

鲜干品组方六神曲发酵前后指标成分的 LC-MS 测定及指纹图谱分析

王丽芳^{1,2}, 高文远^{1*}, 徐鑫², 张学栋², 肖斌³, 胡凤娇³

(1. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 山西中医药大学 附属医院, 太原 030024; 3. 四川省天然药物分离纯化工程技术研究中心, 成都 610041)

[摘要] **目的:**建立六神曲的指纹图谱质控方法,比较鲜干品各组样品发酵前后槲皮苷、槲皮素、木犀草素等成分的变化状况。**方法:**经拆方研究,按前期优选的工艺制备六神曲基本组及鲜干品各组,分别为基本组、鲜品煎汁组、干品 1/3 量煎汁组及干品全量煎汁组,并于发酵前后取样检测。采用 LC-MS 检测,Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 甲酸水溶液梯度洗脱,检测波长 254 nm,电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测。**结果:**确定鲜干品组方六神曲指纹图谱共有峰 15 个,其中 10,13,15 号峰分别为槲皮苷、木犀草素、槲皮素。基本组仅含木犀草素,发酵前后质量分数分别为 18.5, 21.3 μg·g⁻¹,明显低于其他 3 组。在发酵前,鲜品煎汁组样品的 3 种成分含量均显著高于其他 3 组,与发酵前相比,发酵后木犀草素、槲皮素质量分数分别增长 54.84%, 4.53%;槲皮苷质量分数降低了 0.76%。干品全量煎汁组发酵后 3 种成分含量较发酵前显著增加,其中槲皮苷、木犀草素、槲皮素质量分数分别增加了 59.9%, 161.7%, 75.5%。**结论:**该质控检测方法精密、准确、重复性好,适用于六神曲的量化质量评价。发酵法可促进六神曲部分药效成分的溶出度增加及其生物转化反应的发生,初步揭示了六神曲发酵前后药效物质变化状况及鲜品入药优于干品的药效物质基础。

[关键词] 六神曲; 鲜品; 发酵; 拆方研究; 槲皮苷; 木犀草素; 指纹图谱

[中图分类号] R945;R283.6;R285.5;R284;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0008-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010008

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1006.008.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 10:06

Determination of Index Components and Fingerprint About Medicated Leaven Composed of Fresh or Dry Medicines Before and After Fermentation by LC-MS

WANG Li-fang^{1,2}, GAO Wen-yuan^{1*}, XU Xin², ZHANG Xue-dong², XIAO Bin³, HU Feng-jiao³

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. The Hospital of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

3. Separation and Purification Engineering Technology Research Center of Natural Medicine in Sichuan Province, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a fingerprint quality control method of medicated leaven, and to compare the change of effective components (such as quercetin, luteolin, quercetin, and so on) about medicated leaven composed of fresh or dry medicines before and after fermentation. **Method:** By studying on the decomposed recipes of medicated leaven, samples of four groups were prepared. Each group was fermented separately under the prior optimum conditions, taking samples before fermentation and after the completion of the fermentation, and then samples dried at 40 °C for testing. LC-MS analysis was performed on a Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm ×

[收稿日期] 20170516(006)

[基金项目] 山西省科技厅科技攻关项目(20140313008)

[第一作者] 王丽芳,博士,副主任药师,从事中药新药研究、饮片质量控制研究,Tel:0351-8618540,E-mail:wangli-fang@163.com

[通信作者] *高文远,博士生导师,从事中药新药研究、药事管理研究,Tel:13920837932,E-mail:pharmgao@tju.edu.cn

250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol-0.2% formic acid aqueous solution in gradient mode, the flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹, the detection wavelength was set at 254 nm, electrospray ionization source (ESI) was adopted in positive ion mode. **Result:** A total of 15 common peaks were confirmed in the fingerprint of medicated leaven composed of fresh medicines or dry ones; among them, peak 10, 13, 15 were quercetin, luteolin, quercetin, respectively. The base group contained only a very small amount of luteolin determined by LC-MS, the content of this ingredient was 18.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and 21.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ before and after fermentation, it was significantly lower than the other groups. The contents of quercetin, luteolin, quercetin in the second group (composed of fresh medicines) were higher and had obvious advantages than the other groups before the fermentation, after fermentation, the amounts of luteolin and quercetin had grown by 54.8% and 4.53%, respectively, but the content of quercitrin was slightly reduced by 0.76%. The contents of quercetin, luteolin, quercetin in the 4th group (composed of dry ones) were significantly increased after fermentation. **Conclusion:** The method is precise, accurate with high repeatability, which is suitable for quantitative evaluation of medicated leaven. In addition, the fermentation method can increase the solubility of active ingredients and the occurrence of biological transformation reactions about medicated leaven, the results show that the changes of pharmacological substances of medicated leaven before and after fermentation and pharmacodynamic material basis of fresh medicines is better than dry ones be used as medicine.

[**Key words**] medicated leaven; fresh products; fermentation; decomposed recipes research; quercetin; luteolin; fingerprint

六神曲又称神曲,始载于唐《药性论》,为传统曲剂^[1],尚未制定国家药典标准。目前全国各地神曲在组方、配伍、发酵工艺等方面均有所不同,质量差异较大^[2]。以性状鉴定为主的质量控制缺乏量化指标,质量标准有待提升^[3-5]。而且由于复方组成及自然发酵的复杂性,其药效物质基础研究薄弱^[6],目前仅见神曲发酵前后苦杏仁苷变化状况分析^[7],未见发酵对组方中其他药物作用的研究。《本草纲目》载:神曲中青蒿、苍耳子、辣蓼三药以鲜品自然汁发酵。但市售六神曲中青蒿等鲜、干品均组方入药^[3]。有学者比较神曲中青蒿等鲜、干品发酵后蛋白酶活力、薄层色谱状况,未见显著差异^[8-9];亦有学者认为神曲以鲜品煎汁入药为佳^[10]。本课题组前期研究表明,神曲鲜品入药优于干品,其消化酶活力及食积小鼠胃肠推动与肠道菌群检测实验均支持上述结果^[11-12],鲜、干品组方发酵过程中药效物质状况有待进一步研究确认,鲜品入药优于干品的药效物质基础有待阐释。因此,本实验采用 LC-MS 检测并比较鲜、干品组方的六神曲发酵前后药效成分变化状况,建立六神曲的量化质控方法,用于六神曲的发酵工艺及成品质量评价,以提高其质量控制水平,为六神曲鲜干品中药发酵研究提供实验数据。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),

Expression CMS 型质谱仪(美国 Advion 公司), CPA225D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司), HC-2062 型离心机(安徽中科中佳仪器有限公司), DF-20 型台式粉碎机(浙江温岭机械公司)。槲皮苷、木犀草素、槲皮素对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为 PS08081501, PS010346, PS0605-0025, 纯度均 $\geq 98\%$), 检测用六神曲鲜干品组方发酵样品(自制), 甲酸(美国 Sigma-Aldrich 公司, 纯度 $\geq 95\%$), 水为超纯水, 甲醇、乙腈为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 六神曲样品的制备^[11-12]

2.1.1 配方 以 1988 年版《全国中药饮片炮制规范》中神曲组方为依据, 结合目前市场上制作方法, 通过拆方研究, 制备 4 组神曲样品, 分别为第 1 组(基本组, 含面粉、赤小豆、苦杏仁, 简称 MCK, 其中面粉 100 g, 赤小豆 4 g, 苦杏仁 4 g, 将苦杏仁和赤小豆粉碎, 过 20 目筛, 与面粉混匀, 即得), 第 2 组(鲜品煎汁组, MCK + 鲜青蒿、鲜苍耳子、鲜辣蓼各 7 g 煎煮), 第 3 组(干品 1/3 量煎汁组, MCK + 干品青蒿、苍耳子、辣蓼各 2.33 g 煎煮) 和第 4 组(干品全量煎汁组, MCK + 干品青蒿、苍耳子、辣蓼各 7 g 煎煮)。其中煎汁法为各组原料分别加 15, 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 15 min, 煎液兑入面粉、赤小豆、苦杏仁中, 即得; 保持各组神曲样品含水量均为 40% (包括煎汁)。

2.1.2 发酵及样品液的制备 取上述第 1~4 组药物,按前期优选的工艺条件(温度 33 ℃,相对湿度 70%~80%)发酵 4 d,即得。各组分别于发酵前、发酵第 4 天取样,将所取发酵样品置于 40 ℃ 下低温烘干,粉碎,过 100 目筛,待测。

2.2 分析条件 色谱条件为 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 25% B; 5~10 min, 25%~30% B, 10~16 min, 30%~36% B; 16~20 min, 36% B; 20~40 min, 36%~55% B; 40~50 min, 55%~60% B; 50~55 min, 60%~90% B; 55~65 min, 90% B; 65~66 min, 90%~25% B; 66~78 min, 25% B),柱温设定 35 ℃,流速设定 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,干燥气(氮气)流速 3.0 L·min⁻¹,干燥气温度 200 ℃,雾化压力 400 kPa,离子扫描范围 *m/z* 10~1 000,数据采集及处理分别采用 Advion Mass Express 及 Advion Data Express 分析软件。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 分别称取槲皮苷、木犀草素、槲皮素对照品适量,精密称定,加甲醇超声使溶解并定容至 100 mL,得质量浓度分别为 0.036, 0.038, 0.037 g·L⁻¹的混合对照品溶液,备用。

2.3.2 供试品溶液 取六神曲样品适量,研细过 100 目筛,精密称取约 10 g,精密加入甲醇 40 mL,称定质量,加热回流提取 1 h,放冷,减压浓缩至干,加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 鲜干品各组样品指纹峰的 LC-MS 检测及成分推断 依据所建立的测定条件对六神曲样品进行 LC-MS 检测,确定共有特征峰 15 个。测定指纹峰的相对分子质量,波长扫描范围 200~400 nm。根据相对分子质量测定结果,对照化学成分数据库并结合文献报道^[13-15],确定其中 10, 13, 15 号峰分别为槲皮苷、木犀草素、槲皮素。另推测峰 4 为红蓼苷或异红蓼素,峰 5 为花白苷,峰 14 为青蒿乙素,其他指纹峰有待进一步确认,见表 1 和图 1。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 将 2.3.1 项下对照品溶液分别稀释至 6 个不同质量浓度,得系列对照品溶液,每个质量浓度进样 2 次,以峰面积平均值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得槲皮苷、槲皮素和木犀草素的线性回归方程为 $Y = 19.82X - 0.196 (r = 0.9999)$,

表 1 六神曲样品中 15 个指纹峰化合物的信息

Table 1 Information of 15 common peaks of medicated leaven

峰号	λ_{max}/nm	$[M+H]^+$	推断化合物
1	210,280	349	-
2	203,290	244	-
3	350	499	-
4	330	449	红蓼苷、异红蓼素
5	350	453	花白苷
6	330	433	-
7	240,330	554	-
8	240,330	442	-
9	240,325	433	-
10	250	449	槲皮苷
11	245	679	-
12	280	270	-
13	250	287	木犀草素
14	250	251	青蒿乙素
15	250	303	槲皮素

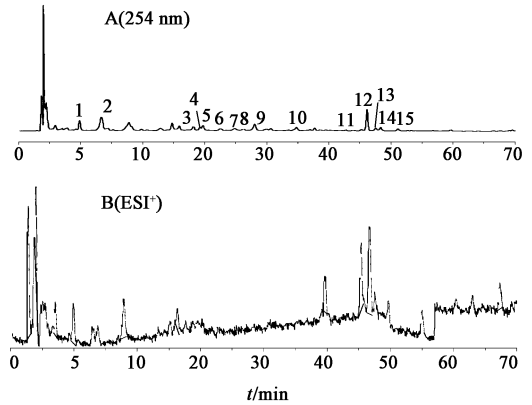


图 1 六神曲样品的 LC-MS 指纹谱(A)和总离子流(B)

Fig. 1 Fingerprint (A) and total ion current (B) of medicated leaven samples by LC-MS

$Y = 35.24X - 3.665 (r = 0.9999)$, $Y = 32.87X - 4.446 (r = 0.9999)$,线性范围依次为 1.125~36.00, 1.156~37.00, 1.180~38.00 mg·L⁻¹。

2.5.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液适量,按 2.2 项下条件连续进样 6 次,结果槲皮苷、木犀草素、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 1.7%, 1.5%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液适量,分别于配制后 0, 4, 9, 14, 18, 24 h 按 2.2 项下条件进样测定,结果槲皮苷、木犀草素、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.4%, 1.8%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批第 4 组六神曲发酵前样品 6 份,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定,结果槲皮苷、木犀草素、槲皮素的质量分数分别为 7.36,7.12,4.37 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 0.4%,0.3%,0.6%,表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收试验 精密称取已知指标成分含量的第 4 组六神曲发酵前样品 6 份,槲皮苷、木犀草素、槲皮素分别按质量的 50%,100%,150% 加入混合对照品,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定,计算加样回收率,见表 2。

2.6 样品特征信息比较 分别吸取槲皮苷、木犀草素和槲皮素混合对照品溶液和供试品溶液(第 1~4 组共 8 个样品)各 10 μL ,按 2.2 项下条件测定,记录色谱图。在相同色谱条件下,选择 15 号(槲皮素)为参照峰,此峰为鲜干品各组样品共有,分别求出各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。见表 3 和图 2。

2.7 样品测定 取各供试品溶液适量,按 2.2 项下条件测定,见表 4。结果发现基本组未检测出槲皮苷和槲皮素,仅检测到木犀草素,其含量发酵前后变化较小,且明显低于其他各组。其他 3 组发酵前后均含有槲皮苷等 3 种成分,且显著高于基本组,说明槲皮苷和槲皮素特征性成分主要来源于组方中青蒿等药材。干品全量煎汁组发酵后 3 种成分含量较

表 2 六神曲中指标成分的加样回收试验

Table 2 Recovery test of three index components in medicated leaven

成分	称样量 /g	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
槲皮苷	2.000	14.72	7.200	21.86	99.17	99.24	0.4
	2.002	14.73	7.200	21.84	98.75		
	2.001	14.73	14.40	29.01	99.17		
	1.998	14.71	14.40	29.12	100.07		
	2.005	14.76	21.60	36.18	99.17		
	1.996	14.69	21.60	36.10	99.12		
木犀草素	1.995	14.20	7.120	21.28	99.44	99.23	0.3
	1.994	14.20	7.120	21.25	99.02		
	2.005	14.28	14.24	28.40	99.16		
	2.002	14.25	14.24	28.44	99.65		
	1.997	14.22	21.36	35.39	99.11		
	2.004	14.27	21.36	35.42	99.02		
槲皮素	2.001	8.752	4.200	12.95	99.95	99.39	0.6
	1.998	8.739	4.200	12.92	99.55		
	1.999	8.744	8.400	16.99	98.17		
	1.992	8.713	8.400	17.08	99.61		
	2.001	8.752	12.60	21.27	99.35		
	2.004	8.765	12.60	21.33	99.72		

表 3 各组六神曲样品共有峰的相对保留时间及相对峰面积

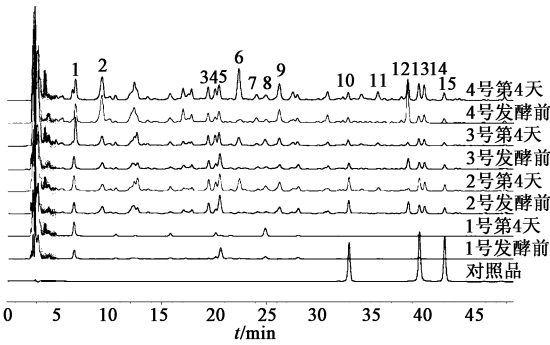
Table 3 Relative retention times and relative peak areas of common peaks of medicated leaven samples

峰号	2 号(鲜品煎汁组)				3 号(干品 1/3 量煎汁组)				4 号(干品全量煎汁组)			
	发酵前		发酵第 4 天		发酵前		发酵第 4 天		发酵前		发酵第 4 天	
	RRT	RA	RRT	RA	RRT	RA	RRT	RA	RRT	RA	RRT	RA
1	0.16	1.80	0.16	2.41	0.16	2.81	0.16	8.14	0.16	2.79	0.16	2.45
2	0.22	1.76	0.22	1.50	0.22	2.11	0.22	4.50	0.22	8.81	0.22	4.28
3	0.46	1.92	0.46	1.90	0.46	1.98	0.46	3.01	0.46	1.75	0.46	1.56
4	0.48	0.68	0.48	1.40	0.48	1.16	0.48	3.64	0.48	1.22	0.48	1.43
5	0.49	3.61	0.49	2.91	0.49	4.14	0.49	4.41	0.49	2.33	0.49	2.12
6	0.53	0.31	0.53	2.69	0.53	0.48	0.53	4.27	0.53	1.28	0.53	5.68
7	0.57	0.34	0.58	0.23	0.58	0.56	0.57	0.87	0.57	1.28	0.57	0.83
8	0.59	0.31	0.59	1.28	0.59	0.65	0.59	3.25	0.59	0.75	0.59	0.96
9	0.62	1.66	0.62	2.12	0.63	1.62	0.62	3.56	0.62	3.87	0.62	3.13
10	0.78	2.10	0.78	2.07	0.78	1.27	0.78	1.80	0.78	0.97	0.78	0.87
11	-	-	0.85	0.60	-	-	0.85	1.03	-	-	0.85	1.17
12	0.92	1.97	0.92	0.50	0.92	2.34	0.92	1.13	0.92	8.38	0.92	2.64
13	0.94	1.44	0.94	2.14	0.94	1.59	0.94	2.51	0.94	1.37	0.94	2.28
14	0.95	1.31	0.95	1.49	0.96	1.58	0.95	2.27	0.95	1.63	0.95	2.10
15	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

注:RRT 为相对保留时间,RA 为相对峰面积。

发酵前显著增加,其中槲皮苷、木犀草素、槲皮素质量分数分别增加了 59.9%,161.7%,75.5%;该组

发酵后木犀草素和槲皮素质量分数分别高于鲜品煎汁组发酵后 26.6%,18.7%。但考虑到干品青蒿等



10. 槲皮苷; 13. 木犀草素; 15. 槲皮素; 1 号. 基本组; 2 号. 鲜品煎汁组; 3 号. 干品 1/3 量煎汁组; 4 号. 干品全量煎汁组

图 2 混合对照品和各组六神曲样品的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed reference substance and medicated leaven samples in each group

折干率为鲜品的 1/3 ~ 1/2, 用量实为鲜品组 2 ~ 3 倍, 远未达到相等剂量鲜品中实际含量。说明干燥可致鲜品中活性成分含量降低, 但发酵炮制可使其部分成分溶出度增加。

表 4 六神曲各组样品中指标成分的质量分数

Table 4 Contents of index components in medicated leaven samples

组别	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$					
	槲皮苷		木犀草素		槲皮素	
	发酵前	发酵后	发酵前	发酵后	发酵前	发酵后
基本	0	0	18.50	21.30	0	0
鲜品煎汁	236.20	234.40	95.00	147.10	61.80	64.60
干品 1/3 量煎汁	100.60	91.60	75.70	77.90	44.60	29.50
干品全量煎汁	73.60	117.70	71.20	186.30	43.70	76.70

3 讨论

六神曲为传统曲剂, 因复方组方及自然发酵的复杂性, 发酵机制尚未阐明, 发酵对组方药物青蒿、苍耳子、辣蓼的作用未见相关报道, 特别是鲜干品组方作用差异有待比较。本课题通过拆方研究, 比较鲜干品组方六神曲发酵前后化学成分变化状况, 有助于六神曲组方优化及发酵品质量评价。

3.1 建立六神曲多指标定量兼指纹图谱定性质控方法 目前, 六神曲量化质控研究报道较少, 在仅有的文献中, 谢彦博等^[16]以 HPLC 测定多个产地六神曲中青蒿素、芦丁和槲皮素的含量, 结果差异较大。但鲜干品组方六神曲发酵前后成分检测及其含量比较未见相关报道。本文采用 LC-MS 检测各组六神曲样品发酵前后化学成分的变化状况, 通过比较组间差异, 建立了 15 个共有指纹峰, 确定了槲皮苷、木犀草素、槲皮素 3 种成分并检测其含量, 同时以槲皮素为参照峰, 计算 15 个共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积, 可有效控制六神曲的质量, 改变其以

性状鉴定为主的质控现状, 提高其质量控制水平。

预试验中考察了流动相溶剂系统和检测波长, 结果选定甲醇-0.2% 甲酸水溶液系统最优, 在 254 nm 处特征峰分离度高, 较 365, 210 nm 处基线平稳, 色谱峰数目相对较多且鲜干品各组特征峰响应明显。另通过图谱比较发现, 由于六神曲样品中特征峰含量较低, 浓缩后, 响应相对较高, 故选用浓缩定容法。另外, 由于六神曲为复方组方发酵, 受流动相分流比、进样浓度以及溶剂等因素影响, 实验中质谱指纹图谱基线噪音较高, 但不会影响定性判断。

3.2 六神曲中青蒿等鲜干品组方特征成分比较及归属 针对六神曲的复杂体系, 引入系统思维方式, 对其进行拆方研究^[6], 将青蒿等药材归为一类, 制备基本组及鲜干品各组, 基本组为面粉、赤小豆、苦杏仁, 并不含青蒿、苍耳子、辣蓼。经检测发现, 基本组仅含木犀草素, 发酵前后变化较小, 并未检出槲皮苷及槲皮素, 说明槲皮苷及槲皮素主要来源于青蒿等药材。比较鲜干品组 15 个共有指纹峰情况, 其中 10, 13, 15 号峰确定为槲皮苷、木犀草素、槲皮素, 根据文献报道, 可归属为青蒿、红蓼的药效成分。根据相对分子质量情况, 推测峰 4 (相对分子质量 448) 可能为红蓼苷或异红蓼素, 峰 5 (相对分子质量 452) 可能为花白苷, 二者均归属于组方药物红蓼 (辣蓼尚未制定国家药典标准, 各地应用品种不一, 山西地区习用红蓼); 推测峰 14 (相对分子质量 250) 可能为青蒿乙素, 可归属于青蒿, 上述指纹峰有待后续研究确认。另 11 号峰系发酵后产生, 为新产生化学成分, 有待后续进一步检测确定。

3.3 揭示六神曲中青蒿等鲜品入药优于干品的药效物质 近年来六神曲研究多集中于其微生物及消化酶检测, 发酵对组方药物作用报道较少。高慧等^[8]比较神曲中青蒿等鲜干品制法, 酶活力与 TLC 均无显著差别, 认为以干品粉碎发酵代替鲜品可不受季节限制。但王海洋等^[10]考察鲜干品入药对神曲中淀粉酶活力等的影响, 结果发现青蒿等药材以鲜品水煎液混匀后拌料为最佳, 说明鲜干品不同组方及制法仍存争议。本课题组前期酶活力检测及食积小鼠药效实验均表明鲜品组方入药优于干品, 本实验比较鲜干品组方六神曲发酵前后槲皮苷等成分变化及差异状况, 量化各组发酵前后槲皮苷、槲皮素及木犀草素含量。结果显示鲜品组发酵前后, 槲皮苷等成分均显著高于基本组及干品组, 具有明显优势, 表明青蒿等鲜品组方入药优于干品, 支持前述酶活力及药效学实验结果。

中药发酵过程中,可借助于酶和微生物的分解与转化,完成一些化学合成难以进行的反应,主要涉及羟基化、环氧化、氢化、水解、水合、芳构化等,可更大幅度地改变药性,产生新的化学成分或活性更强的先导化合物等^[17]。在本研究中,六神曲经发酵后,鲜品煎汁组及干品1/3量煎汁组的槲皮苷含量降低,而鲜品煎汁组及干品全量煎汁组的槲皮素有所增长,考虑系发酵过程中槲皮苷发生水解反应生成槲皮素所致,推断水解反应可能是其发酵过程中主要化学反应之一。另鲜干品组发酵后木犀草素均有所增长,其中鲜品煎汁组和干品全量煎汁组增长幅度较大,且产生新的11号未知峰。可见六神曲发酵过程中,存在较为复杂的化学反应,不仅促进了部分药效成分溶出度增加,还发生了成分转化及新成分的产生。

3.4 揭示槲皮苷等成分与六神曲消食止泻功效的相关性 前期研究均表明鲜品组方入药为最佳选择^[11-12]。槲皮苷、槲皮素及木犀草素均为黄酮类物质,具有明显的抗炎、抗氧化作用,生物活性良好。据报道,木犀草素具有肠道抑菌作用,对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和大肠埃希菌等常见菌种均有高效的抗菌活性^[18],槲皮素具有肠黏膜损伤保护及肠道止泻作用,其机制可能与抗氧化作用、拮抗钙离子通道、抑制小肠推进功能和腹腔毛细血管通透性有关^[19-21]。槲皮苷在葡聚糖硫酸钠诱导的大鼠结肠炎模型中,表现出显著抗炎活性^[22]。据此推断,槲皮苷等成分可能在六神曲健脾消食止泻功效中发挥了肠道保护及抑菌止泻作用。另外,基本组与鲜品煎汁组的消化酶活力较高且相近,故前期开展了食积小鼠药效实验^[11-12],结果表明基本组中无青蒿等药材,其胃排空作用最强,肠推进作用最弱,青蒿等药材的加入会影响胃排空,促进肠推进。结合本实验结果,基本组中仅含少量木犀草素,并未检测出槲皮苷等其他成分,故肠推进最弱,可从另一侧面印证槲皮苷等成分与肠推进存在密切关系。而基本组药效成分较少,却保持较高胃排空作用,考虑可归因其较高的消化酶活力,六神曲中酶活力及槲皮苷等药效成分共同促进了其健脾止泻作用的实现。

通过以上研究,初步揭示了六神曲中青蒿等以鲜品入药优于干品的药效物质基础。通过鲜干品各组槲皮苷等成分的定量检测及指纹图谱定性鉴别,量化了六神曲的质量控制水平,可改变目前六神曲缺乏量化质控指标,以性状鉴定为主的现状,并为传统中药曲剂的现代研究提供可资借鉴的思路与方法。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:2337.
- [2] 胥敏,吴纯洁,李欣逸,等. 曲类中药质量标准共性问题的思考[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):16-21.
- [3] 刘双,杨静,江振作,等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展[J]. 天津中医药,2015,32(5):318-320.
- [4] 府炳荣. 影响中药神曲“神曲”功效的因素分析[J]. 抗感染药学,2009,6(4):237-240.
- [5] 任巧玲,宋潇潇. 六神曲的质量情况分析[J]. 中国现代药物应用,2010,4(10):113-114.
- [6] 王丽芳,高文远. 论六神曲中微生物、消化酶动态检测及整体性研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(8):1896-1898.
- [7] 陈缤,高慧,孟莉,等. 神曲组方中用生苦杏仁和制苦杏仁的比较研究[J]. 中成药,2008,30(9):1324-1325.
- [8] 高慧,陈秀媛,贾天柱,等. 神曲的发酵工艺研究[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(3):221-222.
- [9] 戴龙瑞,陶文元. 浅谈六神曲和建曲的组方、制作及改良途径[J]. 上海中医药杂志,1988(9):30-31.
- [10] 王海洋,高文远,张丽霞. 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2084-2087.
- [11] 王丽芳,高文远,裴香萍,等. 鲜干品组方及不同制法六神曲中消化酶活力的动态检测及分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(1):20-24.
- [12] 王丽芳,高文远,徐鑫,等. 神曲鲜干品组方对食积小鼠胃肠动力及肠道菌群调整的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):20-24.
- [13] 中国科学院上海有机化学研究所. 化学专业数据库[DB/OL]. <http://www.orgchem.csdb.cn>. [1978-2017].
- [14] 谢周涛,何再安,刘焱文. 红蓼的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(10):1034-1035.
- [15] 杨志云,秦民坚,钱士辉. 红蓼研究进展[J]. 中国野生植物资源,2008,27(1):11-15.
- [16] 谢彦博,徐云,孙盛,等. HPLC测定六神曲中青蒿素、芦丁和槲皮素含量[J]. 中国酿造,2014,33(10):140-144.
- [17] 何文胜. 微生物转化在中草药生产中的应用研究[J]. 海峡药学,2006,18(4):191-194.
- [18] 林卓慧. 木犀草素抗菌活性研究[J]. 检验医学与临床,2009,6(12):1022.
- [19] 孟德胜,汪仕良. 槲皮素等对烫伤后小鼠肠粘膜损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2000,16(6):673-675.
- [20] WU S N, Chiang H T, SHEN A Y, et al. Differential effects of quereetin, a natural polyphenolic flavonoid, on L-type calcium current in pituitary tumor (GH3) cells and neuronal NG108-15 cells[J]. J Cell Physiol,2003,195(2):298-308.
- [21] 张文举,陈宝田,王彩云,等. 槲皮素止泻机制研究[J]. 南方医科大学学报,2003,23(10):1029-1031.
- [22] Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas M E, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOs expression[J]. Br J Pharmacol,2004,143(7):908-918.

[责任编辑 刘德文]