基于血清药物化学的厚藤治疗急性痛风性关节炎质量标志物研究

侯小涛[1,2]，韦棪婷[1,2]，夏中尚[2,3]，韦　玮[2]，郝二伟[2]，杜正彩[2]，周月敏[1]，邓家刚[2*]

1. 广西中医药大学药学院，广西 南宁　530200
2. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室，广西 南宁　530200
3. 成都中医药大学药学院，四川 成都　611137

摘　要：目的　基于中药质量标志物（quality marker，Q-Marker）的概念，研究厚藤提取物对急性痛风性关节炎（acute gouty arthritis，AGA）大鼠的治疗作用，并分析厚藤提取物在正常大鼠及 AGA 大鼠的血中移行成分，为厚藤 Q-Marker 的确定提供依据。**方法**　采用尿酸钠建立 AGA 大鼠模型，考察厚藤提取物对 AGA 大鼠关节肿胀指数、足垫肿胀程度和滑膜组织病理变化的影响，考察厚藤提取物对 AGA 大鼠血清中白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、巨噬细胞炎性蛋白-1α（macrophage inflammatory protein-1α，MIP-1α）和 MIP-2 水平的影响。采用液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱（LC-Q-TOF-MS/MS）技术对厚藤提取物进行定性分析，探寻正常大鼠和 AGA 大鼠 ig 厚藤提取物后的入血成分。**结果**　与模型组比较，厚藤提取物组大鼠关节肿胀指数和足垫厚度均显著降低（$P<0.05$、0.01），厚藤提取物高、中剂量组大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平均显著降低（$P<0.05$），厚藤提取物高、中剂量组大鼠滑膜组织炎性细胞浸润减轻。从厚藤提取物中鉴定出树脂糖苷类、黄酮类、有机酸类、香豆素类、核苷类、木脂素类等 53 个成分，其中有机酸类和黄酮类为其主要成分，并推测了树脂糖苷类、黄酮类、有机酸类、香豆素类部分成分的裂解规律；正常大鼠含药血浆中鉴定出苹果酸、咖啡酸、咖啡酸甲酯和对羟基苯甲酸 4 个成分，AGA 大鼠含药血浆中鉴定出莨菪亭、咖啡酸、咖啡酸甲酯和对羟基苯甲酸 4 个成分。**结论**　厚藤提取物能够明显改善 AGA 大鼠关节肿胀，抑制血清中 IL-1β、MIP-1α 及 MIP-2 水平，并抑制炎症反应；采用 LC-Q-TOF-MS/MS 技术可快速鉴定厚藤水提物的主要成分为有机酸类和黄酮类，莨菪亭、咖啡酸、绿原酸及其异构体（新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C）和原儿茶酸在 AGA 大鼠中以原型成分或代谢物形式入血，可作为厚藤治疗 AGA 的 Q-Marker。

关键词：厚藤；急性痛风性关节炎；质量标志物；液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱；莨菪亭；咖啡酸；绿原酸；新绿原酸；隐绿原酸；异绿原酸 B；异绿原酸 A；异绿原酸 C；原儿茶酸

中图分类号：R285.5；R285.61　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)09 - 2638 - 15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.09.015

Study on Q-Marker for treating acute gouty arthritis with *Ipomoea pes-caprae* based on serum pharmacochemistry

HOU Xiao-tao[1, 2], WEI Yan-ting[1, 2], XIA Zhong-shang[2, 3], WEI Wei[2], HAO Er-wei[2], DU Zheng-cai[2], ZHOU Yue-min[1], DENG Jia-gang[2]

1. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China
2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective　To study the therapeutic effect of *Ipomoea pes-caprae* extract on acute gouty arthritis (AGA) rats and analyze the transitional components in blood of normal rats and AGA rats based on theory of quality marker (Q-Marker) of traditional Chinese medicine, and provide experimental basis for the determination of Q-Marker. **Methods**　AGA model was induced by

收稿日期：2021-04-10

基金项目：广西中药药效研究重点实验室运行补助项目（20-065-38）；广西一流学科建设项目重点课题（2018XK043）；广西中医药大学校级一般硕士研究生科研创新项目（YCSY2020026）；广西中医药大学自治区级硕士研究生科研创新项目（YCSW2019170）；中国东盟传统药物研究国际合作联合实验室建设（二期）资助项目（桂科 AD19110165）；农作物废弃物功能成分研究协同创新中心资助项目（CICAR2020）；广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目（2018006）

作者简介：侯小涛（1969—），女，博士，教授，从事中药活性成分及质量控制研究。Tel: 13878858205　E-mail: xthou@126.com

***通信作者：**邓家刚，教授。E-mail: dengjg53@126.com

sodium urate. The effect of *I. pes-caprae* extract on joint swelling index, foot pad swelling and synovial tissue pathological changes in AGA rats were evaluated. The effect of *I. pes-caprae* extract on interleukin-1β (IL-1β), macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α), and MIP-2 levels in serum of AGA rats were observed. LC-Q-TOF-MS/MS was used to qualitatively analyze *I. pes-caprae* extract, and then the blood components of normal rats and AGA rats were identified after ig *I. pes-caprae* extract. **Results** Compared with model group, joint swelling index and foot pad thickness of rats in *I. pes-caprae* extract group were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), IL-1β, MIP-1α, and MIP-2 levels in serum of high- and medium-dose *I. pes-caprae* extract groups were significantly decreased ($P < 0.05$), infiltration of inflammatory cells in synovial tissue were reduced in high- and medium-dose *I. pes-caprae* extract groups. 53 components were identified from *I. pes-caprae* extract, including resin glycosides, flavonoids, organic acids, coumarins, nucleosides, lignans, among which organic acids and flavonoids were the main components. Fragmentation rules of some compounds of resin glycosides, flavonoids, organic acids, and coumarins were also speculated. Four components including malic acid, caffeic acid, methyl caffeic acid and 4-hydroxybenzoic acid were identified in normal rat sample plasma. Four components including scopoletin, caffeic acid, methyl caffeic acid, and 4-hydroxybenzoic acid were identified in AGA rat sample plasma. **Conclusion** *I. pes-caprae* extract can significantly relieve joint swelling of AGA rats, inhibit IL-1β, MIP-1α, and MIP-2 levels in serum, and inhibit inflammatory response. Main chemical components from *I. pes-caprae* extract were rapidly identified as organic acids and flavonoids by using LC-Q-TOF-MS/MS. Scopoletin, caffeic acid, chlorogenic acid and its isomers (neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C) and protocatechuic acid were injected into the blood in form of prototype components or their metabolites in AGA rats, which could be used as Q-Marker for the treatment of AGA with *I. pes-caprae* extract.

Key words: *Ipomoea pes-caprae* (Linn.) Sweet; acute gouty arthritis; quality marker; LC-Q-TOF-MS/MS; scopoletin; caffeic acid; chlorogenic acid; neochlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; protocatechuic acid

痛风是嘌呤代谢紊乱造成皮下组织、关节周围、骨骼及尿路中尿酸盐结晶沉淀而引发的病变，我国痛风发病率 1%～3%，为仅次于糖尿病的第 2 大代谢类疾病[1-2]。急性痛风性关节炎（acute gouty arthritis，AGA）是痛风急性发作期的首发症状，其发病机制与炎症反应和高尿酸血症密切相关[3]。目前临床上针对 AGA 的化学药物多为秋水仙碱、非甾体类抗炎药物、糖皮质激素等[4]，普遍存在不良反应，临床应用上受到一定的限制。目前越来越多的研究从中西医结合的途径入手，探索中医药在治疗 AGA 的优势。

厚藤 *Ipomoea pes-caprae* (Linn.) Sweet 为旋花科番薯属植物，是我国南方沿海地区常用的海洋中药，其味辛、苦，性微寒，归肺、肝、胃、大肠经，具有祛风除湿、消痈散结、拔毒消肿的功效，常用于治疗腰肌劳损、风湿关节痛等疾病[5-6]。厚藤具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等多种药理活性[7]。抗炎活性与厚藤祛湿拔毒等传统功效密切相关，被认为是其主要的药效作用。目前其抗炎活性研究多停留在验证传统功效层面，未见对其作用机制进行深入研究的报道，也未见对其化学成分与药理作用之间关联性进行研究的报道。基于刘昌孝院士[8]提出质量标志物（quality marker，Q-Marker）的概念，本研究利用液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱（LC-Q-TOF-MS/MS）技术，在药物有效的前提下，分别对正常大鼠和 AGA 大鼠 ig 厚藤提取物后的含药血浆进行分析，为厚藤 Q-Marker 的确定及其药材的质量标准研究提供依据和思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，6 周龄，体质量（200±10）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证号 SCXK（湘）2016-0002。动物饲养于温度（23±2）℃、湿度 50%～60%、12 h/12 h 昼夜交替光照的环境中，自由进食饮水。动物实验经广西中医药大学动物伦理委员会批准（批准号 DW20190418-015）。

1.2 药材

厚藤于 2019 年 4 月 20 日采自广西防城港市北仑河口国家级自然保护区，经广西中医药大学韦松基教授鉴定为旋花科植物厚藤 *I. pes-caprae* (L.) Sweet。

1.3 药品与试剂

尿酸钠（批号 U2875-5G）购自美国 Sigma 公司；秋水仙碱片（批号 180101）购自西双版纳版纳

药业公司；4%多聚甲醛（批号 70120900）购自 Biosharp 公司；EDTA 脱钙液（批号 E1171）购自北京索莱宝科技有限公司；白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、巨噬细胞炎性蛋白-1α（macrophage inflammatory protein-1α，MIP-1α）、MIP-2 多因子试剂盒（批号 64325505）购自美国 BIO-RAD 公司；质谱级甲醇、乙腈购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；色谱级甲酸购自日本 TCI 公司；异槲皮苷对照品（批号 DST180108-006）购自德思特生物公司；绿原酸对照品（批号 AF8112791）购自成都埃法生物科技公司；异莨菪亭对照品（批号 PS020323）购自成都普思生物科技公司）；阿魏酸对照品（批号 MUST-18032928）购自成都曼思特生物公司；对照品秦皮乙素（批号 190329）、异绿原酸 C（批号 190507）、异绿原酸 A（批号 190423）、异绿原酸 B（批号 160822）、咖啡酸（批号 160803）购自上海融禾医药科技有限公司；以上对照品质量分数均≥98%。

1.4 仪器

ExionLC AC 液相色谱仪、X500R QTOF 质谱仪、SCIEX OS 2.0 数据处理软件（美国 SCIEX 公司）；CPA225D 万分之一天平（德国赛多利斯科学仪器北京公司）；KQ-500DE 型数控超声仪（昆山市超声仪器公司）；Hei-VAP 型旋转蒸发仪（德国 Heidolph 公司）；TGL-16M 型台式高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；X-200 Luminex 多功能流式点阵仪（美国 Luminex 公司）。

2 方法

2.1 厚藤提取物的制备

称取厚藤地上部分粗段，加入 12 倍量水煮沸后再煎 30 min，滤过；再加入 10 倍量水提取 1 次，合并 2 次滤液，55 ℃减压浓缩至稠膏。

2.2 动物分组、造模与给药

大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱（0.27 mg/kg）组和厚藤提取物高、中、低剂量（928.80、464.40、222.90 mg/kg，分别相当于成人每日服用生药材 50、25、12 g）组，每组 10 只，另随机选取 3 只作为正常给药组。各给药组 ig 相应药物，正常给药组 ig 厚藤提取物（928.80 mg/kg），对照组和模型组 ig 等体积纯化水，1 次/d，连续 7 d。第 7 天给药 1 h 后，大鼠 ip 10%水合氯醛（3 mL/kg）麻醉，正常给药组和对照组大鼠于右后侧踝关节腔注射 0.1 mL 无菌生理盐水，其余各组大鼠于右后侧踝关节腔注射 0.1 mL 尿酸钠溶液（0.5 g/10 mL），建立 AGA 模型[9]。造模后，各给药组 ig 相应药物，1 次/d，连续 2 d。

2.3 厚藤提取物对 AGA 大鼠踝关节肿胀指数和右后足垫厚度的影响

造模后观察各组大鼠关节肿胀和右后足垫肿胀程度，并计算关节肿胀指数。

关节肿胀指数＝测定时间点关节周径－初始关节周径

2.4 厚藤提取物对 AGA 大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平的影响

大鼠禁食不禁水 12 h，末次给药后 1 h，腹主动脉采血至含肝素钠的采血管中，3000 r/min 离心 10 min，取上清液，按照试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平。

2.5 厚藤提取物对 AGA 大鼠滑膜组织病理变化的影响

大鼠脱颈椎处死，取各组大鼠踝关节滑膜组织，浸泡于 4%多聚甲醛中，脱钙后包埋于石蜡中制成组织块，随后采用苏木精-伊红（HE）染色，显微镜下观察滑膜组织病理变化。

2.6 供试品溶液的制备

取适量厚藤提取物稠膏于蒸发皿中，55 ℃水浴烘干，取 0.1 g 提取物粉末，精密称定，加入 20 mL 50%甲醇，密塞称定质量，超声提取 30 min，冷却至室温后再次称定质量，以 50%甲醇补足质量，摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.7 对照品溶液的制备

分别取秦皮乙素、咖啡酸、异槲皮苷、异莨菪亭、绿原酸对照品适量，精密称定，加入甲醇配制成各成分质量浓度为 10 μg/mL 的混合对照品溶液。分别取异绿原酸 C、异绿原酸 B、异绿原酸 A、阿魏酸适量，加入甲醇配制成质量浓度为 10 μg/mL 的对照品溶液。

2.8 血浆样品的制备

将正常给药组、对照组、模型组、厚藤提取物高剂量组同组血浆混合，各吸取 1 mL，加入 3 倍量甲醇-乙腈（1∶1）溶液沉淀蛋白，涡旋 3 min，4 ℃、15 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，氮气吹干至固状，残渣加入 200 μL 甲醇，超声 3 min，涡旋混匀 1 min，4 ℃、15 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液进行分析。

2.9 厚藤成分库的建立

通过 CNKI、PubMed 等数据库检索与厚藤相关

的文献，对厚藤的化学成分进行总结，共检索到 119 个化学成分；利用 ChemBioDraw 软件、PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）、Chemicalbook（https://m.chemicalbook.com/）等平台收集化学成分的名称、分子式、结构式、相对分子质量等信息。

2.10 色谱条件

Hypersil Gold 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.9 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液（A）-乙腈（B），洗脱程序：0～30 min，5%～95% B；体积流量为 0.4 mL/min；进样量为 3 μL；柱温为 40 ℃。

2.11 质谱条件

双喷雾 TurboV 离子源；正/负离子扫描方式；扫描范围为 *m/z* 100～1500；正离子源电压为 5500 V，负离子源电压为 −4500 V；离子源温度为 600 ℃；雾化气压力为 55 psi（1 psi＝6.895 kPa），辅助气压力为 55 psi，气帘气压力为 35 psi；母离子碰撞能量为 −10 V；去簇电压为 −80 V；子离子碰撞能量为 −35 V。

2.12 数据处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 Graphpad Prism 8.0 软件处理，组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 厚藤提取物对 AGA 大鼠踝关节肿胀指数的影响

如表 1 所示，与对照组比较，造模后第 4～24 小时，模型组大鼠踝关节肿胀指数显著升高（$P<0.01$），于造模后第 12 小时达到肿胀高峰。与模型组比较，造模后第 24～48 小时，厚藤提取物组大鼠踝关节肿胀指数显著降低（$P<0.05$、0.01）。

3.2 厚藤提取物对 AGA 大鼠右后足垫厚度的影响

如表 2 所示，与对照组比较，造模后第 4～24 小时，模型组大鼠右后足垫厚度显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，造模后第 8、24 小时，厚藤提取物组大鼠右后足垫厚度显著降低（$P<0.05$、0.01）。

3.3 厚藤提取物对 AGA 大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平显著升高（$P<0.05$、0.01）；与模型组比较，厚藤提取物高、中剂量组大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平显著降低（$P<0.05$）。

表 1 厚藤提取物对 AGA 大鼠踝关节肿胀指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 1 Effect of *I. pes-caprae* extract on joint swelling index of AGA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	造模后				
		第 4 小时	第 8 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时
对照	—	0.042±0.102	0.022±0.065	0.017±0.089	0.006±0.086	0.028±0.053
模型	—	0.379±0.112$^{\#\#}$	0.641±0.125$^{\#\#}$	0.766±0.151$^{\#\#}$	0.618±0.160$^{\#\#}$	0.446±0.125$^{\#\#}$
秋水仙碱	0.27	0.250±0.159	0.310±0.225**	0.447±0.193**	0.425±0.080**	0.242±0.093**
厚藤提取物	928.80	0.299±0.180	0.449±0.326	0.616±0.320	0.391±0.211**	0.241±0.200**
	464.40	0.309±0.180	0.457±0.219	0.619±0.234	0.407±0.143**	0.289±0.131*
	222.90	0.281±0.166	0.451±0.194	0.606±0.187	0.398±0.193**	0.288±0.184*

与对照组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$，下表同

$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* model group, same as below tables

表 2 厚藤提取物对 AGA 大鼠右后足垫厚度的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 2 Effect of *I. pes-caprae* extract on thickness of right hindfoot pad of AGA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	造模后					
		第 0 小时	第 4 小时	第 8 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时
对照	—	6.04±0.04	6.14±0.11	6.19±0.08	6.19±0.08	6.05±0.18	6.09±0.06
模型	—	6.01±0.06	6.37±0.09$^{\#\#}$	7.19±0.29$^{\#\#}$	7.30±0.41$^{\#\#}$	6.85±0.27$^{\#\#}$	6.52±0.18$^{\#\#}$
秋水仙碱	0.27	6.00±0.11	6.26±0.11**	6.60±0.22**	6.66±0.24**	6.59±0.28*	6.43±0.20
厚藤提取物	928.80	6.04±0.10	6.33±0.14	6.74±0.39**	6.98±0.51	6.58±0.36*	6.40±0.31
	464.40	6.02±0.06	6.30±0.13	6.74±0.30**	6.99±0.45	6.55±0.15**	6.45±0.16
	222.90	5.98±0.12	6.40±0.10	6.87±0.30*	7.03±0.29	6.61±0.15*	6.48±0.16

表 3 厚藤提取物对 AGA 大鼠血清中 IL-1β、MIP-1α 和 MIP-2 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 3 Effect of *I. pes-caprae* extract on levels of IL-1β, MIP-1α, and MIP-2 in serum of AGA rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg^{-1})	IL-1β/(pg·mL^{-1})	MIP-1α/(pg·mL^{-1})	MIP-2/(pg·mL^{-1})
对照	—	182.87±102.08	163.61±38.04	26.92±10.81
模型	—	389.97±193.91$^{\#}$	294.11±112.13$^{\#}$	49.07±14.33$^{\#\#}$
秋水仙碱	0.27	152.09±61.15**	162.13±31.43*	26.38±6.04**
厚藤提取物	928.80	178.62±181.47*	184.61±55.92*	28.61±13.39*
	464.40	197.55±193.36*	194.79±124.61*	34.82±12.95*
	222.90	245.47±174.07	226.10±71.40	44.32±8.39

3.4 厚藤提取物对 AGA 大鼠滑膜组织病理变化的影响

如图 1 所示，对照组大鼠滑膜结构清晰完整，滑膜组织无炎性细胞浸润及纤维组织增生；模型组大鼠滑膜衬里层较多炎性细胞浸润，以核分叶的中性粒细胞和圆形深染的淋巴细胞为主，有少量滑膜细胞变性坏死，坏死细胞核固缩或崩解、胞质淡染，血管轻度充血且扩张，管腔内充斥大量红细胞；秋水仙碱组和厚藤提取物高、中剂量组大鼠滑膜结构较清晰，少量衬里层组织脱落，衬里层内炎性细胞浸润明显减轻；厚藤提取物低剂量组大鼠滑膜仍有轻度充血及炎性细胞浸润现象。

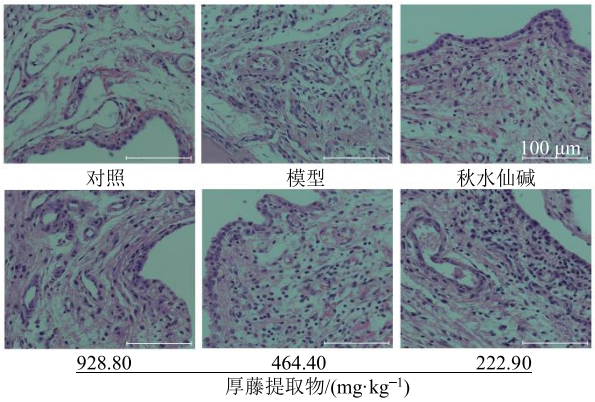


图 1 厚藤提取物对 AGA 大鼠滑膜组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of *I. pes-caprae* extract on synovial tissue pathological changes of AGA rats (HE, × 400)

3.5 厚藤提取物中的化学成分及其质谱裂解规律解析

采用 LC-Q-TOF-MS/MS 技术，参照厚藤成分库、SCIEX 数据库、对照品比对及现有文献报道，对厚藤提取物中的主要成分进行分析，共鉴定出 53 个化学成分，包括树脂糖苷类成分 3 个、黄酮类成分 10 个、有机酸类成分 26 个、香豆素类成分 5 个、核苷类成分 2 个、氨基酸类成分 2 个、萜类成分 2 个、木脂素类成分 1 个、刺五加苷类成分 1 个和维生素类成分 1 个，并推测了部分化学成分的裂解途径。厚藤提取物总离子流图见图 2，鉴定成分及碎片信息见表 4。

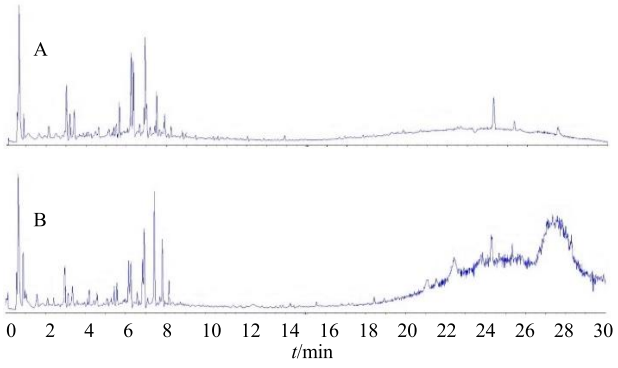


图 2 负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下厚藤水提取物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of *I. pes-caprae* extract in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

表 4 厚藤提取物中化学成分的鉴定

Table 4 Identification of compound in *I. pes-caprae* extract

序号	t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量(*m/z*)		误差/($\times10^{-6}$)	碎片离子(*m/z*)	名称	类别
				理论值	测定值				
1	0.66	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.056 1	191.054 3	−9.7	173.045 0, 127.039 4, 109.029 2	奎尼酸[10]	有机酸类
2	0.69	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.019 7	191.019 3	−2.0	129.019 2, 111.007 9	柠檬酸[11]	有机酸类
3	0.70	$C_4H_6O_5$	$[M-H]^-$	133.014 3	133.014 4	0.9	115.003 5	苹果酸[12]	有机酸类
4	0.90	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	$[M+H]^+$	268.104 0	268.103 1	−3.5	136.062 1, 119.036 9	腺苷[10]	核苷类
5	0.91	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	$[M-H]^-$	282.084 4	282.084 5	0.4	150.042 0, 133.015 6	鸟苷[13]	核苷类
6	0.99	$C_4H_6O_4$	$[M-H]^-$	117.019 3	117.019 1	−1.8	117.019 2, 116.928 7	琥珀酸	有机酸类
7	1.13	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.014 3	169.014 4	0.8	125.023 9	没食子酸[14]	有机酸类
8	1.65	$C_9H_{11}NO_2$	$[M-H]^-$	164.071 7	164.071 8	0.8	147.045 1, 118.065 6, 103.055 3	苯丙氨酸[15]	氨基酸类
9	1.93	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	153.019 3	153.019 1	−1.7	109.029 2	原儿茶酸[14]	有机酸类
10	2.14	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.087 2	−2.3	191.054 8, 179.033 9, 135.044 1	新绿原酸[10]	有机酸类
11	2.45	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M-H]^-$	203.082 6	203.082 4	−1.2	186.054 2, 159.093 2, 116.050 7	色氨酸[16]	氨基酸类
12	2.50	$C_{15}H_{16}O_9$	$[M-H]^-$	339.072 2	339.072 7	1.7	177.019 5, 133.030 4	秦皮甲素[10]	香豆素类
13	2.68	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	137.024 4	137.024 1	−2.7	137.024 3, 119.014 1, 108.021 6	原儿茶醛[11]	有机酸类
14	3.02	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.086 8	−2.9	191.054 0, 127.040 0	绿原酸[10]	有机酸类
15	3.13	$C_{10}H_8O_4$	$[M+H]^+$	193.049 5	193.049 6	0.5	178.027 9, 150.033 3, 133.030 6, 122.038 4	莨菪亭	香豆素类
16	3.19	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.086 6	−3.4	191.055 0, 179.033 9, 173.044 3, 135.044 0	隐绿原酸[10]	有机酸类
17	3.24	$C_9H_6O_4$	$[M+H]^+$	179.033 9	179.033 4	−2.7	151.040 3, 123.045 6, 105.034 9	秦皮乙素[10]	香豆素类
18	3.28	$C_9H_{10}O_2$	$[M-H]^-$	149.060 8	149.061 3	3.0	149.062 6, 121.029 7	4-乙烯基愈创木酚	有机酸类
19	3.33	$C_8H_8O_3$	$[M-H]^-$	151.040 1	151.040 2	1.0	136.017 7, 108.021 6	尼泊金甲酯	有机酸类

续表 4

序号	t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量(*m/z*)		误差/($\times10^{-6}$)	碎片离子(*m/z*)	名称	类别
				理论值	测定值				
20	3.40	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.035 0	179.034 4	−3.2	135.043 8, 107.050 1	咖啡酸[14]	有机酸类
21	3.44	$C_{17}H_{14}O_6$	$[M-H]^-$	313.071 8	313.072 4	1.9	269.081 6, 147.045 3, 129.034 2, 101.040 2	3,7-dihydroxy-5,4′-dimethoxy flavone	黄酮类
22	3.89	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	$[M+H]^+$	377.145 6	377.145 5	−0.2	377.147 8, 243.089 7, 172.089 7	维生素 B2[17]	维生素类
23	4.18	$C_{21}H_{20}O_{13}$	$[M+H]^+$	481.097 7	481.097 6	−0.1	319.046 9	杨梅素-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖苷[18]	黄酮类
24	4.51	$C_{27}H_{30}O_{17}$	$[M-H]^-$	625.141 0	625.141 8	1.3	300.028 1, 271.023 8	白麻苷[19]	黄酮类
25	4.54	$C_9H_6O_2$	$[M+H]^+$	147.044 1	147.043 5	−3.8	119.050 9	香豆素	香豆素类
26	4.56	$C_{10}H_{10}O_3$	$[M+H]^+$	179.070 3	179.070 6	1.7	133.066 4, 105.035 6	蜂蜜曲菌素	有机酸类
27	4.68	$C_{32}H_{42}O_{16}$	$[M-H]^-$	681.240 0	681.240 9	1.3	357.135 7, 151.039 3	松脂醇二葡萄糖苷[20]	木脂素类
28	5.09	$C_{10}H_8O_4$	$[M+H]^+$	193.049 5	193.048 9	−3.3	178.028 0, 150.033 2, 133.029 9, 122.038 1	异莨菪亭[14]	香豆素类
29	5.27	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M+H]^+$	195.065 2	195.065 9	3.6	177.056 4, 149.062 1, 145.030 0, 117.034 8	阿魏酸[14]	有机酸类
30	5.31	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.146 1	609.144 6	−2.4	300.028 0, 271.025 1	芦丁[14]	黄酮类
31	5.33	$C_{34}H_{46}O_{18}$	$[M+FA-H]^-$	787.266 6	787.268 2	2.0	579.209 0, 417.156 5	刺五加苷[21]	酚酸苷类
32	5.52	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 2	463.086 1	−4.5	300.025 5, 301.034 2, 271.024 1, 255.029 5	异槲皮苷[22]	黄酮类
33	5.66	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 2	463.086 7	−3.3	301.033 6, 300.025 3, 271.023 5, 255.029 2	槲皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷	黄酮类
34	5.84	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M-H]^-$	593.151 2	593.151 3	0.2	284.032 7	山柰酚-3-*O*-芸香糖苷[23]	黄酮类
35	6.04	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	287.055 0	287.055 5	1.7	153.020 2, 121.028 8	山柰酚[14]	黄酮类
36	6.11	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.093 3	447.093 5	0.4	284.032 2, 255.029 6, 277.035 0	紫云英苷[24]	黄酮类
37	6.24	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.119 5	515.117 3	−4.3	353.085 2, 191.054 3, 179.032 9, 173.043 5	异绿原酸 B[20]	有机酸类
38	6.35	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.119 5	515.117 1	−4.6	353.085 3, 191.053 9, 179.033 1, 173.045 2	异绿原酸 A[20]	有机酸类
39	6.36	$C_{11}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	209.080 8	209.081 9	5.1	177.057 0, 103.055 2	咖啡酸乙酯	有机酸类
40	6.51	$C_{26}H_{32}O_{11}$	$[M-H]^-$	519.187 2	519.186 8	−0.6	357.134 5, 151.039 9, 136.016 2	松脂素-β-*D*-吡喃葡萄糖苷[14]	有机酸类
41	6.75	$C_{22}H_{26}O_8$	$[M-H]^-$	417.155 5	417.156 3	1.9	387.106 9, 181.051 5, 166.027 3, 137.024 8	丁香脂素[20]	有机酸类
42	6.94	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.119 5	515.116 7	−5.4	353.084 7, 191.054 6, 179.033 0, 173.043 4	异绿原酸 C[20]	有机酸类
43	8.09	$C_{26}H_{26}O_{12}$	$[M-H]^-$	529.135 2	529.133 7	−2.6	367.103 3, 353.087 1, 179.034 9, 173.045 1	3,5-二咖啡酰奎尼酸甲酯或 4,5-二咖啡酰奎尼酸甲酯或 3,4-二咖啡酰奎尼酸甲酯[25]	有机酸类
44	8.26	$C_{34}H_{30}O_{14}$	$[M-H]^-$	661.156 3	661.156 5	0.3	515.117 4, 499.125 5, 353.088 5, 191.056 0, 179.035 2	3,5-二-*O*-咖啡酰-4-*O*-香豆酰奎尼酸	有机酸类
45	9.39	$C_{18}H_{16}O_6$	$[M+H]^+$	329.102 0	329.102 5	1.7	314.079 1, 299.055 9	4′-羟基-3,5,7-三甲氧黄酮	黄酮类
46	10.96	$C_{36}H_{58}O_{10}$	$[M+FA-H]^-$	695.401 2	695.401 4	0.2	487.343 5	长梗冬青苷[26]	萜类
47	11.03	$C_{43}H_{36}O_{16}$	$[M-H]^-$	807.193 1	807.192 0	−1.3	645.161 8, 499.125 5, 377.093 7, 179.035 5	4,5-di-*O*-caffeoyl-1,3-di-*O*-coumaroylquinicacid	有机酸类
48	11.11	$C_{15}H_{20}O_2$	$[M+H]^+$	233.153 6	233.153 7	0.3	215.145 3, 187.148 2, 159.119 0, 109.104 0	异土木香内酯或木香烃内酯[27]	萜类
49	12.57	$C_{42}H_{62}O_{16}$	$[M-H]^-$	821.396 5	821.395 8	−0.9	351.057 3	甘草酸[28]	有机酸类
50	18.94	$C_{13}H_{14}O_2$	$[M+H]^+$	203.106 7	203.107 1	2.0	185.099 8, 161.097 8, 121.066 5	2-hydroxy-4,4,7-trimethyl-1(4*H*)-naphthalenone	有机酸类

续表 4

序号	t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量(*m/z*) 理论值	相对分子质量(*m/z*) 测定值	误差/($\times10^{-6}$)	碎片离子(*m/z*)	名称	类别
51	23.91	$C_{61}H_{106}O_{24}$	$[M+FA-H]^-$	1 267.705 6	1 267.705 3	−0.2	1 221.700 4, 1 049.557 3, 417.285 8, 163.061 6	pescapreins XXX	树脂糖苷类
52	24.82	$C_{62}H_{108}O_{24}$	$[M+FA-H]^-$	1 281.721 3	1 281.715 4	−4.6	1 235.719 8, 1 133.651 6, 527.322 4, 417.287 3	(11*S*)-牵牛脂酸-11-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→3)-*O*-[4-*O*-(2*S*)-2-甲基-丁酰基-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)]-*O*-(2-*O*-正十二烷酰基)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-*D*-吡喃木糖苷	树脂糖苷类
53	25.75	$C_{63}H_{110}O_{24}$	$[M+FA-H]^-$	1 295.736 9	1 295.736 1	−0.6	1 249.733 4, 1 147.666 7, 1 049.555 6, 417.286 5	(11*S*)-牵牛脂酸-11-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→3)-*O*-[4-*O*-(2*S*)-2-甲基-丁酰基-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)]-*O*-(2-*O*-正十二烷酰基)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→3)-β-*D*-吡喃岩藻糖苷	树脂糖苷类

3.5.1　树脂糖苷类化合物质谱分析　树脂糖苷类化合物又称大环内酯类化合物，其结构复杂，一般由长链脂肪酸作为苷元与不同数量、种类的单糖形成内酯，主要分布于旋花科番薯属植物中[29]。以 pescapreins XXX 为例，负离子模式下，得到 *m/z* 1 267.705 3 $[M+FA-H]^-$的准分子离子峰；二级碎片离子 *m/z* 1 221.700 4 为丢失甲酸形成的$[M-H]^-$的离子峰，*m/z* 1 049.557 3 为丢失一长链脂肪酸形成的碎片离子$[M-H-C_{10}H_{20}O_2]^-$，*m/z* 417.285 8 为 *m/z* 1 049.557 3 发生糖苷键断裂形成的$[M-H-C_{10}H_{20}O_2-C_{29}H_{44}O_{15}]^-$的碎片离子，*m/z* 163.061 6 为 *m/z* 417.285 8 丢失长链脂肪酸形成的$[M-H-C_{10}H_{20}O_2-C_{29}H_{44}O_{15}-C_{16}H_{30}O_2]^-$；根据该化合物的精确相对分子质量、二级碎片裂解方式，鉴定为 pescapreins XXX，其二级质谱图见图 3，可能的裂解途径见图 4。

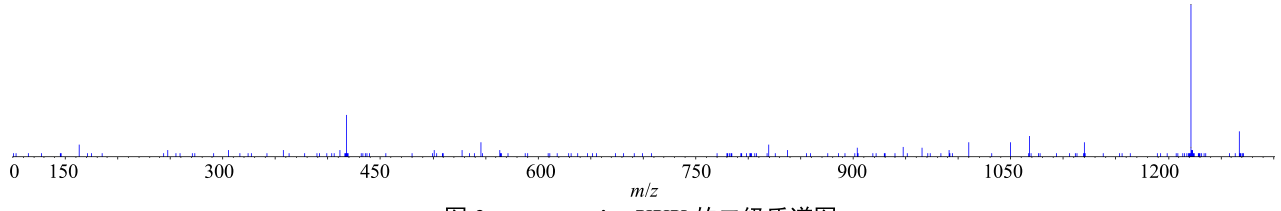


图 3　pescapreins XXX 的二级质谱图

Fig. 3　Secondary ion mass spectrometry of pescapreins XXX

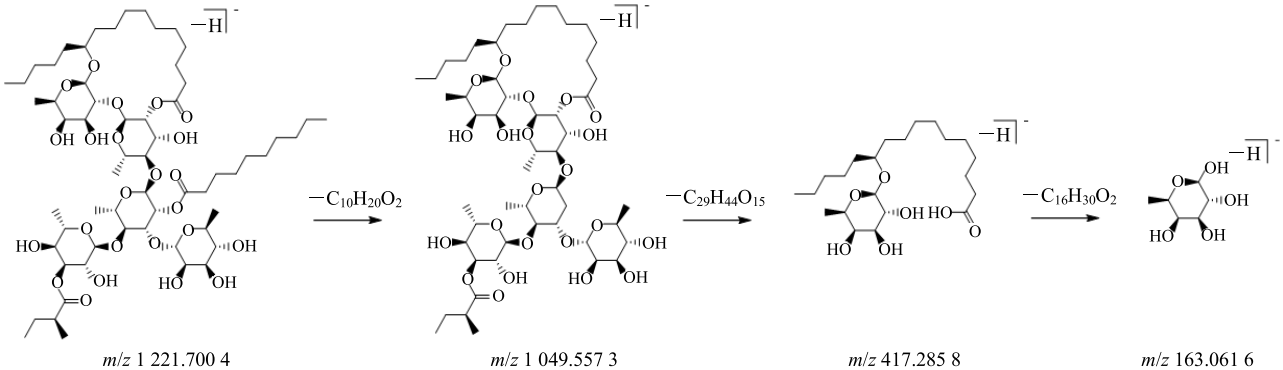


图 4　pescapreins XXX 的质谱主要断裂途径

Fig. 4　Main fragmentation pathways in mass spectrometry of pescapreins XXX

3.5.2 黄酮类化合物质谱分析 黄酮类化合物在自然界广泛存在，是中草药的主要有效成分之一。以化合物 **32**、**33** 为例，在负离子模式下，t_R 分别为 5.52、5.66 min，分别得到 *m/z* 463.086 1 $[M-H]^-$和 *m/z* 463.086 7 $[M-H]^-$的准分子离子峰，在二级质谱信息中都具有 *m/z* 300、301、271、255 的碎片，分别对应$[M-H-Glc-H]^-$、$[M-H-Glc]^-$、$[M-H-Glc-CO-2H]^-$、$[M-H-Glc-CO-OH-H]^-$，根据其裂解规律文献对照[22]推测为异槲皮苷或槲皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，因 t_R 不同，依据反相色谱柱洗脱原理，鉴定化合物 **32** 为异槲皮苷，化合物 **33** 为槲皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷，其二级质谱图见 5，以异槲皮苷为例，可能的裂解途径见图 6。

3.5.3 有机酸类化合物质谱分析 厚藤含有的有机酸类成分较多，主要为 2～3 种成分的同分异构体及其衍生物的奎尼酸类成分，在二级质谱中容易丢失 H_2O、CO_2 等分子。化合物 **37**、**38**、**42** 的 t_R 分别为 6.24、6.35、6.94 min，在负离子模式下，得到相同 *m/z* 515 $[M-H]^-$的分子离子峰，在二级质谱中，因失去 2 个咖啡酰基，具有 *m/z* 353、191、179、173 的特征性碎片离子，推测为异绿原酸。异绿原酸 B 对照品的 t_R 为 6.14 min，异绿原酸 A 对照品的 t_R 为 6.26 min，异绿原酸 C 对照品的 t_R 为 6.80 min，都具有 *m/z* 353、191、179、173、135 的二级碎片，根据与对照品比对、反相色谱柱洗脱原理及文献对照[20]，推测化合物 **37**、**38**、**42** 分别为异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C。以异绿原酸 A 为例，其二级质谱图见图 7，可能的断裂途径见图 8。

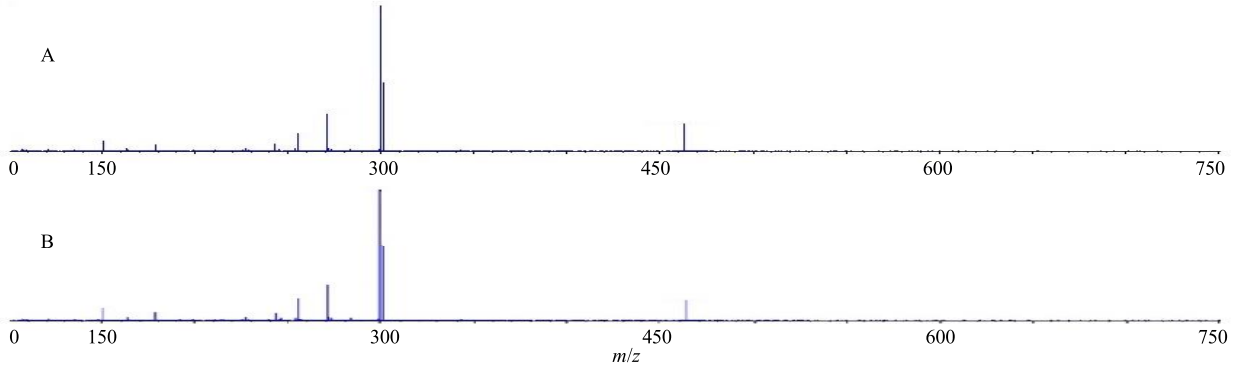


图 5 异槲皮苷 (A) 和槲皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (B) 的二级质谱

Fig. 5 Secondary ion mass spectrometry of isoquercitrin (A) and quercetin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside (B)

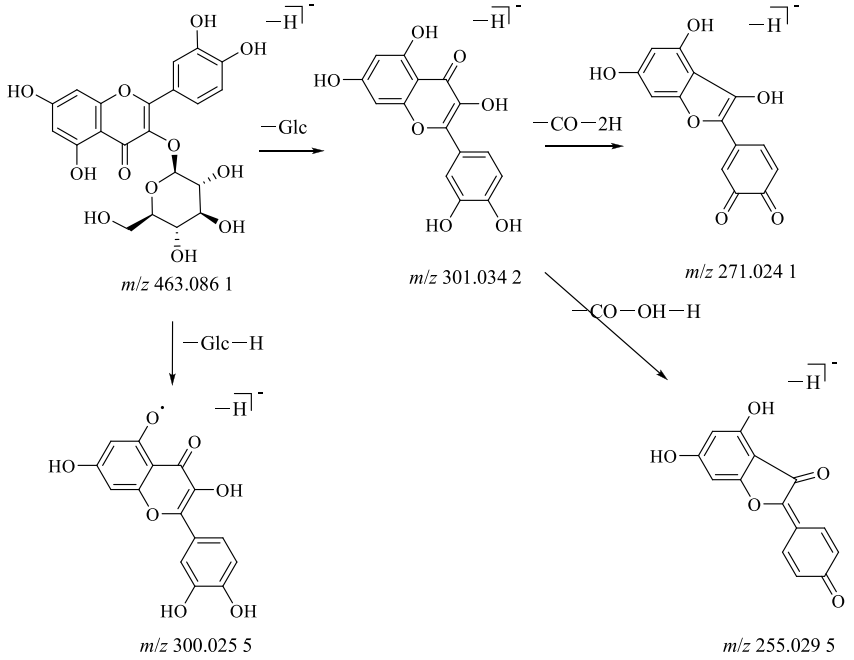


图 6 异槲皮苷的质谱主要断裂途径

Fig. 6 Main fragmentation pathways in mass spectrometry of isoquercitrin

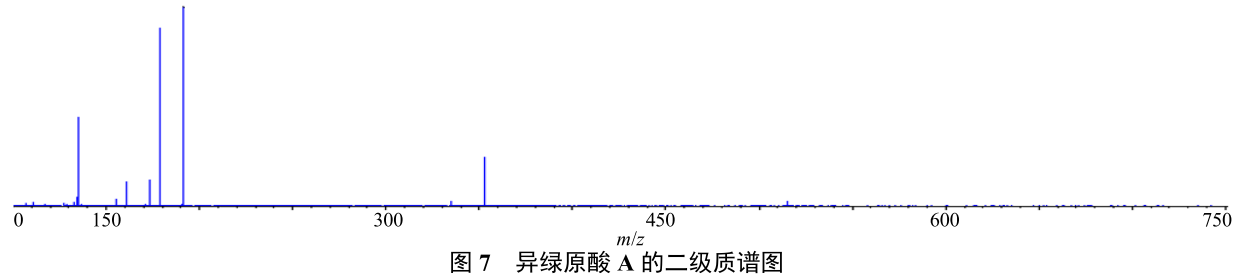


图 7　异绿原酸 A 的二级质谱图

Fig. 7　Secondary ion mass spectrometry of isochlorogenic acid A

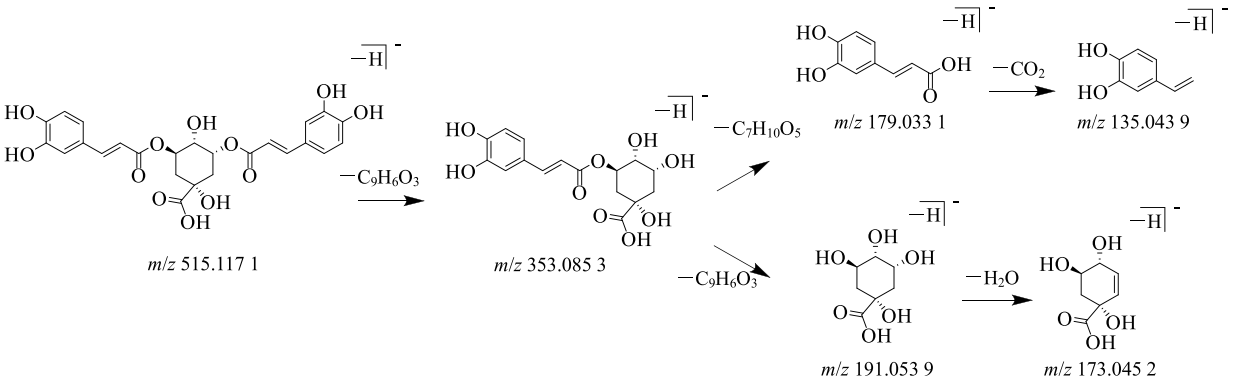


图 8　异绿原酸 A 的质谱主要断裂途径

Fig. 8　Main fragmentation pathways in mass spectrometry of isochlorogenic acid A

3.5.4　香豆素类化合物质谱分析　以化合物 **12** 为例，t_R 为 2.50 min，准分子离子峰为 *m/z* 339.072 7 $[M-H]^-$，二级质谱信息显示有 *m/z* 177.019 5、133.030 4，是由准分子离子丢失 1 个 Glc，继续丢失 1 个 CO_2 形成的碎片离子，根据该化合物一级质谱信息、二级裂解方式及文献报道[10]，鉴定为秦皮甲素，其二级质谱图见图 9，可能的裂解途径见图 10。

化合物 **28** 的 t_R 为 5.09 min，在正离子模式下得到 *m/z* 193.048 9 $[M+H]^+$的准分子离子峰，以该母离子进行 MS/MS 扫描，得到二级碎片离子 *m/z* 178.028 0，为准分子离子丢失 1 分子 CH_3 形成；碎片离子 *m/z* 133.029 9 为准分子离子丢失 1 分子 CH_3OH 继而丢失 1 分子 CO 形成；碎片离子 *m/z* 150.033 2 为母离子丢失 1 分子 CH_3 后，再丢失 1

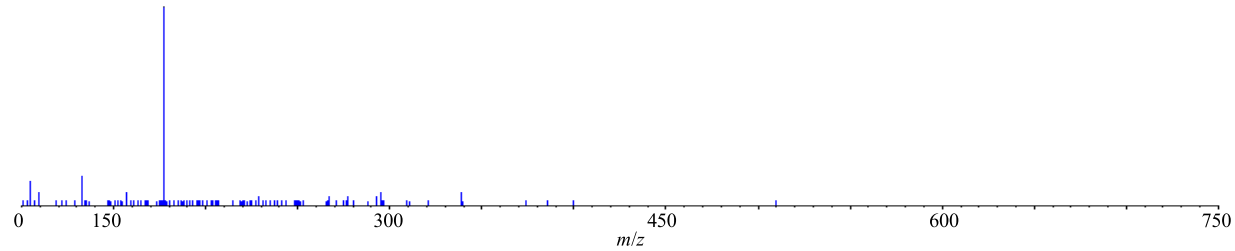


图 9　秦皮甲素的二级质谱图

Fig. 9　Secondary ion mass spectrometry of esculin

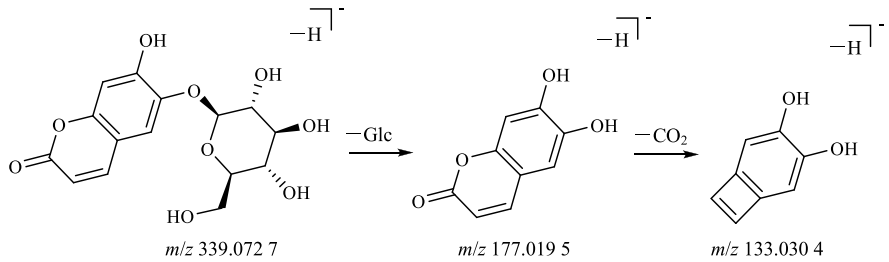


图 10　秦皮甲素的质谱主要断裂途径

Fig. 10　Main fragmentation pathways in mass spectrometry of esculin

分子 CO 形成，继续丢失 1 分子 CO 形成 *m/z* 122.038 1 的离子碎片。根据以上裂解方式，结合对照品及文献比对[14]，鉴定该化合物为异莨菪亭。其二级质谱图见图 11，可能的裂解途径见图 12。

3.6 厚藤在正常及 AGA 大鼠中入血成分鉴定

将对照组、正常给药组、模型组、厚藤高剂量组血浆样品分别在正、负离子模式下进行分析，给药组得到的数据扣除对照组的内源性成分，筛选只含在给药组血浆样品而不在对照组血浆样品的成分为入血成分；同理，厚藤高剂量组得到的数据扣除模型组的内源性成分。将入血成分的精确相对分子质量、二级碎片等信息与厚藤提取物鉴定结果比对，若一致，则为原型入血成分。从正常给药组初步鉴定 4 个入血成分，从厚藤提取物高剂量组初步鉴定出 4 个入血成分，2 组中相同成分有 3 个。入血成分鉴定信息见表 5、6，总离子流图见图 13、14，提取离子流色谱图见图 15、16。

3.7 厚藤在正常及 AGA 大鼠中入血成分分析

正常大鼠血浆中，t_R 为 0.69 min 的化合物在负离子模式下，得到 *m/z* 133.0146 $[M-H]^-$的准分子离子峰，其二级碎片主要有 *m/z* 115.005 7 $[M-H-H_2O]^-$、*m/z* 71.014 5 $[M-H-H_2O-COOH]^-$，根据

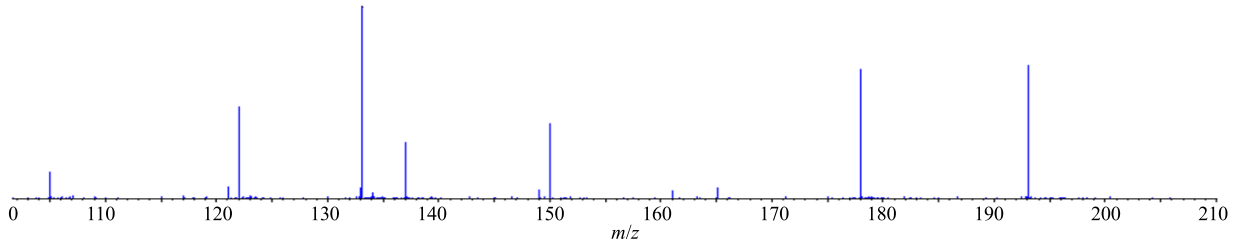


图 11 异莨菪亭的二级质谱图

Fig. 11 Secondary ion mass spectrometry of isoscopoletin

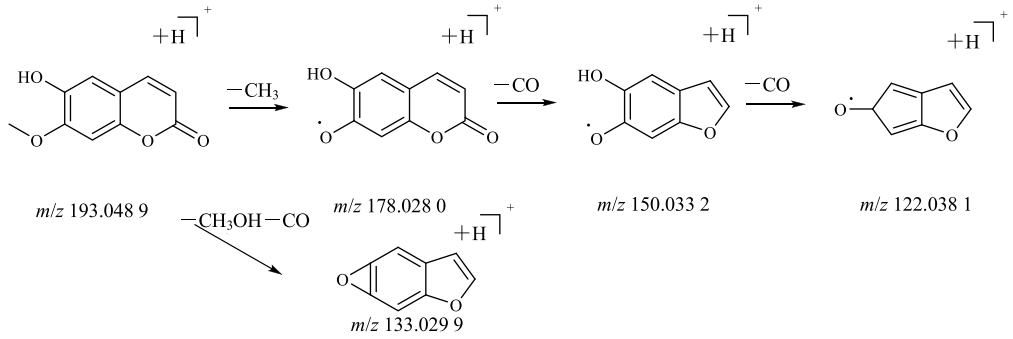


图 12 异莨菪亭的质谱主要断裂途径

Fig. 12 Main fragmentation pathways in mass spectrometry of isoscopoletin

表 5 厚藤提取物在正常大鼠中入血成分鉴定结果

Table 5 Identification results of blood components of *I. pes-caprae* extract in normal rats

t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量(*m/z*) 理论值	测定值	误差/($\times10^{-6}$)	碎片离子(*m/z*)	名称	类别
0.69	$C_4H_6O_5$	$[M-H]^-$	133.014 3	133.014 6	2.4	115.005 7, 71.014 5	苹果酸	原型成分
2.87	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.035 0	179.035 3	1.8	135.045 0	咖啡酸	原型成分或代谢产物
3.04	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 6	193.050 6	−0.2	178.025 7, 134.037 4	咖啡酸甲酯	代谢产物
6.31	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	137.024 4	137.024 5	0.8	93.034 9, 65.040 0	对羟基苯甲酸	代谢产物

表 6 厚藤提取物在 AGA 大鼠中入血成分鉴定结果

Table 6 Identification results of blood components of *I. pes-caprae* extract in pathological rats

t_R/min	分子式	离子模式	相对分子质量(*m/z*) 理论值	测定值	误差/($\times10^{-6}$)	碎片离子(*m/z*)	名称	类别
2.90	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.035 0	179.035 5	2.7	135.044 3	咖啡酸	原型成分或代谢产物
3.02	$C_{10}H_8O_4$	$[M+H]^+$	193.049 5	193.050 1	2.5	178.026 8, 150.033 0, 133.030 7, 122.039 1	莨菪亭	原型成分
3.07	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 6	193.050 8	0.6	134.037 4, 78.960 2	咖啡酸甲酯	代谢产物
6.32	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	137.024 4	137.024 4	−0.3	93.034 4, 65.039 1	对羟基苯甲酸	代谢产物

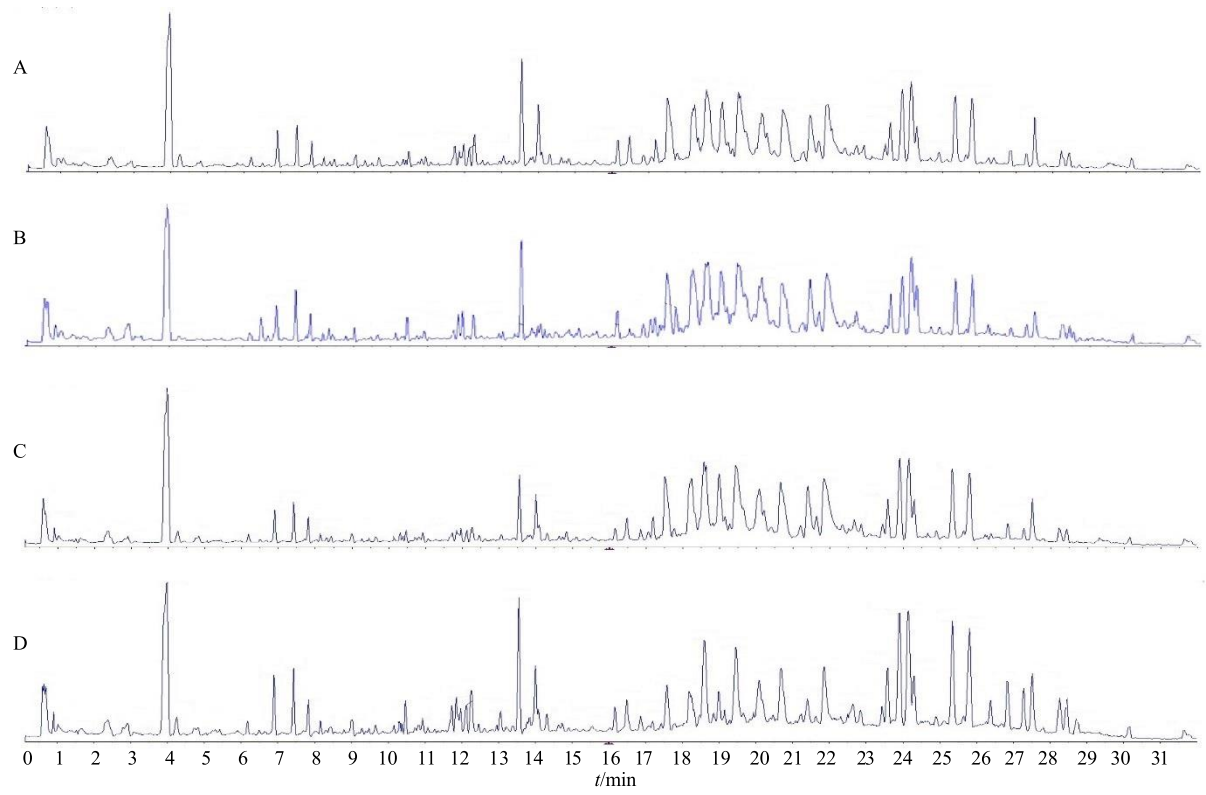


图 13　负离子模式下对照组 (A)、空白给药组 (B)、模型组 (C) 和厚藤提取物高剂量组 (D) 血浆样本的总离子流图

Fig. 13　Negative ion mode of total ion current for plasma sample in control group (A), Blank administration group (B), model group (C), and high-dose *I. pes-caprae* extract group (D)

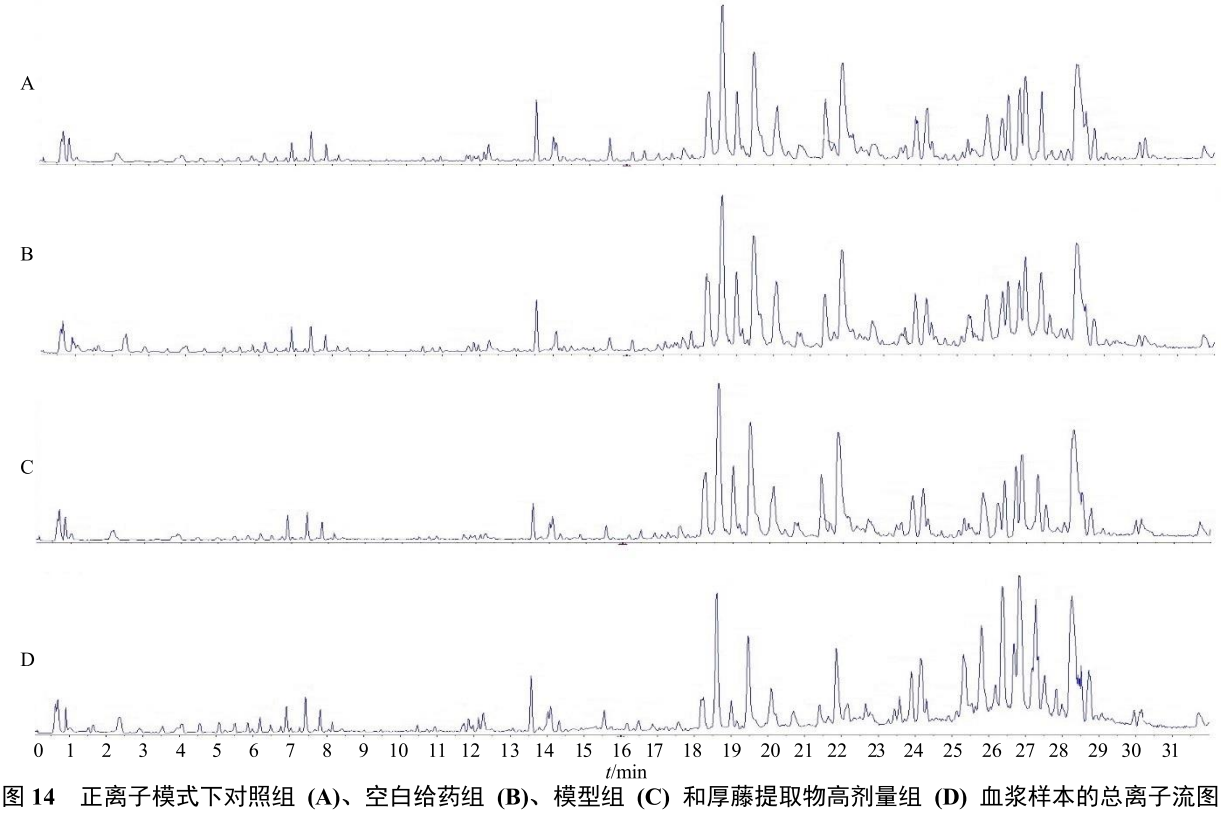


图 14　正离子模式下对照组 (A)、空白给药组 (B)、模型组 (C) 和厚藤提取物高剂量组 (D) 血浆样本的总离子流图

Fig. 14　Positive ion mode of total ion current for plasma sample in control group (A), blank administration group (B), model group (C), and high-dose *I. pes-caprae* extract group (D)

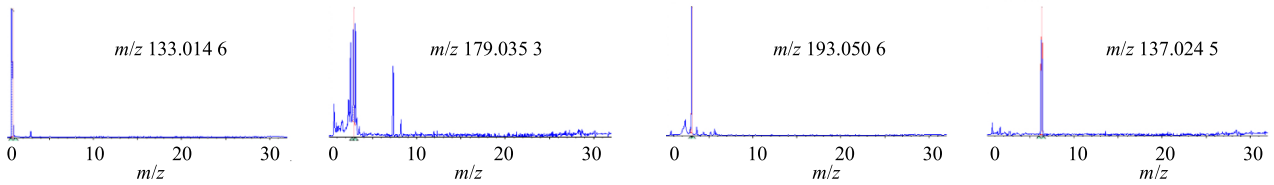


图 15 厚藤提取物在正常大鼠中入血成分的提取离子流色谱图

Fig. 15 Extracted ion chromatogram of blood components of *I. pes-caprae* extract in normal rats

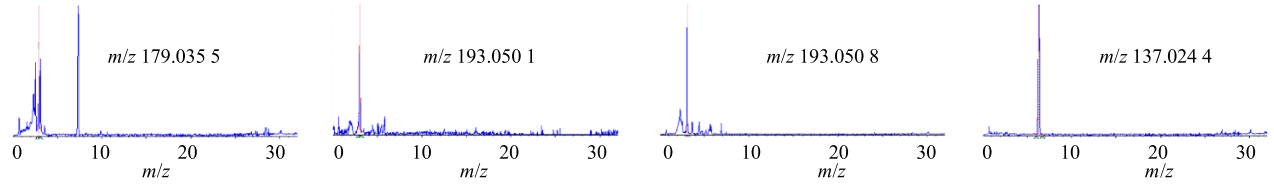


图 16 厚藤提取物在 AGA 大鼠中入血成分的提取离子流色谱图

Fig. 16 Extracted ion chromatogram of blood components of *I. pes-caprae* extract in AGA rats

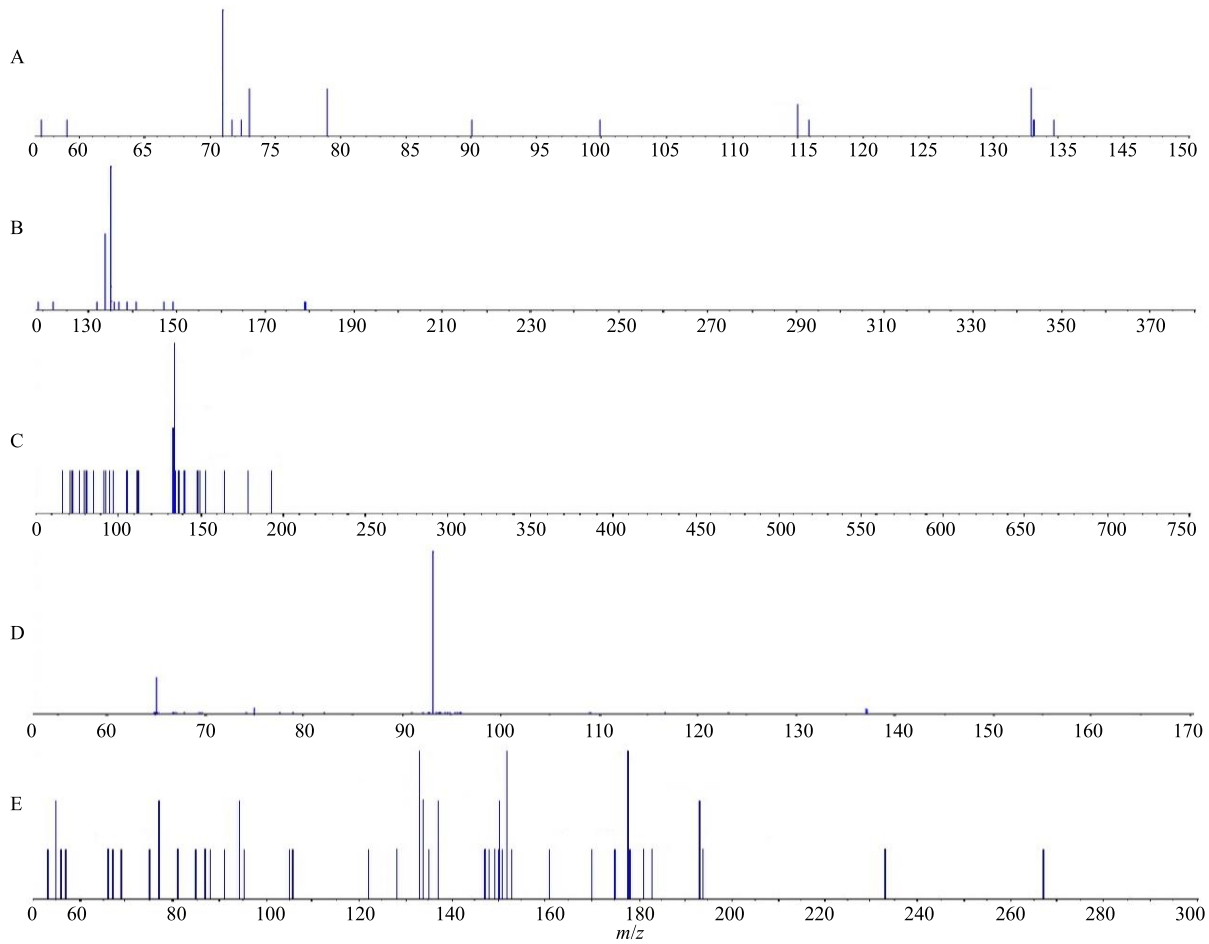
该化合物精确相对分子质量、二级质谱信息，并和厚藤提取物鉴定结果比对，鉴定为苹果酸，其二级质谱图见图 17。t_R 为 2.87 min 的化合物在负离子模式下，得到 *m/z* 179.035 3 $[M-H]^-$的准分子离子峰，二级质谱信息显示主要有 *m/z* 135.0450 $[M-H-COOH]^-$，根据该化合物精确相对分子质量、二级质谱信息，并和厚藤提取物鉴定结果比对，鉴定为咖啡酸，其二级质谱图见图 17。t_R 为 3.04 min 的化合物在负离子模式下，得到 *m/z* 193.050 6 $[M-H]^-$的准分子离子峰，比咖啡酸准分子离子峰 *m/z* 179 $[M-H]^-$多 14，提示增加 1 个 CH_2，发生甲基化反应，结合二级碎片信息 *m/z* 178.025 7 $[M-H-CH_3]^-$、*m/z* 134.037 4 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$，与咖啡酸二级质谱信息比较，符合咖啡酸甲基化过程。根据该化合物一级质谱信息、二级质谱信息并与文献比对，鉴定为咖啡酸甲酯[30]，其二级质谱图见图 17。t_R 为 6.31 min 的化合物在负离子模式下，得到 *m/z* 137.024 5 $[M-H]^-$的准分子离子峰，二级碎片主要有 *m/z* 93.034 9 $[M-H-CO_2]^-$、*m/z* 65.040 0 $[M-H-CO_2-CO]^-$，根据该化合物一级质谱信息、二级质谱信息并与文献对照[31]，鉴定为对羟基苯甲酸，推测为单咖啡酰基奎宁酸类（绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸）在体内代谢成奎尼酸而进一步代谢生成对羟基苯甲酸[32-33]，或是原儿茶酸在体内发生去羟基化反应生成，其二级质谱图见图 17。

AGA 大鼠血浆中，t_R 为 3.02 的化合物在正离子模式下，得到 *m/z* 193.050 1 $[M+H]^+$的准分子离子峰，其二级碎片主要有 *m/z* 178.026 8 $[M+H-CH_3]^+$、*m/z* 150.033 0 $[M+H-CH_3-CO]^+$、*m/z* 133.030 7 $[M+H-CH_3-CO_2]^+$，根据该化合物精确相对分子质量、二级质谱信息，并与厚藤提取物鉴定结果比对，鉴定为莨菪亭，其二级质谱图见图 17。AGA 大鼠中移行成分除莨菪亭外，其余鉴定成分均与厚藤提取物在正常大鼠血浆中移行成分一致。

4 讨论

AGA 是尿酸钠晶体沉积所致的关节疾病，临床表现为关节红、肿、热、痛，在中医属“痹证”等范畴[34-35]。其发病机制主要涉及代谢、免疫调节与炎症反应。单钠尿酸盐作为危险信号，可活化含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3（NLR family Pyrin domain containing protein 3，NLRP3）炎症小体，产生大量 IL-1β，引起炎症反应[36]，IL-1β 在 AGA 的发病过程中起着关键作用。单钠尿酸盐晶体可迅速诱导巨噬细胞趋化因子 MIP-1α、MIP-2 水平升高，促使巨噬细胞活化[37]。本研究结果显示，与对照组比较，模型组大鼠关节、足垫显著肿胀，血清中 IL-1β、MIP-1α、MIP-2 水平均升高，滑膜组织有较多炎性细胞浸润、血管充血现象，表明 AGA 模型制备成功；与模型组比较，秋水仙碱组和厚藤提取物高、中剂量组大鼠关节及足垫肿胀明显缓解，血清中 IL-1β、MIP-1α、MIP-2 水平均降低，滑膜炎性细胞浸润减轻，表明厚藤提取物可抑制 AGA 大鼠炎症反应。

传统中药为口服中药，口服药进入机体后经历复杂的代谢过程，只有吸收入血的成分才可能发挥药效。中药血清药物化学的概念，为研究中药药效的物质基础研究提供了科学方法[38]。本研究采用 LC-Q-TOF-MS/MS 技术首先对厚藤提取物中的化



A-苹果酸　B-咖啡酸　C-咖啡酸甲酯　D-对羟基苯甲酸　E-异莨菪亭

A-malic acid　B-caffeic acid　C-methyl caffeate　D-4-hydroxybenzoic acid　E-isoscopoletin

图 17　入血成分的二级质谱图

Fig. 17　Secondary ion mass spectrometry of blood components of IP

学成分进行表征，继而对厚藤提取物在正常大鼠及 AGA 大鼠中的入血成分进行分析，结果表明，厚藤提取物中主要成分为有机酸类化合物，其中主要包括咖啡酸、绿原酸、异绿原酸等奎尼酸类化合物及其衍生物，其次为山柰酚、异槲皮苷等黄酮类化合物。有机酸类[39]和黄酮类[40]成分具有抗炎活性，与厚藤的传统药效吻合。中药血清药物化学研究的给药设计、采血时间及采血方式有多种，本研究采取与厚藤提取物高剂量组同等剂量、1 次/d、连续 7 d 的给药方式，确保中药绝大多数成分在体内血药浓度维持在一个基本稳定的水平。研究发现[41]，最佳的采血时间是在动物给药后 0.5～2 h。采血方式通常有腹主动脉采血、眼眶静脉丛采血等方法。腹主动脉采血可获得大量血液且不易发生溶血，适用于单次采血；眼眶静脉丛采血可实现短时间内多次取血，但采血量较少。因考虑与厚藤提取物在 AGA 大鼠入血成分研究的采血方式平行，若采用眼眶静脉丛多次采血可能会对大鼠产生炎症或应激反应的影响，且 AGA 为急性模型，大鼠会出现自愈现象，不能确保末次采血时动物维持在病理状态。综上，本研究采取末次给药后 1 h 腹主动脉采血。ig 厚藤提取物后，从正常大鼠血浆中鉴定出苹果酸、咖啡酸、咖啡酸甲酯、对羟基苯甲酸 4 种成分；在 AGA 大鼠血浆中鉴定出咖啡酸、莨菪亭、咖啡酸甲酯、对羟基苯甲酸 4 种成分，除莨菪亭外，其余成分均与厚藤提取物在正常大鼠血浆中移行成分一致。造成上述情况的原因可能是大鼠在正常状态和病理状态下对药物的吸收有一定差异[42]。在病理状态下检测厚藤入血成分更能体现药物临床病理状态下体内过程的特点。其中，莨菪亭为原型成分吸收入血，咖啡酸不仅是厚藤中的化学成分，也是绿原酸及其异构体（新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿

原酸 A、异绿原酸 C）水解后的代谢产物[32-33,43]，咖啡酸甲酯为咖啡酸发生甲基化反应形成，对羟基苯甲酸可由单咖啡酰基奎宁酸类代谢产生或由原儿茶酸发生去羟基化反应生成。因此，葶苈亭、咖啡酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 及原儿茶酸可作为厚藤治疗 AGA 的 Q-Marker。研究发现，咖啡酸可有效缓解类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis，RA）大鼠足肿胀和炎症细胞浸润，降低足跖中核因子-κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）、壳多糖酶 3 样蛋白 1（chitinase-3-like protein 1，CHI3L1）、IL-1β、基质金属蛋白酶-9（matrix metalloprotein-9，MMP-9）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）和半胱氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）表达，从而发挥抗 RA 作用[44]。原儿茶酸能够抑制 NF-κB 和蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白（Akt/mTOR）信号通路，从而抑制 RA 成纤维样滑膜细胞的增殖与迁移[45]。异绿原酸 A 抗炎活性可能与抑制 NLRP3 炎性复合体激活和 NF-κB 磷酸化表达有关[46]。绿原酸和咖啡酸可通过清除细胞内活性氧自由基（reactive oxygen species，ROS），抑制 p38 级联磷酸化和 NF-κB 信号通路来抑制 IL-8 生成，从而发挥抗炎作用[47]。葶苈亭能够通过作用于丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）/蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC）/环磷酸腺苷反应单元结合蛋白（cAMP response element binding protein，CREB）通路，抑制成纤维样滑膜细胞产生 IL-6，从而改善佐剂型关节炎大鼠滑膜炎症和软骨破坏[48]。本研究鉴定到的原型成分较少，在二级质谱中碎片离子响应较低，推测可能为中药水煎液成分复杂，各成分含量较低，导致吸收入血的药物浓度更低。

课题组前期[49]采用薄层色谱法以咖啡酸为对照品，对厚藤进行定性鉴别，并采用高效液相色谱法检测了厚藤提取物中咖啡酸、异槲皮苷、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 6 个成分的含量，发现咖啡酸等酚酸类成分可作为厚藤的 Q-Marker。本研究基于传统功效-药理活性-活性成分的思路，运用 LC-Q-TOF-MS/MS 技术，从“有效性”和“可测性”[50]确定厚藤治疗 AGA 的 Q-Marker，为进一步开展厚藤药材质量标准、体内过程及作用机制研究提供思路和基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Chen Y, Tang Z, Huang Z, *et al*. The prevalence of gout in mainland China from 2000 to 2016: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Public Health*, 2017, 25: 521-529.

[2] 曾小峰, 陈耀龙. 2016 中国痛风诊疗指南 [J]. 浙江医学, 2017, 39(21): 1823-1832.

[3] 万春平, 李兆福, 徐翔峰, 等. 急性痛风性关节炎免疫学发病机制研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2012, 1(4): 52-55.

[4] 郭润竹, 王雄, 邹吉利, 等. 痛风治疗药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3265-3269.

[5] 邓家刚. 海洋中药学 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2018: 86-87.

[6] 管华诗, 王曙光. 中华海洋本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.

[7] 冯小慧, 邓家刚, 秦健峰, 等. 海洋中药厚藤的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 955-964.

[8] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物（Q-Marker）: 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[9] 武妤霞. 痛风方治疗痛风性关节炎急性期湿热蕴结证模型大鼠疗效研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.

[10] 杨林军, 谢彦云, 李志锋, 等. UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析中华常春藤中的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 566-572.

[11] 李杨, 刘思妍, 周鑫, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术快速识别补肾活血方的化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 111-121.

[12] 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术分析黄连中非生物碱类成分 [J]. 中药材, 2020, 43(2): 354-358.

[13] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.

[14] 孙燕, 冯峰, 黄特辉, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 技术结合 OTCML 数据库快速分析沙棘的功效成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(7): 1192-1202.

[15] 李欣, 唐力英, 许静, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的中药瓜蒌化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 201-210.

[16] 李郭帅, 马阳, 耿婷, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析复方南星止痛膏化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 298-307.

[17] 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.

[18] 孙国东, 霍金海, 王改丽, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的核桃楸皮成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 657-667.

[19] 李婷婷, 张明燕, 彭显信, 等. UPLC-ESI-QTOF-MS 技

术分析苎蓝中的化学成分 [J]. 广东化工, 2018, 45(7): 55-57.

[20] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于LC-MS联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1029-1040.

[21] 乔怀耀, 罗荣, 吴娟, 等. 舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 208-213.

[22] 谭林威, 金辉辉, 刘永祥, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析肠炎宁片中主要化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4124-4132.

[23] 谭亚杰, 濮宗进, 唐于平, 等. 基于 UPLC-QTRAP®/MS^2 方法评价不同干燥方式对益母草中化学成分的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1576-1586.

[24] 曾美玲, 沈耐涛, 吴赛伟, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 方法的三叶青化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 874-883.

[25] Asamenew G, Kim H W, Lee M K, *et al*. Comprehensive characterization of hydroxycinnamoyl derivatives in green and roasted coffee beans: A new group of methyl hydroxycinnamoyl quinate [J]. *Food Chem X*, 2019, 2: 100033.

[26] 张雯霞, 冯敏, 苗雨露, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的还贝止咳方化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3022-3034.

[27] 龙红萍, 李欣, 王婷婷, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的小儿扶脾颗粒的化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5522-5531.

[28] 杨彬, 王媛, 田梦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究法半夏中甘草化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 45-49.

[29] 尹永芹, 孔令义. 树脂糖苷-大环内酯类化合物的结构解析研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 517-518.

[30] 王加利, 田婧鋆, 顾娟, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 快速识别驱虫斑鸠菊中多酚类化合物 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(7): 881-887.

[31] 刘彦玲, 刘传鑫, 田悦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的渴络欣胶囊化学成分研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 622-629.

[32] 樊荣, 羿国娟, 鲁兰, 等. 绿原酸及其 13 种体内主要代谢物的体外抗菌作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(24): 6239-6245.

[33] 李洁, 刘子菡, 董凡, 等. 新绿原酸的大鼠体内代谢产物的 UPLC-Q-TOF MS 鉴定 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(7): 1048-1055.

[34] 娄玉钤, 李满意. “风湿病”的病名源流 [J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(1): 37-41.

[35] 周厚明, 姚真荣, 项婷, 等. 加味四妙散对急性痛风性关节炎大鼠模型疗效的影响 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1486-1488.

[36] Mangan M S J, Olhava E J, Roush W R, *et al*. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9): 688.

[37] Jaramillo M, Godbout M, Naccache P H, *et al*. Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52797-52805.

[38] 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, 2002, 4(2): 1-4.

[39] 朱文卿, 任汉书, 郑媛媛, 等. 金银花的功能性成分及其生物活性研究进展 [J/OL]. 食品工业科技, 2021-03-09. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070411.

[40] 魏江存, 欧和生, 滕红丽, 等. 黄酮类成分抗炎活性及其作用机制的研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, 2021-03-09. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20200817.1418.276.html.

[41] 张雯霞, 冯敏, 苗雨露, 等. 中药血清药物化学的应用现状概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(7): 1448-1453.

[42] Shi X Q, Tang Y P, Zhu H X, *et al*. Pharmacokinetic comparison of seven major bio-active components in normal and blood deficiency rats after oral administration of Danggui Buxue decoction by UPLC-TQ/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 169-177.

[43] 李云. 基于 LC-HR-MS^n 的小儿清解颗粒成分分析与体内代谢研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[44] Fikry E M, Gad A M, Eid A H, *et al*. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 878-886.

[45] Wu H Q, Wang J, Zhao Q, *et al*. Protocatechuic acid inhibits proliferation, migration and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 969-976.

[46] 刘杨, 段学清, 严福林, 等. 异绿原酸 A 抑制 NLRP3 炎性复合体/NF-κB 活化减轻胶原诱导型关节炎大鼠炎症反应 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1415-1419.

[47] Shin H S, Satsu H, Bae M J, *et al*. Catechol groups enable reactive oxygen species scavenging-mediated suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 signaling pathway by chlorogenic and caffeic acids in human intestinal cells [J]. *Nutrients*, 2017, 9(2): 165.

[48] Dou Y, Tong B, Wei Z, *et al*. Scopoletin suppresses IL-6 production from fibroblast-like synoviocytes of adjuvant arthritis rats induced by IL-1β stimulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(4): 1037-1043.

[49] 冯小慧, 韦棪婷, 邓家刚, 等. 海洋中药厚藤的质量标准研究 [J]. 广西科学, 2019, 26(5): 503-510.

[50] 刘昌孝. 中药质量标志物（Q-Marker）：提高中药质量标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.

[责任编辑 李亚楠]