

## 中药饮片质量标志物(Q-marker)研究: 莪术饮片质量评价研究及质量标准探讨

郝敏<sup>1</sup>, 童黄锦<sup>2,4#</sup>, 张季<sup>4</sup>, 李金慈<sup>3</sup>, 苏联麟<sup>4</sup>, 费诚浩<sup>4</sup>, 顾薇<sup>4</sup>, 陆兔林<sup>4\*</sup>, 毛春芹<sup>4\*</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

3. 东部战区总医院 制剂科, 江苏 南京 210002

4. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

**摘要:** 基于饮片质量标志物(Q-marker)的概念、确定标准及研究模式, 以莪术饮片为例进行示范性研究, 通过对生、醋莪术饮片化学物质组辨识明确化学物质基础及炮制前后发生显著变化的差异成分; 结合药效、药性及药动学研究以及物质基础的相关性分析并做比较, 明确其主要药效物质基础; 综合研究结果, 确定莪术二酮、莪术醇、吉马酮、呋喃二烯、 $\beta$ -榄香烯5个化学成分为质量标志物, 建立生、醋莪术饮片多指标成分含量测定及指纹图谱控制方法。为中药饮片质量标志物的研究提供示范。

**关键词:** 生莪术; 醋莪术; 饮片; 质量标志物; 药效; 多成分定量测定; 饮片质量控制; 莪术二酮; 莪术醇; 吉马酮; 呋喃二烯;  $\beta$ -榄香烯; 指纹图谱

中图分类号: R284; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)19-4673-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.020

## Quality markers research on Chinese herbal pieces: Quality evaluation and quality standards of steamed and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma*

HAO Min<sup>1</sup>, TONG Huang-jin<sup>2,4</sup>, ZHANG Ji<sup>4</sup>, LI Jin-ci<sup>3</sup>, SU Lian-lin<sup>4</sup>, FEI Cheng-hao<sup>4</sup>, GU Wei<sup>4</sup>, LU Tu-lin<sup>4</sup>, MAO Chun-qin<sup>4</sup>

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Pharmacy Department, National Clinical Research Center of Kidney Diseases, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China

4. College of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** A demonstration research on Chinese herbal decoction pieces of *Curcumae Rhizoma* was performed based on the concept of quality markers (Q-markers), standard establishment, and research modes. The chemical constituents of both steamed processed pieces of *Curcumae Rhizoma* and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma* decoction pieces were identified by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS). The major effective components were analyzed through pharmacodynamics, drug property, pharmacokinetics studies, and correlation analysis of chemical constituents. The Q-markers were determined by all the results. At last, five compounds including curdione, curcumenol, germacrone, furanodiene and  $\beta$ -elemene were selected as Q-markers. The quality control methods of multi-component assaying and fingerprint were also established. Overall, this study provides a demonstration for the study of quality markers of Chinese herbal decoction pieces.

收稿日期: 2019-08-30

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFC1707000); 国家自然科学基金资助项目(81673598); 国家自然科学基金资助项目(81973483); 国家中医药行业专项(2015468002-2); 国家发改委中药饮片标准化建设项目(ZYBZH-Y-SC-40)

**作者简介:** 郝敏, 女, 助理研究员, 主要从事中药质量控制及炮制机制研究。Tel: 15858265915 E-mail: hao\_min0509@163.com

**\*通信作者** 陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量控制及炮制研究。Tel: 13951636763 E-mail: lutuling2005@126.com

毛春芹, 高级实验师, 硕士研究生导师, 主要从事中药质量控制及炮制研究。Tel: 13851500946 E-mail: mcq63@163.com

#并列第一作者 童黄锦, 女, 副主任药师, 主要从事中药质量控制及炮制机制研究。Tel: 13770330158 E-mail: hjtong62@126.com

**Key words:** steamed processed pieces of *Curcumae Rhizoma*; vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma*; Chinese herbal decoction pieces; quality markers; drug effect; quantitative determination of multi-component; quality control of Chinese herbal decoction pieces; curdione; curcuminol; germacrone; furanodiene;  $\beta$ -elemene; fingerprint

中药饮片是 3 大中药产业的重要组成部分,是中药汤剂、中成药、中药配方颗粒的原料药,其质量好坏直接关系到中医临床用药的安全性和有效性。因此,制定科学合理、安全有效的中药饮片质量标准是大中药产业快速稳步发展的重要前提。近年来,国家先后出台相关文件支持和鼓励中医药发展。2016 年 2 月国务院印发《中医药发展战略规划纲要(2016—2030 年)》明确指出要统筹推进中药相关领域标准制修订,在《中国药典》及其配套强制性标准的框架下,按照补充完善、共同形成中药标准体系的思路。《中国药典》2015 年版已将更多的先进技术和方法应用到中药质量标准的制定中,进一步提高了检测的灵敏度、专属性和稳定性,使中药产品的质量标准更加科学合理,然而中药饮片经不同炮制工艺加工后,物质基础、药性、临床功效均发生显著改变的特点,决定了其质量标准制定较中药材更为复杂。目前,《中国药典》2015 年版大部分饮片项下仍缺乏含量测定等多项检测内容,且有含量测定项的饮片品种多与药材检测指标相同,定量限度与药材相同或低于药材,不能体现饮片本身的质量特性<sup>[1]</sup>。因此,如何解决中药饮片现有质量标准的匮乏和不足,提高质量可控性、一致性和溯源性,有利于中药产品生产过程控制和质量监管,势在必行。

## 1 中药饮片质量标志物(Q-marker)的确定原则及对饮片质量控制的意义

### 1.1 中药饮片质量标志物的确定原则

根据中药质量标志物的确定原则<sup>[2]</sup>,结合饮片自身特点,初步制定中药饮片质量标志物的确定原则:(1)中药饮片 Q-marker 是存在于中药饮片固有的或炮制过程中形成的、与中药饮片的功能属性密切相关的化学物质,有明确的化学结构、可进行定性鉴别和定量测定的物质,作为反映中药饮片安全性、有效性和专属性的标示性物质进行质量控制。(2)在中药饮片质量标志物研究中,必须使用标准方法制备标准饮片(选用道地药材或主产地药材;依据《中国药典》2015 年版炮制方法或地方炮制规范进行炮制),来确定用于定性和定量的质量标志物。(3)为体现饮片专属性,饮片质量标志物的确定应兼顾炮制加工后导致饮片外观形状、药性及药

效改变的差异化学成分来确定饮片质量标志物。

### 1.2 中药饮片质量标志物对饮片标准化建设的意义

**1.2.1** 中药饮片质量标志物的提出,有利于提高体现饮片专属性的质量标准 中药材经过产地处理、炮制加工后形成中药饮片,饮片经过煎煮、提取浓缩、制粒等制剂工艺过程得到中药制剂,中药材、中药饮片和中药制剂三者之间质量息息相关<sup>[3]</sup>。其中,中药材在属性上属于农副产品<sup>[4]</sup>,只有经过产地加工、炮制工艺得到饮片,才具有了药品的属性,因此,中药饮片作为 3 大中药产品的中间环节,其质量好坏对中药产业链的健康发展具有至关重要的作用。目前,中药产品缺乏以质量标志物为依据体现药品专属性的质量标准<sup>[5]</sup>,且中药质量控制一直以中药材为主,饮片的质量控制不能体现其本身特性。此外,药典中关于三者之间的质量标准缺乏溯源性。针对《中国药典》2015 年版中大部分饮片缺乏含量测定项或有含量测定的内容所选指标多与药材相同且量的要求低于药材最低限度,这些均不能体现饮片的专属性。如何制定适用于饮片产品特点的质量标准刻不容缓。基于“中药 Q-marker”的研究思路与饮片本身特点相结合,形成具有饮片特色的“中药饮片 Q-marker”的质量控制新思路,有利于提高体现饮片专属性的质量标准。

**1.2.2** 中药饮片质量标志物有利于建立中药饮片全程质量控制及溯源体系 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<sup>[6]</sup>。基于“中药 Q-marker”,具有饮片特色的“中药饮片 Q-marker”的研究思路,采用标准饮片为研究对象,使用标准方法制备标准提取物,利用现代先进分析技术与方法进行炮制前后化学物质的动态变化研究,将能体现饮片炮制作用的差异成分确定为饮片的质量标志物。通过中药饮片的质量控制,追溯中药材的来源,承接中药产品的质量标准制定的依据,有利于建立中药饮片全程质量控制及质量溯源体系。

## 2 莪术饮片质量标志物的探索研究

莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis*

Val.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎，后者习称温莪术。冬季茎叶枯萎后采挖，洗净，蒸或煮至透心，晒干或低温干燥后除去须根和杂质。其味辛苦，性温，归肝、脾经，具有行气破血、消积止痛之功效，临床常应用于治疗癥瘕积聚、瘀血经闭、胸痹心痛、食积胀满<sup>[7]</sup>。现代研究表明，莪术具有良好的抗纤维组织增生、抗肿瘤、抗血栓、抗炎、抗病毒、抗早孕、抗菌、保肝等作用<sup>[8]</sup>，其中莪术在抗肝纤维化和抗肿瘤方面成效显著<sup>[9]</sup>。《中国药典》2015 年版一部中，莪术药材质量标准包括性状鉴定、显微鉴别、薄层色谱鉴别以

及莪术挥发油的含量测定，生、醋莪术饮片的质量标准同药材。然而，莪术经炮制后功效发生明显变化，生莪术长于行气止痛，醋莪术长于破血化瘀，炮制前后物质基础亦发生一定变化<sup>[10]</sup>，因此药典对于莪术药材、生醋莪术饮片均采用挥发油做含量测定，且限度要求一致，不能体现饮片的专属性与有效性。根据目前中药质量标准中存在的问题，刘昌孝院士首次提出了“中药质量标志物 (Q-marker)”的概念<sup>[2]</sup>，为未来中药饮片质量标准的研究提供了方向。笔者以生、醋莪术饮片研究为例，系统描述中药饮片 Q-marker 研究探索过程，详细研究思路见图 1。

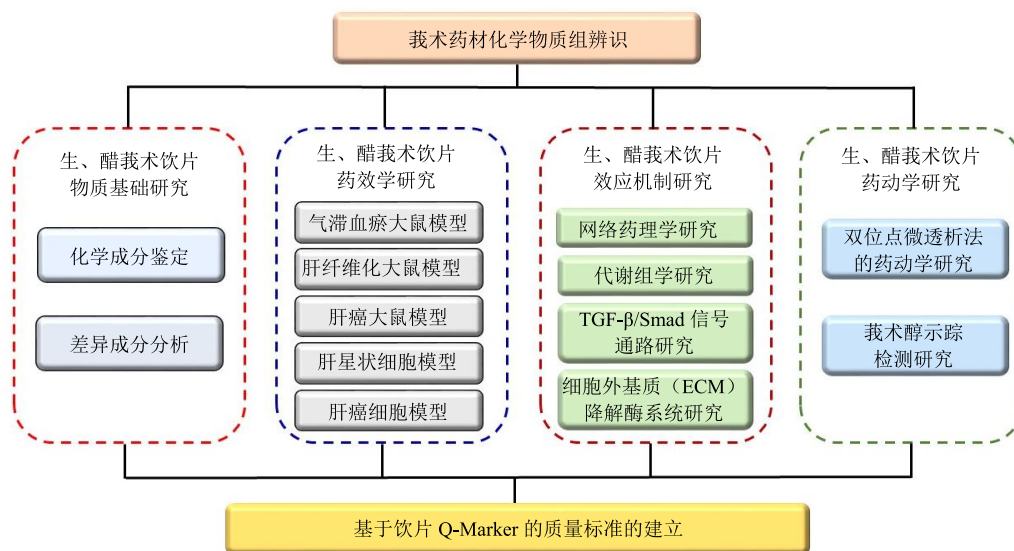


图 1 莪术饮片质量标志物的研究思路

Fig. 1 Research on Q-marker of *Curcumae Rhizoma* pieces

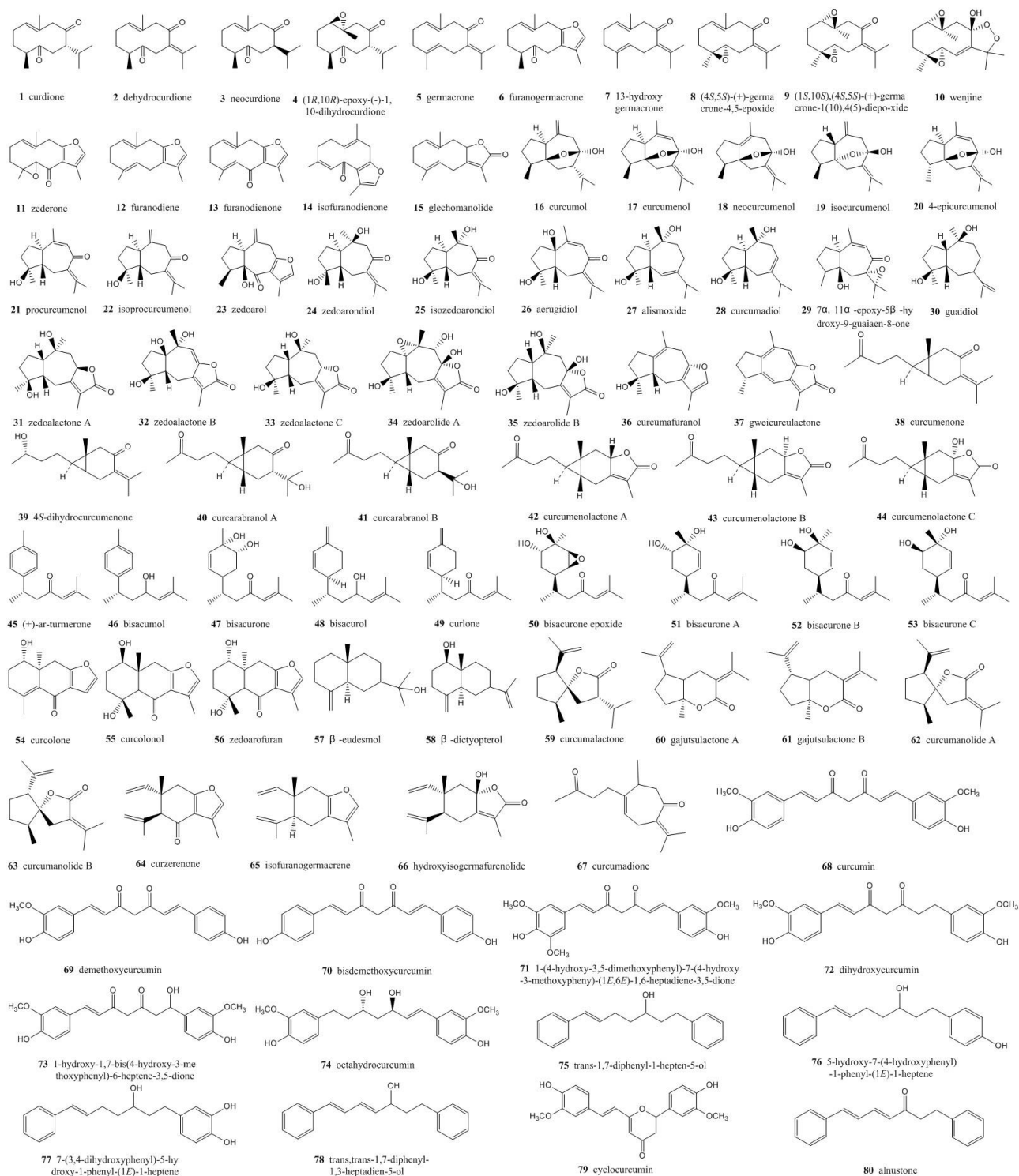
## 2.1 莪术药材化学物质组辨识

中药材是饮片的来源，是 3 大中药产品溯源体系的源头，充分了解中药材的化学物质基础对于制定体现饮片专属性的质量标准具有重要意义。因此，饮片质量标志物研究的第一步是要深入挖掘中药材的化学物质基础。莪术中主要含有挥发油、姜黄素类、微量元素及多糖等成分，其中挥发油和姜黄素类是其主要的有效成分群。莪术挥发油中主要是萜类及倍半萜衍生物。到目前为止，莪术中已分离得到的倍半萜类化合物，根据结构骨架可以细分为吉马烷型、愈创木烷型、薷烷、桉烷、没药烷、榄香烷、苍耳烷、杜松烷、螺内酯、蛇麻烷、拉松烷和其他类。姜黄素类主要指二苯基庚烯类化合物，也指个别戊烯类化合物，根据苯环上有无羟基可分为酚性和非酚性 2 类，现在已经分离并鉴定 20 多个姜

黄素类化合物，本研究通过文献检索的方法汇总了目前莪术药材中已发现的 80 种主要化学成分<sup>[11]</sup>，结果见图 2。

## 2.2 生、醋莪术饮片 UPLC-Q/TOF-MS 差异成分分析<sup>[12]</sup>

课题组采用 UPLC-Q/TOF-MS (UPLC 超高效液相系统，日本岛津公司；AB Sciex TripleTOF 5600 飞行时间质谱仪，美国 AB Sciex 公司) 方法对生、醋莪术饮片所含主要化学成分进行化学物质组表征和指纹成分辨识。将化合物二级质谱图与 Massbank 等质谱数据库进行比对，生醋莪术饮片质谱总离子流图中初步鉴定得到 21 个化学成分，分别为 zedoalactone B (1)、2-aerugidiol (2)、3-zedoarofuran (3)、蓬莪术环氧酮 (zederone, 4)、zedoarondiol (5)、呋喃二烯 (6)、莪术烯醇 (curcumenol, 7)、



1~15-吉马烷型 16~37-愈创木烷型 38~44-萆烷型 45~53-没药烷型 54~58-桉烷型 59~63-裂环愈创木烷型 64~66-榄香烷型 67-苍耳烷型 68~80-姜黄素类

1—15-germacrane type 16—37-guaiane type 38—44-carabrane type 45—53-bisaborane type 54—58-eudesmane type 59—63-seco-guaiane type 64—66-elemanane type 67-xanthane type 68—80-curcuminoids

图2 莪术中已发现的主要化学成分

Fig. 2 Primary chemical components of *Curcumae Rhizoma*

莪术双环烯酮 (curcumenone, 8)、焦莪术酮 (pyrocurzerenone, 9)、莪术呋喃烯酮 (curzerenone,

10)、二氢姜黄素 (dihydrocurcumin, 11)、去氧甲基姜黄素 (demethoxycurcumin, 12)、姜黄素

(curcumin, **13**)、新莪术二酮 (neocurdione, **14**)、莪术二酮 (curdione, **15**)、curzeone (**16**)、furanogermenone (**17**)、curcumenolactones A (**18**)、莪术醇 (curcumol, **19**)、吉马酮 (germacrone, **20**)、bisacucrol (**21**)。采用 SPSS 20.0 统计分析软件, 对生、醋莪术饮片中鉴定得到的 21 个化学成分的相对含量进行了单因素方差分析, 结果 (图 3) 表明, 炮制前后各成分相对含量发生明显变化, 其中, 呋喃二烯、zedoalactone B、aerugidiol 等 9 个成分变化

最为显著 ( $P < 0.05$ ); 采用 Simca-P14.1 多元统计分析软件对生、醋莪术饮片质谱总离子流图进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 建模分析, 2 种饮片可明显归为 2 类, 表明生、醋莪术饮片物质基础发生显著变化。根据 S-Plot 得分图筛选差异标志物, 初步确定呋喃二烯、莪术二酮、吉马酮对二者分类贡献最大。通过以上对莪术炮制前后化学物质的变化研究, 为生、醋莪术饮片质量标准研究及制定提供了依据。

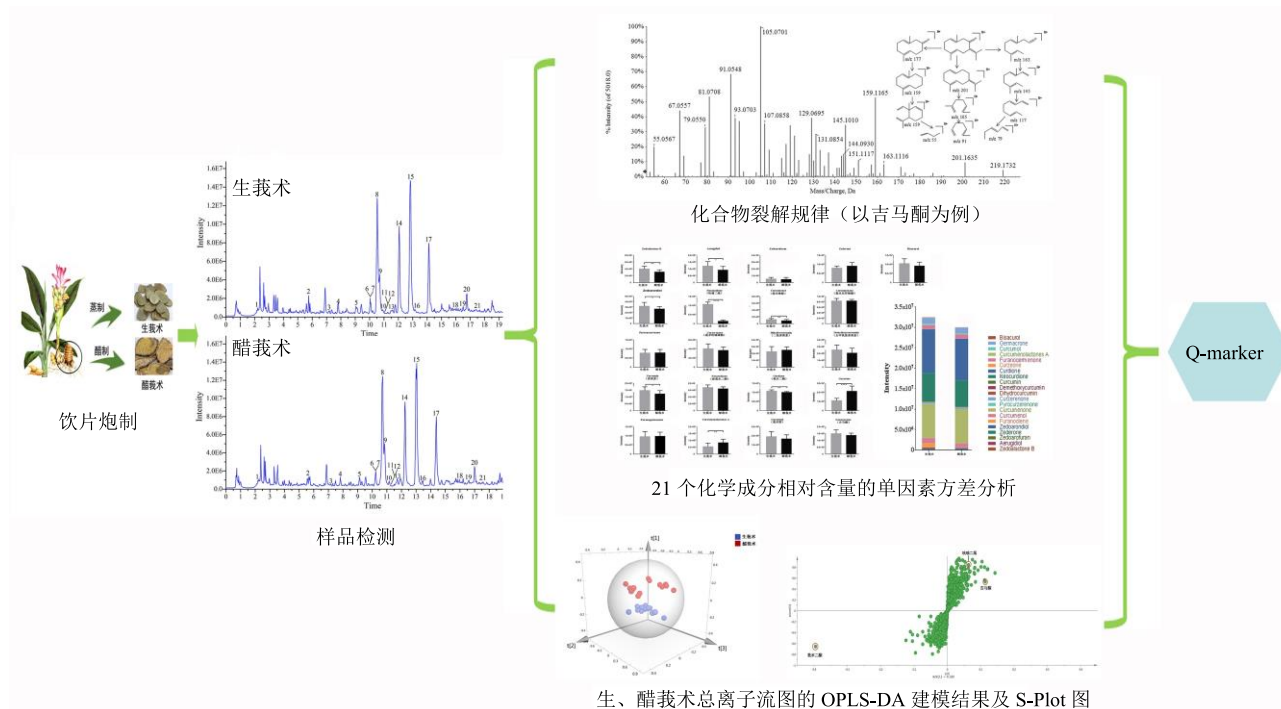


图 3 生、醋莪术饮片 UPLC-Q/TOF-MS 差异成分分析

Fig. 3 Differential component analysis of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcuma Rhizoma* by UPLC-Q/TOF-MS

## 2.3 莪术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 [气滞血瘀大鼠模型、复合因素致肝纤维化大鼠模型、免疫性肝纤维化大鼠模型、四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 增敏的二乙基亚硝胺诱导大鼠原发性肝癌模型] 和细胞模型 [肝星状细胞 (HSC-T6) 模型、人肝癌细胞 (HepG2) 模型], 以生、醋莪术饮片水煎液为实验样本, 考察生、醋莪术饮片活血化瘀、抗肝纤维化及抗肝癌作用。与模型组比较, 生、醋莪术均显著降低模型大鼠各切变率下全血黏度与血浆黏度, 明显缩短凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血酶原时间 (APTT), 降低纤维蛋白原 (FIB) 水平、

显著升高纤溶酶原激活物 (t-PA), 降低纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1) 水平及炎症因子白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 其中, 醋莪术效果更为明显。生、醋莪术均可不同程度地改善大鼠肝纤维化程度, 降低血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBiL)、透明质酸 (HA)、层黏连蛋白 (LN) 水平, 降低肝组织中羟脯氨酸 (Hyp)、丙二醛 (MDA) 水平, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 其中, 醋制莪术疗效明显优于生莪术, 且高剂量组效果较优。生、醋莪术均能不同程度减轻大鼠肝细胞坏死程度, 降低炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达水平, 降低炎症反应, 减轻脂肪变性, 减少纤维组织增生; 降低



血清 AST、ALT 和碱性磷酸酶 (AKP) 的表达水平;降低大鼠 III 型前胶原 (PC-III)、大鼠 IV 型胶原 (IV-C)、LN、HA、Hyp 的表达水平; Masson 染色和天狼猩红染色结果也显示,相比于生莪术给药组,醋莪术使肝组织中胶原表达减少;降低肝组织 MDA 水平,提高 SOD 活性,改善脂质过氧化,提示生、醋莪术均可不同程度改善大鼠免疫性肝纤维化,尤以高剂量醋莪术组效果更佳。生、醋莪术均可降低甲胎蛋白 (AFP)、AFP-L3、IL-17 水平,醋莪术比生莪术疗效明显,尤以高剂量醋莪术组疗效更佳。采用 MTT 法测定不同浓度生、醋莪术含药血清作用不同时间对 HSC-T6 增殖的影响,用流式细胞仪检测凋亡情况,结果显示,生、醋莪术含药血清均能抑制其增殖,且呈时效和量效关系;均促进 HSC-T6 细胞的凋亡,醋莪术含药血清高剂量组更

显著。采用 MTT 法测定不同浓度生、醋莪术含药血清作用不同时间对 HepG2 细胞增殖的影响,生、醋莪术含药血清均能抑制其增殖,且呈时效和量效关系;Western blotting 实验观察生、醋莪术含药血清对 HepG2 细胞蛋白激酶 (Akt) 蛋白、活化的蛋白激酶 (p-Akt) 蛋白的影响,均对 Akt 蛋白无明显作用,均明显降低 p-Akt 蛋白表达水平,醋莪术含药血清效果更佳<sup>[13]</sup>。

(2) 网络药理学分析<sup>[14]</sup>: 采用 Swiss Target Prediction 数据库预测生醋莪术饮片在气滞血瘀模型大鼠中入血成分的蛋白靶点。将预测所得的蛋白靶点导入 KEGG 数据库,得到与靶点相关的代谢途径,采用 Cytoscape 3.6.1 网络互作软件构建“成分-靶点-途径”网络关系预测图 (图 4),分析生、醋莪术饮片物质基础与活血化瘀作用的内在联系。

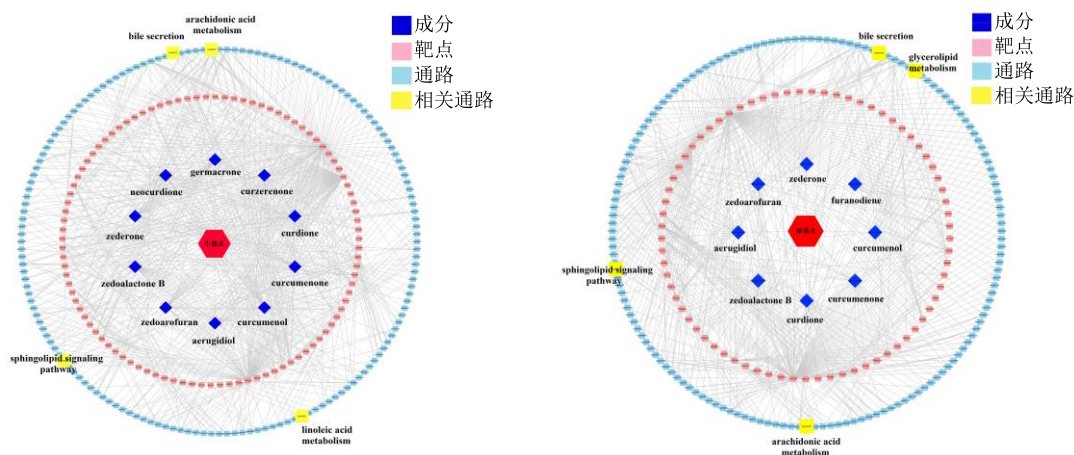


图 4 生、醋莪术饮片的入血成分-靶点-途径网络预测图

Fig. 4 Blood component-target-pathway network prediction map of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma*

结果表明,生莪术 10 个入血成分(包括吉马酮、莪术二酮、莪术呋喃烯酮、莪术双环烯酮、莪术烯醇、新莪术二酮、aerugidiol、zedoarofuran、zedoalactone B、zederone)共预测得到 80 个蛋白靶点,162 条相关代谢途径,其中亚油酸代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢及胆汁分泌经实验验证及文献参考与活血化瘀作用密切相关;醋莪术 8 个入血成分(包括呋喃二烯、莪术二酮、莪术烯醇、莪术双环烯酮、zedoalactone B、zederone、zedoarofuran、aerugidiol)共预测得到 74 个蛋白靶点,154 条相关代谢途径,其中鞘脂代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢及胆汁分泌经实验验证及文献参考与活血化瘀作用密切相关。

(3) 生、醋莪术饮片活血化瘀作用的代谢组学

研究<sup>[14]</sup>: 课题组采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术结合多元统计分析方法,以模型动物整体小分子内源性代谢物为研究对象,比较生、醋莪术饮片水煎液对气滞血瘀模型大鼠内源性代谢物及代谢通路的影响。结果 (图 5) 表明,与模型组相比,生莪术可显著回调 45 个血瘀导致异常的内源性代谢物,涉及代谢通路主要有甘油磷脂代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢、原发性胆汁酸生物合成等脂质类相关代谢通路;醋莪术显著回调 50 个血瘀导致异常的内源性代谢物,涉及主要代谢通路除上述甘油磷脂代谢等通路以外,还对色氨酸代谢通路具有显著调控作用。从代谢组学的角度初步阐释了莪术醋制增强活血化瘀作用的机制。

(4) 生、醋莪术饮片抗肝纤维化机制研究<sup>[15]</sup>:

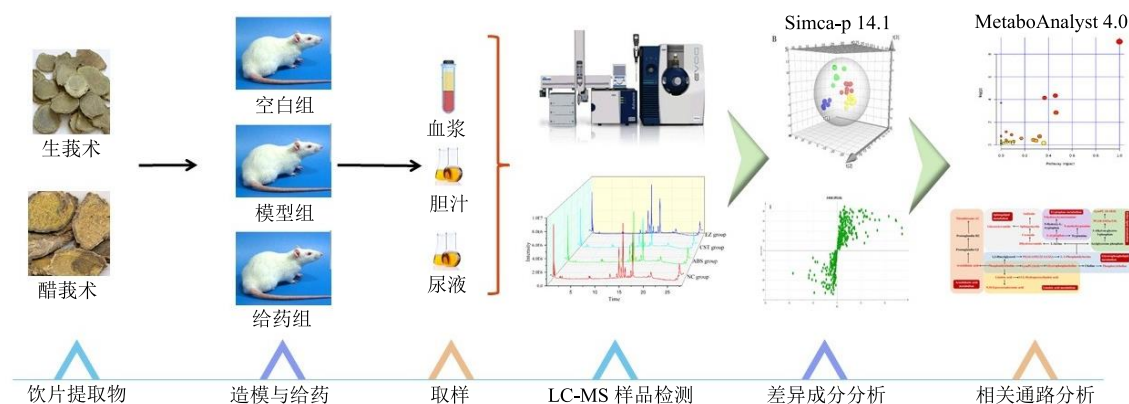


图 5 生、醋莪术饮片对活血化痰作用的代谢组学研究

Fig. 5 Metabolomics study on effect of promoting circulation and removing stasis of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcuma Rhizoma*

课题组基于转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) /Smad 信号通路及细胞外基质 (ECM) 降解酶系统调控作用研究生、醋莪术抗肝纤维化作用机制。采用免疫荧光染色法、real-time PCR 和 Western blotting 法检测各组大鼠 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路中 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ RI、TGF- $\beta$ RII、Smad2、Smad3、Smad7 的表达情况及 ECM 降解酶系统中纤溶酶原激活物抑制因子-1 (PAI-1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、1-型金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP-1) 的表达情况。结果显示, 各给药组均不同程度抑制 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ RI、TGF- $\beta$ RII、Smad2、Smad3 的表达, 增加 Smad7 的表达, 且醋莪术高剂量组更显著; 莪术经醋制后, 能够降低肝组织中 PAI-1、TIMP-1 的表达水平, 提高 MMP-2 表达水平, HSC-T6 中 PAI-1、MMP-2、TIMP-1 的表达情况与肝组织中一致。提示莪术抗肝纤维化的作用机制可能与抑制肝星状细胞的增殖、促进 HSC-T6 细胞的凋亡、减少胶原等细胞外基质的生成同时提高抗氧化活性, 减少 TGF- $\beta$ 1 的生成, 并且能够抑制其受体的表达, 同时能够调控其作用

底物 Smads 的表达, 阻断 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的传导; 莪术经醋制后能够增强 PAI-1 的调控作用, 减少了其对纤溶酶的抑制作用; 使得 MMP-2 被激活; 同时减少 TIMP-1 的表达, 减少其对 MMP-2 的抑制作用; 调节 MMP-2/TIMP-1 的水平, 维持 ECM 在生成与降解之间的平衡, 从而达到醋制增强抗肝纤维化的作用。

### 2.3.2 基于与归经相关的质量标志物的发现及确定

(1) 双位点微透析技术比较生、醋莪术饮片药动学差异: 课题组研究建立了血液、肝脏双位点同步微透析系统, 以莪术二酮、莪术醇为对象, 采用 RRLLC-MS 技术测其血药浓度, 运用 WinNonlin 软件按非房室模型计算药动学参数, 从效应成分的药动学角度推测莪术醋制入肝的机制。药动学结果(图 6) 显示, 大鼠 ig 给予生莪术饮片后莪术二酮的肝组织分布率 ( $AUC_{肝}/AUC_{血}$ ) 为  $0.37 \pm 0.08$ , 莪术醇的肝组织分布率为  $0.85 \pm 0.11$ , 大鼠 ig 给予醋莪术后莪术二酮的肝组织分布率为  $0.55 \pm 0.09$ , 莪术醇的肝组织分布率为  $0.86 \pm 0.09$ , 生、醋莪术组相

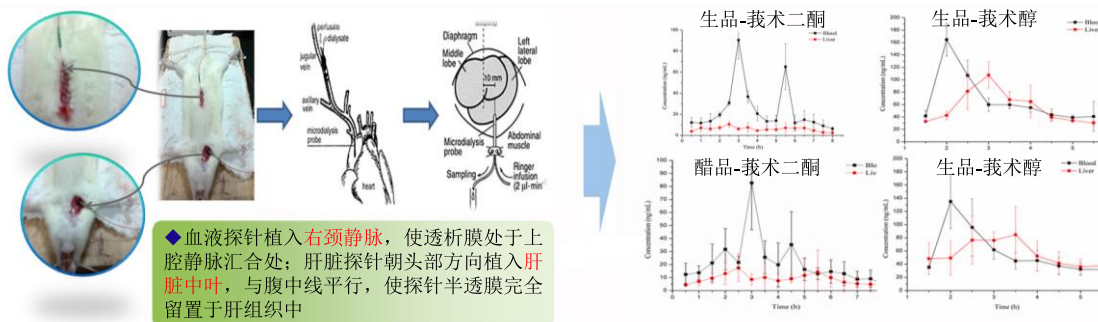


图 6 双位点微透析技术比较生醋莪术饮片中莪术醇、莪术二酮的药动学差异

Fig. 6 Comparison of pharmacokinetics of curcumol and curdione in steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcuma Rhizoma* by two-site microdialysis technique

比, 莪术二酮的肝组织分布率有明显提高 ( $P < 0.05$ ), 因此推测莪术醋制后可能促进了莪术二酮在肝组织中的分布效应<sup>[16]</sup>。

(2) 荧光成像法追踪莪术醇体内代谢过程<sup>[17]</sup>: 课题组应用荧光成像技术对莪术醇在裸鼠体内的吸收代谢过程进行可视化跟踪。结果 (图 7) 发现莪术醇注射入裸鼠体内后, 荧光立即分布于全身, 5

min 后膀胱处即有显著的荧光富集, 且强度高于其余组织, 莪术醇在体内呈现明显的肾排泄特点。裸鼠肺组织、脑组织有明显的荧光强度, 其代谢速率慢于心脏, 肝脏由于表面积较大, 其平均荧光强度稍弱, 但总荧光光子数最高。莪术醇的体内过程在一定程度上与莪术的归经特点及足厥阴肝经的循行特点相吻合。

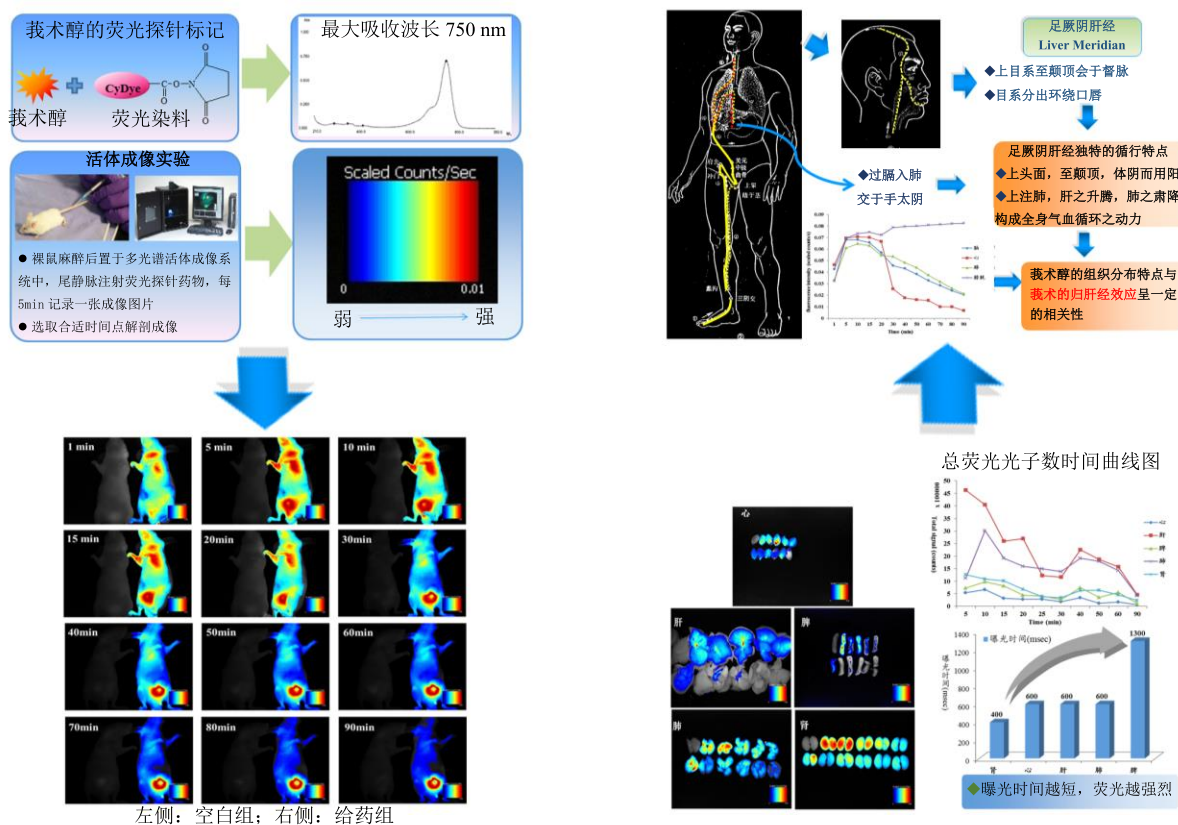


图 7 莪术醇体内示踪检测研究

Fig. 7 *In vivo* tracer detection of curcumol

### 3 基于饮片质量标志物的莪术饮片质量标准的建立<sup>[18]</sup>

#### 3.1 多质量标志物成分含量测定方法的建立

根据生醋莪术饮片化学物质组研究, 莪术主要的生物活性成分包括以莪术二酮、莪术醇、吉马酮、呋喃二烯和  $\beta$ -榄香烯等为代表的倍半萜类成分, 醋制前后这 5 个主要药效成分含量发生了显著变化。 $\beta$ -榄香烯、莪术醇和呋喃二烯在抗肿瘤方面研究较多, 为主要有效成分。莪术二酮除抗肿瘤外, 还具有镇痛抗炎、抗血栓的药理作用。上述 5 种萜类成分是莪术药材、饮片、莪术油及莪术复方制剂中研究较多的成分, 也是主要有效成分。当前莪术药动学研究也主要集中于以上几种成分。本研究通过药效学、归经、药动学及其物质基础的相关性分析,

初步确定莪术二酮、莪术醇、吉马酮、呋喃二烯及  $\beta$ -榄香烯 5 个成分为质量标志物, 建立多质量标志物成分定量测定方法。

UPLC 多质量标志物成分含量测定 采用 UPLC 法建立了同时测定莪术二酮、莪术醇、吉马酮、呋喃二烯及  $\beta$ -榄香烯 5 个成分的测定方法, 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、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, 色谱图见图 8。

对收集的生、醋莪术饮片各 10 批中 5 个成分进行了含量测定及比较, 结果表明, 各成分在不同炮制品之间差异较大。5 个成分含量经醋炙后均有不同程度的降低, 结果见图 8 和表 1。



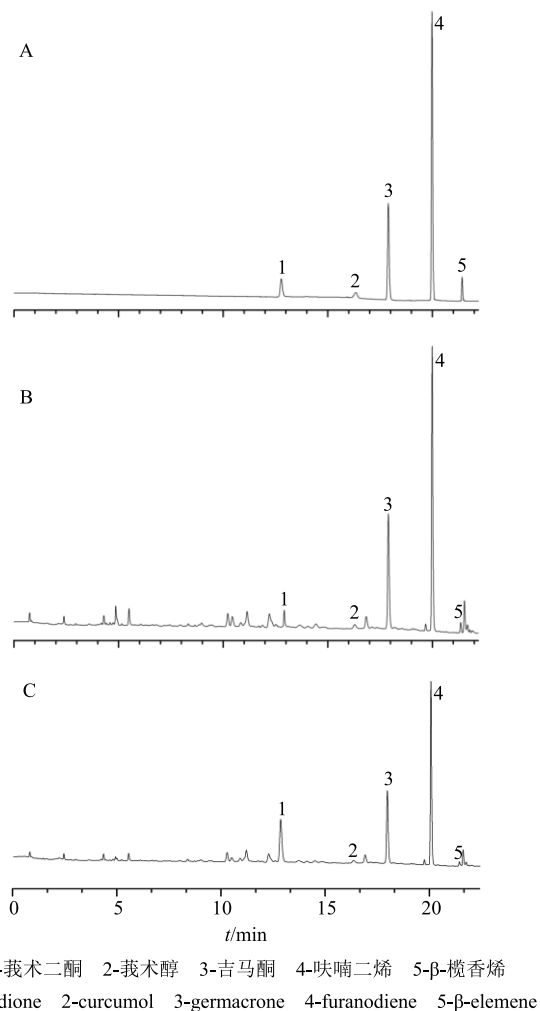


图 8 混合对照品 (A) 和生莪术样品 (B) 和醋莪术样品 (C) 的 UPLC 图  
Fig. 8 UPLC of reference substances (A), steamed pieces of *Curcumae Rhizoma* (B), and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma* (C)

表 1 生、醋莪术中 5 种化学成分在 10 批饮片中的平均含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 Average content of five compounds in 10 batches of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma* ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 样品  | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |             |             |             |             |
|-----|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|     | 姜烯二酮                       | 姜烯醇         | 姜酮          | 呋喃二烯        | 榄香烯         |
| 生莪术 | 9.43 ± 1.72                | 2.02 ± 0.37 | 3.13 ± 0.71 | 8.81 ± 2.33 | 3.07 ± 0.72 |
| 醋莪术 | 7.99 ± 1.21                | 1.66 ± 0.22 | 2.68 ± 0.46 | 7.03 ± 1.35 | 2.02 ± 0.51 |

3.2 UPLC 指纹图谱的建立

采用 UPLC 法构建生、醋莪术饮片指纹图谱，利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012.130723 版) 对生醋莪术饮片各 10 批进行色谱峰匹配及相似度评价，使用 Simca-P14.1 软件进行

主成分分析 (PCA)、OPLS-DA 建模分析。结果表明，生、醋莪术饮片相似度均大于 0.9，表明样品一致性良好。共匹配得到 23 个共有峰，生、醋莪术饮片共有模式见图 9，10 批生、醋莪术饮片 UPLC 指纹图谱叠加图见图 10。PCA、OPLS-DA 建模结果均表明，生、醋莪术指纹图谱存在显著差异 (图 11)。

4 讨论

本研究以饮片质量标志物的概念及核心要素为着眼点，对莪术饮片的物质基础进行了详细研究及差异分析，采用多种病症动物模型及细胞模型对生醋莪术饮片的药效进行比较研究，并采用代谢组学、信号通路等机制研究方法深入探索了莪术醋制增效的作用机制，采用双位点微透析技术，荧光示踪检

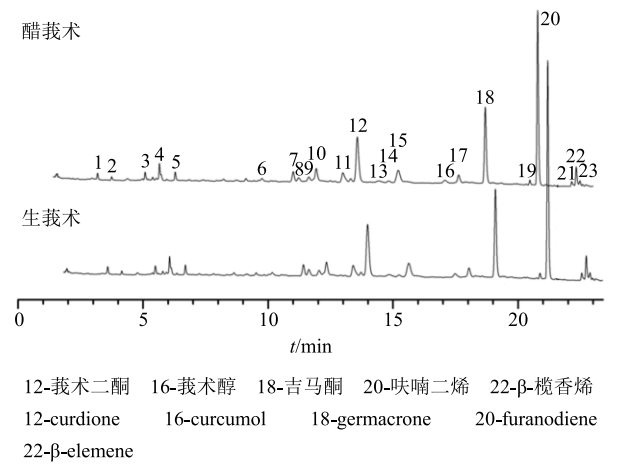


图 9 生、醋莪术 UPLC 指纹图谱共有模式  
Fig. 9 UPLC fingerprint common pattern of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma*

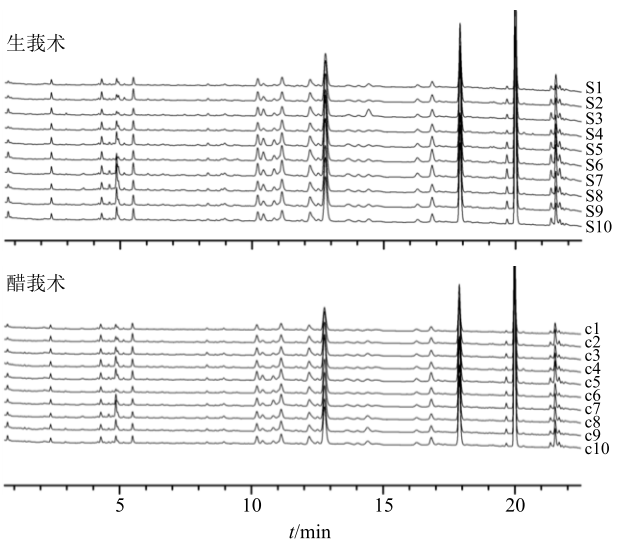


图 10 10 批生、醋莪术饮片 UPLC 指纹图谱叠加图  
Fig. 10 UPLC fingerprint of 10 batches of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcumae Rhizoma*

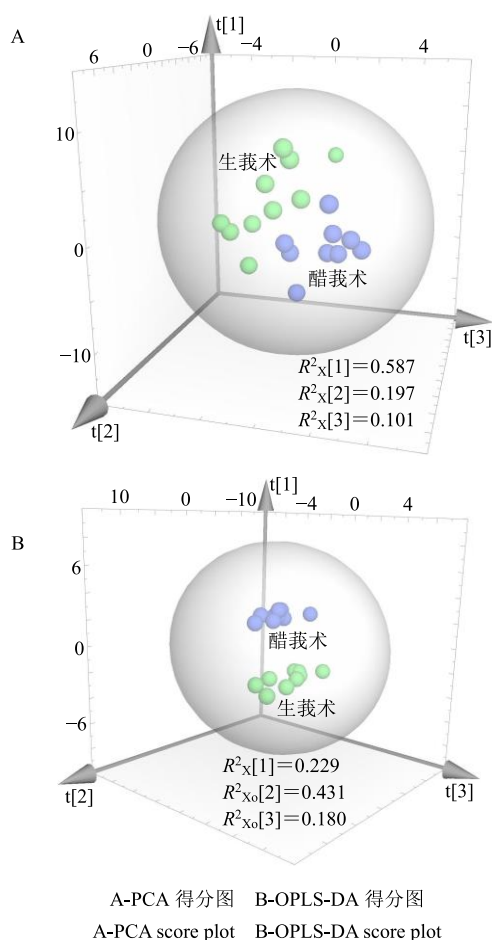


图 11 生、醋莪术饮片 UPLC 指纹图谱 PCA、OPLS-DA 得分图

Fig. 11 PCA and OPLS-DA score plot of UPLC fingerprint of steamed pieces and vinegar-processed pieces of *Curcuma Rhizoma*

测比较生醋莪术饮片主要活性成分的药动学差异，通过以上大量基础研究并结合成分的可测性综合考虑，最终确定以莪术二酮、莪术醇、吉马酮、呋喃二烯、 $\beta$ -榄香烯 5 个成分作为生、醋莪术饮片的 Q-marker，采用 UPLC 建立了 5 种成分的含量测定方法及指纹图谱，为饮片质量标志物的研究提供示范。

#### 参考文献

- [1] 郝敏, 陆兔林, 毛春琴, 等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1699-1708.
- [2] 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.
- [3] Liu C, Guo D A, Liu L. Quality transitivity and

traceability system of herbal medicine products based on quality markers [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 247-257.

- [4] 张永生, 张光霁. 发展中医药必须坚持自身特色 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(8): 3335-3338.
- [5] Zhang T, Bai G, Han Y, *et al.* The method of quality marker research and quality evaluation of traditional Chinese medicine based on drug properties and effect characteristics [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 204-211.
- [6] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 陈晓军, 韦洁, 苏华, 等. 莪术药理作用的研究新进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(11): 664-668.
- [9] 张季, 宋熾, 王巧晗, 等. 生、醋莪术对大鼠免疫性肝纤维化及 HSC-T6 增殖和  $\alpha$ -SMA, Procollagen I 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2538-2545.
- [10] 姜国非, 陆兔林, 毛春芹, 等. 不同产地醋莪术饮片中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和  $\beta$ -榄香烯含量的比较 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2834-2837.
- [11] 郝敏. 温郁金不同炮制品活血化瘀效应物质基础及作用机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [12] Hao M, Ji D, Li L, *et al.* Metabolic profiling analysis of three processed rhizomes of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen *et al.* Ling by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Pharmacogn Mag*, 2019, 15(60): 164-171.
- [13] 袁雪芳. 生、醋莪术对大鼠原发性肝癌模型的治疗作用及对 HepG2 的抑制增殖作用研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [14] Hao M, Ji D, Li L, *et al.* Mechanism of *Curcuma Wenyujin Rhizoma* on acute blood stasis in rats based on a UPLC-Q/TOF-MS metabolomics and network approach [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 82.
- [15] 张季. 基于 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的莪术醋制增强抗肝纤维化效应机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [16] Li J, Mao C, Li L, *et al.* Pharmacokinetics and liver distribution study of unbound curdione and curcumol in rats by microdialysis coupled with rapid resolution liquid chromatography (RRLC) and tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 95: 146-150.
- [17] 李金慈. 基于微透析及荧光成像技术的莪术醋制入肝效应机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [18] 郝敏, 陆兔林, 毛春芹, 等. 3 种温郁金根茎炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2288-2294.