

· 药物代谢 ·

基于 HPLC-MS 和主成分分析的乌梅血清药物化学研究

吴贤波¹, 董培智², 周海³, 谢毅强¹, 朱海燕¹, 唐宋琪¹, 王明谊^{3*}

(1. 海南医学院, 海口 571199; 2. 山西省食品药品检验所, 太原 030001;
3. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的:对比分析乌梅给予大鼠后的入血成分及其代谢产物。方法:8只雌性大鼠分为乌梅给药组和空白组,前者灌胃 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 含 $0.633\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 乌梅生药溶液,后者给予同体积纯水。给药4d后,用固相萃取法提取含药血清及空白血清,用乌梅的乙腈提取液作为乌梅药材对照。色谱采用 Angient Zorbax Eclipse Plus C₈ 色谱柱($3.0\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$),流动相0.1%甲酸溶液-乙腈梯度洗脱,流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;质谱采用ESI源, m/z 50~1 200正离子扫描模式。获得质谱数据用Mzmine 2.9软件进行预处理和主成分分析,利用主成分分析结果和乌梅原型成分数据库对乌梅血中移行成分及代谢物进行鉴定。结果:乌梅药材原型入血成分有3种(包括:齐墩果酸或熊果酸以及苜蓿酸),入血后的代谢产物有10种。结论:该方法能更客观、全面地分析药材入血成分及其代谢产物,为研究乌梅的药效物质基础提供参考和依据。

[关键词] 乌梅; 高效液相色谱-质谱法; 主成分分析; 血清药物化学

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)24-0118-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240118

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141106.1440.014.html>

[网络出版时间] 2014-11-06 14:40

Serum Pharmacochemistry of Mume Fructus by HPLC-MS and Principal Component Analysis

WU Xian-bo¹, DONG Pei-zhi², ZHOU Hai³, XIE Yi-qiang¹,
ZHU Hai-yan¹, TANG Song-qi¹, WANG Ming-yi^{3*}

(1. Hainan Medical University, Haikou 571199, China;
2. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China;
3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze components and metabolites in serum of rats after given of Mume Fructus by gavage. **Method:** Eight female rats were divided into Mume Fructus group and blank control group, former group were given Mume Fructus crude solution ($0.633\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ by gavage, the latter with pure water. Four days later, solid phase extraction method was used to extract the drug-containing serum and blank serum, using Mume Fructus extracted by acetonitrile as medicinal materials control. Chromatography using Angient Zorbax Eclipse Plus C₈ ($3.0\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$) for chromatographic column, using 0.1% formic acid solution-acetonitrile gradient elution, flow rate of $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Mass spectrometry using ESI source, within the scope of 50-1 200 m/z positive scanning mode. Mass spectrum data were preprocessed and principal component analyzed by Mzmine 2.9 software, using the results of principal component analysis and the database of prototype

[收稿日期] 20140521(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102677)

[第一作者] 吴贤波,博士,副教授,从事过敏性疾病中医药防治研究,Tel:0898-66890539,E-mail:cdutcmwu@163.com

[通讯作者] *王明谊,副教授,从事中西医结合基础研究,Tel:028-61800076,E-mail:mingyi526@sina.com

component to identify blood transitional component and metabolites. **Result:** In serum there were three components from the Mume Fructus original medicinal herbs (such as ursolic acid or oleanolic acid, medicagenic acid), and there were 10 kinds of the metabolites. **Conclusion:** This method can be used for analysis of components of medicinal materials into the blood and its metabolites more objective and comprehensive, and it can be used to provide reference and basis for pharmacodynamics research of the Mume Fructus material.

[**Key words**] Mume Fructus; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; principal component analysis; serum pharmacochemistry

乌梅具有敛肺涩肠、生津安蛔之功,可用于治疗肺虚久咳、久泻久痢、虚热消渴、蛔厥腹痛呕吐。药理研究表明,其具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤、镇咳、抗纤维化、降脂、镇静、抗惊厥、抑制黑色素等作用^[1-8]。迄今为止,已从生药乌梅中分离出多种化学成分,其中主要报道了有机酸、氨基酸、挥发性成分、黄酮类、萜类、生物碱、氢氰酸、苦仁苷等^[9-11]。但未见有对其入血成分及代谢产物的鉴别报道。目前,血清药物化学的基本研究思路为通过比较供试品、含药血清和空白血清色谱指纹图谱的差异,确定了入血移行成分,是否为原形成分、代谢产物、体内应激产物或血清内源性物质^[12-15]。但由于色谱条件、仪器、目标组分的复杂性等因素的影响,往往色谱图基线及背景干扰大,人工鉴别耗时费力。本研究尝试用代谢组学常用的主成分分析法(PCA)获得差异性数据,通过对比差异性数据出现的四种模式识别相应来源,最后确定乌梅的入血成分及其代谢产物,并对乌梅入血成分及代谢产物进行鉴别,以探索乌梅可能的药效成分,为进一步研究乌梅的药效奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 1260 系列快速液相色谱系统(Agilent), micr-OTOF-QII 质谱系统(Bruker), H2050R 型台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司), CP-124S 型电子天平(北京赛多利斯有限公司), Mzmine 2.9 质谱分析软件。

乙腈、甲醇(色谱级, Fisher 公司, LOT096318, LOT111270), 甲酸(色谱级, 成都市科龙化工试剂厂, 20100913)。

1.2 药物与动物 乌梅药材饮片购于北京同仁堂, 经成都中医药大学鉴定教研室严铸云教授鉴定为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* 成熟果实的加工熏制品。药材于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

SPF 级 SD 雌性大鼠 8 只, 购自四川省医学科学院实验动物研究所, 动物合格证号 SCXK(川) 2008-24。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Angient Zorbax Eclipse Plus C_8 色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 95% A; 3 ~ 5 min, 95% ~ 90% A; 5 ~ 15 min, 90% ~ 80% A; 15 ~ 25 min, 80% ~ 55% A; 25 ~ 35 min, 55% ~ 20% A; 35 ~ 35.5 min, 20% ~ 95% A; 35.5 ~ 40 min, 95% A), 流速 0.5 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 3 μL , 分析时间 40 min, 柱色谱洗脱液不经分流直接导入质谱系统检测。

2.2 质谱条件 ESI 离子化模式 m/z 50 ~ 1 200 正离子扫描模式, 干燥气流流速 6 L \cdot min⁻¹, 干燥气温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾压力 0.1 MPa, 毛细管电压 -500/5 000 V, 聚焦主动式, 传输电压及能量 200.0 vpp, 200 vpp, 0 eV, 150 eV; 四级杆 3.0 eV, m/z 80.00; 碰撞池 8.0 eV, 210.0 vpp, 8.0 us, 5.0 us。

2.3 供试品溶液制备 取乌梅饮片 158.4 g, 加 15 倍量水浸泡 0.5 h 后, 大火煮沸, 调小火微沸 0.5 h, 过滤, 收集药液; 药渣加 10 倍量水煮沸后小火微沸 1 h, 过滤, 收集药液; 药渣按二煎方法再煎煮 1 次, 合并 3 次滤液, 浓缩至 250 mL。分取 5 mL 药液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用, 给药前 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温热, 作为乌梅供试品溶液, 含乌梅生药 0.633 6 g \cdot mL⁻¹。

2.4 给药与采集血清 8 只大鼠随机选取 4 只作为空白, 其余 4 只经口灌胃乌梅供试品溶液(2 mL \cdot kg⁻¹), 空白组灌胃等体积纯水。每日给药 3 次, 连续给药 3 d 后禁食 8 h, 第 4 天末次给药 1 h 后腹腔注射 20% 乌来糖溶液。待动物麻醉后打开大鼠腹腔, 下腔静脉取血, 室温放置 1 h 待凝血后, 以 3 500 r \cdot min⁻¹ \times 10 min 离心后取血清, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

2.5 样品处理

2.5.1 血清处理 以 25 mL 纯水及 20 mL 甲醇预处理的固相萃取小柱为固定相, 含药血清或空白血清常压下通过固相萃取小柱, 10 mL 纯水淋洗, 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液。室温下氮气吹干, 2 mL 乙

睛复溶残留物,涡旋 1 min, 13 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,作为含药血清及空白血清样品。

2.5.2 乌梅供试品溶液处理 取乌梅供试品溶液 0.1 mL,加入 1 mL 色谱乙腈涡旋 30 s,再加入 1 mL 色谱乙腈涡旋 30 s,如此加乙腈并涡旋,最后总共加入 4 mL 乙腈,再以 4 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜,弃去初滤液,收集续滤液,作为乌梅药材样品。

2.6 乌梅入血成分鉴别 通过在 PlantMedica 检索、ChemSPIDE 检索、MASSUNION 检索,共获得乌梅原型化合物 14 个及其质谱 M + H, M + ACN + H, M + Na, M + K 及其同位素峰型共 77 个离子峰质荷比详细信息,建立了原型化合物成分鉴别数据库。

由 HPLC-Q-TOFII 分析得到乌梅药材样品、空白血清和含药血清样品总离子流图谱,用工作站软件以 mzxml 格式导出。文件导入采用 Mzmine 2.9 软件对 3 组数据进行标准化处理,主要的预处理包括质谱峰检出、色谱图重建、重叠峰解析、峰对齐、峰匹配等,采用软件默认参数。标准化处理后的数据以 csv 格式导出,通过 excel 进行归一化,得到由共有峰号、样品号及归一化后的峰强度组成的三维矩阵。用 Mzmine 2.9 导入后进行主成分分析,对各组数据进行处理,绘制反映出组间离散程度的得分图。在得分图中,如在第一主成分方向,所有个体均分布于 95% 置信区间内,未见离群点;空白组与给药组数据点无重叠,表明组间存在差异;数据点较为分散,说明组内差异较大。通过得分图获得对不同组样品差别的信息。结合主成分分析的计算原理,依据表 1,从差异性数据出现的 4 种模式中识别相应来源。根据建立的原型化合物成分数据库鉴别入血成分及代谢产物。

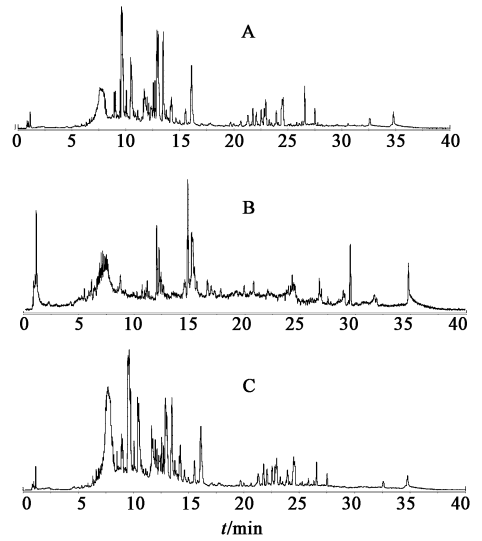
表 1 乌梅原型入血成分及代谢产物判定方法

药材总离子流解卷积数据	空白血清总离子流解卷积数据	含药血清总离子流解卷积数据	物质来源
有	有	有	背景干扰
有	无	有	原型入血成分
无	无	有	原型成分的代谢物
无	有	有(但含量相对空白血清有显著变化)	药物引起的内源性物质变化

2.7 结果 由 HPLC-Q-TOFII 得到乌梅药材样品、空白血清和含药血清样品的总离子流图谱(TIC)见图 1。用 Mzmine 2.9 进行主成分分析获得的得分图

见图 2。从图 2 的 PCA 得分图上可以看出,乌梅药材、空白血清、含药血清得分点分布在不同的区域,较分散,且 3 组数据之间有很好的区分。表明 3 组数据包含了不同的物质信息,差异较大。

经鉴别,乌梅药材原型入血成分 3 种,代谢产物 10 种(见表 2)。其中 *m/z* 为 457.264 9 的物质为齐墩果酸或熊果酸、*m/z* 为 503.302 6 的物质为苜蓿酸。其余物质未能鉴定出结构式。



A. 空白组血清; B. 乌梅药材; C. 乌梅组血清

图 1 乌梅含药血清样品总离子流

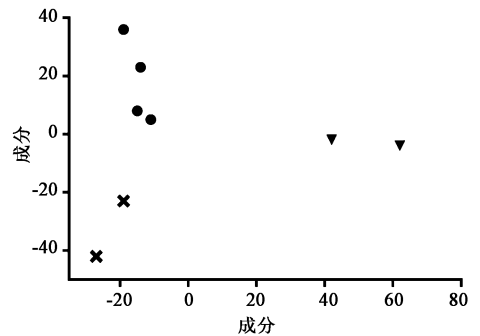


图 2 乌梅药材(▼)、空白血清(●)、含药血清(×)得分

4 讨论

传统血清药物化学研究方法,是直接将药材、空白血清、含药血清的二维分析图谱进行人工匹配,寻找移行成分。但由于二维图谱将质荷比进行了叠加处理,通过与三维图谱对比我们发现,同一保留时间可能含有较多种流出物质;每一时间点的基峰往往不是特征性成分;总分离物质数量巨大;背景高度相似。因此人工比对二维图谱的方法寻找血清药化学成分难度极大,会造成明显的浪费。

主成分分析也称主分量分析,其主要目的是在

表 2 乌梅原型入血成分及代谢产物

m/z	t_R/min	药材	空白血清	含药血清	物质来源
457.264 9	27.24	有	无	有	原型入血成分
312.321 9	26.75	有	无	有	原型入血成分
503.302 6	26.92	有	无	有	原型入血成分
1 039.668	12.87	无	无	有	代谢产物
991.665 8	13.45	无	无	有	代谢产物
635.202 9	7.51	无	无	有	代谢产物
551.325 5	16.08	无	无	有	代谢产物
550.381 5	17.07	无	无	有	代谢产物
549.31	14.25	无	无	有	代谢产物
497.336 6	13.60	无	无	有	代谢产物
487.129 1	7.51	无	无	有	代谢产物
482.354 4	13.93	无	无	有	代谢产物
482.316 8	12.09	无	无	有	代谢产物

运用降维思想,把多指标转化为少数几个综合指标。用综合指标解释多变量的方差、协方差,把给定的一组相关变量通过线性变换转成另一组不相关的变量。主成分分析法被广泛用于光谱、色谱及其联用指纹图谱的模式识别^[16],也被广泛用于代谢组学研究的数据处理中^[17-19]。

本文用主成分分析的方法,对 3 组数据进行同一方法的多维原始数据解卷积但不进行峰补齐等处理,获得同一批次用于模式识别的原始数据,对这些数据采用主成分分析方法获得差异性数据,通过对比差异性数据出现的 4 种模式识别相应来源,最后确定乌梅的入血成分及其代谢产物。本方法能很好弥补传统血清药物化学研究方法对实验数据的浪费以及人工对比图谱过程中主观因素对实验结果影响,能更客观、全面地分析药材入血成分及其代谢产物。

文献报道,乌梅中同时含有齐墩果酸和熊果酸^[20],二者为差向异构体。本实验中未做进一步鉴定。药理学研究表明,二者有广泛的生物活性,具有广谱抗肿瘤^[21]、降糖^[22]、抗炎^[23]、抗变态反应^[24]、抗菌^[25]作用,这与乌梅的药理学作用大致相同,结合本实验结果,可以推测乌梅中主要的药效物质可能是齐墩果酸或熊果酸;苜蓿酸未见相关药理学研究,关于该物质的药理作用、体内代谢过程尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Seneviratne C J, Wong R W, Hagg U, et al. *Prunus mume* extract exhibits antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria[J]. *Int J Paediatr Dent*, 2011,

21(4):299.

- [2] Park C, Jin C Y, Kim G Y, et al. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Prunus mume* in U937 human leukemia cells through activation of caspases [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(4):987.
- [3] Xia D, Wu X, Shi J, et al. Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44:347.
- [4] 黎同明,高洁,王桂香. 乌梅水煎液镇静催眠及抗惊厥作用实验研究[J]. *中医学报*, 2011, 26(7):818.
- [5] 张理平,王英豪,张海燕,等. 乌梅抑制黑色素的机制[J]. *福建中医药大学学报*, 2011, 21(5):12.
- [6] 陈林,陈鸿平,刘友平,等. 乌梅不同部位药理作用研究[J]. *中国药房*, 2007, 18(27):2089.
- [7] 陈仲新,资晓红,刘爱文,等. 山楂乌梅降脂茶对高脂血症大鼠血脂和血液流变学的影响[J]. *中医药导报*, 2007, 13(9):71.
- [8] Sriwilaijaroen N, Kadowaki A, Onishi Y, et al. Mumefural and related HMF derivatives from Japanese apricot fruit juiceconcentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A (H1N1) virus [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(1):1.
- [9] 苗志伟,刘玉平,孙宝国. SDE-GC-MS 分析乌梅中挥发性成分[J]. *食品科学*, 2011, 32(24):270.
- [10] 郭长海,侯雪,王红,等. 乌梅中黄酮成分的分离与鉴定[J]. *中成药*, 2009, 31(10):1613.
- [11] 任少红,付丽娜,王红,等. 乌梅中生物碱的分离与鉴定[J]. *中药材*, 2004, 27(12):917.
- [12] 杨波,张爱华,董巍,等. 酸枣仁汤的血清药物化学及不同配伍变化对血中移行成分的影响研究[J]. *中医药信息*, 2013, 30(4):44.
- [13] 谭玉柱,黄君梅,杨国政,等. 血清药物化学应用于中药复方的研究现状[J]. *中药与临床*, 2011, 2(2):53.
- [14] 柯良芳,孙盼盼,黄赤夫,等. 罗汉果茎叶提取物的血清药物化学研究[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(3):187.
- [15] 谢长,沈娟娟,陈树和,等. 菝葜抗炎活性部位的血清药物化学研究[J]. *医药导报*, 2012, 31(3):288.
- [16] 刘万仓,孙磊,于孟琦,等. 中药指纹图谱模式识别研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(6):446.
- [17] 周本宏,梁艺小,吴丽宁,等. 天麻-川芎药对对大鼠尿液代谢的影响[J]. *中国药师*, 2013, 16(2):186.
- [18] Gao X, Guo M, Peng L, Zhao B, et al. UPLC Q-TOF/MS-based metabolic profiling of urine reveals the novel antipyretic mechanisms of Qingkailing injection in a rat model of yeast-induced pyrexia [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:864747.

离体外翻肠囊法研究安石榴苷的大鼠肠吸收特性

畅静¹, 田莉^{1,2*}, 张慧慧¹, 高晓黎³

- (1. 新疆医科大学 中医学院, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学 药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:考察安石榴苷的肠吸收特性。方法:采用离体外翻肠囊法考察石榴皮多酚中安石榴苷在不同肠段(十二指肠、空肠、回肠、结肠)、不同质量浓度(153.34, 301.70 mg·L⁻¹)下、不同时间点(0, 30, 60, 90, 120 min)的肠吸收特性,采用HPLC法[YMC-Triart C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 甲醇-0.1%磷酸]测定样品浓度。结果:随着药液中安石榴苷浓度的上升,肠吸收速率常数(K_a)也随之增加;安石榴苷在各个肠段的吸收无显著性差异,低浓度时,吸收速率常数回肠>结肠>空肠>十二指肠,高浓度时,空肠>结肠>回肠>十二指肠;各肠段累积吸收量均随药物质量浓度的增加而增加,在高浓度时,安石榴苷在十二指肠、空肠、回肠结肠的累积吸收量分别为(0.60±0.10), (0.64±0.59), (0.71±0.13), (0.73±0.11) μg·cm⁻²。结论:安石榴苷在大鼠肠道内不存在特殊的“吸收窗”,其吸收符合零级动力学方程。

[关键词] 安石榴苷; 离体外翻肠囊法; 肠吸收; 高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0122-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240122

Rat Intestine Absorption Characteristics of Punicalagins with Isolated Everted Intestine Model

CHANG Jing¹, TIAN Li^{1,2*}, ZHANG Hui-hui¹, GAO Xiao-li³

- (1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

[收稿日期] 20140617(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260668)

[第一作者] 畅静, 硕士, Tel:15199167643, E-mail:305217907@qq.com

[通讯作者] * 田莉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药民族药新制剂研究与开发, Tel:13201333388, E-mail:tianli109@126.com

- [19] 范昕, 张涛, 孙萌, 等. 中药研究中代谢组指纹图谱数据分析的思想与方法[J]. 中国医院统计, 2011, 18(1):28.
- [20] 范成杰, 刘友平, 陈鸿平, 等. 乌梅药材中齐墩果酸和熊果酸的高效液相色谱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8):1843.
- [21] Lu X M, Yi H W, Xu J L, et al. A novel synthetic oleanolic acid derivative with amino acid conjugate suppresses tumour growth by inducing cell cycle arrest [J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59(8):1087.
- [22] Rao V S, de Melo C L, Queiroz M G, et al. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from Sambucus australis, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet [J]. J Med Food, 2011, 14(11):1375.
- [23] Checker R, Sandur S K, Sharma D, et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kappaB, AP-1 and NF-AT [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31318.
- [24] Martin R, Carvalho-Tavares J, Hernandez M, et al. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(2):198.
- [25] Ge F, Zeng F, Liu S, et al. In vitro synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against Mycobacterium tuberculosis [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 5):567.

[责任编辑 顾雪竹]