

黑布药膏的化学成分表征研究

成小红¹, 刘惠君², 蒋丽², 刘丽芳^{2*}

(¹中国医学科学院皮肤病医院,南京 210042; ²中国药科大学中药学院生药学系,南京 211198)

摘要 黑布药膏系常用的院内制剂,由五倍子、蜈蚣等制成,临床疗效确切,但其药效物质基础尚未全面阐明。本研究采用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对黑布药膏及其生药混合物的化学成分进行定性分析,并探讨了制剂前后成分的差异。在电喷雾(ESI)正、负离子模式下,根据精确相对分子质量、特征碎片离子、色谱保留时间等初步鉴定出73个化合物,其中生药混合物、黑布药膏分别鉴定了57、65个化合物,包括鞣质类、酚酸类、核苷类、氨基酸类等,在制备过程中,化学结构发生变化的成分主要集中在鞣质类。结果表明,UPLC-Q-TOF-MS/MS技术可以灵敏、高效地表征黑布药膏制剂中所含的化学成分及其在制剂过程中的结构变化,为充分阐明黑布药膏药效物质基础和制剂工艺的合理性及后续制剂质量标准提升研究提供重要依据。

关键词 黑布药膏;五倍子;蜈蚣;UPLC-Q-TOF-MS/MS;化学成分

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)01-0077-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.2023020601

引用本文 成小红,刘惠君,蒋丽,等.黑布药膏的化学成分表征研究[J].中国药科大学学报,2023,54(1):77-88.

Cite this article as: CHENG Xiaohong, LIU Huijun, JIANG Li, et al. Characterization of chemical constituents of *Heibu Yaogao* (ointment) [J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(1): 77-88.

Characterization of chemical constituents of *Heibu Yaogao* (ointment)

CHENG Xiaohong¹, LIU Huijun², JIANG Li², LIU Lifang^{2*}

¹Hospital for Skin Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042; ²Department of Pharmacognosy, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract *Heibu Yaogao* (ointment), which made of Galla chinensis, Scolopendra, etc., is a commonly used hospital preparation with definite clinical efficacy, yet its material basis has not been fully clarified. By ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS), the chemical constituents of *Heibu Yaogao* (ointment) and its crude drug mixture were qualitatively analyzed, and the differences of components before and after preparation were discussed. Scanned by electrospray ionization (ESI) source in positive and negative ion modes, a total of 73 compounds were identified via precise molecular weight, characteristic fragment ions and chromatographic retention time. 57 and 65 compounds were detected in crude drug mixture and *Heibu Yaogao* (ointment) respectively, including tannins, phenolic acids, nucleosides, amino acids, etc. In the process of preparation, the chemical structure changes are mainly concentrated in tannins. The change of components of *Heibu Yaogao* (ointment) before and after processing were proved by UPLC-Q-TOF-MS/MS, which provides important reference for elucidating the material basis of *Heibu Yaogao* (ointment), illustrating the rationality of preparation technology and further promoting the quality control of the preparation.

Key words *Heibu Yaogao* (ointment); *Galla chinensis*; *Scolopendra*; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical constituent

黑布药膏是我国著名中医皮外科专家赵炳南教授在行医过程中收集到的民间药方,由五倍子、蜈蚣组成,是以冰片为促渗剂、陈醋和蜂蜜为基质

的外用软膏,具有破瘀软坚散结之功效,临床用于瘢痕疙瘩、疖痈初期、乳头状皮炎等^[1]。长期临床实践证实,该药膏遣药切中,药少力专,使用方便,

患者顺应性强,具有独到的优势^[2]。配制方法是将黑布大火煮沸0.5 h后停止加热,冷却后加入已过筛的五倍子细粉,边加边搅拌,使五倍子和醋充分接触,静置过夜。第2天中火继续加热搅拌约2 h后,加入已加热好的蜂蜜,改文火继续加热搅拌至药膏成细腻光亮黑紫色,用刮刀挑起来后成片状掉落时停止加热,冷却后加入已过筛的蜈蚣和冰片细粉,继续搅拌至均匀即可。现代研究表明黑布药膏具有抗菌抗病毒、清除自由基、抗氧化、收敛等多种药理作用^[3],但其复方药味的化学成分研究不够深入,缺乏较为完善的质量控制标准,因此,阐明组方的化学成分、论证其制剂合理性对黑布药膏活性物质的深入研究及其质量标准提升具有重要参考价值。

超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)具有高分辨率、高灵敏度、高分离度的特点^[4],近年来已成为中药分析领域的重要手段。本课题组前期也建立了质谱数据库驱动的中药复方化学成分深度解析策略^[5],首先通过检索文献和开源数据库(如pubchem等)构建了各组方药味的质谱数据库,在此基础上,选择具有代表性的标准品进一步确证特定结构类型成分的裂解规律和诊断离子,最终以化合物结构、分子式、检测模式、质荷比和特征碎片离子等关键信息为鉴定条件,对各药材和复方制剂中的化学成分进行系统、准确的解析,全面表征其中的化学成分并探讨其在制剂前后发生的结构变化,为全面阐明黑布药膏的药效物质基础,提升其质量控制标准提供重要依据。

1 材料

1.1 试剂

UPLC-Q-TOF-MS/MS分析对照品:没食子酸、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖、原儿茶酸、腺苷(成都埃法生物公司,纯度≥98%)。超纯水(广东屈臣氏食品饮料有限公司);甲酸(色谱纯,美国Sigma公司);乙腈(色谱纯,德国Merck公司)。

样品制备所用原料药材:五倍子粉(批号:200901)、蜈蚣粉(批号:200603),均购自安徽省万生中药饮片有限公司,经中国医学科学院皮肤病医院成小红鉴定,分别来自于漆树科植物盐肤木*Rhus chinensis* Mill.、青麸杨*Rhus potaninii* Maxim.

或红麸杨*Rhus punjabensis* Stew. var. *sinica* (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿,蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch 的干燥体,且符合2020年版《中华人民共和国药典》的规定。黑布药膏(批号:20220926,由中国医学科学院皮肤病医院制剂室制备,且符合江苏省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准的规定)。

1.2 仪器

SCIEX Exion LC联合TripleTOF X500B mass spectrometer液质联用仪、Analyst TF 1.7.1数据采集软件、Peak View 1.2数据分析软件(美国AB Sciex公司);C₁₈固相萃取柱(500 mg, 3 CC, 美国Waters公司);KQ-500E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司);H1650R高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 对照品的制备 取对照品适量,精密称定,加入甲醇配制成每毫升含1 μg的溶液,即得。

2.1.2 黑布药膏供试品溶液的制备 取黑布药膏0.1 g,精密称定,精密加入70%甲醇10 mL,密塞,称重,静置2 h,常温下超声处理(功率250 W,频率50 kHz)30 min,放冷,再次称重,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,13 000 r/m离心15 min,取上清液,即得。

2.1.3 主要原料药混合物供试品溶液的制备 取五倍子、蜈蚣粉末适量,精密称定,配制成相当于黑布药膏0.1 g的主要原料药混合物,精密加入70%甲醇10 mL,密塞,称重,静置2 h,常温下超声处理(功率250 W,频率50 kHz)30 min,放冷,再次称重,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,13 000 r/min离心15 min,取上清液,即得。

2.2 样品前处理

取C₁₈固相萃取柱,依次加入甲醇2 mL、超纯水2 mL活化,取样品上清液上样,依次用超纯水2 mL和甲醇2 mL洗脱,收集甲醇洗脱液,氮气吹干,加入50%甲醇溶解混匀,得供试品溶液。

2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 采用Waters Acuity HSS T₃色

谱柱($2.1\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$);流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱 $0\sim 5\text{ min}$, $8\% \text{ B}$; $5\sim 11\text{ min}$, $8\%\sim 30\% \text{ B}$; $11\sim 20\text{ min}$, $30\%\sim 80\% \text{ B}$; $20\sim 21\text{ min}$, $80\%\sim 95\% \text{ B}$; $21\sim 27\text{ min}$, $95\%\sim 95\% \text{ B}$; $27\sim 28\text{ min}$, $95\%\sim 3\% \text{ B}$; $28\sim 34\text{ min}$, $3\% \text{ B}$;柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;流速 0.3 mL/min ;进样量 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 质谱条件 在ESI离子源正、负离子模式下进行检测,扫描范围 m/z $100\sim 1250$ 。雾化气流速为 55 mL/min ,脱溶剂气流速为 55 mL/min ,气帘气流速为 35 mL/min ;脱溶剂气温度为 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$;离子喷雾电压 $5\,500/-4\,500\text{ V}$,去簇电压为 $\pm 60\text{ V}$;碰撞能 $\pm 5\text{ V}$ 。

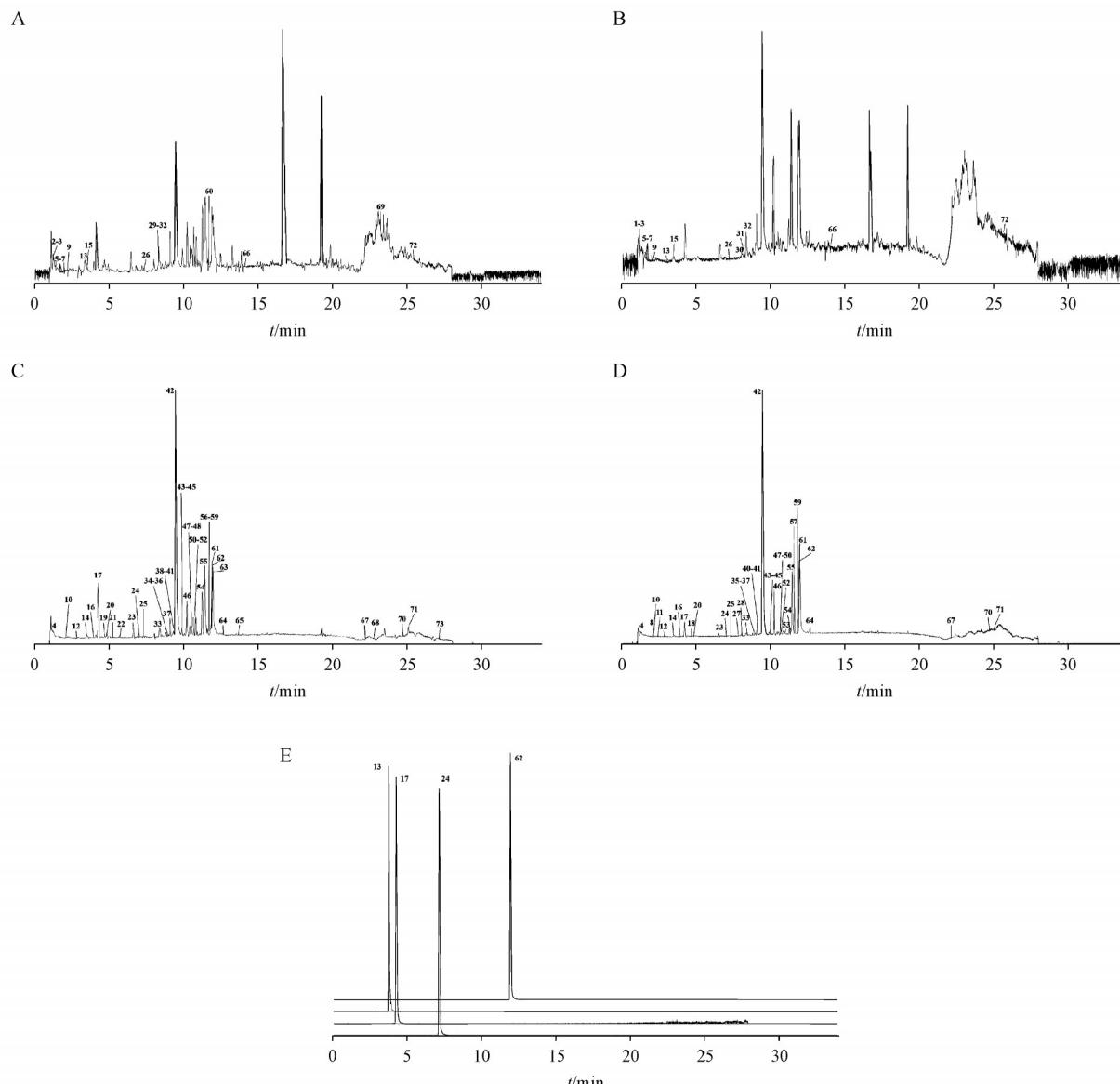


Figure 1 Total ion chromatography (TIC) of *Heibu Yaogao* (ointment) in positive ion mode (A), crude drug mixture in positive ion mode (B), *Heibu Yaogao* (ointment) in negative ion mode (C), crude drug mixture in negative ion mode (D) and extraction ion chromatogram (XIC) of standards (E)

3 结 果

在相同条件下,利用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对原料药混合物及黑布药膏化学成分进行全面表征,依据化合物的保留时间(t_R)、一级质谱分子质量信息、二级串联质谱离子碎片信息,结合自建化学成分质谱库进行成分归属分析,其总离子流图如图1。本实验初步鉴定出73个化合物,包括41种鞣质、7种酚酸、7种核苷、3种氨基酸、7种有机酸、8种其他类化合物,指认了生药混合物中57个成分、黑布药膏中65个成分,其中,制剂前后共有化学成分49个,多数为鞣质、酚酸类化合物

(图2),而差异成分主要集中在鞣质类化合物。

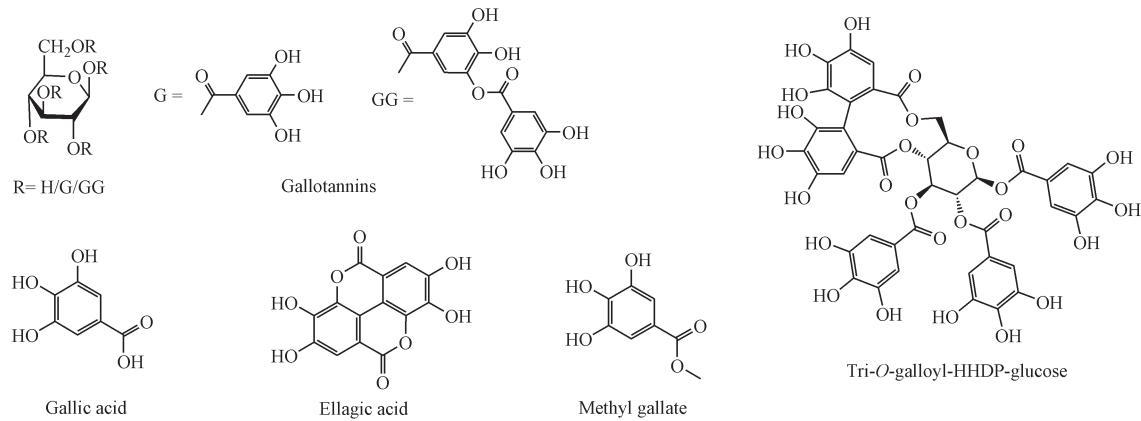


Figure 2 Typical structures of tannins and phenolic acids in *Galla chinensis*

3.1 鞣质类化合物

五倍子是复方中的君药,其主要活性成分为鞣质类化合物,具有抗菌、抗病毒、抗氧化、清除自由基等药理作用^[6]。本实验经对照品比对,根据色谱保留时间、质谱信息,结合化合物极性共鉴定出41种鞣质。

没食子鞣质(gallotannins)的基本骨架为1,2,3,4,6-O- β -D-葡萄糖,没食子酰基(G)或聚没食子酰基(GG)以缩酚酸的形式不规则地分布在C-2、C-

3、C-4位,故存在大量同分异构体。没食子鞣质二级质谱具有一系列相差152和170的子离子,是化合物逐个脱去没食子酰基和没食子酸碎片而产生的。以三-O-没食子酰基葡萄糖 I 为例(图3),其在[M-H]⁻的准分子离子峰为m/z 635.088 3,首先母离子脱去1分子没食子酰基(C₇H₄O₄,M=152)产生碎片m/z 483,或母离子直接脱去1分子没食子酸碎片(C₇H₆O₅,M=170)产生m/z 465的碎片离子,然后再以同样的方式脱去没食子酰基或没食

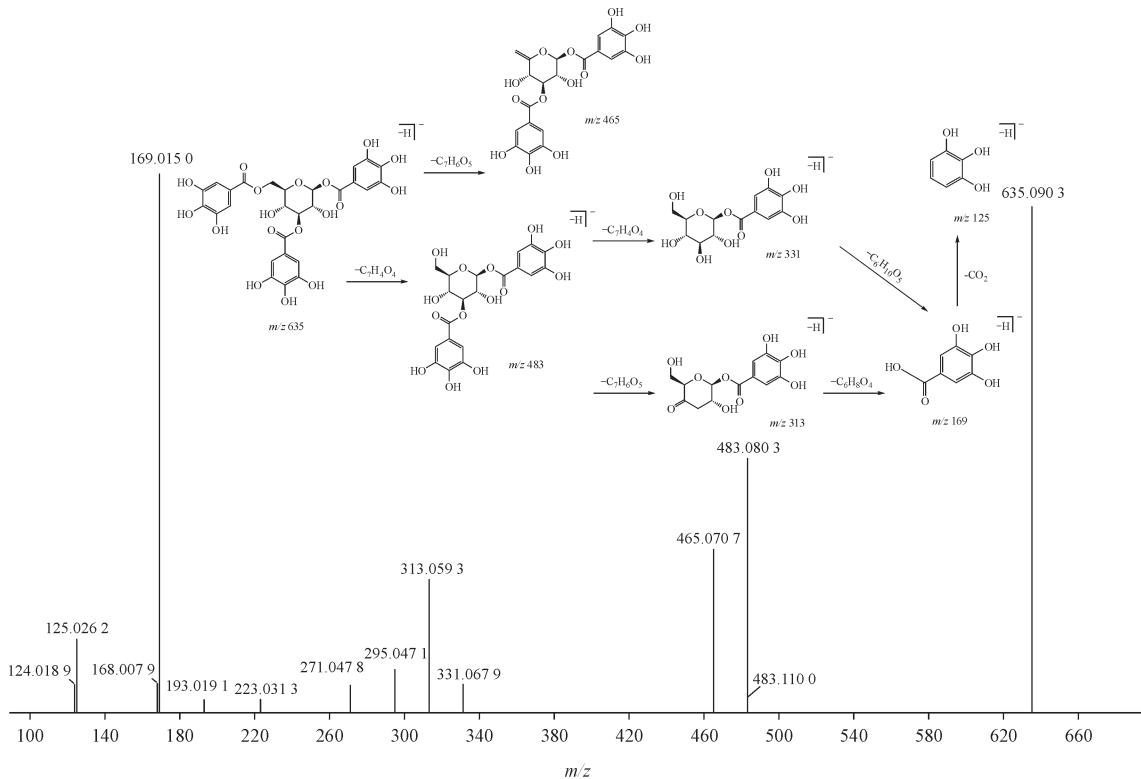


Figure 3 Mass spectra of trigalloylglycose I and fragmentation

子酸分别产生碎片 m/z 331、313。同理推测其他没食子鞣质类化合物。

在负离子模式下峰 51 和峰 63 产生一系列碎片离子, 如 m/z 937、769、617、465、447, 推测是化合物失去没食子酰基(152、168、170)而形成的, 结合

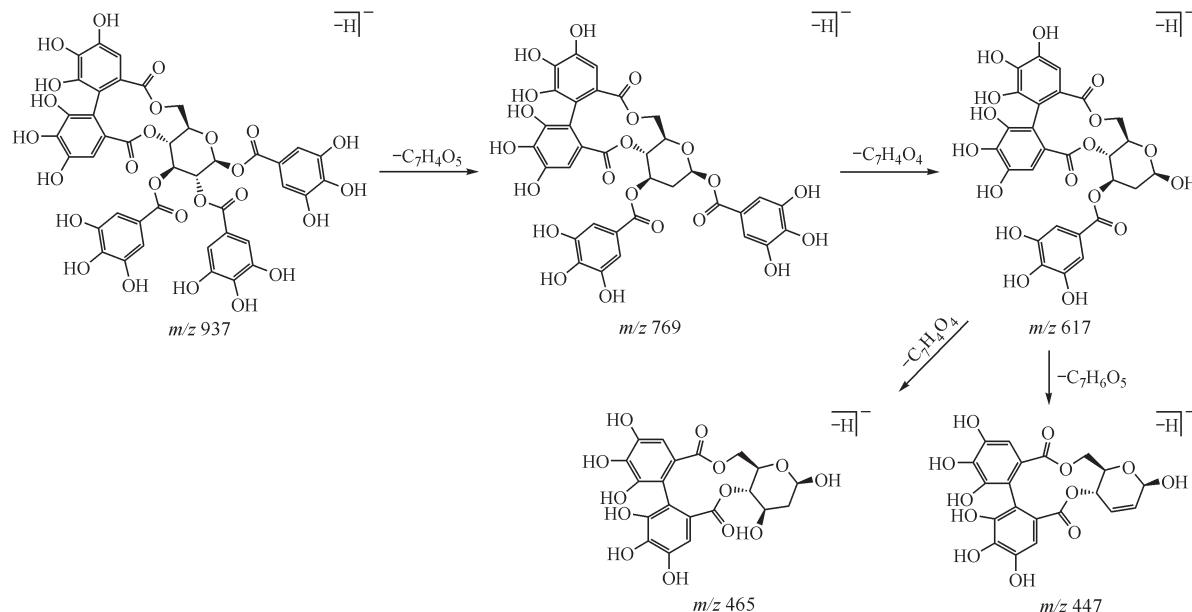


Figure 4 Fragmentation pathway of ellagittannins

综上,总结鞣质类化合物的裂解规律如下:(1)分子离子峰以 $[M-H]^-$ 的形式存在;(2)在飞行时间质谱负离子检测模式下,鞣质的酚羟基形成氧负离子,易发生 α 裂解,脱去没食子酰基而产生152、168、170的碎片离子。

3.2 酚酸类化合物

酚酸类化合物是五倍子重要的次生代谢产物,是其抗氧化、抗菌消炎的主要活性成分之一^[8]。负离子模式下,制剂前后均鉴定出来源于五倍子的7个酚酸类化合物。峰 17 准分子离子峰 m/z 169.014 1, 在 MS/MS 谱中存在 m/z 125 的特征碎片离子, 为母离子发生 α 裂解失去1分子 CO_2 ($M = 44$)形成, m/z 125 $[M-H-CO_2]^-$ 再失去1分子 H_2O ($M = 18$)形成 m/z 107 的碎片离子, 鉴定为没食子酸。峰 24 在 $[M-H]^-$ 准分子离子峰为 m/z 153.019 6, 相对丰度较低, 主要碎片为 m/z 109 $[M-H-CO_2]^-$, 进一步与对照品比对, 二者相符, 鉴定为原儿茶酸。峰 40 在 $[M-H]^-$ 准分子离子峰为 m/z 321.025 0, 对其进行 MS/MS 分析得到碎片 m/z 169、125, 分别对应没食子酸碎片离子与没食子酸失去1分子 CO_2 而

文献[7]鉴定为二没食子酰基-六羟基联苯葡萄糖与三没食子酰基-六羟基联苯葡萄糖, 是具有六羟基联苯二甲酰基(HHDP)结构的鞣花鞣质(ellagittannin), 其裂解规律如图 4。

形成的碎片离子,推断为间双没食子酸。峰 42 鉴定为没食子酸甲酯(图 5), 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 183.029 4, 其二级质谱得到 m/z 168 $[M-H-CH_3]^-$ 和 m/z 124 $[M-H-CH_3-CO_2]^-$ 的碎片离子。峰 61 准分子离子峰为 m/z 300.999 1, 其二级质谱得到 m/z 283 $[M-H-OH]^-$ 、 m/z 257 $[M-H-CO_2]^-$ 与 m/z 229 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 的碎片离子, 与文献报道一致^[9], 鉴定为鞣花酸。同理, 推测化合物 57、59 分别为没食子酸乙酯、香草酸。

3.3 核苷类化合物

核苷是具有广泛生理活性的一类水溶性成分, 是生物细胞维持生命活动的重要组成部分, 在正离子模式下, 制剂前后均鉴定出鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶、次黄嘌呤、腺苷、肌苷等6个核苷类化合物, 黑布药膏中还鉴别出了5'-腺嘌呤核苷酸二钠盐。峰 13 在 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰 m/z 268.104 0, 其二级碎片 m/z 136、119 分别对应 $[M+H-C_5H_8O_4]^+$ 、 $[M+H-C_5H_8O_4-NH_3]^+$, 进一步与对照品比对, 二者相符, 确定为腺苷。峰 15 在 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰为 m/z 269.089 6, 丢失1分子 D-呋

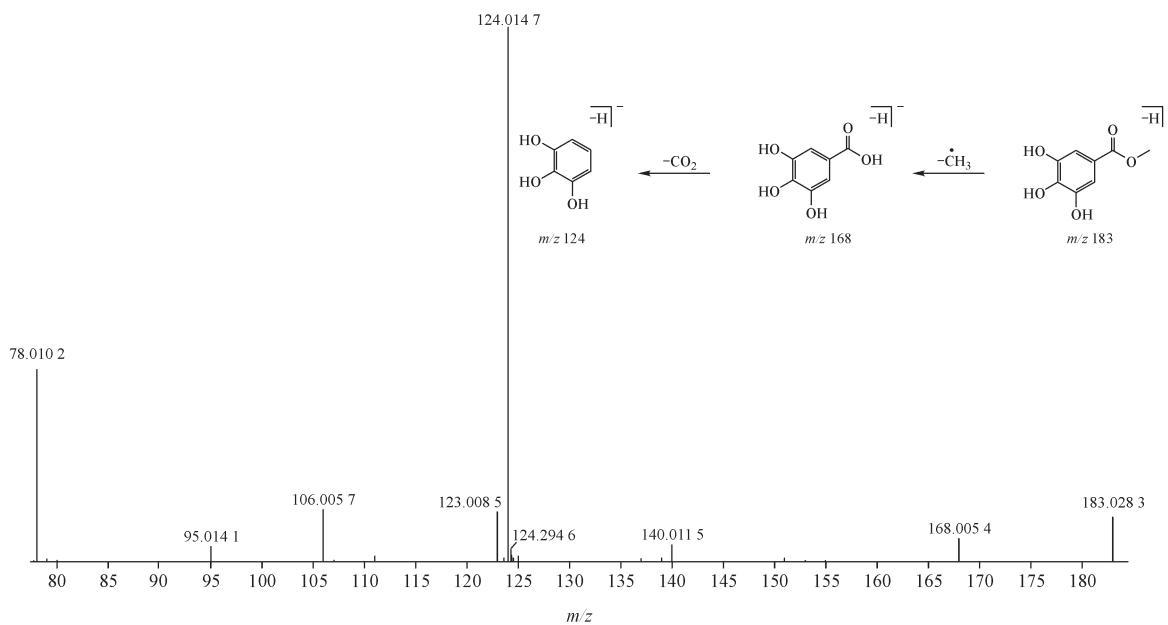


Figure 5 Mass spectra of methyl gallate and fragmentation

喃核糖(132)后形成 m/z 137的碎片离子,然后产生一系列碎片离子如 m/z 119、110,对应 H_2O (18)、

HCN (27)的中性分子丢失,参考文献[10]推测为肌苷,质谱碎片信息及裂解途径如图6。

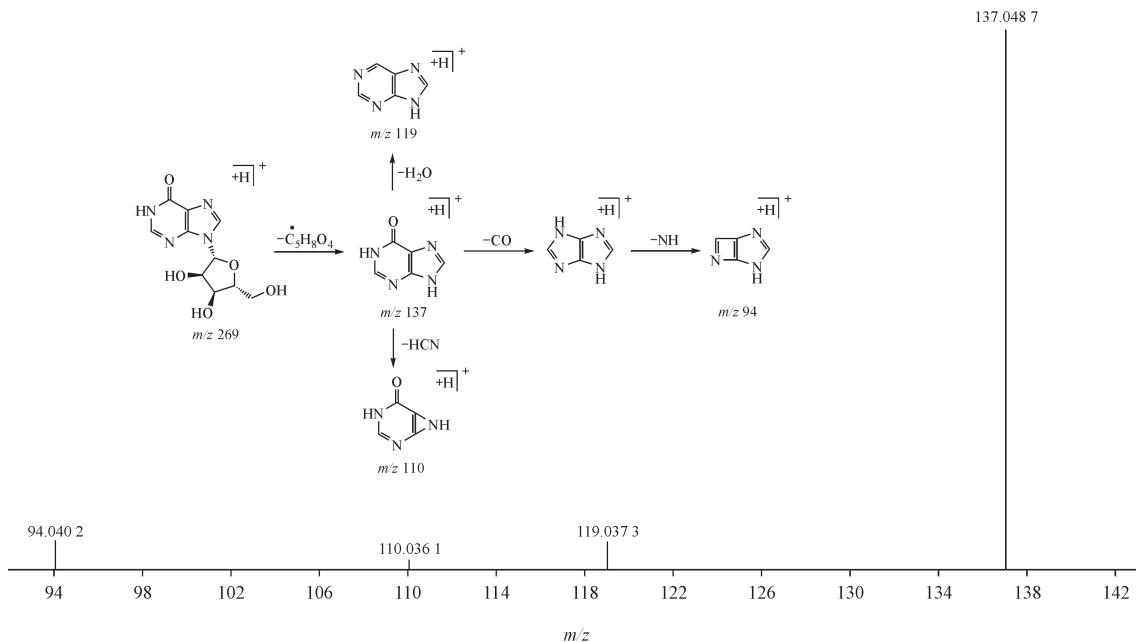


Figure 6 Secondary mass spectra of inosine and fragmentation

3.4 氨基酸类化合物

生药混合物中指认出来自蜈蚣的精氨酸、脯氨酸和缬氨酸等3个氨基酸,其保留时间均在1.1~1.4 min,黑布药膏中鉴别出脯氨酸、缬氨酸。正离子模式下,氨基酸的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 相对丰度较低,仅有极少较强的碎片峰。以缬氨酸为例,

其准分子离子峰为118.0860 $[\text{M}+\text{H}]^+$,易发生 α 裂解而失去 NH_2 和 C_3H_7 而形成 m/z 59 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ 碎片离子,或失去 COOH 和 CH_3 而形成 m/z 58 $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}-\text{CH}_3]^+$ 碎片离子,其质谱碎片信息及裂解途径如图7。

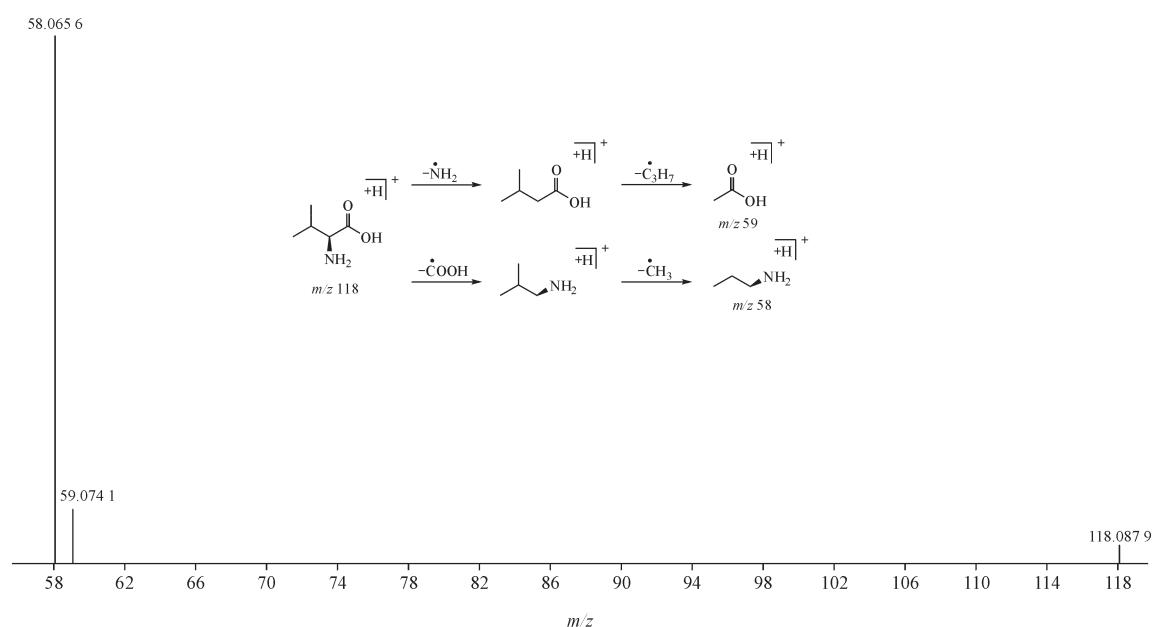


Figure 7 Mass spectra of valine and fragmentation

3.5 有机酸类化合物

根据自建化学成分质谱库与特征碎片, 结合文献共推断出来自五倍子的 3 种有机酸(包括月桂酸、熏陆香二烯酮酸、棕榈酸)以及来自蜈蚣的单硬脂酸甘油酯, 另外, 在黑布药膏中还鉴别出了漆树酸、肉豆蔻酸、硬脂酸等成分。现代药理研究表明, 有机酸具有很强的抗氧化、抗菌消炎活性^[11], 与黑布药膏收敛固涩的作用一致。负离子模式

下, 大部分有机酸类化合物准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 相对丰度较高, 不易发生解离, 碎片离子较少, 或仅产生 1 分子 CO_2 的中性丢失。以峰 68 为例, 其准分子离子峰 m/z 为 347.259 8, MS/MS 谱中其特征碎片离子为 m/z 303, 是由 m/z 347 失去 1 分子 CO_2 而形成的, 根据数据库信息检索鉴定为漆树酸, 其质谱碎片信息及裂解途径如图 8。

已推断出的化合物质谱信息见表 1。

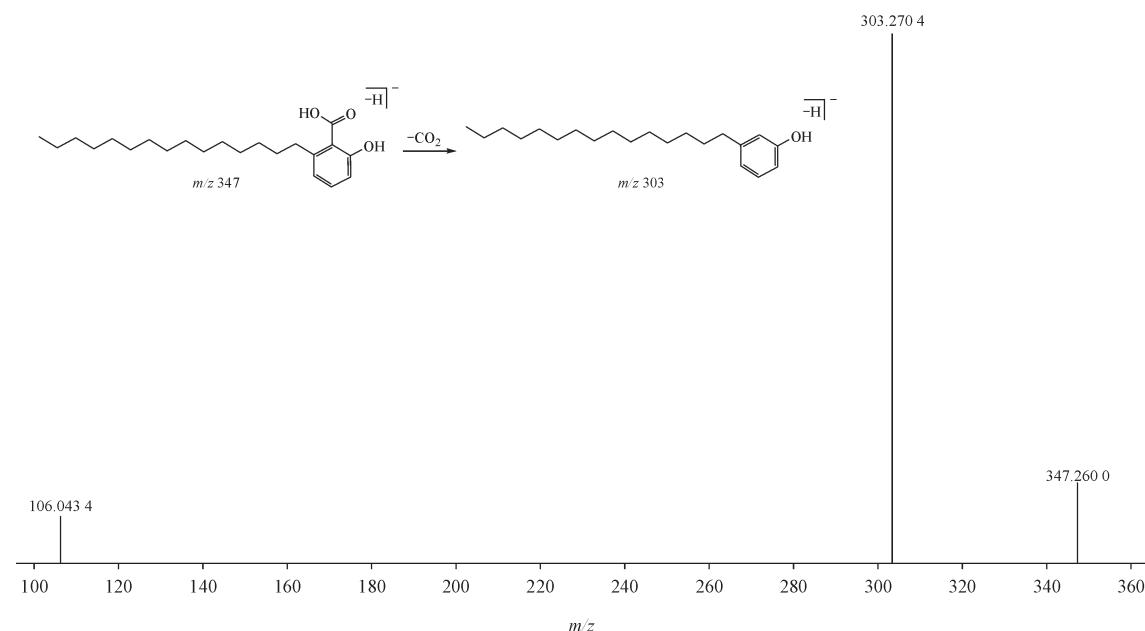


Figure 8 Mass spectra of 2-hydroxy-6-pentadecylbenzoic acid and fragmentation

Table 1 Mass spectrum information of compounds in crude drug mixture and *Heibu Yaogao* (ointment)

No.	t_R / min	MS ¹ / (m/z)	Error/ ($\times 10^6$)	Formula	Adduct	MS ² / (m/z)	Compound	Source
1	1.12	175.119 4	2.7	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	70,60	Arginine ^(s)	A
2	1.28	118.086 0	-2.2	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118,59,58	Valine ^(s)	A/B
3	1.35	116.070 5	-1.0	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116,70,68	Proline ^(s)	A/B
4	1.49	331.067 7	1.8	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,124,96	Galloylglucopyranose I ^(G)	A/B
5	1.78	152.056 6	-0.9	C ₅ H ₅ N ₅ O	[M+H] ⁺	152,135,110,80,53	Guanine ^(s)	A/B
6	1.96	136.061 0	-5.4	C ₅ H ₅ N ₅	[M+H] ⁺	136,119,92,77,67,65	Adenine ^(s)	A/B
7	1.97	244.093 9	4.4	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	112,95	Cytidine ^(s)	A/B
8	2.11	331.067 9	2.4	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,125	Galloylglucopyranose II ^(G)	A
9	2.20	137.044 8	-7.1	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	137,119,110,94,82	Hypoxanthine ^(s)	A/B
10	2.23	331.067 0	-0.2	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,124,107	Galloylglucopyranose III ^(G)	A/B
11	2.32	331.068 1	3.1	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,125	Galloylglucopyranose IV ^(G)	A
12	2.98	331.066 9	-0.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,124,107	Galloylglucopyranose V ^(G)	A/B
13	3.38	268.104 0	-0.3	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268,136,119	Adenosine ^{*(s)}	A/B
14	3.58	331.067 2	0.3	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,125	Galloylglucopyranose VI ^(G)	A/B
15	3.68	269.089 6	5.7	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	137,119,110,94	Inosine ^(S)	A/B
16	4.14	331.066 9	-0.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,211,169	Galloylglucopyranose VII ^(G)	A/B
17	4.28	169.014 1	-0.8	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	125,124,109,79,51	Gallie acid ^{*(G)}	A/B
18	4.77	331.066 9	-0.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,211,169	Galloylglucopyranose VIII ^(G)	A
19	4.80	483.078 5	1.1	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	483,331,313,169,125	Digalloylglucopyranose I ^(G)	B
20	4.88	331.066 8	-0.7	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331,271,169,107	Galloylglucopyranose IX ^(G)	A/B
21	5.32	483.078 6	1.2	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	483,331,271,169,125	Digalloylglucopyranose II ^(G)	B
22	5.73	483.078 4	0.7	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	483,331,169	Digalloylglucopyranose III ^(G)	B
23	6.68	483.078 7	1.3	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	483,331,313,169,125	Digalloylglucopyranose IV ^(G)	A/B
24	7.19	153.019 6	1.5	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	109,108,91,81	3,4-Dihydroxybenzoic acid ^{*(G)}	A/B
25	7.30	483.077 9	-0.3	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	483,331,313,271,169,125	Digalloylglucopyranose V ^(G)	A/B
26	7.45	162.055 2	1.7	C ₉ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	162,134,77	Jineol ^(S)	A/B
27	7.97	483.077 5	-1.0	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	483,331,313,169,125	Digalloylglucopyranose VI ^(G)	A
28	8.03	483.077 6	-0.8	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₉	[M-H] ⁻	483,331,271,169,125	Digalloylglucopyranose VII ^(G)	A
29	8.09	242.013 0	5.1	C ₉ H ₇ NO ₅ S	[M+H] ⁺	162,144	Jineol-8-sulfate ^(S)	B
30	8.10	162.055 5	3.6	C ₉ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	162,144,134	Scolosprine A ^(S)	A/B
31	8.33	125.059 6	-0.8	C ₇ H ₈ O ₂	[M+H] ⁺	125,110,77	2-Methoxyphenol ^(S)	A/B
32	8.44	483.078 0	-1.1	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₀	[M+H] ⁺	483,313,271,169,125	Digalloylglucopyranose VIII ^(G)	A/B
33	8.57	483.077 6	-0.9	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₁	[M-H] ⁻	483,313,271,211,169,125	Digalloylglucopyranose IX ^(G)	A/B
34	8.76	635.088 3	-1.0	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,483,465,331,313,169,125	Trigalloylglucopyranose I ^(G)	B
35	8.83	483.077 7	-0.7	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₂	[M-H] ⁻	483,331,271,211,169,125	Digalloylglucopyranose X ^(G)	A/B
36	8.94	483.078 0	-0.6	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₃	[M-H] ⁻	483,331,313,271,169,125	Digalloylglucopyranose XI ^(G)	A/B
37	9.09	483.077 7	-0.6	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₄	[M-H] ⁻	483,331,313,271,169,125	Digalloylglucopyranose XII ^(G)	A/B
38	9.31	635.089 0	-1.5	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,483,465,331,313,169	Trigalloylglucopyranose II ^(G)	B
39	9.33	483.077 6	-0.9	C ₂₀ H ₂₀ O ₂₅	[M-H] ⁻	483,331,313,271,169,125	Digalloylglucopyranose XIII ^(G)	B
40	9.36	321.025 0	-0.5	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	[M-H] ⁻	169,125	Digallic acid ^(G)	A/B
41	9.44	635.089 0	0.0	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,483,465,331,169,125	Trigalloylglucopyranose III ^(G)	A/B
42	9.47	183.029 4	-2.9	C ₈ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	183,124,95,78,	Methyl gallate ^(G)	A/B
43	9.57	217.097 6	1.9	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	144,126	(3S)-1,2,3,4-Tetrahydro-beta-carbo-line-3-carboxylic acid ^(S)	A/B
44	9.89	635.087 9	-1.8	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	483,465,313,169,125	Trigalloylglucopyranose IV ^(G)	A/B

(Continued)

No.	t_R / min	MS ¹ / (m/z)	Error/ ($\times 10^6$)	Formula	Adduct	MS ² / (m/z)	Compound	Source
45	10.07	635.088 2	-1.2	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,465,313,169	Trigalloylglucopyranose V ^(G)	A/B
46	10.23	635.088 1	-1.4	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	483,465,313,169,125	Trigalloylglucopyranose VI ^(G)	A/B
47	10.42	635.088 3	-1.1	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,483,465,313,169,125	Trigalloylglucopyranose VII ^(G)	A/B
48	10.53	635.087 5	-2.3	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,465,313,169,125	Trigalloylglucopyranose VIII ^(G)	A/B
49	10.55	635.087 2	-2.9	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,169,125	Trigalloylglucopyranose IX ^(G)	A
50	10.66	787.098 0	-2.4	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	787,635,313,169	Tetra-O-galloylglucose I ^(G)	A/B
51	10.67	785.083 1	-1.6	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	[M-H] ⁻	785,617,465,169	Di-O-galloyl-HHDP-glucose ^(G)	B
52	10.81	787.097 5	-3.1	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	787,617,465,169	Tetra-O-galloylglucose II ^(G)	A/B
53	10.84	635.088 9	-0.2	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635,465,313,169,125	Trigalloylglucopyranose X ^(G)	A
54	11.23	787.099 2	-1.0	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	787,635,465,295,169	Tetra-O-galloylglucose III ^(G)	A/B
55	11.41	787.097 2	-3.5	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	617,465,313,295,169	Tetra-O-galloylglucose IV ^(G)	A/B
56	11.61	787.098 9	-1.3	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	787,617,465,169	Tetra-O-galloylglucose V ^(G)	B
57	11.62	197.046 1	2.9	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	169,125,124,78	Ethyl gallate ^(G)	A/B
58	11.79	463.088 9	1.5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463,316,271,178	Myricitrin ^(G)	B
59	11.80	167.036 4	8.4	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167,108	Vanillic acid ^(G)	A/B
60	11.82	392.033 6	-1.6	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ Na ₂ O ₇ P	[M+H] ⁺	268,125,124	Adenosine phosphate disodium	B
61	11.86	300.999 1	0.4	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M-H] ⁻	300,283,201,145,129,101	Ellagic acid ^(G)	A/B
62	11.94	939.108 5	-2.6	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	[M-H] ⁻	939,769,617,125	Penta-O-galloylglucose ^(G)	A/B
63	11.95	937.098 5	3.4	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	[M-H] ⁻	937,769,617,507,447,169	Tri-O-galloyl-HHDP-glucose ^(G)	B
64	12.62	1091.121 4	0.8	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	[M-H] ⁻	1091,939,769,617	Hexa-O-galloylglucose ^(G)	A/B
65	13.76	151.041 1	7.0	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	136,151	Vanillin ^(G)	B
66	14.12	164.107 5	3.1	C ₁₀ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	164,122,105	N-acetyl-2-phenylethylamine ^(S)	A/B
67	22.24	199.170 7	2.0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	[M-H] ⁻	199	Lauric acid ^(G)	A/B
68	22.78	347.259 8	1.8	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	[M-H] ⁻	347,303	2-Hydroxy-6-pentadecylbenzoic acid	B
69	23.46	227.202 2	2.6	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	[M+H] ⁺	227	Myristic acid	B
70	24.89	453.337 6	0.5	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	[M-H] ⁻	453	Masticadienolic acid ^(G)	A/B
71	25.03	255.234 1	4.3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255	Palmitic acid ^(G)	A/B
72	25.54	359.316 8	3.4	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	[M+H] ⁺	341,109,57	Glycerylmonostearate ^(S)	A/B
73	27.29	283.265 2	3.5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	[M-H] ⁻	283	Octadecanoic acid	B

*: Confirmed by standards; (G): Galla chinensis; (S): Scolopendra; A: crude drug mixture; B: Heibu Yaogao (ointment)

4 黑布药膏制剂前后鞣质类成分变化分析

从表1中得出, 本实验指认出原料药混合物中32个、黑布药膏中34个鞣质类化合物, 而共有的鞣质类成分仅有25种, 所以制剂前后的差异成分主要集中在鞣质类化合物。

黑布药膏中的鞣质类成分包括没食子鞣质类与鞣花鞣质类化合物, 可以被酸、碱或酶催化水解。研究表明^[12-13], 高相对分子质量的没食子鞣质在体内、外的低酸性环境中发生不完全水解, 产生低相对分子质量的三-O-没食子酰基葡萄糖与四-O-没食子酰基葡萄糖, 从图1可以看出, 制剂后二者的峰强度相对增加, 含量上升, 与报道一致。与更

小分子的鞣质相比, 此类鞣质具有较低的极性, 亲脂性更强, 有利于透过皮肤屏障发挥药效^[14]; 同时具有更强的抗氧化活性与蛋白质沉淀能力^[15], 对氧自由基诱发的生物大分子损伤具有保护作用, 也可以凝固皮肤、黏膜、伤口处的组织蛋白, 形成一层薄膜保护创面, 发挥收敛止血的药效^[16]。

本实验还在黑布药膏中鉴别出了两种新的鞣花鞣质, 即二没食子酰基-六羟基联苯葡萄糖与三没食子酰基-六羟基联苯葡萄糖, 此类鞣质具有较强的抗炎、抗菌、抗氧化活性^[17]。据报道^[18], 鞣花鞣质可能来自于五-O-没食子酰基葡萄糖的降解, 没食子酰残基和葡萄糖分子之间通过氧化形成

HHDP结构,这是鞣花鞣质的基本单元。

在制剂过程中,黑醋提供的酸性环境使结构复杂的大分子鞣质发生水解,因为没食子酸之间的化学键比核心酯键更容易断裂^[19],所以首先聚没食子酰基发生水解,而后与中心多元醇连接的没食子酰基逐步水解,生成没食子酸与较为稳定的小分子鞣质(图9);五-O-没食子酰基葡萄糖发

生分子内的酚氧化偶联,与糖核相连的没食子酰基单元之间形成C-C联芳基,生成具有HHDP结构的鞣花鞣质(图10)。研究证实^[20],在不完全水解过程中,鞣质混合物的体外抗氧化能力增强;同时制剂的热处理过程进一步促进了鞣质水解,有效提高了其抗氧化和抗菌活性^[21],为制剂工艺的合理性提供了有益依据。

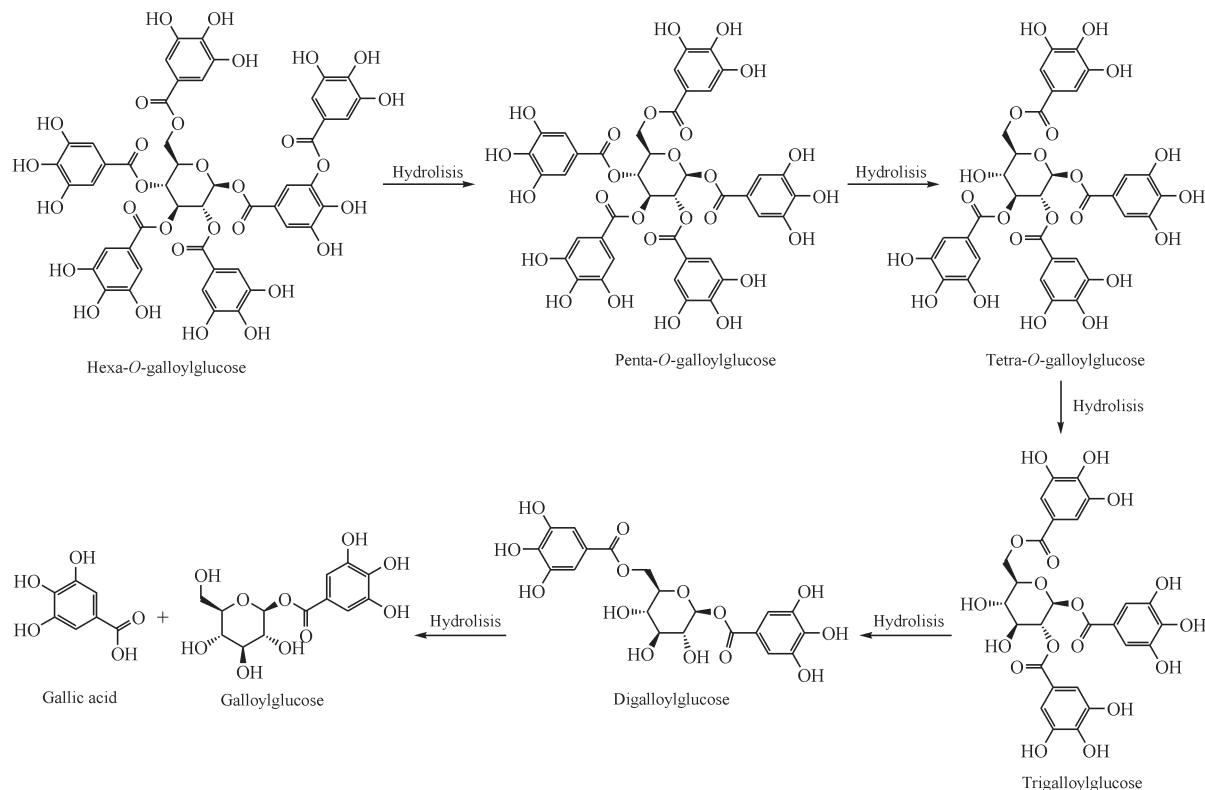


Figure 9 Hypothetical scheme of gallotannins

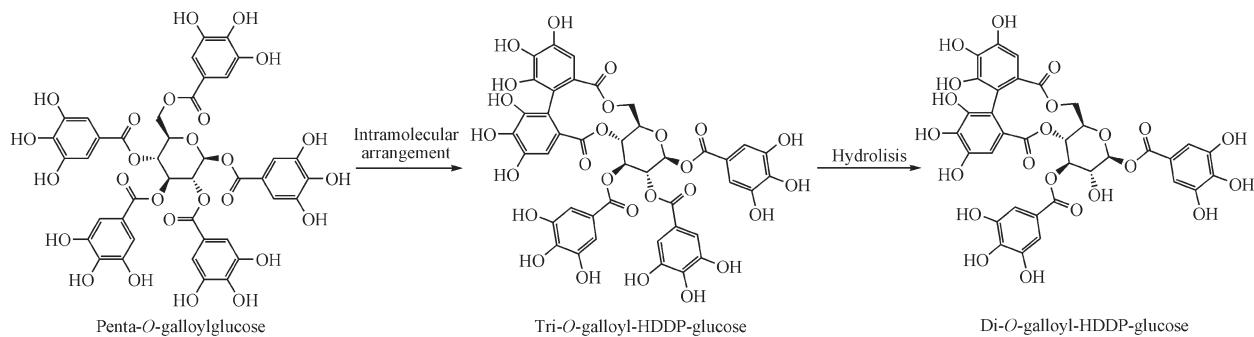


Figure 10 Hypothetical scheme of ellagittannins production from penta-O-galloylglucose

5 讨论

瘢痕疙瘩是继发于皮肤创伤或自发形成的过度生长的异常瘢痕组织,是内在湿热与外在毒邪搏结,气机阻碍,血行瘀滞的结果^[22]。黑布药膏中

五倍子敛汗止血、收湿敛疮,其味酸、涩、寒,为君药;蜈蚣通络止痛、攻毒散结,其味辛温,是为臣药;冰片促渗镇痛,黑醋软坚解毒,二者同为佐药;蜂蜜调和诸药,生肌敛疮,是为使药,五药合用破

疗软坚,配伍精妙,疗效确切。长期临床实践已证明,黑布药膏对瘢痕疙瘩、疖痈初期、乳头状皮炎等具有良好的治疗效果。君药五倍子中的主要有效成分有鞣质类、酚酸类、有机酸类化合物,具有抗氧化、抗菌的药理作用,且鞣质可以与伤口处的蛋白质、生物碱、多糖类化合物结合^[23],收敛伤口;佐药蜈蚣具有人体需要的多种营养成分如核苷类、氨基酸类化合物^[24],如腺苷可以促进真皮层胶原蛋白与皮下脂肪的生成,改善皮肤粗糙干燥与色素沉着^[25]。两药加冰片、黑醋和蜂蜜经加热制成膏剂后鞣质类化合物发生酸水解反应,产物的相对分子质量变小,其抗菌、抗氧化的作用进一步增强^[26]。冰片作为良好的促渗剂,可以干扰脂质双分子层、诱导水通道形成以促进药物渗透^[27];黑醋和蜂蜜作为基质,具有防腐的作用,同时使软膏具有一定的黏稠度,不仅便于涂布,还可以保持皮肤和黏膜湿润,防止伤口恶化和纤维化^[28]。现代研究认为 pH 影响皮肤屏障功能、脂质合成与聚集、表皮分化与脱落^[29],在煎煮过程中,黑醋中的乙酸成分虽有一定的挥发损失,但制剂后新生成了 16 个化学成分,且有机酸含量相对增加,使制剂刺激性减弱的同时保证了合适的酸度,另外,肉豆蔻酸与棕榈酸具有协同抑菌抗炎的作用^[30];漆树酸可以杀菌抗炎、抗氧化损伤^[31],杨梅苷具有抗氧化、抗病毒、抑菌、镇痛抗炎活性^[32],使制剂的有效性进一步提升。本研究系统分析了黑布药膏原料及制剂中所含的化学成分及其在制备过程中的变化,为深入阐明黑布药膏药效物质基础和后续的质量标准提升研究提供了有益参考。

References

- [1] Liu QW, Wang SD, Chen J, et al. The treatment for keloid with TCM [J]. *Dermatol Bull* (皮肤科学通报), 2017, **34**(6): 656-661.
- [2] Cao W, Qu JH. Experience of *Zhao Bing'nan Heibu* ointment in treating keloid [J]. *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医药), 2019, **38**(10): 956-958.
- [3] Xie J, Wu JK. Brief investigation of pharmacological mechanism by main components in *Heibu* ointment [J]. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2016, **10**(20): 271-272.
- [4] Cao GY, Geng SX, Luo Y, et al. The rapid identification of chemical constituents in *Fufang Xiling Jiedu* capsule, a modern Chinese medicine, by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry and data mining strategy [J]. *J Sep Sci*, 2021, **44**(9): 1815-1823.
- [5] Liu KX, Li N, Yin YH, et al. An in-house database-driven untargeted identification strategy for deep profiling of chemicalome in Chinese medicinal formula [J]. *J Chromatogr A*, 2022, **1666**: 462862.
- [6] Maugeri A, Lombardo GE, Cirmi S, et al. Pharmacology and toxicology of tannins [J]. *Arch Toxicol*, 2022, **96**(5): 1257-1277.
- [7] Enomoto H. Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging [J]. *Curr Res Food Sci*, 2021, **4**: 821-828.
- [8] Valanciene E, Jonuskiene I, Syrpas M, et al. Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(6): 874.
- [9] Akande T, Khatib M, Ola Salawu S, et al. ¹H NMR and HPLC-DAD-MS for the characterization of ellagitannins and triterpenoids of less investigated *Anogeissus leiocarpus* DC (Combretaceae) stem bark [J]. *Food Chem*, 2022, **375**: 131813.
- [10] Zhang Y, Dong WT, Huo JH, et al. Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, **48**(2): 252-262.
- [11] Zhang QQ, Feng Y, Li CH, et al. Rapid identification of phthalides and organic acids in *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. *China Pharm* (中国药房), 2022, **33**(5): 579-585, 591.
- [12] Kiss AK, Piwowarski JP. Ellagitannins, gallotannins and their metabolites- the contribution to the anti-inflammatory effect of food products and medicinal plants [J]. *Curr Med Chem*, 2018, **25**(37): 4946-4967.
- [13] Barnes RC, Krenek KA, Meibohm B, et al. Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and *in vitro* hydrolysis of gallotannins in physiological conditions [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, **60**(3): 542-550.
- [14] Virtanen V, Karonen M. Partition coefficients ($\log P$) of hydrolysable tannins [J]. *Molecules*, 2020, **25**(16): 3691.
- [15] Watrelot AA, Le Guernevé C, Hallé H, et al. Multimethod approach for extensive characterization of gallnut tannin extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, **68**(47): 13426-13438.
- [16] Engström MT, Virtanen V, Salminen JP. Influence of the hydrolyzable tannin structure on the characteristics of insoluble hydrolyzable tannin-protein complexes [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(41): 13036-13048.
- [17] Banc R, Rusu ME, Filip L, et al. The impact of ellagitannins and their metabolites through gut microbiome on the gut health and brain wellness within the gut-brain axis [J]. *Foods*, 2023, **12**(2): 270.
- [18] Chávez-González ML, Guyot S, Rodríguez-Herrera R, et al. Exploring the degradation of gallotannins catalyzed by tannase produced by *Aspergillus niger* GH1 for ellagic acid production

- in submerged and solid-state fermentation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, **185**(2):476-483.
- [19] He HF. Recognition of gallotannins and the physiological activities: from chemical view [J]. *Front Nutr*, 2022, **9**:88892.
- [20] Chambi F, Chirinos R, Pedreschi R, et al. Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from Tara (*Caesalpinia spinosa*) pods [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, **47**:168-175.
- [21] Kim TJ, Silva JL, Kim MK, et al. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing [J]. *Food Chem*, 2010, **118**(3):740-746.
- [22] Wang SX. Clinical observation on the treatment of hypertrophic scar with *Heibao* ointment(黑布药膏治疗增生性瘢痕的临床观察) [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2009.
- [23] Liang Z, Xu Q, Zhang Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Galla chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2022, **53**(18):5908-5919.
- [24] Ji LL, Lv SW, Yang ZX. Research progress of chemical constituents and pharmacological action of centipede [J]. *Special Wild Econ Animal Plant Res*(特产研究), 2020, **42**(4):75-84.
- [25] Marucci G, Buccioni M, Varlaro V, et al. The possible role of the nucleoside adenosine in countering skin aging: a review [J]. *Biofactors*, 2022, **48**(5):1027-1035.
- [26] Zhang YY, Cai SB, Ma S, et al. Water caltrop (*Trapa quadrispi-*
nosa roxb.) husk improves oxidative stress and postprandial blood glucose in diabetes: phenolic profiles, antioxidant activities and α -glycosidase inhibition of different fractions with *in vitro* and *in silico* analyses [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, **11**(10):1873.
- [27] Xiao SS, Yu H, Xie YF, et al. The anti-inflammatory potential of *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl essential oil *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **267**:113516.
- [28] Almasaudi S. The antibacterial activities of honey [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, **28**(4):2188-2196.
- [29] Burian M, Wolz C, Yazdi AS. Transcriptional adaptation of staphylococci during colonization of the authentic human environment: an overview of transcriptomic changes and their relationship to physiological conditions [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, **12**:1062329.
- [30] Prasath KG, Alexpandi R, Parusuraman R, et al. Anti-inflammatory potential of myristic acid and palmitic acid synergism against systemic candidiasis in *Danio rerio* (Zebrafish) [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, **133**:111043.
- [31] Saedtler M, Förstig N, Ohlsen K, et al. Antibacterial anacardic acid derivatives [J]. *ACS Infect Dis*, 2020, **6**(7):1674-1685.
- [32] Xu C, Liu YL, Gao ZW, et al. Pharmacological activities of myricetin and its glycosides [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2020, **45**(15):3575-3583.

·征订启事·

欢迎订阅2023年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由中华人民共和国教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2020年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD核心)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2022年,《中国药科大学学报》被评为中国高校百佳科技期刊,2021年被评为华东地区优秀期刊。根据中国知网《中国学术期刊影响因子年报》的数据显示:《中国药科大学学报》2022年最新复合影响因子达到1.138,在药学期刊界的学术声誉和影响力持续不断攀升,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定 价:40元/期,全年240元

地 址:南京市童家巷24号

邮 政 编 码:210009

电 话:025-83271566

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

<http://zgykdxzb.cpu.edu.cn>