

障眼明片浸膏在Beagle犬尿液和粪便中原型成分及代谢产物的分析

廖彦¹, 吴灏^{1*}, 何婷¹, 苏薇薇¹, 彭维¹, 胡佳佳²,
陈明瀚³, 谭艳丹³

(1. 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心, 广东省植物逆境生物学重点实验室, 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广州白云山中一药业有限公司, 广东 广州 510530; 3. 广州白云山奇星药业有限公司, 广东 广州 510530)

摘要: 采用超快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UFLC-Q-TOF-MS/MS)分析了障眼明片浸膏在Beagle犬尿液和粪便中的原型成分及代谢产物。色谱柱为Kinetex C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm), 以水-乙腈(均含0.1%甲酸, 体积分数)为流动相进行梯度洗脱, 流速为0.3 mL/min, 柱温为40 °C; 采用电喷雾离子源(ESI)正、负离子模式扫描, 结合保留时间、质谱碎片信息, 并与对照品、数据库和文献进行比较, 对化合物进行鉴定。在Beagle犬尿液、粪便中共鉴定出36个原型化合物和13个代谢成分, 主要包括I相代谢反应(氢化、脱葡萄糖化)和II相代谢反应(葡萄糖化、甲基化、木糖化、葡萄糖醛酸化、硫酸化)。该研究揭示了障眼明片浸膏化学成分在Beagle犬体内的代谢转化过程, 为阐明其药效物质基础与临床推广提供了依据。

关键词: 障眼明片浸膏; 超快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱; Beagle犬; 尿液; 粪便; 体内代谢

中图分类号: O657.7; R914.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)09-0001-10

Analysis of Prototype Compounds and Metabolites of Zhangyanming Tablet Extract in Beagle Dog Urine and Feces

LIAO Yan¹, WU Hao^{1*}, HE Ting¹, SU Wei-wei¹, PENG Wei¹, HU Jia-jia²,
CHEN Ming-han³, TAN Yan-dan³

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Stress Biology, Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation of Post-Marketed TCM, Guangzhou 510275, China; 2. Guangzhou Baiyunshan Zhongyi Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510530, China; 3. Guangzhou Baiyunshan Qixing Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510530, China)

Abstract: Ultra-fast liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UFLC-Q-TOF-MS/MS) was employed to analyze the prototype compounds and metabolites of Zhangyanming Tablet extract in the urine and feces of Beagle dogs. The mobile phase consisted of water and acetonitrile, both containing 0.1% formic acid (volume fraction). Gradient elution was performed on a Kinetex C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm) column, with a flow rate of 0.3 mL/min and the column temperature maintained at 40 °C. An electrospray ionization (ESI) source was used to scan the *m/z* range from 50 to 1 500 in both positive and negative ion modes. A total of 36 prototype compounds and 13 derived metabolites in Beagle dog urine and feces were characterized by analyzing retention time, MS fragments, reference standards, database, and literature data. The main metabolic reactions included phase I (hydrogenation, deglycosylation) and phase II reactions (glucosylation, methylation, xylosylation, glucuronidation, sulfation). This study revealed the *in vivo* metabolic biotransformation of Zhangyanming Tablet extract in Beagle dogs, providing scientific evidence and references for elucidating the pharmacologically active substances and facilitating clinical application of Zhangyanming Tablet.

Key words: Zhangyanming Tablet extract; UFLC-Q-TOF-MS/MS; Beagle dog; urine; feces; metabolism *in vivo*

障眼明片是由传统名方益气聪明汤和驻景丸改良而成的现代复方中药制剂,具有补益肝肾和退翳明目的功效,临床上被广泛用于治疗白内障和干眼等多种眼科疾病^[1]。障眼明片收载于中国药典,处方包含石菖蒲、决明子、肉苁蓉、葛根、青箱子、党参、蔓荆子、枸杞子、车前子、白芍、山茱萸、甘草、菟丝子、升麻、蕤仁、菊花、密蒙花、川芎、酒黄精、熟地黄、关黄柏、黄芪共 22 味中药材^[2],化学成分非常复杂,其复杂的化学成分可通过调节机体内的多种代谢酶而影响彼此的代谢。中药复方制剂各药味间存在相互作用,合理的中药配伍不仅能够改变各味组方药材药效成分的药代动力学参数,也可能使其对机体的毒性发生改变^[3],最终起到增强药效并降低毒性的双重收益。因此,系统研究中药复方制剂的化学成分及其体内吸收与代谢过程,对于阐明其药效物质基础和药理作用机制至关重要,同时也能为其组方“君、臣、佐、使”的配伍规律提供科学解释。

目前,关于障眼明片浸膏体内代谢转化的研究较少,尚未见其在尿液和粪便中代谢成分的研究。由于 Beagle 犬的药代动力学特征与人类更接近,常被推荐用于临床前的药代动力学研究^[4]。基于此,本研究采用超快速液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UFLC-Q-TOF-MS/MS)联用技术,系统研究障眼明片浸膏在 Beagle 犬尿液和粪便中的原型化合物及其代谢产物,以期阐明其药效物质基础和临床推广提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

LC-20A 超快速液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); Triple TOF 5600 plus 四极杆飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); ME204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Simplicity 超纯水机(美国 Millipore 公司); 5424R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司); Vortex 3 涡旋仪(德国 IKA 公司); ALPHA 1-4LD plus 冷冻干燥机(德国 Christ 公司); DW-86L338J 超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 材料与试剂

障眼明片浸膏(批号: CA1007)由广州白云山中一药业有限公司提供;对照品:葛根素(批号: 110752-201816,纯度: 95.4%)、马钱苷(批号: 111640-201808,纯度: 99.0%)、京尼平苷酸(批号: 111828-201805,纯度: 98.1%)、阿魏酸(批号: 110773-201915,纯度: 99.4%)、党参炔苷(批号: 111732-201908,纯度: 100.0%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(批号: A456-4)和乙腈(批号: A955-4)均为质谱纯,购自美国 Fisher Chemical 公司;甲酸(批号: 94318-250ML-F)为质谱纯,购自美国 Fluka Analytical 公司。

1.3 实验动物

本研究动物实验在广东莱恩医药研究院有限公司(实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2021-0246)进行,已通过伦理审批(审批号为 IA-TA20230602);实验动物为 Beagle 犬 6 只(雌雄各半),购自福州振和实验动物技术开发有限公司(实验动物生产许可证号 SCXK(闽)2018-0001);动物实验环境为恒温恒湿条件(温度范围为 21~23 °C,相对湿度范围为 40%~70%),保持 12 h 黑暗/光照循环。

1.4 对照品溶液的制备

分别取葛根素、马钱苷、京尼平苷酸、阿魏酸、党参炔苷对照品适量,用 75% 甲醇溶液配成质量浓度分别为 10.12、9.86、9.94、10.08、10.14 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

1.5 动物给药与生物样本的采集

实验开始前,Beagle 犬禁食 12 h。采集尿液 3 mL 和粪便样本 2 g,作为空白尿液、空白粪便对照组,随后给予障眼明片浸膏单次口服给药,剂量为 499.5 mg/kg。给药后,分别在 0~4、4~8、8~12、12~24、24~48 h 时间段采集尿液 3 mL 和粪便 2 g,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.6 生物样本的处理

1.6.1 尿液样本 取尿液 100 μL 置于离心管中,加入 200 μL 乙腈,涡旋 3 min,4 °C、13 000 g 离心 10 min,取离心后上清液适量,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得^[4]。

1.6.2 粪便样本 粪便在冷冻干燥机中干燥 24 h 后研磨成粉,取粪便粉末约 100 mg 置于离心管中,

加入生理盐水 2 mL, 涡旋 2 min 后超声(功率 300 W, 频率 40 kHz) 15 min, 4 °C、10 000 g 离心 1 min。取上清液 100 μ L 置于离心管中, 加入 200 μ L 乙腈, 涡旋 3 min, 4 °C、13 000 g 离心 10 min, 取离心后上清液适量, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得^[4]。

1.7 色谱及质谱条件

1.7.1 色谱条件 色谱柱为 Kinetex C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.6 μ m); 柱温 40 °C; 流速 0.3 mL/min; 流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。洗脱梯度如下: 0~30 min, 95%~5% A; 30~35 min, 5% A; 35~37 min, 5%~95% A; 37~45 min, 95% A。进样体积为 10 μ L^[4]。

1.7.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)进行扫描, 采集模式为信息依赖采集(IDA), 扫描参数如下: 正、负离子模式下离子喷雾电压(ISVF)分别为 5 500 V 和 4 500 V; 雾化气体(Gas 1)为 379.2 kPa; 加热气体(Gas 2)为 344.8 kPa; 帘式气体(CUR)为 241.3 kPa, 离子源温度(TEM)为 550 °C; 扫描范围为 m/z 50~1 500; 去簇电压(DP)为 80 V; 碰撞能量(CE)为 30 eV。

1.8 数据处理

采用 Peak View 和 Metabolite Pilot 软件对 Analyst 软件采集的质谱数据进行处理, 结合加合离子峰二级碎片信息, 并通过与对照品、Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 数据库(美国 AB SCIEX 公司)和参考文献对比, 综合分析鉴定原型化合物及其体内代谢成分。

2 结果与讨论

2.1 原型化合物和代谢产物鉴定

Beagle 犬灌胃给药障眼明片浸膏后, 其尿液和粪便在 UFLC-Q-TOF-MS/MS 正、负离子模式下的总离子流图(TIC)如图 1 和图 2 所示。结合保留时间、质谱碎片等信息, 并与对照品、数据库和相关参考文献进行对比, 对化合物进行鉴定分析, 结果见表 1。在 Beagle 犬尿液中共鉴定出 14 个原型成分和 9 个代谢产物, 包括 14 个黄酮类、6 个有机酸类、2 个萜类和 1 个苯酞类化合物。代谢类型主要包括 I 相代谢反应的脱葡萄糖化, 以及 II 相代谢反应的木糖化、葡萄糖化、葡萄糖醛酸化、甲基化和硫酸化。在 Beagle 犬粪便中共鉴定出 30 个原型成分和 5 个代谢成分, 包括 12 个有机酸类、8 个黄酮类、6 个萜类、5 个苯丙素类、2 个生物碱类、1 个甾体类和 1 个聚炔类化合物。代谢类型主要包括 I 相代谢反应的氢化和脱葡萄糖化, 以及 II 相代谢反应的甲基化和硫酸化。

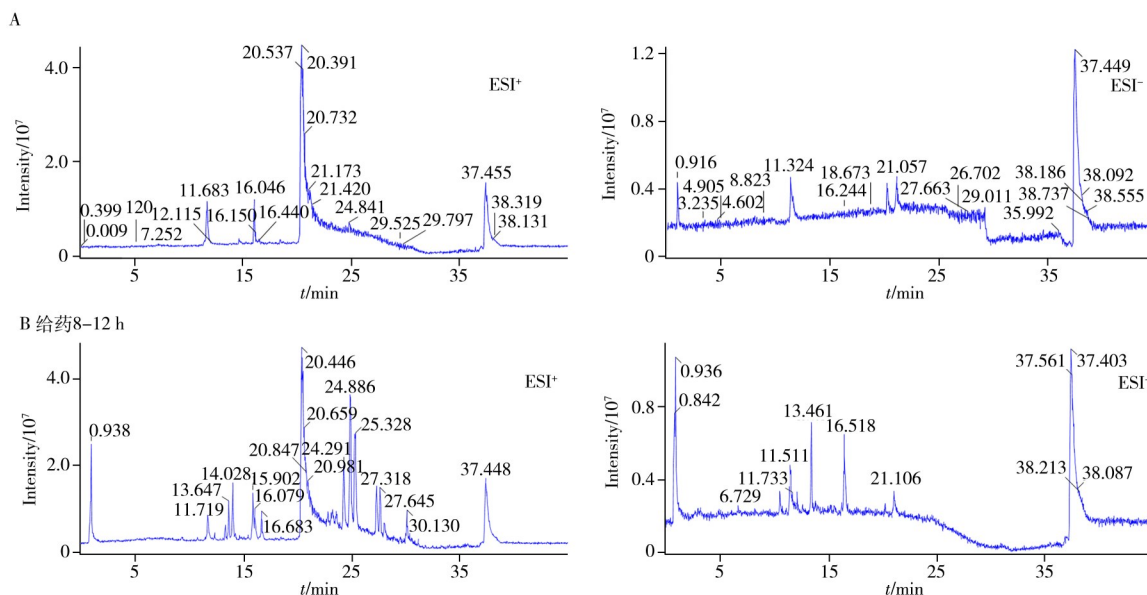


图1 Beagle犬空白尿液(A)和口服障眼明片浸膏后尿液(B)的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of blank urine(A) and urine after oral administration of Zhangyanming Tablet extract(B) in Beagle dogs

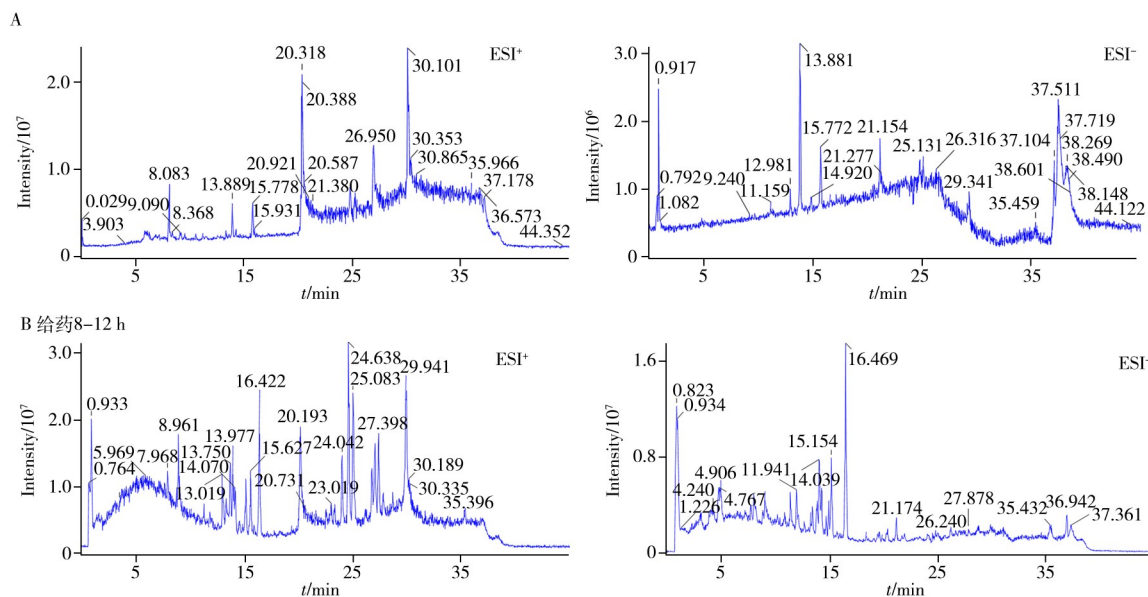


图 2 Beagle 犬空白粪便(A)和口服障眼明片浸膏后粪便(B)的总离子流图

Fig. 2 TIC of blank feces(A) and feces after oral administration of Zhangyanming Tablet extract(B) in Beagle dogs

表 1 Beagle 犬口服障眼明片浸膏后尿液与粪便中的原型成分及代谢产物鉴定

Table 1 Identification of prototype components and metabolites in Beagle dog urine and feces after oral administration of Zhangyanming Tablet extract

No.	Compound	Metabolic type	t_R /min	Formula	Adduct		MS/MS		Compound Biological type	sample	Herbal source
					ESI ⁺	ESI ⁻	ESI ⁺	ESI ⁻			
1	苹果酸	原型	0.94	C ₄ H ₆ O ₅	ND	133.014 3 ^c	ND	115.003 6 71.013 5	有机酸类	F	菟丝子
2	柠檬酸	原型	1.07	C ₆ H ₈ O ₇	ND	191.019 7 ^c	ND	87.008 7	有机酸类	U	甘草
3	肉苁蓉苷 F	原型	2.66	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	ND	487.145 7 ^c	ND	340.092 7 294.081 9	苯丙素类	F	肉苁蓉
4	原儿茶酸	原型	2.99	C ₇ H ₆ O ₄	ND	153.019 3 ^c	ND	109.028 8	有机酸类	F	熟地黄
5	高香草酸	原型	3.14	C ₉ H ₁₀ O ₄	ND	181.050 6 ^c	ND	137.061 9 122.037 5	有机酸类	F	菟丝子
6	咖啡酸	原型	3.70	C ₉ H ₈ O ₄	ND	179.035 0 ^c	ND	134.045 5 116.0437	有机酸类	F	菊花
6-M1	咖啡酸+甲基化	Ⅱ 相代谢	9.07	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ND	193.050 6 ^c	ND	179.024 8 134.036 5	有机酸类	F	ND
7	马钱苷*	原型	3.92	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	ND	435.150 8 ^d	ND	227.099 2	萜类	U	熟地黄
8	葛根素*	原型	3.99	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.118 ^a	415.103 5 ^c	297.075 4	295.063 1	黄酮类	U, F	葛根
8-M1	葛根素+木糖化	Ⅱ 相代谢	4.31	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	ND	547.145 7 ^c	ND	253.067 2	黄酮类	U	ND
9	管花肉苁蓉苷 C1	原型	4.05	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₁	ND	801.245 9 ^c	ND	783.231 0	苯丙素类	F	肉苁蓉
10	马钱苷酸	原型	4.13	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	ND	375.129 7 ^c	ND	212.088 2	萜类	F	党参
11	奎尼酸	原型	4.21	C ₉ H ₁₂ O ₆	ND	191.056 1 ^c	ND	147.065 5	有机酸类	F	菟丝子
12	降氧化北美黄莲次碱	原型	4.20	C ₁₀ H ₉ NO ₃	ND	190.051 0 ^c	ND	146.061 4	生物碱类	F	黄柏
13	黄柏碱	原型	4.35	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	ND	340.155 4 ^c	ND	325.135 0 310.110 7	生物碱类	F	黄柏
14	毛蕊异黄酮苷	原型	4.46	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 6 ^a	445.114 0 ^c	327.080 8	283.071 3 268.051 2 149.072 6	黄酮类	U	葛根
14-M1	毛蕊异黄酮苷-脱葡萄糖化	Ⅰ 相代谢	8.61	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	ND	283.061 2 ^c	ND	235.028 9	黄酮类	U	ND
14-M2	毛蕊异黄酮苷+葡萄糖醛酸化	Ⅱ 相代谢	9.65	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	ND	459.093 3 ^c	ND	283.060 9	黄酮类	U	ND
15	京尼平苷酸*	原型	4.47	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	ND	373.114 0 ^c	ND	211.061 3 193.071 2	萜类	U	车前子
16	氢化芍药苷	原型	13.81	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₁	ND	481.171 5 ^c	ND	449.139 5	萜类	F	白芍
17	肉桂酸	原型	4.56	C ₉ H ₈ O ₂	ND	147.045 2 ^c	ND	103.054 9	有机酸类	U, F	白芍
18	车前子苷	原型	4.82	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	ND	639.193 1 ^c	ND	621.183 0 161.024 0	苯丙素类	F	车前子
19	对香豆酸	原型	4.93	C ₉ H ₈ O ₃	ND	163.040 1 ^c	ND	119.050 8	有机酸类	U, F	枸杞子

(续表1)

No.	Compound	Metabolic type	t_R /min	Formula	Adduct		MS/MS		Compound type	Biological sample	Herbal source
					ESI ⁺	ESI ⁻	ESI ⁺	ESI ⁻			
20	阿魏酸 [*]	原型	5.63	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ND	193.050 6 ^c	ND	178.028 5 133.042 5	有机酸类	U, F	党参
20-M1	阿魏酸+氢化	I相代谢	4.79	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	ND	195.066 3 ^c	ND	178.025 9	有机酸类	F	ND
20-M2	阿魏酸+甲基化	II相代谢	8.90	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	209.080 8 ^a	ND	195.902 1	ND	有机酸类	U	ND
21	甘草素	原型	8.22	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	ND	255.066 3 ^c	ND	133.008 0	黄酮类	U, F	甘草
21-M1	甘草素+葡萄糖化+葡萄糖醛化	II相代谢	5.64	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	ND	431.098 4 ^c	ND	255.066 9	黄酮类	U	ND
22	管花苷A	原型	6.01	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₁	ND	827.261 5 ^c	ND	665.233 2	苯丙素类	F	肉苁蓉
23	2'-乙酰基金石蚕苷	原型	6.57	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₀	ND	811.266 6 ^c	ND	665.196 5	苯丙素类	F	菟丝子
24	芒柄花素	原型	11.72	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	ND	267.066 3 ^c	ND	252.044 8	黄酮类	U, F	黄芪
24-M1	芒柄花素+葡萄糖化+葡萄糖醛化	II相代谢	7.87	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	ND	443.098 4 ^c	ND	267.067 1	黄酮类	U	ND
25	大豆苷元	原型	8.31	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	ND	253.050 6 ^c	ND	224.053 9	黄酮类	U, F	葛根
25-M1	大豆苷元+硫酸化	II相代谢	11.62	C ₁₅ H ₁₀ SO ₇	333.007 5 ^a	ND	255.051 9	ND	黄酮类	U	ND
25-M2	大豆苷元+葡萄糖化+葡萄糖醛化	II相代谢	4.91	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	ND	429.082 7 ^c	ND	253.052 4	黄酮类	U	ND
26	洋川芎内酯G	原型	8.83	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	226.117 2 ^b	207.102 7 ^c	191.106 4	163.039 9	苯酚类	U	川芎
27	木犀草苷	原型	6.88	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	ND	447.093 3 ^c	ND	285.059 4 153.026 3 135.052 5	黄酮类	U	菟丝子
27-M1	木犀草苷-脱葡萄糖化+硫酸化	II相代谢	8.39	C ₁₅ H ₁₀ SO ₉	ND	364.997 3 ^c	ND	285.036 7	黄酮类	U, F	ND
27-M2	木犀草苷-脱葡萄糖化+甲基化	II相代谢	10.88	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	ND	299.056 1 ^c	ND	284.033 9	黄酮类	F	ND
27-M3	木犀草苷-脱葡萄糖化+硫酸化+甲基化	II相代谢	8.61	C ₁₆ H ₁₂ SO ₉	ND	379.012 9 ^c	ND	284.034 8	黄酮类	F	ND
28	薯蓣皂苷	原型	9.85	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	ND	913.480 2 ^d	ND	867.315 3	甾体类	F	肉苁蓉
29	阿魏酸乙酯	原型	11.48	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	ND	221.081 9 ^c	ND	121.029 0 77.038 9	有机酸类	U, F	黄芪
30	新苦参醇	原型	12.15	C ₂₇ H ₃₄ O ₇	ND	469.223 2 ^c	ND	423.284 4	黄酮类	F	党参
31	黄芪皂苷II	原型	12.89	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	ND	871.469 7 ^c	ND	825.458 1	萜类	F	黄芪
32	柠檬苦素	原型	16.04	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	ND	469.186 8 ^c	ND	425.197 3	萜类	F	黄柏
33	Tataroside	原型	16.16	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀	ND	443.192 3 ^c	ND	397.192 0	萜类	F	石菖蒲
34	黄柏酮	原型	16.52	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	ND	453.191 9 ^c	ND	436.184 2	萜类	F	黄柏
35	党参炔苷 [*]	原型	17.34	C ₂₀ H ₂₈ O ₈	ND	441.176 6 ^d	ND	395.174 3	聚炔类	F	党参
36	α -亚麻酸	原型	23.31	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	ND	277.217 3 ^c	ND	162.973 1	有机酸类	F	决明子

*validated by standards; a, b, c, d represent the adduct ion forms of [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺, [M-H]⁻, [M+HCOO]⁻, respectively; U and F represent urine and feces, respectively; ND represents not detected (*表示对照品验证; a、b、c、d分别代表[M+H]⁺、[M+NH₄]⁺、[M-H]⁻、[M+HCOO]⁻加合离子形式; U、F分别代表尿液、粪便; ND代表未检出)

2.2 原型成分鉴定

2.2.1 黄酮类成分 黄酮类是以C6(A环)-C3(C环)-C6(B环)为母核结构的天然产物,主要包括黄酮、异黄酮、二氢黄酮和黄酮醇,在质谱裂解过程中常发生RDA反应产生特征性离子碎片^[5]。以化合物14为例,其在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 445.114 0 [M-H]⁻,首先脱去1分子葡萄糖基产生离子碎片 m/z 283.071 3 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻,随后脱去1个甲基产生 m/z 268.051 2 [M-H-C₆H₁₀O₅-CH₃]⁻离子碎片,或发生RDA裂解反应生成 m/z 149.072 6和 m/z 137.110 1的特征性离子碎片,结合上述二级离子碎片信息及质谱裂解信息和文献报道^[6],鉴定化合物14为毛蕊异黄酮苷。化合物27在负离子模式下产生 m/z 447.093 3 [M-H]⁻的准分子离子峰,脱去葡萄糖基后产生苷元离子碎片 m/z 285.059 4 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻,再发生RDA裂解产生离子碎片 m/z 153.026 3和 m/z 135.052 5,与文献报道相符^[7],鉴定其为木犀草苷。

2.2.2 萜类成分 萜类是由异戊二烯或异戊烷通过各种方式连接而成的天然化合物,主要包括单萜、二萜、三萜和环烯醚萜等,在质谱裂解过程中常发生二氢吡喃环和糖环裂解得到特征性离子碎片^[8]。化合物7在负离子模式下加合1个HCOO⁻产生 m/z 435.150 8 [M+HCOO]⁻的加合离子峰,脱去1分子葡萄糖基产生离子碎片 m/z 227.099 2 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻,通过与对照品质谱信息比对,鉴定其为马钱苷。化

合物 15 在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 373.114 0 $[M-H]^-$, 首先脱去葡萄糖基产生 m/z 211.061 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 离子碎片, 然后脱去 1 分子水产生 m/z 193.071 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$ 离子碎片, 结合上述质谱裂解信息和对照品比对, 鉴定化合物 15 为京尼平苷酸。

2.2.3 有机酸类成分 有机酸类广泛存在于多种中草药中, 含有 1 个或多个羧酸基团, 在质谱裂解过程中常丢失 $COOH$ 、 CO_2 和 H_2O 等碎片^[9]。以化合物 6 为例, 其在负离子模式下产生 m/z 179.035 0 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 脱去 1 分子羧基产生离子碎片 m/z 134.045 5 $[M-H-COOH]^-$, 继续丢失 1 个水分子后产生 m/z 116.043 7 $[M-H-COOH-H_2O]^-$ 离子碎片, 与文献报道相符^[10], 鉴定其为咖啡酸。以化合物 20 为例, 其在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 193.050 6 $[M-H]^-$, 丢失 1 分子甲基生成离子碎片 m/z 178.028 5 $[M-H-CH_3]^-$, 继续脱去 1 个羧基产生 m/z 133.042 5 $[M-H-CH_3]^-$ 离子碎片, 与对照品的二级质谱信息一致, 鉴定其为阿魏酸。

2.2.4 苯丙素类成分 苯丙素类是以 C6~C3 为母核结构的化合物, 主要包括苯丙酸类和香豆素类, 在质谱裂解过程中常失去甲基和甲氧基等离子碎片。化合物 3 在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 487.145 7 $[M-H]^-$, 失去 1 分子鼠李糖产生 m/z 340.092 7 $[M-H-C_6H_{10}O_4]^-$ 离子碎片, 继续脱去 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO 产生离子碎片 m/z 294.081 9 $[M-H-C_6H_{10}O_4-H_2O-CO]^-$, 与文献报道相符^[11], 鉴定其为肉苁蓉苷 F。以化合物 22 为例, 其在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 827.261 5 $[M-H]^-$, 脱去 1 分子葡萄糖基产生 m/z 665.233 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 离子碎片, 继续脱去 1 分子鼠李糖生成离子碎片 m/z 518.142 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_4]^-$, 与文献报道相符^[12], 鉴定其为管花苷 A。

2.2.5 生物碱类成分 生物碱类是一类含氮的碱性化合物, 其结构非常多元, 质谱裂解特征也非常丰富。化合物 12 在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 190.051 0 $[M-H]^-$, 丢失 1 分子 CO 和 NH 后产生 m/z 147.057 1 $[M-H-CO-NH]^-$ 离子碎片, 与文献报道一致^[13], 鉴定其为降氧化北美黄连次碱。以化合物 13 为例, 其在负离子模式下产生 m/z 340.155 4 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 随后连续丢失 2 个甲基分别产生 m/z 325.135 0 $[M-H-CH_3]^-$ 和 m/z 310.110 7 $[M-H-2CH_3]^-$ 离子碎片, 结合文献报道^[14], 鉴定其为黄柏碱。

2.3 代谢产物鉴定

2.3.1 I 相代谢产物 I 相代谢主要包括氧化、还原或者水解等反应类型, 能够引入或暴露出中成药原型成分的极性官能团, 使其极性增加, 为后续的 II 相代谢反应提供基础^[15]。I 相代谢主要通过细胞色素 P450 酶介导催化完成, 能够改变中成药复杂成分的生理活性, 或为增加药效, 或为降低毒性。以化合物 20-M1 为例, 其在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 195.066 3 $[M-H]^-$, 比化合物 20 (阿魏酸) 的准分子离子峰大 2 Da, 推测其为阿魏酸的氢化代谢产物, 分子式为 $C_{10}H_{12}O_4$, 其丢失 1 分子 OH 后产生二级碎片 m/z 178.025 9 $[M-H-OH]^-$, 与文献报道相符^[16], 鉴定其为阿魏酸的氢化代谢产物。其二级质谱图与裂解途径见图 3。

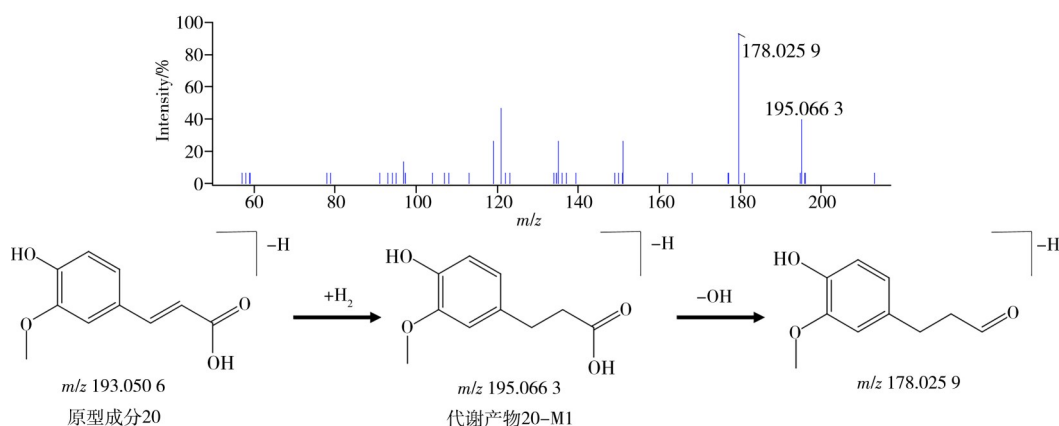


图 3 代谢产物 20-M1 的二级质谱图及裂解途径

Fig. 3 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of metabolite 20-M1

化合物14-M1在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 283.061 2 $[M-H]^-$, 比化合物14(毛蕊异黄酮苷)的准分子离子峰小162 Da, 推测其为毛蕊异黄酮苷脱去1分子葡萄糖基的代谢产物, 分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 继续脱去1分子羟基和1分子甲氧基后产生二级碎片 m/z 235.028 9 $[M-H-OH-CH_3O]^-$, 结合文献报道^[17], 鉴定其为毛蕊异黄酮苷的脱葡萄糖基代谢产物毛蕊异黄酮。其二级质谱图与裂解途径见图4。

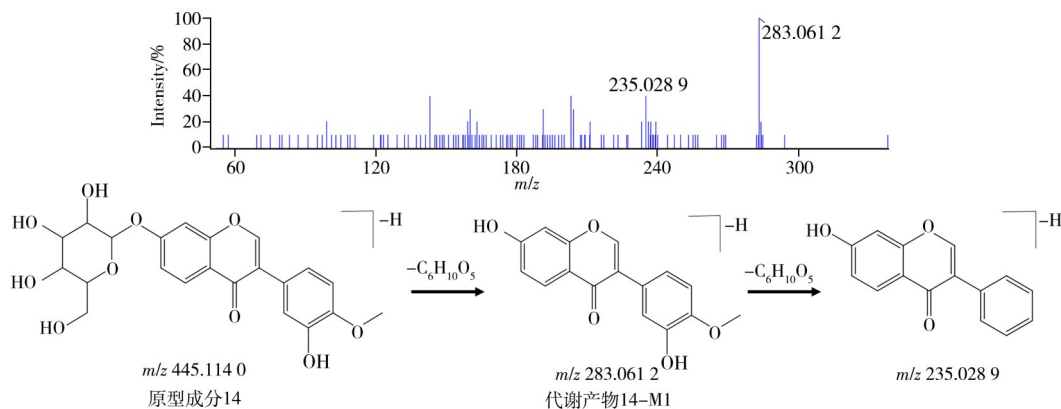


图4 代谢产物14-M1的二级质谱图及裂解途径

Fig. 4 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of metabolite 14-M1

2.3.2 II 相代谢产物 II相代谢又称为结合反应, 通常由尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶和谷胱甘肽S-转移酶等催化完成, 能够使底物与葡萄糖醛酸、硫酸和谷胱甘肽等内源性物质发生偶联反应, 以增加前者的水溶性, 促进其通过尿液或粪便排出体外, 可降低中成药复杂成分尤其是毒性成分在体内的蓄积^[18]。以化合物6-M1为例, 其在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 193.050 6 $[M-H]^-$, 比化合物6(咖啡酸)的准分子离子峰大14 Da, 推测其为咖啡酸发生甲基化产生的代谢产物, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 进一步脱去1分子 CH_3 和1分子 $COOH$ 产生二级碎片 m/z 134.036 5 $[M-H-CH_3-COOH]^-$, 与文献报道相符^[19], 鉴定其为咖啡酸的甲基化代谢产物。其二级质谱图与裂解途径见图5。

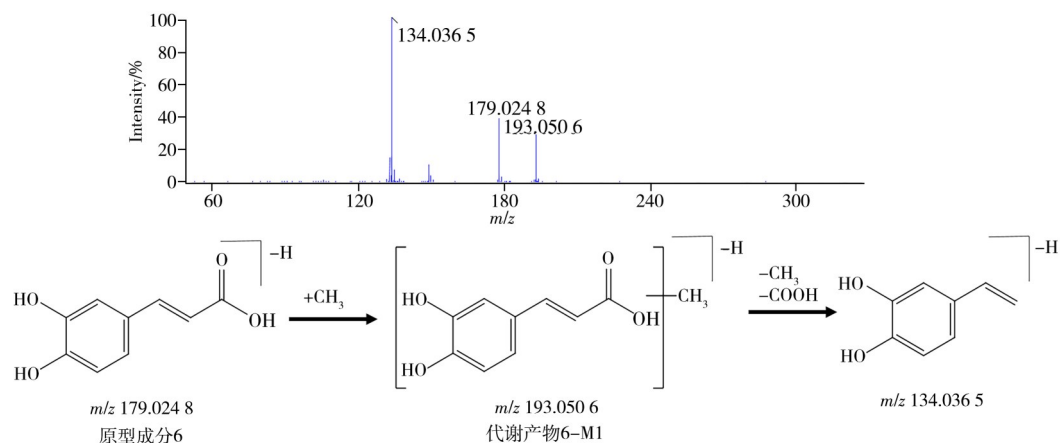


图5 代谢产物6-M1的二级质谱图及裂解途径

Fig. 5 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of metabolite 6-M1

化合物8-M1在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 547.145 7 $[M-H]^-$, 比化合物8(葛根素)的准分子离子峰大132 Da, 推测其为葛根素结合1分子木糖基的代谢产物, 分子式为 $C_{26}H_{28}O_{13}$, 连续脱去1分子木糖基和1分子葡萄糖基后产生二级碎片 m/z 253.067 2 $[M-H-C_5H_8O_4-C_6H_{10}O_5]^-$, 结合文献报道^[20], 鉴定其为葛根素的木糖化代谢产物。

以化合物25-M1为例, 其在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 333.007 5 $[M+H]^+$, 比化合物25(大豆苷元)的准分子离子峰大78 Da, 推测其为大豆苷元发生硫酸化产生的代谢产物, 分子式为 $C_{15}H_{10}SO_7$, 脱去1分子 SO_3 后产生二级碎片 m/z 255.051 9 $[M+H-SO_3]^+$, 与文献报道相符^[21], 鉴定其为大

大豆苷元的硫酸化代谢产物。除了硫酸化代谢反应之外,大豆苷元还会发生葡萄糖化和葡萄糖醛酸化代谢反应,产生代谢产物 25-M2。化合物 25-M2 在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 429.082 7 $[M-H]^-$, 比大豆苷元的准分子离子峰大 176 Da, 推测其分子式为 $C_{21}H_{18}O_{10}$, 脱去 1 分子葡萄糖醛酸基后产生二级碎片 m/z 253.052 4 $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, 结合文献报道^[21], 鉴定其为大豆苷元的葡萄糖化和葡萄糖醛酸化代谢产物, 其二级质谱图与裂解途径见图 6。

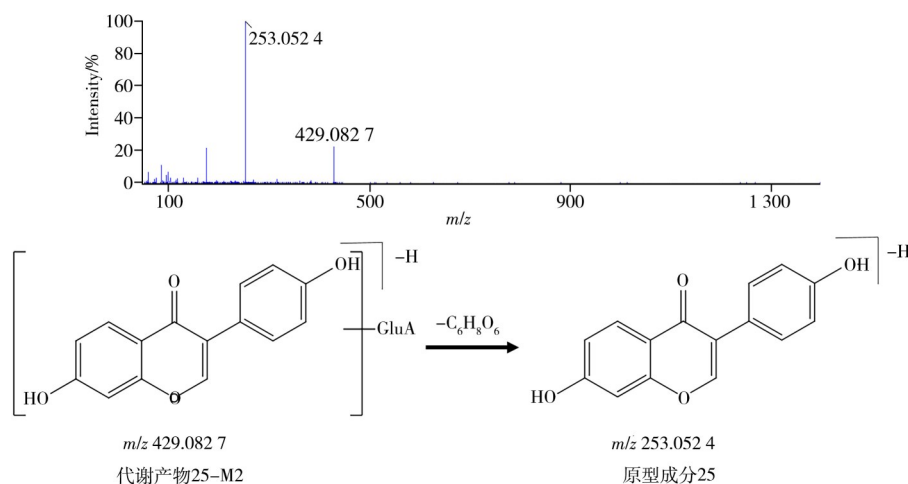


图 6 代谢产物 25-M2 的二级质谱图及裂解途径

Fig. 6 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of metabolite 25-M2

2.4 讨论

体内生物代谢转化对中成药的质量和药效评价至关重要, 体内药代动力学行为和代谢方式与其药效或毒性的产生和强弱密切相关。转运体和代谢酶主要介导中成药在体内的生物转化, 是药效成分在体内发生变化的重要影响因素^[22]。Beagle 犬口服障眼明目片浸膏后, 其体内代谢过程多样, 其中, 咖啡酸的代谢产物有 1 个, 为其甲基化产物 6-M1; 葛根素发生 II 相代谢反应结合 1 分子木糖产生 8-M1; 毛蕊异黄酮苷通过失去 1 分子葡萄糖基产生其苷元 14-M1, 或发生葡萄糖醛酸化产生代谢产物 14-M2; 阿魏酸的代谢产物有 2 个, 分别为其氢化产物 20-M1 和甲基化产物 20-M2; 甘草素和芒柄花素均结合 1 分子葡萄糖后发生葡萄糖醛酸化, 分别生成代谢产物 21-M1 和 24-M1; 大豆苷元主要发生 II 相代谢反应, 可发生硫酸化产生代谢产物 25-M1, 或发生葡萄糖化和葡萄糖醛酸化得到代谢产物 25-M2; 木犀草苷首先水解脱去 1 分子葡萄糖产生其苷元, 随后发生硫酸化反应得到代谢产物 27-M1, 或发生甲基化反应产生 27-M2; 上述化合物的代谢途径见图 7。

黄酮类化合物进入体内后, 较少以原型形式存在, 或被水解代谢为苷元和酚酸类物质后吸收, 或经硫酸化和葡萄糖醛酸化等 II 相代谢反应后排泄出体外^[19]。与大多数糖苷类化合物类似, 毛蕊异黄酮苷和木犀草苷等黄酮苷类原型化合物在体内首先被肠道微生物分泌的 β -糖苷酶水解为苷元, 可增强原型成分的疏水性并提高其生物利用度, 从而发挥多种生物活性, 如毛蕊异黄酮苷被水解代谢成苷元毛蕊异黄酮后, 可有效降低甘油三酯等脂质的积累, 具有良好的保肝作用^[23]; 葛根素可能通过抑制 I κ B α /NF- κ B p65 信号轴改善非酒精性脂肪肝^[24], 葛根素发生木糖化后可提高其在体内的转运效率, 可能与提高其生物活性有关; 提示肠道微生物与黄酮苷类化合物在体内存在密切的相互作用。此外, 酚酸类化合物常在胃肠道被吸收后进入体内循环, 该类化合物多发生甲基化和葡萄糖醛酸化等代谢反应后被排泄出体外^[25]。本研究发现原儿茶酸、咖啡酸、奎尼酸等酚酸类成分仅通过 Beagle 犬粪便排泄, 表明这些成分的生物利用度相对较低。这些酚酸在胃肠道中大量存在, 会与多种肠道微生物发生相互作用, 提示肠道微生物不仅在中成药的生物转化中发挥关键作用, 还可能参与调节其体内生物活性^[26]。研究报道, 阿魏酸在肠道微生物的作用下, 发生氢化反应被代谢为二氢阿魏酸, 随后被进一步代谢为对羟基苯丙酸等小分子酚酸, 进而发挥抗病毒、抗炎和抗氧化等生物活性^[27-28]。

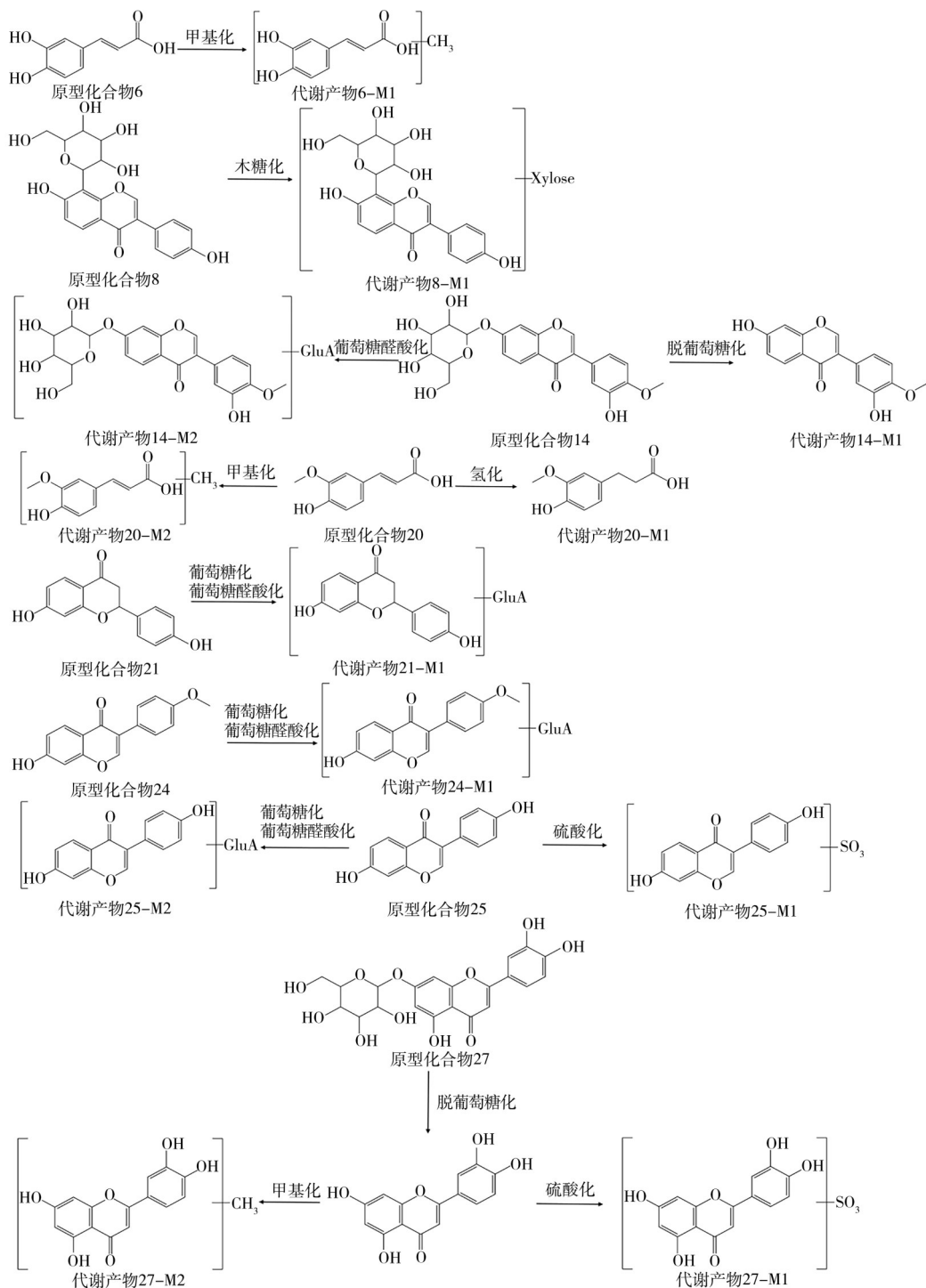


图7 Beagle犬口服障眼明片浸膏后尿液和粪便中化合物的代谢途径

Fig. 7 Proposed metabolic pathways of compounds in Beagle dog urine and feces after oral administration of Zhangyanming Tablet extract

3 结论

本研究首次采用UFLC-Q-TOF-MS/MS对Beagle犬口服障眼明片浸膏后尿液和粪便中的原型成分及代谢产物进行系统的分析和鉴定,共鉴定出36个原型化合物和13个代谢成分,包括17种黄酮类、14种有机酸类、8种萜类、5种苯丙素类、2种生物碱类和3种其他类化合物,主要代谢反应包括氢化、脱葡萄糖化等I相代谢,以及葡萄糖化、甲基化、木糖化、葡萄糖醛酸化、硫酸化等II相代谢反应。本研究对阐明障眼明片的药理机制、安全性评价及临床应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Xu J. *Res. Integr. Tradit. Chin. West. Med.* (徐佳. 中西医结合研究), **2024**, 16(6): 406–408.
- [2] National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part I)*. Beijing: China Medical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部. 北京: 中国医药科技出版社), **2025**: 1860–1861.
- [3] Zhao Y N, Chen Y K, Chen Q, Qiao L S, Zhang J F, Cai L Y, Pei Y L, Zhang Y L. *China J. Chin. Mater. Med.* (赵亚楠, 陈艳昆, 陈茜, 乔连生, 张景芳, 蔡涟漪, 裴艳玲, 张燕玲. 中国中药杂志), **2020**, 45(4): 923–931.
- [4] He Y, Su W, Chen T, Zeng X, Yan Z, Guo J, Yang W, Wu H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2019**, 176: 112806.
- [5] Xiao S P, Li L M, Xie B, Liang H, Yin Q, Li J H, Du J, Wang J Y, Zhao R H, Xu Y Q, Sun Y B, Lu Z Y, Tu P F. *China J. Chin. Mater. Med.* (肖苏萍, 李龙妹, 谢彬, 梁鸿, 殷琼, 李建会, 杜杰, 王继永, 赵润怀, 徐艳琴, 孙云波, 卢宗元, 屠鹏飞. 中国中药杂志), **2025**, 50(11): 3054–3069.
- [6] Huang J, Liao J Z, Liu W P, Liao S Y, Chen H Y, Rui W. *Guangdong Chem. Ind.* (黄晶, 廖婧竹, 刘武平, 廖双叶, 陈宏远, 芮雯. 广东化工), **2017**, 44(9): 50–52.
- [7] Wang M N, Cao Y G, Wei Y X, Ren Y J, Liu Y L, Chen X, He C, Zheng X K, Feng W S. *Nat. Prod. Res.*, **2022**, 36(13): 3317–3323.
- [8] Gong J H, Xiang J, Zou J D, Zhou Q, Li C Y. *J. Instrum. Anal.* (拱佳慧, 向杰, 邹建东, 周青, 李长印. 分析测试学报), **2025**, 44(5): 822–835.
- [9] Nie Y S, Peng X, Ma X, Liu C H, Chen S Y, Li Y T, Wang Y L. *Chin. Tradit. Pat. Med.* (聂雨杉, 彭潇, 马雪, 刘春花, 陈思颖, 李月婷, 王永林. 中成药), **2023**, 45(1): 127–134.
- [10] Çelik Ş, Dervişoğlu G, İzol E, Seçzyk Ł, Özdemir F A, Yilmaz M E, Yilmaz M A, Gülçin İ, Al-Anazi K M, Farah M A, Zafar M, Makhkamov T, Khan M A. *Biomed. Chromatogr.*, **2024**, 38(10): e5975.
- [11] Li T, Cao L, Tang H, Tu P, Song Q, Song Y. *J. Chromatogr. B*, **2021**, 1162: 122457.
- [12] Song Q Q, Zhang K, Li T, Guan P W, Gong X C, Xu X, Li J, Tu P F, Song Y L. *Chin. J. Anal. Chem.* (宋青青, 张珂, 李婷, 管朋维, 龚兴成, 许霞, 李军, 屠鹏飞, 宋月林. 分析化学), **2020**, 48(11): 1573–1593.
- [13] Yu H M, Zhou L X, Yang J, He M Z, Zhong G Y, Feng Y L, Yang S L. *J. Chin. Med. Mater.* (余惠敏, 周兰香, 杨婕, 何明珍, 钟国跃, 冯育林, 杨世林. 中药材), **2024**, 47(6): 1420–1424.
- [14] Shi M, Ren B N, Qiu Z H, Wu Y. *Chin. J. Hosp. Pharm.* (史敏, 任炳楠, 邱志宏, 吴茵. 中国医院药学杂志), **2022**, 42(21): 2225–2229.
- [15] Wang Y M, Zhao P X, Zhang X J, Dang Z, Li H, Liu Z Y, Wang J T, Yu S X, Ma X M. *Curr. Biotechnol.* (王育萌, 赵鹏翔, 张旭娟, 党政, 李函, 刘子怡, 王佳腾, 于思雪, 马雪梅. 生物技术进展), **2026**, 16(2): 309–317.
- [16] Pan Q, Li W, Yang Y, Zhao Y Q, Lian L, Cong Q Q, Wang L H, Song Y L, Hong Q. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (潘倩, 李玮, 杨阳, 赵勇强, 连俐, 丛晴晴, 王立红, 宋月林, 洪倩. 质谱学报), **2025**, 46(3): 265–275.
- [17] Wang L J, Yang Q, Wang F, Zhu P. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* (王李俊, 杨琴, 王飞, 朱盼. 中草药), **2017**, 48(12): 2382–2384.
- [18] Zhang G T, He H Y, Huang J D, Zhou Z X. *J. Instrum. Anal.* (张桃滕, 何洪源, 黄家栋, 周宗贤. 分析测试学报), **2023**, 42(2): 233–240.
- [19] Zong Z, Hu Y, Xu B L, Xin G S, Chen Y X, Li W L. *Chin. J. Pharm.* (宗政, 胡扬, 徐蓓蕾, 辛国松, 陈鹰翔, 李文兰. 中国医药工业杂志), **2024**, 55(12): 1659–1675.
- [20] Li Y F, Guo K X, Chen W, Ye J T, Fan S M, Tang H, Huang K E, Ke X H. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (李燕芳, 郭凯欣, 陈为, 叶晋通, 凡思敏, 唐慧, 黄可儿, 柯雪红. 中国现代应用药学), **2024**, 41(22): 3061–3070.
- [21] Chen J X, Chen R Y, Lian Y, Yao X S, Huang Y X, Gao Y, Xiao Y. *Food Res. Dev.* (陈嘉序, 陈如扬, 连媛, 姚欣硕, 黄钰昕, 高瑶, 肖愈. 食品研究与开发), **2021**, 42(9): 176–182.
- [22] Chen Y W, Yang Z W, Tian G F, Wang Z, Wang X L. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* (陈玥雯, 杨紫薇, 田冠芳, 王泽, 王晓良. 中草药), **2025**, 56(5): 1852–1860.
- [23] Xu W, Zhou F, Zhu Q, Bai M, Luo T, Zhou L, Deng R. *Eur. J. Pharmacol.*, **2022**, 925: 174988.
- [24] Hu B, Xu Y, Ding H, Fang X Q, Wang T B. *J. Guangzhou Univ. Tradit. Chin. Med.* (胡波, 徐颖, 丁辉, 方学奇, 王天宝. 广州中医药大学学报), **2021**, 38(2): 366–372.
- [25] Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. *J. Nutr.*, **2003**, 133(5): 1355–1361.
- [26] Zhai Y J, Wang X X, Wang X, Gong Y J, Xu Y Y, Li Y B. *China J. Chin. Mater. Med.* (翟玉静, 王晓萱, 王雪, 窦亚洁, 许妍妍, 李遇伯. 中国中药杂志), **2024**, 49(22): 5977–5987.
- [27] Lu S, Cheng D, Yao H, Wen Y, Yu Y, Li H, Wang J, Sun B. *J. Agric. Food Chem.*, **2024**, 72(17): 9807–9817.
- [28] Chen T, Wu H, He Y, Pan W, Yan Z, Liao Y, Peng W, Gan L, Zhang Y, Su W, Yao H. *Molecules*, **2019**, 24: 4287.

(责任编辑: 丁 岩)