

• 方药研究 •

LC-MS/MS 鉴定大鼠血浆中桃红四物汤有效成分

王慧卓, 彭代银, 陈卫东, 李白坤, 韩 岚, 张艳艳, 王妍妍, 郭栋栋, 吴欢茹, 帅 陈

(安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 研究桃红四物汤有效成分体内作用的物质基础。方法 利用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography technique coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)提供的色谱及离子碎片信息, 对大鼠灌胃桃红四物汤中入血成分进行分析鉴定。结果 通过保留时间比对、离子碎片解析等综合分析, 鉴定桃红四物汤中6个入血成分(梓醇、藁本内酯、阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷和苦杏仁苷)均为原形成分, 入血成分可能为桃红四物汤体内直接作用的有效成分。结论 本实验确定了桃红四物汤经口服后可被胃肠道吸收入血的6个有效成分, 为后期桃红四物汤的药物代谢动力学研究提供了参考依据。

[关键词]桃红四物汤; 液相色谱-串联质谱; 梓醇; 藁本内酯; 阿魏酸; 芍药苷; 芍药内酯苷; 苦杏仁苷

[中图分类号]R927 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.03.020

血瘀证是血液循环发生障碍的一种病理过程, 涉及内、外、妇、儿各科。体内血液通行不畅, 瘀阻于经脉及脏腑之中进而形成血瘀, 严重时会导致中风等疾病^[1]。桃红四物汤源自于清代吴谦所著《医宗金鉴》, 由桃仁、红花、当归、白芍、熟地黄、川芎6味药组成。方中熟地黄、白芍为血中的血药, 当归、川芎为血中的气药, 阴阳动静相配, 加入桃仁、红花为主药, 突出了活血化瘀的作用^[2-3]。由于桃仁、红花的活血作用和缓, 配合四物汤养血扶正, 使瘀血去、新血生、气机畅^[4]。四物汤有效成分的药物代谢动力学研究已有较多的文献报道, 给药形式包括化学成分单体、药材提取物和中药复方^[5-10], 并为课题后续体内有效成分的药物代谢动力学研究奠定基础。

本研究在前期课题组研究的基础上, 采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography technique coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术对桃红四物汤活血化瘀的入血成分进行分析, 从而找出其在体内发挥疗效的有效成分, 为阐明其药理作用及其机制提供重要依据。

1 材料

1.1 试药 梓醇(纯度为98.0%, 批号140509)、藁本内酯(纯度为98.0%, 批号140805)、阿魏酸(纯度为98.0%, 批号140508)、芍药苷(纯度为98.0%, 批号140401)、芍药内酯苷(纯度为98.0%, 批号

140728)、苦杏仁苷(纯度为98.0%, 批号140127): 四川省维克奇生物科技有限公司; 甲酸(规格500 mL, 批号20140208): 江苏强盛功能化学股份有限公司; 甲酸铵(批号20120524): 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯): 德国莫克公司; 超纯水: 实验室自制。

1.2 仪器 美国Agilent 1290 UPLC和美国ABI公司API 4500 3Q/MS, Agilent Technologies 数据处理系统; AB135-S型十万分之一电子天平; 德国METTLER TOLEDO; XW-80 A微型涡旋混合仪; 上海沪西分析仪器厂; TG16-WS台式高速离心机; 长沙湘仪离心机仪器有限公司; DW-86L388 A立式超低温保存箱; 青岛海尔特种电器有限公司; BCD-225 CHC冰箱; 合肥美菱股份有限公司; SHB-III型旋转蒸发仪; 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 动物 SD大鼠6只, 来源于安徽医科大学, 生产许可证号为SCXK(皖)2015-002, 雌性, 体质量(200±20)g, 在温度20~22℃, 相对湿度45%~65%, 光照/黑暗周期为12 h/12 h的条件下饲养, 自由饮食、饮水, 适应性饲养1周后开始实验。

2 方法

2.1 给药方案 给药前禁食12 h, 自由饮水, 按照1.8 g/mL(给药剂量为临床用量的20倍)平行灌胃6只大鼠后, 分别于5、10、15、20、30、40、60、120、180、240、360、480 min眼底静脉丛采血约0.3 mL, 加入至肝素钠润洗干燥后的离心管中, 3 500 r/min离心10 min, 备用。

2.2 血浆样品处理 准确移入含药血浆50 μL于离心管中, 加入75 μL乙腈, 涡旋混匀2 min, 12 000 r/min离心10 min, 取上层清液5 μL进样,

基金项目:国家自然科学基金项目(81473387); 国家自然科学基金青年项目(81503291); 安徽省自然科学基金项目(1408085QH163)

作者简介:王慧卓(1989-), 男, 硕士研究生

通信作者:彭代银, pengdy@ahtcm.edu.cn

LC-MS/MS分析。

2.3 桃红四物汤的制备 取桃红四物汤各单味药材(按照中国中医药出版社第7版《方剂学》中的剂量:熟地黄60 g,当归、白芍、桃仁各45 g,川芎、红花各30 g,共255 g于圆底烧瓶中,第1次加10倍量的75%乙醇(1:10),回流2 h,后过滤取滤液,第2次加8倍量的75%乙醇(1:8),后过滤取滤液。合并2次滤液,60℃旋转蒸发至浓度为1.8 g/mL,相当于原药材浓度。

2.4 标准品溶液和肝素的制备 精密称取各标准品约1 mg,加适量甲醇溶解分别配制成1 mg/mL的储备液。取适量储备液,用甲醇将梓醇、阿魏酸、藁本内酯、芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷分别稀释成100 ng/mL的工作液,过0.22 μm的有机滤膜,用于一级质谱和二级质谱研究。取适量梓醇、阿魏酸、藁本内酯、芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷的储备液,将其混合,用甲醇稀释成500 ng/mL的混标溶液,过0.22 μm的有机滤膜,进样容积是5 μL,LC-MS/MS分析。取2支肝素,每支含12 500 U,置于25 mL容量瓶中,用生理盐水定容至刻度,配成1 000 U/mL的肝素溶液,置于4℃储存备用。

2.5 色谱和质谱条件 色谱条件:梓醇以乙腈(A)-5 mmol/L 甲酸铵(B)作为流动相,梯度洗脱(0~0.9 min, A:B为2:8;0.91~1 min, A:B为9:1;1.01~3 min, A:B为8:2;3.01~4 min, A:B为7:3;4.01~5 min, A:B为2:8)。分离色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),分析时间为5 min,流速为0.2 mL/min,柱温为24~26℃,进样容积是5 μL,LC-MS/MS分析。

阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷以乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)作为流动相,梯度洗脱(0~1 min, A:B为1:9;1.01~1.5 min, A:B为4:6;1.51~2 min, A:B为7:3;2.01~2.5 min, A:B为

8:2;2.51~3 min, A:B为9:1;3.01~3.5 min, A:B为7:3;3.51~4 min, A:B为4:6;4.01~5 min, A:B为1:9)。分离色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),分析时间为5 min,流速为0.2 mL/min,柱温为24~26℃,进样容积是5 μL,LC-MS/MS分析。

藁本内酯以乙腈(A)-0.1%甲酸铵(B)作为流动相,梯度洗脱(0~1 min, A:B为1:9;1.01~1.5 min, A:B为4:6;1.51~2 min, A:B为7:3;2.01~2.5 min, A:B为8:2;2.51~3 min, A:B为9:1;3.01~3.5 min, A:B为7:3;3.51~4 min, A:B为4:6;4.01~5 min, A:B为1:9)。分离色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),分析时间为5 min,流速0.2 mL/min,柱温为24~26℃,进样容积是5 μL,LC-MS/MS分析。

质谱条件:离子源为ESI源,采用多级反应监测的扫描方式进行样品分析。梓醇用正离子模式检测,检测离子对为 m/z 380.0→183.2,电喷雾电压为5 500 V;离子化温度为500℃;藁本内酯的检测离子对为 m/z 191.1→91.1,电喷雾电压为5 500 V;离子化温度为500℃;阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷和苦杏仁苷用负离子模式检测,检测离子对分别为 m/z 192.9→134.0、525.0→449.0、525.0→121.1和501.9→322.8,电喷雾电压为-4 500 V;离子化温度为450℃。

3 结果

3.1 梓醇 在全波长模式扫描下,标准品梓醇的 Q_1 (m/z)为380.0, Q_3 (m/z)为183.2,保留时间为0.79 min,梓醇标准品和血浆样品的总离子流图见图1。质谱数据与文献[11]吻合,证明该成分均能在标准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,梓醇经口服给药后可入血,但检测的量很少,无法定量。

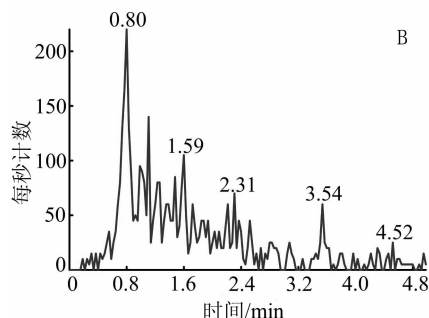
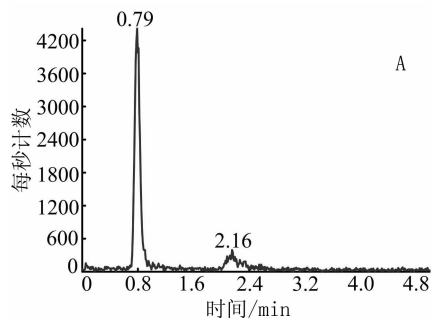


图1 梓醇标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

3.2 藁本内酯 在全波长模式扫描下,标准品藁本

内酯的 Q_1 (m/z)为191.1, Q_3 (m/z)为91.1,保留时

间为2.82 min,标准品和血浆样品的总离子图见图2。质谱数据与文献[11]吻合,证明该成分均能在标

准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,藁本内酯经口服给药后可入血。

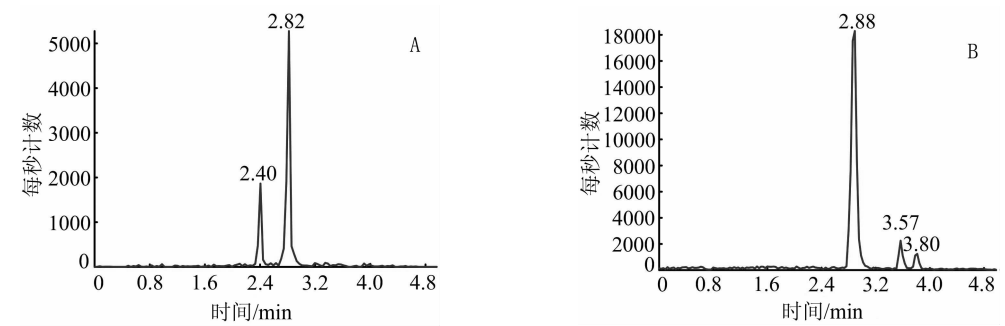


图2 藁本内酯标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

3.3 阿魏酸 在全波长模式扫描下,标准品阿魏酸的 $Q_1(m/z)$ 为 192.9, $Q_3(m/z)$ 为 134.0,保留时间为 2.66 min,标准品和血浆样品的总离子流图见图

3。质谱数据与文献[11]吻合,证明该成分均能在标准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,阿魏酸经口服给药后可入血。

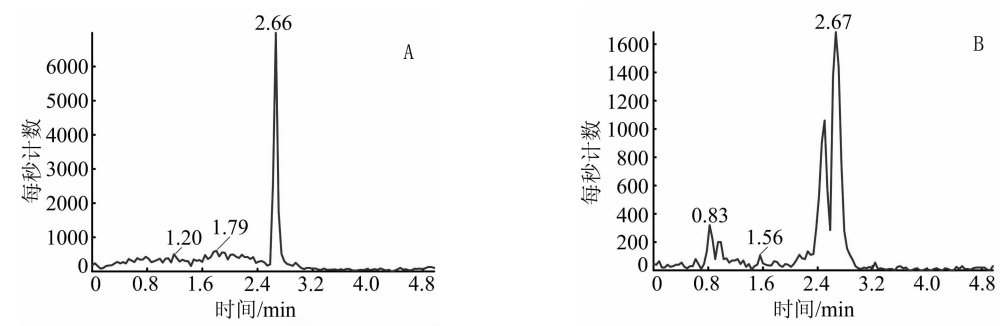


图3 阿魏酸标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

3.4 芍药苷 在全波长模式扫描下,标准品芍药苷的 $Q_1(m/z)$ 为 525.0, $Q_3(m/z)$ 为 449.0,保留时间为 2.50 min,标准品和血浆样品的总离子流图见图

4。质谱数据与文献[11]吻合,证明该成分均能在标准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,芍药苷经口服给药后可入血。

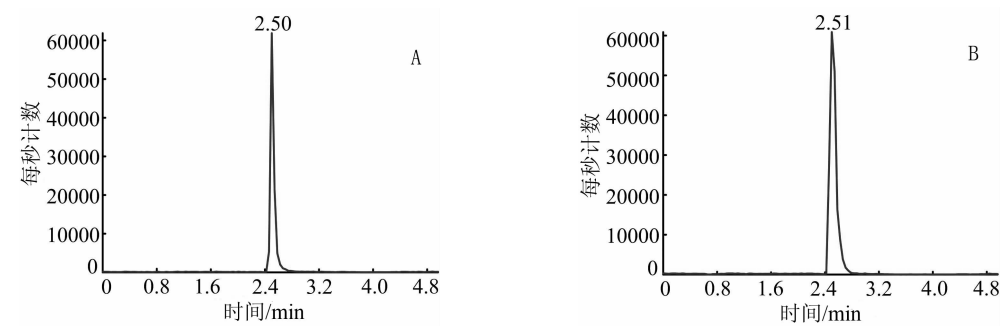


图4 芍药苷标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

3.5 芍药内酯苷 在全波长模式扫描下,标准品芍药内酯苷的 $Q_1(m/z)$ 为 525.0, $Q_3(m/z)$ 为 121.1,保留时间为 2.47 min,标准品和血浆样品的总离子流图见图5。质谱数据与文献[11]吻合,证明该成分均能在标准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,芍药内酯苷经口服给药后可入血。

3.6 苦杏仁苷 在全波长模式扫描下,标准品苦杏仁苷的 $Q_1(m/z)$ 为 501.9, $Q_3(m/z)$ 为 322.8,保留时间为 2.45 min,标准品和血浆样品的总离子流图见图6。质谱数据与文献[12]吻合,证明该成分均能在标准品和血浆样品中于相同的保留时间被检出,苦杏仁苷经口服给药后可入血。

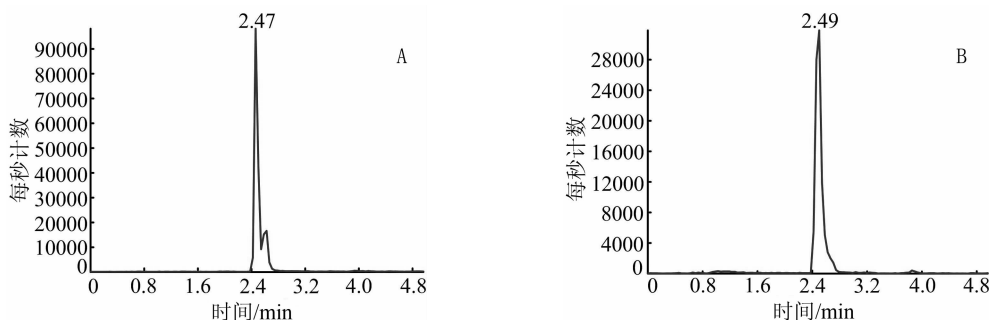


图5 芍药内酯苷标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

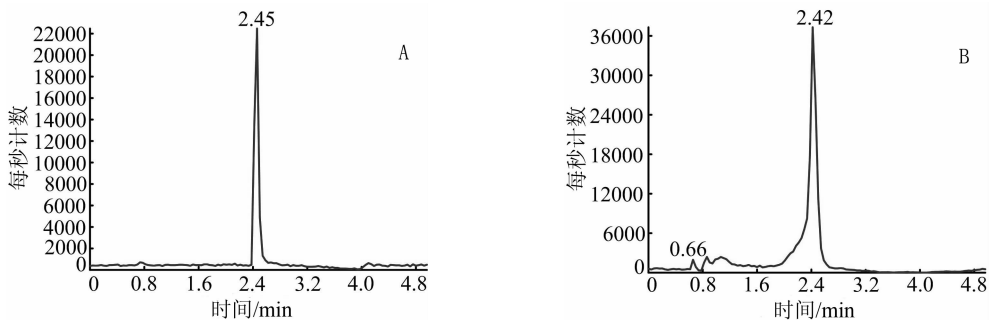


图6 苦杏仁苷标准品(A)和血浆样品(B)总离子流图

4 讨论

本实验主要通过扫描标准品的一级质谱和二级色谱,得到较为精确的标准物质的质荷比值和碎片离子图谱,而后对标准品和血浆样品的质谱总离子流图进行提取,得特定质荷比下的离子流图;比较标准品与各样品之间保留时间,确定了桃红四物汤经口服后可被胃肠道吸收入血的6个有效成分。

优化了6个有效成分的质谱条件,芍药苷、芍药内酯苷和阿魏酸在ESI离子化方式下,负离子模式检测的响应比正离子模式的高,而梓醇、藁本内酯和川芎嗪则在正离子模式下得到更好的质谱信号。同时,由于芍药苷和芍药内酯苷两对物质结构相似、分子量相同,质谱条件优化过程中发现存在响应较高的共同离子碎片。为减少彼此间的干扰和得到最佳的质谱响应,芍药苷、芍药内酯苷和藁本内酯分别采用 m/z 525.0→449.1、 m/z 525.0→121.1、 m/z 191.1→91.1。

采用乙腈为有机相,可使该两对物质的色谱峰得到更好的分离。由于芍药苷和芍药内酯苷的母离子均为 $[M+HCOOH-H]^-$,因此在流动相中加入少量的甲酸,不仅可以改善峰型,亦可增大二者的质谱响应。由于梓醇极性较强,试验中发现其在反相色谱柱上保留时间很短,杂质影响很大,只能定性不能定量,需要更换色谱柱才能有更好的保留时间、色谱峰型以及质谱响应,才能更好地定量。

参考文献:

- [1] 李莎莎,肖雪,王跃生,等. 血瘀证与活血化瘀研究进展[M]//活血化瘀与活血化研究,学苑出版社,2009:102-104.
- [2] 谢辉,龙志江,罗尧岳,等. 浅谈中医血瘀证治源流与发展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(9):1125-1126.
- [3] 丁艳杰,张前德. 桃红四物汤临床与实验研究进展[J]. 江苏中医药,2010,42(1):77-79.
- [4] 张正升,彭代银. 桃红四物汤临床应用研究进展[J]. 安徽医药,2011,15(9):1162-1165.
- [5] SHENG Y, LI L, WANG C, et al. Solid-phase extraction-liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of albiflorin and paeoniflorin in rat serum after oral administration of Si-Wu decoction[J]. J Chromatogr B,2004,806(2):127-132.
- [6] WANG C H, WANG R, CHENG X M, et al. Comparative pharmacokinetic study of paeoniflorin after oral administration of decoction of Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba in rats[J]. Journal of Ethnopharmacol,2008,117(3):467-472.
- [7] YAN R, KO N L, LI S L, et al. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in Rhizoma Chuanxiong, in the rat[J]. Drug Metabolism & Disposition,2008,36(2):400-408.
- [8] NIU Z, CHEN F, SUN J, et al. High-performance liquid chromatography for the determination of 3-*n*-butylphthalide in rat plasma by tandem quadrupole mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study

[J]. J Chromatogr B, 2008, 870(1): 135-139.

[9] WANG Q, XING M, CHEN W, et al. HPLC-APCI-MS/MS method for the determination of catalpol in rat plasma and cerebrospinal fluid: application to an *in vivo* pharmacokinetic study[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2012, 70(21): 337-343.

[10] WU Y T, LIN L C, SUNG J S, et al. Determination of acteoside in *Cistanche deserticola* and *Boschniakia ros-sica* and its pharmacokinetics in freely-moving rats using LC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B An-alytical Technologies in the Biomedical & Life Sci-ences, 2006, 844(1): 89-95.

[11] 黄开福. 四物汤有效成分代表性组分药代动力学相互作用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.

[12] 高萌, 王跃生, 魏惠珍, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱和超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱用于血浆中苦杏仁苷及其代谢产物野黑樱苷的定性和定量分析[J]. 色谱, 2014, 32(6): 591-599.

(收稿日期: 2016-09-02; 编辑: 曹健)

Identification of Effective Constituents of Taohong Siwu Decoction in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Hui-zhuo, PENG Dai-yin, CHEN Wei-dong, LI Bai-kun, HAN Lan, ZHANG Yan-yan, WANG Yan-yan, GUO Dong-dong, WU Huan-ru, SHUAI Chen
(Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the material basis for the *in vivo* effect of the effective constituents of Taohong Siwu Decoction. **Methods** The chromatographic information and information on fragment ions provided by liquid chromatography technique coupled with tandem mass spectrometry were used for the analysis and identification of the constituents (into blood) of Taohong Siwu Decoction given by gavage in rats. **Results** Based on the analysis of retention time and fragment ions, a total of six constituents (into blood) of Taohong Siwu Decoction were identified, i. e., catalpol, ligustilide, ferulic acid, paeoniflorin, albiflorin, and amygdalin, and all of them were original constituents. Such constituents were possibly the effective constituents of Taohong Siwu Decoction with a direct *in vivo* effect. **Conclusion** This experiment identifies six effective constituents of Taohong Siwu Decoction which can be absorbed into blood by the gastrointestinal tract after oral administration, which provides a reference for future pharmacokinetic studies of Taohong Siwu Decoction.

[Key words] Taohong Siwu Decoction; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Catalpol; Ligustilide; Ferulic acid; Paeoniflorin; Albiflorin; Amygdalin

敬告作者、读者

本刊诚征探析中医药发展战略及趋向、中医基本概念等理论研究论文,及临床、实验、方药等研究论文,大力提倡学术争鸣、科技创新,崇尚学术求真。对国家级、省部级科研基金资助的研究论文采取“抢时限”等措施,优先录用;对博士研究生、硕士研究生的论文实行倾斜优惠政策。欢迎广大专家、学者积极投稿。欢迎广大读者审读本刊,提出意见和建议。

欢迎广大作者在本刊网站(<http://xuebao.ahcm.edu.cn>)先注册、再投稿。

《安徽中医药大学学报》编辑部