

· 药物代谢 ·

秦岭岩白菜入血成分及其代谢产物的UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析

任慧, 鲁文静, 崔小敏, 胡静, 李宁, 曲彤, 陈志永*

(陕西省中医药研究院, 西安 710003)

[摘要] 目的:研究秦岭岩白菜提取物在大鼠体内的入血原型成分及代谢产物。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(UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS)技术,通过比对秦岭岩白菜提取液、空白血清和含药血清的图谱差异,根据保留时间、相对分子质量,以及一级、二级离子碎片,解析秦岭岩白菜提取物经大鼠灌胃给药后血清中的原型成分和代谢产物,检测条件为流动相选择甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~40 min, 5%~95%A; 40~45 min, 95%A),流速设定 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $1\ \mu\text{L}$,加热电喷雾离子源,检测范围 m/z 80~1 200,正、负离子扫描模式。结果:大鼠口服给药后,共在血清中检测到35个移行成分,其中6个为原型成分,29个为代谢产物。经鉴定6个原型成分分别为熊果苷、mallonoside A、岩白菜素、ardimerin、水杨酸、鞣花酸,29个代谢产物主要是来自含有没食子酸、mallonoside A、岩白菜素、儿茶素、鞣花酸等结构单元的化合物代谢物,其代谢途径主要为葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、甲基化等,以II相代谢为主。结论:入血成分及其代谢产物可能是秦岭岩白菜体内直接作用的药效成分,其中mallonoside A、岩白菜素、鞣花酸在体内既可以原型成分入血,又可以经过II相代谢发挥药效;而秦岭岩白菜药材中的其他大多数化学成分在体内可能主要是先通过水解等途径转化为没食子酸、岩白菜素、儿茶素等简单结构,再进一步发生II相代谢。

[关键词] 大盘龙七; 秦岭岩白菜; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS); 原型成分; 代谢产物; 酚酸类; 碳苷

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0113-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220554

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220606.1400.001.html>

[网络出版日期] 2022-06-07 13:03

Analysis of Prototype Components and Metabolites from *Bergeniae Scopulosae* Rhizoma Absorbed into Blood by UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS

REN Hui, LU Wenjing, CUI Xiaomin, HU Jing, LI Ning, QU Tong, CHEN Zhiyong*

(*Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China*)

[Abstract] **Objective:** To analyze the blood-transition constituents of *Bergeniae Scopulosae* Rhizoma extract based on the serum pharmacochromatography method. **Method:** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS) technique was used to compare the chromatogram differences of *Bergeniae Scopulosae* Rhizoma extract, blank serum and drug-containing serum, according to the retention time, relative molecular weight and the ratio with primary and secondary ion fragments provided by MS, the prototype components and metabolites of *Bergeniae*

[收稿日期] 2022-03-11

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973419);陕西省重点研发计划一般项目(2022SF-544);陕西省中医药管理局“双链融合”中青年科研创新团队项目(2022-SLRH-YQ-003);陕西省中医药管理局科研项目(2021-ZZ-JC033);陕西省中医药研究院“苗圃培育计划”项目(2021-05);西安市科技计划项目[2019115613YX011SF044(13)]

[第一作者] 任慧,博士,副研究员,从事中药质量控制与活性成分研究,Tel:029-85395696,E-mail:renhui1.cool@163.com

[通信作者] * 陈志永,博士,副研究员,从事中药质量控制与活性成分研究,Tel:029-85395696,E-mail:18829014325@163.com

Scopulosae Rhizoma extract were analyzed in serum of rats after oral administration. The detection conditions were as follows: the mobile phase of methanol (A) -0.1% formic acid solution (B) for elution gradient (0-40 min, 5%-95%A; 40-45 min, 95%A), the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, the injection volume of 1 μL, heated electrospray ionization, detection range of *m/z* 80-1 200, positive and negative ion scanning modes. **Result:** After oral administration, a total of 35 components were detected in the serum, of which 6 were prototype components and 29 were metabolites of prototype components. The 6 prototype components were identified as arbutin, mallonanose A, bengenin, ardimerin, salicylic acid and ellagic acid. The 29 metabolites were mainly metabolites from compound containing structural units such as gallic acid, mallonanose A, bengenin, catechin, and ellagic acid, and their metabolic pathways were mainly glucuronidation, sulfation, methylation and others, which by phase II metabolism. **Conclusion:** The components absorbed into the blood and their metabolites may be the pharmacodynamic components of *Bergenia Scopulosae Rhizoma*. Among them, mallonanose A, bengenin and ellagic acid can not only enter the blood as prototype components, but also exert their efficacy through phase II metabolism. Most of the other chemical components in *Bergenia Scopulosae Rhizoma* may be transformed into simple structures such as gallic acid, bengenin and catechin by hydrolysis, and then further metabolized by phase II.

[Keywords] *Bergenia Scopulosae Rhizoma*; *Bergenia scopulosa*; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS); prototype components; metabolites; phenolic acids; C-glycoside

秦岭岩白菜是虎耳草科岩白菜属植物秦岭岩白菜 *Bergenia scopulosa* 的干燥根茎,2015年版《陕西省药材标准》中规定其副名为大盘龙七^[1]。其味涩,性平,归脾、肝、膀胱、肺经,具有收涩固肠、止血止带、止痢止泻、健脾渗湿的功效^[1],临床上用于治疗急慢性肠胃炎、咳嗽、吐血、便血、肠炎、浮肿、崩漏、白带等^[2]。目前从秦岭岩白菜药材中分离鉴定的成分主要有异香豆素、黄酮、酚酸、萘醌等类型^[3-6];关于其药理作用的报道则主要集中在体外抗菌^[7]、抗氧化^[8]等活性研究。然而,秦岭岩白菜发挥临床疗效作用的物质基础尚未阐明。入血成分分析可快速、准确地锁定中药药效物质,也是中药质量标志物确定的重要依据,其已成为快速确定中药药效物质的有效途径之一^[9-10]。液质联用技术可以实现入血成分的快速识别、解析,已成为入血成分研究的首选方法^[11]。关于秦岭岩白菜体内作用成分及代谢过程的研究报道较少,目前仅有单体没食子酸^[12]、岩白菜素^[13-14]、儿茶素^[15]等的体内代谢过程,缺乏对该药材提取物入血成分及代谢成分的整体分析。因此,亟需对秦岭岩白菜的入血成分进行全面研究,以阐明其发挥药效作用的物质基础。

本课题组前期借助超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS)建立了秦岭岩白菜根茎中化学成分的分析方法,并对其进行了快速、全面的定性分析,

结合化合物的精确质量数、二级质谱碎片信息、保留时间、文献分析及对照品比对共解析了66个化学成分,丰富了秦岭岩白菜的化学成分库^[6]。这些成分大多具有相同的结构单元,如岩白菜素、没食子酸、儿茶素、熊果苷等基本单元成酯或苷或原型存在,但目前尚未对秦岭岩白菜药效物质进行深入研究,其体内代谢过程尚未得到阐明,这在一定程度上限制了秦岭岩白菜的质量标准制定及临床应用。在前期研究基础上,本研究运用UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS技术分析大鼠灌胃给予秦岭岩白菜提取液后的入血移行成分,解析其入血原型成分和代谢产物,为进一步揭示秦岭岩白菜临床治疗急慢性肠胃炎、咳嗽、吐血等疾病的药效物质基础及作用机制提供实验依据。

1 材料

BT25S、BS210S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],UltiMate 3000型超高效液相色谱系统和Q Exactive Focus型质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),TG-16WS型台式高速离心机(湖南迈克仪器有限公司)。秦岭岩白菜购自陕西省宝鸡市眉县,经陕西省中医药研究院陈志永研究员鉴定为虎耳草科植物秦岭岩白菜 *B. scopulosa* 的根茎。熊果苷、岩白菜素对照品(上海圻明生物科技有限公司,批号分别为18061203、17061307,纯度均≥98%),水杨酸对照品(四川省维

克奇生物科技有限公司,批号 wkq20082007,纯度 $\geq 98\%$),鞣花酸对照品(上海麦克林生化科技有限公司,批号 C11648502,纯度 $\geq 98\%$),水为超纯水,甲醇为色谱纯,甲酸为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量(200 \pm 20) g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(陕)2018-001。本文涉及的动物实验经陕西省中医药研究院实验动物伦理委员会批准,批准号 SYDWLL-GL-01。

2 方法

2.1 色谱条件 Thermo Accucore aQ RP18 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 2.6 μ m),进样量 1 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL \cdot min $^{-1}$,流动相甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~40 min, 5%~95%A; 40~45 min, 95%A)。

2.2 质谱条件 加热电喷雾离子源(HESI),正、负离子扫描模式。正、负离子模式喷雾电压均设定为 3.0 kV,鞘气体积流量 40 arb,辅助气流量 10 arb,毛细管温度 320 $^{\circ}$ C,雾化温度 350 $^{\circ}$ C,透镜射频电压(S-lens RF level)50 V。扫描模式为全扫描/数据依赖性二级扫描(Full MS/dd-MS 2),Full MS 分辨率 7 万,dd-MS 2 分辨率 17 500,扫描范围 m/z 80~1 200;碰撞能量 30 eV。

2.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇使溶解并定容,制得熊果苷、岩白菜素、水杨酸、鞣花酸质量浓度分别为 419.0、214.0、530.0、111.2 mg \cdot L $^{-1}$ 的单一对照品储备液;混合对照品溶液储备液由各对照品储备液混合并稀释得到,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.4 秦岭岩白菜提取物的制备 取秦岭岩白菜药材 200 g,加 70% 乙醇 2 L 加热提取 1.5 h,用 100 目筛过滤;加 70% 乙醇 1 L 加热提取 1.5 h,同法过滤,合并 2 次提取液,减压浓缩成浸膏,于 50 $^{\circ}$ C 减压干燥,得秦岭岩白菜提取物,得率 27.6%。实验时取秦岭岩白菜提取物适量,加蒸馏水使溶解,配成质量浓度为 0.25 g \cdot mL $^{-1}$ 的药液(以提取物质量计)。

2.5 血清样品的采集 取 8 只 SD 大鼠,随机等分为 2 组,给药组和空白组,2 组大鼠给药前禁食 12 h,自由饮水。给药组按照 10 mL \cdot kg $^{-1}$ 灌胃给予秦岭岩白菜药液(0.25 g \cdot mL $^{-1}$),空白组按照同样方式给予等量生理盐水灌胃。分别于给药后 30、45、60、90、120 min 进行眼眶取血采集血样,每个时间点采集 0.5 mL,3 500 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 63 mm,下同),收集上清,分装,-80 $^{\circ}$ C 冰箱贮藏,备用。按

相同方式采集空白血清。

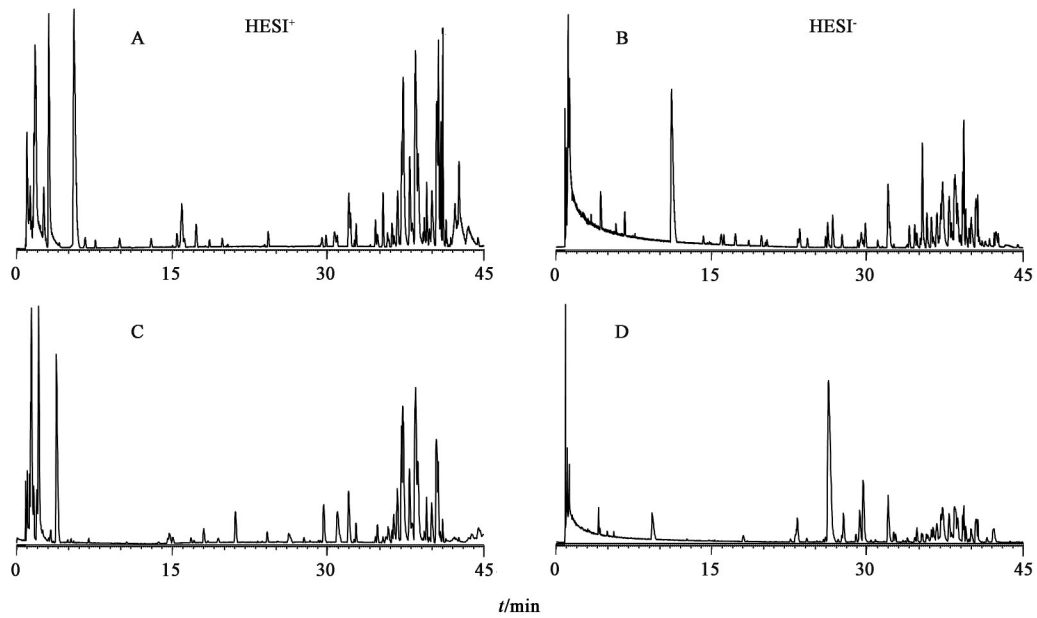
2.6 血清样品的处理 取大鼠空白血清及给药血清样品于 4 $^{\circ}$ C 融化,各时间点样本各取 100 μ L,得混合血清样本 500 μ L,加入乙腈 1 mL 进行蛋白沉淀,涡旋 1 min,16 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min。取上清液至干净的离心管中,37 $^{\circ}$ C 空气流吹干,固体残渣用 50% 甲醇 100 μ L 复溶,涡旋 1 min,16 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min,取上清液待测。

3 结果

采用 UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS 分别对含药血清和空白血清样品在正、负离子模式下进行分析,基峰色谱图见图 1。通过比对秦岭岩白菜药液、含药血清和空白血清样品的基峰色谱图,依据化合物在秦岭岩白菜药液和给药血清样本中均含有,而空白血清中不存在,则判断该化合物为秦岭岩白菜的入血原型成分;若化合物在给药血清样本中含有,而秦岭岩白菜药液和空白血清中均不存在,则推断该成分可能是秦岭岩白菜的入血代谢产物。依据化合物的一级、二级 MS 及裂解规律进行解析,结果共检测到 35 个移行成分,其中 6 个为原型成分,29 个为代谢产物。

3.1 原型成分分析 通过与对照品及前期解析的秦岭岩白菜提取液化学成分的 MS 信息^[6]比对,结果从秦岭岩白菜血清样本中共解析出 6 个入血原型成分,包括 2 个酚酸、1 个异香豆素、2 个碳苷和 1 个氧苷,其中熊果苷(P1)、岩白菜素(P3)、水杨酸(P5)、鞣花酸(P6)4 个成分与对照品比对后确定。秦岭岩白菜入血原型成分的提取离子流色谱图(EIC)见图 2,鉴定结果见表 1,化学结构见图 3。

化合物 P1:负离子模式下可得到 m/z 271.082 3 [M-H] $^{-}$ 的提取离子峰,拟合分子式为 C $_{12}$ H $_{16}$ O $_7$ 。MS/MS 有特征碎片离子 m/z 108.020 5 [M-H-C $_6$ H $_{11}$ O $_5$] $^{-}$,参考文献并与对照品比对确定其为熊果苷^[6]。化合物 P2 在负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 345.082 8 [M-H] $^{-}$,拟合分子式为 C $_{14}$ H $_{18}$ O $_{10}$,MS/MS 中有碎片离子 m/z 330.060 1 [M-H-CH $_3$] $^{-}$ 、225.040 1 [M-H-C $_4$ H $_8$ O $_4$] $^{-}$ 、210.015 8 [M-H-CH $_3$ -C $_4$ H $_8$ O $_4$] $^{-}$ 、194.992 9 [M-H-CH $_3$ -C $_5$ H $_{11}$ O $_4$] $^{-}$ 、180.005 6 [M-H-CH $_3$ -C $_4$ H $_8$ O $_4$ -CH $_2$ O] $^{-}$ 、166.026 3 [M-H-C $_5$ H $_{10}$ O $_4$ -COOH] $^{-}$ 、138.031 2 [M-H-C $_3$ H $_{10}$ O $_4$ -COOH-CO] $^{-}$ 、124.015 5 [M-H-CH $_3$ -C $_4$ H $_8$ O $_4$ -C $_2$ H $_2$ O-CO $_2$] $^{-}$,结合文献分析推测该化合物为 mallonanosiide A^[6]。化合物 P3 在正离子模式下可得到 m/z 329.086 7 [M+H] $^{+}$ 的提取离子峰,拟合分子式为 C $_{14}$ H $_{16}$ O $_9$,MS/MS 中



注:A,B.含药血清;C,D.空白血清

图1 大鼠含药血清和空白血清在正、负离子模式下的基峰色谱

Fig. 1 Base peak chromatograms of drug-containing serum and blank serum of rats in positive and negative ion modes

可见 m/z 195.029 0 $[M+H-C_5H_{10}O_4]^+$ 、193.049 8 $[M+H-C_4H_8O_5]^+$ 、181.049 7 $[M+H-C_4H_8O_4-CO]^+$; 负离子模式下可得到准分子离子峰 m/z 327.072 3 $[M-H]^-$, 拟合分子式为 $C_{14}H_{16}O_9$, MS/MS 中可见 m/z 312.048 8 $[M-H-CH_3]^-$ 、234.016 7 $[M-H-C_2H_6O_3-CH_3]^-$ 、192.005 8 $[M-H-CH_3-C_4H_8O_4]^-$, 参考文献并与对照品比对确定其为岩白菜素^[6]。

化合物 P4 在正离子模式下得到准分子离子峰 m/z 679.148 7 $[M+Na]^+$, 拟合分子式为 $C_{28}H_{32}O_{18}$, MS/MS 中有准分子离子内酯环开裂形成的特征碎片离子 m/z 351.068 7 $[C_{14}H_{16}O_9Na]^+$; 负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 655.152 2 $[M-H]^-$, 拟合分子式为 $C_{28}H_{32}O_{18}$, MS/MS 中有准分子离子内酯环开裂形成的特征碎片离子 m/z 327.072 3 $[C_{14}H_{15}O_9]^-$, 还有其他碎片离子 m/z 312.048 9 $[C_{13}H_{12}O_9]^-$ 、249.040 3 $[C_{12}H_9O_6]^-$ 、207.029 4 $[C_{10}H_7O_5]^-$, 结合文献分析推测该化合物为 ardimerin^[6]。化合物 P5 在负离子模式下可得到 m/z 137.024 4 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_7H_6O_3$, MS/MS 中有特征碎片离子 m/z 93.033 3 $[M-H-CO_2]^-$ 、65.038 4 $[M-H-CO_2-CO]^-$, 结合文献并与对照品比对确定其为水杨酸^[6]。化合物 P6 在负离子模式下可得到准分子离子峰 m/z 300.999 1 $[M-H]^-$, 拟合分子式为 $C_{14}H_6O_8$, MS/MS 中有特征碎片离子 m/z 283.996 7 $[M-H-OH]^-$ 、257.008 2 $[M-H-CO_2]^-$ 、229.013 6 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 、201.018 9 $[M-H-CO_2-2CO]^-$ 、185.023 8

$[M-H-2CO_2-CO]^-$ 、173.023 6 $[M-H-CO_2-3CO]^-$, 参考文献并与对照品比对确定其为鞣花酸^[6]。

3.2 代谢产物分析 在前期解析秦岭岩白菜化学成分的基础上, 以体内常见的 I 相(氧化、还原、开环)和 II 相(葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、葡萄糖基化、甲基化、乙酰化)代谢途径建立化合物代谢产物库^[10, 16-17], 结合准分子离子及 MS/MS 碎片离子信息对秦岭岩白菜血清样本中的色谱峰进行解析。结果从秦岭岩白菜血清样本中共解析出 29 个入血代谢产物, 主要是来自含有没食子酸、mallonanoid A、岩白菜素、儿茶素、鞣花酸等结构单元的化合物代谢物, 其代谢途径主要为葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、葡萄糖基化、甲基化等, 以 II 相代谢为主。秦岭岩白菜入血代谢产物的 EIC 见图 4, 鉴定结果见表 2。

化合物 M1、M2 在负离子模式下得到的准分子离子峰分别为 m/z 521.114 7 $[M-H]^-$ 、521.114 6 $[M-H]^-$, 分子式均为 $C_{20}H_{26}O_{16}$, 推测互为同分异构体; 两者在 MS/MS 中均可见特征碎片离子 m/z 345.082 6 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 均比准分子离子减少了 176 Da, MS/MS 中还可见碎片离子 m/z 330 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3]^-$ 、225 $[M-H-C_6H_8O_6-C_4H_8O_4]^-$, 推测二者可能为 mallonanoid A 葡萄糖醛酸苷^[6]。化合物 M3、M7、M9 在负离子模式下均可得到 m/z 507.135 5 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_{20}H_{28}O_{15}$, 比 mallonanoid A 增加 $C_6H_{10}O_5$ (162 Da); 化合物 M7 在 MS/MS 中可见特征碎片离子

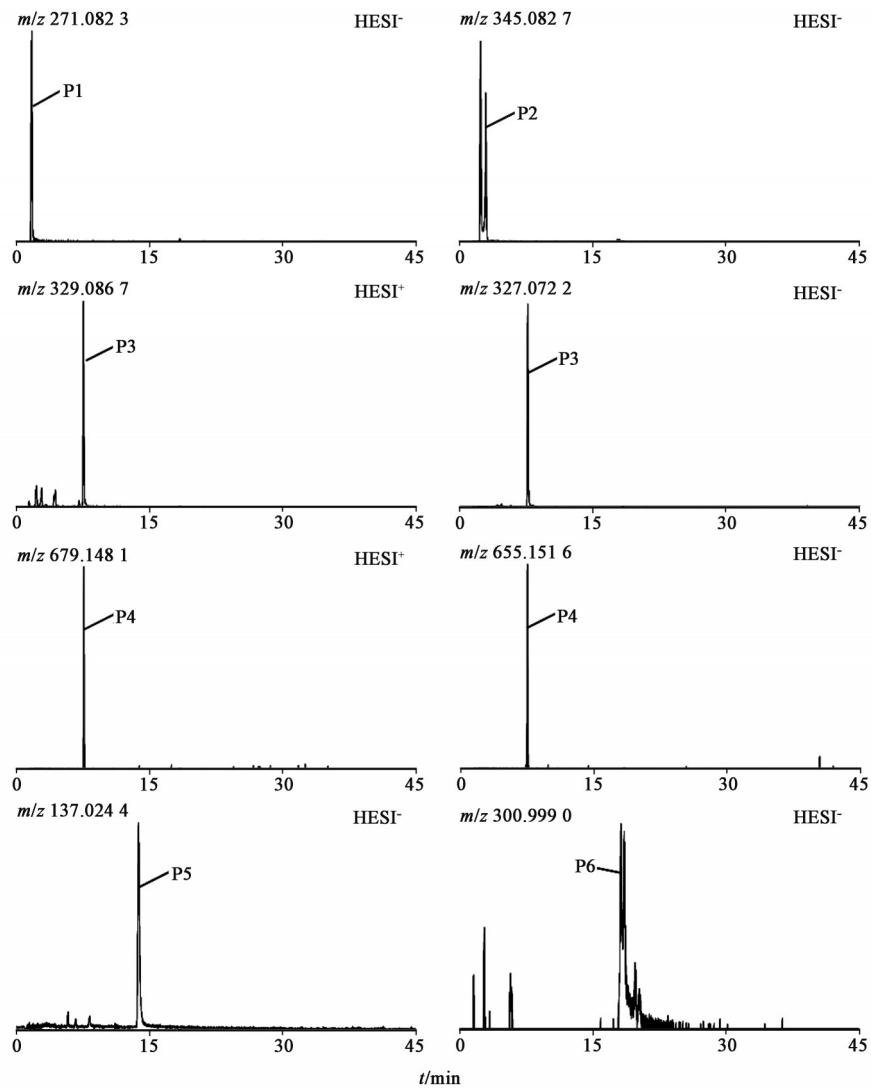


图2 秦岭岩白菜入血原型成分的EIC

Fig. 2 EIC of prototype components from *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* absorbed into blood

表1 秦岭岩白菜入血原型成分的分析

Table 1 Analysis of prototype components from *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* absorbed into blood

No.	化合物	分子式	t_R /min	m/z		δ /ppm	模式	MS/MS
				理论值	实测值			
P1	熊果苷	$C_{12}H_{16}O_7$	1.78	271.0823	-	-	$[M-H]^-$	108.0205
P2	mallonoside A	$C_{14}H_{18}O_{10}$	2.89	345.0827	345.0828	0.3	$[M-H]^-$	330.0601, 225.0401, 210.0158, 194.9929, 180.0056, 166.0263, 138.0312, 124.0155
P3	岩白菜素	$C_{14}H_{16}O_9$	7.58	329.0867	-	-	$[M+H]^+$	233.0448, 205.0496, 195.0290, 193.0498, 191.0336, 181.0497, 177.0182, 159.0441, 133.0286
				7.62	327.0722	327.0723	0.3	$[M-H]^-$
P4	ardimerin	$C_{28}H_{32}O_{18}$	7.59	679.1481	679.1487	0.9	$[M+Na]^+$	351.0687
				7.62	655.1516	655.1522	0.9	$[M-H]^-$
P5	水杨酸	$C_7H_6O_3$	13.74	137.0244	-	-	$[M-H]^-$	93.0333, 65.0384
P6	鞣花酸	$C_{14}H_6O_8$	18.18	300.9990	300.9991	0.3	$[M-H]^-$	283.9967, 257.0082, 229.0136, 201.0189, 185.0238, 173.0236

m/z 492.1126 $[M-H-CH_3]^-$ 、225.0401 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_4H_8O_4]^-$ 、180.0056 $[M-H-C_6H_{10}O_5-$

$C_4H_8O_4-CH_3-CH_2O]^-$ ，化合物 M3、M9 则均无 MS/MS，推测这三个化合物可能为 mallonoside A

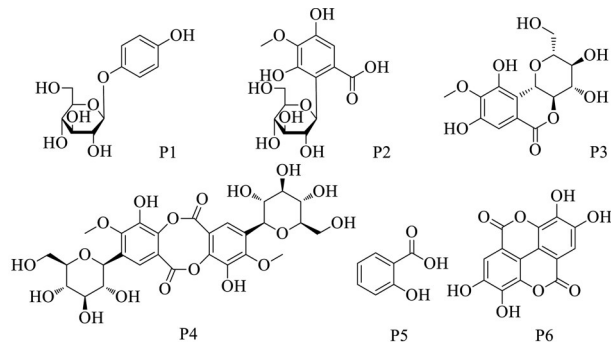


图3 秦岭岩白菜入血成分中原型化合物的结构

Fig. 3 Chemical structures of prototype components from *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* absorbed into blood

葡萄糖苷^[6]。化合物M4、M6在负离子模式下均可得到 m/z 248.971 1 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 分子式为 $C_7H_6SO_8$; MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 169 $[M-H-SO_3]^-$, 比准分子离子减少了 80 Da, MS/MS 中还可见特征碎片离子 m/z 125.023 3 $[M-H-SO_3-CO_2]^-$, 提示可能为没食子酸硫酸酯^[12]。化合物M5在负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 345.083 0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{14}H_{18}O_{10}$, MS/MS 中有碎片离子 m/z 330.059 3 $[M-H-CH_3]^-$ 、210.016 5 $[M-H-CH_3-C_4H_8O_4]^-$ 、194.993 0 $[M-H-CH_3-C_3H_{11}O_4]^-$ 、180.005 7 $[M-H-CH_3-C_4H_8O_4-CH_2O]^-$ 、166.026 3 $[M-H-C_3H_{10}O_4-COOH]^-$ 、138.031 2 $[M-H-C_3H_{10}O_4-COOH-CO]^-$ 、124.015 5 $[M-H-CH_3-C_4H_8O_4-C_2H_2O-CO_2]^-$, 通过与秦岭岩白菜提取液的MS比对, 并结合文献分析推测该化合物为 mallonanaside A 同分异构体^[6]。化合物M8、M11在负离子模式下均可得到 m/z 345.046 3 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_{13}H_{14}O_{11}$, 推测互为同分异构体; 但两者均未看到MS/MS, 其分子式均比没食子酸的分子式增加了 $C_6H_8O_6$ (176 Da), 推测二者可能为没食子酸葡萄糖醛酸苷^[12]。

化合物M10、M13在负离子模式下得到的准分子离子峰分别为 m/z 503.104 5 $[M-H]^-$ 、503.103 6 $[M-H]^-$, 分子式均为 $C_{20}H_{24}O_{15}$, 推测互为同分异构体; 二者在MS/MS中均可见特征碎片离子 m/z 327 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 均比准分子离子减少了 176 Da, MS/MS 中还可见碎片离子 m/z 249 $[M-H-C_6H_8O_6-C_2H_6O_3]^-$ 、207 $[M-H-C_6H_8O_6-C_4H_8O_4]^-$ 、192 $[M-H-C_6H_8O_6-CH_3-C_4H_8O_4]^-$, 推测二者可能为岩白菜素葡萄糖醛酸苷^[13]。化合物M12在负离子模式下可得到 m/z 262.986 7 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_8H_8SO_8$; MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 183.029 1 $[M-H-SO_3]^-$, 比准分子离子减少

80 Da, MS/MS 中还可见特征碎片离子 m/z 168.005 6 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 、124.015 5 $[M-H-SO_3-CH_3-CO_2]^-$, 提示可能为甲基没食子酸硫酸酯^[17]。化合物M14在负离子模式下得到准分子离子峰分别为 m/z 407.028 7 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{14}H_{16}SO_{12}$; MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 327.073 3 $[M-H-SO_3]^-$, 比准分子离子减少了 80 Da, MS/MS 中还可见特征碎片离子 m/z 249.040 3 $[M-H-SO_3-C_2H_6O_3]^-$ 、207.029 4 $[M-H-SO_3-C_4H_8O_4]^-$ 、192.005 8 $[M-H-SO_3-CH_3-C_4H_8O_4]^-$, 提示可能为岩白菜素硫酸酯^[14]。化合物M15在负离子模式下得到 m/z 183.029 9 $[M-H]^-$ 的提取离子峰, 分子式为 $C_8H_8O_5$, 其分子式均比没食子酸的分子式增加 CH_2 (14 Da), 且MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 124.015 6 $[M-H-CH_3-CO_2]^-$ 、123.007 6 $[M-H-CH_3-COOH]^-$, 提示该化合物可能为甲基没食子酸, 但无法确定甲基化准确的代谢位点^[17]。化合物M16、M17在负离子模式下得到的准分子离子峰分别为 m/z 489.125 3 $[M-H]^-$ 、489.125 7 $[M-H]^-$, 分子式均为 $C_{20}H_{26}O_{14}$, 推测互为同分异构体; 二者分子式均比岩白菜素的分子式增加了 $C_6H_{10}O_5$ (162 Da), 且在MS/MS中均可见特征碎片离子 m/z 249 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_2H_6O_3]^-$ 、207 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_4H_8O_4]^-$ 、192 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CH_3-C_4H_8O_4]^-$, 推测二者可能为岩白菜素葡萄糖苷^[6]。化合物M18在正离子模式下可得到 m/z 451.123 5 $[M+H]^+$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_{21}H_{22}O_{11}$, MS/MS 可见特征碎片离子 m/z 275.091 3 $[M+H-C_6H_8O_6]^+$, 比准分子离子减少了 176 Da, 还可见其C环开裂形成的特征碎片离子 m/z 139.039 1 $[C_7H_7O_3]^+$ 、107.049 6 $[C_7H_7O]^+$; 在负离子模式下的MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 273.077 0 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 推测该化合物可能为阿夫儿茶精葡萄糖醛酸苷^[6,18]。

化合物M19在负离子模式下得到准分子离子峰为 m/z 353.035 3 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{15}H_{14}SO_8$ 。MS/MS 中可见特征碎片离子 m/z 273.077 1 $[M-H-SO_3]^-$, 比准分子离子减少了 80 Da, 提示可能为阿夫儿茶精硫酸酯^[6,18]。化合物M20、M25在正离子模式下均可得到 m/z 287.091 4 $[M+H]^+$ 的提取离子峰, 拟合分子式为 $C_{16}H_{14}O_5$, 均比柚皮素分子式多了 CH_2 (14 Da); 化合物M20在MS/MS 中C环开裂生成对甲氧基苯甲酰基特征离子 m/z 137.059 8 $[C_8H_9O_2]^+$, 化合物M25则无MS/MS, 推测这2个化合物可能为甲基柚皮素, 但无法确定甲基化准确的

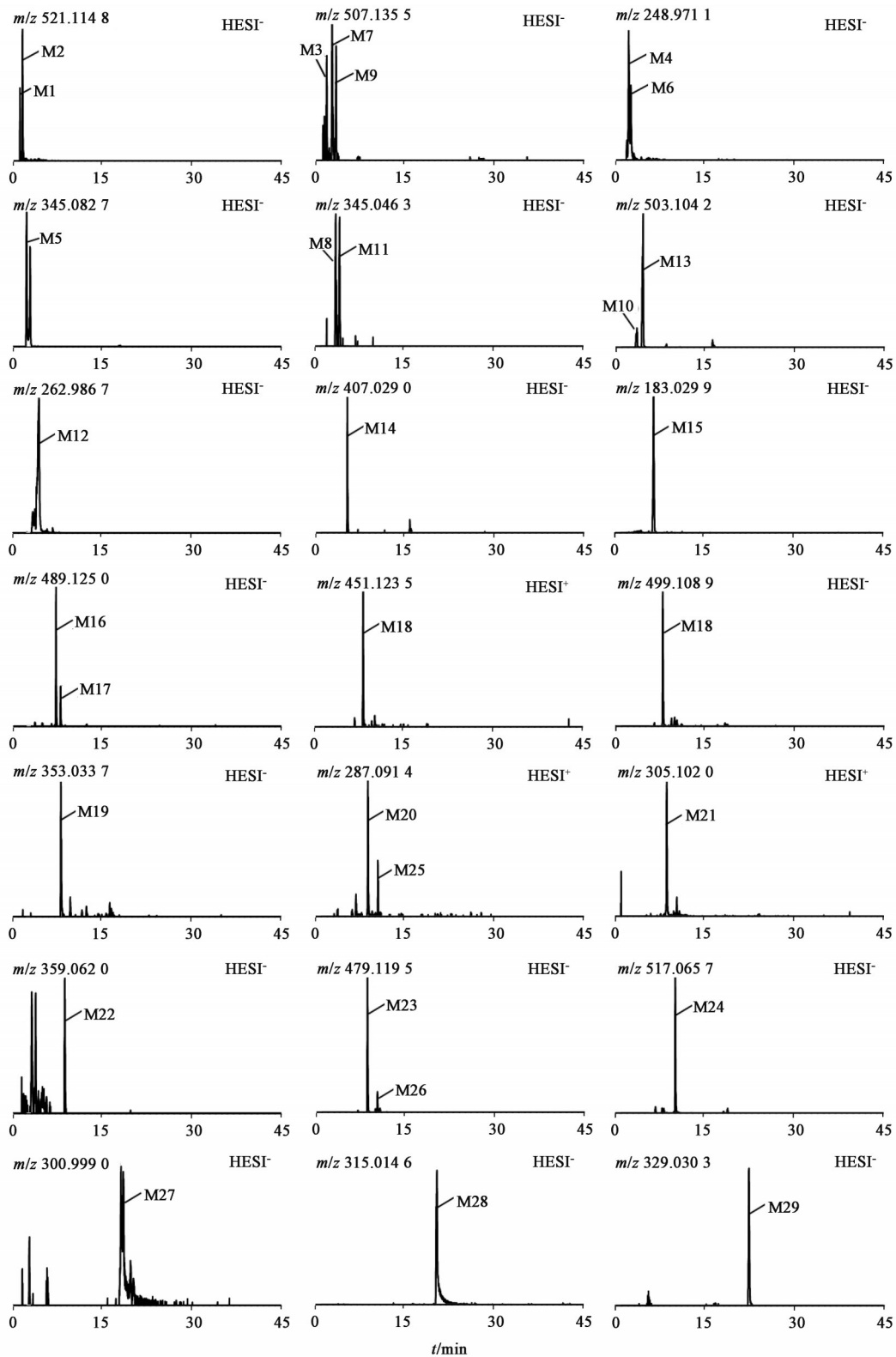


图4 秦岭岩白菜入血代谢产物的EIC

Fig. 4 EIC of metabolites from *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* absorbed into blood

代谢位点。化合物M21在正离子模式下得到 m/z 305.1020 $[M+H]^+$ 的提取离子峰,拟合分子式为 $C_{16}H_{16}O_6$, 比儿茶素分子式多了 CH_2 , 其在MS/MS中C环开裂生成特征碎片离子 m/z 139.039 1

$[C_7H_7O_3]^+$ 、137.0598 $[C_8H_9O_2]^+$, 推测该化合物可能为甲基儿茶素, 但无法确定甲基化准确的代谢位点^[15]。化合物M22在负离子模式下得到的准分子离子峰 m/z 359.0621 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{14}H_{16}O_{11}$,

表2 秦岭岩白菜入血代谢产物分析

Table 2 Analysis of metabolites from *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* absorbed into blood

No.	名称	分子式	t_r /min	m/z		δ /ppm	模式	代谢途径	MS/MS
				理论值	实测值				
M1	mallonoside A 葡萄糖醛酸苷	$C_{20}H_{26}O_{16}$	1.05	521.114 8	521.114 7	-0.2	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	345.082 6, 330.059 2, 255.050 9, 225.040 0, 195.029 2
M2	mallonoside A 葡萄糖醛酸苷	$C_{20}H_{26}O_{16}$	1.50	521.114 8	521.114 6	-0.4	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	345.082 6, 330.059 4, 255.050 7, 225.039 9, 195.029 2
M3	mallonoside A 葡萄糖苷	$C_{20}H_{28}O_{15}$	1.85	507.135 5	-	-	$[M-H]^-$	葡萄糖苷化	-
M4	没食子酸硫酸酯	$C_7H_6SO_8$	2.25	248.971 1	-	-	$[M-H]^-$	硫酸酯化	169.013 4, 125.023 3
M5	mallonoside A 同分异构体	$C_{14}H_{18}O_{10}$	2.29	345.082 7	345.083 0	0.9	$[M-H]^-$	异构化	330.059 3, 210.016 5, 194.993 0, 180.005 7, 166.026 3, 138.031 2, 124.015 5
M6	没食子酸硫酸酯	$C_7H_6SO_8$	2.65	248.971 1	-	-	$[M-H]^-$	硫酸酯化	169.013 3, 125.023 3
M7	mallonoside A 葡萄糖苷	$C_{20}H_{28}O_{15}$	2.75	507.135 5	507.135 7	0.4	$[M-H]^-$	葡萄糖苷化	492.112 6, 255.050 9, 225.040 1, 195.029 3, 180.005 6
M8	没食子酸葡萄糖醛酸苷	$C_{13}H_{14}O_{11}$	3.38	345.046 3	-	-	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	-
M9	mallonoside A 葡萄糖苷	$C_{20}H_{28}O_{15}$	3.41	507.135 5	-	-	$[M-H]^-$	葡萄糖苷化	-
M10	岩白菜素葡萄糖醛酸苷	$C_{20}H_{24}O_{15}$	3.47	503.104 2	503.104 5	0.6	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	327.072 3, 312.049 2, 249.039 9, 207.029 3, 192.005 8, 113.023 2
M11	没食子酸葡萄糖醛酸苷	$C_{13}H_{14}O_{11}$	4.01	345.046 3	-	-	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	-
M12	甲基没食子酸硫酸酯	$C_8H_8SO_8$	4.35	262.986 7	-	-	$[M-H]^-$	硫酸酯化	183.029 1, 168.005 6, 124.015 5
M13	岩白菜素葡萄糖醛酸苷	$C_{20}H_{24}O_{15}$	4.48	503.104 2	503.103 6	-1.2	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	327.072 6, 249.040 0, 207.029 4, 192.005 8, 113.023 3
M14	岩白菜素硫酸酯	$C_{14}H_{16}SO_{12}$	5.31	407.029 0	407.028 7	-0.7	$[M-H]^-$	硫酸酯化	327.073 3, 249.040 3, 207.029 4, 192.005 8
M15	甲基没食子酸	$C_8H_8O_5$	6.47	183.029 9	-	-	$[M-H]^-$	甲基化	124.015 6, 123.007 6, 95.012 7, 61.987 1
M16	岩白菜素葡萄糖苷	$C_{20}H_{26}O_{14}$	7.13	489.125 0	489.125 3	0.6	$[M-H]^-$	葡萄糖苷化	249.040 4, 207.029 4, 192.005 7
M17	岩白菜素葡萄糖苷	$C_{20}H_{26}O_{14}$	7.90	489.125 0	489.125 7	1.4	$[M-H]^-$	葡萄糖苷化	327.075 3, 249.040 3, 207.029 5, 192.005 8
M18	阿夫儿茶精葡萄糖醛酸苷	$C_{21}H_{22}O_{11}$	7.99	451.123 5	-	-	$[M+H]^+$	葡萄糖醛酸化	275.091 3, 149.059 9, 139.039 1, 107.049 6
			8.00	449.108 9	-	-	$[M-H]^-$		273.077 0
M19	阿夫儿茶精硫酸酯	$C_{15}H_{14}SO_8$	8.06	353.033 7	353.035 3	4.5	$[M-H]^-$	硫酸酯化	273.077 1, 255.066 0, 137.023 4
M20	甲基柚皮素	$C_{16}H_{14}O_5$	8.66	287.091 4	-	-	$[M+H]^+$	甲基化	149.059 8, 137.059 8, 122.036 6
M21	甲基儿茶素	$C_{16}H_{16}O_6$	8.66	305.102 0	-	-	$[M+H]^+$	甲基化	147.044 1, 139.039 1, 137.059 8
M22	甲基没食子酸葡萄糖醛酸苷	$C_{14}H_{16}O_{11}$	8.69	359.062 0	359.062 1	0.3	$[M-H]^-$	甲基化/葡萄糖醛酸化	183.029 1
M23	甲基儿茶素葡萄糖醛酸苷	$C_{22}H_{24}O_{12}$	8.70	479.119 5	479.119 1	-0.8	$[M-H]^-$	甲基化/葡萄糖醛酸化	303.087 6, 113.023 2
M24	甲基没食子酰熊果苷硫酸酯	$C_{20}H_{22}SO_{14}$	10.00	517.065 7	517.065 7	0.0	$[M-H]^-$	硫酸酯化	437.109 0, 422.085 3, 327.072 2, 183.029 1
M25	甲基柚皮素	$C_{16}H_{14}O_5$	10.33	287.091 4	-	-	$[M+H]^+$	甲基化	-
M26	甲基儿茶素葡萄糖醛酸苷	$C_{22}H_{24}O_{12}$	10.37	479.119 5	479.120 4	1.9	$[M-H]^-$	葡萄糖醛酸化	303.087 4, 113.023 2
M27	鞣花酸同分异构体	$C_{14}H_6O_8$	18.55	300.999 0	300.999 0	0.0	$[M-H]^-$	异构化	283.996 0, 257.009 6, 229.013 5, 205.027 5, 201.018 5, 185.023 8, 173.022 9
M28	甲基鞣花酸	$C_{15}H_8O_8$	20.32	315.014 6	315.016 0	4.4	$[M-H]^-$	甲基化	299.991 3
M29	二甲基鞣花酸	$C_{16}H_{10}O_8$	20.43	329.030 3	329.029 1	-3.6	$[M-H]^-$	甲基化	314.006 3, 298.983 5, 270.988 4

其MS/MS中可见特征碎片离子 m/z 183.029 1 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 比准分子离子减少了176 Da, 推测该化合物可能为甲基没食子酸葡萄糖醛酸苷^[17]。化合物M23、M26在负离子模式下的准分子离子峰分别为 m/z 479.119 1 $[M-H]^-$ 、479.120 4 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{22}H_{24}O_{12}$; 二者MS/MS中均可见特征碎片离子 m/z 303 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 比甲基儿茶素增加了 $C_6H_8O_6$ (176 Da), 推测这2个化合物可能为甲基儿茶素葡萄糖醛酸苷^[15]。化合物M24在负离子模式下得到准分子离子峰为 m/z 517.065 7 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{20}H_{22}SO_{14}$; 其MS/MS中可见特征碎片离子 m/z 437.109 0 $[M-H-SO_3]^-$, 比准分子离子减少了80 Da, MS/MS中还有特征碎片离子 m/z 422.085 3 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 、327.072 2 $[M-H-SO_3-hydroquinone]^-$ 和甲基没食子酸特征离子 m/z 183.029 1 $[C_8H_7O_5]^-$, 结合文献推测该化合物为甲基没食子酰熊果苷硫酸酯^[6]。

化合物M27在负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 300.999 0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{14}H_6O_8$, MS/MS中还有特征碎片离子 m/z 283.996 0 $[M-H-OH]^-$ 、257.009 6 $[M-H-CO_2]^-$ 、229.013 5 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 、201.018 5 $[M-H-CO_2-2CO]^-$ 、185.023 8 $[M-H-2CO_2-CO]^-$ 、173.022 9 $[M-H-CO_2-3CO]^-$, 参考文献并与原型成分比对推测该化合物为鞣花酸同分异构体^[6]。化合物M28在负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 315.016 0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{15}H_8O_8$, 比鞣花酸分子式多 CH_2 (14 Da), 其MS/MS中有特征碎片离子 m/z 299.991 3 $[M-H-CH_3]^-$, 推测该化合物为甲基鞣花酸, 但无法确定甲基化准确的代谢位点^[6]。化合物M29在负离子模式下得到准分子离子峰 m/z 329.029 1 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{10}O_8$, 比鞣花酸分子式多2个 CH_2 , 其MS/MS中有特征碎片离子 m/z 314.006 3 $[M-H-CH_3]^-$ 、298.983 5 $[M-H-2CH_3]^-$ 、270.988 4 $[M-H-2CH_3-CO]^-$, 推测该化合物为二甲基鞣花酸, 但无法确定甲基化准确的代谢位点^[6]。

4 讨论

太白“七药”秦岭岩白菜成分复杂, 依据中医整体观的思想, 进入体内的成分才能对疾病发挥治疗作用, 通过研究其转移到体内的成分可以缩小研究秦岭岩白菜治疗急慢性肠胃炎、咳嗽、吐血、便血、肠炎等疾病的效应物质范围^[19]。由于中药成分本身复杂, 进入体内还会发生I相和II相代谢, 再加上体内内源性物质的干扰, 给中药体内代谢产物的

研究带来了一定难度。而UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS可以较好地解决这一问题, 该技术是专门针对小分子化合物分析, 并且具有高分辨率、高灵敏度、快速分析等优势, 可以提供准分子离子、二级碎片离子、精确相对分子质量及元素组成等信息, 能够实现药物在体内转移的复杂成分的分析 and 鉴定。

本研究采用UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS对大鼠口服秦岭岩白菜提取物后的血清样本进行分析, 与前期解析的秦岭岩白菜中的成分进行比对, 根据入血成分MS/MS图谱中准分子离子及特征碎片离子, 共解析出35个移行成分, 其中6个为原型成分, 29个为代谢产物。通过分析秦岭岩白菜入血代谢产物, 发现主要为没食子酸、mallonoside A、岩白菜素、儿茶素、鞣花酸等成分发生葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、葡萄糖基化、甲基化代谢产生, 结合前期解析的秦岭岩白菜药材中发现的成分主要含有没食子酸、岩白菜素、儿茶素等结构单元, 故推测秦岭岩白菜药材中的化学成分在体内可能主要是先通过水解等途径转化为没食子酸、岩白菜素、儿茶素等简单结构, 再进一步发生II相代谢, mallonoside A、岩白菜素、鞣花酸在体内既可以以原型成分入血, 又可以经过II相代谢发挥药效。据报道, 熊果苷具有促进伤口愈合、抗炎、抗溃疡、利尿、止咳、抗氧化等作用^[20]; mallonoside A具有一定抗氧化能力^[21]; 岩白菜素已被开发为镇咳祛痰药复方岩白菜素片, 其还具有抗微生物、促进伤口愈合、抗溃疡、抑制血小板聚集、抗氧化等作用^[22]; 没食子酸具有抗炎、抗氧化、抗溃疡、抗微生物、抗癌等作用^[23-24]; 鞣花酸具有抗氧化、抗炎、抗诱变、抗恶性细胞增殖、促进伤口愈合及解毒等作用^[25]; 儿茶素具有抗微生物、抗氧化、抗癌、抗抑郁等作用^[26]。秦岭岩白菜成分复杂, 本研究通过建立其含药血清的UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析方法, 解析了秦岭岩白菜的入血原型成分及代谢产物, 由于动物个体的差异性, 入血成分分析也存在一定偏差, 针对该药入血移行成分的药效作用还需进一步在动物、细胞、分子水平验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省药材标准[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2016.
- [2] 郭琳, 徐悦, 李玉泽, 等. 盘龙七药材的质量评价[J].

- 陕西中医药大学学报, 2021, 44(6): 61-66.
- [3] 崔莹. 盘龙七化学成分的研究(I) [J]. 中成药, 2011, 33(9): 1546-1549.
- [4] 崔莹. 盘龙七化学成分研究(II) [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1704-1707.
- [5] 毛少利, 李倩, 李阳, 等. 珍稀濒危植物秦岭岩白菜的研究进展 [J]. 广西林业科学, 2017, 46(4): 396-399.
- [6] 任慧, 崔小敏, 胡静, 等. 秦岭岩白菜根茎化学成分的UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 118-128.
- [7] MA L. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of *Bergenia scopulosa* T. P. Wang extract [J]. Adv J Food Sci Technol, 2014, 6(8): 994-997.
- [8] 张韫, 唐一梅, 高苏亚, 等. 盘龙七的体外抗氧化活性研究 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(4): 13-18.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] ZHANG A H, SUN H, YAN G L, et al. Chinmedomics: A powerful approach integrating metabolomics with serum pharmacochemistry to evaluate the efficacy of traditional Chinese medicine [J]. Engineering, 2019, 5(1): 60-68.
- [12] YASUDA T, INABA A, OHMORI M, et al. Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical [J]. J Nat Prod, 2000, 63(10): 1444-1446.
- [13] REN Y P, WAN C C, LIAO M, et al. Pharmacokinetics and excretion study of bergenin and its phase II metabolite in rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(7): e4513.
- [14] SONG H J, WANG J, ZHANG R, et al. *In vivo* metabolism study of bergenin in rats by HPLC-QTOF mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(11): 1398-1405.
- [15] LIANG J, XU F, ZHANG Y Z, et al. The profiling and identification of the metabolites of (+)-catechin and study on their distribution in rats by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSⁿ technique [J]. Biomed Chromatogr, 2014, 28(3): 401-411.
- [16] 孙志, 周霖, 禹明洋, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的6-姜酚在大鼠体内代谢产物的鉴定及代谢途径的分析 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7420-7427.
- [17] 阴奇材, 陈聪聪, 田俊生, 等. 基于UPLC-QE-Orbitrap-MS技术的柴胡-白芍药对血清药物化学分析 [J]. 药学学报, 2019, 54(12): 2296-2302.
- [18] SUN C C, LI G J, LI H B, et al. Enhancing flavan-3-ol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(43): 12763-12772.
- [19] 洪方, 闫艳, 赵雷, 等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS鉴定葛根汤的入血成分及其代谢产物 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5944-5952.
- [20] SAEEDI M, KHEZRI K, ZAKARYAEI A S, et al. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin [J]. Phytother Res, 2021, 35(8): 4136-4154.
- [21] PHAN V K, NGUYEN T M, MINH C V, et al. Two new C-glucosyl benzoic acids and flavonoids from *Mallotus nanus* and their antioxidant activity [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(2): 203-208.
- [22] BAJRACHARYA G B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages [J]. Fitoterapia, 2015, 101: 133-152.
- [23] FERNANDES F H A, SALGADO H R N. Gallic acid: Review of the methods of determination and quantification [J]. Crit Rev Anal Chem, 2016, 46(3): 257-265.
- [24] 阿丽亚·依拉木, 阿布都艾则孜·艾尔肯, 古丽娜·卡里曼江, 等. 基于JAK/STAT通路研究没食子酸抗结肠癌作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 91-99.
- [25] SHARIFI-RAD J, QUISPE C, CASTILLO C M S, et al. Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3848084.
- [26] 雷志伟, 李露露, 郭灿, 等. 儿茶素糖基化修饰研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5362-5372.

[责任编辑 刘德文]