

宝儿康散大鼠 ig 给药后血浆暴露成分分析

何坤明^{1,2}, 刘延平², 杨元辉², 魏广力², 李全胜², 陈勇^{1*}, 司端运^{2*}

1. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北大学生物资源绿色转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 分析大鼠 ig 宝儿康散后在血浆中的暴露成分, 为其作用机制及药动学研究奠定基础。**方法** 采用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF/MS), 分离给药后吸收入血成分。根据化合物的保留时间, 相对分子质量及二级质谱特征碎片, 结合文献报道, 分析鉴定大鼠血浆中宝儿康散化学成分。**结果** 大鼠 ig 宝儿康散 1 h 后, 在血浆中分离鉴定了 23 个化合物, 其中有 5 个化合物通过与对照品比对保留时间与质谱数据, 确定了化学结构, 分别为牡荆素、甘草素、橙皮素、甘草次酸、熊果酸。**结论** 本方法可以快速分析宝儿康散大鼠 ig 给药后血浆暴露成分, 对进一步探究其作用机制及其药动学奠定了基础。

关键词: 宝儿康散; 高分辨质谱; 血浆暴露成分; 牡荆素; 甘草素; 橙皮素; 甘草次酸; 熊果酸

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章** 0253-2670(2017)09-1740-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.008

Analysis on components exposing in rat plasma after oral administration of Baoerkang Powder

HE Kun-ming^{1,2}, LIU Yan-ping², YANG Yuan-hui², WEI Guang-li², LI Quan-sheng², CHEN Yong¹, SI Duan-yun²

1. Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the components exposing in rat plasma after oral administration of Baoerkang Powder, and to study the mechanism of Baoerkang Powder and pharmacokinetic behavior. **Methods** Components absorbed in rat plasma after oral administration of Baoerkang Powder to rats were analyzed by UPLC tandem High-resolution mass spectrometer. The structures of Baoerkang Powder in rat plasma identified by comparing the retention time, molecular weight, and CID fragmentation patterns with their corresponding compounds reported in the literatures. **Results** Twenty-three components in rat plasma were identified after oral administration of Baoerkang Powder to rats for 1 h, including five components confirmed by comparing retention time and information of mass with their reference substances, components confirmed were vitexin, liquiritigenin, hesperetin, glycyrrhetic acid, and ursolic acid. **Conclusion** It is suggested that the method could be applied to quick analysis of the components exposing in rat plasma after oral administration of Baoerkang Powder, which is beneficial to studying its mechanism and pharmacokinetic behavior.

Key words: Baoerkang Powder; high-resolution mass spectrometry; plasma exposure analysis; vitexin; liquiritigenin; hesperetin; glycyrrhetic acid; ursolic acid

传统中药在预防和治疗疾病, 尤其是疑难杂症和慢性疾病方面发挥着重要的作用。复方中药由多味药材组成, 所含成分十分复杂。因此, 研究其中单个化合物的体内外活性并不能代表复方的药理活

性与体内作用特点。中药以口服为主, 经消化和吸收后入血。从药动学角度来看, 只有被吸收入血的化学成分才有可能作为药物的活性成分, 发挥预防和治疗疾病的作用。因此, 有必要分析中药复方制

收稿日期: 2016-11-25

作者简介: 何坤明 (1988—), 男, 在读硕士, 主要从事药动学研究。Tel: 15620251879 E-mail: hkm458063956@126.com

*通信作者 陈勇 (1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为微生物与生化药理学。Tel: (027)88663590 E-mail: 1740952455@qq.com

司端运 (1965—), 男, 研究员, 博士, 主要从事药动学研究。Tel: (022)84845261 E-mail: sidy@tjpr.com

剂经口服后的入血成分,为中药活性成分的药动力学研究奠定基础^[1]。液质联用技术,尤其是以 Q-TOF 技术为代表的高分辨质谱,已被广泛用于中药化学成分的体内外分析,在中药活性成分及其代谢物的筛选与鉴定方面发挥着重要的作用^[2]。

宝儿康散是在香港及东南亚地区广泛使用的一种中药复方制剂,由 14 味中药(太子参、芡实、茯苓、白术、甘草、山药、薏苡仁、山楂、陈皮、麦芽、石菖蒲、莲子、北沙参、白扁豆)组成,具有补气健脾、开胃消食、渗湿止泻等功能。临床上适用于小儿脾胃虚弱、消化不良、食欲不振、大便异常、精神困倦、睡眠不安、夜惊夜啼等症^[3-4]。目前关于宝儿康散的活性成分及其作用机制尚不清楚,不利于质量控制,也限制了其临床应用。本实验应用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF/MS),分离、鉴定了大鼠 ig 宝儿康散后的血浆暴露成分,这对进一步研究阐明宝儿康散的药效物质基础与作用机制具有积极作用。

1 仪器与试剂

Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨飞行时间质谱仪;XS 105 型分析天平(瑞士 METTER TOLEDO 公司);3K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Thermo Revco 超低温冰箱(中科美菱公司);固相萃取柱(迪马科技)。

宝儿康散(批号 9150789)购于香港康思堂制药有限公司;对照品甘草次酸(批号 110723-201514)、甘草素(批号 110325-201518)、熊果酸(批号 PCS0365-150329)购自中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%;牡荆素(批号 PCS0646-150714)、橙皮素(批号 PCS0168-160129)购自北京中科华标生物技术研究院,质量分数均大于 98%;色谱纯甲醇、乙腈购于美国 Fisher 公司;色谱纯甲酸购于天津市光复精细化工研究所;屈臣氏纯净水。

2 方法

2.1 宝儿康散大鼠 ig 混悬液配制

准确称量 500 mg 宝儿康散粉末,缓慢加入 10 mL 0.5%羧甲基纤维素钠,研磨混悬,配制成质量浓度为 50 mg/mL 混悬溶液。

2.2 对照品溶液配制

精密称量甘草次酸、甘草素、熊果酸、牡荆素、橙皮素各 5.0 mg,分别用甲醇定容于 5.0 mL 量瓶中得各自对照品储备液(质量浓度均为 1.0 mg/mL),

并保存于 4 °C 冰箱。

2.3 大鼠给药及血样采集

SD 健康雄性大鼠,体质量(200±50)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。给药前禁食 12 h,不禁水。空白组大鼠 ig 0.5%羧甲基纤维素钠(10 mL/kg),给药组大鼠 ig 50 mg/mL 宝儿康散混悬液(10 mL/kg)。给药 1 h 后,每只大鼠经腹主动脉取血 10 mL 置于肝素抗凝管中,经 4 000 r/min 离心 10 min 收集上清液,于-70 °C 冰冻保存。

2.4 色谱及质谱条件

2.4.1 色谱条件 ACQUITYUPLC-HSS T3 超高效液相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),柱温 40 °C;正离子模式流动相为含 5%乙腈和 0.1%甲酸的水溶液(A)-乙腈(B),负离子模式流动相为水(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~0.5 min, 5% B;0.5~6 min, 5%~40% B;6~9 min, 40%~95% B;9~12 min, 95% B;12~15 min, 95%~5% B,体积流量 0.4 mL/min;进样体积 8 μL,进样器温度 8 °C。

2.4.2 质谱条件 ESI 离子源,正负离子模式分别采集一、二级离子碎片;负离子与正离子毛细管电压分别为 2 500 V 和 3 000 V;干燥气(氮气)流量 800 L/h;离子源温度 100 °C;锥孔电压 40 V;脱溶剂温度 500 °C;扫描质量范围 m/z 50~650。

2.5 样品处理方法

固相萃取柱经甲醇活化后,取 1 mL 血浆样品上样,先用 1 mL 水淋洗,再用 1 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,并在 40 °C 条件下氮气吹干。残渣用 200 μL 50%甲醇水溶解、混匀,再经 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样分析。

3 结果

3.1 宝儿康散相关的血浆暴露物谱分析

通过对比大鼠空白血浆正、负离子总离子色谱图和宝儿康散大鼠 ig 给药后血浆正、负离子总离子色谱图,在给药大鼠血浆中正离子模式下发现了 23 个化合物,负离子模式下发现了 15 个化合物,正、负离子模式下都能检测到的化合物有 15 个(图 1)。结合化合物的一、二级质谱及裂解规律,并参考相关文献推测了 18 个化合物结构;经与对照品比对确定了 5 个化合物结构,其保留时间(t_R)和一、二级质谱信息见表 1。

3.2 血浆暴露成分的结构推测

结合化合物的分子离子及其二级碎片离子,并

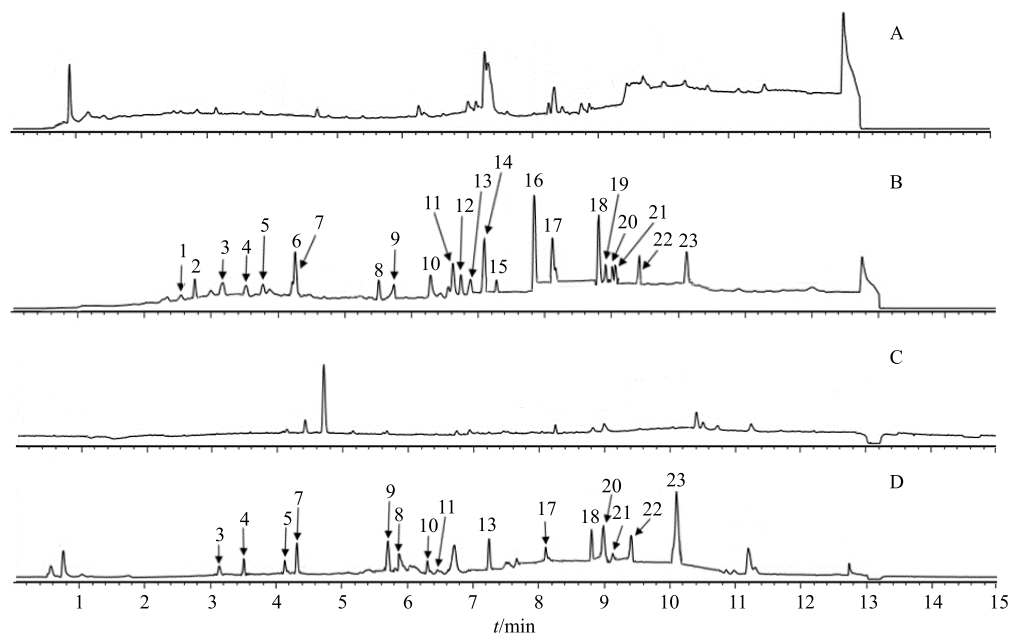


图 1 大鼠空白血浆在正 (A)、负 (C) 离子模式下及大鼠 ig 宝儿康散后血浆在正 (B)、负 (D) 离子模式下的总离子流色谱图
Fig. 1 Typical total ion chromatograms of rat blank plasma in positive(A) and negative ion mode (C) and rat plasma after oral administration of Baokang Powder in positive (B) and negative ion mode (D)

参考相关文献,在给药组大鼠血浆中推断出 18 个化合物。

化合物 1 的 t_R 为 2.48 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 300.166 5, 其二级质谱特征碎片为失去甲氧基 ($-OCH_3$, m/z 31.040 9) 所形成的碎片离子 $[M+H-OCH_3]^+$ 为 m/z 269.125 6。N-甲基乌药碱的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 300.159 4, 其分子离子和碎片离子^[5]与化合物 1 的基本相同。因此,推测化合物 1 为 N-甲基乌药碱。

化合物 2 的 t_R 为 2.75 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 387.172 9, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水 (m/z 18.010 0) 所形成的碎片离子 $[M+H-H_2O]^+$ 为 m/z 369.162 9, 失去 2 分子水 (m/z 36.020 7) 所形成的碎片离子 $[M+H-H_2O-H_2O]^+$ 为 m/z 351.152 2。桉脂素的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 387.180 2, 其分子离子和碎片离子^[6]与化合物 2 的基本相同。因此,推断化合物 2 为桉脂素。

化合物 3 的 t_R 为 3.06 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 193.056 5, 其二级质谱特征碎片为失去一氧化碳 (m/z 27.996 4) 所形成的碎片离子 $[M+H-CO]^+$ 为 m/z 165.060 1。东莨菪内酯的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 193.049 5, 其分子离子和碎片离子^[7]与化合物 3 的基本相同。因

此,推断化合物 3 为东莨菪内酯。

化合物 4 的 t_R 为 3.56 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 287.094 0, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水和 1 分子一氧化碳 (m/z 46.015 5) 所形成的碎片离子 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 为 m/z 241.082 5。氧化前胡素的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 287.091 4, 其分子离子和碎片离子^[7]与化合物 4 的基本相同。因此,推断化合物 4 为氧化前胡素。

化合物 6 的 t_R 为 4.25 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 245.082 5, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水 (m/z 18.006 2) 所形成的碎片离子 $[M+H-H_2O]^+$ 为 m/z 227.076 3。尿嘧啶核苷的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 245.082 5, 其分子离子和碎片离子^[8]与化合物 6 的基本相同。因此,推断化合物 6 为尿嘧啶核苷。

化合物 7 的 t_R 为 4.27 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 193.068 4, 其二级质谱特征碎片为失去二氧化碳 (m/z 44.007 6) 所形成的碎片离子 $[M-H-CO_2]^-$ 为 m/z 149.060 8。阿魏酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 193.050 6, 其分子离子和碎片离子^[9]与化合物 7 的基本相同。因此,推断化合物 7 为阿魏酸。

化合物 8 的 t_R 为 5.55 min, 在正离子条件下检

表 1 大鼠 ig 宝儿康散后在血浆中的暴露成分

Table 1 Components exposing in rat plasma after oral administration of Baoerkang Powder

峰号	t_R/min	分子离子 (m/z)		碎片离子 (m/z)	分子式	相对分子质量	化合物
		正离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$	负离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$				
1	2.48	300.166 5		269.125 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	299.152 1	<i>N</i> -甲基乌药碱
2	2.75	387.172 9		369.162 9, 351.152 2	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$	386.172 9	桉脂素
3	3.06	193.056 5		165.060 1	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$	192.043 2	东莨菪内酯
4	3.56	287.094 0		241.082 5	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	286.084 1	氧化前胡素
5*	4.09		431.117 6	311.065 2	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	432.105 6	牡荆素
6	4.25	245.082 5		227.076 3	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	244.069 5	尿嘧啶核苷
7	4.27		193.068 4	149.060 8	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	194.057 9	阿魏酸
8	5.55	285.079 9		270.046 9	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	284.068 5	金合欢素
9*	5.68		255.077 3	135.013 8, 119.056 2	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	256.073 6	甘草素
10*	6.26	303.105 0		177.065 0, 153.025 7	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$	302.079 0	橙皮素
11	6.63	419.147 5		389.086 7, 404.110 1	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	418.106 4	8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮
12	6.75	373.139 9		343.102 3	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$	372.142 0	丁香苷
13	6.90	269.088 7		254.055 1, 238.055 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	268.073 6	芒柄花素
14	7.08	403.155 7		388.115 2, 373.091 7	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$	402.131 5	川陈皮素
15	7.21	343.132 0		313.070 6	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$	342.110 3	6,7,8,4-四甲氧基黄酮
16	7.85	433.164 9		403.102 3, 418.125 8	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_9$	432.142 0	3,5,6,7,8,3,4-七甲氧基黄酮
17	8.07	249.157 4		231.142 4	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	248.141 2	白术内酯 III
18	8.84		471.357 1	409.346 4	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	472.355 3	16- α -羟基茯苓酸
19	8.97	469.396 8		313.265 6	$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$	468.396 7	蒲公英萜醇乙酸酯
20	8.98		483.342 0	465.112 4	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4$	484.355 3	去氢土莫酸
21	9.03		497.321 0	453.325 5, 469.255 4	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$	498.334 5	茯苓新酸
22*	9.40		469.350 9	425.367 7, 340.214 7	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	470.339 6	甘草次酸
23*	10.11		455.376 8	407.357 2	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	456.360 3	熊果酸

*通过比对照品确定

*Identified by comparing with the reference substance

测的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 285.079 9, 其二级质谱特征碎片为失去 1 个甲基 (m/z 15.033 0) 所形成的碎片离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ 为 m/z 270.046 9; 金合欢素的理论分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 285.075 7, 其分子离子和碎片离子^[8]与化合物 **8** 的基本相同。因此, 推断化合物 **8** 为金合欢素。

化合物 **11** 的 t_R 为 6.63 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 419.147 5, 其二级质谱特征碎片为失去 1 个甲基 (m/z 15.037 4) 所形成的碎片离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ 为 m/z 404.110 1, 失去 2 个甲基 (m/z 30.060 8) 所形成的碎片离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{CH}_3]^+$ 为 m/z 389.086 7。8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮的理论分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 419.133 7, 其分子离子和碎片离子^[10]与化合物 **11**

的基本相同。因此, 推断化合物 **11** 为 8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮。

化合物 **12** 的 t_R 为 6.75 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 373.139 9, 其二级质谱特征碎片为失去 2 个甲基 (m/z 为 30.037 6) 所形成的碎片离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{CH}_3]^+$ 为 m/z 343.102 3。丁香苷的理论分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 373.149 3, 其分子离子和碎片离子^[11]与化合物 **12** 的基本相同。因此, 推断化合物 **12** 为丁香苷。

化合物 **13** 的 t_R 为 6.90 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 269.088 7, 其二级质谱特征碎片为失去 1 个甲基 (m/z 为 15.033 6) 所形成的碎片离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ 为 m/z 254.055 1, 失去 1 个甲氧基 (m/z 为 31.033 5) 所形成的碎片离子

$[M+H-OCH_3]^+$ 为 m/z 238.055 2。芒柄花素的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 269.080 8, 其分子离子和碎片离子^[12]与化合物 **13** 的基本相同。因此, 推断化合物 **13** 为芒柄花素。

化合物 **14** 的 t_R 为 7.08 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 403.155 7, 其二级质谱特征碎片为失去 1 个甲基 (m/z 15.040 5) 所形成的碎片离子 $[M+H-CH_3]^+$ 为 m/z 388.115 2, 失去 2 个甲基 (m/z 30.064 0) 所形成的碎片离子 $[M+H-CH_3-CH_3]^+$ 为 m/z 373.091 7。川陈皮素的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 403.138 7, 其分子离子和碎片离子^[10]与化合物 **14** 的基本相同。因此, 推断化合物 **14** 为川陈皮素。

化合物 **15** 的 t_R 为 7.21 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 343.132 0, 其二级质谱特征碎片为失去 2 个甲基 (m/z 30.061 4) 所形成的碎片离子 $[M+H-CH_3-CH_3]^+$ 为 m/z 313.070 6。6,7,8,4'-四甲氧基黄酮的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 343.117 6, 其分子离子和碎片离子^[10]与化合物 **15** 的基本相同。因此, 推断化合物 **15** 为 6,7,8,4'-四甲氧基黄酮。

化合物 **16** 的 t_R 为 7.85 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 433.164 9, 其二级质谱特征碎片为失去 1 个甲基 (m/z 15.039 1) 所形成的碎片离子 $[M+H-CH_3]^+$ 为 m/z 418.125 8, 失去 2 个甲基 (m/z 30.062 6) 所形成的碎片离子 $[M+H-CH_3-CH_3]^+$ 为 m/z 403.102 3。3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 433.149 3, 其分子离子和碎片离子^[10]与化合物 **16** 的基本相同。因此, 推断化合物 **16** 为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮。

化合物 **17** 的 t_R 为 8.07 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 249.157 4, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水 (m/z 18.015 0) 所形成的碎片离子 $[M+H-H_2O]^+$ 为 m/z 231.142 4。白术内酯 III 的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 249.148 5, 其分子离子和碎片离子^[13]与化合物 **17** 的基本相同。因此, 推断化合物 **17** 为白术内酯 III。

化合物 **18** 的 t_R 为 8.84 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 471.357 1, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水和二氧化碳 (m/z 62.010 7) 所形成的碎片离子 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 为 m/z 409.346 4。16- α -羟基茯苓酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 471.348 0, 其分子离子和碎片离子^[14]与化

合物 **18** 的基本相同。因此, 推断化合物 **18** 为 16- α -羟基茯苓酸。

化合物 **19** 的 t_R 为 8.97 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 469.396 8, 其二级质谱特征碎片为失去中性基团 ($C_9H_6O_2$) (m/z 156.131 2) 所形成的碎片离子 $[M+H-C_9H_6O_2]^+$ 为 m/z 313.265 6。蒲公英萜醇乙酸酯的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 469.404 0, 其分子离子和碎片离子^[15]与化合物 **19** 的基本相同。因此, 推断化合物 **19** 为蒲公英萜醇乙酸酯。

化合物 **20** 的 t_R 为 8.98 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 483.342 0, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水 (质量数为 18.229 6) 所形成的碎片离子 $[M-H-H_2O]^-$ 为 m/z 465.112 4。去氢土莫酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 483.348 0, 其分子离子和碎片离子^[14]与化合物 **20** 的基本相同。因此, 推断化合物 **20** 为去氢土莫酸。

化合物 **21** 的 t_R 为 9.03 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 497.321 0, 其二级质谱特征碎片为失去 1 分子水和一氧化碳 (m/z 43.995 5) 所形成的碎片离子 $[M-H-H_2O-CO]^-$ 为 m/z 453.325 5, 失去一氧化碳 (质量数为 28.065 6) 所形成的碎片离子 $[M-H-CO]^-$ 为 m/z 469.255 4。茯苓新酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 497.327 2, 其分子离子和碎片离子^[14]与化合物 **21** 的基本相同。因此, 推断化合物 **21** 为茯苓新酸。

3.3 血浆暴露成分的结构确定

通过与对照品出峰时间以及质谱信息比对, 确定宝儿康散大鼠 ig 给药后血浆中 5 个化合物结构。

化合物 **5** 的 t_R 为 4.09 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 431.117 6。牡荆素的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 431.098 4, 其与化合物 **5** 二级质谱见图 2, 均产生了特征碎片离子 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ 为 m/z 311.065 2。由于在相同质谱条件下化合物 **5** 与牡荆素对照品的裂解规律和出峰时间一致, 因此确定 5 号峰为牡荆素。

化合物 **9** 的 t_R 为 5.68 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 255.077 3, 甘草素的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 255.066 3, 其与化合物 **9** 二级质谱见图 3, 均产生了特征碎片离子 $[M-H-C_8H_8O]^-$ 为 m/z 135.013 8 和 $[M-H-C_7H_4O_3]^-$ 为 m/z 119.056 2。由于在相同质谱条件下化合物 **9** 与甘草素对照品的裂解规律和出峰时间一致, 因此确

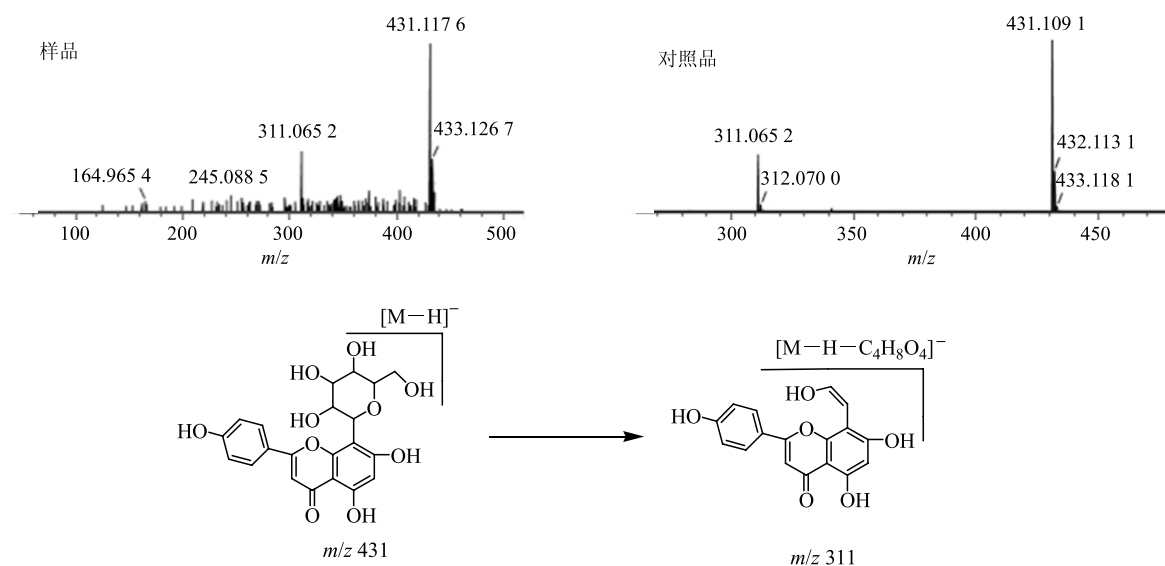


图 2 化合物 5 与牡荆素对照品的二级质谱裂解图

Fig. 2 MS-MS fragments of compound 5 and reference substance of vitexin

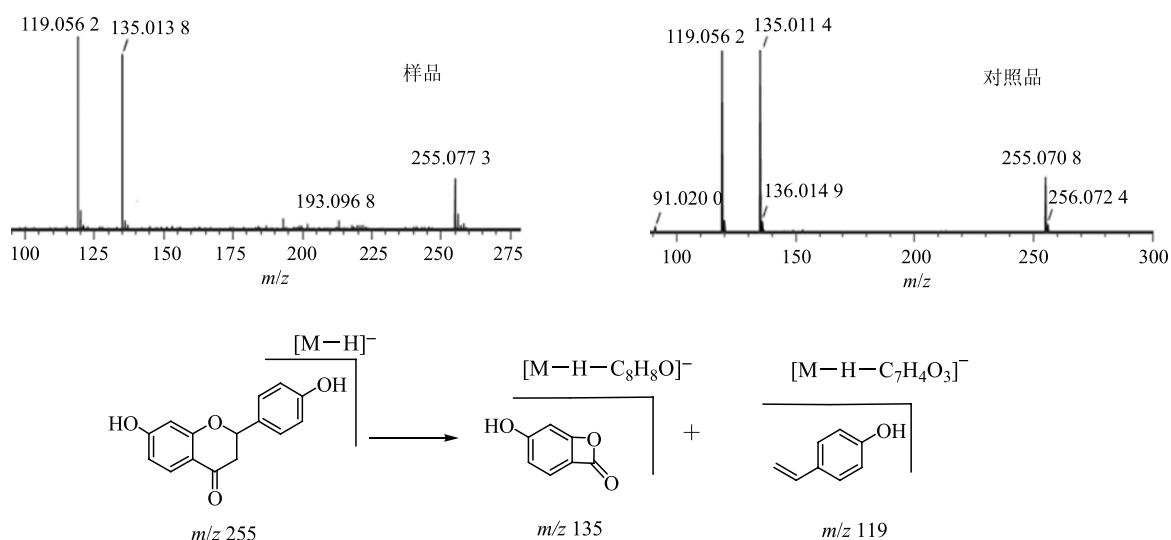


图 3 化合物 9 与甘草素对照品的二级质谱裂解图

Fig. 3 MS-MS fragments of compound 9 and reference substance of liquiritigenin

定 9 号峰为甘草素。

化合物 10 的 t_R 为 6.26 min, 在正离子条件下检测的分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 303.105 0, 橙皮素的理论分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 303.086 3, 其与化合物 10 二级质谱见图 4, 均产生了特征碎片离子 $[M+H-C_9H_{10}O_2]^+$ 为 m/z 153.025 7。由于在相同质谱条件下化合物 10 与橙皮素对照品的裂解规律和出峰时间一致, 因此确定 10 号峰为橙皮素。

化合物 22 的 t_R 为 9.40 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 469.350 9, 甘草次酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 469.332 3, 其与化

合物 22 二级质谱见图 5, 均产生了特征碎片离子 $[M-H-CO_2]^-$ 为 m/z 425.367 7。由于在相同质谱条件下化合物 22 与甘草次酸对照品的裂解规律和出峰时间一致, 因此确定 22 号峰为甘草次酸。

化合物 23 的 t_R 为 10.11 min, 在负离子条件下检测的分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 455.376 8, 熊果酸的理论分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 455.353 1; 其与化合物 23 均产生了特征碎片离子 m/z 407.357 2。由于在相同质谱条件下化合物 23 与熊果酸对照品有相同的特征碎片离子并且出峰时间一致, 因此确定 23 号峰为熊果酸。

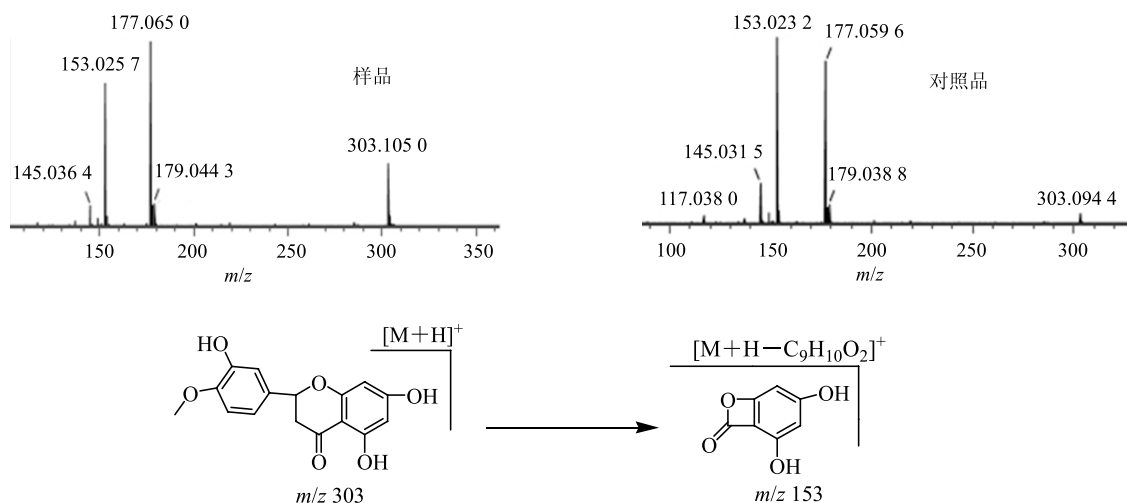


图 4 化合物 10 与橙皮素对照品的二级质谱裂解图

Fig. 4 MS-MS fragments of compound 10 and reference substance of hesperetin

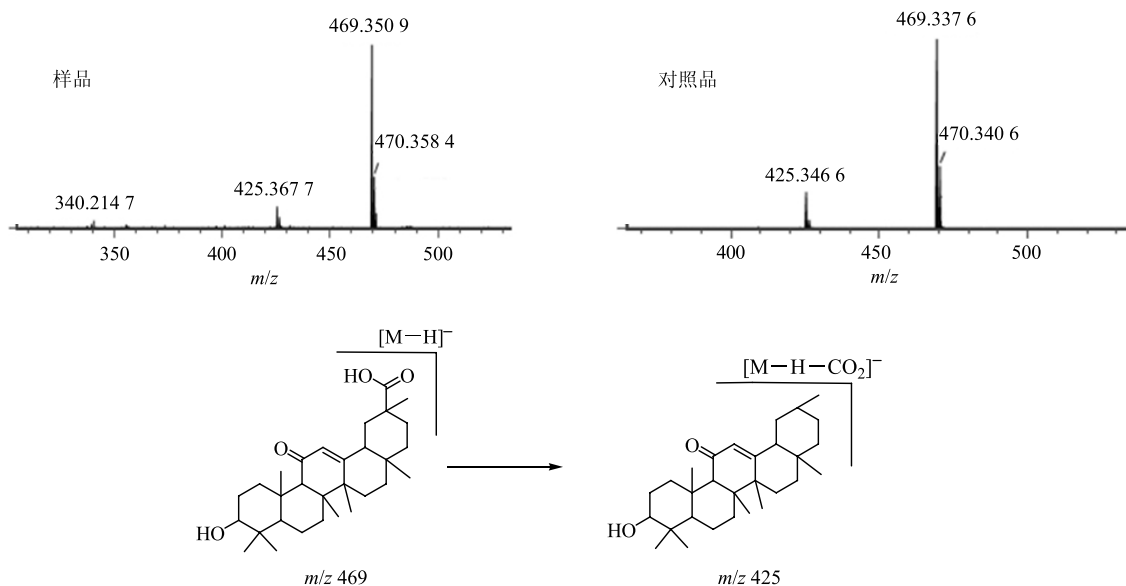


图 5 化合物 22 与甘草次酸对照品的二级质谱裂解图

Fig. 5 MS-MS fragments of compound 22 and reference substance of glycyrrhetic acid

4 讨论

宝儿康散由 14 味中药组成,所含化学成分结构多样、数量繁多,很难实现对复方全组分进行定性定量研究。本实验考察了甲醇-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-水、水(含 5%乙腈和 0.1%甲酸)等多种流动相对分离检测的影响,发现在流动相中加入少量酸能有效改善峰形及离子化效果,且用乙腈各个峰之间分离度要好于用甲醇。因此,最终选用了水(含微量酸)-乙腈混合液为流动相进行梯度洗脱,并采用正、负离子质谱扫描采集血浆成分,以更全面获得给药后血浆中的化合物信息。

在中药血清化学研究中,高浓度一次性给动物服药是一种常见的给药方式。宝儿康散的临床给药剂量为每次 50 mg/kg,本实验采用一次性高浓度给药,给药剂量为临床给药剂量的 10 倍,即 500 mg/kg。分别在给药后 0.5、1、2、4 h 进行腹腔取血,测定分析后,给药 1 h 后血浆 EIC 图中峰的数目最多且响应值较高,所以选择给药后 1 h 腹腔取血。

本研究在大鼠 ig 宝儿康散 1 h 后的血浆中分离鉴定了 23 个化合物。通过查阅相关文献报道^[16-18],对这 23 个化合物进行了药材归属,即 3 个(甘草素、芒柄花素、甘草次酸)来源于甘草,2 个(牡荆素、

熊果酸)来源于山楂, 2个(尿嘧啶核苷、金合欢素)来源于太子参, 1个(桉脂素)来源于石菖蒲, 3个(16- α -羟基茯苓酸、去氢土莫酸、茯苓新酸)来源于茯苓, 2个(白术内酯 III、蒲公英萜醇乙酸酯)来源于白术, 1个(*N*-甲基乌药碱)来源于莲子, 4个(东莨菪内酯、氧化前胡素、阿魏酸、丁香苷)来源于北沙参, 5个(橙皮素、8-羟基3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮、川陈皮素、6,7,8,4'-四甲氧基黄酮、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮)来源于陈皮。研究结果为进一步探究宝儿康散的药效物质基础及作用机制提供了有益参考。

参考文献

- [1] Tao Y, Xu H Y, Wang S S, *et al.* Identification of the absorbed constituents after oral administration of YuanhuZhitong prescription extract and its pharmacokinetic study by rapid resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 935(2): 1-9.
- [2] Ma H L, Liu Y, Mai X, *et al.* Identification of the constituents and metabolites in rat plasma after oral administration of Huanglian Shangqing Pills by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 125: 194-204.
- [3] 张丽学. 宝儿康散治疗脾虚湿困型小儿腹泻的临床疗效观察 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1605-1609.
- [4] 池浩波, 张雪原, 林晓辉, 等. 宝儿康散质量标准修订研究 [J]. 中国药品标准, 2008, 9(5): 334-338.
- [5] 林敏婷, 张超, 唐思丽, 等. LC-MS/MS 鉴定莲子心生物碱在 Caco-2 细胞中的代谢产物 [J]. 中药材, 2015, 38(12): 2531-2534.
- [6] 李云峰. 对药远志-石菖蒲化学成分及药代动力学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [7] 刘曼. 北沙参体内外香豆素类成分与其代谢物研究及抗脑衰胶囊质量控制方法研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [8] 张健, 李友宾, 王大为, 等. 太子参化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1051-1053.
- [9] 张祥柏, 唐旭利, 李国强, 等. 北沙参的化学成分研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 38(5): 757-760.
- [10] 马琳, 黄小方, 欧阳辉, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定陈皮化学成分 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(19): 33-37.
- [11] 范惠霞, 邓志鹏, 仲浩, 等. LC-MS/MS 法同时测定刺五加制剂中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量 [J]. 食品与药品, 2014, 16(2): 95-99.
- [12] 林青, 李媛, 谭晓梅, 等. LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中黄芪成分芒柄花素、毛蕊异黄酮和异鼠李素的浓度及其药动学研究 [J]. 中药材, 2013, 36(4): 589-593.
- [13] Wang Q, Jiang P, Ye F Y, *et al.* Identification and pharmacokinetics of multiple constituents in rat plasma after oral administration of Yinchenzhufu Decoction [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 153(3): 714-724.
- [14] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [15] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的白术药材化学成分快速识别研究 [J]. 质谱学报, 2015, 36(1): 72-77.
- [16] 林喆, 赵亚, 原忠. 北沙参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(7): 91-93.
- [17] 吴宗耀, 牛李义, 梁喜爱. 甘草化学成分及药理作用分析 [J]. 河南中医, 2010, 30(12): 1235-1236.
- [18] 刘家兰, 徐晓玉. 山楂的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 63-66.