

· 基础研究 ·

金莲花提取物代谢产物研究[△]

刘斯琪, 赵灿, 丁鹏敏, 陶志, 賡迪, 王如峰*

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

[摘要] **目的:** 研究金莲花化学成分的体内代谢产物及代谢规律。**方法:** 静脉注射方式给予大鼠金莲花提取物并在各时间段采血, 利用高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱技术(LC-ESI-MS)对血清中的代谢产物进行研究。**结果:** 根据 LC-ESI-MS 结果发现了 23 种原型成分及 45 种代谢产物。原型成分中有 3 种酚酸类物质、19 种黄酮类物质、1 种生物碱类物质。通过准分子离子峰及二级碎片得到了代谢产物可能的化学结构, 分析了这些代谢产物的裂解途径, 推测 19 种来源于酚酸类物质、20 种来源于黄酮类物质、6 种来源于生物碱类物质。**结论:** 本研究探讨了金莲花提取物中化学成分的代谢规律, 为其血液移行成分及药理作用的进一步研究奠定基础。

[关键词] 金莲花提取物; 静脉注射; 代谢产物; 代谢规律

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-1027-21

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190828002

Study on Metabolites of Flos Trollii Extract in Rats

LIU Si-qi, ZHAO Can, DING Peng-min, TAO Zhi, GENG Di, WANG Ru-feng*

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

[Abstract] **Objective:** To study the metabolites and metabolism rules of the chemical constituents of Flos Trollii. **Methods:** The extract from Flos Trollii was given intravenously in rats and blood samples were collected at various time periods. The metabolites in serum were studied by high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS) technique. **Results:** 23 Prototypic components including 3 phenolic acids, 19 flavonoids and 1 alkaloid and 45 metabolites were identified by LC-ESI-MS. The possible chemical structures of metabolites were obtained from their quasi-molecular ion peaks and secondary fragments, then their cleavage pathways were analyzed. It was speculated that 19 metabolites came from phenolic acids, 20 from flavonoids, and 6 from alkaloids. **Conclusion:** In this study, the metabolism of the chemical constituents in the extract of Flos Trollii was studied to provide a basis for the further study of its blood transitional components and pharmacological effects.

[Keywords] Flos Trollii extract; intravenous injection; metabolites; metabolism rules

金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 是毛茛科多年生草本植物, 主要分布于西南、西北、华北、东北和台湾地区^[1]。其干燥花作为中药金莲花(Flos Trollii)入药^[2], 味苦, 性寒, 无毒, 具明目、解岚障的功效, 主治口疮、喉肿、浮热牙宣、耳疼、目痛^[3]。中药金莲花中的主要化学成分包括黄酮、酚酸、生物碱等类成分。其中, 黄酮类含量最高, 主要为黄酮碳苷, 包括蒺藜草苷和牡荆苷及其衍生物^[4]; 酚酸类成分主要有藜芦酸、苯甲酸、金莲酸、原金莲酸、金莲花苷等^[5-6]; 生物碱类成分含量最低, 主要为金

莲花碱^[7]。中药化学成分的体内代谢过程对其药效物质的组成有重要影响^[8], 而关于金莲花化学成分的体内代谢研究却鲜有报道。由于中药成分经肠吸收最终进入血液的成分较为微量, 导致其分析较为困难, 许多代谢产物无法被检测到, 而且金莲花的主要成分为黄酮碳苷类, 较难吸收, 进一步增加了检测的难度。为了克服金莲花入血成分及其代谢产物难以检测的缺点, 采取分步研究的策略较为实际, 即先通过静脉给药方式研究金莲花提取物的体内代谢轮廓, 总结代谢规律, 在此基础上再对口服给药

[△] [基金项目] 北京市自然科学基金面上项目(7172129)

* [通信作者] 王如峰, 教授, 研究方向: 中药化学; Tel: (010)84738646, E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

的血液移行成分进行研究。因此,本研究采用高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱技术(LC-ESI-MS)对金莲花提取物静脉给药后的血液移行成分进行了鉴定和代谢途径分析,为后续的深入研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Waters公司,美国), Thermo LTQ ORBITRAP XL 质谱仪(Thermo公司,美国), 甲酸, 乙腈(Fisher公司,美国)。

1.2 实验动物

清洁级SD大鼠,体质量(200 ± 20) g,由北京斯贝福实验动物科技有限公司提供,合格证编号:SCXK(京)2011-0004。实验前禁食不禁水24 h。

1.3 试药

金莲花药材(批号:20110901)购自河北省安国药材市场,经北京中医药大学王如峰教授鉴定为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花。取金莲花250 g,加12倍量蒸馏水回流提取2次,每次1 h。合并提取液,过滤,减压浓缩和冷冻干燥后得金莲花总提取物95.5 g。总提取物加适量蒸馏水溶解并稀释成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的总提取物溶液,供大鼠静脉给药用。

2 方法

2.1 色谱条件

Phenomenex Synergi Polar-RP 色谱柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$),有预柱;流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B);梯度洗脱($0 \sim 12 \text{ min}$, $2\% \sim 15\% \text{ A}$; $12 \sim 15 \text{ min}$, $15\% \sim 27\% \text{ A}$; $15 \sim 27 \text{ min}$, $27\% \sim 45\% \text{ A}$; $27 \sim 30 \text{ min}$, $45\% \sim 2\% \text{ A}$);流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2 质谱条件

Accela 600 泵,电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式,扫描范围 m/z : $100 \sim 1000$ 。毛细管温度: 350°C ,毛细管电压: -35 V ,气化温度: 300°C ,鞘气流流量: $17 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3 给药及采血

实验动物按取血时间分为6个时间点,加上空白对照组,共7个组,每组雌雄各1只大鼠。实验组动物 $0.0045 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 尾静脉注射给药, $0.0035 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 10%水合氯醛腹腔注射的方式麻醉,给药后0、5、15、30、60、90 min下腔静脉取血。

2.4 样品处理

各时间点血样均放置在室温中,2.5 h静置凝出血清, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径为6.6 cm),取上清液。雌雄各取0.8 mL血清混合,血清配总提取物组为1.6 mL空白血清,加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 总提取物溶液 $44 \mu\text{L}$ 。上述样品均分别加入3倍量乙腈混合,沉淀蛋白, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径为5.6 cm),取上清液。吸取全部上清液,于 37°C 氮气吹干,再用未吹干前体积的1/20倍甲醇复溶。超声溶解2 min, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径为6.6 cm)。吸取上清液备LC-ESI-MS分析用。最终样品为原血清样品浓缩的5倍,血清配总提取物的最终检测质量浓度为 $6.67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 结果

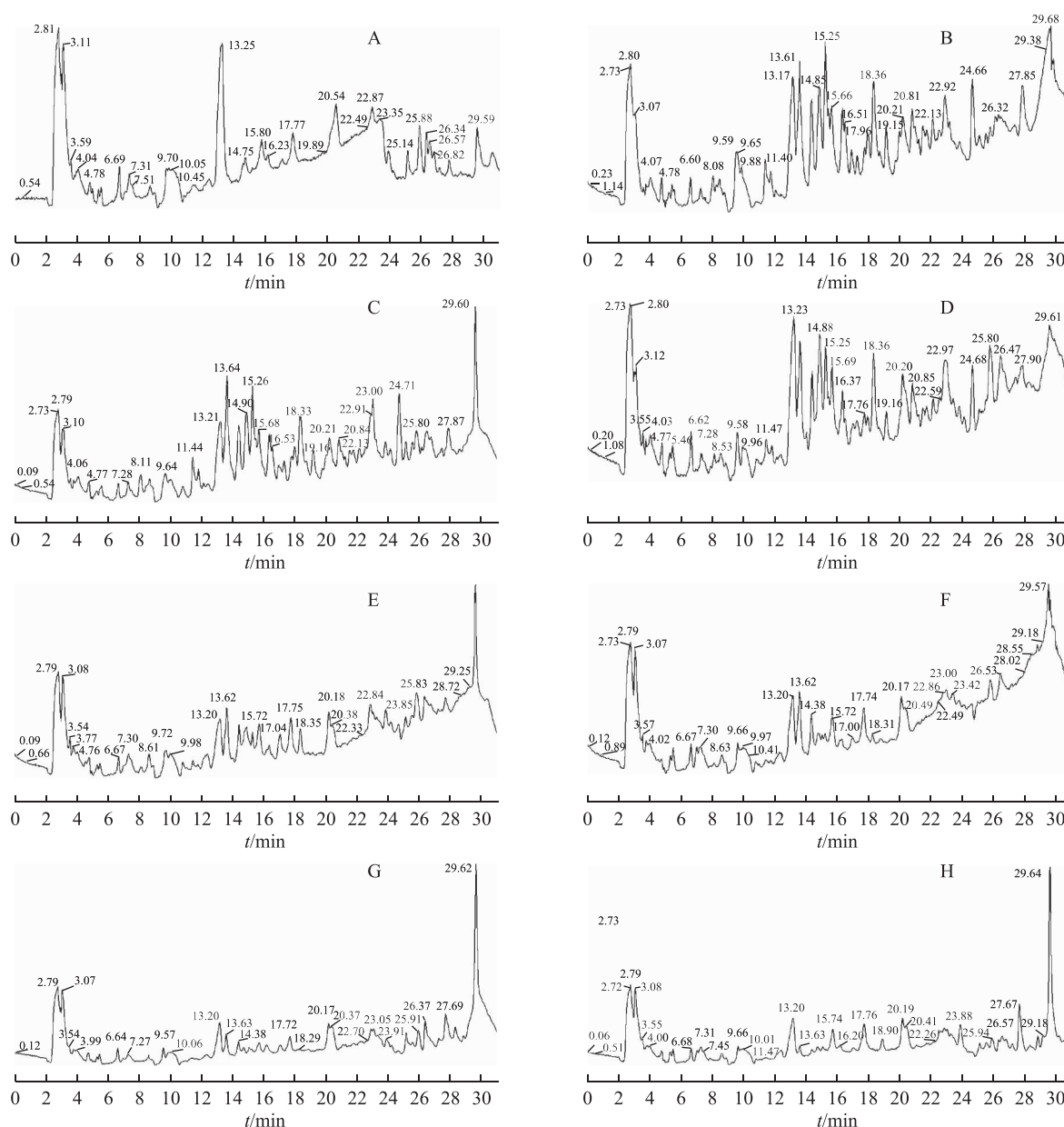
各时间点LC-ESI-MS的质谱总离子流图,见图1。

3.1 原型成分质谱裂解规律分析

根据LC-ESI-MS数据分析了酚酸类、黄酮类、生物碱类原型成分在质谱电喷雾离子源(ESI)系统中形成的碎片(表1),并对其断裂规律进行归纳总结。

酚酸类成分与糖结合的氧苷易断裂,会产生葡萄糖醛酸碎片及其互补离子对,同时还会出现脱羧基的碎片等。

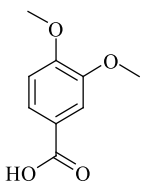
黄酮类成分几乎全部是六碳糖碳苷,其中代表性的碎片为 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6-\text{H}]^-$ 等。荭草素、荭草素-2"-O- β -L-半乳糖苷、2"-O-(2"-甲基丁酰基)荭草素及6"-HMG-2"-O- β -L-半乳糖苷荭草素等均存在荭草素特征离子碎片 m/z 357、327,而荭草素-2"-O- β -L-吡喃木糖苷与荭草素-2"-O- β -L-半乳糖苷的结构基本相同,前者在2"连了1个五碳糖,后者连了1个六碳糖,相差1个 CH_2O ,故其离子碎片基本为荭草素-2"-O- β -L-半乳糖苷的特征离子碎片减去1个甲氧基。牡荆素、牡荆素-2"-O- β -L-半乳糖苷等均存在 m/z 341、311等牡荆素特征离子碎片。2"-O-(2"-甲基丁酰基)牡荆素和3"-O-2-甲基丁酰牡荆素是同分异构体,仅甲基丁酰基的位置不同,均存在 m/z 323、293,即牡荆素特征碎片失去1分子水。同时,2"-O-(2"-甲基丁酰基)牡荆素的特征离子碎片也基本为金莲花碳苷Ⅲ减去1个甲基。异槲皮素的碎片中存在 m/z 151.00和311.12,可能是经逆狄尔斯-阿德尔(RDA)裂解产生的 $\text{A}^{1,3}$ 离子碎片。



注: A. 大鼠空白血清; B. 血清配总提取物; C. 0 min 含药血清; D. 5 min 含药血清; E. 15 min 含药血清; F. 30 min 含药血清; G. 60 min 含药血清; H. 90 min 含药血清。

图1 空白血清、血清配总提取物和含药血清的总离子流图

表1 原型成分结构式及二级碎片信息

名称	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
藜芦酸		$C_9H_{10}O_4$	181.05 $[M-H]^-$	136.93 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 165.96 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 122.95 $[M-CO_2-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44-14]^-$) 106.93 $[M-CO_2-CH_2-O-H]^-$ ($[M-H-44-30]^-$)

续表 1

名称	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
金莲花苷		$C_{19}H_{26}O_9$	397. 15 $[M-H]^-$	235. 01 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 220. 09 $[M-C_6H_{10}O_5-CH_3-H]^-$ ($[M-H-162-15]^-$) 191. 15 $[M-C_6H_{10}O_5-CO_2-H]^-$ ($[M-H-162-44]^-$) 176. 11 $[235-CH_3-CO_2]^-$ ($[235-15-44]^-$) 165. 90 $[235-C_5H_9]^-$ ($[235-69]^-$)
4-O-(β -D-葡萄糖基)-3-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲酸		$C_{18}H_{24}O_8$	367. 14 $[M-H]^-$	205. 09 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 160. 85 $[M-C_6H_{10}O_5-CO_2-H]^-$ ($[M-H-162-44]^-$) 349. 04 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 323. 34 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 299. 16 $[M-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-68]^-$)
荭草素		$C_{21}H_{20}O_{11}$	447. 09 $[M-H]^-$	357. 11 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 327. 18 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$)
牡荆素		$C_{21}H_{20}O_{10}$	431. 10 $[M-H]^-$	341. 08 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 311. 06 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) ^[9] 283. 18 $[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$ ($[M-H-120-28]^-$)
日本异当药素		$C_{22}H_{22}O_{11}$	461. 11 $[M-H]^-$	341. 02 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 313. 05 $[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$ ($[M-H-148]^-$) 298. 17 $[M-C_4H_8O_4-CO-CH_3-H]^-$ ($[M-H-148-15]^-$)
异当药黄素		$C_{22}H_{22}O_{10}$	445. 11 $[M-H]^-$	325. 10 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 297. 12 $[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$ ($[M-H-148]^-$) 282. 02 $[M-C_4H_8O_4-CO-CH_3-H]^-$ ($[M-H-148-15]^-$)

续表 1

名称	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
荭草素-2''-O- β -L-半乳糖苷		$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.15 $[M-H]^-$	519.31 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 489.15 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 429.18 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-180]^-$) 369.11 $[M-C_6H_{12}O_6-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-180-60]^-$) 309.16 $[M-C_6H_{12}O_6-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-180-120]^-$) (以及与荭草素一致的碎片: 357.17、327.14、297.24)
牡荆素-2''-O- β -L-半乳糖苷		$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.15 $[M-H]^-$	503.07 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 473.19 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 413.14 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-180]^-$) 293.14 $[M-C_6H_{12}O_6-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-180-120]^-$) (以及与牡荆素一致的碎片: 341.19、311.06)
金莲花碳苷I		$C_{27}H_{30}O_{12}$	545.17 $[M-H]^-$	443.16 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 461.32 $[M-C_5H_8O-H]^-$ ($[M-H-84]^-$) 383.22 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 353.21 $[M-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-102-90]^-$) 323.17 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$)
金莲花碳苷II		$C_{31}H_{30}O_{14}$	625.16 $[M-H]^-$	443.18 $[M-C_9H_{10}O_4-H]^-$ ($[M-H-182]^-$) 383.22 $[M-C_9H_{10}O_4-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-182-60]^-$) 353.19 $[M-C_9H_{10}O_4-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-182-90]^-$) 323.15 $[M-C_9H_{10}O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-182-120]^-$)
金莲花碳苷III		$C_{27}H_{30}O_{11}$	529.17 $[M-H]^-$	427.16 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 445.14 $[M-C_5H_8O-H]^-$ ($[M-H-84]^-$) 367.15 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 337.08 $[M-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-102-90]^-$) 307.13 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$)

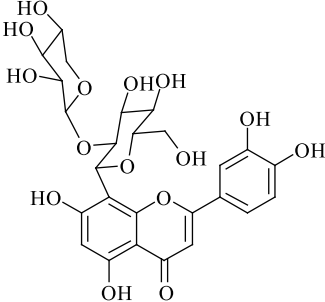
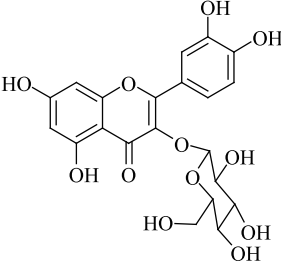
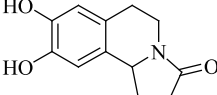
续表 1

名称	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
2''-O-(2'''-甲基丁酰基)牡荆素		$C_{26}H_{28}O_{11}$	515. 16 $[M-H]^-$	413. 14 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 353. 27 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 323. 19 $[M-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-102-90]^-$) 293. 21 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$)
3''-O-2-甲基丁酰牡荆素		$C_{26}H_{28}O_{11}$	515. 16 $[M-H]^-$	413. 19 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 353. 31 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 323. 07 $[M-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-102-90]^-$) 293. 09 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$)
2''-O-(2'''-甲基丁酰基)荭草素		$C_{26}H_{28}O_{12}$	531. 15 $[M-H]^-$	429. 20 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 369. 21 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 339. 15 $[M-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-102-90]^-$) 309. 10 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$) (以及与荭草素一致的碎片: 357. 06、327. 16)
6'''-HMG-2''-O- β -L-半乳糖苷荭草素		$C_{33}H_{38}O_{20}$	753. 19 $[M-H]^-$	609. 25 $[M-C_6H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-144]^-$) (以及与荭草素-2''-O- β -L-半乳糖苷一致的碎片: 489. 25、429. 22、357. 13、327. 16)

续表 1

名称	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
6"-HMG-2"-O- β -L-半乳糖苷牡荆素		$C_{33}H_{38}O_{19}$	737. 19 $[M-H]^-$	593. 22 $[M-C_6H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-144]^-$) (以及与牡荆素-2"-O- β -L-半乳糖苷一致的碎片: 473. 16、323. 13、293. 16)
2"-O-藜芦酰异当药黄素		$C_{31}H_{30}O_{13}$	609. 15 $[M-H]^-$	427. 16 $[M-C_9H_{10}O_4-H]^-$ ($[M-H-182]^-$) 367. 14 $[M-C_9H_{10}O_4-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-182-60]^-$) 337. 24 $[M-C_9H_{10}O_4-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-182-90]^-$) 307. 11 $[M-C_9H_{10}O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-182-120]^-$) 504. 49 $[M-C_3H_6O_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-90-15]^-$)
2"-O-藜芦酰牡荆素		$C_{30}H_{28}O_{13}$	595. 13 $[M-H]^-$	413. 18 $[M-C_9H_{10}O_4-H]^-$ ($[M-H-182]^-$) 353. 15 $[M-C_9H_{10}O_4-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-182-60]^-$) 323. 08 $[M-C_9H_{10}O_4-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-182-90]^-$) 293. 06 $[M-C_9H_{10}O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-182-120]^-$)
2"-O-藜芦酰荭草素		$C_{30}H_{28}O_{14}$	611. 14 $[M-H]^-$	429. 17 $[M-C_9H_{10}O_4-H]^-$ ($[M-H-182]^-$) 369. 20 $[M-C_9H_{10}O_4-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-182-60]^-$) 339. 08 $[M-C_9H_{10}O_4-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-182-90]^-$) 309. 05 $[M-C_9H_{10}O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-182-120]^-$)

续表 1

名称	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
荭草素-2''-O- β -L-吡喃木糖苷		$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.14 $[M-H]^-$	489.35 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 459.23 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 429.22 $[M-C_5H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-150]^-$) 369.22 $[M-C_5H_{10}O_5-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-150-60]^-$) 309.20 $[M-C_5H_{10}O_5-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-150-120]^-$) 357.00 $[M-C_5H_8O_4-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-132-90]^-$) 327.10 $[M-C_5H_8O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-132-120]^-$)
异槲皮素		$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.09 $[M-H]^-$	301.04 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 445.21 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 343.18 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 151.00 $[M-C_{14}H_{16}O_8-H]^-$ ($[M-H-312]^-$) 311.12 $[M-C_7H_4O_4-H]^-$ ($[M-H-152]^-$)
金莲花碱		$C_{12}H_{13}NO_3$	218.08 $[M-H]^-$	134.86 $[M-CH_2O-C_2H_2-NCH-H]^-$ ($[M-H-30-26-27]^-$) 200.05 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 188.06 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 161.94 $[M-CH_2O-C_2H_2-H]^-$ ($[M-H-30-26]^-$) 173.13 $[M-CH_2O-NH-H]^-$ ($[M-H-30-15]^-$)

生物碱类原型成分只检测到了金莲花碱,样品中金莲花碱的提取离子流图显示,保留时间为14.9 min,但是这个时间点的提取离子流图是金莲花碱的硫酸酯化产物 m/z 298.04。由于硫酸酯键易断裂,因此在提取离子流图中就能提到其最大丰度的二级碎片 m/z 218.08 $[M-H]^-$ 。金莲花中的金莲花碱在体内的代谢较快,基本被上述提取峰所压制,故在提取离子流图中没有体现。

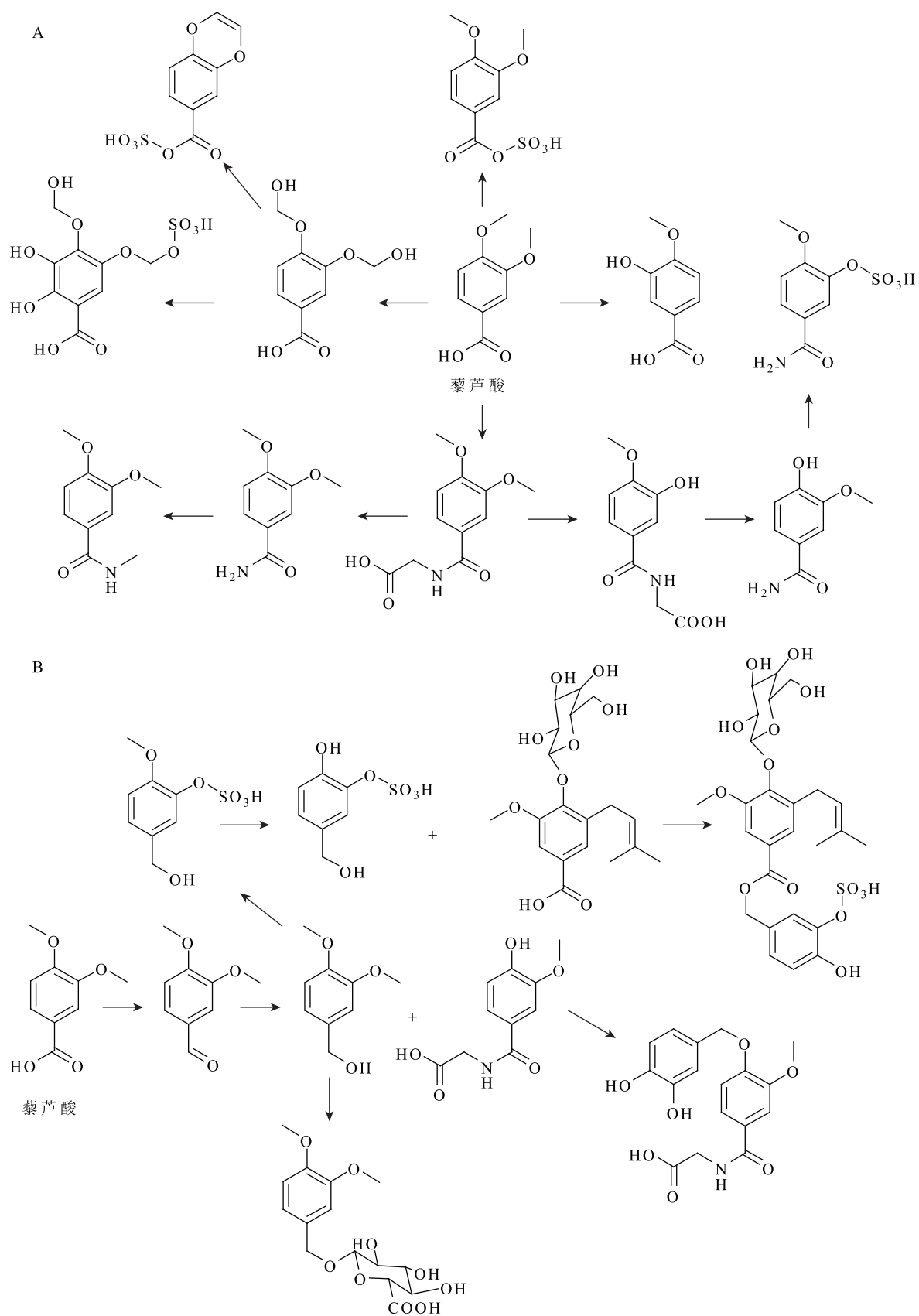
3.2 代谢产物及代谢规律分析

酚酸类成分的代谢过程大多为结合反应,如藜芦酸、金莲花苷及原金莲酸的羧羟基可与硫酸酯以酯键结合,也可以同甘氨酸以肽键结合。该羧基还可以发生还原反应,还原为醇羟基后,再进行结合。除此之外还会发生 O -脱甲基或直接脱甲氧基的现

象, O -脱甲基形成羟基后也可发生与葡萄糖醛酸结合及上述其他结合反应。金莲花苷及原金莲酸都易发生 ω -氧化,金莲花苷的氧化位置可能为3-位甲氧基,原金莲酸则可能发生于 C_3 侧链末端或 C_5 位^[10]。酚酸类成分代谢途径见图2~3,各代谢产物结构及二级碎片信息见表2。

黄酮类成分代谢过程大多为开环裂解过程,可能会发生A型或B型裂解,生成 C_6-C_3 及 C_6-C_2 型衍生物,其羟基同样会发生葡萄糖醛酸、硫酸酯结合反应或羧基还原成醛后发生甲基结合反应。黄酮类成分代谢途径见图4,各代谢产物结构及二级碎片信息见表3。

金莲花碱多为葡萄糖醛酸、硫酸酯及甲基结合反应,除此之外也可能发生杂环开裂等过程,其代谢途径见图5,各代谢产物结构及二级碎片信息见表4。



注：A. 代谢途径一；B. 代谢途径二。

图2 藜芦酸体内代谢途径

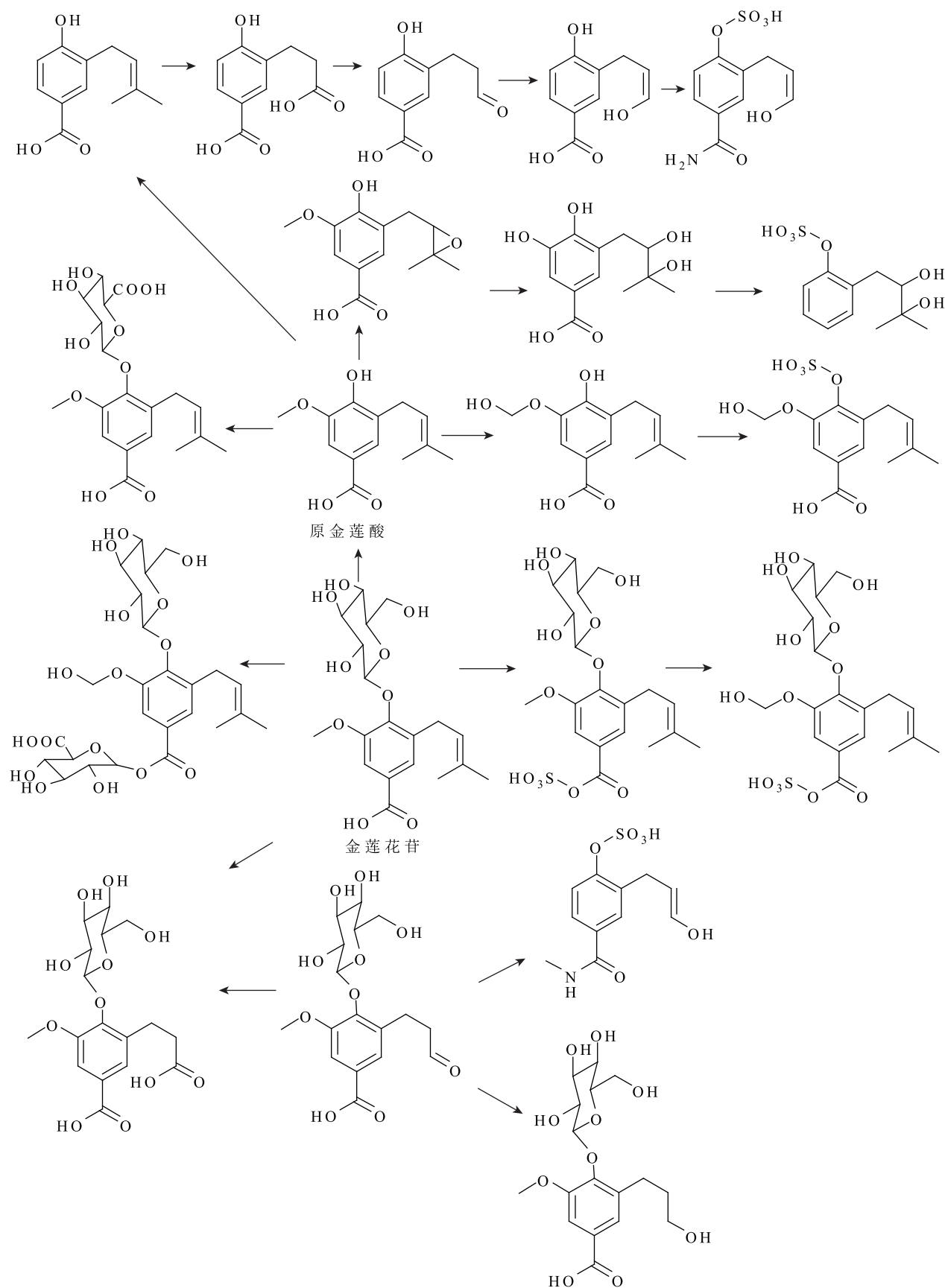
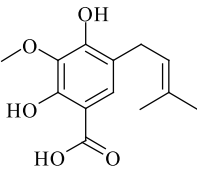
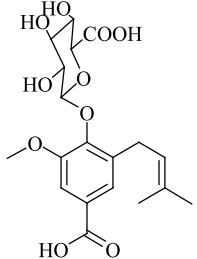
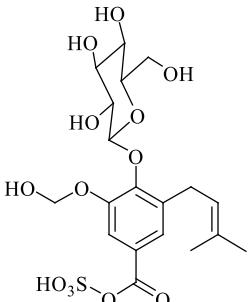
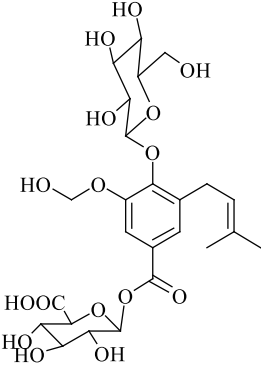
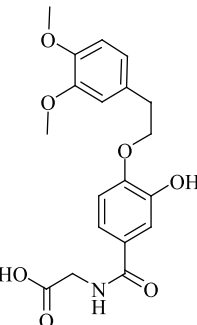


图3 金莲花苷及原金莲酸体内代谢途径

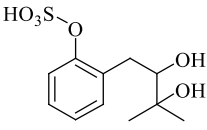
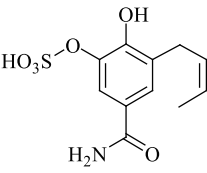
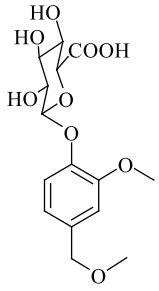
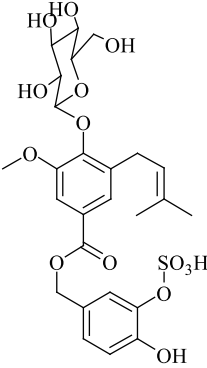
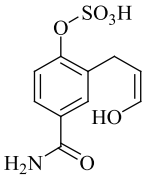
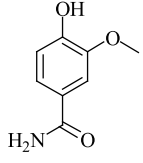
表 2 酚酸类代谢产物及二级碎片信息

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
1		$C_8H_8O_4$	167.02 $[M-H]^-$	151.95 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 122.91 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 137.02 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 108.03 $[M-CO_2-CH_3-H]^-$ ($[M-H-44-15]^-$) 推测为藜芦酸的 <i>O</i> -脱甲基产物, <i>O</i> -脱甲基的位置可能为 3'-甲氧基或 4'-甲氧基。
2		$C_{11}H_{13}NO_5$	238.07 $[M-H]^-$	193.95 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 178.94 $[M-CO_2-CH_3-H]^-$ ($[M-H-44-15]^-$) 164.87 $[M-CO_2-CH_3CH_2-H]^-$ ($[M-H-44-29]^-$) 136.89 $[181-CO_2]^-$ ($[181-44]^-$) 122.13 $[181-COOH-CH_2]^-$ ($[181-45-14]^-$) 推测为藜芦酸与甘氨酸通过肽键连接的化合物。
3		$C_9H_{10}O_7S$	261.01 $[M-H]^-$	180.93 和 79.76 为互补离子对 79.76 $[SO_3]^-$ 217.05 $[M-CH_2O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 推测为藜芦酸的羧羟基与硫酸酯发生硫酸酯结合反应。
4		$C_9H_{12}O_6S$	247.03 $[M-H]^-$	167.01 和 79.91 为互补离子对 79.91 $[SO_3]^-$ 203.09 $[M-CO_2-H]^-$ 或 $[M-CH_2O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 152.02 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-95]^-$) 137.05 $[M-SO_3-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-110]^-$) 123.11 $[M-SO_3-CO_2-H]^-$ 或 $[M-SO_3-CH_2O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-124]^-$) 根据藜芦酸的分子结构特点推测, 167.01 可能为藜芦酸羧基还原成醇羟基的代谢产物, 而 247.03 则为其硫酸酯化产物, 或者是先发生 <i>O</i> -脱甲基反应, 再发生硫酸酯和甲基结合反应。
5		$C_8H_{10}O_6S$	233.01 $[M-H]^-$	152.94 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 80.91 $[SO_3H]^-$ 188.90 $[M-CH_2O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 202.98 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 122.85 $[M-SO_3-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-110]^-$) 推测为代谢产物 4 的 <i>O</i> -脱甲基产物。
6		$C_{10}H_{11}NO_5$	224.05 $[M-H]^-$	99.98 和 123.02 为互补离子对 99.98 为甘氨酸酰胺 123.02 $[M-CO_2HCHNHCO-H]^-$ ($[M-H-101]^-$) 179.96 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 推测为藜芦酸 <i>O</i> -脱甲基后羧基与甘氨酸通过肽键结合而形成的代谢产物。
7		$C_8H_9NO_6S$	246.01 $[M-H]^-$	165.95 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 80.82 $[SO_3H]^-$ 198.93 $[M-CH_3O-NH_2-H]^-$ ($[M-H-47]^-$) 201.97 $[M-CONH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 188.02 $[M-CONH_2-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44-14]^-$) 推测为藜芦酸羧基与甘氨酸结合后酰胺断裂后再 <i>O</i> -脱甲基和硫酸酯结合反应产生的代谢产物。

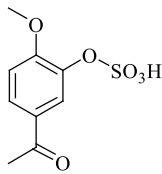
续表 2

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
8		$C_{13}H_{16}O_5$	251.09 $[M-H]^-$	232.99 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 235.92 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 207.01 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 220.92 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 176.99 $[M-CH_2O-CO_2-H]^-$ ($[M-H-30-44]^-$) 165.88 $[M-C_5H_8-OH-H]^-$ ($[M-H-68-17]^-$) 121.88 $[M-C_5H_8-OH-CO_2-H]^-$ ($[M-H-68-17-44]^-$) 推测为原金莲酸的氧化加羟基产物, 因为存在 m/z 235.92、192.04, 氧化发生芳香环上的可能性最大, 即芳香烃上的氢直接被氧化成酚羟基。
9		$C_{19}H_{24}O_{10}$	411.13 $[M-H]^-$	235.15 和 175.02 为互补离子对 156.93 为葡萄糖醛酸的特征断裂碎片 220.84 为原金莲酸的离子碎片 366.84 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 393.02 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 364.89 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30-16]^-$) 342.87 $[M-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 339.07 $[M-CO_2-CH_2 * 2-H]^-$ ($[M-H-44-28]^-$) 推测为原金莲酸的葡萄糖醛酸结合产物, 可能与羧基或者酚羟基缩水结合。
10		$C_{19}H_{26}O_{13}S$	493.10 $[M-H]^-$	413.12 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 446.98 $[M-OCH_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 425.08 $[M-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 331.23 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 343.20 $[M-C_5H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-150]^-$) 373.12 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 402.95 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 166.91 $[M-C_6H_{10}O_5-O-SO_3-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-162-16-80-68]^-$) 推测为金莲花苷的 ω 氧化和硫酸酯结合产物, ω 氧化的位置可能发生在 3-位甲氧基。
11		$C_{25}H_{34}O_{16}$	589.17 $[M-H]^-$	413.04 和 174.94 为互补离子对 174.94 为葡萄糖醛酸 520.97 $[M-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 504.95 $[M-C_5H_8-O-H]^-$ ($[M-H-84]^-$) 477.35 $[M-C_5H_8-CO_2-H]^-$ ($[M-H-112]^-$) 528.71 $[M-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-60]^-$) 499.21 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 469.30 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 251.14 $[M-C_6H_8O_6-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-176-162]^-$) 413.04 $[M-H-176]^-$ 比金莲花苷 m/z 397 大 16 推测其为金莲花苷氧化加羟基、葡萄糖醛酸化的代谢产物。
12		$C_{19}H_{21}NO_7$	374.12 $[M-H]^-$	193.15 和 180.02 为互补离子对 330.13 $[M-CO_2-H]^-$ 或 $[M-CH_2-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 315.09 $[M-CO_2-CH_3-H]^-$ ($[M-H-59]^-$) 推测其为藜芦酸的甘氨酸结合产物和羧基还原产物。

续表 2

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
13		$C_{11}H_{16}O_6S$	275.06 $[M-H]^-$	195.09 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 79.66 $[SO_3]^-$ 96.73 $[HO-SO_3]^-$ 230.02 $[M-CH_2O-CH_3-H]^-$ ($[M-H-45]^-$) 216.96 $[M-CH_2 * 2-O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-58]^-$) 246.08 $[M-CH_2-CH_3-H]^-$ ($[M-H-14-15]^-$) 257.07 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 推测为金莲花苷衍生物烯键环氧化后水解后发生硫酸酯结合反应形成的代谢产物。
14		$C_{11}H_{13}NO_6S$	286.04 $[M-H]^-$	206.04 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 267.91 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 241.90 $[M-CONH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 191.06 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-80-15]^-$) 175.03 $[M-SO_3-CH_3-O-H]^-$ ($[M-H-80-15-16]^-$) 推测为原金莲花苷脱掉 1 个甲基后发生硫酸酯和甘氨酸结合且酰胺键断裂形成的代谢产物。
15		$C_{15}H_{20}O_9$	343.10 $[M-H]^-$	174.85 和 167.79 为互补离子对 174.85 为葡萄糖醛酸分子 112.68 为葡萄糖醛酸的特征离子碎片 324.91 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 314.94 $[M-CH_2 * 2-H]^-$ ($[M-H-28]^-$) 299.03 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 297.12 $[M-CH_2 * 2-H_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 271.03 $[M-CO_2-CO-H]^-$ ($[M-H-44-28]^-$) 推测为藜芦酸的羧基还原后葡萄糖醛酸结合产物, 或者是藜芦酸羧基还原和 <i>O</i> -脱甲基后葡萄糖醛酸和甲基结合产物。
16		$C_{26}H_{32}O_{14}S$	599.14 $[M-H]^-$	519.12 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 437.13 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 357.14 $[M-C_6H_{10}O_5-SO_3-H]^-$ ($[M-H-242]^-$) 569.33 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 479.30 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 581.03 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 552.94 $[M-CH_3O-CH_3-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 531.01 $[M-C_5H_8-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 推测为金莲花苷和藜芦酸的羧基还原产物脱水缩合后 <i>O</i> -脱甲基和硫酸酯结合反应产生的代谢产物。
17		$C_{10}H_{11}NO_6S$	272.02 $[M-H]^-$	191.96 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 80.88 $[SO_3H]^-$ 254.96 $[M-OH-H]^-$ ($[M-H-17]^-$) 227.96 $[M-CONH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 推测为 4- <i>O</i> -(β -D-葡萄糖基)-3-(3-甲基-2-丁烯基)苯甲酸的侧链被氧化成羧基后还原为羟基, 再经重排的产物发生硫酸酯和甘氨酸结合且酰胺键断裂生成的代谢产物。
18		$C_8H_9NO_3$	166.03 $[M-H]^-$	150.82 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 137.76 $[M-CO-H]^-$ ($[M-H-28]^-$) 121.95 $[M-CONH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 106.90 $[M-CONH-O-H]^-$ ($[M-H-43-16]^-$) 推测为藜芦酸 <i>O</i> -脱甲基和甘氨酸结合且酰胺键断裂生成的代谢产物。

续表 2

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
19		$C_9H_{10}O_6S$	245.01 $[M-H]^-$	164.95 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 80.90 $[SO_3H]^-$ 230.17 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 201.14 $[M-CH_2CH_2O-H]^-$ 或 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 150.05 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-95]^-$) 217.03 $[M-CO-H]^-$ 或者 $[M-CH_2CH_2-H]^-$ ($[M-H-28]^-$) 123.24 $[M-SO_3-CH_2CO-H]^-$ ($[M-H-122]^-$) 推测为藜芦酸发生甲基和硫酸酯结合反应。

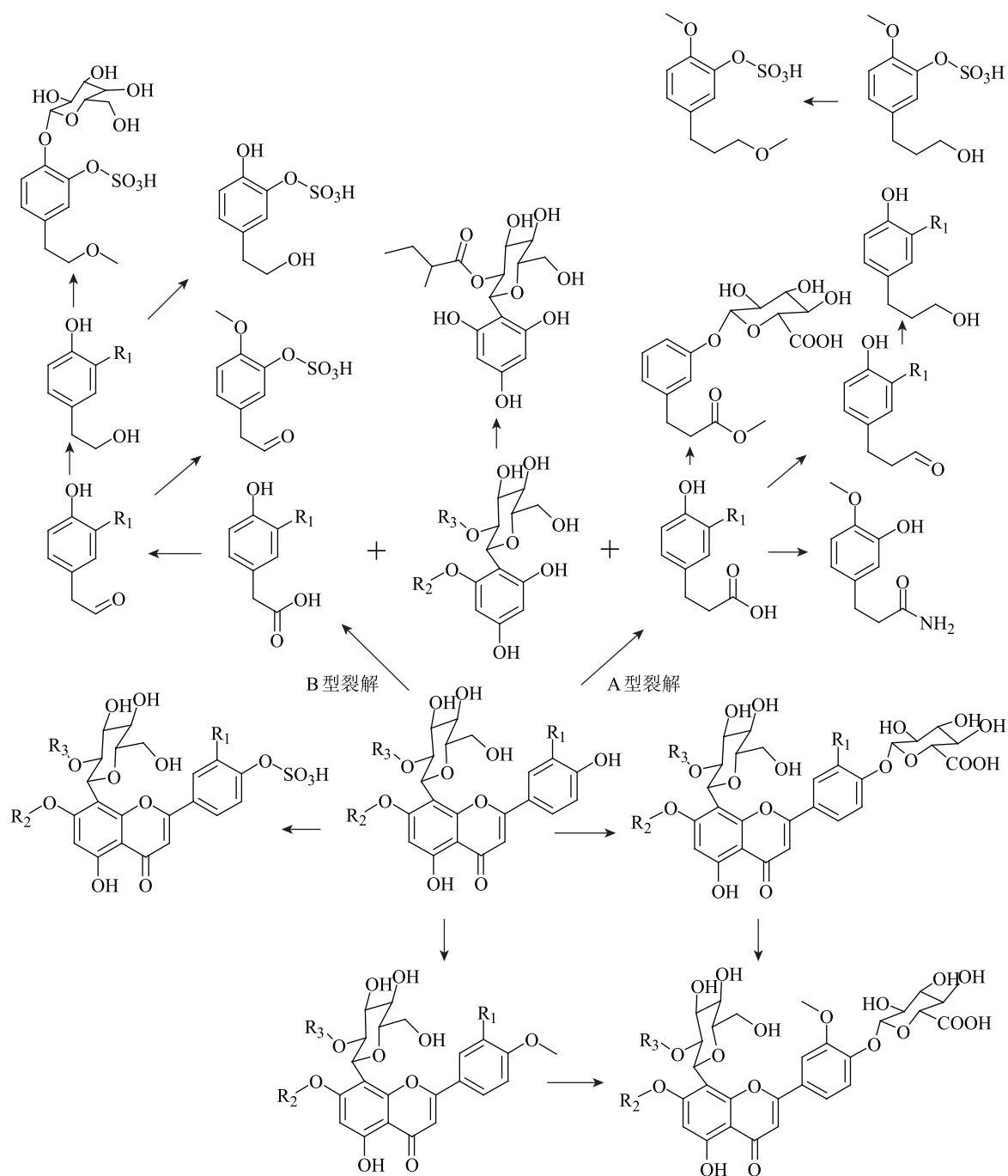
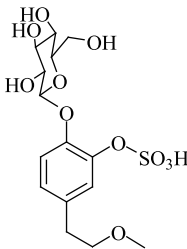
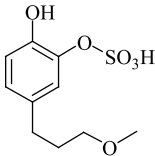
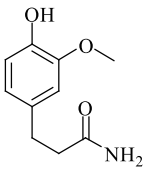
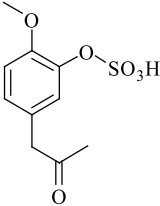
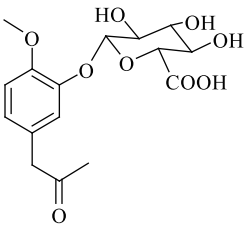
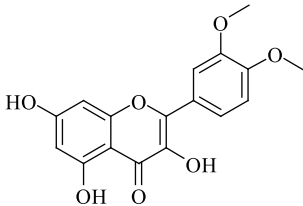
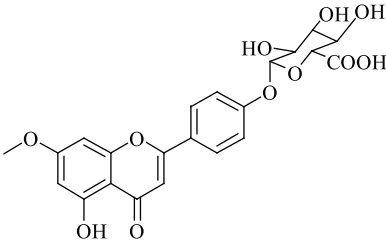
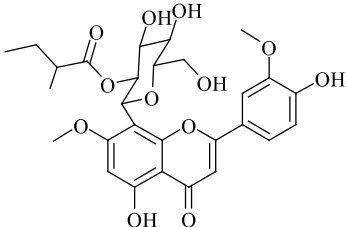
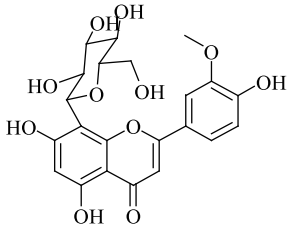
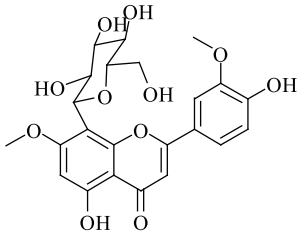


图 4 黄酮类成分体内代谢途径

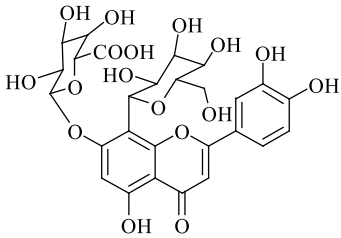
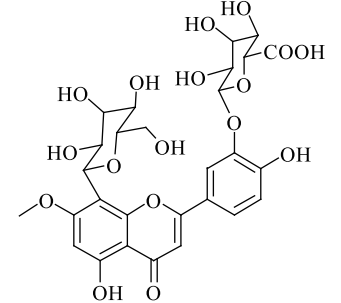
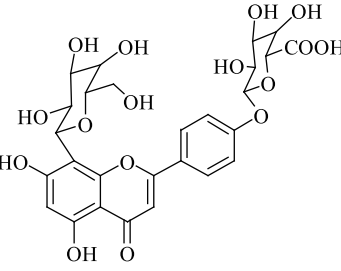
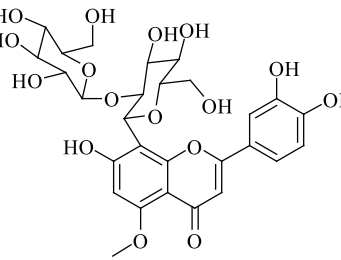
表 3 黄酮类代谢产物及二级碎片信息

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
20		$C_{15}H_{22}O_{11}S$	409.08 $[M-H]^-$	363.02 $[M-CH_2OHCH_3-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 390.87 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 329.21 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 247.02 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162]^-$) 318.94 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 289.07 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 229.05 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-180]^-$) 推测为黄酮类成分 B 型开裂形成的 C_6-C_2 型衍生物发生硫酸酯和葡萄糖结合反应。
21		$C_{10}H_{14}O_6S$	261.04 $[M-H]^-$	180.98 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 79.75 $[SO_3]^-$ 165.90 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-80-15]^-$) 243.02 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 216.98 $[M-CH_2O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 134.84 $[M-SO_3-CH_2O-O-H]^-$ ($[M-H-80-46]^-$) 推测为黄酮类化合物 A 型开裂形成的 C_6-C_3 型衍生物羧基被还原成醇再发生硫酸酯结合反应生成的代谢产物。
22		$C_{10}H_{13}NO_3$	194.08 $[M-H]^-$	136.94 $[M-CONHCH_2-H]^-$ ($[M-H-57]^-$) 179.00 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 175.95 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 178.00 $[M-OH-H]^-$ ($[M-H-16]^-$) 147.78 $[M-CH_2O-O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 推测为黄酮类成分 A 型开裂形成的 C_6-C_3 型衍生物甘氨酸结合后酰胺键断裂后的甲基结合反应而形成的代谢产物
23		$C_{10}H_{12}O_6S$	259.03 $[M-H]^-$	178.88 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 79.74 $[SO_3]^-$ 244.00 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 163.94 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-80-15]^-$) 215.01 $[M-CH_2CH_2O-H]^-$ 或 $[M-CO_2-H]^-$ ($[M-H-44]^-$) 135.00 $[M-SO_3-CH_2O-CH_2-H]^-$ 或者 $[M-SO_3-CO_2-H]^-$ ($[M-H-124]^-$) 推测为黄酮类成分 B 型裂解生成的 C_6-C_2 型衍生物羧基被还原成醛后再与甲基发生结合反应生成的代谢产物。
24		$C_{16}H_{20}O_9$	355.10 $[M-H]^-$	174.85 和 179.01 为互补离子对 174.85 为葡萄糖醛酸 157.10 和 112.81 为葡萄糖醛酸分子特征离子碎片 336.83 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 308.87 $[M-CO-H_2O-H]^-$ 或 $[M-CH_2 * 2-H_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 265.16 $[M-CO_2-CO-H_2O-H]^-$ ($[M-H-44-28-18]^-$) 179.01 可能为脱硫酸基产物 推测为黄酮类成分 B 型裂解生成的 C_6-C_2 型衍生物的葡萄糖醛酸和甲基结合反应产物。

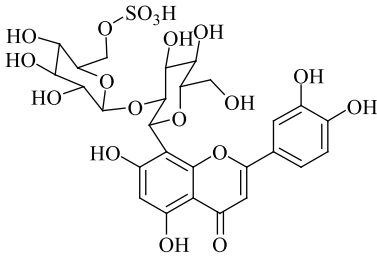
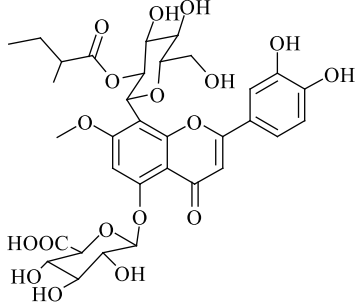
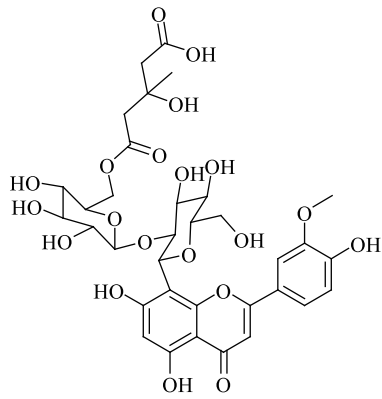
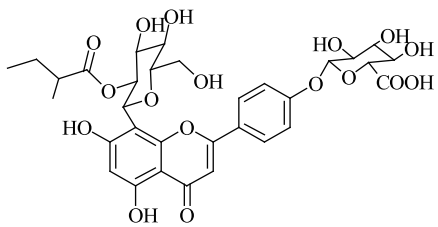
续表 3

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
25		$C_{17}H_{14}O_7$	329.07 $[M-H]^-$	313.98 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 299.09 $[M-CH_3 * 2-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 284.08 $[M-CH_3-CH_2-O-H]^-$ ($[M-H-15-14-16]^-$) 285.03 $[M-CH_2 * 2-O-H]^-$ ($[M-H-28-16]^-$) 282.99 $[M-CO-H_2O-H]^-$ ($[M-H-28-18]^-$) 235.02 $[M-CH_2O * 2-H_2O-O-H]^-$ ($[M-H-30 * 2-18-16]^-$) 311.10、282.99 和 240.15 分别比槲皮素 ^[11] 的二级碎片 283、255 和 212 相差 28 推测为槲皮素的双甲基结合产物。若双甲基均结合在 A 环、B 环或者分别结合于 A、B 环, 其 RDA 断裂产生的 $A^{3,4-}$ 和 $B^{3,4-}$ 离子对分别为 m/z 181 和 149、 m/z 153 和 177、 m/z 167 和 163, 二级数据中的 m/z 177.12 相对较高, 其余 m/z 153、163 和 149 均较低, 故双甲基结合在 B 环的可能性最大。
26		$C_{22}H_{20}O_{11}$	459.09 $[M-H]^-$	174.98 和 283.01 为互补离子对 174.98 为葡萄糖醛酸分子 156.93 为葡萄糖醛酸特征碎片 441.04 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 431.20 $[M-CO-H]^-$ ($[M-H-28]^-$) 413.09 $[M-CO-H_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 391.08 $[M-O * 2-H_2O * 2-H]^-$ ($[M-H-32-36]^-$) 387.15 $[M-CO_2-CO-H]^-$ ($[M-H-44-28]^-$) 推测为 5, 4'-二羟基-7-甲氧基黄酮的葡萄糖醛酸产物。
27		$C_{28}H_{32}O_{12}$	559.18 $[M-H]^-$	457.23 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 475.30 $[M-C_5H_8O-H]^-$ ($[M-H-84]^-$) 337.02 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-102-120]^-$) 541.52 $[M-OH-H]^-$ ($[M-H-17]^-$) 推测为金莲花碳苷 I 的甲基结合产物, 甲基结合反应发生在黄酮母核上。二级数据中找到 m/z 413.63 离子碎片, 则结合反应发生在 B 环。
28		$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.11 $[M-H]^-$	371.09 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 341.09 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 313.02 $[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$ ($[M-H-148]^-$) 推测为荭草素的甲基化代谢产物, 且甲基化发生在黄酮母核的 B 环上, 即 3'或 4'位的羟基。
29		$C_{23}H_{24}O_{11}$	475.13 $[M-H]^-$	460.11 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 456.68 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 415.10 $[M-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-60]^-$) 385.10 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 355.10 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 341.24 $[M-C_4H_8O_4-CH_2-H]^-$ ($[M-H-120-14]^-$) 327.24 $[M-C_4H_8O_4-CO-H]^-$ 或 $[M-C_4H_8O_4-CH_2 * 2-H]^-$ ($[M-H-120-28]^-$) 推测为日本异当药素的甲基化产物, 且甲基结合发生在黄酮母核的羟基上, 或者是荭草素的双甲基结合产物。

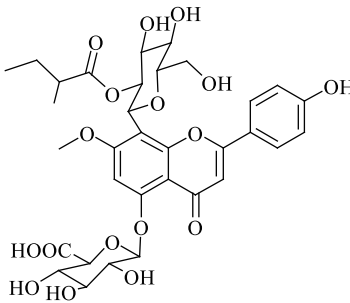
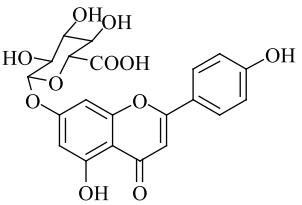
续表 3

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
30		$C_{27}H_{28}O_{17}$	623.13 $[M-H]^-$	357.10 和 326.99 为荛草素的特征离子碎片。 533.13 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 及 503.16 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 为六碳糖的特征断裂方式 447.18 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 357.10 $[M-C_6H_8O_6-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-176-90]^-$) 326.99 $[M-C_6H_8O_6-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-176-120]^-$) 推测为荛草素的葡萄糖醛酸结合产物。在二级数据中找到 m/z 463.41, 推测葡萄糖醛酸化发生在黄酮母核的 A 环上, 7-OH 结合葡萄糖醛酸的能力远强于 3-OH, 故推测葡萄糖醛酸化发生在 7-OH 上。
31		$C_{28}H_{30}O_{17}$	637.14 $[M-H]^-$	461.22 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 547.10 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 517.16 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 622.33 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 618.99 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 590.87 $[M-CO-H_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 569.06 $[M-O^*2-H_2O^*2-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 371.06 $[M-C_6H_8O_6-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-176-90]^-$) 341.26 $[M-C_6H_8O_6-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-176-120]^-$) 推测为日本异当药素或荛草素的葡萄糖醛酸和甲基结合产物。
32		$C_{27}H_{28}O_{16}$	607.13 $[M-H]^-$	431.20 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 547.12 $[M-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-60]^-$) 487.16 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 588.63 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 561.01 $[M-CO-H_2O-H]^-$ ($[M-H-46]^-$) 539.04 $[M-O^*2-H_2O^*2-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 341.16 $[M-C_6H_8O_6-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-176-90]^-$) 311.13 $[M-C_6H_8O_6-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-176-120]^-$) 推测为牡荆素的葡萄糖醛酸结合产物。
33		$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.16 $[M-H]^-$	443.16 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-180]^-$) 503.24 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 341.12 $[M-C_6H_{10}O_5-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-162-120]^-$) 311.10 $[M-C_6H_{10}O_5-C_5H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-162-150]^-$) 上述碎片均为六碳糖的特征断裂方式 428.26 $[M-C_6H_{12}O_6-CH_3-H]^-$ ($[M-H-180-15]^-$) 推测为荛草素-2''-O-β-L-半乳糖苷的甲基结合产物, 且甲基结合部位为黄酮母核的羟基。其二级中存在 m/z 463.25, 确定甲基化反应发生在 A 环的 5-OH 或 7-OH 上, 又 A 环 5-OH 的结合能力要强于 7-OH, 可推断甲基的结合位置为 A 环 5-OH。

续表 3

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰(m/z)	二级离子碎片(m/z)
34		$C_{27}H_{30}O_{19}S$	689.10 $[M-H]^-$	609.23 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 670.58 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 644.28 $[M-HO-CO-H]^-$ ($[M-H-17-28]^-$) 373.12 $[M-C_6H_{10}O_5-C_4H_8O_4-O-H_2O-H]^-$ ($[M-H-162-120-16-18]^-$) 推测为荭草素-2''-O-β-L-半乳糖苷的硫酸酯结合产物, 结合的位置可以是六碳糖上的羟基或者黄酮母核的 5-OH、7-OH、3'-OH 或者 4'-OH, 因二级数据中无显示六碳糖的特征断裂方式的离子碎片, 推测硫酸酯结合于六碳糖上。
35		$C_{33}H_{38}O_{18}$	721.20 $[M-H]^-$	443.06 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-H]^-$ 为 ($[M-H-176-102]^-$) 353.31 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-176-102-90]^-$) 545.25 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 703.40 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 622.78 $[M-C_5H_8O-CH_2-H]^-$ ($[M-H-84-14]^-$) 推测为葡萄糖醛酸结合产物, 结合位置可能为 A 环 5-OH。
36		$C_{34}H_{40}O_{20}$	767.20 $[M-H]^-$	623.17 $[M-C_6H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-144]^-$) 503.13 $[M-C_6H_8O_4-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-144-120]^-$) 443.18 $[M-C_6H_8O_4-C_6H_{12}O_6-H]^-$ ($[M-H-144-180]^-$) 371.16 $[M-C_6H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-144-162-90]^-$) 341.02 $[M-C_6H_8O_4-C_6H_{10}O_5-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-144-162-120]^-$) 461.19 $[M-C_6H_8O_4-C_6H_{10}O_5-H]^-$ ($[M-H-144-162]^-$) 605.27 $[M-C_6H_8O_4-H_2O-H]^-$ ($[M-H-144-18]^-$) 749.20 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 720.89 $[M-H_2O-CO-H]^-$ ($[M-H-18-28]^-$) 推测为 6'''-HMG-2''-O-β-L-半乳糖苷荭草素的甲基结合产物, 且甲基结合在黄酮母核。因其二级数据中存在 m/z 621.01 离子碎片, 则甲基应结合在 B 环。
37		$C_{32}H_{36}O_{17}$	691.19 $[M-H]^-$	515.21 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 413.11 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-176-102]^-$) 323.35 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ 为 ($[M-H-176-102-90]^-$) 293.13 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-176-102-120]^-$) 673.01 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 644.97 $[M-H_2O-CO-H]^-$ ($[M-H-18-28]^-$) 622.89 $[M-O * 2-H_2O * 2-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 589.20 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 601.01 $[M-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-90]^-$) 571.20 $[M-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-120]^-$) 推测为 2''-O-(2'''-甲基丁酰基) 牡荆素的葡萄糖醛酸产物, 其二级数据中只找到 m/z 293.13, 因此葡萄糖醛酸最有可能的结合位置为 B 环 4'-OH。

续表 3

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
38		$C_{33}H_{38}O_{17}$	705.20 $[M-H]^-$	529.16 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ ($[M-H-176]^-$) 427.12 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-176-102]^-$) 397.09 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-176-102-30]^-$) 336.69 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-C_3H_6O_3-H]^-$ ($[M-H-176-102-90]^-$) 307.17 $[M-C_6H_8O_6-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-H]^-$ ($[M-H-176-102-120]^-$) 659.05 $[M-H_2O-CO-H]^-$ ($[M-H-18-28]^-$) 637.03 $[M-O^*2-H_2O^*2-H]^-$ ($[M-H-68]^-$) 421.11 $[M-C_5H_{10}O_2-C_4H_8O_4-CO_2-H_2O-H]^-$ ($[M-H-102-120-44-18]^-$) 603.04 $[M-C_5H_{10}O_2-H]^-$ ($[M-H-102]^-$) 542.73 $[M-C_5H_{10}O_2-C_2H_4O_2-H]^-$ ($[M-H-102-60]^-$) 为六碳糖的特征断裂方式 推测为金莲花碳苷Ⅲ的葡萄糖醛酸产物，葡萄糖醛酸结合在黄酮母核，可能位置为 A 环 5-OH。
39		$C_{21}H_{18}O_{11}$	445.08 $[M-H]^-$	268.99 和 175.02 为互补离子对 157.11 是葡萄糖醛酸的特征离子碎片 427.33 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 399.20 $[M-H_2O-CO-H]^-$ ($[M-H-18-28]^-$) 推测为葡萄糖醛酸结合产物。二级数据中存在 m/z 327.12，因此可以确定葡萄糖醛酸结合在芹菜素(牡荆素苷元)母核的 A 环，即 5-位或者 7-位。

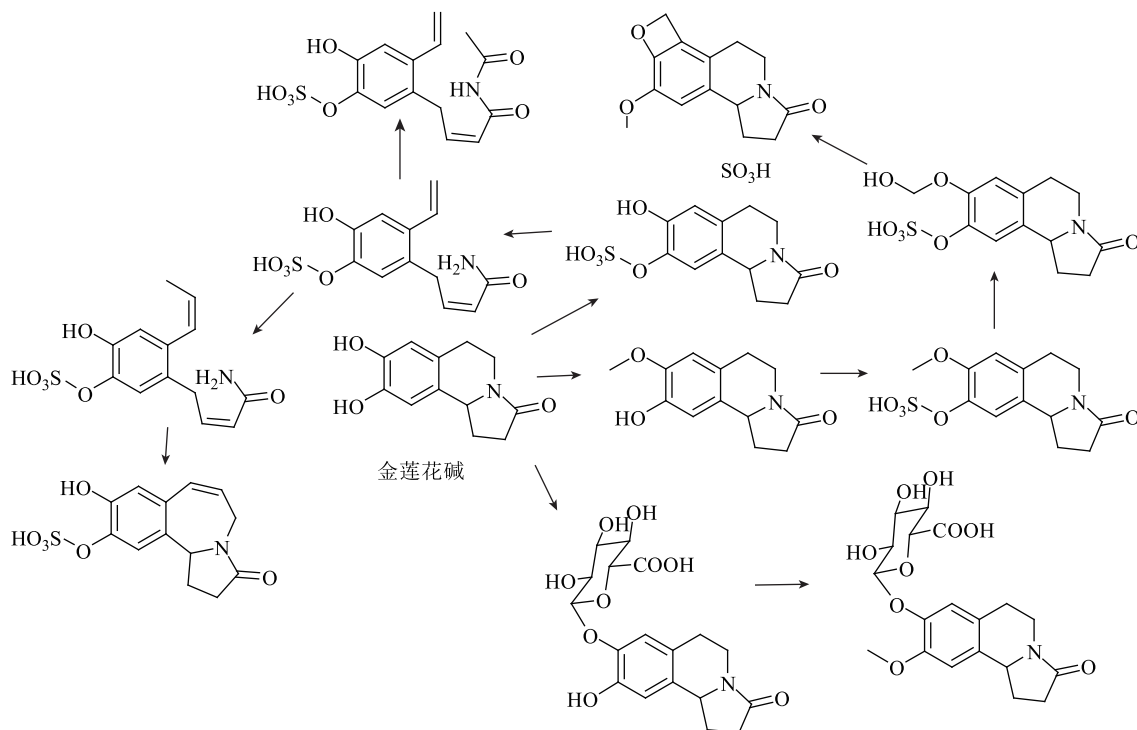
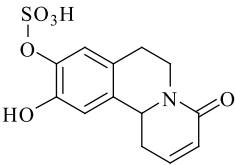
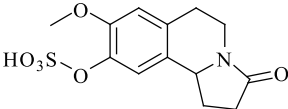
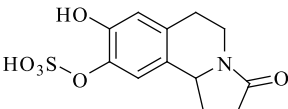
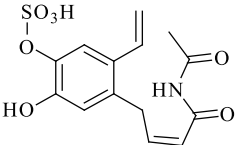
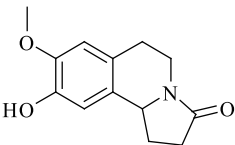
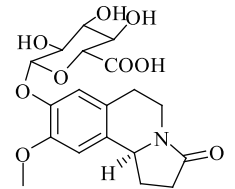


图 5 金莲花碱体内代谢途径

表 4 生物碱类代谢产物及二级碎片信息

代谢产物	结构式	分子式	准分子离子峰 (m/z)	二级离子碎片 (m/z)
40		$C_{13}H_{13}NO_6S$	310.04 $[M-H]^-$	230.08 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 292.02 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 267.08 $[M-CONH-H]^-$ ($[M-H-43]^-$) 252.94 $[M-CONH-CH_2-H]^-$ ($[M-H-57]^-$) 172.83 $[M-SO_3-CONH-CH_2-H]^-$ ($[M-H-137]^-$) 推测为金莲花碱的衍生物的硫酸酯结合产物。
41		$C_{13}H_{15}NO_6S$	312.06 $[M-H]^-$	232.03 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 297.06 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 216.89 $[M-SO_3-CH_3-H]^-$ ($[M-H-80-15]^-$) 282.05 $[M-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-30]^-$) 267.01 $[M-CONH_3-H]^-$ ($[M-H-45]^-$) 推测为金莲花碱的甲基和硫酸酯结合产物。
42		$C_{12}H_{13}NO_6S$	298.04 $[M-H]^-$	217.99 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 270.09 $[M-CO-H]^-$ ($[M-H-28]^-$) 253.22 $[M-CONH_3-H]^-$ ($[M-H-45]^-$) 172.16 $[M-SO_3H-CONH_3-H]^-$ ($[M-H-81-45]^-$) 推测为金莲花碱的硫酸酯结合产物, 结合部位可能为 2 个羟基。
43		$C_{14}H_{15}NO_7S$	340.05 $[M-H]^-$	260.02 $[M-SO_3-H]^-$ ($[M-H-80]^-$) 123.77 和 134.55 为 260.02 的互补离子对 推测其为金莲花碱的杂环开裂生成伯胺再发生乙酰基和硫酸酯结合反应的产物。
44		$C_{13}H_{15}NO_3$	232.10 $[M-H]^-$	217.07 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 187.89 $[M-CH_2-CH_2O-H]^-$ ($[M-H-14-30]^-$)、 174.94 $[M-CH_2-CONH-H]^-$ ($[M-H-14-43]^-$)、 161.90 $[M-CH_2-COC_2H_4-H]^-$ ($[M-H-14-56]^-$) 推测为金莲花碱的甲基结合产物。
45		$C_{19}H_{23}NO_9$	408.13 $[M-H]^-$	232.08 和 174.95 为互补离子对 156.90 为葡萄糖醛酸的特征离子碎片 392.93 $[M-CH_3-H]^-$ ($[M-H-15]^-$) 390.09 $[M-H_2O-H]^-$ ($[M-H-18]^-$) 362.94 $[M-CONH_3-H]^-$ ($[M-H-45]^-$) 335.86 $[M-CO_2-CO-H]^-$ ($[M-H-72]^-$) 272.02 $[M-CO_2-CO-CH_2O-H_2O-O-H]^-$ ($[M-H-136]^-$) 推测为金莲花碱的甲基化和葡萄糖醛酸结合产物。

4 讨论

金莲花中的酚酸基本上是以藜芦酸和金莲花苷及其衍生物为主。本研究发现藜芦酸和金莲花苷在体内发生的 II 相代谢^[12], 以硫酸酯化、甲基化、葡萄糖醛酸化和氨基酸结合反应为主, 其中氨基酸一般指的是甘氨酸, 这类型代谢产物还会通过酰胺

键的断裂再生成新的代谢产物。藜芦酸 I 相代谢的氧化分为甲氧基末端的 ω 氧化、芳香环上加氧成羟基和环氧化。还原大多指羧基的还原, 一般会经历羧基还原成醛最终还原成醇的过程。金莲花苷的氧化除了甲氧基末端的 ω 氧化和 O-脱甲基等外, 还有侧链末端的 ω 氧化、烯键氧化和环氧化。烯键氧化一般会产生羧基, 再发生还原, 依次生成醛

和醇。醛会通过重排生成烯醇，双键环氧化后最终会水解生成2个羟基。除此以外本研究表明，金莲花提取物体内代谢和单体酚酸体内代谢的最大不同在于金莲花提取物能够产生两类酚酸的缩合产物，其中尤以藜芦酸的羧基还原为醇后易发生缩合反应。

金莲花中黄酮类成分以碳苷为主，各成分可以通过水解转化，同时其水解反应也是黄酮类成分在体内的重要反应类型。经静脉注射给药黄酮类成分的主要代谢器官是肝脏，而发生的反应主要是Ⅱ相代谢，包括硫酸酯化、甲基化和葡萄糖醛酸反应，这类反应使原型成分极性增加，利于排泄或者失活。总结研究成果发现，当黄酮母核B环只存在4'位1个羟基时，易发生葡萄糖醛酸反应，当同时存在3'-和4'-2个羟基时，容易同时发生甲基和硫酸酯结合反应，或者是甲基和葡萄糖醛酸结合反应，甲基化一般发生在3'-羟基。黄酮类成分还会发生裂解，这类反应一般是通过肠内菌代谢产生，但是经静脉注射的给药方式并不经过肠代谢，可能的原因是体内存在肝肠循环，能够使经静脉注射给药的中药成分同样拥有与口服给药一样完整的体内代谢。本研究中黄酮类成分在体内的开裂大多为A型或B型开裂2种，A型开裂部位在C环的C₄和A环的C₅之间，生成C₆-C₃型(苯丙酸)衍生物和间苯三酚衍生物；B型开裂则发生于C环的C₃和C₄之间，生成C₆-C₂型(苯乙酸)衍生物，黄酮醇一般发生B型开裂。黄酮类成分开裂形成的C₆-C₃型和C₆-C₂型衍生物和酚酸一样会在体内发生Ⅰ相和Ⅱ相代谢生成对应的代谢产物。

金莲花碱在体内的Ⅱ相代谢也是以甲基化、硫

酸酯化和葡萄糖醛酸化为主，其他类型的反应应该都与其杂环开裂有关，杂环开裂形成的伯胺又易发生乙酰化反应。

参考文献

- [1] 李良千. 毛茛科金莲花亚科植物的地理分布[J]. 植物分类学报, 1995, 33(6): 537-555.
- [2] 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, 2015: 1080.
- [3] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 256.
- [4] 黄睿, 张贵君, 潘艳丽, 等. 金莲花化学成分的HPLC-MS表征分析与鉴定[J]. 中草药, 2012, 43(4): 670-672.
- [5] 雷蓉, 冯丽, 刘永利, 等. 金莲花的研究进展[J]. 中药材, 2015, 38(5): 1085-1091.
- [6] 李镇. 金莲花中藜芦酸的分离与鉴定[J]. 中草药, 1982, 13(3): 34.
- [7] 张朋美, 杨晓民, 史建国, 等. 高效液相色谱法测定金莲花中的生物碱[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2008, 24(1): 43-45.
- [8] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.
- [9] 白玉静, 卢建秋, 张宏桂. 荭草苷、牡荆苷和葛根素碳苷类化合物的电喷雾质谱裂解规律及解析[J]. 中草药, 2010, 41(3): 361-364.
- [10] CUI Y, ANG C Y, BEGER R D, et al. *In vitro* metabolism of hyperforin in rat liver microsomal systems[J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(1): 28-34.
- [11] 李宇航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- [12] 钟大放. 药物代谢[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 2-3.

(收稿日期: 2019-08-28 编辑: 谢睿)