

UPLC-MS/MS 测定二妙散提取物中 14 种成分的含量

冯昕, 赵文军, 侯婷, 张宁*

(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:**建立同时测定二妙散提取物中 14 种成分(小檗碱,黄柏碱,巴马汀,木兰花碱,药根碱,四氢小檗碱,四氢巴马汀,绿原酸,阿魏酸,黄柏内酯,黄柏酮,白术内酯 I,白术内酯 II,白术内酯 III)含量的 UPLC-MS/MS 分析方法。**方法:**采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 0.1% 甲酸(A)-甲醇(B)作为流动相进行梯度洗脱(0~1.0 min, 10% B; 1.0~8.0 min, 10%~60% B; 8.0~9.0 min, 60%~90% B; 9.0~13.0 min, 90% B; 13.0~13.1 min, 90%~10% B; 13.1~15.0 min, 10% B), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL; 质谱条件采用多反应离子监测扫描模式(MRM)及正离子电喷雾模式, 优化三重四级杆质谱仪参数和 14 种指标性成分的质谱参数进行检测; 数据处理采用独立样本 *t* 检验。**结果:**在一定浓度范围内, 14 种成分的线性关系良好($r > 0.9995$); 平均加样回收率在 95%~110%, RSD ≤ 5%; 不同批次的提取物之间各成分含量差异较小; 配伍后有利于黄柏碱、木兰花碱、白术内酯类成分的溶出($P < 0.05$), 显示出配伍的优越性。**结论:**该方法灵敏度高、稳定可靠、重复性良好, 为综合评价二妙散的质量提供一定的依据。

[关键词] 超高压液相色谱串联质谱; 含量测定; 二妙散提取物; 配伍

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210079

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1043.056.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:43

Simultaneous Determination of 14 Compounds in Ermiaosan Extracts by UPLC-MS/MS

FENG Xin, ZHAO Wen-jun, HOU Ting, ZHANG Ning*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of 14 components (berberine, phellodendrine, palmatine, magnoflorine, jatrorrhizine, tetrahydroberberine, tetrahydropalmatine, chlorogenic acid, ferulic acid, obaculactone, obacunone, atractylenolide I, atractylenolide II and atractylenolide III) in Ermiaosan extracts. **Method:** A Waters Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used, with a mobile phase composed of 0.1% formic acid (A) -methanol (B) for gradient elution (0-1.0 min, 10% B; 1.0-8.0 min, 10%-60% B; 8.0-9.0 min, 60%-90% B; 9.0-13.0 min, 90% B; 13.0-13.1 min, 90%-10% B; 13.1-15.0 min, 10% B). The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the injection volume was 5 μL; 14 analytes were monitored under positive ionization conditions by multi reaction monitoring in an electrospray ionization mode. Mass spectrometric parameters of spectrometer and 14 index components were optimized for testing. Independent *t*-test (*t*-test) was applied for the data processing. **Result:** Within a certain linear range, the calibration curves of 14 analytes showed a good linearity ($r > 0.9995$). The average recovery of 14 analytes were between 95% and 110%, with RSD ≤ 5%. The content of 14 components in different batches of samples was slightly different. The compatibility of Ermiaosan showed a superiority, with increases in the contents of phellodendrine, magnoflorine and atractylenolide ($P < 0.05$). **Conclusion:** It is the first report about simultaneous analysis of 14 components in Ermiaosan extracts by UPLC-MS/MS, and highly sensitive, stable,

[收稿日期] 20170420(001)

[第一作者] 冯昕, 在读硕士, 从事中药分析与质量控制研究, Tel: 021-51323054, E-mail: epufbn@126.com

[通讯作者] * 张宁, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药与质量评价研究, Tel: 021-51323054, E-mail: ningzh18@126.com

reliable and high reproducible, and provides a basis for comprehensive evaluation for quality of Ermiaosan extracts.

[Key words] UPLC-MS/MS; content determination; Ermiaosan extract; compatibility

二妙散起源于《丹溪心法》，是中医用于治疗燥湿清热的基础名方^[1]。二妙散由黄柏、苍术两味中药等份组成，方中黄柏为君药，其性味苦寒，善祛下焦之湿热、泻火解毒；苍术为臣药，其性味辛温，燥湿健脾，祛湿邪，两药合用，药少力专，共奏清热燥湿之功效。二妙散对于足膝肿痛、筋骨疼痛、小便短赤、舌苔黄腻等病作用显著，该方清热燥湿的功效与痛风证型相适应，现代多应用于治疗关节炎和痛风等疾病^[2-3]，临床应用广泛。

2015 年版《中国药典》一部收载二妙丸，收载了以苍术对照药材和以小檗碱为对照的 2 个薄层鉴别方法；规定了以 HPLC 测定小檗碱含量，二妙丸中每 1 g 含黄柏以盐酸小檗碱计算，不得少于 3.0 mg^[4]。关于二妙丸（散）的质量标准研究主要集中在生物碱及挥发性成分，针对其他成分研究较少。肖娟等^[5]建立了超细粉和细粉 HPLC 指纹图谱，从整体上反映出二妙丸的化学成分信息；王琰等^[6]构建了二妙散指纹图谱，确立 16 个共有峰，进行相似度评价，丰富了黄柏、苍术配伍的指纹图谱研究，同时针对苍术素进行了定量分析^[7]；潘超等^[8]建立同时测定二妙丸中 5 种生物碱的 HPLC 方法，为二妙丸质量控制提供了参考。

液质联用技术综合了色谱的高分离性能和质谱的高鉴别特点，特异性强、灵敏度高^[9]。结合二妙散复杂的组成成分，本实验优选液质联用技术定量分析复方中的生物碱类、有机酸类、内酯类、倍半萜类指标性成分，建立 UPLC-MS/MS 分析方法同时测定不同批次二妙散提取物中 14 种成分的含量。选用拆方法进行二妙散提取物的配伍研究，描述配伍前后主要成分的变化情况，拆方法对于研究复方的组成原则和配伍作用，阐明配伍关系和组方理论，明确单味药所处的地位和作用具有一定的价值。本实验为提高二妙散的质量控制提供了实验依据，为探索二妙散的物质基础奠定了良好基础。

1 材料

Dionex UPLC 3000 型超高效液相-Thermo TSQ quantum Access MAX 型三重四级杆质谱联用系统（美国 Thermo 公司），Acquity BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司），CP255D 型分析天平（上海精密科学仪器有限公司），FA2004N 型分析天平（上海精密科学仪器有

限公司），超纯水仪（美国 Millipore 公司），科导超声仪（上海科导超声仪器有限公司）。

木兰花碱（批号 130611），盐酸巴马汀（批号 140702），黄柏酮（批号 140618），盐酸药根碱（批号 130318），四氢巴马汀（批号 121201），白术内酯 I（批号 121125），黄柏碱（批号 140521）购于四川省维克奇生物科技有限公司，纯度均 ≥ 98%；四氢小檗碱（批号 YY90748），黄柏内酯（批号 1320911），白术内酯 II（批号 PA0808RA13），白术内酯 III（批号 2M0311BD13）购于上海源叶生物，纯度均 ≥ 98%；阿魏酸（批号 0773-9910），绿原酸（批号 110753-201415），盐酸小檗碱（批号 110713-201212）购于中国食品药品检定研究院，纯度分别为 98%，96.2%，86.7%。甲醇（色谱纯，Merk 公司），甲酸（色谱纯，CNW Technologies），甲醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司），其他试剂均为分析纯。

5 批二妙散提取物（实验室自制，批号 20150801 ~ 20150805），黄柏提取物（实验室自制，批号 150910），苍术提取物（实验室自制，批号 150910）。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱（2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm），流动相 0.1% 甲酸（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0 ~ 1.0 min, 10% B；1.0 ~ 8.0 min, 10% ~ 60% B；8.0 ~ 9.0 min, 60% ~ 90% B；9.0 ~ 13.0 min, 90% B；13.0 ~ 13.1 min, 90% ~ 10% B；13.1 ~ 15.0 min, 10% B），流速 0.3 mL·min⁻¹，柱温 40 °C，进样室温度 4 °C，进样量 5 μL。采用多反应离子监测扫描模式（MRM）和正离子扫描模式，分别提取 14 种指标性成分离子通道的相关信息，设定固定离子通道进行检测，避免各个通道信息相互干扰。质谱参数：喷雾电压 3 500 V，离子源温度 350 °C，去溶剂温度 100 °C，鞘气 310.26 kPa，辅助气 103.42 kPa。14 种成分的质谱参数见表 1，混合对照品与二妙散提取物的色谱图见图 1。

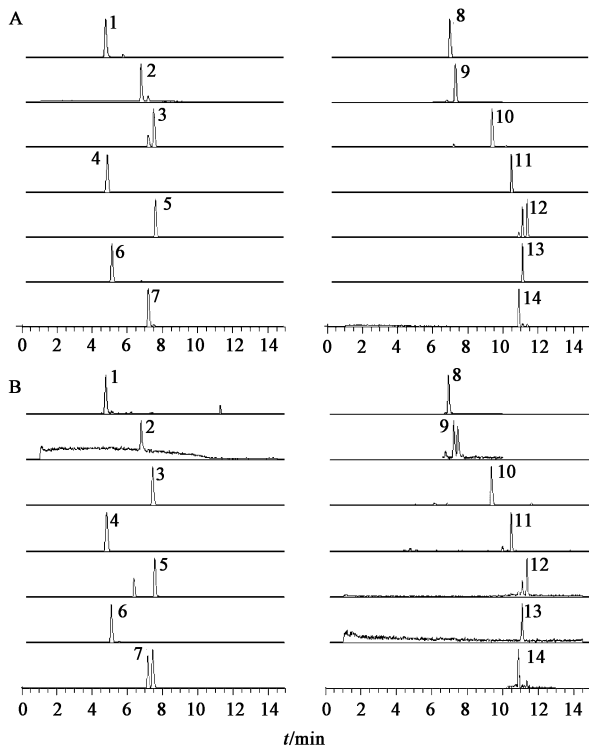
2.2 二妙散提取物的制备 称取黄柏、苍术饮片各 300 g，等量（1:1）投入，加入 10 倍量 70% 乙醇，回流提取 3 次，每次回流 2 h，合并 3 次提取滤液，减压浓缩至稠膏状，65 °C 真空干燥，即得，按照此工艺共制备 5 批二妙散提取物（批号 20150801 ~ 20150805）。分别称取黄柏饮片 300 g，苍术饮片

表 1 14 种成分的质谱测定参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of 14 components

成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	透镜电 压/V	碰撞能 量/eV	保留时 间/min
绿原酸	355.1	163.1	40	12	4.80
阿魏酸	195.1	89.3	46	29	6.80
小檗碱	336.1	320.0	79	30	7.49
黄柏碱	342.2	192.2	61	21	4.85
巴马汀	352.1	336.1	80	29	7.58
木兰花碱	342.1	297.1	78	18	5.12
药根碱	338.1	322.1	79	29	7.17
四氢巴马汀	356.2	192.1	85	28	6.96
四氢小檗碱	340.2	176.1	70	28	7.27
黄柏内酯	471.3	425.3	78	17	9.38
黄柏酮	455.3	161.1	81	24	10.48
白术内酯 I	231.1	185.1	80	18	11.38
白术内酯 II	233.2	187.2	69	15	11.11
白术内酯 III	249.2	231.2	55	8	10.90

注:14 种成分测定均为正离子模式。



1. 绿原酸;2. 阿魏酸;3. 小檗碱;4. 黄柏碱;5. 巴马汀;6. 木兰花碱;7. 药根碱;8. 四氢巴马汀;9. 四氢小檗碱;10. 黄柏内酯;11. 黄柏酮;12. 白术内酯 I;13. 白术内酯 II;14. 白术内酯 III

图 1 混合对照品 (A) 与二妙散提取物 (B) 中 14 种成分的离子流色谱

Fig. 1 Ion Chromatograms of 14 components in reference standards (A) and Ermiaosan extracts (B)

300 g,按照上述工艺分别制备黄柏提取物(批号 150910),苍术提取物(批号 150910),均避光妥善保存。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取木兰花碱 4.65 mg,四氢小檗碱 4.26 mg,四氢巴马汀 6.25 mg,巴马汀 4.28 mg,药根碱 1.036 mg,分别定容于 5 mL 棕色量瓶中;精密称取阿魏酸 6.72 mg,小檗碱 5.79 mg,黄柏酮 3.50 mg,黄柏内酯 3.66 mg,绿原酸 4.15 mg,黄柏碱 6.02 mg,白术内酯 I 5.01 mg,白术内酯 II 4.35 mg,白术内酯 III 3.89 mg,分别置于 10 mL 棕色量瓶中,加适量甲醇溶解后定容,摇匀。上述 14 种对照品储备液于 -20 °C 冰箱储存,备用。将各对照品储备液进行一定倍数稀释,精密吸取各稀释液一定量至 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,得到 14 种混合对照品溶液。以超纯水稀释 1 倍,得混合对照品母液(溶剂为 50% 甲醇)。

2.4 供试品溶液的制备 取二妙散提取物适量,研磨成均匀细粉,精密称定 0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 mL,适当超声使样品完全溶解,称定质量,封口,超声提取 60 min(280 W,53 kHz),温度保持在 30 °C 左右。提取结束后擦干外壁,放冷至室温,再次称定,50% 甲醇补足减失质量。充分混匀,以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,收集续滤液 1 mL,备用。50% 甲醇分别稀释 16 倍,800 倍后进样分析。

2.5 线性关系考察 取 2.3 项下的混合对照品母液以 50% 甲醇进行不同倍数稀释,得到系列浓度的混合对照品溶液。根据 2.1 项下的色谱-质谱条件,进样分析。以各成分的浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归拟合,得到标准曲线和各成分线性相关系数。标准曲线的最低浓度到最高浓度为该成分的线性范围,将线性范围的最低浓度继续稀释,进样分析,取信噪比 $S/N = 10$ 的进样浓度为最低定量限(LOQ);信噪比为 3 时的进样浓度为最低检测限(LOD)。结果见表 2。

2.6 精密度试验 制备高、中、低 3 个质量浓度的质控(QC)样本,每个质量浓度平行 3 份,按照 2.1 项下的色谱-质谱条件,进样分析。24 h 内连续进样 6 次,根据随行标准曲线和样品峰面积计算各 QC 样本的实际质量浓度及 6 次进样的 RSD,用以评价日内精密度;连续 3 d 进样,根据随行标准曲线和样本峰面积计算各 QC 样本的实际质量浓度及 3 d 内的 RSD,用以评价日间精密度。精密度结果见表 3,各成分 $RSD < 5.0\%$,表明所用仪器及方法的精密度良好,符合分析要求。

表 2 14 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限

Table 2 Regression equation, correlation coefficients, linear ranges, LOQ, LOD of 14 components

成分	线性回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
绿原酸	$Y = 449.1X - 4\ 781.9$	0.999 9	24.80 ~ 3 173.88	6.19	24.80
阿魏酸	$Y = 463.1X + 13\ 997.9$	0.999 7	126.00 ~ 8 064.00	31.50	63.00
小檗碱	$Y = 157\ 000.0X + 1\ 353\ 258.0$	0.999 6	3.57 ~ 609.08	0.18	0.73
黄柏碱	$Y = 135\ 116.8X + 60\ 161.0$	0.999 9	0.47 ~ 120.40	0.05	0.09
巴马汀	$Y = 107\ 884.2X + 383\ 647.7$	0.999 6	2.37 ~ 405.00	0.03	0.12
木兰花碱	$Y = 88\ 262.4X + 12\ 035.0$	1.000 0	0.29 ~ 74.40	0.12	0.29
药根碱	$Y = 112\ 498.0X + 176\ 197.2$	0.999 8	2.16 ~ 554.04	0.02	0.11
四氢巴马汀	$Y = 135\ 626.0X + 13\ 922.6$	0.999 7	0.22 ~ 56.25	0.09	0.11
四氢小檗碱	$Y = 124\ 091.2X + 10\ 553.4$	0.999 6	0.05 ~ 8.52	0.03	0.05
黄柏内酯	$Y = 1\ 135.0X + 21\ 976.8$	0.999 9	18.87 ~ 1 207.80	9.44	18.87
黄柏酮	$Y = 1\ 025.1X - 1\ 605.8$	0.999 7	5.20 ~ 665.00	2.60	5.20
白术内酯 I	$Y = 5\ 251.3X - 17\ 192.9$	0.999 9	6.93 ~ 886.77	3.46	6.93
白术内酯 II	$Y = 5\ 224.5X - 2\ 628.3$	0.999 9	2.29 ~ 587.25	2.29	2.29
白术内酯 III	$Y = 1\ 482.0X + 9\ 697.8$	0.999 8	4.41 ~ 564.05	2.20	4.41

表 3 14 种成分的日内、日间精密度 RSD

Table 3 Intra-day and inter-day precision of 14 components %

成分	日内精密度	日间精密度	成分	日内精密度	日间精密度
绿原酸	4.5	2.9	四氢巴马汀	4.0	3.6
	2.3	4.4		1.4	3.5
	0.6	4.3		1.3	5.0
阿魏酸	1.8	4.8	四氢小檗碱	4.8	4.1
	2.6	2.1		1.8	2.5
	2.7	1.3		1.9	1.1
小檗碱	1.8	1.4	黄柏内酯	2.8	4.4
	1.6	2.3		2.3	4.3
	1.5	2.8		1.4	0.3
黄柏碱	4.0	4.7	黄柏酮	4.8	4.1
	0.9	1.7		1.4	4.6
	0.9	1.0		1.4	4.7
巴马汀	1.3	3.8	白术内酯 I	3.0	4.6
	1.9	3.7		1.8	1.6
	1.0	3.2		1.6	4.5
木兰花碱	4.6	3.9	白术内酯 II	1.3	5.0
	2.1	0.7		3.8	2.7
	0.9	2.8		0.9	5.0
药根碱	3.7	4.5	白术内酯 III	1.9	4.7
	1.4	2.9		2.9	4.2
	1.1	3.0		1.7	4.2

2.7 重复性试验 取同一批次二妙散提取物,按照

2.4 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按照 2.1 项下的色谱-质谱条件进样分析,记录各成分的峰面积,根据随行标准曲线计算各成分含量及 RSD。结果显示,小檗碱,黄柏碱,木兰花碱,巴马汀,药根碱,四氢小檗碱,四氢巴马汀,绿原酸,阿魏酸,黄柏内酯,黄柏酮,白术内酯 I,白术内酯 II,白术内酯 III 含量的 RSD 分别为 2.3%, 2.9%, 4.0%, 3.8%, 3.2%, 3.5%, 4.5%, 3.8%, 3.9%, 4.2%, 3.6%, 3.8%, 4.2%, 4.5%, 各成分 RSD 均 < 5.0%, 表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一批次二妙散提取物,按照

2.4 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份。按照 2.1 项下的色谱-质谱条件,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 重复进样,记录各成分的峰面积,根据随行标准曲线计算各成分含量及 RSD。结果显示 48 h 内小檗碱,黄柏碱,木兰花碱,巴马汀,药根碱,四氢小檗碱,四氢巴马汀,绿原酸,阿魏酸,黄柏内酯,黄柏酮,白术内酯 I,白术内酯 II,白术内酯 III 含量的 RSD 分别为 3.1%, 4.7%, 4.6%, 4.7%, 3.7%, 3.0%, 4.3%, 4.3%, 4.7%, 3.1%, 4.5%, 4.4%, 2.2%, 3.7%, 各成分 RSD < 5.0%, 表明各成分在 48 h 内的稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批次二妙散提取物 9 份,每份约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别精密加入低、中、高 3 个质量浓度的混

合对照品溶液,50% 甲醇定容至刻度,每一质量浓度平行 3 份,超声提取及后续操作同 2.4 项。按照 2.1 项下的色谱-质谱条件进样分析,记录各成分的峰面积,根据随行标准曲线计算各成分含量、回收率及 RSD。结果见表 4,各成分平均回收率在 95% ~ 110%,RSD 均 <5.0%,表明该方法的回收率良好,满足分析要求。

2.10 样品含量测定 按 2.4 项下方法制备不同批次二妙散提取物(批号 20150801 ~ 20150805)的供试品溶液,每批平行 6 份。按照 2.1 项下的色谱-质谱条件,进样分析,记录各成分的峰面积,根据随行标准曲线计算 14 种成分在浸膏中的含量,结果见表 5。经测定,不同批次间多数成分的含量差异较小,表明前期制备工艺和提取条件稳定、可行。其中,四氢小檗碱、黄柏酮、白术内酯类成分批次间差异较大,RSD >5.0%,其余 9 种含量相对高的成分批次间差异较小,RSD <5.0%;分析不同批次提取物中不同极性、不同类别的成分,有助于更全面、系统地评价该复方。

2.11 配伍前后成分含量变化 按照 2.4 项下方法制备二妙散提取物(批号 150801)供试品溶液,平行 6 份;取黄柏提取物、苍术提取物适量,各平行 6 份,按照 2.4 项下方法制备,得到黄柏供试品溶液和苍术供试品溶液(保证 3 种供试品溶液的生药含量相等)。按照 2.1 项下的色谱-质谱条件,进样分析,检测二妙散、黄柏、苍术提取物中各成分的含量。运用 SPSS 21.0 统计软件,分析配伍前后各成分的含量变化情况,两组之间比较选用独立样本 *t*-检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示具有显著性统计学差异。3 种提取物中各成分的生药含量如表 6 所示,结果表明配伍后黄柏碱,木兰花碱,白术内酯 I,白术内酯 II,白术内酯 III 含量增加($P < 0.05$);小檗碱、四氢巴马汀、黄柏内酯、阿魏酸等含量相差不大,配伍有利于多数成分的溶出,具有一定优越性。

3 讨论

3.1 色谱-质谱条件优化 水相尝试不同体积分数(0.1% ~ 0.5%)的甲酸水溶液,0.1% 甲酸水溶液酸性适中,各成分响应稳定,峰形良好;有机相考察乙腈和甲醇,二者在 UPLC 体系中分离效果相当,乙腈毒性大且经济成本高,优选甲醇;优化梯度洗脱程序,保证 14 种成分出峰时间恰当,相互无干扰。14 种成分在 15 min 内完成测试,提高了工作效率。选择正离子模式对提取物中 14 种成分进行检测,优化

表 4 二妙散中 14 种成分加样回收率试验($n = 3$)

成分	回收率/%	RSD/%
绿原酸	97.4	5.0
	97.4	4.4
	97.0	1.4
阿魏酸	99.6	5.0
	106.1	1.4
小檗碱	96.5	0.7
	97.8	4.7
黄柏碱	105.2	1.5
	102.3	4.5
	101.1	2.7
巴马汀	102.9	0.9
	100.7	4.6
	99.6	5.0
木兰花碱	109.1	2.4
	106.1	3.4
	100.00	2.6
药根碱	96.7	1.6
	100.7	5.0
	100.2	4.0
四氢巴马汀	102.5	4.1
	98.8	4.2
	101.4	2.7
四氢小檗碱	101.7	3.1
	105.2	0.5
	100.5	3.4
黄柏内酯	104.3	0.9
	100.9	2.3
	102.9	3.1
黄柏酮	106.8	2.3
	108.0	1.5
	103.7	1.6
白术内酯 I	103.5	2.9
	99.6	0.6
	97.3	5.0
白术内酯 II	98.6	5.0
	98.8	2.8
	96.7	1.8
白术内酯 III	102.7	2.7
	100.1	4.3
	99.6	5.0
	106.2	2.3
	101.1	5.0

表 5 不同批次二妙散提取物中 14 种成分质量分数测定 ($n=6$)

Table 5 Determination of 14 components in Ermiaosan extracts from different batches ($n=6$) mg·g⁻¹

批号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
150801	3.892	4.036	70.458	7.137	1.073	2.250	0.913	0.016	0.003	3.411	0.228	0.342	0.116	0.156
150802	3.706	4.063	73.822	7.167	1.055	2.211	0.875	0.017	0.004	3.356	0.209	0.353	0.146	0.167
150803	3.925	4.148	70.778	6.837	1.017	2.143	0.903	0.016	0.004	3.388	0.239	0.333	0.132	0.148
150804	3.982	3.968	65.892	6.937	1.042	2.259	0.877	0.016	0.003	3.181	0.188	0.314	0.120	0.121
150805	4.062	4.114	66.990	7.094	1.051	2.299	0.900	0.017	0.003	3.077	0.187	0.306	0.120	0.123

注:A.绿原酸;B.阿魏酸;C.小檗碱;D.黄柏碱;E.巴马汀;F.木兰花碱;G.药根碱;H.四氢巴马汀;I.四氢小檗碱;J.黄柏内酯;K.黄柏酮;L.白术内酯 I;M.白术内酯 II;N.白术内酯 III。表 6 同。

表 6 配伍前后 14 种成分质量分数测定 ($n=6$)

Table 6 Determination of 14 components in compatibility ($n=6$) mg·g⁻¹

配伍	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
二妙散提取物	1.584	1.406	40.188	3.713 ²⁾	0.393	1.067 ¹⁾	0.354	0.005	0.001	1.316	0.080	0.123 ²⁾	0.046 ²⁾	0.065 ²⁾
黄柏提取物	1.268	1.359	39.310	2.842 ²⁾	0.422	0.893 ¹⁾	0.365	0.005	0.001	1.375	0.092	-	-	-
苍术提取物	0.168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.085 ²⁾	0.019 ²⁾	0.039 ²⁾

注:单味药提取物与二妙散提取物中相关成分相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

各成分的母离子、子离子及相应质谱参数,保证响应稳定、良好。文献报道绿原酸、阿魏酸多以负离子模式检测,母离子/子离子分别为 353.1/191.1^[10], 193.1/134.1^[11],而在本实验条件下负离子模式响应不理想,尝试以正离子模式进行优化,得到绿原酸、阿魏酸的母离子/子离子分别为 355.1/163.1, 195.1/89.3。

3.2 供试品溶液提取方法优化 本实验针对供试品制备的超声提取方法进行优化,分别从提取溶剂(25% 甲醇,50% 甲醇,75% 甲醇,甲醇),样品溶剂比(1:250,1:500,1:750),超声时间(30,45,60,75 min)3 个方面进行单因素试验考察。提取物中各成分极性差异大,如黄柏碱、木兰花碱等生物碱极性较大,而白术内酯类成分极性较小,75%,100% 甲醇对于黄柏碱和木兰花碱提取率较低,色谱峰形差,容易出现裂峰;50% 甲醇提取能兼顾不同极性的成分,保证各成分较高的提取率,为本实验理想的提取溶剂。当样品溶剂比为 1:500 或 1:750 时,各成分提取更完全,考虑甲醇具有一定毒性,选择 1:500 的样品溶剂比例。当超声提取时间达 60 min 以上,各成分提取更完全,优选 60 min 作为超声提取时间。

3.3 稀释倍数的确定 二妙散提取物中不同成分的含量差异较大,发现同一处理方法(稀释倍数)处理后进样,某些成分超出线性范围,如小檗碱含量过高,四氢小檗碱含量过低,进一步扩大线性范围则导致 r 不达标。因此,本实验针对稀释倍数进行了探

索,并确定供试品溶液稀释 16 倍(小檗碱、黄柏碱、木兰花碱定量分析),800 倍(其余 11 种定量分析)后进样测试,各成分的含量均能落在线性范围内。

综上,本实验兼顾不同极性成分,针对二妙散(原方)进行有效的提取和制备,得到二妙散提取物。前期实验证明提取物与经典原方在主成分的含量上无明显差异,该提取物对原方中主要成分进行了富集和浓缩,且顺应性良好,便于动物或细胞给药,有利于对该复方进行系统化研究。小檗碱能够调节脂质代谢^[12]、抗病原微生物(如大肠埃希菌^[13]、金黄色葡萄球菌^[14]);阿魏酸对于小檗碱具有协同降糖作用^[15];四氢巴马汀具有镇痛、镇静作用^[16],本实验针对生物碱类(小檗碱、黄柏碱、巴马汀、木兰花碱、四氢巴马汀、药根碱、四氢小檗碱),有机酸类(绿原酸、阿魏酸),内酯类(黄柏内酯、黄柏酮),倍半萜类(白术内酯 I,白术内酯 II,白术内酯 III)成分展开定量分析,为进一步探索二妙散的物质基础提供了实验依据。液质联用方法不适用于分析苍术素, β -桉叶醇,茅术醇等成分,未优化出合适的质谱参数,后续拟建立 GC-MS 进行定量分析,进一步发掘可能的物质基础。选用拆方法比较单药提取物及二妙散提取物中各成分的变化,初步阐述了黄柏、苍术配伍后所产生的协同作用;后续拟结合主要成分的体内过程和药效作用机制,以探寻该协同作用可能发生的环节在哪里,如何体现,进一步诠释该复方配伍的优越性。

[参考文献]

- [1] 尹莲. 二妙丸系列类方作用规律的相关性探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8): 71-73.
- [2] 李欣, 尹莲, 朱晓勤, 等. 二妙丸类方抗湿热证痛风有效部位群指纹图谱比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1971-1975.
- [3] 唐诗韵, 万雪梅, 贾琴, 等. 二妙散系列方治疗痛风的系统评价[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(6): 198-202.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 439.
- [5] 肖娟, 蔡萍, 万丹, 等. 不同粉体二妙丸 HPLC 指纹图谱对比研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1331-1335.
- [6] 王琰, 傅春升, 李玥, 等. 二妙散中苍术黄柏不同剂量配伍的指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 833-834.
- [7] 王琰. HPLC 测定二妙丸中苍术素[J]. 中国实验方剂学志, 2011, 17(24): 65-66.
- [8] 潘超, 张莉, 王玉. HPLC 法同时测定二妙丸中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(4): 361-364.
- [9] 张齐家, 孙文军. 串联质谱及液质联用技术在药物分析研究中的应用[J]. 中医药学报, 2009, 37(6): 111-113.
- [10] YE J X, WEI W, QUAN L H, et al. An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of Shuang-huanglian in rats[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(4): 625-630.
- [11] LI N, LIU C, MI S, et al. Simultaneous determination of oleanolic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, kaempferol and quercetin in rat plasma by LC-MS-MS and application to a pharmacokinetic study of Oldenlandia diffusa extract in rats[J]. J Chromatogr Sci, 2012, 50(10): 885-892.
- [12] 师凌云, 田蜜, 常伟, 等. 小檗碱对脂质代谢相关基因 PPAR α 和 CPT1A 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(11): 1461-1464.
- [13] Karaosmanoglu K, Sayar N A, Kurnaz I A, et al. Assessment of berberine as a multi-target antimicrobial: a multi-omics study for drug discovery and repositioning[J]. OMICS, 2014, 18(1): 42-53.
- [14] 孙艳, 李娜, 陆颖, 等. 大蒜素与盐酸小檗碱联用体外抗菌试验[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2589-2595.
- [15] 陈红英. 黄连化学成分的分离及其降糖活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [16] CHU H, JIN G, Friedman E, et al. Recent development in studies of tetrahydroprotoberberines: mechanism in antinociception and drug addiction[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(4): 491-499.

[责任编辑 顾雪竹]