSD11B2、MAPT 等靶点作用于癌症、黏着连接等关键信号通路发挥药理作用。为进一步明确甘草的 Q-marker,采用高效液相技术从可测性角度对不同产地甘草进行定性及定量研究,结果表明不同产地甘草中甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸和甘草次酸 4 个标志性成分含量高低各异且具有显著差异;结合网络药理学分析结果确定这 4 个化学成分既是造成产地间差异的主要标记性成分,又是甘草发挥临床功效的活性成分,因此最终确定甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸、甘草次酸为甘草潜在的 Q-marker,为甘草质量控制的指标成分选择提供了实验依据。

Q-marker 从质量传递与溯源、成分特有性、成分的有效性、成分可测性及复方配伍环境 5 方面对中药 Q-marker 进行探讨,本研究主要从有效性及可测性角度初步预测甘草潜在 Q-marker。目前,相关研究对甘草生品和不同炮制品中标定到的甘草苷、甘草酸、蔗糖甘草苷等共有成分进行测定^[15,21-22],准确表达从“药材-饮片”的传递和溯源特性。基于复方配伍环境麻黄汤^[23]、苓桂术甘汤^[24]、白虎加桂枝汤^[25]等中药复方以含甘草特有性成分甘草苷、甘草酸在内的标志性成分对复方进行质量控制,在四君子汤治疗脾气虚证的 Q-marker 研究中表征到甘草苷、甘草酸、甘草次酸为来源于甘草的 Q-marker^[26],基于复方配伍理念,不仅体现了甘草中甘草苷、甘草酸等成分的特有性,且体现了“药材-饮片-复方”的传递和溯源性。结合国内外研究进一步佐证了本研究初步预测甘草苷、蔗糖甘草苷、甘草酸、甘草次酸为甘草潜在 Q-marker 的合理性。

甘草是多基原中药,具有野生和种植品 2 种生态类型,现存甘草片、炒甘草、炙甘草等几种炮制品,甘草亦作为炮制辅料、在复方制剂中也有使用。因此,对甘草进行 Q-marker 的确定有利于甘草及含甘草复方制剂的质量控制。可测性研究部分本课题仅以甘草这一基原为主要研究对象初步预测甘草潜在 Q-marker,尚未对多基原、不同炮制品、中药复方及其代谢产物进行整体研究,后续有待根据 Q-marker 的整体研究模式,借助液质联用、代谢组学、分子探针等前沿技术针对甘草多种基原及生态类型的药材、炮制品、中药复方及代谢产物进行深入研究,为甘草的质量追溯和评价体系提供更为全面的科学依据。

参考文献

- [1] 崔鸿宾. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [2] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [3] 孙立丽, 游广娇, 任晓亮, 等. 甘草化学成分快速定性分析与化学模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2074-2079.
- [4] 杨 豆, 张卫波. 甘草化学成分及药理作用研究 [J]. 湖南饲料, 2017(3): 21-23.
- [5] Wang M, Zhang M, Tang Q, et al. Influence of honey-roasting on the main pharmacological activities and the water-soluble active glycosides of licorice [J]. *Afr J Tradit Compl Altern Med*, 2012, 9(2): 189-196.
- [6] Park S Y, Kim E J, Choi H J, et al. Anti-carcinogenic effects of non-polar components containing licochalcone A in roasted licorice root [J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(3): 257-266.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 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.
- [9] 张铁军, 白 钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [10] Zhang Q, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [11] 郑云枫, 魏娟花, 冷 康, 等. 甘草属 *Glycyrrhiza* L. 植物资源化学及利用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1096-1108.
- [12] Yang R, Yuan B C, Ma Y S, et al. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 5-18.
- [13] 姜 雪, 孙森凤, 王 悦, 等. 甘草药理作用研究进展 [J]. 化工时刊, 2017, 31(7): 25-28.
- [14] Tao W, Duan J, Zhao R, et al. Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of *Glycyrrhiza* based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1681-1689.
- [15] 杨 瑞, 李文东, 马永生, 等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 318-326.
- [16] 杨 瑞, 袁伯川, 马永生, 等. 3 种不同基原甘草中 4 个主要黄酮类化合物的含量分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1729-1736.
- [17] Baba M, Fukuda E, Uesawa Y, et al. Application of

- mixture analysis to crude materials from natural resources (V) [1]: Discrimination of *Glycyrrhiza uralensis* and *G. glabra* by EI mass spectrometry [J]. *Nat Prod Commun*, 2017, 12(1): 27-29.
- [18] Wang C, Cai Z, Shi J, *et al.* Comparative metabolite profiling of wild and cultivated licorice based on ultra-fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67(10): 1104-1115.
- [19] Wei S S, Yang M, Chen X, *et al.* Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbitrap mass spectrometry analyses [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 232-240.
- [20] Jiang Z, Wang Y, Zheng Y, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry and chemometric analysis of licorice based on the simultaneous determination of saponins and flavonoids [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(15): 2928-2940.
- [21] 周 萃, 杨燕云, 顾颖杰, 等. 甘草饮片及其四种炮制品的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 377-380.
- [22] 关 皎, 王 强, 孙宇慧, 等. UFLC 法同时测定甘草及其炮制品中 2 种活性成分的含量 [J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(4): 241-243.
- [23] 张国瑗. 经典名方麻黄汤物质基准研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [24] 陈 蒙, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量测定 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4152-4157.
- [25] 郭敏群, 严曾豪, 吴 灏, 等. 基于 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术的白虎加桂枝汤化学物质基础 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 134-141.
- [26] Zhao Q, Gao X, Yan G, *et al.* Chinmedomics facilitated quality-marker discovery of Sijunzi decoction to treat spleen qi deficiency syndrome [J]. *Front Med*, 2019, doi: 10.1007/s11684-019-0705-9.