

基于化学特征和核心功效的经典名方清胃散中地黄炮制品研究

王敏¹, 刘欢欢¹, 张婷¹, 于银萍¹, 潘金火¹, 季德¹, 苏联麟¹, 陆兔林¹, 李林^{1*}, 程晓莉^{2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏连云港市中医院 中药房, 江苏 连云港 222000

摘要: **目的** 辨析地黄不同炮制品(鲜地黄、生地黄、干地黄、酒地黄、熟地黄)的化学特征, 结合经典名方清胃散的核心功效, 明确其地黄的炮制方法和炮制品种, 为中药新药的开发和中药临床的合理应用提供参考。**方法** 采用液质联用法和液相色谱法对地黄不同炮制品中的共有成分和特有成分进行定性和定量分析。运用现代网络药理学筛选和分析地黄的成分作用靶点和通路, 构建成分-靶点-通路网络, 进一步预测地黄的化学成分和核心功效的相关性。**结果** 在地黄的不同炮制品中共鉴定出 55 个成分, 其中 26 个为 5 种地黄炮制品共有, 鲜地黄经炮制后, 大部分化学成分的含量有不同程度的下降, 其中干地黄的环烯醚萜类成分下降幅度最小。采用网络药理学对焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷、益母草苷、梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、连翘酯苷、6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇进行机制预测, 富集的通路中环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路、乙型肝炎、血清素突触、缺氧诱导因子-1(hypoxiainduciblefactor-1, HIF-1)信号通路等与清热作用相关。**结论** 干地黄的化学特征与鲜地黄最为相似, 药性和功效与清胃散中地黄的核心功效最为接近, 故干地黄为清胃散中地黄的最适宜炮制品。

关键词: 地黄; 经典名方; 清胃散; 炮制; 清热; 化学特征; 核心功效; 网络药理学; 成分-靶点-通路网络; 环烯醚萜类; 焦地黄素 D; 桃叶珊瑚苷; 益母草苷; 梓醇; 地黄苷 A; 地黄苷 D; 连翘酯苷; 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇; cAMP 信号通路; 乙型肝炎; 血清素突触; HIF-1 信号通路

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-3940-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.007

Research on *Rehmanniae Radix* processed products in classical prescription Qingwei Powder based on chemical characteristics and core functions

WANG Min¹, LIU Huan-huan¹, ZHANG Ting¹, YU Yin-ping¹, PAN Jin-huo¹, JI De¹, SU Lian-lin¹, LU Tu-lin¹, LI Lin¹, CHENG Xiao-li²

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

2. Jiangsu Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective Distinguish the chemical characteristics of different processed products of *Rehmanniae Radix* (RR), combine the core functions of the classical prescription Qingwei Powder (QP), and clarify the processing methods and types of processed products of RR. This provides references for the development of new Chinese medicine and the rational application of Chinese medicine in clinical practice. **Methods** The common and unique components in different processed products of RR were qualitatively analyzed by UPLC and UPLC-Q-TOF/MS. Using modern network pharmacology to screen and analyze the targets and pathways of dried RR, construct a component-target-pathway network to further predict the correlation between the chemical components and core functions of RR. **Results** A total of 55 components were identified in different processed species of RR, 24 of which are shared by 5 kinds of processed products. Aucubin and jioglutin D are the unique components of dried RR. After being processed, the content of most chemical components decreased in different degrees, and the iridoids of dried RR decreased the least. Using network pharmacology to predict the mechanism of jioglutin D, aucubin, ajugol, catalpol, rehmannioside A, rehmannioside D,

收稿日期: 2022-01-06

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1701902); 国家重点研发计划(2018YFC1707000)

作者简介: 王敏, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制学。Tel: 17802528205 E-mail: njucm20200853@163.com

*通信作者: 李林, 副教授, 主要从事中药炮制机制及饮片质量标准研究。Tel: 13913842209 E-mail: lilin@njucm.edu.cn

程晓莉, 副主任药师, 主要从事中药房管理。E-mail: 1670704480@qq.com

forsythoside A, and 6-*O-E*-feruloyl ajugol in dried RR. Among the enriched pathways, cAMP signaling pathway, hepatitis B, serotonergic synapse, HIF-1 signaling pathway, etc. have antipyretic effects related. **Conclusion** The chemical characteristics of dried RR are most similar to those of fresh RR, and its medicinal properties and efficacy are closest to the core functions of RR in QP. Therefore, dried RR is the most suitable processed product of RR in QP.

Key words: *Rehmanniae Radix*; classic prescription; Qingwei San; processed; antipyretic; chemical characteristics; core functions; modern network pharmacology; component-target-pathway network; iridoids; jioglutin D; aucubin; ajugol; catalpol; rehmannioside A; rehmannioside D; forsythoside A; 6-*O-E*-feruloyl ajugol; cAMP signaling pathway; hepatitis B; serotonergic synapse; HIF-1 signaling pathway

国家中医药管理局颁布的《古代经典名方目录(第一批)》中“清胃散”出自李东垣《兰室秘藏》(卷中·口齿咽喉门):“治因服补胃热药,致使上下牙疼痛不可忍,牵引头脑,满面发热大痛……当归身,择细黄连(如连不好,更加二分,夏月倍之),生地黄(酒制,以上各三分),牡丹皮(五分),升麻(一钱)”。现代临床主要用于治疗胃火牙痛、口腔溃疡、口臭、牙周炎等疾病,方中生地黄为臣药,协助黄连清胃,其核心功效为清热养阴、除血中伏火,酒制后,可引药上行,清头面部之热。

地黄药材为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的新鲜或干燥块根,始载于《神农本草经》,列为上品。地黄饮片的功效随着炮制方法的不同而不同,传统炮制大多采用黄酒、陈皮、砂仁等辅料,以蒸、煮、炖等水火共制为主。清胃散首载于金代李东垣《脾胃论》,是由升麻、黄连、当归、生地黄、牡丹皮组成,其中地黄记载为“真生地黄”,具有清胃凉血之功,主治胃中积热、牙痛牵引头痛、面颊发热之效。鲜地黄始载于明代李中立的《本草原始》,明代以前生、鲜地黄名称混淆严重,徐军等^[1]和王军等^[2]通过对历代本草著作进行梳理,认为清胃散中的生地黄应为鲜地黄。

经典名方的开发研究原则上需要“以古籍记载的制备方法为依据”,而历代关于地黄炮制的方法和品种主要有3种,一是《雷公炮炙论》中短时间酒蒸法炮制的干地黄,二是《历代中药炮制法汇典》和部分地方炮制规范中酒炙法炮制的酒地黄,三是《中国药典》中长时间酒炖法炮制的熟地黄。地黄中主要含有环烯醚萜类、苯乙醇苷类、糖类其他类化合物等^[3],经炮制后数量和含量发生变化^[4-5],其中环烯醚萜类成分具有清热、抗菌、抗病毒以及抗癌作用^[6-7],苯乙醇苷类具有神经保护、抗氧化、抗菌、免疫调节和酶抑制作用^[8-9]。地黄作为经典名方清胃散中的臣药,具体酒制的方法和饮片品种尚未明确,给产品开发研究带来了极大的阻碍。本实验在前期

文献研究和工艺研究的基础上,系统分析地黄不同炮制品的化学特征,并结合现代网络药理学技术构建成分-靶点-通路网络,探索清胃散中地黄的核心功效关联物质,旨在为中药经典名方的开发和中药临床的合理应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AB Sciex Triple TOFTM 5600+,美国 AB Sciex 公司; Waters Aquity UPLC,美国 Waters 公司; MS-105D 型电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司。

1.2 材料

新鲜地黄采收于山西运城、河南武陟、河南温县,经南京中医药大学刘训红教授鉴定,为玄参科地黄属植物地黄 *R. glutinosa* Libosch.的新鲜块根;黄酒购自绍兴女儿红酿酒有限公司;对照品梓醇(批号 RFS-Z00511803015,质量分数 $\geq 98\%$)、地黄苷 D(批号 RFS-D08402007022,质量分数 $\geq 98\%$)、益母草苷(批号 RFS-Y22002004018,质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊花糖苷(批号 RFS-M01102002025,质量分数 $\geq 98\%$)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;甲酸、磷酸(分析纯),甲醇(色谱纯),乙腈(质谱纯),均购自南京晚晴化玻仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 地黄不同饮片的炮制和性状

2.1.1 饮片的炮制

(1) 鲜地黄:参照《中国药典》2020年版地黄项下鲜地黄要求,取采收的新鲜地黄,除去芦头、须根及泥沙杂质。

(2) 干地黄:参照《雷公炮炙论》中地黄酒蒸的炮制方法,取鲜地黄,洗净,去皮,置蒸笼中蒸至透心,放凉,加适量黄酒拌匀,闷润至黄酒被吸尽,置蒸笼中蒸制 1 h,于 70 °C 干燥,切厚片,取出放凉,干燥(每 100 kg 去皮鲜地黄用黄酒 6 kg)。

(3) 生地黄:参照《中国药典》2020年版地黄项下生地黄要求,取鲜地黄,置烘箱 50 °C 烘 48 h

后,升温至 70 °C 继续烘至无硬心,再将温度降至 40 °C 烘至地黄表面发硬,取出,用麻袋盖严发汗,使内部水分往外渗出至表里干湿一致,40 °C 干燥至地黄全身发软,手握表面发硬,取出,放凉,得生地黄药材。切厚片,得生地黄饮片。

(4) 酒地黄:参照《历代中药炮制法汇典》(现代部分)地黄项下酒炙的炮制方法,取生地黄饮片,加适量黄酒拌匀闷润至酒尽,置热锅内用文火炒至微焦为度,取出,放凉(每 100 kg 生地黄饮片,用黄酒 12 kg)。

(5) 熟地黄:参照《中国药典》2020 年版酒炖法项下要求,取生地黄饮片,置适宜容器内,加适量黄酒,密闭后炖至酒被吸尽,显乌黑光泽,味转甜,取出,晾至外皮的粘液稍干时,切厚片,60 °C 干燥,晾凉(每 100 kg 生地黄,用黄酒 30 kg)。

2.1.2 饮片的性状 鲜地黄(图 1-A)呈纺锤形或条状,外皮薄,表面浅红黄色,具弯曲的纵皱纹、

芽痕、横长皮孔及不规则疤痕。肉质,易折断,切面淡黄白色,可见橘红色油点,中部有放射状纹理。气微,味微甜、微苦。干地黄饮片(图 1-B)呈类圆形厚片。表面为黄棕色,质硬,有光泽。不易折断,断面棕黄色,导管呈放射状排列。气微,味微甜、微苦,微有酒气。生地黄饮片(图 1-C)呈类圆形厚片,表面棕黑色或乌黑色,有光泽,油润黏性,中心部隐现菊花心纹理。皱缩,质硬。气微,味微甜。酒地黄饮片(图 1-D)呈类圆形的厚片,表面棕黑色或乌黑色,有焦斑,有光泽,有光泽,中心部呈隐现菊花心纹理,有焦苦味。质脆,味甜,微有酒气。熟地黄饮片(图 1-E)呈类圆形的厚片,表面乌黑发亮,质滋润而柔软,易黏连。味甜,微有酒气。

2.2 地黄不同饮片成分测定

2.2.1 液质分析条件 UPLC-Q-TOF/MS 液相色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,

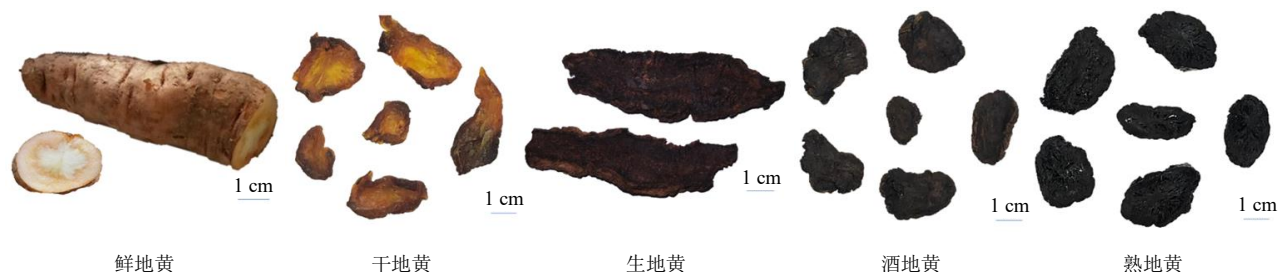


图 1 地黄不同饮片图

Fig. 1 Processed products of RR

5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱: 0~5 min, 5%~15% 乙腈; 5~20 min, 15%~20% 乙腈; 20~25 min, 20%~100% 乙腈; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积 5 μL。扫描模式: 正离子模式和负离子模式,毛细管温度 325 °C, 离子源电压 4500 V, 喷雾气压 379.21 kPa (55 psi), 去簇电压: -60 V, 加热气压 379.21 kPa (55 psi), 离子源温度 550 °C, 一级质谱扫描范围 m/z 100~1500, 二级质谱激活类型 CID。

2.2.2 色谱条件

(1) 色谱条件 1: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈; 梯度洗脱程序: 0~10 min, 1%~1.2% 乙腈; 10~12 min, 1.2%~3% 乙腈; 12~17 min, 3%~5% 乙腈; 17~18 min, 5%~8% 乙腈; 18~24 min, 8%~12% 乙腈; 24~29 min, 12%~13% 乙腈; 29~36 min, 13%~15% 乙腈; 36~40 min, 15%~

20% 乙腈; 40~45 min, 20%~22% 乙腈; 45~50 min, 22%~100% 乙腈; 体积流量 0.6 mL/min; 检测波长为 210、334 nm; 柱温 30 °C; 进样量 6 μL。

(2) 色谱条件 2: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液(5:95); 体积流量 0.6 mL/min; 检测波长 210 nm; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL。

2.2.3 对照品溶液的制备 取梓醇对照品适量,精密称定,加甲醇制成含梓醇 2.175 mg/mL 的对照品溶液; 取地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成分别含地黄苷 D 2.020 mg/mL、益母草苷 2.012 mg/mL、毛蕊花糖苷 2.010 mg/mL 的对照品溶液。取对照品(各对照品溶液制备相同)约 1.0 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度处,摇匀后制备成 0.1 mg/mL 的单一对照品储备液; 精密称取梓醇、地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷各单一对照品储备液等量,混匀,

加甲醇稀释后制成混合对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 同《中国药典》2020年版地黄中含量测定项下测定梓醇时样品制备方法。

2.2.5 线性关系考察 依次取“2.2.3”项下梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷对照品溶液按“2.2.3”项下色谱条件进样,记录色谱峰峰面积,以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,进行线性回归,得到梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷的回归方程及其线性范围分别为梓醇 $Y=6\ 071\ 646 X-113\ 505$, $R^2=0.999\ 3$,线性范围为 $0.043\ 5\sim 2.175\ \text{mg/mL}$;地黄苷 D $Y=636\ 204 X+20\ 609$, $R^2=0.999\ 0$,线性范围为 $0.040\ 4\sim 2.020\ \text{mg/mL}$;益母草苷 $Y=607\ 711 X-4\ 663.8$, $R^2=0.999\ 1$,线性范围为 $0.040\ 2\sim 2.012\ \text{mg/mL}$;毛蕊花糖苷 $Y=12\ 890\ 737 X-35\ 453$, $R^2=0.999\ 7$,线性范围为 $0.040\ 2\sim 2.010\ \text{mg/mL}$ 。

2.3 质谱分析结果

取供试品溶液,按照 UPLC-Q-TOF/MS 液相色谱条件和质谱条件进行进样分析。根据一级质谱精确相对分子质量信息,经 ChemSpider 数据库和本地化学成分数据库进行匹配,初步推测分子信息。Peakview1.2 软件与二级质谱数据匹配筛查,设置“匹配度 $\geq 80\%$ 、质量误差绝对值 $\leq 1.0\times 10^{-5}$ ”,并根据相关文献报道进行结构分析,共鉴定出 55 个化学成分,化合物详细信息见表 1,地黄不同饮片质谱总离子流图见图 2。

鲜地黄中鉴定出 42 个成分,其中包含 16 个环烯醚萜类化合物,5 个糖类化合物,17 个苯乙醇苷类化合物,2 个氮苷类化合物,1 个氨基酸类化合物和 1 个黄酮类化合物;干地黄中鉴定出 34 个成分,其中包含 17 个环烯醚萜类化合物,4 个糖类化合物,10 个苯乙醇苷类化合物,2 个氮苷类化合物

表 1 地黄不同饮片所含化学成分信息

Table 1 Information table of chemical components contained in processed products of RR

编号	t_R / min	模式	准分子离子	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	分子式	名称	来源				
										鲜地黄	干地黄	生地黄	酒地黄	熟地黄
1	0.67	-	[M-H] ⁻	665.214 58	665.214 53	-0.1	485.150 8, 383.117 7, 341.107 9	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	水苏糖 ^[10]	√	√	√	√	√
2	0.67	-	[M-H] ⁻	827.267 41	827.268 14	0.9	545.173 2, 383.119 2, 179.055 1	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	毛蕊花糖 ^[11]	√		√	√	
3	0.68	-	[M-H] ⁻	665.208 71	665.214 44	8.6	485.150 8, 383.117 1, 341.107 9	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	2'-acetylacteoside ^[12]	√		√	√	
4	0.68	-	[M-H] ⁻	503.161 76	503.161 13	-1.2	221.063 9, 179.054 5, 161.045 0, 89.024 5	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	甘露三糖			√		√
5	0.68	-	[M-H] ⁻	503.161 76	503.161 76	0.0	383.117 0, 341.105 6, 323.098 6, 281.085 8, 221.063 9	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	棉籽糖 ^[11]	√	√	√	√	√
6	0.71	-	[M-H] ⁻	179.056 11	179.056 06	-0.3	89.023 9, 71.016 0, 59.018 1	C ₆ H ₁₂ O ₆	D-果糖 ^[13]				√	√
7	0.73	-	[M-H] ⁻	341.108 94	341.109 27	1.0	179.054 2, 161.043 4, 119.035 0	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蔗糖	√	√	√	√	√
8	0.74	-	[M-H] ⁻	341.108 94	341.108 91	-0.1	179.054 1, 161.041 6, 143.032 2	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蜜二糖	√	√	√	√	√
9	0.75	-	[M-H] ⁻	179.056 11	179.056 06	-0.3	89.023 9, 71.016 0, 59.018 1	C ₆ H ₁₂ O ₆	葡萄糖 ^[13]				√	√
10	0.98	-	[M-H] ⁻	361.114 02	361.114 01	0.0	199.059 8, 169.049 0	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	梓醇 ^[13]	√	√	√	√	√
11	1.00	+	[M+H] ⁺	268.104 03	268.104 49	1.7	136.063 6, 119.036 0	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷	√	√	√	√	√
12	1.01	-	[M-H] ⁻	361.114 02	361.114 01	0.0	199.058 9, 169.049 0, 151.038 1	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	单密力特苷 ^[14]	√	√		√	√
13	1.02	-	[M-H] ⁻	397.090 70	397.090 64	-0.2	361.108 4, 199.058 4	C ₁₅ H ₂₃ O ₁₀ Cl	氯化梓醇 ^[15]	√	√			√
14	1.04	+/-	[M-H] ⁻	282.084 39	282.084 19	-0.7	150.041 2, 133.014 6, 108.019 9	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	鸟苷 ^[16]	√	√	√	√	√
15	1.08	+/-	[M-H] ⁻	130.087 35	130.087 53	1.3	88.039 4	C ₆ H ₁₃ NO ₂	亮氨酸	√	√	√	√	
16	1.21	-	[M-H] ⁻	523.166 84	523.166 41	-0.8	505.156 7, 361.113 0, 343.100 6, 323.096 8	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	3'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-梓醇					√
17	1.40	-	[M-HCOO] ⁻	445.170 44	445.171 05	1.4	119.035 6, 89.026 4	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₃	castanoside F ^[17-18]	√				
18	1.43	+/-	[M-H] ⁻	523.166 84	524.166 41	-0.8	505.156 7, 361.113 0, 343.100 6, 323.096 8	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	地黄苷 A ^[13]	√	√	√	√	√
19	1.44	+/-	[M-H] ⁻	685.219 67	685.220 35	1.0	505.157 4, 341.108 9, 221.065 7	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	地黄苷 D ^[19]	√	√	√	√	√

续表 1

编号	tr/ min	模式	准分子离子	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差/ ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	分子式	名称	来源				
										鲜地黄	干地黄	生地黄	酒地黄	熟地黄
20	1.57	+	[M+H] ⁺	127.038 97	127.039 06	0.7	109.026 7, 99.045 2, 81.033 1	C ₆ H ₆ O ₃	5-HMF ^[20]				√	√
21	2.02	+/-	[M-HCOO] ⁻	166.049 87	166.051 25	8.3	107.036 4	C ₉ H ₉ NO ₅	龙胆酸 ^[21]					√
22	2.30	+/-	[M-H] ⁻	509.187 59	509.187 03	-1.1	179.055 8, 167.071 4, 161.044 9	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₄	地黄昔 C ^[22]	√	√	√	√	√
23	2.48	+	[M+H] ⁺	349.149 31	349.149 32	-0.2	151.074 5	C ₁₅ H ₂₄ O ₉	益母草昔 ^[13]	√	√	√	√	√
24	2.48	+	[M+HCOO] ⁺	224.076 48	224.076 60	0.6	59.015 2	C ₆ H ₁₃ NO ₅	葡萄糖胺 ^[23]				√	
25	3.12	+/-	[M-H] ⁻	461.166 45	461.166 73	0.6	315.108 5, 135.045 2, 85.031 8	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	连翘酯昔 E ^[24]	√	√	√	√	√
26	3.12	+/-	[M-H] ⁻	461.166 45	461.166 73	0.6	315.108 5, 297.097 0, 161.045 1	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	去咖啡酰毛蕊花糖昔 ^[16]	√	√	√	√	√
27	3.16	+/-	[M-H] ⁻	375.129 67	375.129 97	0.8	213.075 7, 169.085 5, 151.075 6, 133.065 4	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	8-表番木鳖酸 ^[16]	√	√			√
28	3.31	-	[M-H] ⁻	345.119 11	345.119 01	-0.3	299.111 9, 255.097 4, 179.056 2	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	桃叶珊瑚昔 ^[14,16]		√			
29	3.70	-	[M-H] ⁻	387.129 67	387.127 32	-6.1	341.108 0, 179.060 5, 161.044 7	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	去羟梔子昔 ^[23]	√	√	√	√	√
30	3.82	+	[M+HCOO] ⁺	226.071 00	226.071 21	0.9	114.054 4, 71.016 8	C ₉ H ₁₁ NO ₅	酪氨酸					√
31	5.61	+/-	[M-H] ⁻	401.145 32	401.145 12	-0.5	269.099 8, 161.044 7, 149.055 7	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	乙酰梓醇 ^[24]	√	√			
32	5.61	-	[M-H] ⁻	345.155 49	345.155 77	0.8	179.055 6, 165.091 9, 121.102 3	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	地黄苦昔 ^[13,16]	√		√	√	√
33	5.61	-	[M-HCOO] ⁻	345.154 39	345.155 71	3.8	179.055 6, 165.091 9, 119.035 9	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	二氢马鞭草昔 ^[25]				√	
34	5.62	-	[M-H] ⁻	390.152 60	389.145 32	-0.8	389.104 4, 343.139 9, 179.054 4	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	筋骨草昔 ^[19]	√	√	√	√	√
35	6.25	-	[M-H] ⁻	785.250 97	785.253 39	3.1	623.221 9, 161.023 9	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	洋地黄叶昔 C ^[26]	√	√	√	√	√
36	6.36	-	[M-H] ⁻	785.250 97	785.251 95	1.2	623.220 9, 161.024 6, 133.030 3	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	洋地黄叶昔 B ^[27]	√	√	√	√	√
37	6.36	-	[M-H] ⁻	785.250 97	785.251 95	1.2	623.220 9, 161.024 6	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	松果菊昔 ^[12,18]	√		√	√	
38	6.53	+/-	[M-H] ⁻	389.143 30	389.145 01	-0.8	343.102 2, 183.096 8, 119.031 6	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	马钱素 ^[28]	√	√	√	√	√
39	6.74	+/-	[M-H] ⁻	225.076 85	225.076 76	-0.4	207.067 7, 147.041 5, 69.001 6	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	京尼平 ^[29]	√				
40	6.91	-	[M-HCOO] ⁻	492.183 74	492.182 77	-2.0	289.103 4	C ₂₂ H ₃₃ O ₁₅	美利妥双昔 ^[23]	√	√			
41	7.48	-	[M-H] ⁻	799.266 62	799.267 45	1.0	623.223 0, 175.038 7	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	焦地黄苯乙醇昔 A ^[27]	√	√	√	√	√
42	8.66	-	[M-H] ⁻	799.266 62	799.268 77	2.7	623.223 0	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	肉苁蓉昔 A ^[12]	√	√	√	√	√
43	9.48	+/-	[M-H] ⁻	623.198 14	623.198 72	0.9	461.165 8, 315.107 5	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖昔 ^[30-31]	√	√	√	√	√
44	10.69	-	[M-H] ⁻	497.166 45	497.166 45	0.8	167.033 8, 123.045 0	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₂	6-O-香草酰基筋骨草醇 ^[19]	√	√	√	√	√
45	11.26	+/-	[M-H] ⁻	623.198 14	623.198 72	0.9	461.165 8, 315.107 5, 179.033 4, 161.023 5, 135.044 1	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	连翘酯昔 ^[30]	√	√	√	√	√
46	12.21	+/-	[M-H] ⁻	623.198 14	623.198 72	0.9	461.165 8, 315.107 5, 179.033 4, 161.023 5, 135.044 1	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	异麦角甾昔 ^[18,31]	√	√	√	√	√
47	13.95	+/-	[M-H] ⁻	637.213 79	637.214 65	1.3	461.168 3, 193.050 9, 161.024 1	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	cis-leucosceptoside A ^[32]	√		√	√	
48	15.33	+/-	[M-H] ⁻	637.213 79	637.214 09	0.5	161.023 8, 133.028 2	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	焦地黄苯乙醇昔 D ^[27]	√			√	
49	16.30	-	[M-H] ⁻	523.182 10	523.182 37	0.5	193.050 4, 175.040 0	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇 ^[13,16]	√	√	√	√	√
50	19.29	-	[M-HCOO] ⁻	201.112 14	201.113 35	6.0	183.110 3, 139.112 1	C ₁₁ H ₁₈ O ₆	焦地黄素 D ^[23,33]		√			
51	21.50	+/-	[M-H] ⁻	651.229 44	651.231 02	2.4	193.050 3, 175.039 9	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	地黄昔 ^[13]	√	√	√	√	√
52	21.66	+/-	[M-H] ⁻	591.208 32	591.208 21	-0.2	161.024 8	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	osmanthuside B ^[34]	√		√	√	
53	21.89	-	[M-H] ⁻	299.056 11	299.056 28	0.6	255.028 5, 151.002 8	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	香叶木素 ^[21,23]	√			√	
54	22.34	-	[M-HCOO] ⁻	187.132 87	187.133 96	5.8	141.132 2	C ₁₁ H ₂₀ O ₅	焦地黄素 E ^[33]			√		
55	22.50	+	[M+H] ⁻	239.164 17	239.164 19	0.1	193.158 0, 69.083 8	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	白藜芦醇 ^[23]					√

“√”表示含有此化合物

“√” means containing this compound

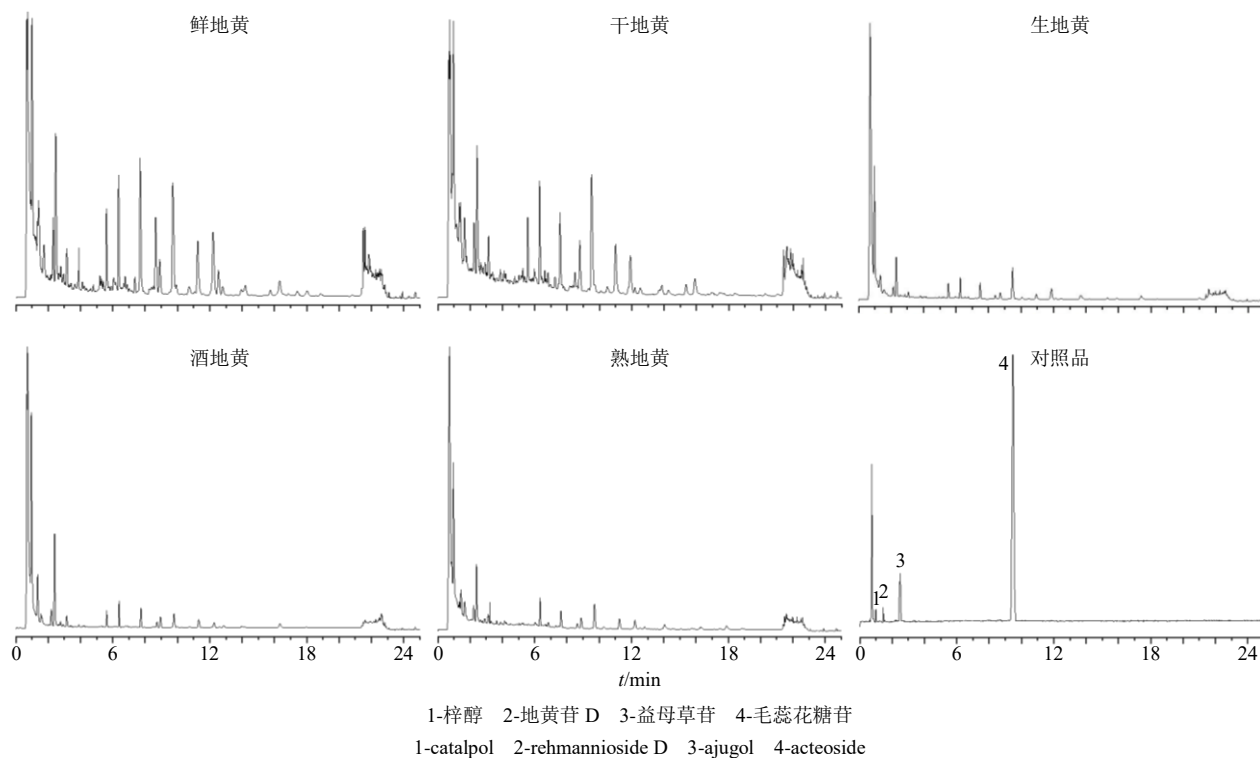


图 2 地黄不同饮片负离子模式下质谱总离子流图

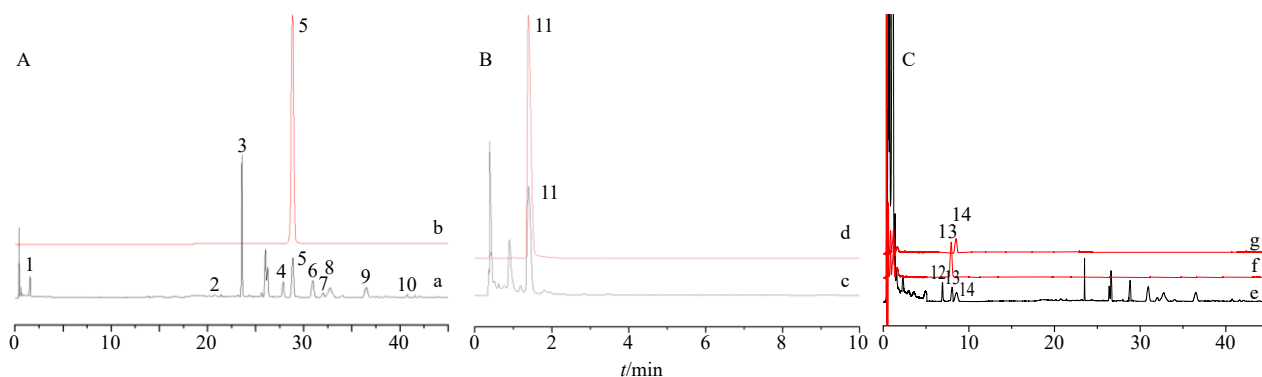
Fig. 2 Mass spectrum total ion chromatogram of processed products of RR

和 1 个氨基酸类化合物；生地黄中鉴定出 36 个成分，其中包括 11 个环烯醚萜类化合物，7 个糖类化合物，15 个苯乙醇苷类化合物，2 个氮苷类化合物和 1 个氨基酸类化合物；酒地黄中鉴定出 42 个成分，其中包括 12 个环烯醚萜类化合物，7 个糖类化合物，16 个苯乙醇苷类化合物，2 个氮苷类化合物，2 个氨基酸类化合物，1 个呋喃醛衍生物，1 个黄酮类化合物和 1 个非黄酮类多酚；熟地黄中鉴定出 35 个成分，其中包括 13 个环烯醚萜类化合物，7 个糖类化合物，11 个苯乙醇苷类化合物，2 个氮苷类化合物，1 个氨基酸类化合物和 1 个呋喃醛衍生物。其中有 26 个成分为 5 种饮片所共有，如梓醇、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、连翘酯苷等，非共有成分中，有 11 个为单种饮片所独有，鲜地黄独有成分为 cistanoside F 和京尼平，干地黄独有成分为桃叶珊瑚苷和焦地黄素 D，生地黄独有成分为葡萄糖胺、二氢马鞭草苷和焦地黄素 E，酒地黄独有成分为 3'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-梓醇和白藜芦醇，熟地黄独有成分为龙胆酸。总体来说，鲜地黄、干地黄、生地黄、酒地黄所含成分，相似度较大，而熟地黄与另外 4 种饮片差异较大。鲜地黄炮制成生地黄、酒地黄、熟地黄过程中，环烯醚萜类成分的数量明显减少，而干地黄中此类成分的损失则较少。除了桃叶珊瑚

苷、焦地黄素 D 2 个独有的成分外，其他均为与鲜地黄共有的成分。

2.4 液相分析结果

对于地黄 5 种饮片的共有成分中，梓醇、地黄苷 D 等 14 个成分为液相可测成分，见图 3。采用色谱条件 1 运用外标法测定地黄炮制品中梓醇、毛蕊花糖苷、地黄苷 D、益母草苷的质量分数（表 2）。通过一测多评法对山西运城、河南温县和河南武陟的 5 个炮制品中连翘酯苷、洋地黄叶苷 B、焦地黄苯乙醇苷 A1、异麦角甾苷、焦地黄苯乙醇苷 D、连翘酯苷 E、地黄苷、地黄苷 A、6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇、5-HMF 的测定相对含量。色谱条件 1 (334 nm) 下以毛蕊花糖苷为内参，焦地黄苯乙醇苷 A1 和色谱条件 1 (210 nm) 下以益母草苷为内参 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇、地黄苷 A、5-HMF 各相对校正因子分别为 0.854、0.682、0.321、0.508^[35-40]。毛蕊花糖苷、连翘酯苷、异麦角甾苷、焦地黄苯乙醇苷 D、地黄苷、连翘酯苷 E 为同系物，洋地黄叶苷 B 和焦地黄苯乙醇苷 A1 为同系物，相对校正因子相近为 1。一测多评法测定连翘酯苷、洋地黄叶苷 B、焦地黄苯乙醇苷 A1、异麦角甾苷、焦地黄苯乙醇苷 D、连翘酯苷 E、地黄苷、6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇、地黄苷 A、5-HMF 的相对含量（表 3）。



A-色谱条件1液相色谱图(334 nm): a-地黄样品, b-毛蕊花糖苷对照品 B-色谱条件2液相色谱图(210 nm): c-地黄样品, d-梓醇对照品 C-色谱条件1液相色谱图(210 nm): e-地黄样品, f-地黄苷D对照品, g-益母草苷对照品 1-5-HMF 2-连翘酯苷 E 3-洋地黄苷叶 B 4-焦地黄苯乙醇苷 A1 5-毛蕊花糖苷 6-连翘酯苷 7-异麦角甾苷 8-焦地黄苯乙醇苷 D 9-6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇 10-地黄苷 11-梓醇 12-地黄苷 A 13-地黄苷 D 14-益母草苷

A-chromatographic condition 1 liquid chromatogram (334 nm): a-RR sample b-acteoside standard B-chromatographic condition 2 liquid chromatogram (210nm): c-RR sample d-catalpol standard C-chromatographic condition 1 liquid chromatogram (210 nm): e-RR sample f-rehmannioside D standard g-ajugol standard 1-5-HMF 2-forsythoside E 3-lanatoside B 4-jionoside A1 5-acteoside 6-forsythoside 7-isoacteoside 8-jionoside D 9-6-O-E-feruloyl ajugol 10-rehmannioside 11-catalpol 12-rehmannioside A 13-rehmannioside D 14-ajugol

图3 干地黄液相图

Fig. 3 UPLC of dried RR

表2 地黄不同饮片化学成分质量分数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Comparison of chemical components contained in processed products of RR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	产地	质量分数/%				样品	产地	质量分数/%			
		梓醇	毛蕊花糖苷	地黄苷 D	益母草苷			梓醇	毛蕊花糖苷	地黄苷 D	益母草苷
鲜地黄	山西运城	3.847±0.006	1.057±0.016	1.206±0.012	1.553±0.066	酒地黄	山西运城	1.649±0.023**	0.246±0.001**	1.227±0.001	0.692±0.006**
	河南温县	4.058±0.076	0.960±0.007	0.875±0.025	2.421±0.058	河南温县	1.394±0.117**	0.303±0.009**	0.731±0.016*	1.229±0.013**	
	河南武陟	4.556±0.072	1.077±0.035	1.309±0.104	2.474±0.083	河南武陟	1.566±0.203**	0.436±0.002**	1.205±0.175	1.253±0.000**	
干地黄	山西运城	3.737±0.073	0.099±0.003**	1.554±0.098*	1.154±0.019*	熟地黄	山西运城	0.753±0.042**	0.177±0.001**	1.345±0.052	0.258±0.001**
	河南温县	3.595±0.135	0.105±0.003**	0.926±0.017	1.644±0.139*	河南温县	0.626±0.035**	0.185±0.004**	0.886±0.000	0.686±0.003**	
	河南武陟	4.195±0.113	0.094±0.002**	1.130±0.170	1.980±0.009*	河南武陟	0.850±0.059**	0.199±0.005**	0.950±0.059	0.705±0.016**	
生地黄	山西运城	2.062±0.082**	0.121±0.004**	1.268±0.021	0.849±0.010**						
	河南温县	2.376±0.205**	0.238±0.006**	0.788±0.018	1.261±0.005**						
	河南武陟	2.789±0.063**	0.477±0.010**	0.954±0.004*	1.291±0.017**						

鲜地黄经烘、蒸、炙等方法,炮制成干地黄、生地黄、酒地黄、熟地黄后,大部分化学成分的含量有不同程度的下降;其中属于环烯醚萜苷类成分的益母草苷、梓醇、地黄苷 A,虽然相较于鲜地黄,干地黄中的质量分数有所下降,但下降程度无显著性差异,另外 3 种饮片下降程度却具有显著性差异 ($P < 0.01$);而毛蕊花糖苷、异麦角甾苷等苯乙醇苷类成分,除连翘酯苷外,其他成分含量相较于鲜地黄均有大幅度下降,甚至连翘酯苷 E、毛蕊花糖苷、地黄苷 3 个成分在干地黄中的含量下降的幅度高于生地黄、酒地黄和熟地黄。相对来说,成分含量变化比较特殊的有 3 个,一是环烯醚萜苷类成分地黄

苷 D,在各炮制品中质量分数变化不大,甚至干地黄中的质量分数还略高于鲜地黄;二是分子结构中既有环烯醚萜基团,又有苯乙醇基团的 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇,较鲜地黄,干地黄中的相对含量明显高于其他 4 种饮片,具有显著性差异 ($P < 0.01$);三是地黄中 5-HMF 的相对含量则随着炮制中加热时间的增长,加热次数的增多,呈递增的趋势。

2.5 基于成分-靶点-通路的网络药理学分析

2.5.1 候选化合物靶点预测 检索中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 和 PubChem Compound 化合物数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取干地黄中特

表 3 地黄不同饮片化学成分相对含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Comparison of chemical components relative contained in processed products of RR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	产地	相对含量/%									
		焦地黄苯乙醇苷 A1	连翘酯苷	异麦角甾苷	焦地黄苯乙醇苷 D	6-O-E-阿魏酰筋骨草醇	地黄苷	连翘酯苷 E	洋地黄叶苷 B	地黄苷 A	5-HMF
鲜地黄	山西运城	0.076±0.008	0.072±0.001	0.077±0.007	0.148±0.013	1.824±0.044	0.031±0.001	0.069±0.008	0.671±0.086	3.519±0.113	0.374±0.017
	河南温县	0.120±0.016	0.086±0.001	0.091±0.011	0.165±0.004	1.451±0.032	0.057±0.006	0.067±0.008	0.729±0.104	4.260±0.245	0.365±0.011
	河南武陟	0.115±0.016	0.069±0.004	0.082±0.001	0.110±0.016	1.390±0.046	0.042±0.006	0.058±0.011	0.822±0.105	3.743±0.052	0.203±0.006
干地黄	山西运城	0.046±0.008	0.068±0.002	0.022±0.001**	0.063±0.002*	4.267±0.115**	0.006±0.000**	0.007±0.000**	0.184±0.022*	2.710±0.055*	0.471±0.022*
	河南温县	0.035±0.001*	0.055±0.008*	0.012±0.003*	0.051±0.004**	3.578±0.104**	0.004±0.000**	0.005±0.001**	0.173±0.013*	2.629±0.314*	0.422±0.011*
	河南武陟	0.028±0.001*	0.038±0.001*	0.012±0.001**	0.045±0.002*	4.432±0.179**	0.006±0.000*	0.005±0.001*	0.132±0.008*	2.361±0.201*	0.474±0.013**
生地黄	山西运城	0.017±0.001*	0.017±0.001**	0.021±0.000**	0.034±0.001**	1.883±0.022	0.013±0.000**	0.038±0.001*	0.109±0.001*	0.683±0.039**	2.482±0.252**
	河南温县	0.014±0.001*	0.025±0.001**	0.018±0.001*	0.046±0.002**	1.461±0.083	0.021±0.000*	0.016±0.003*	0.154±0.008*	0.558±0.006**	2.985±0.142**
	河南武陟	0.026±0.001*	0.035±0.000**	0.040±0.000**	0.063±0.000	0.843±0.042**	0.024±0.006	0.029±0.001	0.227±0.001*	0.960±0.005**	2.486±0.148**
酒地黄	山西运城	0.025±0.001*	0.044±0.002**	0.036±0.000*	0.047±0.000**	1.505±0.019*	0.027±0.001	0.035±0.006*	0.206±0.002*	0.206±0.001**	2.596±0.061**
	河南温县	0.021±0.001*	0.039±0.003**	0.023±0.000*	0.053±0.001**	1.261±0.012*	0.033±0.005	0.026±0.002*	0.183±0.002*	0.819±0.011**	2.643±0.006**
	河南武陟	0.024±0.001*	0.053±0.004	0.033±0.001**	0.061±0.001	1.539±0.064	0.023±0.001*	0.025±0.000	0.273±0.001*	0.704±0.037**	2.370±0.154**
熟地黄	山西运城	0.029±0.001*	0.053±0.001**	0.039±0.001*	0.042±0.002**	1.179±0.038**	0.028±0.001	0.041±0.001*	0.150±0.007*	0.019±0.000**	5.730±0.187**
	河南温县	0.013±0.001*	0.045±0.004**	0.022±0.002*	0.030±0.002**	0.694±0.023**	0.023±0.001*	0.025±0.001*	0.137±0.006*	0.075±0.004**	4.479±0.045**
	河南武陟	0.010±0.000*	0.046±0.001*	0.026±0.001**	0.023±0.001*	0.697±0.033**	0.023±0.001*	0.027±0.001	0.182±0.009*	0.076±0.004**	4.647±0.205**

与鲜地黄组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs fresh RR

有成分焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷, 含量和鲜地黄基本一致成分益母草苷、梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、连翘酯苷, 以及含量升高成分 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇这 8 个化合物的 Canonical SMILES 编号, 将得到的化合物 SMILES 结构输入 Swiss Target Prediction 服务器 (<https://new.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测, 并结合 Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行靶点蛋白和基因信息校正, 筛选出物种为“homo sapiens”的靶点, 得到上述 8 个化合物的作用靶点, 筛去重复靶点, 最终得到与其相关的作用靶点共 88 个。

2.5.2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络构建 将“2.5.1”项下靶点信息导入到 STRING 11 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 进行 PPI 网络分析, 物种限定为“Homo sapiens”, 获得核心靶点间相互作用的信息。将 PPI 网络结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件中 Network Analyzer 插件获取靶点关系信息, 依据度值 (degree)、介度中心性 (betweenness centrality)、接近中心性 (closeness centrality) 3 个参数均大于中位数且度值大于等于 5, 筛选得 10 个核心靶点。分

析发现 5 个靶点与焦地黄素 D 有关, 4 个与桃叶珊瑚苷有关, 3 个与梓醇有关, 具体见表 4。

2.5.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 GO 富集分析结果包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF), 描述

表 4 核心靶点网络的拓扑学性质

Table 4 Topological properties of core targets network

靶点	名称	介度中心性	接近中心性	度值
CASP3	Caspase-3	0.361 210 93	0.357 142 86	12
HSP90AA1	heat shock protein HSP 90-alpha	0.133 895 45	0.324 324 32	11
IL-6	interleukin-6	0.066 645 57	0.295 566 5	10
APP	beta amyloid A4 protein	0.199 468 85	0.292 682 93	8
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	0.242 068 32	0.326 086 96	8
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	0.054 633 33	0.291 262 14	8
HK1	hexokinase type I	0.124 516 23	0.288 461 54	6
HK2	hexokinase type II	0.124 516 23	0.288 461 54	6
PTGS2	prostaglandin G/H synthase 2	0.064 404 45	0.291 262 14	6
TK1	thymidine kinase, cytosolic	0.229 293 79	0.292 682 93	5

了基因产物行使的分子功能,所处的细胞环境,以及参与的生物过程进而产生药效。将 88 个干地黄相关作用靶点导入到 DAVID6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 选取 Homo sapiens 物种项, 得到 GO 生物功能分析结果, 设置 $P < 0.01$, 设置基因数 (count) 从大到小排序。KEGG 通路富集分析得到干地黄靶点的信号通路, 设置 $P < 0.01$ 。

GO 富集分析结果共有 142 个项目, 包含 112 个 BP、8 个 CC 和 22 个 MF, 设置 $P < 0.01$, 按照基因数目选取前 15 个项目, 见图 4。结果表明靶点参与的细胞组成中, 细胞质、质膜、胞质溶胶、细胞外分泌体、细胞外间隙、质膜的组成部分占比较大; 分子功能以蛋白质同二聚化活性、相同的蛋白质结合、蛋白质异二聚化活性最为显著; 生物功能

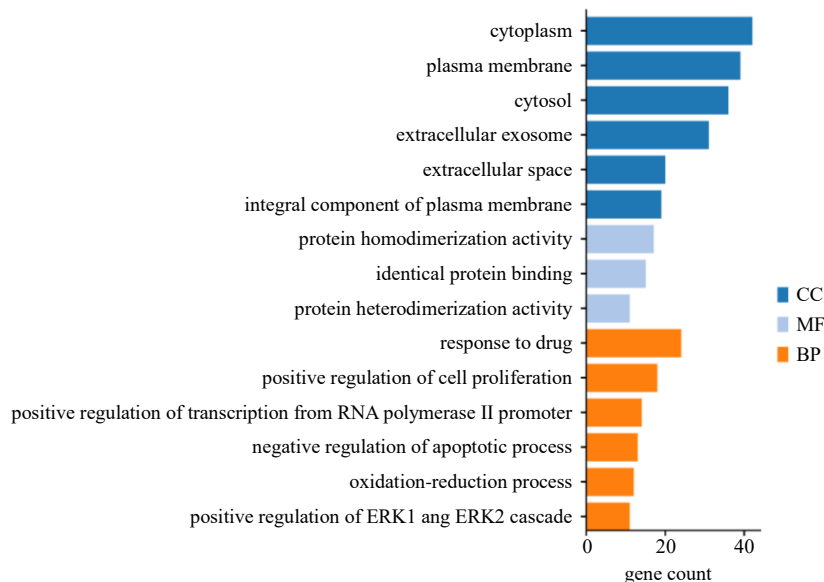


图 4 GO 富集分析 (前 15 条)

Fig. 4 GO analysis of number of genes (top 15)

涉及细胞增殖的正调控, RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控, 凋亡过程的负调控, ERK1、ERK2 的正调控, 氧化还原反应, 药物反应。

KEGG 富集分析筛选出 24 条通路, 选取具有显著性的前 15 的通路, 如图 5, 主要包括药物代谢、cAMP 信号通路、碳水化合物消化与吸收、HIF-1 信号通路、细胞凋亡、间隙连接通路、肌萎缩侧索硬化、乙型肝炎、癌症通路、氮代谢、半乳糖代谢、血清素突触、淀粉和蔗糖代谢、神经活性配体-受体相互作用通路。

2.5.4 成分-靶点-通路网络构建 根据筛选到的地黄的 8 个成分、88 个靶点和 15 条关键通路, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点-通路网络图, 见图 6。根据 Cytoscape 3.7.2 软件对网络图进行分析, 以成分、靶点信号通路的度值 (degree) 为参考, 发现焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷、梓醇连接度较高, 可能是干地黄发挥凉血滋阴功效的成分, 腺苷 A2a 受体 (adenosine A2a receptor)、碳酸酐酶 II (carbonic anhydrase II)、II 型己糖激酶 (hexokinase type II)、I 型己糖激酶 (hexokinase type I)、细胞凋亡调节因

子 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2)、腺苷 A1 受体 (adenosine A1 receptor)、转录因子 p65 (transcription factor p65)、Caspase-3、蛋白激酶 Cα (protein kinase Cα) 靶点连接度较高 (degree > 5), 可能是清胃散中地黄发挥药效的关键靶点, 代谢通路 (metabolic pathways)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、癌症通路 (pathways in cancer)、血清素突触 (serotonergic synapse)、乙型肝炎 (hepatitis B)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway) 连接度较大 (degree > 8), 均可能是干地黄发挥作用的关键信号通路。网络中既存在一个分子与多个靶点蛋白的相互作用, 也存在同一个靶点蛋白与不同分子作用的现象, 表明了干地黄的多成分与多靶点之间共同作用的机制, 符合中药的多靶点, 多作用, 多角度的特点。

2.5.5 整合分析 经典名方清胃散中地黄具有清热、凉血、滋阴之效。研究通过质谱和液相对地黄化学成分和液相共有成分分析, 获取干地黄中特有成分焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷, 含量和鲜地黄基本一致成分益母草苷、梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、连翘

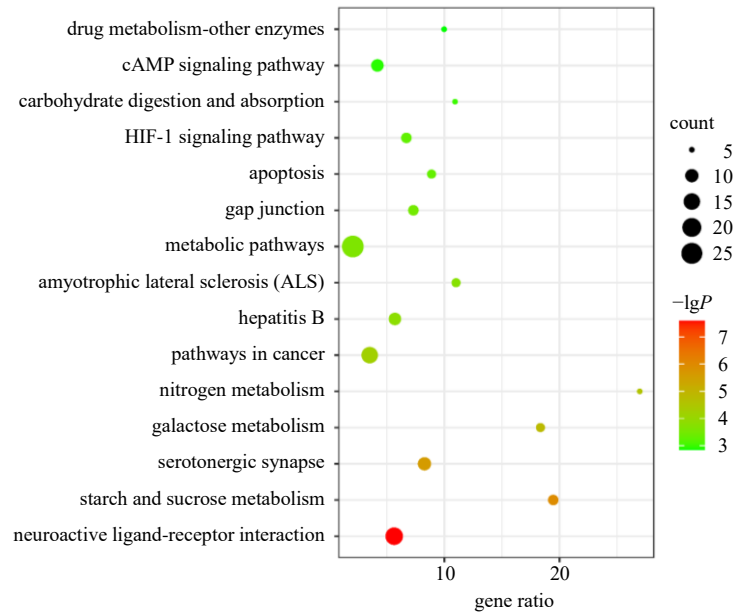


图 5 KEGG 富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis results of KEGG

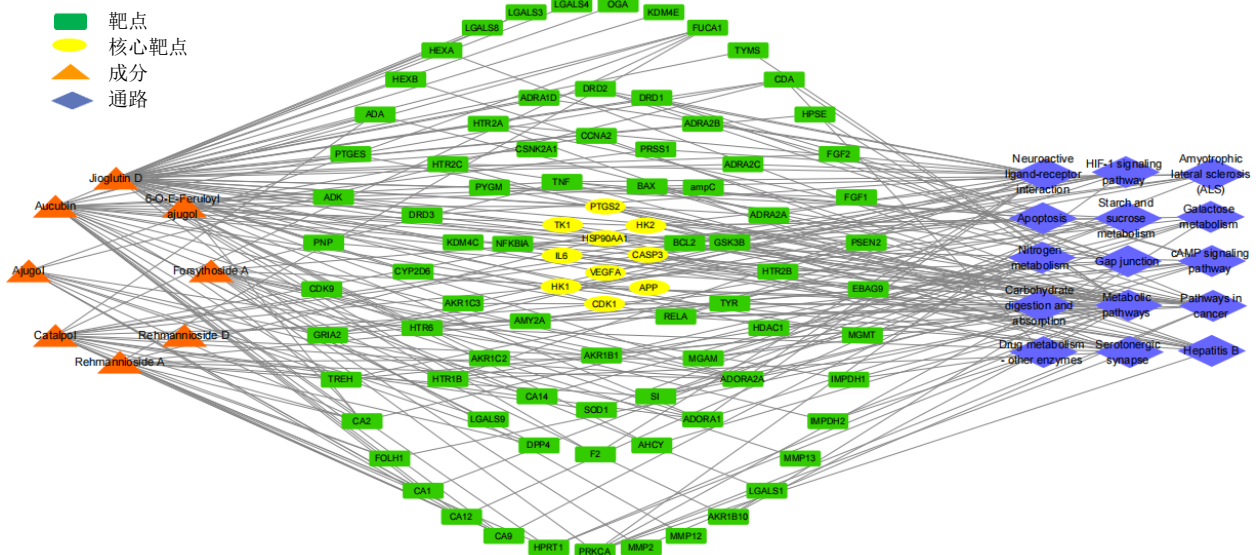


图 6 成分-靶点-通路网络图

Fig. 6 Compound-target-pathway network diagram

酯苷, 以及含量升高成分 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇这 8 个化合物进行现代网络药理学分析, 并对作用机制进行探讨分析。网络药理学结果表明, 筛选的干地黄 8 个化合物, 共获得 88 个靶点, 通过构建 PPI 信息网络, 根据度值、接近中心性、介数中心性的拓扑参数进行分析, 得到 10 个核心靶点, 网络药理学分析筛选得到清胃散中干地黄的核心靶点和信号通路。应用 Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点-通路网络信息, 根据度值分析得出焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷和梓醇这 3 个成分可能是清胃散中地黄

发挥清热凉血功效的成分。

3 讨论

纵观地黄的几个炮制品, 鲜地黄寒性最强, 清热作用亦最强, 干地黄经过短时间蒸制后, 寒性略有下降, 生地黄由于经过长时间烘烤, 寒性进一步下降, 而以生地黄为原料, 经过酒炙而成的酒地黄和经过酒蒸而成的熟地黄, 药性亦转为温性, 药效也转为滋补。从地黄的几个炮制品性状的变化, 也可以看出此趋势。因此, 从药性的角度看, 清胃散中最适宜使用鲜地黄, 但鲜地黄含水量高, 不耐贮

存,且经过酒蒸后,可以引药上行和引药入血分,达到清头面部之热和血中之热的目的,结合清胃散中地黄的核心功效,最适宜选择的品种,应为用酒短时间蒸制的干地黄。

针对地黄的几个炮制品的化学特征研究,亦支持此推论。就液质鉴定的化合物种类和数目而言,生地黄、酒地黄和熟地黄的环烯醚萜类化合物较鲜地黄和干地黄均有大幅度减少,而生地黄、酒地黄和熟地黄的糖类化合物较鲜地黄和干地黄均有大幅度增加,含有环烯醚萜类化合物中药药性多为寒凉,而糖类物质具有温补作用。干地黄和鲜地黄不但有大量的共有成分,如美利妥双苷、乙酰梓醇等,且所含的环烯醚萜类成分的含量,如益母草苷、梓醇、地黄苷 A 等,相较于生地黄、酒地黄、熟地黄,亦更接近于鲜地黄,可以说干地黄较好的保留了鲜地黄中环烯醚萜类化合物,其中梓醇、地黄苷 A 和益母草苷具有抗炎、抗氧化、镇痛和解热作用^[41-43],这些都和地黄的清热疗效密切相关。同时,也应注意,干地黄中也有其特有的成分,如桃叶珊瑚苷、焦地黄素 D,以及含量明显高于其它饮片的 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇,研究发现^[44-45]桃叶珊瑚苷具有抗炎、抗氧化作用,对乙醇诱导的急性胃粘膜损伤具有保护作用,这给干地黄具有自己独特的疗效带来了可能,而焦地黄素 D 和 6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇在药理药效方面研究较少,后续值得进一步研究。

现代网络药理学^[46]研究清胃散发现,IL-6、VEGFA、EGF、TNF 靶点蛋白与其他蛋白相互作用较多,功能和通路富集主要涉及氧化应激反应、ERK1 和 ERK2 调控、对活性氧的反应等生物过程,以及 HIF-1 信号通路、IL-17 信号通路、细胞凋亡等通路。而对鲜地黄和干地黄典型共有成分和特有成分靶点分析,发现干地黄中焦地黄素 D、桃叶珊瑚苷、益母草苷、梓醇、地黄苷 A、地黄苷 D、连翘酯苷、6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇成分通过调控 Caspase-3、热休克蛋白 HSP 90- α (heat shock protein HSP 90- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、 β 淀粉样 A4 蛋白 (β amyloid A4 protein)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A)、I 型己糖激酶 (hexokinase type I)、II 型己糖激酶 (hexokinase type II) 等关键靶点,涉及细胞增殖的正调控、凋亡过程的负调控、ERK1 和 ERK2 的正调控、氧化还原反应等生物功能,作用

于 cAMP 信号通路、HIF-1 信号通路等信号通路发挥干地黄清热作用。

10 个核心靶点中, CASP3 又称胱天蛋白酶 3,是一种蛋白酶,能够特异性的剪切多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP1) 和乙酰基-DEVD-7-氨基-4-甲基香豆素 (Ac-DEVD-AMC),从而导致 DNA 裂解促进细胞凋亡。HSP90AA1 具有同源二聚体的功能,编码的蛋白质通过协同伴侣调节的 ATP 酶活性有助于特定靶蛋白的正确折叠。APP 是一种跨膜蛋白,经代谢途径产生的 α APPs 等物质能营养和修复神经元。研究发现上调 CASP3、下调 HSP90AA1 和抑制 APP 水解途径均能抑制胃癌的发生和侵袭^[47-49]。IL-6 为一类促炎细胞因子,多是由淋巴细胞分泌的,具有参与骨吸收,阻滞成纤维细胞生长的作用,已有研究发现地黄会影响 IL-6 的表达从而改善牙周组织炎症^[50]。因此,清胃散中地黄可能是通过这些靶点起到抑制胃部病症,缓解牙周炎症。

地黄可能通过调节 cAMP 信号通路起到解热的作用^[51]。周晴等^[52]研究发现地黄通过乙型肝炎通路治疗慢性乙型肝炎引起的热毒。Sun 等^[53]发现梓醇通过细胞凋亡通路抑制胃癌细胞增殖。血清素突触通路血清素主要由胃肠道的肠嗜铬细胞产生,血清素通过促进细胞上 2C 受体和激活 HTR2B,促进抗炎细胞极化,与炎症性肠胃病相关^[54],Chen 等^[55]通过 HIF 通路调节巨噬细胞极化抑制牙周炎,这些与炎症反应相关,故推测清胃散中地黄治疗胃火牙痛的机制,可能是通过相关靶点作用于这些信号通路。

地黄是极具特色的一味中药,其炮制后药性发生转变,带来了功效的变化,但由于其不同饮片名称的混淆错乱,带来了临床使用的混乱,“清胃散”中所用地黄为“生地黄(酒制,三分)”,按常规理解,生地黄酒制,即为熟地黄,而本方的主治功用为通过清胃凉血,达到治疗胃热牙痛的目的,使用地黄取其清热的作用,使用酒制法取其引药上行,引药入血分的作用,而非熟地黄酒蒸的增强补益作用,降低滋腻之性的目的。现代清胃散组方研制中,其中地黄采用鲜地黄,制成清胃胶囊,具有一定的镇痛、抗炎等作用^[56]。故此方中的生地黄应指的鲜地黄,而采用的酒制法,正是《雷公炮炙论》中拌酒短时间蒸的方法,最终使用的饮片应为本文的研究对象-干地黄,本实验通过液质联用和现代网络药理学对干地黄的成分研究,均支持此推论。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐军, 傅喆喆. 地黄炮制品名历史沿革及功效考辨探讨 [J]. 中成药, 2017, 39(9): 1913-1916.
- [2] 王军, 程铭恩, 詹志来, 等. 经典名方中地黄品种的演变与考证 [J]. 中华医史杂志, 2020, 50(5): 275-282.
- [3] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [4] 王悦, 周巧, 张学兰, 等. HPLC 法同时测定地黄及不同炮制品中 8 种成分的含量 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 64-68.
- [5] 吕思霖. 基于性状、化学成分的地黄九蒸九晒炮制科学性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [6] 孔媛芳, 杨彬, 胡玉龙, 等. 环烯醚萜类化合物的结构及构效关系研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(7): 1236-1250.
- [7] 杜亚朋, 王美, 李璐遥, 等. 基于化合物稳定性探讨炮制对含环烯醚萜类成分中药药性及功效影响的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 5039-5051.
- [8] Xue Z Z, Yang B. Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 991.
- [9] Wu L P, Georgiev M I, Cao H, et al. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review [J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(6): 2605-2649.
- [10] Zhou Y, Xu D S, Liu L, et al. A LC-MS/MS method for the determination of stachyose in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 123: 24-30.
- [11] 甄振鹏, 高裕锋, 黄敏兴, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定乳粉中低聚半乳糖 [J]. 甘蔗糖业, 2019(1): 46-50.
- [12] 王义明, 张思巨, 罗国安, 等. 用 LC/ESI-MS/MS 研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物 [J]. 药学报, 2000, 35(11): 839-842.
- [13] 周婕. 湖北地黄化学成分研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [14] Kirmizibekmez H, Caliş I, Akbay P, et al. Iridoid and bisiridoid glycosides from *Globularia cordifolia* [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2003, 58(5/6): 337-341.
- [15] Das N, Achari B, Harigaya Y, et al. A new flavonol glucoside from the aerial parts of *Sida glutinosa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(10): 965-971.
- [16] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [17] Wang F C, Huang S Y, Chen Q G, et al. Chemical characterisation and quantification of the major constituents in the Chinese herbal formula Jian-Pi-Yi-Shen Pill by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-QQQ-MS/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(6): 915-929.
- [18] Li Z, Rychindorj L, Liu B N, et al. Chemical profiles and metabolite study of raw and processed *Cistanche deserticola* in rats by UPLC-Q-TOF-MS^E [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 95.
- [19] 李孟. 生地黄化学成分研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.
- [20] Serra-Cayuela A, Castellari M, Bosch-Fusté J, et al. Identification of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) in Cava sparkling wines by LC-DAD-MS/MS and NMR spectrometry [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3373-3380.
- [21] 张艳丽. 地黄叶的化学成分研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013.
- [22] Oshio H, Inouye H. Iridoid glycosides of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(1): 133-138.
- [23] 蒙雄裕. 天目地黄化学成分、质量标准及其抗衰老活性研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2015.
- [24] Li Y S, Chen Z J, Zhu D Y. A novel bis-furan derivative, two new natural furan derivatives from *Rehmannia glutinosa* and their bioactivity [J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19(2): 165-170.
- [25] Kitagawa I, Fukuda Y, Taniyama T, et al. Chemical studies on crude drug processing. VII. on the constituents of *Rehmanniae Radix*. (1): Absolute stereostructures of rehmaglucitins A, B, and D isolated from Chinese *Rehmanniae Radix*, the dried root of *Rehmannia glutinosa* Libosch. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(5): 1171-1176.
- [26] Ravi B G, Guardian M G E, Dickman R, et al. Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1618: 460903.
- [27] 陶益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 地黄炮制前后化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 102-106.
- [28] Zhao X F, Wang Y, Sun Y Q. Quantitative and qualitative determination of Liuwei Dihuang tablets by HPLC-UV-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2007, 45(8): 549-552.
- [29] Morota T, Sasaki H, Nishimura H, et al. Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(8): 2149-2153.
- [30] Wu L, du S L, Yang F R, et al. Simultaneous determination of nineteen compounds of Dahuang Zhechong Pill in rat plasma by UHPLC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr*

- B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1151: 122200.
- [31] 易博, 张旻, 胡引明, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的裸花紫珠不同部位化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4661-4669.
- [32] Skrzypek Z, Wysokińska H, Swiatek L, *et al.* Phenylpropanoid glycosides from *Penstemon serrulatus* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(1): 127-129.
- [33] 刘彦飞, 梁东, 罗桓, 等. 地黄的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 16-22.
- [34] 肖凯, 冯大伟, 杨金丽, 等. 盔状黄芩中的苯乙醇苷及黄酮苷类化合物分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 36-41.
- [35] 乔媛媛, 黄琦雅, 余婷婷, 等. 一测多评法测定藏族药肉果草中 4 种成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 99-102.
- [36] 邹献亮. 地黄及六味地黄胶囊质量标准提升研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [37] 赵志国, 姚建华, 王婧宁, 等. HPLC 一测多评法同时测定慢肝养阴片中 7 种成分含量 [J]. 食品与药品, 2020, 22(5): 375-383.
- [38] 崔小弟, 李执栋, 徐芳芳, 等. 热毒宁注射液多指标成分的一测多评法同时测定 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1116-1119.
- [39] 吕佳佳, 王莎, 周昌艳, 等. 一测多评法测定牛黄上清系列制剂中 7 种成分的含量 [J]. 遵义医学院学报, 2018, 41(2): 219-224.
- [40] 陈海燕, 刘华东, 李冰, 等. 一测多评法同时测定百合固金片中 9 种成分含量 [J]. 医药导报, 2020, 39(3): 370-375.
- [41] Rezaq S, Mahmoud M F, El-Shazly A M, *et al.* Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic properties of *Potamogeton perfoliatus* extract: *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4826.
- [42] Sun M, Shen X M, Ma Y Z. Rehmamioside A attenuates cognitive deficits in rats with vascular dementia (VD) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109492.
- [43] Akkol E K, Tatli I I, Akdemir Z S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of saponin and iridoid glycosides from *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense* Hub. -Mor [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2007, 62(11/12): 813-820.
- [44] Zeng X C, Guo F, Ouyang D S. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin [J]. *Fitoterapia*, 2020, 140: 104443.
- [45] Yang Y, Yin B, Lv L, *et al.* Gastroprotective effect of aucubin against ethanol-induced gastric mucosal injury in mice [J]. *Life Sci*, 2017, 189: 44-51.
- [46] 孟颖, 蒋志涛, 严国俊, 等. UPLC-Q-TOF-MS、GC-MS 联合网络药理学及分子对接技术分析经典名方清胃散治疗牙周炎的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(10): 1-11.
- [47] Liang R, Chen W, Chen X Y, *et al.* Dihydroartemisinin inhibits the tumorigenesis and invasion of gastric cancer by regulating STAT1/KDR/MMP9 and P53/BCL2L1/CASP3/7 pathways [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 218: 153318.
- [48] Ba M C, Ba Z, Gong Y F, *et al.* Knockdown of lncRNA ZNRD1-AS1 suppresses gastric cancer cell proliferation and metastasis by targeting the miR-9-5p/HSP90AA1 axis [J]. *Aging*, 2021, 13(13): 17285-17301.
- [49] di Stadio C S, Altieri F, Minopoli G, *et al.* Role of human GKN₁ on APP processing in gastric cancer [J]. *Biochimie*, 2017, 135: 149-153.
- [50] de Molon R S, Park C H, Jin Q M, *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis [J]. *Microsc Res Tech*, 2018, 81(12): 1412-1421.
- [51] 代良萍, 代良敏, 代超, 等. 青黛对内生致热原性发热家兔的解热作用及其机制研究 [J]. 海峡药学, 2021, 33(10): 13-16.
- [52] 周晴, 徐燎宇, 陈晓蓉, 等. 犀角地黄汤加味治疗慢性乙型肝炎热毒炽盛型 46 例 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(2): 41-43.
- [53] Sun F Z, Wang Z H, Wang X Y. Chloroquine enhances catalpol's ability to promote apoptosis by inhibiting catalpol's autophagy-promoting effect on gastric cancer [J]. *J Buon*, 2021, 26(3): 924-931.
- [54] Shajib M S, Khan W I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation [J]. *Acta Physiol*, 2015, 213(3): 561-574.
- [55] Chen M H, Wang Y H, Sun B J, *et al.* HIF-1 α activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107901.
- [56] 蔡晓燕. 清胃胶囊制备工艺与质量标准研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.

[责任编辑 郑礼胜]