

天舒胶囊血中移行成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

秦建平^{1,2}, 孙晓萍^{1,2}, 吴建雄^{1,2}, 陈健^{1,2}, 李家春^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 研究天舒胶囊化学成分及大鼠 ig 天舒胶囊后血中移行成分。方法 以 UPLC-Q-TOF-MS 作为分析方法, 以阿魏酸、咖啡酸、盐酸川芎嗪、天麻素、5-羟甲基糠醛和藁本内酯作为对照, 综合分析总离子流色谱图、提取离子流图及质谱图等信息, 通过对比各色谱峰的保留时间及质谱图特征, 确认天舒胶囊化学成分及大鼠 ig 天舒胶囊后血中移行成分。结果 推断出天舒胶囊中 24 个化学成分, 其中 5 个来源于天麻, 其他 19 个来源于川芎; 给药后血浆中共发现 13 个原型成分。结论 为阐明天舒胶囊药效物质基础和完善质量标准提供依据。

关键词: 天舒胶囊; UPLC-Q-TOF-MS; 移行成分; 阿魏酸; 咖啡酸; 盐酸川芎嗪; 天麻素; 5-羟甲基糠醛; 藁本内酯

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)05-0649-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.007

UPLC-Q-TOF-MS analysis on constituents of Tianshu Capsule absorbed into plasma

QIN Jian-ping^{1,2}, SUN Xiao-ping^{1,2}, WU Jian-xiong^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of Tianshu Capsule *in vivo* and *in vitro*. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was used as the analytic method. The ferulic acid, caffeic acid, ligustrazine hydrochloride, gastrodin, 5-hydroxymethyl furfural, and ligustilide were used as the reference compounds. The information on the total ion chromatogram, extraction chromatogram and the mass spectrogram were synthetically analyzed to confirm the constituents of Tianshu Capsule *in vivo* and *in vitro*. **Results** Twenty-four compounds from Tianshu Capsule were detected among five constituents came from Tianma and 19 constituents came from Chuanxiong. After oral administration of Tianshu Capsule, 13 compounds were absorbed into plasma. **Conclusion** The findings obtained from the study can provide the useful information for the determination of bioactive substances and the perfection of quality standard of Tianshu Capsule.

Key words: Tianshu Capsule; UPLC-Q-TOF-MS; constituents absorbed into plasma; ferulic acid; caffeic acid; ligustrazine hydrochloride; gastrodin; 5-hydroxymethyl furfural; ligustilide

天舒胶囊是在金·刘完素《宣明论方》中的大川芎方基础上研究开发的现代中药制剂, 由川芎、天麻 2 味药组成, 具有活血平肝、通络止痛之功效, 治疗瘀血阻络肝阳上亢所致的头痛诸证, 收载于《中国药典》2010 年版一部, 其标准中规定采用 HPLC-UV 分别测定指纹图谱和川芎、天麻中的指标性成分阿魏酸、天麻素的量, 用于天舒胶囊质量的评价。天舒胶囊处方中药味川芎、天麻和原方大川芎方的体内外化学成分分析已有文献报道^[1-4], 但该制剂经提取浓缩等工序处理后其物质效应基础可能区别于大川芎方, 关于天舒胶囊药效物质基础研究的报道

较少^[5], 尚未见其化学成分及入血成分研究, 本研究应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析了天舒胶囊的化学成分及其入血成分, 确定了除阿魏酸和天麻素外更多的有效成分, 共推断出 24 个化学成分, 其中 5 个来源于天麻, 其他 19 个来源于川芎; 为其体内物质基础研究及质量标准的完善奠定了基础。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高压液相色谱仪, Agilent 6538 Q-TOF 质谱仪 (美国 Agilent 公司); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); Centrifuge 5415D 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Milli-Q

收稿日期: 2014-05-11

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”项目: 偏头痛治疗药物天舒胶囊大品种技术改造 (2012ZX09201201-002)

作者简介: 秦建平 (1979—), 女, 本科, 工程师, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: (0518)81152321 E-mail: qinjianping111@126.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzzh-nj@163.net

Academic 纯水机 (美国 Millipore 公司); GL-88B 旋涡混合器 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-250DB 型超声波清洗机 (昆山市超声波仪器有限公司)。

天舒胶囊 (批号 121003, 江苏康缘药业股份有限公司); 对照品阿魏酸 (批号 110773-200701)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、盐酸川芎嗪 (批号 110817-201006)、天麻素 (批号 110807-200605)、欧当归内酯 A (批号 111826-201102)、Z-藁本内酯 (批号 111737-201102) 和 5-羟甲基糠醛 (批号 111626-201007) 均购于中国食品药品检定研究院。肝素钠 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇 (色谱纯, Merck 公司); 甲酸 (色谱纯, Fluka 公司); Millipore 超纯水。

SD 健康雄性大鼠, 体质量 (400 ± 50) g, SPF 级, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (沪) 2008-0016。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

色谱条件: Proshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 柱温 40 °C; 流动相 A 为甲醇, B 为 0.1% 甲酸水溶液, 线性梯度洗脱, 0~5 min, 5%~15% A; 5~35 min, 15%~95% A; 35~40 min, 95%~100% A; 体积流量 0.5 mL/min; 进样量为 10 μL; 检测波长为 276 nm。

质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI), 正负离子全扫描检测, 扫描范围 m/z 100~1 100, 加热毛细管温度 325 °C, 干燥气体积流量 9 L/min, 喷雾器压力 310 kPa, 毛细管电压 4 000 V (正离子模式), 3 500 V (负离子模式), 碎裂电压 140 V, 锥孔电压 65 V。

2.2 对照品溶液的制备

取阿魏酸、咖啡酸、盐酸川芎嗪、天麻素、5-羟甲基糠醛、欧当归内酯 A 和 Z-藁本内酯对照品适量, 精密称定, 用甲醇制成质量浓度分别为 10、10、10、10、12、13 和 17 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 天舒胶囊供试品溶液的制备

取天舒胶囊内容物, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 离心, 取上清液, 作为天舒胶囊 UPLC-Q-TOF-MS 分析的供试品溶液。

2.4 天舒胶囊给药样品溶液的制备

取天舒胶囊内容物, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成每 100 毫升含天舒胶囊 18 g 的样品溶液。

2.5 血浆样品的采集与处理

SD 健康雄性大鼠, 体质量 (400 ± 50) g, 给药前不禁食, 不禁水, 给药前眼眶采血取空白血浆后给药, 1g 给药天舒胶囊样品溶液 3.6 g/kg 后 30 min 对大鼠进行眼眶取血 1.0 mL, 以肝素抗凝, 4 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 血浆于 -20 °C 冰冻保存。

取空白血浆和给药血浆约 0.8 mL, 分别加入 50 μL 1% 甲酸水溶液和 500 μL 甲醇, 涡旋 30 s, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 转移上清液, 残渣再加入 500 μL 甲醇, 涡旋 30 s, 超声处理 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 合并上清液, 40 °C 氮气吹干, 残渣加入 200 μL 甲醇溶解, 12 000 r/min 离心 5 min, 转移上清液进行分析。

2.6 天舒胶囊化学成分分析

天舒胶囊供试品溶液正、负总离子流图见图 1,

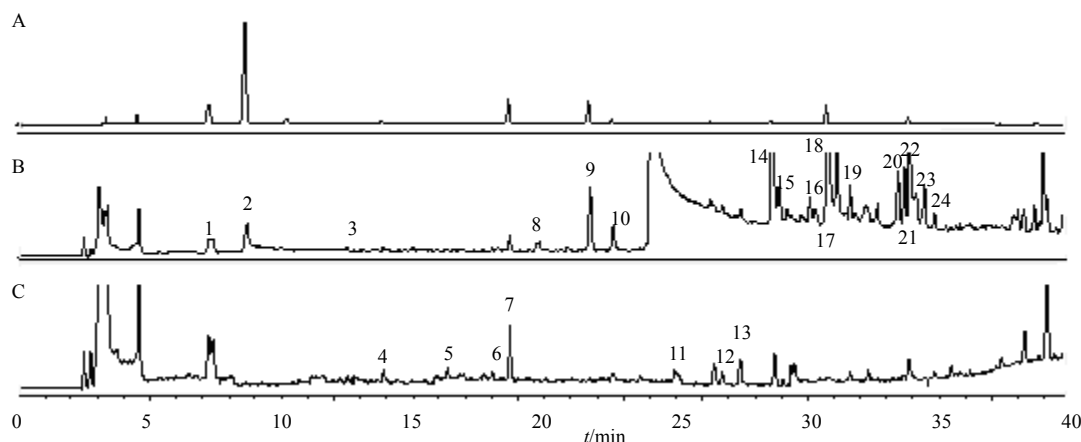


图 1 天舒胶囊 276 nm 下的液相色谱图 (A) 和总离子流图 (B-正离子, C-负离子)

Fig. 1 HPLC (A) and total ion chromatogram (B-kation, C-anion) of Tianshu Capsual (at 276 nm)

结合对照品及相关文献数据^[1-4]对比进行化学成分
确认(表1),共推断出24个化学成分,通过与天

麻和川芎在相同条件下获得的TIC图和质谱信息比
较,其中TIC图中1、2、3、5和6号峰5个化学

表1 天舒胶囊化学成分 UPLC-Q-TOF-MS 数据及结果推测

Table 1 Speculation and results on UPLC-Q-TOF-MS data of chemical constituents in Tianshu Capsual

编号	t_R /min	一级离子	测定值	理论值	误差	分子式	化合物
1 ⁺	7.23	$[M+NH_4]^+$	304.139 8	304.139 1	-2.30	$C_{13}H_{18}O_7$	天麻素
		$[M+Cl]^-$	321.076 0	321.074 7	-4.00		
2 ⁺	8.68	$[M+H]^+$	127.031 5	127.031 7	1.60	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基糠醛
3	12.52	$[M+NH_4]^+$	478.156 1	478.155 5	-1.20	$C_{19}H_{24}O_{13}$	2-[4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzyl] citrate
		$[M-H]^-$	459.114 2	459.114 4	-0.40		
4	13.89	$[M+H]^+$	355.103 1	355.102 4	-2.00	$C_{16}H_{18}O_9$	咖啡酰奎宁酸
		$[M-H]^-$	353.086 5	353.087 8	3.70		
5	16.32	$[M-H]^-$	727.210 5	727.209 1	-1.90	$C_{32}H_{40}O_{19}$	巴利森苷 C
6	17.68	$[M-H]^-$	995.305 2	995.303 8	-1.40	$C_{45}H_{56}O_{25}$	巴利森苷
7 ⁺	18.71	$[M+H]^+$	195.065 4	195.065 2	-1.00	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸
		$[M-H]^-$	193.050 8	193.050 6	-1.00		
8	19.79	$[M+H]^+$	227.127 9	227.127 8	-0.40	$C_{12}H_{18}O_4$	洋川芎内酯 J
		$[M+Na]^+$	249.109 8	249.109 7	-0.40		
		$[2M+Na]^+$	475.230 9				
9 ⁺	21.82	$[M+H]^+$	225.111 6	225.112 1	2.20	$C_{12}H_{16}O_4$	洋川芎内酯 I
		$[M+Na]^+$	247.093 6	247.094 1	2.00		
		$[2M+Na]^+$	471.192 0				
10 ⁺	22.74	$[M+H]^+$	225.111 4	225.112 1	3.10	$C_{12}H_{16}O_4$	洋川芎内酯 H
		$[M+Na]^+$	247.093 4	247.094 1	2.80		
		$[2M+Na]^+$	471.197 7				
11	25.16	$[M-H]^-$	221.082 8	221.081 9	-4.10	$C_{12}H_{14}O_4$	洋川芎内酯 D
12	26.77	$[M+H]^+$	209.117 5	209.117 2	-1.40	$C_{12}H_{16}O_3$	洋川芎内酯 G
		$[M-H]^-$	207.103 7	207.102 7	-4.80		
13	27.43	$[M+H]^+$	207.101 3	207.101 6	1.40	$C_{12}H_{14}O_3$	洋川芎内酯 F
		$[M-H]^-$	205.087 6	205.087 0	-2.90		
14 ⁺	28.68	$[M+H]^+$	193.122 8	193.122 3	-2.60	$C_{12}H_{16}O_2$	洋川芎内酯 A
15	28.89	$[M+H]^+$	191.106 8	191.106 7	-0.50	$C_{12}H_{14}O_2$	丁基苯酞
16	30.09	$[M+H]^+$	195.138 3	195.138 0	-1.50	$C_{12}H_{18}O_2$	蛇床内酯
17	30.26	$[M+H]^+$	191.107 2	191.106 7	-2.60	$C_{12}H_{14}O_2$	E-藁本内酯
18 ⁺	30.78	$[M+H]^+$	191.106 1	191.106 7	3.10	$C_{12}H_{14}O_2$	Z-藁本内酯
19	31.62	$[M+H]^+$	381.206 5	381.206 0	-1.30	$C_{24}H_{28}O_4$	dimer
		$[M+NH_4]^+$	398.233 6	398.232 6	-2.50		
20	33.46	$[M+H]^+$	383.221 6	383.221 7	0.26	$C_{24}H_{30}O_4$	dimer
		$[M+Na]^+$	405.203 4	405.203 6	0.49		
21	33.70	$[M+H]^+$	381.208 1	381.206 0	-5.50	$C_{24}H_{28}O_4$	dimer
		$[M+NH_4]^+$	398.233 0	398.232 6	-1.00		
22 [*]	33.88	$[M+H]^+$	381.207 7	381.206 0	-4.40	$C_{24}H_{28}O_4$	欧当归内酯 A
		$[M+NH_4]^+$	398.233 7	398.232 6	-2.80		
23	34.15	$[M+H]^+$	381.205 9	381.206 0	0.26	$C_{24}H_{28}O_4$	dimer
		$[M+NH_4]^+$	398.232 8	398.232 6	-0.50		
24	34.42	$[M+H]^+$	383.222 5	383.221 7	-2.10	$C_{24}H_{30}O_4$	dimer
		$[M+Na]^+$	405.205 1	405.203 6	-3.70		

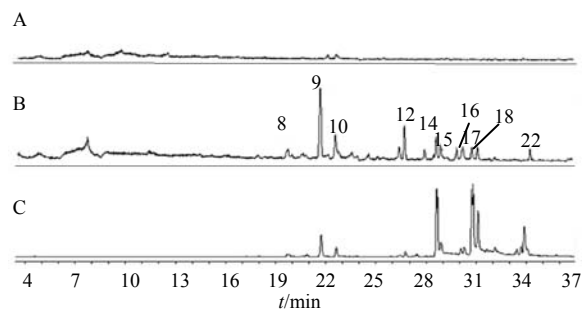
*经过对照品比对鉴定的化合物; +为质量标准中控制的化合物

*compounds identified by comparison on reference substances; +compounds controlled in quality standards

成分来源于天麻,其他 19 个成分来源于川芎,为酚酞类成分、苯酞类成分和苯酞二聚体化合物。色谱峰 19、20、21、23 和 24 均为苯酞二聚体化合物,准分子离子峰为 m/z 381.2 $[M+H]^+$, 可能为 riligustilide 和 tokinolide B, 准分子离子峰为 m/z 383.2 $[M+H]^+$ 可能为 senkyunolide P, 但由于质谱相似及无对照品,难以进行区分。

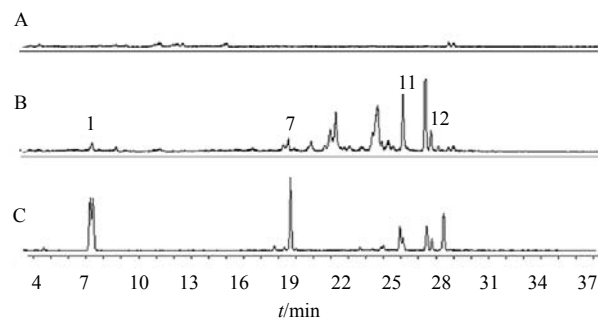
2.7 天舒胶囊血中移行成分分析

对比空白血浆、给药血浆和天舒胶囊 TIC 图(图 2、3),仅发现阿魏酸(ferulic acid, 7 号峰)和洋川芎内酯 D(senkyunolide D, 11 号峰)为天舒胶囊入血成分。再根据“2.6”项中天舒胶囊推断的 24 个化合物,选择丰度相对较高的离子作为特征目标离子,分别从空白血浆、给药血浆和天舒胶囊中获得对应化合物的提取离子流图。对获得的 3 个提取离子流图进行比较,在给药血浆和天舒胶囊中对应位置共同存在而在空白血浆中未出现的色谱峰,推断为吸收入血原型成分。依据此方法,共发现 13 个吸收入血成分,分别为天麻素(gastrodin, 1 号峰)、阿魏酸(ferulic acid, 7 号峰)、洋川芎内酯 J(senkyunolide J, 8 号峰)、洋川芎内酯 I(senkyunolide I, 9 号峰)、洋川芎内酯 H(senkyunolide H, 10 号峰)、洋川芎内酯 D(senkyunolide D, 11 号峰)、洋川芎内酯 G(senkyunolide G, 12 号峰)、洋川芎内酯 A(senkyunolide A, 14 号峰)、丁基苯酞(butylphthalide, 15 号峰)、蛇床内酯(cnidilide, 16 号峰)、*E*-藁本内酯(*E*-ligustilide, 17 号峰)、*Z*-藁本内酯(*Z*-ligustilide, 18 号峰)和欧当归内酯 A(levistolide A, 22 号峰)。



A-空白血浆 B-给药血浆 C-天舒胶囊
A-blank plasma B-plasma with administration C-Tianshu Capsual

图 2 吸收入血化学成分正离子模式下提取离子流图
Fig. 2 Extraction ion chromatogram of chemical constituents absorbed in plasma under kation patten



A-空白血浆 B-给药血浆 C-天舒胶囊
A-blank plasma B-plasma with administration C-Tianshu Capsual

图 3 吸收入血化学成分负离子模式下提取离子流图
Fig. 3 Extraction ion chromatogram of chemical constituents absorbed in plasma under anion patten

3 讨论

由于给药 10 倍临床剂量后血浆中成分的量仍比较低,而 TIC 图上包含了所有化合物的峰,内源性物质干扰严重,从总离子流图中很难直接观测到原型成分,通过总离子流色谱图对比,仅能观察到 2 个入血成分。根据天舒胶囊推断的 24 个化合物,选择丰度相对较高的离子作为特征目标离子,分别从空白血浆、给药血浆和天舒胶囊中获得对应化合物的提取离子流图,然后进行入血成分对比分析,不仅大大提高了分析灵敏度,而且还提高了选择性。

实验考察了固相萃取小柱对血浆样品的处理,结果固相萃取小柱处理后未能提高检测灵敏度。又分别考察了有机溶剂法和加酸法处理血浆的效果,结果表明加酸法优于有机溶剂法,因此采用加酸法处理血浆样品。

本研究考察了 1 倍、3 倍和 10 倍临床剂量的给药剂量,结果给药 10 倍临床剂量的血浆 EIC 图峰的数目最多且响应值较高,故选定 10 倍临床剂量为给药剂量。分别在给药后 15、30、60 和 120 min 后进行眼眶取血,测定分析,结果给药 30 min 后血浆 EIC 图中峰的数目最多且响应值较高,故选定给药后 30 min 眼眶取血。

本实验对天舒胶囊化学成分和入血成分进行了研究,推断出天舒胶囊中 24 个化学成分,其中 5 个化学成分来源于天麻,其他 19 个成分来源于川芎,给药后血浆中共发现 13 个原型成分,对于研究天舒胶囊体内物质基础及质量标准的完善具有重要意义。

参考文献

- [1] 沈 岚, 林 晓, 梁 爽, 等. HPLC-DAD-MSⁿ联用技术表征大川芎方效应组分中主要化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 36(9): 1175-1178.
- [2] Wang L, Xiao H B, Liang X M, *et al.* Identification of phenolics and nucleoside derivatives in *Gastrodia elata* by HPLC-UV-MS [J]. *J Seperat Sci*, 2007, 30(10): 1488-1495.
- [3] 沈 岚, 林 晓, 洪燕龙, 等. 大川芎方效应组分血浆及脑脊液 HPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 2017-2023.
- [4] 魏元锋, 林 晓, 张 宁, 等. 大川芎方效应组分血中移行成分 UPLC-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1245-1248.
- [5] 孙 兰, 林 楠, 范振宇, 等. 天舒胶囊效应部位组对硝酸甘油致大鼠偏头痛的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 14(2): 1489-1492.