

补骨脂-肉豆蔻配伍前后血中移行成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

王 晶², 韩燕全¹, 魏良兵¹, 高家荣^{1*}

1. 安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031

2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038

摘要: **目的** 分析鉴定口服补骨脂-肉豆蔻药对后大鼠血中移行成分, 进一步研究补骨脂-肉豆蔻配伍对移行成分的影响。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆飞行质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术快速分析补骨脂-肉豆蔻药对提取物在大鼠体内移行成分, 并结合 Peakview 软件进行分析。**结果** 与体外补骨脂提取物相比, 有 15 个原型成分入血; 与体外补骨脂-肉豆蔻药对提取物相比, 有 26 个原型成分入血; 与体外肉豆蔻药材提取物相比, 有 6 个原型成分入血。**结论** UPLC-Q-TOF/MS 能快捷、准确、较全面地鉴定补骨脂-肉豆蔻药对的化学成分, 为补骨脂-肉豆蔻药对的药效物质基础和质量控制等研究奠定了基础。

关键词: 补骨脂; 肉豆蔻; 超高效液相色谱-四极杆飞行质谱; 定性分析; 移行成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5264-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.008

UPLC-Q-TOF/MS analysis on transitional constituents of before and after combination *Psoralea corylifolia*-*Myristica fragrans* absorbed into plasma

WANG Jing², HAN Yan-quan¹, WEI Liang-bing¹, GAO Jia-rong¹

1. Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of TCM, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

2. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To analyze and identify the transitional constituents of combination *Psoralea corylifolia*-*Myristica fragrans* *in vivo* and *in vitro*, and further study the effect of this combination on transitional components. **Methods** A rapid ultra-performance liquid chromatography/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) method was established to rapidly analyze constituents of before and after combination *P. corylifolia*-*M. fragrans* after oral administration in rats, and combined with Peakview software analysis. **Results** Compared with *in vitro* extract of *P. corylifolia*, there are 15 prototypes absorbed into the blood. Compared with *in vitro* combination *P. corylifolia*-*M. fragrans* extract, 26 prototype components were absorbed into the blood. Compared with *M. fragrans* extract, six prototype components were absorbed into the blood. **Conclusion** By using UPLC-Q-TOF/MS method, the main chemical constituents from the combination can be rapidly and accurately identified, and the results would facilitate the quality control of combination *P. corylifolia*-*M. fragrans* for safe and efficient use.

Key words: *Psoralea corylifolia* L.; *Myristica fragrans* Houtt.; UPLC-Q-TOF/MS; qualitative analysis; transitional components

补骨脂和肉豆蔻 2 味中药组成的药对, 最早出自宋·许叔微的《普济本事方》, 具有温肾暖脾、涩肠止泻之功效。临床常用的方剂四神丸、肉蔻四神丸均含有该药对, 广泛用于溃疡性结肠炎^[1]、腹泻型肠易激综合征^[2]等症状的治疗。补骨脂和肉豆蔻 2 味药单用皆性温、止泻, 两药配伍符合中医“七

情合和”理论中相须、相使之法, 药对配伍通过协同作用发挥药效, 因此有必要对其中化学成分开展系统全面研究, 以明确其中的药效成分, 阐明药效物质基础。目前围绕补骨脂-肉豆蔻药对的研究多集中于体外化学成分和药理作用的研究^[3-9], 缺少对配伍前后体内移行成分的研究。

收稿日期: 2018-03-04

基金项目: 国家中医药重点学科临床中药学建设项目 (国中医药人 [2012] 32 号教发); 安徽中医药大学科学研究基金项目 (2015fy003); 2016 年度省卫生计生委中医药科研课题 (2016zy80)

作者简介: 王 晶 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。Tel: 15256281457 E-mail: jingyansho@163.com

*通信作者 高家荣 (1964—), 男, 硕士生导师, 主任药师, 研究方向为中药新药研发。Tel: 13075537705 E-mail: zyfygir2006@163.com

超高效液相色谱-四级杆飞行质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术同时具备UPLC卓越高效的分离特性和Q-TOF高分辨的定性能力,该方法较其他成分定性方法更具灵活便捷、准确度高、通用性好的特点,逐渐成为中药复杂体系中化学成分快速分离和鉴定的有效手段,有助于科学阐明中药复方药效物质基础^[10]。本实验首次采用UPLC-Q-TOF/MS技术,为系统分析补骨脂-肉豆蔻药对配伍前后入血化学成分建立了一种灵敏可靠、快速的定性方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器、试剂与药材

超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(AB SCIEX Triple TOF 5600⁺; Foster City, CA),配有电喷雾离子源(ESI)、Analyst 1.6 色谱工作站和Peakview等质谱分析软件(AB SCIEX公司); Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); BSI10S 型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); BF2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司); TGL16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); MilliQ 超纯水仪(美国Millipore公司)。

对照品补骨脂素(批号110739-201416,质量分数≥99.9%)、去氢二异丁香酚(批号111838-201403,质量分数≥98.2%),均购于中国食品药品检定研究院; 异补骨脂素(批号PS13102201,质量分数≥99.73%)、补骨脂乙素(批号PS13112802,质量分数≥99.67%),购于成都普思生物科技股份有限公司。甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司); 乙醚为分析纯。

补骨脂、肉豆蔻药材由安徽中医药大学第一附属医院中草药房提供,均为道地药材(四川产盐补骨脂,海南产麸煨肉豆蔻),经安徽中医药大学第一附属医院李立华主任药师鉴定,补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁。

1.2 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量(305.5±19.5)g,购自安徽省实验动物中心,动物许可证号SCXK(皖)2011-002。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100

mm×2.1 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱:0~0.01 min, 0~3% B; 0.01~1 min, 3% B; 1~2 min, 3%~35% B; 2~13 min, 100% B; 15~15.1 min, 100%~3% B; 15.1~18 min, 3% B。体积流量0.3 mL/min,进样量1 μL,柱温30℃。

2.2 质谱条件

离子化模式为电喷雾正离子模式(ESI⁺),离子源电压分别为5 kV,离子源温度为500℃,裂解电压(DP)为100 V,碰撞能量(CE)为40 eV,碰撞能量扩展(CES)为10 eV。雾化气体为氮气(N₂),雾化气(gas1)、辅助气(gas2)压力均设定为60 psi(1 psi≈6.9 kPa),气帘气(CUR)为35 psi。一级质谱母离子扫描范围为 *m/z* 100~1 000,子离子扫描范围为 *m/z* 50~1 000。

2.3 供试药液的制备

精密称取盐炙补骨脂160 g、麸煨肉豆蔻80 g,加8倍量60%乙醇水提取2次,每次1 h,合并提取液浓缩定容至100 mL,得到含生药2.4 g/mL的补骨脂-肉豆蔻药对醇提液,供ig给药用。分别精密称取盐炙补骨脂160 g、麸煨肉豆蔻80 g,按上述方法处理,滤液浓缩,定容至100 mL,分别得到1.6 g/mL补骨脂醇提液、0.8 g/mL肉豆蔻醇提液,供ig给药用。

2.4 体外供试品的制备

分别取“2.3”项下制备的ig供试药液各1 mL置于蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解定容至10 mL,进样前过0.22 μm微孔滤膜。

2.5 生物样品的采集

24只SD大鼠,自由饮食饮水,适应性饲养1周。随机分为补骨脂组、补骨脂-肉豆蔻药对组、肉豆蔻组、空白组,每组6只。给药组按5 mL/kg的剂量,每天ig给予大鼠,均为每天2次,连续3 d,空白组给予等剂量的生理盐水,第3天ig全天剂量后,给药1 h后注射水合氯醛麻醉,经腹主动脉取血5 mL。室温静置1 h直至有血清析出后4 000 r/min离心15 min,分离出血清于-80℃冰箱中冷藏备用。

2.6 大鼠血清样品的制备

实验前,取出样品常温下解冻。精密量取血清1 mL,加入甲醇2 mL,涡旋混匀1 min,室温静置20 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液在氮气流下吹干(40℃),残渣加0.2 mL甲醇复溶。将溶解液转移置1.5 mL的EP管中,涡旋1 min,12 000

r/min 离心 10 min, 取上清液, 并合并每组上清液, 备用, 供 UPLC-Q-TOF/MS 检测分析。

2.7 数据采集

预先通过文献研究以及 Chemical Book 数据库检索, 建立补骨脂-肉豆蔻药对的化学成分以及可能代谢产物的数据库, 结合 Peakview 软件中 XIC Manager 功能对目标化合物进行鉴定和确证。利用 Peakview 软件中 Formula finder 功能, 结合相关化合物的一级质谱和二级质谱, 以及同位素分布和化合物裂解规律, 进行未知化合物的分析与鉴别。

3 结果与讨论

3.1 UPLC-Q-TOF/MS 的分析结果

采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对补骨脂-肉豆蔻药对体外供试品进行分析, 正、负离子下总离子流图见图 1。在正离子条件下峰信息较负离子条件下丰富, 且分离度更优于负离子条件, 故选择在正离

子模式下对体外补骨脂、肉豆蔻及补骨脂-肉豆蔻药对提取液和体内补骨脂、肉豆蔻及补骨脂-肉豆蔻药对血清样品进行定性鉴别。

3.2 补骨脂-肉豆蔻药对在大鼠血中移行成分的鉴定和归属

将体外补骨脂、肉豆蔻、补骨脂-肉豆蔻药对提取物和体内补骨脂、肉豆蔻、补骨脂-肉豆蔻药对血清样品以及空白血清(图 2)分别与补骨脂-肉豆蔻药对的化学成分以及可能代谢产物的数据库进行对照并汇总, 初步判断, 再依据高能碰撞下碎片离子信息, 并通过文献比对, 推测化学成分, 共推断 41 个化学成分峰。通过与单味药材对比, 分别确定以上化学成分来源。通过对补骨脂-肉豆蔻药对血清样品及单味药的体外、体内样品进行分析, 研究大鼠口服补骨脂-肉豆蔻药对配伍组分的血中移行成分, 结果见表 1。

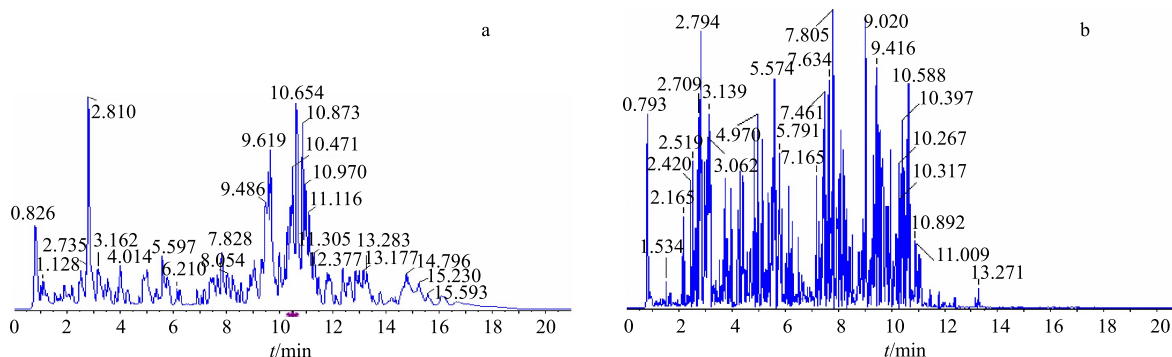


图 1 正 (a)、负 (b) 离子条件下样品总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of sample under positive (a) and negative (b) ions

3.3 补骨脂-肉豆蔻药对体内物质基础分析

由于补骨脂-肉豆蔻药对各提取液各原型成分在大鼠含药血清中的浓度很低, 采用全扫描方式很难检测到各原型成分, 故采用多反应监测方式(MRM), 通过监测相关的离子反应^[11], 在含药血清中检测到主要成分香豆素、黄酮、萜酚、木脂素等成分入血。

3.4 补骨脂-肉豆蔻药对主要成分的质谱分析

对补骨脂-肉豆蔻药对主要成分进行质谱分析, 质谱图见图 3。

3.4.1 香豆素类 本实验前期已经明确补骨脂-肉豆蔻药对的主要成分为香豆素类, 该类成分源于补骨脂药材。补骨脂素、异补骨脂素为香豆素类化合物的代表成分, 补骨脂素、异补骨脂素质谱行为正离子以 $[M-H]^+$ 的准分子离子峰形式存在, 质谱高

能碰撞多产生 $[M+H-CO_2-CO]^+$ 或 $[M+H-CO-CO]^+$ 的碎片离子^[12-13]。

3.4.2 黄酮类 补骨脂药材黄酮类包括二氢黄酮、查耳酮、异黄酮等类。补骨脂甲素、补骨脂乙素、补骨脂宁为黄酮类化合物, 该类成分多来自药材补骨脂, 补骨脂乙素高能碰撞质谱中易形成丢失 C_4H_5 、 C_8H_8O 等碎片离子。

3.4.3 木脂素类 肉豆蔻木脂素是开环新木脂素类化合物, 是肉豆蔻种仁和假种皮的主要成分之一^[14]。去氢二异丁香酚为木脂素类化合物的代表成分, 去氢二异丁香酚质谱行为正离子以 $[M-H]^+$ 的准分子离子峰形式存在, 质谱高能碰撞多易形成丢失 $C_7H_8O_2$ 、 CH_3 等碎片离子。

4 讨论

补骨脂-肉豆蔻药对是治疗“脾虚泄泻”方剂中

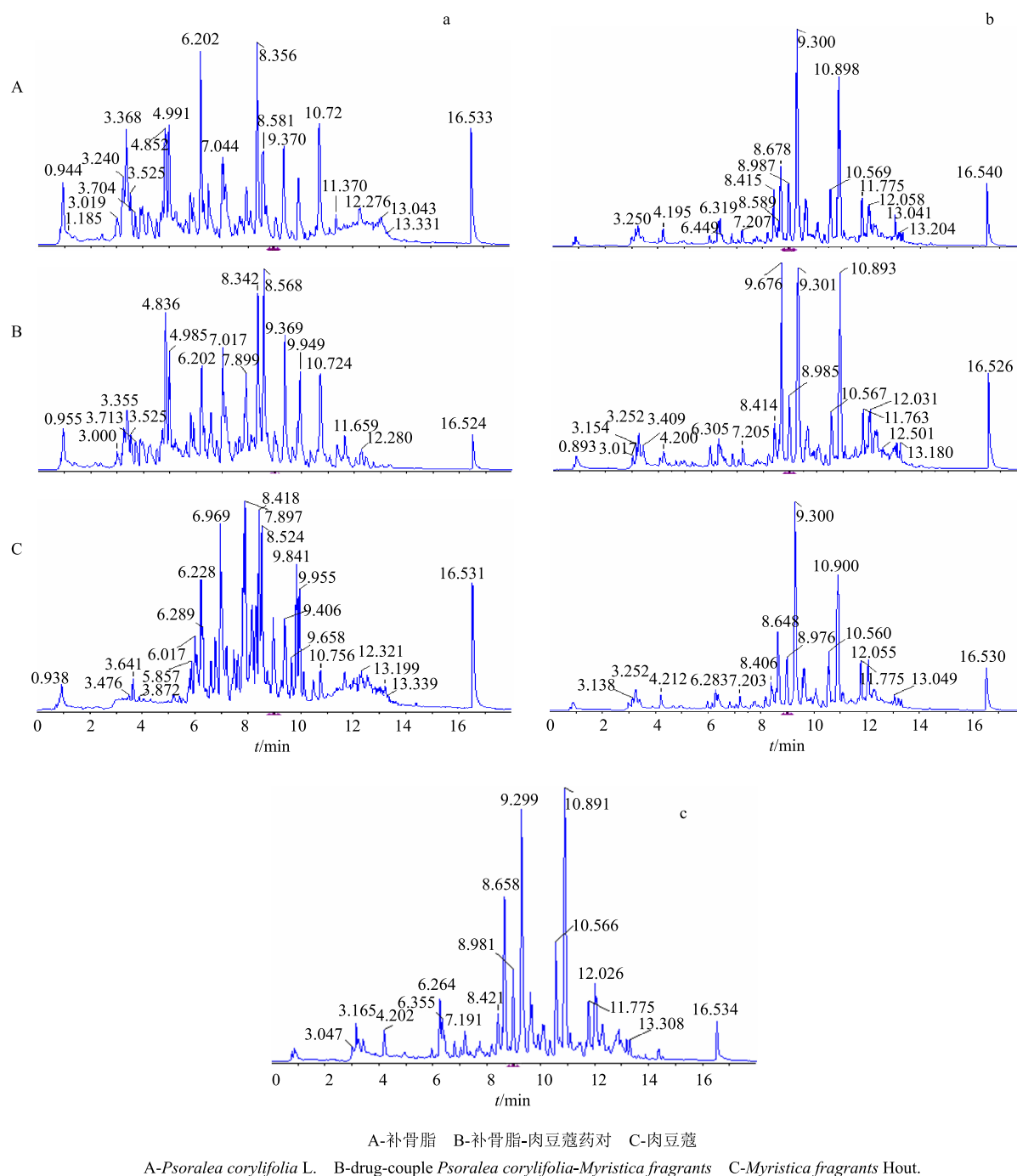


图 2 体外 (a)、体内 (b) 样品及空白血清 (c) 总离子流图
Fig. 2 Total ion chromatograms of *in vitro* (a) and *in vivo* (b) sample and blank serum (c)

常用药对。中药药对配伍是在中医药理论指导及辨证论治的前提下,通过合理有效的中药配伍组成方剂应用于临床,是中医治疗疾病的一大特色^[15]。中药血清药物化学是以传统药物化学方法为基础,综合应用多种现代技术,分析鉴定口服中药后血清中移行成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础的应用学科^[16]。从直接入血成分或者药物代谢

产物入手研究有效物质基础更有实际意义,通过探究血清中的成分及其变化,可以为确定药对真正有效成分奠定基础。王宇卿等^[17]采用 HPLC 技术对补骨脂血清药物化学进行研究,初步确定药材中成分在体内的吸收情况,结果表明,补骨脂素和异补骨脂素均能吸收入血,与药理研究结果相吻合。张昀等^[18]采用 HPLC 技术测定补骨脂中有效成分补骨

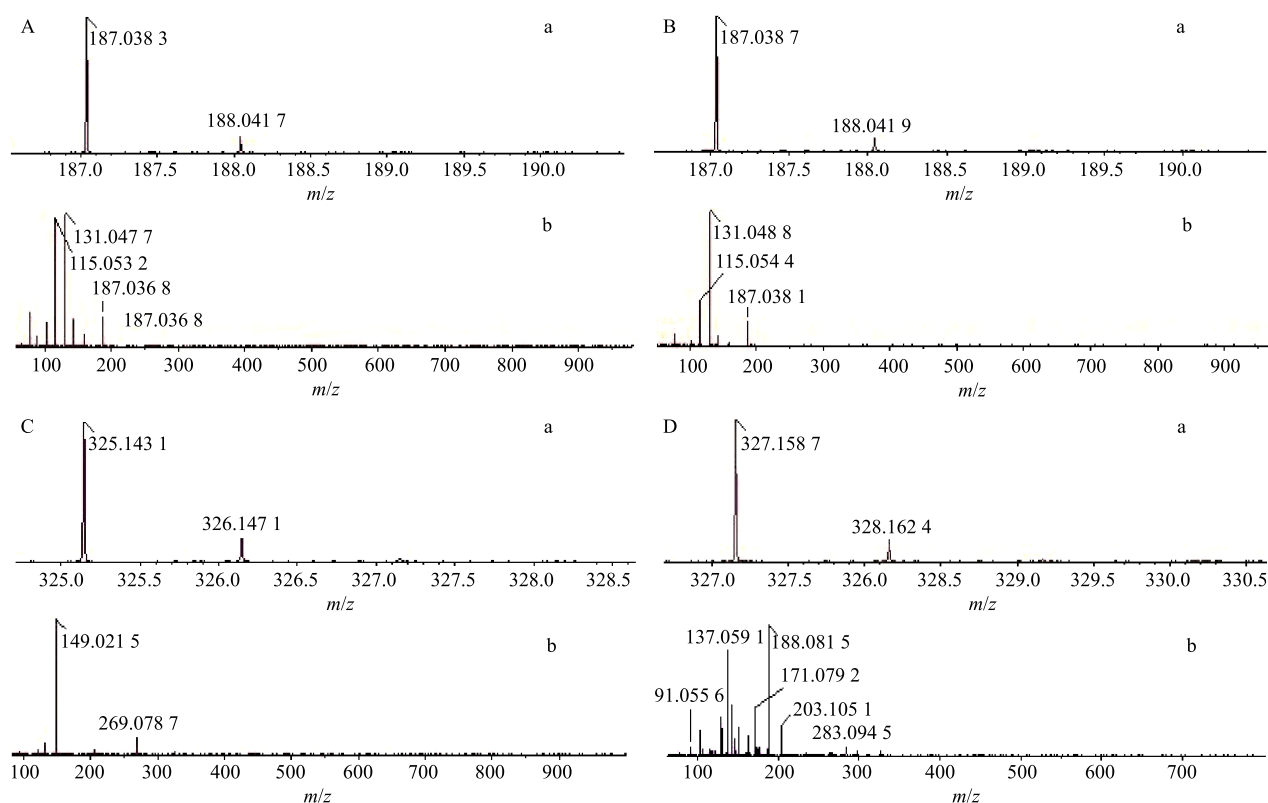
表 1 补骨脂-肉豆蔻药对配伍前后血中移行成分

Table 1 Chemical constituents of before and after combination *P. corylifolia*-*M. fragrans* in vivo and in vitro

序号	分子式	化合物	体外			体内		
			BGZ	YD	RDK	BGZ	YD	RDK
1	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	octadecanoic acid	—	—	—	+	+	—
2	C ₁₇ H ₁₈ O ₉	psoralenoside	+	+	—	+	+	—
3	C ₇ H ₆ O ₂	4-hydroxybenzaldehyde	+	+	—	+	+	—
4	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	fragransin B	—	+	+	—	+	+
5	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	myristicanol B	—	+	+	—	+	+
6	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	corylidin	+	+	—	—	—	—
7	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	corylinal	+	+	—	—	—	—
8	C ₁₁ H ₆ O ₃	psoralen	+	+	—	+	+	—
9	C ₁₁ H ₆ O ₃	angelicin	+	+	—	+	+	—
10	C ₁₁ H ₆ O ₃	bakuchicin	+	+	—	+	+	—
11	C ₁₂ H ₈ O ₄	xanthotoxin	—	—	—	+	+	—
12	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	psoralidin oxide	+	+	—	+	+	—
13	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	bavacoumestan	+	+	—	—	—	—
14	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	psoralenol	+	+	—	—	—	—
15	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	fragransin A2	—	+	+		+	+
16	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	bakuchalcone	+	+	—	+	+	—
17	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	bavachromanol	+	+	—			—
18	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	6-prenylnaringenin	+	+	—	+	+	—
19	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	fragransin C	—	+	+	—	+	—
20	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	fragransol A	—	+	+	—	+	—
21	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	fragnasol A	—	+	+	—	+	—
22	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	bavachromene	+	+	—	—	—	—
23	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	neobavaisoflavone	+	+	—	—	—	—
24	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	fragransin E1	—	+	+	—	+	+
25	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	corylin	+	+	—	+	+	—
26	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	fragransin D	—	+	+	—	+	—
27	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	isopsoralidin	+	+	—	—	—	—
28	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	psoralidin	+	+	—	+	+	—
29	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	fragnasol C	—	+	+		+	+
30	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	isobavachin	+	+	—	+	+	—
31	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	bavachin	+	+	—	+	+	—
32	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	isobavachalcone	+	+	—	+	+	—
33	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	psoracorylifol	+	+	—	—	—	—
34	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	sophoracoumestan A	+	+	—	—	—	—
35	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	bavachalcone	+	+	—	+	+	—
36	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	bavachinin	+	+	—	+	+	—
37	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	dehydrodiisoeugenol	—	+	+		+	+
38	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	corylifol A	—	—	—	+	+	—
39	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	bavachromene	—	—	—	+	+	—
40	C ₁₈ H ₂₄ O	bakuchiol	+	+	—	+	+	—
41	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	myristic acid	+	+	—	—	—	—

BGZ-补骨脂 YD-药对 RDK-肉豆蔻 “+”表示检测到 “—”表示未检测到

BGZ-*Psoralea corylifolia* L. YD-drug-couple RDK-*Myristica fragrans* Hout. “+”means detected “—”means undetected



A-补骨脂素 B-异补骨脂素 C-补骨脂乙素 D-去氢二异丁香酚
A-psoralen B-isopsoralen C-Corylifolinin D-dehydrodiisoeugenol

图 3 各成分的 ESI 模式下 MS (a)、MS/MS (b) 图
Fig. 3 ESI mode MS (a) and MS/MS (b) of each component

脂素和异补骨脂素在大鼠血清、肝脏、肾脏的分布。

本实验根据中药血清药物化学研究思路,首次建立补骨脂-肉豆蔻药对血清样品的 UPLC-Q-TOF/MS 快速分析的方法,基于化合物的精确相对分子质量、相关数据库和参考文献,鉴定了补骨脂-肉豆蔻药对中 41 个化合物,其中 30 个成分入血,16 个成分来源于补骨脂药材,10 个成分来源于肉豆蔻,并根据建立的数据库匹配,确定每个成分的化学式,对于研究补骨脂-肉豆蔻药对体内代谢过程及药效物质基础提供科学依据。采用 UPLC-Q-TOF/MS 能够很好地分离和鉴定大鼠血清中补骨脂-肉豆蔻药对的化学成分,为血清中补骨脂-肉豆蔻药对成分的定性分析提供了一种快速、简便、可靠的分析手段,对研究补骨脂-肉豆蔻药对移行成分具有重要意义,同时也为阐明补骨脂-肉豆蔻药对药效物质基础提供了重要依据。

参考文献

[1] 刘端勇,黄小英,程绍民,等. 四神丸对实验性结肠炎结肠组织 Bax/Bcl-2 mRNA、Fax/FaxL 的调控作用 [J].

中国中药杂志, 2011, 36(24): 3484-3488.

[2] 郭宇,苏晓兰,李依洁,等. 温脾健胃方对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜 5-羟色胺及其受体的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(10): 86-91.
[3] 张婷,杨晓旭,高家荣,等. 基于超高效液相色谱指纹图谱的正交试验优选“二神丸”药对醇提工艺考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(12): 1130-1133.
[4] 高家荣,杨晓旭,吴溪,等. 道地产补骨脂-肉豆蔻药对中 7 个指标成分同时测定及其化学成分的初步鉴别 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1959-1963.
[5] 高家荣,杨晓旭,魏良兵,等. 补骨脂、肉豆蔻配伍前后特征指纹图谱及指标成分含量变化研究 [J]. 中药材, 2014, 37(10): 1873-1876.
[6] 杨晓旭,高家荣,韩燕全,等. 正交试验结合指纹图谱优选补骨脂-肉豆蔻药对醇提工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2178-2183.
[7] 王天晓,尹震花,张伟,等. 补骨脂抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶和抗菌活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2328-2333.
[8] 吴疆,魏巍,袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作

- 用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [9] 毕亚男, 李 震, 卢国彦, 等. 补骨脂水提物对小鼠的肝毒性及胆汁酸转运的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 267-270.
- [10] 杨岱琳, 佟 玲, 李晓稳, 等. UPLC-Q-TOF/MS E 方法分析养血清脑颗粒的化学成分 [J]. 药学报, 2016, 51(5): 797-805.
- [11] 乔 颖, 温 静, 宋 洋. 基于 UPLC-PDA-MS/MS 技术的四逆散水煎液体内外物质基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 27(11): 1672-1676.
- [12] 李晶晶, 鹿秀梅, 李发美. 补骨脂的化学及代谢成分的超高效液相色谱串联质谱法鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2235-2238.
- [13] 聂丽娟. 补骨脂化学成分和大鼠血清药物化学初步研究 [D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2015.
- [14] 杨秀伟, 艾合买提·买买提, 李 勤. 肉豆蔻化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(增刊): 93-96.
- [15] 庞 婷, 麦蓝尹, 陈 勇. 中药药对配伍的化学成分变化研究进展 [J]. 中药材, 2015, 38(11): 2429-2434.
- [16] 韩旭阳, 张 苍, 彭 冰. 基于 UPLC-Q TOF/MS^E 方法的凉血活血胶囊口服给药后入血成分初探 [J]. 北京中医药, 2016, 35(4): 383-385.
- [17] 王宇卿, 闫 明, 陈 文, 等. 补骨脂血清药物化学的初步研究 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(5): 396-399.
- [18] 张 昀, 张 瑜. 补骨脂有效成分在大鼠血清、肝、肾中的测定 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1237-1240.