

· 药物代谢 ·

基于 UPLC-Q-TOF-MS^E 分析芍枣胶囊在 大鼠体内的代谢产物

王羽凝¹, 穆丽华¹, 许璐¹, 魏沛沛², 王茹¹, 刘屏^{1*}

(1. 中国人民解放军总医院, 北京 100853; 2. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233003)

[摘要] 目的:研究芍枣胶囊在抑郁模型大鼠体内的代谢产物,并归纳和总结其代谢途径。方法:大鼠灌胃芍枣胶囊提取液后,收集血液、尿液、粪便和全脑并进行预处理,采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 分析,流动相 0.1% 甲酸-乙腈梯度洗脱,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 45 °C,在负离子模式下获得 MS/MS^E 质谱信息,通过 Metabolynx 软件处理后对芍枣胶囊中活性化合物在血浆、尿液、粪便和全脑中的代谢产物进行推测。结果:大鼠体内共鉴定得到代谢产物 7 个,其中芍药苷的 2 个,斯皮诺素的 3 个,3,6'-二芥子酰基蔗糖的 2 个。结论:芍枣胶囊中活性化合物芍药苷,斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖主要代谢产物存在于血液、尿液和粪便中,代谢途径主要有脱糖水解、甲基化、脱羰基等。

[关键词] 芍枣胶囊;芍药苷;斯皮诺素;3,6'-二芥子酰基蔗糖;代谢产物

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;Q946.92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0077-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200077

Analysis on *in Vivo* Metabolites of Shaozao Capsules in Rats by UPLC-Q-TOF-MS^E

WANG Yu-ning¹, MU Li-hua¹, XU Lu¹, WEI Pei-pei², WANG Ru¹, LIU Ping^{1*}

(1. Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze three bioactive compounds from Shaozao capsules and their metabolites in depression model rats, and summarize their metabolic pathways. **Method:** After oral administration of Shaozao capsules extract, rat plasma, urine, feces and brain were collected, these samples were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS^E, mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid for gradient elution, flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, metabolites of bioactive compounds were processed with Metabolynx software. **Result:** According to the mass information, 7 metabolites were discovered, including 3 metabolites of peoniflorin, 2 metabolites of spinosin and 2 metabolites of 3,6'-disinapoyl sucrose. **Conclusion:** The metabolites mainly exist in rat plasma, urine and feces. The metabolic reactions of these active compounds from Shaozao capsules are methylation, decarbonylation and hydrolysis-desugar, et al.

[Key words] Shaozao capsules; peoniflorin; spinosin; 3,6'-disinapoyl sucrose; metabolites

芍枣胶囊配方源自肝胆两益汤,由白芍、酸枣仁、远志 3 味药组成,载于《辨证录》卷四,用于治疗夜不能寐等证。课题组前期报道了芍枣胶囊镇静安

眠的药理作用及作用机制,发现该制剂具有显著的镇静催眠作用,其可能通过增加脑中 γ -氨基丁酸(GABA)和肾上腺特异蛋白(Asp)的含量而发挥镇

[收稿日期] 20160603(015)

[基金项目] 军队“十二五”中医药推广研发项目(10ZY2141)

[第一作者] 王羽凝,主管药师,从事医院药学研究,Tel:010-66939962,E-mail:sunny_5087@163.com

[通讯作者] *刘屏,研究员,从事中药药理研究,Tel:010-66936676,E-mail:liuping301@126.com

静催眠作用^[1-2]。中药复方所含化学成分复杂,口服给药后在胃肠道经消化液、消化酶及肠道菌群的作用,有些成分可能发生变化,胃肠道中存在中药成分的原型或代谢产物,这些成分一部分被吸收进入血液,一部分直接排泄。因此,研究芍枣胶囊中活性化合物在大鼠体内的代谢产物,可更好地确定该制剂的有效成分群。

课题组前期对芍枣胶囊进行了质量标准研究,对芍药苷、斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖这 3 个代表性成分的含量进行了规定。有文献报道了这 3 个化合物的药代动力学研究,但尚无含这些化合物的中药复方的代谢产物分析报道^[3-4]。本实验对芍枣胶囊中这 3 个化合物在大鼠体内的代谢产物进行分析,采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 获得质谱信息^[5-6],推测芍枣胶囊中活性化合物在血浆、胆汁、尿液、粪便中的代谢产物,总结其代谢途径及体内过程的差异^[7],为该制剂的临床应用和作用机制解析提供依据。

1 材料

ACQUITYTM 型超高效液相色谱系统和 SYNAPT 型质谱系统(美国 Waters 公司),3K15 型高速离心机(美国 Sigma 公司),BF-2000 型氮吹浓缩仪(北京八方世纪科技有限公司),Votex-Genie2 型涡旋混合仪(美国 Cole-Parmer 公司)。白芍、远志和酸枣仁均购自北京绿野药业有限责任公司,产地分别为浙江、山西、河北,经 301 医院中药房古今主任药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求。芍药苷、斯皮诺素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201539,111869-201203),3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品(自制,纯度 > 98%),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 白芍、远志和酸枣仁粉碎成粗粉,按白芍-远志-酸枣仁(2:1:2)称取,加 8 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩成相对密度 1.12 ~ 1.17(60 ℃)的药液,加乙醇使含醇量达 80%,充分搅拌,静置过夜,滤去沉淀物,滤液回收乙醇并浓缩成相对密度 1.25 ~ 1.30(60 ℃)的药液,浓缩,干燥,得芍枣胶囊粉末(7.8 g·g⁻¹,以生药量计)。精密称量芍枣胶囊粉末 51.3

mg 溶于 10 mL 的 50% 甲醇,超声 30 min,得 5.1 g·L⁻¹芍枣胶囊溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备 称取芍药苷、斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品各约 1.00 mg,分别溶于 1 mL 甲醇中,各取 50 μL 分别稀释至 500 μL,得各成分的 100 mg·L⁻¹对照品溶液。

2.3 色谱条件 CORTECTS UPLC C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.6 μm),流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min,95% ~ 93% A;3 ~ 11 min,93% ~ 90% A;11 ~ 12 min,90% ~ 86% A;12 ~ 16 min,86% A;16 ~ 18 min,86% ~ 80% A;18 ~ 19.5 min,80% A;19.5 ~ 26 min,80% ~ 75% A;26 ~ 30 min,75% ~ 50% A;30 ~ 34 min,50% ~ 5% A;34 ~ 35 min,5% A;35 ~ 35.1 min,5% ~ 95% A;35.1 ~ 37 min,95% A),流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 45 ℃。

2.4 质谱条件 离子化模式为电喷雾负离子,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V,除溶剂气体 900 L·h⁻¹,离子源温度 100 ℃,除溶剂温度 450 ℃,质荷比采集范围 *m/z* 150 ~ 2 000,碰撞气体为氩气,正离子碰撞能量的离子阱电压 50 ~ 65 eV,转移电压 15 eV,负离子碰撞能量的离子阱电压 65 ~ 80 eV,转移电压 15 eV。准确质量数用亮氨酸-脑啡肽作校正液。

2.5 生物样品的采集 SD 大鼠 12 只,实验前先适应性饲养 3 周左右,体重增至大约 370 g,随机分为 2 组(空白组与给药组)。精密称量药粉溶于水中,溶解后灌胃用,给药剂量(以生药量计)42.5 g·kg⁻¹,药粉中芍药苷、斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的质量分数分别为 26.07,0.97,0.69 mg·g⁻¹,即 3 种成分的实际给药量依次为 142.05,5.29,3.76 mg·kg⁻¹。给药组将每日给药剂量分早、晚 2 次给药,连续给药 5 d,空白组以相同剂量水灌胃。末次给药前 12 h 禁食不禁水,于末次给药后 30 min 腹腔注射麻醉大鼠,经腹主动脉取全血置于加肝素的抗凝管中,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,得血浆,置于 -80 ℃ 冰箱中储存。连续给药 5 d 后用代谢笼收集 24 h 的粪便和尿液。取血后将大鼠断头,在冰上开颅取全脑,剥离脑膜血管,用生理盐水冲洗,滤纸吸干后锡纸包裹置于冻存管内 -80 ℃ 储存备用。

2.6 样品的前处理方法^[8]

2.6.1 血浆 用移液枪吸取血浆 2 mL 至离心管中,加入甲醇 8 mL,涡旋 5 min 混匀,于 4 ℃,5 500

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清, 40 °C 下 N_2 吹干, 沉淀加甲醇-水(1:1)混合液 200 μL 复溶, 涡旋 30 s, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进样分析。

2.6.2 粪便和尿液 分别取空白尿液和给药后尿液各 5 mL, 置于离心管中, 5 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清各 2 mL, 分别加入甲醇 4 mL, 涡旋混匀 30 s, 于 4 °C, 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL 过 0.22 μm 滤膜作为供试液分析。将空白粪便和给药后粪便样品分别碾碎, 各称量 1.0 g, 加入甲醇 2 mL, 低温超声 30 min, 在 4 °C, 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL 过 0.22 μm 滤膜作为供试液进行分析。

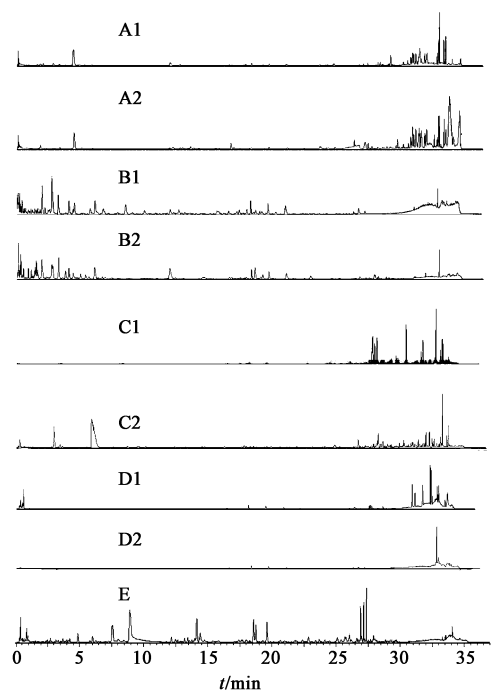
2.6.3 全脑 取脑组织置于研磨器中, 加入生理盐水 2 mL, 用研磨器在冰浴中研磨 10 min 至匀浆, 用移液枪将匀浆液转移至离心管中, 于 4 °C, 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液加 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 50 μL 和三氯甲烷 2 mL, 涡旋 3 min; 静置 10 min, 3 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 吸取三氯甲烷层于离心管内, 将三氯甲烷层用 N_2 吹干, 沉淀加甲醇 2 mL 复溶, 涡旋 30 s, 过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液 1 μL 进样分析。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 图谱分析 芍枣胶囊样品, 空白和给药后抑郁模型大鼠血浆、尿液、粪便和全脑在负离子条件下的总离子流图见图 1。

3.2 代谢产物分析 采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 完成样品的色谱分离及 MS/MS^E 分析, 将待测化合物可能的 I 相和 II 相代谢方式输入 Metabolynx 软件中, 寻找可能的代谢产物, 对已找到的代谢产物, 分析其 MS 离子碎片并进一步确认代谢产物结构。结果在大鼠体内共鉴定出芍药苷的代谢产物 2 个(A2 和 A3), 斯皮诺素代谢产物 3 个(B2, B3 和 B4), 3,6'-二芥子酰基蔗糖代谢产物 2 个(C2 和 C3)。见表 1。大鼠的血浆、尿液、粪便和全脑中均未发现芍药苷的原型, 说明芍药苷已全部代谢。选择性地监测 m/z 493.2 进行 LC-MS/MS 分析, 分别生成 m/z 121.3, 201.3, 425.2 和 m/z 439.3, 149.3, 305.5, 421.3 的碎片离子, 根据代谢物对应的准分子离子峰 m/z 493.2, 与芍药苷的分子离子峰相差 14 Da, 推测 A2 为单甲基化产物。根据代谢物 A3 对应的准分子离子峰 m/z 507.2, 与芍药苷的分子离子峰相差 28 Da, 推测为双甲基化产物。见图 2。

在给药血浆、粪便和尿液样品中均未发现斯皮诺素原型的色谱峰, 说明斯皮诺素进入体内后可被完全代谢。在血浆中检测到代谢产物 B2, 其准分子



A1. 空白血浆; A2. 给药血浆; B1. 空白尿液; B2. 给药尿液; C1. 空白粪便; C2. 给药粪便; D1. 空白脑组织; D2. 给药后脑组织; E. 芍枣胶囊溶液

图 1 不同生物样品的 TIC

Fig. 1 Total ion chromatograms in negative mode of nine samples

表 1 芍药苷、斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的代谢产物分析
Table 1 Metabolites analysis of peoniflorin, spinosin and 3,6'-disinapoyl sucrose from Shaozao capsules

No.	t_R /min	准分子离子 峰 $[M - H]^-$	代谢产物推测	代谢类型	来源
A1	17.63	479.157 2	芍药苷	-	-
A2	8.19	493.280 1	A1 + CH ₃	I 相	粪便
A3	32.81	507.275 9	A1 + 2CH ₃	I 相	粪便
B1	13.76	607.168 3	斯皮诺素	-	-
B2	28.46	461.123 0	B1-C ₈ H ₂ O ₃	I 相	血浆
B3	35.09	579.391 8	B1-CO	I 相	血浆、尿液
B4	13.06	445.182 2	B1-Glc	I 相	血浆、尿液
C1	18.53	753.224 2	3,6'-二芥子酰基蔗糖	-	-
C2	29.62	549.258 9	C1 - C ₁₁ H ₁₀ O ₄	I 相	粪便
C3	33.06	547.350 2	C1 - C ₁₁ H ₁₂ O ₄	I 相	粪便

离子峰 m/z 461 $[M - H]^-$ 结合 MS^E 碎片, 推测化合物 B2 为斯皮诺素的代谢产物酚酸糖酯^[9]。在血浆和尿液中检测到代谢产物 B3, 其分子离子峰 m/z 579 $[M - H]^-$ 初步推断为斯皮诺素脱去羰基的代谢产物。血浆和尿液中发现代谢产物 B4, B4 在质谱图中显示 m/z 547 $[M - H]^-$, 结合 MS^E 碎片, 推测为斯皮诺素失去一分子葡萄糖的产物。见图 3。

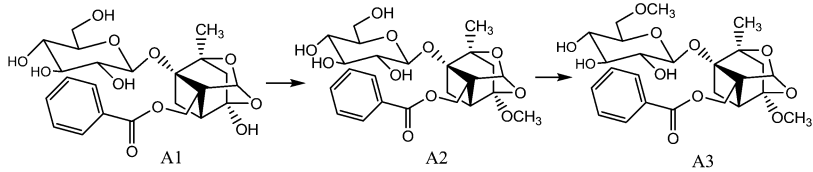


图 2 芍药苷在大鼠体内主要代谢产物的代谢途径

Fig. 2 Proposed major metabolic pathway of peoniflorin in rats

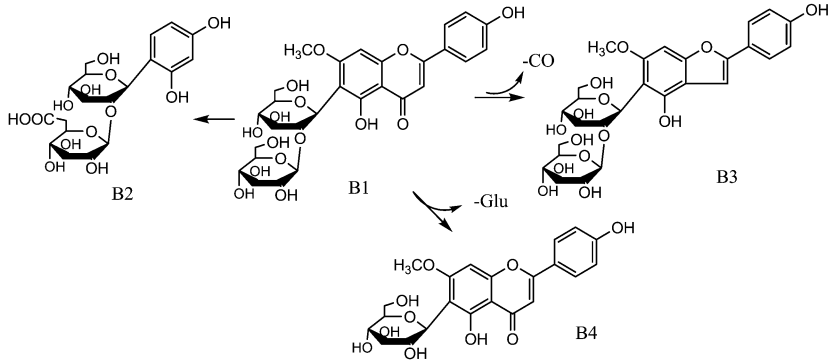


图 3 斯皮诺素在大鼠体内主要代谢产物的代谢途径

Fig. 3 Proposed major metabolic pathway of spinosin in rats

采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 分析时,在给药血浆、粪便和尿液样品中均未发现 3,6'-二芥子酰基蔗糖原型的色谱峰,说明该成分进入体内后可被完全代谢。化合物 C2 在质谱图中显示 m/z 549 [M - H]⁻, 结合 MS^E 碎片,推测为 3-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯丙酰基)-蔗糖或 6'-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯丙酰基)-蔗糖。化合物 C3 在质谱图中显示 m/z 547 [M - H]⁻, 结合 MS^E 碎片,推测为 3 或 6'失去一分子芥子酰基的碎片,结构为 3-芥子酰基蔗糖或 6'-芥子酰基蔗糖。见图 4。

酰基)-蔗糖或 6'-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯丙酰基)-蔗糖。化合物 C3 在质谱图中显示 m/z 547 [M - H]⁻, 结合 MS^E 碎片,推测为 3 或 6'失去一分子芥子酰基的碎片,结构为 3-芥子酰基蔗糖或 6'-芥子酰基蔗糖。见图 4。

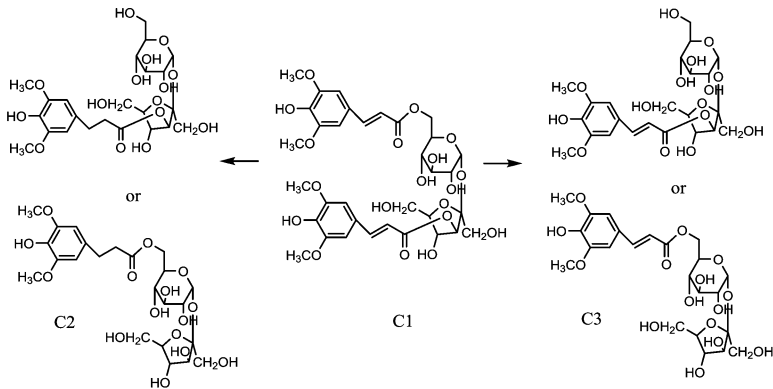


图 4 3,6'-二芥子酰基蔗糖在大鼠体内主要代谢产物的代谢途径

Fig. 4 Proposed major metabolic pathway of 3,6'-disinapoyl sucrose in rats

4 讨论

芍药胶囊由白芍,远志和酸枣仁组成,其提取物中多为皂苷类和糖脂类成分,选择恰当的流动相梯度洗脱可使不同极性的组分保留时间比较适宜。本实验给药方案采取每天给药 2 次,于给药第 5 天收集 24 h 尿液、粪便,并于第 5 天收集全脑和血浆。这种给药方式可使药物在大鼠体内累积达到稳态浓度,从而便于分析大鼠体内的原型成分及其代谢

产物^[10]。

本实验收集灌胃芍药胶囊提取物后大鼠的全脑、粪便、尿液、血浆,但在这些部位中都未检测到芍药苷、斯皮诺素和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的原型,说明化合物进入体内很快被代谢。在大鼠体内鉴定得到 3 种主要成分的代谢产物共 7 个。结果表明这 3 个化合物的代谢类型以 I 相代谢中脱糖水解、甲基化、脱羰基为主,代谢途径主要为血浆、尿液和粪便。

在大鼠的脑中未检测到这3个化合物的代谢产物,这可能和血脑屏障有关。这些代谢产物在全脑、粪便、尿液和血浆中共同存在的物质对于芍枣胶囊的药效物质研究更具意义^[11-13],但是对于体内样品中部分代谢产物仅靠其色谱和质谱信息进行结构鉴定并不可靠,还需要在后续实验中对有意义的活性化合物进行分离纯化,并通过核磁共振波谱等其他方法确定其确切的结构。

[参考文献]

[1] 钟海平,张光霁.失眠的病因与发病机制[J].浙江中医药大学学报,2009,33(3):307-308.
[2] 张岗强.肝胆两益汤的镇静催眠作用及其机制研究[D].北京:北京中医药大学,2013.
[3] Li Y J, Liang X M, Xiao H B, et al. Determination of spinosin in rat plasma by reversed-phase high-performance chromatography after oral administration of Suanzaoren decoction [J]. J Chromatogr B, 2003, 787(2):421-425.
[4] Xing J, Xie C, Lou H. Recent applications of liquid chromatography mass spectrometry in natural products bioanalysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2):368-378.
[5] 冯亮,胡昌江,余凌英.人参皂苷 Rg₁ 及其代谢产物的药代动力学研究 [J]. 药学学报, 2010, 45(5):636-640.
[6] Liu C F, Yang W Z, Liu K D, et al. Characterization of chemical constituents and *in vivo* metabolites of Kai-Xin-San prescription by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ [J]. J Chin

Pharm Sci, 2012, 21(6):569-576.

[7] 杨杰,黄丹雪,鹿秀梅,等.小柴胡汤化学成分及其在抑郁模型大鼠体内代谢成分的分析[J].中草药,2012,43(9):1691-1698.
[8] 辛杨,张滢,张哲,等.乌头碱给药大鼠尿液生物标记物的检测[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(3):89-91.
[9] Bao K D, Li P, Qi L W, et al. Characterization of flavonoid metabolites in rat plasma, urine, and feces after oral administration of Semen Ziziphi Spinosae extract by HPLC-diode-array detection (DAD) and ion-trap mass spectrometry (MSⁿ) [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2009, 57(2):144-148.
[10] Jiang P, Liu R, Dou S, et al. Analysis of the constituents in rat plasma after oral administration of Shexiang Baixin pill by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(12):1333-1343.
[11] 迟明艳,向文英,杨武,等. UPLC-Q-TOF/MS 分析头花蓼提取物在大鼠尿液中的代谢产物 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17):77-80.
[12] 姚志红,林舒颖,曹秀珍,等.甲基原薯蓣皂苷静脉注射给予大鼠后体内代谢物的 LC-MSⁿ 分析 [J]. 分析测试学报, 2014, 33(9):1010-1018.
[13] 陆林玲,束艳,钱大玮,等.大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定 [J]. 药学学报, 2011, 46(11):1374-1379.

[责任编辑 刘德文]