

· 基础研究 ·

新绿原酸的大鼠体内代谢产物的
UPLC-Q-TOF MS 鉴定[△]李洁¹, 刘子茜¹, 董凡¹, 王喻淇¹, 王少平², 代龙², 张加余^{2*}, 卢建秋^{3*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;

2. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003;

3. 北京中医药大学 图书馆, 北京 100029

[摘要] **目的:** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)高分辨质谱技术分析鉴定新绿原酸大鼠体内的代谢产物。**方法:** 灌胃给药后, 收集正常组和给药组大鼠的血浆、尿液和粪便。以固相萃取法处理生物样品后, 采用 Waters HSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 0.1% 甲酸水溶液(B)-乙腈(A)流动相系统进行梯度洗脱; 在负离子模式下对生物样品进行分析。**结果:** 最终根据所获得的精确相对分子质量、色谱保留行为、质谱裂解规律、特征碎片离子、对照品比对以及相关文献报道, 共分析鉴定了包括原型药物在内的 43 个代谢产物。其主要代谢途径为异构化反应、水解反应、甲基化、葡萄糖醛酸化以及其复合反应。**结论:** 应用 UHPLC-Q-TOF MS 高分辨液质联用技术能较为全面地阐明新绿原酸在大鼠体内的代谢情况, 并为进一步的药效学以及绿原酸类物质的开发、利用提供借鉴。

[关键词] 新绿原酸; 体内代谢; 咖啡酸; 奎尼酸; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-1048-09

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191030003

Metabolite Identification of Neochlorogenic Acid in Rats Based on UPLC-Q-TOF MS

LI Jie¹, LIU Zi-han¹, DONG Fan¹, WANG Yu-qi¹, WANG Shao-ping², DAI Long², ZHANG Jia-yu^{2*}, LU Jian-qiu^{3*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

3. Library of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

[Abstract] **Objective:** An efficient method of ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) was established to elucidate the *in vivo* metabolites of neochlorogenic acid in rats. **Methods:** Urine, plasma and feces samples were collected after oral gavage. After processing biological sample by solid-phase extraction, Waters ACQUITY HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used with 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B) solution as the mobile phase for gradient elution. The bio-samples were then analyzed by UPLC-Q-TOF equipped with a HESI ion source under negative ion mode. **Results:** According to the obtained accurate molecular weight, combined with chromatographic retention behavior, mass spectrometry cleavage, characteristic fragment ions, reference comparison, and related literature reports, a total of 43 metabolites. Main metabolic pathways contained isomerization, reduction reaction, methylation, glucosylation and their complicated reactions. **Conclusion:** The results showed that the metabolism of neochlorogenic could be comprehensively clarified by using UPLC-Q-TOF MS. And the study provided scientific evidence for the further study of the pharmacological activities of neochlorogenic acid.

[Keywords] neochlorogenic acid; metabolite identification; caffeic acid; quinic acid; UPLC-Q-TOF MS

[△] **[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302); 山东省青创人才引育创新研究团队项目; 烟台市校地融合中药大健康产业化平台项目(2019XDRHXMPT18); 滨州医学院高层次人才科研启动基金(2019KYQD05)

^{*} **[通信作者]** 张加余, 教授, 研究方向: 中药质量控制及体内代谢, Tel: (0535)6913719; E-mail: zhangjiayu0615@163.com
卢建秋, 研究员, 研究方向: 中药质量控制及体内代谢, E-mail: lujq@vip.sina.com

绿原酸(chlorogenic acids, CGAs)是天然抗氧化剂,也是药食同源中药中最丰富的多酚之一^[1]。绿原酸类化学成分是众所周知的抗菌消炎活性成分。此外,该类成分还具有保护DNA^[2]、抗溃疡^[3]、降低胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白^[4-5]等作用。其中,绿原酸(5-O-咖啡酰奎尼酸)是由咖啡酸与奎尼酸生成的缩酚酸^[6],又名咖啡鞣酸和咖啡单宁酸。由于咖啡酰基与奎尼酸结合位点的不同,绿原酸还有新绿原酸(3-O-咖啡酰奎尼酸)和隐绿原酸(4-O-咖啡酰奎尼酸)等重要的同分异构体。

绿原酸类在金银花、菊花、茵陈、忍冬、杜仲等药用植物中含量较高,并凭借显著的抗炎效果成为《中华人民共和国药典》中对中药进行质量控制的指标。然而,绿原酸在高温、强光下不稳定,在中性及碱性条件下容易水解为新绿原酸、隐绿原酸^[7]。因此,异构体之间的相互转化直接影响到药品质量,从而影响到临床疗效。药物进入人体后,吸收和代谢是药物体内代谢过程的重要步骤,与药理活性密切相关。目前绿原酸的体内代谢过程研究较为深入,但其位置异构体新绿原酸的研究尚未开展,体内代谢产物尚不明确。因此,新绿原酸的体内代谢过程亟需进一步研究。

超高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)技术具有优秀的色谱重现性以及超高的灵敏度和选择性,可作为中药复杂体系的快速分析平台,并在代谢物鉴定中显示出优异的性能^[8-10]。本文基于UPLC-Q-TOF MS筛选鉴定了新绿原酸的体内代谢产物,并阐明其主要的体内代谢通路,以期绿原酸类成分的新药研发及药材、制剂的全面质量控制奠定基础。

1 材料

Exion LC™ AC液相色谱仪与X500R QTOF质谱,配有双喷雾Turbo V离子源,SCIEX OS 1.3工作站(AB SCIEX公司);R200D型电子分析天平(十万分之一,德国Sartorius公司);Millipore Synergy UV型超纯水机(美国Millipore公司);KQ-250 DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Eppendorf Centrifuge 5424 R离心机(德国);SPE Cartridges C₁₈固相萃取小柱[500 mg·(3 mL)⁻¹]。

新绿原酸(批号:PRF8050442)、隐绿原酸(批号:PRF8010501)、咖啡酸(批号:PRF7102044)、

奎尼酸(批号:PRF8060823)均购自成都普瑞法科技开发有限公司,绿原酸(批号:110753-200413)、阿魏酸(批号:110773-201313)购于中国食品药品检定研究院,异阿魏酸(批号:MUST-14110611)购自成都曼思特生物科技有限公司,所有对照品纯度均大于98%;乙腈和甲醇(质谱级,美国Thermo Fisher公司);甲酸(色谱级,德国Merck公司)。

Sprague Dawley(SD)大鼠,雄性,体质量(200±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制

分别取上述7种对照品适量,精密称定,加入甲醇制成质量浓度约100 μg·mL⁻¹的储备液,用时稀释成质量浓度适宜的对照品溶液。

2.2 生物样品的制备

2.2.1 对照品给药液的配制 称取新绿原酸180 mg,加入8 mL 0.9%氯化钠溶液,超声至充分混悬,配制成给药溶液,于4℃储存。

将8只SD大鼠随机平均分为空白组和给药组。实验前,2组大鼠在动物房内进行适应性饲养1周(室温22~26℃,相对湿度40%~70%,12 h昼夜更替),给药前禁食12 h,全程不禁水。给药组按200 mg·kg⁻¹的剂量给予0.9%氯化钠溶液混悬液,而空白组的每只大鼠灌胃等体积0.9%氯化钠溶液。各组均连续给药2 d。

2.2.2 血浆样本的收集与储存 大鼠在最后一次给药后0.5、1、2、4 h,分别眼眶静脉取血0.5 mL。所采集的血样置于涂肝素钠的离心管中静置15 min,3500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径为5.5 cm),合并上述4个时间点的血液。分别吸取上清液,即得空白血浆和含药血浆,于-80℃冰箱冻存。

2.2.3 尿样和粪样的收集与储存 灌胃给药后0~24 h内,每隔6 h收集1次尿液和粪便,分别合并。尿样3500 r·min⁻¹离心10 min,后取上清液于-80℃冰箱冻存。粪样置于通风橱中晾干后碾碎,装于离心管中冻存。

2.3 大鼠生物样品的前处理

将2组冻存的血浆、尿液生物样本放到室温下解冻。取固相萃取柱,依次用3 mL甲醇和3 mL水对其进行活化,然后分别吸取生物样品2 mL上样,

依次用3 mL水和3 mL甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液。

取各组粪样适量,按照1:5(W:V)比例加入去离子水,超声处理60 min,3500 r·min⁻¹离心10 min,取上清液。取各组处理好的上清液置于固相萃取小柱,用3 mL水冲洗杂质,最后用3 mL甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液。

将上述所有甲醇洗脱液,在室温下用氮气吹干,残渣用100 μL的初始流动相复溶,涡旋振荡3 min后,14 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径为5.5 cm)。取上清液进行分析。

2.4 液质联用分析条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters HSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1%甲酸水溶液(B)和乙腈(A), 进样室温度: 15℃, 柱温: 40℃, 洗脱梯度(0~6 min, 2%~10% A; 6~10 min, 10%~25% A; 10~15 min, 25%~35% A; 15~16 min, 35%~40% A; 16~20 min, 40%~80% A; 20~21 min, 80%~95% A; 21~24 min, 95% A), 体积流量: 0.3 mL·min⁻¹, 进样量: 5 μL。

2.4.2 质谱条件 HESI 负离子模式, 离子源温度: 550℃, 电离源电压: 4.5 kV, 鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度>99.99%), 扫描模式: Full MS/dd-MS²; 数据依赖性 ddMS² 采集, Full MS 分辨率70 000, dd-MS² 分辨率17 500, 高分辨扫描范围 m/z 100~1000, 碰撞能为30 eV。

2.5 高分辨质谱数据的预处理

药物的代谢产物通常具有相同或者相似的母核结构。基于此,可采用数据采集的质量亏损过滤(MDF)软件进行筛选追踪主要的代谢物,尤其是不可预知的代谢产物。基于母药新绿原酸的化学结构,设置了如下MDF模板: 1)母药(m/z 353.086 71)及其核心结构咖啡酸和奎宁酸(m/z 179.035 02、 m/z

191.055 04); 2) GSH 结合产物(m/z 660.171 51), 糖基化产物(m/z 515.140 43), 葡萄糖醛酸结合产物(m/z 529.119 90)和磺酸化产物(m/z 433.043 53)等。另外, MDF 窗口设置为±50 mDa。

所有数据采集和处理均在 SCIEX OS 1.3.1 工作站进行。根据精确分子质量,元素组成和可能发生的反应,对所有的母离子和碎片离子的分子式进行预测。相关参数设置为: C [0-30], H [0-50], O [0-30], S [0-2], N [0-3], 环不饱和双键数(RDB equivalent value) [0-15], 质量精度误差在 1×10^{-5} 以内。

3 结果与讨论

3.1 新绿原酸的质谱裂解规律分析

对新绿原酸对照品在负离子模式下的碎片离子进行系统分析,总结得到相关的特征离子。在负离子模式下,新绿原酸的准分子离子峰为 $[M-H]^-$ m/z 353.087 40(1.83×10^{-6} , C₁₆H₁₇O₉),在质谱裂解过程中,其先丢失1分子咖啡酰基,产生特征碎片离子 m/z 191.055 04(1.10×10^{-6} , C₇H₁₁O₆),该离子继续丢失1分子水产生 m/z 173.045 46(0.26×10^{-6} , C₉H₇O₄)。与此同时,还检测到特征碎片咖啡酸离子 m/z 179.035 02,另外此离子分别丢失1分子水和1分子CO₂形成碎片离子 m/z 161.022 4和 m/z 135.045 22。可能的裂解规律见图1。

3.2 大鼠体内代谢产物的分析鉴定

通过对给药组生物样品与空白组样品的比较分析,结合在线MDF数据处理软件对新绿原酸代谢产物进行相对准确地筛查、鉴定,最终在大鼠的尿液、血浆和粪便样品中共筛选鉴定了43个代谢产物。其中在血、尿和粪中分别鉴定了20、30、11个,具体的质谱信息见表1。代谢产物的鉴定结果分析如下。

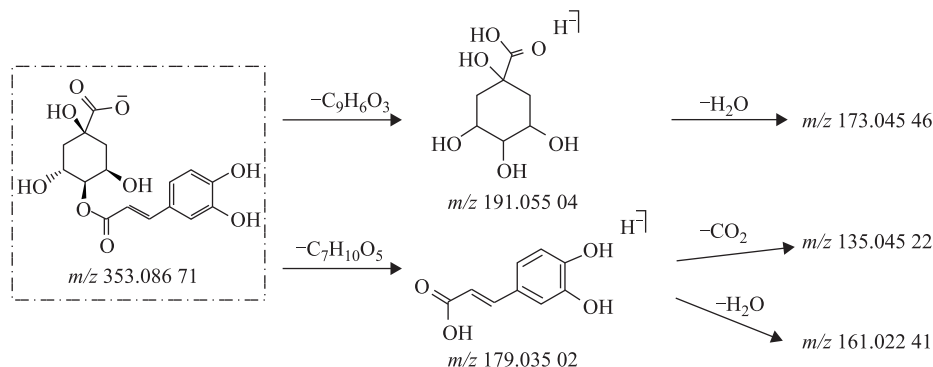


图1 负离子模式下新绿原酸对照品的质谱裂解图

表 1 大鼠生物样品中新绿原酸代谢产物的质谱信息

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	裂解碎片	鉴定结果	血浆	尿液	粪便
M1	0.93	$C_7H_{11}O_6$	191.055 04	191.056 14	1.10	$MS^2[191]:173(100),147(63),111(43)$	奎尼酸*	-	-	+
M2	3.67	$C_7H_9O_5$	173.044 45	173.045 72	1.27	$MS^2[173]:129(100),155(36),111(23)$	莽草酸	+	-	-
M3	4.70	$C_9H_9O_5$	197.044 45	197.045 80	1.35	$MS^2[197]:149(100),121(80),167(23)$	丁香酸	-	+	-
M4	4.78	$C_9H_7O_2$	147.045 40	147.045 43	0.03	$MS^2[147]:103(100)$	肉桂酸	+	+	+
M5	5.33	$C_8H_7O_4$	167.033 88	167.034 97	1.09	$MS^2[167]:167(100),123(47),149(13)$	香草酸	-	+	+
M6	6.14	$C_{11}H_{10}NO_5$	236.055 34	236.057 07	1.73	$MS^2[236]:162(100),134(34)$	咖啡酸甘氨酸结合物	+	-	+
M7	6.15	$C_9H_9O_5$	197.044 45	197.046 01	1.56	$MS^2[197]:123(100),135(34),121(11),167(3),149(3)$	丁香酸	-	+	-
M8	6.31	$C_9H_9O_7S$	261.006 35	261.007 54	1.19	$MS^2[261]:181(100),137(33)$	二氢咖啡酸硫酸结合物	+	+	-
M9	6.89	$C_9H_9O_4$	181.049 53	181.050 58	1.05	$MS^2[181]:137(100),163(23)$	二氢咖啡酸	+	+	+
M10	6.93	$C_{16}H_{17}O_9$	353.086 71	353.086 82	0.11	$MS^2[353]:191(100),179(63),135(58)$	新绿原酸*	+	+	-
M11	7.00	$C_9H_9O_7S$	261.006 35	261.007 99	1.64	$MS^2[261]:137(100),181(12)$	二氢咖啡酸硫酸结合物	-	+	-
M12	7.43	$C_7H_5O_3$	137.023 32	137.024 59	1.27	$MS^2[137]:137(100),93(54),109(31)$	3-羟基苯甲酸	+	+	-
M13	7.77	$C_9H_8NO_4$	194.044 78	194.046 43	1.63	$MS^2[194]:135(100),150(72)$	3-羟基马尿酸	-	+	+
M14	8.13	$C_9H_9O_7S$	261.006 35	261.007 47	1.12	$MS^2[261]:181(100),137(38),167(35)$	二氢咖啡酸硫酸结合物	+	-	-
M15	8.32	$C_9H_9O_7S$	261.006 35	261.007 86	1.51	$MS^2[261]:181(100),137(38),179(8)$	二氢咖啡酸硫酸结合物	-	+	-
M16	8.56	$C_9H_9O_4$	181.049 53	181.050 75	1.22	$MS^2[181]:137(100),163(23)$	二氢咖啡酸	-	+	-
M17	8.59	$C_{16}H_{17}O_9$	353.086 71	353.087 99	1.28	$MS^2[353]:191(100),135(68),179(46)$	新绿原酸异构体	+	+	-
M18	8.61	$C_9H_8NO_3$	178.049 86	178.051 07	1.21	$MS^2[178]:134(100),150(90)$	马尿酸	+	-	+
M19	8.64	$C_{10}H_9O_4$	193.049 53	193.050 76	1.23	$MS^2[193]:149(100),134(45),178(20)$	阿魏酸异构体	+	-	-
M20	8.84	$C_{16}H_{17}O_9$	353.086 71	353.087 17	0.46	$MS^2[353]:191(100),179(68),135(60)$	绿原酸*	+	+	-
M21	8.92	$C_{17}H_{19}O_9$	367.102 36	367.103 74	1.38	$MS^2[367]:193(100),134(92),191(34)$	甲基化	-	+	-
M22	9.01	$C_9H_7O_3$	165.054 60	165.055 88	1.29	$MS^2[165]:121(100),135(72)$	对羟基苯丙酸或其异构体	+	-	-
M23	9.08	$C_{10}H_9O_7S$	273.007 40	273.007 60	0.20	$MS^2[273]:193(100),134(51),178(43),149(12)$	甲基化咖啡酸的硫酸结合物	-	+	-
M24	9.08	$C_{17}H_{21}O_9$	369.118 01	369.120 44	2.43	$MS^2[369]:195(100),173(8),19(8)$	甲基化,氢化	-	+	-
M25	9.17	$C_9H_7O_4$	179.035 02	179.035 26	1.38	$MS^2[179]:135(100),161(56),134(25)$	咖啡酸*	-	+	-
M26	9.23	$C_9H_7O_4$	179.035 02	179.071 59	1.21	$MS^2[179]:135(100),134(38)$	咖啡酸异构体	+	-	-
M27	9.24	$C_7H_5O_2$	121.028 40	121.029 85	1.45	$MS^2[121]:121(100),93(25)$	苯甲酸	+	+	+
M28	9.38	$C_9H_7O_3$	163.038 97	163.040 30	1.33	$MS^2[163]:101(8),119(7)$	香豆酸	-	+	+
M29	9.39	$C_{17}H_{19}O_9$	367.102 36	367.103 14	0.78	$MS^2[367]:193(100),134(78),178(5)$	甲基化	-	+	-
M30	9.41	$C_{10}H_9O_4$	193.049 53	193.050 94	1.41	$MS^2[193]:134(100),178(34),149(9)$	异阿魏酸*	-	+	-
M31	9.51	$C_{17}H_{21}O_9$	369.118 01	369.119 55	1.54	$MS^2[369]:191(100),173(23),137(6)$	甲基化,氢化	-	+	-
M32	9.83	$C_{17}H_{21}O_9$	369.118 01	369.119 56	1.55	$MS^2[369]:173(100),191(45)$	甲基化,氢化	-	+	-
M33	10.02	$C_{17}H_{21}O_9$	369.118 01	369.119 76	1.75	$MS^2[369]:369(100),173(73),191(65)$	甲基化,氢化	-	+	-
M34	10.10	$C_{17}H_{19}O_9$	367.102 36	367.102 25	1.34	$MS^2[367]:173(100),191(43),134(32)$	甲基化	+	-	-
M35	10.24	$C_8H_7O_2$	135.044 06	135.045 40	1.34	$MS^2[135]:135(100),120(83),92(45)$	咖啡酸脱羧	+	-	-
M36	10.32	$C_{17}H_{21}O_9$	369.118 01	369.119 15	1.14	$MS^2[369]:369(100),173(98),191(68)$	甲基化,氢化	-	+	-
M37	10.42	$C_{17}H_{19}O_9$	367.102 36	367.102 86	0.50	$MS^2[367]:173(100),193(25),134(24)$	甲基化	-	+	-
M38	10.72	$C_9H_7O_3$	165.054 60	165.055 85	1.25	$MS^2[165]:121(100),135(72)$	对羟基苯丙酸或其异构体	+	-	-
M39	10.79	$C_9H_9O_4$	179.035 02	179.035 22	1.34	$MS^2[179]:135(100),134(70),107(14)$	咖啡酸异构体	+	-	+

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	裂解碎片	鉴定结果	血浆	尿液	粪便
M40	11.04	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_9$	355.102 36	355.097 23	-5.13	$\text{MS}^2[355]:181(100),137(30),173(16)$	氢化	+	+	-
M41	11.05	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$	193.049 53	193.050 85	1.32	$\text{MS}^2[193]:134(100),178(35),149(13)$	阿魏酸*	-	-	+
M42	13.82	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{14}$	543.170 83	543.171 72	0.89	$\text{MS}^2[543]:367(100),349(34),173(9),135(5)$	甲基化,葡萄糖醛酸化	-	+	-
M43	14.15	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$	357.081 62	357.078 55	-3.07	$\text{MS}^2[357]:357(100),313(48),181(28)$	二氢咖啡酸的葡萄糖醛酸化	-	+	-

注: + 检测到; - 未检测到; * 与对照品比对鉴定。

在负离子模式下,代谢物 **M10**、**M20**、**M17** 产生相同的准分子离子峰 m/z 353.086 71 $[\text{M-H}]^-$, 推测其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。在其 ESI-MS^2 谱图中,它们均产生碎片离子 m/z 179.035 02(咖啡酸骨架离子)以及奎尼酸负离子碎片 m/z 191.055 04。其中, **M10** 和 **M20** 的色谱保留时间与质谱裂解信息与新绿原酸、绿原酸相同,因此将两者分别准确鉴定为新绿原酸和绿原酸,并将 **M17** 推断为其同分异构体。

代谢物 **M39**、**M25**、**M26** 的相对保留时间分别为 10.79、9.17、9.23 min。它们的准分子离子峰为 m/z 179.035 26 $[\text{M-H}]^-$, 推断最可能的分子式为 $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。在其 ESI-MS^2 谱中,观察到碎片离子 m/z 135 $[\text{M-H-CO}_2]^-$, 表明它们的分子中存在羧基。另外,根据与咖啡酸对照品的保留时间以及质谱裂解行为比对,可将 **M25** 准确鉴定为咖啡酸,结合参考文献 [11] 报道将 **M39** 和 **M26** 推断为咖啡酸异构体。

代谢物 **M9**、**M16** 具有相同的准分子离子峰 m/z 181.049 53 $[\text{M-H}]^-$, 比咖啡酸多 2。根据精确相对分子质量推测其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4$, 相对误差均小于 2×10^{-6} 。在 ESI-MS^2 谱中, m/z 181 丢失 1 分子 H_2O (18 Da) 产生了主要的碎片离子 m/z 163, 并且可中性丢失 1 分子 CO_2 (44 Da) 形成碎片离子 m/z 137。结合参考文献 [12] 报道将两者鉴定为咖啡酸的氢化产物。

M6 的准分子离子峰为 m/z 236.057 07 $[\text{M-H}]^-$, 可知其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_5$, 误差为 1.73×10^{-6} 。在其 ESI-MS^2 谱图中, m/z 236 通过中性丢失 $\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2$ 和 $\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}_3$, 生成碎片离子 m/z 162 $[\text{M-H-NH}_2\text{CH}_2\text{COO}]^-$ 和 m/z 134 $[\text{M-H-C}_2\text{H}_4\text{NO}_2\text{-CO}]^-$, 由此推测分子中有甘氨酸和羰基的存在。参照文献 [13] 报道,可将代谢产物 **M6** 鉴定为咖啡酸的甘氨酸结合产物。

代谢物 **M43** 在 14.15 min 被洗脱,其准分子离子峰为 m/z 357.078 55 $[\text{M-H}]^-$, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$, 误差 $< 2 \times 10^{-6}$ 。在 ESI-MS^2 谱图中, m/z 357 通过中性丢失 1 分子 CO_2 形成碎片离子 m/z 313。此外,还观察到碎片离子 m/z 181 $[\text{M-H-glucuronide-H}_2\text{O}]^-$, 推测葡萄糖醛酸结合反应发生。结合文献 [14] 报道, **M43** 被鉴定为二氢咖啡酸的葡萄糖醛酸结合产物。

代谢物 **M4** 在准分子离子峰在 m/z 147.045 43 $[\text{M-H}]^-$, 推测其相对分子式为 $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2$ (误差 0.03×10^{-6})。在其 ESI-MS^2 光谱中, m/z 147 通过中性丢失 1 分子 CO_2 生成碎片离子 m/z 103 $[\text{M-H-CO}_2]^-$ 。此外,它的相对分子质量比咖啡酸少 32 Da。结合文献 [15] 报道以及相关的生物转化规律,将 **M4** 鉴定为肉桂酸。

M28 的准分子离子峰为 m/z 163.040 30 $[\text{M-H}]^-$, 根据精确相对分子质量推测其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3$ 。**M28** 的相对分子质量比咖啡酸少 16 Da, 并产生碎片离子 m/z 119 $[\text{M-H-CO}_2]^-$, 表明有羧基基团的存在。因此,将 **M28** 鉴定为咖啡酸的脱羟基产物香豆酸。

M8、**M14**、**M11**、**M15** 有相同的准分子离子峰 m/z 261.006 35 $[\text{M-H}]^-$, 推测其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_7\text{S}$, 所有质量误差均小于 2×10^{-6} 。在 ESI-MS^2 谱图中,由于中性丢失 1 分子 SO_3 和 1 分子 CO_2 , 分别产生碎片离子 m/z 181 $[\text{M-H-SO}_3]^-$ 和 m/z 137 $[\text{M-H-SO}_3\text{-CO}_2]^-$, 说明它们的分子结构中存在羧基和磺酸基。结合相关文献 [14] 报道,它们被鉴定为二氢咖啡酸磺酸化结合物。

代谢物 **M23** 的保留时间为 9.08 min, 准分子离子峰为 m/z 273.007 40 $[\text{M-H}]^-$, 其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_7\text{S}$ (质量误差 0.20×10^{-6})。在 ESI-MS^2 谱图中,由于中性丢失 SO_3 、 CO_2 和 CH_3 , 分别产生碎片离子 m/z 193 $[\text{M-H-SO}_3]^-$ 、 m/z 149 $[\text{M-H-SO}_3\text{-CO}_2]^-$ 和 m/z 134 $[\text{M-H-SO}_3\text{-CO}_2\text{-CH}_3]^-$, 表明分子结构中

存在羧酸基团、硫酸基团以及甲基。基于上述推论和相关的生物转化反应, **M23** 被鉴定为甲基化咖啡酸的磺酸化产物。

M35 的准分子离子峰为 m/z 135.044 06 $[M-H]^-$, 保留时间为 10.24 min。此外, 分子式为 $C_8H_7O_2$ (质量误差 1.34×10^{-6})。在 ESI-MS² 图谱中, 由于中性丢失 1 分子 CH_3 , 从而观察到二级碎片离子 m/z 120 $[M-H-CH_3]^-$ 。根据相关的生物转化规律, 将 **M35** 鉴定为咖啡酸脱羧产物。

代谢物 **M19**、**M30**、**M41** 的保留时间为 8.64、9.41、11.05 min, 准分子离子峰为 m/z 193.049 53 $[M-H]^-$ 。根据精确相对分子质量推测其分子式为 $C_{10}H_9O_4$ (质量误差均在 2.00×10^{-6} 以内)。在 ESI-MS² 图谱中, 由于中性丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 CH_3 产生碎片离子 m/z 178 $[M-H-CH_3]^-$ 、 m/z 149 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 134 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$, 表明分子中存在羧基和甲基。通过与对照品的质谱碎片离子信息和色谱保留时间比较, **M41** 被准确鉴定为阿魏酸, **M30** 被准确鉴定为异阿魏酸, **M19** 推断为其同分异构体。

M22、**M38** 的色谱保留时间分别为 9.01、10.72 min, 准分子离子峰分别为 m/z 165.055 89 和 m/z 165.055 85, 根据精确相对分子量可知分子式组成为 $C_9H_9O_4$ (误差分别为 1.29×10^{-6} 和 1.25×10^{-6})。在 ESI-MS² 图谱中, 两者均通过丢失 1 分子 CO_2 在 m/z 121 $[M-H-CO_2]^-$ 处形成产物离子, 这表明其分子中存在羰基。根据先前报道的文献 [16], **M22** 和 **M38** 被鉴定为对羟基苯丙酸或其异构体。

代谢物 **M1** 的准分子离子峰为 m/z 191.056 14 $[M-H]^-$, 保留时间为 0.93 min, 分子式为 $C_7H_{11}O_6$ (质量误差 1.13×10^{-6})。在 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子水和 1 分子 CO_2 产生碎片离子 m/z 173 $[M-H-H_2O]^-$ 和 m/z 147 $[M-H-CO_2]^-$ 。此外, 中性丢失 2 分子水和 1 分子 CO_2 产生碎片离子 m/z 111 $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$ 。据此推断分子中极有可能存在至少 2 个羟基和 1 个羧基。**M1** 与奎尼酸对照品的色谱保留时间和质谱碎片相同, 因此结合参考文献 [17] 将代谢物 **M1** 准确鉴定为奎尼酸。

代谢物 **M2** 准分子离子峰为 m/z 173.045 72 $[M-H]^-$, 基于精确分子质量可知其分子式为 $C_7H_9O_5$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。其分子离子比奎尼酸少 18 Da, 推测它极有可能是奎尼酸的脱羟基产

物。在 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子 CO_2 产生碎片离子 m/z 129 $[M-H-CO_2]^-$, 另外中性丢失 1 分子 H_2O 产生碎片离子 m/z 155 $[M-H-H_2O]^-$, 这表明分子中存在羟基和羧基。结合相关的文献 [11] 报道, 将代谢产物 **M2** 鉴定为莽草酸。

代谢物 **M27** 的准分子离子峰为 m/z 121.029 85 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_7H_5O_2$ (误差为 1.45×10^{-6})。此外, 它通过丢失 1 分子 CO 产生碎片离子 m/z 93 $[M-H-CO]^-$, 这表明该化合物中存在羰基。根据先前报道的文献 [18], 代谢产物 **M27** 被鉴定为苯甲酸。

代谢物 **M12** 准分子离子峰为 m/z 137.024 59 $[M-H]^-$ 。分子式为 $C_7H_5O_3$ (误差为 1.27×10^{-6})。其分子离子比苯甲酸多 16 Da, 推测可能是苯甲酸的羟基化产物。在 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 H_2O 分别产生碎片离子 m/z 93 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 109 $[M-H-H_2O]^-$, 表明该化合物中存在羟基和羰基。根据先前报道的文献 [19], 将代谢物 **M12** 鉴定为 3-羟基苯甲酸。

代谢物 **M18** 准分子离子峰在 m/z 178.051 07 $[M-H]^-$, 基于精确分子质量、同位素丰度比可知其分子式为 $C_9H_8NO_3$ (误差 1.21×10^{-6})。在 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子 CO_2 产生二级碎片离子 m/z 134 $[M-H-CO_2]^-$, 这表明分子中有羧酸基团的存在。因此, 将其鉴定为马尿酸。

代谢物 **M13** 在 7.77 min 时洗脱, 准分子离子峰为 m/z 194.046 43 $[M-H]^-$ 。其分子式为 $C_8H_8NO_4$ (误差 1.63×10^{-6})。另外, 它的分子离子比马尿酸多 16 Da。此外, 通过中性丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 CH_3 生成碎片离子 m/z 135 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$ 和 m/z 150 $[M-H-CO_2]^-$, 表明分子中存在羧基和甲基。因此, 结合参考文献 [19] 将其鉴定为 3-羟基马尿酸。

代谢物 **M3**、**M7** 色谱保留时间分别为 4.7、6.15 min。它们的准分子离子峰为 m/z 197.044 45 $[M-H]^-$, 分子式组成为 $C_9H_9O_5$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。在 ESI-MS² 图谱中, 通过丢失 1 分子 OCH_2 、1 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 生成碎片离子 m/z 167 $[M-H-OCH_2]^-$, m/z 149 $[M-OCH_3-H_2O]^-$ 和 m/z 121 $[M-OCH_3-H_2O-CO]^-$, 表明分子中存在甲氧基、羰基以及羟基。结合相关的生物转化知识, 代谢物 **M3**、**M7** 鉴定为丁香酸或其异构体。

代谢物 **M5** 色谱保留时间为 5.33 min。在其 ESI-MS 谱图中, 准分子离子峰 m/z 167.034 97 $[M-H]^-$ (分子式为 $C_8H_7O_4$, 误差 1.09×10^{-6})。在其 ESI-MS² 谱图中, 通过中性丢失 1 分子 CO_2 (44 Da) 和 1 分子 H_2O (18 Da) 产生碎片离子 m/z 123 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 149 $[M-H-H_2O]^-$, 这表明分子中存在羧基和羟基。结合相关的文献报道将其鉴定为香草酸。

在 ESI-MS 谱图中, 代谢物 **M40** 的准分子离子峰为 m/z 355.097 23 $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{19}O_9$, 误差 -5.13×10^{-6}), 色谱保留时间为 11.04 min。其分子式比原型药物多 2H, 推测它是新绿原酸的氢化产物。除此之外, 在其 ESI-MS² 谱图中, 观察到二级碎片 m/z 173 $[奎尼酸-H_2O-H]^-$ 和 m/z 181 $[二氢咖啡酸-H]^-$ 和 m/z 137 $[二氢咖啡酸-CO_2-H]^-$ 。因此, 代谢物 **M40** 鉴定为二氢新绿原酸。

在 $C_{17}H_{19}O_9$ 提取离子流图中, 可以检测到 4 个准分子离子峰 **M21**、**M29**、**M34**、**M37** (误差均 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$), 色谱保留时间为 8.92 ~ 10.42 min。它们分子式比原药新绿原酸多 CH_2 。在其 ESI-MS² 谱图中, 它们都具有相同的产物离子 m/z 134.045 22。此外, 还存在碎片离子 m/z 191.055 04 $[奎尼酸-H]^-$ 和 m/z 173.045 72 $[奎宁酸-H_2O-H]^-$ 。综上分析, 它们具有与原药相同的特征离子并且比原药分子离子多 14 Da, 因此将其鉴定为新绿原酸的甲基化产物。

M24、**M31**、**M32**、**M33**、**M36** 有相同的准分子离子峰为 m/z 369.118 01 $[M-H]^-$ ($C_{17}H_{21}O_9$, 误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。它们分子式比原药的甲基化产物多 2 H。在其 ESI-MS² 光谱中, 它们具有与原药相同的特征离子 m/z 191 $[奎尼酸-H]^-$, m/z 173 $[奎尼酸-H_2O-H]^-$, 据此推断它们是甲基化绿原酸的氢化产物。

代谢物 **M42** 保留时间为 13.82 min, 准分子离子峰为 m/z 543.170 83 $[M-H]^-$ ($C_{24}H_{31}O_{14}$)。在其 ESI-MS² 谱图中, 通过丢失 176 Da 产生碎片离子 m/z 367 $[M-H-C_7H_{12}O_5]^-$, 这表明其分子中含有葡萄糖醛酸。且 m/z 367 比原药分子式多 CH_2 , 结合二级碎片离子 m/z 173 $[奎宁酸-H_2O-H]^-$ 和 m/z 135 $[咖啡酸-CO_2-H]^-$ 。表明有奎尼酸骨架、咖啡酸骨架存在。因此, **M42** 被鉴定为甲基新绿原酸的葡萄糖结

合产物。

3.3 大鼠体内新绿原酸的代谢途径分析

新绿原酸进入大鼠体内后发生了广泛的代谢反应^[20-22]。结合代谢产物分析新绿原酸在体内的代谢过程及转化, 结果见图 2, 其在体内主要发生的反应有 3 种。1) 异构化: 在新绿原酸给药后的生物样品中发现了绿原酸和其异构体, 说明新绿原酸在体内进行了位置异构等反应。2) 分解反应: 新绿原酸进入体内后可以水解为咖啡酸和奎尼酸 2 个核心代谢产物, 并在此基础上发生进一步的二次代谢反应。奎尼酸经体内代谢转化为莽草酸, 经 2 次脱羟基后生成羟基苯甲酸, 再脱羟基变为苯甲酸, 经过与甘氨酸结合后生成马尿酸, 最后马尿酸羟基化反应生成 3-羟基马尿酸; 奎尼酸也可以直接转化为丁香酸, 而后脱去甲氧基和羟基生成香草酸。而咖啡酸也发生多种反应。例如, 甲基化生成阿魏酸或异阿魏酸; 还原反应生成二氢咖啡, 并在此基础上进行硫酸酯化生成二氢咖啡酸硫酸酯结合物或者二氢咖啡酸葡萄糖醛酸化生成二氢咖啡酸葡萄糖醛酸结合物; 咖啡酸还发生了分解反应, 比如脱羧反应, 再者脱羟基后生成香豆酸而后继续脱羟基生成肉桂酸等。3) 其他反应: 首先新绿原酸容易还原生成二氢新绿原酸; 其次甲基化反应, 新绿原酸在咖啡酸侧链上发生甲基化反应; 最后, 新绿原酸能够在侧链上连接葡萄糖醛酸发生葡萄糖醛酸结合反应。

4 结论

本研究利用 UPLC-Q-TOF MS 高分辨液质联用技术分析鉴定了新绿原酸在大鼠的血浆、尿液和粪便样品中的代谢产物。通过分析这些代谢产物的精确相对分子质量、特征碎片离子以及色谱保留行为等, 共筛选鉴定出包括新绿原酸原型在内的 43 个代谢产物。同时, 本研究还推测了新绿原酸的体内代谢途径, 初步阐释了其发挥药效的物质基础轮廓。新绿原酸的体内代谢产物主要有咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、莽草酸、香草酸等, 它们均具有很好的抗菌、抗氧化作用, 这为阐明新绿原酸发挥抗菌、抗炎等药理活性提供了一定依据。上述研究结果也为含有绿原酸类物质的中药及食品的体内代谢研究提供了借鉴, 尤其对药效物质基础的研究具有重要参考意义。

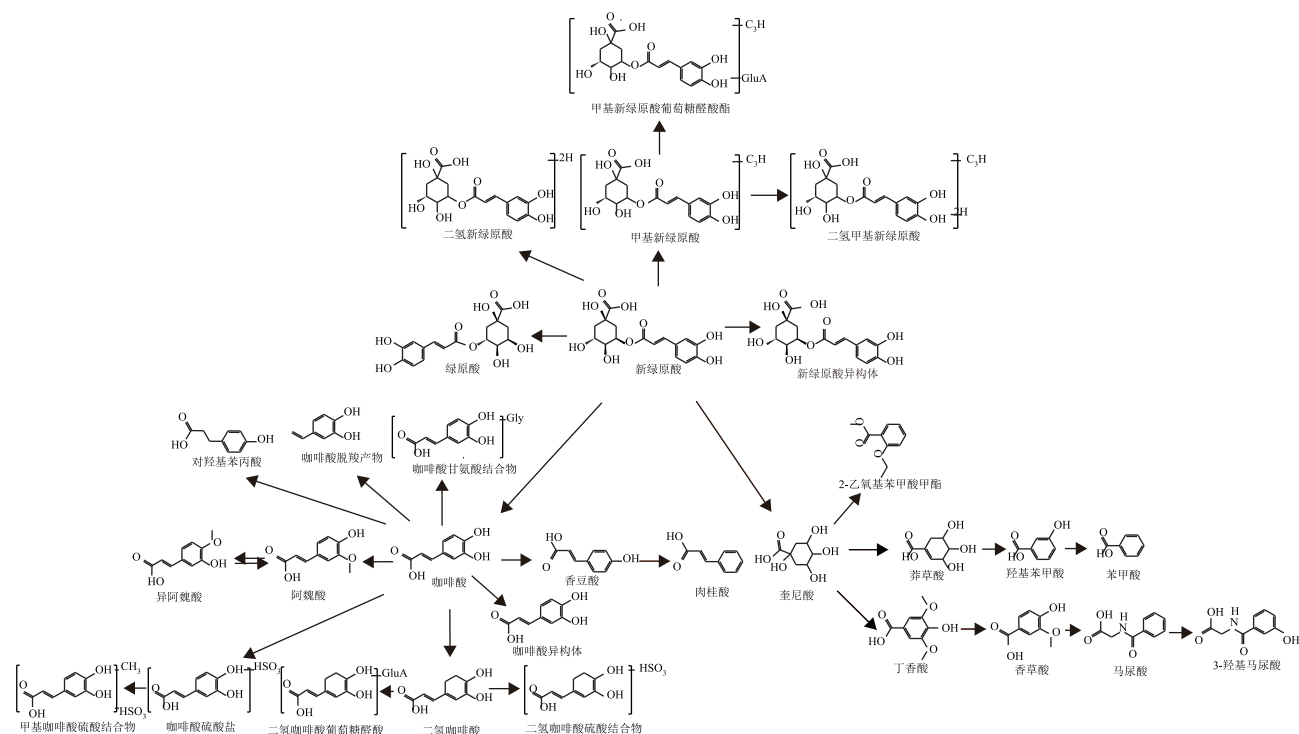


图2 新绿原酸在大鼠体内的代谢途径

参考文献

- [1] VIVIANE M, ADRIANA F. Chlorogenic acids and related compound in medicinal plants and infusions [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 370-376.
- [2] LIANG N J, KITTS D D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions[J]. Nutrients, 2016, 8(1): 1-20.
- [3] SHIMOYAMA A T, SANTIN J R, MACHADO I D, et al. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer[J]. N-S Arch Pharmacol, 2013, 386(1): 5-14.
- [4] 郭秋娟, 金邦荃, 陈和平. 绿原酸生物活性与提取方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 346-348.
- [5] NISHI, AHAD A, KUMAR P, et al. Hypolipidemic effect of chlorogenic acid in a hypercholesterolemic rat model[J]. Int J Pharm Bio Sci, 2013, 4(1): B582-B586.
- [6] 郭晓园, 罗磊. 金银花中绿原酸检测方法对比研究[J]. 食品科技, 2010, 35(4): 251-254.
- [7] 朱鹏, 苗潇磊, 陈勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学[J]. 药学报, 2016, 51(1): 122-126.
- [8] LI Y, CAI W, CAI Q, et al. Comprehensive characterization of the in vitro and in vivo metabolites of geniposide in rats using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer [J]. Xenobiotica, 2015, 46(4): 357-368.

- [9] ZHANG J Y, WANG Z J, ZHANG Q, et al. Rapid screening and identification of target constituents using full scan-parent ions list-dynamic exclusion acquisition coupled to diagnostic product ions analysis on a hybrid LTQ-Orbitrap mass spectrometer[J]. *Talanta*, 2014, 124: 111-122.
- [10] ZHANG J Y, CAI W, ZHOU Y, et al. Profiling and identification of the metabolites of baicalin and study on their tissue distribution in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer[J]. *J Chromatogr B*, 2015, 985: 91-102.
- [11] GOODWIN B L, RUTHVEN C R J, SANDLER M. Gut flora and the origin of some urinary aromatic phenolic compounds[J]. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47: 2294-2297.
- [12] BOOTH A N, EMERSON O H, JONES F T, et al. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids[J]. *J Biol Chem*, 1957, 229(1): 51-59.
- [13] 陈笑艳, 钟大放, 谢岑. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物[J]. *药学报*, 2011, 46(1): 88-95.
- [14] CLIFFORD M N. Chlorogenic acids and other cinnamates: Nature, occurrence and dietary burden, absorption and metabolism[J]. *J Sci Food Agr*, 1999, 80(7): 1033-1043.
- [15] ADRIANA F, MARIANA M, CARMEN M D, et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans[J]. *J Nutr*, 2008, 138(12): 2309-2315.

(下转第 1071 页)

表4 大鼠口服给予葛兰心宁软胶囊后绞股蓝皂苷A的药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

药动学参数	结果
AUC/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2562 $\pm$ 252
MRT ₀₋₁ /h	7.825 $\pm$ 0.409 0
$C_{\max}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	377.6 $\pm$ 75.3
$T_{\max}$ /h	0.75
$t_{1/2}$ /h	6.247 $\pm$ 2.039
CL/F/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.249 2 $\pm$ 0.050 02

4 结论

本研究建立了大鼠灌胃葛兰心宁软胶囊内容物后,血浆中绞股蓝皂苷A的LC-MS/MS测定方法,并采用非房室模型计算分析了其药动学参数。该方法简单、快捷、灵敏度高、精密性及线性关系良好,可以用于生物样本中绞股蓝皂苷A的药代动力学研究。药动学参数 $C_{\max}$ 反映了药物在血浆中的最大浓度,绞股蓝皂苷A的 $C_{\max}$ 为(377.6 $\pm$ 75.3) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.75 h迅速达到最大血药浓度, $t_{1/2}$ 为(6.247 $\pm$ 2.039)h, CL为(0.249 2 $\pm$ 0.050 02) L·h⁻¹·kg⁻¹,清除非常快。绞股蓝皂苷A是绞股蓝中含量较高且有效的单体成分^[3],其结构属于达玛烷型四环三萜皂苷。Zhang等^[7]报道

了大鼠口服绞股蓝总皂苷后,2个达玛烷型四环三萜皂苷类成分 gypenoside LVI和 gypenoside XLVI的药代动力参数,半衰期与本研究的结果相近,但是 $T_{\max}$ 为4 h,可能与糖基的种类、数量、连接位置不同有关。

参考文献

- [1] 王阶,许军,李十红. 葛兰心宁治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(3):203-206.
- [2] 史琳. 绞股蓝的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2010.
- [3] 张转平,王新权,胥道宝. HPLC法测定绞股蓝中绞股蓝皂苷A的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(2):87-88.
- [4] 乐圆,肖娅萍,张宁. HPLC-ELSD法测定绞股蓝中绞股蓝皂苷A的含量[J]. 光谱实验室,2010,27(5):1734-1737.
- [5] 常金花,刘喜纲,薛禾菲,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中薯蓣皂苷元浓度[J] 中国药理学杂志,2017,52,(17):1536-1541.
- [6] 王超,顾冬冬,王彦,等. 七叶胆苷XVⅡ大鼠体内药代动力学研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(4):783-788.
- [7] ZHANG L H, LIN Y F, GUAN H S, et al. Simultaneous determination of gypenoside LVI, gypenoside XLVI, 2 α -OH-protopanaxadiol and their two metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic studies[J]. J Chromatogr B, 2015(1005):9-16.

(收稿日期:2019-09-05 编辑:王笑辉)

(上接第1055页)

- [16] AZUMA K, IPOUSHI K, NAKAYAMA M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5496-5500.
- [17] NARANJO P M, MONTOLIU I, AURA A M, et al. *In vitro* gut metabolism of [U-13C]-quinic acid, the other hydrolysis product of chlorogenic acid[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(22): e1800396.
- [18] PLUMB G W, KROON P A, RHODES M, et al. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora[J]. J Sci Food Agr, 1999, 79(3): 390-392.
- [19] MORISHITA H, OHNISH M. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds[J]. Stud Nat Prod Chem, 2001, 25: 919-953.
- [20] 尚庆文,于盱梁,呈元,等. 加工方法对金银花质量的影响[J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 76-81.
- [21] 邱玲玲,肖莹,支星等. Box-Behnken 响应曲面法筛选金银花中抗流感病毒活性成分研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(11): 1454-1457.
- [22] 黄开远,谢展雄,吴群华,等. 复方金银花外洗液及其单味药的体外透皮实验与抑菌活性研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(6): 798-803.

(收稿日期:2019-10-30 编辑:戴玮)