

- vascular remodeling in the pathogenesis of essential hypertension [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0157456.
- [25] Kelly J C, Lungchukiet P, Macleod R J, et al. Extracellular calcium-sensing receptor inhibition of intestinal epithelial TNF signaling requires CaSR-mediated Wnt5a/Ror2 interaction [J]. *Front Physiol*, 2011, 2: 17.
- [26] 施 舜, 陈 烨, 赵建宇. 缓激肽B2受体基因多态性+9/-9bp对骨关节炎患者血清NO产物水平的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(1): 14-19.
- [27] Goncalves-Zillo T O, Pugliese L S, Sales V M T, et al. Increased bone loss and amount of osteoclasts in kinin B1 receptor knockout mice [J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(7): 653-660.
- [28] 申 晶, 苗俊秋, 高丽娟, 等. 肥胖大鼠经 Roux-en-Y 胃旁路术减重后脂肪组织差异基因表达的生物信息学分析[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(4): 433-438.
- [29] 张 瑞, 唐 莎, 袁 琳, 等. 气道上皮趋化因子与肺部炎症反应的研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(21): 3277-3282.
- [30] 王锦聪, 俞万钧, 王华英. CXCL12/CXCR4通路在气道炎性疾病发病机制中的研究进展[J]. 中国临床研究, 2020, 33(11): 1591-1593; 1597.
- [31] 张 瑶, 李作孝. S1PR1基因慢病毒转染对EAE小鼠调节性T细胞及IL-17、IFN- γ 水平的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(11): 1305-1309.
- [32] 李 鑫, 刘圆圆, 张才擎. IL-27通过PI3K/Akt通路对哮喘小鼠气道重塑的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 798-803.
- [33] 武明云, 虞坚尔, 薛 征, 等. 基于MAPK信号通路的中药治疗支气管哮喘的实验研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(2): 86-91.
- [34] 赖菲菲, 孙治中, 黄勇智, 等. 基于网络药理学探讨麻黄治疗儿童哮喘作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 211-217.
- [35] 宋立强, 戚好文, 郎 兵, 等. Ras-MAPK信号转导系统在哮喘气道重塑中的作用[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(13): 1158-1160.
- [36] 张 磊. 基于网络药理学的郁金治疗哮喘的作用机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(1): 61-67.
- [37] 邱 宇, 黄 玲. 钙离子通道对支气管哮喘影响的研究进展[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2013, 7(2): 131-134.
- [38] 张荣凯, 叶志强, 陈 琰, 等. 早期骨关节炎软骨下骨趋化因子信号通路的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(11): 1925-1930.

基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法的芪蛭降糖胶囊血清药物化学研究

史静超¹, 裴 科¹, 张维钲¹, 陈相君¹, 张淑蓉^{1*}, 柴 智^{2*}

(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西晋中 030619; 2. 山西中医药大学基础医学院, 山西晋中 030619)

摘要: 目的 对芪蛭降糖胶囊进行血清药物化学分析, 阐明其口服吸收后的入血成分。方法 采用UPLC-QE-Orbitrap-MS技术, 对芪蛭降糖胶囊醇提物、空白血清、含药血清进行对比分析, 根据精确分子量、分子式、碎片离子对比标准品及文献相关信息, 明确血中移行成分。结果 共鉴定并表征了36种成分, 包含15种原型成分、21种代谢产物。原型成分包括酚酸类、环烯醚萜苷类、黄酮类、三萜皂苷类化合物, 代谢产物主要为原型成分发生羟基化、去羟基化、甲基化、去甲基化、乙酰化、硫酸酯化等反应得到的产物。结论 该方法快速、准确, 可用于鉴定芪蛭降糖胶囊的入血成分, 可为明确该制剂药效物质基础、提升其质量控制标准提供科学依据。

关键词: 芪蛭降糖胶囊; 血清药物化学; 原型成分; 代谢产物; UPLC-QE-Orbitrap-MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)07-2414-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.07.054

芪蛭降糖胶囊由黄芪、地黄、黄精、水蛭组成, 具有补气养阴、活血化瘀的功效, 可用于气阴两虚兼血瘀所致

的消渴病, 证见口渴多饮、多尿易饥、倦怠乏力、自汗盗汗、面色晦暗、肢体麻木, 2型糖尿病见上述证候者^[1]。

收稿日期: 2022-05-16

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2020140001483); 山西省科技厅应用基础研究计划项目(201601D202108); 山西中医药大学科技创新团队项目(2022TD1013, 2022TD2007)

作者简介: 史静超(1986—), 女, 讲师, 从事中药品种基础及其药理机制研究。E-mail: 15834025042@139.com

*通信作者: 张淑蓉(1962—), 女, 教授, 从事中药活性成分分析及其药效物质基础研究。E-mail: zhangsr62@163.com
柴 智(1979—), 男, 教授, 从事中药方剂效用及其物质基础研究。E-mail: chaizhi008@126.com

临床和现代药理研究表明, 茂蛭降糖胶囊对糖尿病及其并发症疗效确切^[2-3], 但其药效物质基础不明, 限制了茂蛭降糖胶囊质量控制和药理机制的深入研究。

课题组前期研究已初步明确了茂蛭降糖胶囊的体外成分主要包括黄酮、苯丙素、环烯醚萜苷、三萜、香豆素类^[4-5], 但其体内吸收和代谢情况尚不明确。中药血清药物化学是以药物化学研究手段为基础, 结合现代分析技术表征口服中药后血清移行成分, 从而使中药质量标准化^[6-7]。UPLC-MS法因其具有高分辨率、高灵敏、高分离效率的特点, 特别适用于中药复杂体系的成分分析^[8-9]。因此, 本研究基于前期建立的茂蛭降糖胶囊醇提物的UPLC-QE-Orbitrap-MS法, 对茂蛭降糖胶囊血中移行成分进行分析, 以明确其在体内直接作用的物质基础, 为相关质量控制标准研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 超高效液相色谱-轨道阱高分辨质谱联用仪(美国 Thermo 公司); TYXHI 型涡旋振荡仪(上海启前电子科技有限公司); Milli-Q 型一体化净水系统(美国 Millipore 公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); AG 22331 Hamburg 真空离心浓缩机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂与药物 茂蛭降糖胶囊(批号 170102, 吉林一正药业集团有限公司); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 分析纯, 德国 Sigma 公司); 毛蕊异黄酮(批号 MUST-19061412)、山柰酚(批号 MUST-19092510)、芒柄花素(批号 MUST-19062509)、黄芪甲苷(MUST-19092017)对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 纯度≥98%)。甲醇、乙腈(质谱纯, 美国 Thermo 公司); 甲醇(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 水为超纯水。

1.3 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量(180±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0006, 置于昼夜节律光照条件下, 自由进食进水, 适应性饲养 7 d。本研究经山西中医药大学伦理委员会批准(伦理号 2020DW121)。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 供试样品 精密称取本品内容物粉末 3.0 g, 加入 100 mL 75% 甲醇超声提取 30 min, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清液, 水浴蒸干溶剂, 残渣加甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取毛蕊异黄酮、山柰酚、芒柄花素、黄芪甲苷对照品适量, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 制成毛蕊异黄酮、山柰酚、芒柄花素、黄芪甲苷质量浓度均为 1.0 g/L 的贮备液, 取 100 μL, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 血清样本制备 取大鼠 10 只, 随机分为空白组、给药组, 每组 5 只。给药前 12 h 禁食, 其间可自由饮水, 给药组大鼠灌胃给予 3.83 g/kg 茂蛭降糖胶囊 CMC-Na 混悬液

(相当于人体临床每日 5 倍剂量), 空白组大鼠给予等体积蒸馏水, 早晚各 1 次, 连续 3 d。于末次给药后 0、3、6、9、12 h 眼眶采血各 1 mL, 静置 30 min, 4 °C、3 500 r/min 离心 15 min, 收集血清, 于-80 °C 冰箱中保存。

将大鼠血清在冰水浴中解冻, 各取 200 μL 混合, 得到 1 000 μL 血清, 加入 3 倍量甲醇, 涡旋混匀 1 min 后 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 真空离心浓缩至干, 残渣加 100 μL 甲醇溶解, 涡旋混匀 1 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即得。

2.3 UPLC-QE-Orbitrap-MS 条件

2.3.1 色谱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~13 min, 1%~25% A; 13~21 min, 25%~35% A; 21~28 min, 35%~85% A; 28~30 min, 85%~100% A); 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 203 nm; 进样量 3 μL。

2.3.2 质谱 电喷雾离子源, 正负离子全扫描模式, 扫描质量范围 100~1 500 Da; 碰撞能量(CE) 30~60 V; 离子喷雾电压 5 500 V; 去溶剂温度 500 °C; 鞘气体积流量 35 arb; 辅气体积流量 10 arb; 快速数据依赖采集模式(DDA), 对离子强度大于 5 000 的前驱离子进行 MS/MS 采集。

2.4 数据分析方法 采用 Xcalibur 3.2 软件, 以空白血清作为对照, 扣除血清中的内源性成分, 将处理后的数据导入 Compound discoverer 3.0 (CD) 软件进行峰提取和归一化, 设置质量偏差<5.0×10⁻⁶, 保留时间阈值为 0.05 min, 信噪比阈值为 1.5。原型成分通过前期研究结果及文献, 根据化合物的保留时间、精确分子量、碎片离子信息进行鉴定。代谢物鉴定是将得到的原型成分的化学结构式(mol 格式) 导入 CD 软件, 设置最多反应步数为 3, 在体内代谢模式下计算原型化合物的 I 相和 II 相代谢产物, 得到相应化合物的保留时间、质核比、反应类型及匹配度等信息, 将这些信息通过比对文献进行鉴定。

3 结果

共鉴定出 36 种入血成分, 包括 15 种原型成分、21 种代谢成分, 其中原型成分包括酚酸类、环烯醚萜苷类、黄酮类、三萜皂苷类, 检测到的代谢物来自酚酸类、黄酮类、三萜皂苷类。茂蛭降糖胶囊醇提物、空白血清、含药血清在正负离子模式下的总离子流图见图 1, 血中移行成分鉴定结果见表 1~2。

3.1 原型成分鉴定

3.1.1 酚酸类 共鉴定得到 1 个, 即化合物 1。保留时间为 5.97 min, 说明极性较大, 负离子模式下的准分子离子为 179.033 9 [M-H]⁻, 分子式为 C₉H₈O₄, 碎片离子 m/z 151.039 6 比准分子离子少 28 Da, 推测为丢失一分子 CO 所得, 碎片离子 m/z 135.048 8 比准分子离子少 44 Da, 推测为丢失一分子 CO₂ 所得, 推测化合物 1 为酚酸类物质, 结合分子式和精确分子量鉴定为咖啡酸。

3.1.2 环烯醚萜苷类 共鉴定得到 4 个, 以化合物 3 为

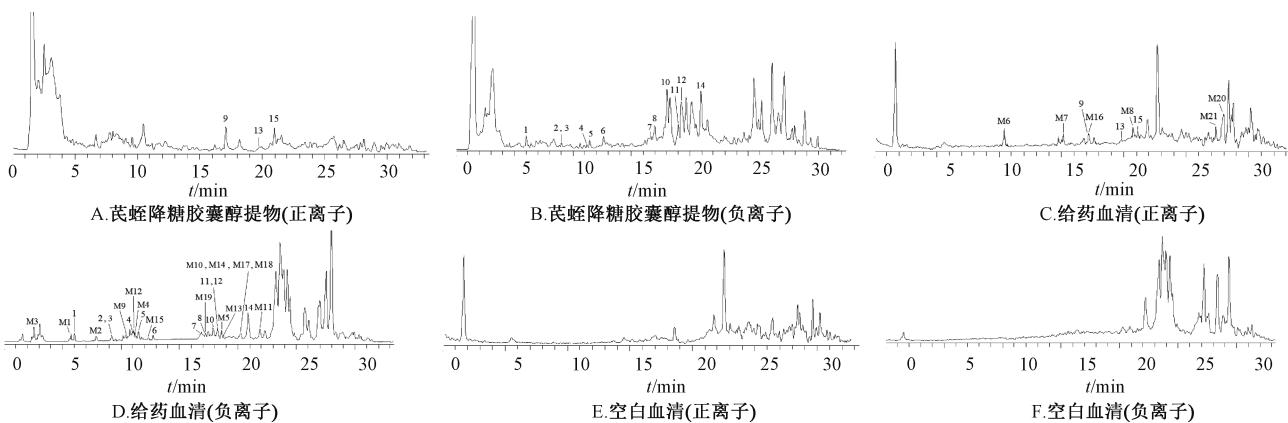


图1 正负离子模式下样品总离子流图

表1 茜蛭降糖胶囊入血原型成分

编号	t_R/min	化合物	分子式	偏差($\times 10^{-6}$)	母离子 m/z	碎片离子 m/z
1	5.97	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	4.26	179.033 9 [$M-H^-$]	151.039 6, 135.048 8
2	9.16	地黄苷 D	$C_{27}H_{42}O_{20}$	0.73	685.219 4 [$M-H^-$]	667.203 7, 505.157 0, 179.055 9
3	9.28	蜜力特苷	$C_{21}H_{32}O_{15}$	1.15	523.166 6 [$M-H^-$]	505.157 1, 343.102 8, 179.052 8
4	11.04	益母草苷	$C_{15}H_{24}O_9$	-0.72	347.133 9 [$M-H^-$]	329.123 1, 167.070 6
5	11.52	杨梅素	$C_{15}H_{10}O_8$	5.29	317.030 9 [$M-H^-$]	289.019 5, 163.003 2, 151.003 2
6	12.63	毛蕊花糖苷	$C_{29}H_{36}O_{15}$	0.25	623.198 7 [$M-H^-$]	461.167 7, 179.034 2, 161.024 1
7	16.74	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	1.27	255.067 3 [$M-H^-$]	153.019 8, 135.009 2, 119.050 2
8	17.02	黄豆黄素	$C_{16}H_{12}O_5$	5.05	283.061 6 [$M-H^-$]	268.038 1, 135.008 0, 119.946 0
9	17.04	毛蕊异黄酮*	$C_{16}H_{12}O_5$	0.53	285.076 5 [$M+H^+$]	270.052 9, 257.049 8, 137.023 5
10	18.05	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	-0.11	301.036 1 [$M-H^-$]	273.040 3, 151.003 2, 107.013 3
11	19.29	异鼠李素	$C_{16}H_{12}O_7$	-0.95	315.051 2 [$M-H^-$]	300.027 9, 151.003 2
12	19.43	山柰酚*	$C_{15}H_{10}O_6$	1.93	285.040 9 [$M-H^-$]	257.046 2, 151.003 2, 133.023 4
13	19.83	黄芪甲苷*	$C_{41}H_{68}O_{14}$	-0.93	807.452 3 [$M+Na^+$]	627.389 4, 495.346 1, 335.095 6
14	20.93	木樨草素	$C_{15}H_{10}O_6$	-2.73	285.041 0 [$M-H^-$]	257.047 8, 151.002 8, 133.027 2
15	21.25	芒柄花素*	$C_{16}H_{12}O_4$	0.68	269.081 7 [$M+H^+$]	254.057 4, 237.054 9, 137.003 4

注: *为和对照品比对鉴定。

表2 茜蛭降糖胶囊入血代谢成分

编号	t_R/min	原型化合物	代谢物分子式	原型代谢方式	母离子 m/z	碎片离子 m/z
M1	5.75	咖啡酸	$C_{10}H_{10}O_5$	羟基化, 甲基化	209.044 9 [$M-H^-$]	179.034 2, 135.046 0
M2	7.92	咖啡酸	$C_{11}H_{10}O_5$	乙酰化	221.058 1 [$M-H^-$]	179.038 1, 151.039 9, 135.049 2
M3	2.61	甘草素	$C_{15}H_{12}O_7S$	硫酸酯化	335.007 3 [$M-H^-$]	255.050 3, 227.065 3
M4	11.43	甘草素	$C_{15}H_{12}O_5$	羟基化	271.050 5 [$M-H^-$]	243.069 2, 135.010 6
M5	19.49	甘草素	$C_{15}H_{10}O_6$	二次羟基化	287.040 9 [$M-H^-$]	151.039 9, 135.010 9
M6	10.39	毛蕊异黄酮	$C_{15}H_{10}O_8S$	去甲基化, 硫酸酯化	351.017 8 [$M+H^+$]	257.080 9, 137.024 4
M7	15.27	毛蕊异黄酮	$C_{15}H_{10}O_5$	去甲基化	271.086 7 [$M+H^+$]	243.072 7, 137.024 0
M8	20.93	毛蕊异黄酮	$C_{16}H_{12}O_4$	去羟基化	269.081 5 [$M+H^+$]	254.057 7, 137.033 4
M9	10.48	木樨草素	$C_{15}H_{10}O_8$	二次羟基化	317.030 2 [$M-H^-$]	299.020 2, 151.003 6
M10	19.75	木樨草素	$C_{16}H_{12}O_7$	羟基化, 甲基化	315.051 4 [$M-H^-$]	300.028 9, 146.965 2, 151.003 2
M11	21.93	木樨草素	$C_{15}H_{10}O_7$	羟基化	301.035 9 [$M-H^-$]	273.136 0, 241.0506, 151.003 1
M12	10.91	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_8$	羟基化	317.030 6 [$M-H^-$]	255.029 6, 151.003 4
M13	19.51	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_6$	去羟基化	285.040 9 [$M-H^-$]	255.029 6, 151.003 1
M14	19.89	槲皮素	$C_{16}H_{12}O_7$	甲基化	315.051 1 [$M-H^-$]	300.028 0, 135.008 0, 151.003 4
M15	12.29	芒柄花素	$C_{15}H_{10}O_7$	去甲基化, 三次羟基化	301.035 9 [$M-H^-$]	273.041 0, 257.045 8, 135.023 7
M16	17.05	芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_5$	羟基化	285.076 4 [$M+H^+$]	225.054 0, 214.063 0, 137.024 0
M17	19.69	芒柄花素	$C_{15}H_{10}O_6$	去甲基化, 二次羟基化	285.040 9 [$M-H^-$]	257.045 6, 135.023 4
M18	20.12	芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_7$	三次羟基化	315.050 8 [$M-H^-$]	300.028 0, 271.024 1, 151.003 1
M19	17.04	山柰酚	$C_{16}H_{12}O_5$	去羟基化, 甲基化	283.061 6 [$M-H^-$]	268.038 1, 240.042 5, 151.003 2
M20	27.94	黄芪甲苷	$C_{35}H_{57}O_9$	脱葡萄糖基化	623.400 6 [$M+H^+$]	487.344 2, 147.047 3
M21	27.37	黄芪甲苷	$C_{36}H_{59}O_{10}$	脱木糖基化	675.505 7 [$M+Na^+$]	627.374 7, 487.342 4

例, 保留时间为 9.28 min, 分子式为 $C_{21}H_{32}O_{15}$, 负离子模式下其准分子离子为 m/z 523.166 6 [$M-H^-$]⁻, 丢失一分子 H_2O 得到碎片离子 m/z 505.157 1, 继续丢失一分子葡萄糖基得到碎片离子 m/z 343.102 8, 准分子离子丢失一分子葡萄糖基后继续脱去环戊烯并二氢吡喃结构得到碎片离子 m/z 179.052 8, 通过精确分子量、碎片离子信息^[10-11]推测为蜜力特昔, 二级质谱见图 2, 可能裂解途径见图 3。根据上述裂解规律结合文献[10], 还鉴定得到其他 3 个环烯醚萜苷类化合物。

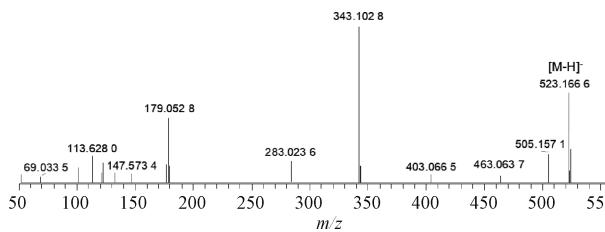


图 2 蜜力特昔 MS/MS 图

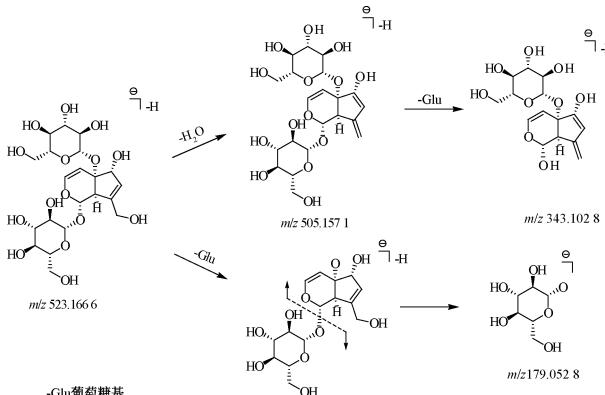


图 3 蜜力特昔可能裂解途径

3.1.3 黄酮类 共鉴定得到 9 个, 其中化合物 9、12、15 经对照品比对保留时间、精确分子量、碎片离子分别确认为毛蕊异黄酮、山柰酚、芒柄花素。以化合物 9 为例, 准分子离子为 m/z 285.076 5 [$M+H^+$]⁺, 丢失 15 Da 得到碎片离子 m/z 270.052 9, 推测为脱 CH_3 , 丢失 28 Da 得到碎片离子 m/z 257.049 8, 推测为脱 CO , 发生 RDA 裂解反应得到碎片离子 m/z 137.023 5。毛蕊异黄酮二级质谱见图 4, 可能裂解途径见图 5。根据上述裂解规律结合文献碎片离子等信息, 还鉴定得到其他 6 个黄酮类化合物^[12]。

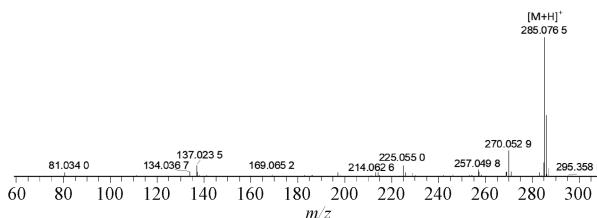


图 4 毛蕊异黄酮 MS/MS 图

3.1.4 三萜皂苷类 共鉴定得到 1 个, 即化合物 13, 通过对照品比对保留时间、精确分子量、碎片离子等信息确认

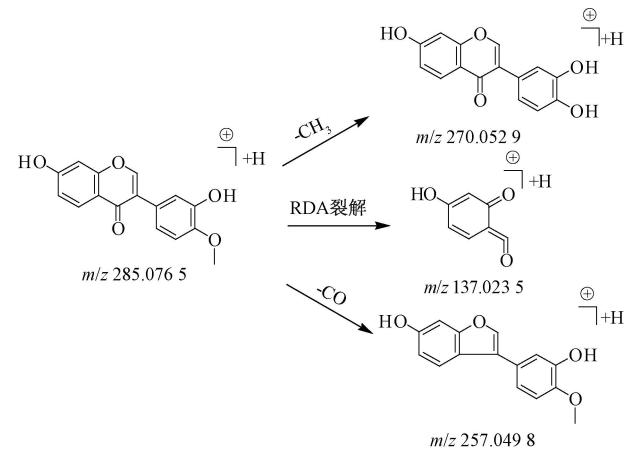


图 5 毛蕊异黄酮可能裂解途径

为黄芪甲苷, 保留时间为 19.83 min, 正离子模式下准分子离子为 m/z 807.452 3 [$M+Na^+$]⁺, 碎片离子 m/z 627.389 4 比准分子离子少 180 Da, 为丢失一分子 H_2O 、一分子葡萄糖基, 碎片离子 m/z 495.346 1 比碎片离子 m/z 627.389 4 少 132 Da, 为继续丢失一分子木糖基。化合物 13 二级质谱见图 6, 可能裂解途径见图 7。

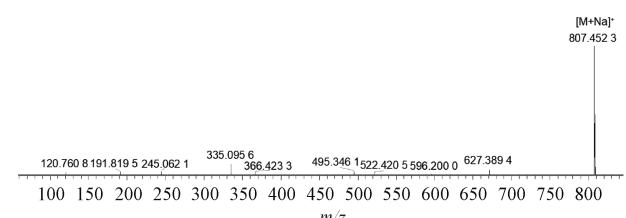


图 6 黄芪甲苷 MS/MS 图

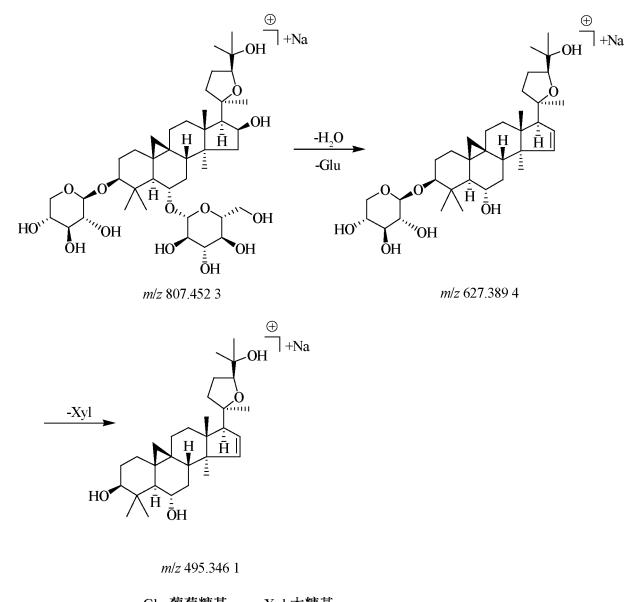


图 7 黄芪甲苷可能裂解途径

3.2 代谢产物鉴定 共鉴定得到 21 种入血代谢产物^[13-16]。以咖啡酸、木犀草素为例, 说明代谢物推测过程。

3.2.1 咖啡酸 根据质谱裂解途径结合代谢产物的二级质

谱数据及文献[13]，推测咖啡酸在体内可能的代谢途径有羟基化、甲基化、乙酰化，具体见图8。以代谢物M2为例，保留时间为7.92 min，负离子模式下其准分子离子为 m/z 221.058 1 [$M-H^-$]，碎片离子 m/z 179.038 1与准分子离子相差42 Da， m/z 179.038 1为咖啡酸在负离子模式下的典型母离子，推测代谢物M2为咖啡酸乙酰化的产物，结合碎片离子 m/z 151.039 9为 m/z 179.038 1中性丢失一分子CO所得，碎片离子 m/z 135.049 2为 m/z 179.038 1中性丢失一分子CO₂所得，推测代谢物M2为咖啡酸乙酰化的产物。代谢物M2和咖啡酸在负离子模式下的MS/MS镜像谱见图9，可能裂解途径见图10。

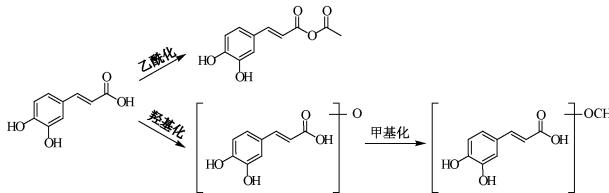


图8 咖啡酸体内代谢途径

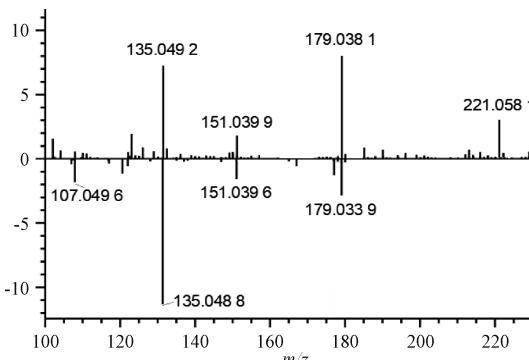


图9 咖啡酸及其代谢物M2负离子模式下的质谱对比像图

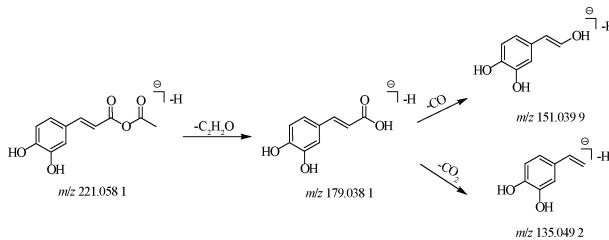


图10 咖啡酸代谢物M2可能裂解途径

3.2.2 木犀草素代谢产物 根据质谱裂解规律、代谢产物的二级质谱数据结合文献[16]，鉴定了3个人血的代谢产物，代谢途径见图11。以代谢物M11为例，在负离子模式下的准分子离子为 m/z 301.035 9 [$M-H^-$]，比木犀草素的准分子离子 m/z 285.041 0 [$M-H^-$]多了16 Da，推测可能为木犀草素羟基化产物；准分子离子为 m/z 301.035 9丢失一分子CO得到碎片离子 m/z 273.136 0，丢失一分子CO₂得到碎片离子 m/z 241.050 6，代谢物M11有黄酮类化合物发生RDA裂解的特征碎片离子 m/z 151.003 1，推测为木犀草素发生羟基化反应的产物。但由于木犀草素结构中A环、B

环、C环均易发生羟基化反应，故不能确定羟基化的具体位置。代谢物M11和木犀草素在负离子模式下的MS/MS镜像谱见图12，裂解途径见图13。

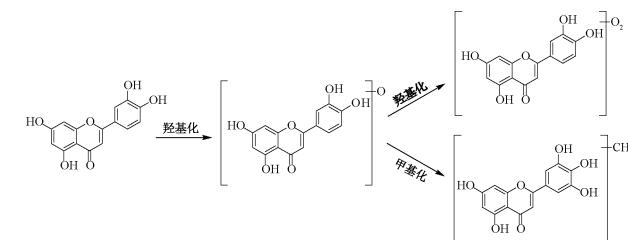


图11 木犀草素体内代谢途径

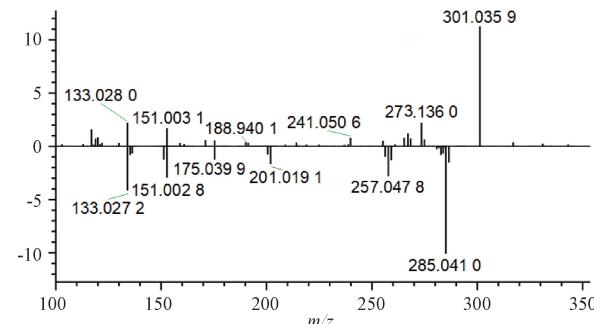


图12 木犀草素及其代谢物M11负离子模式下的质谱对比像图

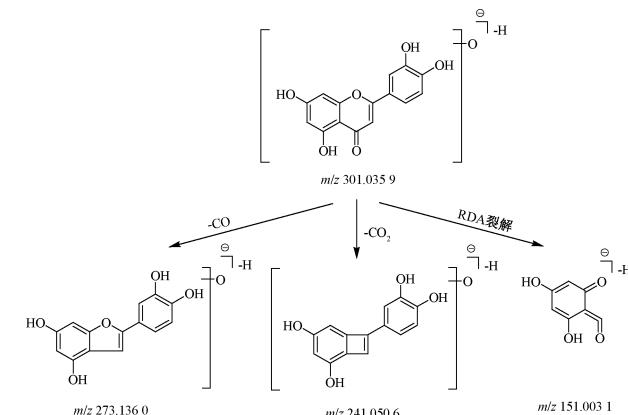


图13 木犀草素代谢物M11的裂解途径

4 讨论

本研究考察了大鼠灌胃给予芪蛭降糖胶囊后0、3、6、9、12 h的LC-MS出峰情况，发现部分峰仅在某一时间点出现，为得到更多化学成分信息，最终将各时间点样本混合进行分析。本研究还考察了多种血清样本制备方法，包括甲醇、乙腈沉淀蛋白、乙酸乙酯萃取的方法，通过比较不同处理方法的总离子流图中总峰数、总峰面积、峰分离度等，发现甲醇沉淀法得到的总峰数最多，内源性杂质干扰较少，峰分离较好，故最终选择甲醇沉淀法处理血清。

本研究从大鼠含药血清中共指认了36种入血成分，其中15种为原型成分，包括黄酮类化合物、酚酸类、三萜类、环烯醚萜苷类；21种为代谢产物，包括黄酮类、酚酸类、三萜皂苷类的代谢产物，涉及的I相代谢反应有羟基化、去甲基化、脱糖基，II相代谢反应有甲基

化、乙酰化、硫酸酯化。其中环烯醚萜苷类化合物的代谢产物未能检测到，可能是由于环烯醚萜苷类化合物容易代谢失去糖基得到苷元，而苷元极不稳定，易聚合或开环，现有技术手段难以检出和表征^[17]。

本研究鉴定的芪蛭降糖胶囊中入血成分对糖尿病及其并发症具有诸多药理活性，如黄酮类化合物能够通过调节靶向细胞信号网络有效降低血糖^[18]。酚酸类化合物可改善因线粒体通透性转换孔的开放、线粒体膜电位的破坏和线粒体活性氧水平升高引起的损伤，改善糖尿病性心肌病的线粒体功能障碍^[19]。环烯醚萜苷类化合物可抑制肾脏晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体/鞘氨醇激酶1信号通路的激活，抑制血清胰岛素水平降低和尿胰岛素水平升高^[20]。三萜皂苷类化合物黄芪甲苷可通过缓解氧化应激，延缓肾纤维化，抗凋亡和抗炎发挥肾脏保护作用^[21]。上述入血成分很可能就是芪蛭降糖胶囊在体内发挥药效作用的物质基础。

本研究通过采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法阐明芪蛭降糖胶囊的入血成分，初步明确芪蛭降糖胶囊的质量控制指标成分，为其质量标准的提升研究提供参考依据，也为其药理机制和药动学研究奠定基础。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：991.
- [2] 彭琳，陈远美，黄映红. 芪蛭降糖胶囊联合缬沙坦治疗早期糖尿病肾病的疗效观察 [J]. 中医药导报，2014，20(7)：37-39.
- [3] 郭兆安，孟凡辰，于春江，等. 芪蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏结构和功能的影响 [J]. 中国医药科学，2015，5(1)：31-36.
- [4] 史静超，柴智，杨丽. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定芪蛭降糖胶囊中 6 种成分的含量 [J]. 中华中医药杂志，2018，33(10)：4627-4630.
- [5] 史静超，张淑蓉，柴智，等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术的芪蛭降糖胶囊化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(16)：116-123.
- [6] 王喜军，张伯礼. 基于药物代谢组学的方剂配伍规律及配伍科学价值揭示 [J]. 中国中药杂志，2010，35(10)：1346-1348.
- [7] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究 [J]. 世界科学技术（中医药现代化），2002，4(2)：1-4；78.
- [8] Liu Q, Liu J H, Fan S J, et al. Rapid discovery and global characterization of multiple components in corn silk using a multivariate data processing approach based on ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(21)：4022-4030.
- [9] 郑单单，魏文峰，霍金海，等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的芪风固表颗粒血清药物化学研究 [J]. 中草药，2021，52(3)：643-652.
- [10] 张波泳，江振作，王跃飞，等. UPLC/ESI-Q-TOFMS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药，2016，38(5)：1104-1108.
- [11] 李存满，骆亚薇，田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展 [J]. 河北师范大学学报（自然科学版），2015，39(6)：522-526.
- [12] 李伟，冯育林，黎田儿，等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物 [J]. 质谱学报，2016，37(6)：504-516.
- [13] 魏文峰，陈宏昌，刘烨，等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的刺五加叶血清药物化学初步研究 [J]. 中草药，2017，48(7)：1306-1313.
- [14] 胡英还. 黄芪建中汤体内外化学成分研究 [D]. 太原：山西大学，2018.
- [15] 靳志东，李科，李爱平，等. 黄芪建中汤及其组方单味药化学成分与体内代谢研究进展 [J]. 中草药，2019，50(18)：4495-4501.
- [16] Han X, Wang S, Yang X X, et al. Analysis of plasma migration components in *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss. effective parts by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(1)：e4701.
- [17] 薛长松，徐晶，李萃萍，等. 环烯醚萜类化合物体内代谢及代谢物药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志，2018，43(1)：39-45.
- [18] 顾丽媛，唐海涛，孙云，等. 中药黄酮类化合物治疗糖尿病肾病的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36(12)：1729-1732.
- [19] Jubaidi F F, Zainalabidin S, Mariappan V, et al. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: the possible therapeutic roles of phenolic acids [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17)：6043.
- [20] Lv X, Dai G Y, Lv G H, et al. Synergistic interaction of effective parts in *Rehmanniae Radix* and *Cornus officinalis* ameliorates renal injury in C57BL/KsJ-db/db diabetic mice: involvement of suppression of AGEs/RAGE/SphK1 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185：110-119.
- [21] Zhou X T, Zou J J, Ao C, et al. Renal protective effects of astragaloside IV, in diabetes mellitus kidney damage animal models: a systematic review, meta-analysis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160(10)：105192.