

中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究

张铁军¹, 许浚¹, 韩彦琪¹, 张洪兵², 龚苏晓¹, 刘昌孝^{3*}

1. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津药物研究院 新药评价中心, 天津 300193

摘要: 基于提出的质量标志物 (Q-marker) 的概念、确定标准及研究模式, 以延胡索为范例进行示范性研究, 通过对延胡索化学物质组辨识明确化学物质基础; 通过延胡索化学成分生源途径及成分特异性分析明确其化学成分的来源及特异性; 通过药效、药性及药动学研究及其物质基础的相关性分析, 明确其主要药效物质基础; 并综合研究结果, 确定质量标志物。最后以延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、D-四氢药根碱及原阿片碱 7 个生物碱为质量标志物, 建立了延胡索多指标成分定量测定及指纹图谱控制方法。

关键词: 延胡索; 质量标志物; 生源途径; 特异性; 药效; 质量控制

中图分类号: R286.02; R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1458-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.002

Quality markers research on Chinese materia medica: Quality evaluation and quality standards of *Corydalis Rhizoma*

ZHANG Tie-jun¹, XU Jun¹, HAN Yan-qi¹, ZHANG Hong-bing², GONG Su-xiao¹, LIU Chang-xiao³

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Safety and Evaluation Center of the New Drug, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: *Corydalis Rhizoma* was taken as an example for demonstration research based on the concept of quality markers (Q-markers), confirmed standards and research modes were proposed by the author. The chemical constituents of *Corydalis Rhizoma* were identified using high performance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry (HPLC/ESI-Q-TOF MS). The source and specificity of chemical constituents were confirmed by analyzing biosynthetic pathway and component specificity. The major effective components were clarified through efficacy, drug property, pharmacokinetic studies, and correlation analysis of chemical constituents. The Q-markers were determined by integrating all the results of the studies. At last, seven alkaloidal compounds including tetrahydropalmatine, corydaline, coptisine, palmatine, dehydrocorydaline, tetrahydrojatrorrhizine, and protopine have been selected as Q-markers and quality control methods of multi-component assaying and fingerprint have been established.

Keywords: *Corydalis Rhizoma*; quality markers; biosynthetic pathway; specificity; drug effect; quality control

中药质量是对中药有效性和安全性的反映和表征, 是中医临床用药和中成药有效性控制的重要依据。近年来, 由于中药材品质、临床用药合理性等因素, 使国际和国内业界对中医药的有效性和科学性提出诸多质疑, “古方虽效, 今用无功”现象频繁出现, 这一现象已严重影响了中医药的声誉, 也一定程度上影响了国人对中医药的“自信心”。我国中医药学者对中药质量控制技术方法进行了大量的研

究和探索, 从单指标成分定量测定到多指标成分定量测定结合指纹图谱等, 这些研究成果无疑对中药质量评价和质量控制水平的提高起到了积极的促进作用, 但已有的研究思路和方法是否聚焦和体现了中药自身的传统药物属性、临床用药方式和作用特点? 质控指标是否能反映中药质量的完整性或核心内涵? 如何对中药质量进行有效的把控? 中药界一直关注其质量研究的科学性和实用性。

收稿日期: 2016-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81430096)

作者简介: 张铁军, 研究员, 主要从事中药新药研发及中药大品种二次开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

*通信作者 刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liuchangxiao@163.com

延胡索为罂粟科 (Papaveraceae) 紫堇属 *Corydalis* Vent. 植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 夏初茎叶枯萎时采挖, 除去须根, 洗净, 置沸水中煮至恰无白心时, 取出, 晒干。延胡索别称元胡、玄胡、玄胡索等, 最早记载于《神农本草经》, 列为中品, 味辛、苦, 性温, 归肝、脾经, 具有活血、行气、止痛等功效, 用于治疗胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后瘀阻、跌扑肿痛等症。《中国药典》2015年版一部中, 延胡索药材质量标准包括性状鉴定、显微鉴别、薄层色谱鉴别以及延胡索乙素的定量测定, 现行质量标准存在着质控指标单一、与药效关联性不强的问题, 需要建立与安全性和有效性密切相关的质量控制方法和质量标准。为此, 笔者根据质量标志物 (Q-marker) 新概念^[1], 在实验研究的基础上, 提出中药延胡索质量标志物的范例性研究结果, 以供参考。

1 中药质量标志物确定原则及对质量控制的意义

中药质量标志物是存在于中药材和中药产品 (饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂等) 中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质, 作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制。

1.1 中药质量标志物的确定原则

中药质量标志物的确定原则: (1) 中药质量标志物是存在于中药材、中药饮片、中药提取物、单方制剂或复方制剂中、与功效有关的化学物质, 经研究分析后确定这类物质具有生物学特异性。(2) 在质量标志物研究中, 必须使用标准方法制备样品 (符合中医临床应用标准汤剂或标准工艺过程制备单方或复方中药制剂的标准提取物, 或全药材入药的标准提取物) 来确定用于定性和定量的质量标志物。(3) 为保证质量标志物具有溯源性应在药材或饮片或提取物的质量标志物基础上确定制剂的质量标志物。(4) 为体现中药制剂在中医理论指导下的组方配伍的原理, 制剂质量标志物的确定应遵循组方配伍, 以君药为主, 臣、佐、使药兼顾的原则。

1.2 中药质量标志物的提出及其对中药标准化建设的意义

1.2.1 中药质量标志物的提出, 密切中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分的关联度 长期以来, 中药质量控制手段、质量评价指标及质量标准与中药的有效性关联性不强, 缺少能反映中药有效性的核心质量概念的统领, 在药材、饮片、中成药质量

研究中存在碎片化的倾向。中药质量标志物概念的提出, 针对中药生物属性、制造过程及配伍理论等自身医药体系的特点, 整合多学科知识, 提出核心质量概念, 以此统领中药质量研究, 进一步密切中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分的关联度。

1.2.2 中药质量标志物的提出, 有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系 中药质量标志物源自中药基原生物体内生物合成, 经历采收加工、炮制及制药工艺过程的物质传递及化学变化, 最终以复方制剂的形式通过药物传输过程发挥临床疗效, 其以物质-功能为核心贯穿中药形成及生产全过程^[2]。并以中药饮片标准汤剂为研究的核心范本进行质量研究, 确定质量标志物, 并向药材和饮片 (及炮制品) 溯源, 向复方制剂和中成药延伸^[3-4]。所建立的思维模式和研究方法着眼于全过程的物质基础的特有、差异、动态变化和质量的传递性、溯源性, 有利于建立中药全程质量控制及质量溯源体系。

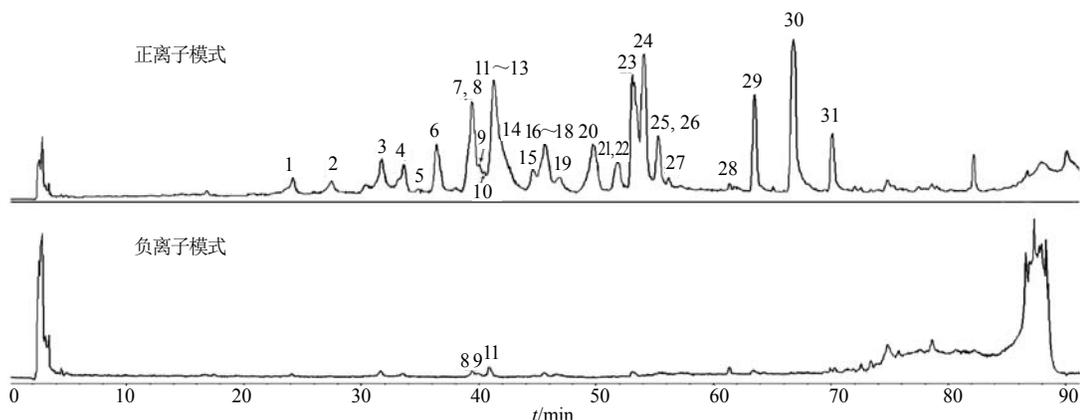
2 延胡索质量标志物的发现与确定

2.1 延胡索化学物质组辨识

本课题组采用 HPLC-Q/TOF-MS (Agilent 1200 高效液相色谱仪, Bruker micro TOF-Q II 质谱仪, 德国 Bruker 公司) 方法对醋延胡索药材标准提取物所含化学成分进行化学物质组表征和指纹成分辨识。从醋延胡索指纹图谱 (图 1) 中表征分析出 31 个化学成分, 鉴定出其中 28 个化合物, 分别为金黄紫堇碱 (2)、紫堇球碱 (3)、异紫堇球碱 (4)、*d*-鹅掌楸啡碱 (5)、原阿片碱 (6)、 α -别隐品碱 (7)、四氢药根碱 (8)、药根碱 (9)、隐品碱 (10)、异波尔定 (11)、四氢非洲防己碱 (12)、*D*-海罂粟碱 (13)、黄连碱 (14)、去氢紫堇球碱 (15)、*N*-甲基四氢小檗碱 (16)、taxilamine (17)、13-甲基去氢延胡索胺 (18)、元胡宁 (19)、巴马汀 (20)、小檗碱 (21)、荷包牡丹碱 (22)、去氢延胡索甲素 (23)、延胡索乙素 (24)、元胡菲碱 (26)、*D*-南天竹啡碱 (28)、四氢小檗碱 (29)、延胡索甲素 (30) 和四氢黄连碱 (31), 均为生物碱类化合物 (结构见图 2), 为醋延胡索药材质量标准研究及制定提供了依据。

2.2 延胡索次生代谢产物生源途径及成分特异性分析

次生代谢产物是植物在长期的进化中对环境的适应结果, 其在植物中生成和分布通常有种属、器官组织和生长发育期的特异性。这些在植物体内含量不等的次生代谢物均有自己独特的代谢途径。



2-金黄紫堇碱 3-紫堇球碱 4-异紫堇球碱 5-D-鹅掌楸啡碱 6-原阿片碱 7- α -别隐品碱 8-D-四氢药根碱 9-药根碱 10-隐品碱 11-异波尔定 12-四氢非洲防己碱 13-D-海罂粟碱 14-黄连碱 15-去氢紫堇球碱 16-N-甲基四氢小檗碱 17-taxilamine 18-13-甲基去氢延胡索胺 19-元胡宁 20-巴马汀 21-小檗碱 22-荷包牡丹碱 23-去氢延胡索甲素 24-延胡索乙素 26-元胡菲碱 28-D-南天竹啡碱 29-四氢小檗碱 30-延胡索甲素 31-四氢黄连碱

2-scoulerine 3-corybulbine 4-isocorybulbine 5-D-lirioferine 6-protopine 7- α -allocryptopine 8-D-tetrahydrojatrorrhizine 9-jatrorrhizine 10-cryptopine 11-isoboldine 12-tetrahydrocolumbamine 13-D-glaucine 14-coptisine 15-dehydrocorybulbine 16-N-methylcanadine 17-taxilamine 18-13-methyldehydrocorydalmine 19-yanhunine 20-palmatine 21-berberine 22-bicuculline 23-dehydrocorydaline 24-tetrahydropalmatine 26-coryphenanthrine 28-D-nantenine 29-tetrahydroberberine 30-corydaline 31-tetrahydrocoptisin

图 1 延胡索药材 HPLC-Q/TOF-MS 谱图

Fig. 1 Chromatogram of *Corydalis Rhizoma* by HPLC-Q/TOF-MS

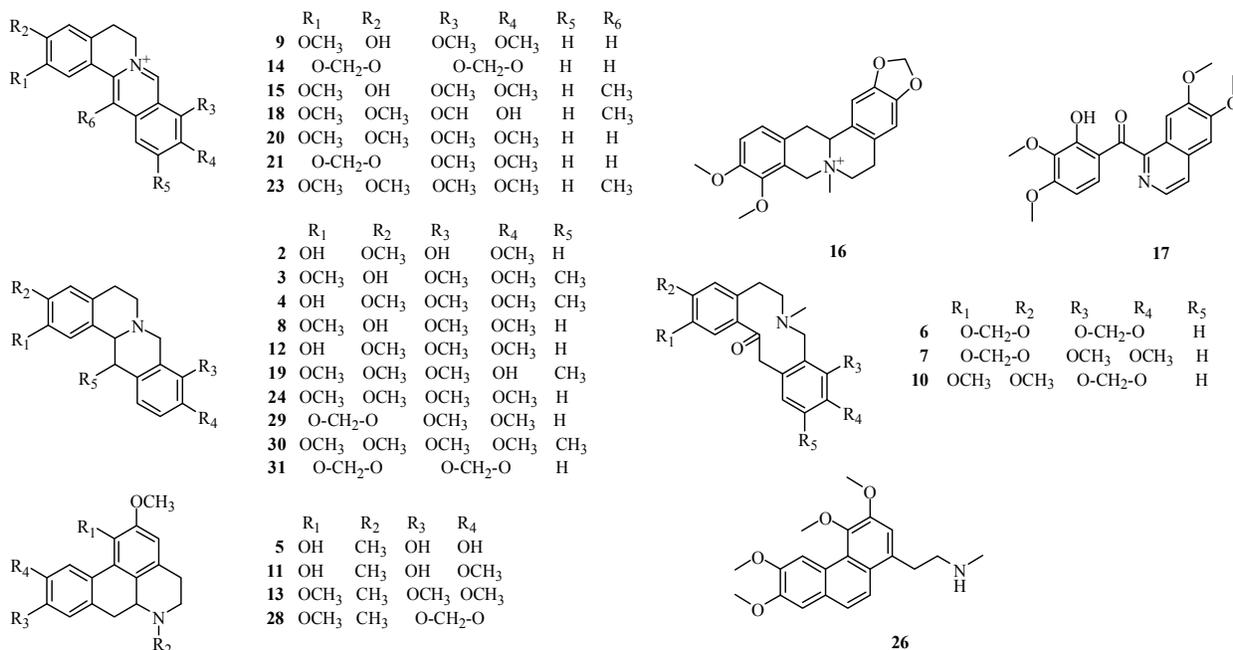


图 2 延胡索中化学物质组结构

Fig. 2 Chemome structures of constituents in *Corydalis Rhizoma*

通过对中药中次生代谢产物生源途径及成分特异性分析有助于发现该中药中特异性化学成分。在延胡索化学物质组辨识研究基础上，本课题组对次生代谢产物的生源途径进行研究，为其特异性质量标志物的发现和选择提供依据。

2.2.1 延胡索化学成分生源途径 延胡索中的生物碱类化合物主要为 3 类，分别是原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）、原托品碱型生物碱（原阿片碱、 α -别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（D-海罂粟碱等）。

这 3 类生物碱具有共同的生源前体——酪氨酸，酪氨酸首先合成 2 种前体原料多巴胺和 4-羟基苯乙醛，这 2 种前体原料在去甲乌药碱合成酶的作用下，缩合形成苄基异喹啉生物碱生物合成的第一个中间体去甲乌药碱 (norcoclaurine)。去甲乌药碱经过几次甲基化作用，接受来自腺苷甲硫氨酸的甲基，转

化为另一个重要中间体 (S)-网状番荔枝碱 [(S)-reticuline]。(S)-网状番荔枝碱为四氢苯基异喹啉类生物碱合成途径的分支点。在特异性合酶的作用下(S)-网状番荔枝碱可进一步合成 D-海罂粟碱、延胡索乙素、黄连碱、原阿片碱等生物碱^[5-7]，生源关系见图 3。

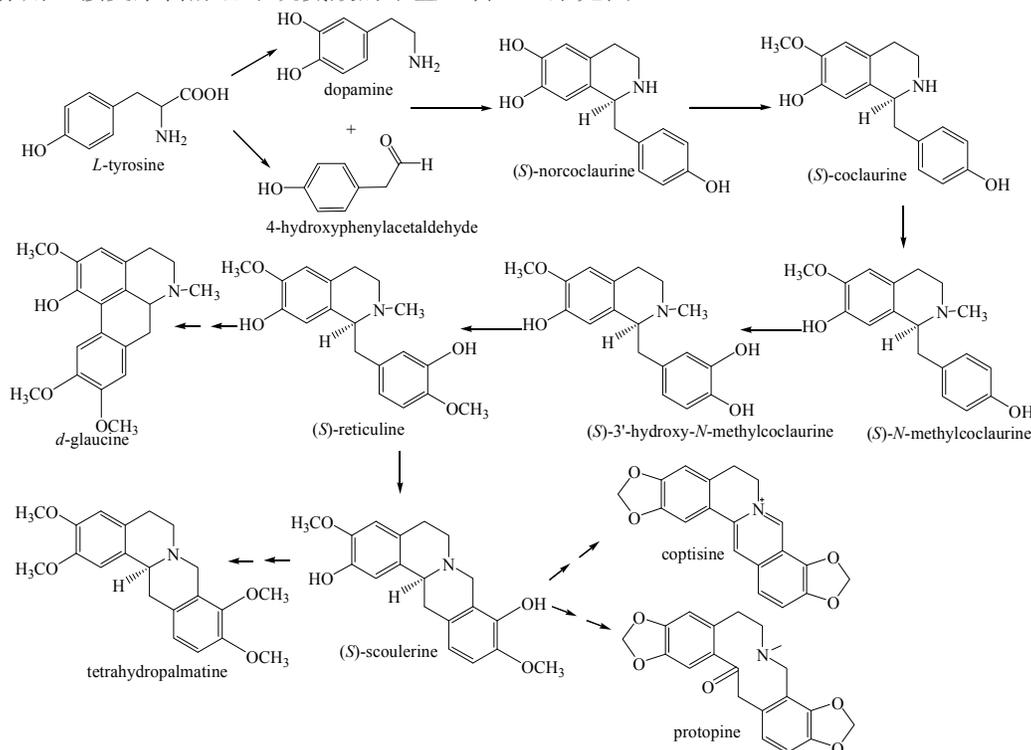


图 3 延胡索生物碱生源关系

Fig. 3 Biosynthesis relationship of alkaloids in *Corydalis Rhizoma*

2.2.2 延胡索化学成分特异性分析 延胡索中的延胡索甲素、延胡索乙素、小檗碱、巴马汀、原阿片碱、 α -别隐品碱等均属于异喹啉类生物碱。异喹啉生物碱在生源途径中是单一来源的生物碱，并且，在紫堇属植物中，苄基异喹啉类生物碱可能是原托品碱类、苄菲啶类、阿朴碱类、桔拉灵类等其他几种基核结构类型生物碱的前体物质，它们之间可能具有如图 4 所示的生源关系^[8-10]。

从成分的特异性分析：相对于原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）而言，原托品碱型生物碱（原阿片碱、 α -别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（D-海罂粟碱等）处于生源途径的下游位置，因此，可认为该类成分的植物特异性较强，而原阿片碱、黄连碱更被视为罂粟科植物的特征性成分。从成分的量看，延胡索甲素、延胡索乙素等是延胡索的主要成分。

综合生源途径及成分的特异性分析，认为延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、D-四氢药根碱及原阿片碱可考虑作为延胡索的质量标志物。

2.3 延胡索药效相关的质量标志物的发现及确定

2.3.1 基于与药效相关的质量标志物的发现及确定

(1) 药效学实验：采用整体动物模型（小鼠热板、小鼠醋酸扭体和大鼠痛经模型）、离体器官模型（未孕大鼠离体子宫平滑肌模型）和细胞模型（大鼠原代子宫平滑肌细胞模型），以延胡索 60%乙醇提取物为实验样品，观察延胡索的镇痛作用及其物质基础。与模型组比较，延胡索提取物可显著延长给药后 0.5、1、2 h 热刺激致小鼠舔足反应的潜伏期，并可持续到给药后 2 h，延长率最高可达 27.5%。延胡索提取物非常显著地减少醋酸扭体反应的扭体次数，抑制率可达 34.3%。延胡索提取物能够显著延长痛经模型大鼠扭体反应的潜伏期，潜伏期延

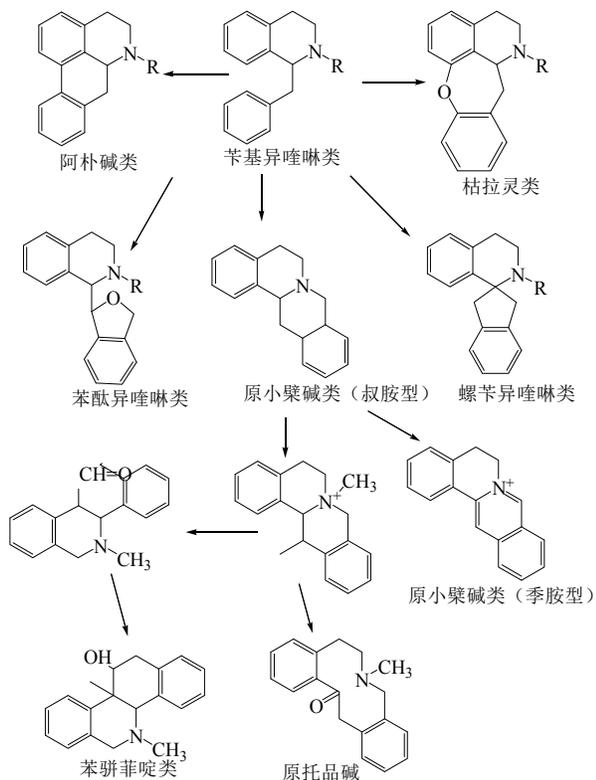


图 4 紫堇属植物生物碱的生源关系

Fig. 4 Biosynthesis relationship of alkaloids in plants from *Corydalis Vent.*

长率为 22.7%，显著减少扭体次数，扭体次数抑制率为 53.7%。延胡索提取物可显著升高 β -内啡肽 (β -EP) 量，显著降低 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NA) 的量，可显著升高前列腺素 E_2 (PGE_2) 水平，显著降低前列腺素 F_{2a} (PGF_{2a}) 的量及 PGF_{2a}/PGE_2 值。延胡索提取物和延胡索乙素可明显降低缩宫素引起的子宫收缩的频率、平均振幅和活动力，并呈现剂量依赖性。对 PGF_{2a} 引起的子宫收缩频率和活动力也显著降低，并呈现剂量依赖性。

(2) 网络药理学分析：使用 ChemBioOffice 2010 软件绘制延胡索乙素、巴马汀、*D*-海罂粟碱、原阿片碱 4 个代表性化合物的三维立体结构图。将化合物三维立体结构投入反向分子对接网站 PharmMapper，进行药物分子的体内靶点预测；将筛选得到的靶点投入 UniProt 数据库，得到所有靶点对应编号。将对接得分最高的前 10 个靶点编号投入 MAS 3.0，得到与靶点相关的通路，选取与原发性痛经相关的通路进行下一步分析。综合以上计算出的数据，再通过 KEGG 数据库及相关文献的查阅对计算出的通路进行分析，找到和激素调节、中枢镇痛、解痉、炎症和免疫调节相关的通路，经 Cytoscape 2.6 软件处理，得到 4 个代表性化合物的相关靶点通路预测图 (图 5)。

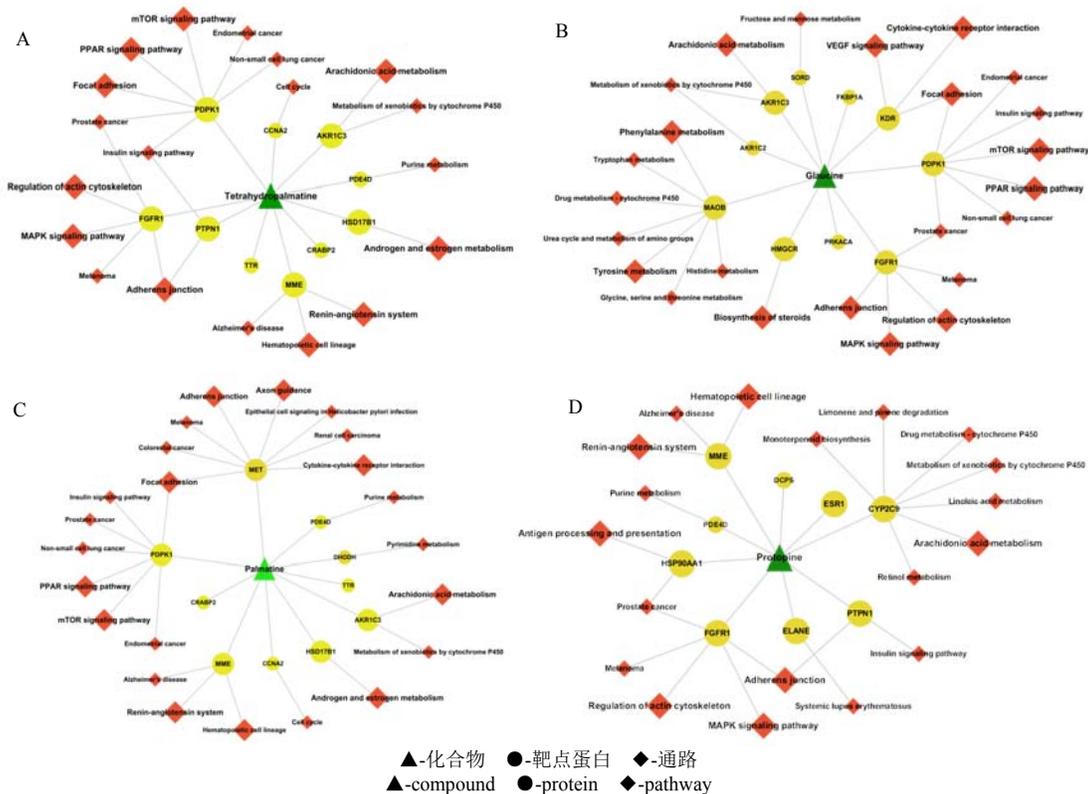


图 5 延胡索乙素 (A)、巴马汀 (B)、*D*-海罂粟碱 (C) 和原阿片碱 (D) “化合物-靶点-通路”网络图

Fig. 5 “Compound-Target-Pathway” network of tetrahydropalmatine (A), glaucine (B), *D*-palmatine (C), and protopine (D)

结果表明以延胡索乙素、巴马汀、海罂粟碱、原阿片碱为代表的延胡索生物碱类化合物可以作用于 9 个蛋白靶点, 即胺氧化酶 (MAOB)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 1 型 (PTPN1)、脑啡肽酶 (MME)、细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9)、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、血管内皮生长因子受体 2 (KDR)、醛-酮还原酶家族 1 成员 C3 (AKR1C3)、雌激素受体 (ESR1)、肝细胞生长因子 (MET) 和 9 条信号通路, 即 Tyrosine metabolism、Phenylalanine metabolism、Renin-angiotensin system、Hematopoietic cell lineage、Arachidonic acid metabolism、mTOR、VEGF、Cytokine-cytokine receptor interaction、Axon guidance。这些靶点及通路多数都与中枢镇痛有关, 其中脑啡肽酶是主要的内源性阿片肽脑啡肽的降解酶, 其对中枢镇痛起着关键性作用, 因此推断生物碱类化合物主要是通过调节神经镇痛介质而发挥治疗痛经的作用。

通过整合整体动物、器官水平、细胞、受体和网络药理等多角度的实验结果发现, 延胡索中的生物碱类成分可通过作用于中枢镇痛相关蛋白、平滑肌相关受体蛋白以及血栓素、血管紧张素等靶点蛋白来调节下游生物信号转导通路, 从而发挥止痛、理气、活血等功效。其中, 延胡索乙素、巴马汀、*D*-海罂粟碱、原阿片碱为主要药效物质基础, 可作为质量标志物。

2.3.2 基于与药性相关的质量标志物的发现及确定 “药性” 是中药功能属性的另一个方面, 以电子舌、电子鼻等为代表的味觉、嗅觉仿生手段可对药物的味觉、嗅觉进行客观、量化的划分和表征, 味觉、嗅觉仿生模型的“真实五味” 表征和界定; 基于药物分子-味觉 (嗅觉) 受体结合理论, 运用计算机虚拟筛选方法可进一步进行“性 (味)” 物质基础筛选。

进一步苦味受体 hTAS2R10 同源模建, 以奎宁 (quinine) 为阳性配体, 通过 Schrödinger 软件将 hTAS2R10 的激动剂奎宁用 InduceFit 模块对接到 hTAS2R10 中, 得到结合模式图, 并进行分子动力学

模拟, 以延胡索药材中的原小檗碱型化合物 *D*-四氢药根碱、延胡索乙素、黄连碱、巴马汀以及原托品碱型化合物原托品碱、 α -别隐品碱和阿朴菲型生物碱 *D*-海罂粟碱与苦味受体进行对接筛选, 其结果与阳性配体奎宁的对接结果比较, 原小檗碱型的代表性化合物延胡索乙素与构建的苦味受体 hTAS2R10 的亲和力较强, 而原托品碱类成分对接结果较差, 故推测原小檗碱型化合物可能为延胡索药材中的苦味成分。以辣椒素为阳性配体, 进行辛味受体 OR7D4 对接筛选, 其结果与辣椒素对接打分比较, 延胡索乙素、原阿片碱与 OR7D4 的对接得分均高于辣椒素, 初步推测其可能为辛味物质基础 (图 6)。

功能受体作为药性“功效五味” 的表征方式, 本课题组进行的 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 结合实验表明 (图 7): 延胡索提取物给药后对 5-羟色胺受体 (5-HT1A)、阿片受体 (OPRM1)、 β_2 肾上腺素受体 (ADRB2) 有显著的激活作用, 并且体现出浓度依赖性, 对多巴胺受体 (D_2) 产生显著的抑制作用。延胡索乙素可激活 ADRB2, 抑制血栓素-前列腺素受体 (TP/TBXA2R) 和 D_2 , 原托品碱可拮抗乙酰胆碱受体 (M_2) 和 D_2 。延胡索乙素和原阿片碱可作用于与辛、苦味相关的功能受体, 故可能为辛、苦味物质基础。

通过以上研究, 延胡索提取物、原阿片碱、巴马汀及延胡索乙素对 6 个 GPCRs 受体的激动和拮抗作用, 从药性物质基础角度为质量标志物的确定提供实验依据。

2.3.3 基于药动力学及体内过程的质量标志物的发现及确定 中药的功效是其物质基础通过一定的药物传输途径及体内过程最终生物效应的综合体现。因此, 药动力学及体内过程研究是中药药效物质基础研究、质量标志物的发现及确定的重要内容, 本课题采用 UPLC-Q/TOF-MS 方法, 从 *ig* 延胡索提取物大鼠血浆中鉴定出 11 个生物碱类原型成分和 6 个代谢产物, 11 个原型成分为四氢药根碱、

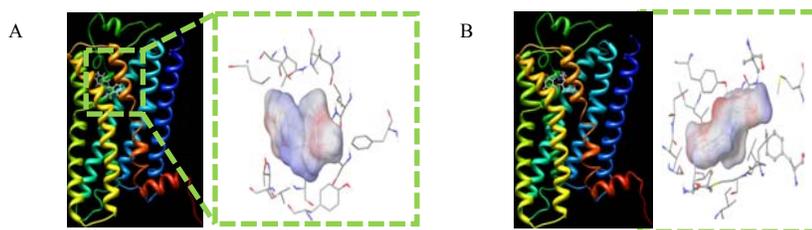


图 6 OR7D4 与延胡索乙素 (A)、原阿片碱 (B) 结合模式图

Fig. 6 Combination pattern of OR7D4 with tetrahydropalmatine (A) and protopine (B)

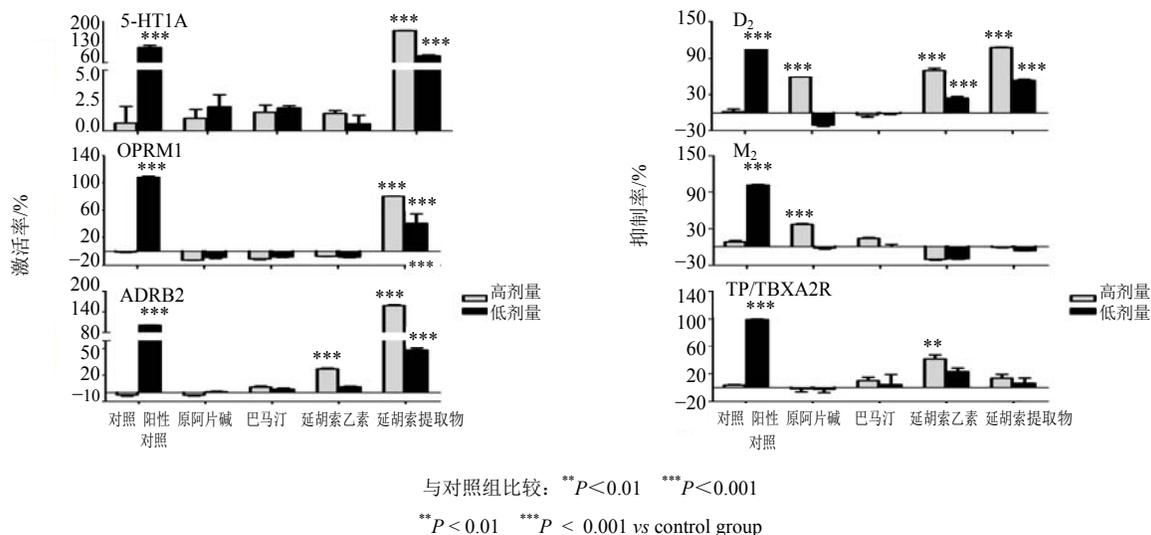


图 7 延胡索提取物、原阿片碱、巴马汀及延胡索乙素对 6 个 GPCRs 受体的激动和拮抗作用

Fig. 7 Activation and antagonism of *Corydalis Rhizoma* extraction, protopine, paltamine, and tetrahydropaltamine on six GPCRs

原阿片碱、四氢小檗碱、紫堇球碱、延胡索乙素、 α -别隐品碱、*N*-甲基四氢巴马汀、延胡索甲素、四氢黄连碱、二氢白屈菜红碱和二氢血根碱。其中 7 个原型成分（原阿片碱、四氢小檗碱、紫堇球碱、延胡索乙素、 α -别隐品碱、延胡索甲素、四氢黄连碱）同样在给药组大鼠脑组织中被检测到。研究结果显示，延胡索提取物 *po* 给药后在大鼠血浆中检测到的 11 个原型成分可能是真正的药物活性成分。更重要地，其中 7 个原型成分亦能在给药组大鼠脑组织中被检测到，表明它们能够穿过血脑屏障渗透进入脑组织，这些化合物可能是元胡止痛方发挥中枢镇痛作用的关键成分。黄连碱虽未在血中检测到，但有报道季胺型异喹啉类生物碱经肠内菌代谢后主要以叔胺型生物碱的形式吸收入血，血中检测到的四氢黄连碱可能源于黄连碱，因此，黄连碱亦可考虑作为质量标志物。

采用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (UPLC-QQQ/MS, Dionex UltiMate 3000 超高效液相色谱, Thermo TSQ Vantage MS/MS 质谱, 美国 Thermo Scientific 公司), 建立生物分析方法并被确证后, 研究 *po* 延胡索提取物后大鼠血浆中延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱药动学和脑组织分布情况。药动学结果表明, 大鼠 *ig* 延胡索提取物后, 大鼠血浆中延胡索甲素药物浓度的达峰时间 (t_{max}) 为 1.33 h、峰浓度 (C_{max}) 为 93.00 $\mu\text{g/L}$ 、消除半衰期 ($t_{1/2}$) 为 3.42 h、平均滞留时间 (MRT_{0-t}) 为 3.89 h、药时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 为 368.16 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; 延胡索乙素药物的 t_{max} 为 1.92 h、 C_{max} 为 181.62 $\mu\text{g/L}$ 、

$t_{1/2}$ 为 3.11 h、 MRT_{0-t} 为 5.21 h、 AUC_{0-t} 为 1 242.73 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; 原阿片碱的 t_{max} 为 1.33 h、 C_{max} 为 1.21 $\mu\text{g/L}$ 、 $t_{1/2}$ 为 2.75 h、 MRT_{0-t} 为 2.78 h、 AUC_{0-t} 为 3.70 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ 。脑组织分布研究表明, *ig* 给药 15 min 后即可在大鼠脑组织中检测到延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱的存在, 表明它们能够迅速透过血脑屏障而进入中枢系统发挥镇痛作用。

综合以上对延胡索化学成分生源途径及成分特异性分析、物质基础、药效、药性及药动学研究, 确定延胡索甲素、延胡索乙素、黄连碱、原阿片碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、*D*-四氢药根碱为延胡索的质量标志物。

3 延胡索质量标准的建立

3.1 多质量标志物成分定量测定方法的建立

根据延胡索化学物质组研究, 延胡索主要含有生物碱类成分, 包括原小檗碱型生物碱 (叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季胺类小檗碱、巴马汀等)、原托品碱型生物碱 (原阿片碱、 α -别隐品碱等)、阿朴菲型生物碱 (*D*-海罂粟碱等) 以及其他类。本文通过化学成分生源途径及成分特异性分析, 药效、药性和药动学研究及其物质基础的相关性分析, 确定延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、*D*-四氢药根碱及原阿片碱 7 个生物碱成分为质量标志物, 建立多质量标志物成分定量测定方法。

3.1.1 基于外标法多质量标志物成分定量测定 采用 HPLC 法建立了同时测定醋延胡索药材中延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索

甲素、*D*-四氢药根碱及原阿片碱 7 个生物碱成分的测定方法，并进行了方法学考察，包括供试品溶液的制备方法、色谱条件和系统适用性试验（图 8）、线性范围、精密度、稳定性、重复性和加样回收率试验等，结果均符合要求。并对收集的 14 个批次的醋延胡索药材中 7 个生物碱成分进行了测定，测定结果见图 9。

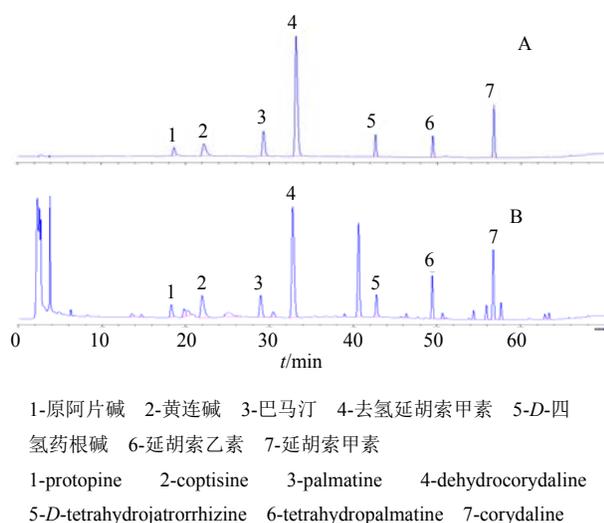


图 8 混合对照品 (A) 及延胡索样品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 8 HPLC of mixed reference substances (A) and *Corydalis Rhizoma* sample (B)

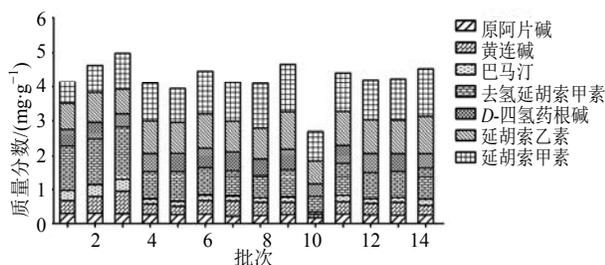


图 9 14 批醋延胡索指标成分的累积加和图
Fig. 9 Content accumulation of index component of 14 batches of *Corydalis Rhizoma* processed with vinegar

3.1.2 基于一测多评法 (QAMS) 的多质量标志物定量测定 多指标质量控制存在对照品短缺和高昂的检测成本的问题，QAMS 通过测定 1 个价廉、易得的成分而实现多成分同步测定，为中药多指标质量控制提供了理想的解决方案。QAMS 的中药质量控制模式是依据成分的量在一定线性范围内与检测器的响应呈正比的原理，以样品中的某一典型成分（有对照品供应者）为内参物，建立该成分与其他待测成分间的相对校正因子 ($f_{k/s}$)，通过 $f_{k/s}$ 计算其他待测成分的量。

$$f_{k/s} = (C_s \times A_k) / (C_k \times A_s)$$

$$C_k = (C_s \times A_k) / (f_{k/s} \times A_s)$$

C_s 为参照物质质量浓度， A_s 为参照物质色谱峰峰面积， C_k 为其他对照组分质量浓度， A_k 为其他对照组分色谱峰峰面积， C_k 为待测成分质量浓度， A_k 为待测组分色谱峰峰面积

本文以延胡索乙素为参照物建立与原阿片碱、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、*D*-四氢药根碱和延胡索甲素 6 个成分的 $f_{s/k}$ ，结果在一定的线性范围内，原阿片碱、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、*D*-四氢药根碱、延胡索甲素与延胡索乙素的 $f_{s/k}$ 分别为 0.800、0.240、0.271、1.045、0.570、0.765；且在不同实验条件下重现性良好，相对校正因子的 $RSD < 2.0\%$ ($n=6$)。通过对 14 个批次的醋延胡索药材中 7 个生物碱成分进行测定，结果表明 QAMS 测定结果与外标法测定结果间没有显著性差异。

3.2 指纹图谱建立

采用 HPLC 法建立了醋延胡索药材的指纹图谱，并进行了方法学考察，包括色谱条件和系统适用性试验、精密度、稳定性、重复性试验等，结果均符合要求。采集了 14 个批次的醋延胡索药材指纹图谱，用《中药色谱图的指纹图谱评价系统》软件 (2004A) 进行色谱峰的匹配，计算了 14 批醋延胡索药材的相似度，并采用主成分分析和系统聚类法对醋延胡索药材进行了分类研究。选取其中 11 批醋延胡索药材制定了标准指纹图谱，并采用 HPLC-Q/TOF-MS 方法和对照品比对，对主要指纹峰进行了指认（图 10~13）。

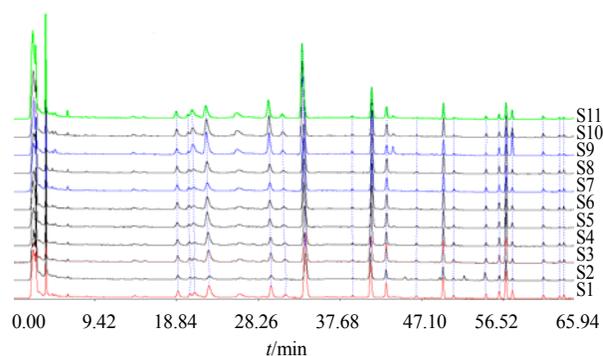
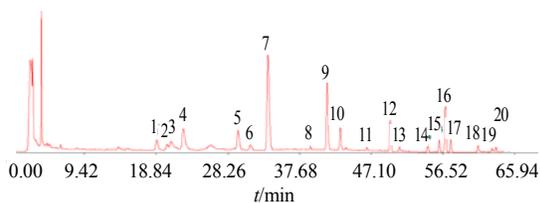


图 10 11 批醋延胡索 HPLC 指纹图谱
Fig. 10 HPLC fingerprint of 11 batches of *Corydalis Rhizoma* processed with vinegar

4 结论和讨论

4.1 根据质量标志物的概念确定质量的化学物质标准

以化学成分生源途径及成分特异性、成分的量、



1-原阿片碱 2-别隐品碱 4-黄连碱 5-巴马汀 7-去氢延胡索甲素 9-海罂粟碱 10-D-四氢药根碱 12-延胡索乙素 16-延胡索甲素
 1-protopine 2-allocryptopine 4-coptisine 5-palmatine
 7-dehydrocorydaline 9-glaucine 10-D-tetrahydrojatrorrhizine
 12-tetrahydropalmatine 16-corydaline

图 11 醋制延胡索对照指纹图谱

Fig. 11 Reference fingerprint of *Corydalis Rhizoma* processed with vinegar

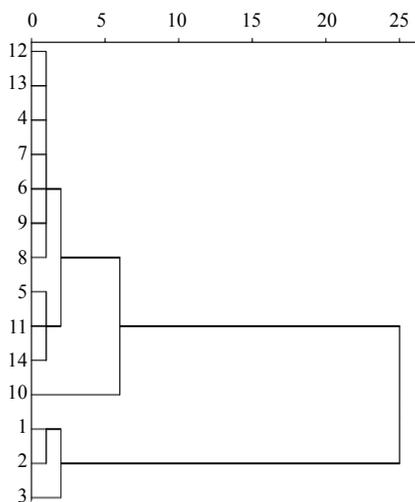


图 12 延胡索药材的聚类分析树状图

Fig. 12 Dendrogram of *Corydalis Rhizoma*

药效、网络药理分析、药性及吸收入血及组织分布、成分的可测性等为标准，定性鉴别建议必须检验的质量标志物有延胡索乙素、延胡索甲素、去氢延胡索甲素；定量测定延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、D-四氢药根碱及原阿片碱 7 个生物碱成分为延胡索的质量标准。

4.2 以确定的质量标志物为指标，建立了基于外标法和 QAMS 的延胡索多指标成分定量测定方法

对 11 个批次的醋制延胡索药材为样品，建立了延胡索指纹图谱控制方法，并进行相似度分析、主成分分析及色谱峰指认，原阿片碱、别隐品碱、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、海罂粟碱、D-四氢药根碱、延胡索乙素、延胡索甲素 9 个成分为特征性共有成分。

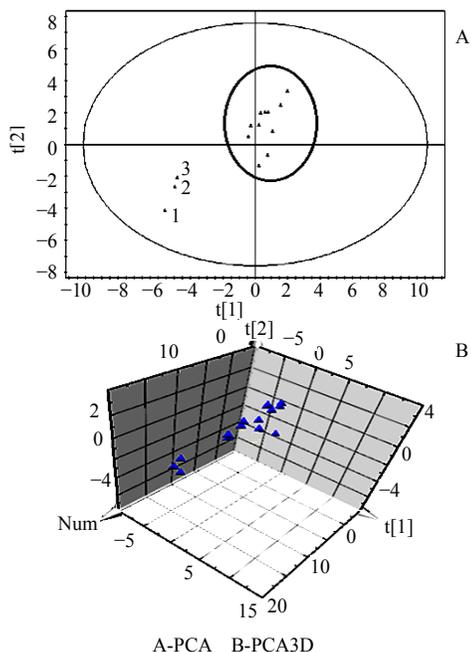


图 13 醋制延胡索 PCA 结果

Fig. 13 PCA of *Corydalis Rhizoma* processed with vinegar

4.3 质量标志物的定量

通过 QAMS 对质量标志物的分析，初步发现其量从高到低依次为去氢延胡索甲素 (7) > 9-海罂粟碱 (9) > 延胡索甲素 (16) > 延胡索乙素 (12) > 黄连碱 (4) > D-四氢药根碱 (10) > 巴马汀 (5)。为准确定量，设计一个标准的提取方案，制备 10 批标准提取物，测定以上物质在标准提取物中的准确量，确定各物质量的上下限，以供作为该品种提取物的质量参考标准。

参考文献

[1] 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): 1443-1457.
 [2] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
 [3] 肖小河, 金城, 鄢丹, 等. 中药大质量观及实践 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508.
 [4] Li R, Niu Y B, Dou Z Y. Comparative study for pharmaceutical action of *Corydalis Rhizoma* before and after processing [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(3): 247-254.
 [5] Facchini P J, De Luca V. Opium poppy and madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants [J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 763-784.

- [6] Liscombe D K, Facchini P J. Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine *cis*-*N*-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14741-14751.
- [7] 程巧, 曾建国, 乐捷. 异喹啉类生物碱生物合成、运输、储藏相关细胞生物学研究进展 [J]. *植物学报*, 2014, 49(6): 720-728.
- [8] Dewan S, Sudha J, Sandeep G, *et al.* The biosynthesis of the alkaloids of *Corydalis meifolia* wall [J]. *Tetrahedron*, 1986, 42(2): 675-680.
- [9] Tani C, Tagahara K. Studies on berberine derivatives and related alkaloids. VII. On the biosynthesis of protopine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1974, 22(10): 2457-2459.
- [10] Takao N, Iwasa K, Kamigauchi M, *et al.* Studies on the alkaloids of papaveraceous plants. XXV. Biosynthesis of the alkaloids of *Corydalis incisa* Pers. and *Chelidonium majus* L. incorporations of tetrahydroprotoberberines, *N*-methosalts of tetrahydroprotoberberines, and protopine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24(11): 2859-2868.