

基于大鼠体内序贯代谢的白芍质控成分遴选研究

李雪岩¹, 韩星¹, 杨文宁¹, 陈洪娇¹, 杨海洋¹, 江晓泉¹, 森慕黎¹, 汪国鹏², 刘洋^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 中财瀚熙(北京)生物科技发展有限公司, 北京 101503

摘要: 目的 基于序贯代谢的研究思路, 研究白芍 *Paeoniae Radix Alba* 多种成分在体内的代谢情况, 遴选白芍潜在质控成分。方法 制备白芍水提物, 通过在体动物实验的方法, 收集白芍的肠代谢、肝代谢以及综合代谢样品, 结合超高效液相色谱-四级杆/静电场高分辨质谱联用技术 (UPLC-Q-Exactive MS), 对各个样品所含成分进行分析与鉴别。结果 白芍水提物中共鉴定出36个化学成分。序贯代谢结果显示, 共有17个原型入血成分, 其中有14个成分在经肠代谢样品中检测到, 有8个成分先经肠代谢、再经肝代谢后可检测到, 有11个成分在经ig给药的全面代谢样品中检测到; 羟基芍药苷、芍药苷、芍药内酯苷、环五(异)亮氨酸、环六(异)亮氨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸这7个成分在3种代谢部位均可以检测到。结论 共遴选出没食子酸、芍药内酯苷等17个经代谢后仍原型入血的成分, 可作为日后白芍质控成分。

关键词: 白芍; 序贯代谢; 质控成分; 超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-MS/MS); 羟基芍药苷、芍药苷、芍药内酯苷、环五(异)亮氨酸、环六(异)亮氨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 02-0329-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.02.011

Selection of quality control components from *Paeoniae Radix Alba* based on sequential metabolism in rats

LI Xueyan¹, HAN Xing¹, YANG Wenning¹, CHEN Hongjiao¹, YANG Haiyang¹, JIANG Xiaoquan¹, SEN Muli¹, WANG Guopeng², LIU Yang¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Zhongcai Health (Beijing) Biological Technology Development Co.Ltd., Beijing 101503, China

Abstract: Objective To investigate the metabolism of *Radix Paeoniae Alba* and to select potential quality control components based on the research through of sequential metabolism. **Methods** After preparing the water extract of *Radix Paeoniae Alba*, *in vivo* animal experiments were applied to collect its intestinal metabolism, liver metabolism, as well as comprehensive metabolism samples, combined with ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive MS), to analyze and identify the components of samples. **Results** A total of 36 chemical components were identified from the water extract of *Radix Paeoniae Alba*. Sequential metabolic studies shown that there were 17 protoplasmic components, of which 14 components could be detected after intestinal metabolism, 8 components could be detected after intestinal metabolism followed by liver metabolism, and 11 components could be detected in comprehensive metabolic samples after intragastric administration. Hydroxypaeoniflorin, paeoniflorin, paeoniflorin, cyclopenta (isoleucine), cyclohexa (isoleucine), benzoic acid and *p*-hydroxybenzoic acid were detected in the three metabolic sites. **Conclusion** Through analyzing the results of different samples, 17 components that still can enter the blood circulation in the form of a prototype after metabolism, such as gallic acid, albiflorin and so on, were selected as potential quality control components of *Radix Paeoniae Alba* in the future.

Key words: *Paeoniae Radix Alba*; sequential metabolism; quality control ingredients; UPLC-MS/MS; hydroxypaeoniflorin; paeoniflorin; paeoniflorin; cyclopenta (isoleucine); cyclohexa (isoleucine); benzoic acid; *p*-hydroxybenzoic acid

收稿日期: 2020-10-18

基金项目: 国家中医药管理局项目 (ZYBZH-Y-HUB-20)

第一作者: 李雪岩 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药靶结合动力学与药物代谢。E-mail: 15194178536@163.com

*通信作者: 刘洋 (1973—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药靶结合动力学与药物代谢。E-mail: liuyang@bucm.edu.cn

白芍始见于《本草经集注》，为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，味苦、酸，微寒，归肝、脾经，具有养血调经、柔肝止痛等功效，可用于血虚萎黄、月经不调等症^[1-3]。白芍主要含有萜类、黄酮类、鞣质类和多糖等成分，临床常用于肝炎、风湿、免疫等疾病的治疗^[4-7]。在《中国药典》2020年版中，仅以芍药苷作为白芍药材的质控成分。然而，白芍中还含有多种化学成分，仅以单一成分作为质量控制标准无法全面评定药材的多成分药效以及质量，而且白芍饮片是临床中直接使用的，因此对于白芍药材的质控成分和质量标准的研究尤为重要。

序贯代谢是本课题组为全面、连续表征多成分药物动态生物转化过程而提出的多成分药物代谢理论^[8-9]。即对于大部分口服药物，多成分药物的体内过程按照药物进入机体消化道的空间顺序开展研究，依次研究胃内代谢、肠道代谢和肝代谢。通过这种研究思路，本课题组已进行了川芎、红景天、枸杞子、秦艽等中药的质控研究^[10-13]。现代药理学认为，发挥药效的前提是药物中成分能够通过体内的生物屏障到达作用靶点，并维持一定起效的血药浓度^[14-15]。换言之，只有能被机体吸收并在靶点保持一定浓度的化学成分才是需要重点关注的成分。因此探寻药物中各成分在不同代谢部位的血中移行成分对于质控成分的遴选尤为重要。本研究以序贯代谢为研究基础，使用煎煮给药的方式，运用动物在体实验与液质联用检测技术，对体内的药物成分进行动态表征，全程连续分析，将时间和空间维度关联，从而获得药材的原型入血成分，为日后制定更加科学的白芍质量控制方案提供参考。

1 材料

1.1 药材和主要试剂

白芍药材由湖北金贵中药产业发展有限公司提供，经北京中医药大学王晶娟副教授鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。

儿茶素对照品(批号 110877-201604，质量分数为 99.2%)、没食子酸对照品(批号 110831-201605，质量分数为 90.8%)、芍药苷对照品(批号 110736-201035，质量分数为 96.5%)、苯甲酸对照品(批号 100419-201703，质量分数为 99.9%)，均购自中国食品药品检定研究院。芍药内酯苷对照品(批号 18050235，质量分数为 98%)、羟基芍药苷对照品(批号 18031641，质量分数为 98%)、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品(批号 18112221，质量分数

为 98%)、没食子酸甲酯对照品(批号 15060162，质量分数为 98%)，均购自成都曼思特生物科技有限公司。乙腈(色谱纯，批号 L-25962)、甲醇(色谱纯，批号 L-21064)、甲酸(质谱纯，批号 A117-50)，均购自美国 Fisher 公司。磷酸(色谱纯，天津市光复精细化工研究所，批号 20180316)；Oasis HLB C₁₈ 固相萃取柱(美国 Waters 公司，批号 WAT094225)。

1.2 主要仪器

UltiMate 3 000-Q-Orbitrap(美国 Fisher 公司，配有 UltiMate 3 000 超高效液相色谱仪、Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、DAD 检测器、Xcalibur 质谱工作站)；电子分析天平(德国 Sartorius 公司，BSA2202S)；蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司，BT-100-1F)；超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司，KQ5200E)；电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司，HH-2A)；高速冷冻离心机(德国 Sigma 离心机，1-15PK)；水浴氨吹仪(北京成萌伟业科技有限公司，CM-12)。

1.3 实验动物

SD 雄性大鼠，SPF 级，体质量 220~240 g，购于斯贝福(北京)生物技术有限公司，实验动物生产许可合格证号 SCXF(京)2016-0002，并已通过北京中医药大学伦理部的伦理审批(伦理审批号 BUCM-4-2019060515-1028)。大鼠饲养于昼夜节律光照条件下(温度 25~27 °C，相对湿度 50%~70%)，实验前适应性饲养 14 d，自由进食进水。

2 方法

2.1 白芍水提物的制备

称取 300.07 g 白芍药材，洗净后加 10 倍量双蒸水浸泡 1 h，使用武火煎煮，待沸腾后用文火煎煮 1 h，收集滤液；将残渣再加等量双蒸水煎煮 1 h，合并滤液并浓缩至生药量 1 g/mL。

制备质量浓度为 0.01 g/mL 白芍药材水提物，10 000 r/min 离心 10 min，径 0.22 μm 滤膜滤过后进行 UPLC-MS 分析。

2.2 对照品溶液制备

精密称取没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、没食子酸甲酯对照品，加甲醇完全溶解，配制 20 ng/mL 的混合对照品溶液，使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后，即得对照品溶液。

2.3 序贯代谢实验操作

将 SD 雄性大鼠随机分为肠代谢手术组、肝代谢手术组与综合代谢手术组。

2.3.1 肠代谢手术组 大鼠适应性饲养14 d后,随机选取4只禁食12 h大鼠(不禁水),ip 10%水合氯醛麻醉,腹主动脉采血后置于37 °C水浴中,用于补充手术过程中大鼠损失血液。另取同样禁食的大鼠腹腔麻醉后,小心剖离颈静脉,插入静脉留置针,另一端通过蠕动泵与大鼠血液连接。沿大鼠腹中线剪开腹腔,选取空肠段约10 cm作为供试肠段,结扎实验用肠段以外的血管。37 °C生理盐水缓慢冲出肠内容物,至流出液澄清后将生理盐水排净。注射泵与空肠段一端相连,灌注白芍水提物(1 g/mL),体积流量0.2 mL/min,灌注持续2 h,总灌注体积24 mL。用37 °C生理盐水润湿的纱布覆盖在裸露肠段上,并使用保温灯加热以保持大鼠生理状态。结扎肝门静脉及旁支有干扰的血管,同时开启蠕动泵,进行颈静脉输血(体积流量0.3 mL/min),肠系膜静脉采血。连续采血2 h,平行操作3组。对照组给药生理盐水,其余操作相同。

2.3.2 肝代谢手术组 不结扎肝门静脉,在股静脉处连续采血2 h,其余操作同“2.3.1”项。

2.3.3 综合代谢手术组 随机选取12只SD大鼠,ig白芍水提物(1 g/mL),给药体积2 mL,将大鼠随机分为4组,每组3只,各组分别在0.5、1.0、1.5、2.0 h于腹主动脉处采集血液样品。对照组ig生理盐水,其余操作相同。

2.4 血浆样品处理

将收集后的血液样品使用离心机于4 000 r/min离心10 min,分离血浆。将收集的血浆样品用固相萃取柱(SPE)进行处理,分别用甲醇和双蒸水进行活化。将4%磷酸溶液与血浆样品按照1:1的比例混合,涡旋3 min,静置5 min后取3 mL上样SPE柱,分别使用5%甲醇和水冲洗SPE柱后,使用乙腈-甲醇(90:10)进行洗脱,收集洗脱液后用氮气吹干,用100 μ L流动相复溶,进行超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)分析。在洗脱过程中尽量降低流速使其成滴流下。

2.5 液质条件

液相条件:色谱柱:CORTECSUPLCT3(100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μ m);体积流量0.3 mL/min;流动相:0.1%甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min, 95%A; 1~20 min, 95%~5%A; 20~21 min, 5%A; 21.0~21.1 min, 5%~95%A; 21.1~22.0 min, 95%A);进样体积2 μ L;检测波长190~400 nm(DAD检测器);柱温40 °C。

质谱条件:电喷雾电离(HESI)源;正、负离子检

测模式;扫描范围100~1 500;喷雾电压:+3.5 kV(正离子模式)、+3.0 kV(负离子模式);鞘气体积流量35 arb;辅助气体积流量:10 arb;辅助气温度:250 °C;离子传输管温度:300 °C;扫描模式:Full MS/dd-MS2, Full MS分辨率为70 000, dd-MS2分辨率为17 500;碰撞能为20、30、40 eV。

3 结果

3.1 白芍水提物化学成分鉴定

通过精确相对分子质量及二级碎片离子信息,借助对照品、mzVault 2.0 质谱数据库、HMDB 数据库及相关文献报道进行比对,共鉴定出白芍水提物中36个化学成分,其中包含单萜及其苷类化合物23个,环肽类化合物3个,黄酮类化合物3个,鞣质类化合物3个,有机酸类化合物4个,ESI-MS和ESI⁺-MS的质谱总离子流图(TIC)见图1,结果见表1。

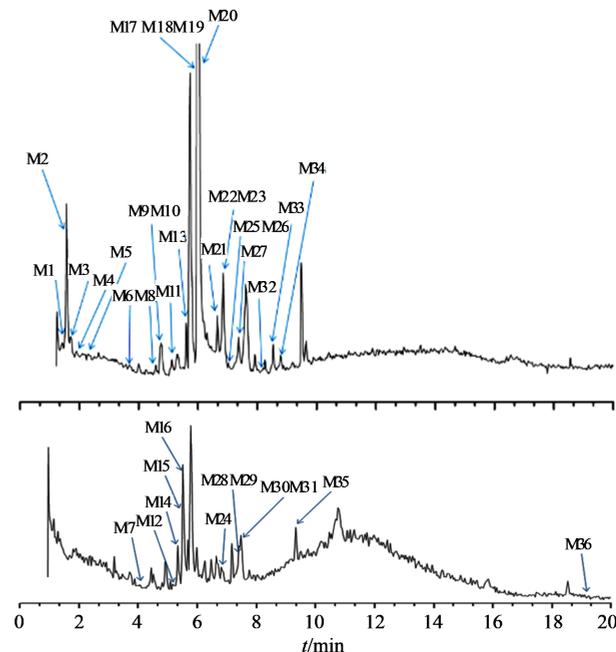


图1 白芍水提物中负离子和正离子模式的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram in negative and positive ion mode for water extract of *Radix Paeoniae Alba*

3.2 主要类别化合物结构解析

3.2.1 单萜及其苷类化合物的鉴定 白芍中单萜及苷类化合物主要包含芍药苷、白芍苷、芍药内酯苷等23个化合物,现以芍药内酯苷和芍药苷为例进行结构解析。化合物M16在负离子模式下,一级质谱离子峰为 m/z 479.156 1 [$M-H$],软件给出的精确分子式为 $C_{24}H_{29}O_{13}$, [$M-H$]准分子离子峰脱去1分子 CH_2O 和苯甲酸形成碎片离子 m/z 449 [$M-H-CH_2O$]⁻、 m/z 357 [$M-H-C_7H_6O_2$]⁻以及 m/z 121 [$C_7H_6O_2$]⁻,通过与对照品进行比较,推测化合物M16为芍药内酯苷,芍药内酯苷裂解途径见图2。

表1 白芍水提物化学成分UPLC-MS分析

Table 1 Qualitative analysis results of chemical constituents in water extract of *Radix Paeoniae Alba* by UPLC-MS

化合物 编号(峰)	t_R / min	分子式	一级质谱(m/z)		偏差 ($\times 10^{-9}$)	二级碎片信息	化合物名称
			理论值	实测值			
M1	1.40	$C_{16}H_{23}O_{10} [M-H]^-$	375.128 6	375.129 3	2.017	345、195、183、151	去苯甲酰基芍药苷 ^[16]
M2	1.50	$C_7H_5O_5 [M-H]^-$	169.013 1	169.013 4	1.362	151、125、107	没食子酸 ^[17]
M3	1.74	$C_{16}H_{23}O_9 [M-H]^-$	359.133 7	359.134 6	2.732	97、179	牡丹酮-1- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷或其异构体 ^[16]
M4	1.98	$C_{19}H_{25}O_{15} [M-H]^-$	493.118 8	493.120 2	2.299	331、313、283、169、125	1'- <i>O</i> -galloylsucrose ^[16]
M5	2.11	$C_{19}H_{25}O_{15} [M-H]^-$	493.118 8	493.119 5	1.508	331、169、125	没食子酰蔗糖或异构体 ^[16]
M6	3.69	$C_{17}H_{27}O_{11} [M-H]^-$	407.154 8	407.155 9	2.608	361、179、119、89	6- <i>O</i> -copyranosyl-lactinide ^[18]
M7	4.24	$C_{17}H_{25}O_{10} [M+HCOO]^+$	389.144 2	389.145 4	2.998	343、181、161、89	牡丹皮苷F ^[19]
M8	4.44	$C_8H_7O_5 [M-H]^-$	183.028 8	183.028 9	0.984	169、124	没食子酸甲酯
M9	4.69	$C_{15}H_{13}O_6 [M-H]^-$	289.070 7	289.071 7	3.651	271、245、165、137、125	儿茶素
M10	4.79	$C_{23}H_{27}O_{12} [M-H]^-$	495.149 7	495.150 7	2.014	333、281、195、167	羟基芍药苷
M11	5.22	$C_{21}H_{19}O_{11} [M-H]^-$	447.092 2	447.096 3	6.223	401、269、161、149	黄芪苷 ^[17]
M12	5.39	$C_9H_{11}O_3 [M+H]^+$	167.070 3	167.069 9	-0.321	84、58	丹皮酚 ^[17]
M13	5.50	$C_{15}H_{19}O_8 [M-H]^-$	327.107 4	327.108 4	2.923	205、161、143、125、121	丹皮酚苷 ^[17]
M14	5.55	$C_{29}H_{39}O_{16} [M+H]^+$	643.223 3	643.222 3	-1.510	481、319、197、105	β -龙胆二糖苷芍药苷 ^[17]
M15	5.69	$C_{17}H_{19}O_6 [M+H]^+$	319.117 6	319.117 1	-1.331	123、105、77	芍药内酯C ^[20]
M16	5.74	$C_{24}H_{29}O_{13} [M+HCOO]^+$	525.160 3	525.161 1	1.300	449、357、121	芍药内酯苷
M17	5.90	$C_{16}H_{23}O_8 [M-H]^-$	343.138 7	343.139 7	2.640	191、173	芍药内酯G ^[17]
M18	5.91	$C_{23}H_{27}O_{12} [M-H]^-$	495.149 7	495.150 5	1.691	137、121、93	4"-羟基白芍苷 ^[21]
M19	5.94	$C_{23}H_{27}O_{11} [M-H]^-$	479.154 8	479.154 6	-0.330	449、327、121	白芍苷
M20	6.00	$C_{23}H_{27}O_{11} [M-H]^-$	479.154 8	479.155 7	1.966	449、357、327、	芍药苷
M21	6.57	$C_{15}H_{13}O_5 [M-H]^-$	273.075 8	273.075 3	-2.600	153、147	柚皮素 ^[22]
M22	6.78	$C_{30}H_{31}O_{15} [M-H]^-$	631.165 7	631.166 8	1.685	613、509、465、313、169	没食子酸芍药苷 ^[16]
M23	6.85	$C_{41}H_{32}O_{26} [M-H]^-$	939.109 8	939.111 1	0.017	787、479、449、327、121	1,2,3,4,6- <i>O</i> -没食子葡萄糖
M24	6.95	$C_{30}H_{36}O_5N_5 [M+H]^+$	566.427 6	566.426 9	-1.265	548、453、435、322	环五(异)亮氨酸 ^[23]
M25	7.02	$C_{24}H_{29}O_{12} [M-H]^-$	509.165 4	509.166 1	2.136	463、331、161、121	牡丹皮苷D ^[19]
M26	7.06	$C_7H_5O_2 [M-H]^-$	121.028 4	121.028 3	-0.545	121、77	苯甲酸
M27	7.39	$C_{36}H_{67}O_6N_6 [M-H]^-$	679.511 7	679.510 7	-1.443	566、435、322	环六(异)亮氨酸 ^[23]
M28	7.45	$C_7H_5O_3 [M+H]^+$	137.023 3	137.023 3	-0.296	93、65	对羟基苯甲酸 ^[19]
M29	7.61	$C_{23}H_{29}O_{11} [M+H]^+$	481.170 4	481.169 9	-1.077	319、179、197、105	牡丹皮苷I ^[23]
M30	7.65	$C_{24}H_{29}O_{12} [M+HCOO]^+$	509.165 4	509.166 1	1.487	463、121	1- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖基-8- <i>O</i> -苯甲酰芍药苷 ^[23]
M31	7.70	$C_{42}H_{78}O_7N_7 [M+H]^+$	792.595 7	792.594 3	-1.330	774、679、661、548、435	环七(异)亮氨酸 ^[23]
M32	8.17	$C_{30}H_{31}O_{14} [M-H]^-$	615.170 8	615.164 3	1.996	493、313	牡丹皮苷H ^[19]
M33	8.48	$C_{30}H_{31}O_{13} [M-H]^-$	599.175 9	599.177 8	1.807	165、137、121	苯甲酰氧芍药苷 ^[20]
M34	8.79	$C_{21}H_{33}O_{10} [M-H]^-$	445.206 8	445.209 2	2.376	299、233、149、89	(<i>Z</i>)-(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- β -蒎烯10-基- β -巢菜糖苷 ^[17]
M35	9.47	$C_{30}H_{33}O_{12} [M+H]^+$	585.196 7	585.196 7	0.115	463、319、267、197	苯甲酰芍药苷 ^[24]
M36	19.07	$C_{14}H_{19}O_9 [M+H]^+$	331.102 4	331.284 0	-0.954	313、293、109	牡丹苷A ^[25]

没有标注参考文献的化合物均通过对照品鉴定

Compounds without reference were identified by standard

化合物M20在负离子模式下,一级质谱准分子离子峰为 m/z 479.155 7 $[M-H]^-$,软件给出的精确分子式为 $C_{23}H_{27}O_{11}$,二级质谱中可发现失去醛基部分的碎片离子 m/z 449 $[M-H-CH_2O]^-$,失去苯甲酸($C_7H_6O_2$)和失去羰基部分、苯甲酸($C_7H_6O_2$)后形成的碎片离子 m/z 357 $[M-H-C_7H_6O_2]^-$ 、 m/z 327 $[M-H-HCHO-C_7H_6O_2]^-$,通过与对照品进行比较,推测化合物20为芍药苷,芍药苷裂解途径见图3。

3.2.2 有机酸类化合物的结构鉴定 白芍中有机酸类化合物主要包含没食子酸、没食子酸甲酯等4

个化合物,现以没食子酸、没食子酸甲酯和对羟基苯甲酸为例进行结构解析。化合物M2在负离子模式下,一级质谱准分子离子峰为 m/z 169.013 4 $[M-H]^-$,软件给出的精确分子式为 $C_7H_5O_5$,可发现脱去1分子 CO_2 和 H_2O 形成特征碎片 m/z 125 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 151 $[M-H-H_2O]^-$,前者继续失去1分子 H_2O 形成 m/z 107 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$,通过对照品与文献报道^[17]进行比较,推测化合物M2为没食子酸,没食子酸裂解途径如图4所示。

化合物M8在负离子模式下,一级质谱准分子

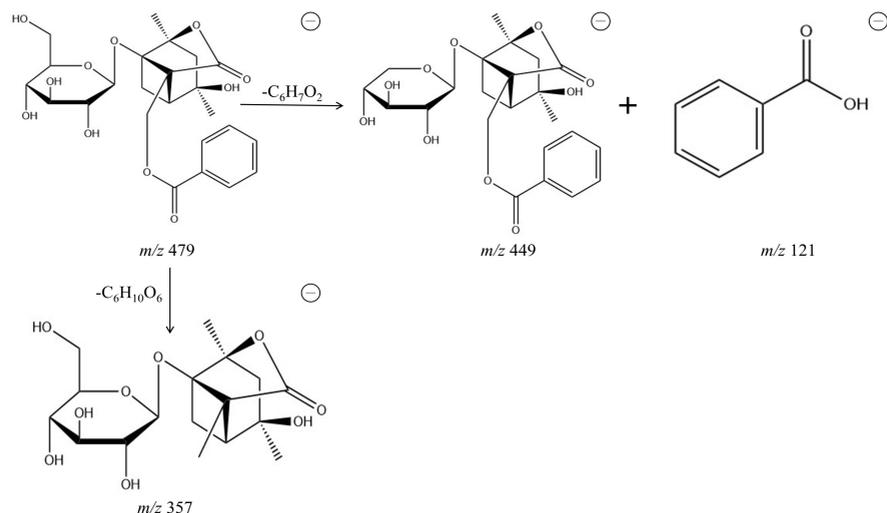


图2 芍药内酯苷裂解规律

Fig. 2 Proposed fragmentation pathway of albiflorin

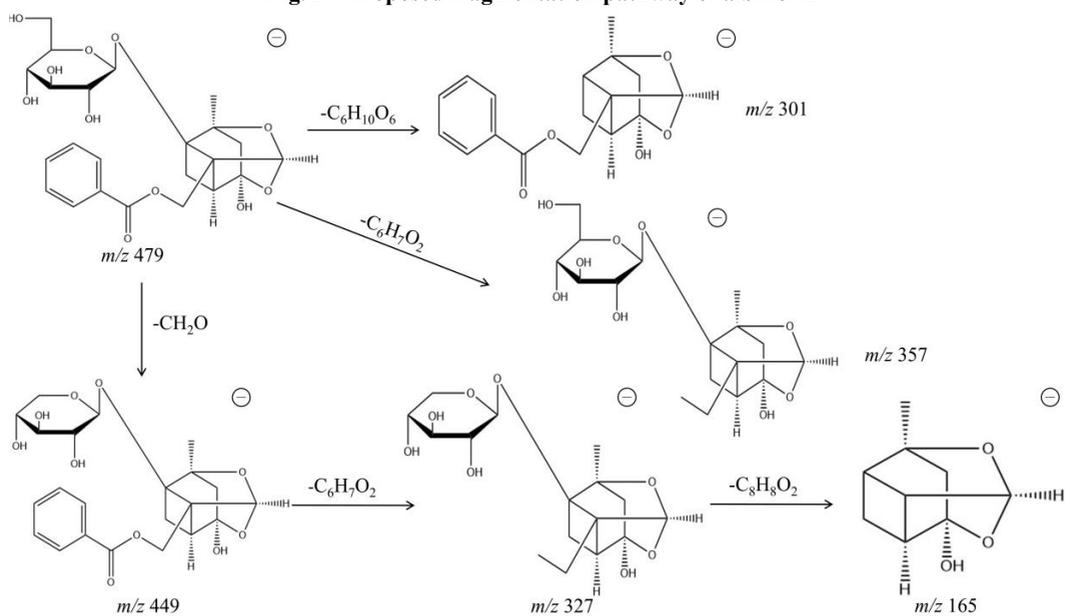


图3 芍药苷裂解规律

Fig. 3 Proposed fragmentation pathway of paeoniflorin

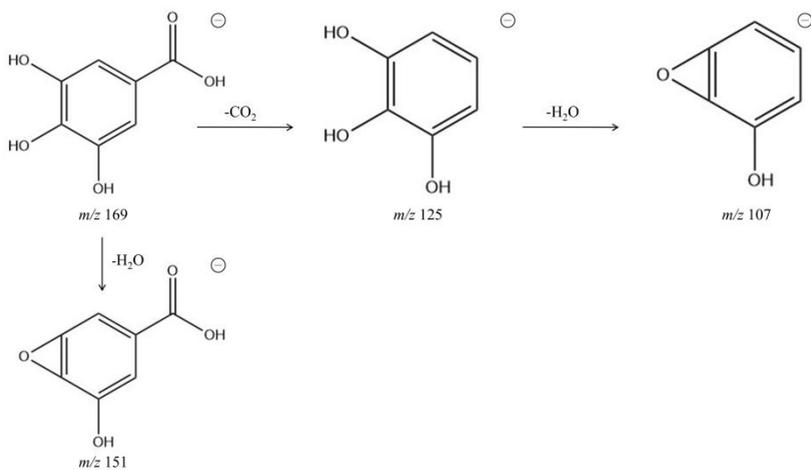


图4 没食子酸裂解规律

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of gallic acid

离子峰为 m/z 183.028 9 $[M-H]^-$, 软件给出的精确分子式为 $C_8H_7O_5$, 发现脱去乙酸甲酯形成特征碎片 m/z 124 $[M-H-C_2H_3O_2]^-$, 通过与标准品进行比较, 推测化合物M8为没食子酸甲酯。

化合物M28在正离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 137.023 3 $[M+H]^+$, 软件给出的精确分子式为 $C_7H_5O_3$, 其二级碎片离子有 m/z 93、65, 通过与HMDB数据库、文献^[19]进行比较, 推测化合物M28为对羟基苯甲酸。

3.2.3 鞣质类化合物的结构鉴定 白芍中鞣质类成分主要包含3个化合物, 现以没食子酰蔗糖为例进行结构解析。化合物M5在负离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 493.119 5 $[M-H]^-$, 软件给出的精确分子式为 $C_{19}H_{25}O_{15}$, 发现脱去1或2分子葡萄糖形成特征碎片 m/z 331 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、169 $[M-H-2C_6H_{10}O_5]^-$, 后者继续失去1分子 CO_2 后形成 m/z 125 $[M-H-2C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ 碎片离子。通过与HMDB数据库、文献报道^[16]进行比较, 推测化合物M5为没食子酰蔗糖或异构体。

3.2.4 环肽类化合物的结构鉴定 白芍水提取物中共包含此类化合物3种, 分别为环五(异)亮氨酸、环六(异)亮氨酸、环七(异)亮氨酸。环肽类化合物一般质谱裂解特征为, 一级质谱中主要形成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 二级质谱中主要为失去1分子水和亮氨酸或者异亮氨酸分子而形成特征碎片。

化合物M24在正离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 566.426 9 $[M+H]^+$, 软件给出的精确分子式为 $C_{30}H_{56}O_5N_5$, 其二级碎片离子有 m/z 566、548、453、435、322, 通过与HMDB数据库、文献报

道^[23]进行比较, 推测化合物M24为环五(异)亮氨酸。

化合物M27在正离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 679.510 7 $[M-H]^-$, 软件给出的精确分子式为 $C_{36}H_{67}O_6N_6$, 其二级碎片离子有 m/z 679、566、435、322, 通过与HMDB数据库、文献报道^[23]进行比较, 推测化合物M27为环六(异)亮氨酸。

化合物M31在正离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 792.594 3 $[M+H]^+$, 软件给出的精确分子式为 $C_{42}H_{78}O_7N_7$, 其二级碎片离子有 m/z 792、774、679、661、548、435, 通过与HMDB数据库、文献报道^[23]进行比较, 推测化合物M31为环七(异)亮氨酸。

3.2.5 黄酮类化合物的结构鉴定 白芍水提取物中共包含黄酮类化合物3种, 现以儿茶素为例进行结构解析。化合物M9在负离子模式下, 一级质谱准分子离子峰为 m/z 289.071 7 $[M-H]^-$, 软件给出的精确分子式为 $C_{15}H_{13}O_6$, 准分子离子峰在B环上失去1分子 H_2O 和 CO_2 产生二级碎片离子有 m/z 245 $[M-H-CO_2]^-$ 、 m/z 271 $[M-H-H_2O]^-$, C环发生RDA裂解而产生 m/z 165、137、125等碎片离子。通过与对照品进行比较, 推测化合物M9为儿茶素。儿茶素裂解途径如图5所示。

3.3 白芍代谢成分UPLC-MS分析

通过将不同部位血浆样品分析结果与白芍水提取物、对照品以及空白血浆进行比较, 发现原型入血成分如表2所示。其中没食子酸、6-*O*-coryranosyl-lactinolide、芍药内酯C、白芍苷、牡丹皮苷I、1-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-8-*O*-苯甲酰芍药苷经过肠道代谢后仍以原型存在, 但在经肝脏代谢后的血浆中未发现, 推测这些成分被肠壁吸收后主要在

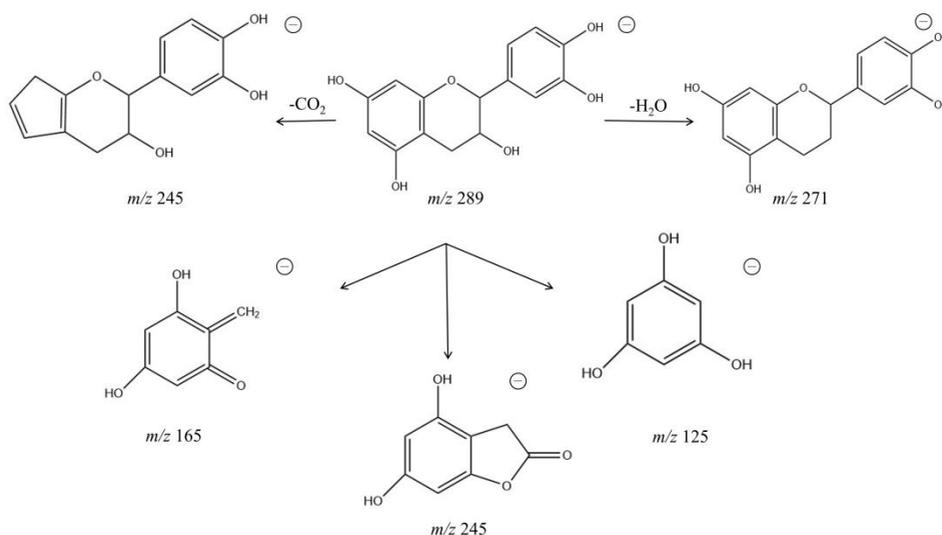


图5 儿茶素裂解规律

Fig. 5 Proposed fragmentation pathway of catechin

表2 白芍原型入血成分
Table 2 Prototype constituents into blood of *Radix Paeoniae Alba*

峰	化合物名称	肠代谢	肝代谢	综合代谢
M2	没食子酸	Y	ND	ND
M6	6- <i>O</i> -copyranosyl-lactinolide	Y	ND	ND
M7	牡丹皮苷F	ND	ND	Y
M8	没食子酸甲酯	ND	ND	Y
M10	羟基芍药苷	Y	Y	Y
M15	芍药内酯C	Y	ND	ND
M16	芍药内酯苷	Y	Y	Y
M17	芍药内酯G	ND	ND	Y
M19	白芍苷	Y	ND	Y
M20	芍药苷	Y	Y	Y
M24	环五(异)亮氨酸	Y	Y	Y
M27	苯甲酸	Y	Y	Y
M26	环六(异)亮氨酸	Y	Y	Y
M28	对羟基苯甲酸	Y	Y	Y
M29	牡丹皮苷I	Y	ND	ND
M30	1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖基-8- <i>O</i> -苯甲酰芍药苷	Y	ND	ND
M31	环七(异)亮氨酸	Y	Y	ND

Y-原型入血成分;ND-未检测到该成分

Y - original blood component; ND - component was not detected

肝脏发生代谢;没食子酸甲酯、芍药内酯G、牡丹皮苷F经肠道代谢后会进一步经肝脏代谢;药典中所收录的白芍质控成分芍药苷在经过不同形式的代谢后均可以检测到,并且以原型进入血液。除此之外,羟基芍药苷、芍药内酯苷、环五(异)亮氨酸、环六(异)亮氨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸在经过不同形式的代谢后均可以检测到,并且以原型进入血液。环七(异)亮氨酸在肠道代谢与肝脏代谢后均可以检测到,而经综合代谢后消失,推测其可能在胃内发生酸分解。

4 讨论

如何建立中药质量评价体系,选取更加科学的中药质控成分,并与临床药效相关联,一直以来都是中药学研究的难题^[26-29]。国家“十二五”规划也指出,要明确中药药效物质基础,进而提高中药质量标准。白芍,作为临床较为常用的药材,除了含有芍药苷外,还含有环烯醚萜苷类、黄酮类及萜类等多种化学成分。然而并非所有成分均可发挥药效,只有到达靶标并维持起效血药浓度的成分才会产

生治疗作用。因此,本研究以序贯代谢思路为基础,使用煎煮给药的方式,结合在体动物实验与UPLC-MS技术,分析不同代谢部位与时间的原型入血成分,全面、连续地表征了白芍中多成分在体内吸收代谢的动态变化,将中药质量标准与药效成分相结合的思路用于质控成分的筛选。

本研究将实验动物分为3组,分别为肠代谢组、肝代谢组和综合代谢组。3者的区别在于:肠代谢组由于给药部位在空肠段,并且结扎肝门静脉以及旁支血管,于肠系膜静脉处取血,故此时收集的血液主要经过肠道代谢(肠道菌群代谢);肝代谢组由于不结扎肝门静脉,故药物除经肠道代谢外,还会被肝脏代谢;而综合代谢是最接近传统煎煮后给药方式,药物除了经历以上两种代谢方式外,还会经胃液代谢,即酸性环境下的化学成分的降解。序贯代谢的研究结果显示,共发现了17个原型入血成分,其中14个成分在经过肠道代谢之后可以检测到,8个成分在经过肝代谢后可以检测到,11个成分经综合代谢后仍可以检测到。值得注意的是,羟基芍药苷、芍药苷,芍药内酯苷、环五(异)亮氨酸、环六(异)亮氨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸这7个成分在3种代谢部位均可以检测到。综上所述,17个原型入血成分可作为白芍潜在质控遴选成分。

虽然白芍体内的部分代谢成分也可产生药效^[30],但在本研究中暂未考虑代谢成分的作用。原因在于,体内代谢成分在血液中占比较少^[31],且目前若将代谢物作为质控成分,检测难度较大。但是在后期研究时,可以融合指纹图谱/特征图谱等技术手段,将其与序贯代谢研究思路相结合,从而将部分代谢成分也纳入质控成分中,使本研究成果能更全面的应用于中药白芍质量控制,建立更加科学可行的中药质量评价体系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 赵秋龙,卞晓坤,钱大玮,等.基于UPLC指纹图谱及化学计量学的不同产地白芍差异比较研究[J].中国中药杂志,2019,44(15):3316-3322. Zhao Q L, Bian X K, Qian D W, et al. Comparative study on differences of *Paeonia lactiflora* from different habitats based on fingerprint and chemometrics [J]. China J Chin Mater Med, 2019,44(15):3316-3322.

- [3] 叶先文, 夏澜婷, 任洪民, 等. 白芍炮制的历史沿革及化学成分、药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(7): 1951-1969.
Ye X W, Xiao L T, Ren H M, et al. Research progress on processing history evolution, chemical constituents and pharmacological action of *Paeoniae Radix Alba* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(7): 1951-1969.
- [4] Xiang N, Li X M, Zhang M J, et al. Total glucosides of paeony can reduce the hepatotoxicity caused by methotrexate and leflunomide combination treatment of active rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 802-807.
- [5] 李晋奇, 彭成, 姬洁莹. 制川乌总碱与白芍总苷、白芍多糖配伍治疗类风湿性关节炎大鼠的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2937-2942.
Li J Q, Peng C, Ji J Y, Mechanism study of action on compatible using of total alkaloids of *Radix Aconiti Praeparata* and total glycosides or polysaccharides of *Radix Paeoniae Alba* therapy on rheumatoid arthritis in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(22): 2937-2942.
- [6] Jo G H, Kim S N, Kim M J, et al. Protective effect of *Paeoniae radix alba* root extract on immune alterations in mice with atopic dermatitis [J]. J Toxicol Environ Health A, 2018, 81(12): 502-511.
- [7] 唐燕, 张丹, 孟祥林, 等. 白芍总苷脂质体对荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2547-2551.
Tang Y, Zhang D, Meng X L, et al. Effects of liposomes of total glucosides of paeonia on tumor growth and immune function in tumor-bearing mice [J]. Chin New Drugs J, 2014, 23(21): 2547-2551.
- [8] 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.
Liu Y, Pang Y L, Wang J J, et al. Analysis on theory and technology method of multicomponent drug metabolism [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(12): 1663-1667.
- [9] 刘洋, 翟华强, 赵保胜, 等. 多成分药物代谢学术思想在中医临床药学研究中的应用分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1335-1338.
Liu Y, Zhai H Q, Zhao B S, et al. Analysis of multicomponent drug metabolism used in clinical pharmacy research of traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(7): 1335-1338.
- [10] Luo Z, Ma X, Liu Y, et al. An approach to characterizing the complicated sequential metabolism of salidroside in rats [J]. Molecules, 2016, 21(6): 706.
- [11] 刘洋, 罗志强, 吕贝然, 等. 多成分药物序贯代谢方法用于川芎水煎液多成分不同阶段吸收代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1178-1182.
Liu Y, Luo Z Q, Lv B R, et al. Absorption and metabolism of *Chuanxiong Rhizoma* decoction with multi-component sequential metabolism method [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(7): 1178-1182.
- [12] 杨文宁, 韩星, 杨海洋, 等. 基于多成分药物代谢的秦艽质控成分遴选研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1897-1902.
Yang W N, Han X, Yang H Y, et al. Study on the selection of quality control components from *Radix Gentianae Macrophyllae* based on multicomponent metabolism [J]. World Chin Med, 2020, 15(13): 1897-1902.
- [13] 潘福璐, 韩星, 冀艳华, 等. 基于多成分药物代谢的枸杞子质控成分遴选研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1865-1871.
Pang F L, Han X, Ji Y H, et al. Selection of quality control components from *Fructus Lycii* based on multicomponent metabolism [J]. World Chin Med, 2020, 15(13): 1865-1871.
- [14] 李川. 中药多成分药代动力学研究: 思路与方法[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 607-617.
Li C. Multi-compound pharmacokinetic research on Chinese herbal medicines: approach and methodology [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(4): 607-617.
- [15] Lu T, Yang J, Gao X, et al. Plasma and urinary tanshinol from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiotoxic pills, a cardiovascular herbal medicine [J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36(8): 1578-1586.
- [16] 贺晶, 高晓霞, 田俊生, 等. UPLC-MS分析柴胡、白芍水煎液的化学成分及其对逍遥散的贡献[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(4): 375-382.
He J, Gao X X, Tian J S, et al. Analysis on chemical constituents in *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* by UPLC-MS and their contribution to Xiaoyao Powder [J]. J Shanxi Med Univ, 2018, 49(4): 375-382.
- [17] 谭淑瑜, 肖雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 94-100.
Tan S Y, Xiao X, Pu S H, et al. Analysis and identification of water-soluble components of *Paeonia lactiflora* [J]. J Chin Med Mater, 2017, 40(1): 94-100.
- [18] Murakami N, Saka M, Shimada H, et al. New bioactive monoterpene glycosides from *Paeoniae Radix* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1996, 44(6): 1279-1281.
- [19] 许舜军, 杨柳, 张勉, 等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 药学学报, 2006, 41(9): 852-856.
Xu S J, Yang L, Zhang M, et al. Rapid identification of compounds in *Cortex Moutan* by liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin, 2006, 41(9):852-856.
- [20] Hayashi T, Shinbo T, Shimizu M, et al. Paeonilactone-A, -B, and -C, new monoterpenoids from peony root [J]. Tetrahedron Lett, 1985, 26(31): 3699-3702.
- [21] 胡绪玮, 乔善义, 范海涛, 等. 当归芍药散活性部位DSS-A-N-30中1种新单萜苷[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1413-1415.
Hu X W, Qiao S Y, Fan H T, et al. A new monoterpene glycosides from active fraction (DSS-A-N-30) of Danggui Shanoyao San [J]. China J Chin Mater Med, 2008, 33(12):1413-1415.
- [22] 樊慧蓉, 李全胜, 张爱杰, 等. 柚皮素在大鼠体内的代谢途径研究[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2093-2099.
Fan H R, LI Q S, Zhang A J, et al. *In vivo* metabolic pathway of naringenin in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(10): 2093-2099.
- [23] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MSⁿ分析当归芍药散中化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1056-1062.
Niu Y, Wang S F. Analysis on chemical constituents in Danggui-Shaoyao-San by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MSⁿ [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [24] Chen L, Qi J, Chang Y X, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(2): 127-137.
- [25] 任浚冀, 刘春明, 王乐奇, 等. 白芍化学成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1727-1731.
Ren J Q, Liu C M, Wang L Q, et al. Determination of chemical compositions in extract of *Radix Paeoniae Alba* by liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(10): 1727-1731.
- [26] 张铁军. 中药质量认识与质量评价[J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
Zhang T J. Realization and evaluation of Chinese materia medica quality [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(1): 1-9.
- [27] 林朝展, 李宝晶, 韩立炜. 从近5年国家自然科学基金资助项目浅谈中药质量评价研究现状[J]. 中草药, 2020, 51(2): 281-286.
Lin C Z, Li B J, Han L W. Analysis of projects funded by NSFC in field of Chinese materia medica quality evaluation in recent five years [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 281-286.
- [28] 孙国祥, 孙万阳, 张晶, 等. 中药质量一致性评价体系-基于定量指纹图谱检查的中药标准制剂控制模式的解析[J]. 中南药学, 2018, 16(1): 2-13.
Sun G X, Sun W Y, Zhang J. et al. TCM quality evaluation consistency system-the analyses for control mode of standard preparation based on quantitative fingerprints [J]. Cent South Pharm, 2018, 16(1): 2-13.
- [29] 王晶娟, 刘洋, 赵保胜, 等. 中药"质效代关联"研究方法理论的建立[J]. 中草药, 2014, 45(11): 1507-1510.
Wang J J, Liu Y, Zhang B S, et al. Research on methods and theories of correlation in "quality, curative effect, and metabolism" for quality control of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(11): 1507-1510.
- [30] 谢静, 李云鹃, 缪兴龙, 等. 基于代谢组学技术的中药复方药效物质基础与作用机制研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1439-1445.
Xie J, Li Y J, Miao X L, et al. Research on effective substances and mechanism of traditional Chinese medicine prescriptions based on metabolomics technology [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(7): 1439-1445.
- [31] 黄财顺, 向诚, 李宝才, 等. 基于中药血清药物化学的活性成分筛选的现状和问题[J]. 中草药, 2014, 45(20): 3009-3014.
Huang C S, Xiang C, LI B C, et al. Screening active ingredients based on serum pharmacology of traditional Chinese medicine: current situation and problems [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(20): 3009-3014.

[责任编辑 兰新新]