

血栓心脉宁片在血瘀大鼠脑组织中的成分分析

谭 静¹, 林红强¹, 刘云鹤¹, 王 涵¹, 董庆海¹, 吴福林¹, 朱继忠², 刘传贵², 李平亚¹, 刘金平¹, 朱海林^{1*}

1. 吉林大学药学院 天然药物研究中心, 吉林 长春 130021

2. 吉林华康药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700

摘要: 目的 基于血清药物化学方法, 研究血栓心脉宁片 ig 给予病理大鼠后的入脑移行成分。方法 通过冰水浴-肾上腺素法复制急性血瘀大鼠模型, 并 ig 给予血栓心脉宁片[1.4 g/(kg·d)] 8 d, 末次 ig 给药后收集脑组织样本, 继而采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术与多元统计分析相结合的方法快速分析并鉴定吸收入脑的原型成分及其代谢产物。结果 从血瘀大鼠脑组织中鉴定出包括菲醌和蟾酥甾二烯等其他结构类型的 11 种原型入脑成分及 3 个代谢产物。结论 UPLC-Q-TOF/MS 分析方法的建立全面阐释了血栓心脉宁片的入脑原型成分及其代谢产物, 为该中药大品种的药效物质基础研究提供了科学依据。

关键词: 血栓心脉宁片; UPLC-Q-TOF/MS; 入脑成分; 血清药物化学; 菲醌; 蟾酥甾二烯

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)17-4254-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.035

Composition analysis of Xueshuan Xinmaining Tablet in brain tissue of blood stasis rats

TAN Jing¹, LIN Hong-qiang¹, LIU Yun-he¹, WANG Han¹, DONG Qing-hai¹, WU Fu-lin¹, ZHU Ji-zhong², LIU Chuan-gui², LI Ping-ya¹, LIU Jin-ping¹, ZHU Hai-lin¹

1. Natural Product Research Center, College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China

2. Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China

Abstract: Objective To study the constituents and metabolites in rat brain after ig administration of Xueshuan Xinmaining Tablet (XXT) based on the serum medicinal chemistry. **Methods** The acute blood stasis rat model was replicated by ice bath-adrenalin method, and XXX [1.4 (g·kg⁻¹·d⁻¹)] was administered orally for 8 d. The brain samples were collected and pretreated after ig administration for the last time. Then the absorbed prototype constituents and their metabolites in rats plasma were rapidly analyzed and identified by combination of ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) and multivariate statistical analysis. **Results** Finally, a total of 11 absorbed prototype constituents and three metabolites were identified, including phenanthrene, bufonis venenum oxadiene, and other structural types of compounds. These constituents absorbed into brain may be the potential bioactive components in XXX. **Conclusion** The establishment of UPLC-Q-TOF/MS analysis method explained comprehensively the brain migration component of XXX, and provided scientific basis for clarifying its substance basis of pharmacodynamics of this large variety of Chinese medicine.

Key words: Xueshuan Xinmaining Tablet; UPLC-Q-TOF/MS; absorbed constituents in brain; serum medicinal chemistry; phenanthrene; bufonis venenum oxadiene

血栓心脉宁片(Xueshuan Xinmaining Tablet, 国药典》2015 年版^[1]。临床上用于心绞痛、冠心病
XXX)具活血散瘀、芳香开窍之功效, 收载于《中 及缺血性中风恢复期等症^[2-5]。研究表明 XXX 抗血

收稿日期: 2019-07-24

基金项目: 吉林省省校共建中药专项项目(SXGJSF2017-1-1)

作者简介: 谭 静(1996—), 女, 在读硕士, 山东临沂人, 研究方向为天然药物化学。Tel: 18243052267 E-mail: tanjing17@mails.jlu.edu.cn

*通信作者 朱海林(1992—), 男, 江西南昌人, 在读博士, 研究方向为天然药物化学成分及其生物活性研究。

Tel: 13578965875 E-mail: 13578965875@163.com

瘀的作用靶点多种多样,包括上调 F13a1、Car1 和 Tbx2r 基因表达以改善血液流变学^[6];下调 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 (HMOX1)、谷氨酰胺半胱氨酸连接酶 (GCLM)、编码还原型辅酶/醌氧化还原酶 (NQO1) 等信号通路对抗血管内皮细胞氧化损伤的蛋白表达^[7];调节类固醇激素的生物合成、内源性代谢途径如花生四烯酸代谢和脂质代谢等来抑制血栓形成^[3]。XXT 处方组成包括丹参、川芎、槐花、人参茎叶总皂苷、毛冬青、水蛭、人工牛黄、人工麝香、冰片及蟾酥 10 味中药,该制剂许多成分尚未明确。XXT 药效物质基础研究略显薄弱。有关 XXT 的研究主要集中在体外成分分析和生物活性筛选等方面^[8-10],尚无其入脑成分的定性分析报道。

中药化学成分复杂,特别是治疗中风等中枢系统疾病的复方作用于机体后,血中移行成分并不一定都能透过血脑屏障,这导致复方作用实际与体外血清药理学实验模拟存在差异^[11]。因此,基于中药血清药物化学方法,探讨透血脑屏障的活性成分对阐明中药复方治疗脑系疾病的药效物质基础十分必要。目前,UPLC-Q-TOF/MS 凭借其快速、灵敏、高分辨的优势,不仅适用于多组分快速检测,还能够对复杂基质中的组分准确定性^[12-14],成为中药复方体外成分分析首选。

本研究拟采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术并结合多元统计分析对 ig 给予 XXT 的血瘀大鼠的脑组织样本进行分析,辨识其脑中移行成分,为该中药大品种的药效物质基础的阐明提供参考。

1 材料

1.1 药物与试剂

XXT (批号 180404) 由吉林华康药业有限公司提供 (ig 前配制成 0.14 g/mL 的溶液);肾上腺素 (批号 1811281) 购自天津药业集团有限公司;亮氨酸-脑啡肽购自美国 Sigma 公司;分析纯乙醚 (批号 20181210) 购自天津天泰精细化学品有限公司;质谱级乙腈和甲酸钠购自 Fisher Chemical 公司;Milli-Q 水纯化系统 (Millipore 公司,美国)。

1.2 仪器

Xevo G2-XS Q-TOF/MS 四级杆飞行时间质谱仪、样本管理器及 ACQUITY UPLC 二元泵购自美国 Waters 公司;DCY-12S 氮吹仪,青岛海科仪器有限公司;FDU-1200 冷冻干燥仪,EYELA 东京理化

器械株式会社;飞鸽 TGL-16 aR 超高速离心机购自上海安亭科学仪器厂。

1.3 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体质量 (200±20) g,合格证号 SCXK (吉)-2018-003,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司。在温度 (22±4) °C,相对湿度 40%~60% 的环境下适应性饲养 1 周,每隔 12 h 明-暗交替循环,自由采食、饮水。

2 方法

2.1 XXT 入脑成分的测定

2.1.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温 30 °C,流动相:0.1%甲酸水溶液 (A)-0.1%甲酸乙腈溶液 (B)。梯度洗脱:0~2 min, 10% B; 2~26 min, 10%~90% B; 26~28 min, 90% B; 28~28.1 min, 90%~10% B; 28.1~30 min, 10% B。自动进样器保持在 15 °C,进样体积 5 μL,体积流量 0.4 mL/min。
2.1.2 质谱条件 Xevo G2-S QToF 质谱仪,MS^E continuum 模式下,扫描范围为 *m/z* 100~1 500。在 ESI⁺和 ESI⁻模式下,毛细管电压和锥孔电压分别为 3.0 kV 和 40 V,氦气流量 0.15 mL/min,温度为 120 °C 时锥孔气流量为 50 L/h,温度为 300 °C 时脱溶剂流量为 600 L/h,质量的准确测定是以 100 ng/mL 的亮氨酸-脑啡肽 (ESI⁺: *m/z* 556.277 1, ESI⁻: *m/z* 555.261 5) 溶液为校正标准液 (Lock Spray TM),体积流量 15 μL/min,使用甲酸钠对仪器进行校正。

2.1.3 脑组织样本的处理 雄性 Wistar 大鼠 18 只,适应性饲养 3~5 d 后,按体质量随机分为模型组和给药组,每组 9 只,其中给药组以 1.4 g/kg 连续 ig 给药 8 d,每次给药 30 min 后将 2 组实验鼠置于冰水 (0~1 °C) 中 5 min,末次 ig 给予 XXT 30 min 后,各组大鼠 sc 0.1% 肾上腺素 (1 mg/kg) 2 次,第 1 次剂量为 1 mg/kg,第 2 次剂量减为 0.5 mg/kg,间隔 4 h,间隔时间内将各组实验鼠冰水浴 5 min,以建立急性血瘀模型^[15]。造模 2 h 后给药组再 ig 给药 1 次。末次给药 1 h 后,各组大鼠用乙醚麻醉,将大鼠脱颈椎处死,取脑组织,用生理盐水冲洗干净后置于 4 mL EP 管中,捣碎,匀浆,取 0.5 g,加 4 倍量甲醇沉淀处理,涡旋混匀 3 min,超声 3 min,混合液 10 000 r/min 低温离心,取上清,冷冻干燥。所得残渣用 0.2 mL 甲醇复溶,涡旋 3 min,超声 3 min,10 000 r/min 低温离心取上清,过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。与此同时,将每个样本吸取 15 μL,

混合后得质量控制 (QC) 样本, 在进样前、进样中及进样后各进一针 QC 样本, 以对系统的稳定性进行评估^[16]。

2.1.4 数据处理 采用 MarkerLynx XS 4.1 软件对脑组织样本的 UPLC-Q-TOF/MS 数据文件进行一系列处理, 包括峰检测、校准、去褶皱、数据缩减、同位素消除、色谱峰提取及归一化等分析, 保留时间 0~30 min, 质量范围 m/z 100~1 200, 质量公差为 0.10, 标记强度阈值为 2 000, 最小强度为 5%, 保留时间窗为 0.20, 质量窗为 0.10, 噪声消除水平为 6。所得数据通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 获得 VIP (variable importance in the projection) 值和 OPLS-DA/S-plot 图, 发现能够代表组间差异的潜在的标记物。采用 R^2Y 和 Q^2 2 个参数来评价模型, 模型的拟合度和可预测度分别用 R^2Y 和 Q^2 表示, 这 2 个参数的大小能够反映模型的可靠性与准确性。所得数据通过 PCA 和 OPLS-DA, 获得 VIP 值和 OPLS-DA/S-plot 图, 发现能够代表组间差异的脑中移行成分。

3 结果

3.1 XXT 及生物样品色谱图的建立与分析

对模型组和给药组大鼠脑组织样本进行定性分析。XXT 给药脑组织中所含的各单体成分在 30 min 内得到较好的分离, 2 组脑组织样本在负离子模式下的基峰总离子流图见图 1。结果显示脑中所含有的内源性物质检测良好, 但因其质谱响应值高于

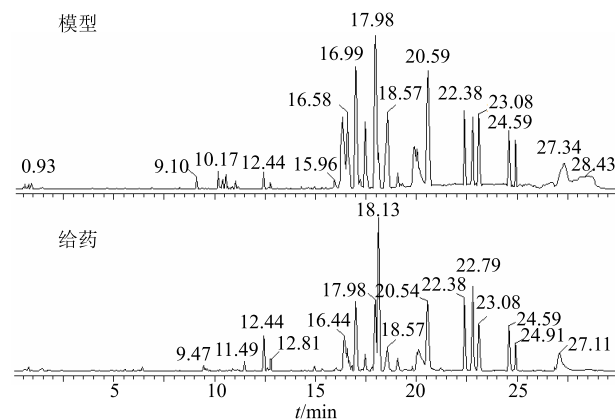


图 1 XXT 的给药脑组织样本在负离子模式下的基峰离子流图

Fig. 1 Base peak intensity chromatograms in brain administrated by XXT in ESI⁻ mode

XXT 体内成分, 存在明显干扰, 在所采集的色谱图中难以直观上发现 XXT 的体内成分。故在此基础上结合 PCA 和 OPLS-DA 检测和鉴定 XXT 的入脑成分。

3.2 多元统计分析

将 UPLC-Q-TOF/MS 原始数据文件导入 Simca-P 13.0 软件中, 进行加入分组信息的 PLS-DA。结果 PLS-DA 模型显示出很好的组间差异。

PCA 载荷图中的每个点代表 1 个样本, ESI⁻模式下的模型和给药组大鼠 ig 给予 XXT 后的 PCA 载荷图见图 2。从图中可以看出 2 个组别的大鼠脑组织样品被明显的分为 2 个区域, 说明各样本存在显著差异。QC 样本聚集, 说明系统稳定性良好。ESI⁻模式下的血瘀大鼠 ig 给予 XXT 的脑组织代谢轮廓的 OPLS-DA 载荷图以及 OPLS-DA/S-plots 图分别见图 3、4。在 OPLS-DA 得分图中, 可明显观察到脑组织样本被分成 2 个离散群, 分别为模型组 (得分矩阵左侧) 和给药组 (XXT, 得分矩阵右侧),

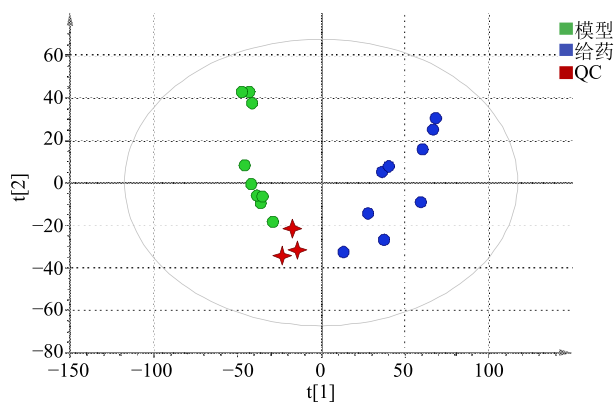


图 2 模型组和给药组大鼠脑组织代谢轮廓的 PCA 图
Fig. 2 PCA plots of brain metabolic profiles in M and MD group rats

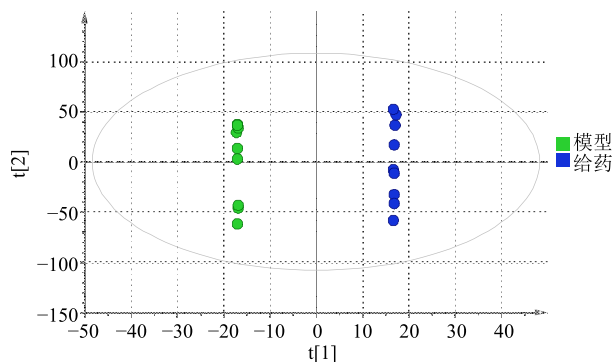


图 3 模型组和给药组大鼠的脑组织代谢谱 OPLS-DA 载荷图
Fig. 3 OPLS-DA load map of brain metabolic profiles in M and MD group rats

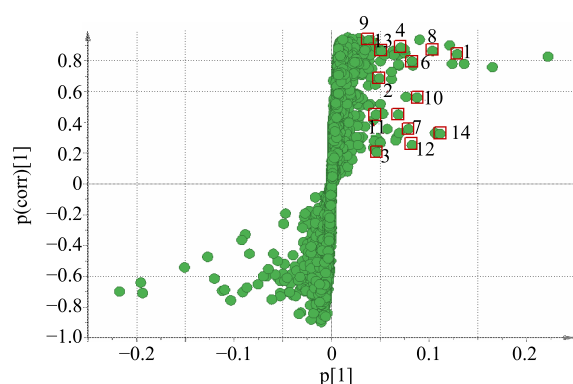


图 4 模型组和给药组大鼠脑组织代谢谱 OPLS-DA/S-plots 载荷图
Fig. 4 OPLS-DA/S-plots load map of brain metabolic profiles in M and MD group rats

说明脑组织样品存在明显的差异。

变量对分类的重要程度 (VIP) 的大小代表某个变量对模型分类的贡献程度, 以此为依据对变量进行筛选。认为 $VIP > 1.0$ 且经 t 检验后 $P < 0.05$ 的代谢物是具有差异性的代谢物。后经一级、二级高分辨质谱的数据分析, 并结合 XXT 图谱与对照品及参考文献中的质谱数据进行比对, 在血瘀大鼠脑组织中共鉴定出 11 个入脑原型成分及 3 个代谢产物, 详细裂解碎片见表 1。

3.3 XXT 中吸收入脑原型成分的鉴定

在筛选出的离子峰中, 脑中移行成分认为是既存在于 XXT 中, 又存在于 XXT 给药脑组织中的成分^[17]。通过比对保留时间, MS、MS/MS 色谱图,

表 1 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术的血栓心脉宁片 ig 给予急性血瘀大鼠的入脑成分鉴定

Table 1 Identification of components absorbed in blood stasis rat brain tissue by ig administration of XXT based on UPLC-Q/TOF-MS

编号	t_R/min	分子式	计算值	理论值	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要质谱碎片	鉴定结果	来源
1	9.65	$C_{24}H_{34}O_5$	402.240 6	402.238 0	-2.7	447.236 2 $[M+HCOO]^-$, 383.237 8 $[M+H-H_2O]^-$	19-羟基蟾毒灵 ^a	蟾酥
2	10.36	$C_{26}H_{34}O_7$	458.230 5	458.229 8	-0.6	503.228 0 $[M+HCOO]^-$, 439.322 4 $[M-H-H_2O]^-$, 414.315 0 $[M-H-C_2H_5O]^-$, 318.167 3 $[M-H-C_2H_5O-C_3H_5O_2]^-$, 278.124 3 $[M-H-C_9H_8O_4]^-$	华蟾毒它灵 ^a	蟾酥
3	14.36	$C_{18}H_{14}O_3$	278.093 8	278.094 3	-1.0	323.091 5 $[M+HCOO]^-$, 232.089 5 $[M-H-CH_3-CH_2O]^-$, 二氢丹参酮 I ^a , 219.074 4 $[M-H-C_3H_6O]^-$		丹参
4	15.29	$C_{19}H_{20}O_4$	312.143 1	312.141 2	1.2	311.150 4 $[M-H]^-$, 296.231 9 $[M-H-CH_3]^-$, 281.030 5 $[M-H-丹参酚酮 II^a]$, $CH_2O]^-$, 238.038 3 $[M-H-CH_3-C_3H_6O]^-$		丹参
5	17.35	$C_{32}H_{44}O_9$	572.296 3	572.298 5	-2.2	571.289 0 $[M-H]^-$, 433.256 1 $[M-H-C_3H_5O_2-2H_2O-CHO]^-$, 噤根草配基-3-辛二酸半酯 ^a , 333.175 8 $[M-H-2H_2O-CHO-C_8H_{13}O_4]^-$		丹参
6	18.07	$C_{34}H_{46}O_9$	598.313 1	598.314 2	-1.1	597.305 8 $[M-H]^-$, 465.262 1 $[M-H-OCOCH_3-C_3H_5O_2]^-$	华蟾毒精-3-辛二酰甲酯 ^a	蟾酥
7	18.75	$C_{18}H_{16}O_3$	280.095 0	280.094 3	2.5	279.102 3 $[M-H]^-$, 225.046 0 $[M-H-C_4H_6]^-$, 143.066 9 $[M-H-次甲二氢丹参酮^a]$, $C_7H_4O_3]^-$		丹参
8	23.13	$C_{18}H_{32}O_2$	280.239 1	280.240 2	-3.9	279.231 9 $[M-H]^-$, 261.030 5 $[M-H-H_2O]^-$, 246.038 3 $[M-H-亚油酸^a]$, $CH_3-H_2O]^-$, 124.020 4 $[M-H-H_2O-C_{10}H_{17}]^-$		川芎
9	23.19	$C_{24}H_{34}O_2$	330.253 5	330.255 9	-2.3	329.246 3 $[M-H]^-$, 124.095 5 $[M-H-2CH_3-H_2O-C_{12}H_{13}]^-$	孕烯醇酮 ^a	川芎
10	24.64	$C_{16}H_{32}O_2$	256.238 7	256.240 2	-1.5	255.231 5 $[M-H]^-$, 224.219 5 $[M-H-OCH_3]^-$, 83.050 7 $[M-H-12-甲基豆蔻酸甲酯^a]$, $OCH_3-C_{10}H_{21}]^-$		水蛭
11	26.92	$C_{18}H_{36}O_2$	284.270 7	284.271 5	-3.1	283.263 4 $[M-H]^-$, 240.213 2 $[M-H-C_3H_7]^-$, 223.218 4 $[M-H-十七烷酸甲酯^a]$, $OCH_3-C_2H_5]^-$		水蛭
12	11.22	$C_{48}H_{76}O_{19}$	956.418 9	956.417 7	1.3	955.409 9 $[M-H]^-$, 943.378 5 $[M-H-H_2O]^-$, 909.490 5 $[M-H-人参皂苷 Rg_1 代谢产物^b]$, $H_2O-CH_2OH]^-$, 798.461 4 $[M-H-Glu]^-$, 769.205 4 $[M-H-CH_3-C_6H_8O_6]^-$, 747.336 0 $[M-H-2H_2-CH_2OH-C_6H_8O_6]^-$		人参茎叶总皂苷
13	12.27	$C_{25}H_{32}O_9$	476.297 6	476.299 9	-4.8	475.292 1 $[M-H]^-$, 439.152 0 $[M-H-2CH_3]^-$, 279.094 7 $[M-H-隐丹参酮代谢产物^b]$, $CH_3-C_6H_8O_6]^-$, 257.067 1 $[M-H-CH_3-CH_2O]^-$		丹参
14	14.74	$C_{26}H_{42}O_6$	450.298 1	450.295 5	5.7	449.287 7 $[M-H]^-$, 407.220 2 $[M-H-C_2H_5O]^-$, 337.202 0 $[M-H-胆酸代谢产物^b]$, $H-4H_2O-C_2H_5O]^-$, 387.249 0 $[M-H-CH_3-HCOOH]^-$		牛黄

a-原型成分 b-代谢产物

a-prototype components b-metabolites

选取 $VIP > 1.0$ 且经 t 检验 $P < 0.05$ 的代谢物, 共鉴定了 11 个入脑原型成分, 裂解碎片信息见表 1。

3.3.1 XXT 给药脑组织中菲醌类成分的鉴定 在病理大鼠给药脑组织中鉴定出 3 个菲醌类化合物, 其结构式见图 5。菲醌类母核为邻菲醌, 较易失去 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{CH}_3$ 及 H_2O 等小分子。化合物 4 在 ESI^- 模式下, 准分子离子峰为 311.150 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级质谱图见图 6。碎片离子 m/z 296.231 9、281.030 5 分别为其母离子丢失 $-\text{CH}_3$ 及 $-\text{CH}_2\text{O}$ 产生; m/z 296.231 9 继而丢失 1 分子 $-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ 产生碎片离子 m/z 238.038 3, 与隐丹参酮碎片离子裂解规律相似^[18], 结合前期基于 UNIFI 平台的 XXT 全成分分析, 可推断化合物 4 为丹参酚醌 II。

3.3.2 XXT 给药脑组织中蟾酥甾二烯类成分的鉴定

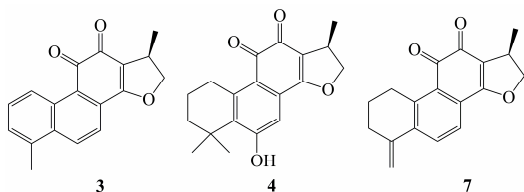


图 5 XXT 给药脑组织中菲醌类化合物的结构

Fig. 5 Structures of phenanthrenes in brain of XXT

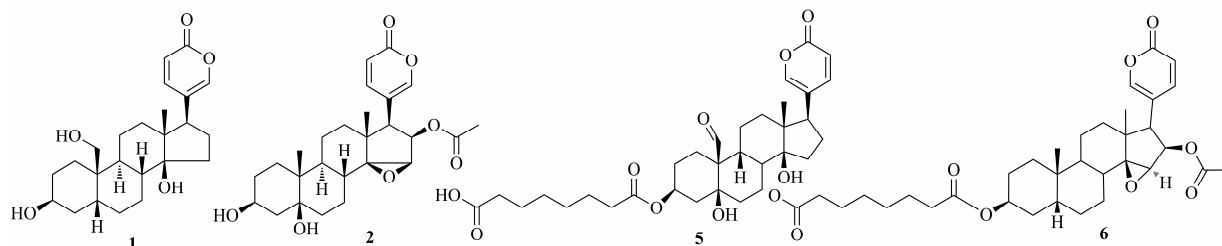


图 7 XXT 给药脑组织中蟾酥甾二烯类化合物的结构

Fig. 7 Structures of bufonis venenum oxadienes in brain of XXT

3.3.3 XXT 给药脑组织中其他类成分的鉴定 在模型大鼠的给药脑组织中还鉴定出一些种类较少且含量较低的成分, 应用提取离子色谱法结合文献报道, 共分别推断出 4 个其他类原型成分, 包括酯类、有机酸类、甾体类等, 其结构式见图 9。各化

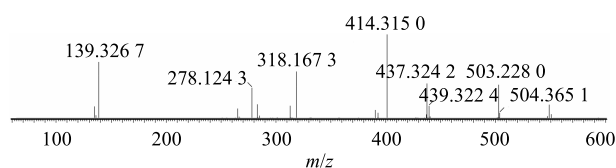


图 8 ESI^- 模式下化合物 2 的二级质谱图

Fig. 8 Secondary mass spectrum of compound 2 in ESI^- mode

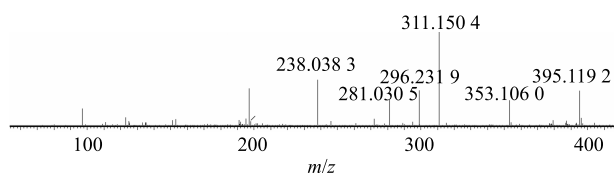


图 6 ESI^- 模式下化合物 4 的二级质谱图

Fig. 6 Secondary mass spectrum of compound 4 in ESI^- mode

定 在给药组大鼠的脑组织中鉴定出 4 个蟾酥甾二烯类原型成分, 其结构见图 7。该类化合物羟基较多, C-17 侧链为 $\Delta^{\alpha\beta, \gamma\delta}$ - δ 内酯, 质谱裂解较易脱去 H_2O 和 m/z 96、109、123、135、136 等含有 δ -吡喃环的碎片, 其中 δ -吡喃环也较易丢失 $-\text{CO}$ 形成 δ -呋喃环。以化合物 2 为例, 在 ESI^- 模式下, 准分子离子峰为 503.228 0 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, 其二级质谱图见图 8。碎片离子 m/z 439.322 4 是由母离子脱去 1 分子 H_2O 产生, m/z 414.315 0 由母离子通过酯键断裂丢失 $-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ 产生, 继而脱去 δ -吡喃环形成 m/z 318.167 3、 m/z 278.124 3 由母离子丢失含 δ -吡喃环的碎片 $-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ 产生, 这与文献报道基本一致^[19], 推断化合物 2 为华蟾毒它灵。

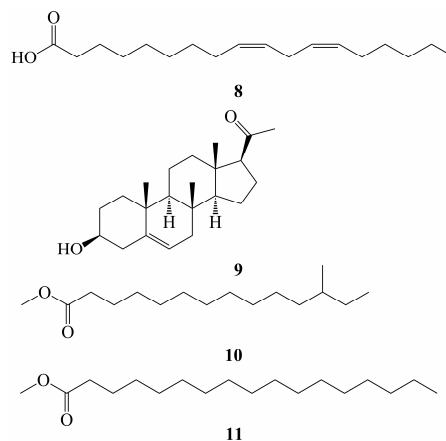


图 9 XXT 给药脑组织中其他类化合物的结构

Fig. 9 Structures of other compounds in brain of XXT

合物准分子离子峰的精确质量数均在 5×10^{-6} 误差范围内,具体质谱数据见表 1。以化合物 8 为例,在 ESI⁻模式下,准分子离子峰为 279.231 9 [M-H]⁻,较易脱去 H₂O、-CH₃ 等小分子结构,在其二级质谱(图 10)中,由母离子脱去 1 分子 H₂O 形成 m/z 261.030 5 是其特征碎片离子峰,继而分别丢失 1 分子 -CH₃ 和 1 分子 -C₁₀H₁₇ 产生碎片离子 m/z 246.038 3 和 m/z 124.020 4,这与文献报道基本一致^[20],可推断化合物 8 为亚油酸。

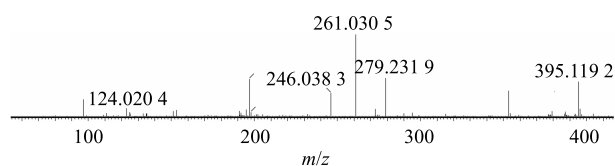


图 10 ESI⁻模式下化合物 8 的二级质谱图

Fig. 10 Secondary mass spectrum of compound 8 in ESI⁻ mode

3.4 代谢产物的鉴定

3.4.1 人参皂苷 Rg₁ 代谢产物 在保留时间 11.22 min 时,出现 m/z 955.409 9 的峰,推测为 [M-H]⁻ 峰,以 m/z 955.409 9 为母离子进行 MS/MS 扫描,产生 5 个主要碎片离子,碎片离子峰 m/z 943.378 5 是由母离子丢失 1 分子 H₂O 形成的 [M-H-H₂O]⁻ 峰,继而丢失 1 分子 -CH₂OH 得到 m/z 909.490 5 [M-H-H₂O-CH₂OH]⁻ 峰;碎片离子峰 m/z 798.461 4 是由母离子丢失 1 分子葡萄糖形成的 [M-H-Glu]⁻ 峰;母离子丢失 1 分子 -CH₃ 与 1 分子 C₆H₈O₆ 形成碎片离子 m/z 769.205 4 [M-H-CH₃-C₆H₈O₆]⁻ 峰;母离子丢失 1 分子 -CH₂OH、1 分子 C₆H₈O₆ 及脱去 2 分子 H₂ 形成碎片离子 m/z 747.336 0 [M-H-2H₂-CH₂OH-C₆H₈O₆]⁻ 峰;与原型成分人参皂苷 Rg₁ 的分子结构及碎片裂解规律相比,除脱去 2 分子 H 和 1 分子 C₆H₈O₆ 外,相对分子质量还相差 18,可能最先脱掉 1 分子 H₂O,故推测该分子式为 C₄₈H₇₆O₁₉,属三萜皂苷类,结合人参皂苷 Rg₁ 的质谱裂解规律^[21],其代谢途径推测为人参皂苷 Rg₁ 在体内先脱水,再氧化,然后发生葡萄糖醛酸化反应,其二级质谱图见图 11。

3.4.2 隐丹参酮代谢产物 在保留时间 12.27 min 时,出现 m/z 475.292 1 的峰,推测为 [M-H]⁻ 峰,以 m/z 475.292 1 为母离子进行 MS/MS 扫描,产生 3 个主要碎片离子,碎片离子峰 m/z 439.152 0 是由母离子丢失 2 分子 -CH₃ 形成的 [M-H-2CH₃]⁻ 峰;

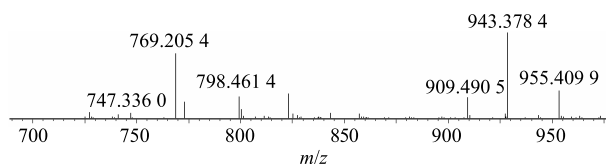


图 11 ESI⁻模式下人参皂苷 Rg₁ 代谢产物的二级质谱图
Fig. 11 Secondary mass spectrum of ginsenoside Rg₁ metabolite in ESI⁻ mode

碎片离子峰 m/z 279.094 7 是由母离子丢失 1 分子 -CH₃ 和 1 分子 C₆H₈O₆ 产生的 [M-H-CH₃-C₆H₈O₆]⁻ 峰;母离子丢失 1 分子 -CH₃ 和 1 分子 -CH₂O 形成碎片离子 m/z 257.067 1 [M-H-CH₃-CH₂O]⁻ 峰;与原型成分隐丹参酮的分子结构及碎片裂解规律基本一致,故推测该分子式为 C₂₅H₃₂O₉,属菲醌类,其代谢途径推测为隐丹参酮^[22]在体内发生葡萄糖醛酸化反应,其二级质谱图见图 12。

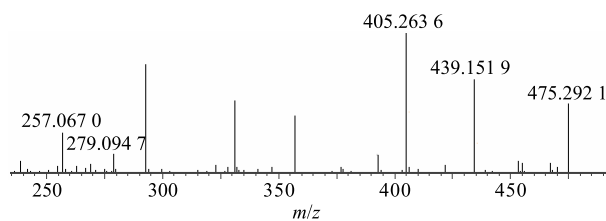


图 12 ESI⁻模式下隐丹参酮代谢产物的二级质谱图
Fig. 12 Secondary mass spectrum of Cryptotanshinone metabolite in ESI⁻ mode

3.4.3 胆酸代谢产物 在保留时间 14.74 min 时,出现 m/z 449.287 7 的峰,推测为 [M-H]⁻ 峰,以 m/z 449.287 7 为母离子进行 MS/MS 扫描,产生 3 个主要碎片离子,碎片离子 m/z 407.220 2 由母离子丢失 1 分子 -C₂H₂O 得 [M-H-C₂H₂O]⁻ 峰,继而丢失 4 分子 H₂O 形成 m/z 337.202 0 [M-H-4H₂O-C₂H₂O]⁻ 峰;碎片离子 m/z 387.249 0 是由母离子丢失 1 分子 -CH₃ 和 HCOOH 形成 [M-H-CH₃-HCOOH]⁻ 峰;均为侧链断裂峰;与原型成分胆酸的分子结构及碎片裂解规律^[23]基本一致,故推测该分子式为 C₂₆H₄₂O₆,属于甾体类成分,其代谢途径推测为胆酸在体内发生乙酰化反应,见图 13。

4 讨论

中药传统的口服给药方式决定了只有吸收入血并通过血脑屏障的成分才能发挥治疗脑部疾病的药效作用^[24]。脑组织成分分析存在含量较低、组分复杂、分离较难、生物个体差异较大的特点,因此本实验基于 UPLC-Q-TOF/MS 提供的高选择性、高分

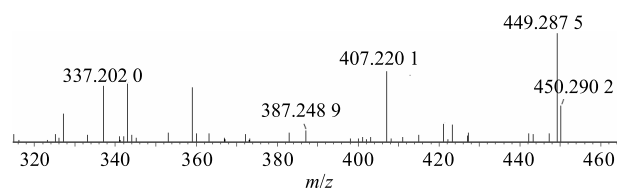


图13 ESI⁻模式下胆酸代谢产物的二级质谱图

Fig. 13 Secondary mass spectrum of cholic acid metabolite in ESI⁻ mode

离度、高灵敏度及高质量精度质谱数据并结合多变量统计分析技术,借鉴中药血清药物化学研究方法,对血栓心脉宁片 ig 给予病理大鼠的入脑成分进行分析鉴别。

本实验前期建立 XXT 化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析,明确了 XXT 的体外化学成分,在此基础上,对比分析模型组和给药组大鼠脑组织,从中获得对应化合物的提取总基峰离子图,然后与入脑成分分析比对,快速分离并初步鉴定出 11 种原型成分入脑及 3 种代谢产物。这些成分以菲醌和蟾酥甾二烯类为主,其中,19-羟基蟾毒灵、噁根草配基-3-辛二酸半酯、华蟾毒精-3-辛二酰甲酯、亚油酸、12-甲基豆蔻酸甲酯及十七烷酸甲酯含量较高,可能为 XXT 的体内直接作用物质,在后续研究中,将进一步对各成分与各作用靶点进行关联性研究,为 XXT 进一步开发和临床合理应用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李妍怡,樊建安,巩婷. 血栓心脉宁在心脑血管疾病中的应用进展 [J]. 西部中医药, 2017, 30(4): 143-145.
- [3] Tan J, Wang C Z, Zhu H L, et al. Comprehensive metabolomics analysis of Xueshuan Xinmaining Tablet in blood stasis model rats using UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1650-1667.
- [4] 赵星宇,睢大员,于晓风,等. 血栓心脉宁片对大鼠急性心肌梗死的保护作用及其机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 36(2): 177-179.
- [5] 刘建伟,曲绍春,于晓风,等. 血栓心脉宁片对大鼠实验性脑缺血的保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(3): 333-334.
- [6] Zhang X T, Zhang C, Sai J Y, et al. Xueshuan Xinmaining Tablet treats blood stasis through regulating the expression of F13a1, Car1, and Tbx2r [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2015, doi.org/10.1155/2015/704390.
- [7] Xiong, L X, Xie, J S, Song, C X, et al. The activation of Nrf2 and its downstream regulated genes mediates the antioxidative activities of Xueshuan Xinmaining Tablet in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(22): 1-7.
- [8] 明磊. 血栓心脉宁片药效物质基础研究 [D]. 长春:

吉林大学, 2012.

- [9] 刘传贵,王福文,李振伟. HPLC 测定血栓心脉宁片中丹参酮 IIA 和丹酚酸 B 的含量 [J]. 中国现代中药, 2007, 21(8): 12-14.
- [10] 杜冰,谢湘林,方圣博,等. 血栓心脉宁治疗缺血再灌注大鼠血管性痴呆的机制 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(11): 2652-2653.
- [11] 孙志翠,王欣. “中药脑脊液药物化学”研究的初步构建 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 289-291.
- [12] 王晶,韩燕全,魏良兵,等. 补骨脂-肉豆蔻配伍前后血中移行成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5264-5270.
- [13] 张楠淇,李平亚,王翠竹,等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析西洋参皂苷总皂苷的入血成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 117-124.
- [14] 左爱华,程孟春,王莉,等. 川芎吸收入脑成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2012(23): 3647-3650.
- [15] Su S, Duan J, Cui W, et al. Network-based biomarkers for cold coagulation blood stasis syndrome and the therapeutic effects of Shaofu Zhuyu Decoction in rats [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2013, doi:10.1155/2013/901943.
- [16] Lin H, Pi Z F, Men L H, et al. Urinary metabonomic study of *Panax ginseng* in deficiency of vital energy rat using ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 184: 10-17.
- [17] 范连霞,章建华,尹华,等. 急性心力衰竭模型下附子入血成分及其体内动态变化的初步研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 221-225.
- [18] 张驰,张彩娟,邱敏懿,等. 丹参多化学成分的 UPLC-LTQ Orbitrap MS 快速表征解析 [J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 14-21.
- [19] 李娟,狄留庆,李俊松,等. HPLC-MS 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 700-705.
- [20] Sebök Á, Vasanits-Zsigrai A, Helenkár A, et al. Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography-mass spectrometry. [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(12): 2288-2301.
- [21] Zhang H R, Ding L, Qu C L, et al. Study on the noncovalent complexes of ginsenoside and cytochrome c by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular Biomolecular Spectr*, 2007, 68(2): 312-316.
- [22] 张驰,张彩娟,邱敏懿,等. 丹参多化学成分的 UPLC-LTQ Orbitrap MS 快速表征解析 [J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 14-21.
- [23] 霍金海,孙国东,魏文峰,等. UPLC-Q-TOF/MS 法分析牛黄清感胶囊成分 [J]. 中成药, 2018, 40(10): 2340-2348.
- [24] 王强,沈岚,房鑫,等. 大川芎方沿体外-血浆-脑脊液-脑组织的移行成分研究 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2364-2371.