

【评价方法学】

金芪降糖片入血成分的UPLC-ESI-MS研究

金 华, 牟佳佳, 夏 娜, 丁菲菲, 陈 芳, 邓雁如*

天津中医药大学, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 301617

摘要: **目的** 通过对金芪降糖片血清药物化学研究方法的建立, 探讨其口服吸收后的入血成分。**方法** 利用超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱(UPLC-ESI-MS)和多重反应监测(MRM)对金芪降糖片样品及ig给予金芪降糖片后大鼠血清样品进行分析, 比较各样品分析结果, 确认金芪降糖片的血中移行成分。**结果** ig给予金芪降糖片后大鼠血清中发现16种原形产物, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木兰花碱、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芪甲苷。**结论** 确定了金芪降糖片的血中移行成分, 为阐明其有效成分及作用机制提供参考。

关键词: 金芪降糖片; 血清药物化学; 超高效液相-质谱联用; 多反应监测; 血中移行成分

中图分类号: R917.7

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)12-2227-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.017

Identification and analysis of absorbed components in rat plasma after oral administration of Jinqi Jiangtang Tablets by UPLC-ESI-MS

JIN Hua, MOU Jiajia, XIA Na, DING Feifei, CHEN Fang, DENG Yanru

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Chemistry and Analysis on Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the absorbed constituents in plasma after oral administration of Jinqi Jiangtang Tablets determined by its serum pharmacology research method. **Methods** Using UPLC-ESI-MS and multiple response monitoring (MRM) method, the chromatograms of rat serum samples after oral administration of Jinqi Jiangtang Tablets were analyzed and compared with samples of rats in the control group, in order to identify the constituents absorbed into blood of Jinqi Jiangtang Tablets. **Results** A total of 16 original form compounds absorbed into the blood after ig administration of Jinqi Jiangtang Tablet were detected, including Neochlorogenic acid, Chlorogenic acid, Cryptochlorogenic acid, Caffeic acid, Magnoflorine, Rutin, Hyperoside, Luteoloside, Isochlorogenic acid A, Isochlorogenic acid C, Coptisine, Epiberberine, Jatrorrhizine, Berberine Palmatine, and Astragaloside A. **Conclusion** The constituents absorbed into blood after oral administration of Jinqi Jiangtang Tablets were identified in this study, which is conducive to the exploration of bioactive constituents of Jinqi Jiangtang Tablets and its mechanism of action.

Key words: Jinqi Jiangtang Tablet; serum pharmacology; UPLC-ESI-MS; MRM

金芪降糖片是中国医学科学院药物研究所依据古方、结合现代药理学研发的一种安全有效的中成药^[1],由黄连、黄芪、金银花组成,其中黄连组分主要有小檗碱、药根碱、巴马汀、木兰花碱、表小檗碱和黄连碱^[2],黄芪组分主要有黄芪甲苷^[3],金银花组

分主要有绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、木犀草苷、芦丁、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A和C^[4]等。金芪降糖片功能清热益气,用于消渴病气虚内热证,症见口渴喜饮,易饥多食,气短乏力;轻、中型非胰岛素依赖型糖尿病见上述证候者^[5-7]。前期,本课题

收稿日期: 2018-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21502142);天津市应用基础与前沿技术计划(15JCQNJC14100)

第一作者: 金 华(1968—),女,副教授,研究方向为中药基础理论及实验研究。Tel: 15320015127 E-mail: zyxyjin@163.com

*通信作者: 邓雁如,教授,主要从事天然药物化学研究。E-mail: dyanru@sina.com

组开展了金芪降糖片成分的定性、定量分析及肠吸收特性试验^[8-13],本实验将其入血成分进行研究,给药后,通过分析大鼠血清中的成分,明确金芪降糖片中真正的有效成分。观测血清中外源性活性物质及其作用和代谢规律^[14]是研究中成药效应的重要环节,本研究通过超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)法对金芪降糖片的血清药物化学进行了初步探索,为进一步研究金芪降糖片的效应物质奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪、Waters Quattro Premier XE 质谱仪、Empower 数据处理系统(美国 Waters 公司);BT125D 电子分析天平(德国赛多利斯公司);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Allegra 64R centrifuge 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);其林贝尔 XW-80A 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 主要试剂

金芪降糖片(批号 AC08759),天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂;绿原酸(批号 110753-200413)、咖啡酸(批号 110885-200102)、金丝桃苷(批号 111521-201205)、木犀草苷(批号 111720-201106)、盐酸小檗碱(批号 110713-200911)、盐酸药根碱(批号 110733-200806)、盐酸巴马汀(批号 110732-200907)、黄芪甲苷(批号 110781-200613)、芦丁(批号 100080-200707)对照品,均购于中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%;新绿原酸(批号 X-014-110822)、隐绿原酸(批号 Y-067-110825)、木兰花碱(批号 M-026-110623)、异绿原酸 A(批号 Y-068-120328)、异绿原酸 C(批号 Y-070-111128)对照品,购自成都瑞芬思生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;表小檗碱、黄连碱对照品为本实验室自制,质量分数均大于 98%;甲醇、乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);其他试剂为分析纯;水为纯化水。

1.3 实验动物

健康 SD 大鼠,体质量(240±20) g,雌雄各半,天津市山川红实验动物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(津)2009-0001。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 ig 药液的制备 取金芪降糖片去包衣,粉碎,

过 40 目筛,混合均匀,精密称取该粉末适量,生理盐水配制为 0.7 g/mL 的混悬液,超声 30 min,静置 24 h,于 4 °C 保存。

2.1.2 含药血清、空白血清供试品溶液的制备 取 SD 大鼠 12 只,雌雄各半,随机分成空白组和金芪降糖片组,正常饲养 1 周,以适应实验室环境。禁食 12 h(自由饮水)后,每天按照 7 g/kg 剂量、10 mL/kg 给药体积,分 3 次 ig 给予金芪降糖片混悬液,连续 3 d,空白组 ig 等体积的生理盐水。给药组于末次给药后 30 min 后腹主动脉取血,取全血后置于 37 °C 水浴 30 min,4 °C 静置 30 min,取出后 4 000 r/min 离心 10 min,取上层血清。将同组血清混合,消除个体差异。

分别取含药血清、空白血清 1 mL 置离心管中,加入硫酸铵 0.36 g 置微型涡旋混合仪快速混匀,分次加甲醇(每次 1 mL,总计 5 mL)同法充分混匀,16 000 r/min 离心 10 min,去上层血清于洁净离心管中,80 °C 水浴挥干。加入盐酸-甲醇(1:100) 0.5 mL 充分溶解残渣,16 000 r/min 离心 10 min,上清液即含药血清、空白血清供试品溶液,进样前 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.1.3 金芪降糖片供试品溶液的制备 精密称取金芪降糖片粉末 0.5 g,甲醇定容至 50 mL 容量瓶,超声提取 1 h,称质量,补足质量,进样前 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.4 成分对比用对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木兰花碱、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄连碱、表小檗碱、盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、黄芪甲苷各 2 mg,甲醇定容至 5 mL,制成质量浓度为 0.4 g/L 的对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:0.1% 甲酸(A)-乙腈(B),金芪降糖片定性分析实验流动相洗脱程序为 0~3 min,98%~85% A;3~5 min,85% A;5~15 min,85%~79% A;入血移行成分测定实验流动相洗脱程序为 0~3 min,98%~71% A;3~5 min,71% A;5~10 min,71%~5% A;10~10.1 min,5%~98% A;体积流量 0.3 mL/min,检测波长为 270 nm;柱温 37 °C;进样量 10 μL。

2.3 质谱条件

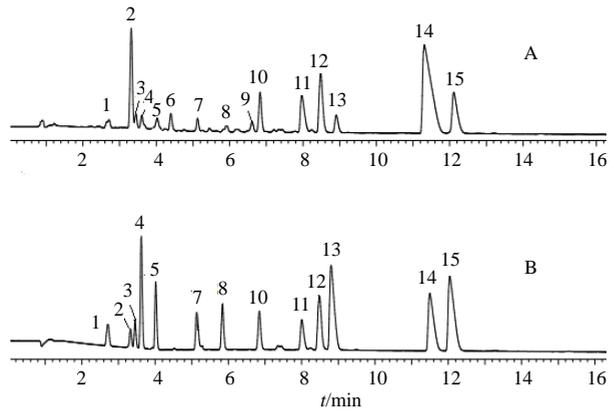
Waters Quattro Premier XE 质谱仪;正/负离子检测模式,多重反应监测(MRM)扫描方式;离子源

温度 120 ℃;去溶剂温度 350 ℃;去溶剂气 650 L/h;锥孔气 50 L/h;毛细管电压 ESI(+), 3.2 kV; ESI(-), -2.8 kV;扫描范围 100~1 100。

3 结果

3.1 金芪降糖片的定性分析

按照上述色谱、质谱条件,取金芪降糖片样品溶液进样分析,分别得到金芪降糖片和混合对照品的超高效液相色谱-紫外(UPLC-UV)色谱图(图1)、



1-新绿原酸;2-绿原酸;3-隐绿原酸;4-咖啡酸;5-木兰花碱;6-芦丁;7-金丝桃苷;8-木犀草苷;9-异绿原酸A;10-异绿原酸C;11-黄连碱;12-表小檗碱;13-药根碱;14-小檗碱;15-巴马汀
1 - neochlorogenic acid; 2 - chlorogenic acid; 3 - cryptochlorogenic acid; 4 - caffeic acid; 5 - magnolia base; 6 - rutin; 7 - hyperoside; 8 - luteolin; 9 - isochlorogenic acid A; 10 - isochlorogenic acid C; 11 - berberine; 12 - epiberberine; 13 - jatrorrhizine; 14 - berine; 15 - palmatine

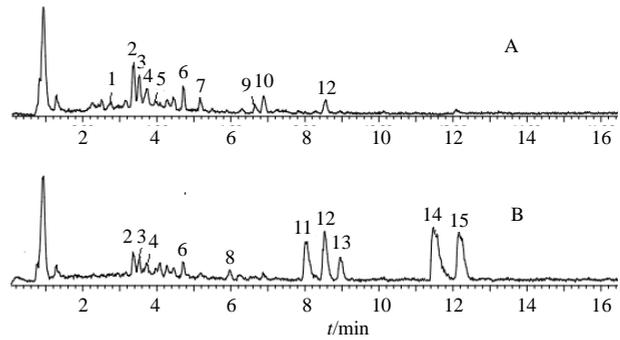
图1 金芪降糖片样品(A)和对照品(B)的UPLC图

Fig. 1 UPLC chromatograms of Jinqi Jiangtang Tablet sample (A) and reference substances (B)

金芪降糖片总离子流图(图2)、正负离子检测模式所得质谱信息(表1)。由图1可见金芪降糖片样品的UPLC图主含15个色谱峰,各色谱峰之间实现了较好的分离。在此液相色谱条件下,对各主要色谱峰按相对保留时间排序,通过比较金芪降糖片样品和对照品的色谱保留时间(t_R)、紫外吸收光谱及MS数据,确定色谱峰1~5、7、8、10~15分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木兰花碱、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸C、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀。

根据金芪降糖片样品的质谱总离子流色谱图给出的碎片信息及相关文献,对色谱图中6、9号色谱峰进行了初步归属。

其中峰6的准分子离子峰为 m/z 609 $[M-H]^-$, 二级质谱显示主要碎片离子为 $301[M-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5-H]^-$, 与文献报道芦丁^[15]的主要碎片离子一



1-新绿原酸;2-绿原酸;3-隐绿原酸;4-咖啡酸;5-木兰花碱;6-芦丁;7-金丝桃苷;8-木犀草苷;9-异绿原酸A;10-异绿原酸C;11-黄连碱;12-表小檗碱;13-药根碱;14-小檗碱;15-巴马汀
1 - neochlorogenic acid; 2 - chlorogenic acid; 3 - cryptochlorogenic acid; 4 - caffeic acid; 5 - magnolia base; 6 - rutin; 7 - hyperoside; 8 - luteolin; 9 - isochlorogenic acid A; 10 - isochlorogenic acid C; 11 - berberine; 12 - epiberberine; 13 - jatrorrhizine; 14 - berine; 15 - palmatine

图2 金芪降糖片样品的UPLC-ESI(-)-MS(A)和UPLC-ESI(+)-MS(B)质谱图

Fig. 2 UPLC-ESI(-)-MS (A) and UPLC-ESI(+)-MS (B) chromatograms of Jinqi Jiangtang Tablet sample

表1 金芪降糖片中15个活性成分的ESI(+/-)MS数据

Table 1 ESI (+/-) MS data of 15 bioactive constituents of Jinqi Jiangtang Tablet

峰号	t_R /min	ESI	m/z	化合物
1	2.50	-	353 $[M-H]^-$	新绿原酸
2	3.36	-	353 $[M-H]^-$	绿原酸
3	3.53	-	353 $[M-H]^-$	隐绿原酸
4	3.73	-	179 $[M-H]^-$	咖啡酸
5	4.07	+	342 $[M+H]^+$	木兰花碱
6	4.40	-	609 $[M-H]^-$	芦丁
7	5.23	-	463 $[M-H]^-$	金丝桃苷
8	5.96	-	447 $[M-H]^-$	木犀草苷
9	6.66	-	515 $[M-H]^-$	异绿原酸A
10	6.89	-	515 $[M-H]^-$	异绿原酸C
11	8.06	+	321 $[M+H]^+$	黄连碱
12	8.54	+	337 $[M+H]^+$	表小檗碱
13	8.96	+	339 $[M+H]^+$	药根碱
14	11.49	+	337 $[M+H]^+$	小檗碱
15	12.16	+	353 $[M+H]^+$	巴马汀

致,故推测为芦丁。

峰9的准分子离子峰为 m/z 515 $[M-H]^-$, 与异绿原酸C一致, 二级质谱显示主要碎片离子为 $353[M-C_9H_9O_3-H]^-$ 、 $191[M-C_9H_9O_3-C_9H_9O_3-H]^-$, 且出峰时间优先于异绿原酸C, 与文献报道^[16]一致, 故推断为异绿原酸A。

3.2 金芪降糖片中移行成分的指认

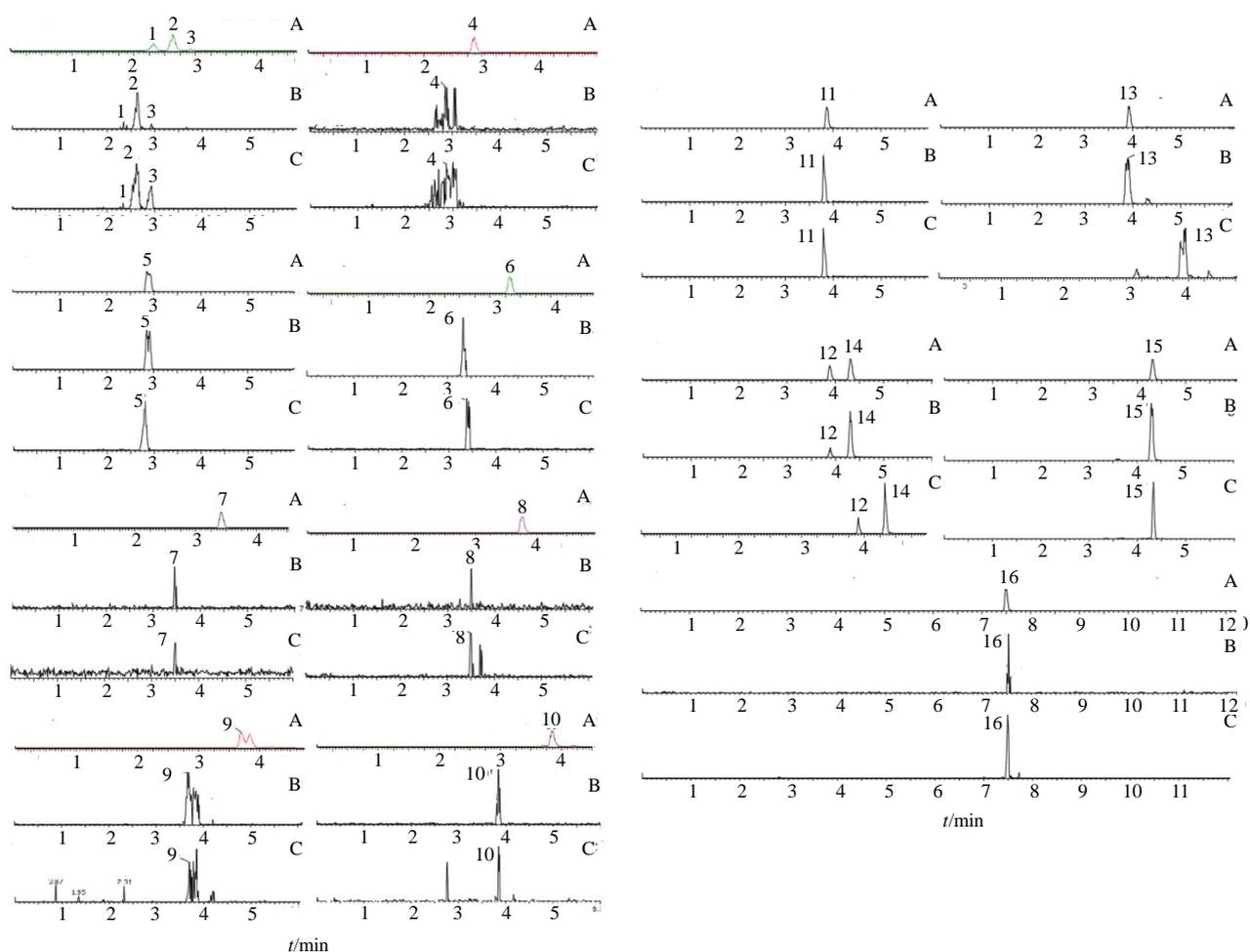
选择MRM对金芪降糖片提取液、大鼠进药后血样进行鉴定,通过与空白血样和对照品进行对比,在给药后的大鼠血样中检测到16种原形产物。结果表明,在MRM模式下,血清中内源性物质均没有干扰测定。原形产物分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、木兰花碱、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芪甲苷,MRM模式下各组分的提取离子流质谱图见图3。根据图3总结各组分的主要碎片离子及其归属见表2。

4 讨论

文献报道金芪降糖片成分检测大多数为液相

色谱紫外或荧光法,且目前对金芪降糖片代谢产物测定的研究也较少,本实验首次使用灵敏度高的UPLC-MS对金芪降糖片成分及其血中移行成分进行分析,综合研究结果将对金芪降糖片的深入研究及开发提供有力支撑。

利用一级全扫描质谱鉴定药物的代谢产物是药物代谢研究中一种常用的手段,本实验对金芪降糖片给药血样进行了全扫描,但由于药物中移行成分含量较低,无法得到较好峰形的一级全扫描质谱图,因此本实验采用MRM筛选大鼠血清中的代谢产物。MRM的本质特点是选择具有目标物结构特征的母离子和其子离子为指标进行离子监测,在定性分析中能够快速找到符合代谢特征的离子对信



1-新绿原酸;2-绿原酸;3-隐绿原酸;4-咖啡酸;5-木兰花碱;6-芦丁;7-金丝桃苷;8-木犀草苷;9-异绿原酸A;10-异绿原酸C;11-黄连碱;12-表小檗碱;13-药根碱;14-小檗碱;15-巴马汀;16-黄芪甲苷

1 - neochlorogenic acid; 2 - chlorogenic acid; 3 - cryptochlorogenic acid; 4 - caffeic acid; 5 - magnolia base; 6 - rutin; 7 - hyperoside; 8 - luteolin; 9 - isochlorogenic acid A; 10 - isochlorogenic acid C; 11 - berberine; 12 - epiberberberine; 13 - jatrorrhizine; 14 - berine; 15 - palmatine; 16 - astragaloside IV

图3 对照品(A)、金芪降糖片(B)及金芪降糖片给药血清(C)MRM图

Fig. 3 MRM chromatograms of control (A), Jinqi Jiangtang Tablet (B) and rat serum samples after ig administration (C) of Jinqi Jiangtang Tablet

表2 血中移行成分MRM参数

Table 2 MRM parameters of constituents absorbed into blood

峰号	化合物	t_R /min	监测离子对 m/z	锥孔电压 /V	碰撞能 /eV
1	新绿原酸	2.33	353.1/190.7	25	20
2	绿原酸	2.62	353.1/190.7	25	20
3	隐绿原酸	2.92	353.1/190.7	25	20
4	咖啡酸	2.87	179/134.1	30	30
5	木兰花碱	2.85	341.9/297	40	20
6	芦丁	3.32	609.1/299.9	45	38
7	金丝桃苷	3.41	463.1/270.8	45	40
8	木犀草苷	3.52	447.1/284.8	45	35
9	异绿原酸A	3.70	515.2/352.9	30	30
10	异绿原酸C	3.83	515.2/172.7	40	32
11	黄连碱	3.88	320.9/293	40	35
12	表小檗碱	3.89	336.9/321	40	35
13	药根碱	3.93	338.9/323.1	40	30
14	小檗碱	4.31	336.9/321	40	35
15	巴马汀	4.31	351.9/336.1	40	35
16	黄芪甲苷	7.48	785.5/143.1	20	20

号,专属性更强,能够快速鉴定药物的体内代谢产物。实验结果显示,各成分出峰信噪比大于3,分离度大于2。

质谱离子模式选择时,碱性化合物一般选择正离子模式,酸性化合物一般选择负离子模式。本实验选取的16个监测指标中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C均含有酸性官能团,负离子响应高,故选用负离子模式进行检测;木兰花碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀均含有碱性官能团,正离子响应高,故选用正离子模式进行检测;黄芪甲苷在正、负离子模式下均有响应,正离子响应比负离子响应高,因此采用正离子模式鉴别黄芪甲苷。

在ESI⁺和ESI⁻离子化模式下,分别进行全扫描得到各分析物的二级质谱图。选择[M+H]⁺准分子离子峰作为母离子,丰度较强的两个离子作为子离子,最终每个分析物选定母离子/子离子对,通过优化毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等质谱参数,使每种分析物的准分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度达到最大。MRM模式下部分分析物出现相同的保留时间,但因离子对不同,可使分析物在同时洗脱的状况下分析准确检测,避免了繁琐的

色谱条件优化过程,明显缩短了分析时间。

本实验对金芪降糖片提取物化学成分进行研究,并研究了金芪降糖片在大鼠体内吸收入血的成分,结果表明金芪降糖片中16种原型成分吸收入血发挥药效,因此研究结果在某种程度上对阐明金芪降糖片药效成分奠定了基础,对于其他未检测到的成分或代谢产物需进一步研究完善。

参考文献

[1] 陶忠华,谢明智,邵国贤,等. 金芪降糖片的研究概述[J]. 中国新药杂志, 1996, 5(1): 21-23.

[2] 卢芳,陈平平,刘树民. 黄连血中移行成分经时变化规律探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 108-111.

[3] 梁瑾,刘小花,任远,等. HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪中5个成分的含量[J]. 2013, 33(2): 210-213.

[4] 李红霞,王雪芹,李振国,等. 不同产地金银花与山银花主要成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2935-2937.

[5] 尹清晟,范姗姗,陈瑞,等. 金芪降糖片联合胰岛素激活PPAR- α /FGF21信号改善2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗[J]. 药物评价研究, 2018, 41(8): 1425-1429.

[6] 袁雪海,吕楠,靳学海,等. 新工艺金芪降糖片降糖和调脂作用研究[J]. 中草药, 2015, 46(21): 3219-3222.

[7] 姚庆春. 金芪降糖片联合二甲双胍治疗2型糖尿病的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(7): 786-790.

[8] 于静,邓雁如,陈奇,等. HPLC测定金银花及金芪降糖片中6种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 57-60.

[9] 于静,邓雁如,宋丽丽,等. 金芪降糖片HPLC指纹图谱的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 278-279.

[10] 陈芳,邓雁如,郭利平. HPLC法同时测定金银花及金芪降糖片中9种成分的含量[J]. 天津中医药, 2014, 31(3): 168-172.

[11] 丁菲菲,邓雁如,张晓静,等. HPLC-ELSD法同时测定黄芪及金芪降糖片中5种皂苷类成分的含量[J]. 中药材, 2015, 38(1): 156-159.

[12] 丁菲菲,张晓静,孙奕,等. 外翻肠囊法研究金芪降糖片的肠吸收特性[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(3): 185-190.

[13] 夏娜,邓雁如,金华,等. 金芪降糖片与牛血清白蛋白作用的超滤-色谱联用技术研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1804-1807.

[14] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.

[15] Zhou X Q, Sun X H, Cai S, et al. Investigation on the chemical constituents and variation of the flower buds of *Lonicera* species by UPLC-ESI-MS/MS and principle component analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2009, 44(8): 895-904.

[16] Clifford M N, Johnston K L, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(10): 2900-2911.