

复方蜥蜴散大鼠血浆、尿液、胆汁、粪便中代谢产物的鉴定

黄楷迪¹, 朱西杰², 牛 阳², 张 婷³, 卜凡淑³, 张祎盈³, 赵秋龙³, 钱大玮^{1*}, 郭 盛¹, 段金成¹

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 宁夏医科大学, 宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室, 宁夏 银川 750003

3. 南京中医药大学 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究复方蜥蜴散在大鼠体内的代谢产物。方法 大鼠 ig 复方蜥蜴散后, 收集并处理血浆、胆汁、尿液、粪便, 采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 方法以及质量亏损过滤技术分析主要成分代谢产物。结果 建立了复方蜥蜴散代谢产物分析方法, 共鉴定出芒柄花素、毛蕊异黄酮、延胡索乙素等 8 个原型成分和 31 个代谢产物。结论 复方蜥蜴散主要成分在大鼠体内主要发生去甲基化、羟基化、还原反应等 I 相反应, 硫酸化、葡萄糖醛酸化等 II 相反应, 所建立的方法简单可靠。为进一步阐明复方蜥蜴散药效物质基础, 优化临床给药方案提供依据。

关键词: 复方蜥蜴散; UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 代谢产物; 芒柄花素; 毛蕊异黄酮; 延胡索乙素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)03-0678-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.005

Identification of metabolites of Compound Xiyi Powder in rat plasma, bile, urine and feces after intravenous administration

HUANG Kai-di¹, ZHU Xi-jie², NIU Yang², ZHANG Ting³, BU Fan-shu³, ZHANG Yi-ying³, ZHAO Qiu-long³, QIAN Da-wei¹, GUO Sheng¹, DUAN Jin-ao¹

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, China

3. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine College of Pharmacy, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the metabolites of Compound Xiyi Powder (复方蜥蜴散) in rats. **Methods** After rats ig administrated with Compound Xiyi Powder, the plasma, bile, urine and feces were collected and disposed. The main metabolites were analyzed by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS method and quality loss filtering technology. **Results** A method for the analysis of metabolites of Compound Xiyi Powder was established, and eight prototype components and 31 metabolites were identified, including formononetin, calycosin, tetrahydropalmatine and so on. **Conclusion** The main components of the prescription mainly occurred in the first phase of demethylation, hydroxylation and reduction, and the second phase of sulfation and glucuronization, the established method is simple and reliable. It provides the basis for further elucidating the material basis of Compound Xiyi Powder and optimizing the clinical drug delivery scheme.

Key words: Compound Xiyi Powder; UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS; metabolites; formononetin; calycosin; tetrahydropalmatine

复方蜥蜴散为一复方散剂, 由黄芪、醋元胡、山药、三七、白及等药材组合而成, 主要含有黄酮类、生物碱类以及皂苷类成分, 具有疏肝行气散结、抑酸止痛、和胃降逆的功效, 是治疗胃黏膜相关疾

病如胃溃疡、胃炎、胃癌的临床经验方^[1]。目前对于该方的研究仅限于药效学方面^[2-3], 鲜有体内代谢产物相关研究。中药复方成分复杂, 各成分化学性质不均一, 难以确定真正的起效物质。研究中药复

收稿日期: 2021-08-08

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划(东西部合作)项目(2017BY084)

作者简介: 黄楷迪, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: (025)85811916 E-mail: 809100505@qq.com

*通信作者: 钱大玮, 硕士研究生导师, 研究员, 研究方向为中药化学成分体内的吸收与代谢。Tel: (025)85811916 E-mail: qiandwnj@126.com

方在大鼠体内的代谢过程,明确复方入血成分,寻找主要成分体内代谢产物,可为确定复方有效成分提供参考依据,进一步优化中药复方给药方案,促进中药现代化及新药开发。但体内代谢过程、背景基质复杂,代谢产物结构多样,且含量较低不易被检测,使得准确鉴定代谢产物的结构具有一定难度。四极杆-离子阱质谱(LTQ-Orbitrap)组合型傅里叶转换质谱将LTQ与Orbitrap技术结合,在LTQ灵敏、快速的基础上增加了轨道阱技术的高分辨率、高质量准确度的特点,其可在有效色谱检测的同时提供精确的MS及MS/MS谱图数据,现已成为代谢产物鉴定的主要技术手段^[4]。中药物质基础研究数据挖掘技术主要有提取离子流、质量亏损、中性丢失过滤以及质谱树状图相似度过滤等策略,其中质量亏损策略是基于体外原型成分与体内代谢成分具有相同母核,只是部分取代基会发生规律性变化,据此推测体内产生的代谢产物^[5-6]。本研究采用UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS方法、质量亏损过滤策略研究大鼠ig复方蜥蜴散后主要成分在血浆、胆汁、尿液、粪便中的代谢产物,为进一步阐明其药效物质基础,指导临床安全合理用药提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LTQ-Orbitrap Velos Pro 质谱仪(美国 Thermo 公司); Xcalibur 3.0、Networks 1.3 及 Mass Frontier 7.0 分析软件(美国 Thermo 公司); WH-微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); ML204、MS105 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); EPED 型超纯水系统(南京易普易达科技发展有限公司); D2012 型高速台式离心机(大龙兴创实验仪器北京有限公司); KQ-250E 型超声清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品芒柄花苷(批号 F27J7S18516)、毛蕊异黄酮(批号 R28O8F46957)、阿魏酸(批号 wkq17112012)、延胡索乙素(批号 Y21S7Y17091)、延胡索甲素(批号 Z25N8B49010)、四氢小檗碱(批号 B17O9T72592)、天麻素(批号 Y02M6K1)、三七皂苷 R1(批号 G22D9Y77958),购于南京春秋生物工程技术有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲酸、乙腈均为色谱纯。

黄芪、三七、醋元胡、白及等药材均购自亳州市紫锐药业有限公司。经南京中医药大学江苏省中

药资源产业化过程协同中心严辉副教授鉴定,黄芪为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根、醋元胡为醋制罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang 的干燥块茎、白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,均符合《中国药典》2020 年版各项要求。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 \pm 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2016-0006,动物伦理经南京中医药大学实验动物中心批准(批准号 201907A019)。分笼每笼 5 只饲养,置于室温(22 \pm 1) $^{\circ}$ C、湿度(60 \pm 5)%、光照/黑暗(12 h/12 h)的环境下,并在屏障系统中适应性饲养 1 周。

2 方法

2.1 复方蜥蜴散给药溶液、对照品溶液的制备

分别按照处方量称取各味药材粉末,混合均匀,配成 0.17 g/mL 的 0.5%CMC-Na 混悬溶液。分别精密称取对照品芒柄花素、毛蕊异黄酮、延胡索甲素、延胡索乙素、四氢小檗碱、阿魏酸、三七皂苷 R1、天麻素 10 mg,甲醇溶解并定容至 10 mL,得 1 mg/mL 的各对照品储备液。

2.2 复方蜥蜴散全方供试液制备

按照处方比例精密称取各药材粉末共 5.5 g,混合均匀后,加入 110 mL 70%甲醇,称定质量后超声提取 1 h,用 70%甲醇补足减失质量,13 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,取续滤液进样测定。

2.3 给药方案

将 15 只大鼠随机分为 4 组,空白组 6 只、血浆、胆汁、尿液/粪便组每组各 3 只,给药剂量为 1.7 g/(kg·d),给药组连续给药、空白组连续给予等体积生理盐水 3 d。

2.4 生物样品采集

大鼠给药前禁食 12 h,自由饮水。血浆组:分别取给药后 0、0.5、1、2、4、6、8、10 h 的眼眶静脉丛血,置于预先涂有 1%肝素钠生理盐水的 EP 管中,4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为血浆样品;胆汁组:大鼠麻醉后,行胆管插管术,收集 10 h 内的胆汁;尿液/粪便组(共同取样):将大鼠置于代谢笼中,分别收集 12 h 内的尿液和粪便。以上样品均置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.5 生物样品前处理

2.5.1 血浆样品供试液制备 取各时间点血浆, 混合均匀成 300 μ L 后加入 3 倍量甲醇沉淀蛋白, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 离心浓缩后用 50 μ L 50%甲醇和 50 μ L 0.1%甲酸水复溶, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液则为血浆样品供试液。

2.5.2 胆汁、尿液样品供试液制备 取各时间点胆汁、尿液, 混合成 200 μ L 后加入等量甲醇, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 离心浓缩后用 190 μ L 0.1%甲酸水和 10 μ L 乙腈复溶, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液则为胆汁、尿液样品供试液。

2.5.3 粪便样品供试液制备 取各时间点粪便, 混合后称取 1 g, 加入 3 倍量 50%甲醇溶解, 超声 30 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加等体积甲醇, 涡旋后离心取上清液则为粪便样品供试液。

3 分析条件

3.1 液相色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 柱; 流动相为 0.1%甲酸 (A) -乙腈 (B), 洗脱梯度 (0~5 min, 5%~30% B; 5~8 min, 30%~35% B; 8~11 min, 35%B; 11~16 min, 35%~60%B; 16~20 min, 60%B; 20~25 min, 60%~100%

B), 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 2 μ L。

3.2 质谱条件

MS 检测条件电喷雾离子源 (ESI), 采用正离子检测模式, m/z 采集范围为 50~1 500。主要质谱参数: 毛细管温度 350 $^{\circ}$ C, 蒸发器温度 350 $^{\circ}$ C, 鞘气流 40 kPa, 辅助气流 15 kPa, 喷雾电压 3.5 V, 源电流 100 μ A; MS2 质谱的触发方式为动态数据依赖分析模式, 选取上一级最高峰进行碰撞诱导碎裂解离碎片扫描 (collision induced dissociation, CID), 以离子阱打拿极检测。

4 结果

采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 方法以及质量亏损过滤技术, 扣除空白生物样品后, 通过对比复方蜥蜴散提取液和各成分对照品的保留时间及特征离子碎片、参考相关文献来推测各物质代谢产物结构及分子式。

4.1 复方蜥蜴散化学成分分析

将复方蜥蜴散醇提液质谱图与各物质对照品质谱图进行比对, 共鉴定出 17 个化学成分, 结果见表 1。

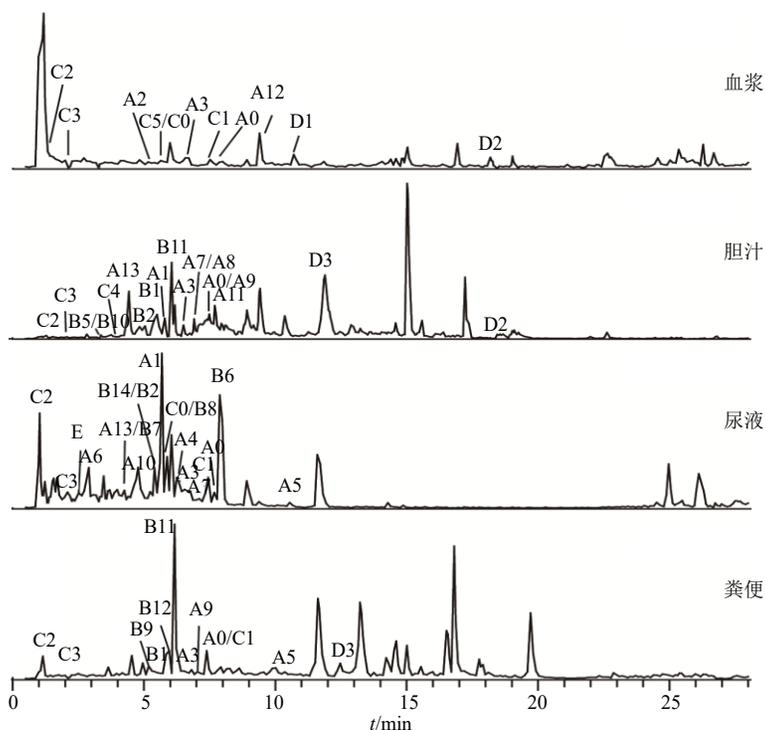
4.2 大鼠血浆、胆汁、尿液、粪便 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析

给药血浆、胆汁、尿液、粪便样品正离子模式下原形化合物及其代谢产物总提取离子流图, 见图 1。

表 1 复方蜥蜴散全方化学成分

Table 1 Chemical constituents of Compound Xiyi Powder

名称	t_R /min	化学式	准分子离子	MS (m/z)		
				理论值	实测值	误差 ($\times 10^{-6}$)
毛蕊异黄酮	7.63	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.076 3	285.074 3	-7.02
毛蕊异黄酮苷	5.32	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	447.129 1	447.125 1	-8.95
芒柄花素	6.90	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.081 4	269.083 7	8.55
芒柄花苷	6.85	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	431.129 5	431.129 5	0.00
咖啡酸	4.38	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.034 4	179.032 5	-10.61
阿魏酸	5.76	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 7	195.064 1	-8.20
天麻素	2.52	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	[M+H] ⁺	287.113 1	287.114 4	4.53
人参皂苷 Rb ₂	11.54	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	[M+Na] ⁺	1 101.582 1	1 101.572 3	-8.90
三七皂苷 R ₁	10.90	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	[M+Na] ⁺	933.542 3	933.550 1	8.36
三七皂苷 Fe	14.66	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	[M+Na] ⁺	939.529 3	939.519 4	-10.21
七叶胆苷 XVII	14.22	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	[M+Na] ⁺	969.539 9	969.529 6	-10.62
延胡索甲素	6.86	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	370.201 8	370.198 5	-8.91
延胡索乙素	5.49	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺	356.186 2	356.182 9	-9.26
四氢小檗碱	6.05	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	340.154 9	340.154 8	-0.29
小檗碱	7.58	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	[M+H] ⁺	337.131 4	337.132 8	4.15
异黄芪皂苷 I	16.57	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+Na] ⁺	891.471 8	891.462 5	-10.43
黄芪甲苷	11.80	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+Na] ⁺	807.450 7	807.444 3	-7.93



图中编号与表 2 对应

The numbers in the figure correspond to table 2

图 1 给药血浆、胆汁、尿液、粪便样品原型化合物及其代谢产物总提取离子流图

Fig. 1 Combined ion chromatograms of original compounds and metabolites in rat plasma, bile, urine and feces

各代谢成分信息见表 2。

4.3 鉴定结果

4.3.1 黄酮、异黄酮类物质代谢产物 药物代谢分为 I 相反应与 II 相反应，其中 I 相反应包括氧化、还原、水解、羟基化反应。II 相反应为结合反应，包括结合葡萄糖醛酸、硫酸根、半胱氨酸等基团使得物质极性增大易于吸收、排泄。黄酮类物质在体内以原型形式存在的化合物较少，但其在体内可发生广泛的代谢。其多以葡萄糖醛酸、硫酸以及甲基结合产物的形式存在，或被代谢为苷元、水解为酚酸类物质后被吸收^[7]。在 I 相反应中，黄酮类物质较易发生甲基化、去甲基化、羟基化、去羟基化等反应。鉴定结果显示 A1 相对分子质量比毛蕊异黄酮低 14，且二级质谱存在 m/z 285.073 1 $[M+H+CH_3]^+$ 碎片，提示其为去甲基化的毛蕊异黄酮。A3 相比原型少 30，并存在 m/z 237.129 0 $[M+H-H_2O]^+$ 、227.125 7 $[M+H-CO]^+$ 的碎片，根据文献推测其为 7,3'-二羟基异黄酮^[8]。黄酮类物质较易发生逆狄尔斯-阿德尔 (Retro Diels-Alder reaction, RDA) 反应，故可根据特定的离子碎片进行推测。根据二级质谱碎片离子 m/z 268.976 3 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ ，其比

毛蕊异黄酮大 16，并存在 RDA 裂解反应碎片 m/z 137.058 2，故推测其为羟基化的毛蕊异黄酮。碎片 m/z 299.094 5、269.083 7 提示毛蕊异黄酮发生了甲基化和去羟基化反应。A9 相较于芒柄花素少 14，比毛蕊异黄酮少 30，根据碎片 m/z 209.132 0 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、199.986 3 $[M+H-2CO]^+$ ，并结合文献，进一步证明其为大豆苷元^[9]。A10 加氢相对分子质量为 243.100 0，推测其分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$ ，其存在 m/z 225.109 7 $[M+H-H_2O]^+$ ，参考文献，推测其可能为雌马酚^[10]。黄酮类物质的 II 相反应大多结合硫酸根或葡萄糖醛酸，二级碎片 m/z 255.110 2、269.078 2 $[M+H-GlcUA]^+$ 提示其可能为葡萄糖醛酸化的芒柄花素和结合了硫酸根的去甲基化毛蕊异黄酮。综上所述，芒柄花素、毛蕊异黄酮体内代谢途径见图 2，RDA 反应举例见图 3，具体信息见表 2。

4.3.2 生物碱类代谢产物 生物碱类物质的取代位点较多，研究表明，延胡索中的生物碱类主要以 O-去甲基化或 O-去甲基化-葡萄糖醛酸化为其代谢途径^[11]。但由于该类物质易产生同分异构体，故无法准确判断其反应位点。根据碎片 m/z 354.165 9 $[M+H-OH]^+$ ，其比 B1 多 16，推测多加了 1 个羟

表2 大鼠 ig 复方蜥蜴散后的血浆、胆汁、尿液、粪便样本中主要成分分析

Table 2 Analysis of main components in plasma, bile, urine and feces of rats after gavage of Compound Xiyi Powder

编号	t_R /min	离子模式	分子式	MS (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	鉴定结果	来源
				理论值	实测值				
A0*	7.63	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.076 3	285.074 3	-7.02	224.126 4 [M+H-H ₂ O-CH ₃ -CO] ⁺ , 268.976 2 [M+H-OH] ⁺	毛蕊异黄酮	P、U、B、F
A1	5.76	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.056 2	271.057 1	3.32	285.073 1 [M+H+CH ₃] ⁺	A0 去甲基化	P、U、B
A2	5.16	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ S	351.013 0	351.013 3	0.85	255.110 2 [M+H-SO ₃] ⁺	A0 去甲基化且硫酸化P	
A3	7.40	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.061 3	255.062 4	4.31	237.129 0 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 227.125 7 [M+H-CO] ⁺	A0 去甲氧基化	P、U、B、F
A4	6.54	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₈ S	365.033 1	365.030 0	-8.49	285.042 9 [M+H-SO ₃] ⁺ , 268.123 4 [M+A0 硫酸化 H-SO ₃ -OH] ⁺ , 149.094 5 RDA		U
A5	10.07	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 2	301.070 7	-1.66	268.976 3 [M+H-H ₂ O-CH ₃] ⁺ , 137.058 2 RDA	A0 羟基化	U、F
A6	3.06	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	299.091 9	299.094 5	8.69	284.086 1 [M+H-CH ₃] ⁺ , 255.095 4 [M+H-CO ₂] ⁺	A0 甲基化	U
A7*	6.90	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.081 4	269.083 7	8.55	251.177 0 [M+H-H ₂ O] ⁺	芒柄花素	B、U
A8	6.91	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	445.113 5	445.109 9	8.09	413.194 9 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 269.078 2 [M+H-GlcUA] ⁺	A7 葡萄糖醛酸化	B
A9	7.45	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.065 7	255.066 4	2.74	209.132 0 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 199.986 3 [M+H-2CO] ⁺	A7 去甲基化	U、B
A10	4.88	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	243.097 6	243.100 0	9.87	225.109 7 [M+H-H ₂ O] ⁺	雌马酚	U
A11	7.73	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	431.097 8	431.096 3	3.48	255.062 4 [M+H-GlcUA] ⁺ , 413.195 7 [M+H-H ₂ O] ⁺	A9 葡萄糖醛酸化	B
A12	9.74	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ S	335.022 5	335.019 6	8.66	255.062 5 [M+H-SO ₃] ⁺ , 317.157 3 [M+H-H ₂ O] ⁺	A9 硫酸化	U
A13	4.53	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	259.097 0	259.097 4	1.54	241.058 8 [M+H-H ₂ O] ⁺	A9 还原	U、B
B0*	6.86	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	370.201 8	370.198 5	-8.91	366.109 3 [M+H-4H] ⁺	延胡索甲素	B、U
B1*	5.49	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.186 2	356.182 9	-9.26	299.124 7 [M+H-N-3CH ₂] ⁺	延胡索乙素	B、U
B2	5.22	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₅	372.176 5	372.176 5	0.00	356.186 2 [M+H-OH] ⁺	B0 羟基化	B、U
B3	5.76	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.186 2	356.183 9	-6.46	342.166 0 [M+H-CH ₃ -CH ₂] ⁺	B0 去甲基化	U
B4	5.39	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342.166 3	342.169 0	7.89	298.088 9 [M+H-2CH ₂ -CH ₃ OH] ⁺	B0 双去甲基化	B
B5	4.34	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₁ NO ₁₀	518.202 6	518.199 8	-5.40	342.166 5 [M+H-GlcUA] ⁺	B4 葡萄糖醛酸化	B
B6	2.52	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	354.179 5	354.176 3	-9.03	298.145 4 [M+H-CH ₃ OH-CH ₂] ⁺	B0 去甲基和环化	U
B7	4.58	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₀	502.171 3	502.174 4	6.17	298.049 5 [M+H-GlcUA-2CH ₂] ⁺	B6 葡萄糖醛酸化	B
B8	6.65	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	338.139 2	338.137 3	-5.62	298.145 4 [M+H-CH ₃ OH-CH ₂] ⁺	B6 去甲基和环化	B
B9	5.19	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342.170 5	342.168 5	-5.85	328.243 9 [M+H-CH ₂] ⁺ , 190.086 8 RDA	B1 去甲基化	B、U、F
B10	4.43	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₁ NO ₁₀	518.202 6	518.198 8	-7.33	342.166 5 [M+H-GlcUA] ⁺ , 503.302 5 [M+H-CH ₃] ⁺	B9 葡萄糖醛酸化	F、U、B
B11*	6.05	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.154 9	340.154 8	-0.29	282.112 8 [M+H-2CH ₂] ⁺	四氢小檗碱	B、U、F
B12	5.84	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	324.123 6	324.120 3	-10.18	149.060 3 RDA	B11 去甲基和环化	F、U
B13	4.93	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	312.123 6	312.121 1	-8.01	282.112 8 [M+H-2CH ₂] ⁺	B11 双去甲基化	B
B14	5.58	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₃ NO ₁₀	532.218 3	532.213 9	-8.27	356.181 9 [M+H-GlcUA] ⁺	B3 葡萄糖醛酸化	B

续表 2

编号	t_R /min	离子模式	分子式	MS (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	鉴定结果	来源
				理论值	实测值				
C0*	5.76	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 7	195.064 1	-8.20	133.099 6 $[M+H-COOH-OH]^+$	阿魏酸	P、U
C1	7.28	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{12}O_4$	197.081 4	197.079 8	-8.12	152.060 3 $[M+H-COOH]^+$, 182.079 3 $[M+H-CH_3]^+$	C0 氢化	P、U、F
C2	1.19	$[M+H]^+$	$C_9H_8O_3$	165.055 2	165.054 2	-6.06	136.074 5 $[M+H-CH_3OH]^+$	C0 去甲氧基	P、B、U、F
C3	2.00	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{18}O_{10}$	371.097 8	371.097 1	-1.89	355.067 6 $[M+H-O]^+$	C0 葡萄糖醛酸化	P、B、U、F
C4	4.73	$[M+H]^+$	$C_9H_{10}O_3$	167.070 8	167.071 1	1.80	135.053 9 $[M+H-CO-2H]^+$	C2 氢化	B、U
C5	5.64	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{16}O_9$	341.087 3	341.086 8	-1.47	165.981 1 $[M+H-GluCA]^+$, 149.094 4 $[M+H-GluCA-O]^+$	C2 葡萄糖醛酸化	P
D1*	10.90	$[M+Na]^+$	$C_{47}H_{80}O_{18}$	933.542 3	933.550 1	-8.30	783.538 6 $[M+H-Xyl]^+$	三七皂苷 R1	P
D2	12.86	$[M+Na]^+$	$C_{30}H_{52}O_4Na$	499.376 3	499.374 4	3.80	371.257 1 $[M+H-2OH-2CH_3-3CH_2]^+$	原人参三醇	B、F
D3	18.17	$[M+H]^+$	$C_{36}H_{62}O_8$	623.452 3	623.452 7	-0.64	425.342 8 $[M+H-Glu-OH]^+$	化合物 K	P、B
E*	2.52	$[M+H]^+$	$C_{13}H_{18}O_7$	287.113 1	287.114 4	-4.53	107.048 0 $[M+H-GluCA]^+$	天麻素	U

*原型成分 P-血浆 B-胆汁 U-尿液 F-粪便

*original compounds P-plasma B-bile U-urine F-feces

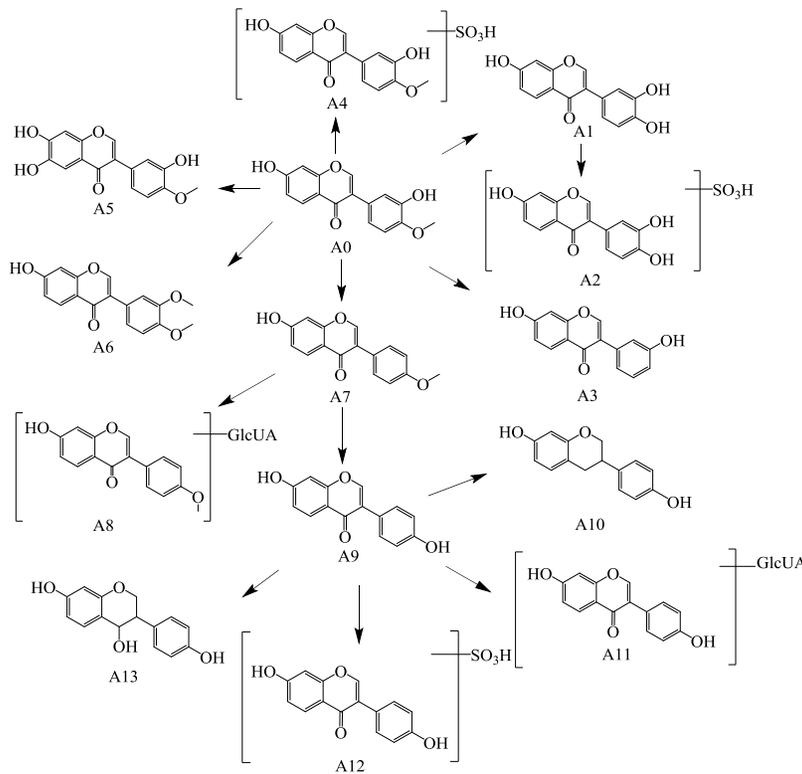


图 2 黄酮类物质体内代谢途径

Fig. 2 *In vivo* metabolic pathways of flavonoids

基, 为延胡索甲素羟基化后的产物。B3 比延胡索甲素少 14, 比 B2 少 16, 推测分子式为 $C_{21}H_{25}NO_4$, 并有 m/z 342.166 0 $[M+H-CH_3-CH_2]^+$ 、298.088 9 $[M+H-2CH_2-CH_3OH]^+$ 碎片, 推测其为延胡索甲素的 *O*-去甲基化产物。B8 的加氢离子峰碎片为 m/z

338.135 3, 根据参考文献^[12], 推测其为 2、3、10、11 位脱去 2 分子 CH_4 成环后的产物, 与文献相符。B9 与 B4、B5 与 B10 具有相同的相对分子质量, 但保留时间有所差异, 由于 B9 二级质谱显示其具有 RDA 反应碎片 m/z 190.086 8, 提示其 A 环连接了 2

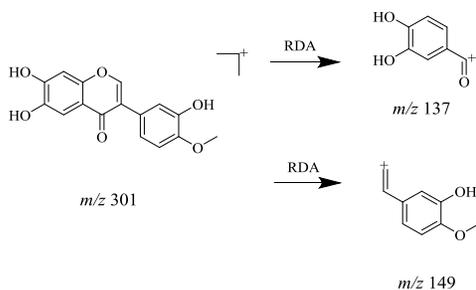


图3 黄酮类物质 RDA 反应碎片

Fig. 3 Flavonoids RDA reaction fragments

分子甲氧基，故推测 B9 为 B1 的去甲基化产物。B12 相比较 B11，去掉了 16 (CH₄)，准分子离子峰为 m/z 324.120 3，且存在 m/z 149.060 3 的 RDA 反应典型裂解碎片，推测为 2、3 位点与 10、11 位点同时脱去 CH₄ 后成环。II 相反应中 B5 较 B4 多了 176，且存在 m/z 342.166 5 [M+H-GluCA]⁺ 碎片，提示其为去甲基后又进一步结合葡萄糖醛酸的代谢产物。 m/z 502.164 4 [M+H]⁺ 为 B7 的加氢离子峰，根据 Mass Frontier 软件，显示存在 m/z 298.049 5

[M+H-GluCA-2CH₂]⁺ 的碎片，将 B7 的加氢相对分子质量减去 176 后，相对分子质量为 326，比 B6 少 28，故推测其为 B6 去掉 2 个甲基后结合葡萄糖醛酸的代谢产物。四氢小檗碱型生物碱的代谢反应大多通过尿液和胆汁排泄，且结构复杂存在较多同分异构体^[13]。综上，延胡索甲素、延胡索乙素以及四氢小檗碱的体内代谢途径见图 4，RDA 反应举例见图 5。具体信息见表 2。

4.3.3 酚酸类物质代谢产物 咖啡酸、阿魏酸等单酚酸类物质可经胃肠道直接吸收，而多酚酸较难吸收入体内，常在胃肠道被菌、酶代谢为单酚酸后吸收入血。在体内代谢主要发生甲基化、葡萄糖醛酸化等反应^[14]。本实验所鉴定的阿魏酸为单酚酸类物质。C0 准分子离子峰为 m/z 195.063 1，二级质谱碎片显示 m/z 133.099 6 [M+H-COOH-OH]⁺，与对照品相符，推测其为阿魏酸。C1 较 C0 多 2，并存在二级碎片 m/z 152.060 3 [M+H-COOH]⁺、182.079 3 [M+H-CH₃]⁺，推测为去双键后的阿魏

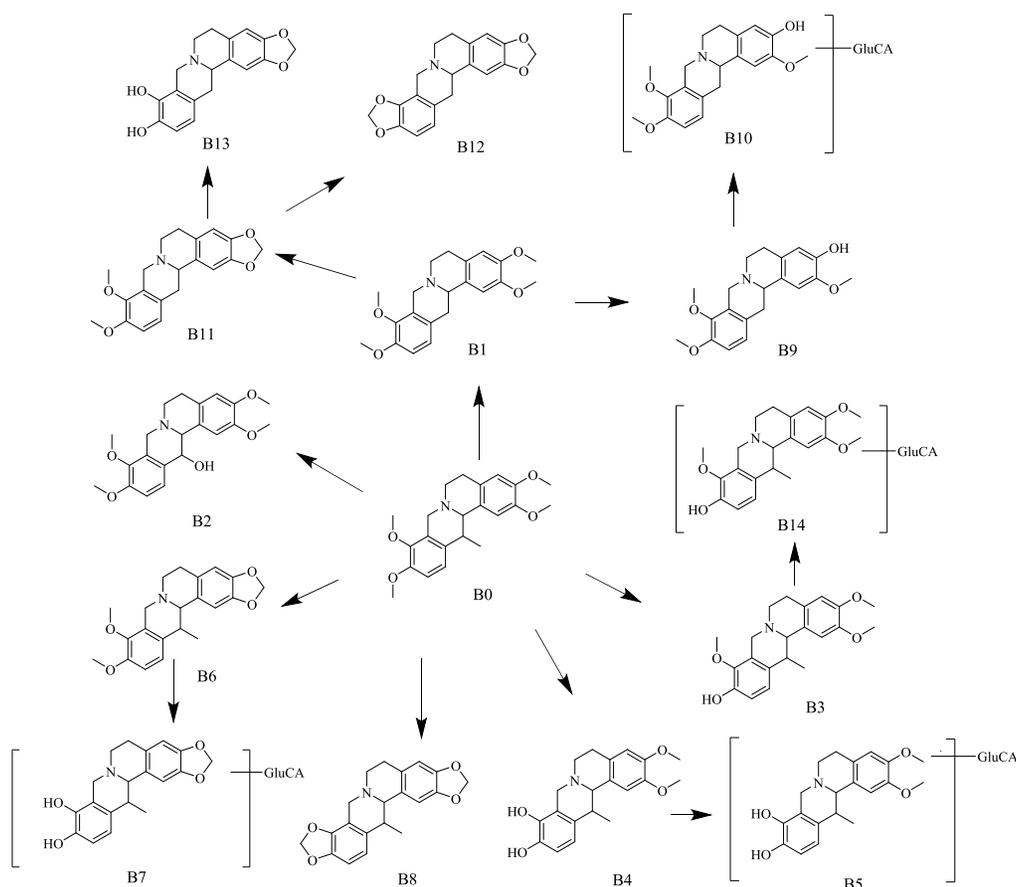


图4 生物碱类物质的体内代谢途径

Fig. 4 *In vivo* metabolic pathways of alkaloid

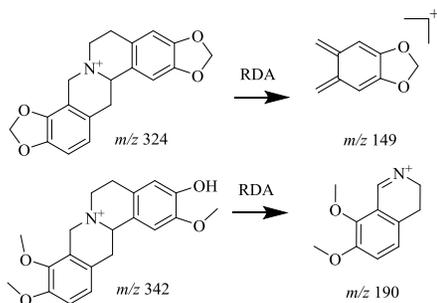


图5 生物碱类物质 RDA 反应碎片

Fig. 5 RDA reaction of alkaloids fragments

酸。C2 比阿魏酸大 30，分子式为 $C_9H_8O_3$ ，推测为去甲氧基的阿魏酸。C3 与 C5 相对于 C0 与 C2 大 176，并有相同的离子碎片，故推测 C3、C5 分别为 C0、C2 的葡萄糖醛酸结合产物。C4 相对于 C2 大 2，且比 C1 大 30，准分子离子峰为 m/z 167.071 1，推测为去甲氧基化的 C1。综上，阿魏酸的体内代谢途径见图 6，具体信息见表 2。

4.3.4 苷类物质代谢产物 苷元常以苷的形式存在于中药材中，苷类物质由于结合了糖分子致其极性增大，而较苷元更易吸收。进入体内后，苷元又在胃肠道中转化为苷元而发挥药效^[15]。D1 准分子离子峰为 m/z 933.552 4，且存在二级质谱碎片 783 $[M+H-Xy]^+$ ，分子式为 $C_{47}H_{80}O_{18}$ ，推测其为三七皂苷 R_1 ^[16]，与对照品相符。D2 的准分子离子峰为 m/z 499.374 4，根据文献报道^[17]，可能为 D1 脱去 2 分子葡萄糖和 1 分子木糖后的代谢产物。D3 准分子离子峰为 m/z 623.432 7，二级质谱碎片 425.342 8 $[M+H-Glu-OH]^+$ ，根据文献报道^[18]，推测其可为人参皂苷的代谢产物化合物 K。E 准分子离子峰

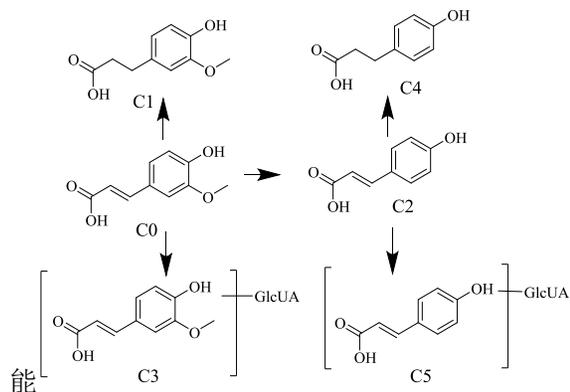


图6 阿魏酸的体内代谢途径

Fig. 6 Metabolic pathways of ferulic acid *in vivo*

为 m/z 287.114 4，分子式为 $C_{13}H_{18}O_7$ ，存在二级质谱碎片 m/z 107.048 0 $[M+H-GluCA]^+$ ，根据文献报道^[19]，推测其为糖苷类物质天麻素，与对照品相符，但在生物样品中并未发现其代谢产物。苷类物质部分代谢产物及原型成分见图 7，具体信息见表 2。

5 讨论

黄芪药材中，黄芪皂苷 IV 为黄芪所含皂苷的主要成分，同时《中国药典》2020 年版也规定其为指标成分，但在本次实验中并未检测到黄芪皂苷类物质，考虑可能由于皂苷类物质的相对分子质量较大，存在屏障作用，从而不易被吸收，导致生物样品中含量较低，不易被检测^[9]，另有文献表明，黄芪皂苷 IV 在比格犬体内胃肠道吸收较差，生物利用度极低^[20]。

由于延胡索甲素 2、3、10、11 这 4 个位点同时存在甲氧基基团，若发生其中 2 个位点的去甲基反应，会产生多种同分异构体，单凭质谱难以判断去甲基具体发生在哪一位点，故确切的代谢物结构还

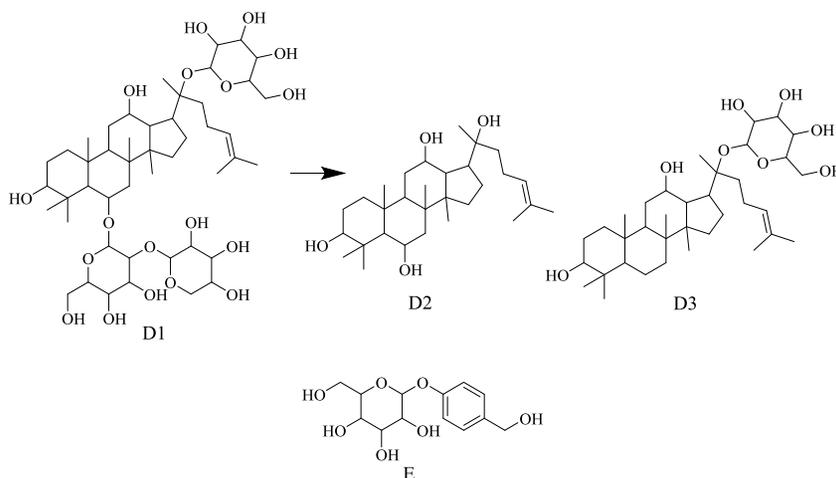


图7 苷类物质部分代谢产物及原型成分

Fig. 7 Metabolites and prototypical components of glycosides

需进一步通过 NMR 来辅助判断。

只在尿液中检测到天麻素原型和部分人参皂苷类代谢产物,并未检测到天麻素的代谢产物以及人参皂苷类物质原型成分,考虑原因其一可能为白及药材中所含天麻素含量较低,不易被检测;其二,人参皂苷 Rb₃、Rc 等原人参二醇型皂苷多存在于三七叶片中,而原人参三醇型皂苷如三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re 等成分大多存在于三七根中,且含量较高^[21],考虑可能由于这个原因本次实验检测到的原人参二醇皂苷类物质较少。其三可能是在生物样品前处理时,待测成分回收率较低,应优化生物样品前处理方法,提高成分回收率。

本研究采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术,建立了大鼠 ig 复方蜥蜴散后的入血成分及其代谢产物的检测方法,明确了该方在体内的移行成分,而这些成分极有可能是真正发挥药效的物质,故可在本实验的基础上,可进一步深入研究这些成分在动物体内的分布、排泄过程,完善该方药效物质研究基础,促进其更广泛临床应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐丽华,朱西杰,郭利民,等.朱西杰教授应用蜥蜴治疗胃肠黏膜病变临床经验[J].湖北中医杂志,2012,34(4):29-30.
- [2] 朱西杰,张静霜,李卫强,等.复方蜥蜴散不同微粒组合剂对CAG模型大鼠细胞凋亡基因Bcl-2与Bax表达影响的实验研究[J].时珍国医国药,2011,22(1):5-8.
- [3] 关芳,艾梦环,王骄,等.复方蜥蜴散不同微粒组合剂含药大鼠血清对人SGC-7901胃癌细胞SIRT1、P53的影响[J].山西中医,2019,35(9):57-59.
- [4] 李亮,陈笑艳,钟大放.液相色谱-质谱联用技术在药物代谢产物鉴定中的应用[J].质谱学报,2017,38(4):375-387.
- [5] 吴然.芪精升白颗粒化学成分研究[D].上海:中国人民解放军海军军医大学,2018.
- [6] 程丹,畅洪昇,王旭,等.超高压液相色谱/线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法鉴定锁阳有效部位的化学成分[J].世界中医药,2019,14(2):306-310.
- [7] 裴利宽,郭宝林.黄酮类化合物吸收和代谢研究进展[J].中国药学杂志,2006(8):568-572.
- [8] 黄晶.基于UPLC/Q-TOF-MS技术的蜜炙黄芪大鼠体内代谢成分分析[D].广州:广东药科大学,2017.
- [9] Shi J, Zheng L, Lin Z F, et al. Study of pharmacokinetic profiles and characteristics of active components and their metabolites in rat plasma following oral administration of the water extract of *Astragali radix* using UPLC-MS/MS[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 183-194.
- [10] 林慧.大豆异黄酮在中国人体内的初步代谢动力学探讨[D].北京:中国协和医科大学,2008.
- [11] 李开通.延胡索中原小檗碱型季铵碱药物代谢动力学研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.
- [12] 程星烨,石钺,孙虹,等.延胡索活性部位入血成分的LC-MS/MS研究[J].药科学报,2009,44(2):167-174.
- [13] Liu X B, Zhou Q Y, Liu S S, et al. Characterization of in vitro metabolites of three tetrahydroprotoberberine alkaloids in rat liver S9 by high-performance liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrometry*, 2018, 32(17): 1540-1548.
- [14] 斯日古楞,刘洪涛.中药酚酸的体内代谢研究进展[J].亚太传统医药,2008(6):49-51.
- [15] 张李赢,杨铁舜,张彤,等.肠道菌群对中药苷类成分的代谢研究进展[J].中药材,2011,34(7):1155-1158.
- [16] Yang L, Wang C Y, Xie X N. LC-MS/MS determination of ginsenoside compound K and its metabolite 20(S)-protopanaxadiol in human plasma and urine: applications in a clinical study[J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(5): 365-380.
- [17] 陈昕,周秋丽,王本祥.人参皂甙 Rb1 的肠内菌代谢[J].药科学报,1999(6):11-15.
- [18] Tang M S, Xie X, Yang Y Y. A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K[J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 208-220.
- [19] 王俏.天麻素和天麻苷元的体内外代谢和靶靶向性研究[D].杭州:浙江大学,2007.
- [20] Guo Z Z, Lou Y M, Kong M Y. A systematic review of phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics on *Astragali Radix*: Implications for *Astragali Radix* as a personalized medicine[J]. *Inter J Molecular Sci*, 2019, 20(6): 1463.
- [21] Ju Z C, Li J, Han H. Analysis of bioactive components and multi-component pharmacokinetics of saponins from the leaves of *Panax notoginseng* in rat plasma after oral administration by LC-MS/MS[J]. *J Separation Sci*, 2018, 41(7): 1512-1523.

[责任编辑 王文倩]