

## 仲景名方白头翁汤的指纹图谱及功效关联物质预测分析

丘海芯<sup>1</sup>, 甘金月<sup>1</sup>, 王宝林<sup>1</sup>, 杨世林<sup>1</sup>, 许琼明<sup>1</sup>, 覃喜军<sup>1</sup>, 谭小青<sup>2</sup>, 高红伟<sup>1,3\*</sup>, 刘振杰<sup>1\*</sup>

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530299

2. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西 南宁 530022

3. 广西优势中成药与民族药开发工程技术研究中心, 广西 南宁 530299

**摘要:** **目的** 研究仲景名方白头翁汤的化学成分, 建立 HPLC 指纹图谱, 并结合网络药理学对其功效关联物质进行机制预测分析, 为白头翁汤质量控制提供参考依据。 **方法** 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对白头翁汤的化学成分进行定性分析, 建立 HPLC 指纹图谱, 进行相似度评价, 匹配共有峰并进行色谱峰归属。基于质谱鉴定和指纹图谱筛选白头翁汤的有效成分, 通过网络药理学建立了“组分-靶点-通路”网络, 进一步佐证白头翁汤有效成分选择的合理性。 **结果** 通过数据库匹配、元素组成和碎片结构分析, 共鉴定出 21 种化合物; 在建立 15 批白头翁汤样品的指纹图谱中, 标定 16 个共有峰, 通过对照品指认出秦皮甲素 (峰 2)、秦皮乙素 (峰 5)、秦皮素 (峰 7)、白头翁皂苷 B4 (峰 15)、白头翁皂苷 B5 (峰 16)、黄柏碱 (峰 3)、黄连碱 (峰 11)、小檗碱 (峰 13)、巴马汀 (峰 14) 9 个色谱峰, 各批次样品相似度均 >0.90, 且 16 个共有峰均能归属到白头翁、黄连、黄柏、秦皮 4 味药材; 通过网络药理学对所指认的 9 个药效成分进行机制预测, 富集的通路中含癌症通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路以及缺氧信号转导-1 (hypoxia signaling-1, HIF-1) 信号通路等, 这些通路可能与白头翁汤治疗疾病的作用相关。 **结论** UPLC-Q-TOF-MS/MS 法能快速鉴定白头翁汤的成分, 建立的白头翁汤指纹图谱分析方法简便可行, 结合网络药理学发现白头翁汤 9 个成分与白头翁汤功效属性密切相关, 为白头翁汤的质量控制提供参考, 同时也为白头翁汤药效关联物质基础的研究及作用机制的探索奠定基础。

**关键词:** 白头翁汤; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度评价; 网络药理学; 秦皮甲素; 秦皮乙素; 秦皮素; 白头翁皂苷 B4; 白头翁皂苷 B5; 黄柏碱; 黄连碱; 小檗碱; 巴马汀; 白头翁; 黄连; 黄柏; 秦皮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1740-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.016

## Predictive analysis of fingerprints and efficacy related substances of Zhongjing famous prescription Baitouweng Decoction

QIU Hai-xin<sup>1</sup>, GAN Jin-yue<sup>1</sup>, WANG Bao-lin<sup>1</sup>, YANG Shi-lin<sup>1</sup>, XU Qiong-ming<sup>1</sup>, QIN Xi-jun<sup>1</sup>, TAN Xiao-qing<sup>2</sup>, GAO Hong-wei<sup>1,3</sup>, LIU Zhen-jie<sup>1</sup>

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, China

2. Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China

3. Guangxi Engineering Technology Research Center of Advantage Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530299, China

**Abstract: Objective** To study the chemical components of a famous prescription of Zhongjing named Baitouweng Decoction (白头翁汤), establish HPLC fingerprint and analyze the mechanism of its efficacy-related substances using network pharmacology, so as to provide a reference for the quality control of Baitouweng Decoction. **Methods** Qualitative analysis of the chemical components of Baitouweng Decoction was carried out by UPLC-Q-TOF-MS/MS, the HPLC method was used to establish the fingerprint analysis

收稿日期: 2021-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860711); 国家自然科学基金资助项目 (81860270); 广西自然科学基金资助项目 (2018GXNSFBA281034); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD19245124)

作者简介: 丘海芯, 硕士研究生, 研究方向为中药化学和中药分析。Tel: 18894642093 E-mail: 974525034@qq.com

\*通信作者: 刘振杰, 助理研究员, 研究方向为药物分析。Tel: 13737048648 E-mail: rainman982@126.com

高红伟, 博士, 副研究员, 主要研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。Tel: 18077022216 E-mail: gaohongwei06@126.com

method of Baitouweng Decoction and the similarity was evaluated. The common peaks were matched, at the same time, the attribution analysis of each common peak was performed. The active ingredients of Baitouweng Decoction were screened based on Mass spectrometry identification and fingerprints, and the “component-target-pathway” network was established through network pharmacology, which further supported the rationality of functional components selection for Baitouweng Decoction. **Results** Through database matching, element composition and fragment structure analysis, a total of 21 compounds were identified. The Baitouweng Decoction fingerprint analysis method was established, 15 batches of Baitouweng Decoction samples were measured, 16 common peaks were calibrated, and nine peaks of esculin (peak 2), aesculetin (peak 5), fraxetin (peak 7), anemoside B4 (peak 15), anemoside B5 (peak 16), phellodendrine (peak 3), coptisine (peak 11), berberine (peak 13) and palmatine (peak 14) were identified by comparing with the reference substance. The similarity of each batch of samples was greater than 0.90. And the 16 common peaks can be assigned to the four flavors of Baitouweng (*Pulsatillae Radix*), Huanglian (*Coptidis Rhizoma*), Huangbo (*Phellodendri Chinensis Cortex*), and Qinpi (*Fraxini Cortex*). The mechanism of the identified nine medicinal components was predicted. The enriched pathways included cancer pathways, PI3K-Akt signaling pathways, and HIF-1 signaling pathways, which may be related to the effect of Baitouweng Decoction in treating diseases. **Conclusion** The UPLC-Q-TOF-MS/MS method can quickly identify the chemical components of Baitouweng Decoction, and the fingerprint analysis method established in this experiment is simple and feasible. Combined with network pharmacology, it is found that the nine components of Baitouweng Decoction are closely related to the efficacy and attributes of Baitouweng Decoction, which provides a reference for the overall control of the quality and provides a material basis for the efficacy of Baitouweng Decoction. The research and the exploration of the mechanism of action also lay the foundation.

**Key words:** Baitouweng Decoction; UPLC-Q-TOF-MS/MS; HPLC; fingerprint; similarity evaluation; network pharmacology; esculin; aesculetin; fraxetin; anemoside B4; anemoside B5; phellodendrine; coptisine; berberine; palmatine; *Pulsatillae Radix*; *Coptidis Rhizoma*; *Phellodendri Chinensis Cortex*; *Fraxini Cortex*

白头翁汤 (Baitouweng Decoction) 源于张仲景的《伤寒论》<sup>[1]</sup>, 由白头翁、黄连、黄柏、秦皮 4 味药组成, 具有清热解毒、凉血止痢的功效<sup>[2]</sup>, 为治湿热痢疾的首选方剂。近年来, 对这一传统方剂的化学成分和药理作用的深入研究证明其具有显著的药理活性<sup>[3]</sup>, 现已向临床各科扩展<sup>[4]</sup>, 且在兽医临床也有广泛应用。鉴于中药复方具有多成分-多靶点-多通路的特点, 超高效液相色谱-三重四极杆飞行时间质谱联用 (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术可实现对中药及中药复方化学成分的快速分析, 同时指纹图谱技术能够更加全面地反映药材的内在整体化学成分类型, 并且可用于评价中药材质量的真实性、优良性和稳定性, 为中药及中药复方质量控制提供有效手段<sup>[5-6]</sup>。

化学模式识别技术可以将多个指标进行综合、降维和分类分析, 对指纹图谱中的信息进行表达、识别和处理, 二者结合可以更加系统、全面、客观地评价中药的质量<sup>[7]</sup>。网络药理学预测可快速发现中药主要作用通路及作用靶点, 对于预测中药成分的潜在作用靶点具有重要意义<sup>[8-10]</sup>。目前尚未见有关白头翁汤指纹图谱的研究报道, 本实验对白头翁汤进行化学成分定性分析, 再建立白头翁汤的 HPLC 指纹图谱, 结合多元统计学方法, 初步筛选出差异常标志物, 结合网络药理学寻找潜在作用靶点和作用

通路, 为白头翁汤质量控制提供参考, 也为白头翁汤药效关联物质基础的研究及作用机制的探索奠定基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Sciex X500R Q-TOF 液质联用仪, 美国 Sciex 公司, 配有 ESI 源和 Sciex OS 数据处理软件; Waters Acquity Arc 超高效液相色谱仪, 四元泵、自动进样器、柱温箱、2998PDA 检测器、Waters 工作站, 沃特世科技 (上海) 有限公司; SB-800DTD 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SQP 型十万分之一电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司。

### 1.2 材料

**1.2.1 试剂** 水为屈臣氏饮用水, 甲醇为分析级, 乙腈为色谱级。对照品白头翁皂苷 B4 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、白头翁皂苷 B5 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、秦皮甲素 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、秦皮乙素 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、秦皮素 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、黄柏碱 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、盐酸黄连碱 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、盐酸小檗碱 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ )、盐酸巴马汀 (HPLC 质量分数  $\geq 98\%$ ), 上述试剂均购于成都普思生物科技股份有限公司。

**1.2.2 药材** 白头翁为毛茛科白头翁属植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 的干燥根; 秦皮为木犀科白蜡树属植物白蜡树 *Fraxinus chinensis* Roxb. 的干燥枝皮或干皮; 黄柏为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮;

黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎<sup>[2]</sup>。经广西中医药大学许琼明教授鉴定, 所购买的饮片均为正品。将单味药各批次饮片随机取样组合, 得到 15 批白头翁汤样品, 编号为 S1~S15, 药材产地信息见表 1。

表 1 药材产地信息

Table 1 Origin information of medicinal herbs

样品编号	黄连	秦皮	白头翁	黄柏
S1	四川 (批次 20191201)	陕西 (批次 180901)	秦皇岛 (批次 2021042804)	四川 (批次 20201002)
S2	四川 (批次 20201201)	陕西 (批次 20200501)	大连 (批次 2021042805)	广西 (批次 20200701)
S3	四川 (批次 20200603)	陕西 (批次 180901)	秦皇岛 (批次 2021042804)	广西 (批次 20200701)
S4	四川 (批次 20201201)	陕西 (批次 20200501)	鞍山 (批次 2021042802)	广西 (批次 20200701)
S5	四川 (批次 20200603)	陕西 (批次 20180401)	大连 (批次 2021042805)	四川 (批次 200901)
S6	四川 (批次 20200603)	陕西 (批次 20180401)	鞍山 (批次 2021042802)	四川 (批次 200901)
S7	四川 (批次 20200603)	陕西 (批次 20200501)	保定 (批次 2021050401)	四川 (批次 20201002)
S8	四川 (批次 D21010B4)	陕西 (批次 20180401)	秦皇岛 (批次 2021042804)	四川 (批次 200401)
S9	四川 (批次 20201001)	陕西 (批次 180901)	大连 (批次 2021042805)	广西 (批次 20200701)
S10	四川 (批次 D21010B4)	陕西 (批次 20180401)	保定 (批次 2021050401)	四川 (批次 200401)
S11	四川 (批次 20201001)	陕西 (批次 180901)	鞍山 (批次 2021042802)	四川 (批次 20201002)
S12	四川 (批次 201907299)	陕西 (批次 20200501)	保定 (批次 2021050401)	四川 (批次 200901)
S13	四川 (批次 20191201)	陕西 (批次 180901)	秦皇岛 (批次 2021042804)	四川 (批次 20201002)
S14	四川 (批次 201907299)	陕西 (批次 20180401)	保定 (批次 2021050401)	四川 (批次 200401)
S15	四川 (批次 20191201)	陕西 (批次 20180401)	大连 (批次 2021042805)	四川 (批次 200401)

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 白头翁汤样品溶液制备** 张仲景《伤寒论》中记载白头翁汤的处方为白头翁 15 g、黄柏 12 g、黄连 6 g、秦皮 12 g, 本实验按照原方比例进行煎煮, 即白头翁-黄柏-黄连-秦皮 5:4:2:4。将 4 种单味药随机组合成的 S1~S15 样品按比例称取, 加入 10 倍量的水, 煎煮 2 次, 每次煎煮 1 h, 过滤后合并滤液, 滤液备用。取滤液过 0.22 μm 滤膜, 即得到白头翁汤供试品溶液。

**2.1.2 单味药样品溶液制备** 将白头翁汤处方中的白头翁、黄柏、黄连、秦皮的 4 种单味饮片按“2.2.1”项的煎煮方法制备溶液, 即得到单味药样品供试品溶液。

**2.1.3 混合对照品溶液的制备** 精密称取 9 个对照品, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 得到含秦皮甲素 0.13 mg/mL、秦皮乙素 0.63 mg/mL、秦皮素 0.41 mg/mL、白头翁皂苷 B4 0.11 mg/mL、白头翁皂苷 B5 0.06 mg/mL、黄柏碱 0.9 mg/mL、盐酸黄连碱 0.62 mg/mL、盐酸小檗碱 1.63 mg/mL、盐酸巴马汀 0.16

mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.2 UPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Hypersil Gold C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~1 min, 5%乙腈; 1~5 min, 5%~27%乙腈; 5~15 min, 27%~70%乙腈; 15~18 min, 70%~95%乙腈; 18~20 min, 95%~5%乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40.0 °C; 进样量 3 μL。

**2.2.2 质谱条件** 电喷雾电离源 (ESI), 正、负离子模式, 扫描范围  $m/z$  100~2000; 碰撞能量 35 eV; 离子源温度为 600 °C; 喷雾电压 5500 V。通过一级质谱信息确定精确相对分子质量, 二级质谱获得裂解信息, 搜索数据库和查阅文献推测化合物的结构式信息。

**2.2.3 化合物质谱分析** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对白头翁汤进行分析, 选择正、负离子模式分别对供试品溶液进行扫描, 总离子流图 (total ions current, TIC) 见图 1。通过 SCIX OS 数据处理系统查找质谱响应较高的成分的精确相对分子质量, 与天然产物高分辨质谱数据库 (natural products HR-

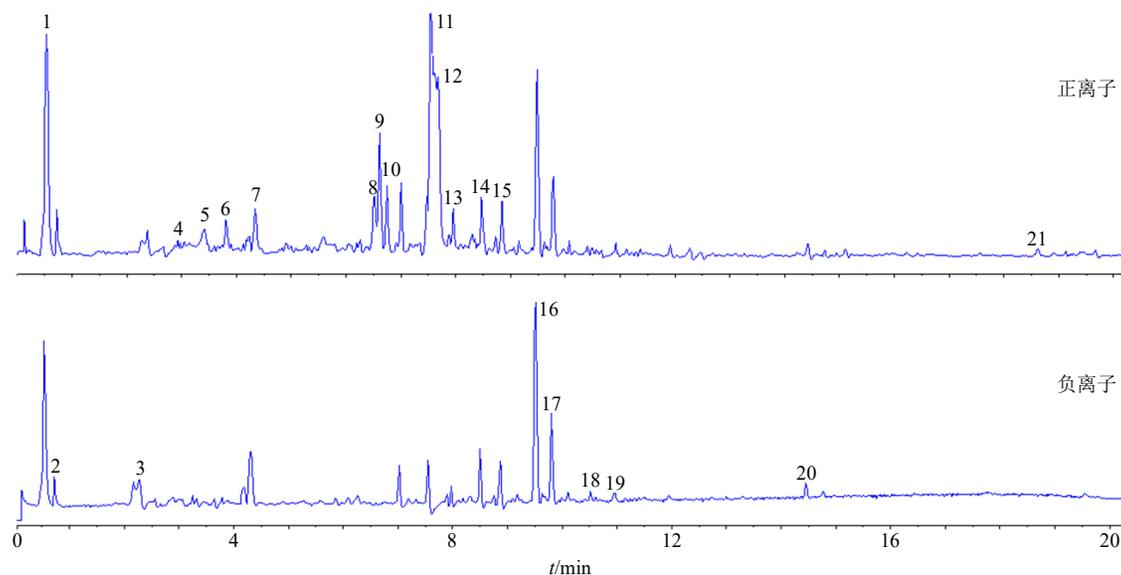


图1 白头翁汤的正离子、负离子模式的 TIC 图

Fig. 1 TIC of Baitouweng Decoction in positive and negative modes

MS/MS 2.0) 进行比对, 获得候选化合物, 然后通过二级碎片离子及母离子可能的断裂规律来确定其结构, 最后通过市售对照品保留时间的对比, 对部分成分的结果作进一步确证。结果显示, 从白头翁汤中鉴定出 21 个化学成分, 各化学成分的保留时间、质谱信息见表 2。通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术对白头翁汤的化学成分进行了初步鉴定, 发现白头翁汤中所含成分可分为生物碱类、香豆素类、皂苷类和柠檬苦素类 4 大类成分, 与文献研究结果相一致<sup>[1]</sup>。为反映白头翁汤内在整体化学成分情况, 实验将结合指纹图谱和网络药理学对白头翁汤进一步研究, 以期了解其药效物质基础。

### 2.3 白头翁汤指纹图谱的建立及相似度评价

**2.3.1 色谱条件** 采用 Ultimate<sup>®</sup> XB C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水溶液, 梯度洗脱: 0~2 min, 10%甲醇; 2~75 min, 10%~48%甲醇; 75~90 min, 48%~73%甲醇; 90~95 min, 73%甲醇; 95~100 min, 73%~75%甲醇; 柱温 30 °C; 体积流量 0.6 mL/min; 进样量 5 μL; 检测波长 210 nm。

**2.3.2 参照峰的选择** 在特征图谱中, 小檗碱含量较高, 色谱峰较稳定, 故选择小檗碱的色谱峰 (13) 作为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

**2.3.3 精密度试验** 取编号为 S1 的白头翁汤供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 连续进样 6 次, 记录谱图, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD

均小于 3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取编号为 S1 的白头翁汤样品, 平行制备 6 份白头翁汤供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 测定特征图谱, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 表明方法重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取编号为 S1 的白头翁汤供试品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 将样品置于室温下, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.6 指纹图谱建立及相似度评价** 按“2.1.1”项下方法, 分别制备 S1~S15 白头翁汤供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版) 软件, 设定 S1 样品的色谱图为参照图谱, 利用多点校正方式, 时间窗宽度为 0.1 min, 平均数法生成指纹图谱和对照指纹图谱。15 批白头翁汤样品的指纹图谱 (图 2), 并进行相似度评价, S1~S15 的相似度结果分别为 0.980、0.973、0.941、0.952、0.956、0.987、0.983、0.987、0.930、0.935、0.981、0.947、0.983、0.933、0.997, 结果显示相似度均 > 0.90。

根据特征图谱分析, 将白头翁汤与各单味药样品 HPLC 谱图进行比对, 确定出峰情况良好、无干

表 2 白头翁汤中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果

Table 2 Identification result of chemical components in Baitouweng Decoction by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	$t_R$ /min	电离模式	理论值 ( $m/z$ )	实测值 ( $m/z$ )	误差/ $(\times 10^{-6})$	MS/MS 二级碎片	分子式	鉴定化合物
1	0.533	$[M+H]^+$	370.301 1	370.302 0	2.4	121.065 1, 180.139 3	$C_{16}H_{18}O_{10}$	秦皮苷
2	0.721	$[M-H]^-$	191.020 0	191.021 0	5.2	191.173 0, 111.855 0	$C_{15}H_{10}O_7$	柠檬酸
3	2.260	$[M-H]^-$	339.074 9	339.075 6	2.1	177.024 9	$C_{15}H_{16}O_9$	秦皮甲素*
4	2.996	$[M+H]^+$	179.034 6	179.034 0	-3.4	123.044 2	$C_9H_6O_4$	秦皮乙素*
5	3.404	$[M+H]^+$	342.171 8	342.170 3	-4.3	192.101 4	$C_{20}H_{24}NO_4$	黄柏碱*
6	3.813	$[M+H]^+$	209.043 4	209.044 6	5.7	166.026 6, 209.044 6	$C_{10}H_8O_5$	秦皮素*
7	4.345	$[M+H]^+$	342.170 5	342.170 1	-1.2	297.112 5, 265.086 7	$C_{20}H_{24}NO_4$	木兰花碱
8	6.511	$[M+H]^+$	320.095 4	320.095 8	1.3	292.097 2, 262.086 6	$C_{19}H_{14}NO_4$	黄连碱*
9	6.609	$[M+H]^+$	339.142 5	339.142 9	1.2	322.107 2, 323.115 1, 265.064 0, 294.112 5	$C_{20}H_{20}NO_4$	药根碱
10	6.745	$[M+H]^+$	337.126 5	337.125 9	-1.8	320.091 5, 292.097 5	$C_{20}H_{18}NO_4$	表小檗碱
11	7.597	$[M+H]^+$	336.123 0	336.122 1	2.7	320.091 9, 278.083 1	$C_{20}H_{18}NO_4$	小檗碱*
12	7.769	$[M+H]^+$	353.155 5	353.156 9	4.0	278.081 8, 336.123 0	$C_{21}H_{22}NO_4$	巴马汀*
13	7.952	$[M+H]^+$	353.104 1	353.105 2	3.1	278.068 7	$C_{21}H_{22}NO_4$	掌叶防己碱
14	8.473	$[M+H]^+$	455.206 0	455.205 4	-2.4	114.092 0, 453.345 1	$C_{26}H_{30}O_7$	黄柏酮
15	8.845	$[M+H]^+$	471.201 0	471.202 2	1.9	243.138 7, 404.344 2	$C_{26}H_{30}O_8$	柠檬苦素
16	9.509	$[M-H]^-$	1 221.626 0	1 221.630 1	3.4	749.459 9, 750.461 1, 603.401 4, 469.164 8	$C_{59}H_{96}O_{26}$	白头翁皂苷 B4*
17	9.805	$[M-H]^-$	1 221.619 5	1 221.619 1	-0.3	749.461 0, 471.349 1	$C_{56}H_{96}O_{26}$	白头翁皂苷 B5*
18	10.515	$[M-H]^-$	895.913 4	895.912 9	-5.6	895.518 8, 733.464 6	$C_{47}H_{76}O_{16}$	黑海常春藤皂苷 A1*
19	10.958	$[M-H]^-$	911.501 0	911.502 1	1.2	765.440 3, 603.390 2	$C_{47}H_{76}O_{17}$	白头翁皂苷 D
20	14.456	$[M-H]^-$	749.454 0	749.454 6	0.8	471.351 0, 603.400 8	$C_{41}H_{66}O_{12}$	$\alpha$ -常春藤皂苷*
21	18.615	$[M+H]^+$	457.368 0	457.365 9	4.6	207.369 3, 190.010 7	$C_{33}H_{52}O_8$	齐墩果酸

\*表示化合物已通过对照品比对

\* indicates that the compound has been compared with the reference substance

扰的色谱峰为各药味特征峰(图3)。15批白头翁汤指纹图谱共检测到16个共有峰,经过与混合对照

品溶液图谱的比对(图4),指认了9个色谱峰,分别为秦皮甲素(峰2)、黄柏碱(峰3)、秦皮乙素(峰

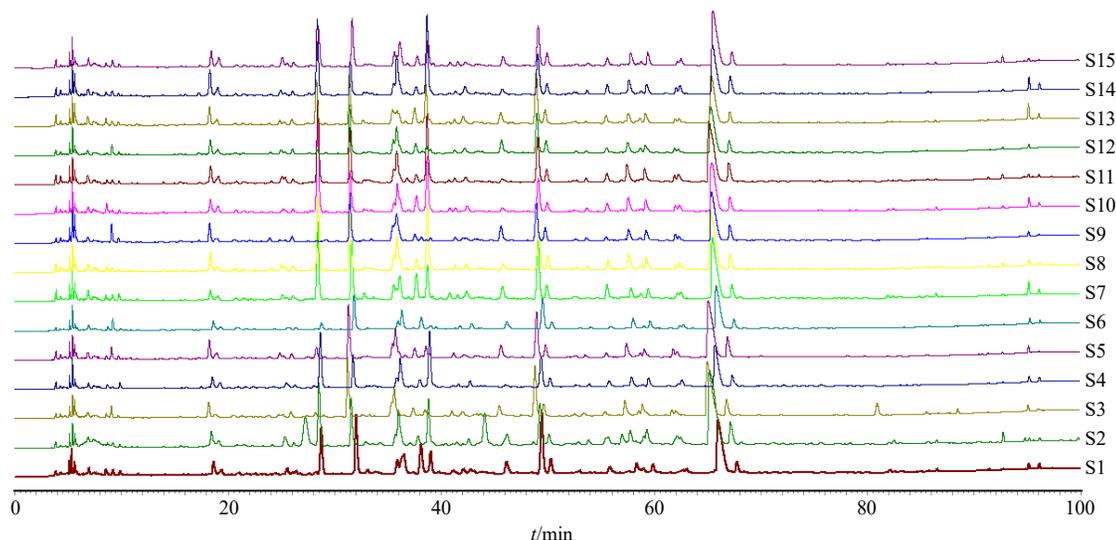


图 2 15批白头翁汤样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of Baitouweng Decoction samples

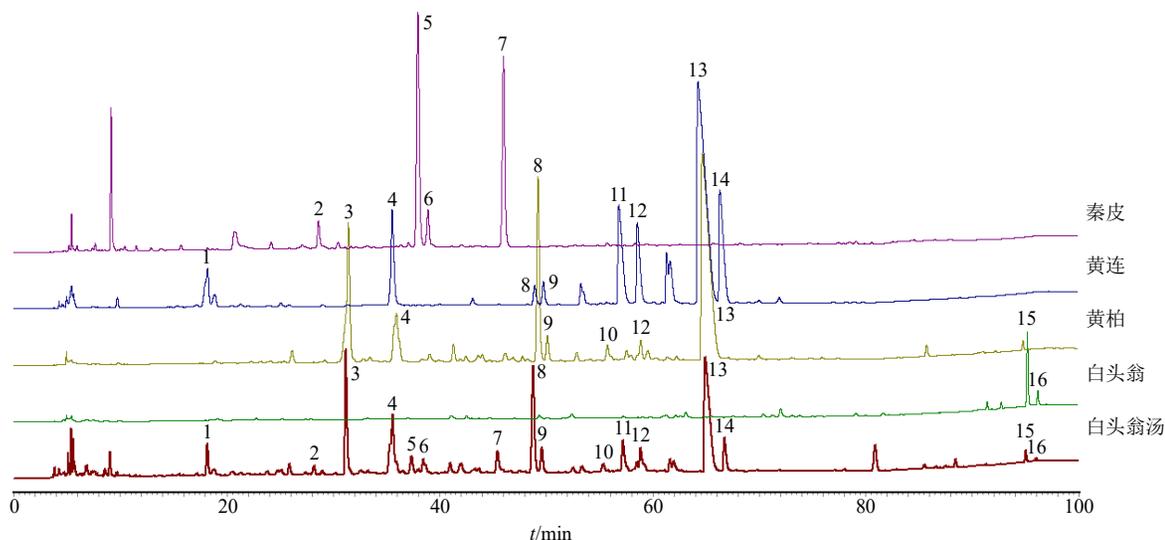
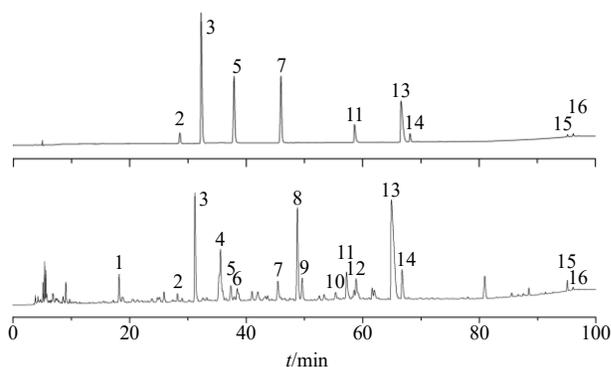


图3 白头翁汤和单味药色谱图

Fig. 3 Chromatograms of Baitouweng Decoction and single medicinal herb



2-秦皮甲素 3-黄柏碱 5-秦皮乙素 7-秦皮素 11-黄连碱 13-小檗碱 14-巴马汀 15-白头翁皂苷 B4 16-白头翁皂苷 B5  
2-esculin 3-phellodendrine 5-aesculetin 7-fraxetin 11-coptisine 13-berberine 14-palmatine 15-anemoside B4 16-anemoside B5

图4 混合对照品 (A) 和白头翁汤 (B) 的 HPLC 谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Baitouweng Decoction (B)

5)、秦皮素 (峰 7)、黄连碱 (峰 11)、小檗碱 (峰 13)、巴马汀 (峰 14)、白头翁皂苷 B4 (峰 15)、白头翁皂苷 B5 (峰 16)。结合 UPLC-Q-TOF-MS/M 法鉴定出白头翁汤的 21 种化合物 (表 2), 其中 9 种成分均能在指纹图谱上明确指认, 实验将进一步采用化学识别模式对指纹图谱中共有峰在样品中的差异进行分析, 并围绕明确指认的 9 个成分进行网络药理学功效关联物质预测分析。

### 2.4 化学模式识别分析

中药指纹图谱可全面系统地反映物质基准的化学信息, 同时采用化学识别模式对指纹图谱中共有峰在样品中的差异进行分析, 可将共有峰对各批次

样品间指纹图谱差异的贡献度量化。

**2.4.1 聚类分析 (cluster analysis) [12]** 将 15 批白头翁汤样品的共有峰的相对峰面积进行数据标准化, 接着导入 MetaboAnalyst 5.0 数据分析进行系统聚类, 测量区间为欧几里得, 聚类结果如图 5 所示。当距离为 15 时, 可将 15 批白头翁汤样品分为 2 类, 其中 S13、S7、S8、S1、S11、S4、S14、S10 聚为一类, S9、S3、S5、S12、S6、S15、S2 聚为一类。聚类结果表明, 不同批次样品间存在差异, 与白头翁汤样品中配伍的药材的产地具有一定相关性, 如

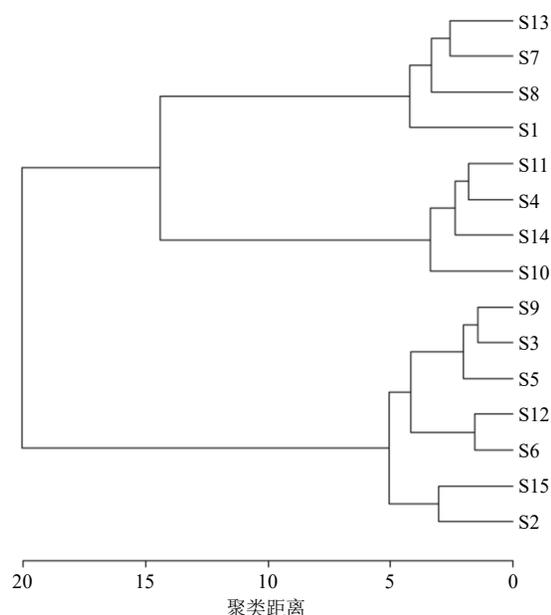


图5 15批白头翁汤聚类树状分析图

Fig. 5 Cluster dendrogram of 15 batches of Baitouweng Decoction

聚为一类的 S13、S7、S1、S11 中黄柏的产地均来自四川的同一批次（批次均为 20201002），聚为一类的 S3、S5、S6、S7 中黄连的产地均为四川的同一批次（批次均为 20200603）。

**2.4.2 偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)** [13] 将 15 个批次的白头翁汤样品 16 个共有峰峰面积的标准化处理数据导入 SIMCA 14.1 软件，得到 PLS-DA 得分矩阵图、载荷散点图和变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 值图，如图 6 所示。结果发现其关键参数  $R^2_X$ 、 $R^2_Y$ 、 $Q^2$  的值分别为 0.517、

0.891、0.685，均大于 0.5，说明该模型具有良好的拟合能力及预测能力。并且在置信区间 (95%) 内，15 批样品存在一定差异性。根据分布可将样品 S1~S15 分为 2 类，样品 S13、S7、S8、S1、S11、S4、S14、S10 为 A 类，样品 S9、S3、S5、S12、S6、S15、S2 为 B 类，结果与聚类分析一致。PLS-DA 载荷散点图 (图 6-B) 上每 1 个点代表 1 个变量，距离原点越远，表明对样本的区分能力越强。为进一步筛选出对上述样本分类贡献较大的成分，结合 VIP 图可更直观地看出各色谱峰的影响程度，VIP 值 > 1.0 为有意义变量。结果共找到 6 个有意义变量，依次为峰 2 (秦皮甲素)、峰 6、峰 10、峰 16 (白头翁皂苷 B5)、峰 7、峰 15 (白头翁皂苷 B4)，见图 6-C。说明这 6 种成分可能是将 15 批白头翁汤分为 2 类的差异性质量标志物 (quality markers, Q-Marker)。

**2.5 基于网络药理学的白头翁汤功效关联物质预测分析**

**2.5.1 白头翁汤潜在 Q-Marker 的来源定位** 白头翁汤的化学成分包括生物碱类、香豆素类、皂苷类、柠檬苦素类、甾醇类和木脂素类等[11,14]。其中生物碱类、香豆素类、皂苷类和柠檬苦素类化合物为白头翁汤中主要的化学成分，具有抗炎、抗菌、免疫调节、抗肿瘤等药理作用[15]，可能为汤剂发挥药效的主要物质基础。故将此 4 类成分作为白头翁汤的潜在 Q-Marker 的来源范围，具体主要成分有白头翁皂苷 B4 (anemoside B4)、常春藤皂苷 C (hederacoside C)、秦皮甲素 (esculin)、秦皮乙素 (esculetin)、秦皮素 (fraxetin)、黄柏碱 (phellodendrine)、巴马汀 (palmatine)、黄连碱 (coptisine)、小檗碱 (berberine) 9 个活性成分为候选化合物。

**2.5.2 候选化合物靶点预测** 通过检索数据库 TCMS (https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php) 和 Swiss Target Prediction (http://www.swisstargetprediction.ch/)，查找候选化合物作用靶点，通过 UniProt (https://www.uniprot.org/) 数据库规范靶点基因名，靶点合并，去除重复值，得到与 9 个化合物相关的 545 个靶点。

**2.5.3 靶点蛋白与蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析** 将获得的 545 个靶点上传至 STRING 11.0 在线分析数据库 (https://string-db.org)，选择物种为 “homo sapiens”，设置蛋白交互参数评分值大于 0.96 的蛋白互作数据，去掉网络

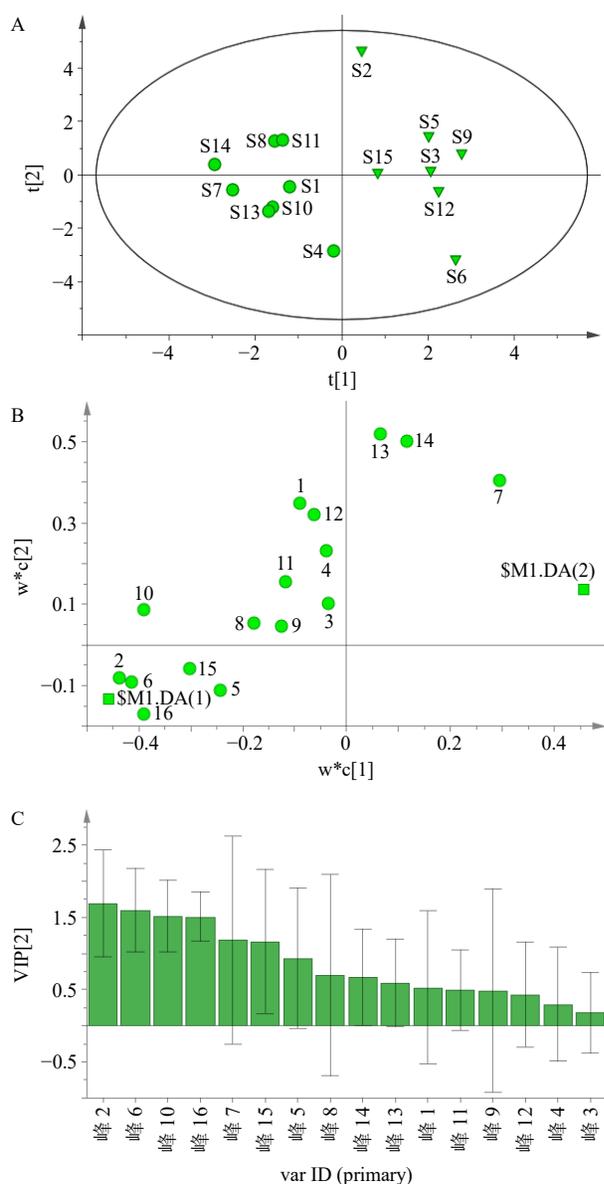
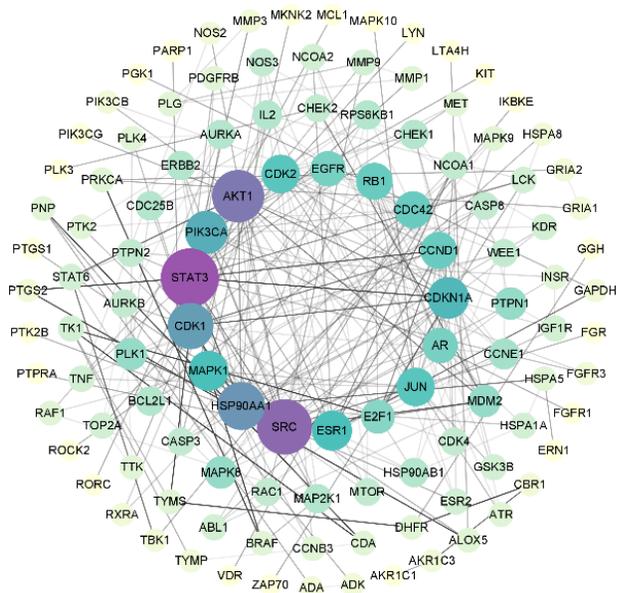


图 6 PLS-DA 得分散点图 (A)、载荷散点图 (B) 和 VIP 值 (C)  
 Fig. 6 PLS-DA scatter plot (A), loading scatter plot (B) and VIP value (C)

中游节点,最终筛选到 114 个节点,将结果以 TSV 文本格式导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建 PPI 网络,如图 7 所示。利用 Cytoscape 3.8.2 软件中的“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑属性分析,计算选取介数中心性 (betweenness centrality)、接近中心性 (closeness centrality) 和度值 (degree) 3 个重要拓扑参数均大于其平均数的靶点作为关键靶点,经筛选得到 18 个关键作用靶点 (表 3)。



图中颜色越深、圆圈越大说明 degree 值越大 the darker the color and the larger the circle in the graph, the larger the degree value

图 7 PPI 网络

Fig. 7 PPI network

**2.5.4 功能富集分析与通路分析** 采用基迪奥生物 (<https://www.omicshare.com/>) 数据库对 114 个作用靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 生物通路富集分析,共筛选出 215 条相关通路,对 P 值最小的前 20 条通路进行分析 (图 8),包括癌症通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路、以及缺氧信号转导-1 (hypoxia signaling-1, HIF-1) 信号通路等,这些通路可能与白头翁汤治疗疾病的作用相关。

**2.5.5 “成分-靶点-通路”网络构建** 将白头翁汤的 9 个活性成分、114 个作用靶点、20 条通路,在 Cytoscape 3.8.2 软件中构建“成分-靶点-通路”网络图 (图 9),图中网络错综复杂,1 个成分对应多个靶点,每条通路由多个靶点调控,体现了中药复方

表 3 关键靶点的拓扑特征

Table 3 Topological features of key targets

靶点	介数中心性	接近中心性	度值
STAT3	0.255 2	0.410 9	25
SRC	0.170 4	0.421 6	23
AKT1	0.149 4	0.412 4	21
HSP90AA1	0.194 8	0.424 8	18
CDK1	0.192 1	0.366 9	17
PIK3CA	0.060 3	0.349 8	15
CDKN1A	0.111 7	0.406 5	14
MAPK1	0.092 6	0.383 1	13
ESR1	0.095 8	0.388 3	13
JUN	0.047 8	0.366 9	12
CDK2	0.031 8	0.338 3	12
RB1	0.025 8	0.356 5	11
CCND1	0.077 8	0.389 7	11
CDC42	0.034 2	0.324 7	11
AR	0.035 6	0.353 1	10
E2F1	0.090 9	0.340 4	9
MDM2	0.072 5	0.362 2	8
NCOA1	0.026 9	0.289 7	5

中多成分、多靶点、多途径共同作用疾病的效果。

**2.5.6 整合分析** 白头翁汤主要的功效是清热解毒、凉血止痢,主治痢疾,是治疗腹泻的经典名方。通过对关键靶点的相关信息整理发现,信号转导子与转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 可以将肽激素信号从细胞表面传递到细胞核,在细胞内被许多细胞因子迅速激活,一旦激活过度,会导致一系列的疾病发生。

有研究指出,通过阻断 STAT3 靶点的促炎信号传导,可以达到抗结肠炎的效果<sup>[16-18]</sup>; AKT1 靶点参与细胞凋亡、生物代谢以及碳水化合物代谢等过程,可调节细胞能量代谢状态<sup>[19]</sup>。KEGG 富集发现,前 20 条通路主要包括癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、酪氨酸激酶受体 (tyrosine kinase receptor, ErbB) 信号通路以及 HIF-1 信号通路等。其中,PI3K-Akt 信号通路<sup>[20]</sup>是调控细胞周期的经典通路之一,一些酪氨酸激酶受体可以通过该途径促进细胞繁殖或抑制细胞凋亡,抑制 PI3K-Akt 信号通路可以减轻慢性结肠炎病理损伤,降低促炎细胞因子表达,缓解疾病所致的便血、腹泻现象<sup>[21]</sup>。由此可推测,白头翁汤可能通过作用于这些靶点和通路达到清热解毒、凉血止痢的功效。

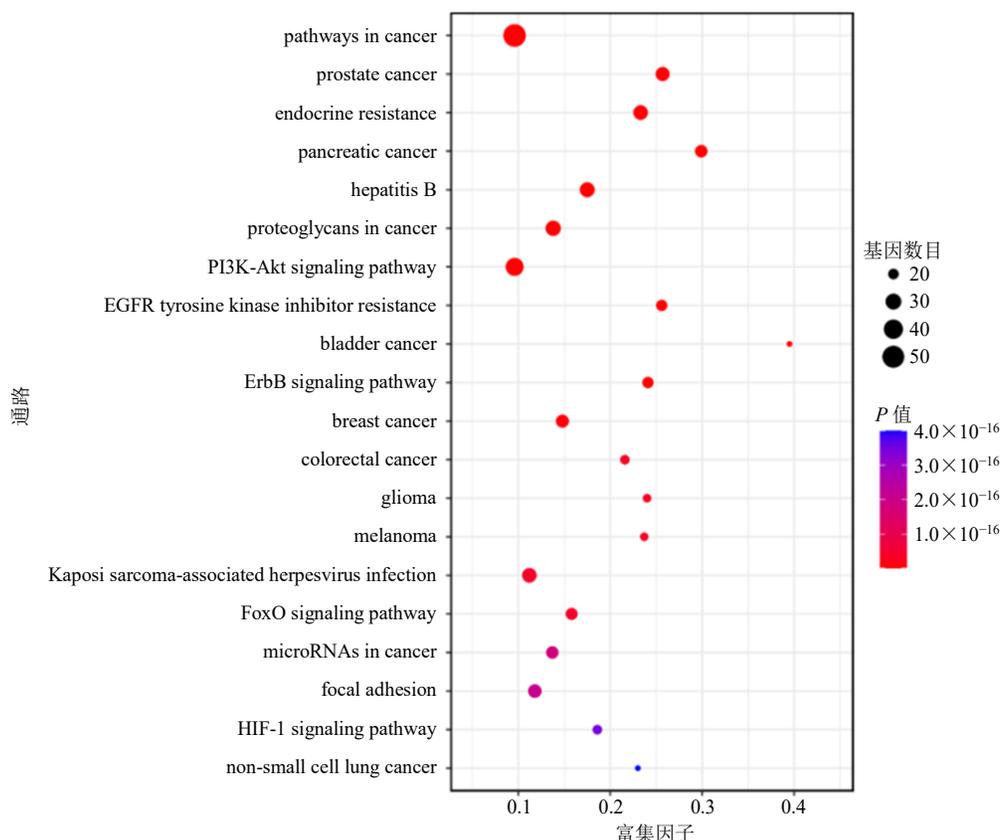
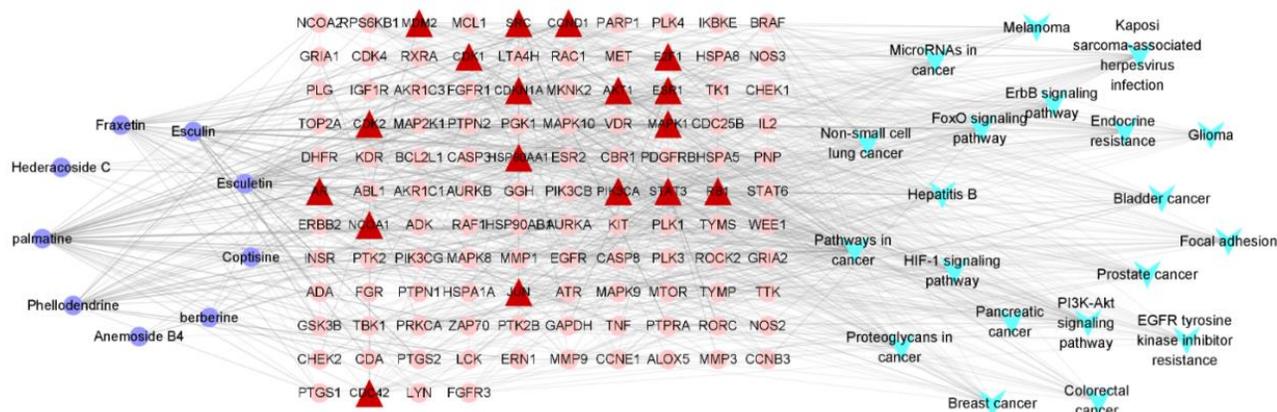


图 8 白头翁汤 KEGG 通路富集结果 (前 20)

Fig. 8 Enrichment results of KEGG pathway in Baitouweng Decoction (top 20)



图中左边圆环部分代表化学成分、中间矩形部分代表靶点（深红三角形节点代表关键靶点）、右边圆环部分代表通路  
the circle part on the left in the figure represents the chemical composition, the rectangular part in the middle represents the target (the dark red triangle node represents the key target), and the circle part on the right represents the pathway

图 9 “成分-靶点-通路”网络

Fig. 9 “Component-target-pathway” network

### 3 讨论

本实验分别对不同提取溶剂、不同提取方式和不同提取时间进行了考察，基于成分响应值、出峰数目和杂质干扰情况，选择出最优条件。通过比较白头翁汤冷冻干粉分别用甲醇、70%甲醇、乙腈、纯水溶剂提取，发现用有机试剂超声提取不如纯水

出峰数量多，故确定用纯水作为提取溶剂，再比较超声提取和煎煮法提取 2 种方法。结果发现，煎煮法色谱峰の出峰数量、峰形、提取化学成分的全面性以及汤剂煎煮更加合理，因此综合考虑，确定用煎煮法为最佳提取条件。

本实验还考察波长、流动相组成、色谱柱、体

积流量、柱温等条件,其中波长和流动相的选择是本实验考虑的重点。白头翁汤的化学成分较为复杂,含有生物碱类、香豆素类、皂苷类和柠檬苦素类等化合物,测定时选用紫外检测器全波长对样品进行扫描,发现皂苷类成分在 203 nm 下响应较高,生物碱类成分在 345 nm 下响应较高,因此着重考察了 203、210、345 nm 波长,综合考虑其出峰数量、响应值、峰形、基线等,为了使指纹图谱信息丰富,避免影响峰值响应和检测结果稳定性,保证多成分在最大吸收波长下的最佳吸收而互不干扰,最终确定扫描波长为 210 nm。流动相分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液,发现用乙腈作为洗脱溶剂,生物碱类成分均出现明显后拖尾且峰形较宽,若在流动相中加入缓冲溶剂,也没有明显修饰峰形。因此,考虑更换溶剂,使用甲醇洗脱有较好的色谱峰峰形,分离度良好,出峰数量多,响应值高,且不用添加缓冲溶剂,综合考虑选用甲醇作为流动相。

白头翁汤是由白头翁、黄连、黄柏、秦皮 4 味药组成,其中白头翁味苦性寒,能入血分,清热解毒,凉血止痢,为君药;黄连清热解暑,燥湿厚肠,为治痢要药;黄柏善清下焦湿热,2 药共助君药清热解暑,燥湿治痢,为臣药。秦皮苦寒而涩,清热解暑兼能收涩止痢,为佐使药。全方 4 味药配合有度,其药效的发挥并非是单一有效成分的作用,而是其所含多元化活性成分共同作用的结果,建立指纹图谱时应综合考虑全方,选择具有代表性且与药效相关性强的成分作为质控指标,使物质基准能准确反映原方质量,以助于更好地发挥物质基准的参照物功能,保证经典方剂的质量<sup>[22]</sup>。

本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术对白头翁汤化学成分进行表征,鉴定出 21 个化学成分,建立 15 批白头翁汤指纹图谱标定了 16 个色谱峰且通过对照品指认出 9 个化学成分,包括白头翁的药效成分白头翁皂苷 B4 和白头翁皂苷 B5,黄连的药效成分黄连碱和小檗碱,黄柏的药效成分黄柏碱和小檗碱,秦皮中的的药效成分秦皮素、秦皮甲素和秦皮乙素。未成功指认 7 个色谱峰,由白头翁汤和单味药材的色谱叠图可大致推断,峰 6 来自秦皮,峰 1、4、8、9、12 来自黄连,峰 4、8、9、10、12 来自黄柏,其中峰 4、8、9、12 为黄连、黄柏的共有成分。通过查阅文献,黄连、黄柏共有的成分研究较多为木兰花碱、药根碱、防己碱和表小檗碱

等生物碱类成分<sup>[23-24]</sup>,从文献查阅和白头翁汤化学成分 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果来看,出峰顺序依次为木兰花碱、药根碱和表小檗碱且均出峰早于小檗碱,若需明确峰 8、9、12 是否为这 3 种物质,后期仍需购买对照品进行比对或通过制备色谱分离技术与结构鉴定技术对这 3 个色谱峰进行深入的探索分析。

综上,本实验首次全面表征了白头翁汤成分的整体样貌,同时将网络药理学与指纹图谱相结合,运用网络数据库建立“成分-靶点-通路”网络拓扑结构,对明确指认出的 9 种药效成分进行筛选与靶点预测,筛选得到 18 个关键作用靶点,通过癌症通路、PI3K-Akt 通路和 HIF-1 通路等信号通路发挥治疗疾病的作用。不仅对白头翁汤质量控制指标成分的合理性进行了验证,而且揭示白头翁汤功效关联性的物质基础,为白头翁汤发挥功效及药理作用机制的阐释提供了思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 汉·张仲景. 伤寒论 [M]. 厉畅, 梁丽娟, 点校. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 61-62.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1180-1181.
- [3] 傅晔柳, 诸梦露, 楼霆. 白头翁汤对链脲佐菌素诱导的糖尿病肝损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(8): 1430-1435.
- [4] 王洪杰, 吕冠华. 白头翁汤临床应用概况 [J]. 江西中医药, 2016, 47(5): 75-77.
- [5] 崔美娜, 钟凌云, 兰泽伦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析多物料多流程炮制对半夏化学成分的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7428-7437.
- [6] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.
- [7] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [8] 李鹏帆, 罗月, 顾思臻, 等. 基于网络药理学探讨白头翁汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28(7): 527-533.
- [9] 任俊泽, 张展, 李柏. 基于网络药理学探讨白头翁汤的抗肿瘤作用机制 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(4): 241-248.
- [10] 马琪. 基于代谢组学和网络药理学的白头翁汤治疗湿热泄泻的作用机制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.

- [11] 金燊懿, 毕凌, 焦丽静, 等. 白头翁汤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(3): 109-111.
- [12] 严辉, 谢舒平, 濮宗进, 等. 基于 UPLC-PDA 指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价大黄质量 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4755-4762.
- [13] 李明月. 心脉通胶囊的 HPLC 指纹图谱研究与化学模式识别 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1104-1112.
- [14] 丁秀娟, 陈重, 李夏, 等. 白头翁化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1952-1954.
- [15] 查正霞, 刘艳丽, 许琼明. 白头翁中三萜皂苷类成分的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(1): 120-124.
- [16] Kasembeli M, Bharadwaj U, Robinson P, *et al.* Contribution of STAT3 to inflammatory and fibrotic diseases and prospects for its targeting for treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2299.
- [17] 邢潇潇. 经典名方治疗溃疡性结肠炎湿热证患者的循证医学分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [18] Kim S H, Yum H W, Kim S H, *et al.* Protective effects of taurine chloramine on experimentally induced colitis: NF $\kappa$ B, STAT3, and Nrf2 as potential targets [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 479.
- [19] Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395.
- [20] 云云, 姜晶晶, 王亚东, 等. 白头翁汤正丁醇提取物主要组分对中性粒细胞趋化抑制作用的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(16): 4201-4207.
- [21] Yan S G, Hui Y, Li J T, *et al.* Glutamine relieves oxidative stress through PI3K/Akt signaling pathway in DSS-induced ulcerative colitis mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(9): 1124-1129.
- [22] 孟岩, 李焜仪, 单家明, 等. 经典名方小承气汤物质基准的 HPLC 指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 130-136.
- [23] 周松, 刘永刚, 张国祥, 等. 黄柏化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3740-3742.
- [24] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.

[责任编辑 郑礼胜]