

基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法测定补肺益肾方中 10 个入血成分的含量*

康俊丽¹, 黄海英^{1,2**}, 刘雅敏¹, 余亚辉¹, 赵鹏², 冯素香^{1,2}, 杜燕², 李建生^{2**}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学河南省呼吸病协同创新中心, 郑州 450046)

摘要 目的: 应用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法建立补肺益肾方中 10 个成分(人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷)的含量测定方法。方法: 应用 Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 以 0.1% 甲酸水(A)和乙腈(B)为流动相, 0.3 mL·min⁻¹ 流速梯度洗脱(0~2 min, 5% B; 2~12 min, 5% B→100% B; 12~15 min, 100% B), 柱温 30℃, 电喷雾离子源(ESI), Full mass 模式进行正负切换全扫测定。结果: 10 个成分线性范围内线性关系良好($r>0.9983$), 加样回收率和 RSD 分别在 93.7%~104.0% 和 2.1%~4.1% 范围内, 精密性、稳定性考察符合定量分析的要求。3 批样品中各成分测定结果分别为 0.555~0.579、0.534~0.550、0.439~0.472、0.020~0.025、0.264~0.294、0.277~0.295、0.321~0.362、6.285~6.510、0.106~0.112、4.061~4.327 mg·g⁻¹。结论: 本研究建立的测定方法高效、可靠、重复性好, 为补肺益肾方有效成分的定量研究提供参考。

关键词: UPLC-QE-Orbitrap-MS 法; 补肺益肾方; 有效成分; 入血成分; 含量测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)03-0441-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.03.11

Simultaneous determination of 10 absorbed active components in rat plasma of Bufeiyishen recipe by UPLC-QE-Orbitrap-MS*

KANG Jun-li¹, HUANG Hai-ying^{1,2**}, LIU Ya-min¹, YU Ya-hui¹,
ZHAO Peng², FENG Su-xiang^{1,2}, DU Yan², LI Jian-sheng^{2**}

(1. Department of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

Abstract Objective: To establish an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of 10 absorbed active components (ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, astragaloside IV, peimine, schisandrin B,

* 国家自然科学基金资助项目(No. 81830116); 国家自然科学基金资助项目(No. 81603473); 河南省高校创新基金(No. 18B360003); 河南中医药大学博士基金(No. 03301189); 河南省博士后基金(No. 00104303); 河南中医药大学创新项目(No. 2017YCX040)

** 通信作者 李建生 Tel: (0371) 65676568; E-mail: li_js8@163.com
黄海英 Tel: 15538023650; E-mail: huang.haiying@126.com
第一作者 Tel: 18337106127; E-mail: k_junli@126.com

icariin, hesperidin, nobiletin and paeoniflorin) in Bufei Yishen recipe by UPLC-QE-Orbitrap-MS. **Methods:** The chromatographic separation was performed on a Phenomenex kinetex C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile (B)–0.1% formic acid water (A) at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹ (0–2 min, 5%B; 2–12 min, 5%B → 100%B; 12–15 min, 100% B). The column temperature was 30 °C. Electrospray ionization source (ESI) was used combined with full mass mode for positive and negative switching full sweep measurement. **Results:** Good linearity was obtained ($r > 0.9983$) for 10 potential active components. The recoveries of 10 potential active components were within the range of 93.7%–104.0% with the RSDs within 2.1%–4.1%. Precision and stability investigation met the requirements of quantitative analysis. Contents of the analytes in the samples were 0.555–0.579 mg · g⁻¹, 0.534–0.550 mg · g⁻¹, 0.439–0.472 mg · g⁻¹, 0.020–0.025 mg · g⁻¹, 0.264–0.294 mg · g⁻¹, 0.277–0.295 mg · g⁻¹, 0.321–0.362 mg · g⁻¹, 6.285–6.510 mg · g⁻¹, 0.106–0.112 mg · g⁻¹ and 4.061–4.327 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method is efficient, reliable and repeatable, which provides reference for quantitative study of the active component in Bufei Yishen recipe.

Keywords: UPLC-QE-Orbitrap-MS method; Bufei Yishen recipe; active component; absorbed components in rat plasma; content determination

补肺益肾方为河南中医药大学第一附属医院临床验方,由人参、黄芪、酒萸肉、枸杞子、醋五味子、炙淫羊藿、浙贝母、陈皮、矮地茶、炒紫苏籽、赤芍、地龙 12 味中药组成,具有补肺益肾、益气化痰、止咳平喘等功效,在治疗慢性阻塞性肺炎 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 疾病方面具有显著的临床疗效。前期研究表明补肺益肾方在调节肺泡表面活性蛋白进而维持肺泡结构稳定^[1],调节气道慢性炎症的进程^[2-3],纠正肺脏炎症信号通路^[4],抑制 COPD 炎症反应^[5],延缓 COPD 气道重塑^[6-9],改善 T 淋巴细胞亚群,调节机体免疫功能^[10-13],改善 COPD 氧化应激状态^[14]等方面效果显著,可以有效缓解 COPD 患者肺功能下降,减少急性加重发作次数和程度^[15];改善慢阻肺疾病稳定期患者的活动耐力和生活质量^[16-17]。在治疗 COPD 疾病方面极大的减轻患者痛苦,延长患者的生命,提高患者生存质量,且其远后效应显著,具有较大二次开发的潜力。

超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 因为具有快速、准确、灵敏等特点,对于中药物质尤其是微量成分的鉴定和检测速度得到了很大的提升,在血清化学成分的鉴定及定量中起到不可替代的作用。张爱华等^[18]采用 UPLC-MS 方法对男仕胶囊进行研究,发现其血清化学显性成分对肾阳虚大鼠的代谢轮廓有较大改善,并进行相应的含量测定。王喜军等^[19]采用 UPLC-MS 方法对茵陈蒿汤进行研究,发现其血清化学显性成分对肝损伤大鼠的代

谢轮廓有较大改善,并进行相应的含量测定。血清药物中的显性成分越来越多的被中药学家作为含量测定的指标性成分进行检测,并已经成为研究中药复方药效物质基础的主流方法。目前已有学者应用液相色谱质谱联用技术同时测定参芍胶囊^[20]、复方苦参汤^[21]、回春育子颗粒^[22]等中药成分的含量,为本研究测定补肺益肾方中入血成分的含量提供了参考。

本研究应用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法检测补肺益肾方的血浆入血成分,并以其中 10 个为指标建立补肺益肾方中的含量测定方法,为今后该药建立全面的质量控制及定量研究提供了更为科学的数据,这对中药更好地发挥临床疗效具有深远的意义及应用价值。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive 台式四极杆-轨道阱高分辨质谱仪 (Thermo Scientific 公司); Xcalibur 质谱工作站 (Thermo Scientific 公司); UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (Thermo Scientific 公司); Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm); Milli-Q 处理纯净水 (Millipore 公司); 十万分之一电子天平 (METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 试药

对照品人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 及贝母素甲、五味子乙素、黄芪甲苷、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷 (分析纯, 98%, 四川维克奇生物科技有限公司); 补

肺益肾颗粒(10 g·袋⁻¹,批号 20180426、20180518、20180603)由国家中医临床研究基地河南中医药大学第一附属医院临床药理研究基地提供。超纯水(自制);乙腈,甲醇,甲酸(色谱纯, Fisher Scientific, 赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 入血成分的确

2.1.1 含药血浆的处理 SD 雄性大鼠,随机分为给药组和空白组,每组 6 只,给药剂量以 60 kg 成人计大鼠等效计量的 10 倍,药物溶于 1% 羧甲基纤维素钠溶液,空白组给予等量的 1% 羧甲基纤维素钠溶液,连续给药 7 d,末次给药前 12 h 禁食但不禁水,给药后 2 h 腹主动脉取血,室温静置 1 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离血浆,取血浆样品 100 μL, 3 倍量甲醇沉淀蛋白,涡旋 120 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,

上清液用氮吹仪吹干,残渣用 100 μL 的 50% 甲醇复溶, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,进样。

2.1.2 血浆样品的测定及结果 采用 Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min, 5% B; 2~12 min, 5% B→100% B, 12~15 min, 100% B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 5 μL。应用 ESI 离子源,正负切换全扫模式采集数据;应用 Xcalibur 软件以精确 *m/z* 提取离子峰以确定保留时间;应用 Mass Frontier 6.0 工作站匹配特征碎片离子,鉴别化合物结构,确定入血成分,结合文献对各成分的药效报道最终选定人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷 10 个为药物入血的有效成分, 10 个成分定性鉴别结果见表 1。

表 1 10 个化学成分鉴定结果

Tab. 1 Identification results of 10 components

序号 (No.)	<i>t_R</i> /min	成分 (component)	分子式 (formula)	理论值 (theoretical) <i>m/z</i>	测定值 (measured) <i>m/z</i>	误差值 × 10 ⁻⁶ (error)
1	5.72	芍药苷 (paeoniflorin)	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.161 4	525.161 6	0.449
2	5.87	贝母素甲 (peimine)	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	432.347 2	432.347 5	0.646
3	6.38	橙皮苷 (hesperidin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.182 5	609.183 1	0.996
4	6.56	人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.548 3	991.548 8	0.486
5	6.57	人参皂苷 Rg ₁ (ginsenoside Rg ₁)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.490 4	845.491 1	0.817
6	7.11	淫羊藿苷 (icariin)	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	721.234 9	721.236 5	2.187
7	7.43	人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 153.601 1	1 153.602 0	0.744
8	7.85	黄芪甲苷 (astragaloside IV)	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	829.459 1	829.458 0	-1.337
9	8.89	川陈皮素 (nobiletin)	C ₂₁ H ₃₂ O ₈	403.138 7	403.138 6	-0.357
10	11.89	五味子乙素 (schizandrin B)	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	401.195 9	401.195 7	-0.411

2.1.3 专属性考察 取质量浓度为 0.05 μg·mL⁻¹ 混合对照品溶液 20 μL 加入空白血浆 100 μL 中,制得对照品血浆;分别取空白血浆、含药血浆以及对照品血浆各 100 μL,按照“2.1.1”项下方法处理,按照“2.1.2”项下方法测定,结果见图 1。结果显示各成分峰形良好,空白无干扰。

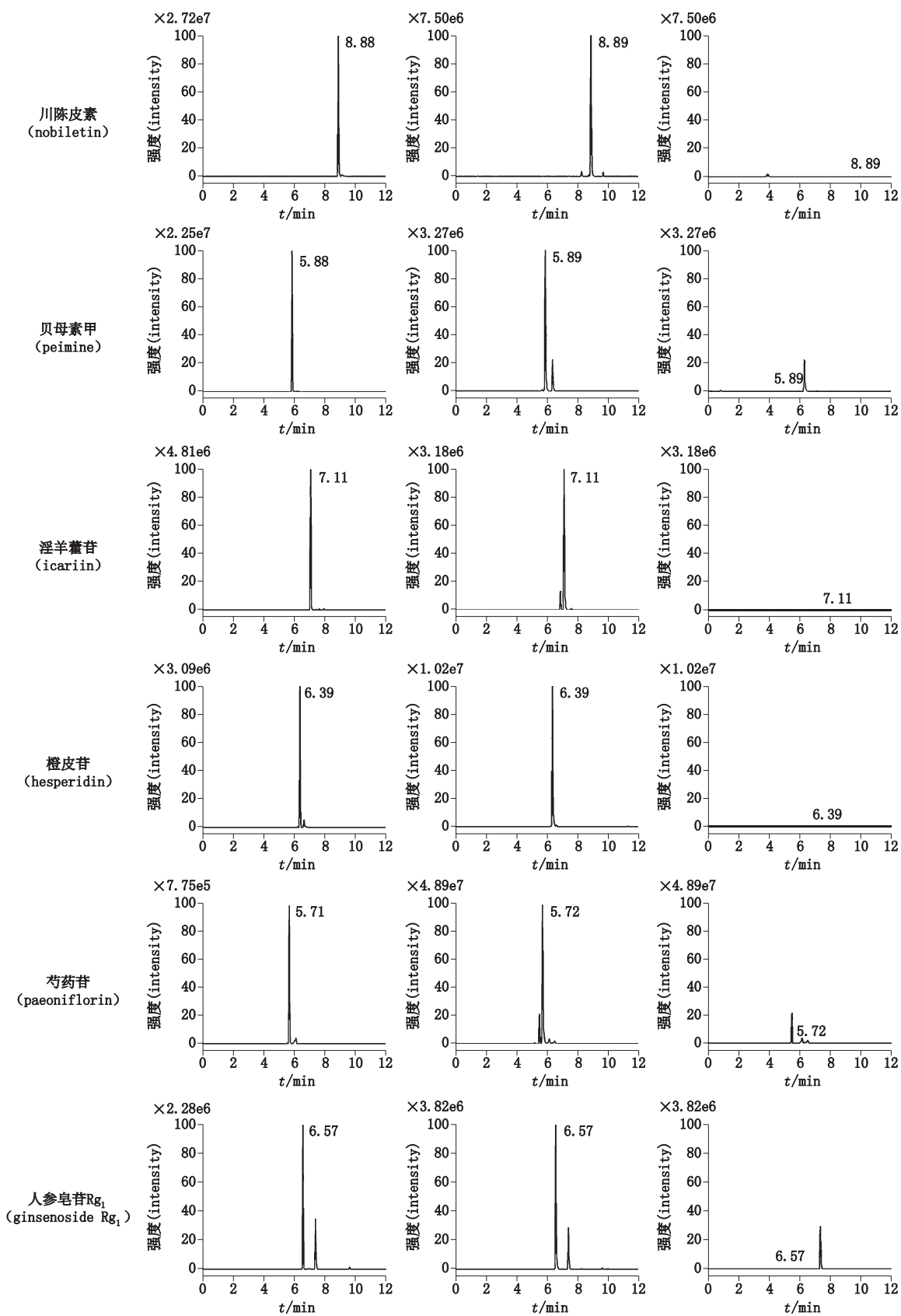
2.2 含量测定方法

2.2.1 混合对照品储备液的制备 分别精密称取对照品人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 及黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷适量,以甲醇配制得 1 mg·mL⁻¹ 的各单一成分对照品溶液。分别移取计算量的单一成分对照品溶液,用

50% 甲醇水配制成人参皂苷 Re 1.042 μg·mL⁻¹、人参皂苷 Rb₁ 1.405 μg·mL⁻¹、人参皂苷 Rg₁ 1.223 μg·mL⁻¹、黄芪甲苷 1.024 μg·mL⁻¹、贝母素甲 1.240 μg·mL⁻¹、五味子乙素 1.262 μg·mL⁻¹、淫羊藿苷 1.124 μg·mL⁻¹、橙皮苷 10.80 μg·mL⁻¹、川陈皮素 1.366 μg·mL⁻¹、芍药苷 10.62 μg·mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取一定量补肺益肾方颗粒,按照 1:500 的比例加入 50% (v/v) 甲醇水,称量,超声 60 min,取出冷却至室温,50% 甲醇水补足减失的量,摇匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.3 色谱条件 同“2.1.2”。



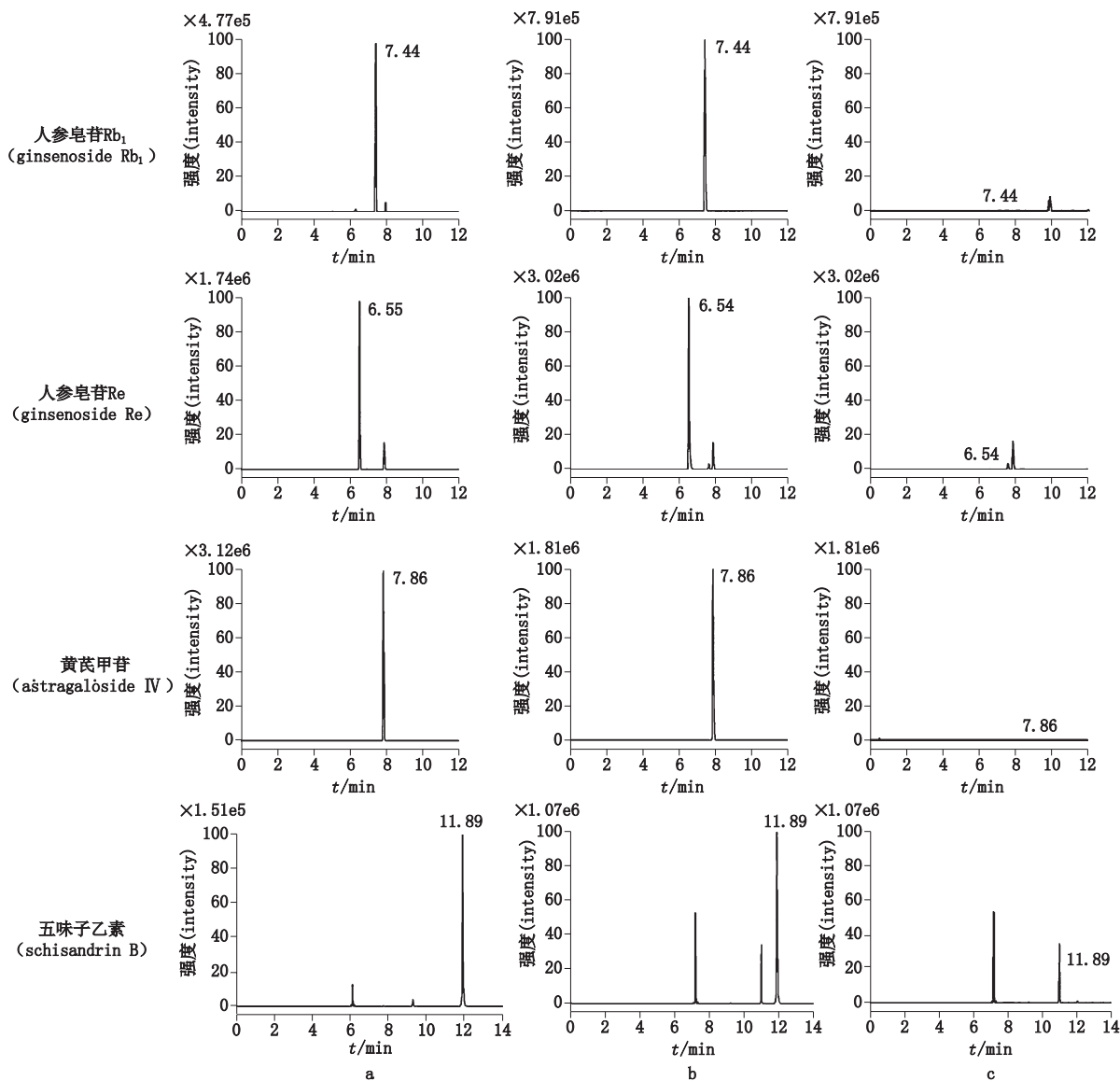


图1 对照品 (a)、给药血浆 (b)、空白血浆 (c) 各成分 UPLC-MS/MS 色谱图

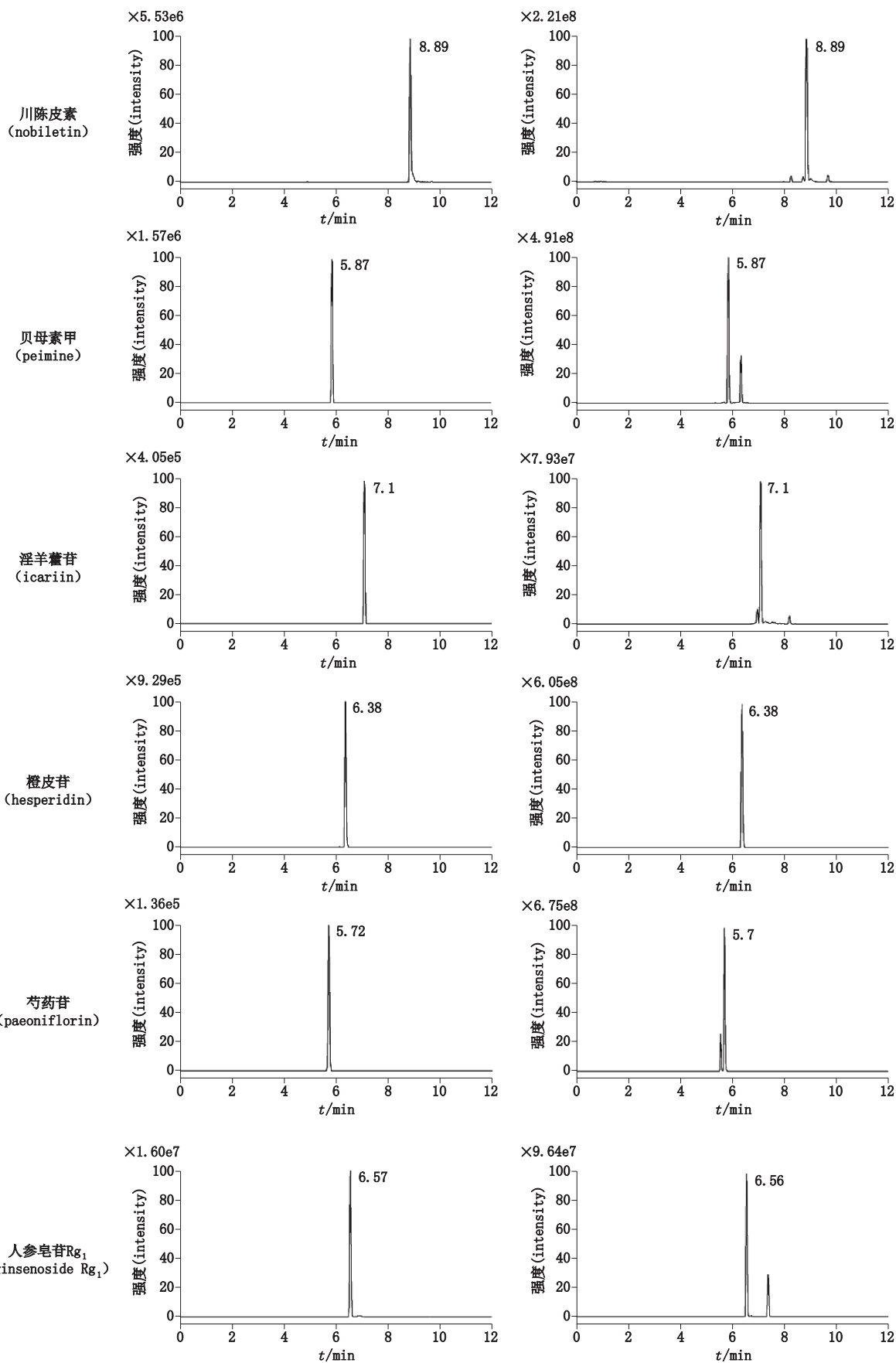
Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of reference substances (a), administration plasm (b) and blank plasm (c)

2.2.4 质谱条件 电喷雾离子化源 (ESI), 载气为氮气, 鞘气压力 3.5 MPa, 辅助气流速 3.3 L·min⁻¹, 喷雾电压 3.50 kV (+), 透射电镜 120 V。毛细管温度 350 °C, 辅助气加热温度 200 °C, 分辨率为 70 000, 扫描方式为全扫模式, 正、负离子切换模式测定, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 500。各成分提取离子流图见图 2。

2.2.5 线性关系的考察 精密吸取混合对照品溶液适量, 加 50% 甲醇稀释成 7 个浓度梯度的系列混合对照品溶液, 依照“2.2.3”项下条件进行测定, 以浓度 *X* 为横坐标、峰面积 *Y* 为纵坐标绘制标准曲

线。10 个成分的线性范围、回归方程、相关系数见表 2。结果表明各成分线性范围内具有良好的线性关系。

2.2.6 检测下限和定量下限 将混合对照品溶液逐步稀释, 进样测定, 以信噪比为 3 : 1 为检测下限, 10 : 1 为定量下限。人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁、黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷 10 个成分检测下限分别为 0.008、0.028、0.008、0.011、0.025、0.077、0.010、0.012、0.007、0.030 ng·mL⁻¹; 定量下限分别为 0.026、0.096、0.024、0.039、0.076、0.212、0.033、0.381、0.027、0.101 ng·mL⁻¹。



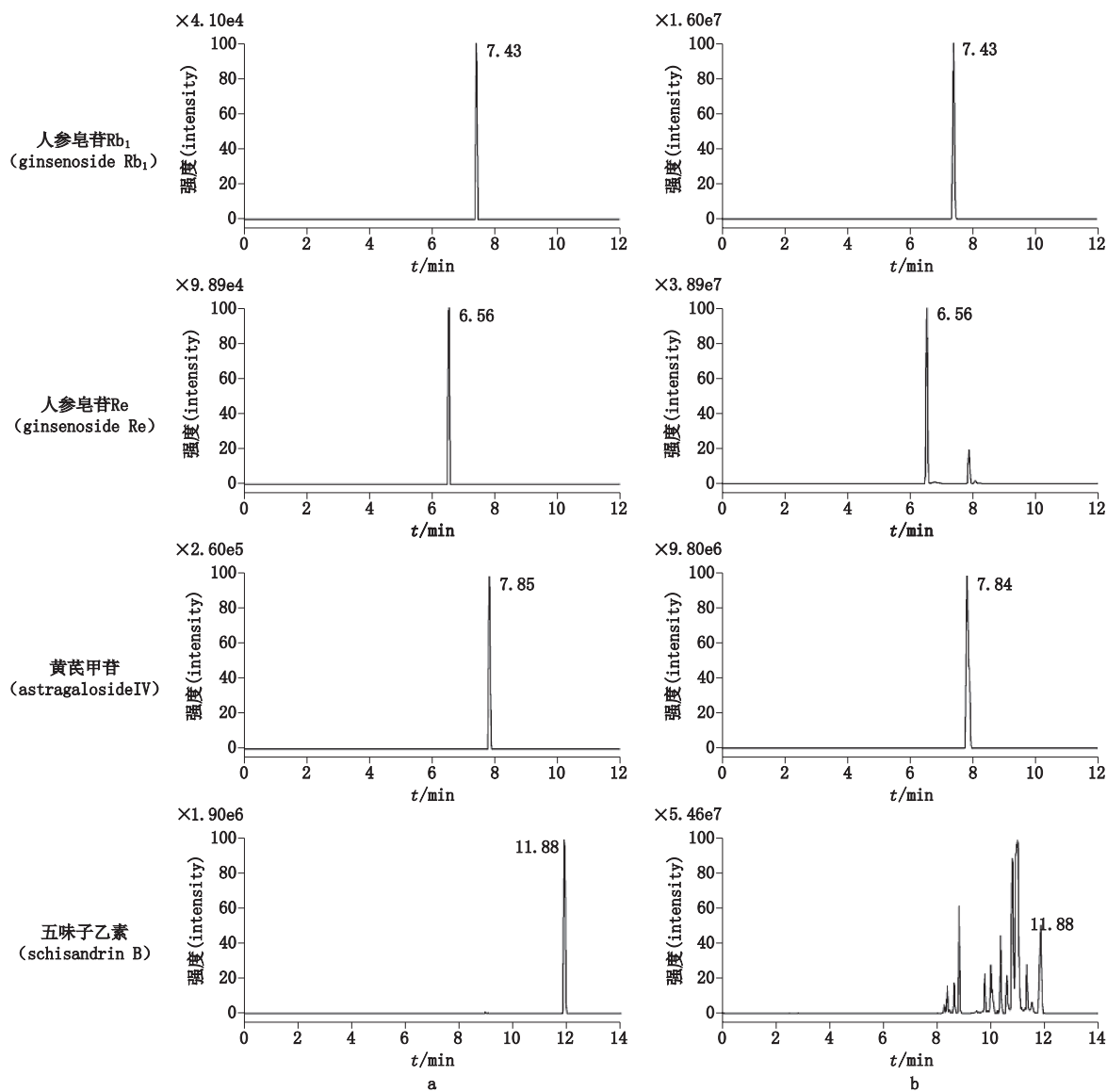


图 2 对照品 (a)、补肺益肾样品 (b) 的各成分 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 UPLC-MS/MS chromatograms of reference substances (a) and Bufeiyishen sample (b)

表 2 10 个成分的线性范围、回归方程

Tab. 2 Linear ranges, regression equation of 10 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	$Y=9.758 \times 10^4+9.092 \times 10^7X$	0.998 9	0.016~1.040
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	$Y=3.775 \times 10^5+3.028 \times 10^7X$	0.999 1	0.022~1.391
人参皂苷 Rg ₁ (ginsenoside Rg ₁)	$Y=1.038 \times 10^6+1.368 \times 10^8X$	0.999 5	0.019~1.220
黄芪甲苷 (astragaloside IV)	$Y=1.553 \times 10^6+1.987 \times 10^8X$	0.999 6	0.016~1.024
贝母素甲 (peimine)	$Y=6.906 \times 10^6+6.870 \times 10^8X$	0.999 6	0.019~1.248
五味子乙素 (schizandrin B)	$Y=6.528 \times 10^6+5.533 \times 10^8X$	0.999 7	0.020~1.263
淫羊藿苷 (icariin)	$Y=-2.952 \times 10^5+2.107 \times 10^8X$	0.999 6	0.018~1.120
橙皮苷 (hesperidin)	$Y=1.392 \times 10^7+6.310 \times 10^7X$	0.999 1	0.216~8.640
川陈皮素 (nobiletin)	$Y=4.230 \times 10^7+7.477 \times 10^8X$	0.999 1	0.043~1.359
芍药苷 (paeoniflorin)	$Y=1.024 \times 10^7+9.073 \times 10^8X$	0.998 3	0.212~8.480

2.2.7 精密度试验 取混合对照品溶液,连续进样6次,人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 及黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷 10 个成分峰面积的 RSD 分别为 2.5%、1.9%、2.1%、2.3%、2.2%、2.2%、2.4%、2.5%、1.7%、2.2%,仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、8、12 h 分别进样 5 μL 进行测定。结果人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 及黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷 10 个成分峰面积的 RSD 分别为 2.7%、1.8%、2.5%、2.8%、2.2%、2.5%、2.4%、1.9%、2.3%、2.2%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品(批号 20180426)各 9 份(针对黄芪甲苷 5 g、橙皮苷、芍药

苷 0.1 g、川陈皮素 2 g、其他成分 0.5 g),分别按已知量的 80%、100%、120% 加入对照品溶液,依照“2.2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定,计算各成分的平均加样回收率,结果人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 及黄芪甲苷、贝母素甲、五味子乙素、淫羊藿苷、橙皮苷、川陈皮素、芍药苷加样回收率分别为 97.2%、96.7%、96.0%、99.8%、104.0%、97.8%、100.6%、98.7%、93.7%、98.0%,RSD 分别为 2.1%、2.6%、3.1%、3.4%、2.8%、2.0%、2.4%、3.6%、4.1%、2.7%,表明该方法加样回收率良好。

2.2.10 样品的测定 分别取 20180426、20180508、20180603 批补肺益肾方颗粒,依照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液制备方法依照“2.2.3”和“2.2.4”项下条件进行 10 个成分的含量测定,结果如表 3。

表 3 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 3 Results of sample analysis

成分 (component)	含量(content)/ $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$		
	批号(lot No.) 20180426	批号(lot No.) 20180508	批号(lot No.) 20180603
人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	0.555±0.025	0.591±0.042	0.579±0.033
人参皂苷 Rb ₁ (ginsenoside Rb ₁)	0.542±0.013	0.550±0.022	0.534±0.020
人参皂苷 Rg ₁ (ginsenoside Rg ₁)	0.463±0.012	0.472±0.030	0.439±0.008
黄芪甲苷 (astragaloside IV)	0.022±0.005	0.025±0.007	0.020±0.001
贝母素甲 (peimine)	0.284±0.075	0.294±0.082	0.264±0.015
五味子乙素 (schizandrin B)	0.286±0.058	0.277±0.095	0.295±0.063
淫羊藿苷 (icariin)	0.321±0.095	0.327±0.165	0.362±0.024
橙皮苷 (hesperidin)	6.465±0.106	6.285±0.127	6.510±0.203
川陈皮素 (naringin)	0.106±0.035	0.112±0.002	0.109±0.001
芍药苷 (paeoniflorin)	4.188±0.168	4.327±0.121	4.061±0.165

3 讨论

3.1 测定成分的选择

补肺益肾方中含有 12 味中药,所含化学物质复杂多样,采用血浆药物化学研究方法,应用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析空白血浆和含药血浆,寻找药物入血成分,通过对入血成分进行分析最终确定与治疗 COPD 疾病显著相关的 10 个原型入血成分,并对其进行含量测定。

橙皮苷和芍药苷在处方中虽然含量较高,但二者在血浆中原型成分较难检测,此外方法学考察结果表明测定误差均在定量测定允许范围内,目前止痒乳膏^[21]、一清胶囊^[22]、参芍胶囊^[23]中含量较高成分亦基于 LC-MS 法进行含量测定,因此本文处方中橙皮苷和芍药苷的测定也选用 LC-MS 法测定含量。

3.2 质谱条件的选择

本研究通过对 10 个成分进行正负切换全扫模式测定发现人参皂苷、芍药苷、淫羊藿苷、橙皮苷和黄芪甲苷在负离子模式下响应较好,其中人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁ 及芍药苷、淫羊藿苷、黄芪甲苷加合离子峰为 $[\text{M}+\text{HCOO}]^{-}$, m/z 分别为 991.548 3、845.490 4、1 153.601 1、525.161 4、721.134 9、829.459 1;橙皮苷加合离子峰为 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$, m/z 为 609.182 5;川陈皮素、五味子乙素、贝母素甲在正离子下具有较好的响应,加合离子峰为 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$, m/z 分别为 403.137 0、401.195 9、432.347 2;因此研究中应用正负切换全扫模式采集数据。

3.3 色谱条件的选择

色谱条件考察了流动相系统对实验测定分离效

果的影响。本研究分析了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液3个不同流动相系统对各成分的分离效果。结果发现乙腈和甲醇相比,乙腈具有较强的洗脱能力,各成分出峰较快;水与0.1%甲酸水溶液相比,0.1%甲酸水溶液系统可以改善峰型且分离度较好;故本研究选择乙腈-0.1%甲酸水溶液流动相系统,各成分较快出峰,分离度和峰形较好,适用于本研究各成分的分析。

3.4 血浆样品制备条件的考察

血浆样品的制备应用蛋白沉淀的方法,考察了甲醇、乙腈、乙醇沉淀溶剂,及100%甲醇、70%甲醇水、50%甲醇水不同复溶溶剂,结果发现以甲醇为沉淀蛋白的溶剂,以50%甲醇水为复溶溶剂,各成分峰形较好,响应度高,适于该研究中血浆样品的制备。

3.5 供试品溶液的制备

在供试品溶液的制备过程中考察了50%甲醇水、70%甲醇水、100%甲醇不同提取溶剂,结果显示50%甲醇水作为提取溶剂各成分分离效果好,含量较高,故本研究选择50%甲醇水作为提取溶剂。

3.6 小结

本研究建立了UPLC-QE-Orbitrap-MS法测定补肺益肾方中有效成分的含量测定方法,方法灵敏、准确、高效;该质谱方法的建立为该方的质量控制及后续的体内药代动力学分析提供了稳定可靠的方法,具有较为深远的意义和应用价值。

参考文献

- [1] 田燕歌,董浩然,刘学芳,等.补肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺泡表面活性蛋白A、D及肺泡结构的影响[J].中医学报,2018,33(1):99
TIAN YG, DONG HR, LIU XF, *et al.* Effects of Bufeiyishen recipe on alveolar surfactant protein ANAD and alveolar structure in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Chin Med*, 2018, 33(1):99
- [2] 田燕歌,崔红新,李建生,等.调补肺肾三法调控慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠炎症反应的R值综合评价[J].中医杂志,2015,56(15):1330
TIAN YG, CUI HX, LI JS, *et al.* Comprehensive evaluation of R value of regulating inflammatory response in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) at stable stage by three methods of regulating lung and kidney[J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 56(15):1330
- [3] 王明明.补肺益肾方对幼龄哮喘豚鼠模型IL-5信号通路的调控机制[J].长春中医药大学学报,2016,32(2):234
WANG MM. Regulation mechanism of Bufeiyishen recipe on IL-5 signaling pathway in young asthma guinea pig model[J]. *J Changchun Univ Tradit Chin Med*, 2016, 32(2):234
- [4] 崔红新,田燕歌,李建生,等.调补肺肾三法调控COPD大鼠肺脏炎症信号通路的R值综合评价研究[J].中国中药杂志,2015,40(8):1570
CUI HX, TIAN YG, LI JS, *et al.* The comprehensive evaluation of the R value of regulating lung and kidney by 3 methods of regulating lung and kidney in COPD rats[J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(8):1570
- [5] 郝丽丽.基于肺泡上皮细胞A549中NF- κ B信号通路调控的调补肺肾三方对炎症反应机制的影响[D].郑州:河南中医药大学,2014
HAO LL. The Effect of Regulating Lung and Kidney by Regulating NF- κ B Signaling Pathway in Alveolar Epithelial Cell A549 on the Inflammatory Response Mechanism[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2014
- [6] 王洋.补肺益肾方调控NF- κ B通路抑制MRC-5细胞炎症反应的机制[D].郑州:河南中医药大学,2017
WANG Y. Mechanism of Bufeiyishen Fang Regulating NF- κ B Pathway in Inhibiting Inflammatory Response of MRC-5 Cells[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2017
- [7] 田燕歌.补肺益肾方联合舒肺贴抑制炎症反应治疗COPD大鼠的机制研究[D].北京:北京中医药大学,2015
TIAN YG. Study on the Mechanism of Bufeiyishen Decoction Combined with Shufei Pian to Inhibit Inflammatory Response in COPD Rats[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015
- [8] 王明明.补肺益肾方对幼龄哮喘豚鼠模型气道重塑中嗜酸粒细胞凋亡的影响[J].辽宁中医杂志,2014,41(11):2488
WANG MM. Effect of Bufeiyishen recipe on apoptosis of eosinophils in airway remodeling of guinea pigs with asthma[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2014, 41(11):2488
- [9] 李卫卫.调补肺肾三方调控NF- κ B/TGF- β 1/Smad2信号通路改善COPD大鼠气道重塑的远后效应[D].郑州:河南中医药大学,2013
LI WW. Regulation of NF- κ B/TGF- β 1/Smad2 Signaling Pathway by Regulating the Lung and Kidney in Rats with COPD[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2013
- [10] 李建生,崔红新,田燕歌,等.调补肺肾三法调节慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠T淋巴细胞亚群的R值综合评价[J].中医杂志,2015,56(12):1054
LI JS, CUI HX, TIAN YG, *et al.* Comprehensive evaluation of R value of regulating T lymphocyte subsets in stable rats with chronic obstructive pulmonary disease by regulating lung and kidney therapy[J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 56(12):1054
- [11] 李琳琳.补肺益肾方联合舒肺贴对COPD大鼠免疫球蛋白及T淋巴细胞亚群的影响[D].郑州:河南中医药大学,2015.
LI LL. Effects of Bufeiyishen Recipe Combined with Shufei Paste on Immunoglobulin and T Lymphocyte Subsets in COPD Rats[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2015

- [12] 李亚, 田燕歌, 李琳琳, 等. 补肺益肾方联合舒肺贴对慢性阻塞性肺疾病大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (8): 1748
LI Y, TIAN YG, LI LL, *et al.* Effect of Bufeiyishen recipe combined with Shufeipaste on T lymphocyte subsets in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43 (8): 1748
- [13] 姚凤佳. 补肺益肾方调节树突状细胞治疗 COPD 大鼠的机制研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2014
YAO FJ. Study on the Mechanism of Bufeiyishen Recipe Regulating Dendritic Cells in Treating COPD Rats [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2014
- [14] 田燕歌, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29 (2): 621
TIAN YG, LI Y, LI JS, *et al.* Effects of three methods of regulating lung and kidney on oxidative stress and long-term effect of lung tissue in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 29 (2): 621
- [15] LI SY, LI JS, WANG MH, *et al.* Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four center, open-label, randomized, controlled study [J]. BMC Compl Altern Med, 2012 (12): 197
- [16] 李竹英, 郭玮, 刘紫君. 补肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者生活质量的影响 [J]. 中国中医急症, 2017, 26 (4): 690
LI ZY, GUO W, LIU ZJ. Effect of BFYS on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease at stable stage [J]. J Tradit Chin Med, 2017, 26 (4): 690
- [17] 王国力, 邓虎, 徐艳玲. 补肺益肾方提高慢性阻塞性肺疾病患者活动耐力的临床研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12 (1): 66
WANG GL, DENG H, XU YL. Clinical study on improving activity endurance of patients with chronic obstructive pulmonary disease by Bu fei Yishen recipe [J]. World J Integr Tradit West Med, 2017, 12 (1): 66
- [18] 闫广利, 孙晖, 张爱华, 等. 基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (16): 3729
YAN GL, SUN H, ZHANG AH, *et al.* Discovery of quality markers of Chinese materia medica based on chinmedomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49 (16): 3729
- [19] WANG X, ZHANG A, ZHOU X, *et al.* An integrated chinmedomics strategy for discovery of effective constituents from traditional herbal medicine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 18997
- [20] 孙大赢, 赵文法, 李广华, 等. LC-MS/MS 法同时测定参芍胶囊中人参皂苷和芍药苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (1): 186
SUN DY, ZHAO WF, LI GH, *et al.* LC-MS / MS method for simultaneous determination of ginsenoside and paeoniflorin in Shenshao capsules [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38 (1): 186
- [21] 洪宗超, 吴和珍, 杨艳芳, 等. 基于液相质谱联用测定复方苦参汤中三种生物碱的含量 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20 (2): 39
HONG ZC, WU HZ, YANG YF, *et al.* Determination of three alkaloids in compound *Sophora flavescens* decoction by liquid chromatography mass spectrometry [J]. J Hubei Univ Tradit Chin Med, 2018, 20 (2): 39
- [22] 薛刚强, 曹宝帅, 高淑丽, 等. LC-MS/MS 法同时测定回春育子颗粒中 9 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29 (9): 1213
XUE GQ, CAO BS, GAO SL, *et al.* LC-MS / MS were used to simultaneously determine the content of 9 components in Huichun Yuzi granules [J]. China Pharm, 2018, 29 (9): 1213

(本文于 2019 年 1 月 18 日修改回)