

中药多成分药代动力学分析技术研究进展

李元元, 王彩虹, 生 宁, 马聪玉, 张金兰

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 中药多成分药代动力学是中医药理论和作用机制阐明的重要研究内容。如何全面、准确地描述中药复杂成分在体内的药代动力学过程, 诠释中药多成分、多靶标、多途径的特点, 需要强有力的分析技术支撑。近年来, 多种高通量、快速、自动化的前处理技术显著提升了中药体内外多成分的分离提取效率; 色谱、质谱分析技术蓬勃发展, 推动了中药体内外多成分的快速鉴别和全面、准确定量; 质谱成像等新兴技术不断涌现, 为中药多成分药代动力学研究提供了新的分析平台和研究手段。本文综述了近 10 年来中药多成分药代动力学研究分析技术的进展和应用, 并对其前景进行展望。

关键词: 中药; 多成分药代动力学; 前处理; 色谱; 质谱

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2023)01-0001-12

doi: 10.7538/zpxb.2022.0021

Research Advance on Multi-Component Pharmacokinetic Analytical Techniques of Traditional Chinese Medicine

LI Yuan-yuan, WANG Cai-hong, SHENG Ning,

MA Cong-yu, ZHANG Jin-lan

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: The multi-component pharmacokinetic of traditional Chinese medicine (TCM) is vital to clarify the theory and mechanism of TCM. Based on information of absorption, distribution, metabolism, and excretion dynamic changes for active components of TCM *in vivo*, the material basis for the safety and efficacy can be elucidated via combination with pharmacodynamics. However, due to the complexity and diversity of TCM components, and their complicated and unclear interactions with biological system, there are many bottleneck problems for the multi-component pharmacokinetics of TCM, such as the numerous chemical composition and diverse metabolic reaction make it difficult to identify their structures and interpret metabolic pathway *in vivo*; and unclear active components, low concentrations of target components in biological samples, endogenous interferences from matrix and lack of authentic standards bring difficulties to establish qualitative and quantitative methods. In recent years, the pretreatment methods for biological samples have been well developed. The separation and extraction efficiency for multi-component of TCM *in vivo* and *in vitro* have been significantly

improved using various high-throughput, fast and automated pretreatment techniques. The development of chromatography and mass spectrometry promotes the rapid comprehensive and accurate discovery and quantification for multi-component of TCM. Novel analytical methods such as mass spectrometry imaging were used to provide new strategies for multi-component pharmacokinetics of TCM. In this paper, the development and application of analytical techniques for multi-component pharmacokinetic of TCM in the past 10 years were summarized, and a brief perspective was discussed. Firstly, the pretreatment of biological sample was introduced, the advantages and disadvantages of some usual sample pretreatment methods were compared such as protein precipitation and liquid-liquid extraction, solid phase extraction, microextraction, microdialysis. The applications of these different pretreatment techniques in the pharmacokinetics research of TCM were interviewed. Then, the principles and developments of different chromatographic techniques including high performance liquid chromatography and gas chromatography used in multi-component pharmacokinetic of TCM were introduced. Finally, the mass spectrometry ionization techniques were summarized and discussed including electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for liquid chromatography, electron impact and chemical ionization for gas chromatography, desorption electrospray ionization, direct analysis in real time, mass spectrometry imaging.

Key words: traditional Chinese medicine (TCM); multi-component pharmacokinetic; pretreatment; chromatography; mass spectrometry

中药药代动力学是研究中药活性成分或指标成分在体内吸收、分布、代谢和排泄的动态变化规律,与药效学结合诠释中药的安全性和有效性,为中药发挥药效的物质基础、作用机制、复方组方原理及中药传统理论的科学阐释提供依据,是诠释中药理论和机制的桥梁学科。由于中药成分的复杂性及药效物质尚不明确,其药代动力学研究存在诸多困难,如中药化学组成复杂、体内代谢途径多样、体内成分结构鉴定和代谢途径诠释困难;中药药效成分不明使药代动力学研究的目标成分不明确,且目标成分在生物样本中的浓度低、内源性基质和目标成分之间干扰大、中药成分及其代谢产物对照品有限,使中药多成分检测和定量分析方法的建立存在困难。

随着分析技术的快速发展,研究人员通过探索并开发适合中药多成分分析的新技术,有力地推动了中药多成分药代动力学研究,实现了体内中药多成分高效、全面的定性分析和灵敏、快速、准确、宽动态范围的定量分析。本文将对近10年来中药药代动力学的分析技

术发展及应用进行综述。

1 样本前处理技术

生物样本的前处理技术主要包括提取、分离与富集,以达到提高分析灵敏度和准确度,同时降低基质干扰的目的^[1]。在中药多成分药代动力学研究中,给药液自身的复杂性和所采集生物样本中内源性物质、中药原型成分及代谢产物的复杂性等都对生物样本前处理技术提出了更高的要求。中药药代动力学研究采集的生物样本通常包括体液(血浆、血清、尿液、胆汁等)和组织器官(心、肝、脑、肠等),前处理方法主要有蛋白沉淀法、液-液萃取法和固相萃取法^[2]。由于生物样本的基质复杂、中药待测成分含量低且不易提取,研究人员需要针对具体生物样本和待测目标成分的理化性质系统地优化并选择适合的前处理技术。另外,针对特定化合物的理化性质还需采用特殊的方式,如黄芩苷和黄芩素在生物样本中易发生氧化,需要在样本采集后加入抗坏血酸进行保护^[3-4]。针对生物样本中不稳定成分采用的稳定剂列于表1。

表 1 生物样本中不稳定成分采用的稳定剂

Table 1 Stabilizers for unstable components in biological samples

不稳定成分 Unstable component	结构类型 Structure type	稳定剂 Stabilizer	样本类型 Sample type	参考文献 Reference
黄芩素、黄芩苷	黄酮类	抗坏血酸	大鼠血浆、尿液、粪便、组织	[3-4]
花青素、花青素苷	黄酮类	乙酸	人血浆、尿液	[5]
杨梅素	黄酮类	盐酸、抗坏血酸	大鼠血浆	[6]
丹酚酸 A	酚酸类	抗坏血酸	大鼠血浆、脑组织	[7-8]
丹酚酸 B、迷迭香酸	酚酸类	抗坏血酸	大鼠血浆	[8-9]
没食子酸	酚酸类	甲酸	大鼠血浆	[10]
没食子酸、槲皮素、槲皮苷	酚酸类、黄酮类	甲酸	大鼠血浆	[11]
京尼平	环烯醚萜类	乙酸	大鼠血浆	[12]
京尼平苷酸	环烯醚萜类	甲酸	大鼠血浆	[13]

1.1 常用前处理技术

1.1.1 蛋白沉淀法 蛋白沉淀法 (protein precipitation, PPT)适用于含药浓度较高的生物样本,具有操作简单、设备要求不高等特点,主要用于血浆和组织样本的前处理,常用的有机溶剂包括乙腈、甲醇和乙醇等,将不同有机溶剂按不同比例混合能够影响生物样本中蛋白的变性和沉淀过程,从而影响化合物的提取回收率。例如,Chen 等^[14]使用含不同比例乙醇的乙腈蛋白沉淀法比较了大鼠血浆和组织样本中没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸等 15 种中药火炭母成分的提取效率,发现当乙醇与乙腈体积比为 1 : 1 时,各成分的提取回收率最佳,均大于 80%,实现了大鼠给药火炭母提取物后多成分血浆药代动力学和组织分布研究。

1.1.2 液-液萃取法 液-液萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE)的优点在于其具有较高的选择性,可通过使用不同的萃取溶剂选择性去除生物样本中的干扰物质。但该方法难以应用于多个极性差异较大化合物的同时提取,必要时需采用多步液-液萃取法。例如,尼莫地平 and 银杏叶提取物联用对血管性痴呆患者具有较好的临床疗效,但银杏叶提取物的主要活性成分黄酮类化合物在体内以苷元、葡萄糖醛酸化代谢物和硫酸化代谢物 3 种形式存在,与尼莫地平的极性差异较大。基于此,Xiao 等^[15]开发了两步萃取法,即先用正己烷-乙醚混合溶剂提取大鼠血浆中的尼莫地平,剩余残渣经酸水解,将黄酮的葡萄糖醛酸化

代谢物和硫酸化代谢物转化为黄酮苷元后,再用乙酸乙酯充分提取,实现了大鼠血浆中尼莫地平和银杏叶提取物多成分的同时定量分析。实验结果表明,与单药给药相比,联用给药不会改变尼莫地平或银杏叶提取物成分在大鼠体内的药代动力学行为,为联用给药剂量和方案的制订提供了数据支持。

1.1.3 固相萃取法 固相萃取法 (solid phase extraction, SPE)在降低内源性物质干扰、减少基质效应方面极具优势。通常采用商品化的固相萃取小柱,按其所用填料主要分为反相填料^[16] (硅胶键合 C4、C8、C18 和 Phenyl)、正相填料^[16] (硅胶键合 Si-CN、Si-NH₂ 和 Si-Diol)、离子交换填料^[17] (硅胶键合 Si-WAX、Si-SAX、Si-SCX 和 Si-WCX)以及混合型填料^[18] (分子印迹聚合物和分子印迹膜),一般需依据分析物的极性、溶解度、解离常数 (pKa)等理化性质选择合适的固相萃取柱。Zheng 等^[19]开展了益气复脉粉针剂在心力衰竭大鼠体内的药代动力学研究,使用甲醇或乙腈蛋白沉淀法,以及乙酸乙酯、氯仿或正丁醇液-液萃取法均无法排除大鼠血浆中内源性物质对人参皂苷类成分的基质干扰,且提取回收率较低;而采用 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱前处理后可使基质效应符合要求,各人参皂苷类成分的提取回收率大于 60%,实现了益气复脉粉针剂给药后大鼠血浆中 10 种人参皂苷类成分的准确定量。

近年来,随着新型固相吸附剂的开发,固相萃取小柱得到了较快发展。从传统的反相固相

吸附剂发展到两亲性固相吸附剂(同时具备非极性和极性官能团),其可以保留极性至非极性化合物,适用于理化性质差异较大的中药多成分前处理要求。同时,为适应生物样本的大规模、平行、快速处理,高通量固相萃取板和集成式全自动固相萃取仪相继产生,并出现了一些无需活化和平衡的“快速”固相萃取小柱(例如,默克 Supel™ Swift HLB 小柱),极大地提高了中药多成分药代动力学研究的分析通量。

1.2 微萃取技术

除常规 PPT、LLE 和 SPE 外,一些新型的生物样本前处理技术不断涌现。微萃取技术具有高通量、消耗样本量和溶剂量小等特点,主要包括固相微萃取技术(solid-phase microextraction, SPME)^[20]、搅拌棒吸附萃取技术(stir bar sorptive extraction, SBSE)^[21]、填充吸附剂微萃取技术(microextraction by packed sorbent, MEPS)^[22]和单滴微萃取技术(single drop microextraction, SDME)^[23]等。微萃取技术的最大优势在于集生物样本分离、富集、浓缩于一体,可与分析仪器直接联用,极大地提高了样品的前处理效率。同液相色谱相比,微萃取部件更容易直接与气相色谱进样口端嵌和连接。例如,Deng 等^[24]通过优化纤维涂层种类、样品温度、萃取时间、搅拌速度等关键参数,建立了适用于兔血浆中细辛醚提取和富集的顶空固相微萃取-气相色谱联用技术,整个样品的前处理仅需 20 min,且无需有机溶剂,高效快速地表征了兔口服石菖蒲挥发油后血浆中细辛醚的药代动力学。但与常规的前处理技术相比,微萃取技术需要实验前期繁复的条件摸索和优化,对操作人员的要求较高,限制了其广泛应用。

1.3 微透析技术

中药药代动力学研究常用的取样方法主要是在给药后不同时间点取动物全血或动物组织进行匀浆,采集的生物样本通常要经过分层、离心、萃取、过滤等繁琐的前处理操作。微透析(microdialysis)作为一种生物活体取样技术,基于扩散的分离原理将带有半透膜装置的探针植入生物体内,在非平衡条件下只有游离的小分子药物能沿浓度梯度扩散至探针,并被灌流液不断带出,得到含有药物的透析液,操作流程

示于图 1。由于该技术使用的半透膜只允许小分子物质透过,大分子蛋白和脂类物质则被截留,因此透析液可以不经前处理直接测定。除此之外,微透析技术可以实现单个或多个部位的连续实时采样,降低实验动物体液损失、减少动物个体差异对结果的干扰^[25],该技术已应用于中药多成分体内分析研究。例如,Fu 等^[26]经微透析采样,结合液相色谱-三重四极杆质谱联用技术比较了正常大鼠和阿尔茨海默症模型大鼠的血浆和脑脊液中 10 种木脂素类成分的药代动力学差异,发现阿尔茨海默症病理状态能够显著改变木脂素类成分在大鼠体内的药代动力学行为,提示研究人员应充分关注疾病状态对中药多成分药代动力学的影响。欧咏^[27]在大鼠血管、肝脏、膝关节多部位同时植入微透析探针,可同时动态监测中药复方三妙丸给药后小檗碱在大鼠血、肝脏和膝关节中的浓度。微透析技术的另一优势在于其可与分析仪器直接联用,提高实验效率且避免前处理过程中的交叉污染和操作误差。例如,Wang 等^[28]研发了在线联用的接口装置,实现了微透析实时取样与超高效液相色谱-串联质谱的联用,并将其应用于慢性脑缺血大鼠给药刺五加提取物后 6 种主要活性成分在脑内的药代动力学研究,同时监测脑内神经递质的动态变化规律,阐明了刺五加提取物活性成分透过血脑屏障的能力和对神经递质的调控作用。

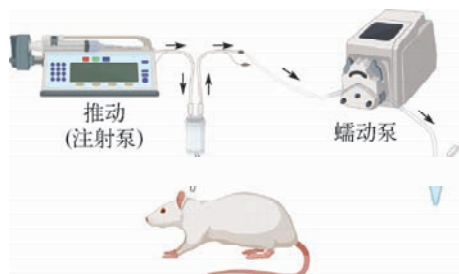


图 1 微透析技术示意图

Fig. 1 Schematic diagram of microdialysis technique

1.4 样本自动化前处理技术

中药药代动力学研究常需要对大批量样本进行前处理,快速、准确和自动化的前处理技术不仅能够提高检测通量,还有助于减少人为过

程的影响。目前,多家公司已经研发出专门用于蛋白沉淀法和固相萃取法的 96 孔板和固相萃取系统,如 Waters 公司的 Sirocco 蛋白沉淀板、Oasis 固相萃取板和配套的 96 孔正压提取装置,Agilent 公司的 Captiva 蛋白沉淀板和 Bond Elut 固相萃取板,Thermo 公司的 Hyper-Sep 蛋白沉淀板和 HyperSep-96 固相萃取装置等;另外,在线固相萃取、固相微萃取和微透析技术也渐趋成熟。自动化的前处理技术极大提高了中药生物样本的前处理通量,如 Tao 等^[29]以甲醇和乙酸乙酯为洗脱溶剂,采用 Waters Oasis HLB μ Elution 96 孔固相萃取板对大鼠灌胃给予麝香保心丸后的血浆样本进行前处理,结合液相色谱-质谱联用技术研究 9 种人参皂苷和 7 种蟾蜍二烯羟酸内酯成分的药代动力学特征;Pascale 等^[30]采用 Agilent Captiva EMR-Lipid 96 孔蛋白沉淀板用于人口服 5 种姜黄提取物制剂后血浆样本的前处理,结合液相色谱-质谱联用技术研究姜黄素及其主要代谢产物的药代动力学特征,实现了生物样本的高通量分析。

2 分析技术

中药体内成分和代谢物分析具有成分复杂、干扰多、含量低、浓度变化动态范围宽和数据处理工作量大等特点,需要分离效能高、灵敏度高、选择性好的分析技术。

2.1 色谱分析技术

2.1.1 高效液相色谱法 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)是目前中药药代动力学应用最广泛的分离技术,能够分离极性、离子化、不易挥发和热不稳定的化合物,具有分离效能高、适用范围广、选择性好的特点。为进一步缩短高效液相色谱的分析时间,提高分离效率,超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)逐渐得到应用,其基于 HPLC 原理,采用小颗粒填料色谱柱(粒径小于 2 μ m)和超高压系统(压力大于 105 kPa),具有分离效率更高、分析速度更快、重现性更好等优点,在中药及中药生物样本的分析中发挥了巨大的优势^[31]。Wei 等^[32]采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱技术同时测定比格犬灌胃给药补骨脂

提取物后血浆中的 10 种活性成分,研究补骨脂提取物中多成分药代动力学特征,在保证待测的 2 对同分异构体达到基线分离的同时,每个样本的分析时间仅需 8.5 min,该方法适用于大样本量的药代动力学分析。

根据流动相与固定相极性的差别程度,将高效液相色谱分为反相液相色谱(reversed phase liquid chromatography, RPLC)和正相液相色谱(normal phase liquid chromatography, NPLC)。RPLC 是目前应用最广的色谱分离技术,它能与各种常规的检测方法结合,解决多种分析问题,但对极性和亲水性化合物却很少或无法保留。采用 NPLC 法分析极性和亲水性化合物同样存在局限性。亲水相互作用色谱(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)采用极性固定相和高比例有机相-水的流动相。近年来,HILIC 受到越来越多的关注^[33-35]:一方面是对强极性和亲水化合物有很好的保留和分离选择性,与反相色谱有很好的互补性,同时,使用的流动相体系相对简单,克服了正相色谱流动相对水溶性物质溶解性差、与质谱检测器不兼容的问题。另一方面是因为强极性化合物的分离引起各研究领域的关注,如代谢组学、药物分析等;氨基、酰胺基、氰基、二醇基等都是亲水相互作用色谱常见的键合相类型,实验时可依据待测成分性质进一步优化色谱柱类型。Sun 等^[36]在开展中药乌头活性成分附子宁碱在大鼠血浆中的药代动力学研究时发现,附子宁碱在反相色谱柱上几乎无保留(保留时间小于 2 min),而使用键合有聚丙烯酰胺的 HILIC 色谱柱后,附子宁碱可与血浆中其他干扰物质有效分离,能够满足药代动力学研究的要求。

经典的一维色谱分离有时存在峰容量低和峰重叠等问题,难以实现中药及其代谢物全组分的准确定性和定量。而二维液相色谱通过 2 个不同分离模式的色谱柱分离样品,显著提高了系统峰容量和分离度^[37],成为分离中药复杂样品的有效工具。针对中药莪术提取物在常规一维液相色谱分离时存在色谱峰重叠、基线干扰、成分鉴定少的问题,Zhou 等^[38]建立 RPLC $\times$ RPLC-Q-TOF/MS 分析方法,第一维采用苯基/四唑硫醚(PTAS)键合相色谱柱,第二维采用 C18 色谱柱,两者的正交性可

达 93.2%,从莪术提取物中识别出 439 个色谱峰,鉴定出 105 种成分,其中有 73 种成分尚未见文献报道,解决了莪术成分表征不充分的问题。但受限于二维流动相兼容性差、阀切换过程样品丢失和多维数据处理困难等技术瓶颈,尚未见二维液相色谱在中药多成分药代动力学中的应用,但其提供的全新分析模式值得借鉴。

2.1.2 气相色谱法 气相色谱(gas chromatography, GC)与质谱联用后用于中药挥发性成分的分析,具有分离效率高、灵敏度高和通量高的特点。电子轰击离子源(EI 源)是气相色谱-质谱联用仪最常用的电离源,其性能稳定、碎片重现性好、特征性强,且有成熟的化学物质标准谱库(如 NIST 和 Wiley 数据库等)可供检索。目前,气相色谱工作站均搭载了上述化合物标准谱库,极大地提高了化学成分结构鉴定的效率和准确度。Lan 等^[39]采用气相色谱-质谱法结合 NIST 14 标准谱库快速表征了莪术药材中 40 种挥发油成分,与聚类分析相结合实现了来源于 5 个产地共 30 批莪术药材的区分和质量评价。气相色谱-质谱技术同样适用于分析中药生物样本中的挥发性成分,如 Fan 等^[40]采用气相色谱-质谱技术表征了大鼠口服细辛提取物后血浆中挥发性成分黄樟素和甲基丁香酚的药代动力学特征;Wang 等^[41]基于气相色谱-质谱技术研究了石菖蒲挥发油给药后大鼠血浆中 4 种挥发性苯丙素类成分的药代动力学特征。

2.2 质谱分析技术

2.2.1 质谱离子化技术 中药多成分药代动力学要求尽可能多的分析中药原型成分及代谢产物,因此要求质谱能够同时电离不同种类和结构的化合物,给离子化技术带来了挑战。电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)^[42]和大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)^[43]是近年来液相色谱-质谱中的主流离子化技术。ESI 通过液滴的形成、去溶剂化和气相离子的形成,使非挥发性溶液相离子转为气相,适合分析极性化合物和生物大分子。APCI 是在大气压下以试剂离子和靶分子之间的电荷转移为基础,对产生的靶离子进行质量分析,其对 ESI 源难以电离的弱极性化合物有较好的电离能力,与 ESI 源优势互补。羽扇豆

醇是中药中广泛存在的一种活性成分,具有抗炎、抗肿瘤、促进创面愈合等药理作用,但其为五环三萜类成分,分子结构中缺少发色团,难以应用紫外检测器检测,且分子极性弱,ESI 源电离效率低。因此,Khatal 等^[44]基于 APCI 源,使用 UPLC-MS/MS 技术成功表征了大鼠给药羽扇豆醇后的血浆药代动力学。

电子轰击电离(electron impact, EI)和化学电离(chemical ionization, CI)是气相色谱-质谱中常用的电离方式。在一定能量的电子作用下,EI 将易挥发的样品分子电离,使其聚焦成离子束进入质量分析器,可获得丰富的化合物碎片信息,谱图重现性好。Li 等^[45]采用 Agilent 7890B 气相色谱系统联用配备 EI 源的 Agilent 5977A 质谱系统,建立了同时测定大鼠口服姜黄精油后血浆中 7 种主要活性成分的定量方法,与 Ji 等^[46]采用的 HPLC-MS/MS 方法相比,目标化合物的检测灵敏度提高了 7~21 倍。CI 通过反应气试剂电离产生活性反应离子,与样品发生离子-分子反应实现样品分子的电离,常用的反应气试剂有甲烷、异丁烷、氨气等。对于 EI 源下不稳定的化合物,CI 源能够获得丰度较高的分子离子峰信息。例如,合成代谢类固醇是一类在结构及活性上与人体雄性激素睾酮相似的化学合成衍生物,EI 源产生的分子离子峰丰度低,难以获得化合物的分子质量信息。Polet 等^[47]以氨气作为反应气,采用 GC-CI-MS 技术测得 3 种不同结构类型的合成代谢类固醇分子离子峰,并结合碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)获得这些化合物的特征碎片离子,总结不同类型合成代谢类固醇质谱的特征碎片与结构之间的关系。但由于 CI 谱图的重现性不如 EI,而且没有标准谱库,尚未见将其应用于中药药代动力学的报道。

常压离子化技术以解吸电喷雾电离(desorption electrospray ionization, DESI)和实时直接分析(direct analysis in real time, DART)为代表,具有样品前处理过程简单,可以进行实时和原位分析的特点。Wei 等^[48]建立了 LC-MS/MS 法结合 DESI 技术监测人参皂苷 Rg1 在大鼠肝、肾、肺、脑等多个组织中的分布情况,通过 DESI 成像将人参皂苷 Rg1 在

不同组织中的空间分布可视化,直观地表征了Rgl在大鼠体内的代谢轮廓。Li等^[49]应用DART技术识别和鉴定乌头碱、中乌头碱和次乌头碱在大鼠肠内菌中的36种代谢产物,整个分析过程无需样品前处理,单个样品的分析时间少于10 s。与传统的离子化方式相比,常压离子源具有一定的优势,但其在灵敏度和重现性等方面还存在不足,限制了在中药药代动力学的应用。

质谱成像技术(mass spectrometry imaging, MSI)是将质谱的离子扫描过程与专业图像处理软件结合,对样本表面的化学组成、相对丰度和空间分布进行全面、快速分析,可以原位反映内源性物质及外源性物质的种类、浓度和空间分布信息,便于药代动力学的深入开展,质谱成像示意图示于图2。Tan等^[50]采用MSI技术研究紫杉醇在猪腹膜组织上的浓度和空间分布,为紫杉醇在靶向治疗腹膜癌症方面提供有效信息。光学显微镜与质谱仪的联用不仅可以获得组织切片图像,还可以获得药物与代谢产物的空间分布信息,并且能够区分两者,获得分子结构信息^[51]。Wang等^[52]采用基质辅助激光解吸电离质谱成像技术(MALDI-MSI)获得小鼠肾组织切片中灯盏乙素及其代谢产物的原位空间分布图,发现灯盏乙素及其脱糖苷化代谢产物(野黄芩素)分布在肾脏皮质和髓质区域,丰度相对较高,而其余代谢产物则分布在肾脏皮质中,丰度较低。虽然质谱成像技术有诸多优势,但其在中药药代动力学的应用仍存在许多限制,如背景基质干扰、很难准确定量和图片分辨率低等问题。

图2 MALDI质谱成像示意图

Fig.2 Schematic diagram of MALDI mass spectrometry imaging

2.2.2 质量分析器及质谱联用技术 通常按照质量分析器的不同对质谱仪进行划分,包括四极杆(quadruple, Q)、离子阱(ion trap, IT)、飞行时间质谱(time of flight, TOF)、傅里叶变换-离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR)、轨道阱(Orbitrap)以及将不同类型的质量分析器串联起来的复合式串联质谱。在中药药代动力学研究领域,具有多反应监测功能的三重四极杆质谱(QqQ)是中药定性鉴定和定量测定不可缺少的工具^[53-55],而离子阱质谱的多级串联功能和四极杆-飞行时间质谱(Q-TOF)的高分辨及串联功能可为中药代谢物的结构表征提供重要信息^[56]。此外,离子回旋共振及轨道阱质谱得到的精确质量数将提供准确的元素组成信息,可以进一步确证中药未知代谢物的结构。

Fu等^[57]建立了液质联用分析方法研究急性痛风性关节炎模型大鼠单独和同时灌胃给予白术和黄柏提取物后的血浆药代动力学特征,诠释了中药二妙丸中白术和黄柏治疗急性痛风性关节炎的协同作用机制。此外,质谱还可以与其他分析技术联用,如紫外光谱、核磁共振、圆二色谱等,其中液相色谱-核磁共振-质谱(LC-NMR-MS)联用技术由于能够提供更丰富的结构信息,被越来越多地应用于中药微量代谢产物的结构鉴定。Su等^[58]首先采用LC-MS/MS技术初步识别和鉴定大鼠胆汁中异巴伐查酮的15种代谢产物,再通过LC-NMR-MS技术确定代谢产物的取代基位置。但由于核磁共振对¹³C的灵敏度很低,目前只能做¹H核磁共振,这样会导致化合物结构信息的缺损;另外,采用溶剂信号抑制技术会丢失与溶剂峰有重叠的目标化合物的部分结构信息。

3 结语与展望

分析技术的进步有力地推动了中药多成分的药代动力学研究,为中药物质基础和机制研究拓展了可行手段,但依然需要突破一些关键的瓶颈。例如,如何建立中药体内多成分药代动力学数据与中药药效的关联分析策略,识别中药药效物质;如何以药代动力学数据为指导开展后续的中药药效成分验证实验,以及更深入的中药药效成分作用机制研究。前处理技术

和分析技术的不断创新发展对中药药代动力学的深入研究不可或缺,未来将为中药多成分药代动力学研究提供更多的技术支撑,为更全面、更清晰地阐明中药物质基础和药效机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 荆文光,程显隆,郭晓晗,马双成,魏锋. 中药及天然药物质量分析样品前处理技术研究进展[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(9): 1 487-1 504.
JING Wenguang, CHENG Xianlong, GUO Xiaohan, MA Shuangcheng, WEI Feng. Research progress of sample pretreatment technology for quality analysis of traditional Chinese medicine and natural products[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 41(9): 1 487-1 504(in Chinese).
- [2] MOEIN M M, EL B A, ABDEL-REHIM M. Bioanalytical method development and validation: critical concepts and strategies[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1 043: 3-11.
- [3] WANG C H, JIA Z X, WANG Z, HU T, QIN H L, DU G H, WU C S, ZHANG J L. Pharmacokinetics of 21 active components in focal cerebral ischemic rats after oral administration of the active fraction of Xiao-Xu-Ming decoction[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 110-117.
- [4] WANG L B, SHEN X, MI L, JING J, GAI S C, LIU X Y, WANG Q W, ZHANG S Y. Simultaneous determinations of four major bioactive components in *Acacia catechu* (L. f.) Willd and *Scutellaria baicalensis* Georgi extracts by LC-MS/MS; application to its herb-herb interactions based on pharmacokinetic, tissue distribution and excretion studies in rats[J]. Phytomedicine, 2019, 56: 64-73.
- [5] KASOTE D M, DUNCAN G J, NEACSU M, RUSSELL W R. Rapid method for quantification of anthocyanidins and anthocyanins in human biological samples[J]. Food Chem, 2019, 290: 56-63.
- [6] SUN Z, ZHAO L S, ZUO L H, QI C, ZHAO P, HOU X H. A UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids, gallic acid and 5, 8-dihydroxy-1, 4-naphthoquinone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Cortex Juglandis Mandshu-
ricae extract[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 958: 55-62.
- [7] FENG S Q, AA N, GENG J L, HUANG J Q, SUN R B, GE C, YANG Z J, WANG L S, AA J Y, WANG G J. Pharmacokinetic and metabolic analyses of the neuroprotective effects of salvianolic acid A in a rat ischemic stroke model[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(11): 1 435-1 444.
- [8] WANG S P, LIU L, WANG L L, JIANG P, XIANG L, ZHANG W D, LIU R H. Simultaneous determination of six hydrophilic components in rat plasma after oral administration of Jitai tablet by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 912: 75-84.
- [9] LU P, XING Y, XUE Z F, MA Z, ZHANG B, PENG H, ZHOU Q T, LIU H F, LIU Z D, LI J W. Pharmacokinetics of salvianolic acid B, rosmarinic acid and Danshensu in rat after pulmonary administration of *Salvia miltiorrhiza* polyphenolic acid solution[J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(8): e4561.
- [10] ZHANG L, MA W F, LI J, HE J, ZHANG P, ZHENG F, ZHANG B L, GAO X M, CHANG Y X. Influence of processing on pharmacokinetic of typical constituents in radix polygoni multiflori after oral administration by LC-ESI-MS/MS[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1): 246-253.
- [11] HUANG Y, SUN H Y, QIN X L, LI Y J, LIAO S G, GONG Z P, LU Y, WANG Y L, WANG A M, LAN Y Y, ZHENG L. A UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of free and total forms of a phenolic acid and two flavonoids in rat plasma and its application to comparative pharmacokinetic studies of *Polygonum capitatum* extract in rats[J]. Molecules, 2017, 22(3): 353.
- [12] JIN J Y, XUE H Y, SUN X S, ZAN B, LI Y Y, WANG T M, SHI R, MA Y M. Simultaneous determination of multiple compounds of Da-Huang-Xiao-Shi decoction in rat plasma by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174: 8-18.
- [13] LONG Z M, ZHANG R W, ZHAO X, MENG

- X, BI K S, CHEN X H. Determination and pharmacokinetics of geniposidic acid in rat plasma after oral administration of *Gardenia jasminoides* fruit crude extract and Zhi-zi-chi decoction[J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(6): 812-816.
- [14] CHEN X Q, WEI L T, PU X P, WANG Y L, XU Y J. Pharmacokinetics and tissue distribution study of 15 ingredients of *Polygonum chinense* Linn extract in rats by UHPLC-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35(2): e4975.
- [15] XIAO J, WANG T Y, LI P, LIU R, LI Q, BI K S. Development of two step liquid-liquid extraction tandem UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of *Ginkgo flavonoids*, terpene lactones and nimodipine in rat plasma; application to the pharmacokinetic study of the combination of *Ginkgo biloba* dispersible tablets and Nimodipine tablets[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1 028: 33-41.
- [16] HENNION M C. Solid-phase extraction; method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1999, 856 (1/2): 3-54.
- [17] ASHRI N Y, ABDEL-REHIM M. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices[J]. Bioanalysis, 2011, 3(17): 2 003-2 018.
- [18] de J W H, WILKENS M H, de V E G, KEMA I P. Automated mass spectrometric analysis of urinary and plasma serotonin[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(7): 2 609-2 616.
- [19] ZHENG H R, CHU Y, ZHOU D Z, JU A C, LI W, LI X, XIA Y, POLACHI N, LI D K, ZHOU S P, SUN H, LIU C X. Integrated pharmacokinetics of ginsenosides after intravenous administration of YiQiFuMai powder injection in rats with chronic heart failure by UFLC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1 072: 282-289.
- [20] SAJID M, KHALED N M, RUTKOWSKA M, SZCZERAŃSKA N, NAMIEŚNIK J, PLOTKA-WASYLKA J. Solid phase microextraction; apparatus, sorbent materials, and application[J]. Crit Rev Anal Chem, 2019, 49(3): 271-288.
- [21] HE M, WANG Y, ZHANG Q, ZANG L, CHEN B, HU B. Stir bar sorptive extraction and its application[J]. J Chromatogr A, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461810.
- [22] PEREIRA J A M, GONÇALVES J, PORTO-FIGUEIRA P, FIGUEIRA J A, ALVES V, PERESTRELO R, MEDINA S, CÂMARA J S. Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications[J]. Analyst, 2019, 144(17): 5 048-5 074.
- [23] PURGAT K, OLEJARZ P, KOŚKA I, GŁOWACKI R, KUBALCZYK P. Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction[J]. Anal Biochem, 2020, doi: 10.1016/j.ab.2020.113640.
- [24] DENG C, LIN S, HUANG T, DUAN G, ZHANG X. Development of gas chromatography/mass spectrometry following headspace solid-phase microextraction for fast determination of asarones in plasma[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(14): 2 120-2 126.
- [25] 庞博, 刘舒, 刘志强, 刘淑莹, 宋凤瑞. 微透析-液相色谱-质谱联用技术在中药研究中的应用[J]. 质谱学报, 2021, 42(5): 553-562.
- PANG Bo, LIU Shu, LIU Zhiqiang, LIU Shuying, SONG Fengrui. Application of microdialysis combined with liquid chromatography mass spectrometry technique on Chinese medicine research [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 553-562(in Chinese).
- [26] FU J, ZHANG H X, LIU S, WU J J, ZHANG Y Y, GAO Y, SONG F R, QIN Y H, HU X L, LIU Z Y. An integrated strategy using LC-MS/MS combined with *in vivo* microdialysis for the simultaneous determination of lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fructus and endogenous neurotransmitters; application in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. Food Funct, 2021, 12(19): 8 932-8 945.
- [27] 欧咏. 多位点微透析采样技术动态监测大鼠体内的三妙丸中生物碱含量的方法学研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2014.
- [28] WANG Y, LIU S, WANG R, SHI L, LIU Z, LIU Z. Study on the therapeutic material basis and effect of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms leaves in the treatment of ischemic stroke by PK-PD analysis based on online mi-

- cro dialysis-LC-MS/MS method[J]. Food Funct, 2020, 11(3): 2 005-2 016.
- [29] TAO J, MAO L, ZHOU B, LIU Q, YANG A, WEI G, LIU R, ZHANG W D, XU W, YE J. Simultaneous determination of ginsenosides and bufadienolides in rat plasma after the oral administration of Shexiang Baoxin Pill for pharmacokinetic study by liquid chromatography tandem mass spectrometry following solid-phase extraction[J]. Biomed Chromatography, 2017, doi: 10.1002/bmc.3816.
- [30] FANÇA-BERTHON P, TENON M, BOUTERBANON S L, MANFRÉ A, MAUDET C, DION A, CHEVALLIER H, LAVAL J, van BREEMEN R B. Pharmacokinetics of a single dose of turmeric curcuminoids depends on formulation: results of a human crossover study[J]. J Nutr, 2021, 151(7): 1 802-1 816.
- [31] ZHAI S, DENG X, ZHANG C, ZHOU Y, XIE H, JIANG Z, JIA L. A novel UPLC/MS/MS method for rapid determination of murrayone in rat plasma and its pharmacokinetics[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.113046.
- [32] 魏蒙蒙, 孙学燕, 吴思扬, 王树瑶, 高杨, 康琛, 杨维, 李鹰飞, 李川. UPLC-MS/MS 快速同时测定犬血浆中补骨脂的 10 个活性成分及补骨脂犬药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 444-453.
- WEI Mengmeng, SUN Xueyan, WU Siyang, WANG Shuyao, GANG Yang, KANG Chen, YANG Wei, LI Yingfei, LI Chuan. Rapid and simultaneous determination of 10 active components of Psoraleae Fructus in beagle dog plasma using UPLC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(2): 444-453(in Chinese).
- [33] NIE S, ZHAO Y, QIU X, WANG W, YAO Y, YI M, WANG D. Metabolomic study on nude mice models of gastric cancer treated with modified Si Jun Zi Tang via HILIC UHPLC-Q-TOF/MS analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019(3): 1-18.
- [34] WANG H, XIAO D, LI W, ZHANG X, GAO X, YONG J, ZHAO J, KOIKE K. A simple and fast quantitative analysis of quinolizidine alkaloids and their biosynthetic precursor, lysine, in *Sophora alopecuroides* by hydrophilic interaction chromatography coupled with triple-quadrupole tandem mass spectroscopy[J]. Phytochem Anal, 2018, 29(5): 500-506.
- [35] LANG L, MENG Z, SUN L, XIAO W, ZHAO L, XIONG Z. Intergrated metabonomic study of the effects of Guizhi Fuling capsule intervention on primary dysmenorrheal using RP-UPLC-MS complementary with HILIC-UPLC-MS technique[J]. Biomed Chromatogr, 2018, doi: 10.1002/bmc.4093.
- [36] SUN J, ZHANG F, PENG Y, LIU J, ZHONG Y, WANG G. Quantitative determination of diterpenoid alkaloid Fuziline by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-electrospray ionization mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study in rats[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013 (913/914): 55-60.
- [37] ZHOU W, LIU Y, WANG J, GUO Z, SHEN A, LIU Y, LIANG X. Application of two-dimensional liquid chromatography in the separation of traditional Chinese medicine[J]. J Sep Sci, 2020, 43(1): 87-104.
- [38] ZHOU W, GUO Z, YU L, ZHOU H, SHEN A, JIN Y, JIN G, YAN J, YANG F, LIU Y, WANG C, FENG J, LIU Y, LIANG X. On-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of *Curcuma kwangsiensis*[J]. Talanta, 2018, 186: 73-79.
- [39] 蓝振威, 王绿虹, 李琦婷, 王淑美, 孟江. 基于 GC-MS 与化学计量学的不同栽种术特征性挥发油成分分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3 614-3 624.
- LAN Zhenwei, WANG Lvhong, LI Qiting, WANG Shumei, MENG Jiang. Analysis of volatile oil components of different species of *Curcuma* Rhizoma based on GC-MS and chemometrics[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(14): 3 614-3 624(in Chinese).
- [40] FAN Y, YANG D, HUANG X, YAO G, WANG W, GAO M, JIA X, OUYANG H, CHANG Y, HE J. Pharmacokinetic study of safrole and methyl eugenol after oral administration of the essential oil extracts of asarum in rats

- by GC-MS[J]. Biomed Res Int, 2021, doi: 10.1155/2021/6699033.
- [41] WANG Z, WANG Q, YANG B, LI J, YANG C, MENG Y, KUANG H. GC-MS method for determination and pharmacokinetic study of four phenylpropanoids in rat plasma after oral administration of the essential oil of *Acorus tatarinowii* Schott rhizomes[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(2): 1 134-1 140.
- [42] 魏娟娟,孙江晖,尹伊颜,那娜,欧阳津. 基于电喷雾质谱的反应监测研究进展[J]. 质谱学报, 2021,42(5):755-771.
- WEI Juanjuan, SUN Jianghui, YI Yiyan, NA Na, OUYANG Jin. Recent developments on reaction monitoring by electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 755-771(in Chinese).
- [43] NANNAPANENI N K, JALALPURE S S, MUPPAVARAPU R, SIRIGIRI S K. A sensitive and rapid UFLC-APCI-MS/MS bioanalytical method for quantification of endogenous and exogenous Vitamin K1 isomers in human plasma; development, validation and first application to a pharmacokinetic study[J]. Talanta, 2017, 164: 233-243.
- [44] KHATAL L, MORE H. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of Lupeol in plasma and its application to pharmacokinetic study in rats[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1 121: 58-65.
- [45] LI W J, HONG B, LI Z J, LI Q, BI K S. GC-MS method for determination and pharmacokinetic study of seven volatile constituents in rat plasma after oral administration of the essential oil of *Rhizoma Curcumae* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 149: 577-585.
- [46] 季德,毛春芹,李金慈,陆兔林,谢辉,姜国非,肖永庆. 莪术挥发油中莪术二酮、吉马酮在大鼠体内的药动学研究[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2 622-2 626.
- JI De, MAO Chunqin, LI Jinci, LU Tulin, XIE Hui, JIANG Guofei, XIAO Yongqing. Pharmacokinetics of curdione and germacrone in zedoary turmeric oil in rats *in vivo* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(12): 2 622-2 626(in Chinese).
- [47] POLET M, GANSBEKE W V, EENOO P V, DEVENTER K. Gas chromatography/chemical ionization triple quadrupole mass spectrometry analysis of anabolic steroids; ionization and collision-induced dissociation behavior[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2016, 30(4): 511-522.
- [48] WEI W, LI Z, LI H, AN Y, QU H, YAO C, ZHANG J, LI J, ZHANG G, SHI Y, GUO D A. Exploration of tissue distribution of ginsenoside Rg1 by LC-MS/MS and nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, doi: 10.1016/j.jpba.2021.113999.
- [49] LI X, HOU G, XING J, SONG F, LIU Z, LIU S. Direct analysis in real time-mass spectrometry for the rapid detection of metabolites of aconite alkaloids in intestinal bacteria[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2014, 25(12): 2 181-2 184.
- [50] TAN H L, KIM G, CHARLES C J, LI R R, JANG C J, SHABBIR A, CHUE K M, TAI C H, SUNDAR R, GOH B C, BONNEY G K, LOOI W D, CHEOW E S, SO J B, WANG L, YONG W P. Safety, pharmacokinetics and tissue penetration of PIPAC paclitaxel in a swine model [J]. Eur J Surg Oncol, 2021, 47(5): 1 124-1 131.
- [51] NISHIDATE M, HAYASHI M, AIKAWA H, TANAKA K, NAKADA N, MIURA SI, RYU S, HIGASHI T, IKARASHI Y, FUJIWARA Y, HAMADA A. Applications of MALDI mass spectrometry imaging for pharmacokinetic studies during drug development[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2019, 34(4): 209-216.
- [52] WANG T, LEE H K, YUE G G L, CHUNG A C K, LAU C B S, CAI Z. A novel binary matrix consisting of graphene oxide and caffeic acid for the analysis of scutellarin and its metabolites in mouse kidney by MALDI imaging[J]. Analyst, 2021, 146(1): 289-295.
- [53] JIAO W, QIN N, WANG K, WU D, YU H, DU L, WU G, WU H, ZHAO X. LC-MS/MS for determination of aesculetin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. Biomed Chromatogr, 2022, 36(1): e5233.
- [54] WANG X, QIAN Y, LI X, JIA X, YAN Z,

- HAN M, QIAO M, MA X, CHU Y, ZHOU S, YANG W. Rapid determination of rosmarinic acid and its two bioactive metabolites in the plasma of rats by LC-MS/MS and application to a pharmacokinetics study[J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35(2): e4984.
- [55] GUAN Y M, SHEN Q, HE L F, CHEN L M, ZANG Z, LIU L, ZHU W F, LI H C, LIU H N. Pharmacokinetics and tissue distribution of combined triptolide and paeoniflorin regimen for percutaneous administration in rats assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, doi: 10.1155/2021/8864273.
- [56] CHENG C R, YANG M, YU K, GUAN S H, WU X H, WU W Y, SUN Y, LI C, DING J, GUO D A. Metabolite identification of crude extract from *Ganoderma lucidum* in rats using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 941: 90-99.
- [57] FU X L, ZHOU J, TANG W W, LIU Y, LI Z L, LI P, CHEN J. Study on the compatibility effect and active constituents of Atractylodis Rhizoma in Ermiao Wan against Acute Gouty Arthritis[J]. J Ethnopharmacol, 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114353.
- [58] SU S, WANG Y, BAI L, XIA B, LI X, TANG Y, XU P, XUE M. Structural elucidation of *in vivo* metabolites of isobavachalcone in rat by LC-ESI-MSⁿ and LC-NMR[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 104: 38-46.
- (收稿日期:2022-02-03;修回日期:2022-03-25)