

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的芪风固表颗粒血清药物化学研究

郑单单, 魏文峰, 霍金海, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要:目的 运用中药血清药物化学方法初步分析大鼠口服给药芪风固表颗粒后的入血成分。方法 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术进行分析, 结合 Peakview 和 Metabolite Pilot 软件, 根据所提供的保留时间、精确相对分子质量及二级质谱裂解碎片, 鉴定和表征其血清中化学成分。结果 在给药后的大鼠血清中分析表征了 37 个化学成分, 其中 17 个原型成分、20 个代谢产物。结论 借助 UPLC-Q-TOF-MS 方法鉴定了大鼠口服芪风固表颗粒后血清中的化学成分, 初步分析了芪风固表颗粒的入血成分, 为阐明该方的药效物质基础提供依据。

关键词: 芪风固表颗粒; 血清药物化学; UPLC-Q-TOF-MS; 原型成分; 代谢产物; 升麻素; 紫丁香苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0643-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.006

Study on serum pharmacochemistry of Qifeng Gubiao Granules based on UPLC-Q-TOF-MS

ZHENG Dan-dan, WEI Wen-feng, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming

Heilongjiang Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: Objective To preliminarily analyze the components in rat serum after oral administration of Qifeng Gubiao Granules (芪风固表颗粒) by serum pharmacochemical methods. **Methods** The rat serum were collected and analyzed by UPLC-Q-TOF-MS after intragastric administration of Qifeng Gubiao Granules. The chemical components in control and dose groups were identified and speculated by Peakview and Metabolite Pilot data processing software using retention time, exact relative molecular mass, and cleavage fragments of MS/MS as indexes. **Results** A total of 37 chemical components, including 17 prototype components and 20 metabolites, were analyzed and characterized in rat serum after administration. **Conclusion** The chemical constituents in the rat serum were identified after oral administration of Qifeng Gubiao Granules based on UPLC-Q-TOF-MS, and the components in serum of Qifeng Gubiao Granules were preliminarily analyzed, which could clarify its pharmacodynamic material basis and provide evidence for clarify its pharmacodynamic material basis.

Key words: Qifeng Gubiao Granules; serum pharmacochemistry; UPLC-Q-TOF-MS; prototype components; metabolites; atractylodin; syringin

芪风固表颗粒是黑龙江省中医药科学院自主研发的中药新药(发明专利号: CN1325098C, 批准文号: 国药准字 B20020410), 该药由黄芪、麦冬、防风、刺五加、炒白术、五味子 6 味中药组成, 具有益肺、健脾、补肾、益卫固表、补气生津的功效, 是治疗表虚不固易感病症有效方剂。文献报道表明, 芪风固表颗粒能止咳化痰, 延长咳嗽潜伏期, 又能缓解气管炎症, 抑制肺组织病变, 改善和治疗支气

管炎和肺炎, 减少肺部炎症发作, 能调节免疫功能, 使机体免疫系统恢复到平衡状态^[1-4]。芪风固表颗粒的药理作用已有初步研究, 然而其药效物质基础尚未完全阐明。

中药方剂成分复杂, 口服给药后, 有效成分被直接吸收入血, 或转化为代谢产物被吸收入血。通过中药血清药物化学研究可以确立中药中的有效成分, 以此为指标建立定性、定量方法, 从而使中药

收稿日期: 2020-04-15

基金项目: 黑龙江省青年科学基金项目(QC2018108); 黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GA17C017)

作者简介: 郑单单(1994—), 女, 硕士研究生, 从事中药质量评价及药效物质基础研究。Tel: (0451) 55653086-6902 E-mail: zhengd0415@163.com

*通信作者: 王伟明(1966—), 女, 硕士生导师, 研究员, 从事中药新产品研发工作。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

及中药复方质量标准化^[5]。本研究利用中药血清药化学方法初步研究芪风固表颗粒的入血成分,旨在明确其药效物质基础,进一步锁定建立芪风固表颗粒质量标准化相关指标。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY™ UPLC 液相色谱仪(美国 Waters 公司); AB Sciex 5600+型质谱仪、Analyst TF1.6 工作站(美国 Sciex 公司); PeakView 2.0 软件、Metabolite pilot 2.0.2 软件(美国 Sciex 公司); IKAMS3 digital 涡旋振荡器(广州仪科实验室技术有限公司); ST16R 型低温高速离心机(美国 Thermofisher Scientific 公司); MTN-2800W 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂与药品

黄芪(批号 20180909)、防风(批号 DC1111)、麸炒白术(批号 180602)、麦冬(批号 180501)、五味子(批号 20180325)、刺五加(批号 20171121)以上 6 味饮片均购于北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,经黑龙江省中医药科学院霍金海副研究员鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. 的干燥根;麸炒白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎蜜制麸皮炒制品;麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L.f) Ker-Gawl. 的干燥块根;五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实;刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎。

对照品升麻素苷(批号 S-004-150421)、升麻素(批号 S-007-170426)、鲁斯可皂苷元(批号 L-009-171026)、芒柄花素(批号 C-018-140128)均购于成都瑞芬思生物科技有限公司,质量分数>98%。刺五加按《中国药典》2015 年版“刺五加水浸膏制备方法”制成刺五加浸膏。甲醇和乙腈(色谱级,Merck 公司);甲酸(色谱级,Fisher 公司);蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.3 实验动物

健康 SD 雄性大鼠,体质量(240±20)g,SPF 级,许可证号 SCXK(黑)2019-001,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。该实验由黑龙江省中医

药科学院动物伦理委员会批准,批准号:201903001。

2 实验方法

2.1 芪风固表颗粒供试品的制备

按照 2020 版《中国药典》^[6]规定,取黄芪 3000 g、白术(炒)1000 g、五味子 500 g,防风 1000 g、麦冬 1000 g,加水煎煮 2 次,煮沸起开始计时,每次 1 h,合并煎液,离心,滤过,静置 24 h,倾取上清液,加入刺五加浸膏 75 g,浓缩至相对密度 1.20~1.22(60℃)的清膏,趁热加入糊精适量,混匀,60℃干燥,粉碎成细粉,加乙醇适量制粒,干燥。按《标准》的 1/20 用药量以上述方法,制备芪风固表颗粒供试品。

2.2 供试品溶液的制备

取供试品芪风固表颗粒粉末约 3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 50%甲醇水 30 mL,密塞,称定重量,超声处理 50 min,放冷至室温,用 50%甲醇水补足减失的质量后摇匀,5000 r/min 离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 药液的制备

取芪风固表颗粒供试品,加适量蒸馏水超声溶解,配制成质量浓度 1.08 g/mL 的芪风固表颗粒大鼠 ig 药液,储存至 4℃冰箱中,备用。

2.4 体内分析样品的制备

取 SD 大鼠,禁食 12 h(自由饮水),给药组按照 9.0 g/kg(相当于人体临床每日 10 倍剂量)ig 给予芪风固表颗粒 ig 药液,空白组按照 20.0 mL/kg ig 给予蒸馏水。给药 1 h 后,ip 10%水合氯醛进行麻醉,腹主动脉取血,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80℃冻存备用。

取大鼠空白血清及给药血清各 1.2 mL,各加 4.8 mL 甲醇,3000 r/min 涡旋震荡 90 s,4℃、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,氮气挥干,残渣用 150 μL 70%甲醇复溶,3000 r/min 涡旋震荡 90 s,4℃、13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,进样 3 μL 供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.5 质谱条件

电喷雾正、负离子模式,正、负离子源电压分别为 5500 V、-4500 V,离子源温度为 550℃,雾化气体为 N₂,雾化气、辅助气压力均为 379.2 kPa,气帘气压力为 241.3 kPa,裂解电压为±80 V,碰撞能量为±35 eV,碰撞能量扩展均为 15 eV。TOF/MS 扫描范围为 *m/z* 100~1500,IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描,Product

Ion 扫描范围为 m/z 50~1500, 开启动态背景扣除 (DBS)。数据采集所用软件为 Analyst TF 1.6 software, 数据处理软件为 Peakview 2.0-masterview 1.0。

2.6 色谱条件

Waters ACQUITY™ UPLC 液相色谱仪; ACQUITY™ BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈ 预柱 (5 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35 °C; 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B); 梯度洗脱: 0→15 min, 95%→50% A; 15→18 min, 50%→0 A; 18→18.1 min, 0→95% A; 18.1→20 min, 95% A。体积流量 0.3 mL/min; 样品仓温度 4 °C; 进样量 8 μL; 色谱仪流出液不分流直接进行正、负离子扫描检测。

2.7 数据分析方法

利用 Peakview 软件通过对比给药后血清和空白血清的质谱图, 扣除血清中的内源性成分, 将剩余离子峰与体外药材提取液离子峰的保留时间、质荷比及二级质谱图进行对比, 如果一致则确认为芪风固表颗粒中的原型成分; 利用 MetabolitePilot 数据处理软件, 导入化合物信息建立 Compound library, 设置 Biotransformation parameters, 选择 I 和 II 相代谢途径, 设置 Processing parameter, 将空白血清及给药血清样品导入, 筛选代谢产物, 根据软件数据结果和参考文献资料推测其代谢产物。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 色谱图的采集

依据“2.5”项质谱条件及“2.6”项色谱条件分

析样本, 在正、负离子模式下采集以上样品的色谱图, 见图 1。

3.2 入血成分分析

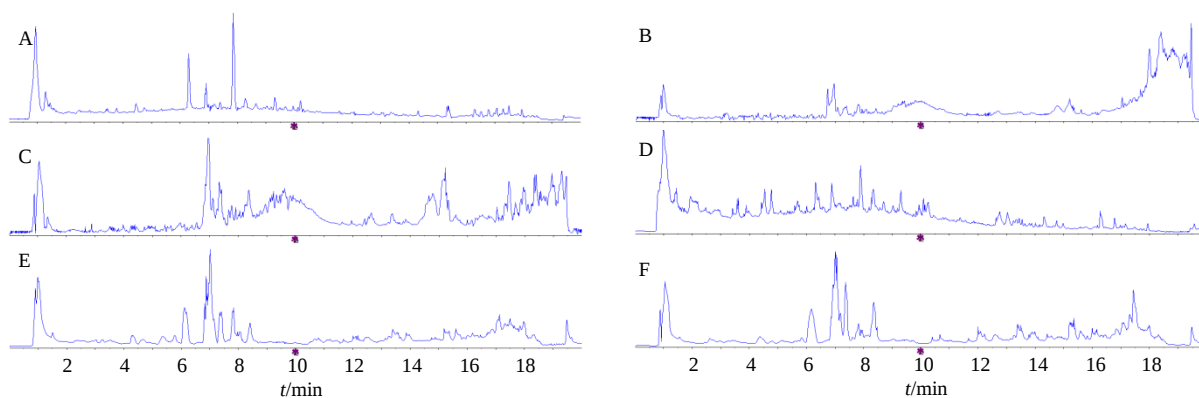
本课题组前期已经应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对芪风固表颗粒的化学成分进行了分析, 在分析过程中根据精确相对分子质量、同位素丰度比、分子碎片峰, 参考相关文献、对照品色谱保留时间及二级谱图, 共推断了 110 个化合物, 其中 22 个来自黄芪, 13 个来自防风, 6 个来自白术, 10 个来自麦冬, 21 个来自五味子, 14 个来自刺五加。本实验在此基础上根据“2.7”项下方法, 结合以往文献报道^[7-11], 并参照对照品二级色谱图, 鉴定了大鼠口服芪风固表颗粒后血清中的 37 个入血成分, 其中 17 个为原型成分, 20 个为代谢产物, 并对其来源进行了归属, 结果见表 1。

3.3 主要色谱峰的质谱分析

3.3.1 原型成分 共鉴定和表征出 17 个原型成分, 分别以化合物 3、9 为例说明推测过程。

化合物 3: 正离子模式下, 其在含药血清总离子图与芪风固表颗粒总离子流图中升麻素的保留时间基本一致, 二级质谱碎片一致, 准分子离子峰 m/z 307 [M+H]⁺ 相对丰度最强, 拥有共同二级碎片 m/z 289、259、235 等, 见图 2, 参考文献报道^[7], 对比升麻素对照品的二级质谱图, 故推测其结构为升麻素, 可能的裂解途径见图 3。

化合物 9: 正离子模式下, 其与芪风固表颗粒总离子流图中鲁斯可皂苷元的保留时间基本一致,



A-芪风固表颗粒溶液正离子模式 B-空白血清正离子模式 C-给药血清正离子模式 D-芪风固表颗粒溶液负离子模式 E-空白血清负离子模式 F-给药血清负离子模式

A-Qifeng Gubiao granule solution in positive ion mode B-Blank serum in positive ion mode C-Administration serum in positive ion mode D-Qifeng Gubiao granule solution in negative ion mode E-Blank serum in negative ion mode F-Administration serum in negative ion mode

图 1 正离子和负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms in positive and negative ion mode

表 1 芪风固表颗粒入血成分分析结果

Table 1 Chemical composition analysis results of Qifeng Gubiao Granules

编号	t _R /min	选择离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ (×10 ⁻⁶)	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS) 及来源	鉴定结果	类别	来源
1	3.3	[M+H] ⁺	127.039 0	127.039 0	0.1	C ₆ H ₆ O ₃	127 [M+H] ⁺ , 109 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 81 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 53 [M+H-H ₂ O-2CO] ⁺	5-羟甲基糠醛	原型	五味子、麦冬、刺五加、白术
2	6.6	[M+H] ⁺	469.168 9	469.170 4	-3.2	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469 [M+H] ⁺ , 307 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 290 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -OH] ⁺ , 261 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-CO] ⁺ , 243 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -2H ₂ O-CO] ⁺	升麻素苷	原型	防风
3	7.7	[M+H] ⁺	307.117 5	307.117 6	-0.4	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307 [M+H] ⁺ , 289 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 259 [M+H-H ₂ O-2CH ₃] ⁺ , 235 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -2C] ⁺ , 221 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -2C-CH ₂] ⁺ , 177 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -2C-CH ₂ -CO-O] ⁺	升麻素	原型	防风
4	8.2	[M+H] ⁺	285.075 7	285.075 8	-0.3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285 [M+H] ⁺ , 270 [M+H-CH ₃] ⁺ , 253 [M+H-CH ₃ -OH] ⁺ , 225 [M+H-CH ₃ -OH-CO] ⁺ , 197 [M+H-CH ₃ -OH-2CO] ⁺ , 186 [M+H-CH ₃ -3CO] ⁺ , 137 [M+H-CH ₃ -OH-CO-C ₇ H ₄] ⁺	毛蕊异黄酮	原型	黄芪
5	13.1	[M+H] ⁺	515.225 0	515.225 1	-4.7	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	515 [M+H] ⁺ , 497 [M+H-H ₂ O] ⁺	五味子酯乙	原型	五味子
6	16.3	[M+H] ⁺	531.222 4	531.222 5	-0.1	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₀	531 [M+H] ⁺ , 485 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 401 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁺ , 383 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -H ₂ O] ⁺ , 341 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -H ₂ O-C ₃ H ₆] ⁺ , 328 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -H ₂ O-C ₃ H ₆ -CH] ⁺	戈米辛 D	原型	五味子
7	16.7	[M+H] ⁺	183.080 4	183.080 4	-0.5	C ₁₃ H ₁₀ O	183 [M+H] ⁺ , 105 [M+H-C ₆ H ₆] ⁺ , 77 [M+H-C ₆ H ₆ -CO] ⁺	苍术素	原型	白术
8	16.8	[M+H] ⁺	391.283 3	391.284 0	-0.8	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391 [M+H] ⁺ , 373 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 355 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 337 [M+H-3H ₂ O] ⁺ , 309 [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺ , 215 [M+H-3H ₂ O-CO-C ₇ H ₁₀] ⁺ , 145 [M+H-3H ₂ O-CO-C ₇ H ₁₀ -C ₅ H ₁₀] ⁺	merulinic acid A	原型	五味子
9	17.9	[M+H] ⁺	431.315 5	431.315 6	-0.1	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	431 [M+H] ⁺ , 413 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 395 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 367 [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ , 297 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀] ⁺ , 269 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄] ⁺ , 243 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂] ⁺ , 229 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂ -CH ₂] ⁺ , 215 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂ -2CH ₂] ⁺ , 177 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂ -2CH ₂ -C ₃ H ₂] ⁺ , 149 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂ -4CH ₂ -C ₃ H ₂] ⁺ , 97 [M+H-2H ₂ O-CO-C ₅ H ₁₀ -C ₂ H ₄ -C ₂ H ₂ -4CH ₂ -C ₃ H ₂ -C ₄ H ₄] ⁺	鲁斯可皂苷元	原型	麦冬
10	18.3	[M+H] ⁺	281.247 2	281.247 5	-1.0	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281 [M+H] ⁺ , 263 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 245 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 175 [M+H-2H ₂ O-CH ₃ -3CH ₂ -CH] ⁺ , 161 [M+H-2H ₂ O-CH ₃ -4CH ₂ -CH] ⁺ , 147 [M+H-2H ₂ O-CH ₃ -5CH ₂ -CH] ⁺ , 133 [M+H-2H ₂ O-CH ₃ -6CH ₂ -CH] ⁺ , 119 [M+H-2H ₂ O-CH ₃ -7CH ₂ -CH] ⁺	亚油酸	原型	麦冬、防风、黄芪
11	6.5	[M-H] ⁻	275.092 8	275.092 8	1.2	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	275 [M-H] ⁻ , 201 [M-H-H ₂ O-2CH ₃ -C ₂ H ₂] ⁻	亥茅酚	原型	防风

续表 1

编号	t _R /min	选择离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ (×10 ⁻⁶)	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS) 及来源	鉴定结果	类别	来源
12	8.4	[M-H] ⁻	431.101 7	431.098 4	7.8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431 [M-H] ⁻ , 255 [M-H-C ₆ H ₆ O ₆] ⁻	染料木苷	原型	黄芪
13	8.9	[M-H] ⁻	137.024 8	137.024 4	2.8	C ₇ H ₆ O ₃	137 [M-H] ⁻ , 93 [M-H-CO ₂] ⁻	对羟基苯甲酸	原型	麦冬、刺五加
14	12.9	[M-H] ⁻	373.130 6	373.129 3	3.6	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373 [M-H] ⁻ , 197 [M-H-C ₆ H ₆ O ₆] ⁻	麦冬黄烷酮 F	原型	麦冬
15	13.3	[M-H] ⁻	267.066 8	267.066 3	1.8	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267 [M-H] ⁻ , 252 [M-H-CH ₃] ⁻ , 224 [M-H-CH ₃ -CO] ⁻ , 167 [M-H-CH ₃ -OH-CO-C ₂ O] ⁻	芒柄花素	原型	黄芪
16	15.9	[M-H] ⁻	361.167 6	361.164 6	-3.1	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361 [M-H] ⁻ , 221 [M-H-C ₆ H ₄ O ₄] ⁻ , 205 [M-H-C ₆ H ₄ O ₄ -CH ₃] ⁻ , 148 [M-H-C ₆ H ₄ O ₄ -CH ₃ -C ₄ H ₉] ⁻	开环异落叶松树脂酚	原型	刺五加
17	16.7	[M-H] ⁻	535.200 4	535.197 4	5.6	C ₃₀ H ₃₂ O ₉	535 [M-H] ⁻ , 489 [M-H-2CH ₃ -O] ⁻	五味子酯甲	原型	五味子
18	1.6	[M+H] ⁺	165.058 9	165.054 3	-1.9	C ₉ H ₈ O ₃	165 [M-H] ⁻ , 147 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 137 [M-H-CO] ⁻ , 123 [M-H-CO-CH ₂] ⁻ , 119 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻	咖啡酸脱氧代谢物	代谢物	五味子、黄芪、刺五加
19	5.9	[M+H] ⁺	323.113 3	323.112 2	-0.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	323 [M+H] ⁺ , 275 [M+H-H ₂ O-2CH ₃] ⁺ , 247 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -CO] ⁺ , 232 [M+H-H ₂ O-3CH ₃ -CO] ⁺ , 203 [M+H-H ₂ O-3CH ₃ -CO-CHO] ⁺	升麻素苷脱糖后氧化代谢物	代谢物	防风
20	6.7	[M+H] ⁺	483.148 9	483.149 0	-1.5	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂	483 [M+H] ⁺ , 307 [M+H-C ₆ H ₆ O ₆] ⁺ , 289 [M+H-C ₆ H ₆ O ₆ -H ₂ O] ⁺ , 259 [M+H-C ₆ H ₆ O ₆ -H ₂ O-2CH ₃] ⁺	升麻素苷酮基化代谢物	代谢物	防风
21	7.7	[M+H] ⁺	307.118 7	307.118 2	1.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307 [M+H] ⁺ , 289 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 259 [M+H-H ₂ O-2CH ₃] ⁺ , 221 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -C ₃ H ₇] ⁺ , 177 [M+H-H ₂ O-2CH ₃ -C ₃ H ₇ -O-CO] ⁺	5-O-甲基维斯阿米醇苷脱甲基后羧酸化氧化产物	代谢物	防风
22	11.1	[M+H] ⁺	417.192 3	417.190 8	0	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	417 [M+H] ⁺ , 402 [M+H-CH ₃] ⁺ , 385 [M+H-CH ₃ -OH] ⁺ , 359 [M+H-CH ₃ -OH-C ₂ H ₅] ⁺ , 327 [M+H-2CH ₃ -2OH-C ₂ H ₅] ⁺ , 296 [M+H-2CH ₃ -2OH-C ₂ H ₅ -CH ₃ O] ⁺ , 268 [M+H-3CH ₃ -2OH-C ₂ H ₅ -CH ₃ O-CO] ⁺ , 253 [M+H-4CH ₃ -2OH-C ₂ H ₅ -CH ₃ O-CO] ⁺	五味子酯乙脱 2-甲基-2 丁烯基产物	代谢物	五味子
23	11.5	[M+H] ⁺	433.185 5	433.185 3	-0.9	C ₂₃ H ₂₈ O ₈	433 [M+H] ⁺ , 415 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 383 [M+H-H ₂ O-CH ₃ -OH] ⁺ , 344 [M+H-H ₂ O-CH ₃ -OH-C ₃ H ₇] ⁺ , 313 [M+H-H ₂ O-CH ₃ -OH-C ₃ H ₇ -CH ₃ O] ⁺	五味子酯甲脱苯甲酰基产物	代谢物	五味子
24	16.3	[M+H] ⁺	485.213 7	485.216 4	-1.2	C ₂₇ H ₃₂ O ₈	485 [M+H] ⁺ , 401 [M+H-C ₃ H ₆ O] ⁺ , 383 [M+H-C ₃ H ₆ O-H ₂ O] ⁺ , 352 [M+H-C ₃ H ₆ O-H ₂ O-CH ₃ O] ⁺ , 341 [M+H-C ₃ H ₆ O-H ₂ O-C ₃ H ₆] ⁺ , 337 [M+H-C ₃ H ₆ O-H ₂ O-CH ₃ O-CH ₃] ⁺ , 328 [M+H-C ₃ H ₆ O-H ₂ O-C ₃ H ₆ -CH ₃] ⁺	戈米辛 D 脱甲氧基后脱氧产物	代谢物	五味子
25	1.4	[M-H] ⁻	191.020 6	191.020 1	1.8	C ₆ H ₈ O ₇	191 [M-H] ⁻ , 129 [M-H-COOH-OH] ⁻ , 111 [M-H-COOH-OH-H ₂ O] ⁻	柠檬酸二甲酯脱双甲基产物	代谢物	五味子
26	1.6	[M-H] ⁻	189.037 2	189.040 6	0.8	C ₇ H ₁₀ O ₆	189 [M-H] ⁻ , 174 [M-H-CH ₃] ⁻ , 129 [M-H-CH ₃ -COOH] ⁻ , 99 [M-H-CH ₃ -COOH-CH ₂ O] ⁻	柠檬酸二甲酯脱甲氧基产物	代谢物	五味子
27	4.2	[M-H] ⁻	273.046 5	273.047 3	12.5	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S	273 [M-H] ⁻ , 191 [M-H-H ₂ SO ₃] ⁻ , 153 [M-H-H ₂ SO ₃ -C ₂ H ₂] ⁻	紫丁香苷失去脱氧葡萄糖脱氧后硫酸化产物	代谢物	白术、刺五加
28	4.4	[M-H] ⁻	205.076 6	205.070 1	-8.2	C ₈ H ₁₄ O ₆	205 [M-H] ⁻ , 143 [M-H-3OH] ⁻ , 129 [M-H-3OH-CH ₂] ⁻ , 115 [M-H-3OH-CO] ⁻	奎宁酸甲基化产物	代谢物	五味子、刺五加
29	5.4	[M-H] ⁻	239.054	239.055 5	-2.5	C ₁₁ H ₁₂ O ₆	239 [M-H] ⁻ , 163 [M-H-COOH-CH ₃ O] ⁻ , 147 [M-H-COOH-CH ₃ O-O] ⁻ , 131 [M-H-COOH-CH ₃ O-2O] ⁻ , 117 [M-H-COOH-CH ₃ O-2O-CH ₂] ⁻	紫丁香苷脱脱氧葡萄糖后甲基羧酸化产物	代谢物	白术、刺五加

续表 1

编号	t_R/min	选择离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ ($\times 10^{-6}$)	分子式	主要二级碎片离子 (MS/MS) 及来源	鉴定结果	类别	来源
30	5.8	$[M-H]^-$	621.149 2	621.149 9	6.1	$C_{28}H_{30}O_{16}$	621 $[M-H]^-$, 459 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 283 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6]^-$, 268 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6-CH_3]^-$, 239 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6-CH_3-CHO]^-$, 211 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_8O_6-CH_3-CHO-CO]^-$	毛蕊异黄酮葡萄糖苷葡萄糖糖醛酸化产物	代谢物	黄芪
31	6.7	$[M-H]^-$	323.112 9	323.112 6	0.1	$C_{16}H_{18}O_7$	323 $[M-H]^-$, 247 $[M-H-C_3H_6O_2]^-$, 232 $[M-H-C_3H_6O_2-CH_3]^-$, 203 $[M-H-C_3H_6O_2-CH_3-CHO]^-$	绿原酸脱双氧产物	代谢物	五味子、刺五加
32	8.1	$[M-H]^-$	333.010 5	333.008 5	3.3	$C_{15}H_{10}O_7S$	333 $[M-H]^-$, 253 $[M-H-SO_3]^-$, 223 $[M-H-SO_3-CH_2O]^-$	毛蕊异黄酮脱甲氧基后硫酸化产物	代谢物	黄芪
33	8.2	$[M-H]^-$	459.096 7	459.094 9	3.6	$C_{22}H_{20}O_{11}$	459 $[M-H]^-$, 441 $[M-H-H_2O]^-$, 283 $[M-H-H_2O-C_6H_6O_5]^-$, 268 $[M-H-H_2O-C_6H_6O_5-CH_3]^-$, 239 $[M-H-H_2O-C_6H_6O_5-CH_3-CHO]^-$, 211 $[M-H-H_2O-C_6H_6O_5-CH_3-CHO-CO]^-$	芒柄花苷脱甲基后羧酸化产物	代谢物	黄芪
34	8.3	$[M-H]^-$	305.070 3	305.067 6	2.9	$C_{15}H_{14}O_7$	305 $[M-H]^-$, 261 $[M-H-COO]^-$, 189 $[M-H-H_2O-COO-2CH_3-C_2H_2]^-$, 161 $[M-H-H_2O-COO-2CH_3-C_2H_2]^-$	亥茅酚脱甲基为羧酸化产物	代谢物	防风
35	9.3	$[M-H]^-$	475.090 7	475.089 5	2.7	$C_{22}H_{20}O_{12}$	475 $[M-H]^-$, 299 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 284 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3]^-$, 255 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3-CHO]^-$, 227 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3-CHO-CO]^-$, 211 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3-CHO-CO-O]^-$	毛蕊异黄酮葡萄糖苷脱甲基为羧酸化产物	代谢物	黄芪
36	9.7	$[M-H]^-$	443.097 9	443.100 0	3.7	$C_{22}H_{20}O_{10}$	443 $[M-H]^-$, 267 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 251 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_4]^-$, 223 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_4-CO]^-$, 195.044 6 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_4-2CO]^-$, 167.049 1 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_4-3CO]^-$	芒柄花素葡萄糖醛酸化产物	代谢物	黄芪
37	11.5	$[M-H]^-$	347.025 6	347.023 6	1.3	$C_{16}H_{12}O_7S$	347 $[M-H]^-$, 267 $[M-H-SO_3]^-$, 251 $[M-H-SO_3-CH_4]^-$, 223 $[M-H-SO_3-CH_4-CO]^-$, 195 $[M-H-SO_3-CH_4-2CO]^-$	芒柄花素硫酸化产物	代谢物	黄芪

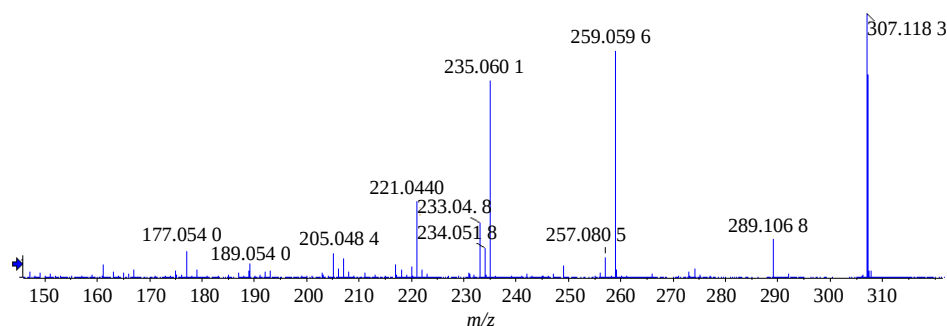


图 2 升麻素正离子模式下的 MS/MS 质谱图

Fig. 2 MS/MS mass spectrum of atracylodin in a positive mode

二级质谱碎片一致, 准分子离子峰 m/z 431 $[M+H]^+$ 相对丰度较强, 拥有共同二级碎片 m/z 395、269 等, 见图 4, 参考文献报道^[8], 对比鲁斯可皂苷元对照品的二级质谱图, 故推测其结构为鲁斯可皂苷元,

可能的裂解途径见图 5。

3.3.2 代谢产物 根据“2.7”项下方法结合 Metabolite Pilot 代谢物数据处理软件给出的代谢物最优化峰匹配, 最终推测 20 个代谢产物, 以化合物 27、36 为

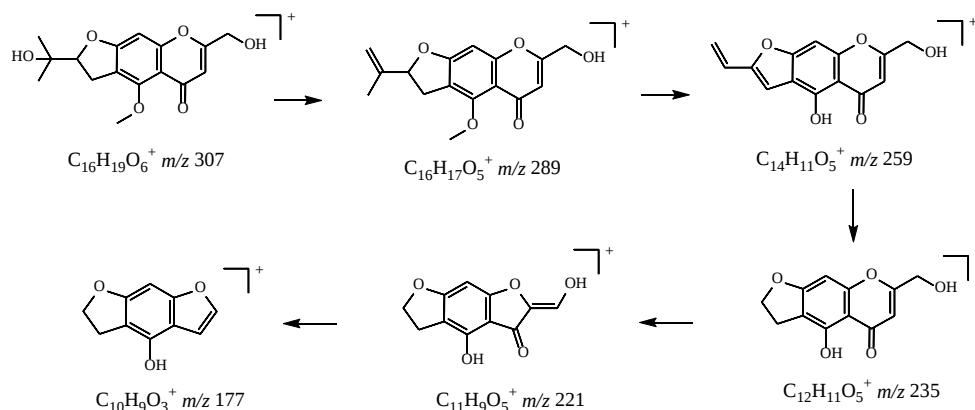


图3 推测的升麻素裂解途径

Fig. 3 Speculative cleavage pathway of atractylodin

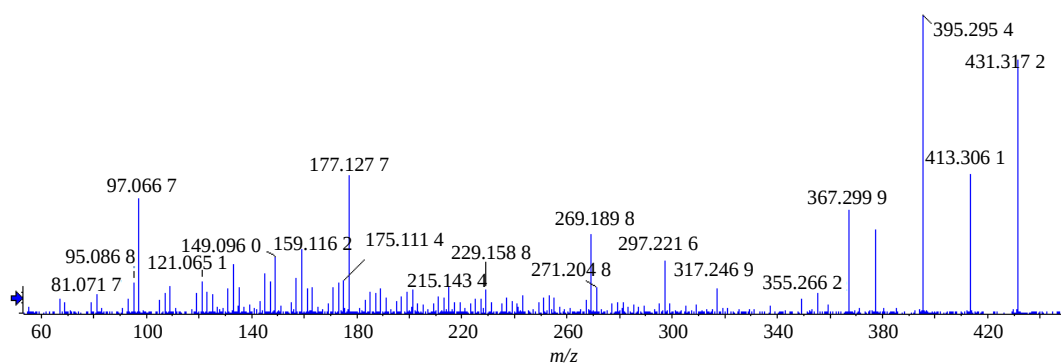


图4 鲁斯可皂苷元正离子模式下的 MS/MS 质谱图

Fig. 4 MS/MS mass spectrum of ruscogen in positive mode

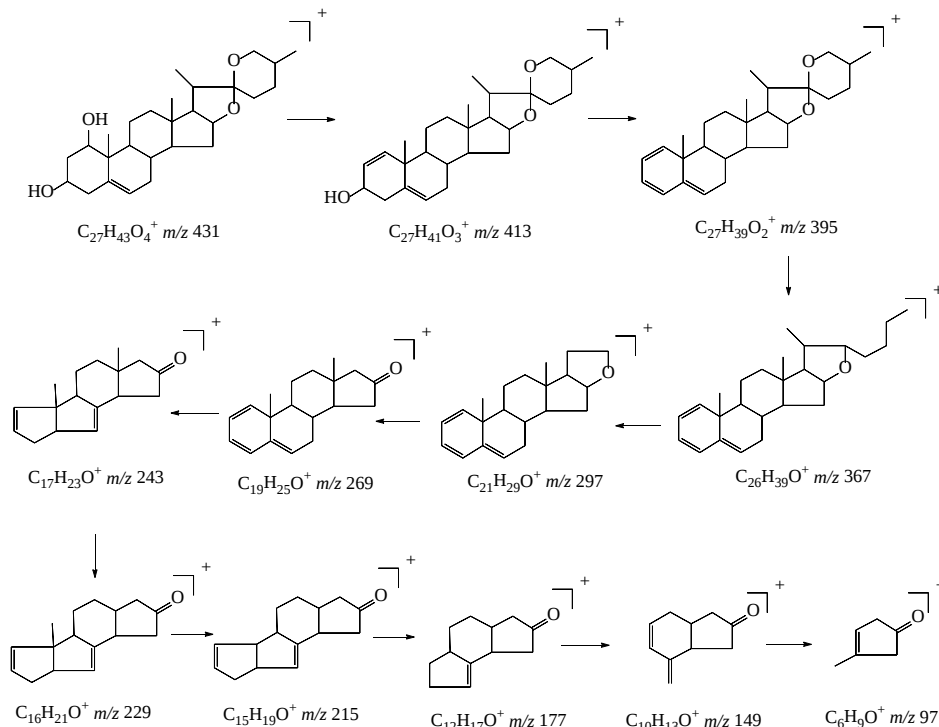


图5 推测的鲁斯可皂苷元裂解途径

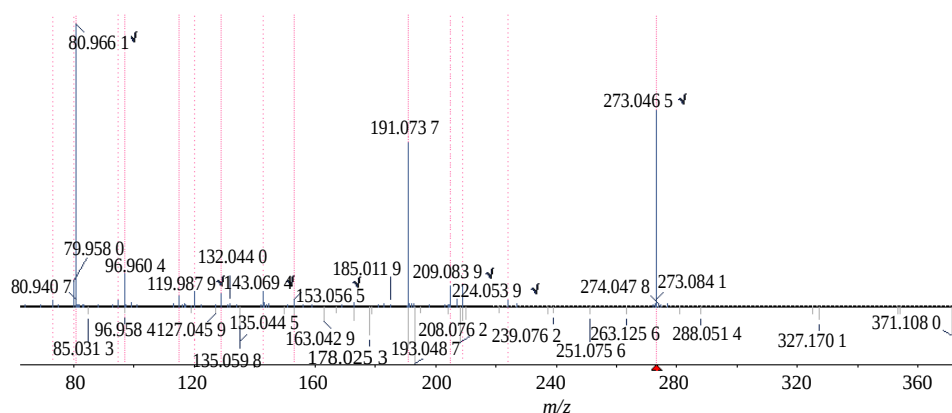
Fig. 5 Speculative cleavage pathway of ruscogen

例说明鉴定过程。

化合物 **27**: 刺五加中的刺五加苷类成分是其主要活性部位, 紫丁香苷是主要成分之一。紫丁香苷是苯丙醇的苷类化合物, 该化合物在体内发生 I 相水解反应, 失去脱氧葡萄糖水解为苷元, 其苷元脱氧后苯环上的羟基发生硫酸酯化, 形成硫酸酯化代谢产物。代谢物在负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 273 $[M-H]^-$, 比紫丁香苷准分子离子峰 m/z 371 $[M-H]^-$ 少 98, 提示其失去脱氧葡萄糖脱氧后硫酸酯化, 结合碎片 m/z 191、153 等, 与紫丁香苷二级碎片比较, 符合其裂解过程, 结合文献报道^[9], 紫丁香苷苷元苯环上的羟基可能发生硫酸酯化。紫丁香苷失去脱氧葡萄糖脱氧后硫酸酯化产物和紫丁香苷在负离子模式下的质谱匹配度见图 6, 可能的裂解途径

见图 7。

化合物 **36**: 芒柄花素是来自黄芪的黄酮类化合物, 易发生 II 相代谢反应, A 环 7 位羟基发生葡萄糖醛酸化, 生成芒柄花素葡萄糖醛酸化产物。该产物在负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 443 $[M-H]^-$, 比异微凸剑叶莎醇准分子离子峰 m/z 301 $[M-H]^-$ 多 142, 表明化合物发生葡萄糖醛酸化, 结合其特征碎片 m/z 267、251、223 等, 与芒柄花素二级碎片比较, 符合其葡萄糖醛酸化过程, 参考文献报道^[10-11], 芒柄花素 A 环 7 位羟基易发生葡萄糖醛酸化, 同时芒柄花苷在大鼠体内发生 I 相代谢水解后, 生成芒柄花素, 亦可能有相同代谢产物。芒柄花素葡萄糖醛酸化产物和芒柄花素在负离子模式下的质谱匹配度见图 8, 推测的裂解途径见图 9。



✓表示可以与原型成分匹配的代谢产物裂解碎片, 下同

✓ indicates that the fragments of metabolites can match the original components, same as below

图 6 紫丁香苷失去脱氧葡萄糖脱氧后硫酸酯化产物和紫丁香苷负离子模式下的质谱图

Fig. 6 Mass spectra of sulphate conjugation after lost deoxyglucose and oxygen of syringin in negative mode

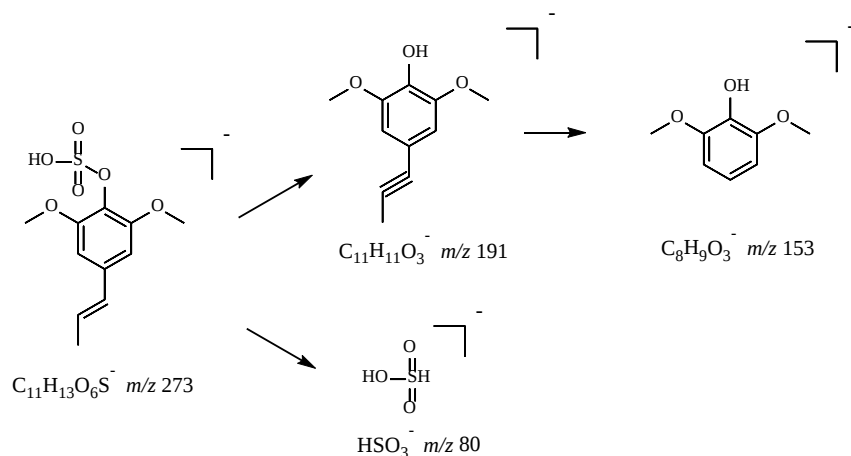


图 7 推测的紫丁香苷失去脱氧葡萄糖脱氧后硫酸酯化产物裂解途径

Fig. 7 Speculative cleavage pathway of sulphate conjugation after lost deoxyglucose and oxygen of syringin

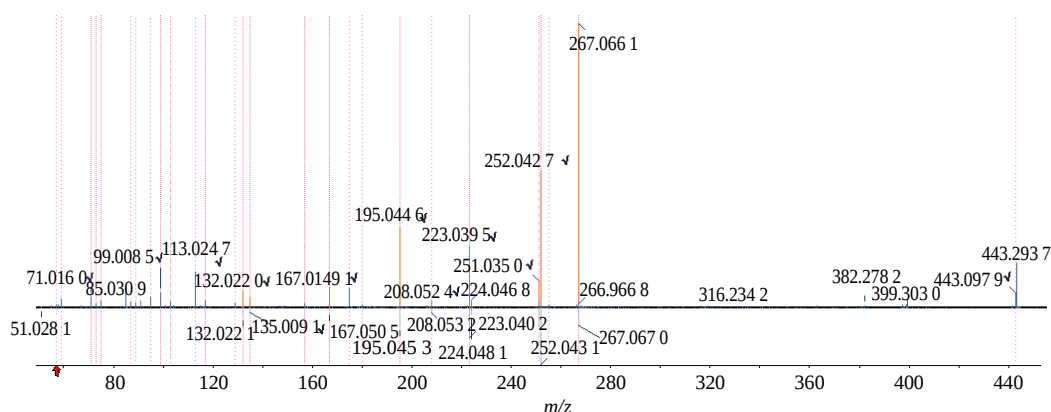


图 8 芒柄花素葡萄糖醛酸化产物和芒柄花素在负离子模式下的质谱图

Fig. 8 Mass spectra of glucuronidation of formononetin in negative mode

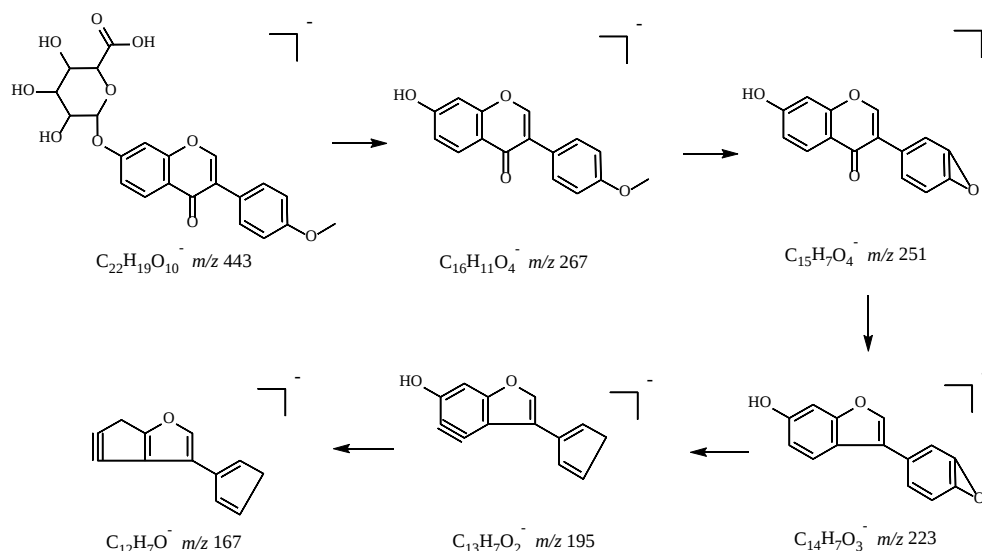


图 9 推测的芒柄花素葡萄糖醛酸化产物裂解途径

Fig. 9 Speculative cleavage pathway of glucuronidation of formononetin

4 讨论

本实验在取血方式上,选取腹主动脉取血,腹主动脉取血的取血量较大,更适合用于后续样品制备。在样品处理方法上,比较了甲醇沉淀法、固定相萃取-甲醇洗脱法 2 种血清处理方法,结果显示,甲醇沉淀法检测到的血中移行成分较多,故选择甲醇沉淀法作为血清最佳处理方法。在采血时间上考察了 0、0.5、1、2、4、8、12、24 h 共 8 个不同时间点,结果在给药 1 h 后采血所检测的色谱峰数目最多、响应值最强,故选择给药 1 h 后采血为最佳采血时间点。

在大鼠 ig 芪风固表颗粒 ig 药液后的含药血清中共鉴定出 37 个入血成分,包括 17 个原型成分,

20 个代谢产物。其中来自黄芪的多为黄酮类成分,黄芪中的芒柄花素及其苷类、毛蕊异黄酮及其苷类等黄酮类成分,能抗病毒^[12],改善肺纤维化肺功能^[13],还能通过降低模型动物的脾细胞辅助 T 细胞 1/辅助 T 细胞 2 (T helper 1 cell/T helper 2 cell, Th1/Th2) 和高细胞增殖活性等改善其机体免疫功能失调,又能增强机体的耐力^[14]。防风的主要成分升麻素等色原酮及其苷类,具有解热抗炎^[15]作用。刺五加中的紫丁香苷等刺五加苷类^[16]及有机酸类等成分,可能具有抗疲劳^[17],调节免疫功能等多重作用。五味子具有免疫调节作用^[18]。麦冬中的主要皂苷元鲁斯可皂苷元具有抗炎作用,马丽等^[19]通过体外实验发现,鲁斯可皂苷元可显著抑制细胞因子肿瘤坏死因子- α

(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导的急髓白血病 HL-60 细胞与人脐静脉内皮 ECV304 细胞之间的黏附作用, 从而发挥抗炎活性。结合各味药传统功效及现代药理学研究, 初步可以推断, 本次实验分析所得入血的 37 种成分可能为其体内发挥作用的药效物质基础。

实验中运用中药血清药物化学方法及 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 简单、快捷分析了中药复方芪风固表颗粒中的入血成分, 初步探究了该方的药效物质基础, 进一步锁定其质量控制指标性成分, 为其质量标准的提升研究提供依据, 为传统品种的二次开发提供了良好的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王博, 齐绪交, 张俊威, 等. 芪风固表颗粒对慢性支气管炎模型小鼠肺泡灌洗液及肺组织病理学影响 [J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(5): 155-156.
- [2] 王伟明, 张树明. 芪风固表颗粒对小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. 黑龙江中医药, 2005, 34(2): 37-39.
- [3] 齐绪交, 刘媛媛, 黄燕茹, 等. 芪风固表颗粒预防 ICR 小鼠慢性支气管炎发作的脏器系数及 sIgA 的影响 [J]. 黑龙江中医药, 2016, 45(1): 58-59.
- [4] 王伟明, 张树明. 芪风固表颗粒止咳化痰作用及机理的实验研究 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(10): 1800-1801.
- [5] 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.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 979-980.
- [7] 李丽, 刘质净, 桂语歌, 等. 防风中的色原酮化合物的高效液相色谱与电喷雾质谱联用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1310-1311.
- [8] 王子健. 麦冬复杂物质体系的 LC-MS 分析效率提高策略研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [9] 郭丽娜. 金莲花三类成分的血清药物化学及血清药理学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [10] 史培颖. 中药四类成分质谱裂解规律及芪参益气方药代动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [11] 孙国东, 霍金海, 潘五九, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的槐角药材化学成分分析 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3774-3783.
- [12] 于玲, 王知斌, 王秋红, 等. 黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(2): 104-108.
- [13] 蔺兴遥, 张毅, 李娟, 等. 黄芪黄酮与红芪黄酮对肺间质纤维化模型大鼠肺功能影响的对比研究 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1770-1773.
- [14] Kuo Y H, Tsai W J, Loke S H, et al. *Astragalus membranaceus* flavonoids (AMF) ameliorate chronic fatigue syndrome induced by food intake restriction plus forced swimming [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1): 28-34.
- [15] 赵娟, 刘春芳, 林娜, 等. 防风色原酮提取物对大鼠胶原诱导性关节炎的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 52-56.
- [16] Wang G H, Dong H Y, Dong W G, et al. Protective effect of *Radix Acanthopanax Senticosi* capsule on colon of rat depression model [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(9): 1373-1377.
- [17] Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of various *Eleutherococcus senticosus* cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(2/3): 447-453.
- [18] 李洁, 顾伟鹰, 时扣荣, 等. 五味子木脂素类有效成分的药动学及药效学研究进展 [J]. 世界临床药物, 2017, 38(5): 348-352.
- [19] 马丽, 寇俊萍, 黄跃, 等. 鲁斯可皂苷元对 HL-60 与 ECV304 细胞黏附的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(6): 706-709.

[责任编辑 王文倩]