

· 资源与质量评价 ·

基于 LC-MS 和分子对接策略分析金芪降糖片治疗 2 型 糖尿病的药效物质基础

王文鑫, 刘传鑫, 张丛, 何涛, 袁付丽, 韩霜, 王强, 黄建梅*
(北京中医药大学 中药学院, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 基于 LC-MS 和分子对接策略, 探讨金芪降糖片治疗 2 型糖尿病的药效物质基础。**方法:** 该研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术鉴定其化学成分, 在此基础上, 结合在线疾病数据库和蛋白互作筛选疾病靶点, 采用分子对接技术验证金芪降糖片中化学成分与疾病靶点的相互关系, 寻找金芪降糖片治疗 2 型糖尿病的潜在药效物质基础。**结果:** 基于 UPLC-Q-TOF-MS, 金芪降糖片共鉴定出 51 个化学成分, 其中黄芪 31 个, 黄连 16 个, 金银花 4 个; 通过 CTD 数据库、拓扑学分析以及相关文献, 确定过氧化氢酶 (CAT) 受体, 过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARG) 受体和胰岛素 (INS) 受体为关键靶点; 通过分子对接技术发现木兰花碱, 黄连碱, 表小檗碱, 黄芪甲苷, 咖啡酸, 巴马汀, 小檗碱, 药根碱, 小檗红碱, berberastine, groenlandicine, lycorane B, demethyleneberberine, isomucronulatol-7-O-glucoside 和 calycosin-7-O-glucoside 为金芪降糖片治疗 2 型糖尿病潜在的药效物质基础。**结论:** 蛋白互作与网络拓扑学分析有助于实现核心靶点的快速定位; 分子对接技术可实现大规模的虚拟筛选具有潜力的候选化合物; 该文整合 LC-MS 和分子对接技术可方便快捷的寻找中药复方中的潜在药效物质基础, 为后续的药物活性筛选实验提供参考。

[关键词] 2 型糖尿病; 分子对接技术; 金芪降糖片; 药效物质基础

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0125-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192414

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190903.1607.008.html>

[网络出版时间] 2019-09-03 17:11

Pharmacodynamic Basis of Jinqi Jiangtang Tablets in Treatment of Type 2 Diabetes Based on LC-MS and Molecular Docking Strategy

WANG Wen-xin, LIU Chuan-xin, ZHANG Cong, HE Tao, YUAN Fu-li, HAN Shuang,
WANG Qiang, HUANG Jian-mei*

(School of Traditional Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** Based on LC-MS and molecular docking strategy, to study the pharmacodynamic material basis of Jinqi Jiangtang tablets in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Method:** UPLC-Q-TOF-MS was used to identify the chemical constituents of Jinqi Jiangtang tablets. On this basis, the disease targets were screened based on the online disease target database and protein-protein interaction (PPI). The molecular docking technology was used to verify the relationship between the chemical constituents and disease targets in Jinqi Jiangtang tablets, so as to find out the potential pharmacodynamic basis of Jinqi Jiangtang tablets in the treatment of T2DM. **Result:** Based on UPLC-Q-TOF-MS, 51 chemical constituents were identified in Jinqi Jiangtang tablets, including 31 astragalus, 16 coptis and 4 honeysuckle. The key targets of catalase from micrococcus lysodeiktic

[收稿日期] 20190326(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774014)

[第一作者] 王文鑫, 在读硕士, 从事代谢组学与计算机辅助药物设计研究, E-mail: wwx15735178895@163.com

[通信作者] * 黄建梅, 博士, 教授, 从事中药质量控制及药物代谢研究, E-mail: huangjm@buem.edu.cn

(CAT) receptor, peroxisome proliferative activated receptor (PPARG) receptor and insulin (INS) receptor were identified by CTD database, topological analysis and related literature. Based on LC-MS and molecular docking technology, we found that magnoflorine, coptisine, epiberberine, astragaloside IV, caffeic acid, palmatine, berberine, jateorhizine, berberubine, berberastine, groenlandne, lycoranine B, demethyleneberberine, isomucronolula-7-O-glucoside and calycosin-7-O-glucoside were used to treat type 2 diabetes potential pharmacodynamic material basis of urinary diseases. **Conclusion:** Protein interaction and network topology analysis are helpful for the rapid localization of core targets. In addition, molecular docking technology can realize large-scale virtual screening of potential candidate compounds. The integration of LC-MS and molecular docking technology can facilitate and quickly find the potential pharmacodynamic substance basis in traditional Chinese medicine prescriptions, and provide a reference for subsequent drug activity screening experiments.

[**Key words**] type 2 diabetes mellitus; molecular docking technology; Jinqi Jiangtang tablets; pharmacodynamic material basis

2 型糖尿病 (T2DM) 是以血糖增高为特征的代谢性疾病, 该疾病由胰岛素受损所致^[1]。目前, 治疗 T2DM 的西药多针对单靶点进行研发, 其降糖效果虽然明显, 但长期使用容易引起多种不良反应, 如低血糖、酮酸中毒、肥胖、心血管疾病等^[2]。

金芪降糖片 (Z10920027) 是由黄芪、黄连、金银花组成的中药复方制剂, 具有清热益气的功效, 该方具有良好的降血糖、降血脂作用, 临床用于治疗轻、中度非胰岛素依赖型糖尿病^[3]。然而, 截至目前, 金芪降糖片治疗 T2DM 的药效物质基础尚不明确。

超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术, 不仅具备 UPLC 高效的分离能力, 同时 Q-TOF 拥有高分辨的定性能力, 相对其他定性方法而言, 该方法具有准确度高、通用性好以及灵活便捷的特点, 已逐渐成为中药复杂体系中化学成分快速分离和鉴定的有效手段^[4]。分子对接是利用计算机模拟药物分子产生药效反应的过程, 通过蛋白质大分子受体与药物小分子之间的相对位置和取向了解两者之间的相互作用, 从而推测出药物起效的作用机制^[5]。分子对接具有方便、快捷和成本低的优势, 其广泛应用于计算机辅助药物设计、先导化合物的开发以及分子靶点的确定^[6]。可见, 在药物设计以及探讨药物作用机制的过程中, 分子对接技术处于重要地位。

基于以上研究现状, 本文整合 LC-MS 与分子对接技术探讨金芪降糖片治疗 T2DM 的药效物质基础。采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析其化学成分, 在此基础上, 结合在线疾病数据库和蛋白互作筛选靶点, 进而采用分子对接验证金芪降糖片中化学成分与疾病靶点的相互关系, 寻找金芪降糖片治疗 T2DM 的潜在药效物质基础。

1 材料

金芪降糖片 (天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂, 批号 FD87103), 甲醇、乙腈、甲酸 (赛默飞世尔科技有限公司), 0.22 μm 有机微孔滤膜 (津腾实验设备有限公司)。

ACQUITY UPLC Class I 型超高效液相色谱仪, SYNAPT G2-Si Q-TOF/MS 型原位离子敞度高分辨质谱仪, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), Acquity UPLC HSS T₃ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) (美国 Waters 公司); Milli-Q 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司), 数据处理软件 MassLynx 4.1, 分子显示软件 PyMOL, 分子对接软件 AutoDock Tool 1.5.6。

2 方法

2.1 溶液的配制 称取去除包衣的金芪降糖片粉末 0.5 g 左右至 100 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声提取 1 h, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 备用。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 14 min, 2% B; 14 ~ 16.5 min, 2% ~ 60% B; 16.5 ~ 18 min, 60% ~ 98% B; 18 ~ 20 min, 98% B), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子模式下分别进行质谱检测分析。使用高纯 N₂ 作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体, 干燥气流速 10 mL·min⁻¹, N₂ 温度 120 °C, 雾化气气压 310 kPa, 脱溶剂氮气流速 900 L·h⁻¹, 锥孔反吹氮气 50 L·h⁻¹。毛细管电离电压 500 V, 锥孔电压 40 V, 碰撞能量为 40 ~ 65 eV, 四极杆扫描范围为

50 ~ 1 200 Da。

2.3 金芪降糖片治疗“2 型糖尿病-作用靶点”的获取

2.3.1 基于在线数据库查找“2 型糖尿病-作用靶点”以“type 2 diabetes mellitus”为关键词,通过基因组学毒理数据库 Comparative Toxicogenomics Database, CTD (<http://ctdbase.org/>) 查找 T2DM 的疾病治疗靶点。

2.3.2 靶蛋白互作网络(PPI)的构建与分析 基于 String 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>),将所获取的金芪降糖片治疗 T2DM 的靶点导入,选择人源物种,导出 TSV 格式结果。将此结果一并导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络,以 Degree 反映网络中节点的大小,得到金芪降糖片治疗 T2DM 的蛋白相互作用网络,并用 Cytoscape 中的“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑学分析,将 Degree 前 3 的靶点作为网络中的关键靶点。

2.4 分子对接

2.4.1 配体分子准备 从 ZINC (<http://zinc.docking.org/>)数据库下载小分子配体(mol₂格式),AutoDock Tool 1.5.6 软件对配体小分子配体进行处理,包括添加极性氢原子和 Gasteiger 电荷等过程,之后保存相应的 pdbqt 格式。

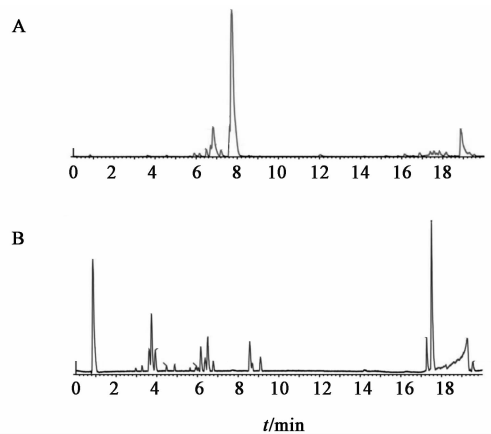
2.4.2 受体分子准备 从 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>)蛋白质数据库获得蛋白质受体的晶体结构,CAT,PPARG 和 INSR 受体对应的 PDB ID 分别是 1DGF,1FM9 和 1IR3。利用 PYMOL 软件去除水分子和蛋白质受体中的原有配体,以 pdb 格式保存。通过 AutoDock Tool 1.5.6 软件,在大分子受体上添加极性氢原子和 Gasteiger 电荷等过程,之后保存相应的 pdbqt 格式。

2.4.3 分子对接过程 在 AutoDock Tool 1.5.6 软件中,利用 AutoGrid 设置网格大小和参数,运行生成相应的文件,选择拉马克遗传算法预测受体和

配体分子的最佳结合位置,最后运行 AutoDock 进行分子对接计算实验运算。对接结果以结合自由能(binding energy, ΔG_{bind})和估计抑制常数(inhibit constant, K_i)作为参考指标。

3 结果

3.1 金芪降糖片化学成分的鉴定 考虑到金芪降糖片中复杂的化学成分,因此本研究采用正(+),负(-)两种 ESI 电离模式对金芪降糖片的化学成分进行全扫描,以尽可能多的鉴定其化学成分。见图 1。



A. ESI⁺; B. ESI⁻

图 1 金芪降糖片 Q-TOF/MS 的基峰色谱 BPI

Fig.1 Base peak chromatogram BPI of Jinqi Jiangtang tablets Q-TOF-MS

UPLC-Q-TOF-MS 分析进程结束后,通过 MassLynx 4.1 软件对峰值进行检测、校准、采集得到原始数据。参数如下,保留时间 0 ~ 20 min, m/z 50 ~ 1 200 Da;消除噪声水平 6。然后转换成 Excel 格式,包括保留时间, m/z 及各组峰面积等。数据通过处理得到目标化合物。最后,由数据库确定提取目标化合物,并通过二级碎片和对照品比对进行鉴定。金芪降糖片共鉴定出 51 个化学成分,其中黄芪 31 个,黄连 16 个,金银花 4 个^[7-33]。见表 1。

表 1 金芪降糖片中化合物的 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析

Table 1 Qualitative analysis of compounds in Jinqi Jiangtang tablets by UPLC-Q-TOF-MS

No.	t_R /min	加和离子	测定值 m/z	计算值 m/z	δ /ppm	特征离子	化学式	鉴定	来源
1	0.77	$[M-H]^-$	131.044 4	131.045 7	-9.92	131.044 4 $[M-H]^-$, 114.020 1 $[M-H-NH_3]^-$, 113.037 8 $[M-H-H_2O]^-$, 95.032 6 $[M-H-CH_2O_2]^-$	$C_4H_8N_2O_3$	asparagine ^[7,11]	A
2	0.86	$[M+HCOO]^-$	387.111 7	387.113 9	-5.67	387.111 7 $[M+HCOO]^-$, 341.111 9 $[M-H]^-$, 179.054 2 $[M-H-glc]^-$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	disaccharide ^[7]	A

续表 1

No.	t_R /min	加和离子	测定值 m/z	计算值 m/z	δ /ppm	特征离子	化学式	鉴定	来源
3	0.78	$[M-H]^-$	503.164 8	503.161 2	7.15	503.164 8 $[M-H]^-$, 161.049 8 $[M-2H-2glc]^-$	$C_{18}H_{32}O_{16}$	raffinose ^[7]	A
4	1.59	$[M-H]^-$	134.047 5	134.046 7	5.97	134.047 5 $[M-H]^-$, 107.038 7 $[M-H-H-NCN]^-$	$C_5H_5N_5$	adenine ^[7]	A
5	4.66	$[M-H]^-$	371.135 3	371.134 2	2.96	371.135 3 $[M-H]^-$, 209.044 6 $[M-H-H-gluc]^-$	$C_{17}H_{24}O_9$	syringin ^[7]	A
6	2.77	$[M-H]^-$	153.018 1	153.018 8	-4.57	153.018 1 $[M-H]^-$, 109.032 4 $[M-H-H-CO_2]^-$	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸 ^[7]	A
7	5.1	$[M-H]^-$	433.132 6	433.134 6	-4.62	433.132 6 $[M-H]^-$, 139.004 5 $[M-H-H-C_5H_8O_4-gluc]^-$, 301.098 6 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$	$C_{18}H_{26}O_{12}$	markhamioside F ^[7]	A
8	3.51	$[M-H]^-$	137.023 2	137.023 9	-5.11	137.023 2 $[M-H]^-$, 93.036 5 $[M-H-H-CO_2]^-$, 75.003 8 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$	$C_7H_6O_3$	羟基苯甲酸 ^[7]	A
9	3.91	$[M-H]^-$	193.051 4	193.050 1	6.73	193.051 4 $[M-H]^-$, 178.995 8 $[M-H-H-CH_3]^-$, 149.060 6 $[M-H-H-CO_2]^-$, 134.037 3 $[M-H-H-CO_2-CH_3]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸 ^[7-8]	A
10	5.97	$[M-H]^-$	623.158 9	623.161 2	-3.69	623.158 9 $[M-H]^-$, 461.189 5 $[M-H-H-gluc]^-$, 299.024 7 $[M-H-2glc]^-$	$C_{28}H_{32}O_{16}$	rhamnocitrin3,4'-di-O-glucoside ^[7]	A
11	4.11	$[M+HCOO]^-$	225.038 0	225.039 9	-8.44	225.038 0 $[M+HCOO]^-$, 179.036 7 $[M-H]^-$, 135.044 5 $[M-H-H-CO_2]^-$, 117.033 0 $[M-H-H-CO_2-H_2O]^-$	$C_9H_8O_4$	咖啡酸 ^[7-8]	A, L
12	6.49	$[M-H]^-$	461.105 1	461.108 4	-7.16	461.105 1 $[M-H]^-$, 299.055 0 $[M-H-H-gluc]^-$, 284.038 1 $[M-H-H-gluc-CH_3]^-$	$C_{22}H_{22}O_{11}$	pratensein-7-O-glucoside ^[7]	A
13	4.93	$[M+HCOO]^-$	269.064 0	269.066 1	-7.80	269.064 0 $[M+HCOO]^-$, 223.062 9 $[M-H]^-$, 205.002 3 $[M-H-H_2O]^-$, 179.030 8 $[M-H-H-CO_2]^-$, 163.035 4 $[M-H-2CH_2O]^-$, 161.044 3 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$	$C_{11}H_{12}O_5$	sinapic acid ^[7]	A
14	6.27	$[M-H]^-$	431.098 1	431.097 8	0.70	431.098 1 $[M-H]^-$, 269.042 5 $[M-H-H-gluc]^-$	$C_{21}H_{20}O_{10}$	cosmosiin ^[7]	A
15	6.58	$[M+Cl]^-$	223.075 9	223.073 7	9.86	223.075 9 $[M+Cl]^-$, 187.099 9 $[M-H]^-$, 169.082 3 $[M-H-H_2O]^-$, 143.862 9 $[M-H-H-CO_2]^-$, 125.096 3 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$	$C_9H_{16}O_4$	azelaic acid ^[7]	A
16	7.95	$[M-H]^-$	463.162 1	463.160 4	3.67	463.162 1 $[M-H]^-$, 301.030 3 $[M-H-H-gluc]^-$, 271.054 8 $[M-H-H-gluc-CH_3O]^-$	$C_{23}H_{28}O_{10}$	isomucronulatol-7-O-glucoside ^[7]	A
17	3.61	$[M-H]^-$	353.085 9	353.087 3	-3.97	353.085 9 $[M-H]^-$, 191.053 2 $[M-H-H-Caffeyl]^-$, 173.042 6 $[M-H-H-Caffeyl-H_2O]^-$, 161.026 7 $[M-H-quinine acyl]^-$	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 ^[10]	A
18	0.80	$[M+H]^+$	203.052 8	203.053 2	-1.97	203.052 8 $[M+H]^+$, 143.019 8 $[M+Na-C_2H_4O_2]^+$	$C_6H_{12}O_6$	己糖 ^[9]	A
19	0.84	$[M+H]^+$	132.099 7	132.102 5	-2.27	132.099 7 $[M+H]^+$, 86.950 0 $[M+H-CH_2O_2]^+$	$C_6H_{13}NO_2$	高氨酸 ^[10]	A

续表 1

No.	t_R /min	加和离子	测定值 m/z	计算值 m/z	δ /ppm	特征离子	化学式	鉴定	来源
20	10.01	$[M + H]^+$	269.084 6	269.082 4	8.18	269.084 6 $[M + H]^+$, 253.837 5 $[M + H - C_{15}H_7O_4]^+$, 225.476 5 $[M + H - C_{14}H_7O_3]^+$	$C_{16}H_{12}O_4$	formononetin ^[11-12]	A
21	5.58	$[M + H]^+$	595.166 0	595.166 3	-0.50	595.166 0 $[M + H]^+$, 433.024 3 $[M + H - glc]^+$, 271.072 1 $[M + H - 2glc]^+$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	emodin-di- <i>O</i> -glucoside ^[7]	A
22	5.38	$[M + H]^+$	285.078 4	285.076 3	7.37	285.078 4 $[M + H]^+$, 270.899 6 $[M + H - CH_3]^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	毛蕊异黄酮 ^[12]	A
23	8.45	$[M + H]^+$	913.500 7	913.516 1	-9.20	913.500 7 $[M + H]^+$, 935.330 1 $[M + Na]^+$	$C_{47}H_{76}O_{17}$	astragaloside VIII ^[7,12]	A
24	0.81	$[M + H]^+$	104.108 1	104.107 5	5.76	104.108 1 $[M + H]^+$, 60.081 5 $[M + H - C_2H_3O]^+$	$C_5H_{13}NO$	choline ^[13]	A
25	0.87	$[M + H]^+$	136.063 1	136.062 3	5.88	136.063 1 $[M + H]^+$, 119.017 7 $[M + H - NH_3]^+$, 92.956 9 $[M + H - NH_3 - HCN]^+$	$C_5H_5N_5$	adenine ^[7]	A
26	1.64	$[M + H]^+$	268.104 3	268.104 6	-1.12	268.104 3 $[M + H]^+$, 136.935 3 $[M + H - ribose]^+$, 119.809 7 $[M + H - ribose - NH_3]^+$	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	adenine nucleoside ^[7]	A
27	18.17	$[M + H]^+$	643.219 0	643.223 8	-7.46	643.219 0 $[M + H]^+$, 665.442 4 $[M + Na]^+$	$C_{29}H_{38}O_{16}$	isomucronulatol-2',5'-di- <i>O</i> -glucoside ^[7]	A
28	5.92	$[M + H]^+$	195.064 0	195.065 7	-8.72	195.064 0 $[M + H]^+$, 177.054 6 $[M + H - H_2O]^+$, 149.023 3 $[M + H - CH_2O_2]^+$, 117.035 1 $[M + H - CH_2O_2 - CH_3OH]^+$	$C_{10}H_{10}O_4$	异阿魏酸 ^[7]	A
29	5.38	$[M + H]^+$	447.127 5	447.129 1	-3.58	447.127 5 $[M + H]^+$, 285.071 0 $[M + H - glc]^+$, 270.059 4 $[M + H - glc - CH_3]^+$	$C_{22}H_{22}O_{10}$	calycosin-7- <i>O</i> -glucoside ^[7,12]	A
30	8.57	$[M + H]^+$	943.519 5	943.526 6	-7.52	943.519 5 $[M + H]^+$, 965.356 3 $[M + Na]^+$	$C_{48}H_{78}O_{18}$	soyasaponin I ^[7,10]	A
31	18.37	$[M + NH_4]^+$	803.500 1	803.503 1	-3.73	803.500 1 $[M + NH_4]^+$, 807.254 3 $[M + NH_4 + Na]^+$	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪甲苷IV ^[12]	A
32	4.51	$[M + H]^+$	342.172 5	342.170 5	5.85	342.172 5 $[M + H]^+$, 297.115 2 $[M + H - C_2H_7N]^+$, 282.093 4 $[M + H - C_2H_7N - CH_3]^+$, 265.080 8 $[M + H - C_2H_7N - MeOH]^+$	$C_{20}H_{23}NO_4$	木兰黄碱 ^[14-15,19-20]	C
33	7.22	$[M + H]^+$	322.107 8	322.107 9	-0.31	322.107 8 $[M + H]^+$, 279.087 7 $[M + H - CH_3 - CO]^+$, 307.086 1 $[M + H - CH_3]^+$	$C_{19}H_{15}NO_4$	groenlandicine ^[16]	C
34	7.41	$[M + H]^+$	352.120 7	352.118 5	6.25	352.120 7 $[M + H]^+$, 703.219 7 $[2M + H]^+$	$C_{20}H_{17}NO_5$	berberastine ^[17,21]	C
35	7.45	$[M + H]^+$	368.151 7	368.149 8	5.16	368.151 7 $[M + H]^+$, 735.229 2 $[2M + H]^+$	$C_{21}H_{21}NO_5$	lincangene ^[21]	C
36	5.99	$[M + H]^+$	324.124 8	324.123 6	3.70	324.124 8 $[M + H]^+$, 647.178 0 $[2M + H]^+$	$C_{19}H_{17}NO_4$	demethylene-berberine ^[23-24]	C
37	5.06	$[M + H + NH_4]^+$	325.115 9	325.118 8	-10.38	325.115 9 $[M + H + NH_4]^+$, 308.089 1 $[M + H]^+$, 615.141 8 $[2M + H]^+$	$C_{18}H_{13}NO_4$	lycoranine B ^[21]	C

续表 1

No.	t_R /min	加和离子	测定值 m/z	计算值 m/z	δ /ppm	特征离子	化学式	鉴定	来源
38	6.71	$[M+H]^+$	338.138 3	338.139 2	-2.66	338.138 3 $[M+H]^+$, 294.112 6 $[M-CH_3-CO]^+$, 323.111 6 $[M+H-CH_3]^+$	$C_{20}H_{19}NO_4$	非洲防己碱 ^[14-17]	C
39	6.72	$[M+H]^+$	336.126 3	336.123 6	8.03	336.126 3 $[M+H]^+$, 320.097 3 $[M+H-CH_4]^+$, 292.102 0 $[M+H-CH_4-C_2H_4]^+$	$C_{20}H_{17}NO_4$	表小檗碱 ^[22-24]	C
40	6.90	$[M+H]^+$	320.089 4	320.092 3	-9.06	320.089 4 $[M+H]^+$, 292.102 0 $[M+H-CO]^+$	$C_{19}H_{13}NO_4$	黄连碱 ^[15-20]	C
41	5.08	$[M+H]^+$	310.107 8	310.107 9	-0.32	310.107 8 $[M+H]^+$, 619.339 5 $[2M+H]^+$	$C_{18}H_{15}NO_4$	thalifendine ^[21]	C
42	7.63	$[M+H]^+$	352.153 5	352.154 9	-3.98	352.153 5 $[M+H]^+$, 294.112 6 $[M+H-2CH_3-CO]^+$, 322.107 8 $[M+H-2CH_3]^+$, 336.126 3 $[M+H-CH_4]^+$	$C_{21}H_{21}NO_4$	巴马汀 ^[14-20]	C
43	7.72	$[M+H]^+$	336.126 3	336.123 6	8.03	336.126 3 $[M+H]^+$, 278.082 1 $[M+H-2CH_3-CO]^+$, 292.094 5 $[M+H-C_2H_4O]^+$, 306.077 0 $[M+H-2CH_3]^+$, 320.089 4 $[M+H-CH_4]^+$	$C_{20}H_{17}NO_4$	小檗碱 ^[22-23]	C
44	8.31	$[M+H]^+$	350.140 9	350.139 2	4.86	350.1409 $[M+H]^+$, 699.254 2 $[2M+H]^+$	$C_{21}H_{19}NO_4$	dihydrocherythrine ^[21]	C
45	4.05	$[M+H]^+$	291.125 3	291.125 9	-2.06	291.125 3 $[M+H]^+$, 274.007 8 $[M+H-OH]^+$, 262.982 0 $[M+H-OH-C]^+$, 246.004 0 $[M-2OH-C+2H]^+$	$C_{19}H_{16}NO_4$	berberrubine ^[25-26]	C
46	6.83	$[M+H]^+$	338.138 3	338.139 2	-2.66	338.138 3 $[M+H]^+$, 674.267 3 $[2M+H]^+$	$C_{20}H_{19}NO_4$	jatrorrhizine ^[17,21]	C
47	6.81	$[M+H]^+$	339.145 7	339.142 6	-9.14	339.147 1 $[M+H]^+$, 322.107 8 $[M-CH_4]^+$, 308.089 1 $[M-2CH_3]^+$, 294.112 6 $[M-C_2H_4O]^+$, 280.102 4 $[M-2CH_3-CO]^+$	$C_{20}H_{20}NO_4$	jateorrhizine ^[22]	C
48	3.28	$[M-H]^-$	375.127 5	375.129 1	-4.27	213.074 5 $[M-glc-H]^-$, 169.088 0 $[M-glc-CO_2-H]^-$, 151.027 4 $[M-glc-H_2O-CO_2-H]^-$, 125.027 9 $[M-glc-H_2O-CO_2-C_2H_2-H]^-$	$C_{16}H_{24}O_{10}$	loganin acid ^[27,29-30]	L
49	4.48	$[M-H]^-$	357.120 4	357.1186	5.04	195.066 1 $[M-glc-H]^-$, 149.910 0 $[M-glc-H_2O-CO-H]^-$, 124.988 8 $[M-pent-glc-C_3O-H_2O-H]^-$	$C_{16}H_{22}O_9$	sweroside ^[31-33]	L
50	4.86	$[M-H]^-$	403.126 4	403.124 0	5.95	371.101 7 $[M-H-32]^-$, 223.062 9 $[M-glc-H_2O-H]^-$, 191.053 2 $[M-H-glc-H_2O-32]^-$, 164.926 6 $[M-H-glc-H_2O-32-CO]^-$, 121.029 7 $[M-H-glc-H_2O-32-CO-H]^-$	$C_{17}H_{24}O_{11}$	secoxyloganin ^[28-30]	L
51	1.37	$[M-H]^-$	387.128 9	387.129 1	-0.52	225.858 1 $[M-H-glc]^-$, 179.054 2 $[M-H-glc-H_2O-CO]^-$, 155.956 1 $[M-H-glc-H_2O-CO-24]^-$, 123.901 9 $[M-H-glc-H_2O-CO-24-32]^-$	$C_{17}H_{24}O_{10}$	secologanin ^[29-33]	L

注: A. 黄芪; C. 黄连; L. 金银花; caffeyl. 咖啡酰基; quinine acyl. 奎宁酰基; pent. 戊糖基。

3.2 金芪降糖片治疗“2 型糖尿病-作用靶点”的选择 以“type 2 diabetes mellitus”为关键词,通过 CTD

数据库查找 2 型糖尿病的直接作用靶点,结果中标记有“marker/mechanism/therapeutic”的靶标有 6 个,

标记有“therapeutic”的靶标有 3 个。将该 9 个靶蛋白导入 String 蛋白互作数据库,选择人源物种,挖掘间接靶标,一并导入 Cytoscape 软件进行互作网络的拓扑学分析,共涉及 21 个节点,初步选择 Degree 数值高的直接作用靶点 INS(胰岛素),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)和过氧化氢酶(CAT)作为分子对接的蛋白作用靶点,见图 2,3。



图 2 2 型糖尿病靶标的网络相互作用

Fig. 2 Network interaction map of targets in type 2 diabetes mellitus

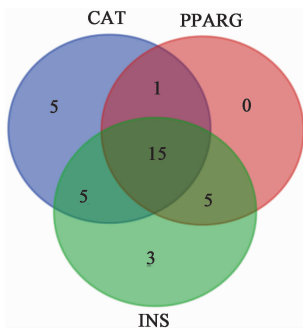


图 3 分子对接结果

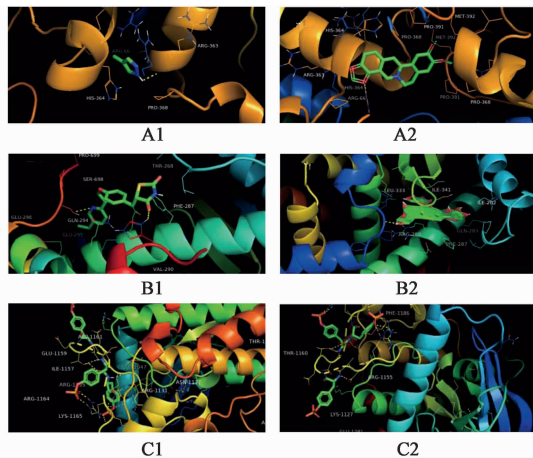
Fig. 3 Venn diagram of molecular docking results

结合相关报道,胰岛素(INS)功能异常或缺乏可引起 2 型糖尿病^[34];国外有研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)是属于转录因子的核激素受体超家族成员,参与糖脂代谢和线粒体能量代谢调节,其与糖尿病的发生极为密切^[35],同时,唐新等^[36]研究显示 PPARG 基因单核苷酸多态性与 T2DM 有关,这些提示 PPARG 基因与 T2DM,代谢综合征及脂类糖类代谢密切相关;研究证实,氧化应激与 T2DM 及其并发症的发生发展关系紧密,贾春新等^[37]研究发现,CAT 作为内源性抗氧化酶,可清除活性氧及氧化损伤代谢产物以维持细胞正常的氧化还原状态,因此,CAT 在 T2DM 发生及发展中扮演重

要角色。

本研究结合在线数据库以及相关文献的佐证,最后选择 INS 受体,PPARG 受体和 CAT 受体进行下一步分子对接工作。

3.3 分子对接结果 利用 AutoDock 分子对接软件,将金芪降糖片中所鉴定出的 51 个化合物分别和 CAT 受体,PPARG 受体和 INS 受体进行分子对接。对接结果以结合自由能(binding energy, ΔG_{bind})和估计抑制常数(inhibit constant, K_i)作为参考指标,其中 ΔG_{bind} 和 K_i 越小表明药物小分子与蛋白质大分子受体结合越稳定。结果见表 2,发现与上市的 3 个阳性药甲吡唑,吡格列酮和罗格列酮的分子对接结果的均值比较,结合图 4 发现,3 个靶标蛋白质与金芪降糖片中的 15 个化学成分有较好的结合作用,这些成分包括木兰花碱,黄连碱,表小檗碱,黄芪甲苷,咖啡酸,巴马汀,小檗碱,药根碱,小檗红碱,berberastine, groenlandicine, lycoranine B, isomucronulatol-7-O-glucoside, demethyleneberberine 和 calycosin-7-O-glucoside。基于此结果,初步确定这 15 种成分是金芪降糖片治疗 2 型糖尿病潜在的药效物质基础。



A1. CAT 受体与甲吡唑配体;A2. CAT 受体和黄连碱配体;B1. PPARG 受体分别与吡格列酮配体,PPARG 受体与黄芪甲苷配体;C1. INS 受体分别与罗格列酮配体,INS 受体与黄连素配体

图 4 药物分子与关键靶点分子对接模式

Fig. 4 Patterns of docking between drug molecules and key targets

4 讨论

4.1 色谱、质谱条件的优化 中药复方中的化学成分是寻找药物成分以及确认药效物质基础的关键。传统的分析方法通常采用液相色谱-紫外检测方法检测中药中复杂的化合物,但因其所得的化合物指纹图谱往往存在灵敏度低且专一性差的特点,以致无法确认化学物质的结构信息。

表 2 金芪降糖片中化合物的分子对接

Table 2 Molecular docking results of compounds in Jinqi Jiangtang tables

金芪 降糖片	编号	化合物名称	CAT		PPARG		INS		
			ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹	ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹	ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹	
阳性药	1	甲吡唑	-3.09	5.41	-3.55	2.5	-3.08	5.53	
	2	吡格列酮	-4.08	1.03	-5.14	169.6	-4.82	293.59	
	3	罗格列酮	-4.63	400.59	-4.80	269.97	-5.17	162.63	
平均值	4	average	-3.93	135.68	-4.50	147.07	-4.36	153.92	
黄芪	5	asparagine	-2.25	22.34	-3.41	3.15	-2.92	7.27	
	6	disaccharide	-3.44	2.99	-3.69	1.97	-2.30	20.46	
	7	raffinose	-3.03	47.71	-1.27	117.95	-1.35	102.54	
	8	adenine	-3.74	1.81	-3.87	1.45	-3.02	6.14	
	9	syringin	-0.14	9.76	-2.69	10.62	-3.69	1.99	
	10	protocatechuic acid	-2.15	26.54	-1.72	54.91	-4.62	411.81	
	11	markhamioside F	-4.51	1.33	0.12	-4.35	-2.67	11.12	
	12	hydroxybenzoic acid	-4.92	245.48	-1.87	42.45	-3.10	5.33	
	13	阿魏酸	-1.94	37.93	-3.38	3.32	-4.26	759.80	
	14	rhamnocitrin 3,4'-di-O-glucoside	-4.64	400.0	-1.47	83.34	-4.11	972.50	
	15	咖啡酸	-5.49	94.64	-4.63	1.26	-4.48	1.20	
	16	pratensein-7-O-glucoside	-7.15	5.77	-2.73	10.01	-5.70	66.75	
	17	sinapic acid	-2.91	7.35	-1.96	36.46	-3.47	2.84	
	18	cosmosiin	-2.02	32.79	-3.89	1.41	-3.74	1.81	
	19	azelaic acid	-3.91	1.37	-1.32	107.56	-0.70	307.89	
	20	isomucronulatol-7-O-glucoside	-4.66	2.88	-6.97	7.72	-6.70	12.22	
	21	chlorogenic acid	-3.05	5.79	-3.45	2.94	-2.67	11.04	
	22	hexose	-1.62	64.45	-3.25	4.12	-2.54	13.76	
	23	leucine	-3.16	52.17	-2.25	22.39	-3.06	5.76	
	24	formononetin	-3.13	5.07	-5.89	47.9	-6.40	20.48	
	25	emodin-di-O-glucoside	-6.55	15.73	-1.18	137.45	-4.75	329.70	
	26	calycosin	-2.82	8.59	-5.82	54.14	-5.34	122.20	
	27	astragaloside VIII	-8.30	1.87	-9.55	100.24	-3.77	1.72	
	28	choline	-2.14	26.97	-2.27	21.71	-3.23	4.26	
	29	adenine	-3.74	1.81	-3.87	1.45	-3.02	6.14	
	30	adenine nucleoside	-3.93	1.31	-4.00	1.16	-3.50	2.73	
	31	isomucronulatol-2',5'-di-O-glucoside	-4.09	1.01	-3.60	2.28	-4.07	1.04	
	32	isoferulic acid	-2.13	7.43	-3.37	3.41	-4.70	360.10	
	33	calycosin-7-O-glucoside	-6.29	24.54	-5.22	1.65	-5.34	121.69	
	34	soyasaponin I	-1.79	8.62	-4.78	312.21	-4.96	231.70	
	35	黄芪甲苷	-7.70	2.25	-10.21	33.01	-6.61	14.25	
	黄连	36	木兰花碱	-4.73	338.34	-8.30	43.76	-5.65	71.74

续表 2

金芪 降糖片	编号	化合物名称	CAT		PPARG		INS	
			ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹	ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹	ΔG_{bind} /kcal·mol ⁻¹	K_i /μmol·L ⁻¹
	37	groenlandicine	-7.63	2.56	-8.27	5.05	-7.16	5.68
	38	berberastine	-7.73	2.14	-4.70	7.12	-6.62	14.00
	39	lincangene	-6.16	30.42	-0.47	453.74	-5.56	83.60
	40	demethyleneberberine	-6.86	9.40	-7.05	6.81	-6.84	9.61
	41	lycoranine B	-7.63	2.57	-8.50	87.88	-7.34	4.13
	42	columbamine	-5.25	141.52	-3.43	3.07	-5.32	126.69
	43	epiberberine	-8.05	1.26	-6.58	15.12	-6.80	10.39
	44	黄连碱	-7.57	2.81	-8.27	18.43	-6.72	11.93
	45	thalifendine	-7.91	1.59	-5.40	109.75	-6.70	12.32
	46	巴马汀	-5.71	65.68	-7.41	5.79	-5.44	103.51
	47	小檗碱	-6.27	26.26	-6.71	12.12	-7.08	6.51
	48	dihydrochelerythrine	-3.00	6.30	-7.51	3.12	-6.88	9.08
	49	berberrubine	-7.65	2.48	-5.10	5.22	-7.54	2.98
	50	jatrorrhizine	-1.85	15.62	-7.70	2.27	-6.75	11.36
	51	药根碱	-6.57	15.37	-5.28	135.82	-6.34	22.43
金银花	52	马钱苷酸	-1.34	104.21	-1.68	58.39	-3.79	1.66
	53	sweroside	-2.82	8.58	-2.42	16.83	-5.30	130.96
	54	secoxyloganin	-1.97	32.45	-1.22	127.66	-3.47	2.84
	55	secologanin	-2.57	56.26	-2.92	7.25	-3.45	2.96

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 高分辨原位质谱平台,为了保证实验结果的准确性和可靠性,本实验对液质条件进行了一定程度的优化。本研究中,基于金芪降糖片主要 3 味中药(黄芪、黄连、金银花)的成分信息并结合相关文献,采用 BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,美国 Waters 公司)和 HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,美国 Waters 公司)进行色谱条件优化,同时对进样量和流速进行调整。最终采用 BEH C₁₈ 色谱柱,优化条件为柱温为 40 °C,流速为 0.3 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,在流动相中加入 0.1% 甲酸能够得到较好的分离度且较好的峰型。同时,为了全面地分析金芪降糖片中的化学成分,本实验分别进行了正、负离子模式的全扫描,在提取离子流图(BPI)中发现金芪降糖片中的化合物在正负离子模式下都有出峰行为,参照对照品的质谱行为,选用两种模式同时进样分析。

4.2 靶点的选择与确定 生命体是一个极其复杂的系统,各作用靶点之间互作联系,互相影响,本文基于 CTD 数据库查找 T2DM 的疾病靶点,在此基础上引入拓扑学分析策略,以 degree 值作为参考寻找

网络关系中的核心靶点,并通过文献确证,最终确定分子对接的受体为 CAT, PPARG 和 INS。其中 PPARG 受体^[38]是调节目的基因表达的核内受体转录因子超家族成员,通过与目的基因增强子位点中的特异性过氧化物酶体增殖物反应元件结合,参与调控脂质代谢、胰岛素敏感性、脂肪酸转运等作用;CAT 受体^[39]可以改善 ROS 产生增加所致的 PDX-1 表达下降及活性改变,从而改善 β 细胞功能;INS 受体^[40]为胰岛素受体,胰岛素与胰岛素受体结合促进胰岛素受体底物的磷酸化,进而激活各种下游分子如磷脂酰肌醇 3 激酶,蛋白激酶 B 等,从而起到改善糖尿病的作用。基于以上文献报道,CAT 受体,PPARG 受体和 INS 受体均与糖尿病存在密切的关系并起到关键性的作用。该方法充分考略到靶点之间的相互作用,以数据库为龙头,以网络分析为手段,系统、快速、准确的筛选关键靶点。

4.3 分子对接在筛选药效物质基础中的重要作用 目前,中药药效物质基础的研究方法主要有谱-效关系法^[41]、仿生技术法^[42]及细胞膜色谱法^[43]等,其中,谱-效关系法的瓶颈主要是化学成分指纹谱

表征不足;仿生技术法和细胞膜色谱法在筛选过程中,活性成分可能与功能性受体及非功能性受体相结合,筛选出的活性成分不能很好代表中药发挥药效的物质基础。基于以上研究现状,本文采用分子对接技术,其可通过大规模的虚拟筛选寻找具有潜力的候选化合物,该方法节省实验操作,缩短实验时间,通过模拟药物分子与受体活性位点的相对位置和取向评价结合作用的优劣,初步筛选中药复方的药效物质基础,避免传统药效物质基础成本过高,分析物过多的不足,并为其进一步的机制研究指明方向^[41]。

4.4 金芪降糖片治疗 T2DM 潜在药效物质基础

T2DM 是由于胰岛素调控葡萄糖代谢能力的下降,并且伴随胰岛 β 细胞功能缺陷,从而导致胰岛素分泌减少,脂肪、碳水化合物和蛋白质代谢异常,以血糖升高为主要特征代谢性疾病^[44]。在传统中医理论中,糖尿病被称为“消渴病”,消渴是因为五脏虚弱、阴虚燥热,从而引起形体消瘦、多尿、多食、多饮。禀赋不足、劳欲过度、情志失调以及饮食不节等均可能导致消渴。中药复方制剂金芪降糖片来源于《千金方》中的千金黄连丸^[45],由黄连、黄芪、金银花组成,其君药为黄连,臣药为黄芪,佐使药为金银花,具有清热益气的功效,该方具有良好的降血糖、降血脂作用,临床用于治疗轻、中度非胰岛素依赖型糖尿病。

本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 和分子对接技术发现金芪降糖片治疗 T2DM 的药效物质基础包括木兰花碱,黄芪甲苷和咖啡酸等 15 种成分,其中木兰花碱,黄连碱,表小檗碱,巴马汀,小檗碱,药根碱,小檗红碱,berberastine, groenlandicine, lycoranine B, demethyleneberberine 这 11 中成分来自于黄连,甲芪甲苷, isomucronulatol-7-O-glucoside, calycosin-7-O-glucoside 这 3 种成分来自于黄芪,咖啡酸来自于黄芪和金银花。其中黄连中含量最高的小檗碱,具有降低 T 细胞与外基质的黏附能力,通过阻断炎症细胞 mRNA 的复制与转录,发挥抗炎作用;还可以促进胰岛 β 细胞再生及胰岛素释放,抑制肝脏糖原异生,促进糖酵解,从而发挥降血糖作用^[46]; 臣药黄芪^[47]是补气药,具有抗氧自由基生成、抗氧化、抗炎作用,其主要成分黄芪甲苷可通过抑制 p-130Cas 表达上调,抑制高糖诱导的足细胞足突融合,缓解糖尿病病变^[48];佐使药金银花具有清热解毒、抗炎、抗氧化的作用,而炎症状态正是胰岛素抵抗的重要原因之一^[47]。

分析结果表明, magnoflorine, caffeic acid, coptisine, epiberberine, astragaloside IV, palmatine, jateorhizine 和 berberine 与靶点对接结果优于阳性药物平均值,与文献报道的金芪降糖片的质控成分和入血成分基本一致^[49-50]。基于以上所述,整合 LC-MS 和分子对接技术可快速筛选中药药效物质基础,且结果与文献报道基本一致。除此之外, groenlandicine, lycoranine B, berberastine, isomucronulatol-7-O-glucoside, demethyleneberberine, calycosin-7-O-glucoside 和 berberrubine 与靶点对接结果优于阳性药物平均值,是具有潜力的候选药效物质基础,但其是否具有有良好的药物活性,还需进一步的药理学验证和活性评估。

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 和分子对接技术,发现 magnoflorine, coptisine, epiberberine, astragaloside IV, caffeic acid, palmatine, berberine, jateorhizine, berberrubine, berberastine, groenlandicine, lycoranine B, demethyleneberberine, isomucronulatol-7-O-glucoside 和 calycosin-7-O-glucoside 为金芪降糖片治疗 T2DM 潜在的药效物质基础。

[参考文献]

- [1] 田田,金丽娟,沈和荣,等. 黄芪葛根汤联合二甲双胍对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的影响[J]. 中医临床杂志, 2019, 31(2):304-306.
- [2] 吴青华,李冰涛,涂珺. 复方中药治疗糖尿病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6):1104-1109.
- [3] 彭金兰,印嫔,汪彬,等. 金芪降糖片治疗 2 型糖尿病的有效性和安全性[J]. 医药导报, 2013, 32(6):796-800.
- [4] 潘玄玄,宋粉云,林秀莲,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析沉香化气丸在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3):527-531.
- [5] 关宏伟,徐丽君,董慧. 反向分子对接技术在中药作用靶点预测、有效成分筛选及作用机制探索中的应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23):4537-4541.
- [6] ZHANG L, WEI T T, LI Y, et al. Functional metabolomics characterizes a key role for N-acetylneuraminic acid in coronary artery diseases[J]. Circulation, 2018, 137(13):1374-1390.
- [7] LIU M, LI P, ZENG X, et al. Identification and pharmacokinetics of multiple potential bioactive constituents after oral administration of Radix Astragali on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c Mice[J]. IJMS, 2015, 16(3):5047-5071.

- [8] LIU X, ZHU R, HU F, et al. Tissue distribution of six major bio-active components after oral administration of Zhenqi Fuzheng capsules to rats using ultra-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogra B, 2015, 986:44-53.
- [9] ZHANG J, XU X J, XU W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in Radix Astragali by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. J Chromatogra Sci, 2015, 53(6) :945-952.
- [10] MA X, LV B, LI P, et al. Identification of “ multiple components-multiple targets-multiple pathways ” associated with Naointong capsule in the treatment of heart diseases using UPLC/Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. Evid Based Complement Alter Med, 2016, doi:10.1155/2016/9468087.
- [11] Jung J Y, Jung Y, Kim J S, et al. Assessment of peeling of *Astragalus* roots using ¹H NMR-and UPLC-MS-based metabolite profiling [J]. J Agr Food Chem, 2013, 61(43) :10398-10407.
- [12] DUAN Y, PEI K, CAI H, et al. Bioactivity evaluation-based ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and novel distinction of multi-subchemome compatibility recognition strategy with Astragali Radix-Fructus Corni herb-pair as a case study [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2016, 129:514-534.
- [13] WU X, ZHU J C, ZHANG Y, et al. Lipidomics study of plasma phospholipid metabolism in early type 2 diabetes rats with ancient prescription Huang-Qi-San intervention by UPLC/Q-TOF-MS and correlation coefficient [J]. Chem Biol Interact, 2016, 256: 71-84.
- [14] LI S, LIU S, LIU Z, et al. A target-group-change strategy based on the UPLC-Q-TOF-MSE method for the metabolites identification of Fufang-Xialian-Capsule in rat's plasma [J]. J Chromatogra B, 2018, 1085:42-53.
- [15] CHEN J, ZHAO H, WANG X, et al. Analysis of major alkaloids in Rhizoma coptidis by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes [J]. Electrophoresis, 2008, 29(10) :2135-2147.
- [16] CHEN L, TANG Y P, CHEN M J, et al. Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint [J]. Phytomedicine, 2010, 17(2) :100-107.
- [17] YAN Y, DU C, LI Z, et al. Comparing the antidiabetic effects and chemical profiles of raw and fermented Chinese Ge-Gen-Qin-Lian decoction by integrating untargeted metabolomics and targeted analysis [J]. Chin Med, 2018, 13(1) : 54.
- [18] SUN L, DING F, YOU G, et al. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for pharmacokinetic comparison of five alkaloids from JinQi Jiangtang tablets and its monarch drug *Coptidis Rhizoma* [J]. Pharmaceutics, 2017, 10(1) : 4.
- [19] ZHENG G D, LI K, LI Y, et al. Fast profiling of chemical constituents in Yiqing Capsule by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2012, 35(1) :174-183.
- [20] YI L, LIANG Z T, PENG Y, et al. Histochemical evaluation of alkaloids in rhizome of *Coptis chinensis* using laser microdissection and liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Drug Testing Anal, 2015, 7(6) : 519-530.
- [21] JIANG X, HUANG L F, WU L B, et al. UPLC-QTOF/MS analysis of alkaloids in traditional processed *Coptis chinensis* Franch [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, doi:10.1155/2012/942384.
- [22] DOU S S, ZHU S L, DAI W X, et al. Qualitative and quantitative analysis for the quality control of Rhizoma *Coptidis* by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS [J]. Chem Res Chin Univ, 2010, 26(5) : 735-741.
- [23] MIAO W, WANG Q, BO T, et al. Rapid characterization of chemical constituents and rats metabolites of the traditional Chinese patent medicine Gegen-Qinlian-Wan by UHPLC/DAD/qTOF-MS [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2013, 72: 99-108.
- [24] LIU Q, QIU S, YU H, et al. Selective separation of structure-related alkaloids in Rhizoma coptidis with “click” binaphthyl stationary phase and their structural elucidation with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst (Lond), 2011, 136(20) : 4357-4365.
- [25] 陈文文, 过林, 贺敏, 等. UPLC-DAD/Q-TOF-MS 法分析左金丸化学成分 [J]. 中成药, 2017, 39(11) : 12412-2414.
- [26] 布赫, 王立乾, 唐振球, 等. UPLC-ESI-Q-TOF-MSE 快速鉴定黄连中生物碱类成分 [J]. 化学工程师, 2018, 32(2) :21-24.
- [27] WANG Y D, HE Y, DAI Z, et al. A comparative study on bioactive constituents in different parts of *Lonicera japonica* determined by HPLC-ESI-MSⁿ [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(10) : 988-1003.
- [28] DENG J, FAN C, YANG Y. Identification and determination of the major constituents in Deng's herbal

- tea granules by rapid resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(5): 928-936.
- [29] Kucharska A, Fecka I. Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS [J]. Molecules, 2016, 21(9): 1157.
- [30] Kucharska A, Sokół-Łtowska A, Oszmiański J, et al. Iridoids, phenolic compounds and antioxidant activity of edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.) [J]. Molecules, 2017, 22(3): 405.
- [31] TANG Y, YIN L, ZHANG Y, et al. Study on anti-inflammatory efficacy and correlative ingredients with pharmacodynamics detected in acute inflammation rat model serum from *Caulis Lonicerae Japonicae* [J]. Phytomedicine, 2016, 23(6): 597-610.
- [32] ZHOU W, TAN X, SHAN J, et al. Study on the main components interaction from *Flos Lonicerae* and *Fructus Forsythiae* and their dissolution *in vitro* and intestinal absorption in rats [J]. PLoS one, 2014, 9(10): e109619.
- [33] GAO W, YANG H, QI L W, et al. Unbiased metabolite profiling by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate data analysis for herbal authentication: Classification of seven *Lonicera* species flower buds [J]. J Chromatogr A, 2012, 1245: 109-116.
- [34] 马芳芳, 杨飞丹, 申姗姗. 化学发光法检测血清 INS 及 Cp 水平在 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞功能评估中的应用价值 [J]. 实验与检验医学, 2018, 36(2): 201-203.
- [35] 多力坤·买买提玉素甫, 祖克拉·肉孜, 宋曼曼, 等. PPAR γ 基因 taqSNPs 遗传模型及单体型与 2 型糖尿病的相关性 [J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2015, 32(4): 399-409, 505.
- [36] 唐新, 林婴, 黄文芳, 等. PPAR γ 基因单核苷酸多态性与 2 型糖尿病血脂异常的相关性研究 [J]. 检验医学, 2009, 24(3): 190-193.
- [37] 贾春新, 张红利, 李海鸥, 等. 参芍口服液对 2 型糖尿病大鼠肝脏超微结构及氧化应激的影响 [J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2017, 19(2): 131-136.
- [38] 郑欣洵, 张智静, 黄宝艺, 等. 单核细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 条件敲除小鼠的繁殖和基因型鉴定 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(3): 222-226.
- [39] 李雪芹. CAT 及其基因多态性与 2 型糖尿病周围神经病变的关系 [D]. 昆明: 昆明医学院, 2011.
- [40] 胡久略, 张璩方, 侯紫君, 等. 玉液汤对气阴两虚型糖尿病大鼠血糖与胰岛素受体的影响 [J]. 科学技术与工程, 2019, 19(3): 62-66.
- [41] 吴思宇, 温宗良, 夏星, 等. 对叶百部总生物碱止咳作用的谱效关系研究 [J]. 中药材, 2019, 42(3): 515-519.
- [42] 罗琼枝. 两色金鸡菊头状花序聚块有效部位化学成分与抗炎活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [43] 王晓宇, 陈啸飞, 顾妍秋, 等. 细胞膜色谱研究进展及其在中药活性成分筛选中的应用 [J]. 分析化学, 2018, 46(11): 1695-1702.
- [44] 宗阳, 董宏利, 陈婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 888-894.
- [45] 王月, 王涛, 吴建霞, 等. 金芪降糖片组分体外抗糖尿病的作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16): 105-109.
- [46] 王恩莹, 陈靓, 马恒, 等. 金芪降糖片配伍对小檗碱大鼠体内药动学的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4231-4234.
- [47] 邓志远, 王钺佳, 樊耀华, 等. 金芪降糖片治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗的 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20190401.502.
- [48] 何东元, 陈建国, 陈宜方, 等. 黄芪甲苷抑制 p-130Cas 表达缓解糖尿病肾病的作用机制研究 [J]. 浙江医学, 2018, 40(14): 1532-1535.
- [49] 陈芳, 邓雁如, 许妍妍, 等. 双波长 HPLC 同时测定黄连及金芪降糖片中 6 种生物碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 60-65.
- [50] 金华, 牟佳佳, 夏娜, 等. 金芪降糖片入血成分的 UPLC-ESI-MS 研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2227-2231.

[责任编辑 顾雪竹]