

HPLC-MSⁿ 分析扶正化癆方中五味子的入血成分

沈丹萍^{1,2}, 杨莉³, 陶艳艳², 王清兰², 刘成海^{1,2,4*}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237;

2. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203;

3. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室暨中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203;

4. 上海高校中医内科学 E 研究院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 分析扶正化癆方 (Fuzheng Huayu decoction, FZHY) 灌胃大鼠后进入血液的五味子中木脂素类成分, 以探讨部分体内效应成分。方法: 应用液相色谱-电喷雾质谱联用 (HPLC-ESI/MSⁿ) 技术, 通过空白血清, 口服 FZHY 方后含药血清, FZHY 方和对照品之间的色谱图和质谱碎片信息的对比分析, 结合文献报道, 确定口服 FZHY 方后大鼠的入血成分。结果: FZHY 方和口服 FZHY 方后含药血清中均含有五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素, 并在 FZHY 方中还发现含有五味子甲素和丙素。结论: 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素是直接吸收入血的成分, 可能是发挥抗肝纤维化的体内效应成分。

[关键词] 扶正化癆方; 木脂素类成分; 五味子; 含药血清; 抗肝纤维化

中药复方的临床疗效通过严格随机对照的临床实验, 越来越多的获得循证医学证据与国际医学的认可, 相关作用机制研究通过动物试验等也取得了显著进步^[1]。但是, 中药复方成分复杂, 且中药复方发挥体内效应的物质基础及其代谢特点, 依然是困扰中药复方现代化的原因之一^[2]。扶正化癆胶囊 (方) 由丹参、桃仁、虫草菌丝、五味子、绞股兰、松黄粉组成, 是我国抗肝纤维化中药新药, 目前正在美国进行 II 期临床试验, 前期研究发现, 整体动物服用该方的含药血清 (药物血清) 有良好的体外抗肝纤维化活性, 包括抑制肝星状细胞活化、保护肝细胞损伤等^[3]。五味子是临床用于治疗肝炎的常用中药, 其化学研究表明^[4], 五味子有效部位主要包括木脂素、有机酸、挥发油、多糖等多种成分, 其中含量较高, 研究深入广泛且应用于临床的主要有效成分为木脂素类。因此, 本实验利用中药血清药物化学方法, 应用液质联用分析手段, 确认扶正化癆方

(Fuzheng Huayu decoction, FZHY) 中五味子的入血成分, 为进一步发现 FZHY 方体内效应物质奠定基础。

1 材料

Finnigan Deca XP plus LCQ HPLC-ESI (APCI) - Ion trap MS - 80 °C 冰箱 (Thermo 公司); 高速冷冻离心机 (Optima L-100XP, Beckman, Brea, CA, USA); 超高速离心机 (HITACHI P100MX, Beckman, Brea, CA, USA); Milli-Q 纯水仪 (Millipore, Milford, MA, USA)。

甲醇 (色谱纯), 购自 Fisher Scientific Co. (Santa Clara, USA); 醋酸铵 (色谱纯), 购自 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA); 其余试剂均为分析纯; 水为超纯水。五味子对照品五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素、五味子甲素, 纯度 > 98%, 均购自上海融合科技发展有限公司 (图 1)。扶正化癆方 (FZHY) 浸膏粉由上海现代中医药技术发展公司提供。

Wistar 雄性大鼠 (SPF 级), 220~250 g 由上海中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号 SYXK (沪) 2003-003。

2 方法

2.1 FZHY 溶液的制备

精确称取 66 mg FZHY 浸膏粉, 加入 70% 乙醇溶液 1 mL, 超声 20 min 溶解, 静置 2 h 后 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 供分析用。

[稿件编号] 20100908005

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2006CB504801); 上海市自然科学基金项目 (10ZR1431000); 上海市教育委员会 E-研究院建设项目 (E-03008)

[通信作者] * 刘成海, 教授, Tel (020) 20256521, E-mail chenghai_li@yahoo.com.cn

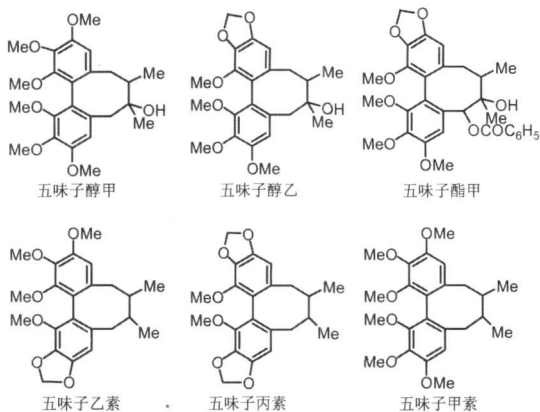


图 1 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素、五味子丙素、五味子甲素的结构

2.2 血清样品的制备 Wistar大鼠, 禁食 12 h(自由饮水), 以 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大鼠体重灌胃给药 FZHY, 给药后 15 30 min, 6 h 采血, 静置 3~4 h, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液, 分装, 置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱贮存备用。

取 200 μL 上述血清样品, 加入 200 μL 纯水和 80 μL ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 盐酸溶液, 涡旋混合 30 s, 混合液用 2 倍量水饱和乙酸乙酯萃取 3 次, 每次涡旋混合 2 min, 静置 5 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 分取上层乙酸乙酯层至 2 mL 离心管, 于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中通氮气流挥干, 残渣用 100 μL 甲醇-水-冰醋酸 (5:5:0.01) 溶液溶解, 静置 2 min, $20000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取上清, 供分析用。

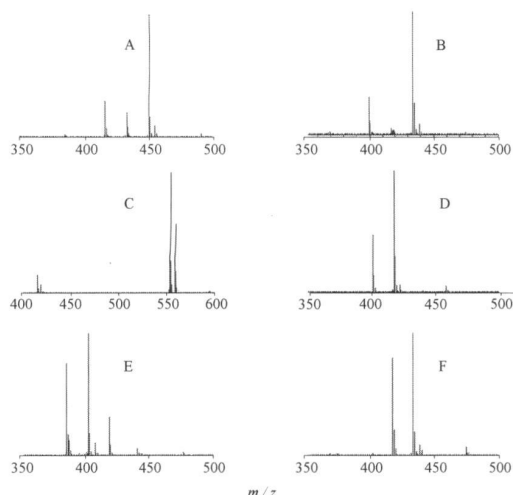
2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品适量, 以甲醇配制含五味子甲素 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 五味子乙素 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 五味子丙素 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 五味子醇甲 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 五味子醇乙 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 五味子酯甲 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品溶液, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

2.4 液相色谱与电喷雾质谱联用分析条件 Waters Atlantis T3 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $3.0 \mu\text{m}$); 流动相 甲醇- $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵, 梯度洗脱 0~5 min 10% 甲醇; 5~15 min 10%~70% 甲醇; 15~25 min 90% 甲醇; 25~30 min 90%~95% 甲醇; 30~35 min 95% 甲醇; 35~36 min 95%~10% 甲醇; 36~45 min 10% 甲醇。柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 200~600 nm 扫描。电喷雾 (ESI) 离子源, 鞘气 (氮气) 流速 $30 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气 (氮气) 流速 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 喷雾电压 5.0 kV , 毛细管温度 300

$^\circ\text{C}$, 正离子检测, 扫描范围 m/z 120~800 MS^2 和 MS^3 相对碰撞能量为 35%~40%。

3 结果与分析

3.1 6种五味子对照品的 HPLC-ESI/MSⁿ 分析 6 个木脂素类化合物对照品在一级全扫描正离子模式下, 主要的峰为分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 加合离子峰 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$; 脱水离子峰 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 见图 2。其 ESI/MSⁿ 数据见表 1。



A. 五味子醇甲; B. 五味子醇乙; C. 五味子酯甲; D. 五味子乙素; E. 五味子丙素; F. 五味子甲素。

图 2 对照品的一级质谱图

3.2 血清中五味子木脂素类化合物的鉴定 空白血清、含药血清 (给药后 15 min)、FZHY 方、对照品的选择离子色谱图见图 4, 离子 m/z 433, 417, 537, 401 在含药血清、FZHY 方、对照品中的保留时间基本一致, 表明上述离子可能为五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素。为了进一步确定化合物结构, 对上述选择离子在 FZHY 方、含药血清中进行多级质谱分析, 其碎片离子等信息见表 2。离子 m/z 415 可能为 m/z 433 的脱水离子峰 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 进一步在 ESI/MS^2 中, 离子 m/z 415 主要的碎片为 m/z 384, 400, 373, 359, 进一步在 ESI/MS^3 中, 离子 m/z 384 产生的主要的碎片为 m/z 369, 353, 经与对照品裂解规律比对, 参考文献 [7-9], 确定 FZHY 方和含药血清中都含有五味子醇甲, 其裂解途径见图 3。其他化合物的鉴定与五味子醇甲类似, 从而确定 FZHY 方和含药血清中都含有五味子

表 1 对照品的 ES/MS 数据

No.	t_R /min	HPLC-ES/MS	HPLC-ES/MS ^a	化合物
1	19.93	433[M+H] ⁺	M S ² [415]: 384(100), 400(28), 359(19), 373(17) M S ³ [384]: 369(100), 353(37)	五味子醇甲
2	21.64	417[M+H] ⁺	M S ² [399]: 384(14), 369(100), 368(88), 357(30), 337(27), 343(23), 384(11) M S ³ [369]: 337(100), 341(24) M S ³ [368]: 353(100), 337(37)	五味子醇乙
3	23.56	537[M+H] ⁺	M S ² [559]: 415(100), 371(53), 437(15), 373(13), 385(12), 340(8), 343(6) M S ³ [415]: 371(100), 373(28), 385(26), 343(12), 397(7)	五味子酯甲
4	27.38	401[M+H] ⁺	M S ² [401]: 331(100), 386(60), 300(55), 371(48), 370(36), 301(30) M S ³ [331]: 300(100), 301(34), 273(10), 316(6)	五味子乙素
5	25.59	417[M+H] ⁺	M S ² [417]: 347(100), 402(83), 316(74), 370(17), 386(16), 371(9), 387(5) M S ³ [347]: 316(100), 332(13)	五味子甲素
6	28.63	385[M+H] ⁺	M S ² [385]: 355(100), 315(58), 285(47), 325(23), 299(8), 323(7), 257(7) M S ³ [355]: 309(100), 285(87), 297(69), 227(67), 323(62) M S ³ [315]: 285(100), 257(26), 227(9), 255(7)	五味子丙素

醇乙、五味子酯甲、五味子乙素。五味子甲素、丙素仅 在 FZHY 方中发现, 在含药血清中未发现, 见表 2。

表 2 FZHY 方五味子木脂素成分及入血成分

No.	t_R /min	HPLC-ES/MS	HPLC-ES/MS ^a	化合物	来源
1	20.01	433[M+H] ⁺	M S ² [415]: 384(100), 400(26), 373(18), 359(17) M S ³ [384]: 369(100), 353(30)	五味子醇甲	FZHY 含药血清
2	21.75	417[M+H] ⁺	M S ² [399]: 369(100), 368(94), 357(30), 337(28), 343(19), 384(14) M S ³ [369]: 337(100), 341(8) M S ³ [368]: 353(100), 337(44)	五味子醇乙	FZHY 含药血清
3	23.77	537[M+H] ⁺	M S ² [559]: 415(100), 371(50), 437(15), 373(12), 385(9), 340(9) M S ³ [415]: 371(100), 373(29), 385(26), 340(16), 343(11), 397(5)	五味子酯甲	FZHY 含药血清
4	27.5	401[M+H] ⁺	M S ² [401]: 331(100), 386(74), 300(50), 371(46), 370(45), 301(33), 354(8) M S ³ [331]: 300(100), 301(38), 316(10)	五味子乙素	FZHY 含药血清
5	25.56	417[M+H] ⁺	M S ² [417]: 347(100), 402(85), 316(77), 370(17), 386(15), 371(9), 387(5) M S ² [347]: 316(100), 332(12)	五味子甲素	FZHY
6	28.61	385[M+H] ⁺	M S ² [385]: 355(100), 315(58), 285(47), 325(23), 257(8) M S ³ [355]: 309(100), 285(87), 227(78), 323(78) M S ³ [315]: 285(100), 257(24), 227(8), 255(7)	五味子丙素	FZHY

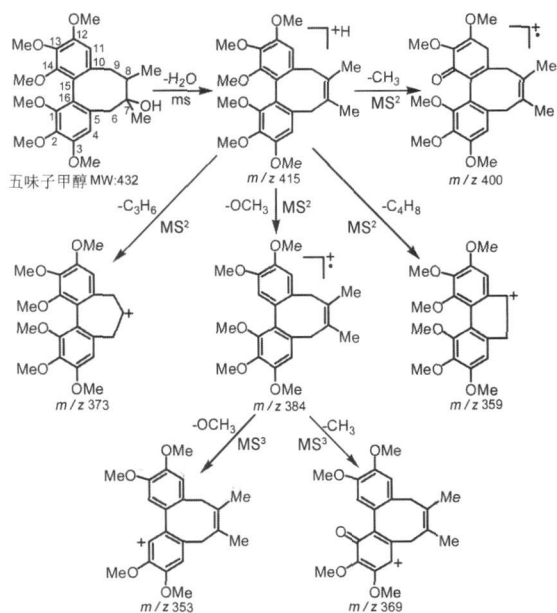
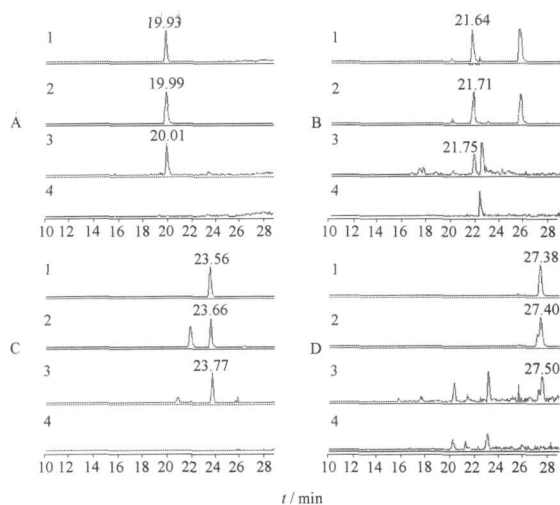


图 3 五味子醇甲的裂解途径



1. 对照品; A-1. 五味子醇甲; B-1. 五味子醇乙; C-1. 五味子酯甲; D-1. 五味子乙素; 2. FZHY 方; 3. 口服 FZHY 方后的含药血清; 4. 空白对照。

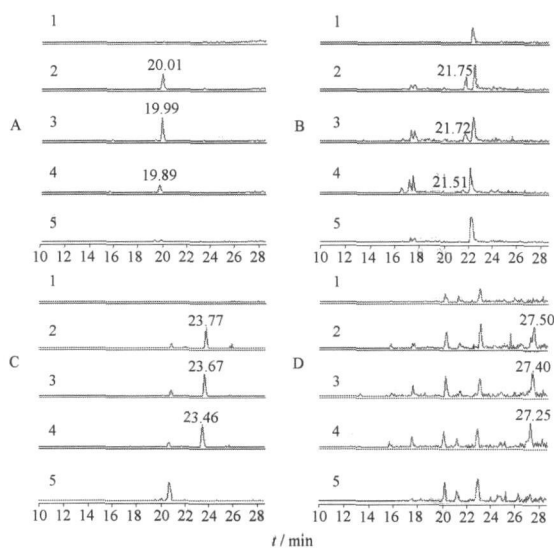
图 4 空白血清、含药血清、FZHY 方和对照品的选择离子色谱图

4 讨论

本实验通过 HPLC-ESI-MSⁿ 分析技术, 快速、简便地分析了 FZHY 方含有的五味子木脂素类化学成分, 同时鉴定了大鼠口服 FZHY 方后, 其含药血清中所含成分, 结果表明 FZHY 方和含药血清中都含有五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子乙素, 但在 FZHY 方中鉴定的五味子甲素和丙素并没有在

含药血清中发现, 表明 FZHY 方中五味子醇甲等 4 种成分以原型形式进入体内, 而五味子甲素等 2 种成分没有在血清测到, 可能没有被吸收入血, 或者已经发生代谢。五味子具有保肝降酶作用^[6-7], 但是所含成分与其入血成分有较大差别, 而针对所检测到的入血成分, 开展抗肝纤维化的生物活性评价, 可能更科学的有助于较快发现该方抗肝纤维化的部分体内效应成分。

在以往报道中, 口服给药五味子药材后, 部分木脂素类化合物的最大血药浓度吸收浓度为给药后 6 h 左右^[8], 但若以丹参和五味子配伍口服给药, 其血药浓度时间曲线有双峰现象, 并且第 1 次最大血药浓度吸收时间为给药后 1 h 左右^[9]。本文以大鼠口服 FZHY 方, 以动态多点取血, 检测五味子的入血成分, 结果发现, 在给药 15、30 min, 1 h 后, 木脂素类化合物的血药浓度没有很大变化, 但在 6 h 的血样中, 已检测不到五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子醇乙等化合物见图 5。由于 FZHY 方中尚含有丹参、桃仁、虫草菌丝、绞股兰等组分, 他们有可能对五味子中木脂素类化合物在体内的代谢规律产生影响。研究显示, 复方与单味药或拆方在体内吸收分布代谢可能存在差别, 在复方的研究中, 应注意复方作为一个整体的分析, 不可用单味药或拆方的效果替代复方的效果^[10]。



1. 0 min; 2. 15 min; 3. 30 min; 4. 1 h; 5. 6 h; A. 五味子醇甲; B. 五味子醇乙; C. 五味子酯甲; D. 五味子乙素。

图 5 不同时间段含药血清样品选择离子色谱图

[参考文献]

- [1] Zhang H, Chen S, Deng X, et al. The effects of Danggui Bu Xue Tang on blood lipid and expression of genes related to foam cell formation in the early stage of atherosclerosis in diabetic GK rats [J]. *Diabetes Res Clin Pract* 2007, 77 (3): 479
- [2] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究 [J]. *世界科学技术——中医药现代化*, 2002, 4 (2): 1.
- [3] Liu C, Hu Y, Xu L, et al. Effect of Fuzheng Huayu formula and its actions against liver fibrosis [J]. *Chin Med*, 2009, 4 (1): 12.
- [4] 李晓光, 高勤, 翁文, 等. 五味子有效部位及其药理作用研究进展 [J]. *中药材*, 2005, 28 (2): 156.
- [5] Huang X, Song F, Liu Z, et al. Structural characterization and identification of dibenzocyclooctadiene lignans in Fructus Schisandrae using electrospray ionization ion trap multiple-stage tandem mass spectrometry and electrospray ionization Fourier transform cyclotron resonance multiple stage tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta* 2008, 615 (2): 124.
- [6] 郭冷秋, 张鹏, 黄莉莉, 等. 五味子药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2006, 34 (4): 51.
- [7] Loo W T, Cheung M N, Chow L W. Fructus schisandrae (Wuwei zi) - containing compound inhibits secretion of HBeAg and HBsAg in hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Biom ed Pharm acother* 2007, 61 (9): 606.
- [8] Wang B L, Hu J P, Tan W, et al. Simultaneous quantification of four active schisandra lignans from a traditional Chinese medicine Schisandra chinensis (Wuwei zi) in rat plasma using liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biom ed Life Sci* 2008, 865 (1/2): 114.
- [9] 杨秀伟. 中药成分的吸收分布代谢排泄毒性和药效. 下册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009. 317.
- [10] 刘永刚, 罗佳波, 吴忠, 等. 麻黄汤拆方对过敏性炎症的抑制作用 [J]. *中草药*, 2005, 36 (4): 563.

Identification of the lignans components after oral administration of Fuzheng Huayu decoction in rat serum by HPLC-MSⁿ

SHEN Danping^{1,2}, YANG Li³, TAO Yanyan², WANG Qinglan², LIU Chenghai^{1,2,4*}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

3. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

4. E-Institute of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To study the lignans components in rat serum after oral administration of Fuzheng Huayu decoction (FZHY), and to investigate the active ingredients *in vivo*. **Method** A rapid, sensitive and selective method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI/MSⁿ) was established. The serum samples were extracted with ethyl acetate (EOA) for three times. The chromatographic separation was achieved on a Waters Atlantis T3 column by gradient elution using methanol and water containing 5 mmol L⁻¹ ammonium acetate as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹. Mass spectra were acquired in positive ion mode. Identification and structural elucidation of the components in FZHY and dosed serum were performed by comparing their retention time and MSⁿ spectra with those of reference compounds and reported data in the literatures. **Result** Schisandrin, schisandrol B, schisantherin A and schisandrin B were found in FZHY and dosed serum, but schisandrin C and deoxyschisandrin were only found in FZHY. **Conclusion** Schisandrin, schisandrol B, schisantherin A and schisandrin B can be directly absorbed into the blood after oral administration of FZHY, and the four lignans components from Schisandra chinensis might play a key role as the ingredient basement of FZHY for anti liver fibrosis.

[Key words] Fuzheng Huayu decoction; lignans; Schisandra chinensis; serum containing drug; anti liver fibrosis

doi 10.4268/cjmm.20110707

[责任编辑 马超一]