基于化学“组成-含量-相态”综合表征的黄连厚朴汤物质基础挖掘研究

谢明辉[1]，张嘉懿[2]，蒋天晴[1]，邹　亮[2,3]，胡一晨[1,2*]

1. 成都大学药学院，四川 成都　610106
2. 成都大学食品与生物工程学院 农业农村部杂粮加工重点实验室，四川 成都　610106
3. 成都农业科技职业学院，四川 成都　611130

摘　要：目的　以黄连厚朴汤（Huanglian Houpu Decoction，HHD）煎液种类、含量、相态为基础，研究配伍合煎的化学成分及含量变化；探究配伍合煎的组分自组装行为。**方法**　采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法（UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS）鉴定并归属 HHD 化学成分；利用超速离心和透析技术对 HHD 进行相态拆分，使用马尔文粒径仪、透射电子显微镜对各相态的粒径、ζ 电位、微观形态进行表征，选用紫外分光光度法、HPLC 法对各相态的蛋白、多糖及黄连、厚朴有效成分表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚含量进行测定。**结果**　鉴定并归属 HHD 中的 43 种成分；分析其中 2 个未知化合物的裂解规律，发现可能存在组分自组装行为；对比合煎液、混合液及单煎液化学成分及含量，发现 6 种有效成分含量均表现为合煎液低于混合液低于单煎液；通过相态拆分获得 5 个亲水型相态，粒径分布在 20～1 000 nm，主要为沉淀相态、真溶液相态和胶体相态；对比合煎液与混合液不同相态，分析蛋白、多糖、黄连与厚朴中 6 种有效成分含量，发现它们在沉淀相态中的含量均表现为合煎液低于混合液，而在胶体相态中正好相反；说明蛋白、多糖及 6 种有效成分通过配伍合煎后，可能发生结合，未沉降而保留在胶体相态，进一步推测组分自组装行为的存在。**结论**　HHD 配伍合煎的化学成分及含量存在明显差异，这可能与中药汤剂配伍合煎的复杂变化有关，为后续深入研究中药汤剂组分自组装提供依据。

关键词：UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS；黄连厚朴汤；配伍合煎；相态；超分子；自组装；蛋白；多糖；表小檗碱；黄连碱；巴马汀；小檗碱；和厚朴酚；厚朴酚；沉淀相态；真溶液相态；胶体相态

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)11 - 3879 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.010

Exploration of material basis in Huanglian Houpu Decoction based on comprehensive characterization of “composition-content-phase” in chemistry

XIE Minghui[1], ZHANG Jiayi[2], JIANG Tianqing[1], ZOU Liang[2,3], HU Yichen[1,2]

1. School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China
2. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China
3. Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China

Abstract: Objective　To study the chemical composition and content changes of the decoction of Huanglian Houpu Decoction (HHD, 黄连厚朴汤) based on the decoction type, content and phase state, and to investigate the self-assembly behavior of the components of the decoction of HHD. **Methods**　The compositions of HHD were identified by UPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS. The phases of HHD were separated using ultracentrifugation and dialysis, and the particle size, ζ potential, and microscopic morphology of each phase were characterized by Zetasizer Nano ZS instrument and transmission electron microscope. The contents of proteins, polysaccharides, epiberberine, coptisine, palmatine, berberine, magnolol and honokiol in different phases of HHD were determined by UV spectrophotometry and HPLC. **Results**　A total of 43 compositions were identified and assigned, the fragmentation patterns of

收稿日期：2024-12-10

基金项目：成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室开放研究基金资助项目（SKLSCMR2021008）

作者简介：谢明辉，硕士研究生，研究方向为中药物质基础研究。Tel: 18280252703　E-mail: 212023100703004@cdu.edu.cn

***通信作者：**胡一晨，硕士生导师，教授，研究方向为中药药效物质基础研究及作用机制研究、中药质量控制评价方法研究。Tel: 18781977105　E-mail: huyichen@cdu.edu.cn

two unknown compounds which revealed the possible existence of composition self-assembly behaviors were analyzed. Compared chemical compositions and contents of the combined decoction, the mixed decoction and the single decoction, it was found that the contents of six active compositions all showed combined decoction were less than mixed decoction, mixed decoction were less than single decoction. Five hydrophilic phases were isolated from HHD, the particle size distribution ranged from 20 to 1 000 nm, mainly including precipitation phases, true solution phase and colloidal phase. Compared different phases of combined decoction and mixed decoction, the contents of proteins, polysaccharides, and six active compositions from *Coptis chinensis* and *Magnolia officinalis* were analyzed, it was found that contents of these compositions in combined decoction were less than mixed decoction under the precipitation phases, while it was just the opposite under the colloidal phase. It indicated that during the compatibility of combined decoction, proteins, polysaccharides and six active compositions may combine with each other, remain in the colloidal phase without sedimentation, and further speculating the existence of self-assembly behaviors among the compositions. **Conclusion** There were significant differences in chemical compositions and contents during the compatibility of combined decoction in HHD, which may be related to the complex changes during the compatibility of combined decoction and providing a basis for the subsequent research on the composition self-assembly in traditional Chinese medicine decoctions.

Key words: UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS; Huanglian Houpo Decoction; compatibility of combined decoction; phases; supramolecule; self-assembly; proteins; polysaccharides; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine; honokiol; magnolol; precipitation phases; true solution phase; colloidal phase

中药汤剂是中医药服务临床的首选剂型和最常用剂型之一，是中药颗粒剂、片剂、口服液等现代制剂发展和创新的源头[1]。目前，对中药汤剂药效物质基础和作用机制的研究大多停留在可测化学成分挖掘和活性评价角度[2-3]。有学者提出“结构中药学”理论，认为中药药效物质包含化学和物理双重属性，中药起效除与其所含化学成分有关，还与成分的存在形式和物相状态息息相关[4]。越来越多研究发现，汤剂制备过程中成分间发生复杂的物理化学反应，如沉淀、络合、解离、氧化等相互作用，从而导致中药汤剂呈现“复杂混合相态”状态，汤剂制备过程中成分相态的改变也显著影响其吸收、转运、分布、代谢等体内行为[5-6]。

随着超分子化学、纳米生物学、结构生物学、计算科学等学科的发展，中药汤剂物相形式和化学成分结构特征被逐渐揭示，极大地拓展了中药药效物质基础的认识维度[7]。已有研究表明，汤剂中成分间发生自组装形成纳米相态，可以提高中药有效成分的溶解度、稳定性和生物利用度，从而增强其药效[8-10]。因此，从中药汤剂化学成分种类、含量、相态等角度进行物质基础综合研究，有利于全面解析中药汤剂临床药效作用机制。

黄连厚朴汤（Huanglian Houpo Decoction，HHD）记载于明代中医书籍《普济方》卷一百三十三引《德生堂方》，主要由黄连（三钱）和厚朴（两钱）组成，主治伤寒发热烦渴之证，具有清热、燥湿、止痢功效[11]，临床常用于治疗湿热所致的胃肠道难疑杂症。针对某些消化系统疾病及炎症反应，如溃疡性结肠炎，王佳俊等[12]在葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎模型小鼠中发现 HHD 可以缓解相关症状：抑制炎症反应、调节活性氧表达、降低细胞凋亡、改善结肠病理损伤等，具有良好的治疗潜力。此外现代药理研究表明 HHD 还具有抗炎[13-15]、抗流感[16-17]、止泻[18]等功效。前期研究发现 HHD 配伍合煎后呈现混合相态，但目前对 HHD 的研究大多聚焦于药理药效方面；缺乏对其物质基础的全面表征，不利于临床应用。

高分辨液质联用仪在解析中药汤剂化学组成中具有分析范围广、分离能力强、分析结果可靠、分析时间快、自动化程度高等优势，结合超滤-透析法分离汤液的不同相态，从组分概貌、多指标成分含量、相态拆分等途径对 HHD 综合表征，为解析 HHD 物质基础新形式提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Q Exactive Focus 组合型 Orbitrap 高分辨液质联用仪，赛默飞世尔科技公司；DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅，北京市永光明医疗仪器有限公司；UV-2600A 型紫外-可见分光光度计，上海尤尼柯仪器有限公司；IGL-16M 型高速冷冻离心机，长沙湘智离心机仪器有限公司；Optima XPN-100 型超高速离心机，贝克曼库尔特公司；Nano-ZS/ZEN-3600 型动态光散射粒度仪（DLS），英国马尔文公司；JEM-F200 型透射电子显微镜（TEM），日本电子株式会社；Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪、Biotek Synergy HTX 型酶标仪，安捷伦科技（中国）有限

公司；CPA225D 型十万分之一电子天平，北京赛多利斯科学仪器有限公司；SHZ-D III 型循环式真空泵，巩义市予华仪器有限责任公司；FE28 型 pH 剂，上海梅特勒-托利多仪器有限公司；SB-800DTD、SB-5200DT 型超声波清洗仪，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 药物与试剂

甲醇、乙腈均为色谱纯，磷酸、三乙胺、苯酚均为分析纯，购自成都市科隆化学品有限公司；浓硫酸为分析纯，购自成都金山化学试剂有限公司；BCA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所；试验用水为超纯水。

本研究所用黄连饮片、厚朴饮片均购自四川省成都市国际商贸城，经成都中医药大学章津铭教授鉴定，黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.的干燥根茎，厚朴为木兰科木兰属植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.的干燥根皮。

对照品表小檗碱（批号 WP24012606）、黄连碱（批号 WP24012606）、巴马汀（批号 WP23050608）、小檗碱（批号 WP23050512）、和厚朴酚（批号 WP23042703）、厚朴酚（批号 WP23042401），购自四川省维克奇生物科技有限公司，质量分数均≥98%；对照品无水葡萄糖，批号 190620，购自西陇科学股份有限公司，质量分数≥98%。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 黄连厚朴合煎液 将黄连饮片及厚朴饮片粉碎，根据明《普济方》中 HHD 的剂量，将其处方换算为现代计量单位[19]，取黄连饮片 13.98 g，厚朴饮片 9.32 g，加水 900 mL，武火煮沸文火煎煮 30 min 后滤过，即得黄连厚朴合煎液。

2.1.2 黄连、厚朴单煎液 将黄连饮片及厚朴饮片粉碎，根据明《普济方》中 HHD 的剂量，将其处方换算为现代计量单位。取黄连饮片 13.98 g，加水 540 mL，武火煮沸文火煎煮 30 min 后滤过，即得黄连单煎液；取厚朴饮片 9.32 g，加水 360 mL，武火煮沸文火煎煮 30 min 后滤过，即得厚朴单煎液。

2.1.3 黄连厚朴混合液 将黄连单煎液与厚朴单煎液混合后，即得黄连厚朴混合液。

2.1.4 供试品溶液 取合煎液、混合液、单煎液各 50 mL，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，滤液过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.1.5 对照品溶液 精密称定对照品表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚适量，加甲醇溶解并稀释制得含表小檗碱 0.10 mg/mL、黄连碱 0.10 mg/mL、巴马汀 0.10 mg/mL、小檗碱 0.10 mg/mL、和厚朴酚 0.05 mg/mL、厚朴酚 0.05 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.6 阴性对照溶液 按照“2.1.1”项下方法制得不含黄连、厚朴的阴性对照溶液。

2.2 UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 技术分析 HHD 化学成分

2.2.1 色谱条件[20] 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3（50 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液（A）-0.1%甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱：0～11.0 min，85%～25% A；11.0～12.0 min，25%～2% A；12.0～14.0 min，2% A；14.0～14.1 min，2%～85% A；14.1～16.0 min，85% A；体积流量 0.5 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 5 μL。

2.2.2 质谱条件 使用 Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪作为分析检测的仪器，采用电喷雾离子化源（ESI），辅助气流量 15 arb，辅助加热器温度 350 ℃，离子传输管温度 320 ℃，S-lens 射频水平 50；正负离子检测模式（ESI^+、ESI^-），喷雾电压 4 kV（正）或−3.8 kV（负），鞘气流量 35 arb，扫描方式采用正负离子 Full MS/dd-MS^2 模式，其中包括 1 次一级全扫描（分辨率为 60 000 FWHM）和 1 次数据依赖的二级扫描（分辨率为 15 000 FWHM）2 个事件，正、负离子扫描范围均为 *m*/*z* 100～1 000，碰撞能梯度为 16、32、48 V。

2.2.3 HHD 化学成分数据库的构建和色谱峰的鉴定 根据高分辨质谱提供的准分子离子$[M]^+$、$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$、$[M-H]^-$等信息提取到对应的一级质谱离子峰和精确的相对分子质量，利用 Xcalibur 工作站计算未知化合物可能的元素组成和可能的分子式，并通过 Pubchem、Tcmsp、Etcm 化学成分数据库检索、对照品比对及国内外文献报道，对合煎液、混合液及单煎液中化学成分进行色谱峰鉴定。分析推导相关化合物的裂解规律。

基于“2.2.1”项下色谱条件和“2.2.2”项下质谱条件，应用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 技术对 HHD 化学成分进行定性分析，HHD 正、负离子模式的总离子流图如图 1 所示。通过 Pubchem、Tcmsp、Etcm 化学成分数据库检索及国内外文献报

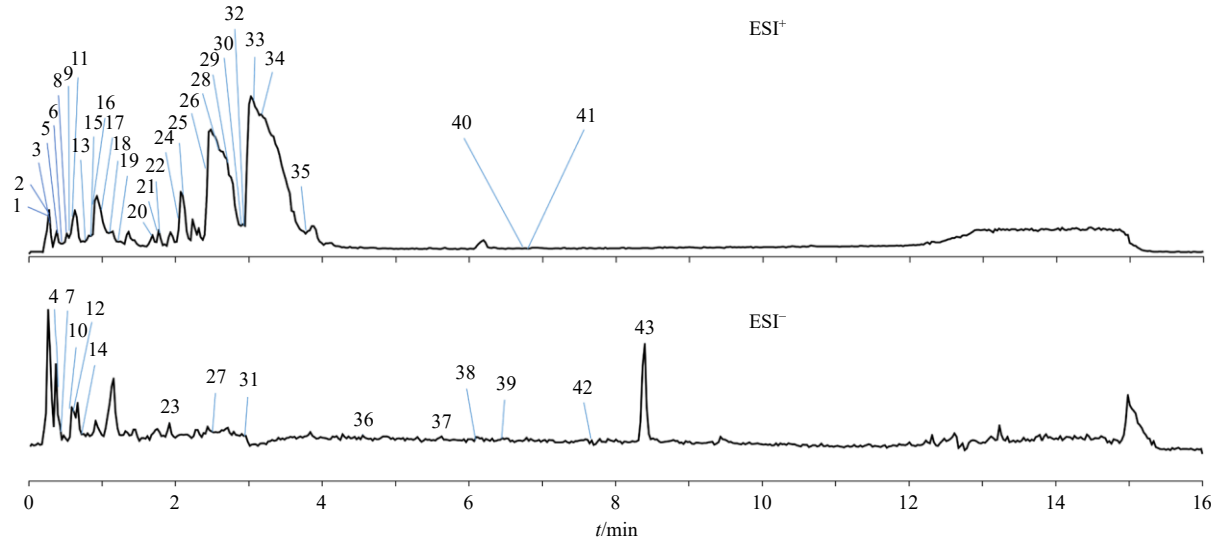


图 1　HHD 合煎液总离子流图

Fig. 1　TICs of HHD combined decoction

道，共总结归纳得到 43 个化合物，并记录化合物信息，包括化合物中英文名称、分子式和精确相对分子质量及结构式，其中黄连 20 个、厚朴 26 个，共有化合物 5 个，未知化合物 2 个。结果见表 1。

2.2.4　相关化合物裂解规律分析

（1）生物碱类：从 HHD 中鉴定出 22 种生物碱类成分，主要包括白栝楼碱、甜菜碱、降氧化北美黄连次碱、厚朴碱、赤藓碱、8-氧化黄连碱、波尔定碱、木兰花碱、reticuline、四氢小檗碱、阿西米洛宾、竹叶椒碱、去亚甲基小檗碱、格兰地新、黄连碱、表小檗碱、非洲防己碱、*N*-去甲基荷叶碱、番茄枝碱、小檗碱、巴马汀、脱氢紫堇碱。以小檗碱和黄连碱二级质谱[M]$^+$离子模式下裂解碎片推导过程为例，小檗碱和黄连碱在正离子模式下响应均良好，一级质谱得到小檗碱[M]$^+$准分子离子峰，经 Xcalibur 元素组成拟合化学式为 $C_{20}H_{18}NO_4^+$，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得二级碎片离子 *m/z* 336.122 7 [M]$^+$，依次裂解为 *m/z* 321.099 3 [M－CH_3]$^+$、306.075 7 [M－CH_3－CH_3]$^+$、292.096 4 [M－CH_3－H－CO]$^+$、278.080 5 [M－CH_3－CH_3－CO]$^+$ 离子碎片；同样黄连碱一级质谱得到 *m/z* 320.091 3 [M]$^+$准分子离子峰，经 Xcalibur 元素组成拟合化学式为 $C_{19}H_{14}NO_4^+$，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得二级碎片离子 *m/z* 292.096 2 [M－CO]$^+$，可能进一步裂解为 *m/z* 264.101 8 [M－CO－CO]$^+$碎片离子，由以上裂解 *m/z* 值可知化合物小檗碱和黄连碱裂解途径符合生物碱的裂解规律，与文献报道裂解途径相似[22]，通过对照品的一级、二级质谱裂解碎片和提取离子峰位置、相对保留时间比对，最终确定化合物为小檗碱（$C_{20}H_{18}NO_4^+$）和黄连碱（$C_{19}H_{14}NO_4^+$），相应质谱裂解途径见图 2。

（2）木脂素类：从 HHD 中鉴定出 5 种木脂素类成分，主要包括木兰苷 F、厚朴木脂体 B、厚朴醛 B、和厚朴酚、厚朴酚。以和厚朴酚与厚朴酚二级质谱[M－H]$^-$离子模式下裂解碎片推导过程为例，和厚朴酚与厚朴酚在负离子模式下都有较好的响应，一级质谱得到和厚朴酚 *m/z* 265.123 5 [M－H]$^-$准分子离子峰，经 Xcalibur 元素组成拟合化学式为 $C_{18}H_{17}O_2^-$，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得二级碎片离子 *m/z* 249.092 1 [M－H－CH_3]$^-$、224.084 2 [M－H－$CH_2CH{=}CH_2$]$^-$。同样，厚朴酚一级质谱得到 *m/z* 265.123 6 [M－H]$^-$准分子离子峰，经 Xcalibur 元素组成拟合化学式为 $C_{18}H_{17}O_2^-$，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得主要二级碎片离子 *m/z* 247.112 9 [M－H－H_2O]$^-$、224.082 3 [M－H－$CH_2CH{=}CH_2$]$^-$。由以上裂解 *m/z* 值并通过对照品的一级、二级质谱裂解碎片和提取离子峰位置、相对保留时间比对，最终确定化合物为和厚朴酚（$C_{18}H_{18}O_2$）与厚朴酚（$C_{18}H_{18}O_2$），相应质谱裂解途径见图 3。

（3）主要成分复合物类：经过合煎处理发现，在合煎液中存在未知化合物 1、2，而在混合液和单煎液中并不存在，通过观察其碎片离子，不难发现，未知化合物具有和上述生物碱类成分极为相似的碎片离子。由此可以推测未知化合物至少包含了上述生物碱类成分的母核结构，并与另外的分子形成了

表 1 HHD 化学成分鉴定

Table 1 Ingredient identification of HHD

峰号	t_R/min	化合物分子式	离子模式	*m/z* 理论值	*m/z* 测定值	误差 ($\times10^{-6}$)	碎片离子	化合物	类别	来源
1	0.25	$C_6H_{14}N_4O_2$	$[M+H]^+$	175.119 0	175.119 0	0.273	175.118 7, 116.070 7, 130.097 4, 158.092 2	精氨酸	氨基酸类	厚朴
2	0.28	$C_{11}H_{18}NO^+$	$[M]^+$	180.138 8	180.138 2	−3.548	121.064 9, 180.138 0, 163.075 1, 145.064 7	白栝楼碱	生物碱类	厚朴
3	0.31	$C_5H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	118.086 3	118.086 5	2.073	118.086 4, 59.073 6, 72.081 3, 58.065 8	甜菜碱	生物碱类	黄连、厚朴
4	0.38	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.019 7	191.019 1	−3.276	111.007 6, 87.007 5, 191.019 1, 129.018 2	柠檬酸[21]	羧酸类	黄连、厚朴
5	0.39	$C_{10}H_9NO_3$	$[M+H]^+$	192.065 5	192.065 5	−0.103	192.101 7, 177.078 2, 128.019 4, 149.083 2	降氧化北美黄连次碱[22]	生物碱类	黄连
6	0.42	$C_9H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	166.086 3	166.086 2	−0.332	128.080 8, 166.086 0, 137.059 5, 149.059 6	苯丙氨酸	氨基酸类	黄连
7	0.43	$C_9H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	197.045 5	197.045 1	−2.267	70.991 9, 135.044 2, 123.044 1, 179.034 3	丁香酸	酚酸类	黄连
8	0.50	$C_{14}H_{20}N_2O_3$	$[M+H]^+$	265.154 7	265.154 5	−0.637	177.054 4, 145.028 2, 265.154 2, 248.127 7	*N*-feruloylputrescine	有机碱类	厚朴
9	0.55	$C_{17}H_{24}O_9$	$[M+Na]^+$	395.131 3	395.131 0	−0.641	395.130 7, 232.070 2, 185.041 9, 364.112 6	紫丁香苷	苯丙醇苷	厚朴
10	0.57	$C_{35}H_{46}O_{20}$	$[M-H]^-$	785.251 0	785.252 6	2.080	161.023 6, 785.252 3, 623.220 0, 477.161 5	木兰苷F[23]	木脂素类	厚朴
11	0.60	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	$[M]^+$	314.175 6	314.174 9	−2.287	314.174 7, 58.065 8, 107.049 4, 269.116 7	厚朴碱	生物碱类	黄连、厚朴
12	0.62	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.088 4	1.684	191.055 5, 353.088 3, 173.044 8, 179.034 3	绿原酸	有机酸类	黄连、厚朴
13	0.71	$C_{18}H_{19}NO_3$	$[M+H]^+$	298.143 8	298.143 6	−0.570	298.143 0, 283.119 7, 130.159 1, 191.093 8	赤薜碱[20]	生物碱类	黄连
14	0.73	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	137.024 4	137.023 4	−7.425	137.023 4, 136.015 5, 108.020 6, 119.012 7	原儿茶醛	有机酸类	厚朴
15	0.77	$C_{19}H_{13}NO_5$	$[M+Na]^+$	358.068 6	358.068 4	−0.541	358.164 6, 263.070 0, 295.096 3, 313.106 9	8-氧化黄连碱[24]	生物碱类	黄连
16	0.85	$C_{19}H_{21}NO_4$	$[M+H]^+$	328.154 3	328.154 0	−1.020	328.154 0, 265.085 2, 297.105 5, 177.077 7	波尔定碱	生物碱类	黄连、厚朴
17	0.96	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	$[M]^+$	342.170 5	342.169 9	−1.850	342.169 5, 297.111 7, 265.085 4, 237.090 8	木兰花碱	生物碱类	厚朴
18	1.10	$C_{19}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	330.170 0	330.170 0	0.046	192.101 6, 330.169 5, 137.059 6, 175.075 1	reticuline	生物碱类	厚朴
19	1.18	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M+H]^+$	369.118 0	369.117 7	−0.836	177.054 4, 145.028 2, 117.033 6, 149.059 7	阿魏酰奎宁酸异构体	有机酸类	黄连
20	1.67	$C_{20}H_{21}NO_4$	$[M+H]^+$	340.154 3	340.154 1	−0.690	340.154 0, 324.122 7, 325.130 5, 309.099 5	四氢小檗碱[25]	生物碱类	黄连
21	1.75	$C_{17}H_{17}NO_2$	$[M+H]^+$	268.133 2	268.133 1	−0.393	251.106 2, 219.080 2, 191.085 2, 268.132 6	阿西米洛宾	生物碱类	厚朴
22	1.77	$C_{21}H_{26}NO_4^+$	$[M]^+$	356.186 2	356.185 4	−2.199	206.117 4, 356.185 2, 191.093 7, 190.085 5	竹叶椒碱	生物碱类	厚朴
23	1.90	$C_{29}H_{36}O_{15}$	$[M-H]^-$	623.198 1	623.199 2	1.695	161.023 6, 623.199 4, 135.044 1, 315.109 0	毛蕊花糖苷	苯乙醇苷	厚朴
24	2.02	$C_{19}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	324.123 6	324.122 9	−2.107	324.122 7, 309.099 2, 294.075 5, 266.081 1	去亚甲基小檗碱[22]	生物碱类	黄连
25	2.07	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	$[M]^+$	322.107 9	322.107 5	−1.344	322.107 0, 307.083 4, 279.088 4, 294.111 6	格兰地新[25]	生物碱类	黄连
26	2.43	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	$[M]^+$	320.092 3	320.091 3	−3.070	320.091 3, 292.096 2, 277.072 8, 264.101 8	黄连碱*	生物碱类	黄连
27	2.50	$C_9H_{16}O_4$	$[M-H]^-$	187.097 6	187.096 9	−3.647	125.096 1, 187.096 9, 97.064 7, 169.086 4	壬二酸	脂肪酰类	厚朴
28	2.59	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	336.123 6	336.122 7	−2.627	336.122 7, 320.091 5, 292.096 3, 321.099 2	表小檗碱*	生物碱类	黄连
29	2.68	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	$[M]^+$	338.139 2	338.138 3	−2.759	338.138 2, 323.114 8, 322.107 0, 294.112 1	非洲防己碱	生物碱类	黄连
30	2.90	$C_{18}H_{19}NO_2$	$[M+H]^+$	282.148 9	282.148 7	−0.551	265.121 9, 250.098 4, 234.103 6, 282.148 3	*N*-去甲基荷叶碱	生物碱类	厚朴
31	2.91	$C_{18}H_{20}O_5$	$[M-H]^-$	315.123 8	315.124 3	1.596	267.102 9, 249.092 1, 315.124 4, 297.113 6	厚朴木脂体B[26]	木脂素类	厚朴
32	2.92	$C_{17}H_{15}NO_2$	$[M+H]^+$	266.117 6	266.117 4	−0.584	249.090 6, 219.080 2, 191.085 3, 266.117 5	番茄枝碱	生物碱类	厚朴
33	3.06	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	336.123 6	336.122 7	−2.627	336.122 7, 320.091 5, 292.096 4, 306.075 7	小檗碱*	生物碱类	黄连
34	3.20	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	$[M]^+$	352.154 9	352.154 1	−2.224	352.153 9, 336.122 6, 308.127 8, 322.106 9	巴马汀*	生物碱类	黄连
35	3.72	$C_{22}H_{24}NO_4^+$	$[M]^+$	366.170 5	366.170 0	−1.456	366.169 5, 350.138 1, 322.143 4, 336.122 4	脱氢紫堇碱	生物碱类	黄连
36	4.56	$C_{15}H_{14}O_3$	$[M-H]^-$	241.087 0	241.087 0	−0.073	241.086 9, 223.076 2, 197.096 6, 95.012 6	厚朴三酚[27]	苯丙素类	厚朴
37	5.61	$C_{16}H_{14}O_3$	$[M-H]^-$	253.087 0	253.087 1	0.326	253.087 1, 235.076 3, 207.080 6, 233.060 5	厚朴醛D[28]	苯丙素类	厚朴
38	6.11	$C_{18}H_{16}O_3$	$[M-H]^-$	279.102 7	279.102 9	0.832	279.102 8, 261.092 3, 233.097 1, 207.080 6	厚朴醛B[29]	木脂素类	厚朴
39	6.49	$C_{18}H_{16}O_4$	$[M-H]^-$	295.097 6	295.097 8	0.738	295.097 8, 178.026 4, 150.031 1, 177.018 4	dimethylstrobochrysin[30]	苯丙素类	厚朴
40	6.78	$C_{37}H_{32}NO_6^+$	$[M]^+$	586.223 0	586.221 9	−1.813	320.091 5, 586.221 9, 292.096 3, 277.074 1	未知	复合物	−
41	6.86	$C_{38}H_{36}NO_6^+$	$[M]^+$	602.254 3	602.253 6	−1.100	336.122 4, 602.253 6, 321.099 0, 292.096 1	未知	复合物	−
42	7.68	$C_{18}H_{18}O_2$	$[M-H]^-$	265.123 4	265.123 5	0.365	265.123 5, 224.084 2, 250.100 0, 249.092 1	和厚朴酚*	木脂素类	厚朴
43	8.40	$C_{18}H_{18}O_2$	$[M-H]^-$	265.123 4	265.123 6	0.743	265.123 6, 247.112 9, 245.097 5, 224.082 3	厚朴酚*	木脂素类	厚朴

“*”与对照品比对确定。

“*” compared with standards.

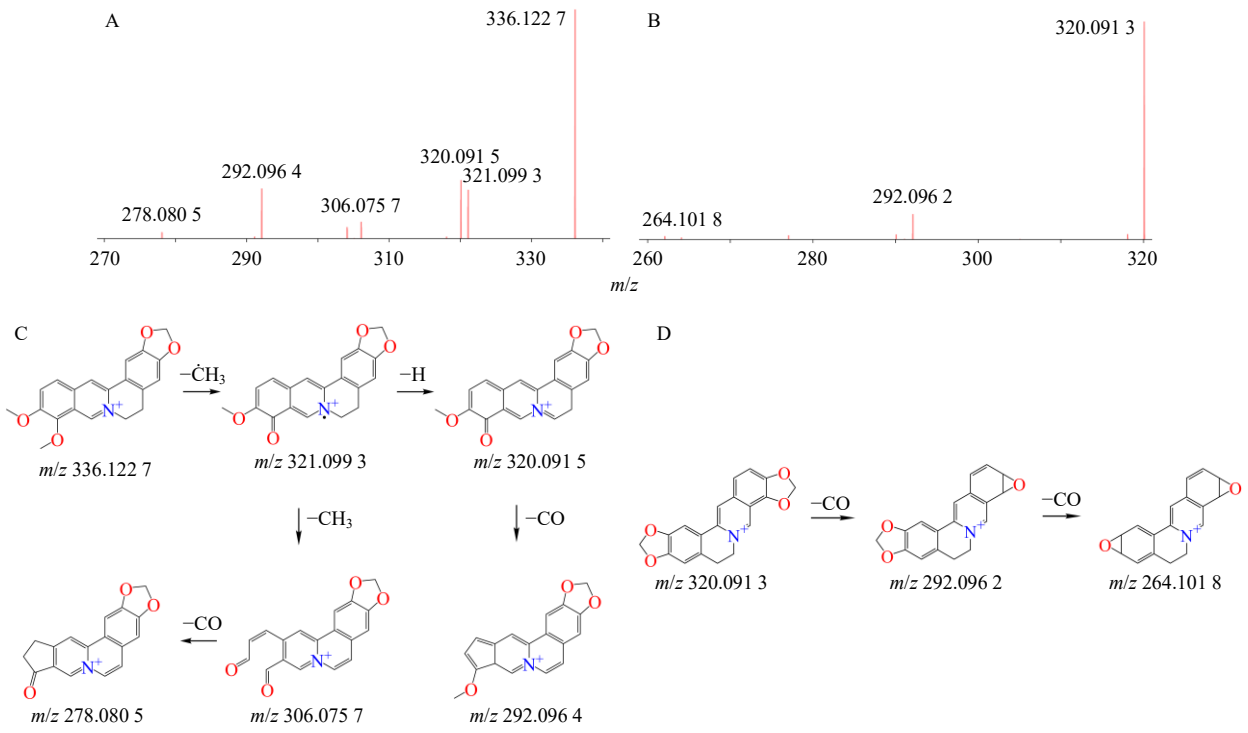


图 2　小檗碱与黄连碱的质谱棒状图（A、B）和裂解途径（C、D）

Fig. 2　Mass spectrometry (A, B) and fragmentation pathways (C, D) of berberine and coptisine

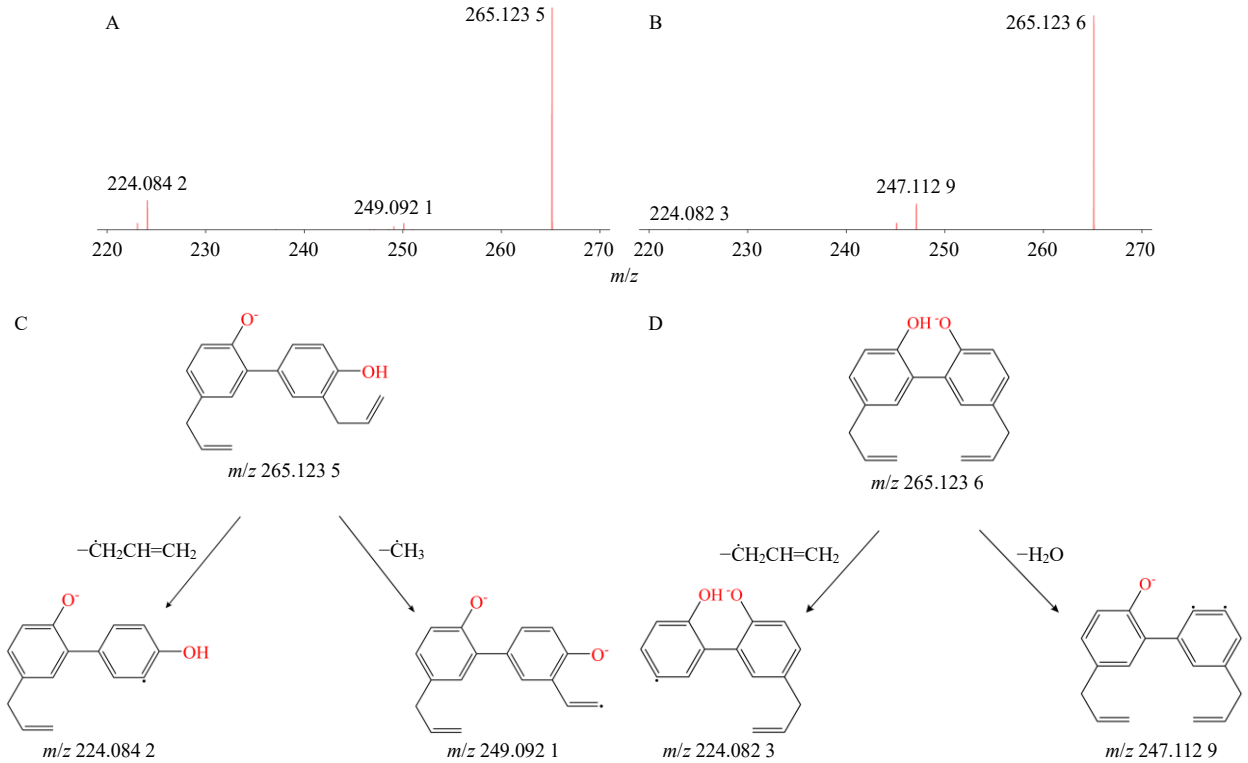
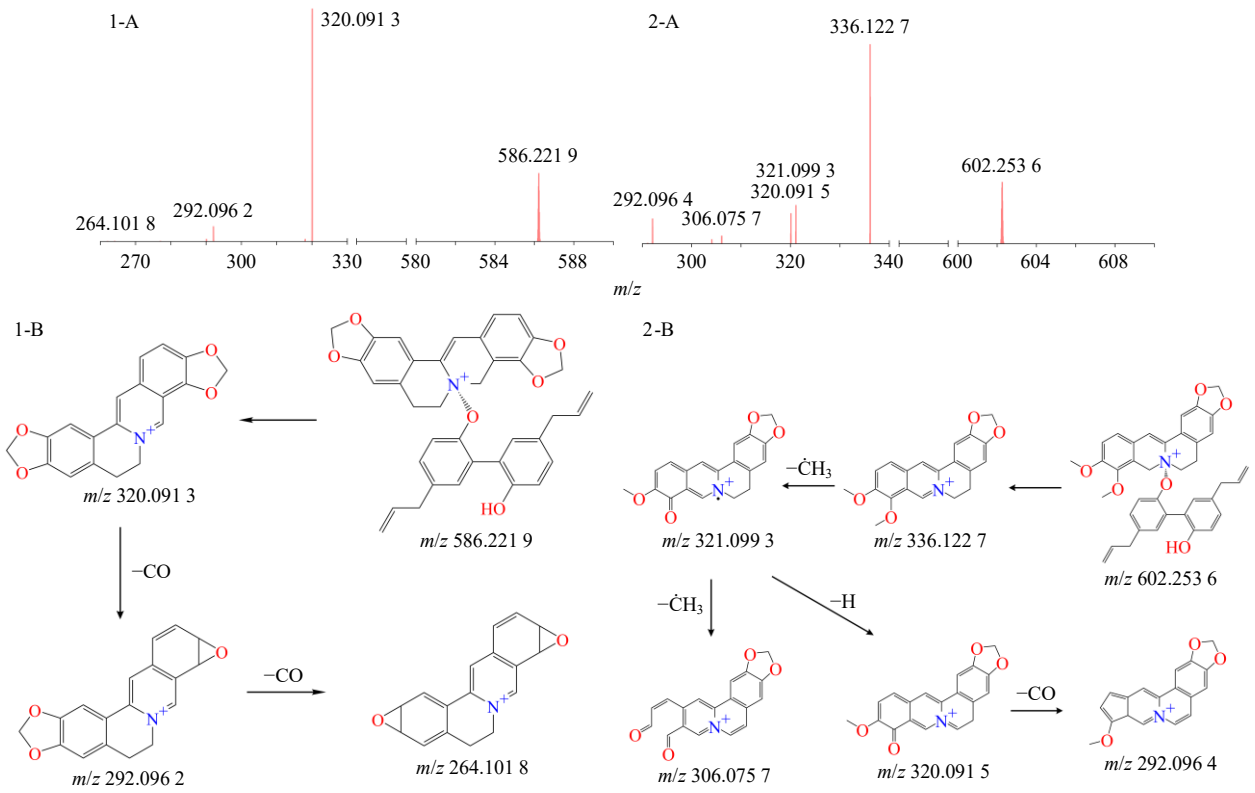


图 3　和厚朴酚与厚朴酚的质谱棒状图（A、B）和裂解途径（C、D）

Fig. 3　Mass spectrometry (A, B) and fragmentation pathways (C, D) of honokiol and magnolol

复合物。以上述未知化合物 1、2 为例进行分析，未知化合物 1 响应较好，一级质谱得到 *m/z* 586.221 9 $[M]^+$准分子离子峰，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得二级碎片离子 *m/z* 320.091 3、292.096 2、264.101 8，均为黄连碱的二级质谱碎片离子，说明该未知化合物 1 中包含有黄连碱结构，

又因黄连碱中季铵阳离子表现出一定的碱性，易与酸性物质或带负电荷的化合物发生结合，如木脂素成分和厚朴酚与厚朴酚，对上述小分子间的结合进行推测，发现未知化合物 1 的相对分子质量约为黄连碱与和厚朴酚（或厚朴酚）之和（*m/z* 586.221 9≈320.091 3＋266.130 7）。此外，未知化合物 2 同样具有相似的情形，其一级质谱得到 *m/z* 602.253 6 $[M]^+$ 准分子离子峰，在高能 H-ESI 质谱离子源碰撞离子作用下获得二级碎片离子 *m/z* 336.122 7、321.099 3、292.096 4，均为小檗碱的二级质谱碎片离子，同理推测，未知化合物 2 的相对分子质量约为表小檗碱（或小檗碱）与和厚朴酚（或厚朴酚）之和（*m/z* 602.253 6≈336.122 7＋266.130 7）。相应质谱裂解途径见图 4。



1-黄连碱-和厚朴酚（或厚朴酚）；2-小檗碱（或表小檗碱）-和厚朴酚（或厚朴酚）。

1-coptisine-honokiol (or magnolol); 2-berberine (or epiberberine)-honokiol (or magnolol).

图 4　生物碱-木脂素结合物的质谱棒状图（A）和裂解途径（B）

Fig. 4　Mass spectrometry (A) and fragmentation pathways (B) of alkaloids-lignans conjugates

2.3　HPLC 法测定 HHD 中化学成分含量

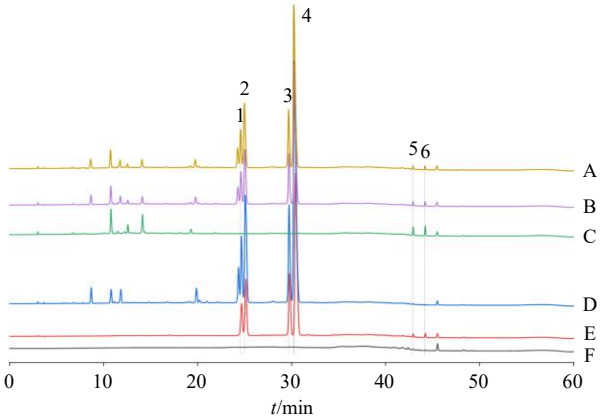
2.3.1　色谱条件　色谱柱为 Pursuit C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；以乙腈-0.3%磷酸水溶液（三乙胺调节 pH 值 4）为流动相，梯度洗脱[20]：0～30 min，10%～30%乙腈；30～40 min，30%～75%乙腈；40～50 min，75%乙腈；50～55 min，75%～10%乙腈；55～60 min，10%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 345 nm（0～40 min）、294 nm（40～60 min）[31]；进样体积 10 μL。

2.3.2　方法学考察　经对照品验证，黄连 4 种生物碱，包括表小檗碱、黄连碱、巴马汀与小檗碱，以及厚朴 2 种木脂素，包括和厚朴酚与厚朴酚，共 6 个有效成分，进行定量方法学考察。

（1）专属性考察：取黄连、厚朴饮片，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定，考察表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的专属性。

在上述“2.3.1”项下色谱条件，通过与对照品保留时间和 UV 图谱对照，确定色谱峰 1～6 分别对应表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚 6 个有效成分；测试溶液和参比溶液保留时间相同，在相同位置处无干扰峰，表明该方法专属性良好。结果见图 5。

（2）线性关系考察：精密称定 6 种对照品，加甲醇配制为含表小檗碱 220.42 μg/mL、黄连碱 255.00



1-表小檗碱；2-黄连碱；3-巴马汀；4-小檗碱；5-和厚朴酚；6-厚朴酚。

1-epiberberine; 2-coptisine; 3-palmatine; 4-berberine; 5-honokiol; 6-magnolol.

图 5　混合液（A）、HHD 合煎液（B）、厚朴单煎液（C）、黄连单煎液（D）、混合对照品溶液（E）、阴性对照溶液（F）的 HPLC 图

Fig. 5　HPLC spectra of mixed decoction (A), HHD combined decoction (B), single decoction of *Magnoliae Officinalis Cortex* (C), single decoction of *Coptidis Rhizoma* (D), mixed control solution (E) and negative control solution (F)

μg/mL、巴马汀 175.83 μg/mL、小檗碱 585.83 μg/mL、和厚朴酚 10.42 μg/mL、厚朴酚 15.42 μg/mL 的混合对照品溶液。以各对照品质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得回归方程分别为表小檗碱 $Y=15.249X-86.164$，$R^2=0.999\,6$，线性范围 22.04～881.67 μg/mL；黄连碱 $Y=20.991X-21.824$，$R^2=0.999\,1$，线性范围 25.50～510.00 μg/mL；巴马汀 $Y=36.869X-200.860$，$R^2=0.999\,5$，线性范围 17.58～703.33 μg/mL；小檗碱 $Y=34.593X-425.340$，$R^2=0.999\,6$，线性范围 58.58～2 343.33 μg/mL；和厚朴酚 $Y=12.974X+4.038$，$R^2=0.999\,6$，线性范围 2.08～83.33 μg/mL；厚朴酚 $Y=13.869X-1.802$，$R^2=0.999\,7$，线性范围 3.08～123.33 μg/mL；结果显示，各化合物在线性范围内呈现良好的线性关系。

（**3**）精密度考察：取黄连、厚朴饮片，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定，重复进样 6 次，测定其峰面积，结果显示表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.23%、0.31%、0.43%、0.22%、1.44%、0.25%，表明该仪器精密度良好。

（**4**）稳定性考察：取黄连、厚朴饮片，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，在制备后 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定，计算表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的峰面积，结果显示表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.16%、0.18%、0.45%、0.20%、0.26%、0.17%，表明供试品溶液在常温下 24 h 内稳定性良好。

（**5**）重复性考察：取黄连、厚朴饮片，平行 6 份，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定，计算表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的质量分数，结果显示，表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚质量分数的 RSD 分别为 0.11%、0.14%、0.12%、0.16%、0.12%、0.21%，表明该方法重复性良好。

（**6**）加样回收率考察：称取已测知 6 种成分含量的黄连、厚朴饮片 6 份，每份分别约 6.99 g、4.66 g，精密称定，分别按其中各成分质量分数的 100% 加入对照品，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率，结果显示表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的平均加样回收率分别为 93.50%、96.60%、94.28%、97.04%、105.38%、99.34%，RSD 分别为 0.62%、1.05%、0.98%、0.81%、0.91%、1.17%，表明该方法准确度良好。

2.3.3　HHD 合煎液、混合液及单煎液中 6 种有效成分含量对比分析　按照“2.1”项下方法制备合煎液、混合液、黄连单煎液、厚朴单煎液及其供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的含量，结果见表 2。

通过研究合煎液、混合液及单煎液，发现 6 种有效成分在配伍合煎后含量存在一定变化：总体而言，6 种有效成分的含量均表现为合煎液＜混合液＜单煎液，说明单煎液混合后，组分间可能发生反应使得含量降低，而配伍合煎则是在更高的温度和更剧烈的反应下使得含量进一步的降低。推测生物碱类成分可能在配伍合煎后与其他物质发生一系列复杂的物理化学反应，其中可能包括与木脂素成分发生自组装结合。

通过上述研究，发现 6 种有效成分含量在合煎液、混合液中均有不同程度的降低。为此，进一步

表 2 HHD 中 6 种有效成分含量测定（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Table 2 Determination of contents of six active compositions in HHD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	质量分数/(mg·g^{-1})					
	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	和厚朴酚	厚朴酚
合煎液	17.154±0.044^{c}	26.470±0.073^{c}	11.669±0.037^{c}	45.033±0.160^{c}	2.119±0.010^{c}	2.238±0.016^{c}
混合液	17.709±0.020^{b}	28.253±0.029^{b}	12.619±0.010^{b}	48.341±0.051^{b}	2.170±0.028^{b}	2.326±0.002^{b}
黄连单煎液	18.531±0.005^{a}	29.379±0.007^{a}	12.942±0.014^{a}	49.525±0.028^{a}	–	–
厚朴单煎液	–	–	–	–	2.207±0.001^{a}	2.412±0.002^{a}

带有上标字母 a、b 和 c 的值在各列之间存在显著差异（$P<0.05$）。

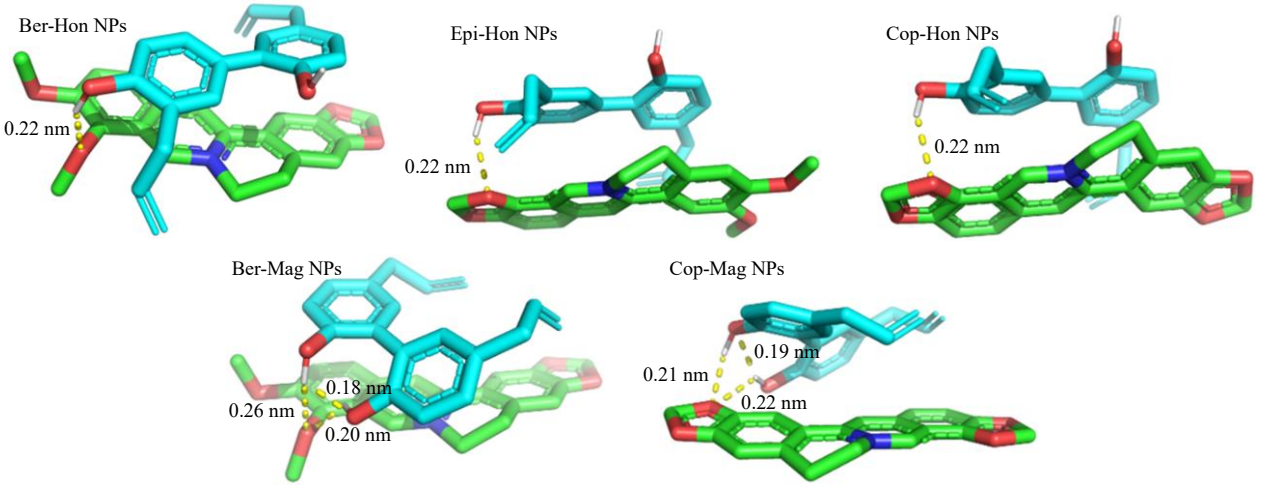
Values with superscript letters a, b and c are significantly different across columns ($P < 0.05$).

通过相态分离手段，获得各种相态，如沉淀相态、真溶液相态以及胶体相态等，从相态的角度深入研究 6 种有效成分含量存在明显差异的原因，为深入探讨组分自组装提供合理依据。

2.4 黄连生物碱与厚朴木脂素组分自组装纳米粒的分子对接模拟

从 Pubchem 数据库下载表小檗碱、黄连碱、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的 SDF 文件。用 OpenBabel 3.1.1 软件将 SDF 文件转换为 PDB 文件。AutoDock Tools 1.5.7 软件优化小分子结构，利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接模拟，记录最低结合能，一般认为结合能越低，结合性越好，通常认为结合能低于 0 时，能自发进行结合，且分子结合能小于 −17.78 kJ/mol，分子与靶点有一定的结合活性；小于−23.01 kJ/mol，分子与靶点有较好的结合活性；小于−33.47 kJ/mol，分子与靶点的结合具有强烈活性。因此，选择结合自由能（binding free energy，G）最低的对接模型作为最适合分子模拟的结合模型[32]，并用 PyMOL 2.5.7 软件进行可视化处理。

从“2.2.4（3）”项下 2 个实例可以推测生物碱类成分表小檗碱、黄连碱、小檗碱，可能与木脂素类成分和厚朴酚、厚朴酚发生小分子间的结合，形成小分子-小分子复合物。利用 PyMOL 2.5.7 软件可视化处理时，选取距离为 0.3、0.4、0.5 nm 分子间相互作用力为依据，以下 5 种自组装均存在距离小于 0.3 nm 的氢键作用力，结果见图 6 和表 3；但表小檗碱-厚朴酚自组装并不存在距离小于 0.3 nm 的作用力（0.4 nm 和 0.5 nm 范围内也不存在）。所以最终选取了 PyMOL 2.5.7 软件中分子间作用力最小的距离即 0.3 nm。此外，表小檗碱-厚朴酚这种自组装间的距离未达到 0.5 nm 范围内，说明表小檗碱-厚朴酚自组装的作用力微弱，难以形成较为稳定的结构。进而推测汤剂配伍合煎时，通过氢键作用力可能使得某些小分子间发生结合[33]，即配伍合煎存在组分自组装。通过上述研究发现，配伍合煎时可能存在组分自组装。然而分子间的结合往往伴随着



黄色虚线代表氢键；Ber-小檗碱；Epi-表小檗碱；Cop-黄连碱；Hon-和厚朴酚；Mag-厚朴酚；NPs-纳米粒。

The yellow dotted line represents hydrogen bonds; Ber-berberine; Epi-epiberberine; Cop-coptisine; Hon-honokiol; Mag-magnolol; NPs-nanoparticles.

图 6 生物碱成分与木脂素成分的自组装纳米粒

Fig. 6 Self-assembly nanoparticles of alkaloids and lignans

表 3　5 种纳米粒的 *G*

Table 3　*G* of five nanoparticles

纳米粒	*G*/(kJ·mol^{-1})	纳米粒	*G*/(kJ·mol^{-1})
Ber-Hon NPs	−16.66	Ber-Mag NPs	−14.24
Epi-Hon NPs	−15.41	Cop-Mag NPs	−13.31
Cop-Hon NPs	−15.28		

成分含量的变化，为此，进一步通过对生物碱类成分表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱，木脂素类成分和厚朴酚、厚朴酚的含量进行相应考察，对比研究合煎液、混合液、黄连单煎液以及厚朴单煎液中 6 种有效成分的含量变化，为进一步研究组分自组装提供一定的参考。

2.5　HHD 合煎液的物相形态考察

2.5.1　HHD 的相态分离　取黄连、厚朴饮片，按照“2.1.1”项下方法制备 HHD 合煎液，4 ℃静置过夜，4 000×*g* 离心 10 min，得到相态 1 和上清液。相态 1 用少量水混悬收集，上清液于相对分子质量 3 500 的透析袋（按文献报道方法[34]预处理）中透析 6 h，透析外液为相态 2。透析袋内样品分别于 100 000、150 000×*g* 梯度超速离心 60、90 min，沉淀分别为相态 3、4，收集方法与相态 1 一致，向获得的沉淀中分别加入等量的纯水，借助移液枪反复吹打附着在离心管底、管壁的沉淀，以此得到沉淀相态 1、3、4。其中 150 000×*g* 离心后上清液为相态 5，留样储存于−20 ℃冰箱，HHD 物相形态拆分流程[35]见图 7。

2.5.2　HHD 合煎液物相形态的鉴定与表征　经观察发现，5 种相态均属于亲水型相态。其中相态 1、3、4 为沉淀相态，相态 2 为真溶液相态，相态 5 为具有较明显丁达尔效应的胶体相态。分别吸取各相态溶液适量，采用马尔文粒径仪测定各样品的粒径和 ζ 电位；同时将样品滴至铜网支持膜上，阴干后于 TEM 下观察粒子形态。动态光散射（dynamic light scattering，DLS）和 TEM 结果如图 8 所示，合煎液及各个相态所含粒子粒径在 20～1 000 nm 均有分布，其形貌多表现为圆球形颗粒。合煎液作为整个汤剂体系而言，成分复杂且不太稳定，粒径较大，约为 284.5 nm；ζ 电位绝对值最小，约为−3.6 mV。经过离心后的沉淀相态 1、3、4 形貌更加均一，粒径逐渐减小，分别约为 219.2、191.5、173.6 nm；ζ 电位绝对值逐渐增大，分别约为−10.7、−10.5、−12.1 mV，其中沉淀相态 3 的 ζ 电位绝对值小于相态 1，可能是因为第 1 次超速离心时影响汤剂中的某些不稳定成分，导致 ζ 电位的细微变化。经过透析后大多数小分子游离至真溶液相态 2，处于较为稳定的状态，粒径最小，约为 164.0 nm；ζ 电位绝对值最大，约为−14.6 mV。经过梯度超速离心后的胶体相态 5，其形貌存在较多圆球形颗粒间的结合，导致粒径反而增大，约为 325.4 nm；由于存在分散的可能，故而稳定性降低，ζ 电位减小，约为−10.0 mV。

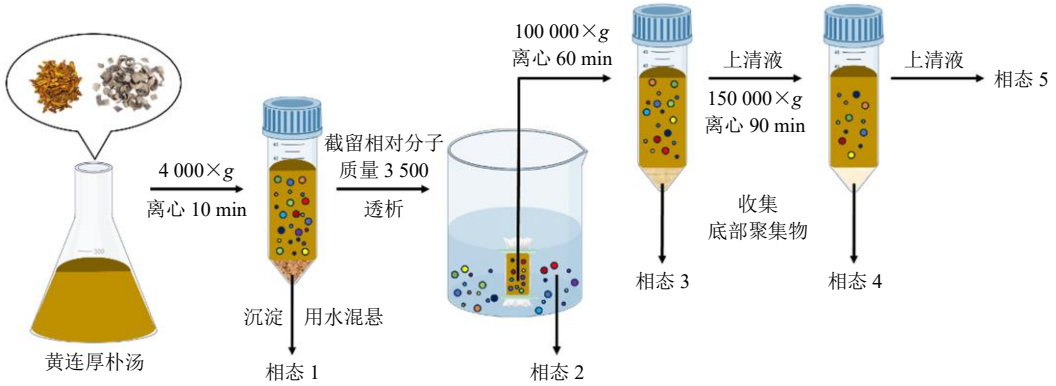


图 7　HHD 物相形态拆分流程

Fig. 7　Flow chart of separating phases for HHD

2.5.3　HHD 物相形态组成分析及成分分布考察　蛋白、多糖物质在汤液相态形成中发挥着重要作用[34]，两者在合煎过程中可能会参与相态形成，故进行亲水型相态中蛋白、多糖的定量分析；同时，以黄连、厚朴有效成分表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚为代表，考察小分子成分在亲水型相态中的分布情况。

（**1**）蛋白含量测定[36]：取各相态溶液适量，稀释适当倍数得样品溶液，平行 3 份。按照试剂盒说明书配制 BCA 工作液及标准曲线，吸取 10 μL 样品溶液于 96 孔板中，加入 250 μL 工作液，37 ℃孵育 30 min 后，酶标仪测定 562 nm 处的吸光度（*A*）值，

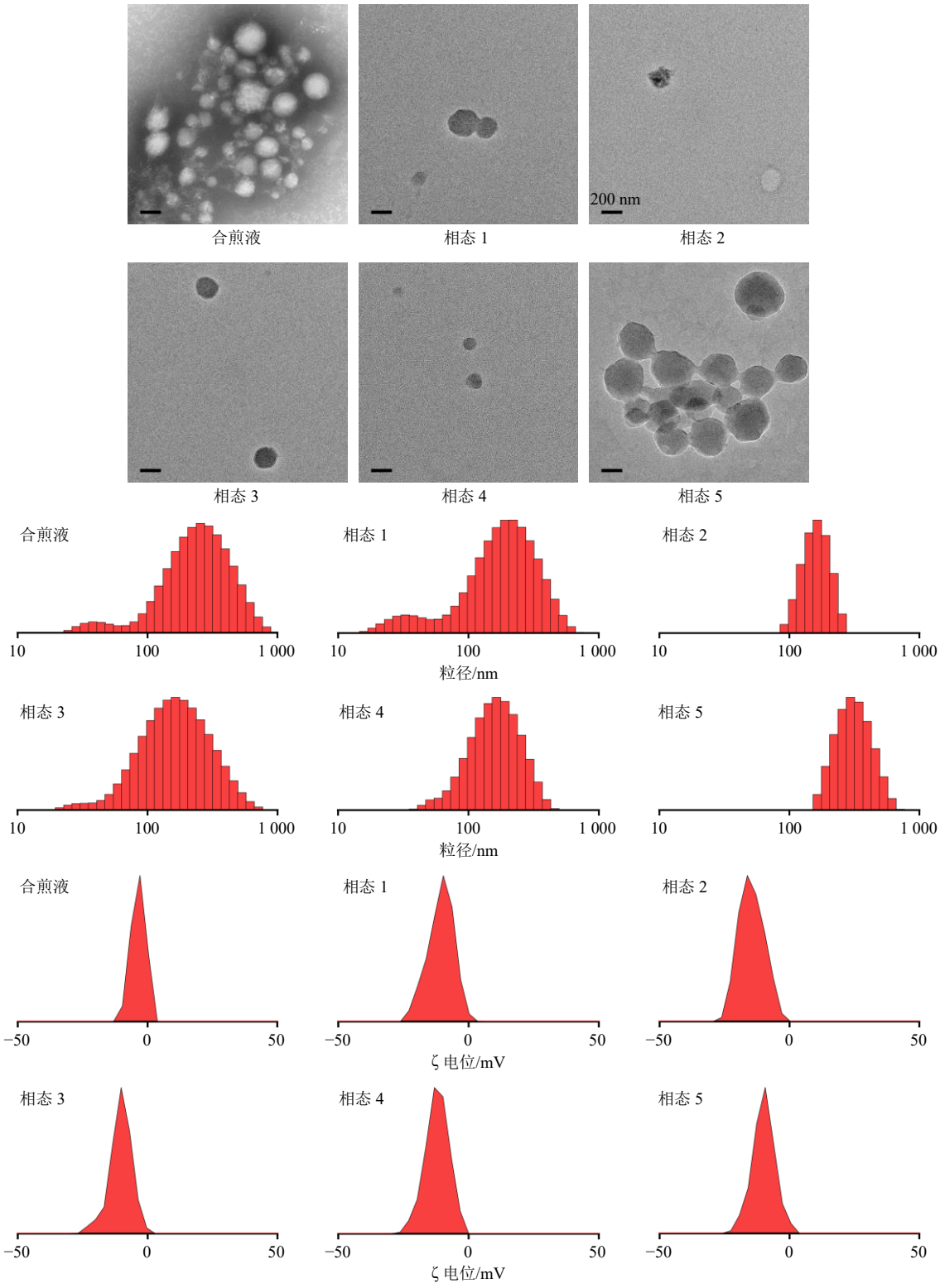


图 8　合煎液亲水型相态的微观形态、粒径分布及 ζ 电位

Fig. 8　Microscopic morphology, size distribution and ζ potential in hydrophilic phases of combined decoction

代入标准曲线计算样品中蛋白含量。结果如表 4 所示，合煎液中蛋白含量低于混合液，合煎液相态 1 中蛋白含量显著低于混合液相态 1（$P<0.05$）；合煎液相态 3（$P<0.001$）、4（$P<0.01$）中蛋白含量极显著低于混合液对应相态；合煎液相态 2、5 中蛋白含量具有高于混合液对应相态的趋势。

（2）多糖含量测定[37]：采用苯酚-硫酸法测定样品中多糖含量。配制质量浓度为 2.0～20.0 μg/mL 的

表 4 HHD 中蛋白和多糖含量测定（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4 Determination of proteins and polysaccharides contents in HHD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	蛋白/(μg·g^{-1})	多糖/(μg·g^{-1})
合煎液	9 891.035±907.418	4 563.205±29.853***
合煎液相态1	1 203.047±232.263*	872.753±5.188***
合煎液相态2	302.118±3.519	77.624±0.666***
合煎液相态3	94.012±3.876***	77.900±1.639***
合煎液相态4	30.735±4.834**	18.781±0.404***
合煎液相态5	4 981.047±456.076	1 909.562±10.842**
混合液	10 558.608±628.102	4 804.639±17.744
混合液相态1	1 992.984±265.378	1 950.540±21.683
混合液相态2	204.026±41.181	50.812±0.739
混合液相态3	371.958±39.111	133.861±1.807
混合液相态4	49.935±2.801	27.688±0.385
混合液相态5	4 209.555±253.556	1 648.032±74.357

与混合液及其对应相态比较：*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001；表 5 同。

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* mixed decoction and its correspond phase states; same as table 5.

葡萄糖对照品溶液，按体积比 1∶1∶5 将对照品溶液、4%苯酚、硫酸溶液混匀，反应 30 min 后，在 490 nm 处测定 *A* 值，以 *A* 值为纵坐标，葡萄糖质量浓度为横坐标绘制标准曲线。取各相态溶液适量，平行 3 份，按上述操作反应，测定 *A* 值并代入标准曲线中计算各相态多糖含量。结果如表 4 所示，多糖含量与蛋白含量的结果相似。合煎液及其相态 1、3、4 多糖含量极显著低于混合液及其对应相态（P<0.001），而合煎液相态 2（P<0.001）、5（P<0.01）多糖含量极显著高于混合液对应相态。

以上结果表明配伍合煎后，蛋白、多糖能减少沉降而更多地保留在真溶液相态 2 或者胶体相态 5 中；表明蛋白、多糖在配伍合煎时可能会通过一系列分子间作用力与其他物质发生结合，进而导致其含量的变化。

（3）小分子成分含量测定：参照文献中液相色谱方法[20]，测定 HHD 各相态中表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚的含量。分别取各相态溶液适量，在“2.3.1”项下色谱条件进样测定。由表 5 可知，6 种有效成分含量变化几乎同蛋白和多糖一致：在合煎液相态 1、3、4 中极显著低于混合液对应相态（P<0.01、0.001）；在合煎液相态 5 中极显著高于混合液相态 5（P<0.001）。有趣的是，6 种有效成分含量在合煎液相态 2 中极显著低于混合液相态 2（P<0.001），且未检测到 2 种木脂素类成分；表明两者在配伍合煎后并非以游离态形式存在，而是通过一系列分子间作用力与其他物质发生反应，变为结合态。从上述实验结果推测 4 种生物碱类成分和 2 种木脂素类成分存在两两结合的可能性，即配伍合煎时发生组分自组装。

表 5 HHD 中 6 种有效成分含量测定（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 5 Determination of contents of six active compositions in HHD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	质量分数/(mg·g^{-1})					
	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	和厚朴酚	厚朴酚
合煎液	17.154±0.044***	26.471±0.072***	11.669±0.036***	45.034±0.159***	2.119±0.010*	2.238±0.016**
合煎液相态1	1.370±0.002**	1.654±0.004***	1.036±0.001***	3.745±0.001***	0.886±0.001***	0.967±0.008***
合煎液相态2	1.099±0.002***	1.036±0.004***	0.892±0.001***	2.773±0.004***	−	−
合煎液相态3	0.137±0.001***	0.177±0.001***	0.101±0.001***	0.383±0.001***	0.077±0.001***	0.117±0.001***
合煎液相态4	0.070±0.001***	0.045±0.001***	0.061±0.001***	0.166±0.001***	0.007±0.001***	0.015±0.001***
合煎液相态5	11.953±0.014***	17.270±0.019***	8.919±0.010***	31.197±0.035***	0.262±0.004***	0.248±0.002***
混合液	17.709±0.020	28.253±0.029	12.619±0.010	48.341±0.051	2.170±0.028	2.326±0.002
混合液相态1	1.380±0.004	1.826±0.010	1.071±0.002	4.030±0.004	0.983±0.001	1.137±0.010
混合液相态2	1.214±0.002	1.359±0.004	0.964±0.001	3.228±0.002	0.046±0.001	0.109±0.001
混合液相态3	0.174±0.001	0.246±0.002	0.123±0.001	0.495±0.001	0.086±0.001	0.128±0.001
混合液相态4	0.114±0.002	0.127±0.002	0.092±0.001	0.294±0.001	0.009±0.001	0.017±0.001
混合液相态5	9.186±0.013	12.686±0.020	6.564±0.017	22.825±0.031	0.239±0.004	0.220±0.002

2.6 统计学分析

通过 SPSS 27.0 软件分析多组数据之间的差异，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。双样本采用 *t* 检验分析；多组样本采用单因素方差分析。

3 讨论

本研究首先基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 技术探究 HHD 配伍合煎的化学成分，结果显示，HHD 合煎液、混合液、单煎液化学成分的种

类、数量有所不同，存在差异性成分。其中合煎液中含有 2 种未知化合物，而混合液与单煎液中并不存在，通过二级质谱发现未知化合物包含了黄连生物碱类成分表小檗碱、黄连碱、小檗碱的碎片离子，推测其裂解途径发现黄连生物碱类成分可能与木脂素类成分在配伍合煎时发生发应，形成了组分间的小分子-小分子复合物。

进一步研究合煎液、混合液、单煎液中 6 种有效成分含量变化，发现它们的变化趋势为合煎液低于混合液低于单煎液。接着对 HHD 合煎液、混合液进行相态分离，分析蛋白、多糖以及 6 种有效成分含量在不同相态中的变化情况，发现蛋白和多糖主要分布在混合液的沉淀相态，以及合煎液的真溶液相态和胶体相态。

此外，6 种有效成分含量与之相似，主要分布在混合液的沉淀相态，以及合煎液的胶体相态；而在真溶液相态 2 中的含量极显著低于混合液相态 2，可能是因为配伍合煎产生的剧烈反应导致游离成分变少；且并未检测到木脂素类成分，表明在配伍合煎时它们极大可能与其他物质发生反应，导致结构变化形成结合态。

结合目前已有报道，吴淑洋等[10]在研究葛根芩连汤配伍合煎时成分间的相互作用，发现小檗碱、汉黄芩苷、葛根素、黄芩苷、巴马汀、甘草酸之间存在组分自组装纳米粒，可以改善伊立替康导致的肠毒性；沈成英等[38]发现芍药甘草汤配伍合煎时同样存在自组装纳米粒，并通过在体单向肠灌流研究自组装纳米粒对白芍主要成分吸收的影响；Zhang 等[39]发现黄连解毒汤配伍合煎时存在黄芩苷-小檗碱复合物，具有保护神经的作用。此外，Xu 等[40]研究黄连、厚朴有效成分小檗碱与厚朴酚的自组装结合，发现小檗碱-厚朴酚自组装纳米粒可以改善溃疡性结肠炎。总结上述研究，可以推断 HHD 配伍合煎时极大可能存在生物碱类成分（表小檗碱、黄连碱、小檗碱）与木脂素类成分（和厚朴酚、厚朴酚）的组分自组装行为。

本实验以 HHD 煎液种类、含量、相态为基础，从组分概貌、多指标成分含量、相态拆分等途径对 HHD 进行综合表征，为解析 HHD 物质基础新形式提供依据，为后续深入研究中药汤剂组分自组装提供参考。此外基于组分自组装的 HHD 药效作用机制尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.

[2] 郭倩, 田成旺, 任涛, 等. 中药药效物质基础研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 648-654.

[3] 刘悦, 丁晓彦, 王娜, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS 的丹参提取物成分表征及其抗血栓作用谱效相关药效物质基础解析 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1609-1619.

[4] 乔宏志, 狄留庆, 平其能, 等. 结构中药学: 中药药效物质基础研究的新领域 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2443-2448.

[5] 韦玉芳, 窦志英, 金传山, 等. 中药汤剂中的微粒研究进展 [J]. 药学学报, 2023, 58(2): 339-350.

[6] 杨勋玥, 简龄龙, 杨梅, 等. 中药汤剂中相态的形成表征及其药效作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2024, 59(20): 1917-1924.

[7] 惠璇, 张竞研, 康安, 等. 中药物质基础新形式及其药动/药效研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(10): 1013-1023.

[8] 胡静雯, 贾国香, 董亚倩, 等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307-7316.

[9] 管庆霞, 周小影, 吕邵娃, 等. 中药复方汤剂多成分自组装纳米相态的形成原理及现状探析 [J]. 海南医学院学报, 2023, 29(11): 872-880.

[10] 吴淑洋, 杨晓琴, 成威键, 等. 葛根芩连汤成分间自组装纳米粒改善伊立替康所致肠毒性作用研究 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 3987-3997.

[11] 高猎防, 马俊远, 郑梦晓, 等. 基于 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路调控铁死亡探讨黄连厚朴汤对溃疡性结肠炎模型小鼠的影响 [J]. 海南医学院学院, 2025, doi: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250221.005.

[12] 王佳俊, 杨显娟, 王立映, 等. 黄连厚朴汤改善溃疡性结肠炎的网络药理学机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 217-224.

[13] Wang X, Fu L, Cheng W J, *et al*. Oral administration of Huanglian-Houpo herbal nanoemulsion loading multiple phytochemicals for ulcerative colitis therapy in mice [J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1): 2204207.

[14] Cheng W J, Wang X, Wu Y H, *et al*. Huanglian-Houpo extract attenuates DSS-induced UC mice by protecting intestinal mucosal barrier and regulating macrophage polarization [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116181.

[15] Xie Q, Li H Y, Ma R, *et al*. Effect of *Coptis chinensis* Franch and *Magnolia officinalis* on intestinal flora and

intestinal barrier in a TNBS-induced ulcerative colitis rats model [J]. *Phytomedicine*, 2022, 97: 153927.

[16] 吴巧凤, 严云良, 孙瑶, 等. 基于 MOGA 和 BPNN-GA 优化黄连厚朴汤抗流感活性成分的提取工艺 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 1-5.

[17] Zhang F L, Yin X J, Yan Y L, *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Huanglian-Houpo Decoction based on berberine hydrochloride and magnolol against H1N1 influenza virus [J]. *Eur J Drug Metab Pharm*, 2022, 47(1): 57-67.

[18] 郑新光, 傅勇, 王建, 等. 黄连配厚朴对小鼠胃肠动力及止泻作用的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1585-1587.

[19] 宋佳, 谭曦然, 傅延龄. 宋代至清代经方本原剂量研究概述 [J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1804-1807.

[20] 赵东云. 基于成分、药效探讨黄连-厚朴配伍作用机理 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.

[21] 吴美琪, 刘建庭, 许浚, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的小儿消积止咳口服液化学物质组快速辨识研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7117-7127.

[22] 王永丽, 黄广建, 刘从进, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 分析黄连解毒汤的化学成分及大鼠组织分布 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 6985-7000.

[23] 张文文, 姚长良, 陈雪冰, 等. UPLC-Q-TOF/Fast DDA 结合 UNIFI 软件快速检测与鉴定小承气汤的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2121-2133.

[24] 王婷婷, 安叡, 梁琨, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1498-1507.

[25] 王晓丽, 彭梅梅, 陈琪, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典名方黄连汤化学成分鉴定及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1249-1263.

[26] 罗思妮, 彭致铖, 范倩, 等. 经典名方小承气汤中化学成分的 UPLC-Q-Orbitrap-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 1-10.

[27] 肖康宁, 苏酩, 侯玉洁, 等. 经典名方达原饮化学成分的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 快速表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10): 1-12.

[28] 石立强. 经典名方“厚朴温中汤”组方饮片确定、化学成分分析及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.

[29] Guo K, Tong C Y, Fu Q, *et al*. Identification of minor lignans, alkaloids, and phenylpropanoid glycosides in *Magnolia officinalis* by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2019, 170: 153-160.

[30] 赵慧, 严颖, 邹立思, 等. 基于 LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 技术分析“川朴”与“温朴”的差异化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 1-9.

[31] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263, 316-318.

[32] 李江玲, 刘爽, 谢以清, 等. 基于自组装体系研究双黄连主要成分与环丙沙星的分子互作 [J]. 药学学报, 2022, 57(8): 2445-2452.

[33] 李文, 王志家, 林晓钰, 等. 基于弱键诱导的超分子体系探讨甘草和合黄连“性-味-效”物质基础 [J]. 药学学报, 2022, 57(6): 1901-1908.

[34] 肖航, 黄菊, 孟祥瑞, 等. 中药大分子口服吸收起效: 物相结构新角度及研究模式 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 285-291.

[35] 陶春晓, 叶泰玮, 李敏, 等. 基于物相形态差异探究煎煮过程对红花-桃仁药对药效物质的传递作用 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5550-5559.

[36] 帕尔哈提·柔孜, 高彦华, 木合布力·阿布力孜, 等. 中药牛骨髓中蛋白与多肽提取方法的比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3600-3608.

[37] 单东杰, 罗秀明, 常艳丽, 等. 基于化学计量学研究莪术-三棱药对水煎液物理参数与化学成分的相关性 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5363-5378.

[38] 沈成英, 朱君君, 戴博, 等. 芍药甘草汤自组装纳米粒的形成及其对白芍主要成分释放和吸收的影响 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2190-2196.

[39] Zhang C Z, Zhao R, Yan W Q, *et al*. Compositions, formation mechanism, and neuroprotective effect of compound precipitation from the traditional Chinese prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1094.

[40] Xu Y D, Chen Z J, Hao W, *et al*. Berberine and magnolol exert cooperative effects on ulcerative colitis in mice by self-assembling into carrier-free nanostructures [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 538.

[责任编辑 郑礼胜]