

· 药物代谢 ·

芍药甘草汤主要成分在正常及多囊卵巢综合征大鼠 尿液和粪便中的代谢产物分析

郭一婷^{1,2}, 程瑶^{1,2}, 邵云云², 刘俊瑾², 冯小娟^{1,2}, 张京平², 侯锐刚^{2*}
(1. 山西医科大学, 太原 030000; 2. 山西医科大学第二医院, 太原 030001)

[摘要] 目的: 分析及鉴定芍药甘草汤主要成分在正常及多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠尿液和粪便中的代谢产物, 探究 PCOS 对芍药甘草汤代谢的影响。方法: 雌性 SD 大鼠随机分为正常组和 PCOS 组, 利用来曲唑溶液灌胃 21 d 制备 PCOS 大鼠模型, 观察动情周期; 采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术并结合 LightSight 2.3 软件对芍药甘草汤主要成分在正常及 PCOS 大鼠尿液和粪便中的代谢产物进行分析与鉴定, 流动相水-甲醇梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 电喷雾离子源, 负离子模式。结果: 药物代谢主要发生 I 相及 II 相反应, 正常组大鼠尿液中共检测到代谢物 27 个, PCOS 组大鼠尿液中共检测到代谢物 34 个; 正常组大鼠粪便样品中共检测到代谢物 29 个, PCOS 组大鼠粪便样品中共检测到代谢物 27 个。结论: PCOS 大鼠尿液中代谢产物比正常大鼠更具多样性, PCOS 疾病状态可能会影响芍药甘草汤有效成分在体内的代谢途径。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 芍药甘草汤; 代谢产物; 代谢途径; 尿液; 粪便; 肠道菌群

[中图分类号] R22; R969.1; R28; O657.6; R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0103-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192156

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190719.1812.009.html>

[网络出版时间] 2019-07-22 09:17

Analysis on Metabolites of Major Components of Shaoyao Gancaotang in Urine and Feces of Normal and Polycystic Ovary Syndrome Rats

GUO Yi-ting^{1,2}, CHENG Yao^{1,2}, SHAO Yun-yun², LIU Jun-jin², FENG Xiao-juan^{1,2},
ZHANG Jing-ping², HOU Rui-gang^{2*}
(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;
2. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze and identify the metabolites of major components of Shaoyao Gancaotang in urine and feces of normal and polycystic ovary syndrome (PCOS) rats, and to explore the effect of PCOS on the metabolism of Shaoyao Gancaotang. **Method:** Female SD rats were randomly divided into normal group and PCOS group. PCOS rat model was prepared by administration of letrozole solution for 21 days, and the estrous cycle of rats was observed. UHPLC-QTRAP-MS/MS technique and LightSight 2.3 software were used to analyze and identify the metabolites of major components of Shaoyao Gancaotang in urine and feces of normal and PCOS rats. The mobile phase was water-methanol for gradient elution, the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, electrospray ion source was employed under negative ion mode. **Result:** Phase I and phase II reactions mainly occurred in drug metabolism. A total of 27 metabolites were detected in urine of normal rats, and 34 metabolites were detected in urine of PCOS rats. A total of 29 metabolites were detected in feces of normal rats, and 27 metabolites were detected in feces of PCOS rats. **Conclusion:** The metabolites in the urine of PCOS rats are more

[收稿日期] 20190508(014)

[基金项目] 山西省中药现代化关键技术研究振兴专项(2014ZD0102); 山西省卫生计生委科研课题(2015046)

[第一作者] 郭一婷, 在读硕士, 从事药效学及药代动力学研究, E-mail: Guoyit@126.com

[通信作者] * 侯锐刚, 主任药师, 从事药效学及药代动力学研究, Tel: 0351-3365405, E-mail: houruigang9966@163.com

diverse than those of normal rats, and the disease status of PCOS may affect the *in vivo* metabolic pathway of active ingredients in Shaoyao Gancaotang.

[Key words] polycystic ovary syndrome; Shaoyao Gancaotang; metabolites; metabolic pathway; urine; feces; intestinal flora

芍药甘草汤是出自东汉张仲景《伤寒论·太阳篇》的经典名方,由芍药和甘草配伍组成,具有养阴柔肝、活血化瘀之效。现代药理学研究表明^[1],芍药甘草汤可以提高排卵率,改善多囊卵巢综合征(PCOS)的症状,对 PCOS 有明确的治疗作用。然而,由于芍药甘草汤中的活性成分较多且体内代谢途径复杂多样,使得芍药甘草汤体内代谢产物鉴定仍然存在很大挑战。目前的研究大多集中在芍药、甘草单体体内代谢产物的鉴定,尚无完整的关于芍药甘草汤在大鼠体内代谢产物鉴定的研究。

据报道,PCOS 疾病状态会影响药物体内代谢动力学参数,进而改变药物体内代谢速率^[2],由此推测 PCOS 疾病状态同样可能影响芍药甘草汤体内的代谢途径,使其体内代谢产物发生改变,但是目前芍药甘草汤体内代谢产物的研究仅限于正常大鼠,关于芍药甘草汤在正常与 PCOS 疾病状态下代谢产物的鉴别及比较的研究尚未见报道,研究正常及 PCOS 状态下药物体体内代谢产物对阐明疾病状态下药物代谢差异具有重要意义。因此,本实验采用超高效液相色谱-三重四极杆-线性离子阱串联质谱(UHPLC-QTRAP-MS/MS)对正常及 PCOS 大鼠灌胃给予芍药甘草汤后主要活性成分在尿液及粪便中的代谢产物进行分析,为探究 PCOS 疾病状态对芍药甘草汤代谢途径的影响提供参考。

1 材料

Q-TRAP 5500 型三重四极杆线性离子阱串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司),LD-30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),SQP 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(上海)有限公司],D-37520 型高速冷冻离心机(德国贺利氏公司),DZF-6050 型真空干燥箱(苏州江东精密仪器有限公司),Vortex-5 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、甘草苷、甘草酸、甘草次酸、甘草素对照品(批号分别为 MUST-17031901, MUST-18041601, MUST-18052801, MUST-17031801, MUST-17060805, MUST-18032207, MUST-18060801, 纯度依次为 $\geq 99\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99\%$)以及染料木素(内标,批号 MUST-17031412, 纯度 $\geq 99\%$)均购于成

都曼思特生物科技有限公司,来曲唑片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 S0124),水为自制超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;芍药、甘草饮片均由山西医科大学第二医院中药房提供,经山西医科大学第二附属医院张京平副主任中药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求。

SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 150 ~ 180 g,由中国食品药品检定研究院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2014-0013。本文涉及的动物实验经山西医科大学第二医院实验动物伦理委员会审查批准,批准编号 2015KS001。

2 方法与结果

2.1 芍药甘草汤的制备 分别取芍药和甘草饮片各 50 g,加入 8 倍量水浸泡 1 h,煎煮 1 h,共煎 3 次,趁热过滤,合并 3 次滤液,减压浓缩后制成生药质量浓度为 $4.24 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎液,备用^[3]。

2.2 动物模型制备及评价 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为正常组与 PCOS 组,每组 8 只。PCOS 组大鼠连续灌胃给予来曲唑溶液($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 21 d 造模,同时正常组大鼠灌胃给予生理盐水 21 d 作为对照。造模第 15 天开始进行阴道涂片,观察动情周期变化,如动情周期紊乱即表示大鼠模型制备成功^[3]。

2.3 检测条件

2.3.1 色谱条件 流动相水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、甘草苷和甘草素的梯度洗脱程序为 0 ~ 2 min, 5% B; 2 ~ 3 min, 5% ~ 15% B; 3 ~ 4 min, 15% B; 4 ~ 9 min, 15% ~ 50% B; 9 ~ 11 min, 50% B; 11 ~ 14 min, 50% ~ 95% B; 14 ~ 16 min, 95% B; 16 ~ 16.1 min, 95% ~ 5% B; 16.1 ~ 19 min, 5% B。甘草酸和甘草次酸的梯度洗脱程序为 0 ~ 4.5 min, 30% B; 4.5 ~ 5.5 min, 30% ~ 90% B; 5.5 ~ 9.5 min, 90% B; 9.5 ~ 10.2 min, 90% ~ 30% B; 10.2 ~ 11 min, 30% B), Kinetex XB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm), 柱温 25 °C, 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 10 μL。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 负离子模式检测, 喷雾电压 4.5 kV, 雾化气压力

0.345 MPa, 辅助气压力 0.345 MPa, 离子源温度 500 ℃。采用多反应监测-增强子离子扫描 (MRM-EPI) 方式, 采集范围 m/z 50 ~ 1 000。

2.4 生物样品的收集与处理

2.4.1 样品的收集

造模成功后将正常组及 PCOS 组大鼠置于代谢笼中, 分别收集空白尿液和粪便。将正常组及 PCOS 组大鼠禁食 12 h, 分别一次灌胃给予芍药甘草汤 ($50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 一般将成人芍药甘草汤用量的 6 倍作为大鼠的等效剂量, 前期实验研究^[3]将 $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作为大鼠服用芍药甘草汤的高剂量) 并收集 24 h 内的尿液和粪便, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存。

2.4.2 尿液样品的预处理

将收集到的正常组和 PCOS 组大鼠的尿液在低温下解冻, 分别混匀。取尿液 100 μL , 精密加入甲醇 300 μL , 涡旋震荡 3 min, 离心 ($12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同) 后取上清液, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥箱中干燥, 残渣用甲醇-水 (3:7) 100 μL 复溶, 涡旋 3 min, 离心, 取上清液 50 μL 进样分析。

2.4.3 粪便样品的预处理

将收集到的正常组和 PCOS 组大鼠的粪便阴干后研磨粉碎 (过 80 目筛), 精密称取 100 mg 后置于 600 μL 的甲醇-水 (1:1) 中浸泡、匀浆, 超声提取匀浆液 2 次, 每次 10 min, 离心, 取上清液 100 μL , 处理方法同 2.4.2 项。

2.5 数据处理

采用 LightSight 2.3 和 MultiQuant 3.0.2 软件进行数据分析及处理。使用 LightSight 2.3 软件建立预测 MRM 信息关联扫描 (pMRM-IDA) 的采集方法。根据芍药甘草汤中 7 种主要活

性成分的母药结构, 基于软件内置的 I, II 相代谢途径, 预测潜在代谢产物的理论 MRM 离子对。以 pMRM 作为预扫描, 设置相应的 IDA 条件以触发 EPI。软件自动将液相图谱与 MS 数据关联进行后续处理, 最终给出可能的代谢产物列表。将列表中每个代谢产物的 MS 图谱及裂解方式与母药进行比对验证, 进一步确认药物的代谢产物。

2.6 代谢物的鉴定

采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术对收集到的尿液、粪便样品进行分析, 将代谢物的精确相对分子质量及二级质谱与相关数据库、文献 [4-7] 进行对比, 从而对代谢物进行分析和鉴定。结果在正常组及 PCOS 组大鼠尿样和粪便样品中共检测到代谢产物 50 个, 其中在正常组大鼠尿液中检测到 27 个代谢产物 (源自芍药和甘草的主要成分代谢物分别为 5, 22 个), PCOS 组大鼠尿液中则检测到 34 个代谢产物 (源自芍药和甘草的主要成分代谢物分别为 12, 22 个); 正常组大鼠粪便中检测到 29 个代谢产物 (源自芍药和甘草的主要成分代谢物分别为 8, 21 个), PCOS 组大鼠粪便中则检测到 27 个代谢产物 (源自芍药和甘草的主要成分代谢物分别为 11, 16 个)。见表 1。芍药甘草汤在尿液及粪便中的代谢产物主要包括以氧化产物为主的 I 相代谢产物, 以葡萄糖醛酸化、硫酸化及氧化与葡萄糖醛酸化相结合产物为主的 II 相代谢产物。与正常组相比, PCOS 组大鼠尿液中的代谢物更具有多样性, 推测 PCOS 疾病状态下芍药甘草汤主要成分在体内的代谢途径与正常状态下有一定差异。

表 1 芍药甘草汤 7 种主要成分在尿液和粪便样品中的代谢产物

Table 1 Metabolites of 7 main components of Shaoyao Gancaotang in urine and feces

No.	t_{R} /min	$[\text{M} - \text{H}]^{-}$ m/z	分子式	MS/MS 碎片信息	代谢产物	来源	
						尿液	粪便
M1-1	14.54	686.8	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{19}$	511, 479, 121	芍药苷 + 2O + GluA	P	-
M1-2	14.12	703.1	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{20}$	527, 495, 479, 121	芍药苷 + 3O + GluA	P	N, P
M1-3	6.30	495.1	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	465, 401, 137	芍药苷 + O	N, P	N, P
M1-4	2.32	559.2	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{S}$	357, 201, 121	芍药苷 + Sul	N, P	P
M1-5	4.26	575.2	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{15}\text{S}$	479, 449, 217, 201	芍药苷 + O + Sul	P	-
M1-6	7.91	598.3	$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{S}$	446, 357, 121	芍药苷 + S + Cys	-	N
M2-1	6.20	495.1	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	449, 137	芍药内酯苷 + O	N, P	P
M2-2	2.35	559.2	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{14}\text{S}$	479, 201, 137, 121	芍药内酯苷 + Sul	N, P	P
M2-3	4.29	575.0	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{15}\text{S}$	479, 217, 137, 121	芍药内酯苷 + O + Sul	P	-
M2-4	9.24	655.0	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$	611, 567, 479, 435, 259	芍药内酯苷 + GluA	P	-
M2-5	14.53	687.0	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{19}$	511, 479, 343	芍药内酯苷 + 2O + GluA	P	-

续表 1

No.	t_R /min	$[M - H]^-$ m/z	分子式	MS/MS 碎片信息	代谢产物	来源	
						尿液	粪便
M2-6	14.14	511.3	$C_{23}H_{28}O_{13}$	467, 293, 267, 93	芍药内酯苷 + 2O	-	P
M2-7	14.08	527.3	$C_{23}H_{28}O_{14}$	479, 137	芍药内酯苷 + 3O	-	P
M2-8	13.07	703.3	$C_{29}H_{36}O_{20}$	527, 479, 137	芍药内酯苷 + 3O + GluA	-	N, P
M2-9	7.88	598.3	$C_{26}H_{33}NO_{13}S$	479, 254, 121	芍药内酯苷 + S + Cys	-	N
M3-1	6.89	511.2	$C_{23}H_{28}O_{13}$	495, 319, 153, 137	羟基芍药苷 + O	N	N, P
M3-2	9.22	671.2	$C_{29}H_{36}O_{18}$	495, 319, 137	羟基芍药苷 + GluA	P	-
M3-3	3.06	703.1	$C_{29}H_{36}O_{20}$	527, 495, 345	羟基芍药苷 + 2O + GluA	P	N, P
M3-4	13.83	575.3	$C_{23}H_{28}O_{15}S$	495, 137	羟基芍药苷 + Sul	-	N
M3-5	8.65	614.3	$C_{26}H_{33}NO_{14}S$	495, 256	羟基芍药苷 + S + Cys	-	P
M4-1	2.53	433.1	$C_{21}H_{22}O_{10}$	417, 255, 151, 135, 119, 91	甘草苷 + O	N, P	N, P
M4-2	1.09	609.1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	433, 255, 151	甘草苷 + O + GluA	N	-
M4-3	9.75	513.2	$C_{21}H_{22}O_{13}S$	513, 255, 151, 135, 119	甘草苷 + O + Sul	N, P	N, P
M4-4	14.29	688.9	$C_{27}H_{30}O_{19}S$	417, 255, 151	甘草苷 + O + Sul + GluA	P	-
M4-5	3.97	593.0	$C_{27}H_{30}O_{15}$	417, 401, 255, 113	甘草苷 + GluA	N, P	N, P
M4-6	4.91	497.2	$C_{21}H_{22}O_{12}S$	417, 255, 135	甘草苷 + Sul	N, P	N
M4-7	6.69	536.0	$C_{24}H_{27}NO_{11}S$	417, 255, 135, 119	甘草苷 + S + Cys	P	-
M4-8	8.72	465.1	$C_{21}H_{22}O_{12}$	417, 135	甘草苷 + 3O	-	N, P
M5-1	6.54	271.2	$C_{15}H_{12}O_5$	255, 151, 119	甘草素 + O	N, P	N, P
M5-2	11.87	287.2	$C_{15}H_{12}O_6$	167, 151, 135, 91	甘草素 + 2O	N, P	N, P
M5-3	5.87	303.1	$C_{15}H_{12}O_7$	255, 183, 167, 151	甘草素 + 3O	N	N, P
M5-4	3.82	351.1	$C_{15}H_{12}O_8S$	271, 255, 151, 135, 119, 91	甘草素 + O + Sul	P	P
M5-5	4.53	447.1	$C_{21}H_{20}O_{11}$	271, 151, 135, 119	甘草素 + O + GluA	N, P	N, P
M5-6	9.04	527.2	$C_{21}H_{20}O_{14}S$	351, 335, 151,	甘草素 + O + Sul + GluA	N, P	N, P
M5-7	6.17	463.2	$C_{21}H_{20}O_{12}$	287, 255, 167, 151,	甘草素 + 2O + GluA	N	-
M5-8	2.15	479.2	$C_{21}H_{20}O_{13}$	303, 255, 183, 119	甘草素 + 3O + GluA	N, P	-
M5-9	15.04	335.3	$C_{15}H_{12}O_7S$	267, 255, 199, 131	甘草素 + Sul	N, P	N, P
M5-10	4.44	431.0	$C_{21}H_{20}O_{10}$	255, 175, 135, 119	甘草素 + GluA	N, P	N
M5-11	12.82	510.7	$C_{21}H_{20}O_{13}S$	493, 425, 335, 255	甘草素 + Sul + GluA	N	-
M5-12	4.16	374.2	$C_{18}H_{17}NO_6S$	255, 254, 135, 119	甘草素 + S + Cys	N, P	N
M5-13	15.94	607.3	$C_{27}H_{28}O_{16}$	589, 255	甘草素 + 2GluA	-	N
M6-1	2.99	837.2	$C_{42}H_{62}O_{17}$	821, 351	甘草酸 + O	N, P	N, P
M6-2	3.70	940.2	$C_{45}H_{67}NO_{18}S$	821, 470	甘草酸 + S + Cys	N, P	N, P
M7-1	6.86	485.3	$C_{30}H_{46}O_5$	469, 280	甘草次酸 + O	N, P	N, P
M7-2	1.92	549.1	$C_{30}H_{46}O_7S$	355, 255, 135	甘草次酸 + Sul	N, P	N
M7-3	7.45	645.0	$C_{36}H_{54}O_{10}$	525, 476, 469, 457	甘草次酸 + GluA	-	N
M7-4	6.86	565.3	$C_{30}H_{46}O_8S$	469, 435, 355	甘草次酸 + O + Sul	P	N, P
M7-5	1.05	741.1	$C_{36}H_{54}O_{14}S$	469, 425, 355,	甘草次酸 + O + Sul + GluA	P	-
M7-6	1.72	725.2	$C_{36}H_{54}O_{13}S$	549, 469, 355, 135	甘草次酸 + Sul + GluA	N	P
M7-7	1.17	821.0	$C_{42}H_{62}O_{16}$	469, 453, 355, 237	甘草次酸 + 2GluA	N, P	N

注: GluA. 葡萄糖醛酸; Sul. 磺酸基; Cys. 半胱氨酸; N. 正常组; P. PCOS 组。

2.7 尿液中代谢产物的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 分析

2.7.1 芍药苷、芍药内酯苷和羟基芍药苷代谢产物分析 芍药的主要活性成分是芍药苷、芍药内酯苷和羟基芍药苷, 三者的二级质谱图见图 1, 相关代谢通路见图 2。在 MRM-EPI 模式下扫描到芍药苷 (M1) 的保留时间 (t_R) 7.93 min, 分子离子峰 m/z 479.0 $[M - H]^-$ ($C_{23}H_{27}O_{11}$), 子离子为 m/z 121, 165, 327, 357。文献报道芍药苷在体内代谢过程中可发生 I 相氧化反应和 II 相结合反应^[4], 与实验结果一致。代谢物 M1-1 对应分子离子峰 m/z 686.8 ($[M - H]^-$) 与芍药苷分子离子峰相差 208 Da, 且有 m/z 121, 497 特征离子峰, 推测 M1-1 可能为芍药苷与葡萄糖结合同时双氧化的产物。M1-2 准分子离子峰 m/z 703.1 ($[M - H]^-$) 比芍药苷大 224 Da, 由此推测可能为芍药苷的三氧化加葡萄糖醛酸化产物。芍药苷中苯甲酰氧基 ($C_7H_6O_2$) 较不稳定, 易发生氧化和磺酸化反应。M1-3 准分子离子峰为 m/z 495.1 ($[M - H]^-$), 比芍药苷大 16 Da, 存在 m/z 137 碎片且比碎片离子 m/z 121 ($C_7H_6O_2$) 大 16 Da, 故推测其为苯甲酰基氧化产物, 然而与羟基芍药苷对照品 t_R 作对比后发现其并不是羟基芍药苷。

M1-4 具有 m/z 559.2 $[M - H]^-$ 分子离子峰, 碎片 m/z 201 比碎片离子 m/z 121 ($C_7H_6O_2$) 大 80 Da, 故推测其为苯甲酰基硫酸化代谢物。M1-5 具有 m/z 575.2 $[M - H]^-$ 分子离子峰和 m/z 217, 故推测其为芍药苷氧化加硫酸化代谢产物。

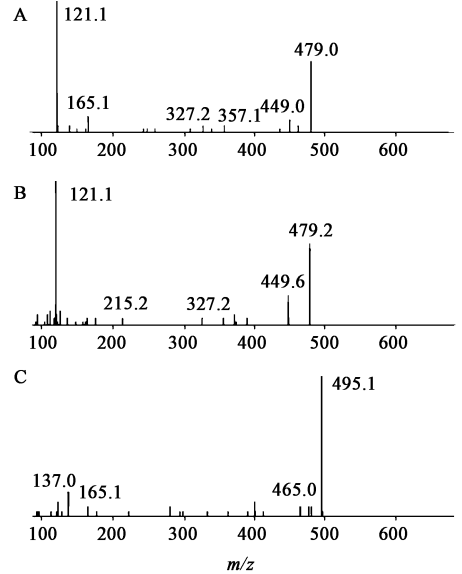


图 1 芍药苷 (A), 芍药内酯苷 (B) 及羟基芍药苷 (C) 的 MS/MS
Fig. 1 MS/MS spectra of paeoniflorin (A), albilflorin (B) and hydroypaeoniflorin (C)

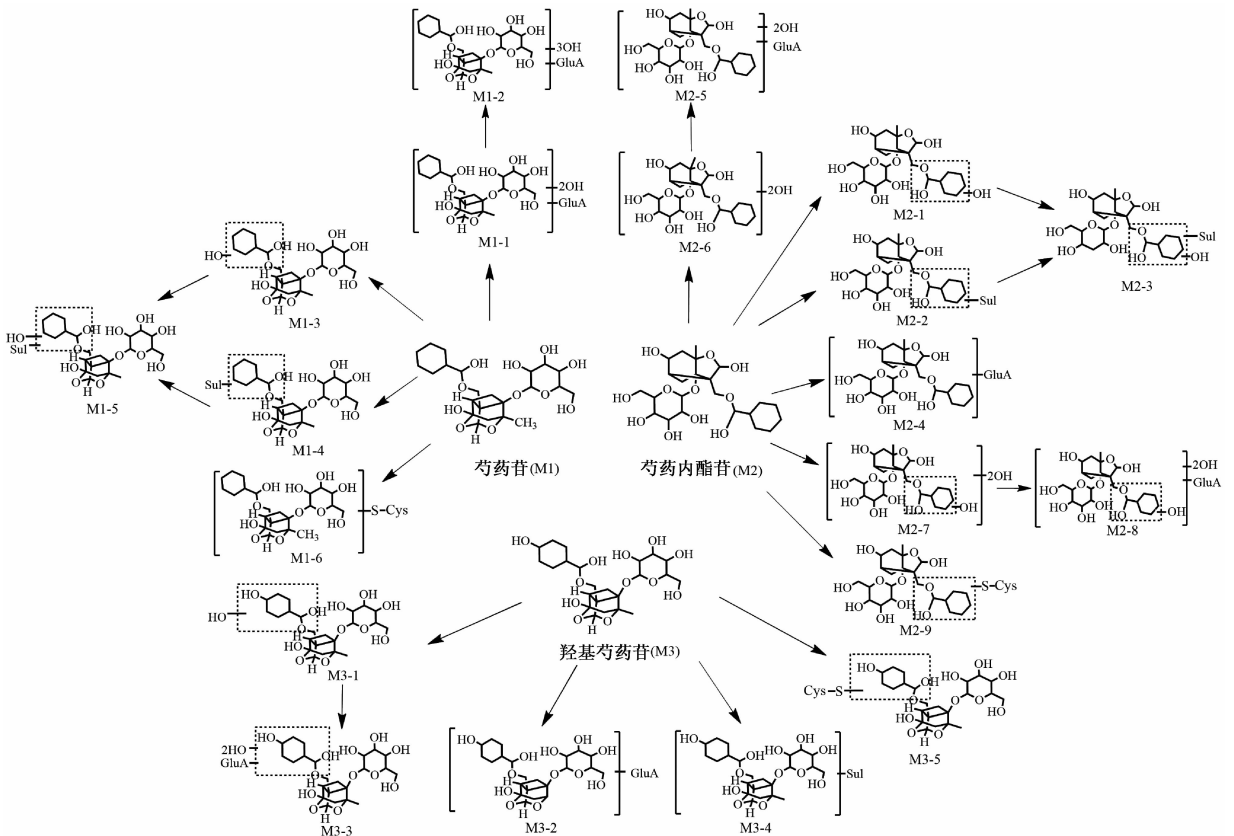


图 2 大鼠口服芍药甘草汤后芍药苷、芍药内酯苷和羟基芍药苷在体内的代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of paeoniflorin, albilflorin and hydroypaeoniflorin in rats after oral administration of Shaoyao Gancaotang

芍药内酯苷(M2)的 $t_R = 7.92$ min, 分子离子峰 m/z 479.2 $[M - H]^-$ ($C_{23}H_{27}O_{11}$), 二级质谱图观察到 m/z 121, 215, 327, 449 的子离子峰。代谢物 M2-1 准分子离子峰为 m/z 495.1 且有 m/z 137 碎片峰, 由此推测 M2-1 为芍药内酯苷单氧化产物。M2-2 准分子离子峰为 m/z 559.2, 具有 m/z 137, 121 等特征碎片峰且比芍药苷大 80 Da, 由此推测 M2-2 为芍药内酯苷硫酸化产物。M2-3 准分子离子峰为 m/z 575.0 $[M - H]^-$ 且具有 m/z 137, 217 特征碎片峰, 且 M2-3 比 M2-2 大 16 Da, 由此推测 M2-3 为芍药内酯苷单氧化加硫酸化产物。代谢物 M2-4 分子离子峰 m/z 655.0 $[M - H]^-$ 比芍药内酯苷相对分子质量大 176 Da, 结合二级信息推测为芍药内酯苷的葡萄糖醛酸化产物。代谢物 M2-5 准分子离子峰 m/z 687.0 与芍药苷相差 208 Da, 由此推测 M2-5 为芍药内酯苷结合葡萄糖同时双氧化的产物。

羟基芍药苷(M3)的 $t_R = 7.89$ min, 准分子离子峰 m/z 495.1 $[M - H]^-$ ($C_{23}H_{27}O_{12}$), 二级质谱图上观察到 m/z 137, 165, 465 的离子峰。代谢物 M3-1 准分子离子峰 m/z 511.2 $[M - H]^-$, MS/MS 图谱观察到 m/z 137, 153 碎片峰, 对羟基苯甲酰氧基部分可能发生氧化反应, 推测 M3-1 为羟基芍药苷单氧化物。代谢物 M3-2 具有 m/z 671.2 $[M - H]^-$ 分子离子峰, 比羟基芍药苷相对分子质量大 176 Da, 推测 M3-2 为羟基芍药苷葡萄糖醛酸化产物。代谢物 M3-3 是先发生 I 相反应再发生 II 相反应的代谢产物, 具有 m/z 703.1 $[M - H]^-$ 分子离子峰, 且比 M3-2 相对分子质量大 32 Da, 由此推测 M3-3 为羟基芍药苷双氧化加葡萄糖醛酸化产物。

2.7.2 甘草苷和甘草素的代谢产物分析 甘草苷和甘草素是甘草的主要活性成分, 其二级质谱图见图 3, 相关代谢通路见图 4。甘草苷(M4)的 $t_R = 8.38$ min, 分子离子峰 m/z 417.1 ($C_{21}H_{21}O_9$) $[M - H]^-$, 在 MS/MS 图谱上观察到 m/z 91, 119, 135 特征离子峰。体内代谢过程中甘草苷结构中的糖苷键易于水解丢失葡萄糖而形成苷元, 代谢物 M5 较 M4 少 162 Da, 与文献[5]报道一致, 即为甘草素。代谢物 M4-1 具有 m/z 433.1 $[M - H]^-$ 分子离子峰且比甘草苷大 16 Da, 推测其为甘草苷单氧化代谢物。代谢物 M4-2, M4-3, M4-4 分别具有 m/z 609.1, 513.2, 688.9 $[M - H]^-$ 分子离子峰且均有 m/z 151 的离子峰, 分别比 M4-1 相对分子质量大 176, 80, 256 Da, 故推测 M4-2 ~ M4-4 分别为甘草苷的单氧化加葡萄糖醛酸化产物、单氧化加硫酸化产物、单氧

化加硫酸化加葡萄糖醛酸化产物。代谢物 M4-5, M4-6 分子离子峰分别为 m/z 593.0, 497.2 $[M - H]^-$, 分别比甘草苷相对分子质量大 176, 80 Da, 推测二者分别为甘草苷的葡萄糖醛酸化产物和硫酸化产物。M4-7 分子离子峰为 m/z 536.0 $[M - H]^-$, 比甘草苷分子离子峰大 119 Da, 结合二级碎片推测 M4-7 为甘草苷的半胱氨酸结合产物。

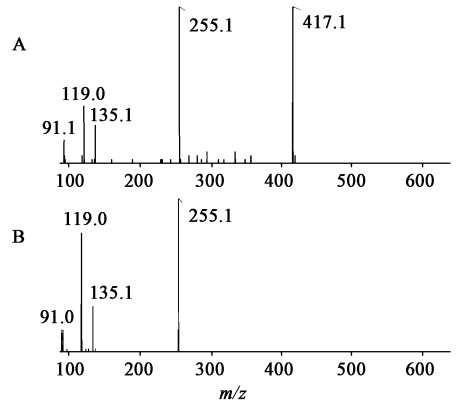


图 3 甘草苷(A)和甘草素(B)的 MS/MS
Fig. 3 MS/MS spectra of licorice root glycoside (A) and licorice root (B)

甘草素(M5)的 $t_R = 11.90$ min, 具有 m/z 255.1 ($C_{15}H_{11}O_4$) $[M - H]^-$ 分子离子峰, MS/MS 图谱上观察到 m/z 91, 119, 135 的离子峰。M5-1 ~ M5-3 均为甘草素的 I 相代谢产物, 分子离子峰分别为 m/z 271.2, 287.2, 303.1 $[M - H]^-$, 且分别比甘草素大 16, 32, 48 Da, 由此推测三者分别为甘草素单氧化物、双氧化物和三氧化物。M5-4 ~ M5-6 分别比 M5-1 相对分子质量大 80, 176, 256 Da, 且均有 m/z 151 的离子峰, 推测分别为甘草素的单氧化加硫酸化产物、单氧化加葡萄糖醛酸化产物、单氧化加硫酸化加葡萄糖醛酸化产物。M5-7 和 M5-8 依次比 M5-2, M5-3 相对分子质量大 176 Da, 推测二者分别为甘草素双氧化加葡萄糖醛酸化产物、甘草素三氧化加葡萄糖醛酸化产物。M5-9 ~ M5-11 分别比甘草素大 80, 176, 256 Da, 推测分别为甘草素的硫酸化产物、葡萄糖醛酸化产物、硫酸化加葡萄糖醛酸化产物。M5-12 为甘草素的半胱氨酸结合产物。

2.7.3 甘草酸和甘草次酸的代谢产物分析 甘草酸和甘草次酸是甘草中主要的活性成分, 属于三萜皂苷类化合物, 其二级质谱图见图 5, 相关代谢通路见图 6。甘草酸的 $t_R = 7.44$ min, 具有 m/z 821.4 ($C_{42}H_{61}O_{16}$) $[M - H]^-$ 分子离子峰, MS/MS 图谱上观察到 m/z 351 的离子峰。甘草酸在体内代谢易发生水解反应, 代谢物 M7 较 M6 少 352 Da, 与文献

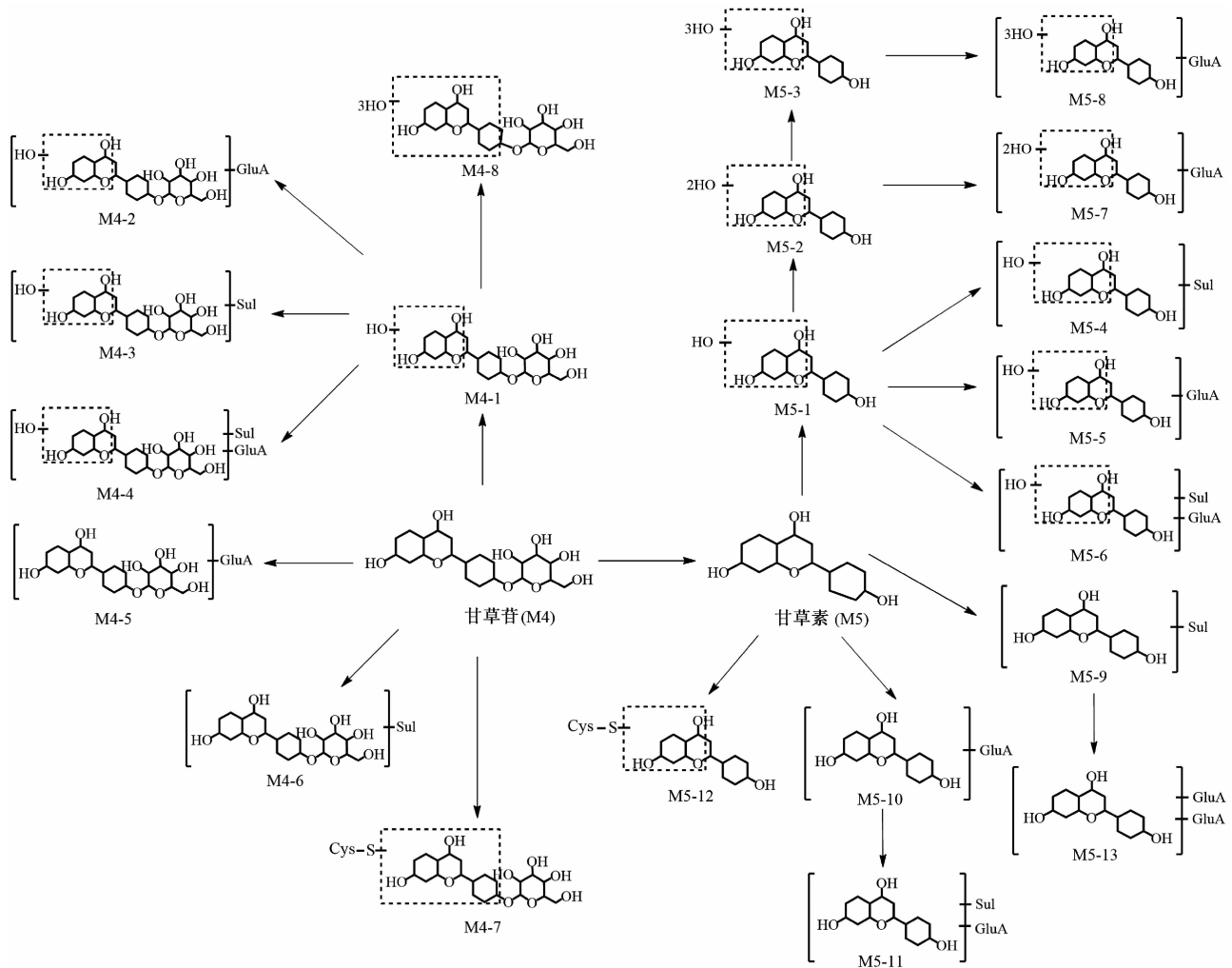


图 4 大鼠口服药甘草汤后甘草苷和甘草素在大鼠体内的代谢途径
Fig. 4 Metabolic pathways of liquiritin and liquiritigenin in rats after oral administration of Shaoyao Gancaotang

[6]报道一致,为甘草酸脱掉两分子葡萄糖醛酸产物,即甘草次酸。代谢物 M6-1 具有 m/z 837.2 $[M - H]^-$ 分子离子峰,比甘草酸大 16 Da,推测其可能为甘草酸氧化物。 m/z 940.2 $[M - H]^-$ 分子离子峰比甘草酸大 119 Da,且存在 m/z 470 碎片峰,推测 M6-2 可能为甘草酸半胱氨酸结合产物。

甘草次酸 (M7) 的 $t_R = 7.80$ min, 具有 m/z 469.3 ($C_{30}H_{45}O_4$) $[M - H]^-$ 分子离子峰,从二级图谱上观察到 m/z 355,425 的碎片峰。甘草次酸在体内代谢易发生氧化反应,代谢物 M7-1 比 M7 的相对分子质量大 16 Da,推测其为甘草次酸单氧化产物。M7-2 具有 m/z 549.1 $[M - H]^-$ 分子离子峰,比甘草次酸大 80 Da,推测其为甘草次酸硫酸化产物。M7-4 和 M7-5 分别具有 m/z 565.3, 741.1 $[M - H]^-$ 分子离子峰,且分别比 M7-1 大 80,256 Da,推测二者分别为甘草次酸单氧化加硫酸化产物和单氧化加硫酸化加葡萄糖醛酸化产物。M7-6, M7-7 的分

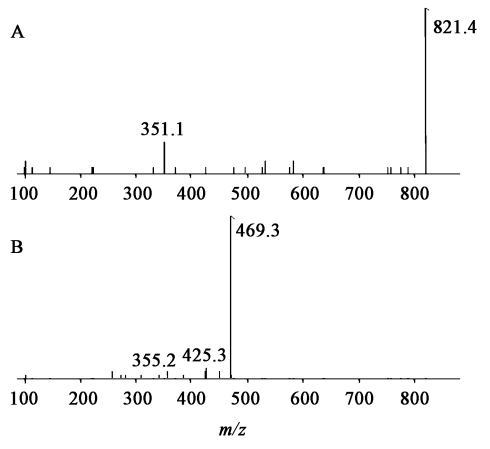


图 5 甘草酸 (A) 和甘草次酸 (B) 的 MS/MS
Fig. 5 MS/MS spectra of glycyrrhizic acid (A) and glycyrrhetic acid (B)

子离子峰分别为 m/z 725.2, 821.0 $[M - H]^-$, 分别比甘草次酸大 256, 352 Da, 推测二者分别为甘草

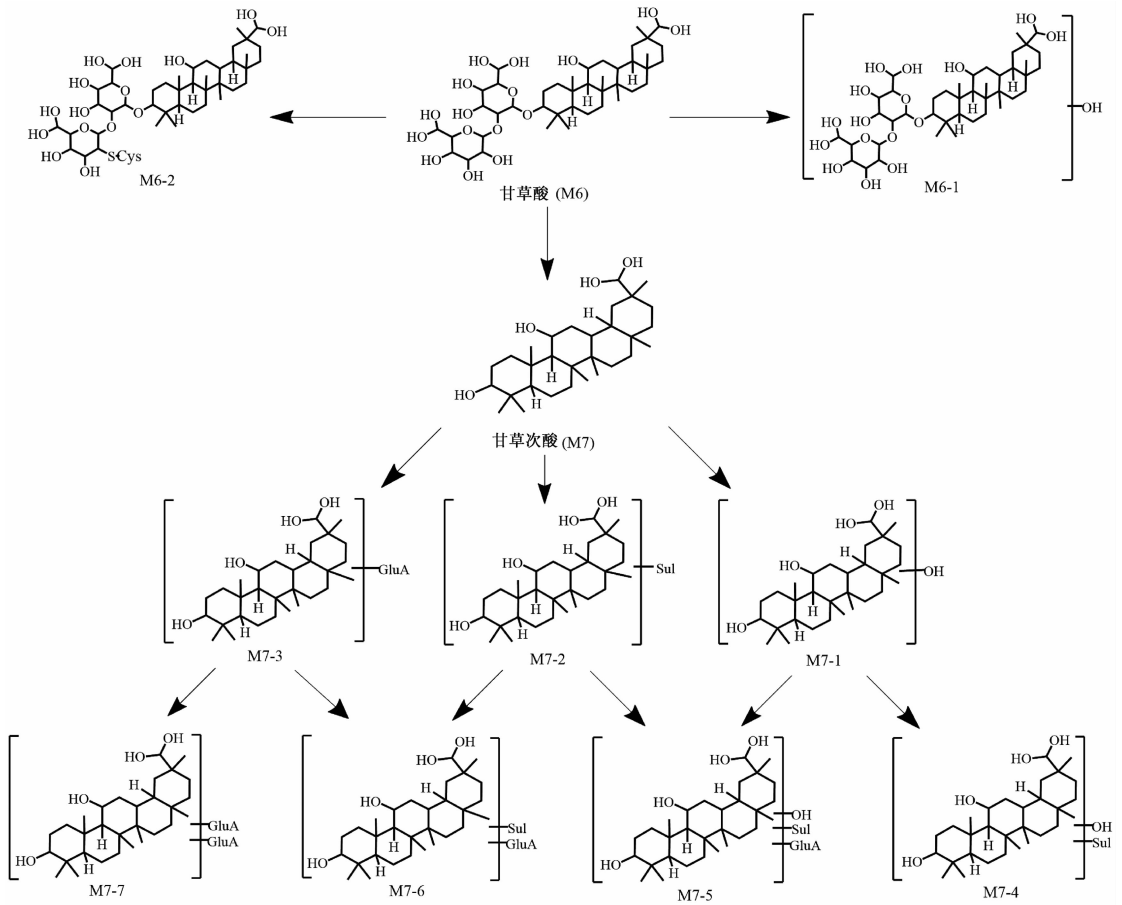


图 6 大鼠口服芍药甘草汤后甘草酸和甘草次酸在大鼠体内的代谢途径

Fig. 6 Metabolic pathways of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in rats after oral administration of Shaoyao Gancatong

次酸硫酸化加葡萄糖醛酸化产物和双葡萄糖醛酸化产物。

2.8 粪便中代谢产物的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 分析

2.8.1 芍药苷、芍药内酯苷和羟基芍药苷代谢产物

采用上述方法分析鉴定粪便中的代谢物,结果发现粪便中大部分代谢物也存在于尿液中,因此以下仅分析只存在于粪便中的代谢产物。代谢物 M1-6 具有 m/z 598.3 $[M-H]^-$ 分子离子峰,二级质谱观察到 m/z 121 且比 M1 相对分子质量大 119 Da, MS/MS 分析 M1-6 为芍药苷半胱氨酸结合产物,其仅存在于正常组大鼠的粪便中。M2-6 和 M2-7 的分子离子峰分别为 m/z 511.3, 527.3, 分别与 M2 相差 32, 48 Da, 故推测二者分别为芍药内酯苷的双氧化产物和三氧化产物,并且仅存在于 PCOS 组大鼠粪便中。代谢物 M2-8 准分子离子峰为 m/z 703.3 $[M-H]^-$, 与 M2-5 准分子离子峰相差 16 Da, 故推测 M2-8 为芍药内酯苷三氧化加葡萄糖醛酸化产物。根据 m/z 598.3 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,二级

质谱发现 m/z 121, 254, 479 碎片峰, 推测 M2-9 可能为芍药苷半胱氨酸结合物。代谢物 M3-4 具有 m/z 575.3 $[M-H]^-$ 分子离子峰, 比 M3 相对分子质量大 80 Da, 推测其为羟基芍药苷硫酸化产物, 且仅存在于正常组大鼠的粪便中。代谢物 M3-5 具有 m/z 614.3 $[M-H]^-$ 分子离子峰, 比 M3 大 119 Da, MS/MS 中有 m/z 256 特征碎片峰, 故推测其为羟基芍药苷半胱氨酸结合产物。

2.8.2 甘草苷和甘草素的代谢产物

代谢物 M4-8 分子离子峰为 m/z 465.1 $[M-H]^-$, 比 M4 相对分子质量大 48 Da, 推测其为甘草苷三氧化代谢物。M5-13 的分子离子峰为 m/z 607.3 $[M-H]^-$, 比 M5 相对分子质量大 352 Da, 推测其为甘草素的双葡萄糖醛酸化产物, 且仅存在于正常组大鼠的粪便中。

2.8.3 甘草酸和甘草次酸的代谢产物

代谢物 M7-3 具有 645.0 $[M-H]^-$ 分子离子峰, 比甘草次酸大 176 Da, 推测其为甘草次酸葡萄糖醛酸化产物。M7-3 是甘草次酸中最重要的活性代谢物, 但是其仅存在于正常组大鼠的粪便中, 而在 PCOS 组

大鼠尿液及粪便中均未发现,此结果与文献[8]报道一致。

3 讨论

本研究采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 分析并比较正常与 PCOS 疾病状态下芍药甘草汤在大鼠尿液及粪便中的代谢产物,结果显示芍药甘草汤在尿液及粪便中的代谢产物主要为 I 相, II 相及结合代谢产物,且 2 种状态下芍药甘草汤体内代谢产物存在明显差异,PCOS 组大鼠尿液中的代谢物多于正常组大鼠,但其粪便中的代谢物则少于正常组大鼠。总体来讲,PCOS 疾病状态下芍药甘草汤在尿液中的代谢产物更具有多样性,表明 PCOS 疾病状态可能会影响芍药甘草汤主要成分在体内的代谢途径。本文采用的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术比传统的三重四极杆质谱具有更好的代谢物鉴定能力,同时 MRM-EPI 扫描模式具有高灵敏性和高选择性,可检测更低水平的代谢产物^[9-10]。LightSight 软件是发现代谢物的终极工具,可以创建高度优化的采集方法、提升代谢物检测的速度和效率,能提供可靠的定性结果。

芍药甘草汤经口服给药后会不可避免的与肠道接触,而肠道中的菌群可以参与多种代谢活动,大部分活性成分在肠道菌群作用下会代谢成其他活性产物发挥作用并最后排出体外^[11],提示肠道菌群改变可能会对芍药甘草汤的代谢转化产生一定的影响。实验研究发现^[12],PCOS 女性患者肠道中微生物结构发生明显改变,肠道菌群失调与 PCOS 发生、发展或有密切联系。GUO 等^[13]测定 PCOS 模型大鼠肠道菌群结构时发现,与正常大鼠相比,PCOS 大鼠肠道内乳酸杆菌、梭状芽胞杆菌减少,普氏菌增多。柯仲成等^[14]在离体培养的大鼠肠道菌群中加入芍药苷进行厌氧孵育并对芍药苷代谢产物进行分析,发现肠道菌群对芍药苷的代谢产物具有转化作用。同时,高超等^[15]研究发现在肠道菌群干预下甘草酸的代谢处置有差异。由此推测 PCOS 病理状态下肠道菌群会发生改变,进而对芍药甘草汤的代谢产物种类产生明显影响。

此外,还有研究发现 PCOS 患者卵巢细胞中细胞色素 P450(CYP450)酶及过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)表达均较低,CYP450 酶主要参与 I 相代谢反应,PPARs 可以影响许多 II 相代谢酶的表达(如尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶等),推测正常及 PCOS 疾病状态下代谢酶等内源性物质表达水平的不同可能会影响芍药甘草汤的

代谢途径,但具体机制仍需进一步探究。

一直以来,对于芍药甘草汤体内代谢的研究主要集中在正常机体,而对其在疾病状态下的代谢差异关注较少。本研究分析并鉴定了芍药甘草汤中 7 种主要活性成分在正常及 PCOS 模型大鼠尿液及粪便中的代谢产物,明确了 PCOS 疾病状态对芍药甘草汤体内代谢的影响。虽然本文未对疾病状态下影响体内药物代谢的因素和机制作深入探讨,但是仍可为探究正常及疾病状态下药物体内代谢差异提供参考。后续将进一步确定芍药甘草汤在正常及疾病状态下的差异代谢产物,寻找与 PCOS 发生、发展相关的代谢通路,以期为 PCOS 的药物治疗提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 程瑶,邵云云,常壮鹏,等. 加味芍药甘草汤对多囊卵巢综合征模型大鼠的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):139-144.
- [2] LIU J J, CHENG Y, SHAO Y Y, et al. Comparative pharmacokinetics and metabolites study of seven major bioactive components of Shaoyao-Gancao decoction in normal and polycystic ovary syndrome rats by ultra high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2019, doi: 10.1002/jssc.201900002.
- [3] SHAO Y Y, CHANG Z P, CHENG Y, et al. Shaoyao-Gancao Decoction alleviated hyperandrogenism in a letrozole-induced rat model of polycystic ovary syndrome by inhibition of NF- κ B activation[J]. Biosci Rep,2019, doi:10.1042/BSR20181877.
- [4] 刘鑫鑫. 芍药苷和芍药内酯苷的代谢研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2009.
- [5] XIE P S, LEUNG A Y. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica [J]. J Chromatogr A,2009,1216(81):1933-1940.
- [6] XIANG C, QIAO X, WANG Q, et al. From single compounds to herbal extract;a strategy to systematically characterize the metabolites of licorice in rats[J]. Drug Metab Dispos,2011,39(9):1597-1608.
- [7] 王羽凝,穆丽华,许璐,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS^E 分析芍药胶囊在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(20):77-81.
- [8] FAN R, LI N, XU H, et al. The mechanism of hydrothermal hydrolysis for glycyrrhizic acid into glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid 3-O-mono-d-glucuronide in subcritical water[J]. Food Chem,2016,

- 190;912-921.
- [9] HUANG M, CHENG Z, WANG L, et al. A targeted strategy to identify untargeted metabolites from *in vitro* to *in vivo*: rapid and sensitive metabolites profiling of licorice in rats using ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1092:40-50.
- [10] LI Y Y, WANG H, ZHAO C, et al. Identification and characterization of kukoamine metabolites by multiple ion monitoring triggered enhanced product ion scan method with a triple-quadruple linear ion trap mass spectrometer [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63 (50): 10785-10790.
- [11] 门薇,陈颖,李玉洁,等. 肠道菌群对中药有效成分的生物转化研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2):229-234.
- [12] LINDHEIM L, BASHIR M, MÜNZKER J, et al. Alterations in gut microbiome composition and barrier function are associated with reproductive and metabolic defects in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a pilot study [J]. PLoS One, 2017, 12 (1):e0168390.
- [13] GUO Y, QI Y, YANG X, et al. Association between polycystic ovary syndrome and gut microbiota [J]. PLoS One, 2016, 11(4):e0153196.
- [14] 柯仲成,杨楠,侯雪峰,等. 大鼠肠道菌群对芍药苷体外代谢转化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (20):3839-3845.
- [15] 高超,单纯,苏瑞霞,等. 甘草酸在肝炎患者和肝癌患者肠道菌群参与下代谢差异研究 [J]. 中成药, 2017, 39(2):393-398.

[责任编辑 刘德文]