

远志炮制前后人血成分血清药物化学研究

庄梓鸣^{1,2}, 赵鑫², 赵梦¹, 李浩然², 邢玥², 张学兰^{1,2*}

(1. 山东协和学院, 山东 济南 250109; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

【摘要】目的 应用血清药物化学方法分析远志甘草汁煮制前后入血成分, 对比炮制前后差异。方法 SD 大鼠分别灌胃给予远志与制远志提取物后制备含药血清, 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道质谱联用(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术对血清样本进行检测, 在自建远志和制远志提取物化学成分库的基础上, 结合 ThermoXcalibur 软件, 根据质谱相对保留时间、相对分子质量、裂解规律、文献报道等方法对质谱碎片信息进行分析, 鉴定远志与制远志入血成分, 结合主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)、t 检验分析远志与制远志入血成分差异。结果 在远志组大鼠血清样品中鉴定出 23 个成分, 包括 13 个原型成分和 10 个代谢产物; 在制远志组大鼠血清样品中鉴定出 27 个成分, 包含 16 个原型成分和 11 个代谢产物; 共筛选出远志与制远志入血差异成分 9 个, 包括 6 个原型成分和 3 个代谢产物。结论 远志甘草汁煮制后入血成分的种类、数量和相对含量发生明显变化, 为远志炮制前后的药效物质基础和炮制机制研究提供了科学依据。

【关键词】远志; 甘草汁煮制; 血清药物化学; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 原型成分; 代谢产物

DOI:10.70976/j.1008-0805.SZGYGY-2025-1411

CSTR:32392.14.j.1008-0805.SZGYGY-2025-1411

【中图分类号】R283.1 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1008-0805(2025)14-2666-08

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根, 该药首载于《神农本草经》, 为临床常用的安神药, 具有安神益智、交通心肾、祛痰消肿之功效^[1], 临床多用于失眠、健忘、心悸、癫痫、惊狂、咳嗽、痲疽疮疡等症^[2]。甘草汁煮法为远志法定炮制方法, 收载于《中国药典》2020 年版^[3]。远志经甘草汁煮后可缓和燥性, 增强安神益智作用, 因此, 远志一般需炮制后人药。研究表明, 远志主要含有皂苷、甾体酮、寡糖酯、有机酸类成分, 具有改善记忆、抗痴呆、抗抑郁、镇静催眠等作用^[3]。远志经甘草炮制后主要化学成分含量发生明显变化, 并可增强神经保护和提高学习记忆作用, 而胃肠毒性明显减弱^[4-8]。目前对远志及其炮制品的研究主要集中于体外化学成分和药理作用方面, 对其药效物质基础研究相对薄弱。因此, 亟待阐明远志和制远志的药效物质基础, 为揭示远志临床有效和炮制的科学性奠定基础。

中药血清药物化学是鉴别口服中药后血清中移行成分的一种研究方法, 已广泛应用于中药药效物质基础研究^[9, 10]。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道质谱联用仪(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)具有

高分辨率、高准确度、高灵敏度、高通量分析等特点, 适用于复杂混合物中化合物的快速、准确分析, 并广泛应用于中药药效物质基础研究领域。本研究在课题组前期远志甘草汁煮制前后体外化学成分析的基础上, 采用血清药物化学方法结合 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术快速鉴定远志与制远志入血成分, 采用多元统计分析法研究远志炮制前后入血成分差异, 为揭示远志和制远志的药效物质基础和炮制机制提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 18 只, 体质量 180~220 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(鲁)20220006, 在温度(20~26)℃, 相对湿度(55±10)% , 光照/黑暗(12 h/12 h)条件下饲养, 自由饮食、饮水, 适应性喂养 7 d 后开始实验。

1.2 药物与试剂

远志饮片(批号 220101, 产地山东)、甘草饮片(批号 180620, 产地甘肃)购自山东百味堂中药饮片有限公

收稿日期: 2024-11-08; 修订日期: 2025-03-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82173974); 国家中医药管理局中药炮制技术传承项目[国中医药科技中药(2022)59号];

山东省中医药科技项目(Q-2023150); 山东中医药大学科学研究基金(KYZK2024Q42);

山东中医药大学药学院青年教师科研强基计划项目(KYQJ-202317)

作者简介: 庄梓鸣(2000-), 女(汉族), 山东济南人, 山东中医药大学在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事中药炮制原理与饮片质量控制研究工作。

*通讯作者简介: 张学兰(1963-), 女(汉族), 山东蓬莱人, 山东协和学院教授, 硕士学位, 主要从事中药炮制原理与饮片质量控制研究工作。

司,经山东中医药大学李峰教授鉴定为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎;制远志:按《中国药典》2020 年版方法制备^[1],取净甘草片 30 g,加 12 倍水煎煮 2 h,过滤,药渣再加 12 倍量水煎煮 1 h,过滤,合并滤液,即得甘草汁。取净远志段 500g,加甘草汁和适量水,闷润至透,加热煮至汤液基本吸尽,口尝无刺喉感时,取出,70 ℃ 烘干;西伯利亚远志糖 A5(批号 CHB151227,质量分数≥98%)购自成都克洛玛生物科技有限公司;西伯利亚远志糖 A6(批号 15112401,质量分数≥98%)购自成都普瑞法科技开发有限公司;远志酮 III(批号 P27A11S122507,质量分数≥98%)购自中国食品药品鉴定研究院;对香豆酸(批号 20130608)、芥子酸(批号 S05M6Y1)、细叶远志皂苷(批号 R23N8F49013)购自上海源叶生物科技有限公司,质量分数均≥98%;瓜子金皂苷 XXVIII 对照品(批号分别为 AFBJ1302,纯度均≥95%)购自成都埃法生物科技有限公司;色谱甲醇购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 仪器

DS - Y500 型粉碎机(上海顶帅机器有限公司);UPLC - Q - Exactive Orbitrap MS 四级杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱仪,Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(美国赛默飞世尔科技公司);KQ - 500E 型超声波清洗器(功率 400 W,频率 40 kHz,江苏昆山超声仪器有限公司);FA1604N 型电子天平(十万分之一,上海精密科学仪器有限公司);H3 - 18KR 型台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6,对香豆酸、芥子酸、远志酮 III、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷 XXVIII 对照品适量,加甲醇稀释,制成质量浓度分别为 0.252,0.254,0.224,0.217,0.230,0.258,0.260 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 分组及给药

取远志与制远志粗粉各 500g,精密称定,分别加 10、8、8 倍量的 70% 乙醇超声提取 3 次,每次超声 1 h,抽滤,滤液合并,减压浓缩至一定体积,冷冻干燥,得远志与制远志提取物。取雄性 SD 大鼠 18 只,随机分为 3 组,分别为空白组、远志组、制远志组,每组 6 只,实验前 12 h 禁食不禁水,给药组大鼠按 4 g/kg 生药灌胃给药,空白组灌胃等体积的蒸馏水,1 次/d,连续 3 d。

2.3 血清样品的制备和处理

各组大鼠分别于末次灌胃后 0.25,1,2,4,6,8 h 以毛细管由眼眶静脉丛取血,每次 0.5 mL,放入 EP 管中,静置 30 min,于 4℃ 下 3500 r/min 离心 10 min,取上

清液,至 EP 管中,置于 -80 ℃ 冰箱中保存。取 -80℃ 保存的血浆样品室温解冻,分别吸取 6 个时间点的血清各 100 μL,置同一 EP 管中,加入 3 倍量甲醇,涡旋混匀 2 min,10000 r/min 离心 15 min,取上清液,40 ℃ 氮气吹干,加甲醇 100 μL 复溶,超声 30 min,10000 r/min 离心 10 min,取上清液于进样瓶中,待测。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Halo C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm,2.7 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 5 min,5% ~ 12% B;5 ~ 10 min,12% ~ 25% B;10 ~ 18 min,25% B;18 ~ 23 min,25% ~ 30% B;23 ~ 28 min,30% ~ 37% B;28 ~ 38 min,37% B;38 ~ 48 min,37% ~ 45% B;48 ~ 60 min,45% ~ 70% B),体积流量 0.3 mL/min,柱温 45 ℃,进样量 2 μL。

2.5 质谱条件

采用电喷雾离子源,负离子模式检测;毛细管电压 3000 V;毛细管温度 350 ℃;源内温度 350 ℃;裂解电压 3 kV;辅助气温度 350 ℃;质谱采集范围 m/z 100 ~ 1900;分辨率为 70000;S - Lens RF Level 为 55;阶梯碰撞能量(CE);10,20,35 V。

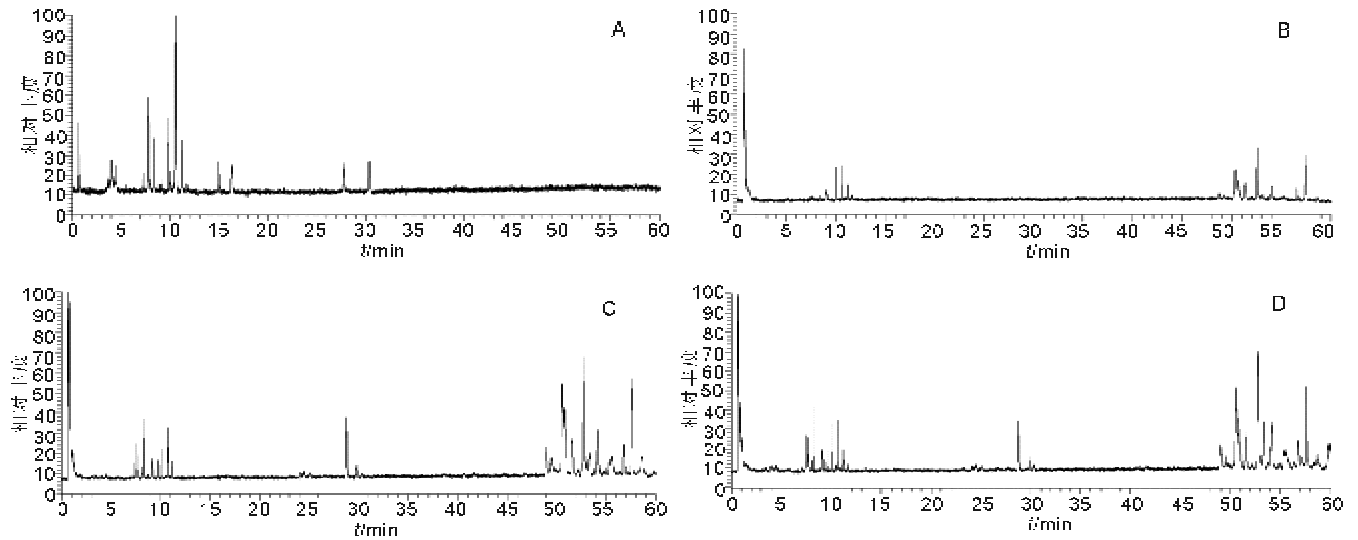
2.6 数据处理

查阅远志、制远志化学成分和血清药物化学相关文献,结合课题组前期远志与制远志提取物 UPLC - Q - Exactive Orbitrap MS 成分分析结果,并选择常见的代谢途径,推测远志和制远志体内可能的代谢产物,建立远志和制远志体外化学成分及其体内代谢产物数据库;采用 Thermo Xcalibur 软件分析各组大鼠血清样品液质数据,以空白组大鼠血清为对照,扣除血清中内源性成分,根据数据库中成分的分子量理论值,筛选出实测分子量与理论分子量差值小于 10 ppm 的成分,并计算其可能的元素组成;将筛选出的成分信息与已知对照品、成分数据库中的相关信息进行比对,鉴定远志与制远志入血成分。采用 SIMCA - P 14.1 软件对远志、制远志入血成分离子峰响应值进行无监督的主成分分析(PCA),进一步采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS - DA),选择变量载荷评价参数(VIP)值来评价变量的贡献度,采用 Graphpad Prism 9.0 统计软件对 VIP 值≥1 的成分进行 t 检验,筛选远志与制远志血中差异成分,P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 远志和制远志入血成分鉴定

在远志组大鼠血清中共鉴定出 23 个成分,包括 13 个原型成分和 10 个种代谢产物,在制远志组大鼠血清中共鉴定出 27 个成分,包括 16 个原型成分和 11 个代谢物。各样品总离子流图见图 1,入血成分鉴定结果见表 1,表 2。



A. 混合对照品 B. 空白组大鼠血清 C. 远志组大鼠血清 D. 制远志组大鼠血清

图 1 负离子模式下各样品总离子流图

表 1 远志和制远志入血原型成分鉴定和比较

| 编号 | t_r / min | 化合物名称 | 分子式 | 母离子 m/z [M-H] ⁻ | 偏差/ $\times 10^{-6}$ | 二级碎片离子 | 远志 | 制远志 | VIP 值 | 趋势 |
|-----------------|----------------|--------------|--|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----|-----|-------|-----|
| 1 ^a | 1.82 | 芥子酸 | C ₉ H ₁₂ O ₂ | 223.0609 | 3.58 | 176.8363 | + | + | 0.12 | ↑ |
| 2 ^a | 1.95 | 对香豆酸 | C ₉ H ₆ O ₃ | 163.0440 | -2.12 | 119.0485, 93.0379 | - | + | 0.26 | ↑ |
| 3 ^a | 3.74 | 西伯利亚远志糖 A5 | C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄ | 517.1566 | 2.74 | 193.0497, 175.0390 | + | + | 0.35 | ↓ |
| 4 ^a | 4.60 | 西伯利亚远志糖 A6 | C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅ | 547.1664 | 1.19 | 223.0606, 205.0499 | + | + | 1.67 | ↓* |
| 5 | 7.68 | 远志甾 MI | C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅ | 567.1357 | 2.17 | 435.0911, 417.0838 | + | + | 0.07 | ↑ |
| 6 ^a | 8.10 | 远志甾 III | C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅ | 567.1362 | 3.04 | 357.0630, 345.0616, 315.0512 | + | + | 1.18 | ↓* |
| 7 | 10.14 | 对甲氧基肉桂酸 | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ | 177.0624 | -0.02 | 133.8385 | - | + | 0.18 | ↑ |
| 8 | 11.56 | 远志寡糖 K | C ₅₇ H ₇₀ O ₃₂ | 1265.3764 | -0.19 | 1119.3421, 1077.3371 | + | + | 0.17 | ↓ |
| 9 | 13.55 | 远志寡糖 O | C ₆₁ H ₇₆ O ₃₃ | 1367.4094 | 0.77 | 1149.3518, 1245.3726, 1191.3630 | + | + | 0.38 | ↓ |
| 10 ^a | 14.64 | 瓜子金皂苷 XXVIII | C ₅₃ H ₇₀ O ₂₄ | 1103.5283 | 1.30 | 1073.5266, 455.3172, 425.3064 | + | + | 2.46 | ↑** |
| 11 | 15.21 | 远志皂苷 TG | C ₆₄ H ₁₁₀ O ₃₂ | 1379.6119 | 0.39 | 1235.5738, 455.3179, 425.3064 | + | + | 0.37 | ↓ |
| 12 | 16.58 | 甘草素 | C ₄ H ₁₂ O ₄ | 255.0661 | 3.66 | 135.0073, 119.0487, 91.0173 | - | + | 1.17 | ↑** |
| 13 ^a | 20.11 | 细叶远志皂苷 | C ₃₈ H ₅₀ O ₁₇ | 679.3701 | 1.85 | 455.3171, 425.3062 | + | + | 2.42 | ↑** |
| 14 | 29.90 | 远志皂苷 L | C ₃₆ H ₄₈ O ₁₅ | 1847.7750 | 0.25 | 1703.7347, 455.3162, 425.3064 | + | + | 0.13 | ↓ |
| 15 | 30.33 | 瓜子金皂苷 XXXII | C ₇₉ H ₁₁₈ O ₃₈ | 1673.7252 | 2.08 | 1643.7213, 1449.7137, 669.2276 | + | + | 1.99 | ↑** |
| 16 | 30.36 | 远志皂苷 V | C ₈₂ H ₁₂₂ O ₄₁ | 1761.7358 | -1.10 | 1617.6982, 455.3222, 425.3064 | + | + | 0.47 | ↓ |

a. 对照品比对鉴定; + 检测到, - 未检测到; ↑ 炮制后响应值上升, ↓ 炮制后响应值下降; 与远志组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 远志和制远志入血代谢产物鉴定和比较

| 编号 | t_r / min | 化合物名称 | 分子式 | 母离子 m/z [M-H] ⁻ | 偏差/ $\times 10^{-6}$ | 二级碎片离子 | 远志 | 制远志 | VIP 值 | 趋势 |
|-----|----------------|---------------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|----|-----|-------|-----|
| D1 | 1.85 | 对香豆酸 + H ₂ | C ₉ H ₁₀ O ₂ | 165.0556 | 5.933 | 121.0307 | + | + | 1.07 | ↑ |
| D2 | 1.97 | 对香豆酸 + CH ₃ | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ | 177.0551 | 2.707 | 133.9835, 93.0382 | + | + | 0.83 | ↑ |
| D3 | 7.84 | 远志酸 | C ₂₅ H ₃₄ O ₆ | 487.3048 | -0.635 | 469.1344 | + | + | 0.69 | ↑ |
| D4 | 8.17 | 远志 酮 III - H ₂ O | C ₂₅ H ₂₆ O ₄ | 549.1253 | 2.583 | 343.0630, 287.0512, 243.3462 | + | + | 0.69 | ↓ |
| D5 | 8.21 | 远志 酮 III - CH ₃ | C ₂₄ H ₂₆ O ₅ | 553.1194 | 1.091 | 343.0630, 287.0512 | + | + | 0.78 | ↓ |
| D6 | 11.24 | 3,4,5-三甲氧基肉桂酸 - CH ₃ | C ₁₁ H ₁₂ O ₃ | 223.0620 | 8.518 | 209.2562 | + | + | 1.09 | ↑* |
| D7 | 16.75 | 甘草素 + CH ₃ | C ₁₆ H ₁₄ O ₄ | 269.0825 | 6.186 | 255.0661, 135.0073, 91.0173 | - | + | 1.13 | ↑** |
| D8 | 19.31 | 细叶远志皂苷 - Glc | C ₃₂ H ₄₆ O ₆ | 502.3167 | 1.392 | 455.3176, 425.3071 | + | + | 1.46 | ↑** |
| D9 | 20.43 | 细叶远志皂苷 - OH | C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁ | 663.3743 | 0.620 | 455.3176, 425.3067 | + | + | 0.79 | ↑ |
| D10 | 21.21 | 细叶远志皂苷 - CH ₂ OH | C ₃₅ H ₅₅ O ₁₁ | 648.3522 | 2.755 | 425.3061 | + | + | 0.24 | ↑ |
| D11 | 21.32 | 细叶远志皂苷 + H ₂ O | C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂ | 697.3816 | 3.200 | 679.3693, 425.3062 | + | + | 0.49 | ↑ |

+ 检测到, - 未检测到; ↑ 炮制后响应值上升, ↓ 炮制后响应值下降; 与远志组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 远志和制远志入血原型成分鉴定

在远志组大鼠血清中鉴定出 1 个有机酸类成分、2 个酮类成分、4 个寡糖酯类成分、6 个皂苷类成分；在制远志组大鼠血清中鉴定出 3 个有机酸类成分、2 个酮类成分、4 个寡糖酯类成分、6 个皂苷类成分和 1 个黄酮类成分。远志和制远志共有入血原型成分 13 个，分别为芥子酸、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志酮 XI、远志酮 III、远志寡精 K、远志寡精 O、瓜子金皂苷 XXVIII、远志皂苷 TG、细叶远志皂苷、远志皂苷 L、瓜子金皂苷 XXXII、远志皂苷 V，而对香豆酸、对甲氧基肉桂酸和甘草素 3 个成分只在制远志组大鼠血清中检出；除黄酮类成分甘草素来源于辅料甘草外，其余成分均来源于远志。

3.2.1 有机酸类

化合物 1、2、7 为有机酸类化合物。化合物 1、2 与文献数据^[11]及对照品芥子酸、对香豆酸的母离子和质谱裂解碎片比较，鉴定为芥子酸、对香豆酸。化合物 7 母离子 m/z 177.0624 $[M - H]^-$ ，推测其分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$ ，碎片离子主要为 m/z 133.8385 $[M - H - HCOOH]^-$ ，与文献^[11]报道的对甲氧基肉桂酸数据相符，推测化合物 7 为对甲氧基肉桂酸，对甲氧基肉桂酸可能的裂解途径见图 2。

3.2.2 酮类

化合物 5、6 为有酮类化合物。化合物 5 的母离子 m/z 567.1357 $[M - H]^-$ ，推测其分子式可能为 $C_{25}H_{28}O_{15}$ ，碎片离子主要为 m/z 435.0911 $[M - H - C_5H_8O_4]^-$ ，

m/z 417.0838 $[M - H - C_5H_8O_4 - H_2O]^-$ ，与文献报道的远志酮 XI 数据相符^[11]，推测化合物 5 为远志酮 XI。化合物 6 与文献数据^[11]及对照品远志酮 III 的保留时间和质谱裂解碎片比较，鉴定为远志酮 III。

3.2.3 寡糖酯类

化合物 3、4、8、9 为寡糖酯类化合物。化合物 3、4 与文献数据^[11]及对照品西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 的母离子和质谱裂解碎片比较，鉴定为西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6。化合物 8 母离子 m/z 1265.3764 $[M - H]^-$ ，推测其分子式为 $C_{57}H_{70}O_{32}$ ，碎片离子主要为 m/z 1119.3421 $[M - H - C_9H_6O_2]^-$ ， m/z 1077.3371 $[M - H - C_9H_6O_2 - C_2H_3O]^-$ ，与文献^[11]报道的远志寡精 K 数据相符，鉴定为远志寡精 K，远志寡精 K 可能的裂解途径见图 3。同理化合物 9 的质谱数据与文献^[11]报道的远志寡精 O 数据一致，鉴定为远志寡精 O。

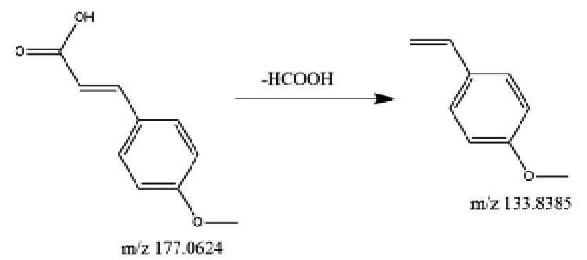


图 2 对甲氧基肉桂酸可能的裂解途径

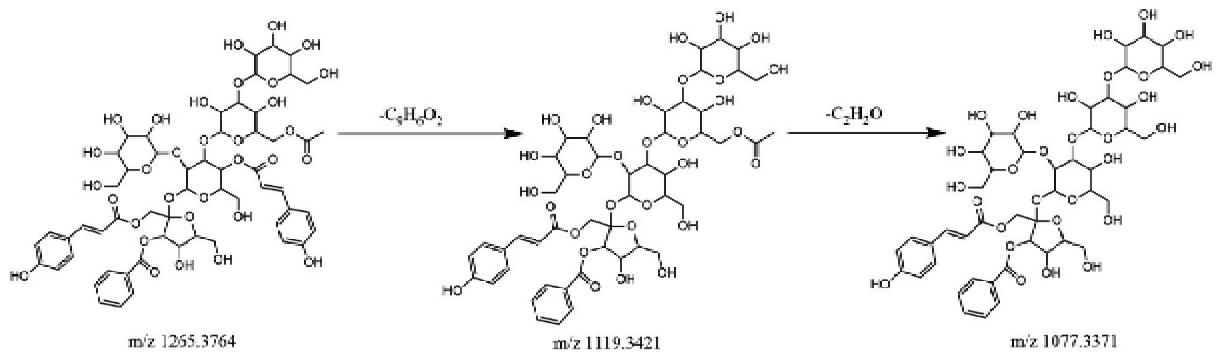


图 3 远志寡精 K 可能的裂解途径

3.2.4 皂苷类

化合物 10、11、13、14、15、16 为皂苷类化合物。化合物 10、13 与文献数据^[11]及相应对照品的母离子和质谱裂解碎片比较，鉴定为瓜子金皂苷 XXVIII、细叶远志皂苷。化合物 15 母离子 m/z 1673.7252 $[M - H]^-$ ，推测其分子式为 $C_{59}H_{118}O_{38}$ ，碎片离子主要有 m/z 1643.7213 $[M - H - OCH_2]^-$ ， m/z 1449.7137 $[M - H - C_7H_6O - C_4H_7O_4]^-$ ， m/z 669.2276 $[M - H - C_{36}H_{54}O_2$

$- C_5H_8O_5 - C_5H_8O_3 - OCH_2]^-$ ，结合文献报道^[11]，推测该化合物为瓜子金皂苷 XXXII，瓜子金皂苷 XXXII 可能的裂解途径见图 4。同理参考文献^[11]推测化合物 11、14、16 依次为远志皂苷 TG、远志皂苷 L、远志皂苷 V。

3.3 远志和制远志入血代谢产物鉴定

在远志和制远志组大鼠血清中分别鉴定出 10、11 个代谢产物，其中，对香豆酸 + H_2 、对香豆酸 + CH_3 、远

志酸、远志酮 III - H₂O、远志酮 III - CH₃、3,4,5 - 三甲氧基肉桂酸 - CH₃、细叶远志皂苷 - Glc、细叶远志皂苷 - OH、细叶远志皂苷 - CH₂OH、细叶远志皂苷 + H₂O

为远志和制远志共有代谢产物,而甘草素 + CH₃ 只在制远志组大鼠血清中检出。检测到的代谢产物包括有机酸、酮类、皂苷类、黄酮类成分。

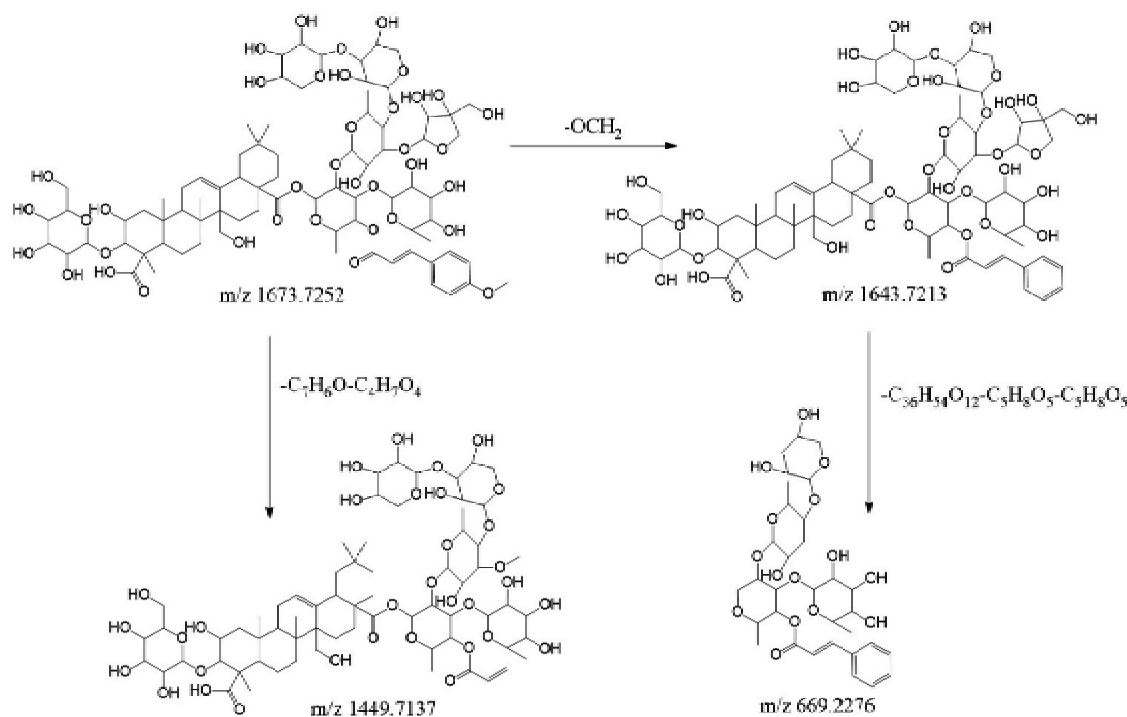


图 4 瓜子金皂苷 XXXII 可能的裂解途径

3.3.1 有机酸类代谢产物

在大鼠体内共检测到 4 个有机酸类代谢产物(D1、D2、D3、D6),有机酸类成分在大鼠体内主要发生还原、水解、去甲基化、甲基化反应。化合物 D1 的母离子 m/z 165.0556 [M - H]⁻,推测分子式可能为 C₉H₁₀O₃,与对香豆酸的母离子(m/z 163.0440)相差约 2 Da,且产生二级质谱碎片 m/z 121.0307 [M - H - CHO₂]⁻,与对香豆酸产生的二级质谱碎片 m/z 119.0485 相差约 2 Da,故推测 D1 为对香豆酸的加氢还原产物对香豆酸 + H₂。同理,推测化合物 D2 为对香豆酸的甲基化产物对香豆酸 + CH₃,D3 为远志皂苷类成分的水解产物远志酸,D6 为 3,4,5 - 三甲氧基肉桂酸的去甲基化产物 3,4,5 - 三甲氧基肉桂酸 - CH₃。

3.3.2 酮类代谢产物

在大鼠体内共检测到 2 个酮类代谢产物(D4、D5),酮类成分在大鼠体内主要发生水解、去甲基化反应。化合物 D4 的母离子 m/z 549.1253 [M - H]⁻,推测分子式可能为 C₂₅H₂₆O₁₄,与远志酮 III 的母离子(m/z 567.1362)相差约 18 Da,且产生二级质谱碎片 m/z 343.0630 [M - H - OCH₃ - C₆H₈O₄ - O₂]⁻, m/z 287.0512 [M - H - C₁₀H₁₅O₈]⁻, m/z 243.3462 [M - H - C₁₁H₁₇O₆ - OCH₃]⁻,故推测化合物 D4 为远志酮 III 的水解产物远志酮 III - H₂O。同理推测化合物 D5 为远志

酮 III 的去甲基化产物远志酮 III - CH₃。远志酮 III 可能的代谢途径见图 5。

3.3.3 皂苷类代谢产物

在大鼠体内共检测到 4 个皂苷类代谢产物(D8、D9、D10、D11),皂苷类成分在大鼠体内主要发生去羟基化、去羟甲基化、脱葡萄糖和水合等反应。化合物 D8 的母离子 m/z 502.3167 [M - H]⁻,推测分子式可能为 C₃₀H₄₆O₇,与细叶远志皂苷的母离子(m/z 679.3701)相差约 177 Da,且二级质谱碎片 m/z 455.3176、 m/z 425.3071 为细叶远志皂苷母核产生的特征离子,故推测化合物 D8 为细叶远志皂苷脱葡萄糖产物细叶远志皂苷 - Glc。同理推测化合物 D9、D10、D11 分别为细叶远志皂苷的去羟基化产物细叶远志皂苷 - OH、细叶远志皂苷的去羟甲基化产物细叶远志皂苷 - CH₃OH、细叶远志皂苷的水合产物细叶远志皂苷 + H₂O。细叶远志皂苷可能的代谢途径见图 6。

3.3.4 黄酮类代谢产物

在大鼠体内共检测到 1 个黄酮类代谢产物(D7),黄酮类成分在大鼠体内发生甲基化反应。化合物 D7 的母离子 m/z 269.0825 [M - H]⁻,推测分子式可能为 C₁₆H₁₄O₂,与甘草素的母离子(m/z 255.0661)相差约 14 Da,且二级质谱碎片 m/z 255.0661、 m/z 135.0073、 m/z 91.0173 为甘草素母核产生的特征离子,故推测为甘草素的甲基化产物甘草素 + CH₃。

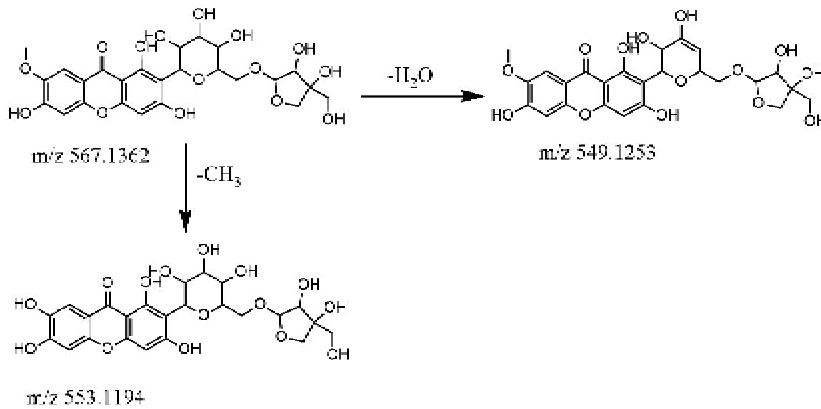


图 5 远志酮 III 可能的代谢途径

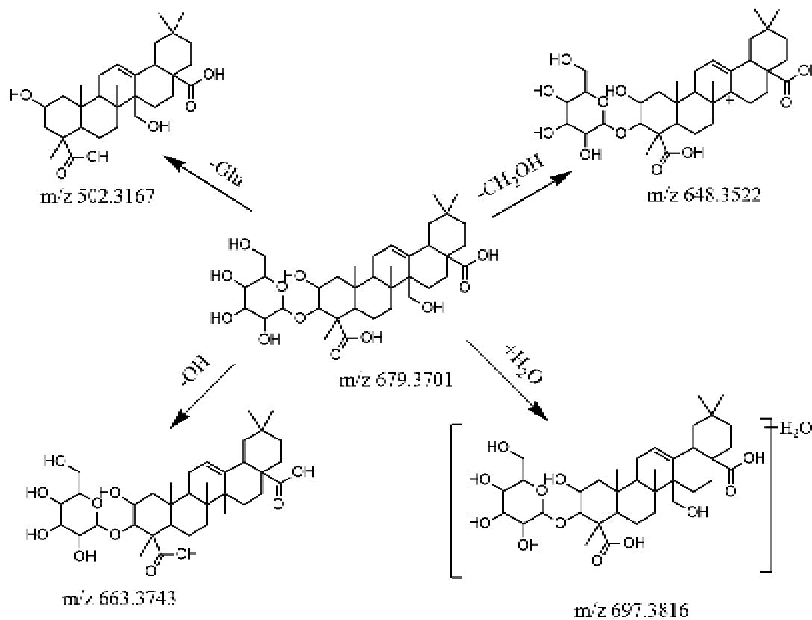


图 6 细叶远志皂苷可能的代谢途径

3.4 远志和制远志入血成分差异分析

远志和制远志入血成分 PCA、OPLS-DA 得分见图 7~图 8, 结果两组间存在明显分离, 各化合物 VIP 值见表 1。对 VIP 值 ≥ 1 的成分进行 t 检验, 比较组间差异, 结果筛选出 9 种入血差异成分, 包括 6 个原型成分和 3 个代谢产物; 远志经甘草汁煮制后, 瓜子金皂苷 XXVIII、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷 XXXII、甘草素、3,4,5-三甲氧基肉桂酸-CH₃、甘草素+CH₃、细叶远志皂苷-Glc 响应值显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 西伯利亚远志糖 A6、远志酮 III 响应值显著下降 ($P < 0.05$); 此外, 芥子酸、对香豆酸、远志酮 XI、对甲氧基肉桂酸、对香豆酸+H₂、对香豆酸+CH₃、远志酸、细叶远志皂苷-OH、细叶远志皂苷-CH₂OH、细叶远志皂苷+H₂O 响应值呈上升趋势, 西伯利亚远志糖 A5、远志寡精 K、远志寡精 O、远志皂苷 TG、远志皂苷 L、远志皂苷 V、远志酮 III-H₂O、远志酮 III-CH₃ 响应值呈下降趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果见表 2、表 3。

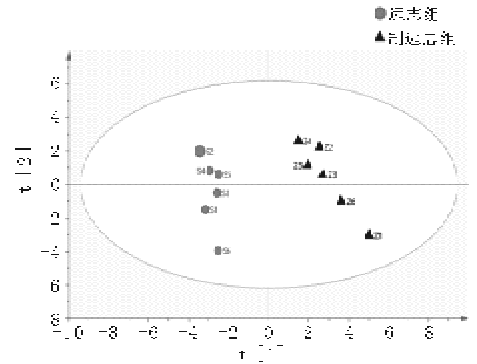


图 7 远志和制远志组大鼠血清样本 PCA 得分图

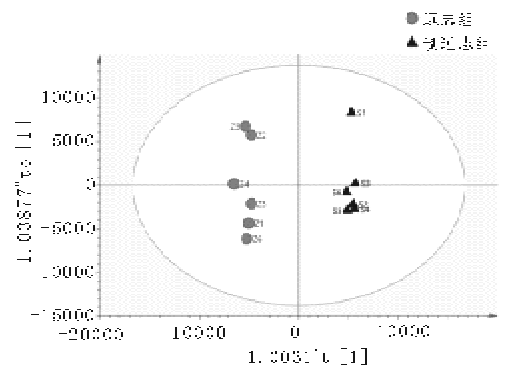


图 8 远志和制远志组大鼠血清样本 OPLS-DA 得分图

4 讨论

本研究在前期建立远志和制远志提取物体外化学成分库基础上, 采用血清药物化学方法和 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析大鼠灌胃远志和制远志提取物含药血清的化学成分, 结果显示, 在远志组大鼠血清样品中鉴定出 23 个成分, 包括 13 个原型成分和 10 个代谢产物, 原型成分包括有机酸类、酮类、寡糖酯类、皂苷类成分, 代谢产物包括有机酸类、酮类、皂苷类成分; 在制远志组大鼠血清样品中鉴定出 27 个成分, 包含 16 个原型成分和 11 个代谢产物, 原型成分包括有机酸类、酮类、寡糖酯类、皂苷类、黄酮类成分, 代谢产物包括有机酸类、酮类、皂苷类、黄酮类成分; 进一步结合 PCA、OPLS-DA、t 检验分析远志与制远志入血成分差异, 共筛选出远志与制远志入血差异成分 9 个, 包括 6 个原型成分和 3 个代谢产物, 其中, 远志经甘草汁煮制后, 大鼠血清中瓜子金皂苷 XXVIII、甘草素、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷

XXX II、3,4,5-三甲氧基肉桂酸-CH₃、甘草素+CH₃、细叶远志皂苷-Glc 响应值显著上升,西伯利亚远志糖 A6、远志酮 III 响应值显著下降。上述研究说明,远志经甘草汁煮制后人血成分的种类、数量和相对含量发生明显变化。

目前对远志化学成分药理作用研究主要集中于中枢神经系统。研究表明,细叶远志皂苷具有镇静催眠、提高学习记忆和抗老年痴呆作用^[12,13]。芥子酸可改善大鼠的记忆缺陷^[14]。远志皂苷 L、远志皂苷 V、西伯利亚远志糖 A5 对神经细胞具有保护作用^[15,6]。远志酮 III 具有抗炎作用^[17]。瓜子金皂苷 XXX II 可减轻东莨菪碱诱导的小鼠认知功能障碍^[15]。代谢产物远志酸具有抑制炎症和减轻认知功能障碍^[19]。本研究表明,芥子酸、西伯利亚远志糖 A5、远志酮 III、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷 XXX II、远志皂苷 L、远志皂苷 V、远志酸为远志和制远志共有入血成分,上述成分的药理活性可能是远志和制远志发挥安神益智功效的共有物质基础。在远志和制远志代谢产物中发现的远志酮 III-H₂O、远志酮 III-CH₃、细叶远志皂苷-Glc、细叶远志皂苷-OH、细叶远志皂苷-CH₂OH、细叶远志皂苷+H₂O 表明,远志酮 III、细叶远志皂苷吸收入血后在体内可能发生生物转化,进一步推测上述代谢产物也可能是远志和制远志的共有活性成分。研究表明,甘草素可显著改善绝经前后阿尔茨海默病小鼠的学习记忆能力,并有神经保护作用^[20,21]。本研究表明,甘草素仅在制远志组大鼠血清中检出,甘草素及其代谢产物甘草素+CH₃可能是制远志有别于生远志的活性成分。

本研究表明,远志甘草汁煮制前后在大鼠血清中的代谢途径基本一致,包括甲基化、去甲基化、去羟基化、去羟甲基化、还原、水解、脱葡萄糖反应和水合反应,远志中有机酸类、酮类、皂苷类成分及甘草中黄酮类成分在大鼠体内可发生代谢转化。代谢产物远志酸分析是由于入血的远志皂苷类成分在体内发生生物转化所致。

课题组前期研究表明,远志在炮制过程中,其所含的远志皂苷 B、远志皂苷 Z、远志皂苷 F 均可水解为细叶远志皂苷和瓜子金皂苷 XXVIII^[5]。本研究表明,远志炮制后大鼠血清中的瓜子金皂苷 XXVIII、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷 XXX II、甘草素含量显著升高,结合上述成分的药理研究报道,推测远志炮制增效可能与提高血清中瓜子金皂苷 XXVIII、细叶远志皂苷、瓜子金皂苷 XXX II 等小分子皂苷类成分和甘草素的浓度有关,小分子皂苷类成分和甘草素可能是远志炮制增效的主要物质基础。

本实验应用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术和多元变量统计分析方法,从血清药物化学角度分析

了远志甘草汁煮制前后入血成分及其差异,结果表明,本研究初步分析得到血中原型成分和代谢产物可能是远志和制远志各自潜在活性成分,远志炮制前后入血成分具有明显差异,为揭示远志和制远志药效物质基础及远志炮制原理提供了实验依据,但远志炮制前后主要化学成分的体内变化规律尚不清楚,未来将采用药代动力学等方法深入研究远志炮制前后主要化学成分的体内吸收、分布、代谢及排泄规律,探讨其体内转化过程,研究甘草汁在远志炮制中的作用,以期更深入阐释远志炮制机理,并为建立具有个性特色的制远志饮片质量标准提供科学依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 163.
- [2] 韩晗, 张智华, 曹秋实, 等. 远志的药用分析 [J]. 中医药导报, 2018, 24(24): 127.
- [3] ZHAO X, GUI Y L, WU P, et al. *Polygonae Radix*: a review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics [J]. *Fitoterpia*, 2020, 147: 104759.
- [4] 高慧, 熊晓莉, 张青, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术分析远志炮制前后成分变化 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12): 1845.
- [5] 何梦娇, 庄梓鸣, 邢玥, 等. 基于模拟炮制技术研究远志炮制前后皂苷类成分转化规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 169.
- [6] 王梓宇, 张智慧, 吴鹏, 等. 基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨甘草制远志降低肠道炎症的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4556.
- [7] 郭常润. 远志不同炮制品对东莨菪碱模型小鼠模型学习记忆的影响 [J]. 山东化工, 2015, 44(4): 10.
- [8] CUI Y, ZHAO X, TANG Y, et al. Comparative study on the chemical components and gastrointestinal function on rats of the raw product and licorice-simmered product of *Polygona tenuifolia* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8855536.
- [9] WANG L, PU X, NIE X, et al. Integrated serum pharmacochromy and network pharmacological analysis used to explore possible anti-rheumatoid arthritis mechanisms of the Shentong-Zhuyu decoction [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 273: 113988.
- [10] GAO H, YUAN Z, LIANG H, et al. Integrating UPLC-Q-Orbitrap MS with serum pharmacochromy networks and experimental verification to explore the pharmacological mechanisms of *Cynanchi stauntonii rhizoma et radix* against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Frontiers in pharmacology*, 2024, 15: 1261772.
- [11] 何梦娇, 周巧, 赵梦, 等. 远志与放远志化学成分差异及对大鼠胃肠运动的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(12): 2923.
- [12] WEN L, XIA N, TANG P, et al. The gastrointestinal irritation of *polygona saponins* and its potential mechanism in vitro and in vivo [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 918048.
- [13] 冯非, 李昕三, 赵宏伟, 等. 细叶远志皂苷治疗痴呆的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 258.
- [14] KARAKIDA F, IKEYA Y, TRITEPENOID M, et al. Cerebral protective and cognition-improving effects of sinupic acid in rodents. [J]. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(3):514.

- [15] LI C, YANG J, YU S, et al. Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots of *Polygala tenuifolia* [J]. *Planta Med*, 2008;74(2): 133.
- [16] XU H H, LIU P, MA L, et al. Isolation and activity of oligosaccharide esters from effective regions of *Polygala tenuifolia* Willd [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008; 33(11): 1278.
- [17] WU Y, FU H, YANG X, et al. Polygalaxanthone III downregulates inflammation in the lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages: A quantibody array analysis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021; 147(2): 184.
- [18] ZHOU H, XUE W, CHU S F, et al. Polygalasaponin XXXII, a triterpenoid saponin from *Polygalae Radix*, attenuates scopolamine-induced cognitive impairments in mice [J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2016; 37(8): 1045.
- [19] ZHAO T, JIA J. Polygalacic acid attenuates cognitive impairment by regulating inflammation through PPAR γ /NF- κ B signaling pathway [J]. *CNS neuroscience & therapeutics*, 2024, 30(2): e14581.
- [20] 耿清华, 赵月阳, 贺桂琼, 等. 甘草素对去卵巢 APP/PS1 转基因小鼠肠道菌群的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2023, 44(5):768.
- [21] 赫秋会, 贺桂琼, 骆世芳, 等. 甘草素对去卵巢 APP/PS1 双转基因小鼠的保护作用初探 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018; 37(3):1110.

Study on serum pharmacochimistry of components of Radix Polygalae entering the blood aspect before and after preparation

ZHUANG Ziming^{1,2}, ZHAO Xin², ZHAO Meng¹, LI Haoran², XING Yue², ZHANG Xuelan^{1,2*}

(1. *Shandong Xiehe University, Jinan 250109, China*; 2. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China*)

Abstract; **Objective** To analyze the components and difference of Radix Polygalae before and after licorice processing in the serum of rats using serum pharmacochimistry. **Methods** SD rats were given extracts of Radix Polygalae or licorice-processed Radix Polygalae to prepare drug-containing serum, and components of Radix Polygalae or licorice-processed Radix Polygalae were identified by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. Based on the self-constructed chemical composition library of extracts of Radix Polygalae and licorice-processed Radix Polygalae, combined with Thermo Xcalibur software, the mass spectrometry fragment information was analyzed and identified according to the relative retention time, relative molecular mass, fragmentation pattern, and literature reports. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and t test were performed to study the different components of Radix Polygalae before and after licorice processing. **Results** 23 components, including 13 prototypical components and 10 metabolites, were identified in the serum samples of Radix Polygalae group. 27 components, including 16 prototypical components and 11 metabolites, were identified in serum samples of licorice-processed Radix Polygalae group. A total of 9 different components of Radix Polygalae and licorice-processed Radix Polygalae were screened out, including 6 prototypical components and 3 metabolites. **Conclusion** The type, quantity and relative content of Radix Polygalae before and after licorice processing in serum were changed significantly. The prototype components and metabolites identified in serum may be the potential active components of Radix Polygalae and licorice-processed Radix Polygalae. This study provides a scientific basis for the research on the pharmacological material basis and processing mechanism of Radix Polygalae and licorice-processed Radix Polygalae.

Key words; Radix Polygalae; Licorice-processed; Serum pharmacochimistry; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; Prototypical components; Metabolites

(责任编辑:熊久林)