

【药动力学研究】

基于大鼠体内多成分代谢的黄芪质控成分遴选

刘傲雪¹, 王晶娟^{1*}, 张贵君¹, 刘洋¹, 鲁利娜¹, 王月¹, 张久旭¹, 李小阳¹, 马晓云¹
北京中医药大学, 北京 102488

摘要: 目的 基于中药多成分作用特点, 探讨黄芪多成分在体内的代谢情况, 遴选黄芪质控成分。方法 制备黄芪水提物, ig 给予大鼠 (生药 20 g/kg), 每天 3 次, 连续给药 3 d, 腹主动脉采血、代谢笼收集尿液, 结合超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术对黄芪水提物主要成分、入血成分和尿液排泄成分进行鉴别, 并分析主要的代谢途径, 遴选黄芪质控成分。结果 黄芪水提物主成分共鉴别出包括毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、calycosin-7-O-glc-6"-O-malonate、毛蕊异黄酮、芒柄花素等在内的 15 个化合物; 血浆样品中指出 11 个成分, 包括 7 个代谢成分和 4 个原型成分; 尿液样品中指出 14 个成分, 9 个代谢成分及 5 个原型成分。结论 根据质谱数据分析结果, 遴选出黄芪中以原型入血的成分和参与体内代谢的成分, 包括毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、大豆苷元、3-hydro-9, 10-diMP、isomer of 3-hydro-9, 10-diMP、calycosin-7-O-glc-6"-O-acetate 和 formononetin-7-O-glc-6"-O-acetate, 作为黄芪的质控成分。

关键词: 黄芪; 水提物; 多成分代谢; 遴选; 质控成分; 血液; 尿液; 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS)

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)02-0216-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.008

Selection of quality control components from *Astragali Radix* based on multi-component metabolism in rats

Liu Aoxue¹, Wang Jingjuan¹, Zhang Guijun¹, Liu Yang¹, Lu Lina¹, Wang Yue¹, Zhang Jiuxu¹, Li Xiaoyang¹, Ma Xiaoyun¹

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488

Abstract: Objective To investigate the internal metabolism of *Astragali Radix* and to select the quality control components of *Astragali Radix* by using UPLC-MS/MS based on the feature of multi-component. **Methods** Water extract of *Astragali Radix* was prepared for ig administration (crude drug 20 g/kg) to rats for 3 d, three times a day. The metabolic components in the rats blood from abdominal aorta and urine collected by metabolic cage, as well as water extracts after oral administration were analyzed by UPLC-MS/MS with view to analyzing the metabolic pathway and the quality control components of *Astragali Radix*. **Results** There are 15 known constituents identified in the decoction of *Astragali Radix*, including calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, calycosin-7-O-glc-6"-O-malonate, calycosin, formononetin etc. Eleven constituents were detected in the blood, including seven metabolic components, and four prototypes. There are 14 constituents identified in the Urine sample, including nine metabolic components and five prototypes. **Conclusion** There 10 components metabolic components and prototypes as quality control ingredients in water extracts of *A. Radix* based on the results of MS, which included calycosin-7-O-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, daidzein, 3-hydro-9,10-diMP, isomer of 3-hydro-9,10-diMP, calycosin-7-O-glc-6"-O-acetate and formononetin-7-O-glc-6"-O-acetate.

Key words: *Astragali Radix*; waterextract; multicomponent metabolism; selection; quality control ingredients; plasma; urine; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2017-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303217)

第一作者: 刘傲雪 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物代谢与中药质量评价研究。Tel: 18811792203 E-mail: axlijiayoula@163.com

*通信作者: 王晶娟, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药质量评价与药效组分研究。E-mail: jingjuanw@163.com

黄芪为临床常用大宗饮片,是豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。始载于《神农本草经》,列为上品。其味甘,性温,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1-3],具有较高的药用价值。

中药作为一个极其复杂的混合物体系,所含成分数十至上百种^[4],其体内过程是多种成分的原型与代谢产物,代谢产物与代谢产物,原型、代谢产物与受体分子之间的复杂的相互作用。中药药效物质(有效成分)既可以以原型形式发挥药效,也可以以一种至数种(或众多种)代谢产物的形式发挥药效,还可二者均发挥药效。多成分或/和多代谢产物在各个靶点上的叠加作用,与各个靶点之间多成分的协同作用,共同构成了中药发挥药效的药理学作用机制的重要内涵^[5-6]。本实验在中医药理论的指导下,以黄芪饮片为研究对象,根据中药“多成分临床应用^[7]”的特点及黄芪的药效特征,将多成分代谢与中药质量控制^[8]相关联,采用大鼠 ig 给药后腹主动脉采血法和代谢笼收集尿液法,借助超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术对黄芪水提物及其血尿样品成分进行同时检测,通过对比分析,遴选出黄芪中以原型入血的成分和参与体内代谢的成分,作为其质控成分,为制定合理的黄芪质量控制方案提供可靠依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo 液质联用系统(美国赛默飞世尔科技),包括 ultimate 3000 高效液相色谱仪、自动进样器、DAD 检测器、柱温箱、二元泵和 LTQ Orbitrap 质谱, Xcalibur Networks 和 Mass Frontier 7.0 用于数据采集和处理;电子分析天平(BT-25S,北京赛多利斯仪器有限公司);电热恒温水浴锅(DZKW-4,北京中兴伟业仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药材与主要试剂

黄芪饮片,购买于北京同仁堂,经北京中医药大学张贵君教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的根。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号

分别为 140326、130607);毛蕊异黄酮、大豆苷元、大豆苷、黄芪甲苷对照品(成都曼思特生物技术有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号分别为 MUST-14051511、MUST-12020708、MUST-11121201、MUST-14062716);芒柄花素对照品(上海诗丹德生物技术有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,批号 162601);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);娃哈哈纯净水购买于娃哈哈集团公司(中国杭州)。其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量 300 g,由北京斯贝福实验动物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号 SYXK(京)2011-0024,饲养于符合国家标准的屏障环境中,温度 22~24 °C,相对湿度 60%。实验前适应性喂养大鼠 1 周以上,自由饮水和进食。

2 方法

2.1 黄芪水提物及 UPLC-MS 原药液的制备

称取黄芪药材 200 g,加 2 000 mL 去离子水回流提取 1 h,滤过;将残渣再次加入 2 000 mL 去离子水提取 1 h,滤过。合并两次滤液,并悬蒸浓缩至生药量为 1 g/mL 的混悬液,即为黄芪水提物,放置,用于大鼠 ig 给药。

将以上所得黄芪混悬液取适量稀释约至质量浓度为 0.02 mg/mL,取 2 mL,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得原药液,用于 UPLC-MS/MS 进样分析。

2.2 对照品溶液配制

分别精密称取约 2 mg 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、大豆苷元、黄芪甲苷、大豆苷对照品分别置于 10 mL 量瓶,加甲醇溶解稀释为质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液,分别取 0.2 mg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、大豆苷元 1 mL 置于另一量瓶,加甲醇至 10 mL 配制 0.02 mg/mL 的混合标准品溶液,将黄芪甲苷、大豆苷及混合标准品溶液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.3 腹主动脉血的采集

5 只大鼠(体质量 300 g),分成 2 组,黄芪水提物组 3 只,对照组 2 只。禁食 12 h,自由进水,按照 20 mL/kg 剂量(生药 20 g/kg) ig 给予黄芪水提物,每只 4~5 mL,每天 3 次,连续给药 3 d,在末次给药后 1 h 腹主动脉采血。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL,加入 3 倍量的甲醇,漩涡震

荡混匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 减压浓缩至 0.4 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用于 UPLC-MS/MS 进样分析。

2.4 代谢笼尿液的收集

5 只 SD 大鼠, 分组及给药操作同“2.3”项, 将大鼠置于代谢笼中收集尿液 3 d, 4 000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 mL, 加入 3 倍量的甲醇, 超声提取 20 min 后, 漩涡震荡混匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 减压浓缩到适当浓度, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用于 UPLC-MS 进样分析。

2.5 液质条件

色谱条件: Thermo BOS HYPERSIL C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 2.4 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~3 min, 5%~20%A; 4~13 min, 20%~65%A; 14~15 min, 65%A; 体积流量 0.30

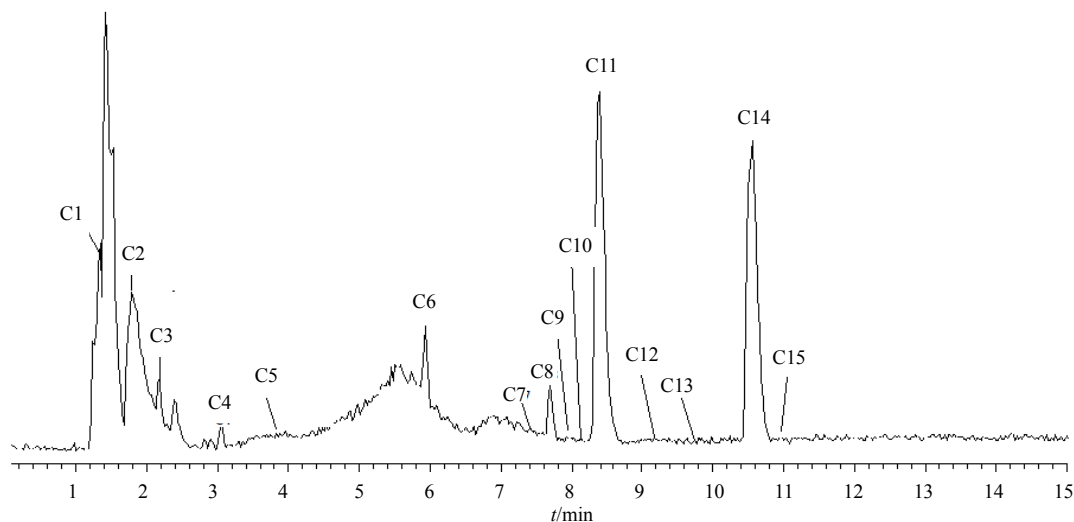
mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 260 nm; 进样量 2 μL。

质谱条件: ESI 源, 正离子模式检测, 喷雾气压 344.75 kPa, 干燥气(N₂) 体积流量 5.0 L/min, 干燥气体温度 330 °C, 气化室温度 350 °C, 毛细管电压+4000 V, 电晕放电电流正离子模式为 4.0 μA, 破碎电压为 100 V; 全扫描质荷比(*m/z*) 范围为 100~1 000。

3 结果

3.1 黄芪水提物化学成分鉴别分析

按照“2.5”项下质谱条件对“2.1”项下黄芪原药液中成分进行分析鉴定。借助对照品、精确分子质量、裂解规律和相关文献对黄芪水提物样品溶液中的化合物进行结构鉴别。共指认 15 个主要成分, 记为 C1~C15, 如图 1 所示。各化合物结构的质谱详细信息见表 1。



C1-天冬氨酸; C2-胆碱; C3-腺嘌呤核苷; C4-亮氨酸; C5-苯丙氨酸; C6-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; C7 - calycosin-7-O-glc-6"-O-malonate; C8-芒柄花苷; C9-大豆苷元; C10 - 3-hydro-9, 10-diMP; C11-毛蕊异黄酮; C12 - formononetin-7-O-glc-6"-O-acetate; C13-红车轴草素; C14-芒柄花素; C15 - 3-hydro-9, 10-diMP 同分异构体

C1 - asparagine; C2 - choline; C3 - adenine nucleoside; C4 - leucine; C5 - phenylalanine; C6 - calycosin-7-O-glucoside; C7 - calycosin-7-O-glc-6"-O-malonate; C8 - ononin; C9 - daidzein; C10 - 3-hydro-9, 10-diMP; C11 - calycosin; C12 - formononetin-7-O-glc-6"-O-acetate; C13 - pratensein; C14 - formononetin; C15 - isomer of 3-hydro-9, 10-diMP

图 1 黄芪水提物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of water extracts of *Astragalus Radix*

3.2 入血成分和尿液排泄成分鉴别分析

采用 UPLC-MS 对血浆和尿液样品化学成分进行分析鉴定。借助相关文献中精确分子质量和裂解规律进行结构鉴别, 见表 2。血浆样品中识别出 11 个成分, 包括 7 个代谢成分和 4 个原型成分。尿液样品中检测 14 个成分, 9 个代谢成分和 5 个原型成分。黄芪在大鼠体内发生的代谢反应类型主要包括: 水解、还原、脱甲基、羟基化、硫酸化和葡萄糖醛酸化等。

芒柄花苷和芒柄花素相关代谢产物: 代谢成分 M1 和 M4 准分子离子峰[M+H]⁺分别为 *m/z* 431.099 8 (C₂₁H₁₈O₁₀) 和 *m/z* 335.024 1 (C₁₅H₁₀O₇S), 比芒柄花素脱甲基或大豆苷元分别高 176 (C₆H₈O₆) 和 80 (SO₃), 从二者共有二级特征峰 *m/z* 255.067 3 (C₁₅H₁₁O₄⁺), 可推测其母核为大豆苷元, 由此推断 M1 和 M4 分别是由芒柄花素脱甲基产物或药液中的大豆苷元的葡萄糖醛酸化和硫酸化。代谢成分 M7

表1 黄芪水提物样品溶液化学成分信息

Table 1 Chemical composition information in water extract of *Astragali Radix*

编号	保留时间/min	化合物	正离子模式 离子峰	误差/ $\times 10^{-6}$	碎片离子	分子式
C1	1.35	天冬氨酸 ^[9]	133.061 6	6.097	116.034 9[M+H-NH ₃] ⁺ 88.039 6[M+H-NH ₃ -CO] ⁺ 87.055 7[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃
C2	1.79	胆碱 ^[9]	104.107 6	5.757	60.080 8[M+H-C ₂ H ₄ O] ⁺	C ₅ H ₁₃ NO
C3	2.18	腺嘌呤核苷 ^[9]	268.105 6	5.929	136.062 6[M+H-Ribose] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄
C4	3.07	亮氨酸 ^[9]	132.102 6	5.638	86.096 7[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 69.069 8[M+H-NH ₃ -CH ₂ O ₂] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂
C5	3.83	苯丙氨酸 ^[9]	166.087 1	5.267	149.060 5[M+H-NH ₃] ⁺ 131.049 9[M+H-NH ₃ -H ₂ O] ⁺ 120.081 5[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺ 103.054 7[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂
C6	5.93	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷*	447.131 3	6.076	469.112 5[M+Na] ⁺ 285.077 9[M+H-glc] ⁺ 270.053 7[M+H-glc-CH ₃] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
C7	7.37	calycosin-7- <i>O</i> - Glc-6"- <i>O</i> -malonate ^[10]	489.141 6	4.972	285.077 8[M+H-glc-ace] ⁺ 270.053 9[M+H-glc- ace-CH ₃] ⁺ 225.056 4[M+H-glc- ace-CH ₃ -CHO ₂] ⁺	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁
C8	7.69	芒柄花苷*	431.136 4	6.242	453.117 8[M+Na] ⁺ 269.082 7[M+H-glc] ⁺ 254.058 6[M+H-glc-CH ₃] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
C9	7.95	大豆苷元*	255.066 5	5.076	237.056 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 227.072 0[M+H-CO] ⁺ 199.076 8[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 137.024 3[M+H-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
C10	8.13	3-hydro-9, 10-diMP ^[10]	301.108 7	5.579	269.082 6[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 241.087 4[M+H-2CH ₂ O] ⁺ 191.071 5[M+H-C ₆ H ₅ O-CHO] ⁺ 167.071 3[M+H-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺ 163.040 0[M+H-C ₈ H ₁₀ O ₂] ⁺ 147.045 0[M+H-C ₈ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₅
C11	8.39	毛蕊异黄酮*	285.077 5	6.069	270.054 3[M+H-CH ₃] ⁺ 253.051 5[M+H-CH ₃ -OH] ⁺ 229.087 5[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 225.056 4[M+H-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ 137.024 3[M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
C12	9.22	formononetin-7- <i>O</i> - Glc-6"- <i>O</i> -acetate ^[9]	473.814 6	5.361	269.082 5[M+H-glc-ace] ⁺ 254.057 7[M+H-glc-ace-CH ₂] ⁺	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀
C13	9.75	红车轴草素 ^[10]	301.072 0	4.303	286.048 8[M+H-CH ₃] ⁺ 269.045 9[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 245.081 9[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 241.050 7[M+H-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ 153.018 9[M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
C14	10.56	芒柄花素*	269.082 3	5.592	291.064 3[M+Na] ⁺ 254.059 1[M+H-CH ₃] ⁺ 237.056 30[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 213.092 5[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 136.016 5[M+H-C ₉ H ₈ O] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
C15	10.85	3-hydro-9, 10-diMP 同分异构体	301.108 8	5.811	269.082 6[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 241.087 4[M+H-2CH ₂ O] ⁺ 191.071 5[M+H-C ₆ H ₅ O-CHO] ⁺ 167.071 3[M+H-C ₈ H ₆ O ₂] ⁺ 163.040 0[M+H-C ₈ H ₁₀ O ₂] ⁺ 147.045 0[M+H-C ₈ H ₁₀ O ₃] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₅

*通过对照品鉴定

*Identification by control

表2 血、尿样品中的化学成分信息

Table 2 Chemical composition information in plasma and urine samples

编号	保留时间/min	化合物	正离子模式 离子峰	误差/ $\times 10^{-6}$	碎片离子	分子式	来源	
							血液	尿液
C9	5.93	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	447.131 2	—	—	$C_{22}H_{22}O_{10}$	—	+
C15	8.03	大豆苷元	255.066 9	6.879	227.072 0[M+H-CO] ⁺ 199.076 8[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 137.024 4[M+H-C ₈ H ₆ O] ⁺	$C_{15}H_{10}O_4$	+	+
C17	8.44	毛蕊异黄酮	285.077 5	6.525	270.054 3[M+H-CH ₃] ⁺ 253.051 5[M+H-CH ₃ -OH] ⁺ 229.087 5[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 225.056 4[M+H-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ 137.024 3[M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	$C_{16}H_{12}O_5$	+	+
C22	10.62	芒柄花素	269.082 3	5.592	254.059 2[M+H-CH ₃] ⁺ 237.056 4[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 213.092 6[M+H-C ₂ O ₂] ⁺ 136.016 5[M+H-C ₉ H ₉ O] ⁺	$C_{16}H_{12}O_4$	+	+
C24	10.93	3-hydro-9, 10-diMP 同分异构体	301.108 9	—	—	$C_{17}H_{16}O_5$	+	+
M1	5.44	大豆苷元 葡萄糖醛酸化 ^[13]	431.099 8	6.348	255.067 30[M+H-glu] ⁺	$C_{21}H_{18}O_{10}$	+	+
M2	6.25	毛蕊异黄酮脱甲基 葡萄糖醛酸化 ^[11]	447.094 9	6.022	271.062 2[M+H-glu] ⁺	$C_{21}H_{18}O_{11}$	+	+
M3	6.72	毛蕊异黄酮 葡萄糖醛酸化 ^[9]	461.107 8	4.451	285.076 8[M+H-glu] ⁺ 270.054 2[M+H-glu-CH ₃] ⁺ 137.022 1[M+H-glu-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	$C_{22}H_{20}O_{11}$	+	+
M4	6.93	大豆苷元硫酸化 ^[14]	335.024 1	6.388	255.067 3[M+H-SO ₃] ⁺ 227.072 0[M+H-SO ₃ -CO] ⁺ 199.080 1[M+H-SO ₃ -C ₂ O ₂] ⁺ 137.024 4[M+H-SO ₃ -C ₈ H ₆ O] ⁺	$C_{15}H_{10}O_7S$	—	+
M5	7.19	毛蕊异黄酮硫酸化 ^[9]	365.034 9	6.261	285.077 8[M+H-SO ₃] ⁺ 270.054 6[M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺ 253.051 6[M+H-SO ₃ -CH ₃ -OH] ⁺ 225.056 5[M+H-SO ₃ -C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ 137.024 4[M+H-SO ₃ -C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	$C_{16}H_{12}O_8S$	—	+
M6	7.53	毛蕊异黄酮羟基化 ^[11]	301.0725	6.528	286.049 0[M+H-CH ₃] ⁺ 269.046 1[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 153.019 2[M+H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	$C_{16}H_{12}O_6$	+	+
M7	7.76	芒柄花素葡萄糖 醛酸化 ^[9]	445.112 4	6.148	269.081 9[M+H-glu] ⁺ 254.058 8[M+H-glu-CH ₃] ⁺ 237.055 9[M+H-glu-CH ₂ -H ₂ O] ⁺	$C_{22}H_{20}O_{10}$	+	+
M8	8.18	7, 2'-二羟基-3', 4'- 二甲氧基异黄烷 ^[9]	303.124 7	6.465	193.087 2[M+H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺ 181.087 1[M+H-C ₇ H ₆ O ₂] ⁺ 167.071 4[M+H-C ₈ H ₈ O ₂] ⁺ 149.060 7[M+H-C ₈ H ₁₀ O ₂] ⁺ 123.044 9[M+H-C ₁₀ H ₁₂ O ₃] ⁺	$C_{17}H_{18}O_5$	+	+
M9	8.39	3-hydro-9, 10-diMP 葡萄糖醛酸化	477.141 8	5.474	301.109 1[M+H-glu] ⁺ 269.082 5[M+H-glu-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 241.087 1[M+H-glu-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ 191.070 9[M+H-glu-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺ 167.070 8[M+H-glu-C ₆ H ₈ O ₂] ⁺	$C_{23}H_{24}O_{11}$	+	+

准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 445.1124 ($C_{22}H_{20}O_{10}$), 比芒柄花素高 176 ($C_6H_8O_6$), 其二级特征离子峰 m/z 269.081 9 $[M+H^- \text{ glucoside}]$ 与芒柄花素准分子离子峰相同, 特征离子峰 m/z 254.058 8 和 m/z 237.057 7 与芒

柄花素特征离子碎片相同, 故推测 M7 为芒柄花素葡萄糖醛酸化的产物。

ig 给予大鼠黄芪水提取物后 9 个代谢产物在体内可能的代谢途径见图 2。

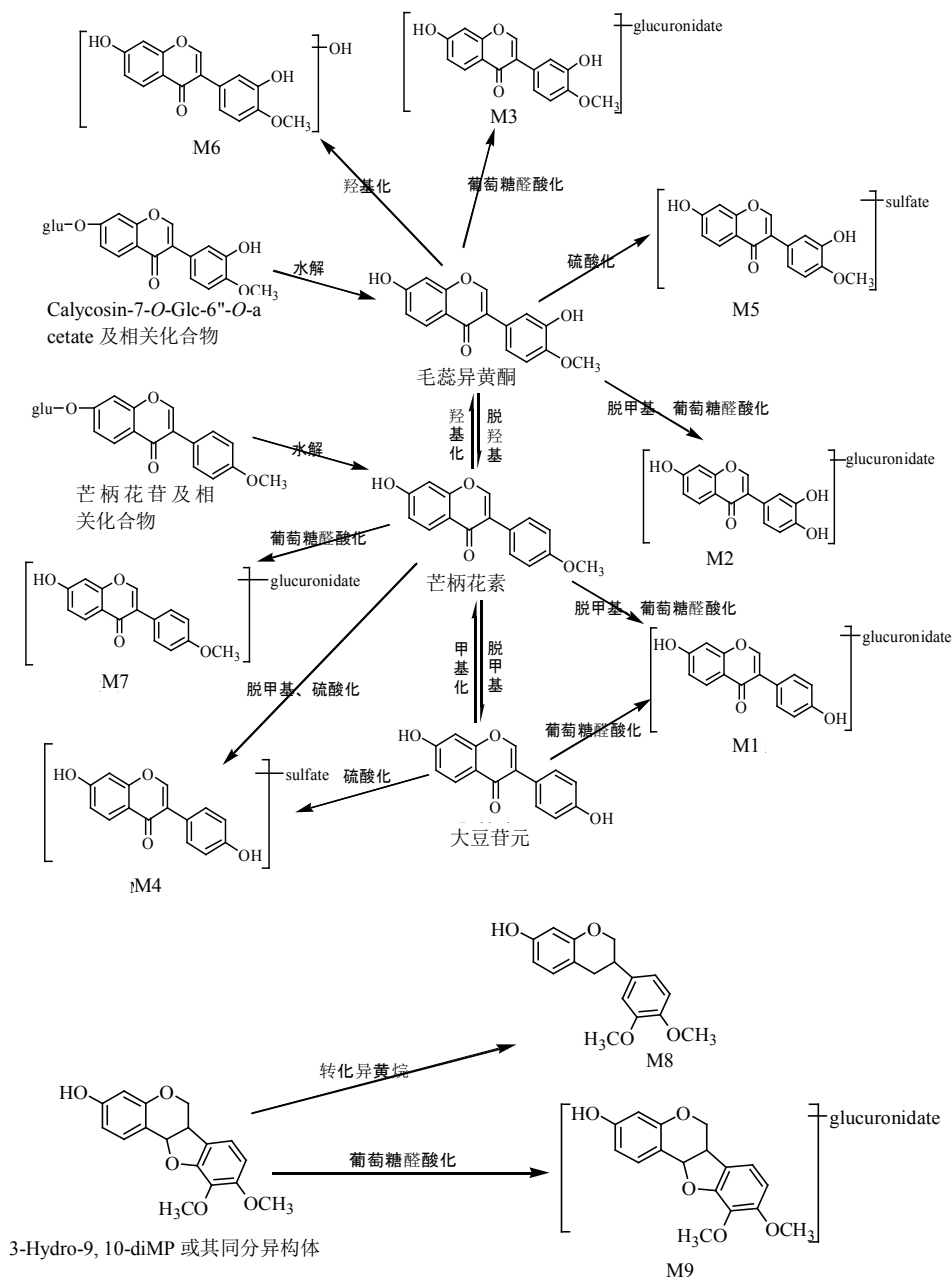


图 2 大鼠 ig 黄芪水提取物后 9 个代谢产物在体内可能的代谢途径

Fig. 2 Possible metabolic pathways of nine metabolites in rat ig administered with water extract of *Astragali Radix*

毛蕊异黄酮葡萄糖苷和毛蕊异黄酮相关代谢产物: 代谢成分 M3 和 M5 准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 分别为 461.107 8 ($C_{22}H_{20}O_{11}$) 和 365.034 9 ($C_{16}H_{12}O_8S$), 比毛蕊异黄酮分别高 176 ($C_6H_8O_6$) 和 80 (SO_3), 二者的二级碎片 270.054 6、253.051 6、

225.056 5、137.024 4 与毛蕊异黄酮相近, 故推断 M3、M5 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖醛酸化和毛蕊异黄酮硫酸化。代谢成分 M2 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 447.094 5 ($C_{21}H_{18}O_{11}$), 其二级碎片 271.062 2 ($C_{15}H_{11}O_5^+$) 为 $[M+H^- \text{ glucoside-CH}_2]^+$ 峰, 由此推

断 M2 为毛蕊异黄酮脱甲基产物的葡萄糖醛酸化。代谢成分 M6 保留时间为 7.53 min, 根据其准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 301.0725 ($C_{16}H_{12}O_6$), 其二级碎片 286.049 0、269.046 1、153.019 2 等特征峰与红车轴草素相近, 推测为毛蕊异黄酮羟基化的产物, 与红车轴草素互为同分异构体。

其他相关代谢产物: 代谢成分 M8 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 303.124 7 ($C_{17}H_{18}O_5$), 结合其二级碎片 193.087 2、181.087 1、167.071 4、149.060 7、123.044 9 等特征峰, 暂时推测 M8 为 3-Hydro-9, 10-diMP 转化的 isomucronulatol。代谢成分 M9 准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 477.139 3 ($C_{23}H_{24}O_{11}$), 其二级碎片 m/z 301.108 1 为 $[M+H-\text{glucoside}]^+$ 峰, 其余二级碎片 m/z 269.081 6、241.087 1、191.070 9、167.070 8 与 3-hydro-9, 10-diMP 及其同分异构体相似, 故推测 M9 为 3-hydro-9, 10-diMP 或 3-hydro-9, 10-diMP 同分异构体的葡萄糖醛酸化产物, 首次在黄芪的代谢产物中报道。

4 讨论

本研究基于传统煎煮方法, 采取 ig 给药, 进行大鼠给药后腹主动脉采血和尿液收集, 秉持成分同时分析原则^[15], 结合 UPLC-MS/MS 技术对黄芪水提物在大鼠体内的代谢情况进行研究, 从而遴选黄芪质量控制成分, 阐明了 ig 给予黄芪水提物大鼠能够通过肝肠吸收代谢后进入血液循环的成分代谢途径信息和尿液中的最终代谢产物信息。通过对入血成分、尿液成分与原药成分信息对比分析, 归属代谢成分、代谢前成分及原药中以原型入血的成分, 共遴选出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、大豆苷元、3-hydro-9, 10-diMP、isomer of 3-hydro-9, 10-diMP、calycosin-7-*O*-glc-6"-*O*-acetate 和 formononetin-7-*O*-glc-6"-*O*-acetate 等 9 个质控成分, 为建立“质-效-代”关联的中药质量评价方法体系^[8]提供可靠的理论依据和方法学依据。

参考文献

- [1] 谢竹藩, 楼之岑. 汉英中医药分类词典 [M]. 北京: 新世界出版社, 2002.
- [2] 江 燕. 黄芪药理作用及在方剂配伍方面的应用 [J]. 中国实用医药, 2015, (1): 226-227.
- [3] 张星华. 黄芪应用的历史沿革 [J]. 江西中医药, 2008, 39(2): 43.
- [4] 周 刚, 王 停, 何燕萍. 中药新药研发中药材研究需

关注的问题 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3192-3195.

- [5] 刘昌孝. 中药质量标志物: 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [6] 徐 风, 杨东辉, 尚明英, 等. 中药药效物质的“显效形式”、“叠加作用”和“毒性分散效应”——由中药体内代谢研究引发的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 688-703.
- [7] 贺福元, 邓凯文, 石继连, 等. 中药多成分体系宏观质量表征的数学模型建立及实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3096-3103.
- [8] 王晶娟, 刘 洋, 赵保胜, 等. 中药“质效代关联”研究方法 with 理论的建立 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1507-1510.
- [9] Liu M, Li P, Zeng X, et al. Identification and pharmacokinetics of multiple potential bioactive constituents after oral administration of radix astragali on cyclophosphamide - induced immune suppression in Balb/c mice [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(3): 5047-5071.
- [10] Zhang J, Xu X J, Xu W, et al. Rapid Characterization and identification of flavonoids in *Radix Astragali* by Ultra-High-Pressure liquid chromatography coupled with linear ion Trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2015, 53(6): 70-76.
- [11] Zhang Y Z, Xu F, Dong J, et al. Profiling and identification of the metabolites of calycosin in rat hepatic 9 000 $\times$ g, supernatant incubation system and the metabolites of calycosin-7-*O*- β -d -glucoside in rat urine by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn technique [J]. JPBA, 2012, 70(15):425-439.
- [12] Rafii F, Davis C, Park M, et al. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals [J]. Arch Microbiol, 2003, 180(1): 11-16.
- [13] Xu F, Zhang Y, Xiao S, et al. Absorption and metabolism of Astragali radix decoction: *in silico*, *in vitro*, and a case study *in vivo* [J]. Drug Metab and Dispos, 2006, 34(6): 913-24.
- [14] Zhang Y Z, Xu F, Yi T, et al. Chemical profile analysis and comparison of two versions of the classic TCM formula Danggui Buxue Tang by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn [J]. Molecules, 2014, 19(5): 5650-5673.
- [15] 刘 洋, 潘艳丽, 王晶娟, 等. 多成分药物代谢理论及技术方法分析 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1663-1667.