

连翘砵溶液不同储存条件下主要活性成分变化研究

叶 羊¹, 张晓喻¹, 杜 娟², 薛艾莲¹, 杨 梅¹, 谢 洁^{1*}, 袁学刚^{3*}, 杨向东⁴

1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

2. 四川师范大学地理与资源科学学院, 四川 成都 610101

3. 四川洲际肛肠肛门病医院, 四川 成都 610000

4. 成都肛肠专科医院, 四川 成都 610015

摘要: **目的** 考察连翘砵溶液在不同储存条件下其所含主要活性成分的含量变化情况, 为连翘砵溶液的应用及质量提升提供参考。 **方法** 采用 Eclipse Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 238 nm, 柱温 25 °C。建立连翘砵溶液化学成分指纹图谱分析方法, 用于测定分析其在密封及非密封储存条件下主要活性成分随时间的变化情况。 **结果** 所建立并采用的连翘砵溶液 HPLC 指纹图谱的精密性、稳定性、重复性和加样回收率均符合要求, 可用于连翘砵溶液化学成分的分析。2 种储存条件下不同时间点的样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度值均大于 0.95; 利用外标指认法及光谱特征分析共指认出连翘砵溶液中的 9 种活性成分, 其中的生物碱类物质 (包括非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱) 在 2 种储存条件下均无显著变化, 但环烯醚萜类化合物京尼平龙胆双糖苷和梔子苷含量显著降低, 京尼平含量在前 3 个月增加但超过 3 个月后其含量有所降低。推测京尼平龙胆双糖苷及梔子苷能被溶液中的酶转化为京尼平, 而京尼平也可能被微生物产生的其他酶所降解。 **结论** 连翘砵溶液在 6 个月的储存时间内, 仍然存在成分的转化, 这可能与储存过程中相关酶的作用有关。为提高每批次产品的质量一致性, 建议可采用新的终点判断方法并在发酵炮制结束后对其采取酶的灭活和灭菌处理。

关键词: 连翘砵溶液; 储存; 生物碱; 环烯醚萜; HPLC; 非洲防己碱; 表小檗碱; 盐酸药根碱; 盐酸黄连碱; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱; 京尼平龙胆双糖苷; 梔子苷; 京尼平

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5745-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.015

Study on changes of active components in Lianzhifan solution under different storage conditions

YE Yang¹, ZHANG Xiao-yu¹, DU Juan², XUE Ai-lian¹, YANG-Mei¹, XIE Jie¹, YUAN Xue-gang³,
YANG Xiang-dong⁴

1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

2. College of Geography and Resource Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

3. Intercontinental Hospital of Proctology and Gastroenterology, Chengdu 610000, China

4. Chengdu Anorectal Hospital, Chengdu 610015, China

Abstract: Objective To study on changes of active components in Lianzhifan solution (LZF) under different storage conditions, which may provide a reference for the application and quality improvement of the LZF. **Methods** HPLC analysis was performed on Eclipse Agilent C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The gradient elution was performed by the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous with the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 238 nm, and the column temperature was 25 °C. A fingerprint analysis method for the chemical composition of LZF was established to analyze the change of main active components with time under sealed and unsealed storage conditions. **Results** The precision, stability,

收稿日期: 2019-07-05

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究计划项目 (2017JY0345); 四川省中医药科学技术研究专项 (2016Q075)

作者简介: 叶 羊 (1994—), 女, 在读硕士研究生, 专业方向为微生物学。Tel: 18280107653 E-mail: yeyang2019@126.com

*通信作者 谢 洁 Tel: 13880757684 E-mail: xiejaye@163.com

袁学刚 Tel: 13880484566 E-mail: 14472543@qq.com

repeatability and sample recovery of the HPLC fingerprint of LZF were all in accordance with the requirements, and can be used for the analysis of the chemical constituents of LZF. The similarity values of sample fingerprints and control fingerprints at different time points under both storage conditions were greater than 0.95; The nine chemical components in LZF were identified by using the external labeling method and spectral characteristic analysis. The content of alkaloids (columbamine, epiberberine, jatrorrhizine chloride, coptisine chloride, palmatine chloride, and berberine) did not change significantly under the two storage conditions. However, the content of the iridoids, genipin-1- β -D-gentiobioside and geniposide was significantly reduced, and the content of genipin was increased in the first 3 months but decreased after 3 months. It is speculated that genipin-1- β -D-gentiobioside and geniposide can be converted to genipin by the enzyme in solution, and genipin may be degraded by other enzymes produced by microorganisms. **Conclusion** During the six-month storage period, LZF still has a convert tendency, which may be caused by the action of enzymes produced by microbes. In order to improve the quality consistency of LZF product, it is recommended to adopt more scientific method to judge the endpoint and it is better to inactivate enzyme and sterilize after the end of the fermentation processing.

Key words: Lianzhifan solution; storage; alkaloids; iridoids; HPLC; columbamine; epiberberine; jatrorrhizine chloride; coptisine chloride; palmatine chloride; berberine; genipin-1- β -D-gentiobioside; geniposide; genipin

连翘砒溶液（国药准字 Z20080191）为成都肛肠专科医院的医院效验制剂，是我国著名中医肛肠病学专家黄济川先生的临床效验方^[1]，由黄连、枳实和白矾制备而成，临床上常用于肛漏^[2]、肛门尖锐湿疣^[3]、肛门坠胀^[4]、肛周脓肿^[5]以及慢性溃疡性直肠炎^[6-7]等肛肠科疾病的预防与治疗，疗效显著。其中黄连的主要活性成分如表小檗碱、小檗碱和黄连碱等生物碱类化合物^[8-9]和枳实的主要活性成分如枳实苷、京尼平龙胆双糖苷等环烯醚萜苷类化合物^[10-11]均具有抗菌、抗肿瘤和抗炎等多种药理活性作用^[12-13]，是连翘砒溶液中的主要活性成分。

从现代生物技术的角度来看，连翘砒溶液的制备属于自然条件下的多菌种混合发酵。前期研究已证实在连翘砒溶液发酵炮制过程中真菌的丰富度和多样性较高，且随发酵时间的增加逐渐增加^[14]，发酵后期青霉属和曲霉属的丰富度较高。微生物生长代谢产生的酶能对发酵底物中的化学成分进行生物转化，从而使其成分发生变化^[15-17]，如 β -葡萄糖苷酶。然而连翘砒溶液发酵炮制结束后，仅对其进行了简单的密封装瓶，未对其进行酶的灭活和灭菌处理，溶液中势必还残留相应的微生物和酶。根据 Zhou 等^[18]和杨胜远等^[19]的研究发现部分 β -葡萄糖苷酶等在 4 °C 储存条件下酶活几乎保持不变。按照连翘砒溶液的临床用药方法，在保留灌肠的使用过程中，患者每次的用量为 10 mL，1 瓶药液（100 mL）可分多次使用。所以在患者日常使用过程以及储存过程中，连翘砒溶液中的主要活性成分是否会发生变化，呈现怎样的变化规律值得深入研究。

因此，本研究拟采用 HPLC 指纹图谱法，对连翘砒溶液在无氧及通氧储存过程中的生物碱和环烯醚萜苷类化合物进行监测，以揭示其在产品仓储和

患者日常使用过程中化学成分的变化规律。实验结果可为研究连翘砒溶液发酵结束后化学成分变化提供理论依据，为提高其产品一致性提供数据参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

连翘砒溶液（瓶装，批号 20181002）由四川省成都肛肠专科医院提供。对照品京尼平龙胆双糖苷（批号 18051408）和盐酸药根碱（批号 16041203）均购于成都普菲德生物技术有限公司；对照品枳实苷（批号 Z-003-170222）、京尼平（批号 J-028-171216）、非洲防己碱（批号 F-029-180929）、表小檗碱（批号 B-064-170818）、盐酸黄连碱（批号 Y-024-171216）、盐酸巴马汀（批号 Y-156-170227）和盐酸小檗碱（批号 Y-035-160107）均购于成都瑞芬思生物科技有限公司；以上对照品经 HPLC 检测，质量分数均 $\geq 98\%$ ；色谱纯乙腈、甲醇和磷酸均购于成都硕博研创科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；ESJ220-4B 电子天平，0.1 mg，沈阳龙腾电子有限公司；HKC-40A 超声波清洗机，天津欧诺仪器股份有限公司；Direct-Q 超纯水仪，美国 Millipore 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Eclipse Agilent C₁₈ 柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μ m）；流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈；梯度洗脱：0~8 min，5%~15% 乙腈；8~15 min，15%~18% 乙腈；15~20 min，18%~20% 乙腈；20~30 min，20%~25% 乙腈；30~50 min，25%~25% 乙腈^[20]；检测波长为 238 nm；体积流量 1.0 mL/min；

柱温 25 °C，进样量 10 μ L。

2.2 混合对照品溶液制备

精密称取京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱等对照品适量，置于容量瓶中，加甲醇超声溶解并稀释定容，制成质量浓度分别为 0.18、0.18、0.20、0.20、0.30、0.18、0.30、0.30、0.30 mg/mL 的混合对照品溶液，用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后，按“2.1”项色谱条件进样测定。

2.3 供试品溶液制备

连翘溶液瓶装样品分为 2 组，A 组揭去瓶口粘合的薄膜垫片，带盖置于 4 °C 冰箱保存，以模拟患者日常使用过程中非密封状态的储存条件；B 组直接带盖置于 4 °C 冰箱保存，以模拟医院制剂工厂仓储过程中密封状态的储存条件。以上分组分别在储存第 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0 个月（A1~A10、B1~B10）取样 100 μ L，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇-盐酸（100:1）溶液超声溶解并稀释定容，经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后，按“2.1”项色谱条件进样分析。

2.4 精密度考察

取同一瓶连翘溶液（A1），按“2.3”项下方法进行供试品溶液制备，并按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录指纹图谱，以盐酸小檗碱主峰（9 号峰）为参照，各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明方法精密度良好。

2.5 稳定性考察

取精密度试验项下同一供试品溶液（A1），按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、10、24、48 h 进样测定，记录指纹图谱，以盐酸小檗碱主峰（9 号峰）为参照，各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.6 重复性考察

取同一批次连翘溶液（A1），按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件测定，记录指纹图谱，以盐酸小檗碱主峰（9 号峰）为参照，各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.7 指纹图谱建立与相似度评价

取 2 种储存条件下不同储存时间的连翘溶液样品（A1~A10、B1~B10），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进样测

定，得到 HPLC 指纹图谱（图 1）。将指纹图谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”，分别以 A1、B1 为参照图谱，时间窗宽度为 0.5 ms，采用多点校正后进行自动匹配。将不同储存时间点的连翘溶液样品与对照指纹图谱匹配，进行相似度评价，结果见表 1、2。

由结果可知，在 2 种储存过程中连翘溶液均存在成分的转化，使储存前期和后期样品的相似度有一定差异，但整体与对照指纹图谱间的相似度均大于 0.95，具有较好一致性。

2.8 连翘溶液中主要色谱峰的化学指认

根据已有文献报道^[9-10]，采用对照品外标指认法结合光谱特征对连翘溶液中的主要化学成分进行指认，共指认出 9 个色谱峰，分别是 1-京尼平龙胆双糖苷、2-栀子苷、3-京尼平、4-非洲防己碱、5-表小檗碱、6-盐酸药根碱、7-盐酸黄连碱、8-盐酸巴马汀和 9-盐酸小檗碱（图 2）。其中，非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱均属于生物碱类化合物；京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平属于环烯醚萜类化合物。

由图 2-c 可看出，连翘溶液非密封状态储存 6 个月后，京尼平龙胆双糖苷和栀子苷色谱峰消失，京尼平色谱峰峰面积增加，其他化合物无显著变化。

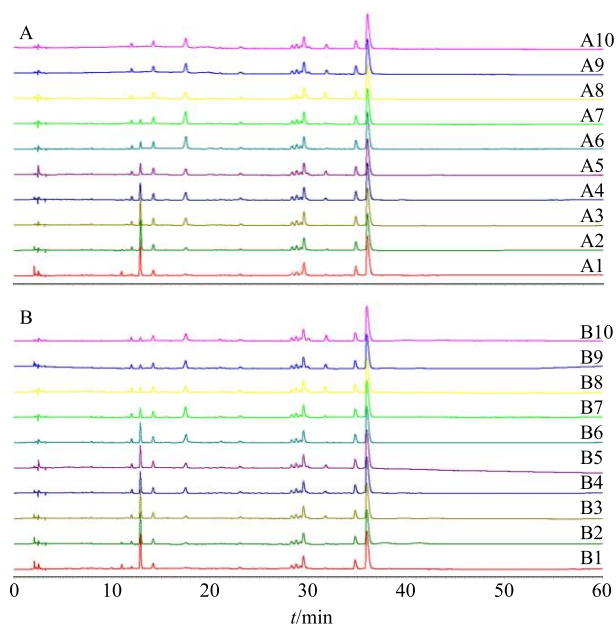


图 1 连翘溶液非密封（A1~A10）和密封（B1~B10）储存不同时间点的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of LZF at different storage time points under unsealed (A1—A10) and sealed (B1—B10) storage

表 1 连翘溶液非密封储存条件下不同时间点的相似度分析

Table 1 Similarity analysis of different time points under unsealed storage of LZF

样品	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	对照
A1	1.000	0.996	0.979	0.963	0.950	0.915	0.907	0.905	0.904	0.904	0.958
A2	0.996	1.000	0.991	0.978	0.966	0.940	0.933	0.923	0.927	0.927	0.974
A3	0.979	0.991	1.000	0.995	0.982	0.974	0.969	0.953	0.959	0.959	0.992
A4	0.963	0.978	0.995	1.000	0.991	0.986	0.983	0.976	0.978	0.978	0.998
A5	0.950	0.966	0.982	0.991	1.000	0.984	0.982	0.987	0.987	0.987	0.996
A6	0.915	0.940	0.974	0.986	0.984	1.000	0.999	0.978	0.989	0.989	0.990
A7	0.907	0.933	0.969	0.983	0.982	0.999	1.000	0.982	0.990	0.990	0.987
A8	0.905	0.923	0.953	0.976	0.987	0.978	0.982	1.000	0.992	0.992	0.983
A9	0.904	0.927	0.959	0.978	0.987	0.989	0.990	0.992	1.000	1.000	0.986
A10	0.904	0.927	0.959	0.978	0.987	0.989	0.990	0.992	1.000	1.000	0.986
对照	0.958	0.974	0.992	0.998	0.996	0.990	0.987	0.983	0.986	0.986	1.000

表 2 连翘溶液密封储存条件下不同时间点的相似度分析

Table 2 Similarity analysis of different time points under sealed storage of LZF

样品	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	对照
B1	1.000	1.000	0.998	0.991	0.989	0.989	0.965	0.948	0.947	0.946	0.986
B2	1.000	1.000	0.999	0.990	0.989	0.989	0.963	0.948	0.945	0.944	0.986
B3	0.998	0.999	1.000	0.994	0.995	0.995	0.974	0.963	0.960	0.959	0.992
B4	0.991	0.990	0.994	1.000	0.998	0.999	0.991	0.979	0.980	0.979	0.999
B5	0.989	0.989	0.995	0.998	1.000	1.000	0.990	0.984	0.982	0.981	0.999
B6	0.989	0.989	0.995	0.999	1.000	1.000	0.992	0.984	0.983	0.983	1.000
B7	0.965	0.963	0.974	0.991	0.990	0.992	1.000	0.995	0.998	0.997	0.994
B8	0.948	0.948	0.963	0.979	0.984	0.984	0.995	1.000	0.998	0.998	0.987
B9	0.947	0.945	0.960	0.980	0.982	0.983	0.998	0.998	1.000	1.000	0.987
B10	0.946	0.944	0.959	0.979	0.981	0.983	0.997	0.998	1.000	1.000	0.986
对照	0.986	0.986	0.992	0.999	0.999	1.000	0.994	0.987	0.987	0.986	1.000

由图 2-d 可看出,连翘溶液密封状态储存 6 个月,除连翘苷色谱峰未见消失外,其他变化与非密封状态化学成分变化类似。综合来看,京尼平应由京尼平龙胆双糖苷和连翘苷代谢产生。

2.9 连翘溶液中 9 种成分的定量测定

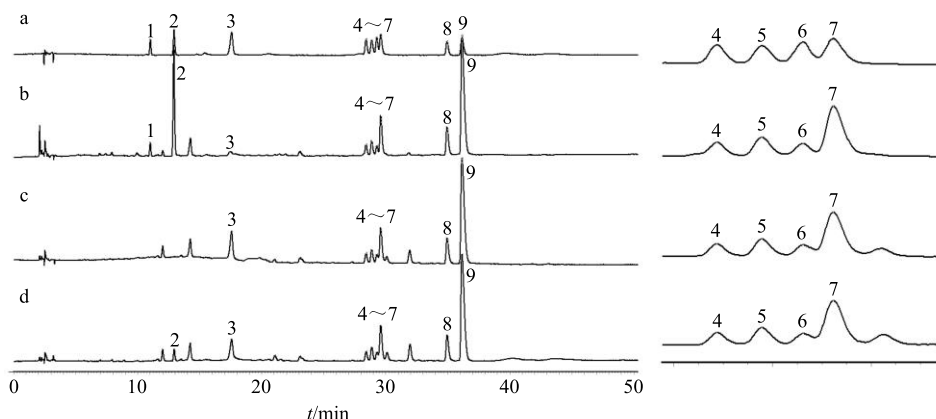
2.9.1 线性关系考察

分别精密称取京尼平龙胆双糖苷、连翘苷、京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品各 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解并稀释定容,制成质量浓度分别为 0.5 mg/mL 的对照品母液,再按等比稀释法稀释成质量浓度为 50.0、25.0、12.5、2.5、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品梯度稀释液。分别将梯度稀释液用 0.22 μm 的滤膜滤过,并按照“2.1”项下色谱条件进样,以不同对照品的进样质量浓度为横坐标 (X)、所对应的

峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归,得回归方程:京尼平龙胆双糖苷 $Y=7.899 X+5.65$, $r^2=0.999 6$;连翘苷 $Y=14.58 X+9.79$, $r^2=0.999 2$;京尼平 $Y=23.929 X+16.349$, $r^2=0.999 0$;非洲防己碱 $Y=13.125 X+0.372$, $r^2=0.999 5$;表小檗碱 $Y=13.348 X-6.872$, $r^2=0.997 1$;药根碱 $Y=11.666 X+9.162$, $r^2=0.999 0$;黄连碱 $Y=30.199 X-42.221$, $r^2=0.996 3$;巴马汀 $Y=14.051 X+8.054$, $r^2=0.999 3$;小檗碱 $Y=20.036 X+11.334$, $r^2=0.999 2$;表明各对照品在 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内与峰面积线性关系良好,可用于定量分析。

2.9.2 精密度考察

取同一瓶连翘溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算各组分的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果京尼平龙胆双糖苷、连翘苷、



1-京尼平龙胆双糖苷 2-栀子苷 3-京尼平 4-非洲防己碱 5-表小檗碱 6-盐酸药根碱 7-盐酸黄连碱 8-盐酸巴马汀 9-盐酸小檗碱
1-genipin-1- β -D-gentiobioside 2-geniposide 3-genipin 4-columbamine 5-epiberberine 6-jatrorrhizine chloride 7-coptisine chloride
8-palmatine chloride 9-berberine

图 2 混合对照品 (a)、连翘矾溶液储存前 (b) 和非密封储存 6 个月后 (A10, c)、密封储存 6 个月后 (B10, d) 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of mixed control (a), before storage of LZF (b) and after 6 months of unsealed storage (A10, c), and 6 months after sealed storage (B10, d)

京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的相对保留时间 RSD 分别是 0.23%、0.26%、0.21%、0.32%、0.56%、0.96%、0.84%、0.25%、0.22%，相对峰面积 RSD 分别是 0.81%、0.86%、0.79%、1.01%、1.55%、2.57%、2.11%、0.88%、0.90%，表明仪器精密度良好。

2.9.3 稳定性考察 取精密度试验项下同一供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、10、24、48 h 进样测定，计算各组分的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的相对保留时间 RSD 分别是 0.21%、0.24%、0.26%、0.40%、0.46%、0.83%、0.75%、0.26%、0.20%，相对峰面积 RSD 分别是 1.23%、1.27%、1.19%、1.33%、1.53%、2.76%、2.50%、1.23%、1.28%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.9.4 重复性考察 取同一批次连翘矾溶液（批号 20181002），按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件测定，计算各组分的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的相对保留时间 RSD 分别是 0.27%、0.29%、0.24%、0.44%、0.51%、0.82%、0.71%、0.30%、0.33%，相对峰面积 RSD 分别是 1.78%、1.83%、

1.61%、1.93%、1.97%、2.40%、2.31%、1.66%、1.76%，表明该方法的重复性良好。

2.9.5 加样回收率考察 取重复性试验样品共 6 份，每份精密吸取 0.25 mL，加入一定体积的混合对照品溶液，按“2.3”项下方法操作，按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、京尼平、非洲防己碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的回收率分别是 98.34%、97.66%、98.77%、96.68%、97.15%、94.15%、95.11%、98.30%、98.28%，RSD 分别为 1.89%、1.91%、1.87%、2.00%、2.18%、2.81%、2.74%、1.92%、1.97%，表明方法加样回收率符合要求。

2.9.6 连翘矾溶液非密封储存过程中化学成分的含量变化 图 3 为连翘矾溶液非密封储存过程中各化学成分的含量变化。从图 3-a 可看出，在不同储存时间下连翘矾溶液中的环烯醚萜苷类成分含量变化显著。随着储存时间的增加，京尼平龙胆双糖苷的含量变化最快，储存初期含量为 0.176 mg/mL，储存 0.5 个月后便无法检出；栀子苷含量在储存初期为 1.142 mg/mL，在整个储存过程中也表现出持续的降低。储存前 3 个月，栀子苷含量持续降低，伴随着京尼平质量浓度的增加，最高约 0.4 mg/mL。但超过 3 个月储存后，京尼平质量浓度整体呈现降低的趋势，推测一方面京尼平龙胆双糖苷及栀子苷被溶液中的酶转化为京尼平，而京尼平也可能被

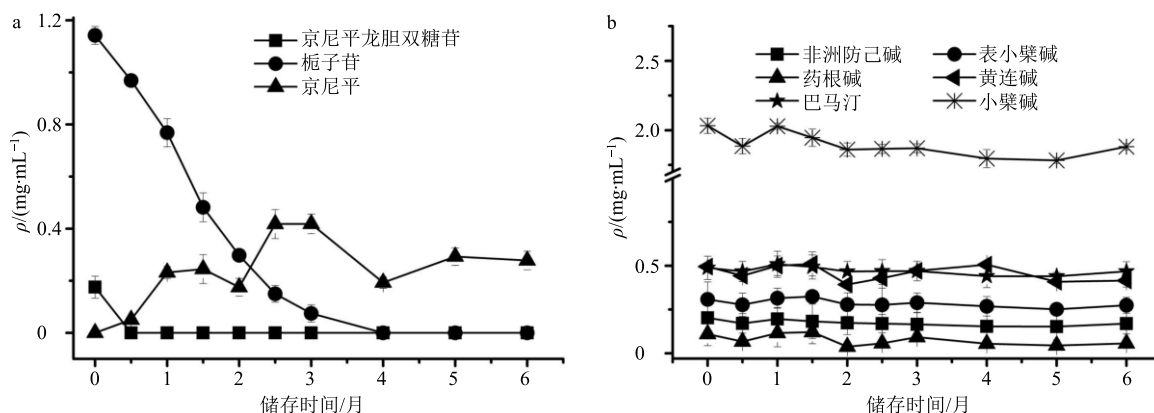


图 3 连翘砵溶液非密封储存过程中环烯醚萜苷类的含量 (a) 和生物碱含量 (b) 变化

Fig. 3 Changes in content of iridoids (a) and alkaloids (b) in process of LZF unsealed storage

微生物产生的其他酶所降解。

图 3-b 所示为连翘砵溶液非密封储存过程中生物碱类的含量变化趋势。由图可知, 连翘砵溶液非密封储存过程中各生物碱含量变化虽有一定的波动, 但总体而言并未发生显著的降低或增加, 意味着这几种生物碱未被溶液中的微生物转化。

2.9.7 连翘砵溶液密封储存过程中化学成分的含量变化 图 4 为连翘砵溶液密封储存过程中各化学成分的含量变化。从图 4-a 中可看出, 连翘砵溶液密封储存过程中环烯醚萜苷类成分含量变化与非密封储存下的结果类似, 但其中的京尼平龙胆双糖苷完全转化的时间比非密封状态下有所延长。在整个密封储存过程中, 栀子苷含量也表现出持续的降低, 但其完全转化时间也较非密封储存下有所延长, 到第 6 个月仍可检测到少量的栀子苷。相比于密封储存方法, 非密封储存下由于间断开盖取样, 造成了溶液与氧气接触的几率增加, 可能导致转化过程更加高效, 进而提高非密封状态下环烯醚萜类物质京尼平龙胆双糖苷和栀子苷的转化速率, 使其完全转

化时间有所缩短。同样的, 京尼平龙胆双糖苷和栀子苷含量下降的也伴随着京尼平含量的增加, 其变化趋势与非密封储存下的变化趋势基本一致, 即前 3 个月储存期其含量总体呈现增加的趋势, 储存 3 个月以后有所降低, 在第 3 个月储存期时含量约 0.4 mg/mL。密封状态下的连翘砵溶液生物碱类物质也基本保持不变。

3 讨论

本实验参考 Bian 等^[20]和熊婷婷等^[21]建立的 HPLC 指纹图谱法并做一定的修改, 旨在同时对连翘砵溶液中黄连和栀子的化学成分进行分离并检测其在储存过程中的含量变化。分析结果显示, 密封和非密封条件下连翘砵溶液储存后的主要峰群的整体化学轮廓相比储存前均有所变化, 整个系统中可能存在成分之间的相互转化, 导致了某些成分的含量减少, 并伴随着其他成分的含量增加。总体来看, 2 种储存状态下生物碱含量基本保持不变, 其变化主要表现在环烯醚萜类化合物京尼平龙胆双糖苷和栀子苷 2 种糖苷含量降低以及京尼平含量的增加。

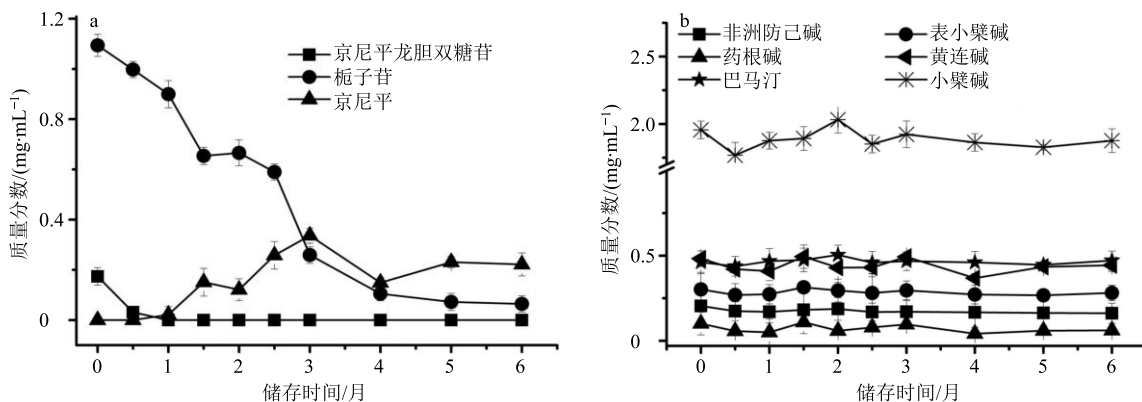


图 4 连翘砵溶液密封储存过程中环烯醚萜苷类的含量 (a) 和生物碱含量 (b) 变化

Fig. 4 Changes in content of iridoids (a) and alkaloids (b) in process of LZS sealed storage

非密封储存状态下,可能由于增加了溶液与氧气接触的几率,使其溶液中溶解氧的量增加,加强了溶液中微生物或代谢物的催化活动,从而导致环烯醚萜类化合物的转化速率比密封储存状态下快。环烯醚萜类化合物是含有环戊烷结构单元的环状单萜衍生物,最基本的母核是环烯醚萜醇,特征结构骨架为1个二氢吡喃环顺式连接1个环戊烷类的单元结构,具有环状烯醚及醇羟基,醇羟基属于半缩醛羟基,性质活泼,易发生各种反应。栀子苷与京尼平龙胆双糖苷都能在 β -葡萄糖苷酶的催化作用下转化为其苷元京尼平^[22-24],随后京尼平又能通过葡萄糖醛酸化和京尼平吡喃环系列开环裂解后的去羟基化、N杂环化和还原反应等转化成其他的同类物质^[25]。文献研究已证实 β -葡萄糖苷酶的水解反应是栀子苷等环烯醚萜苷类化合物显示出生物活性的必要步骤^[26]。栀子苷对肝脏细胞膜的保护作用^[27]、抗脂肪肝作用^[28]以及抗炎作用^[29]均是通过水解成京尼平后发挥药效,证实京尼平是主要的消炎成分,活性比栀子苷强^[30]。

连翘苷溶液中的非洲防己碱、表小檗碱、药根碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱等生物碱类化合物均属于原小檗碱型季铵生物碱,其化学结构差异极小,理化性质极其相似,具有调血脂^[31]、抗癌^[32]、抗菌^[33-34]、抗肿瘤^[35]等多种活性。郭懿萍等^[36]、袁学刚等^[37]对不同批次的连翘苷溶液中的成分进行研究,发现生物碱的含量也无显著变化,说明生物碱在连翘苷溶液中可稳定存在,能保持较高的生理活性。目前,针对上述几种生物碱的分离仍存在一定难度^[38],其主要原因在于其结构的高度相似性。本实验所建立并采用的色谱方法可在兼顾分离环烯醚萜苷类物质的基础上实现对这几种生物碱的分离,尽管分离效果上有待提高,但本实验观察到这几种生物碱在储存前后并未发生显著变化,故该方法可完全满足实验需求。

同时本实验中所分析的样品与以往实验相比,在发酵结束后仍然含有少量栀子苷,从而导致发酵结束装瓶后,栀子苷在储存过程中仍然存在继续转化。目前对连翘苷溶液发酵过程监控及终点判定仅依靠工人的传统经验,没有科学地以化学成分的变化作为发酵终点的判断依据,进而导致批次之间成分存在差异。基于京尼平是栀子苷发挥其抗炎活性的真正物质基础这一事实,结合对产品品质的一致性考虑,建议对连翘苷溶液发酵炮制过程中的栀子

苷进行监控,并将其转化率>95%作为判定发酵炮制终点的标准之一。另一方面,由于传统工艺中发酵炮制结束后未进行热处理(灭菌和灭酶)即装瓶,使得溶液中由微生物产生的酶仍具有较强的转化活性,可能导致京尼平这一活性物质的降解。因此建议发酵炮制结束后对产品进行酶的灭活和灭菌处理,以确保每批次产品质量统一,提高产品的质量一致性、稳定性和安全性。

参考文献

- [1] 袁学刚,王战,邹亮,等.连翘苷溶液促进大鼠肛周脓肿创面愈合作用研究[J].成都中医药大学学报,2016,39(1):39-43.
- [2] 余腾江,杨向东,理习阳.连翘苷溶液联合康复新液对41例肛漏术后换药的疗效观察[J].云南中医中药杂志,2014,35(1):45-46.
- [3] 卿勇,夏登梅,李薇.连翘苷溶液坐浴联合高频电刀治疗肛门尖锐湿疣临床观察[J].四川中医,2015,33(4):151-152.
- [4] 李远志,杨向东.玄参汤口服合并连翘苷溶液灌肠治疗肛门坠胀临床观察[J].河南中医,2013,33(11):2025-2026.
- [5] 王钧冬,董文娟,李燕,等.中药熏洗剂对低位肛周脓肿术后创面修复的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(21):144-145.
- [6] 洪彪.复方黄柏液与连翘苷溶液保留灌肠对慢性溃疡性直肠炎的疗效对比探究[J].中国地方病防治杂志,2016,31(8):956-957.
- [7] 郭永宏.连翘苷溶液加锡类散保留灌肠治疗慢性溃疡性直肠炎的效果分析[J].中国现代药物应用,2014,8(23):193-194.
- [8] Dai S Y, Xu B, Zhang Y, et al. Establishment and reliability evaluation of the design space for HPLC analysis of six alkaloids in *Coptis chinensis* (Huanglian) using bayesian approach [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(9): 697-708.
- [9] Lv X, Yan L, Tang C, et al. Integration of HPLC-based fingerprint and quantitative analyses for differentiating botanical species and geographical growing origins of *Rhizoma coptidis* [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(12): 1-8.
- [10] Fu Z W, Xue R, Li Z X, et al. Fragmentation patterns study of iridoid glycosides in *Fructus Gardeniae* by HPLC-Q/TOF-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 28(12): 1795-1807.
- [11] Yin F Z, Wu X Y, Li L, et al. Quality control of *Gardeniae Fructus* by HPLC-PDA fingerprint coupled with chemometric methods [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(10): 1685-1694.
- [12] Yan D, Jin C, Xiao X H, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry [J]. *J Biochem Bioph Meth*, 2008, 70(6):

- 845-849.
- [13] Rosa T, Loizzo M R, Federica M, *et al.* Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2008, 8(4): 399-420.
- [14] 袁学刚, 叶 羊, 赵甲元, 等. 基于高通量测序分析连翘溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性变化 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 60-69.
- [15] Li Q, Cai S, Li Y, *et al.* Biochemical components associated with microbial community shift during the pile-fermentation of primary dark tea [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1509.
- [16] Yan Y, Du C, Li Z, *et al.* Comparing the antidiabetic effects and chemical profiles of raw and fermented Chinese Ge-Gen-Qin-Lian decoction by integrating untargeted metabolomics and targeted analysis [J]. *Chin Med*, 2018, 13(1): 54.
- [17] Yim N H, Gu M J, Park H R, *et al.* Enhancement of neuroprotective activity of Sagunja-tang by fermentation with *Lactobacillus* strains [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2018, 18(1): 312.
- [18] Zhou L, Li S, Zhang T, *et al.* Properties of a novel polydatin- β -D-glucosidase from *Aspergillus niger* SK34.002 and its application in enzymatic preparation of resveratrol [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(7): 2588-2595.
- [19] 杨胜远, 刘玉燕, 梁智群. β -葡萄糖苷酶产生菌的分离筛选 [J]. *工业微生物*, 2002, 32(4): 36-38.
- [20] Bian B L, Lower-Nedza A, Song J, *et al.* Validation of a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quality control of the traditional Chinese medicine (TCM) formulation, traditional Chinese formula Huanglian-jiedutang (HLJDT) [J]. *J Med Plants*, 2011, 27(5): 6278-6283.
- [21] 熊婷婷, 白俊毅, 傅超美, 等. 连翘溶液 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中国药师*, 2019, 22(2): 218-221.
- [22] Jiang P, Ma Y, Gao Y, *et al.* A comprehensive evaluation of the metabolism of genipin-1- β -D-gentiobioside *in vitro* and *in vivo* by using HPLC-Q-TOF [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(27): 5490-5498.
- [23] Gong G H, Zheng Z M, Liu H, *et al.* Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2014, 24(6): 788-794.
- [24] Yang Y S, Zhang T, Yu S C, *et al.* Transformation of geniposide into genipin by immobilized β -glucosidase in a two-phase aqueous-organic system [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 4295-4304.
- [25] Han H, Li Y, Ying X, *et al.* Identification of metabolites of geniposide in rat urine using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Rcm*, 2011, 25(21): 3339-3350.
- [26] Park K S, Kim B H, Chang I M. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- α and nitric oxide production *in vitro* [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2010, 7(1): 41-45.
- [27] 彭 婕. 栀子利胆、保肝机制的实验研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2003.
- [28] Kazuko K, Tsutomu S, Yasuhiro N, *et al.* Preventive effect of geniposide on metabolic disease status in spontaneously obese type 2 diabetic mice and free fatty acid-treated HepG2 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(10): 1613-1618.
- [29] Mase A, Makino B, Tsuchiya N, *et al.* Active ingredients of traditional Japanese (kampo) medicine, inchinkoto, in murine concanavalin A-induced hepatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 742-749.
- [30] Koo H J, Lim Khjung H J, Park E H. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103(3): 496-500.
- [31] Zou Z Y, Hu Y R, Ma H, *et al.* Epiberberine reduces serum cholesterol in diet-induced dyslipidemia syrian golden hamsters via network pathways involving cholesterol metabolism [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 774(5): 1-9.
- [32] Chai F N, Ma W Y, Zhang J, *et al.* Coptisine from *Rhizoma Coptidis* exerts an anti-cancer effect on hepatocellular carcinoma by up-regulating miR-122 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1002-1011.
- [33] Kubra K, Nihat Alpugu S, Isil Aksan K, *et al.* Assessment of berberine as a multi-target antimicrobial: A multi-omics study for drug discovery and repositioning [J]. *Omics*, 2014, 18(1): 42-53.
- [34] Kong W, Zhao Y, Xiao X, *et al.* Comparison of anti-bacterial activity of four kinds of alkaloids in *Rhizoma Coptidis* based on microcalorimetry [J]. *Chin J Chem*, 2010, 27(6): 1186-1190.
- [35] Tillhon M, Ortiz L M G, Lombardi P, *et al.* Berberine: New perspectives for old remedies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(10): 1260-1267.
- [36] 郭懿萍, 覃彩缤, 陈 黎, 等. UPLC-MS/MS 法测定连翘溶液中 7 种成分的含量 [J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2143-2146.
- [37] 袁学刚, 王战, 胡慧玲, 等. HPLC 测定连翘溶液中表小檗碱、黄连碱、巴马汀和盐酸小檗碱的含量 [J]. *中药与临床*, 2016, 7(1): 31-33.
- [38] 刘 芳, 张 浩, 青琳森, 等. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(21): 3713-3719.