

UHPLC-Q-TOF/MS 鉴定大鼠体内隐绿原酸的代谢产物

李 芳¹, 李 洁², 王喻淇², 董 凡², 陶雨凡³, 王少平³, 张加余^{3*}

1. 北京市丰台区妇幼保健院 药剂科, 北京 100069

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

3. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

摘要: 目的 定性分析隐绿原酸在大鼠血浆、尿液和粪便中的代谢产物。方法 大鼠给予隐绿原酸后, 采集血液、尿液和粪便并进行样品处理, 采用 UHPLC-Q-TOF/MS 法检测各生物样品中的代谢产物。结果 通过相应的色谱保留行为、精确相对分子质量、特征碎片离子、质谱裂解规律、文献报道以及对照品比对, 最终分析鉴定了 47 个代谢产物。其主要体内代谢途径为水解反应、异构化反应、甲基化、氢化、葡萄糖醛酸化以及它们的复合反应。结论 UHPLC-Q-TOF/MS 法能较全面地鉴定隐绿原酸在大鼠体内的代谢产物, 有助于进一步阐明隐绿原酸的药效学物质基础。

关键词: 隐绿原酸; 大鼠; UHPLC-Q-TOF MS; 代谢产物鉴定; 生物样品

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)13-3810-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.005

Metabolite identification of cryptochlorogenic acid in rats using UHPLC-Q-TOF MS

LI Fang¹, LI Jie², WANG Yu-qi², DONG Fan¹, TAO Yu-fan³, WANG Shao-ping³, ZHANG Jia-yu³

1. School of Pharmacy, Fengtai Maternal and Children's Health Hospital of Beijing, Beijing 100069, China

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective To elucidate the *in vivo* metabolites of cryptochlorogenic acid in rat plasma, urine and feces samples. **Methods** Urine, plasma and feces samples were collected after oral gavage. After processing biological sample by solid-phase extraction, an efficient method of ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF) mass spectrometer was established to identify its metabolites. **Results** According to the obtained accurate mass weight, chromatographic retention behavior, mass spectrometry cleavage, characteristic fragment ions, reference comparison, and related literature reports, a total of 47 metabolites were finally screened and characterized. The main metabolic pathways contained hydrolysis, isomerization, hydrogenation, glucosylation and their complicated reactions. **Conclusion** The results showed that the metabolism of cryptochlorogenic acid could be comprehensively clarified by using UHPLC-Q-TOF mass spectrometer. Moreover, our study provided the scientific evidence for the further study of the pharmacological material basis of cryptochlorogenic acid.

Key words: cryptochlorogenic acid; rats; UHPLC-Q-TOF MS; metabolite identification; biological samples

绿原酸类化合物 (chlorogenic acids, CGAs) 一般是指 1 个或多个有机酸 (如咖啡酸、肉桂酸、阿魏酸、芥子酸与奎宁酸或其衍生物莽草酸、奎宁

酸甲酯或丁酯、4-去氧奎宁酸) 缩合形成的酯。很多中药材及其复方制剂均富含绿原酸 (5-O-咖啡酰奎尼酸)、隐绿原酸 (4-O-咖啡酰奎尼酸) 和新绿原

收稿日期: 2020-12-20

基金项目: 2017 年北京市科技新星与领军人才培养专项计划 (Z171100001117029); 滨州医学院高层次人才科研启动基金项目 (2019KYQD05); 山东省青创人才引育创新研究团队; 烟台市校地融合中药大健康产业化平台项目

作者简介: 李 芳 (1980—), 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为中药调肝方药药理研究。Tel: (010)83917191 E-mail: myhappyflash@126.com

*通信作者: 张加余 (1981—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制及体内代谢研究。

Tel: (0535)6913719 E-mail: zhangjiayu0615@163.com

酸(3-O-咖啡酰奎尼酸)等绿原酸类成分^[1-3]。近年来,它们凭借着显著的抗炎、抗菌和抗病毒药理活性而广受关注^[4-6]。

中药体内代谢以及药动学研究是阐明中药复杂体系作用模式的重要途径,也是中药现代化研究的难点和重点。很多临床有效的中药,进入人体发挥药效的物质基础及其体内过程尚不明确,严重影响了中医药的现代化进程。作为中药物质基础基本单元的单体成分,其体内代谢过程的阐明对于中药起效物质基础和作用靶点等重要科学问题的揭示具有重要意义。目前,绿原酸的体内吸收代谢过程已相对清晰^[7-11],而绿原酸的同分异构体之一——隐绿原酸的体内分布代谢研究却未见报道。本研究利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)系统分析了隐绿原酸在大鼠体内(血浆、尿液及粪便)的代谢产物及代谢途径,以期全面地反映隐绿原酸在生物体内的药效物质基础,并为其后续的临床研究提供依据。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

隐绿原酸(批号 PRF8010501)、新绿原酸(批号 PRF8050442)、奎尼酸(批号 PRF8060823)和咖啡酸(批号 PRF7102044)均购自成都普瑞法科技开发有限公司;绿原酸(批号 110753-200413)和阿魏酸(批号 110773-201313)购于中国食品药品检定研究院;所有对照品经 HPLC-UV 检测质量分数均大于 98%。甲酸(色谱级,德国 Merck 公司),乙腈和甲醇(质谱级,美国 Thermo Fisher 公司)。SPE Cartridges C₁₈ 固相萃取小柱(500 mg/3 mL, Grace Pure™ 公司)。

1.2 仪器

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)。

1.3 动物

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。动物实验经北京中医药大学动物实验中心审查批准(伦理审查号 Bucm-4-2018062602-3039)。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

分别精密称取上述 6 个对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 100 μg/mL 的储备液。吸取各对照品储备液 100 μL,最终加甲醇定容至 1 mL,制成质量浓度约为 10 μg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.2 色谱条件

Waters HSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B);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;柱温 40 °C;体积流量 0.3 mL/min;进样量 5 μL。

2.3 质谱条件

HESI 负离子模式,离子源温度 550 °C,电离源电压 4.5 kV,鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度>99.99%),鞘气体积流量 35 arb,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。

2.4 给药样品的制备

称取隐绿原酸 200 mg,加入 8 mL 生理盐水,超声至充分混悬,配制成质量浓度为 25 mg/mL 的给药溶液,用前保存于 4 °C 冰箱中。

2.5 动物实验与生物样品采集

8 只 SD 大鼠(随机分组,空白组和给药组各 4 只),饲养于温度为 22~26 °C、湿度为 40%~70%、12 h 昼夜更替的 SPF 级动物室内。实验前适应性喂养 7 d,受试前禁食 12 h,全程不禁水。给药组 ig 给予隐绿原酸药液 200 mg/kg,空白组 ig 给予等量的生理盐水。空白组和给药组大鼠分别于 ig 后 0.5、1、2、4 h 时间点眼眶取血 0.5 mL,置于肝素钠抗凝 EP 管中,混合均匀,3500 r/min 离心 10 min,分别合并 4 个时间点的血浆,即得空白血浆和含药血浆,于 -80 °C 冰箱保存,备用。

空白组和给药组 ig 给药后 24 h 内,每隔 6 h 收集一次尿液和粪便,分别合并。空白组和给药组尿液 4000 r/min 离心 10 min,取上清液于 -80 °C 冰箱中保存;空白组和给药组粪便样品分别晾干后碾碎,置于 -80 °C 冰箱中冻存。

2.6 生物样品的处理

取固相萃取柱,依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水对

其进行活化。分别吸取室温下解冻的空白组和给药组的血浆和尿液生物样品 2 mL 上样,依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,分别制备空白组和给药组的血浆和尿液样品;取空白组和给药组粪便样品适量,按照 1:5 比例加入去离子水,超声处理 60 min, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液加到预处理好的固相萃取小柱,用 3 mL 水冲洗杂质,再用 3 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,分别制备空白组和给药组的粪便样品。

将上述所有甲醇洗脱液,在常温下用 N₂ 吹干,残渣用初始流动相定容至 100 μ L,涡旋 3 min 后,再 14 000 r/min 离心 15 min。取上清液,注入 UHPLC-Q-TOF-MS 进行分析。

3 结果

3.1 高分辨质谱数据的预处理

所有数据采集和处理均在 SCIEX OS 1.3.1 工作站进行。基于药物的代谢产物通常具有相同或者相似的母核结构,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产物。基于母药隐绿原酸的化学结构,设置了如下 MDF 模板:

母药隐绿原酸(m/z 353.086 7)及其核心结构咖啡酸和奎宁酸(m/z 179.033 9、 m/z 191.055 0);隐绿原酸谷胱甘肽结合产物(m/z 660.171 5)、糖基化产物(m/z 515.140 4)、葡萄糖醛酸结合产物(m/z 529.119 9)和磺酸化产物(m/z 433.043 5)等。MDF 窗口设置为 ± 0.05 。

根据精确相对分子质量、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。

3.2 隐绿原酸在大鼠体内的代谢产物分析鉴定

基于 UHPLC-Q-TOF 分析空白组和给药组的大鼠血浆、尿液和粪便样品。通过对比给药前后的生物样品图谱信息,结合色谱保留时间、精确相对分子质量、碎片离子、文献报道以及对照品比对信息等,共鉴定了包括原型在内的 47 个代谢产物。其中,在给药组血浆、尿液和粪便样品中分别鉴定了 13、38、18 个代谢产物,具体的质谱信息见表 1。

表 1 大鼠生物样品中隐绿原酸代谢产物的质谱信息

Table 1 Summary of cryptochlorogenic acid metabolites in rat urine, plasma and feces

序号	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	0.88	C ₉ H ₉ O ₅	197.044 45	197.045 80	1.35	149 (100), 121 (80), 167 (23)	丁香酸	+	+	+
M2*	0.93	C ₇ H ₁₁ O ₆	191.055 01	191.056 14	1.13	173 (100), 155 (63), 111 (43), 127 (15)	奎尼酸	+	+	+
M3	3.67	C ₇ H ₉ O ₅	173.044 45	173.045 72	1.27	129 (100), 155 (36), 111 (23)	莽草酸	+	+	-
M4	4.78	C ₉ H ₇ O ₂	147.045 43	147.045 46	0.03	103 (100)	肉桂酸	-	-	+
M5	5.33	C ₈ H ₇ O ₄	167.033 88	167.034 97	1.09	167 (100), 124 (47), 140 (13)	香草酸	-	+	-
M6	6.14	C ₁₁ H ₁₀ NO ₅	236.055 34	236.057 07	1.73	162 (100), 134 (34)	咖啡酸甘氨酸结合物	-	-	+
M7	6.31	C ₉ H ₉ O ₇ S	261.006 35	261.007 54	1.19	181 (100), 135 (33)	二氢咖啡酸硫酸结合物	-	-	+
M8	6.49	C ₈ H ₇ O ₄	167.033 88	167.035 42	1.54	123 (100), 167 (43), 149 (9)	香草酸	-	+	-
M9	6.89	C ₉ H ₉ O ₄	181.049 53	181.050 58	1.05	137 (100)	二氢咖啡酸	-	+	+
M10	6.91	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	355.102 35	355.103 88	1.53	181 (100), 137 (30), 173 (16), 155 (12), 267 (9)	氢化	-	+	-
M11*	6.93	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.086 71	353.086 82	0.11	191 (100), 179 (63), 135 (58)	新绿原酸	-	+	+
M12	7.43	C ₇ H ₅ O ₃	137.023 32	137.024 59	1.27	137 (100), 93 (54), 136 (31), 109 (11)	3-羟基苯甲酸	-	+	-
M13	7.77	C ₉ H ₈ NO ₄	194.044 78	194.046 42	1.63	135 (100)	3-羟基马尿酸	-	+	+
M14	8.25	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.086 71	353.088 59	1.88	179 (100), 173 (90), 191 (74), 135 (62)	隐绿原酸异构体	+	+	+
M15	8.26	C ₉ H ₇ O ₇ S	258.991 8	258.992 64	0.84	153 (100), 125 (76), 135 (41), 179 (36)	咖啡酸硫酸结合物	-	+	-
M16	8.56	C ₉ H ₉ O ₄	181.049 53	181.050 75	1.22	137 (100)	二氢咖啡酸	-	+	-
M17	8.59	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.086 71	353.087 99	1.28	191 (100), 135 (68)	隐绿原酸异构体	-	+	+
M18	8.61	C ₉ H ₈ NO ₃	178.049 86	178.051 07	1.21	134 (100), 150 (90)	马尿酸	+	-	-

续表 1

序号	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
M19*	8.84	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9$	353.086 71	353.087 17	0.46	191 (100), 179 (68), 135 (60), 173 (56)	绿原酸	+	+	+
M20	8.89	$\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$	179.033 88	179.035 33	1.45	135 (100), 134 (50)	咖啡酸异构体	-	+	-
M21	8.92	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_9$	367.102 36	367.103 74	1.38	193 (100), 134 (92), 191 (34)	甲基化	-	+	-
M22	9.08	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_7\text{S}$	273.007 4	273.007 62	0.20	193 (100), 134 (51), 178 (43), 149 (22)	甲基化咖啡酸的硫酸结 合物	-	+	-
M23	9.08	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.120 44	2.43	195 (100), 173 (8)	甲基化+氢化	-	+	-
M24*	9.17	$\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$	179.033 88	179.035 26	1.38	135 (100), 161 (56), 134 (25), 107 (10)	咖啡酸	-	+	-
M25	9.22	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$	195.065 18	195.066 67	1.49	151 (100), 122 (31), 165 (30), 180 (10), 108 (7)	二氢阿魏酸	+	+	-
M26	9.23	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$	179.070 27	179.071 59	1.32	135 (100), 178 (60)	2-乙氧基苯甲酸甲酯	+	-	-
M27	9.24	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$	121.028 4	121.029 85	1.45	121 (100), 93 (25)	羟基苯甲醛	-	-	+
M28	9.31	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_9$	355.102 35	355.103 94	1.59	175 (100), 160 (82), 193 (26)	氢化	-	+	-
M29	9.38	$\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3$	163.038 97	163.040 32	1.33	101 (8), 119 (7)	香豆酸	-	-	+
M30	9.39	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_9$	367.102 36	367.103 14	0.78	193 (100), 134 (78), 178 (5)	甲基化	+	+	+
M31	9.51	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.119 55	1.54	191 (100), 173 (23), 137 (6)	甲基化+氢化	-	+	-
M32	9.52	$\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$	179.033 88	179.035 22	1.34	135 (100)	咖啡酸异构体	-	+	-
M33	9.73	$\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4$	181.049 53	181.050 93	1.40	137 (100), 163 (25)	二氢咖啡酸	-	+	+
M34	9.83	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.119 56	1.55	173 (100)	甲基化+氢化	-	+	-
M35	9.85	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$	195.065 18	195.066 54	1.36	180 (100), 163 (45), 134 (20)	二氢阿魏酸	-	+	-
M36	10.02	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.119 76	1.75	369 (100), 173 (73), 191 (65)	甲基化+氢化	-	+	-
M37	10.1	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_9$	367.102 36	367.102 25	1.34	173 (100), 191 (43), 134 (32), 193 (18)	甲基化	-	+	-
M38	10.23	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.120 11	2.10	191 (100), 173 (21), 181 (17), 137 (6)	甲基化+氢化	-	+	-
M39	10.24	$\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2$	135.044 06	135.045 42	1.34	135 (100), 120 (83)	咖啡酸脱羧	-	+	-
M40	10.32	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_9$	369.118 01	369.119 15	1.14	369 (100), 173 (98), 191 (68)	甲基化+氢化	-	+	-
M41	10.42	$\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5$	197.044 45	197.045 82	1.35	153 (100), 182 (96), 123 (84), 137 (45)	丁香酸	-	-	+
M42	10.42	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_9$	367.102 36	367.102 86	0.50	173 (100), 193 (25), 134 (24)	隐绿原酸甲基化	+	+	+
M43	11.04	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_9$	355.102 36	355.099 73	-2.63	167 (100), 275 (23)	隐绿原酸氢化	+	-	+
M44	11.42	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$	195.065 18	195.066 23	1.05	180 (100), 152 (9)	二氢阿魏酸	-	+	-
M45*	13.53	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$	193.049 53	193.051 35	1.82	134 (100), 149 (46)	阿魏酸	-	+	-
M46	13.82	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{14}$	543.170 83	543.171 72	0.89	367 (100), 349 (34), 173 (12), 129 (13)	甲基化+葡萄糖醛酸化	-	+	-
M47	14.15	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_{10}$	357.081 62	357.078 55	-3.07	357 (100), 313 (48), 181 (32), 163 (28)	二氢咖啡酸的葡萄糖醛 酸化	+	-	-

“+” 检测到 “-” 未检测到 *与对照品比对鉴定

“+”detected “-”undetected *identified with reference standard

在负离子模式下, M11、M14、M17 和 M19 产生相同的准分子离子峰 m/z 353.086 71 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 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-MS² 谱中, 它们均产生特征碎片离子 m/z 191.056 13 (奎尼酸骨架离子)。其中, M11 和 M19 的色谱保留时间和多级质谱裂解行为与相应的对照品基本相同。因此, 分别将 M11 和 M19 准确鉴定

为新绿原酸和绿原酸, 同时将 M14 和 M17 鉴定为隐绿原酸的同分异构体^[12-15]。

M20、M24 和 M32 具有相同的准分子离子峰 m/z 179.035 26, 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-MS² 谱中均可见特征碎片离子 m/z 135 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$, 表明分子中存在羧基。通过与咖啡酸对照品的保留时间以及质谱裂

解行为比对, 可将 M24 准确鉴定为咖啡酸, 并把 M20 和 M32 鉴定为咖啡酸同分异构体。M9、M16 和 M33 的实验相对分子质量均比咖啡酸多 2, 并产生相同的准分子离子峰 m/z 181.049 53 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_9H_9O_4$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。在 ESI-MS² 谱中, 它们均可脱去 1 分子 H_2O (18) 产生主要的碎片离子 m/z 163, 并可中性丢失 1 分子 CO_2 (44) 产生碎片离子 m/z 137。因此, 可将 M9、M16 和 M33 鉴定为二氢咖啡酸同分异构体。

M47 的准分子离子峰为 m/z 357.078 55 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{15}H_{17}O_{10}$, 误差为 3.07×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, m/z 357 脱去 1 分子 CO_2 (44) 形成碎片离子 m/z 313。同时还检测到碎片离子 m/z 181 $[M-H-glucuronide-H_2O]^-$ 。因此, 推测 M47 是二氢咖啡酸的葡萄糖醛酸结合反应产物。其 ESI-MS² 裂解的产物离子 m/z 163 $[M-H-glucuronide-2H_2O]^-$, 可进一步确认上述推断。M6 的准分子离子峰为 m/z 236.057 07 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{11}H_{10}NO_5$, 误差为 1.73×10^{-6} 。在其 ESI-MS² 谱中, m/z 236 分别中性丢失 1 分子 $C_2H_4NO_2$ 和 $C_3H_4NO_3$, 生成碎片离子 m/z 162 $([M-H-NH_2CH_2COO]^-)$ 和 m/z 134 $([M-H-NH_2CH_2COO-CO]^-)$, 表明其分子中存在甘氨酸和羰基。参照文献报道, 可将其鉴定为咖啡酸的甘氨酸结合产物。

M23 的色谱保留时间为 9.08 min, 准分子离子峰为 m/z 273.007 60 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{10}H_9O_7S$ 。在其 ESI-MS² 谱图中, m/z 273 相继产生碎片离子 m/z 193 $[M-H-SO_3]^-$ 、 m/z 149 $[M-H-SO_3-CO_2]^-$ 和 m/z 134 $[M-H-SO_3-CO_2-CH_3]^-$, 表明其母核结构中存在羧酸、硫酸基团及甲氧基等。结合相关文献报道, 将 M23 鉴定为咖啡酸甲基化和磺酸化的复合产物。M4 的准分子离子峰为 m/z 147.045 43 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_9H_7O_2$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。同时, M4 的实验相对分子质量比咖啡酸少 32。在其 ESI-MS² 谱图中, m/z 147 脱掉 1 分子 CO_2 (44) 生成碎片离子 m/z 103。结合文献报道^[16], 可将 M4 鉴定为肉桂酸。

M7 的色谱保留时间为 9.24 min, 相对分子质量为 261.006 35, 推测其分子式为 $C_9H_9O_7S$ (误差 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$)。在它的 ESI-MS² 谱中, m/z 261 脱掉 1 分子 SO_3 (80) 和 1 分子 CO_2 (44), 分别产生碎片离子 m/z 181 $[M-H-SO_3]^-$ 和 m/z 137 $[M-H-$

$SO_3-CO_2]^-$, 表明其母核结构中存在羧基和磺酸基。因此, M7 被鉴定为二氢咖啡酸磺酸化结合物。M29 的准分子离子峰为 m/z 163.040 30 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_9H_7O_3$ (误差 1.33×10^{-6})。它的实验相对分子质量比咖啡酸少 16, 推测是咖啡酸的脱羟基产物。结合产生碎片离子 m/z 119 $[M-H-CO_2]^-$, 将 M29 鉴定为咖啡酸的脱羟基产物香豆酸^[17-18]。

M39 的准分子离子峰为 m/z 135.045 40 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_8H_7O_2$ (误差为 1.34×10^{-6})。在 ESI-MS² 谱中, 其可中性丢失 1 分子 CH_3 , 产生二级碎片离子 m/z 120, 表明其母核结构中存在甲基。结合相关文献报道, 将 M39 鉴定为咖啡酸脱羧产物。M45 的色谱保留时间为 13.53 min, 准分子离子峰为 m/z 193.051 35 $[M-H]^-$ 。根据精确分子质量推测其分子式为 $C_{10}H_9O_4$ (质量误差 1.82×10^{-6})。在 ESI-MS² 图谱中, m/z 193 依次丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 CH_3 , 分别产生碎片离子 m/z 149 和 m/z 134, 推测其分子中存在羧基和甲基。通过与相应的对照品比对, 将 M45 准确鉴定为阿魏酸。

M2 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 $C_7H_{11}O_6$ 。在 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 产生 m/z 173 和 m/z 147。此外, 中性丢失 2 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 产生 m/z 111 $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$ 。据此推断 M2 分子中极有可能存在至少 2 个羟基和 1 个羧基。由于 M2 与奎尼酸对照品的色谱保留时间和质谱碎片相同, 可将其准确鉴定为奎尼酸。

M12 的准分子离子峰为 137.023 32 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_7H_5O_3$, 误差为 1.27×10^{-6} 。其相对分子质量比苯甲酸多 16, 推测 M12 可能是苯甲酸的羟基化产物。由于其 ESI-MS² 碎片离子 m/z 109 $[M-H-H_2O]^-$ 和 m/z 93 $[M-H-CO_2]^-$ 是通过中性丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 H_2O 分别产生的, 表明其母核结构上存在羟基和羰基。因此, 最终将 M12 鉴定为 3-羟基苯甲酸。

M5 和 M8 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 分别为 167.034 9、167.035 4, 并分别产生 ESI-MS² 碎片离子 m/z 123 和 m/z 149。其中, m/z 167 脱去 1 分子 CO_2 产生 m/z 123, m/z 167 中性丢失 1 分子 H_2O 产生 m/z 149。因此, 可将二者鉴定为香草酸及其同分异构体^[19]。

M27 的准分子离子峰为 m/z 121.029 85 $[M-$

H]⁻, 分子式为 C₇H₅O₂。在其 ESI-MS² 图谱中, 通过中性丢失 1 分子 CO 产生碎片离子 m/z 93 [M-H-CO]⁻。因此将 M27 鉴定为羟基苯甲醛。M3 的色谱保留时间为 1.27 min, 结合高分辨相对分子质量 173.045 7, 推测分子式为 C₇H₉O₅, 其产生的碎片离子为 m/z 129、 m/z 155 和 m/z 111。在负离子模式下, 其准分子离子峰 m/z 173 脱去 1 分子 H₂O 产生 m/z 155, 脱去 1 分子 CO₂ 产生 m/z 129, m/z 155 脱去 1 分子 CO₂ 生成 m/z 111, 说明分子中存在羧基和羟基, 由此将 M3 鉴定为莽草酸^[20-21]。

M18 的准分子离子峰 [M-H]⁻ 为 178.051 7, 由氮规律推测其含有奇数个氮原子。结合精确相对分子质量推测其分子式为 C₉H₈NO₃, 分别产生 ESI-MS² 碎片离子 m/z 134 和 m/z 150 等。其中, m/z 150 为 m/z 178 脱去 1 分子 CO 产生的; m/z 178 中性丢失 1 分子 CO₂ 产生 m/z 134。因此, 最后将其鉴定为马尿酸^[22]。

M26 的准分子离子峰 [M-H]⁻ 为 179.071 59, 推测其分子式为 C₉H₈NO₃, 误差为 1.32×10^{-6} 。其 ESI-MS² 谱碎片离子 m/z 135 可推测为 [M-H]⁻ 离子中性丢失 1 分子 CO₂ 所产生的。因此, 将 M26 推测为 2-乙氧基苯甲酸甲酯。

M13 在总离子流图提取的准分子离子峰为 m/z 194.046 43 [M-H]⁻。结合精确其相分子质量推测其分子式为 C₈H₈NO₄, 误差为 1.63×10^{-6} 。由于其相对分子质量较马尿酸多 16, 并均产生碎片离子 m/z 135 [M-H-CO₂-CH₃]⁻ 和 m/z 150 [M-H-CO₂]⁻, 说明 M13 分子中存在羧基和甲基。因此, 将其鉴定为 3-羟基马尿酸^[22]。

M25、M35 和 M44 的色谱保留时间分别为 9.22、9.58、11.42 min。根据高分辨精确相对分子质量推测它们的分子式为 C₁₀H₁₁O₄, 误差均 $\leq \pm 2.00 \times 10^{-6}$ 。在其 ESI-MS² 谱中, [M-H]⁻ 离子由于中性丢失 1 分子 CH₃ 和 1 分子 CO₂ 分别产生碎片离子 m/z 180 和 m/z 151, 表明分子中存在甲基和羧基。结合相关文献报道, 将其鉴定为二氢阿魏酸。

M1 的准分子离子峰均 m/z 197.045 8 [M-H]⁻, 结合高分辨精确相对分子质量推测其分子式为 C₉H₉O₅, 误差均为 1.35×10^{-6} 。在 ESI-MS² 谱图中, 均可见碎片离子 m/z 167 [M-H-OCH₂]⁻、 m/z 149 [M-OCH₂-H₂O]⁻ 和 m/z 121 [M-OCH₂-H₂O-CO]⁻, 表明分子中存在甲氧基、羰基以及羟基。因此, 将 M1 鉴定为丁香酸^[19]。

M15 的精确相对分子质量为 m/z 258.992 64, 较 M24 相对分子质量多 80, 推测其分子式为 C₉H₈NO₃ (误差为 0.84×10^{-6})。在其 ESI-MS² 谱图中, m/z 179 [M-H-SO₃]⁻ 表明分子中磺酸基团的存在。鉴于其裂解规律与咖啡酸裂解规律相近, 可将 M15 推测为咖啡酸硫酸化产物。

M10、M28 和 M43 的准分子离子峰为 m/z 355.102 35, 根据高分辨精确相对分子质量推测它们的分子式为 C₁₆H₁₉O₉ (误差 $\leq \pm 5.00 \times 10^{-6}$), 其相对分子质量比绿原酸多 2, 且均产生 m/z 181、 m/z 173 和 m/z 155, 故将其鉴定为隐绿原酸氢化产物。

M21、M30、M37 和 M42 色谱保留时间相近, 根据高分辨精确相对分子质量推测它们的分子式为 C₁₇H₁₉O₉, 且相对分子质量比隐绿原酸多 14 (CH₂)。在它们的 ESI-MS² 谱图中, 均产生碎片离子为 m/z 173 [奎尼酸-H-H₂O]⁻、 m/z 137 [二氢咖啡酸-H-CO₂]⁻ 和 m/z 191 [奎尼酸-H]⁻, 故将它们鉴定为隐绿原酸甲基化产物。

M23、M31、M34、M36、M38 和 M40 的理论精确相对分子质量均为 m/z 369.118 01, 推测它们的分子式为 C₁₇H₂₁O₉, 误差均小于 3×10^{-6} 。由于其相对分子质量较 M17 多 14, 较 M21 多 2, 且在 ESI-MS² 谱均产生 m/z 173 [奎尼酸-H-H₂O]⁻ 和 m/z 191 [奎尼酸-H]⁻ 等, 推测它们为隐绿原酸氢化和甲基化产物。

M46 的准分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 543.171 72, 推测分子式为 C₂₄H₃₁O₁₄, 误差为 8.9×10^{-7} 。在其 ESI-MS² 谱图中, 通过丢失 176 产生碎片离子 m/z 367 [M-H-C₇H₁₂O₅]⁻, 表明其分子中含有葡萄糖醛酸基团。同时, m/z 367 比原药分子式多 CH₂, 结合二级碎片离子 m/z 173 [奎尼酸-H₂O-H]⁻ 和 m/z 135 [咖啡酸-CO₂-H]⁻, 表明分子存在奎尼酸骨架、咖啡酸骨架。因此, M46 被鉴定为甲基隐绿原酸的葡萄糖结合产物。

4 隐绿原酸在大鼠体内的代谢途径分析

通过分析, 本研究共从大鼠的血浆、尿液和粪便中鉴定了 47 个代谢产物, 其中有 5 个代谢产物通过与对照品的精确相对分子质量、特征碎片离子以及色谱保留行为比对而被准确鉴定。通过归纳分析, 隐绿原酸在大鼠体内的主要代谢反应有异构化、氢化、甲基化、葡萄糖醛酸化以及它们的复合反应。其中, 本研究并未检出原药隐绿原酸, 而其同分异构体绿原酸、新绿原酸等均检出, 说明隐绿原酸在大鼠

体内稳定性较差, 极易发生异构化反应。同时, 隐绿原酸在结构上由咖啡酸和奎尼酸脱水缩合形成, 当隐绿原酸进入体内后极易容易水解成咖啡酸和奎尼酸 2

个核心代谢产物, 并在此基础上发生进一步的代谢转化反应, 涉及的反应有葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、去羟基化以及它们的复合反应。其主要代谢途径见图 1。

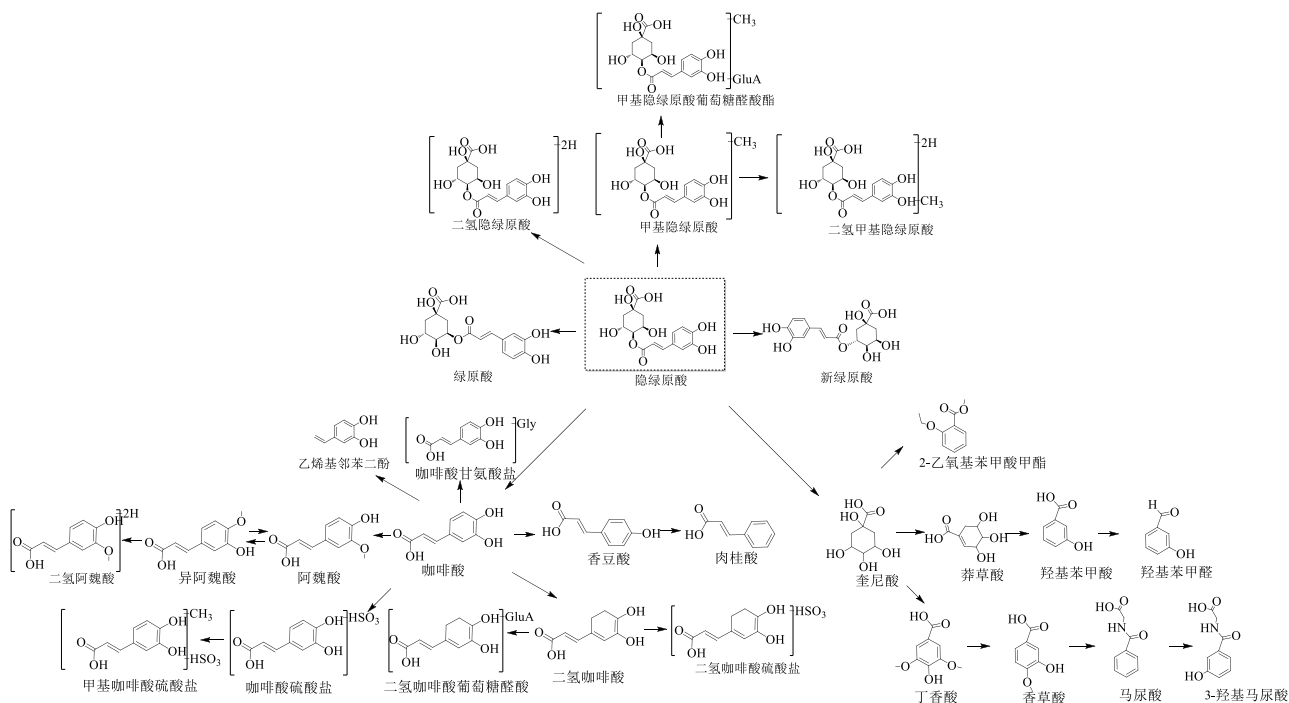


图 1 隐绿原酸在大鼠体内的代谢途径

Fig. 1 Metabolic pathways of cryptochlorogenic acid in rats

5 讨论

本研究利用 UHPLC-Q-TOF MS 高分辨质谱联用技术分析鉴定了隐绿原酸在正常 SD 大鼠血浆、尿液及粪便中的代谢产物。通过分析这些代谢产物的精确分子质量、质谱裂解规律以及特征碎片离子等, 筛选鉴定了 47 个代谢产物。其发生的主要代谢反应与绿原酸较为相似, 主要缘于二者类似的母核结构和取代模式。本研究为进一步研究绿原酸类的体内代谢奠定了基础。

除此之外, 隐绿原酸进入体内后产生核心代谢产物咖啡酸和奎宁酸, 并在此基础上发生进一步的代谢, 产生阿魏酸、异阿魏酸、香豆酸等, 它们均具有很好的抗菌消炎的药理作用, 上述结果可为隐绿原酸的临床应用研究以及阐明药效物质基础提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Clifford M N, Marks S, Knight S, *et al.* Characterization by LC-MS(n) of four new classes of *p*-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(12): 4095-4101.

[2] Liang N J, Kitts D D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions [J]. *Nutrients*, 2015, 8(1): E16.

[3] Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions [J]. *Food Chem*, 2009, 113(4): 1370-1376.

[4] 米慧娟, 王永香, 吴云, 等. 基于化学成分群动态变化研究金银花药材在抗菌活性方面的质量优劣 [J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1677-1681.

[5] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 490-495.

[6] Fernandez-Gomez B, Ullate M, Picariello G, *et al.* New knowledge on the antiglycoxidative mechanism of chlorogenic acid [J]. *Food Funct*, 2015, 6(6): 2081-2090.

[7] 谢岑, 钟大放, 陈笑艳. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物 [J]. *药理学学报*, 2011, 46(1): 88-95.

[8] Naranjo Pinta M, Montoliu I, Aura A M, *et al.* *In vitro* gut metabolism of [^{13}C]-quinic acid, the other hydrolysis product of chlorogenic acid [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(22): e1800396.

[9] Plumb G W, Garcia-Conesa M T, Kroon P A, *et al.* Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora [J]. *J Sci Food Agric*, 1999,

- 79(3): 390-392.
- [10] Azuma K, Ippoushi 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.
- [11] Morishita H, Ohnishi M. Absorption, metabolism and biological activities of chlorogenic acids and related compounds [J]. *Stud Nat Prod Chem*, 2001, 25: 919-953.
- [12] 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.
- [13] 张敏敏, 赵志国, 刘倩, 等. 基于离线 2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 联用技术的金银花抗氧化成分系统筛选研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3193-3200.
- [14] Clifford M N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden [J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79(3): 362-372.
- [15] Farah A, Monteiro M, Donangelo C M, *et al.* Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans [J]. *J Nutr*, 2008, 138(12): 2309-2315.
- [16] 王静哲, 刘震, 马立满, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 分析加工炮制对玄参化学成分的影响 [J]. *质谱学报*, 2016, 37(1): 1-9.
- [17] 赵利娟, 高文雅, 顾欣如, 等. 蒲地蓝消炎口服液化学成分鉴定及归属研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(8): 1573-1587.
- [18] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液中化学成分分析 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(4): 809-817.
- [19] 李振华, 徐金娣, 鞠建明, 等. 川楝子水提化学成分的分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 496-501.
- [20] 郝庆秀, 康利平, 朱寿东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS^E 技术的彝药满山香的化学成分鉴别研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4234-4245.
- [21] 周丹丹, 邹秦文, 林瑞超. 基于超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱质谱的胃复春片化学成分研究 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(13): 1841-1848.
- [22] 马飞祥, 薛培凤, 韩盟帝, 等. 蒙药蓝盆花乙醇提取物的血清药物化学研究 [J]. *中国药房*, 2018, 29(21): 2953-2957.

[责任编辑 王文倩]