

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01765

高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法鉴定 金匱肾气丸总苷化学成分及代谢产物

李文兰^{*1 2} 胡杨¹ 季宇彬^{1 2} 杜娟¹ 孙志¹ 白晶^{1 2}

¹(哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076)

²(国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 哈尔滨 150076)

摘 要 应用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法(HPLC-ESI/MSⁿ) 鉴定金匱肾气丸总苷的化学成分及总苷大鼠灌胃给药血浆化学成分或代谢产物。对比体内外样品色谱图各色谱峰, 根据负离子模式下的分子离子峰获得化合物分子量信息, 金匱肾气丸总苷含 19 个化学成分: 没食子酰-3-O-芹糖基(1→6) 葡糖苷、羟基芍药苷、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、地黄苷 A 或 B、1, 2, 3-三-O-没食子酰葡萄糖、芍药苷、山茱萸新苷 II、6'- β -(3, 4, 5-三羟基苯甲酰) 芍药苷、1, 2, 3, 6-四-O-没食子酰葡萄糖、山茱萸新苷 I、五没食子酰葡萄糖、苯甲酰羟基芍药苷、丹皮酚原苷、苯甲酰芍药苷、4'-羟基- β -(3, 4, 5-三羟基苯甲酰) 芍药苷和两个未知化合物成分。金匱肾气丸总苷大鼠灌胃血浆鉴定出 17 个化学成分, 其中有 8 个化合物以原型存在, 9 个可知代谢转化成分, 分别为没食子酸-2-羟基苯乙酮-4-O-葡萄糖醛酸酯、芍药苷代谢素 I、2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2, 4-二羟基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2, 4-二羟基苯乙酮和 3 个未知成分。

关键词 金匱肾气丸总苷; 成分分析; 代谢产物; 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用技术

1 引 言

金匱肾气丸为祖国医学经典补肾壮阳方药, 临床上多用于治疗肾阳虚型疾病, 具有抗衰老、增强免疫力、改善脂肪和糖代谢等作用^[1]。该方剂由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、肉桂、附子(制) 药味组成, 其中熟地黄主要成分为环烯醚萜苷类、糖类及氨基酸类; 山药富含皂苷、甾醇类、多糖及多种微量元素; 山茱萸主要含马钱苷、莫诺苷等苷类和有机酸及酯类成分; 泽泻含多种四环三萜酮醇衍生物; 茯苓主要含三萜类成分; 牡丹皮含有丹皮酚、芍药苷、苯甲酰芍药苷等苷类及挥发油、植物甾醇等; 肉桂主要含挥发油类成分; 附子(制) 主要成分为生物碱类和多糖类。前期实验对复方有效部位进行了筛选^[2], 确定复方的总苷类成分可使肾阳虚大鼠的睾酮含量和 SOD 活性升高, MDA 水平降低, 有效改善性激素分泌状况, 具有抗衰老及抗自由基等作用, 为金匱肾气丸治疗肾阳虚及抗衰老的药效部位。

高效液相色谱和电喷雾离子阱质谱(HPLC-ESI/MS) 联用技术具有高灵敏、高选择性的特点, 利用离子阱技术在温和的条件下直接获得待测物的准分子离子峰, 并对选定的母离子逐步提高其相对碰撞能量, 给出母离子与碎片离子的关系, 为代谢产物的结构分析提供丰富的信息。本研究采用 HPLC-ESI/MS 方法鉴定金匱肾气丸总苷及其在大鼠血浆中的代谢产物, 对全面系统了解总苷的化学及代谢信息提供了理论依据。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

1100 液相色谱系统(Agilent 公司, 包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器); 1100 液相色谱/VL 型离子阱液质谱联用仪(Agilent 公司, 配大气压电喷雾源 ESI 及化学电离源 APCI); 仪器操作及数据处理系统采用 HPLC-3D 化学工作站; XW-80A 型旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂); Allegra-64R 型低温高速离心机(美国贝克曼公司)。

2010-04-15 收稿; 2010-06-28 接受

本文系黑龙江省科技厅攻关项目(No. GC05C31601) 资助

* E-mail: lwlzd@163.com

对照品: 马钱苷、芍药苷标准品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 编号分别为 111640-200502、110736-200320); 药材熟地黄(*Radix Rehmanniae*)、山药(*Rhizoma Dioscoreae*)、山茱萸(*Fructus Corni*)、牡丹皮(*Cortex Moutan*)、泽泻(*Rhizoma Alismatis*)、茯苓(*Poria*)、附子(制)(*Radix Aconiti Lateralis Preparata*)、肉桂(*Cortex Cinnamomi*)均购于宝丰医药商业有限公司, 经张德连教授鉴定; 乙腈、甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 冰醋酸(色谱纯, 天津耀华化学试剂公司); 实验用水为超纯水。金匱肾气丸总苷: 依据参考文献[34]制备, 以马钱苷计总苷含量为 43.9%。

雄性 Wistar 大鼠(10 周龄, (300 ± 20) g, 长春国家生物产业基地实验动物中心, 批号 SCXK-(吉)2003-0004) 随机分为空白组和灌胃给药组, 每组 10 只。

2.2 溶液配制

总苷体外样品溶液: 取总苷样品 32.7 mg, 以甲醇溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 即为供试品溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取 10 μL 进高效液相分析。

灌胃溶液: 取适量总苷样品, 以蒸馏水溶解, 制成 0.590 g/mL 总苷灌胃液。

对照品溶液: 准确称取马钱苷和芍药苷对照品各 0.2 mg, 分别置 1 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容; 将两者混合, 浓度均为 0.1 g/L, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取 10 μL 进样色谱分析。

2.3 实验方法

2.3.1 HPLC-UV 及 HPLC-ESI/MS 分析条件 Symmetry ShieldTM RP₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 1.0% 冰醋酸(B) 溶液; 梯度洗脱: 0 ~ 4 min, 95% ~ 92% A; 10 ~ 30 min, 92% ~ 80% A; 30 ~ 80 min, 80% ~ 50% A。柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.5 mL/min。质谱仪所用离子源为大气压电喷雾电离源(ESI), 雾化气压力: 0.17 MPa; 干燥气流速: 10.0 L/min; 毛细管电压: 4 kV; 传输电压: 70 V。选择负离子扫描方式, 扫描范围: m/z 100 ~ 1200。

2.3.2 大鼠含药及空白血浆样品制备 Wistar 大鼠禁食 12 h, 期间自由饮水, 按 10 mL/kg 为大鼠灌胃给药, 空白组给予等体积蒸馏水溶液。给药 90 min 后, 经眼眶静脉丛取血 500 μL , 置肝素化试管中, 充分混匀。以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 合并各组血浆, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻保存。将冻存血浆取出置于室温下缓慢溶解, 取 2 mL 血浆, 加入 1 mL 6% HClO_4 沉淀蛋白, 混匀振荡 1 min, 以 14000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取 50 μL 进行高效液相色谱仪分析。大鼠空白血浆样品同法处理。

3 结果与讨论

3.1 总苷化合物的 HPLC-ESI/MS 分析

用 HPLC-ESI-MS 对总苷化学成分进行定性分析, 色谱图见图 1a, (-) ESI-MS 的质谱总离子流图见图 1b。由分子离子峰质谱信息确定可能的分子量, 通过与文献[5~7]的成分或对照品对照, 确定化合物的可能结构, 共鉴定出 19 个化合物, 结果见表 1。例如, 化合物 2: m/z 463 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 445 $[\text{M} - \text{H} - \text{OH}]^-$, m/z 403 $[\text{M} - \text{H} - 2\text{CH}_2\text{O}]^-$, m/z 301 $[\text{M} - \text{H} - \text{Glu}]^-$, 推测为没食子酰-3-O-芹糖基(1 \rightarrow 6) 葡萄糖苷; 化合物 5: m/z 779 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 747 $[2\text{M} - \text{CH}_2\text{OH} - \text{H}]^-$, m/z 389 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 227 $[\text{M} - \text{Glu}]^-$ 为马钱苷, 与标准品对照一致; 化合物 6: m/z 715 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 357 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 推测为獐芽菜苷; 化合物 8: m/z 635 为 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 峰, m/z 465 与其相差 170, 估计丢失中性小分子, 丢失的是没食子酸加水, 推测为 1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖; 化合物 9: m/z 959 $[2\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 941 $[2\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$ 去水分子离子峰, m/z 449 $[\text{M} - \text{OCH}_3]^-$, m/z 327 $[\text{M} - \text{H} - \text{CH}_2\text{O} - (\text{Benzoic acid})]^-$ 与标准品对照一致, 为芍药苷; 化合物 12: m/z 631 $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{COOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$, 即丢失中性小分子 140 (苯甲酸 + H_2O), 推测为 6-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷; 化合物 13: m/z 787 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 617 和其也相差 170, 丢失的是没食子酸, 推测为 1,2,3,6-四-O-没食子酰葡萄糖; 化合物 15: m/z 939 $[\text{M} - \text{H}]^-$, m/z 903 $[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O}]^-$, m/z 769 与 m/z 939 相差 170, 丢失没食子酸, m/z 617 为 m/z 769 丢失了分子量为 152 的苯甲酸, 推测为五没食子酰葡萄糖; 化合物 16: m/z 599 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 569 $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^-$, m/z 477 为 m/z 599 的

去苯甲酸峰 m/z 551 为 m/z 569 的去水分子峰 $[M - CH_2O - H_2O]^-$, 推测为苯甲酰羟基芍药苷; 化合物 19: m/z 647 $[M - H]^-$, m/z 601 $[M - C_2H_5OH - H]^-$, m/z 525 为去苯甲酸峰, 推测为 4'-羟基, 6'-(3, 4, 5-三羟基苯甲酰) 芍药苷; 化合物 1 和 10 为未知成分。

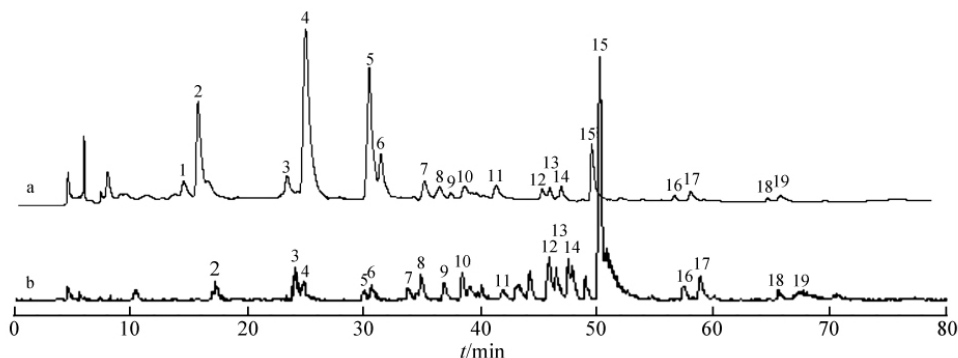


图 1 金匮肾气丸总苷的 HPLC 色谱图 (a) 和负离子模式的总离子流图 (b)

Fig. 1 Chromatogram of total glycosides of Jinkuishenqi pill (a) and mass spectrometric total ion current chromatogram in negative ion mode

峰号同表 1 (The Peak number is the same as in Table 1)。

表 1 金匮肾气丸总苷 HPLC-ESI-MS 数据及成分鉴定

Table 1 HPLC-ESI-MS data and identification for total glycosides of Jinkuishenqi pill

色谱峰编号 Peak No.	保留时间 Retention time t_R (min)	负离子模式 Negative ion mode (m/z)		分子量 Molecular weight	化合物推测 Compound presumed
		准分子离子峰 (MS) Molecular ion peak	二级碎片特征离子峰 Fragmentation (MS/MS)		
1	14.6	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown
2	16.4	463	403 373 445 300	464	没食子酰-3-O-芹糖基(1→6) 葡糖苷 Galloyl-3-O-apiofuranosyl-(1→6)-glucoside
3	23.1	495	137 333 465	496	羟基芍药苷 Hydroxyl-paeoniflorin
4	25.9	405	243 373 345	406	莫诺苷 Morroniside
5	30.0	389	227 449	390	马钱苷 Logenin
6	31.4	715	417 357	358	獐芽菜苷 Sweroside
7	34.2	523	505 487	524	地黄苷 A 或 B Rehmaionoside A or B
8	34.6	635	465 544 597	636	1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖 1,2,3-Tri-O-galloyl-β-D-glucose
9	37.4	959	449 479 327 515	480	芍药苷 Paeoniflorin
10	38.8	799	783 475	800	未知 Unknown
11	42.0	777	615	778	山茱萸新苷 II Cornuside II
12	45.9	631	491 271	632	6'-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷 6'-(3,4,5-Trihydroxybenzoyl)-paeoniflorin
13	46.5	787	617 465	788	1,2,3,6-四-O-没食子酰葡萄糖 1,2,3,6-Tetra-O-galloyl-β-D-glucose
14	47.5	541	347 379	542	山茱萸新苷 I Cornuside I
15	50.2	939	769 617	940	五没食子酰葡萄糖 Pentagalloylglucose
16	57.4	599	281 403 447 477 569	600	苯甲酰羟基芍药苷 Hydroxy-benzoyl paeoniflorin
17	59.0	495	333 171	460	丹皮酚原苷 Paeonoside
18	65.3	583	553 431	584	苯甲酰芍药苷 Benzoylpaeoniflorin
19	66.9	647	259 601 525	648	4'-羟基 6'-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷 4'-Hydroxy 6'-(3,4,5-trihydroxy-benzoyl) paeoniflorin

综上所述, 总苷中共有 3 个没食子酸鞣质苷类成分 (1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖、1,2,3,6-四-O-没食子酰葡萄糖、五没食子酰葡萄糖) 6 个单萜芍药苷类成分 (羟基芍药苷、芍药苷、6'-(3,4,5-三羟基

苯甲酰) 芍药苷、苯甲酰羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、4'-羟基, 6'-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷) 和 6 个环烯醚萜苷类成分(莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、地黄苷 A 或 B、山茱萸新苷 II 和山茱萸新苷 I) , 以及没食子酰-3-O-芹糖基(1→6) 葡糖苷与丹皮酚原苷。

3.2 总苷在大鼠血浆中代谢产物 HPLC-ESI/MS 分析

采用 2.3.2 节实验方法对灌胃总苷后大鼠的血浆代谢产物与空白组对照, 研究样品中有总苷原型成分及其代谢转化成分, 色谱图结果见图 2 及表 2。根据分子量及碎片信息共检测 8 个原型成分(2~9 号

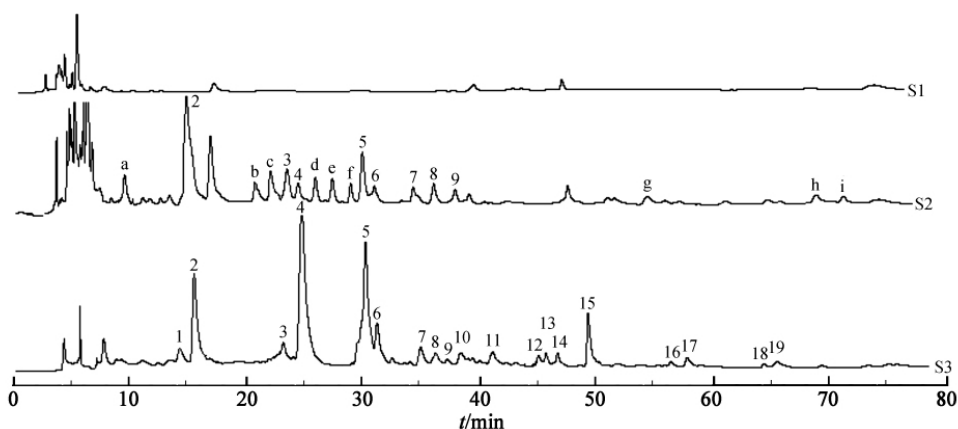


图 2 体外样品(S1)、含药血浆样品(S2)和空白血浆样品(S3)总苷色谱图

Fig. 2 Chromatograms of total glycosides in vitro (S1), medicated plasma (S2) and blank plasma (S3)

峰号 1~9 及 a~j 见表 2 (The Peak number is the same as in Table 2)。

表 2 总苷在大鼠血浆中的原型及代谢成分

Table 2 Original components and metabolized components of total glycosides in rats plasma

化合物编号 Compound No.	保留时间 Retention time (min)	负离子模式 Negative ion mode(<i>m/z</i>)		分子量 Molecular weight	化合物推测 Compoundpresumed	备注 Note
		准分子离子(MS) Molecular ion peak	二级碎片特征离子峰 Fragmentation (MS/MS)			
a	10.1	169	125, 81	170	没食子酸 Gallic acid	A
2	16.4	463	403, 373, 445, 300	464	没食子酰-3-O-芹糖基(1→6) 葡糖苷 Galloyl-3-O-apiofuranosyl-(1→6)-glucoside	B
b	21.6	665	490	666	未知 Unknown	A
c	22.3	327	151	328	2-羟基苯乙酮-4-O-葡萄糖醛酸酯 2-Hydroxyacetophenone-4-O-glucuronic acid esters	A
3	23.1	495	137, 333, 465	496	羟基芍药苷 Hydroxy-paeoniflorin	B
4	25.9	405	243, 373, 345	406	莫诺苷 Morroniside	B
d	27.1	197	151, 123, 108	198	芍药苷代谢素 I Paeonimetabolin I	A
e	28.1	962	561, 446	963	未知 Unknown	A
f	29.5	543	324, 253	544	未知 Unknown	A
5	30.0	389	227, 449	390	马钱苷 Loganin	B
6	31.4	715	417, 357	358	獐芽菜苷 Sweroside	B
7	34.2	523	505, 487	524	地黄苷 A 或 B Rehmaionoside A or B	B
8	34.6	635	465, 544, 597	636	1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖 1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose	B
9	37.4	959	449, 479, 327, 515	480	芍药苷 Paeoniflorin	B
g	54.3	261	181	262	2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-硫酸酯 2-Hydroxy-4-methoxy acetophenone-5-O-sulfate	A
h	71.4	247	167	248	2,4-二羟基苯乙酮-5-O-硫酸酯 2,4-Dihydroxyacetophenone-5-O-sulfate	A
i	73.6	151	109	152	2,4-二羟基苯乙酮 2,4-Dihydroxyacetophenone	A

A: 代谢成分(Metabolic components); B: 原型(Prototype)。

峰) 分别为: 没食子酰-3-O-芹糖基 (1→6) 葡糖苷、羟基芍药苷、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、地黄苷 A 或 B、1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖和芍药苷。9 个代谢成分 (a~i 号峰) 分别为: 化合物 a (M_w 170): m/z 169 为 $[M-H]^-$ 峰 m/z 125 为 $[M-COOH]^-$ 峰 m/z 81 为没食子酸脱羧及脱 2 个羟基后的开环产物, 推测为没食子酸; 化合物 b 为未知结构化合物; 化合物 c: 由紫外光谱图可知该化合物的紫外最大吸收波长在 254 nm 附近, 又由其分子离子 m/z 327 $[M-H]^-$ 推测其分子量为 328, 且在其二级质谱中出现了丰度最大的碎片离子 m/z 151, 为准分子离子丢失一个葡萄糖醛酸分子, 根据羟基苯乙酮类成分质谱裂解方式可知, 该化合物结构中可能存在葡萄糖醛酯结构, 推测其为丹皮酚原苷水解后与葡萄糖醛酸的结合产物, 即为 2-羟基苯乙酮-4-O-葡萄糖醛酸酯; 化合物 d: m/z 197 丰度最大 m/z 151、123 和 108, 与文献 [10] 相符, 推测为芍药苷代谢素 I; 化合物 e 和 f 为未知结构化合物; 化合物 g 与化合物 h 的质谱裂解规律相同, 但分子离子峰碎片 m/z 247 比 261 的分子量少 14, 说明化合物 h 可能被甲基化, 推测其分别为 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2,4-二羟基苯乙酮-5-O-硫酸酯; 化合物 i 的紫外最大吸收在 275 nm 附近, 可能含有苯羟基结构, 又根据碎片 m/z 151 $[M-H]^-$ 和 m/z 109 $[M-H-CH_3CO]^-$ 推测其为 2,4-二羟基苯乙酮, 与文献 [8~10] 报道相似。

3.3 总苷代谢产物的代谢途径分析

没食子酸推测其来源有可能有两种, 一是没食子酰类化合物水解代谢产生没食子酸, 二是 6'-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷与 4'-羟基, 6'-(3,4,5-三羟基苯甲酰) 芍药苷中的 3,4,5-三羟基苯甲酰结构与葡萄糖水解后产生; 2-羟基苯乙酮-4-O-葡萄糖醛酸酯、2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2,4-二羟基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2,4-二羟基苯乙酮推测可能为丹皮酚原苷的代谢产物; 芍药苷代谢素 I 代谢途径见图 3^[11]。

本研究采用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法, 能够高效分离、灵敏检测和全面鉴定总苷中多类成分及其在大鼠血浆中的多种代谢产物。实验结果表明, 总苷中有 19 个苷类化合物, 给大鼠灌胃口服总苷后, 在血浆中可检测到 17 个化合物, 其中 8 个为原型成分分别是没食子酰-3-O-芹糖基 (1→6) 葡糖苷、羟基芍药苷、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷、地黄苷 A 或 B、1,2,3-三-O-没食子酰葡萄糖、芍药苷; 9 个代谢成分分别是没食子酸、2-羟基苯乙酮-4-O-葡萄糖醛酸酯、2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2,4-二羟基苯乙酮-5-O-硫酸酯、2,4-二羟基苯乙酮及芍药苷代谢素 I 及 3 个未知成分。由此可见, 多类成分在大鼠体内的代谢情况存在较大差异: 芍药苷类成分多以原型存在, 代谢产物较单一; 没食子酰类化合物也可以原型存在, 多代谢为小分子的没食子酸; 环烯醚萜苷没有发现代谢成分; 丹皮酚原苷易水解为丹皮酚中间代谢物, 再与硫酸、葡萄糖醛酸结合产生新的代谢物。

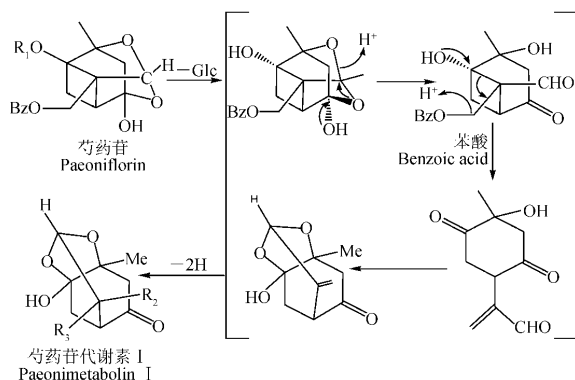


图 3 芍药苷类化合物代谢途径

Fig. 3 Metabolism way of paeoniflorin

References

- GUO Gai-Ge (郭改革), WU Sheng-Shui (吴水生). *Strait Pharmaceutical Journal* (海峡药学), 2007, 19(2): 79~80
- LI Wen-Lan (李文兰), DAI Ye (戴焯), XU Dong (徐栋), JI Yu-Bin (季宇彬). *Chinese Journal of New Drugs* (中国新药杂志), 2007, 16(23): 1944~1946
- LI Wen-Lan (李文兰), REN Xiao-Lei (任晓蕾), ZHAO Ji (赵稷), JI Yu-Bin (季宇彬), XU Dong (徐栋). *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2008, 39(2): 199~203
- LI Wen-Lan (李文兰), ZHAO Ji (赵稷), XU Dong (徐栋), REN Xiao-Lei (任晓蕾). *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)* (哈尔滨商业大学学报(自然科学版)), 2007, 23(6): 651~657
- Hsieh Y S. *Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology*, 2008, 4(1): 93~101

- 6 ZHAO Xin-Feng(赵新峰), LI Ping(李平), SUN Yu-Qing(孙毓庆). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*(药物分析杂志), **2007**, 27(6): 874 ~ 876
- 7 LI Wen-Lan(李文兰), SUN Zhi(孙志), CHENG Bin(程斌), JI Yu-Bin(季宇彬), BAI Jing(白晶). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), **2008**, 28(8): 1914 ~ 1918
- 8 Barfield M, Spooner N, Lad R, Parry S, Fowles S. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 870(1): 32 ~ 37
- 9 LIANG Qiong-Lin(梁琼麟), WEN Hua-Zhen(温华珍), WANG Yu-Li(王玉莉). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(11): 1555 ~ 1559
- 10 Zhao W J, Wang B J, Wei C M, Yuan G Y, Bu F L, Guo R C. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **2008**, 33(3): 289 ~ 294
- 11 ZHAO Rui(赵锐), XING Zeng-Tao(邢增涛), LI Xiang-Gao(李向高), CHENG Ke-Di(程克棣), YANG Xiu-Wei(杨秀伟). *Journal of Jilin Agricultural University*(吉林农业大学学报), **1998**, 20(2): 103 ~ 110

Identification of Chemical and Metabolic Components of Total Glycosides of Jinkuishenqi Pill by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry

LI Wen-Lan^{*1,2}, HU Yang¹, JI Yu-Bin^{1,2}, DU Juan¹, SUN Zhi¹, BAI Jing^{1,2}

¹(Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences Harbin University of Commerce, Harbin 150076)

²(Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs Ministry of Education, Harbin 150076)

Abstract To identify the chemical components of total glycosides of Jinkuishenqi pill and their metabolites in vivo, analysis and comparison were carried out by High performance liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) among rats' plasma samples obtained after oral administration of total glycoside (TG) of Jinkuishenqi pill. 19 compounds, including galloyl-3-O-apiofuranosyl-(1→6)-glucoside, hydroxyl-paeoniflorin, morroniside, loganin, sweroside, rehmanioside A or B, 1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose, paeoniflorin, cornuside II, 6'-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl) paeoniflorin, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose, cornuside I, pentagalloylglucose, hydroxy-benzoyl paeoniflorin, paeonoside, benzoylpaeoniflorin, 4'-hydroxy 6'-(3,4,5-trihydroxy-benzoyl)-paeoniflorin and 2 compounds unknown, were detected in TG of Jinkuishenqi pill. The compounds absorbed into blood, including their prototype components and their metabolites, were identified. 17 compounds were detected after oral administration of TG, 9 of which are metabolites and others are the original form of the compounds contained in Jinkuishenqi pill. Among the total, the metabolites are Galic acid, 2-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronic acid esters, paeonimetabolin I, 2-hydroxy-4-methoxy acetophenone-5-O-sulfate, 2,4-dihydroxyacetophenone-5-O-sulfate, 2,4-dihydroxyacetophenone and 3 compounds unknown, respectively. The results showed that HPLC-ESI/MS method is efficient, sensitive for detection and identification of prototype and metabolism of total glycosides of metabolites in vivo, which is important to reveal the chemical component of the metabolism in vivo.

Keywords Total glycoside of Jinkuishenqi pill; Component analysis; Metabolites in vivo; High performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry

(Received 15 April 2010; accepted 28 June 2010)