

高分离快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱法 检测人参皂苷 Re 在大鼠体内的分布

王恩鹏¹, 斋藤哲男², 孙 岩¹, 陈长宝¹, 刘淑莹¹

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117;

2. 新潟药科大学应用生命科学研究院, 日本 新潟市 956-8603)

摘要:建立了高分离快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS)法检测大鼠尾静脉注射人参皂苷 Re(G-Re)后,不同组织(心、肝、脾、肺、肾、脑)中 G-Re 的分布情况。样本经蛋白沉淀处理, Supelco Ascentis® Express C18 色谱柱(50 mm×3.0 mm×2.7 μm)分离,采用含 0.1% 甲酸的水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,以人参皂苷 Re(G-Re)作为内标,在电喷雾负离子模式下检测。结果表明:组织匀浆标准曲线的线性范围为 10~20 000 μg/L,线性关系良好($r>0.99$),最低检出限(S/N=3)为 3 μg/L,最小定量限为 10 μg/L;准确度、日内和日间精密性、提取回收率均符合生物样品的分析要求。大鼠尾静脉注射 20 mg/kg G-Re 溶液后,在大鼠体内不同组织中均能检测到 G-Re,主要分布在肺、脾、肾、心、脑、肝等器官,其中在肺中分布最多,在肝中分布最少。该方法简单、灵敏、快速、检出限低,适用于检测人参皂苷 Re 在生物体内的分布。

关键词:高分离快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS);人参皂苷 Re;静脉注射;组织分布

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2016)06-0526-07

doi:10.7538/zpxb.youxian.2016.0038

Tissue Distribution of Ginsenoside Re in Rats by Rapid Resolution Liquid Chromatography Coupled With Quadrupole-Time-of Flight Mass Spectrometry

WANG En-peng¹, SAITO Tetsuo², SUN Yan¹, CHEN Chang-bao¹, LIU Shu-ying¹

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Department of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy & Applied Life Sciences, Higashijima 265-1, Niigata 956-8603, Japan)

Abstract: A method of rapid resolution liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF MS) was established to investigate the distribution of ginsenoside Re (G-Re) in rat various tissues (heart, liver, spleen, lung,

收稿日期:2015-12-30;修回日期:2016-04-08

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(20150344);长春市科技局重大科技攻关项目(14KG057)资助

作者简介:王恩鹏(1983—),男(汉族),吉林人,助理研究员,从事中药化学研究。E-mail: robbinwang913@163.com

通信作者:刘淑莹(1943—),女(汉族),黑龙江人,教授,从事中药化学和有机质谱学研究。E-mail: sylu19@yahoo.com.cn

网络出版时间:2016-09-01;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160901.1500.002.html>

kidney and brarin) after a single administration by intravenous injection. The biological samples were prepared by protein precipitation. Chromatographic separations was achieved on a Supelco Ascentis® Express C18 column (50 mm×3.0 mm×2.7 μm) with a mobile phase consisting of solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (acetonitrile) at a flow rate of 0.3 mL/min. Gradient elution was as follows: 0-15 min, 20%-40%B; 15-20 min, 40%-50%B; 20-22 min, 50%-100%B. Ginsenoside Rc (G-Rc) was used as internal standard (IS). All mass spectrometric experiments were performed on RRLC-Q-TOF MS equipped with an electrospray ionization (ESI) source operated in negative mode. The result shows that the calibration curve is linear in the range of 10-20 000 μg/L for tissue homogenates ($r>0.99$), the lower limit of detection (LLOD) is 3 μg/L, and the lower limit of quantification (LLOQ) is 10 μg/L. The accuracy, intra-day, inter-day precision and recovery ratio can meet the requirements of the biological samples analysis. As a result, G-Re could be widely distributed in organizations with 20 mg/kg solution by caudal vein injection, which could be detected in different organs and distributed mainly in the lung, spleen, kidney and heart. Lung had a highest affinity to G-Re, which was not easy to pass through the blood-brain barrier and hard to accumulate. This method is simple, sensitive and rapid, which is suitable for analyzing ginsenosides Re in vivo.

Key words: rapid resolution liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF-MS); ginsenoside Re; intravenous injection; tissue distribution

人参系五加科植物,被称为“百草之王”,在传统中医药中占据重要地位。目前,人参在中国、韩国、日本、俄罗斯、美国和加拿大^[1]等国家被广泛种植,它作为一种补充食品深受人们欢迎^[2-3]。人参皂苷 Re 是人参皂苷中的主要成分,具有良好的抗氧化、抗衰老、降血糖、降血脂等功效,对于缺血性心律失常、体液免疫和细胞免疫均有较好的作用^[4-6],其结构示于图 1。近年来,有许多关于人参皂苷 Re 的体内代谢及药代动力学研究的报道。如,Bae 等^[7]利用高效液相色谱法对人参皂苷 Re 的肠内菌群代谢产物进行检测,结果表明,G-Re 在体内代谢的主要初级产物为人参皂苷 Rg1,其继续水解可生成人参皂苷 Rh1 和 Rf1。陈广通等^[8]利用 HPLC-ESI-MS/MS 法从口服 G-Re 大鼠的粪便中检测出 6 个代谢产物,分别是 20(S)-人参皂苷 Rg2、20(S)-人参皂苷 Rh1、20(R)-人参皂苷 Rh1、人参皂苷 F1、3-羧基人参皂苷 Rh1 和原人参三醇。彭缨等^[9]采用 HPLC 法测定大鼠静脉注射 3 种不同剂量(20、30、40 mg/kg)G-Re 后的血药浓度,结果表明,3 组大鼠的药代动力学参

数成双隔室型,在该剂量范围内 G-Re 的消除为线性动力学。近年来,人们在研究人参皂苷血浆药物浓度的同时,其组织分布也受到重视,两者结合能更好地阐明人参皂苷 Re 的体内代谢过程,有效地评价生物利用度^[10]。

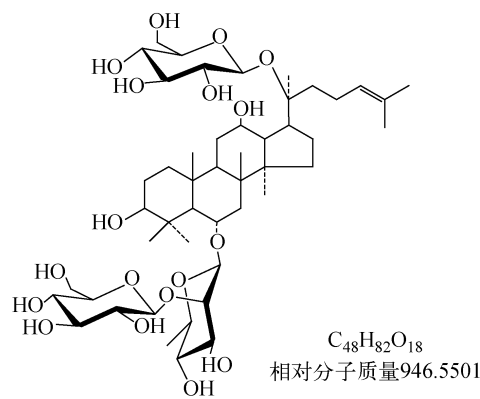


图 1 人参皂苷 Re 的化学结构式
Fig. 1 Chemical structure of ginsenoside Re

目前,人参皂苷的分析多采用高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)法,但该方法的分析

时间长^[11-12],特别是分析生物样本时需要30 min以上^[13]。且由于生物样品中内源性干扰较多,影响了测定的准确度和灵敏度,液相色谱在没有标准品的情况下,不利于目标成分的准确测定和确认。高分离快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF MS)法作为中药生物样品多成分复杂体系的分析工具,将快速液相色谱仪与高分辨质谱仪连接,液相色谱部分采用高压双元泵,提高了流动相的压力与流速,同时使用2.7 μm 粒径填料的色谱柱,可明显加快分析速度。与常规的HPCL-UV相比,该方法具有准确度高、专属性强、灵敏度高、分析速度快等优点^[14-18],能够提高生物样品的分析效率,现已被广泛用于药物鉴定、代谢组学、药代动力学等领域的研究^[11-12,19-21]。

本研究拟采用RRLC-Q-TOF MS法考察大鼠静脉注射人参皂苷Re后的组织分布特征,并对其进行专属性、线性范围及检测限、精密密度与准确度、提取回收率、检测限和稳定性的考察,旨在进一步开发利用人参皂苷Re奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 系列 RRLC 系统、Agilent 6520 Q-TOF 质谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有 ESI 离子源和 Mass Hunter 数据处理系统;WS2-261-79 型电热恒温水浴箱:北京长安科学仪器厂产品;高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;DY89-II 型电动玻璃匀浆机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;超低温冰箱:美国 Thermo 公司产品;MTN-2800D 型氮吹仪:天津奥特塞恩斯仪器有限公司产品。

人参皂苷 Re、Rc 标准品(色谱级,纯度>98%):购自吉林大学药学院;乙腈(色谱级):美国 Tedia 公司产品;甲酸(色谱级):美国 Sigma 公司产品;超纯水:由美国 Millipore 公司的 Milli-Q 系统制得。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 Supelco Ascentis® Express C18 HPLC 色谱柱(50 mm×3.0 mm×2.7 μm);流动相:A 为含 0.1%甲酸的超纯水,

B 为乙腈;梯度洗脱:0~15 min、20%~40%B, 15~20 min、40%~50%B, 20~22 min、50%~100%B, 22~25 min、100%B;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.3 mL/min;进样量 5 μL 。

1.2.2 质谱条件 电喷雾负离子电离模式,气体温度 350 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流速 9 L/min,喷雾气压 276 kPa,毛细管电压 3.5 kV,裂解电压 175 V,锥孔电压 65 V,质量扫描范围 m/z 50~1 000。样品测试前,使用调谐液校正质量轴。

1.3 溶液配制和样品处理

1.3.1 标准溶液和内标溶液的配制 精密称取 1.00 mg 人参皂苷 Re 标准品,用甲醇稀释至 1 mL,配制成浓度为 1 g/L 的母液;然后用甲醇稀释成浓度为 1、10、100 mg/L 的工作液。精密称取 1.00 mg 人参皂苷 Rc 标准品,用甲醇定容至 2 mL,配制成浓度为 0.5 g/L 的内标溶液。

1.3.2 标准曲线的绘制 分别取 100 μL 空白大鼠的组织(心、肺、脾、肾、脑、肺)匀浆清液于 1.5 mL Eppendorf 管中。向每个样品中加入不同质量的人参皂苷 Re,配制成浓度分别为 10、20、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000、20 000 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液;加入 10 μL 1 g/L 人参皂苷 Rc 作为内标,用移液枪混匀,再加入 300 μL 甲醇,涡旋 5 min,以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液;经 0.45 μm 滤膜过滤,进样检测。以人参皂苷 Re 浓度为横坐标 x ,G-Re 与 G-Rc 的峰面积比值(A/A_i)为纵坐标 y ,进行线性回归,绘制标准曲线。

1.3.3 动物实验 25 只雄性 Wistar 大鼠,体重(200±30) g,动物合格证号:SCXK-(吉)2011-0007,由长春生物制品有限公司动物中心提供。在标准环境下(湿度(50±10)%,温度(25±2) $^{\circ}\text{C}$,12 h 昼夜循环)进食进水,实验前禁食 12 h。

1.3.4 样品的采集与制备 将 25 只大鼠随机分为 5 组,其中 1 组为空白对照组,其余 4 组分别在尾静脉注射 20 mg/kg 人参皂苷 Re,在 0.5、1、2、4、8 h 后处死,取心、肝、脾、肺、肾、脑等脏器,以蒸馏水洗净,称其质量;按质量-体积比 1:5 向各组织中加入生理盐水,冰上匀浆后,置于预置好的 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速冷冻离心机内,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于冻干机内冻干;

加入 1 mL 甲醇,涡旋 5 min,超声溶解 15 min,转移至 1.5 mL Eppendorf 管内,置于预置好的 4 ℃ 高速冷冻离心机内,以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液;45 ℃ 下氮气吹干,向每个样品中加入 10 μL 1 g/L 人参皂苷 Re 内标溶液,用流动相定容至 1 mL,制成浓度为 10 mg/L 的溶液;经 0.45 μm 滤膜过滤,置于 4 ℃ 冰箱中,待测。

2 结果与讨论

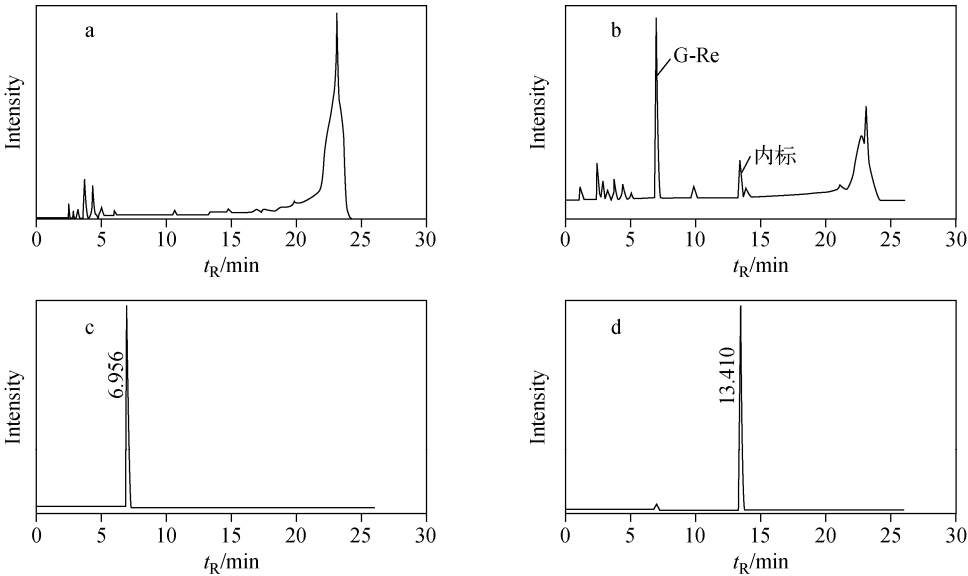
2.1 专属性考察

以大鼠的肺脏组织为例,在电喷雾负离子模式下,其总离子流图示于图 2。通过比较供

试空白组织色谱图、向空白组织中加入待测物和内标物后得到的总离子流图(TIC)、提取离子流图(EIC)和给药后不同时间测得的色谱图,发现组织中所含内源性物质不干扰被测物和内标物的测定,被测物峰形良好;在 1.2.1 和 1.2.2 节条件下,G-Re 和内标 G-Re 的保留时间分别为 6.956 min 和 13.410 min。

2.2 线性范围及检测限

大鼠组织样本的线性范围和标准曲线列于表 1。可以看出:该方法的线性关系良好($r>0.99$),以 $S/N\geq 3$ 计算方法的最低检出限(LLOD)为 3 μg/L。



注:a. 空白大鼠肺脏总离子流图;b. 向空白组织中加入 G-Re 与内标物的总离子流图;
c. G-Re 的提取离子流图;d. 内标物的提取离子流图

图 2 负离子模式下,大鼠肺脏组织的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram (TIC) of rat lung tissue in negative ion mode

表 1 大鼠组织样本的标准曲线,相关系数和线性范围

Table 1 Standard calibration curves, correlation coefficients and liner ranges of G-Re in rats tissue samples			
组织样本	线性回归方程	相关系数 (r)	线性范围/(μg/L)
心	$y=0.0283x-0.0273$	0.9993	10~20000
肝	$y=0.0322x-0.0165$	0.9971	10~20000
脾	$y=0.0449x-0.0504$	0.9969	10~20000
肺	$y=0.0249x+0.0387$	0.9976	10~20000
肾	$y=0.0219x+0.0158$	0.9986	10~20000
脑	$y=0.0284x-0.0286$	0.9994	10~20000

2.3 精密度与准确度

按 1.3.2 节方法分别配制 G-Re 各组织匀浆液高、中、低 3 个浓度(3、30、300 μg/L)的质量控制(QC)样品,每个浓度进行 5 样本分析,连续测定 3 d,为保持实验条件一致,标准曲线的测定与上述样品测定同时进行。根据当日标准曲线计算 QC 样品浓度(C1~C3),与配制浓度(C1'~C3')对照,将 QC 样品的结果进行计算,通过每一浓度的 2 种处理方法的浓度比值(C/C')计算回收率,得出方法准确度,通过计算二者的浓度相对标准偏差得出方法的精密

度。方法的准确度和精密度列于表 2。结果表明:G-Re 在各组织匀浆液中的日内和日间精密度 RSD 均小于 20%,准确度在 90.0%~110.0% 范围内。

表 2 质量控制样品的日内、
日间精密度和准确度 (n=5)

Table 2 Intra-day precision, inter-day precision and
accuracy of quality control samples (n=5)

组织 样本	浓度/ (μg/L)	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%	准确度 RE/%
心	3	4.9	4.3	-1.3
	30	5.8	5.9	-2.8
	300	6.2	6.5	-2.4
肝	3	4.2	10.5	-2.1
	30	4.6	8.4	-1.5
	300	5.5	5.3	1.7
脾	3	5.0	7.5	-2.4
	30	5.2	5.2	-1.9
	300	4.7	9.6	2.6
肺	3	3.2	8.3	2.8
	30	4.3	7.5	-2.4
	300	5.6	9.4	-0.9
肾	3	6.3	6.1	-1.2
	30	6.6	6.6	-1.6
	300	7.4	7.2	1.7
脑	3	5.2	7.1	-2.4
	30	6.1	9.8	2.9
	300	6.6	5.4	-1.3

2.4 提取回收率

按 1.3.2 节方法分别配制 G-Re 各组织匀浆液高、中、低 3 个浓度的 QC 样品,每个浓度进行 5 样本分析,连续测定 3 d,为保持实验条件一致,标准曲线的测定与上述样品测定同时进行。根据当日标准曲线计算 QC 样品浓度,与配制浓度对照,将 QC 样品的相应峰面积记为 A₁;另取各空白组织匀浆液,离心后得上清液,分别加入上述低、中、高浓度的标准溶液(每个浓度进行 3 样本分析)进样分析,获得相应的

峰面积值 A₂;以每一浓度的 2 种处理方法的峰面积比值(A₁/A₂)计算提取回收率。以肺匀浆液为例,提取回收率分别为 (91.6±1.0)%、(90.9±3.9)%、(93.2±2.3)%,内标(IS)回收率为(98.2±1.1)%。

2.5 稳定性考察

按 1.3.2 节方法分别配制 G-Re 各组织匀浆液高、中、低 3 个浓度的 QC 样品,每个浓度进行 3 样本分析。分别将样品在室温(约 20℃)下放置 6 h、4℃下冷藏 8 h、-20℃冻融循环 3 次,经处理后进样测定,考察大鼠的各个组织匀浆液中 G-Re 在室温、冷藏、反复冻融条件下的稳定性。以每一浓度 3 样本分析,3 种情况下得到的 G-Re 峰面积与时间点的偏差均在 15%以内,说明各组织匀浆液中的待测物稳定性良好。

2.6 组织分布考察

大鼠尾静脉注射 20 mg/kg G-Re 溶液后,在大鼠体内不同时间点(0.5、1、2、4、8 h)各组织中 G-Re 的分布情况示于图 3。结果表明:在心、肝、脾、肺、肾、脑等 6 种组织器官中均能检测到 G-Re,G-Re 在各组织中的分布迅速且具有不均衡性,其含量排序为:肺>脾>肾>心>脑>肝。

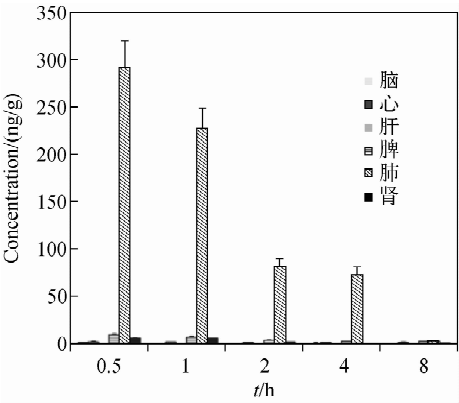


图 3 大鼠尾静脉注射 20 mg/kg G-Re 后,G-Re
在各组织中的浓度变化

Fig. 3 Concentration-time profile of G-Re in tissues
after intravenous administration at a dose
of 20 mg/kg to rats

3 结论

本研究建立了 RRLC-Q-TOF MS 法测定

人参皂苷 Re 在大鼠体内的分布,该方法简便快速、专属性强、灵敏度高、分析效率好,可弥补人参皂苷类物质在紫外吸收差、检测限值高的缺陷。RRLC 液相色谱仪结合 $2.7\ \mu\text{m}$ 粒径填料色谱柱的使用,提高了色谱的分离效率,加快了分析速度。质谱检测采用电喷雾负离子电离模式,在尾静脉注射 G-Re 大鼠的 6 种主要组织器官中均能检出 G-Re,不同组织样本中的 G-Re 定量范围在 $10\sim 20\ 000\ \mu\text{g/L}$ 之间。该方法适用于生物样品中人参皂苷类成分的高通量分析。

参考文献:

- [1] LU J M, YAO Q, CHEN C, et al. Ginseng compounds: An update on their molecular mechanisms and medical applications[J]. *Current Vascular Pharmacology*, 2009, 7(3): 293-302.
- [2] ZUCCHI O L, MJ O J E. Characterization of hypoglycemic plants by total reflection X-ray fluorescence spectrometry[J]. *Biological Trace Element Research*, 2005, 103(103): 277-290.
- [3] MURTHY H N, GEORGIEV M I, KIM Y S, et al. Ginsenosides: Prospective for sustainable biotechnological production[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(14): 6 243-6 254.
- [4] 何道同,王兵,陈珺明. 人参皂苷药理作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012, (7): 118-121.
HE Daotong, WANG Bing, CHEN Junming, et al. Research progress on pharmacological effects of ginsenoside[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, (7): 118-121(in Chinese).
- [5] ATTELE A S, ZHOU Y P, XIE J T, et al. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component[J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1 851-1 858.
- [6] ZHANG Z G, LI X Y, LV W S, et al. Ginsenoside Re reduces insulin resistance through inhibition of c-Jun NH_2 -terminal kinase and nuclear factor- κB [J]. *Molecular Endocrinology*, 2008, 22(1): 186-195.
- [7] BAE E A, SHIN J E, KIM D H. Metabolism of ginsenoside Re by human intestinal microflora and its estrogenic effect[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(10): 1 903-1 908.
- [8] 陈广通,杨敏,果德安. 人参皂苷 Re 在大鼠体内的代谢研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(12): 1 540-1 543.
CHEN Guangtong, YANG Min, GUO Dean, et al. Metabolic study of ginsenoside Re in rats[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(12): 1 540-1 543(in Chinese).
- [9] 彭纛,王淑君,潘卫三,等. 人参皂苷 Re 大鼠体内药物动力学研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(4): 4-7.
PENG Ying, WANG Shujun, PAN Weisan. Pharmacokinetics of ginsenoside Re in rat[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2006, 23(4): 4-7(in Chinese).
- [10] LEE J, LEE E, KIM D, et al. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(1): 143-148.
- [11] 陈英红,姜瑞芝,罗浩铭,等. 人参总皂苷提取物指纹图谱研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(11): 12-14.
CHEN Yinghong, JIANG Ruizhi, LUO Haoming, et al. Studies on the HPLC fingerprints of general ginsenoside in the extract of Ginseng Radix[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2009, 15(11): 12-14 (in Chinese).
- [12] 张金秋,夏娟,孙光芝,等. RP-HPLC 法测定人参花中 11 个人参皂苷含量[J]. *药物分析杂志*, 2015, (9): 1 596-1 600.
ZHANG Jinqiu, XIA Juan, SUN Guangzhi, et al. Determination of 11 kinds of ginsenosides from *Ginseng Bud* by RP-HPLC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2015, (9): 1 596-1 600(in Chinese).
- [13] 马静,李学林,唐进法,等. 不同途径给药参麦注射液中人参皂苷 Rg1 及 Re 在大鼠体内药代动力学研究[J]. *中药药理与临床*, 2012, (2): 9-11.
MA Jing, LI Xuelin, TANG Jinfa, et al. Pharmacokinetic study on ginsenoside Rg1 and Re in rats following intravenous and oral administration of Shenmai injection[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2012, (2): 9-11 (in Chinese).
- [14] WU W, QIN Q J, GUO Y Y, et al. Studies on the chemical transformation of 20 (S)-proto-

- panaxatriol (PPT)-type ginsenosides Re, Rg2, and Rf using rapid resolution liquid chromatography coupled with quadruple-time-of-flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF-MS)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(40): 10 007-10 014.
- [15] WEN X D, LIU E H, YANG J. Identification of metabolites of Buyang Huanwu decoction in rat urine using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 67/68(3): 114-122.
- [16] NIU J, PI Z F, YUE H, et al. Effect of ginseng polysaccharide on the urinary excretion of type 2 diabetic rats studied by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 907(20): 7-12.
- [17] WANG P X, LI Y H, Y J, et al. Determination of protopine in rat brain tissues by RRLC-ESI/Q-TOF-MS method[J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(2): 125-130.
- [18] SUN J H, WU W, GUO Y Y, et al. Pharmacokinetic study of ginsenoside Rc and simultaneous determination of its metabolites in rats using RRLC-Q-TOF-MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 88(Complete): 16-21.
- [19] LIU J, CHEN X Y, HU Y H, et al. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2010, 51(5): 1 134-1 141.
- [20] WANG Y, MA L, SUN Y, et al. Metabonomics study on the hot syndrome of traditional Chinese medicine by rapid resolution liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Archives of Pharmacal Research, 2014, 37(7): 1-8.
- [21] WU W, SUN L, ZHANG Z, et al. Profiling and multivariate statistical analysis of *Panax ginseng* based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 107: 141-150.