

基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS快速鉴定补阳还五汤及其在人血浆和尿液中药物化学成分

姚维一^a, 王春^a, 龚弟鸿^a, 邓佳丽^b, 丁维俊^{a,b*}(成都中医药大学, a.临床医学院, b.基础医学院, 成都 611975)

摘要: 目的 应用超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)技术鉴定补阳还五汤及其在人血浆和尿液中药物化学成分。方法 采集补阳还五汤及其临床患者口服给药后的血浆和尿液样本, 样本经 80% 甲醇水处理后, 采用 Hyperil Gold C₁₈ 色谱柱(1.0 mm×50 mm, 1.9 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B)(各含 0.1% 甲酸和 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵)进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C。通过对比分析补阳还五汤、给药后人血浆和给药后人尿液样本, 同时结合化合物的质谱碎裂规律, 表征其制剂、含药血浆和尿液中药物化学成分。结果 在汤剂中共鉴定了 55 个化合物; 在给药后患者的血浆中共鉴定了 34 个化合物; 在尿液中鉴定了 23 个化合物。这些成分主要是黄酮类、苯酸类、苯酞类和皂苷类化合物。结论 本研究全面阐明了补阳还五汤及其在人血浆和尿液药物化学成分, 为揭示补阳还五汤真正治疗脑卒中的药效物质基础提供了参考。

关键词: 补阳还五汤; 药效物质基础; 血浆; 尿液; 超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱; 脑卒中

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)14-1719-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.010

引用本文: 姚维一, 王春, 龚弟鸿, 等. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS快速鉴定补阳还五汤及其在人血浆和尿液中药物化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1719-1725.

Rapid Identification of Chemical Constituents for Buyang Huanwu Decoction and Its Chemical Constituents in Human Plasma and Urine by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

YAO Weiyi^a, WANG Chun^a, GONG Dihong^a, DENG Jiali^b, DING Weijun^{a,b*}(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, a.School of Clinical Medicine, b.College of Basic Medicine, Chengdou 611975, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify Buyang Huanwu decoction and its chemical constituents in human plasma and urine by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. **METHODS** The plasma and urine samples of patients were collected after oral administration of Buyang Huanwu decoction. The samples were treated by 80% methanol water. The Hyperil Gold C₁₈ column (1.0 mm×50 mm, 1.9 μm) was used. The mobile phase was water(A)-acetonitrile(B)(containing 0.1% formic acid and 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate) for gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40 °C. Through the comparative analysis of Buyang Huanwu decoction, human plasma after administration and human urine samples after administration, combined with the mass spectrometry fragmentation law of the compound, the medicinal chemical components in its preparation, medicated plasma and urine were characterized. **RESULTS** Fifty-five compounds were identified in Buyang Huanwu decoction, 34 compounds in plasma and 23 compounds in urine. These components were flavonoids, benzoic acid, phthalide and saponins. **CONCLUSION** This study comprehensively elucidate the chemical constituents of Buyang Huanwu decoction and its pharmacochimistry in human plasma and urine, which provides a reference for revealing the real material basis of pharmacodynamics in treating stroke.

KEYWORDS: Buyang Huanwu decoction; pharmacodynamic material base; plasma; urine; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; stroke

补阳还五汤由黄芪生、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁等 7 味常见中药组成, 是益气活血的代表方^[1]。补阳还五汤常用于治疗脑血管意外后遗症中缺血性脑卒中^[2-3]。药理研究证明, 补阳还五汤可以减少脊髓损伤部位的细胞凋亡^[4], 促进脑缺血后血管生成^[5], 降低血管细胞黏附分子和

基质金属蛋白酶-9 的表达, 降低 C-反应蛋白和血脂水平, 具有抗动脉粥样硬化作用^[6]等。补阳还五汤治疗缺血性脑卒中药效确切, 但是其药效物质基础尚不明确。中药药效物质基础研究是阐释中药整体功效及作用本质的核心环节^[7], 目前对补阳还五汤和其在体内的药物化学的鉴定分析已有相

作者简介: 姚维一, 女, 硕士生 Tel: 17882238933
Tel: (028)6180045 E-mail: dingwj123@163.com

E-mail: 461361244@qq.com

*通信作者: 丁维俊, 男, 博士, 教授, 博导

关文献报道,如 Liu 等^[8]利用高效液相色谱-二极管阵列检测器-飞行时间质谱(HPLC-DAD-TOF/MS)技术结合化合物精确分子离子和特征碎片离子在补阳还五汤中一共鉴定了 54 个化合物,主要是喹诺酮类、黄酮类、异黄酮类、单萜苷类、皂苷类、有机酸和氨基酸。在体内的相关研究如沈晓等^[9]利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术结合精确相对分子质量和特征碎片离子对大鼠灌胃补阳还五汤后的脑组织中共检测到 5 个化合物,在血浆中检测到 7 个化合物,同时杨东辉等^[10]利用高效液相色谱-二极管阵列检测器-线性离子阱质谱(HPLC-DAD-itrap/MS)结合化合物精确相对分子质量、特征碎片离子和紫外吸收特征在猪的血清中共鉴定了 45 个化合物,上述研究均为揭示补阳还五汤的药效物质基础提供了实验依据,但是其在临床上的相关研究尚未见文献报道,而药物只有进入人体后才能发挥药效,故对补阳还五汤在人体内的药物化学研究,更有益于阐释其药效物质基础。本研究采用的超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)技术具有快速、准确、灵敏度高的特点,建立此分析方法对补阳还五汤及其在人血浆和尿液药物化学成分进行快速分析,将为揭示其治疗缺血性脑卒中的物质基础提供更加有利的实验依据。

1 仪器与材料

Vanquish UHPLC 超高效液相色谱仪、QE-HF-X 型质谱仪、ST16R 型冷冻离心机均来自美国 Thermo 公司;血浆采血管(美国 BD 公司);尿杯(上海高创化学科技有限公司);甲醇、水、甲酸、醋酸铵(LC-MS 级)均购自美国 Thermo 公司,其他试剂均为分析纯。补阳还五汤严格遵照原方黄芪生 120 g、当归尾 6 g、赤芍 415 g、地龙、川芎、桃仁、红花各 3 g 配比水煎而成。阿魏酸(批号:EB04168;纯度 $\geq 99\%$)、毛蕊异黄酮苷(批号:EB07531;纯度 $\geq 98\%$)对照品均购自上海士锋生物科技有限公司;黄芪皂苷 III(批号:B20567;纯度 $\geq 98\%$)、洋川芎内酯 H(批号:B21462;纯度 $\geq 98\%$)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 临床样本采集

随机选取 6 名被诊断为脑卒中患者(男女各

半),禁食 4 h,服用补阳还五汤后,分别在 1, 2 h 采集患者的血浆和尿液样本,血浆和尿液离心($3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),取上清液约 0.5 mL,混合不同时间点的血浆和尿液样本后冷冻保存于 $-80\ ^\circ\text{C}$,备用。

2.2 样本前处理

分别取补阳还五汤、解冻后的血浆和尿液样本 100 μL 至 EP 管中,加入 400 μL 含 0.1%甲酸甲醇溶液,涡旋震荡 1 min,冰浴静置 5 min,以 $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,取 300 μL 上清液加 LC-MS 级水稀释至 500 μL ,使用含有 0.22 μm 滤膜的离心管中以 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,收集滤液,进样分析。

2.3 对照品工作液配制

精密称取适量的阿魏酸、毛蕊异黄酮苷、黄芪皂苷 III 和洋川芎内酯 H 对照品,置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别配成质量浓度为 10.0, 10.0, 20.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。分别取各对照品储备液适量,置于同一个 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释配制对照品混合工作液,保存于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱。

2.4 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析

色谱柱为 Hyperil C_{18} (1.0 mm \times 50 mm, 1.9 μm);流动相为水(A)-乙腈(B)(各含 0.1%甲酸和 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵);流速为 0.30 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;进样量为 2 μL 。梯度洗脱:0~2 min, 2%B, 2~12 min, 2% \rightarrow 100%B, 12~14 min, 100%B, 14~14.1 min, 100% \rightarrow 2%B, 14.1~16 min, 2%B。扫描范围选择 m/z 100~1 500;ESI 源:毛细管电压为 3.2 kV;鞘气流速:35 arb;辅助气体流速:10 arb;毛细管温度:320 $^\circ\text{C}$ 。MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

2.5 补阳还五汤化学成分和其在人血及尿液中药物化学成分的鉴定

采用 LC/MS 条件对补阳还五汤样品和人血及尿液样品进行检测分析。通过比较补阳还五汤样品、给药组血浆和尿液的总离子流图和化合物质谱碎裂规律鉴定药物化学成分,并对主要成分采用对照品指认。

3 结果

3.1 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 色谱图的采集

根据建立的测试分析方法,在正、负离子模式下采集补阳还五汤样品和给药人血浆及尿液样品的色谱图,结果见图 1。

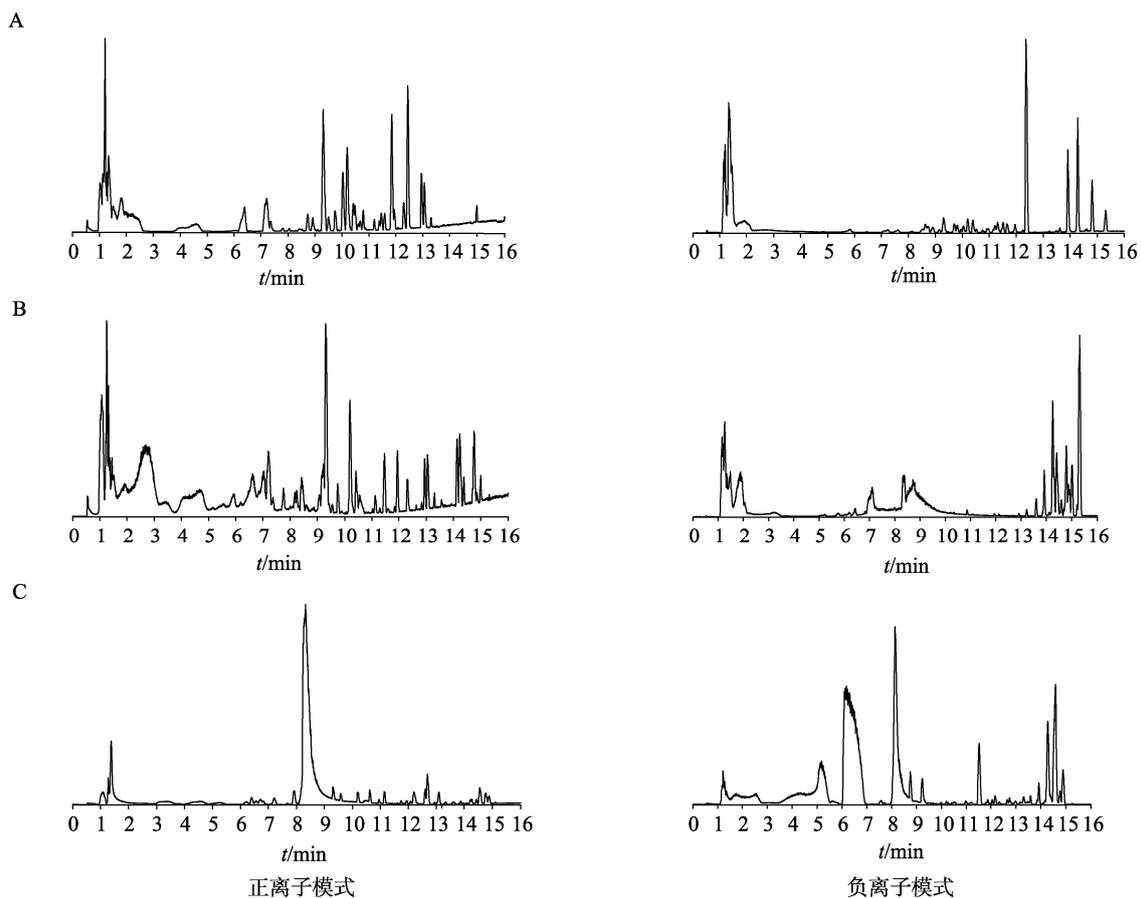


图1 基峰离子流色谱图

A-补阳还五汤; B-给药血浆; C-给药尿液。

Fig. 1 Primary peak ion flow chromatogram

A-Buyang Huanwu decoction; B-plasma after administration; C-urine after administration.

3.2 补阳还五汤及其给药人血浆、尿液药物化学成分鉴定

本研究应用UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS技术对补阳还五汤及其给药人血浆和尿液药物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、分子离子特征碎片峰及其碎裂规律,在补阳还五汤中共鉴定了55个化合物;给药后人的血浆中鉴定了34个化合物;在尿液中鉴定了23个化合物,结果见表1。

3.3 补阳还五汤主要药物化学成分的裂解规律

黄酮类成分的裂解规律:研究发现补阳还五汤及其在人血浆和尿液中黄酮及其苷类化合物的数量较多,且在正离子模式下的质谱响应较好,例如牡荆素、红橘素、木犀草素和毛蕊异黄酮及其苷类。以补阳还五汤中主要活性成分毛蕊异黄酮苷为例,其色谱保留时间为8.72 min,准分子离子峰为 m/z 447.127 8 $[M+H]^+$,产生的二级特征离

子碎片有 m/z 285.075 1 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ 为毛蕊异黄酮苷脱去1个葡萄糖后的特征碎片离子, m/z 166.984 3 $[M+H-C_{13}H_{14}O_7]^+$ 为毛蕊异黄酮苷的基本母核经碎裂后得到的离子碎片。毛蕊异黄酮苷对照品提取离子流色谱图(extracted ion chromatogram, XIC)和在汤剂中质谱碎裂规律见图2~3。

苯酸类成分的裂解规律:研究发现补阳还五汤及其在人血浆和尿液中苯酸类化合物的数量较多,且在正离子模式下的质谱响应较好,例如阿魏酸、绿原酸、没食子酸和高藜芦酸等。以补阳还五汤中主要活性成分阿魏酸为例,其色谱保留时间为7.12 min,准分子离子峰为 m/z 195.065 0 $[M+H]^+$,产生的二级特征离子碎片有 m/z 177.054 5 $[M+H-H_2O]^+$ 为阿魏酸脱去1个 H_2O 后的特征碎片离子, m/z 149.012 1 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 为阿魏酸脱去1个 H_2O 后再脱去1个CO的特征碎片离子。阿魏酸对照品XIC图和汤剂中质谱碎裂规律见图4~5。

表 1 鉴定药物化学成分结果

Tab. 1 Results of identification for chemical components

编号	化合物	t_R /min	分子式	离子模式	实测值	质谱碎片	来源
1	莽草酸	1.30	C ₇ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	173.045 4	154.928 2, 141.016 9, 96.960 1	汤剂, 血
2	没食子酸	1.48	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.014 1	151.061 1, 125.024 3	汤剂, 血
3	原花青素 B2	6.25	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	579.148 6	519.074 4	汤剂, 血, 尿
4	阿魏酸	7.12	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 0	177.054 5, 149.012 1, 125.038 8	汤剂, 血, 尿
5	绿原酸	7.27	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M+H] ⁺	355.101 4	249.156 8, 163.038 8, 153.018 1	汤剂, 血, 尿
6	刺五加苷 B	7.44	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	[M+H] ⁺	390.175 1	355.101 2, 2 271 751	汤剂, 血
7	高藜芦酸	7.74	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	197.080 8	181.049 4, 179.070 2, 163.038 9, 153.018 2	汤剂, 尿
8	黄柏碱	7.99	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	[M+H] ⁺	342.169 0	328.211 0, 297.059 8	汤剂, 血, 尿
9	夏佛塔昔	8.25	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 4	535.238 8, 485.165 9, 443.250 4	汤剂
10	延胡索乙素	8.46	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺	356.184 5	328.211 1, 315.070 3	汤剂
11	别隐品碱	8.50	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	[M+H] ⁺	370.164 0	356.184 6	汤剂, 尿
12	毛蕊异黄酮苷	8.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.127 8	285.075 1, 166.984 3	汤剂
13	牡荆素	8.73	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.097 8	413.705 6, 341.108 7, 161.045 5	血
14	小檗碱	8.82	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	[M+H] ⁺	336.122 2	308.090 3, 291.085 7	汤剂
15	甘草苷	8.83	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.118 6	399.128 9	汤剂
16	阿魏酸甲酯	8.93	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	209.080 6	195.065 1, 177.054 6, 161.059 6	汤剂, 血, 尿
17	异阿魏酸	8.93	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 1	177.054 6, 151.089, 149.012 1	汤剂, 血, 尿
18	异牡荆素	8.99	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.097 9	413.705 5, 385.234 1, 161.045 5	血, 尿
19	脱氢紫堇碱	9.11	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	[M+H] ⁺	366.169 2	352.153 9	汤剂
20	异槲皮苷	9.23	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	465.102 6	285.075 2, 109.101 2	汤剂, 血
21	柚皮苷	9.40	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	579.172 2	433.077 4, 401.145 2, 271.060 5, 253.092 6	汤剂, 血
22	黄芩苷	9.57	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 6	401.134 9, 275.092 1, 269.150 3, 119.035 0	汤剂, 血
23	紫云英苷	9.57	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 1	429.176 8, 285.095 5, 269.150 2, 161.045 5, 119.035 0	汤剂, 血
24	橙皮苷	9.58	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	609.183 8	593.094 5, 463.124 6, 300.998 4, 285.074 6	汤剂
25	异鼠李素-3- <i>O</i> - 新橙皮苷	9.61	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.167 5	605.068 4	汤剂, 血
26	香叶木素-7- <i>O</i> - β - D-葡萄糖苷	9.68	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	463.123 1	435.332 5, 301.070 1	汤剂
27	二氢麻醉椒苦素	9.73	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺	277.106 6	259.143 8, 177.054 6	汤剂
28	表儿茶素	9.79	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.071 0	273.076 5, 151.04, 137.024 4	汤剂, 血
29	异甘草苷	9.86	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.118 9	255.232 5, 237.076 5	汤剂, 血
30	6''- <i>O</i> -乙酰黄豆黄苷	9.87	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	489.138 7	285.075 1, 269.080 3, 205.085 8	汤剂
31	圣草酚	9.93	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.055 6	271.116 2, 269.150 1, 255.232 5, 179.056, 151.04	汤剂, 血
32	甘草素	10.04	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.066 0	239.076 9, 135.008 7, 119.035 0	汤剂, 血
33	洋川芎内酯 H	10.05	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	[M+H] ⁺	225.111 8	209.108 1, 207.101 4, 189.090 9	汤剂, 血
34	芒柄花黄素	11.58	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.080 3	251.138 4, 207.101 4, 151.005 1	汤剂, 血
35	芒柄花苷	10.05	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	431.132 9	269.080 3, 225.111 8, 207.101 4, 189.090 9	汤剂, 血
36	甘草查尔酮 B	10.09	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	285.076 4	267.065 7, 255.066 0, 239.076 9, 183.029 8, 161.045 5, 119.034 9	汤剂, 血
37	4',7-二甲基柚皮素	10.12	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻	299.092 0	283.263 7, 245.081 5	汤剂, 血
38	新橙皮苷二氢查耳酮	10.32	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	[M+H] ⁺	613.215 4	595.406 6, 539.116 3, 163.038 9	汤剂, 尿
39	槲皮素	10.38	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.034 9	283.060 7, 217.002 7, 151.040 0	汤剂, 血
40	甲氧基补骨脂素	10.51	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.049 3	187.038 9, 173.028 7, 116.985 9	汤剂
41	黄芩异黄酮苷	10.51	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	463.160 7	445.255 6, 435.226 2, 301.034 9, 285.039 9	汤剂, 血
42	木犀草素	10.56	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.039 9	283.060 7, 255.232 5, 239.076 8, 151.040 0, 131.035 0	汤剂, 血

续表 1

编号	化合物	t_R /min	分子式	离子模式	实测值	质谱碎片	来源
43	柚皮素	10.56	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	271.060 7	255.232 5, 253.092 4, 187.137 8, 151.040 0, 119.035 0	汤剂, 血
44	毛蕊异黄酮	10.97	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	283.060 8	255.232 5, 239.076 9, 161.045 5	汤剂, 血
45	异虎耳草素	10.98	$C_{13}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	247.059 5	217.046 7, 163.038 8	汤剂, 血
46	棕矢车菊素	11.03	$C_{17}H_{14}O_7$	$[M-H]^-$	329.066 5	327.217 2, 300.998 4, 177.040 3, 161.045 5	汤剂
47	异鼠李素	11.14	$C_{16}H_{12}O_7$	$[M-H]^-$	315.050 5	299.055 6, 283.263 6, 161.045 5, 151.040 0	尿
48	芹菜素	11.16	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.043 2	253.092 4, 239.076 8, 151.039 9, 143.107 7	汤剂
49	异甘草素	11.21	$C_{15}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	255.065 9	239.076 8, 183.029 7, 119.034 9	尿
50	甘草酸	11.54	$C_{42}H_{62}O_{16}$	$[M-H]^-$	821.398 3	469.051 5, 410.194 3	汤剂, 尿
51	异泽兰黄素	11.72	$C_{18}H_{16}O_7$	$[M+H]^+$	345.096 0	327.072 3, 299.090 7, 207.101 4	汤剂, 尿
52	洋川芎内酯 A	11.86	$C_{12}H_{16}O_2$	$[M+H]^+$	193.122 3	175.111 7, 147.116 8, 137.059 7	汤剂, 尿
53	川陈皮素	12.09	$C_{21}H_{22}O_8$	$[M+H]^+$	403.138 1	387.166 9	汤剂, 血, 尿
54	二氢青蒿酸	12.27	$C_{15}H_{24}O_2$	$[M+H]^+$	237.185 7	219.101 2, 191.106 5, 163.038 9, 149.023 3	汤剂, 血, 尿
55	藜本内酯	12.45	$C_{12}H_{14}O_2$	$[M+H]^+$	191.106 5	173.096 0, 145.101 1	汤剂, 血, 尿
56	去甲基川陈皮素	12.51	$C_{20}H_{20}O_8$	$[M+H]^+$	389.122 3	373.127 3, 359.148 0, 163.038 9	汤剂, 尿
57	紫檀芪	12.52	$C_{16}H_{16}O_3$	$[M-H]^-$	255.102 2	239.076 8, 221.066 3	尿
58	红橘素	12.59	$C_{13}H_{14}O_5$	$[M+H]^+$	373.127 3	351.213 2, 317.210 5	汤剂, 尿
59	甘草查尔酮 A	12.83	$C_{21}H_{22}O_4$	$[M-H]^-$	337.144 0	291.102 1, 255.232 5, 183.029 7, 119.034 9	汤剂, 尿
60	光甘草定	13.03	$C_{20}H_{20}O_4$	$[M-H]^-$	323.128 4	293.211 9, 291.196 0, 239.076 9, 134.894 7, 108.996 3	尿
61	黄芪皂苷 III	13.19	$C_{41}H_{68}O_{14}$	$[M-H]^-$	783.456 0	621.063 6, 469.051 0	汤剂

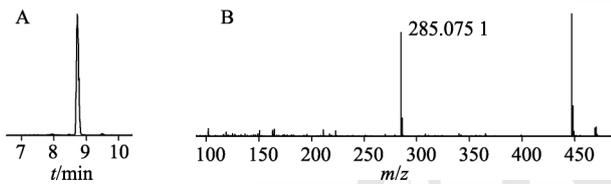


图 2 毛蕊异黄酮苷对照品提取离子流色谱图(A)和毛蕊异黄酮苷在汤剂中二级质谱碎裂图(B)
Fig. 2 XIC for reference materia(A) and secondary mass spectrum of calycosin glycoside(B)

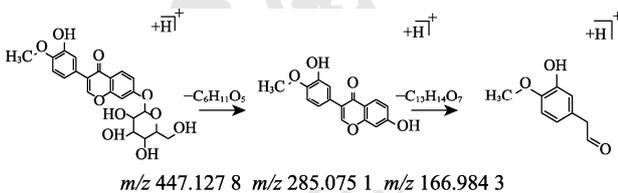


图 3 毛蕊异黄酮苷质谱碎裂规律
Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of calycosin glycoside

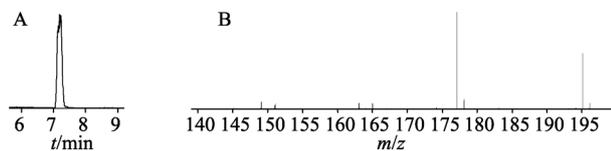


图 4 阿魏酸对照品提取离子流色谱图(A)和阿魏酸在汤剂中二级质谱碎裂图(B)
Fig. 4 XIC for reference materia(A) and secondary mass spectrum of ferulic acid(B)

苯酚类成分的裂解规律：研究发现补阳还五汤及其在人血浆和尿液中苯酚类化合物的数量较

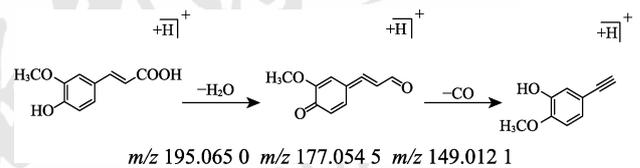


图 5 阿魏酸质谱碎裂规律
Fig. 5 Proposed fragmentation pathways of ferulic acid

多，且在正离子模式下的质谱响应较好，例如洋川芎内酯 A、藜本内酯和洋川芎内酯 H 等。以补阳还五汤中主要活性成分洋川芎内酯 H 为例，其色谱保留时间为 10.05 min，准分子离子峰为 m/z 225.118 $[M+H]^+$ ，产生的二级特征离子碎片有 m/z 207.101 4 $[M+H-2H_2O]^+$ 为洋川芎内酯 H 脱去 1 个 H_2O 后的特征碎片离子， m/z 189.090 8 $[M+H-2H_2O]^+$ 为洋川芎内酯 H 脱去 2 H_2O 个的特征碎片离子。洋川芎内酯 H 对照品 XIC 图和汤剂中质谱碎裂规律见图 6~7。

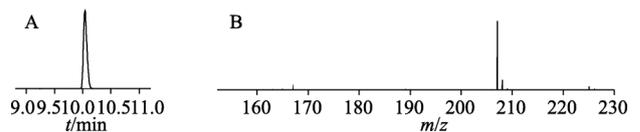


图 6 洋川芎内酯 H 对照品提取离子流色谱图(A)和洋川芎内酯 H 在汤剂中二级质谱碎裂图(B)
Fig. 6 XIC for reference materia(A) and secondary mass spectrum of senkyunolide H(B)

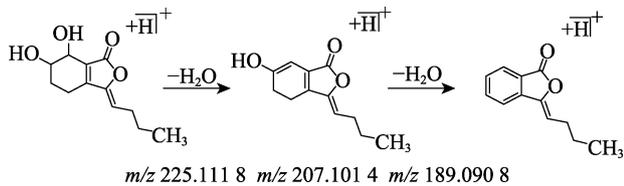


图7 洋川芎内酯H质谱碎裂规律

Fig. 7 Proposed fragmentation pathways of Senkyunolide H

皂苷类成分的裂解规律：研究发现补阳还五汤主要活性成分黄芪皂苷III，其在负离子模式下的质谱响应较好，色谱保留时间为13.19 min，准分子离子峰为 m/z 783.4557 [M-H]⁻ 和 m/z 843.4777 [M+CH₃COO]⁻，产生的二级特征离子碎片有 m/z 621.0635 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻ 为黄芪皂苷III脱去1个葡萄糖后的特征碎片离子， m/z 469.0510 [M-H-C₆H₁₀O₅-C₅H₉O₄-H₂O-2H]⁻ 为黄芪皂苷III脱去1个葡萄糖，脱去1个木糖，1个水和2个氢后的特征碎片离子，此碎裂规律与文献报道^[11]一致，黄芪皂苷III对照品 XIC 图和在汤剂中黄芪皂苷III[M-H]⁻ 质谱碎裂规律见图8~9。

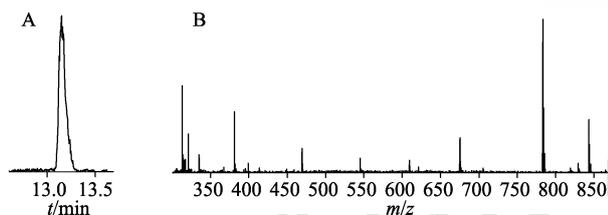


图8 黄芪皂苷III对照品提取离子流色谱图(A)和黄芪皂苷III在汤剂中二级质谱碎裂图(B)

Fig. 8 XIC for reference materia(A) and secondary mass spectrum of Astragaloside III(B)

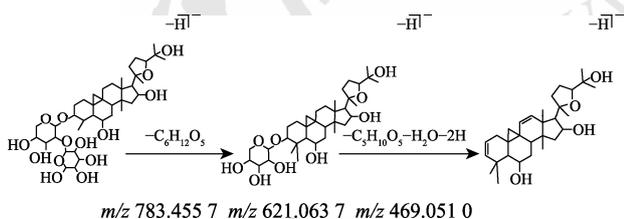


图9 黄芪皂苷III质谱碎裂规律

Fig. 9 Proposed fragmentation pathways of Astragaloside III

4 讨论

本研究建立的检测方法在16 min完成了补阳还五汤及其在人血浆和尿液中的药物化学成分的检测，一共鉴定了61个化合物。本研究采用的UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS技术，与文献^[8-10]报道的HPLC-DAD-TOF/MS和UPLC-Q-TOF-MS/MS技术相比，具有更快的分析速度、更高的准确度和灵敏度。本研究在人的血浆中分析鉴定了34

个化合物，尿液中分析鉴定了23个化合物。这些成分主要是黄酮、苯酸和苯酚，这与文献^[10]猪的血清中主要成分存在一定的差异，猪的血清中主要成分以黄酮类化合物为主，其他化合物并没有检测到，这可能是当时的技术平台和人与动物之间的吸收和代谢差异引起的。在人的血浆中和尿液中鉴定的化合物已被证明具有治疗脑卒中的作用，如黄酮类化合物的芦丁、毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷和槲皮素等在体外已经证明其可降低损伤大鼠脑细胞流动性^[12]。苯酸类化合物阿魏酸、绿原酸、没食子酸等具有降低主动血管炎症、改善急性心肌缺血、保护神经细胞线粒体功能而降低神经细胞损伤^[13-15]等作用。苯酚类成分洋川芎内酯A、藁本内酯和洋川芎内酯H等具有在抗氧化损伤、抗炎镇痛、抗凝及抗血小板聚集、舒张血管等作用^[16]。结合各单个化合物药理活性相关报道，初步推断人血浆和尿液的药效成分可能为补阳还五汤在人体内发挥作用的药效物质基础。

中药进入体内后发挥药效的物质有可能是药物原型，也会是药物的代谢产物^[17]。在前期研究中发现，补阳还五汤的各个成分进入人体后，在血浆样本和尿液样本中检测的代谢产物相对较少。目前还未见对补阳还五汤吸收进入人体后的代谢产物进行研究的文献报道。本研究将在现有的研究基础上优化实验条件，进一步研究补阳还五汤进入人体后的代谢产物和其代谢途径，为进一步揭示补阳还五汤的药效物质基础提供实验参考。

本研究应用UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS技术完成了补阳还五汤和其给药后在人血浆及尿液中药物化学的快速分析，为揭示补阳还五汤治疗缺血性脑卒中药效物质基础提供了参考。

REFERENCES

- [1] 刘建春, 张红珍, 郭文娟, 等. 补阳还五汤防治多发性硬化作用机理概述[J]. 中医杂志, 2016, 57(13): 1155-1159.
- [2] SHANG F K, ZHU W J, SUN X F. The therapeutic effect of Buyang Huan Five decoction in treatment of stroke sequela [J]. China Mod Dr(中国现代医生), 2014, 52(15): 82-84.
- [3] XIAO M F, LIU J L, YANG Y T, et al. Current research situation of Buyang Huanwu decoction and its development of new medical invention [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(7): 1688-1694.

- [4] HOU Z Y, CHEN Z, WEI J S. Effects of Buyang Huanwu decoction on neural cell apoptosis after acute spinal cord injury in rats [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志), 2015, 25(1): 8-11, 106.
- [5] LI L, LIU Z T, CHU L S, et al. Buyang Huanwu decoction promotes neuroblast migration from subventricular zone via inducing angiogenesis after ischemia [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(2): 298-302.
- [6] ZHANG H Z, LI L, JIAO R, et al. Effect of Buyang Huanwu Tang on rho kinase, PAI-1 and *ENOS* mRNA expressions in atherosclerosis model aorta [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(16): 110-114.
- [7] ZHANG W N, LI A P, LI K, et al. Progress on pharmacodynamic material basic of traditional Chinese medicine [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2018, 53(10): 761-764.
- [8] LIU E H, QI L W, PENG Y B, et al. Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(8): 828-842.
- [9] SHEN X, ZHENG H Z, MENG Y J, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of brain and blood absorption components of buyang Huanwu Tang after intragastric administration [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(2): 8-13.
- [10] YANG D H, CAI S Q, LIU H Y, et al. On-line identification of the constituents of Buyang Huanwu decoction in pig serum using combined HPLC-DAD-MS techniques [J]. J Chromatogr B, 2006, 831(1/2): 288-302.
- [11] 黄晶. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术的蜜炙黄芪大鼠体内代谢成分分析[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [12] LU J F, LI C X, GULINUER, et al. Effects of BYHW decoction and its effective constituents on the fluidity of the cell membrane in a stroke-modeled rat brain [J]. J Chin Pharm Sci(中国药理学), 2002, 11(4): 132-136.
- [13] HU X, REN G Y, TANG L H, et al. Ferulic acid inhibits aortic inflammation induced by PM_{2.5} through regulating TLRs signaling pathway in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(5): 642-647.
- [14] GENG J, ZHANG Z, LI W. Protective effect of chlorogenic acid preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(6): 682-685.
- [15] QIN Y F, ZHOU G H, PAN C Y, et al. Effect of buyanghuanwu decoction on myocardial fibrosis in mice with viral myocarditis [J]. Pharm Today(今日药理学), 2018, 28(5): 298-301.
- [16] HAN W. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Ligusticum Chuanxiong* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2017, 19(9): 1341-1349.
- [17] WANG X J. Methodology for systematic analysis of *in vivo* efficacy material base of traditional Chinese medicine: Chinmedomics [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(1): 13-17.

收稿日期: 2019-06-25
(本文责编: 沈倩)