

· 药物代谢 ·

基于序贯代谢方法的痛风定胶囊体内代谢分析

陈洪娇¹, 杨文宁¹, 尹仁芳², 朱彦², 祁东盈¹, 李雪岩¹, 刘慧宁¹, 于爽¹, 潘艳丽^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中国中医科学院中医药信息研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:采用序贯代谢方法,结合超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS),鉴定痛风定胶囊在大鼠体内的原型成分和代谢物。方法:采用ACQUITY UPLC BEH Shield RP18色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1 min, 5%B; 1~2.4 min, 5%~10%B; 2.4~13.5 min, 10%~32%B; 13.5~18.5 min, 32%~90%B; 18.5~19 min, 90%~5%B; 19~21 min, 5%B),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL,柱温35 °C,运用加热电喷雾离子源(HESI),扫描范围 m/z 100~1 500,正、负离子模式检测。通过比较给药血浆和空白血浆的差异,对由肠道灌流并行采血制备得到的肠代谢、肝代谢血浆样品及灌胃给药方法制备得到的综合代谢血浆样品中的原型入血成分和代谢产物进行鉴定。结果:从肠代谢、肝代谢及综合代谢样品中分别检测到了76、53、74个化学成分,从上述不同血浆样品中共鉴定出100个化学成分,包括64种原型入血成分(34个生物碱类、12个萜类、9个有机酸类、6个黄酮类与3个其他类成分)与36种代谢产物,代谢产物生成过程中涉及的代谢反应主要有葡萄糖醛酸化、去葡萄糖基化、脱氢化与羟基化。结论:痛风定胶囊中化学成分在肠道与肝脏处会发生一系列代谢反应,生成大量代谢产物,其中生物碱类可能是其主要成分群,可为该制剂体内药效物质基础的系统阐释奠定基础。

[关键词] 痛风定胶囊; 序贯代谢方法; 超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS); 羟基化; 葡萄糖醛酸化; 生物碱; 萜类

[中图分类号] R22;R28;R96;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)24-0160-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220853 [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.20220829.2019.004.html>

[网络出版日期] 2022-08-30 16:15

Metabolic Analysis of Tongfengding Capsules *in vivo* Based on Sequential Metabolism

CHEN Hongjiao¹, YANG Wenning¹, YIN Renfang², ZHU Yan², QI Dongying¹, LI Xueyan¹,

LIU Huining¹, YU Shuang¹, PAN Yanli^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Institute of Information on Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Based on sequential metabolism and ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS), to identify the prototype components and metabolites of Tongfengding capsules in rat plasma. **Method:** An ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used for gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution (A) - acetonitrile (B) as the mobile phase (0-1 min, 5%B; 1-2.4 min, 5%-10%B; 2.4-13.5 min, 10%-32%B; 13.5-18.5 min, 32%-90%B; 18.5-19 min, 90%-5%B; 19-21 min, 5%B) at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, injection volume of 2 μL and column temperature at 35 °C. The heated electrospray ionization (HESI) was applied under positive and negative ion modes, and the scanning range was m/z 100-1 500. By comparing the differences between the administered plasma and the blank plasma, the prototype components and metabolites in intestinal

[收稿日期] 2022-06-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973295)

[第一作者] 陈洪娇,在读硕士,从事药物代谢与药靶结合研究,E-mail:1736160007@qq.com

[通信作者] *潘艳丽,博士,研究员,从事医药信息学研究,Tel:010-64089636,E-mail:panely@163.com

metabolism sample and liver metabolism sample prepared by intestinal perfusion with parallel blood collection, and comprehensive metabolism sample prepared by intragastric administration method were identified. **Result:** A total of 76, 53, 74 chemical components were detected in the intestinal metabolism sample, the liver metabolism sample and the comprehensive metabolism sample. A total of 100 components were identified from these different plasma samples, including 64 prototype components (34 alkaloids, 12 terpenoids, 9 organic acids, 6 flavonoids and 3 other components) and 36 metabolites. The main metabolic reactions involved in the formation of metabolites were glucuronidation, deglycosylation, dehydrogenation and hydroxylation. **Conclusion:** The chemical components of Tongfengding capsules can undergo a series of metabolic reactions in the intestine and liver, and a large number of metabolites are generated, among which alkaloids may be the leading component group for efficacy, which can lay the foundation for systematic elucidating the material basis of Tongfengding capsules *in vivo*.

[Keywords] Tongfengding capsules; sequential metabolism; ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS); hydroxylation; glucuronidation; alkaloids; terpenoids

除了直接作用于肠道菌群或肠道靶点的药物外,通常情况下,中药口服给药后,药效成分有序经过胃肠道及肝脏的生物转化后进入血液循环^[1-2],最终到达靶器官并作用于相应靶点才能发挥整体药效^[3],因此,中药口服后的入血成分更有可能是潜在的 药物活性成分,而锁定这些潜在的 药物活性成分 是阐明其作用机制的基础。序贯代谢方法对药物口服后在体内的吸收与代谢情况进行逐层递进研究^[4-5],可实现对入血成分的系统 and 全面代谢变化表征,是研究药物体内吸收、代谢情况的强有力技术手段^[6]。超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS)具有高灵敏度、高分辨率的特点,在鉴定复杂基质样品中的微量化学成分方面具有独特优势,常用于生物样品中原型成分与代谢产物的鉴别^[7-9]。

痛风定胶囊由秦艽、黄柏、延胡索、赤芍、川牛膝、泽泻、车前子与土茯苓8味中药组成,收载于2020年版《中华人民共和国药典》,具有清热祛湿、活血通络定痛的功效^[10],临床上常用于治疗痛风^[11-12]、高尿酸血症^[13-14]与类风湿性关节炎^[15]等。目前,关于痛风定胶囊化学成分方面的研究较少^[16-17],本课题组前期针对这一问题,从痛风定胶囊中鉴定出了141个化学成分,主要为生物碱类、黄酮类、有机酸类与萜类化合物^[18]。但该制剂发挥临床疗效的物质基础尚未充分阐明,这在一定程度上限制了痛风定胶囊的质量标准制定及进一步开发应用。分析入血成分可快速、准确地解析中药药效物质,也是中药质量标志物筛选的重要依据,是快速确定中药体内药效物质的有效途径之一^[19-20]。基于此,本实验选择痛风定胶囊为研究对象,采用序贯

代谢方法,结合UPLC-HRMS技术,解析该制剂在体内的原型成分与代谢产物,为进一步阐明其治疗痛风、高尿酸血症等疾病的体内药效物质基础与作用机制提供实验依据。

1 材料

Vanquish型超高效液相色谱仪和Q-Exactive型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),BSA2202S型电子分析天平(德国赛多利斯公司),1-15PK型高速冷冻离心机(德国Sigma公司),BT-100-1F型蠕动泵、LSP02-1B型注射泵(保定兰格恒流泵有限公司),CM-12型水浴氮吹仪(北京成萌伟业科技有限公司)。

痛风定胶囊(四川升和药业股份有限公司,批号2008103),腺苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷、绿原酸、芍药苷、盐酸黄连碱和盐酸药根碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号依次为110879-201703、111865-201704、110785-201404、110753-201817、110736-201842、112026-201601、110733-201609,纯度分别为99.7%、97.4%、98.3%、96.8%、97.4%、95.1%、89.5%),木兰花碱、芍药内酯苷、非洲防己碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、水杨酸和龙胆苦苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号依次为R21M9F61834、Y21A9H59553、W21J9Z66216、Y31J9H67024、Z12J7X15968、J22S6J3607、Y30J9Q66926,纯度分别为≥98%、≥91.4%、≥98%、≥98%、≥98%、≥98%、≥98%),黄柏碱、四氢小檗碱、落新妇苷、黄杞苷、延胡索甲素、杯苋甾酮、原阿片碱、脱氢紫堇碱和延胡索乙素对照品(成都植化纯生物技术有限公司,批号依次为210517、200606、201018、201006、

210316、200926、210415、201208、200710,纯度均 \geq 98%),羟基芍药苷对照品(上海同田生物技术有限公司,批号18031641,纯度 \geq 98%),水合氯醛(福晨天津化学试剂有限公司,批号20181020),肝素钠注射液(上海上药第一生化药业有限公司,批号1804103),水为屈臣氏饮用水,甲醇、乙腈为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级SD雄性大鼠,体质量220~250 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010,本文涉及的动物实验已通过北京中医药大学伦理部的伦理审批(伦理审批号BUCM-4-2019060515-1028)。大鼠饲养于昼夜节律光照条件下(温度20~24 $^{\circ}$ C,相对湿度50%~70%),实验前适应性饲养7 d,自由进食进水。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备 取各对照品少量置于同一5 mL量瓶中,加甲醇约3 mL,超声(40 kHz,200 W,下同)使溶解,加甲醇定容,混匀,即得。相对分子质量相同的同分异构体(芍药苷、芍药内酯苷)配制于不同量瓶中,配制过程与上述一致。

2.2 灌流液的制备 取痛风定胶囊内容物适量,研细,称取10.01 g,加水100 mL,超声提取30 min,于8 500 r \cdot min $^{-1}$ 离心5 min(离心半径10 cm,下同),残渣重复上述提取离心过程,合并2次上清液,55 $^{\circ}$ C水浴浓缩,用水定容至100 mL量瓶中,即得。

2.3 灌胃液的制备 取痛风定胶囊内容物1.50 g,加0.5%羧甲基纤维素钠溶液10 mL后用移液枪打混匀,制成质量浓度为0.15 g \cdot mL $^{-1}$ 的悬浮液。

2.4 肠代谢研究 随机选取4只12 h内禁食的大鼠,腹腔注射10%水合氯醛,腹主动脉采血并置于37 $^{\circ}$ C水浴保温,用于补充手术过程中损失的血液。另取禁食(不禁水)的大鼠麻醉,沿腹中线剪开腹腔,选择十二指肠以下约10 cm的空肠作为供试肠段,先用37 $^{\circ}$ C生理盐水缓慢冲出肠内容物,至流出液澄清,继续充入空气将生理盐水排净。将灌流液注入肠段,末端开口排出,通过注射泵控制流速为0.2 mL \cdot min $^{-1}$ 。用37 $^{\circ}$ C生理盐水润湿过的纱布覆盖在裸露肠段上,保温灯加热。暴露颈静脉,插入静脉留滞针,通过蠕动泵连接到盛有供血的离心管中;在肠系膜静脉插入充满肝素的静脉留滞针,结扎周围多余血管,另一端通过蠕动泵收集血液至干净离心管。开启蠕动泵,同时结扎肝门静脉,进行颈静脉输血(流速0.3 mL \cdot min $^{-1}$),肠系膜静脉采血,连续采血2 h后处死大鼠。

2.5 肝代谢成分鉴定 另取5只禁食(不禁水)的大鼠麻醉,除不结扎肝门静脉,在股静脉处采血外,其余操作同2.4项下。

2.6 综合代谢成分鉴定 随机选取3只SD大鼠,给予灌胃液4 mL,2 h后腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,4 $^{\circ}$ C储存,备用。

2.7 血浆样品处理 将给药收集后的血浆样品或空白血浆样品于4 $^{\circ}$ C、4 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心10 min,取上清液加入等体积乙腈混匀,涡旋2 min,4 $^{\circ}$ C离心(1万 r \cdot min $^{-1}$,10 min,下同),吸取上清液,氮气吹干,加50%甲醇200 μ L复溶,离心,吸取上清液,待测。

2.8 色谱条件 采用ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm,1.7 μ m),柱温35 $^{\circ}$ C,流速0.3 mL \cdot min $^{-1}$,流动相选择0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~1 min,5%B;1~2.4 min,5%~10%B;2.4~13.5 min,10%~32%B;13.5~18.5 min,32%~90%B;18.5~19 min,90%~5%B;19~21 min,5%B),进样量2 μ L。

2.9 质谱条件 加热电喷雾离子源(HESI),正、负离子模式检测,扫描范围 m/z 100~1 500,HESI $^{+}$ /HESI $^{-}$ 喷雾电压设定为3.8 kV/-3.2 kV,鞘气、辅助气体积流量分别为35、15 arb,辅助气温度300 $^{\circ}$ C,离子传输管温度350 $^{\circ}$ C,扫描模式为全扫描/数据依赖二级质谱扫描(Full MS/dd-MS 2),Full MS分辨率为7万,dd-MS 2 分辨率17 500,碰撞能量20、40、60 eV。

3 结果

3.1 原型入血成分鉴定 分析对照品的二级碎片信息并归纳总结不同类型化合物质谱裂解特征,将化合物母离子的分子式、保留时间(t_R)、裂解规律及其二级碎片,与文献报道、中药成分高分辨质谱数据库OTCML进行比对,完成化合物的定性鉴别。二级碎片的产生与碰撞模式、碰撞能量相关。为了使同一化合物在实验中获得与OTCML类似的二级碎片信息,在方法开发时,将高能诱导裂解(HCD)裂解池的参数设置与建立OTCML时设定的参数一致,即碰撞方式为归一化碰撞能量模式,以实现化合物的快速比对与鉴别。痛风定胶囊各处理组血浆样品的总离子流色谱图(TIC)见增强出版附加材料。结果表明从不同血浆样品中共鉴定出64种原型入血成分,包括34个生物碱类成分、12个萜类成分、9个有机酸类成分、6个黄酮类成分与3个其他类成分。其中,从肠代谢样品、肝代谢样品及综合代谢样品中分别鉴定出58、30、45个原型入血成分,化合物鉴定结果见表1。

表1 痛风定胶囊中原型入血成分的UPLC-HRMS鉴定

Table 1 Identification of prototype components absorbed into plasma of Tongfengding capsules by UPLC-HRMS

化合物	t_r /min	分子式	准分子离子 m/z	δ / ppm	主要二级碎片	名称	肠 代谢	肝 代谢	综合 代谢
1	0.83	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.103 2 [M+H] ⁺	-0.7	136.061 8	腺苷 ^a	N	N	Y
2	0.90	C ₄ H ₆ O ₅	133.013 1 [M-H] ⁻	-4.6	115.002 4, 89.023 1, 71.012 5	苹果酸 ^[21]	Y	N	Y
3	1.09	C ₆ H ₈ O ₇	191.018 8 [M-H] ⁻	-2.2	173.008 4, 129.018 2, 111.007 5	柠檬酸 ^[21]	Y	Y	Y
4	2.55	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 9 [M-H] ⁻	1.1	211.060 5, 167.070 3, 149.059 7, 123.043 9	京尼平苷酸 ^[22]	Y	N	N
5	3.77	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	314.174 8 [M] ⁺	-1.0	298.106 4, 269.117 2, 237.090 0, 107.049 4	lotusine ^[23]	Y	Y	Y
6	3.79	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.128 9 [M-H] ⁻	1.0	213.076 2, 169.086 0, 151.075 5	马钱苷酸 ^a	Y	Y	Y
7	3.97	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 6 [M-H] ⁻	2.4	191.055 3, 179.043 0, 135.044 0	隐绿原酸异构体 ^[22]	Y	N	N
8	3.99	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃ ⁺	298.143 6 [M] ⁺	-0.7	283.119 8, 255.123 8,	A ₁ ^[23]	Y	N	N
9	4.12	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 1 [M-H] ⁻	-1.2	119.012 4, 108.020 4, 93.033 3, 81.033 2	原儿茶醛 ^b	Y	N	Y
10	4.29	C ₂₀ H ₂₂ NO ₅ ⁺	356.148 7 [M] ⁺	-1.4	206.081 0, 191.057 5	氧化黄柏碱 ^[24]	Y	Y	Y
11	4.42	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342.169 6 [M] ⁺	-1.2	192.101 7, 177.078 3	黄柏碱 ^a	Y	Y	Y
12	4.49	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	417.140 0 [M+COOH] ⁻	1.9	209.081 2, 194.057 7, 179.034 2, 161.023 4	紫丁香酚苷 ^b	Y	N	Y
13	4.52	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.108 5 [M-H] ⁻	1.6	345.118 7, 209.044 6, 165.054 7, 121.064 6	secologanoside ^[25]	Y	N	Y
14	4.58	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	541.152 8 [M+Na] ⁺	0.0	365.105 1, 347.094 4	A ₂ ^[26]	Y	N	Y
15	4.84	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈	448.196 3 [M+H] ⁺	-0.7	286.143 3, 255.101 3, 107.079 4	A ₃ ^[23]	Y	Y	Y
16	4.89	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.169 6 [M+H] ⁺	-1.2	297.111 7, 282.088 3, 265.085 6, 237.090 7	木兰花碱 ^a	Y	Y	Y
17	5.08	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.150 7 [M-H] ⁻	2.1	465.140 7, 137.023 2, 93.033 2	羟基芍药苷 ^a	Y	Y	Y
18	5.14	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	401.108 2 [M+COOH] ⁻	1.0	179.055 2, 149.059 5, 119.033 8	龙胆苦苷 ^a	Y	Y	Y
19	5.52	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	314.174 8 [M] ⁺	-1.0	298.106 4, 269.117 2, 237.090 0, 107.049 4	oblongine ^[23]	Y	N	Y
20	5.57	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₂	226.154 9 [M+H] ⁺	-0.6	208.144 3, 84.056 1	车前瓜酸 ^[22]	Y	Y	Y
21	5.70	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄ ⁺	356.185 2 [M] ⁺	-1.3	311.127 0, 296.103 5, 279.101 0, 264.077 7	蝙蝠葛任碱 ^[27]	Y	Y	N
22	5.82	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 2 [M-H] ⁻	1.5	191.055 3	绿原酸 ^a	Y	N	N
23	5.88	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.160 5 [M+COOH] ⁻	0.5	357.118 1, 283.082 9, 121.028 3	芍药内酯苷 ^a	Y	Y	Y
24	6.19	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄ ⁺	344.185 1 [M] ⁺	-0.2	299.126 6, 206.117 1, 175.075 0, 137.059 4	tembetarine ^[23]	Y	N	N
25	6.54	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.160 3 [M+COOH] ⁻	0.1	449.145 0, 327.108 1, 165.054 7, 121.028 2	芍药苷 ^a	Y	Y	Y
26	6.63	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.185 1 [M+H] ⁺	-1.4	340.153 9, 192.101 8, 177.078 4, 165.090 9	元胡宁或其异构体 ^[28]	Y	N	Y
27	6.67	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342.169 8 [M+H] ⁺	-0.5	326.138 0, 192.101 8, 178.086 2, 163.062 7	四氢非洲防己碱 ^[28]	Y	N	N
28	6.81	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.185 1 [M+H] ⁺	-1.4	340.153 1, 192.101 8, 177.078 4, 165.090 9	元胡宁或其异构体 ^[28]	Y	N	Y
29	7.05	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	354.133 1 [M+H] ⁺	-1.4	336.123 1, 206.081 2, 188.070 5, 189.078 3	原阿片碱 ^a	Y	N	Y
30	7.15	C ₂₀ H ₁₈ NO ₅ ⁺	352.117 3 [M] ⁺	-1.9	336.086 3, 337.092 8, 322.070 6, 308.091 3	小檗亭 ^[27]	Y	Y	Y
31	7.34	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺	324.122 9 [M] ⁺	-0.4	308.091 3, 294.075 8, 280.096 5, 266.080 9	去亚甲基小檗碱 ^[29]	Y	Y	Y
32	7.56	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.092 7 [M-H] ⁻	2.6	191.055 2, 173.044 5, 163.038 9, 119.048 9	A ₄ ^[30]	Y	N	Y
33	7.68	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.102 2 [M-H] ⁻	-0.4	191.055 2, 173.044 6, 134.036 1, 111.043 8	5-O-阿魏酰奎尼酸 ^[31]	Y	Y	Y
34	7.71	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	370.164 3 [M+H] ⁺	-1.7	352.153 7, 336.122 3, 206.080 7, 188.070 1	别隐品碱 ^[28]	Y	N	N
35	7.88	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.076 8 [M-H] ⁻	2.0	179.034 0, 173.044 6, 161.023 3, 135.043 9	5-O-咖啡酰莽草酸 ^[32]	Y	N	N
36	7.90	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄ ⁺	370.200 8 [M] ⁺	-1.3	354.169 2, 206.117 4, 190.086 1, 165.091 0	N-甲基四氢巴马亭 ^[23]	Y	N	Y
37	7.98	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.184 9 [M+H] ⁺	-2.0	340.154 0, 192.101 7, 177.078 2, 165.090 9	延胡索乙素 ^a	Y	Y	Y
38	8.07	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.185 4 [M+H] ⁺	-0.8	325.143 1, 310.119 5, 294.124 5, 279.101 2	海罂粟碱 ^[28]	Y	N	N
39	8.16	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄ ⁺	320.091 7 [M] ⁺	0.0	292.096 4, 277.073 2, 262.086 0, 234.091 1	黄连碱 ^a	N	Y	Y
40	8.37	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	338.138 4 [M] ⁺	-0.8	323.114 3, 322.107 0, 308.090 6, 294.111 6	非洲防己碱 ^a	Y	Y	Y
41	8.59	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	338.138 4 [M] ⁺	-0.9	323.114 3, 322.107 0, 308.090 6, 294.111 6	药根碱 ^a	Y	Y	Y

续表 1

化合物	t_R /min	分子式	准分子离子 m/z	δ / ppm	主要二级碎片	名称	肠 代谢	肝 代谢	综合 代谢
42	8.67	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.153 9 [M+H] ⁺	-1.2	324.122 3, 176.070 4, 165.090 7	四氢小檗碱 ^a	Y	N	N
43	8.70	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	322.107 2 [M+H] ⁺	-0.6	307.083 4, 279.088 7	thalifendine ^[29]	Y	Y	Y
44	8.97	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	370.200 8 [M+H] ⁺	-1.2	354.169 9, 192.101 7, 179.106 5, 165.090 9	延胡索甲素 ^a	Y	Y	N
45	9.09	C ₂₀ H ₁₆ NO ₄ ⁺	334.106 9 [M] ⁺	-1.5	319.084 2, 306.111 8, 291.088 1, 276.101 4	刻叶紫堇明碱 ^[33]	N	Y	Y
46	9.22	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	322.107 4 [M+H] ⁺	-0.1	307.083 4, 292.060 4, 279.088 4, 264.065 8	小檗红碱 ^[29]	N	Y	Y
47	9.28	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	352.153 8 [M] ⁺	-1.5	337.130 0, 322.106 0, 308.127 3, 293.104 2	13-甲基脱氢紫堇达明碱 ^[34]	Y	N	Y
48	9.53	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	336.122 6 [M] ⁺	-1.4	320.091 4, 306.075 7, 292.096 3, 278.080 8	小檗碱 ^a	Y	Y	Y
49	9.53	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	352.153 7 [M] ⁺	-1.8	336.122 6, 322.106 5, 308.127 5, 294.111 8	巴马汀 ^a	Y	Y	Y
50	9.99	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.096 6 [M-H] ⁻	0.6	169.086 0, 143.106 6, 125.095 9, 97.064 5	壬二酸 ^[35]	Y	Y	Y
51	10.11	C ₂₉ H ₄₄ O ₈	565.301 6 [M+COOH] ⁻	1.5	501.289 4, 319.190 5, 301.181 0, 199.096 7	杯苋甾酮 ^a	Y	Y	Y
52	10.12	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.108 4 [M-H] ⁻	1.3	303.050 8, 285.040 3, 151.002 6	落新妇苷异构体 ^[36]	Y	N	N
53	10.23	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄ ⁺	366.169 1 [M] ⁺	-2.5	350.138 4, 336.122 2, 322.143 3, 308.127 6	脱氢紫堇碱 ^a	Y	Y	Y
54	10.36	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.108 2 [M-H] ⁻	0.7	303.050 8, 285.040 3, 151.002 6	新落新妇苷 ^[36]	Y	N	N
55	10.57	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 1 [M-H] ⁻	-1.9	93.033 2	水杨酸 ^a	Y	Y	Y
56	10.63	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.108 4 [M-H] ⁻	0.7	303.050 8, 285.040 3, 151.002 6	落新妇苷 ^a	Y	N	N
57	11.75	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.113 3 [M-H] ⁻	0.8	287.055 6, 269.045 4, 259.060 8, 178.997 7	新黄杞苷 ^[36]	Y	N	N
58	12.04	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.113 2 [M-H] ⁻	0.6	287.056 0, 269.045 7, 259.060 6, 178.997 7	黄杞苷 ^a	Y	N	N
59	14.49	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	629.186 8 [M+COOH] ⁻	0.6	553.171 6, 431.135 2, 121.028 2	苯甲酰芍药苷 ^[37]	Y	N	Y
60	14.54	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	230.081 1 [M+H] ⁺	0.3	215.057 0, 200.033 6, 186.054 4, 172.038 9	花椒碱 ^[23]	Y	N	N
61	14.73	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	629.186 9 [M+COOH] ⁻	0.6	553.172 6, 431.135 9, 121.028 2	苯甲酰芍药苷 ^[36]	Y	N	Y
62	16.06	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	939.496 1 [M-H] ⁻	0.8	777.443 7, 715.443 5, 569.384 9, 551.373 5	地肤子皂苷 II _A ^[38]	N	N	Y
63	16.64	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 4 [M-H] ⁻	3.6	225.055 3, 151.002 6, 117.033 3, 107.012 5	芹菜素 ^[39]	Y	N	N
64	17.22	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	939.496 0 [M-H] ⁻	0.7	793.441 0, 551.376 9, 455.353 4	地肤子皂苷 II _A 异构体 ^[38]	N	N	Y

注:^a与对照品比对后鉴定;^b与OTCML比对后鉴定;Y.检测到该成分;N.未检测到该成分;A₁.3,4-dihydro-1-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-7-methoxy-2-methyl-6-isoquinolinol;A₂.6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷;A₃.N-methylhigenamine-7-glucopyranoside;A₄.4-p-coumaroylqu-inicacid

3.1.1 生物碱类成分 从不同血浆样品中共鉴定出34个生物碱类成分,包括12个原小檗碱型生物碱(化合物30、31、39~41、43、45~49、53)、9个四氢原小檗碱型生物碱(化合物10、11、26~28、36、37、42、44)、3个阿朴芬类生物碱(化合物16、21、38)、2个普罗托品类生物碱(化合物29、34)、5个苜基异喹啉类生物碱(化合物5、8、15、19、24)和3个其他类型的生物碱(化合物1、20、60)。通过与对照品比对,鉴定了黄柏碱、木兰花碱、原阿片碱等化合物。根据这些对照品的二级碎片信息,对其质谱裂解规律进行归纳总结发现,苜基异喹啉类与阿朴芬类生物碱会失去(CH₃)₂NH或者CH₃NH₂从而形成[M-45]⁺或者[M-31]⁺的碎片,苜基异喹啉类生物碱会发生母核骨架的断裂从而形成m/z较小、丰度较大的碎片离子,而阿朴芬类生物碱只有侧链的断裂与重组,据此可区分这两大类生物碱;普罗托品类与四氢原小

檗碱型生物碱均会发生逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA反应)裂解,普罗托品类生物碱存在[M+H-18]⁺([M+H-H₂O]⁺)的碎片,而四氢原小檗碱型生物碱不存在此特征性碎片,据此可区分这两大类生物碱;原小檗碱型生物碱中存在C-5-C6位碳碳单键,使母核易丢失2个氢形成稳定的大π共轭系统,产生[M-2]⁺([M-2H]⁺)的碎片,据此可将原小檗碱型生物碱与上述四大类生物碱区分。提示可以利用生物碱质谱裂解方式来初步判定生物碱的结构类型,为后续生物碱类成分的准确鉴别奠定基础。

3.1.2 萜类成分 从不同血浆样品中鉴定出12个萜类成分(化合物4、6、13、14、17、18、23、25、59、61、62、64)。通过与对照品比对,化合物6、17、18、23、25分别鉴定为马钱苷酸、羟基芍药苷、龙胆苦苷、芍药内酯苷与芍药苷。以化合物6为例,其准分子离子峰为m/z 375.128 9 [M-H]⁻,软件给出的准分子

离子峰分子式为 $C_{16}H_{23}O_{10}$, 其主要二级特征碎片为 m/z 213.076 2、169.086 0、151.075 5, 通过与对照品 t_R 、质谱数据对比, 确定该化合物为马钱苷酸。质谱裂解过程为母离子失去一分子葡萄糖配基生成碎片离子 m/z 213.076 2 $[M-H-Glc]^-$, 之后发生羧基断裂丢失一分子 CO_2 , 生成碎片离子 m/z 169.086 0 $[M-H-Glc-CO_2]^-$, 分子中的羟基与相邻位的质子发生缩合反应, 失去一分子 H_2O , 生成碎片离子 m/z 151.075 5 $[M-H-Glc-CO_2-H_2O]^-$, 裂解途径见图 1。

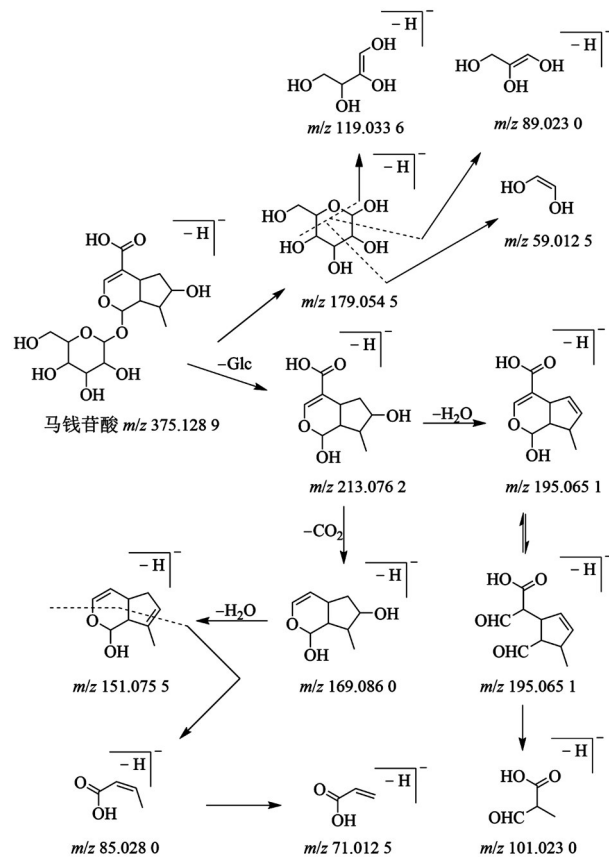


图 1 马钱苷酸的质谱裂解途径

Fig. 1 Fragmentation pathways of loganic acid

3.1.3 有机酸类成分 从不同血浆样品中共鉴定出 9 个有机酸类成分(化合物 2、3、7、22、32、33、35、50、55)。通过与对照品比对, 化合物 22、55 分别鉴定为绿原酸与水杨酸。以化合物 22 为例, 其准分子离子峰为 m/z 353.087 2 $[M-H]^-$, 软件给出的准分子离子峰分子式为 $C_{16}H_{17}O_9$, 其主要二级特征碎片为 m/z 191.055 3, 通过与对照品 t_R 和质谱数据对比, 鉴定化合物 22 为绿原酸, 其质谱裂解途径见增强出版附加材料。

3.1.4 黄酮类成分 从不同血浆样品中鉴定出 6 个黄酮类成分(化合物 52、54、56~58、63), 通过与对照品比对, 鉴定化合物 56、58 分别为落新妇苷与黄杞

苷。以化合物 56 为例, 其准分子离子峰为 m/z 449.108 4 $[M-H]^-$, 且软件给出的准分子离子峰分子式为 $C_{21}H_{21}O_{11}$, 特征碎片离子有 m/z 303.050 8 $[M-H-C_6H_{10}O_4]^-$ 、285.040 3 $[M-H-C_6H_{10}O_4-H_2O]^-$ 、151.002 6 $[M-H-C_6H_{10}O_4-C_8H_8O_3]^-$, 通过与对照品 t_R 和质谱数据对比, 确定该化合物为落新妇苷, 其质谱裂解途径见增强出版附加材料。

3.1.5 其他类 除了上述化学成分外, 从痛风定胶囊血浆样品中还解析出 3 个其他类型的化合物(化合物 9、12、51)。化合物 9 准分子离子峰为 m/z 137.023 1 $[M-H]^-$, 且软件给出的准分子离子峰分子式为 $C_7H_5O_3$, 其主要二级特征碎片 m/z 119.012 4 $[M-H-H_2O]^-$ 、108.020 4 $[M-H-CHO]^-$ 、93.033 3 $[M-H-CO_2]^-$ 、81.033 2 $[M-H-2CO]^-$, 与 OTCML 数据库比对, 推测其为原儿茶醛。化合物 12 准分子离子峰为 m/z 417.140 0 $[M+COOH]^-$, 且软件给出的准分子离子峰分子式为 $C_{18}H_{25}O_{11}$, 其主要二级特征碎片有 209.081 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、194.057 7 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CH_3]^-$ 、179.034 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5-2CH_3]^-$ 、161.023 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5-2CH_3-H_2O]^-$, 与 OTCML 数据库比对, 推测其为紫丁香酚苷。化合物 51 准分子离子峰为 m/z 565.301 6 $[M+COOH]^-$, 且软件给出的准分子离子峰分子式为 $C_{30}H_{45}O_{10}$, 其主要二级特征碎片为 m/z 519.295 8 $[M-H]^-$ 、501.289 4 $[M-H-H_2O]^-$ 、319.190 5 $[M-H-C_{10}H_{16}O_4]^-$ 、301.181 0 $[M-H-C_{10}H_{16}O_4-H_2O]^-$ 、199.096 7 $[C_{10}H_{15}O_4]^-$, 与对照品 t_R 和质谱数据对比, 鉴定其为杯苋甾酮。

3.1.6 各化合物在不同血浆分布情形 通过对比各化合物在不同血浆样品中的分布情况, 发现存在 6 种分布情形: ①化学成分在肠代谢与肝代谢样品中检出, 而在综合代谢样品中未检出, 推测该化学成分在样品中含量较低, 肠道灌流并行采血法持续灌流给药, 使得含量相对较低的化学成分被检出, 如化合物 21。②化学成分在肠代谢样品中未检出, 而在肝代谢与综合代谢样品中检出, 推测该成分是复方中的另一主要成分或其他多个成分的代谢产物, 如化合物 46。文献分析发现, 小檗碱是小檗碱(化合物 48)在肝脏中的主要代谢产物^[40], 而本文研究结果发现小檗碱以原型到达肝脏进而被代谢, 证实了上述推测的合理性。③化学成分在肠代谢、肝代谢与综合代谢血浆样品中均被检出, 说明以上成分经胃肠道吸收代谢仍以原型进入血液循环中, 如化合物 6。④化学成分在肠代谢样品中检出, 而在肝代谢与综合代谢样品中未检出, 说明以上成分

经肠吸收并由肝脏中的药物代谢酶代谢,如化合物**22**。据报道,绿原酸在小肠中以原型吸收入血^[41],且在肝脏被广泛代谢^[42],证实了上述推测的合理性。⑤化学成分在肠代谢与综合代谢样品中检出,而在肝代谢样品中未检出,推测该化合物主要由小肠中的其他肠段进行吸收,而不是本研究选择的空肠段,同时吸收量在肝脏中发生了进一步代谢,从而导致了上述现象,如化合物**29**。已有研究表明,原阿片碱在回肠段吸收最好,十二指肠、空肠次之,且在回肠段的表观渗透系数与其他肠段相比差异有统计学意义^[43],此外,原阿片碱的生物利用度很低,在肝脏中转化成多种代谢产物^[44],证实了上述推测的合理性。基于大部分情况下空肠是化合物主要的吸收位点^[45],故本文仅选择空肠段进行研究,但各化合物理化性质不同,不同肠段对各化合物的吸收能力亦各不相同。⑥化学成分在肠代谢与肝代谢样品中未检出,而在综合代谢样品中检

出,推测上述化合物直接在胃中吸收进入血液,进入肠道后可能会被广泛代谢,如化合物**1**。

3.2 代谢产物鉴定 选择肠道灌流并行采血法进行肠代谢与肝代谢研究,二者区别在于血浆样品收集位点,肠代谢研究时结扎肝门静脉、肠系膜静脉采血,而进行肝代谢研究时,不结扎肝门静脉、股静脉处采血。此外,与单次口服给药相比,肠道灌流并行采血法持续灌注给药,有助于检测一些含量相对较低的成分。结果从不同血浆样品中共鉴定出36种代谢产物。其中,肠代谢、肝代谢和综合代谢样品中分别鉴定出18、23、29个代谢产物。代谢产物生成过程中涉及的代谢反应主要有葡萄糖醛酸化、去葡萄糖基化、脱氢化与羟基化,见表2。对比分析后发现,肝代谢组中的代谢产物多于肠代谢组,这是因为肝脏中拥有更丰富的I相和II相代谢酶。而综合代谢组中的代谢产物又多于肝代谢组,这是因为肠道菌群也能参与部分化合物的代谢。

表2 痛风定胶囊不同血浆样品中代谢产物的鉴定

Table 2 Identification of metabolites in different plasma sample of Tongfengding capsules

编号	t_R /min	母离子	化学式	δ /ppm	主要二级碎片	代谢物	肠 代谢	肝 代谢	综合 代谢
M1	1.24	694.234 9 [M] ⁺	C ₃₂ H ₄₀ NO ₁₆	1.1	518.202 5, 342.169 6, 178.086 1, 163.062 7	黄柏碱的双葡萄糖醛酸化 ^[46]	N	N	Y
M2	1.84	518.202 6 [M] ⁺	C ₂₆ H ₃₂ NO ₁₀	1.1	342.169 8, 192.101 8, 177.078 3	黄柏碱的葡萄糖醛酸化 ^[46]	Y	Y	Y
M3	3.27	174.055 1 [M+H] ⁺	C ₁₀ H ₇ NO ₂	0.7	146.060 0, 128.149 6	龙胆碱-2H ^[47]	Y	Y	Y
M4	3.64	195.065 2 [M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0.2	177.054 5, 149.059 7, 131.049 2, 121.064 6	红白金花内酯的羟基化物 ^[48]	Y	Y	Y
M5	3.64	177.054 6 [M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₃	0.0	159.044 0, 149.059 6, 131.049 2, 121.064 6	红白金花内酯 ^[48]	Y	Y	Y
M6	3.66	373.113 6 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	1.9	193.033 7, 149.059 6, 119.033 7	马钱苷酸-2H	Y	Y	Y
M7	3.75	328.154 4 [M] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	0.4	283.096 1, 265.085 6, 251.069 9	木兰花碱脱甲基化物 ^[49]	N	N	Y
M8	4.37	371.098 1 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	2.3	195.065 4, 175.023 9, 136.023 2	马钱苷酸-4H	Y	Y	Y
M9	4.37	371.098 1 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	2.3	195.065 4, 175.023 9, 113.023 2	龙胆苦苷脱葡萄糖基+2H+葡萄糖醛酸 ^[47]	Y	N	N
M10	4.40	358.165 1 [M] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ NO ₅	0.6	340.153 7, 313.106 4, 295.096 1, 263.070 1	木兰花碱羟基化物 ^[49]	N	Y	Y
M11	4.61	518.202 5 [M] ⁺	C ₂₆ H ₃₂ NO ₁₀	0.9	342.169 7, 178.086 2, 163.062 7, 151.175 3	黄柏碱的葡萄糖醛酸化 ^[46]	Y	Y	Y
M12	4.85	371.098 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	2.4	195.065 5, 175.023 7, 113.023 2	龙胆苦苷脱葡萄糖基+2H+葡萄糖醛酸 ^[47]	Y	N	N
M13	5.55	336.086 7 [M] ⁺	C ₁₉ H ₁₄ NO ₅	0.2	318.075 6, 308.091 1, 290.081 0	黄连碱的酮化物 ^[50]	N	N	Y
M14	5.71	639.156 6 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	1.5	463.124 8, 317.066 4, 178.997 7, 152.010 5	3'-O-甲基化落新妇苷异构体的葡萄糖醛酸化物 ^[51]	N	Y	Y
M15	5.96	195.065 4 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	1.2	177.054 8, 133.064 8, 123.043 9	龙胆苦苷脱葡萄糖基+2H ^[47]	Y	N	N
M16	6.03	639.156 9 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	2.1	463.124 9, 317.066 5, 178.997 8, 152.010 5	3'-O-甲基化落新妇苷的葡萄糖醛酸化物 ^[51]	N	Y	Y
M17	6.11	498.139 7 [M] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ NO ₁₀	0.4	322.107 1, 307.083 5, 279.088 6	thalifendine或小檗红碱葡萄糖醛酸化物 ^[40]	N	N	Y
M18	6.15	174.055 0 [M+H] ⁺	C ₁₀ H ₇ NO ₂	0.3	146.060 0, 128.149 5	龙胆碱-2H ^[47]	Y	Y	Y
M19	6.22	500.155 5 [M] ⁺	C ₂₅ H ₂₆ NO ₁₀	0.7	324.122 7, 308.091 4, 280.096 6	去亚基小檗碱葡萄糖醛酸化物 ^[40]	N	N	Y

续表 2

编号	t_r /min	母离子	化学式	δ /ppm	主要二级碎片	代谢物	肠 代谢	肝 代谢	综合 代谢
M20	6.25	514.071 3	$[M]^+$	$C_{26}H_{28}NO_{10}$	1.1 338.138 4, 323.114 2, 322.107 1, 294.112 2	非洲防己碱或药根碱葡萄糖醛 酸化物 ^[40]	N	N	Y
M21	7.06	322.107 5	$[M]^+$	$C_{19}H_{16}NO_4$	0.3 307.083 5, 279.088 6	小檗碱脱甲基化物 ^[52]	N	Y	Y
M22	7.13	195.065 0	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{12}O_4$	-0.8 177.054 6, 136.051 9, 121.028 3	龙胆苦苷脱葡萄糖基+2H ^[47]	Y	N	N
M23	7.34	368.149 5	$[M]^+$	$C_{21}H_{22}NO_5$	0.6 352.117 7, 338.101 6, 324.122 8	巴马汀的单羟基化物 ^[53]	N	Y	Y
M24	8.31	193.049 8	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	1.2 178.026 3, 149.059 7, 134.036 2	阿魏酸 ^[54]	Y	Y	Y
M25	8.35	197.081 1	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{14}O_4$	1.6 179.070 6, 153.091 1, 135.080 4, 111.043 9	芍药苷代谢素 I 或其异构体 ^[55]	Y	Y	N
M26	8.58	193.049 8	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	1.2 178.026 3, 149.059 7, 134.036 2	龙胆苦苷脱葡萄糖基 ^[47]	Y	N	N
M27	8.59	197.081 2	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{14}O_4$	2.1 153.091 1, 118.028 6	芍药苷代谢素 I 或其异构体 ^[55]	N	Y	Y
M28	8.91	193.049 9	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	1.8 178.026 3, 149.059 7, 134.036 1	异阿魏酸 ^[54]	Y	Y	Y
M29	9.03	193.049 9	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	2.1 178.026 3, 149.059 7, 134.036 2	龙胆苦苷脱葡萄糖基 ^[47]	Y	N	N
M30	9.78	176.070 8	$[M+H]^+$	$C_{10}H_9NO_2$	1.3 130.065 3	龙胆碱 ^[56]	Y	Y	Y
M31	10.92	447.093 3	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{20}O_{11}$	2.5 271.061 3, 151.002 7, 113.023 2	柚皮素的葡萄糖醛酸化物 ^[57]	N	Y	Y
M32	11.06	199.096 8	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{16}O_4$	1.4 181.086 3, 155.106 7, 121.028 3	芍药苷代谢素 II ^[5]	N	Y	Y
M33	11.45	463.124 6	$[M-H]^-$	$C_{22}H_{24}O_{11}$	2.7 317.066 7, 299.056 4, 178.997 7, 152.010 5	3'-O-甲基化落新妇苷异构体 ^[51]	N	Y	Y
M34	12.08	463.124 6	$[M-H]^-$	$C_{22}H_{24}O_{11}$	2.3 317.066 7, 299.056 4, 178.997 7, 152.010 7	3'-O-甲基化落新妇苷 ^[51]	N	Y	Y
M35	12.16	398.123 9	$[M]^+$	$C_{21}H_{20}NO_7$	1.3 380.112 5, 365.088 0, 336.086 1, 306.071 6	巴马汀脱氢的三羟基化物 ^[52]	N	N	Y
M36	12.39	137.023 3	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_3$	-0.5 93.033 2	龙胆醛 ^[56]	N	Y	Y

4 讨论

本研究采用序贯代谢方法结合 UPLC-HRMS 技术对痛风定胶囊中的入血成分进行分析,共鉴定出 64 种原型入血成分和 36 种代谢产物,代谢途径主要有羟基化、脱甲基化、去葡萄糖基化、氧化的 I 相代谢和葡萄糖醛酸化的 II 相代谢,其中,生物碱类成分的占比>50%,且在血浆中检测到黄柏碱、木兰花碱、黄连碱、小檗碱等生物碱类成分的葡萄糖醛酸化、羟基化、脱甲基化等反应产生的代谢产物,故推测生物碱类成分可能是痛风定胶囊发挥药效的主要成分群。此外,本研究通过对比肠代谢、肝代谢和综合代谢 3 种不同血浆样品,动态、连续、整体地阐明了痛风定胶囊中化学成分在机体各部位的吸收、代谢情况。

目前,临床上主要通过抑制黄嘌呤氧化酶活性、减少尿酸的生成达到治疗高尿酸血症与痛风的目的。据报道,上述入血成分中的落新妇苷^[58]、芹菜素^[59]、小檗碱^[60]、巴马汀^[60]均具有较强地抑制黄嘌呤氧化酶活性;同时,本课题组通过体外酶活抑制实验发现痛风定胶囊水提物对黄嘌呤氧化酶有良好的抑制能力。因此,推测上述成分可能是痛风定胶囊治疗高尿酸血症与痛风的药效物质。此外,据报道,上述入血成分中的马钱苷酸、壬二酸、京尼

平苷酸、新落新妇苷、落新妇苷、新黄杞苷、黄杞苷、芹菜素、木兰花碱、地肤子皂苷 II_A 等成分可能通过作用于花生四烯酸代谢通路而发挥治疗痛风的药效^[18]。综上分析,痛风定胶囊入血成分及代谢成分的解析可为全面阐明其药效物质基础奠定基础。

痛风定胶囊中化学成分复杂,本研究采用序贯代谢方法解析了其在大鼠体内的原型入血成分和代谢物。该方法可排除中药中大量无法被吸收的成分的干扰,缩小研究范围,更容易锁定绝大部分潜在药效成分,是阐明中药药效物质基础一种有力的方法。但笔者也意识到本研究中确定的痛风定胶囊入血移行成分并不等同于其降低尿酸的药效成分。本课题组后续将鉴定痛风定胶囊于黄嘌呤氧化酶所在靶器官(肝脏)中原型成分和代谢物情况,结合靶点垂钓技术,进一步确认痛风定胶囊在体内可能药效物质,并在体外及动物水平验证这些成分的活性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] FENG G F, SUN Y F, LIU S, et al. Stepwise targeted matching strategy from *in vitro* to *in vivo* based on ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry technology to quickly identify and

- screen pharmacodynamic constituents [J]. *Talanta*, 2019, 194: 619-626.
- [2] ANNUNZIATA G, MAISTO M, SCHISANO C, et al. Colon bioaccessibility and antioxidant activity of white, green and black tea polyphenols extract after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion[J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1711.
- [3] ZHOU J, ZHANG Y J, LI N, et al. A systematic metabolic pathway identification of Common Gardenia Fruit (*Gardeniae Fructus*) in mouse bile, plasma, urine and feces by HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1145: 122100.
- [4] ZHANG L, ZHAO H Y, LIU Y, et al. Metabolic routes along digestive system of licorice: Multicomponent sequential metabolism method in rat [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(6): 902-912.
- [5] LUO Z Q, LIU Y, HAN X, et al. Mechanism of *Paeoniae Radix Alba* in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease based on sequential metabolites identification approach, network pharmacology and binding affinity measurement[J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 677659.
- [6] 刘洋, 罗志强, 吕贝然, 等. 多成分药物序贯代谢方法用于川芎水煎液多成分不同阶段吸收代谢研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(7): 1178-1182.
- [7] CHEN Y H, BI J H, XIE M, et al. Classification-based strategies to simplify complex traditional Chinese medicine (TCM) researches through liquid chromatography-mass spectrometry in the last decade (2011-2020): Theory, technical route and difficulty [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1651: 462307.
- [8] LIU R X, LIU Q Q, LI B, et al. Pharmacokinetics, bioavailability, excretion, and metabolic analysis of schisanlactone E, a bioactive ingredient from *Kadsura heteroclita* (Roxb) Craib, in rats by UHPLC-MS/MS and UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112875.
- [9] LIN R M, YIN J X, WU M F, et al. Global identification and determination of the major constituents in Kai-Xin-San by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-Orbitrap mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 206: 114385.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1758.
- [11] 唐莉. 别嘌醇联合痛风定胶囊对痛风患者炎症因子、肝肾功能及相关指标的影响研究[J]. *海南医学*, 2016, 22(21): 2551-2554.
- [12] 王倩. 别嘌醇联合痛风定胶囊对痛风患者炎症因子、肝肾功能及痛风相关指标的影响分析[J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(12): 134-135.
- [13] 陆玉鹏, 李义凯, 李益军, 等. 痛风定胶囊联合非布司他对高尿酸血症患者炎症因子的影响及其疗效[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(1): 59-61.
- [14] 林国敬, 阮国梅, 刘基凤. 痛风定胶囊联合苯溴马隆片治疗高尿酸血症的临床研究[J]. *实用中西医结合临床*, 2021, 21(9): 122-123.
- [15] 陈慕远. 正清风痛宁经皮导入加痛风定胶囊内服治疗早期类风湿性关节炎 36 例总结[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(8): 64-65.
- [16] 薛嘉盛, 曲健源, 王婧芸, 等. 高效液相色谱法测定痛风定胶囊中落新妇苷的含量[J]. *沈阳医学院学报*, 2018, 20(5): 467-469.
- [17] 覃芳, 李广胜, 郭兴辉. HPLC法测定痛风定胶囊中龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、杯苋甾酮、泽泻醇F、泽泻醇A、24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B[J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(2): 240-244.
- [18] YANG W N, JIANG X Q, LIU J T, et al. Integrated strategy from *in vitro*, *in situ*, *in vivo* to *in silico* for predicting active constituents and exploring molecular mechanisms of Tongfengding capsule for treating gout by inhibiting inflammatory responses [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 759157.
- [19] 邹钊, 李佳珊, 徐颖, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(22): 159-166.
- [20] 魏飞亭, 程昊, 乔日发, 等. UPLC-Q-TOF/MS鉴定大鼠灌服枳壳提取物后的入血成分及其代谢产物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21): 161-172.
- [21] ZOU D X, WANG J F, ZHANG B, et al. Analysis of chemical constituents in Wuzi-Yanzong-Wan by UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21373-21404.
- [22] WANG D D, QI M, YANG Q M, et al. Comprehensive metabolite profiling of Plantaginis Semen using ultra high performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with elevated energy technique [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(10): 1842-1852.
- [23] XIAN X Y, SUN B H, YE X T, et al. Identification and analysis of alkaloids in cortex *Phellodendron amurense* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry coupled with photodiode array detection [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37

- (13):1533-1545.
- [24] 孙振刚,邱昆成,李丹,等. UPLC-LTQ-Orbitrap XL 分析知母-黄柏药对化学成分[J]. 中药材,2017,40(1):101-106.
- [25] ZHANG G L, LI Y, WEI W L, et al. Metabolomics combined with multivariate statistical analysis for screening of chemical markers between *Gentiana scabra* and *Gentiana rigescens* [J]. *Molecules*, 2020, 25(5):1228.
- [26] LYU T, XU M, WANG D, et al. The chemical constituents from the roots of *Gentiana crassicaulis* and their inhibitory effects on inflammatory mediators NO and TNF- α [J]. *Nat Product Bioprospecting*, 2012, 2(5):217-221.
- [27] SUN H, WANG H Y, ZHANG A H, et al. Chemical discrimination of cortex *Phellodendri Amurensis* and cortex *Phellodendri Chinensis* by multivariate analysis approach [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(45):41-49.
- [28] HONG Z Y, ZHAO L, WANG X L, et al. High-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry with adjustment of fragmentor voltages for rapid identification of alkaloids in rat plasma after oral administration of rhizoma *corydalis* extracts [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35(13):1690-1696.
- [29] TAN X S, MA J Y, FENG R, et al. Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77969.
- [30] KISELOVA-KANEVA Y, GALUNSKA B, NIKOLOVA M, et al. High resolution LC-MS/MS characterization of polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity of *Sambucus ebulus* fruit tea traditionally used in Bulgaria as a functional food [J]. *Food Chem*, 2022, 367:130759.
- [31] CHEIRAN K P, RAIMUNDO V P, MANFROI V, et al. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2019, 286:113-122.
- [32] CCANA-CCAPATINTA G V, FEITAS J A, MONGE M, et al. Metabolomics and chemophenetics support the new taxonomy circumscription of two south America genera (Barnadesioideae, Asteraceae) [J]. *Phytochem Lett*, 2020, 40:89-95.
- [33] 赵玲玲,袁将,王加利,等. HPLC-MSⁿ法分析延胡索饮片生物碱成分[J]. 现代中药研究与实践,2016,30(3):58-60,64.
- [34] CHENG X Y, SHI Y, ZHEN S L, et al. HPLC-MS analysis of ethanol extract of *Corydalis yanhusuo* and simultaneous determination of eight protoberberine quaternary alkaloids by HPLC-DAD [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(6):441-444.
- [35] MARTINEZ J R, MONTSERRAT-DE-LA P S, DE-LA-PUERTA R, et al. Characterization of bioactive compounds in defatted hempseed (*Cannabis sativa* L.) by UHPLC-HRMS/MS and anti-inflammatory activity in primary human monocytes [J]. *Food Funct*, 2020, 11(5):4057-4066.
- [36] CHEN S D, LU C J, ZHAO R Z. Qualitative and quantitative analysis of *Rhizoma Smilacis glabrae* by ultra high performance liquid chromatography coupled with LTQ orbitrap^{xl} hybrid mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2014, 19(7):10427-10439.
- [37] LI S L, SONG J Z, CHOI F F K, et al. Chemical profiling of Radix Paeoniae evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2):253-266.
- [38] LI J X, HAREYAMA T, TEZUKA Y, et al. Five new oleanolic acid glycosides from *Achyranthes bidentata* with inhibitory activity on osteoclast formation [J]. *Planta Med*, 2005, 71(7):673-679.
- [39] HAO J F, LI Y Y, JIA Y S, et al. Comparative analysis of major flavonoids among parts of *Lactuca indica* during different growth periods [J]. *Molecules*, 2021, 26(24):7445.
- [40] XU P, XU C, LI X X, et al. Rapid identification of berberine metabolites in rat plasma by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(10):1994.
- [41] STALMACH A, STEILING H, WILLIAMSON G, et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 501(1):98-105.
- [42] AZUMA K, IPPOUSHI K, NAKAYAMA M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11):5496-5500.
- [43] 马宏达,郭涛,何进. 夏天无提取物中原阿片碱和延胡索乙素的大鼠肠吸收特性[J]. 医药导报,2011,30(9):1125-1129.
- [44] HUANG Y J, CHENG P, ZHANG Z Y, et al. Biotransformation and tissue distribution of protopine and allocryptopine and effects of Plume Poppy Total Alkaloid on liver drug-metabolizing enzymes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):537.
- [45] LI H W, DONG L, LIU Y, et al. Biopharmaceutics

- classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats[J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 133-138.
- [46] ZHANG F X, YUAN Y L L, CUI S S, et al. Characterization of metabolic fate of phellodendrine and its potential pharmacological mechanism against diabetes mellitus by ultra-high-performance liquid chromatography-coupled time-of-flight mass spectrometry and network pharmacology [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2021, 35(18):e9157.
- [47] HAN H, XIONG A Z, HE C Y, et al. Combination of UHPLC/Q-TOF-MS, NMR spectroscopy, and ECD calculation for screening and identification of reactive metabolites of gentiopicroside in humans [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(6):1781-1793.
- [48] WANG S S, TANG S H, SUN Y J, et al. Highly sensitive determination of new metabolite in rat plasma after oral administration of swertiamarin by liquid chromatography/time of flight mass spectrometry following picolinoyl derivatization [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(7):939-946.
- [49] 魏桂杰, 薛宝娟, 王宏雅, 等. LC-MS/MS 鉴定木兰花碱在大鼠体内外主要代谢产物[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(1):31-37.
- [50] AI G X, HUANG Z W, CHENG J J, et al. Gut microbiota-mediated transformation of coptisine into a novel metabolite 8-oxocoptisine: Insight into its superior anti-colitis effect[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:639020.
- [51] 王文艳, 仝瑶瑶, 张林琪, 等. HPLC-MS/MS 法鉴定落新妇苷在大鼠尿中的代谢产物[J]. *质谱学报*, 2011, 32(1):36-42.
- [52] LI Y, ZHOU Y Y, SI N, et al. Comparative metabolism study of five protoberberine alkaloids in liver microsomes from rat, rhesus monkey, and human [J]. *Planta Med*, 2017, 83(16):1281-1288.
- [53] YANG Q C, WU W H, HAN F M, et al. Identification of *in vivo* and *in vitro* metabolites of palmatine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(5):647-652.
- [54] 樊荣, 羿国娟, 鲁兰, 等. 绿原酸及其 13 种体内主要代谢物的体外抗菌作用研究[J]. *中草药*, 2020, 51(24):6239-6245.
- [55] 刘玉峰, 孙珊珊, 朱丽君, 等. 赤芍中芍药苷和芍药内酯苷的代谢及药动学研究进展[J]. *辽宁大学学报: 自然科学版*, 2018, 45(4):296-303.
- [56] 宋纯清, 杨肖锋, 胡之璧. 龙胆苦甙的人肠内菌代谢实验观察[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(1):1-2.
- [57] 樊慧蓉, 李全胜, 张爱杰, 等. 柚皮素在大鼠体内的代谢途径研究[J]. *中草药*, 2017, 48(10):2093-2099.
- [58] 徐婷婷, 承志凯, 尹莲, 等. 土茯苓抑制黄嘌呤氧化酶活性的物质基础研究[J]. *中药材*, 2012, 35(4):582-585.
- [59] 李雪岩, 刘洋, 刘芳, 等. 菊花黄酮类化合物与黄嘌呤氧化酶的药靶结合动力学研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(7):1822-1831.
- [60] LI S N, LIU C M, GUO L P, et al. Ultrafiltration liquid chromatography combined with high-speed countercurrent chromatography for screening and isolating potential α -glucosidase and xanthine oxidase inhibitors from Cortex Phellodendri [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(18):2504-2512.

[责任编辑 刘德文]