

浙贝母提取液在大鼠尿液、粪便中的原型成分及代谢产物分析

宗政¹, 胡扬¹, 王昊¹, 王金宏¹, 杨波¹, 胡玲玲¹, 程斌², 周爱珍², 李文兰^{1*}

(1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 浙江药科职业大学中药学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: **目的** 分析浙贝母提取液在大鼠尿液、粪便中的原型成分及代谢产物。**方法** UPLC-Q-TOF-MS 分析采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 电喷雾离子源; 正负离子扫描。**结果** 在大鼠尿液中共检测出化学成分 28 种, 其中原型成分 19 种, 代谢产物 9 种; 在大鼠粪便中共检测出化学成分 53 种, 其中原型成分 37 种, 代谢产物 16 种, 去除重复后, 共检测出化学成分 66 种, 其中原型成分 45 种, 代谢产物 21 种; 粪便、尿液中共有原型成分 24 种, 粪便中独有成分 15 种, 尿液中独有成分 6 种; 粪便、尿液中共有代谢成分 6 种, 粪便中独有成分 11 种, 尿液中独有成分 4 种。浙贝母主要活性成分贝母素甲、贝母素乙代谢途径包括 I 相代谢 (羟基化、氧化脱氢、还原加氢)、II 相代谢 (硫酸化)。

结论 该方法快速准确, 简单可行, 可用于解析浙贝母体内过程, 阐明其药效物质基础。

关键词: 浙贝母提取液; 原型成分; 代谢产物; 尿液; 粪便; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)02-0577-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.037

浙贝母为百合科浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎, 名列“浙八味”之首, 是我国传统的道地药材之一, 常用于治疗风热咳嗽、肺癰、乳癰、瘰癧、疮毒, 肿瘤等疾病^[1-3]。迄今为止, 从浙贝母中已经鉴定出数百种化学成分^[4]。研究表明, 浙贝母生物碱类成分为其抗炎、抗氧化及抗肿瘤的潜在活性成分^[5-7], 贝母素甲和贝母素乙为浙贝母中的主要活性成分^[6-8]。程斌等^[9-10]通过谱-效相关性研究初步筛选出浙贝母 9 种与抗炎作用相关的质量标志物, 6 种与化痰作用相关的质量标志物。

近年来, 鉴定药物在体内化学成分的方法和技术不断发展, 最常用的为超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术^[11-12]。李荣荣等^[13]对浙贝母主要成分在大鼠血中的代谢产物进行研究, 而目前尚未有对浙贝母在大鼠尿液、粪便中化学成分的相关研究。因此, 本实验对灌胃浙贝母后大鼠的尿液和粪便样品进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 初步明确其在尿液、粪便中的化学成分, 并追寻主要活性成分贝母素甲、贝母素乙的代谢途径, 以期为其药效物质基础研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体质量 (230±20) g, 购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, 实验动物生产许

可证号 SCXK (吉) 2018-0007。单次实验所用大鼠均为同一批次, 自由进食饮水, 饲养于哈尔滨商业大学实验室, 适应性饲养 1 周, 设定温度为 (22±1) °C, 相对湿度为 45%~60%。所有实验操作均符合哈尔滨商业大学动物伦理委员会要求 (审查号 HSDYXY-2020080)。

1.2 试剂与药物 浙贝母 (产地浙江章水) 购自哈尔滨三棵树药材市场, 经哈尔滨商业大学张德连教授鉴定为正品。贝母素甲 (批号 B20080)、贝母素乙 (批号 B20081)、西贝素 (批号 B21331)、贝母辛 (批号 B20082) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均>99.0%。乙腈 (质谱纯)、甲醇 (质谱纯)、甲酸 (质谱纯) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 甲醇 (色谱级)、氨水 (分析纯) 均购自天津市天力化学试剂有限公司; 三氯甲烷 (分析纯) 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 水为蒸馏水, 购自广州屈臣氏食品有限公司。

1.3 仪器 Xevo G2 Q TOF 质谱、Acquity UPLC 色谱仪 (美国 Waters 公司); 电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); 干式氮吹仪 (北京成萌伟业科技有限公司); 快速混匀器 (常州国华电器有限公司); 台式离心机 (上海安亭科学仪器有限公司); 超声清洗器 (深圳洁盟清洗设备有限公司)。

收稿日期: 2023-01-01

基金项目: 黑龙江省重点研发计划指导类项目 (GZ20210092)

作者简介: 宗政 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 18846076317, E-mail: zongzheng0823@163.com.

* 通信作者: 李文兰 (1967—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0451) 84866056, E-mail: lwlzd@163.com

网络出版日期: 2022-12-29

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20221228.1642.004.html>

2 方法

2.1 提取物制备 称取已过 4 号筛的浙贝母粉末 13 g，加入 26 mL 浓氨水浸润 1 h，再加入 260 mL 三氯甲烷-甲醇混合液（4：1），称定质量后混匀，在 80 ℃ 水浴中加热回流 2 h，自然放冷，滤纸过滤后浓缩成浸膏，即得，置于 -20 ℃ 冰箱保存。

2.2 分组与给药 将大鼠随机分为空白组、浙贝母组，每组 6 只。在前期实验基础上，确定浙贝母灌胃给药剂量为 0.9 g/kg（以生药计），空白组大鼠灌胃给予等体积生理盐水，每天 1 次，连续 7 d。

2.3 尿液、粪便收集及预处理

2.3.1 尿液 给药 7 d 后，将浙贝母组大鼠置于代谢笼中，禁食不禁水 12 h，收集 0~12 h 含药尿液，3 500 r/min 离心 15 min，取上清液 2 mL，加入 4 倍量乙腈涡旋混匀 2 min，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，N₂ 吹干，加入 2 倍量乙腈涡旋混匀 2 min，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，N₂ 吹干，0.4 mL 甲醇复溶，0.22 μm 微孔滤膜过滤，同法制备空白尿液供试品溶液，4 ℃ 保存。

2.3.2 粪便 给药 7 d 后，将浙贝母给药组大鼠置于代谢笼中，禁食不禁水 12 h，收集 0~12 h 含药粪便，研钵捣碎研磨后称取 0.5 g，加入 4 倍量乙腈超声提取 30 min，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，N₂ 吹干，加入 2 倍量乙腈，涡旋混匀 2 min，13 000 r/min 离心 5 min，取上清

液，N₂ 吹干，0.4 mL 甲醇复溶，0.22 μm 微孔滤膜过滤，同法制备空白粪便供试品溶液，在 4 ℃ 下保存。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析条件

2.4.1 色谱 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 甲酸（B），梯度洗脱（0~5 min，2%~25% A；5~12 min，25%~45% A；12~15 min，45%~80% A；15~18 min，80%~86% A；18~25 min，86%~94% A）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 2 μL。

2.4.2 质谱 电喷雾离子源（ESI），正负离子扫描；质量扫描范围 *m/z* 50~1 200；喷雾电压 3.0 kV；离子源温度 100 ℃；去溶剂气温度 400 ℃，体积流量 800 L/h；锥孔气体体积流量 50 L/h；碰撞能量 20~45 mV。

2.5 数据处理 通过 PubMed、CNKI、Chemspider、中药系统药理数据库和分析平台（TCMSP）等数据库，收集整理关于浙贝母化学成分及其代谢物的信息，采用 Waters Masslynx 4.1 软件进行数据分析，根据分子量、分子式、碎片离子质谱图、同类化合物的质谱裂解规律和相关文献对化合物结构进行鉴定。

3 结果

3.1 成分鉴定及分析 尿液、粪便在正负离子模式下的基峰色谱图分别见图 1~2。

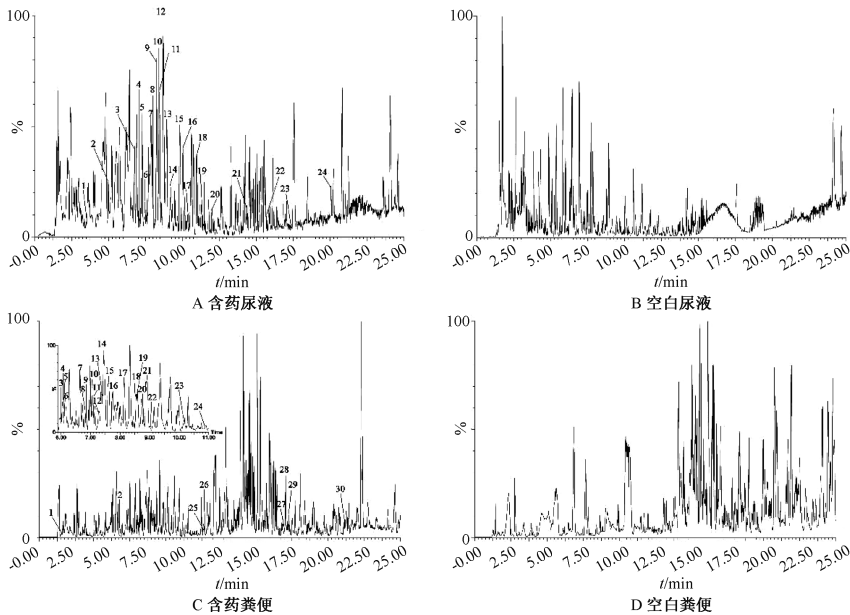


图 1 大鼠粪便、尿液正离子模式基峰色谱图

正离子模式下，尿液中共检测到 15 种原型成分、9 种代谢产物；而负离子模式下共检测到 5 种原型成分，去除重复后共检测到 28 种，包括 19 种原型成分、9 种代谢产物。正离子模式下，粪便中共检测到 16 种原型成分、14 种代谢产物；而负离子模式下共检测到 23 种原型成分、5 种代谢产物，去除重复后共检测到 53 种化学成分，包括 37 种原型成分、16 种代谢产物。除去不同生物样品中的重复成分后，共检测出 66 种化学成分，包括 45 种原型成分、

21 种代谢产物，其中共有原型成分 24 种，粪便中独有成分 15 种，尿液中独有成分 6 种；共有代谢成分有 6 种，粪便中独有成分 11 种，尿液中独有成分 4 种，具体见表 1~2。

3.2 原型成分代谢途径分析

3.2.1 贝母素甲 该成分可能会发生 I 相代谢反应，即羟基化反应、氧化脱氢反应，以及 II 相代谢反应，即硫酸化反应，其代谢途径见图 3A。

A15 号峰保留时间 9.84 min，分子量 431.339 9，*m/z*

表 1 正离子模式下大鼠尿液、粪便中浙贝母原型成分及代谢产物

峰号	t_R/min	名称	离子模式	分子式	相对分 子质量	理论值 m/z	实测值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	主要二级碎片 离子 m/z	成分 类型	代谢类型	归属	文献
A1	3.48	木糖	[M+H] ⁺	C ₃ H ₁₀ O ₅	151.060	6	151.061	2	3.97	150.052 8, 91.037 6, 106.025 2	A	无	N [11]
A2	4.98	浙贝素	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₆ O ₆	280.094	7	281.102	5	-8.54	265.102 1, 250.084 3, 251.080 8	A	无	N [13]
A3	6.76	贝母素甲代谢物 M8	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₄	447.334	9	448.342	7	1.34	430.332 1, 414.300 6, 412.321 1	B	羟基化	N, F [14]
A4	7.24	贝母素甲代谢物 M4/贝母素乙代谢物 M3	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	445.319	2	446.327	6	1.34	428.315 9, 410.305 2, 175.147 7	B	羟基化, 氧化脱氢	N [14]
A5	7.28	贝母素甲代谢物 M4/贝母素乙代谢物 M3	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	445.319	2	446.327	9	2.02	428.316 7, 410.305 2, 175.147 7	B	羟基化, 氧化脱氢	N [13]
A6	7.44	贝母甲素代谢物 M3/贝母乙素代谢物 M6	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₄	443.303	6	444.311	2	-0.45	428.325 9, 410.305 8, 388.281 2, 57.032 7	B	羟基化, 氧化脱氢	N, F [15]
A7	7.89	西贝素	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	1	-4.88	428.315 6, 412.322 2, 175.148 7, 138.127 8	A	无	N, F 对照品
A8	7.95	贝母辛	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃	427.308	6	428.316	5	-9.81	410.305 5, 126.128 0, 114.092 2	A	无	N, F 对照品
A9	8.25	贝母素乙代谢物 M2	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃	431.339	9	432.347	8	5.55	431.334 7, 430.336 1, 412.320 8, 256.205 7	B	还原加氢	N, F [13, 15]
A10	8.37	丹皮酚	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063	0	167.070	8	2.39	149.061 9	A	无	N [16]
A11	8.44	3-去氢浙贝母碱/浙贝酮	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	1	2.32	428.316 0, 412.322 7, 175.014 8, 138.128 3	A	无	N [17]
A12	8.70	贝母素乙	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	1	7.44	428.315 0, 412.326 1, 175.147 4, 138.128 3	A	无	N, F 对照品
A13	9.20	贝母素甲代谢物 M2/贝母素乙代谢物 M5	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃	427.308	6	428.316	5	-1.40	410.306 5, 126.127 7, 114.092 0	B	氧化脱氢	N [13]
A14	9.30	3-去氢浙贝母碱/浙贝酮	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	1	-1.16	428.317 2, 412.320 3, 175.148 0, 138.128 3	A	无	N [17]
A15	9.84	贝母素甲	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₃	431.339	9	432.347	8	4.86	431.335 5, 430.331 4, 414.321 2, 256.205 9	A	无	N, F 对照品
A16	10.03	贝母素甲代谢物 M1	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	8	1.63	428.311 3, 412.321 7, 175.148 9, 138.128 3	B	氧化脱氢	N, F [13]
A17	10.46	去氢郭贝定碱	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	413.329	4	414.337	2	-1.93	396.326 7, 119.086 5, 105.0703	A	无	N, F [4, 13]
A18	10.96	去氢郭贝定碱	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	413.329	4	414.337	2	2.17	396.327 0, 119.086 0, 105.070 6	A	无	N, F [4, 13]
A19	11.55	双(二乙二醇)邻苯二甲酸酯	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	342.131	5	343.139	3	-8.17	326.136 6, 298.138 7, 238.105 4	A	无	N [18]
A20	12.00	郭贝定碱	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₂	415.345	0	416.352	9	0	414.336 4, 398.341 2, 105.070 4	A	无	N, F [4, 19]
A21	14.32	5-羟基-戊酸 p-t-丁基苯酯同分异构体	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.156	9	251.164	7	1.59	233.154 2, 193.125 2, 58.908 1	A	无	N [20]
A22	15.71	5-羟基-戊酸 p-t-丁基苯酯	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.156	9	251.164	7	0.40	233.155 4, 193.122 1, 58.907 9	A	未知	N [14]
A23	16.03	香草乙酮	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063	0	167.070	8	2.99	149.059 6	B	未知	N [14]
A24	20.50	4-叔丁氧基苯乙烯	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O	176.120	1	177.127	9	2.26	无碎片	A	无	N [20]
C1	1.55	胞嘧啶	[M+H] ⁺	C ₄ H ₅ N ₃ O	111.043	3	112.051	1	-4.46	96.065 8, 67.041 2	A	无	F [21]
C2	5.60	贝母甲素代谢物 M3/贝母甲素代谢物/贝母乙素代谢物 M6/贝母乙素代谢物 M6 同分异构体	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₄	443.303	6	444.311	4	-3.15	428.315 1, 410.304 0, 388.282 4, 57.033 6	B	羟基化, 氧化脱氢	F [13-14]
C3	6.01	karelamine	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	459.298	5	460.306	3	-1.30	442.293 2, 158.109 5, 146.079 5	B	未知	F [22]
C9	6.86	贝母素甲代谢物 M6/贝母素乙代谢物 M1	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₆ S	509.281	1	510.288	9	-0.78	431.334 2, 430.330 8, 412.320 6	B	氧化脱氢, 硫酸化	F [15]
C10	7.03	3-去氢浙贝母碱/浙贝酮	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.324	3	430.332	1	-1.39	428.315 4, 412.321 0, 175.149 2, 138.128 1	A	无	F [17]
C12	7.28	贝母素甲代谢物 M2/贝母素乙代谢物 M5	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃	427.308	6	428.316	5	-1.17	410.305 0, 126.127 8, 114.092 4	B	氧化脱氢	F [14]
C14	7.43	贝母素甲代谢物 M7/贝母素甲代谢物 M6 同分异构体	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆ S	511.296	7	512.304	6	6.25	431.333 4, 414.338 2, 396.328 7	B	硫酸化	F [13-14]
C15	7.61	贝母素甲代谢物 M6/贝母素乙代谢物 M1	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₆ S	509.281	1	510.288	9	4.70	431.335 0, 430.331 9, 412.320 6	B	氧化脱氢, 硫酸化	F [13]
C17	8.13	贝母素甲代谢物 M7/贝母素甲代谢物 M6 同分异构体	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆ S	511.296	7	512.304	6	0.39	432.333 7, 414.337 4, 396.327 0	B	硫酸化	F [13]
C18	8.55	环巴胺	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	411.313	7	412.321	6	-0.97	396.330 1, 394.286 9, 355.281 3	A	无	F [12]
C24	10.89	腺苷	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.104	6	269.112	4	1.92	266.986 5, 250.988 6, 86.059 5	B	未知	F [11]
C25	11.43	对羟基苯甲醛	[M+H] ⁺	C ₇ H ₆ O ₂	122.036	8	123.044	6	-4.06	95.049 3, 94.042 1, 93.033 3	A	无	F [23]
C26	11.57	亚麻酸或亚麻酸同分异构体	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.224	6	279.232	4	-3.58	151.038 6, 123.044 2, 97.101 2	A	无	F [16]
C27	17.61	亚麻酸或亚麻酸同分异构体	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.224	6	279.232	4	2.15	151.037 8, 123.043 9, 97.100 0	A	无	F [16]
C28	17.71	亚麻酸或亚麻酸同分异构体	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.224	6	279.232	4	-2.87	151.038 8, 123.043 8, 97.101 2	A	无	F [16]
C29	19.88	亚麻酸或亚麻酸同分异构体	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.224	6	279.232	4	-2.15	151.039 3, 123.043 9, 97.101 9	A	无	F [16]
C30	21.11	ent-15α, 16-epoxy-kauran-17-ol/ent-15β, 16-epoxy-kauran-17-ol	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.240	2	305.248	1	-2.29	无碎片	A	无	F [24]

注: A 为原型成分, B 为代谢产物, N 为尿液样品, F 为粪便样品。

表 2 负离子模式下大鼠尿液、粪便中浙贝母原型成分及代谢产物

峰号	<i>t</i> _R / min	名称	离子模式	分子式	相对分 子质量	理论值 <i>m/z</i>	实测值 <i>m/z</i>	误差 <i>m/z</i> ($\times 10^{-6}$)	主要二级碎 片离子 <i>m/z</i>	成分 类型	代谢 类型	归属	文献
G1	2.57	尿苷	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.069 5	243.061 7	243.062 0	1.23	200.056 2, 153.031 0, 140.034 9, 122.025 5	A	无	N, F	[25]
G2	15.73	5-羟基-戊酸 p-t-丁基苯基酯	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250.156 9	249.149 1	249.149 0	-0.40	231.137 1, 191.100 7, 57.037 8	A	无	N	[20]
G3	16.63	coriolic acid, α-dimorphelic acid, β-dimorphelic acid	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296.235 1	295.227 3	295.227 8	1.69	277.216 4, 235.206 3, 59.014 0	A	无	N, F	[1]
G4	21.21	9,18-十八碳二烯酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 2	279.232 4	279.232 8	1.43	261.224 4, 109.062 2, 71.011 2	A	无	N	[26-27]
G5	23.21	软脂酸	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240 2	255.232 4	255.233 0	2.35	253.217 2, 251.233 0, 233.229 8	A	无	N, F	[28]
G2	3.30	肌苷/肌苷的同分异构体	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	268.080 8	267.072 9	267.072 3	-2.25	152.049 1	A	无	F	[25]
G3	3.62	肌苷/肌苷的同分异构体	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	268.080 8	267.072 9	267.073 5	2.25	152.048 6	A	无	F	[25]
G4	3.64	胸苷	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	242.090 3	241.082 4	241.082 8	1.66	223.071 9	A	无	F	[25]
G5	5.66	贝母素甲代谢物 M9	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₅ NO ₇ S	527.291 7	526.283 8	526.284 0	0.38	508.276 2	B	羟基化, 硫酸化	F	[13]
G6	5.96	贝母素甲代谢物 M5/贝母素乙代谢物 M4	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₃ NO ₇ S	525.276 0	524.268 2	524.268 8	1.14	524.268 2, 506.257 3	B	氧化脱氢, 羟基化, 硫酸化	F	[13-15]
G7	7.45	贝母素甲代谢物 M7/贝母素甲代谢物 M7 同分异构体	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆ S	511.296 8	510.288 9	510.289 4	0.98	510.291 3, 492.272 7	B	硫酸化	F	[13]
G8	7.60	贝母素甲代谢物 M7	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₃ NO ₆ S	509.281 1	508.273 3	508.274 6	2.56	508.275 8, 490.265 8	B	氧化脱氢, 硫酸化	F	[13]
G9	8.13	贝母素甲代谢物 M7/贝母素甲代谢物 M7 同分异构体	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆ S	511.296 8	510.288 9	510.289 7	1.57	510.290 5, 492.273 9	B	硫酸化	F	[13]
G10	12.55	鄂贝酸	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₄ O ₄	362.245 7	361.237 9	361.238 3	1.11	359.222 3, 343.227 4	A	无	F	[28]
G11	14.98	贝尊皂苷元	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488.350 1	487.342 3	487.342 3	0.00	470.333 6, 469.331 5	A	无	F	[1]
G12	15.17	4-辛酯异丁基-邻苯二甲酸	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334.214 4	333.206 6	333.206 1	-1.50	199.170 9	A	无	F	[18]
G16	19.82	顺式婴柏酸/反式婴柏酸	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.224 6	301.216 8	301.216 7	-0.33	286.192 7, 256.219 0	A	无	F	[24]
G17	20.13	亚麻酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.224 6	277.216 8	277.217 5	2.53	149.029 0, 121.028 8, 95.083 3	A	无	F	[29]
G18	20.65	十四烷酸	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.208 9	227.201 1	227.201 4	1.08	255.181 6, 209.191 1	A	无	F	[30]
G19	20.99	顺式婴柏酸/反式婴柏酸	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.224 6	301.216 8	301.217 2	1.33	286.218 8, 255.218 8	A	无	F	[24]
G20	21.42	<i>ent</i> -15α, 16-epoxy-kauran-17-ol/ <i>ent</i> -15β, 16-epoxy-kauran-17-ol	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.240 2	303.232 4	303.233 8	4.62	285.243 0, 116.928 7	A	无	F	[24]
G21	21.61	<i>ent</i> -15α, 16-epoxy-kauran-17-ol/ <i>ent</i> -15β, 16-epoxy-kauran-17-ol	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.240 2	303.232 4	303.233 2	2.64	285.240 9, 116.928 7	A	无	F	[24]
G22	21.92	9,12-十八碳二烯酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 2	279.232 4	279.234 3	6.8	261.222 0, 109.066 1, 71.013 9	A	无	F	[26-27]
G23	22.81	<i>ent</i> -kauran-16β, 17-diol/ <i>ent</i> -kauran-16α, 17-diol	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.255 9	305.248 1	305.247 8	-0.98	255.232 0, 116.928 4	A	无	F	[24]
G25	23.56	<i>ent</i> -kauran-16β, 17-diol/ <i>ent</i> -kauran-16α, 17-diol	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306.255 9	305.248 1	305.247 8	-0.98	255.232 4, 116.928 4	A	无	F	[24]
G27	24.00	油酸/反油酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255 9	281.248 1	281.248 2	0.36	267.232 5, 263.234 0, 171.108 9, 167.182 1	A	无	F	[31]
G28	24.73	油酸/反油酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255 9	281.248 1	281.249 3	4.27	267.232 3, 263.234 0, 171.102 0, 167.182 1	A	无	F	[31]

注: A 为原型成分, B 为代谢产物, N 为尿液样品, F 为粪便样品。

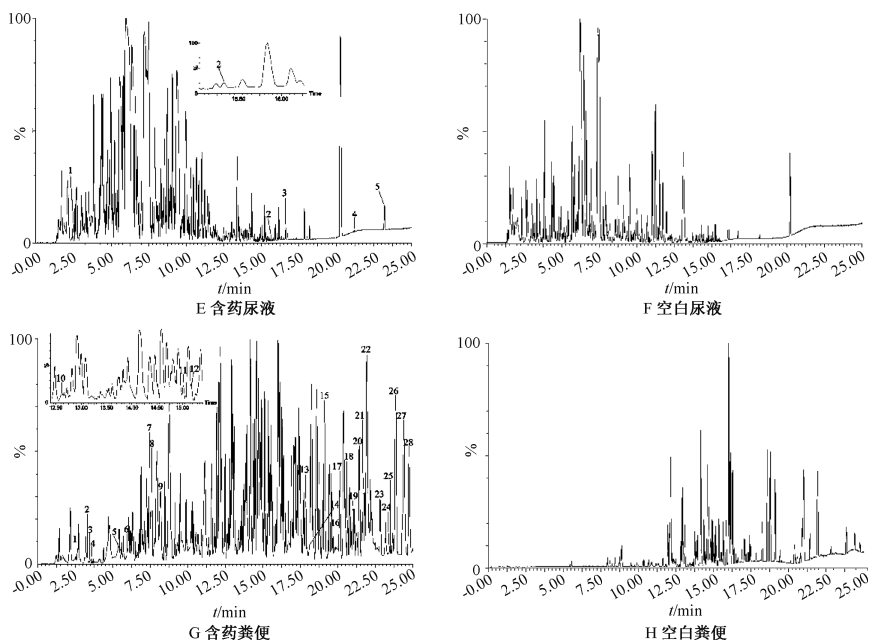


图 2 大鼠粪便、尿液负离子模式基峰色谱图

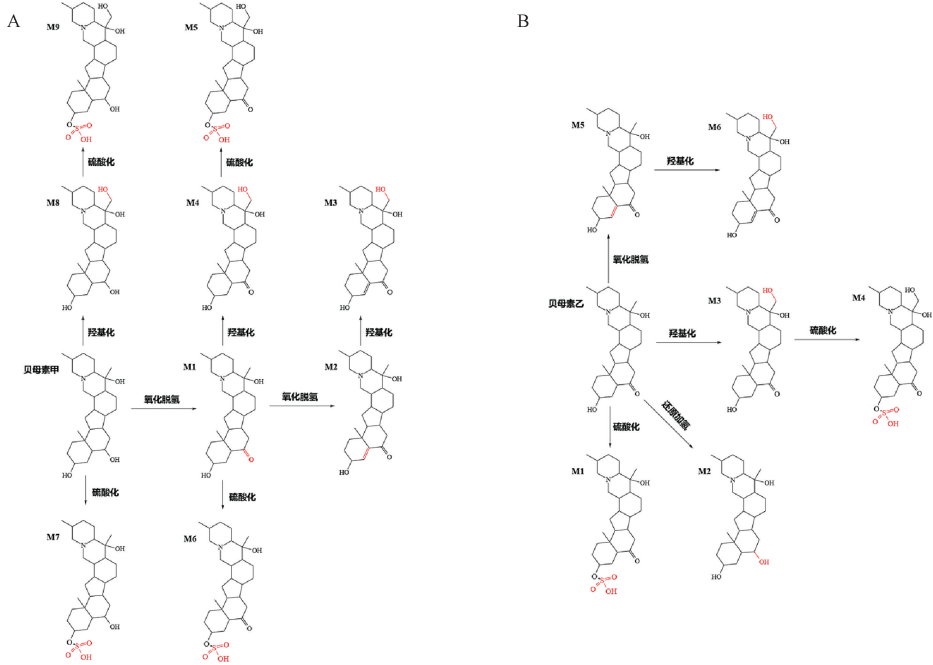


图 3 贝母素甲 (A)、贝母素乙 (B) 代谢途径

432.349 9 $[M+H]^+$ ，失去一分子水形成 m/z 414.321 2 $[M+H-H_2O]^+$ ，碎片离子 m/z 431.335 5、430.331 4 与对照品碎片离子一致，推测为贝母素甲。

A16 号峰保留时间 10.03 min，分子量 429.324 3， m/z 430.332 8 $[M+H]^+$ ，与贝母素甲准分子离子峰相差 2，可能为贝母素甲氧化脱氢产物，二级碎片离子 m/z 428.311 3 $[M+H-H_2]^+$ ， m/z 412.321 7 $[M+H-H_2O]^+$ ，与文献 [15] 报道一致，推测为贝母素甲代谢物 **M1**。

C12 号峰保留时间 7.28 min，分子量 427.308 6， m/z 428.316 0 $[M+H]^+$ ，与贝母素甲代谢物 **M1** 准分子离子峰相差 2，可能为贝母素甲代谢物 **M1** 进一步氧化脱氢产物，

二级碎片 m/z 410.305 $[M+H-H_2O]^+$ 为失去一分子水形成， m/z 256.206 9、148.111 8 碎片离子与文献 [16] 报道一致，推测为贝母素甲代谢物 **M2**。

C2 号峰保留时间 7.44 min，分子量 443.303 6， m/z 444.311 4 $[M+H]^+$ ，与贝母素甲代谢物 **M2** 准分子离子峰相差 16，可能为贝母素甲代谢物 **M2** 进一步羟基化产物，脱氧形成二级碎片离子 m/z 428.315 9 $[M+H-O]^+$ ，进一步失去一分子水形成 m/z 410.305 8 $[M+H-O-H_2O]^+$ 碎片离子与文献 [15-16] 报道一致，推测为贝母素甲代谢物 **M3**。

A4 号峰保留时间 7.24 min，分子量 445.319 2， m/z 446.327 6 $[M+H]^+$ ，与贝母素甲代谢物 **M1** 准分子离子峰

相差 16, 可能为贝母素甲代谢物 **M1** 进一步羟基化产物, 失去一分子水形成 m/z 428.315 9 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 进一步失去一分子水产生 m/z 410.305 2 $[M+H-H_2O-H_2O]^+$ 碎片离子, 此过程与文献 [16] 报道一致, 推测为贝母甲素代谢物 **M4**。

G6 号峰保留时间 5.96 min, 分子量 525.276, m/z 524.268 8 $[M-H]^-$, 与贝母素甲代谢物 **M4** 准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素甲代谢物 **M4** 进一步硫酸化产物, 失去一分子水形成 m/z 506.257 3 $[M-H-H_2O]^-$ 的碎片离子, 与文献 [15] 报道一致, 推测为贝母甲素代谢物 **M5**。

C15 号峰保留时间 6.86 min, 分子量 509.281 1, m/z 510.288 5 $[M+H]^+$, 与贝母素甲代谢物 **M1** 准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素甲代谢物 **M1** 进一步硫酸化产物, 碎片离子 m/z 430.330 8 为贝母素甲特征峰, 它和 m/z 412.320 6 $[M+H-H_2O-SO_3]^+$ 与文献 [15] 报道一致, 推测为贝母素甲代谢物 **M6**。

C14 号峰保留时间 7.43 min, 分子量 511.296 7, m/z 512.304 6 $[M+H]^+$, 与贝母素甲准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素甲硫酸化产物, 二级碎片离子 m/z 414.337 4 $[M+H-H_2O-SO_3]^+$ 、 m/z 396.328 7 $[M+H-2H_2O-SO_3]^+$ 与文献 [15-16] 报道一致, 推测为贝母素甲代谢物 **M7**。

A3 号峰保留时间 9.20 min, 分子量 447.334 9, m/z 448.342 3 $[M+H]^+$, 与贝母素甲准分子离子峰相差 16, 可能为贝母素甲羟基化产物, 失去一分子水形成 m/z 410.036 5 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 与文献 [16] 报道一致, 推测为贝母素甲代谢物 **M8**。

G5 号峰保留时间 5.66 min, 分子量 527.291 7, m/z 526.284 $[M-H]^-$, 与贝母素甲代谢物 **M3** 准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素甲代谢物 **M3** 进一步硫酸化产物, 失去一分子水形成 m/z 508.276 2 $[M-H-H_2O]^-$ 的碎片离子, 与文献 [15] 报道一致, 推测为贝母素甲代谢物 **M9**。

3.2.2 贝母素乙 该成分可能发生 I 相代谢反应, 即羟基化反应、还原加氢反应、氧化脱氢反应, 以及 II 相代谢反应, 即硫酸化反应, 其代谢途径见图 3B。

A12 号峰保留时间 8.70 min, 分子量 429.324 3, m/z 430.337 3 $[M+H]^+$, 失去一分子水形成 m/z 412.326 1 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 与对照品二级碎片信息一致, 推测为贝母素乙。

C9 号峰保留时间 6.86 min, 分子量 509.281 1, m/z 510.291 3 $[M+H]^+$, 与贝母素乙准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素甲硫酸化产物, 碎片离子 m/z 412.320 6 $[M+H-H_2O-SO_3]^+$ 、 m/z 430.331 9 $[M+H-SO_3]^+$ 与贝母素乙碎片离子及文献 [17] 报道一致, 推测为贝母素乙代谢物 **M1**。

A9 号峰保留时间 8.25 min, 分子量 431.339 9, m/z 432.350 2 $[M+H]^+$, 与贝母素乙准分子离子峰相差 2, 可能为贝母素乙还原加氢产物, 其加氢得到 m/z 430.331 6 $[M+H-H_2]^+$ 碎片离子, 失去一分子水形成 m/z 412.320 8 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 与文献 [15, 17] 报道一致, 推

测为贝母素乙代谢物 **M2**。

A5 号峰保留时间 7.28 min, 分子量 445.319 2, m/z 446.327 9 $[M+H]^+$, 与贝母素乙准分子离子峰相差 16, 可能为贝母素乙羟基化产物, 失去一分子水形成 m/z 428.325 9 $[M+H-H_2O]^+$ 碎片离子, 进一步失去一分子水形成 m/z 410.305 8 $[M+H-H_2O-H_2O]^+$ 碎片离子, 与文献 [15] 报道一致, 推测为贝母素乙代谢物 **M3**。

G6 号峰保留时间 5.96 min, 分子量 525.276, m/z 524.268 8 $[M-H]^-$, 与贝母素乙代谢物 **M3** 准分子离子峰相差 80, 可能为贝母素乙代谢物 **M3** 进一步硫酸化产物, 失去一水分子形成 m/z 506.257 3 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子, 与文献 [15-17] 报道一致, 推测为贝母素乙代谢物 **M4**。

A13 号峰保留时间 9.20 min, 分子量 427.308 6, m/z 428.316 $[M+H]^+$, 与贝母素乙准分子离子峰相差 2, 可能为氧化脱氢产物, 失去一分子水形成 m/z 410.036 5 碎片离子, 与文献 [15] 报道一致, 推测为贝母素乙代谢物 **M5**。

A6 号峰保留时间 7.44 min, 分子量 443.303 6, m/z 444.311 4 $[M+H]^+$, 与贝母素乙代谢物 **M2** 准分子离子峰相差 16, 可能为贝母素乙代谢物 **M2** 进一步羟基化产物, 脱去一个氧形成 m/z 428.315 9 $[M+H-O]^+$ 碎片离子, 进一步失去一分子水形成 m/z 410.305 8 $[M+H-O-H_2O]^+$ 碎片离子, 与文献 [17] 报道一致, 推测为贝母素乙代谢物 **M6**。

4 讨论

中药及其复方的有效组分研究和体内代谢产物、代谢过程的研究为中药药效物质基础研究提供强有力的支撑, 推动中药及其复方的现代化。由于中药化学成分多而复杂, 在体内代谢产物、代谢路径存在不可预知性, 如何在数量庞大的生物样本信息中辨识目标组分, 是目前对中药体内代谢研究的重点和难点, 故本实验采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对灌胃浙贝母提取物后大鼠的尿液与粪便进行定性分析。结果发现, 在大鼠尿液中共检测出化学成分 28 种, 其中原型成分 19 种, 代谢产物 9 种; 在大鼠粪便中共检测出化学成分 53 种, 其中原型成分 37 种, 代谢产物 16 种, 去除重复后, 共检测出化学成分 66 种, 其中原型成分 45 种, 代谢产物 21 种; 粪便、尿液中共有原型成分 24 种, 粪便中独有成分 15 种, 尿液中独有成分 6 种; 粪便、尿液中共有代谢成分 6 种, 粪便中独有成分 11 种, 尿液中独有成分 4 种。

浙贝母中的有效活性成分主要是异甾型生物碱, 其极性较小, 多以原型被吸收^[32]。本实验在尿液和粪便中共计检测出 47 种原型成分, 这些原型成分排泄途径大多不一致, 一些原型药物代谢后主要通过肾脏, 由尿液排泄; 一些原型药物可能未被吸收, 或吸收经胆汁分泌进入肠道, 最后通过粪便排泄^[33]。而贝母素甲、贝母素乙、去氢鄂贝定碱、紫鄂贝碱、鄂贝定碱、coriolic acid 等原型药物存在尿液、粪便共有现象, 推测这些成分可能经胃肠道吸收后, 一部分进入体循环后随尿液排出, 一部分经胆汁分泌进入小肠随粪便排出。本实验通过对尿液、粪便的成分研究发

现, 主要发生生物转化的活性成分是生物碱类成分, 本实验在推测灌胃浙贝母后尿液、粪便化学成分的基础上, 分析了其主要生物碱活性成分贝母素甲、贝母素乙的代谢途径, 结果表明其主要通过 I 相代谢 (羟基化、氧化脱氢、还原加氢)、II 相代谢 (硫酸化) 等, 可为后期进一步研究浙贝母的体内代谢过程和作用机制奠定基础。

参考文献:

[1] Nile S H, Su J J, Wu D, *et al.* *Fritillaria thunbergii* Miq. (Zhe Beimu): A review on its traditional uses, phytochemical profile and pharmacological properties[J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112289.

[2] 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: 304.

[3] Cui M C, Chen S J, Wang H H, *et al.* Mechanisms of *Fritillariae Thunbergii* Flos in lung cancer treatment from a systems pharmacology perspective [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113245.

[4] 周建良, 刘 伟, 郭增喜, 等. 基于快速液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱的浙贝母特征图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2832-2837.

[5] Rashid I, Yaqoob U. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Fritillaria*—a review [J]. *Bull Nat Res Centre*, 2021, 45(1): 1-37.

[6] Kim J, Kim M, Hong S, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Fritillaria thunbergii* Miquel extracts in LPS-stimulated murine macrophage RAW 264. 7 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (5): 429.

[7] Mostafa K, Zahra Y, Zaher M, *et al.* Cytotoxic effect of methanolic extracts of *Fritillaria imperialis* bulbs and *Eryngium caucasicum* leaves on hepatoma and colon cancer cells [J]. *Asian Pacific J Trop Biomed*, 2019, 9(8): 353.

[8] 王翰华, 杨晓春, 崔明超, 等. 浙贝母花与宁海白枇杷花配伍的抗炎及抗菌作用 [J]. 中成药, 2018, 40 (1): 46-50.

[9] 程 斌, 童静玲, 周爱珍, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 谱效分析的浙贝母化痰质量标志物的初步筛选及含量差异研究[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(6): 462-471.

[10] 程 斌, 周爱珍, 彭 昕, 等. 浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2129-2135.

[11] Li H Y, Zhao H W, Yang Y, *et al.* Identification of chemical components of Qi-Fu-Yin and its prototype components and metabolites in rat plasma and cerebrospinal fluid *via* UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1995766.

[12] Park M, Lee B I, Choi J, *et al.* Quantitative analysis of daporinad (FK866) and its *in vitro* and *in vivo* metabolite identification using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2022, 27(6): 2011.

[13] 李荣荣, 赵 迪, 李蒙蒙, 等. 基于 UHPLC-Q Exactive-Orbitrap 高分辨质谱研究浙贝母和陈皮主要成分在大鼠体内的代谢物 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(8): 1413-1424.

[14] 田 溪. 基于体内过程变化和代谢组学的知母-川贝母药对配伍机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.

[15] 吴 潇. 浙贝乙素大鼠体内药代动力学研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.

[16] 彭 伟, 黎江华, 刘玉杰, 等. 浙贝母花脂肪油成分和生物活性研究 [J]. 中药与临床, 2017, 8(3): 19-21; 68.

[17] 张兴建, 劳爱娜, 黄慧珠, 等. 浙贝母化学成分的研究——Ⅲ. 浙贝酮的分离和鉴定 [J]. 药学报, 1992, 27 (6): 472-475.

[18] 金悦仙, 潘苇芩, 魏鸿雁, 等. 伊犁贝母的化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2534-2538.

[19] Tang W, Eisenbr G. Chinese drugs of plant origin [M]. Berlin: Springer, 1992: 711-737.

[20] 梁君玲, 曹小吉, 李建伟, 等. 浙贝母花挥发油的气相色谱-飞行时间质谱分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2689-2692.

[21] 李 菡, 武康雄, 史阔豪, 等. 土贝母化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (17): 4314-4322.

[22] 黄金昌, 雷 春, 阿吉艾克拜尔·艾萨, 等. 砂贝母中异甾体生物碱类成分的研究 [J]. 有机化学, 2019, 39 (3): 842-847.

[23] 周勤梅, 彭 成, 陆廷亚, 等. 暗紫贝母化学成分研究 [J]. 中药材, 2016, 39(10): 2237-2239.

[24] 崔琳琳, 包永睿, 王 帅, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定补肺健脾方的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 184-193.

[25] 周冠炜. 不同产地贝母化学成分分析及川贝母在保健食品中的应用研究 [D]. 成都: 西华大学, 2019.

[26] 谭 静, 林红强, 刘云鹤, 等. 血栓心脉宁片在血瘀大鼠脑组织中的成分分析 [J]. 中草药, 2019, 50 (17): 4254-4260.

[27] 吴福林. 止痛化癥胶囊抗血瘀药效物质基础及其作用机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.

[28] 崔治家, 马艳珠, 张小荣, 等. 川贝母化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2768-2784.

[29] Atta-ur-Rahman, Akhtar M N, Choudhary M I, *et al.* New diterpene isopimara-7, 15-dien-19-oic acid and its prolyl endopeptidase inhibitory activity [J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19 (1): 13-22.

[30] 先有其. 基于液相色谱高分辨质谱联用技术的桑叶茶成分分析及品质鉴别 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021.

[31] 戴 静, 刘博文, 刘晓凤, 等. 基于化学成分相似性的川贝母茎叶药效研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (16): 4942-4953.

[32] Liu F J, Jiang Y, Li P, *et al.* Untargeted metabolomics coupled with chemometric analysis reveals species-specific steroidal alkaloids for the authentication of medicinal *Fritillariae Bulbus* and relevant products [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1612: 460630.

[33] Schlosser P, Li Y, Sekula P, *et al.* Genetic studies of urinary metabolites illuminate mechanisms of detoxification and excretion in humans [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(2): 167-176.