

· 药物代谢 ·

## UPLC/Q-TOF-MS 快速分析桂枝茯苓胶囊的入血成分

尹权微, 李家春, 秦建平, 黄文哲, 王振中\*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

**[摘要]** 目的: 采用 UPLC/Q-TOF-MS 对桂枝茯苓胶囊入血成分进行定性分析, 为该制剂的体内药效物质研究提供参考。方法: Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> 色谱柱 (3 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~ 20 min, 5% ~ 17% A; 20 ~ 28 min, 17% ~ 30% A; 28 ~ 30 min, 30% ~ 58% A; 30 ~ 40 min, 58% ~ 83% A; 40 ~ 45 min, 83% ~ 88% A; 45 ~ 50 min, 88% A), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。采用电喷雾离子源, 负离子扫描, 毛细管电压 3.5 kV, 雾化气压力 45 Pa, 干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 加热毛细管温度 350 °C, 源内裂解电压 145 V, 质量数扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 200。结果: 通过与空白生物样品和对照品的提取离子色谱图、质谱碎片裂解信息对比, 初步鉴定出 14 个入血成分, 包括 13 个原型成分和 1 个代谢产物 (野樱苷)。结论: 建立的 UPLC/Q-TOF-MS 可为桂枝茯苓胶囊入血成分的定性分析提供一种快速、简便、可靠的分析手段, 为该制剂的药效物质基础研究奠定基础。

**[关键词]** 桂枝茯苓胶囊; 芍药苷; 芍药内酯苷; 丹皮酚; 肉桂酸; 苯甲酸; 野樱苷

**[中图分类号]** R969.1; R945; R284.1; R944.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2016) 21-0083-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210083

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0904.012.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-06 9:04

## UPLC/Q-TOF-MS Rapid Analysis of Components in Plasma from Guizhi Fuling Capsules

YIN Quan-wei, LI Jia-chun, QIN Jian-ping, HUANG Wen-zhe, WANG Zhen-zhong\*

(State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process,  
Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze and identify the chemical components in plasma from Guizhi Fuling capsules by UPLC/Q-TOF-MS. **Method:** Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> column (3 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used for isolation and identification of chemical components in Guizhi Fuling capsules with a mobile phase of methanol-water containing 0.1% formic acid for gradient elution and the flow rate of 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. Electrospray ion (ESI) source were applied for the qualitative analysis under the negative ion mode. **Result:** Based on UPLC/Q-TOF-MS analysis, a total of 14 compounds (including 13 prototypes and 1 metabolites) were identified by compared with ion chromatograms and pyrolysis information of mass fragmentation of the blank biological samples and reference substances. **Conclusion:** This method is rapid, simple and credible for identification of ingredients in plasma from Guizhi Fuling capsules, and it can provide a foundation for the illumination of its pharmacodynamics material basis.

**[Key words]** Guizhi Fuling capsules; paeoniflorin; albiflorin; paeonol; cinnamic acid; benzoic acid; prunasin

**[收稿日期]** 20160321 (015)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX09402203)

**[第一作者]** 尹权微, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 18861308961, E-mail: 18861308961@163.com

**[通讯作者]** \* 王振中, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-81152367, E-mail: wzzhz-nj@163.net

桂枝茯苓胶囊由桂枝、茯苓、牡丹皮、白芍、桃仁 5 味中药组成,具有活血、化瘀、散结之功效,临床常用于卵巢囊肿、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、慢性盆腔炎、痛经等妇科血瘀症的治疗<sup>[1-5]</sup>。目前,关于桂枝茯苓胶囊的研究主要集中于制剂工艺、药理及临床、化学成分研究方面<sup>[5-7]</sup>,对其入血成分的研究尚未见报道。本实验旨在建立一种快速高效的桂枝茯苓胶囊入血成分定性分析方法,运用乙酸乙酯沉淀蛋白的提取方法,超高效液相色谱仪(UPLC)作为分离工具,三重四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS)作为定性鉴别手段,在线获取样品中各化合物离子的精确质核比,并结合各个成分的二级质谱碎片信息、文献报道数据及部分对照品的比对<sup>[7-15]</sup>,对桂枝茯苓胶囊的入血成分进行快速分析和鉴定,发现了 14 个人血成分,包括 13 个原型成分和 1 个代谢产物,为该制剂的体内物质基础研究及质量标准完善提供参考。

## 1 材料

1290 型高效液相色谱仪和 6538Q-TOF 型质谱仪(美国安捷伦科技有限公司),XP-6 型电子分析天平(梅特勒-托利多国际股份有限公司),HGC-36A 型氮吹仪(中国天津恒奥科技有限公司),H1650-W 型台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司),GL-88B 型旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),Milli-Q-Academic 型超纯水器(美国 Millipore 公司)。

丹皮酚、芍药苷、没食子酸、齐墩果酸、肉桂酸、苯甲酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110708-201407, 110736-201438, 111907-201501, 110709-201206, 110786-200503, 100419-201302),芍药内酯苷(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 Must-14112008),桂枝茯苓胶囊(江苏康缘药业股份有限公司,批号 131137),肝素钠(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,清洁级,体重(200 ± 20) g,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析条件

**2.1.1 色谱条件** Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> 色谱柱(3 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~ 20 min, 5% ~ 17% A; 20 ~ 28 min, 17% ~ 30% A; 28 ~ 30

min, 30% ~ 58% A; 30 ~ 40 min, 58% ~ 83% A; 40 ~ 45 min, 83% ~ 88% A; 45 ~ 50 min, 88% A),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,进样量 10 μL。

**2.1.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),负离子扫描,毛细管电压 3.5 kV,雾化气压力 45 Pa,干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>,加热毛细管温度 350 °C,源内裂解电压 145 V,质量数扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 200。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取芍药苷、芍药内酯苷、丹皮酚、没食子酸、齐墩果酸、肉桂酸、苯甲酸对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 162.4, 149.5, 159.7, 173.5, 168.3, 178.2, 173.5 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.3 样品溶液的制备** 取桂枝茯苓胶囊,研细,混匀,精密称取约 0.5 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 甲醇 50 mL,超声处理 30 min,冷却至室温,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,即得。

**2.4 给药样品溶液的制备** 取桂枝茯苓胶囊内容物适量,加适量水振荡,混合均匀,制成每 1 mL 含桂枝茯苓胶囊 0.25 g 的样品溶液。

**2.5 血浆样品的采集与处理** 取 SD 大鼠,给药前禁食 12 h(自由饮水),给药前眼眶静脉丛采血取空白血浆后给药,按 0.015 mL·g<sup>-1</sup> 灌胃给药样品溶液,给药后 1 h 由眼眶静脉丛取血 1.0 mL 置于肝素处理的离心管中,离心(6 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min,下同),收集上清液,置 -80 °C 冷藏备用。精密吸取空白血浆和含药血浆 300 μL 置于 5 mL 具塞离心管中,加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 100 μL,涡旋混合 30 s,加乙酸乙酯 600 μL 萃取 3 次,每次涡旋混合 1 min,离心,分取上层乙酸乙酯液,用 35 °C 氮气吹干,残渣加入乙腈-0.1% 甲酸(50:50)200 μL 复溶,于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液进样分析。

**2.6 大鼠血浆中桂枝茯苓胶囊成分的定性分析** 应用 UPLC/Q-TOF-MS 进行快速定性分析,主要根据测得的化合物精确相对分子质量,应用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 3.0 处理软件在规定的误差范围内(误差 ± 5 ppm)计算可能的元素组成,结合各个成分色谱峰的二级质谱碎片信息、文献报道数据及部分对照品比对,对色谱峰进行定性分析。通过比较桂枝茯苓胶囊供试品溶液、空白血浆、给药血浆样品保留时间和质谱信息,最终确定了 14 个人血成分,其中 13 个为原型成分,1 个为代谢产物,结果见表 1,2 和图 1。

**2.7 代谢产物的结构鉴定** 代谢产物的一级质谱

表 1 桂枝茯苓胶囊在大鼠血浆中成分的 LC-MS 分析

Table 1 LC-MS analysis of constituents in rat plasma after oral administration of Guizhi Fuling capsules

No.	化合物	$t_R$ /min	分子式	离子模式	$m/z$		误差 /ppm
					理论值	实测值	
1	芍药内酯苷	15.633	$C_{23}H_{28}O_{11}$	$[M + HCOO]^-$	525.161 4	525.160 9	0.75
2	芍药苷	16.757	$C_{23}H_{28}O_{11}$	$[M + HCOO]^-$	525.161 4	525.161 9	-0.90
3	野樱苷 <sup>1)</sup>	19.302	$C_{14}H_{17}NO_6$	$[M + HCOO]^-$	340.103 8	340.102 5	3.25
4	没食子酸乙酯	21.291	$C_9H_{10}O_5$	$[M - H]^-$	197.045 5	197.044 9	1.95
5	牡丹皮苷 E	21.345	$C_{24}H_{30}O_{13}$	$[M - H]^-$	525.161 3	525.161 2	0.30
6	苯甲酸	24.422	$C_7H_6O_2$	$[M - H]^-$	121.029 5	121.029 7	-1.22
7	丹皮酚	24.759	$C_9H_{10}O_3$	$[M - H]^-$	165.055 7	165.055 8	-0.62
8	苯甲酰芍药苷	26.501	$C_{30}H_{32}O_{12}$	$[M + HCOO]^-$	629.187 6	629.188 5	-1.14
9	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	27.062	$C_{41}H_{32}O_{26}$	$[M - H]^-$	939.110 9	939.111 2	-1.01
10	没食子酸	28.832	$C_7H_6O_5$	$[M - H]^-$	169.014 2	169.013 8	0.56
11	肉桂酸	31.470	$C_9H_8O_2$	$[M - H]^-$	147.045 2	147.044 9	1.12
12	猪茯苓酸	36.436	$C_{31}H_{46}O_4$	$[M - H]^-$	481.332 3	481.331 6	1.01
13	茯苓新酸	37.701	$C_{31}H_{48}O_5$	$[M - H]^-$	499.315 2	499.314 8	1.21
14	齐墩果酸	43.232	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M - H]^-$	455.351 6	455.352 4	-2.76

注: <sup>1)</sup> 代谢产物(表 2 同)。

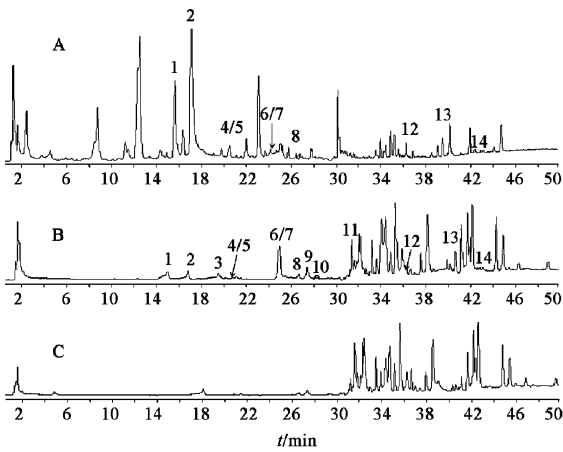
表 2 桂枝茯苓胶囊在大鼠血浆中成分的 LC-MS/MS 分析

Table 2 LC-MS/MS analysis of constituents in rat plasma after oral administration of Guizhi Fuling capsules

No.	化合物	$t_R$ /min	MS/MS 碎片离子信息
1	芍药内酯苷	15.327	479[M - H] <sup>-</sup> , 449[M - H - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 327[M - H - CH <sub>2</sub> O - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 121[C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> - H] <sup>-</sup>
2	芍药苷	16.566	479[M - H] <sup>-</sup> , 357[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 121[C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> - H] <sup>-</sup>
3	野樱苷 <sup>1)</sup>	19.302	294[M - HCOO - H] <sup>-</sup> , 161[M - HCOO - H - C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO] <sup>-</sup>
4	没食子酸乙酯	21.291	197[M - H] <sup>-</sup> , 182[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 138[M - H - CH <sub>3</sub> - COO] <sup>-</sup>
5	牡丹皮苷 E	21.345	507[M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 495[M - H - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 363[M - H - Glc - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 167[M - H - (Glc - H <sub>2</sub> O)-aglycone] <sup>-</sup>
6	苯甲酸	24.422	121[M - H] <sup>-</sup> , 77[M - H - COO] <sup>-</sup>
7	丹皮酚	24.759	165[M - H], 150[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 135[M - H - CH <sub>2</sub> O], 122[M - H - CH <sub>3</sub> CO] <sup>-</sup>
8	苯甲酰芍药苷	26.501	583[M - H] <sup>-</sup> , 553[M - H - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 431[M - H - CH <sub>2</sub> O - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 121[C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> - H] <sup>-</sup>
9	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	27.062	787[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 617[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 447[M - H - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> - 2C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 169[C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> - H] <sup>-</sup>
10	没食子酸	28.832	169[M - H] <sup>-</sup> , 125[M - H - COO] <sup>-</sup> , 107[M - H - COO - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 97[M - H - COO - CO] <sup>-</sup>
11	肉桂酸	31.470	147[M - H] <sup>-</sup> , 103[M - H - COO] <sup>-</sup>
12	猪茯苓酸	36.436	481[M - H] <sup>-</sup> , 308[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 280[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> - CO] <sup>-</sup> , 256[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> - CO - CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>
13	茯苓新酸	37.701	499[M - H] <sup>-</sup> , 326[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 312[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 268[M - H - H <sub>2</sub> O - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - COO] <sup>-</sup>
14	齐墩果酸	43.232	455[M - H] <sup>-</sup> , 411[M - H - COO] <sup>-</sup> , 393[M - H - COO - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>

信息显示了  $m/z$  340 的分子离子峰,  $m/z$  340 比苦杏仁苷加甲酸离子峰  $m/z$  502 少 162, 提示为脱去 1 分子葡萄糖基的代谢产物, 且在二级质谱中显示了 1 个主要的碎片离子  $m/z$  161, 比母离子 294 少 133,

推断为碎片  $C_8H_7NO$ , 则代谢产物中含有苯氰基, 推断该代谢产物为野樱苷<sup>[16-17]</sup>。苦杏仁苷的代谢途径可能为在肠道菌群的作用下脱去 1 分子的葡萄糖后形成野樱苷。



A. 桂枝茯苓胶囊样品; B. 含药血浆样品; C. 空白血浆样品

图 1 负离子模式下桂枝茯苓胶囊的 ESI 总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of Guizhi Fuling capsules under ESI of negative ion mode

### 3 讨论

中药传统的口服方式决定了被吸收入血的物质才能产生活性,桂枝茯苓胶囊按 10 倍临床剂量给药后血浆中成分的量仍较低,而 ESI 总离子流图上包含了所有化合物的色谱峰,内源性物质干扰严重,从总离子流图中很难直接观测到原型成分,本实验依据中药血清药物化学研究思路,运用 UPLC/Q-TOF-MS 技术分别从空白血浆、给药血浆和桂枝茯苓胶囊中获得对应化合物的提取离子流图,然后进行入血成分分析和对比,初步分离和鉴定了 14 个化学成分,其中 13 个为原型入血成分,1 个为代谢产物,表明 UPLC/Q-TOF-MS 能够很好地分离和鉴定大鼠血浆中桂枝茯苓胶囊的化学成分,为血浆中桂枝茯苓胶囊成分的定性分析提供了一种快速、简便、可靠的分析手段,为该制剂体内物质基础研究及质量标准的完善奠定了基础。但桂枝茯苓胶囊入血成分的分析存在含量低、组分多、分离难,特别是生物体存在较大的个体差异,入血成分在体内定量测定具有较大的偏差,同时其作用机制不明确是制约桂枝茯苓胶囊现代化的一大障碍。本研究结果也说明明确中药药效物质基础的关键,不仅是在体外研究药物的成分,其根本在于要明确中药复方以何种形式进入体内,进入体内后如何变化,药物配伍对血中成分的影响,只有这样才能把握中药复方的内在实质,实现经方的科学化、现代化。

#### [参考文献]

[1] 林芬. 桂枝茯苓丸在妇产科的临床应用进展[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(14): 1870-1871.

[2] 孙兰, 林楠, 吕耀中, 等. 桂枝茯苓胶囊对大鼠慢性盆腔炎的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 21-24.

[3] 柳于介, 萧伟, 王振中, 等. 不同剂量桂枝茯苓胶囊治疗原发性痛经疗效探索研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 2019-2022.

[4] 江晓玲. 观察桂枝茯苓胶囊治疗卵巢囊肿的临床效果[J]. 中国医药指南, 2013, 11(13): 294-295.

[5] 苏真真, 李娜, 曹亮, 等. 桂枝茯苓胶囊主要药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 989-992.

[6] 廖正根, 梁新丽, 平其能, 等. 桂枝茯苓双层缓释片处方设计和优化研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 553-557.

[7] 王振中, 李成, 李家春, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究(I)[J]. 中草药, 2011, 42(5): 856-858.

[8] Chen L, Wang D W, Wu J, et al. Identification of multiple constituents in the traditional Chinese medicine formula GuiZhiFuLing-Wan by HPLC-DAD-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(2): 267-275.

[9] 许舜军, 杨柳, 张勉, 等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 药学学报, 2006, 41(9): 852-856.

[10] 朱克近, 王振中, 李成, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2011, 42(6): 1087-1089.

[11] 王振中, 李家春, 窦霞, 等. 液相色谱-质谱联用法对桂枝茯苓胶囊指纹图谱中特征峰的鉴定[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(3): 194-196.

[12] 张伟, 王雪, 秦建平, 等. DART-Q-TOF-MS 快速鉴别桂枝茯苓胶囊中 6 种化学成分[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4118-4122.

[13] 母会丹, 朱靖博, 丁燕, 等. 白芍化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J]. 分析实验室, 2013, 32(7): 113-117.

[14] 陶晓倩, 李娜, 曹亮, 等. 桂枝茯苓胶囊中主要成分对子宫肌瘤细胞增殖及小鼠离体子宫收缩活动的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 91-96.

[15] 秦建平, 孙晓萍, 吴建雄, 等. 天舒胶囊血中移行成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中草药, 2015, 46(5): 649-653.

[16] 汤庆发, 谢颖, 陈飞龙, 等. 苦杏仁中苦杏仁苷的存在形式及其影响因素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 107-109.

[17] 朱克近, 孙晓萍, 常秀娟, 等. 桂枝茯苓胶囊主要效应成分在比格犬体内的药代动力学[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1015-1018.

[责任编辑 刘德文]