

黄芪建中汤在大鼠胆汁中代谢产物的鉴定

王国宏¹, 贾璐², 王世伟^{1*}, 刘月涛^{2*}

1. 山西省中医药研究院(山西省中医院), 山西 太原 030012

2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 研究黄芪建中汤在正常大鼠胆汁中的代谢产物, 并归纳主要代谢途径。**方法** 采用高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Exactive MS)方法, 结合 Compound Discover 3.0 软件等技术, 系统分析黄芪建中汤在大鼠胆汁中的原型成分和代谢产物。**结果** 在大鼠体内共检出 6 个原型成分和 88 个代谢产物, 主要代谢途径为氧化、还原、脱水、乙酰化、甲基化、硫酸化、葡萄糖醛酸化、葡萄糖苷结合等。**结论** 建立的高分辨质谱方法可以分析黄芪建中汤在大鼠胆汁中的代谢产物, 初步阐明了黄芪建中汤的体内代谢特征, 为其在体内发挥疗效的药效物质基础研究提供了依据。

关键词: 黄芪建中汤; UHPLC-Q-Exactive MS; Compound Discover 3.0 软件; 代谢产物; 代谢途径

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)19-5827-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.005

Metabolites identification of Huangqi Jianzhong Decoction in rat bile

WANG Guo-hong¹, JIA Lu², WANG Shi-wei¹, LIU Yue-tao²

1. Department of Pharmacy, Shanxi Province Hospital of Traditional Chinese Medicine Taiyuan 030012, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To study the metabolites of Huangqi Jianzhong Decoction (黄芪建中汤) in the bile of normal rats by UHPLC-Q-Exactive MS, and summarize their main metabolic pathways. **Methods** In this study, UHPLC-Q-Exactive MS and Compound Discover 3.0 software was used to identify the prototype and metabolites of Huangqi Jianzhong Decoction in bile samples, and summarized their main metabolic pathways. **Results** A total of six prototypes and 88 metabolites were detected in bile. The main metabolic pathways were oxidation, reduction, dehydration, acetylation, methylation, sulfation, glucuronization, glucoside binding, etc. **Conclusion** The studies have established a high-resolution mass spectrometry method to analyze the metabolites of Huangqi Jianzhong Decoction in bile, preliminarily clarify the metabolism characteristics of Huangqi Jianzhong Decoction, and provide the basis for the study of the pharmacodynamic substance *in vivo*.

Key words: Huangqi Jianzhong Decoction; UHPLC-Q-Exactive MS; Compound Discover 3.0 software; metabolites; metabolic pathways

黄芪建中汤出自《金匮要略》,是由黄芪、饴糖、炙甘草、白芍、桂枝、大枣和生姜 7 味药材组成,用于治疗虚寒性胃痛,临床多用于治疗胃肠道疾病,其药效成分经体内过程最终发挥药效^[1-6]。血浆中的药物及其代谢产物的含量较少且处于动态变化中,在收集过程中可能会造成某些成分的丢失,胆汁中的代谢产物易富集,可逆向鉴定被吸收的化学成分,可补充血浆代谢产物分析的不足,获得较完整的药物体内代谢信息,且目前,尚未发现有黄芪建中汤

在大鼠胆汁中代谢产物研究。所以本研究对给药后的正常大鼠胆汁代谢物进行表征,并解析其在体内的代谢过程。

本研究选择具有良好的数据采集能力的 UHPLC-Q-Exactive MS 对口服黄芪建中汤大鼠的胆汁代谢物进行表征。UHPLC-Q-Exactive MS 技术是一种快速、灵敏、高通量、高准确度的分析技术,已广泛应用于中药原型及代谢物的鉴定。UHPLC 为中药分析提供了高分辨率、高灵敏度和快速分离

收稿日期: 2021-02-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81703697); 山西中医药大学科技创新能力培育计划项目(2019PY-136)

作者简介: 王国宏, 主管药师, 主要从事临床药学研究。E-mail: wgh1258@sina.com

*通信作者: 刘月涛, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中医药代谢组学研究。E-mail: yuetaoliu@sxu.edu.cn

王世伟, 硕士, 教授, 主要从事中药质量评控及中药药事管理。E-mail: 281699773@qq.com

的手段,特别是 Q-Exactive MS 可以帮助快速获得准确的质量信息。Compound Discover 3.0 是 UHPLC-Q-Exactive MS 配置的用于检测和鉴定代谢物的软件,可自动处理 UHPLC-MS 数据集,以搜索目标和非目标代谢物。使用“Metabolism w Stats Expected w FISH Scoring and Background Removal”模块可快速识别胆汁中的原型和代谢物,本研究所建立的方法初步阐明了黄芪建中汤的体内代谢特征,为其在体内发挥疗效的药效物质基础研究提供了依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

UHPLC-Q-Exactive MS 四级杆静电场轨道阱高分辨质谱(美国 Thermo 公司),KQ-300E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利仪器有限公司);Milli-Q Integral Water Purification System(美国 millipore 公司)甲酸和乙腈为质谱纯(美国 Thermo 公司),甲醇为分析纯。

1.2 动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体质量(200 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK(京)2016-0006,实验动物根据山西大学动物实验指南(批准号 SXULL 20180052),在无特定病原体的条件下进行饲养。

1.3 药材

实验所需桂枝、白芍和炙甘草药材购自北京同仁堂药业有限公司,黄芪采摘于山西省浑源县,生姜和大枣于本地市场采购,分别由山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥嫩枝,炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根的炮制品,生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎,大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus Jujuba* Mill 的成熟果实。饴糖购于景春天力生物科技有限公司(中国湖北黄冈)。

2 方法

2.1 黄芪建中汤的制备

称取黄芪(9 g)、桂枝(9 g)、白芍(18 g)、炙甘草(6 g)、生姜(9 g)和大枣 4 枚,混合药材,加 10 倍水量,浸泡 2 h 后加热回流提取 2 h,收集

滤液,残渣加 8 倍量水,继续回流提取 2 h,滤过,合并 2 次滤液并加入饴糖,进行减压浓缩,质量分数为 36.8 g/kg。

2.2 动物处理及生物样品采集

实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水。将大鼠分为 2 组,空白组($n=6$)和给药组($n=6$)。空白组 ig 蒸馏水,实验组 ig 给予黄芪建中汤,早晚各给药 1 次,连续给药 3 d。最后 1 次给药后,进行大鼠胆管插管手术,收集 ig 给药后 0~6 h 的胆汁。

2.3 生物样品前处理

使用 Alltech C₁₈ 固相萃取(SPE)柱(500 mg/6.0 mL)制备。首先,用 3 mL 甲醇活化 SPE 柱,用 3 mL 蒸馏水洗涤。将 1 mL 胆汁样品上样,用 6 mL 蒸馏水冲洗,然后用 6 mL 70%甲醇洗脱。收集洗脱液并在 37 °C 下用氮气吹干,用 200 μ L 甲醇复溶,13 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液进行分析。

2.4 色谱和质谱条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 柱,进样量 1 μ L,柱温 30 °C,体积流量 0.25 mL/min,流动相为 0.1%甲酸水(A)和乙腈(B)。梯度洗脱:0~3 min, 1%B; 3~13 min, 1%~20%B; 13~15 min, 20%~25%B; 15~18 min, 25%~30%B; 18~20 min, 30%~40%B; 20~23 min, 40%~60%B; 23~25 min, 60%~99%B。

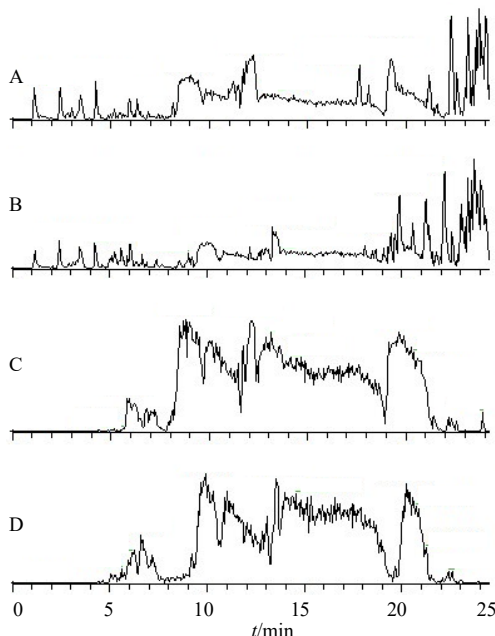
2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源,扫描方式为正、负离子模式扫描,正、负电喷雾电压为 3.5 kV(+), 2.5 kV(-),扫描质量范围为 m/z 50~1500,鞘气气体体积:241.316 kPa(35 psi),辅助体积:68.948 kPa(10 psi),毛细管温度 275 °C,透镜电压 55 kPa,质量分辨率:140 000。数据分析使用 Compound Discover 3.0 软件和 Xcalibur 2.3 软件。

3 结果

3.1 大鼠给药胆汁 UHPLC-Q-Exactive MS 分析

使用 Compound Discover 3.0 软件对口服黄芪建中汤后获得的胆汁原始质谱数据进行处理。选择“Metabolism w Stats Expected w FISH Scoring and Background Removal”模块,可以快速找到和识别预期的代谢产物,应用 FISH 评分自动注释碎片离子结构和背景去除空白(使用空白文件);执行保留时间校准,检测预期的代谢产物、脱烷基和脱烷基产物以及具有分辨率感知同位素模式匹配的生物转化产物,并对所有样品中的预期化合物进行分组。根

据所得代谢产物的色谱保留时间、计算公式以及分子离子和片段离子的信息,推导出代谢产物的分子式和结构。通过 Xcalibur 2.3 软件得到空白胆汁和给药胆汁的图谱,利用 Xcalibur 2.3 软件在原始质谱数据中提取二级碎片,对 Compound Discover 3.0 软件计算的代谢物根据裂解规律进行逐一验证。胆汁中鉴定了 94 个成分,包括 6 个原型成分和 88 个代谢产物,图谱见图 1。



A-正离子模式下空白胆汁样品图谱 B-正离子模式下给药后胆汁样品图谱 C-负离子模式下空白胆汁样品图谱 D-负离子模式下给药后胆汁样品图谱

A-The spectrum of blank bile sample in positive ion mode B-The spectrum of bile sample after administration in positive ion mode C-The spectrum of blank bile sample in negative ion mode D-The spectrum of bile sample after administration in negative ion mode.

图 1 胆汁样本的质谱总离子流图

Fig. 1 Mass spectrum total ion chromatogram of bile sample

3.1.1 黄芪建中汤在大鼠胆汁中原型成分鉴定分析
根据准确相对分子质量和 MS² 碎片信息与文献、

PubChem 和 HMDB 等数据库比对,在胆汁样本中共鉴定出 6 个原型成分,包括芍药内脂苷(P1)、芍药苷(P2)、芒柄花素(P3)、芒柄花苷(P4)、甘草皂苷 H2(P5)、甘草酸(P6)。这些成分主要来源于黄芪、炙甘草和白芍^[7-11]。

以 P1 为例说明识别原型成分的过程。在正离子模式下检测到分子离子峰 m/z 481.171 0,除此之外, m/z 319.117 5、 m/z 197.080 8 和 m/z 133.064 8 等裂解离子符合 PubChem 数据中的芍药内酯苷质谱碎片信息结果见图 2。所有其他原型成分的碎片信息见表 1。

3.1.2 黄芪建中汤在大鼠胆汁中的代谢物鉴定分析
将胆汁样本的原始质谱数据和黄芪建中汤原型成分的化学结构式导入 Compound Discover 3.0 软件进行计算,得到保留时间、相对分子质量、化学式、质量误差和软件推测的代谢反应等结果,在原始质谱数据中提取二级碎片,根据碎片裂解规律逐个验证,共鉴定出 88 种代谢产物。这些代谢物按种类可分为 3 类:(1)黄酮类物质代谢产物;(2)苷类物质代谢产物;(3)酚类物质代谢产物。以下是一些代表性代谢产物的详细代谢过程,其他代谢产物的代谢信息见表 2。

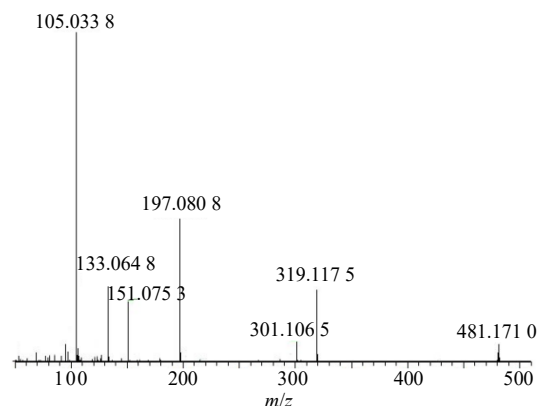


图 2 芍药内酯苷的二级质谱图

Fig. 2 Albiflorin secondary mass spectrum

表 1 胆汁中黄芪建中汤的原型成分

Table 1 Prototype components of Huangqi Jianzhong Decoction in bile

序号	t_R/min	原型成分	离子模式	离子碎片	参考文献
P1	6.21	芍药内酯苷	正	481.171 0, 319.117 5, 197.080 8	8
P2	6.26	芍药苷	负	503.152 3, 341.098 6, 219.062 9	8
P3	6.37	芒柄花苷	负	429.197 0, 267.085 9, 253.050 8	8,9
P4	9.62	芒柄花素	正	269.080 7, 254.057 2, 237.054 6, 226.062 3, 213.090 7	7,8
P5	21.68	甘草皂苷 H2	负	821.397 2, 645.369 9, 351.057 2	8
P6	23.04	甘草酸	正	823.410 3, 647.378 6, 453.335 9	12

表 2 黄芪建中汤在大鼠胆汁中的代谢产物

Table 2 Metabolites of Huangqi Jianzhong Decoction in rat bile

编号	t_R/min	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	原型成分	代谢过程
				理论值	实测值				
M1	5.67	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.084 8	447.084 6	-0.19	285.075 6, 270.051 9, 253.049 5, 243.064 5, 185.133 4, 161.066 0, 145.101 7	毛蕊异黄酮苷	葡萄糖醛酸结合
M2	5.83	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	315.078 9	315.085 9	-0.52	300.062 4, 283.060 0, 255.064 9, 243.064 9, 163.075 3, 123.044 0	毛蕊异黄酮苷	氧化、甲基化
M3	8.01	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.084 8	447.091 8	-0.26	271.060 0, 253.049 7, 243.064 9, 145.028 3,	毛蕊异黄酮苷	葡萄糖醛酸结合
M4	8.98	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	461.100 6	461.106 6	0.09	285.075 6, 270.052 0, 253.049 4, 225.054 2, 137.023 3	毛蕊异黄酮苷	葡萄糖醛酸结合
M5	9.48	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.073 4	269.080 7	-0.55	254.056 9, 237.054 2, 198.061 8, 154.062 6	毛蕊异黄酮苷	脱水、还原
M6	10.35	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	317.094 8	317.101 7	0.27	299.090 9, 284.066 4, 257.078 7, 243.101 0, 163.038 8, 123.044 1	毛蕊异黄酮苷	水合、甲基化
M7	12.13	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	445.105 8	445.112 5	0.26	269.080 7, 254.051 7, 213.090 5, 154.022 5, 125.158 7	毛蕊异黄酮苷	脱水、糖苷结合
M8	13.24	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.106 0	433.112 6	0.83	257.080 6, 242.057 0, 163.038 8, 137.023 3	毛蕊异黄酮苷	糖苷结合
M9	8.22	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.025 4	365.032 5	0.41	285.075 5, 270.051 5, 253.049 8, 225.054 4, 173.132 5, 123.080 7	毛蕊异黄酮	硫酸化
M10	12.13	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	445.105 8	445.112 5	0.26	269.080 7, 254.057 1, 237.054 0, 213.090 5, 137.023 1, 124.158 7	毛蕊异黄酮	去饱和、葡萄糖苷结合
M11	12.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.072 8	269.080 7	-2.70	254.056 9, 237.054 1, 213.090 5, 154.025 8	毛蕊异黄酮	脱水、还原
M12	17.15	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	445.121 0	445.114 4	-0.70	269.082 2, 254.058 5, 239.035 3, 175.024 3,	毛蕊异黄酮	糖苷结合
M13	6.55	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	365.040 8	365.033 8	-0.34	285.077 0, 270.053 1, 253.050 9, 137.436 5	芒柄花苷	水化、硫酸化
M14	7.90	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	365.040 9	365.034 0	0	285.077 1, 270.053 6, 255.030 3, 226.063 2, 137.024 2	芒柄花苷	水化、硫酸化
M15	8.98	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+ /$ $[\text{M}-\text{H}]^-$	461.100 6/ 459.100 5	461.107 8/ 459.093 8	0.09/-0.12	285.075 6, 269.044 2, 253.049 4, 225.045 2, 137.023 3/283.061 3, 268.037 9, 224.047 9, 175.024 4	芒柄花苷	氧化、葡萄糖醛酸结合
M16	9.48	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.073 4	269.080 7	-0.55	254.056 9, 237.054 2, 226.062 2, 213.090 7, 197.059 1, 154.026 2, 137.023 3	芒柄花苷	脱水、还原
M17	9.50	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	347.030 2	347.023 3	-0.51	267.066 4, 252.042 8, 223.036 9, 135.008 4	芒柄花苷	硫酸化
M18	12.13	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	445.105 8	445.112 5	0.26	2 269.080 7, 254.057 1, 213.090 5, 154.022 5	芒柄花苷	葡萄糖醛酸结合
M19	13.24	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.105 7	433.112 6	0.05	257.080 6, 239.070 6, 211.074 9, 147.044 0, 137.023 3	芒柄花苷	氧化、糖苷结合
M20	14.83	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.099 6	301.106 8	-0.59	286.084 4, 269.080 3, 241.085 3, 226.063 3, 163.038 6, 123.044 1	芒柄花苷	水合、甲基化
M21	5.53	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.084 8	447.128 3	-0.19	285.075 5, 270.051 8, 253.049 3, 225.054 4, 137.023 2	芒柄花素	氧化、葡萄糖醛酸结合
M22	6.35	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	461.100 8	461.106 8	0.42	285.075 7, 270.052 0, 253.049 2, 225.054 4, 137.023 4	芒柄花素	氧化、葡萄糖醛酸结合
M23	6.39	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	431.090 1	431.097 0	0.32	255.065 1, 237.084 6, 227.068 9, 137.023 3	芒柄花素	去饱和、葡萄糖苷结合
M24	6.71	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	463.116 2	463.123 1	0.04	287.091 1, 269.080 6, 245.080 7, 227.070 0, 137.023 1	芒柄花素	水合、葡萄糖醛酸结合

续表 2

编号	t_R/min	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	原型成分	代谢过程
				理论值	实测值				
M25	7.94	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.099 8	301.107 5	-0.08	283.153 4, 269.080 0, 255.141 1, 237.147 9, 226.062 6, 213.090 4, 137.066 7	芒柄花素	水合、甲基化
M26	8.56	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.132 0	463.124 6	0.37	287.092 8, 271.063 1, 255.079 7, 175.024 3, 137.023 8	芒柄花素	水合、糖苷结合
M27	8.98	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	461.100 6	461.106 6	0.09	285.075 6, 270.052 0, 253.049 4, 225.054 2, 137.023 3	芒柄花素	氧化、葡萄糖醛酸结合
M28	12.13	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	445.105 8	445.112 5	0.26	269.080 7, 254.057 1, 237.054 0, 226.062 20, 213.090 5, 137.023 1	芒柄花素	葡萄糖醛酸结合
M29	12.18	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	431.126 5	431.133 6	0.23	269.080 7, 254.056 8, 237.054 6, 226.062 5, 154.025 2, 137.023 4	芒柄花素	糖苷结合
M30	14.83	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.099 6	301.106 8	-0.59	269.080 3, 255.112 1, 237.055 2, 123.044 1	芒柄花素	水合、甲基化
M31	5.56	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{13}\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	511.062 4	511.055 3	-0.14	431.100 3, 335.023 3, 283.366 1, 255.066 3,	芹菜素-hex	硫酸化
M32	6.60	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{14}\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	529.072 8	529.065 8	-0.49	449.108 8, 273.077 1, 255.081 2, 175.024 2, 149.059 9	芹菜素-hex	水化、硫酸化
M33	7.50	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{13}\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$ / $[\text{M}+\text{H}]^+$	511.062 5/ 513.062 6	511.055 5/ 513.068 8	0.1/0.17	431.098 7, 335.024 3, 255.066 2, 175.022 4, 149.023 1/433.113 0, 337.037 4, 257.080 6, 239.070 1, 211.074 9	芹菜素-hex	硫酸化
M34	14.70	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	475.131 8	475.125 0	-0.22	351.242 6, 284.069 2, 269.045 7, 241.051 2, 175.024 3, 113.023 6	芹菜素-HEX	还原、乙酰化
M35	6.25	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	319.110 4	319.115 4	0.10	301.105 3, 197.080 9, 179.070 2, 151.075 3, 121.065 0	紫檀烷	水合作用
M36	6.36	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	461.100 8	461.106 8	0.42	309.077 5, 285.075 7, 253.049 2, 225.054 4, 213.055 7, 137.023 4,	紫檀烷	去饱和、葡萄糖醛酸结合
M37	8.20	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	363.025 5	363.018 5	0.49	283.064 1, 286.037 6, 239.064 9, 211.040 0, 175.024 3, 113.024 5	紫檀烷	脱水、硫酸化
M38	9.48	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.073 4	269.080 69	-0.55	253.049 2, 237.054 2, 213.090 7, 137.023 3,	紫檀烷	脱水、甲基化
M39	9.67	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	491.110 9	491.118 20	-0.55	315.086 0, 300.062 6, 283.059 8, 255.064 8, 212.046 2, 141.017 9,	紫檀烷	去饱和、氧化、葡萄糖酸
M40	12.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.072 8	269.080 7	-2.70	253.048 9, 237.054 2, 213.095, 197.059 8, 137.023 3, 95.085 8	紫檀烷	脱水、甲基化
M41	12.43	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	475.116 2	475.123 3	0.04	299.091 3, 284.067 7, 267.065 4, 211.075 0, 137.059 2	紫檀烷	脱水、葡萄糖醛酸结合
M42	14.82	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	477.131 9	477.140 6	-0.02	301.106 8, 269.080 7, 167.070 2, 163.038 8, 139.075 4, 95.049 5	紫檀烷	葡萄糖醛酸结合
M43	19.39	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	477.131 8	477.137 8	-0.15	301.106 9, 283.096 9, 256.589 4, 179.070 2, 165.054 6, 137.059 7	紫檀烷	葡萄糖醛酸结合
M44	6.26	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	481.171 0	481.171 0	0.32	301.106 5, 286.150 5, 179.070 2, 133.064 8, 109.028 5	异黄烷	糖苷结合
M45	13.29	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	567.291 4	567.298 6	0.16	487.342 6, 469.331 8, 451.320 8, 423.326 9, 376.376 8, 315.126 5	黄芩甲苷 IV	去饱和、硫酸化
M46	19.39	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	485.318 7	485.326 7	-0.40	467.316 0, 455.314 0, 437.304 4,	黄芩甲苷 IV	去饱和、去饱和

续表 2

编号	t_R/min	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	原型成分	代谢过程
				理论值	实测值				
M47	4.64	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{15}\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	575.114 5	575.108 0	-0.65	495.151 2, 465.142 5, 333.100 0, 195.065 6, 137.023 7	没食子酰芍药苷	硫酸化
M48	20.09	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	469.324 1	469.334 1	0.39	451.325 5, 433.312 3, 353.249 0, 177.146 2	甘草酸	
M49	21.51	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	663.367 3	663.373 4	1.03	487.341 7, 469.330 1, 451.332 0, 423.324 3, 405.315 5, 317.211 0, 159.117 0	甘草酸	水合、葡萄糖醛酸结合
M50	21.69	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	453.328 9	453.337 8	-0.38	435.325 3, 407.332 6, 369.649 3, 235.169 3, 199.147 6, 159.116 9	甘草酸	脱水
M51	22.33	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	487.334 5	487.341 8	-0.01	469.331 5, 423.326 9, 357.280 0, 195.116 8	甘草酸	水合作用
M52	22.84	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	487.334 4	487.342 7	-0.20	469.333 3, 451.332 5, 443.309 0, 405.319 1, 177.163 1	甘草酸	水合作用
M53	22.98	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	647.372 3	647.378 6	0.93	471.346 9, 53.335 3, 425.352 3, 407.331 1, 235.168 7, 159.116 3	甘草酸	脱水、还原
M54	4.62	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	271.090 1	271.097 3	3.19	257.074 6, 239.104 9, 227.043 2, 162.022 0, 137.058 8	异甘草苷	甲基化
M55	5.54	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	255.057 8	255.065	-0.42	238.107 2, 227.069 7, 145.028 2, 137.023 3	异甘草苷	去饱和
M56	6.60	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.046 0	337.039 1	-0.06	257.082 0, 239.071 4, 163.039 5, 137.023 6	异甘草苷	还原、硫酸化
M57	9.48	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.073 4	269.080 7	-0.55	254.056 9, 237.542, 226.062 2, 213.090 7, 154.026 2, 137.023 3	异甘草苷	去饱和、甲基化
M58	12.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.072 8	269.080 7	-2.70	254.056 9, 237.542, 226.062 2, 213.090 5, 154.025 8, 137.023 3	异甘草苷	去饱和、甲基化
M59	5.01	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.046 0	337.038 9	-0.06	257.082 0, 239.071 2, 137.023 7	芹糖甘草苷	还原、硫酸化
M60	6.59	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.046 0	337.039 1	-0.06	257.082 0, 239.071 4, 163.039 5, 137.023 6	芹糖甘草苷	还原、硫酸化
M61	8.26	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	257.073 5	257.080 6	-0.10	239.069 6, 137.023 3, 123.044 2	芹糖甘草苷	脱水、还原
M62	8.29	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	495.068 0	495.060 67	0.81	415.103 8, 325.108 5, 257.082 0, 151.039 5, 115.002 9	芹糖甘草苷	硫酸化
M63	9.67	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	315.078 5	315.085 7	-1.87	269.190 4, 255.064 8, 226.061 9, 123.043 9	芹糖甘草苷	乙酰化
M64	10.35	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	317.094 8	317.101 7	0.27	299.090 9, 257.078 7, 229.085 4, 179.069 9, 123.044 1	芹糖甘草苷	水合作用, 乙酰化
M65	12.23	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	419.126 4	419.131 2	0.02	257.080 7, 239.070 3, 225.148 0, 137.023 3	芹糖甘草苷	糖苷结合
M66	14.68	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.099 6	301.106 7	-0.59	255.113 0, 243.065 3, 226.062 0, 179.069 9, 134.036 3	芹糖甘草苷	还原、乙酰化
M67	21.00	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.073 6	269.080 7	0.02	257.057 0, 237.054 0, 226.062 2, 137.023 1	芹糖甘草苷	去饱和、甲基化
M68	5.01	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.046 0	337.038 9	-0.06	257.082 8, 239.071 2, 175.482 1, 133.028 8	甘草素-7,4'-二葡萄糖苷	还原、硫酸化
M69	5.20	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	495.067 5	495.060 6	-0.12	415.103 8, 252.042 8, 223.049 7, 132.021 1	甘草素-7,4'-二葡萄糖苷	去饱和、硫酸化
M70	6.39	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	431.090 1	431.097	0.32	255.065 1, 237.184 6, 227.069 8, 137.023 3	甘草素-7,4'-二葡萄糖苷	去饱和、葡萄糖醛酸结合
M71	6.59	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.046 0	337.039 1	-0.06	257.082 0, 239.071 4, 137.023 6	甘草素-7,4'-二葡萄糖苷	还原、硫酸化

续表 2

编号	t_R/min	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	原型成分	代谢过程
				理论值	实测值				
M72	7.43	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.105 6	433.113 3	-0.23	257.080 7, 239.070 1, 137.023 3	甘草素-7,4'-二葡萄糖醛酸结合 葡萄糖苷	
M73	8.60	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	351.025 3	351.018 1	-0.10	271.064 1, 253.050 2, 227.021 0, 135.044 5	甘草素-7,4'-二葡萄糖氧化、硫酸化 葡萄糖苷	
M74	9.28	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.040 9	353.033 8	-0.09	273.077 0, 255.066 6, 163.039 8, 135.044 5	甘草素-7,4'-二葡萄糖水化、硫酸化 葡萄糖苷	
M75	9.46	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	335.030 2	335.023 4	-0.44	255.066 4, 153.018 7, 135.008 0	甘草素-7,4'-二葡萄糖硫酸化 葡萄糖苷	
M76	12.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.072 8	269.080 7	-2.70	254.056 9, 237.054 2, 133.064 8	甘草素-7,4'-二葡萄糖去饱和、甲基化 葡萄糖苷	
M77	20.04	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	503.329 1	503.336 8	-0.64	486.267 0, 439.319 4, 189.163 7, 177.164 0,	甘草皂苷 G2	水合, 甲基化
M78	20.94	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	663.366 7	663.373 7	0.11	487.341 8, 469.333 4, 189.163 9, 177.164 1, 159.113 7	甘草皂苷 G2	还原、甲基化
M79	22.10	$\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	661.351 1	661.358 4	0.24	550.884 5, 486.328 8, 467.315 4, 189.163 9, 177.162 7, 159.116 6	甘草皂苷 G2	还原、甲基化
M80	22.33	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	487.334 5	487.341 8	-0.01	469.331 5, 451.321 7, 189.163 6, 171.164 4, 159.116 6	甘草皂苷 G2	还原、甲基化
M81	22.56	$\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	633.356 2	633.362 9	0.22	439.321 2, 189.163 6, 177.163 6, 159.116 7, 141.017 5	甘草皂苷 G2	糖苷结合
M82	20.56	$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	529.126 8	529.130 3	0.08	353.101 8, 338.070 1, 283.060 5, 271.058 9, 243.064 9	甘草宁 C	去饱和、葡萄糖醛酸 结合
M83	21.43	$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	529.126 7	529.133 5	-0.15	353.101 7, 325.077 1, 309.096 9, 297.079 6	甘草宁 C	去饱和、葡萄糖醛酸 结合
M84	21.45	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	431.051 7	431.044 6	0.34	351.087 8, 335.056 5, 323.092 2, 309.077 7, 255.103 1, 241.086 7	甘草宁 C	去饱和、硫酸化
M85	8.22	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	453.202 4	453.212 9	-4.97	277.179 2, 199.020 9, 137.060 1	6-姜烯酚	葡萄糖醛酸结合
M86	10.92	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	335.177 8	335.236 5	-0.72	317.226 5, 277.195 3, 199.148 3, 137.090 1, 117.069 9	6-姜烯酚	氧化、乙酰化
M87	18.08	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	295.183 1	295.205 9	-0.06	137.059 8, 115.112 3, 99.080 8	6-姜烯酚	水合作用
M88	22.98	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	275.156 8	275.162 7	-0.39	243.133 7, 215.142 8, 199.111 2, 147.080 4, 135.084, 117.010 2	6-姜烯酚	去饱和

(1) 黄酮类物质代谢产物: 黄酮类物质在体内多以葡萄糖醛酸、硫酸以及甲基结合产物的形式存在。研究发现芒柄花苷和芒柄花素在胆汁中发生了水合、脱水、氧化、硫酸化、甲基化、葡萄糖苷结合、葡萄糖醛酸结合反应。

M21: 将芒柄花素的结构式导入 Compound Discover 3.0 软件, 在 5.53 min 处提取到为 m/z 447.128 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的分子离子峰, m/z 285.075 5 是 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 减少 192 ($176+16$); 其他特征碎片为 m/z

270.051 8、253.049 3、225.054 4、137.023 2 与毛蕊异黄酮的特征碎片相似, 已有文献报道芒柄花素与毛蕊异黄酮在体内会发生相互转化^[12], 因此推测 M21 是芒柄花素在体内转化为毛蕊异黄酮后反生葡萄糖醛酸结合反应的结果。

M31: 芹菜素-hex 在体内易发生水合、还原、乙酰化和硫酸化。在 5.56 min 处提取到为 m/z 511.055 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的分子离子峰, m/z 431.100 3 是 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 减少 80(SO_3), 其他特征碎片为 m/z 335.023 3、

283.366 1、255.066 3, 与芹菜素-hex 的碎片相同, 因此, 推测 M31 为芹菜素-hex 在体内发生了硫酸化反应形成的代谢物。

M54: 异甘草苷在体内易发生水合、脱水、氧化、去饱和、硫酸化、甲基化、乙酰化和葡萄糖苷结合反应。M54 的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 271.097 3, 分子式为 $C_{16}H_{14}O_4$, 是异甘草苷在体内产生的 1 个代谢产物, 与异甘草苷相差 148 ($C_5H_8O_5$), m/z 257.074 6 是 $[M+H]^+$ 减少 14 (CH_2), 其他特征碎片为 m/z 239.104 9、227.043 2、162.022 0、137.058 8, 与异甘草苷的碎片相同。因此, 推测 M54 为异甘草苷先在体内脱去 1 个 $C_5H_8O_5$ 基团后发生甲基化反应形成。

(2) 苷类物质代谢产物: 由于苷类结合了糖分子极性增大, 因此较苷元更易吸收, 进入体内后, 在胃肠道中转化为苷元而发挥药效。

M45: 黄芪皂苷 IV 在体内代谢过程中易发生去饱和和硫酸化反应。在 13.29 min 处提取到为 m/z 567.298 6 ($[M+H]^+$) 的分子离子峰, 与黄芪皂苷 IV 相差 218 ($C_{11}H_{22}O_6$), m/z 487.342 6 是 $[M+H]^+$ 减少 80 (SO_3), 其他特征碎片为 m/z 469.331 8、451.320 8、423.326 9、376.376 8、315.126 5, 与黄芪皂苷 IV 碎片相同。因此, 推测 M45 为黄芪皂苷 IV 先在体内脱去 1 个 $C_{11}H_{22}O_6$ 基团后发生硫酸化反应形成。

M47: 没食子酰芍药苷在体内易发生硫酸化反应。的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 575.108, 分子式为 $C_{23}H_{28}O_{15}S$, 是没食子酰芍药苷在体内产生的一个代谢物, 与没食子酰芍药苷相差 88 (C_7H_4), m/z 495.151 2 是 $[M-H]^-$ 减少 80 (SO_3), 其他特征碎片为 m/z 465.142 5、333.100 0、195.065 6、137.023 7, 与没食子酰芍药苷的碎片相同。因此, 推测 M47 为没食子酰芍药苷在体内先脱去 1 个 C_7H_4 基团再发生硫酸化反应形成。

M59: 芹糖甘草苷在体内易发生还原、脱水、硫酸化、甲基化、乙酰化、水合作用、与糖苷结合反应。M59 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 337.038 9, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_7S$, 是芹糖甘草苷在体内产生的 1 个代谢产物, 与芹糖甘草苷相差 213, m/z 257.082 0 是 $[M-H]^-$ 减少 80 (SO_3), 其他特征碎片为 m/z 239.071 2、137.023 7, 与芹糖甘草苷碎片相同。因此, 推测 M59 为芹糖甘草苷现在体内脱去 1 个 $C_{11}H_{16}O_6$ 基团后发生还原和硫酸化反应形成。

(3) 酚类物质代谢产物: 6-姜烯酚体内易发生氧化、水合、去饱和、乙酰化和葡萄糖醛酸结合反应。M85 是将 6-姜烯酚的结构式导入 Compound Discover 3.0 软件得到的其中 1 个代谢产物, 可在 8.22 min 处提取到为 m/z 453.212 9 $[M+H]^+$ 的分子离子峰, 与 6-姜烯酚相差 177 ($C_6H_8O_6$), 其他特征碎片为 m/z 277.179 2、199.020 9、137.060 1, 与 6-姜烯酚的碎片相同。因此, 推测 M85 为 6-姜烯酚在体内与葡萄糖醛酸结合形成。

3.2 黄芪建中汤在大鼠胆汁中可能的代谢途径

黄芪建中汤在体内的代谢反应包括氧化、水合、脱水、甲基化、乙酰化、硫酸化和葡萄糖苷缀合等反应。当药物进入肝脏以后, 其代谢分为 2 个阶段: I 相反应和 II 相反应。第 1 阶段为氧化、还原及水解反应, 产生一系列肝细胞毒性产物, 主要包括亲电子基和氧自由基, 也称作 I 相反应。第 2 阶段为结合反应, 即药物解毒过程, 也称作 II 相反应。其中, II 相反应在所有反应中占很大比例, 并且 I 相反应的发生一般是与体内的 II 相酶代谢相关。通过 II 相酶代谢的药物中, 其中大约 35% 是通过葡萄糖醛酸转移酶代谢产生的。葡萄糖醛酸结合反应就是在葡萄糖醛酸转移酶催化下与羟基等易连接的基团相结合后分泌到胆汁和尿液排出体外。此外比较常见的化学反应还有硫酸化反应和甲基化反应, 硫酸化反应是药物与转磺酶的同工酶催化下发生硫酸化反应, 它形成了极性较弱的产物, 在体内停留时间较长, 阻碍了药物的清除。甲基化反应是有机化合物分子中的氢被甲基取代, 结果也会产生极性较弱的代谢物, 阻碍药物的清除。由此可以知晓, I 相反应使药物产生或去掉 1 个基团, 从而促使 II 相反应得以发生。

4 讨论

本实验分别采用正离子模式、负离子模式对胆汁样品进行检测, 胆汁中鉴定了 94 个成分, 包括 6 个原型和 88 个代谢物, 其中 I 相反应主要为氧化还原等反应, II 相反应主要为甲基化、乙酰化、硫酸化和葡萄糖醛酸结合等反应。其中仅鉴定出 3 味药的原型成分, 其他原型成分在体内多以其代谢物形式出现, 与前期血浆中代谢物比较发现^[13], 血浆中 II 相反应主要为甲基化、乙酰化和硫酸化反应相对降低了代谢物的极性使其更容易穿过生物膜被组织吸收。胆汁中 II 相反应主要为葡萄糖结合和葡萄糖醛酸结合反应相对增加了代谢物极性更易排出体外。

UHPLC-Q-Exactive MS 和 Compound Discover

3.0 软件技术相结合可以快速、高通量的对中药及复方的原型及代谢物进行鉴定^[12]。本研究建立了UHPLC-Q-Exactive MS 对大鼠胆汁的检测,具有扫描质量范围广和灵敏度高特点,并结合超高压液相的优良的分析能力可在 25 min 内完成胆汁这类复杂生物样品中的黄芪建中汤的代谢轮廓分析。此法可对检测样品色谱信息进行全采集,且各色谱峰分离较好,为后期分析处理海量的代谢数据奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 许济群, 王锦之. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 80.
- [2] Liu Y T, Cui J J, Hu Y H, *et al.* Integrating untargeted metabolomics, partial least square regression analysis and MetPA to explore the targeted pathways involved into Huangqi Jianzhong Tang against chronic atrophic gastritis rats [J]. *Chemom Intell Lab Syst*, 2017, 164: 16-25.
- [3] Liu W G, Jiang S H, Wang Q, *et al.* Effects of Huangqi Jianzhong Decoction on the digestive system of rat with chronic atrophic gastritis with syndrome of spleen deficiency [J]. *Chin J Anatomy*, 2007, 30(6): 718-721.
- [4] Liu Y, Xu W, Wang G, *et al.* Material basis research for Huangqi Jianzhong Tang against chronic atrophic gastritis rats through integration of urinary metabolomics and SystemsDock [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 223: 1-9.
- [5] Liu W G, Jiang S H. Effects of huangqi jianzhong decoction on the expression of epidermal growth factor, mRNA of inducible Nitric-oxide synthase and epidermal growth factor receptor in stomach mucosa of chronic atrophic gastritis rats with syndrome of spleen deficiency [J]. *Chin J Clinical Rehabilitation*, 2006, 10(43): 123-125.
- [6] Wei Y, Ma L X, Yin S J, *et al.* Huangqi Jianzhong Tang for treatment of chronic gastritis: A systematic review of randomized clinical trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 878164.
- [7] Dong X, Li X, Li N, *et al.* A target-group-change couple with mass defect filtering strategy to identify the metabolites of “Dogel ebs” in rats plasma, urine and bile [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(21): 3382-3389.
- [8] Wang F, Wu Y, Ai Y, *et al.* Metabolites identification of Huo Luo Xiao Ling Dan in rat urine by UPLC coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 30(3): 396-409.
- [9] Clarke M B, Bezabeh D Z, Howard C T. Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry: A comparison with ion chromatography and application to product discrimination [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(6): 1975-1981.
- [10] Li G, Nikolic D, van Breemen R B. Identification and chemical standardization of licorice raw materials and dietary supplements using UHPLC-MS/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(42): 8062-8070.
- [11] 任娟, 刘晓, 李伟东, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的白芍炒制前后化学成分研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(2): 268-273.
- [12] Li H F, Xu F, Yang P, *et al.* Systematic screening and characterization of prototype constituents and metabolites of total astragalosides using HPLC-ESI-IT-TOF-MSⁿ after oral administration to rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 142: 102-112.
- [13] Liu Y T, Jia L, Li A P, *et al.* Metabolite analysis of Huangqi Jianzhong Tang using UHPLC-Q-Exactive-MS in rat plasma [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2019, 42(17/18): 1-12.

[责任编辑 王文倩]