

基于超分子“印迹模板”比较与分析补阳还五汤不同结构部位

李海英¹,陶叶琴²,谯茹³,
薛晓⁴,杨磊¹,贺鹏³,李文姣^{5*},贺福元^{3*}¹湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007;²浏阳市中医医院,浏阳 410300;³湖南中医药大学药学院,长沙 410208;⁴南华大学衡阳医学院附属第一医院中医科,衡阳 421001;⁵湖南中医药大学第二附属医院,长沙 410005

摘要:比较与分析补阳还五汤全方与苷、苷元、生物碱 3 个不同结构部位“印迹模板”印迹性,预测补阳还五汤药效部位。测定补阳还五汤与不同结构部位的 32 个成分含量,计算其分子连接性指数 (molecular connectivity index, MCI) 及 MCI 相似度;建立补阳还五汤与不同结构部位的 UPLC 指纹图谱,计算指纹图谱总量统计矩参数及其相似度,联合 MCI 相似度和总量统计矩相似度比较补阳还五汤与不同结构部位的“印迹模板”相似度。结果表明,补阳还五汤全方与不同结构部位的 MCI 相似度大小顺序为:苷 > 苷元 > 生物碱;全方与不同结构部位的峰数目、总量一阶矩和信息熵均存在显著性差异,全方与不同结构部位的总量统计矩相似度大小排序为:苷 > 苷元 > 生物碱。补阳还五汤各“印迹模板”印迹性存在差异,苷与全方的“印迹模板”相似度较高,可能是最能代表全方的结构部位。本研究采用总量统计矩法与 MCI 法表征不同结构部位“印迹模板”,可为补阳还五汤创制成组分中药提供依据。

关键词:补阳还五汤;结构部位;总量统计矩;分子连接性指数;印迹模板

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)8-1764-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.8.015

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.8.015

Comparison and analysis of the different structural fractions of Buyang Huanwu decoction based on supramolecular "imprinting template"

LI Hai-ying¹,TAO Ye-qing²,QIAO Ru³,
XUE Xiao⁴,YANG Lei¹,HE Peng³,LI Wen-jiao^{5*},HE Fu-yuan^{3*}¹The First Affinity Hospital, Hunan

University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

²Liuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuyang 410300, China;³College ofPharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;⁴The First Affiliated

Hospital, Department of Chinese Medicine, Hengyang Medical School, University of South China, Heng yang

421000, China;⁵The Second Affinity Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005, China

Abstract: To predict the pharmacodynamic fractions of Buyang Huanwu decoction, the imprinting properties of the "imprinting template" of the entire formula and its three different structural fractions of Buyang Huanwu decoction were compared and analyzed. The content of 32 components in the entire formula of Buyang Huanwu decoction and different structural fractions was measured and their molecular connectivity index (MCI) and MCI similarity was calculated. The UPLC fingerprint spectra of the entire formula of Buyang Huanwu decoction and different structural fractions was established. And the total statistical moment parameters and their similarity of the fingerprint spectra was calculated, and the "imprinting template" similarity between Buyang Huanwu decoction and different structural fractions was compared by combining MCI similarity and total statistical moment similarity. The similarity order of MCI between the entire formula and its different structural fractions is: glyco-

收稿日期:2025-06-23 接受日期:2025-10-30

基金项目:湖南省自然科学基金青年项目(2024JJ6362);湖南省卫生健康委卫生科研课题(W20243177);湖南中医药大学 2022 年度校级“揭榜挂帅”专项(2022-12-27-1);湖南中医药大学重点项目(2025XYLH049)

* 通信作者 Tel:86-013627424868; E-mail:20163378@stu.hnucm.edu.cn, pharmsharking@163.com

side > aglycone > alkaloid. There are significant differences in the number of peaks, the total first-order moment and information entropy in the entire formula and its various fractions of Buyang Huanwu decoction. The similarity order of the total moment between the entire formula and its different structural fractions is: glycoside > aglycone > alkaloid. There are differences in the imprinting patterns of each "imprinting template" of Buyang Huanwu decoction, and the similarity between the "imprinting template" of glycoside and the entire formula is relatively high, which may be the most representative pharmacodynamic fraction of the entire formula. The total statistical moment method and MCI method were utilized to characterize the "imprinting template" of different structural fractions in the study, providing a basis for the creation of multi-component Chinese medicine from Buyang Huanwu Decoction.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; structural fractions; total statistical moments; molecular connectivity index; imprinting template

超分子“印迹模板”是指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。中药与人体都是生物巨复超分子体,中药成分作为客体分子进入人体后,在超分子气析作用下,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(相似)的“印迹模板”产生相同(相似)的药效,反之亦然^[1]。

笔者团队前期已建立起基于总量统计矩与分子连接性指数(molecular connectivity index, MCI)表征“印迹模板”印迹性的方法^[2-5]。总量统计矩法能将单成分含量分析、多成分含量分析、单成分印迹性、多成分印迹性、单成分印迹方差、多成分印迹方差有机结合,具加合、统计、偶联、段带和消除干扰性,据此可建立“个体测定,群体分析,印迹表征”的 Q-Marker 新型评价方法。该法已用于补阳还五汤、金银花和山银花、鱼腥草、桃红四物汤、桑源药材、芍药甘草汤、咽饮配方颗粒、羌活胜湿汤、丹红注射剂等中药的质量评价,现已成为中药及其复方指纹图谱定性定量分析的通用工具^[6-9]。MCI 可对分子结构作出定量判断,通过分子结构将其与分子的物理、化学和生物学性质进行关联,则可建立一种量化的关系式,表达成分整体“印迹模板”特征^[10]。已证实 MCI 与分子的多种理化性质和生物效应有关,如液体密度、沸点、有机物的水溶性、摩尔折射度、分子极化度、立体参数、分配系数及麻醉活性、酶抑制活性、抗菌活性、致幻活性、毒性等多种理化性质和生物效应有关^[11,12]。

补阳还五汤为治疗缺血性脑中风临床应用最广泛的中药复方,出自王清任的《医林改错·下卷·瘫痪论》,由黄芪、当归、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙这 7 味药组成,具有补气活血通络的功效,体现

“不在逐瘀以活血,重在补气以活血”的配伍特点,是治疗半身不遂、瘫痪不用诸症的首选方^[13],但目前临床上却没有正式获批的补阳还五汤新药使用。本团队前期对补阳还五汤不同结构部位进行了配伍研究,筛选出补阳还五汤的苷、苷元、生物碱等结构部位对缺血性脑中风均有较好的疗效,然尚缺乏从物质基础层面对不同结构部位之间进行对比研究^[14]。因此,本文将采用总量统计矩法与 MCI 法表征不同结构部位“印迹模板”,阐明和比较还五汤不同结构部位“印迹模板”特征,为补阳还五汤研制成组方新药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药材

补阳还五汤由黄芪、川芎、当归、地龙、赤芍、红花、桃仁这 7 种药材组成,分别编号为 HQ1 ~ HQ15、CX1 ~ CX15、DG1 ~ DG15、DL1 ~ DL15、CS1 ~ CS15、HH1 ~ HH15、TR1 ~ TR15。本文共制备 15 批补阳还五汤样品,编号为 BHD1 ~ BHD15,分别由编号相同的上述 7 种药材批次配伍而成(见表 1)。上述药材经湖南中医药大学药学院石继连教授鉴定,黄芪为豆科草本植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎;当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根;广西玉林陆川和湖北宜昌产地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体,其余 3 产地地龙为钜蚓科动物栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体;赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根;红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花;桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子。

表 1 补阳还五汤药材信息

Table 1 Source information of Buyang Huanwu decoction

编号 No.	产地 Place of origin	采集时间 Collection time	编号 No.	产地 Place of origin	采集时间 Collection time	编号 No.	产地 Place of origin	采集时间 Collection time
HQ1	内蒙古固阳县	2021. 09	DG6	甘肃宕昌县	2021. 09	CS11	山西吕梁市	2022. 03
HQ2	内蒙古固阳县	2021. 09	DG7	甘肃渭源县	2021. 10	CS12	山西吕梁市	2022. 03
HQ3	内蒙古固阳县	2021. 09	DG8	甘肃渭源县	2021. 10	CS13	陕西榆林市	2022. 04
HQ4	内蒙古克什克腾旗	2021. 09	DG9	甘肃渭源县	2021. 10	CS14	陕西榆林市	2022. 04
HQ5	内蒙古克什克腾旗	2021. 09	DG10	甘肃漳县	2021. 11	CS15	陕西榆林市	2022. 04
HQ6	内蒙古克什克腾旗	2021. 09	DG11	甘肃漳县	2021. 11	HH1	甘肃兰州市	2021. 08
HQ7	内蒙古奈曼旗	2021. 11	DG12	甘肃漳县	2021. 11	HH2	甘肃兰州市	2021. 08
HQ8	内蒙古奈曼旗	2021. 11	DG13	甘肃迭部县	2021. 11	HH3	甘肃兰州市	2021. 08
HQ9	内蒙古奈曼旗	2021. 11	DG14	甘肃迭部县	2021. 11	HH4	新疆昌吉自治州	2021. 09
HQ10	甘肃岷县	2021. 11	DG15	甘肃迭部县	2021. 11	HH5	新疆昌吉自治州	2021. 09
HQ11	甘肃岷县	2021. 11	DL1	广西陆川县	2021. 09	HH6	新疆昌吉自治州	2021. 09
HQ12	甘肃岷县	2021. 11	DL2	广西陆川县	2021. 09	HH7	新疆裕民县	2021. 09
HQ13	甘肃渭源县	2021. 12	DL3	广西陆川县	2021. 09	HH8	新疆裕民县	2021. 09
HQ14	甘肃渭源县	2021. 12	DL4	河南周口市	2021. 09	HH9	新疆裕民县	2021. 09
HQ15	甘肃渭源县	2021. 12	DL5	河南周口市	2021. 09	HH10	云南大理自治州	2021. 08
CX1	四川都江堰徐渡乡	2021. 05	DL6	河南周口市	2021. 09	HH11	云南大理自治州	2021. 08
CX2	四川都江堰徐渡乡	2021. 05	DL7	江苏盐城市	2021. 10	HH12	云南大理自治州	2021. 08
CX3	四川都江堰徐渡乡	2021. 05	DL8	江苏盐城市	2021. 10	HH13	云南永胜县	2021. 08
CX4	四川敖平镇	2021. 06	DL9	江苏盐城市	2021. 10	HH14	云南永胜县	2021. 08
CX5	四川敖平镇	2021. 06	DL10	湖北宜昌市	2021. 09	HH15	云南永胜县	2021. 08
CX6	四川敖平镇	2021. 06	DL11	湖北宜昌市	2021. 09	TR1	内蒙古土默特右旗	2021. 06
CX7	四川彭山县	2021. 04	DL12	湖北宜昌市	2021. 09	TR2	内蒙古土默特右旗	2021. 06
CX8	四川彭山县	2021. 04	DL13	安徽亳州市	2021. 10	TR3	内蒙古土默特右旗	2021. 06
CX9	四川彭山县	2021. 04	DL14	安徽亳州市	2021. 10	TR4	河北丰宁县	2021. 07
CX10	四川德阳市	2021. 05	DL15	安徽亳州市	2021. 10	TR5	河北丰宁县	2021. 07
CX11	四川德阳市	2021. 05	CS1	内蒙古多伦县	2022. 04	TR6	河北丰宁县	2021. 07
CX12	四川德阳市	2021. 05	CS2	内蒙古多伦县	2022. 04	TR7	山东费县	2021. 06
CX13	四川阿坝州	2021. 05	CS3	内蒙古多伦县	2022. 04	TR8	山东费县	2021. 06
CX14	四川阿坝州	2021. 05	CS4	内蒙古克什克腾旗	2022. 04	TR9	山东费县	2021. 06
CX15	四川阿坝州	2021. 05	CS5	内蒙古克什克腾旗	2022. 04	TR10	陕西蒲城县	2021. 08
DG1	甘肃岷县	2021. 10	CS6	内蒙古克什克腾旗	2022. 04	TR11	陕西蒲城县	2021. 08
DG2	甘肃岷县	2021. 10	CS7	山东菏泽市	2022. 03	TR12	陕西蒲城县	2021. 08
DG3	甘肃岷县	2021. 10	CS8	山东菏泽市	2022. 03	TR13	甘肃宁县	2021. 06
DG4	甘肃宕昌县	2021. 09	CS9	山东菏泽市	2022. 03	TR14	甘肃宁县	2021. 06
DG5	甘肃宕昌县	2021. 09	CS10	山西吕梁市	2022. 03	TR15	甘肃宁县	2021. 06

1.2 试剂与仪器

丹皮酚、黄芪甲苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、没食子酸、芍药苷、羟基红花黄色素 A、苦杏仁苷、芒柄花素、琥珀酸、儿茶素、咖啡酸、山柰酚-

3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素、腺嘌呤、羟甲香豆素、香草酸、异亮氨酸(批号分别为110708-201407、110781-201616、110773-201614、111920-201606、100080-201811、110831-201605、110736-201842、111637-201810、110820-201607、111703-201504、110896-201602、110877-201604、110885-201703、112007-201602、110860-201611、110886-201102、100241-200503、110776-201503、140683-201302,质量分数均 $\geq 98\%$,中国药品生物制品检定所);异黄芪皂苷II、毛蕊异黄酮、槲皮素、4 β -羟基黄芪紫檀烷苷、洋川芎内酯I、香兰素、川芎嗪、刺芒柄花苷、氧化芍药苷、苯甲酰基芍药苷、黄芪皂苷I、山柰酚、洋川芎内酯H(批号分别为YM0306HD14、Y14J8Y39707、C01J10Y91727、M21A9S68359、P02F9F54166、J24A6R2696、KJ0622CA14、R2808F46957、Z20A9S68312、011GB163260、YM0328HA14、G03J11 L117305、P02F9F54165,质量分数均 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,批号:22075178、22095326,美国天地有限公司);磷酸(分析纯,批号:20200224,国药集团化学试剂有限公司);水为怡宝纯净水。

TQ-S scronos 型质谱联用仪(美国沃特世公司);ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(美国沃特世公司);Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8 μ m,美国沃特世公司);MA110 型电子天平(上海精宏实验设备有限公司);SQP 型十万分之一分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 补阳还五汤不同结构部位的提取、分离与精制

1.3.1.1 补阳还五汤不同结构部位的提取

按处方量比例称取黄芪120 g、川芎12 g、当归18 g、红花18 g、桃仁18 g、赤芍18 g、地龙18 g,煎煮2次,每次加10倍量的水煎煮1 h,合并2次滤液,旋转蒸发仪浓缩至120 mL,得生药质量浓度为1.85 g/mL的补阳还五汤药液。加入乙醇至含醇浓度为85%,4 $^{\circ}$ C放置24 h,抽滤,回收乙醇并浓缩至100 mL,反复处理3次,最后一轮的乙醇体积分数达到90%,抽滤,回收乙醇得到含苷、苷元、生物碱的混合溶液1。

1.3.1.2 补阳还五汤不同结构部位的分离

混合液1用7% HCl调pH为2,通过1 000 g预先已活化好并用7% HCl处理好的732型阳离子

交换树脂柱,先用蒸馏水3 BV(1 500 mL)洗脱除去无机盐,再收集洗脱液,得苷、苷元混合溶液2。然后再用0.25%的氨水3 BV(1 500 mL)进行洗脱,收集得生物碱、氨基酸混合溶液3。混合液2调pH为中性,并于60 $^{\circ}$ C下旋转浓缩至100 mL,用等体积乙酸乙酯进行连续萃取4次,分离得到上层乙酸乙酯苷元部位样品溶液4和下层苷部位样品溶液5。

1.3.1.3 补阳还五汤结构部位的精制

取已处理好的1 000 g D-101大孔树脂,加苷混合溶液5于大孔树脂柱上,先用水约3 BV(1 500 mL)洗脱糖类反应为阴性、苷反应刚出现阳性反应为止,然后用60%乙醇3 BV(1 500 mL)洗下被大孔树脂吸附的苷类,回收乙醇得苷部位样品溶液。

生物碱和氨基酸混合样品液3旋转浓缩至500 mL,用0.25%氨水调pH为10,依次加入75、35、25、15 mL氯仿萃取水层生物碱,至生物碱沉淀试剂反应消失为止,于45 $^{\circ}$ C下回收氯仿得生物碱部位样品溶液。

1.3.2 补阳还五汤全方与不同结构部位32个成分含量测定

1.3.2.1 液相色谱条件和质谱条件

色谱条件:流动相为0.01%甲酸水(A相)和乙腈(B相),梯度洗脱条件如下:0~3 min,99% A;3~4 min,99% A $\rightarrow$ 93% A;4~8 min,93% A $\rightarrow$ 87.5% A;8~12 min,87.5% A $\rightarrow$ 75% A;12~20 min,75% A $\rightarrow$ 20% A;20~22 min,20% A $\rightarrow$ 99% A;22~26 min,99% A,流速为0.3 mL/min。

质谱条件:质谱检测采用ESI离子源,用多反应检测模式(multiple reaction monitoring,MRM),高纯氮气为雾化器和辅助气,氦气为碰撞气,离子源温度为400 $^{\circ}$ C,鞘气(N_2)流速:1 000 L/h,碰撞气(Ar)流速:50 L/h,喷雾电压2 500 V。

1.3.2.2 补阳还五汤全方样品溶液制备

精密移取“1.3.1.1”项下制备得到的1.85 g/mL的补阳还五汤全方药液1 mL至10 mL容量瓶中,稀释后定容,再过0.22 μ m水系微孔滤膜,取续滤液置于进样小瓶中,待测。

1.3.2.3 苷部位样品溶液制备

称取苷部位样品124.60 mg,加纯化水溶解至10 mL,超声使充分溶解,得浓度为12.46 mg/mL的苷样品溶液,过0.22 μ m水系微孔滤膜,取续滤液置于进样小瓶中,待测。

1.3.2.4 苷元部位样品溶液制备

称取苷元部位样品 25.00 mg,加纯甲醇溶解至 5 mL,超声使充分溶解,得浓度为 5.00 mg/mL 的苷元样品溶液,过 0.22 μm 有机系微孔滤膜,取续滤液置于进样小瓶中,待测。

1.3.2.5 生物碱部位样品溶液制备

称取生物碱部位样品 25.00 mg,加纯甲醇溶解至 5 mL,超声使充分溶解,得浓度为 5.00 mg/mL 的生物碱样品溶液,过 0.22 μm 有机系微孔滤膜,取续滤液置于进样小瓶中,待测。

1.3.2.6 混合对照品溶液制备

精密称取适量的对照品,加 50% 甲醇溶液,超声使充分溶解,得浓度约为 100 ug/mL 的单个对照

品溶液。精密移取以上对照品溶液适量置 25 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇溶解定容至刻度,配成混合对照品储备液备用,再采用逐级稀释法分别精密移取混合对照品储备液适量定容至刻度,得不同浓度的混合对照品溶液。

1.3.2.7 方法学考察

取不同浓度混合对照品溶液,按照“1.3.2.1”项下色谱和质谱条件进样分析,以峰面积(*Y*)对进样量(*X*)进行回归计算,得到 32 个对照品成分的回归方程、线性范围、相关系数(见表 2)。这 32 个对照品成分的相关系数均大于 0.990 7,表明这 32 个成分在线性范围内相关性良好,可用于定量分析。

表 2 32 个对照品成分的成分分类及线性回归方程、线性范围和相关系数

Table 2 Component classification and linear regression equation,linear range and correlation coefficient of 32 reference components

编号 No.	化合物 Compound	成分种类 Compound classification	回归方程 Regression equation	<i>R</i> ²	线性范围 Linear range (μg/mL)
1	黄芪甲苷 Astragaloside IV	苷	<i>Y</i> = 101.3 <i>X</i> - 7.8	0.999 1	0.50 ~ 40.00
2	异黄芪皂苷 II Isoastragaloside II	苷	<i>Y</i> = 630.5 <i>X</i> - 429.6	0.996 7	0.44 ~ 8.72
3	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 Alycosin-7-glucoside	苷	<i>Y</i> = 1 492.0 <i>X</i> - 200.0	0.999 0	0.03 ~ 9.88
4	芦丁 Rutin	苷	<i>Y</i> = 1 159.6 <i>X</i> - 186.9	0.997 9	0.05 ~ 9.80
5	4β-羟基黄芪紫檀烷苷 4β-Hydroxyastragaloside	苷	<i>Y</i> = 338.4 <i>X</i> - 298.8	0.990 7	0.80 ~ 24.12
6	芍药苷 Paeoniflorin	苷	<i>Y</i> = 1 858.2 <i>X</i> - 3461.8	0.996 9	3.52 ~ 352.00
7	苦杏仁苷 Amygdalin	苷	<i>Y</i> = 680.1 <i>X</i> - 125.2	0.997 5	0.34 ~ 42.60
8	刺芒柄花苷 Ononin	苷	<i>Y</i> = 70 550.0 <i>X</i> - 602.3	0.996 7	0.06 ~ 1.12
9	氧化芍药苷 Oxypaeoniflorin	苷	<i>Y</i> = 6 874.7 <i>X</i> + 14.7	0.999 5	0.02 ~ 41.20
10	苯甲酰基芍药苷 Benzoylpaeoniflorigenin	苷	<i>Y</i> = 11 570.0 <i>X</i> - 1 786.9	0.997 3	0.01 ~ 9.68
11	黄芪皂苷 I Astragaloside I	苷	<i>Y</i> = 489.1 <i>X</i> - 254.8	0.997 9	0.27 ~ 8.84
12	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	苷	<i>Y</i> = 2 158.4 <i>X</i> - 28.2	0.999 2	0.01 ~ 9.28
13	阿魏酸 Ferulic acid	苷元	<i>Y</i> = 9 587.1 <i>X</i> - 15 983.0	0.997 6	0.36 ~ 72.00
14	毛蕊异黄酮 Calycosin	苷元	<i>Y</i> = 10 848.0 <i>X</i> - 6 319.8	0.993 6	0.09 ~ 8.92
15	槲皮素 Quercetin	苷元	<i>Y</i> = 193.9 <i>X</i> - 79.1	0.996 5	0.35 ~ 14.16
16	没食子酸 Gallic acid	苷元	<i>Y</i> = 288.0 <i>X</i> - 914.1	0.998 1	1.03 ~ 103.20
17	羟基红花黄色素 A Hydroxysafflor yellow A	苷元	<i>Y</i> = 77.5 <i>X</i> - 371.1	0.999 2	0.96 ~ 384.00
18	芒柄花素 Formononetin	苷元	<i>Y</i> = 800.8 <i>X</i> - 127.8	0.991 2	0.36 ~ 4.48
19	香兰素 Vanillin	苷元	<i>Y</i> = 5 033.7 <i>X</i> - 23.1	0.999 3	0.01 ~ 3.01
20	琥珀酸 Succinic acid	苷元	<i>Y</i> = 681.3 <i>X</i> + 99.9	0.999 0	0.01 ~ 10.44
21	儿茶素 Cianidanol	苷元	<i>Y</i> = 143.1 <i>X</i> - 12.5	0.999 8	0.04 ~ 26.40
22	咖啡酸 Caffeic acid	苷元	<i>Y</i> = 1 430.4 <i>X</i> - 368.2	0.994 0	0.01 ~ 9.40
23	异鼠李素 Isorhamnetin	苷元	<i>Y</i> = 6 831.9 <i>X</i> - 210.2	0.999 7	0.01 ~ 6.15
24	山柰酚 Kaempferol	苷元	<i>Y</i> = 455.7 <i>X</i> - 14.1	0.999 3	0.06 ~ 98.40
25	羟甲香豆素 4-Methylumbelliferone	苷元	<i>Y</i> = 6 120.1 <i>X</i> - 158.3	0.999 1	0.05 ~ 9.16
26	香草酸 Vanillic acid	苷元	<i>Y</i> = 3 607.9 <i>X</i> - 627.5	0.995 8	0.10 ~ 10.28

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	化合物 Compound	成分种类 Compound classification	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)
27	川芎嗪 Tetramethylpyrazine	生物碱	$Y = 58\ 156.0X - 373.8$	0.999 5	0.01 ~ 3.18
28	腺嘌呤 Adenine	生物碱	$Y = 24\ 054.0X - 15\ 607.0$	0.996 4	0.01 ~ 44.40
29	丹皮酚 Paeonol	其他	$Y = 1\ 367.6X - 4\ 486.5$	0.993 8	1.02 ~ 10.20
30	异亮氨酸 <i>L</i> -Isoleucine	其他	$Y = 127.1X - 105.1$	0.993 9	0.04 ~ 12.72
31	洋川芎内酯 H Senkyunolide H	其他	$Y = 50\ 866.0X - 11\ 726.0$	0.997 8	0.10 ~ 19.04
32	洋川芎内酯 I Senkyunolide I	其他	$Y = 28.2X - 49.5$	0.964 7	1.50 ~ 9.00

按照“1.3.2.1”项下方法分别进行精密度、重复性及稳定性。结果表明,精密度试验中,32 个成分峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均在 1.0% ~ 13% 之间,表明仪器精密度良好。重复性试验中,32 个对照品成分峰面积的 RSD 均在 0.26% ~ 14% 之间,表明该方法重复性符合要求。稳定性试验中,32 个对照品成分峰面积的 RSD 均在 2.0% ~ 13% 之间,表明该样品的化学性质在 24 h 内较稳定。

1.3.3 UPLC 指纹图谱建立

1.3.3.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),以 0.4% 磷酸水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱条件如下:0 ~ 5.5 min, 99% A;5.5 ~ 19 min,99% A→93% A;19 ~ 25.5 min, 93% A→87.5% A;25.2 ~ 33 min,87.5% A→75% A; 33 ~ 50 min,75% A→20% A;50 ~ 55 min,20% A→ 99% A。流速:0.4 mL/min,柱温:40 $^{\circ}\text{C}$,进样量:3 μL ,波长:260 nm。

1.3.3.2 供试品溶液制备

补阳还五汤全方、苷、苷元、生物碱样品溶液制备方法分别同“1.3.2.2”“1.3.2.3”“1.3.2.4” “1.3.2.5”项下方法。

1.3.3.3 UPLC 方法学考察

按照“1.3.2.1”项下色谱条件分别进行精密度、重复性及稳定性。结果表明,精密度试验中,补阳还五汤全方指纹图谱峰数的 RSD 为 2.9%,总量一阶矩的 RSD 为 6.7%,总量二阶矩的 RSD 为 1.7%,信息熵的 RSD 为 1.6%,结果表明仪器精密度良好。重复性试验中,补阳还五汤全方指纹图谱峰数的 RSD 为 3.5%,总量一阶矩的 RSD 为 7.9%,总量二阶矩的 RSD 为 7.9%,信息熵的 RSD 为 2.1%,结果表明方法重复性良好。稳定性试验中,

补阳还五汤全方指纹图谱峰数的 RSD 为 1.7%,总量一阶矩的 RSD 为 4.7%,总量二阶矩的 RSD 为 1.9%,信息熵的 RSD 为 0.87%,结果表明样品稳定性良好。

2 结果

2.1 补阳还五汤各结构部位得率

15 批次补阳还五汤苷、苷元和生物碱部位平均得率分别为 2.11%、1.03%、1.23%,苷部位得率最大,苷元部位得率最小(见图 1)。

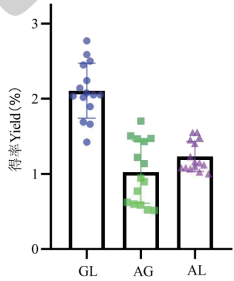


图 1 15 批次补阳还五汤不同结构部位得率

Fig. 1 Yield obtained of different structural fractions of 15 batches of Buyang Huanwu decoction

注:GL、AG 和 AL 分别表示苷、苷元和生物碱部位,下同。注: GL,AG and AL represent glycoside,aglycone,and alkaloid fractions, respectively,the same below.

2.2 补阳还五汤各类成分在各结构部位含量分布

正、负离子模式下补阳还五汤全方及各结构部位总离子流图分别见图 2 和图 3。

补阳还五汤苷、苷元、生物碱部位 32 个成分含量归一化热图见图 4。苷类成分在苷部位含量较高,苷元成分在苷元部位含量较高,生物碱成分在生物碱部位含量较高。对 32 个成分进行归类,并对其在苷、苷元、生物碱部位的总含量进行统计分析(见图 5)。苷类成分含量在苷部位占比 83.72%,苷元成分含量在苷元部位占比 61.10%,生物碱成分含量在生物碱部位占比 87.02%,各结构部位含量均 >60%,表明分离得到的结构部位纯度较高。

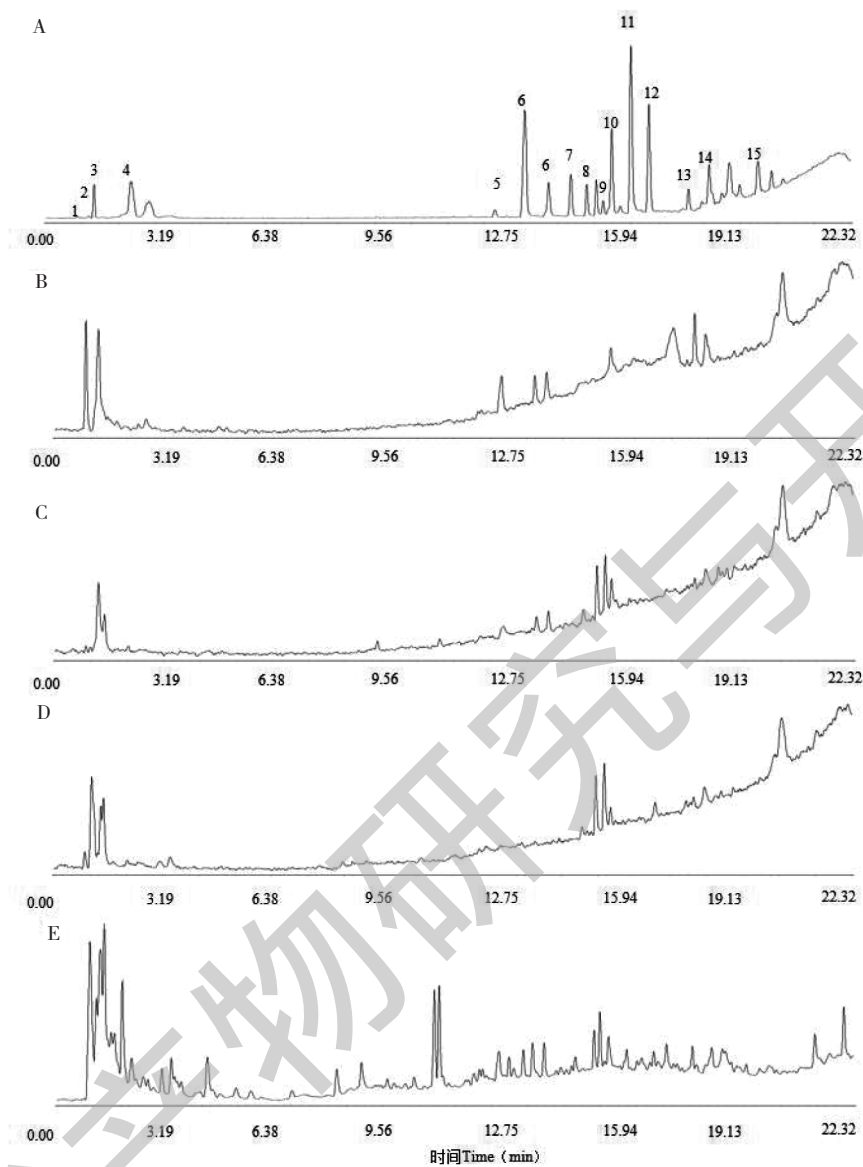


图2 正离子模式下混合标准品溶液(A)、苷(B)、苷元(C)、生物碱(D)部位和补阳还五汤(E)总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of mixed standard solution(A), glycoside (B), aglycone (C), alkaloid (D) fractions and Buyang Huanwu Decoction (E) in positive ion mode

注:1. 腺嘌呤;2. 异亮氨酸;3. 琥珀酸;4. 香草酸;5. 川芎嗪;6. 香兰素;7. 阿魏酸;8. 羟甲香豆素;9. 洋川芎内酯 H;10. 4β-羟基黄芪紫檀烷苷;11. 毛蕊异黄酮;12. 丹皮酚;13. 山柰酚;14. 异鼠李素;15. 异黄芪皂苷 II。Note:1. Adenine;2. *L*-Isoleucine;3. Succinic acid;4. Vanillic acid;5. Tetramethylpyrazine;6. Vanillin;7. Ferulic acid;8. 4-Methylumbelliferone;9. Senkyunolide H;10. 4β-Hydroxyastragaloside;11. Calycosin;12. Paeonol;13. Kaempferol;14. Isoquercitrin;15. Isoastragaloside II.

2.3 补阳还五汤全方与各结构部位成分平均 MCI 及相似度比较

2.3.1 补阳还五汤全方与各结构部位成分平均 MCI
补阳还五汤全方与各结构部位共测得成分 32 个,其中属于苷成分 12 个(黄芪甲苷、异黄芪皂苷 II、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、芍药苷、苦杏仁苷、刺芒柄花苷、氧化芍药苷、苯甲酰基芍药苷、黄芪皂

苷 I、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、4β-羟基黄芪紫檀烷苷),苷元成分 14 个(阿魏酸、毛蕊异黄酮、槲皮素、没食子酸、羟基红花黄色素 A、芒柄花素、香兰素、琥珀酸、儿茶素、咖啡酸、异鼠李素、山柰酚、羟甲香豆素、香草酸),生物碱成分 2 个(川芎嗪、腺嘌呤),说明苷元成分数目占比最大。补阳还五汤全方与各结构部位成分平均 MCI 见图 6。

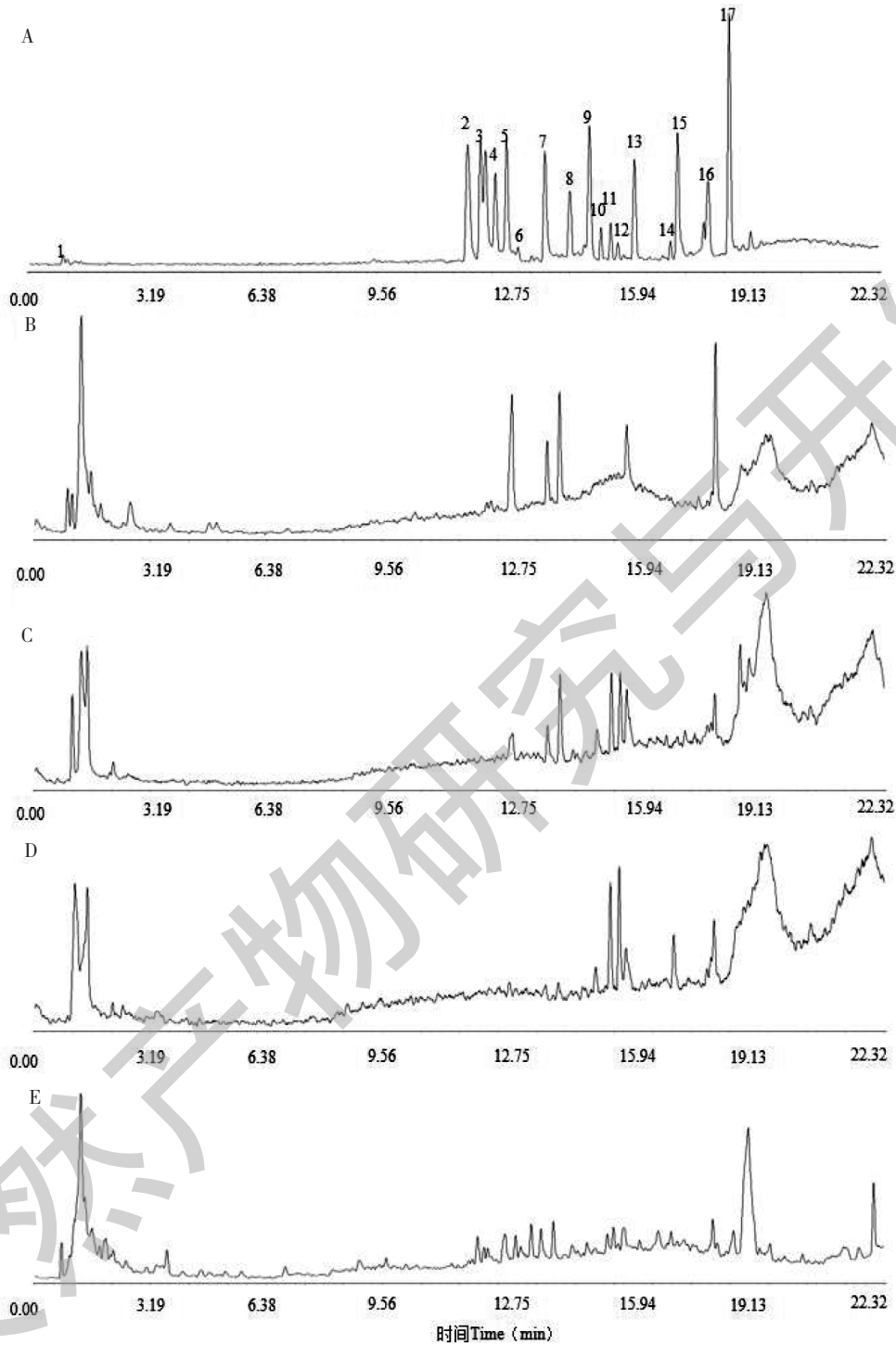


图3 负离子模式下混合标准品溶液(A)、苷(B)、苷元(C)、生物碱(D)部位和补阳还五汤(E)总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatograms of mixed standard solution(A), glycoside (B), aglycone (C), alkaloid (D) fractions and Buyang Huanwu Decoction (E) in negative ion mode

注:1. 没食子酸;2. 儿茶素;3. 咖啡酸;4. 羟基红花黄色素 A;5. 氧化芍药苷;6. 苦杏仁苷;7. 芍药苷;8. 芦丁;9. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷;10. 山柰酚-3-O-芸香糖苷;11. 洋川芎内酯I;12. 刺芒柄花苷;13. 槲皮素;14. 苯甲酰基芍药苷;15. 芒柄花素;16. 黄芪甲苷;17. 黄芪皂苷 I. Note: 1. Gallic acid;2. Cianidanol;3. Caffeic acid;4. Hydroxysafflor yellow A;5. Oxypaeoniflorin;6. Amygdalin;7. Paeoniflorin;8. Rutin;9. Alycosin-7-glucoside;10. Kaempferol-3-O-rutinoside;11. Senkyunolide I;12. Ononin;13. Quercetin;14. Benzoylpaeoniflogenin;15. Formononetin;16. Astragaloside IV;17. Astragaloside I.

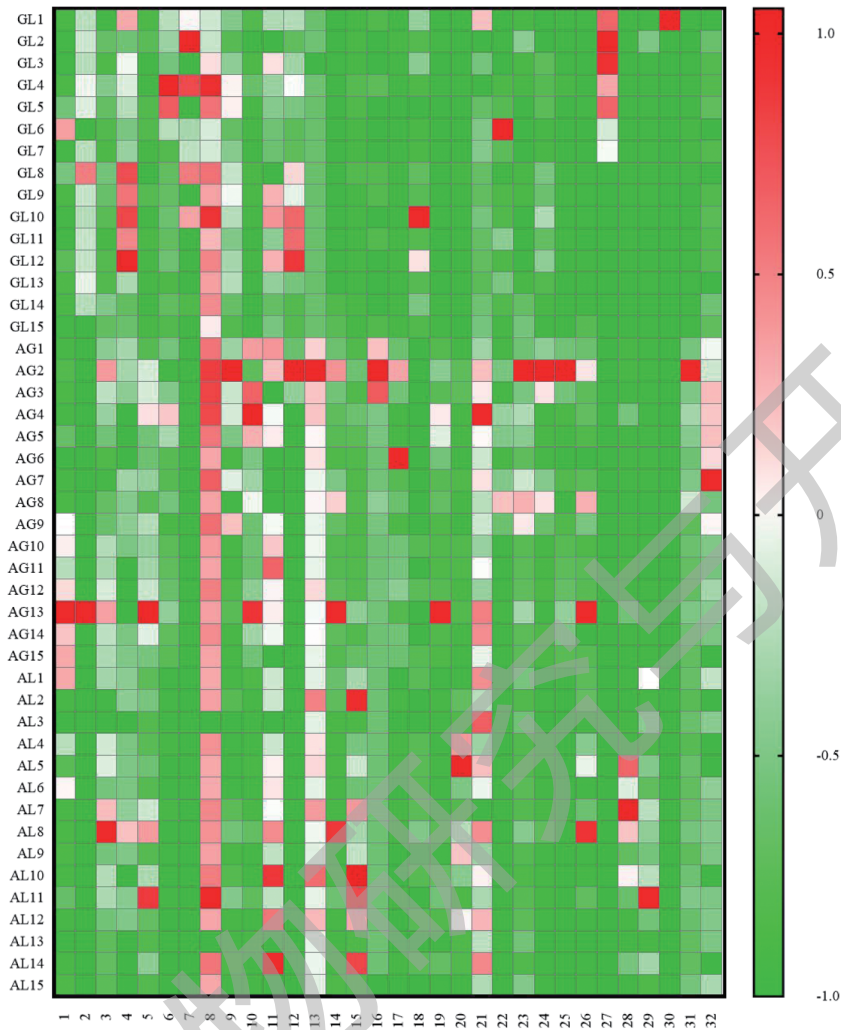


图4 补阳还五汤不同结构部位 32 个成分含量归一化热图

Fig. 4 Normalized heat map of the content of 32 components of different structural fractions in Buyang Huanwu decoction
注:图中下侧编号对应的化合物见表2。Note:The compounds corresponding to the numbers shown at the bottom of the figure are listed in Table 2.

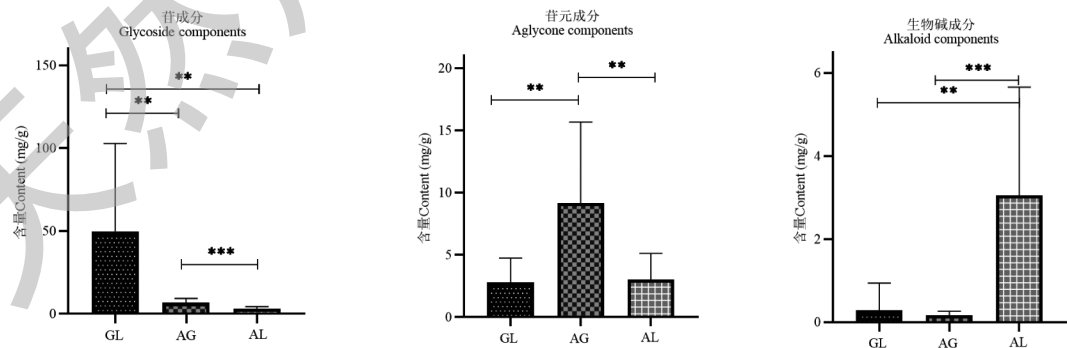


图5 补阳还五汤各类成分含量在不同结构部位分布

Fig. 5 Distribution of the total content of the different components of Buyang Huanwu decoction among the different structural fractions of Buyang Huanwu decoction

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 下同。Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

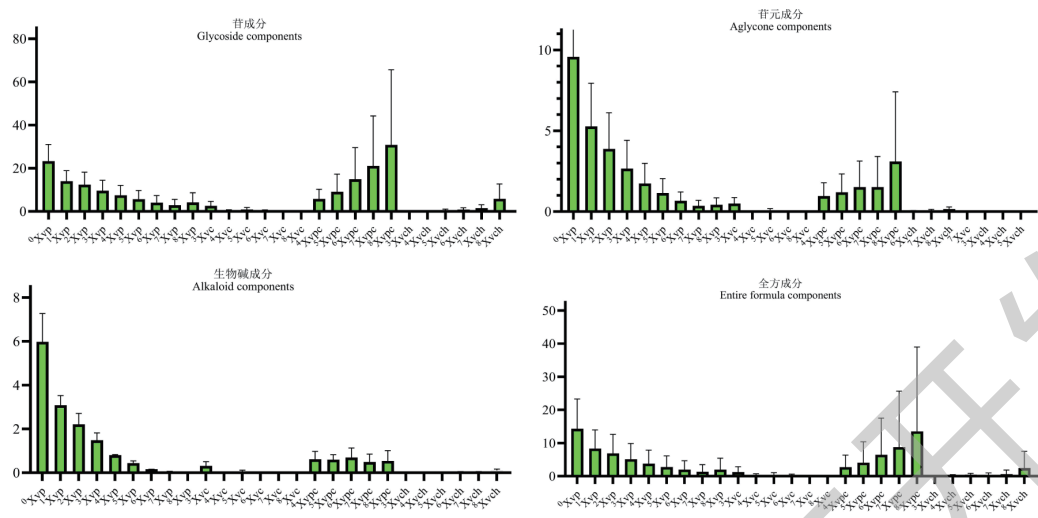


图6 补阳还五汤全方及不同结构部位成分平均 MCI

Fig. 6 Average MCI of the components between the entire formula and its various structural fractions of Buyang Huanwu decoction

注:Xvp,Xvc,Xvpc,Xvch 分别代表链状结构、簇状结构、链状和簇状结构、环状结构的 MCI。数字表示不同阶价的 MCI。Note:Xvp,Xvc,Xvpc,and Xvch respectively represent MCI with chain-like structure,cluster-like structure,chain-like and cluster-like structure,and cyclic structure. The numbers represent MCI at different valences.

2.3.2 补阳还五汤全方与各结构部位成分平均 MCI 相似度

采用夹角余弦法计算各结构部位与全方之间的 MCI 相似度,按大小排序为:苷(0.99) > 苷元(0.90) > 生物碱(0.81)。结果表明,苷和全方的 MCI 相似度最高,其次为苷元,生物碱与全方的相似度最小。

2.4 补阳还五汤全方与各结构部位 UPLC 指纹图谱总量统计矩参数及相似度

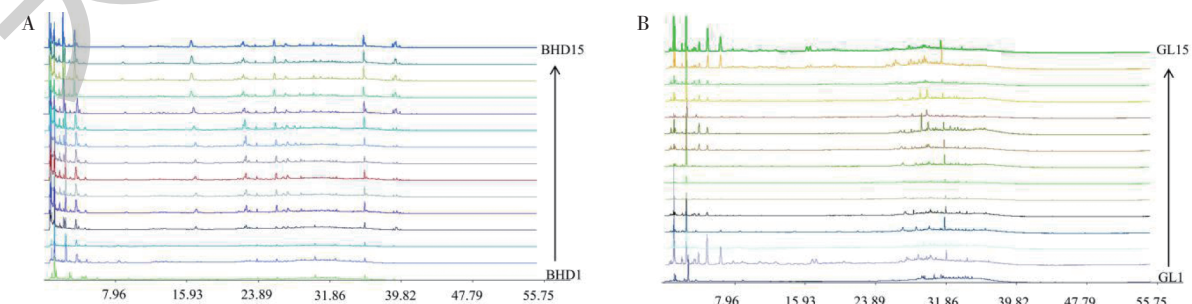
2.4.1 补阳还五汤全方与各结构部位 UPLC 指纹图谱总量统计矩参数

根据 15 批补阳还五汤全方与各结构部位 UPLC 指纹图谱(见图 7),计算得到峰数目、总量一阶矩、总量二阶矩及信息熵参数(见图 8)。峰数目中,全方、苷、苷元与生物碱两两间均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),峰数目大小顺序依次为:全方

> 苷 > 苷元 > 生物碱;总量一阶矩中,全方与苷($P < 0.001$)、苷元与生物碱($P < 0.001$)、苷与苷元($P < 0.001$)、苷与生物碱($P < 0.001$)、苷元与生物碱($P < 0.05$)均有显著性差异,总量一阶矩大小依次为:苷 > 全方 > 苷元 > 生物碱;总量二阶矩中,全方与苷($P < 0.001$)、苷与苷元($P < 0.001$)、苷与生物碱($P < 0.001$)均有显著性差异,总量二阶矩大小顺序依次为全方 > 苷元 > 苷 > 生物碱;信息熵中,全方、苷、苷元与生物碱两两间均有显著性或差异($P < 0.001$),信息熵大小顺序依次为:全方 > 苷 > 苷元 > 生物碱。

2.4.2 补阳还五汤全方与各结构部位 UPLC 指纹图谱总量统计矩相似度

根据指纹图谱总量统计矩参数,进一步计算总量统计矩相似度(见图9)。结果表明,15批全方与



续图 7(Continued Fig.7)

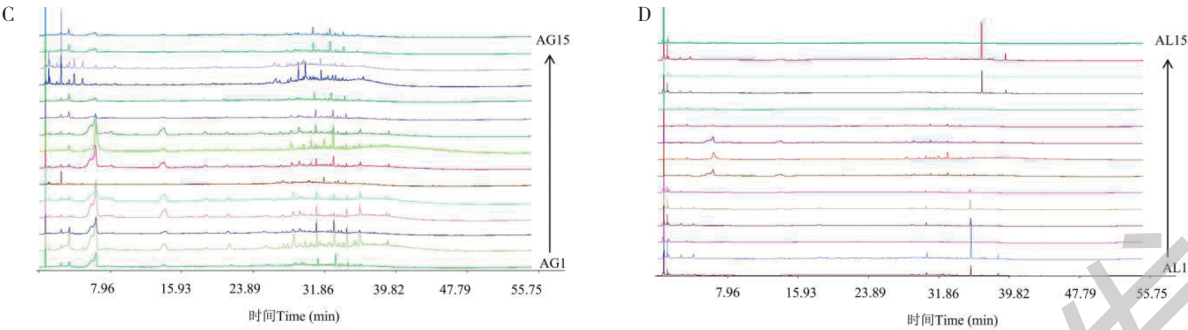


图 7 15 批补阳还五汤全方 (A)、苷 (B)、苷元 (C) 与生物碱 (D) 部位 UPLC 指纹图谱

Fig. 7 UPLC fingerprints of 15 batches of entire formula, glycoside, aglycone, and alkaloid fraction of Buyang Huanwu decoction

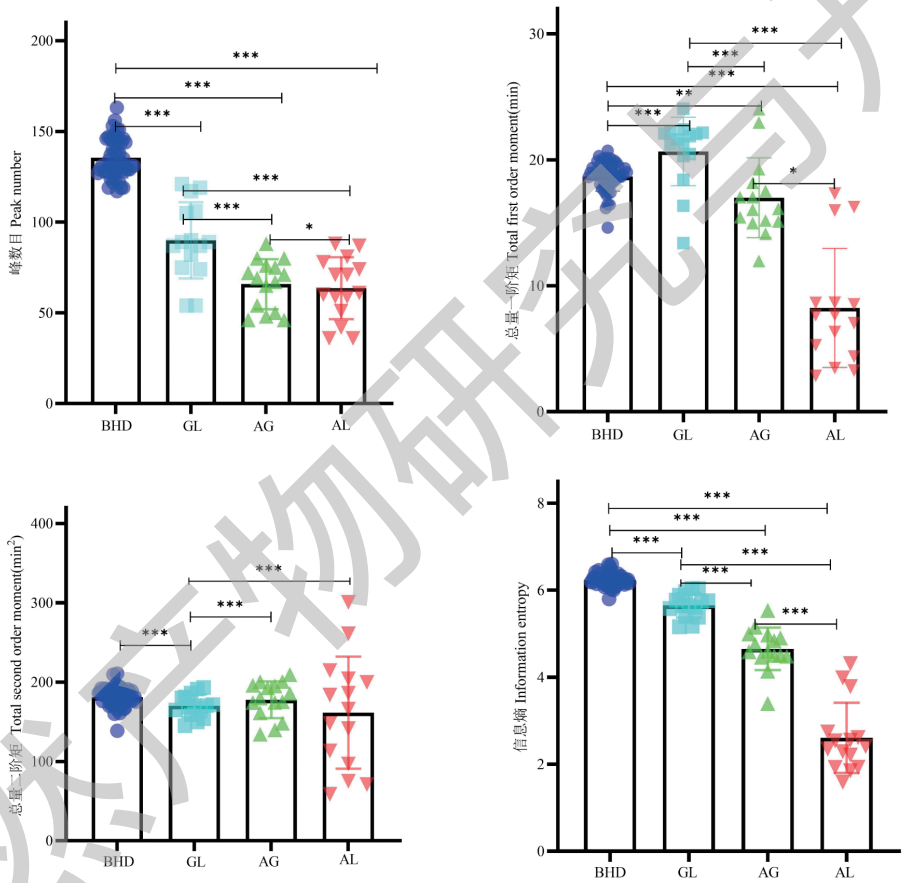


图 8 15 批补阳还五汤全方与不同结构部位峰数目、总量统计矩参数和信息熵

Fig. 8 Number of peaks, total statistical moment parameters and information entropy of 15 batches of the entire formula and different structural fractions of Buyang Huanwu decoction

15 批苷、15 批苷元、15 批生物碱的总量统计矩相似度分别为 1 ~ 0.673、1 ~ 0.630、1 ~ 0.356。由此可知,全方与苷的指纹图谱总量统计矩相似度最高,与生物碱的相似度最小。

3 讨论与结论

大量研究表明,中药药效与其成分种类和含量不对等,而与“印迹模板”对等,如金银花和山银花

化学成分种类和含量不一致,药理作用却一致,究其本质是“印迹模板”一致^[15]。据此,本文运用总量统计矩和 MCI 来表征补阳还五汤不同结构部位成分“印迹模板”特征,以推测药理作用强弱。

MCI 研究结果表明,苷类成分 MCI 相似度与全方的 MCI 相似度最接近,其次为苷元成分,生物碱的相似度最低。补阳还五汤全方与各部位的峰数目

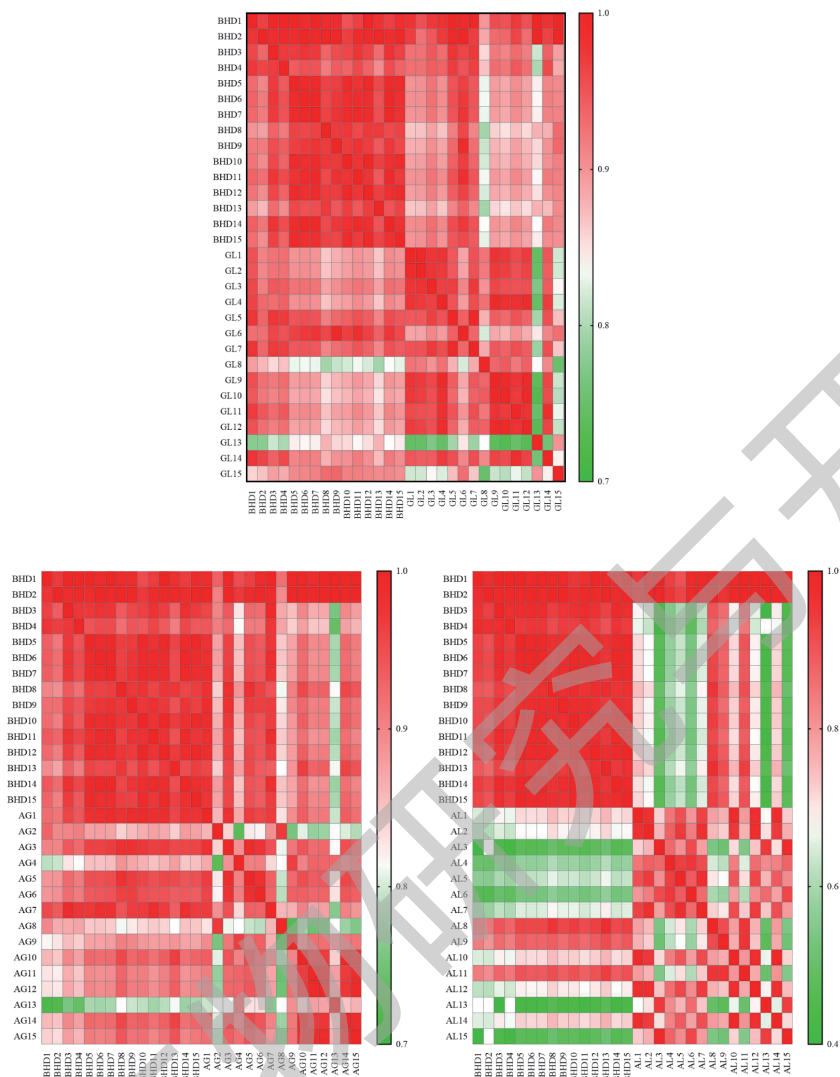


图9 15批补阳还五汤全方与不同结构部位指纹图谱总量统计矩相似度

Fig. 9 Similarity of the total statistical moments of the fingerprint of 15 batches of the entire formula and different structural fractions of Buyang Huanwu decoction

均有显著性差异,全方的峰数目最多,其次为苷部位,生物碱部位的峰数目最少,这与文献梳理得到的结果相吻合,说明补阳还五汤以苷类成分为主,生物碱成分较少。总量统计矩研究结果表明:苷的总量一阶矩最大,全方的总量一阶矩位于苷和苷元之间,生物碱总量一阶矩最小;苷和全方指纹图谱总量一阶矩最接近,推测苷与全方的作用性质最接近。此外,指纹图谱总量统计矩相似度结果表明,苷与全方的相似度最高,与生物碱的相似度最低。总量统计矩参数和 MCI 可以定性表征“印迹模板”作用性质,具有相同或相似总量统计矩参数和 MCI 的成分(群)可能具有相同或相似的药理作用。

综上,本文研究结果表明苷类成分是最能表征

补阳还五汤全方的“印迹模板”,与全方的药理作用最接近,这与文献研究结果相吻合。She 等^[16]研究发现补阳还五汤的苷部位通过抑制脑缺血再灌注损伤后神经元焦亡发挥神经保护作用,潜在的作用机制与 NLRP3 对经典焦亡途径的调节密切相关。Yan 等^[17]研究证明补阳还五汤的糖苷组合(芍药苷、苦杏仁苷、黄芪甲苷)通过减少 IF-1 α 、IF-1 β 、STAT3 和 VEGF-A 生成从而抑制 STAT3/HIF-1/VEGF 信号通路,显著减少动脉粥样硬化血管生成。Wu 等^[18]研究发现补阳还五汤苷结构部位对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显保护作用,其机制可能与抑制炎症因子的分泌和表达及减轻脑组织的炎症反应有关。Fu 等^[19]研究发现补阳还五汤苷类组分抗炎作用与全方相

当,是治疗动脉粥样硬化的主要药效物质基础。

本论文也存在不足之处,后期可进一步结合药效学实验,进行“印-效”关联,从而阐明补阳还五汤的药效部位,为补阳还五汤创制成组分新药奠定基础。由于糖类化合物的测定方法与其他类化合物的测定方法不同,本文未对多糖的 UPLC 指纹图谱进行测定,后续将采用蒸发光散射检测器或采用衍生化方法使单糖具有紫外吸收,然后建立多糖的液相指纹图谱并测定其中的阿拉伯糖、鼠李糖等单糖含量。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00393>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Liu H, Wu YF, Zhu ZF, et al. Study on 'heterogeneous equivalence' of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Flos Loniceræ* based on molecular imprinting technique [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2022, 37: 1027-1035.
- 2 Pan X. Research on the classification of volatile components in *Houttuynia cordata* and their "quantitative-structure -activity" relationship [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine (湖南中医药大学), 2022.
- 3 Li HY, He P, Fan QM, et al. Analysis of total statistical moment and one-time steady-state feeding quantity of HPLC fingerprint of Taohong Siwutang [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2019, 25: 37-43.
- 4 He QJ, Sheng DD, Chen YX, et al. Characteristic analysis of imprinting template of flavonoid clusters in four Chinese medicines to lung meridian and establishment of experimental approach of meridian tropism *in vitro* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2024, 30: 141-147.
- 5 Li HY, Fan QM, He YT, et al. Quality control of dynamic volatile components in *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 148-155.
- 6 Li HY, He QJ, Deng KW, et al. Constructing a new quality imprinting evaluation system for traditional Chinese medicine Q-Marker based on supramolecular "qi-xi" theory [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 4771-4778.
- 7 Zhu ZF, Liu JL, Fan QM, et al. Comparative analysis and research on composition of mulberry-sourced medicinal materials by fingerprint division total statistical moment method and information entropy [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 2547-2555.
- 8 Zhou M, Chen Z, Sheng DD, et al. Total quantum statistical moment and information entropy analysis of UPLC fingerprints of Chinese medicinal materials belong to large intestine meridian and lung meridian [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2022, 37: 7413-7417.
- 9 Yuan X, Wu YF, Li SX, et al. Research on material basis of homologous and heterogeneous effect of *Aurantii Fructus Immaturus* and *Aurantii Fructus* based on total statistical moment analysis and molecular connectivity index [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2024, 30: 161-168.
- 10 Zhang YC, Zhong PY, Xia F, et al. Exploration of key active component clusters in Naotai Tang for anticerebral thrombosis by QSAR method based on topological index [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54: 877-885.
- 11 Liu WL, Zhang XL, Fan SQ, et al. A novel concept of Q-markers: Molecular connectivity index [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 36-40.
- 12 Chen SY, Wang R, Li WJ, et al. Correlation between the area of cerebral infarction and structural topological index for treatment of cerebral infarction drugs [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2019, 54: 1305-1310.
- 13 Fan ZG, Yuan Y, Ouyang XQ, et al. Study on the mechanism of modified Buyang Huanwu Decoction in preventing and treating atherosclerosis through Nrf2/ARE pathway [J]. *Res Dev Nat Prod* (天然产物研究与开发), 2024, 36: 644-652.
- 14 Liu ZG. Research on the network spectrum effect of the compatibility of the structural fractions of Buyang Huanwu decoction [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2014.
- 15 Li WJ, Xiao MF, Li HY et al. Theoretical study on dynamic and steady-state changes of Chinese medicine ingredient clusters by effect of supramolecular "imprinting template" [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54: 2659-2667.
- 16 She Y, Shao L, Zhang YR, et al. Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.
- 17 Yan FC, Ding H, Sun ZJ, et al. Glycoside combinations of Buyang Huanwu decoction ameliorate atherosclerosis via STAT3, HIF-1, and VEGF [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2023, 396: 1187-1203.
- 18 Wu CQ, Wang CY, Shao X, et al. Protection and mechanism of effective fraction from Buyang Huanwu Decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 114-117.
- 19 Fu XY, Yang RY, Sun ZJ, et al. Mechanism of glycosides of Buyang Huanwu Decoction on regulating atherosclerotic inflammation and lipid metabolism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 4221-4231.