

黄连配方颗粒化学成分体内代谢研究

吴茵^{1,2}, 任炳楠², 张森^{1*}, 隋峰^{1*} (1.中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2.河北省人民医院, 石家庄 050051)

摘要: 目的 探讨黄连配方颗粒主要成分体内代谢过程。方法 采用 UHPLC-TOF/MS 技术, 根据精确相对分子质量和碎片离子分析, 并结合相关文献检索及质谱裂解规律, 比较黄连配方颗粒给药前后大鼠血清及尿液的图谱。结果 在黄连给药组血清中共发现原型成分 15 个, 代谢物 9 个; 尿液中原型成分 18 个, 代谢物 20 个。结论 本研究较为全面地阐释了黄连配方颗粒主要化学成分的体内过程, 研究结果可为黄连配方颗粒药动学、代谢产物推测、药效物质基础及作用机制等研究提供参考依据。

关键词: 黄连配方颗粒; 体内代谢; UHPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)02-0147-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.02.002

引用本文: 吴茵, 任炳楠, 张森, 等. 黄连配方颗粒化学成分体内代谢研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(2): 147-153.

Study on Metabolism of Chemical Constituents in Coptidis Rhizome Dispensing Granule *in Vivo*

WU Yin^{1,2}, REN Bingnan², ZHANG Miao^{1*}, SUI Feng^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China; 2. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the metabolism process of major chemical constituents in Coptidis Rhizome Dispensing Granule. **METHODS** UHPLC-TOF/MS technology was adopted. Based on accurate relative molecular mass and fragment ion analysis, combined with relevant literature search and mass spectrometry fragmentation rules, the chromatograms of serum and urine of rats were compared before and after administration of Coptidis Rhizome Dispensing Granule. **RESULTS** Fifteen parent components and 9 metabolites were found in containing drug serum. There were 18 parent components and 20 metabolites in containing drug urine. **CONCLUSION** This study comprehensively explains the *in vivo* process of the main chemical components of Coptidis Rhizome Dispensing Granule. The results can provide scientific reference for the study of pharmacokinetics, metabolite prediction, pharmacodynamic material basis and mechanism of action about Coptidis Rhizome Dispensing Granule.

KEYWORDS: Coptidis Rhizome Dispensing Granule; metabolism *in vivo*; UHPLC-Q-TOF/MS

黄连是临床常用中药, 为毛茛科植物黄连 (*Coptis chinensis* Franch.)、三角叶黄连 (*Coptis deltoidea* C.Y.Cheng et Hsiao)、云南黄连 (*Coptis teeta* Wall.) 的干燥根茎, 有清热燥湿、泻火解毒的作用; 其味苦、性寒; 归心、脾、胃、胆、大肠经。研究发现黄连在抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、降血糖等方面都表现出了显著的药理活性^[1-5]。中药配方颗粒在临床使用中有方便服用和携带, 即冲即服的优点, 是传统中药汤剂的改良产品。目前有关黄连的成分分析主要集中于体外黄连药材、含黄连制剂和黄连单一成分的研究^[6-11], 体内成分分析和代谢过程研究较少。黄连配方颗粒体内作用成分及代谢过程尚无研究报告, 药效物质基础尚不明确。因此, 本实验以黄连

配方颗粒为研究对象, 采用 UHPLC-TOF/MS 技术对大鼠灌胃黄连配方颗粒后体内移行成分进行指认, 对其在血清和尿液的分布和代谢轮廓进行了分析, 可为配方颗粒的药动学、代谢产物推测、药效物质基础及作用机制的深入研究提供参考。

1 材料

AB Sciex Triple TOFTM 5600⁺型飞行时间谱仪(美国 Applied Biosystems 公司); 超高效液相色谱系统(日本 Shimadzu 30A UHPLC system), 配有二元高压梯度泵 (Shimadzu 30AD), 柱温箱 (Shimadzu CTO30A) 和自动进样器 (Shimadzu SIL30AC)。数据采集软件 Analyst 1.7.1; 数据分析软件: Peakview 2.2、Masterview 2.0、Metabolite pilot 1.5。BP211D 型分析天平(北京赛多利斯仪器有限公

基金项目: 国家自然科学基金项目(81903819); 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A03803); 河北省自然科学基金项目(H2019307100); 第 64 批中国博士后科学基金(2018M641609); 河北省中医药管理局科研计划项目(2018071)

作者简介: 吴茵, 女, 博士, 副主任药师 E-mail: wuyin82@163.com *通信作者: 张森, 女, 博士 E-mail: zhangmiao8691@126.com 隋峰, 男, 博士, 研究员 E-mail: fsui@icmm.ac.cn

司); KQ500DE 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

盐酸小檗碱对照品(批号: 110713-200609; 纯度>98%)、盐酸药根碱对照品(批号: 0733-20000; 纯度>98%)均购自中国药品生物制品检定所; 非洲防己碱(批号: 2015022)、巴马汀(批号: 2016121)均购自南京春秋生物科技有限公司; 阿魏酸(批号: 19041327; 纯度>98%)和奎宁酸(批号: 19041511; 纯度>98%)购自上海士峰生物科技有限公司。黄连配方颗粒(广州一方药业, 规格: 每袋 0.5 g; 批号: 160014)。甲醇、乙腈(色谱纯, Merck 公司); 甲酸(色谱纯, Fisher 公司); Millipore 超纯水。

SPF 级♂SD 大鼠 20 只, 体质量(200±50)g, 购于河北医科大学动物实验中心, 动物生产许可证号: SCXK(冀)2018-004。标准动物房中饲养, 实验动物喂养环境: 温度 23~25 °C; 相对湿度(50±5)%。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 Kinetex-XB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 柱温 40 °C; 流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 线性梯度洗脱: 0~25 min, 5%~85% A; 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 进样量为 3 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源正、负离子扫描模式下采集数据, 离子源电压分别为 5 500/-4 500 V, 离子源温度 550 °C; 雾化气体 N₂, 雾化气、辅助气压力 379.17 kPa, 气帘气压力 241.29 kPa; 裂解电压±100 V; 碰撞能量±30 eV, 碰撞能量扩展 15 eV。TOF MS 扫描范围 100~1 200 Da, IDA 设置响应值超过 200 cps 的 10 个最高峰进行二级质谱扫描; Product Ion 扫描范围 50~900 Da, 开启动态背景扣除。

2.2 供试品溶液的制备

取黄连配方颗粒 0.05 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声 20 min, 冷却后离心, 经微孔滤膜过滤后上清液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取小檗碱、药根碱、非洲防己碱、巴马汀、阿魏酸和奎宁酸 6 个对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇超声溶解, 冷却至室温, 定容, 即得混合对照品溶液。

2.4 血清的收集

取清洁级♂SD 大鼠 10 只, 体质量(200±50)g,

随机分成空白组和给药组, 每组 5 只。给药前禁食 12 h, 自由饮水。用适量水溶解黄连配方颗粒, 0.25 g·L⁻¹ 配成灌胃液, 实验组以 10 mL·kg⁻¹(给药剂量按《药理实验方法学》人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值计算, 约为人剂量 56 倍)作为给药剂量灌胃给药; 空白组给予等量蒸馏水。实验组给药后 0.25, 0.5, 1.5, 3 h 眼内眦取血 0.4 mL, 以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上血清, 将各时间点同组血清混合, 以消除个体差异, 置于-20 °C 保存, 备用。

2.5 血清的处理

取含药血清和空白血清各 800 μL, 加入乙腈-甲醇(50:50)溶液 4 mL, 涡旋混合 2 min, 离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min)。随后取上清液置氮吹仪中, 37 °C 下吹干。残留物加入 50% 甲醇 200 μL 复溶, 涡旋 1 min, 低温离心, 进 UHPLC-TOF/MS 系统分析。

2.6 尿液的收集

另取清洁级♂SD 大鼠 10 只, 体质量(200±50)g, 随机分成空白组和给药组, 每组 5 只分别置于代谢笼中。禁食 12 h, 自由饮水。实验组按血清收集组给药剂量灌胃给予黄连配方颗粒, 空白组给予等量蒸馏水。实验组给药后 0~2 h, 2~4 h, 4~8 h 收集各时间段尿液样品, 将各时间点同组尿液样品混合, 置于-20 °C 保存, 备用。

2.7 尿液的处理

取含药尿液和空白尿液各 1 mL, 加入乙腈-甲醇(50:50)溶液 4 mL, 涡旋混合 2 min, 离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min)。随后取上清液置氮吹仪中, 37 °C 下吹干。残留物加入 50% 甲醇 300 μL 复溶, 涡旋 1 min, 低温离心, 进 UHPLC-Q-TOF/MS 系统分析。

2.8 UHPLC-Q-TOF/MS 成分分析

取黄连配方颗粒供试品溶液, 含药血清样品、空白血清样品、含药尿液样品和空白尿液样品在相同的色谱条件下进行 UHPLC-Q-TOF/MS 分析, 参照有关文献、对照品及其一级、二级质谱信息初步鉴定黄连的体内成分。并用 Metabolite Pilot 1.5 软件分析黄连体内成分的代谢物, 推导代谢物结构并分析体内代谢途径。

3 结果

3.1 血清和尿液中原型成分的鉴定

通过 UHPLC-Q-TOF/MS 技术对黄连配方颗粒

体内药性成分进行定性分析,并结合对照品比对及文献^[12-16]报道,利用 Peakview 和 Masterview 软件比较黄连配方颗粒、含药血清、空白血清黄连含药尿液和空白尿液的差异色谱图发现,含药血清中出现 15 个原形成分,含药尿液中出现 18 个原型成分,结果见表 1~2;正、负离子模式下质谱基峰色谱图见图 1~2。

3.1.1 生物碱类成分的鉴定 黄连中生物碱主要为异喹啉生物碱^[12-13]。结合化合物一、二级质谱信息与对照品进行比对,鉴定化合物 P4, P8, P10, P12 分别为药根碱、巴马汀、非洲防己碱和小檗碱。以小檗碱为例,正离子模式下产生分子离子 m/z 336.122 7[M]⁺,进一步裂解失去端基上的甲基产生 m/z 321.099 1[M-CH₃]⁺,并发生氢重排产生碎片离子 m/z 320.090 8[M-CH₄]⁺。该碎片一方面可失去端基位的甲基,形成 m/z 306.075 1[M-CH₄-CH₂]⁺;也

可一侧苯环开裂,丢失 CO 碎片,形成 m/z 292.096 5 [M-CH₄-CO]⁺碎片离子,见图 3。根据该类生物碱类成分质谱裂解规律,推断鉴定血液和尿液中其他生物碱类原型成分。

3.1.2 苯丙素类化合物的鉴定 由大鼠灌胃黄连配方颗粒后的生物样本中鉴定出 4 个苯丙素类化合物,主要为阿魏酸及其与奎宁酸形成的酯类。其中阿魏酸经与对照品比对后准确鉴定。以阿魏酸为例,在负离子模式下形成准分子离子 m/z 193.050 6 [M-H]⁻,在二级质谱中,可见依次丢失 CH₃, CO₂ 形成碎片离子 m/z 178.027 8[M-H-CH₃]⁻, 149.062 8 [M-H-CO₂]⁻, 134.037 5[M-H-CH₃-CO₂]⁻,结果见图 4,根据文献^[15]报道,并经与对照品比对后确定其为阿魏酸。

3.1.3 有机酸类化合物的鉴定 有机酸是一类具有羧基、酚羟基等酸性基团的有机化合物,本研究

表 1 黄连配方颗粒正离子模式下血液和尿液中的原型成分鉴定

Tab. 1 Identification of prototype compounds from plasma and urine after oral administration of Coptidis Rhizome Dispensing Granule in positive mode

编号	t/min	分子式	鉴定结果	m/z	离子	误差	MS/MS	分布
P1	6.23	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	格陵兰黄连碱	322.107 6	[M] ⁺	-1.0	307.104 8, 279.089 0	血清
P2	6.29	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄	去亚甲基小檗碱	324.122 8	[M] ⁺	-0.8	309.099 9, 308.091 3, 294.076 4, 280.097 0	尿液
P3	7.09	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	黄连碱	320.093 0	[M] ⁺	0.4	293.099 7, 278.102 4	血清, 尿液
P4	7.12	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	药根碱	338.138 4	[M] ⁺	-1.2	323.114 6, 322.106 3, 308.090 7, 294.111 5	血清, 尿液
P5	7.20	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	表小檗碱	336.123 3	[M] ⁺	-0.9	321.099 4, 320.091 2, 306.0752, 304.096 4, 292.092 7	尿液
P6	7.23	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	小檗红碱	322.107 6	[M] ⁺	-1.0	307.108 7, 279.089 1	血清
P7	7.90	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	蝙蝠葛碱	365.178 5	[M] ⁺	1.9	336.123 9, 322.130 0, 308.132 7	尿液
P8	7.96	C ₂₀ H ₁₆ NO ₄	甲基黄连碱	334.107 4	[M] ⁺	-1.6	306.111 2, 276.101 0	尿液
P9	8.17	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	巴马汀	352.162 2	[M] ⁺	-1.4	337.130 0, 336.121 5, 308.128 9	血清, 尿液
P10	8.23	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	非洲防己碱	338.138 5	[M] ⁺	-2.8	323.114 6, 322.106 3, 308.090 7, 294.111 5	血清, 尿液
P11	8.31	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	伪非洲防己碱	338.138 4	[M] ⁺	-2.6	323.115 2, 322.104 9, 308.089 6, 294.110 2	血清, 尿液
P12	8.32	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	小檗碱	336.122 7	[M] ⁺	-2.8	321.099 1, 320.090 8, 292.096 5	血清, 尿液
P13	8.51	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	木兰花碱	342.170 0	[M] ⁺	-1.5	299.127 6, 297.111 9, 282.088 4, 265.085 6	血清, 尿液

表 2 黄连配方颗粒负离子模式下血液和尿液中的原型成分鉴定

Tab. 2 Identification of prototype compounds from plasma and urine after oral administration of Coptidis Rhizome Dispensing Granule in negative mode

编号	t/min	分子式	鉴定结果	m/z	离子	误差	MS/MS	分布
P14	0.45	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸	191.056 2	[M-H] ⁻	0.3	173.009 2, 127.040 4, 93.034 9	血清, 尿液
P15	1.68	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸	359.077 8	[M-H] ⁻	1.3	322.847 8, 197.047 2, 179.035 9	血清, 尿液
P16	2.10	C ₇ H ₆ O ₄	龙胆酸	153.020 2	[M-H] ⁻	4.9	108.022 1, 78.958 3	尿液
P17	3.21	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸	193.050 6	[M-H] ⁻	0.3	178.062 1, 149.063 5, 134.037 4	血清, 尿液
P18	3.55	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	阿魏酸奎宁异构体	367.103 1	[M-H] ⁻	-1.9	193.051 4, 173.047 0, 134.037 4	尿液
P19	4.70	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	阿魏酸奎宁异构体	337.103 5	[M-H] ⁻	0.2	193.052 0, 173.054 9, 134.037 8	血清, 尿液
P20	4.83	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	阿魏酸奎宁异构体	367.103 5	[M-H] ⁻	0.2	193.050 3, 173.045 9, 134.037 0	血清, 尿液

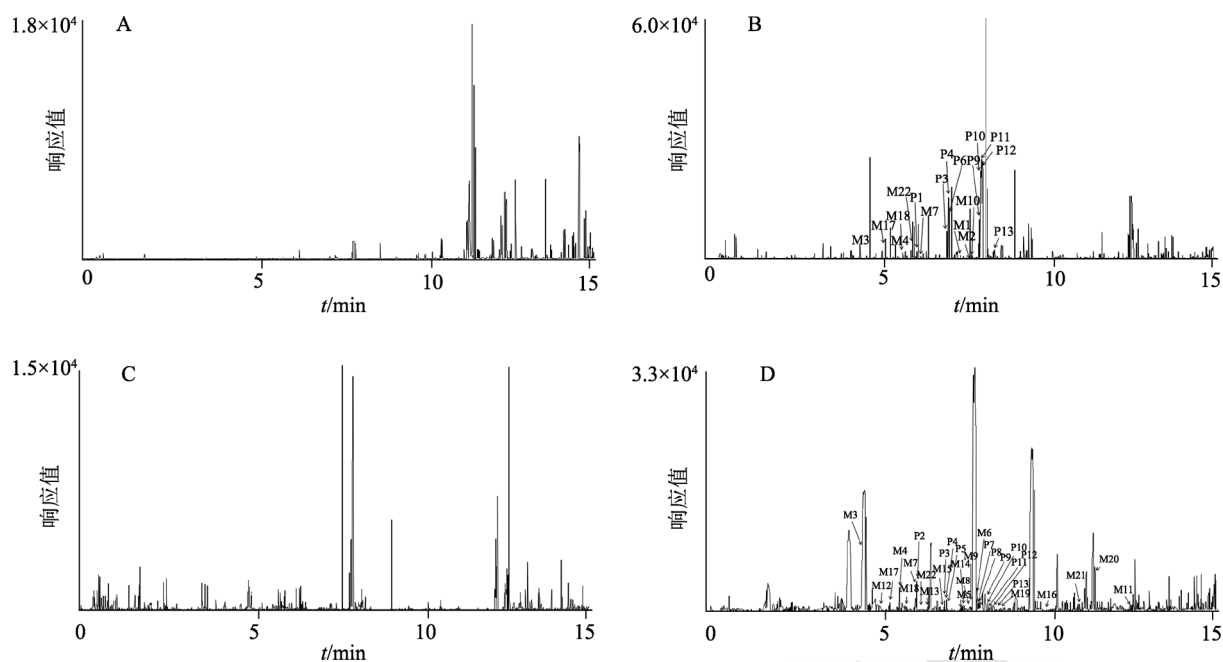


图 1 黄连配方颗粒成分的正离子质谱基峰色谱图

A-空白血浆; B-含药血浆; C-空白尿液; D-含药尿液。

Fig. 1 Base peak chromatograph in positive mode of Coptidis Rhizome Dispensing Granule

A-blank plasma; B-drug-containing plasma; C-blank urine; D-drug-containing urine.

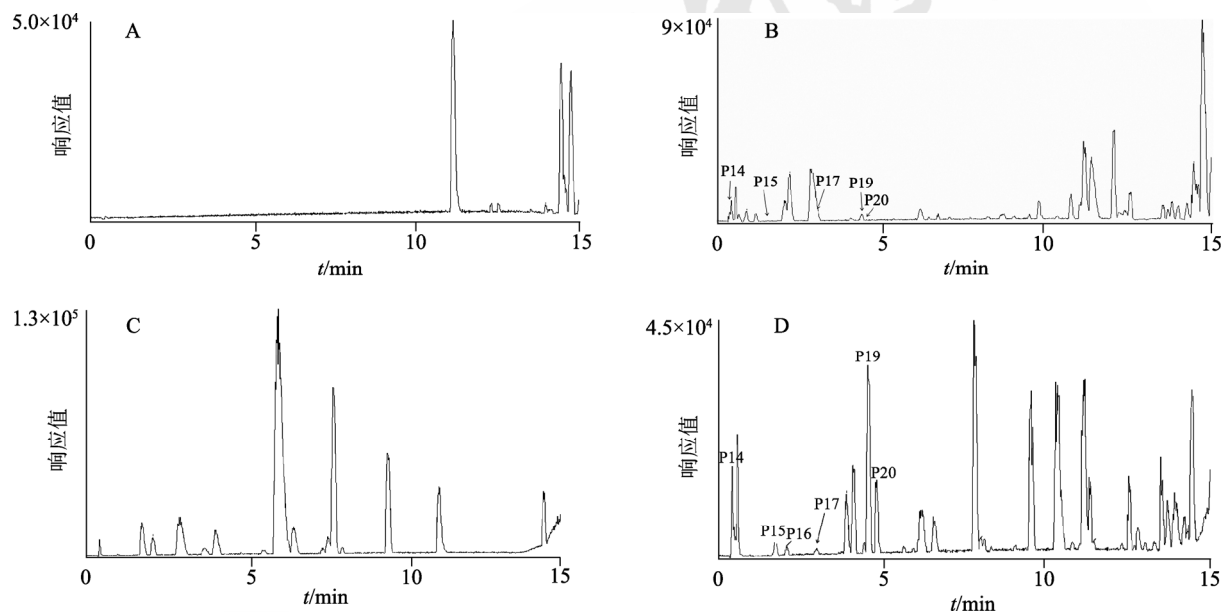


图 2 黄连配方颗粒成分的负离子质谱基峰色谱图

A-空白血浆; B-含药血浆; C-空白尿液; D-含药尿液。

Fig. 2 Base peak chromatograph in negative mode of Coptidis Rhizome Dispensing Granule

A-blank plasma; B-drug-containing plasma; C-blank urine; D-drug-containing urine.

在大鼠给药后生物样本鉴定了 3 个有机酸类化合物。以化合物奎宁酸为例,在负离子模式下形成准分子离子 m/z 191.055 8[M-H]⁻,推测其分子式为 C₇H₁₂O₆,在二级质谱中可见连续丢失 H₂O、CO₂,形成碎片离子 m/z 173.009 2[M-H-H₂O]⁻, m/z 127.040 4[M-H-2H₂O-CO]⁻,见图 5。根据文献^[16]

报道,并经与对照品比对后确定化合物 P14 为奎宁酸。

3.2 血清和尿液中代谢物的鉴定

根据大鼠给药后生物样本鉴定结果,黄连生物碱类成分在体内较其他类化合物更丰富,含量也更高,因此本研究利用 Metabolitepilot 1.5 代谢

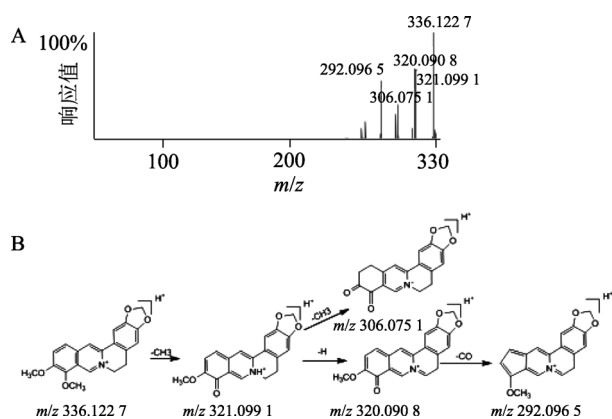


图3 小檗碱质谱裂解图(A)及可能的裂解途径(B)
Fig. 3 Mass fragmentation spectrum of berberine(A) and its proposed fragmentation pathways(B)

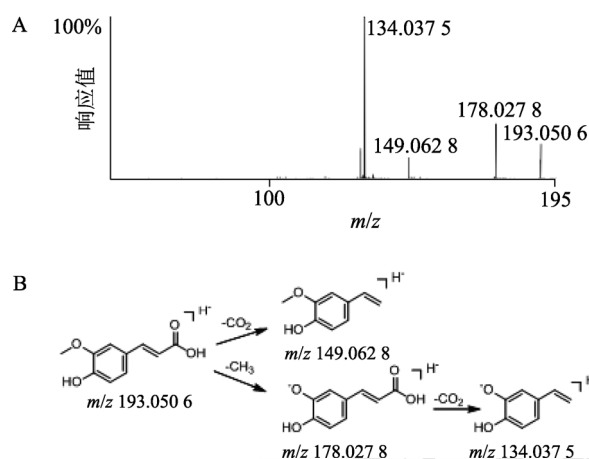


图4 阿魏酸质谱裂解图(A)及可能的裂解途径(B)
Fig. 4 Mass fragmentation spectrum of ferulic acid(A) and its proposed fragmentation pathways(B)

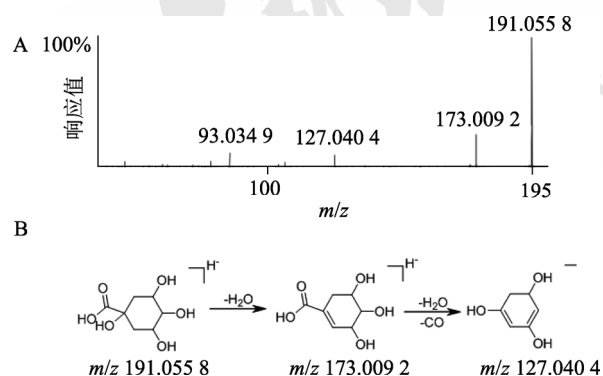


图5 奎宁酸质谱裂解图(A)及可能的裂解途径(B)
Fig. 5 Mass fragmentation spectrum of quinic acid(A) and its proposed fragmentation pathways(B)

物鉴定软件主要鉴定分析了小檗碱、黄连碱和巴马汀3个黄连主要活性成分的体内代谢情况。基于生物碱类成分质谱裂解规律,以小檗碱为例说明黄连生物碱主要代谢途径。正离子模式下, M1 和 M2 分子离子峰为 $[M]^+$ m/z 322.107 7 和 322.107 4。与小檗碱相比, M1 和 M2 均失去甲基, 质谱裂解规律

与小檗碱类似, 故推测为小檗碱去甲基代谢产物。M3 和 M4 分子离子峰为 $[M]^+$ m/z 498.139 3 和 498.139 4, 与 M1 和 M2 相比增加了 176($C_6H_8O_6$), 质谱裂解规律类似, 故推测为小檗碱去甲基后葡萄糖醛酸化后的产物。同理, M5 和 M6 分子离子峰为 $[M]^+$ m/z 402.064 2 和 402.064 5, 与小檗碱相比, 失去甲基增加了 80(SO_3), 故推测为小檗碱去甲基后硫酸化后的产物。M7 分子离子峰为 $[M]^+$ m/z 512.155 3, 和小檗碱相比增加了 176($C_6H_8O_6$), 故推测为小檗碱葡萄糖醛酸化后的产物, 见图 6 和表 3。根据黄连生物碱裂解规律和代谢特点, 分别鉴定出小檗碱相关代谢产物 7 个, 黄连碱相关代谢产物 5 个, 巴马汀相关代谢产物 10 个。代谢物的种类和浓度尿液中远高于血液。黄连生物碱类主要以脱甲基, 氧化等 I 代谢产物及葡萄糖醛酸化, 硫酸化等相应的 II 相结合产物的形式排出体外, 小檗碱、黄连碱、和巴马汀可能的代谢途径分别见图 6~8。

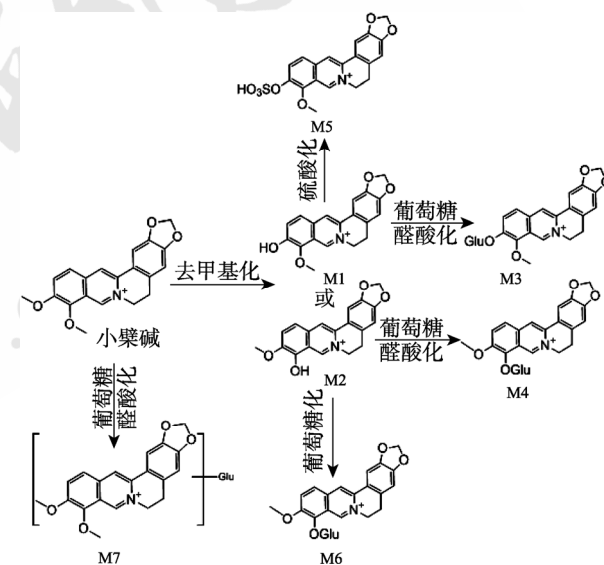


图6 小檗碱可能的代谢途径
Fig. 6 Proposed metabolic pathways of berberine

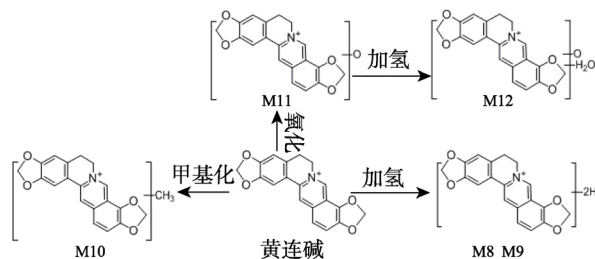


图7 黄连碱可能的代谢途径
Fig. 7 Proposed metabolic pathways of coptisine

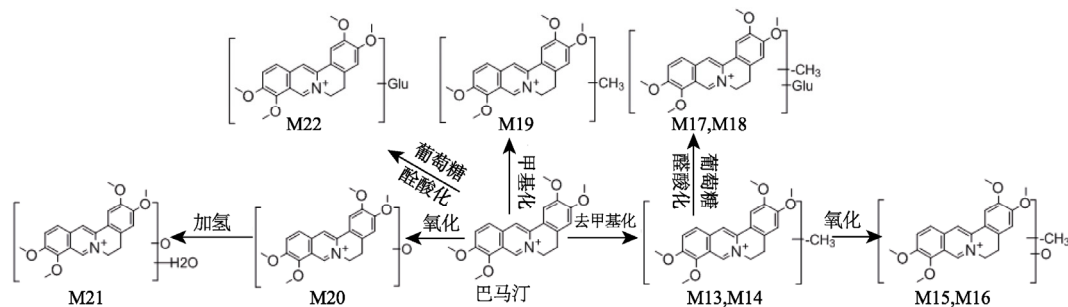


图8 巴马汀可能的代谢途径

Fig. 8 Proposed metabolic pathways for palmatine

表3 黄连体内代谢成分的质谱信息和鉴定

Tab. 3 Mass spectrometry information and identification of components metabolized by *Coptis chinensis* Franch. *in vivo*

编号	t/min	分子式	代谢途径	m/z	离子	误差	MS/MS	分布
P8	8.32	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	—	336.122 7	[M] ⁺	-2.8	321.099 1, 320.090 8, 294.096 5	血清, 尿液
M1	7.53	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	去甲基化	322.107 7	[M] ⁺	0.9	307.081 6, 279.081 3	血清
M2	7.72	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	去甲基化	322.107 4	[M] ⁺	0.1	307.083 8, 279.089 1	血清
M3	4.61	C ₂₅ H ₂₃ NO ₁₀	去甲基化、葡萄糖醛酸化	498.139 3	[M] ⁺	-0.4	322.107 5, 307.084 9	血清, 尿液
M4	5.72	C ₂₅ H ₂₃ NO ₁₀	去甲基化、葡萄糖醛酸化	498.139 4	[M] ⁺	-0.2	322.108 1, 307.081 9	血清, 尿液
M5	7.47	C ₁₉ H ₁₅ NO ₇ S	去甲基化、硫酸化	402.064 2	[M] ⁺	-0.1	322.108 0, 320.094 0, 307.083 8	尿液
M6	7.94	C ₁₉ H ₁₅ NO ₇ S	去甲基化、硫酸化	402.064 5	[M] ⁺	0.2	322.108 7, 320.091 1, 307.084 2	尿液
M7	6.32	C ₃₀ H ₂₉ NO ₁₆	葡萄糖醛酸化	512.155 3	[M] ⁺	-0.1	336.123 1, 322.098 0	血清, 尿液
P3	7.09	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	—	320.093 0	[M] ⁺	0.4	293.099 7, 278.102 4	血清, 尿液
M8	7.73	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	氢化	322.107 3	[M] ⁺	-0.3	307.083 8, 279.089 1, 278.081 1	尿液
M9	7.82	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	氢化	322.107 4	[M] ⁺	0.1	307.083 8, 279.089 1, 278.081 3	尿液
M10	7.84	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	甲基化	334.107 6	[M] ⁺	0.7	309.076 8, 306.116 3	血清
M11	12.40	C ₁₉ H ₁₃ NO ₅	氧化	336.078 1	[M] ⁺	1.3	308.086 4, 307.111 8, 279.067 1, 278.085 1	尿液
M12	5.19	C ₁₉ H ₁₅ NO ₆	氧化、水解	354.097 5	[M] ⁺	0.7	336.087 3, 326.102 4	尿液
P9	8.17	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	—	352.162 2	[M] ⁺	-1.4	337.130 0, 336.121 5, 308.128 9	血清, 尿液
M13	6.80	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	去甲基化	338.139 1	[M] ⁺	1.2	323.119 1, 322.104 7, 308.087 7	尿液
M14	7.53	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	去甲基化	338.138 9	[M] ⁺	0.6	323.116 4, 322.103 6, 308.094 7	尿液
M15	6.95	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	去甲基化、氧化	354.133 7	[M] ⁺	0.3	339.111 5, 296.087 5	尿液
M16	9.95	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	去甲基化、氧化	354.134 0	[M] ⁺	1.2	339.111 1, 296.084 5	尿液
M17	5.38	C ₁₆ H ₂₇ NO ₁₀	去甲基化、葡萄糖醛酸化	514.170 8	[M] ⁺	0.1	338.138 4, 323.114 9	血清, 尿液
M18	5.84	C ₂₆ H ₂₇ NO ₁₀	去甲基化、葡萄糖醛酸化	514.171 0	[M] ⁺	0.5	338.113 0	血清, 尿液
M19	8.66	C ₂₂ H ₂₃ NO ₄	甲基化	366.170 9	[M] ⁺	2.5	351.150 3, 322.134 1	尿液
M20	11.37	C ₂₁ H ₂₂ NO ₅	氧化	368.149 4	[M] ⁺	0.3	338.100 9, 310.111 6, 294.074 4	尿液
M21	10.93	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	氧化、水解	386.159 6	[M] ⁺	-0.5	358.165 6, 343.138 0, 326.137 7	尿液
M22	6.23	C ₂₆ H ₂₇ NO ₁₀	葡萄糖醛酸化	528.186 3	[M] ⁺	-0.2	352.145 8	血清, 尿液

4 讨论

对多个采集时间点的血清和尿液样品进行分析, 结果显示, 大鼠灌胃给予黄连配方颗粒 1.5 h 后的血清样品中药物原型成分和代谢物多, 灌胃 2~4 h 后尿液样品中代谢物丰富, 故采用灌胃 1.5 h 的血清样品和灌胃 2~4 h 尿液样品进行药物成分分析。在本研究发现的 20 种原型成分中, 生物碱类成分在黄连或含黄连制剂的大鼠体内成分分析均有报道^[17-18], 其余原型成分未见报道, 这可能

缘于药材提取方式、样本种类和检测条件的差异。本实验中发现黄连生物碱类代谢方式主要包括脱甲基、氧化等 I 代谢产物及葡萄糖醛化, 硫酸化等 II 相结合产物。因黄连成分复杂, 同分异构体较多, 以往研究因检测方法受限, 多未对药物体内成分及代谢物进行指认。UHPLC-Q-TOF/MS 技术强大的多成分检测功能和数据分析能力对于中药复杂体系体内多成分代谢研究有明显的优势。在药物代谢研究中既可确定分子量, 还能根据特

异性断裂规律推导出重要部分结构, 迅速找出药物代谢途径。本研究建立了 UHPLC-Q-TOF/MS 的检测方法, 将 UHPLC 强大的分离能力和质谱的高分辨特点运用在中药复杂体系中, 指认了黄连配方颗粒进入体内的成分及其代谢物。由于黄连单个化学成分体内含量低且同分异构体较多, 体内存在药物代谢的相互转化, 仅凭化合物的二级结构难以做到准确鉴定。同时, 采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术进行结构鉴定, 代谢物具有较高的相对浓度和响应值也是关键。因此, UHPLC-Q-TOF/MS 技术在化合物的精确结构确定特别是同分异构体的鉴定方面还存在局限性, 中药代谢的研究有赖于新技术的发展和多学科交叉。本实验综合评价了黄连配方颗粒的体内直接作用物质基础, 为阐明黄连配方颗粒的物质基础和质量控制提供方法和参考。

REFERENCES

- [1] ZOU P, LIU J, XU H M, et al. Mechanism of Coptis and Astragalus in treatment of nasopharyngeal carcinoma based on network pharmacology[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2021, 40(4): 276-281.
- [2] YU G Z, PENG H J, HUANG X F, et al. Effect of berberine on TLR4/NF- κ B pathway induced by A β ₂₅₋₃₅ in HT22 cells[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(24): 164-170.
- [3] QIN S R, TANG H L, LI W, et al. Research progress of the prevention and treatment of ischemic stroke by berberine based on AMPK and its downstream targets[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(4): 489-494.
- [4] QIU X, WEI X, GUAN H, et al. Comparative proteomic analysis of two differently extracted *Coptis chinensis* in the treatment of type 2 diabetic rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018(2018): 3248521. Doi: 10.1155/2018/3248521.
- [5] ZHOU X, REN F, WEI H, et al. Combination of berberine and evodiamine inhibits intestinal cholesterol absorption in high fat diet induced hyperlipidemic rats[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 239. Doi: 10.1186/s12944-017-0628-x.
- [6] 陈文文, 过林, 贺敏, 等. UHPLC-DAD/Q-TOF-MS 法分析左金丸化学成分[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2412-2414.
- [7] HUANG T Y, WANG H, WENG Y J, et al. Rapid analysis of the chemical components in Huanglian-Jiedu decoction by electrospray ionization mass spectrometry[J]. Chin Med Mat(中药材), 2017, 40(1): 119-121.
- [8] ZHAO Z F, ZOU T, WU A, et al. Establishment of the UPLC fingerprint of classical herbal prescription Huanglian Decoction and determination of the contents of 6 components[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2859-2867.
- [9] JI W L, ZHOU Z H, WANG T T, et al. Identification of chemical constituents in Banxia Xiexin decoction based on UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(10): 1736-1750.
- [10] ZHAO X Z, LI W F, XING Y C, et al. Research progress on the pharmacokinetics and pharmacological activities of berberine[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2020, 22(10): 86-90.
- [11] QI J, CHEN H G, LIU Q H, et al. Identification of the metabolites of coptisine in urine, feces and bile of diabetic rats[J]. Mod Tradit Chin Med Mat Med-World Sci Tech(世界科学技术-中医药现代化), 2020, 22(6): 1922-1929.
- [12] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 黄连属药用植物化学成分和质量控制的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(15): 1121-1125.
- [13] HAO Y M, HUO J H, WANG T, et al. Analysis of alkaloids and their fragmentation behavior of coptis rootlet by UHPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(21): 2582-2586.
- [14] ZHANG Y, DNEG Q, WEI M, et al. Identification of chemical constituents in *Coptis chinensis* inflorescence by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(15): 91-99.
- [15] 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 技术分析黄连中非生物碱类成分[J]. 中药材, 2020, 43(2): 354-358.
- [16] LIU R, WANG R, FEI K, et al. Rapid identification of chemical constituents of *Pimpinella thellungiana* by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(5): 145-151.
- [17] LI S J, WANG Y Q, ZHANG G. Screening and analysis of the multiple absorbed bioactive components and metabolites of *Coptis chinensis* by HPLC-DAD coupled with HPLC-Q-TOF/MS[J]. Chin J Hops Pharm(中国医院药学杂志), 2019, 39(8): 781-785.
- [18] WANG J, CHENG Y, YUAN Z M. Correlation between integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of bile processed Rhizoma Coptidis in febrile rats[J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2016, 51(1): 127-131.

收稿日期: 2021-03-23

(本文责编: 陈怡心)