

UPLC-Q-TOF-MS 快速鉴定止动颗粒血浆及尿液中移行成分

魏婷婷^{1,2,3}, 沈 晨^{1,2,3}, 韩国园^{2,3}, 钱长敏^{2,3}, 宋兆辉^{2,3,4*}, 何 毅^{2,3}, 夏玉凤^{1*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

4. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 目的 采用 UPLC-Q-TOF-MS 对止动颗粒血浆及尿液中移行成分进行快速定性, 为体内药效物质基础研究提供参考。方法 Waters UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 采用电喷雾电离源(ESI), MS^E扫描模式进行正、负离子检测。结果 通过与空白生物样品和对照品的提取离子色谱图、质谱碎片裂解信息比对, 初步鉴定出 45 个血浆及尿液中移行成分, 包括 28 个原型成分和 17 个代谢产物。结论 建立的 UPLC-Q-TOF-MS 分析方法可为止动颗粒在血浆及尿液中移行成分的定性分析提供一种快速、简便、可靠的分析手段, 为该制剂的药效物质基础研究奠定基础。

关键词: 止动颗粒; UPLC-Q-TOF-MS; 入血成分; 代谢产物; 黄芩苷; 钩藤碱; 栀子苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4244-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.034

Identification of components and metabolites of Zhidong Granule in rats plasma and urine by UPLC-Q-TOF-MS

WEI Ting-ting^{1,2,3}, SHEN Chen^{1,2,3}, HAN Yuan-yuan^{2,3}, QIAN Chang-min^{2,3}, SONG Zhao-hui^{2,3,4}, HE Yi^{2,3}, XIA Yu-feng¹

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the prototype components and metabolites of Zhidong Granule in rats plasma and urine by UPLC-Q-TOF-MS. **Methods** The analysis was carried out on a Waters UPLC HSS T3 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) column, with the mobile phase of 0.1% formic acid solution (A)-acetonitrile (B) at a flowing rate of 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in both positive and negative ion mode. **Results** A total of 45 components, including 28 prototype components and 17 metabolites, were identified by comparing their retention time, ion fragmentation information with that of the blank biological samples, herb extract, and reference compounds. **Conclusion** This experimental method is simple and reliable, which can provide theoretical basis for elucidating the bioactive components of Zhidong Granule.

Key words: Zhidong Granule; UPLC-Q-TOF-MS; components in plasma; metabolites; baicalin; rhynchophylline; geniposide

止动颗粒是由白芍、天麻、蒺藜、钩藤、灵芝、首乌藤、酸枣仁、胆南星、栀子、黄芩等 11 味药组成的中药复方制剂, 具有平肝息风、清火豁痰、宁心安神的功效^[1-5], 适应症为抽动秽语综合征。现阶

收稿日期: 2019-05-21

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制项目-面向国际的创新中药大平台建设(2013ZX09402202)

作者简介: 魏婷婷(1991—), 硕士在读, 研究方向为中药新药研发与复方体内代谢。Tel: 18039673771 E-mail: 735469642@qq.com

*通信作者 夏玉凤(1967—), 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分与质量标准。E-mail: yfxiacpu@126.com

宋兆辉(1978—), 高级工程师, 研究方向为中药新药开发与质量控制研究。E-mail: songzh@tasly.com

段临床多用氟哌啶醇、泰必利等抗精神病药物治疗抽动秽语综合征,但多出现锥体外系反应等不良反应,易引起儿童不耐受。止动颗粒前期临床试验表明,其能有效对抗患者肌肉不自主的抽动伴有喉部发声的临床症状,改善抽动发生,同时不影响其中枢兴奋性。

中药药效物质是指中药及其复方中发挥作用的化学成分,是阐释中药整体功效及其作用本质的核心环节。由于中药作用的整体性、中药成分和作用机制的复杂性,使中药复方药效物质基础研究变得复杂艰难,成为制约中药现代化、产业化和国际化进程的瓶颈。中药血清药物化学^[6]是王喜军教授团队提出的关于中药药效物质基础研究的基本方法,该方法较为科学的阐述了中药药效成分来自于吸收入血的成分群,同时原型成分会在体内发生多种代谢反应,生成一系列代谢产物,或在体产生药效,或直接排出体外。超高效液相四极杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)是一种现代的分析联用技术,兼具 UPLC 快速高效的分离特性和 Q-TOF-MS 高分辨率、高灵敏度的定性分析特点,能够实现复杂样品的快速分离和多成分的准确定性分析。计算机软件的使用能够帮助实验人员深入挖掘数据,进而为研究提供更多可能性。应用 Metabolynx 软件中质量亏损过滤(MDF)技术,按照预先设定的可能代谢途径设定其质量亏损范围,在 MS 数据中寻找可能存在的代谢产物。再通过对比分析含药样品与空白样品,去除多余干扰离子而简化质谱图的解析,从而实现代谢产物的快速检测。

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 的优点,快速分析大鼠 ig 给予止动颗粒后的生物样品,同时利用 Makerlynx 和 Metabolynx 等数据处理软件,将所得数据深入挖掘。通过对比分析空白组和给药组的血浆及尿液样品,研究止动颗粒在血浆及尿液中的移行成分,进而阐明止动颗粒在体内的原型成分及代谢产物,揭示其药效物质基础,为后续药动学及作用机制研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

UPLC-Q-TOF-MS 质谱(UPLC-Q-TOF-MS, Waters 公司),电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),台式冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司),涡旋振荡仪、氮吹仪、Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料及试剂

止动颗粒(批号 151001,天士力控股集团有限

公司研究院提供);对照品天麻素(批号 110807-201507)、栀子苷(批号 110749-201718)、芍药苷(批号 110736-201741)、黄芩苷(批号 110715-201318)、京尼平苷酸(批号 111828-201403)、黄芩素(批号 111595-201607)、汉黄芩素(批号 111514-201605)、野黄芩苷(批号 110842-201709)、汉黄芩苷(批号 112002-201702)购自中国食品药品检定研究院(对照品质量分数均大于 90%,可供含量测定用);钩藤碱(批号 PS010726)、异钩藤碱(批号 PS001033)购自成都普思生物科技股份有限公司;芍药内酯苷(批号 wkq17122003)购自四川省维克奇生物科技有限公司(对照品质量分数均大于 98%,可供含量测定用)

甲醇(色谱级)、乙腈(质谱级)、甲酸(质谱级),德国 Merck 公司;纯净水(吉林娃哈哈食品有限公司);超纯水(Milli-Q 制备)。

1.3 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 12 只,体质量 240~260 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006,在温度(21~25)℃,相对湿度(55±10)%,光照/黑暗(12 h/12 h)条件下饲养,自由饮食、饮水,适应性饲养 3 d 后开始实验。

2 方法

2.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T3(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱,体积流量 0.3 mL/min,柱温 35℃,流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~3 min, 3% B; 3~7 min, 3%~5% B; 7~13 min, 5%~14% B; 13~22 min, 14%~20% B; 22~24 min, 20%~28% B; 24~27 min, 28%~35% B; 27~32 min, 35%~50% B; 32~37 min, 50%~65% B; 37~40 min, 65%~80% B; 40~42 min, 80%~90% B; 42~45 min, 90% B; 45~46 min, 90%~3% B; 46~50 min, 3% B。

2.2 质谱条件

采用电喷雾电离化源(ESI),MS^E扫描模式进行正、负离子检测,扫描范围: m/z 50~1 500,以亮氨酸脑啡肽(正离子模式下 m/z 556.277 1,负离子模式下 m/z 554.261 5)作为校正液,进行质量实时校正,质量浓度为 200 ng/mL,体积流量为 3 μL/min。雾化器为高纯度氮气,碰撞气为氦气,离子源温度 110℃,脱溶剂气温度 350℃,毛细管电压负离子模式-2.5 kV,正离子模式 2.8 kV,样品锥

孔电压 40 V, 雾化器体积流量 50 L/h, 脱溶剂气体体积流量 800 L/h。扫描 trap CE 电压为 20~60 V。

2.3 对照品溶液的制备

分别称取芍药苷、天麻素、栀子苷、黄芩苷、钩藤碱、异钩藤碱、汉黄芩苷、野黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素、京尼平苷酸、芍药内酯苷对照品适量, 溶于甲醇中, 制备成质量浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取止动颗粒(批号 151001) 适量, 加水振荡, 混合均匀, 制成质量浓度为 1 g/mL 的止动颗粒供试品溶液。

2.5 样品采集

取 SD 大鼠, 空白组 6 只, 给药组 6 只, 所有大鼠实验前禁食 12 h (自由饮水), 给药组大鼠按 16 g/kg 剂量 ig 给药, 空白组等剂量 ig 生理盐水, 给药后置于代谢笼中, 用接收管收集大鼠给药后 0~6、6~12、12~24 h 的尿液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测。并且于给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、8、12、24 h 在大鼠眼眶静脉丛采血 300 μL 置于肝素钠预处理的离心管中, 离心 (4 500 r/min, 10 min), 分离血浆, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 待测。

2.6 样品前处理

取 100 μL 空白组及给药组混合样品, 加入 400 μL 0.1% 甲酸-乙腈, 涡旋 3 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 上清液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下吹干, 加入 100 μL 乙腈-水 (1:1), 涡旋 3 min 复溶, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 上清液置于内插管中待分析。

3 结果与分析

按“2.6”项下方法处理生物样品, 精密吸取血浆样品 4 μL , 尿液样品 2 μL , 按“2.1”“2.2”项下的色谱与质谱条件进行分析, 采用正、负离子全扫描, 获得空白血浆、含药血浆、空白尿液、含药尿液的总离子流图 (TIC), 见图 1、2。

利用 Markerlynx 软件, 将空白组和给药组样品质谱数据进行归一化处理, 并且利用 Simca-P 进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 得到 S-plot 图 (图 3) 及 VIP 值图 (图 4), S-plot 图中越离散的点组间差异越大, VIP 值越大, 该变量贡献程度越强。因此根据 S-plot 图中外围离散离子趋势图及 VIP 值 > 1 来筛选代谢谱的特征变量, 从而找出空白组中响应为零或接近零而在含药血浆中响应高的离子, 最终解析出止动颗粒在血浆中的移行成分。

根据查阅文献、筛查数据库、对照品对比结果, 从尿液和血浆中共解析出 28 个原型成分和 17 个代谢产物, 见表 1、2, 其中 45 个成分在尿液中均存在, 血浆中有 21 个原型及 10 个代谢产物。解析出的原型及代谢产物主要包括黄酮类 (22 个)、环烯醚萜类 (6 个)、单萜类 (3 个)、生物碱类 (11 个) 及其他类 (2 个), 主要来自于白芍、天麻、钩藤、栀子、黄芩等几味药材, 分别对应该复方的君臣佐药味, 体现了复方配伍整体作用的优点。

3.1 入血原型成分的解析

3.1.1 黄酮类成分解析 黄酮类成分是中药中广泛存在的一类物质, 如二氢黄酮、黄烷酮、异黄酮等多种母核, 同时, 黄酮类成分在体内可以发生广泛

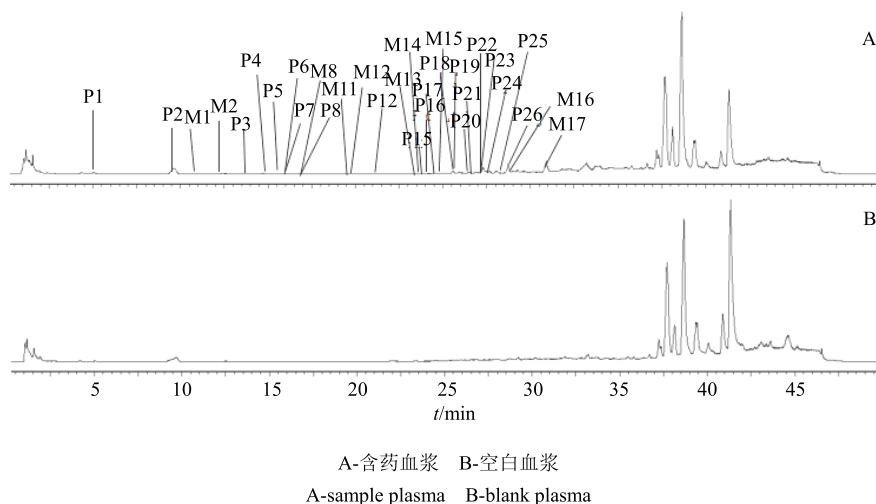
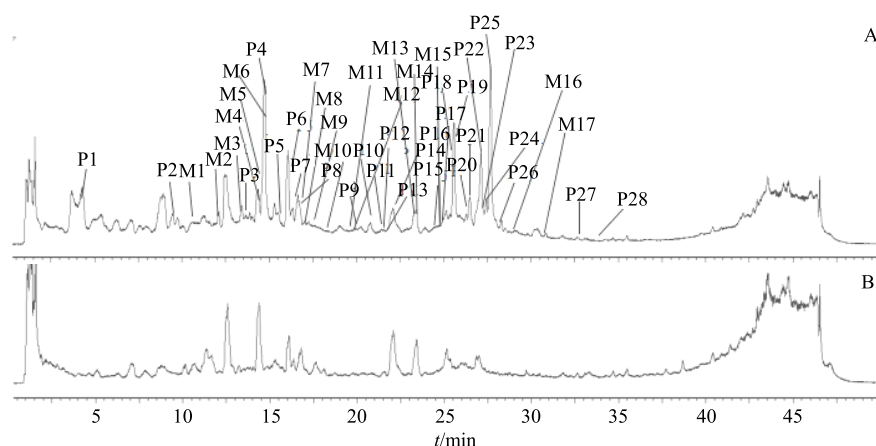


图 1 血浆总离子流图

Fig. 1 TIC of plasma



A-含药尿液 B-空白尿液
A-sample urine B-blank urine

图 2 尿液样品总离子流图

Fig. 2 TIC of urine

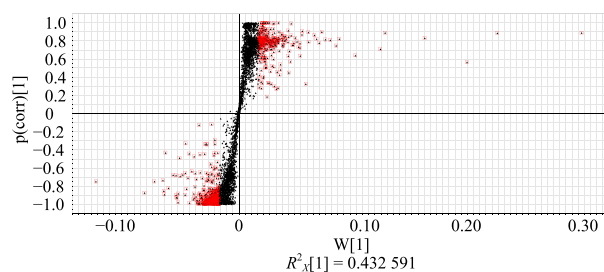


图 3 血浆样品 S-Plot 图

Fig. 3 S-Plot diagram of plasma

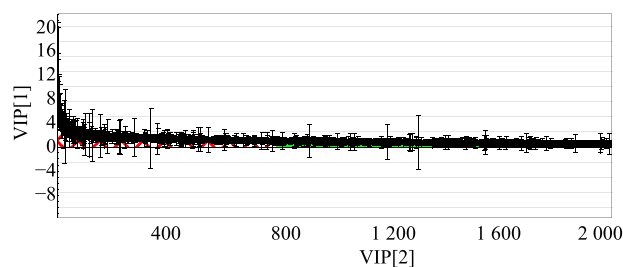


图 4 血浆样品 VIP 值图

Fig. 4 VIP value map of plasma

表 1 入血原型成分指认结果及化合物归属

Table 1 Identification of major prototype components in plasma and urine by UPLC-Q-TOF-MS

编号	t_R /min	测定值	母离子	碎片信息	理论值	误差/ ($\times 10^{-6}$)	化学式	可能的物质	来源	
									血浆	尿液
P1*	4.54	309.095 1	309.095 1 [M+Na] ⁺	272.996 2, 212.971 7	309.095 0	0.32	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	天麻素 ^[7]	+	+
P2*	9.41	373.114 0	373.114 0 [M-H] ⁻	211.062 3, 167.068 5, 149.056 5, 123.048 2	373.113 5	1.34	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	京尼平苷酸 ^[7]	+	+
P3	13.62	549.181 9	549.181 9 [M-H] ⁻	353.075 3, 225.077 8, 123.045 9	549.181 9	0.00	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	京尼平-β-D-龙胆双糖苷 ^[8]	+	+
P4*	14.90	411.126 4	411.126 4 [M+Na] ⁺	227.091 3, 209.081 8, 191.069 8, 177.055 0, 149.059 3, 121.065 9	411.126 7	-0.73	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	栀子苷 ^[8,9]	+	+
P5	15.52	342.170 1	342.170 1 [M] ⁺	297.112 1, 282.087 2, 265.086 2, 191.083 9, 165.069 3, 107.048 5	342.170 5	-1.17	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	木兰花碱 ^[8]	+	+
P6	15.83	342.170 5	342.170 5 [M+H] ⁺	297.111 8, 282.091 9, 265.084 8	342.170 5	0.00	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	酸李碱 ^[10-11]	+	+
P7*	15.92	503.153 1	503.153 1 [M+Na] ⁺	319.113 8, 197.097 0, 121.034 2	503.152 9	0.40	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药内酯苷 ^[12-14]	+	+
P8*	16.94	503.152 4	503.152 4 [M+Na] ⁺	431.097 7, 255.068 5, 121.040 5	503.152 9	-0.99	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷 ^[12-14]	+	+
P9	20.21	547.145 4	547.145 4 [M-H] ⁻	487.125 2, 457.112 8, 427.105 3, 367.082 0, 337.071 0	547.145 2	0.37	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	白杨素 6-C-葡萄糖苷-8-C-阿拉伯糖苷 ^[7]	-	+
P10*	20.96	463.088 6	463.093 6 [M+H] ⁺	287.073 0, 269.044 8, 153.021 7, 123.028 7	463.087 7	1.94	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	野黄芩苷 ^[8]	-	+
P11	21.13	609.143 3	609.143 3 [M+H] ⁺	447.090 5, 271.066 6, 255.064 8, 130.067 7	609.145 6	-3.78	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆	黄芩苷+葡萄糖苷 ^[8]	-	+
P12	21.23	137.024 6	137.024 6 [M-H] ⁻	93.033 7	137.023 9	5.11	C ₇ H ₆ O ₃	对羟基苯甲酸 ^[7]	+	+
P13	21.65	547.147 0	547.147 0 [M-H] ⁻	457.113 6, 427.104 3, 367.082 0, 337.072 9, 281.082 2	547.145 2	3.29	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	白杨素 8-C-葡萄糖苷-6-C-阿拉伯糖苷	-	+
P14	21.68	371.194 6	371.194 6 [M+H] ⁺	269.132 6, 160.078 2	371.197 1	-6.73	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	脱甲基钩藤碱 ^[7,14]	-	+

续表 1

编号	t_R/min	测定值	母离子	碎片信息	理论值	误差/ ($\times 10^{-6}$)	化学式	可能的物质	来源	
									血浆	尿液
P15	24.65	479.156 3	479.156 3 [M-H] ⁻	121.032 3	479.155 3	2.09	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷同分异构体 ^[8]	+	+
P16*	24.78	385.211 5	385.211 5 [M+H] ⁺	353.186 2, 269.157 6, 241.101 9, 226.135 2, 160.068 9, 110.092 4	385.212 7	-3.12	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	异钩藤碱 ^[7,14]	+	+
P17	24.85	383.196 1	383.196 1 [M+H] ⁺	351.173 4, 267.143 8, 160.077 0	383.197 1	-2.61	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	去氢钩藤碱 ^[7,14]	+	+
P18*	25.63	385.211 5	385.215 5 [M+H] ⁺	353.174 5, 269.074 2, 241.103 5 160.069 0	385.212 7	-3.12	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	钩藤碱 ^[7,14]	+	+
P19*	25.76	447.093 0	447.093 0 [M+H] ⁺	271.062 3, 253.048 8, 169.080 1, 123.007 6	447.092 7	0.67	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷 ^[7,8]	+	+
P20	26.58	461.109 9	461.108 1 [M+H] ⁺	447.099 5, 419.171 4, 285.077 2, 271.068 3	461.108 4	3.25	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	汉黄芩苷异构体	+	+
P21	26.68	447.093 5	447.093 5 [M+H] ⁺	271.063 0	447.092 7	1.79	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷异构体 ^[8]	+	+
P22	27.28	461.109 1	461.109 9 [M+H] ⁺	431.097 6, 285.077 0, 255.066 6, 169.133 8	461.108 4	1.52	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	千层纸素 A 葡萄糖醛酸 ^[8]	+	+
P23	27.40	475.089 1	475.089 1 [M-H] ⁻	459.094 0, 445.084 0, 299.056 1, 283.061 0, 269.046 2	475.087 7	2.95	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	5,6,7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸 ^[7]	+	+
P24	27.57	447.093 3	447.093 3 [M+H] ⁺	285.085 2, 271.061 0, 253.051 1, 169.023 1, 123.008 8	447.092 7	1.34	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	大黄酸 8-O- β -葡萄糖苷 ^[8]	+	+
P25*	27.80	461.108 8	461.108 8 [M+H] ⁺	447.094 4, 285.077 8	461.108 4	0.87	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	汉黄芩苷 ^[7,8]	+	+
P26	28.09	491.123 0	491.123 0 [M+H] ⁺	461.113 1, 315.087 8, 285.076 6, 270.051 5, 183.011 0	491.119 0	8.14	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮 7-O-葡萄糖醛酸 ^[7]	+	+
P27	32.95	285.077 2	285.077 2 [M+H] ⁺	270.054 2, 271.064 6, 113.980 1	285.076 3	3.16	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	千层纸素 A ^[7,8]	-	+
P28*	33.55	285.077 0	285.077 0 [M+H] ⁺	270.079 3, 184.070 1, 168.010 6, 140.002 0, 139.046 9	285.076 3	2.46	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	汉黄芩素 ^[7,8]	-	+

*表示经对照品确认, -表示未找到, +表示找到, 表 2 同

*compared with reference substance -not found, + found, same as Table 2

表 2 代谢产物指认结果及化合物归属

Table 2 Identification of major metabolites in plasma and urine by UPLC-Q-TOF-MS

编号	t_R/min	测定值	母离子	碎片信息	理论值	误差/ ($\times 10^{-6}$)	化学式	可能的物质	来源	
									血浆	尿液
M1	10.83	462.176 2	462.176 2 [M+H] ⁺	286.136 4, 269.118 0, 206.047 0	462.176 4	-0.43	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	乌药碱+葡萄糖醛酸 ^[11,15]	+	+
M2	12.06	462.174 9	462.174 9 [M+H] ⁺	286.136 6, 269.118 3	462.176 4	-3.25	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	乌药碱+葡萄糖醛酸异构体 ^[11,15]	+	+
M3	13.50	403.123 7	403.123 7 [M-H] ⁻	243.002 7, 163.039 1, 119.050 5	403.124 0	-0.74	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	京尼平葡萄糖醛酸开环 ^[9]	-	+
M4	14.39	305.034 2	305.034 2 [M-H] ⁻	225.076 5, 123.045 6	305.033 1	3.61	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	京尼平+硫酸酯 ^[9]	-	+
M5	14.53	314.138 6	314.138 6 [M] ⁺	297.111 9, 282.099 0, 265.076 2	314.139 2	-1.91	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	酸李碱脱甲基 ^[15]	-	+
M6	14.88	401.110 1	401.110 1 [M-H] ⁻	225.075 7, 123.043 7	401.108 4	4.24	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₁	京尼平+葡萄糖醛酸 ^[9]	-	+
M7	16.53	463.087 6	463.087 6 [M+H] ⁺	287.063 0, 169.020 2	463.087 1	1.08	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	黄芩苷+羟基 ^[16]	-	+
M8	17.03	431.098 3	431.098 3 [M+H] ⁺	345.153 8, 255.066 6, 169.122 1, 153.060 3, 107.050 1	431.098 7	-0.93	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	黄芩苷脱羟基	+	+
M9	17.24	463.088 6	463.088 6 [M+H] ⁺	287.054 9, 169.122 7	463.087 1	3.24	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	黄芩苷+羟基 ^[16]	-	+
M10	17.85	461.111 0	461.111 0 [M+H] ⁺	285.078 6	461.108 4	5.64	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	黄芩苷+甲氧基 ^[17]	-	+
M11	19.64	399.191 0	399.191 0 [M+H] ⁺	367.140 5, 283.134 8, 176.070 0, 160.051 3, 108.098 5	399.192 0	-2.51	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	钩藤碱去氢化+羟基 ^[7,14]	+	+
M12	19.81	465.104 2	465.104 2 [M+H] ⁺	447.093 8, 289.072 1, 273.085 3, 271.053 5	465.103 3	1.94	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄芩苷水合化 ^[18]	+	+
M13	23.38	623.126 3	623.126 3 [M+H] ⁺	609.146 4, 447.093 7, 285.103 6, 271.065 2	623.124 8	2.41	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	黄芩苷+甲氧基+葡萄糖苷 ^[17]	+	+
M14	23.71	401.208 1	401.208 1 [M+H] ⁺	369.165 4, 285.128 5, 176.072 4, 110.097 4	401.207 6	1.25	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₅	钩藤碱+羟基 ^[7,14]	+	+
M15	24.83	651.120 1	651.120 1 [M-H] ⁻	475.083 3, 445.084 4 299.064 2, 283.102 8	651.119 7	0.61	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₈	黄芩苷+甲氧基+葡萄糖醛酸 ^[17,19]	+	+
M16	28.69	491.119 6	491.119 6 [M+H] ⁺	461.110 7, 447.092 5, 315.092 1, 285.076 6, 271.063 4	491.119 0	1.22	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	汉黄芩苷+甲氧基	+	+
M17	30.51	285.076 5	285.076 5 [M+H] ⁺	271.067 6, 193.045 2, 169.049 1, 307.064 8 [M+Na] ⁺	285.076 3	0.70	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	黄芩素+甲氧基 ^[18]	+	+

的代谢, 如氧化、还原、加-OH、加-OCH₃、脱葡萄糖醛酸基、与葡萄糖醛酸结合等 I 相和 II 相代谢反应, 生成多种代谢产物。同时在前处理方法考察时发现, 黄酮类成分在酸性条件下保留较多, 在质谱下的响应较高, 因此前处理过程中加入甲酸, 增加黄酮类成分的响应。黄芩苷在正离子模式下一级母离子 $[M+H]^+$, m/z 447.093 0, 易脱掉葡萄糖醛酸基 (-174) 得到黄芩素的碎片 m/z 271.062 3 $[M+H-GluA]^+$, 二级碎片易形成 m/z 253.048 8 $[M+H-GluA-H_2O]^+$, m/z 169.080 1 $[M+H-GluA-C_8H_5]^+$, m/z 123.007 6 $[M+H-GluA-C_9H_6O]^+$ 等碎片离子, 质谱信息见图 5。此碎片信息与文献报

道一致^[7], 并且与对照品比对, 鉴定结构为黄芩苷。推测其裂解规律见图 6。

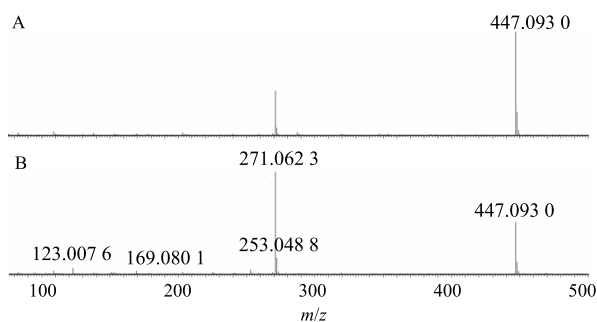


图 5 黄芩苷一级 (A)、二级 (B) 质谱图
Fig. 5 Mass spectra of baicalin (A: MS, B: MS^E)

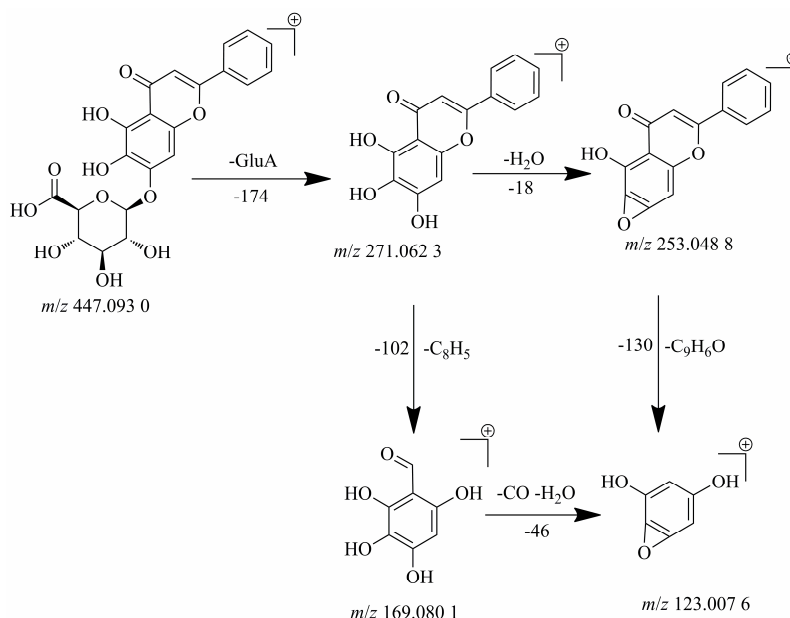


图 6 黄芩苷的裂解规律 (正离子模式)

Fig. 6 Possible fragment pathway of baicalin (positive mode)

3.1.2 生物碱类成分解析 由于生物碱类成分存在 N 原子, 可以给出 1 对电子, 易与质子结合或脱电子形成正离子, 因此, 止动颗粒入血成分中鉴定出 11 个生物碱类成分, 均在正离子模式下检出, 这些成分主要来自于钩藤、酸枣仁、白芍等药材。钩藤碱一级准分子离子 $[M+H]^+$, m/z 385.215 5, 较易连续失去 CH₃OH、C₄H₅O₂ 及 C₂H₄ 后生成碎片离子 m/z 353.174 5 $[M+H-CH_3OH]^+$ 、269.157 6 $[M+H-CH_3OH-C_4H_5O_2]^+$ 、241.101 9 $[M+H-CH_3OH-C_4H_5O_2-C_2H_4]^+$, 一级准分子离子较易发生裂解生成 2 个碎片离子 m/z 160.068 9 $[M+H-C_{12}H_{19}NO_3]^+$ 、226.135 2 $[M+H-C_{10}H_9NO]^+$, 碎片离子 m/z 226.135 2 较易断键失去 C₃H₈O₃ 生成碎片离子 m/z 110.092 4 $[M+H-C_{10}H_9NO-C_3H_8O_3]^+$ 。

其中碎片离子 m/z 160.068 9 是稳定结构, 强度较高, 结果见图 7。此碎片信息与文献报道一致^[7,14], 并且与对照品比对, 鉴定结构为钩藤碱。推测其裂解规律见图 8。

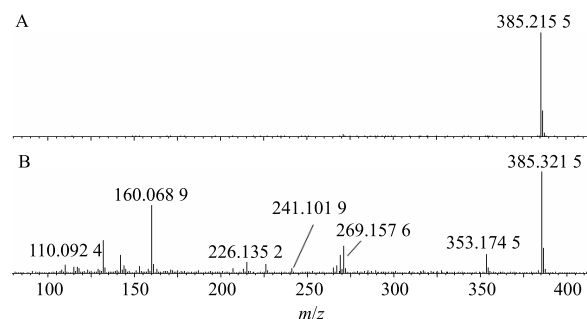


图 7 钩藤碱一级 (A)、二级 (B) 质谱图

Fig. 7 Mass spectra of rhynchophylline (A: MS, B: MS^E)

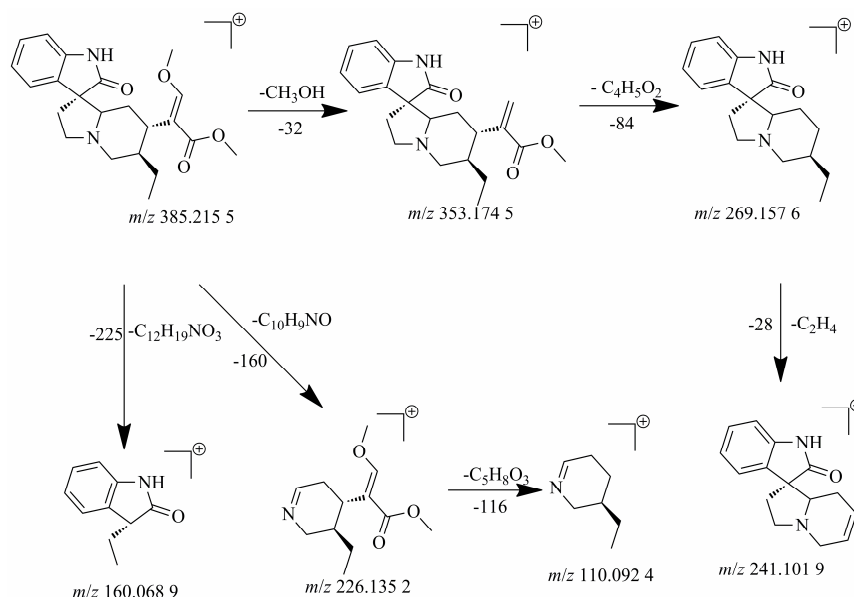


图 8 钩藤碱裂解规律 (正离子模式)

Fig. 8 Pathway of rhynchophylline (positive mode)

3.1.3 环烯醚萜类成分解析 梔子苷是来自于梔子苷的环烯醚萜苷类成分, 一级母离子 $[M+Na]^+$, m/z 411.126 4, 易脱糖(-162)形成京尼平($[C_{11}H_{14}O_5]^+$), m/z 227.091 3, 京尼平是梔子苷的母核结构, 在大鼠体内找到了京尼平的硫酸酯化、葡萄糖醛酸化、及开环的代谢产物, 均以京尼平为母核结构进行修饰, 推测梔子苷的代谢是先水解形成京尼平之后再行下一步的代谢反应, 形成多种代谢产物, 揭示了梔子苷在体内的代谢过程。梔子苷在正离子模式下易形成 m/z 209.081 8 $[M+H-Glc-H_2O]^+$ 、191.069 8 $[M+H-Glc-H_2O-H_2O]^+$ 、177.055 0 $[M+H-Glc-H_2O-CH_3O]^+$ 、149.059 3 $[M+H-C_2H_6O_3]^+$ 、121.065 9 $[M+H-C_2H_6O_3-CO]^+$ 的二级碎片, 其质谱信息见图 9, 相关裂解途径见图 10。碎片信息及相关代谢产物碎片信息与文献报道一致^[9], 对照品比对信息也一致, 鉴定此化合物为梔子苷。

3.1.4 单萜类成分结构解析 止动颗粒中还存在芍药苷等单萜苷类成分, 芍药苷在负离子模式下一级母离子存在 $[M+HCOO]^-$ 和 $[M-H]^-$ 2 种形式, m/z 为 525.161 7 和 479.156 5, 所连葡萄糖基易脱 CH_2O 形成 m/z 449.145 4 的碎片, 苯甲酰基断裂易形成 m/z 357.121 0 $[M-H-C_7H_6O_2]^-$ 和 121.030 0 $[M-H-CH_2O-C_{15}H_{20}O_8]^-$ 的 2 个碎片离子, 芍药苷母核脱糖基、脱苯甲酰基形成 m/z 165.055 5 $[M-H-CH_2O-C_7H_6O_2-C_6H_{10}O_5]^-$ 碎片, 具体质谱信

息见图 11。二级碎片信息与文献报道一致^[20], 同时经过对照品比对, 鉴定此化合物为芍药苷。可能裂解规律见图 12。

3.2 代谢产物的指认

根据药物在体内可能发生的代谢途径, 利用 Metabolyx 软件进行数据处理, 解析止动颗粒在体内的代谢产物。

从解析结果来看, 止动颗粒在体内主要发生 II 相代谢, 包括葡萄糖醛酸结合、硫酸酯化、羟基化、甲氧基化、甲基取代等多种结合反应, 少数氧化, 还原等 I 相代谢产物。如 M1 和 M2 母离子都是 $[M+H]^+$, m/z 为 462.176 2, 二级碎片为 m/z 286, 与母离子相差 m/z 162, 此碎片是中性丢失形成的, m/z 269, 又丢失 m/z 17 ($-OH$), 由文献报道对比^[15], 母

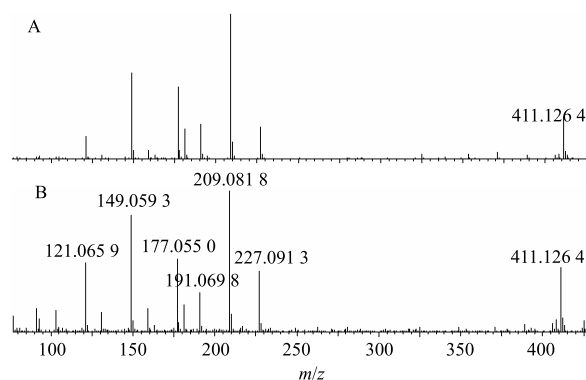


图 9 梔子苷正离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图

Fig. 9 Mass spectra of geniposide (A: MS, B: MS^E)

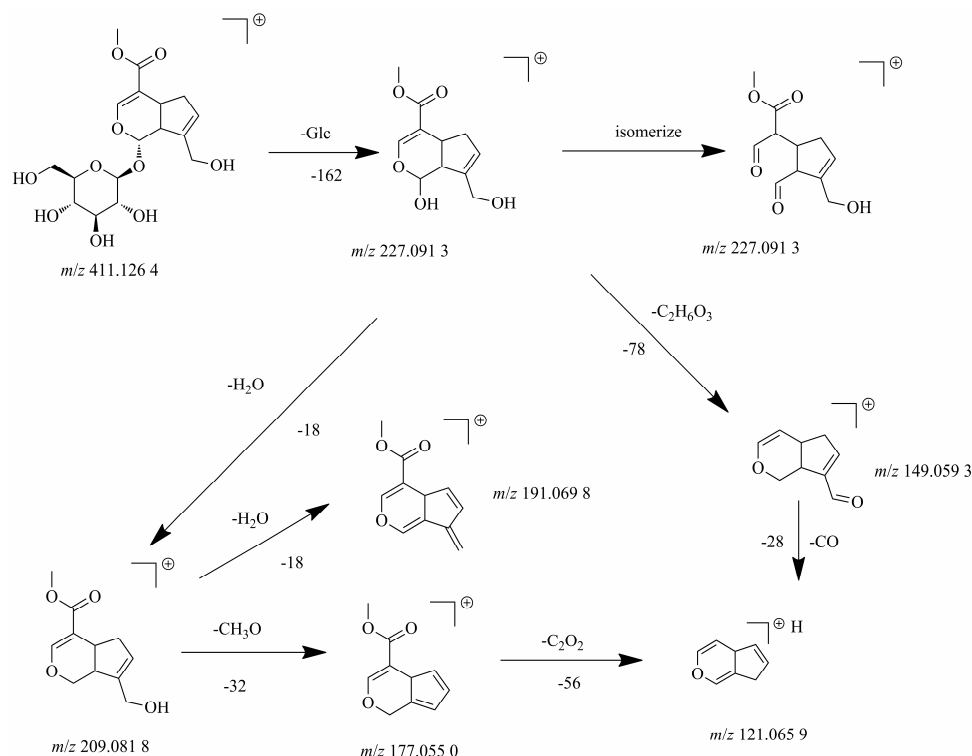


图 10 栀子苷可能的裂解规律

Fig. 10 Possible fragment pathway of geniposide (positive mode)

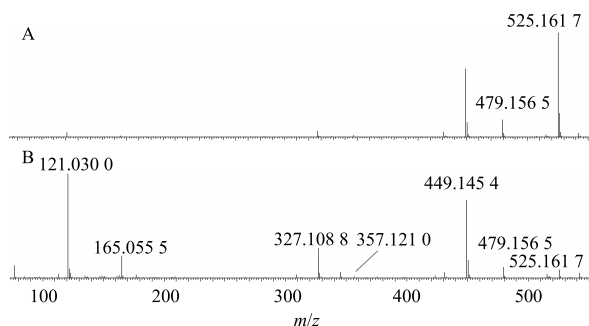


图 11 芍药苷一级 (A)、二级 (B) 质谱图

Fig. 11 Mass spectra of paeoniflorin (A: MS, B: MS^E)

核为乌药碱, M1 和 M2 为乌药碱的代谢产物, 乌药碱上有 2 个酚羟基, 因此, 与葡萄糖醛酸结合存在异构现象, 形成 2 个代谢产物。M4、M6 均存在相同的碎片信息, m/z 225.075 7, 此碎片为京尼平的离子形式, 因此推测 M4、M6 为栀子苷的代谢产物, 参考文献报道^[9], 推测 M4 为京尼平硫酸酯化产物, M6 为京尼平与葡萄糖醛酸加和产物, M3 为京尼平葡萄糖醛酸开环产物。根据文献报道^[16-23]对比, M7、M9 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 463.087 6 和 m/z 463.088 6, 与黄芩苷相比增加了 m/z 16, 同时具有典型的碎片离子 m/z 287 $[M+H-GluA]^+$ 和 m/z 169 $[M+H-GluA-C_8H_5O]^+$, 因此推

测可能是 2'-羟基黄芩苷和 4'-羟基黄芩苷; M8 的一级母离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 431.098 3, 与黄芩苷母核相比, 相差 m/z 16, 碎片信息同时与黄芩苷的二级碎片信息相差 m/z 16, 推测可能是 7,8-二羟基黄酮葡萄糖醛酸; M10 一级母离子为 m/z 461.110 0 $[M+H]^+$, 二级碎片 m/z 285, 同时 M17 母离子 $[M+H]^+$, m/z 285.076 5, 二级碎片离子为 m/z 271、193、169, 推测 M17 为甲基黄芩素, M10 为甲基黄芩苷; M12 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 465.104 2, 与黄芩苷相差 m/z 18, 推测可能为氢键与水加和的产物; M15 准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 651.120 1, 与黄芩苷相比增加了 206, 二级碎片中存在 m/z 475、445、299、283 等碎片, 因此可能的生成的代谢产物为甲氧基取代的黄芩素二葡萄糖醛酸产物, 黄芩苷在体内可能的代谢途径见图 13。

4 讨论

根据中医理论对于抽动秽语综合征的病因病机来看, 止动颗粒起到平肝息风、清火豁痰、宁心安神的功效。本实验基于中药血清药物化学的理论, 利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术和 Markerlynx、Metabolynx 等数据处理软件, 研究 ig 给药止动颗粒后大鼠血浆及尿液中出现的原型及代谢成分, 共鉴

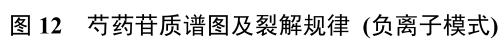


Fig. 12 Possible fragment pathway of paeoniflorin (negative mode)

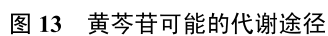


Fig. 13 Possible metabolic pathways of baicalin

别出 28 个原型成分、17 个代谢产物,主要来自于白芍、天麻、钩藤、栀子、黄芩、酸枣仁等药材。

基于文献报道,天麻的主要成分天麻素具有熄风止痉作用,对脑缺血再灌注损伤、脑神经元有保护作用^[24],白芍中的芍药苷具有延长小鼠中枢神经抑制的作用^[25],钩藤中的生物碱类成分更是具有定痉熄风、调节中枢神经系统的作用^[26]。因此,解析出的这些成分均有可能是在体内产生药效作用的物质,具有治疗抽动症相关的药理作用。而且,体内移行成分分别来自复方配伍中的君臣佐药味,体现了复方中药配伍协同作用的优点。同时,明确止动颗粒在体内的移行成分,完善其药效物质基础研究,可为筛选产品质量控制指标提供依据。

基于本实验,后续可进一步研究这些成分在体内的分布情况,为明确止动颗粒起效部位和体内蓄积情况提供数据,同时为后续筛选药效指标和“PK-Marker”提供依据。随着中药现代化和国际化的要求的增高,清晰的认识中药复方药效物质基础并明确其作用机制成为重中之重,现有研究结果可以为止动颗粒深入研究及推广提供前期数据支持。

参考文献

- [1] 牟翔宇,郭英慧,孙文君,等. 柴胡配伍白芍治疗 PMDD 肝气郁证的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 192-199.
- [2] 高晓宇,丁茹,王道平,等. 钩藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天津医科大学学报, 2017, 23(4): 380-382.
- [3] 郑勇凤,王佳婧,傅超美,等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [4] 李福元,陈容,姚淑琼,等. 小酸枣汤与酸枣仁汤对小鼠镇静催眠作用的比较研究 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11): 130-131.
- [5] 赵晓峰. 天麻钩藤饮联合抑眩宁胶囊治疗肝阳上亢型中风后眩晕的疗效 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(31): 140-141.
- [6] 闫广利,孙晖,王喜军,等. 中药血清药物化学研究概况及其理论和方法拓展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3406-3412.
- [7] 张晓勇,吴蓓,姚云,等. 天麻钩藤饮大鼠血中移行成分的 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析 [J]. 时珍国医国药, 2017(9): 2075-2080.
- [8] 李玲云,王云,刘梦娇,等. 栀子金花丸化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定与分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 1-11.
- [9] Han H, Yang L, Xu Y, et al. Identification of metabolites of geniposide in rat urine using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2011, 25(21): 3339-3350.
- [10] Sun S, Liu H, Xu S, et al. Quality analysis of commercial samples of *Ziziphi spinosae* semen (suanzaoren) by means of chromatographic fingerprinting assisted by principal component analysis [J]. *J Pharm Anal*, 2014, 4(3): 217-222.
- [11] 李强,杜晨晖,张敏,等. 血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1936-1943.
- [12] 李芳,朱付全,宋春红,等. HPLC-ESI-MSⁿ 法鉴定大鼠口服白芍提取物后血清及脑内的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2475-2481.
- [13] 柯仲成,杨楠,侯雪峰,等. 大鼠肠道菌群对芍药苷体外代谢转化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3839-3845.
- [14] 李军茂,何明珍,黎田儿,等. 异钩藤碱 ESI-MS 裂解规律及其在代谢产物鉴定中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, (15): 78-84.
- [15] 闫艳,李强,杜晨晖,等. 基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质 [J]. 药学学报, 2017(2): 283-290.
- [16] 魏文峰,刘焯,霍金海,等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析大鼠口服芩百清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1115-1122.
- [17] 王义. 黄芩苷在大鼠体内代谢及其代谢产物的生物活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [18] Wang Y, Yang J, Li X, et al. The Metabolism of baicalin in rat and the biological activities of the metabolites [J]. *Evidence-Based Comp Alter Med*, 2012, 2012(7): 404-529.
- [19] Feng N P, Di B, Liu W Y. Comparison of the metabolism of baicalin in rats orally administered with *Radix Scutellariae* extract and Shuang-Huang-Lian extract [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(8): 978-983.
- [20] Chen Z W, Tong L, Li S M, et al. Identification of metabolites of *Radix Paeoniae Alba* extract in rat bile, plasma and urine by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Anal*, 2014, 4(1): 14-25.
- [21] 刘大伟,闫广利,方圆,等. UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析 [J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 20-24.
- [22] 陈腾飞,刘建勋,孙明谦,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析通络清脑注射剂在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017(17): 98-103.
- [23] 邢世华. 基于胃肠道代谢的黄芩、连翘药效物质基础研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [24] 李红月,孙志伟,王淑琴. 天麻素在神经系统的药理作用研究概况 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(11): 1047-1050.
- [25] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [26] 罗小金,王春梅. 异钩藤碱对阿尔茨海默病及其他中枢神经系统疾病的药理作用研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2015, 28(10): 1112-1115.