

基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术研究清肺排毒汤化学成分及小鼠组织分布

刘伟¹, 葛广波², 王永丽³, 黄恺¹, 陈佳美¹, 王长虹^{3*}, 刘平^{1,2*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所 肝肾病证教育部重点实验室 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203

2. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203

3. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

摘要: 目的 旨在开展国家卫生健康委员会和国家中医药管理局推荐治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的协定通用处方清肺排毒汤的主要化学成分及小鼠组织分布研究,为其药效物质研究提供参考依据。方法 采用UHPLC-Q-Orbitrap HRMS对清肺排毒汤的主要化学成分进行分析,色谱分离采用Acquity UPLC[®] BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸水,梯度洗脱,体积流量0.3 mL/min。基于化合物的一级、二级质谱信息,结合对照品比对确认,实现复方主要化学成分的快速、精准识别。在此基础上,对小鼠ig清肺排毒汤后血及组织中的移行成分进行了鉴定,并建立了同步测定麻黄碱、伪麻黄碱、苦杏仁苷、野黑樱苷、甘草苷、金丝桃苷、橙皮苷、黄芩苷、次野鸢尾黄素的定量分析方法,对小鼠ig清肺排毒汤后上述9种入血成分的组织分布进行研究。结果 从清肺排毒汤中共鉴定出39种化学成分,ig给药后,在小鼠血清、心、肝、脾、肺、肾中分别鉴定出12、9、9、8、10、10种化学成分。发现9种化学成分可快速吸收并分布到多个组织,在0.5 h时血清及各组织中除黄芩苷之外的8种化学成分的含量均达到峰值,黄芩苷含量峰值出现在2 h或4 h。重点关注的肺组织中0.5 h时各成分的暴露量依次为麻黄碱(2 759.11±784.39) ng/g>野黑樱苷(1 819.7±427.28) ng/g>伪麻黄碱(880.60±287.97) ng/g>苦杏仁苷(304.43±234.70) ng/g>橙皮苷(78.33±38.38) ng/g>次野鸢尾黄素(8.62±4.66) ng/g>黄芩苷(8.53±1.91) ng/g>金丝桃苷(7.72±1.63) ng/g>甘草苷(7.68±5.19) ng/g; 2 h时成分含量为麻黄碱(776.61±148.40) ng/g>野黑樱苷(325.20±104.17) ng/g>伪麻黄碱(212.21±44.63) ng/g>黄芩苷(71.72±23.96) ng/g>苦杏仁苷(46.39±36.45) ng/g>橙皮苷(13.39±10.99) ng/g>金丝桃苷(3.11±0.75) ng/g>甘草苷(2.86±0.46) ng/g; 4 h时各成分质量分数为麻黄碱(327.61±212.59) ng/g>野黑樱苷(173.77±58.21) ng/g>伪麻黄碱(84.68±59.04) ng/g>黄芩苷(49.33±17.06) ng/g>苦杏仁苷(1.26±0.26) ng/g。结论 研究建立的UHPLC-Q-Orbitrap HRMS方法可实现清肺排毒汤中多种化学成分的快速、准确分析,并明确了ig给药后清肺排毒汤主要成分在小鼠的组织分布情况,为后续清肺排毒汤的药效物质基础研究及进一步的临床应用提供了药动学信息和指导。

关键词: UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; 清肺排毒汤; 组织分布; 麻黄碱; 野黑樱苷; 伪麻黄碱; 苦杏仁苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)08-2035-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.007

Chemical constituent and tissue distribution study of Qingfei Paidu Decoction in mice using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

LIU Wei¹, GE Guang-bo², WANG Yong-li³, HUANG Kai¹, CHEN Jia-mei¹, WANG Chang-hong³, LIU Ping^{1,2}

1. Institute of Liver Disease, Key Laboratory of Liver and Kidney Disease (Ministry of Education), Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shuguang Hospital Affiliated with Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2020YFC0845400); 国家重点研发计划资助项目(2017YFC1700200); 国家自然科学基金资助项目(81530101); 国家自然科学基金资助项目(81703681)

作者简介: 刘伟,男,副研究员,研究方向为中药复方药效物质基础及体内过程研究。Tel: (021)20256526 E-mail: lwzhayl@shutcm.edu.cn

***通信作者** 刘平,男,教授,研究方向为中医药防治慢性肝病的临床与基础研究。Tel: (021)20256526 E-mail: liuliver@vip.sina.com

王长虹,男,研究员,研究方向为中药新制剂与体内过程研究。Tel: (021)51322511 E-mail: wchcxm@163.com

Abstract: Objective Qingfei Paidu Decoction is recommended as therapies of corona virus disease 2019 (COVID-19) by National Health Commission of the People's Republic of China and National Administration of Traditional Chinese Medicine. The purpose of this study is to investigate the main chemical constituents in Qingfei Paidu Decoction and the tissues distribution of major absorbed ingredients in mice, as well as to provide some guidance for study of its pharmacodynamic substance. **Methods** In this study, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to analyze the main chemical constituents in Qingfei Paidu Decoction. An Acquity UPLC® BEH C₁₈ chromatographic column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used as solid phase, while the mobile phase was methanol and 0.1% formic acid water. The major constituents in this Chinese medicine compound were quickly and accurately identified, *via* comparison with the MS and MS/MS spectra of the standards. After then, the constituents absorbed into mice blood and tissues after oral administration of Qingfei Paidu Decoction were studied. Meanwhile, an LC-MS based analytical method was established for simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, amygdalin, prunasin, liquiritin, hyperoside, hesperidin, baicalin, and risflorelin in biological samples. The tissue distribution of the nine target constituents in mice after oral administration of Qingfei Paidu Decoction were then investigated. **Results** A total of 39 chemicals were identified from Qingfei Paidu Decoction. After oral administered Qingfei Paidu Decoction in mice, 12, 9, 9, 8, 10, and 10 constituents were identified in serum, heart, liver, spleen, lung, and kidney, respectively. It was also found that these nine constituents could be quickly absorbed into circulation system and then distributed to various tissues. Except baicalin, the exposure of other eight target constituents were peaked in serum and tissues at 0.5 h. The exposure of baicalin was peaked at 2 h or 4 h. At 0.5 h, the exposure of target components to lung tissue were ranked as follows: ephedrine ($2\,759.11 \pm 784.39$ ng/g) > prunasin ($1\,819.70 \pm 427.28$ ng/g) > pseudoephedrine (880.60 ± 287.97 ng/g) > amygdalin (304.43 ± 234.70 ng/g) > hesperidin (78.33 ± 38.38 ng/g) > risflorelin (8.62 ± 4.66 ng/g) > baicalin (8.53 ± 1.91 ng/g) > hyperoside (7.72 ± 1.63 ng/g) > liquiritin (7.68 ± 5.19 ng/g). At 2 h, ephedrine (776.61 ± 148.40 ng/g) > prunasin (325.20 ± 104.17 ng/g) > pseudoephedrine (212.21 ± 44.63 ng/g) > baicalin (71.72 ± 23.96 ng/g) > amygdalin (46.39 ± 36.45 ng/g) > hesperidin (13.39 ± 10.99 ng/g) > hyperoside (3.11 ± 0.75 ng/g) > liquiritin (2.86 ± 0.46 ng/g). At 4 h, ephedrine (327.61 ± 212.59 ng/g) > prunasin (173.77 ± 58.21 ng/g) > pseudoephedrine (84.68 ± 59.04 ng/g) > baicalin (49.33 ± 17.06 ng/g) > amygdalin (1.26 ± 0.26 ng/g). **Conclusion** A UHPLC-Q-Orbitrap HRMS based method has been established for rapid and accurate identification of the constituents in Qingfei Paidu Decoction, while tissue distribution of the major absorbed constituents were investigated in mice following oral administration of Qingfei Paidu Decoction. These findings provided key information and guidance for further studies on pharmacodynamic substances and clinical applications of Qingfei Paidu Decoction.

Key words: UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; Qingfei Paidu Decoction; tissue distribution; ephedrine; prunasin; pseudoephedrine; amygdalin

2019年12月,新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)在全球爆发,中国确诊病例已经超过8万^[1]。COVID-19具有潜伏期长、传染性强、各类人群普遍易感等特点,对人民健康、经济发展、社会和谐带来巨大的负面影响。然而至今仍无针对COVID-19的特效药物,既往经验表明中医药对病毒性感染性肺炎具有良好疗效,在国家卫健委不断更新发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》中,一直包含推荐中医药治疗COVID-19的方案,目前已经更新至第七版^[2]。疫情发生后,国家中医药管理局以临床“急用、实用、效用”为导向,紧急启动“防治新型冠状病毒感染的肺炎中医药有效方剂筛选研究”项目,在我国山西、河北、黑龙江、陕西四省试点开展“清肺排毒汤”治疗COVID-19临床疗效观察,截止2月5日4个试点运用清肺排毒汤救治确诊病例214例,3d为1个疗程,总有效率达90%以上,其中60%以上患者的症状和影

像学表现改善明显,30%患者的症状平稳且无加重^[3]。鉴于确切的临床疗效,2020年2月7日,国家中医药管理局发布关于《推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知》(国中医药办医政函〔2020〕22号)^[4]。

清肺排毒汤来源于中医经典方剂的组合,包括麻杏石甘汤、射干麻黄汤、小柴胡汤和五苓散,4方皆出自《伤寒杂病论》,性味平和。处方由麻黄、炙甘草、杏仁、生石膏等21味中药组成,所含化学成分复杂多样,开展相关化学成分、入血成分及组织分布研究,对于探索清肺排毒汤抗COVID-19的药效物质基础十分必要。超高效液相串联四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术是一种具有高灵敏度、高分辨率的分析技术,可用于复杂体系中化学成分快速识别与定量分析,目前广泛用于药物成分分析、代谢组学、蛋白质组学等研究领域^[5]。本研究采用UHPLC-Q-

Orbitrap HRMS 技术进行清肺排毒汤化学成分分析,并对小鼠 ig 清肺排毒汤后血清及组织分布进行研究,为阐释清肺排毒汤抗 COVID-19 药效活性成分与深入研究作用机制提供一定参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UHPLC-Q-Orbitrap 液质联用系统: Dionex Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司); Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),配有 H-ESI II 离子源和自动进样器; Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司); 5415R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); BT25S 十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); HGC-36A 干式热氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司); 高通量组织研磨仪(上海必横生物科技有限公司); JYH-A30A1 煎药壶(广东小熊电器股份有限公司, 500 W, 50 Hz)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈、甲酸为色谱级,购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;实验用水为超纯水,由 Milli-Q 超纯水处理系统制得;清肺排毒汤处方组成:麻黄(批号 191119-1)、桂枝(批号 190802-1)、款冬花(批号 191207-1)、猪苓(批号 191109-1)、细辛(批号 191220-1)、泽泻(批号 191031-1)、山药(批号 191023-1)购自上海万仕诚药业有限公司;姜半夏(批号 191009)、生石膏(批号 190801)、茯苓(批号 191218)、柴胡(批号 200103)、藿香(批号 190814)购自上海虹桥中药饮片有限公司;黄芩(批号 19112307)、紫菀(批号 1909247)、陈皮(批号 191119)购自上海养和堂中药饮片有限公司;白术(批号 190830)购自上海青浦中药饮片有限公司;炙甘草(批号 191213)、杏仁(批号 200108)、射干(批号 191022)、枳实(批号 200119)购自上海康桥中药饮片有限公司;新鲜生姜购于上海欧尚生活超市(金科路店),所有药材均由上海中医药大学中药研究所王长虹研究员鉴定符合《中国药典》2015 年版要求。其他试剂均为分析纯。

对照品盐酸麻黄碱(批号 17241-201809)、盐酸伪麻黄碱(批号 17137-201510)购于中国食品药品检定研究院;马兜铃酸 I(批号 PRF10022801)、甘草苷(批号 PRF10041741)、桂皮醛(批号

PRF9091141)、23-乙酰泽泻醇(批号 PRF20022223)、白术内酯 I(批号 PRF9062801)、茯苓酸(批号 PRF9090303)、琥珀酸(批号 PRF9120811)、6-姜辣素(批号 PRF9072503)、8-姜酚(批号 PRF9060643)、10-姜酚(批号 PRF10011141)、次野鸢尾黄素(批号 PRF9060422)、细辛脂素(批号 PRF10031121)、辛弗林(批号 PRF9110141)、白藜芦醇(批号 PRF8091921)、木犀草素(批号 PRF8072642)、柚皮苷(批号 PRF7101346)、绿原酸(批号 PRF7102045)、新绿原酸(批号 15012903)、隐绿原酸(批号 15020603)、莱菔素(批号 15081915)、异绿原酸 A(批号 15062009)、异绿原酸 B(批号 15062011)、异绿原酸 C(批号 15042210)均购于成都普瑞法科技开发有限公司;甘草酸(批号 150206)、咖啡酸(批号 190425)购于上海融禾医药科技发展有限公司;柴胡皂苷 A(批号 D0423AS)、黄芩苷(批号 D0321AS)、款冬酮(批号 S1130AS)、橙皮苷(批号 A1006AS)、没食子酸(批号 D0409AS)、苦杏仁苷(批号 M0905AS)、芦丁(批号 J0509AS)、槲皮素(批号 S0821AS)、山柰酚(批号 J1110AS)、金丝桃苷(批号 00807AS)、阿魏酸(批号 M1102AS)均购于大连美仑生物技术有限公司;野黑樱苷(批号 X06D9C77005)购于上海源叶生物科技有限公司;山药素 I(批号 JZ18030304)购于南京景竹生物科技有限公司;以上对照品经 HPLC 峰面积归一化法测定,质量分数均≥98%。

1.3 实验动物

健康 C57 小鼠 24 只,雌雄各半,体质量(23.0±3.0) g;由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2017-0011;饲养于上海南方模式生物科技股份有限公司,室内温度为 22~26 °C,相对湿度为 40%~70%,光照/黑暗时间各 12 h。

2 方法

2.1 清肺排毒汤供试品溶液和对照品溶液的制备

按清肺排毒汤处方:麻黄 9 g、炙甘草 6 g、杏仁 9 g、生石膏 30 g、桂枝 9 g、泽泻 9 g、猪苓 9 g、白术 9 g、茯苓 15 g、柴胡 16 g、黄芩 6 g、姜半夏 9 g、生姜 9 g、紫菀 9 g、款冬花 9 g、射干 9 g、细辛 6 g、山药 12 g、枳实 6 g、陈皮 6 g、藿香 9 g,称取各药材(共计 211 g)。将石膏加水 250 mL 先煎 30 min,其余各药材混合加 500 mL 水浸泡 30 min,待石膏煮好后,加入浸泡好的各药材,再加

250 mL 水, 煎煮 60 min, 纱布滤过药液, 药材再进行第 2 次煎煮, 加水 800 mL, 煎煮 45 min, 滤过, 合并 2 次的药液, 减压回收定容至 250 mL, 即得清肺排毒汤提取液。取上述提取溶液适量, 使用 20% 甲醇稀释获得按生药量计算为 50 mg/mL 的稀释溶液, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得清肺排毒汤供试品溶液。

精密称取各对照品约 1.0 mg, 加入甲醇配制成 1.0 mg/mL 的单一对照品储备液。从上述各单一对照品储备液中精密量取储备液适量, 加入 20% 甲醇水稀释, 配制质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的单一对照品溶液, 同时从上述各单一对照品储备液中精密量取储备液适量, 混合后加入 20% 甲醇水稀释, 配制得到质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品混合对照品溶液。

2.2 色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 Dionex Ultimate 3000 高压液相系统, Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水与甲醇, 梯度洗脱, 条件 1 (化学成分鉴定): 洗脱程序为 0~4 min, 4% 甲醇; 4~10 min, 4%~12% 甲醇; 10~30 min, 12%~70% 甲醇; 30~35 min, 70% 甲醇; 35~38 min, 70%~95% 甲醇; 38~42 min, 95% 甲醇; 42~45 min, 4% 甲醇。条件 2 (组织分布含量测定): 洗脱程序为 0~0.5 min, 4% 甲醇; 0.5~5.0 min, 4%~12% 甲醇; 5.0~11.0 min, 12%~95% 甲醇; 11.0~13.5 min, 95% 甲醇; 13.5~15.0 min, 4% 甲醇。体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL 。

2.2.2 质谱条件 使用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪作为分析检测的仪器; 离子源为电喷雾离子源 (H-ESI), 辅助气流量 13 arb, 辅助加热器温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 自动增益控制 (AGC) 1×10^6 , s-lens 射频水平 50; 正离子模式: 鞘气 (N_2) 流量 35 arb, 喷雾电压 3.5 kV; 负离子模式: 鞘气 (N_2) 流量 35 arb, 喷雾电压 2.5 kV。扫描方式采用正负离子 Full MS/dd-MS² 模式, 其中包括 1 次一级全扫描 (分辨率为 70 000 FWHM) 和 1 次数据依赖的二级扫描 (分辨率为 17 500 FWHM) 2 个事件, 正、负离子扫描范围均为 m/z 80~1 200, 碰撞能梯度为 20 V、50 V、100 V。

2.3 清肺排毒汤所含化合物分析

按照上述色谱、质谱条件进样后, 根据高分辨质谱提供的准分子离子和加荷离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量, 经 Xcalibur 3.0

软件拟合分子式。通过与对照品保留时间及高能碰撞下产生的碎片离子信息, 进一步对清肺排毒汤所含化学成分进行鉴定。

2.4 组织样品收集

给药前将小鼠禁食 12 h, 自由饮水。小鼠随机分为 4 组 (空白、0.5 h 组、2 h 组和 4 h 组, 每组 6 只), 空白组给予超纯水, 其他 3 组按照生药量 26 g/kg ig 给予清肺排毒汤提取液 (按 65 kg 成人等效剂量换算获得), 在给药后 0.5、2、4 h, 取血至未抗凝的 1.5 mL EP 管中, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 在 2 500 $\times g$ 下离心 15 min (4 $^{\circ}\text{C}$) 获得血清, 摘取心、肝、脾、肺、肾, 用 0.9% 生理盐水清洗表面残留血, 滤纸吸干, 置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

2.5 组织样品处理

准确称取各组织约 100 mg 至 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL 色谱甲醇, 使用全自动组织匀浆机 (65 Hz) 匀浆 2 min, 2 500 $\times g$ 离心 15 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清液 800 μL 至 1.5 mL EP 管中, 温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流吹干, 加 80 μL 20% 甲醇水溶液复溶, 9 000 $\times g$ 离心 15 min, 取上清液进样。血清样品取 100 μL , 加入 500 μL 甲醇沉淀蛋白, 2 500 $\times g$ 离心 15 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清液 420 μL 至 1.5 mL EP 管, 温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流吹干, 加 70 μL 20% 甲醇水溶液复溶, 9 000 $\times g$ 离心 15 min, 取上清液进样分析。

3 结果

3.1 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的清肺排毒汤化学成分鉴定

基于以上优化后的色谱、质谱分析条件, 对清肺排毒汤进行分析。在正、负离子同时扫描模式下从清肺排毒汤中共鉴定出 39 个化合物, 均经对照品比对确证, 提取液和混合对照品溶液总离子流图 (TIC) 见图 1、2, 成分鉴定结果见表 1。

3.2 小鼠血清及各组织转移化学成分鉴定

基于“3.1”项下的鉴定结果, 将提取物中鉴定的化学成分在给药组与空白组中进行比较提取分析, 结合保留时间及碎片离子信息, 发现小鼠 ig 清肺排毒汤后, 血清中检测到麻黄碱、伪麻黄碱、苦杏仁苷、野黑樱苷、甘草苷、异绿原酸 A、金丝桃苷、橙皮苷、黄芩苷、次野鸢尾黄素、甘草酸、23-乙酰泽泻醇共 12 种化学成分。心、肝、脾、肺、肾中分别检测到 9、9、8、10、10 种化学成分, 见表 1。

3.3 组织分布含量测定方法学验证

对“2.2”项下条件 2 的方法学进行验证, 结果

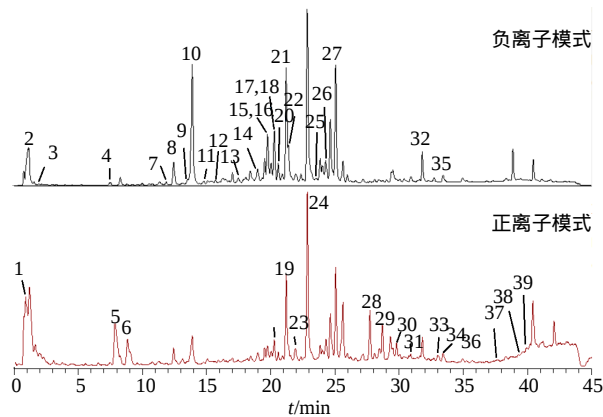


图 1 清肺排毒汤提取液总离子流图

Fig. 1 TICs of extract of Qingfei Paidu Decoction

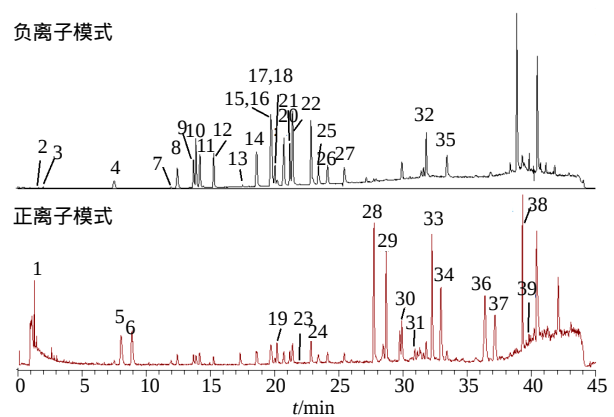


图 2 混合对照品溶液总离子流图

Fig. 2 TICs of mixed reference substances solution

表 1 清肺排毒汤化学成分的鉴定

Table 1 Ingredient identification of Qingfei Paidu Decoction

编号	化合物	分子式	模式	m/z		t _R /min	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子	归属	分布					
				理论值	实测值					血	心	肝	脾	肺	肾
1	辛弗林	C ₉ H ₁₃ NO ₂	P	168.101 91	168.101 94	1.20	0.207	168.10 [M+H] ⁺ , 150.09 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 135.07 [M+H - H ₂ O - CH ₃] ⁺ , 119.05 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N] ⁺ , 91.05 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N - CO] ⁺	枳实	-	-	-	-	-	-
2	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	N	117.018 24	117.017 78	1.78	-3.890	117.02 [M - H] ⁻ , 99.01 [M - H - H ₂ O] ⁻ , 73.03 [M - H - CO ₂] ⁻	姜半夏	-	-	-	-	-	-
3	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	N	169.013 15	169.012 99	2.16	-0.945	169.01 [M - H] ⁻ , 125.02 [M - H - CO ₂] ⁻ , 97.03 [M - H - CO ₂ - CO] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
4	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	N	353.086 71	353.087 59	7.51	2.497	353.09 [M - H] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 135.04 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅ - CO ₂] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
5	麻黄碱	C ₁₀ H ₁₅ NO	P	166.122 64	166.122 62	8.05	-0.124	166.12 [M+H] ⁺ , 148.11 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 133.09 [M+H - H ₂ O - CH ₃] ⁺ , 117.07 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N] ⁺ , 91.05 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N - C ₂ H ₂] ⁺	麻黄	+	+	+	+	+	+
6	伪麻黄碱	C ₁₀ H ₁₅ NO	P	166.122 64	166.122 68	8.91	0.237	166.12 [M+H] ⁺ , 148.11 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 133.09 [M+H - H ₂ O - CH ₃] ⁺ , 117.07 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N] ⁺ , 91.05 [M+H - H ₂ O - CH ₃ N - C ₂ H ₂] ⁺	麻黄	+	+	+	+	+	+
7	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	N	179.033 89	179.033 81	12.34	-0.420	179.03 [M - H] ⁻ , 135.04 [M - H - CO ₂] ⁻ , 117.03 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ , 107.05 [M - H - CO ₂ - CO] ⁻ , 89.04 [M - H - CO ₂ - CO - H ₂ O] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
8	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	N	353.086 71	353.087 43	12.77	2.043	353.09 [M - H] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 135.04 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅ - CO ₂] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
9	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	N	353.086 71	353.087 62	13.94	2.581	353.09 [M - H] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 135.04 [M - H - C ₇ H ₁₀ O ₅ - CO ₂] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
10	苦杏仁苷	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	N (II)	502.155 52	502.156 31	14.11	1.581	502.16 [M+HCOOH - H] ⁺ , 323.10 [M+HCOOH - H - C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁺ , 263.08 [M+HCOOH - H - C ₆ H ₁₁ O ₆ - C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ , 221.07 [M+HCOOH - H - C ₆ H ₁₁ O ₆ - C ₇ H ₄ N] ⁺ , 179.06 [M - H - C ₁₅ H ₁₈ O ₇] ⁻ , 161.04 [M - H - C ₁₅ H ₁₈ O ₇ - H ₂ O] ⁻ , 119.03 [M - H - C ₁₅ H ₁₈ O ₇ - H ₂ O - C ₂ H ₂ O] ⁻ , 101.02 [M - H - C ₁₅ H ₁₈ O ₇ - H ₂ O - C ₂ H ₂ O - H ₂ O] ⁻	杏仁	+	+	+	+	+	+
11	野黑樱苷	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	N (II)	340.102 69	340.103 58	14.42	2.608	340.10 [M+HCOOH - H] ⁺ , 161.04 [M - H - C ₉ H ₉ O ₃] ⁻ , 101.02 [M - H - C ₉ H ₉ O ₃ - C ₂ H ₄ O ₂] ⁻ , 89.02 [M - H - C ₉ H ₉ O ₃ - C ₃ H ₄ O ₂] ⁻ , 71.01 [M - H - C ₉ H ₉ O ₃ - C ₃ H ₄ O ₂ - H ₂ O] ⁻	杏仁	+	+	+	+	+	+
12	莱菔素	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	N	515.118 40	515.119 14	15.46	1.432	515.12 [M - H] ⁻ , 353.09 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - M. H.] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₉ H ₇ O ₄ - C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₇ H ₁₃ O ₅] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
13	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	N	193.049 54	193.049 59	17.56	0.284	193.05 [M - H] ⁻ , 178.03 [M - H - CH ₃] ⁻ , 149.06 [M - H - CO ₂] ⁻ , 134.04 [M - H - CO ₂ - CH ₃] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
14	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	N	417.118 00	417.118 77	18.76	1.825	417.12 [M - H] ⁻ , 255.07 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 153.02 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₆ H ₆] ⁻ , 135.01 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₆ H ₆ - H ₂ O] ⁻	甘草	+	+	+	+	+	+

续表 1

编号	化合物	分子式	模式	m/z		t _R /min	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子	归属	分布					
				理论值	实测值					血	心	肝	脾	肺	肾
15	异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	N	515.118 40	515.118 84	19.89	0.849	515.12 [M - H] ⁻ , 353.09 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₉ H ₇ O ₄ - C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₇ H ₁₃ O ₅] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
16	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	N	515.118 40	515.118 90	19.95	0.966	515.12 [M - H] ⁻ , 353.09 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₉ H ₇ O ₄ - C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₇ H ₁₃ O ₅] ⁻	M. H.	+	-	-	-	+	+
17	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	N	463.087 10	463.087 95	20.19	1.830	463.09 [M - H] ⁻ , 301.03 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 271.02 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅ - CH ₂ O] ⁻ , 243.03 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅ - CH ₂ O - CO] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₆ H ₁₀ O ₅ - CH ₂ O - C ₇ H ₄ O ₂] ⁻	M. H.	+	+	+	-	+	+
18	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	N	609.145 01	609.146 00	20.21	1.623	609.15 [M - H] ⁻ , 300.03 [M - H - C ₆ H ₁₁ O ₄ - C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 271.02 [M - H - C ₆ H ₁₁ O ₄ - C ₆ H ₁₀ O ₅ - CHO] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₆ H ₁₁ O ₄ - C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₈ H ₅ O ₃] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
19	白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	P	229.085 92	229.085 92	20.41	-0.003	229.09 [M+H] ⁺ , 211.08 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 193.06 [M+H - H ₂ O - H ₂ O] ⁺ , 183.08 [M+H - H ₂ O - CO] ⁺ , 165.07 [M+H - H ₂ O - H ₂ O - CO] ⁺ , 135.04 [M+H - C ₆ H ₆ O] ⁺ , 119.05 [M+H - C ₆ H ₆ O - O] ⁺ , 107.05 [M+H - C ₇ H ₆ O ₂] ⁺ , 91.05 [M+H - C ₇ H ₆ O ₂ - O] ⁺	M. H.	-	-	-	-	-	-
20	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	N	579.170 83	579.171 51	20.44	1.171	579.17 [M - H] ⁻ , 459.12 [M - H - C ₆ H ₆ O] ⁻ , 271.06 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉] ⁻ , 193.01 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉ - C ₆ H ₆] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉ - C ₆ H ₆ O] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
21	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	N	609.181 40	609.181 82	21.35	0.695	609.18 [M - H] ⁻ , 301.07 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉] ⁻ , 286.05 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉ - CH ₃] ⁻ , 257.08 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉ - CO ₂] ⁻ , 242.06 [M - H - C ₁₂ H ₂₀ O ₉ - CH ₃ - CO ₂] ⁻	陈皮	+	+	+	+	+	+
22	异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	N	515.118 40	515.118 77	21.53	0.713	515.12 [M - H] ⁻ , 353.09 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 191.06 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ , 179.03 [M - H - C ₉ H ₇ O ₄ - C ₉ H ₇ O ₄] ⁻ , 161.02 [M - H - C ₉ H ₆ O ₃ - C ₇ H ₁₃ O ₅] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
23	桂皮醛	C ₉ H ₈ O	P	133.064 79	133.064 87	21.90	0.590	133.06 [M+H] ⁺ , 115.05 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 105.07 [M+H - CO] ⁺ , 86.10 [M+H - H ₂ O - C ₂ H ₅] ⁺	桂枝	-	-	-	-	-	-
24	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	P	447.092 19	447.091 83	23.02	-0.800	271.06 [M+H - C ₆ H ₆ O ₆] ⁺ , 243.06 [M+H - C ₆ H ₆ O ₆ - CO] ⁺ , 225.05 [M+H - C ₆ H ₆ O ₆ - CO - H ₂ O] ⁺ , 153.01 [M+H - C ₆ H ₆ O ₆ - C ₆ H ₆ O] ⁺ , 119.05 [M+H - C ₆ H ₆ O ₆ - C ₇ H ₄ O ₄] ⁺	黄芩	+	+	+	+	+	+
25	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	N	301.034 28	301.035 10	23.60	2.727	301.04 [M - H] ⁻ , 179.00 [M - H - C ₇ H ₆ O ₂] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₈ H ₆ O ₃] ⁻ , 121.03 [M - H - C ₈ H ₄ O ₅] ⁻ , 107.01 [M - H - C ₈ H ₆ O ₃ - CO ₂] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
26	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	N	285.039 36	285.040 28	24.34	3.212	285.04 [M - H] ⁻ , 241.05 [M - H - CO ₂] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₈ H ₆ O ₂] ⁻ , 133.03 [M - H - C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 107.01 [M - H - C ₈ H ₆ O ₂ - CO ₂] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
27	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	N	285.039 36	285.040 22	25.23	3.001	285.04 [M - H] ⁻ , 151.00 [M - H - C ₈ H ₆ O ₂] ⁻ , 133.03 [M - H - C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 107.01 [M - H - C ₈ H ₆ O ₂ - CO ₂] ⁻ , 93.03 [M - H - C ₉ H ₄ O ₅] ⁻	M. H.	-	-	-	-	-	-
28	次野鸢尾 黄素	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	P	387.107 44	387.107 12	27.92	-0.837	387.10 [M+H] ⁺ , 372.08 [M+H - CH ₃] ⁺ , 357.06 [M+H - CH ₃ - CH ₃] ⁺ , 341.07 [M+H - CH ₃ - CH ₃ O] ⁺ , 326.08 [M+H - CH ₃ - CH ₂ O ₂] ⁺	射干	+	+	+	+	+	+
29	6-姜辣素	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	P (II)	317.172 33	317.172 06	28.86	-0.853	317.17 [M+Na] ⁺ , 217.08 [M+Na - C ₆ H ₁₂ O] ⁺	生姜	-	-	-	-	-	-
30	山药素 I	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	P	285.112 14	285.112 12	29.92	-0.054	285.11 [M+H] ⁺ , 270.09 [M+H - CH ₃] ⁺ , 254.09 [M+H - CH ₃ O] ⁺ , 253.09 [M+H - CH ₃ - OH] ⁺ , 225.09 [M+H - CH ₃ O - CHO] ⁺	山药	-	-	-	-	-	-
31	细辛脂素	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	P (II)	377.099 56	377.099 37	31.12	-0.502	377.10 [M+Na] ⁺ , 337.11 [M+H - H ₂ O] ⁺ , 319.10 [M+H - H ₂ O - H ₂ O] ⁺ , 289.09 [M+H - H ₂ O - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺ , 261.09 [M+H - CH ₃ O ₂ - CH ₃ O ₂] ⁺ , 215.07 [M+H - C ₇ H ₆ O ₂ - H ₂ O] ⁺	细辛	-	-	-	-	-	-
32	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	N	821.395 41	821.396 42	31.95	1.227	821.40 [M - H] ⁻ , 803.38 [M - H - H ₂ O] ⁻ , 759.40 [M - H - H ₂ O - CO ₂] ⁻ , 645.37 [M - H - C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 469.33 [M - H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 351.06 [M - H - C ₃₀ H ₄₆ O ₄] ⁻ , 193.03 [M - H - C ₃₀ H ₄₆ O ₄ - C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ , 175.02 [M - H - C ₃₀ H ₄₆ O ₄ - C ₆ H ₈ O ₆] ⁻	甘草	+	-	-	-	-	-

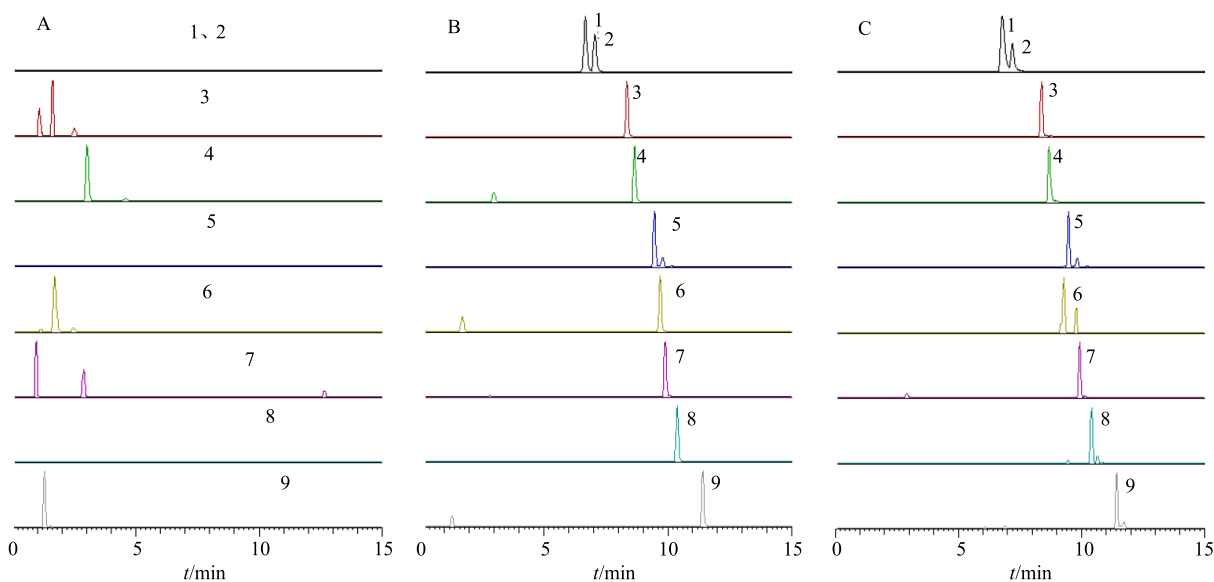
续表 1

编号	化合物	分子式	模式	m/z		t _R /min	误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子	归属	分布					
				理论值	实测值					血	心	肝	脾	肺	肾
33	8-姜酚	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	P (II)	345.203 63	345.203 43	32.41	-0.581	345.20 [M+Na] ⁺ , 217.08 [M+Na-C ₈ H ₁₆ O] ⁺	生姜	-	-	-	-	-	-
34	白术内酯 I	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	P	231.137 96	231.137 94	33.16	-0.071	231.14 [M+H] ⁺ , 213.13 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 203.11 [M+H-C ₂ H ₄] ⁺ , 185.13 [M+H-CH ₂ O] ⁺ , 157.10 [M+H-CH ₂ O ₂ -C ₂ H ₄] ⁺ , 143.09 [M+H-CH ₂ O ₂ -C ₂ H ₄ -CH ₂] ⁺	白术	-	-	-	-	-	-
35	柴胡皂苷 A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	N (II)	825.463 10	825.464 36	33.63	1.529	825.46 [M+HCOOH-H] ⁻ , 779.46 [M-H] ⁻ , 617.41 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 417.36 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻	柴胡	-	-	-	-	-	-
36	款冬酮	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	P (II)	413.229 85	413.229 68	36.73	-0.400	413.23 [M+Na] ⁺ , 371.22 [M+Na-C ₂ H ₂ O] ⁺ , 353.21 [M+Na-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ , 299.16 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₂] ⁺ , 239.14 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₂ -C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	款冬花	-	-	-	-	-	-
37	10-姜酚	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	P (II)	373.234 93	373.234 83	37.48	-0.270	373.23 [M+Na] ⁺ , 217.08 [M+Na-C ₁₀ H ₂₀ O] ⁺	生姜	-	-	-	-	-	-
38	23-乙酰泽泻醇 B	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	P (II)	537.355 05	537.354 92	39.37	-0.234	537.35 [M+Na] ⁺ , 477.33 [M+Na-CH ₃ COOH] ⁺	泽泻	+	-	-	-	-	-
39	茯苓酸	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	P	529.388 75	529.388 55	39.89	-0.380	493.36 [M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 451.36 [M+H-CH ₃ COOH-H ₂ O] ⁺ , 433.35 [M+H-CH ₃ COOH-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 355.26 [M+H-CH ₃ COOH-H ₂ O-C ₇ H ₁₂] ⁺ , 295.24 [M+H-CH ₃ COOH-H ₂ O-C ₇ H ₁₂ -C ₂ H ₄ O ₂] ⁺	茯苓	-	-	-	-	-	-

N-负离子模式 [M-H]⁻; N (II)-负离子模式 [M+HCOOH-H]⁻; P-正离子模式 [M+H]⁺; P (II)-正离子模式 [M+Na]⁺; “+”-检测到该化学成分; “-”-未检测到该化学成分; M. H. 表示多种药材

N-negative mode [M-H]⁻; N (II)-negative mode [M+HCOOH-H]⁻; P-positive mode [M+H]⁺; P (II)-positive mode [M+Na]⁺; “+”-the chemical component is detected, “-”-the chemical component is not detected; M. H. means multiple herbs

表明,以肝组织为例,典型色谱图结果见图 3,组织中所含内源性物质不干扰被测物的测定(空白肝组织在黄芩苷测定通道 9.40 min 有 1 个干扰峰,但不影响 10.40 min 黄芩苷的测定),被测物峰形良好,提示方法的专属性良好;9 种目标成分在相应线性范围内线性关系良好,相关系数(*r*)均大于 0.99,



A-空白肝组织样品 B-空白肝组织加标 C-0.5 h 肝组织样品 1-麻黄碱 2-伪麻黄碱 3-苦杏仁苷 4-野黑樱苷 5-甘草苷 6-金丝桃苷 7-橙皮苷 8-黄芩苷 9-次野鸢尾黄素

A-blank liver sample B-blank liver plus mixed references solution C-liver sample under 0.5 h 1-ephedrine 2-pseudoephedrine 3-amygdalin 4-prunasin 5-liquiritin 6-hyperoside 7-hesperidin 8-baicalin 9-risfloreitin

图 3 典型 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 图
Fig. 3 Typical UHPLC-Q-Orbitrap HRMS chromatograms

各成分麻黄碱、伪麻黄碱、苦杏仁苷、野黑樱苷、甘草苷、金丝桃苷、橙皮苷、黄芩苷和次野鸢尾黄素的定量下限分别为 3.28、3.28、3.28、3.28、3.28、3.28、3.28、3.28 和 3.28 ng/mL，检出下限分别为 0.52、0.52、1.31、1.31、1.31、1.31、1.31、1.31 和 0.52 ng/mL。各成分的日内和日间精密度 RSD 均小于 15%，准确度范围为 90%~110%，提示该方法准确度、精密度良好。肝组织中提取回收率良好，不存在明显的基质效应，符合生物样品分析的要求。肝组织样品在自动进样器（10℃）中放置 24 h 和冰箱中反复冻融 3 次后，样品中 9 个成分的峰面积偏差均在 15% 以内，表明待测成分在肝组织中的稳定性良好。

3.4 不同时间点小鼠血清及各组织分布结果

按照“2.5”项下处理各组织样品，照“2.2”项下分析条件 2 进行测定并计算给药后大鼠血清、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏中 9 种成分的浓度，除血清以每毫升含有待测成分的量（ng）表示，其他组织以每克含有待测成分的量（ng）表示。此外，照“2.2”项下分析条件 2 测得给予小鼠 ig 的清肺排毒汤提取液中麻黄碱、伪麻黄碱、苦杏仁苷、野

黑樱苷、甘草苷、金丝桃苷、橙皮苷、黄芩苷、次野鸢尾黄素的质量浓度分别为 131.310、37.770、57.750、0.006、19.630、7.030、40.450、180.040 和 26.530 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4.1 清肺排毒汤中麻黄碱和伪麻黄碱的组织分布 清肺排毒汤中麻黄碱和伪麻黄碱的组织分布结果见图 4。麻黄碱和伪麻黄碱不同时间下在心、肝、脾、肺、肾中均有分布，且相对含量均高于血清，其中在肝、脾、肺、肾中分布较多。不同组织中麻黄碱和伪麻黄碱的量（ng/g）在 0.5 h 时均为肝>肾>肺>脾>心>血清；在 2 h 时麻黄碱的量为肝>脾>肾>肺>心>血清，伪麻黄碱的量为肝>肾>脾>肺>心>血清；在 4 h 时麻黄碱的量为肝>肾>脾>肺>心>血清，伪麻黄碱的量为肝>肾>脾>肺>心>血清。

3.4.2 清肺排毒汤中苦杏仁苷和野黑樱苷的组织分布 清肺排毒汤中苦杏仁苷和野黑樱苷的组织分布结果见图 5。苦杏仁苷和野黑樱苷不同时间下在心、肝、脾、肺、肾中均有不同程度分布，其中肺和肾分布较多。在 0.5 h 时苦杏仁苷的量为肺>肾>脾>肝>血清>心，野黑樱苷的量为肾>血清>肺>

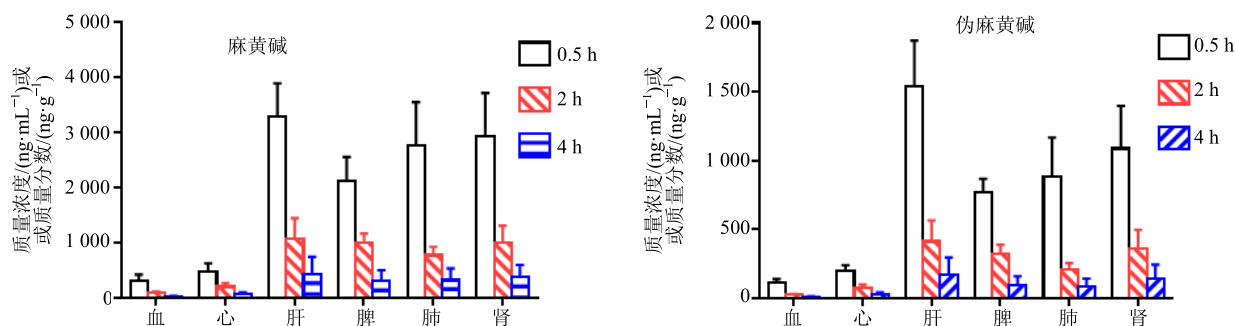


图 4 不同时间麻黄碱和伪麻黄碱在各组织中的分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Distribution of ephedrine and pseudoephedrine in different tissues under different time ($\bar{x} \pm s, n=6$)

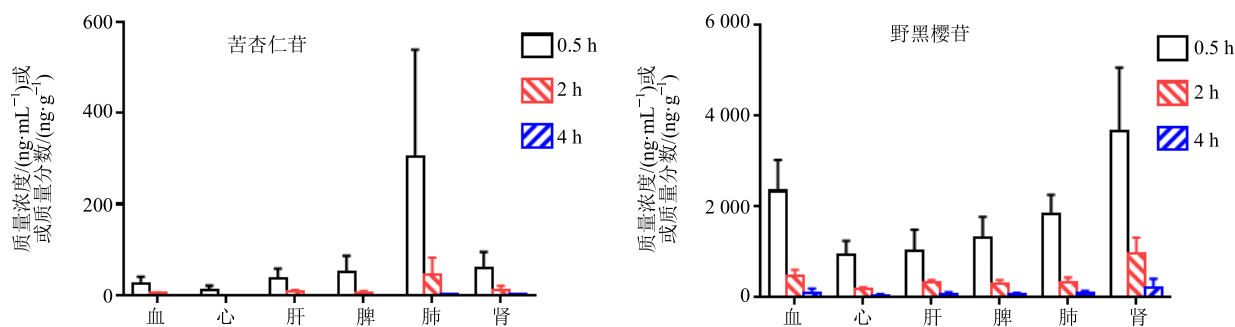


图 5 不同时间苦杏仁苷和野黑樱苷在各组织中的分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Distribution of amygdalin and prunasin in different tissues under different time ($\bar{x} \pm s, n=6$)

脾>肝>心;在 2 h 时苦杏仁苷的含量为肺>肾>肝>血清>脾,野黑樱苷的量为肾>血清>肺>肝>脾>心;在 4 h 时苦杏仁苷的量为肺>肾>脾>肝>血清>心,野黑樱苷的量为肾>血清>肺>脾>肝>心。

3.4.3 清肺排毒汤中甘草苷和金丝桃苷的组织分布 清肺排毒汤中甘草苷和金丝桃苷的组织分布结果见图 6。甘草苷和金丝桃苷不同时间点在心、肝、脾、

肺、肾中均有不同程度分布,其中甘草苷在肝和肺的分布较多,金丝桃苷在肾和肺的分布较多。在 0.5 h 时甘草苷的量为肝>肺>肾>脾>血清>心,金丝桃苷的量为血清>肾>肺>肝>心;在 2 h 时甘草苷的量为肝>肾>肺>心>血清,金丝桃苷的量为血清>肾>肺>心;在 4 h 时仅在肝和肾中的检测到甘草苷,仅在肾和血清中检测到金丝桃苷。

3.4.4 清肺排毒汤中橙皮苷和黄芩苷的组织分布

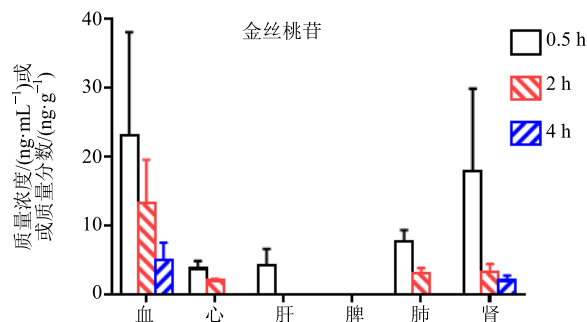
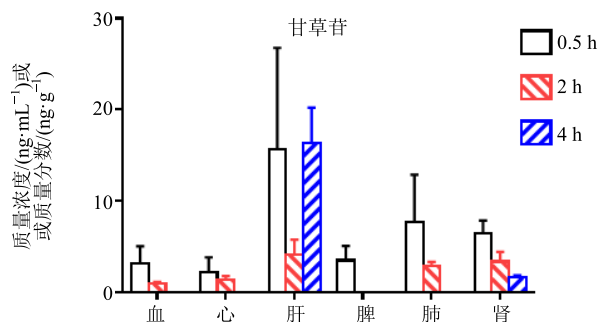


图 6 不同时间甘草苷和金丝桃苷在各组织中的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Distribution of liquiritin and hyperoside in different tissues under different time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

清肺排毒汤中橙皮苷和黄芩苷的组织分布结果见图 7。橙皮苷和黄芩苷不同时间下在心、肝、脾、肺、肾中均有不同程度分布,其中橙皮苷在肺和脾的分布较多,黄芩苷在肾、肝和肺的分布较多。在 0.5 h 时橙皮苷的量为肺>脾>肝>血清>肾>心,黄芩苷的量为肝>肾>脾>肺>心;在 2 h 时橙皮苷的量为肺>肝>血清>心>肾,黄芩苷的量为肾>肝>肺>心>血清>脾;在 4 h 时橙皮苷的量低于定量下限,黄芩苷的量为肾>肝>肺>血清>心>脾。

3.4.5 清肺排毒汤中次野鸢尾黄素的组织分布 清肺排毒汤中次野鸢尾黄素的组织分布结果见图 8 所示:次野鸢尾黄素 0.5 h 时在心、肝、脾、肺、肾中均有不同程度的分布,其中在肝中分布较多。在 0.5

h 时次野鸢尾黄素的量为肝>肺>血清>脾>肾>心;在 2 h 和 4 h 时仅能检测到肝脏中的含量。

4 讨论

COVID-19 属于中医学“疫病”范畴,中医在防治疫病方面积累了丰富的诊疗经验,结合试点地区临床实践发现的确切疗效,国家卫生健康委员会和国家中医药管理局推荐在中西医结合救治 COVID-19 中使用清肺排毒汤。清肺排毒汤由麻杏石甘汤、小柴胡汤、五苓散、射干麻黄汤 4 个经方演化而来,组方中有宣肺、清热、健脾和胃的药味,处方涵盖面广,考虑到了寒、热、燥及胃肠问题^[6]。何清湖等^[7]认为 COVID-19 病因是感受疫戾之气,病机特点是“湿、热、毒、瘀”,病位在肺。毒邪入

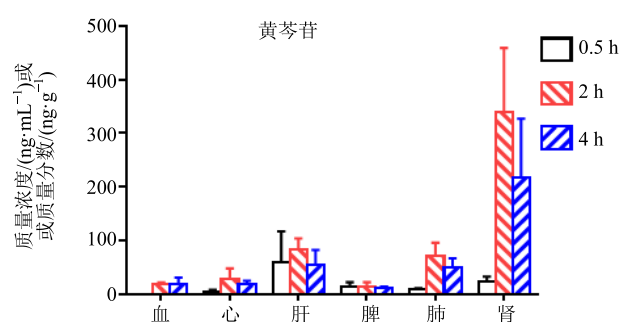
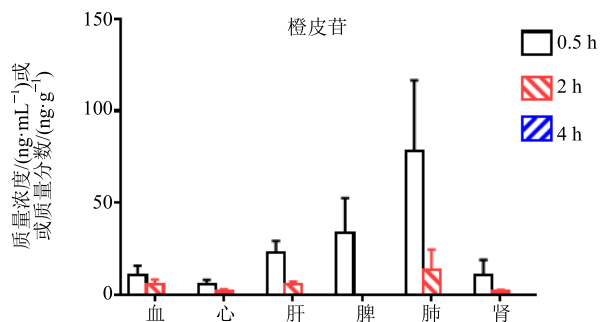


图 7 不同时间橙皮苷和黄芩苷在各组织中的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Distribution of hesperidin and baicalin in different tissues under different time ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

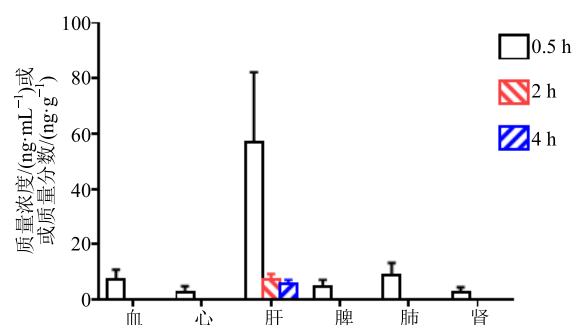


图 8 不同时间次野鸢尾黄素在各组织中的分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Distribution of risflorentin in different tissues under different time ($\bar{x} \pm s, n=6$)

里化热，壅遏于肺，肺失宣降而致发热、咳嗽，故君以麻杏石甘汤。麻黄辛温，开宣肺气以平喘，开腠解表以散邪；石膏辛甘大寒，清泄肺热以生津，辛散解肌以透邪。同时，湿邪入里，加之肺失宣降，津液不布，水湿内盛，以致出现脘痞、纳差、呕恶、便溏等胃肠道症状及常见舌苔厚腻。寒湿之邪，郁而化热入里，邪热充斥内外而发热，故臣以五苓散利水渗湿，温阳化气，小柴胡汤和解清热。此外，寒湿入肺，痰饮郁结，而气逆喘咳，佐以射干麻黄汤下气平喘。

现代中医药研究认为中药复方具有多成分、多靶点、多环节等作用特点，对机体通常发挥全方位、整体的调控作用。近期国内多个课题组基于清肺排毒汤组方中单味药已报道的化学成分，采用网络药理学方法研究探索清肺排毒汤治疗 COVID-19 潜在活性成分、潜在靶标及关联性^[8-10]，提高了对清肺排毒汤治疗 COVID-19 作用机制等方面的认识。本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术直接精确鉴定了清肺排毒汤中 39 种化学成分，小鼠 ig 清肺排毒汤后，在血清、心、肝、脾、肺、肾中分别鉴定出 12、9、9、8、10、10 种化学成分。入血成分包括麻黄中的麻黄碱和伪麻黄碱，桃仁中苦杏仁苷和野黑樱苷，炙甘草中的甘草苷和甘草酸，陈皮中的橙皮苷，黄芩中的黄芩苷，射干中的次野鸢尾黄素，泽泻中的 23-乙酰泽泻醇，以及多种药材共有的异绿原酸 A 和金丝桃苷。其中，麻黄碱、伪麻黄碱、苦杏仁苷、野黑樱苷、甘草苷、橙皮苷、黄芩苷、金丝桃苷、次野鸢尾黄素在各组织中广泛分布。现代药理学研究发现这些化学成分具有广泛的药理活性，如麻黄碱、伪麻黄碱和苦杏仁苷具有显著的止咳平喘^[11]、抗炎^[12-13]和免疫调节作用^[14-15]，是许多呼吸系统疾病治疗药物的主要组成成分；Zhang

等^[16]研究发现苦杏仁苷能够通过抑制肿瘤坏死因子- κ B (NF- κ B) 和 NLR 家族蛋白 3 (NLRP3) 信号通路对脂多糖 (LPS) 诱导的急性肺损伤发挥保护作用；黄芩中的黄芩苷具有抗病毒、抗炎、抗氧化、免疫调节等药理活性^[17]，研究还报道其能够显著抑制 H1N1 病毒活性^[18]，并在近期 COVID-19 病毒活性成分虚拟筛选中发现橙皮苷和黄芩苷等具有潜在的抑制作用^[19]；甘草中甘草苷和甘草酸等成分具有广泛的抗炎^[20]、抗损伤作用^[21]，相关药物制剂天晴甘美和甘草酸二铵等是目前临床常用的抗炎保肝药物。这提示清肺排毒汤发挥治疗 COVID-19 的作用与这些成分有着密切的联系，有待后续开展相关研究加以阐明。此外，近期部分学者对清肺排毒汤中使用细辛 6 g 提出质疑，多篇文章也就此进行了探讨^[22-23]，本研究中检测到细辛指标性成分细辛脂素，但使用马兜铃酸 I 的对照品进行比对分析，未在本研究制备的清肺排毒汤中检测到马兜铃酸 I (低于马兜铃酸 I 的检出限，提示提取液中其质量分数 < 10.38 ng/mL)，远低于药典要求细辛中马兜铃酸 I 质量分数不得高于 0.001% (换算成到本实验中制备的清肺排毒汤提取液为不得高于 240 ng/mL)^[24]。

综上所述，本研究完成了清肺排毒汤中 39 种化学成分的快速准确鉴定，并考察了其中 9 种主要入血成分的组织分布情况，为探索清肺排毒汤治疗 COVID-19 药效物质基础及进一步的临床应用提供了药动学关键信息和指导。清肺排毒汤组方药物种类较多，所包含化学成分复杂多样，本研究为保证成分准确性，所有成分均通过对照品比对确认，必然存在一定数量未鉴定的化学成分或液质联用法难以鉴定的化学成分，因此后续仍需要开展更为全面的化学成分表征及体内代谢过程和药效学研究，以期最终阐明清肺排毒汤治疗 COVID-19 的药效物质基础，为该方的临床科学合理应用及相关的研发提供科学依据。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会. 截至 3 月 6 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况 [EB/OL]. [2020-03-07]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202003/4cda391851a544279cb36f334944ca6e.shtml>
- [2] 国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）的通知 [EB/OL]. [2020-03-04]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>

- [3] 国家中医药管理局. 中医药有效方剂筛选研究取得阶段性进展 [EB/OL]. [2020-02-06]. <http://bgs.satcm.gov.cn/gongzuodongtai/2020-02-06/12866.html>.
- [4] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于推荐在中西医结合救治新型冠状病毒感染的肺炎中使用“清肺排毒汤”的通知 [EB/OL]. [2020-02-07]. https://mp.weixin.qq.com/s/_PceHDFnRf8_T5g0JnPF6A.
- [5] 刘丽伟, 周霖, 李卓伦, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的参松养心胶囊化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5930-5940.
- [6] 路志正, 路喜善. “清肺排毒汤”彰显中医药抗疫疗效与自信 [J/OL]. 中医杂志, [2020-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200302.0930.002.html>.
- [7] 何清湖, 刘应科, 孙相如, 等. 中医药向新型冠状病毒肺炎亮剑——国家中医药管理局发布“清肺排毒汤”的意义与作用 [J/OL]. 中医杂志, [2020-02-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200224.1038.008.html>.
- [8] 吴昊, 王佳琪, 杨雨薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制 [J/OL]. 药学学报, [2020-03-01]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2020-0136>.
- [9] 赵静, 田赛赛, 杨健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J/OL]. 中草药, [2020-03-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20200216.2044.002.html>.
- [10] 许冬玉, 许玉龙, 王至婉, 等. 基于网络药理学研究清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J/OL]. 中药药理与临床, [2020-03-07]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyy1.20200305.001>.
- [11] Miyagoshi M, Amagaya S, Ogihara Y. Antitussive effects of *L*-ephedrine, amygdalin, and makyokansekito (Chinese traditional medicine) using a cough model induced by sulfur dioxide gas in mice [J]. *Planta Med*, 1986, 52(4): 275-278.
- [12] Wu Z, Kong X, Zhang T, *et al*. Pseudoephedrine/ephedrine shows potent anti-inflammatory activity against TNF- α -mediated acute liver failure induced by lipopolysaccharide/d-galactosamine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724: 112-121.
- [13] Paoletti I, Gregorio V, Baroni A, *et al*. Amygdalin analogues inhibit IFN- γ signalling and reduce the inflammatory response in human epidermal keratinocytes [J]. *Inflammation*, 2013, 36(6): 1316-1326.
- [14] Fiebich B L, Collado J A, Stratz C, *et al*. Pseudoephedrine inhibits T-cell activation by targeting NF- κ B, NFAT and AP-1 signaling pathways [J]. *Immunopharm Immunot*, 2011, 34(1): 98-106.
- [15] Deng J G, Li C Y, Wang H L, *et al*. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(3): 523-529.
- [16] Zhang A, Pan W, Lv J, *et al*. Protective effect of amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF- κ B and NLRP3 signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 745-751.
- [17] 龙宇. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [18] Kant N M, Agrawal A S, Sudeshna B, *et al*. Antiviral activity of baicalin against influenza virus H1N1-pdm09 is due to modulation of NS1-mediated cellular innate immune responses [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(5): 1298-1310.
- [19] Wu C R, Liu Y, Yang Y Y, *et al*. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods [J/OL]. *Acta Pharm Sin B*, [2020-02-18]. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>.
- [20] Yu J Y, Ha J Y, Kim K M, *et al*. Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13041-13054.
- [21] Zhang Y, Zhang L, Zhang Y, *et al*. The protective role of liquiritin in high fructose-induced myocardial fibrosis via inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84(2016): 1337-1349.
- [22] 秦子楠, 王梦昕, 史楠楠, 等. 基于文献分析的细辛在清肺排毒汤中合理应用 [J/OL]. 中国中药杂志, [2020-03-07]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20200305.501>.
- [23] 臧滨. 清肺排毒汤中用细辛安全吗 [N]. 健康报, 2020-02-26(005).
- [24] 中国药典 [S]. 一部. 2015.