

大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中 主要代谢产物的鉴定

陆林玲, 束 艳, 钱大玮*, 宿树兰, 段金赓, 钱叶飞, 薛彩福

(南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 采用 UPLC-Q-TOF/MS 研究四逆散提取物在大鼠体内的代谢产物, 利用碰撞能量梯度 (MS^E) 和质量亏损过滤 (MDF) 技术进行分析, 鉴定大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中的代谢产物。四逆散提取物中柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草次酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 在大鼠不同代谢途径中推测出原形、羟基化、葡萄糖醛酸化、硫酸化、葡萄糖醛酸化与硫酸化结合、羟化葡萄糖醛酸化等共 41 个代谢产物。

关键词: 四逆散; UPLC-Q-TOF/MS; 代谢产物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1374-06

Identification of the metabolites of Sinisan extract in rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration

LU Lin-ling, SHU Yan, QIAN Da-wei*, SU Shu-lan, DUAN Jin-ao, QIAN Ye-fei, XUE Cai-fu

(Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: Sinisan is a widely used traditional Chinese medicine (TCM) in treating various diseases; however, the *in vivo* metabolic profile of its multiple components remains unknown. In this paper, ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was applied to identify the metabolites of Sinisan extract in rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration. Using MS^E and mass defect filter techniques, 41 metabolites of 10 parent compounds (naringin, naringenin, hesperidin, neohesperidin, liquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, glycyrrhetinic acid, saikosaponin a and saikosaponin d) were detected and tentatively identified. It was shown by our results that these compounds was metabolized to the forms of hydroxylation, glucuronidation, sulfation, glucuronidation with sulfation and glucuronidation with hydroxylation *in vivo*.

Key words: Sinisan; UPLC-Q-TOF/MS; metabolite

四逆散首载于汉代张仲景的《伤寒论》, 由柴胡、白芍、枳实、甘草四味药组成, 具有解郁透热、疏肝理脾、宣散气血郁滞之功效, 是疏肝解郁、调和肝脾

的基础方, 药理实验表明该方具有镇静催眠、抗疲劳、抗抑郁、抗肝损伤的作用^[1]。研究中药复方在体内的代谢产物, 可逆向鉴定被吸收的化学成分, 大大加快有效成分群的确定^[2], 是阐明中药复方作用物质基础及其配伍原理和作用机制的重要环节。

四逆散主要化学成分为柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸、甘草次酸、甘草苷、甘草素、柴胡皂苷、芍药苷等 (图 1)。近年来, 对其组方的单味

收稿日期: 2011-05-31.

基金项目: 江苏省方剂高技术研究重点实验室建设资助项目 (BM2010576); 江苏省理血方剂创新药物工程中心建设资助项目.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811916, E-mail: qiandw05@yahoo.com.cn

药或其所含的单体成分的代谢研究较多,文献^[3-6]报道枳实提取液中黄酮类成分、甘草提取液、甘草次酸、芍药苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 主要有水解、还原、葡萄糖醛酸结合、硫酸结合等代谢途径,而整方给药在体内代谢产物研究尚未见报道。

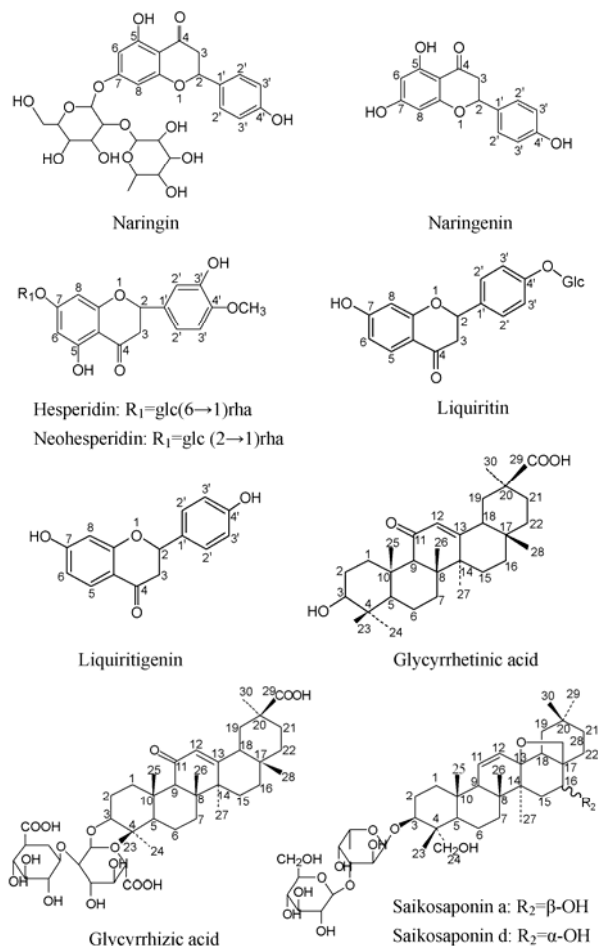


Figure 1 Structures of reference substances

目前药物代谢研究多采用柱色谱分离,通过代谢物对照品或高效液相制备色谱得到代谢物单体并分析确定其结构,虽然准确性高,但存在生物样品量少、内源性物质干扰多、研究周期长、对照品难以获得等缺点。高分辨率的 Q-TOF/MS 仪在进行物质定性分析时可提供较为可靠的多种结构相关信息,结合基于质量亏损滤过为基础的代谢物寻找软件可快速寻找目标代谢物,进一步对目标代谢物进行 MS/MS 分析,可较可靠地快速推测复杂生物基质中代谢产物^[7, 8]。本文采用 UPLC 串联 Q-TOF/MS 技术研究四逆散水提物主要化学成分在大鼠体内代谢产物,为进一步探讨四逆散在体内的代谢过程提供依据。

材料与方法

仪器与试剂 UPLC Acquity™ 系统 (Waters 公司); Synapt™ Q-TOF 质谱仪 (Waters 公司), 配有 Lock-spray 接口; 电喷雾离子源 (ESI); Masslynx 4.1 质谱工作站软件 (Waters 公司), MetaboLynx™ 分析软件 (Waters 公司)。

柚皮苷 (110722-200610)、柚皮素 (05-2010)、橙皮苷 (110721-200211)、新橙皮苷 (05-1010)、甘草苷 (111610-200604)、甘草酸铵 (110731-200409)、甘草次酸 (723-200109)、芍药苷 (110736-200934)、柴胡皂苷 a (110736-2004)、柴胡皂苷 d (110778-200301) 均购自中国药品生物制品检定所,甘草素 (自制,经 HPLC 面积归一化法测定,纯度>98%)。

柴胡 (伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根)、枳实 (芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果)、甘草 (豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎) 由安徽丰原铜陵中药饮片有限公司提供,白芍 (毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根) 由南京药业股份有限公司中药饮片厂提供,以上药材均经南京中医药大学段金廛教授鉴定。

实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠,约 8 周龄,体重 (250 ± 10) g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK (沪) 2007-0005。

UPLC 检测条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱; 流动相: 乙腈 (A) - 0.5% 醋酸水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 5%~35% A, 5~8 min, 35%~55% A, 8~10 min, 55% A, 10~12 min, 55% A~60% A, 12~15 min, 60% A~70% A); 柱温 30 °C; 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。

MS 检测条件 ESI 源, 扫描方式: ESI±模式, 毛细管电压: 3 kV, 锥孔电压: 40 V, 离子源温度: 120 °C, 脱溶剂气温度: 350 °C, 锥孔气流量: 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气流量: 600 L·h⁻¹, 碰撞能量 (6~40 V), 离子能量: 1 V; 准确质量测定采用芦丁溶液为锁定质量溶液。质量扫描范围 *m/z* 100~1 000, 数据采集方式和模式: Centroid 与 MS^E, 数据分析: 质量亏损过滤 (MDF)。

对照品溶液的制备 分别精密称取柚皮苷、柚皮素、橙皮苷、新橙皮苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、甘草次酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷对照品适量,以 70% 甲醇配制成质量浓度分别为 28、29、32、28、30、32、31、35、43、40 和 41 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

四逆散提取物的制备 取柴胡 90 g、枳实 90 g、白芍 135 g、甘草 90 g, 加 8 倍量蒸馏水, 浸泡 1 h, 回

流提取 3 次, 合并滤液, 减压浓缩, 得四逆散提取物, 其中每克提取物含柚皮苷 25.86 mg、柚皮素 0.87 mg、橙皮苷 5.83 mg、新橙皮苷 4.46 mg、甘草苷 3.09 mg、甘草素 2.07 mg、甘草酸 4.81 mg、甘草次酸 0.51 mg、柴胡皂苷 a 1.08 mg、柴胡皂苷 d 0.98 mg、芍药苷 7.73 mg。此浓缩液每克相当于生药 2 g。

生物样品的采集与供试液的制备 取 SD 大鼠 6 只, 随机分为空白组和给药组, 给药前禁食 12 h (自由饮水), 按 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生药量给大鼠灌胃, 分别灌予蒸馏水和四逆散提取物, 每日 1 次, 连续给药 2 天后, 分别收集 12 h 内的尿液和粪便, 得到尿液、粪便样品。第 3 天给药后 1 h 眼眶取血于预先涂有 1% 肝素钠生理盐水的 EP 管中, 离心 10 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液, 得到血浆样品。同时进行胆管插术, 收集 1~4 h 胆汁。以上生物样本于 -18°C 保存。

大鼠血浆样品供试液的制备 取血浆 1 mL, 加入 3 倍量乙腈沉淀蛋白, 涡旋混匀 30 s, 离心 10 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液于 37°C 氮气吹干, 以 30% 乙腈复溶, 离心 5 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液作为血浆样品供试液。

大鼠尿液、胆汁样品供试液的制备 取尿液或胆汁 1 mL, 加乙腈 420 μL , 离心 10 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液作为尿液或胆汁样品供试液。

大鼠粪便样品供试液的制备 取碾碎混匀的粪便 1 g, 加 70% 乙腈 3 mL 溶解, 超声 10 min, 取出后离心 10 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液 0.5 mL, 加蒸

馏水 670 μL , 再离心 10 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液作为粪便样品供试液。

Metabolynx 处理 将待测化合物 I 相、II 相可能代谢产物输入 Metabolynx 软件中, 质谱数据检测误差范围设为 $<1 \times 10^{-5}$, 并将质量亏损过滤应用于数据处理。

结果与讨论

1 给药血浆、尿液、粪便、胆汁 UPLC-Q-TOF/MS 分析

空白血浆、尿液、粪便、胆汁和给药血浆、尿液、粪便、胆汁样品负离子条件下的总离子流图如图 2, 在正离子条件下, 给药血浆、尿液、粪便、胆汁未得到较好的响应信号。

2 Metabolynx 处理

采用了两次 UPLC 串联 Q-TOF/MS 分析完成代谢产物的寻找与确认。首先, 采用碰撞能梯度功能对经 UPLC 色谱分离的代谢产物进行分析, 并运用 Metabolynx 软件寻找可能的代谢物。其次, 采用与第一次相同的 UPLC 色谱条件, 对已找到的可能代谢物进行 MS/MS 分析, 以进一步确认代谢产物。本文中所有 MS 离子碎片都是在选择了产物分子离子峰后进行 MS/MS 分析的结果。

2.1 柚皮苷及柚皮素的代谢产物 大鼠体内共鉴定出与柚皮苷、柚皮素相关的代谢产物 13 个, 主要碎片离子见表 1。

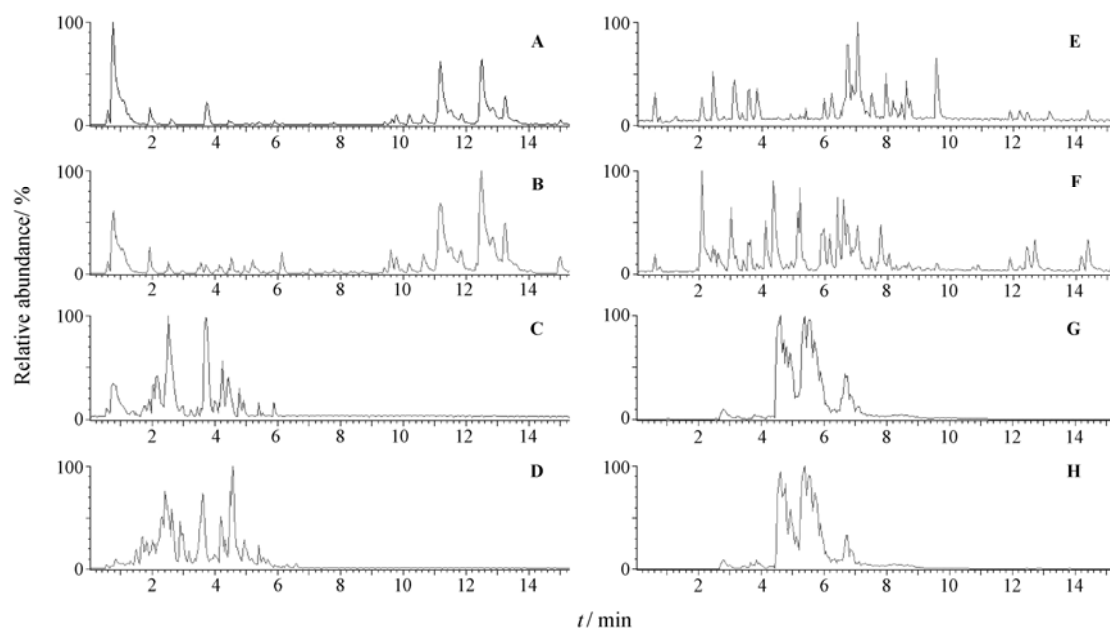


Figure 2 Total ion chromatograms in the negative mode of the samples. A: Blank plasma sample; B: Drug spiked plasma sample; C: Blank urine sample; D: Drug spiked urine sample; E: Blank fecal sample; F: Drug spiked fecal sample; G: Blank bile sample; H: Drug spiked bile sample

Table 1 Metabolites of naringin and naringenin by Metabolynx software

No.	t_R / min	Mass	Metabolite	MS/MS	Source
A1	4.12	580.179 2	A1: parent	579[M-H] ⁻ , 459, 271, 151	Urine, feces, bile
A2	5.88	272.068 5	A2: parent	271[M-H] ⁻ , 177, 151, 119	Urine, feces
A3	3.41	660.136 0	A1+SO ₃	659[M-H] ⁻ , 579[M-SO ₃] ⁻ , 459, 351, 271, 151, 199	Feces
A4	4.82	352.025 3	A2+SO ₃	351[M-H] ⁻ , 271[M-SO ₃] ⁻ , 151, 199, 119	Urine, feces, bile
A5	3.62	288.063 4	A2+O	287[M-H] ⁻ , 271[M-O] ⁻ , 177, 151, 119	Urine, feces
A6	3.36	676.130 9	A1+O+SO ₃	675[M-H] ⁻ , 595[M-SO ₃] ⁻ , 579[M-O-SO ₃] ⁻ , 459, 271	Plasma, urine, feces, bile
A7	4.78	368.020 2	A2+O+SO ₃	367[M-H] ⁻ , 351[M-O] ⁻ , 287[M-SO ₃] ⁻ , 271[M-O-SO ₃] ⁻ , 230, 177, 119	Feces, bile
A8	2.49	756.211 3	A1+C ₆ H ₈ O ₆	755[M-H] ⁻ , 579[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 459, 295, 271, 151, 119	Bile
A9	4.20	448.100 6	A2+C ₆ H ₈ O ₆	447[M-H] ⁻ , 327, 271[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 151, 119	Plasma, urine, bile
A10	3.19	772.206 2	A1+C ₆ H ₈ O ₆ +O	771[M-H] ⁻ , 755[M-O] ⁻ , 595[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 579[M-O-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 459, 271, 151	Urine
A11	3.35	464.095 5	A2+C ₆ H ₈ O ₆ +O	463[M-H] ⁻ , 447[M-O] ⁻ , 327, 287[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 271[M-O-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 177, 151, 119	Urine, bile
A12	3.42	528.057 4	A2+C ₆ H ₈ O ₆ +SO ₃	527[M-H] ⁻ , 447[M-SO ₃] ⁻ , 351[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 271[M-SO ₃ -C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 177, 151, 119	Plasma, urine, bile
A13	5.95	274.084 1	A2+2H	273[M-H] ⁻ , 271[M-2H] ⁻ , 151, 119	Feces

柚皮苷的 5-OH 与 4'-OH 及柚皮素的 5-OH, 7-OH, 4'-OH 易与硫酸或葡萄糖醛酸结合, 经 MS² 分析, A3 存在 m/z 199 碎片峰, 由柚皮苷-4'-O-硫酸酯 RDA 裂解 B 环产生的碎片, 故推测 A3 为柚皮苷-4'-O-硫酸酯; A4 亦存在 m/z 199 碎片峰, 故推测 A4 为柚皮素-4'-O-硫酸酯; A8 中存在 m/z 295 的碎片峰, 由柚皮苷-4'-O-葡萄糖醛酸酯 RDA 裂解 B 环产生的碎片, 故推测 A8 为柚皮苷-4'-O-葡萄糖醛酸酯; A9 存在 m/z 327 的碎片峰, 是由柚皮素-7-O-葡萄糖醛酸酯或柚皮素-5-O-葡萄糖醛酸酯 RDA 裂解 A 环产生的碎片峰, 尚不能确定 A9 中葡萄糖醛酸结合的具体位置。柚皮苷、柚皮素的其他代谢产物均由于代谢物连接的基团不稳定, 在母核裂解之前已经断裂而无法准确判断其连接位置。

柚皮苷及柚皮素在体内发生葡萄糖醛酸化、硫酸化、羟化、羟化硫酸化、羟化葡萄糖醛酸、硫酸化葡萄糖醛酸化及还原反应。各样品中代谢产物不同, 推测血浆中以柚皮苷羟化硫酸酯及柚皮素葡萄糖醛酸酯为主; 尿液中以柚皮苷原形及柚皮素葡萄糖醛酸酯为主; 粪便中以柚皮苷原形及柚皮素还原物为主; 胆汁中以柚皮苷原形和柚皮素硫酸葡萄糖醛酸酯为主。除柚皮苷乙酰酯外^[6, 7], 其余单味药、柚皮苷及柚皮素单体的代谢物均在本研究中检出。此外, 本文推测了柚皮素 1 个新代谢产物羟化硫酸化物 (A7)。

2.2 橙皮苷和新橙皮苷的代谢产物 大鼠体内共鉴定出与橙皮苷和新橙皮苷有关的代谢产物 6 个, 主要碎片离子见表 2。

Table 2 Metabolites of hesperidin and neohesperidin by Metabolynx software

No.	t_R / min	Mass	Metabolite	MS/MS	Source
B1	4.32	610.189 8	B1: parent	609[M-H] ⁻ , 301, 285	Plasma, urine, feces, bile
B2	4.36	610.189 8	B2: parent	609[M-H] ⁻ , 301, 285	Plasma, urine, feces, bile
B3	3.41	786.221 9	B1+C ₆ H ₈ O ₆	785[M-H] ⁻ , 609[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 301, 285	Plasma, urine, bile
B4	3.45	786.221 9	B2+C ₆ H ₈ O ₆	785[M-H] ⁻ , 609[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 301, 285	Plasma, urine, bile
B5	3.48	690.146 6	B1+SO ₃	689[M-H] ⁻ , 609[M-SO ₃] ⁻ , 301, 229	Bile
B6	3.52	690.146 6	B2+SO ₃	689[M-H] ⁻ , 609[M-SO ₃] ⁻ , 301, 229	Bile

橙皮苷由橙皮素与 glc(6→1) rha 连接而成, 新橙皮苷由橙皮素与 glc(2→1) rha 连接而成, 它们的质谱行为相同, 但色谱行为不同, 由对照品的出峰顺序可知, 橙皮苷的极性较新橙皮苷大, 当它们发生相同的代谢反应时, 代谢产物的极性顺序一般不变, 故可根据出峰顺序判断各自的代谢产物。经 MS² 分析, B5、B6 均存在 m/z 229 碎片峰, 由橙皮苷-3'-O-硫酸酯和新橙皮苷-3'-O-硫酸酯 RDA 裂解 B 环产生的碎片, 故推测 B5 为橙皮苷-3'-O-硫酸酯, B6 为新橙皮苷-3'-O-硫酸酯; B3、B4 均未见可判断葡萄糖醛基连接位置的碎片离子峰, 原因为其葡萄糖醛基在母核裂解之前已经裂解, 故只能推测 B3 为橙皮苷-3'-O-葡萄糖醛酸酯或橙皮苷-5-O-葡萄糖醛酸酯, B4 为新橙皮苷-3'-O-葡萄糖醛酸酯或新橙皮苷-5-O-葡萄糖醛酸酯。

橙皮苷和新橙皮苷发生葡萄糖醛酸化及硫酸化反应。各样品中代谢产物不同, 推测血浆和尿液中均以

橙皮苷和新橙皮苷的原形及葡萄糖醛酸酯为主;粪便中以橙皮苷和新橙皮苷原形为主;胆汁中以橙皮苷硫酸酯和新橙皮苷硫酸酯为主。橙皮苷单体灌胃后检出的橙皮素葡萄糖醛酸苷^[9],在本文中并未发现。

2.3 甘草苷及甘草素的代谢产物 大鼠体内共鉴定出与甘草苷及甘草素有关的代谢产物6个,主要碎片离子见表3。

Table 3 Metabolites of liquiritin and liquiritigenin by Metabolynx software

No.	t_R / min	Mass	Metabolite	MS/MS	Source
C1	3.61	418.400 3	C1: parent	417[M-H] ⁻ , 255, 135, 119	Not found
C2	4.22	256.073 6	C2: parent	255[M-H] ⁻ , 135, 119	Plasma, urine, bile
C3	3.01	498.083 2	C1+SO ₃	497[M-H] ⁻ , 417[M-SO ₃] ⁻ , 255, 135, 119	Bile
C4	3.26	336.030 4	C2+SO ₃	335[M-H] ⁻ , 255[M-SO ₃] ⁻ , 215, 135, 119	Plasma, urine, bile
C5	2.43	594.158 5	C1+C ₆ H ₈ O ₆	593[M-H] ⁻ , 417[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 255, 135	Plasma, urine, feces, bile
C6	3.78	432.105 6	C2+C ₆ H ₈ O ₆	431[M-H] ⁻ , 255[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 295, 135, 119	Plasma, urine, bile
C7	2.96	512.062 5	C2+SO ₃ +C ₆ H ₈ O ₆	511[M-H] ⁻ , 335[M-C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 295, 255[M-SO ₃ -C ₆ H ₈ O ₆] ⁻ , 215, 135, 119	Urine, bile

甘草苷的7-OH易与硫酸或葡萄糖醛酸结合,推测C3为甘草苷-7-*O*-硫酸酯,C5为甘草苷-7-*O*-葡萄糖醛酸酯。甘草素7-OH和4'-OH易与硫酸或葡萄糖醛酸结合,经MS²分析,C4存在 m/z 215碎片峰,由甘草素-7-*O*-硫酸酯RDA裂解A环产生的碎片,故推测C4为甘草素-7-*O*-硫酸酯;C6存在 m/z 295碎片峰,由甘草素-4'-*O*-葡萄糖醛酸酯RDA裂解B环产生的碎片,故推测C6为甘草素-4'-*O*-葡萄糖醛酸酯;C7存在 m/z 215、295碎片峰,由甘草素-7-*O*-硫酸-4'-*O*-葡萄糖醛酸酯RDA裂解A、B环产生的碎片,故推测C7为甘草素-7-*O*-硫酸-4'-*O*-葡萄糖醛酸酯。

甘草苷和甘草素发生葡萄糖醛酸化、硫酸化、硫酸化葡萄糖醛酸化反应。各样品中代谢产物不同,推测血浆中以甘草素、甘草素葡萄糖醛酸酯、甘草苷葡萄糖醛酸酯为主;尿液中以甘草苷葡萄糖醛酸酯和甘草素葡萄糖醛酸酯为主;粪便中以甘草苷葡萄糖醛酸酯为主;胆汁中以甘草苷硫酸酯和甘草素硫酸葡萄糖醛酸酯为主。

2.4 甘草酸及甘草次酸的代谢产物 大鼠体内共鉴定出与甘草酸及甘草次酸有关的代谢产物8个,主要碎片离子见表4。

Table 4 Metabolites of glycyrrhizic acid and glycyrrhetinic acid by Metabolynx software

No.	t_R / min	Mass	Metabolite	MS/MS	Source
D1	6.95	822.403 8	D1: parent	821[M-H] ⁻ , 645[M-GluA] ⁻ , 469[M-2×GluA] ⁻ , 425[M-2×GluA-CO ₂] ⁻	Plasma, urine, feces, bile
D2	12.68	470.339 6	D2: parent	469[M-H] ⁻ , 425[M-CO ₂] ⁻	Plasma, urine, feces, bile
D3	8.58	646.371 7	D2+C ₆ H ₈ O ₆	645[M-H] ⁻ , 469[M-GluA] ⁻ , 425	Plasma, urine, feces, bile
D4	7.02	662.366 6	D2+O+C ₆ H ₈ O ₆	661[M-H] ⁻ , 485[M-GluA] ⁻ , 469	Feces, bile
D5	7.63	824.419 4	D1+2H	823[M-H] ⁻ , 821[M-2H] ⁻ , 469[M-2H-GluA] ⁻ , 425	Urine, feces
D6	6.57	840.414 4	D1+H ₂ O	839[M-H] ⁻ , 821[M-H ₂ O] ⁻ , 469	Feces
D7	6.62	838.398 7	D1+O	837[M-H] ⁻ , 821[M-O] ⁻ , 469	Urine
D8	8.91	486.419 4	D2+O	485[M-H] ⁻ , 469[M-O] ⁻ , 425	Feces

甘草次酸葡萄糖醛酸酯(D3)的葡萄糖醛酸基可能连接在羟基或羧基上,甘草酸及甘草次酸的羟化物可能连接在22-或24-位上^[10],仅以LC-MS难以实现鉴定两者的目的,但甘草酸及甘草次酸其他相关代谢物的连接位置可用LC-NMR研究确定。

本方中甘草酸和甘草次酸发生葡萄糖醛酸化、羟化、羟化葡萄糖醛酸化、水合化、还原反应。各样品中代谢产物不同,推测血浆中以甘草酸和甘草次酸原形为主;尿液中以甘草酸为主;粪便中以甘草酸羟化物和甘草次酸羟化物为主;胆汁中以甘草酸和甘草次酸葡萄糖醛酸酯为主。甘草酸在体内可转化为甘草次酸^[11],本文检测出甘草次酸单葡萄糖醛酸酯(D3)、甘草次酸羟化单葡萄糖醛酸酯(D4)、甘草酸还原物(D5)、甘草酸水合物(D6)、甘草酸羟化物(D7)、甘草次酸羟化物(D8)。

2.5 柴胡皂苷a、柴胡皂苷d的代谢产物鉴定 大鼠体内共鉴定出与柴胡皂苷a、柴胡皂苷d相关的代谢产物8个,主要碎片离子见表5。

柴胡皂苷a、柴胡皂苷d是差向异构体,它们的质谱行为相同,但色谱行为不同,由对照品的出峰顺序可知,柴胡皂苷a的极性较柴胡皂苷d大。当它们发生相同的代谢反应时,代谢产物的极性顺序一般不变,故可根据出峰顺序判断各自的代谢产物。因皂苷母核较难断裂,柴胡皂苷羟化物(E5、E6)和柴胡皂苷葡萄糖醛酸酯(E7、E8)连接的位置未能确定。

本方中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d主要发生葡萄糖醛酸化和羟化反应,各样品中代谢产物不同,推测血浆中以原形和前柴胡皂苷元为主,尿液中未检测到原

Table 5 Metabolites of saikosaponin a and saikosaponin d by Metabolynx software

No.	t_R / min	Mass	Metabolite	MS/MS	Source
E1	7.69	780.466 0	E1: parent	779[M-H] ⁻ , 617[M-gluc] ⁻ , 471[M-rha] ⁻	Urine, feces
E2	8.77	780.466 0	E2: parent	779[M-H] ⁻ , 617[M-gluc] ⁻ , 471[M-rha] ⁻	Urine, feces
E3	8.07	618.413 2	E1-C ₆ H ₁₀ O ₅	617[M-H] ⁻ , 471	Urine, feces, bile
E4	9.61	618.413 2	E2-C ₆ H ₁₀ O ₅	617[M-H] ⁻ , 471	Urine, feces, bile
E5	7.67	796.460 9	E1+O	795[M-H] ⁻ , 779[M-O] ⁻ , 617[M-O-gluc] ⁻ , 471	Feces
E6	7.69	796.460 9	E2+O	795[M-H] ⁻ , 779[M-O] ⁻ , 617[M-O-gluc] ⁻ , 471	Feces
E7	7.37	956.498 1	E1+C ₆ H ₈ O ₆	955[M-H] ⁻ , 779[M-gluA] ⁻ , 617[M-gluA-gluc] ⁻ , 471	Feces
E8	7.39	956.498 1	E2+C ₆ H ₈ O ₆	955[M-H] ⁻ , 779[M-gluA] ⁻ , 617[M-gluA-gluc] ⁻ , 471	Feces

形及相关代谢物, 粪便中以柴胡皂苷原形和柴胡皂苷葡萄糖醛酸酯为主, 胆汁中以前柴胡皂苷元为主。大鼠灌胃柴胡皂苷 a 找到前柴胡皂苷及柴胡皂苷元^[12], 四逆散中亦检测到相同的代谢物。此外, 本文新发现代谢物 E5、E6、E7 和 E8。

2.6 芍药苷的代谢产物 在粪便中检出芍药苷原形, 未检测到其代谢产物。芍药苷主要以原形由粪便排出, 血浆、尿液、胆汁中均未检测出原形或其代谢物。

四逆散中黄酮类及皂苷类成分在大鼠体内进行的代谢主要为 II 相代谢产物。由于含羧基或酚羟基的化合物在体内易与葡萄糖醛酸结合形成葡萄糖醛酸苷, II 相代谢产物水溶性增加, 易于排出体外, 故四逆散方中葡萄糖醛酸化代谢物广泛存在^[13]。本研究中有某些黄酮苷在粪中主要检测到原形而非苷元, 可能因为肠道菌群不一定将黄酮苷全部水解为苷元, 出现黄酮苷与其苷元共存的现象, 但由于黄酮苷元在体内的吸收速度大于苷元^[14, 15], 苷元被吸收进入体内的比率较多, 以致随粪便排出体外的量较少而未能检出, 而吸收较差的黄酮苷则随粪便排出体外。

References

- [1] Wang YT, Tan QR, Sun LL, et al. Possible therapeutic effect of a traditional Chinese medicine, Sinisan, on chronic restraint stress related disorders [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 449: 215–219.
- [2] Fang N, Yu S, Bader TM. Characterization of isoflavones and their conjugates in female rat urine using LC/MS/MS [J].

J Agric Food Chem, 2002, 50: 2700–2707.

- [3] Li Z, Song R, Xu FG, et al. Identification of flavonoid metabolites of Fructus Aurantii Immaturus in rat biological samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2010, 41: 539–547.
- [4] Liu L, Xiao J, Peng ZH, et al. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human cytochrome P450 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 81–87.
- [5] Li N, Chen XJ, Han D, et al. Influence of glycyrrhizin on paeoniflorin pharmacokinetic fate in unrestrained conscious rats by intravenous administration [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2009, 34: 1720–1723.
- [6] Sun GL, Qian DW, Duan JA, et al. UPLC-Q-TOF/MS analysis of naringin and naringenin and its metabolites in rat urine and feces after intragastric administration of alcohol extract of *Exocarpium Citri Grandis* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 761–766.
- [7] Zhang JM, Brodbelt JS. Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS [J]. *Analyst*, 2004, 129: 1227–1233.
- [8] Zhu MS, Ma L, Zhang DL, et al. Detection and characterization of metabolites in biological matrices using mass defect filtering of liquid chromatography/high resolution mass spectrometry data [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1722–1733.
- [9] Matsumoto H, Ikoma Y, Sugiura M, et al. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered besperidin in rat plasma [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 6653–6659.
- [10] Akao T, Aoyama M, Akao T, et al. Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes-II: 22 α -and 24-Hydroxylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40: 291–296.
- [11] Akao T, Akao T, Kobashi K. Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes: glycyrrhetinate dehydrogenase [J]. *Biochim biophys Acta*, 1990, 1042: 241–246.
- [12] Shimizu K, Amagaya A, Ogihara Y. Structural transformation of saikosaponins by gastric juice and intestinal flora [J]. *J Pharmacobiodyn*, 1985, 8: 718–725.
- [13] Xie T, Liang Y, Hao HP, et al. Advances in study of metabolic activation of carboxyl-acid containing drugs by UGTs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 1193–1199.
- [14] Crepy V, Morand C, Besson C, et al. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 618–621.
- [15] Xue CF, Guo JM, Qian DW, et al. Absorption of flavonoids from *Abelmoschus manihot* extract by *in situ* intestinal perfusion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 454–459.