

## 基于UPLC-Q/TOF-MS技术的治咳川贝枇杷滴丸在家兔体内的定性定量研究

胡雪岩<sup>1</sup>, 程丹丹<sup>2</sup>, 侯媛媛<sup>1\*</sup>, 白 钢<sup>1</sup>

1. 南开大学药学院, 天津 300353

2. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** **目的** 对舌下含服和口服给予家兔治咳川贝枇杷滴丸(CBPP)后的入血成分进行定性和定量研究,旨在明确CBPP的药效物质基础,比较两种给药方式的差异。**方法** UPLC-Q/TOF-MS法采用Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.05%甲酸水(B),梯度洗脱,体积流量为0.4 mL/min;质谱采用正、负离子扫描,扫描范围m/z 50~1500。舌下含服和口服两种给药方式分别给予家兔CBPP(200 mg/kg),给药后于不同时间点耳缘静脉取血0.5 mL,分离血浆,UPLC-Q/TOF-MS结合多元统计分析方法用于区分不同血浆样本,旨在寻找对分组贡献率较大的生物标志物(Marker)即为潜在的入血成分,并通过对其峰面积进行积分比较了两种给药方式下的相对含量。**结果** 在舌下含服和口服给药下的血浆中共解析出6种入血成分,定量结果表明该6种成分在体内达到最高值的时间均在1 h以内,且在各个时间点下舌下含服的血药浓度均大于口服给药。**结论** 从药效物质基础层面证明了舌下含服优于口服给药,为CBPP的进一步临床应用与发展提供依据。

**关键词:** 治咳川贝枇杷滴丸; UPLC-Q/TOF-MS; 入血成分; 舌下含服; 口服

**中图分类号:** R949 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 01-0105-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.015

## Qualitative and quantitative analysis in rabbit after oral and sublingual administration of Zhikechuanbeipipa dropping pills by UPLC-Q/TOF-MS

HU Xueyan<sup>1</sup>, CHENG Dandan<sup>2</sup>, HOU Yuanyuan<sup>1</sup>, BAI Gang<sup>1</sup>

1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300353, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To carry out the qualitative and quantitative analysis of the components in plasma after oral and sublingual administration of Zhikechuanbeipipa dropping pills (CBPP). **Methods** An Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with 0.05% formic acid aqueous solution-acetonitrile as mobile phases by gradient elution. The metabolites were detected by electrospray ion (ESI) source in both positive and negative mode mode. Rabbits were dosed with CBPP (200 mg/kg) by oral and sublingual administration Blood samples of 0.4 mL were taken from auricular vein at different time points and plasma components and contents were determined by UPLC-Q/TOF-MS. **Results** A total of 6 components were identified in rabbit plasma, and the peak areas of all the 6 components in sublingual administration were higher than oral administration. **Conclusion** Sublingual administration is better than oral administration based on the material basis of CBPP, which will provide a basis for further clinical application and development of CBPP.

**Key words:** CBPP; UPLC-Q/TOF-MS; metabolites; sublingual administration; oral administration

治咳川贝枇杷滴丸(CBPP)由枇杷叶、川贝母、桔梗、水半夏的提取物加薄荷脑精制而成,根据中医药理论体系中的配伍原则和用药规律,枇杷叶为CBPP的君药,川贝母和桔梗属于CBPP的臣药,水

半夏和薄荷脑分别为佐药和使药。CBPP是以现代分离提取技术对有效成分精制而成的现代滴丸制剂,具有宣肺降气、清热化痰等功效。目前,对于CBPP的研究主要围绕其药物疗效<sup>[1-4]</sup>、化学物质组

收稿日期: 2018-05-29

\*通信作者: 侯媛媛,女,博士,副教授,主要从事复方药物与系统生物学研究。Tel: (022) 23506930 E-mail: houyy@nankai.edu.cn

成<sup>[5-6]</sup>和药理活性<sup>[7-8]</sup>等方面,但对于其在体内代谢、生物利用度和药动学等方面的研究还是未知,同时没有确定最佳的给药方式,即哪种给药方式更能提高CBPP的生物利用度。因此利用药物分析及药物代谢的研究方法,对该复方在不同给药方式下的定性和定量研究是十分必要的。

本实验建立了超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q/TOF-MS)结合多元统计分析(multivariate statistical analysis, MSA)的研究方法,对舌下含服和口服给药方式下的不同血浆样本进行分析,寻找CBPP在家兔体内的入血成分,同时对其进行相对定量分析,比较两种给药方式下入血成分在血中量的差异,为CBPP选择更好的服用方法提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验仪器** UPLC/Q-TOF-MS (ACQUITY UPLC I-Class / UPCC / M-Class / SYNAPT G2-SI, Waters公司,美国);色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); MIKRO 220R 高速冷冻离心机(Hettich,德国);氮气吹干仪(恒奥科技发展有限公司,中国);旋涡混匀器(IKA,德国);HU3120B 超声波仪(恒奥科技发展有限公司,中国);分析天平(Mettler Toledo公司,瑞士);负压采血管和采血针(江苏海门有限公司,中国);Milli-Q超纯水仪(MILLIPORE,美国)。

**1.1.2 药品和试剂** 治咳川贝枇杷滴丸由天津中新药业第六中药厂提供。色谱纯乙腈、甲醇(Fisher,美国);色谱纯甲酸(Acros,比利时);超纯水由Milli-Q制备。

**1.1.3 实验动物** 家兔6只,雌雄不限,体质量为(2.5±0.25)kg,由北京市海淀区兴隆实验动物养殖场提供,动物许可证编号:SCXK(京)2016-0003。饲养条件为:温度20~22℃,湿度(50±10)%,12 h的光照周期,可自由采食和饮水。分笼饲养,每笼1只,所有家兔在正式实验开始前适应性饲养1周左右,并需在实验开始前12 h内禁食不禁水。所有动物实验操作得到南开大学动物伦理委员会(中国天津)批准,并按照国家相关部门的指导方针进行。

### 1.2 色谱和质谱条件

色谱条件:流动相A为乙腈,流动相B为0.05%甲酸Milli-Q水,梯度程序见表1;体积流量0.4 mL/min;柱温35℃;进样量5 μL。

Waters Q-TOF Premier 配备ESI源,利用正负模

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution

t / min	体积流量/(mL·min <sup>-1</sup> )	乙腈/%	0.05% 甲酸水溶液/%
0	0.4	2	98
13	0.4	30	70
16	0.4	50	50
25	0.4	80	20
28	0.4	100	0
30	0.4	100	0
32	0.4	2	98
34	0.4	2	98

式精确分子量的测定和二级质谱数据。各参数分别为:电喷雾离子源为V模式;毛细管电压为负离子模式2.5 kV、正离子模式3.0 kV;锥孔电压为负离子模式25 V,正离子模式30 V;离子源温度105℃;脱溶剂气温度300℃;脱溶剂氮气流量650 L/h;锥孔气流量50 L/h;检测器电压1 900 V;采样频率0.1 s,间隔0.02 s;质量数检测范围150~1 500;Lockmass采用LEA ([M-H]<sup>-</sup>=553.2775; [M+H]<sup>+</sup>=555.2931),LEA质量浓度为200 ng/mL,体积流量设定为0.2 μL/min。质谱扫描范围100~1 500。在MS<sup>E</sup>模式下,碰撞能量设置为30~50 eV。使用Waters MassLynx™ v4.1软件进行数据采集和分析。

### 1.3 给药方案与血液采集

家兔分为舌下给药与口服给药两组,给药前禁食不禁水12 h。根据成人的给药剂量并按照成人和家兔的体表面积比折算成家兔的等效给药剂量,即为200 mg/kg,并按照以下时间点于耳缘静脉采集血液:0.5、1、1.5、2 h,每个时间点采血约0.5 mL。

**1.3.1 舌下给药** 固定好家兔,用适量乙醚浸润的棉花麻醉家兔5 min后,固定其头部并使头向上仰,用中间开口直径0.6 cm小孔的木棍压住兔子的左右齿槽间隙,用小镊子控制舌部,将滴丸放置至其下方,全程控制好家兔头部和下颚的方向以减少药物的流失。

**1.3.2 口服给药** 固定好家兔,固定头部并使头向上仰,用中间开口直径0.6 cm小孔的木棍压住兔子的左右齿槽间隙,压住舌部,用人用导尿管作胃管,经开口器小孔插入,经咽徐徐插入胃中。把药物碾成粉末状,与温水混匀后置注射器中,下连软管经家兔口腔把药物灌服到胃中。投药完毕后,用少量温清水冲洗药物,再用手堵住胃管的体外端,将兔子头部放低,并折住胃管慢慢拔出,取下开口器,放

回兔子即可。

#### 1.4 血浆样品前处理

血样采集后,以 3 500~4 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,-20℃保存,待测;将冷冻保存的血浆取出自然解冻,离心 5 min 后取上清。

沉淀蛋白(有机溶剂沉淀法):精密量取肝素抗凝的家兔血浆 200 μL,加甲醇 600 mL,涡旋提取 3 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 50℃水浴用氮气流吹干。用 200 μL 50% 甲醇水溶液复溶,涡旋提取 3 min,13 000 r/min 离心 10 min,残渣加流动相溶解后进样 5 μL。

#### 1.5 数据处理分析

为了区分家兔不同血浆样本之间的差异,本实验采用 UPLC-Q/TOF-MS 结合 MSA 方法对正离子和负离子模式下的质谱数据进行综合分析,使用 MassLynx 软件对 Marker 成分进行解析。定性分析主要通过保留时间、一级和二级质谱离子并结合标准品验证或文献调研等方式进行,并通过互联网在线数据库进行进一步研究,数据库包括 Mass Bank (<http://www.massbank.jp/>) 或人类代谢数据库(HMDB, <http://www.hmdb.ca/>)等。定量分析主要通过入血成分的色谱峰面积进行积分从而进行初步的定量研究。

#### 1.6 相对定量分析

在没有对照品的情况下,通过对峰面积进行积分从而实现目标物质的相对定量分析。具体步骤为分别对目标物质进行提取离子流操作,即在总离子流图谱中提取目标物质的相对分子质量以尽可能减小其他离子的干扰。依据此方法对不同时间点下的 Marker 成分进行相对定量分析,同时比较了舌下和口服给药血浆的差异。

## 2 实验结果

### 2.1 定性分析结果

正离子模式下的分析结果显示舌下给药和口服给药方式下的不同血浆样本没有显著性差异,而在负离子模式下二者却有显著差异。如图 1(a)得分图所示,家兔的不同血浆样本被明显分成两组,舌下给药血浆样本(绿色)聚集成一组,而口服给药血浆样品(蓝色)聚集成另一组。载荷图是一种呈现潜在生物标志物的直观方式,其中的每一点表示保留时间和质荷比的变量,其距离中心的远近代表了对分组的贡献率(VIP),偏离中心点越远则代表其在不同组间的变化越大。如图 1(b)载荷图所示,清晰地观察到 VIP 相对较大的离散点,通过对这些离散点逐一进行分析,共找出 6 种潜在的 Marker 成分。

基于 UPLC-Q/TOF-MS 结合 MSA 方法的分析结果,可以全面、灵敏且有效地找出不同血浆样本的差异性成分。图 2 显示了家兔在给予 CBPP 前后不同血浆样本在负离子模式下的基峰色谱图(BPI)。下图从上至下依次为同一质谱响应值下的空白血浆(A),舌下给药血浆(B)和口服给药血浆(C)的 BPI 谱图。

如图 2 所示,6 种入血成分在空白血浆中没有或有极低的质谱响应,而在舌下含服和口服给药血浆中却有不同程度的响应。使用 MassLynx 软件对 6 种入血成分进行解析,并通过同对照品对比、文献或在线数据库调研等方法从而完成对 Marker 的定性分析,相关的数据库主要包括 ChemSpider 数据库 (<http://www.chemspider.com>), Mass Bank (<http://www.massbank.jp/>), 或人类代谢数据库(HMDB, <http://www.hmdb.ca/>)等。以 pingpeimine C 为例介

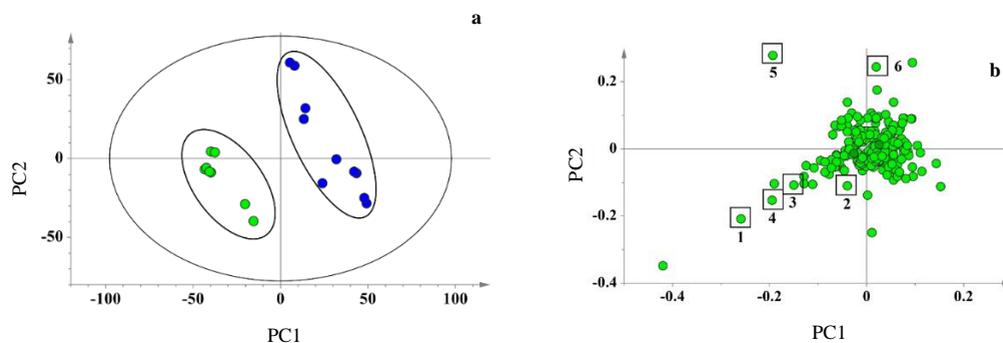


图 1 家兔舌下给药血浆和口服给药血浆 UPLC-Q/TOF-MS 结合 MSA 分析的得分图(a)和载荷图(b)

Fig. 1 Score-loading plots of the various rabbit plasma samples after sublingual and oral administration of CBPP by UPLC-Q/TOF-MS in negative ESI (electrospray ionization) mode. (a) Score plots (b) Loading plots

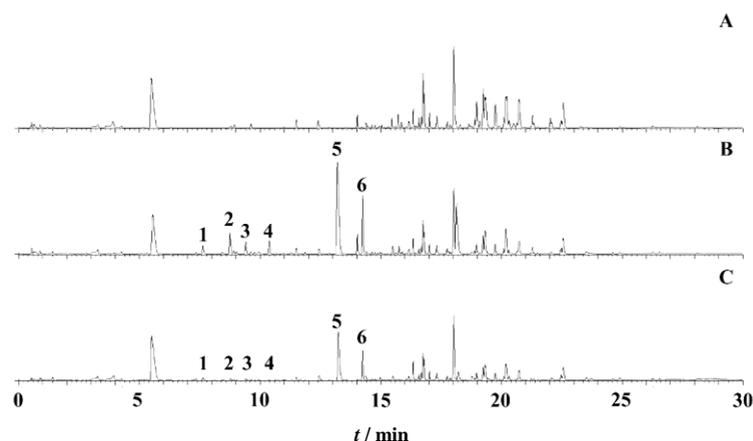


图2 给予CBPP前后家兔空白血浆(A)、舌下给药血浆(B)和口服给药血浆(C)的基峰色谱图

Fig. 2 BPI chromatograms in negative ion mode of (A) blank plasma; (B) plasma after sublingual administration of CBPP and (C) plasma after oral administration of CBPP

绍Marker成分的解析过。该Marker的保留时间为14.24 min,一级质谱离子为 $m/z$  476,二级质谱数据推测其可能的裂解规律为失去一分子甲基变为 $m/z$  461, $m/z$  461失去一分子 $\text{CH}_2\text{O}$ 变为 $m/z$  431,继续失去两个氧原子变为 $m/z$  399。此外还结合在线数据库和文献调研等方式对其进行分析,推测该Marker成分的分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_6$ ,将其解析为pingpeimine C,来源于川贝母。

6种入血成分的质谱解析结果如表2所示,其分别为来源于桔梗的apigenin-7-glucoside和luteolin-7-glucoside;来源于川贝母的pingbeinine、regalosite A和pingpeimine C以及来源于枇杷叶的kaempferol-3-glucoside。6种入血成分的质谱图及

结构如图3所示。

## 2.2 定量分析结果

图4为舌下含服和口服两种给药方式下6种入血成分在0~120 min期间峰面积的变化趋势图。由图可知:(1)6种成分在体内达到最高值的时间均在1 h以内,相较于口服给药,舌下含服趋势图在0~30 min内的斜率较大,说明舌下含服的起效较快;(2)舌下含服的时间曲线下面积大于口服给药,说明舌下含服的生物利用度优于口服给药;(3)在120 min时,6种入血成分在口服给药方式下的峰面积接近于0,而舌下含服的峰面积仍能维持相对较高的水平,说明舌下含服后6种入血成分在120 min时仍有较高的血药浓度,作用时间较长。综上所述

表2 6种Marker成分的质谱解析结果

Table 2 Q/TOF-MS spectrum analysis results of six markers

编号	t/min	标志物离子	入血成分分子式	实测相对分子质量	理论相对分子质量	误差	质谱模式	化合物名称	质谱离子	来源
1	7.63	251.0965	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	432.1045	432.1056	-2.5	Negative	apigenin-7-glucoside	431.0967, 319.0630, 304.9109, 242.9450	桔梗
2	8.74		$\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{NO}_3$	445.3579	445.3556	5.1	Negative	pingbeinine	444.3501, 351.0380, 335.0205, 304.9567	川贝母
3	9.31	347.1716	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	448.0993	448.1006	-2.9	Negative	luteolin-7-glucoside	447.0915, 415.1582, 304.9158, 242.9447	桔梗
4	10.29		$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	448.0981	448.1006	-5.5	Negative	kaempferol-3-glucoside	447.0903, 415.1579, 304.9151, 242.9443	枇杷叶
5	13.20	235.0993	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	400.1389	400.1369	5.0	Negative	regalosite A	399.1311, 375.0182, 365.0689, 303.0891	川贝母
6	14.24	331.1778	$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_6$	477.3079	477.3090	-2.3	Negative	pingpeimine C	476.3001, 461.1237, 431.0995, 399.1644	川贝母

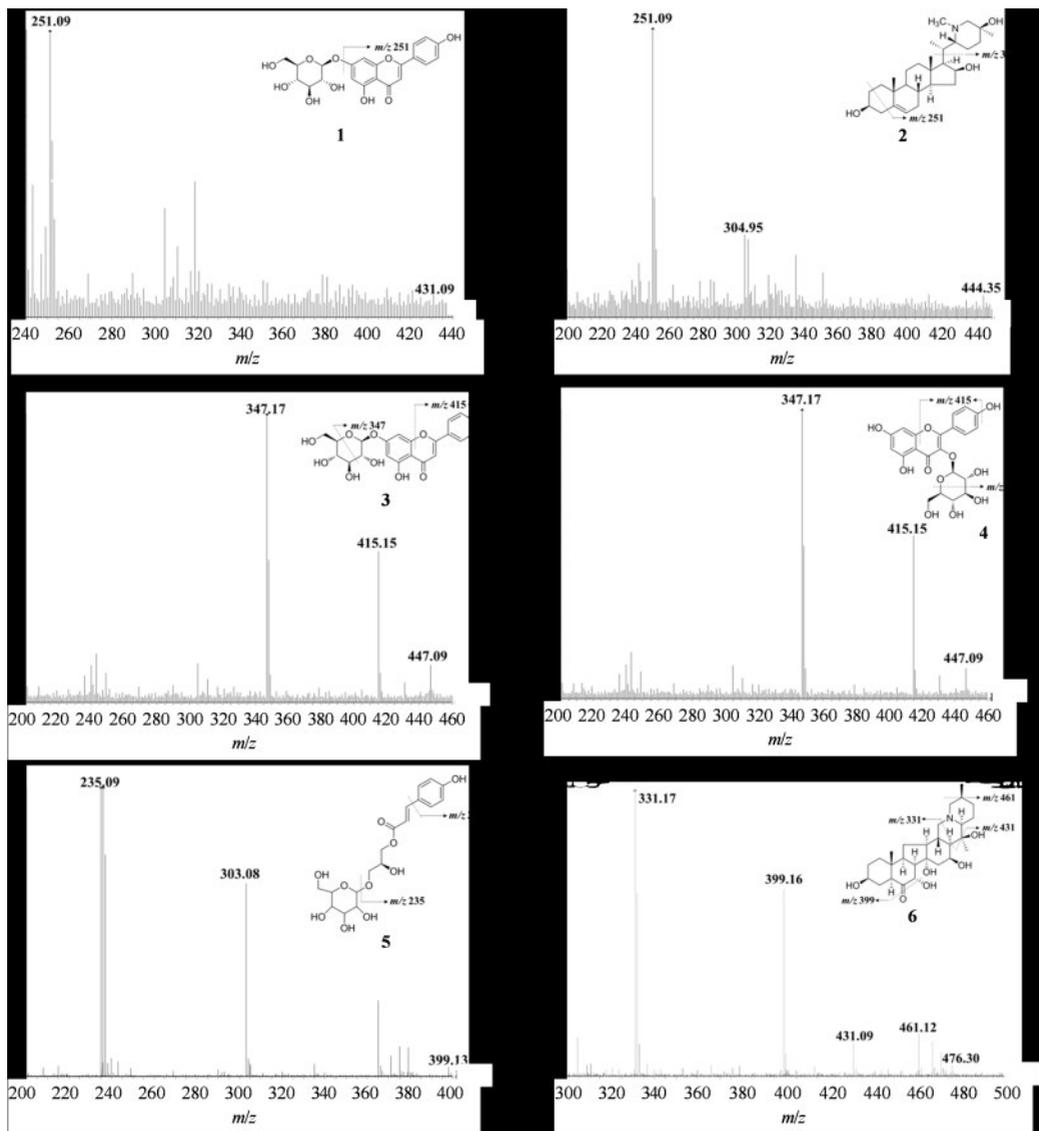


图3 6种Marker成分的质谱图和化学结构

Fig. 3 Q/TOF-MS spectrum of six markers and their chemical structures.

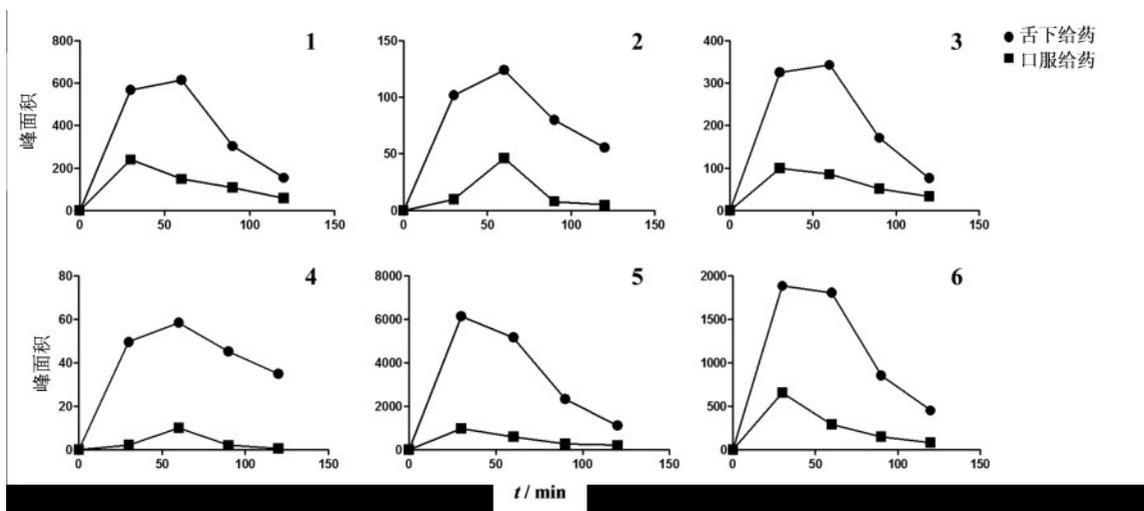


图4 6种入血成分峰面积-时间的变化趋势图

Fig. 4 Line charts of the peak area of six compounds in plasma from 0 min to 120 min

述,舌下含服优于口服给药方式。

### 3 讨论

本文基于UPLC-Q/TOF-MS结合MSA方法对舌下含服和口服两种给药方式下CBPP在家兔体内的入血成分进行定性分析,阐明了CBPP的体内药效物质基础。结果显示6种Marker成分分别来源于君药枇杷叶、臣药川贝母和佐药桔梗,该结果符合中医药理论体系中配伍原则和用药规律。其中,pingpeimine C作为贝母中的主要成分,据报道,其可作为鉴别松贝母、青贝母等不同品种贝母的潜在Marker成分,从而实现中药贝母的质量控制<sup>[9]</sup>。此外,本文对两种给药方式下的入血成分进行了定量研究,比较了两种给药方式下入血成分在血中量的差异,结果显示6种入血成分在不同时间点下始终呈现舌下含服大于口服给药的趋势,这可能是由于舌下含服具有吸收迅速、避免首过效应等优势<sup>[10-11]</sup>。

本文结合家兔体内入血成分的定性和定量分析结果,从药效物质基础的层面阐明了CBPP在舌下含服给药方式下的生物利用度大于口服给药,证明了舌下含服给药方式更利于CBPP药效的发挥。这为CBPP在临床最佳用药方式的选择上提供了药效物质基础层面的解释,为CBPP选择最佳的服用方法提供依据,有助于其进一步临床应用与发展。

### 参考文献

- [1] 侯媛媛,李若洁,程彬峰. 治咳川贝枇杷滴丸镇咳平喘作用研究[J]. 药物评价研究, 2010, 33(03): 194-197.
- [2] 任莹利,明红霞,杨延停,等. 治咳川贝枇杷滴丸体外抗单纯疱疹病毒I型的作用[J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(4): 467-470.
- [3] 肖凡,李楠. 治咳川贝枇杷滴丸对慢性阻塞性肺病急性加重期患者的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 210-213.
- [4] Ling Z R, Xing C Y, Chao C J. Study on the Pharmacodynamic of ChuanBeiPipa Confection[J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2004, 10(5): 24-26.
- [5] Yi L, Gang B, Guo L, et al. UPLC / Q-TOF-MS fingerprint investigations of Zhikechuanbeipipa dropping pills [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(11): 1940-1943.
- [6] Wei Y, Xin Q, Jia W, et al. Quality Control of ZhikeChuanbeipipa Dropping Pills and Determination of Volatile Components [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2013, 44(9): 878-882.
- [7] Dong L Y, Luo Y, Cheng B F, et al. Bioactivity-integrated ultra-performance liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the identification of nuclear factor-B inhibitors and (2) adrenergic receptor agonists in Chinese medicinal preparation Chuanbeipipa dropping pills [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(8): 960-967.
- [8] Hong Y, Lu X, Meng-Ge Z, et al. Network pharmacological research of volatile oil from ZhikeChuanbeiPipaDropping Pills in treatment of airway inflammation [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2011, 43(6): 1129-1135.
- [9] Li Y, Zhang L, Wu H, et al. Metabolomic study to discriminate the different Bulbus fritillariae species using rapid resolution liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled with multivariate statistical analysis [J]. Anal Meth, 2014, 6(7): 2247.
- [10] 白淑琴,刘玉萍. 合理用药的分析[J]. 中国社区医师(医学专业), 2012, 14(08): 27.
- [11] 梁硕,李超英. 舌下给药研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(06): 1309-1311.