

## 基于化学模式识别和网络药理学预测枳实潜在质量标志物

李 灿<sup>1,2</sup>, 曾 娟<sup>1,2</sup>, 龙雨青<sup>1,2</sup>, 曾 梅<sup>1,2</sup>, 周新茹<sup>1,2</sup>, 杨 敏<sup>1,2</sup>, 周伊昀<sup>3</sup>, 周日宝<sup>1,2,4</sup>, 刘湘丹<sup>1,2,4</sup>

(湖南中医药大学 1 药学院, 2 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点实验室, 长沙 410208;

3 湖南华夏湘众有限公司, 安仁 423600; 4 湖南中医药大学湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208)

**[摘要]** **目的:** 本文基于 HPLC 指纹图谱、化学模式识别、质量标志物“五原则”和网络药理学, 分析预测枳实药材潜在质量标志物(Q-Marker)。**方法:** 运用高效液相色谱法建立枳实指纹图谱; 利用 OPLS-DA 筛选共有峰组间主要差异成分; 利用网络药理学方法构建差异成分“活性成分-靶点-通路”网络, 进一步佐证其作为枳实药材潜在 Q-Marker 的合理性。**结果:** 建立了 22 批枳实药材指纹图谱, 确认了 36 个共有峰; 经 OPLS-DA 分析, 筛选出柚皮苷和新橙皮苷 2 个差异成分; 通过网络药理学佐证了柚皮苷和新橙皮苷可作为枳实药材潜在 Q-Marker。**结论:** 建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可行, 筛选的柚皮苷和新橙皮苷 2 个差异成分可作为枳实潜在 Q-Marker, 为枳实药材质量控制和药效机制研究提供了参考。

**[关键词]** 枳实; 质量标志物; 指纹图谱; OPLS-DA; 网络药理学; 柚皮苷; 新橙皮苷

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)12-1243-10

## Prediction of potential quality markers of Aurantii fructus immaturus based on chemical pattern recognition and network pharmacology

LI Can<sup>1,2</sup>, ZENG Juan<sup>1,2</sup>, LONG Yu-qing<sup>1,2</sup>, ZENG Mei<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin-ru<sup>1,2</sup>, YANG Min<sup>1,2</sup>,

ZHOU Yi-yun<sup>3</sup>, ZHOU Ri-bao<sup>1,2,4</sup>, LIU Xiang-dan<sup>1,2,4</sup>

(1 School of Pharmacy, 2 Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Bulk Authentic Medicinal Materials, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3 Hunan Huaxia Xiangzhong Co., Ltd., Anren 423600, China; 4 Hunan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization Research in Colleges and Universities, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyse and predict the potential quality markers of Aurantii fructus immaturus which based on HPLC fingerprint, chemical pattern recognition, the “Five Principles” of quality markers and network pharmacology. **Methods:** The fingerprint of Aurantii fructus immaturus was established by HPLC; OPLS-DA was used to screen the main difference components among the common peak groups; the “active ingredient-

**[基金项目]** 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21); 湖南省现代农业产业技术体系项目; 湖南省科技厅中央引导地方项目(2020ZYQ045); 湖南省教育厅重点研究项目(20A383); 刘良院士工作站指导项目(21YS005); 农业农村部农产品加工重点实验室 农业农村部农产品质量安全收贮运管控重点实验室开放课题(S2020KFKT-17); 2020 年湖南省一流专业建设点: 中药资源与开发; 湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科学[2018]3 号)

**[作者简介]** 李灿, 女, 硕士生, 主要从事中药资源与质量评价研究。联系电话: (0731)88458233, E-mail: 1179819916@qq.com。

**[通讯作者]** 周日宝, 男, 博士, 教授, 主要从事中药资源与质量评价研究。联系电话: (0731)88458233, E-mail: 1057323510@qq.com。刘湘丹, 女, 博士, 副教授, 主要从事中药资源与质量评价研究。联系电话: (0731)88458233, E-mail: paeonia\_dd@126.com。

target-pathway” network of differential components was constructed by network pharmacology method to further support its rationality as potential quality makers (Q-Marker) of *Aurantii fructus immaturus*. **Results:** The fingerprints of 22 batches of *Aurantii fructus immaturus* were established, and 36 common peaks were identified. Two different components of naringin and neohesperidin were screened by OPLS-DA analysis. Network pharmacology confirmed that naringin and neohesperidin can be used as potential Q-Markers of *Aurantii fructus immaturus*. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint method is stable and feasible, and the two differential components of naringin and neohesperidin screened can be used as potential Q-Markers of *Aurantii fructus immaturus*, which provided reference for the quality control and pharmacological mechanism research of *Aurantii fructus immaturus*.

**[Key words]** *Aurantii fructus immaturus*; quality marker; fingerprint; OPLS-DA; network pharmacology; naringin; neohesperidin

枳实为芸香科柑橘属植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 及其栽培变种或甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 的干燥果果<sup>[1]</sup>。主要分布在长江流域各省区和华南地区,目前商品药材主要有江枳实、湘枳实和川枳实等。

多来源、多产地等复杂情况导致中药材质量差异悬殊,给质量评价和标准制定带来许多难题<sup>[2]</sup>。基于此背景,2016年刘昌孝院士<sup>[3]</sup>提出中药质量标志物(quality markers, Q-Marker)概念,中药 Q-Marker 是存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质,需经过结构分析确定其化学结构,并可定性定量的特有化学成分。中药指纹图谱具有整体性和模糊性的特点,能反映中药材及其制剂内在质量的稳定性和均一性<sup>[4]</sup>。化学模式识别技术强调药材之间差异性,通过对指纹图谱数据信息整合和校正,进一步缩小药材活性成分的范围<sup>[5]</sup>。网络药理学不仅能够从网络层面观察中药对疾病的干预与影响,而且能对中药有效组分进行功效预测或对中药功效进行化学成分预测<sup>[6]</sup>。基于中药具有多成分、多靶点及多通路的特点,三者结合既能评估中药质量的优劣,也能分析中药质量的差异,评价更全面。

枳实化学成分主要为黄酮类、生物碱和挥发油<sup>[2]</sup>,其中生物碱类成分辛弗林为《中华人民共和国药典》收录的指标成分。随着中药 Q-Marker 的提出,单一化学成分难以全面反映药材整体质量,故本研究采用 HPLC 法建立枳实的指纹图谱,通过正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)对共有峰进行初步筛选,得到影响枳实质量的主要差异成分,并

进一步结合网络药理学验证差异成分作为枳实药材潜在 Q-Marker 的可行性,旨在为更全面控制枳实药材的质量及进行枳实作用机制研究提供参考依据。

## 材 料

### 1 仪器

Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ME204E/02 电子分析天平[瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Eco-S15 实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司); 中草药粉碎机(天津市泰式特仪器有限公司); BCD-452WDPF 冰箱(青岛海尔服务有限公司)。

### 2 数据库与软件

中药系统药理学数据库和分析平台 TCMSP (<http://tcmispw.com/tcmisp.php>)、String 网站 (<https://cn.string-db.org/>)、Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)、David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、Cytoscape 软件(版本号:3.9.0)、OpenBabel 软件(版本号:2.4.1)。

### 3 药品与试剂

对照品柚皮苷(批号:H24N9Z75896,纯度 $\geq 98\%$ )、新橙皮苷(批号:G10S11L123540,纯度 $\geq 98\%$ )均购自上海源叶生物技术有限公司; 甲醇(安徽天地高纯溶剂有限公司,色谱纯); 甲醇(国药集团化学试剂有限公司,分析纯); 冰醋酸(江苏强盛功能化

学股份有限公司,分析纯);磷酸二氢钾(广东光华科技股份有限公司,分析纯);十二烷基磺酸钠(上海源叶生物技术有限公司,纯度:97%);水为超纯水。

22份枳实药材,由湖南中医药大学周日宝教授鉴定为芸香科柑橘属植物酸橙及其栽培变种的干燥幼果。药材具体信息见表1。

表1 样品信息

编号	产地	编号	产地
S1	湖南湘潭	S12	湖南沅江
S2	湖南安仁	S13	湖南沅江
S3	湖南澧县	S14	湖南沅江
S4	湖南澧县	S15	湖南沅江
S5	湖南沅江	S16	江西新干
S6	湖南沅江	S17	湖南涟源
S7	湖南沅江	S18	浙江
S8	湖南沅江	S19	浙江
S9	湖南沅江	S20	湖南安仁
S10	湖南沅江	S21	湖南湘潭
S11	湖南沅江	S22	湖南湘潭

## 方法与结果

### 1 枳实指纹图谱研究

#### 1.1 色谱条件

采用 Supersil ODS-B100A 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-磷酸二氢钾溶液(B, 取磷酸二氢钾 0.6 g、十二烷基磺酸钠 1.0 g、冰醋酸 1 mL 加水溶解并稀释至 1 000 mL);采用梯度洗脱(0 ~ 5 min, 0 ~ 10% A; 5 ~ 10 min, 10% ~ 30% A; 10 ~ 20 min, 30% ~ 35% A; 20 ~ 31 min, 35% ~ 35% A; 31 ~ 50 min, 35% ~ 70% A; 50 ~ 60 min, 70% ~ 80% A; 60 ~ 70 min, 80% ~ 85% A);体积流量为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温 30 ℃;进样量 10 μL;检测波长 275 nm。

#### 1.2 供试品溶液制备

取 22 份枳实药材,粉碎后过四号筛,取粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,加热回流 1.5 h,冷却后补足损失重量,取上清液 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,

即得。

#### 1.3 对照品溶液制备

分别精密称取柚皮苷、新橙皮苷对照品适量,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为 12.2, 7.89 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,密封,低温避光保存,备用。

#### 1.4 方法学考察

**1.4.1 参照峰的选择** 各份枳实样品色谱图中新橙皮苷分离良好,峰形稳定,峰面积较大且为所有样品共有,故确定新橙皮苷为参照峰。

**1.4.2 精密度实验** 取 S8 号样品,按“1.2”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱图,测得 36 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.04% ~ 0.22%,相对峰面积的 RSD 在 0.15% ~ 2.77%,表明仪器精密度良好。

**1.4.3 重复性实验** 取 S8 号样品(6 份),每份精密称取 1 g,按“1.2”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下进样,记录色谱图,测得 36 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.03% ~ 0.20%,相对峰面积的 RSD 在 0.19% ~ 2.80%,表明该方法重复性良好。

**1.4.4 稳定性实验** 精密称取 S8 号样品 1 g,按“1.2”项下方法制备供试品溶液,在该项色谱条件下,分别于 0, 2, 6, 8, 12, 14, 16, 24 h 进样,记录色谱图,测得 36 个共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.03% ~ 0.54%,相对峰面积的 RSD 在 0.13% ~ 2.89%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

#### 1.5 枳实 HPLC 指纹图谱建立及分析

将 22 份枳实的色谱图依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》2012A 版,设置 S1 为参照图谱,对照图谱生成方法为中位数法,时间窗为 0.1 s,多点校正后进行全谱峰匹配,得到 22 份枳实样品的 HPLC 指纹图谱叠加图和对照图谱 R 见图 1,并得到 22 份枳实药材供试品色谱图与对照指纹图谱相似度,见表 2。结果表明共获得 36 个共有峰,通过比对色谱图和保留时间,指认 2 个共有峰:23 号峰为柚皮苷,24 号峰为新橙皮苷,见图 2。相似度结果显示 22 份枳实药材相似度在 0.931 ~ 0.998。

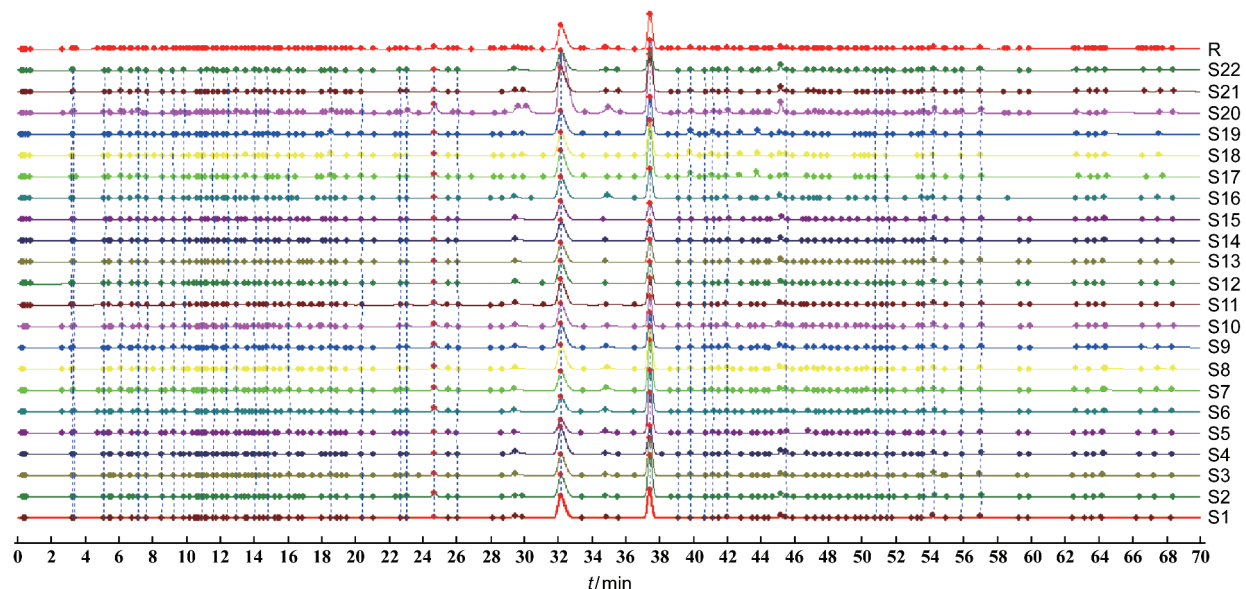
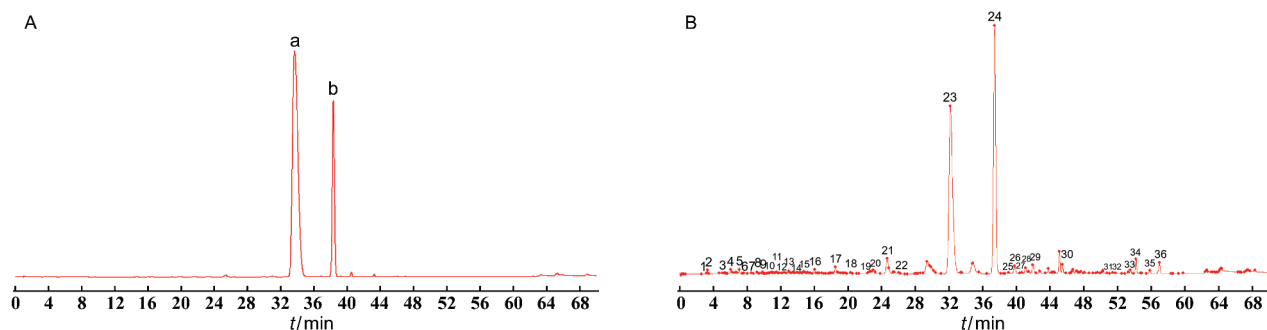


图 1 22 份样品 HPLC 指纹图谱叠加图



a: 柚皮苷 (共有峰 23); b: 新橙皮苷 (共有峰 24)

图 2 混合对照品色谱图(A)及指纹图谱共有模式图(B)

表 2 22 份样品相似度评价结果

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.996	S12	0.980
S2	0.989	S13	0.990
S3	0.995	S14	0.980
S4	0.985	S15	0.975
S5	0.933	S16	0.994
S6	0.938	S17	0.989
S7	0.957	S18	0.995
S8	0.995	S19	0.994
S9	0.999	S20	0.990
S10	0.994	S21	0.998
S11	0.984	S22	0.984

### 1.6 OPLS-DA 分析

为了更好地观察组间差异,本实验以 22 份枳实

药材中 36 个共有峰的峰面积为变量导入 SIMCA 多元变量统计软件,采用有监督模式识别方法进行了各组间的 OPLS-DA。结合评价 OPLS-DA 模型的 3 个指标:模型拟合参数  $R^2X=0.988, R^2Y=0.896$ , 模型预测参数  $Q^2=0.681, R^2$  代表模型的解释能力,  $Q^2$  代表模型的预测能力,模型中  $R^2$  和  $Q^2$  均  $>0.5$ , 表明数学模型构建成功,具有很好的拟合度和预测能力。OPLS-DA 得分矩阵图见图 3,结果显示 3 个产地枳实样品各自聚为一类;S16 聚为一类,S18 ~ S19 聚为一类,S1 ~ S15, S17, S20 ~ S22 聚为一类,说明不同产地的枳实药材质量存在差异。

为明确引起不同产地枳实质量差异的物质,结合各变量的 VIP (variable importance in the projection) 正态分布图见图 4,以 VIP 值  $>1$  为标准,筛选出贡献较大的 2 个变量。一般 VIP 值  $>1$  的变量为

组间样本的主要差异变量,且VIP值越大,表明该成分对组间差异的贡献越大。根据对照品指认结果,共有峰23为柚皮苷,共有峰24为新橙皮苷,其中柚

皮苷的VIP值为4.44752,新橙皮苷的VIP值为3.18141。说明这2个成分在区分不同产地不同批次枳实时起到重要作用,是枳实的主要标志性成分。

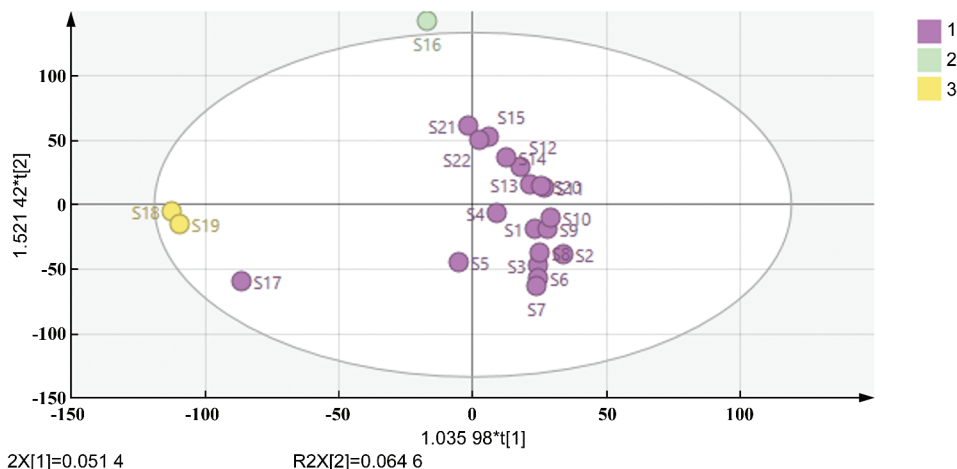


图3 22批枳实样品的OPLS-DA得分图

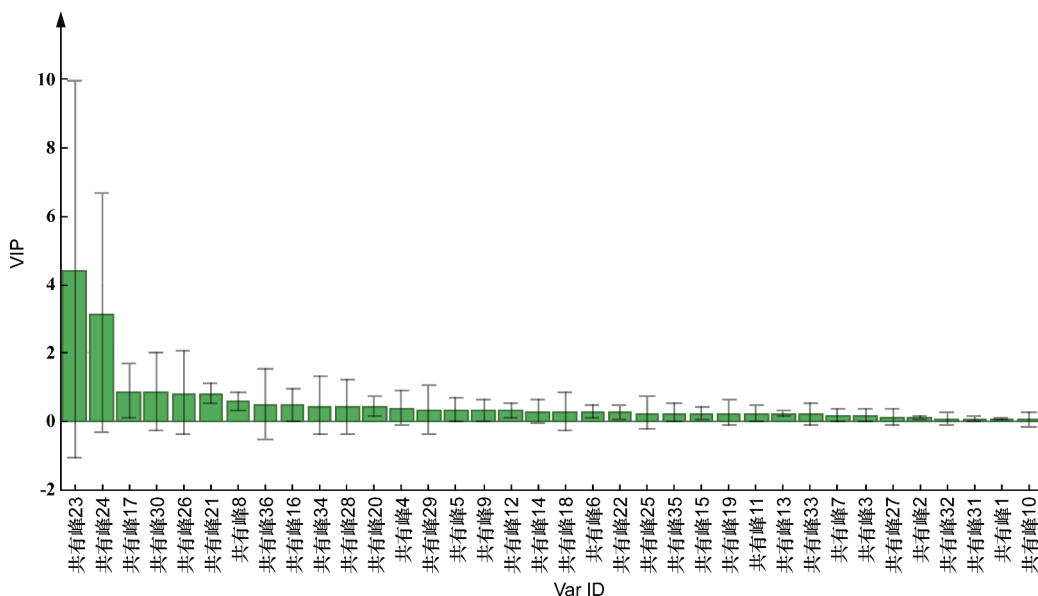


图4 枳实药材的重要性变量

## 2 成分-靶点-通路网络药理学分析

相关药动学研究报道表明,柚皮素和橙皮素分别为柚皮苷和新橙皮苷的苷元,且生物利用度比柚皮苷和新橙皮苷高,故本实验应用网络药理学对柚皮素、橙皮素、柚皮苷和新橙皮苷4个化学成分的相关靶点和通路进行分析。

### 2.1 中药靶点预测

通过中药系统药理数据库TCMSP对柚皮苷、

新橙皮苷、柚皮素和橙皮素进行化合物检索,相关信息见表3。通过PubChem Compound数据库进行搜索得到化合物3D结构的CID格式,应用OpenBabel 2.4.1软件转换成SMILES格式,将得到的化合物SMILES结构输入Swiss Target Prediction服务器进行靶点预测,得到上述4个化合物的作用靶点,筛去重复靶点,最终得到与其有关的作用靶点共146个。

表 3 枳实的 4 个化学成分信息

编号	化合物名称	口服生物利用度(OB)/%	类药性(DL)
MOL002341	橙皮素	70.31	0.27
MOL005812	柚皮苷	6.92	0.78
MOL004328	柚皮素	59.29	0.21
MOL013383	新橙皮苷	11.57	0.69

## 2.2 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络构建与关键靶标筛选

将上述 146 个潜在靶点基因导入在线 String11.5 网站,选择“Multiple proteins”模式,选择物种为“Ho-

mo sapiens”,蛋白交互参数评分值为“high confidence > 0.9”,隐藏网络中无联系的节点,其余参数设置不变,构建 PPI 网络。将 PPI 结果以 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.9.0 软件,制得蛋白相互作用网络可视化图,结果见图 5(节点大小代表度值大小),并利用软件中“Network Analyzer”功能进行拓扑属性分析筛选核心靶点,将度值 > 2 倍中位数值作为筛选条件,筛选得到 18 个核心靶点,分别为 MMP1, MMP9, AKR1C3, CCNA1, CDK5, CCNB1, CCNE1, CDK2, PLG, CYP3A4, CCNA2, ESR1, CDK4, CDK1, VEGFA, HRAS, PIK3CA, SRC。

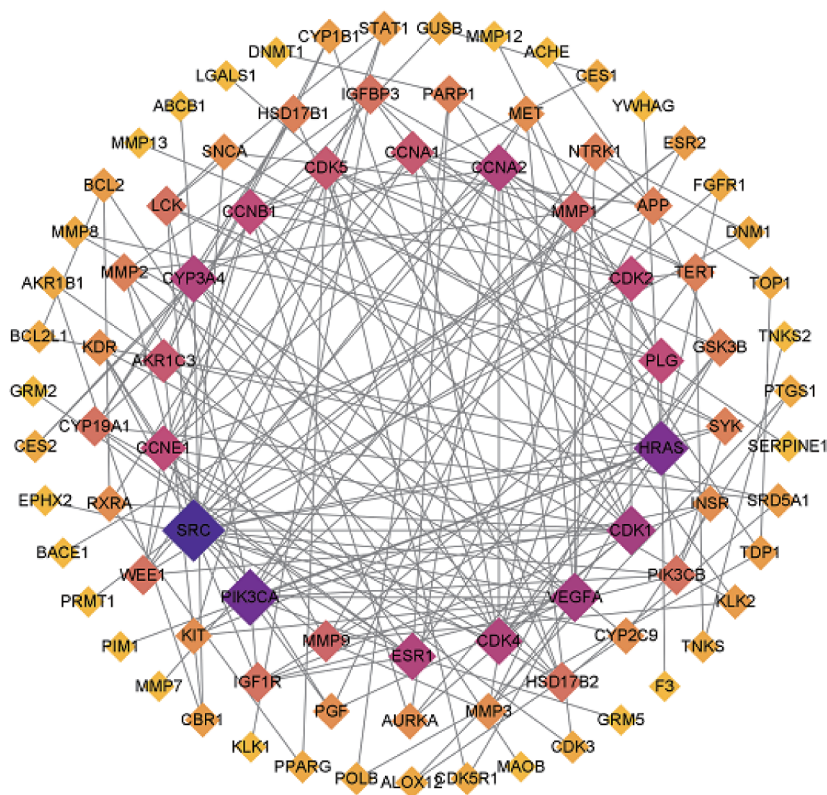


图 5 蛋白-蛋白相互作用网络构建

## 2.3 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用 David 6.8 数据库对 146 个潜在靶点进行 GO 功能分析,选取智人 (Homo sapiens) 物种的“Gene\_Ontology”项,得到 GO 条目,包含 252 个生物过程 (biological process, BP) 条目,46 个细胞组成 (cellular component, CC) 条目,以及 92 个分子功能 (molecular function, MF) 条目,分别占 64.6%, 11.8%, 23.6%。设置  $P < 0.01$ , 错误发现率 (false discovery rate, FDR)  $< 0.01$ , 选取显著性程度前 20 的条目导入微生信网站作图进行展示,结果见图 6。结果显

示以上靶点参与的生物过程包括一碳代谢过程、碳酸氢盐运输、对药物的反应、蛋白质自磷酸化、细胞外基质分解、肽基苏氨酸磷酸化、胶原分解代谢过程、蛋白质磷酸化、肽基丝氨酸磷酸化、凋亡过程的负调控、细胞增殖等过程,涉及细胞质核周区,具有碳酸脱水酶活性、蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、锌离子结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酶结合和细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、RNA 聚合酶 II 转录因子活性及配体激活的序列特异性 DNA 结合等分子功能。

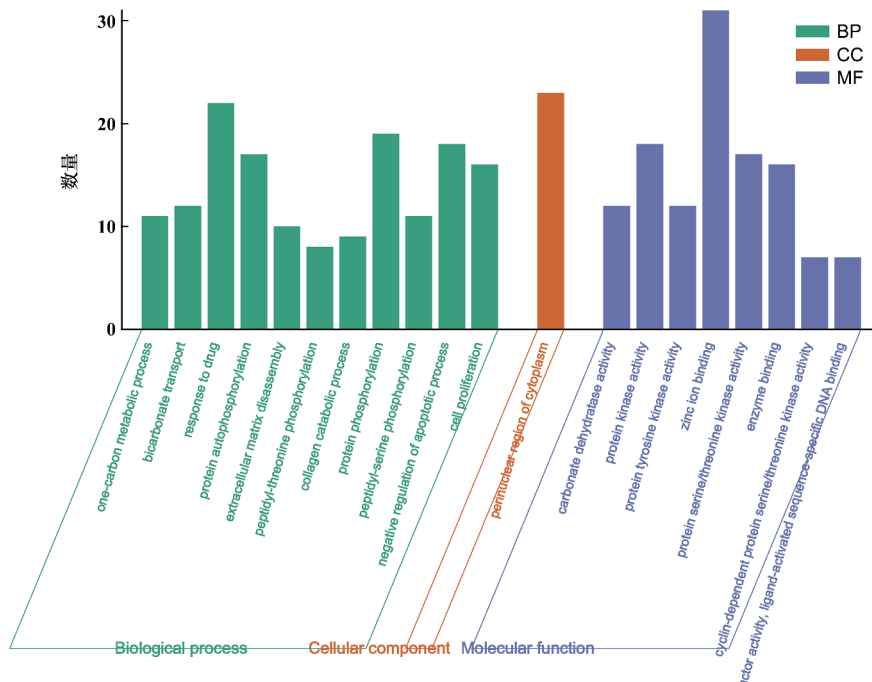


图 6 GO 分析富集图

KEGG 富集分析共得到 72 条通路,根据  $P < 0.01$ ,  $FDR < 0.01$ , 筛选得到 21 条相关通路,对前 20 条相关的信号通路作表展示,见图 7。通路主要包括氮代谢、癌症的途径、花生四烯酸代谢、PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、乙型肝炎、膀胱癌、亚油酸

代谢、前列腺癌、卵巢类固醇生成、催乳素信号通路、病毒致癌、Rap1 信号通路、细胞周期、类固醇激素生物合成、小细胞肺癌、癌症中的蛋白聚糖、孕酮介导的卵母细胞成熟、癌症的中心碳代谢、p53 信号通路等。

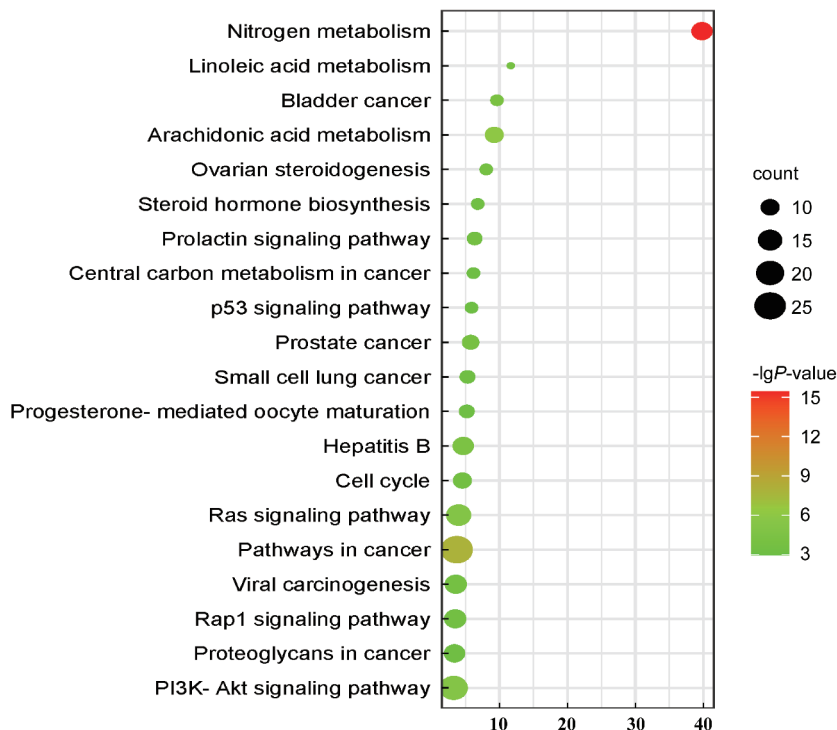


图 7 KEGG 富集分析



### 2.4 成分-靶点-通路网络构建

根据筛选得到的4个成分、146个靶点和20条关键通路,运用Cytoscape 3.9.0软件构建成分-靶点-通路网络图,结果见图8。以各节点之间连接的degree值为参考,靶点PIK3CB(degree 15),PIK3CA

(degree 15),HRAS(degree 13),IGF1R(degree 11),CDK2(degree 11),CCNE1(degree 10)的连接度较高,说明这6个靶点的作用尤为重要,可作为核心靶点;癌症的途径(degree 24)、PI3K-Akt信号通路(degree 20)为重要通路。

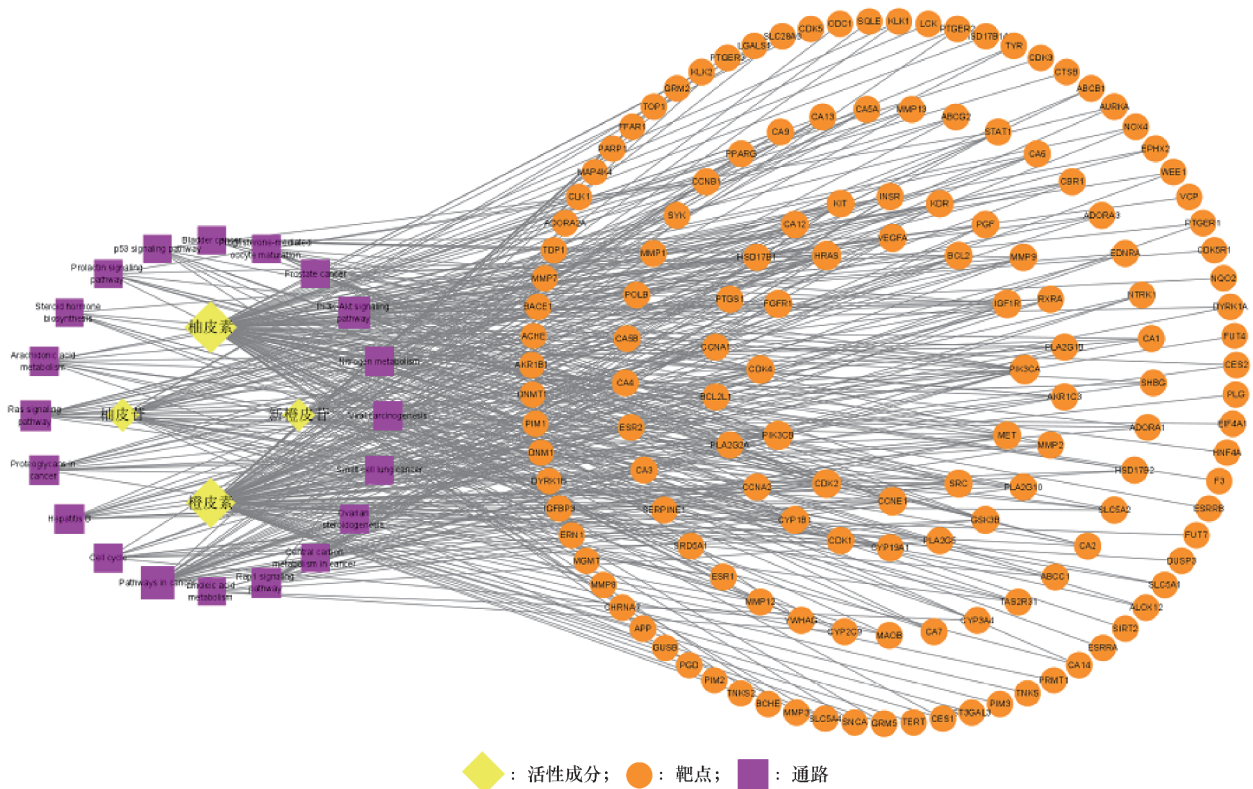


图8 “成分-靶点-通路”网络图

## 3 枳实中柚皮苷、新橙皮苷的含量测定

### 3.1 线性关系考察

取“1.3”项下混合对照品溶液适量,稀释2,4,8,16,32倍,按“1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各成分的质量浓度为横坐标(X),以测得的峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归计算,结果见表4。

表4 线性关系考察结果

成分	标准曲线	R <sup>2</sup>	线性范围 /mg·mL <sup>-1</sup>
柚皮苷	Y = 11 070X + 1 267.3	0.999 7	0.38 ~ 12.2
新橙皮苷	Y = 7 292.1X - 208.5	0.999 2	0.25 ~ 7.89

### 3.2 方法学考察

#### 3.2.1 精密度实验 取S8号供试品溶液,按“1.1”

项下色谱条件连续进样6次,进行色谱分析,记录色谱图。测得柚皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为0.09%,0.15%,表明仪器精密度良好。

#### 3.2.2 重复性实验 取枳实药材样品(S8)粉末6份,每份称取1g,精密称定,按“1.2”项下方法平行制备供试品溶液,按“1.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。测得柚皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为2.78%,0.33%,表明该方法重复性良好。

#### 3.2.3 稳定性实验 取S8号供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24h进样,记录色谱图。测得柚皮苷、新橙皮苷峰面积的RSD分别为1.27%,0.41%,表明供试品溶液在24h内稳定性良好。

#### 3.2.4 加样回收率实验 精密称定已知含量的S8号样品6份,约0.5g,分别精密加入适量对照品溶液,按“1.2”项制备供试品溶液,按“1.1”项下色谱

条件进样测定,计算加样回收率。结果表明新橙皮苷的平均回收率为 103.94% (RSD = 2.40%), 柚皮苷的平均回收率为 100.45% (RSD = 0.04%), 表明该方法的回收率良好。

### 3.3 样品含量测定

称取 22 份枳实样品粉末,按“1.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 10  $\mu$ L,按“1.1”项下色谱条件进行测定,计算样品中各成分含量,结果见表 5。

表 5 22 份枳实药材中 2 个化学成分含量 %

编号	柚皮苷	新橙皮苷	编号	柚皮苷	新橙皮苷
S1	13.79	16.92	S12	13.81	12.95
S2	13.52	24.99	S13	12.29	13.39
S3	13.22	22.15	S14	12.52	11.92
S4	16.88	16.81	S15	11.03	10.18
S5	7.81	23.89	S16	13.52	16.94
S6	8.59	24.98	S17	17.23	30.49
S7	11.55	29.43	S18	15.04	20.54
S8	14.37	23.81	S19	14.73	21.98
S9	14.41	19.64	S20	28.99	19.59
S10	14.46	16.26	S21	14.66	21.80
S11	15.98	15.44	S22	12.48	12.52

## 讨 论

黄酮类化合物是柑橘属植物中一类重要的生物活性物质,是柑橘属重要的化学标志物<sup>[7]</sup>,广泛存在于甜橙、酸橙等柑橘植物中<sup>[8-9]</sup>。研究表明,黄酮类和生物碱类为枳实主要药效成分,黄酮类成分占比最高,达总量的 5% ~ 28%<sup>[10]</sup>;橙子(酸橙)黄酮类成分以柚皮苷和新橙皮苷为主<sup>[7]</sup>,属二氢黄酮苷类,因此类化学成分含有多个甲氧基,又称多甲氧基黄酮,其为柑橘属植物特有成分,可作为 Q-Marker。

枳实始载于《神农本草经》<sup>[11]</sup>,《中华人民共和国药典》2020 年版收载枳实具有破气消积、化痰散痞的功效。柚皮苷和新橙皮苷是黄酮类主要成分。现代药理作用研究表明黄酮类具有调节胃肠功能、保肝、镇痛、抗炎、抗氧化作用<sup>[2,7,12]</sup>,与枳实传统功效相关。枳实味苦,苦味药主要包括苷类、黄酮类、生物碱类、挥发油类等。有研究者采用分子对接技术,以苦味受体(TAS2R10)为研究对象,利用同源模建法,对枳实药材各类型代表化合物进行分子对接,结果表明黄酮类成分柚皮苷、新橙皮苷与苦味受

体对接得分较高,推测其可能为苦味物质基础<sup>[7]</sup>,柚皮苷和新橙皮苷可作为枳实 Q-Marker 分析对象。

冯晓敏<sup>[13]</sup>基于谱效关系对枳实理气物质基础进行研究,结果表明柚皮苷、新橙皮苷与胃排空率、小肠推进率、胃动素、胃泌素均呈正相关,阐明了其为发挥理气药效的物质基础之一,提示柚皮苷和新橙皮苷可作为枳实 Q-Marker 分析对象。马雪琴等<sup>[14]</sup>研究枳实总黄酮提取物中柚皮苷和新橙皮苷的大鼠药动学,将 SD 大鼠随机分为 4 组,枳实总黄酮提取物按 80 mg·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃给药,柚皮苷及新橙皮苷分别为 32,27.2 mg·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃给药,分别于给药前及给药后 0.083 3,0.25,0.5,1,2,4,6,8,10,12,14,24,30 h 眼眶静脉丛取血,利用葡萄糖醛酸酶对血样进行预处理,测定血浆中总苷元柚皮素及橙皮素浓度并分析药动学参数,间接反映柚皮苷和新橙皮苷的药动学。结果表明,枳实总黄酮提取物组中柚皮素和橙皮素的 AUC<sub>0-1</sub>, C<sub>max</sub> 显著高于柚皮苷单体组、新橙皮苷单体组,与柚皮苷-新橙皮苷组的药动学参数无显著性差异,说明枳实总黄酮提取物中柚皮苷与新橙皮苷存在相互促进吸收的作用;柚皮苷-新橙皮苷组中柚皮素和橙皮素的 AUC<sub>0-1</sub>, C<sub>max</sub> 较柚皮苷单体组、新橙皮苷单体组均有所增加,但增加程度低于枳实总黄酮提取物组,说明枳实总黄酮提取物中其他成分协同促进两者的吸收。柚皮素和橙皮素分别为柚皮苷和新橙皮苷的苷元,实验发现柚皮苷、新橙皮苷的生物利用度很低,只有 1% ~ 2%,柚皮苷、新橙皮苷在肠内细菌作用下脱糖基化产生苷元被吸收进入肝脏,而苷元会快速与葡萄糖醛酸结合再吸收入血<sup>[15-17]</sup>。以上文献说明柚皮苷、新橙皮苷、柚皮素和橙皮素均为枳实入血成分,根据中药 Q-Marker 必须为药物中固有存在的化学物质,而不是它们经过生物体内过程被吸收的化学物质和所产生的化学物质(如人体内代谢物、消化道酶或微生物转化的化学物质)<sup>[3]</sup>,亦可将新橙皮苷和柚皮苷作为枳实的 Q-Marker。

S5 ~ S15 湖南沅江产枳实药材的直径分别为 0.5,0.7,0.9,1.2,1.3,1.5,1.7,1.9,2.1,2.3,2.5 cm,含量结果表明,柚皮苷和新橙皮苷含量随果实生长呈先递增后递减的趋势,与文献报道一致。笔者对文献中不同产地枳实药材、不同品种枳实和枳实饮片等近 105 个样本中柚皮苷和新橙皮苷成分含量进行了分析,105 个样本柚皮苷和新橙皮苷百分含量比值介于 0.10 ~ 3.84,文中 22 批枳实药材样品柚

皮苷和新橙皮苷百分含量比值为 0.33 ~ 1.48,说明不同产地枳实药材柚皮苷和新橙皮苷含量较稳定。

本文建立的 HPLC 指纹图谱方法稳定可行,通过 OPLS-DA 筛选得到 2 个差异成分柚皮苷和新橙皮苷,应用网络药理学进一步佐证柚皮苷和新橙皮苷可作为枳实的潜在 Q-Marker,为枳实药材质量评价和药效相关机制的研究提供参考。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020,258.
- [2] 张霄潇,李正勇,马玉玲,等. 中药枳实的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(2):185-190.
- [3] 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.
- [4] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别概念、属性、技术与应用[J]. 中国中药杂志,2001,26(10):653-655.
- [5] 周文霞,程肖蕊,张永祥. 网络药理学:认识药物及发现药物的新理念[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(1):4-9.
- [6] 周梦楠,陈向阳,陈晓鹤,等. 基于“优势成分预测-潜在靶点筛选”的“2R 网络药理学”的中药复方有效组分研究方法的构建[J]. 中国中药杂志,2021,46(9):2363-2369.
- [7] 许姗姗,许浚,张笑敏,等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药,2018,49(1):35-44.
- [8] KANES K, TISSERAT B, BERHOW M, *et al.* Phenolic composition of various tissues of Rutaceae species[J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(4):967-974.
- [9] 邓秀新. 中国柑橘品种[M]. 北京:中国农业出版社,2008:5-15.
- [10] 骆杨丽,曲玮,梁敬钰. 柑橘属植物化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(7):1-6.
- [11] 张晓娟,赵良友,李建华,等. 中药枳实的研究概况[J]. 中医药学报,2021,49(1):94-100.
- [12] 赵佳琛,王艺涵,翁倩倩,等. 经典名方中枳实与枳壳的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(8):1175-1184.
- [13] 冯晓敏. 基于谱效关系的枳实理气物质基础研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨商业大学,2018.
- [14] 马雪琴,李辰,袁林华,等. 枳实总黄酮提取物中柚皮苷和新橙皮苷的大鼠药代动力学[J]. 中国药科大学学报,2013,44(2):161-166.
- [15] 高艳艳,陈晓鹤,苏磊,等. 高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的地骨皮饮片质量研究[J]. 世界中医药,2023,18(5):593-599.
- [16] FANG TZ, WANG YG, MA Y, *et al.* A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2):454-459.
- [17] KANAZE FI, KOKKALOU E, GEORGARAKIS M, *et al.* A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the Citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36(1):175-181.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-11-25