

基于 UPLC-Q-TOF/MS 的复方鱼腥草合剂大鼠血清药物化学研究

金汉台¹, 刘建庭^{2,3#}, 王建方^{4,5}, 张洪兵^{2,3}, 刘芯亦⁶, 何厚洪^{4,5}, 许浚^{2,3*}, 张铁军^{2,3*}

1. 浙江康恩贝中药有限公司, 浙江 丽水 323400
2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462
3. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300193
4. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052
5. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052
6. 天津中医药大学, 天津 301617

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF/MS) 对复方鱼腥草合剂口服吸收收入血成分进行辨识研究, 初步阐明其可能的药效物质基础。 **方法** 采用 Acquity BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。采用电喷雾离子源, 正、负离子模式扫描, 毛细管电压负离子模式 2 kV。离子源温度 110 °C, 锥孔电压 30 V, 锥孔气体积流量 50 L/h, 氮气脱气温度 350 °C, 脱气体积流量 800 L/h, 扫描范围 *m/z* 50~2000。 **结果** 通过对复方鱼腥草合剂样品和空白组大鼠血浆色谱图及质谱碎片信息进行比对分析, 鉴定出 24 个化学成分, 包括 15 个原型成分和 9 个代谢产物。 **结论** 血浆中鉴定出的原型成分和代谢产物, 可能是复方鱼腥草合剂潜在的活性成分, 为其质量标志物研究提供了依据。

关键词: 复方鱼腥草合剂; 血清药物化学; UPLC-Q-TOF/MS; 原型成分; 代谢产物

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)10-2890-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.005

Identification of absorbed components in rat plasma after oral administration of Yuxingcao Mixture by UPLC-Q-TOF/MS

JIN Han-tai¹, LIU Jian-ting^{2,3}, WANG Jian-fang^{4,5}, ZHANG Hong-bing^{2,3}, LIU Xin-yi⁶, HE Hou-hong^{4,5}, XU Jun^{2,3}, ZHANG Tie-jun^{2,3}

1. Zhejiang CONBA Chinese Medicine Co., Ltd., Lishui 323400, China
2. State Key Laboratory of Drug Delivery and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China
3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
4. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China
5. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Technology in TCM, Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China
6. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To analyze and identify the chemical components in plasma from Yuxingcao Mixture by UPLC-Q-TOF/MS.

Method Acquity BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used for isolation and identification of chemical components in Yuxingcao Mixture with a mobile phase of acetonitrile-water containing 0.1% formic acid for gradient elution and the flow rate of

收稿日期: 2020-08-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81830111); “中医药现代化研究”重点专项 (2019YFC1711200)

作者简介: 金汉台, 男, 高级工程师, 主要从事中药工艺及质量研究。E-mail: jinht@conbagroup.com

*通信作者: 张铁军, 男, 研究员, 研究方向为中药资源、中药质量。E-mail: zhangtj@tjipr.com.cn

许浚, 男, 研究员, 从事中药药效成分和中药质量研究。E-mail: xuj@tjipr.com.cn

#并列第一作者: 刘建庭, 男, 硕士, 主要从事中药药理学研究。E-mail: liujianting@tjipr.com.cn

0.2 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the sample size was 5 µL. Electrospray ion (ESI) source were applied for the qualitative analysis under the positive and negative ion mode. The capillary voltage under negative ion mode was 2 kV, ion source temperature 110 °C, cone hole voltage 30 V, cone hole gas volume flow rate 50 L/h, nitrogen degas temperature 350 °C, degas volume flow rate 800 L/h, and scan range was m/z 50—2000. **Result** Based on UPLC-Q-TOF/MS analysis, a total of 24 compounds (including 15 prototypes and nine metabolites) were identified by comparing with ion chromatograms and pyrolysis information of mass fragmentation of the blank biological samples and Yuxingcao Mixture samples. **Conclusion** The prototype components and metabolites identified in the plasma may be the potential active components of Yuxingcao Mixture, which provides a foundation for the establishment of quality markers.

Key words: Yuxingcao Mixture; serum pharmacochimistry; UPLC-Q-TOF/MS; prototype component; metabolite

复方鱼腥草合剂由鱼腥草、黄芩、板蓝根、连翘和金银花 5 味中药组成, 具有清热解毒之功效, 临床上常用于外感风热引起的咽喉肿痛、急性咽炎、扁桃腺炎有风热证候者^[1]。由于复方鱼腥草合剂为临床疗效确切的中药复方制剂, 其化学成分组成复杂, 药效物质基础尚不清楚, 严重制约了其临床应用。

中药血清药物化学依据中药经口给药的特点, 通过分析口服给药后能进入血液的化学成分及其代谢产物, 从入血成分的角度, 研究中药的药效物质基础^[2-3]。同时, 超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF/MS) 具有快速、灵敏、高效的特点, 也为中药吸收入血成分的快速发现和辨识提供了技术方法。近年来, 质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 作为中药质量的核心, 是与药效密切相关的标志性活性化学成分, 更重要的是, Q-Marker 贯穿质量传递体系, 是质量过程控制的基础^[4-5]。因此, 对于 Q-Marker 的发现, 研究从药材到复方制剂再到血液的化学转移过程非常重要。

本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 在口服给予复方鱼腥草合剂的大鼠血浆中共鉴定出 24 个化学成分, 其中包括 15 个原型成分和 9 个代谢产物, 为其药效物质基础和 Q-Marker 的确定奠定了基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Xevo G2 Q-TOF 高分辨质谱 (美国 Waters 公司); AB204-N 电子天平 (德国 Meteler 公司); BT25S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 超声波清洗仪 (宁波新芝生物科技公司); VORTEX-5 旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造公司); TG20-WS 台式高速离心机 (长沙维尔康湘鹰离心机有限公司)。

1.2 材料

咖啡酸 (批号 110885-200102)、黄芩苷 (批号

110715-201821)、汉黄芩苷 (批号 112002-201702)、黄芩素 (批号 111595-201808)、汉黄芩素 (批号 111514-201605) 购自中国食品药品检定研究院, 连翘苷 (批号 PS006-0025MG) 购自成都普思生物科技股份有限公司, 对照品质量分数均大于 95%; 甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)、甲酸 (色谱纯), 购自天津康科德科技有限公司; 纯净水购自杭州娃哈哈饮用水有限公司; 复方鱼腥草合剂来自浙江康恩贝中药有限公司。

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 170~190 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2019-0010。置于室温 25 °C、湿度 50%, 12 h 昼夜交替, 自由采食、饮水饲养适应 1 周。实验前禁食 (不禁水) 12 h。动物实验经天津天诚新药评价有限公司批准, 伦理批准号 2019110103。

2 方法

2.1 动物实验

取 10 支 (10 mL/支) 复方鱼腥草合剂, 采用旋转蒸发仪减压浓缩至 20 mL, 作为复方鱼腥草合剂大鼠 ig 溶液。

雄性 SD 大鼠, 随机分为 2 组并称重体质量, 对照组按 10 mL/kg ig 给予纯净水, 鱼腥草合剂给药组按 10 mL/kg 的剂量 ig 给予复方鱼腥草合剂大鼠 ig 溶液。给药 1 h 后以 1% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血置肝素化试管中, 于 4 °C 条件下 3500 r/min 离心 10 min 分离血浆, 置 -20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 溶液及血浆样品的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、咖啡酸、连翘苷对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度为 1 mg/mL 的混合对照品溶液, 经 0.22 µm 微孔滤膜滤过, 供 UPLC-Q-TOF/MS 检测分析。

2.2.2 供试品溶液的制备 取复方鱼腥草合剂适

量,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过至进样小瓶中,作为复方鱼腥草合剂体外供试品溶液,供 UPLC-Q-TOF/MS 检测分析。

2.2.3 血浆样品的制备 取大鼠给药血浆样品 500 μL 置于 EP 管中,加入 2 mL 甲醇,涡旋 1 min 混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 9000 $\times g$ 离心 10 min 沉淀蛋白,上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 N_2 吹干,残渣以 200 μL 甲醇涡旋 1 min 复溶,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,续滤液供 UPLC-Q/TOF-MS 检测分析。空白血浆进行同样操作。

2.3 UPLC-MS 分析条件

2.3.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱;流动相: 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱: 0~2 min, 95% A; 2~9 min, 95%~80% A; 9~20 min, 80%~70% A; 20~24 min, 70%~62% A; 24~27 min, 62% A; 27~30 min, 62%~35% A; 30~31 min, 35%~5% A; 31~33 min, 5% A; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 Xevo G2 Q-TOF 高分辨质谱仪,配备电喷雾离子源 (ESI),负离子模式下进行监测,负离子模式毛细管电压 2 kV。离子源温度 110 $^{\circ}\text{C}$,样品锥孔电压 30 V,锥孔气体体积流量 50 L/h,氮气脱气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,脱气气体体积流量 800 L/h,扫描范围 m/z 50~2000,内参校准液亮氨酸脑啡肽用于相对分子质

量实时校正。

2.4 数据处理

使用 MasslynxTM4.1 软件进行数据处理,分析色谱图信息以及各色谱峰的质谱信息,对给药组和对照组大鼠血浆样品进行原型成分和代谢物的检测和分析。

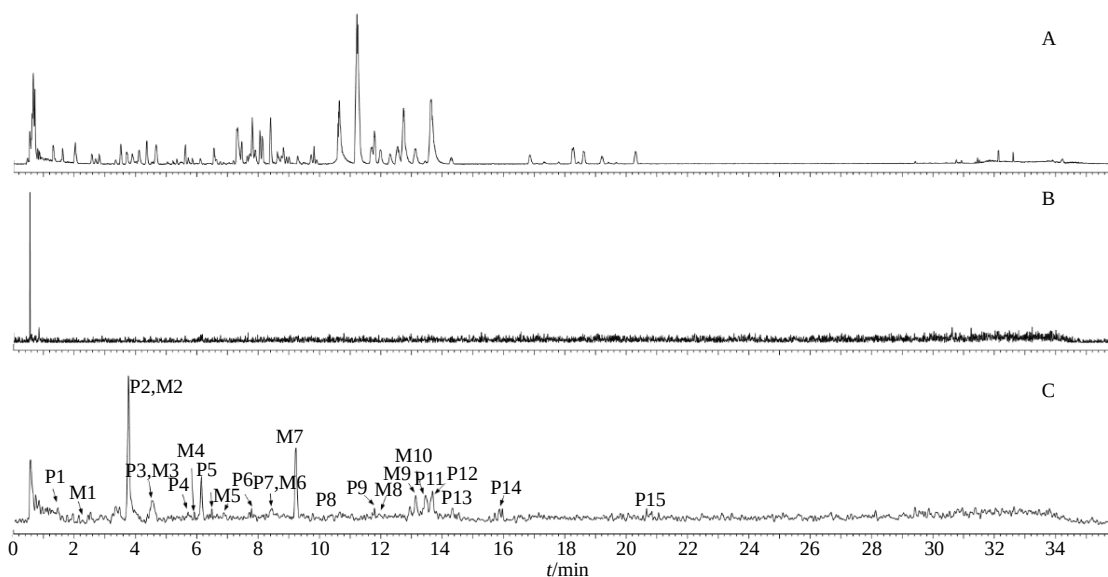
3 结果

采用“2.3”项下所述优化的 UPLC-Q-TOF/MS 条件,对复方鱼腥草合剂、大鼠空白血浆及给药血浆样品进行检测分析,在负离子模式下,复方鱼腥草合剂、大鼠空白血浆和给药血浆样品的色谱图如图 1 所示。

通过比对分析复方鱼腥草合剂制剂和给药血浆样品的色谱图,同时存在于复方鱼腥草合剂与给药血浆样品中的离子被认为是潜在的以原型形式吸收的药物成分。通过查阅 Massbank、Chemspider 等公共数据库,并结合复方鱼腥草合剂所含化学成分的相关文献报道^[6],分析质谱裂解规律,在给予复方鱼腥草合剂的大鼠血浆中共鉴定得到 24 个移行成分,包括 15 个吸收原型成分和 9 个代谢产物,其 UPLC-Q-TOF/MS 数据见表 1、2。TOF/MS 的实测值与理论值比较,精确质量数的误差均小于 1×10^{-5} 。代谢产物的主要代谢途径见图 2、3。

3.1 原型成分的鉴定

在给予复方鱼腥草合剂的大鼠血浆中鉴定出 15



A-复方鱼腥草合剂基峰色谱图 B-空白血浆提取离子流色谱图 C-给药血浆提取离子流色谱图

A-BPI of Yuxingcao Mixture B-EIC of blank plasma C-EIC of drug plasma

图 1 负离子模式色谱图

Fig. 1 Negative ion mode chromatogram

表 1 鱼腥草合剂吸收入血原型成分 LC-MS 数据

Table 1 LC-MS data of plasma prototype components of Yuxingcao Mixture

编号	t_R/min	分子式	离子模式	一级质谱	二级质谱	名称
P1	1.32	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.056 6	127、111、93、85	奎尼酸
P2	3.78	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.035 7	135	咖啡酸*
P3	4.69	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	373.114 7	193、149	断马钱子酸
P4	5.62	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	403.124 3	357、193、179	獐牙菜苷
P5	6.55	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	403.124 6	371、223、179	断氧化马钱子苷
P6	7.81	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	547.145 2	515、457、427、337	白杨素-6-阿拉伯糖-8-葡萄糖苷
P7	8.40	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	547.145 6	515、457、427、337	白杨素-6-葡萄糖-8-阿拉伯糖苷
P8	10.66	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	445.077 1	269、239	黄芩苷*
P9	11.80	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	579.206 8	395、309	连翘苷*
P10	13.44	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	445.077 1	271、253	汉黄芩素-5-O- β -D-葡萄糖苷
P11	13.65	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	459.092 7	283、268、239	汉黄芩苷*
P12	13.70	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	459.092 5	283、268、175	千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷
P13	14.33	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	489.103 3	315、300	5-羟基-6,8-二甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷
P14	15.89	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	269.045	251、239、223	黄芩素*
P15	20.50	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	283.068 5	268、239	汉黄芩素*

*与对照品对比确认

*confirmed by the standards

表 2 复方鱼腥草合剂血浆代谢成分 LC-MS 数据

Table 2 LC-MS data of plasma metabolic components of Yuxingcao Mixture

编号	t_R/min	化学式	离子模式	一级质谱	二级质谱	代谢产物
M1	2.25	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	181.050 6	135	还原咖啡酸
M2	3.89	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	197.045 5	181、137	羟基化还原咖啡酸
M3	4.58	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	355.069 2	179、161、135	咖啡酸葡萄糖醛酸结合物
M4	5.98	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	273.008 4	193、179、135	甲基化咖啡酸硫酸酯结合物
M5	6.85	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	357.080 5	181	还原咖啡酸葡萄糖醛酸结合物
M6	8.53	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	261.007 9	181、135	还原咖啡酸硫酸酯结合物
M7	9.24	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.034 4	161、135	咖啡酸异构体
M8	11.95	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	459.089 0	445、283	甲基化黄芩苷
M9	13.15	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	475.086 8	460、299、283	羟基化汉黄芩苷

个原型成分,包括 9 个黄酮醇及黄酮苷类成分,3 个环烯醚萜类、2 个有机酸类和 1 个木脂素类成分。

P2 的准分子离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 179.035 7, 确定分子式为 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$, 发生中性丢失形成碎片离子 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ m/z 135, 通过与对照品比对, 鉴定 P2 为咖啡酸。

P4 的准分子离子为 $[\text{M}+\text{HCOOH}-\text{H}]^-$ m/z 403.124 3, 确定分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 碎片离子 m/z 357 为 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 195 为 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$,

结构中可能存在 1 分子六碳糖, 通过查阅 Massbank 等数据库, 推测 P4 为獐牙菜苷。

P5 的准分子离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 403.124 6, 确定分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$, 碎片离子 m/z 371 为 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}]^-$, m/z 223 为 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 通过查阅 Massbank 等数据库, 推测 P5 为断氧化马钱子苷。

P11 的准分子离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 459.092 7, 确定分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$, 脱去葡萄糖醛酸形成碎片

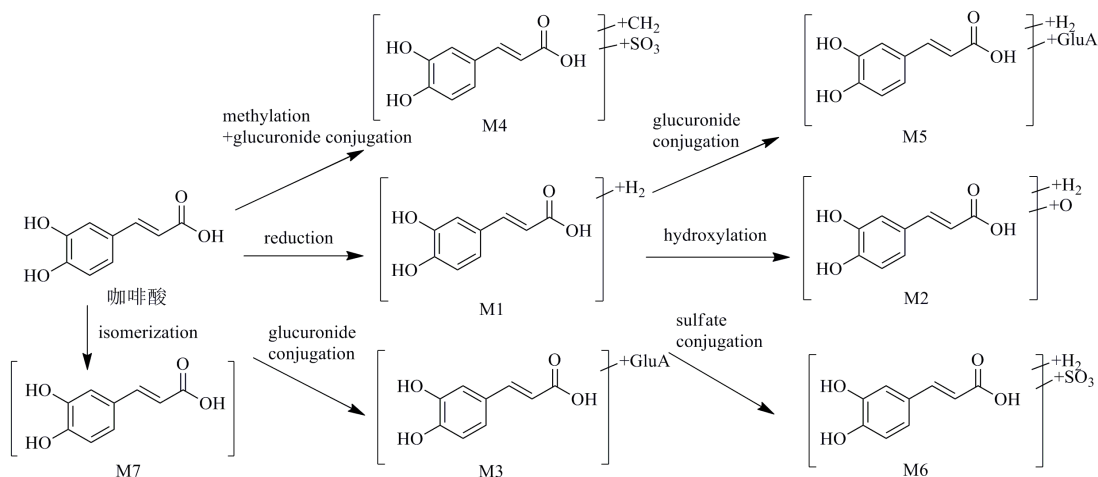


图2 咖啡酸可能的代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of caffeic acid

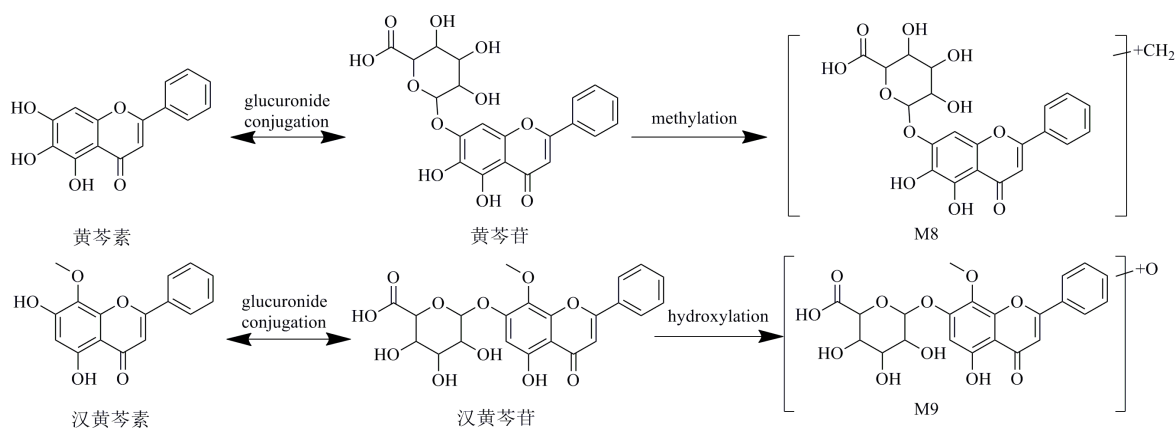


图3 汉黄芩苷和黄芩苷可能的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of wogonin and baicalin

离子 $[M-GluA-H]^-$ m/z 283.06, 再脱去 CH_2 形成 $[M-GluA-CH_3-H]^-$ m/z 268.03, 再脱去 CO 和 CO_2 分别形成碎片离子 m/z 239 和 m/z 224, 通过与对照品比对并结合文献报道^[7-9], P11 被鉴定为汉黄芩苷。通过相似的分析手段, 与对照品比对, P8、P9、P14 和 P15 被鉴定为黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷和汉黄芩素。

3.2 代谢产物的鉴定

在给予复方鱼腥草合剂的大鼠血浆中初步鉴定出 9 个代谢产物, 代谢途径包括甲基化、葡萄糖醛酸结合和硫酸酯结合等, 如图 2、3 所示。

M1 的准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 181.050 6, 确定分子式为 $C_9H_{10}O_4$, m/z 181 比咖啡酸的准分子离子 (m/z 179) 多 2 (H_2), 并且表现出相同的碎片离子 m/z 135 $[M-CH_2O_2-H]^-$, 推测 M1 为咖啡酸的还原产物。

M3 的准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 355.069 2, 其碎片离子 m/z 179 为 m/z 355 脱去葡萄糖醛酸 (176) 形成, 与咖啡酸准分子离子相同, 此外, m/z 179 再脱去 CO_2 (44) 形成碎片离子 m/z 135, 这与咖啡酸裂解方式一致, 推测 M3 为咖啡酸的葡萄糖醛酸结合物。

M4 的准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 273.006 0, 确定分子式为 $C_{10}H_{10}O_7S$, 脱去 1 分子硫酸酯基 (80) 形成 $[M-SO_3-H]^-$ m/z 193 的碎片离子, 提示经过硫酸酯结合代谢途径, 又脱去 CH_2 形成与咖啡酸的准分子离子相同的碎片离子, 提示可能是经过甲基化代谢途径, 推测 M4 为甲基化咖啡酸的硫酸酯结合物。以相似的方式, 通过与原型成分的裂解规律进行对比, 推测出 M1~M7 为咖啡酸代谢产物, 代谢途径包括了还原、甲基化、葡萄糖醛酸结合和硫酸酯结合等。

M8的准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 459.089 0, 确定分子式为 $C_{22}H_{20}O_{11}$, 与汉黄芩苷的分子式相同, 比黄芩苷的准分子离子多14(CH_2), 脱去 CH_2 形成 $[M-CH_2-H]^-$ m/z 445的碎片离子, 或脱去葡萄糖醛酸, 形成 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ m/z 283的碎片离子, 推测M8为黄芩苷的甲基化代谢产物。

M9的准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 475.086 8, 确定分子式为 $C_{22}H_{20}O_{10}$, 碎片离子 m/z 460为母离子丢失 CH_3 (15)而形成, 说明结构里含有甲基, 碎片离子 m/z 299为 m/z 475脱去葡萄糖醛酸(176)形成, m/z 283为 m/z 299脱去O(16)形成, 且与汉黄芩素准分子离子相同, 提示可能是经过羟基化代谢途径, 推测M9为汉黄芩苷的羟基化代谢产物。

4 讨论

本实验在正、负离子模式下对样品均进行了检测分析, 体外样品在正、负离子模式下均显示出峰, 但负离子响应更高, 血浆样品在负离子模式下的基质响应更低, 而峰数量未有明显变化, 故选用负离子模式。考察了大鼠取血时间, 分别在0.5、1、2 h进行了血浆采集, 发现在1 h的血浆样品中获得的原型成分和代谢物较多, 因此选用1 h的血浆样品进行分析。在血浆样品处理过程中考察了甲醇沉淀蛋白法和乙腈沉淀蛋白法, 使用甲醇沉淀蛋白可降低基质的干扰, 提高仪器灵敏度, 故使用甲醇沉淀蛋白法。对流动相的选择, 比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水, 使用乙腈可以缩短保留时间, 提高分离度, 优化峰形, 使用0.1%甲酸水可使黄酮类成分响应变高, 更易被检测出, 故选用乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

以咖啡酸和绿原酸为代表的有机酸类成分是复方鱼腥草合剂中的重要成分, 绿原酸可以在肠道菌群的作用下被水解为咖啡酸^[10-11], 咖啡酸具有广泛药理活性, 研究表明咖啡酸及其衍生物具有抗氧化、抗炎、镇痛、免疫调节、抗菌和抗病毒等多种重要的药理作用^[12-13], 这可能是复方鱼腥草发挥清热解毒功效的原因之一, 并且咖啡酸入血迅速, 并在体内发生广泛的代谢^[14-15], 产生多种类型的代谢产物, 如甲基化、硫酸结合和葡萄糖醛酸结合等, 本实验中检测到了7个咖啡酸相关代谢物, 代谢途径与文献报道基本一致, 其中M7可能是其它原型成分经过相关代谢而形成, 但由于仅靠质谱数据无法确定其结构, 而M7的分子式与咖啡酸相同, 碎

片也大致相似, 因此M7被推测成咖啡酸的异构化产物。复方鱼腥草合剂中含量最多的成分是以黄芩素和黄芩苷为代表的黄酮醇和黄酮苷类成分^[16-17], 雷奇林等^[18]用网络药理学的方法探究黄芩抗炎的作用机制, 结果表明黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类成分通过MAPK14、EGFR、TNFRSF1A、SELE等靶点抑制炎症因子的产生、抑制炎症因子与相应受体结合、阻断炎症反应的启动等, 最终发挥抗炎效应。这可能是复方鱼腥草合剂发挥抗炎作用的原因之一。此外, 黄芩苷等黄酮类成分的代谢被广泛报道^[19-22], 黄芩苷和黄芩素等成分经结肠吸收入血^[23], 在肠道菌群作用下可以发生多种代谢途径, 黄芩苷和汉黄芩苷均可以发生脱糖化, 形成相应苷元被吸收入血, 而在血中黄芩素可以发生葡萄糖醛酸化、双葡萄糖醛酸化和甲基化, 汉黄芩素可以发生去甲基化和葡萄糖醛酸化。本实验中, 黄芩苷和汉黄芩苷的相关代谢物被少量检测出, 这可能是由于复方鱼腥草合剂作为1个复方制剂, 药味多, 所含化学成分复杂, 各个成分在吸收入血过程中可能形成竞争或协调作用, 黄芩苷等成分在肠道和血浆代谢的过程中受到其他成分影响, 而未表现出与单味药或单个成分相的多种代谢途径。

在口服给予复方鱼腥草合剂后的大鼠血浆中初步鉴定出24个化学成分, 包括15个原型吸收成分和9个代谢产物, 来自于鱼腥草、黄芩和金银花等药材, 主要为黄酮类和有机酸类成分, 代谢途径主要为II相代谢, 包括甲基化、葡萄糖醛酸结合和硫酸酯结合等。这些原型成分和代谢产物, 可能是复方鱼腥草合剂潜在的活性成分, 为其Q-Marker的确定奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020: 1328.
- [2] 王莉梅, 金向群. 中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 77-80.
- [3] 张灵娜, 林兵, 宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2662-2666.
- [4] Liu C X. Quality marker concept inspires the quality research of traditional Chinese medicines[J]. Chin Herb Med, 2017, 9(1): 1-2.
- [5] 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.
- [6] 汪培钧, 叶飞. 基于液相色谱质谱联用的复方鱼腥草合剂化学成分分析及特征图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 659-665.
- [7] 周明月, 霍金海, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的连翘叶化学成分分析 [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2582-2587.
- [8] 郑国帅, 赵鑫, 范国荣. 黄酮醇糖苷及其结构类似物的质谱裂解规律研究 [J]. 药学服务与研究, 2015, 15(3): 196-200.
- [9] 罗曼, 刘德育. 色谱-质谱联用技术在生物样品黄酮类及其代谢物研究中的应用 [J]. 广东药学, 1998, 8(4): 8-11.
- [10] 谢岑, 钟大放, 陈笑艳. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物 [J]. 药科学报, 2011, 46(1): 88-95.
- [11] Wang F, Shang Z P, Xu L L, *et al.* Profiling and identification of chlorogenic acid metabolites in rats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometer [J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(6): 605-617.
- [12] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(8): 577-582.
- [13] 郝利军, 梁爱华, 宋经元. 鱼腥草注射液原料药材资源与质量控制研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(5): 657-662.
- [14] 魏玲, 周茂金, 张铁军, 等. 咖啡酸在大鼠体内两个葡萄糖醛酸结合物的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 949-952.
- [15] 魏玲. 咖啡酸在大鼠体内 II 相代谢产物研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2010.
- [16] 王发英, 吴查青, 陈张金, 等. 复方鱼腥草合剂中 3 个有效成分及防腐剂的含量测定 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 399-403.
- [17] 李锐, 黄依玲. HPLC 同时测定复方鱼腥草合剂中绿原酸、黄芩苷和汉黄芩素的含量 [J]. 解放军药科学报, 2015(4): 341-343.
- [18] 雷奇林, 黄雅兰, 钟茜, 等. 基于网络药理学的黄芩抗炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3523-3530.
- [19] Zhang J Y, Cai W, Zhou Y, *et al.* Profiling and identification of the metabolites of baicalin and study on their tissue distribution in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap-orbitrap mass spectrometer [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 985: 91-102.
- [20] Du L Y, Qian D W, Shang E X, *et al.* UPLC-Q-TOF/MS-based screening and identification of the main flavonoids and their metabolites in rat bile, urine and feces after oral administration of *Scutellaria baicalensis* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 156-162.
- [21] Yang L, Guo X Y, Che Q M. Identification of the metabolites of baicalin in rat serum [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2011, doi: 10.5246/jcps.2011.03.034.
- [22] 许伯慧, 严菲. 黄芩苷及其苷元黄芩素体内过程的研究进展 [J]. 南通大学学报: 医学版, 2010, 30(3): 220-223.
- [23] 刘太明. 黄芩苷和黄芩素的吸收机理研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.

[责任编辑 王文倩]