

基于UPLC-Q-Orbitrap-MS和分子对接技术的青盐方 药效物质基础分析

邹钊¹, 李佳珊², 徐颖^{2*}, 杨一博², 徐盼瑜², 杜寒倩², 朱卫丰¹, 林娜^{2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:采用血清药物化学方法研究青盐方的入血成分,并考察入血成分与雌激素受体(ER)的结合能,确认青盐方在大鼠体内的药效物质基础。方法:采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)比较青盐方70%乙醇提取物、各单味药70%乙醇提取物、空白血清、青盐方70%乙醇提取物给药后血清的指纹图谱差异,根据质谱的保留时间、相对分子质量,以及一级、二级离子碎片,判定青盐方在大鼠体内的入血成分,流动相选择0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min, 2%~20%B; 5~10 min, 20%~50%B; 10~15 min, 50%~80%B; 15~25 min, 80%~95%B; 25~26 min, 95%~2%B; 26~30 min, 2%B),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量5 μL,电喷雾离子源,检测范围 m/z 150~2 000,正、负离子扫描模式。采用分子对接技术表征入血成分与ER α 、ER β 的结合能,进一步确认青盐方药效物质基础。结果:口服青盐方后,从血清中检测出30种入血成分,其中9种为原型成分,21种为代谢产物。经鉴定9种原型成分分别为水晶兰苷、车叶草苷、麦角甾苷、松果菊苷、 β -蜕皮甾酮、尿囊素、去乙酰基车叶草苷酸、甜菜碱、咖啡酸,21种代谢产物包括有机酸、氨基酸、胆碱类等。上述9种原型成分与ER α 的结合能分别为-6.7、-8.9、-6.0、-5.7、-5.3、-4.9、-7.3、-3.3、-6.3 kcal·mol⁻¹(1 kcal \approx 4 184 J),与ER β 的结合能分别为-6.6、-7.2、-7.7、8.0、-7.4、-5.5、-6.9、-3.6、-6.4 kcal·mol⁻¹。结论:水晶兰苷等9种入血的原型成分是青盐方在体内发挥雌激素样作用的活性成分,可为该方质量标准的制定及后续研发提供实验依据。

[关键词] 青盐方; 血清药物化学; 分子对接; 原型成分; 指纹图谱; 雌激素受体(ER); 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0159-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220353 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220224.1909.002.html>

[网络出版日期] 2022-02-26 17:36

Analysis of Pharmacodynamic Material Basis of Qingyan Formula Based on UPLC-Q-Orbitrap-MS and Molecular Docking

ZOU Zhao¹, LI Jiashan², XU Ying^{2*}, YANG Yibo², XU Panyu², DU Hanqian²,
ZHU Weifeng¹, LIN Na^{2*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the constituents migrating to blood of Qingyan formula by serum pharmacology, and investigate the binding energy between these constituents and estrogen receptor (ER), so as to confirm the pharmacodynamic material basis of Qingyan formula in rats. **Method:** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field-orbital trap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS) was used to determine the constituents migrating to blood of Qingyan formula in rats by

[收稿日期] 2021-12-13

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A03802);国家自然科学基金项目(81774203,82004248)

[第一作者] 邹钊,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:1374735576@qq.com

[通信作者] *徐颖,博士,研究员,硕士生导师,从事中药药性和中药药理研究,E-mail:yxu@icmm.ac.cn;

*林娜,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理和中药药性研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:linna888@163.com

comparing the fingerprint differences of 70% ethanol extract of Qingyan formula, 70% ethanol extract of each single drug in this formula, blank serum and serum after administration of 70% ethanol extract of Qingyan formula, according to the retention time, relative molecular weight and the primary and secondary ion fragments provided by MS. Mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile(B) for gradient elution (0-5 min, 2%-20%B; 5-10 min; 20%-50%B; 10-15 min, 50%-80%B; 15-25 min, 80%-95%B; 25-26 min, 95%-2%B; 26-30 min, 2%B), the flow rate was $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the injection volume was $5 \mu\text{L}$, electrospray ionization was used with detection range of m/z 150-2 000, positive and negative ion scanning modes. Molecular docking technology was used to characterize the binding energy of constituents migrating to blood with $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$, and to confirm the material basis of this formula. **Result:** After oral administration of Qingyan formula, 30 components were detected in serum, of which 9 were prototype components and 21 were metabolites. Nine prototype components were identified as monotropein, asperuloside, verbascoside, β -ecdysone, allantoin, deacetyl asperuloside acid, echinacoside, betaine and caffeic acid, 21 metabolites mainly included organic acids, amino acids, cholines and so on. The binding energies of the above 9 prototype components with $\text{ER}\alpha$ were $-6.7, -8.9, -6.0, -5.7, -5.3, -4.9, -7.3, -3.3, -6.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ kcal} \approx 4.184 \text{ J}$), and the binding energies of them with $\text{ER}\beta$ were $-6.6, -7.2, -7.7, 8.0, -7.4, -5.5, -6.9, -3.6, -6.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** These nine prototype components into blood are the active ingredients of Qingyan formula that play estrogen-like role in the body, which can provide experimental basis for the formulation of quality standards and subsequent research and development of Qingyan formula.

[Keywords] Qingyan formula; serum pharmacochimistry; molecular docking; prototype components; fingerprint; estrogen receptor (ER); ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field-orbital trap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS)

雌激素在女性生长发育和某些疾病的发生发展过程中发挥着重要作用。据报道,绝经期女性体内雌激素水平下降,近期可出现焦虑,中期可出现生殖靶器官萎缩,远期出现骨质疏松及心血管系统疾病等,而长期服用化学合成雌激素容易引起高血压、水肿等不良反应,且能潜在增加乳腺癌及子宫内膜癌发病风险^[1],因此,选择相对安全的植物雌激素进行替代治疗成为研究热点。植物雌激素是一类天然存在于植物中的非甾体类化合物,能与体内雌激素受体(ER)竞争性结合,通过调节ER发挥雌激素样作用^[2]。传统中药是植物雌激素的重要来源。青盐方记载于《圣济总录》,由肉苁蓉、巴戟天、牛膝、蜀椒、青盐按2:2:2:1.5:1比例组成,5味药皆入肾经,是补肾益精的经典方剂。本课题组前期研究发现,青盐方70%乙醇提取物具有雌激素样作用,能够拮抗去卵巢大鼠生殖靶器官萎缩,促进未成熟小鼠生殖靶器官生长发育,其主要是通过提高血液循环中雌激素水平和靶器官ER表达来发挥雌激素样作用;同时,其可缓解去卵巢大鼠围绝经期综合征近期焦虑症状和远期骨质疏松症状,进而起到抗焦虑及抗骨丢失作用^[3-6],但目前尚未对青盐方发挥疗效作用的物质基础进行深入研究,这在一定

程度上限制了该方的质量标准制定、后续制剂开发及临床合理使用。

中药复方虽成分复杂,但只有吸收入血的成分才能发挥药效,中药血清药物化学研究运用现代分离技术及多维联用技术,分析口服给药后受试对象血清中移行成分,阐明中药体内直接作用物质,以期实现中药复方质量的合理化与标准化。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Orbitrap-MS)对母离子具有高选择性,对精确质量数具有高分辨性,样品的基质效应小,可以实现复杂中药或生物样品成分的定性和定量分析。因此,在前期研究基础上,本实验拟通过对青盐方70%乙醇提取物进行血清药物化学研究,采用UPLC-Q-Orbitrap-MS技术建立血清指纹图谱,以确定青盐方给药后的血中移行成分及其代谢产物,并运用分子对接技术对入血原型成分进行ER结合能计算,以期明确青盐方发挥雌激素样作用可能的药效物质基础。

1 材料

TD5A-WS型台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),BSA224S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],D3024R型高速冷冻型

微量离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司), MTV-100型多管涡旋混合仪(杭州奥盛仪器有限公司), UltiMate 3000 RS型超高效液相色谱仪和 Q-Exactive型高分辨质谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司], EPED-E1-10TJ型超纯水机(南京易普易达科技发展有限公司)。

普通抗凝管(河北鑫乐医疗器械科技股份有限公司,批号19087001),水为超纯水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。酒苻蓉、巴戟天、牛膝饮片(批号分别为1806016、1808003、1809016),蜀(花)椒(批号91501002)和青盐(批号84830501)均购自北京同仁堂崇文门药店,经中国中医科学院中药研究所朱晶晶研究员鉴定,分别为列当科植物肉苻蓉 *Cistanche deserticola* 的干燥带鳞叶的肉质茎的酒制品;茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* 的干燥根;苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* 的干燥根;芸香科花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 的干燥成熟果皮;青盐是卤化物类石盐族湖盐结晶体,主含氯化钠,主产于青海盐湖中。

14只SPF级雌性SD大鼠,体质量(200±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006,实验动物使用许可证号SYXK(京)2019-0003。饲养条件为环境温度22~25℃,相对湿度约45%,自然昼夜节律光照,动物自由摄食与饮水。实验前12h停止喂食但仍给予自由饮水。本文所涉及的动物实验经中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查委员会审核后批准,批准编号2020B100。

2 方法

2.1 青盐方70%乙醇提取物的制备^[2] 青盐方(酒苻蓉、巴戟天、牛膝、蜀椒、青盐)按比例2:2:2:1.5:1分别称取780、780、780、585、390g,合计3315g,加入10倍量70%乙醇回流提取5h,200目筛滤过;滤渣加8倍量70%乙醇回流提取5h,过滤,合并2次滤液,将合并后的提取液减压干燥成粉末状,干燥保存,干粉质量1621g,得率48.9%。同法制备各单味药提取物。

2.2 色谱条件 采用Welch RP-C₁₈色谱柱(2.1mm×150mm,1.8μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5min,2%~20%B;5~10min,20%~50%B;10~15min,50%~80%B;15~25min,80%~95%B;25~26min,95%~2%B;26~30min,2%B),流速0.3mL·min⁻¹,进样量5μL。

2.3 质谱条件 离子源为电喷雾离子源,离子源温

度350℃,扫描方式为正、负离子模式切换,检测模式为全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/dd-MS²),扫描范围 *m/z* 150~2000,电喷雾电压3.8kV,鞘气(氮气)纯度≥99.999%,鞘气压力40arb,去溶剂气(氮气)纯度≥99.999%,去溶剂气温度350℃。碰撞气(高纯氩气)纯度≥99.999%,碰撞能量40eV。

2.4 血清样品的制备与处理

2.4.1 血清样品制备 将SD大鼠随机编号并分为2组,空白组6只、给药组8只,本课题组前期研究确定青盐方70%乙醇提取物大鼠给药的临床等效剂量为1.4g·kg⁻¹^[4],预试验得到青盐方最大给药剂量为临床等效剂量的6倍,故按剂量8.4g·kg⁻¹配制灌胃溶液。按照20mL·kg⁻¹给药,每天2次,连续给药3d^[7],空白组给予相同体积水,末次给药后3h,用3%戊巴比妥钠溶液腹腔注射进行麻醉,腹主动脉取血,室温下静置30min,3000r·min⁻¹离心15min(离心半径15.7cm),取上清液,置于-80℃冰箱冷冻,备用。

2.4.2 血清样本处理 精密吸取血清样本50μL,加入甲醇200μL,涡旋混匀,离心(温度4℃,时间10min,转速2万×g,下同),取上清液,待测。

2.5 体外供试品溶液的制备及处理 称取青盐方及其各单味药的70%乙醇提取物干燥粉末200mg,精密称定,分别加入80%甲醇1mL,涡旋混匀。加入2~3颗二氧化锆研磨珠,研磨提取3min,离心,上清液用0.22μm微孔滤膜过滤,取续滤液,待测。

2.6 数据分析 MS所获得的数据通过Compound Discoverer 2.1完成初步整理后进行数据库检索比对(*mzCloud*、*mzVault*、*ChemSpider*),通过对比给药后血清、空白血清和供试品溶液的MS图谱,将血清和供试品溶液中所含的化合物进行差异性分析。

2.7 分子对接 利用PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载相应化合物的sdf格式文件,使用Chem3D 20.0软件对其进行mol2格式的转换。从RCSB Protein Data Bank数据库(RCSB PDB, <http://www.rcsb.org>)下载ERα(PDBID:7MSA)和ERβ(PDBID:5TOA)的晶体结构,利用PyMOL 2.3.2软件进行去水、加氢等预处理。利用AutoDock Vina 1.2.0进行分子对接,其结果可视化采用PyMOL 2.3.2软件完成。

3 结果

3.1 色谱图采集 采集青盐方70%乙醇提取物溶液、空白血清、含药血清及各单味药70%乙醇提取物溶液在正、负离子模式下的色谱图,见增强出版

附加材料。

3.2 入血成分分析 采用UPLC-Q-Orbitrap-MS对青盐方70%乙醇提取物、空白血清、含药血清及各单味药70%乙醇提取物的化学成分进行推测与指认。将空白血清与含药血清所得图谱进行比对后,所得差异性成分即为入血成分,将其与各单味药70%乙醇提取物检测出的成分进行对比筛选,再结合各单味药相关文献中的化学成分的分子离子峰、二级碎片峰,并利用化学专业数据库(<http://www.organchem.csdb.cn>)、代谢组学数据库(<http://pharmdata.ncmi.cn/dxzx/>)等进行比对,推测可能的

化合物及其名称,并对其来源进行了归属,经分析可得青盐方70%乙醇提取物大鼠给药后入血成分有30种,其中原型成分9种,其余21种为代谢产物,见表1和表2。对结果进行分析后发现,入血原型成分中麦角甾苷、松果菊苷、甜菜碱来源于肉苁蓉,水晶兰苷、车叶草苷、去乙酰基车叶草苷酸来源于巴戟天, β -蜕皮甾酮来源于牛膝,尿囊素、咖啡酸则在肉苁蓉和牛膝中均有检测到。21种代谢产物主要是有机酸、氨基酸和胆碱类,其中有9种成分来源归属未知,这些成分极有可能是青盐方组方配伍给药后经体内吸收、分布、代谢后产生的新产物。

表1 青盐方入血原型成分分析

Table 1 Analysis of prototype components into blood of Qingyan formula

化合物	t_R /min	名称	分子式	准分子离子峰 m/z	特征离子碎片	可能来源
1	1.50	尿囊素 ^[8-9]	$C_4H_6N_4O_3$	157.036 7	97.004 3、114.030 9	肉苁蓉、牛膝
2	1.69	咖啡酸 ^[10-11]	$C_9H_8O_4$	179.055 6	161.044 9、117.033 5	肉苁蓉、牛膝
3	2.08	甜菜碱 ^[12-14]	$C_5H_{11}NO_2$	118.086 5	59.073 7	肉苁蓉
4	3.97	车叶草苷 ^[15-16]	$C_{18}H_{22}O_{11}$	413.108 9	147.045 2、191.034 9	巴戟天
5	9.79	水晶兰苷 ^[17-20]	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.109 9	146.937 5、190.927 8	巴戟天
6	12.73	β -蜕皮甾酮 ^[21-22]	$C_{27}H_{44}O_7$	479.071 9	319.227 8、159.092 1	牛膝
7	16.65	松果菊苷 ^[23-25]	$C_{35}H_{46}O_{20}$	787.237 4	625.729 1、163.038 8	肉苁蓉
8	18.52	麦角甾苷 ^[26-27]	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.198 4	461.098 6、315.051 5	肉苁蓉
9	19.94	去乙酰基车叶草苷酸 ^[28]	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.231 5	209.080 7	巴戟天

3.3 入血原型成分分析与指认 通过查阅各单味药MS分析文献,与其报道的化合物的分子离子峰、碎片离子峰等MS/MS信息进行比对。以青盐方入血原型成分为例说明鉴定过程。化合物1在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 157.036 7 $[M-H]^-$, 推测其分子式 $C_4H_6N_4O_3$, MS/MS图谱中具有明显的 m/z 97.004 3、114.030 9等碎片离子,结合文献[8-9]及mzCloud数据库推测该化合物为尿囊素。化合物2在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 179.055 6 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_9H_8O_4$, 脱去一分子水形成 m/z 161.044 9 $[M-H-H_2O]^-$ 的离子碎片,继续脱去一分子 CO_2 形成离子碎片 m/z 117.033 5 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$,结合文献[10-11]及mzCloud数据库推测该化合物为咖啡酸。化合物3在正离子模式下产生准分子离子峰 m/z 118.086 5 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_5H_{11}NO_2$, MS/MS图谱中具有明显的碎片离子 m/z 59.073 7,结合文献[12-14]及mzCloud数据库推测该化合物为甜菜碱。化合物4在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 413.108 9 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{18}H_{22}O_{11}$, 准分子离子峰脱去一分子葡萄糖残基和一分子 CH_3COOH 形成离子碎片 m/z

191.034 9 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CH_3COOH]^-$,继续丢失一分子 CO_2 形成离子碎片 m/z 147.045 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CH_3COOH-CO_2]^-$,结合文献[15-16]及mzCloud数据库推测该化合物为车叶草苷,其可能裂解途径见增强出版附加材料。

化合物5负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 389.109 9 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{16}H_{22}O_{11}$, 容易脱去一分子糖基和一分子水形成离子碎片 m/z 190.927 8,继续脱去一分子 CO_2 形成离子碎片 m/z 146.937 5,结合文献[17-20]及mzCloud数据库推测该化合物为水晶兰苷。化合物6在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 479.071 9 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{27}H_{44}O_7$, 其丢失20位的侧链形成离子碎片 m/z 319.227 8 $[M-H-C_8H_{16}O_3]^-$,侧链形成碎片离子 m/z 159.092 1 $[M-H-C_{19}H_{28}O_4]^-$,结合文献[21-22]及mzCloud数据库推测其为 β -蜕皮甾酮,其可能裂解途径见增强出版附加材料。化合物7在正离子模式下产生准分子离子峰 m/z 787.237 4 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{35}H_{46}O_{20}$, 其脱去一分子葡萄糖残基形成 m/z 625.729 1 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ 的离子碎片,继续水解掉一分子鼠李糖、咖啡酰基、葡萄糖形成 m/z

表2 青盐方入血代谢成分分析

Table 2 Analysis of metabolic components into blood of Qingyan formula

化合物	t_R /min	名称	分子式	可能来源
10	1.39	L-赖氨酸	$C_6H_{14}N_2O_2$	生物素代谢
11	1.43	琥珀酸半醛	$C_4H_6O_3$	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
12	3.30	缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	氨基酸代谢
13	6.00	3-(1-hydroxyethyl)-2,3,6,7,8,8a-hexahydropyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione	$C_9H_{14}N_2O_3$	-
14	11.02	DL- α -甲氧基苯乙酸	$C_9H_{10}O_3$	酚酸类
15	11.29	斑蝥素	$C_{10}H_{12}O_4$	-
16	12.89	丁香酸	$C_9H_{10}O_5$	没食子酸及其衍生物
17	13.93	3-叔丁基己二酸	$C_{10}H_{18}O_4$	有机酸类
18	13.99	1-(1,3-苯并二氧杂环戊-5-基)-2-(1-吡咯烷基)-1-戊酮	$C_{16}H_{21}NO_3$	-
19	14.66	(9aR,9bS)-9a-hydroxy-6,9-dimethyl-3-methylene-3,3a,4,5,9a,9b-hexahydroazuleno[4,5-b]furan-2,7-dione	$C_{15}H_{16}O_4$	-
20	15.00	白皮杉醇	$C_{14}H_{12}O_4$	-
21	15.01	(3R,4S)-4,6,8-trihydroxy-7-methoxy-3-methyl-3,4-dihydro-1H-isochromen-1-one	$C_{11}H_{12}O_6$	-
22	15.85	5-(ethylsulfonyl)-2-[(3S)-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-3-pyrrolidinyl]-1,3-benzoxazole	$C_{18}H_{24}N_2O_4S$	-
23	16.13	6-酮基前列腺素F _{1α}	$C_{20}H_{34}O_6$	前列环素代谢物
24	16.54	O-去甲文拉法辛	$C_{16}H_{25}NO_2$	代谢产物的琥珀酸盐形式
25	16.80	对羟基苯甲酸丙酯	$C_{10}H_{12}O_3$	含有苯甲酸的芳香族化合物
26	17.92	对甲氧基肉桂醛	$C_{10}H_{10}O_2$	-
27	18.62	3,5-双(叔丁基)苯甲醛	$C_{15}H_{22}O$	-
28	19.53	2-花生四烯酸甘油	$C_{23}H_{38}O_4$	花生四烯酸衍生物
29	22.62	邻苯二甲酸二辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	苯甲酸的酯衍生物
30	23.89	DL-dipalmitoylphosphatidylcholine	$C_{40}H_{80}NO_8P$	磷脂酰胆碱类化合物

163.038 8 $[M+H-C_6H_{10}O_5-C_{20}H_{30}O_{12}]^+$ 的离子碎片,结合文献[23-25]及mzCloud数据库推测该化合物为松果菊苷,其可能的裂解途径见增强出版附加材料。化合物8负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 623.198 4 $[M-H]^-$,推测其分子式为 $C_{29}H_{36}O_{15}$,其水解掉一分子咖啡酰基形成 m/z 461.098 6 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 的离子碎片,继续失去中性碎片形成 m/z 315.051 5 $[M-H-C_9H_6O_3-C_6H_{10}O_4]^-$ 的离子碎片,结合文献[26-27]及mzCloud数据库推测该化合物为麦角甾苷,其可能裂解途径见增强出版附加材料。化合物9负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 389.231 5 $[M-H]^-$,推测其分子式为 $C_{16}H_{22}O_{11}$,其脱去一分子葡萄糖残基,再脱去一分子 H_2O ,形成 m/z 209.080 7 $[M-H-C_6H_{12}O_5-H_2O]^-$ 离子碎片,结合文献[28]及mzCloud推测该化合物为去乙酰基车叶草苷酸,其可能裂解途径见增强出版附加材料。

3.4 代谢产物分析 代谢产物主要是有机酸、氨基酸、胆碱类,利用化学专业数据库和代谢组学数据

库进行实验结果确认,推测这些代谢产物的可能来源主要是氨基酸代谢、磷脂酰胆碱代谢、花生四烯酸代谢等,其中有9种成分在数据库中未匹配到相应结果,尚需进一步研究确认。

3.5 入血成分与ER结合 采用分子对接技术检测入血成分与ER α 、ER β 的结合能,见表3。结果发现雌二醇与ER α 及ER β 的结合能均 ≤ -7 kcal \cdot mol $^{-1}$ (1 kcal \approx 4 184 J),提示其与ER具有强结合能力;除尿囊素和甜菜碱外,ER α 与另外7个入血原型成分的结合能均 ≤ -5 kcal \cdot mol $^{-1}$,其中与车叶草苷、去乙酰基车叶草苷酸的结合能均 ≤ -7 kcal \cdot mol $^{-1}$,提示具有强结合活性。除了松果菊苷和甜菜碱外,ER β 与另外7个入血原型成分的结合能均 ≤ -5 kcal \cdot mol $^{-1}$,其中与车叶草苷、麦角甾苷、 β -蜕皮甾酮的结合能均 ≤ -7 kcal \cdot mol $^{-1}$,说明具有强结合活性,推测这些成分可能是青盐方主要药效物质。入血成分与ER结合能 ≤ -7 kcal \cdot mol $^{-1}$ 的分子对接模式见图1。

表3 青盐方活性成分与ER α 、ER β 的结合能

Table 3 Binding energy of active ingredients of Qingyan formula with ER α and ER β

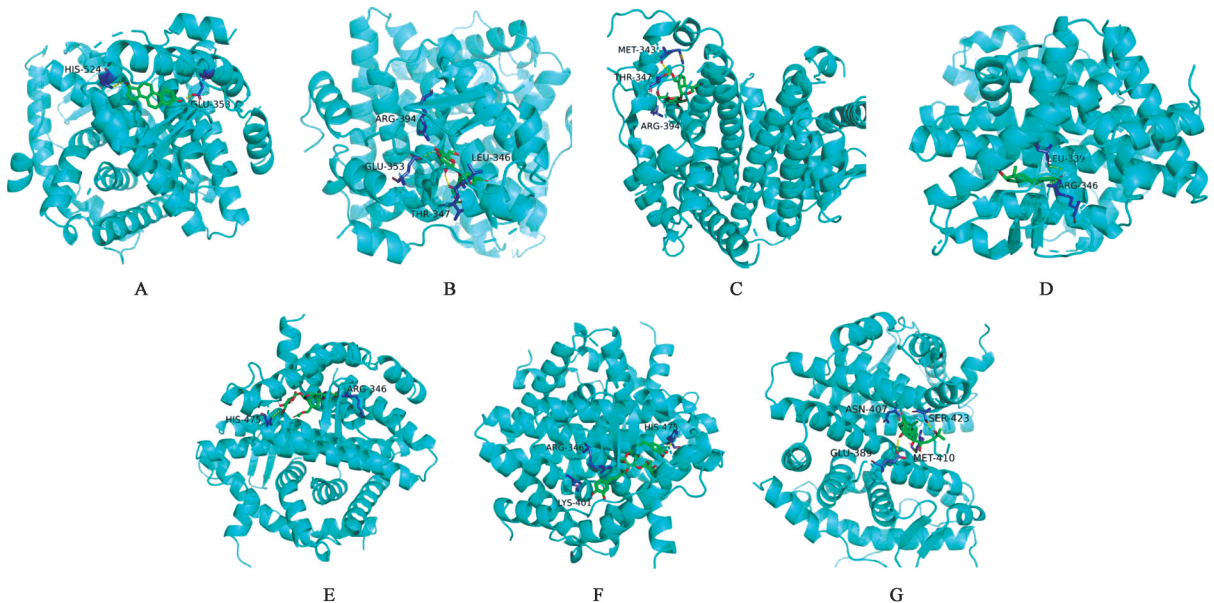
成分	ER α	ER β
雌二醇	-9.6	-11.0
水晶兰苷	-6.7	-6.6
车叶草苷	-8.9	-7.2
麦角甾苷	-6.0	-7.7
松果菊苷	-5.7	8.0
β -蜕皮甾酮	-5.3	-7.4
尿囊素	-4.9	-5.5
去乙酰基车叶草苷酸	-7.3	-6.9
甜菜碱	-3.3	-3.6
咖啡酸	-6.3	-6.4

4 讨论

本文利用UPLC-Q-Orbitrap-MS检测口服青盐方70%乙醇提取物后大鼠体内入血成分,最终检测出30种入血成分,其中9种原型成分。结合相关文献报道,确定9个原型成分主要为苯乙醇苷类、环烯醚萜类、生物碱类及有机酸类,这些成分主要来源于肉苁蓉、巴戟天、牛膝;21种代谢产物则涉及有机酸、氨基酸、胆碱类等。在此基础上,笔者采用分子对接技术表征出入血原型成分与ER α 、ER β 的结合能,进一步明确青盐方主要药效物质为水晶兰苷、车叶草苷、麦角甾苷、松果菊苷、 β -蜕皮甾酮、尿囊素、去乙酰基车叶草苷酸、甜菜碱、咖啡酸,可为青

盐方质量标准的制定及其后续开发提供实验依据。

分子对接是将药物与靶蛋白通过化学环境和能量等相互识别寻找最低互作能量位点的过程。本研究利用AutoDock Vina 1.2.0软件进行分析,以结合能作为评价分子对接结果的依据。一般来说,当结合能 ≤ -4.3 kcal \cdot mol $^{-1}$ 时,说明二者有一定结合活性;当结合能 ≤ -5 kcal \cdot mol $^{-1}$ 时,说明二者有较好结合活性;当结合能 ≤ -7 kcal \cdot mol $^{-1}$ 时,说明有强结合活性;结合能越低,表明分子与蛋白结合能力越佳^[29]。ER分为2种亚型(ER α 和ER β),存在于细胞核及细胞膜内,主要通过经典调节途径,即雌激素与ER首先在细胞核结合形成二聚体,再结合位于目标基因启动子的雌激素反应元件(ERE),进而启动下游雌激素依赖的生理生化反应来发挥作用^[30],故本文选择对青盐方入血成分进行ER结合能的计算,结果表征出其入血成分车叶草苷、 β -蜕皮甾酮、麦角甾苷及去乙酰基车叶草苷酸与ER均具有强结合活性,水晶兰苷、松果菊苷、尿囊素和咖啡酸与ER均有一定的结合活性,而甜菜碱与ER的结合活性最弱。本课题组前期研究表明尿囊素、去乙酰基车叶草苷酸能显著促进MG-63成骨细胞的增殖并能显著增强其碱性磷酸酶活性,同时降低破骨细胞的数目,降低破骨细胞活性,抑制破骨细胞形成。同时,据报道,尿囊素具有雌激素样活性^[31];麦角甾苷和松果菊苷可通过结合ER而发挥雌激素作用^[30],



注:A.雌二醇-ER α ;B.车叶草苷-ER α ;C.去乙酰基车叶草苷酸-ER α ;D.雌二醇ER β ;E.车叶草苷-ER β ;F.麦角甾苷-ER β ;G. β -蜕皮甾酮-ER β ;HIS.组氨酸;GLU.谷氨酸;ARG.精氨酸;THR.苏氨酸;LEU.亮氨酸;MET.蛋氨酸;LYS.赖氨酸;ASN.天冬氨酸;SER.丝氨酸

图1 青盐方入血成分与ER的分子对接模式

Fig. 1 Molecular docking mode between constituents migrating to blood of Qingyan formula and ER

且麦角甾苷还具有雄性激素作用^[32];β-蜕皮甾酮作为牛膝的主要活性成分之一,能够促进ER阳性细胞增殖,表现出雌激素样作用,也具有提高组织ER表达水平的作用,增强内源性雌激素的效应^[33];咖啡酸对ER阳性MCF-7细胞有增殖作用,且对ERα和ERβ均表现出部分激动活性^[34]。本文研究发现水晶兰苷、车叶草苷、去乙酰基车叶草苷酸等与ER结合能 $\leq -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明其与ER有较好的结合活性,而甜菜碱与ER的结合性能较弱,但这些成分是否具有雌激素样作用尚需进一步研究确认。

前期药效实验结果表明,青盐方70%乙醇提取物的雌激素活性优于水提物,且青盐方70%乙醇提取物治疗围绝经期综合征已经获得发明专利(专利号201810866887.0)。本课题组前期还利用网络药理学技术对青盐方不同配伍组的活性成分-靶点进行预测,以在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)中生物利用度>30%、类药性>0.18为条件对青盐方中5味药的化学成分进行筛选,最终得到74个化学成分、322个靶点。本研究检测出了青盐方的9个入血原型成分,经与青盐方活性成分-靶点预测结果比对后,发现咖啡酸、β-蜕皮甾酮参与调控雌激素相关靶标,例如,细胞色素P450(CYP)1A1、CYP1B1, CYP1A1参与雌激素C-4、C-6α、C-15α、C-7α的羟化代谢,属于雌激素代谢相关酶^[35];由分子对接结果可知,咖啡酸、β-蜕皮甾酮具有雌激素活性,验证了部分青盐方活性成分-靶点预测的结果。CYP1B1是参与雌激素C-4氧化反应的代谢酶,即17β-雌二醇代谢的关键酶,在雌激素局部代谢及维持雌激素平衡上起重要作用^[36];其他原型成分或未见雌激素相关研究报道,或与雌激素效应相关文献未被收录在TCMSP,提示这9种原型成分的雌激素活性尚有待进一步研究。

青盐方为补肾益精的经典方剂。方中肉苁蓉味甘、咸,性温,归肾、大肠经,为君药;巴戟天味辛、甘,性微温,归肾、肝经,为臣药;牛膝味苦、甘、酸,性平,入肝、肾经,为佐药;蜀椒味辛,性温,归脾、胃、肾经,为佐药;青盐味咸,性寒,归心、肾、膀胱经,为使药;全方5味药皆入肾经。本课题组前期针对中药药性理论的重要组成部分中药方剂归经理论,将现代医学中的受体学说与中药归肾经联系起来,以“归肾经中药与生殖-内分泌-骨骼系统网络的相关性”为命题,从方药/活性成分-归经-靶器官-受体-靶基因思路切入研究,探讨中药方剂归肾经的科学内涵,研究发现经典名方青娥方^[37]、七宝美髯

方^[38]、青盐方^[4]均具有ER激动剂样作用,通过经典的ER-ERE信号转导通路发挥作用;证实雌激素样作用是此类补肾方药归肾经药效表征之一,方中雌激素样作用活性成分为其归肾经的物质基础,靶器官上的ER是归肾经的生物学靶点之一。提示入血原型成分水晶兰苷、车叶草苷、麦角甾苷、松果菊苷、β-蜕皮甾酮、尿囊素、去乙酰基车叶草苷酸、甜菜碱、咖啡酸可与ER结合,推测这些成分可能是该方归肾经的物质基础,但以待后续进行实验验证。同时,本课题组后续将利用代谢组学对青盐方代谢产物及代谢途径进行分析,以明确该方治疗围绝经期综合征的作用机制,为其开发应用提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 孔令娜,左萍萍. 植物雌激素研究进展[J]. 生殖医学杂志,2003,12(1):46-53.
- [2] 赵元,郑红霞,徐颖,等. 中药植物雌激素的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3474-3487.
- [3] ZHAO Y, ZHENG H X, XU Y, et al. Estrogenic effect of the extract of Qingyan formula on reproductive tissues in immature mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 5493714.
- [4] ZHENG H X, ZHAO Y, XU Y, et al. Long-time qingyan formula extract treatment exerts estrogenic activities on reproductive tissues without side effects in ovariectomized rats and via active ER to ERE-independent gene regulation[J]. Aging, 2019, 11(12): 4032-4049.
- [5] ZHAO Y, XU Y, ZHENG H X, et al. Qingyan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113644.
- [6] 赵元,郑红霞,徐颖,等. 青盐方治疗围绝经期焦虑症的网络分析及实验验证[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4129-4139.
- [7] 张敏,吴青青,李晨辉,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析不同配伍比例雄黄对青黛入血成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 79-86.
- [8] 张亚锋,舒蕊华,王苑桃,等. HPLC-MS/MS法测定山中药中尿囊素的量[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3627-3629.
- [9] 冯梓誉,杨晗,李义凯,等. 应用UPLC-MS/MS观测6种中药对尿酸盐体外溶解度的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(5): 1705-1711.
- [10] 刘佳星,魏洁,武锦春,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/

- MS技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 1-12.
- [11] 赵晓梅, 程宇欣, 梁彩霞, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的吴茱萸化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 113-126.
- [12] 张金磊, 邢丽杰, 王远, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定红枣中甜菜碱[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(17): 213-215.
- [13] 汤丽昌. 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定劲酒中8种活性成分含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6724-6728.
- [14] 赖丽嫦, 陈丰连, 王术玲, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS的广金钱草水提物抗肾草酸钙结石大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 950-959.
- [15] 高天元, 雷雨恬, 唐国琳, 等. 药用鸡矢藤药材化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 134-141.
- [16] 赵祥升, 弓宝, 周亚奎, 等. UPLC-MS/MS同时测定巴戟天中4个环烯醚萜苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(9): 1490-1495.
- [17] ZHANG Z G, ZHANG Q Y, YANG H, et al. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice [J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 166-172.
- [18] ZHOU Q, YAN H, LI R, et al. Quantitative determination of monotropein in rat plasma and tissue by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic and tissue distribution studies [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2018, 28(4): 451-456.
- [19] 倪建成, 卢柱华, 莫舒云, 等. 巴戟天化学成分的研究[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1212-1216.
- [20] 彭朵花, 周芳, 欧阳文, 等. 巴戟天中水晶兰苷的提取分离及其含量测定[J]. 中南药学, 2008, 16(6): 705-707.
- [21] 李建朋, 王彦志, 李曼倩, 等. 基于UHPLC-Q-Trap-MS/MS对牛膝8种成分的定量研究[J]. 中药材, 2021(6): 1433-1438.
- [22] CHAKRABORTY S, BASU S. Dual inhibition of BACE1 and A β aggregation by β -ecdysone: Application of a phytoecdysteroid scaffold in Alzheimer's disease therapeutics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 281-287.
- [23] 王力伟, 曹瑞, 房永雨, 等. UPLC-QQQ-MS法测定肉苁蓉中有效成分的含量[J]. 中药材, 2017, 40(2): 295-300.
- [24] 曾永长, 梁少瑜, 吴俊洪, 等. 基于UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS技术的中药复方新天泰1号多类别多成分质量控制方法研究[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3835-3841.
- [25] 谭乐俊, 王萌, 任晓亮, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS的中药水蜜丸制剂二至丸多成分稳定性研究[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2260-2268.
- [26] KOBAYASHI H, OGUCHI H, TAKIZAWA N, et al. New phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. I. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(8): 3309-3314.
- [27] 李文兰, 白晶, 臧宝珊, 等. HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS分析肉苁蓉拟雌激素活性部位入血成分[J]. 质谱学报, 2015, 36(3): 223-228.
- [28] 任晓航, 石梦鸽, 刘博男, 等. UPLC-QQQ-MS法测定巴戟天炮制前后10种成分的含量[J]. 中药材, 2019, 42(3): 588-593.
- [29] 郭锦晨, 王荃, 孙宇洁, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨桑叶-菊花治疗高血压的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(5): 847-858.
- [30] 王琳琳, 李薇, 宋新波, 等. 肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的植物雌激素活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 377-380.
- [31] 郑晓珂, 张贝贝, 曾梦楠, 等. 尿囊素雌激素样作用[J]. 药科学报, 2018, 53(1): 68-73.
- [32] 于连云. 肉苁蓉的药理作用及临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(4): 87-88.
- [33] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 异补骨脂素和蜕皮甾酮对人乳腺癌 T47D 细胞增殖及 ER 亚型表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(4): 242-245.
- [34] AN B H, JEONG H, KIM J H, et al. Estrogen receptor-mediated transcriptional activities of spent coffee grounds and spent coffee grounds compost, and their phenolic acid constituents [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(31): 8649-8659.
- [35] 王晓莉, 曾静, 王珏, 等. 雌激素代谢酶 CYP1A1 及 COMT 基因多态性与子宫肌瘤相关性研究[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(2): 120-123.
- [36] 朱壮彦, 糜若然, 刘静. CYP1B1 基因多态性与卵巢癌易感性的研究[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(3): 184-187.
- [37] XU Y, ZHANG Z J, GENG F, et al. Treatment with Qing'E, a kidney-invigorating Chinese herbal formula, antagonizes the estrogen decline in ovariectomized mice[J]. *Rejuvenation Res*, 2010, 13(4): 479-488.
- [38] XU Y, MA X P, DING J, et al. Treatment with qibaomeiran, a kidney-invigorating Chinese herbal formula, antagonizes estrogen decline in ovariectomized rats[J]. *Rejuvenation Res*, 2014, 17(4): 372-381.

[责任编辑 刘德文]