

基于UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS的如意珍宝丸 体内外成分分析

陈可点¹, 马兆臣¹, 蔡冰冰¹, 刘颖¹, 刘毓东¹, 李涛¹, 胥明珠¹, 王海苹²,
林娜^{1*}, 张彦琼^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 金诃藏药股份有限公司, 西宁 810003)

[摘要] **目的:** 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS)对如意珍宝丸所含化学成分及其入血、入脑成分进行定性研究。**方法:** 采用UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS鉴定如意珍宝丸的化学成分。12只雄性SD大鼠随机分为空白组与如意珍宝丸组,如意珍宝丸组按生药量 $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行如意珍宝丸混悬液灌胃,空白组灌胃等体积纯水。灌胃1.5 h后取血浆与脑脊液,采用ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱($2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~15 min, 97%~80%A; 15~30 min, 80%~60%A; 30~40 min, 60%~30%A; 40~45 min, 30%~5%A),电喷雾离子源(ESI),扫描范围 m/z 100~1 500,并结合文献和对照品的相应信息,分别完成在正、负离子模式下对样品进行入血与入脑成分的定性分析。**结果:** 从如意珍宝丸80%甲醇溶液中鉴定出126种化合物,血浆中检测到14种原型成分,脑脊液中检测到7种原型成分,并分析了芹菜素、芹菜素-7-O葡萄糖醛酸苷、高良姜素、甘草苷、胡椒碱、甘草酸、丁香酚、没食子酸和胆酸的裂解规律。**结论:** 该研究实现了如意珍宝丸中多类别体外化学成分、入血及入脑成分的快速表征与鉴定,为该品种药效物质基础与质量控制研究提供了参考。

[关键词] 如意珍宝丸; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS); 化学成分; 入血成分; 入脑成分

[中图分类号] R2-0; R33; R274 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)24-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241443 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240919.1508.003>

[网络出版日期] 2024-09-19 16:11:55

Identification of *in Vitro* and *in vivo* Chemical Constituents of Ruyi Zhenbaowan Based on UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS

CHEN Kedian¹, MA Zhaochen¹, CAI Bingbing¹, LIU Ying¹, LIU Yudong¹, LI Tao¹, XU Mingzhu¹,
WANG Haiping², LIN Na^{1*}, ZHANG Yanqiong^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Arura Tibetan Medicine Co. Ltd., Xining 810003, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the chemical constituents of Ruyi Zhenbaowan *in vitro* and *in vivo*. **Method:** The chemical constituents of Ruyi Zhenbaowan were identified based on UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS. A total of 12 male SD rats were randomized into two groups: control (pure water) and Ruyi Zhenbaowan ($1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rats were administrated with the suspension of Ruyi Zhenbaowan or pure water by gavage. After 1.5 h, the plasma and cerebrospinal fluid were collected. Chromatographic separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} column ($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$) with a mixture of 0.1%

[收稿日期] 2024-06-06

[基金项目] 青海省中央引导地方科技发展资金项目(2023ZY025);中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20230501)

[第一作者] 陈可点,在读博士,从事中药药理学研究, E-mail: cecich@126.com

[通信作者] * 张彦琼,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn;

* 林娜,研究员,博士生导师,从事抗炎免疫中药药理研究, E-mail: nlin@icmm.ac.cn

formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase. Gradient elution was carried out according to the procedure of 0~15 min, 97%~80%A; 15~30 min, 80%~60%A; 30~40 min, 60%~30%A; 40~45 min, 30%~5%A. The ion source was electrospray ionization, and scan range was m/z 100-1 500. The prototype components and the components in the plasma and cerebrospinal fluid were analyzed qualitatively by scanning in positive and negative ion modes and identified by comparison with the data in published literature and the information of standard substances. **Result:** A total of 126 chemical constituents were identified from the 80% methanol solution of Ruyi Zhenbaowan, and 14 and 7 prototype constituents were detected in the plasma and the cerebrospinal fluid, respectively. In addition, the fragmentation rules of apigenin, apigenin-7-O-glucuronide, galangin, liquiritin, piperine, glycyrrhizic acid, eugenol, gallic acid, and cholic acid were deduced. **Conclusion:** This study achieved rapid multicomponent characterization and identification of Ruyi Zhenbaowan *in vitro* and *in vivo*, providing theoretical support for exploring active substances and performing quality control.

[Keywords] Ruyi Zhenbaowan; UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS; chemical constituent; constituent absorbed into plasma; constituent absorbed into cerebrospinal fluid

“白脉”属于藏医理论范畴,始载于藏医著作《四部医典》,书中记载:“大脑脉络犹如海洋中,如根植土深入地表内,传导润泽水脉十九条。”藏医将从脑中发出的,以隆为物质基础的脉称为白脉^[1]。从现代医学视角,“白脉”泛指中枢及外周神经系统^[2-3],由此衍生出的白脉疗法在神经系统、骨关节等疾病的治疗中具有重要影响^[1]。如意珍宝丸源自《藏医医诀补遗》,为藏族药经典名方,由短穗兔耳草、珍珠母、红花、肉豆蔻、毛诃子、荜茇、肉桂、藏木香、人工麝香、沉香、诃子、决明子等30味药材组成,具有清热、醒脑开窍、舒筋通络、干黄水等功效,是藏医治疗白脉病的首选药物,在三叉神经痛、偏头痛、带状疱疹后神经痛等神经病理性疼痛、关节性疼痛及中风后遗症的治疗中具有良好的临床疗效^[4]。然而,其化学成分鉴定与药效物质基础研究尚未见报道。

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS)已被广泛应用于复杂样品痕量成分的检测,其利用目标化合物准分子离子的精确质荷比进行分析,适用于复方多成分的探索研究^[5]。本研究基于如意珍宝丸功能主治特点,拟采用UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS技术,快速、准确地鉴定如意珍宝丸所含化学成分,及其入血和入脑成分,以期为藏医经典方如意珍宝丸的药效物质基础研究、质量控制与临床合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠12只,体质量(200±20)g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,实验动物合格证号SCXK(京)2021-0011。大鼠饲养

于中国中医科学院中药研究所实验动物中心SPF标准环境下,6只/笼进行喂养,共2笼。动物室干净明亮,通风情况良好,室温(23±5)℃,湿度55%±5%。每3d更换1次垫料。大鼠自由进食饮水,每天及时更换。在实验正式开始前,将大鼠适应性喂养1周。本实验获得中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准(批准号2024B074)。

1.2 药物与试剂 如意珍宝丸(金诃藏药股份有限公司,批号01230301,每1g相当于1g原药材);甘草酸、甘草苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、没食子酸、高良姜素、胆酸、丁香酚、胡椒碱标准品(成都乐美天医药科技有限公司,批号分别为DSTDGQ000603、DSTDG000902、DSTDQ002602、DSTDQ009001、DSTDMD000802、DST220118-020、DSTDD04201、DSTDD003601、DSTDH004301),纯度均≥98%;甲醇为色谱纯,乙腈为质谱级,其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 Thermo Q-Exactive液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪、Xcalibur数据分析系统(美国Thermo公司);Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm, 美国Waters公司)。

2 方法

2.1 如意珍宝丸样品制备 取如意珍宝丸适量,加80%甲醇超声提取30 min,制成质量浓度25 g·L⁻¹的溶液,取0.22 μm超滤膜过滤续滤液待测。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称量1.2项下的9种对照品适量置于10 mL量瓶中,用80%甲醇配制成0.1 g·L⁻¹的对照品储备液。精密吸取上述对照品溶液制备成3个混合对照品溶液,混合对照品溶

液1由芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、甘草苷、甘草酸、没食子酸和胆酸组成,混合对照品溶液2为高良姜素对照品溶液,混合对照品溶液3由胡椒碱和丁香酚组成。分别量取适量各组对照品溶液置于10 mL量瓶中,80%甲醇水溶液定容,分别得终质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 动物分组及给药 取如意珍宝丸15 g,加适量超纯水振荡混匀,制成质量浓度为 $0.36\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,待灌胃。SD大鼠12只,随机分成空白组和如意珍宝丸组,每组6只,给药前禁食12 h,自由饮水。经前期预实验确认,如意珍宝丸组按照4倍临床等效剂量 $1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃如意珍宝丸混悬液^[6],空白组灌胃同体积超纯水。

2.4 血浆样品制备 各组大鼠灌胃1.5 h后,1.5%戊巴比妥钠($2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,静置30 min, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径7 cm,下同),取上清,将相同组别不同大鼠的血浆涡旋混合,取血浆200 μL 加入4倍体积甲醇,涡旋混合3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,氮气吹干,残渣用甲醇200 μL 复溶后,涡旋混合3 min,取0.22 μm 超滤膜过滤续滤液供后续分析。

2.5 脑脊液样品制备 取血后,固定大鼠头部,75%乙醇对颈后部皮肤消毒,微量输液针从枕骨大孔刺入小脑延髓池,抽取脑脊液于预冷离心管中,将相同组别不同大鼠脑脊液涡旋混合, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上层脑脊液,各组取脑脊液200 μL ,加4倍体积甲醇,涡旋3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,氮气吹干,残渣用甲醇200 μL 复溶后,涡旋混合3 min,取0.22 μm 超滤膜过滤续滤液供后续分析。

2.6 UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS分析

2.6.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$),流动相A为0.1%甲酸水,流动相B为乙腈。色谱梯度洗脱条件设置如下:0~15 min,97%~80%A;15~30 min,80%~60%A;30~40 min,60%~30%A;40~45 min,30%~5%A。柱温设置为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量设置为4 μL ,流速设置为 $0.30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.6.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式采集数据。数据采集范围 m/z 100~1 500。裂解电压(DP)100 V,碰撞能量(CE)25 eV,碰撞电压差(CES)15 eV。

2.7 数据分析 通过对 Scifinder、CNKI、

Chemspider、PubChem 等在线数据库汇总和文献的检索,建立如意珍宝丸所含化学成分数据库,共收录566种化合物的名称、化学结构、分子量和分子式信息。将以上信息导入 Xcalibur 软件平台数据库中,对比文献资料分析不同类型化合物的分子量、保留时间与二级离子碎片,部分化合物与对照品比对进行确认,推测如意珍宝丸所含化学成分。

3 结果

3.1 如意珍宝丸所含化学成分鉴定 通过 Xcalibur 软件分析如意珍宝丸样品在正、负离子模式下采集得到的质谱数据,获得正负离子模式下总离子图见增强出版附加材料。通过参考文献与已有数据库所获得的分子量、二级质谱信息等对数据采集结果进行归属,以实测值和理论值误差 $<10\text{ ppm}$ 为标准,部分化合物与标准品进行对照,共从如意珍宝丸中初步鉴定了126个化合物,主要包含黄酮类、生物碱类、萜类成分、有机酸类、酚类、鞣质类成分,各成分分子离子峰、二级离子碎片等信息见增强出版附加材料。

3.1.1 黄酮类成分 共鉴定出如意珍宝丸所含39个黄酮类成分,此类成分在裂解过程中容易脱去糖基、发生逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA)及丢失 CH_3 、 CH_2 、 CO 、 CO_2 等中性碎片^[7]。以芹菜素、高良姜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷和甘草苷为例进行裂解规律分析。化合物**84**在正离子模式下显示准分子离子峰 m/z 271.059 8,丢失1分子 CO 产生 m/z 243.064 9的碎片, m/z 153.019 5和 m/z 119.050 3碎片是黄酮类化合物C环发生RDA裂解生成的特征碎片离子,与标准品保留时间、准分子离子峰及裂解规律等信息对照后,确认其为芹菜素(见增强出版附加材料)。化合物**85**在正离子模式下具有与化合物**86**相同的准分子离子峰(m/z 271.060 0),且部分裂解规律相同(m/z 153.018 3),为芹菜素同分异构体,由于其不存在 m/z 119.050 3碎片,且产生特征性碎片离子 m/z 225.049 1和 m/z 197.059 6^[8](见增强出版附加材料),推测其为黄酮醇类化合物,经对照品指认,确认其为高良姜素。化合物**61**在负离子模式下显示分子离子峰 m/z 445.077 1,脱去葡萄糖醛酸形成 m/z 269.045 8和 m/z 175.024 9的离子碎片,见增强出版附加材料,与对照品比对后确认其为芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷。甘草苷为黄酮-O-糖苷类化合物,负离子模式下,甘草苷示 m/z 417.119 6的分子离子峰,氧苷键断裂后产生 m/z 255.066 6的碎片离子,进一步发生RDA反应裂解产生

m/z 135.008 9 和 m/z 119.050 3 (见增强出版附加材料)。

3.1.2 生物碱类成分 共鉴定出如意珍宝丸所含22个生物碱类成分,主要为酰胺类生物碱。以胡椒碱为例进行裂解规律分析。胡椒碱为吡啶结合末端带有亚甲二氧基苯的不饱和脂肪酸,在正离子模式下显示 m/z 286.143 4 分子离子峰,其质谱裂解特点为含氮部分容易失去一个中性吡啶($C_5H_{10}N$),形成 m/z 201.054 5 碎片离子及末端产生 m/z 135.044 0 的甲基亚甲二氧基苯结构^[9]。 m/z 201.054 5 离子碎片丢失 CO 形成 m/z 173.043 8 的碎片离子。见增强出版附加材料。

3.1.3 萜类成分 共鉴定出如意珍宝丸所含15个萜类成分,包含五环三萜、环烯醚萜以及倍半萜类,以甘草酸为例进行裂解规律分析。负离子模式下甘草酸的准分子离子为 m/z 821.398 6,易脱去2分子葡萄糖醛酸($[M-H]^-$, m/z 351.057 3),或糖基上脱去两分子羧酸、糖苷键断裂并失去 $C_9H_{24}O$ 基团后得到 m/z 193.035 6 碎片,其裂解规律见增强出版附加材料。

3.1.4 有机酸类成分 共鉴定出如意珍宝丸所含8个有机酸类成分,此类成分易在羰基处断裂形成碎片离子,且易丢失 CO、 CO_2 、 H_2O 等基团^[7]。以胆酸与没食子酸为例进行裂解规律分析。胆酸在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 407.080 9,脱去1分子 H_2O 得 m/z 389.319 9 碎片离子,丢失末端基团($C_5H_{14}O_4$)后形成 m/z 251.179 2 碎片离子。化合物 10 在负离子模式下准分子离子峰 m/z 169.013 8,丢失羧基形成 m/z 125.024 5 碎片离子,结合化合物的分子式、裂解规律、保留时间与标准品比对,确认其为没食子酸,见增强出版附加材料。

3.1.5 酚类成分 共鉴定出如意珍宝丸所含8个酚类成分,此类成分的裂解主要显示为各种取代基的丢失,以丁香酚为例说明此类化合物的推测过程及其可能的裂解途径。丁香酚含酚羟基,正离子模式下分子离子峰为 m/z 165.090 9,其C4位烯丙基双键不能与苯环形成 $\pi-\pi$ 共轭,在碰撞中易丢失双键,同时脱水得到 m/z 137.059 6,然后直接脱去 CO 得到 m/z 109.065 1,其可能的裂解途径见增强出版附加材料^[10-11]。

3.2 如意珍宝丸入血成分鉴定 在正、负离子模式下对大鼠血浆样本进行数据采集,与前期收集的分子量、保留时间和准分子离子峰及二级碎片离子峰信息进行对照分析,鉴定得到14个如意珍宝丸入血

成分,主要属于有机酸、生物碱及黄酮类成分,入血成分相关信息见表1。

3.3 如意珍宝丸入脑成分鉴定 在正、负离子模式下对大鼠脑脊液样本进行数据采集,对照分子量、保留时间及二级离子信息等,从如意珍宝丸给药脑脊液中鉴定得到7个原型成分,以有机酸类成分为主,还包含苯丙素类、生物碱类以及萜类成分。入脑成分相关信息见表2。

4 讨论

本研究通过 UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS 技术,对正、负模式下的离子信息进行整合归属,鉴定得到126个如意珍宝丸所含化学成分,其中,39个黄酮类成分、22个生物碱类成分、15个萜类成分、8个有机酸类成分、8个酚类成分、8个鞣质类成分、6个酯类成分、4个苯丙素类成分、3个醛类成分、2个氨基酸类成分、1个苯乙醇类成分和10个其他类型成分,黄酮及其苷类成分占比最多。

由于药物通过吸收入血进行体内分布,大部分在到达靶器官后发挥药效,故鉴定入血成分有助于药效物质基础的初步确认。本研究对如意珍宝丸入血情况进行了分析,其中,2个有机酸类成分、5个黄酮类成分、4个生物碱类成分、1个苯丙素类成分、1个酚类成分和1个萜类成分。与体外原型成分相比,黄酮类成分数量大量减少,主要是因为其在体外主要与多种糖类形成单糖苷或双糖苷的形式存在,糖苷键形成位置、糖的种类与数量等改变都导致黄酮类成分种类增加,例如,以芹菜素为苷元的多种黄酮苷类在体外被指认,但入血后未被检测,因此推断,其主要以苷元形式在体内存在并发挥药效,有研究表明,芹菜素能够通过抑制干扰素基因刺激因子(STING)/干扰素调节因子3(IRF3)通路抑制先天免疫反应和减轻炎症^[12],并通过激活细胞外调节蛋白激酶(ERK)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)/脑神经营养因子(BDNF)轴而发挥神经保护作用^[13]。入血的生物碱类成分均来自莼苳,根据藏医理论,莼苳常与诃子、白豆蔻、肉桂配伍治疗隆病^[14],前者主要含酰胺类生物碱为主的碱性成分,而后三者主要含没食子酸等酸性成分,配伍后有利于莼苳中生物碱成分的溶出,而有研究表明,胡椒碱、莼苳壬三烯哌啶及莼苳壬二烯哌啶是莼苳的主要药效成分^[15],可抑制NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的激活,减少炎性细胞因子的释放^[16],通过抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)信号传导有效减少 β 淀粉样蛋白(A β)的生成,缓解神经炎症,并减轻自

表 1 如意珍宝丸入血成分的 UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS 分析
Table 1 Identification of chemical components containing Ruyi Zhenbaowan in plasma by UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS

No.	成分	分子式	离子类型	m/z 理论值	m/z 实测值	δ/ppm	碎片离子	成分类型
1	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.013 1	169.012 2	5.32	124.037 0	有机酸
2	对香豆素酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	165.054 6	165.054 3	1.82	147.044 1、119.049 4	苯丙素类
3	西藏龙胆碱	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166.086 3	166.086 3	0.00	149.059 7、131.049 2、120.081 0、 107.049 5	生物碱
4	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.119 1	417.119 6	1.20	135.045 3、119.050 3	黄酮类
5	丁香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	[M+H] ⁺	165.091 0	165.090 6	2.42	137.059 7、124.052 0、109.028 8、 105.070 2	酚类
6	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.056 1	299.056 5	1.34	284.068 6、255.065 2、107.049 7	黄酮类
7	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 6	445.077 1	1.12	269.045 9、175.024 9	黄酮类
8	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.060 1	271.060 9	2.95	153.069 7	黄酮类
9	高良姜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.060 1	271.060 2	0.39	197.059 8、153.069 9	黄酮类
10	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.396 5	821.399 2	2.28	351.057 6、193.035 5	萜类
11	胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	[M-H] ⁻	407.280 3	407.280 9	1.47	389.271 0、371.259 8、363.291 0、 361.274 9、353.249 2、351.230 6、 343.264 8、341.248 8、327.270 4、 325.254 2、323.237 4、289.217 7、 251.202 2	有机酸
12	胡椒碱	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286.143 8	286.143 4	1.40	201.054 5、173.059 8、135.044 0	生物碱
13	萆薢壬三烯哌啶	C ₂₁ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	340.190 7	340.190 8	0.29	255.102 1、227.107 5、179.130 4、 161.059 6、131.049 2	生物碱
14	萆薢壬二烯哌啶	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	342.206 4	342.206 4	0.00	161.059 7、135.044 0	生物碱

表 2 如意珍宝丸入脑成分的 UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS 分析
Table 2 Identification of chemical components containing Ruyi Zhenbaowan in brain by UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS

No.	成分	分子式	离子类型	m/z 理论值	m/z 实测值	δ/ppm	碎片离子	成分类型
1	莽草酸	C ₇ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	173.045 5	173.056 9	6.59	155.046 3、129.067 1	有机酸
2	对香豆素酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	165.054 6	165.054 3	1.82	147.044 0、119.049 3	苯丙素类
3	西藏龙胆碱	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166.086 3	166.086 0	1.81	149.059 5、131.049 1、120.081 0、 107.049 4	生物碱
4	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.013 1	169.013 0	0.59	125.035 4	有机酸
5	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.396 5	821.398 2	2.07	351.057 3、193.035 6	萜类
6	胆酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	[M-H] ⁻	407.280 3	407.280 9	1.47	389.270 2、371.259 9、363.290 7、 361.274 9、353.249 2、351.202 1、 343.264 4、341.249 3、327.270 1、 325.254 0、323.238 6、289.217 9、 251.202 1	有机酸
7	土木香内酯	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	233.153 6	233.154 9	5.58	215.143 1、187.148 1、177.091 0、 173.959 0、155.085 5、151.075 3、 133.101 2、105.070 2	萜类

身免疫性脑脊髓炎的症状及巨噬细胞和 T 细胞的活化^[17],能够发挥其治疗外周与神经炎症的功效。

脑脊液能够广泛表征受到血脑、血脑脊液及血脊髓屏障严格控制且能进入中枢神经系统的多种分子,在很大程度上反映了大脑的代谢活动和需求,而炎症条件下出现的渗透性增加和屏障渗漏往往能干扰上述过程^[18]。由于临床不易获得脑组织,所以脑脊液也作为多种神经系统或炎症相关疾病

的诊断和病理生理学分析^[19],这也与如意珍宝丸的临床适应症紧密相关。因此,本研究以脑脊液样本为检测样本之一,对如意珍宝丸的体内成分谱进行表征。除甘草酸外,脑脊液中的原型成分均为质荷比<500 Da的小分子量成分,可经被动扩散直接透过进入脑脊液,大分子物质多通过内皮细胞膜上的转运蛋白辅助入脑发挥作用^[20-21],提示如意珍宝丸中大多数成分以被动扩散方式通过血脑脊液屏障,并进入中枢神经系统发挥作用。入血成分中的黄酮苷类成分芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸由其苷元芹菜素与糖基连接而成,结合后水溶性增加,脂溶性下降,生物膜透过性较差,屏障透过能力也较差,使得其苷类成分在体内的吸收较差,无法在脑中被检测到^[22]。本研究指出莽草酸与土木香内酯2种入脑成分并未在血清中被同步检测到,可能是由于其快速吸收入血,先一步被组织代谢;其次,仅在脑脊液中检测到的成分推测其可能具有脑靶向作用,可通过血脑脊液屏障直达病灶部位发挥药效^[23]。与体外成分和入血成分鉴定结果对比,酚酸类成分在入脑过程中具有更好的表现,且此类成分具有公认的抗炎与神经保护作用^[24-25],如没食子酸能够通过抑制嘌呤能受体(P2X7)介导的NF- κ B/信号传导转录激活因子3(STAT3)信号通路而缓解神经性疼痛行为^[26],并通过抑制NF- κ B/MAPK信号通路而减轻炎症^[27],被认为是治疗神经系统疾病和障碍的潜在先导化合物之一,可用于治疗多种神经疾病,如中风、神经性疼痛及神经炎症^[28]。因此,推测此类成分能够以原型形式对白脉病中神经系统异常相关症状直接发挥干预作用,而黄酮苷元与生物碱类成分则可能通过纠正机体外周免疫系统失衡,缓解骨关节炎、类风湿关节炎或急性痛风性关节炎等疾病^[29],同时,通过减轻疾病靶位的炎症反应而影响多种屏障所调控的化学成分吸收与代谢,从而发挥其缓解神经系统疾病的药效作用。

综上所述,本研究采用UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS技术,定性识别了藏药如意珍宝丸的体外成分、入血与入脑成分。值得关注的是,本研究首次鉴定到该品种的14个入血成分和7个入脑成分原型。其中,有机酸类成分与黄酮类成分为鉴定所得最多的入血成分种类;入脑成分以有机酸类成分为主。上述结果可为如意珍宝丸的后续质量控制、药效物质识别和作用机制阐释奠定扎实的数据基础。然而,在健康和病理状态下,如意珍宝丸化学成分的吸收、代谢特征可能有所不同,后续

将采用特定动物模型对其具体的体内的代谢与作用机制进行探索^[6,30]。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张壮,周生军,陈伦举,等. 藏医白脉理论浅述及白脉软膏近10年的研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2018,24(11):63-66.
- [2] 刘毓东,毛霞,张苏雅,等. 基于生物信息学分析整合组方规律发掘白脉软膏治疗白脉病的作用机制及其功效组配伍特点[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021,27(24):186-195.
- [3] 志玛优措,多杰仁青. 基于数据挖掘的藏医治疗“白脉病”的用药规律及药性研究[J]. 中国民族医药杂志, 2023,29(6):72-76.
- [4] 仁增加,安拉太,东格吉,等. 藏医治疗白脉病用药规律及寒热证型方剂药性分析[J]. 中成药, 2022,44(11):3709-3713.
- [5] JIA W, WU X, ZHANG R, et al. UHPLC-Q-Orbitrap-based lipidomics reveals molecular mechanism of lipid changes during preservatives treatment of Hengshan goat meat sausages [J]. Food Chem, 2022, 369: 130948.
- [6] 胥明珠,马兆臣,李怀平,等. “药效-靶标-成分-药动”多维关联模式下的如意珍宝丸药效物质基础辨识[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20250261.
- [7] 张建伟,刘伟,沈沁,等. 基于UPLC-Q-Orbitrap-MS的鹿角方化学成分及组织分布分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024,30(8):148-156.
- [8] 马银玲. 高良姜素的吸收机制与代谢轮廓及其对大鼠细胞色素P450酶及mRNA表达的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2019.
- [9] 张弘,张慧文,张晨,等. 基于UPLC-Q-Exactive-MS技术鉴定蒙药葶苈的化学成分[J]. 中南药学, 2023, 21(2):442-448.
- [10] 肖娟兰,赵鹿,张东旭,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术的蒙药安神补心六味丸化学成分辨识[J]. 中药材, 2021,44(7):1656-1667.
- [11] 陈文君,刘平,范赛,等. 5种丁香酚类化合物的电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017,8(9):3491-3498.
- [12] ZHOU X W, WANG J, TAN W F. Apigenin suppresses innate immune responses and ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of STING/IRF3 pathway [J]. Am J Chin Med, 2024,52(2):471-492.
- [13] OLASEHINDE T A, OLAOKUN O O. The beneficial

- role of apigenin against cognitive and neurobehavioural dysfunction; A systematic review of preclinical investigations [J]. *Biomedicines*, 2024, 12 (1):178.
- [14] 泽让王么,明吉措姆. 基于数据挖掘的含芫芨藏药方剂用药规律及药性研究[J]. *中国民族民间医药*, 2023,32(20):96-100.
- [15] 侯红平,王彩霞,彭博,等. 经典藏药如意珍宝片多次给药的靶器官-脑组织的成分探究[J]. *世界中医药*, 2024,19(2):139-146.
- [16] 赵晓敏. 芫芨酰胺抑制NLRP3炎症小体活化的效应及机制初步研究[D]. 广州:华南理工大学,2021.
- [17] GU S M, LEE H P, HAM Y W, et al. Piperlongumine improves lipopolysaccharide-induced amyloidogenesis by suppressing NF- κ B pathway [J]. *Neuromolecular Med*, 2018,20(3):312-327.
- [18] CARSTENS G, VERBEEK M M, ROHLWINK U K, et al. Metabolite transport across central nervous system barriers[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(7):1063-1077.
- [19] DAKTERZADA F, JOVÉ M, CANTERO J L, et al. The shift in the fatty acid composition of the circulating lipidome in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2024,20(5):3322-3333.
- [20] 王晓宇,张松林,吴萍,等. 合欢花药效物质基础的研究进展[J]. *世界中医药*, 2024,19(12):1860-1864, 1869.
- [21] 陈龙,王瑞锋,张振凯,等. 基于药动学-药效学的中药引经理论现代研究进展与思考[J]. *中成药*, 2024, doi:10.1368.R.20231123.1433.002.
- [22] 沈晓,郑华珠,孟英姣,等. 补阳还五汤吸收入脑及人血成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019,25(2):8-13.
- [23] 曾珂琪,周欣,聂聪,等. 补阳还五汤抗脑缺血损伤药效物质基础的血清药物化学研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2023,34(9):1227-1235.
- [24] LI Z, LIU Y, WANG F, et al. Neuroprotective effects of protocatechuic acid on sodium arsenate induced toxicity in mice: Role of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2021,337:109392.
- [25] 张驰,田富林,金丹,等. 酚酸生物活性研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2023,36(5):4-7,23.
- [26] YANG R, LI Z, ZOU Y, et al. Gallic acid alleviates neuropathic pain behaviors in rats by inhibiting P2X7 receptor-mediated NF- κ B/STAT3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:680139.
- [27] CHU C, RU H, CHEN Y, et al. Gallic acid attenuates LPS-induced inflammation in Caco-2 cells by suppressing the activation of the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2024,56(6):905-915.
- [28] BHUIA M S, RAHAMAN M M, ISLAM T, et al. Neurobiological effects of gallic acid: Current perspectives[J]. *Chin Med*, 2023,18(1):27.
- [29] 张爽,毕映燕,刘晓婷,等. 中药有效成分调控氧化应激防治骨关节炎的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024,30(11):282-289.
- [30] 王文丽,张国鑫,刘莹,等. 如意珍宝丸干预出血性脑卒中小鼠继发性脑损伤及中枢痛的作用及免疫炎症机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20240644.

[责任编辑 孙丛丛]