

当归芍药散含药血浆 UPLC-UV 指纹图谱研究

李国强, 王运来, 周敏, 刘浩坤, 姚瑶, 潘永福, 方庆, 许钊*

安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

摘要: **目的** 建立当归芍药散含药血浆指纹图谱并分析给药后血中移行成分。**方法** 大鼠 ig 给予当归芍药散提取液, 制备 11 组含药血浆, 采用超高效液相色谱-紫外 (UPLC-UV) 法构建 11 组当归芍药散含药血浆的指纹图谱, 运用指纹图谱参数共有峰、相似度进行分析。超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q/TOF-MS) 法分析大鼠 ig 当归芍药散后血中移行成分。**结果** 建立了当归芍药散含药血浆指纹图谱, 通过对含药血浆、空白血浆图谱进行比对, 指定了 15 个共有峰, 相似度在 0.933 以上。初步鉴定了当归芍药散入血的 15 个成分, 其中原型成分 10 个和代谢产物 5 个。**结论** 当归芍药散含药血浆指纹图谱研究为进一步血中移行成分的研究提供了基础。

关键词: 当归芍药散; 含药血浆指纹图谱; 血浆药物化学; 超高效液相色谱-紫外法; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱; 移行成分

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)19-4017-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.018

Studies on plasma fingerprint of Danggui Shaoyao Powder by UPLC-UV

LI Guo-qiang, WANG Yun-lai, ZHOU Min, LIU Hao-kun, YAO Yao, PAN Yong-fu, FANG Qing, XU Fan

School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: **Objective** To establish the plasma fingerprint of Danggui Shaoyao Powder (DSP) for the analysis of the transitional components in rat plasma after administration of DSP extracts **Methods** Eleven batches of rat plasma were prepared after oral administration and the plasma fingerprint was established by UPLC-UV. The transitional components in rat plasma after administration of DSP extracts was analyzed by UPLC-Q/TOF-MS. **Results** The plasma fingerprints of common peaks for 11 batches of DSP were established to ascertain the optimized blood collection time, and the method was used to process the plasma. Fifteen common peaks were detected in plasma fingerprint, and the similarity were both higher than 0.933. The methodology of plasma pharmacochromy was adopted to analyze the common peaks, and 15 transitional components, including 10 prototype components and five metabolites were identified. **Conclusion** The established plasma fingerprint of DSP provide the basis for the further study of transitional components.

Key words: Danggui Shaoyao Powder; plasma fingerprint; plasma pharmacochromy; UPLC-UV; UPLC-Q/TOF-MS; transitional components

目前, 中药现代化研究的主要方向之一是从整体层面上揭示中药作用特点, 单一的化学成分研究不能反映中药的多成分整体作用特点; 此外, 基于血清药物化学概念, 只有吸收入血的成分才有可能其药效成分, 也即血中移行成分, 移行成分可能是原型成分, 也可能是其代谢产物。因此, 对于中药药效物质基础的研究对象应集中在中药被吸收入血后的含药血清或血浆上面^[1-2]。近年来发展迅速的中药指纹图谱能够反映中药所含成分的数量和种

类, 其整体性和模糊性能够较为全面表征中药的整体特点, 对评价中药整体质量、物质组成具有不可替代的作用^[3-4]。基于血清药物化学理论的中药血清/血浆指纹图谱研究通过比较中药提取物化学指纹图谱和生物体液指纹图谱, 能够发现中药原型成分及代谢产物, 对表征中药体内药效物质具有重要意义。当归芍药散由当归、芍药、川芎、白术、茯苓、泽泻 6 味中药组成, 每味中药都含有复杂的化学成分, 其药效作用也是多成分作用的结果。已有研究^[5-7]

收稿日期: 2017-03-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173368, 81573720)

作者简介: 李国强 (1981—), 男, 讲师。

*通信作者 许钊, 教授, 博士生导师。Tel: (0551)68129295 E-mail: 845570851@qq.com

采用多种质谱联用技术分析当归芍药散提取液化学成分及主要成分的药动学特征,尚缺乏体内成分的整体表征。本研究采用超高效液相色谱紫外(UPLC-UV)法建立了当归芍药散含药血浆指纹图谱,通过对含药血浆图谱共有峰分析,为进一步血中移行成分的研究提供基础。

1 材料

1.1 实验动物

SD大鼠,SPF级,体质量(200±20)g,购于安徽省实验动物中心,合格证号SCXK(皖)2013-002。

1.2 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class 系统(美国Waters公司,包括四元高压泵、在线脱气机、柱温箱、PDA检测器、自动进样装置),数据处理:Empower 3 色谱工作站;Acquity UPLC™超高效液相色谱仪(美国Waters公司);Xevo G2 QTOF 质谱仪和MassLynx 4.1 数据处理工作站(美国Waters公司);色谱柱为Acquity UPLC-UV BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);SK250HP型超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);SZ-1型快速漩涡混匀器(江苏金坛市金成国胜实验仪器厂);GL-16G-II型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);MTNN-2800D 氮吹仪(天津奥特赛恩斯公司);HH-S2 数显恒温水浴锅(金华市晶波实验仪器厂);十万分之一电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);0.22 μm 微孔滤膜(Millipore公司)。

1.3 药物与试剂

当归芍药散组方药材均购自安徽普仁中药饮片有限公司,并经安徽中医药大学金传山教授鉴定,均符合《中国药典》2015年版规定。乙腈、甲醇均为色谱级(德国Merck公司);色谱级甲酸(ROE Scientific公司);实验用水为超纯水;亮氨酸脑啡肽(美国Sigma公司)。

2 方法

2.1 当归芍药散提取液的制备

准确称取当归芍药散处方药材43 g(当归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻质量比为3:16:8:4:4:8),充分混匀后置1 000 mL圆底烧瓶中,加10倍量75%乙醇浸泡药材,水浴回流提取1.5 h,收集滤液;残渣再加8倍量75%乙醇回流提取1.5 h,合并2次滤液,浓缩成生药质量浓度为1.72 g/mL的药液(含芍药苷122 mg/L),临用时配制成生药

质量浓度为43 mg/mL的药液,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液即得。

2.2 当归芍药散含药血浆的制备

36只大鼠适应性饲养1周,于给药前12 h禁食不禁水,随机分为12组,每组3只,其中1组大鼠为对照组,另外11组大鼠均ig给予17.2 g/kg(10 mL/kg)当归芍药散提取液,对照组给予等量去离子水。给药后30 min,行肝门静脉采血,置于肝素钠真空采血管中,4 000 r/min离心15 min,吸取上清液于-20℃冷冻保存。

2.3 血浆样本处理

取1 mL含药血浆,加入3 mL甲醇涡旋混匀,在4℃下,12 000 r/min离心15 min,取上清液在40℃下用氮吹仪吹干溶剂;残渣用100 μL甲醇复溶,涡旋,4℃条件下,12 000 r/min离心15 min,取上清液过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液供分析。

2.4 色谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~1 min, 2%~8% B;1~9 min, 8%~25% B;9~15 min, 55% B;15~20 min, 95% B;20~23 min, 95% B;23~25 min, 2% B;25~27 min, 2% B;体积流量0.3 mL/min;柱温40℃;进样量3 μL;检测波长254 nm。

2.5 质谱条件

离子化模式为电喷雾正、负离子模式,毛细管电压为3.0 kV(正离子模式)和-2.5 kV(负离子模式),样品锥孔电压为50 V,提取锥孔电压为4 V;离子源温度为120℃,脱溶剂气温度为350℃,锥孔气体流量为50 L/h,脱溶剂气体流量为500 L/h,碰撞能量低能量为6 V,梯度高能量为10~30 V(+),15~40 V(-),碰撞气体为氩气,扫描时间为0.2 s,扫描范围 m/z 100~1 400。采集过程中采用亮氨酸脑啡肽(leucine enkephalin)进行实时质量数校准, m/z 分别为556.277 1(正离子模式)和554.261 5(负离子模式)。

2.6 当归芍药散含药血浆指纹图谱评价

每组大鼠血浆混合后,按照“2.3”项方法处理,得含药血浆样本,在上述色谱条件下进样分析,得到11组当归芍药散含药血浆指纹图谱,通过与对照组血浆图谱比对,扣除血浆中固有成分色谱峰,将含药血浆中特有的色谱峰进行积分处理。将采集到的色谱图输出为*.cdf格式,导入到“中药色谱指

纹图谱相似度评价系统(2012 版)”中进行多点校正,匹配色谱峰,确定共有指纹的数目,自动生成共有模式并进行相似度计算。

3 结果

3.1 相关影响因素的考察

3.1.1 色谱条件的考察 对于中药的色谱分析条件大多以甲醇(乙腈)-甲酸(磷酸)为流动相。本实验考察了甲醇-甲酸、甲醇-磷酸、乙腈-甲酸、乙腈-磷酸等流动相组成,结果发现流动相组成中乙腈出峰数量较甲醇多,且基线较平稳,甲酸的峰形优于磷酸,因而以乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。通过 PDA 检测器全扫描,确定了 254 nm 为检测波长。

3.1.2 采血时间点的考察 为了获得较为全面的当归芍药散血中移行成分信息,避免出现假阴性结果,先对采血时间点进行了考察。分别采集给药后 0、10、20、30、60、90、120、240 min 含药血浆样本,通过与同条件下空白血浆样本色谱图进行对比,观察最佳采血时间点。由图 1 可见,给药后 30 min 采集的血浆样本图谱出峰最多,且响应值较好,因此选定本实验的最佳采血时间点为给药后 30 min。

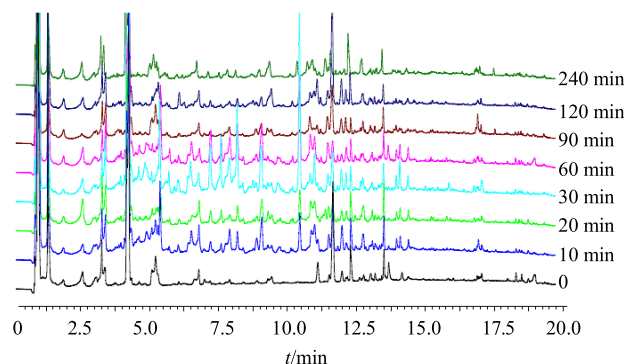
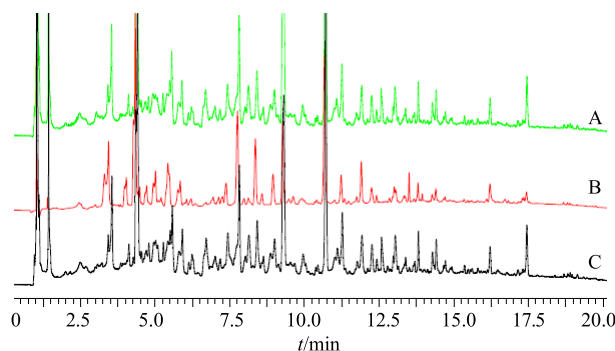


图 1 不同采血时间点的血浆色谱图比较

Fig. 1 Plasma chromatograms of different blood sampling time

3.1.3 样本处理方法考察 为获得最多的入血成分峰且内源性成分干扰最小化,本实验选择甲醇沉淀蛋白法、乙腈沉淀蛋白法、固相萃取小柱法作为血浆样本处理方法考察对象。通过与同条件下空白血浆色谱图对比,可以观察到甲醇和乙腈沉淀蛋白法出峰数量较多,响应值较高,而固相萃取小柱峰响应值较低,提示固相萃取小柱可能存在成分丢失和回收率低等问题,见图 2。考虑到经济效益,本实验以甲醇沉淀蛋白法处理血浆样本。



A-甲醇沉淀法 B-固相萃取小柱法 C-乙腈沉淀法

A-methanol B-solid phase extraction cartridges C-acetonitrile

图 2 血浆样本不同处理方法图谱

Fig. 2 Plasma chromatograms of different processing methods

3.2 血浆指纹图谱的评价

3.2.1 血浆指纹图谱的建立 11 组大鼠分别 ig 给予当归芍药散提取液,将得到的 11 组当归芍药散血浆样本按照“2.3”项方法处理、进样分析,得到 11 组当归芍药散含药血浆指纹图谱(图 3)。采用相似度软件对 11 组血浆样品进行指纹图谱分析。通过对谱峰进行多点校正和匹配,标定 15 个共有指纹峰。

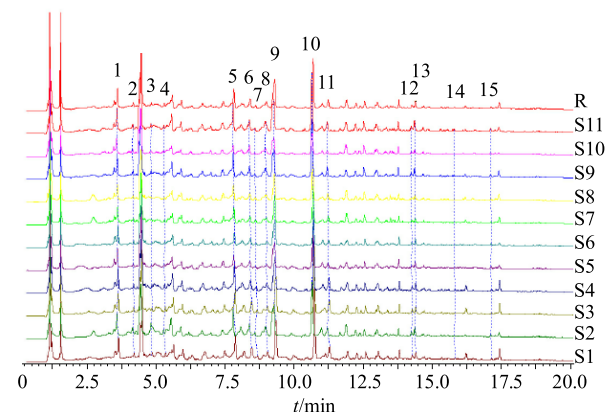


图 3 11 组当归芍药散含药血浆指纹图谱

Fig. 3 Chromatographic fingerprints obtained from 11 batches of DSP plasma-containing samples

3.2.2 血浆指纹图谱相似度计算 采用国家药典委员会开发的相似度计算软件对 11 组样品图谱进行分析,采用平均数相关系数法对指纹峰进行多点校正及谱峰匹配,生成当归芍药散含药血浆样本共有模式的对照指纹图谱(R)。生成对照后进行相似度的计算。11 组当归芍药散含药血浆与对照指纹图谱保留时间、峰面积及相似度数据见表 1、2。

表 1 当归芍药散含药血浆共有峰保留时间和相对峰面积

Table 1 Relative retention time and area of DSP plasma-containing fingerprint of common peak

峰号	t_R/min	相对峰面积											保留时间		峰面积
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	RSD/%	RSD/%	
1	3.328	83.499	84.572	92.935	94.173	78.135	75.681	68.616	82.589	90.447	62.246	88.206	0.68	12.27	
2	3.898	27.293	30.767	28.870	31.216	40.782	32.025	34.935	25.926	21.295	36.972	20.377	0.48	20.76	
3	4.559	28.568	22.332	8.129	19.530	8.812	19.191	6.398	18.737	7.234	23.525	9.423	0.34	49.96	
4	5.031	15.513	12.827	18.653	27.909	14.932	9.119	7.685	17.744	11.175	27.960	16.641	0.53	40.73	
5	7.564	216.021	139.714	101.158	169.406	99.560	203.819	124.757	86.618	131.716	73.954	152.967	0.39	33.97	
6	8.155	97.194	127.756	87.837	80.911	78.227	62.305	42.776	107.290	74.498	66.212	99.402	0.39	27.91	
7	8.363	41.842	38.072	18.545	21.080	21.535	28.933	36.337	33.956	20.067	23.002	25.767	0.40	29.14	
8	8.747	30.145	56.498	37.026	27.538	31.240	35.399	22.783	25.111	47.767	29.840	55.977	0.33	32.80	
9	9.049	388.238	406.485	381.211	399.962	311.692	298.985	336.878	302.737	301.159	376.060	370.594	0.35	12.06	
10	10.445	431.748	361.343	483.406	476.469	241.353	338.938	283.936	358.863	385.949	351.538	412.368	0.31	19.81	
11	11.003	78.607	47.805	66.087	104.038	54.600	31.501	73.542	47.153	91.107	27.276	62.633	0.28	38.26	
12	14.041	36.459	33.639	21.409	25.146	26.731	23.038	18.153	16.739	30.324	19.881	30.550	0.12	25.32	
13	14.167	32.813	43.178	31.719	35.194	25.753	22.804	28.370	37.863	36.269	31.834	41.447	0.12	18.79	
14	15.561	16.854	20.151	6.841	7.055	21.763	12.758	15.319	9.687	13.380	8.961	8.275	0.10	40.59	
15	16.902	17.619	18.128	15.980	9.452	13.747	13.294	20.226	19.931	17.739	10.245	18.189	0.10	23.28	

表 2 11 批当归芍药散含药血浆样本相似度

Table 2 Similarity of 11 batches of plasma fingerprint of DSP

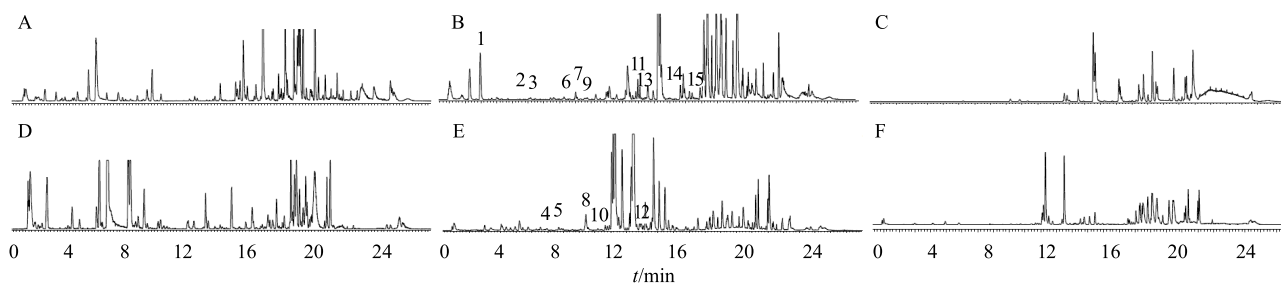
样本	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	对照指纹图谱
S1	1.000	0.933	0.998	0.987	0.945	0.952	0.967	0.975	0.983	0.949	0.980	0.986
S2	0.933	1.000	0.934	0.948	0.972	0.970	0.942	0.950	0.955	0.968	0.963	0.970
S3	0.998	0.934	1.000	0.986	0.948	0.955	0.970	0.975	0.983	0.955	0.981	0.987
S4	0.987	0.948	0.986	1.000	0.963	0.969	0.986	0.989	0.990	0.960	0.990	0.993
S5	0.945	0.972	0.948	0.963	1.000	0.999	0.971	0.971	0.964	0.986	0.976	0.982
S6	0.952	0.970	0.955	0.969	0.999	1.000	0.977	0.976	0.968	0.988	0.980	0.986
S7	0.967	0.942	0.970	0.986	0.971	0.977	1.000	0.993	0.980	0.961	0.980	0.987
S8	0.975	0.950	0.975	0.989	0.971	0.976	0.993	1.000	0.990	0.960	0.992	0.992
S9	0.983	0.955	0.983	0.990	0.964	0.968	0.980	0.990	1.000	0.966	0.996	0.994
S10	0.949	0.968	0.955	0.960	0.986	0.988	0.961	0.960	0.966	1.000	0.976	0.980
S11	0.980	0.963	0.981	0.990	0.976	0.980	0.980	0.992	0.996	0.976	1.000	0.996
对照指纹图谱	0.986	0.970	0.987	0.993	0.982	0.986	0.987	0.992	0.994	0.980	0.996	1.000

3.3 血浆指纹图谱的评价

分别采集正、负离子模式下当归芍药散药液、含药血浆和空白血浆的 UPLC-Q/TOF-MS 基峰强度离子流图 (图 4)。通过直观比较,并对可能的入血成分分子离子在空白血浆和药液进行 MS 扫描,在当归芍药散 UPLC-Q/TOF-MS 图谱中共筛选出 15 个空白血浆中没有的成分峰,以保留时间顺序进行编号。通过与药液的比对,15 个血中移行成分在药液找到了 10 个,这 10 个峰被确定为入血的原型成分,其他 5 个峰被鉴定为代谢产物。当归芍药散血中移行成分鉴定结果见表 3。

4 讨论

血浆指纹图谱的色谱条件决定了血中移行成分的检出程度,可在数量和含量方面表征血液的质量及辨识中药入血成分,在整体上体现出血浆指纹图谱的价值。本实验分别对流动相组成、比例、梯度、体积流量、柱温、波长等进行了考察,依据谱图中色谱峰的出峰情况、体内固有物质的干扰情况等优化了色谱条件。结果表明乙腈-甲酸水溶液组成的流动相系统具有较好的色谱行为和较强的质谱信号响应,适用于 UPLC-Q/TOF-MS 的检测工作。在流动相中加入微量的甲酸有利于改善色谱峰峰



A、D-当归芍药散提取液 B、E-当归芍药散含药血浆 C、F-空白血浆
A, D-ethanol extract of DSS B, E-plasma after administration with DSS C, F-blank plasma

图4 正离子 (A~C) 和负离子 (D~F) 模式下 BPI 图

Fig. 4 BPI chromatograms in positive (A—C) and negative (D—F) ion mode

表3 当归芍药散血中移行成分 LC-MS 数据及鉴定结果

Table 3 LC-MS data and identified results of constituents in rat plasma after oral administration of DSP

峰号	t_R/min	鉴定成分	分子式	准分子离子	碎片离子	备注
1	2.905	色氨酸 ^[8-9]	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	$205.110\ 4\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$188.084\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, $170.073\ 4$, $159.105\ 9$, $146.074\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}]^+$, $132.094\ 9$, $118.079\ 0\ [\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2]^+$	原型
2	5.462	芍药苷 ^[6]	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$503.172\ 6\ [\text{M}+\text{Na}]^+$	$463.163\ 6\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $301.116\ 6\ [\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $179.083\ 4\ [\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{BA}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $161.074\ 9\ [\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{BA}-2\text{H}_2\text{O}]^+$	原型
3	6.136	阿魏酸 ^[10]	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$195.079\ 1\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$186.068\ 6$, $177.069\ 4\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $145.041\ 5\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$, $135.132\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, $117.047\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$	原型
4	6.746	阿魏酸松柏酯 ^[6,11]	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$	$193.051\ 5\ [\text{M}-\text{H}-\text{coniferyl}]^-$	$134.036\ 8\ [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$, $149.064\ 3\ [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{CO}_2]^-$, $178.021\ 0\ [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{CH}_3]^-$	代谢物
5	7.477	阿魏酸代谢物 ^[12]	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$211.059\ 3\ [\text{M}-\text{H}]^-$	$193.084\ 6\ [\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$, $162.841\ 9$, $149.059\ 0\ [\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$	代谢物
6	8.334	川芎酚 ^[13-14]	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	$207.116\ 3\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$189.108\ 5\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $177.107\ 1\ [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_6]^+$, $149.037\ 8\ [\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_{10}]^+$	原型
7	9.030	洋川芎内酯 I ^[15-16]	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	$225.125\ 4\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$207.116\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $247.108\ 4\ [\text{M}+\text{Na}]^+$, $189.107\ 4\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, $179.121\ 9\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, $165.069\ 9\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3]^+$, $133.117\ 2\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$, $119.098\ 3$	原型
8	9.360	senkyunolide H/I-4,5-alkene-6/7-sulphate ^[17]	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$301.037\ 9\ [\text{M}-\text{H}]^-$	$221.081\ 0\ [\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$, $203.085\ 2\ [\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$, $177.090\ 6\ [\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3-\text{CO}_2]^-$	代谢物
9	9.586	洋川芎内酯 H ^[8,11]	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	$225.125\ 9\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$207.115\ 6\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $247.110\ 0\ [\text{M}+\text{Na}]^+$, $189.107\ 3\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, $179.119\ 5\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, $165.107\ 5\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$	原型
10	10.141	Z/E-butylidenephthalide-O-sulphate ^[17]	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}$	$283.026\ 5\ [\text{M}-\text{H}]^-$	$203.069\ 7\ [\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$, $159.079\ 9\ [\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3-\text{CO}_2]^-$, $147.080\ 2$	代谢物
11	12.881	(Z)-6,7-环氧藁本内酯 ^[18-19]	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	$207.121\ 9\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$229.098\ 8\ [\text{M}+\text{Na}]^+$, $189.105\ 5\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $161.112\ 2\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, $133.043\ 4\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$	原型
12	13.035	阿魏酸代谢物 ^[13]	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$207.102\ 4\ [\text{M}-\text{H}]^-$	$163.112\ 7\ [\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$, $149.113\ 6\ [\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_2]^-$	代谢物
13	13.365	16-氧化泽泻醇 A ^[5,20-21]	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$	$505.351\ 1\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$487.338\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $469.334\ 9\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, $451.321\ 4\ [\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$, $415.293\ 4\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$	原型
14	16.058	Z-藁本内酯 ^[17,22]	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	$191.122\ 0\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$173.111\ 2\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $163.126\ 8\ [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, $149.075\ 0\ [\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$, $145.115\ 8\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, $135.059\ 8$	原型
15	17.080	泽泻醇 B ^[20-21]	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	$473.367\ 0\ [\text{M}+\text{H}]^+$	$455.357\ 0\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $437.335\ 7\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, $383.303\ 3\ [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$, $365.295\ 0\ [\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$	原型

形,并能提高部分成分的响应强度,产生相应的加和离子 $[M-H+HCOOH]^+$,有利于成分相对分子质量的确定。此外,MS^E采集模式采用了高低碰撞能交叉扫描的方式采集质谱数据,并且高碰撞能通道的碰撞电压是动态变化的,这保证了在一定电压范围内不同类型的化合物都能获得充分裂解,从而提供丰富的碎片离子信息。

当归芍药散是《金匱要略》中活血利水治法代表方,广泛应用于妇科疾病及神经功能障碍性疾病。近年来,与药理作用有关的活性成分逐渐显露出来,其中单萜糖苷类、苯酞类、三萜类等是当归芍药散的最典型成分。在本实验对入血成分的初步鉴定结果中,当归和川芎中的洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H、senkyunolide H/I-4, 5-alkene-6/7-sulphate、Z/E-butylidenephthalide-O-sulphate、(Z)-6,7-环氧藁本内酯、Z-藁本内酯、川芎酚、阿魏酸及其代谢物具有抗血栓、抗氧化、抗炎等作用^[23-26];白芍中的单萜内酯类成分芍药苷有镇痛、解痉、抗炎、抗凝血等作用^[27];泽泻中的三萜类化合物 16-氧化泽泻醇 A、泽泻醇 B 有细胞毒作用、抗炎、抗氧化作用^[28-29];这与当归芍药散整体药理作用一致。研究结果表明,在含药血浆中未发现白术及茯苓的血中移行成分。对当归芍药散体外成分分析结果显示两味药物中仅有白术内酯类及茯苓酸得以鉴别,可能是这些成分含量低微、在肠道吸收率低,难以以原型成分吸收入血。但这并不等同于两味药无作用,组方为茯苓、白术、当归的当归芍药散精简方,在防治老年痴呆上药效作用明显^[30]。本实验结果表明,当归芍药散吸收入血的成分主要来自于当归和川芎,提示在当归芍药散的药理活性表现上,当归和川芎发挥主要作用,其他药材发挥重要的协同作用。

在 254 nm 检测波长下,建立了当归芍药散含药血浆 UPLC-UV 指纹图谱,表征了 15 个血中移行成分,表明 11 组指纹图谱相似度均在 0.933~1.000,表明所建立的指纹图谱重现性良好,样本整体质量稳定,指纹图谱技术指标稳定,为体内成分分析奠定了基础。但是在血浆指纹图谱的研究中仅是 UPLC 系统,与 UPLC-Q/TOF-MS 系统不同,且当归芍药散化学成分未必能在 Q/TOF-MS 条件下响应。因此,利用 UPLC-Q/TOF-MS 无法准确辨识血浆指纹图谱中的 15 个共有峰,当归芍药散实际入血成分可能更多。

本实验将指纹图谱结合质谱联用技术应用到

含药血浆移行成分的辨识上,在一定程度上表征了当归芍药散 15 个入血成分,对今后血浆药物化学及血浆药理学研究提供一定的基础。

参考文献

- [1] 魏元锋,张宁,冯怡,等. 中药血清药物化学在中药药效物质基础研究中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1489-1492.
- [2] 张灵娜,林兵,宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2662-2666.
- [3] Liang Y Z, Xie P S, Chan K. Chromatographic fingerprinting and metabolomics for quality control of TCM [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2010, 13(10): 943-953.
- [4] Liang Y Z, Wang W P. Chromatographic fingerprinting coupled with chemometrics for quality control of traditional Chinese medicines [J]. *Chimia*, 2011, 65(12): 944-951.
- [5] 牛研,王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1056-1061.
- [6] Chen L, Qi J, Chang Y, *et al.* Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(2): 127-137.
- [7] Chen L L, Wang Y H, Qi J, *et al.* Identification and determination of absorbed components of Danggui-Shaoyao-San in rat plasma [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(5): 363-368.
- [8] Wu Y, Wang L, Liu G, *et al.* Characterization of principal compositions in the roots of *Angelica sinensis* by HPLC-ESI-MSⁿ and chemical comparison of its different parts [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 393-402.
- [9] Puurunen J, Tiira K, Lehtonen M, *et al.* Non-targeted metabolite profiling reveals changes in oxidative stress, tryptophan and lipid metabolisms in fearful dogs [J]. *Behav Brain Funct*, 2016, 12(1): 7-18.
- [10] Wang Y L, Liang Y Z, Chen B M. High-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of *Angelica sinensis* [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(4): 265-274.
- [11] Qian Y, Wang Y, Sa R, *et al.* Metabolic fingerprinting of *Angelica sinensis* during growth using UPLC-TOFMS and chemometrics data analysis [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1): 42-52.

- [12] 李伟霞. 当归-川芎药对功效物质与配伍作用机理研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [13] 胡 杨. 川芎化学成分分离提取及结构鉴定研究 [D]. 长春: 长春师范大学, 2013.
- [14] 徐晓芳, 孙东东, 李 祥, 等. 川芎水提部位化学成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(4): 382-386.
- [15] 左爱华, 程孟春, 王 莉, 等. 川芎吸收入脑成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3647-3650.
- [16] Zhang X, Xiao H, Xu Q, *et al.* Characterization of Phthalides in *Ligusticum Chuanxiong* by liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2003, 41(8): 428-433.
- [17] 王 璐, 徐 风, 刘广学, 等. HPLC-MSn 法分析当归乙酸乙酯提取物在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国药房, 2014, 25(47): 4425-4429.
- [18] Liu L, Cheng Y, Zhang H, *et al.* Phytochemical analysis of anti-atherogenic constituents of Xue-Fu-Zhu-Yu-Tang using HPLC-DAD-ESI-MS [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(11): 1295-1301.
- [19] Zuo A, Cheng M, Zhuo R, *et al.* Structure elucidation of degradation products of Z-ligustilide by UPLC-QTOF-MS and NMR spectroscopy [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(6): 911-916.
- [20] Li Q, Qu H. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1046-1053.
- [21] Liu X, Li S L, Zhou Y, *et al.* Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1514-1522.
- [22] Zhao Y, Sun J, Yu L L, *et al.* Chromatographic and mass spectrometric fingerprinting analyses of *Angelica sinensis* (Oliv.) diels-derived dietary supplements [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(13): 4477-4485.
- [23] Qi H, Siu S O, Chen Y, *et al.* Senkyunolides reduce hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human liver HepG2 cells via induction of heme oxygenase-1 [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 183(3): 380-389.
- [24] Zhang Y T, Li F M, Guo Y Z, *et al.* (Z)-ligustilide increases ferroportin1 expression and ferritin content in ischemic SH-SY5Y cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 792: 48-53.
- [25] Li J, Yu J, Ma H, *et al.* Intranasal Pretreatment with Z-ligustilide, the main volatile component of *Rhizoma Chuanxiong*, confers prophylaxis against cerebral ischemia via Nrf2 and HSP70 signaling pathways [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(8): 1533-1542.
- [26] Liu Y M, Shen J D, Xu L P, *et al.* Ferulic acid inhibits neuro-inflammation in mice exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45: 128-134.
- [27] 胡增峣, 徐 岚, 闫 蓉, 等. 芍药苷作用于神经系统的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 297-301.
- [28] Lee S, Kho Y, Min B, *et al.* Cytotoxic triterpenoids from *Alismatis Rhizoma* [J]. *Arch Pharm Res*, 2001, 24(6): 524-526.
- [29] 刘 瑜. 泽泻醇在小胶质细胞中对基质金属蛋白酶 3 与一氧化氮的抑制作用 [J]. 实验技术与管理, 2012, 29(10): 47-50.
- [30] 林志宏, 朱丹妮, 严永清, 等. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 II——抗脑老化组方功效相似性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 18-20.