

基于超高效液相色谱分析黄连、吴茱萸配伍药对的有效成分

虞文妹 周宝玉

(南京中医药大学附属常州市武进中医医院中药房, 南京, 213161)

摘要 目的:评价通过超高效液相色谱(UPLC)分析黄连、吴茱萸配伍药对的有效成分。方法:选取4对不同产地的黄连、吴茱萸配伍药对进行研究,采用 ACQUITY UPLC BEH C18 作为本研究的色谱柱(1.7 μm , 100 mm $\times$ 2.1 mm),柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;加入 2 μL 10 $^{\circ}\text{C}$ 的样品后,以乙腈(流动相 A)-纯水加 0.05% 甲酸(流动相 B),流速为 0.4 mL/min 进行梯度洗脱,建立 UPLC-质谱(MS)指纹图谱分析方法。结果:在黄连、吴茱萸配伍药对的对照指纹图谱和样品指纹图谱的比较中,相对保留时间标定 16 个较有特征的共有峰分别与单味黄连药物及单味吴茱萸的指纹图谱特征峰比较,发现 9、15 和 16 号共有峰是黄连、吴茱萸都存在的特征峰,而 1、2、13、14 号共有峰仅吴茱萸方有的特征峰,余下共有峰为黄连药物的特征峰。9、15 和 16 号黄连、吴茱萸配伍药对共有的特征峰,结合质谱分析和化合物质谱裂解规律,推测出木兰花碱、格陵兰黄连碱和 1-甲基-2 壬基-4(1H)-奎若酮等 3 中化合物。结论:采用 UPLC-MS 技术建立黄连、吴茱萸配伍药对有效成分,为黄连和吴茱萸药材的有效成分和质量评估提供参考。

关键词 黄连;吴茱萸;配伍;药对;超高效液相;质谱;指纹图谱;有效成分

Effective Components of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae Compatibility Based on Ultra-high Performance Liquid Chromatography

Yu Wenmei, Zhou Baoyu

(TCM Pharmacy, Wujin Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 213161, China)

Abstract Objective: To analyze the effective components of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae compatibility by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). **Methods:** A total of 4 pairs of different origin of the compatibility of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae. ACQUITY UPLC BEH C18 was used as a column of this study (1.7 μm , 100 mm $\times$ 2.1 mm). The column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. 2 μL 10 $^{\circ}\text{C}$ after samples with acetonitrile (mobile phase A)-water with 0.05 % formic acid (mobile phase B) was added. The flow rate was 0.4 mL/min by gradient elution. UPLC-mass spectrometry (MS) fingerprint analysis method was established. **Results:** 1) In the combination of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae compatibility, control fingerprint and sample fingerprint were compared according to the relative retention time calibration of 16 more characteristic common peaks. The 16 peaks were respectively compared with the fingerprint of Rhizoma Coptidis characteristic peaks and Fructus Evodiae fingerprint characteristic peaks. Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae shared 9, 15, and 16 characteristic peaks. The 1, 2, 13, 14 common peaks were presented in Fructus Evodiae characteristic peaks. The rest peaks was presented in Rhizoma Coptidis. 2) Effective components of the combination of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae were qualitatively analyzed using UPLC and mass spectrometry analysis. Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae shared 9, 15 and 16 common characteristic peaks were showed in Table 2. Magnoflorine, Greenland, coptisine and 1-methyl nonyl-2-4 (1H)-Quirrell ketone compounds were inferred with mass spectrometry and compounds cracking law. **Conclusion:** The effective components of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae compatibility was established by UPLC-MS technology, providing reference for effective components and quality evaluation of Rhizoma Coptidis and Fructus Evodiae.

Key Words Rhizoma Coptidis; Fructus Evodiae; Compatibility; Drug pair; Ultra-high performance liquid chromatography; Mass spectrometry; Fingerprint; Effective component

中图分类号: R282 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.11.050

药对又名对药,是医师在长期的临床疾病诊疗过程归纳和总结出来的宝贵用药经验,是临床用药

复方的最小配伍单位^[1]。药对配伍一直是传统中药学的主要组成部分,历代医家对其十分重视,并一直

基金项目: 国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培训项目(中国中医药人函(2015)168)

作者简介: 虞文妹(1972.01—),女,本科,主任中药师,研究方向: 中药的传统技术研究, E-mail: 892514965@qq.com

通信作者: 周宝玉(1968.10—),男,本科,主任中药师,研究方向: 中药的鉴定, E-mail: 495204194@qq.com

在进行研究和改进;通过不同形式的配伍使用,药对或可通过相须、相使的作用以增强疗效、并对主药提供相辅作用而增强疗效,使方中诸药直达病所;或可通过相畏相杀而对组方中的药物进行相互制约而降低药物的不良反应^[2-4]。黄连和吴茱萸的配伍使用由来已久,历朝历代均多有记载,《丹溪心法》中将其配伍 6:1 使用,用以治疗肝火犯胃,这体现寒热配伍使用的经典药对组合^[5]。黄连是多年生草本植物,为毛茛科黄连属,最早记载见于《神农本草经》,因其根茎呈连珠状而色黄,故而谓之,具有清热燥湿,泻火解毒之功效。吴茱萸为芸香科吴茱萸属、具有散热止痛、降逆止呕之功效。通过相似度评价对数据进行比较分析,分析指纹图谱中的有效信息,建立相对应的指纹图谱,以期为黄连和吴茱萸药的物质基础、配伍机制和临床应用提供相应的科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 超高效液相色谱(UPLC)仪(型号:ACQUITY,美国 Waters 公司),质谱检测器(型号:Xevo TQ,美国 Waters 公司)。

1.2 试剂 研究中购于中国食品药品检定研究院的对照品有盐酸小檗碱(110713-201212),盐酸巴马汀(110732-201309),盐酸药根碱(110733-201108),吴茱萸碱(110802-201409),吴茱萸次碱(110801-201207),吴茱萸内酯(110800-201205);购于上海纯优生物科技有限责任公司对照品有黄连碱(3486-66-6),表小檗碱(6873-09-2)。乙腈色谱纯、甲酸色谱纯、纯水均购于上海睿鹰生物科技有限公司。

1.3 分析样品 不同产地的黄连-吴茱萸配伍药对,药对配伍比例均按照《丹溪心法》中 6:1 的比较,研究共选择 4 种不同来源,样品 1(S1)重庆石柱黄连和江西樟树吴茱萸,样品 2(S2)四川峨眉山黄连和贵州印江吴茱萸,样品 3(S3)湖北利川黄连和浙江磐安吴茱萸,样品 4(S4)贵州羊昌黄连和贵州金沙吴茱萸;各药对样品均研磨成粉代用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 选用 ACQUITY UPLC BEH C18 作为本次研究的色谱柱(1.7 μm,100 mm×2.1 mm),柱温为 40℃;加入 2 μL 10℃的样品后,以乙腈(流动相 A)-纯水加 0.05% 甲酸(流动相 B),流速为 0.4 mL/min 进行梯度洗脱,具体梯度洗脱程序。见表 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取适量 1.2 中所有的对照品,用 100% 甲醇溶解并制成混合对照品溶液。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.00	10	90
10.00	15	85
20.00	20	80
30.00	27	73
38.00	35	65
45.00	65	35
50.00	65	35
60.00	80	20
65.00	90	10

2.3 供试品溶液的制备 以 3 号筛筛取并精密称量 1.3 样品粉末 0.2 g 于锥形瓶中,用 50 mL 100% 甲醇进行溶解,为加速溶解进程,可先浸泡 1 h 后再采用超声法 30 min,超声期间摇匀溶液,待冷却后用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,制成供试品溶液。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液各 5 μL,采用薄层层析方法(TLC)对黄连、吴茱萸配伍药对进行专属性试验,分别点与同一片硅胶 G 薄层色谱板,经过展开后,晾干硅胶 G 薄层色谱板,喷上含有 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液,加热 100℃,5 min 后将色谱板放置于 365 nm 的紫外光灯下观察,专属性试验结果显示黄连、吴茱萸配伍药对的专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 20 μL,进行 UPLC 反应并以混合对照品进样量(μg)为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果表明,黄连回归方程为 $Y = 3310.8X + 83.44$,相关系数为 0.9995,线性范围为 0.086 ~ 2.775;吴茱萸回归方程为 $Y = 13736X + 2.18$,相关系数为 0.9997,线性范围为 0.0041 ~ 0.1326。

2.6 中间精密度试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果显示平均 RSD(相对标注偏差)是 1.8%,仪器精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,配置后分别放置 0、2、4、8、12 h 后进样检测,结果显示平均 RSD 是 1.8%,试验条件稳定性良好。

2.8 重复性试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,在相同 UPLC 仪器和色谱条件上检测 5 次,结果显示平均 RSD 为 1.9%,重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取 6 份已知含量的同一批号样品各约 0.5 g,分别精密加入 20 mL 混合对照品溶液,进行回收率试验测定,计算结果显示平均回收率为 99.6%,RSD 为 1.4%。

2.10 样品测定结果

2.10.1 指纹图谱 在黄连、吴茱萸配伍药对的对照指纹图谱和样品指纹图谱的比较中,研究根据相对保留时间标定 16 个较有特征的共有峰;这 16 个共有峰分别与单味黄连药物及单味吴茱萸的指纹图谱特征峰比较,发现 9、15 和 16 号共有峰是黄连、吴茱萸都存在的特征峰,而 1、2、13、14 号共有峰仅吴茱萸方有的特征峰,余下共有峰为黄连药物的特征峰。见图 1 和图 2。

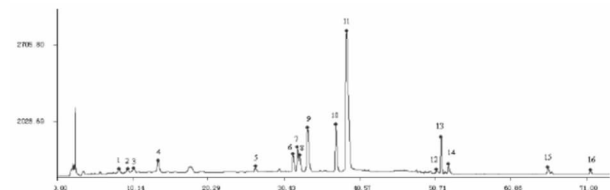


图 1 黄连、吴茱萸配伍药对的对照指纹图谱

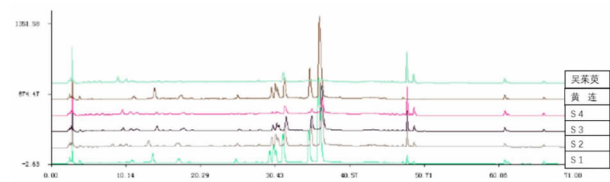


图 2 黄连、吴茱萸配伍药对的样品指纹图谱

2.10.2 黄连、吴茱萸配伍药对有效成分鉴定 研究采用 UPLC 和质谱技术联合分析黄连、吴茱萸配伍药对的有效成分进行定性分析,结果显示如表 2,其中 9、15 和 16 号黄连、吴茱萸配伍药对共有的特征峰,在结合质谱分析和化合物质裂解规律,推测出木兰花碱、格陵兰黄连碱和 1-甲基-2 壬基-4 (1H)-奎若酮等 3 中化合物。

表 2 黄连、吴茱萸配伍药质谱数据及有效成分鉴定

编号	保留时间 (min)	成分鉴定	电喷雾质谱 [M + H] + (m/z)
1	9.260	吴茱萸内酯	471.02
2	10.345	异鼠李素	401.68
3	10.996	黄连碱	320.04
4	13.219	表小檗碱	336.12
5	25.001	盐酸药根碱	338.10
6	29.674	盐酸小檗碱	336.08
7	30.213	盐酸巴马汀	352.13
8	30.525	小檗碱	344.37
9	31.446	木兰花碱	342.20
10	35.022	小檗红碱	339.15
11	36.301	甲基黄连碱	326.09
12	47.800	掌叶防己碱	346.11
13	48.383	吴茱萸碱	304.16
14	49.305	吴茱萸次碱	288.12
15	61.727	格陵兰黄连碱	322.08
16	62.164	1-甲基-2 壬基-4 (1H)-奎若酮	286.11

3 讨论

3.1 提取的优化分析 分别通过以下条件的比较分析,包括:1)提取溶剂^[6-9]:提取溶剂需要根据中药各成分在溶剂中的溶解性而选择,溶解剂必须最大限度溶剂研究所需的有效成分而对不需要的成分仅有最小溶解度,溶解剂选择中一般以强极性溶解剂水为首要考虑,其次根据所提取成分的亲水性和亲脂性而选择不同的溶剂,在本研究中尝试以亲水性大于亲脂性的甲醇和乙醇,不同比例甲醇(25%、50%、75%、100%)、乙醇、水进行前期研究,寻找最佳提取浓度和比例,结果显示 100% 甲醇的提取率和提取纯度最高;2)提取方法主要有冷提和热提 2 组方法^[10-13],其中超声、微波、加热回流、煎煮等属于热提法,最终发现超声法提取过程中无需中途过滤,且使用的溶剂量最少,最大限度节约研究时间和研究成本;因此在超高效液相色谱(UPLC)检测研究中,对色谱峰数、峰形、峰面积、分离度、基线指标进行分析后,最后将甲醇作为最后的提取溶剂,并用超声波加速整个提取进程。

3.2 色谱和质谱的指纹图谱条件优化分析 梯度洗脱的不但调整流动相的浓度配比条件优化,能够最大限度的缩短分析周期,并改善峰型减少其拖尾现象,提高药物成分的分离程度及增加其灵敏度^[14-16]。本实验尝试了水-乙腈、不同浓度甲酸水如 0.05% 甲酸水、0.10% 甲酸水、0.20% 甲酸水、0.50% 甲酸水、1.00% 甲酸水与乙腈的流动相浓度配比,水-甲醇、0.10% 甲酸水分别与 0.10% 甲酸乙腈、甲醇、0.10% 甲酸甲醇等流动相配比,结果以 0.05% 甲酸水-乙腈这一流动相系统为最优的色谱和质谱的指纹图谱分析条件,得到较好且稳定的色谱峰峰形;而在梯度洗脱程序中必须有稳定的流速来保证其进程的有序进行,研究中采用恒流泵来保证流速的稳定性,本研究最终选择 0.40 mL/min 获得色谱峰较好峰形且具有较好分离度。

3.3 超高效液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)定性分析 本研究中采用 UPLC 较普通的高效液相色谱法(HPLC),具有更高的分离度,更高的速度以及更强的灵敏度^[17],同时本研究结合液相色谱-质谱联用仪,利用质谱对化合物鉴定的专门技术建立黄连、吴茱萸配伍药对指纹图谱,丰富黄连、吴茱萸配伍药对指纹图谱色谱峰的信息量、出峰数目、分离度,更加全面的反映了黄连、吴茱萸配伍药对有效化学成分^[18-20]。黄连-吴茱萸药对配伍历代医家向来对其十分重视,历代医家及现代医学均不断的在研

究黄连-吴茱萸药对是通过相须、相使的作用以增强疗效;亦或是通过相畏相杀而起到相互制约而降低药物的不良反应。本质谱研究中质荷比选择了 100 ~ 1000 和 200 ~ 800 2 个条件进行优化,结果显示 100 ~ 1000 范围内的质荷比能获得相对较多色谱峰数,以 S1 黄连、吴茱萸配伍药对为样品采用 UPLC-MS 技术进行检测,鉴定 16 个特征色谱峰中主要成分和化合物,通过分析 UPLC-MS 与 MS 系统分析,同时结合色谱峰参考文献^[21-25],结果显示除了 9、15 和 16 号特征色谱峰外,来源于黄连的成分和化合物有分别归属其来源,其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄连碱和表小檗碱;来源于吴茱萸的成分和化合物有吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱;结合化合物质谱裂解规律,推测出 3 种化合物,分别为木兰花碱、格陵兰黄连碱和 1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮。

参考文献

- [1] 李伟霞,唐于平,史旭芹,等. 药对研究(Ⅳ)—药对的配伍效应[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4203-4207.
- [2] 李伟霞,唐于平,刘立,等. 药对研究(Ⅲ)—药对的功效物质基础[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4196-4202.
- [3] 尚尔鑫,李文林,叶亮,等. 药对研究(Ⅱ)—药对的数据挖掘[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4191-4195.
- [4] 唐于平,束晓云,李伟霞,等. 药对研究(Ⅰ)—药对的形成与发展[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4185-4190.
- [5] 王林艳,唐于平,刘欣,等. 药对研究(Ⅵ)—黄连-吴茱萸药对[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4214-4219.
- [6] 崔红梅,杨军,黎万寿. 不同溶剂和提取方式对黄连-甘草药对中有有效成分提取率的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,7(12):43-46.
- [7] 席国萍,宋国斌. 不同方法及溶剂对黄连小檗碱的提取效果比较[J]. 化学工程师,2011,3(7):59-60.
- [8] 赵恒强,陈军辉,郭秀春,等. 加速溶剂萃取法快速提取黄连中的生物碱[J]. 分析试验室,2008,27(11):5-9.

- [9] 邢美莲,贾鹏燕,冯冬艳,等. 吴茱萸不同溶剂提取物抗氧化和抑菌性研究[J]. 作物杂志,2013,8(6):76-78.
- [10] 刘珊珊,周兴清,梁彩霞,等. 吴茱萸水提取物化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,4(8):58-64.
- [11] 杨文婷,黄士栩,徐文广,等. 超声波辅助提取吴茱萸生物碱的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(8):54-57.
- [12] 涂瑶生,江志强,孙冬梅,等. 黄连生物碱提取及纯化工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(2):208-212.
- [13] 林滔,黄丽萍,万东华. 超声法提取黄连中紫外吸收剂的试验研究[J]. 中国药师,2008,11(11):1335-1336.
- [14] 朱彭龄. 梯度洗脱[J]. 分析测试技术与仪器,2010,16(1):56-59.
- [15] 袁清照,张水寒,李顺祥,等. 吴茱萸道地药材的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药,2010,41(9):1534-1538.
- [16] 霍志鹏,王玉,周水平,等. 黄连生物碱成分的 HPLC-DAD-MS 分析[J]. 天津药学,2016,28(2):8-12.
- [17] 高青,刘颖,宋彬彬,等. 超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证[J]. 药物分析杂志,2016,9(7):1279-1286.
- [18] 潘浪胜,徐晓梅,吕秀阳,等. 黄连与吴茱萸分煎后配伍时主要组分含量变化规律研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(4):258-261.
- [19] 彭明兴,吴永江,程翼宇. 黄连与吴茱萸配伍时黄连中主要化学组分溶出率变化规律研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):629-632.
- [20] 周晟,陈澈,孟庆刚. 黄连-吴茱萸药对配伍结构及应用规律[J]. 中医杂志,2017,58(19):1646-1649.
- [21] 马岩,张万军,卫军营,等. 反相高效液相色谱双梯度洗脱分离肽混合物及质谱分析[J]. 色谱,2011,29(3):205-211.
- [22] 陈军辉,赵恒强,李文龙,等. 高效毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱联用分析黄连中的生物碱[J]. 化学学报,2007,65(23):2743-2749.
- [23] 王道武,刘志强,郭明全,等. 黄连中小檗碱及其同分异构体的电喷雾质谱研究[J]. 分析化学,2003,31(9):1101-1104.
- [24] 陈焕文,郑健,王伟萍,等. 电喷雾解吸电离质谱快速测定吴茱萸中生物碱[J]. 分析化学,2009,37(2):237-241.
- [25] 廖琼峰,谢智勇,张蕾,等. 液相色谱-电喷雾质谱联用研究吴茱萸化学成分溶出规律[J]. 中成药,2009,31(2):259-263.

(2018-03-22 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 2867 页)

- [14] 孙丽蕴,邓丙戌,陈凯,等. 靛玉红紫草素对角质形成细胞株凋亡的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志,2004,18(6):336-338.
- [15] 王燕,赵京霞,林燕,等. 紫草素对人外周血单核细胞来源的树突状细胞表型及功能的影响[J]. 免疫学杂志,2014,30(8):667-670,676.
- [16] Wang Y, Zhao J, Zhang L, et al. Suppressive effect of β , β -dimethylacryloyl alkannin on activated dendritic cells in an imiquimod-in-

duced psoriasis mouse model[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6):6665-6673.

- [17] 李迎秋,王旭东,龚宇,等. SUMO 化修饰调控 T 细胞免疫突触形成和 T 细胞活化[J]. 中国科学基金,2016(4):315-319.
- [18] 赵海慧,赵阴环. T 细胞异常活化在系统性红斑狼疮中的分子免疫机制[J]. 中国临床药理学与治疗学,2012,17(4):452-457.

(2018-05-24 收稿 责任编辑:杨觉雄)