

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的知母-黄柏药对入血成分分析

夏天利¹, 王岩², 王迪¹, 赵德萍³, 苏婷¹, 赵继会², 雷霞^{4*}, 张宁^{1,3*} (1. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 湖南医药学院 药学院, 湖南 怀化 418000; 3. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 4. 无锡市中医医院中医药研究所, 江苏 无锡 214071)

摘要:目的 以正常家兔为实验对象,探讨知母-黄柏药对口服吸收后的入血成分。方法 采用相当于生药量 $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的知母-黄柏水煎液灌胃家兔,每日 1 次,连续 7 d,末次给药后取家兔含药血清,利用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS),在正、负两种离子模式下,根据保留时间、精确相对分子质量、二级质谱裂解碎片,确定入血成分。结果 家兔含药血清中共鉴别出 54 个入血成分,包括 46 个原型入血成分,包括生物碱类、黄酮类、皂苷类、糖苷类、酚酸类、苯丙素类、内酯类、酚类衍生物;9 个代谢产物,分别来源于小檗碱、药根碱、小檗红碱、芒果苷。结论 知母-黄柏药对中含有 46 个可以入血的化学成分,还可能含有 4 个化学成分在体内代谢为 9 个代谢产物。

关键词:知母;黄柏;药对;超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术;入血成分

doi:10.11669/cpj.2024.04.006 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)04-0330-08

Analysis of Absorbed Components of Rhizoma Anemarrhenae-Cortex Phellodendri Chinese Herb-Pair Based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS

XIA Tianli¹, WANG Yan², WANG Di¹, ZHAO Deping³, SU Ting¹, ZHAO Jihui², LEI Xia^{4*}, ZHANG Ning^{1,3*} (1. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China; 3. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 4. Institute of Traditional Chinese Medicine, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the components of Rhizoma Anemarrhenae-Cortex Phellodendri Chinese (RA-PC) herb-pair absorbed into blood in normal rabbits. **METHODS** Rabbits were fed with the decoction of RA-PC herb pair ($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) once a day for 7 days, then blood samples were taken. High-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital trap (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) technique was applied for the analysis, and fragments were split in both positive and negative ion modes. The compositions into blood were determined according to retention time, accurate relative molecular mass, and secondary mass spectra. **RESULTS** A total of 54 components were identified in the drug-containing serum of rabbits, including 46 prototype components, which were alkaloids, flavonoids, saponins, glycosides, phenolic acids, phenylpropanoids, lactones, and phenolic derivatives. The nine metabolites were derived from berberine, jatrorrhizine, berberrubine, and mangiferin, respectively. **CONCLUSION** RA-PC contains 46 chemical components that can enter blood of normal rabbits, and may also contains four chemical components which are metabolized into nine metabolites.

KEY WORDS: Rhizoma Anemarrhenae; Cortex Phellodendri Chinese; herb pair; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; absorbed component

知母-黄柏药对(以下简称“知柏”)是中医临床治疗阴虚内热证的经典药对,最早出自金李杲的《兰室秘藏》^[1],在知柏地黄丸、滋肾丸、大补阴丸等方剂中都用到了知母和黄柏的配伍。知母甘寒上清肺金而泻火,下润肾燥而滋阴;黄柏苦寒坚阴,清热燥湿,泻火解毒,善退虚热。二药伍用,发挥滋肾阴之亏损,兼泻妄动之相火的功效,临床常用其治疗

糖尿病^[2]。

目前国内外对于知母、黄柏的研究较多,但大多集中于对药理作用的研究。研究表明,知母中的主要成分为皂苷及黄酮类化合物,其中知母皂苷类物质具有改善老年痴呆症状、降血糖、抗肿瘤等药理作用^[3];黄柏中多以生物碱类物质为主,具有抗炎、抗氧化、抑菌等药理作用^[4]。对于知柏的

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目资助(LH2020H097);黑龙江省中医药科研项目资助(ZHY202088);江苏省中医退行性骨关节病临床医学创新中心资助项目资助(苏中科教[2021]4号)

作者简介:夏天利,女,硕士研究生 研究方向:药物分析
Tel:(0510)81008810;张宁,男,博士,教授 研究方向:药物分析

* **通讯作者:**雷霞,女,博士,副教授 研究方向:药理学
Tel:(0451)82114400

体内吸收成分研究较少,对于知母,大多集中于皂苷类物质及以芒果苷为代表的黄酮类物质的研究,知母中苯丙素类物质的体内情况研究较少;对于黄柏,更多侧重于对其药理活性的研究,或是以生物碱类物质为代表的某一大类成分的研究,有关黄柏酚酸类、糖苷类、内酯类及酚类衍生物的体内情况研究较少。目前缺乏对知柏入血成分的整体分析药对配伍是通过协同作用发挥药效,因此有必要对入血成分进行全面研究,以明确药效成分,以期阐明药效物质基础^[5]。

1 材料

1.1 动物

家兔 12 只,雄性,黑龙江中医药大学实验中心,合格证号:SCXK(黑)2018-003。SPF 级环境饲养,饲养环境温度范围 $-22 \sim 20$ °C,相对湿度 $(50 \pm 10)\%$,自由采食、饮水,分笼饲养,每笼 1 只。实验流程均符合黑龙江中医药大学实验动物管理委员会对实验动物管理和保护的相关规定。

1.2 仪器

Dionex UltiMate 3000 超高液相色谱与 Thermo Q-Exactive Focus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司);Milli-Q 纯水器(密理博上海贸易有限公司);Mikro 200R 离心机(德国 Hettich 公司)。

1.3 药材与试剂

知母饮片、黄柏饮片均购自北京同仁堂药店(哈尔滨店),并经黑龙江中医药大学佳木斯学院陈效忠副教授鉴定为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)的干燥根茎以及芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮,符合 2020 年版《中国药典》标准。甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯)。

2 方法

2.1 知母-黄柏药液的制备

将知母饮片、黄柏饮片按 1:1 混合,加入 10 倍量水,煎煮 1 h,过滤,收集滤液,残渣加入 8 倍量水煎煮 1 h,合并两次滤液,浓缩至相当于饮片 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即得。

2.2 动物给药与含药血清样品采集

将家兔随机分为空白组和给药组,每组 6 只,实验前 12 h 禁食不禁水,给药组按饮片量

$4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予知母-黄柏药液,空白组灌胃给予等量水,分别于给药后 30、60、90、120 min 心脏取血(左手放在右胸处,轻轻向左推,将心脏固定。拇指在兔胸左侧由下向上数第 3 至第 4 肋骨间探测心脏搏动最剧烈处,右手持注射器,在此搏动最强烈处刺入心脏,缓慢抽取血液,达足量时,拔出注射器),室温静置 30 min 后,离心,取血清,用 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器无菌过滤, -80 °C 保存备用。

2.3 血清样本处理

血清样品置于 4 °C 解冻后,取 $500 \mu\text{L}$ 血清样品,加入 2 mL 甲醇溶液涡旋混合 1 min,超声 2 min,以 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 力 4 °C 下离心 10 min,取上清液置真空浓缩仪中, 40 °C 下吹干。复溶:加 $100 \mu\text{L}$ 体积分数 70% 的甲醇溶液复溶, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,进样 $5 \mu\text{L}$ 。

2.4 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)条件

2.4.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC™ HSS T₃ 柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$);柱温: 40 °C;流动相:0.1% 甲酸的水溶液(流动相 A)、0.1% 甲酸的乙腈溶液(流动相 B);梯度洗脱: $0 \sim 3.5 \text{ min}, 0\% \sim 15\% \text{ B}$; $3.5 \sim 6 \text{ min}, 15\% \sim 30\% \text{ B}$; $6 \sim 12.5 \text{ min}, 30\% \sim 70\% \text{ B}$; $12.5 \sim 18 \text{ min}, 70\% \sim 100\% \text{ B}$;流速: $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

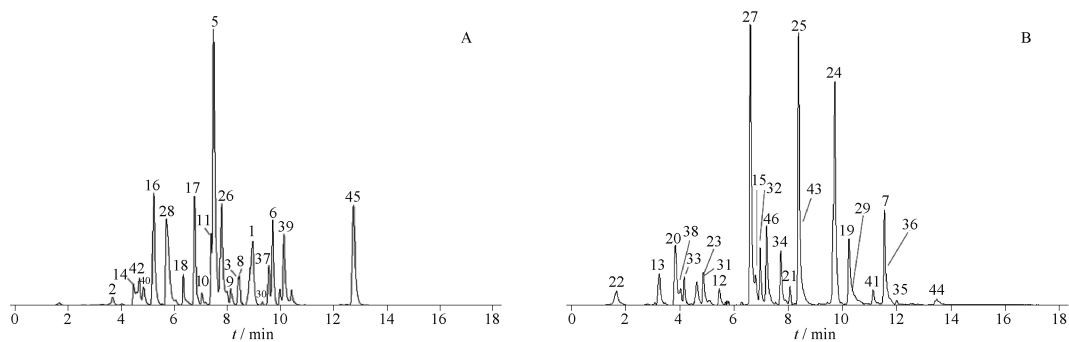
2.4.2 质谱条件

电喷雾离子源,正、负离子模式下扫描。质谱扫描范围: m/z $50 \sim 1500$,离子传输管和辅助气温度分别为 320 °C 和 350 °C,正离子模式下:喷雾电压为 3.5 kV ;负离子模式下:喷雾电压为 3.2 kV ;鞘气压力: $275 \sim 800 \text{ Pa}$;碰撞能量: $20, 40, 60 \text{ eV}$;分辨率:一级高分辨质谱 70000 FWHM ,二级高分辨质谱 17500 FWHM ;动态排除时间: 5 s 。

3 结果

3.1 知母-黄柏入血成分鉴定

使用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术,对知母-黄柏家兔入血成分进行定性分析,在正、负离子模式下的质谱高分辨提取离子流图见图 1。入血成分总离子流图见图 2。质谱分析软件 Thermo Scientific Xcalibu 对主要出峰化合物进行辨认。根据保留时间和质谱特征、化合物 MS 一级质谱和 MS/MS 二级质谱信息,同时结合体外成分分析结果进行成分确认,结果见表 1。

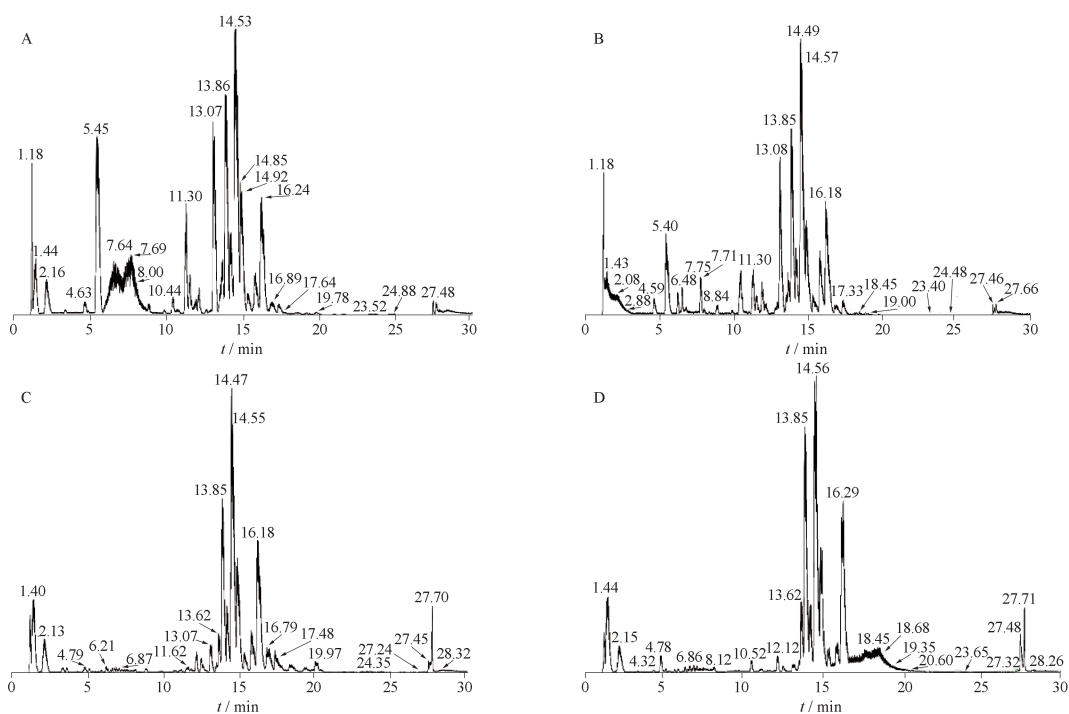


A - 正离子模式; B - 负离子模式; 图中序号对应表 1 中的成分。

A - positive ion mode; B - negative ion mode; the serial numbers in the figure correspond to the components in Table 1.

图 1 知母-黄柏入血成分提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of blood components Rhizoma Anemarrhenae-Cortex Phellodendri Chineseis



负离子模式: A - 空白血清; B - 给药血清; 正离子模式: C - 空白血清; D - 给药血清。

negative ion mode: A - blank serum; B - administration serum; positive ion mode C - blank serum; D - administration serum.

图 2 知母-黄柏入血成分总离子流图

Fig. 2 The total ion current chromatograms of blood components Rhizoma Anemarrhenae-Cortex Phellodendri Chineseis

3.2 知母-黄柏入血成分质谱裂解规律

3.2.1 生物碱类 以化合物 28 为例, 保留时间 5.56 min, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 42.17 $[M + H]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{23}NO_4$, MS^2 产生碎片离子 m/z 297.11 $[M + H - C_2H_7N]^+$ 、 m/z 265.09 $[M + H - C_2H_7N - CH_3OH]^+$ 、 m/z 237.09 $[M + H - C_2H_7N - CH_3OH - CO]^+$, 与参考文献[6]对比, 初步鉴定为木兰花碱。裂解途径见图 3。

3.2.2 酚酸类 以化合物 13 为例, 保留时间为 3.22 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 353.09 $[M - H]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, MS^2 产生碎

片离子 m/z 191.06 $[M - H - caffeoul]^-$, 奎宁取代基位置可为 1, 3 或 5 位, 通过与文献[7]对比, 初步鉴定为绿原酸。裂解途径见图 4。

3.2.3 黄酮类 以化合物 31 为例, 化合物 23 和 31 互为同分异构体, 分子式均为 $C_{19}H_{18}O_{11}$, 准分子离子峰均为 m/z 421.08 $[M - H]^-$, MS^2 均产生碎片离子 m/z 331.05 $[M - H - C_3H_6O_3]^-$ 、 m/z 301.04 $[M - H - C_4H_8O_4]^-$, 这种方式为碳苷类化合物典型的裂解形式, 结合文献[8-9]对比, 初步鉴定化合物 31 为芒果苷, 化合物 23 为异芒果苷。裂解途径见图 5。

表 1 知母-黄柏入血成分

Tab. 1 The total ion current chromatograms of blood components Rhizoma Anemarrhenae-Cortex Phellodendri Chineseis

No.	Molecular formula	t_R /min	Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)	Adduct	Error ($\times 10^{-6}$)	m/z (MS^2)	Component	Source	Category
1	C ₂₁ H ₂₁ NO ₄	8.92	352.154 33	352.153 53	[M + H] ⁺	0.086	336.122 25, 308.127 11	Palmatine	PC	Alkaloid
2	C ₂₀ H ₂₀ NO ₇	3.80	387.131 25	387.189 94	[M + H] ⁺	-0.428	145.028 03, 177.054 14	Trihydroxy jatrorrhizine	PC	Alkaloid
3	C ₂₁ H ₁₃ N ₃ O	8.30	324.113 13	324.121 95	[M + H] ⁺	-0.754	308.090 70, 280.095 89	7,8-deoxyrutaecarpine	PC	Alkaloid
4	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	7.52	352.117 94	352.116 85	[M + H] ⁺	0.692	336.085 60, 308.090 73	Berlambine	PC	Alkaloid
5	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	8.20	336.123 03	336.121 83	[M + H] ⁺	0.41	320.090 70, 306.518 68	Berbine	PC	Alkaloid
6	C ₂₁ H ₁₈ NO ₄ ⁺	9.66	350.138 68	350.137 57	[M + H] ⁺	0.651	334.106 29, 320.090 7	Chelerythrine	PC	Alkaloid
7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	11.53	513.176 62	513.138 79	[M - H] ⁻	0.321	367.139 50	Baohuoside I	RA	Flavonoids
8	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	8.36	322.107 38	322.106 32	[M + H] ⁺	-0.696	307.082 89, 279.087 95	Menisporphine	PC	Alkaloid
9	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	8.03	339.146 5	339.140 87	[M + H] ⁺	-0.79	323.113 01, 308.090 27	Flavonoids	PC	Alkaloid
10	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	7.19	356.185 63	356.184 33	[M + H] ⁺	0.106	311.126 56, 296.103 39	Menisperine	PC	Alkaloid
11	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	7.36	324.123 03	324.122 16	[M + H] ⁺	-0.754	308.090 70, 294.075 29	Berberrubine	PC	Alkaloid
12	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	5.44	367.103 45	367.103 27	[M - H] ⁻	-0.362	191.055 31, 173.044 59	3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	PC	Phenolic acids
13	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.22	353.087 8	353.086 06	[M - H] ⁻	-0.002	191.055 24, 179.034 03	Chlorogenic acid	PC	Phenolic acids
14	C ₁₇ H ₁₇ NO ₅	4.14	316.117 94	316.283 69	[M + H] ⁺	1.303	298.274 02, 280.262 12	Hippeastrine	PC	Alkaloid
15	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	6.88	533.166 44	533.151 55	[M - H] ⁻	0.218	371.100 46, 325.091 77	Aegineoside	PC	Flavonoids
16	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈	5.15	448.196 59	448.195 28	[M + H] ⁺	0.066	107.049 18, 286.142 79 ¹⁾		PC	Glycoside
17	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃	6.79	260.128 11	260.127 38	[M + H] ⁺	2.317	242.116 73, 224.106 48	Pilocarpine	PC	Alkaloid
18	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	6.35	314.175 07	314.173 95	[M + H] ⁺	0.517	299.112 82, 269.116 82	Isoliensinine	PC	Alkaloid
19	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃	10.22	739.427 41	739.428 16	[M - H] ⁻	0.002	577.376 65, 529.609 62	Timosaponin AIII	RA	Saponins
20	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₆	3.86	583.130 45	583.129 39	[M - H] ⁻	0.050	421.077 61, 331.045 84	Neomangiferin	RA	Flavonoids
21	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉	8.06	917.475 15	917.476 14	[M - H] ⁻	-0.085	71.012 41, 89.023	Anemarsaponin D	RA	Saponins
22	C ₁₃ H ₁₈ O ₈	1.66	301.092 89	301.093 66	[M - H] ⁻	1.756	123.007 48, 138.031 19	Tachioside	PC	Phenolic acids
23	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	4.88	421.077 63	421.077 97	[M - H] ⁻	0.225	301.035 10, 331.045 90	Isomangiferin	RA	Flavonoids
24	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	9.78	901.480 23	901.484 13	[M - H] ⁻	-0.026	101.023 06, 113.023 09	Anemarsaponin B	RA	Saponins
25	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	8.37	919.490 8	919.489 75	[M - H] ⁻	0.048	757.432 56, 595.383 79	Anemarsaponin BII	RA	Saponins
26	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	7.69	338.138 68	338.137 45	[M + H] ⁺	0.320	323.113 83, 294.111 02	Jatrorrhizine	PC	Alkaloid
27	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6.58	431.098 37	431.097 93	[M - H] ⁻	0.346	311.056 12, 283.061 00	Atzelin	RA	Flavonoids
28	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	5.56	342.169 98	342.169 19	[M + H] ⁺	0.133	297.111 05, 265.085 17	Magnoflorine	PC	Alkaloid
29	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	10.30	329.233 34	329.233 28	[M - H] ⁻	-0.936	311.222 41, 293.211 7	Sanleng acid	PC	Phenolic acids
30	C ₁₁ H ₁₈ NO	9.00	181.146 11	181.085 91	[M + H] ⁺	-0.060	121.101 23, 93.070 31	<i>N</i> -Candicine	PC	Alkaloid
31	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	4.88	421.077 63	421.077 97	[M - H] ⁻	0.225	331.045 90, 301.035 10	Mangiferin	RA	Flavonoids
32	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	6.81	521.202 83	521.203 19	[M - H] ⁻	0.219	329.139 34, 175.075 52 ²⁾		PC	Glycoside
33	C ₁₅ H ₂₄ N ₆ O ₉	4.17	431.153 19	431.155 64	[M - H] ⁻	0.811	191.054 50, 119.048 93	2-(<i>p</i> -hydroxyphenyl)ethanol- <i>O</i> - β -D-glucoside	PC	Glycoside
34	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	7.74	935.485 71	935.485 41	[M - H] ⁻	-0.032	773.437 68, 449.330 32	Timosaponin N	RA	Saponins
35	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₄	11.91	755.422 32	755.422 3	[M - H] ⁻	0.089	325.255 52, 593.371 22	Timosaponin G	RA	Saponins
36	C ₁₇ H ₁₆ O ₂	11.55	251.107 75	251.107 41	[M - H] ⁻	1.001	236.082 70, 157.064 74	Nyasol	RA	Phenylpropionin
37	C ₁₄ H ₈ N ₂ O	9.90	221.070 93	221.073 81	[M + H] ⁺	-1.435	177.044 76, 150.036 79	6H-Indolo(3,2,1- <i>de</i>)(1,5)naphthyridin-6-one	PC	Alkaloid
38	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃	4.02	268.097 91	268.127 44	[M - H] ⁻	-1.491	250.099 72, 235.075 2	4-[<i>N</i> -(<i>p</i> -Methoxy-benzylidene)amino]-phenyl acetate	PC	Phenolic acids
39	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	10.12	230.081 16	230.080 46	[M + H] ⁺	2.751	215.057 01, 200.033 66	Γ -fagarine	PC	Alkaloid
40	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	4.83	303.045 62	303.050 17	[M + H] ⁺	0.543	285.039 85, 275.055 94	Quercetin	PC	Flavonoids
41	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	11.00	469.195 67	469.189 45	[M - H] ⁻	-0.080	425.205 94	Limonin	PC	Lactones
42	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	5.51	260.091 73	260.185 06	[M + H] ⁺	-2.209	242.175 57, 237.908 63	Skimmianine	PC	Alkaloid
43	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	8.36	269.081 93	269.210 75	[M - H] ⁻	-1.379	253.216 60, 231.007 11	2'- <i>O</i> -methyl-isoliquiritigenin	RA	Flavonoids
44	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	13.53	485.181 70	485.282 71	[M - H] ⁻	-0.104	397.166 38, 383.149 08	Rutaevin	PC	Lactones
45	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	12.74	373.149 30	373.272 58	[M + H] ⁺	0.539	355.262 42, 337.252 5	Syringin	PC	Phenols
46	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	7.86	463.088 19	463.306 52	[M - H] ⁻	-0.503	377.271 30, 359.261 08	Hyperoside	PC	Flavonoids

注: ¹⁾ -1-(对-羟基苄基)-6,7-二羟基-*N*-甲基四氢异喹啉 7- β -D-吡喃葡萄糖苷; ²⁾ - (+/-)-8-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6,7-bis-(hydroxymethyl)-3-methoxy-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthalenyl- β -D-glucopyranoside。

Note: ¹⁾ -1-(*p*-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-*N*-methyltetrahydroisoquinoline 7- β -D-glucopyranoside; ²⁾ - (+/-)-8-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6,7-bis-(hydroxymethyl)-3-methoxy-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthalenyl- β -D-glucopyranoside.

表2 小檗碱、药根碱、芒果苷、小檗红碱在家兔血浆中的代谢产物

Tab. 2 Metabolites of berberine, jatrorrhizine, mangiferin and berberrubine in serum of rabbits

No.	Molecular formula	t_R /min	Theoretical mass (m/z)	Experimental mass (m/z)	Adduct	Error ($\times 10^{-6}$)	m/z (MS ²)	Identification	Prototype ingredients
M1	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄	11.70	322.10738	322.19095	[M + H] ⁺	-0.439	307.16687	Thalifendin or berberrubinen	Berberine
M2	C ₂₅ H ₂₄ NO ₁₀	6.74	498.13947	498.13876	[M + H] ⁺	0.231	322.10678	Thalifendin- <i>O</i> -glucuronide or Berberrubinen- <i>O</i> -glucuronide	Berberine
M3	C ₃₀ H ₃₀ NO ₁₆	16.36	660.15591	660.42346	[M + H] ⁺	-0.328	308.71030	Demethylenecoptisine-di- <i>O</i> -glucuronide	Berberine
M4	C ₂₅ H ₂₆ NO ₁₀	6.26	500.15512	500.15384	[M + H] ⁺	0.121	324.12244	Demethyleneepiberberine- <i>O</i> -glucuronide	Jatrorrhizine
M5	C ₂₆ H ₂₈ NO ₁₀	6.52	514.17077	514.16949	[M + H] ⁺	0.117	338.13812	Jateorrhizine- <i>O</i> -glucuronide	Jatrorrhizine
M6	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	5.86	435.09218	435.09296	[M - H] ⁻	-0.565	259.06107	Methylation	Mangiferin
M7	C ₁₉ H ₁₅ O ₁₂	1.4	435.09218	436.95300	[M - H] ⁻	-0.351	315.04102	Monomethylated Mangiferin	Mangiferin
M8	C ₁₃ H ₈ O ₆	5.59	260.03153	261.03009	[M - H] ⁻	0.436	221.84196	Norathyriol	Mangiferin
M9	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀ N	6.74	498.13947	498.13876	[M + H] ⁺	0.123	322.10678	9- <i>O</i> - β -D-Glucuronic acid berberine	Berberubine

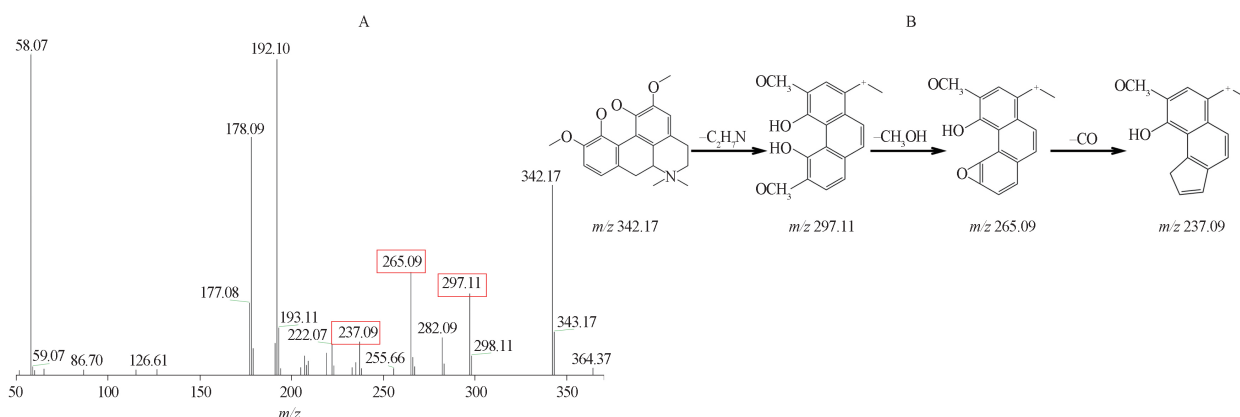


图3 木兰花碱二级碎片离子图(A)及裂解途径(B)

Fig. 3 Secondary fragment ion map of magnoflorine(A) and pyrolysis pathway(B)

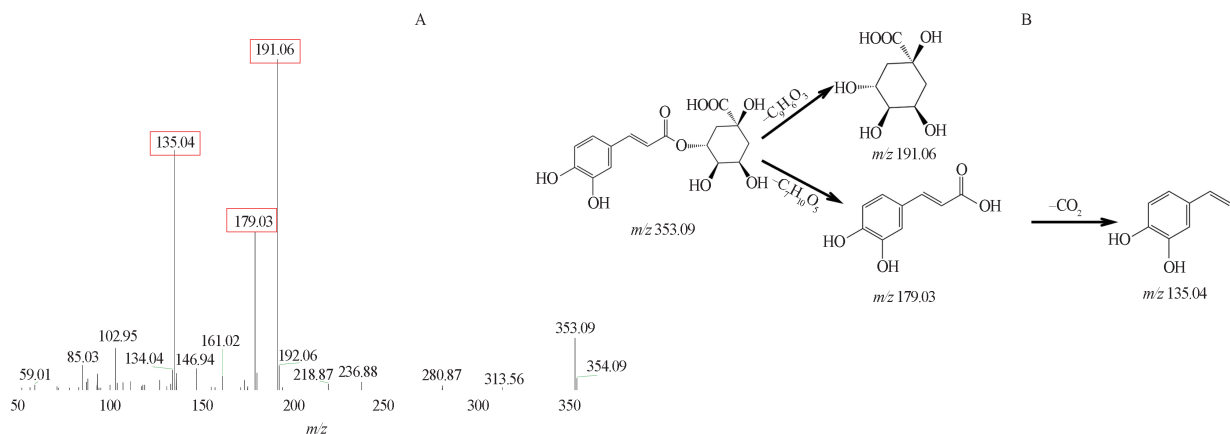


图4 绿原酸二级碎片离子图(A)及裂解途径(B)

Fig. 4 Secondary fragment ion map of chlorogenic acid(A) and pyrolysis pathway(B)

3.2.4 皂苷类 以化合物 25 为例,保留时间为 8.37 min,在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 919.49 [M - H]⁻,分子式为 C₄₅H₇₆O₁₉,MS²产生碎片离子 m/z 757.43 [M - H - Glc]⁻、 m/z 595.38 [M - H - Glc - Gal]⁻,通过与文献对比^[10],初步鉴定为知母皂苷 B II。推测裂解途径见图 6。

3.2.5 内酯类 以化合物 41 为例,保留时间为 11.00 min,在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 469.19 [M - H]⁻,分子式为 C₂₆H₃₀O₈,MS²产生碎片离子 m/z 425.20 [M - H - CO₂ - H₂O]⁺、通过与文献[11]对比,初步鉴定为柠檬苦素。推测裂解途径见图 7。

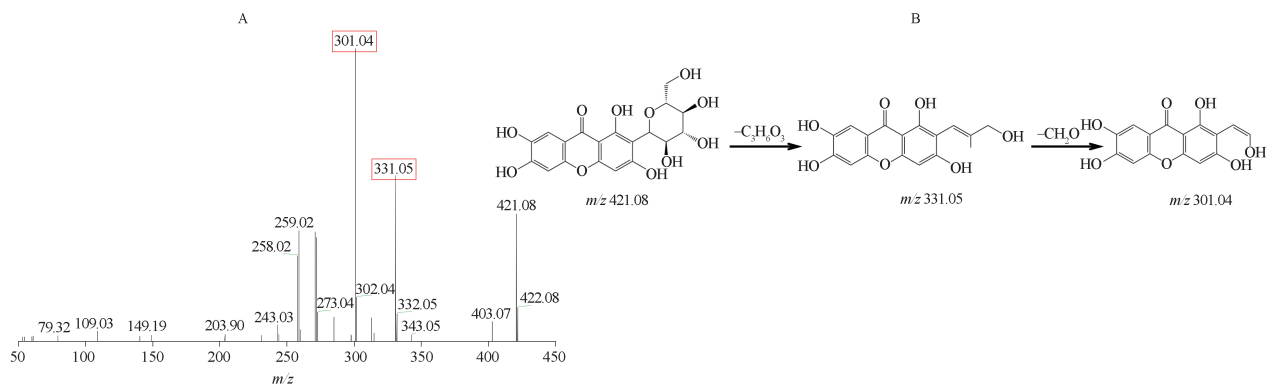


图5 芒果苷二级碎片离子图(A)及裂解途径(B)

Fig. 5 Secondary fragment ion map of mangiferin(A) and pyrolysis pathway(B)

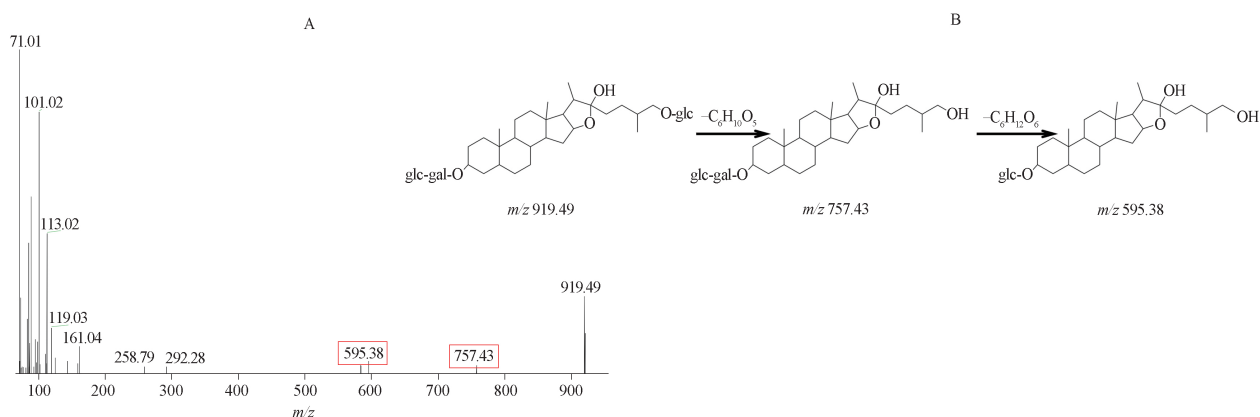


图6 知母皂苷B II二级碎片离子图(A)及裂解途径(B)

Fig. 6 Secondary fragment ion map(A) and pyrolysis pathway(B) of timosaponin B II

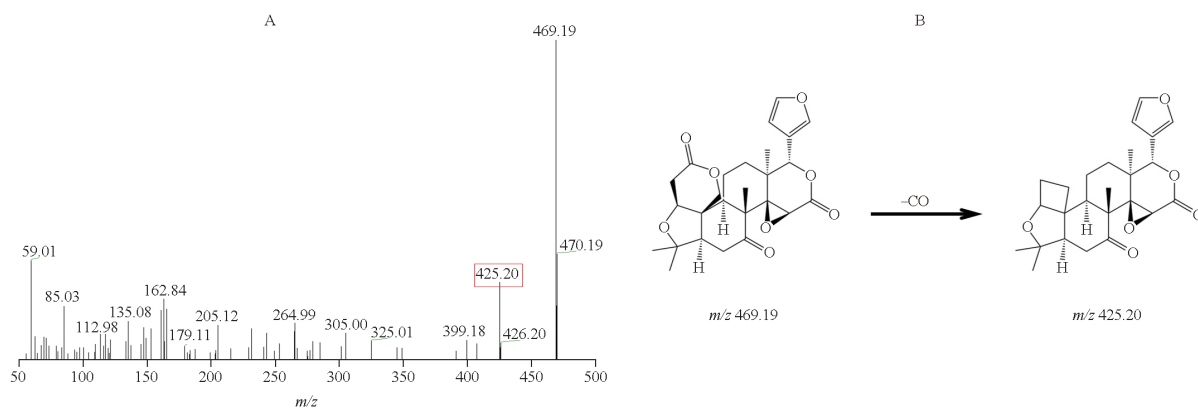


图7 柠檬苦素二级碎片离子图(A)及裂解途径(B)

Fig. 7 Secondary fragment ion map of limonin(A) and pyrolysis pathway(B)

3.2.6 糖苷类 以化合物 32 为例,保留时间为 6.81 min,在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 431.16 $[M - H]^-$,分子式为 $C_{15}H_{24}N_6O_9$, MS^2 产生碎片离子 m/z 269.05 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$,通过与文献[12]对比,初步鉴定为 2-(*p*-hydroxyphenyl) ethanol-1-*O*- β -D-glucoside。

3.2.7 其他类成分 化合物 45 为酚类衍生物,通过与文献[13]对比,初步鉴定为丁香苷。化合物 36 为苯丙素类化合物,通过与文献[14]对比,初步鉴定为 nyasol。

代谢产物结构鉴定:表 2 显示,家兔血清中共鉴定出小檗碱代谢产物 3 个,代谢途径分别为

去甲基化、葡萄糖醛酸化;药根碱代谢产物 2 个,代谢途径分别为去甲基化、葡萄糖醛酸化;芒果苷代谢产物 3 个,代谢途径分别为甲基化、去糖基化;小檗红碱代谢产物 1 个,代谢途径为葡萄糖醛酸化。

4 讨论

过往对知柏成分的研究主要集中于体外,而忽视了体内环境对中药成分的影响。目前,已有研究报道了知柏水煎液在大鼠体内的吸收情况, Ma 等^[15]使用高效液相色谱-二极管阵列-串联质谱技术(HPLC-DAD-MS/MS)方法评估吸收入血的原型成分,包括 4 个生物碱类(木兰花碱、巴马丁、小檗碱、蝙蝠葛碱)、5 个皂苷类(知母皂苷 N 或知母皂苷 E1、知母皂苷 D、知母皂苷 C 或知母皂苷 B、知母皂苷 B II、知母皂苷 A III)。Sun 等^[16]使用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱技术(UHPLC-LTQ-Orbitrap MS)方法在大鼠体内发现 16 个原型入血成分,包括 3 个黄酮类(新芒果苷、芒果苷、异芒果苷)、5 个皂苷类(知母皂苷 N、知母皂苷 C、知母皂苷 B II、知母皂苷 A III、知母皂苷 E1)、6 个生物碱类(小檗碱、巴马丁、黄柏碱、木兰花碱、四氢巴马丁、药根碱)、2 个有机酸类(3-O-阿魏酰奎宁酸、5-O-阿魏酰奎宁酸),这些研究为揭示知柏的药效物质基础提供依据。现有研究表明^[17-18],知母和黄柏中至少有 270 个化合物,在众多化合物中筛选到真正的药效物质难度巨大。通过分析知柏口服后的入血成分,确定其体内直接作用物质,已成为快速、准确地确定知柏药效物质基础的有效途径。

家兔的代谢和免疫方面与人类接近,且家兔的血流量更为充足,避免了 SD 大鼠多时间点、重复采血的技术局限性,因此选择家兔作为实验动物。结合前期预实验结果,选择 30、60、90、120 min 4 个时间点取血,等体积混匀,检测离子数目最多,能最大程度反应知柏的入血成分。结果显示,初步检测出 46 个原型入血成分,包括皂苷类 6 个、生物碱类 19 个、酚酸类 5 个、糖苷类 3 个、苯丙素类 1 个、黄酮类 9 个、内酯类 2 个以及 1 个酚类衍生物。研究表明,丁香苷作为酚类衍生物,具有抗癌、抗氧化、保护肝脏等作用^[19];金丝桃苷具有改善心血管功能、抗肿瘤、抗抑郁、抗炎等药理活性^[20];吴茱萸苦素具有抑制血管生成和扩张血管的作用,提示其可能具有开发成为抗高血压药物的

的潜在药物^[21]。

在鉴别出的 9 个代谢产物中,3 个是以知母中芒果苷为母体代谢产生的;6 个是以黄柏中生物碱类物质为母体代谢而来。小檗碱、药根碱和小檗红碱代谢物类型主要为葡萄糖醛酸结合的产物,芒果苷的代谢产物主要以甲基化产物和葡萄糖醛酸化产物为主。其中小檗碱的口服生物利用度很低^[22],口服给药后生物利用度不足 1%,提示小檗碱吸收入血量较少,进入体内的小檗碱绝大部分经肝脏代谢转化呈葡萄糖醛酸结合物,血中剩余少量的原型被检出。

只有被吸收入血的药物才可能有效,因此本研究采用准确度高、灵敏度高的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术,对知柏体内成分进行全面评估,为更准确地筛选到知柏清热作用的潜在药效物质基础、新药研发及临床研究提供数据参考。

REFERENCES

- [1] DING Y Q. 'The secret collection of the Orchid Chamber' is based on the knowledge of the Chinese herb [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医函授通讯), 1995 (2):14-15.
- [2] LIU J. Study on the pharmacodynamic mechanism of effective fractions of *Rhizoma anemarrhenae* and *cortex phellodendri* in improving diabetic cognitive impairment [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.
- [3] LI Q T, XIONG Y H, HU L, et al. Advances in pharmacological research of *Anemarrhena chinensis* at home and abroad [J]. *Sci Consult* (科学咨询) 2023, (2):120-124.
- [4] WANG L, DU X, ZHU H L, et al. Research progress on pharmacological action of active components of *Phellodendron Chinese DC* [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2022, 54(4):77-81.
- [5] WANG J, HAN Y Q, WEI L B, et al. UPLC-Q-TOF/MS analysis of migration components in blood before and after compatibility of *Psoralea corylifolia* and nutmeg [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49(22):5264-5270.
- [6] XIANG Z N. *In vivo* and *in vitro* components combined with multi-group analysis to study the anti-diabetic material basis and mechanism of Xiaoke drinking water component compound [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2022.
- [7] ZHAO H T. Study on the pharmacodynamic material basis and molecular mechanism of jiedu granule in treating liver cancer [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2021.
- [8] DUAN J P, DUAN Q, WANG T C, et al. Chemical composition analysis of dangyao based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2021, 23(7):1182-1189.
- [9] LI L Y, WANG Y, LIU M J, et al. Rapid identification and analysis of chemical constituents in Zhizi Jinhua pills by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(14):1-11.
- [10] XIAO G L, CHEN W T, ZHONG H M, et al. UPLC-Q-TOF-

- MS/MS rapid analysis of chemical constituents in Baihu decoction [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2022, (11):2656-2663.
- [11] CUI X, CHEN R, ZHENG P, *et al.* Uplc-q-tof MS ~ E method was used to analyze the chemical constituents of cortex phellodendri [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广州化工), 2017, 45(16):105-107.
- [12] ZOU D. Analysis of components in Cortex Phellodendri by HPLC [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2014.
- [13] SUN Z G. Studies on chemical constituents and pharmacokinetics of rhizoma anemarrhenae-cortex phellodendri [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.
- [14] SUN Z G, QIU K C, LI D, *et al.* UPLC-LTQ-Orbitrap XL analysis of chemical constituents of RHIZOMA anemarrhenae and cortex phellodendri [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2017, 40(01):101-106.
- [15] MA C, FAN M, TANG Y, *et al.* Identification of major alkaloids and steroidal saponins in rat serum by HPLC-diode array detection-MS/MS following oral administration of Huangbai-Zhimu herb-pair Extract [J]. *Biomed Chromatogr BMC*, 2008, 22(8):835-850.
- [16] CAO Y, SUN Z, HUANG H, *et al.* Comparative analysis of absorbed ingredients and metabolites, and pharmacokinetic studies of Zhimu-Huangbai herb pair in the plasma of normal and type 2 diabetes mellitus rats by UHPLC-linear trap quadrupole-orbitrap MS and LC-MS/MS [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(3):664-676.
- [17] SHI M, REN B N, QIU Z H, *et al.* Rapid identification of chemical constituents in Phellodendron chinense based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2022, 42(21):2225-2229.
- [18] HUANG B B. Studies on the chemical constituents of Anemarrhena asphodeloides [D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [19] LIU Y, ZHU X, TONG X, *et al.* Syringin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting neuroinflammation and TLR4 signaling [J]. *Perfusion*, 2022, 37(6):562-569.
- [20] GUO X, ZHANG Y, LU C, *et al.* Protective effect of hyperoside on heart failure rats via attenuating myocardial apoptosis and inducing autophagy [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(4):714-724.
- [21] WEI S T, LIU Y Q, HUANG J, *et al.* Advances in chemical constituents, pharmacodynamics and hepatotoxicity of Evodia rutaecarpa [J]. *World J Tradit Chin Med* (世界中医药), 2020, 15(23):3580-3588, 92.
- [22] ZHOU J X, WU S G, GONG J B, *et al.* Pharmacological activities of berberine and strategies for improving its oral bioavailability [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2022, 57(5):1263-1272.

(收稿日期:2023-02-13)