

基于 UPLC 指纹图谱和网络药理学的当归炮制前后差异质量标志物研究

覃柳莹, 梁丽金, 胡懿, 甘力帆, 黄森, 徐杰, 张志鹏*

广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

摘要:目的 筛选当归 *Angelicae Sinensis Radix* 炮制前后差异特征成分, 建立当归炮制前后差异质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 的定量分析方法, 为当归和当归炭 *Angelicae Sinensis Radix Carbonisata* 的质量评价提供依据。方法 采用 UPLC 法分别构建当归和当归炭的指纹图谱, 运用化学模式识别技术筛选当归炭炮制前后的主要差异成分, 结合中药 Q-Marker “五原则” 和网络药理学分析筛选潜在的差异 Q-Marker, 并进行定量分析。结果 15 批当归 UPLC 指纹图谱共标定 19 个共有峰, 当归炭 UPLC 指纹图谱共标定 10 个共有峰, 指认 7 个成分。采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 可明显区分当归和当归炭; 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares method-discriminant analysis, PLS-DA) 辨识出影响当归与当归炭差异的 10 个主要色谱峰, 按 VIP 值大小排序依次为峰 23、22、10、16、7、3、2、1、4、11。结合中药 Q-Marker “五原则” 和网络药理学分析, 筛选出色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藜本内酯、5-羟甲基糠醛为当归炭炮制前后差异的 Q-Marker。Q-Marker 定量结果表明, 当归炒炭后色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藜本内酯含量均明显下降; 同时产生了新成分 5-羟甲基糠醛, 其质量分数在 0.720 6~3.989 0 mg/g。结论 建立的 UPLC 指纹图谱可有效地对当归和当归炭进行区分, 结合中药 Q-Marker “五原则” 和网络药理学分析当归和当归炭的主要差异成分群, 可为当归和当归炭的 Q-Marker 研究和质量评价提供参考。

关键词: 当归; 当归炭; UPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 网络药理学; 质量标志物; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 色氨酸; 绿原酸; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 洋川芎内酯 H; 藜本内酯; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-5892-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.007

Differential quality markers of *Angelicae Sinensis Radix* before and after processing based on UPLC fingerprinting and network pharmacology

QIN Liu-ying, LIANG Li-jin, HU Yi, GAN Li-fan, HUANG Sen, XU Jie, ZHANG Zhi-peng

Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule Enterprises, Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

Abstract: Objective To screen the characteristic components of Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*, ASR) before and after processing, and establish a quantitative analysis method for the differential quality markers (Q-Marker) of ASR before and after processing, so as to provide a basis for the quality evaluation of ASR and Dangguitan (*Angelicae Sinensis Radix Carbonisata*, ASRC). **Methods** The fingerprints of ASR and ASRC were constructed separately by UPLC, and the chemical pattern recognition technique was applied to screen the main differential components of ASRC before and after processing, combined with the “five principles” of Q-Marker and network pharmacological analysis to screen the potential differential Q-Marker and quantitative analysis was conducted. **Results** A total of 19 common peaks were identified in 15 batches of ASR UPLC fingerprint profiles, 10 common peaks were identified in ASRC UPLC fingerprint profiles, and seven components were identified. Principal component analysis (PCA) was used to clearly distinguish ASR from ASRC; Ten major peaks affecting the difference between ASR and ASRC was identified by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), which were ranked in order of VIP value as peaks 23, 22, 10, 16, 7, 3, 2, 1, 4, 11. Combined with the “five principles” of Q-Marker and network pharmacological analysis, tryptophan, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide I, senkyunolide H, ligustilide and 5-hydroxymethylfurfural were screened as differential Q-Markers of ASRC before and

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 中华人民共和国工业和信息化部 2022 年产业技术基础公共服务平台 (2022-230-221); 佛山市核心技术攻关项目 (1920001000378)

作者简介: 覃柳莹 (1996—), 女, 壮族, 硕士, 主要从事中药饮片及配方颗粒质量标准研究。Tel: (0757)85128604 E-mail: qlytem@163.com

*通信作者: 张志鹏 (1990—), 男, 汉族, 硕士, 主要从事中药饮片及配方颗粒质量标准研究。

Tel: (0757)85128604 E-mail: zhangzp0909@163.com

after processing. The quantitative results of Q-Marker showed that the contents of tryptophan, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide I, senkyunolide H and ligustilide were all decreased significantly after ASR was fried into charcoal; Meanwhile, a new component 5-hydroxymethylfurfural was produced, with mass fractions ranging from 0.720 6—3.989 0 mg/g. **Conclusion** The fingerprints established can effectively differentiate ASR and ASRC, and combined the “five principles” of Q-Marker and network pharmacology to analyze the main differential component groups of ASR and ASRC, which can provide reference for the Q-Marker research and quality evaluation of ASR and ASRC.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; *Angelicae Sinensis Radix Carbonisata*; UPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; network pharmacology; quality marker; principal component analysis; partial least squares-discriminant analysis; tryptophan; chlorogenic acid; ferulic acid; senkyunolide I; senkyunolide H; ligustilide; 5-hydroxymethylfurfural

当归 *Angelicae Sinensis Radix* (ASR) 为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 味甘、辛, 性温, 归肝、心、脾经, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便的功效, 主要用于妇科血虚、血瘀等证候诸疾的治疗, 素有“妇科要药”之称^[1]。当归的炮制品广泛应用于临床各科, 故亦有“药王”之称。见诸历代文献的当归炮制方法达 25 种之多, 较常用的有酒制、炒制、制炭等^[2]。其中当归制炭始见于明朝, 常用于治疗妇科崩漏之症, 有收敛止血之效^[3]。

中药发挥药效作用的基础是多种有效成分的合理、有机的组合, 其模式是多途径作用于机体内与疾病相关的多靶点, 发挥对机体的整体调节作用^[4]。因此, 当归与当归炭 *Angelicae Sinensis Radix Carbonisata* (ASRC) 的功效不同可理解为内在化学成分存在差异。中药指纹图谱是从中药物质群出发, 以反映中药化学成分的整体情况, 具有整体性、特异性和选择性的特点, 是探究中药质量物质基础的有效技术手段^[5]。网络药理学是通过揭示中药化合物的作用和治疗机制来研究药物、靶点和疾病之间的关系, 阐明中药对疾病的作用机制^[6]。中药质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 是由刘昌孝院士提出的针对中药产品质量控制的新理念, 聚焦中药质量属性的本质特征进行质量控制^[7]。结合中药指纹图谱与网络药理学筛选当归炮制前后差异的 Q-Marker, 可初步揭示当归和当归炭的主要差异成分以及发挥药效的专属性物质基础。因此, 本研究拟建立当归和当归炭的 UPLC 指纹图谱, 采用化学模式识别技术结合网络药理学, 筛选当归和当归炭的主要差异 Q-Marker, 并进行定量分析, 以期当归和当归炭的 Q-Marker 研究及质量评价提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity 型超高效液相色谱系统, 美国

Waters 公司; ME204E 型万分之一分析天平、XP26 型百万分之一天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; KQ-500DE 型数控超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 型超纯水系统, 默克股份有限公司。

1.2 对照品与试剂

对照品色氨酸 (批号 140686-201904, 质量分数 99.9%)、绿原酸 (批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、阿魏酸 (批号 110773-201915, 质量分数 99.4%)、洋川芎内酯 I (批号 112071-202101, 质量分数 99.2%)、5-羟甲基糠醛 (批号 111626-202215, 质量分数 99.5%) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品洋川芎内酯 H (批号 DSTDY018201, 质量分数 99.6%) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 对照品藁本内酯 (批号 20092403, 质量分数 98.77%) 购自成都普菲德生物技术有限公司。

甲醇, 分析纯, 西陇科学股份有限公司; 乙醇, 乙腈, 色谱纯, 默克股份有限公司; 甲酸, 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 水为超纯水。

1.3 药材

15 批当归药材 (DG01~DG15) 分别由陇西县冯了性药材饮片有限公司 (DG01~DG09)、哈尔滨福顺堂药材有限公司 (DG10)、甘肃中平仓储服务有限公司 (DG11~DG13)、安徽省永香中药饮片有限公司 (DG14~DG15) 提供, 产地均为甘肃。经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中医师鉴定, 15 批当归药材均为伞形科当归属植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 当归炭饮片的制备

取 15 批当归药材 (DG01~DG15), 分别按照《中国药典》2020 年版一部当归饮片炮制项下方法, 除去杂质, 洗净, 润透, 切薄片, 低温干燥, 即得净当归片; 按照《中国药典》2020 年版炮制通则项下炒炭法制备, 分别取上述净当归片, 置热锅内,

用武火炒至表面焦黑色、内部焦褐色或至规定程度时，喷淋清水少许，熄灭火星，取出，晾干，即得当归炭（DGT01~DGT15）。

2.2 供试品溶液的制备

取当归、当归炭粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 40 kHz）30 min，再称定质量，加甲醇补足缺失的质量，滤过，取续滤液，即得当归、当归炭供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称定色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯、5-羟甲基糠醛对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 48.45、17.43、32.50、20.04、16.73、372.07、85.67 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液，备用。

2.4 色谱条件

采用 Waters Acquity UPLC BEH Shield RP₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm ）；流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~12 min，5%~23% 乙腈；12~13 min，23%~43% 乙腈；13~18 min，43%~44% 乙腈；18~20 min，44%~46% 乙腈；20~22 min，46%~47% 乙腈；22~23 min，47%~58% 乙腈；23~29 min，58%~59% 乙腈；29~30 min，59%~80% 乙腈；30~34 min，80% 乙腈；体积流量为 0.3 mL/min；柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长为 270 nm；进样量为 1 μL 。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 取当归样品（DG12）及当归炭样品（DGT12）的供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件，连续进样测定 6 次，以洋川芎内酯 I 为参照峰，计算各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.28%，相对峰面积的 RSD 均小于 2.85%，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱测定要求。

2.5.2 重复性试验 取当归样品（DG12）及当归炭样品（DGT12）各 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件进样测定，以洋川芎内酯 I 为参照峰，计算各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.35%，相对峰面积的 RSD 均小于 3.93%，表明方法的重复性良好，符合指纹图谱测定要求。

2.5.3 稳定性试验 取当归样品（DG12）及当归炭样品（DGT12）供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件，分别于 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、

22、24 h 进样测定，以洋川芎内酯 I 为参照峰计算各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.20%，相对峰面积的 RSD 均小于 4.14%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定，符合指纹图谱测定要求。

2.6 指纹图谱建立及化学模式识别

2.6.1 当归及当归炭指纹图谱建立 取 15 批当归和 15 批当归炭，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 年版）进行图谱分析，设定 DG12 和 DGT12 样品图谱作为参照图谱，时间窗宽度为 0.1 min，采用中位数法结合多点校正，进行色谱峰匹配，生成当归对照图谱和当归炭对照图谱。15 批当归指纹图谱共标定 19 个共有峰，15 批当归炭指纹图谱共标定 10 个共有峰，经混合对照品比对，指认其中 7 个色谱峰，依次为 5-羟甲基糠醛（峰 1）、色氨酸（峰 3）、绿原酸（峰 5）、阿魏酸（峰 7）、洋川芎内酯 I（峰 8）、洋川芎内酯 H（峰 9）、藁本内酯（峰 14）。15 批当归和 15 批当归炭指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱见图 1，混合对照品图谱见图 2。

2.6.2 相似度分析 将“2.6.1”项下采集的当归、当归炭 UPLC 指纹图谱分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行全谱峰匹配，生成对照指纹图谱（DG-R、DGT-R），并计算各样品（DG01~DG15、DGT01~DGT15）与对照指纹图谱（DG-R、DGT-R）的相似度，结果见表 1。15 批当归样品与当归对照图谱相似度在 0.959~0.999，与当归炭对照图谱相似度在 0.206~0.213；15 批当归炭样品与当归炭对照图谱相似度在 0.836~0.999，与当归对照图谱相似度在 0.080~0.679。结果表明，炮制前后的当归和当归炭相似度区间无交集，指纹图谱差异明显，建立的当归和当归炭 UPLC 指纹图谱可分别用于当归和当归炭的整体控制。

2.6.3 主成分分析（principal component analysis, PCA） 比较当归炒炭炮制前后指纹图谱各色谱峰峰面积的变化情况，发现相较于当归，当归炭样品中峰 3~21 峰面积均明显下降，且新生成峰 1、2、22、23。

将 30 批当归和当归炭指纹图谱各色谱峰的峰面积（未检测到的峰面积以 0 计）作为变量，导入 SIMCA 软件，采用非监督模式识别方法 PCA 观察样品的自然聚集，得分图矩阵见图 3。结果显示 30 批样品在主成分空间的分布上可明显分为 2 大类，

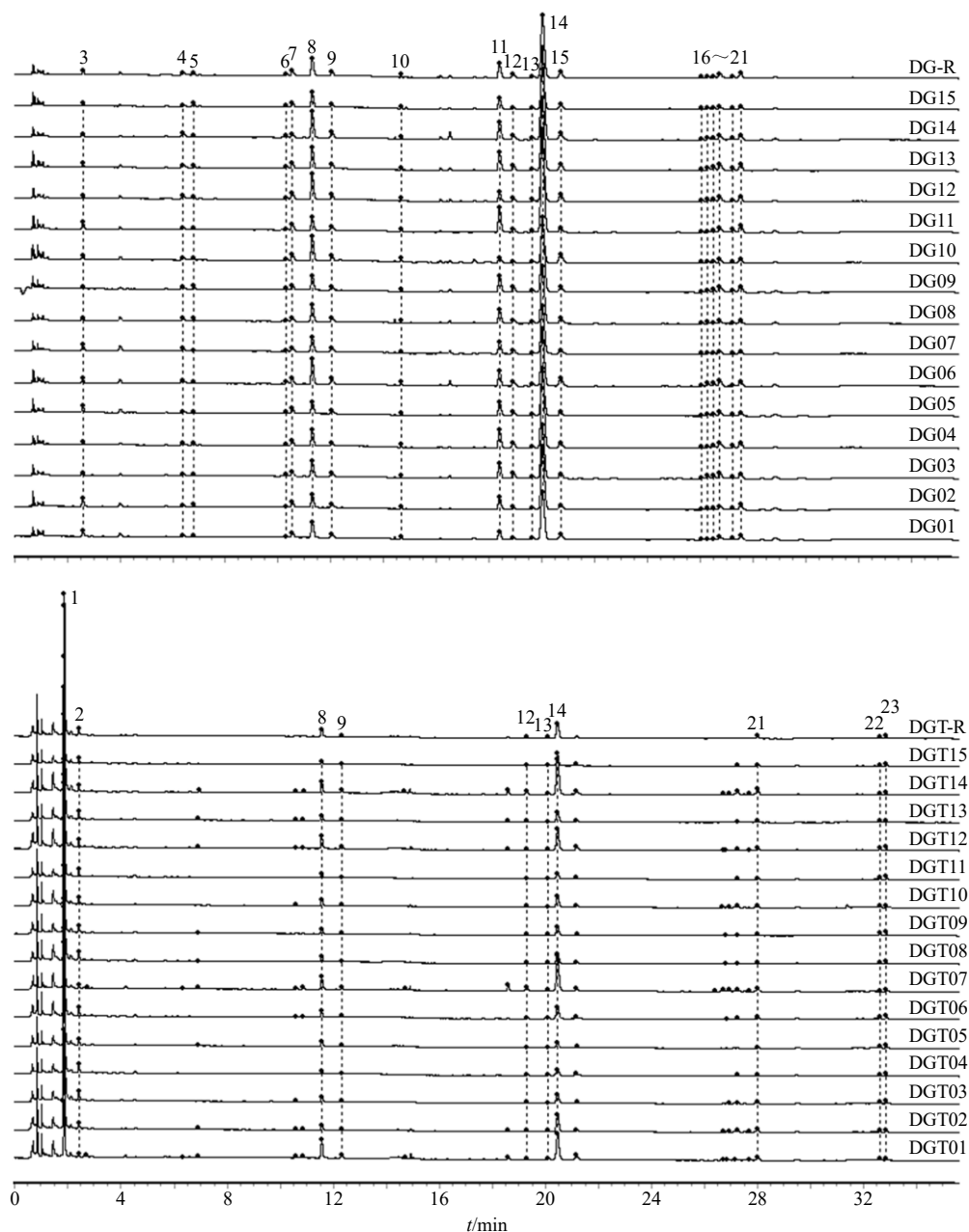


图1 15批当归 (DG01~DG15) 和当归炭 (DGT01~DGT15) 的指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (DG-R、DGT-R)
 Fig. 1 Fingerprint overlay of 15 batches of ASR (DG01—DG15) and ASRC (DGT01—DGT15) and its reference fingerprints (DG-R, DGT-R)

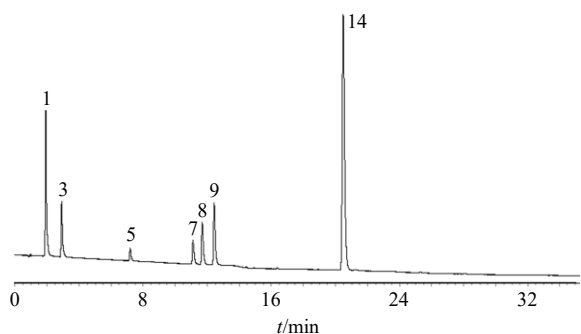
其中 15 批当归样品分为一类，15 批当归炭样品分为另一类，表明当归和当归炭指纹图谱各成分差异较大，通过指纹图谱各色谱峰峰面积可对两者进行初步分类。

2.6.4 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares method-discriminant analysis, PLS-DA) 基于“2.6.3”项下 PCA 结果，将 30 批当归、当归炭的峰面积数据导入 SIMCA 软件进行 PLS-DA，对 30 批样品按已知的类别进行主观分类，结果见图 4。

PLS-DA 模型中的拟合参数 $R^2=0.96$ ，模型预

测参数 $Q^2=0.934$ ，均大于 0.5，表明所建模型预测能力较强。

PLS-DA 模型中 23 个色谱峰 VIP 值见图 5，其中 VIP 值越大，表明该变量对于分类贡献越大，即为区分生当归和当归炭的差异性标志物。以 VIP 值大于 1 作为指标对生当归和当归炭的差异性标志物进行筛选，提取了 10 个重要的特征峰，重要程度依次为峰 23>峰 22>峰 10>峰 16>峰 7>峰 3>峰 2>峰 1>峰 4>峰 11，其中 1、3、7 号峰分别为 5-羟甲基糠醛、色氨酸、阿魏酸。



1-5-羟甲基糠醛 3-色氨酸 5-绿原酸 7-阿魏酸 8-洋川芎内酯 I 9-洋川芎内酯 H 14-藜本内酯
1-5-hydroxymethylfurfural 3-tryptophan 5-chlorogenic acid 7-ferulic acid 8-senkyunolide I 9-senkyunolide H 14-ligustilide

图2 混合对照品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of mixed reference

表1 当归与当归炭样品相似度评价结果

Table 1 Similarity results of ASR and ASRC

当归	相似度		当归炭	相似度	
	DG-R	DGT-R		DGT-R	DG-R
DG01	0.998	0.212	DGT01	0.836	0.679
DG02	0.997	0.209	DGT02	0.994	0.301
DG03	0.998	0.210	DGT03	0.991	0.080
DG04	0.998	0.209	DGT04	0.991	0.080
DG05	0.997	0.208	DGT05	0.992	0.086
DG06	0.992	0.211	DGT06	0.997	0.136
DG07	0.999	0.210	DGT07	0.890	0.620
DG08	0.999	0.210	DGT08	0.992	0.086
DG09	0.997	0.209	DGT09	0.997	0.131
DG10	0.959	0.210	DGT10	0.999	0.175
DG11	0.992	0.206	DGT11	0.994	0.107
DG12	0.994	0.213	DGT12	0.996	0.291
DG13	0.999	0.211	DGT13	0.995	0.114
DG14	0.999	0.211	DGT14	0.987	0.355
DG15	0.997	0.211	DGT15	0.999	0.165

2.7 当归炭炮制前后差异成分筛选及网络药理学分析

通过化学模式识别技术的量化分析,由 PLS-DA 初步分析筛选出指纹图谱中峰 23、22、10、16、7、3、2、1、4、11 为当归和当归炭的主要差异特征峰,根据 Q-Marker 的“五原则”要求^[8-9],基于质量传递与溯源、成分特有性、成分可测性的特点,筛选出的 10 个主要差异特征峰中,峰 1 (5-羟甲基糠醛)、3 (色氨酸)、7 (阿魏酸) 为已指认的成分,其中阿魏酸为药典中当归的质量控制成分,5-羟甲基糠醛是当归炭炮制后产生的主要特征性成分,这

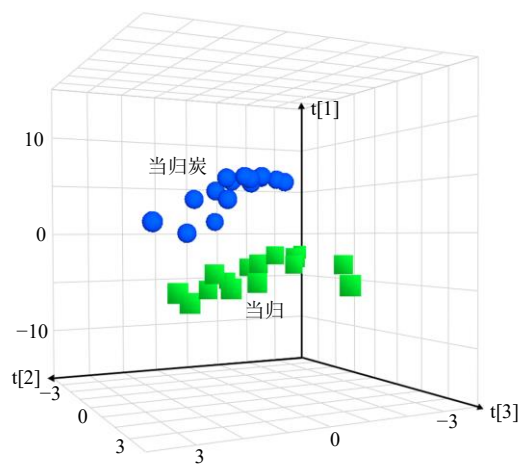


图3 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plot

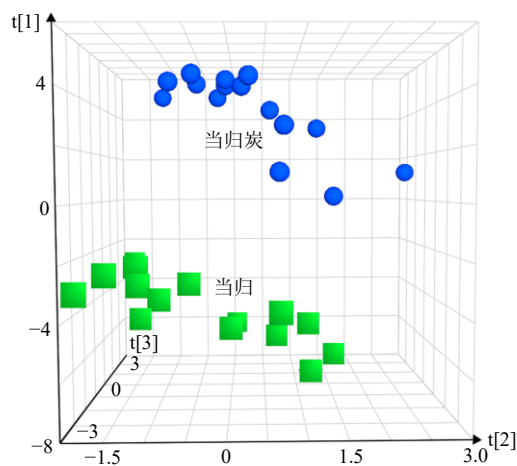


图4 PLS-DA 得分图

Fig. 4 PLS-DA score plot

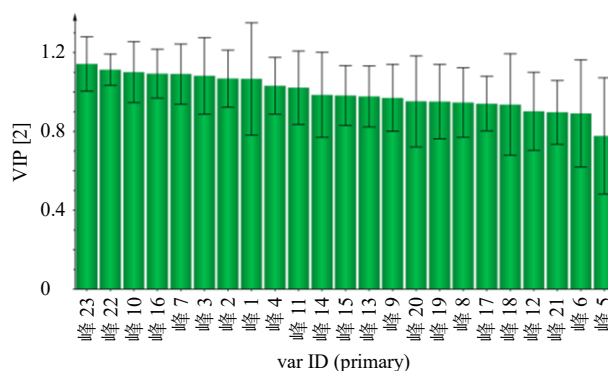


图5 当归和当归炭 PLS-DA 模型中 23 个色谱峰的 VIP 值
Fig. 5 VIP values of 23 peaks in PLS-DA model of ASR and ASRC

3 个成分可作为当归炭炮制前后的质量控制特征指标。当归中化学成分众多,结合二者的指纹图谱分析,峰 5 (绿原酸)、8 (洋川芎内酯 I)、9 (洋川芎内酯 H)、14 (藜本内酯) 在各批次当归中峰面积较大且稳定,是当归的主要活性成分,且在当归炭炮

制后峰面积显著下降。为扩充差异 Q-Marker 的选择, 筛选 5-羟甲基糠醛、色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯共 7 个差异成分进行网络药理学分析。

2.7.1 候选差异化合物靶点预测 检索中药系统药理数据库 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmssp.php>)、swisstargetprediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 中 5-羟甲基糠醛、色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯 7 个化合物的作用靶点, swisstargetprediction 数据库选择 probability>0.1 进行筛选; 并通过 uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将预测出的靶点蛋白名转换为对应的基因名。其中洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 2 个成分均未检索到靶点蛋白, 考虑到洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 与藁本内酯均属于苯酞类成分, 可互相转化, 藁本内酯的预测结果一定程度上也可以反映洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 的相关作用靶点, 故将其余相关靶点蛋白整理合并, 最终得到与 5 个化合物相关的 63 个靶点蛋白。

2.7.2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction,

PPI) 网络构建 将筛选得到的 63 个靶点导入 STRING (<http://string-db.org>) 数据库构建 PPI 网络, 选择物种为“Homo sapiens”, 蛋白交互评分值“high confidence>0.4”, 隐藏无联系的节点, 得到 59 个靶蛋白的 PPI 网络。以 TSV 格式导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化及拓扑分析, 结果见图 6。筛选出度 (degree) 参数 ≥ 2 倍中位数, 介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 均大于中位数的共 9 个靶点作为核心靶点, 分别为溶质运载家族 6 成员 4 (solute carrier family 6 member 4, SLC6A4)、SLC6A3、单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A, MAOA)、5-羟色胺受体 2C (5-hydroxytryptamine receptor 2C, HTR2C)、MAOB、SLC6A2、前列腺素-内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 $\alpha 2$ (γ -aminobutyric acid type A receptor subunit $\alpha 2$, GABRA2)、谷氨酸离子型受体 AMPA 型亚基 2 (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2, GRIA2) (度值分别是 18、15、15、15、14、14、12、12、12)。

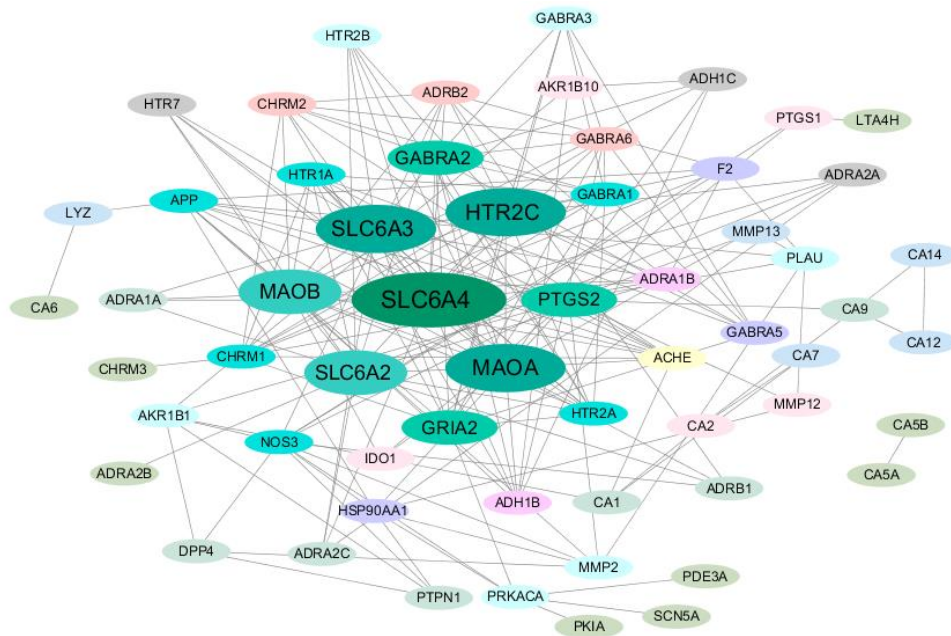


图 6 靶点 PPI 网络图

Fig. 6 Target PPI network

2.7.3 基因本体论 (gene ontology, GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集 利用 David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对筛选的 9 个核心靶点进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。GO

功能分析和 KEGG 通路分析均选取“ $P < 0.05$ ”具有统计学意义。

GO 功能富集共得到 42 个条目, 其中生物过程 (biological process, BP) 占 17 条, 细胞组成 (cell composition, CC) 占 13 条, 分子功能 (molecular

function, MF) 占 12 条, 结果见图 7。BP 主要包括对外源物质刺激反应的调节、神经递质的运输、代谢、生物合成等; CC 主要包括神经细胞(轴突、树

突等)组成、质膜的组成部分等; MF 主要包括调节单胺跨膜转运体活性、调节神经递质跨膜转运体活性、与血清素结合等。

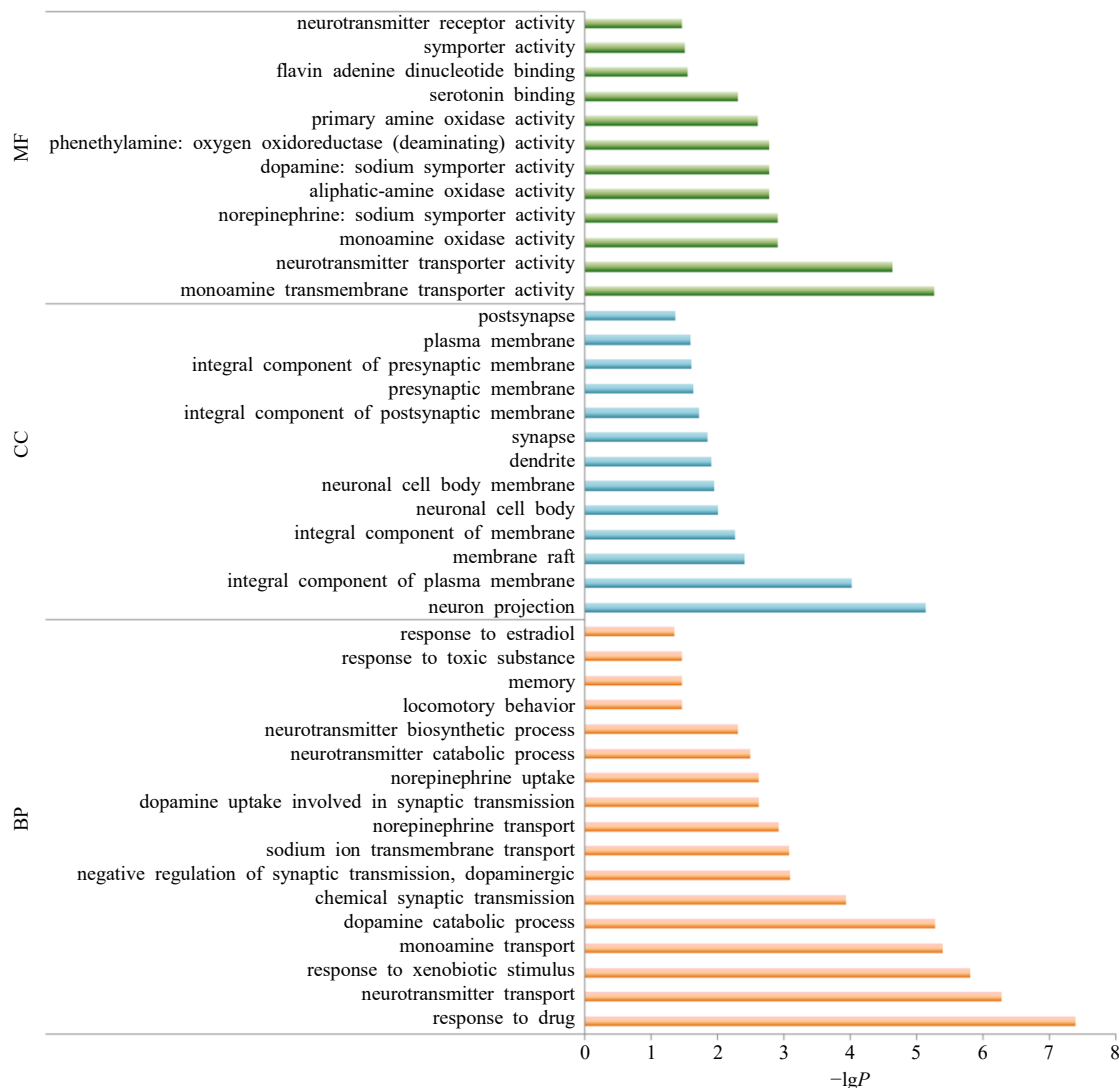


图 7 核心靶点 GO 功能富集分析

Fig. 7 Analysis of GO function enrichment of core targets

KEGG 富集共得到 16 条通路, 结果见图 8。富集的通路主要涉及血清素突触 (serotonergic synapse) 通路、多巴胺能突触 (dopaminergic synapse) 通路、突触小泡周期通路 (synaptic vesicle cycle) 等。表明这 9 个核心靶点可能主要通过调节这些通路起到干预治疗疾病的作用。

2.7.4 差异成分-靶点-通路网络构建及分析 根据筛选得到的 5 个差异成分、9 个核心靶点和 16 条通路, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建当归炭炮制前后主要差异成分的“差异成分-靶点-通路”可视化网络图, 结果见图 9。当归炭炮制前后差异成分通过调控不同的蛋白靶点, 作用于多条通路发挥作用。

当归的主要作用为补血调经、活血止痛, 临床对血虚血瘀引起的月经不调、虚寒腹痛等症状具有显著治疗效果。而炮制成当归炭后, 呈现止血作用。结合网络药理学分析, 血清素能突触和多巴胺能突触通路均能影响疼痛的产生, 在 5 个差异成分中, 与藁本内酯、阿魏酸连接度最高, 提示两者可能是当归的主要活性成分并存在较高的协同作用, 可同时作用于 SLC6A3、MAOA、MAOB、SLC6A2、PTGS2 这 5 个关键靶点, 其中 SLC6A3、SLC6A2 为多巴胺转运蛋白, MAOA 与 MAOB 与单胺类神经递质的代谢有关, 其作用机制可能与通过调节单胺类神经递质、5-羟色胺、多巴胺等神经递质的神经元反

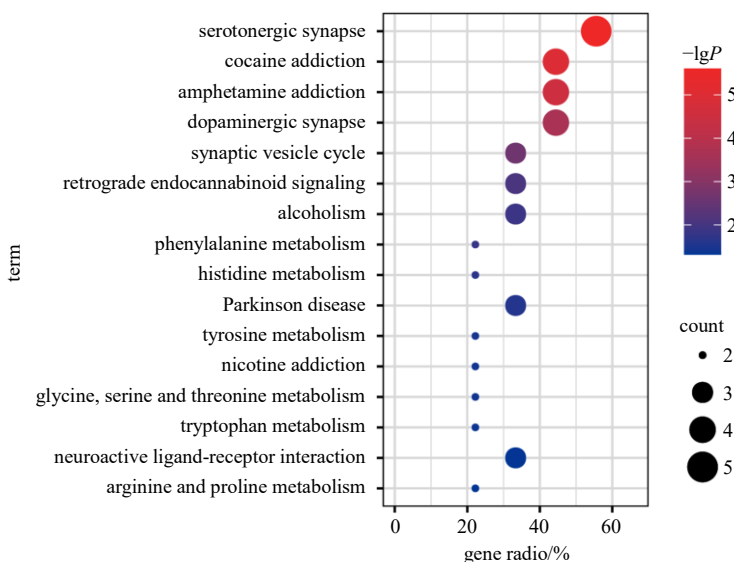


图8 KEGG 通路富集分析结果

Fig. 8 Results of KEGG pathway enrichment analysis

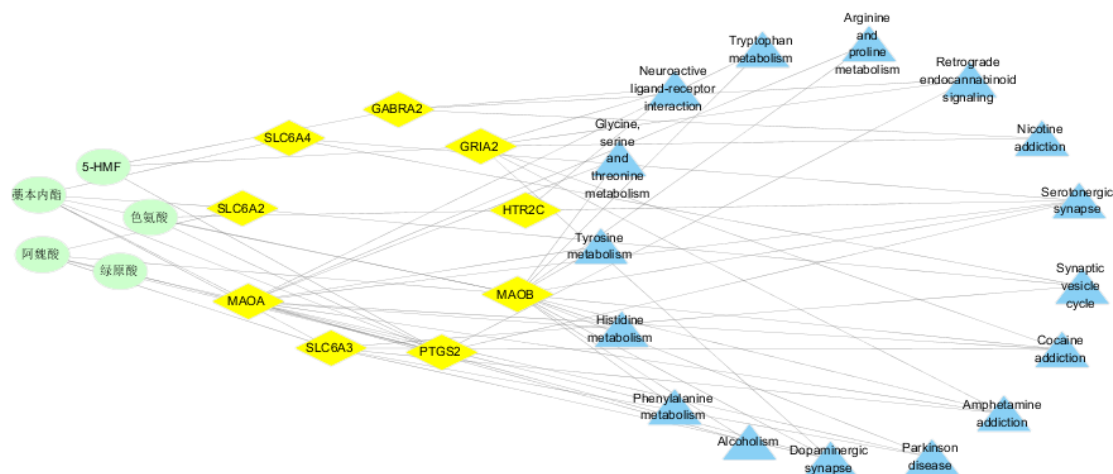


图9 “差异成分-靶点-通路”网络图

Fig. 9 Network diagram of “differential component-target-pathway”

应发挥神经保护作用，并影响疼痛的产生相关。

PTGS 又称环氧化酶 (cyclooxygenase, COX), 是生物体内前列腺素 (prostaglandin, PG) 合成起始步骤的关键酶, 可调控机体内前列腺素的水平, 能够通过不同途径参与炎症反应^[10-11]。相关研究表明, COX-2 表达过高会催化合成前列腺素, 刺激子宫肌层持续收缩, 导致子宫血流减少, 引起痛经^[12]。提示 PTGS2 可能是当归活血化瘀、调经止痛的关键靶点。当归炭化后生成的主要成分为 5-羟甲基糠醛, 文献研究证实, 5-羟甲基糠醛具有抗氧化、抗组织缺血、神经保护等多种药理活性^[13]。其潜在靶点结果显示, 5-羟甲基糠醛能够作用于 GABRA2、GRIA2 和 PTGS2 关键靶点, 影响逆行内源性大麻素信号传

导、神经活性配体-受体相互作用、多巴胺能突触等多条通路发挥作用。

现代药理学研究表明, 绿原酸、阿魏酸能够抑制血小板激活, 达到抗血小板聚集的作用^[14-15]。杨英来等对当归补血、活血作用的谱效关系研究结果也表明阿魏酸与补血、活血活性关联度最大^[16]。以洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯为代表的苯酞类成分在当归中含量较高, 也是当归挥发油重要组成部分, 这些成分对血管具有一定的舒张作用, 能够改善血液流态和红细胞聚集状态, 加快血流流速^[17]。有研究报道, 当归油可通过升高子宫组织中 NO 含量和降低 Ca²⁺水平显著减少痛经模型小鼠的扭体次数, 可能是当归调经止痛的重要物质基础^[18]。

综上, 当归炭炮制前后药理作用的改变通过多成分、多靶点、多途径发挥作用, 推测当归炭活血作用的减弱可能与炮制后阿魏酸、藁本内酯等成分峰面积大幅下降有关, 网络药理学的预测结果与已有文献报道较为一致, 说明该研究方法具有一定的准确性和可取性。这些有效成分可通过作用于多靶点, 干预多条通路发挥药效作用, 进一步说明指纹图谱所选的指标成分具有合理性。基于 Q-Marker 的五原则, 为实现良好的质量传递和溯源, 初步预测色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯、5-羟甲基糠醛 7 个成分为当归炭炮制前后潜在的差异 Q-Marker, 并对其进行含量测定研究。

2.8 当归炭炮制前后差异 Q-Marker 含量测定

2.8.1 线性关系考察 分别取“2.3”项下配制的混合对照品母液 5.00、2.00、1.00、0.40、0.25、0.10 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯、5-羟甲基糠醛的质量浓度分别为 24.23、8.72、16.25、10.02、8.37、186.04、42.84 $\mu\text{g/mL}$, 9.69、3.49、6.50、4.01、3.35、74.41、17.13 $\mu\text{g/mL}$, 4.85、1.74、3.25、2.00、1.67、37.21、8.57 $\mu\text{g/mL}$, 1.94、0.70、1.30、0.80、0.67、14.88、3.43 $\mu\text{g/mL}$, 1.21、0.44、0.81、0.50、0.42、9.30、2.14 $\mu\text{g/mL}$, 0.48、0.17、0.33、0.20、0.17、3.72、0.86 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液。

取对照品母液及上述不同质量浓度的混合对照品溶液, 按照“2.4”项下色谱条件进样测定, 以对照品质量浓度作为横坐标 (X), 峰面积作为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果分别为色氨酸 $Y=4\ 798.4X+294.19$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 0.48~48.45 $\mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=3\ 426.6X+415.52$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围 0.17~17.43 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=5\ 930.6X+920.4$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围 0.33~32.50 $\mu\text{g/mL}$; 洋川芎内酯 I $Y=13\ 694.0X+858.03$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 0.20~20.04 $\mu\text{g/mL}$; 洋川芎内酯 H $Y=16\ 416.0X+652.97$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 0.17~16.73 $\mu\text{g/mL}$; 藁本内酯 $Y=937.08X-1\ 390.4$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围 3.72~372.07 $\mu\text{g/mL}$; 5-羟甲基糠醛 $Y=14\ 756.0X+5\ 636.0$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 0.86~85.67 $\mu\text{g/mL}$ 。结果显示, 各成分在质量浓度范围内线性关系良好。

2.8.2 精密度试验 取当归样品 (DG12) 的供试品

溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 计算色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 2.26%、1.33%、1.45%、0.87%、1.03%、1.33%。另取当归炭样品 (DGT12) 的供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 计算 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 为 0.46%, 表明仪器精密度良好。

2.8.3 重复性试验 取当归样品 (DG12) 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 计算色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯质量分数的 RSD 分别为 1.82%、2.81%、1.21%、1.05%、1.32%、2.42%。另取当归炭样品 (DGT12) 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样测定, 计算 5-羟甲基糠醛质量分数的 RSD 为 2.81%, 表明方法重复性良好。

2.8.4 稳定性试验 取当归样品 (DG12) 供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 分别于 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 进样测定, 计算色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯峰面积的 RSD 分别为 2.50%、2.73%、1.50%、1.51%、1.24%、1.32%。另取当归炭样品 (DGT12) 供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 分别于 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 进样测定, 计算 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 为 2.63%, 表明样品稳定性良好。

2.8.5 加样回收率试验 精密称定已测定的当归样品 (DG12) 6 份, 每份约 0.1 g, 按 1:1 加入适量对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。按“2.4”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯的平均加样回收率分别为 99.71%、100.09%、102.08%、103.49%、101.76%、102.04%, RSD 分别为 2.63%、2.21%、2.78%、0.99%、0.92%、0.68%。另取当归炭样品 (DGT12) 6 份, 每份约 0.1 g, 按 1:1 加入适量对照品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。按“2.4”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果 5-羟甲基糠醛平均加样回收率为 103.15%, RSD 为 2.16%, 满足测定要求。

2.8.6 样品含量测定 取当归和当归炭各 15 批, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样测定, 计算各成分含量, 结果见表 2。结果表明, 各批次当归中阿魏酸质量分数均大于

表 2 30 批当归和当归炭样品中各成分的质量分数 (n = 2)

Table 2 Mass fractions of target compounds in 30 batches of ASR and ASRC (n = 2)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	色氨酸	绿原酸	阿魏酸	洋川芎内酯 I	洋川芎内酯 H	藁本内酯	5-羟甲基糠醛
DG01	0.380 7	0.171 2	0.529 0	0.755 7	0.117 5	34.993 2	—
DG02	0.528 3	0.275 2	0.705 1	0.621 6	0.114 7	34.303 9	—
DG03	0.148 1	0.143 1	0.662 8	0.714 2	0.127 3	38.663 6	—
DG04	0.148 5	0.252 8	0.745 0	0.759 6	0.125 3	53.650 2	—
DG05	0.412 4	0.193 6	0.736 4	0.549 5	0.099 1	31.626 3	—
DG06	0.243 1	0.189 0	0.691 7	1.273 9	0.227 6	35.009 1	—
DG07	0.330 2	0.103 8	0.596 1	0.696 6	0.142 3	35.886 8	—
DG08	0.114 2	0.318 2	0.502 2	0.918 0	0.161 1	39.448 3	—
DG09	0.120 0	0.382 8	0.661 4	0.663 3	0.120 8	50.658 9	—
DG10	0.220 3	0.181 4	0.577 1	1.133 7	0.236 1	28.356 2	—
DG11	0.431 5	0.178 9	0.915 6	0.624 6	0.130 0	59.421 6	—
DG12	0.143 9	0.214 9	0.638 2	1.023 0	0.173 4	35.792 6	—
DG13	0.195 2	0.182 2	0.735 5	0.978 2	0.176 4	43.377 1	—
DG14	0.148 7	0.218 0	0.597 3	1.227 0	0.258 8	62.164 7	—
DG15	0.183 6	0.344 0	0.566 6	0.713 6	0.127 2	33.469 8	—
DGT01	0.000 0	0.081 1	0.000 0	0.554 2	0.083 6	13.852 8	0.720 6
DGT02	0.010 4	0.065 9	0.000 0	0.148 4	0.019 0	8.083 6	1.717 3
DGT03	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.138 9	0.024 0	5.671 3	3.989 0
DGT04	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.083 3	0.014 0	4.650 1	2.804 1
DGT05	0.000 0	0.081 1	0.000 0	0.554 2	0.083 6	13.852 8	0.720 6
DGT06	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.179 2	0.030 1	5.573 4	2.893 1
DGT07	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.083 3	0.014 0	4.650 1	1.185 7
DGT08	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.159 8	0.027 9	4.552 3	3.811 6
DGT09	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.120 1	0.019 1	4.966 6	2.138 3
DGT10	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.180 3	0.030 1	5.713 5	2.294 8
DGT11	0.000 0	0.033 7	0.000 0	0.117 0	0.018 1	3.990 8	1.910 1
DGT12	0.026 9	0.060 1	0.080 0	0.362 1	0.058 4	9.815 4	2.205 2
DGT13	0.000 0	0.000 0	0.019 6	0.145 5	0.025 6	5.643 4	3.271 9
DGT14	0.000 0	0.071 1	0.000 0	0.368 7	0.061 3	20.166 1	3.460 5
DGT15	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.078 3	0.014 2	4.200 2	1.336 1

“—”表示未检出

“—” means not detected

0.05%，符合《中国药典》2020 年版标准，所选批次当归质量较均匀。色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯 6 个成分在大部分批次当归中质量分数均大于 0.01%，各批次当归炒炭后的色氨酸、绿原酸、阿魏酸、藁本内酯的下降比例均超过 50%，除 DG01 和 DG05 批次炒炭后洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 含量差异不大，

其余批次炒炭后洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 含量均明显下降，各批次当归炒炭后产生了新成分 5-羟甲基糠醛，质量分数在 0.720 6~3.989 0 mg/g。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备及色谱条件考察

本研究比较了不同提取溶剂、提取时间、提取方式和溶剂体积对当归各色谱峰的影响。使用甲醇

作为提取溶剂时,各色谱峰分离度较好,峰面积较大,故选择甲醇作为提取溶剂。比较了回流和超声提取法对当归的提取情况,结果显示,超声提取时峰5即阿魏酸峰面积略低于回流提取。但有文献研究表明,当归中的阿魏酸松柏酯受热时易分解为游离的阿魏酸和松柏醇^[19]。因此,考虑温度对成分含量的影响,选择超声提取法。同时对流动相梯度变化、体积流量、柱温、检测波长等参数进行优化,最终确定的色谱条件能较全面分离当归和当归炭的化学成分,同时达到相关成分含量测定要求。

3.2 炭药炮制机制及当归炭炮制前后的成分变化

当归为“妇科圣药”,是活血补血的要药,在医家用药中素有“十方九归”之称,可见其用药之广。由于成分复杂,功效多变,临床中常通过炮制改变其药性,以发挥不同的药效。中药炭药的主要炮制机制分为2大类:一是基于药性的炮制前后变化,二是基于活性物质的炮制前后变化。炮制对四气五味、升降浮沉、有毒无毒等药性均有一定影响,炭药在性味上多表现为“涩”,涩附于酸,具有收敛固涩的作用,而制炭后原药材的性状、性味、功能与主治均有一定程度的改变,而这必然与炮制前后药材内在的物质基础变化密不可分^[20]。传统炮制理论认为当归甘温,取其润性,补血又润肠;当归炭则缓其辛烈之性而专于止血^[21]。当归和当归炭相比较,当归的挥发油气味明显,而炒炭后味涩、气焦香,在性味上均发生了改变。当归和当归炭指纹图谱中各色谱峰及指标成分含量也具有显著的差异,当归炒炭后各色谱峰均有不同程度的降低,色氨酸、绿原酸、阿魏酸、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯等活性成分含量经炮制后均下降,新生成了5-羟甲基糠醛。其中绿原酸、阿魏酸等有机酸类成分性质不稳定,易受高温的影响造成自身分解^[22-23]。以洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、藁本内酯为代表的苯酞类成分则是当归挥发油中的重要组成部分,经高温炮制后,当归的组织结构被破坏,挥发油逸散导致含量降低^[24]。结合网络药理学预测结果,以阿魏酸和藁本内酯为代表的有机酸类和苯酞类成分当是当归活血止痛的重要物质基础,炒炭后药理作用的改变与其炮制后的活性成分损失有关,符合炮制理论中炒炭以缓和药性的特点。

此外,当归炒炭后色氨酸含量下降与产生的5-羟甲基糠醛可能与当归中的氨基酸类成分及当归多糖经高温加热后发生美拉德反应有关^[25]。已有研究

证明5-羟甲基糠醛具有多种药理活性,但在一定剂量下产生的明显毒性也不容忽视。江海燕等^[26]采用质谱成像技术从组学水平可视化5-羟甲基糠醛给药后肾脏组织代谢的时空变化,发现5-羟甲基糠醛早期毒性主要通过氧化应激、能量代谢紊乱、嘌呤代谢障碍和氨基酸代谢失衡导致肾毒性。考虑到5-羟甲基糠醛的潜在毒性,《中国药典》2020年版中的部分品种标准也对其进行了控制,限度大多规定不高于葡萄糖含量的0.02%^[27]。结合当归炭含量测定结果,发现当归炒炭后5-羟甲基糠醛含量大幅度上升,因此,为避免潜在毒性,同时便于药物安全监控,对其中的5-羟甲基糠醛含量检测十分必要。

3.3 基于指纹图谱的当归炭炮制前后差异 Q-Marker

本研究通过建立UPLC指纹图谱可较为直观地反映当归炭炮制前后的整体化学信息,但对于当归中的挥发油和多糖类成分测定考虑不够全面,其单一成分类Q-Marker的筛选还需要结合气相及紫外测定等实验进行进一步的研究。对通过指纹图谱筛选出的7个主要差异成分进行了网络药理学分析,其中洋川芎内酯 I 和洋川芎内酯 H 未找到相关靶点,结合文献研究及当归炭炮制前后指纹图谱中峰面积情况,这2个成分在当归中含量较高,且炮制前后含量差异较大,属于苯酞类成分,是当归挥发油的重要组成部分,具有潜在的药理活性^[28]。因此,结合中药Q-Marker“五原则”中质量传递与溯源及可测性要求,亦将其筛选为差异Q-Marker,同时对筛选的7个差异Q-Marker进行定量分析,当归炒炭前后各成分含量差异显著,提示当归和当归炭功效差异的物质基础。当归中的化学成分复杂,其药效的发挥也是多种成分协同作用的结果,炒炭前后功效的差异通过多成分、多靶点、多通路发挥作用,通过建立的UPLC指纹图谱及多指标成分含量测定,为揭示当归炭炮制前后化学成分变化提供了实验依据,也为当归和当归炭的Q-Marker研究和质量评价提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 向璐,张巧艳,赵琦明,等. 黄芪-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2196-2213.
- [2] 王祝举,唐力英,宋秉生,等. 当归炮制历史沿革研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 135-138.

- [3] 王康宇, 陶雪慧, 刘小康, 等. 当归道地产区及历代炮制方法考证 [J]. 吉林中医药, 2021, 41(10): 1371-1374.
- [4] 杜冠华, 王月华, 张冉, 等. 多成分多靶点是对中药作用机制的表面认识 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 480-484.
- [5] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [6] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [10] 王训翠, 储明星, 陈宏权. 前列腺素内过氧化物合酶 2 基因的研究进展 [J]. 生命科学, 2004, 16(1): 31-34.
- [11] Hsu P S, Lin C M, Chang J F, *et al.* Participation of NADPH oxidase-related reactive oxygen species in leptin-promoted pulmonary inflammation: Regulation of cPLA2 α and COX-2 expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1078.
- [12] 赵敏珍, 应延风. 环氧化酶和痛经相关性研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(23): 3712-3713.
- [13] 李恩灿, 贺玖明, 靳洪涛, 等. 5-羟甲基糠醛的药理和毒理研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4): 210-215.
- [14] 樊宏伟, 肖大伟, 余黎, 等. 金银花及其有机酸类化合物的体外抗血小板聚集作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(2): 145-147.
- [15] 伍珊珊, 刘振杰, 章从恩, 等. 基于谱效关系的灯盏细辛体外抗血小板聚集活性成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5179-5185.
- [16] 杨英来, 崔方, 胡芳, 等. 当归补血、活血作用的谱效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3923-3927.
- [17] 李曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [18] 王小荣, 邱明丰, 谢国祥, 等. 当归油对痛经小鼠子宫组织中一氧化氮和钙离子的影响 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 723-724.
- [19] 李韶菁, 张迎春, 苏培瑜, 等. 阿魏酸松柏酯的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 229-231.
- [20] 赵玉升, 屈会化, 赵琰. 炭药纳米类成分的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 921-929.
- [21] 钟立甲. 基于代谢组学的生当归、当归炭、酒当归活血化瘀作用机制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [22] 郭满满, 肖卓炳, 于华忠, 等. 热重法研究绿原酸的热稳定性、分解动力学及贮存期 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 348-352.
- [23] 徐自升, 蔡宝昌, 张弦. 中药川芎中阿魏酸稳定性的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(2): 25-27.
- [24] 张来宾, 吕洁丽, 陈红丽, 等. 当归中苯酞类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 167-176.
- [25] 钱晓东, 周桂芬, 吕圭源. 不同产地当归炮制前后多糖与新产生成分 5-羟甲基糠醛和 5-羟基麦芽酚含量变化规律性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1320-1323.
- [26] 江海燕, 高杉杉, 李婕, 等. 基于质谱成像技术探究 5-羟甲基糠醛肾毒性作用机制 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(2): 142-147.
- [27] 祝清芬, 魏霞, 王维剑, 等. 基于杂质遗传毒性谈药物中 5-羟甲基糠醛的质量控制 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 485-489.
- [28] 徐兰兰, 车仙花, 李宁, 等. 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(2): 98-102.

[责任编辑 郑礼胜]