

基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的6-姜酚在大鼠体内代谢产物的鉴定及代谢途径的分析

孙志^{1,2,3}, 周霖^{1,2,3}, 禹明洋¹, 王振辉⁵, 乔高星¹, 薛鹏⁴, 赵红宇⁴, 康建^{1,2,3}, 张晓坚^{1,2,3}, 左莉华^{1,2,3*}

1. 郑州大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450052
2. 河南省精准医学临床质谱工程研究中心, 河南 郑州 450052
3. 郑州市临床质谱重点实验室, 河南 郑州 450052
4. 郑州大学第一附属医院 口腔急诊科, 河南 郑州 450052
5. 河南理工大学医学院, 河南 焦作 454000

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry, UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术对6-姜酚在大鼠血浆、尿液和粪便中的代谢产物进行鉴定分析。方法 SD大鼠 ig 给药 6-姜酚羧甲基纤维素钠混悬液后, 收集其血浆、尿液、粪便以及胆汁样品。样品前处理后, 采用 Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱。在电喷雾电离源 (ESI 源) 正、负离子模式下采集生物样品的质谱数据。结果 对代谢产物的质谱数据进行结构鉴定分析, 检测到大鼠体内 6-姜酚相关代谢产物共 21 个, 其中血浆样品中 5 个代谢产物, 尿液样品中 9 个代谢物, 粪便样品中 12 个代谢产物, 胆汁样品中 8 个代谢产物。结论 通过液质联用技术阐明了 6-姜酚在大鼠体内的代谢产物及其代谢途径, 为今后相关研究提供重要的理论依据, 同时也为药物代谢鉴定研究提供一种综合研究方法。

关键词: 6-姜酚; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; 代谢产物; 代谢途径; 血浆; 尿液; 粪便; 胆汁

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2021)24 - 7420 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.003

Metabolites and metabolic pathway analysis of 6-gingerol in rats based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

SUN Zhi^{1, 2, 3}, ZHOU Lin^{1, 2, 3}, YU Ming-yang¹, WANG Zhen-hui⁵, QIAO Gao-xing¹, XUE Peng⁴, ZHAO Hong-yu⁴, KANG Jian^{1, 2, 3}, ZHANG Xiao-jian^{1, 2, 3}, ZUO Li-hua^{1, 2, 3}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China
2. Henan Engineering Research Center of Clinical Mass Spectrometry for Precision Medicine, Zhengzhou 450052, China
3. Zhengzhou Key Laboratory of Clinical Mass Spectrometry, Zhengzhou 450052, China
4. Oral Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China
5. College of Medicine, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China

Abstract: Objective To identify the metabolites of 6-gingerol in plasma, urine, feces and bile in rats by using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS method. **Methods** The plasma, urine, fecal and bile samples were collected and processed after ig administration of 6-gingerol CMC-Na suspension. A Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was applied and 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B) solution were as the mobile phase for gradient elution. The mass spectrometry data of biological samples was acquired under the both positive and negative electrospray ion mode. **Results** A total of 21 metabolites of 6-gingerol were identified in rats by analyzing the mass spectrometry data, including five metabolites in plasma, nine metabolites in urine, 12 metabolites products in feces, eight metabolites in bile samples. **Conclusion** The study expounded metabolites and metabolic pathways of 6-gingerol in rats

收稿日期: 2021-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703666); 河南省高等学校重点科研项目基础研究计划 (18A310036, 19A360008, 19A320070)

作者简介: 孙志, 博士, 研究方向为中药药物代谢。Tel: (0371)66862570 E-mail: sunzhi2013@163.com

*通信作者: 左莉华, 博士, 副主任药师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0371)66862570 E-mail: zuolihua2013@126.com

based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS method and provided an important basic for future studies. In addition, this paper could offer a comprehensive research method for drug metabolism identification.

Key words: 6-gingerol; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; metabolites; metabolic pathway; plasma; urine; feces; bile

姜为姜科 (Zingiberaceae) 植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。株高 0.5~1.0 m, 根茎肥厚, 多分枝, 有芳香及辛辣味。根茎供药用, 鲜品或干品可作烹调配料或制成酱菜、糖姜。茎、叶、根茎均可提取芳香油, 用于食品、饮料及化妆品香料中。其中药性表现为发散风寒、化痰止咳, 又能温中止呕、解毒等, 常常用于外感风寒及胃寒呕逆等症的治疗^[1-2]。

姜的化学成分繁杂, 主要归属 3 大类: 挥发油类 (萜类化合物)、二苯基庚烷类 (1,7-二取代苯基庚烷骨架) 和姜辣素类。姜辣素是姜中辣味成分的总称, 其中 6-姜酚在姜的辣味成分中含量最高, 也是姜的主要活性成分^[2-5]。6-姜酚具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、强心、降压、调血脂、降血糖、抗凝等多种生物学活性。其中 6-姜酚在抗肿瘤方面具有良好的应用前景^[6], 还具有保肝利胆、消炎、镇咳、防晕止吐、抑制中枢神经等多种功效, 杀虫、抗病原微生物和杀菌防腐作用^[7-9]。目前, 对于 6-姜酚的提取分离方法、分析测定方法和生物活性研究较为全面, 而且药代动力学研究显示, 6-姜酚在机体内快速吸收并迅速消除, 且这一变化规律与给药途径及给药剂量没有显著的关联性^[10], 但对 6-姜酚的体内代谢过程和代谢产物尚不明确^[11-13], 亟需进一步研究。本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 建立了一种灵敏度高、准确性好的鉴定药物体内代谢产物的研究方法, 对大鼠血浆、尿液和粪便中 6-姜酚的主要代谢产物进行鉴定分析, 为 6-姜酚的进一步药用开发奠定基础。

1 材料

1.1 药物与试剂

6-姜酚对照品 (批号 MUST-18090710, 质量分数 >98%, 购自成都曼思特生物科技有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 购于天津市科密欧化学试剂科技有限公司。

1.2 仪器

UHPLC-Q-Orbitrap 液相色谱-质谱联用系统: Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公

司), Q Exactive 型高分辨质谱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); BX7200HP 台式超声波清洗器 (上海新苗医疗器械制造有限公司); AL104 型万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司)。

1.3 动物

SD 大鼠 18 只, 雄性, 体质量 (230±20) g, 购于郑州大学动物实验中心。合格证号 SCXK (豫) 2019-0002。动物于恒温恒湿房饲养, 保持 12 h 光照循环, 期间自由饮水进食, 提供实验室标准动物饲料, 所有实验操作按照河南省郑州大学第一附属医院动物伦理委员会的要求进行。给药前禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~2.0 min, 5% B; 2.0~2.5 min, 5%~10% B; 2.5~20 min, 10%~25% B; 20~35 min, 25%~65% B; 35~45 min, 65%~100% B; 45~50 min, 100% B; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 5 μL; 柱温 40 °C。

2.2 质谱条件

UHPLC-Q-Exactive 液质联用仪: 离子源采用 HESI 源 (heated ESI), 辅助气体积流量为 10 μL/min, 辅助气温度为 300 °C, 离子传输管温度 320 °C; 正离子模式: 鞘气体积流量 40 μL/min, 喷雾电压 3.50 kV; 负离子模式: 鞘气体积流量 38 μL/min, 喷雾电压 2.80 kV。扫描方式采用正、负离子 Full MS/dd-MS² 模式, 其中包括 1 次一级全扫描 (分辨率为 70 000 FWHM) 和 1 次数据依赖的二级扫描 (分辨率为 17 500 FWHM) 2 个事件, 质荷比窗口宽度设置为 2, 碰撞能梯度为 20、40、60 eV, 扫描范围 m/z 80~1200。

2.3 样品的制备

称取 250 mg 6-姜酚的对照品, 加入 25 mL 0.5% CMC-Na, 摇匀, 制成质量浓度为 10 mg/mL 的混悬液^[14-15], 作为给药样品。

2.4 给药及样品采集

实验前,将SD大鼠随机分为3组(采血组、集尿组、胆汁组),每组6只,再将各组分为空白组(3只)和6-姜酚给药组(3只),在动物房内适应性喂养1周,饲养环境温度控制在20℃。

受试前1天,将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水12h。给药组以10 mg/kg的剂量大鼠ig给予6-姜酚CMC-Na混悬液,空白组大鼠ig等体积0.5% CMC-Na溶液。分别于ig给药前和给药后5、10、15、30 min和1、2、4、6、10 h眼眶取血300 μL,置于1.5 mL肝素钠抗凝EP管中,轻摇3下,4℃、3000 r/min离心10 min,取上清液,-20℃保存,备用;收集0~24 h 2组大鼠的尿液,滤过,置于EP管中,-20℃保存,备用;收集0~24 h 2组大鼠的粪便,置于EP管中,-20℃保存,备用。胆汁组大鼠采用5 mg/kg ip乌拉坦(20%)进行麻醉,对大鼠实施胆管插管手术。给药组大鼠以10 mg/kg的剂量ig给予6-姜酚CMC-Na混悬液,收集0~24 h胆汁样品,-20℃保存,备用。若实验过程取血不足,则可在给药1 h后ig适量生理盐水^[14-15]。

2.5 样品前处理

精密称定6-姜酚对照品适量,置10 mL量瓶,甲醇定容,配制成0.1 mg/mL储备液。稀释100倍后,取200 μL置进样瓶,进样;甲醇、乙腈、水按1:1:1各取100 μL,涡旋混合30 s,作为空白溶剂,取200 μL置进样瓶,进样。

取所有不同采血点血浆各100 μL均匀混合,进行甲醇沉淀(1:3),涡旋3 min,4℃、13 000 r/min离心10 min。取上清,浓缩至干;用50%甲醇水80 μL复溶,涡旋30 s,超声10 s,4℃、13 000 r/min离心5 min,上清液置进样瓶,进样^[16];取尿液200 μL和200 μL甲醇置EP管,涡旋2 min,4℃、13 000 r/min离心10 min,取上清液,浓缩至干;取50%甲醇水80 μL复溶,涡旋30 s,超声10 s,4℃、13 000 r/min离心5 min,取上清液置进样瓶,进样;取胆汁样品100 μL,甲醇(1:3)沉淀蛋白,涡旋3 min,4℃、13 000 r/min离心10 min。取上清,浓缩至干,用50%甲醇80 μL复溶,涡旋30 s,超声10 s,4℃、13 000 r/min离心5 min,上清液置进样瓶,进样;取粪便样品,晾干,研磨,精密称定0.15 g,加入1.5 mL的80%甲醇水,超声提取20 min,4℃、5000 r/min离心10 min,取上清,经0.22 μm滤膜滤过,取200 μL置进样瓶,进样。

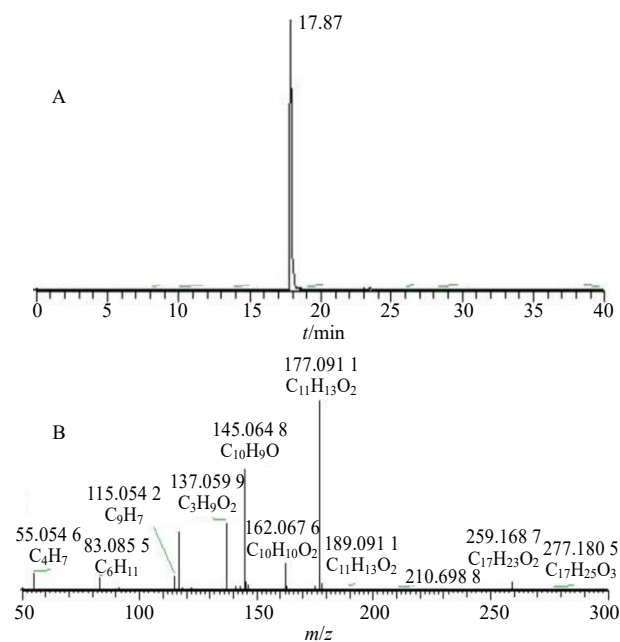
2.6 质谱分析

对处理后的血浆、尿液、粪便样品进行质谱分析,扣除空白背景后,依据质谱提供的准分子离子和加荷离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量,经Xcalibur 2.0软件拟合分子式,误差范围在 1×10^{-5} 并与数据库信息对比,对代谢物结构进行初步推测,再依据对照品的ESI-MS²谱和相关参考文献^[3,13,16],进一步推断代谢物的化学结构。

3 结果与分析

3.1 6-姜酚对照品的质谱裂解途径分析

在正离子模式下,实验结果中未提取到6-姜酚对照品(C₁₇H₂₆O₄)的离子流色谱图,仅能提取到C₁₇H₂₄O₃的离子流色谱图,其产生 m/z 277.179 32 [M+H]⁺的准分子离子峰($t_R=17.87$ min)。推测6-姜酚对照品在未受到粒子冲撞前已经发生了结构变化,丢失了1分子H₂O,见图1。M₀的 $t_R=17.87$ min, m/z 277.179 32,将M₀准确鉴定为6-姜酚原型丢失1分子H₂O。在其ESI-MS²谱中, m/z 277经碰撞诱导裂解后产生一系列二级碎片离子 m/z 259、189、177、162、145等。其中, m/z 277中性丢失1分子H₂O形成的 m/z 259,继续丢失长链烷基(C₅H₁₀)形成 m/z 189; m/z 189脱



A-一级谱图 B-二级碎片离子图

A-first-order spectra B-second order fragment ion diagram

图1 正离子模式下6-姜酚的多级质谱图

Fig. 1 Mass spectrometry of 6-gingerol in positive ion mode

掉1个甲基形成的 m/z 177, 继续脱甲基形成 m/z 163; m/z 145 由 m/z 162 中性丢失1分子 H_2O 而形成。由此, 可推测6-姜酚经碰撞诱导裂解易脱水, 并且易产生脱烷基的碎片离子峰, 尤其易产生丢失甲基的碎片离子峰。这可能与6-姜酚母核中存在烷基长链有关^[16]。

3.2 6-姜酚在大鼠体内代谢产物的分析鉴定

基于UHPLC-Q-Orbitrap技术分析给药后的大鼠血浆、尿液和粪便, 通过对比给药前后的生物样品图谱, 结合色谱保留时间、精确相对分子质量、多级碎片离子等信息的分析, 共鉴定了原型在内的22个代谢产物, 其中大鼠血浆中鉴定代谢产物5个、尿液中鉴定代谢产物9个、粪便中鉴定代谢产物12个、胆汁中鉴定代谢产物8个, 具体代谢产物质谱信息见表1。

3.2.1 大鼠血浆中代谢产物的鉴定 大鼠血浆中共鉴定代谢产物5个, 分别为 $M_1 \sim M_5$ 。 M_1 的相对分子质量比6-姜酚母核少34, 其准分子离子峰为 m/z 261.147 98 $[M+H]^+$ ($C_{16}H_{20}O_3$)。其分子式较6-姜酚母核少1个C、1个O和6个H, 对比 M_0 的裂解规律, 推测其脱去了苯环上的甲氧基(CH_2O), 但实际相对分子质量又缺少4, 推测同时又脱去长链上H形成2个双键。因此, M_1 可鉴定为6-姜酚的去甲氧基和双脱饱和(脱H)代谢产物。

在正离子模式下, 检测到2个色谱峰 M_2 ($C_{17}H_{24}O_3$, $t_R=18.23$ min)、 M_3 ($C_{17}H_{24}O_3$, $t_R=14.86$ min)。两者的实验相对分子质量均与 M_0 相同, 推测二者同样由6-姜酚母核中性丢失1分子 H_2O 而得到, 且都产生了 m/z 259、189、177、163等碎片离子, 得到的碎片离子与 M_0 裂解产生的碎片离子基本相同, 进一步验证了上述推断。因此, 可将两者鉴定为6-姜酚的脱水产物。

M_4 的准分子离子峰为 m/z 281.246 86 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{32}O_2$)。其分子式较6-姜酚少2个O、多1个C和6个H。在ESI-MS²谱中, 得到了6-姜酚对照品的 m/z 295、249、177碎片离子, 而 M_4 在二级裂解过程中产生的 m/z 263较 m/z 249多14, 推测母核发生甲基化; 产生的 m/z 263较 m/z 295少32, 推测母核发生硝基还原; 产生的 m/z 179较 m/z 177多2, 推测母核发生还原(双键加H)。因此, 推测 M_4 是由6-姜酚母核发生还原(双键加H)、硝基还原、甲基化得到的代谢产物。

M_5 的准分子离子峰为 m/z 289.215 18 $[M+H]^+$

($C_{19}H_{28}O_2$)。对比其与 M_{15} 、 M_{16} 的实验相对分子质量和二级谱图, 发现 M_5 在发生乙酰化和硝基还原反应的同时又脱去1分子 H_2O 。由此, 推测 M_5 是由6-姜酚乙酰化、硝基还原和脱水而得到的代谢产物。

3.2.2 大鼠尿液中代谢产物的鉴定 大鼠尿液中共鉴定代谢产物9个, 分别为 M_1 、 M_2 、 M_3 和 $M_6 \sim M_{11}$ 。代谢产物 $M_6 \sim M_{11}$ 的鉴定结果如下。

在正离子模式下, M_6 的准分子离子峰为 m/z 493.203 34 $[M+Na]^+$ ($C_{23}H_{34}O_{10}$)。其相对分子质量较6-姜酚多176, 推测是6-姜酚葡萄糖醛酸结合反应产物。由其二级裂解产生的 m/z 317产物离子(丢失了1分子葡萄糖醛酸), 可进一步确认上述推断^[14]。 M_7 的准分子离子峰为 m/z 463.192 84 $[M+Na]^+$ ($C_{22}H_{32}O_9$)。其相对分子质量较 M_6 少30, 并且其二级裂解产生的碎片离子 m/z 287, 是由 m/z 463脱去1分子葡萄糖醛酸产生的。因此, 可将 M_7 鉴定为6-姜酚单去甲氧基和葡萄糖醛酸结合产物。

M_8 的准分子离子峰为 m/z 259.168 61 $[M+H]^+$, 其分子式为 $C_{17}H_{22}O_2$ 。其相对分子质量比 M_0 少18, 推测其由6-姜酚母核中性丢失2分子 H_2O 形成。因此, 可将 M_8 鉴定为6-姜酚的双脱水产物。

M_9 的准分子离子峰为 m/z 261.184 48 $[M+H]^+$ ($C_{17}H_{24}O_2$)。 M_9 比6-姜酚母核的相对分子质量同样少34, 对比其分子式较6-姜酚母核少2个O和2个H, 并且在其二级裂解过程中产生了 m/z 229的碎片离子, 推测该碎片离子为 m/z 243丢失甲氧基上的甲基($-CH_2$)形成, 进而推测 M_9 未脱去苯环上的甲氧基, 而是脱去2分子 H_2O , 但由于其实际相对分子质量数并未减少36, 推测是6-姜酚母核长链上的羰基还原后以羟基形式脱去。由此, 推测 M_9 是由6-姜酚发生还原反应(还原羰基)、双脱水反应而得到的代谢产物。

M_{10} 的准分子离子峰为 m/z 423.248 14 $[M+H]^+$ ($C_{22}H_{34}N_2O_6$)。依据其分子式 $C_{22}H_{34}N_2O_6$, 初步推测6-姜酚母核发生了谷氨酰胺结合, 在其ESI-MS²谱中产生的 m/z 362由6-姜酚母核脱去基团 CH_9NO_2 得到, 从而进一步验证了 M_{10} 中含有谷氨酰胺结构。再对比 M_{10} 与6-姜酚母核的分子式, 发现其结构还缺少1个O, 推测6-姜酚母核还发生了单去羟基化反应。由此, 推测 M_{10} 是6-姜酚的谷氨酰胺结合和单去羟基化产物。

M_{11} 的准分子离子峰为 m/z 495.218 72 $[M+Na]^+$ ($C_{23}H_{36}O_{10}$)。依据其分子式, 初步推测6-姜酚

表1 大鼠血浆、尿液和粪便中6-姜酚的代谢产物质谱信息

Table 1 Mass spectrometric information of 6-Gingerol metabolites in rat plasma, urine and feces

| 化合物 | 分子式 | t_R /min | 模式 | 理论值 (m/z) | 实测值 (m/z) | 误差 ($\times 10^{-6}$) | 碎片离子 (m/z) | 代谢反应类型 | 血浆 | 尿液 | 粪便 | 胆汁 |
|-----------------|---|------------|---------------------|------------------|------------------|----------------------------|---|--------------------------|----|----|----|----|
| M ₀ | C ₁₇ H ₂₄ O ₃ | 17.87 | [M+H] ⁺ | 277.179 82 | 277.179 32 | -0.501 | 259.16, 189.09, 177.09, 162.06, 145.06 | 6-姜酚脱水 | + | - | + | + |
| M ₁ | C ₁₆ H ₂₀ O ₃ | 14.60 | [M+H] ⁺ | 261.148 52 | 261.147 98 | -2.072 | 243.13, 255.12, 177.09, 163.07, 159.08, 145.06, 137.05, 131.04, 109.06, 107.08 | 去甲氧基、双脱饱和和反应 (脱氢) | + | + | + | - |
| M ₂ | C ₁₇ H ₂₄ O ₃ | 18.13 | [M+H] ⁺ | 277.179 82 | 277.179 32 | -1.808 | 259.16, 189.09, 177.09, 162.06, 145.06, 137.05, 117.06, 103.05, 91.05, 83.08, 55.05 | 脱水反应 | + | + | - | - |
| M ₃ | C ₁₇ H ₂₄ O ₃ | 14.87 | [M+H] ⁺ | 277.179 82 | 277.179 26 | -2.025 | 259.16, 189.09, 177.09, 162.06, 145.06, 137.05, 117.06, 83.08, 55.05 | 脱水反应 | + | + | - | + |
| M ₄ | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 23.57 | [M+H] ⁺ | 281.247 5 | 281.246 86 | -2.300 | 263.24, 179.23, 135.14, 111.11, 107.08 | 硝基还原反应、甲基化反 应、还原反应 | + | - | + | - |
| M ₅ | C ₁₉ H ₂₈ O ₂ | 18.01 | [M+H] ⁺ | 289.216 2 | 289.215 18 | -3.550 | 271.20, 229.19, 147.11, 133.10, 121.09, 119.08, 107.08, 105.07 | 乙酰化反应、硝基还原反 应、脱水反应 | + | - | + | - |
| M ₆ | C ₂₃ H ₃₄ O ₁₀ | 14.87 | [M+Na] ⁺ | 493.204 41 | 493.203 34 | -2.186 | 393.11, 317.17 | 葡萄糖醛酸结合反应 | - | + | - | + |
| M ₇ | C ₂₂ H ₃₂ O ₉ | 15.17 | [M+Na] ⁺ | 463.193 85 | 463.192 84 | -2.188 | 287.16 | 单去甲氧基、葡萄糖醛酸 结合反应 | - | + | - | - |
| M ₈ | C ₁₇ H ₂₂ O ₂ | 14.87 | [M+H] ⁺ | 259.169 25 | 259.168 61 | -2.494 | 203.10, 189.09, 175.07, 163.07, 161.07, 129.05, 105.06 | 双脱水反应 | - | + | - | + |
| M ₉ | C ₁₇ H ₂₄ O ₂ | 14.12 | [M+H] ⁺ | 261.184 9 | 261.184 48 | 1.633 | 243.18, 229.13, 215.15, 201.14, 191.12, 187.10, 177.11, 163.09 | 还原反应、双脱水反应 | - | + | + | - |
| M ₁₀ | C ₂₂ H ₃₄ N ₂ O ₆ | 10.68 | [M+H] ⁺ | 423.248 96 | 423.248 14 | -1.945 | 362.23, 345.20, 245.13 | 谷氨酰胺结合反应、单去 羟基化反应 | - | + | - | - |
| M ₁₁ | C ₂₃ H ₃₆ O ₁₀ | 14.23 | [M+Na] ⁺ | 495.220 06 | 495.218 72 | -2.723 | 319.16 | 葡萄糖苷结合反应、氧化 反应 | - | + | + | + |
| M ₁₂ | C ₁₈ H ₃₂ O ₃ | 24.47 | [M+H] ⁺ | 297.242 42 | 297.241 73 | -2.326 | 233.22, 261.22, 121.22, 109.10 | 硝基还原反应、甲基化反 应、水合作用 | - | - | + | - |
| M ₁₃ | C ₁₈ H ₂₄ O ₃ | 17.37 | [M+H] ⁺ | 289.179 82 | 289.179 17 | -2.252 | 271.18, 253.16, 187.15, 161.10, 159.09, 135.08, 133.09 | 甲基化反应、脱水反应、 脱饱和和反应 | - | - | + | - |
| M ₁₄ | C ₁₈ H ₂₆ O ₄ | 17.39 | [M+Na] ⁺ | 329.172 33 | 329.171 54 | -2.401 | 121.02, 81.07 | 甲基化反应、脱饱和和反应 (脱氢) | - | - | + | + |
| M ₁₅ | C ₁₉ H ₃₀ O ₃ | 15.33 | [M+Na] ⁺ | 329.208 71 | 329.210 33 | 4.903 | 311.21, 285.12, 145.06, 171.06, 119.08, 105.08 | 乙酰化反应、硝基还原反 应 | - | - | + | - |
| M ₁₆ | C ₁₉ H ₃₂ O ₃ | 13.61 | [M+Na] ⁺ | 331.224 36 | 331.225 77 | 4.239 | 313.21, 285.21, 133.10, 131.08, 119.08, 109.10, 107.08, 105.08 | 乙酰化反应、硝基还原反 应、还原反应 | - | - | + | - |
| M ₁₇ | C ₁₈ H ₃₂ O ₃ | 24.47 | [M+H] ⁺ | 297.242 42 | 297.241 73 | -2.326 | 109.10, 107.08, 97.06, 95.08 | 谷氨酰胺结合反应、去甲 基化反应、还原反应 | - | - | + | - |
| M ₁₈ | C ₁₈ H ₂₄ O ₃ | 17.37 | [M+H] ⁺ | 289.179 82 | 289.179 17 | -2.252 | 339.23, 279.22, 109.10, 107.08 | 半胱氨酸结合反应、硝基 还原反应、还原反应 | - | - | + | - |
| M ₁₉ | C ₁₆ H ₂₀ O ₄ | 12.76 | [M+Na] ⁺ | 299.125 38 | 299.127 44 | 6.886 | 299.12, 281.11, 263.10, 245.09, 133.06, 107.04, 79.05 | 去甲基化反应、双脱饱和 反应(脱氢) | - | - | - | + |
| M ₂₀ | C ₁₈ H ₃₀ O ₆ | 12.80 | [M+Na] ⁺ | 365.193 45 | 365.192 47 | -2.710 | 365.19, 107.08, 101.05, 95.085 | 双氧化反应、甲基化反应 | - | - | - | + |
| M ₂₁ | C ₁₉ H ₃₀ O ₅ | 13.12 | [M+K] ⁺ | 377.172 48 | 377.173 52 | 2.751 | 377.17, 359.15, 327.13, 285.12, 109.10, 107.08 | 还原反应、乙酰化反应 | - | - | - | + |

“+”代表样品中检测到，“-”代表样品中未检测到

"+" means detected in the sample, and "-" means not detected in the sample

母核发生了葡萄糖苷结合和氧化反应。在其二级裂解的过程中, M_{11} 产生了 m/z 319 的碎片离子, 其由 m/z 495 脱去 $C_6H_8O_6$ 大基团而得到, 从而进一步验证了上述推测, 并且推测 6-姜酚氧化部位在葡萄糖苷部分。由此, 推测 M_{11} 是 6-姜酚的葡萄糖苷结合和氧化反应产物。

3.2.3 大鼠粪便中代谢产物的鉴定 大鼠粪便中共鉴定代谢产物 12 个, 分别为 M_1 、 M_4 、 M_5 、 M_9 、 M_{11} 和 $M_{12} \sim M_{18}$ 。代谢产物 $M_{12} \sim M_{18}$ 的鉴定结果如下。

在正离子模式下, M_{12} 的准分子离子峰为 m/z 297.241 73 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{32}O_3$)。在其二级裂解过程中, 得到 m/z 279、261 碎片离子, 与 M_4 的碎片离子 m/z 281、263 对比推测出 M_{12} 在 6-姜酚母核的结构上同样发生了硝基还原和甲基化反应, 但未发生还原反应(双键加 H)。根据实验相对分子质量计算, 在进行上述反应后得实验相对分子质量仍较 6-姜酚母核多 18, 推测 M_{12} 又发生了水合反应, 在 M_{12} 的二级裂解过程中 m/z 279 由 m/z 297 脱去 1 分子 H_2O 得到, 进一步证明了上述推测。由此, 推测 M_{12} 是 6-姜酚的甲基化、硝基还原、水合作用的代谢产物。

M_{13} 的准分子离子峰为 m/z 289.179 17 $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{24}O_3$)。其分子式较 6-姜酚母核多 1 个 C, 少 1 个 O 和 2 个 H。推测 6-姜酚在大鼠体内发生了甲基化反应和脱水反应, 在 M_{13} 的 ESI-MS² 谱中, m/z 289 较 6-姜酚甲基化产物的实验相对分子质量少 20, 再推测 6-姜酚在大鼠体内发生甲基化和脱水反应, 并且脱去 2 个 H 形成 1 个双键。由此, 推测 M_{13} 为 6-姜酚的甲基化、脱水、脱饱和产物。

M_{14} 的准分子离子峰为 m/z 329.171 54 $[M+Na]^+$ ($C_{18}H_{26}O_4$)。其分子式较 6-姜酚母核多 12, 分子式较 6-姜酚多 1 个甲基, 推测 M_{14} 是由 6-姜酚母核甲基化和脱饱和(脱去 2 个 H)而得到的产物。

M_{15} 的准分子离子峰为 m/z 329.210 33 $[M+Na]^+$ ($C_{19}H_{30}O_3$)。其分子式较 6-姜酚母核多 2 个 C、少 1 个 O, 并依据其一级谱图、二级谱图初步推测 M_{15} 是由 6-姜酚母核发生乙酰化和硝基还原得到的代谢产物, 在其 ESI-MS² 谱中, m/z 285 可能为 M_{15} 脱落乙酰基得到的离子碎片, 进一步验证了上述推测。由此, 推测 M_{15} 是 6-姜酚乙酰化和硝基还原而得到的代谢产物。同理, M_{16} 的准分子离子峰为 m/z

331.225 77 $[M+Na]^+$ ($C_{19}H_{32}O_3$)。其分子式较 6-姜酚母核多 2, 并结合其分子式以及一级谱图和二级谱图推测 M_{16} 是由 6-姜酚发生乙酰化、硝基还原和还原反应而得到代谢产物。 M_{17} 的准分子离子峰为 m/z 411.249 66 $[M+H]^+$ ($C_{21}H_{34}N_2O_6$)。依据其分子式 $C_{21}H_{34}N_2O_6$, 初步推测 6-姜酚母核发生了谷氨酰胺结合, 在其 ESI-MS² 谱中产生的 m/z 352 由 6-姜酚母核脱去基团 CH_3NO_2 得到, 从而进一步验证了 M_{17} 中含有谷氨酰胺结构。再对比 M_{17} 与 6-姜酚母核的分子式, 发现还缺少 1 个 C 和 1 个 O, 推测 6-姜酚母核还发生了去甲基和还原反应(还原羰基)。由此, 推测 M_{17} 是 6-姜酚发生谷氨酰胺结合、去甲基化反应和还原反应得来的代谢产物。 M_{18} 的准分子离子峰为 m/z 356.260 99 $[M+H]^+$ ($C_{20}H_{37}NO_2S$)。依据其分子式 $C_{20}H_{37}NO_2S$, 初步推测 6-姜酚母核发生了半胱氨酸结合, 在其二级裂解过程中得到了 m/z 121 离子碎片, 从而验证了上述推测; 得到了 m/z 339 离子碎片, m/z 339 由 m/z 356 脱去 1 分子 NH_3 得到的, 进一步说明了半胱氨酸羧基端与 6-姜酚结合, 并且进一步对比 M_{18} 与 6-姜酚的分子式发现, M_{18} 较 6-姜酚母核缺少 3 个 O, 推测其又进行了硝基还原和还原反应(还原羰基)。由此, 推测 M_{18} 是 6-姜酚在大鼠体内发生半胱氨酸结合、硝基还原和还原反应(羰基还原)的代谢产物。

3.2.4 大鼠胆汁中代谢产物的鉴定 大鼠胆汁中共鉴定代谢产物 8 个, 分别为 M_3 、 M_6 、 M_8 、 M_{11} 、 M_{14} 和 $M_{19} \sim M_{21}$ 。代谢产物 $M_{19} \sim M_{21}$ 的鉴定结果如下。

在正离子模式下, M_{19} 的准分子离子峰为 m/z 299.127 44 $[M+Na]^+$ ($C_{16}H_{20}O_4$)。其分子式较 6-姜酚母核少 1 个 C, 6 个 H, 初步推测 6-姜酚母核脱去了亚甲基基团 (CH_2), 但其分子式又缺少 4 个 H, 进一步推测 6-姜酚母核又发生了 2 次脱饱和反应(脱 H)。因此, 可将 M_{19} 鉴定为 6-姜酚母核发生去甲基化反应和双脱和反应(脱 H)而得到的代谢产物。

M_{20} 的准分子离子峰为 m/z 365.192 47 $[M+Na]^+$ ($C_{18}H_{30}O_6$)。其分子式较 6-姜酚母核多 1 个 C、2 个 O、4 个 H。对比其与 6-姜酚母核的二级裂解碎片, 推测 M_{20} 由 6-姜酚母核脱去甲基基团 (CH_2) 并进行 2 次氧化反应而得到。 M_{21} 的准分子离子峰为 m/z 365.192 47 $[M+Na]^+$ ($C_{19}H_{30}O_5$)。在 M_{21} 的 ESI-MS² 谱中, 得到了 m/z 285 碎片离子, 推测由 m/z 327 脱去乙酰基基团而得到, 初步推测 6-姜酚母

核发生了乙酰基结合反应。但 M₂₁ 的分子式又较 6-姜酚母核多 2 个 H，因此可将 M₂₁ 鉴定为 6-姜酚的乙酰基结合反应和还原反应的代谢产物。

3.3 5-姜酚在大鼠体内的代谢位置及途径分析

从大鼠的血浆、尿液、粪便和胆汁中共鉴定了 6-姜酚原型在内的 22 个代谢产物，其主要的体内代

谢反应有脱水、去甲氧基、去甲基化、乙酰化、硝基还原、葡萄糖醛酸化以及它们的复合反应等。其中少数代谢产物发生了谷氨酰胺结合、半胱氨酸结合等结合反应。6-姜酚较容易较易发生去甲氧基、去甲基化、乙酰化和硝基还原等反应。其主要代谢途径见图 2。

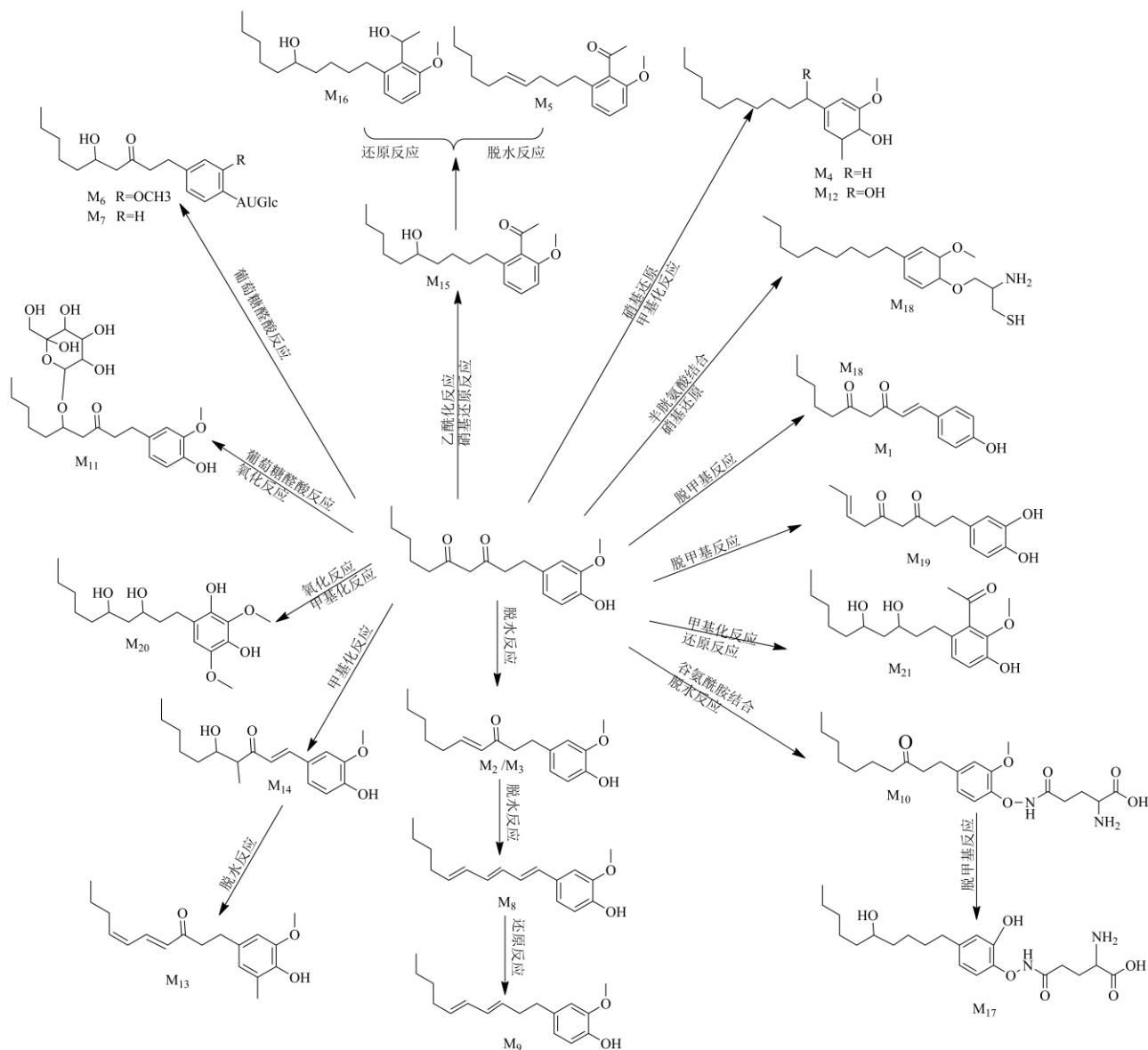


图 2 6-姜酚在大鼠体内的主要代谢途径

Fig. 2 Proposed 6-gingerol *in vivo* metabolic patterns in rats

4 讨论

本实验采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对 6-姜酚在正常 SD 大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁中的代谢产物进行鉴定分析。结果表明，6-姜酚在大鼠体内的主要代谢反应有脱水、去甲氧基、乙酰化、

硝基还原、葡萄糖醛酸化、去羟基化以及相关的复合反应等。通过分析这些代谢产物的精确相对分子质量、质谱裂解规律以及特征碎片离子等，筛选鉴定了包括 6-姜酚原型在内的 22 个代谢产物，探讨了 6-姜酚的在大鼠体内的代谢途径和裂解规律，为

进一步研究 6-姜酚的代谢产物及作用机制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 14.
- [2] Mamoru S, Hideko S, Iwao S, *et al.* Pharmacological studies on ginger. V Pharmacological comparison between (6)-shogaol and capsaicin [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 1986, 88(5): 339.
- [3] 薛文静, 张燕, 杨龙华, 等. UPLC-MS/MS 测定姜辣素中的 6-姜酚 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(9): 2178-2178.
- [4] 张科卫, 宋坤, 崔小兵, 等. 全国主要产区生姜中 6-姜酚、6-姜醇含量的测定 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(22): 1692-1694.
- [5] Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, *et al.* Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol [J]. *J Pharmacobio-Dynamics*, 1984, 7(11): 836-848.
- [6] 刘鑫, 张宏伟, 傅若秋, 等. 生姜中姜酚类活性成分的抗肿瘤作用及其机制 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(9): 884-890.
- [7] 渠柳, 杨淑, 马开, 等. 基于脾胃虚寒模型的生姜、干姜、炮姜姜辣素部位组织分布与归经的相关性研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3199-3222.
- [8] 吴英智, 傅强, 严全能, 等. 姜酚在心血管疾病中的药理作用研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(18): 1824-1827.
- [9] 营大礼. 干姜化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2008, 19(18): 1435-1436.
- [10] 耿彤, 吴晓磊, 王志伟. 姜活性成分 6-姜酚药代动力学研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(4): 231-235.
- [11] 蒋苏贞, 王宁生. 姜酚的提取分离及 6-姜酚含量测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 222-224.
- [12] 马龙利, 李岗, 叶菲菲, 等. 6-姜酚的分离纯化及抗氧化能力研究 [J]. 食品科技, 2016, 41(8): 206-209.
- [13] 许玲玲, 安睿, 王新宏. 液质联用技术在中药分析中的应用 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 239-246.
- [14] Jiang S Z, Wang N S, Mi S Q. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of [6]-gingerol in rats [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2008, 29(9): 529-537.
- [15] Wang W, Li C Y, Wen X D, *et al.* Plasma pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of 6-gingerol in rat by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2009, 49(4): 1070-1074.
- [16] Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of [6]-gingerol in rats [J]. *Life Sci*, 2002, 70(18): 2165-2175.

[责任编辑 王文倩]