

基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的升麻素苷在正常大鼠和牙周炎模型大鼠体内外代谢研究

张婉婉¹, 张子建², 杨梦华², 张洁茹¹, 张旭¹, 王伟然¹, 王春英^{1,3*}

1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017

2. 河北省中医院 口腔科, 河北 石家庄 050011

3. 新疆科技学院医学院, 新疆 库尔勒 841000

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术 (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 并结合多种数据后处理技术分析鉴定升麻素苷在正常大鼠及牙周炎模型大鼠体内外代谢物, 并比较代谢差异。 **方法** 收集正常大鼠和模型大鼠新鲜粪便, 探究升麻素苷在肠道菌孵育体系中的体外代谢轮廓。正常及模型大鼠 ig 升麻素苷 (100 mg/kg) 后, 分别于不同时间收集血浆、尿液、粪便、胆汁样本, 合并相同样本, 经适当方法进行处理后, 采用 COSMOCORE C₁₈ 柱 (150 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-甲醇 (B) 为流动相, 梯度洗脱。在电喷雾离子源 (electro-spray ionization, ESI) 正离子模式下采集各生物样品的质谱数据, 同时以右美沙芬为内标, 采用峰面积相对定量法评估不同生物样品中代谢物的相对含量。 **结果** 初步鉴定出正常大鼠中代谢产物 25 个 (其中 I 相代谢产物 21 个、II 相代谢产物 4 个), 牙周炎模型大鼠中代谢产物 27 个 (其中 I 相代谢产物 22 个、II 相代谢产物 5 个)。通过峰面积相对定量比较发现在不同病理状态下及不同生物样本中各代谢物含量存在显著差异, 其中升麻素在各生物样品中的含量普遍较高。 **结论** 在不同病理状态下, 同种化合物产生的代谢物种类及含量存在显著差异, 模型动物的代谢研究更符合临床实际用药。升麻素可能是其在体内发挥抗炎、抗菌作用的药效物质。

关键词: 升麻素苷; 升麻素; 牙周炎; 代谢; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)12-4084-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.016

In vivo and *in vitro* metabolism study of prim-*O*-glucosylcimifugin in normal rats and periodontitis model rats based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHANG Wanwan¹, ZHANG Zijian², YANG Menghua², ZHANG Jieru¹, ZHANG Xu¹, WANG Weiran¹, WANG Chunying^{1,3}

1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Department of Stomatology, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China

3. Medical College, Xinjiang College of Science & Technology, Kuerle 841000, China

Abstract: Objective To analyze and identify the metabolites of prim-*O*-glucosylcimifugin between normal and periodontitis model rats both *in vivo* and *in vitro* by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS) combined with various data post-processing techniques and compare the metabolic differences. **Methods** Fresh feces of normal and model rats were collected to explore the *in vitro* metabolic profile of prim-*O*-glucosylcimifugin in intestinal bacteria incubation system. After the normal and model rats were given prim-*O*-glucosylcimifugin (100 mg/kg), plasma, urine, feces and bile samples were collected at different times, and the same samples were combined. After sample pre-treatment, COSMOCORE C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) was used and 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B) solution were as the mobile phase for gradient elution. The mass spectrometry data of biological samples were acquired in positive ion mode with electro-spray ionization (ESI). At the same time, dextromethorphan was used as the internal standard to evaluate the relative content of metabolites in different

收稿日期: 2023-11-15

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2020206404); 河北省中医药管理局 2020 年度中医药类科研计划课题 (2020162)

作者简介: 张婉婉 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制。E-mail: 1915194917@qq.com

*通信作者: 王春英 (1972—), 女, 博士, 教授, 从事中药质量控制和体内过程研究。E-mail: wangcy730301@163.com

biological samples by peak area relative quantitative method. **Results** A total of 25 metabolites were preliminarily identified in normal rats (including 21 phase I metabolites and four phase II metabolites), and a total of 27 metabolites in periodontitis model rats were identified (including 22 phase I metabolites and five phase II metabolites). Through the relative quantitative comparison of peak area, it was found that there were significant differences in the contents of metabolites in different pathological conditions and different biological samples, and the content of cimifugin was generally higher in all biological samples. **Conclusion** Under different pathological conditions, there are significant differences in the type and content of metabolites produced by the same compound, and the metabolic study of model animals is more in line with the clinical use of drugs. Cimifugin may be a pharmacological substance that exerts anti-inflammatory and antibacterial effects *in vivo*.

Key words: prim-*O*-glucosylcimifugin; cimifugin; periodontitis; metabolism; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

防风 *Saposhnikovia Radix* 为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 具有祛风解表、胜湿止痛、止痉的功效^[1]。防风含有多种化学成分, 主要包括色原酮类、香豆素类、多糖类、挥发油类等^[2], 这些成分具有解热、镇痛、抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[3-6]。升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为主的色原酮类成分是防风的主要活性物质, 具有解热、镇痛、抗炎等多种药理活性^[7-10], 其中升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷已作为《中国药典》2020 年版中防风质量控制的标志物。课题组前期已对 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷体内外的代谢进行了全面的研究^[11], 但尚未见对升麻素苷的研究报道。有研究表明升麻素苷是防风抗炎作用的主要成分^[12], 而防风为《中国药典》2020 年版收录的中成药齿痛消炎灵颗粒的君药, 齿痛消炎灵颗粒具有治疗牙周炎的作用^[13-14], 故本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 与 MetabolitePilot 2.0、PeakView 2.0 软件, 对升麻素苷在牙周炎模型大鼠和正常大鼠的体内代谢进行研究, 并比较代谢差异, 为防风的药效物质基础提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (220±20) g, 由河北石家庄伊维沃生物技术有限公司提供, 动物生产许可证号 SYXK (冀) 2020-002。动物于温度 (22±2) °C、相对湿度 (50±3) %、12 h 光照/12 h 黑暗循环环境下饲养。动物实验通过河北医科大学动物伦理委员会的伦理审查 (批准号 DW2019003)。

1.2 药品与试剂

升麻素苷对照品 (批号 BD121316, 质量分数≥98%), 购自上海毕得医药科技股份有限公司; 升麻素对照品 (批号 HR1638W2) 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 右美沙芬对照品 (批号

Y03S11W120802, 质量分数>98%) 购自上海源叶生物科技股份有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯) 购自美国 Tedia 公司; 甲酸 (色谱纯) 购自美国 Diamond 公司; 纯净水购自娃哈哈有限公司。

1.3 仪器

Triple TOF 5600+ 型高分辨质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); 超高效液相色谱系统包括 CBM20A 型控制器、DGU-20A5R 型在线脱气模块、LC-30AD 型二元梯度高压泵系统、SIL-30AC 型自动进样器和 CTO-30A 型柱温箱 (日本岛津公司); D3024R 型高速冷冻离心机 (美国 SCILOGEX 公司); KQ-5200E 型台式超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一分析天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); MTN-2800D 型氮吹仪 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); MX-S 型涡旋混匀器 [大龙兴创实验仪器 (北京) 有限公司]; SkyScan 1176 型小动物 Micro-CT 扫描影像系统、NRecon 软件、3D 重建软件 CTvox (德国 Bruker 公司)。

1.4 数据处理软件

Analyst® TF 1.7 软件、MetabolitePilot 2.0 软件、PeakView 2.0 软件 (美国 AB Sciex 公司)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取升麻素苷、升麻素对照品适量, 甲醇溶解制成质量浓度为 1 mg/mL 的贮备液, 并用甲醇稀释成质量浓度为 100 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 内标 (IS) 溶液的配制 精密称取右美沙芬对照品适量, 甲醇溶解制成质量浓度为 1 mg/mL 的贮备液, 临用前用甲醇稀释成质量浓度为 2.0 μg/mL 的 IS 溶液。

2.1.3 大鼠 ig 溶液的配制 精密称取升麻素苷对照品 600 mg, 加入 60 mL 纯净水, 配成质量浓度为 10 mg/mL 的 ig 溶液。

2.2 牙周炎模型的建立

大鼠适应性喂养 1 周, 采用吸入式 2%~3% 异氟烷实施麻醉, 麻醉成功后采用 0.2 mm 正畸结扎丝结扎大鼠上颌左侧第一磨牙牙颈部, 诱导实验性牙周炎^[15-17], 对侧同名牙作为对照不结扎。手术后, 待大鼠全部苏醒, 喂其常规鼠粮及水, 并定期检查结扎丝牢固程度, 整个实验持续 8 周。

在整个实验过程, 注意大鼠精神状态, 定期检查牙龈炎症、颜色、水肿、探针是否出血及牙周袋是否形成等。造模 8 周后随机抽取牙周炎模型大鼠, 处死, 取上颌左侧第一磨牙及牙龈组织, 同时取其对侧对比, 置于 4% 多聚甲醛固定, 常规脱钙, 脱水透明, 浸蜡包埋, 制作切片, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色后, 于显微镜下观察病理变化。同时采用微型计算机断层成像技术 (micro computed tomography, Micro-CT) 重建大鼠牙槽骨三维图像, 观察牙槽骨吸收情况。

2.3 动物给药及生物样品采集

实验前, 将正常大鼠随机分为 4 组, 每组 3 只, 第 1 组为空白正常胆汁组, 第 2 组为给药正常胆汁组, 第 3 组为空白正常血浆、尿液及粪便组, 第 4 组为给药正常血浆、尿液及粪便组。模型组按与正常组相同的方法随机分为 4 组。给药前大鼠禁食 12 h, 自由饮水。根据大鼠体质量, 以 100 mg/kg 的剂量进行 ig 给药。空白组 ig 等体积的纯净水溶液。

分别于 ig 给药后 0.167、0.333、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24 h 自眼内眦取血 0.3 mL, 置肝素化的离心管中, 4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液获得血浆样品, 并将各组不同时间点获得的血浆样品合并, 即得空白血浆和含药血浆。ig 给药后, 收集大鼠 0~72 h 每 4 个小时的尿液和粪便样本, 并将来自同组大鼠的所有尿液和粪便分别进行混合, 即得空白和给药尿液、粪便。ig 给药后, 通过 ip 20% 乌拉坦生理盐水溶液 (1.5~2.0 g/kg) 麻醉, 实施胆汁插管引流手术收集 0~24 h 的胆汁样品, 将来自同组大鼠的所有胆汁进行混合, 即得空白和给药胆汁。所有样品置于 -80 ℃ 冰箱备用。

分别取正常大鼠及牙周炎模型大鼠新鲜粪便 3 g, 加入 30 mL 厌氧培养液^[18], 用玻璃棒研碎并搅拌均匀, 经医用纱布滤过, 即得肠道菌培养液。取肠道菌培养液 1 mL, 加入 100 μ L (1.0 mg/mL) 升麻素苷溶液, 通入氮气置于无氧并充满氮气的厌氧袋中, 在提前预热至 37 ℃ 的摇床中孵育 12 h, 即得肠道

菌孵育样品。空白组用 100 μ L 超纯水代替升麻素苷溶液。

2.4 样品前处理

取血浆、尿液、胆汁样品各 1 mL, 分别加入 100 μ L 的 IS 溶液 (2 μ g/mL), 混合均匀, 加入 3 倍量甲醇, 涡旋 5 min, 4 ℃、15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。取肠道菌孵育液 1 mL、粪便样品 0.5 g (加 1 mL 蒸馏水超声 30 min 制备成匀浆), 分别加入 100 μ L 的 IS 溶液 (2 μ g/mL), 加入 3 倍量的醋酸乙酯, 涡旋 5 min, 4 ℃、15 000 r/min 离心 10 min, 收集上层萃取液, 重复萃取 3 次, 合并萃取液。将离心后所得的各生物样品上清液置另一清洁离心管中, N₂ 流吹干, 200 μ L 50% 甲醇复溶, 涡旋 5 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即得。

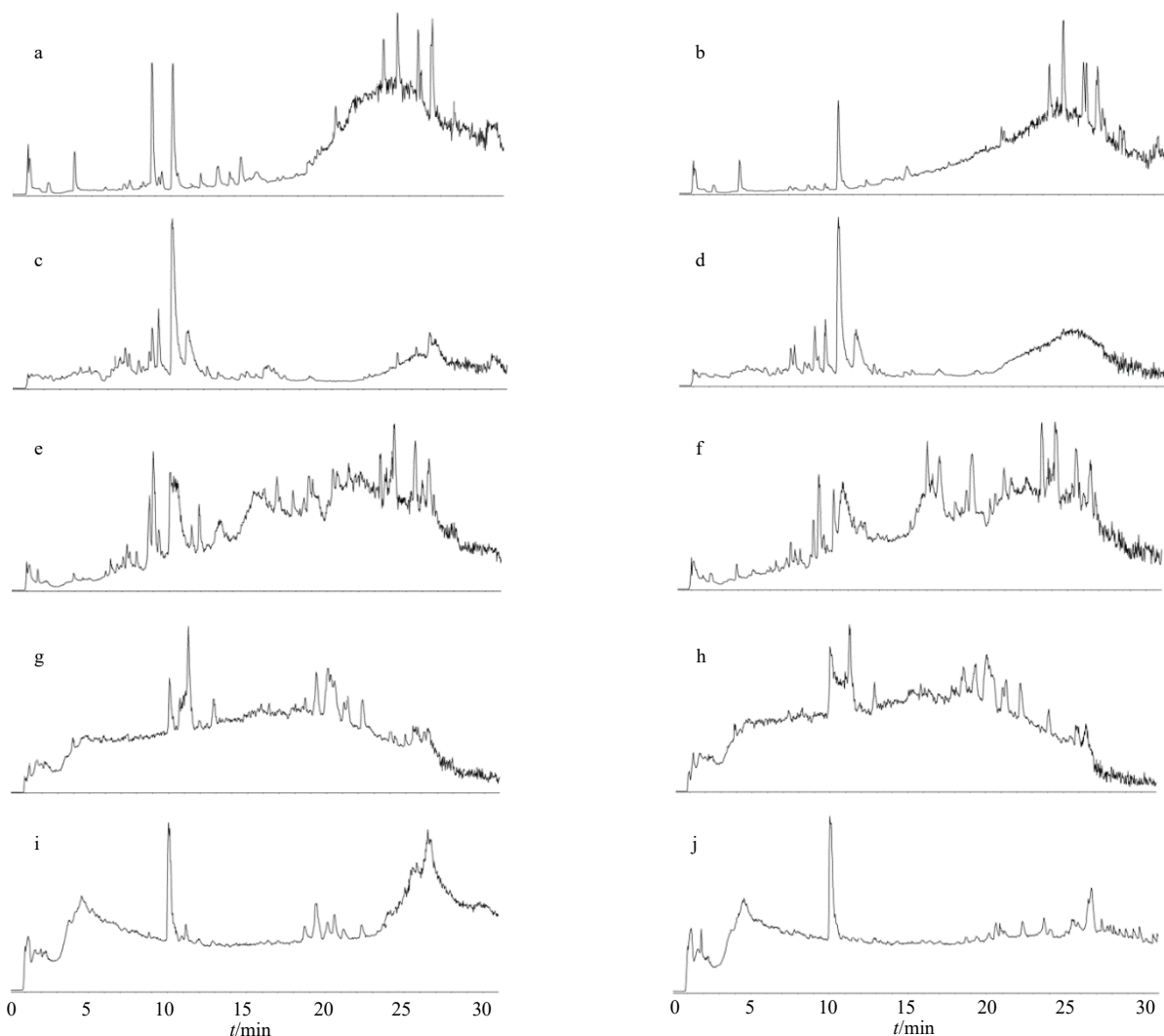
2.5 检测条件

2.5.1 色谱条件 COSMOCORE C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱: 1~3 min, 5%~20% B; 3~25 min, 20%~95% B; 25~30 min, 95% B。预平衡 5 min, 柱温 40 ℃, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 5 μ L。

2.5.2 质谱条件 电喷雾离子源 (electro-spray ionization, ESI), 正离子模式下进行全扫描, 参数设置如下: 离子源喷雾电压 5 500 V; 源温度 550 ℃; 气帘气压力 241.325 kPa; 雾化气 (Gas1) 压力 379.225 kPa; 加热气 (Gas2) 压力 379.225 kPa; 解簇电压 70 V; 碰撞能量 40 eV; 碰撞能量扩展 15 eV。TOF-MS 扫描的扫描范围为 m/z 100~1 200, 积累时间设置为 250 ms。每个扫描周期选择 8 个响应最高的离子进行 MS/MS 扫描。产物离子扫描范围为 m/z 50~1 200, 积累时间为 100 ms。

2.6 数据处理

正常大鼠和牙周炎模型大鼠 ig 升麻素苷后, 各生物样本的总离子流图见图 1。采用以下 5 个步骤来鉴定和分析升麻素苷在正常大鼠及牙周炎模型大鼠体内外的代谢物: ①基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 在线进行全扫描数据采集, 并利用多重质量亏损 (MMDF) 和动态背景扣除 (DBS) 设置获得准确的 MS/MS 质谱信息。②利用 Peak View、Metabolite Pilot 软件中的多种数据挖掘工具, 自动过滤出升麻素苷的可能代谢物。③从准确的质谱数据、母体药物的裂解模式以及相关文献描述代谢物的推断过程。④ClogP 值用作区分具有相同分子式



a-模型血浆样本; b-正常血浆样本; c-模型尿液样本; d-正常尿液样本; e-模型胆汁样本; f-正常胆汁样本; g-模型粪便样本; h-正常粪便样本; i-模型肠道菌培养液样本; j-正常肠道菌培养液样本。
a-model plasma sample; b-normal plasma sample; c-model urine sample; d-normal urine sample; e-model bile sample; f-normal bile sample; g-model feces sample; h-normal feces sample; i-model intestinal bacteria incubation fluid sample; j-normal intestinal bacteria incubation fluid sample.

图 1 大鼠 ig 升麻素苷后各生物样本的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of biological samples after ig prim-O-glucosylcimifugin

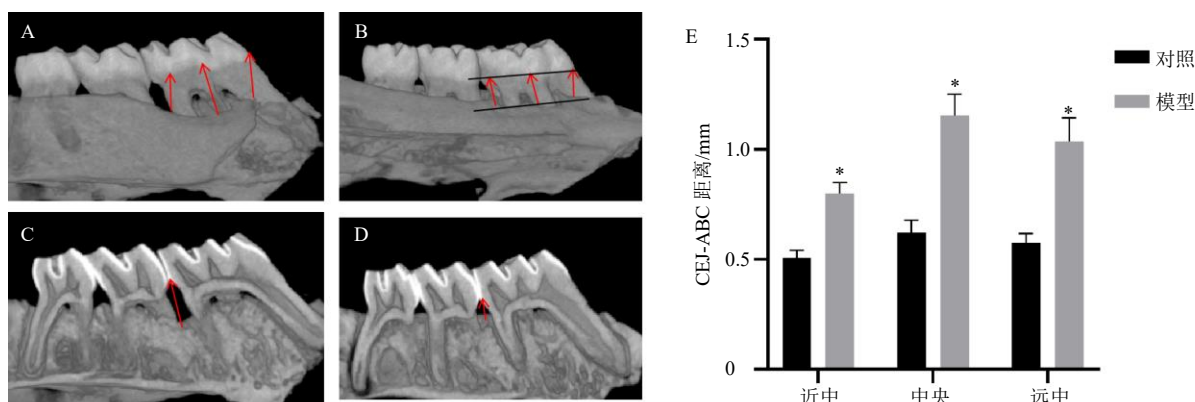
和相似质谱数据的代谢物异构体的参数。Clog P 值越大, 在反相色谱系统中的洗脱时间就越长。⑤根据 Peak View 软件提供的代谢物的峰面积, 用峰面积相对定量法比较代谢物在正常大鼠及牙周炎模型大鼠各生物样品中的含量差异。

3 结果

3.1 CT 成像

应用 Micro-CT 扫描、三维图像重建显示, 与对照组 (图 2-B、D) 相比, 模型组 (图 2-A、C) 牙槽骨吸收明显, 同时有水平和垂直向吸收。对大鼠上颌第一、第二磨牙兴趣区域^[19] (本实验选取的兴

趣区域 (region of interest, ROI) 为第一、第二磨牙近中牙槽嵴吸收情况) 进行测量, 对照组牙近中釉牙骨质界 (cemento-enamel junction, CEJ) 到牙槽嵴顶 (alveolar bone crest, ABC) 的平均距离为 0.394 mm (图 2-D), 与对照组相比, 模型组 CEJ 到 ABC 的距离平均增至 0.813 mm。分析大鼠 CEJ 至 ABC 的垂直距离 (图 2-A、B), 即分别取对照组与模型组样本牙齿颊侧的近中、中央及远中共 3 个位点的 CEJ 至 ABC 的距离, 测量统计分析结果显示, 与对照组相比, 模型组 CEJ-ABC 距离明显增加 ($P < 0.05$, 图 2-E)。



A、C-模型组 Micro-CT 图像；B、D-对照组 Micro-CT 图像；箭头为 CEJ 到 ABC 的距离；E-釉牙骨质界-牙槽嵴顶 (CEJ-ABC) 的距离统计；与相同位置的对照组比较：* $P < 0.05$ 。

A, C-Micro-CT images of model group; B, D-Micro-CT images of control group; Arrow indicates distance from CEJ to ABC; E-statistics analysis of distance between cemento-enamel junction (CEJ) and alveolar bone crest (ABC); * $P < 0.05$ vs control group at same location.

图 2 正常大鼠及牙周炎模型大鼠 Micro-CT 扫描及颊侧釉牙骨质界-牙槽嵴顶的距离统计分析

Fig. 2 Micro CT scanning and statistical analysis of distance between cemento-enamel junction and alveolar bone crest buccal enamel in normal rats and periodontitis model rats

3.2 升麻素苷质谱裂解规律分析

升麻素苷 (**M0**, $C_{22}H_{28}O_{11}$) 的保留时间为 8.80 min, **M0** 通过重排生成准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 469.170 2。母离子 m/z 469.170 2 失去 18 ($-H_2O$)、72 ($-C_4H_8O$) 分别形成特征碎片离子 m/z 451.173 2、397.125 0。**M0** 通过丢失 162 ($-glu$)、234 ($-glu-C_4H_8O$) 分别产生特征碎片离子 m/z 307.128 6、235.068 0, 其中特征碎片离子 m/z 235.068 0 是特征碎片离子 m/z 307.128 6 通过二氢吡喃环失去 C_4H_8O 发生 RDA 裂解反应产生。通过连续丢失 O 和 C_3H_6O 后, m/z 235.068 0 产生碎片离子 m/z 219.072 5、161.065 4。苷元离子 m/z 307.126 8 有 2 种脱水方式 ($-H_2O$), 分别产生 m/z 289.116 6 的 2 种结构不同碎片离子, 苷元离子在失去水的基础上连续失去 2 个 CH_3 分别产生 m/z 274.092 3、259.068 8。通过连续丢失 C_3H_6 、 CH_2 、 C_2H_2 、CO 和 O 后, m/z 289.116 6 产生了一系列碎片离子 m/z 247.068 1、233.052 3、221.051 7、219.072 5、205.056 3、193.056 0、189.061 1、177.060 6。升麻素苷可能的裂解途径见图 3。

3.3 升麻素苷在大鼠体内外代谢物的分析鉴定

采用上述分析策略,共鉴定出 30 个升麻素苷的代谢物 (其中 I 相代谢物 25 个、II 相代谢物 5 个)。在健康大鼠中,共发现 25 个代谢产物 (血浆中 8 个、尿液中 17 个、粪便中 11 个、胆汁中 19 个、体外肠道菌群 3 个)。在牙周炎模型大鼠中,共发现 27 个代谢产物 (血浆中 8 个、尿液中 18 个、粪便中 12

个、胆汁中 22 个、体外肠道菌中 2 个)。升麻素苷原型及 30 种代谢物的详细信息见表 1。

3.3.1 I 相代谢物的鉴定

(1) 水解 (**M1**): **M1** 的保留时间为 10.14 min, 准分子离子为 m/z 307.118 0, 推测其分子式为 $C_{16}H_{18}O_6$ 。**M1** 的相对分子质量比 **M0** 少 162 ($C_6H_{10}O_5$), 此外, **M1** 的特征碎片离子 m/z 307.118 0、289.107 4、274.085 0、259.059 5、247.061 9、235.059 4、233.044 1、221.043 9、217.050 3、205.049 6、189.055 0、177.054 3、161.059 2 均与 **M0** 相同, 这表明 **M1** 在 **M0** 基础上发生了糖基化反应。且经过对照品比对, 确认 **M1** 是 **M0** 脱糖产生的水解产物升麻素。

(2) 水解-羟基化: **M2**~**M5** 的保留时间分别为 5.98、7.12、7.92、8.65 min, 准分子离子峰分别为 m/z 323.113 4、323.111 2、323.112 8、323.113 0, 均比 **M1** 多 16, 表明 **M2**~**M5** 可能为 **M1** 的单羟基化产物, 推测其是分子式 $C_{16}H_{18}O_7$ 的同分异构体。**M2** 的特征碎片离子 m/z 323.113 4、305.101 9、275.085 0、263.064 4 均比 **M1** 的特征碎片离子 m/z 307.118 0、289.107 4、259.059 5、247.061 9 多 16, 此外 **M2** 的特征碎片离子 m/z 247.060 2、235.059 4、233.046 2、221.044 1、177.054 9 均与 **M1** 的特征碎片离子保持一致, 尤其特征碎片 m/z 263.064 4 的存在, 说明该羟基化反应发生在 C-2' 位。**M3** 的特征碎片离子 m/z 323.111 2、305.109 0、275.055 4 均比 **M1** 的特征碎片离子 m/z 307.118 0、289.107 4、274.085 0、

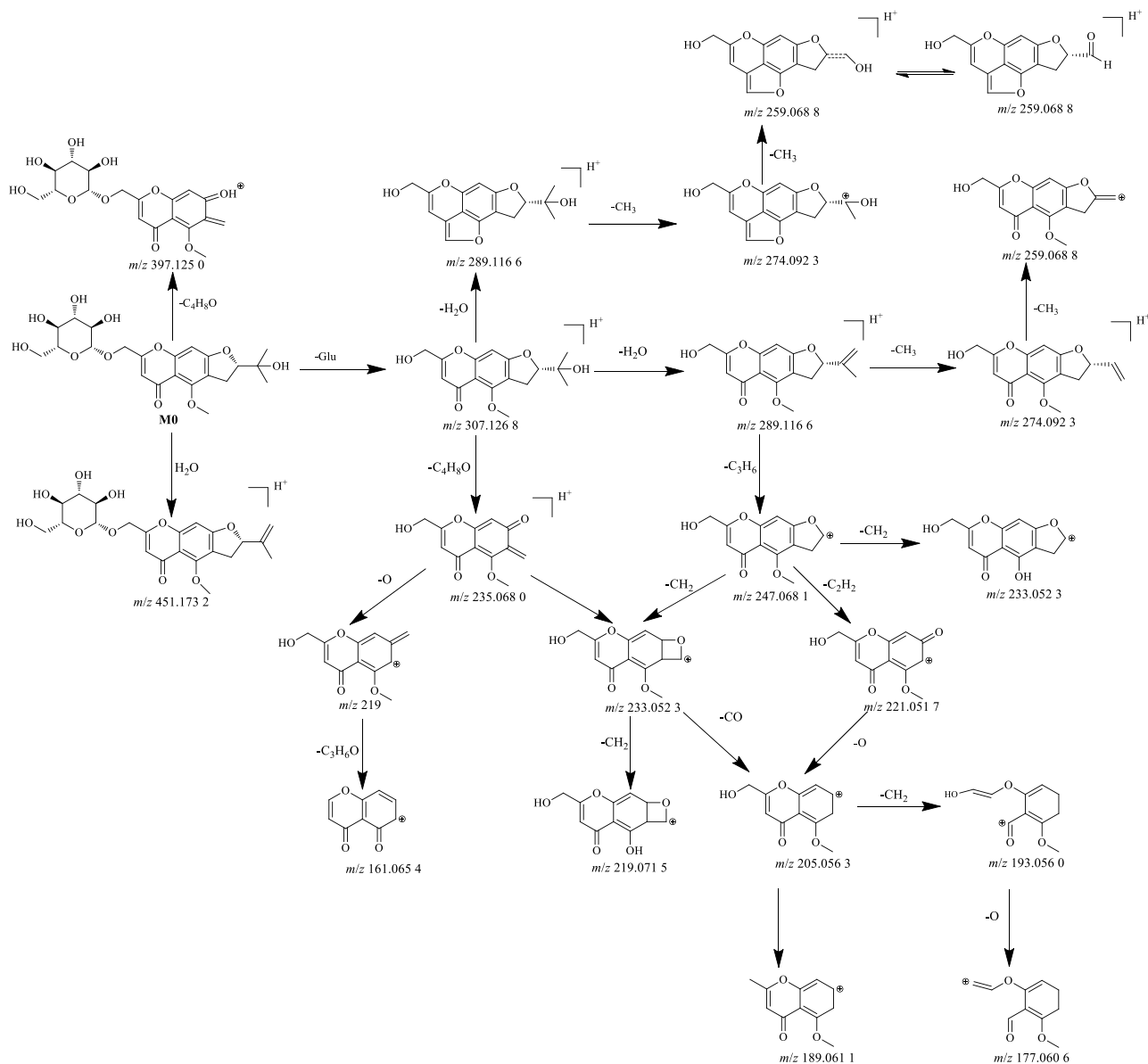


图3 升麻素苷可能的裂解规律

Fig. 3 Possible fragmentation pathway of prim-*O*-glucosylcimifugin

表1 升麻素苷在正常大鼠及牙周炎模型大鼠各生物样本中代谢物的鉴定信息

Table 1 Identification information of metabolites of prim-*O*-glucosylcimifugin in normal rats and periodontitis model rats biological samples

阶段	编号	分子式	[M+H] ⁺	<i>t</i> _R /min	误差 (×10 ⁻⁶)	MS/MS 碎片离子 (<i>m/z</i>)	反应	Clog <i>P</i>	来源
I 相	M0	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469.170 2	8.80	-0.5	469.170 2, 451.173 2, 397.125 0, 307.126 8, 305.111 9, 289.116 6, 274.092 3, 261.120 7, 259.068 8, 247.068 1, 235.068 0, 233.052 3, 221.051 7, 219.072 5, 205.056 3, 193.056 0, 189.061 1, 177.060 6, 161.065 4, 159.049 7	T	—	B ^N , P ^N , F ^N , U ^N , I ^N , B ^M , P ^M , F ^M , U ^M , I ^M
	M1	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307.118 0	10.14	-2.0	307.118 0, 289.107 4, 274.085 0, 259.059 5, 247.061 9, 235.059 4, 233.044 1, 221.043 9, 217.050 3, 205.049 6, 189.055 0, 177.054 3, 161.059 2	T-Glu	—	B ^N , P ^N , F ^N , U ^N , I ^N , B ^M , P ^M , F ^M , U ^M , I ^M
	M2	C ₁₆ H ₁₈ O ₇ (异构体)	323.113 4	5.98	2.7	323.113 4, 305.101 9, 275.085 0, 263.064 4, 247.060 2, 235.059 4, 233.046 2, 221.044 1, 177.054 9	T-Glu+O	-0.859 1	B ^N , B ^M , F ^M

表 1 (续)

阶段	编号	分子式	[M+H] ⁺	t _R /min	误差 (×10 ⁻⁶)	MS/MS 碎片离子 (m/z)	反应	ClogP	来源
I 相	M3	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	323.111 2	7.12	-4.1	323.111 2, 305.109 0, 275.055 4, 235.031 5, 233.035 6, 205.072 2, 193.050 1	T-Glu+O	-0.756 5	B ^N , P ^N , F ^N , U ^N , B ^M , P ^M , F ^M , U ^M
	M4	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	323.112 8	7.92	0.1	323.112 8, 305.101 5, 259.060 0, 247.060 0, 235.060 2, 233.044 6, 221.044 8, 205.048 5, 189.054 3, 177.054 9, 161.060 1	T-Glu+O	-0.364 7	B ^N , P ^N , F ^N , U ^N , B ^M , P ^M , F ^M , U ^M
	M5	C ₁₆ H ₁₈ O ₇	323.113 0	8.65	0.2	323.113 0, 305.102 6, 275.054 8, 259.061 1, 247.060 1, 235.060 3, 233.043 9, 221.044 7, 205.050 2, 189.054 9, 177.054 5	T-Glu+O	-0.018 9	B ^N , F ^N , U ^N , I ^N , B ^M , F ^M , U ^M
	M6	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293.102 3	12.85	1.2	293.102 3, 275.091 6, 245.043 7, 233.044 7, 221.044 8	T-Glu-CH ₂	—	P ^N , F ^N , U ^N , I ^N , F ^M , I ^M
	M7	C ₁₅ H ₁₆ O ₇ (异构体)	309.096 6	7.19	-0.9	309.096 6, 291.099 1, 233.026 8, 221.029 1, 205.031 9	T-Glu-CH ₂ +O	-0.320 8	B ^M , U ^M
	M8	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	309.097 7	9.67	2.7	309.097 7, 249.164 1, 233.050 8, 221.045 6, 177.083 7	T-Glu-CH ₂ +O	0.337 1	U ^M
	M9	C ₁₆ H ₁₆ O ₈ (异构体)	337.092 9	7.78	2.8	337.092 9, 319.082 3, 304.060 0, 289.032 9, 277.071 1, 265.032 2, 263.056 3, 235.024 3, 219.029 1, 207.043 8	T-Glu-CH ₃ + COOH	-1.233 0	F ^N , U ^N , B ^M , F ^M , U ^M
	M10	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	337.091 9	9.30	0.4	337.091 9, 274.130 1, 259.063 0, 247.060 7, 235.061 7, 233.045 8, 205.051 7, 161.061 8	T-Glu-CH ₃ + COOH	-0.585 6	B ^N , U ^N , B ^M , F ^M , U ^M
	M11	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.086 3	10.96	-0.1	291.086 3, 273.076 7, 259.062 8, 258.058 0, 235.096 5, 233.044 7, 221.041 4, 177.052 1	T-Glu-CH ₃ + CHO	—	B ^M
	M12	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	291.122 6	9.83	0.4	291.122 6, 273.076 0, 263.092 2, 219.025 6, 217.159 5	T-Glu-O	—	F ^N
	M13	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	277.106 7	8.24	-1.1	277.106 7, 259.101 8, 217.054 2, 205.052 8, 181.089 7	T-Glu-CH ₂ O	—	U ^N
	M14	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.112 5	6.48	1.3	261.112 5, 243.215 1, 228.206 8, 189.090 3	T-Glu-O-CH ₂ O	—	U ^N , U ^M
	M15	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	305.102 4	8.23	1.5	305.102 4, 287.132 8, 290.071 9, 275.054 4, 247.058 3, 233.044 4, 221.044 1	T-Glu-O+CHO	—	B ^N , F ^N , U ^N , B ^M , F ^M , U ^M
	M16	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₀	397.113 6	8.80	1.7	397.113 6, 235.055 1, 205.136 9, 72.086 6	T-C ₄ H ₈ O	—	P ^M
	M17	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	321.097 4	11.08	1.6	321.097 4, 303.085 9, 273.039 5, 235.022 7, 205.049 6	T-Glu-O-CH ₃ + COOH	—	B ^N , P ^N , F ^N , U ^N , P ^M , F ^M , U ^M
	M18	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₂ (异构体)	485.166 2	6.24	1.8	485.166 2, 409.112 0, 323.111 5, 247.060 0, 235.058 3, 233.043 8, 205.048 4	T+O	-1.881 6	B ^N , B ^M , P ^M , U ^M
	M19	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₂	485.166 5	6.93	2.4	485.166 5, 467.120 3, 323.115 2, 247.060 6, 233.056 6, 205.041 5	T+O	-1.395 7	B ^N , B ^M
	M20	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₂	485.164 7	9.00	-1.4	485.164 7, 323.111 6, 275.057 0, 251.053 8, 237.044 6	T+O	-1.049 8	B ^N , B ^M
	M21	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₃ (异构体)	499.144 9	6.60	2.2	499.144 9, 323.113 0, 235.059 2, 233.045 0	T-CH ₃ +COOH	-2.263 9	B ^N , P ^N , U ^N , B ^M , U ^M
	M22	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₃	499.145 7	7.15	2.2	499.145 7, 247.060 1, 235.060 7, 233.040 4	T-CH ₃ +COOH	-1.616 5	B ^N , U ^N , B ^M , U ^M
	M23	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	453.174 2	10.80	-2.9	453.174 2, 307.117 8, 289.106 2, 259.059 9, 235.061 7, 221.045 5	T-O	—	B ^N , B ^M
	M24	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₁	471.186 8	8.11	1.5	471.186 8, 309.113 1, 237.081 7, 177.025 2	T+2H	—	U ^N
	M25	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	439.161 5	10.33	3.7	439.161 5, 421.144 6, 367.104 9, 307.118 9, 259.059 6	T-CH ₂ O	—	B ^N , F ^N , U ^N , B ^M , F ^M , U ^M
II 相	M26	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₇	645.202 6	8.43	0.1	645.202 6, 469.170 3, 307.118 6, 289.107 3, 261.112 0, 235.059 7	T+Glc-A	—	B ^M , U ^M
	M27	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂	483.148 0	9.10	-3.5	483.148 0, 307.111 8, 289.101 5, 259.054 9, 247.056 5, 235.055 2, 221.040 6, 189.051 8	T-Glu+Glc-A	—	B ^N , P ^N , U ^N , B ^M , P ^M , U ^M
	M28	C ₁₇ H ₂₀ O ₆ (异构体)	321.132 2	10.32	-3.1	321.132 2, 303.087 3, 273.040 9, 249.040 0, 235.022 6, 221.044 2, 205.049 4	T-Glu+CH ₃	1.135 2	B ^N , B ^M
	M39	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	321.132 0	11.30	-4.0	321.132 0, 303.085 9, 273.075 8, 249.075 1, 235.059 2, 221.044 0, 205.049 2	T-Glu+CH ₃	1.213 8	B ^N , P ^N , B ^M , P ^M
	M30	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ S	387.075 1	12.21	1.7	387.075 1, 307.118 1, 289.107 8, 259.060 4, 235.060 3, 221.044 7, 205.050 1, 189.055 2, 177.054 9, 161.060 3	T-Glu+SO ₃	—	B ^N , F ^N , U ^N , B ^M , F ^M , U ^M

“—”代表无同分异构体；N-正常大鼠；M-牙周炎模型大鼠；B-胆汁；F-粪便；U-尿液；P-血浆；I-肠道菌孵育液。

“—” represents no isomers; N-normal rats; M-periodontitis model rats; B-bile; F-feces; U-urine; P-plasma; I-intestinal bacteria incubation fluid.

259.059 5 多 16, 且其特征碎片离子 m/z 235.031 5、233.035 6、205.072 2、193.050 1 均与 **M1** 的特征碎片保持一致, 说明该羟基化反应可能发生在 C-5'位或者 C-2'位。**M4** 的特征碎片离子 m/z 259.060 0、247.060 0、235.060 2、233.044 6、221.044 8、205.048 5、189.054 3、177.054 9、161.060 1 与 **M1** 具有相同的裂解途径, 且根据其特征碎片 m/z 305.1015 的存在, 推测羟基化的位置可能在 C-3'位。**M5** 的碎片离子 m/z 323.113 0、305.102 6 与 **M1** 相比增加了 16, 其特征碎片离子 m/z 259.061 1、247.060 1、235.060 3、233.043 9、221.044 7、205.050 2、189.054 9、177.054 5 均与 **M1** 具有相同的裂解途径, 尤其特征碎片离子 275.054 8 的存在, 推测 **M5** 的羟基化反应可能发生在 C-8 位上。通过计算 $\text{Clog}P$ 值发现, **M2**~**M5** 的 $\text{Clog}P$ 值分别为 -0.859 1、-0.756 5、-0.364 7、-0.018 9, 与保留时间的大小具有一致性, 证明了推测的合理性。

(3) 水解后失去 CH_2 : **M6** 保留时间为 12.85 min, 准分子离子峰为 m/z 293.102 3, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_6$, 是在 **M1** 的基础上丢失 1 个 CH_2 。**M6** 主要的二级碎片离子 m/z 293.102 3、275.091 6、245.043 7、221.044 8 均比 **M1** 的碎片离子 m/z 307.118 0、289.107 4、274.085 0、259.059 5、235.059 4 少 14, 且由于特征碎片 m/z 275.091 6、233.044 7 的存在, 提示反应位点可能在 C-5。

(4) 水解后失去 $\text{CH}_2 + \text{O}$: **M7**、**M8** 的保留时间分别为 7.19、9.67 min, 准分子离子峰分别为 m/z 309.096 6、309.097 7, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_7$ 。与 **M6** 相比多了 16。因此, 代谢物 **M7**、**M8** 被初步鉴定为 **M6** 的羟基化产物。**M7** 的特征碎片离子 m/z 233.026 8、221.029 1、205.031 9 均与 **M6** 保持一致, 且其特征碎片离子 m/z 309.096 6、291.099 1 与 **M6** 相比增加了 16, 提示羟基化的位置发生在侧链上, 推测反应位点在 C-5'位。**M8** 的特征碎片 m/z 233.050 8、221.045 6、177.083 7 均与 **M6** 的特征碎片离子保持一致, 说明 **M8** 与 **M6** 具有相同的裂解途径, 且有特征碎片 m/z 249.164 1 的存在, 说明羟基化的位置在环上, 推测反应位点可能在 C-8 位。此外, 根据上述所推结构, 计算 **M7**、**M8** 的 $\text{Clog}P$ 值分别为 -0.320 8、0.337 1, 与出峰时间保持一致, 证明了推测的合理性。

(5) 水解后去甲基化成羧酸: **M9**、**M10** 的保留时间分别为 7.78、9.30 min, 准分子离子峰分别为 m/z 337.092 9、337.091 9, 推测其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 。

与 **M1** 相比多了 30, 推测 **M9**、**M10** 是 **M1** 结构中的 1 个甲基被氧化成羧酸后得到的代谢产物。根据 **M1** 的结构特征推测发生反应的位点可能是与 C-5 连接的甲氧基及 C-5'位的甲基上。**M9** 的特征碎片离子 m/z 337.092 9、319.082 3、304.060 0、289.032 9、277.071 1、265.032 2、263.056 3、235.024 3、219.029 1、207.043 8 均比 **M1** 的特征碎片离子 m/z 307.118 0、289.107 4、274.085 0、259.059 5、247.061 9、235.059 4、233.044 1、205.049 6、189.055 0、177.054 3 多 30, 因此证明 **M9** 氧化位点发生在 C-5 位连接的甲氧基上。**M10** 在正离子模式下形成的准分子离子峰为 m/z 337.091 9, 与 **M1** 相比多 30, 其特征碎片离子 m/z 274.130 1、259.063 0、247.060 7、235.061 7、233.045 8、205.051 7、161.061 8 均与 **M1** 的特征碎片离子保持一致, 说明其氧化位点发生在 **M1** 的侧链上而不在环上, 故推测反应位点发生在 C-5'位。根据以上推测的结构, 计算两者的 $\text{Clog}P$ 值分别为 -1.233 0、-0.585 6。计算结果与出峰时间顺序保持一致, 进一步确证了推测的合理性。

(6) 水解后去甲基化成酮: **M11** 保留时间为 10.96 min, 准分子离子峰为 m/z 291.086 3, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。与 **M1** 相比少了 16, 推测在 **M1** 的基础上失去了 1 个甲基进一步将连接在中心碳原子上的羟基氧化成酮。**M11** 的特征碎片离子 m/z 291.086 3、273.076 7、258.058 0 与 **M1** 相比均少 16, 特征碎片离子 m/z 259.062 8、235.096 5、233.044 7、221.041 4、177.052 1 与 **M1** 保持一致, 说明反应发生在侧链上, 因此推测反应发生在 C-4'位。

(7) 水解脱羟基: **M12** 的保留时间为 9.83 min, 其准分子离子峰 m/z 291.122 6, 推测其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$ 。与 **M1** 相比少了 16 (O), 推测 **M12** 在 **M1** 的基础上发生了脱羟基反应, **M12** 的特征碎片离子 m/z 273.076 0、263.092 2、219.025 6、217.159 5 均比 **M1** 的特征碎片离子 m/z 289.107 4、247.061 9、235.059 4、233.044 1 少 16, 说明脱羟基位发生在 C-9 位。

(8) 水解后失去 CH_2O : **M13** 的保留时间为 8.24 min, 其准分子离子峰为 m/z 277.106 7, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 。与 **M1** 相比少了 30 (CH_2O), 推测 **M13** 可能是在 **M1** 的基础上丢失甲氧基产生的代谢物。**M13** 的特征碎片离子 m/z 259.101 8、217.054 2、205.052 8、181.089 7 可能是 **M1** 的特征碎片离子 m/z 289.107 4、247.061 9、235.059 4、221.043 9 丢

失 1 个甲氧基产生的, 根据 **M1** 的结构特点推测丢失位点在 C-5 位。

(9) 水解后脱羟基失去 CH_2O : **M14** 的保留时间 6.48 min, 其准分子离子峰为 m/z 261.112 5, 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 。与 **M12** 相比少了 16, 与 **M1** 相比少了 46 ($\text{M1}-\text{O}-\text{CH}_2\text{O}$), 推测 **M14** 可能是在 **M1** 的基础上先失去羟基又失去甲氧基产生的。**M14** 的特征碎片离子 m/z 243.215 1、228.206 8、189.090 3 与 **M1** 的特征碎片离子 m/z 289.107 4、274.085 0、235.059 4 相比均少 46, 且 **M14** 的特征碎片离子 m/z 243.215 1 正好比 **M12** 的特征碎片离子少 16, 证明推测合理。

(10) 水解脱羟基后被氧化成醛: **M15** 的保留时间为 8.23 min, 其准分子离子峰为 m/z 305.102 4, 推测其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 。**M15** 的特征碎片离子 m/z 287.132 8 比 **M12** 的特征碎片离子 m/z 273.076 0 多 14, 水解后脱羟基位点与 **M12** 保持一致。且其特征碎片离子 m/z 290.071 9、275.054 4、247.058 3、233.044 4 可能是在 **M15** 的准分子离子 m/z 305.102 4 的基础上通过连续丢失 2 个甲基、CO 和亚甲基产生的。因此, 推测 **M15** 是代谢物 **M12** 中的 1 个甲基被氧化成醛产生的。根据母药结构特点, 结合 π - π 共轭体系可能使结构更加稳定的规律, 推测氧化反应位点最可能发生在 2 位的 CH_3 上。

(11) 失去 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$: **M16** 的保留时间为 8.80 min, 其准分子离子峰为 m/z 397.113 6, 推测其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 。与 **M0** 相比少了 72, 根据其结构特点推测 **M16** 可能是 **M0** 失去 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ 所得到的代谢产物, 其特征碎片 m/z 235.055 1、205.136 9 与 **M0** 保持一致, 且特征碎片 m/z 72.086 6 ($-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$) 的存在, 初步认为推测 **M16** 的结构合理。

(12) 水解脱羟基后去甲基成羧酸: **M17** 的保留时间为 11.08 min, 其准分子离子峰为 m/z 321.097 4, 推测其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$ 。与 **M9** 相比少了 16, 与 **M1** 相比多了 14, 推测 **M17** 可能是 **M1** 脱羟基后的 1 个甲基被氧化成羧酸的产物。其特征碎片离子 m/z 321.097 4、303.085 9 正好比 **M1** 的特征碎片离子 m/z 289.107 4 多 14, 比 **M9** 的特征碎片离子 m/z 319.082 3 少 16, 特征碎片离子 m/z 273.039 5 比 **M9** 的特征碎片离子 m/z 289.032 9 少 16, 且其含有特征碎片离子 m/z 235.022 7、205.049 6, 与 **M1** 和 **M9** 一致。说明 **M17** 与 **M9** 结构相似, 氧化位点与 **M9** 一致。

(13) 单羟基化反应: **M18**~**M20** 的保留时间分别为 6.24、6.93、9.00 min, 其准分子离子峰分别为 m/z 485.166 2、485.166 5、485.164 7, 推测其分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$ 。与 **M0** 相比多了 16 (O), 因此推测他们可能是 **M0** 的单羟基化产物。根据母药的结构特点可以看出羟基化反应发生在 C-3'、C-5'和 C-8 位时相对稳定。**M18** 的特征碎片离子 m/z 247.060 0、235.058 3、233.043 8、205.048 4 均与 **M1** 的特征碎片离子保持一致, 且其特征碎片离子 m/z 323.111 5 比 **M0** 的特征碎片离子 307.126 8 多 16, 更重要的是其特征碎片离子 m/z 409.112 0 的存在, 证明其羟基化的位点在 C-5'位。**M19** 的特征碎片 m/z 247.060 6、233.056 6、205.041 5 均与 **M0** 的特征碎片离子保持一致, 特征碎片离子 m/z 485.166 5、467.120 3、323.115 2 比 **M0** 的特征碎片离子多 16 (O), 证明了 **M19** 为 **M0** 的羟基化反应, 推测其反应位点可能是 C-3'位。**M20** 的特征碎片离子 m/z 485.164 7、323.111 6、275.057 0、251.053 8、237.044 6 均比 **M0** 的碎片离子多 16, 尤其是 m/z 251.053 8、237.044 6 的存在, 推测其羟基化的位点可能发生在 C-8 位。**M17**~**M19** 的 $\text{Clog}P$ 值分别为 -1.881 6、-1.395 7、-1.049 8, 符合 $\text{Clog}P$ 值越小, 极性越大, 保留时间越小的顺序原则。

(14) 去甲基化成羧酸: **M21**、**M22** 的保留时间分别为 6.60、7.15 min, 其准分子离子峰分别为 m/z 499.144 9、499.145 7, 推测其分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ 。与 **M0** 相比多了 30, 推测可能是 **M0** 的 1 个甲基被氧化成羧酸产生的代谢产物。由于母药的结构特性, 推测氧化位点可能发生在 C-5 位连接的甲氧基上或者发生在 C-5'位。**M21** 的特征碎片离子 m/z 323.113 0 可能是 **M0** 水解脱羟基后 1 个甲基被氧化成羧酸所得, 且其特征碎片离子 m/z 235.059 2、233.045 0 与 **M0** 的特征碎片离子保持一致, 但无法确定其反应位点。**M22** 的特征碎片离子 m/z 499.145 7 比 **M0** 多了 30, 其特征碎片离子 m/z 235.060 7、233.040 4 与母药保持一致, 且其含有特征碎片离子 m/z 247.060 1, 提示氧化位点不在 C-5 位的甲氧基上, 因此推测氧化反应发生在 C-5'位。认为 **M21** 的氧化位点在 C-5 位的甲氧基上。计算 **M21** 和 **M22** 的 $\text{Clog}P$ 值分别为 -2.263 9 和 -1.616 5, 进一步证明了推测的合理性。

(15) 失去氧原子: 代谢物 **M23** 的保留时间为 10.80 min, 其准分子离子峰为 m/z 453.174 2, 推测

其分子式为 $C_{22}H_{28}O_{10}$ 。与 **M0** 相比少了 16 (O)，推测 **M23** 可能是 **M0** 失去 1 个氧原子产生的代谢产物。其特征碎片 m/z 307.117 8、289.106 2、259.059 9、235.061 7、221.045 5 的存在与母药的裂解保持一致，说明昔元的结构没有发生改变，其脱氧位置不在昔元上，可能是糖链上失去了 1 分子的氧，但其脱氧具体位点暂时无法推测。

(16) 氢化反应：**M24** 的保留时间为 8.11 min，其准分子离子峰 m/z 471.186 8，推测其分子式为 $C_{22}H_{30}O_{11}$ 。与母药相比多了 2，推测 **M24** 可能是在母药的基础上加了 2 个氢原子产生的代谢产物。其特征碎片离子 m/z 309.113 1、237.081 7 正好比母药的特征碎片离子 m/z 307.126 8、235.068 0 多 2，且其含有特征碎片 m/z 177.025 2，证明加氢位点在昔元上，推测可能在反应位点可能在 C-2、C-3 位。

(17) 失去 CH_2O ：**M25** 的保留时间为 10.33 min，其准分子离子峰为 m/z 439.161 5，推测其分子式为 $C_{21}H_{26}O_{10}$ 。与 **M0** 相比少了 30 (CH_2O)，推测 **M25** 可能是在 **M0** 的基础上丢失甲氧基产生的代谢物。其特征碎片离子 m/z 439.161 5、421.144 6、367.104 9、259.059 6 正好比 **M0** 的特征碎片离子 m/z 469.170 2、451.173 2、397.125 0、289.116 6 少 30，根据母药的结构推测其甲氧基的丢失位点在 C-5 位。

3.3.2 II 相代谢物的鉴定

(1) 葡萄糖醛酸化：**M26** 的保留时间为 8.43 min，其准分子离子峰为 m/z 645.202 6，推测其分子式为 $C_{28}H_{36}O_{17}$ 。与 **M0** 相比增加了 176 ($C_6H_8O_6$)，且均有特征碎片离子 m/z 469.170 3、307.118 6、289.107 3、261.112 0、235.059 7，故推测 **M26** 为 **M0** 的葡萄糖醛酸化的代谢产物，但无法确定葡萄糖醛酸化的具体位点。

(2) 水解-葡萄糖醛酸化：**M27** 的保留时间为 9.10 min，其准分子离子峰为 m/z 483.148 0，推测其分子式为 $C_{22}H_{26}O_{12}$ 。与 **M1** 相比增加了 176 ($C_6H_8O_6$)，特征碎片离子 m/z 307.111 8、289.101 5、259.054 9、247.056 5、235.055 2、221.040 6、189.051 8 与 **M1** 的裂解一致，推测 **M27** 是由 **M0** 水解成昔元后发生葡萄糖醛酸化的代谢产物。

(3) 水解-甲基化：代谢物 **M28** 和 **M29** 的保留时间分别为 10.32、11.30 min，其准分子离子峰分别为 m/z 321.132 2、321.132 0，推测其分子式为 $C_{17}H_{20}O_6$ 。与 **M1** 相比均多了 14 (CH_2)，提示 **M28** 和 **M29** 可能是 **M1** 的甲基化产物。**M28** 的特征碎

片离子 m/z 321.132 2、303.087 3、273.040 9、249.040 0、235.022 6、221.044 2、205.049 4 和 **M29** 的特征碎片离子 m/z 321.132 0、303.085 9、273.075 8、249.075 1、235.059 2、221.044 0、205.049 2 均比 **M1** 的特征碎片离子多 14。根据 **M1** 的结构特点，其甲基化反应可以发生在 C-9 位的羟基上或 C-4' 位的羟基上，且不管甲基化发生在哪个羟基上，通过去甲基化反应均能裂解出与 **M1** 相同的特征碎片离子。根据 $ClogP$ 值的大小，确定 **M28** 的甲基化反应发生在测其在 C-4' 位的羟基上，**M29** 的甲基化反应发生在测其在 C-9 位的羟基上。

(4) 水解-硫酸化：**M30** 的保留时间为 12.21 min，其准分子离子峰为 m/z 387.075 1，推测其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9S$ 。与 **M1** 相比多 80 (SO_3)，且特征碎片离子 m/z 307.118 1、289.107 8、259.060 4、235.060 3、221.044 7、205.050 1、189.055 2、177.054 9、161.060 3 均与 **M1** 的特征碎片离子保持一致，说明 **M30** 与 **M1** 具有相同的裂解途径，推测其为 **M1** 的硫酸化产物，但无法确定具体反应位点。

3.4 升麻素昔在正常大鼠及牙周炎模型大鼠体内的代谢途径及含量比较

根据上述推断的代谢产物，对其代谢途径进行推测，如图 4、5 所示，升麻素昔在正常大鼠和牙周炎模型大鼠体内外主要发生水解、羟基化、脱羟基化、失去氧原子、氢化、去甲基化成羧酸等 I 相代谢反应，葡萄糖醛酸化、甲基化、硫酸化等 II 相代谢反应。

为了量化升麻素昔在正常大鼠及牙周炎模型大鼠体内外代谢物种类及含量差异，以生物样品中代谢物与内标的相对峰面积比为纵坐标，代谢物种类为横坐标绘制柱状图，见图 6。

4 讨论

本研究结果显示，升麻素昔原型 (**M0**) 及 22 个代谢产物 (**M1**~**M6**、**M9**、**M10**、**M14**、**M15**、**M17**~**M23**、**M25**、**M27**~**M30**) 均存在于正常大鼠及牙周炎模型大鼠中。而 **M12**、**M13**、**M24** 只在健康大鼠中检测到，**M7**、**M8**、**M11**、**M16**、**M26** 只在牙周炎模型大鼠中检测到，2 种生理状态下代谢物种类存在差异，且模型大鼠中代谢物多于正常大鼠。中药有效成分 (尤其是分子结构中含葡萄糖苷类的成分) 易受到肠道菌群的作用，影响药物的体内吸收、代谢^[20]，有报道称牙周炎与肠道菌失调密切相关，肠道菌群发生改变，会导致代谢异常，故可能导致不

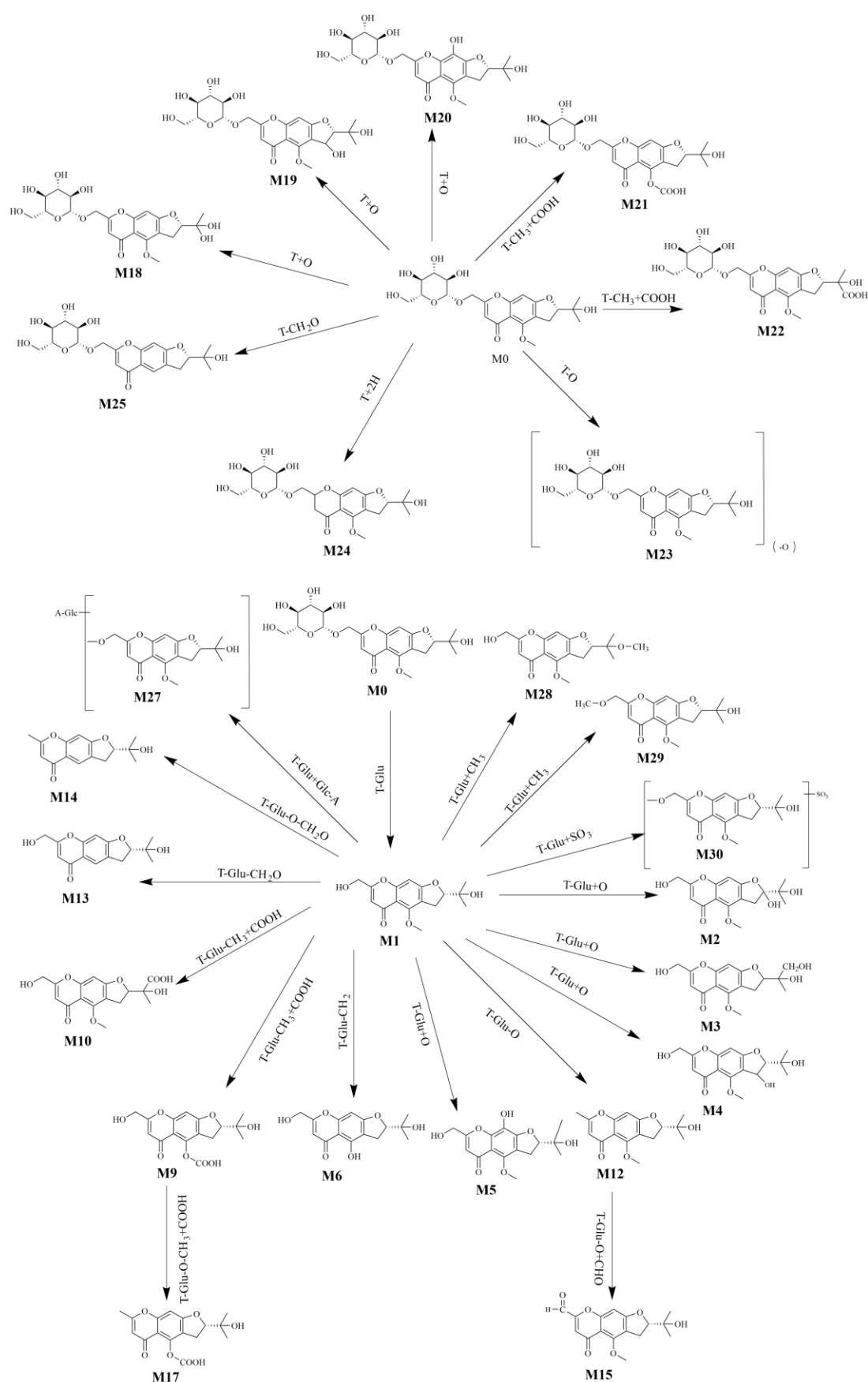


图 4 升麻素苷在正常大鼠体内的代谢途径

Fig. 4 Metabolic pathway of prim-O-glucosylimifugin in normal rats

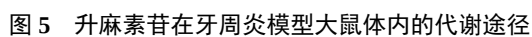


Fig. 5 Metabolic pathway of prim-*O*-glucosylcimifugin in periodontitis model rats

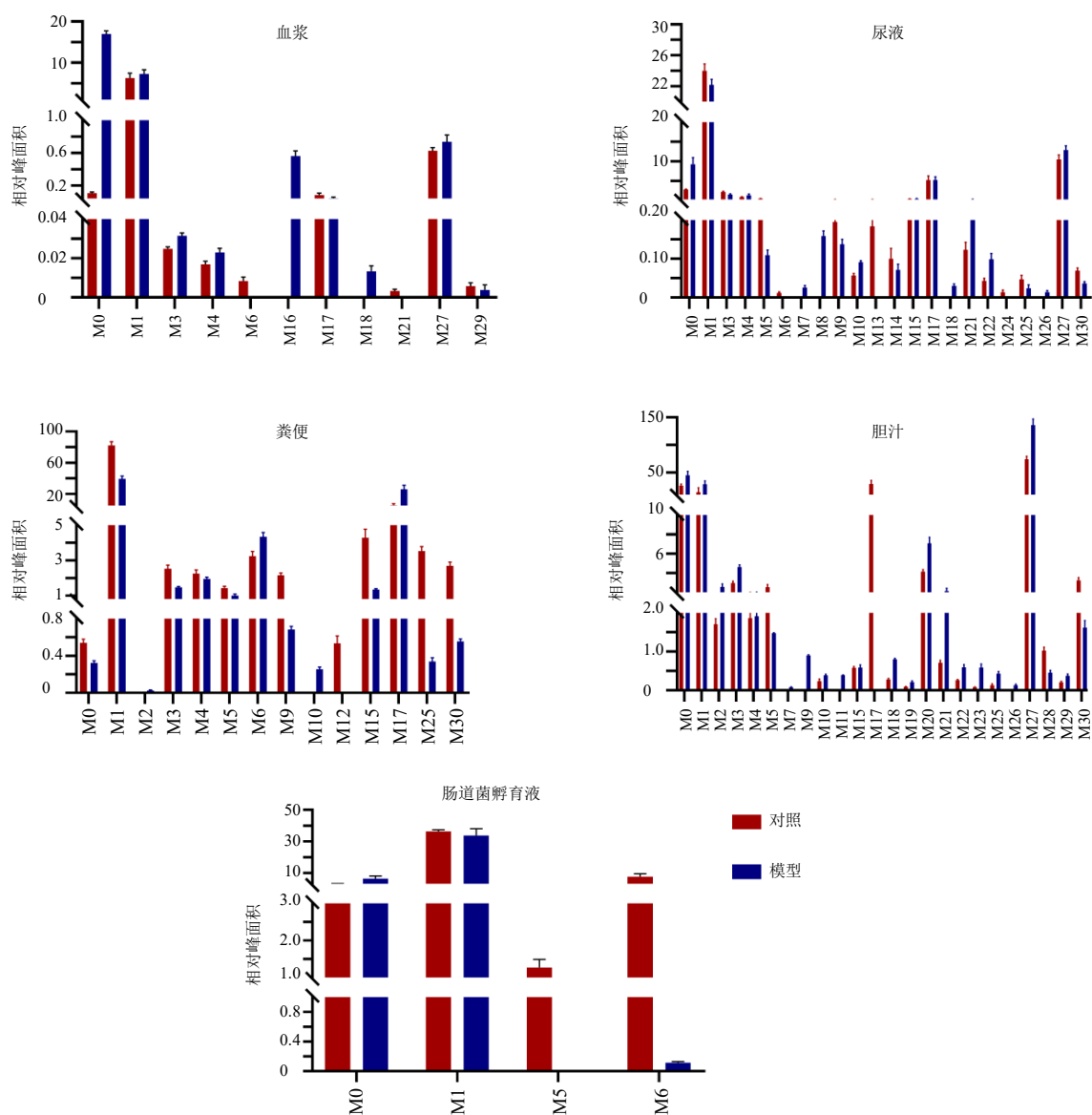


图 6 升麻素苷及代谢物在正常大鼠及牙周炎模型大鼠各生物样本中的相对峰面积的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Comparison of relative area of prim-O-glucosylcimifugin and metabolites in biological samples of normal and periodontitis rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

同生理状态下代谢物存在差异^[21]。如代谢物 **M6**、**M21** 仅在正常大鼠血浆中被检测而未在模型大鼠血浆中检测到，这可能是由于疾病状态下影响某些代谢酶进而影响了代谢物的吸收或加速了其代谢速率，使其浓度过低而未检测到。除上述代谢物的种类存在差异外，代谢物的含量在不同生理状态、不同生物样品中也存在显著差异。有报道称黄酮 C-葡萄糖苷的硫酸化主要经磺基转移酶 1 (sulfotransferase family 1A member 1, **SULT1**) 在体内催化^[22]，故推测升麻素苷的硫酸化产物 **M30** 在模型大鼠体内含量普遍低于正常大鼠是 **SULT1** 活

性发生改变所致。本研究结果再次证明，不同生理状态下，同种化合物产生的代谢产物种类、含量均存在差异，与文献报道^[23-24]一致。故利用病理模型动物进行的代谢研究，更贴近于临床实际用药。

研究结果显示，升麻素 (**M1**) 在正常大鼠及牙周炎模型大鼠各生物样品中含量均很高，说明升麻素苷在肠道菌及体内代谢酶的作用下易水解成苷元，与文献报道^[25-26]一致，这也充分解释了在防风中含量较高的升麻素苷在体内的浓度却远低于其苷元升麻素^[21]的原因。由于升麻素已被很多文献证明具有明确的抗炎作用^[27-28]，故推测升麻素苷主要是

通过水解生成的昔元升麻素在体内发挥抗炎作用。血浆、尿液、胆汁中除 **M1** 外, **M27** 的含量很高, 且不受病理状态的影响, 提示其主要通过昔元与葡萄糖醛酸的 II 相结合形式由胆汁及尿液排出体外。

本研究通过液质联用技术对比升麻素昔在正常大鼠及牙周炎模型大鼠体内外代谢轮廓的差异, 结果表明在不同病理状态下, 同种化合物产生的代谢物种类及含量存在显著差异, 证明采用模型动物进行代谢研究更符合临床实际用药。推测升麻素昔主要转化为其水解产物升麻素在体内发挥抗炎、抗菌作用, 极大地丰富了对升麻素昔代谢的认识, 可为进一步寻找与牙周炎相关药效物质提供参考。

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: 156.
- [2] 蒋勇, 钟淑欣, 何升华, 等. 基于网络药理学探究防风中生物活性成分及对类风湿关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5601-5618.
- [3] 杨波, 曹玲, 王喜军. 防风 CO₂超临界萃取物的药效学研究 [J]. 中医学报, 2006, 34(1): 14-15.
- [4] Kong X Y, Liu C F, Zhang C, *et al.* The suppressive effects of *Saposhnikovia divaricata* (Fangfeng) chromone extract on rheumatoid arthritis via inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen activated protein kinases activation on collagen-induced arthritis model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 842-850.
- [5] 李丽, 桂语歌, 时东方, 等. 防风中色原酮类化合物的抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2135-2137.
- [6] Ding J X, Guo Y H, Jiang X L, *et al.* Polysaccharides derived from *Saposhnikovia divaricata* may suppress breast cancer through activating macrophages [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 10749-10757.
- [7] 姜华, 胡立立, 王紫玮, 等. 静脉给药防风色原酮单体药理活性对比研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1575-1577.
- [8] 金灵璐, 朱尉东, 仲卫红, 等. 升麻素昔治疗膝关节炎的作用机制研究 [J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(12): 45-48.
- [9] Chen N, Wu Q C, Chi G F, *et al.* Prime-O-glucosylcimifugin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(2): 139-147.
- [10] 赵娟, 刘春芳, 林娜, 等. 防风色原酮提取物对大鼠胶原诱导性关节炎的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 52-56.
- [11] Fan X Y, Liu X C, Meng C F, *et al.* Metabolites study on 5-O-methylvisammioside *in vivo* and *in vitro* by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(12): 2107-2114.
- [12] 戴锦娜. 防风药效物质基础和相关成分药代动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [13] 何文娟. 齿痛消炎灵颗粒治疗牙周炎 60 例临床观察 [J]. 新中医, 2015, 47(10): 161-163.
- [14] 张帆, 马丽芳. 齿痛消炎灵颗粒联合浓替硝唑含漱液治疗慢性牙周炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 919-923.
- [15] 吴松, 张文娟, 崔茸茸, 等. 小檗碱对牙周炎大鼠的细胞因子水平、氧化应激和炎症性骨溶解的实验研究 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(5): 814-817.
- [16] 郭晓睿, 王燕铭, 孟培松, 等. Micro-CT 辅助观察大鼠牙周炎模型建立 [J]. 牡丹江医学院学报, 2020, 41(5): 13-15.
- [17] Takeguchi A, Miyazawa K, Sato T, *et al.* Effects of a β 2-adrenergic receptor blocker on experimental periodontitis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119593.
- [18] 罗媛, 杨武, 孙慧园, 等. 没食子酸和原儿茶酸在大鼠肠道菌群中的代谢研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(1): 43-47.
- [19] de Oliveira Lopes G, Aragão W A B, Bittencourt L O, *et al.* Imaging microstructural damage and alveolar bone loss in rats systemically exposed to methylmercury: First experimental evidence [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(10): 3707-3717.
- [20] 肖娟, 王莹, 王新宏, 等. 中药化学成分肠道菌群代谢的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 247-251.
- [21] Wu L, Han J, Nie J Y, *et al.* Alterations and correlations of gut microbiota and fecal metabolome characteristics in experimental periodontitis rats [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 865191.
- [22] Gonzales G B, Smagghe G, Grootaert C, *et al.* Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity [J]. *Drug Metab Rev*, 2015, 47(2): 175-190.
- [23] Zhou G S, Zhang Y L, Li Y, *et al.* The metabolism of a natural product mogroside V, in healthy and type 2 diabetic

- rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1079: 25-33.
- [24] Meng C F, Liu R N, Wang W, *et al*. Metabolic profiling comparison of isovitexin in normal and kidney stone model rats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(12): 2363-2379.
- [25] Li Y Y, Zhao L, Zhang H, *et al*. Comparative pharmacokinetics of prim-*O*-glucosylcimifugin and cimifugin by liquid chromatography-mass spectrometry after oral administration of *Radix Saposhnikoviae* extract, cimifugin monomer solution and prim-*O*-glucosylcimifugin monomer solution to rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(10): 1234-1240.
- [26] 李悦悦, 王慧, 陈俊, 等. RRLC-TOF/MS 鉴别防风血浆、尿液中成分及代谢产物 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(7): 760-763.
- [27] 江小燕, 王慧珠, 桂黎黎, 等. 升麻素通过调节 2 型细胞因子抑制过敏性炎症 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 28-30.
- [28] Han, B, Dai Y, Wu H Y, *et al*. Cimifugin inhibits inflammatory responses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 14(25): 409-417.

[责任编辑 李亚楠]