

基于网络药理学的红花注射液用红花药材质量控制方法研究

胡晓茹¹, 郑海荣², 党海霞³, 胡秦², 康帅¹, 戴忠^{1*}, 马双成^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京工业大学, 北京 100124;
3. 中国中医科学院中医药发展研究中心, 北京 100700)

摘要: 建立的红花“化学成分-靶点-疾病”网络, 进行拓扑学分析得到网络中与脉管炎、冠心病和脑血管疾病相关的核心成分, 基于此建立红花注射液用红花药材的质量控制方法。首先经 TCMID 和 TCMSP 数据库检索得到红花中 132 个化合物, 利用 PharmMapp 和 ChemMapper 数据库对上述成分的靶点进行预测, 利用 CardioGenBase、Therapeutic Target Database、DisGeNET 数据库收集脉管炎、冠心病和脑血管疾病冠心病相关靶点, 经过映射对接, 建立“化学成分-靶点”对应关系; 然后, 利用 Cytoscape 软件构建“药效成分-靶点-疾病”网络模型, 借助 Cytohubba 插件进行核心网络筛选和关键节点分析, 自由度排名靠前的 24 个关键化学成分为 α -生育酚、腺苷, 以及羟基红花黄色素 A、saffloryellow 等醌式查耳酮色素类, 槲皮素、山柰酚等黄酮类, 硬脂酸、亚麻酸、4-香豆酸和肉桂酸等有机酸, 佛手柑内酯等香豆精类成分等。在上述核心成分的基础上, 结合指纹图谱可同时做多成分进行控制的特点, 建立注射用红花药材的指纹图谱, 并对样品进行测定。所建立的指纹图谱可以反映出腺苷、羟基红花黄色素 A、Saffloryellow、4-香豆酸等成分, 通过对所收集到的红花药材进行分析, 结果上述成分在药材中的含量均一性良好。本方法基于网络药理学的方法, 从药材化学成分和疾病出发构建药材“化学成分-靶点-疾病”网络, 通过拓扑学分析方法获取核心化学成分并作为质控指标, 并基于此开展中药质量控制方法的研究, 为中药药材的质控指标研究提供了新的研究思路。

关键词: 网络药理学; 红花; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-2074-09

Pharmacological network-based study on quality control of *Carthamus tinctorius* L. for safflower injection

HU Xiao-ru¹, ZHENG Hai-rong², DANG Hai-xia³, HU Qin², KANG Shuai¹,
DAI Zhong^{1*}, MA Shuang-cheng^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 3. Research Center of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: We determined a component-target-disease network for *Carthamus tinctorius* L. and the key compounds, identified by topological analysis, were related to vasculitis, coronary heart and cerebrovascular disease. Based on these compounds, the chromatographic fingerprint of *Carthamus tinctorius* L. was established. Firstly, 132 compounds were obtained from TCMID and TCMSP databases. Their targets were predicted in the PharmMapp and HemMapper databases. CardioGenBase, Therapeutic Target Database and DisGeNET databases were used to collect targets of vasculitis, coronary heart disease and cerebrovascular disease. The corresponding relationships between component and target protein were established by mapping. Finally, the "component-target-disease" network was built with Cytoscape software. The core network and key nodes were analyzed with the Cytohubba plug-in. The results showed that the 24 key compounds were alpha-tocopherol, adenosine, quinone

收稿日期: 2019-06-01; 修回日期: 2019-08-09.

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-JIN-44).

*通讯作者 Tel: 86-10-67095150, E-mail: daizhong@nifdc.org.cn; mashuangcheng@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0432

chalcone pigments such as hydroxysafflor yellow A, safflower yellow, quercetin, kaempferol and other flavonoids, organic acids such as stearic acid, linolenic acid, coumaric acid and cinnamic acid. This resulting chromatographic fingerprint of *Carthamus tinctorius* L. showed good consistency, and the core chemical compounds obtained by topological analysis of the network of "component-target-disease", could be used as quality control markers. Our research provides a new approach for the identification of quality control indicators in Chinese medicinal materials.

Key words: network pharmacological; *Carthamus tinctorius* L.; fingerprint; quality control

随着现代分析仪器的发展与进步, 中药质量控制指标的选择成为中药质量控制的核心问题。目前较为普遍的研究方法是采用体内外药理实验对中药中化学成分的生物活性进行测定, 依据测定的结果选择合适的质控指标。但是目前传统的药理实验主要基于某一疾病模型进行药理药效的评价, 而中药多成分、多靶点, 在临床上“一药多用”的现象较为普遍, 那么选择单一药理模型进行中药材质控指标的评价就有待商榷。

网络药理学是2008年Hopkins^[1]在 *Nat Chem Biol* 杂志上首次明确提出的新概念, 是从系统生物学和生物网络平衡的角度阐发疾病的发生发展过程, 从改善、恢复生物网络平衡的整体观认识药物和集体的相互作用^[2]。通过“疾病-靶点-药物”网络分析, 系统分析药物与疾病的联系, 阐释多分子药物协同作用于人体的机制, 这与中药多成分、多途径、多靶点协同作用的原理不谋而合, 亦成为新药研发理论方法的一个研究热点^[3,4]。目前中国学者也开展了中药网络药理学的相关研究, 主要通过网络药理学对化学成分、靶点和疾病之间进行数据分析、挖掘和关联, 对中药复方化学成分与临床疾病的机制进行探讨, 通过研究一方面揭示了疾病与疾病之间的共有靶点和通路, 另一方面对药物治疗相关疾病的机制进行了预测^[5,6]。基于上述研究作者提出采用网络药理学的方法, 建立中药化学成分、作用靶点和临床多种疾病网络, 依据数学分析结果寻找与多疾病作用靶点相关的核心化学成分, 并结合质控指标选择的原则, 进而选择基于“一药多效”的中药质控指标。此方法基于多成分、多靶点和多疾病的网络分析, 寻找能够作用于多种疾病靶点的核心化学成分, 对中药质控指标的选择, 尤其是具有“一药多效”的中药材质控指标选择提供新的方法和思路。

红花是菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的管状干燥花, 性温、味辛, 归心、肝经, 具有活血化瘀、通经止痛的功效。红花注射液是以红花药材水提醇沉后制得中药制剂, 在临床上主要用于闭塞性心脑血管疾病、冠心病、脉管炎3种疾病的治疗。目前红花药材的质控指标为羟基红花黄色素A和山柰酚, 未能全面体现红花注射液的内在质量, 所以开展了基于分子对接与网络药理学的红花“一药多效”核心质量控制指标的

研究, 目的是为了寻找红花中与红花注射液临床治疗疾病靶点相关的药效成分, 进而建立注射液用红花药材的质控方法。

材料和方法

红花“成分-靶点-疾病”网络的构建

红花化学成分的获取 从中国中药整合数据库TCMID数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid>)、传统中药系统药理学数据库TCMSP数据库 (<http://isp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 及相关文章^[7-9]中共收集到132个红花的化学成分。

验证靶点的收集 TCMSP数据库是检索中药成分最常用的数据库, 共收录了500味中药及30 069个中药所包含的化合物, 提供每个化合物的药代动力学性质相关数据, 主要包括口服生物利用度、类药性、小肠上皮通透性、药物半衰期、血脑屏障通透性、药物成药五原则、溶解度等, 并提供活性分子的靶点、疾病信息。以单味药名称“Honghua”为关键词搜索红花化学成分及其验证靶点, 共得到183个验证靶点。TCMID数据库包含更多中药和靶点信息, 并且整合多个数据库, 包括TCM@Taiwan、TCM-ID、HIT、BOOK数据库, 共计收录8 159味中药及43 413个化合物, 数据信息更全面。以单味药拼音“Honghua”为关键词搜索红花化学成分和验证靶点, 共得到2 347个验证靶点。TCMSP数据库与TCMID数据库所得到的靶点进行合并后, 共得到2 442个验证靶点。

预测靶点的收集 将检索到的132个红花化学成分分别输入到PubChem Project数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 以SDF格式导出化合物结构, 并将SDF格式文件导入PharmMapper数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/index.php>) 和ChemMapper数据库 (<http://lilab.ecust.edu.cn/chemmapper/index.html>) 得到化合物的预测靶点。PharmMapper数据库和ChemMapper数据库都是基于配体结构特征预测化合物靶点, 得分越高说明该蛋白是化合物靶点的可能性越大, 选择匹配得分(Fit Score)>3的靶点, 共得到480个预测靶点。ChemMapper数据库是采用随机游走算

法以配体 2D 和 3D 结构相似性预测化合物靶点, 本实验中选择 3D 相似性, 相似度阈值>3.0 共得到 738 个预测靶点。合并后共得到 596 个靶点。

疾病靶点的收集 根据红花注射液在临床上主要应用于冠心病、脑血管疾病和脉管炎的治疗。从 CardioGenBase 数据库 (www.cardiogenbase.com)、Therapeutic Target Database (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/>) 数据库以关键词“coronary artery disease”收集冠心病相关靶点, 去掉重复靶点后共得到 1 679 个相关基因。从 CardioGenBase 数据库 (www.cardiogenbase.com) 以关键词“cerebrovascular disease”收集脑血管疾病相关基因共 243 个。从 DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/>) 以关键词“angeitides”收集脉管炎相关基因共 136 个。

红花“成分-靶点-疾病”网络分析 对所收集到的疾病-靶点数据合并, 去除冗余数据后得到 2 061 个疾病-靶点数据与 8 097 个化合物-靶点数据进行映射得到化合物-靶点-疾病数据, 导入 Cytoscape3.6.1 软件, 构建红花“化学成分-靶点-疾病”网络。借助 Network Analyzer 插件对已构建的网络进行拓扑学分析, 计算网络拓扑参数。采用 Cytohubba 插件对核心网络进行分析, 并对节点的属性进行排名。

红花指纹图谱的构建

药品与试剂 羟基红花黄色素 A 对照品 (批号 111637-201810)、腺苷 (批号 110879-201703)、鸟苷 (批号 111977-201501)、紫丁香苷 (批号 111574-201605)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖-7-*O*- β -*D*-龙胆双糖 (批号 111854-201704)、6-羟基山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (批号 112007-201602)、4-香豆酸 (批号 112037-201801) 和山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷 (批号 112007-201602), 均购自中国食品药品检定研究院。山柰酚-3-*O*- β -*D*-槐糖苷 (B21127)、脱水红花黄色素 B (B24457) 和红花红色素 (B24709), 均购自上海源叶生物科技有限公司; 8(*Z*)-癸

烯-4, 6-二炔-1-*O*- β -葡萄糖苷和 *N*1,*N*5,*N*10-(*E*)-三-对香豆酰基亚精胺由山西大学提供。实验用水均为超纯水, 乙腈为色谱纯 (186341), 购自 Fisher Chemical 公司; 三氟乙酸 (S4741160711) 购自 Merck 公司; 甲醇 (10014118) 购自国药集团化学试剂有限公司。22 批红花药材来自新疆基地, 见表 1。

仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪 (Waters 公司, 美国), Empower 数据处理系统 (Waters 公司, 美国), Agilent 1200-6410B QQQ 三重四极杆质谱联用仪 (Agilent 公司, 美国), Masshunter 数据处理系统 (Agilent 公司, 美国), MiLLi-Q 超纯水处理系统 (美国 MiLLipore 公司), KQ-300DA 型数控超声波清洗仪 (中国昆山市超声仪器有限公司), Mettler XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)。

色谱条件 色谱柱为 Waters SymmetryshieLd™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C。流动相 A: 0.05% 三氟乙酸溶液, 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱: 0~15 min 2%~12% B; 15~35 min 12%~23% B; 35~40 min 23% B; 40~48 min 23%~32% B, 48~75 min 32%~42% B; 75~76 min 42%~54% B; 76~80 min 54%~65% B; 80~90 min 65% B; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μ L, 检测波长 270 nm 和 475 nm。

质谱条件 采用 ESI 电喷雾离子化源, MS² Product 正离子检测模式进行定性检测, 正离子模式, 脱溶剂气流速 9.0 L·min⁻¹, 脱溶剂气温 350 $^{\circ}$ C (氮气), 分流比为 1:2。

对照品溶液的配制 取羟基红花黄色素 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得。

供试品溶液的配制 取红花药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 超声处理 (功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再次称重, 用 75% 甲醇补足失重, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取续滤液即得。

Table 1 Sample information of *Carthamus tinctorious*

No.	Medicinal origin	No.	Medicinal origin
S5	Tuoli County, Tacheng, Xinjiang	S22	Jiagesitai Village, Chabuchaer County, Yili, Xinjiang
S6	Yumin County, Tacheng, Xinjiang	S23	Hainuke Village, Chabuchaer County, Yili, Xinjiang
S7	Tacheng, Xinjiang	S24	Nuke Village, Chabuchaer County, Yili, Xinjiang
S8	Tacheng, Xinjiang	S25	Chabuchaer County, Yili, Xinjiang
S9	Tacheng, Xinjiang	S26	Huocheng County, Yili, Xinjiang
S10	Tacheng, Xinjiang	S28	Nileke County, Yili, Xinjiang
S11	Tacheng, Xinjiang	S29	Jimusaer County, Changji, Xinjiang
S12	Tacheng, Xinjiang	S30	Yining County, Yili, Xinjiang
S13	Tacheng, Xinjiang	S31	Jimusaer County, Changji, Xinjiang
S17	Kuohongqi Village, Chabuchaer County, Yili, Xinjiang	S32	Jimusaer County, Changji, Xinjiang
S21	Kan Village, Chabuchaer County, Yili, Xinjiang	S33	Gongliu County, Yili, Xinjiang

化合物中的关键节点除了 α -生育酚和腺苷之外,包括红花黄色素A、saffloryellow、羟基红花黄色素A、槲皮素等黄酮类,月桂酸、亚麻酸、4-香豆酸等有机酸类和佛手柑内酯补骨脂素等香豆素类成分,这些节点在自由度、接近中心性、介数和平均最短路径中均获得很高排名,见表3。表明红花注射液所含的上述化学成分能和较多的闭塞性心脑血管疾病、冠心病、脉管炎3种疾病相关的蛋白靶点结合,具有潜在的药理作用,其中羟基红花黄色素A能与117个蛋白靶点结合。根

据自由度排名前6的靶点为环加氧酶2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、一氧化氮合酶2 (nitric oxide synthase 2, NOS2)、雌激素受体1 (estrogen receptor, ESR1)、一氧化氮合酶3 (nitric oxide synthase 3, NOS3)、环加氧酶1 (prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1)、乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, ACHE), 其中环加氧酶2、雌激素受体1、一氧化氮合酶3和乙酰胆碱酯酶在自由度、接近中心性、介数和平均最短路径中均获得很高排名,被认为是红花治疗脉管炎、冠心病和心脑血管

Table 2 The ingredients- targets-disease related network topology parameters of *Carthamus tinctorius* L.

Argument	Ingredient-target	Argument	Ingredient-target
Clustering coefficient	0.0	Number of nodes	714
Connected components	1	Number of edges	3 245
Network diameter	5	Network density	0.013
Network radius	3	Network heterogeneity	2.88
Network centralization	0.78	Isolated nodes	0
Shortest paths	509 082 (100%)	Number of self-loops	0
Characteristic path length	2.359	Multi-edge node pairs	0
Avg. number of neighbors	9.09	–	–

Table 3 The key nodes of compounds in ingredients-targets-disease network of *Carthamus tinctorius*

Class	Compound	Code	Average shortest path length	Betweenness centrality	Closeness centrality	Degree
Flavonoid	Safflower yellow A	HH094	2.499	2.15×10^{-2}	0.4	126
	Saffloryellow	HH093	2.533	1.69×10^{-2}	0.395	118
	Hydroxysafflor yellow A	HH054	2.547	1.58×10^{-2}	0.393	117
	Quercetin	HH090	2.698	6.90×10^{-3}	0.371	67
	Kaempferol	HH058	2.743	3.30×10^{-3}	0.365	45
	Apigenin	HH028	2.805	1.61×10^{-3}	0.357	32
	Luteolin	HH064	2.816	1.47×10^{-3}	0.355	30
	Onjixanthone I	HH077	2.842	9.67×10^{-4}	0.352	27
	Myricetin	HH068	2.822	8.80×10^{-4}	0.354	21
Organic acids	Lauric acid	HH059	2.67	1.25×10^{-2}	0.374	68
	Stearic acid	HH099	2.69	9.44×10^{-3}	0.372	62
	Linolenic acid	HH062	2.72	7.66×10^{-3}	0.368	59
	Isovaleric acid	HH057	2.87	1.32×10^{-3}	0.348	28
	4-Coumaric acid	HH040	2.84	8.81×10^{-4}	0.352	24
	Oleic acid	HH076	2.84	1.06×10^{-3}	0.353	21
	Cinnamic acid	HH038	2.86	8.16×10^{-4}	0.35	21
	Dehydroshikimic acid	HH044	2.93	9.12×10^{-4}	0.341	21
	Coumarins	Bargapten	HH031	2.71	3.38×10^{-3}	0.369
Psoralene		HH088	2.71	3.53×10^{-3}	0.369	48
8-Hydroxy-5-methoxypsoralen		HH022	2.74	2.37×10^{-3}	0.366	45
Xanthotoxol		HH111	2.74	2.41×10^{-3}	0.365	46
Demethylfuroptarinine		HH045	2.76	1.80×10^{-3}	0.362	38
Umbelliferone		HH109	2.77	1.77×10^{-3}	0.361	37
Isopimpinellin		HH056	2.81	8.61×10^{-4}	0.356	25
Alloimperatorin		HH025	2.86	5.64×10^{-4}	0.349	24
Sterols	Stigmasterol	HH101	2.81	1.13×10^{-3}	0.357	25
Alkaloids	Rutecarpine	HH091	2.78	2.69×10^{-3}	0.36	33
	3-Formylindole	HH016	2.79	1.68×10^{-3}	0.359	32
Others	α -Tocopherol	HH113	2.30	7.29×10^{-2}	0.435	216
	Adeninucleoside	HH024	2.47	3.86×10^{-2}	0.405	142
	Myristicin	HH070	2.79	3.62×10^{-3}	0.359	44
	Benzothiazole	HH032	2.77	2.05×10^{-3}	0.361	37
	Carvacrol	HH037	2.83	1.99×10^{-3}	0.354	31
	1,2,3-Trimethoxy-5-methyl benzene	HH010	2.84	7.30×10^{-4}	0.352	26
	4-Hydroxyacetophenone	HH019	2.84	8.96×10^{-4}	0.352	25

疾病的关键作用靶点,见表4。一氧化氮合酶2和环加氧酶1的介数排名靠后外,可能是在局部网络中具有重要作用的靶点。

2 红花指纹图谱

2.1 样品分析

根据上述拓扑分析的结果,核心化学成分包括羟基红花黄色素A、saffloryellow等醌式查耳酮色素类,槲皮素、山柰酚等黄酮类,硬脂酸、亚麻酸、4-香豆酸和肉桂酸等有机酸,佛手柑内酯等香豆精类和腺苷等成分,所以红花药材的质量控制指标不能仅局限于一种或者一类成分。依据红花注射液的制法工艺,并结合拟定的中药质控指标选择原则:药理活性明确、化学成分的可测性和化学成分具有一定的代表性,开展以腺苷、羟基红花黄色素A、槲皮素、山柰酚、4-香豆酸等成分为质控指标的质控方法研究。结合中药指纹图谱可

同时对多类型多成分进行表征的特点,采用指纹图谱的方法开展红花药材质控方法的研究,以期通过指纹图谱对红花“化学成分-靶点-疾病”网络药理学发现的红花核心化学成分进行质量控制。结合核苷类、醌式查耳酮色素类、黄酮类和有机酸类成分的极性大小分布和紫外吸收特点,开展色谱条件研究。采用上述指纹图谱构建方法对红花样品进行处理,以乙腈-三氟乙酸体系为流动相梯度洗脱,以270 nm和475 nm为检测波长,得到红花指纹图谱色谱图,见图2。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度 结果显示,在270 nm处相似度均值为0.99, RSD为0.20%;在475 nm处相似度均值为0.99, RSD为0.36%,表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性 结果显示,在270 nm处相似度均值为0.99,计算结果的RSD为0.20%;在475 nm处相似度均

Table 4 The key nodes of targets in ingredients-targets-disease network of *Carthamus tinctorius*

Shared	Uniprot	Target	Average shortest path length	Betweenness centrality	Closeness centrality	Degree
PTGS2	P35354	Prostaglandin G/H synthase 2	2.00	1.76×10^{-2}	0.50	64
NOS2	P35228	Nitric oxide synthase, inducible	2.04	1.23×10^{-2}	0.49	55
ESR1	P03372	Estrogen receptor	2.07	1.60×10^{-2}	0.48	54
NOS3	P29474	Nitric oxide synthase, endothelial	2.03	1.84×10^{-2}	0.49	53
PTGS1	P23219	Prostaglandin G/H synthase 1	2.05	1.04×10^{-2}	0.49	51
ACHE	P22303	Acetylcholinesterase	2.06	1.49×10^{-2}	0.49	49
DPP4	P27487	Dipeptidyl peptidase IV	2.07	1.60×10^{-2}	0.48	48
CDK2	P24941	Cell division protein kinase 2	2.11	7.58×10^{-2}	0.48	43
AR	P10275	Androgen receptor	2.09	5.45×10^{-3}	0.48	33
PPARG	P37231	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	2.12	7.90×10^{-3}	0.47	32
SCN5A	Q14524	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	2.12	5.27×10^{-3}	0.47	32

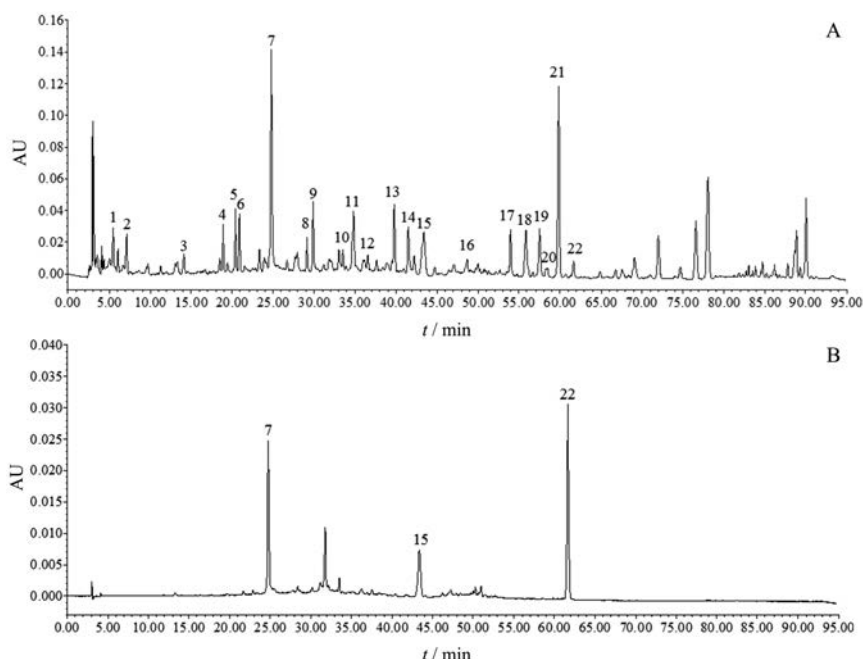


Figure 2 The HPLC fingerprint chromatogram of *Carthamus tinctorius*, fingerprint chromatogram of 270 nm (A), fingerprint chromatogram of 475 nm (B). The peak numbers were in accordance with Table 5

值为0.99计算结果的RSD为0.44%，表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性 结果表明，在270 nm处相似度均值为0.99，RSD为0.18%；在475 nm处相似度均值为0.94，RSD为0.50%，表明供试品溶液在16 h内稳定。

2.2.4 耐用性 结果3根柱子相似度分别为0.99、0.98和0.99，表明不同批次的色谱柱结果基本一致。分别采用Waters 2695和Agilent进行指纹图谱检测，相似度评价0.98和0.99，表明所建立的方法具有较好的耐用性。

2.3 核心化学成分归属

按照LC-MS条件进样，对所建立的指纹图谱色谱峰进行归属。结合色谱峰的质谱和紫外信息，通过与对照品比对，并结合化学成分的结构特点，对色谱图中

酰式查耳酮、核苷类和黄酮类成分的色谱峰进行归属，包括核苷类成分腺苷(峰1)、鸟苷(峰2)；酰式查耳酮类成分羟基红花红色素A(峰7)、脱水红花黄色素B(峰15)和红花红色素(峰22)；黄酮类成分山柰酚-3-*O*- β -*D*-槐糖苷(峰12)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖-7-*O*- β -*D*-龙胆双糖苷(峰5)和山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷(峰14)等；以及有机酸类成分4-香豆酸(峰12)，除此之外还有紫丁香苷、8(*Z*)-癸烯-4,6-二炔-1-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和*N*1,*N*5,*N*10-(*E*)-三-对香豆酰基亚精胺及其4个同分异构体，见表5^[10-15]。通过指纹图谱中上述色谱峰峰面积的大小和比例反映羟基红花黄色素A、腺苷等核心指标性成分的含量情况，进而对药材的整体质量情况进行控制。

Table 5 Identification of peaks in the HPLC fingerprint. *Verified by reference substance

Peak	t_R	Ultraviolet (UV)	Molecular ion	Fragment ion	Compound	Fragmentor	Collision voltage	Reference
1	5.38	205, 262	267.9[M+H] ⁺	135.8	Adenosine*	100	10	[10]
2	7.04	255, 280	283.9[M+H] ⁺	152.1	Vernine*	100	10	[11]
3	17.07	220, 275	205.0[M+H] ⁺	188.3, 146.1, 117.7	Tryptophan	100	5	
4	18.7	220, 265	395[M+H] ⁺	232.3, 364.5	Syringin*	150	20	[12]
5	20.2	228, 270, 340	789.5[M+H] ⁺	627.5, 465.4, 303.3	Quercetin-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucose-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -gentiobioside*	150	12	
7	23.9	230, 400	612.9[M+H] ⁺	451.1, 433.0, 396.9, 355.1, 331.1	Hydroxysafflor yellow A*	100	10	[13]
8	28.7	230, 240, 340	772.7[M+H] ⁺	626.7, 465.0, 302.5	Quercetin-triglucose or 6-hydroxykaempferol-triglucose	100	15	[13]
9	29.52	230, 270, 340	626.9[M+H] ⁺	465.0, 302.5	Quercetin-3,6-diglucoside or 6-hydroxykaempferol-3,6-diglucoside	50	12	[13]
10	33.18	270, 333	610.9[M+H] ⁺	464.7, 303.0, 146.9	6-Hydroxykaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	100	8	[13]
11	34.44	277, 337	464.8[M+H] ⁺	402.9, 303.1, 96.9, 85.0	6-Hydroxykaempferol-glucoside	100	10	[13]
12	36.21	200, 265, 245	610.7[M+H] ⁺	286.9, 126.7	Kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -sophoroside*	100	3	[12]
12	36.21	265, 345	165[M+H] ⁺	146.8	4-Coumaric acid (coefflux)*	100	10	[12]
13	39.42	270, 340	625.0[M+H] ⁺	479.0, 316.8	6-Methoxykaempferol- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	100	5	[13]
14	41.11	265, 350	595.0[M+H] ⁺	448.8, 286.8, 128.9	Kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinoside*	100	5	[13]
15	42.61	244, 406	1 045.0[M+H] ⁺	883.7, 721.0, 312.8, 433.2	Anhydrosafflor yellow B*	150	15	[14]
16	48.67	210, 240, 252, 267, 282	311.0[M+H] ⁺	149	8(<i>Z</i>)-decene-4,6-diyne-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside*	100	5	[12] [15]
17	53.80	230, 270	583.8[M+H] ⁺	438.2, 420.3, 275.0, 203.9, 147.1	Isomers of <i>N</i> 1, <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumarinyl spermidine	150	15	[15]
18	55.70	230, 278	583.8[M+H] ⁺	437.9, 420.2, 275.0, 292.5	Isomers of <i>N</i> 1, <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumarinyl spermidine	150	15	[15]
19	57.31	230, 278	584.4[M+H] ⁺	438.2, 420.3, 146.6, 203.7	Isomers of <i>N</i> 1, <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumarinyl spermidine	150	15	[15]
20	58.09	230, 290	583.5[M+H] ⁺	438.2, 419.9, 275.1	Isomers of <i>N</i> 1, <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumarinyl spermidine	150	15	[15]
21	59.63	225, 296	584.3[M+H] ⁺	438.2, 420.2, 275.2, 203.6, 147.0	<i>N</i> 1, <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-(<i>E</i>)-tri- <i>p</i> -coumarinyl spermidine*	150	15	[14]
22	66.10	243, 375, 520	910[M+H] ⁺	250.1, 320.4, 375.3	Carthamine*	150	15	[13]

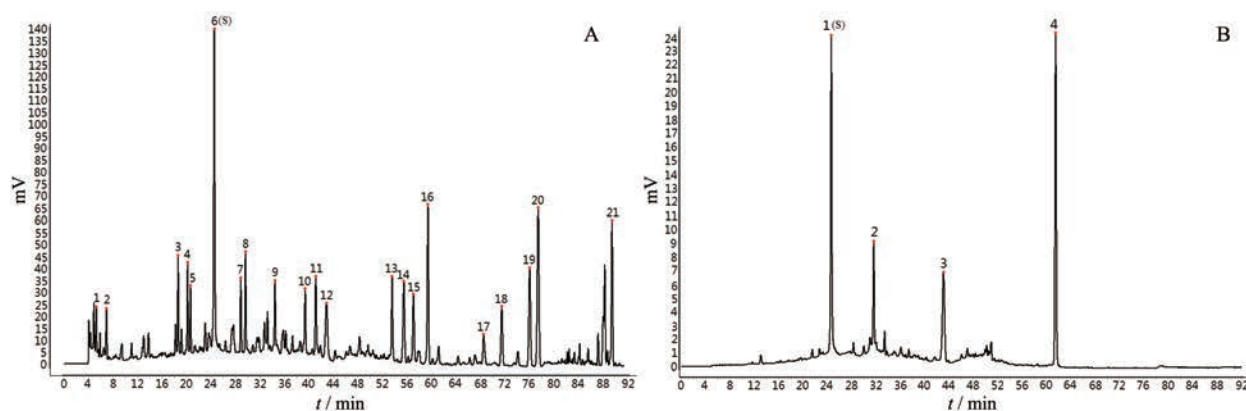


Figure 3 Reference fingerprint of *Carthamus tinctorios*. Reference fingerprint chromatogram of 270 nm(A) and reference fingerprint chromatogram of 475 nm(B). The peaks with different numbers of tags were the common peaks

2.4 相似度评价

采用国家药典委员会相似度评价软件对所收集到的红花药材进行相似度评价。首先建立通过上述方法对红花注射液基地 10 批红花药材进行分析,生成红花药材对照谱图,其中 270 nm 下有 21 个共有色谱峰,包含有核苷类成分、黄酮类、亚精胺类成分; 475 nm 下有 4 个共有峰,主要体现是红花药材中色素类成分,对照图谱见图 3。对所收集的 22 批样品色谱图进行色谱分析,以上述对照图谱进行相似度计算,结果大部分红花药材色谱图中共有峰的峰面积和比例基本一致,270 nm 和 475 nm 下结果均大于 0.9,表明新疆基地红花药材质量较为稳定,见表 6。

Table 6 Similar result of fingerprint of *Carthamus tinctorios*

No.	Similarity		No.	Similarity	
	475 nm	270 nm		475 nm	270 nm
S5	0.98	0.93	S22	0.97	0.98
S6	1.00	0.96	S23	1.00	0.98
S7	1.00	1.00	S24	1.00	0.98
S8	1.00	0.98	S25	1.00	1.00
S9	1.00	1.00	S26	1.00	0.99
S10	0.99	0.99	S28	0.99	0.99
S11	0.99	1.00	S29	0.98	0.98
S12	1.00	0.99	S30	1.00	0.97
S13	0.99	0.99	S31	0.98	0.97
S17	0.99	0.99	S32	1.00	0.97
S21	0.98	0.97	S33	1.00	0.92

讨论

在采用网络药理学方法选择质量控制指标的研究中,本文利用 TCMSP、TCMID、ChemMapper、PharmMapper 数据库收集红花药材中的化合物及其靶点,利用 CardioGenBase、Therapeutic Target Database 和 DisGeNET 数据库收集冠心病、脑血管疾病和脉管炎的靶点,采用 Cytoscape 软件构建红花“化合物-靶点-疾病”网络。在所建的红花“化合物-靶点-疾病”网络

中关键化学成分节点是醌式查耳酮色素、黄酮和有机酸类等成分,与 PTGS2、NOS2、ESR1、NOS3、PTGS1 和 ACHE 等靶点均具有潜在的结合作用。这些靶点与活性氧簇生物合成,细胞脂质应答反应,调控血管直径,氧化压力应答,正向调节脂质的代谢和负性调节急性炎症反应等生物过程相关,这与红花注射液具有抑制内皮素和血栓素,提高 NO 和前列环素的作用^[6],其主要的活性成分羟基红花黄色素 A 具有显著的抗血小板活化因子诱导的血小板聚集作用,有效改善大鼠心肌线粒体损伤的研究相一致^[17,18]。

在上述研究的基础上,选择黄酮类成分、醌式查耳酮类和有机酸类成分作为红花注射液剂生产用红花药材的质控指标。结合上述成分类型的特点,采用 270 nm 和 475 nm 作为检测波长,针对中低等极性的化学成分开展色谱分离,建立尽可能反映上述关键化学成分节点的红花药材指纹图谱方法,并对所收集到的 22 批次红花药材进行检测。通过上述研究,本文基于网络药理学的研究方法,从药材化学成分和疾病出发构建药材“化合物-靶点-疾病”网络,通过拓扑学分析方法获取核心化学成分并作为质控指标,在此基础上开展中药质量控制方法的研究,较好的彰显了中药一药多治和多靶点的特点,为中药材的质控指标研究提供了新的研究思路。

本文基于红花“化合物-靶点-疾病”网络的研究结果筛选出红花药材的核心化学成分,将其作为质控指标应用于注射液用红花药材的质量控制研究。研究工作一方面对从疾病靶点出发选择中药质控指标的研究思路进行了有益的探索,通过网络药理学建立了中药临床应用和化学成分的联系,进而建立基于临床疾病相关的中药质控方法;另一方面,网络药理学是可基于多种疾病靶点构建网络,这与中药“一药多治”的特点十分契合,从网络分析数据中可挖掘出作用于多种疾

病靶点的化学成分,可从一定程度上弥补实验药理学药效评价单一的问题。

目前关于采用网络药理学开展中药质量控制指标的研究可能主要存在两个弊端。其一,网络药理学本身是基于文献和数据库,拓扑学分析的核心成分是在整个网络中连通性和紧密性方面都占据主要地位的成分,所以作用靶点研究较为充分的化学成分,且与相关疾病靶点存在直接或者间接的联系,在网络中更易成为重要节点,但某些结构类型新颖由于相关研究较少,几乎不可能成为重要节点。其二,由于网络药理学中关键节点的判断是依据节点在整个网络中的重要性,强调的是化学成分作用的靶点多与少,所以网络药理学不能体现化学成分生物活性作用的强弱,只能体现成分在疾病相关的作用靶点的重要性。当然评价化学成分生物活性首先是基于单一药效模型的研究,而人体本身就是一个复杂的综合体,中药的特点本身就是多靶点作用,仅仅依赖单一药效评价其作用强弱可能存在局限性。

任何一个技术和方法的发展和运用都会存在一定的问题。在本研究中,基于网络药理学分析得到化学成分建立相应的质控方法,但是在实际色谱分离中存在某些化学成分含量低、色谱分离困难等问题,而前处理的方法不够专属,导致所建立的指纹图谱只能反映部分目标化学成分,所以还需要进一步研究。目前网络药理学在中药质量控制方面的研究还仅仅是局限于化学成分指标选择的领域,但网络药理学作为一种基于文献的药理学数据分析和计算,其还可对与疾病相关的关键靶点进行挖掘,结合这些研究结果可以开展相关的活性评价研究,为中药质量控制的研究提供新的研究内容和方法,还有大量的工作去研究和探讨。

致谢: 山西大学张立伟教授和中国医学科学院药用植物研究所刘海涛研究员对本项工作给予大力支持。

References

- [1] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4: 682-690.
- [2] Zhou WX, Cheng XR, Zhang YX. Network pharmacology-a new philosophy for understanding of drug action and discovery of new drugs [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2012, 26: 4-9.
- [3] Yao X, Hao H, Li Y, et al. Modularity-based credible prediction of disease genes and detection of disease subtypes on the phenotype-gene heterogeneous network [J]. BMC Syst Biol, 2011, 5: 79.
- [4] Zhao J, Jiang P, Zhang W. Molecular networks for the study of TCM Pharmacology [J]. Brief Bioinform, 2010, 11: 417.
- [5] Liu ZQ, Wang BL. Predict "multi-efficacy of one formula" molecular mechanism of Erniaowan based on network pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 170-180.
- [6] Shi HL, Feng XS, Ma XJ, et al. Pharmacological network-based study on interventional mechanism of Gu-Chang-Zhi-Xie pills for treatment of irritable bowel syndrome [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 482-493.
- [7] Li XF. Chemical Constituents and Quality Control of Safflower Injection (红花注射液物质基础及质量控制研究) [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [8] Jiang JS. Studies on the Chemical Constituents and Bioactivities of *Carthamus tinctorius* L. (红花化学成分及生物活性研究) [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2008.
- [9] Zhao JF. Studies on the Bioactive Components and Quality Standards of Safflower Injection (红花注射液生物活性成分及质量标准研究) [D]. Beijing: National Institute of Food and Drug Control, 2014.
- [10] Wang RQ, Yang B, Fu MH. Quality evaluation of Flos Carthami [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2008, 33: 2642-2646.
- [11] Hu XR, Sun L, Dai Zh, et al. Nucleosides in Safflower injection by LC-MS and UPLC [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2013, 48: 1022-1026.
- [12] Zhao JF, Liu J, Guo Y, et al. Chemical constituents from Safflower injection and their bioactivity [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 3102-3106.
- [13] Hu XJ, Yin Sh, Yuan TT, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of *Carthamus tinctorius* L. [J]. J Pharm Pract (药学实践杂志), 2013, 31: 161-169.
- [14] Si W, Yang WZh, Guo DA, et al. Selective ion monitoring of quinochalcone C-glycoside markers for the simultaneous identification of *Carthamus tinctorius* L. in eleven Chinese patent medicines by UHPLC/QTOF MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117: 510-521.
- [15] Yuan MY, Li SF, Zhang LW. Isolation and purification of coumaroyl spermidines from *Carthamus tinctorius* L. and their inhibition effects on [3H]-5-HT reuptake [J]. J Shanxi Med Univ (山西医科大学学报), 2015, 46: 442-447.
- [16] Sun YP, Yang JF, Li W. Clinical observations of the protective effect of carthamus flower (Honghua sodium) on the vascular endothelium in hypertensive disease [J]. Shanghai Med J (上海中医药大学学报), 2002, S1: 50-52.
- [17] Xu L, Dong Z. Effects of HSYA injection on platelet the content of PAF induced GMP-140 aggregation, ultrastructure and in PRP in rabbits [J]. Chin J Clin Pharm Ther (中国临床药理学与治疗学), 2012, 17: 269-273.
- [18] Wu W, Li JR, Pu YZ, et al. Inhibitory effect of hydroxysafflor yellow A against rat myocardial mitochondrial injury [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 16: 1225-1227.