

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的刺五加叶血清药物化学初步研究

魏文峰¹, 陈宏昌¹, 刘 焱¹, 任晓蕾¹, 王伟明^{1,2*}

1. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

2. 黑龙江省林下经济资源研发与利用协同创新中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 对刺五加 *Acanthopanax senticosus* 叶进行血清药物化学初步研究。方法 大鼠 ig 给予刺五加叶提取液, 采集含药血清。采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术, 通过比较相同色谱、质谱条件下刺五加叶提取物、空白血清及给药血清图谱, 并利用 Peakview 和 MetabolitePilot 数据处理软件, 根据质谱所提供的保留时间、精确相对分子质量及二级质谱裂解碎片来鉴定和推测其血中移行成分。结果 刺五加叶提取液 ig 给药后从血清中检测出 19 个入血成分, 其中 9 个为原型成分, 10 个为代谢产物。结论 初步确定了刺五加叶的入血成分, 为阐明其药效物质基础提供依据。

关键词: 刺五加叶; 血清药物化学; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱; 移行成分; 绿原酸; 咖啡酸

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)07-1306-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.008

Preliminary study on serum pharmacochemistry of leaves of *Acanthopanax senticosus* base on UPLC-Q-TOF-MS

WEI Wen-feng¹, CHEN Hong-chang¹, LIU Ye¹, REN Xiao-lei¹, WANG Wei-ming^{1,2}

1. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

2. Heilongjiang Forest Economy Collaborative R&D and Innovation Center Resource Utilization, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the serum pharmacochemistry of leaves of *Acanthopanax senticosus*. **Methods** Rats were ig administered *A. senticosus* extracts and then the serum was collected. Rapid identification of transitional constituents absorbed into blood was carried out by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The transitional constituents were identified and speculated by Peakview and MetabolitePilot data processing software using retention time, exact relative molecular mass, and cleavage fragments of MS/MS as indexes. **Results** After administration of the leaves of *A. senticosus*, 19 transitional constituents absorbed into blood were detected in serum, nine of them were prototype constituents and the other 10 were metabolites. **Conclusion** Transitional constituents of the leaves of *A. senticosus* absorbed into blood are preliminarily identified, which could clarify its pharmacodynamic material basis.

Key words: leaves of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; serum pharmacochemistry; UPLC-Q-TOF-MS/MS; transitional constituents; chlorogenic acid; caffeic acid

刺五加是五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎^[1], 被《神农本草经》列为上品, 具有扶正固本、益智安神和补肾健脾等功效^[2]。因其确切的疗效及长期服用的安全性, 在临床及保健品市场被广泛使用。对野生刺五加根及根茎的过度采挖, 导致刺五加野生资源已严重不足, 对具有可再生和更具开发价值的叶的研究是非常有意义的。刺五加叶与

根和茎具有类似的功效^[3], 含有丰富的化学成分, 其中以黄酮类和苷类化合物居多, 使其具有耐缺氧、抗疲劳、抗肿瘤、治疗心血管疾病及抗菌等广泛药理活性^[4-6]。目前, 在中医方面的临床用药及大量的研究都集中在根和茎上, 而刺五加叶的药效物质基础尚不清楚, 这影响了刺五加叶的合理开发和使用。

中药所含的化学成分众多, 通过口服给药, 真

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项项目 (2010ZX0912102-138); 黑龙江省应用技术与开发计划 (PB15F005)

作者简介: 魏文峰 (1984—), 助理研究员, 研究方向为中药化学成分分析及药物代谢研究。

Tel: (0451)55653086-6902 E-mail: wenfeng0831@163.com

*通信作者 王伟明, 研究员。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

正入血的成分才有可能为中药的药效物质基础^[7],分析和寻找口服后能够入血的原型成分及代谢产物,才能够为阐明其药效物质基础提供一定的依据。

近年来,血清药物化学研究方法被广泛运用于中药药效物质基础研究^[8-9],显示出了很好的应用前景。本课题组前期建立了刺五加叶超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)的化学成分分析方法,明晰了刺五加叶的化学成分^[10],在此基础上,本研究利用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析刺五加叶血中移行成分,通过比较分析刺五加叶提取液、给药后含药血清及扣除空白血清内源性成分,初步推测19个入血成分,为阐明刺五加叶体内直接作用物质基础和质量控制的研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Waters ACQUITYTMUPLC 色谱仪(美国 Waters 公司); AB SCIEX Triple TOF 5600⁺高分辨质谱仪,配有 ESI 源和 APCI 源(美国 AB SCIEX 公司); E4XLS 移液器(美国 RAININ 公司); KQ-300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); LG16-W 型高速离心机(北京京立离心机有限公司);艾科浦超纯水机(颐洋企业发展有限公司)。数据采集软件:Analyst TF 1.6 工作站(美国 AB SCIEX 公司);数据处理软件系统:PeakView 2.0 software; MetabolitePilot 1.5 software(美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 试剂与药品

甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(色谱级,赛默飞世尔科技有限公司);屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);甲醇(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水合氯醛(天津市光复精细化工研究所,批号 20100827);对照品绿原酸(批号 110753-200212,质量分数 99.3%)、咖啡酸(批号 110885-200102,质量分数 99.2%)均购于中国食品药品检定研究院。

刺五加叶采自哈尔滨五常市七峰山,经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥叶。

1.3 实验动物

健康 SD 雄性大鼠,体质量(300±20)g,清洁级,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(黑)2013-0001。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

取刺五加叶药材粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 70%甲醇溶液 30 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)50 min,放冷至室温,用 70%甲醇溶液补足减失质量,摇匀,12 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液,即得。

2.2 给药药液的制备

将刺五加叶药材粉末用 70%甲醇溶液进行超声提取,以 30 倍量的溶剂提取 50 min,然后将提取液进行减压浓缩,得到浸膏,加适量蒸馏水配制含药量均为 1.35 g/mL 的大鼠给药药液,即得。

2.3 血清样本的制备

取 SD 大鼠 10 只,随机分成空白组和给药组,每组 5 只,禁食 12 h(自由饮水),给药组 ig 给予 1.35 g/mL 刺五加叶药液 2.7 g/kg,空白组按照 2 mL/kg ig 给予蒸馏水,给药 1 h 后以 10%水合氯醛(3 mL/kg)ip 进行麻醉,经肝门静脉取血置 EP 管中,血液于 4 °C,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 冻存备用。

取大鼠空白血清及给药血清各 0.5 mL,各加 10 μL 磷酸,加入 6 倍量的甲醇,涡旋震荡 60 s 混匀,于 4 °C 下 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,室温下氮气吹干,残渣用 200 μL 流动相复溶,涡旋震荡 1 min 后,13 000 r/min 离心 10 min,取上层清液,用于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

2.4 色谱条件

Waters ACQUITYTM UPLC 液相色谱仪,色谱柱为 ACQUITYTM BEH C₁₈ column(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温 35 °C;进样体积 2 μL;体积流量 0.3 mL/min;流动相 A 为 0.1%甲酸水,B 为 0.1%甲酸乙腈,梯度洗脱(0→10 min,95%→65% A;10→20 min,65%→0% A),色谱仪流出液不分流直接进行正负离子扫描检测。

2.5 质谱条件

离子化模式为电喷雾正、负离子模式,正负离子源电压分别为 5 500 V/-4 500 V,离子源温度为 550 °C,裂解电压(DP)分别为 80 V/-80 V,碰撞能量(CE)分别为 35 eV/-35 eV,碰撞能量扩展(CES)分别为 15 eV/-15 eV,雾化气(gas1)为 379.2 kPa(55 psi),辅助气(gas2)为 379.2 kPa(55 psi),气帘气(curtain gas)为 241.3 kPa(35 psi),一级质谱母离子扫描范围为 *m/z* 80~1 500,IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8

个最高峰进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围为 m/z 50~1 500, 开启动态背景扣除 (DBS)。

2.6 数据分析方法

利用 Peakview 软件, 将最佳采血点的含药血清色谱图输入, 以空白血清为对照, 扣除血清中的内源性成分, 筛选出含药血清中存在而空白血清中不含有的, 结合供试品中离子峰的保留时间、精确相对分子质量、质荷比及二级碎片等信息, 比对一致, 指认为刺五加叶的原型入血成分; 利用 MetabolitePilot 代谢物数据处理软件, 先建立刺五加叶的 Compound library, 设置 Biotransformation parameters, 选择 I 和 II 相代谢途径, 再将含药血清和空白血清导入, 结合软件分析结果和参考文献推测可能的代谢产物。

3 结果

3.1 刺五加叶 UPLC-Q-TOF-MS/MS 色谱图的采集

根据已建立的刺五加叶血中移行成分分析方法, 采用正、负离子模式对刺五加叶样品、给药血清和空白血清进行数据采集, 色谱图见图 1。

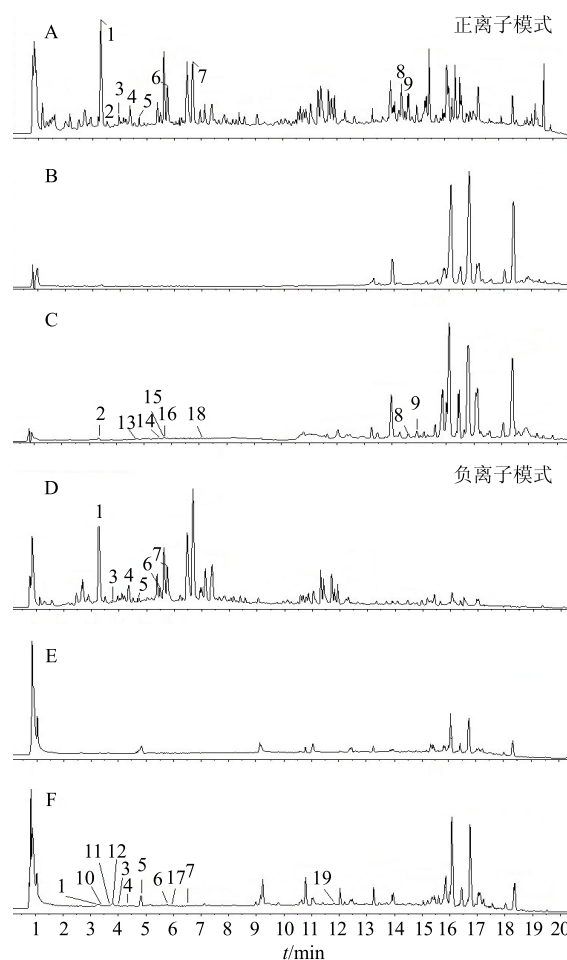
3.2 刺五加叶血中移行成分分析与鉴定

根据“2.6”项下的分析方法, 结合对照品比对及文献报道^[7-16], 鉴定了大鼠 ig 刺五加叶后的 19 个血中移行成分, 其中 9 个为原型成分, 10 个为代谢产物, 结果见表 1。

3.3 主要色谱峰的质谱分析

3.3.1 原型成分的鉴定 本研究共表征和鉴定了 9 个原型成分, 分别以化合物 1 和 12 为例说明推测过程。

化合物 1: 负离子给出的准分子离子峰 m/z 353.091 6 $[M-H]^-$, t_R 为 3.33 min, 在 TOF-MS/MS 中, 准分子离子丢失 1 分子咖啡酰基后, 产生基峰离子 m/z 191 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$, 同时产生碎片离子



A、D-刺五加叶溶液 B、E-空白血清 C、F-给药血清

A, D-samples of the leaves of *Acanthopanax senticosus* B, E-blank serum C, F-serum after administration

图 1 正离子 (A~C) 和负离子 (D~F) 模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram in positive (A—C) and negative (D—F) ion mode

表 1 刺五加叶血中移行成分分析结果

Table 1 Analysis results for migrating constituents of leaves of *A. senticosus* absorbed into blood

峰号	t_R /min	化合物	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	相对分子质量	碎片离子 (m/z)	备注
1	3.33	绿原酸	—	-3.2	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 1	353.091 6 $[M-H]^-$, 191.635 0 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$, 179.034 9 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$, 135.044 6 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O-CO_2]^-$	原型
2	3.41	7-羟基香豆素	+	-3.8	$C_9H_6O_3$	162.031 7	163.039 8 $[M+H]^+$, 145.029 2 $[M+H-H_2O]^+$, 135.044 2 $[M+H-CO]^+$, 117.033 6 $[M+H-CO-H_2O]^+$, 89.038 8 $[M+H-2CO-H_2O]^+$	原型
3	3.93	咖啡酸	—	-1.5	$C_9H_8O_4$	180.042 3	179.036 4 $[M-H]^-$, 135.044 9 $[M-H-CO_2]^-$	原型
4	4.47	5-O-咖啡酰莽草酸	—	-3.8	$C_{16}H_{16}O_8$	336.042 1	335.077 6 $[M-H]^-$, 179.033 0 $[M-H-C_7H_8O_3]^-$, 135.045 7 $[M-H-C_7H_8O_3-CO_2]^-$, 161.025 1 $[M-H-C_7H_8O_3-H_2O]^-$	原型

续表 1

峰号	t_R/min	化合物	离子模式	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	相对分子质量	碎片离子 (m/z)	备注
5	4.83	5-阿魏酰奎宁酸	—	0.1	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$	368.110 7	367.103 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 191.056 1 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$, 173.042 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$, 134.032 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$	原型
6	5.73	金丝桃苷	—	1.8	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	464.095 5	301.034 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, 300.026 2 $[\text{M}-2\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, 271.023 7 $[\text{M}-2\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CO}]^-$, 255.029 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$	原型
7	6.60	异绿原酸 A	—	0.6	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	516.126 8	515.118 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 353.084 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^-$, 191.054 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$	原型
8	14.47	芝麻脂素	+	1.1	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	354.117 6	355.117 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 337.105 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 261.091 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_2\text{O}_2]^+$, 135.043 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4]^+$	原型
9	14.82	阿魏酸	+	-0.2	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	194.057 9	195.065 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 165.018 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{OCH}_2]^+$, 151.039 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$, 137.023 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_2]^+$, 123.044 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]^+$, 107.013 36 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2]^+$	原型
10	3.45	咖啡酸葡萄糖醛酸化产物	—	0.2	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$	356.067 1	355.066 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 179.034 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^-$, 135.044 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6-\text{CO}_2]^-$	代谢物
11	3.77	5-阿魏酰奎宁酸葡萄糖醛酸化产物	—	-0.8	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	544.135 7	543.136 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 367.103 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^-$, 191.055 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$, 173.042 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$	代谢物
12	3.81	5-阿魏酰奎宁酸硫酸酯化产物	—	-0.5	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{S}$	448.059 7	447.059 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 429.049 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$, 367.102 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3]^-$, 173.044 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$	代谢物
13	4.64	异鼠李素葡萄糖醛酸化产物	+	1.3	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$	492.205 4	493.205 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 317.063 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^+$	代谢物
14	5.48	山柰酚葡萄糖醛酸化和硫酸酯化产物	+	3.6	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{15}\text{S}$	542.046 6	543.044 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 525.288 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 367.009 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^+$, 287.054 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6-\text{SO}_3]^+$	代谢物
15	5.60	异鼠李素葡萄糖醛酸化和硫酸酯化产物	+	-2.6	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{16}\text{S}$	572.055 2	573.055 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 397.021 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^+$, 317.065 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6-\text{SO}_3]^+$	代谢物
16	5.86	槲皮素葡萄糖醛酸化产物	+	0	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$	478.082 8	479.080 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.048 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^+$	代谢物
17	5.88	金丝桃苷甲基化产物	—	-1.3	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	478.066 4	477.067 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 301.034 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CH}_3]^-$, 178.998 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3]^-$	代谢物
18	7.05	山柰酚葡萄糖醛酸化产物	+	0	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	462.088 8	463.088 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 287.054 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]^+$	代谢物
19	11.89	绿原酸甲基化产物	—	1.8	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	366.254 7	367.104 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 191.055 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$, 193.051 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, 173.046 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$	代谢物

m/z 179 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$, m/z 161 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$ 和 m/z 135 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O-CO_2]^-$ 是 m/z 179 分别脱去 1 分子 H_2O 及 1 分子 H_2O 和 CO_2 形成的碎片。化合物 **1** 与绿原酸对照品二级碎片基本吻合 (图 2), 故鉴定化合物 **1** 为绿原酸, 推测其可能的裂解过程见图 3。

化合物 **6**: 负离子给出准分子离子峰 m/z

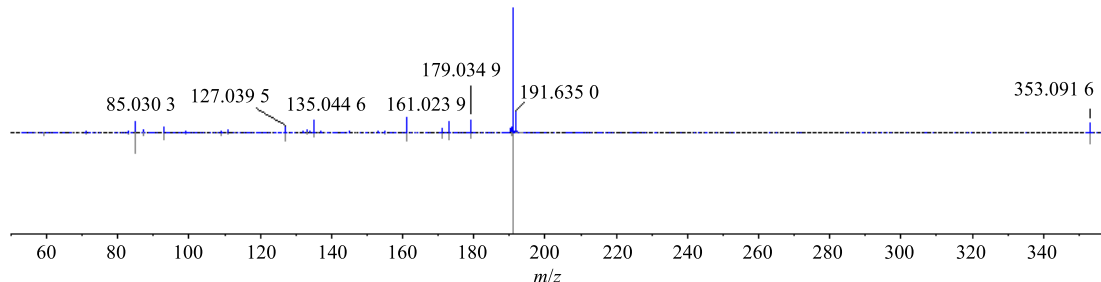


图 2 绿原酸的二级质谱图及与对照品对比镜像图

Fig. 2 MS/MS spectra of chlorogenic acid in negative mode (sample and reference)

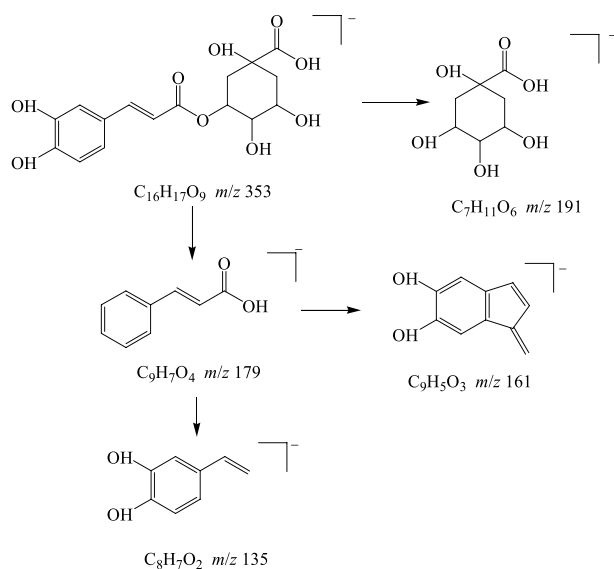


图 3 绿原酸可能的裂解途径 (负离子模式)

Fig. 3 Possible fragmentation pathway of chlorogenic acid (negative ion mode)

463.088 8 $[M-H]^-$, t_R 为 5.73 min, 在 TOF-MS/MS 中, m/z 300 和 m/z 301 是分子离子的糖链分别以均裂和异裂方式脱去 1 分子半乳糖而产生碎片离子, m/z 271 $[M-3H-gal-CO]^-$ 是碎片离子 m/z 300 脱去 1 分子 CO 和 1 个 H 而形成的碎片, m/z 255 $[M-H-gal-H_2O-CO]^-$ 是碎片离子 m/z 301 失去 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO 形成的碎片, 化合物 **6** 与金丝桃苷对

照品二级质谱图基本吻合 (图 4), 因此鉴定化合物 **6** 为金丝桃苷, 推测其可能的裂解过程见图 5。

3.3.2 代谢产物的鉴定 根据“2.6”项下的数据分析方法结合 MetabolitePilot 代谢物数据处理软件给出的代谢物最优化峰匹配, 最终推测 10 个代谢产物, 以咖啡酸葡萄糖醛酸化产物和绿原酸甲基化产物为例说明化合物推测过程。

化合物 **10**: 在咖啡酸母体结构中, 苯环上有 2 个邻位酚羟基, 对位上有共轭双键并连接 1 个羧基, 整体结构为长共轭体系, 化学性质较活泼, 在体内各种辅酶的作用下, 易于生成葡萄糖醛酸化、硫酸酯化等 II 相反应产物^[15]。代谢物负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 355.066 2 $[M-H]^-$, 比咖啡酸准分子离子峰 m/z 179.036 4 $[M-H]^-$ 多 176, 提示增加 1 个 $C_6H_8O_6$, 发生葡萄糖醛酸化反应, 结合其特征碎片 m/z 179 和 m/z 135 与咖啡酸二级碎片比较, 符合其葡萄糖醛酸化过程, 但无法确定其准确的代谢位

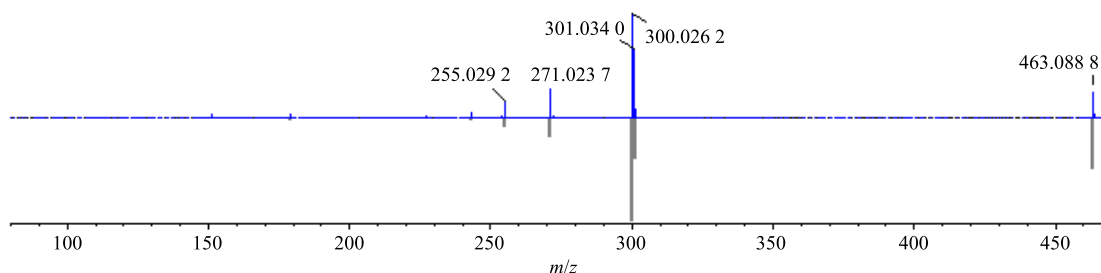


图 4 金丝桃苷的二级质谱图及与对照品对比镜像图

Fig. 4 MS/MS spectra of hyperoside in negative mode (sample and reference)

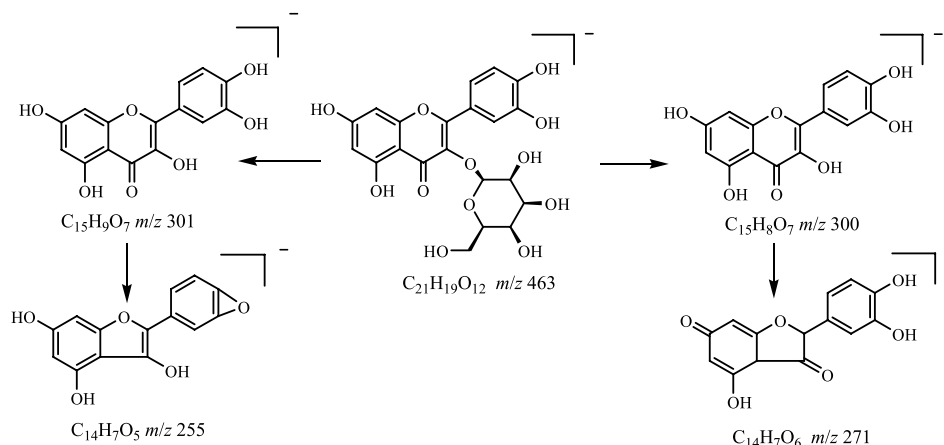


图 5 金丝桃苷可能的裂解途径 (负离子模式)

Fig. 5 Possible fragmentation pathway of hyperoside (negative ion mode)

点, 根据二级质谱图及结合文献推测化合物 **10** 为咖啡酸葡萄糖醛酸化产物, 其二级质谱图见图 6。推测其可能的裂解途径见图 7。

化合物 **19**: 绿原酸与咖啡酸结构相似, 结构中发生反应的位点也多, 其代谢途径多样, 可生成多种 I 相产物与 II 相产物^[16]。代谢物负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 367.104 9 $[M-H]^-$, 比绿原酸准

分子离子峰 m/z 353 $[M-H]^-$ 多 14, 提示增加 1 个 CH_2 , 发生甲基化反应, 结合其特征碎片 m/z 191 和 m/z 134 与咖啡酸二级碎片比较, 符合其甲基化过程, 但无法确定其准确的代谢位点, 根据二级质谱数据及相关文献信息推测化合物 **19** 为绿原酸甲基化产物, 其二级质谱图见图 8, 推测其可能的裂解途径见图 9。

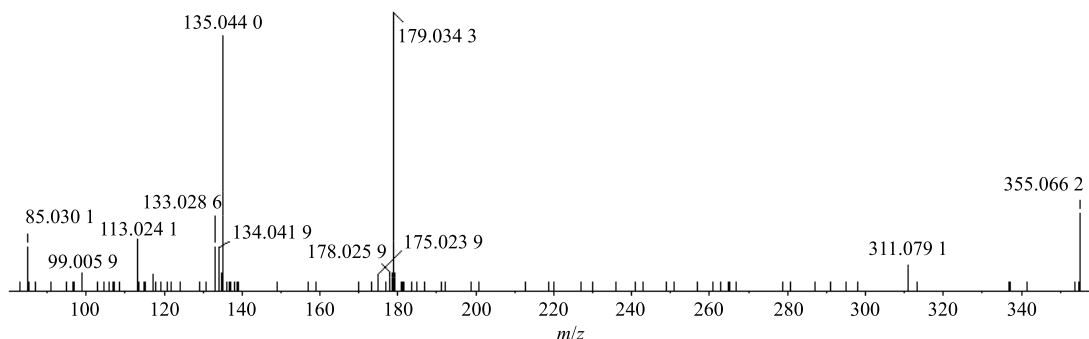


图 6 咖啡酸葡萄糖醛酸化产物负离子模式下的二级质谱图

Fig. 6 MS/MS spectra of glucuronide conjugates of caffeic acid in negative mode

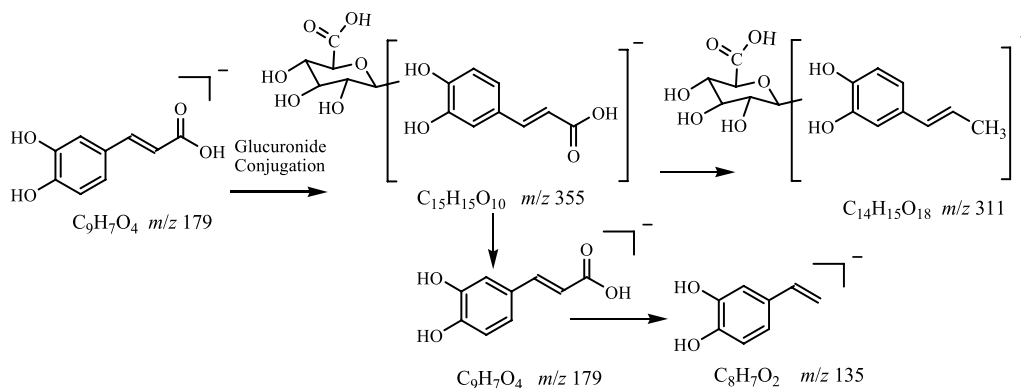


图 7 咖啡酸葡萄糖醛酸化产物可能的裂解途径 (负离子模式)

Fig. 7 Possible fragmentation pathway of glucuronide conjugates of caffeic acid (negative ion mode)

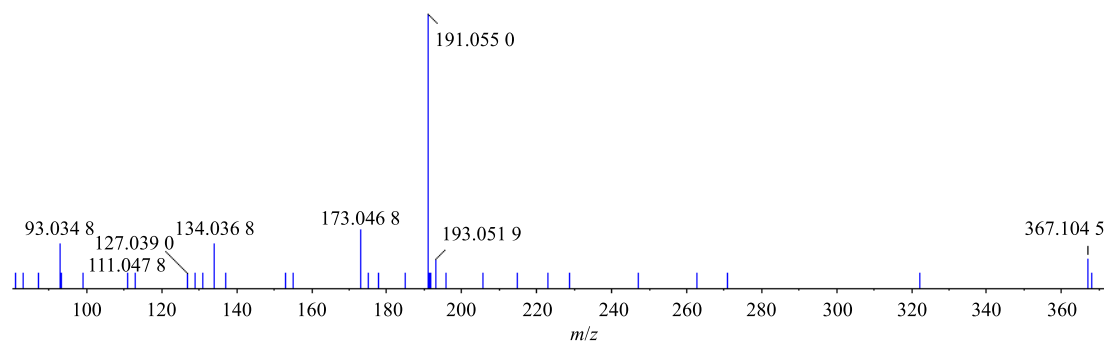


图 8 绿原酸甲基化产物负离子模式下的质谱图

Fig. 8 MS/MS spectra of methylation of chlorogenic acid in negative mode

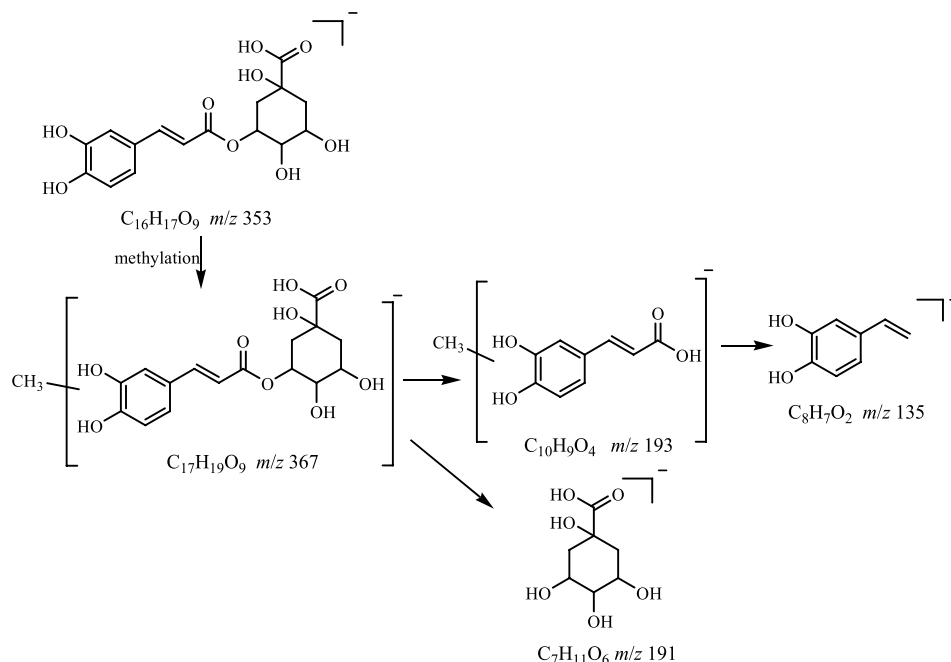


图 9 绿原酸甲基化产物可能的裂解途径 (负离子模式)

Fig. 9 Possible fragmentation pathway of methylation of chlorogenic acid (negative ion mode)

4 讨论

本实验分别进行眼眶取血和肝门静脉取血 2 种采血方式, 通过比较发现肝门静脉取血的给药血清中检测到的成分较多且离子强度也很强, 故选择肝门静脉取血为最佳采血方式; 比较了甲醇沉淀法、乙腈沉淀法、固定相萃取-甲醇洗脱法和固定相萃取-乙腈洗脱法 4 种血清处理方法, 结果显示, 甲醇沉淀法检测到的血中移行成分数目最多, 故选择甲醇沉淀法作为血清最佳处理方法; 考察了 0、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、10 h 不同的采血时间点, 结果在给药 1 h 后进行采血所检测的峰数目最多, 故给药 1 h 后采血为最佳采血时间点。

在大鼠 ig 给予刺五加叶提取液的含药血清, 推

测并鉴定了 19 个血中移行成分, 其中原型成分 9 个, 代谢产物 10 个, 其中酚酸类成分包括绿原酸、咖啡酸等具有显著的抗炎、抗氧化、抗凝血及心血管保护等多种生物活性^[17]; 黄酮类成分金丝桃苷具有良好的抗抑郁作用^[18], 与槲皮素联合应用能够下调 microRNA-27a 的表达从而抑制肾肿瘤细胞^[19]; 7-羟基香豆素能够松弛奥狄氏括约肌, 具有较强的解痉、镇痛作用^[20]。本实验从含药血清中推测出 11 种代谢产物, 其中绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷代谢途径多样, 可生成 I 相和 II 相代谢产物, 而山柰酚、槲皮素等则主要以 II 相代谢产物为主, 结合刺五加叶的药理活性相关报道和传统功效, 初步推断入血的 19 种成分可能成为其体内药效物质基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王知斌, 郭江涛, 匡海学, 等. 刺五加叶的化学成分和药理作用研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(3): 29-31.
- [3] 谢新, 狄留庆. 刺五加叶化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(11): 6-8.
- [4] 杨羽, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 刺五加叶的研究进展 [J]. 吉林农业, 2013, 20(4): 325-326.
- [5] Lee S Y, Shin D S, Oh K B, *et al.* Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus* [J]. *Archiv Pharm Res*, 2003, 26(1): 40-42.
- [6] 董文婷, 霍金海, 王伟明, 等. 刺五加叶的药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 220-223.
- [7] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2002, 4(2): 1-4.
- [8] 唐峥, 尹然, 毕开顺, 等. 栀子大黄汤血清药物化学的初步研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3377-3382.
- [9] 郭辉, 刘晓, 蔡皓, 等. 大黄附子汤血清药物化学的初步研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 528-531.
- [10] 陈宏昌, 魏文峰, 王伟明, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析刺五加叶中的化学成分 [J]. 中药材, 2016, 39(7): 1537-1541.
- [11] Clifford M N, Johnston K L, Knight S, *et al.* Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. *J Agri Food Chem*, 2003, 51(10): 2900-2911.
- [12] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1058-1060.
- [13] 刘淑莹, 宋凤瑞, 刘志强. 中药质谱解析 [M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [14] Wu W, Liu Z Q, Song F R, *et al.* Structural analysis of selected characteristic flavones by electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Sci*, 2004, 20(7): 1103-1105.
- [15] 苏美英, 周婷婷, 周茂金. LC/MSⁿ 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(6): 501-505.
- [16] 孙亮. 痰热清注射液体内代谢与相互作用研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [17] 戴国梁, 马世堂, 刘史佳, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中咖啡酸、绿原酸及其药代动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3753-3757.
- [18] Li W, Liu M, Xu Y F, *et al.* Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a [J]. *Oncol Res*, 2014, 31(1): 117-124.
- [19] Hass J S, Stolz E D, Betti A H, *et al.* The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation [J]. *Planta Med*, 2011, 77(4): 334-339.
- [20] 谈云龙. 7-羟基香豆素衍生物的合成及杀菌活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.