

左金丸组分中药配伍组分制备工艺研究

刘斯琪, 王如峰*

北京中医药大学生命科学院, 北京 102488

摘要:目的 建立左金丸组分中药配伍组分制备工艺并对所得组分的主要成分进行定性和定量表征。方法 通过正交试验设计考察最佳提取溶剂、提取时间和提取次数;以总生物碱含量为指标考察吸附树脂类型、最佳上样质量浓度、上样量、径高比和吸附时间;采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)和 UPLC 法对组分中的主要成分进行定性和定量分析。结果 所选工艺流程为 10 倍量 70%乙醇回流提取 2 次,每次 1 h;提取物用 AB-8 大孔树脂柱纯化,最佳上样质量浓度为 0.5 g/mL,上样量为 0.12 个柱体积(BV),径高比为 1:12,吸附时间为 1 h;洗脱溶剂依次为 28 BV 40%乙醇,16 BV 60%乙醇,13 BV 95%乙醇。上述工艺流程得到 3 个组分,即 C40、C60 和 C95 组分。从 C40 组分中指认了 31 个成分,主要为黄连生物碱类,其中盐酸小檗碱含量最高(20.15%);从 C60 组分中指认了 32 个成分,主要为吴茱萸柠檬苦素类,其中柠檬苦素含量最高(15.40%);从 C95 组分指认了 36 个成分,主要为吴茱萸生物碱类,其中吴茱萸次碱含量最高(4.14%)。结论 建立的左金丸组分中药配伍组分制备工艺重复性好,所得组分活性成分含量高,质量稳定,为进一步成药性研究和组分中药研制奠定基础。

关键词:左金丸;黄连;吴茱萸;组分中药;UPLC-MS/MS;生物碱;盐酸小檗碱;柠檬苦素;吴茱萸次碱

中图分类号:R283.6 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-2670(2022)19-6001-11

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.007

Preparation process of components for component-based Chinese medicine of Zuojin Pills

LIU Si-qi, WANG Ru-feng

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To establish the preparation process of components for component-based Chinese medicine of Zuojin Pills (左金丸) and analyze the main compounds of components qualitatively and quantitatively. **Methods** Orthogonal experimental design was employed to determine the optimal extracting solvent, extracting time and extracting times. The resin type, optimum loading concentration, loading quantity, diameter-height ratio and adsorption time were investigated using total alkaloid content as index. The qualitative and quantitative analysis of main compounds were conducted by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and UPLC, respectively. **Results** The selected process was that the powders were extracted with 10 folds of 70% ethanol under reflux two times for 1 h each. AB-8 macroporous resin was selected to purify the extracts. The optimum loading concentration was 0.5 g/mL, loading volume was 0.12 BV, diameter-height ratio was 1:12 and adsorption time was 1 h. The elution was carried out with 28 BV 40% ethanol, 16 BV 60% ethanol and 13 BV 95% ethanol successively to obtain three components, C40, C60 and C95 components. Thirty-one compounds, which were mainly alkaloids from *Coptidis Rhizoma* (Huanglian), were identified from C40 component. Among them, the content of berberine was the highest (20.15%). Thirty-two compounds, which were mainly limonoids from *Evodiae Fructus* (Wuzhuyu), were identified from C60 component. Among them, the content of limonin was the highest (15.40%). Thirty-six compounds, which were mainly alkaloids from *Evodiae Fructus*, were identified from C95 component. Among them, the content of rutaecarpine was the highest (4.14%). **Conclusion** The preparation process established herein is repeatable and the resultant components with high content of active compounds are qualitative stable. This study lays a foundation for further research and development of druggability and component-based Chinese medicine of Zuojin Pills.

收稿日期: 2022-04-12

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1704506)

作者简介: 刘斯琪, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质。E-mail: liusiqi_wxjs@163.com

*通信作者: 王如峰, 教授, 博士生导师, 主要从事中药化学成分研究工作。Tel: (010)53912163 E-mail: wrf@bucm.edu.cn

Key words: Zuojin Pills; *Coptidis Rhizoma*; *Evodiae Fructus*; component-based Chinese medicine; UPLC-MS/MS; alkaloids; berberine hydrochloride; limonin; rutaecarpin

左金丸为中医经典名方,记载于《丹溪心法·火六》卷一,由黄连 *Coptidis Rhizoma* 和吴茱萸 *Evodiae Fructus* 以 6:1 比例配伍而成。方中黄连解除肝火旺盛,配以吴茱萸调和药性,两者合降胃气,对胃炎、胃溃疡疗效显著。左金丸的主要活性成分为生物碱类成分^[1],左金丸总生物碱有治疗胃溃疡的作用^[2]。其中,来自黄连的生物碱为异喹啉类,包括小檗碱、表小檗碱、黄连碱、药根碱等,有消炎、抗菌、抗病毒、抗癌等多种生物活性^[3];来自吴茱萸的生物碱包括吲哚类和喹诺酮类成分,有抗菌^[4]、抗炎、保护心血管等作用^[5-6]。除此之外,左金丸还有来自吴茱萸的柠檬苦素类成分^[7]。

左金丸化学成分相对明确,通过对主成分生物碱类进行富集除杂有望开发成组分中药。组分中药是在中医药理论指导下,遵循方剂配伍原则,采用现代药物开发方法和技术研制而成的现代中药^[8]。组分中药的物质基础和作用机制相对清楚,不仅保留了中药方剂的优势,而且便于制剂,能实现工业化大规模重复制备并易于质量控制,是中药现代化的重要体现形式^[9]。为了给后续左金丸主要组分的成药性研究提供参考,本研究建立了左金丸总生物碱组分的高效制备工艺,并对获得的配伍组分主要成分进行了定性定量表征,为左金丸的进一步开发利用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-30AD 型超高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司;UPLC-QExactive-MS 型超高效液相色谱串联质谱仪,美国 Thermo 公司;Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2 μm),日本 Shimadzu 公司。

1.2 材料

黄连饮片(产地重庆石柱,批号 III-20190513-YSZ-YC01)、吴茱萸饮片(产地江西九江,批号 WZY-20190513-CJJ-YC01)由北京盈科瑞创新医药股份有限公司提供,经北京中医药大学王如峰教授鉴定为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎和芸香科吴茱萸属植物疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实;AB-8 型大孔树脂购自高华伟业食品添加剂有限公司;D151 型弱酸性

阳离子交换树脂购自郑州和成新材料科技有限公司;95%乙醇购自北京虹湖联合化工产品有限公司;分析纯甲酸和色谱纯乙腈、甲醇为 Thermo Fisher Scientific 公司。对照品格兰地新(批号 M08D8S50327)、黄连碱(批号 P05M9F55053)、药根碱(批号 Z11M8S35794)、掌叶防己碱(批号 W15J9Z52995)、盐酸小檗碱(批号 Y18N8S48598)由上海源叶生物科技有限公司提供;对照品去氢吴茱萸碱(批号 PRF9121743)、吴茱萸碱(批号 PRF9121741)、吴茱萸次碱(批号 PRF9121742)、吴茱萸苦素(批号 PRF8082221)购自成都普瑞法科技开发有限公司;对照品非洲防己碱(批号 RFS-F02902003011)、氧化小檗碱(批号 RFS-Y16702008021)、四氢小檗碱(批号 RFS-S08901905023)、柠檬苦素(批号 RFS-N00611812016)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;对照品 7β-羟基吴茱萸次碱(批号 ML-01047)购自无锡鸣鹭医药科技有限公司;对照品表小檗碱(批号 180309)购自北京四面体生物科技有限公司;对照品二氢吴茱萸新碱(批号 181209)购自成都植标化纯生物技术有限公司;所有对照品质量分数均>98%。

2 方法与结果

2.1 制备工艺研究

2.1.1 提取工艺考察 称取黄连 18.0 g 和吴茱萸粉末 3.0 g(过 50 目筛),混合后分别加入 10 倍量纯水及 30%、50%、70%、80%、95%乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,每种溶剂重复 3 次。提取液合并后减压浓缩,冷冻干燥。取冷冻干燥的提取物,通过酸性染料比色法^[10]测定总生物碱含量,选择最优提取溶剂。由表 1 中总生物碱含量可知,最优提取溶剂为 70%乙醇。

表 1 不同溶剂总生物碱提取结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Extraction of total alkaloids with different solvents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取溶剂	提取物量/g	生物碱量/g	质量分数/%	提取率/%
水	5.936±0.082	1.568±0.091	26.41	7.47
30%乙醇	6.190±0.163	1.847±0.078	29.84	8.79
50%乙醇	6.458±0.216	2.183±0.130	33.81	10.40
70%乙醇	5.982±0.078	2.274±0.006	38.02	10.83
80%乙醇	5.547±0.027	2.201±0.083	39.67	10.48
95%乙醇	4.225±0.019	1.703±0.019	40.30	8.11

本研究具有 3 个主要考察因素,参考已有文献报道^[10]分别选择合适的水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计正交试验(表 2),采用 70%乙醇,以不同提取时间、提取次数和溶剂用量回流提取。正交试验设计与结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

试验号	A/h	B/次	C/倍	D(误差)	总生物碱提取率/%
1	1.0 (1)	1 (1)	8 (1)	(1)	7.66
2	1.0 (1)	2 (2)	10 (2)	(2)	10.12
3	1.0 (1)	3 (3)	12 (3)	(3)	11.79
4	1.5 (2)	1 (1)	10 (2)	(3)	8.26
5	1.5 (2)	2 (2)	12 (3)	(1)	10.23
6	1.5 (2)	3 (3)	8 (1)	(2)	11.29
7	2.0 (3)	1 (1)	12 (3)	(2)	9.40
8	2.0 (3)	2 (2)	8 (1)	(3)	9.85
9	2.0 (3)	3 (3)	10 (2)	(1)	11.44
K_1	29.57	25.32	28.80	29.33	
K_2	29.78	30.20	29.82	30.81	
K_3	30.69	34.52	31.42	29.90	
R	1.12	9.20	2.62	1.48	

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

误差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.236 3	2	0.118 1	0.636 1	
B	14.124 1	2	7.062 0	38.020 2	$P < 0.05$
C	1.162 8	2	0.581 4	3.130 0	
D(误差)	0.371 5	2	0.185 7		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

从上述结果可以看出, $A_3 > A_2 > A_1$ 、 $B_3 > B_2 > B_1$ 、 $C_3 > C_2 > C_1$, 最优工艺为 $A_3B_3C_3$, 即 12 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 2.0 h。其中因素 B 为显著性影响因素, 其极差和 F 值都明显高于其他 2 个因素, 而 A 和 C 为不显著性因素, 对总生物碱提取效率影响较小。对最优工艺进行验证, 发现 $A_3B_3C_3$ 的总生物碱提取率为 11.67% ($n=3$)。

2.1.2 色谱填料考察 取最优提取溶剂提取液, 减压浓缩后冷冻干燥, 测定总生物碱含量。根据已有关于左金丸及组方药化学成分制备的文献报道, 选择 AB-8 型大孔树脂^[10]和 D151 型弱酸性阳离子交换树脂^[11-13]作为考察对象。精密称取 0.70、0.80、0.70 g AB-8 型大孔吸附树脂和 3 份 1.0 g D151 型离子交换树脂, 分别加入 80 mL 药液(总生物碱量 0.56

mg/mL), 25 °C、150 r/min 振摇吸附 12 h, 检测上清液总生物碱含量。弃去全部上清后用纯水洗涤树脂 2 次, AB-8 大孔树脂中加入 70%乙醇, D151 离子交换树脂中加入等量含 10%冰醋酸的 70%乙醇溶液, 25 °C、150 r/min 振摇解吸附 12 h, 取上清液测定总生物碱含量。根据公式确定 2 种树脂的吸附能力。

$$\text{吸附量} = (M_0 - M_1) / W$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_1) / C_0$$

$$\text{解吸量} = M_2 / W$$

$$\text{解吸率} = M_2 / (M_0 - M_1)$$

$$\text{转移率} = \text{吸附率} \times \text{洗脱率}$$

W 为树脂质量, M_0 为吸附开始时上清中生物碱含量, M_1 为吸附完成后上清液中生物碱含量, C_0 为吸附开始时上清液中生物碱含量, C_1 为吸附完成后上清液中生物碱含量, M_2 为洗脱完成后上清液中生物碱含量

2 种树脂的吸附量、吸附率、解吸量、解吸率结果如表 4 所示。从单位质量吸附能力看, AB-8 型大孔树脂远高于 D151 型离子交换树脂, 前者的解吸附能力也明显强于后者, 因此, 选择 AB-8 型大孔树脂。

表 4 AB-8 及 D151 树脂吸附-解吸情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Adsorption-desorption of AB-8 and D151 resins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

树脂类型	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸量/ (mg·g ⁻¹)	解吸率/%
AB-8	58.19 ± 4.05	95.26 ± 0.74	53.74 ± 4.10	92.32 ± 0.66
D151	43.69 ± 0.14	97.89 ± 0.30	39.81 ± 0.90	90.98 ± 2.18

2.1.3 色谱参数考察 取 AB-8 型大孔树脂进行单因素考察: 考察上样质量浓度时设定大孔树脂径高比为 1:10, 设置参数为生药 0.3、0.5、0.7 g/mL; 考察径高比时设定上样质量浓度为生药 0.5 g/mL, 设置参数为 1:10、1:12、1:14; 考察上样体积时设定上样质量浓度为生药 0.5 g/mL, 径高比 1:12, 设置参数为 0.04、0.08、0.12、0.16 个柱体积 (BV); 考察吸附时间时设定上样质量浓度为生药 0.5 g/mL, 径高比 1:12, 上样体积 0.12 BV, 设置参数为 5、15、30 min 及 1、3、12 h。药液均按照相同体积流量上样, 出现碘化铋钾阳性反应时停止, 计算上样生物碱总量 (M_1)。用水以相同体积流量洗脱至 Molish 反应阴性, 计算水洗脱生物碱量 (M_2)。最后用 70%乙醇洗脱至碘化铋钾反应阴性, 计算洗脱下的生物碱含量 (M_3)。每组实验重复 3 次。根据公式计算吸

附-洗脱率, 确定最优上样方法。结果见表 5~8。

$$\text{吸附-洗脱率} = M_3 / (M_1 - M_2)$$

根据上述实验结果 (表 5~8), 上样质量浓度与径高比均选择吸附-洗脱率较高的生药 0.5 g/mL 和

表 5 上样质量浓度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Results of loading concentration investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上样质量浓度/(g·mL ⁻¹)	吸附-洗脱率/%
0.3	62.35 ± 0.69
0.5	83.73 ± 3.73
0.7	72.53 ± 1.07

表 6 径高比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Results of diameter-height ratio investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

径高比	吸附-洗脱率/%
1 : 10	74.41 ± 6.34
1 : 12	79.40 ± 1.97
1 : 14	77.78 ± 3.89

表 7 上样体积考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Results of loading quantity investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上样体积/BV	吸附-洗脱率/%	上样体积/BV	吸附-洗脱率/%
0.04	57.02 ± 2.23	0.12	64.34 ± 0.94
0.08	65.18 ± 4.53	0.16	73.69 ± 8.07

表 9 工艺验证结果

Table 9 Results of process validation

组分	生物碱质量/mg (质量分数/%)				转移率/%
	1	2	3	平均值	
C40	1 461.30 (59.80)	1 476.80 (65.46)	1 531.10 (58.23)	1 489.73 (61.13)	70.05
C60	41.80 (9.58)	32.90 (10.21)	43.70 (4.55)	39.47 (7.90)	0.24
C95	15.10 (10.26)	16.10 (11.04)	16.70 (12.19)	15.97 (11.19)	0.14

2.2 工艺组分主要成分分析

2.2.1 定性分析 将 C40、C60、C95 组分分别定容至 50、10、10 mL, 甲醇稀释后 0.22 μm 滤膜滤过, 进行 UPLC-MS/MS 分析。流动相为 0.05% 甲酸水溶液和乙腈, 体积流量为 0.3 mL/min, 进样体积为 5 μL, 柱温 35 °C。C40 组分洗脱梯度为 0~57 min, 5%~9.7% 乙腈; 57~100 min, 9.7%~17% 乙腈; 100~110 min, 17% 乙腈; 110~140 min, 17%~100% 乙腈; 140~141 min, 100% 乙腈; 141~145 min, 100%~5% 乙腈; 145~150 min, 5% 乙腈。C60 组分洗脱梯度为 0~19.5 min, 5%~23% 乙腈; 19.5~40

表 8 吸附时间考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Results of adsorption time investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

吸附时间/min	总生物碱/μg	吸附时间/h	总生物碱/μg
5	437.12 ± 50.77	1	94.53 ± 4.70
15	158.00 ± 22.01	3	89.84 ± 5.87
30	120.23 ± 22.87	12	87.45 ± 17.70

1 : 12。考虑到按照 0.16 BV 上样会导致泄露, 因此, 上样体积选择吸附-洗脱率相对较高的 0.12 BV。吸附时间考察发现 1 h 后总生物碱的吸附基本饱和, 因此选择 1 h 作为吸附时间。工艺考察结果确定工艺流程为 AB-8 型大孔树脂径高比 1 : 12, 左金丸提取液生药 0.5 g/mL 上样 0.12 BV, 吸附 1 h 后分别采用 28 BV 40% 乙醇、16 BV 60% 乙醇、13 BV 95% 乙醇洗脱。采用不同体积分数的乙醇进行分段洗脱, HPLC 动态检测生物碱含量变化, 确定梯度洗脱溶剂为 40%、60%、95% 乙醇。按照所得最优工艺流程进行组分制备, 将各组分收集后减压浓缩, 冷冻干燥后测定总生物碱含量, 分别得到 C40 (40% 乙醇洗脱)、C60 (60% 乙醇洗脱)、C95 (95% 乙醇洗脱) 组分。工艺重复 3 次进行验证, 结果如表 9 所示。由表 9 可知, C40 组分的生物碱质量分数为 61.13%, 转移率高达 70% 以上; C60 组分和 C95 组分的生物碱质量分数分别为 7.90%、11.19%。3 次重复实验结果平行性良好。

min, 23%~40% 乙腈; 40~50 min, 40%~100% 乙腈; 50~51 min, 100% 乙腈; 51~55 min, 100%~5% 乙腈; 55~60 min, 5% 乙腈。C95 组分洗脱梯度为 0~24 min, 5%~22.6% 乙腈; 24~27 min, 22.6%~23.6% 乙腈; 27~30 min, 23.6%~24% 乙腈; 30~31 min, 24%~29% 乙腈; 31~67 min, 29% 乙腈; 67~74 min, 29%~40% 乙腈; 74~100 min, 40%~100% 乙腈; 100~101 min, 100% 乙腈; 101~105 min, 100%~5% 乙腈; 105~110 min, 5% 乙腈。质谱采用电喷雾离子源, 分别进行正离子和负离子模式扫描, 扫描碎片质量范围为 m/z 100~1000, 分

分辨率为 70 000。碎裂电压为 3500 V，鞘气流量为 17 L/min，辅助气流量为 5.7 L/min，毛细管温度为 320 ℃。根据总离子流图和二级离子流图，结合文献报道，采用 Xcalibur 软件（误差 $\leq 5 \times 10^{-6}$ ）分析碎片信息，推测化学成分。

从 3 个组分中共指认了 80 个化合物。从 C40

组分指认了 31 个成分，主要为黄连的生物碱成分；从 C60 组分指认了 32 个成分，主要为柠檬苦素类成分和部分生物碱成分；从 C95 组分指认了 36 个成分，主要为吴茱萸的吲哚类和喹诺酮类生物碱。总离子流图如图 1 所示，具体结果如表 10 所示。

2.2.2 定量分析 将 C40、C60、C95 组分分别定容

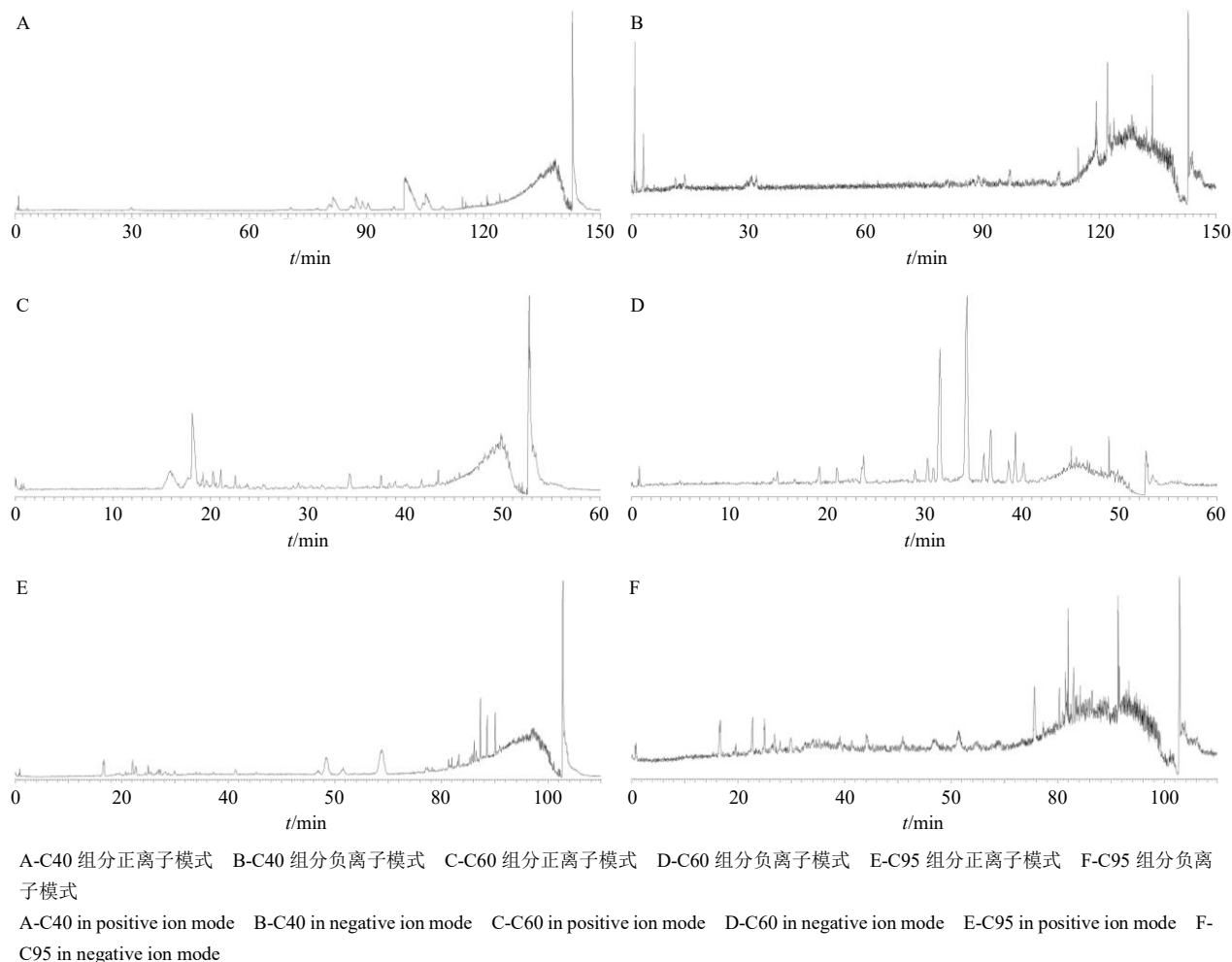


图 1 C40、C60、C95 组分在正、负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion currents of C40, C60 and C95 components in positive and negative modes

至 50、10、10 mL，甲醇稀释后 0.22 μ m 滤膜滤过，进行 UPLC 分析（图 2）。C40 和 C95 组分流动相由 0.05% 甲酸水溶液和乙腈组成，C60 组分流动相由 0.05% 磷酸水溶液和乙腈组成。体积流量为 0.3 mL/min，进样体积为 3 μ L，柱温 35 ℃。C40 组分洗脱梯度为 0~57 min，5%~9.7% 乙腈；57~92 min，9.7%~14% 乙腈；92~100 min，14%~17% 乙腈；100~140 min，17% 乙腈；140~150 min，17%~100% 乙腈；150~151 min，100% 乙腈；151~160 min，100%~5% 乙腈；160~165 min，5% 乙腈；检测波长为 327 nm；C60 组分洗脱梯度为 0~19.5

min，5%~23% 乙腈；19.5~37.6 min，23%~28.6% 乙腈；37.6~43.5 min，28.6% 乙腈；43.5~54.5 min，28.6~33% 乙腈；54.5~74.5 min，33%~43% 乙腈；74.5~90 min，43%~100% 乙腈；90~91 min，100% 乙腈；91~95 min，100%~5% 乙腈；95~100 min，5% 乙腈；检测波长为 210 nm；C95 组分洗脱梯度为 0~24 min，5%~22.6% 乙腈；24~27 min，22.6%~23.6% 乙腈；27~30 min，23.6%~24% 乙腈；30~31 min，24%~29% 乙腈；31~67 min，29% 乙腈；67~74 min，29%~40% 乙腈；74~100 min，40%~100% 乙腈；100~101 min，100% 乙腈；101~105 min，

表 10 工艺组分主要成分定性分析结果

Table 10 Results of qualitative analysis of main compounds in each component

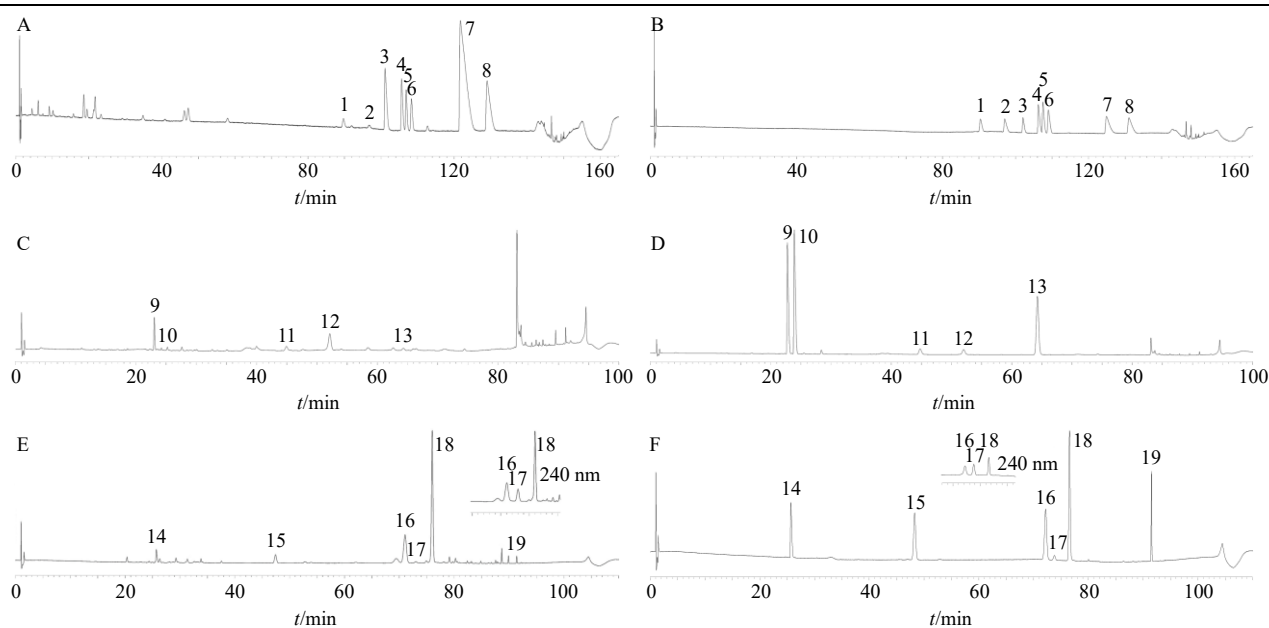
组分	化合物	分子式	t _R /min	m/z	模式	二级离子碎片 (m/z)
C40	盐酸小檗碱 ^[14]	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	100.14	336.121 8	正	320.090 91, 306.075 32, 292.096 04, 278.080 81
C40	格兰地新 ^[14]	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	70.72	322.106 3	正	307.083 07, 279.088 32
C40	去氢吴茱萸碱 ^[14]	C ₁₉ H ₁₆ N ₃ O ⁺	74.62	302.127 7	正	286.096 50, 258.130 75
C40	黄连碱 ^[14]	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄ ⁺	80.56	320.090 5	正	292.095 95, 277.072 66, 262.085 27
C40	表小檗碱 ^[14]	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	85.84	336.121 9	正	320.091 00, 292.096 25
C40	非洲防己碱 ^[14]	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	87.90	338.141 6	正	323.118 01, 308.094 36, 293.070 89, 280.464 94
C40	药根碱 ^[14]	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	90.07	338.137 5	正	323.114 26, 322.106 45, 308.090 67, 294.111 63
C40	掌叶防己碱 ^[14]	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	104.53	352.153 3	正	336.122 10, 322.106 57, 308.127 32, 294.111 63
C40	甲基黄连碱 ^[15]	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	95.16	334.106 2	正	304.096 19
C40	2-羟基药根碱 ^[14]	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺	69.34	324.121 7	正	308.090 91, 294.075 23, 280.096 10
C40	13-甲基小檗碱 ^[14]	C ₂₁ H ₂₀ NO ₄ ⁺	97.51	350.137 6	正	320.091 03, 306.111 60
C40	苹果酸 ^[16]	C ₄ H ₆ O ₅	0.86	133.014 8	负	115.004 13, 71.013 73
C40	柠檬酸 ^[17]	C ₆ H ₈ O ₇	0.94	190.929 2	负	154.999 42, 111.009 18, 85.029 55
C40	咖啡酰葡萄糖酸 ^[17]	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	1.11	357.063 5	负	195.052 02, 179.036 01, 135.045 82
C40	异柠檬酸 ^[17]	C ₆ H ₈ O ₇	1.35	190.929 2	负	154.999 37, 111.009 14, 85.029 51
C40	腺苷 ^[18]	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.61	268.103 2	正	136.061 49
C40	苯丙氨酸 ^[18]	C ₉ H ₁₁ NO ₂	2.63	166.085 8	正	120.080 67, 102.970 41
C40	迷迭香酸 ^[18]	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	3.04	359.100 2	负	197.046 46, 179.035 81, 135.045 76, 123.045 68
C40	丹参素 ^[19]	C ₉ H ₁₀ O ₅	3.06	197.046 5	负	179.035 81, 135.045 72, 123.045 62
C40	香树素-7-O-β-D-葡萄糖苷 ^[17]	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	3.06	449.095 8	负	286.942 87, 268.977 08
C40	4-O-β-D-葡萄糖基香草醇 ^[17]	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	4.28	315.110 0	负	153.056 44
C40	原儿茶酸 ^[18,20]	C ₇ H ₆ O ₄	4.48	153.020 0	负	109.029 85, 91.019 14, 81.034 55
C40	L-色氨酸 ^[19]	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	5.34	203.083 6	负	159.093 48, 142.066 80, 116.050 98
C40	原儿茶醛 ^[18,20]	C ₇ H ₆ O ₃	6.44	137.025 0	负	119.014 11, 108.021 99, 81.034 52
C40	阿魏酰奎宁酸 ^[17]	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	11.56	367.105 3	负	193.051 44, 191.056 96
C40	绿原酸 ^[17]	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	12.79	353.089 5	负	191.056 96, 179.035 80, 161.025 18
C40	姜黄素 ^[18]	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	13.66	369.116 6	正	177.054 15, 145.028 06, 117.033 45, 89.038 86
C40	阿魏酰葡萄糖酸 ^[17]	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	26.57	371.100 3	负	195.052 05, 193.051 62, 134.037 92
C40	二氢吴茱萸定 ^[14]	C ₁₈ H ₂₂ NO ₅ ⁺	89.55	332.138 3	正	317.115 05, 302.091 58
C40	wuchuyamide II ^[17]	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	106.16	336.121 8	正	318.075 62, 304.096 50, 161.141 33
C40	吴茱萸苦素 ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	118.93	485.184 1	负	423.183 65, 397.167 79, 383.152 50
C60	柠檬苦素 ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	34.21	471.199 9	正	427.210 30, 425.194 52, 161.059 25
C60	吴茱萸苦素 ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	31.51	485.183 2	负	423.182 80, 397.166 96, 383.151 31
C60	6β-乙酰氧基-5-表柠檬苦素 ^[17]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	37.52	527.194 0	负	485.183 41, 467.172 49, 383.151 15
C60	吴茱萸内酯醇 ^[17]	C ₂₆ H ₂₈ O ₉	35.94	483.167 6	负	421.167 18, 395.151 49, 161.061 29
C60	石虎柠檬素 A ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	31.11	501.178 4	负	471.167 48, 411.146 24, 235.876 02
C60	吴茱萸苦素乙酸酯 ^[17]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	23.86	529.205 1	正	485.215 39, 469.184 48, 451.173 77, 425.194 49, 393.131 99, 367.152 92
C60	2-羟基药根碱 ^[14]	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺	15.95	324.121 8	正	308.090 70, 294.075 13, 280.096 01, 266.081 21
C60	甲基黄连碱 ^[15]	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	21.14	334.106 0	正	304.096 01
C60	γ-氨基丁酸 ^[18]	C ₄ H ₉ NO ₂	0.76	104.107 1	正	87.044 33, 69.034 00

续表 10

组分	化合物	分子式	t_R/min	m/z	模式	二级离子碎片 (m/z)
C60	柠檬酸 ^[17]	C ₆ H ₈ O ₇	0.78	190.928 9	负	173.009 70, 111.009 03
C60	咖啡酸 ^[17]	C ₉ H ₈ O ₄	0.96	181.025 4	正	163.060 03, 135.007 40, 116.971 84
C60	原儿茶酸 ^[18,20]	C ₇ H ₆ O ₄	1.47	153.032 7	负	108.989 01, 90.808 21
C60	原儿茶醛 ^[17,20]	C ₇ H ₆ O ₃	5.21	137.024 7	负	108.021 84, 81.034 42
C60	松脂醇葡萄糖苷 ^[18]	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	11.63	519.189 2	负	357.171 97, 151.076 77
C60	二氢吴茱萸定 ^[14]	C ₁₈ H ₂₂ NO ₅ ⁺	17.53	332.138 0	正	317.114 83, 302.091 55, 274.413 45
C60	格罗苦素甲 ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	23.11	501.178 4	负	457.188 51, 413.198 46
C60	吴茱萸次碱-10- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷 ^[17]	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₇	26.22	466.159 6	正	304.107 09
C60	7 β -羟基吴茱萸次碱 ^[17]	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	27.85	304.106 9	正	286.096 68
C60	四氢小檗碱 ^[21]	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	23.91	340.116 7	正	176.070 36
C60	13-甲基小檗碱 ^[14]	C ₂₁ H ₂₀ NO ₄	31.34	350.101 0	正	334.085 85, 320.088 96, 305.588 81
C60	木犀草素 ^[18]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	31.76	285.077 7	负	267.067 02, 199.076 89
C60	1-或 3-羟基吴茱萸次碱 ^[17]	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	33.07	304.106 9	正	286.096 53, 167.059 72
C60	14 <i>N</i> -甲酰二氢吴茱萸次碱 ^[17]	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₂	34.33	318.122 5	正	171.091 16, 144.080 38
C60	1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-十一碳-9-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₁ H ₂₉ NO ₂	34.58	328.225 7	正	310.215 30, 186.090 74, 173.083 05
C60	euodirutaecin A ^[17]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	35.13	515.157 6	负	471.203 06, 162.839 43, 146.961 38
C60	去氢吴茱萸碱 ^[17]	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	18.22	302.127 7	正	286.096 59, 258.102 66
C60	1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₁ H ₃₁ NO ₂	37.10	330.241 5	正	312.231 02, 284.164 76, 173.083 11
C60	吴茱萸碱 ^[17]	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	39.97	304.106 9	正	171.091 11, 161.070 43, 144.080 35, 134.059 66
C60	1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-十三碳-9-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	41.92	356.257 0	正	338.246 46, 186.090 87, 173.083 04
C60	1-甲基-2-[(4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i>)-十三碳-4,7-二烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₃₁ NO	42.21	338.246 3	正	186.090 87, 173.083 16
C60	wuchuyamide II ^[17]	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	42.37	336.121 7	正	318.124 00, 304.095 89
C60	姜糖酯 B ^[19]	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₄	44.86	677.378 1	负	415.147 16, 397.136 47, 279.233 80
C95	去氢吴茱萸碱 ^[17]	C ₁₉ H ₁₆ N ₃ O ⁺	22.11	302.127 7	正	287.104 49
C95	7 β -羟基吴茱萸次碱 ^[17]	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	41.36	304.107 2	正	286.096 83
C95	氧化小檗碱 ^[19]	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	58.45	352.116 9	正	337.093 51
C95	吴茱萸碱 ^[17]	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O	61.45	304.143 5	正	171.091 29, 161.070 62, 144.080 51, 134.059 80
C95	吴茱萸次碱 ^[17]	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	68.64	288.112 2	正	273.089 17
C95	二氢吴茱萸新碱 ^[17]	C ₂₃ H ₃₅ NO	90.13	342.278 2	正	173.083 25, 186.091 03
C95	1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-十三碳-9-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	74.09	356.257 4	正	338.246 80, 186.091 02, 173.083 27
C95	goshuyamide I ^[17]	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O	74.53	306.159 1	正	173.107 10, 144.080 55, 134.059 86
C95	1-甲基-2-[(<i>Z</i>)-壬-4-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₁₉ H ₂₅ NO	77.53	284.200 2	正	200.106 60, 186.090 97, 173.083 01
C95	1-甲基-2-[7-羰基-(<i>E</i>)-十三碳-9-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂	77.69	354.241 6	正	228.287 38, 186.090 84, 173.083 19
C95	1-甲基-2-[(3 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>E</i>)-十五碳-3,6,9,12-四烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₅ H ₃₁ NO	77.74	362.246 6	正	200.106 54, 186.090 87, 173.083 11
C95	1-甲基-2-[(1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i>)-十一碳-1,4,7-三烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₁ H ₂₅ NO	80.45	308.199 9	正	186.090 96, 173.083 16
C95	双羟基吴茱萸卡品碱 ^[17]	C ₂₃ H ₃₃ NO ₃	80.49	372.252 0	正	173.083 31
C95	1-甲基-2-正壬基-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₁₉ H ₂₇ NO	81.34	286.215 7	正	186.091 19, 173.083 08
C95	1-甲基-2-[(4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>E</i>)-十三碳-4,7,10-三烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₂₉ NO	83.20	336.231 1	正	186.090 94, 173.083 19
C95	1-甲基-2-[(<i>Z</i>)-十一碳-6-烯基]-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^{5[17]}	C ₂₁ H ₂₉ NO	83.24	312.231 1	正	200.106 45, 186.090 94, 173.083 22
C95	1-甲基-2-癸基-4(1 <i>H</i>)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₀ H ₂₉ NO	83.89	300.231 3	正	173.083 27
C95	亚油酸甲酯 ^[18]	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	84.75	295.226 0	正	179.142 79, 151.111 54, 93.070 21

续表 10

组分	化合物	分子式	t_R/min	m/z	模式	二级离子碎片 (m/z)
C95	1-甲基-2-[(4Z,7Z)-十三碳-4,7-二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₃ H ₃₁ NO	85.43	338.246 6	正	186.090 94, 173.083 15
C95	1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₁ H ₃₁ NO	86.20	314.246 8	正	186.091 02, 173.083 39
C95	1-甲基-2-[(6Z,9Z,12E)-十五碳-6,9,12-三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₅ H ₃₃ NO	86.52	364.262 5	正	186.090 96, 173.083 21
C95	吴茱萸卡品碱 ^[17]	C ₂₃ H ₃₃ NO	87.29	340.262 5	正	256.169 07, 242.153 27, 228.137 60, 200.106 40, 186.090 90, 173.083 15
C95	2-十三烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₂ H ₃₃ NO	88.11	328.262 4	正	186.091 09, 173.083 15
C95	1-甲基-2-[(6Z,9Z)-十五碳-6,9-二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₅ H ₃₃ NO	88.63	366.278 2	正	228.137 85, 186.090 91, 173.083 16
C95	二氢吴茱萸卡品碱 ^[17]	C ₂₃ H ₃₃ NO	90.13	342.278 2	正	186.091 03, 173.083 25
C95	1-甲基-2-[(Z)-十五碳-10-烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[17]	C ₂₅ H ₃₇ NO	90.98	368.293 9	正	173.083 28, 186.090 82
C95	格罗苦素甲或异构体 ^[18]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	26.80	501.179 0	负	457.189 30, 413.199 13
C95	格罗苦素甲或异构体 ^[18]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	27.98	501.178 9	负	457.189 30, 413.199 28
C95	wuchuyamide II ^[17]	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	29.63	336.133 1	正	318.122 89, 161.070 60, 134.059 78
C95	euodirutaecin A ^[17]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	29.85	515.158 3	负	471.168 40, 383.152 40, 146.918 72
C95	euodirutaecin B ^[17]	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	30.83	515.158 3	负	471.168 30, 383.153 99
C95	吴茱萸苦素 ^[17]	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	38.71	485.184 0	负	423.183 62, 397.168 03, 383.152 22
C95	吴茱萸内酯醇 ^[17]	C ₂₆ H ₂₈ O ₉	50.96	483.168 3	负	421.167 97, 395.152 44, 161.061 65
C95	吴茱萸酰胺 ^[17]	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	53.22	308.174 7	正	134.059 81
C95	吴茱萸苦素乙酸酯 ^[17]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	60.98	527.194 6	负	485.183 87, 467.173 25, 383.152 01
C95	6-β-乙酰氧基-5-表柠檬苦素 ^[17]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	64.78	527.194 8	负	485.184 20, 467.173 95, 383.151 89



A-C40 组分 B-C40 对照品 C-C60 组分 D-C60 对照品 E-C95 组分 F-C95 对照品 1-格兰地新 2-去氢吴茱萸碱 3-黄连碱 4-表小檗碱 5-非洲防己碱 6-药根碱 7-盐酸小檗碱 8-掌叶防己碱 9-去氢吴茱萸碱 10-四氢小檗碱 11-吴茱萸苦素 12-柠檬苦素 13-吴茱萸碱 14-去氢吴茱萸碱 15-7β-羟基吴茱萸次碱 16-氧化小檗碱 17-吴茱萸碱 18-吴茱萸次碱 19-二氢吴茱萸新碱

A-C40 component B-C40 reference C-C60 component D-C60 reference E-C95 component F-C95 reference 1-groenlandicine 2-dehydroevodiamine 3-coptisine 4-epiberberine 5-columbamine 6-jatrorrhizine 7-berberine 8-palmatine 9-dehydroevodiamine 10-tetrahydroberberine 11-rutaevin 12-limonin 13-evodiamine 14-dehydroevodiamine 15-7β-hydroxyrutaecarpine 16-oxyberberine 17-evodiamine 18-rutaecarpine 19-dihydroevocarpine

图 2 C40、C60、C95 组分和对照品 UPLC 图

Fig. 2 UPLC results of C40, C60 and C95 components and references

100%~5%乙腈; 105~110 min, 5%乙腈; 检测波长为 327 nm 和 240 nm^[22-23]。参照《中国药典》2020 年版^[24]规定进行方法学考察试验。精密称取格兰地新、去氢吴茱萸碱、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱、药根碱、盐酸小檗碱、掌叶防己碱、四氢小檗碱、吴茱萸苦素、柠檬苦素、吴茱萸碱、7 β -羟基吴茱萸次碱、氧化小檗碱、吴茱萸次碱、二氢吴茱萸

新碱对照品适量, 用甲醇定容至 1.0 mg/mL, 取适量对照品溶液进行梯度稀释, 得混合对照品溶液。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 检测下限为信噪比 (S/N) = 3, 定量下限为 $S/N=10$ 。在检测质量浓度范围内, 所有化合物的线性关系均良好 ($r \geq 0.999\ 3$)。回归方程、 r 值、线性范围、检测下限和定量下限如表 11 所示。

表 11 化合物回归方程、检测下限及定量下限

Table 11 Regression equation, lower limit of detection and quantification of compounds

组分	化合物	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测下限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量下限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
C40	格兰地新	$Y=10\ 117\ X-1\ 521.8$	0.999 8	2~50	0.18	0.58
	去氢吴茱萸碱	$Y=9\ 775\ X-5\ 061.8$	0.999 5	1~20	0.20	0.66
	黄连碱	$Y=10\ 228\ X-3\ 765.8$	0.999 3	1~20	0.18	0.60
	表小檗碱	$Y=19\ 014\ X-1\ 109.9$	0.999 7	1~20	0.07	0.24
	非洲防己碱	$Y=21\ 611\ X-4\ 192.5$	0.999 6	1~20	0.06	0.21
	药根碱	$Y=20\ 815\ X-5\ 620.3$	0.999 7	1~20	0.07	0.24
	盐酸小檗碱	$Y=22\ 361\ X+2\ 254.5$	0.999 4	1~20	0.12	0.40
	掌叶防己碱	$Y=21\ 499\ X-4648$	0.999 3	1~20	0.13	0.42
C60	去氢吴茱萸碱	$Y=29\ 850\ X+2\ 890.1$	0.999 9	0.5~50	0.02	0.06
	四氢小檗碱	$Y=55\ 653\ X+1\ 618.2$	0.999 9	0.2~20	0.01	0.03
	吴茱萸苦素	$Y=3\ 442.4\ X-351.02$	0.999 9	1~50	0.22	0.74
	柠檬苦素	$Y=3\ 849.4\ X-2\ 366.6$	0.999 7	2~100	0.16	0.53
	吴茱萸碱	$Y=41\ 303\ X-1\ 249.3$	0.999 9	0.1~50	0.004	0.014
C95	去氢吴茱萸碱	$Y=12\ 111\ X+82.493$	0.999 9	1~20	0.05	0.17
	7 β -羟基吴茱萸次碱	$Y=17\ 162\ X-2\ 116.9$	0.999 9	1~20	0.12	0.40
	氧化小檗碱	$Y=19\ 842\ X-2314$	0.999 9	1~20	0.10	0.32
	吴茱萸碱	$Y=20\ 749\ X-2\ 555.5$	0.999 9	1~20	0.08	0.27
	吴茱萸次碱	$Y=31\ 707\ X-1\ 453.2$	0.999 9	2~50	0.04	0.12
	二氢吴茱萸新碱	$Y=9\ 219.5\ X-54.69$	0.999 9	1~20	0.06	0.21

2.2.3 方法学考察

(1) 精密度试验: 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 根据标准曲线求得质量浓度, 计算其 RSD 值, 得日内精密度结果。连续 6 d 分析同一混合对照品溶液, 根据标准曲线求得质量浓度, 计算其 RSD 值, 得日间精密度。结果日内和日间精密度的 RSD 分别为 0.410 4%~1.777 5%和 0.194 4%~1.881 4%, 说明仪器精密度良好。

(2) 重复性试验: 按照“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别进行 UPLC 检测, 根据标准曲线和峰面积求得浓度, 计算 RSD 值。RSD 为 0.313 0%~1.854 0%, 说明方法重复性良好。

(3) 稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 在制备后 0、2、4、8、12、24 h 检测, 根据标准曲线求

得质量浓度, 计算 RSD 值。24 h 稳定性试验的 RSD 为 0.407 3%~1.899 9%, 说明样品稳定。

(4) 加样回收率试验: 取各成分质量浓度已知的供试品溶液 6 份, 按照供试品中各成分含量的 50%~150%向其中精密加入已知质量浓度的对照品溶液, 根据标准曲线求得质量浓度, 得总检测量。按照公式加样回收率=(检测量-初始量)/加入量计算各成分回收百分比和 RSD 值。结果得加样回收率为 98.37%~101.57%, RSD 为 0.515 9%~1.937 0% (表 12), 符合检测要求。

2.2.4 样品测定 3 个工艺组分中主要生物碱成分的含量测定结果见表 13。从表 13 中可知, C40 组分中含量最高的成分为盐酸小檗碱, 其次为黄连碱、掌叶防己碱和表小檗碱; C60 组分中柠檬苦素含量

表 12 加样回收率结果

Table 12 Results of recovery test

组分	化合物	初始量/ μg	加入量/ μg	检测量/μg	回收率/ %	RSD/ %	组分	化合物	初始量/ μg	加入量/ μg	检测量/μg	回收率/ %	RSD/ %
C40	格兰地新	2.38	2.20	4.58±0.03	99.89	1.230 9	C60	吴茱萸苦素	6.90	9.50	16.44±0.12	100.43	1.248 0
	去氢吴茱萸碱	0.87	0.84	1.71±0.01	100.54	1.482 9		柠檬苦素	21.71	29.29	50.55±0.68	98.78	1.905 3
	黄连碱	2.52	2.31	4.86±0.03	101.21	1.343 5		吴茱萸碱	0.31	0.39	0.71±0.01	101.53	1.937 0
	表小檗碱	1.04	0.95	1.99±0.01	99.71	1.557 4	C95	去氢吴茱萸碱	3.35	1.95	5.28±0.04	99.91	1.241 2
	非洲防己碱	0.73	0.65	1.39±0.01	100.90	1.675 9		7β-羟基吴茱萸次碱	1.97	1.80	3.76±0.02	99.66	1.257 2
	药根碱	0.54	0.42	0.96±0.00	100.96	0.738 3		氧化小檗碱	2.37	2.63	5.01±0.03	100.35	1.137 2
	盐酸小檗碱	9.77	11.38	21.26±0.15	100.97	1.264 5		吴茱萸碱	4.47	3.72	8.19±0.02	100.09	0.515 9
	掌叶防己碱	1.67	1.61	3.28±0.02	100.03	1.544 9		吴茱萸次碱	11.13	12.10	23.32±0.08	100.76	0.686 2
C60	去氢吴茱萸碱	2.36	3.34	5.67±0.08	98.37	1.673 5		二氢吴茱萸新碱	1.11	0.95	2.05±0.01	99.02	1.173 6
	四氢小檗碱	0.13	0.19	0.32±0.00	101.57	1.446 5							

表 13 样品中主要成分含量

Table 13 Contents of main compounds in samples

组分	化合物	测得量/mg	占该组分生物 碱比/%	占该组分洗脱 总量比/%	组分	化合物	测得量/mg	占该组分生物 碱比/%	占该组分洗脱 总量比/%
C40	盐酸小檗碱	300.17±16.43	32.96	20.15	C60	去氢吴茱萸碱	2.71±0.77	86.86	6.87
	黄连碱	77.91±4.89	8.56	5.23		吴茱萸碱	0.10±0.02	3.21	0.25
	掌叶防己碱	51.80±3.27	5.69	3.48		四氢小檗碱	0.04±0.01	1.28	0.10
	表小檗碱	32.01±1.96	3.51	2.15	C95	吴茱萸次碱	0.66±0.02	36.93	4.14
	非洲防己碱	21.96±0.94	2.41	1.47		吴茱萸碱	0.33±0.01	18.44	2.07
	格兰地新	17.69±0.30	1.94	1.19		7β-羟基吴茱萸次碱	0.15±0.01	8.32	0.93
	药根碱	16.61±0.86	1.82	1.11		二氢吴茱萸新碱	0.10±0.01	5.75	0.64
	去氢吴茱萸碱	8.66±0.39	0.95	0.58		去氢吴茱萸碱	0.10±0.01	5.47	0.61
C60	柠檬苦素	6.08±0.20	—	15.40		氧化小檗碱	0.41±0.05	22.68	2.54
	吴茱萸苦素	2.07±0.31	—	5.24					

最高，与吴茱萸苦素同为三萜苦素类成分，二者相加含量远高于其他成分；C95 组分中吴茱萸碱和吴茱萸次碱是主要成分，二者相加占该组分生物碱总量的 55% 以上。

3 讨论

3.1 制备工艺建立

左金丸以生物碱类为主要活性成分，但是还含有一定数量的柠檬苦素类成分。根据文献报道，柠檬苦素类成分虽然具有多种药理活性，但同时还存在基因毒性，可致肝损伤^[7]、细胞突变和染色体畸变^[25-26]，而且与左金丸主要功效的相关性不大。在组分中药理论指导下，将柠檬苦素类与生物碱类分别富集，进行药效学和药理学研究，有助于高效低毒的现代中药研制。黄连中的生物碱多为异喹啉类生物碱，极性较大，而吴茱萸中的生物碱为吲哚类

和喹诺酮类生物碱，极性较小。二者在色谱行为方面存在差异，在色谱洗脱过程中很难采用一种溶剂或一个梯度进行高效洗脱。已有研究报道，采用大孔树脂柱和单一洗脱梯度纯化，所得左金丸总生物碱的含量较低（38.47%）^[10]。而且，这种洗脱方式也不能将吴茱萸中的柠檬苦素类分离出来。为此，本研究采用组分中药研究中的色谱极性分段筛选方法，通过调整溶剂极性并分段洗脱的方式达到分离的目的。

3.2 定性定量研究

工艺所得 C40 组分主要含有 31 种化合物，其中含量最高的成分为盐酸小檗碱。该组分总生物碱质量分数高达 61.13%，绝大部分为黄连生物碱，是最主要的生物碱组分。C95 组分主要含有 36 种化合物，其中含量最高的为吴茱萸次碱，大部分为吴茱

莨中极性较小的生物碱,包括吲哚和喹诺酮生物碱 2 个类别。该组分总生物碱质量分数为 11.19%,与 C40 组分相加超过 60%。C60 组分主要含有 32 种化合物,其中含量最高的为柠檬苦素,并且柠檬苦素和吴茱萸苦素二者相加占该组分的 20.65%,为优势成分。因此 C40 和 C95 是具有潜在生物活性的生物碱类组分, C60 组分则为柠檬苦素类组分。定性定量分析进一步证实了采用这种分离工艺可实现总生物碱和柠檬苦素类的高效分离,在明确各组分的药理活性和毒性的基础上,3 个组分按照不同比例进行组分配伍研究,可以获得新型的组分中药新处方。

本研究建立了重现性好的左金丸配伍组分制备工艺,所得组分活性成分含量高,质量稳定,为进一步的成药性研究和组分中药研制奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊平, 蒋灵芝, 许利平. 左金丸水煎液和生物碱抗胃溃疡的实验研究 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(2): 263-293.
- [2] 林科名, 丁世兰, 王强松, 等. 左金丸总生物碱对束缚水浸应激性胃溃疡模型大鼠神经体液调节的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 401-405.
- [3] Wang J, Wang L, Lou G H, et al. *Coptidis Rhizoma*: A comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 193-225.
- [4] Rho T C, Bae E A, Kim D H, et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from *Evodiae Fructus* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(10): 1141-1143.
- [5] 刘彦昌, 干信, 张迎庆. 天然药物吴茱萸生物碱研究进展 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(7): 7-10.
- [6] Luo C D, Ai J W, Ren E F, et al. Research progress on evodiamine, a bioactive alkaloid of *Evodiae Fructus*: Focus on its anti-cancer activity and bioavailability (review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1327.
- [7] 魏舒婷, 盛云华, 黄坚, 等. 吴茱萸指标成分体外对肝损伤作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 87-92.
- [8] 张俊华, 樊官伟, 张晗, 等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4054-4058.
- [9] 张伯礼, 王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究: 以组分配伍研制现代中药 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(5): 258-261.
- [10] 李鹤, 龚来颀, 曾作财. AB-8 型大孔吸附树脂纯化左金丸有效部位的工艺优选 [J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(2): 391-394.
- [11] 魏金津, 姚曦, 何伟. 离子交换树脂纯化黄连生物碱的工艺研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 625-628.
- [12] 陈奇, 邓雁如, 于静, 等. 弱酸性离子交换树脂纯化黄连总生物碱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 9-12.
- [13] 龙贝, 肖谷清, 宋娟娟, 等. 聚丙烯酸钠树脂提纯黄连中生物碱 [J]. 离子交换与吸附, 2020, 36(5): 415-422.
- [14] 陈文文, 过林, 贺敏, 等. UPLC-DAD/Q-TOF-MS 法分析左金丸化学成分 [J]. 中成药, 2017, 39(11): 2412-2414.
- [15] 李定祥, 王珍, 罗建光, 等. 坤泰胶囊化学成分的 LC-ESI-MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 90-93.
- [16] 黄涛阳, 王晖, 翁燕君, 等. 电喷雾电离-串联质谱快速分析黄连解毒汤的化学成分 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 119-121.
- [17] 苏秀丽, 印敏, 徐曙, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析吴茱萸化学成分 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1223-1227.
- [18] 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术分析黄连中非生物碱类成分 [J]. 中药材, 2020, 43(2): 354-358.
- [19] 陈冬玲, 张凯, 于欣羽, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 的姜黄连炮制前后化学成分比较研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 693-701.
- [20] 朱童, 杨丹, 刘珊珊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术的黄连地上部分与地下部分化学成分比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 980-987.
- [21] 黄嘉璐, 刘秀斌, 郑亚杰, 等. 基于 UHPLC-QTOF/MS 的博落回花中生物碱类化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(10): 1376-1381.
- [22] 郝乘仪, 冯波, 郭淑英, 等. 黄连上清片中 9 种成分的 HPLC 波长切换法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46(9): 995-998.
- [23] 钟世欢, 陈青俊, 王京, 等. QuEChERS-HPLC 测定柚类果实中柠檬苦素类化合物 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(4): 261-265.
- [24] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 480.
- [25] 夏祺悦, 刘燕萍, 杨润芳, 等. 吴茱萸及其主要成分的遗传毒性研究 [J]. 世界中医药, 2014, 9(2): 145-150.
- [26] 夏祺悦, 杨润芳, 刘燕萍, 等. 吴茱萸对 CHL 细胞染色体畸变影响的研究 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(6): 1081-1085.

[责任编辑 郑礼胜]