

盐黄柏指纹图谱研究及质量标志物预测分析

刘晓琳,吴文平,潘礼业,邢菊玲,官永河,杨晓东,庞伟,李国卫*

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,佛山 528244

摘要:盐黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 干燥树皮的炮制品,具有滋阴降火功效,本研究建立了 22 批盐黄柏指纹图谱,并指认其中 4 个色谱峰,分别为 3-*O*-阿魏酰奎宁酸、5-*O*-阿魏酰奎宁酸、小檗碱、黄柏碱;主成分分析(principal component analysis,PCA)与正交偏最小二乘分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis,OPLS-DA)分析结果表明不同批次盐黄柏差异性成分是黄柏碱、小檗碱。同时,结合网络药理学分析结果,确认小檗碱和黄柏碱是盐黄柏的差异性成分及发挥药效的主要活性成分。明确了小檗碱、黄柏碱为盐黄柏的活性成分和质量标志物,为盐黄柏的质量控制提供参考。

关键词:盐黄柏;指纹图谱;小檗碱;黄柏碱;多元统计分析

中图分类号:R286.0

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)10-1647-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.10.002

Fingerprint analysis and Q-marker prediction of salt-fried *Phellodendri Chinensis* Cortex

LIU Xiao-lin, WU Wen-ping, PAN Li-ye,

XING Ju-ling, GUAN Yong-he, YANG Xiao-dong, PANG Wei, LI Guo-wei*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule,

Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

Abstract: Salt-fried *Phellodendri Chinensis* Cortex (SPCC) is a traditional Chinese medicine, 22 batches of SPCC fingerprints were established, and four common components, 3-*O*-ferulic acid, 5-*O*-ferulic acid, berberine hydrochloride and phellodendrine hydrochloride, were identified. The analysis results of PCA and OPLS-DA showed that the differential component of different batches of SPCC was phellodendrine and berberine. Meanwhile, combined with the results of network pharmacological analysis, it was confirmed that berberine and phellodendrine were also the main active component of SPCC. Berberine and phellodendrine were the active components of SPCC which provided reference for the quality control of SPCC.

Key words: salt-fried *Phellodendri Chinensis* Cortex; fingerprint; berberine; phellodendrine; multivariate statistical analysis

黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮,习称“川黄柏”。剥取树皮后,除去粗皮,晒干。黄柏味苦性寒,具有清热燥湿,泻火除蒸,解毒疗疮之功用;盐黄柏为黄柏照盐水炙法炒干的炮制品,可滋阴降火,用于阴虚火旺,盗汗骨蒸^[1]。黄柏的主要化学成分包括生物碱类、柠檬苦素类、酚酸类及黄酮类^[2]。研究发现,黄柏不同炮制品中化学成分及其含量、药理作用有变化及差异,盐黄柏对金黄色葡萄球菌及白喉杆菌的

抑制作用均优于黄柏丝^[3-5],此外,盐黄柏代谢抑制功能优于黄柏,该活性被认为是黄柏滋阴作用的物质基础,故经盐炮制后黄柏的滋阴作用加强^[6]。2020 版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)采用 HPLC 法测定盐黄柏中小檗碱及黄柏碱的含量,并规定其含量分别不少于 3.0% 及 0.34%,本研究以盐黄柏为研究对象,建立了 22 批盐黄柏 HPLC 指纹图谱,在主成分分析(principal component analysis,PCA)的基础上运用正交偏最小二乘分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis,OPLS-DA)初步筛选出不同批次盐黄柏的差异性成分,结合指纹图谱数据分析及网络药理学分析方法,从化学、生物信息及数理统计相结合的角度筛选盐

收稿日期:2022-04-27 接受日期:2022-09-19

基金项目:佛山市科技创新项目(212000100309);国家工业和信息化部产业技术基础公共服务平台项目(2019-00902-1-2)

* 通信作者 Tel:86-015017592618;E-mail:15017592618@163.com

黄柏的活性成分,进而确认盐黄柏质量标志物,为盐黄柏质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(沃特世公司, Waters e2695, 2489 UV/Vis Detector); Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 万分之一天平(梅特勒-托利多公司, ME204E); 百万分之一天平(梅特勒-托利多公司, XP26); 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, KQ-500DE); 超纯水系统(默克股份有限公司, Milli-Q Direct)。

1.2 试剂和试剂

3-*O*-阿魏酰奎宁酸(四川省维克奇生物科技有限公司, 纯度: 98.4%, 批号: wkq20022003); 5-*O*-阿魏酰奎宁酸(四川省维克奇生物科技有限公司, 纯度: HPLC ≥ 98%, 批号: wkq19100907); 盐酸小檗碱(中国食品药品检定研究院, 含量: 86.8%, 批号: 110713-201613); 盐酸黄柏碱(中国食品药品检定研究院, 含量: 94.9%, 批号: 111895-201504); 甲醇(西陇科技股份有限公司); 乙腈(默克公司, 色谱级); 研究所用盐黄柏饮片 Salt-fried *Phellodendri Chinensis Cortex* (SPCC) 来源信息见表 1, 经广东一方制药有限公司技术中心/质量中心主任中药师魏梅鉴定为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮的炮制加工品。

2 方法与结果

2.1 盐黄柏指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)-0.4 mol/L NH₄Cl(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 95% B; 5~40 min, 95% → 75% B; 40~45 min, 75% → 65% B; 45~50 min, 65% → 45% B; 50~60 min, 45% → 10% B; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10

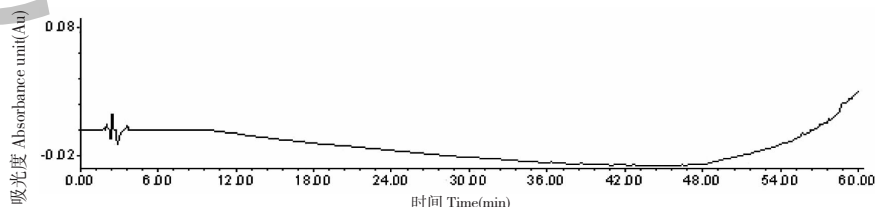


图 1 阴性对照色谱图

Fig. 1 HPLC of negative sample

2.1.4.2 精密度考察

取同一供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 按照

表 1 盐黄柏饮片来源信息

Table 1 Sources of SPCC

批次 No.	产地 Origin	批次 No.	产地 Origin
S1	广西	S12	四川
S2	广西	S13	四川
S3	广西	S14	四川
S4	重庆	S15	四川
S5	重庆	S16	四川
S6	贵州	S17	四川
S7	四川	S18	四川
S8	四川	S19	四川
S9	四川	S20	四川
S10	四川	S21	四川
S11	四川	S22	四川

μL; 检测波长为 210 nm。

2.1.2 对照品溶液制备

取 3-*O*-阿魏酰奎宁酸对照品、5-*O*-阿魏酰奎宁酸对照品、盐酸黄柏碱对照品、盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含 3-*O*-阿魏酰奎宁酸对照品 35 μg、5-*O*-阿魏酰奎宁酸对照品 75 μg、盐酸黄柏碱 150 μg、盐酸小檗碱 100 μg 的混合溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备

取盐黄柏饮片粉末(过四号筛)0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

方法学考察

2.1.4.1 专属性考察

精密吸取 50% 甲醇(阴性对照)各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 1。实验结果表明该分析方法能准确检测所指认的特征峰, 不受提取溶剂的干扰。

“2.1.1”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 记录色谱图, 以与小檗碱参照物相应的峰为 S 峰, 计算特征峰

相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰的相对保留时间与相对峰面积 $RSD < 3\%$, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 稳定性考察

取同一供试品溶液, 精密吸取 $10 \mu\text{L}$, 按照“2.1.1”项下色谱条件, 分别在 0、4、8、16、20、24 h 进样, 记录色谱图, 以小檗碱峰为 S 峰, 计算特征峰相对保留时间和相对峰面积。结果显示各特征峰的相对保留时间及相对峰面积的 $RSD < 3\%$, 表明供试溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.4.4 重复性考察

取同一批盐黄柏饮片粉末 0.1 g , 共 6 份, 精密称定, 按照“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件, 进样, 记录色谱图, 以小檗碱峰为 S 峰, 计算特征峰相对保留时间和相对峰面积。结果显示各特征峰的相对保留时间及相对峰

面积的 $RSD < 3\%$, 该方法的重复性良好。

2.1.5 特征峰指认及共有峰确认

采用国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.0 版) 对 22 批盐黄柏饮片指纹图谱(见图 2) 进行分析, 按平均数法生成对照图谱(见图 3), 建立各自指纹图谱并生成指纹图谱共有模式, 共确定 9 个共有峰。

按“2.1.1”项下的色谱条件分别对供试品溶液和对照品溶液进行测定, 通过与对照品保留时间进行比对, 确定 4 个化学成分, 分别为 3-O-阿魏酰奎宁酸(峰 2)、5-O-阿魏酰奎宁酸(峰 3)、黄柏碱(峰 6)、小檗碱(峰 9)(见图 4)。《中国药典》2020 年版^[1] 将黄柏碱、小檗碱作为评价黄柏质量的指标性成分, 其中小檗碱含量较高且出峰位置适宜, 色谱峰较稳定, 故最终选择小檗碱作为参照峰 S。

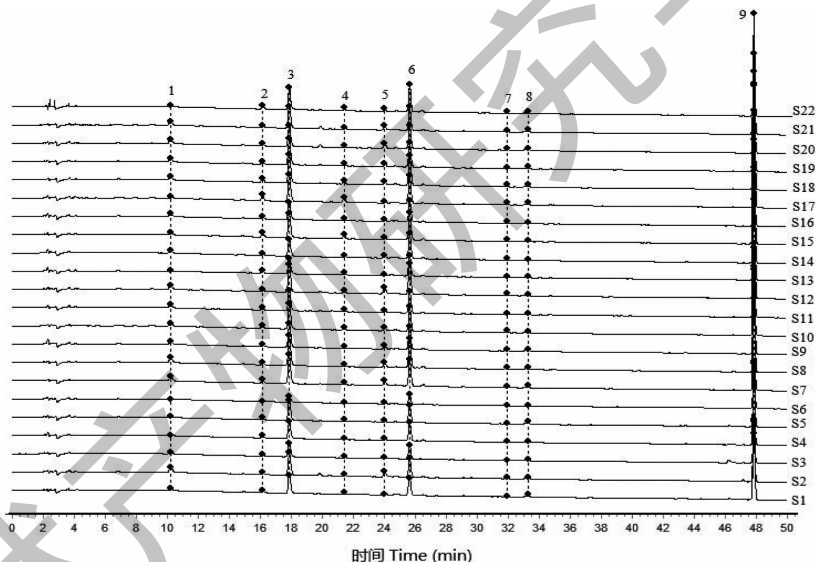


图 2 盐黄柏指纹图谱叠加图

Fig. 2 Overlay of SPCC fingerprints

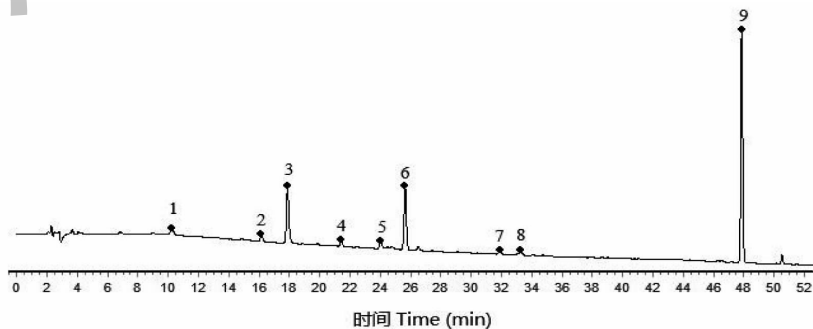


图 3 盐黄柏对照图谱

Fig. 3 Reference chromatogram of SPCC

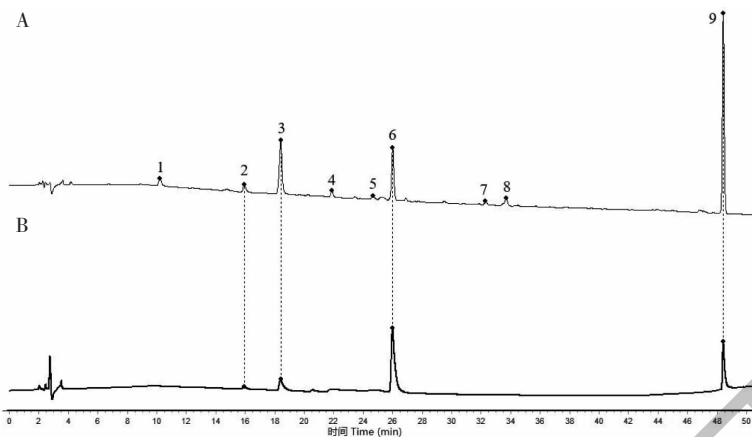


图4 盐黄柏及对照品 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatogram of SPCC and reference substance

注:2;3-*O*-阿魏酰奎宁酸;峰3;5-*O*-阿魏酰奎宁酸;6:黄柏碱;9:小檗碱。A:盐黄柏;B:对照品。Note:2;3-*O*-Feruloylquinic; 3;5-*O*-Feruloylquinic;6:Phellodendrine;9:Berberine. A:SPCC;B:Reference.

2.1.6 相似度评价

采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.0版)对22批盐黄柏饮片指纹图谱进行叠加,进行相似度评价(见表2)。结果显示,不同批次盐黄柏饮片样品的相似度均大于0.95,表明样品指纹图谱与对照图谱的相似度较高,因此,该图谱可作为盐黄柏饮片的指纹图谱。

表2 盐黄柏指纹图谱相似度

Table 2 Similarity evaluation of SPCC fingerprint

批次 No.	相似度 Similarity	批次 No.	相似度 Similarity
S1	1.000	S12	0.996
S2	0.988	S13	0.992
S3	0.995	S14	0.993
S4	0.998	S15	0.998
S5	0.999	S16	0.995
S6	0.983	S17	0.998
S7	0.998	S18	0.999
S8	0.999	S19	0.999
S9	0.998	S20	0.998
S10	0.999	S21	0.998
S11	0.999	S22	0.998

2.1.7 不同批次盐黄柏差异性成分研究

2.1.7.1 主成分分析

将共有峰各色谱峰峰面积(见表3)相对于称样量量化,通过SPSS 20.0软件对22批盐黄柏饮片特

征图谱峰面积结果进行主成分分析。由表4、表5可知,前3个成分累积方差贡献率为93.699%,基本可以反映盐黄柏饮片样品信息。特征图谱主成分1贡献率为61.811%,其中峰6(黄柏碱)、峰3(5-*O*-阿魏酰奎宁酸)在主成分1中贡献率较大,峰2(3-*O*-阿魏酰奎宁酸)、峰4在主成分2中贡献率较大,峰8在主成分3中贡献率最大,因此可以认为峰2(3-*O*-阿魏酰奎宁酸)、峰3、峰4、峰6(黄柏碱)和峰8是影响盐黄柏饮片质量的重要因素。根据各主成分得分进行综合评价(见图5),对22批盐黄柏饮片质量进行排序,四川省得分均高于其他省份,说明四川省作为黄柏的道地产区具有独特优势。

2.1.7.2 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)

为寻找盐黄柏饮片产生差异性的主要标记物,在主成分分析的基础上,进一步采用SIMCA 14.1软件OPLS-DA分析上述两组的差异性成分,归一化方法选择Par,默认自动建模(Autofit),所得结果显示 $R^2X = 0.732$, $R^2Y = 0.727$,预测能力参数 Q^2 为0.597,均大于0.5,说明预测结果良好。采用正交偏最小二乘法分析得到各特征峰的VIP值(见图6)。结果显示,峰6(黄柏碱)、峰9(小檗碱)VIP值均 ≥ 1.25 ,表明影响显著,说明共有峰6(黄柏碱)、峰9(小檗碱)是A、B两组的差异性成分,由于四川省为黄柏的道地产区,质量最佳,且四川省各批次的峰6(黄柏碱)和峰9(小檗碱)峰面积相对于称样量量化后均较其他省份高,因此可以认为峰6(黄柏碱)、峰9(小檗碱)可作为盐黄柏饮片的质量控制的标志物。

表 3 22 批盐黄柏指纹图谱共有峰峰面积
Table 3 Common peaks area of 22 batches of SPCC fingerprint

批次 No.	峰面积 Peak area								
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
S1	146 014	126 381	911 476	103 511	75 270	830 518	58 899	169 198	2 548 789
S2	302 324	107 085	1 177 930	89 024	293 431	933 178	72 113	155 098	2 370 154
S3	91 180	77 407	730 781	75 050	54 774	640 243	32 602	77 301	1 571 195
S4	53 231	120 731	909 753	85 719	100 354	885 892	38 867	39 809	2 786 855
S5	71 761	102 200	1 001 283	87 307	87 133	816 623	29 282	179 382	2 428 042
S6	14 964	35 287	324 367	29 164	59 483	463 507	25 113	24 025	1 805 716
S7	272 031	170 368	1 488 620	127 980	238 150	1 242 540	88 213	155 105	3 537 218
S8	309 644	122 842	1 515 767	100 015	239 095	1 386 911	124 711	151 198	4 059 772
S9	190 318	104 993	1 196 847	83 509	184 469	1 115 809	97 440	58 721	3 245 233
S10	192 321	155 364	1 283 904	123 342	157 638	1 170 030	112 333	65 692	3 389 536
S11	191 231	154 232	1 035 698	129 299	112 228	1 047 503	70 252	121 313	2 833 820
S12	256 935	130 417	1 405 811	118 879	330 595	1 455 283	113 764	52 662	3 811 661
S13	63 795	148 164	792 647	113 462	49 204	969 896	49 510	110 184	3 494 779
S14	136 804	104 753	868 664	91 714	108 181	1 185 358	79 377	48 631	3 659 416
S15	147 168	229 366	1 230 865	183 654	120 829	1 314 464	99 444	109 895	4 217 732
S16	158 700	119 752	853 727	103 891	92 420	991 001	77 771	41 826	3 289 918
S17	107 359	280 011	1 395 797	246 075	98 005	1 358 318	100 735	162 071	3 747 645
S18	220 044	209 809	1 431 953	161 129	175 184	1 431 747	110 972	168 548	4 002 950
S19	208 668	144 774	1 311 743	123 188	166 465	1 191 824	73 254	163 103	3 389 952
S20	242 591	124 762	1 105 687	101 287	219 089	1 135 124	93 232	81 860	3 105 332
S21	243 841	124 148	1 105 576	100 275	219 243	1 129 777	93 768	82 938	3 105 224
S22	86 990	138 272	969 531	112 500	106 709	1 055 740	62 582	61 067	2 965 395

表 4 各主成分的特征值及方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate of each principal component

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate(%)	累积方差贡献率% Cumulative variance contribution rate(%)
1	5.563	61.811	61.811
2	1.851	20.568	82.378
3	1.019	11.321	93.699
4	0.261	2.903	96.602
5	0.149	1.659	98.261
6	0.083	0.918	99.180
7	0.038	0.425	99.604
8	0.028	0.309	99.913
9	0.008	0.087	100.000

表 5 主成分分析结果

Table 5 Principal component analysis results

特征峰 Characteristic peak	主成分 1 Principal component 1	主成分 2 Principal component 2	主成分 3 Principal component 3
1	0.714	-0.620	0.222
2	0.748	0.632	-0.004
3	0.946	-0.105	0.172
4	0.733	0.636	-0.001
5	0.630	-0.715	0.092
6	0.960	0.002	-0.212
7	0.905	-0.215	-0.255
8	0.441	0.269	0.831
9	0.854	0.148	-0.361

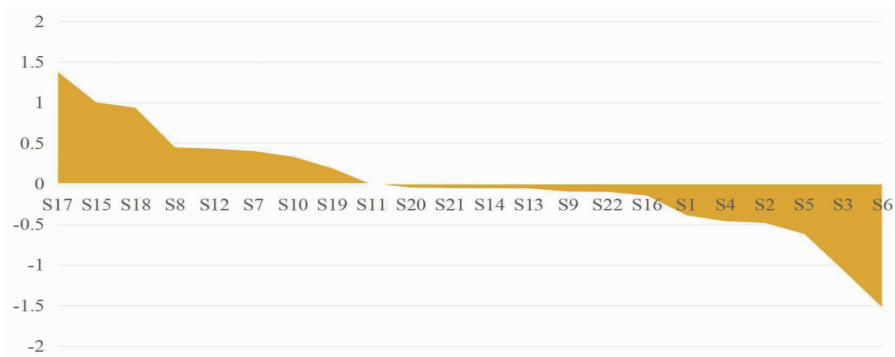


图5 综合得分图

Fig. 5 Comprehensive score plot

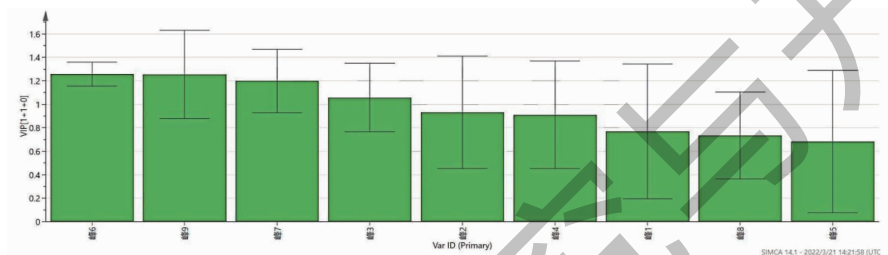


图6 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 6 VIP plot of OPLS-DA model

采用置换检验(Permutation test)验证 OPLS-DA 模型的可靠性,并设置置换次数为 200。结果见图

7, A、B 两组回归线在 Y 轴截距均 < 0 , 表明模型未出现过拟合, OPLS-DA 模型可靠。

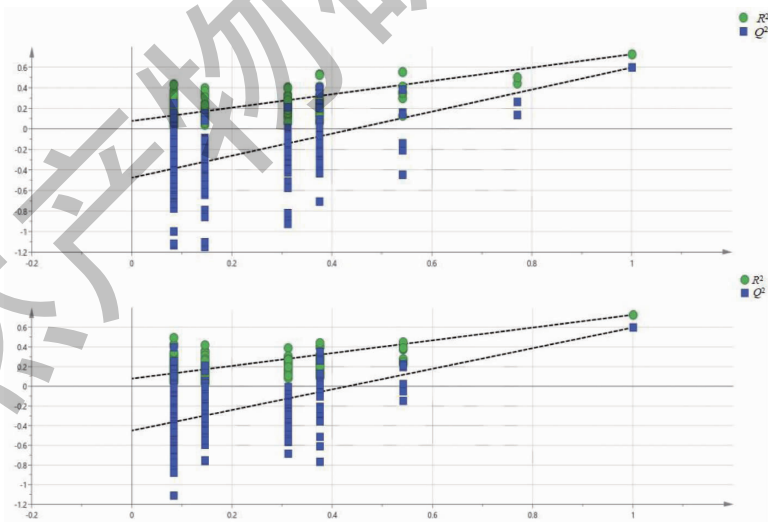


图7 OPLS-DA 模型的验证

Fig. 7 Verification of OPLS-DA modal

2.2 网络药理学研究

2.2.1 候选化合物靶点预测

通过中药系统药理数据库(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>)、PubChem Compound 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Therapeutic Target

Database 数据库(TTD, <http://db.idrblab.net/ttd/>)、Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Pharm mapper(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)检索 3-O-阿魏酰奎宁酸、5-O-阿魏酰奎宁酸、小檗碱及黄柏碱等化合物,筛选化

合物作用的靶点;并通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)将预测出的靶点蛋白转换为对应的基因名。将各数据库筛选出的靶点蛋白合并,除去重复靶点,最终得到与 4 个化合物相关的 198 个靶点蛋白。

2.2.2 靶点蛋白与蛋白互作(PPI)网络分析

将获得的 198 个靶点导入在线 STRING 软件 (<https://cn.string-db.org/>),物种为人(homo sapi-

ens),设置最高置信度蛋白交互参数评分值 > 0.9,隐藏网络中断开的节点,获得 PPI 网络图(见图 8, degree 值越大,节点越大)。利用 Cytoscape 软件采用 MCC 计算方法对 PPI 进行拓扑分析,按得分值排名筛选出前 15 个关键靶点,分析结果见表 6,这些靶点主要与小檗碱、黄柏碱、3-*O*-阿魏酰奎宁酸及 5-*O*-阿魏酰奎宁酸有关。

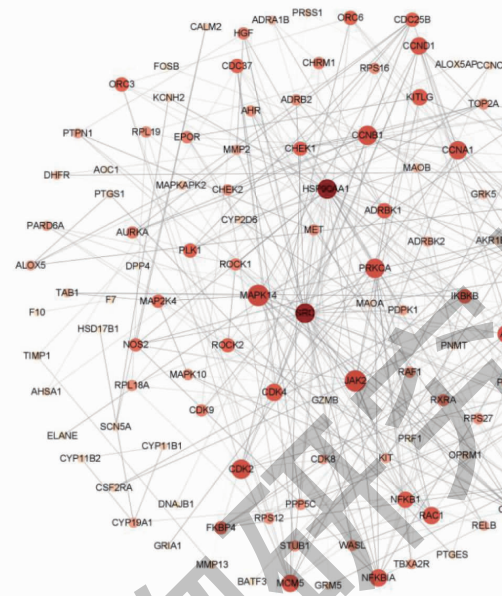


图 8 PPI 网络图

Fig. 8 PPI network

表 6 关键靶点汇总

Table 6 Summary of key targets

序号 No.	靶点 Target	分值 Score
1	SRC	100
2	HSP90AA1	67
3	ESR1	40
4	JUN	34
5	RAC1	34
6	ROCK2	30
7	PRKCA	26
8	ESR2	24
9	MAPK14	23
10	CDC42	22
11	NCOA1	21
12	ADRBK1	18
13	JAK2	16
14	ROCK1	14
15	AR	12

2.2.3 功能富集分析与通路分析

GO 功能富集分析:利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>)对上述 198 个作用靶点进行 GO 功能富集分析,选择 P 值 < 0.01。结果得到生物过程(biological process, BP)条目 419 个,主要涉及的生物过程有:细胞对氮化合物的反应、循环系统、蛋白质磷酸化、对外来刺激的反应、MAPK 级联的正向调节等。细胞组成(cellular components, CC)条目有 67 个,主要富集在突触前膜、受体、膜筏、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物、神经元、胞质核周区等区域。分子功能(molecular function, MF)条目有 125 个,主要富集在神经递质受体的活动、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、儿茶酚胺结合、配体门控离子通道活性等功能。 P 值排名前 20 条目的 BP、CC、MF 见图 9。

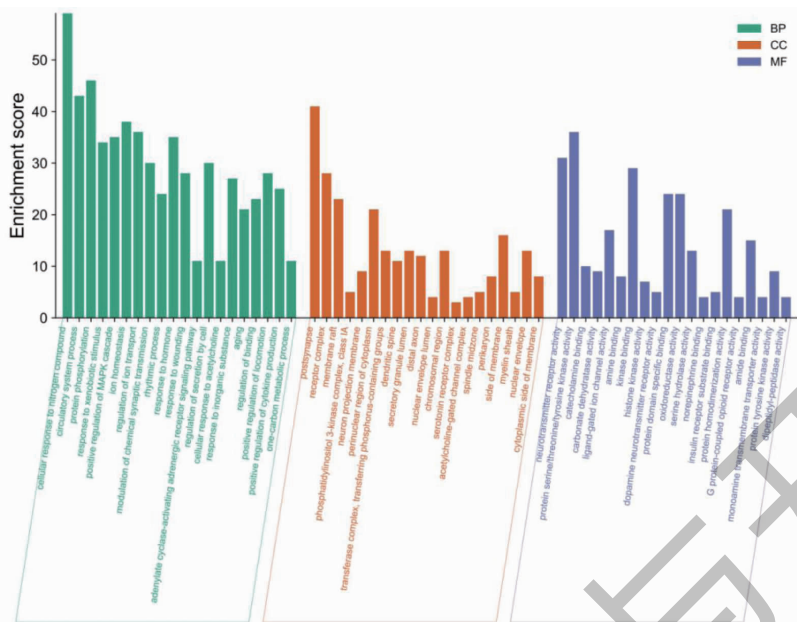


图 9 GO 功能富集分析柱状图

Fig. 9 Bar chart of GO functional enrichment analysis

KEGG 富集分析设置 P 值 < 0.01 , 富集得到的主要涉及 5-羟色胺能突触途径、钙信号通路、刺激神经组织中的交互、癌症通路、炎症介质对 TRP 通

道的调节等, 由此可知, 盐黄柏是通过多靶点、多通路发挥协同作用的。按照 P 值从小到大的顺序筛选前 20 条, 绘制气泡图 (见图 10)。

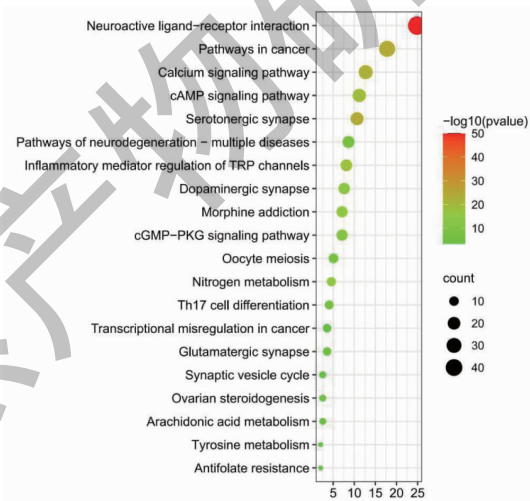


图 10 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 10 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

2.2.4 “成分-靶点-通路”网络构建

将 4 种化学成分和分析得到的 15 个靶点以及 KEGG 通路富集分析得到的前 20 条通路导入 Cytoscape 软件中构建“活性成分-靶点-通路”网络, 并进行可视化分析, 如图 11。根据分析结果, 以化合物-靶点-信号通路的连接度 (degree) 为参考, 发现小檗

碱及黄柏碱有较高的连接度, 提示小檗碱 (degree = 10) 及黄柏碱 (degree = 3) 化合物可能是盐黄柏的高活性成分; PRKCA (degree = 10)、MAPK14 (degree = 6)、ADRB (degree = 5)、AR (degree = 4)、ROCK1 (degree = 4)、ROCK2 (degree = 4)、RAC1 (degree = 4)、JUN (degree = 4) 的连接度高于其他

7 个靶点,表明活性成分可能是通过 PRKCA、MAPK14 等多个靶点发挥作用。癌症通路(pathways in cancer, degree = 12)、cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway, degree = 5)、cGMP-PKG 信号通路(cGMP-PKG signaling pathway, degree = 3)、TRP 通

道对炎症介质的调控(Inflammatory mediator regulation of TRP channels, degree = 3)4 条通路的连接度高于其他通路,说明该 4 条通路可能是盐黄柏潜在 Q-marker 的重要信号通路。

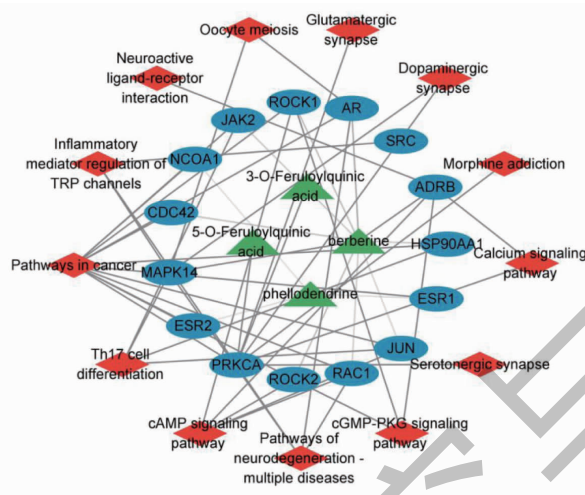


图 11 活性成分-靶点-通路网络

Fig. 11 Network of compound-target-pathway

3 讨论与结论

黄柏的化学成分主要包括生物碱类、黄酮类、甾醇类化合物及挥发油等,其中生物碱类化合物是黄柏的主要有效化学成分。经研究发现,黄柏经盐制后,其主要有效成分小檗碱及黄柏碱的含量都有所上升,经盐炮制后有利于其生物碱成分的溶出^[7]。本研究通过建立指纹图谱指认了小檗碱、黄柏碱、3-O-阿魏酰奎宁酸及 5-O-阿魏酰奎宁酸 4 个化学成分。经网络药理学分析,发现小檗碱及黄柏碱化合物可能是盐黄柏的有效活性成分,并筛出潜在的 8 个核心靶点(PRKCA (degree = 10)、MAPK14 (degree = 6)、ADRB (degree = 5)、AR (degree = 4)、ROCK1 (degree = 4)、ROCK2 (degree = 4)、RAC1 (degree = 4)、JUN (degree = 4)),这些靶点可能作用于癌症通路(Pathways in cancer)、及 cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)、cGMP-PKG 信号通路(cGMP-PKG signaling pathway)及 TRP 通道在炎症介质的调控(Inflammatory mediator regulation of TRP channels)中发挥重要作用,这与盐黄柏的药效滋阴降火可能具有一定相关性。因此,初步预测小檗碱、黄柏碱为盐黄柏潜在的质量标志物成分。现代研究表明小檗碱具有抑菌、抗炎等药理活性,可通过降低磷酸化 ERK/JNK 蛋白表达水平而产生抗

炎作用,可通过抑制非小细胞肺癌中 COP9 信号转导体 5 (CSN5) 的脱泛素活性,减少细胞程序性死亡配体 1 (PD-L1) 的表达,促进抗肿瘤免疫^[8,9],此外,小檗碱还具有降糖、降压、增强肠管张力和振幅以及对前列腺的渗透作用^[10,11]。黄柏碱可抑制 ROS 引起的炎症通路上相关蛋白的表达,抑制 IKK/NF- κ B 通路,还可显著降低 NF- κ B 的下游蛋白 COX-2 的表达,在体内外均有着较好的抗氧化及减轻炎症损伤的作用^[12,13]。奎宁酸衍生物在抗感染、抗心血管疾病及降糖等方面具显著的活性^[14]。阿魏酰奎宁酸类化合物是一种有效的酚类抗氧化剂,其抗氧化能力要强于咖啡酸、对羟苯甲酸、阿魏酸、丁香酸等,且具有消除体内自由基、抑制突变和抗肿瘤作用等^[15]。

中药化学成分复杂多样,中药质量是中药临床安全有效的基础,通过高效液相色谱检测出中药含有的所有化学成分,然后采用网络药理学的方法,能快速得到其含有的活性化合物,高效研究其中的活性成分,排除与主治无关或毒性成分,研究各组分对多靶点的活性,从而有效的节省时间和成本,提高中药活性成分筛选的效率^[16]。为明确盐黄柏的质量标志物,本研究采用 HPLC 法对 22 批不同产地的盐黄柏进行研究,建立了盐黄柏的指纹图谱,确认了 9 个共有峰,不同批次盐黄柏指纹图谱的相似度评价

结果发现,相似度在 0.958 ~ 0.999,表明 22 批盐黄柏饮片化学成分相似度高,质量较为稳定均一。通过主成分分析结果可知,四川省饮片主成分综合排名较其他省份高,说明四川省作为黄柏传统道地产区的科学性;OPLS-DA 分析发现小檗碱和黄柏碱是不同盐黄柏饮片的重要差异性成分,再结合网络药理学可知小檗碱、黄柏碱是盐黄柏发挥功效的主要活性成分。由此,可以确认小檗碱、黄柏碱是盐黄柏潜在的质量标志物。

本研究采用 HPLC 结合化学计量法与网络药理学研究从有效性角度预测出小檗碱、黄柏碱为盐黄柏的活性成分和质量标志物,为盐黄柏的质量控制提供参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:318.
- 2 Dai Q, Hu Y, Lei L, et al. Research progress on literature research, chemical constituents and pharmacological effects of Cortex Phellodendri processed products [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2020, 16: 205-208.
- 3 Liu Y, Ran C, You GX, et al. Determination of berberine hydrochloride in crystal of *Phellodendron chinensis* by HPLC and evaluation of bacteriostatic activity [J]. J Agric Sci Technol (中国农业科技导报), 2020, 22: 179-186.
- 4 Gao J, Ni CR. Experimental study on antibacterial action of 10 kinds of traditional Chinese medicines in common pathogenic bacteria *in vitro* [J]. Renowned Doctor, 2019: 242.
- 5 Guo MX, Wu C, Tong WH. Research progress in equivalence study of TCM dispensing granule and traditional herbal decoction [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2016, 18: 1107-1110.
- 6 Xu S, Zhang F, Liu PP, et al. Effects of processing on Phellodendri Chinensis Cortex based on material and energy metabolism [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 1835-1841.
- 7 Liu YB, Feng H, Tan HM, et al. Effects of different processing methods on the content of berberine hydrochloride and phellodendrine in Cortex Phellodendri [J]. Sci Technol West Chin (中国西部科技), 2015, 14: 5-8.
- 8 Lei FF. Study on the pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the quality components before and after the processing of *Phellodendron chinense* [D]. Shenyang: Liaoning University of Chinese Medicine (辽宁中医药大学), 2018.
- 9 Liu Y, Liu XJ, Zhang N, et al. Berberine diminishes cancer cell PD-L1 expression and facilitates antitumor immunity via inhibiting the deubiquitination activity of CSN₅ [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 2299-2312.
- 10 Zhang GY, Dong RJ, Lian L. Advances in study on chemical constituents and pharmacological activities of *Phellodendron chinense* Schineid. and *Phellodendron amurses* Rupr. [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2012, 29: 205-208.
- 11 Xiong M. Study on chemical constituents and pharmacological action of Cortex Phellodendri Chinensis [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2009, 5: 160-162.
- 12 Mori H, Fuchigami M, Inoue N, et al. Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response: effect of phellodendrine on cellular and humoral immune responses [J]. Planta Med, 1995, 61: 45-49.
- 13 Li L. Study on the relative mechanism of phellodendrine protective effect on ROS-mediated oxidative stress [D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2017.
- 14 Wang LP, Guo D, Wang G, et al. Advancement of chlorogenic acid in traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2011, 22: 961-963.
- 15 Wang M. Study on the chemical constituents and bioactivities of Cortex Phellodendron Chinenseis and *Coptis chinensis* Franch [D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2009.
- 16 Lv LJ, Zhong K, Wang XP, et al. To explore the application of HPLC and network pharmacology for the quality control of traditional Chinese medicine formula granules [J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med (贵州中医药大学学报), 2021, 43: 64-69.