ICS **.***.**
C**

团体标准

T/CACM ****—20**

中药质量标志物研究技术指南

Technical Guide for Research on Quality Markers of Traditional Chinese Medicine

（文件类型：公示稿）

CACM公示稿

20**-**-**发布　　20**-**-**实施

中华中医药学会发布

目　次

前　言..... I
引　言..... II
1 范围..... 1
2 规范性引用文件..... 1
3 术语和定义..... 1
4 确定原则..... 2
5 研究路径..... 2
6 技术方法..... 2
6.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究..... 2
6.2 基于成分特有性的质量标志物研究..... 3
6.3 基于成分有效性的质量标志物研究..... 3
6.4 基于复方配伍环境的质量标志物研究..... 3
6.5 基于成分可测性的质量标志物研究..... 4
附 录 A..... 6
A.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究..... 6
A.2 基于成分特有性的质量标志物研究..... 7
A.3 基于成分有效性的质量标志物研究..... 8
A.4 基于成分可测性的质量标志物研究..... 10
附 录 B..... 12
B.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究..... 12
B.2 基于成分有效性的质量标志物研究..... 14
B.3 基于成分特有性的质量标志物研究..... 16
B.4 基于复方配伍环境的质量标志物研究..... 17
B.5 基于成分可测性的质量标志物研究..... 22
参考文献..... 23

CACM 征求意见稿

前　言

本文件按照GB/T1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由天津药物研究院有限公司提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：天津药物研究院有限公司、中国中医科学院中药研究所、中药监管科学研究中心、天津市药品监管科学研究会、南开大学、广西中医药大学、天津市药品检验研究院、和光中药科技（天津）有限公司、天津天士力之骄药业有限公司、天津达仁堂京万红药业有限公司、鲁南制药集团股份有限公司、安徽济人药业股份有限公司、西藏奇正藏药股份有限公司、江西百神药业有限公司

本文件主要起草人：刘昌孝、张铁军、许海玉、白钢、侯小涛

参与起草人（按姓氏笔画排序）：卜睿臻、马双成、王一涛、王杰、王萍、王跃飞、王淑美、王喜军、王磊、王德勤、邓家刚、田成旺、付诚、朱强、许浚、李文兰、李震宇、李德坤、李霞、杨志刚、杨明、肖小河、张卫东、张林林、张洪兵、陆兔林、果德安、罗花、周军、周跃华、孟宪生、段金廒、姜民、秦雪梅、秦路平、贾伟、贾晓斌、顾健、高文远、唐于平、彭代银、韩彦琪、鞠爱春

CACM公示稿

引　言

中药质量是中药临床疗效的保障，是中药产业发展的生命线。中药质量研究历来是行业关注的焦点，中药质量标准和质量控制研究和应用是关系到中医药科学和产业发展的国家战略问题。长期以来，由于缺少理论创新和系统思路的统领，中药质量研究未能聚焦到中药质量的本质内涵，研究工作呈现碎片化。特别是质量控制指标与有效性关联不强；质控指标专属性差，难以反映不同药材的质量特质；单一成分难以表征中药复杂体系质量属性的完整性；同时，针对中药产业特点和药品全生命周期的全程质量控制体系尚显不足。

为提升我国中药产品质量和质量控制水平，解决制约行业发展的共性关键问题，刘昌孝院士于 2016 年提出中药质量标志物（Q-marker）的新概念。中药质量标志物反映了中药质量本质的科学内涵，既是中药质量的核心概念，又是中药产业的核心概念，是中药行业监管的重要抓手和依据。由于中药质量标志物是新的概念，为了促进中药质量标志物的研究，有必要规范其发现和确定的原则、研究路径和技术方法。

由于中药本身的复杂性及目前研究水平和条件的局限性，中药质量标志物研究尚有诸多问题亟待进一步解决，本文件将结合中医药科学研究以及行业需求变化而不断修订和完善。

CACM公示稿

中药质量标志物研究技术指南

1 范围

本文件提供了中药质量标志物发现和确定的原则、研究路径、技术方法等方面的指导和建议。

本文件适用于从事中药质量工作的从业人员。

本文件适用于中药材、饮片、提取物、配方颗粒、煎液、中成药的质量标志物的研究。

2 规范性引用文件

本文件的制定引用了以下文件。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修订单或勘误）适用于本文件。

《中华人民共和国药典》一部

《中华人民共和国药典》四部

《网络药理学评价方法指南》（2021年）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

中药质量标志物 Quality Markers of Traditional Chinese Medicine，简称为Q-marker

存在于中药材和中药产品（如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中药配方颗粒、中成药）中固有的或加工制备过程中形成的、来源于某药材（饮片）特有的而不是来源于其他药材的、与中药的功能属性密切相关、按中医配伍组成的方剂“君”药首选原则，兼顾“臣”“佐”“使”药、可以进行定性鉴别和定量测定的化学物质。

3.2

特有性 Specificity

存在于中药材和中药产品中特有的并区别于其他中药材和中药产品的化学物质。

3.3

有效性 Effectiveness

体现中药材和中药产品功效（药性/药效）的生物效应表达形式。

3.4

传递性（溯源性） Transferability（Traceability）

在药物形成全过程各环节的化学物质组及其传递和变化规律。

3.5

配伍环境 Compatibility Environment

指中药配伍后影响药效物质基础与作用机制的因素总和，包括配伍的不同形式、不同条件及不同的配伍过程发生的物理、化学和生物效应的总和。

3.6

可测性 Measurability

指具有一定的含量和体内暴露量、具有定性定量测定的方法以及含量测定方法符合专属性要求。

4 确定原则

按照中药质量标志物在中药材和中药产品中的“物质组成”“物质特有性”“物质可测性”、中医药理论“物质功效关联性”以及“配伍环境”和在产品生产过程中的“物质溯源性和传递性”的要素要求，质量标志物研究以传递与溯源、有效性、特有性、配伍环境、可测性为发现和确定原则。

5 研究路径

研究路径包括“传递与溯源”“特有性”“有效性”“配伍环境”和“可测性”研究，根据不同的研究对象（药材、饮片、提取物、配方颗粒、煎液、中成药）采用不同的研究路径（如表1所示）。

表 1 不同类型中药质量标志物研究路径

内容	药材、饮片	提取物、配方颗粒	煎液、中成药
传递与溯源	+	+	+
特有性	+	+	+
有效性	+	+	+
配伍环境	−	−	+
可测性	+	+	+

注：“+”推荐、“−”不推荐或不需要

6 技术方法

6.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究

质量标志物研究应对中药材和中药产品的化学物质组进行系统解析，研究和分析化学物质组在药物形成全生命周期（包括药材-饮片-中间体-制剂-吸收入血成分/肠道菌代谢-生物效应成分）的传递和变化规律，又着眼全程质量控制体系建立的最终目的。

可以采用液相色谱、液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用、核磁共振等技术对药材、饮片、中间体、制剂的化学物质组进行辨识与表征，确定其所含的化学成分。

采用血清药物化学技术方法对血中移行成分进行辨识。

在上述各环节的化学物质组系统辨识和表征的基础上，分析明确药材-饮片-中间体-制剂-入血成分的量值传递及其变化规律。

6.2基于成分特有性的质量标志物研究

针对中药化学成分在基原、药用部位及显微组织化学、采收时间及其物候期特点，以及生态环境及化学性状的环境饰变，“特有性”反映质量控制指标对特定药材的针对性和专属性。

特有概念涵盖不同层次，包括在亲缘相近的一类药材区别于其他药材的特有成分，也包括近缘药材之间的特有性成分或特征性成分。

依据植物学分类地位、系统位置、起源演化规律，提炼各药材的特有性成分和特征性成分，进行次生代谢产物生源途径分析，获得基于植物亲缘学及生源途径的成分特有性证据；采用液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用等技术，分析不同基原、不同药用部位、不同产地、不同采收时间及不同炮制方法的化学成分差异，获得基于实验研究的成分特有性证据，确定基于特有性的质量标志物。

综合药材化学物质组分析结果以及基于植物亲缘学和生源学依据，确定基于特有性的质量标志物。

6.3基于成分有效性的质量标志物研究

“药性”和“药效”是从不同侧面、不同角度对中药治疗疾病性能的客观描述，药物的“体内过程”是其功效产生物质基础。中药质量标志物的有效性表达应体现在 “药性”“药效”和“体内过程”三个方面。

“药性”方面，从“酸、甘、苦、辛、咸”的滋味、气味 “原语义”角度，采用电子舌、电子鼻等仿生模型或者性味生物传感器芯片等研究方法筛选药物成分；从药味的“功效”角度，可选择相关的功能受体、靶点通路等生物学方法，分析成分与药性的相关性。

“药效”方面，从“要素-要素”的角度，采用离体器官、细胞、受体分子以及分子探针、靶点垂钓捕获等化学生物学方法，直接关联药物成分与靶点的对应关系；从“系统-系统”的角度，采用系统生物学结合生物信息学方法和谱-效相关分析方法，分析提炼成分-靶点-通路-功效的关联关系，关联化学物质组与生物学效应。

“体内过程”方面，采用药代动力学研究方法，在中药入血成分及其代谢产物研究基础上，对其体内过程（吸收、分布、代谢、排泄）及动力学规律开展研究。进行物质-药性-药效关联关系的整合分析，确定基于有效性的质量标志物。

基于对中药有效性的基本认识，进行物质-药性-药效关联关系的综合分析，筛选药效物质基础，确定质量标志物。

6.4 基于复方配伍环境的质量标志物研究

复方是中药临床运用的主要形式，复方中药的“系统质”具有“非加和性”。同时，同一中药材在不同复方中发挥的作用及其药效物质基础也可能不同。为体现中药制剂在中医药

理论指导下的组方配伍的原理，其Q-marker的确定应注意遵循组方配伍特点，以君药为主，臣、佐、使兼顾，能体现组方配伍的原则。

中药质量标志物的确定，必须延伸到中药临床运用的层面，针对具体疾病病因病机和治法治则，从处方配伍环境出发，基于中药临床运用时最终效应成分及其功效的临床表达形式，确定质量标志物。

配伍环境是质量研究回归到中医药理论的必要条件。基于配伍环境的中药质量标志物研究多以拆方的形式，基于组方配伍原理，以功效药对、减除药味以及谱-效分析和成分配伍等形式，从整体动物、离体细胞、分子和网络分析等不同层次进行系统研究。

6.4.1 方-证对应分析

基于中医药理论的方-证对应关系，分析针对疾病的中药有效性表达及其物质基础。

6.4.2 “病-证-方-药-物-效”序贯分析

基于病-证-方-药-物-效的序贯思路，结合化学物质组研究，从整体视角针对性地关联分析药效物质基础。

6.4.3 拆方实验研究

基于组方配伍原理，以功效药队、减除药味及谱-效分析和成分配伍等形式，从整体动物、离体细胞、分子和网络分析等不同层次进行系统研究。

通过以上系统研究确定基于复方配伍环境的质量标志物。

6.5 基于成分可测性的质量标志物研究

质量标志物作为中药的质量评价与控制指标，必须满足在现有技术方法条件下能够定量（或定性）测定的要求，“可测性”是质量标志物的必要条件。

6.5.1 成分含量-可测性/可控性研究

分析成分的含量是否足够高以能满足测定和质量控制的要求、是否有专属性的测定方法，及含量测定是否能反映多元质量属性的全貌。

6.5.2 “点-线-面-体”多元质量评价方法

按照中药成分及其有效性表达特点，可将成分分为“指标成分”“指示性成分”“类成分”和“全息成分”，以分主次、分层级的思路，建立“点-线-面-体”的质控模式。

指标成分：含量测定的“指标成分”（marker ingredient）常被认为是质量评价的最重要的指标，是评价质量优劣和合格限度的“金指标”。在“点-线-面-体”的质控模式中属于“点”的层次。指标成分应能反映所评价中药特有的、区别于他药的功效属性。大多数“有效成分”与中药的功效相关，但专属性、特异性及在方-证对应方面的功效针对性不强，也达不到合理评价的要求。在“指标成分”层面，应考虑到成分的结构类型、构-效关系及功效发挥的多靶点、多途径的特点，宜采用“多指标含量测定”的方法。

指示性成分：指示性成分（indicating ingredient）一般是指在中药中含量较大、能代表同类结构、功效类似物质的代表性成分。在“点-线-面-体”的质控模式中属于“线”的层次。

由于成分的结构类似，具有相似的理化性质和色谱、光谱特点，常被用作新药研发中的工艺路线筛选和工艺参数优化评价指标，起到指示性作用。也适合以“一测多评”的方法进行多指标成分的含量测定，达到质量控制的目的。

类成分：类成分（class ingredient）指结构相似的一类成分，如总黄酮、总皂苷、总生物碱等。类成分反映一类活性的总体功效，因此，在质量评价中也非常重要，常以总含量来表示，在“点-线-面-体”的质控模式中属于“面”的层次。总含量测定关键应注意排除非测定成分的干扰，保证方法的专属性和特异性。

全息成分：中药化学成分复杂，“有效成分”和“无效成分”尚不完全清楚，临床功效表达方式复杂多样，物质-功效之间呈现多元、非线性关系，质量评价不但需要以某些成分的含量作为指标，还需要对中药的整体“化学轮廓”及其相应的“生物学模式”进行相关性研究，建立基于“全息成分”（holographic ingredient）和“化学轮廓”的分析方法和质量评价方法，在“点-线-面-体”的质控模式中属于“体”的层次。“全息成分”并不完全等于“全成分”。全息成分是在所用分析方法下能够显现的成分及其所呈现的理化及波谱学信息。基于全息成分的质量评价更适合使用模式识别的方法。指纹图谱技术是常用的基于全息成分的模式识别方法，目前多用于评价质量的一致性，但对于质量优劣差异的评价还存在许多技术瓶颈，近些年来，将中药指纹图谱与药效结合，建立了中药活性指纹图谱技术，为中药谱效关系研究提供研究手段，也为从整体化学轮廓的角度评价中药质量提供新的思路和路径。

通过以上研究确定基于可测性的质量标志物，并建立基于点-线-面-体的多元质量控制方法。

CACM公示稿

附 录 A
（资料性）

中药材质量标志物研究示例

按照中药质量标志物的基本条件、确定原则，基于中医药理论和临床用药方式以及中药材的生物学属性，采用系统生物学、化学生物学以及化学物质组学等现代研究方法，从质量传递与溯源、成分的有效性、成分特有性以及成分可测性等方面全面解析、表征和界定中药材质量标志物，并以延胡索为例，为中药材质量标志物研究提供科学的模式和范例。

A.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究

采用 HPLC-Q/TOF-MS 方法对延胡索药材进行化学物质组表征和成分辨识（图 A.1）。从延胡索图谱中鉴定出 27 个化合物，均为生物碱类，结果见图 A.2。

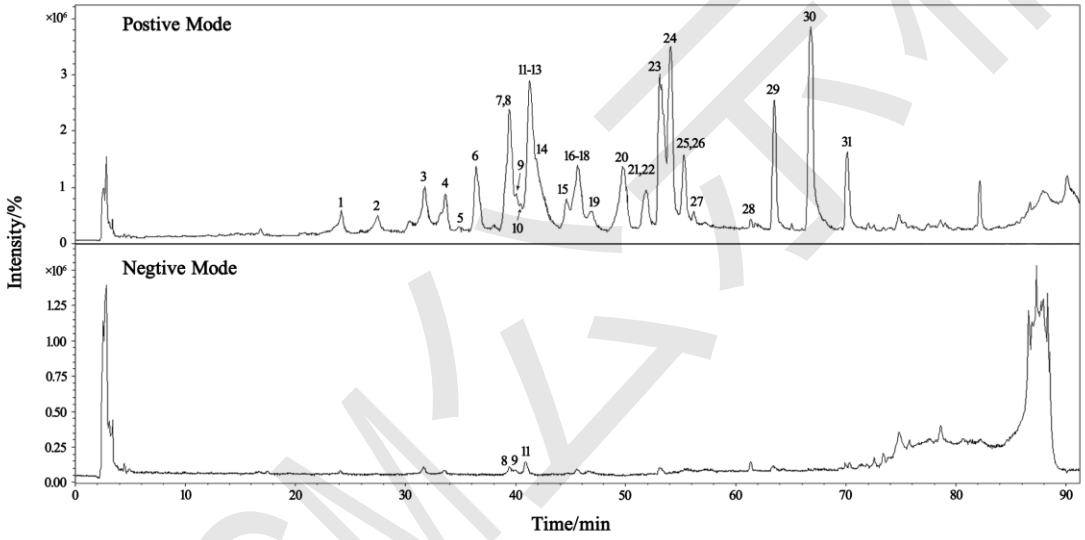
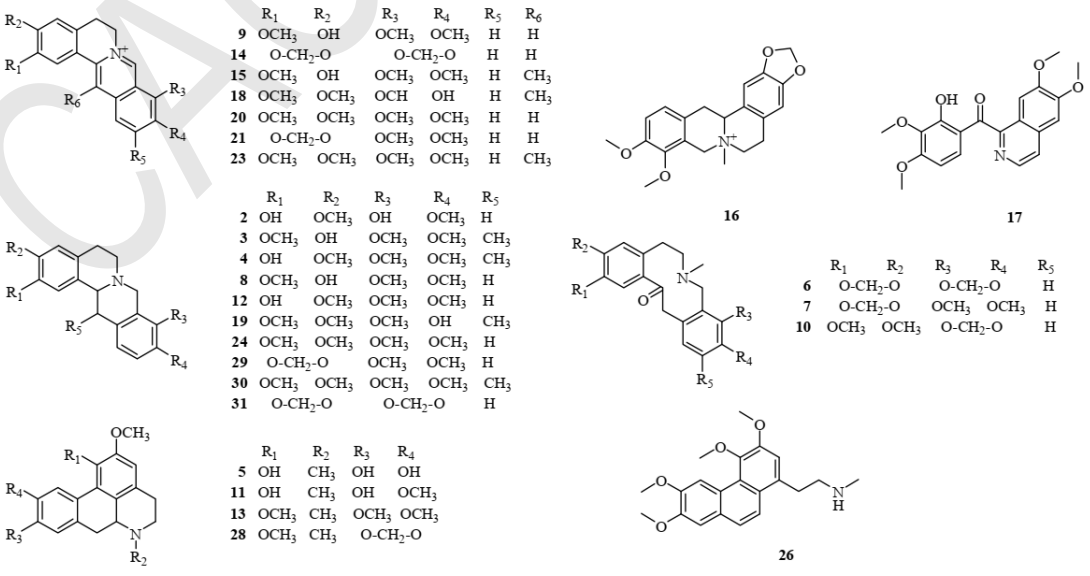


图 A.1 延胡索药材 HPLC-Q/TOF-MS 谱图



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
9	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3	H	H
14	O-CH_2-O		O-CH_2-O		H	H
15	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3	H	CH_3
18	OCH_3	OCH_3	OCH	OH	H	CH_3
20	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H
21	O-CH_2-O		OCH_3	OCH_3	H	H
23	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	CH_3

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
2	OH	OCH_3	OH	OCH_3	H
3	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3	CH_3
4	OH	OCH_3	OCH_3	OCH_3	CH_3
8	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3	H
12	OH	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H
19	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OH	CH_3
24	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H
29	O-CH_2-O		OCH_3	OCH_3	H
30	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	CH_3
31	O-CH_2-O		O-CH_2-O		H

	R_1	R_2	R_3	R_4
5	OH	CH_3	OH	OH
11	OH	CH_3	OH	OCH_3
13	OCH_3	CH_3	OCH_3	OCH_3
28	OCH_3	CH_3	O-CH_2-O	

16

17

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
6	O-CH_2-O		O-CH_2-O		H
7	O-CH_2-O		OCH_3	OCH_3	H
10	OCH_3	OCH_3	O-CH_2-O		H

26

图 A.2 延胡索中化学物质组结构

A.2 基于成分特有性的质量标志物研究

在延胡索化学物质组辨识研究基础上，进一步对次生代谢产物的生源途径进行研究，为其特异性质量标志物的发现和选择提供依据。

延胡索中的生物碱类化合物主要为 3 类，分别是原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）、原托品碱型生物碱（原阿片碱、α-别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（D-海罂粟碱等）。延胡索中的生物碱类化合物生源关系见图 A.3 和 A.4。相对于原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）而言，原托品碱型生物碱（原阿片碱、 α-别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（ D-海罂粟碱等）处于生源途径的下游位置，因此，可认为该类成分的植物特异性较强，而原阿片碱、黄连碱更被视为罂粟科植物的特征性成分。从成分的量看，延胡索甲素、延胡索乙素等是延胡索的主要成分。

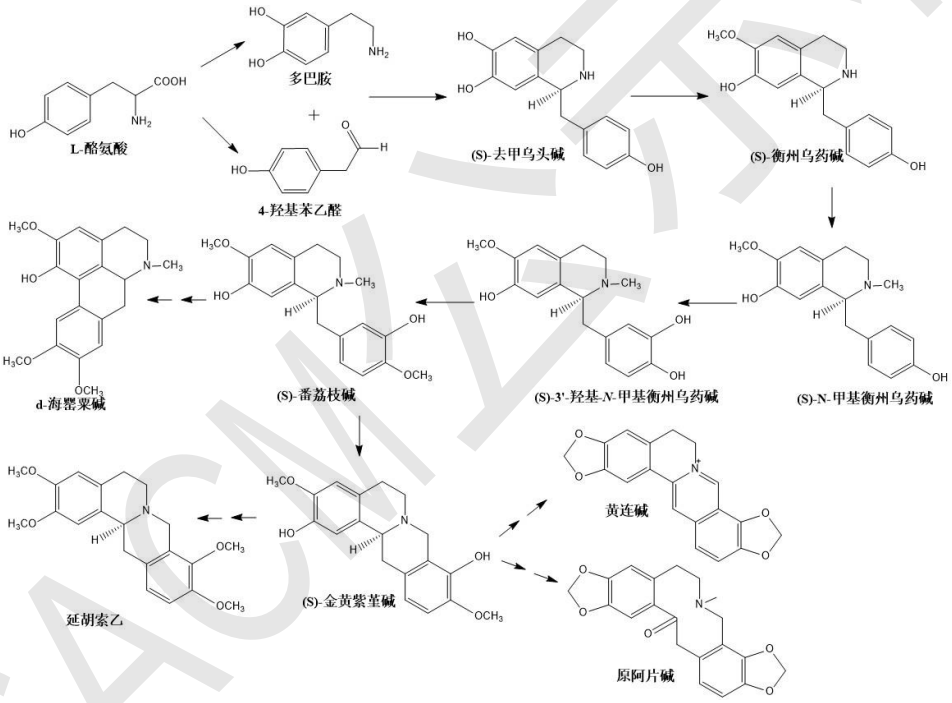


图 A.3 延胡索生物碱生源关系

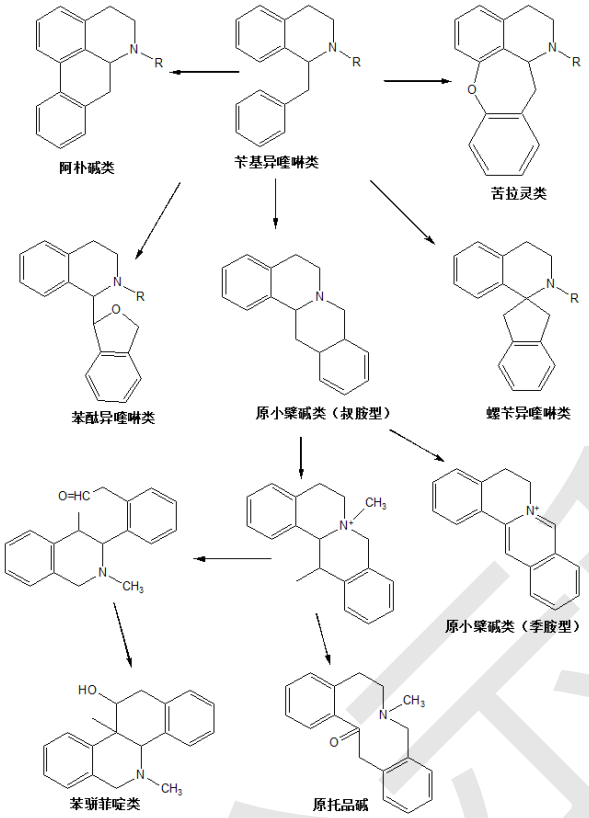


图 A.4 紫堇属植物生物碱的生源关系

综合生源途径及成分的特异性分析，认为延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、D-四氢药根碱及原阿片碱可考虑作为延胡索的质量标志物。

A.3 基于成分有效性的质量标志物研究

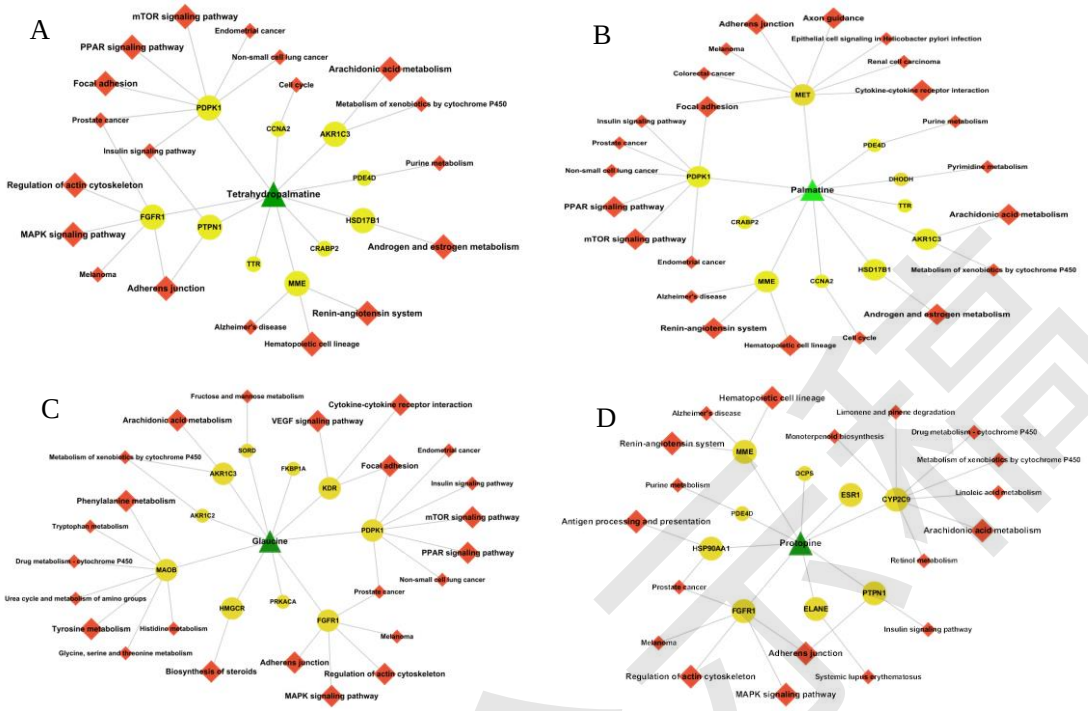
A.3.1 基于药效实验的质量标志物的发现及确定

采用整体动物模型（小鼠热板、小鼠醋酸扭体和大鼠痛经模型）、离体器官模型（未孕大鼠离体子宫平滑肌模型）和细胞模型（大鼠原代子宫平滑肌细胞模型），以延胡索 60%乙醇提取物为实验样品，观察延胡索的镇痛作用及其物质基础。与模型组比较，延胡索提取物可显著延长给药后 0.5、1、2 h 热刺激致小鼠舔足反应的潜伏期，并可持续到给药后 2 h，延长率最高可达 27.5%。

延胡索提取物非常显著地减少醋酸扭体反应的扭体次数，抑制率可达 34.3%。延胡索提取物能够显著延长痛经模型大鼠扭体反应的潜伏期，潜伏期延长率为 22.7%，显著减少扭体次数，扭体次数抑制率为 53.7%。延胡索提取物可显著升高 β-内啡肽（β-EP）量，显著降低 5-羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NA）的量，可显著升高前列腺素 E2（PGE2）水平，显著降低前列腺素 F2α（PGF2α）的量及 PGF2α/PGE2 值。延胡索提取物和延胡索乙素可明显降低缩宫素引起的子宫收缩的频率、平均振幅和活动力，并呈现剂量依赖性。对 PGF2α 引起的子宫收缩频率和活动力也显著降低，并呈现剂量依赖性。

A.3.2基于网络药理学的质量标志物的发现及确定

采用网络药理学方法，建立延胡索药材代表性成分延胡索乙素、巴马汀、D-海罂粟碱、原阿片碱的激素调节、中枢镇痛、解痉、炎症和免疫调节作用相关的靶点通路图（图 A.5）。



▲-化合物 ● -靶点蛋白 ◆-通路

A.延胡索乙素　B.巴马汀　C.D-海罂粟碱　D.原阿片碱

图 A.5 “化合物-靶点-通路”网络图

通过整合整体动物、器官水平、细胞、受体和网络药理等多角度的实验结果发现，延胡索中的生物碱类成分可通过作用于中枢镇痛相关蛋白、平滑肌相关受体蛋白以及血栓素、血管紧张素等靶点蛋白来调节下游生物信号转导通路，从而发挥止痛、理气、活血等功效。其中，延胡索乙素、巴马汀、D-海罂粟碱、原阿片碱为主要药效物质基础，可作为质量标志物。

A.3.3 基于与“药性”相关的质量标志物的发现及确定

以电子舌、电子鼻对延胡索药材的“真实五味”物质基础进行表征和界定；基于药物分子-味觉（嗅觉）受体结合理论，运用计算机虚拟筛选方法可进一步进行“性（味）”物质基础筛选（图 A.6）。

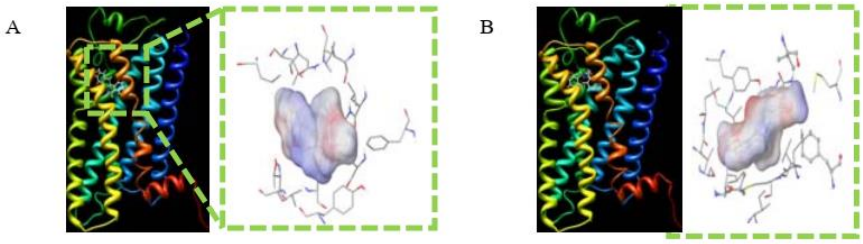
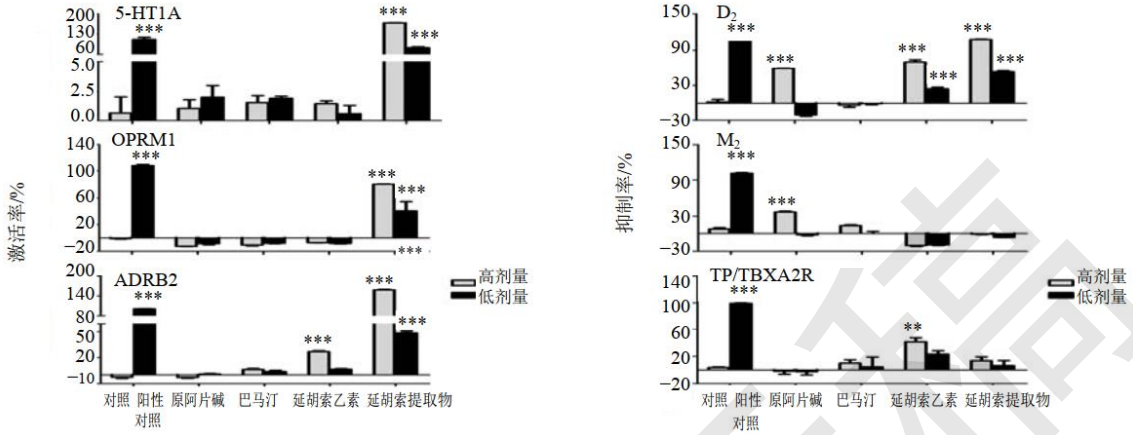


图 A.6 OR7D4 与延胡索乙素 (A)、 原阿片碱 (B) 结合模式图

以 G 蛋白偶联受体（GPCR）结合实验对延胡索药材“功效五味”物质基础进行的表征，延胡索乙素和原阿片碱可作用于与辛、苦味相关的功能受体，故可能为辛、苦味物质基础（图 A.7）。



与对照组比较： **P＜0.01 ***P＜0.001

图 A.7 延胡索提取物及主要成分对 6 个 GPCRs 受体的激动和拮抗作用

通过以上研究，延胡索提取物、原阿片碱、巴马汀及延胡索乙素对 6 个 GPCRs 受体的激动和拮抗作用，从药性物质基础角度为质量标志物的确定提供实验依据。

A.3.4 基于药动力学及体内过程的质量标志物的发现及确定

采用 UPLC-QQQ/MS 建立生物分析方法并经方法学验证后，研究口服灌胃（ig）延胡索提取物后大鼠血浆中延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱药动学和脑组织分布情况。药动学结果表明，大鼠 ig 延胡索提取物后，大鼠血浆中延胡索甲素药物浓度的达峰时间（t_{max}）为 1.33 h、峰浓度（C_{max}）为 93.00μg/L、消除半衰期（$t_{1/2}$）为 3.42 h、平均滞留时间（$MRT_{0\sim t}$）为 3.89 h、药时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$）为 368.16 μg·h/L；延胡索乙素药物的 t_{max} 为 1.92 h、C_{max} 为 181.62μg/L、$t_{1/2}$ 为 3.11 h、$MRT_{0\sim t}$ 为 5.21 h、$AUC_{0\sim t}$ 为 1 242.73μg·h/L；原阿片碱的 t_{max} 为 1.33 h、C_{max} 为 1.21μg/L、$t_{1/2}$ 为 2.75 h、$MRT_{0\sim t}$ 为 2.78 h、$AUC_{0\sim t}$ 为 3.70μg·h/L。

脑组织分布研究结果表明，ig 给药 15 min 后即可在大鼠脑组织中检测到延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱的存在，表明它们能够迅速透过血脑屏障而进入中枢系统发挥镇痛作用。

综合以上对延胡索化学成分生源途径及成分特异性分析、物质基础、药效、药性及药动学研究，确定延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、巴马汀、D-四氢药根碱为延胡索的质量标志物。

A.4 基于成分可测性的质量标志物研究

质量标志物作为中药的质量评价与控制指标，必须满足在现有技术方法条件下能够定量（或定性）测定的要求，“可测性”是质量标志物的必要条件。

A.4.1指纹图谱研究

采用 HPLC 法，针对延胡索生物碱类成分，建立了延胡索的 HPLC 指纹图谱的质量控

制方法。并结合延胡索药材的 HPLC-MS/MS 研究结果，对延胡索的 HPLC 指纹图谱中各色谱峰进行了指认。

A.4.2多成分含量测定研究

依据延胡索质量标志物研究结果，建立了一标多测法同时控制延胡索延中胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、 D-四氢药根碱及原阿片碱 7个成分。建立了基于“有效性”的中药复方定量控制方法，以保证产品的有效性及稳定均一性。

CACM公示稿

附 录 B
（资料性）

中成药质量标志物研究示例

按照中药质量标志物的基本条件、确定原则，基于中医药理论和临床用药方式以及中药材的生物学属性，采用系统生物学、化学生物学以及化学物质组学等现代研究方法，从质量传递与溯源、成分的有效性、成分特有性、复方配伍环境以及成分可测性等方面全面解析、表征和界定中药质量标志物，并以元胡止痛方（延胡索、白芷组成）为例，为中成药质量标志物研究提供科学的模式和范例。

B.1 基于质量传递与溯源的质量标志物研究

质量标志物研究应对中药形成过程各环节的化学物质组进行系统解析，“传递与溯源”既厘清中药药效物质的传递、变化过程，又着眼全程质量控制体系建立的最终目的。

B.1.1 元胡止痛方原型成分及药材归属研究

采用 HPLC-MS/MS 方法，对元胡止痛方以及延胡索和白芷药材所含生物碱和香豆素类成分进行辨识表征（总离子流图见图 B.1～B.3），从元胡止痛方中共鉴定出 51 个化合物，包括 28 个生物碱类成分和 23 个香豆素类成分，并对元胡止痛方中的各化学成分的药材来源进行了归属。

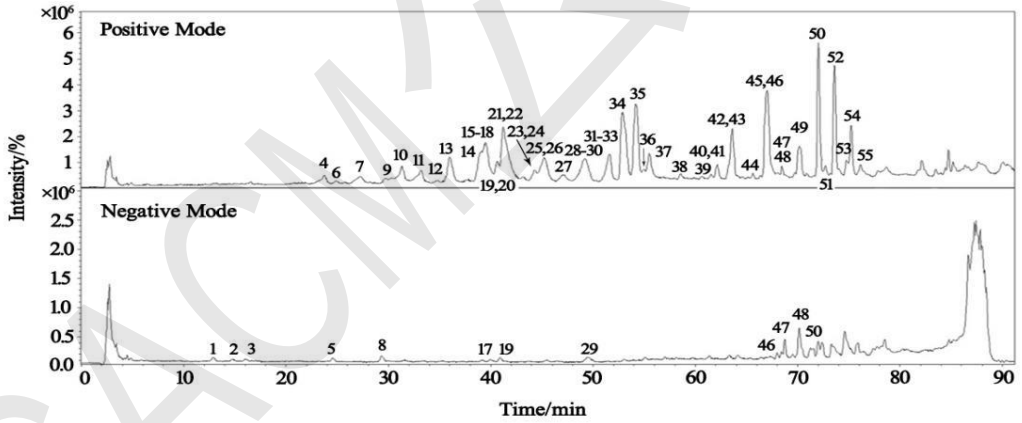


图 B.1 元胡止痛方总离子流图谱

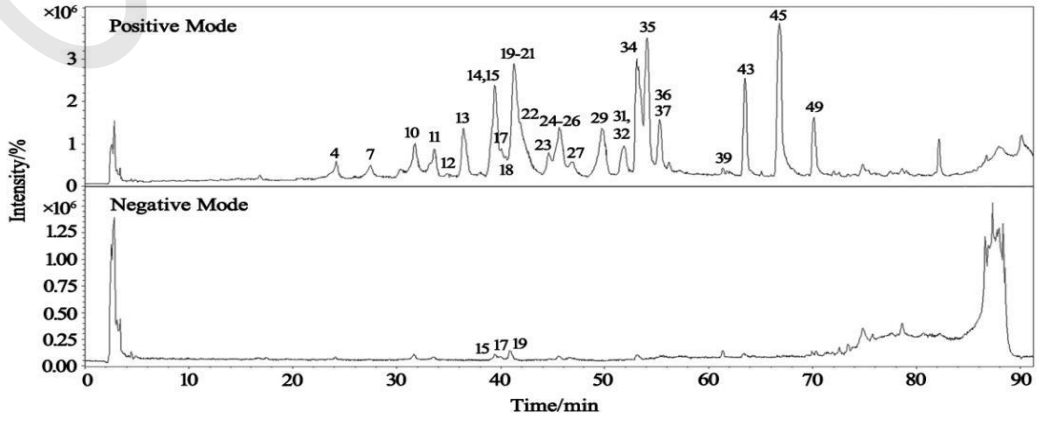


图 B.2 醋延胡索药材总离子流谱图

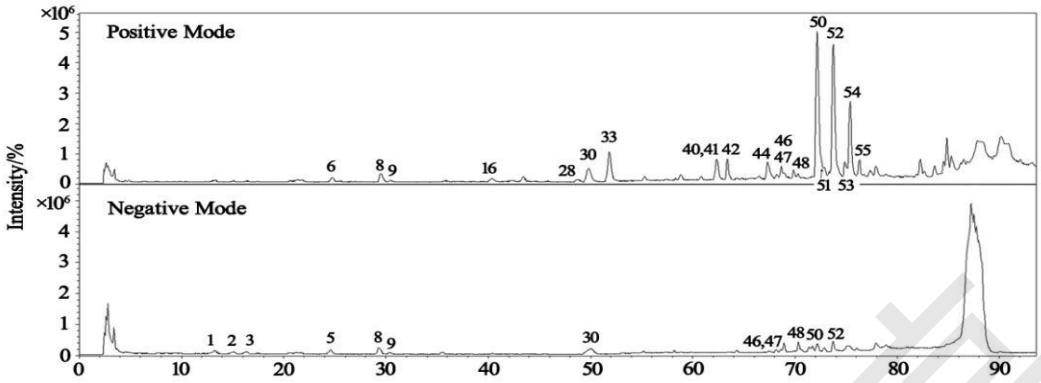


图 B.3 白芷药材总离子流谱图

B.1.2 元胡止痛方入血成分及其代谢产物研究

采用血清药物化学的方法，运用 UPLC-Q/TOF-MS 技术，从口服给予元胡止痛方后大鼠血浆中鉴定出 40 个与元胡止痛方相关的外源性化学成分，包括 26 个原型成分和 14 个代谢产物，元胡止痛方吸收原型成分结构式见图 B.4。

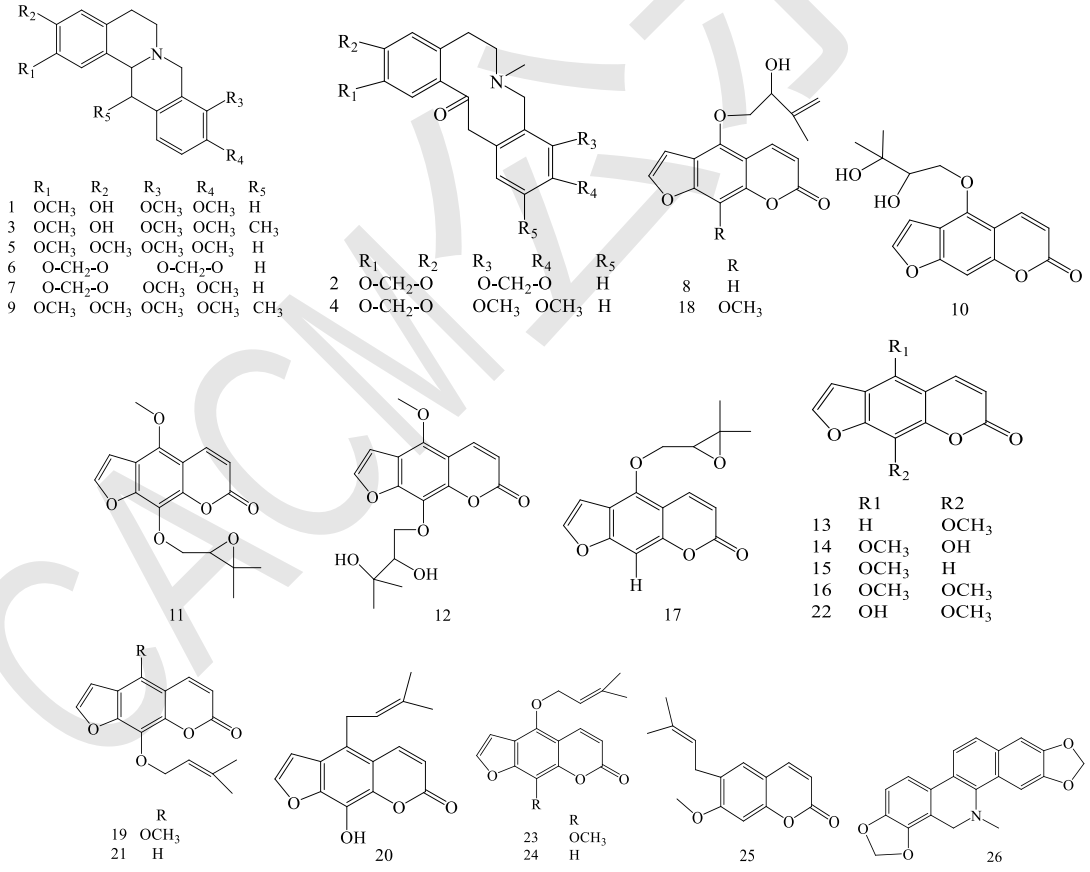


图 B.4 元胡止痛方吸收原型成分结构式

通过对元胡止痛方原型成分及药材归属，到口服入血成分及其代谢产物研究，从质量传递与溯源的角度阐明了元胡止痛方的质量标志物。

B.2 基于成分有效性的质量标志物研究

质量控制的根本目的是对中药有效性的控制，“药性”和“药效”是从不同侧面、不同角度对中药治疗疾病性能的客观描述，反映中药有效性的完整表达，是质量标志物确定的重要依据。

B.2.1 基于药性的质量标志物研究

B.2.1.1 基于仿生模型和计算机分子对接的“真实性（味）”质量标志物研究

依据电子舌对延胡索样品的判定及距离分析结果表明，延胡索药材的滋味为“苦”味，在延胡索的苦味表达中，生物碱类成分的贡献大于其他类成分，叔胺碱类成分的贡献与季铵碱类成分无明显差别，且均被判别为苦味。由结果推断叔胺碱类及季铵碱类成分均为延胡索苦味的物质基础。电子鼻技术对延胡索样品的距离分析结果表明，在延胡索的气味表达中，生物碱类成分的贡献大于其他类成分，叔胺碱类成分的贡献大于季铵碱类成分。由结果推断生物碱类成分中的叔胺碱类成分是延胡索药材的辛味物质基础，而季铵碱类成分在辛味表达中贡献较小。

以延胡索和白芷代表性化合物为小分子配体库，进行 hTAS2R10 苦味受体对接筛选，其结果与阳性配体奎宁的对接结果比较发现，原小檗碱型的代表性化合物延胡索乙素与构建的苦味受体 hTAS2R10 的亲和力较强，而原托品碱类成分对接结果较差，故推测原小檗碱型化合物可能为延胡索药材中的苦味成分。以延胡索和白芷代表性化合物为小分子配体库，进行 OR7D4 辛味受体对接筛选，其结果与阳配体辣椒素对接打分比较发现，延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素与 OR7D4 的对接得分均高于辣椒素，初步推测其可能为辛味物质基础。

B.2.1.2 基于 G 蛋白偶联受体“功效五味”的质量标志物研究

应用胞内钙离子浓度变化荧光技术，对延胡索、白芷药材及其主要成分进行 G 蛋白偶联受体结合实验，结果表明，延胡索药材中原小檗碱叔胺类代表性化合物延胡索乙素可激活与辛味行气作用相关的β_2肾上腺素受体（ADRB2），抑制与活血作用相关的血栓素-前列腺素受体（TP/TBXA2R）和与开窍作用相关的多巴胺受体（D2）；原阿片碱类代表成分原托品碱可拮抗与苦味通泻作用相关的乙酰胆碱受体（M2）以及D2受体。白芷药材中香豆素类代表性成分欧前胡素可拮抗与辛味活血化瘀作用密切相关的TP/TBXA2R受体。从性效表达层面分析，以延胡索乙素为代表的原小檗碱类化合物以及以原托品碱为代表的原阿片碱类化合物可能为延胡索药材辛、苦味的物质基础；以欧前胡素为代表的香豆素类成分或许为白芷药材的辛味物质基础。

B.2.2 基于药效的质量标志物研究

B.2.2.1 基于网络药理学的质量标志物研究

以元胡止痛方入血成分为研究对象。基于元胡止痛方血清药物化学研究结果，并结合相关文献报道，选定延胡索中10个生物碱类入血原型成分、白芷中12个香豆素类入血原型成分

和6个代谢物。采用PharmMapper数据库、UNIPRO数据库、MAS 3.0数据库、KEGG数据库和Cytoscape 2.6软件，利用反向对接技术对元胡止痛方28个入血成分的作用靶点、通路进行虚拟预测。结果表明，此28个化合物都能作用于与痛经相关的52个靶点及31条通路，其主要是通过激素调节、中枢镇痛、平滑肌解痉、抗炎和免疫相关通路来起到相应的治疗效果，体现了元胡止痛方治疗痛经的多成分多靶点作用机制。

B. 2. 2. 2 基于药效实验的质量标志物研究

B. 2. 2. 2. 1 缩宫素诱发大鼠痛经模型的镇痛作用研究

采用腹腔注射缩宫素诱发大鼠痛经模型，研究元胡止痛方对痛经模型大鼠的镇痛作用及机制。结果显示：与模型组比较，元胡止痛方能够显著减少痛经模型大鼠扭体次数，并呈剂量相关性，扭体次数抑制率最高可达 63.8%，元胡止痛方高、中剂量组能够延长扭体反应潜伏期，延长率最高可达 39.3%；并可显著升高 β-内啡肽（β-EP）、前列腺素 E_2（PGE_2）含量，显著降低去甲肾上腺素（NA）、5-羟色胺（5-HT）、前列腺素 F2α（PGF2α）含量以及 PGF2α/PGE2 比值。表明元胡止痛方对痛经模型大鼠具有显著地镇痛作用。

B. 2. 2. 2. 2 对大鼠离体子宫收缩的影响

采用大鼠离体子宫收缩模型，通过加入不同的激动剂和拮抗剂来观察元胡止痛方对子宫收缩活动的影响，进一步探寻其作用机制。元胡止痛方可降低正常未孕大鼠子宫收缩频率和活动力，对缩宫素引起的子宫收缩可显著降低收缩频率和活动力，降低平均振幅；对 Ach 和 PGF2α 引起的收缩可降低频率和活动力。可协同苯海拉明、吲哚美辛对子宫活动的抑制作用，可进一步降低子宫收缩的频率和活动力；对酚妥拉明、维拉帕米的协同作用较弱。表明元胡止痛方治疗痛经可能的作用靶点在缩宫素受体、M 受体、H1 受体及前列腺素的合成环节。

B. 2. 2. 2. 3 对大鼠原代子宫平滑肌细胞钙内流的影响

与对照组比较元胡止痛方及元胡止痛片含药血清可显著抑制细胞外钙内流，从而抑制子宫平滑肌的收缩活动，但与维拉帕米无协同作用。

B. 2. 2. 2. 4 对硝酸甘油诱发大鼠偏头痛模型的镇痛作用

采用皮下注射硝酸甘油诱发大鼠偏头痛模型，研究元胡止痛方对偏头痛模型大鼠的镇痛作用及机制。结果表明，元胡止痛方在 0.8-1.6g 生药/kg 剂量下对实验性偏头痛模型大鼠具有显著地镇痛作用，对外周血中单胺类及 β-内啡肽有显著影响，其作用具有多靶点的特点。

B. 2. 2. 3 基于成分体内过程的质量标志物研究

在对口服元胡止痛方的入血成分及其代谢产物系统辨识基础上，进一步建立了 UPLC-MS/MS 定量分析方法，研究了延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱以及欧前胡素、异欧前胡素的药代动力学行为；分析了延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素及异欧前胡素的脑组织分布规律；最后，研究和探讨了以上成分跨血脑屏障的转运机制。通过以上研究，为质量标志物的确定提供理论和实验依据。

B.3 基于成分特有性的质量标志物研究

延胡索中的生物碱类化合物主要为 3 类，分别是原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）、原托品碱型生物碱（原阿片碱、α-别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（D-海罂粟碱等）。这 3 类生物碱具有共同的生源前体——酪氨酸，酪氨酸首先合成 2 种前体原料多巴胺和 4-羟基苯乙醛，这 2 种前体原料在去甲乌药碱合成酶的作用下，缩合形成苄基异喹啉生物碱生物合成的第一个中间体去甲乌药碱（norcoclaurine）。去甲乌药碱经过几次甲基化作用，接受来自腺苷甲硫氨酸的甲基，转化为另一个重要中间体(S)-网状番荔枝碱（reticuline）。(S)-网状番荔枝碱为四氢苯基异喹啉类生物碱合成途径的分支点。在特异性合酶的作用下(S)-网状番荔枝碱可进一步合成 D-海罂粟碱、延胡索乙素、黄连碱、原阿片碱等生物碱，生源关系见图 B.5。

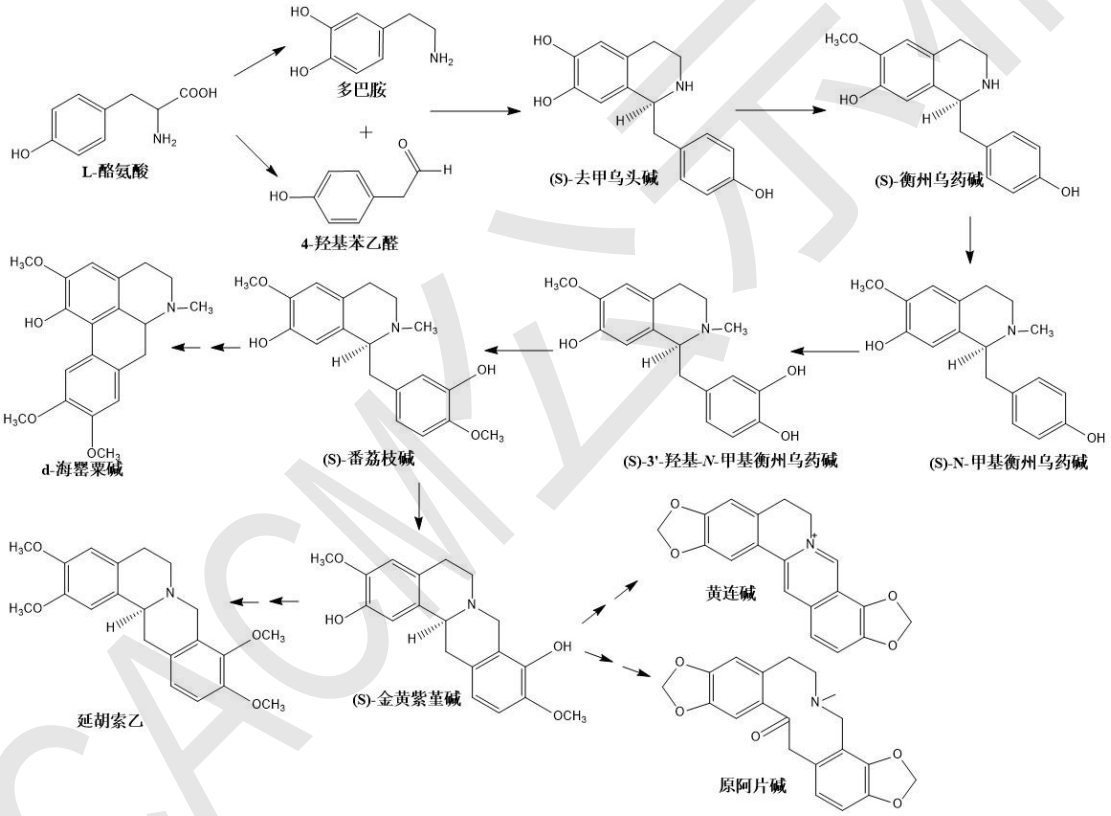


图 B.5 延胡索生物碱生源关系

相对于原小檗碱型生物碱（叔胺类延胡索甲素、延胡索乙素等和季铵类小檗碱、巴马汀等）而言，原托品碱型生物碱（原阿片碱、α-别隐品碱等）和阿朴菲型生物碱（D-海罂粟碱等）处于生源途径的下游位置，因此，可认为该类成分的植物特异性较强，而原阿片碱、D-海罂粟碱更被视为罂粟科植物的特征性成分。就成分的含量而言，延胡索甲素、延胡索乙素等是延胡索的主要成分。

苯丙氨酸脱氨生成桂皮酸，芳环羟化再经反/顺式异构化和环化作用形成 7-羟基香豆素（伞形酮），进一步由乙酰辅酶 A 歧式聚合生成的焦磷酸二甲烯丙酯取代后环合形成角型香

豆素当归根素和线型香豆素补骨脂素。补骨脂素 5-位及 8 位羟基化后分别生成佛手酚和花椒毒酚，再经焦磷酸二甲烯丙酯取代形成异欧前胡素和欧前胡素，生源关系见图 B.6。

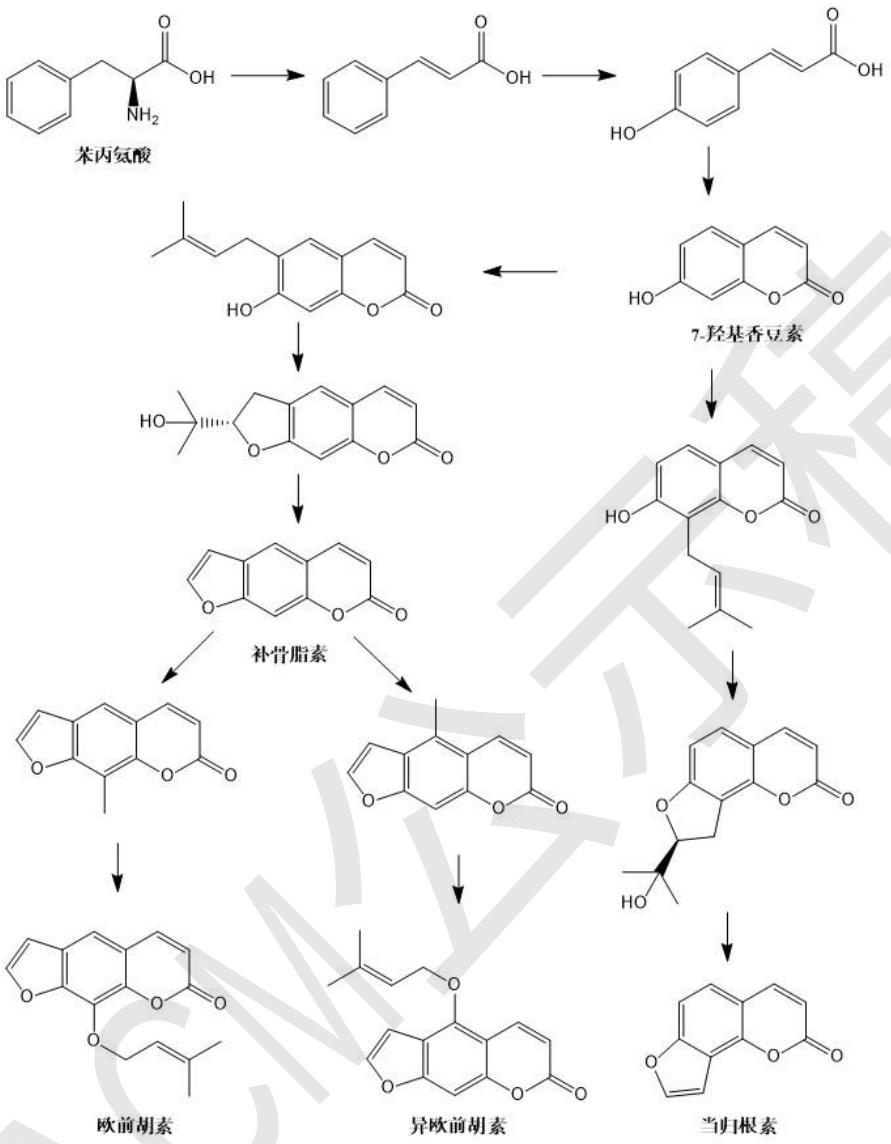


图 B.6 白芷香豆素生源关系

B.4 基于复方配伍环境的质量标志物研究

中药质量研究必须延伸到中药临床运用的层面。针对具体疾病病因病机和治法治则，从处方配伍环境出发，基于其临床功效表达形式及最终效应成分，确定质量标志物。

B.4.1 基于药效学模型的元胡止痛方配伍研究

采用整体动物模型（小鼠热板、小鼠醋酸扭体和大鼠痛经模型）、离体器官模型（未孕大鼠离体子宫平滑肌模型）和细胞模型（大鼠原代子宫平滑肌细胞模型），以元胡止痛方全方、延胡索提取物和白芷提取物为试验样品，进行配伍研究，阐释元胡止痛方在对原发性痛经的病理过程干预的配伍合理性。

B.4.1.1 对小鼠热板模型的影响

与模型组比较，元胡止痛方可显著延长药后 0.5h、1h、2h、3h 热刺激致小鼠舔足反应

的潜伏期，并可持续到药后 3h，延长率最高可达 36.8%；延胡索提取物可显著延长药后 0.5h、1h、2h 热刺激致小鼠舔足反应的潜伏期，并可持续到药后 2h，延长率最高可达 27.5%；白芷提取物对热刺激致小鼠舔足反应的潜伏期基本无影响。试验结果表明，元胡止痛方发挥中枢镇痛作用的有效部位在延胡索提取物。以抑制率为指标，采用金氏概率相加法按公式 $Q=E_{AB}/（E_A+E_B-E_A*E_B）$计算 Q 值，结果显示各时间点 Q 值均大于 1，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对小鼠热板反应所致的疼痛潜伏期具有协同增效作用。

B.4.1.2 对小鼠醋酸扭体模型的影响

与模型组比较，元胡止痛方、延胡索提取物和白芷提取物均可非常显著的减少醋酸扭体反应的扭体次数，抑制率分别可达 58.6%、34.3%、35.7%。可见元胡止痛方、延胡索提取物、白芷提取物对化学刺激引起的疼痛均有明显的镇痛作用。采用金氏概率相加法计算 Q 值，结果显示 Q 值大于 1，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对小鼠扭体次数具有协同增效作用。

B.4.1.3 对大鼠痛经模型的影响

与模型组比较，元胡止痛方、延胡索提取物和白芷提取物能够显著延长痛经模型大鼠扭体反应的潜伏期，潜伏期延长率分别为 73.3%、22.7%、39.8%。采用金氏概率相加法计算扭体反应的潜伏期 Q 值，结果显示 Q 值为 1.370，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对缩宫素所致大鼠痛经疼痛潜伏期具有协同增效作用。

与模型组比较，元胡止痛方、延胡索提取物和白芷提取物能够显著减少扭体次数，扭体次数抑制率分别为 73.7%、53.7%、42.9%。采用金氏概率相加法计算扭体次数 Q 值，结果显示 Q 值为 1.002，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对缩宫素所致大鼠痛经止痛具有协同增效作用。

与模型组比较，元胡止痛方和延胡索提取物可显著升高 β-EP 含量，显著降低 5-HT、NA 含量，白芷提取物可显著降低 5-HT 含量，对 β-EP、NA 含量基本无影响。采用金氏概率相加法计算血浆中 β-EP、5-HT 和 NA Q 值，Q 值分别为 1.30、0.79、1.17，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对缩宫素所致大鼠痛经模型血管活性物质 β-EP 和 NA 具有协同增效作用。

元胡止痛方和延胡索提取物可显著降低 PGF2α 含量及 PGF2α/ PGE2 比值，显著升高 PGE_2 含量，白芷提取物对 PGF2α、PGE2 及 PGF2α/ PGE2 比值基本无影响。采用金氏概率相加法计算血浆中 PGF2α、PGE2 和 PGF2α/ PGE2 Q 值，Q 值分别为 0.96、1.22、0.93，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对缩宫素所致大鼠痛经 PGE2 具有协同增效作用。

B.4.1.4 对未孕大鼠离体子宫平滑肌运动的影响

对缩宫素引起的子宫收缩作用的配伍合理性研究：加入终浓度 0.01 U/ml 缩宫素后，离

体子宫立即产生强烈收缩，频率迅速增加，平均振幅、活动力显著增大，由低到高依次加入元胡止痛方、延胡索提取物、白芷提取物后，可发现子宫收缩的频率、平均振幅和活动力均明显降低，并呈现剂量依赖性。采用金氏概率相加法计算活动力 Q 值，结果显示 Q 值分别为 0.65、0.79，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对缩宫素引起的子宫收缩具有协同作用。

由低到高依次加入延胡索乙素、欧前胡素及两者合用（1:1），可发现子宫收缩的频率和活动力均明显降低，并呈现剂量依赖性。采用金氏概率相加法计算活动力 Q 值，结果显示 Q 值分别为 0.66、0.97，说明延胡索乙素和欧前胡素比例为 1:1 配伍对缩宫素引起的子宫收缩具有协同作用。

对 PGF2α 引起的子宫收缩作用的配伍合理性研究：离体子宫加入终浓度 2×10-6mol/L PGF2α 后，子宫收缩频率、平均振幅和活动力显著增加，由低到高依次加入元胡止痛方、延胡索提取物、白芷提取物后，发现子宫收缩频率和活动力显著降低，并呈现剂量依赖性。采用金氏概率相加法计算活动力 Q 值，结果显示 Q 值分别为 0.52、1.12，说明延胡索提取物和白芷提取物比例为 2:1 配伍对 PGF2α 引起的子宫收缩具有协同增效作用。

由低到高依次加入延胡索乙素、欧前胡素及两者合用（1:1），可发现子宫收缩的频率和活动力均明显降低，并呈现剂量依赖性。采用金氏概率相加法计算活动力 Q 值，结果显示 Q 值分别为 0.53、1.17、1.06，说明延胡索乙素和欧前胡素比例为 1:1 配伍对 PGF2α 引起的子宫收缩具有协同增效作用。

B.4.1.5 对大鼠原代子宫平滑肌细胞钙内流的影响

延胡索提取物、白芷提取物及两者合用对子宫平滑肌细胞 Ca^{2+}内流的影响：各组细胞在未加激动剂前（基础状态），细胞内游离 Ca^{2+}含量基本一致，分别加入终浓度 60 mmol/L KCl、0.01 U/mL 缩宫素后，细胞内 Ca^{2+}含量迅速增加，平均荧光强度较基础状态迅速增大，正常组与对照组增加程度一致，说明溶媒 DMSO 对试验基本无影响，加药各组平均荧光强度较基础状态均有不同程度的增加，但增加幅度显著小于对照组，说明药物有效抑制了细胞内 Ca^{2+}增加，且两者合用组的平均荧光强度增加最少，对 Ca^{2+}内流的抑制作用最强，优于延胡索提取物、白芷提取物单独使用。

延胡索乙素、欧前胡素及两者合用对子宫平滑肌细胞 Ca^{2+}内流的影响：加入终浓度 60 mmol/L KCl、0.01 U/mL 缩宫素后，细胞内 Ca^{2+}含量迅速增加，平均荧光强度较基础状态迅速增大，正常组与对照组增加程度一致，说明溶媒 DMSO 对试验基本无影响，加药各组平均荧光强度较基础状态均有不同程度的增加，但增加幅度显著小于对照组，说明药物有效抑制了细胞内 Ca^{2+}增加，且延胡索乙素、欧前胡素合用组的平均荧光强度增加最少，对 Ca^{2+}内流的抑制作用最强，优于延胡索乙素、欧前胡素单独使用。

元胡止痛方、延胡素提取物、白芷提取物含药血清对子宫平滑肌细胞 Ca^{2+}内流的影响：加入终浓度 60 mmol/L KCl、0.01 U/mL 缩宫素后，细胞内 Ca^{2+}含量迅速增加，平均荧光强

度较基础状态迅速增大，正常组与对照组增加程度一致，说明溶媒 DMSO 对试验基本无影响，加药（20%含药血清）各组平均荧光强度较基础状态均有不同程度的增加，但增加幅度显著小于对照组，说明含药血清有效抑制了细胞内 Ca^{2+}增加，且元胡止痛方含药血清组的平均荧光强度增加最少，对 Ca^{2+}内流的抑制作用最强，优于延胡索提取物含药血清、白芷提取物含药血清单独使用。

B.4.2 基于网络药理学的元胡止痛方配伍研究

采用网络药理学的方法，选取元胡止痛方中君药延胡索药材的生物碱类代表性成分延胡索乙素、巴马汀、d-海罂粟碱和原阿片碱，及白芷药材的两个香豆素类代表性成分欧前胡素和异欧前胡素，进行潜在靶点和作用通路的预测，得到“化合物-靶点-通路”网络药理图。

通过分析试验数据发现，以延胡索乙素、巴马汀、海罂粟碱、原阿片碱为代表的生物碱类化合物可以单独作用于与中枢镇痛相关的 9 个蛋白靶点和 9 条信号通路，通过调节神经镇痛介质而发挥治疗痛经的作用。以欧前胡素和异欧前胡素为代表的香豆素类成分可单独作用于与性激素、炎症以及痉挛关系密切的 9 个蛋白靶点和 2 条信号通路，通过调节性激素的分泌与释放，抑制炎症因子的表达，缓解平滑肌痉挛而起到治疗原发性痛经的作用。同时，6 个化合物还共同作用于涉及免疫反应、炎症表达、平滑肌痉挛以及性激素调节等相关的 5 个蛋白靶点和 8 条信号通路。

结果表明，元胡止痛方中生物碱和香豆素两类成分既有共同的作用靶点群及通路群，又各有偏重，作用通路涉及中枢镇痛、激素调节、解痉、血管舒张、炎症及免疫等各个环节，各通路群间通过共有靶点连接，显示出不同成分间的多靶点、多途径的协同作用。

B.4.3 基于G蛋白偶联受体的元胡止痛方配伍研究

以 6 个 GPCR 受体 5-羟色胺受体（5-HT1A）、阿片受体（OPRM1）、β2 肾上腺素受体（ADRB2）、多巴胺受体（D2）、乙酰胆碱受体（M2）和血栓素-前列腺素受体（TP）为研究对象，通过运用胞内钙离子荧光技术检测延胡索药材、白芷药材、二者配伍给药以及延胡索乙素、欧前胡素、二者配伍给药后对 5-HT1A、OPRM1 和 ADRB2 受体的激动作用以及对 D2、M2 和 TP 受体的抑制作用，从而揭示元胡止痛方的作用机制，并在功能受体层面探究元胡止痛方的配伍合理性。

与空白对照组比较，延胡索和白芷药材配伍给药后可以激动 5-HT1A、OPRM1、ADRB2 受体，抑制 D2、M2 和 TP 受体，从而调节一系列的下游生物信号转导效应，发挥多种生物活性，体现了二者配伍给药的多靶点多途径作用特点。并且二者配伍给药后对 5-HT1A、OPRM1、ADRB2 受体的激活作用和对 D2、M2 和 TP 受体的抑制作用均明显强于两味药材单独给药，且具有统计学差异，表明二者配伍后有显著的增效作用。单体配伍实验表明，延胡索乙素单独给药后可以激动 ADRB2 受体，拮抗 D2 和 TP 受体；欧前胡素可拮抗 TP 受体。而二者配伍后对 ADRB2 的激动作用以及对 D2、TP 受体的拮抗作用均显著强于单独给药，体现配伍后的增效作用。

B.4.4基于药代动力学的元胡止痛方配伍研究

B.4.4.1 生物样品中3种生物碱与2种香豆素的分析方法建立

采用 UPLC-MS/MS 分析方法，建立了同时测定大鼠血浆中生物碱类成分延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱和香豆素类成分欧前胡素、异欧前胡素含量的分析方法。实验结果表明，该方法专属性好、灵敏度高、简单可靠，符合相关规范要求，为后续部分的大鼠药代动力学研究奠定了基础。

B.4.4.2 元胡止痛方配伍多成分大鼠药代动力学研究

采用已建立的 UPLC-MS/MS 定量方法，测定灌胃给予延胡索提取物、白芷提取物和元胡止痛方全方后不同时间点大鼠血浆中各效应指标成分的浓度，分析比较复方配伍对延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素及异欧前胡素体内动力学过程的影响。

t 检验统计分析结果显示，元胡止痛方组与延胡索组相比，延胡索甲素峰浓度 C_{max} 升高（$p < 0.05$），$MRT_{(0-t)}$和 $MRT_{(0-\infty)}$显著延长（$p < 0.01$），$AUC_{(0-t)}$和 $AUC_{(0-\infty)}$显著增加（$p < 0.01$）；延胡索乙素峰浓度 C_{max}、$AUC_{(0-t)}$和 $AUC_{(0-\infty)}$显著增大（$p < 0.01$）；原阿片碱达峰时间 t_{max} 显著延长（$p < 0.01$），$AUC_{(0-t)}$和 $AUC_{(0-\infty)}$增加（$p < 0.05$）。欧前胡素和异欧前胡素在大鼠体内吸收较快。元胡止痛方组与白芷组相比，各药代动力学参数的差异无统计学意义（$p > 0.05$）。

结果表明，与单独给药相比，元胡止痛方能显著增加延胡索甲素、延胡索乙素和原阿片碱的体内吸收程度，揭示了延胡索与白芷配伍的相互协同作用，从动力学角度明确了二者配伍的合理性。

B.4.4.3 元胡止痛方配伍多成分大鼠脑组织分布研究

本部分采用已建立的 UPLC-MS/MS 定量方法，分别灌胃给予大鼠延胡索提取物、白芷提取物和元胡止痛方全方后，测定不同时间点脑组织中各效应指标成分的浓度，分析比较复方配伍对延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素及异欧前胡素脑组织分布的影响。

试验结果，灌胃给药 15 min 后即可在大鼠脑组织中检测到延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素及异欧前胡素的存在，表明它们能够迅速透过血脑屏障而进入中枢系统。不同时间点大鼠脑组织中各效应成分的药物浓度数据拟合药代动力学参数，t 检验统计分析结果显示，与延胡索、白芷单味给药组相比，元胡止痛方组延胡索甲素消除半衰期 $t_{1/2}$ 延长（$p < 0.05$），峰浓度 C_{max} 和 $AUC_{(0-t)}$显著增加（$p < 0.01$），平均驻留时间 $MRT_{(0-t)}$显著延长（$p < 0.01$）；延胡索乙素表现出与延胡索甲素相似的动力学特征，峰浓度 C_{max} 和 $AUC_{(0-t)}$显著增加（$p < 0.01$），平均驻留时间 $MRT_{(0-t)}$显著延长（$p < 0.01$）；原阿片碱峰浓度 C_{max} 和 $AUC_{(0-t)}$显著增加（$p < 0.01$）。欧前胡素和异欧前胡素平均驻留时间 $MRT_{(0-t)}$延长（$p < 0.05$），其它各药代动力学参数的差异无统计学意义（$p > 0.05$）。

结果表明，与单独给药相比，元胡止痛方能显著升高生物碱类成分延胡索甲素、延胡索乙素和原阿片碱在脑组织中的达峰浓度，增加其脑组织分布量，同时延长香豆素类成分欧前胡素和异欧前胡素在脑组织中的平均驻留时间。

综上，通过整合整体动物、器官水平、细胞、受体、药代动力学和网络药理等多角度的实验结果发现，延胡索中的生物碱类成分可通过作用于中枢镇痛相关蛋白、平滑肌相关受体蛋白以及血栓素、血管紧张素等靶点蛋白来调节下游生物信号转导通路，从而发挥止痛、理气、活血等功效，起到君药的作用。白芷药材同样可以通过与 5-羟色胺、乙酰胆碱、前列腺素血栓素等受体结合，参与痉挛、炎症等相关信号通路的调节与转导，从而发挥行气血的功效，辅助君药延胡索加强治疗，起到臣药作用，体现了二者配伍的合理性。

B.5 基于成分可测性的质量标志物研究

质量标志物作为中药的质量评价与控制指标，必须满足在现有技术方法条件下能够定量（或定性）测定的要求，“可测性”是质量标志物的必要条件。

B.5.1指纹图谱研究

采用 HPLC 法，针对元胡生物碱类和白芷香豆素类成分，建立了元胡止痛方的 HPLC 指纹图谱的质量控制方法。并结合元胡止痛方、延胡索和白芷药材的 HPLC-MS/MS 研究结果，对元胡止痛方的 HPLC 指纹图谱中各色谱峰进行了指认。

B.5.2多成分含量测定研究

依据元胡止痛方质量标志物研究结果，建立了一标多测法同时控制元胡止痛方中延胡索乙素、巴马汀、去氢延胡索甲素、延胡索甲素、欧前胡素和异欧前胡素6个成分的质量控制方法。建立了基于“有效性”的中药复方定量控制方法，以保证产品的有效性及稳定均一性。

CACM公示稿

参考文献

[1]刘昌孝,张铁军.中药质量标志物理论与实践[M].北京:科学出版社, 2021

[2]张铁军,刘昌孝. 中药大品种质量标准提升研究[M].北京:科学出版社, 2017

[3]Liu Changxiao,Liu Liang,Guo Dean.Quality marker of TCMs: concept and applications [J] .Phytomedicine, 2018, 44: 85-86.

[4]Liu Changxiao,Guo Dean,Liu Liang,Quality transitivity and traceability system of herbal medicine products based on quality markers [J].Phytomedicine, 2018, 44: 247-257.

[5] Liu Changxiao, Cheng Yiyu, Guo Dean, et al. A New Concept on Quality Marker for Quality Assessment and Process Control of Chinese Medicines [J]. Chinese Herbal Medicines, 2017, 9(1): 3-13.

[6] Liu Changxiao. Determination of Quality Markers is Basis for Establishing Quality Standard and Control of Chinese Herbal Medicines [J]. Chinese Herbal Medicines, 2017, 9(4): 299-300.

[7]Zhang Tiejun,Bai Gang,Han Yanqi, et al. The method of quality marker research and quality evaluation of traditional Chinese medicine based on drug properties and effect characteristics [J].Phytomedicine, 2018, 44: 204-211.

[8] Li Yazhuo, Xie Ying, He Yufei, et al. Quality Markers of Traditional Chinese Medicine: Concept, Progress, and Perspective [J]. Engineering, 2019, 5(5): 888-894.

[9]Zhang Hongbing,Wu Xin,Xu Jun, et al. The comparative pharmacokinetic study of Yuanhu Zhitong prescription based on five quality-markers [J].Phytomedicine, 2018, 44: 148-154.

[10]Zhang Hongbing, Zhang Tiejun, Xu Jun, et al. Rapid Analysis and Identification of Absorbed Components and Their Metabolites of Yuanhu Zhitong Dropping Pill in Rat Plasma and Brain Tissue Using UPLC-Q-TOF/MS with Multivariate Statistical Analysis [J]. Chinese Herbal Medicines, 2016, 8(2): 154-163.

[11]Wang Ze,Shang Haihua,Li Yazhuo,et al. Transporters (OATs and OATPs) contribute to illustrate the mechanism of medicinal compatibility of ingredients with different properties in yuanhuzhitong prescription [J] .Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1646-1657.

[12]刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(09):1443-1457.

[13]刘昌孝.从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展[J].中草药,2016,47(18):3149-3154.

[14]刘昌孝.基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J].中草药,2017,48 (18):3669-3676.

[15]刘昌孝,张铁军,黄璐琦,等.发展监管科学，促进中药产业传承创新[J].药物评价研究,2019,42(10):1901-1912.

[16]刘昌孝.中药质量标志物（Q-marker）：提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展[J].中草药,2019,50(19):4517-4518.

[17]张铁军,白钢,刘昌孝.中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J].药学学报,2019,54(02):187-196+186.

[18]张铁军,许浚,韩彦琪,等.中药大品种质量标准提升研究的思路与实践[J].天津中医药,2017,34(01):4-12.
[19]张铁军,王杰,陈常青,等.基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价路径[J].中草药,2017,48(06): 1051-1060.
[20]张铁军,白钢,陈常青,等.基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J].中草药,2018,49(01):1-13.
[21]张铁军,白钢,许浚,等.基于“精准医学”的中药质量认识与评价研究路径[J].世界科学技术-中医药现代化,2017,19(01):35-43.
[22]刘昌孝,张铁军,何新,等.活血化瘀中药五味药性功效的化学及生物学基础研究的思考[J].中草药,2015,46(05):615-624.
[23]张铁军,刘昌孝.中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径[J].中草药,2015,46(01):1-6.
[24]许海玉,侯文彬,李珂,等.基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(06):1-8.
[25]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.
[26]张铁军,许浚,申秀萍,等.基于中药质量标志物(Q-Marker)的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究[J].中草药,2016,47(13): 2199-2211.
[27]张铁军,许浚,韩彦琪,等.中药质量标志物(Q-marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究[J].中草药,2016,47(09):1458-1467.
[28]曹煌,张铁军,张静雅,等.基于电子鼻和电子舌技术的辛味中药气-味的表征研究[J].中草药,2016,47(11):1962-1967.
[29]韩彦琪,许浚,龚苏晓,等.基于味觉、嗅觉受体分子对接技术的中药性味物质基础研究的路径和方法[J].中草药,2018,49(01):14-19.
[30]武欣,张洪兵,许浚,等.基于质量标志物的元胡止痛方配伍大鼠脑组织分布研究[J].中草药,2018,49(01): 45-49.
[31]马文凤,许浚,韩彦琪,等.仿生技术在中药五味辨识研究中的进展与实践[J].中草药,2018,49(05):993-1001.