

小柴胡汤化学成分及其在抑郁模型大鼠体内代谢成分的分析

杨杰¹, 黄丹雪¹, 鹿秀梅¹, 王芳², 李发美^{1*}

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 采用 UPLC-MS/MS 技术分析小柴胡汤提取液化学成分及其在抑郁模型大鼠体内的代谢产物, 为其抗抑郁作用药效物质研究奠定基础。**方法** 采用 Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 柱进行色谱分离, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 以电喷雾质谱检测, 扫描范围为 m/z 150~1 500, 在正负离子同时扫描的模式下, 通过获得一、二级质谱信息, 参照对照品及相关文献信息, 确定小柴胡汤的化学成分及其在抑郁模型大鼠体内的代谢产物的可能结构。**结果** 小柴胡汤样品中共检测到 44 个化学成分。抑郁模型大鼠 ig 给予小柴胡汤后, 在血清样品中共检测出 7 个原形成分和 8 个代谢产物; 在尿液样品中共检测出 12 个原形成分和 19 个代谢产物。**结论** 建立的 UPLC-MS/MS 法能较全面地分析小柴胡汤的化学成分及其在抑郁模型大鼠体内的代谢产物, 为进一步研究小柴胡汤抗抑郁作用药效物质基础提供依据。

关键词: UPLC-MS/MS; 小柴胡汤; 抗抑郁; 药效物质基础; 代谢产物

中图分类号: R284.1; R285.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1691-08

Analysis on chemical constituents in Xiaochaihu Decoction and their *in vivo* metabolites in depressed rats

YANG Jie¹, HUANG Dan-xue¹, LU Xiu-mei¹, WANG Fang², LI Fa-mei¹

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in Xiaochaihu Decoction (XCD) and their *in vivo* metabolites in depressed rats by UPLC-MS/MS and lay the foundation for the investigation of antidepressant effects. **Methods** The analysis was performed on an Acquity UPLC™ BEH C₁₈ column with gradient elution system of acetonitrile and water containing 0.1% formic acid. Using electrospray ionization (ESI) in both positive and negative ion modes with scanning range from m/z 150 to 1 500. The components in extract of XCD and their *in vivo* metabolites in depressed rats were identified by comparing the MS and MS² data with the reference substances and related literature. **Results** Forty-four components were identified in XCD extract. In bioanalysis process *in vivo*, seven original components and eight metabolites were detected in the serum, and 12 original components and 19 metabolites in the urine after ig administration. **Conclusion** The established UPLC-MS/MS method could comprehensively analyze the components in XCD and metabolites in depressed rats so as to provide the basis for study on the pharmacodynamic material basis of their antidepressant effects.

Key words: UPLC-MS/MS; Xiaochaihu Decoction (XCD); antidepressant; pharmacodynamic material basis; metabolites

小柴胡汤出自东汉张仲景的《伤寒论》,由柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜和大枣 7 味药组成。小柴胡汤为和解少阳而设,具有解表散热、疏肝和胃的功效。药理研究和临床实验表明小柴胡汤具有良好的抗抑郁疗效,是治疗抑郁症的良方^[1-2]。刘晓帆等^[3]采用 HPLC-TOF/MS 法研究了小柴胡汤的化

学成分,小柴胡汤在抑郁模型大鼠体内代谢产物研究尚未见报道。本实验应用 UPLC-MS/MS 技术分析小柴胡汤提取液化学成分以及抑郁模型大鼠 ig 给予小柴胡汤后血清和尿液中成分,阐明小柴胡汤化学成分组成及体内药效物质基础,为揭示小柴胡汤抗抑郁作用药效物质基础提供参考依据。

收稿日期: 2012-05-26

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81130071)

作者简介: 杨杰 (1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药物物质基础及质量标准研究。E-mail: yangjieqm@sina.com

*通讯作者 李发美 Tel/Fax: (024)23986289 E-mail: lifamei@syphu.edu.cn

网络出版时间: 2012-08-14 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120814.1110.001.html>

1 仪器与材料

Acquity Ultra Performance LCTM 超高效液相色谱仪 (Waters, 美国), Waters Quattro Micro API 三重四级杆串联质谱仪, 配备电喷雾离子源、MassLynx 4.1 数据采集软件 (Waters, 美国), LC-400 低速离心机 (科大创新股份有限公司), Anke TGL-16G 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), AL104 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), L-128B 型试管氮吹浓缩仪 (北京来亨科贸有限公司)。

甘草苷 (批号 111610-201106) 购自中国食品药品检定研究院, 黄芩素 (批号 111595-200905)、汉黄芩素 (批号 111514-200403)、人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-200322)、柴胡皂苷 a (批号 110777-200507)、黄芩苷 (批号 110715-200514) 对照品均购自中国药品生物制品检定所。柴胡经鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根, 黄芩经鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根, 甘草经鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 半夏经鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* Breit. 的干燥块茎, 人参经鉴定为五加科属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 生姜经鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎, 大枣经鉴定为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* Mill. 的干燥成熟果实。以上药材均购自沈阳同仁堂大药房, 由沈阳药科大学药用植物教研室路金才教授鉴定。乙腈 (HPLC 级, Tedia 公司, 美国), 甲酸 (HPLC 级, Dikma 公司, 美国), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 其余试剂为分析纯。

健康 SD 大鼠, 体质量 250~350 g, 雄性, 购自沈阳药科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (京) 2009-0004。

2 方法

2.1 小柴胡汤水提液的制备

分别称取柴胡 12 g、黄芩 9 g、人参 9 g、半夏 9 g、炙甘草 6 g、生姜 6 g、大枣 6 g, 加入 10 倍量水, 浸泡 40 min。武火煮沸后文火继续煎煮 30 min, 滤出药汁。二煎, 重新加入 4 倍量水至高出药材约 1 cm, 继续武火煎煮至沸腾后改为文火煎煮 30 min, 滤出药汁。三煎同二煎。合并 3 次煎煮滤液, 将 3 次滤液浓缩至总体积的一半, 置冷冻干燥机内制备成冻干粉, 精确称量所得冻干粉的质量, 得率为 25.2%。将冻干粉置于 -20 °C 冰箱中储存, 备用。分析前, 称取冻干

粉适量, 加入一定体积的水进行溶解, 制得质量浓度相当于生药 50 mg/mL 的溶液。离心后取上清液, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液进行 LC-MS 分析。

2.2 对照品溶液的配制

分别取甘草苷、人参皂苷 Rg₁、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、柴胡皂苷 a 对照品, 各约 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇进行溶解和定容, 得到质量浓度约为 1 mg/mL 的各对照品储备液。精密量取甘草苷、人参皂苷 Rg₁、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、柴胡皂苷 a 储备液, 体积分别为 1、1、2、1、1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇-水 (50 : 50) 定容, 得到混合对照品溶液。

2.3 生物样品的采集

5 只雄性 SD 大鼠, 采用慢性不可预见性中等强度应激刺激 (CUMS) 方法制备抑郁模型^[4], 连续刺激 4 周后模型成功。将小柴胡汤冻干粉用水溶解后制成相当于生药 1 g/mL 的水溶液, 按照生药剂量 5 g/kg ig 给药。每天给药 1 次, 连续给药 7 d, 末次给药后将大鼠置于代谢笼中, 禁食不禁水, 收集 0~24 h 尿液, 所得尿液在 3 500 r/min 条件下离心 10 min, 取上清, 将其置于 -70 °C 储存备用。将大鼠从代谢笼中取出, ig 给药, 于给药后 2 h 眼眶取血, 置于离心管中, 室温静置 30 min, 在 3 500 r/min 条件下离心 15 min, 取上清, 即得血清, 将其置于 -70 °C 储存备用。

2.4 血清样品的处理

吸取 400 μL 血清, 加入 2 倍量乙腈, 涡旋 1 min, 在 13 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清 1 mL, 40 °C N₂ 流下吹干, 残渣用 100 μL 乙腈-水 (10 : 90) 复溶, 涡旋 30 s, 在 13 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 尿液样品的处理

分别取 2 mL 甲醇和 2 mL 水依次活化 Agela cleanert C₁₈ SPE 柱, 取 700 μL 尿液上样于固相萃取小柱中, 2 mL 水进行淋洗, 用 1 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 40 °C N₂ 流下吹干, 残渣用 100 μL 乙腈-水 (10 : 90) 复溶, 涡旋 30 s, 在 13 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.6 色谱和质谱条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 20 °C, 进样室温度 4 °C, 进样量 10 μL, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 95%~75% A; 10~15 min, 75%~

70% A; 15~20 min, 70%~60% A; 20~25 min, 60%~40% A, 检测波长 190~400 nm。

质谱条件: ESI 源; 正负离子同时扫描; 全扫描, 扫描范围 m/z 150~1 500; 毛细管电压为 3.0 kV (ESI⁺), 2.8 kV (ESI⁻); 锥孔电压为 25 V; 源温度为 120 °C; 脱溶剂气为 N₂, 脱溶剂气温度为 450 °C, 脱溶剂气体积流量为 500 L/h; 锥孔气体积流量为 30 L/h, 碰撞气为 Ar。

3 结果

3.1 小柴胡汤提取液化学成分分析

小柴胡汤提取液化学成分色谱图见图 1。在正负离子同时检测的模式下, 共检测到 44 个成分。通过与对照品对照, 确定了 6 个成分的结构; 通过参考相关文献^[5-8]中的质谱一级、二级数据和色谱保留行为, 共推测出 38 个成分的结构。具体结果见表 1。

以 43 号色谱峰为例, 说明化合物结构鉴定过程。该色谱峰的正离子一级谱图中出现 m/z 375 和 397 离子峰, 负离子一级谱图中出现 m/z 373 离子峰, 见图 2。 m/z 375 和 373 分别为 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 准分

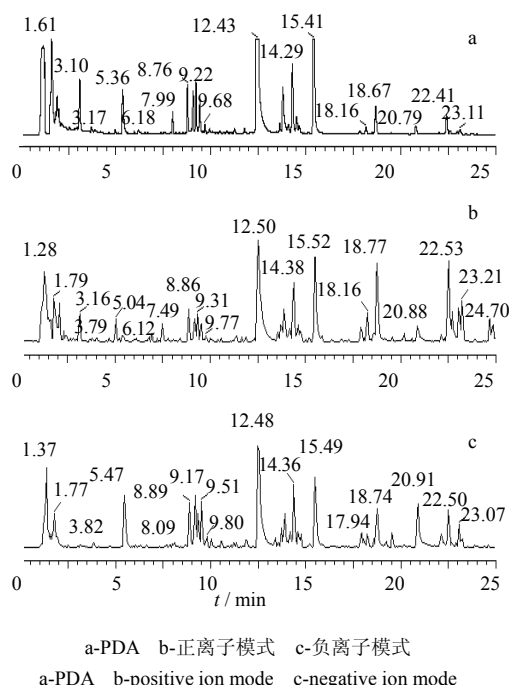


图 1 小柴胡汤提取液体外样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of XCD extract *in vitro*

表 1 小柴胡汤提取液的化学成分

Table 1 Chemical components in XCD extract

峰号 t /min	ESI ⁺ 准分子离子和碎片离子	ESI ⁻ 准分子离子和碎片离子	成分推测
1 3.16	166 $[M+H]^+$, 120 $[M+H-HCOOH]^+$	164 $[M-H]^-$	苯丙氨酸
2 5.04	205 $[M+H]^+$, 188 $[M+H-NH_3]^+$, 146 $[M+H-C_3H_7NO_2]^+$, 118	203 $[M-H]^-$	色氨酸
3 5.47	211 $[M+H]^+$	209 $[M-H]^-$, 165 $[M-H-CO_2]^-$, 121 $[M-H-2CO_2]^-$	D-葡萄糖二酸
4 6.07	603 $[M+Na]^+$, 419 $[M+H-Glu]^+$, 257 $[M+H-2Glu]^+$	579 $[M-H]^-$, 417 $[M-H-Glu]^-$	甘草苷葡萄糖苷
5 6.24	735 $[M+Na]^+$, 551 $[M+H-Glu]^+$, 419 $[M+H-Glu-Api]^+$, 257 $[M+H-2Glu-Api]^+$	711 $[M-H]^-$, 549 $[M-H-Glu]^-$, 417 $[M-H-Glu-Api]^-$	甘草苷葡萄糖苷糖苷
6 8.86	549 $[M+H]^+$, 571 $[M+Na]^+$, 531 $[M+H-H_2O]^+$, 411 $[M+H-H_2O-120]^+$, 393 $[M+H-H_2O-120-H_2O]^+$	547 $[M-H]^-$, 529 $[M-H-H_2O]^-$, 487 $[M-H-60]^-$, 457 $[M-H-90]^-$, 427 $[M-H-120]^-$, 367, 337	白杨素-6-C- α -L-吡喃阿拉伯糖-8-C- β -D-吡喃葡萄糖
7 9.08	441 $[M+Na]^+$, 257 $[M+H-Glu]^+$	417 $[M-H]^-$, 255 $[M-H-Glu]^-$	甘草苷*
8 9.20	573 $[M+Na]^+$, 419 $[M+H-Api]^+$, 257 $[M+H-Api-Glu]^+$	549 $[M-H]^-$, 417 $[M-H-Api]^-$, 255 $[M-H-Api-Glu]^-$	甘草素葡萄糖苷糖苷
9 9.31	419 $[M+H]^+$, 441 $[M+Na]^+$, 257 $[M+H-Glu]^+$	417 $[M-H]^-$, 255 $[M-H-Glu]^-$	异甘草苷
10 9.54	549 $[M+H]^+$, 531 $[M+H-H_2O]^+$, 483, 429 $[M+H-120]^+$, 393 $[M+H-H_2O-120-H_2O]^+$	547 $[M-H]^-$, 529 $[M-H-H_2O]^-$, 487 $[M-H-60]^-$, 457 $[M-H-90]^-$, 427 $[M-H-120]^-$, 367, 337	白杨素-6-C- β -D-吡喃葡萄糖-8-C- α -L-吡喃阿拉伯糖
11 10.54	417 $[M+H]^+$, 439 $[M+Na]^+$	415 $[M-H]^-$, 295 $[M-H-120]^-$	白杨素-8-C-吡喃阿拉伯糖
12 11.31	477 $[M+H]^+$, 499 $[M+Na]^+$, 301 $[M+H-GluA]^+$, 286 $[M+H-GluA-CH_3]^+$, 268 $[M+H-GluA-CH_3-H_2O]^+$	475 $[M-H]^-$, 299 $[M-H-GluA]^-$	三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸
13 11.65	823 $[M+Na]^+$, 621 $[M+H-Glu-H_2O]^+$, 603 $[M+H-Glu-2H_2O]^+$, 423 $[M+H-2Glu-3H_2O]^+$, 405 $[M+H-2Glu-4H_2O]^+$	845 $[M+HCO_2]^-$	人参皂苷 Rg ₁ *
14 11.88	551 $[M+H]^+$, 573 $[M+Na]^+$, 419 $[M+H-Api]^+$, 257 $[M+H-Api-Glu]^+$	549 $[M-H]^-$, 417 $[M-H-Api]^-$, 255 $[M-H-Api-Glu]^-$	异甘草素葡萄糖苷糖苷
15 12.45	431 $[M+H]^+$, 269 $[M+H-Glu]^+$	429 $[M-H]^-$	芒柄花苷

续表 1

峰号 <i>t</i> /min	ESI ⁺ 准分子离子和碎片离子	ESI ⁻ 准分子离子和碎片离子	成分推测
16 12.50	447 [M+H] ⁺ , 469 [M+Na] ⁺ , 271 [M+H-GluA] ⁺	445 [M-H] ⁻ , 269 [M-H-GluA] ⁻	黄芩苷*
17 13.53	447 [M+H] ⁺ , 285 [M+H-Glu] ⁺	445 [M-H] ⁻	汉黄芩素-5- <i>O</i> -葡萄糖苷
18 13.70	449 [M+H] ⁺ , 471 [M+Na] ⁺ , 273 [M+H-GluA] ⁺	447 [M-H] ⁻ , 271 [M-H-GluA] ⁻	5, 6-二羟基-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸黄烷酮
19 14.16	447 [M+H] ⁺ , 469 [M+Na] ⁺ , 271 [M+H-GluA] ⁺	445 [M-H] ⁻ , 269 [M-H-GluA] ⁻	黄芩素-5- <i>O</i> -葡萄糖醛酸
20 14.38	461 [M+H] ⁺ , 483 [M+Na] ⁺ , 285 [M+H-GluA] ⁺	459 [M-H] ⁻ , 283 [M-H-GluA] ⁻ , 175, 113	千层纸素 A-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸
21 14.61	431 [M+H] ⁺ , 255 [M+H-GluA] ⁺	429 [M-H] ⁻ , 253 [M-H-GluA] ⁻	白杨素葡萄糖醛酸
22 14.73	477 [M+H] ⁺ , 499 [M+Na] ⁺ , 301 [M+H-GluA] ⁺	475 [M-H] ⁻ , 299 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸
23 15.01	447 [M+H] ⁺ , 469 [M+Na] ⁺ , 285 [M+H-Glu] ⁺	445 [M-H] ⁻ , 283 [M-H-Glu] ⁻	千层纸素 A-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
24 15.24	447 [M+H] ⁺ , 469 [M+Na] ⁺ , 271 [M+H-GluA] ⁺	445 [M-H] ⁻	黄芩素-6- <i>O</i> -葡萄糖醛酸
25 15.52	461 [M+H] ⁺ , 483 [M+Na] ⁺ , 285 [M+H-GluA] ⁺	459 [M-H] ⁻ , 283 [M-H-GluA] ⁻ , 268 [M-H-GluA-CH ₃] ⁻	汉黄芩苷
26 15.58	491 [M+H] ⁺ , 513 [M+Na] ⁺ , 315 [M+H-GluA] ⁺	489 [M-H] ⁻ , 313 [M-H-GluA] ⁻	二羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸
27 15.87	463 [M+H] ⁺ , 485 [M+Na] ⁺ , 287 [M+H-GluA] ⁺	461 [M-H] ⁻ , 285 [M-H-GluA] ⁻	四羟基黄酮葡萄糖醛酸
28 16.49	985 [M+H] ⁺ , 809 [M+H-GluA] ⁺ , 615 [M+H-2GluA-H ₂ O] ⁺ , 453 [M+H-2GluA-H ₂ O-Glu] ⁺	983 [M-H] ⁻	甘草皂苷 A ₃
29 17.92	271 [M+H] ⁺ , 169 [M+H-C ₈ H ₆] ⁺	269 [M-H] ⁻ , 197 [M-H-CO-CO ₂] ⁻	异汉黄芩素*
30 18.09	839 [M+H] ⁺ , 663 [M+H-GluA] ⁺ , 487 [M+H-2GluA] ⁺ , 469 [M+H-2GluA-H ₂ O] ⁺	837 [M-H] ⁻	甘草皂苷 G ₂
31 18.20	301 [M+H] ⁺ , 323 [M+Na] ⁺ , 286 [M+H-CH ₃] ⁺ , 255 [M+H-CO-H ₂ O] ⁺ , 184 [M+H-CH ₃ -C ₈ H ₆] ⁺	299 [M-H] ⁻	三羟基-单甲氧基黄酮
32 18.60	331 [M+H] ⁺ , 353 [M+Na] ⁺	329 [M-H] ⁻	三羟基-二甲氧基黄酮
33 18.77	271 [M+H] ⁺ , 253 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 169 [M+H-C ₈ H ₆] ⁺	269 [M-H] ⁻	黄芩素*
34 20.88	823 [M+H] ⁺ , 845 [M+Na] ⁺ , 647 [M+H-GluA] ⁺ , 471 [M+H-2GluA] ⁺ , 453 [M+H-2GluA-H ₂ O] ⁺	821 [M-H] ⁻	甘草酸
35 21.22	831 [M+Na] ⁺ , 647 [M+H-Glu] ⁺ , 471 [M+H-Glu-GluA] ⁺ , 453 [M+H-Glu-GluA-H ₂ O] ⁺	807 [M-H] ⁻	甘草皂苷 B ₂
36 21.96	803 [M+Na] ⁺ , 763 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 745 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 619 [M+H-Glu] ⁺ , 601 [M+H-Glu-H ₂ O] ⁺ , 455 [M+H-Glu-H ₂ O-Fuc] ⁺ , 437 [M+H-Glu-2H ₂ O-Fuc] ⁺	779 [M-H] ⁻	柴胡皂苷 a*
37 22.13	823 [M+H] ⁺ , 845 [M+Na] ⁺ , 647 [M+H-GluA] ⁺ , 453 [M+H-2GluA-H ₂ O] ⁺	821 [M-H] ⁻	甘草皂苷 H ₂ /乌拉尔甘草皂苷 A/乌拉尔甘草皂苷 B
38 22.36	823 [M+H] ⁺ , 647 [M+H-GluA] ⁺ , 453 [M+H-2GluA-H ₂ O] ⁺	821 [M-H] ⁻	甘草皂苷 H ₂ /乌拉尔甘草皂苷 A/乌拉尔甘草皂苷 B
39 22.53	285 [M+H] ⁺ , 270 [M+H-CH ₃] ⁺ , 168 [M+H-CH ₃ -C ₈ H ₆] ⁺	283 [M-H] ⁻ , 268 [M-H-CH ₃] ⁻	汉黄芩素
40 22.59	825 [M+H] ⁺ , 847 [M+Na] ⁺ , 647 [M+H-GluA-2] ⁺ , 453 [M+H-2GluA-2-H ₂ O] ⁺	823 [M-H] ⁻	甘草皂苷 J ₂
41 22.64	803 [M+Na] ⁺ , 763 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 455 [M+H-Glu-H ₂ O-Fuc] ⁺ , 437 [M+H-Glu-2H ₂ O-Fuc] ⁺	—	柴胡皂苷 b ₂
42 22.93	803 [M+Na] ⁺ , 763 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 745 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 619 [M+H-Glu] ⁺ , 455 [M+H-Glu-H ₂ O-Fuc] ⁺ , 437 [M+H-Glu-2H ₂ O-Fuc] ⁺	—	柴胡皂苷 b ₁
43 23.02	375 [M+H] ⁺ , 397 [M+Na] ⁺ , 360 [M+H-CH ₃] ⁺ , 345 [M+H-2CH ₃] ⁺ , 327 [M+H-2CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 227 [M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	373 [M-H] ⁻ , 358 [M-H-CH ₃] ⁻ , 343 [M-H-2CH ₃] ⁻ , 328 [M-H-3CH ₃] ⁻ , 300 [M-H-3CH ₃ -CO] ⁻	黄芩新素 II
44 23.21	285 [M+H] ⁺ , 270 [M+H-CH ₃] ⁺ , 168 [M+H-CH ₃ -C ₈ H ₆] ⁺	283 [M-H] ⁻	千层纸素 A

*为经过对照品对照确定的成分

*identified components by reference substance

子离子峰。对 m/z 375 和 373 两个准分子离子进行二级扫描,发现正离子模式下出现 360 $[M+H-CH_3]^+$ 、345 $[M+H-2CH_3]^+$ 、327 $[M+H-2CH_3-H_2O]^+$ 、227 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$ 的碎片离子,负离子模式下出现 358 $[M-H-CH_3]^-$ 、343 $[M-H-2CH_3]^-$ 、328 $[M-H-3CH_3]^-$ 、300 $[M-H-3CH_3-CO]^-$ 的碎片离子,证明该化合物是至少含有 3 个甲氧基的黄酮类成分。

黄酮类化合物易发生 RDA 重排,重排时 C 环上 1-2 位的 C-O 键和 3-4 位的 C-C 键发生断裂(图 3),可以根据重排时脱去的中性碎片辅助判断黄酮的结构。正离子模式下 m/z 227 的存在是由 m/z 375 脱去 148 ($C_9H_8O_2$) 产生的,说明该黄酮 B 环上含有 1 个羟基和 1 个甲氧基。比较文献中黄酮类成分的裂解规律^[5],推测 43 号峰应为黄芩新素 II,结构见图 3。

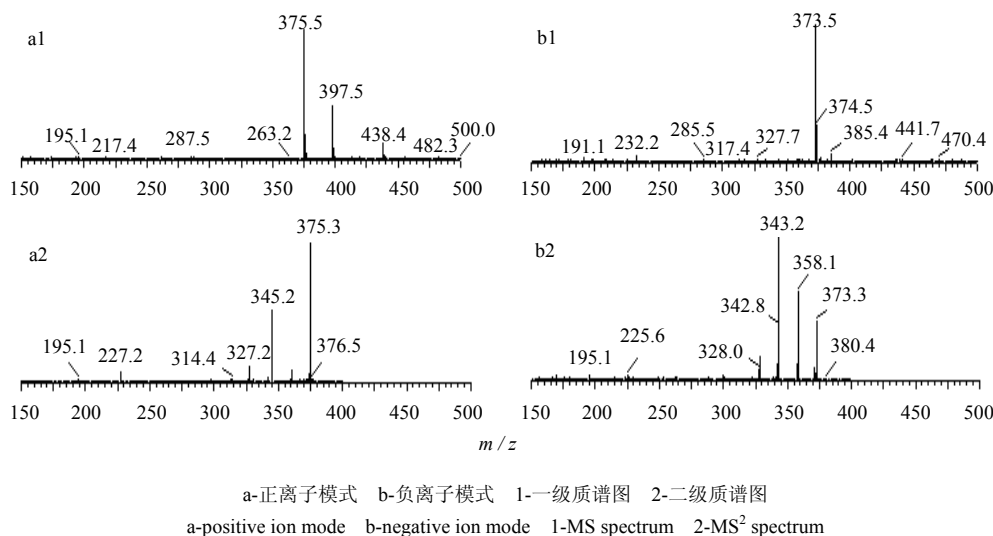


图 2 黄芩新素 II 的一级和二级质谱图
a-正离子模式 b-负离子模式 1-一级质谱图 2-二级质谱图
a-positive ion mode b-negative ion mode 1-MS spectrum 2-MS² spectrum

图 2 黄芩新素 II 的一级和二级质谱图
Fig. 2 MS and MS² spectra of skullcapflavon II

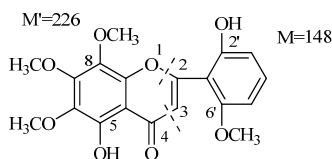


图 3 黄芩新素 II 结构式

Fig. 3 Structure of skullcapflavon II

3.2 小柴胡汤提取液入血成分分析

空白血清和 ig 给药后 2 h 含药血清样品色谱图见图 4。由于部分原形成分在含药血清中浓度较低,很难在全扫描模式下被检测到,故同时采用提取离子和多反应监测(MRM)的方法对原形成分进行分析。在含药血清样品中检测到黄芩苷、千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸、三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸、黄芩素-6-O-葡萄糖醛酸、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 等 7 个原形成分。同时,采用全扫描方式,对含药血清样品总离子流色谱图中各色谱峰的碎片信息进行解析,并将其与文献数据^[9-10]进行比对,初步推测出 8 个代谢物(表 2)。

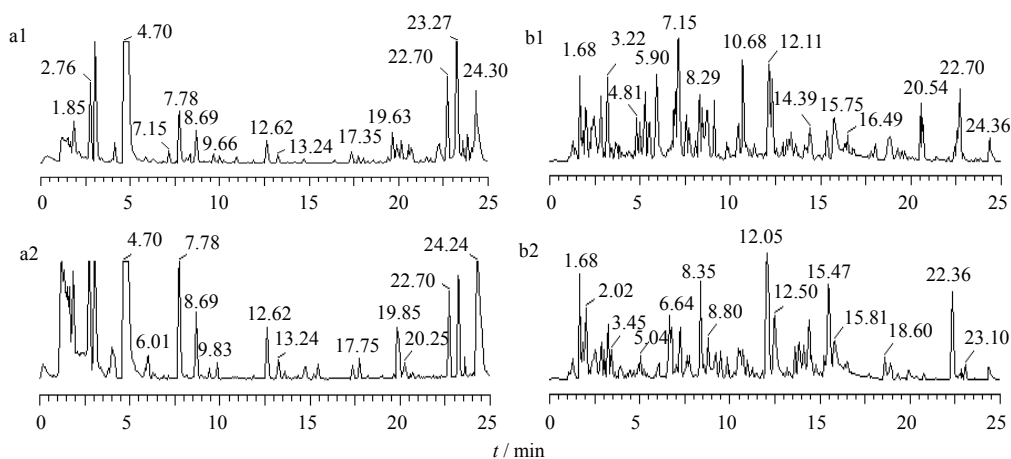
代谢产物 M1 和 M2 的谱图中显示 m/z 433 $[M+H]^+$ 的离子峰, m/z 257 碎片的出现是由母离子峰脱

去 176 形成的,提示 M1 和 M2 应该是某物质的葡萄糖醛酸结合物,根据分子量信息推测可能是甘草素葡萄糖醛酸。对 m/z 257 的碎片进行分析,得到 m/z 137 的碎片离子,与甘草素的碎片离子一致,推测 M1、M2 为甘草素葡萄糖醛酸结合物,但葡萄糖醛酸的结合位点不能确定。根据同样的方法,推测代谢产物 M3、M4、M5、M7 和 M8 分别为汉黄芩素葡萄糖葡萄糖醛酸结合物、黄芩素二葡萄糖醛酸、汉黄芩素二葡萄糖醛酸、异甘草素葡萄糖醛酸和汉黄芩素-5-O-葡萄糖醛酸。

代谢产物 M6 的谱图中显示 653 $[M+H]^+$ 的离子峰,同时出现 m/z 477 和 301 的碎片离子峰,提示 M6 应该是某物质的二葡萄糖醛酸结合物。对 m/z 301 碎片离子进行二级分析,得到 m/z 286, 255, 184 的碎片离子,推测其为黄酮类成分,并且黄酮母核的 B 环上无取代基,但仍不能确定其母核结构,只能初步推测为三羟基-单甲氧基黄酮二葡萄糖醛酸。

3.3 小柴胡汤提取液在抑郁模型大鼠尿液中的成分分析

空白尿液和 ig 给药后 0~24 h 含药尿液样品色谱图见图 4。比较空白尿液、含药尿液和提取液样



a-血清样品 b-尿液样品 1-空白样品 2-含药样品
a-serum sample b-urine sample 1-blank sample 2-sample after ig administration

图 4 血清样品和尿液样品正离子流色谱图

Fig. 4 Positive ion chromatograms of serum and urine samples

表 2 抑郁模型大鼠给药后血清中检测到的小柴胡汤成分的代谢产物

Table 2 Metabolites detected in serum of depressed rats after ig administration of XCD

代谢物	t/min	ESI^+ 准分子离子和碎片离子	ESI^- 准分子离子和碎片离子	代谢产物推测
M1	9.20	433 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 257 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$	431 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 255 $[\text{M}-\text{H}-\text{GluA}]^-$	甘草素葡萄糖醛酸结合物
M2	9.44	433 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 257 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$	431 $[\text{M}-\text{H}]^-$	甘草素葡萄糖醛酸结合物
M3	10.46	623 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 447 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$, 285 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}-\text{Glu}]^+$	621 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 445 $[\text{M}-\text{H}-\text{GluA}]^-$	汉黄芩素葡萄糖葡萄糖醛酸结合物
M4	10.68	623 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 447 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$, 271 $[\text{M}+\text{H}-2\text{GluA}]^+$	621 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 445 $[\text{M}-\text{H}-\text{GluA}]^-$	黄芩素二葡萄糖醛酸结合物
M5	10.96	637 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 461 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$, 285 $[\text{M}+\text{H}-2\text{GluA}]^+$	635 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 459 $[\text{M}-\text{H}-\text{GluA}]^-$	汉黄芩素二葡萄糖醛酸结合物
M6	11.48	653 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 477 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$, 301 $[\text{M}+\text{H}-2\text{GluA}]^+$	651 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 475 $[\text{M}-\text{H}-\text{GluA}]^-$	三羟基-单甲氧基黄酮二葡萄糖醛酸结合物
M7	13.07	433 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 257 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$	431 $[\text{M}-\text{H}]^-$	异甘草素葡萄糖醛酸结合物
M8	13.61	461 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 285 $[\text{M}+\text{H}-\text{GluA}]^+$	459 $[\text{M}-\text{H}]^-$	汉黄芩素-5-O-葡萄糖醛酸

品色谱图,利用提取离子和 MRM 的方法,通过解析各色谱峰的碎片离子并与文献中的数据进行比较^[10-11],在含药尿液样品中检测到黄芩苷、黄芩素-5-O-葡萄糖醛酸、千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸、白杨素葡萄糖醛酸、三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸、黄芩素-6-O-葡萄糖醛酸、汉黄芩苷、二羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸、异汉黄芩素、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 12 个原形成分,并检测到 19 个代谢产物,初步鉴定了其中 18 个的结构。代谢产物鉴定结果见表 3。

4 讨论

本实验首次应用 UPLC-MS/MS 法分析抑郁模型大鼠 ig 给予小柴胡汤提取液后血清中和尿液中的成分,为小柴胡汤抗抑郁作用的药效物质研究奠

定基础。因为抑郁模型大鼠的代谢可能与正常大鼠有差异,本研究采用 CUMS 法造成抑郁模型大鼠进行实验更具实际意义。

小柴胡汤水提液中多是黄酮类成分和皂苷类成分,并且黄酮类成分多以糖苷形式存在,其极性偏大,所以流动相梯度洗脱时选择较大比例水相,可以使极性大的组分保留时间比较适宜。考察了甲酸和醋酸铵作为水相添加剂,当使用甲酸时各峰峰形得到优化并且分离度得到改善。本方法在小柴胡汤提取液中未检测到大枣和生姜中的成分,这可能与药材提取方法或色谱和质谱条件有关。

本实验给药方案采用每天给药 1 次,分别于连续给药第 7 天和第 8 天收集尿液样品和血清样品^[12],

表 3 抑郁模型大鼠给药后尿液中检测到的小柴胡汤成分的代谢产物

Table 3 Metabolites detected in urine of depressed rats after administration of XCD

代谢物	t / min	ESI ⁺ 准分子离子和碎片离子	ESI ⁻ 准分子离子和碎片离子	代谢产物推测
M1	6.15	595 [M+H] ⁺ , 617 [M+Na] ⁺ , 433 [M+H-Glu] ⁺ , 257 [M+H-2GluA] ⁺	593 [M-H] ⁻	甘草素葡萄糖醛酸葡萄糖结合物
M2	7.41	479 [M+H] ⁺ , 461 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 285 [M+H-H ₂ O-GluA] ⁺	477 [M-H] ⁻	汉黄芩素葡萄糖醛酸水合物
M3	9.08	623 [M+H] ⁺ , 447 [M+H-GluA] ⁺ , 271 [M+H-2GluA] ⁺	621 [M-H] ⁻ , 445 [M-H-GluA] ⁻ , 269 [M-H-2GluA] ⁻	黄芩素二葡萄糖醛酸结合物
M4	9.20	433 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-GluA] ⁺	431 [M-H] ⁻ , 255 [M-H-GluA] ⁻	甘草素葡萄糖醛酸结合物
M5	9.44	433 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-GluA] ⁺	431 [M-H] ⁻	甘草素葡萄糖醛酸结合物
M6	9.67	465 [M+H] ⁺ , 289 [M+H-GluA] ⁺	463 [M-H] ⁻	未知
M7	10.28	609 [M+H] ⁺ , 447 [M+H-Glu] ⁺ , 285 [M+H-2Glu] ⁺	607 [M-H] ⁻	汉黄芩素二葡萄糖结合物
M8	10.46	623 [M+H] ⁺ , 447 [M+H-GluA] ⁺ , 285 [M+H-GluA-Glu] ⁺	621 [M-H] ⁻ , 445 [M-H-GluA] ⁻	汉黄芩素葡萄糖葡萄糖醛酸结合物
M9	10.57	609 [M+H] ⁺ , 447 [M+H-Glu] ⁺ , 271 [M+H-Glu-GluA] ⁺	607 [M-H] ⁻ , 445 [M-H-Glu] ⁻ , 269 [M-H-GluA] ⁻	黄芩素葡萄糖醛酸葡萄糖结合物
M10	10.68	623 [M+H] ⁺ , 447 [M+H-GluA] ⁺ , 271 [M+H-2GluA] ⁺	621 [M-H] ⁻ , 445 [M-H-GluA] ⁻	黄芩素二葡萄糖醛酸结合物
M11	11.48	653 [M+H] ⁺ , 477 [M+H-GluA] ⁺ , 301 [M+H-2GluA] ⁺	651 [M-H] ⁻ , 475 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-单甲氧基黄酮二葡萄糖醛酸结合物
M12	12.39	507 [M+H] ⁺ , 331 [M+H-GluA] ⁺	505 [M-H] ⁻ , 329 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M13	12.72	477 [M+H] ⁺ , 301 [M+H-GluA] ⁺	475 [M-H] ⁻ , 299 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M14	12.89	507 [M+H] ⁺ , 331 [M+H-GluA] ⁺	505 [M-H] ⁻ , 329 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M15	13.42	491 [M+H] ⁺ , 315 [M+H-GluA] ⁺	489 [M-H] ⁻	二羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M16	13.61	461 [M+H] ⁺ , 285 [M+H-GluA] ⁺	459 [M-H] ⁻	汉黄芩素-5-O-葡萄糖醛酸
M17	13.94	477 [M+H] ⁺ , 301 [M+H-GluA] ⁺	475 [M-H] ⁻ , 299 [M-H-GluA] ⁻	三羟基-单甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M18	16.69	491 [M+H] ⁺ , 315 [M+H-GluA] ⁺	489 [M-H] ⁻	二羟基-二甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物
M19	17.52	521 [M+H] ⁺ , 345 [M+H-GluA] ⁺	519 [M-H] ⁻ , 343 [M-H-GluA] ⁻	二羟基-三甲氧基黄酮葡萄糖醛酸结合物

这种给药方式可以使药物在大鼠体内积累达到稳态浓度，从而便于分析含药尿液和含药血清中的原形成分及其代谢产物。

实验结果表明抑郁模型大鼠 ig 给予小柴胡汤提取液后在血清和尿液中的代谢产物主要为 II 相代谢产物，并且大部分是葡萄糖醛酸结合物。实验中检测到小柴胡汤中主要是黄酮类成分，这类化合物都含有酚羟基，在体内易与葡萄糖醛酸结合形成葡萄糖醛酸苷，使得代谢产物的水溶性增加，易于排出体外。同时发现血清样品中检测到的全部原形成分也同时出现在尿液样品中，血清中检测到的代谢产物 M1、M2、M3、M4、M8 在尿液样品中也被检测到，这

些血清和尿液中共同存在的物质在下一步药效物质研究中更具有意义。尿液中检测到的原形成分及代谢产物都多于血清中，这为代谢产物的富集和制备提供了可能，也为进一步研究小柴胡汤抗抑郁作用药效物质提供了思路。

对于体外和体内样品中的部分成分仅仅依靠其色谱保留行为以及质谱一级和二级数据等信息进行结构鉴定，不能准确确定其结构，还需要在以后的研究中通过分离和制备技术以及核磁共振等其他分析方法来进行研究，以得到明确的结构。

参考文献

[1] 高建伟, 倪亚平. 小柴胡汤证是治疗抑郁症的良方 [J].

- 实用中医内科杂志, 2008, 22(4): 74-75.
- [2] 陈亚萍. 小柴胡汤加减治疗抑郁症 35 例临床观察 [J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(10): 741-742.
- [3] 刘晓帆, 娄子洋, 朱臻宇, 等. 采用 HPLC-TOF/MS 对中药复方小柴胡汤中化学成分的分析鉴别 [J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(8): 941-946.
- [4] 王建醒, 周 丽, 徐华锋, 等. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其评价 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2006, 27(6): 644-646.
- [5] Han J, Ye M, Xu M, *et al.* Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine—Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 848: 355-362.
- [6] 段天璇, 马长华, 王全文, 等. HPLC-MS 法鉴别甘草的指纹图谱 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 414-417.
- [7] 李 丽, 刘志强, 许庆轩, 等. 人參中皂苷类化合物的 HPLC-ESI MS 研究 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 45-48.
- [8] Chen P, Li C, Liang S P, *et al.* Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubers of *Pinellia ternata* and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 843: 183-193.
- [9] 刑 杰. 黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [10] 路林玲, 束 艳, 钱大玮, 等. 大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定 [J]. 药科学报, 2011, 46(11): 1374-1379.
- [11] 王亦琳. 中药复方小续命汤有效成分组在大鼠体内代谢研究 [D]. 北京: 北京协和医学院药物研究所, 2010.
- [12] 王莉梅. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 77-80.

《中草药》杂志获国家自然科学基金出版基金资助

8 月 17 日, 2012 年度国家自然科学基金申请项目评审结果公布, 《中草药》杂志喜获重点学术期刊项目资助。

国家自然科学基金委员会在 2012 年度项目申请集中接收期间共接收各类项目申请 170 792 项, 经初步审查受理 165 651 项。根据《国家自然科学基金条例》、国家自然科学基金相关类型项目管理办法的规定和专家评审意见, 决定资助面上项目、重点项目、优秀青年科学基金项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目、海外及港澳学者合作研究基金项目、国家基础科学人才培养基金项目、重大国际(地区)合作研究项目、科学仪器基础研究专款项目、国家重大科研仪器设备研制专项自由申请项目、部分联合基金项目和重点学术期刊项目合计 34 779 项。

《中草药》杂志以“新”——选题新、发表成果创新性强, “快”——编辑出版速度快, “高”——刊文学术水平和编辑质量高为办刊特色, 载文覆盖面广、信息量大、学术水平高, 近年屡获大奖, 如中国出版政府奖期刊奖、国家期刊奖、新中国 60 年有影响力的期刊及期刊人、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等。《中草药》杂志将以此为契机, 进一步提高期刊的学术水平, 扩大影响力, 并带动中草药杂志社的整体发展, 走集团化道路, 把中草药杂志社做大做强。同时, 将竭力打造中草药英文版——Chinese Herbal Medicines, 积极推进其国际化进程, 为中药现代化、国际化做出更大的贡献!