基于UPLC-Q-Exactive MS技术太子参环肽heterophyllin A、pseudostellaria C在大鼠体内的代谢产物及代谢途径研究

赵 立[1]，阚永军[1]，蒋 畅[1]，庞文生[3]，胡 娟[1, 2, 3*]

1. 福建省中医药科学院 药物研究所，福建 福州 350003
2. 福建中医药大学附属第二人民医院 药学部，福建 福州 350003
3. 福建中医药大学 药学院，福建 福州 350122

摘 要：目的 分析鉴定大鼠ig太子参环肽提取物后血浆、胆汁、尿液及粪便的代谢产物，并推测其在大鼠体内的代谢途径。**方法** 雄性SD大鼠ig太子参环肽类提取物（400 mg·kg^{-1}），给药后收集血浆、胆汁、尿液及粪便样品。样品处理后，采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱技术（UPLC-Q-Exactive MS）分析环肽的入血原型成分，对其中2种入血环肽heterophyllin （HA）、pseudostellaria C（PC）代谢物进行结构表征。**结果** 共从大鼠血浆中提取到了7种环肽类成分，包括pseudostellarin A、pseudostellarin B、heterophyllin B、PC、pseudostellarin D、HA、pseudostellarin E；在大鼠的生物样本中检测到13个HA代谢产物，其中血浆、胆汁、尿液、粪便分别鉴定出3、7、0、13个；PC代谢产物有15个，其中血浆、胆汁、尿液、粪便分别有3、10、4、14个。2种环肽在大鼠体内存在去羟基化、水解、脱水、甲基化代谢途径。**结论** 通过UPLC-Q-Exactive MS技术推测出了HA和PC代谢产物和途径。

关键词： 太子参环肽；超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道离子阱质谱技术；heterophyllin A；pseudostellaria C；代谢产物；代谢途径

中图分类号： R917 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）11-2585-12

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.014

Study on metabolites and metabolic pathways of *Pseudostellaria heterophylla* cyclic peptides heterophyllin A and pseudostellaria C in rats by UPLC-Q-Exactive MS technology

ZHAO Li[1], KAN Yongjun[1], JIANG Chang[1], PANG Wensheng[3], HU Juan[1, 2, 3]

1. Institute of Pharmaceutical Sciences, Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou 350003, China
2. Department of Pharmacy, The Second People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China
3. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To analyze and identify the metabolites present in plasma, bile, urine and feces after gavage of the cyclic peptide extract of *Pseudostellaria heterophylla* and to speculate on the metabolic pathways of different structural cyclic peptides in rats. **Methods** Male SD rats were ig administered cyclic peptide extract (400 mg·kg^{-1}), and plasma, bile, urine and feces samples were collected. After the samples were processed, the metabolites of two of the blood entry cyclic peptides, heterophyllin A (HA) and pseudostellaria C (PC) were structurally characterized by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital ion trap mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive MS). **Results** Seven cyclic peptide components were extracted from plasma, including pseudostellarin A, pseudostellarin B, heterophyllin B, PC, pseudostellarin D, HA, and pseudostellarin E. 13 metabolites of HA and 15 metabolites of PC were detected in biological samples from rats. 3, 7, 0, and 13 of HA metabolites and 3, 10, 4, and 14 of PC metabolites were identified in plasma, bile, urine, and feces, respectively, and the

收稿日期： 2024-04-28

基金项目： 福建省省属公益类科研院所科研专项项目（2021R1003006）；福建省自然科学基金项目（2021J01913，2020J01723）；国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项（2019YFC1710504）

第一作者： 赵 立（1989—），男，博士，助理研究员，研究方向为中药药效物质基础。E-mail：1181132006@fjtcm.edu.cn

***通信作者：** 胡 娟（1962—），女，硕士，教授，研究方向为中药药效物质基础。E-mail：huj@ fjtcm.edu.cn

metabolism of the two cyclic peptides in rats was elucidated through the pathways of dehydroxylation, hydrolysis, dehydration, and methylation. **Conclusion** The metabolites of HA and PC were deduced by UPLC-Q-Exactive MS.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* cyclic peptides; ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital ion trap mass spectrometry; heterophyllin A; pseudostellaria C; metabolites; metabolic pathway

太子参为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla*（Miq.）Pax ex Pax et Hoffm.（Miq.）Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根，是临床上常用的补气类中药，具有益气健脾、生津润肺功效[1-2]。已报道太子参中化学成分主要有多糖、氨基酸、环肽、皂苷、脂肪酸、微量元素等[3-4]。其中，环肽是太子参中极具代表性的化学成分。目前植物学家或化学家从太子参中分离得到的环肽类化合物有 heterophyllin A～J、pseudostellaria A～L，共 19 种环肽类成分[5-7]。本课题组前期研究发现太子参环肽类提取物能显著降低肺气虚证慢性阻塞性肺疾病（COPD）模型大鼠的气道阻力，提高大鼠的气道动态顺应性[8-9]。国内外其他学者也有关于太子参环肽活性的研究报道[10-11]，具有极大的开发价值。

太子参环肽种类较为丰富，但其药效物质尚不明确。本课题组前期拟通过评价环肽的口服吸收特征来筛选太子参中的活性环肽，但环肽给药吸收入血率较低[12]。通过尾 iv，环肽原型成分的代谢速度极快，国内其他学者也有相应的研究报道[13-14]。太子参环肽有可能通过代谢产物发挥药效活性。因此，有必要对环肽的代谢产物开展研究，为揭示其药效物质提供参考。

关于肽类化合物的体内代谢，有研究报道可能涉及去甲基化、氧化、脱氢、脱羧、甲基化反应等多种途径，胃肠道酶、肝细胞色素均可能对肽的结构产生影响[15-19]。但目前尚未有关于太子参环肽代谢产物和代谢途径的研究。中药代谢产物的鉴定极为复杂，通过超高效液相色谱-高分辨质谱联用（UPLC-Q-Exactive MS）技术可以提高生物样本中微量成分检测的分辨率和检出效率，在中药代谢物的鉴定中应用广泛。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive MS 技术对 ig 太子参环肽提取物后主要的入血原型成分进行了分析，并对其中 2 种入血环肽 pseudostellarin C（PC）、heterophyllin A（HA）的大鼠血浆、胆汁、尿液和粪便代谢产物进行鉴定，初步推测其在大鼠体内的代谢途径及转化规律。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo Q-Exactive HFX 质谱仪、Xcalibur 4.1 分析软件（美国 Thermo 公司）；AE240 电子天平（梅特勒托利多公司）；GZY-P2D-W 型超纯水机（湖南科尔顿水务有限公司）；ST16R 高速冷冻离心机（美国 Thermo 公司）；KQ-700V 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 太子参环肽提取物

太子参药材，产自福建省宁德市柘荣县，由福建柘参生物科技股份有限公司提供，批号 001210802118，经福建中医药大学胡娟教授鉴定为石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla*（Miq.）Pax ex Pax et Hoffm.（Miq.）PaxexPaxetHoffm 的干燥块根。

太子参环肽提取物参照前期研究确定的方案制备[8,12]，太子参粉末采用醋酸乙酯为溶剂进行索氏提取，回收醋酸乙酯；残渣加石油醚溶解脱除脂肪酸，离心收集沉淀；沉淀物加水饱和正丁醇溶解，通过水饱和正丁醇-40% 氨水萃取去除氨基酸，收集水饱和正丁醇液，蒸干；残渣醇沉去除多糖，减压回收乙醇，冷冻干燥，即得。环肽类提取物相对于生药得率为 1.709 g·kg^{-1}，在 ig 给药前该提取物以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液溶解为环肽质量浓度 25 mg·mL^{-1} 的混悬液。

1.3 主要试剂

羧甲基纤维素钠（上海麦克林生化科技股份有限公司，批号 C835846）；乙腈（德国默克公司，色谱纯，批号 JB123830）；甲酸（美国 thermofisher 公司，HPLC 级，批号 179246）；水为超纯水。

1.4 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量（200±10）g，由北京华阜康生物科技股份有限公司提供，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0008，动物实验伦理经福建省中医药科学院实验动物中心批准（批准号 FJATCM-IAEC2022039）。动物饲养条件：温度（22±2）℃、湿度 55%～60%、每天光照 12 h，适应性喂养 1 周。

2 方法

2.1 动物分组给药及样品采集

SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组：血浆组、胆汁组、尿液＋粪便组、空白血浆组、空白胆汁组、空白尿液＋粪便组，每组 6 只。血浆、胆汁、尿液＋粪

便组大鼠分别按剂量为400 mg·kg^{-1} ig太子参环肽提取物，各空白组大鼠ig等量0.5%羧甲基纤维素钠溶液。在给药前12 h禁食，自由饮水。

2.2 生物样品采集及前处理

2.2.1 血浆样品采集及前处理 血浆组大鼠在ig给药后1 h ip戊巴比妥钠（30 mg·kg^{-1}），腹主动脉取血约5 mL至肝素钠抗凝管中。以4 ℃、3 500 r·min^{-1}离心15 min，分离上层血浆，保存于−80 ℃冰箱。

分析前将同组大鼠血浆混匀，取4 mL混匀后血浆于25 mL EP管中，加入乙腈12 mL，涡旋混匀1 min，以4 ℃、14 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，37 ℃氮气吹干，乙腈0.2 mL复溶，涡旋混匀1 min，以4 ℃、14 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，过0.22 μm微孔滤膜后进样分析。

2.2.2 胆汁样品采集及前处理 胆汁组大鼠给药后麻醉，进行胆管插管手术，并收集给药后12 h内的胆汁，保存于−80 ℃冰箱。

分析前混合同组大鼠胆汁，取4 mL混合胆汁于25 mL EP管中，加入乙腈12 mL，后续处理同血浆组样品处理方法。

2.2.3 尿液＋粪便样品采集及前处理 尿液＋粪便组大鼠置于代谢笼中，给药后收集12 h内尿液和粪便，保存于−80 ℃冰箱。

分析前混合同组大鼠尿液，取混合尿液4 mL置于25 mL EP管中，加入乙腈12 mL，后续处理同血浆组样品处理方法。

分析前同组大鼠粪便混匀后40 ℃烘干，取4.0 g混匀烘干后样品置于15 mL EP管中，加入乙腈12 mL，超声60 min，14 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，37 ℃氮气吹干，乙腈0.2 mL复溶，涡旋5 min，14 000 r·min^{-1}离心10 min，取上清液，过0.22 μm微孔滤膜[20-23]。

2.3 UPLC-Q-Exactive MS分析

采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；以0.1%甲酸溶液（A）-0.1%甲酸乙腈溶液（B）为流动相，梯度洗脱：0～5 min，20%→25% B；5～25 min，25%→45% B；25～27 min，45%→90% B；27～30 min，90% B。进样量3 μL，体积流量0.3 mL·min^{-1}，柱温30 ℃[12]。

正离子模式下ESI$^+$离子源，喷雾电压为3 800 V；离子源温度350 ℃，离子传输管温度为320 ℃；鞘气体积流量为40 L·min^{-1}，辅助气体的体积流量为10 L·min^{-1}。该测试方法使用全扫描/数据依赖二级扫描模式（FullMS/dd-MS2），一级和二级扫描分辨率分别为60 000和15 000。一级扫描范围为*m/z* 100～1 500，二级扫描范围为*m/z* 50～1 500，碰撞能量梯度分别为20、40、60 eV。

2.4 数据处理和分析

采用Xcalibur 4.1软件获取质谱数据，Compound Discoverer 3.1软件进行定性分析，通过对比给药组和空白组的色谱图搜索代谢产物，以环肽HA、PC的原型成分为模板化合物。一级质谱*m/z*大于150，二级质谱*m/z*大于50，质谱误差5×10^{-6}以内，峰对齐时保留时间的偏差小于1 min，最小峰面积强度10 000，*S/N*阈值大于1.5，得分阈值大于20，进行分析鉴定。通过Chemdraw 14.0软件绘制其原型成分和代谢产物的质谱裂解规律[24]。

3 结果

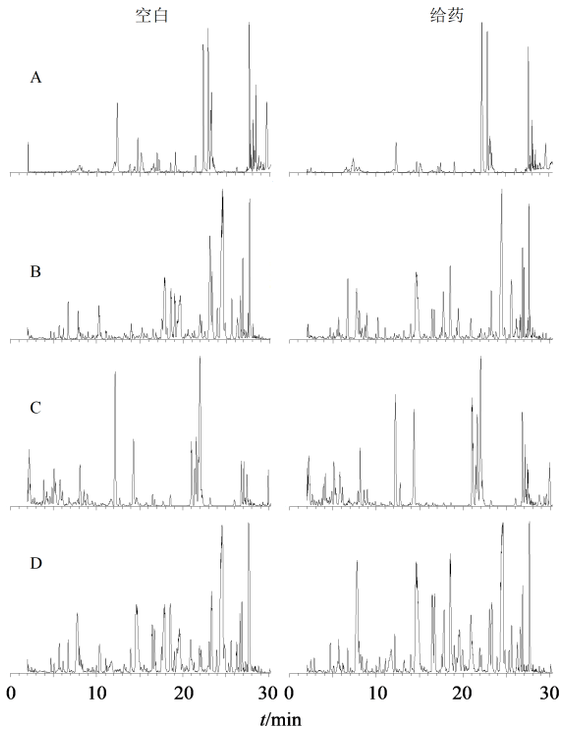
3.1 太子参环肽入血原型成分分析

采用UPLC-Q-Exactive MS法对太子参提取物血浆、胆汁、尿液、粪便样品进行分析，得到各样本的总离子流图（图1）。分别按照不同环肽的一级质谱的相对分子质量，提取血浆中环肽原型成分的离子流色谱图，见图2。共从血浆中提取到了7种环肽类成分，包括PA（*m/z* 502.266 0）、pseudostellarin B（PB）（*m/z* 683.351 7）、heterophyllin B（HB）（*m/z* 779.445 6）、PC（*m/z* 813.450 5）、pseudostellarin D（PD）（*m/z* 714.419 0）、heterophyllin A（HA）（*m/z* 728.434 1）、pseudostellarin E（PE）（*m/z* 878.514 0）[5]。血浆中原型化合物的鉴定结果见表1。本研究后续主要对PC、HA这2种代表性环肽体内代谢产物和途径进行研究。

3.2 HA代谢产物的分析鉴定

通过对比给药前后的生物样品图谱信息，对精确相对分子质量、二级碎片离子等信息进行分析，共鉴定出13个大鼠体内HA代谢产物，见表2。其中血浆中3个，胆汁中7个，尿液中0个，粪便中13个。

3.2.1 HA原型 对于化合物的鉴定，除了一级质谱信息，还需根据二级质谱表征结构。HA的二级质谱见图3，HA准分子离子峰*m/z* 728.436 6［M＋H］$^+$，t_R为18.69 min，图中有碎片离子*m/z* 710.422 5［M＋H−H_2O］$^+$、700.439 5［M＋H−CO］$^+$、615.351 1［M＋H−$C_6H_{11}NO$］$^+$、514.303 7［M＋H−$C_{10}H_{18}N_2O_3$］$^+$、419.229 6［M＋H−$C_{16}H_{27}N_3O_3$］$^+$、310.213 0［M＋H−$C_{21}H_{30}N_4O_5$］$^+$、197.129 0［M＋H−$C_{27}H_{41}N_5O_6$］$^+$、169.133 9［M＋H−$C_{28}H_{41}N_5O_7$］$^+$、120.081 2［M＋H−$C_{29}H_{48}N_6O_8$］$^+$、86.097 1［M＋H−



A-血浆；B-胆汁；C-尿液；D-粪便。

A-plasma; B-bile; C-urine; D-feces.

图1 生物样品正离子模式的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagrams for positive ion modes

$C_{32}H_{46}N_6O_8]^+$、70.065 9 [M+H−$C_{33}H_{50}N_6O_8]^+$。环肽的裂解过程一般伴随着酰胺键的断裂，或在此基础上进一步脱去末端羰基，根据碎片离子特征，可以推测HA的质谱裂解规律（图4）[5]。

3.2.2 HA的Ⅰ相代谢产物的鉴定 MA1～MA5的准分子离子峰分别为*m/z* 744.429 7、744.429 1、744.429 8、744.429 7、744.428 9 $[M+H]^+$，t_R分别为11.82、13.77、14.32、15.13、16.07 min，比HA多16（O），具有特征碎片离子*m/z* 726.418 4 $[M+H-H_2O]^+$、*m/z* 716.433 9 $[M+H-CO]^+$，其他碎片离子*m/z* 197.128 6、169.133 7、86.097 0、70.065 8与HA相近，推断MA1～MA5为HA的羟基化代谢产物的不同同分异构体。根据其二级质谱特征，推测HA的羟基化代谢物质谱裂解规律（图5）。

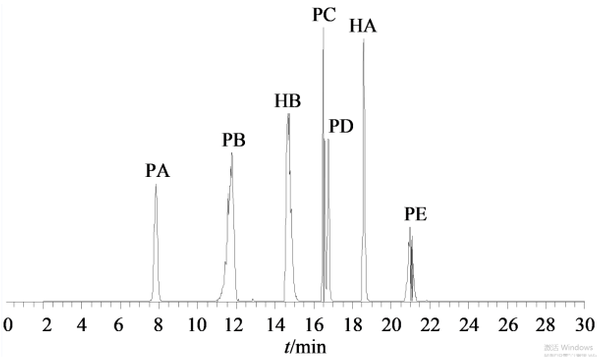


图2 大鼠血浆中环肽的质谱EIC叠加图

Fig. 2 Mass spectral EIC overlay of cyclic peptides in rat plasma

MA6的准分子离子峰为*m/z* 746.442 6 $[M+H]^+$，t_R为16.35 min，比HA多18（H_2O），具有特征碎片离子*m/z* 728.380 4 $[M+H-H_2O]^+$、*m/z* 718.397 5 $[M+H-CO]^+$，其他碎片离子*m/z* 197.128 6、169.133 5、70.065 8与HA相近，推断MA6为HA的水解代谢产物。

表1 大鼠血浆中环肽类原型成分鉴定结果

Table 1 Identification of prototypical components of cyclic peptides in rat plasma

化合物	分子式	t_R/min	$[M+H]^+$		误差/（×10^{-6}）	MS/MS数据
			*m/z*理论值	*m/z*实际值		
PA	$C_{25}H_{35}N_5O_6$	7.98	502.266 0	502.267 6	3.19	474.272 3、389.182 6、318.145 8、233.129 1、197.128 6、127.087 1、86.097 2、70.065 9
PB	$C_{33}H_{46}N_8O_8$	11.82	683.351 7	683.352 2	0.73	665.341 5、570.268 8、513.245 9、399.196 6、314.150 4、217.134 0、120.081 3、70.065 9
HB	$C_{40}H_{58}N_8O_8$	15.14	779.445 6	779.447 0	1.80	751.451 7、666.364 3、552.316 9、405.250 5、308.197 5、183.149 9、98.060 7、70.065 9
PC	$C_{40}H_{60}N_8O_{10}$	16.48	831.450 5	813.449 6	−1.11	795.439 0、777.429 9、655.382 4、542.296 9、358.212 6、211.144 1、183.149 3、120.081 0、86.097 1、70.065 8
PD	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	17.18	714.419 0	714.419 9	1.26	686.424 7、601.335 9、551.356 7、381.250 4、183.149 7、136.076 1、86.097 1、70.065 9
HA	$C_{37}H_{57}N_7O_8$	18.69	728.434 1	728.436 6	3.43	710.422 5、700.439 5、615.351 1、514.303 7、419.229 6、310.213 0、197.129 0、169.133 9、120.081 2、86.097 1、70.065 9
PE	$C_{45}H_{67}N_9O_9$	21.46	878.514 0	878.515 3	1.48	850.519 0、674.425 3、533.345 9、436.294 6、365.219 0、155.081 9、86.097 2、70.065 9

表2 大鼠血浆、胆汁、尿液、粪便中HA代谢产物质谱信息及分布

Table 2 Mass spectrometric information and distribution of HA in rat plasma, bile, urine and feces

序号	分子式	t_R/min	$[M+H]^+$ m/z理论值	m/z实际值	误差/($\times10^{-6}$)	MS/MS数据	代谢途径	来源
MA0	$C_{37}H_{57}N_7O_8$	18.69	728.434 1	728.436 6	3.43	710.422 5、700.439 5、615.351 1、514.303 7、419.229 6、310.213 0、197.129 0、169.133 9、120.081 2、86.097 1、70.065 9	原型	P、B、U、F
MA1	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	11.82	744.929 1	744.429 7	0.81	726.419 3、197.128 6、169.133 6；86.097 0；70.065 8	羟基化	F
MA2	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	13.77	744.929 1	744.429 1	0.00	726.419 1、197.128 4、169.133 5、86.096 9、70.065 8	羟基化	F
MA3	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	14.32	744.929 1	744.429 8	0.94	726.418 4、716.433 9、197.128 5、169.133 5、70.065 8	羟基化	P、B、F
MA4	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	15.13	744.929 1	744.429 7	0.81	726.419 3、716.304 7、197.128 6、169.133 7、70.065 8	羟基化	B、F
MA5	$C_{37}H_{57}N_7O_9$	16.07	744.929 1	744.428 9	−0.27	726.417 5、716.434 6、185.128 5、86.060 6	羟基化	P、B、F
MA6	$C_{37}H_{59}N_7O_9$	16.35	746.444 7	746.442 6	−2.82	728.380 4、718.397 5、197.128 6、169.133 5、70.065 8	水解	F
MA7	$C_{37}H_{55}N_7O_7$	18.57	710.423 6	710.422 7	−1.27	682.428 0、197.128 5、169.133 5、120.080 9、70.065 7	脱水	B、F
MA8	$C_{17}H_{25}N_3O_4$	2.54	336.191 8	336.190 5	−3.87	318.176 5、70.065 8	水解	P、B、F
MA9	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	2.29	279.170 3	279.170 2	−0.36	261.158 3、86.096 9	水解	B、F
MA10	$C_{20}H_{31}N_3O_4$	3.57	378.238 7	378.238 1	−1.59	360.182 0、253.154 8	水解	F
MA11	$C_{27}H_{41}N_5O_6$	5.89	532.313 0	532.310 6	−4.51	514.285 1、126.000 2	水解	F
MA12	$C_{32}H_{52}N_6O_8$	9.73	649.391 9	649.393 9	3.08	631.271 3、305.149 6、287.139 0	水解	F
MA13	$C_{38}H_{59}N_7O_9$	26.73	758.444 7	758.441 2	−4.62	730.446 8	羟基化+甲基化	B、F

P-血浆；B-胆汁；U-尿液；F-粪便。

P-plasma; B-bile; U-urine; F-feces.

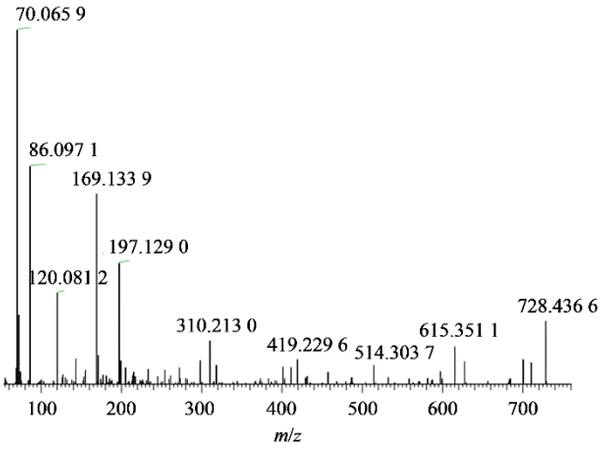


图3 正离子模式下HA的二级质谱图

Fig. 3 Secondary mass spectra of HA in positive ion mode

MA7的准分子离子峰为*m/z* 710.422 7 $[M+H]^+$，t_R为18.57 min，比HA少18（H_2O），具有特征碎片离子*m/z* 682.428 0 $[M+H-CO]^+$，其他碎片离子*m/z* 197.128 5、169.133 5、120.080 9、70.065 7与HA相近，推断MA7为HA的脱水代谢产物。

MA8的准分子离子峰为*m/z* 336.190 5 $[M+H]^+$，t_R为2.54 min，具有特征碎片离子*m/z* 318.176 5 $[M+H-H_2O]^+$，其他碎片离子*m/z* 70.065 8与HA相近，MA8可能为HA开环，脱去Ala、Pro、Thr、Ile水解形成的代谢产物。

MA9的准分子离子峰为*m/z* 279.170 2 $[M+H]^+$，t_R为2.29 min，具有特征碎片离子*m/z* 261.158 3 $[M+H-H_2O]^+$，其他碎片离子*m/z* 86.096 9与HA相近，MA9可能为MA8进一步脱去Gly水解形成的代谢产物。

MA10的准分子离子峰为*m/z* 378.238 1 $[M+H]^+$，t_R为3.57 min，具有特征碎片离子*m/z* 360.182 0 $[M+H-H_2O]^+$，MA10可能为HA开环，脱去Pro、Thr、Ile、Gly水解形成的代谢产物。

MA11的准分子离子峰为*m/z* 532.310 6 $[M+H]^+$，t_R为5.89 min，具有特征碎片离子*m/z* 514.285 1 $[M+H-H_2O]^+$，MA11可能为HA开环，脱去Thr、Ile水解形成的代谢产物。

MA12的准分子离子峰为*m/z* 649.393 9 $[M+H]^+$，t_R为9.73 min，具有特征碎片离子*m/z* 631.271 3 $[M+H-H_2O]^+$，MA12可能为HA开环后脱去Pro水解的代谢产物。

3.2.3 HA的II相代谢产物的鉴定 MA13的准分子离子峰为*m/z* 758.441 2 $[M+H]^+$，t_R为26.73 min，比HA多30（$O+CH_2$），具有特征碎片离子*m/z* 730.446 8 $[M+H-CO]^+$，推断MA13为HA的羟基

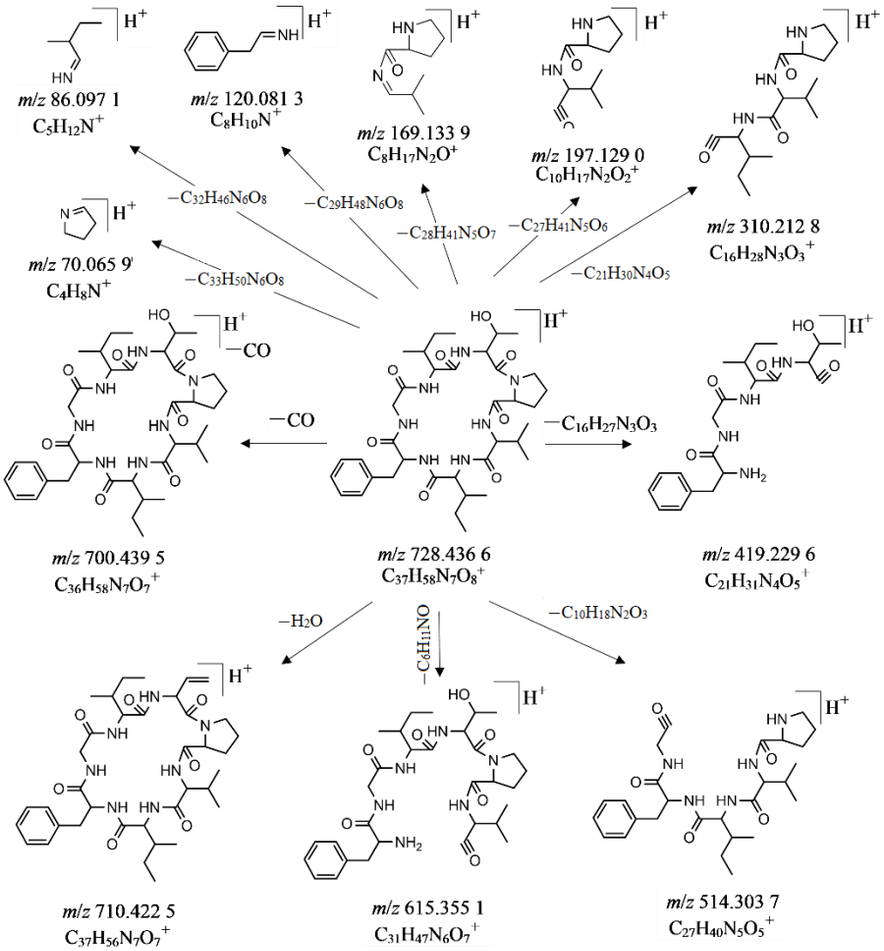


图 4　正离子模式下 HA 的裂解途径推测

Fig. 4　Speculation on cleavage pathway of HA in positive ion mode

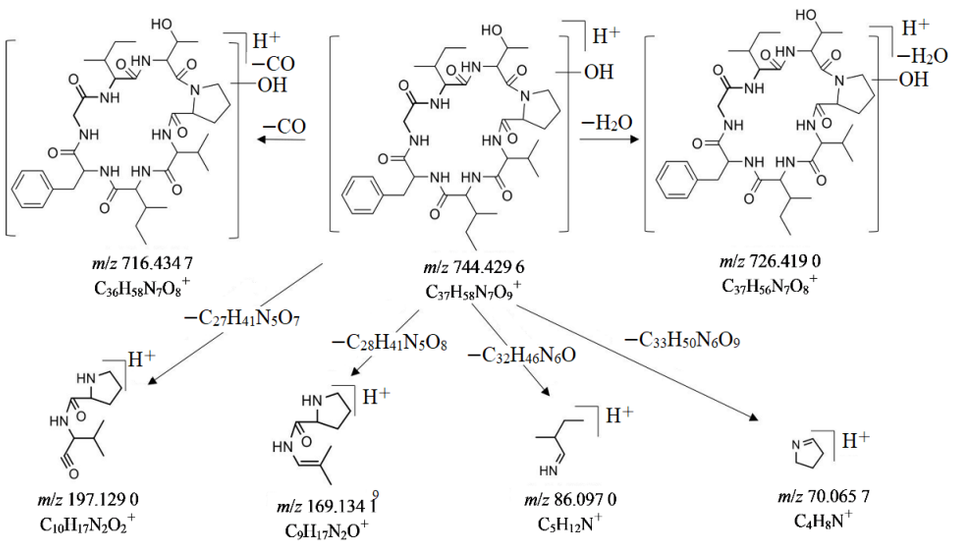


图 5　正离子模式下 HA 的羟基化代谢物的质谱裂解途径推测

Fig. 5　Hypothesized cleavage pathways for mass spectra of hydroxylated metabolites of HA in positive ion mode

化后甲基化代谢产物。

3.3　PC 代谢产物的分析鉴定

通过对比给药前后的生物样品图谱信息，共鉴定出 15 个 PC 大鼠体内代谢产物，见表 3。其中血浆中 3 个，胆汁中 10 个，尿液中 4 个，粪便中 14 个。

3.3.1　PC 原型　PC 的二级质谱图见图 6，PC 准分

表3 大鼠血浆、胆汁、尿液、粪便中PC代谢产物质谱信息及分布

Table 3 Mass spectrometric information and distribution of PC in rat plasma, bile, urine and feces

序号	分子式	t_R/min	[M+H]$^+$ *m/z*理论值	[M+H]$^+$ *m/z*实际值	误差/($\times10^{-6}$)	MS/MS数据	代谢途径	来源
MC0	$C_{40}H_{60}N_8O_{10}$	16.48	831.450 5	813.449 6	−1.11	795.439 0、777.429 9、655.382 4、542.296 9、358.212 6、211.144 1、183.149 3、120.081 0、86.097 1、70.065 8	原型	P、B、U、F
MC1	$C_{40}H_{60}N_8O_{11}$	9.48	829.445 4	829.445 8	0.48	811.434 7、793.424 5、227.139 1、120.081 0、70.065 8	羟基化	B、F
MC2	$C_{40}H_{60}N_8O_{11}$	9.77	829.445 4	829.447 0	1,93	811.434 1、793.423 8、227.139 1、120.081 0、70.065 8	羟基化	B、U、F
MC3	$C_{40}H_{60}N_8O_{11}$	11.27	829.445 4	829.446 0	0.72	811.434 9、793.424 2、211.144 3、167.081 8、70.065 8	羟基化	B、F
MC4	$C_{40}H_{60}N_8O_{11}$	13.13	829.445 4	829.444 8	−0.72	811.434 6、211.144 3、183.149 3、167.081 7、70.065 8	羟基化	B、U、F
MC5	$C_{40}H_{60}N_8O_{11}$	13.30	829.445 4	829.445 5	0.12	811.434 5、211.144 3、183.149 3、120.081 0、70.065 8	羟基化	P、B、U、F
MC6	$C_{40}H_{62}N_8O_{11}$	12.89	829.445 4	831.463 1	2.41	813.450 3、803.469 5、120.081 0、86.097 0、70.065 8	水解	P、B、U、F
MC7	$C_{40}H_{58}N_8O_9$	16.63	795.440 0	795.439 0	−1.26	777.428 6、767.444 5、183.149 3、120.081 0、70.065 8	脱水	B、F
MC8	$C_{23}H_{39}N_5O_8$	6.40	514.287 1	514.285 5	−3.11	496.273 7、478.262 6、355.237 1、126.022 1	水解	F
MC9	$C_{17}H_{25}N_3O_4$	3.87	336.191 8	336.190 5	−3.87	318.176 5、70.065 8	水解	P、B、F
MC10	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	2.29	279.170 3	279.170 2	0.36	261.158 3、86.096 9	水解	B、F
MC11	$C_{22}H_{32}N_4O_5$	4.70	433.244 5	433.243 4	−2.54	415.233 6、230.128 9	水解	B
MC12	$C_{25}H_{37}N_5O_7$	5.60	520.276 6	520.276 2	−0.77	502.262 8、136.075 7、86.097 0、70.065 8	水解	F
MC13	$C_{23}H_{34}N_4O_6$	3.58	463.255 1	463.255 2	0.22	445.244 4、245.244 4、310.070 6、270.123 7、70.065 8	水解	F
MC14	$C_{30}H_{44}N_6O_8$	10.41	617.329 3	617.328 6	−1.13	599.353 5、492.247 0、70.065 8	水解	F
MC15	$C_{41}H_{62}N_8O_{11}$	15.68	843.461 1	843.464 5	4.03	825.454 3、650.354 7、183.149 3、86.097 0	羟基化+甲基化	F

P-血浆；B-胆汁；U-尿液；F-粪便。

P-plasma; B-bile; U-urine; F-feces.

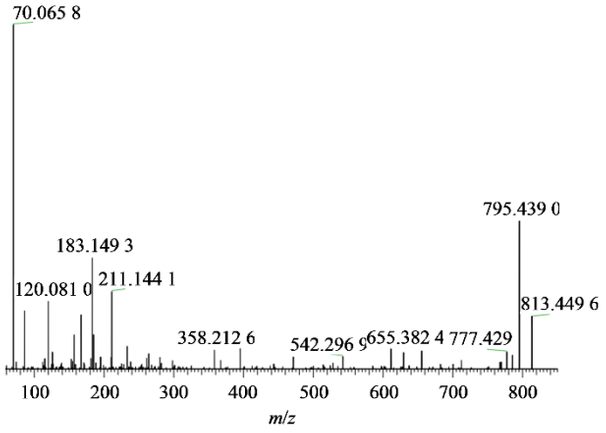


图6 正离子模式下PC的二级质谱图

Fig. 6 Secondary mass spectra of PC in positive ion mode

子离子峰*m/z* 813.449 6 [M+H]$^+$，t_R为16.48 min，图中有碎片离子*m/z* 795.439 0 [M+H−H_2O]$^+$、777.429 9 [M+H−$2H_2O$]$^+$、655.382 4 [M+H−$C_6H_{10}N_2O_3$]$^+$、542.296 9 [M+H−$C_{12}H_{21}N_3O_4$]$^+$、358.212 6 [M+H−$C_{20}H_{33}N_5O_7$]$^+$、211.144 1 [M+H−$C_{29}H_{42}N_6O_8$]$^+$、183.149 3 [M+H−$C_{30}H_{42}N_6O_9$]$^+$、120.081 0 [M+H−$C_{32}H_{51}N_7O_{10}$]$^+$、86.097 1 [M+H−$C_{35}H_{49}N_7O_{10}$]$^+$、70.065 8 [M+H−$C_{36}H_{53}N_7O_{10}$]$^+$。根据碎片离子特征，可以推测PC的质谱裂解规律（图7）[5]。

3.3.2 PC的I相代谢产物的鉴定 MC1～MC5的准分子离子峰分别为*m/z* 829.445 8、829.447 0、829.446 0、829.444 8、829.445 5 [M+H]$^+$，t_R分别为9.48、9.77、11.27、13.13、13.30 min，比PC多16（O），具有特征碎片离子*m/z* 811.434 5 [M+H−H_2O]$^+$、793.423 8 [M+H−$2H_2O$]$^+$，其他碎片离子*m/z* 211.144 3、183.149 3、167.081 7、70.065 8等与PC相近，推断MC1～MC5为PC羟基化代谢产物的不同同分异构体。根据其二级质谱特征，推测PC的羟基化代谢物质谱裂解规律（图8）。

MC6的准分子离子峰为*m/z* 831.463 1 [M+H]$^+$，t_R为12.89 min，比PC多18（H_2O），具有特征碎片离子*m/z* 813.450 3 [M+H−H_2O]$^+$、*m/z* 803.469 5 [M+H−CO]$^+$，碎片离子*m/z* 120.081 0、86.097 0、70.065 8与PC相近，推断MC6为PC水解代谢产物。

MC7的准分子离子峰为*m/z* 795.439 0 [M+H]$^+$，t_R为16.63 min，比PC少18（H_2O），具有特征碎片离子*m/z* 777.428 6 [M+H−H_2O]$^+$、*m/z* 767.444 5 [M+H−CO]$^+$，碎片离子*m/z* 183.149 3、120.081 0、70.065 8与PC相近，推断MC7为PC脱水代谢产物。

MC8的准分子离子峰为*m/z* 514.285 5 [M+

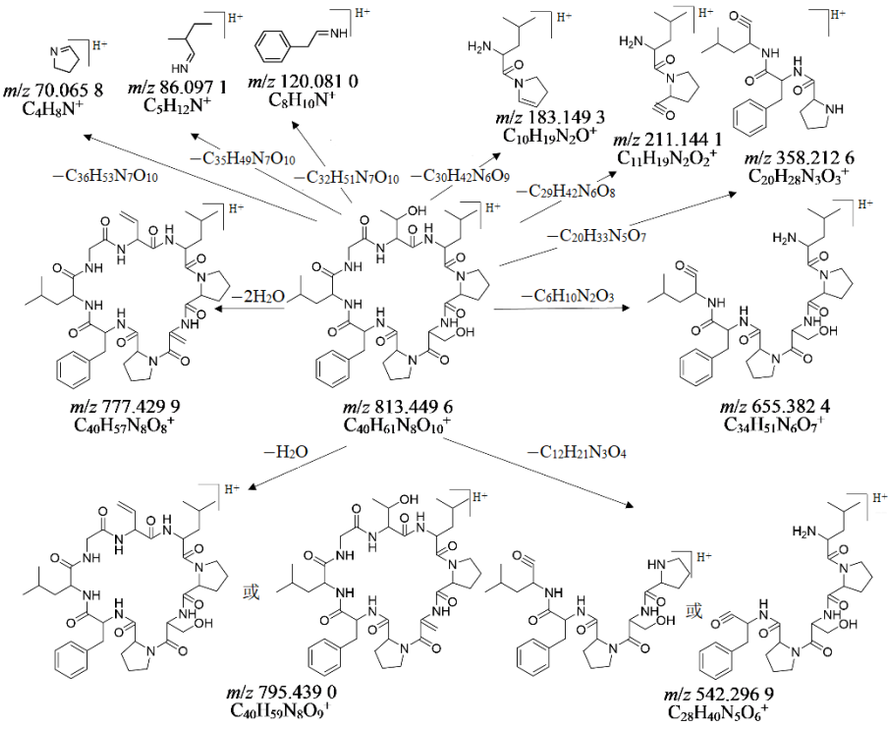


图 7　正离子模式下 PC 的裂解途径推测

Fig. 7　Speculation on cleavage pathway of PC in positive ion mode

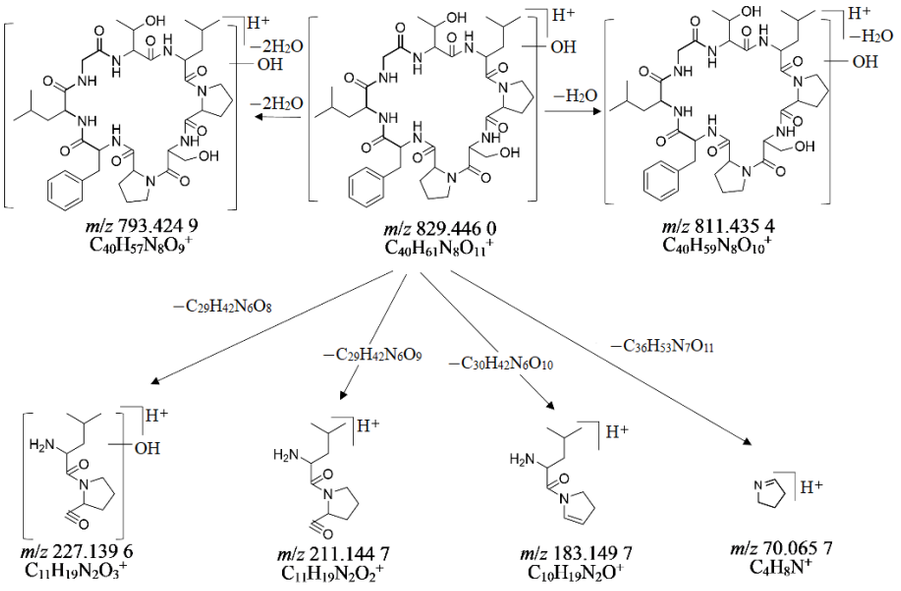


图 8　正离子模式下 PC 的羟基化代谢物的质谱裂解途径推测

Fig. 8　Hypothesized cleavage pathways for mass spectra of hydroxylated metabolites of PC in positive ion mode

H]$^+$，t_R 为 6.40 min，具有特征碎片离子 *m/z* 496.273 7 [M＋H－H_2O]$^+$，推断 MC8 可能为 PC 开环水解脱 Gly、Ile、Phe 代谢产物。

MC9 的准分子离子峰为 *m/z* 336.190 5 [M＋H]$^+$，t_R 为 3.87 min，具有特征碎片离子 *m/z* 318.176 5 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 70.065 8 与 PC 相近，推断 MC9 为 PC 开环水解脱 Pro、Ser、Pro、Ile、Thr 代谢产物。

MC10 的准分子离子峰为 *m/z* 279.170 2 [M＋H]$^+$，t_R 为 2.29 min，具有特征碎片离子 *m/z* 261.158 3 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 86.096 9 与 PC 相近，推断 MC10 为 MC9 进一步水解脱 Gly 代谢产物。

MC11 的准分子离子峰为 *m/z* 433.243 4 [M＋H]$^+$，t_R 为 4.70 min，具有特征碎片离子 *m/z* 415.233 6

[M＋H－H_2O]$^+$，推断 MC11 为 PC 开环水解脱 Ser、Pro、Ile、Thr 代谢产物。

MC12 的准分子离子峰为 *m/z* 520.276 2 [M＋H]$^+$，t_R 为 5.60 min，具有特征碎片离子 *m/z* 502.262 8 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 86.097 0、70.065 8 与 PC 相近，推断 MC12 为 PC 开环水解脱 Pro、Ile、Thr 代谢产物。

MC13 的准分子离子峰为 *m/z* 463.255 2 [M＋H]$^+$，t_R 为 3.58 min，具有特征碎片离子 *m/z* 445.244 4 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 70.065 8 与 PC 相近，推断 MC13 为 MC12 进一步水解脱 Gly 代谢产物。

MC14 的准分子离子峰为 *m/z* 617.328 6 [M＋H]$^+$，t_R 为 10.41 min，具有特征碎片离子 *m/z* 599.353 5 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 70.065 8 与 PC 相近，推断 MC14 为 PC 开环水解脱 Ile、Thr 代谢产物。

3.3.3　PC 的 II 相代谢产物的鉴定　MC15 的准分子离子峰为 *m/z* 843.464 5 [M＋H]$^+$，t_R 为 15.68 min，比 PC 多 30（O＋CH_2），具有特征碎片离子 *m/z* 825.454 5 [M＋H－H_2O]$^+$，碎片离子 *m/z* 183.149 3、86.097 0 与 PC 相近，推断 MC15 为 PC 的羟基化后甲基化代谢产物。

3.4　代谢途径分析

在对 HA 和 PC 代谢产物分析的基础上推测了其在大鼠体内的代谢途径，见图 9、10。

4　讨论

环肽是太子参中极具代表性的化学成分，目前中药化学研究者已鉴定了多种太子参环肽的化学结构。课题组前期已通过动物实验研究发现环肽是柘荣太子参中干预 COPD 的重要药效物质[8-9]。因此探索太子参环肽类物质在体内的代谢规律，可为探讨其药效物质提供参考。

由于目前市场上缺乏不同结构环肽的对照品，本研究以太子参环肽类提取物为研究对象。基于 UPLC-Q-Exactive MS 技术，结合化合物在一级质谱

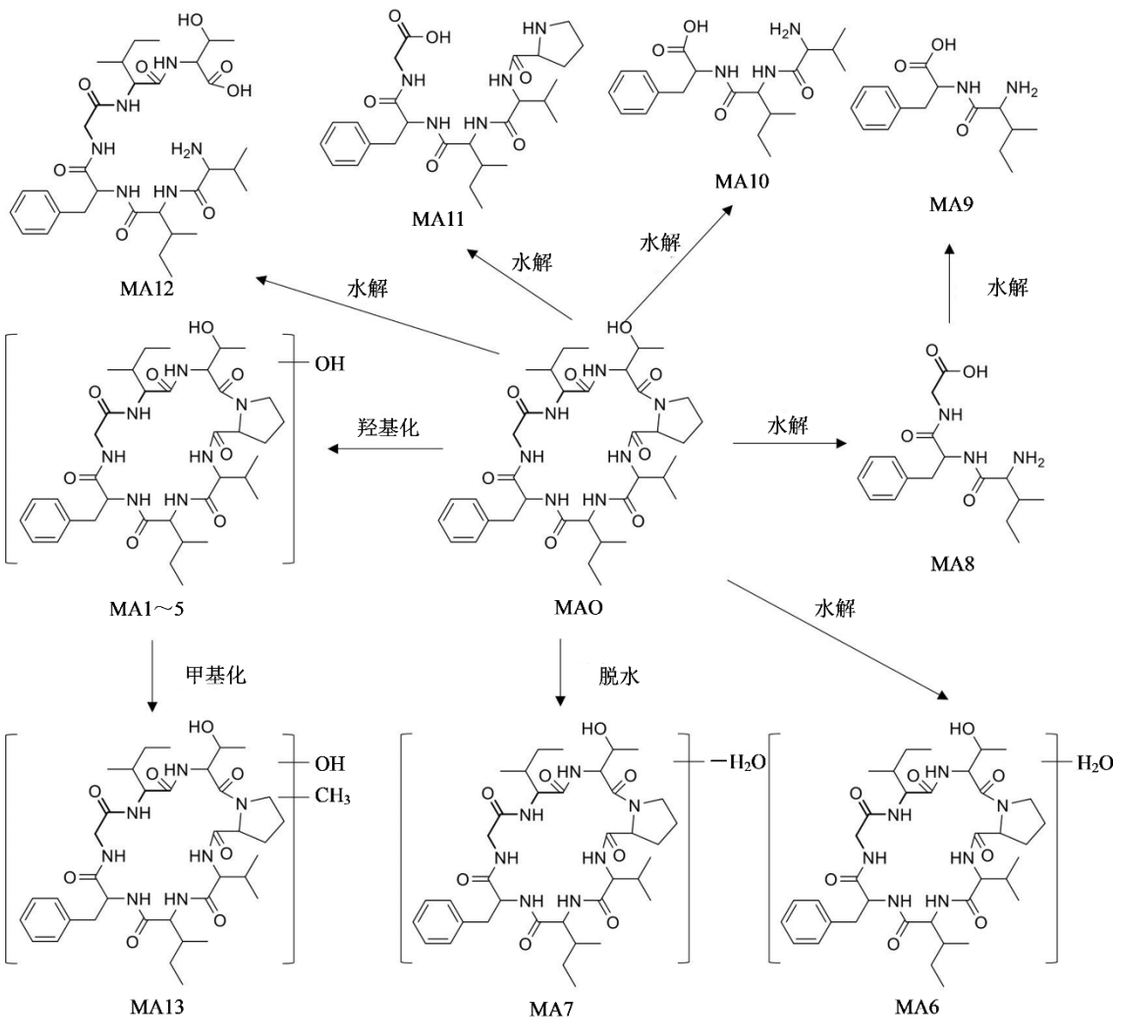


图 9　HA 在大鼠体内的代谢途径推测

Fig. 9　Hypothesized metabolic pathways of HA in rats

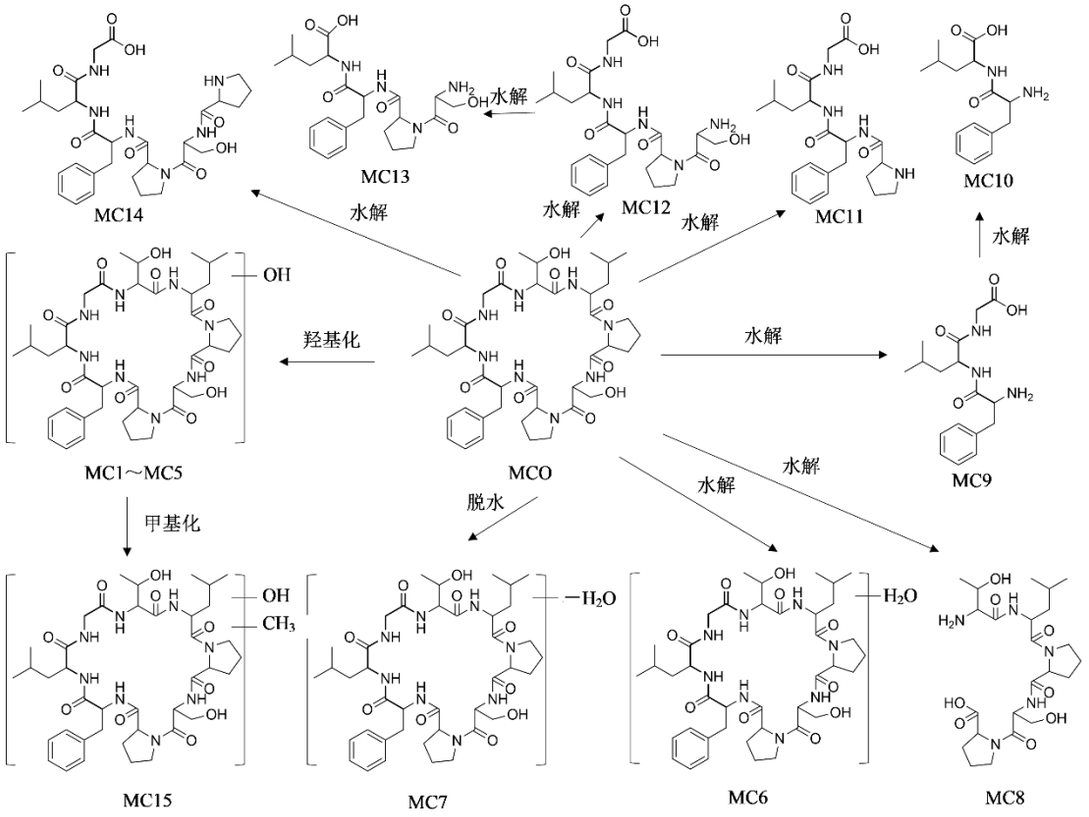


图 10　PC 在大鼠体内的代谢途径推测

Fig. 10　Hypothesized metabolic pathways of PC in rats

的精确相对分子质量及二级质谱中碎片离子裂解规律，分析环肽在大鼠体内的代谢产物及转化特征。根据环肽的入血特征，初步选取了太子参中 HA、PC 这 2 种环肽作为研究对象。后续课题组还会对其他不同结构环肽代谢产物及途径进行分析。

根据前期预试验结果，环肽类成分在乙腈中有较好的溶解性，因此选择采用乙腈为生物样本氮气吹干后复溶的溶剂。

本研究结果显示，太子参 2 种环肽 HA 和 PC 原型成分在血浆、胆汁、尿液和粪便中均有分布。但代谢物的测定结果表明 HA 和 PC 均以胆汁和粪便中的代谢产物居多，而血浆和尿液的代谢物较少，推测由于肝、肠的首关效应，大分子环肽的口服入血率可能较少[25]。HA、PC 可能主要在肝脏中进行代谢。

本研究检测到的 HA 代谢产物有 13 种，PC 代谢产物有 15 种，HA 和 PC 在大鼠体内均发生羟基化、水解、脱水、甲基化代谢反应，其中羟基化和水解的代谢物较多。HA、PC 不同环肽由于所含的氨基酸种类及结构相近，具有相似的代谢途径。其中硫酸化、葡萄糖醛酸化等常见代谢反应在这 2 种环肽中没有检测到，可能与环肽侧链上醇羟基供电子力有关[26-27]。PC 的水解代谢产物较 HA 多 2 个，可能由于组成 PC 的氨基酸数量比 HA 多。

由于中药在体内的代谢产物通常含量较低，不利于检出。本研究对同组大鼠的不同时间点生物样本进行了合并、代谢产物富集检测。初步分析了 2 种太子参环肽潜在的代谢产物。后续课题组拟加大实验动物样本量，分析不同代谢产物在给药后不同时间点的药动学规律。

中药代谢物可能在中药药效中发挥重要作用。本研究首次探讨了太子参环肽在体内的代谢产物，了解了环肽在体内的代谢机制。由于太子参环肽由多个氨基酸脱水缩合而成，结构复杂，关于太子参环肽的代谢物分析研究尚未见报道，环肽中苯丙氨酸苯环的对位取代、脯氨酸的-4-C 可能是羟基化的主要代谢位点；而不同酰胺键可能是环肽主要的水解位点[28-29]。本研究目前尚无法通过单一质谱确定 HA、PC 代谢位点，后续还会对代谢物进行分离，得到不同结构环肽代谢产物单体，并结合核磁共振、红外等方法表征其结构。此外，环肽的代谢途径可通过与人工胃液、人工肠液、肝微粒体等体外孵育的方式进行确认[19]。

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] Xiao Q, Zhao L, Jiang C, et al. Polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* modulate gut microbiota and alleviate syndrome of spleen deficiency in rats [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 20217.

[3] 倪建成, 范永飞, 叶祖云 . 太子参化学成分、药理作用和应用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1963-1977.
Ni J C, Fan Y F, Ye Z Y. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and application of *Pseudostellariae Radix* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(6): 1963-1977.

[4] Hu D J, Shakerian F, Zhao J, et al. Chemistry, pharmacology and analysis of *Pseudostellaria heterophylla*: A mini-review [J]. Chin Med, 2019, 14: 21.

[5] 侯娅, 马阳, 邹立思, 等 . 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析不同产地太子参的差异化学成分 [J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 359-366.
Hou Y, Ma Y, Zou L S, et al. Difference of chemical compositions in *Pseudostellariae Radix* from different origins by UPLC-triple TOF-MS/MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2015, 36(4): 359-366.

[6] 陈前锋, 赵筱斐, 赵邯涛, 等 . 太子参须根中环肽类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 122-126.
Chen Q F, Zhao X F, Zhao H T, et al. Chemical constituents of cyclic peptides from fibrous roots of *Pseudostellaria heterophylla* [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(1): 122-126.

[7] 龙登凯, 周涛 . 植物石竹型环肽的研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报, 2016, 38(5): 86-89.
Long D K, Zhou T. Progress in research of cyclic peptide of caryophyllaceae type [J]. J GuiZhou Univ Tradit Chin Med, 2016, 38(5): 86-89.

[8] Lu F, Yang H, Lin S D, et al. Cyclic peptide extracts derived from *Pseudostellaria heterophylla* ameliorates COPD via regulation of the TLR4/MyD88 pathway proteins [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 850.

[9] 杨晗, 阚永军, 曾洁, 等 . 太子参环肽提取物对 LQIS-COPD 大鼠动物模型的干预作用 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(1): 25-27.
Yang H, Kan Y J, Zeng J, et al. Intervention effect of cyclic peptide extract from *Pseudostellaria heterophylla* on LQIS-COPD rat model [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2019, 28(1): 25-27.

[10] Deng J H, Feng X Y, Zhou L J, et al. Heterophyllin B, a cyclopeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, improves memory via immunomodulation and neurite regeneration in i.c.v.Aβ-induced mice [J]. Food Res Int, 2022, 158: 111576.

[11] Shi W, Hao J T, Wu Y L, et al. Protective effects of heterophyllin B against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via AMPK activation [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 921: 174825.

[12] Zhao L, Yang H, Jiang C, et al. Studies on the oral absorption of cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla* and interacting with membrane receptors [J]. Fitoterapia, 2022, 156: 105072.

[13] 黄侨宗, 冯果, 苏红梅, 等 . UPLC-MS/MS 法分析太子参环肽 B 在大鼠体内的药物代谢动力学 [J]. 贵州中医药大学学报, 2022, 44(4): 15-20.
Huang Q Z, Feng G, Su H M, et al. UPLC-MS/MS analysis of pharmacokinetics of *Pseudostellaria* cyclic peptide B in rats [J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med, 2022, 44(4): 15-20.

[14] Zhao W O, Pang L, Dong N, et al. LC-ESI-MS/MS analysis and pharmacokinetics of heterophyllin B, a cyclic octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla* in rat plasma [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(11): 1693-1699.

[15] 姚金凤, 张瑞锋, 苏春梅, 等 . 几种新型合成肽的体外稳定性和酶降解机制研究 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(20): 2453-2458, 2423.
Yao J F, Zhang R F, Su C M, et al. *In vitro* stability and proteolysis mechanism of several novel synthesized peptides [J]. Chin J New Drugs, 2014, 23(20): 2453-2458, 2423.

[16] 刘春雨, 衣大龙, 杨玉亮, 等 . 牦牛骨胶原蛋白肽体外调节肠道菌群的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 59-65.
Liu C Y, Yi D L, Yang Y L, et al. Modulation effects of yak bone collagen peptides on gut microbiota *in vitro* [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(16): 59-65.

[17] Wu Q H, Kuca K. Metabolic pathway of cyclosporine A and its correlation with nephrotoxicity [J]. Curr Drug Metab, 2019, 20(2): 84-90.

[18] 柳洁, 黄海燕, 肖嘉慧, 等 . 超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间串联质谱法鉴定 α- 鹅膏毒肽在大鼠体内的代谢产物 [J]. 现代预防医学, 2018, 45(21): 3949-3955.
Liu J, Huang H Y, Xiao J H, et al. Identification of metabolites of α -amanitin in rat urine by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Mod Prev Med, 2018, 45(21): 3949-3955.

[19] 朱永乐 . 鱼精蛋白模拟肽化学稳定性及体外代谢转化研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2018.
Zhu Y L. Study on chemical stability and metabolic

transformation of protamine mimetic peptide *in vitro* [D]. Taian: Taishan Medical University, 2018.

[20] 卡地尔亚·库尔班, 王长虹, 徐楠, 等. 去氢骆驼蓬碱在大鼠体内代谢产物与代谢途径的UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 202-209.
Cartiera K B, Wang C H, Xu N, et al. Analysis on metabolites and metabolic pathways of harmine in rats by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(11): 202-209.

[21] 苑楠楠, 王宏进, 孙琪, 等. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS鉴定参芪降糖胶囊在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7358-7373.
Yuan N N, Wang H J, Sun Q, et al. Identification of metabolites of Shenqi Jiangtang Capsules in rats based on UHPLC-Q-exactive orbitrap MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(22): 7358-7373.

[22] 邓放, 刘欣, 郑振兴, 等. 5, 7-二甲氧基香豆素和6, 7-二甲氧基香豆素在大鼠体内的代谢产物鉴定与代谢途径分析 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5629-5639.
Deng F, Liu X, Zheng Z X, et al. Metabolites and metabolic pathway analysis of 5, 7-dimethoxycoumarin and 6, 7-dimethoxycoumarin in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(17): 5629-5639.

[23] 张奥, 段天华, 徐荣荣, 等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS技术的洋川芎内酯A在大鼠体内的代谢产物分析 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58(14): 1287-1294.
Zhang A, Duan T H, Xu R R, et al. Metabolite identification of senkyunolide A in rats by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin Pharm J, 2023, 58(14): 1287-1294.

[24] 何青科, 邹子爵, 易守福, 等. 高效液相色谱-高分辨质谱联合Compound Discoverer软件分析安化黑茶水溶性成分 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5283-5291.
He Q K, Zou Z J, Yi S F, et al. Analysis of water-soluble ingredients in Anhua dark tea by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry combined with Compound Discoverer software [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(13): 5283-5291.

[25] 张翠锋, 谢海棠, 潘国宇. 大分子药物的吸收、分布、代谢、排泄和毒性特征及药代模型的应用 [J]. 药学学报, 2016, 51(8): 1202-1208.
Zhang C F, Xie H T, Pan G Y. Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of biologics and its application in pharmacokinetic modeling [J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(8): 1202-1208.

[26] El-Haj B M, Ahmed S B M. Metabolic-hydroxy and carboxy functionalization of alkyl moieties in drug molecules: Prediction of structure influence and pharmacologic activity [J]. Molecules, 2020, 25(8): 1937.

[27] Duthaler U, Bachmann F, Ozbey A C, et al. The activity of members of the UDP-glucuronosyltransferase subfamilies UGT1A and UGT2B is impaired in patients with liver cirrhosis [J]. Clin Pharmacokinet, 2023, 62(8): 1141-1155.

[28] 张强, 曲媛媛, 周集体, 等. 芳香化合物羟基化酶研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(4): 540-545.
Zhang Q, Qu Y Y, Zhou J T, et al. Advances in hydroxylation of aromatic compounds with oxygenase [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2009, 15(4): 540-545.

[29] 景晓冉, 聂尧, 徐岩. 基于表达和反应耦联的羟基化酶催化合成反式-4-羟基-*L*-脯氨酸 [J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 107-116.
Jing X R, Nie Y, Xu Y. Synthesis of trans-4-hydroxy-*L*-proline by hydroxylase via coupling enzyme expression and catalytic reaction [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2020, 18(1): 107-116.

[责任编辑 兰新新]