

栝楼桂枝汤的血清药物化学研究

许文^{1,2}, 吴猷¹, 黄鸣清^{1,2*}, 林羽¹, 徐伟^{1,2*}, 褚克丹^{1,2}, 林娜³, 陈立典⁴

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 福建中医药大学生物医学研发中心, 福建 福州 350122

3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

4. 福建中医药大学康复医学院, 福建 福州 350122

摘要: 目的 对栝楼桂枝汤进行血清药物化学成分研究, 阐明其体内药效物质基础。方法 通过高效液相串联飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)法快速鉴定栝楼桂枝汤经大鼠 ig 给药后吸收入血的化学成分。HPLC-Q-TOF-MS 法采用 Shimadzu Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 采用负离子模式扫描, 对空白血清、大鼠 ig 栝楼桂枝汤后的含药血清以及栝楼桂枝汤提取原液进行对比分析, 确定血中移行成分。结果 通过比较色谱峰保留时间、质谱信息、质谱裂解方式, 共确认了栝楼桂枝汤 42 个吸收入血成分, 包括单萜苷类、黄酮类、酚酸类、姜酚类、三萜皂苷类及没食子酰糖类等。结论 建立的 HPLC-Q-TOF-MS 鉴定栝楼桂枝汤血清药物化学成分的分析方法简便、快速、准确, 为揭示栝楼桂枝汤对脑卒中后康复, 在体内发挥神经保护作用的药效物质提供实验依据。

关键词: 栝楼桂枝汤; 血清药物化学; 移行成分; 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; 单萜苷类; 黄酮类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2033-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.018

Analysis on pharmacodynamic constituents in Gualou Guizhi Decoction by serum pharmacchemistry

XU Wen^{1,2}, WU Xian¹, HUANG Ming-qing¹, LIN Yu¹, XU Wei^{1,2}, CHU Ke-dan^{1,2}, LIN Na³, CHEN Li-dian⁴

1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. Centre of Biomedical Research & Development, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

4. College of Rehabilitation Medicine of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To study the serum pharmacchemistry of Gualou Guizhi Decoction (GLGZD) as well as the material basis through analyzing the constituents absorbed in blood. **Methods** A high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS) method was developed for the analysis on absorbed components in serum after ig administration of GLGZD to rats. The separation was achieved on a C₁₈ column by gradient elution with acetonitrile-aqueous solution (containing 0.1% formic acid) as mobile phase. The ion acquisition was performed by full scan MS and MS/MS in negative ion mode. The serum after ig administration of GLGZD to rats, blank serum of rats, and GLGZD extracts sample were analyzed by HPLC-Q-TOF-MS. **Results** Forty-two prototype compounds including monoterpene glycosides, flavonoids, phenolic acids, gingerols, triterpenoid saponins, galloylglucoses, and others were confirmed and identified in serum by comparing the retention time and mass spectrometry fragmentation characteristics with reference standards or literatures. **Conclusion** The analysis of absorbed components of GLGZD in serum after administration by serum pharmacchemistry method would provide an experimental basis for revealing the real neuroprotective constituents of GLGZD in treating dysfunction after stroke.

Key words: Gualou Guizhi Decoction; serum pharmacchemistry; pharmacodynamic constituents; HPLC-Q-TOF-MS; monoterpene glycosides; flavonoids

收稿日期: 2016-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503204, 81674046, 81673561); 福建中医药大学校管课题(X2015015, X2014109, X2014132); 福建省高校新世纪优秀人才支持计划(闽教科 2015); 福建省高校杰出青年科研人才计划(闽教科 2016)

作者简介: 许文(1986—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向中药复方药效物质基础研究。Tel: (0591)22861217 E-mail: yaoxuewen@163.com

*通信作者 黄鸣清, 男, 副教授, 研究方向中药复方药效物质基础及作用机制研究。E-mail: hmql1115@126.com

徐伟, 男, 副教授, 研究方向中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: xwfjtc@sina.com

栝楼桂枝汤,处方来源张仲景的《金匱要略》^[1],由天花粉、桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣6味中药组成。福建中医药大学陈立典教授结合多年的临床经验,将栝楼桂枝汤应用于脑卒中后的康复取得良好的疗效,目前该复方的颗粒剂经新药申报批准为福建省第二人民医院院内制剂(批件号:闽2013S0001),主要用于脑卒中后肢体痉挛及康复治疗^[2-3]。前期药理学研究表明栝楼桂枝汤对脑卒中具有良好的神经保护作用^[4-8],为了探索其发挥功效的药效物质基础,本研究采用血清药物化学方法^[9],通过高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS),将栝楼桂枝汤ig给药大鼠后的含药血清、空白血清与栝楼桂枝汤原始方进行分析比较,对栝楼桂枝汤主要入血成分进行分析,旨在揭示栝楼桂枝汤给药后真正吸收入血、发挥抗脑卒中与神经保护作用的药效物质基础。

1 仪器与材料

MicrOTOF 飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司),ESI 离子源;Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司);WH-1 型微型涡旋混合仪(金坛市盛蓝仪器制造有限公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司)。

栝楼桂枝汤(福建省第二人民医院院内制剂,颗粒剂,闽2013S0001),对照品瓜氨酸、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、肉桂酸、甘草苷、甘草酸(批号分别为110875-200506、110831-200302、110809-200604、110753-200413、110786-200503、111610-200604、110731-200615)购于中国食品药品检定研究院;对羟基苯甲酸(批号H108509)、香草酸(批号V104428)、4-羟基肉桂酸(批号C108515)、3-羟基肉桂酸(批号H100569)、2-羟基肉桂酸(批号H113425)购于阿拉丁试剂有限公司;芹糖甘草苷(批号E0773)、五没食子酰葡萄糖(批号E1144)、芹糖异甘草苷(批号E0772)、异甘草苷(批号E0481)、芒柄花苷(批号E0573)、甘草查耳酮A(批号E0145)、甘草素(批号E0309)、异甘草素(批号E0044)、甘草次酸(批号E0043)、甘草皂苷H2(批号E1358)、甘草皂苷G2(批号E1359)、6-姜烯酚(批号E0641)、6-姜酚(批号E0128)、8-姜酚(批号E0165)购于上海同田生物技术股份有限公司;芍药苷亚硫酸酯、芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷为实验室分离纯化,结构经MS、NMR比对确认,以上对照品经HPLC-DAD

检测,面积归一化法计算,质量分数均大于98.0%。乙腈与甲酸(德国 Merck 公司)、Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司),其余试剂均为分析纯。

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,10~12 周龄,体质量(250±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2012-0001,适应性喂养 1 周,每天自由进食饮水。

2 方法

2.1 栝楼桂枝汤给药药液的制备

取栝楼桂枝汤颗粒 100 g,加入 10 倍量 50%乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液减压蒸馏至无醇味,制得 0.9 g/mL 的栝楼桂枝汤提取液。根据人临床用量换算成大鼠 ig 给药剂量 3.6 g/(kg·d)。

2.2 空白血清及含药血清样品的制备

雄性 SPF 级 SD 大鼠 12 只,随机分成 2 组,一组按 3.6 g/kg 剂量 ig 栝楼桂枝汤提取液,另一组空白组 ig 等体积的生理盐水。连续给药 7 d,早晚各 1 次,分别于第 7 天末次给药后 15 min 取样。乙醚麻醉后,腹主动脉取血,离心分离栝楼桂枝汤含药及空白血清,-80℃存放备用。

2.3 血清样品处理

血清置于室温条件下融化,取 2 mL,加入 5 倍量的甲醇,涡旋 2 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于室温下 N₂ 吹干,残渣用 200 μL 50%甲醇进行复溶,涡旋 2 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为含药血清供试品。同法操作制得空白血清供试品。

2.4 色谱和质谱条件

色谱条件:Shimadzu Inertsil ODS-SP 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱程序:0~5 min 5% A;5~50 min,5%~32% A;50~65 min,32%~48% A;65~75 min,48%~57% A;75~100 min,57% A,体积流量 0.8 mL/min。

质谱条件:飞行时间质谱采用负离子模式,毛细管电压-4.5 kV,电喷雾压力 2.0 MPa,脱溶剂气体(N₂)体积流量 4.0 L/min;脱溶剂气流温度:180℃。其他参数如下:funnel 1 和 2 均为 200.0 Vpp,hexapole Rf:100.0 Vpp,四极杆离子能量:3.0 eV,碰撞能 Rf:150.0 Vpp,离子传输时间:80 μs,前脉冲存储时间 5 μs。碰撞气体为氩气,碰撞能量 20~50 eV。

2.5 栝楼桂枝汤提取原液和对照品溶液配制

另取 1.0 mL 栝楼桂枝汤提取液,加 50%甲醇稀

释 100 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得栝楼桂枝汤供试品溶液; 分别精密称取各对照品, 用甲醇稀释近似 1.0 mg/mL 的对照品母液, 分别取适量对照品母液, 制备得混合对照品溶液, 供 LC-MS 定性比较。

2.6 单味药的提取

分别取原料栝楼桂枝汤各味药 (天花粉、桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣), 按照栝楼桂枝汤颗粒处方原料量, 加入 10 倍量 50% 乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 取 1.0 mL 各单味药提取液, 加 50% 甲醇稀释 100 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得单味药供试液, 供 LC-MS 定性成分归属。

2.7 入血成分鉴定方法

分别吸取栝楼桂枝汤供试液、含药血清及空白血清供试液各 2 μL , 在相同的色谱条件下进行分析, 比较分析三者色谱峰保留时间及质谱信息, 确定入血成分。首先, 根据 TOF-MS 总离子流色谱峰上所得到的精确化合物相对分子质量信息 (MS^1), 通过 Compass DataAnalysis Smart Formula Manually 软件在 5×10^{-6} 的质量偏差范围内计算其精确分子式, 完成各化合物的初步鉴定。其次, 选择合适分子离子峰进行碰撞诱导解离 (CID), 通过二级质谱的裂解 (MS^2), 获得化合物相应的碎片离子, 根据离子的裂解情况并结合对照品及文献进一步比对推测其结构。

3 结果

3.1 原型入血成分分析

栝楼桂枝汤提取液、含药血清、空白血清 HPLC-Q-TOF-MS 总离子流图见图 1。通过栝楼桂枝汤供试液、含药血清及空白血清色谱峰保留时间及质谱信息, 共鉴定栝楼桂枝汤血中移行成分 42 个, 根据质谱信息鉴定其中 41 个成分 (30 个成分经对照品比对确认), 鉴定结果见表 1。

3.2 栝楼桂枝汤血清药物化学成分归属及其质谱裂解分析

对 HPLC-Q-TOF-MS 鉴定入血移行成分进行分类归属, 共鉴定得到了 7 类入血成分, 其中, 酚酸类化合物 9 个、黄酮类化合物 12 个、三萜类化合物 9 个、单萜类化合物 5 个、姜酚类成分 3 个、没食子酰葡萄糖类 1 个、其他类 2 个。结构见图 2, 鉴定结果的误差范围皆在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内 (表 1)。

3.2.1 酚酸类 主要来源于桂枝和大枣, 结构中含有羧酸基团为此类化合物的主要共同结构特征, 故其共同裂解碎片化的行为多表现为 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 子离子峰, 以桂枝的代表性成分肉桂酸为例, 在含药血清总离子流图中的峰 23, 保留时间 $t_R=58.58$ min, TOF-MS 一级质谱 MS^1 给出分子离子峰为 $m/z 147.043 4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, 通过软件计算其精确分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$, 和肉桂酸的分子式一致, 在二级质谱图

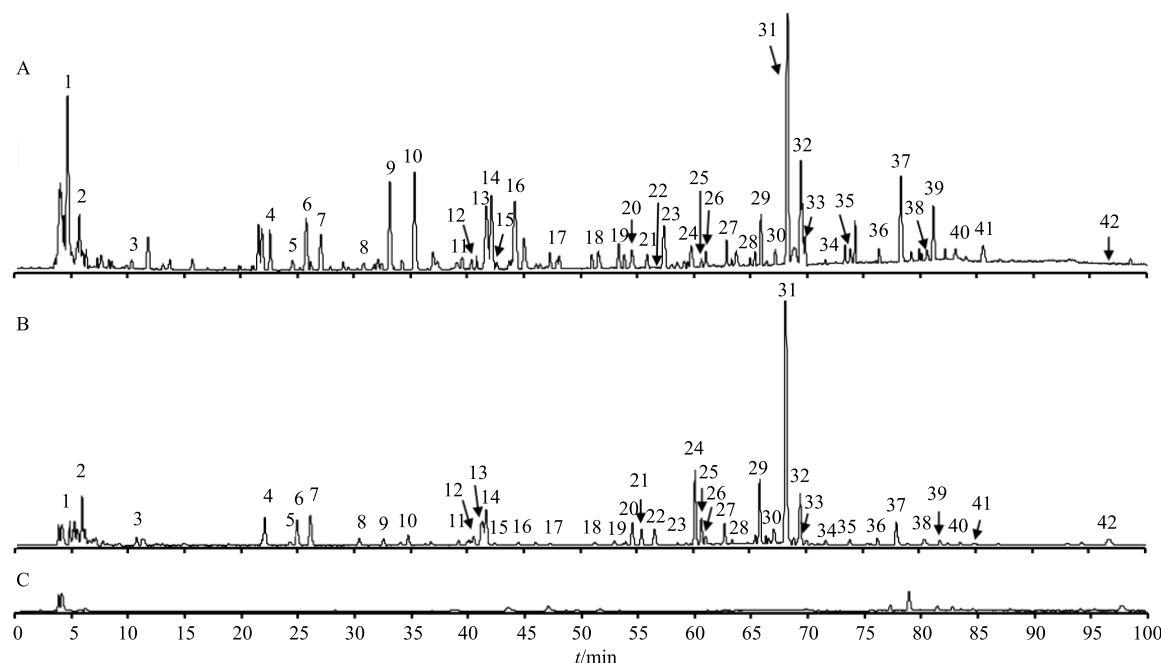


图 1 栝楼桂枝汤提取液 (A)、含药血清 (B) 及空白血清 (C) HPLC-Q-TOF-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of extracts of GLGZD (A), serum containing drug (B), and blank serum (C)

表1 HPLC-Q-TOF-MS 分析栝楼桂枝汤入血成分

Table 1 HPLC-Q-TOF-MS analysis on constituents in rat plasma after oral administration of GLGZD

峰号	t_R/min	化合物	分子式	$MS^1(m/z)$	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS^2 碎片离子 (m/z)	归属
1 ^a	3.93	瓜氨酸	$C_6H_{13}N_3O_3$	174.087 5 $[M-H]^-$	-1.15	131.082 6 $[M-H-CONH]^-$	T
2 ^[10]	5.90	去苯基芍药苷	$C_{16}H_{24}O_{10}$	421.133 3 $[M+HCOO]^-$	-1.66	375.128 2 $[M-H]^-$, 345.118 5 $[M-H-CH_2O]^-$, 195.065 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$, 165.055 8 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CH_2O]^-$	P
3 ^a	10.71	没食子酸	$C_7H_6O_5$	169.014 0 $[M-H]^-$	-1.78	125.024 3 $[M-H-CO_2]^-$	P
4 ^a	22.06	芍药苷亚硫酸酯	$C_{23}H_{28}O_{13}S$	543.117 1 $[M-H]^-$	0.72	497.111 9 $[M-H-CH_2O_2]^-$, 421.080 4 $[M-H-benzoyl]^-$, 375.074 9 $[M-H-benzoyl-CH_2O_2]^-$, 259.026 3 $[M-H-benzoyl-C_6H_{10}O_5]^-$, 213.022 5 $[M-H-benzoyl-C_6H_{10}O_5-CH_2O_2]^-$, 121.030 3 $[benzoic\ acid-H]^-$	P
5 ^a	24.27	原儿茶醛	$C_7H_6O_3$	137.023 2 $[M-H]^-$	-0.73	109.029 2 $[M-H-CO]^-$	J
6 ^a	24.93	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 5 $[M-H]^-$	-2.27	191.055 2 $[M-H-caffeoyl]^-$, 179.035 3 $[caffeic\ acid-H]^-$, 173.045 9 $[M-H-caffeoyl-H_2O]^-$, 161.023 4 $[caffeic\ acid-H-H_2O]^-$, 135.043 2 $[caffeic\ acid-H-CO_2]^-$	J
7 ^a	26.13	对羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	137.023 1 $[M-H]^-$	-1.46	93.033 3 $[M-H-CO_2]^-$	T、J
8 ^a	30.40	香草酸	$C_{10}H_{10}O_3$	167.033 6 $[M-H]^-$	-1.20	152.011 2 $[M-H-CH_3]^-$, 123.045 3 $[M-H-CO_2]^-$	T
9 ^a	32.55	芍药内酯苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.161 4 $[M+HCOO]^-$	-2.29	479.154 4 $[M-H]^-$, 449.144 9 $[M-H-CH_2O]^-$, 357.118 3 $[M-H-benzoyl]^-$, 327.107 9 $[M-H-benzoyl-CH_2O]^-$, 121.029 1 $[benzoic\ acid-H]^-$	P
10 ^a	34.74	芍药苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.159 8 $[M+HCOO]^-$	-0.76	479.155 9 $[M-H]^-$, 449.144 0 $[M-H-CH_2O]^-$, 327.108 5 $[M-H-CH_2O-benzoyl]^-$, 195.065 5 $[M-H-benzoyl-C_6H_{10}O_5]^-$, 165.055 5 $[M-H-benzoyl-C_6H_{10}O_5-CH_2O]^-$, 121.029 4 $[benzoic\ acid-H]^-$	P
11 ^a	39.20	4-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	163.039 2 $[M-H]^-$	1.84	119.049 7 $[M-H-CO_2]^-$	C
12 ^[11]	40.54	新甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	417.118 9 $[M-H]^-$	-2.16	255.065 0 $[M-H-C_6H_9O_5]^-$	G
13 ^a	41.26	芹糖甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.160 8 $[M-H]^-$	-1.09	417.118 2 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$, 255.066 4 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$, 153.019 0 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O+H_2O]^-$, 135.008 4 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O]^-$, 119.049 5 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_7H_4O_3]^-$	G
14 ^a	41.64	甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	417.119 2 $[M-H]^-$	-2.88	255.065 0 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 153.018 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O+H_2O]^-$, 135.007 7 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O]^-$, 119.049 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_7H_4O_3]^-$	G
15 ^a	42.35	3-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	163.039 2 $[M-H]^-$	-1.84	119.049 6 $[M-H-CO_2]^-$	C

续表 1

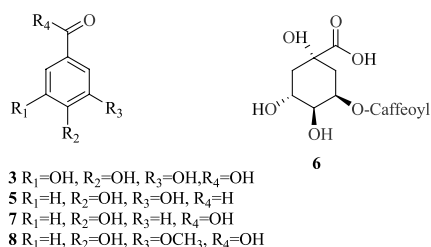
峰号	t_R/min	化合物	分子式	$MS^1(m/z)$	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS^2 碎片离子 (m/z)	归属
16 ^a	44.49	五没食子酰葡萄糖	$C_{41}H_{32}O_{26}$	939.111 2 $[M-H]^-$	-1.49	787.099 6 $[M-H-C_7H_4O_4]^-$, 769.090 8 P $[M-H-C_7H_6O_5]^-$, 617.076 2 $[M-H-C_7H_6O_5-C_7H_4O_4]^-$, 465.066 4 $[M-H-C_7H_6O_5-2C_7H_4O_4]^-$, 447.056 5 $[M-H-C_7H_6O_5-2C_7H_4O_4-H_2O]^-$, 295.044 3 $[M-H-2C_7H_6O_5-2C_7H_4O_4]^-$, 169.013 5 $[gallic\ acid-H]^-$	
17 ^a	47.32	2-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	163.039 1 $[M-H]^-$	-1.23	119.049 7 $[M-H-CO_2]^-$	C
18 ^a	51.27	芹糖异甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.159 3 $[M-H]^-$	-1.64	417.117 1 $[M-H-C_5H_8O_4]^-$, 255.065 3 G $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$, 153.018 7 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O+H_2O]^-$, 135.008 6 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O]^-$, 119.049 3 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_7H_4O_3]^-$, 257.080 8 $[M+H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$	
19 ^a	53.00	异甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	417.117 4 $[M-H]^-$	-1.14	255.065 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 153.018 1 G $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O+H_2O]^-$, 135.008 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_8H_8O]^-$, 119.049 5 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_7H_4O_3]^-$	
20 ^a	54.57	芒柄花苷	$C_{22}H_{22}O_9$	475.123 4 $[M+HCOO]^-$	0	267.065 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 252.041 5 G $[M-H-C_6H_{10}O_5-CH_3]^-$, 26254.057 3 $[M+H-C_6H_{10}O_5-CH_3]^-$, 9.080 8 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$	
21 ^[12]	55.38	甘草查耳酮 B	$C_{16}H_{14}O_5$	285.076 6 $[M-H]^-$	-3.16	270.052 1 $[M-H-CH_3]^-$, 150.031 9 G $[M-H-CH_3-C_7H_4O_2]^-$, 121.028 2 $[M-H-C_9H_8O_3]^-$	
22 ^a	56.53	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	255.064 9 $[M-H]^-$	-0.78	153.019 1 $[M-H-C_8H_8O+H_2O]^-$, G 135.008 4 $[M-H-C_8H_8O]^-$, 119.050 0 $[M-H-C_7H_4O_3]^-$	
23 ^a	58.58	肉桂酸	$C_9H_8O_2$	147.043 4 $[M-H]^-$	-4.08	103.054 2 $[M-H-CO_2]^-$	C
24 ^[13]	60.12	22-羟基-甘草皂苷 G2	$C_{42}H_{62}O_{18}$	853.385 9 $[M-H]^-$	-0.82	677.353 6 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 351.055 0 G $[2glucuronic\ acid-H-H_2O]^-$, 193.034 2 $[glucuronic\ acid-H]^-$	
25 ^a	60.67	甘草皂苷 H2	$C_{42}H_{62}O_{16}$	821.394 5 $[M-H]^-$	-1.10	645.362 7 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 351.055 9 G $[2glucuronic\ acid-H-H_2O]^-$, 193.034 7 $[glucuronic\ acid-H]^-$	
26 ^a	61.06	苯甲酰芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{12}$	629.185 4 $[M+HCOO]^-$	-1.59	583.181 1 $[M-H]^-$, 553.169 4 $[M-H-CH_2O]^-$, 535.159 6 $[M-H-CH_2O-H_2O]^-$, 431.134 9 $[M-H-benzoyl]^-$, 165.055 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5-2benzoyl-CH_2O]^-$, 121.029 4 $[benzoic\ acid-H]^-$	P
27 ^[13]	62.73	22-羟基-甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{17}$	837.388 4 $[M-H]^-$	-2.27	661.358 2 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 485.321 6 G $[M-H-2C_6H_8O_6]^-$, 351.055 4 $[2glucuronic\ acid-H-H_2O]^-$, 193.034 9 $[glucuronic\ acid-H]^-$	

续表 1

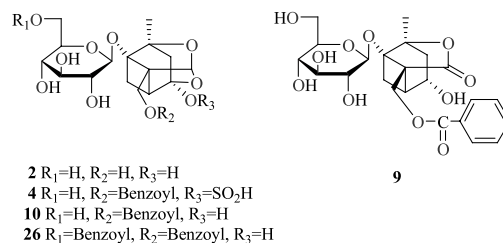
峰号	t_R/min	化合物	分子式	$MS^1(m/z)$	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS^2 碎片离子 (m/z)	归属
28 ^[13]	63.40	22-乙酰基-甘草酸	$C_{44}H_{64}O_{18}$	879.401 1 $[M-H]^-$	-0.34	703.369 2 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 351.055 2 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, 193.034 1 $[glucuronic acid-H]^-$	G
29 ^[10]	65.83	二氢芹菜素	$C_{15}H_{12}O_5$	271.059 8 $[M-H]^-$	-1.11	177.017 9 $[M-H-C_6H_6O]^-$, 165.018 5 $[M-H-C_7H_6O]^-$, 151.002 9 $[M-H-C_8H_8O]^-$, 179.033 2 $[M+H-C_6H_6O]^-$, 167.033 3 $[M+H-C_7H_6O]^-$	P
30 ^a	67.06	甘草皂苷 G2	$C_{42}H_{62}O_{17}$	837.392 2 $[M-H]^-$	-2.27	661.357 8 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 485.322 7 $[M-H-2C_6H_8O_6]^-$, 351.055 1 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, 193.034 4 $[glucuronic acid-H]^-$	G
31 ^a	68.14	甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{16}$	821.391 8 $[M-H]^-$	-4.38	759.392 7 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 645.357 4 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 469.329 9 $[M-H-2C_6H_8O_6]^-$, 351.055 6 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, 193.034 0 $[glucuronic acid-H]^-$	G
32 ^[13]	69.43	乌拉尔皂苷 B	$C_{42}H_{62}O_{16}$	821.396 6 $[M-H]^-$	-1.46	645.363 2 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 351.055 1 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, 193.034 8 $[glucuronic acid-H]^-$	G
33 ^a	69.98	异甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	255.064 7 $[M-H]^-$	-1.57	153.018 4 $[M-H-C_8H_8O+H_2O]^-$, 135.008 0 $[M-H-C_8H_8O]^-$, 119.049 1 $[M-H-C_7H_4O_3]^-$	G
34 ^[13]	71.71	甘草皂苷 J2	$C_{42}H_{64}O_{16}$	823.412 9 $[M-H]^-$	-2.31	647.379 3 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 351.055 1 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, 193.034 5 $[glucuronic acid-H]^-$	G
35 ^a	73.80	6-姜酚	$C_{17}H_{26}O_4$	293.174 2 $[M-H]^-$	-1.71	193.087 7 $[M-H-C_6H_{12}O]^-$, 99.082 3 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3]^-$	Z
36 ^[12]	76.28	甘草异黄酮	$C_{21}H_{20}O_6$	367.117 7 $[M-H]^-$	-0.27	352.093 9 $[M-H-CH_3]^-$, 349.106 9 $[M-H-H_2O]^-$, 209.091 6 $[M-H-C_8H_6O_4]^-$, 149.995 5 $[M-H-CH_3-C_{13}H_{14}O_2]^-$	G
37	78.63	未知	$C_{15}H_{22}O_4$	265.144 2 $[M-H]^-$	-3.02	247.132 8 $[M-H-H_2O]$	G
38 ^a	80.42	甘草查耳酮 A	$C_{21}H_{22}O_4$	337.144 2 $[M-H]^-$	-2.37	322.120 4 $[M-H-CH_3]^-$, 307.098 5 $[M-H-2CH_3]^-$, 281.081 9 $[M-H-C_4H_8]^-$, 243.102 4 $[M-H-C_6H_6O]^-$, 217.122 9 $[M-H-C_7H_4O_2]^-$, 163.113 0 $[M-H-C_9H_6O_2-CO]^-$	G
39 ^[11]	81.79	甘草酚	$C_{21}H_{18}O_6$	365.102 2 $[M-H]^-$	-0.82	337.107 4 $[M-H-CO]^-$, 309.112 8 $[M-H-2CO]^-$	G
40 ^a	83.57	8-姜酚	$C_{19}H_{30}O_4$	321.206 8 $[M-H]^-$	-2.49	193.087 5 $[M-H-C_8H_{16}O]^-$, 127.112 3 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3]^-$	Z
41 ^a	84.93	6-姜烯酚	$C_{17}H_{24}O_3$	275.163 5 $[M-H]^-$	-2.18	139.112 4 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$	Z
42 ^a	96.75	甘草次酸	$C_{30}H_{46}O_4$	469.331 5 $[M-H]^-$	-0.64	425.341 7 $[M-H-CO_2]^-$, 409.309 4 $[M-H-2CH_2O]^-$, 355.263 8 $[M-H-CO_2-C_3H_{10}]^-$	G

T-天花粉 C-桂枝 P-白芍 G-甘草 Z-生姜 J-大枣; ^a 与对照品比对确认T-*Trichosanthis Radix* C-*Cinnamomi Ramulus* P-*Paeoniae Radix Alba* G-*Glycyrrhizae Radix* Z-*Zingiberis Rhizoma Recens* J-*Jujubae Fructus*;^acompared with reference standard

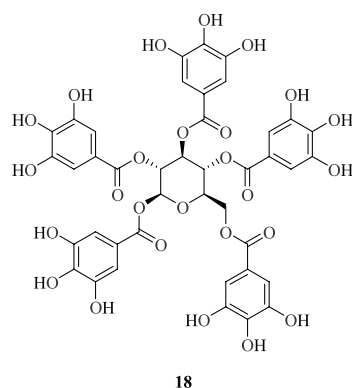
a 酚酸类



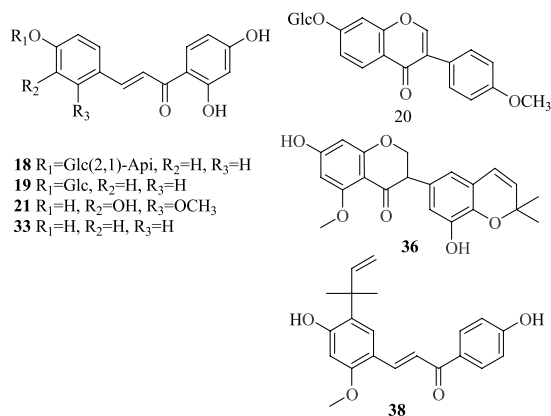
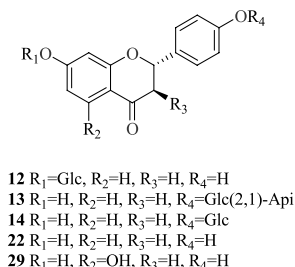
b 单萜萜类



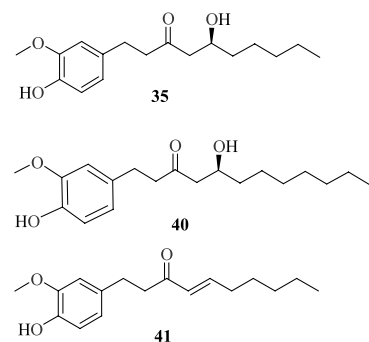
c 没食子酰糖类



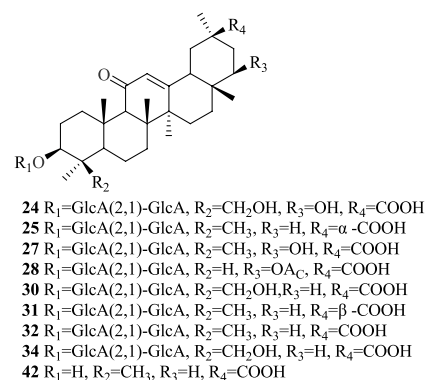
d 黄酮类



e 姜酚类



f 三萜类



g 其他类

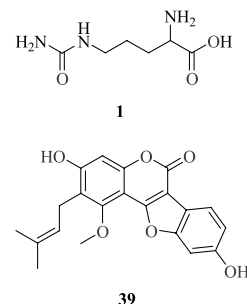


图2 栝楼桂枝汤入血原型成分结构

Fig. 2 Chemical structures of identified prototype compounds in rat plasma after oral administration of GLGZD

中, 碎片离子 m/z 103.054 2, 与分子离子峰相差 44, 可推断为分子离子峰脱去 1 分子 CO_2 得到的碎片离子峰, 并进一步通过与肉桂酸对照品比对, 发现其色谱保留时间、分子离子峰及裂解碎片均一致, 因此, 鉴定该化合物为肉桂酸, 质谱裂解行为见图 3-A。

3.2.2 单萜萜类 主要来源于白芍, 其质谱裂解行为多表现 CH_2O 、苯甲酰基 ($C_7H_6O_2$)、葡萄糖基 (Glc)、苯甲酰基 (Benzoyl) 等基团的丢失。白芍代表性成分芍药苷 (峰 10) 为例, TOF-MS 给出的分子离子峰 m/z 525.159 8, 软件计算分子式为 $C_{24}H_{29}O_{13}$, 与芍药苷或者芍药内酯苷加甲酸的离子

峰 $[M+COOH]^-$ 一致, 可初步推测为芍药苷或者芍药内酯苷, 在二级质谱图中的碎片离子 m/z 479, 449, 357, 327, 195, 165, 121, 与对照品和文献报道的芍药苷^[14]二级质谱碎片离子相一致, 经质谱推测: m/z 479 峰为其分子离子 $[M-H]^-$ 峰, m/z 449 为分子离子峰蒽烷骨架失去 1 个 CH_2O 后重排成的碎片离子峰; m/z 357 是分子离子峰为 $[M-H]^-$ 失去 1 个苯甲酰基后形成, 继而失去葡萄糖 (Glc) 基和 CH_2O 分别形成 m/z 195 离子峰和 m/z 327 离子峰, m/z 195 离子峰的蒽烷骨架又继续失去 1 个 CH_2O 形成 m/z 165.054 6 离子峰; 而 m/z 121 是苯甲酰取代基离子峰, 二级质谱裂解图如图 3-B 所示, 最后经

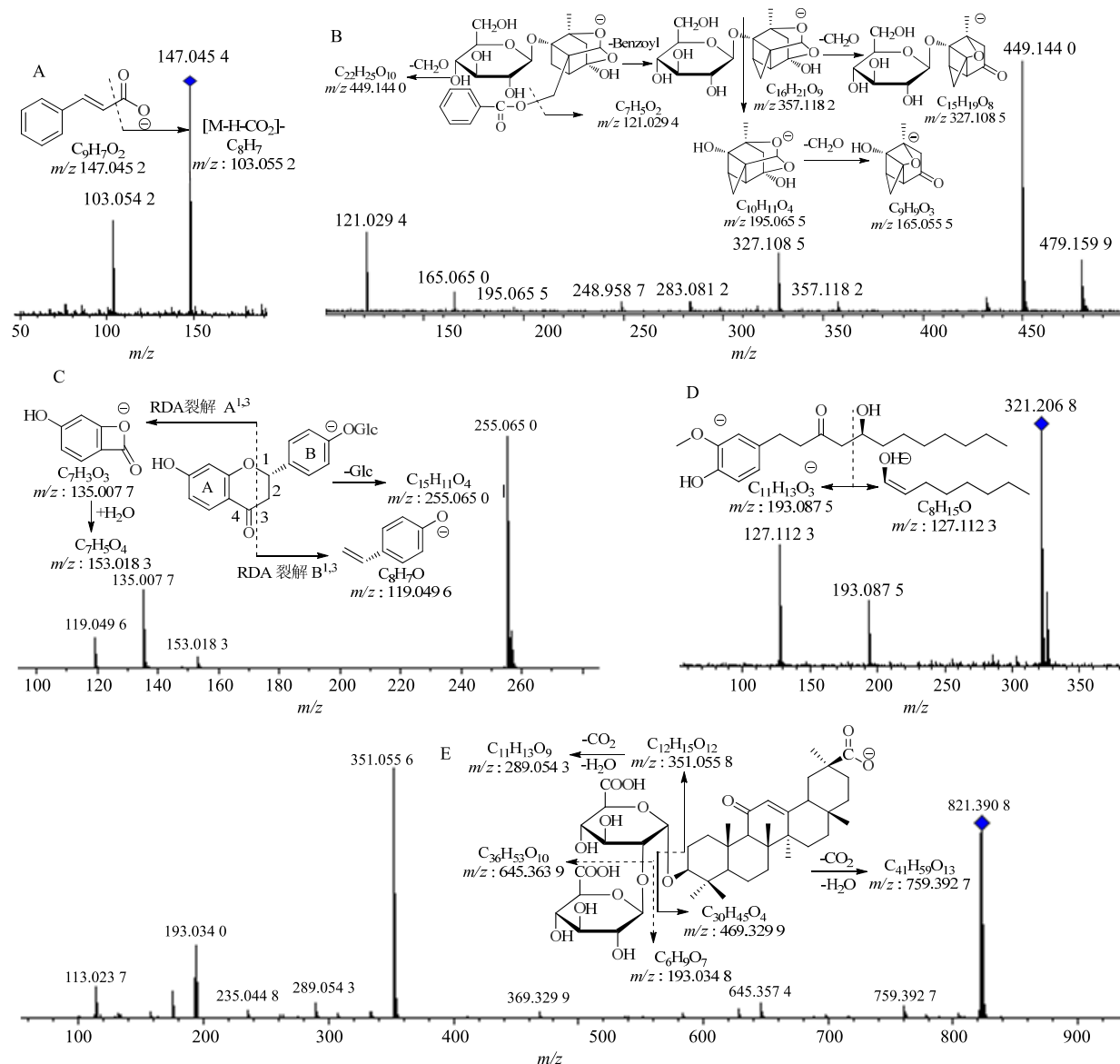


图3 栝楼桂枝汤血中典型入血成分肉桂酸 (A)、芍药苷 (B)、甘草苷 (C)、8-姜酚 (D)、甘草酸 (E) 的 TOF-MS/MS 质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 3 TOF-MS/MS spectra and proposed fragmentation pathway of cinnamic acid (A), paeoniflorin (B), liquiritin (C), 8-gingerol (D) and glycyrrhizic acid (E)

芍药苷对照品比较, 确认峰 10 为芍药苷, 峰 9 为芍药内酯苷。

3.2.3 没食子酰葡萄糖类 来源于白芍, 此类化合物结构 (峰 16, 五没食子酰葡萄糖) 中因含多个没食子酰基团, 故质谱裂解行为表现为连续的没食子酰基的丢失。

3.2.4 黄酮类 是栝楼桂枝汤入血成分最多的一类成分, 本研究中共有 12 种化合物被鉴定为此类化合物, 在负离子模式下同样表现出独特的裂解方式, 其结构中因含 2-苯基色原酮的基本母核, 故多表现

为 RDA 裂解及糖基的断裂。以甘草苷 (化合物 14) 为例, 其失去 1 个葡萄糖基 (Glc) 得到 m/z 255.056 0 $[M-H-Glc]^-$, 母核结构 2-苯基色原酮经 RDA1, 3 位裂解得 135.007 7 $[A^{1,3}]^-$, 119.049 6 $[B^{1,3}]^-$ 及 153.018 3 $[A^{1,3}+H_2O]^-$, 其质谱裂解行为见图 3-C。

3.2.5 姜酚类 来源于生姜, 此类化合物质谱裂解行为主要发生在羰基附近 α 位上的裂解, 从而产生相应的碎片离子。以代表性成分 8-姜酚为例 (化合物 40), 负离子模式下给出分子离子峰为 m/z 321.206 8 $[M-H]^-$, 软件计算分子式为 $C_{19}H_{30}O_4$,

在 TOF-MS/MS 图谱中, 羰基附近 α 位上的裂解, 产生主要碎片离子有 m/z 193.087 5 $[M-H-C_8H_{16}O]^-$, m/z 127.112 3 $[M-H-C_{11}H_{14}O_3]^-$, 质谱裂解图见图 3-D。

3.2.6 三萜类 为甘草主要活性成分。本研究中共有 9 个三萜类成分被分别鉴定, 并显示相似的质谱行为: 所有的三萜皂苷化合物均能产生分子离子峰 $[M-H]^-$, $[M-H]^-$ 又会进一步裂解产生两种相同的碎片离子 m/z 351 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$ 和 m/z 193 $[\text{glucuronic acid}-H]^-$, 这些碎片离子是识别皂苷类化合物的重要特征。以甘草酸 (化合物 31) 为例, 在含药血清总离子流图中, 其响应值最高, TOF-MS 给出的分子离子峰为 m/z 821.391 8 $[M-H]^-$, 软件计算其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$, 和甘草酸分子式一致, 依据 TOF-MS/MS 图谱中的子碎片离子信息进一步确定: 甘草三萜类成分失去 CO_2 和 H_2O 得 m/z 759.392 7 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 失去葡萄糖醛酸得 m/z 645.357 4 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, m/z 469.329 9 $[M-H-2C_6H_8O_6]^-$ 及其甘草三萜特征子离子 m/z 351.055 6 $[2\text{glucuronic acid}-H-H_2O]^-$, m/z 193.034 0 $[\text{glucuronic acid}-H]^-$, 质谱裂解过程见图 3-E。最后, 其他类化学成分, 化合物 1 被鉴定为入血原型成分中唯一的含氮有机酸——瓜氨酸, 来源于君药天花粉。另一个化合物 39 则通过根据质谱信息和文献资料被推断为甘草酚, 来源于甘草。

4 讨论

4.1 给药方案考察

本研究前期比较了单次给药后不同时间点的入血成分情况^[15], 发现所得含药血清峰容量少而且响应较低, 考虑到复方临床具体使用是早晚服用 1 次, 连续服用 7 d, 因此对大鼠给药方案进行优化设定为按照临床使用剂量换算大鼠 ig 给药剂量 3.6 g/(kg·d), 早晚各 1 次, 连续 ig 7 d 后取样。另外, 由于中药复方成分多且复杂, 不同成分结构、极性等不同导致吸收存在差异, 并且多成分间可能存在吸收拮抗或者协同作用, 导致复方成分群吸收情况不一致。前期栝楼桂枝汤初步药动学研究表明, 复方中不同化学组分其代谢消除存有较大差异: 首先, 对于黄酮类成分, 其达峰时间 ($t_{\max}$) 均小于 40 min, 口服后吸收较为迅速。其次, 对于单萜苷类成分, 芍药苷、芍药内酯苷和芍药苷亚硫酸酯, 其体内半衰期 ($t_{1/2}$) 均大于 120 min, 吸收相对较慢。而三萜类成

分甘草次酸, 其体内 $t_{\max}$ 长达 600 min, 长于所有入血成分, 而这时黄酮类成分基本已代谢消除, 因此, 为了提高峰容量和峰响应, 本实验根据初步药动学的药时曲线, 通过比较末次给药后 15、30、60、120、180、360 h 含药血清入血成分情况, 最终选择血药浓度较高的 15 min 时间点进行取材, 共鉴定血清药物化学成分 42 个, 获得较满意的结果。

4.2 色谱及质谱条件优化

针对复方栝楼桂枝汤中化学成分复杂多样性, 本研究对色谱条件进行了优化: 通过比较不同厂家色谱柱 (Waters X-select C_{18} 、Shimadzu Inertsil SP C_{18} 、Welch Polar RP₁₈ 和 Phenomenex Luna C_{18}) 对栝楼桂枝汤血清样品的分离效果, 最终选择 Shimadzu Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱。流动相系统的选择, 比较了 4 种流动相系统: 乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水, 结果表明, 使用乙腈体系流动相优于甲醇体系, 并且水相中添加 0.1%甲酸有利于峰形的改善及质谱响应, 如有利于单萜苷类成分形成加甲酸的分子离子峰。另外, 通过比较正负离子模式对质谱响应的影响, 发现大部分色谱峰负离子模式峰容量和峰响应优于正离子模式, 因此, 本研究选择负离子模式作为质谱检测条件。

4.3 入血成分讨论

栝楼桂枝汤由天花粉、桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣六味药组成, 临床上用于脑卒中及脑卒中后的康复治疗。本研究采用的液相-高分辨率质谱联用法, 能很好地消除内源性物质干扰, 有利于血清移行成分的快速指认, 实验结果表明其入血原型成分有 42 种: 首先, 单萜苷类, 如芍药苷亚硫酸酯、芍药内酯苷、芍药苷等来源于复方臣药白芍, 现代药理研究认为白芍单萜苷类具有良好的神经保护作用, 如芍药苷可以通过激活大麻素受体 2 (cannabinoid receptor 2) 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的海马区神经细胞发挥神经保护作用^[16]。其次, 黄酮类成分如芹糖甘草苷、甘草苷、芒柄花苷、甘草素等则来自甘草, 药理研究表明甘草黄酮类成分可以通过抗氧化应激发挥神经保护作用^[17]。第三, 酚酸类成分如肉桂酸、2-羟基肉桂酸、3-羟基肉桂酸等主要来自方中臣药桂枝, 药理研究表明桂枝中肉桂酸类成分具有良好抗氧化活性, 对神经细胞氧化应激有保护作用^[18], 君药天花粉中的酚酸类成分香草酸具有抗血小板聚集的作用^[19]。第四, 姜

酚类化合物如 6-姜酚、8-姜酚等来自佐药生姜,同样具有良好的神经保护作用,如 6-姜酚能通过抑制 β 淀粉样蛋白引起的神经细胞凋亡^[20], 6-姜烯酚还可以通过激活 Nrf2 系统对神经细胞氧化应激起到保护作用^[21], 10-姜酚能抑制神经炎症而发挥神经保护作用^[22]; 三萜类成分如甘草酸、甘草次酸等则来自甘草,现代药理研究表明甘草三萜类成分对脑卒中中具有显著脑神经保护作用,如甘草酸对局灶脑缺血再灌注模型大鼠,可以通过直接抑制高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1),发挥抗炎、氧化应激和抗凋亡的作用^[23],并且对缺血再灌注损伤小鼠可以通过 HMGB1-TLR4-IL-17A 信号途径发挥脑神经保护作用^[24]; 君药天花粉主要成分瓜氨酸,为抑制性氨基酸,对脑卒中后的脑部兴奋性毒性有拮抗作用^[25],另外大枣中的有机酸成分和白芍中的没食子酰糖类成分五没食子酰葡萄糖也是复方的入血成分,具有良好的抗炎、抗氧化等作用,对神经细胞的神经毒性也有良好的作用^[26]。

综上,本研究采用液质联用-血清药物化学研究鉴定了栝楼桂枝汤的 42 个血中移行成分,在脑卒中发生后,由于血脑屏障被破坏,这些入血成分均有可能入脑发挥其各自功效,提示该方入血的单萜苷类、黄酮类、酚酸类、姜酚类、三萜类等成分可能是栝楼桂枝汤治疗脑卒中后肢体痉挛与神经保护的主要体内药效物质,在后续研究中,为更好地阐明栝楼桂枝汤的体内药效物质,将进一步考察这些入血成分的体内过程及其药效活性。

志谢: 本研究在康复技术协同创新中心国家中医药管理局中医康复研究中心资助下完成。

参考文献

- [1] 李煌, 许文, 徐伟, 等. GC-MS 分析栝楼桂枝汤及其入脑的挥发性成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1509-1515.
- [2] 杨春梅, 陈立典, 陶静. 古方今用瓜蒌桂枝汤 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1599-1600.
- [3] 陈瑛玲, 陈立典, 陶静. 栝楼桂枝汤治疗中风后肢体痉挛的临床研究 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(4): 7-9.
- [4] Chen X W, Li H, Huang M Q, *et al.* Effect of Gua Lou Gui Zhi decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating the expression of excitatory amino acids and their receptors [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 248-254.
- [5] Hu H X, Li Z F, Zhu X Q, *et al.* Gua Lou Gui Zhi decoction suppresses LPS-induced activation of the TLR4/NF-kappaB pathway in BV-2 murine microglial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(6): 1327-1332.
- [6] Hu H X, Li Z F, Zhu X Q, *et al.* Gua Lou Gui Zhi decoction inhibits LPS-induced microglial cell motility through the MAPK signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(6): 1281-1286.
- [7] Zhang Y Q, Li H, Huang M, *et al.* Neuroprotective effects of Gualou Guizhi decoction *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158: 76-84.
- [8] Li Z F, Hu H X, Lin R H, *et al.* Neuroprotective effects of Gua Lou Gui Zhi decoction against glutamate-induced apoptosis in BV-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 597-604.
- [9] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2002, 4(2): 1-4.
- [10] Liang J, Xu F, Zhang Y Z, *et al.* The profiling and identification of the absorbed constituents and metabolites of *Paeoniae Radix Rubra* decoction in rat plasma and urine by the HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSⁿ technique: a novel strategy for the systematic screening and identification of absorbed constituents and metabolites from traditional Chinese medicines [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 83: 108-121.
- [11] Yin Q W, Wang P, Zhang A H, *et al.* Ultra-performance LC-ESI/quadrupole-TOF MS for rapid analysis of chemical constituents of Shaoyao-Gancao decoction [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(7): 1238-1246.
- [12] Xu T T, Yang M, Li Y F, *et al.* An integrated exact mass spectrometric strategy for comprehensive and rapid characterization of phenolic compounds in licorice [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2013, 27(21): 2297-2309.
- [13] Simons R, Vincken J P, Edwin J B, *et al.* A rapid screening method for prenylated flavonoids with ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry in licorice root extracts [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(19): 3083-3093.
- [14] Xu W, Huang M Q, Li H, *et al.* Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 986: 69-84.
- [15] 向青, 许文, 刘杰, 等. HPLC-DAD 法分析栝楼桂枝汤血中移行成分 [J]. 福建中医药, 2015, 46(2): 42-46.
- [16] Cai J, Rao M, Tang M, *et al.* Protective effect of

- paeoniflorin on the hippocampus in rats with cerebral ischemia-reperfusion through activating cannabinoid receptor 2 [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2015, 31(4): 443-447.
- [17] Zeng L H, Zhang H D, Xu C J, *et al.* Neuroprotective effects of flavonoids extracted from licorice on kainate-induced seizure in mice through their antioxidant properties [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 14(11): 1004-1012.
- [18] Silva T, Summavielle T, Remiao F, *et al.* Development of neuroprotective antioxidants: *In vitro* and cellular activity of lipophilic cinnamic acid derivatives [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 229: S80.
- [19] 刘岱琳, 曲戈霞, 王乃利, 等. 瓜蒌的抗血小板聚集活性成分研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(12): 1334-1336.
- [20] Zeng G F, Zong S H, Zhang Z Y, *et al.* The role of 6-gingerol on inhibiting amyloid beta protein-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Rejuven Res*, 2015, 18(5): 413-421.
- [21] Peng S J, Yao J, Liu Y P. Activation of Nrf2 target enzymes conferring protection against oxidative stress in PC12 cells by ginger principal constituent 6-shogaol [J]. *Food Funct*, 2015, 6(8): 2813-2823.
- [22] Ho S C, Chang K S, Lin C C, *et al.* Anti-neuroinflammatory capacity of fresh ginger is attributed mainly to 10-gingerol [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3183-3191.
- [23] Gong G, Xiang L, Yuan L B, *et al.* Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89450.
- [24] Zhang J C, Wu Y, Weng Z L, *et al.* Glycyrrhizin protects brain against ischemia-reperfusion injury in mice through HMGB1-TLR4-IL-17A signaling pathway [J]. *Brain Res*, 2014, 1582: 176-186.
- [25] Li H, Ye M, Zhang Y Q, *et al.* Blood-brain barrier permeability of Gualou Guizhi granules and neuroprotective effects in ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1272-1278.
- [26] Kaeidi A, Taati M, Hajializadeh Z, *et al.* Aqueous extract of Zizyphus jujuba fruit attenuates glucose induced neurotoxicity in an *in vitro* model of diabetic neuropathy [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(3): 301-306.