

基于 UPLC-QTOF/MS 的茵陈蒿汤体外成分鉴定和急性肝损伤防护作用入血成分研究

姚一青[#], 曹奇[#], 王璇, 马荟琳, 陈玉苗, 赵思怡, 郭珉萱, 胡伽濛,
王冬尧*, 吕狄亚*

(海军军医大学药理学系, 上海 200433)

摘要: 鉴定茵陈蒿汤体外活性成分和体内入血成分, 为探究其对急性肝损伤防护作用和防治机制提供了科学依据。利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF/MS) 技术, 鉴定茵陈蒿汤水煎液及口服预防给药 14 天后, 刀豆蛋白 A (con-A) 所致急性肝损伤小鼠的血清样本 (本研究中使用获得海军军医大学伦理委员会批准, 批号 19YF1459400) 中的化学成分。初步鉴定茵陈蒿汤水煎液含 90 个化合物, 主要为黄酮类、萜类、鞣质类、醌类等, 血清样本中含 5 个原形成分, 包括大黄酚、脱氧土大黄苷-8-O-没食子酸盐、玉叶金花苷酸、7-甲氧基-香豆素、大黄素。本文所建立的 UPLC-QTOF/MS 方法能高效灵敏地鉴别茵陈蒿汤的体外成分及其入血成分, 初步阐明茵陈蒿汤保肝作用的药效物质基础, 可为茵陈蒿汤的质量标志物筛选和药理作用研究提供科学依据。

关键词: 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱; 化学成分; 入血成分; 茵陈蒿汤; 急性肝损伤; 保肝作用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1173-08

Identification of constituents *in vitro* and blood-absorbed ingredients of protective effect on acute liver injury from Yin Chen Hao decoction based on UPLC-QTOF/MS

YAO Yi-qing[#], CAO Qi[#], WANG Xuan, MA Hui-lin, CHEN Yu-miao, ZHAO Si-yi,
GUO Min-xuan, HU Jia-meng, WANG Dong-yao*, LÜ Di-ya*

(School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: To identify the active constituents *in vitro* and blood-absorbed ingredients *in vivo* from Yin Chen Hao decoction provides scientific evidence for probing its prevention and treatment mechanism on acute liver injury. An ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS) method was applied for analysis of Yin Chen Hao decoction and the serum samples of mice with con-A induced acute liver injury after preventive oral administration for 14 days (the use of all laboratory animals in this study was approved by the Ethics Committee of the Naval Medical University, 19YF1459400). A total of 90 chemical constituents were identified from Yin Chen Hao decoction, mainly were flavonoids, terpenoids, tannins, quinones. 5 prototype compounds were identified in the serum, including chrysophanol, deoxyrhapontin-8-O-gallate, mussaenosidic acid, herniarin, emodin. The established UPLC-QTOF/MS method could efficiently and

收稿日期: 2022-10-30; 修回日期: 2023-04-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174092); 上海市自然科学基金资助项目 (21ZR1483000, 22ZR1476900); 海军军医大学本科创新能力孵化基地项目 (FH2021116); 上海市浦江人才计划 (21PJD083); 上海市科技人才计划项目 (19YF1459400).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 15802192958, E-mail: lvdy2020@smmu.edu.cn;

Tel: 13391376186, E-mail: wangdongyao@smmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1139

sensitively identify the constituents *in vitro* and blood-absorbed ingredients of Yin Chen Hao decoction, primarily clarify the material basis of its hepatoprotective effect, and provided a scientific basis for the quality marker selection and the pharmacodynamic material basis research on the decoction.

Key words: UPLC-QTOF/MS; chemical constituent; blood-absorbed ingredient; Yin Chen Hao decoction; acute liver injury; hepatoprotective effect

急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 指既往无肝病且出现肝脏异常不足 6 个月的患者, 其肝细胞大量死亡或者肝功能丧失。随着肝细胞的减少, 急性肝损伤可能会进一步发展成肝性脑病, 最终导致严重的肝衰竭^[1], 危害人类健康。目前, 临床常用于治疗急性肝损伤的药物有 *N*-乙酰半胱氨酸、甲基吡唑、亚甲蓝、二甲双胍等。然而, 它们药效有限而且使用剂量较高, 常会在使用时失去效应或出现过敏、恶心、高铁红血症等不良作用。中药在增强肝抗氧化能力和启动细胞自噬等保护机制上具有独特优势, 因此, 需要更广泛的研究来推进中药在急性肝损伤方面的应用^[2]。

茵陈蒿汤出自《伤寒论》, 由茵陈、大黄、栀子三味药材组成, 具有清热、利湿、退黄之功效, 主治湿热黄疸证。目前, 茵陈蒿汤被证实具有良好的保肝作用, 能够改善四氯化碳所致的急性肝损伤^[3], 并且能够通过促进白细胞迁移以提高机体免疫功能^[4], 但还未见其在刀豆蛋白 A (con-A) 免疫性肝损伤保护作用中的活性成分的相关报道。

中药复方体内与体外之间化学成分具有重要关联, 针对复方进入机体内的化学成分群进行分析是发现活性物质的有效手段^[5]。中药血中移行成分含量极低, 传统的成分鉴定和体内代谢分析一般采用液相色谱-单极杆质谱^[6], 对于中药复杂体系缺乏足够的精确度。四极杆飞行时间质谱结合了四极杆质谱和飞行时间质谱两种仪器的优势, 较其他方法可结合多种统计软件建立精确质量数据库, 通过“精确质量数-分子式”的匹配实现半自动化的成分鉴定, 并且能够在缺乏对照品的情况下利用库检索快速准确地进行定性检测^[7]。

因此, 本研究采用长期预防给药茵陈蒿汤水煎液的方式, 运用 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定茵陈蒿汤中具有保肝作用的入血成分, 旨在阐明茵陈蒿汤防护急性肝损伤的药效物质基础, 以期为推进茵陈蒿汤的药效研究提供基础。

材料与amp;方法

仪器 UPLC-Q-TOF/MS, 包含 Infinity-6538 UHD 及 Accurate-Mass QTOF 系统、Agilent 6538 UHD 飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司); 离心机 (美国 Thermo-

Fisher 公司); Milli-QA10 超纯水制备系统 (美国 Millipore 公司); 涡旋机 (美国 Scientific Industries 公司)。

药品与试剂 色谱纯乙腈 (德国 Merck Chemicals 公司); 色谱纯甲酸和色谱纯三氟乙酸 (美国 Tedia 公司); 甲醇等试剂购自中国医药集团上海化学试剂公司; 茵陈蒿汤组方饮片 (茵陈、栀子和大黄) 均购自上海长海医院; con-A (货号 C5275, 德国 Sigma 公司)。

样品制备 称量茵陈约 18 g、栀子约 9 g、大黄约 6 g, 粉碎栀子和大黄。茵陈加入适量蒸馏水浸泡 50 min, 之后先取茵陈加入蒸馏水 600 mL, 煮沸后慢煎至 300 mL, 大约 20 min, 再加入栀子和大黄煎煮大约 30 min, 趁热过滤。再加入蒸馏水 600 mL 煎煮 30 min, 趁热过滤。合并滤液, 浓缩至 330 mL, 相当于生药浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱待测。

实验动物 C57BL/6J 小鼠购买于上海斯莱克动物有限责任公司, 许可证号: SYXK (沪) 2017-0004。18 只小鼠 (体重 18~22 g, 年龄 6~8 周), 随机分为 3 组: 空白组 (6 只)、给药组 (6 只)、模型组 (6 只), 饲养环境保持 12 h 光照与黑暗循环, 环境温度 $20 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50\% \sim 70\%$, 期间自由饮水进食, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。本实验动物饲养于海军军医大学药理学系动物实验中心, 本研究中所有实验动物的使用获得海军军医大学伦理委员会批准, 批号 19YF1459400。

预防给药及急性肝损伤模型建立 给药组按照体重灌胃给药茵陈蒿汤水煎液 ($30 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续 14 天; 模型组与空白组相同剂量灌胃无菌生理盐水。末次灌胃后, 模型组与给药组小鼠给予尾静脉注射 con-A 构建急性肝损伤模型, 按照小鼠体重 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量^[8]; 空白组小鼠给予等量的无菌生理盐水。两组实验小鼠禁食不禁水。

成人汤剂给药剂量为 $6.67 \sim 10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 换算成小鼠为 $60.5 \sim 91 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 考虑到小鼠胃容量大约为 $1 \sim 1.5 \text{ mL}$, 一次最大灌药量为 0.9 mL , 所以给药剂量为 $30 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[9-11]。

血液样品处理 三组分别于造模后 8 h 眼眶取血 0.3 mL 于肝素钠离心管内静置 2 h 后, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清, 加入 3 倍量 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$

预冷甲醇(含 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯苯丙氨酸, 内标), 涡旋混匀3 min, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 下 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min, 取上清液, 于冷冻浓缩仪浓缩, 进样前用 $100\ \mu\text{L}$ 甲醇复溶。

肝功能指标检测 血清样品分别采用谷丙转氨酶(ALT/GPT)试剂盒(货号C009-2-1微板法)和谷草转氨酶(AST/GOT)试剂盒(货号C010-2-1微板法)检测血清ALT和AST水平。

茵陈蒿汤化学成分数据库建立 通过检索中医药综合数据库TCMID (<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、中药系统药理学数据库与分析平台TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、中国科学院上海有机化学研究所中药与化学成分库 (http://www.chemcpd.csdb.cn/scdb/main/tcm_introduce.asp)、中医药整合药理学研究平台TCMIP (<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/Login/login.html>)、Natural Product Activity and Species Source NPASS (<https://bidd.group/NPASS/search.php>), 整理茵陈蒿汤各组药材化学成分, 查阅复方与单味药材化学成分鉴定文献, 完善成分表格。将整理好的茵陈蒿汤化学成分数据表格文件导入安捷伦的数据库构建软件MassHunter PCDL Manager B.08.00, 完成茵陈蒿汤化学成分数据库的建立, 具体信息包含序号、化合物名称、分子式、精确分子质量(由软件PCDL Manager计算得到)。

分析条件 色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C18柱($2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$, $2.5\ \mu\text{m}$, Xbridge爱尔兰), 流动相采用0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B)溶液系统, 梯度洗脱条件为: 0~2 min, 2% B; 2~17 min, 2%~98% B; 17~20 min, 98% B。平衡时间5 min, 流速 $0.4\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $40\ ^\circ\text{C}$, 自动进样器温度 $4\ ^\circ\text{C}$, 进样量 $3\ \mu\text{L}$, 分析时间19 min。

质谱仪采用电喷雾离子源, 毛细管电压 $4\ 000\ \text{V}$ (正离子)/ $3\ 500\ \text{V}$ (负离子); 离子源温度: $350\ ^\circ\text{C}$; 干燥气体流速: $11\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 雾化器压力: $45\ \text{psig}$; 碎片电压: $120\ \text{V}$; skimmer电压: $60\ \text{V}$ 。采集范围 $m/z\ 50\sim 1\ 500$, 参比离子正离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $121.050\ 9$ 和 $922.009\ 8$; 负离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$, $119.036\ 3$ 和 $966.000\ 7$ 。所有数据均由Agilent Mass Hunter 10.0, Agilent PCDL 10.0软件处理。

统计学处理 数据以各组的均数 \pm 标准误差表示, 采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 各组采用单因素方差分析, 统计显著性由Student's *t*检验确定, $*P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果

1 三组小鼠肝功能指标比较

临床常用血清中ALT和AST作为急性肝损伤的

诊断指标, 含量的高低提示con-A造模是否成功以及茵陈蒿汤对con-A所致急性肝损伤是否具有保护作用。三组小鼠的血清ALT和AST水平结果如图1所示。模型组较空白组血清ALT、AST水平均明显升高, 提示造模成功; 给药组较模型组血清ALT、AST水平均明显降低, 说明茵陈蒿汤对于急性肝损伤具有保护作用。

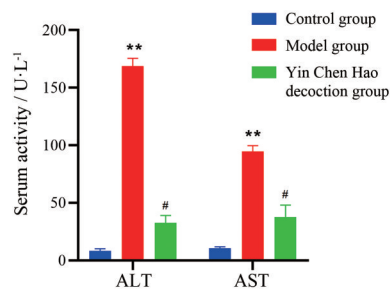


Figure 1 The concentrations of alanine aminotransferase (ALT) or aspartate aminotransferase (AST) in different groups after treatment. Model group is induced by con-A. $**P < 0.01$ vs control group; $\#P < 0.05$ vs model group

2 茵陈蒿汤体外成分分析

采用UPLC-QTOF/MS对茵陈蒿汤水煎液进行液质联用进样分析, 正、负离子模式下的总离子流图, 如图2所示。建立了茵陈蒿汤化学成分数据库, 总共包含已知分子式和精确分子质量的498个化合物。采集与处理数据, 整理得到茵陈蒿汤体外成分共90个化合物, 如表1所示。

从茵陈蒿汤水煎液中共鉴定出90个化合物, 分别为黄酮类19个、萜类16个、鞣质类13个、醌类11个、酚类8个、苯丙素类7个、香豆素类7个、挥发油3个、氨基酸类2个、脂肪酸类2个、生物碱类1个、聚乙炔醇类1个。

体外成分的90个化合物中, 34个来源茵陈, 主要为黄酮类、香豆素类、苯丙素类; 29个来源大黄, 主要为黄酮类、醌类、酚类、鞣质类; 34个来源栀子, 主要为萜类、鞣质类、苯丙素类。其中, 有8个成分同时来源于栀子和茵陈, 表明三味药材在体外成分组成上, 既有共性成分, 又相互补充, 增加了复方化学成分群及其物质基础的复杂性。

3 茵陈蒿汤入血成分分析

数据处理造模后8 h的给药组血清样品, 运用UPLC-QTOF/MS技术分别在正、负离子模式下得到茵陈蒿汤入血成分的总离子流图, 如图3所示。采集与处理数据, 整理得到茵陈蒿汤原形入血成分共5个化合物, 如表2所示。其中, 1个成分来源茵陈, 是7-甲氧

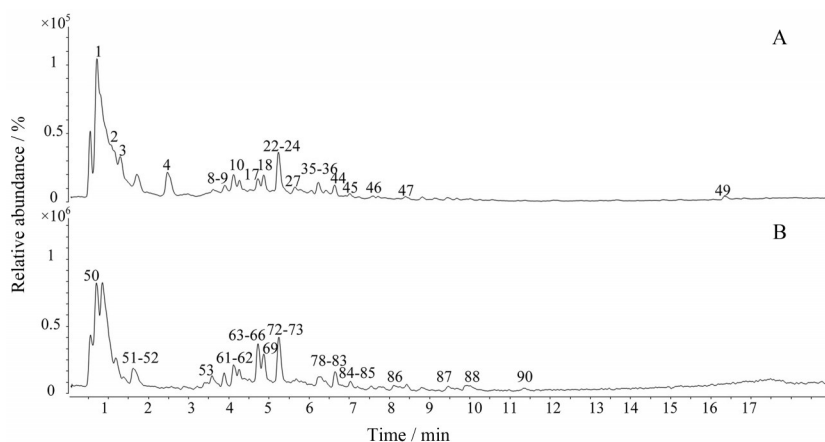


Figure 2 The total ion chromatograms of Yin Chen Hao decoction *in vitro*. A: In positive detection mode; B: In negative detection mode. The peak number is the same as the number in the Table 1

Table 1 Compounds identified in Yin Chen Hao decoction by UPLC-QTOF/MS. YC: Artemisiae Scopariae Herba; DH: Rhei Radix et Rhizoma; ZZ: Gardeniae Fructus

No.	RT /min	Formula	Adduct	Mass	<i>m/z</i>	Score	Error / $\times 10^{-6}$	Compound	Category	Source
1	0.699	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	[M+Na] ⁺	358.0914	381.0811	72.8600	-3.8900	Pyrimethacin	Coumarin	YC
2	1.030	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	258.0862	259.0950	82.5100	5.0700	Rhamnosyl-3,3',5-trihydroxy-4'-methoxystilbene	Phenol	DH
3	1.071	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	115.0638	116.0710	86.5000	-3.8200	Proline	Amino acid	YC
4	2.461	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	165.0797	166.0870	84.6300	-4.5600	Phenylalanine	Amino acid	YC
5	2.932	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	[M+Na] ⁺	196.1461	219.1352	86.7100	1.5000	Geranyl acetate	Volatile oil	YC
6	3.627	C ₉ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	162.0317	163.0391	87.2800	-0.9700	7-Hydroxy-coumarin	Coumarin	YC
7	3.817	C ₆ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	126.0318	127.0386	46.7000	3.0100	1,2,4-Benzenetriol	Phenol	
8	3.892	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	194.0583	195.0641	92.2800	4.7200	Ferulic acid	Phenylpropanoid	YC
9	3.892	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	[M+H] ⁺	452.1312	453.1392	88.1500	0.2700	Catechin-5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	Flavonoid	DH
10	4.131	C ₉ H ₇ NO	[M+H] ⁺	145.0524	146.0597	79.5200	3.2400	4-Formylindole	Alkaloid	YC
11	4.471	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	578.1430	579.1489	91.3400	1.8500	Proanthocyanidin B1	Flavonoid	DH
12	4.471	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	578.1430	579.1489	91.3400	1.8500	Proanthocyanidin B2	Flavonoid	DH
13	4.471	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	578.1430	579.1489	91.3400	1.8500	Proanthocyanidin B3	Flavonoid	DH
14	4.471	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	578.1430	579.1489	91.3400	1.8500	Proanthocyanidin B4	Flavonoid	DH
15	4.471	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M+H] ⁺	578.1430	579.1489	91.3400	1.8500	Proanthocyanidin B7	Flavonoid	DH
16	4.471	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₂	[M+Na] ⁺	556.1581	579.1494	69.4000	-3.4100	Deoxyearth rhein-8- <i>O</i> -gallate	Phenol	DH
17	4.744	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	290.0790	291.0869	97.6200	-2.0500	Catechins	Flavonoid	DH
18	4.876	C ₉ H ₁₄ O ₄	[M+Na] ⁺	186.0892	209.0813	70.6700	-16.0500	Azelaic acid	Fatty acid	YC
19	4.975	C ₁₇ H ₂₂ O	[M+Na] ⁺	242.1665	265.1549	50.4600	12.4500	Dehydrofusarinol	Polyacetylene alcohol	YC
20	5.124	C ₁₀ H ₁₆ O	[M+H] ⁺	152.1208	153.1282	74.0500	-4.5300	Arborone	Volatile oil	YC

Continued

No.	RT /min	Formula	Adduct	Mass	<i>m/z</i>	Score	Error / $\times 10^{-6}$	Compound	Category	Source
21	5.190 0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	594.159 0	595.166 5	96.570 0	-0.820 0	Nicotilorin	Flavonoid	YC
22	5.232 0	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	176.047 3	177.055 1	84.560 0	-2.450 0	7-Methoxy-coumarin	Coumarin	YC
23	5.232 0	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	226.084 1	227.092 4	95.620 0	-3.860 0	Genipine	Terpenoid	ZZ
24	5.232 0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M+H] ⁺	376.139 1	377.146 8	78.580 0	-5.830 0	Mussaenosidic acid	Terpenoid	ZZ
25	5.323 0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	610.154 5	611.161 9	93.460 0	-1.900 0	Rutin	Flavonoid	YC
26	5.562 0	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	[M+H] ⁺	330.168 2	331.175 1	77.220 0	-2.190 0	Epijasminoside A	Quinone	ZZ
27	5.653 0	C ₈ H ₈ O ₂	[M+H] ⁺	136.052 4	137.059 4	75.990 0	0.750 0	Anisaldehyde	Volatile oil	ZZ
28	5.926 0	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	234.053 1	235.060 3	81.610 0	-1.000 0	2-Methyl-5-carboxymethyl-7-hydroxychromone	Quinone	DH
29	6.017 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	302.044 0	303.051 1	74.000 0	-3.480 0	Quercetin	Flavonoid	YC
30	6.059 0	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	192.042 3	193.050 1	84.460 0	-3.140 0	7-Methylchestnut baretin	Coumarin	YC
31	6.059 0	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	192.042 3	193.050 1	84.460 0	-3.140 0	Scopolamine	Coumarin	YC
32	6.059 0	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	192.042 3	193.050 1	84.460 0	-3.140 0	Isoscopolamine	Coumarin	YC
33	6.059 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	302.042 7	303.051 0	76.000 0	-3.150 0	Mulberry pigment	Flavonoid	YC
34	6.059 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	464.095 5	465.105 3	35.150 0	-5.470 0	Hypericin	Flavonoid	YC
35	6.208 0	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	418.126 9	419.134 4	96.440 0	-1.200 0	Gardenia	Flavonoid	ZZ
36	6.208 0	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	[M+Na] ⁺	396.145 5	419.134 4	60.190 0	-7.300 0	2-(2'-Hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromotone-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	Phenol	DH
37	6.282 0	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	624.168 8	625.175 8	72.530 0	0.510 0	Narcissine	Flavonoid	YC
38	6.373 0	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	232.074 8	233.082 1	73.050 0	-4.790 0	2-Methyl-5-propanyl-7-hydroxychromoketone	Quinone	DH
39	6.398 0	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺	234.090 2	235.097 7	89.320 0	-5.530 0	2-(2'-Hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone	Phenol	DH
40	6.414 0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	478.111 1	479.118 8	98.430 0	-0.510 0	Isorhamnein-3- <i>O</i> -galactoside	Flavonoid	YC
41	6.414 0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	478.111 1	479.118 8	98.430 0	-0.510 0	Isorhamnein-3- <i>O</i> -glucoside	Flavonoid	YC
42	6.414 0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	478.111 1	479.118 2	80.180 0	0.170 0	2- <i>O</i> -Coumaryl-1- <i>O</i> -galloyl- β - <i>D</i> -glucose	Tannin	DH
43	6.497 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	316.060 0	317.067 9	65.160 0	3.390 0	Capillarisin	Flavonoid	YC
44	6.671 0	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	206.058 6	207.066 3	69.780 0	3.390 0	Inchen chromogenone	Coumarin	YC
45	6.985 0	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	[M+H] ⁺	190.063 6	191.071 0	91.540 0	-3.760 0	2,5-Dimethyl-7-hydroxychromoton	Quinone	DH
46	7.696 0	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	[M+H] ⁺	408.143 5	409.151 5	66.150 0	-5.090 0	Casidone-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	Phenol	DH
47	7.895 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	254.059 2	255.066 5	79.670 0	-5.130 0	Chrysophanol	Quinone	DH
48	8.416 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	284.069 6	285.077 4	75.400 0	-5.120 0	Physcion	Quinone	DH
49	15.190 0	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	278.225 4	279.233 2	68.450 0	-4.540 0	Linolenic acid or its isomer	Fatty acid	YC
50	0.674 0	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	534.176 1	533.168 8	71.030 0	-4.350 0	<i>p</i> -Coumaryl genipin	Terpenoid	ZZ
51	1.601 0	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	332.075 4	331.068 8	67.170 0	-3.690 0	1- <i>O</i> -Gallic acyl fructose	Tannin	DH
52	1.601 0	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	170.021 5	169.015 0	96.620 0	-3.960 0	Gallic acid	Tannin	DH
53	3.429 0	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	494.125 5	493.118 9	96.660 0	1.920 0	1- <i>O</i> -Gallic acyl sucrose	Tannin	DH
54	3.577 0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	354.095 1	355.102 5	97.520 0	-0.920 0	Chlorogenic acid	Phenylpropanoid	ZZ, YC
55	3.577 0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	354.095 1	355.102 5	97.520 0	-0.920 0	Cryptochlorogenic acid	Phenylpropanoid	ZZ, YC
56	3.577 0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	354.095 1	355.102 5	97.520 0	-0.920 0	Neochlorogenic acid	Phenylpropanoid	ZZ, YC
57	3.577 0	C ₁₀ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	244.058 3	243.050 4	45.960 0	2.600 0	1- <i>O</i> -Gallic acylglycerol	Tannin	DH
58	3.875 0	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	373.113 0	374.121 3	72.000 0	1.410 0	Geniposide acid	Terpenoid	ZZ
59	3.875 0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	392.132 2	391.125 0	92.130 0	-1.200 0	Mountain gardenoside	Terpenoid	ZZ
60	3.917 0	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M+Cl] ⁻	374.121 2	409.090 7	75.820 0	0.110 0	Gardenia new nucleoside	Terpenoid	ZZ

Continued

No.	RT /min	Formula	Adduct	Mass	<i>m/z</i>	Score	Error / $\times 10^{-6}$	Compound	Category	Source
61	4.264 0	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	[M-H] ⁻	346.162 8	345.156 2	95.530 0	-1.030 0	Saffron picylate- β -D-glucopyranose	Terpenoid	ZZ
62	4.264 0	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	[M-H] ⁻	346.163 1	345.156 2	95.530 0	-1.030 0	Jasminoside B	Terpenoid	ZZ
63	4.727 0	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	660.169 0	705.169 8	61.010 0	-4.250 0	3,5-Dicaffeoyl-5-(3-hydroxy-3-methylglutaryl) quinic acid	Tannin	ZZ
64	4.727 0	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	660.169 0	705.169 8	61.010 0	-4.250 0	3,4-Dio-caffeoyl-5- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methyl) glutaryl quinic acid	Tannin	ZZ
65	4.727 0	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	660.169 0	705.169 8	61.010 0	-4.250 0	3,5,6,4'-Tetrahydroxy 3',5'-dimethoxy flavone	Flavonoid	ZZ
66	4.727 0	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	660.169 0	705.169 8	61.010 0	-4.250 0	3,5-Di- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methyl) alutaryl quinic acid	Tannin	ZZ
67	4.727 0	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	660.169 0	705.169 8	61.010 0	-4.250 0	3- <i>O</i> -Ferulyl-4- <i>O</i> -(3-hydroxyl, 3-methyl) glutaryl-5- <i>O</i> -caffeoyl quinic acid	Tannin	ZZ
68	4.744 0	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	[M+HCOO] ⁻	244.074 7	289.073 1	79.050 0	-4.840 0	Piceatannol	Phenol	DH
69	4.876 0	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	550.193 4	595.192 0	76.820 0	-6.850 0	Genipin gentian diglycoside	Terpenoid	ZZ
70	4.984 0	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	[M+Cl] ⁻	550.193 4	585.163 7	72.240 0	-6.190 0	Genipin diglucopyranoside	Terpenoid	ZZ
71	5.017 0	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	180.043 4	179.036 1	79.040 0	-5.800 0	Caffeic acid	Phenylpropanoid	ZZ
72	5.240 0	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	[M+Cl] ⁻	388.140 8	423.110 0	75.980 0	-8.320 0	Geniposide methyl	Terpenoid	ZZ
73	5.240 0	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	[M+Cl] ⁻	388.140 8	423.110 0	75.980 0	-8.320 0	Geniposide	Terpenoid	ZZ
74	5.687 0	C ₈ H ₈ O ₂	[M-H] ⁻	136.053 1	135.045 9	83.880 0	-4.670 0	<i>p</i> -Hydroxyacetophenone	Phenol	YC
75	6.009 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	516.126 8	515.121 7	74.530 0	-5.770 0	Dicaffeoyl quinic acid isomers	Tannin	ZZ, YC
76	6.613 0	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	430.146 7	475.144 9	85.300 0	-0.530 0	6'- <i>O</i> -Acetylgenipinside	Terpenoid	ZZ
77	6.613 0	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	430.146 7	475.144 9	85.300 0	-0.530 0	10-Acetylgenipinside	Terpenoid	ZZ
78	6.621 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	516.127 6	515.119 8	88.230 0	-1.710 0	3,4- <i>O</i> -Dicaffeoyl quinic acid	Tannin	ZZ, YC
79	6.621 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	516.127 6	515.119 8	88.230 0	-1.710 0	1,4-Dicaffeoyl quinic acid	Tannin	ZZ, YC
80	6.621 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	516.127 6	515.119 8	88.230 0	-1.710 0	Isochlorogenic acid A	Phenylpropanoid	ZZ, YC
81	6.621 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	516.127 6	515.119 8	88.230 0	-1.710 0	Isochlorogenic acid C	Phenylpropanoid	ZZ, YC
82	6.654 0	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	[M+Cl] ⁻	696.226 5	731.197 5	68.990 0	-3.460 0	6''- <i>O</i> - <i>p</i> -Coumaryl gentiobiglycoside	Terpenoid	ZZ
83	6.655 0	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	696.228 7	695.216 4	37.760 0	4.080 0	6''- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaryl gentibiglycoside	Terpenoid	ZZ
84	7.027 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+HCOO] ⁻	416.110 7	461.136 8	47.180 0	1.030 0	Chrysophanol-1- <i>O</i> -glucoside	Quinone	DH
85	7.027 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+HCOO] ⁻	416.110 7	461.136 8	47.180 0	1.030 0	Chrysophanol-8- <i>O</i> -glucoside	Quinone	DH
86	7.515 0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	462.118 0	461.111 5	81.940 0	-4.990 0	2- <i>O</i> -Cinnamyl-1- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose	Tannin	DH
87	8.788 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	284.068 5	283.062 5	41.600 0	-4.640 0	5,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavone	Flavonoid	ZZ
88	9.955 0	C ₁₅ H ₈ O ₆	[M-H] ⁻	284.032 1	283.025 1	78.820 0	-2.770 0	Emodin	Quinone	DH
89	11.328 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	270.052 8	269.047 3	69.020 0	-6.080 0	Rhein	Quinone	DH
90	11.344 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	270.054 0	269.047 4	67.920 0	-5.280 0	Aloe-emodin	Quinone	DH

基-香豆素; 3个成分来源大黄, 分别是大黄酚、脱氧土大黄苷-8-*O*-没食子酸盐、大黄素; 1个成分来源栀子, 是玉叶金花苷酸。原形入血成分多含有羟基, 特征离子峰多为 [M+H]⁺ 与 [M+Na]⁺, 因而正离子模式较负离子模式响应更优。保留时间在 0.5~2 min 内原形入血成分较多, 为酚酸类或苷类小分子化合物, 极性大、水溶性好, 较先出峰。

结论与讨论

中药复方具有多成分、多靶点和多途径等鲜明特

点, 而血清药物化学认为, 中药以血液为介质输送至靶点起效, 因此给药后入血成分可作为其活性成分。茵陈蒿汤化学成分成百上千, 为了回答茵陈蒿汤的药效物质基础, 建立一种既能体外分析茵陈蒿汤的化学成分, 又能辨识其入血成分的分析方法十分必要。

茵陈蒿汤体外成分 90 个, 原形入血成分共 5 个化合物, 分别是 7-甲氧基-香豆素、大黄酚、脱氧土大黄苷-8-*O*-没食子酸盐、大黄素、玉叶金花苷酸。其中, 7-甲氧基-香豆素能够下调细胞凋亡水平, 减轻氧化应激, 对 CCl₄ 诱导的肝损伤具有保护作用^[9]。大黄酚通

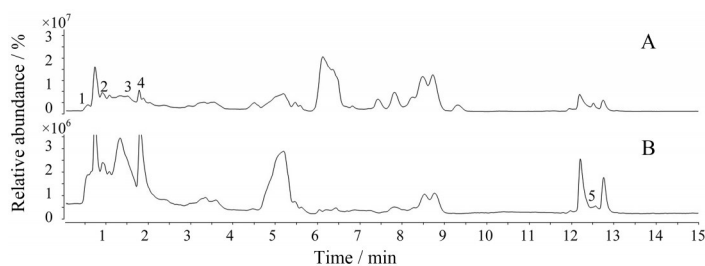


Figure 3 The total ion chromatograms of Yin Chen Hao decoction *in vivo*. A: In positive detection mode; B: In negative detection mode. The peak number is the same as the number in the Table 2

Table 2 Compounds identified in Composition of Yin Chen Hao decoction *in vivo* by UPLC-QTOF/MS

No.	RT/min	Formula	Adduct	Mass	<i>m/z</i>	Score	Error	Compound	Category	Source
1	0.498 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	254.057 9	255.065 6	95.870 0	-1.430 0	Chrysophanol	Quinone	DH
2	1.193 0	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₂	[M+Na] ⁺	556.158 1	579.152 2	64.420 0	-5.120 0	Deoxyrhaponticin 2'- <i>O</i> -gallate	Phenol	DH
3	1.499 0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M+H] ⁺	376.136 9	377.145 6	86.290 0	0.050 0	Mussaenosidic acid	Terpene	ZZ
4	1.739 0	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	176.047 3	177.054 5	64.550 0	3.720 0	Herniarin	Coumarin	YC
5	12.610 0	C ₁₅ H ₈ O ₆	[M+COOH] ⁻	284.032 1	329.035 4	51.100 0	-16.620 0	Emodin	Quinone	DH

过调控谷胱甘肽过氧化物酶和内质网应激反应能够修复肝纤维化^[10]。玉叶金花苷酸能够较强烈地抑制补体经典途径, 调节免疫功能, 在Fe²⁺-胱氨酸诱导的大鼠肝脏微粒体脂质过氧化中具有抗氧化活性^[11]。大黄素能够调控氧化应激途径, 诱导细胞自噬对肝细胞起到保护作用, 降低肝组织损伤^[12, 13]。与茵陈蒿汤体外成分的种类数目相比较, 体内成分十分有限, 这也为方法优化提供了空间, 同时, 在后续的研究中将进一步探究上述成分预防保护急性肝损伤的靶点通路和作用机制。

对提取工艺考察时发现, 茵陈先浸泡可使植物膨胀吸水充分, 煎煮时香豆素类和挥发油更好溶出。大黄后下在煎煮时气味浓郁, 其游离型蒽醌成分和鞣质成分较多煎出, 然而结合型蒽醌成分未鉴定出。在原形入血成分中, 大黄的游离型蒽醌成分较多, 未出现鞣质类成分, 提示大黄保肝作用的药效物质基础可能为游离型蒽醌类。

目前急性肝损伤有多种动物模型, 不同模型有不同的病例特点和发病机制。con-A是一种从刀豆蛋白中提取的植物凝集素, 其发病机制主要为NKT细胞的细胞毒作用及细胞因子的肝损伤作用。其特征是可在8 h内观察到进行性肝炎、严重淋巴细胞浸润等特征^[14]。该模型简便快速, 是目前研究免疫介导肝损伤最广泛使用的工具之一, 很好地模拟了人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等疾病。

中医理论“上医治未病”阐明中药预防保护作用的重要性, 而中药的预防作用研究不多, 更少见复方的相应研究。本研究首先预防给药茵陈蒿汤, 之后造模急性肝损伤, 与中医“不治已乱治未乱”“扶正以助祛邪”的理念不谋而合。本研究采取连续14天长期给药的

方式以期提高机体的免疫应答, 达到对急性肝损伤的预防与保护。相对于直接分析健康小鼠血清, 本研究对给药小鼠造模急性肝损伤, 更符合中医“辨证施治, 方证相应”的基本原则。

致谢: 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室给予帮助。

作者贡献: 本文由吕狄亚、王冬尧、曹奇负责研究思路设计; 姚一青、曹奇、王璇、马荟琳负责实验实施; 陈玉苗、赵思怡、胡伽濛、郭珉萱负责数据处理; 姚一青负责论文撰写; 吕狄亚负责论文修改。

利益冲突: 本文的作者和所涉及的内容不存在潜在的利益冲突。

References

- [1] Crismale JF, Friedman SL. Acute liver injury and decompensated cirrhosis [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104: 647-662.
- [2] Jaeschke H, Akakpo JY, Umbaugh DS, et al. Novel therapeutic approaches against acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 174: 159-167.
- [3] Jiang P, Liu R, Dou S, et al. Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baoxin pill by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23: 1333-1343.
- [4] Chen Z, Wang X, Li Y, et al. Comparative network pharmacology analysis of classical TCM prescriptions for chronic liver disease [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1353.
- [5] Xu H, Zhang Y, Wang P, et al. A comprehensive review of integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1379-1399.
- [6] Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and emergent solutions for

- LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2018, 37: 772-792.
- [7] Liu Y, Shen L, Wang L, et al. Advances in application of liquid chromatography-mass spectrometry technology in study of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中 南 药 学)*, 2015, 13: 962-965.
- [8] Huang NN, Sun R. Application of animal models for the discovery and efficacy evaluation of anti acute liver injury in Chinese medicine [J]. *Chin J Pharmacovigil (中国药物警戒)*, 2015, 12: 669-673.
- [9] Sancheti S, Sancheti S, Seo SY. Ameliorative effects of 7-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2013, 36: 42-47.
- [10] Kuo CY, Chiu V, Hsieh PC, et al. Chrysophanol attenuates hepatitis B virus X protein-induced hepatic stellate cell fibrosis by regulating endoplasmic reticulum stress and ferroptosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144: 172-182.
- [11] Zhang YL, Gan ML, Li S, et al. Chemical constituents of stems and branches of *Adina polycephala* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, 35: 1261-1271.
- [12] Zheng XY, Yang SM, Zhang R, et al. Emodin-induced autophagy against cell apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway in human hepatocytes [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3171-3180.
- [13] Lee EH, Baek SY, Park JY, et al. Emodin in *Rheum undulatum* inhibits oxidative stress in the liver *via* AMPK with Hippo/Yap signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58: 333-341.
- [14] Wang H, Feng X, Yan W, et al. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: unveiling their roles in mouse models and patients [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575572.