

经典名方清宁散 HPLC 指纹图谱及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析

刘玉婷¹, 李 菡¹, 赵宇晴¹, 周晶晶¹, 柯昌华¹, 王燕子¹, 赵倩倩¹, 谢晓林², 张德柱², 高 鸿³, 梁承远^{1*}

1. 陕西科技大学生物与医药学院, 陕西 西安 710021
2. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 陕西 西安 710025
3. 陕西帕尼尔生物科技有限公司, 陕西 西安 710082

摘要: 目的 建立清宁散 HPLC 指纹图谱检测方法, 并对其质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 进行预测分析, 为清宁散质量控制提供参考依据。方法 基于指纹图谱和网络药理学方法, 通过响应面优化法确定清宁散基准样品的最佳制备工艺; 采用 HPLC 法建立清宁散指纹图谱, 对共有峰进行归属和指认; 基于可行性和可追溯性进行活性成分筛选, 通过网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络, 分析清宁散潜在的 Q-Marker。结果 确定了清宁散中桑白皮、赤茯苓、甘草的最佳炮制工艺, 清宁散 HPLC 指纹图谱共标定了 39 个共有峰, 通过对照品色谱及质谱, 指认出 18 个共有成分, 分别为 1 号峰异鼠李素、2 号峰甘草苷、3 号峰芥子碱硫氰酸盐、4 号峰 β -胡萝卜素、10 号峰松苓新酸、15 号峰去氢土莫酸、16 号峰甘草酸铵、19 号峰槲皮素、20 号峰绿原酸、21 号峰甘草查耳酮 A、22 号峰桑黄酮 G、24 号峰京尼平苷酸、26 号峰桑皮苷 A、29 号峰桑辛素、31 号峰槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷、34 号峰毛蕊花糖苷、35 号峰芹菜素、38 号峰茯苓新酸 A, 相似度均大于 0.93; 经网络药理学分析, 筛选出桑皮苷 A、桑辛素、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷、茯苓新酸 A、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、甘草酸铵 8 个活性成分, 进行“成分-靶点-通路”网络构建分析, 富集的通路包括 T 细胞受体信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路等, 根据连接度分析, 初步预测 8 个活性成分可能通过调节相关信号通路达到清肺止咳的作用。结论 响应面优化结合指纹图谱和网络药理学分析预测清宁散治疗疾病的 Q-Marker, 所建立的方法操作简捷, 结果准确, 稳定性好, 可用于清宁散的质量控制评价, 也为进一步研究清宁散的作用机制提供参考。

关键词: 经典名方; 清宁散; 响应面优化; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物; 基准样品; 桑白皮; 赤茯苓; 甘草; 异鼠李素; 甘草苷; 芥子碱硫氰酸盐; 甘草酸铵

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)06-1946-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.017

Establishment of HPLC fingerprints and quality markers (Q-Marker) prediction analysis of classic famous prescription Qingning Powder

LIU Yuting¹, LI Han¹, ZHAO Yuqing¹, ZHOU Jingjing¹, KE Changhua¹, WANG Yanzi¹, ZHAO Qianqian¹, XIE Xiaolin², ZHANG Dezhu², GAO Hong³, LIANG Chengyuan¹

1. School of Biological and Pharmaceutical Sciences, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China
2. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Xi'an 710025, China
3. Shaanxi Pioneer Biotech Co., Ltd., Xi'an 710082, China

收稿日期: 2023-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82373843); 国家自然科学基金项目 (81602967); 陕西省中医药管理局中医药传承创新暨“秦药”开发重点科学基金项目 (2021-02-220-020); 陕西省中医药管理局中药“双链融合”中青年科研创新团队立项项目 (2022-SLRH-YQ-009); 陕西省中医药管理局秦创原中药创新研发项目 (2022-QCYZH-013); 陕西省中医药管理局秦创原中药创新研发项目 (2022-QCYZH-032); 陕西省中医药管理局秦创原中药创新研发项目 (2022-QCYZH-033); 陕西省科学技术厅重点产业创新链 (群) 项目 (2023-ZDLNY-17); 陕西省教育厅服务地方专项-产业化培育项目 (23JC011); 西安市科技局西安市科技计划项目 (22GXFW0006)

作者简介: 刘玉婷 (2000—), 女, 硕士研究生, 从事中药工艺与质量标准研究。Tel: 13086291507 E-mail: 21163065492@qq.com

***通信作者:** 梁承远, 男, 教授, 从事中药工艺与质量标准研究、天然产物改造与生物活性研究。

Tel: 18292490697 E-mail: liangchengyuan@sust.edu.cn

Abstract: Objective To establish a fingerprint detection method for Qingning Powder (清宁散) which quality markers (Q-Marker) were predicted and analyzed to provide a reference for the quality control of Qingning Powder. **Methods** Based on fingerprint and network pharmacology methods, the optimal preparation process for Qingning Powder substance benchmark was determined through response surface optimization method; HPLC was used to establish the fingerprint of Qingning Powder to attribute and identify the shared peaks; Conducting a comprehensive screening of active ingredients based on feasibility and traceability, and constructing a network of “compound-target-pathway” through network pharmacology to analyze the potential Q-Marker of Qingning Powder. **Results** The optimal processing technology of Sangbaipi (*Mori Cortex*), Chifuling (*Rubra Poria*) and Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) in Qingning Powder was determined. In the HPLC fingerprint of Qingning Powder, a total of 39 common peaks were calibrated, with 18 common components of peaks 1—4, 10, 15, 16, 19—22, 24, 26, 29, 31, 34, 35, 38 were identified by reference substance chromatography and mass spectrometry, respectively, named isorhamnetin, liquiritin, sinapine thiocyanate, β -daucosterol, dehydrotrametenolic acid, dehydrotumulosic acid, glycyrrhizic acid ammonium salt, quercetin, chlorogenic acid, licorice chalcone A, kuwanon G, genipinic acid, mulberroside A, morusin, quercetin-3-O- β -D-glucose-7-O- β -D-gentiobiosiden, verbascoside, apigenin and poricoic acid A, all of which exhibit similarities exceeding 0.93. Utilizing network pharmacology analysis, eight active ingredients including mulberroside A, morusin, quercetin-3-O- β -D-glucose-7-O- β -D-gentiobiosiden, poricoic acid A, geniposidic acid, verbascoside, liquiritin, and glycyrrhizic acid ammonium salt were screened out to conduct “component-target-pathway” network construction analysis, the enriched pathways include T cell receptor signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway, etc. Based on connectivity analysis, it was tentatively predicted that these eight active ingredients may play a role in clearing the lungs and relieving cough by modulating related signaling pathways. **Conclusion** Utilizing response surface optimization in conjunction with fingerprint and network pharmacology analysis to predict the quality markers of Qingning Powder in the context of disease treatment. This established method, characterized by its simplicity of operation, result accuracy, and robust stability, could be used for quality control evaluation of Qingning Powder, and also offers a valuable reference for the investigation of Qingning Powder’s mechanism of action.

Key words: classic famous prescription; Qingning Powder; response surface optimization; fingerprint; network pharmacology; Q-Marker; reference sample; *Mori Cortex*; *Rubra Poria*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; isorhamnetin; liquiritin; sinapine thiocyanate; glycyrrhizic acid ammonium salt

中医药是中华民族的瑰宝，经典名方是我国历代医家在不断的传承和实践中凝结的智慧结晶^[1]，是中医理论、方剂发展的核心载体，更是其中的精华^[2]。近年来，国家中医药管理局秉承“以健康为导向，围绕优势病种”的原则，于2018年发布《古代经典名方目录（第一批）》^[3]，2023年再度出台《古代经典名方目录（第二批儿科部分）》的通知^[3]，以发挥中医药治疗疾病的优势，推动中医药复方制剂的快速发展。近年来，小儿疾病发病率逐年上升，儿童用药也愈加受到关注，中药因其疗效稳定、药性温和、药物不良反应少等优点，广泛用于儿科疾病治疗。清宁散收录于《古代经典名方目录（第二批儿科部分）》，出自清代陈复正所著的《幼幼集成》，全方由桑白皮、甜葶苈、赤茯苓、车前子、甘草5味药材组成，“治心肺有热而令咳嗽，宜从小便利出^[4]。”为肃肺利水止咳喘之剂。目前，对清宁散的研究多集中在临床应用方面，其加减方常用于治疗小儿痰热壅肺型咳嗽、痤疮等疾病，未其质量标准研究。

中药复方成分复杂，通过多成分、多靶点、多途径协同发挥疗效^[5]，对其单一成分的研究不能代

表整体药效，中药指纹图谱能够全面、定量地反映中药的化学信息^[6]，是中药及其制剂质量控制的有效手段。为保障中药质量标准的科学性，需要确认影响其品质的功效关联物质^[7]，刘昌孝院士^[8]于2016年提出质量标志物（quality markers, Q-Marker）概念，从系统角度分析药物与机体的交互作用，从而体现中医治疗疾病多途径、多靶点的特点^[9-10]。网络药理学具有整体性、系统性的特点与中医药整体观、辨证论治原则一致^[11-12]，本研究对清宁散的物质构成进行初步研究，并利用网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络，综合预测分析清宁散发挥临床疗效的潜在 Q-Marker，揭示其治疗疾病的科学内涵，为清宁散及其制剂的质量控制及作用机制研究打下基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-16 型高效液相色谱仪，岛津仪器有限公司；Ulti-Mate 3000 型超高效液相色谱-Orbitrap 质谱仪，戴安中国有限公司；LE204E/02 型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；YM-100S 型超声波清洗

机, 深圳市方奥微电子有限公司; FSJ-A05N6 型多功能粉碎机, 小熊电器股份有限公司; WFH-203B 型紫外线分析仪, 上海精科实业有限公司; JHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱, 西安莫吉娜仪器制造有限公司; 30MF53L 型煎药锅, 潮州市潮安区龙光电器有限公司。

1.2 试药

对照品异鼠李素(批号 110860-202012, 质量分数 99.1%)、甘草苷(批号 111610-202209, 质量分数 95.2%)、芥子碱硫酸盐(批号 111702-202107, 质量分数 98.4%)、甘草酸铵(批号 110731-202122, 质量分数 94.4%)、槲皮素(批号 100081-201610, 质量分数 99.8%)、绿原酸(批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、京尼平苷酸(批号 111828-201805, 质量分数 98.1%)、桑皮苷 A(批号 112086-202101, 质量分数 97.2%)、毛蕊花糖苷(批号 111530-201914, 质量分数 95.2%)、芹菜素(批号 111901-202004, 质量分数 99.4%), 均购自于中国食品药品检定研究院; 对照品 β -胡萝卜素(批号 PS0811-0025, 质量分数 98%)、松苓新酸(批号 PS0533-0020, 质量分数 97%)、去氢土莫酸(批号 PS1095-0020, 质量分数 98%)、甘草查耳酮 A(批号 PS0389-0020, 质量分数 98%)、桑黄酮 G(批号 PS1823-0020, 质量分数 98.5%)、桑辛素(批号 PS1304-0025, 质量分数 98%)、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖-7-O- β -D-龙胆双糖苷(批号 PS0618-0020, 质量分数 98%)、茯苓新酸 A(批号 PS1094-0010, 质量分数 97%), 均购自于成都普思生物科技股份有限公司; 对照品甘草酸(批号 20070203, 质量分数 98.27%) 购自于成都普菲德生物技术有限公司; 乙腈、磷酸, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; 甲醇, 天津市天力化学试剂有限公司; 超纯水, 上海娃哈哈饮用水有限公司; 其他试剂均为分析纯。

方中桑白皮、甜葶苈、赤茯苓、车前子、甘草 5 味药材均购自道地产区或主产区, 每味药材收集于多个产地, 总批次不少于 15 批次, 由青海省药品检验检测院中药检验员王珺检验, 留样标本存放于青海省药品检验检测院, 各药材基原、药用部位、产地及采收加工方法均已明确。其中桑白皮来自河南、四川、湖南 3 个产地共 15 批, 均为桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮; 甜葶苈来自江苏、安徽、山东 3 个产地共 15 批, 为十字花科播娘蒿属植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl.

的干燥成熟种子, 也称南葶苈; 赤茯苓来自安徽、云南、河北 3 个产地共 15 批, 为多孔菌科茯苓属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 呈淡棕色、淡红色的干燥菌核; 车前子来自广东、吉林、河北 3 个产地共 15 批, 为车前科车前属植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥成熟种子; 甘草来自山西、宁夏、新疆 3 个产地共 15 批, 为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

本实验前期已按照《中国药典》2020 年版一部各“药材和饮片”项下各单味药材项下的检测方法对药材进行检测, 各药材质量均符合要求。药材来源与批号见表 1。

表 1 清宁散药材来源信息

Table 1 Source information of Qingning Powder

| 药材 | 产地 | 批号 | 饮片炮制标准 |
|-----|----|---------------------------------|--|
| 桑白皮 | 河南 | 210801~210803、 210901、210902 | 《中国药典》2020 年版 一部“桑白皮” |
| | 四川 | 210705~210709 | |
| | 湖南 | 210503~210507 | |
| 甜葶苈 | 江苏 | 211202~211206 | 《中国药典》2020 年版 一部“葶苈子” |
| | 安徽 | 211112~211116 | |
| | 山东 | 210706~210710 | |
| 赤茯苓 | 安徽 | 210303~210307 | 《中国药典》2020 年版 一部“茯苓” |
| | 云南 | 210407~210411 | |
| | 河北 | 211201~211205 | |
| 车前子 | 广东 | 210713~210717 | 《中国药典》2020 年版 一部“车前子”, 《国 家中药饮片炮制规范》 第一批“车前子” |
| | 吉林 | 220114~220118 | |
| | 河北 | 220308~220312 | |
| 甘草 | 山西 | 210403~210407 | 《中国药典》2020 年版 一部“甘草” |
| | 宁夏 | 210611~210615 | |
| | 新疆 | 210901~210905 | |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%乙腈; 10~20 min, 10%~20%乙腈; 20~30 min, 20%~23%乙腈; 30~40 min, 23%~30%乙腈; 40~60 min, 30%~40%乙腈; 60~80 min, 40%~45%乙腈; 80~100 min, 45%~58%乙腈; 100~120 min, 58~63%乙腈; 检测波长: 0~15 min, 254 nm; 15~43 min, 280 nm; 43~120 min,

254 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 25 μL。

2.2 清宁散基准样品的制备

2.2.1 桑白皮炮制研究 根据《中国药典》2020年版炮制通则, 确定桑白皮的炮制方法为炼蜜加水稀释后拌入桑白皮中, 闷透后炒至规定程度, 以桑皮苷 A 的含量为响应值 (Y), 考察炼蜜量 (X₁)、闷透时间 (X₂)、炮制温度 (X₃) 的影响, 单因素实验表明, 每 100 千克炼蜜量 25 kg、闷透时间 4 h、炮制温度 95 ℃时桑皮苷 A 含量最高, 以上述数据为中

心点, 采用 Box-Behnken 试验设计原理, 设计 3 因素 3 水平的试验方案, 具体结果见表 2。采用 Design Expert 13 软件对试验结果进行响应面分析, 并进行模型拟合, 得到线性回归方程: $Y=1.780+0.0097 X_1-0.0093 X_2-0.0064 X_3-0.0145 X_1X_2+0.0280 X_1X_3+0.0057 X_2X_3-0.4274 X_1^2-0.7974 X_2^2-0.2732 X_3^2$, $R^2=0.9949$, 失拟项 $P=0.1934>0.05$, 表明线性回归模型对数据的拟合良好, 该模型可信度高, 能够可靠预测和分析, 3D 响应面图见图 1。

最佳炮制工艺的确定基于 Design Expert 13 软

表 2 桑白皮炮制试验设计和结果

Table 2 Experimental design and results of *Mori Cortex* processing

| 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /℃ | 桑皮苷 A/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /℃ | 桑皮苷 A/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /℃ | 桑皮苷 A/% |
|----|--------------------|-------------------|-------------------|---------|----|--------------------|-------------------|-------------------|---------|----|--------------------|-------------------|-------------------|---------|
| 1 | 25 (0) | 4 (0) | 95 (0) | 1.742 | 7 | 20 (-1) | 4 | 105 | 0.986 | 13 | 25 | 4 | 95 | 1.811 |
| 2 | 25 | 3 (-1) | 85 (-1) | 0.710 | 8 | 25 | 3 | 105 | 0.717 | 14 | 20 | 4 | 85 | 1.087 |
| 3 | 30 (+1) | 4 | 85 | 1.124 | 9 | 25 | 5 (+1) | 105 | 0.728 | 15 | 30 | 3 | 95 | 0.565 |
| 4 | 30 | 4 | 105 (+1) | 1.136 | 10 | 30 | 5 | 95 | 0.499 | 16 | 20 | 3 | 95 | 0.591 |
| 5 | 25 | 4 | 95 | 1.825 | 11 | 25 | 5 | 85 | 0.698 | 17 | 20 | 5 | 95 | 0.582 |
| 6 | 25 | 4 | 95 | 1.734 | 12 | 25 | 4 | 95 | 1.807 | | | | | |

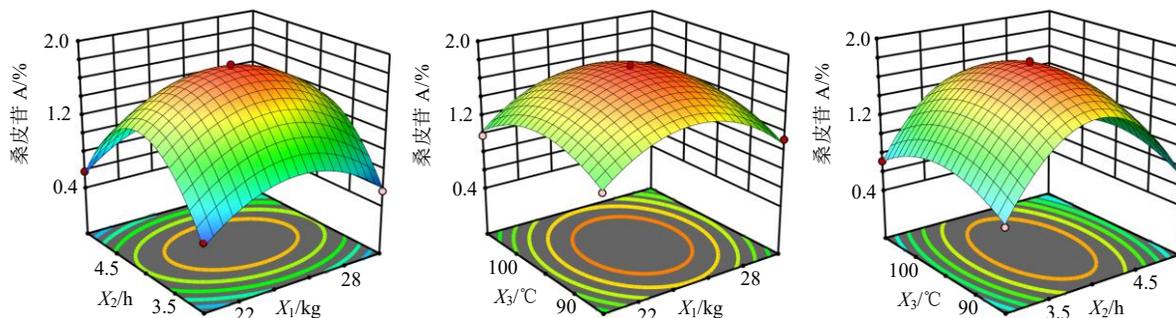


图 1 桑白皮炮制的 3D 响应面图

Fig. 1 3D response surface plots of *Morus Cortex* processing

件对所建模型进行参数最优分析, 得出最优炮制工艺: 每 100 千克炼蜜量 25.054 kg、闷透时间 3.994 h、炮制温度 94.886 ℃, 结合实际情况, 最终确定桑白皮饮片的炮制方法为取桑白皮, 加入 25 kg 的蜂蜜以适量沸水稀释拌匀, 闷制 4 h, 置炒制容器内, 95 ℃炒干, 取出, 放凉。按最佳工艺条件平行制备 3 份蜜桑白皮饮片, 测定桑皮苷 A 含量, 所得综合评分平均值为 96.13, RSD 为 2.58%, 符合预测值波动范围, 表明模型预测性良好, 稳定可靠。

2.2.2 赤茯苓炮制研究 根据《中国药典》2020年版炮制通则, 确定赤茯苓的炮制方法为取赤茯苓, 加黄酒拌匀, 闷透后炒至规定程度, 以茯苓新酸 A 的含量为响应值 (Y), 考察黄酒量 (X₁)、闷透时间 (X₂)、炮制温度 (X₃) 的影响, 单因素实验结果表

明, 每 100 千克黄酒量 16 kg、闷透时间 4 h、炮制温度 105 ℃时茯苓新酸 A 含量最高, 以上述数据为中心点, 采用 Box-Behnken 试验设计原理, 设计 3 因素 3 水平的试验方案, 具体结果见表 3。采用 Design Expert 13 软件对试验结果进行响应面分析和模型拟合, 得到线性回归方程 $Y=0.8195-0.0032 X_1-0.0053 X_2+0.0058 X_3+0.0093 X_1X_2-0.0026 X_1X_3-0.0024 X_2X_3-0.1808 X_1^2-0.2811 X_2^2-0.1873 X_3^2$, $R^2=0.9936$, 失拟项 $P=0.9527>0.05$, 表明线性回归模型对数据的拟合良好, 该模型可信度高, 能够可靠预测和分析, 3D 响应面图见图 2。

最佳炮制工艺的确定基于 Design Expert 13 软件对所建模型进行参数最优分析, 得出最优炮制工艺: 每 100 千克黄酒量 16.469 kg、闷透时间 3.990 h、

表 3 赤茯苓炮制试验设计和结果

Table 3 Experimental design and results of *Rubra Poria* processing

| 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 茯苓新酸 A/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 茯苓新酸 A/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 茯苓新酸 A/% |
|----|--------------------|-------------------|--------------------|-----------|----|--------------------|-------------------|--------------------|-----------|----|--------------------|-------------------|--------------------|-----------|
| 1 | 20 (+1) | 3 (-1) | 105 (0) | 0.351 981 | 7 | 16 | 3 | 115 | 0.369 809 | 13 | 16 | 4 | 105 | 0.845 216 |
| 2 | 16 (0) | 4 (0) | 105 | 0.779 139 | 8 | 13 (-1) | 4 | 95 (-1) | 0.454 713 | 14 | 16 | 5 | 95 | 0.330 582 |
| 3 | 16 | 4 | 105 | 0.824 361 | 9 | 13 | 5 | 105 | 0.345 201 | 15 | 13 | 4 | 115 | 0.462 231 |
| 4 | 16 | 4 | 105 | 0.786 324 | 10 | 20 | 4 | 95 | 0.444 477 | 16 | 13 | 3 | 105 | 0.368 312 |
| 5 | 16 | 5 (+1) | 115 (+1) | 0.346 423 | 11 | 16 | 3 | 95 | 0.344 363 | 17 | 20 | 4 | 115 | 0.443 825 |
| 6 | 20 | 5 | 105 | 0.364 714 | 12 | 16 | 4 | 105 | 0.846 201 | | | | | |

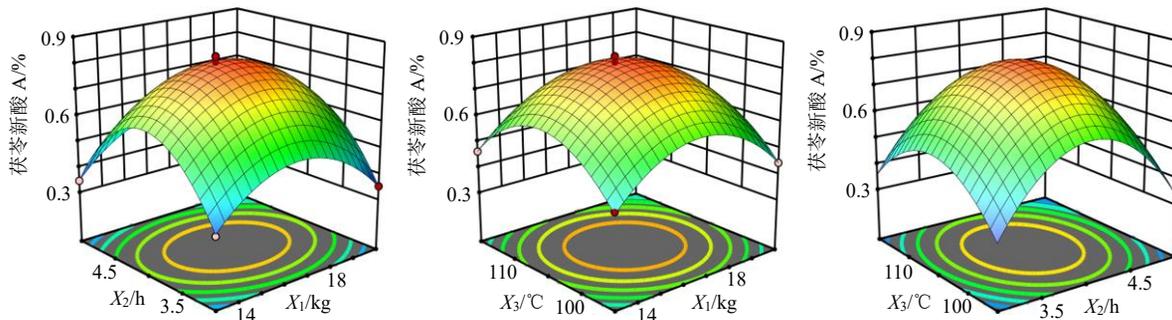


图 2 赤茯苓炮制的 3D 响应面图

Fig. 2 3D response surface plots of *Rubra Poria* processing

炮制温度 105.153 °C，结合实际情况，最终确定赤茯苓饮片的炮制方法为取赤茯苓，加 16.469 kg 黄酒拌匀，闷制 4 h，置炒制容器内，105 °C 炒干，取出，放凉。按最佳工艺条件平行制备 3 份酒炙茯苓饮片，测定茯苓新酸 A 含量，所得综合评分平均值为 95.47，RSD 为 2.08%，符合预测值波动范围，表明模型预测性良好，稳定可靠。

2.2.3 甘草炮制研究 根据《中国药典》2020 年版，确定甘草的炮制方法为炼蜜加水稀释后拌入甘草中，闷透后炒至规定程度，以甘草苷和甘草酸铵含量之和为响应值 (Y)，考察炼蜜量 (X₁)、闷透时间 (X₂)、炮制温度 (X₃) 的影响^[13-14]，单因素实验结果表明，每 100 千克炼蜜量 25 kg、闷透时间 3 h、炮制温度 105 °C 时甘草苷和甘草酸铵含量最高，以

上述数据为中心点，采用 Box-Behnken 试验设计原理，设计 3 因素 3 水平的试验方案，具体结果见表 4。采用 Design Expert 13 软件对试验结果进行响应面分析和模型拟合，得到线性回归方程 $Y=3.660-0.015 6 X_1-0.035 4 X_2-0.006 2 X_3-0.024 3 X_1X_2+0.043 6 X_1X_3+0.011 0 X_2X_3-0.539 8 X_1^2-0.891 2 X_2^2-0.501 7 X_3^2$ ， $R^2=0.991 5$ ，失拟项 $P=0.295 7>0.05$ ，结果表明，线性回归模型对数据的拟合良好，该模型可信度高，能够可靠预测和分析，3D 响应面图见图 3。最佳炮制工艺的确定基于 Design Expert 13 软件对所建模型进行参数最优分析，得出最优炮制工艺：每 100 kg 炼蜜量 24.930 kg、闷透时间为 2.980 h、炮制温度为 104.936 °C，结合实际情况，取甘草，加入 25 kg 的蜂蜜以适量沸水稀释拌匀，

表 4 甘草炮制试验设计和结果

Table 4 Experimental design and results of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processing

| 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 甘草苷+甘草酸铵/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 甘草苷+甘草酸铵/% | 序号 | X ₁ /kg | X ₂ /h | X ₃ /°C | 甘草苷+甘草酸铵/% |
|----|--------------------|-------------------|--------------------|------------|----|--------------------|-------------------|--------------------|------------|----|--------------------|-------------------|--------------------|------------|
| 1 | 25 (0) | 3 (0) | 105 (0) | 3.663 24 | 7 | 20 (-1) | 4 (+1) | 105 | 2.270 43 | 13 | 20 | 2 | 105 | 2.261 87 |
| 2 | 25 | 2 (-1) | 95 (-1) | 2.387 21 | 8 | 25 | 3 | 105 | 3.624 31 | 14 | 30 | 4 | 105 | 2.142 68 |
| 3 | 25 | 3 | 105 | 3.719 16 | 9 | 30 | 3 | 95 | 2.532 41 | 15 | 25 | 4 | 95 | 2.263 74 |
| 4 | 25 | 3 | 105 | 3.734 57 | 10 | 20 | 3 | 95 | 2.603 05 | 16 | 25 | 3 | 105 | 3.546 73 |
| 5 | 25 | 2 | 115 (+1) | 2.243 64 | 11 | 30 | 3 | 115 | 2.716 39 | 17 | 20 | 3 | 115 | 2.612 47 |
| 6 | 30 (+1) | 2 | 105 | 2.231 24 | 12 | 25 | 4 | 115 | 2.164 06 | | | | | |

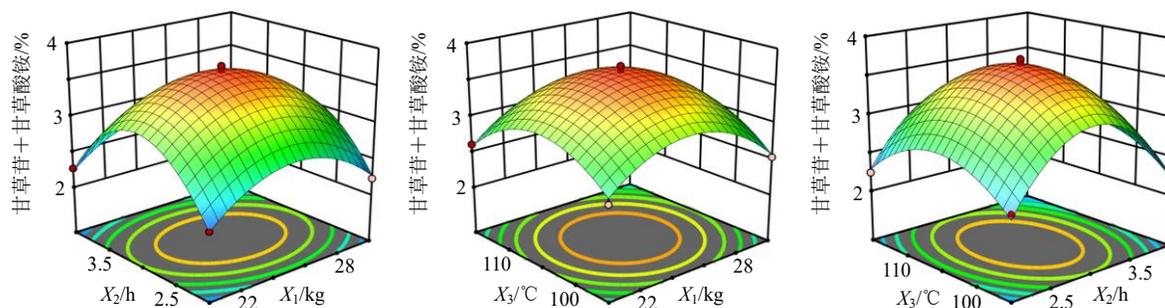


图3 甘草炮制的3D响应面图

Fig. 3 3D response surface plots of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* processing

闷制 3 h, 置炒制容器内, 105 °C 炒干, 取出, 放凉。按最佳工艺条件平行制备 3 份炙甘草饮片, 测定甘草苷和甘草酸铵含量, 所得综合评分平均值为 96.18, RSD 为 1.97%, 符合预测值波动范围, 表明模型预测性良好, 稳定可靠。

2.2.4 甜葶苈炮制研究 按《中国药典》2020 年版 0213 炮制通则项, 取甜葶苈, 照清炒法炒至有爆声。

2.2.5 车前子炮制研究 按《中国药典》2020 年版 0213 炮制通则项, 取车前子, 照盐水炙法炒至起爆裂声时, 喷洒盐水, 炒干。

2.2.6 基准样品的制备 根据国家中医药管理局于 2023 年 5 月发布的古代经典名方关键信息表^[3], 并查阅相关文献典籍^[15-16]确定清代 1 钱约折合成现今 3.73 g, 1 钱等于 10 分。根据文献并结合前期实验确定清宁散基准样品的制备方法为称取上述蜜桑白皮、炒甜葶苈、酒炒赤茯苓、炒车前子各 0.42 g, 炙甘草 0.21 g, 以上药材粗粉混合, 粉碎后过 120 目筛, 即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取异鼠李素、甘草苷、芥子碱硫氰酸盐、甘草酸铵、槲皮素、绿原酸、京尼平苷酸、桑皮苷 A、毛蕊花糖苷、芹菜素、β-胡萝卜素、松苓新酸、去氢土莫酸、甘草查耳酮 A、桑黄酮 G、桑辛素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双糖苷、茯苓新酸 A、甘草酸适量置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇制成质量浓度分别为 128.14、200.32、80.31、20.17、80.12、19.30、100.14、9.87、100.27、50.41、50.35、200.29、15.38、10.26、60.32、100.38、90.37、30.12、25.09 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取按“2.2.6”项下方法制备得到的清宁散基准样品 0.45 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 超声 30 min, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm

微孔滤膜, 即得清宁散基准样品的供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一份清宁散基准样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次进行分析, 记录色谱图。以 10 号色谱峰为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 2.87%; 相对保留时间的 RSD 值均小于 0.93%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同一份清宁散基准样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别在制样后 0、2、4、8、12、24 h 后, 按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以 10 号色谱峰为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 2.93%; 相对保留时间的 RSD 值均小于 0.27%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同一清宁散基准样品, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以 10 号峰为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各共有峰相对峰面积的 RSD 值均小于 2.87%; 相对保留时间的 RSD 值均小于 0.89%, 表明该方法重复性良好。

2.6 基准样品指纹图谱的建立及相似度评价

利用随机数表法, 将蜜桑白皮、炒葶苈子、酒炒赤茯苓、炒车前子、炙甘草 5 种饮片的不同批次随机组合, 按照“2.4”项下方法制备 15 批清宁散基准样品(S1~S15), 并按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A), 以 S1 为参照图谱, 采用中位数法, 进行多点校正和 Mark 峰匹配, 得到 15 批样品叠加图, 共确认 39 个共有峰。结果见

图 4。与对照指纹图谱 (R) 相比, 计算得 15 批清宁散基准样品 (S1~S15) 的相似度分别为 1.000、0.998、0.987、0.993、0.996、0.991、0.978、0.957、0.999、0.993、0.967、0.984、0.995、0.988、0.991, 均 > 0.93, 表明基准样品特征图谱相似度良好, 主要物质群差异性小, 形成的基准样品对照图谱能够作为衡量清宁散基准样品的标准参照物。

2.7 共有峰归属

按“2.4”项下的供试品溶液制备方法分别制备单味药材饮片供试品溶液、缺单味药材饮片阴性样品溶液和清宁散基准样品供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。分别将清宁散基准样品、单味药材饮片、缺单味药材饮片供试品溶液进行叠加比较, 具体归属情况见表 5。

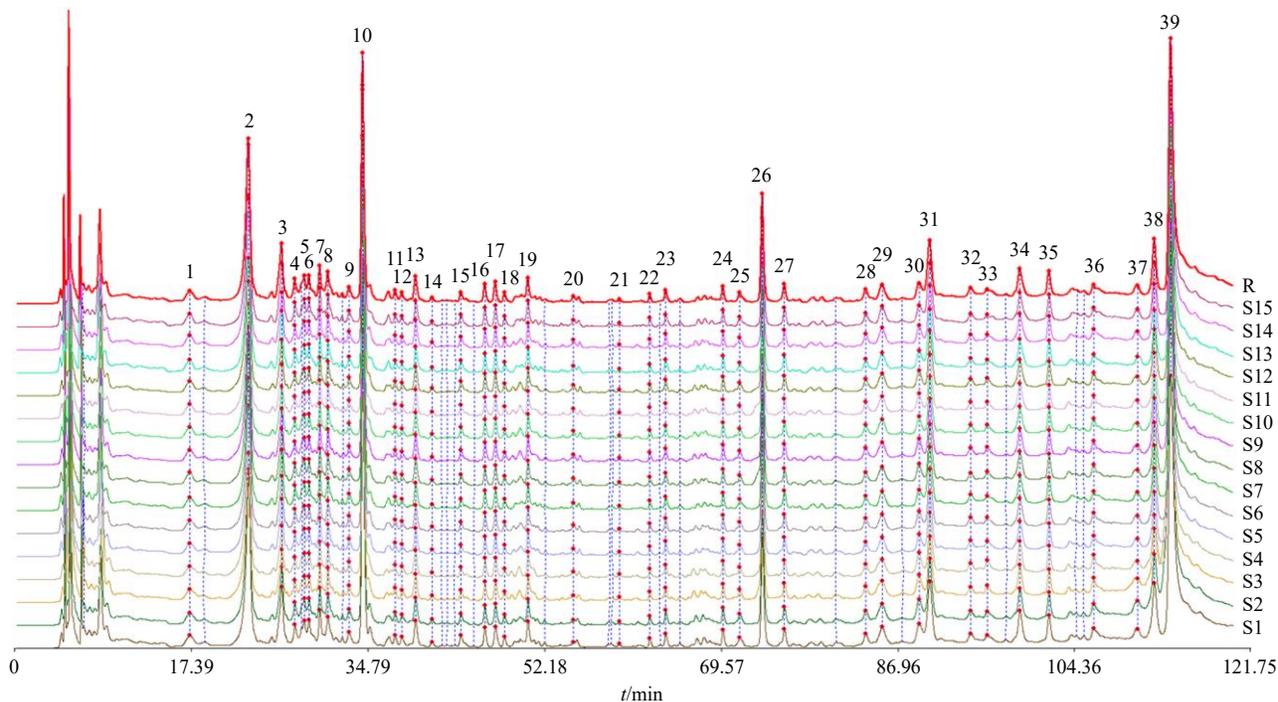


图 4 15 批清宁散基准样品 (S1~S15) 的 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 4 HPLC fingerprint of 15 batches of Qingning Powder substance reference (S1—S15) and reference fingerprint (R)

表 5 清宁散基准样品共有峰归属情况

Table 5 Attribution of common peaks of Qingning Powder substance reference

| 峰号 | 来源 | 化合物 | 峰号 | 来源 | 化合物 | 峰号 | 来源 | 化合物 |
|----|-----|---------|----|---------|-------|----|---------|-------------------------------|
| 1 | 甜葶苈 | 异鼠李素 | 15 | 赤茯苓 | 去氢土莫酸 | 29 | 桑白皮 | 桑辛素 |
| 2 | 甘草 | 甘草苷 | 16 | 甘草 | 甘草酸铵 | 30 | 甘草 | 未指认 |
| 3 | 甜葶苈 | 芥子碱硫氰酸盐 | 17 | 车前子 | 未指认 | 31 | 甜葶苈 | 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双糖苷 |
| 4 | 甜葶苈 | β-胡萝卜素 | 18 | 车前子 | 未指认 | 32 | 甘草 | 未指认 |
| 5 | 桑白皮 | 未指认 | 19 | 甜葶苈 | 槲皮素 | 33 | 甘草 | 未指认 |
| 6 | 桑白皮 | 未指认 | 20 | 甜葶苈 | 绿原酸 | 34 | 车前子 | 毛蕊花糖苷 |
| 7 | 甜葶苈 | 未指认 | 21 | 甘草 | 甘草查耳酮 | 35 | 车前子 | 芹菜素 |
| 8 | 桑白皮 | 未指认 | 22 | 桑白皮 | 桑黄酮 G | 36 | 赤茯苓、车前子 | 未指认 |
| 9 | 甘草 | 未指认 | 23 | 甜葶苈 | 未指认 | 37 | 甘草 | 未指认 |
| 10 | 赤茯苓 | 松萜新酸 | 24 | 车前子 | 京尼平苷酸 | 38 | 赤茯苓 | 茯苓新酸 A |
| 11 | 桑白皮 | 未指认 | 25 | 甘草 | 未指认 | 39 | 甘草 | 未指认 |
| 12 | 桑白皮 | 未指认 | 26 | 桑白皮 | 桑皮苷 A | | | |
| 13 | 桑白皮 | 未指认 | 27 | 甘草 | 未指认 | | | |
| 14 | 车前子 | 未指认 | 28 | 甜葶苈、赤茯苓 | 未指认 | | | |

为进一步明确活性成分，按照“2.4”项下的供试品溶液制备方法和“2.1”项下的色谱条件，使用Dionex UltiMate 3000超高效液相色谱-Orbitrap质谱仪检测，测试条件为电喷雾电离（electrospray ionization, ESI），喷雾电压3 500 V，鞘气体积流量40 arb，辅助气体积流量10 arb，辅助气温度300 ℃，毛细管温度300 ℃，扫描模式为全扫描模式，扫描范围 m/z 为100~1 300，得到总离子流图，见图5。经质谱与对照品比对，指认18个色谱峰，分别为1号峰异鼠李素、2号峰甘草苷、3号峰芥子碱硫氰酸盐、4号峰 β -胡萝卜素、10号峰松苓新酸、15号峰去氢土莫酸、16号峰甘草酸铵、19号峰槲皮素、20号峰绿原酸、21号峰甘草查耳酮A、22号峰桑黄酮G、24号峰京尼平苷酸、26号峰桑皮苷A、29号峰桑辛素、31号峰槲皮素-3- O - β -D-葡萄糖-7- O - β -D-龙胆双糖苷、34号峰毛蕊花糖苷、35号峰芹菜素、38号峰茯苓新酸A。

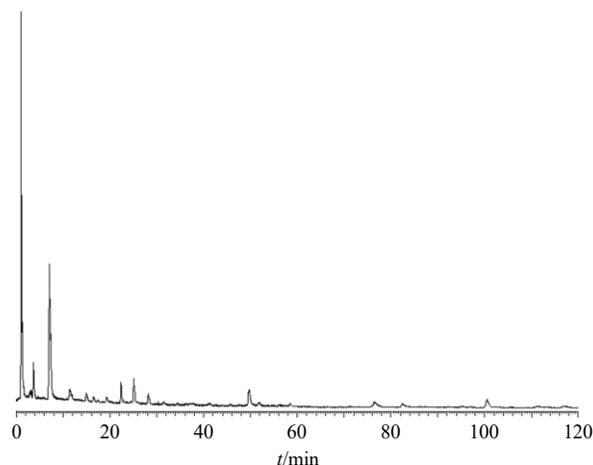


图5 清宁散基准样品质谱总离子流图

Fig. 5 Total ion chromatogram of Qingning Powder substance reference

综上所述，各味药材饮片特征图谱中主要物质群可以从饮片-基准样品较为完整地传递，且物质群的归属关系清晰，说明清宁散基准样品的物质群可清晰地追溯到饮片，且色谱峰归属明确，指认率较高。

2.8 化学计量学分析

2.8.1 系统聚类分析（hierarchical cluster analysis, HCA） 将15批清宁散基准样品39个共有峰的相对峰面积数据输入SPSS 27.0数据分析软件，进行HCA，采用组间连接法，以平方欧式距离为评分依据，聚类结果见图6。结果发现，当平方欧式距离为15时，15批清宁散基准样品被聚为3类，S1~S3、S5、S6、S8~S14为第1类，S4、S15为第2

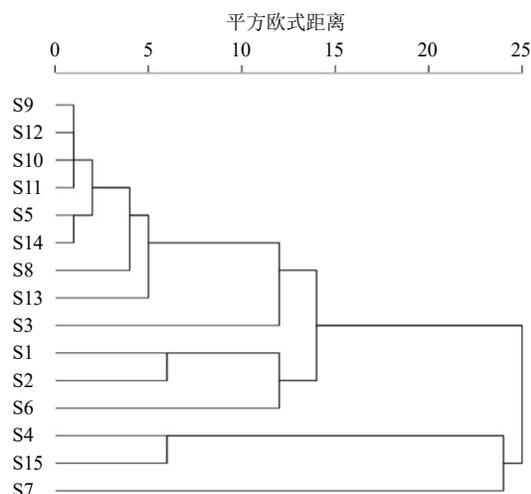


图6 15批清宁散基准样品聚类树状图

Fig. 6 Cluster dendrogram of 15 batches of Qingning Powder substance reference

类，S7为第3类，表明15批基准样品不完全相同，不同产地药材质量及成分含量存在一定差异。

2.8.2 主成分分析（principal component analysis, PCA） 将15批清宁散基准样品的18个特征峰的相对峰面积数据输入SPSS 27.0并进行标准化处理，主成分特征值和累积方差贡献率作为依据进行PCA，结果见表6，其中5个主成分的特征值>1，累积方差贡献率为85.882%，可以较为全面地表征样品共有峰的信息。旋转后的共有峰因子载荷矩阵见表7，第1主成分的主要影响因素来自于峰1~4、16；第2主成分的主要影响因素来自于峰26、31、34、35；第3主成分的主要影响因素来自于峰19、22、29；第4主成分的主要影响因素来自于峰10、26；第5主成分的主要影响因素来自于峰15。以SIMCA 14.1进行分析得主成分得分图，见图7，15批清宁散基准样品大致被分为3类，与聚类分析结果一致。

2.9 基于网络药理学的清宁散功效关联物质预测分析

2.9.1 基于可测性和可塑性的活性成分筛选

表6 PCA特征值及方差贡献率

Table 6 PCA eigenvalue and variance contribution rate

| 主成分 | 特征值 | 方差贡献率/% | 累积方差贡献率/% |
|-----|-------|---------|-----------|
| 1 | 5.750 | 31.942 | 31.942 |
| 2 | 3.996 | 22.197 | 54.139 |
| 3 | 3.034 | 16.854 | 70.994 |
| 4 | 1.522 | 8.453 | 79.447 |
| 5 | 1.158 | 6.426 | 85.882 |

表 7 主成分因子载荷矩阵

Table 7 Principal component factor load matrix

| 峰号 | 载荷 | | | | | 峰号 | 载荷 | | | | | 峰号 | 载荷 | | | | |
|----|-------|--------|--------|--------|--------|----|-------|--------|--------|--------|--------|----|--------|-------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0.830 | -0.271 | 0.316 | -0.250 | -0.178 | 16 | 0.687 | 0.352 | 0.317 | -0.427 | 0.225 | 26 | -0.015 | 0.602 | 0.274 | 0.535 | -0.265 |
| 2 | 0.869 | -0.200 | -0.303 | -0.117 | -0.291 | 19 | 0.588 | 0.161 | 0.642 | 0.252 | -0.168 | 29 | 0.275 | 0.539 | 0.609 | 0.142 | 0.367 |
| 3 | 0.831 | -0.084 | -0.478 | -0.050 | -0.199 | 20 | 0.202 | -0.800 | 0.320 | -0.103 | 0.237 | 31 | 0.490 | 0.682 | -0.126 | 0.010 | 0.021 |
| 4 | 0.845 | -0.335 | -0.006 | -0.083 | -0.280 | 21 | 0.611 | -0.412 | -0.234 | 0.440 | 0.009 | 34 | 0.382 | 0.639 | -0.373 | 0.320 | 0.008 |
| 10 | 0.416 | -0.511 | 0.475 | 0.503 | 0.106 | 22 | 0.269 | -0.154 | 0.748 | -0.181 | 0.224 | 35 | 0.301 | 0.546 | -0.355 | -0.322 | 0.338 |
| 15 | 0.423 | -0.162 | -0.499 | 0.421 | 0.567 | 24 | 0.815 | 0.165 | -0.260 | -0.091 | 0.203 | 38 | 0.170 | 0.800 | 0.341 | -0.045 | -0.214 |

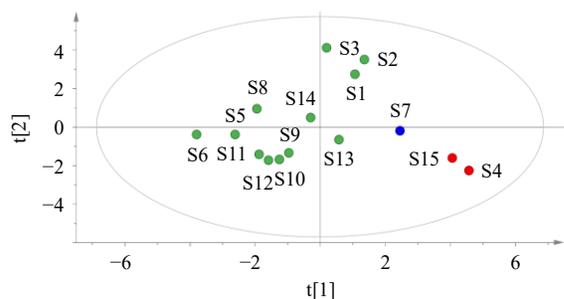


图 7 15 批清宁散基准样品 PCA 得分图

Fig. 7 PCA score plot of 15 batches of Qingning Powder substance reference

相关文献调研，桑白皮为清宁散君药，其主要活性成分为黄酮类和香豆素类，包括桑皮苷 A、桑辛素、环桑色醇、桑根酮、伞形花内酯、东莨菪素、东莨菪内酯等，具有抗炎镇痛、抗病毒、降血糖、抗肿瘤、免疫调节等多重药理作用^[17-19]；甜葶苈为臣药，主要成分为黄酮类和异硫氰酸类，具有改善心血管功能、抗肿瘤、止咳、祛痰、平喘等作用^[20-21]；赤茯苓和车前子为佐药，茯苓的主要化学成分是茯苓多糖，具有抗衰老、提高免疫力、消水利肿等作用^[22]，京尼平苷酸、毛蕊花糖苷为车前子的质量控制指标，发挥清热、利尿通淋、渗湿止泻、明目、祛痰等功效^[23]；甘草为使药，主要活性成分为三萜类和黄酮类，具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化等药理作用^[24-25]。

《中国药典》2020 年版对于组方药的控制主要为葶苈子的槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双糖苷，车前子的京尼平苷酸、毛蕊花糖苷，甘草的甘草苷、甘草酸铵。基于文献研究结合指纹图谱及特征图谱的可测性和可追溯性，确认指纹图谱中指认出的桑皮苷 A、桑辛素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双糖苷、茯苓新酸 A、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、甘草苷、甘草酸铵 8 个活性成分为候

选化合物，通过 Pubchem Compound 化合物数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 8 个候选化合物的 Canonical SMILES 编号，为后续清宁散“成分-靶点-通路”网络的构建做准备。

2.9.2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络构建 将 8 个候选化合物的 Canonical SMILES 编号分别导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行靶点预测，去除重复靶点，获得与 8 个化合物相关的共计 386 个靶点，导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)，选择物种为“Homo sapiens”，蛋白交互参数评分值为“high confidence > 0.9”，获得 PPI 网络图，见图 8。

将分析结果网络图以 TVS 格式导入 Cytoscape 3.10.0 软件，利用软件中的“Network Analyzer”功能对 PPI 网络图进行拓扑属性分析，选取度值 (degree)、介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 3 个重要拓扑参数均大于中位数且度值 ≥ 15 的靶点作为核心靶点，经筛选得到共计 61 个核心靶点。

2.9.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将通过 PPI 网络筛选得到的 61 个核心靶点利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对其进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。选择物种为“Homo sapiens”，GO 功能分析取“P ≤ 0.005”和 KEGG 通路分析取“P ≤ 0.01”，具有统计学意义。

GO 富集分析共获取 92 个 GO 条目，其中生物过程 (biological process, BP) 占 63 条；细胞组成 (cell composition, CC) 占 13 条；分子功能 (molecular

function, MF) 占 16 条, 根据显著性程度进行部分展示, 结果见图 9。BP 显著富集在细胞对多巴胺的

反应、骨化调节、胰岛素受体信号调节、DNA 损伤反应信号传导等过程; CC 显著富集在膜筏、突触、

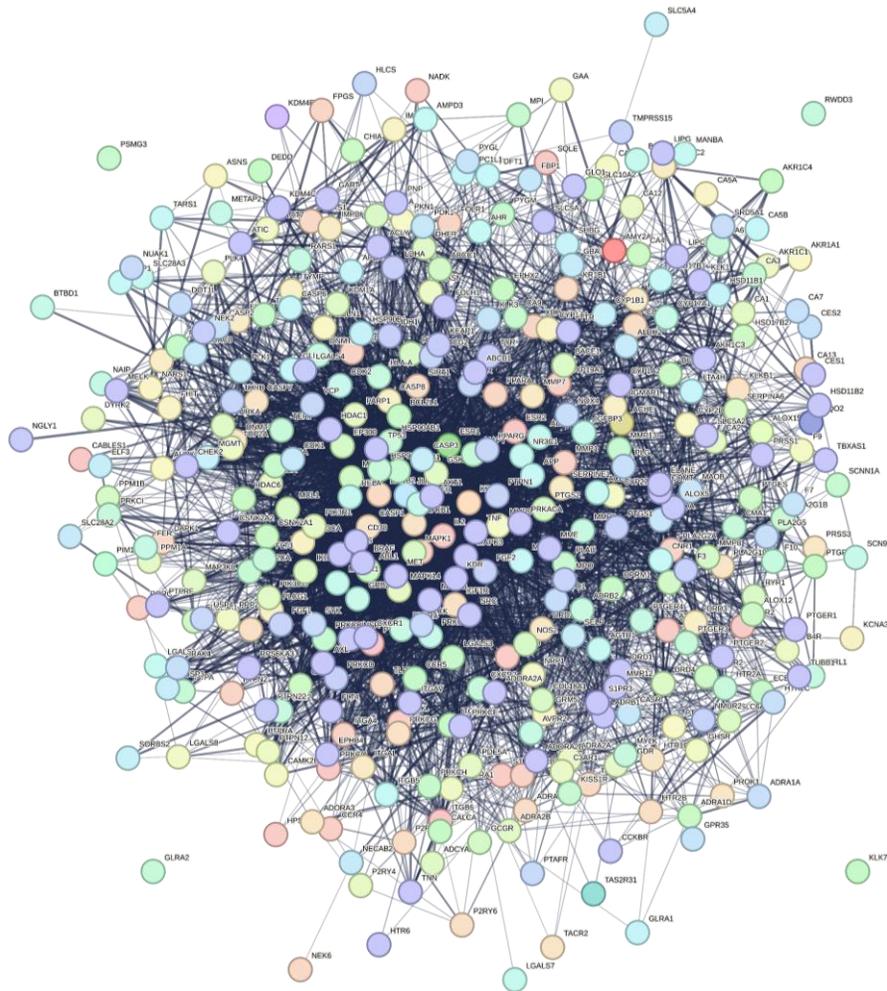


图 8 靶点 PPI 网络图

Fig. 8 Target PPI network

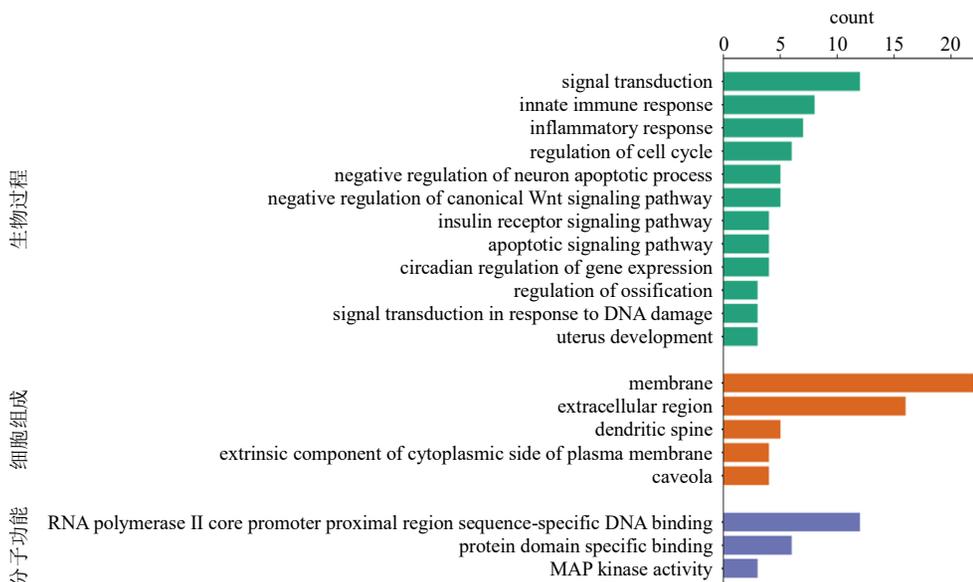


图 9 清宁散核心靶点 GO 功能富集分析

Fig. 9 GO function enrichment analysis of Qingning Powder key targets

细胞外、细胞质膜侧、内质网等区域；MF 显著富集在蛋白质结构域特异性结合、MAP 激酶活性、RNA 聚合酶 II 核心启动子近端区域序列特异性 DNA 结合、血红素结合、类固醇激素受体活性等功能。KEGG 富集分析中前 20 条与清宁散关联程度较高的通路如图 10 所示，主要涉及癌症信号通路、T 细胞受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、脂质和动脉粥样硬化信号通路、TNF 信号通路、甲状腺激素信号通路、雌激素信号通路等，表明 61 个核心

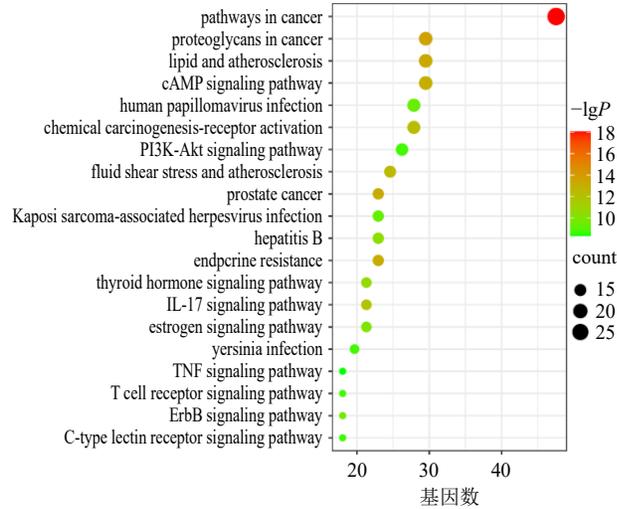


图 10 KEGG 富集分析结果

Fig. 10 Results of KEGG enrichment pathway analysis

靶点可能是主要通过调节这些通路来起到治疗或干预疾病的作用。

2.9.4 “成分-靶点-通路”网络构建及分析及整合分析 将筛选得到的清宁散中 8 个活性成分、61 个核心靶点以及 20 条信号通路，运用 Cytoscape 3.10.0 软件，构建“成分-靶点-通路”网络关系图，结果见图 11。结果表明，清宁散中的多个有效成分通过调控不同通路的多个靶点，以发挥疾病治疗作用。其中，8 个活性成分中茯苓新酸 A、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-18-O-β-D-龙胆双糖苷、京尼平苷酸、桑辛素的连接度相对较高；在 61 个核心靶点中有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、MAPK3、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、核因子-κB1 (nuclear factor kappa B subunit 1, NF-κB1)、肿瘤蛋白 p53 (tumour suppressor p53, TP53)、原癌基因-JUN (proto-oncogene c-Jun proto-oncogene, JUN)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 的连接程度高于其他靶点，在 20 条核心通路中，癌症信号通路、癌症蛋白多糖信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路与、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路的连接程度

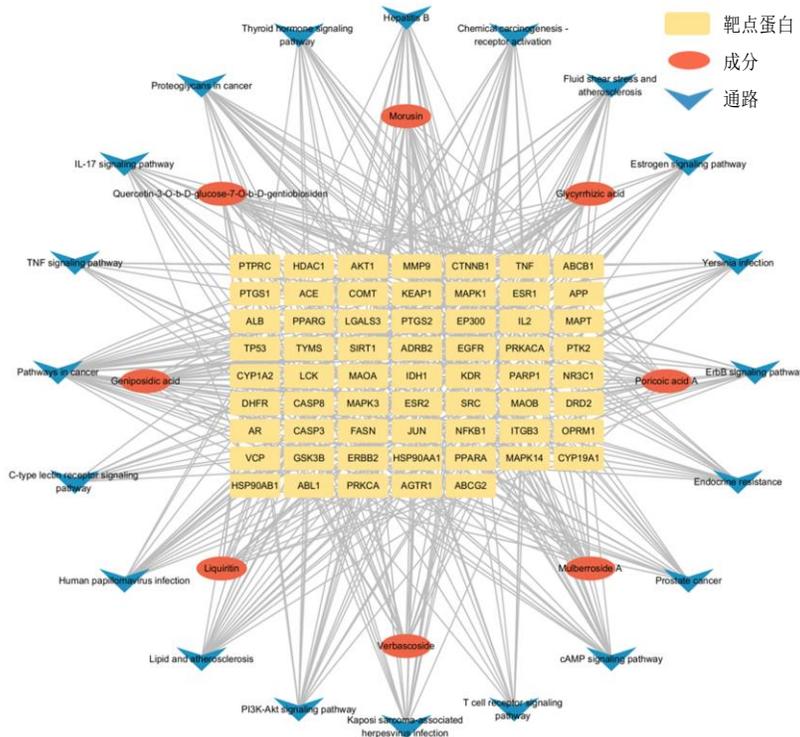


图 11 “成分-靶点-通路”网络图

Fig. 11 “Compound-target-pathway” network diagram

相对较高。

清宁散可消除肺瘀血，减轻肺部渗出，改善心肺功能，为肃肺利水止咳喘之剂，现代临床上常用来治疗小儿心肺蕴热所致发惊、咳嗽等病证^[26]。小儿咳嗽的发生涉及多个因素，包括气道高反应性、气道上皮受损、炎性反应和咳嗽高敏感性等。其中，炎症反应在这一过程中起到了关键作用^[27]。

通过对核心靶点进行整合分析发现，NF- κ B 是可以调节广泛基因表达的核蛋白因子，为控制炎症反应的核心因子^[28]，促进炎症因子增加，从而加重炎症反应^[29]，在参与炎症反应，细胞增殖、分化与凋亡，免疫反应和肿瘤形成等相关的基因转录调控中有重要作用^[30]；MMP9 在肺损伤和疾病发展过程中，可以降解由IV型胶原等组成的毛细血管和肺泡上皮的基膜^[31]，参与炎症和组织修复的调节^[32]；TNF- α 主要由单核巨噬细胞产生的一种肽类炎性介质^[33]，能够使得呼吸道血管内皮细胞表面黏附分子异常表达，增强血管的通透性，引起气道产生炎症改变和黏膜水肿，导致气道反应性增加，加剧气道炎症反应^[34]；MAPK 是细胞外信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者^[35]，激活后可促进多种因子的表达和释放，导致炎症反应失衡^[36]。

KECG 通路富集分析结果表明，清宁散 8 个活性成分主要涉及癌症、炎症因子介导的调节信号通路、离子信号通路等。PI3K-Akt 信号通路是细胞内重要的信号传导通路，可通过一系列蛋白因子的表达来参与蛋白质的合成、细胞凋亡分化，在炎症性疾病、恶性肿瘤中均发挥重要作用^[37]，研究发现，通过激活 PI3K-Akt 信号通路，活化下游 NF- κ B，使得激活的 NF- κ B 转位进核而产生免疫应答^[38]，并诱导 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、TNF- α 等多种炎性因子分泌，并介导中性粒细胞募集及趋化因子生成^[39]，加速气道损害进程，加剧肺组织损伤。

IL-17 是由辅助性 T 细胞 (T helper cell 17, Th17) 分泌的主要效应因子，具有强大的募集和中性粒细胞激活作用^[40]，可以诱导活化的 T 细胞和成纤维细胞、巨噬细胞及上皮细胞产生多种促炎递质如 IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP 和化学激活素从而引起炎症，IL-17 受体通过信号转导复合体 Act1-TRAF6 激活下游 NF- κ B、MAPK 等信号通路^[41]，调节促炎介质和细胞因子的产生。环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路的活化可以抑制 NF- κ B 活性，减少巨噬细胞产生 TNF- α 、

免疫细胞释放白细胞介素，从而阻断炎症介质和免疫相关基因的转录和表达，减轻肺部炎症。

由此可见，清宁散中关键效应成分通过作用于多个靶点，干预多条通路协同发挥治疗/干预疾病的作用。基于指纹图谱和网络药理学研究，清宁散中的桑皮苷 A、桑辛素、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷等 8 个活性成分具有传递性和可溯性，且与清宁散的功能属性密切相关，可预测其为影响清宁散品质的潜在功效关联物质。

3 讨论

清宁散由桑白皮、赤茯苓、车前子、甜葶苈和甘草 5 味药材组成，在基准样品制备时采用响应面优化法以确定最佳制备工艺，为了能够尽可能全面的分析其化学成分，对供试品溶液的制备以及色谱条件进行优化考察。结合方中药材在《中国药典》2020 年版中供试品溶液的制备方法对提取溶剂 (超纯水、80%甲醇水溶液、甲醇) 和提取方法 (超声时间 15、30、45、60 min) 进行优化比较，结果表明，以 80%甲醇超声 30 min，所得色谱图所包含的信息量最全面、成分含量最高且基线平稳，因此，选择 80%甲醇超声 30 min 提取。通过考察不用的检测波长 (254、275、280 nm)、体积流量 (0.6、0.7、0.8、1.0 mL/min)、洗脱体系 (甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液，乙腈-0.1%冰醋酸水溶液) 对色谱峰的影响，确立了清宁散指纹图谱的分析方法为流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液；梯度洗脱；检测波长：0~15 min，254 nm；15~43 min，280 nm；43~120 min，254 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；体积流量 0.8 mL/min。

经典名方组方药味众多、成分复杂，本研究以指纹图谱作为指标，全面考察清宁散原料饮片-基准样品的关键质量属性的传递性。结果显示，清宁散基准样品共确认 39 个峰，通过液质联用共指认 18 个峰，且归属关系清晰。从色谱峰个数和峰强度看，甘草对指纹图谱的贡献最大，桑白皮、车前子、甜葶苈对指纹图谱的贡献度相对较大，赤茯苓对指纹图谱的贡献较低。

中药质量是中药产业发展的重要保障，网络药理学是一种基于“疾病-基因-靶点-药物”相互作用网络的方法，它能够系统地观察药物对疾病网络的影响和作用。在中药领域，网络药理学能够为中药的全程质量控制和质量溯源提供指标和方法。本研

究基于中药化学和中药药理学,整合多学科技术方法,将指纹图谱与网络药理学相结合,通过对经典名方清宁散进行指纹图谱研究,并构建清宁散“成分-靶点-通路”网络,不仅对清宁散质量控制指标成分的合理性进行了验证,而且揭示了清宁散物质基础的相关性,为后续研究清宁散及其相关复方的作用机制提供思路,也为清宁散的质量控制提供了更全面的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐瑞杰,薛蓉,梅茜,等.基于指纹图谱和网络药理学的枳实薤白桂枝汤质量标志物预测[J].中草药,2022,53(2):372-381.
- [2] 高树葳,邱智东,赵燕,等.基于古代经典名方的中药新产品研究进展[J].长春中医药大学学报,2021,37(3):674-677.
- [3] 国家中医药管理局.国家中医药管理局综合司 国家药品监督管理局综合司关于发布《古代经典名方关键信息表(“异功散”等儿科7首方剂)》的通知[EB/OL].(2023-05-31) [2023-09-30]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2023-05-31/30768.html>.
- [4] 清·陈复正辑订.刘勳校正.幼幼集成[M].新1版.上海:上海科学技术出版社,1962:142.
- [5] 刁嘉茵,徐灿,王淑美,等.中药指纹图谱与药效相关性研究进展[J].药学研究,2018,37(3):165-168.
- [6] 徐妍,杨华蕊,杨永寿,等.中药指纹图谱研究现状及展望[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(76):91-94.
- [7] 王璐,张礼欣,贾奥蒙,等.基于指纹图谱和网络药理学对经典名方竹茹汤中葛根的质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2021,52(20):6197-6207.
- [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] 王强,刘敏莹,韩隆胤,等.基于网络药理学探讨断藤益母汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(24):150-158.
- [11] 汤佩佩,白明,苗明三.中医药研究与网络药理学[J].中医学报,2012,27(9):1112-1115.
- [12] Wu P X, Liang S F, He Y P, et al. Network pharmacology analysis to explore mechanism of Three Flower Tea against nonalcoholic fatty liver disease with experimental support using high-fat diet-induced rats[J]. Chin Herb Med, 2022, 14(2): 273-282.
- [13] 段君,许海,沈峰.甘草古今炮制方法考证及饮片质量研究现状[J].实用中医药杂志,2022,38(9):1655-1658.
- [14] 王新杰,张婧秋,杨子焯,等.基于G₁-熵权法结合Box-Behnken响应面法优化蜜炙甘草炮制工艺[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(4):28-32.
- [15] 张琦.历代方剂汤剂用量的研究[D].南京:南京中医药大学,2010.
- [16] 施家希,施旭光.经方药量古今换算与用法初探[J].江西中医药,2016,47(11):18-20.
- [17] 刘红淼,李艳玲,黄志云.桑白皮药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(20):229-234.
- [18] 王洪伟,盛邦跃,林超.桑白皮药理作用研究进展[J].中医学报,2019,34(6):1183-1187.
- [19] 李蕊,曾扬,张葵.桑白皮的药理作用及其治疗老年病的临床应用[J].老年医学与保健,2021,27(6):1339-1342.
- [20] 林雪竹,李蔚群,关永霞,等.葶苈子化学成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2022,24(3):550-558.
- [21] 徐明,张静,邱建平,等.葶苈子的炮制历史沿革及其药理作用研究进展[J].中医药导报,2021,27(10):132-137.
- [22] 杨培树,张娜.茯苓药理作用与研究进展[J].内蒙古中医药,2021,40(11):155-156.
- [23] 雷蒙蒙.浅析车前子新药理作用[J].亚太传统医药,2017,13(15):57-58.
- [24] 肖先,李春燕,刘晓龙,等.甘草的主要化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2023,40(3):280-285.
- [25] 谢瑞强,王长福.炙甘草化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2023,40(4):84-89.
- [26] 吴宏华,郑建波,郑雪辉,等.清宁散加减治疗儿童咳嗽痰热郁肺证的疗效以及对血清IL-8和TNF- α 水平的影响[J].中华中医药学刊,2022,40(6):210-212.
- [27] 周婷,罗银河,王孟清.小儿久咳合剂对感染后咳嗽(肺热阴虚证)大鼠咳嗽敏感性及血清IL-5、TNF- α 、IgE含量的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3637-3640.
- [28] 吴春花,李晓雅,闫颖洁,等.砭贴预处理对急性低压缺氧肺水肿大鼠肺组织NF- κ B及相关炎症因子表达的影响[J].中华中医药杂志,2022,37(10):5904-5907.
- [29] Liang F, Huang T, Li B X, et al. High-intensity interval training and moderate-intensity continuous training alleviate β -amyloid deposition by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice[J]. Neuroreport, 2020, 31(5): 425-432.
- [30] 鲁广建,张群妹,焦路阳.核因子-KB及炎症因子在百

- 草枯致大鼠肾损伤的动态变化的意义 [J]. 中国农村卫生, 2015(15): 66.
- [31] 李茜. 氢气通过上调 Trx1 抑制 TF-MMP9 表达减轻脓毒症血症肺损伤 [D]. 南京: 南京医科大学, 2021.
- [32] 王常田, 申翼, 钱雅君, 等. 心肺转流对大鼠血浆和肺内基质金属蛋白酶-9 的影响 [J]. 医学研究生学报, 2011, 24(3): 242-245.
- [33] 隋博文, 李明爽, 王达, 等. IL-17A、TNF- α 在哮喘小鼠模型气道炎症中的变化及射干麻黄汤的干预作用研究 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(4): 581-583.
- [34] 莫碧文, 张珍祥, 徐永健, 等. 核因子- κ B 对 TNF- α 诱导的大鼠气道平滑肌细胞增殖、凋亡及 TGF- β_1 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(9): 1767-1771.
- [35] 李彦霖, 郁叶, 郭婷莉, 等. 氧化应激和炎症反应中 Nrf2/HO-1 与 MAPK 的相关性 [J]. 医学综述, 2021, 27(1): 8-13.
- [36] 门翔, 党强, 周小果, 等. 槲皮素对基于 TGF- β_1 /P38 MAPK/NF- κ B 信号通路抗博来霉素致小鼠肺纤维化的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(2): 43-47.
- [37] 李明, 李天苏, 杨倩文. 基于 PI3K/Akt 信号通路观察白藜芦醇对呼吸道合胞病毒致肺炎小鼠的保护作用机制 [J]. 中药材, 2020, 43(4): 986-990.
- [38] 张俊英, 赵晓莉, 王鑫, 等. 不同气道损害肺炎支原体肺炎患儿 PI3K-Akt 信号通路变化及治疗转归 [J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(7): 1106-1110.
- [39] Zheng Y L, Li S, Hu R H, *et al.* GFI-1 protects against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and apoptosis by inhibition of the NF- κ B/TNF- α pathway in H9c2 cells [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 74-84.
- [40] 葛一漫, 张礼, 雍江堰, 等. 基于 IL-17、IL-31/STAT3 信号通路探讨马齿苋对急性湿疹大鼠炎症和瘙痒反应的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(5): 1025-1028.
- [41] 永胜, 高玉杰, 许玉珍, 等. IL-17 和 Th17 细胞信号通路参与高原低氧环境小鼠肾脏组织炎症发生的作用机制 [J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(6): 791-799.

[责任编辑 郑礼胜]