

补阳还五汤成分分子印迹聚合物的制备及其印迹性评价

刘赛虎^{1,2}, 陈旺^{1,2}, 陈凡^{1,2}, 张子桢^{1,2}, 贺福元^{1,2,3,4*}, 刘平安^{5*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208

4. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208

5. 湖南省中医研究院, 湖南 长沙 410006

摘要: 目的 制备补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 成分分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIP), 并建立印迹性评价体系, 为精确靶向提取中药复方成分提供实验基础。方法 以 BHD 单个和全方的有效小分子成分为模板分子, 采用悬浮聚合法制备成 MIP; 采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、红外吸收光谱观察方法比较分析其特征; 运用亲和色谱原理、指纹图谱总量统计矩法和分子连接性指数建立动力学的印迹性评价体系。结果 制得了刺芒柄花素、苦杏仁苷、黄芪甲苷和全方的 MIP, 其红外吸收光谱在 $1\,720\text{ cm}^{-1}$ 羰基振动峰、 $1\,450\text{ cm}^{-1}$ 碳氢弯曲振动峰、 $1\,389\text{ cm}^{-1}$ 氢氧弯曲振动峰、 $1\,254\text{ cm}^{-1}$ 碳氮单键伸缩振动峰处、 $1\,154\text{ cm}^{-1}$ 碳氧单键伸缩振动峰等波长处, 模板分子与 MIP 均出现较强的差异特征峰; SEM 的形貌扫描呈现多孔状态, 证明 MIP 制备成功。BHD 全方成分的印迹动力学总量一阶矩由低至高, 证明 MIP 对模板分子具有较强的选择性。刺芒柄花素印迹性系数为 1.022, 印构量为 63.098 7; 苦杏仁苷印迹性指数为 0.798, 印构量为 64.228 6; 黄芪甲苷印迹性系数为 0.996, 印构量为 393.112 3; 全方印迹性指数为 1.121, 印构量为 79.610 2。结论 BHD 成分 MIP 对模板分子具有较强的靶向性吸附能力, 其印迹吸附程度可由所建立印迹性评价指标进行定量评价, 这为中药复方成分的精准靶向提取提供了理论和实验基础。

关键词: 分子印迹聚合物; 印迹性; 分子连接性指数; 总量统计矩; 印迹动力学; 补阳还五汤; 刺芒柄花素; 苦杏仁苷; 黄芪甲苷; 悬浮聚合法; 印迹性系数; 印构量

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7736-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.008

Preparation of molecularly imprinted polymers of Buyang Huanwu Decoction and evaluation of their imprinting properties

LIU Saihu^{1,2}, CHEN Wang^{1,2}, CHEN Fan^{1,2}, ZHANG Zi'an^{1,2}, HE Fuyuan^{1,2,3,4}, LIU Ping'an⁵

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematical Characterization of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. Key Laboratory of Property and Efficacy of Traditional Chinese Medicine of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

5. Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: Objective To prepare molecularly imprinted polymers (MIP) of the components of Buyang Huanwu Decoction (BHD, 补阳还五汤) and establish an imprinted evaluation system, providing an experimental basis for the precise targeted extraction of components from traditional Chinese medicine compound prescriptions. **Methods** Using the effective small molecule components of

收稿日期: 2025-06-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274215); 湖南中医药大学 2022 年度校级“揭榜挂帅”专项 (2022-12-27-1)

作者简介: 刘赛虎, 硕士研究生, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究。E-mail: 915070405@qq.com

*通信作者: 贺福元, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征的研究。E-mail: pharmsharking@163.com

刘平安, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药剂学研究。E-mail: 723679086@qq.com

BHD individual and the entire formula as template molecules, MIP were prepared by suspension polymerization. The characteristics were compared and analyzed by using scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy observation methods. The imprinting evaluation system of kinetics was established by using the principle of affinity chromatography, the total statistical moment method of fingerprint spectra and the molecular connectivity index. **Results** MIP of formononetin, amygdalin, astragaloside A and the whole formula were prepared. At wavelengths such as the $1\,720\text{ cm}^{-1}$ carbonyl vibration peak, $1\,450\text{ cm}^{-1}$ carbon-hydrogen bending vibration peak, $1\,389\text{ cm}^{-1}$, hydrogen-oxygen bending vibration peak, $1\,254\text{ cm}^{-1}$ carbon-nitrogen single bond stretching vibration peak, and $1\,154\text{ cm}^{-1}$ carbon-oxygen single bond stretching vibration peak in its infrared, both the template molecule and the MIP showed strong differential characteristic peaks. The morphology scan of the SEM showed a porous state, proving the successful preparation of the MIP. The total imprinted kinetic moments of the first order of the components of the BHD complete formula increased from low to high, proving that the MIP had a strong selectivity for the template molecule. The imprinting coefficient of the formononetin is 1.022, and the imprinting amount is 63.098 7. Imprinting index of amygdalin is 0.798, and the imprinting quantity is 64.228 6. The imprinting coefficient of astragaloside A is 0.996, and the imprinting quantity is 393.112 3. The imprinting coefficient of entire formula is 1.121, and the imprinting quantity is 79.610 2. **Conclusion** The MIP of the BHD components have a strong targeted adsorption capacity for template molecules. The degree of imprinting adsorption can be quantitatively evaluated by the established imprinting evaluation indicators, which provides a theoretical and experimental basis for the precise targeted extraction of components in traditional Chinese medicine compound prescriptions.

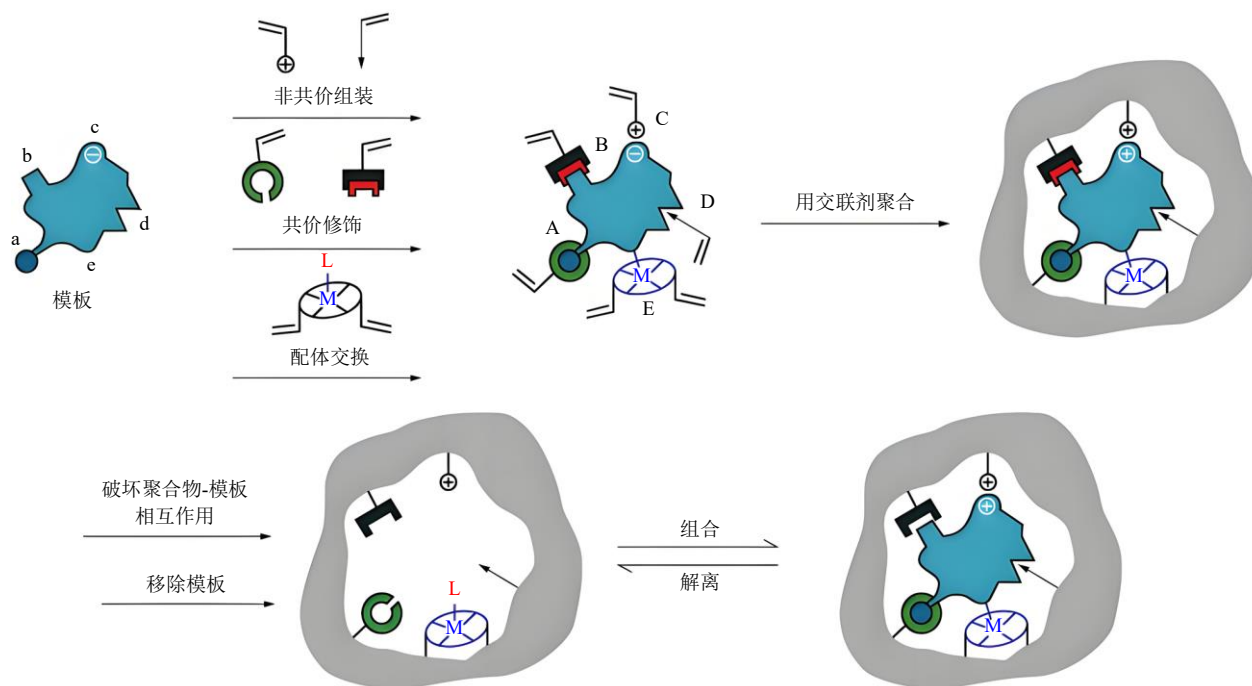
Key words: molecularly imprinted polymers; imprinting; molecular connectivity index; total statistical moment; blotting kinetics; Buyang Huanwu Decoction; formononetin; amygdalin; astragaloside A; suspension polymerization method; imprinting coefficient; imprinting amount

中药复方为多成分体系，发挥多靶点的综合作用，怎样保持原中药复方的靶向精准获取有效成分一直是广大医药工作者十分关注的问题。根据超分子化学“印迹模板”的作用规律，认为不同类型的中药成分与人体的靶点通过“锁-钥”关系以非共价键结合，形成孔穴通道结构与外界发生化学反应，通过人体主体超分子在自识别、自组织、自组装、自复制过程中，中药有效成分由相同或相似的“印迹模板”中药分子构成，人体的经络脏腑由相同或相似的“印迹模板”分子通道结构构成^[1]。前期本实验室建立了中医药超分子“气析”理论，认为中药复方有效成分通过“印迹模板”作用于人体的网络靶点而产生综合作用，因此建立以“印迹模板”为核心，体内外关联的印迹性评价体系对中药复方成分获取与质量评价体系将具有十分重要的作用。

中药复方诸成分通过“印迹模板”作用体内靶点产生印迹作用，这种体内的印迹作用可移植到体外进行研究，建立以中药复方有效成分为“印迹模板”的分子印迹作用特征的评价方法就可以评价中药复方成分各动态性情况下的整体印迹作用，进而评价其质量的动态性与稳态性。小分子印迹性可通过以其为模板分子制备成分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIP)，通过亲和色谱联合总量统计矩方法来整体测定其印迹性的变化规律，越接近标准模板分子的总量统计矩参数，

证明其印迹性越与模板分子的印迹作用接近，其体内的药效作用就越接近于标准模板分子，因此，通过建立基于色谱学的印迹性参数测算体系就能评价中药复方各药材成分因基原、产地、采收期、炮制加工等不同因素造成的质量动态变化规律，进而建立稳定性评价方法。MIP 是指模板分子与功能单体通过静电/离子作用、共价键、金属螯合、半共价键、非共价键等作用力，形成模板-功能单体复合物；通过选择合适的交联剂和引发剂形成具有网状刚性结构的共聚物；最后通过物理/化学方法破坏模板分子与共聚物间结合的作用力，除去模板分子。得到的 MIP 具有与模板分子空间大小、形状结构、功能基团作用位点完全互补的印迹孔穴，用于特异性识别模板分子^[2]（图 1）。

MIP 的常规的制备方法一般主要包括以下 4 种：本体聚合、悬浮聚合、沉淀聚合、乳液聚合^[4]。在印迹材料的制备过程中，本实验以丙烯酰胺为功能单体开展相关实验。功能单体与模板分子之间主要依靠氢键、离子键或疏水作用实现特异性结合，部分情况下还会通过配位键、范德华力等次级相互作用进一步增强结合稳定性，为后续印迹结构的形成奠定基础。在印迹材料的聚合过程中，常选用乙二醇二甲基丙烯酸酯作为交联剂，以构建三维网络结构。引发剂为偶氮二异丁腈。在本研究中，MIP 的制备采用悬浮聚合法完成。

图 1 MIP 制备流程示意图^[3]Fig. 1 Schematic diagram of preparation process of MIP^[3]

超分子“印迹模板”的概念来源于 Fischer 的酶与底物作用的“锁与钥匙模型”以及 Pauling 提出的抗体形成学说,与药理学经典的受体-配体理论具有极大的相似性,能解释受体-配体理论。“印迹模板”是指主、客体相互作用的有效原子基团的空间点阵结构,是主、客体自主结合的作用规则,这种“印迹模板”可用拓扑指数定量表征,最常用的是分子连接性指数 (molecular connectivity index, MCI)^[5]。由于中药成簇在进行体外色谱印迹时,表现为某个分子的某 1 个基团“印迹模板”随机与色谱固定相进行结合-迁移-解结合-再结合-再迁移等印迹作用,最终综合印迹特征以保留时间的形式体现出来,因此对成分簇的保留时间综合分析可获得成分簇的印迹性综合信息^[6],而大量实验表明,成分簇印迹作用与其拓扑结构特征相关,而这种拓扑结构可用 MCI 表征,呈现“构-印”联系^[7],因此可用色谱学印迹性来推测不同成分簇结构的“印迹模板”特征,将中药复方所有成分按保留时间排序,形成印迹谱,将保留时间的色谱参数性质转变成成分结构的拓扑参数性质,为以指纹图谱作为工具研究中药作用奠定物质表征基础。

中药质量分析以鉴别、检查和含量测定为基础方法,中药成分印迹性分析方法的建立,能为这些基础分析提供更具特异性的技术支撑,传统经验鉴

别与化学检查可实现中药的初步定性质量筛查;前文所述的容量分析及仪器分析技术,可满足中药复方成分定量分析的需求^[8-10]。其中以能体现亲和印迹性的免疫芯片分析法^[11]的性能显著,是以后的发展方向之一。而由于目前中药成分抗原的合成、抗体的分离纯化和芯片的制备还不成熟,稳定性差,操作烦琐,并不多用,而色谱法稳定、简便、可靠,常用,若采用质谱检测器,绝大多数中药复方成分可以得以检出^[12]。中药成分在进行色谱分析时,表现为某个分子的某 1 个基团(印迹模板)随机与色谱固定相进行结合-迁移-解结合-再结合-再迁移等印迹作用,最终综合印迹特征以保留时间的形式体现出来,因此,成分的保留时间是衡量成分群间印迹性的综合指标,在中药质量评价中具有重要作用。然而,目前中药质量评价方法却注重成分的含量测定,而保留时间仅供待测成分的定性分析用^[13]。因此,在本实验中通过建立 MIP 的洗脱动力学研究,测定 MIP 的印迹动力学及评价印迹性,而印迹性的评价方法就必须在现有成分含量评价指标的基础上引入印迹性评价指标。

1 仪器与试药

1.1 仪器

RE-2000B 型旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司;SHB-IIIAS 型循环水式多用真空泵、

ZDHW 型调温电热套, 北京中兴伟业仪器有限公司; AUY220 型万级分析天平, 日本岛津公司; Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪, 美国沃特世公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; HH 型数显电热恒温水浴锅, 金坛市金城国胜实验仪器厂; 索氏提取器, 上海兰仪实业有限公司; H1850R 型触摸面板台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 试药

补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 复方黄芪 60 g, 当归 9 g, 红花 9 g, 川芎 6 g, 赤芍 9 g, 桃仁 9 g, 地龙 9 g, 批号分别为 CK2311270、CN24081409、QC23113002、SL23120401、XZ24082202、2023112301、2024011703, 以上中药饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院中药房, 经湖南中医药大学药学院中药炮制教研室石继连教授鉴定, 黄芪基原为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 当归基原为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 红花基原为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 川芎基原为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 赤芍基原为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 桃仁基原为蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子, 地龙基原为钜蚓科环毛蚓属动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体。水为自制超纯水; 对照品刺芒柄花素 (批号 F828304, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、苦杏仁苷 (批号 A871852, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、黄芪甲苷 (批号 B20564, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 及乙二醇二甲基丙烯酸酯 (批号 A800353), 上海麦克林生化科技有限公司; 丙烯酰胺 (批号 A900656), 北京索莱宝科技有限公司; 甲苯, 湖北大学精细化工厂; 偶氮二异丁腈 (AIBN), 上海试四赫维化工有限公司; 乙酸, 湖南汇虹试剂有限公司; 甲醇, 美国天地试剂公司; 甲醇和乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 聚合溶剂的选择

将物质的量比为 1 : 4 的刺芒柄花素和功能单体丙烯酰胺 (乙醇: 4.6 mg 刺芒柄花素和 18.5 mg 丙烯酰胺; 甲醇: 8.0 mg 刺芒柄花素和 34.5 mg 丙

烯酰胺; 甲苯: 58.5 mg 刺芒柄花素和 238.6 mg 丙烯酰胺; 乙腈: 4.9 mg 刺芒柄花素和 19.8 mg 丙烯酰胺; 纯水: 2.0 mg 刺芒柄花素和 9.7 mg 丙烯酰胺) 加入 25 mL 量瓶中两两混合, 用不同有机溶剂 (乙醇、甲醇、甲苯、乙腈、纯水) 定容。在恒温水浴锅中 25 °C 下放置 24 h, 然后用移液枪移取 1 mL 的混合液于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度线, 刺芒柄花素在 248 nm 处吸收峰最大, 则在波长 248 nm^[14]处测定紫外吸收光谱。甲苯溶液在 248 nm 处吸光度 (A) 为 3.167; 甲醇溶液在 248 nm 处 A 值为 3.128; 乙醇溶液在 248 nm 处 A 值为 2.573; 乙腈溶液在 248 nm 处 A 值为 1.855; 纯水溶液在 248 nm 处 A 值为 0.632。结果如图 2 所示, 可见甲苯作为聚合溶剂时的紫外光谱曲线峰值最高, 即说明混合溶液中剩余对照品与丙烯酰胺结合较好, 故选择甲苯作为聚合溶剂较为合适。

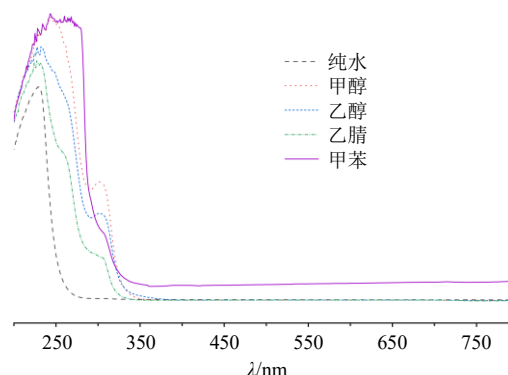


图 2 刺芒柄花素和功能单体丙烯酰胺在不同聚合溶剂中的紫外吸收光谱

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectra of formononetin and functional monomer acrylamide in different polymerization solvents

2.2 MIP 的制备

2.2.1 空白 MIP 的制备 在 250 mL 圆底烧瓶中加入 50 mL 甲苯超声震荡使其溶解, 随后加入 3 005.8 mg 功能单体丙烯酰胺, 超声 10 min 溶解, 预聚合 4 h。然后加入 2.5 mL 交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯和 163.2 mg 引发剂偶氮二异丁腈, 超声溶解 10 min。混合后的溶液通氮气 15 min 后立即封口, 于 60 °C 下恒温水浴, 反应聚合 24 h。取出固体聚合物后研磨, 放入 64 °C 干燥箱干燥 24 h, 得到 MIP 颗粒; 加入甲醇-冰醋酸 (9 : 1) 进行洗脱, 直到在 207 nm 处无紫外吸收, 再用甲醇洗至中性, 最后 60 °C 真空干燥 12 h, 即得到空白 MIP。

2.2.2 BHD 水提液的 MIP 的制备 按照 BHD 处方

要求,称取黄芪 60 g,当归 9 g,红花 9 g,川芎 6 g,赤芍 9 g,桃仁 9 g,地龙 9 g 加 1 000 mL 蒸馏水回流提取 2 次,每次 1 h,滤过 2 次提取的药液,并且混合 2 次滤液^[15],旋转浓缩至 1.2 g/mL 左右;加 95%乙醇至含醇量为 80%,静置过夜,分离出沉淀,上清液减压浓缩至无醇味,再用等体积量醋酸乙酯萃取 8 次;无醋酸乙酯味的水层继续用等体积水饱和的正丁醇萃取 8 次,合并正丁醇萃取液,减压浓缩至浸膏。以上制备得到 BHD MIP 所需模板分子^[16]。精密称取 BHD 水提液的模板分子 2.4 mg,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 50 mL 甲苯超声震荡使其溶解,随后加入 36.0 mg 功能单体丙烯酸胺,超声 10 min 溶解,预聚合 4 h。然后加入 2.5 mL 交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯和引发剂偶氮二异丁腈 161.5 mg,超声溶解 10 min。混合后的溶液通氮气 15 min 后立即封口,于 60 °C 下恒温水浴,反应聚合 24 h。取出固体聚合物后研磨,放入 64 °C 干燥箱干燥 24 h,得到 MIP 颗粒;加入甲醇-冰醋酸(9:1)进行洗脱,除去模板分子,直到在 248 nm 处无紫外吸收,再用甲醇洗至中性,最后 60 °C 真空干燥 12 h,即得到 BHD MIP。

2.2.3 对照品 MIP 的制备 精密称取 213.8 mg 刺芒柄花素对照品置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 50 mL 甲苯超声震荡使其溶解,随后加入 3 132.4 mg 功能单体丙烯酸胺,超声 10 min 溶解,预聚合 4 h。然后加入交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯 2.5 mL 和引发剂偶氮二异丁腈 0.16 g,超声溶解 10 min。混合后的溶液通氮气 15 min 后立即封口,于 60 °C 下恒温水浴,反应聚合 24 h。取出固体聚合物后研磨,放入 64 °C 干燥箱干燥 24 h,得到 MIP 颗粒;加入甲醇-冰醋酸(9:1)进行洗脱,除去模板分子,直到在 248 nm 处无紫外吸收,再用甲醇洗至中性,最后 60 °C 真空干燥 12 h,即得到刺芒柄花素 MIP。精密称取 219.6 mg 苦杏仁苷对照品重复上述操作最后得到苦杏仁苷的 MIP。称取 2.5 mg 黄芪甲苷对照品同理方法可得黄芪甲苷的 MIP。

2.3 MIP 的表征

2.3.1 红外分光光度法(IR)分析表征 MIP 取制备得到的刺芒柄花素 MIP、苦杏仁苷 MIP、空白 MIP、黄芪甲苷 MIP 以及 BHD MIP 粉末,研钵研细,过 100 目筛,取粉末若干,利用压片法进行红外分光光度仪检测,扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹,扫描频率为 32 次。结果如图 3 所示,可以看出制

备成功的空白 MIP、刺芒柄花素 MIP、苦杏仁苷 MIP、黄芪甲苷 MIP 及 BHD MIP,在 1 720 cm⁻¹ 羰基振动峰、1 450 cm⁻¹ 碳氢弯曲振动峰、1 389 cm⁻¹ 氢氧弯曲振动峰、1 254 cm⁻¹ 碳氮单键伸缩振动峰处、1 154 cm⁻¹ 碳氧单键伸缩振动峰等波长处均出现较强的特征峰,说明制备成功后的 5 个 MIP 在化学键的结合上类似(芳香环和不饱和键),证明本实验 MIP 制备方法稳定性强,重复性高,各 MIP 的特征峰归属见表 1;其中 1 720 cm⁻¹ 处的羰基振动峰是由于模板分子与单体的羟基形成了氢键,使电子云密度平均化,从而使伸缩振动频率降低,向高波数,低波长处移动,是 MIP 制备成功的标志之一。

2.3.2 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察表征 MIP 蘸取少量制备完成的 BHD MIP、黄芪甲苷 MIP、刺芒柄花素 MIP、苦杏仁苷 MIP 以及空白 MIP,用导电胶装固在样品台上,喷金 2 min,使用 SEM,观察样品的结构与形貌。结果见图 4,5 种 MIP 的表面都属于粗糙型,但各种 MIP 彼此之间结合得也更为紧密、结实,除空白 MIP 外,其他 MIP 的相对而言更加多孔隙,可能是因为还存在模板分子的原因。在经过长时间的洗脱后,

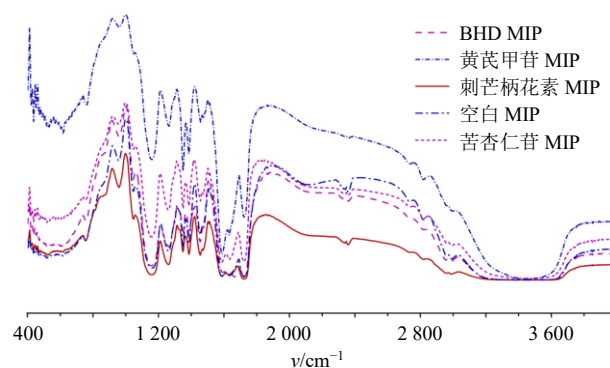


图 3 5 种 MIP 红外光谱扫描结果

Fig. 3 Infrared scanning results of five samples of MIP

表 1 刺芒柄花素和苦杏仁苷 MIP 红外光谱吸收带的归属
Table 1 Attribution of infrared spectral absorption bands of MIP of formononetin and amygdalin

功能团	v/cm ⁻¹				
	刺芒柄花素	苦杏仁苷	黄芪甲苷	BHD	空白
O-H伸缩振动	3 570	—	3 567	3 560	—
C-H伸缩振动	2 988	2 985	—	—	—
C=O伸缩振动	1 721	1 717	1 717	1 716	1 721
C-H弯曲振动	1 451	1 456	1 456	1 506	1 451
O-H弯曲振动	1 389	1 387	—	—	1 389
C-N伸缩振动	1 254	1 255	1 254	1 249	1 254
C-O伸缩振动	1 154	1 158	1 149	1 143	1 154

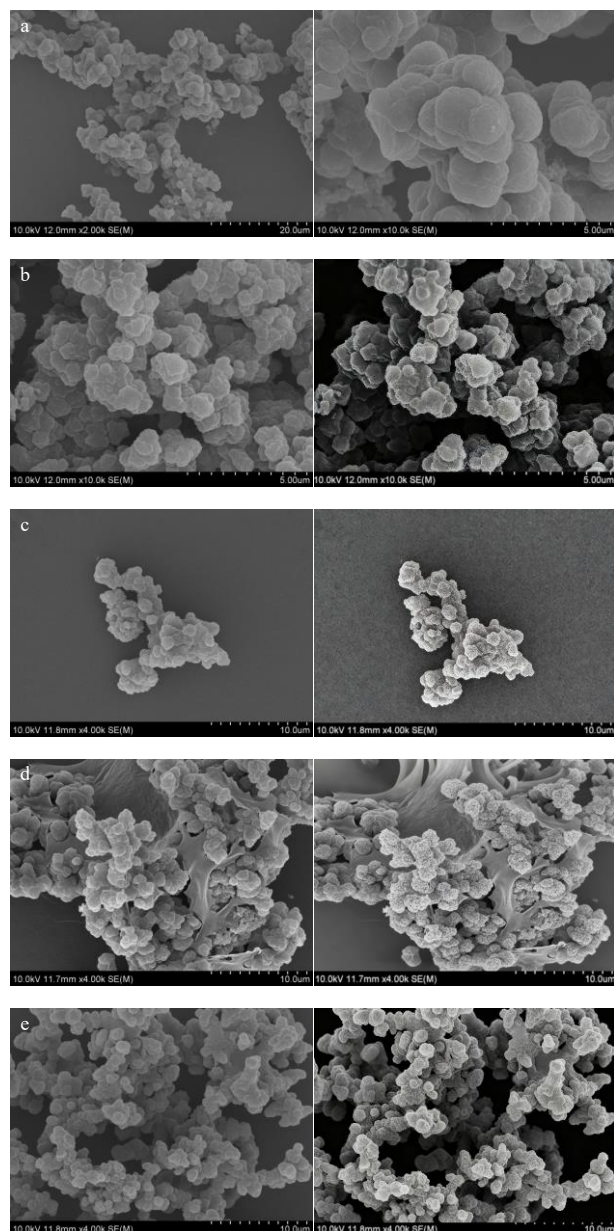


图 4 空白 MIP (a)、刺芒柄花素 MIP (b)、苦杏仁苷 MIP (c)、黄芪甲苷 MIP (d) 和 BHD MIP (e) 的 SEM 扫描结果

Fig. 4 SEM scanning results of blank MIP (a), formononetin MIP (b), amygdalin MIP (c), astragaloside A MIP (d) and BHD MIP (e)

模板分子从 MIP 中脱落, 曾经模板分子存在过的地方的部位则保留脱落后的孔隙, 从而导致 MIP 在表观上能够呈现多孔隙的形貌。初始作图中孔隙结构辨识度较低, 通过清晰化优化, 右图已能展示其孔隙分布特征。

2.4 基于总量统计矩法的 MIP-模板分子体系 UPLC 指纹图谱建立及吸附前后对比分析

2.4.1 供试品溶液的制备 称取黄芪甲苷 MIP、刺芒柄花素 MIP、苦杏仁苷 MIP 以及空白 MIP 粉末 4

份, 每份 0.1 g, 分别置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 BHD 水提液 40 mL, 将锥形瓶置于摇床上振摇 12 h, 收集振摇 12 h 后锥形瓶中溶液, 离心收集上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 与未经吸附的提取液一起, 在相同色谱条件下建立 UPLC 指纹图谱。

称取 0.1 g BHD MIP 粉末, 置于 250 mL 锥形瓶, 加入黄芪甲苷甲醇提取液 40 mL, 将锥形瓶置于摇床上振摇 12 h, 收集 12 h 后锥形瓶中溶液, 离心收集上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4.2 对照品溶液的制备 称取黄芪甲苷、刺芒柄花素、苦杏仁苷对照品适量, 使用甲醇溶解, 超声 (功率 250 W、频率 40 kHz) 15 min, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4.3 测定条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱, 以 0.4%磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱: 0~5.5 min, 1.0%乙腈; 5.5~19.0 min, 1.0%~7.0%乙腈; 19.0~25.5 min, 7.0%~12.5%乙腈; 25.5~33.0 min, 12.5%~25.0%乙腈; 33.0~50.0 min, 25.0%~80.0%乙腈; 50.0~55.0 min, 80.0%~1.0%乙腈; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 3 μ L; 190~400 nm 全波长扫描。经 260 nm 波长导出数据后处理分析。

2.4.4 重复性考察 按照“2.4.1”项下方法平行制备供试品溶液 (S1) 6 份, 并按照“2.4.3”项下色谱条件进样分析, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)”, 设定时间窗 0.1 min, 经多点矫正后全峰匹配, 得到相似度大于 90%, 表明该方法重复性良好, 结果见表 2。

2.4.5 精密度考察 取供试品溶液, 按照“2.4.3”项下色谱条件连续进样进样 6 次, 将数据导入相似度评价软件, 设定时间窗 0.1 min, 经多点矫正后全

表 2 重复性考察结果

Table 2 Results of repetitive investigation

试验号	相似度						对照指纹图谱
	重复性1	重复性2	重复性3	重复性4	重复性5	重复性6	
重复性1	1.000	0.834	0.830	0.818	0.946	0.811	0.937
重复性2	0.834	1.000	0.988	0.838	0.812	0.809	0.945
重复性3	0.830	0.988	1.000	0.841	0.807	0.812	0.944
重复性4	0.818	0.838	0.841	1.000	0.816	0.870	0.927
重复性5	0.946	0.812	0.807	0.816	1.000	0.803	0.927
重复性6	0.811	0.809	0.812	0.870	0.803	1.000	0.913
对照指纹图谱	0.937	0.945	0.944	0.927	0.927	0.913	1.000

峰匹配，得到相似度大于 93%，结果表明该仪器精密度良好，结果见表 3。

2.4.6 稳定性考察 取供试品溶液，分别于制样后

表 3 精密度考察结果

试验号	相似度						对照指 纹图谱
	精密 度1	精密 度2	精密 度3	精密 度4	精密 度5	精密 度6	
精密度1	1.000	0.827	0.938	0.814	0.939	0.817	0.942
精密度2	0.827	1.000	0.801	0.988	0.811	0.969	0.953
精密度3	0.938	0.801	1.000	0.796	0.938	0.799	0.931
精密度4	0.814	0.988	0.796	1.000	0.808	0.977	0.951
精密度5	0.939	0.811	0.938	0.808	1.000	0.812	0.938
精密度6	0.817	0.969	0.799	0.977	0.812	1.000	0.949
对照指纹图谱	0.942	0.953	0.931	0.951	0.938	0.949	1.000

表 4 稳定性考察结果

Table 4 Results of stability investigation

试验号	相似度							对照指 纹图谱
	稳定性0 h	稳定性2 h	稳定性4 h	稳定性6 h	稳定性8 h	稳定性12 h	稳定性24 h	
稳定性0 h	1.000	0.952	0.781	0.803	0.777	0.969	0.761	0.934
稳定性2 h	0.952	1.000	0.753	0.776	0.756	0.981	0.728	0.919
稳定性4 h	0.781	0.753	1.000	0.902	0.845	0.766	0.982	0.929
稳定性6 h	0.803	0.776	0.902	1.000	0.902	0.798	0.897	0.937
稳定性8 h	0.777	0.756	0.845	0.902	1.000	0.773	0.857	0.911
稳定性12 h	0.969	0.981	0.766	0.798	0.773	1.000	0.749	0.933
稳定性24 h	0.761	0.728	0.982	0.897	0.857	0.749	1.000	0.92
对照指纹图谱	0.934	0.919	0.929	0.937	0.911	0.933	0.92	1.000

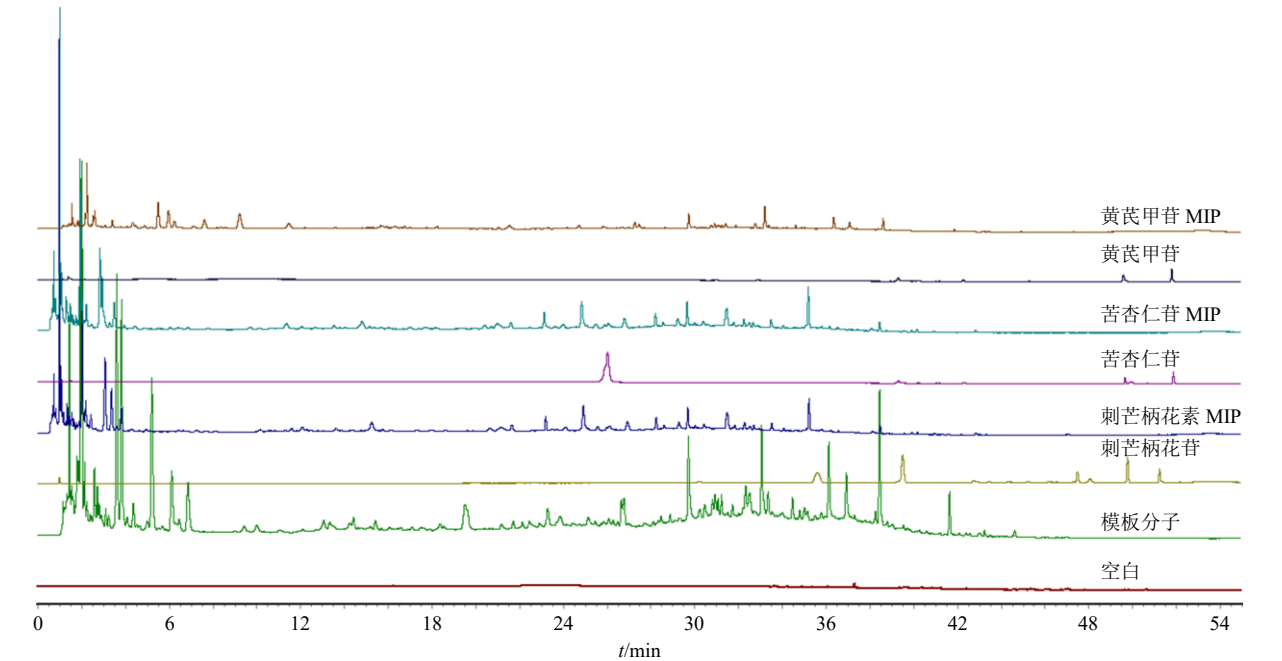


图 5 模板分子及其 MIP 吸附后样品的 UPLC 指纹图谱

Fig. 5 UPLC fingerprint spectra of template molecules and samples after MIP adsorption

表 5 总量统计矩参数、信息熵及信息量结果

Table 5 Total statistical moment parameters, information entropy and information quantity results						
样品	峰数	总量零阶矩	总量一阶矩	总量二阶矩	信息熵	信息量
模板分子	155	13 699 703	15.52	205.36	5.92	81 108 348
刺芒柄花素对照品	29	17 554 278	39.70	41.84	0.74	13 035 834
刺芒柄花素MIP吸附后	152	12 649 814	16.58	196.02	6.31	79 839 080
苦杏仁苷对照品	18	844 356	31.00	120.25	1.83	1 543 190
苦杏仁苷MIP吸附后	163	13 920 835	16.31	190.80	6.18	86 011 708
黄芪甲苷对照品	19	377 672	38.70	162.53	3.32	1 254 630
黄芪甲苷MIP吸附后	153	4 494 804	17.13	190.80	6.17	27 727 393
空白	20	383 980	38.85	217.24	3.44	1 320 815

可能是 MIP 吸附了成分导致；苦杏仁苷 MIP 吸附后的峰数、总量零阶矩和信息量均增大,可能是 MIP 与模板分子产生了相互作用。三者总量一阶矩均有所增大,说明吸附过后溶液的整体成分结构改变,即“印迹模板”特征发生了变化,也反映了 MIP 的成功制备。三者总量二阶矩均有所减小,说明二者的“印迹模板”特征变异强度较吸附前模板分子更小,“印迹模板”特征趋于稳定。

建立模板分子、BHD MIP 吸附后样品的 UPLC

指纹图谱,结果如图 6 所示。由表 6 结果可知,模板分子在经过 BHD MIP 吸附后的总量零阶矩、信息熵和信息量都减小,说明可能是 MIP 吸附了成分导致的。同时,总量一阶矩增大,说明吸附过后溶液的整体成分结构改变,即“印迹模板”特征发生了变化。也反映了 MIP 的成功制备。总量二阶矩均有所减小,表明二者的“印迹模板”特征变异强度均较吸附前的模板分子更小,“印迹模板”特征趋于稳定。

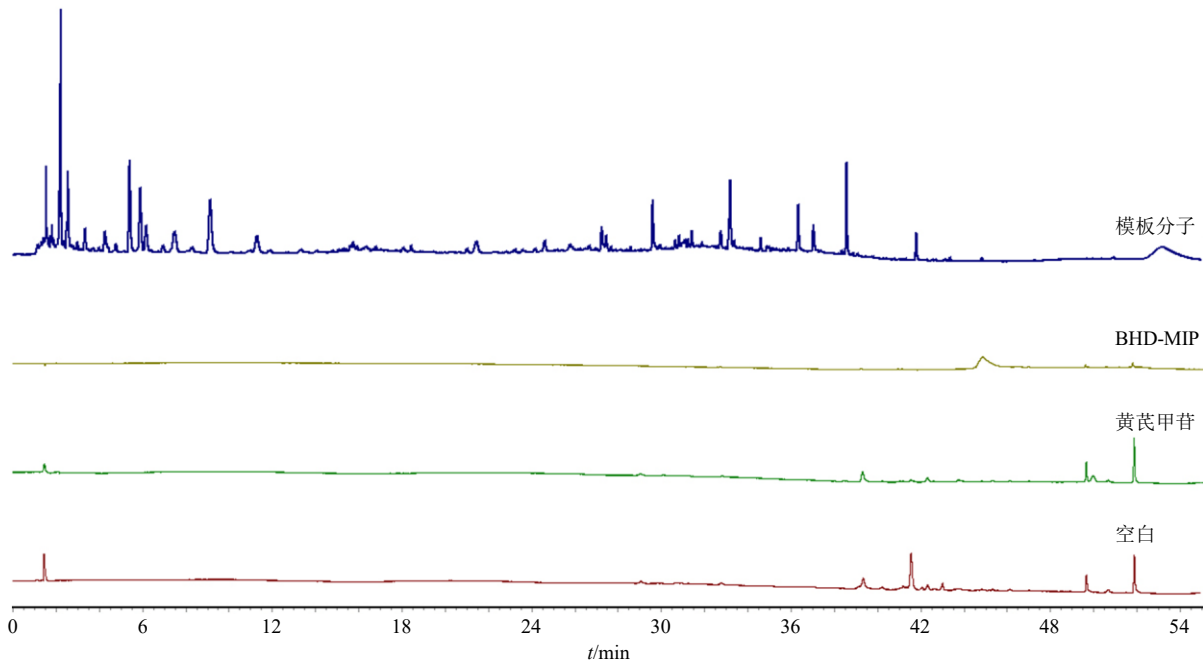


图 6 UPLC 指纹图谱
Fig. 6 UPLC fingerprint spectra

表 6 总量统计矩参数、信息熵及信息量结果

Table 6 Total statistical moment parameters, information entropy and information quantity results						
样品	峰数	总量零阶矩	总量一阶矩	总量二阶矩	信息熵	信息量
模板分子	10	143 591	41.69	161.41	1.69	241 985.26
BHD MIP吸附后	11	134 894	43.54	59.33	1.50	201 816.88

2.5 MIP 评价方法的建立

2.5.1 MIP 印迹动力学测定 称取制备得到的刺芒柄花素、苦杏仁苷、空白、黄芪甲苷以及 BHD MIP 粉末各 0.1 g, 分别置于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 BHD 水提液 40 mL, 将锥形瓶置于摇床上振摇 12 h, 收集 12 h 后锥形瓶中溶液置于层析柱中, 使用 25 mL 甲醇依次洗脱 5 次, 每次 5 mL 甲醇, 洗脱完成后收集甲醇溶液每 5 mL, 进行“2.4.3”项条件下的 UPLC 测定, 测定每次的洗脱甲醇溶液中的 BHD 峰面积以及保留时间。

2.5.2 印迹比 (I_f) 和印迹性指数 (I) 的计算 在一定条件下与标准模板分子的保留时间之比, 有效成分群间的平均保留时间的变化就意味着构成比的变化、成分群整体印迹性的变化以及药效属性的变化, 反之通过建立平均保留时间的评价指标就能控制成分群的构成比和药效属性。“印迹模板”综合印迹性可通过模板分子色谱的保留时间测定获得, 2 种成分的保留时间比值, 即印迹比 I_f 可反映成分印迹相关性, 则 I_f 可为印迹比, 也可表达为印记相关性, 为式 (1)。

$$I_f = t_{R,s} / t_{R,c} \quad (1)$$

以下以 2 种方法来分别评价印迹性。若以 MIP 作固定, 则印迹指数定义为与空白 MIP 的保留时间的差比, 其中 t_s 为样品 MIP 的平均保留时间, t_c 为空白 MIP 平均保留时间, 如式 (2)。

$$I = (t_s - t_c) / t_s = 1 - t_c / t_s \quad (2)$$

若 MIP 以洗脱为主, 则利用总量统计矩中的一阶矩 (MRT) 测算, 则样品的印迹性指数为式 (3)。

$$I_f = (\text{MRT}_s - \text{MRT}_c) / \text{MRT}_s = 1 - \text{MRT}_c / \text{MRT}_s \quad (3)$$

其中由于空白 MIP 的在制备过程中, 没有标准品的存在 (制备时的模板分子), 所导致空白 MIP 与 BHD 的结合相较于其他 MIP 较少, 而模板分子测算出的印迹相关性 (I_f) 最接近 1 时, 说明样品的印迹性越好, 反之亦然。

2.5.3 印构系数 (f) 的计算 将印迹比与各成分的 MCI 进行化学势关联, 获得活系数, 亦 f , 表征各结构中“印迹模板”基团对印迹比的贡献程度。 $t_{R,\text{标}}$ 为标准模板分子保留时间; $t_{R,\text{样}}$ 为样品分子的保留时间。其中 MCI 为常用的模板分子结构拓扑指数, 根据分子中原子的连接方式对化合物结构进行图形化、矩阵化和数值化表征, 定量地描述分子的结构排列^[17-19]。本实验采用自编软件计算零至八阶 MCI, 其公式为 (4)。

$${}^mX_t = \sum_{s=t}^{N_m} \prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i)_s^{1/2} \quad (4)$$

利用 TCMSP 数据库和 <http://localhost/ce/index.php> 以及 MCI 计算软件完成各成分 MCI 的计算, 再通过 Excel 表格的合并计算 BHD 中药各类成分种类的平均 MCI 以及中药的总体平均 MCI, 用 X_p 、 X_{vp} 、 X_c 、 X_{vc} 、 X_{pc} 、 X_{vpc} 、 X_{ch} 、 X_{vch} 分别代表 0~8 阶 MCI。

已有实验证明^[20-21], BHD 尽管各药材指纹图谱的成分数、峰面积变化大, 但其总量一阶矩 (平均印迹性) 的总体 RSD 为 12.47%, 与药效 RSD 变化接近, 说明 BHD 药效变化与平均保留时间变化相关, 存在“构-效-印”关系, 可建立 MCI (mX_t) 与保留时间比值的构-印关系式, 为式 (5); 也可建立 MCI 与药效的构-效关系式, 为式 (6)。

$${}^mX_t = f(R) \quad (5)$$

$$E = f({}^mX_t) \quad (6)$$

将式 (5) 与 (6) 关联可建立药效与保留时间比值 (I_f) 的关系, 为式 (7), 架起成分间构-效-印关系, 实现印迹作用相间转化。

$$E = f({}^mX_t) = f(R) \quad (7)$$

2.5.4 印构量的计算 为印构与各界 MCI 的乘积。是一个通过数学建模将 MCI、保留时间比值 (印迹比) 和药效关联起来后, 计算出的一个综合性的、相对的标度值。其数值大小代表了该成分或复方作为一个整体, 其“印迹模板”所产生的理论印迹作用或药效潜力的相对强弱。依式 (7) 各成分可折算为标准模板分子所产生印迹作用, 叠加构成印迹量, 与效应关联为式 (8)。

$$P_T = \sum_{i=1}^n E_i = \sum_{i=1}^n f({}^mX_t) = \sum_{i=1}^n f(R_i) \quad (8)$$

这时的保留时间为 $t_{R,\text{标}}$, 这样可实现成分群向“印迹模板”的标准模板分子整合, 并与疗效关联。因此, 中药有效复方成分群的印迹性以一定保留时间对应“印迹模板”的标准模板分子印迹总量表现出来。式 (1)~(8) 说明了“印迹模板”成分群的印迹性而非成分构成比能关联起药效与构效关系; 成分群的“构成比与疗效不对等”, 而“印迹性与疗效对等”。待积累研究基础, 可直接由印迹性与构效的关系建立中药复方质量评价体系, 简化药效学证明过程。

2.5.5 色谱印迹性评价结果 “印迹模板”综合印迹性可通过模板分子色谱的保留时间测定获得, 通过黄芪甲苷 MIP、刺芒柄花素 MIP 和苦杏仁苷 MIP 的平均保留时间和模板分子的平均保留时间, 成分

的平均保留时间比值 (I_f) 可反映成分印迹相关性, 结果如表 7 所示。由结果可知, 由于黄芪甲苷作为 BHD 的特征成分, 使用黄芪甲苷评价 BHD 的印迹性效果更好, 但苦杏仁苷的印迹相关性虽有所减弱, 但也能作为 BHD 的印迹性评价标记物。

通过对样品 MIP 和空白 MIP 的保留时间, 进行印迹性指数评价, 结果如表 7 所示。单个样品 MIP 的印迹性评价使用单数据评价为主, 印迹性指数评

表 7 印迹比
 Table 7 Imprint ratio

MIP	MRT/min	印迹比	印迹性指数
刺芒柄花素	39.70	1.021 8	0.021 4
苦杏仁苷	31.00	0.797 9	-0.253 2
黄芪甲苷	38.70	0.996 1	-0.003 9
BHD	43.54	1.120 7	0.107 7
空白	38.85	1.000 0	0.000 0

价的意义在于更贴近 0 的数值, 而表中黄芪甲苷的印迹性指数更加接近于 0, 所以对于以上 4 种 MIP 来比较说, 黄芪甲苷 MIP 用来评价 BHD 复方印迹性更加具有意义。

2.5.6 印迹动力学建立及 MIP 印迹性指数计算 通过对制备成功的 BHD MIP 在“2.4.3”项测定条件下进行 UPLC 分析。对 MIP (BHD 1.2 g/mL) 进行分析, 并且利用总量统计矩中的 MRT 对保留时间和峰面积进行印迹吸附性分析。由图 7 可知, 空白 MIP、黄芪甲苷 MIP、刺芒柄花素 MIP 及苦杏仁苷 MIP 在经过甲醇洗脱过程中平均保留时间均上升, 意味着随着洗脱次数的进行, MIP 中的模板分子逐渐被洗脱。而黄芪甲苷及刺芒柄花素在最后一次洗脱时, 保留时间有所下降, 考虑为洗脱溶剂的过量, 导致大量模板分子被洗脱出, 而导致峰值增加、保留时间下降。

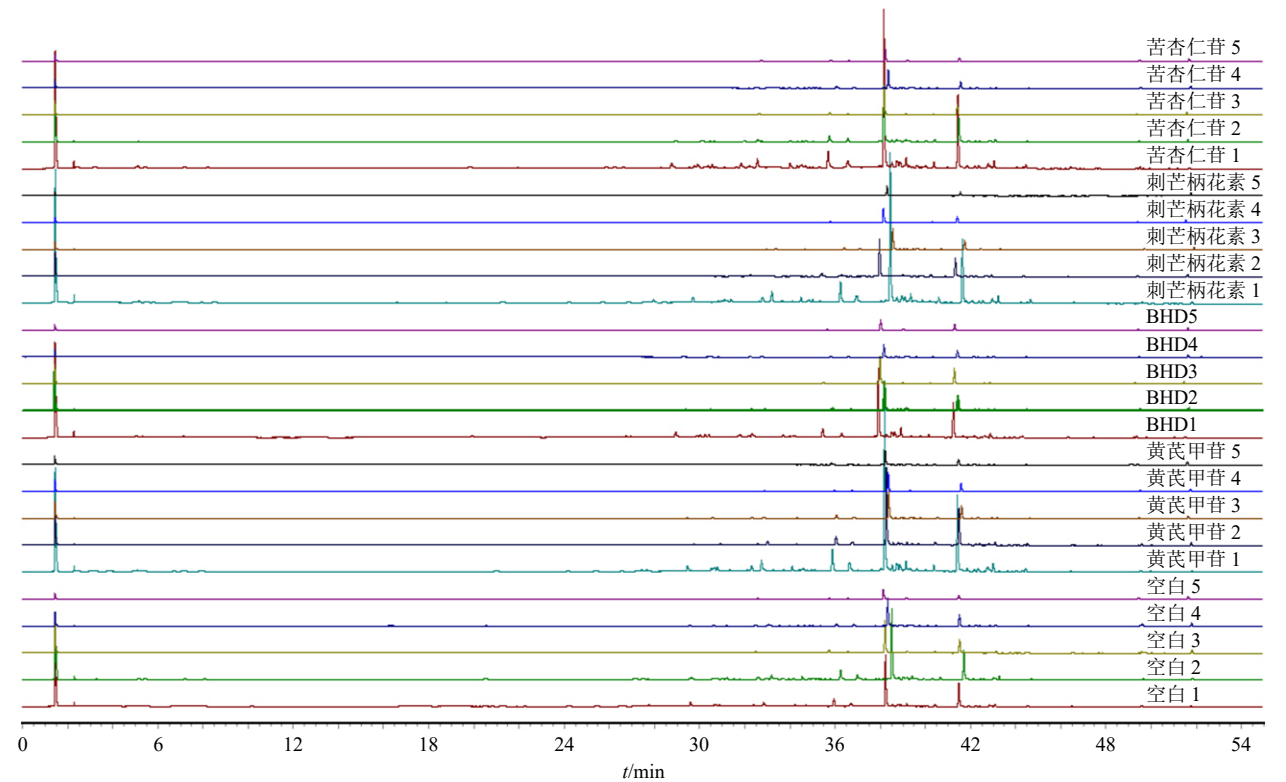


图 7 5 组 MIP-UPLC 吸附后的指纹图谱

Fig. 7 Fingerprint spectra of five groups after adsorption by MIP-UPLC

以空白 MIP 作为对照, 利用总量统计矩中的 MRT 测算 MIP 的印迹相关性, 根据式 (3) 得出 4 种成分的总量一阶矩参数差值, 即印迹性指数, 结果见表 8。其中, 黄芪甲苷、刺芒柄花素、苦杏仁苷和 BHD 的一阶矩差值, 由公式中可知在印迹性指数评价过程中, 会出现有负值的情况存在, 本实验考

察印迹性的标准为更接近于 0 的数值, 则更具有印迹性评价意义, 根据每种样品 MIP 的洗脱出来的一阶矩参数差值所得的平均值作为印迹性指数评价, 而黄芪甲苷 MIP 的印迹性指数的平均值更接近于 0, 所以黄芪甲苷 MIP 用来评价 BHD 复方印迹性更加具有意义。

表 8 MIP 与模板分子的总量一阶矩参数和印迹性指数
Table 8 First-order moment parameters and imprinting indexes of MIP and template molecules

MIP	一阶矩参数/min					印迹性指数/min					
	BHD1	BHD2	BHD3	BHD4	BHD5	BHD1	BHD2	BHD3	BHD4	BHD5	平均值
空白	29.203	30.746	32.979	36.031	28.617	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
刺芒柄花素	31.636	35.328	37.635	38.001	27.037	0.077	0.130	0.124	0.052	-0.058	0.074
苦杏仁苷	30.181	34.592	36.433	37.012	37.167	0.032	0.111	0.095	0.027	0.230	0.101
黄芪甲苷	32.534	34.041	35.664	36.153	36.295	0.102	0.107	0.081	0.003	0.212	0.076
BHD	28.381	32.378	35.585	37.386	37.784	-0.029	0.050	0.073	0.036	0.243	0.082

MIP 的印迹洗脱动力学的适用范围广,可适用于较大范围的中药复方即单味药使用,也可经过洗脱将目标模板分子洗脱出来,观察其平均保留时间,同时评价 MIP 的洗脱能力,通过此类方法进一步完善 MIP 的印迹性评价方法。

2.5.7 印迹性与构印、构效关联 建立 MCI (mX_i) 与保留时间比值的构-印关系式,同时建立 MCI 与药效的构-效关系式,构-印关系式与构-效关系式相结合,架起成分间构-效-印关系,实现印迹作用相到转化。由于式(4)可转置为 $X=f^{-1}(E)$,通过式(5)~(7),通过列出 MCI,将 MCI、保留时间比值(印迹性)、药效三者统一。实现从“结构”到“印迹”

再到“药效”的转化与预测。结果如表 10 所示,列出了黄芪甲苷、苦杏仁苷、刺芒柄花素和 BHD 全方的各阶 MCI,为构-印与构-效关系的建立提供了结构参数基础。根据 MCI 可关联构-印关系式与构-效关系式。综上,由表 9 可知,可建立 BHD 与其对照品的 MCI,并将其 MCI 与保留时间建立构-印关系式,也可建立药效与保留时间建立构-效关系式,即保留时间、药效和 MCI 可互相转换。其 3 种对照品的 RSD 值为 155.97%、157.25%、130.14%,可从数据中认为 BHD 的特征性成分(黄芪甲苷)的结果相对于其他 2 个成分会较好一些。而能够构建构-印-效关系,实现印迹作用的转化。

表 9 对照品 MCI 及构-印与构-效关系式
Table 9 Molecular connectivity index of reference substances and structure-imprint and structure-effect relationship formulas

中文名	Xvp 零阶	Xvp 一阶	Xvp 二阶	Xvp 三阶	Xvp 四阶	Xvp 五阶	Xvp 六阶	Xvp 七阶	Xvp 八阶	Xvc 三阶	Xvc 四阶	Xvc 五阶	Xvc 六阶	Xvc 七阶
	八阶	四阶	五阶	六阶	七阶	八阶	三阶	四阶	五阶	六阶	七阶	八阶	RSD/%	
黄芪甲苷MIP	33.581 9	20.867 7	21.057 4	16.991 6	14.353 6	11.682 3	9.100 8	7.157 6	11.318 9	5.812 4	0.727 6	2.288 3	0.644 4	0.041 7
苦杏仁苷MIP	16.862 5	9.998 8	7.601 2	5.431 5	3.506 9	2.305 3	1.242 0	0.679 2	0.785 6	0.975 1	0.000 0	0.186 9	0.000 0	0.000 0
刺芒柄花素MIP	16.542 8	9.598 0	7.180 1	5.247 8	3.450 6	2.308 5	1.296 0	0.751 8	0.865 3	0.883 7	0.000 0	0.154 2	0.000 0	0.000 0
BHD全方MIP	12.826 6	7.674 8	6.282 8	4.649 6	3.399 6	2.542 0	1.713 9	1.128 4	1.699 4	1.159 7	0.243 2	0.421 5	0.207 4	0.032 5
中文名	Xvc 八阶	Xvpc 四阶	Xvpc 五阶	Xvpc 六阶	Xvpc 七阶	Xvpc 八阶	Xvch 三阶	Xvch 四阶	Xvch 五阶	Xvch 六阶	Xvch 七阶	Xvch 八阶	RSD/%	
黄芪甲苷MIP	0.143 8	12.811 3	21.796 3	37.615 5	57.252 6	84.057 4	0.176 8	0.454 1	0.963 8	2.033 0	3.882 2	16.299 3	130.143 6	
苦杏仁苷MIP	0.000 0	2.004 9	2.369 1	2.850 5	2.610 5	4.290 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.084 5	0.147 2	0.296 2	157.250 0	
刺芒柄花素MIP	0.000 0	1.871 8	2.293 7	2.804 5	2.678 3	4.636 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.092 8	0.151 6	0.290 5	155.971 4	
BHD全方MIP	0.066 9	2.455 5	3.674 9	5.668 9	7.716 7	12.648 0	0.177 4	0.277 3	0.249 2	0.291 3	0.532 5	1.870 2	4.650 9	

2.5.8 印迹量的测算 依据式(1)得知各成分的印迹性,再依据式(4)所得出的构-印-效关系,后依据式(5)将各成分叠加成为印迹量,结果如表 10 所示。由结果可知,黄芪甲苷作为 BHD 的特征成分,

黄芪甲苷的印迹量明显高于其他 2 种成分。同时印迹量还可以转换为模板分子的印迹作用,则黄芪甲苷的印迹作用更加明显。

3 讨论

本团队提出中药汤剂是一个较为复杂的混相体系,但同时也是一个巨大的超分子体——中药超分子印迹模板理论:超分子“印迹模板”是在空间结构和结合位点上能完全匹配的模板物,对中药成分来说既是其分子的空间活性结构,也是活性原子团

表 10 印迹量
Table 10 Imprint quantity

成分	印迹量	成分	印迹量
刺芒柄花素	63.098 7	黄芪甲苷	393.112 3
苦杏仁苷	64.228 6	BHD	79.610 2

的空间排列点阵, 中药与人体“印迹模板”对应关系类似锁钥关系^[22]。中药与人体都是生物巨复超分子体, 中药成分作为客体进入人体后, 在超分子气析作用下, 印迹模板客体分子与结合位点主体分子在空间和能量层面上发挥相互匹配的作用, 进而产生药效, 具有相同(或相似)的“印迹模板”产生相同(相似)的药效, 反之亦然^[7,23]。故该理论可以从化学物质本源上说明主客体分子的普遍作用规律^[24]及“印迹性评价”科学问题。则以刺芒柄花素、苦杏仁苷及黄芪甲苷作为 MIP 的主体分子, 将 BHD 中药液作为客体分子, 可根据印迹动力学中所得到的平均保留时间, 测算出 BHD MIP 的印迹性相关性, 即可建立 BHD 的印迹性评价。

通过紫外光谱、红外光谱、SEM、洗脱成分的指纹图谱对 BHD 等 MIP 进行表征, 因同属于 BHD 药方, 结果表明他们之间的印迹模板结果具有相似性。红外光谱检测表明, 模板分子与单体间形成氢键; 扫描电镜观察 MIP 形貌为多孔形态; UPLC 指纹图谱总量统计矩参数表征“印迹模板”特征变化趋势。而后结合 MIP 与模板分子, 测定印迹动力学, 得洗脱模板的平均保留时间, 以此建立 BHD 印迹性评价; 利用前期该复方的 MCI, 建构-效及构-印关系式, 最终建立其印迹谱体系。中药复方药效物质基础为多成分动态复杂体系, 其成分受药材基原、产地、采收期及炮制工艺等因素影响, 导致质量控制复杂。传统的单一成分测定或指纹图谱相似度评价等质控方法存在局限, 难以反映成分群动态变化与药效关联, 无法满足精准质控需求。而印迹谱体系的出现, 为解决这一难题提供了新的思路和方法, 其研究基础是通过分子印迹技术、总量统计矩与 MCI 来实现对中药复方的质量控制, 具体的调控作用体现在以下 3 种解决方案中。

第 1 种是动态成分群的整合评价。该方案基于“印迹模板”导向的动态整合, 借助超分子“锁-钥”原理, 能够选择性吸附与模板分子结构相似的成分群。即便成分比例因外界因素发生波动, 其印迹性(如 I_f/I) 仍能保持稳定。例如, 黄芪甲苷 MIP 对 BHD 全方的印迹性指数(1.121)显著高于其他成分, 这一现象表明其对复方整体“印迹模板”特征具有很强的捕获能力, 可实现对成分群共性结构特征的动态整合, 从而有效应对成分群的动态变化。

第 2 种是构建“构-效-印”关系的定量桥梁。通过 MCI 与保留时间、药效的关联[式(5)~(7)],

印迹谱体系能够将成分群的动态变化转化为可量化的“印迹量”。如表 12 所示, 黄芪甲苷的印迹量(393.1123)远高于其他成分, 这提示其作为核心“印迹模板”在复方质量评价中发挥着主导作用。这种转化使得成分群的动态波动可以通过印迹性参数(如 I_f/I) 间接反映药效稳定性, 避免了传统方法中因成分比例变化而导致的评价偏差, 让成分群动态变化与药效之间的关系更加清晰可测。

第 3 种解决方案体现在实验优势及质量控制指标的确定上。本实验的优势在于通过总量统计矩分析(表 2、3), 即使成峰数或含量发生变化, 其中一阶矩(MRT)仍能表征整体“印迹模板”特征的稳定性(RSD 为 12.47%, 与药效变化接近), 充分体现了印迹谱体系的动态兼容性。同时, 以“印迹模板”成分簇代表峰及总量统计矩参数等为基础, 确定的中药复方质量控制指标, 不仅涵盖了成分的种类信息, 更反映了成分间的相互关系及整体的印迹特征。相较于传统单一成分指标, 这些指标能更全面地反映中药复方质量, 进一步凸显了印迹谱体系在调控中药复方成分群动态变化方面的优势。

综上所述, 印迹谱体系通过多种方式实现了对中药复方成分群动态变化的有效调控, 为中药复方的质量控制提供了更为全面、精准且可靠的方法, 有助于推动中药复方质量控制水平的提升。印迹谱体系的通用性主要体现在: 印迹谱体系的核心原理超分子“印迹模板”理论及 MCI 的构-效-印关联, 具有普适性化学基础, 而又依赖于模板分子的广谱性、MCI 的普适性以及动态整合能力。而本课题组前期初步建立过印迹性评价体系^[13,25], 其中包含 BHD 中药复方、金银花与山银花的评价。本实验在于能够在于利用印迹谱体系, 可快速评价 BHD 的药效物质基础差异, 实现其药效物质基础的精准表征。达到能够快速评价印迹性的作用, 在中药研究的多个领域展现出广阔的应用前景。随着分子印迹技术的不断发展和与中药研究的深度融合, MIP 所体现出来的特异性吸附避免“共提杂质”, 提高后续的所需要制剂的质量, 例如, 利用 MIP 对黄芪甲苷的特异性结合, 在病灶部位通过 pH 或酶效应释放药物。BHD MIP 具有明确的技术路径与应用价值, 但其可行性依赖于多成分协同印迹技术的突破。未来研究可聚焦: 其一, 多模板分子共印迹: 开发“一锅法”制备同时识别多种活性成分的 MIP, 匹配中药复方的整体性。其二, 临床转化探索: 通过 MIP

纯化的有效成分组合,开展抗血栓、改善微循环的动物实验,推动方剂有效部位群的新药研发,提高药物的靶向性。该技术有望为中药现代化研究提供强有力的工具,推动中药产业的创新发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘润南,贺福元,刘文龙,等.基于超分子“印迹模板”理论探讨中药升降浮沉[J].中草药,2019,50(12): 2771-2776.
- [2] Alsehli B R. Solid-phase extraction of organophosphates from polluted waters on a matrix-imprinted sorbent [J]. *Rev Inorg Chem*, 2024, 44(4): 535-545.
- [3] 国家图书馆研究院.《中国大百科全书(第三版)·图书馆学》发布[J].国家图书馆学刊,2023,32(6): 71.
- [4] Xiong J H, Yu H P, Li X, *et al.* Application of molecularly imprinted polymers for the separation and detection of aflatoxin [J]. *J Chem Res*, 2021, 45(5/6): 400-410.
- [5] Kier L B, Hall L H. *Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis* [M]. Letchworth: Research Studies Press Ltd., 1986: 262.
- [6] 张玉林.一个新的分子连接性指数(mZ_h)用于取代芳烃的定量构效关系研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(8): 109.
- [7] 贺福元,周逸群,邓凯文,等.超分子化学对中医药理论的特殊影响[J].中国中药杂志,2014,39(8): 1534-1543.
- [8] 刘月波,章小敏,仇凤梅,等.中药配方颗粒与传统汤剂化学成分等效性研究进展[J].浙江中医杂志,2018,53(1): 73-75.
- [9] 肖美凤,张雨恬,杨岩涛,等.基于鱼腥草挥发性成分动态性的中药制剂“印迹模板”一致性分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(14): 150-155.
- [10] 贺福元,贺红,邓凯文,等.借超分子“印迹模板”的自主作用解开金(山)银花纷争[J].中国中药杂志,2016,41(6): 1152-1160.
- [11] 贺福元,邓凯文,曾姣丽,等.中药及复方全成分群快速高通量测定技术的现状及免疫芯片综合法[J].中国中药杂志,2012,37(20): 3164-3168.
- [12] 刘洁,李月婷,陈奕君,等.高分辨质谱数据处理策略在中药体内外成分检测和表征中的应用进展[J].药学报,2021,56(1): 113-129.
- [13] 李海英,贺琪琚,邓凯文,等.基于超分子“气析”理论构建中药质量标志物的印迹性新评价体系[J].中草药,2021,52(16): 4771-4778.
- [14] 海力茜·陶尔大洪,何坚,艾尼瓦尔.薄层-紫外分光光度法测定天山岩黄芩根中芒柄花素的含量[J].时珍国医国药,2009,20(1): 47-48.
- [15] 张源,周琴妹,刘顺,等.补阳还五汤常压煎煮工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(19): 5-8.
- [16] 刘惠,吴月峰,朱志飞,等.基于分子印迹技术对金银花与山银花“异质等效”的研究[J].中华中医药杂志,2022,37(2): 1027-1035.
- [17] 王尔华,相秉仁.分子连接性及其在定量构效关系中的应用[J].国外医学·药学分册,1979(3): 129-137.
- [18] 刘惠,杨姣,朱志飞,等.基于总量统计矩分析法的金银花、山银花 HPLC 指纹图谱评价[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21): 132-139.
- [19] 候宝林,施洋,赵俊芳,等.桑白皮化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医杂志,2020,47(8): 212-214.
- [20] 陈思阳,王韧,李文姣,等.治疗脑梗死类药物结构拓扑指数与脑梗死面积关联性的研究[J].中国药理学杂志,2019,54(16): 1305-1310.
- [21] 贺琪琚,盛丹丹,陈泽,等.基于分子连接性指数相似度探讨归肺和大肠经中药成分“印迹模板”的分布特征及实验验证[J].中草药,2023,54(11): 3622-3630.
- [22] 李文姣,肖美凤,李海英,等.中药超分子“印迹模板”作用对成分簇动态性与稳态性变化规律的理论研究[J].中草药,2023,54(8): 2659-2667.
- [23] 夏赞韶,贺福元,邓凯文,等.中药分子印迹技术对中医药理论的特殊影响[J].中国中药杂志,2013,38(8): 1266-1270.
- [24] 王琴,陈林伟,陈子端.基于“超分子化学-配体垂钓”理论构建中药活性组分缓控释制剂体系[J].中华中医药杂志,2021,36(2): 679-682.
- [25] 刘惠,贺红,朱志飞,等.金银花与山银花体外印迹等效性的研究[J].中草药,2019,50(4): 829-835.

[责任编辑 郑礼胜]