

基于 HPLC-Q/TOF MS/MS 技术的菟丝子醇提物的大鼠体内成分分析

王靖雅, 孙向明, 宋 辉, 胡 杨, 徐蓓蕾, 阎新佳, 王昕蕾, 张萌萌, 李文兰*

哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要:目的 对 ig 给予具有拟雌激素活性的菟丝子醇提物后大鼠的体内化学成分进行定性分析。方法 应用 HPLC-Q/TOF MS/MS 技术, 对大鼠尿液中的原型成分及代谢产物进行解析。结果 在含药尿液中表征出 14 个化学成分, 鉴定出 12 个化学成分, 其中包括 6 个原型成分, 分别为山柰酚-3- β -D-葡萄糖醛酸苷、6-O-(反式)对香豆酰基- β -D-呋喃果糖-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-7-鼠李糖苷、绿原酸、芹菜素、槲皮苷; 6 个代谢成分, 分别为对羟基桂皮酸、对羟基苯丙酸、异鼠李素、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、乙酰化咖啡酸、槲皮素硫酸酯。结论 应用 HPLC-Q/TOF MS/MS 技术能够简单、快速地分析大鼠 ig 菟丝子醇提物后尿液中的原型成分及代谢产物, 为进一步阐明其药效物质基础提供了依据。

关键词: 菟丝子; 雌激素作用; HPLC-Q/TOF MS/MS; 代谢物; 尿液; 绿原酸; 对羟基桂皮酸; 山柰酚-3-O-葡萄糖苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3770-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.007

Qualitative analysis of metabolites of ethanol extract of *Cuscuta chinensis* by HPLC-Q/TOF MS/MS

WANG Jing-ya, SUN Xiang-ming, SONG Hui, HU Yang, XU Bei-lei, YAN Xin-jia, WANG Xin-lei, ZHANG Meng-meng, LI Wen-lan

School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical constituents in rats after intragastric administration of estrogenically active ethanol extract of *Cuscuta chinensis*. **Methods** The high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q/TOF MS/MS) was used to identify the prototypes and metabolites in rat urine. **Results** Twelve chemical constituents were identified in the drug-containing urine, including six prototypes and six metabolites. The prototypes are kaempferol-3- β -D-glucuronide, 6-O-(E)-p-coumaroyl- β -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-glucopyranoside, kaempferol-7-rhamnoside, chlorogenic acid, and apigenin. The metabolites are *p*-hydroxycinnamic acid, *p*-hydroxyphenylpropionic acid, isorhamnetin, kaempferol-3-O-glucoside, acetyl caffeic acid, and quercetin sulfate. **Conclusion** The method of HPLC-Q/TOF MS/MS is simple and rapid for the analysis of prototype components and metabolites in rats urine after oral administration of ethanol extract of *C. chinensis*, providing the basis for further clarification of the estrogen material basis of *C. chinensis*.

Key words: *Cuscuta chinensis* Lam.; estrogenic effect; HPLC-Q/TOF MS/MS; metabolites; urine; chlorogenic acid; *p*-hydroxycinnamic acid; kaempferol-3-O-glucoside

北药资源作为我国药用植物资源的重要组成部分, 具有广阔的开发利用价值。为了使北药的应用更加规范化, 对药材的质量进行严格的控制十分必要。中药药效物质基础的研究是保障中药材、中药复方及其相关产品安全有效、质量可控的基础与核心, 然而, 中药的化学成分众多、作用靶点多样的特性严重制约着阐明药效物质基础的进程。中药口

服后, 在体内发生成分的转化, 机体内部不仅有原型成分, 也存在代谢产物和生理活性物质, 以上物质都有可能是其发挥作用的物质基础。由此可以看出, 对中药体内代谢产物的分离和鉴定是研究药效物质基础不可或缺的组成部分。

菟丝子 *Cuscutae Semen* 是我国北药的代表品种之一, 为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.

收稿日期: 2018-03-31

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD2017014)

作者简介: 王靖雅 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 18646058866 E-mail: sherry19941103@163.com

*通信作者 李文兰 (1967—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: lwldzd@163.com

Br. 或菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的干燥成熟种子, 主产于我国东三省以及内蒙古、宁夏、新疆、甘肃等省, 是临床常用中药, 具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻等功效^[1]。常寄生于豆科植物上, 国内一些大豆主产区常利用种植大豆的方式来提高菟丝子的产量, 以获取更大的经济效益^[2]。现代药理证明菟丝子具有抗生殖、改善内分泌及雌激素样作用, 可增强下丘脑-垂体-卵巢促黄体功能, 其作用方式为提高垂体对促黄体素释放激素(LRH)的反应性及卵巢对促黄体生成素(LH)的反应性。除此之外, 菟丝子还具有抗衰老、抗氧化、免疫调节等诸多作用^[3-6]。近年来, 随着植物雌激素研究的不断深入, 已有文献报道菟丝子免煎剂具有拟雌激素活性^[7]。但是, 对其拟雌激素作用的药效物质研究并不深入, 阻碍了菟丝子在临床的应用及质量标准的完善。

本课题组前期实验结果表明, 菟丝子醇提物具有拟雌激素活性^[8], 并对其中 22 个化学成分的结构进行了质谱解析^[9]。为进一步揭示菟丝子进入体内的潜在药效物质, 追寻代谢产物与原型成分之间的代谢转化关系, 应用 HPLC-Q-TOF MS/MS 技术对大鼠 ig 菟丝子醇提物后的尿液进行成分分析, 并推测代谢产物的可能代谢途径, 为阐明菟丝子拟雌激素作用物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent-1260 型高效液相色谱仪、Agilent-1260 型 G6500 系列四级杆-飞行时间串联质谱仪(美国安捷伦科技公司); XW-80A 旋涡混合器(上海宇工机械有限公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机(型号 16001096, 上海力申科学仪器有限公司); AR1140 电子分析天平(美国奥豪斯国际有限公司)。

1.2 药品与试剂

菟丝子药材(购自哈尔滨三棵树药材市场), 经哈尔滨商业大学药学院张德连教授鉴定为菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子; 乙腈、甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司); 甲酸(色谱纯, 天津市福晨化学试剂厂); 娃哈哈纯净水; 其余试剂为分析纯; 对照品: 绿原酸(批号 110753-200413)、金丝桃苷(批号 111521-200303)、槲皮苷(批号 111538-200504)、槲皮素(批号 081-9003)、山柰酚(批号 110861-200808), 均来源于中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$ 。

1.3 动物

雌性 Wistar 大鼠, 体质量(220 ± 20) g, 购自长春国家生物产业基地实验动物中心, 动物许可证号 SCXK-(吉) 2003-0004。

2 方法与结果

2.1 ig 溶液的制备

称取菟丝子药材 50 g, 95%乙醇回流提取, 溶剂用量为 8 倍量, 提取 3 次, 每次提取 3 h, 合并提取液, 浓缩, 得到浸膏, 保存于冰箱备用。实验时用蒸馏水溶解, 制成相当于生药 2.4 g/mL 的 ig 药液, 备用。

2.2 体外药材溶液和对照品溶液的制备

2.2.1 体外药材溶液的制备 称取“2.1”项下制得的浸膏适量, 以 80%甲醇充分溶解, 定容至 10 mL 量瓶, 过 0.45 μm 滤膜, 得待测溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别称取金丝桃苷 1.2 mg、槲皮素 5.5 mg、山柰素 3.7 mg、槲皮苷 1.1 mg、绿原酸 2 mg, 以 80%甲醇充分溶解, 定容至 10 mL 量瓶, 过 0.45 μm 滤膜, 得混合对照品溶液。

2.3 色谱及质谱条件

色谱柱: Waters Symmetry ShieldTM RP₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 保护柱: Nova-PakC₁₈ Guard-PakTM; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 检测波长 328 nm, 体积流量 0.4 mL/min。梯度洗脱条件见表 1。质谱仪离子源: 大气压电喷雾电离源(ESI); 离子源条件为干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气体积流量 10.0 L/min; 雾化气压力 0.17 MPa; 毛细管电压 4 000 V; 传输电压 70 V; 扫描方式: 正、负离子模式; 扫描范围 m/z 50~1 100。

2.4 尿液样品的收集

取 Wistar 雌性大鼠 8 只, 随机分为 2 组(给药

表 1 梯度洗脱系统

Table 1 Mobile phase gradient elution system

t/min	乙腈/%	甲醇/%	0.3%甲酸/%
0	12	0	88
40	16	0	84
60	20	0	80
80	0	45	55
105	0	50	50
120	0	68	32
125	12	0	88
135	12	0	88

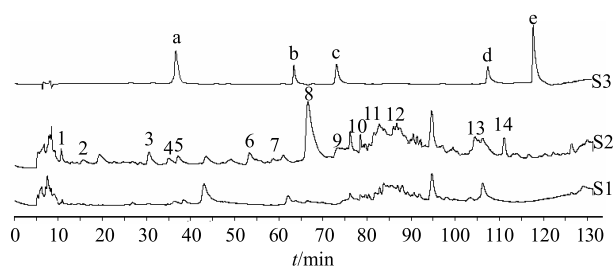
组和对照组), 每组4只, 置于代谢笼中适应性喂养2 d。第3天起称定质量, 给药组按照24 g/(kg·d) (以生药计) 的剂量给予ig药液, 对照组给予等量蒸馏水, 每天早晚各1次, 连续给药3 d。末次给药前将大鼠禁食 (自由饮水) 12 h, 给药后置于代谢笼中收集0~24 h内的尿液, 将滤过后的尿液置-20℃冰箱中冷冻保存, 备用。

2.5 尿液样品的制备

将冻存的含药尿液及空白尿液样品置于4℃下缓慢融化, 以3 000 r/min离心10 min, 取上清液2.0 mL, 每次加2倍量水饱和的正丁醇溶液, 萃取3次, 合并萃取液, 减压回收至干, 用1.0 mL色谱乙腈超声溶解, 0.45 μm微孔滤膜滤过, 待测。

2.6 菟丝子醇提物在大鼠尿液中的成分分析

采用HPLC-Q-TOF MS/MS技术对对照品溶液、含药尿液及空白尿液样品进行分析, 得到负离子模式下各样品的总离子流图 (TIC), 见图1。通过比较含药尿液和空白尿液样品的TIC, 在尿中共标示出14个药源性成分 (1~14号峰)。本课题组在前期的实验研究中, 已经对菟丝子醇提物进行了化学成分定性分析^[9], 与尿中各峰的保留时间和一、二级质谱信息比较可知, TIC中的1、3、4、5、6、9号峰所代表的6个成分为菟丝子原型成分, 2、7、8、10、11、12、13、14号峰所代表的成分为菟丝子经体内代谢转化产生的代谢产物。进一步比较各



a-绿原酸 b-金丝桃苷 c-槲皮苷 d-山柰酚 e-槲皮素
a-chlorogenic acid b-hyperin c-quercetin d-kaempferol e-quercetin

图1 空白尿液 (S1)、含药尿液 (S2) 和对照品 (S3) 在负离子模式下总离子流图

Fig. 1 Mass spectrometry-total ion current chromatogram in negative ion mode for blank urine (S1), drug-containing urine sample (S2), and reference substances (S3)

原型成分与对照品的准分子离子峰、碎片离子峰和保留时间, 可推测5号峰和9号峰分别是绿原酸和槲皮苷。根据飞行时间质谱提供的精确的准分子离子峰及二级离子碎片信息, 结合化合物裂解规律和文献报道对其余化学成分进行结构推测。尿液中14个成分的保留时间、质谱信息、相对分子质量及化合物名称见表2。

2.7 菟丝子醇提物在大鼠尿液中的成分结构解析

各化合物的质谱解析过程如下: 1号峰 ($t_R = 10.832$ min) 相对分子质量462, m/z 461为 $[M-H]^-$ 峰, m/z 279为 $[M-H-gluc]^-$ 峰, m/z 285为 $[M-H]$

表2 含药尿液化学成分鉴定

Table 2 Identification of chemical constituent of drug-containing urine sample

峰号	t_R /min	质谱信息 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	相对分子 质量	化合物推测	类型
		一级碎片	二级碎片				
1	10.832	461.184 1	279.040 9, 285.002 4	-0.38	462	山柰酚-3-β-D-葡萄糖醛酸苷	原型
2	17.398	194.102 1	262.034 4, 411.054 7		195	未知	代谢
3	29.632	487.083 5	163.025 1, 325.093 0	1.42	488	6-O-(反式) 对香豆酰基-β-D-呋喃果糖-(2→1)-α-D-吡喃葡萄糖苷	原型
4	36.358	431.176 4	325.159 0	0.76	432	山柰酚-7-鼠李糖苷	原型
5	37.633	353.101 4	112.965 6, 191.056 8	0.18	354	绿原酸	原型
6	54.933	269.128 9	137.026 6, 233.044 6	0.28	270	芹菜素	原型
7	59.158	163.033 2	163.030 5	-0.86	164	对羟基桂皮酸	代谢
8	66.617	165.048 1	147.045 7, 331.101 4	-0.89	166	对羟基苯丙酸	代谢
9	74.009	447.096 1	112.985 6, 248.970 4	-0.63	448	槲皮苷	原型
10	80.768	315.045 7	631.193 1	-0.40	316	异鼠李素	代谢
11	82.809	446.994 1	385.011 2, 273.172 2	0.20	448	山柰酚-3-O-葡萄糖苷	代谢
12	85.135	473.068 6	212.036 2		未知	未知	代谢
13	104.660	221.082 1	153.020 3, 349.242 2	0.49	222	乙酰化咖啡酸	代谢
14	111.636	381.100 5	301.071 7	1.21	382	槲皮素硫酸酯	代谢

奈酚-H]⁻峰,推测为山奈酚-3-β-D-葡萄糖醛酸苷; 3号峰($t_R=29.632$ min)相对分子质量 488, m/z 487 为 [M-H]⁻峰, m/z 163 为母离子失去 2 分子己糖而得, m/z 325 为母离子失去香豆酰基和 1 个羟基所得,推测为 6-O-(反式)对香豆酰基-β-D-呋喃果糖-(2→1)-α-D-吡喃葡萄糖苷; 4号峰($t_R=36.358$ min)相对分子质量 432, m/z 431 为 [M-H]⁻峰, m/z 325 为 [M-H-benzoyl]⁻峰,推测为山奈酚-7-鼠李糖苷; 5号峰($t_R=37.633$ min)相对分子质量 354, m/z 353 为 [M-H]⁻峰, m/z 191 为 [M-H-caffeic acid]⁻峰,为母离子失去咖啡酸而得奎宁酸,推测为 3-咖啡酰奎宁酸(绿原酸),与对照品一致; 6号峰($t_R=54.933$ min)相对分子质量 270, m/z 269 为 [M-H]⁻峰, m/z 137 为 C₇H₆O₃ 失去 1 个氢,推测为芹菜素; 7号峰($t_R=59.158$ min)相对分子质量 164, m/z 163 为 [M-H]⁻峰,推测为对羟基桂皮酸; 8号峰($t_R=66.617$ min)相对分子质量 166, m/z 165 为 [M-H]⁻峰, m/z 147 为 [M-H-H₂O]⁻峰, m/z 331 为 [2M-H]⁻峰,推测为对羟基苯丙酸; 9号峰($t_R=74.009$ min)相对分子质量 448, m/z 112 为 C₆H₇O₂ 峰, m/z 447 为 [M-H]⁻峰,推测为槲皮

苷,与对照品一致; 10号峰($t_R=80.768$ min)相对分子质量 315, m/z 314 为 [M-H]⁻峰, m/z 631 为 [2M-H]⁻峰,推测为异鼠李素; 11号峰($t_R=82.809$ min)相对分子质量 448, m/z 447 为 [M-H]⁻峰, m/z 385 为 [M-H-2OCH₃]⁻, m/z 273 为 [M-H-Glc-CH₃]⁻,推测为山奈酚-3-O-葡萄糖苷; 13号峰($t_R=104.660$ min)相对分子质量 222, m/z 221 为 [M-H]⁻峰, m/z 153 为 [M-H-C₃O₂H]⁻峰, m/z 349 为 [2M-H-C₃O₂H]⁻峰,推测为乙酰化咖啡酸; 14号峰($t_R=111.636$ min)相对分子质量 382, m/z 381 为 [M-H]⁻峰, m/z 301 为槲皮素失去 1 个氢,推测为槲皮素硫酸酯。

本实验在大鼠的含药尿液中共鉴定出 6 个代谢产物,分别为 7 号峰对羟基桂皮酸,推测可能为芹菜素的代谢产物,代谢途径见图 2^[10-12]; 8 号峰对羟基苯丙酸,推测可能为芹菜素、槲皮苷、槲皮素的代谢产物,代谢途径见图 3^[13-14]; 10 号峰异鼠李素,推测可能为槲皮素的代谢产物,代谢途径见图 4; 11 号峰山奈酚-3-O-葡萄糖苷,推测可能为山奈酚的代谢产物,代谢途径见图 5^[15]; 13 号峰乙酰化咖啡酸,推测可能为绿原酸的代谢产物,代谢途径见图

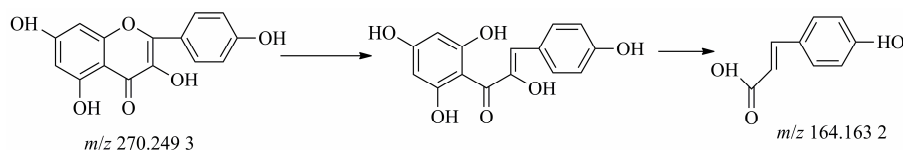


图2 对羟基桂皮酸的代谢途径

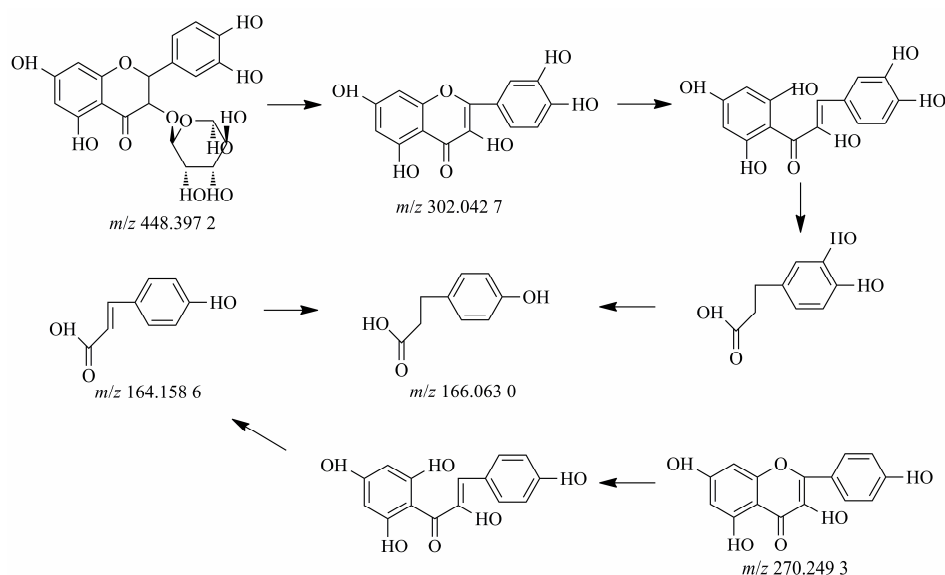
Fig. 2 Metabolic pathway of *p*-hydroxycinnamic acid

图3 对羟基苯丙酸的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathway of *p*-hydroxyphenylpropion

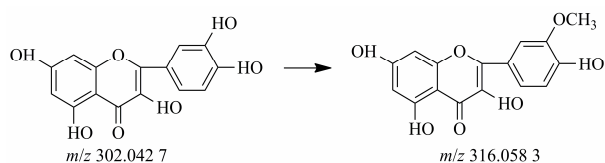


图4 异鼠李素的代谢途径

Fig. 4 Metabolic pathway of isorhamnetin

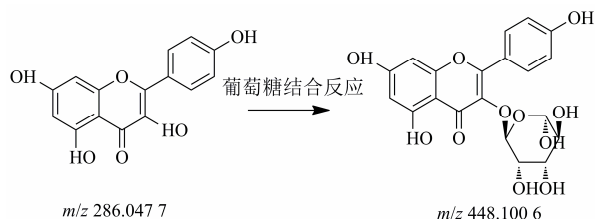


图5 山柰酚-3-O-葡萄糖苷的代谢途径

Fig. 5 Metabolic pathway of kaempferol-3-O-glucoside

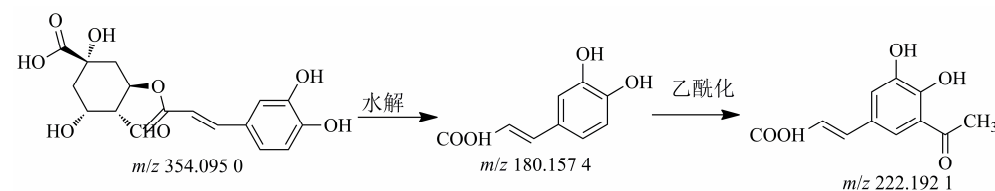


图6 乙酰化咖啡酸的代谢途径

Fig. 6 Metabolic pathway of acetyl caffeic acid

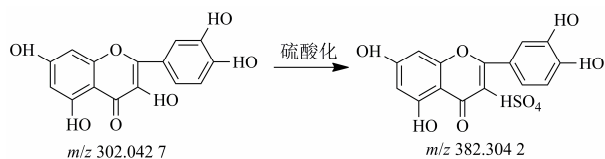


图7 槲皮素硫酸酯的代谢途径

Fig. 7 Metabolic pathway of quercetin sulfate

的化学成分主要是源自于胃肠道的吸收,一些化学成分被直接吸收入血,在肝脏发生代谢,最终经肾脏进入尿液排出体外,而尿液中的成分是可以随时间的推移不断累加的,因此检测时只要能累加到足够检测的量,就可以进一步地分离和鉴定。因此,分析鉴定尿液中的化学成分能够间接地反映中药的药效物质构成。通过逆向追溯尿液中的代谢产物是由哪些菟丝子中的固有成分代谢转化而来,代谢途径如何,将有助于药效物质基础的阐明。

实验前期采用 HPLC-DAD 技术考察给药后大鼠尿液样品的处理方法,分别使用了正丁醇萃取法、醋酸乙酯萃取法和 SPE 小柱固相萃取法来处理大鼠尿液样品,对比后发现正丁醇萃取法保留的成分最多,并且引入的杂质较少,对样品起到了很好的纯

6; 14 号峰槲皮素硫酸酯,推测可能为槲皮素的代谢产物,代谢途径见图 7。

综上所述,菟丝子醇提物在尿液内的 14 个化学成分中,其中包括 6 个原型成分,分别为山柰酚-3-β-D-葡萄糖醛酸苷、6-O-(反式)对香豆酰基-β-D-呋喃果糖-(2→1)-α-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-7-鼠李糖苷、绿原酸、芹菜素、槲皮苷; 8 个代谢成分,分别为对羟基桂皮酸、对羟基苯丙酸、异鼠李素、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、乙酰化咖啡酸、槲皮素硫酸酯,以及 2 个未知成分。

3 讨论

中药经口服后,受到胃肠道微生物、酸碱性、代谢酶等的影响常会使其化学成分发生转化,机体内部不仅有原型成分,也可能存在代谢产物,以上物质都有可能其发挥作用的物质基础。进入体内

化作用,因此确定正丁醇萃取法为尿液样品的最佳处理方法。

本研究对大鼠口服菟丝子拟雌激素作用部位后的尿液中的化学成分进行了分析,应用 HPLC-Q/TOF MS/MS 技术表征出 12 个化学成分的结构,分别是山柰酚-3-β-D-葡萄糖醛酸苷、6-O-(反式)对香豆酰基-β-D-呋喃果糖-(2→1)-α-D-吡喃葡萄糖苷、山柰酚-7-鼠李糖苷、绿原酸、芹菜素、对羟基桂皮酸、对羟基苯丙酸、槲皮苷、异鼠李素、山柰酚-3-O-葡萄糖苷、乙酰化咖啡酸和槲皮素硫酸酯。并对其中的 6 个代谢产物进行了代谢途径的推测,追踪其潜在的效应原型成分,为阐明菟丝子拟雌激素作用的药效物质基础提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 郭澄, 张芝玉, 郑汉臣, 等. 中药菟丝子的本草考证和原植物调查 [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(3): 10-12.
- [3] Kang S Y, Jung H W, Lee M Y, et al. Effect of the semen extract of *Cuscuta chinensis* on inflammatory responses in LPS-stimulated BV-2 microglia [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(8): 573-581.

- [4] Sun S L, Guo L, Ren Y C, *et al.* Anti-apoptosis effect of polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam on cardiomyocytes in aging rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(9): 6117-6124.
- [5] Kang J, Li X, Geng J, *et al.* Determination of hyperin in seed of *Cuscuta chinensis* Lam. by enhanced chemiluminescence of CdTe quantum dots on calcein/K3Fe (CN) (6) system [J]. *Food Chem*, 2012, 134(4): 2383-2388.
- [6] Donnapee S, Li J, Yang X, *et al.* *Cuscuta chinensis* Lam. : A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014(157): 292-308.
- [7] 赵丕文, 王大伟, 牛建昭, 等. 红花等十种中药的植物雌激素活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 436-439.
- [8] Li W L, Bai J, Chen Q, *et al.* Research on phytoestrogenic effective fraction of *Cuscuta chinensis* [J]. *BioTechnol: Indian J*, 2013, 7(11): 476-479.
- [9] Li W L, Zhang Y, Bai J, *et al.* Identification of chemical constituents in *Cuscuta chinensis* using HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS [J]. *BioTechnol: Indian J*, 2013, 8(4): 563-567.
- [10] He X H, Yang W Z, Meng A H, *et al.* Two new lignan glycosides from the seeds of *Cuscuta chinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(11): 934-939.
- [11] Fu N G, Chen F, Wei N, *et al.* LC-MS determination of brief quercetin metabolites in rat plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(5): 764-768.
- [12] Li W L, Zhang Y, Mu Y Y, *et al.* Identification of estrogenic constituents in serum after oral administration of Tu-Si-Zi extract using HPLC-ESI/Q-TOF MS/MS [J]. *J Liquid Chromatogr Related Technol*, 2015, 38(16): 1521-1525.
- [13] 杨秀伟, 郝美荣, 服部征雄. 中药成分代谢分析 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.
- [14] 刘 斌. 中药成分体内代谢与分析研究 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
- [15] 刘 斌. 中药代谢化学 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2017.