

· 药学基础 ·

黄连汤的定性“制剂质量标志物”筛选

杜茂波¹, 李涛², 沈硕¹, 刘淑芝^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 筛选黄连汤的定性“制剂质量标志物”, 为指标成分的选择提供数据支撑, 并建立指标成分与功效(泻火止痛)的直接联系, 做到量效合一。方法: 采用HPLC指纹图谱技术对黄连汤冻干粉制备工艺的稳定性进行考察, 通过超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术对黄连汤中化学成分进行鉴定, 通过查阅相关文献, 将鉴定化合物的药理活性与黄连汤功效对应的药理作用进行比对, 确定黄连汤定性“制剂质量标志物”的组成。结果: 10批黄连汤冻干粉的HPLC指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.9, 说明黄连汤制备工艺稳定可行; 从黄连汤中共鉴定出29个成分, 其中23个生物碱类, 3个苯丙素类, 2个倍半萜内酯类和1个柠檬酸类; 来源于黄连、吴茱萸及木香的成分分别有15, 12, 2个。得到黄连汤定性“制剂质量标志物”的组成为木兰花碱或10-羟基-2,3,9-三甲氧基小檗碱, 黄柏碱, 蝙蝠葛任碱, 芬氏唐松草定碱, 格兰地新, 脱氢吴茱萸碱, 黄连碱, 药根碱, 非洲防己碱, 甲基黄连碱, 黄连素, 表小檗碱, 黄藤素, 吴茱萸碱, 吴茱萸次碱, 绿原酸, 新绿原酸、隐绿原酸, 柠檬苦素, 木香炔内酯和去氢木香炔内酯。结论: 研究筛选黄连汤定性“制剂质量标志物”的方法科学、合理、可行, 可为黄连汤工艺研究中指标成分选择、质量标准中定性和定量指标的确定提供参考。

[关键词] 黄连汤; 指纹图谱; 高效液相色谱法(HPLC); 制剂质量标志物; 冻干粉; 药理作用; 定性分析

[中图分类号] R22;R94;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0101-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201951

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200624.0906.002.html>

[网络出版日期] 2020-6-24 10:26

Screening of Qualitative Preparation Quality Markers of Yuliantang

DU Mao-bo¹, LI Tao², SHEN Shuo¹, LIU Shu-zhi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To screen qualitative preparation quality markers of Yuliantang, in order to provide data support for the selection of indicator components, and establish the direct connection between indicator components and efficacy (Xiehuo Zhitong) for achieving the quantity-effect combination. **Method:** The stability of preparation process of Yuliantang lyophilized powder was investigated by HPLC fingerprint technology, then, the components in Yuliantang lyophilized powder were identified by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS. By referring to the relevant literature, the pharmacological activities of these identified compounds were compared with the pharmacological effects corresponding to the efficacy of Yuliantang, and the composition of the qualitative preparation quality markers of Yuliantang lyophilized powder was determined. **Result:** The similarities between HPLC fingerprint of 10 batches of Yuliantang lyophilized powder and the control fingerprint were >0.9, indicating that the preparation process was stable and feasible. A total of 29 components were identified from Yuliantang, of which 23 alkaloids, 3 phenylpropanoids, 2 sesquiterpenoids and 1 limonoid, and

[收稿日期] 20200520(001)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-052); 国家非物质文化遗产项目——中医传统制剂方法[IX-4(1)]

[第一作者] 杜茂波, 博士, 助理研究员, 从事中药制剂及外用新剂型研究, E-mail: mbdu@icmm.ac.cn

[通信作者] * 刘淑芝, 研究员, 博士生导师, 从事中药制剂及外用新剂型研究, E-mail: liushuzhi2004@sina.com

there were 15 ingredients of *Coptidis Rhizoma*, 12 ingredients of *Euodiae Fructus*, and 2 ingredients of *Aucklandiae Radix*. The composition of the qualitative preparation quality markers of Yuliantang was initially determined as magnoflorine or 10-hydroxy-2, 3, 9-trimethoxyberberine, phellodendrine, menisperine, thalifendine, groenlandicine, dehydroevodiamine, coptisine, jatrorrhizine, columbamine, methylcoptisine, berberine, epiberberine, palmatine, evodiamine, rutaecarpine, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, limonin, costunolide, dehydrocostus lactone. **Conclusion:** The method for researching and screening the preparation quality markers in Yuliantang lyophilized powder is scientific, reasonable and feasible, it can provide reference for the determination of component indicators in the process research of Yuliantang and qualitative and quantitative indexes in its quality standard.

[Key words] Yuliantang; fingerprint; high performance liquid chromatography (HPLC); preparation quality markers; lyophilized powder; pharmacological effects; qualitative analysis

近年来,国家为了振兴中医药产业,出台了系列政策和法规,包括《中华人民共和国中医药法》^[1]和《中医药发展战略规划纲要(2016—2030年)》^[2]等,中医药产业迎来了一个快速发展时期。在中医药产业中,中药制剂产品起到了巨大的支撑作用。然而,中药制剂产品研发过程中亦存在一些问题:①工艺研究中评价指标和质量标准中定性、定量指标的选择缺少科学依据与数据支撑;②指标只能代表制剂产品含量的高低,代表不了产品的功效,做不到量效合一,不能充分说明中药制剂产品的科学性。这些问题在很大程度上限制了中药制剂产品的研发、临床应用及市场推广。

目前,中药产品研发及质量控制过程中选用的指标成分大多依据现行版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)。《中国药典》的权威性自然毋庸置疑,但如果可以建立指标成分与制剂功效的直接联系,使其既能代表制剂质量的优劣,又能说明药效的高低,将更具说服力,这也是瓶颈所在。《神农本草经》是应用阴阳五行学说的典范,其对阴阳五行有了相对明确的内涵——“性”“味”,自此阴阳五行学说在中药中固化了下来。其“性”用阴阳表示,分为寒、热、温、凉;其“味”用五行表示,包括酸、苦、甘、辛、咸。《神农本草经》用以表示中药“味”的酸、苦、甘、辛、咸其实是中药中所含化学物质相互作用后的整体反映,是表示中药中化学成分“量”的最初形式;用以表示中药“性”的寒、热、温、凉其实是中药药效或者毒效高低的表示方法,是表示中药“效”的最初形式。《神农本草经》开创了“性味合一”描述中药内涵的方式,对中药复方(中药制剂)“量效合一”内涵描述方式的建立具有十分重要的启示意义。

近年来,随着药物分析技术的发展,中医药科

研工作者^[3-5]提出了中药质量标志物与药效结合的策略,该策略完成了《神农本草经》中记载的性味由宏观向微观的转变,奠定了中药“量效合一”现代研究的基础。中药由单味走向复方后,反而只有功效的说明,体现“量”的元素反而消失不见了;《神农本草经》形成的“性味合一”描述中药内涵的方式,在中药复方中并没有保留下来。中药复方(中药制剂)需要构建物质基础与功效之间的直接联系,建立“量效合一”描述中药复方(中药制剂)内涵的方式。

基于《黄帝内经》阴阳五行学说的学术思想,传承《神农本草经》开创的“性味合一”描述中药内涵的方式,应用现代科学技术,建立“量效合一”描述中药复方(中药制剂)内涵的方式,本文提出“制剂质量标志物”假说。制剂质量标志物具有以下特点:①制剂质量标志物在中医药理论的指导下,依据临床适应证的要求,按照君-臣-佐-使配伍后产生;②制剂质量标志物不在原料阶段产生,其产生在制剂阶段,被工艺所选择;③制剂质量标志物可用于制剂的工艺筛选、质量评价及质量控制;④制剂质量标志物与临床适应证直接相关,其含量高低反映了药效的高低,也就是产品的优劣。

黄连汤古称黄连丸,始载于《是斋百一选方》^[6],黄连与吴茱萸的比例为1:1,之后《医学入门》^[7]中该方黄连与吴茱萸的比例调整为6:1,现收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》(第五册)(标准号WS3-B-1019-91)^[8],由黄连、吴茱萸、木香按6:1:2的比例组成,功用泻火止痛,用于脘胁疼痛,暖气吐酸,大便热泻。目前,研究多选择黄连汤的处方组成为黄连-吴茱萸-木香(6:1:2),其具有镇痛、抗炎、抗溃疡、抗菌活性^[9-13]。

指纹图谱概念来源于法医学^[14-15],依据每个人

的指纹结构上微小差别可以鉴别区分不同的个体。近代指纹分析的概念结合生物技术的发展延伸到了DNA指纹图谱分析,而且应用范围也从犯罪学扩大到医学和其他生命科学领域。在国家药品监督管理局发布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中,描述中药材指纹图谱系指中药材经适当处理后,采用一定的分析手段,得到的能够标示该中药材特性的共有峰的图谱^[16]。指纹图谱技术最早用在中药注射剂的质量评价中^[17-21],后面在中成药^[22-26]、中药材或中药饮片^[27-31]的质量评价中也有应用。然而,中药指纹图谱技术用以评价中药制剂具体制备工艺环节的稳定性、质量可控性方面却鲜有报道。超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS)可以快速地对工艺稳定、质量可控的黄连汤冻干粉进行全成分分析^[32-33],在药物活性数据库中检索所鉴定成分的药理作用,与临床适应证进行比对,初步筛选出中药制剂的“制剂质量标志物”。网络药理学^[34-36]是在系统生物学和多向药理学快速发展的基础上提出的药物设计新方法和新策略,内容涉及系统生物学、网络生物学分析、基因的连接性和冗余度以及基因的多效性。通过网络药理学分析可以建立化学物质、药理作用及作用靶点之间的联系^[37-41],快速确定各化学物质的作用靶点,并对其贡献度进行预测。

综上所述,确定黄连汤“制剂质量标志物”的流程为①应用指纹图谱技术对工艺的稳定性、可重复性进行评价,获得工艺稳定的产品。②采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS和气相色谱-质谱(GC-MS)技术对黄连汤中的化学成分进行鉴定,将化学成分的药理活性与黄连汤药理作用(镇痛、抗炎、抗溃疡及抗菌)进行文献比对,确定黄连汤定性“制剂质量标志物”;定性“制剂质量标志物”的定义为基于制剂工艺的,建立制剂功效与被鉴定成分药理活性(文献检索)直接联系的化合物组合;该化合物组合可初步反映制剂成分的特征性及制剂的功效。③采用LC-MS和GC-MS对定性“制剂质量标志物”进行定量检测,确定黄连汤定量“制剂质量标志物”;定量“制剂质量标志物”的定义为在定性“制剂质量标志物”的基础上,通过液质或气质联用技术确定的可进行含量测定的化合物组合。④应用网络药理学对定量“制剂质量标志物”中各成分对黄连汤功效泻火止痛(包含镇痛、抗炎、抗溃疡及抗菌作用)的贡献度进行预测;并构建4种药理作用的体

内外药理模型,验证网络药理学的预测,确定黄连汤活性“制剂质量标志物”;⑤将黄连汤定量“制剂质量标志物”的“量”与活性“制剂质量标志物”的“效”进行组合,按量效高低进行排序,选择各药理作用下量效最高的5种成分,组成黄连汤“制剂质量标志物”。本研究拟探讨黄连汤冻干粉定性“制剂质量标志物”筛选方法的可行性,以期为黄连汤工艺研究以及定性、定量指标成分的确定提供参考,并为黄连汤定量制剂质量标志物、活性制剂质量标志物及制剂质量标志物的确定奠定基础。

1 材料

e2695型高效液相色谱仪[美国Waters公司,包括二极管阵列检测器(PDA)检测器,Empower 3工作站],AE240型1/10万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],FW-100型高速粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),LGJ-10B型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司制造),Ultimate 3000型超高效液相色谱仪和LTQ-Orbitrap型质谱仪(包括Xcalibur 2.1工作站)(美国Thermo-Fisher公司),Milli-Q型超纯水制备仪(美国Millipore公司)。

黄连、吴茱萸、木香饮片均购自亳州永刚饮片厂有限公司,经中国中医科学院中药资源中心杨光副主任研究员鉴定,分别为毛茛科植物黄连*Coptis chinensis*的干燥根茎,芸香科植物吴茱萸*Euodia rutaecarpa*的干燥近成熟果实,菊科植物木香*Aucklandia lappa*的干燥根;盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110732-201913,110713-201814,纯度均 $\geq 98\%$),水为屈臣氏纯净水,乙腈、甲醇、磷酸及甲酸为色谱纯或质谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连汤的指纹图谱研究

2.1.1 样品来源^[8-9] 10批黄连汤冻干粉样品为同一批饮片采用相同工艺制备而来。称取相同处方量的饮片各10批(每批黄连300 g,吴茱萸50 g,木香100 g),加10倍水提取2次,每次30 min,合并水提液,水浴浓缩至生药质量分数达 $1\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$,备用;加入2倍量95%乙醇进行醇沉,放置过夜,过滤,收集醇沉上清液,回收乙醇至无醇味,备用;将上述溶液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下预冻2 h后冷冻干燥,得 $5.48\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 黄连汤冻干粉样品S1~S10(按生药量计)。

2.1.2 色谱条件 Agilent HC-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,检测波长330 nm,流动相乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B)

梯度洗脱(0~10 min, 10%~15%A; 10~20 min, 15%~18%A; 20~30 min, 18%~27%A; 30~38 min, 27%A; 38~44 min, 27%~30%A; 44~50 min, 30%~65%A; 50~60 min, 65%~80%A; 60~65 min, 80%~90%A)。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取黄连汤冻干粉约0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇100 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理30 min, 放冷, 用50%甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每1 mL含盐酸巴马汀0.144 mg, 盐酸小檗碱1.448 mg的混合对照品溶液, 即得。

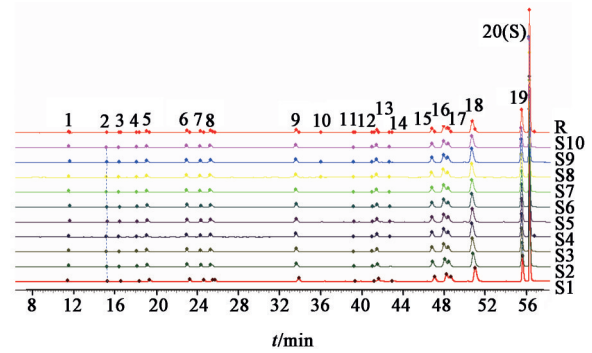
2.1.5 精密度试验 量取同一供试品溶液连续进样6次, 按2.1.2项下色谱条件进行测定。以盐酸小檗碱为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<1.5%, 相对峰面积的RSD均<2.5%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于制备后0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h按2.1.2项下色谱条件测定, 以盐酸小檗碱参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<0.5%, 相对峰面积的RSD均<2.9%, 表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批黄连汤冻干粉共6份, 按2.1.3项下方法平行制备供试品溶液, 按2.1.2项下色谱条件测定, 以盐酸小檗碱为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<1.2%, 相对峰面积的RSD均<1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 指纹图谱的建立与相似度计算 取10批黄连汤冻干粉样品适量, 按2.1.3项下方法制备供试品

溶液, 按2.1.2项下色谱条件测定, 将所得的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版), 以S1样品图谱作为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗设为0.1 min, 经多点校正后得到10批样品的叠加指纹图谱及其对照指纹图谱, 并确定了20个共有峰, 见图1。



R. 对照指纹图谱; 19. 盐酸巴马汀; 20. 盐酸小檗碱

图1 黄连汤的HPLC指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of Yuliantang

2.1.9 指纹图谱共有峰的标定 根据10批黄连汤冻干粉检测所得图谱, 选择稳定性、重复性较好及特征明显的色谱峰作为共有峰, 共标定了20个共有峰, 共有峰峰面积占总峰面积95%以上。其中盐酸小檗碱的分离度较好、峰面积最大、含量较稳定、对照品较容易获得, 故选择其作为参照峰(S)。采用对照品对比, 结合紫外光谱信息, 对黄连汤指纹图谱中20个共有峰进行指认, 结果发现19号峰为盐酸巴马汀, 20号峰为盐酸小檗碱, 见图1。10批黄连汤冻干粉HPLC指纹图谱的相似度均>0.9, 见表1。

表1 10批黄连汤HPLC指纹图谱的相似度评价

Table 1 Similarity evaluation of HPLC fingerprint of 10 batches of Yuliantang

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.907	0.918	0.919	0.918	0.918	0.918	0.917	0.918	0.918	0.933
S2	0.907	1.000	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994
S3	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S4	0.919	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S5	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S6	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S7	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S8	0.917	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S9	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
S10	0.918	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999
对照指纹图谱	0.933	0.994	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000

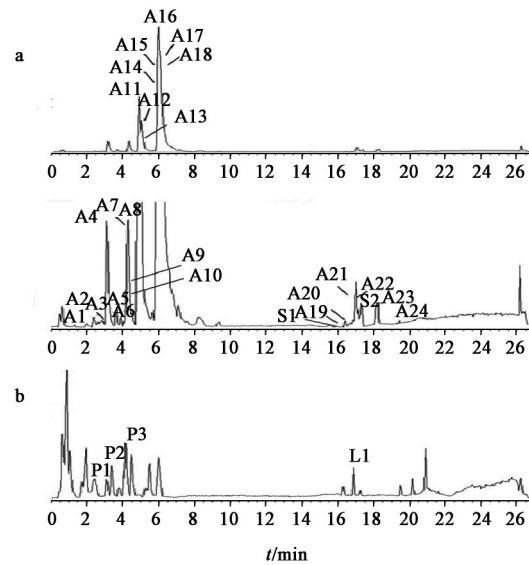
2.2 黄连汤的化学成分分析

2.2.1 超高压液相色谱条件 采用XSelect HSS T3色谱柱(2.1 mm×75 mm, 2.5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 5%~15%A; 3~13 min, 15%~20%A; 13~20 min, 20%~95%A; 20~25 min, 95%A), 流速0.4 mL·min⁻¹, 柱温35 °C, 进样量1 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式下分别扫描。正离子模式毛细管温度350 °C, 毛细管电压35 V, 喷雾电压3.4 kV, 鞘气(N₂)流速35 arb, 辅助气(N₂)流速10 arb, 负离子模式毛细管温度350 °C, 毛细管电压-35 V, 喷雾电压-3.4 kV, 鞘气(N₂)流速35 arb, 辅助气(N₂)流速10 arb。样品一级质谱在傅立叶变换静电场轨道阱模式下进行全扫描(分辨率3万, 扫描范围 *m/z* 50~2 000), 二级及三级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan)。质量轴校准用外标法(质量误差<5 ppm), 校准质量正离子选择 *m/z* 74.096 4, 195.084 6, 262.636 1, 524.265 0和1 022.003 4, 负离子选择 *m/z* 230.101 7, 249.153 0和407.280 3。数据采集和分析采用Xcalibur 2.1和Mass Frontier 7.0软件。

2.2.3 供试品溶液的制备 取2.1.1项下制备的黄连汤冻干粉约0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇20 mL, 称定质量, 室温超声处理15 min, 取出, 放冷, 称定质量, 加甲醇补足失重, 摇匀, 过0.22 μm微孔滤膜, 即得。

2.2.4 样品分析和数据处理流程 根据化合物准确相对分子质量及二级碎片离子信息, 并结合参考文献[42-47]所载数据, 结果从黄连汤中共鉴定出了29个化学成分, 包括23个生物碱类, 3个苯丙素类, 2个倍半萜内酯类和1个柠檬酸类, 见图2和表2。结果发现属于黄连、吴茱萸及木香的成分分别有15, 12, 2个, 所鉴定化合物的误差范围均在±10 ppm以内。



a. 正离子模式; b. 负离子模式; A. 生物碱类; P. 苯丙素类; S. 倍半萜内酯类; L. 柠檬酸类

图2 黄连汤的代表性基峰色谱

Fig. 2 Representative base peak chromatograms of Yuliantang

表2 黄连汤的UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS化学成分分析

Table 2 Identification of chemical components in Yuliantang by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS

类型	编号	<i>t_R</i> /min	分子式	<i>m/z</i>			加荷方式	碎片离子 <i>m/z</i>	化合物	来源	文献
				理论值	实测值	δ/ppm					
生物碱类	A1	2.80	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₀	506.202 1	506.202 9	1.7	[M+H] ⁺	344.151 6 ¹⁾ , 326.141 1, 208.098 2, 190.087 6, 180.103 1, 151.076 3	二氢-11-羟基-左旋光千金藤定碱-葡萄糖苷	黄连	[42]
	A2	3.12	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.170 0	342.170 9	3.0	M ⁺	311.130 1, 297.114 4 ¹⁾ , 279.103 7, 265.088 0, 192.266 0	木兰花碱或10-羟基-2,3,9-三甲氧基小檗碱	黄连	[43-44]
	A3	3.16	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.170 0	342.171 1	3.1	M ⁺	297.114 4 ¹⁾ , 265.088 0, 237.092 8	黄柏碱	黄连	[42]
	A4	3.41	C ₂₅ H ₂₉ NO ₁₀	504.186 4	504.187 7	2.4	[M+H] ⁺	342.136 2 ¹⁾ , 324.125 8, 206.082 8, 188.072 1, 178.087 6, 149.060 7	11-羟基-左旋光千金藤定碱-葡萄糖苷	黄连	[42]
	A5	3.95	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄ ⁺	356.185 6	356.186 3	1.9	M ⁺	311.093 1, 296.105 6, 279.103 0, 206.118 8 ¹⁾	蝙蝠葛任碱	黄连	[42,44]
	A6	4.29	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	322.107 4	322.108 1	2.2	M ⁺	307.085 7 ¹⁾ , 279.090 7	芬氏唐松草定碱	黄连	[42]
	A7	4.37	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	322.107 4	322.108 1	2.2	M ⁺	307.085 7 ¹⁾ , 279.090 7	格兰地新	黄连	[42]
	A8	4.45	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	352.117 9	352.118 7	2.2	[M+H] ⁺	337.096 6 ¹⁾ , 322.072 8, 308.093 7	氧化小檗碱	黄连	[42]

续表2

类型	编号	t_R /min	分子式	m/z			加荷方 式	碎片离子 m/z	化合物	来源	文献
				理论值	实测值	δ /ppm					
	A9	4.83	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	302.128 8	302.129 5	2.3	[M+H] ⁺	287.107 0 ¹⁾ , 286.099 4, 272.083 5	脱氢吴茱萸碱	吴茱萸	[45]
	A10	4.91	C ₁₉ H ₁₄ N ₄ O ⁺	320.091 7	320.092 2	1.3	M ⁺	292.098 7 ¹⁾ , 277.075 1	黄连碱	黄连	[42-44]
	A11	5.03	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ⁺	338.138 7	338.139 0	0.9	M ⁺	323.117 3 ¹⁾ , 308.093 8, 294.114 7, 279.084 4	药根碱	黄连	[42]
	A12	5.07	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ⁺	338.138 7	338.139 1	1.3	M ⁺	323.117 2 ¹⁾ , 294.114 3	非洲防己碱	黄连	[43]
	A13	5.68	C ₂₀ H ₁₆ N ₄ O ⁺	334.107 4	334.107 1	-0.9	M ⁺	319.084 8, 316.097 4, 306.113 3 ¹⁾	甲基黄连碱	黄连	[43]
	A14	5.80	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₂	318.123 7	318.124 4	2.1	[M+H] ⁺	300.114 7 ¹⁾ , 274.135 4	14-甲酰基二氢 吴茱萸次碱	吴茱萸	[45]
	A15	5.97	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ⁺	336.123 0	336.123 4	0.4	M ⁺	320.093 9, 306.078 1, 292.098 7 ¹⁾	黄连素	黄连	[42,44]
	A16	6.00	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ⁺	336.123 0	336.123 4	1.1	M ⁺	320.093 9, 318.078 3, 292.098 7 ¹⁾	表小檗碱	黄连	[42]
	A17	6.12	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ⁺	352.154 3	352.154 7	0.9	M ⁺	337.133 3 ¹⁾ , 336.125 8, 308.130 5	黄藤素	黄连	[42]
	A18	16.61	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	304.108 1	304.105 6	-8.1	[M+H] ⁺	286.095 9 ¹⁾ , 167.105 9	7β-羟基吴茱萸 次碱	吴茱萸	[45]
	A19	16.71	C ₂₁ H ₂₉ NO	312.232 2	312.230 2	-6.5	[M+H] ⁺	186.091 6 ¹⁾ , 173.083 7, 160.075 7, 144.080 7	1-甲基-2-[(Z)- 6-十一烷基]-4-(1 H)-喹诺酮	吴茱萸	[45-46]
	A20	17.22	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	304.144 4	304.142 9	-1.6	[M+H] ⁺	171.092 0, 161.071 2, 144.081 0 ¹⁾ , 134.060 2, 116.049 5, 106.065 1	吴茱萸碱	吴茱萸	[45-46]
	A21	17.35	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	288.113 1	288.111 6	-5.2	[M+H] ⁺	273.089 6 ¹⁾ , 244.087 0, 169.076 1, 145.039 6, 115.053 5	吴茱萸次碱	吴茱萸	[45-46]
	A22	18.26	C ₁₉ H ₂₇ NO	286.216 5	286.215 2	-4.7	[M+H] ⁺	186.091 2, 173.083 5 ¹⁾ , 159.067 7	1-甲基-2-壬基-4 (1H)-喹啉酮	吴茱萸	[45-46]
	A23	19.42	C ₂₁ H ₃₁ NO	314.247 8	314.246 8	-3.4	[M+H] ⁺	186.091 2, 173.083 5 ¹⁾ , 158.059 9	1-甲基-2-十一烷 基-4(1H)-喹诺酮	吴茱萸	[45-46]
苯丙 素类	P1	3.35	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 7	353.085 8	-0.9	[M-H] ⁻	191.055 8 ¹⁾ , 179.034 9, 135.045 2	新绿原酸	吴茱萸	[45]
	P2	4.04	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 7	353.085 4	-1.3	[M-H] ⁻	191.065 2, 179.035 5, 173.044 7 ¹⁾ , 135.048 1	隐绿原酸	吴茱萸	[45]
	P3	4.46	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.086 7	353.085 8	-1.0	[M-H] ⁻	191.055 7, 179.034 7, 173.045 3 ¹⁾ , 135.045 1	绿原酸	吴茱萸	[45]
柠檬 酸类	L1	16.85	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	469.185 7	469.184 3	-1.4	[M-H] ⁻	369.206 3, 249.127 5, 191.034 4, 175.075 9 ¹⁾ , 135.081 3	柠檬苦素	吴茱萸	[45-46]
倍半 萜内酯 类	S1	15.80	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.153 6	233.152 1	-6.5	[M+H] ⁺	215.143 5, 187.148 4 ¹⁾ , 159.117 0, 145.101 3, 131.085 6	木香炔内酯	木香	[47]
	S2	17.66	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	231.138 0	231.136 3	-7.0	[M+H] ⁺	213.152 8 ¹⁾	去氢木香内酯	木香	[47]

注: ¹⁾基峰碎片。

2.3 黄连汤功效与成分药理作用 黄连汤的功效是泻火止痛,与之相对应的药理作用就是选择成分的依据。根据前期研究及文献报道^[9-13],黄连汤具有镇痛、抗炎、抗溃疡、抗金黄色葡萄球菌和痢疾杆菌的药理作用。被鉴定成分的药理活性有一种与黄连汤对应就认为其是组成黄连汤“制剂质量标志物”的成分之一。对黄连汤的功效与药理作用仔细对比后发现,黄连汤的功效可以分解成止痛、泻火两部分进行说明:①止痛对应镇痛;②泻火对应

抗炎、抗溃疡及抗菌。将从黄连汤鉴定出来在化学成分在中医药百科全书(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>), PumChem, ChemBook 中进行检索,以确定其药理作用,见表3。将各成分的药理作用与黄连汤的药理作用进行比对,并结合2015年版《中国药典》含量测定项下确定的指标成分,初步确定黄连汤的“制剂质量标志物”为黄柏碱、蝙蝠葛任碱、芬氏唐松草定碱、格兰地新等。

表3 黄连汤的定性“制剂质量标志物”基本信息及药理活性

Table 3 Basic information and pharmacological activities of qualitative preparation quality markers of Yuliantang

编号	化合物	CAS	药理作用
A1	二氢-11-羟基-左旋光千金藤定碱-葡萄糖苷	1513738-41-4	-
A2	木兰花碱或10-羟基-2,3,9-三甲氧基小檗碱	6681-18-1	抗糖尿病、抗炎、免疫调节、降压、抗氧化和抗真菌活性
A3	黄柏碱	6873-13-8	保护血小板、降压、抗肾炎、抑制免疫反应
A4	11-羟基-左旋光千金藤定碱-葡萄糖苷	1513738-34-5	-
A5	蝙蝠葛任碱	25342-82-9	抗菌、抗炎
A6	芬氏唐松草定碱	18207-71-1	抗氧化、抗菌、抗病原微生物
A7	格兰地新	38691-95-1	消炎、镇痛、降温、降压、抗癌
A8	氧化小檗碱	549-21-3	-
A9	脱氢吴茱萸碱	67909-49-3	降压、抗肿瘤
A10	黄连碱	3486-66-6	抗微生物活性、杀虫、诱导神经细胞分化、保护胃黏膜、抗癌、松弛平滑肌、抗肾炎
A11	药根碱	3621-38-3	抗肿瘤、降血糖、正性肌力作用、清除氧自由基、抗突变
A12	非洲防己碱	3621-36-1	抗菌、抗炎、抗组胺、强心、抗癌
A13	甲基黄连碱	38763-29-0	抗微生物、抗原虫
A14	14-甲酰基二氢吴茱萸次碱	68353-23-1	-
A15	黄连素	2086-83-1	对溶血性链球菌,金黄色葡萄球菌,淋球菌和弗氏、志贺氏痢疾杆菌等均有抗菌作用;增强白血球吞噬作用,抑制结核杆菌、鼠疫杆菌
A16	表小檗碱	6873-09-2	抗病毒、抗炎
A17	黄藤素	3486-67-7	抑制金黄色葡萄球菌、幽门螺旋杆菌、抗酸性分枝杆菌,兴奋子宫,提高白细胞吞噬细菌的能力
A18	7β-羟基吴茱萸次碱	163815-35-8	-
A19	1-甲基-2-[(Z)-6-十一烷基]-4(1H)-喹诺酮	120693-49-4	-
A20	吴茱萸碱	518-17-2	抗肿瘤、抗老年痴呆、降低细胞内环磷酸腺苷(cAMP)相关途径的活性、抑制3β-羟基类固醇脱氢酶(3β-HSD)等类固醇激素生成相关酵素的活性、降低并影响信号转导与RNA活化蛋白(StAR)表达、减肥、降血糖、抗炎镇痛、双向调节心血管系统、降压、舒张血管
A21	吴茱萸次碱	84-26-4	保护心脏、降压、扩张血管、拮抗乙酰胆碱或组胺对离体回肠的收缩作用、降低大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗死面积、促进脑功能恢复、增加缺血区钙钙素基因相关肽(CGRP)浓度、抗血小板、抗炎、抗伤害感受、抗溃疡
A22	1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹啉酮	68353-24-2	-
A23	1-甲基-2-十一烷基-4(1H)-喹诺酮	59443-02-6	-
P1	新绿原酸	906-33-2	止血、缩短凝血和止血时间
P2	隐绿原酸	905-99-7	抗血小板聚集、抗菌、消炎
P3	绿原酸	327-97-9	抗氧化、抗人类免疫缺陷病毒、抗肿瘤、抗菌、提高中枢兴奋、利胆、抗致畸、抗过敏、调节细胞色素P450连接酶的活性、利胆、增进大鼠胆汁分泌、抑制透明质酸酶及葡萄糖-6-磷酸酶
L1	柠檬苦素	1180-71-8	镇痛抗炎、抗焦虑、镇静、防虫杀虫、抗氧化、抗菌、抑制人类免疫缺陷病毒、降低胆固醇、利尿、改善心脑血管循环及睡眠、抗病毒、调节细胞色素
S1	木香烃内酯	553-21-9	对胃肠道有兴奋或抑制双作用
S2	去氢木香内酯	74299-48-2	促进胃排空和肠推进,双向调节血压,扩张支气管平滑肌,与罂粟碱作用相似,抑制链球菌、金黄色与白色葡萄球菌的生长,对大肠埃希氏菌、白喉杆菌作用微弱

注:“-”表示非定性“制剂质量标志物”。

3 讨论

3.1 指纹图谱研究 根据文献[5]关于中药质量标

志物的设计,指纹图谱是筛选的第一步,因此本研究将其作为黄连汤“制剂质量标志物”筛选的第1个

步骤。同时,指纹图谱用以评价黄连汤冻干粉制备工艺环节质量,可为制备工艺稳定的样品提供保障。制备的10批黄连汤冻干粉与对照指纹图谱的相似度均>0.9,说明黄连汤制备工艺重复性良好。

3.2 化学成分分析 采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS对黄连汤中的化学成分进行了指认,初步确定了黄连汤定性“制剂质量标志物”。2015年版《中国药典》^[48]中黄连含量测定项下规定的成分小檗碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀在黄连汤均被鉴定出来;吴茱萸含量测定项下规定的成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素也都被鉴定出来;木香含量测定项下木香烯内酯、去氢木香烯内酯也被鉴定出来。2015年版《中国药典》中规定的含量测定成分在确定黄连汤冻干粉“制剂质量标志物”的过程中具有重要参考意义。全成分分析的时候出现了脂溶性较强的吴茱萸碱、吴茱萸次碱、木香烯内酯等成分,而黄连汤的制备工艺为水提醇沉后再冷冻干燥;间接说明在黄连汤复方体系中脂溶性成分也能被提取出来,进入汤剂发挥药效作用,进而说明临床上汤剂一般都用水煎是科学、合理的。其原因可能是复方中有些成分具有助溶作用、有的成分具有增溶作用、脂溶性成分在共煎的过程中发生水合作用后水溶性增强,具体作用机制值得进一步研究探讨。

3.3 定性“制剂质量标志物” 定性“制剂质量标志物”可初步反映制剂成分的特征性及制剂的功效,是最大范围的与制剂功效相关的化合物组合;定量“制剂质量标志物”、活性“制剂质量标志物”及最终确定的“制剂质量标志物”均是在此基础上筛选、验证后确定。本研究确定了由21种化合物组成的黄连汤冻干粉定性“制剂质量标志物”组合,将其与由GC-MS鉴定的挥发性定性“制剂质量标志物”一起共同组成黄连汤定性“制剂质量标志物”。此外,黄连汤确定的定性“制剂质量标志物”还可用于其指纹图谱中色谱峰的指认。后续将对黄连汤定性“制剂质量标志物”的可定量成分进行考察,确定黄连汤定量“制剂质量标志物”;通过网络药理学分析各成分对镇痛、抗炎、抗溃疡及抗菌的贡献,并通过药理活性实验进行验证,确定黄连汤活性“制剂质量标志物”;最后通过量/效关系比较,确定黄连汤“制剂质量标志物”,为黄连汤工艺研究中指标成分选择、质量标准中定性和定量指标的确定提供依据。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国中央人民政府. 中华人民共和国中

医药法[EB/OL]. http://www.gov.cn/xinwen/2016-12/26/content_5152773.htm, 2016-12-25/2020-05-18.

[2] 中华人民共和国中央人民政府. 中医药发展战略规划纲要(2016—2030年)[EB/OL]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2016-02/26/content_5046678.htm, 2016-02-22/2020-05-18.

[3] LIU C X, CHENG Y Y, GUO D A, et al. A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. Chin Herb Med, 2017, 9(1): 3-13.

[4] YANG W Z, ZHANG Y B, WU W Y, et al. Approaches to establish Q-markers for the quality standards of traditional Chinese medicines [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(4): 439-446.

[5] 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): 1443-1456.

[6] 王璆. 是斋百一选方[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1991: 29.

[7] 李挺. 医学入门[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

[8] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂: 第五册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 744.

[9] 杜茂波. 黄连巴布膏的药学研究与评价[D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.

[10] 王彦礼, 王岚, 杜茂波, 等. 黄连巴布剂的镇痛抗炎作用、刺激性及过敏性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 143-146.

[11] 杨伟鹏, 王怡薇, 王彦礼, 等. 吴茱萸汁炮制对黄连抗炎药效和苦寒药性的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(8): 42-44.

[12] 王岚, 刘淑芝, 王彦礼, 等. 黄连巴布膏抗消化性溃疡的药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 194-197.

[13] 魏长志. 治疗痢疾(或腹泻)6种中成药体外抗菌对比实验[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(11): 171-172.

[14] 谢培山. 中药质量控制模式的发展趋势[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 188-191.

[15] 李强, 李超. 中药指纹图谱研究综述[J]. 药学研究, 2010, 29(3): 158-161.

[16] 安春志, 刘莉, 邢学锋, 等. 中药指纹图谱的现状和研究进展[J]. 第一军医大学分校学报, 2005, 28(2): 197-200, 204.

[17] 冯五文, 王晶, 张世洋, 等. 注射用双黄连(冻干)的UPLC指纹图谱研究及质量评价[J]. 中药与临床, 2018, 9(6): 12, 35-37.

[18] 王昭慧, 刘虹霞, 闫瑞, 等. 骨痹敌注射剂及其药味黄

- 芪的HPLC指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(8):632-636.
- [19] 李炳东, 田金苗, 郭汉文, 等. 鸦胆子油乳注射剂HPLC-ELSD指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22):84-87.
- [20] 郑林, 庞秀清, 黄勇, 等. 参芎葡萄糖注射液的UFLC指纹图谱研究[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(6):611-614.
- [21] 周梦楠, 王亚静, 张怡, 等. 基于HPLC指纹图谱和主成分分析考察醒脑静注射液的配伍稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19):80-86.
- [22] 罗琨映, 郭江彦. 止嗽定喘口服液HPLC指纹图谱研究[J]. 当代化工研究, 2017(12):135-136.
- [23] 刘静, 戴忠, 聂黎行, 等. 牛黄镇惊丸HPLC-DAD-ELSD指纹图谱研究[J]. 分析试验室, 2017, 36(12):1371-1375.
- [24] 连云岚, 郝云芳, 杜娟, 等. 清热解毒片特征图谱的研究[J]. 山西职工医学院学报, 2017, 27(5):1-4.
- [25] 乜红磊. 指纹图谱结合多成分定量用于参苓口液的质量评价研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [26] 刘军, 郑晓芬, 周丽娟, 等. 基于HPLC的丁桂儿脐贴指纹图谱分析方法的建立[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(7):985-991.
- [27] 陈天玲, 肖雪, 马晋芳. 不同产地荷叶药材HPLC指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(22):28-31.
- [28] 田景民, 鞠爱华, 庄志鹤, 等. 山沉香超微粉与普通粉HPLC指纹图谱的比较研究[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(6):625-628.
- [29] 曲悦, 王莎莎, 胡俊杰, 等. 木鳖子制霜炮制前后HPLC指纹图谱比较研究[J]. 中国药师, 2020, 23(1):44-48.
- [30] 林秀敏, 张振凌, 王胜超, 等. 白芍饮片的HPLC指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J]. 中国药房, 2019, 30(24):3375-3382.
- [31] 史晓飒, 张洪梅, 刘自尧, 等. 不同产地蝉花药材HPLC指纹图谱研究[J]. 药物生物技术, 2017, 24(6):489-492.
- [32] 张博, 孙秀丽, 郭云龙, 等. 液质联用技术分析不同产地不同年限人参的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8):206-212.
- [33] 陈俊, 陈聪, 彭小芝, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS/MS的葛根黄芩黄连汤主要成分分析及鉴定[J]. 中药材, 2019, 42(9):2074-2078.
- [34] 李泽运, 曹星, 袁永亮, 等. 排毒清脂片的UPLC-Q-TOF-MS成分分析及网络药理学探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7):129-134.
- [35] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇[J]. 药学报, 2012, 47(6):696-703.
- [36] 刘艾林, 杜冠华. 网络药理学: 药物发现的新思想[J]. 药学报, 2010, 45(12):1472-1477.
- [37] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6):1-8.
- [38] 许海玉, 黄璐琦, 卢鹏, 等. 基于体内ADME过程和网络药理学的中药现代研究思路[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2):142-145.
- [39] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18):3633-3638.
- [40] 曹泽彧, 丁玥, 苏真真, 等. 分子烙印-活性筛选结合评价桂枝茯苓胶囊主要成分活性贡献度研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12):2420-2427.
- [41] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D976-D982.
- [42] YANG Y, ZHAO H W, WANG H, et al. Qualitative and quantitative analysis of four different polarity fractions from Huang-Lian-Jie-Du-Decoction by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and their related neuroprotective effects[J]. J Chin pharm Sci, 2013, 22(4):334-341.
- [43] 张潇, 苗祥贞, 袁炎炎, 等. 基于LTQ-Orbitrap高分辨质谱分析黄黄连中的成分[J]. 中药材, 2018, 41(5):1114-1118.
- [44] LIU Q X, QIU S Y, 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, 2011, 136(20):4357-4365.
- [45] 程宇欣, 陈两绵, 王智民, 等. UHPLC-QTOF-MS法分析鉴定吴茱萸水提物在大鼠血浆、尿液和粪便中的原形成分及其代谢产物[J]. 药学报, 2017, 52(7):145-152.
- [46] LING Y, HU P, ZHANG L F, et al. Identification and structural characterization of acylgluconic acids, flavonol glycosides, limonoids and alkaloids from the fruits of Evodia Rutaecarpa by high performance liquid chromatography coupled to electrospray [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54(9):1593-1604.
- [47] 潘玄玄, 宋粉云, 李华. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术的沉香化气丸化学成分分析[J]. 中草药, 2018, 49(13):2984-2992.
- [48] 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: 62-63, 171-172, 303-305.

[责任编辑 刘德文]