

基于特征分子网络技术分析远志寡糖酯在大鼠体内的代谢产物

魏 颖¹, 杨湘芬², 关庚明², 王子欣², 牛振宇², 宋青青^{2*}

1. 内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 系统阐明远志 *Polygala tenuifolia* 寡糖酯类化合物在大鼠体内的代谢产物, 为揭示远志药效物质基础提供依据。方法 采用 UPLC-QTOF-MS/MS 采集 ig 给药后大鼠血浆样本, 结合特征分子网络 (feature-based molecular networking, FBMN) 技术可视化聚类筛选并鉴定体内代谢物, 运用体外酶孵育和化学异构化合成相关对照品进行比对。结果 FBMN 技术有效地从质谱数据中聚类了结构相似的葡萄糖醛酸化及磺酸化代谢产物, 从大鼠血浆中共鉴定出 59 个代谢产物, 包括 14 个游离酚酸、21 个有机酸的磺酸化产物、17 个有机酸的葡萄糖醛酸化产物及 7 个其他类化合物, 未检出任何原型寡糖酯。远志寡糖酯在体内迅速水解生成如芥子酸、阿魏酸、丁香酸等多种酚酸, 这些酚酸作为前体, 进一步发生广泛的还原、去甲基化、脱羟基等 I 相和以磺酸化与葡萄糖醛酸化为主的 II 相代谢反应。结论 远志寡糖酯口服后以水解有机酸及其广泛的 II 相结合产物为主要入血形式, 采用 UPLC-QTOF-MS/MS 结合 FBMN 可以高效、全面的鉴定远志寡糖酯体内代谢物, 为揭示远志的体内药效物质提供了依据, 也为中药代谢产物的高效发现提供了有效方法。

关键词: 远志; 寡糖酯; 特征分子网络; UPLC-QTOF-MS/MS; 代谢产物; 代谢途径; 芥子酸; 阿魏酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)17-6701-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.005

Metabolic profiling of oligosaccharide esters of *Polygala tenuifolia* in rats based on feature-based molecular networking

WEI Ying¹, YANG Xiangfen², GUAN Gengming², WANG Zixin², NIU Zhenyu², SONG Qingqing²

1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To systematically characterize the metabolites of *polygala* oligosaccharide esters (PROEs) in rats, thereby providing evidence for elucidating the pharmacodynamic material basis of *Polygala tenuifolia*. **Method** Plasma samples from rats after oral administration of PROEs were analyzed using UPLC-QTOF-MS/MS. Feature-based molecular networking (FBMN) was employed to visually cluster and screen for potential metabolites. The identities of predicted metabolites were further confirmed by comparison with reference standards prepared *via in vitro* enzymatic incubation and chemical isomerization synthesis. **Results** FBMN effectively clustered structurally similar metabolites, such as glucuronidated and sulfated products, from the mass spectrometry data. A total of 59 metabolites were identified in rat plasma, including 14 free phenolic acids, 21 sulfated organic acids, 17 glucuronidated organic acids, and seven other compounds. No intact PROEs were detected. The metabolic pathway analysis revealed that PROEs were rapidly hydrolyzed *in vivo* to generate various phenolic acids (e.g., sinapic acid, ferulic acid, syringic acid), which subsequently underwent extensive phase I metabolism (reduction, demethylation, dehydroxylation) and predominantly phase II metabolism (sulfation and glucuronidation). **Conclusion** Following oral administration, PROEs enter the systemic circulation primarily as hydrolyzed organic acids and their extensive phase II conjugates. This study demonstrates that the combination of UPLC-Qtof-MS/MS and FBMN provides an efficient and comprehensive strategy for identifying the *in vivo* metabolites of PROEs. This approach offers a basis for revealing the active constituents of *P. tenuifolia* and serves as an effective method for elucidating the

收稿日期: 2025-12-20

基金项目: 内蒙古医科大学附属医院院级项目—重点实验室开放基金 (2023NYFYSYS007); 内蒙古医科大学致远人才项目善学 (ZY20242136)

作者简介: 魏 颖, 女, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事蒙药药效物质研究。E-mail: weimozhuo@163.com

*通信作者: 宋青青, 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药成分分析及中药质量评价研究。E-mail: sqq1991qq@163.com

metabolic profiles of traditional Chinese medicines.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; oligosaccharide ester; Feature-based molecular networking; UPLC-QTOF-MS/MS; metabolite; metabolic pathway; sinapic acid; ferulic acid

远志是远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 具有交通心肾、益智强志的功效, 多用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚等证。现代药理学研究表明, 远志提取物及成分具有显著的神经保护、抗痴呆和改善学习记忆功能等作用^[1]。其化学成分复杂, 主要包括呋酮、三萜皂苷和寡糖酯类。其中, 远志寡糖酯 (polygala oligosaccharide esters, PROEs) 被认为是远志发挥神经保护作用的药效物质基础之一, 在改善学习记忆障碍方面展现出显著生物活性^[2-3]。PROEs 通常以蔗糖为骨架, 以糖苷键连接葡萄糖形成寡糖, 通过酯键连接多种芳香酰基 (如芥子酰基、阿魏酰基、丁香酰基等), 形成结构多样且极性较大的糖酯类化合物, 迄今已从远志属植物中分离鉴定 150 余种寡糖酯类成分^[4]。然而, 此类成分口服生物利用度普遍较低^[5]。已有研究表明, PROEs 在胃肠道内易发生酯键水解, 生成相应游离酚酸类化合物, 这些酚酸可能进一步被吸收可发声 I 相和 II 相代谢转化, 其代谢产物可能是体内真正的作用形式^[6-7]。目前关于 PROEs 体内代谢的研究仍主要集中于 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯、远志蔗糖酯 A 和西伯利亚远志糖 A5 等少数单体成分及开心散等含远志的复方制剂^[5-9], 而针对 PROEs 系统性体内代谢研究较为有限。因此, 系统阐明 PROEs 在体内的完整代谢谱, 对于揭示其药效物质基础、理解其作用机制以及解释低暴露与高活性之间的矛盾具有重要意义。

中药代谢产物鉴定主要依赖液相色谱-高分辨质谱 (LC-HRMS/MS) 技术, 通过对体内代谢样品、空白生物样品与中药提取物的质谱数据进行比对并结合人工解析, 实现中药代谢产物的筛选与鉴定^[10]。然而, 中药成分复杂、代谢产物类型多样且含量差异显著, 经 LC-HRMS/MS 采集的数据量庞大, 也存在大量内源性代谢物的信号, 给中药代谢物的准确识别带来了难度。近年来, LC-HRMS/MS 结合分子网络技术 (molecular networking, MN) 为复杂体系化学成分的快速解析提供了新思路^[11-12]。该方法基于 MS/MS 谱图相似性对化合物进行聚类分析, 实现结构相关代谢物的可视化分类与系统解析。其

中, 特征分子网络 (feature-based molecular networking, FBMN) 进一步整合色谱保留时间与质谱碎片信息, 增强了对同分异构体的区分能力, 也提高了低丰度代谢物的识别效率和鉴定可靠性^[13]。

基于此, 本研究拟采用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术, 结合 FBMN 分析策略, 对 ig PROEs 后的大鼠血浆中的代谢产物进行系统解析。通过构建分子网络实现体内代谢物的快速筛选和归类; 并利用体外酶孵育 (磺酸化、葡萄糖醛酸化) 获得代谢产物, 对分子网络推测的关键代谢物进行辅助验证。本研究旨在全面分析 PROEs 的体内代谢产物, 阐明其主要代谢规律, 为深入理解远志的药效物质基础及其体内过程提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

岛津 LC-20AD 液相色谱系统 (日本岛津公司) 串联 TripleTOF 6600+ 质谱仪 (美国爱博才思公司), 赛默飞 UltiMate 3000 型液相色谱系统 (赛默飞世尔科技公司) 串联 QTRAP 5500 质谱仪 (美国爱博才思公司), METTLER TOLEDO MS150 型十万分之一电子天平 (美国梅特勒-赛多利斯公司)。

1.2 材料与试剂

质谱级乙腈和甲酸购自赛默飞世尔科技有限公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自默克公司。超纯水由 Milli-Q Integral 纯水系统制备。D101 大孔吸附树脂购自天津海光化学股份有限公司。Sephadex LH-20 购自安玛西亚生物技术公司 (瑞典乌普萨拉)。对照品西伯利亚远志糖 A6 (批号 PS000945) 购自成都普思生物科技股份有限公司, 远志蔗糖酯 B (批号 6059)、远志蔗糖酯 C (批号 8764) 及 3,6'-二芥子酰基蔗糖 (批号 8656) 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对羟基苯甲酸 (批号 D1308S45560)、对甲氧基苯甲酸 (批号 S17HB195056)、2,6-二甲氧基苯酚 (批号 A24GS146393)、对羟基肉桂酸 (批号 Y30A11C12277)、对羟基苯丙酸 (批号 X11A6X1)、间羟基苯丙酸 (批号 H10M8P31009)、4-羟基-3-甲氧基苯甲酸钠 (批号 A18IY223216)、二氢阿魏酸 (批号 JB272747)、丁香酸 (批号 D03HB203147)、

3,4-二甲氧基肉桂酸(批号 W22A7M13372)、3,4,5-三甲氧基肉桂酸(批号 N17D11M133078)购自上海源叶生物科技有限公司。3,4,5-三甲氧基苯酚(批号 P2391952)购自上海泰坦科技股份有限公司。3-羟基-4,5-二甲氧基苯甲酸(批号 KW23-1322449-1)上海凯为化学科技有限公司。芥子酸(批号 K2118058)、松柏醇(批号 G2326065)、阿魏酸(批号 C2218568)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

远志药材采自中国甘肃省,经北京中医药大学屠鹏飞教授鉴定为远志 *P. tenuifolia* Willd. 的干燥根,凭证标本保存于北京中医药大学中药学院标本室。

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,12~14 周龄;体质量(220 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-4-2023060702-0008)。

2 方法

2.1 远志寡糖酯对照品溶液的制备

取对照品西伯利亚远志糖 A6、远志蔗糖酯 B、远志蔗糖酯 C 及 3,6'-二芥子酰基蔗糖适量,分别用 50%甲醇水溶液溶解并配制成 10 mg/mL 的单一储备液。将各对照品储备液混合制得薄层色谱及含量测定用混合寡糖酯对照品溶液。

2.2 远志总寡糖酯的制备

取远志药材 2.73 kg,粉碎后以 10 倍量 50%乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。合并提取液,滤过、浓缩后重新溶于水中,上样至 D101 大孔吸附树脂柱(药材-树脂投料比 1:1),收集 30%乙醇洗脱部位,浓缩后以 50%甲醇溶解,进一步上样至经 50%甲醇预平衡的 Sephadex LH-20 凝胶柱,并以 50%甲醇为流动相进行分离。所得流分通过薄层色谱分析,流动相为二氯甲烷-甲醇-甲酸-水(4:1:0.04:0.04),并结合混合对照品对各流分进行监测,合并薄层色谱谱图一致的流分,共获得 19.02 g 寡糖酯类组分。取上述所得寡糖酯组分适量,以 50%甲醇溶解后,经 HPLC-MS/MS 分析,建立各化合物标准曲线,测定 4 个主要寡糖酯成分的含量:3,6'-二芥子酰基蔗糖为 11.87%、远志蔗糖酯 B 为 1.83%、远志蔗糖酯 C 为 0.84%、西伯利亚远志糖 A6 为 13.09%。

2.3 动物饲养和给药

大鼠在可控环境[(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 12 h 光/暗循

环]中饲养,自由摄食饮水适应 3 d 后,随机分为空白对照组($n=3$)与给药组($n=3$),并置于代谢笼中。PROEs 溶解于生理盐水,超声处理 30 min 制备成 500 mg/mL 给药溶液。禁食过夜后,给药组大鼠按 5 g/kg 剂量 ig 给予 PROEs,对照组给予等体积生理盐水。

2.4 生物样本采集和预处理

于给药后时间点(0.5、1、2、4、6、8、12 h)采集大鼠血液至肝素化采血管中,经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 500 r/min 离心 10 min 获得血浆。每组各时间点血浆样本分别取 50 μL 混合,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测。

取 100 μL 混合血浆,加入 3 倍体积乙腈沉淀蛋白,经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 15 min 后,转移 300 μL 上清液至洁净离心管,室温下氮气吹干。残留物用 50 μL 25%乙腈水溶液复溶,再次于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为待测样本。

2.5 UPLC-Qtof-MS/MS 分析

采用岛津 LC-20AD 液相色谱系统,ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm):以含 0.1%甲酸的水溶液(A)与乙腈(B)为流动相,体积流量 0.2 mL/min,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL ,自动进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱:0~5 min, 2%~10% B; 5~20 min, 10%~60% B; 20~23 min, 60%~100% B; 23~25 min, 100% B; 25~25.1 min, 100%~2% B; 25.1~30 min, 2% B。

TripleTOF 6600 $^{+}$ 质谱仪配备 ESI 离子源,采用负离子模式采集,全扫描质量范围 m/z 100~1 000。主要参数设置为:离子喷雾电压-4.5 kV,气帘气压力 241 kPa,雾化气压力 345 kPa,离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$ 。采用信息依赖采集模式获取二级质谱信息,碰撞能量(-35 $\pm$ 15) eV,扫描范围 m/z 50~1 000。

2.6 特征分子网络分析

经 UPLC-QTOF-MS/MS 采集所得 wiff2 格式的原始数据,通过 MSConvert (3.0 版)软件转换为 mzML 格式,导入 MS-DIAL (4.9 版)进行处理。输出文件(GnpsMgf 与 GnpsTable)上传至 GNPS 平台(<http://gnps.ucsd.edu>)进行分子网络分析。参数设置如下:最小余弦相似度 0.6,最小匹配碎片离子为 4, Precursor Ion Mass Tolerance 与 Fragment Ion Mass Tolerance 的误差值 0.02,其余参数保持默认。将 GNPS 分析结果导入 Cytoscape (3.10.0 版)进行可视化与聚类分析。节点以母离子质量标注,节点大小与母离子强度成正比,边粗细反映余弦相似

度。采用不同节点形状区分化合物类别, 节点颜色代表代谢反应类型, 见图 1。

2.7 代谢产物的验证

2.7.1 顺式异构体的合成

为获取有机酸类顺反异

构体的对照品以实现体内代谢物的精准区分, 参考文献中的光化学合成方法^[14], 将含有一定浓度反式-芥子酸、反式-3,4,5-三甲氧基肉桂酸的甲醇溶液置于紫外波长 356 nm 下, 照射 24 h, 得顺式-芥子酸、

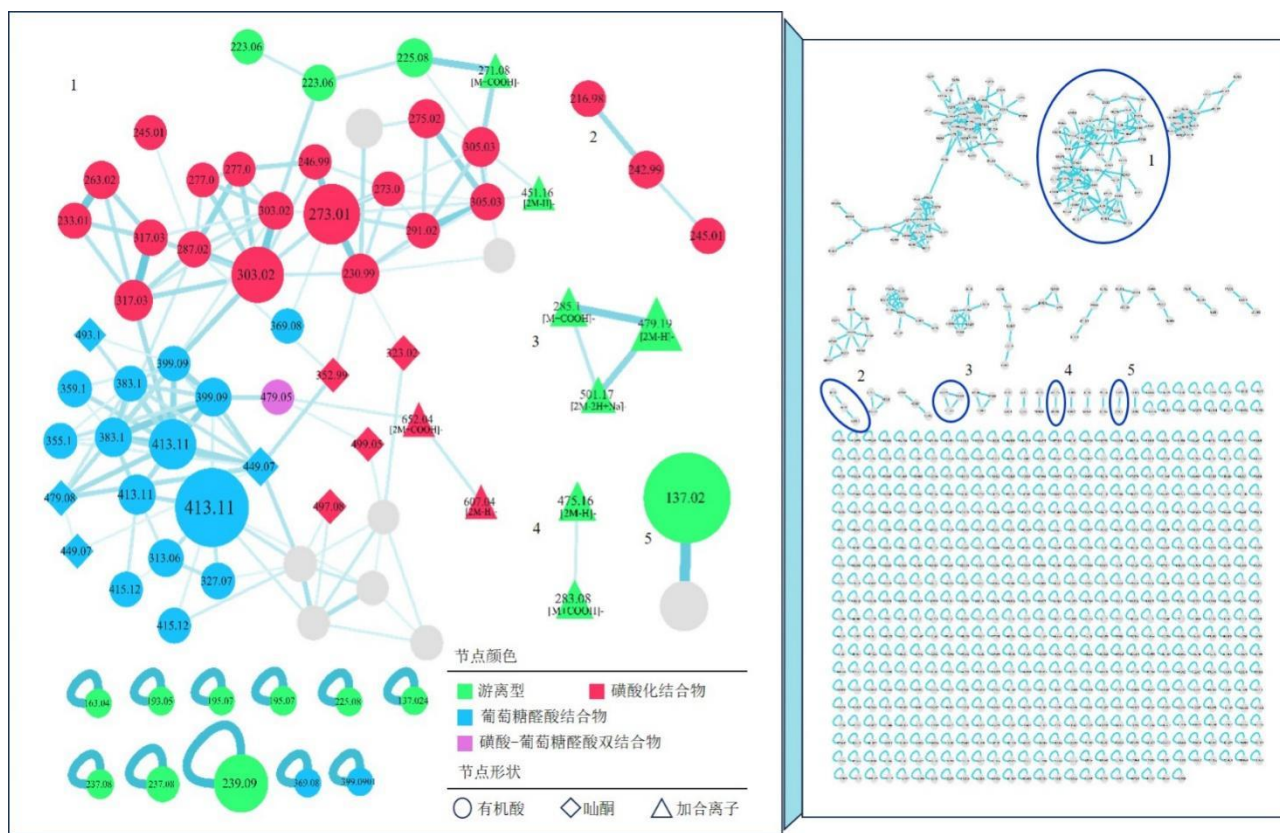


图 1 远志寡糖酯 ig 大鼠血浆的特征分子网络图

Fig. 1 Feature-based molecular networking of plasma from rats intragastrically administered with PROEs

顺式-3,4,5-三甲氧基肉桂酸。

2.7.2 二氢芥子酸及 3,4,5-三甲氧基苯丙酸的合成 为获取有机酸类还原产物的对照品以实现体内代谢物的结构确认, 参照本课题组前期报道的方法^[15], 将反式-芥子酸以及反式-3,4,5-三甲氧基肉桂酸分别溶于甲醇 (100 mmol/L), 加入 5% 钯碳 (Pd/C, 未还原型, 催化剂与底物质量比为 1:5), 在室温、常压氢气条件下搅拌反应过夜。反应结束后, 滤过除去催化剂, 所得滤液经减压浓缩至干, 得二氢芥子酸及 3,4,5-三甲氧基苯丙酸。

2.7.3 葡萄糖醛酸化和磷酸化孵育样品的制备 为确证体内代谢物结构鉴定的准确性, 本研究针对 PROEs 水解后可能产生的有机酸类代谢物, 开展了体外酶孵育实验, 以获取磷酸化及葡萄糖醛酸化产物的对照信息 (表 1)。所有反应体系的体积均为 100 μ L, 底物终浓度为 0.2 mmol/L, 在 37 $^{\circ}$ C 下振荡孵

育 120 min, 加入 100 μ L 冰乙腈终止反应, 充分涡旋 1 min 后于 4 $^{\circ}$ C 环境下 12 000 r/min 离心 10 min。其中, 100 μ L 葡萄糖醛酸化反应体系包含 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4)、10 mmol/L MgCl_2 、25 $\mu\text{g/mL}$ 丙甲菌素、10 mmol/L UDPGA 和 2.5 mg/mL SD 大鼠的肝 S9 匀浆。100 μ L 磷酸化反应体系包含 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4)、10 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L DTT、200 $\mu\text{mol/L}$ PAPS 和 0.5 mg/mL SD 大鼠肝微粒体^[16]。所有实验均重复 3 份, 同时设置对照组和空白组, 对照组以等量灭活肝微粒体代替有活性肝微粒体, 空白组以等量甲醇溶液代替对照品溶液, 平行孵育。

2.7.4 LC-MS/MS 分析 采用 UltiMate 3000 型液相色谱系统, 色谱条件同“2.5”项。QTRAP 5500 质谱仪配备 ESI 离子源, 采用负离子模式采集, 主要参数设置为: 离子喷雾电压 -4.5 kV, 气帘气压力 241

kPa, 雾化气压力 379 kPa, 辅助气压力 379 kPa, 离子源温度 500 °C。采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式对葡萄糖醛酸化和磺酸化孵

育所得到的代谢物进行监测, 各待测物母离子(MS^1)及子离子(MS^2)见表 2, 其中加粗碎片离子作为定量离子, 各离子对的碰撞能量均设置为-20 eV。

表 1 有机酸对照品及体外孵育产物

Table 1 Information on organic acid standards and *in vitro* incubation products

序号	化合物	分子式	相对分子质量	磺酸化产物	葡萄糖醛酸化产物
1	对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	C ₇ H ₆ O ₃	138	M1	M2
2	对甲氧基苯甲酸 (4-methoxybenzoic acid)	C ₈ H ₈ O ₃	152	M29	—
3	2,6-二甲氧基苯酚 (2,6-dimethoxyphenol)	C ₈ H ₁₀ O ₃	154	M6	—
4	对羟基肉桂酸 (4-hydroxycinnamic acid, 4-HCA)	C ₉ H ₈ O ₃	164	M12	—
5	对羟基苯丙酸 (4-hydroxyphenylpropionic acid, 4-PPA)	C ₉ H ₁₀ O ₃	166	M19	—
6	间羟基苯丙酸 (3-hydroxyphenylpropionic acid, 3-PPA)	C ₉ H ₁₀ O ₃	166	M22	—
7	4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)	C ₈ H ₈ O ₄	168	M4	—
8	松柏醇 (coniferyl alcohol)	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180	—	M10
9	3,4,5-三甲氧基苯酚 (3,4,5-trimethoxyphenol)	C ₉ H ₁₂ O ₄	184	M24	M15
10	阿魏酸 (ferulic acid, FA)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194	M18	M5, M20
11	二氢阿魏酸 (dihydroferulic acid)	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196	M13	—
12	丁香酸 (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid)	C ₉ H ₁₀ O ₅	198	M3	—
13	3-羟基-4,5-二甲氧基苯甲酸 (3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzoic acid)	C ₉ H ₁₀ O ₅	198	M16	—
14	3,4-二甲氧基肉桂酸 (3,4-dimethoxycinnamic acid)	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208	—	M40
15	芥子酸 (sinapic acid, SA)	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224	M11	M9, M21
16	二氢芥子酸 (dihydrosinapic acid)	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	226	M8	—
17	3,4,5-三甲氧基肉桂酸 (3,4,5-trimethoxycinnamic acid, TMCA)	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	238	—	M46
18	3,4,5-三甲氧基苯丙酸* (3,4,5-trimethoxyphenylpropionic acid)	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	240	—	M37

*通过氢化反应合成。—未得到体外孵育产物

*Prepared by hydrogenation. —*In vitro* incubation product not obtained.

表 2 远志寡糖酯在大鼠血浆中代谢产物的鉴定结果

Table 2 Identification of metabolites of PROEs in rat plasma

序号	t _R /min	MS ¹ (m/z)	分子式	误差 (×10 ⁻⁶)	MS ² (m/z)	化合物	FBMN 网络
M1	6.83	216.980 1 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₆ S	0.8	137.023 3 , 93.033 1	4-磺基苯甲酸*	簇 2
M2	6.94	313.056 7 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	0.1	137.024 6 , 113.026 2, 93.033 6, 85.029 1	4-葡萄糖醛酸基-苯甲酸*	簇 1
M3	7.17	277.001 6 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₈ S	-0.6	197.044 2 , 182.022 8, 167.000 8, 123.007 3	4-磺基-3,5-二甲氧基苯甲酸*	簇 1
M4	7.58	246.991 2 [M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₇ S	0.0	167.035 6 , 152.011 4, 108.020 6	4-磺基-3-甲氧基苯甲酸*	簇 1
M5	8.59	369.079 5 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	-1.4	193.048 3 , 178.026 5, 134.036 9	4-葡萄糖醛酸基-阿魏酸*	簇 1
M6	8.93	233.013 9 [M-H] ⁻	C ₈ H ₁₀ O ₆ S	1.6	153.055 8 , 138.038 2, 123.008 9, 95.012 4, 79.958 5	2,6-二甲氧基苯酚硫酸酯*	簇 1
M7	8.94	137.024 0 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	-7.0	93.037 1, 75.024 6, 65.039 3	对羟基苯甲酸*	单节点
M8	9.01	305.033 1 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S	2.1	225.077 3 , 165.054 8, 166.066 1, 151.039 8, 150.033 0, 138.030 4, 79.956 8	4-磺基-二氢芥子酸*	簇 1
M9	9.03	399.092 5 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	-0.7	223.061 1 , 208.039 3, 193.016 3, 165.021 2, 164.045 4, 149.018 4, 113.022 2, 85.032 8	4-葡萄糖醛酸基-芥子酸*	簇 1

表 2 (续)

序号	t_R/min	$MS^1 (m/z)$	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	$MS^2 (m/z)$	化合物	FBMN 网络
M10	9.10	355.102 8 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	0.7	179.072 7, 164.053 8, 161.060 4, 146.038 7, 113.023 5	松柏醇葡萄糖醛酸苷*	簇 1
M11	9.17	303.019 7 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₈ S	2.6	223.062 8, 208.038 6, 193.015 6, 179.073 4, 164.049 2, 163.040 2, 149.024 6, 135.043 8, 121.029 4	4-磺基-芥子酸*	簇 1
M12	9.32	242.997 0 [M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₆ S	1.7	163.039 4, 119.050 8, 96.959 5	4-磺基-肉桂酸*	簇 2
M13	9.35	275.024 0 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S	2.2	195.066 8, 151.074 6, 136.053 1, 135.044 1, 121.032 0, 108.021 6, 79.958 9	4-磺基-二氢阿魏酸*	簇 1
M14	9.35	291.015 4 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₈ S	0.8	211.063 3, 152.048 7, 151.041 0, 135.044 9, 124.017 4, 79.956 3	3-磺基-4-羟基-5-甲氧基苯丙酸	簇 1
M15	9.45	359.099 3 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	1.5	183.068 2, 168.042 9, 153.018 8, 137.994 6, 113.023 9, 85.027 6	3,4,5-三甲氧基苯酚葡萄糖醛酸苷*	簇 1
M16	9.48	277.003 6 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₈ S	-0.6	197.047 6, 182.023 6, 167.000 3, 123.009 5	3-磺基-4,5-二甲氧基苯甲酸*	簇 1
M17	9.53	479.048 0 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₄ S	0.2	399.101, 303.020 6, 223.062 4, 208.039 9, 164.045 8, 149.026 9, 134.036 9	芥子酸葡萄糖醛酸双结合物	簇 1
M18	9.59	273.009 0 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	5.3	193.052 0, 178.028 3, 149.061 7, 134.038 3, 133.030 4, 96.958 1, 79.957 5	4-磺基-阿魏酸*	簇 1
M19	9.61	245.011 7 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₆ S	-0.5	165.055 0, 121.067 3, 119.055 4	4-磺基-苯丙酸*	簇 2
M20	9.83	369.082 1 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	0.2	193.046 8, 134.037 3, 113.025 1, 85.030 0	9-葡萄糖醛酸基-阿魏酸*	单节点
M21	9.86	399.093 2 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	-0.2	164.046 3, 149.025 0	9-葡萄糖醛酸基-芥子酸*	单节点
M22	9.89	245.012 1 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₆ S	-0.5	165.055 7, 121.066 6	3-磺基-苯丙酸*	簇 1
M23	10.10	273.004 2 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	0.6	193.051 7, 178.029 3, 134.038 7, 133.031 6	9-磺基-阿魏酸	簇 1
M24	10.15	263.024 9 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ O ₇ S	2.3	247.999 1, 183.064 5, 168.043 1, 153.019 9, 137.996 5, 125.023 7, 110.001 0, 79.956 7	3,4,5-三甲氧基苯酚硫酸酯*	簇 1
M25	10.18	305.033 9 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	2.1	225.079 7, 166.065 6, 165.057 6, 151.039 7, 150.033 5, 149.061 8, 134.038 7, 123.045 5	9-磺基-二氢芥子酸	簇 1
M26	10.26	399.091 9 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₁	1.5	223.062 6, 208.038 8, 193.014 7, 164.049 9, 149.023 6, 113.022 1, 85.024 5	3-葡萄糖醛酸基-4,5-二甲氧基肉桂酸	簇 1
M27	10.81	303.019 3 [M-H] ⁻ 607.041 6 [2M-H] ⁻ 652.043 9 [2M+COOH] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₈ S	3.6	223.063 0, 208.037 8, 193.014 0, 165.020 2, 164.047 5, 163.041 6, 149.023 4, 135.045 8, 121.028 7, 93.034 6, 79.956 8	9-磺基-芥子酸	簇 1
M28	10.86	327.071 6 [M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	2.0	151.039 2, 113.026 1, 107.050 7, 85.027 7	7-葡萄糖醛酸基-4-甲氧基苯甲酸*	簇 1
M29	10.99	230.997 4 [M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₆ S	4.0	151.040 5, 136.015 7, 108.021 9, 92.025 4	7-磺基-4-甲氧基苯甲酸*	簇 1

表 2 (续)

序号	tr/min	MS ¹ (m/z)	分子式	误差 (×10 ⁻⁶)	MS ² (m/z)	化合物	FBMN 网络
M30	11.02	497.077 3 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂ S	-0.4	417.108 4, 321.045 5, 241.088 3, 175.024 0, 121.029 4, 113.025 5	dehydroxyl-6,7-O-methylenemangiferin sulfate	簇 1
M31	11.22	493.097 1 [M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃	-0.3	317.068 3, 302.044 7, 287.021 2, 113.023 4	dimethyl ether and methoxy norathyriol glucuronide	簇 1
M32	11.35	163.040 5 [M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	0.2	119.051 1, 93.033 9	对羟基肉桂酸 [#]	单节点
M33	11.49	195.066 3 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	2.1	136.052 3, 135.045 6	二氢阿魏酸 [#]	单节点
M34	11.50	225.077 2 [M-H] ⁻ 271.082 8 [M+COOH] ⁻ 451.163 2 [2M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	3.8	166.060 8, 165.054 6, 151.040 8, 150.030 0, 134.035 6, 123.045 4	二氢芥子酸 [#]	簇 1
M35	11.66	499.053 4 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃ S	-1.0	419.107 9, 323.019 5, 243.069 0, 228.048 6, 117.019 0, 113.025 9, 85.029 7	dehydroxyl-7-O-methylmangiferin sulfate	簇 1
M36	11.72	415.122 4 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	-2.1	239.076 7, 133.011 9, 113.023 6, 85.027 9	3,4,5-三甲氧基-9-葡萄糖醛酸基 苯丙酸异构体	簇 1
M37	11.90	415.122 1 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	0.5	239.090 8, 180.080 7, 175.026 1, 113.024 0, 85.028 4	3,4,5-三甲氧基-9-葡萄糖醛酸基苯丙酸 [*]	簇 1
M38	11.90	223.062 0 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	1.4	208.038 7, 193.014 4, 165.019 2, 164.047 6, 149.024 6, 135.043 7, 121.029 5, 93.035 1	反式-芥子酸 [#]	簇 1
M39	11.92	193.048 5 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-2.8	134.036 8	阿魏酸 [#]	单节点
M40	11.93	383.099 4 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	0.4	207.067 2, 192.044 0, 177.016 2, 133.029 6, 113.024 3, 85.026 8	3,4-二甲氧基-9-葡萄糖醛酸基 肉桂酸 [*]	簇 1
M41	12.00	225.077 4 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	1.6	165.052 3, 151.039 9, 150.033 4, 123.043 6, 121.028 0	二氢芥子酸异构体	单节点
M42	12.11	195.066 5 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	-0.9	136.053 9, 135.041 3	3-羟基-5-甲氧基苯丙酸	单节点
M43	12.14	413.108 6 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	2.6	237.078 5, 222.054 2, 207.031 5, 179.035 3, 175.024 0, 147.009 6, 113.022 2, 85.024 7	3,4,5-三甲氧基-9-葡萄糖醛酸基 肉桂酸	簇 1
M44	12.17	317.034 4 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₈ S	4.2	237.077 7, 222.053 6, 207.030 1, 179.035 5, 164.009 5, 151.040 5, 147.010 1, 119.014 0	反式-9-磺基-3,4,5-三甲氧基肉桂酸	簇 1
M45	12.24	383.099 1 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	1.9	207.064 8, 192.046 4, 177.018 1, 133.026 3, 113.023 8, 85.026 8	3,4-二甲氧基-9-葡萄糖醛酸基 肉桂酸异构体	簇 1
M46	12.26	413.109 4 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	2.8	237.081 8, 222.052 7, 207.029 8, 175.024 2, 133.015 9, 113.023 6, 85.029 3	反式-3,4,5-三甲氧基-9-葡萄糖醛酸基肉桂酸 [*]	簇 1
M47	12.38	413.109 2 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁	2.6	237.077 7, 222.053 1, 193.092 8, 178.065 5, 175.027 2, 133.066 8, 131.051 7, 113.024 6, 103.057 1, 85.027 9	顺式-3,4,5-三甲氧基-9-葡萄糖醛酸基肉桂酸	簇 1
M48	12.47	449.069 9 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	-0.8	273.040 7, 258.018 9	methyl ether norathyriol glucuronide	簇 1
M49	12.70	479.084 4 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	2.1	303.053 3, 288.028 5, 273.005 4, 245.010 0	methyl ether and methoxy norathyriol glucuronide	簇 1
M50	12.72	223.062 1 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	2.3	193.013 9, 121.026 4, 93.037 3	顺式-芥子酸 [#]	簇 1

表 2 (续)

序号	tr/min	MS ¹ (m/z)	分子式	误差 (×10 ⁻⁶)	MS ² (m/z)	化合物	FBMN 网络
M51	12.81	287.022 5 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S	2.8	207.069 3, 192.043 9, 177.019 9, 164.051 5, 149.034 7, 133.029 1	9-磺基-3,4-二甲氧基肉桂酸	簇 1
M52	12.84	449.073 0 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	2.8	273.043 5, 258.017 7, 230.028 1, 113.024 3, 85.039 3	methyl ether norathyriol glucuronide	簇 1
M53	12.87	317.034 4 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₈ S	3.0	237.078 6, 222.055 0, 207.032 2, 179.035 3, 147.011 3, 135.044 4, 79.954 8	顺式-9-磺基-3,4,5-三甲氧基肉桂酸	簇 1
M54	13.56	137.025 5 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	5.7	93.037 1, 75.024 6, 65.039 3	对羟基苯甲酸异构体	簇 5
M55	13.86	239.093 7 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	-7.0	179.069 2, 164.048 8, 152.046 8, 149.022 9, 137.020 6, 121.028 3	3,4,5-三甲氧基苯丙酸 [#]	簇 3
M56	14.38	237.076 8 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	3.2	103.053 9	反式-3,4,5-三甲氧基肉桂酸 [#]	单节点
M57	14.45	323.022 2 [M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S	0.6	243.066 8, 227.037 8, 200.049 1, 165.018 1	dehydroxy norathyriol sulfate	簇 1
M58	14.62	352.999 3 [M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₀ O ₉ S	1.5	273.046 5, 258.019 0, 230.021 3	methyl ether norathyriol sulfate	簇 1
M59	14.88	237.078 4 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₄ O ₆	6.1	133.065 5, 103.054 7	顺式-3,4,5-三甲氧基肉桂酸 [#]	簇 4

*与酶孵育产物比对鉴定；#与对照品以及合成产物比对鉴定；加粗碎片离子为定量离子。

*Compared with enzyme incubation products and synthesized products; #Compared with reference standards; Bold fragment ions are quantitative ions.

3 结果

3.1 特征分子网络图谱分析

本研究利用 FBMN 对远志寡糖酯给药大鼠后的血浆 UPLC-Qtof-MS/MS 数据进行分析, 见图 1。寡糖酯类化合物以蔗糖为共同母核, 通过糖苷键连接葡萄糖形成寡糖, 并与有机酸以酯键相连而成, 其中, 有机酸主要包括乙酸、苯甲酸和苯丙烯酸等, 详细类型见图 2。研究发现寡糖酯类成分在大鼠胃肠道内会发生水解, 继而发生 I 相和 II 相代谢反应。因此, 该类成分在体内水解会生成游离有机酸, 且存在其磺酸化或葡萄糖醛酸化产物^[7,9], 这类 II 相代谢产物的 MS² 图谱均表现为脱去磺基团(SO₃, 80)或脱去葡萄糖醛基团(C₆H₈O₆, 176)的特征中性碎片。根据该规律对分子簇进行分析, 发现 5 个分子簇中含有目标代谢物, 共 57 个节点, 另外通过推测预期代谢产物, 筛选出 11 个单节点的目标

代谢物。

对分子网络进行具体分析, 以簇 1 为例(图 3), 该簇将大部分磺酸化(红色点)和葡萄糖醛酸化(蓝色点)产物聚集起来。代谢物节点 M11(*m/z* 303.02)、M44(*m/z* 317.03)和 M51(*m/z* 287.02)两两连接, MS² 图谱显示三者均具有 SO₃(80)、CH₃(15)和 CO₂(44), 说明其为磺酸化的有机酸类化合物。M44 和 M51 与 M11 分别相差+14 和-16, 推测两者分别为 M11 的甲基化和去羟基化产物。节点 M9(*m/z* 399.09)、M40(*m/z* 383.10)和 M43(*m/z* 413.11)具有相似的规律, 均具有 C₆H₈O₆(176)、CH₃(15)和 CO₂(44), 为葡萄糖醛酸化的有机酸类化合物。根据相对分子质量差值和 MS² 碎片信息将 M40 和 M43 分别推测为 M9 的去羟基化和甲基化产物。另外, 68 个节点中包含了 9 个加合离子峰, 其中簇 3 和簇 4 均为加合离子。因此, 利用 FBMN 各相连接

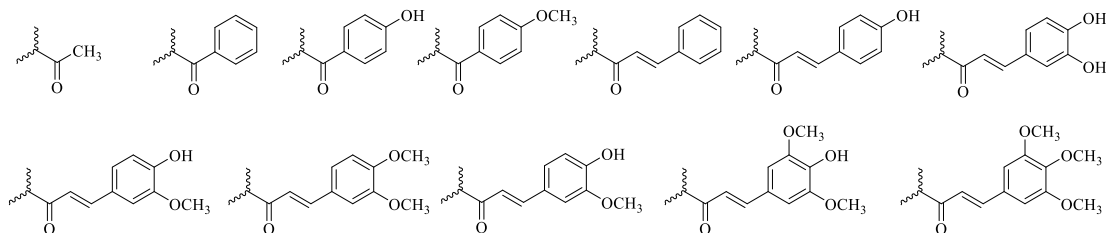


图 2 远志寡糖酯酰基类型

Fig. 2 Types of acyl groups in PROEs

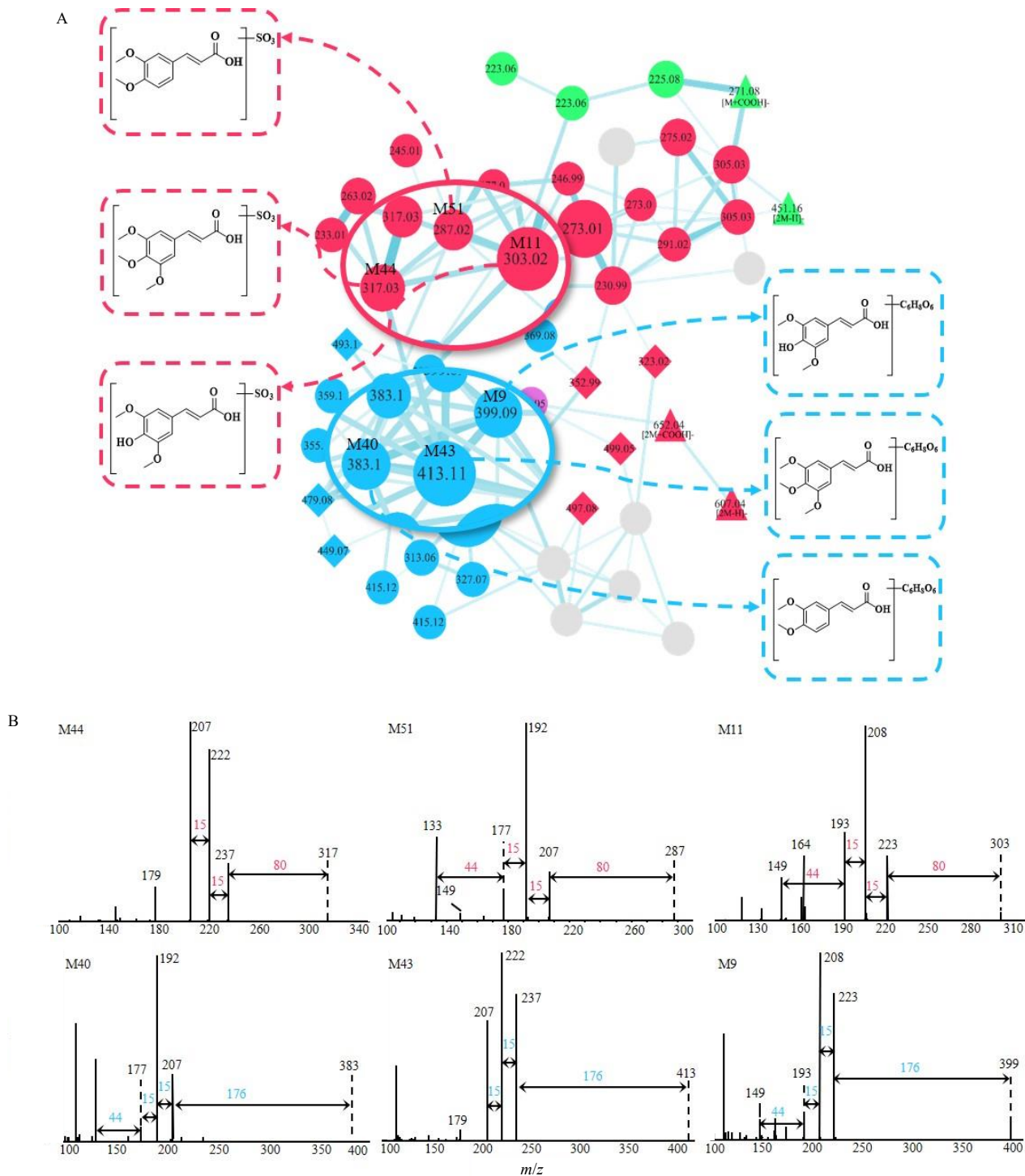


图 3 簇 1 网络图 (A) 和关键节点的 MS² 图谱 (B)

Fig. 3 Cluster 1 network diagram (A) and MS² spectra of key nodes (B)

点的相似性，可以从海量的质谱数据中快速识别代谢物。

3.2 远志寡糖酯在大鼠体内的代谢产物分析

与空白血浆色谱图比对，将分子网络中 68 个节点鉴定为 59 个代谢物，基峰离子流图见图 4。通

过分子网络、MS/MS 图谱及色谱保留行为，对血浆中 59 个代谢产物进行鉴定，共包含 21 个有机酸磺酸化产物、17 个有机酸葡萄糖醛酸化产物、14 个未结合有机酸和 7 个其他类化合物，具体鉴定结果见表 2。通过对有机酸对照品进行孵育，确定了 24 个

代谢产物 (M1~M5、M8、M9、M11~M13、M15、M16、M18~M21、M28、M37、M46)，比对结果见表 1 和图 5。

3.2.1 磺酸化代谢产物的鉴定 以 FBMN 网络中 M11 为核心节点，说明与其相连的磺酸化代谢产物的鉴定过程。M11，准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 303.019 7，预测分子式均为 $C_{11}H_{12}O_8S$ ， MS^2 图谱中主要的碎片离子为 m/z 223 $[M-H-SO_3]^-$ 、208 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 、193 $[M-H-SO_3-2CH_3]^-$ 、164 $[M-H-SO_3-CH_3-CO_2]^-$ 和 149 $[M-H-SO_3-2CH_3-CO_2]^-$ 。其中，中性丢失 80 表明结构中具有磺酸基取代，连续丢失 2 个甲基自由基表明结构中存在两个甲氧基取代，中性丢失 44 表明结构中存在羧基。根据远志寡糖酯结构中多样的酰基类型，此磺酸化代谢产物可能为芥子酰基水解后生成的芥子酸 ($C_{11}H_{12}O_5$ ，相对分子质量 224) 的 II 相代谢产物 (sulfo-sinapic acid)。M27 与 M11 为同分异构体，通过比对前期课题组对芥子酸 (sinapic acid, SA) 的体内代谢产物精准鉴定结果^[15]，且 C-9-OH 衍生物的洗脱顺序晚于 C-4-OH 衍生物^[17]，M27 与 M11 分别鉴定为 9-磺基-芥子酸和 4-磺基-芥子酸。另外，将 SA 与 PAPS 进行体外孵育，得到 SA 磺酸化产物。根据文献中羟基肉桂酸的体外孵育结果^[15-18]，磺酸化优先发生在苯环 C-3 或 C-4 的游离酚羟基上。因此，SA 的磺酸化优先发生在 4-OH，体外孵育磺酸化产物预测为 4-磺基-芥子酸，且该产

物与 M11 的保留时间匹配，并具有相同的 MS/MS 图谱。最终，M11 与 M27 分别鉴定为 4-磺基-芥子酸和 9-磺基-芥子酸。

M3 和 M16，其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 均为 m/z 277.00，预测分子式为 $C_9H_{10}O_8S$ ，与 M11 相差 26，推测与 SA 相比侧链丢失 1 个双键 ($-CH=CH-$)。 MS^2 图谱显示其主要的碎片离子为 m/z 197 $[M-H-SO_3]^-$ 、182 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 、167 $[M-H-SO_3-2CH_3]^-$ 和 123 $[M-H-SO_3-2CH_3-CO_2]^-$ 。其中，中性丢失 80 表明结构中具有磺酸基取代，而碎片 m/z 197.04 与寡糖酯酰基中丁香酰基的诊断离子对应，推测其可能为丁香酸的磺酸化产物。对丁香酸及其同分异构体 3-羟基-4,5-二甲氧基苯甲酸进行孵育 (图 5-B)，两者磺酸化产物分别与 M3 和 M16 的保留时间以及 MS/MS 图谱相匹配 (图 5-A)，因此分别将 M3 和 M16 准确鉴定为 4-磺基-3,5-二甲氧基苯甲酸和 3-磺基-4,5-二甲氧基苯甲酸。

M4 与 M11 和 M3 相连， MS 图谱显示其 $[M-H]^-$ 为 m/z 246.991 2，预测分子式为 $C_8H_8O_7S$ ，与 M3 相差 30 (CH_2O)。 MS^2 图谱中碎片离子包括 m/z 167 $[M-H-SO_3]^-$ 、152 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 和 108 $[M-H-SO_3-CH_3-CO_2]^-$ ，与 M3 裂解途径相似，推测其为丁香酸脱去甲氧基后的磺酸化产物。通过对照品 4-羟基-3-甲氧基苯甲酸体外孵育获得磺酸化产物，将 M4 鉴定为 4-磺基-3-甲氧基苯甲酸。M29 准分子离子峰为 m/z 230.997 4 $[M-H]^-$ ，分子式预测

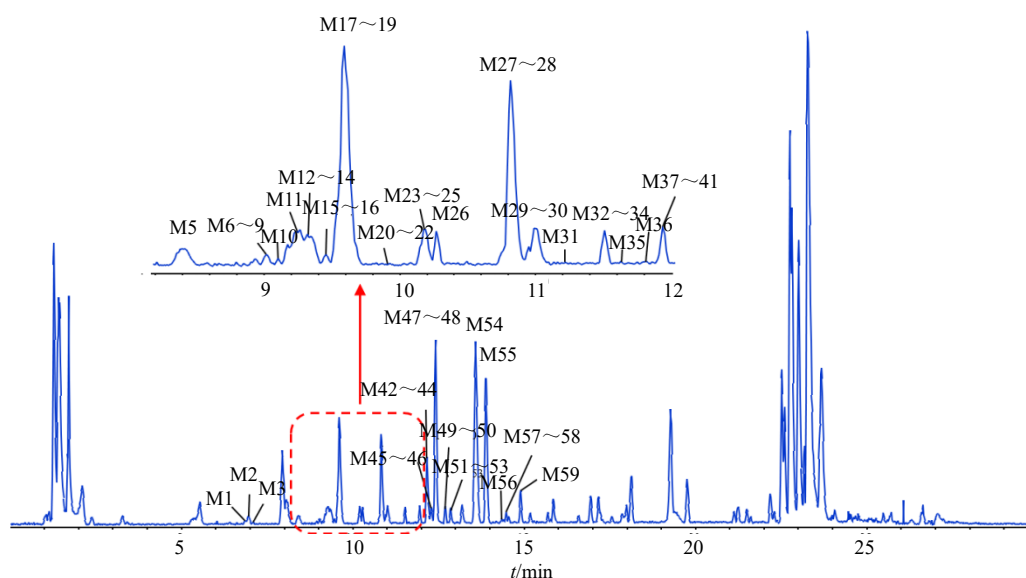


图 4 远志寡糖酯部位 ig 大鼠血浆的基峰离子流图

Fig. 4 Base peak ion chromatogram of plasma from rats intragastrically administered with PROEs

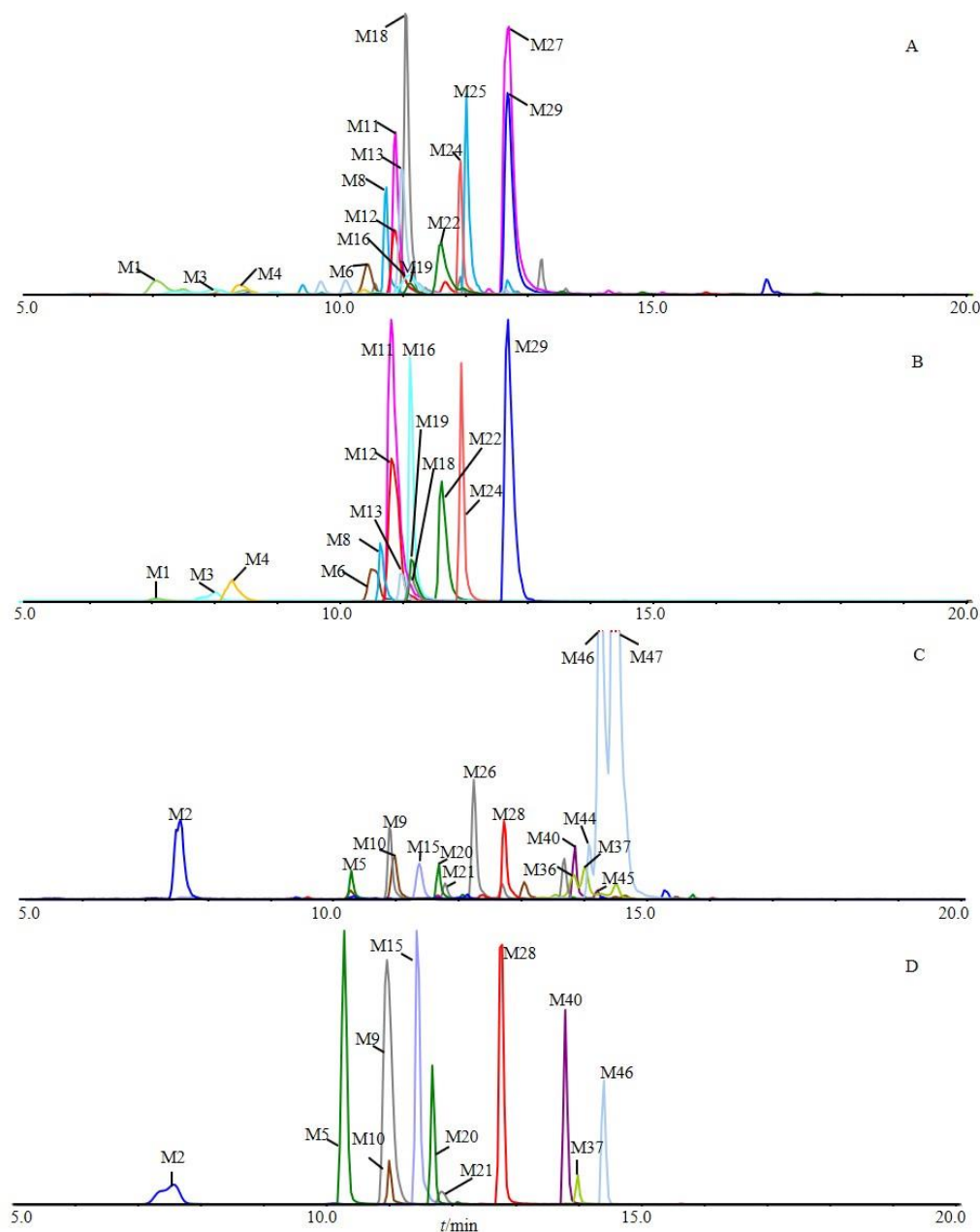


图 5 大鼠血浆样本 (A 和 C)、体外磺酸化孵育样本 (B) 和体外葡萄糖醛酸化孵育样本 (D) 的提取离子流图
Fig. 5 Extracted ion chromatograms of rat plasma samples (A and C), *in vitro* sulfation incubation samples (B), and *in vitro* glucuronidation incubation samples (D)

为 $C_8H_8O_6S$ ，相对分子质量较 M4 小 16，即少 1 个氧原子。MS² 碎片离子包括 m/z 151 $[M-H-SO_3]^-$ 和 136 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 。中性丢失 80 形成的碎片 m/z 151 与寡糖酯中对甲氧基苯甲酰基的诊断离子对应，推测 M29 为对甲氧基苯甲酸的磺酸化产物，即 7-磺基-4-甲氧基苯甲酸。

M18 和 M23 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 均为 m/z 273.00，与 M11 相连且相对分子质量相差 30 (CH_2O)。MS² 图谱显示其主要的碎片离子为 m/z

193 $[M-H-SO_3]^-$ 、178 $[M-H-SO_3-CH_3]^-$ 和 134 $[M-H-SO_3-CH_3-CO_2]^-$ 。80 Da 的中性丢失和 m/z 193 的诊断离子，表明其可能为寡糖酯中阿魏酰基水解生成的阿魏酸的磺酸化产物。体外孵育结果显示仅生成 1 个 FA 磺酸化产物，与 M18 保留时间和质谱信息相同，参考文献报道^[15-17]以及磺酸化芥子酸的鉴定结果，根据保留时间将 M18 和 M23 分别鉴定为 4-磺基-阿魏酸和 9-磺基-阿魏酸。M51 的准分子离子峰 m/z 287.02，比 M18 和 M23 多 14

(CH₂), 比 M11 少 16 (O), 推测为 3,4-二甲氧基肉桂酸的磺酸化产物, 因仅具有羧基 1 个结合位点, 故将其鉴定为 9-磺基-3,4-二甲氧基肉桂酸。M44 和 M53 准分子离子峰 [M-H]⁻ 均为 m/z 317.03, 比 M51 多 30 (CH₂O), 推测其为 3,4,5-三甲氧基肉桂酸的磺酸化产物, 该相对分子质量具有 2 个磺酸化代谢物节点, 根据保留时间, 推测 2 个节点分别是 TMCA 顺式和反式的磺酸化产物, 将 M44 和 M53 鉴定为反式-9-磺基-3,4,5-三甲氧基肉桂酸和顺式-9-磺基-3,4,5-三甲氧基肉桂酸。

M19 (簇 2) 和 M22 (簇 1) 准分子离子 [M-H]⁻ 均为 m/z 245.01, 具有碎片离子 m/z 165 [M-H-SO₃]⁻ 和 121 [M-H-SO₃-CO₂]⁻。其中, 酰基水解产物对羟基肉桂酸与碎片离子 m/z 165 与相差 2, 表明 M19 或 M22 可能为 4-HCA 还原后的磺酸化产物, 即对羟基苯丙酸 (4-hydroxyphenylpropionic acid, 4-PPA) 的磺酸化产物。对羟基苯丙酸经孵育得磺酸化产物和 M19 保留时间以及质谱信息一致, 将 M19 鉴定为 4-磺基-苯丙酸。有研究表明咖啡酸在体内发生脱羟基生成 3-羟基肉桂酸 (3-hydroxycinnamic acid, 3-HCA) [17], 与 4-HCA 互为同分异构体, 且阿魏酸 (ferulic acid, FA) 在体内会发生去甲基化和脱羟基生成 3-HCA [19], 因此 M22 可能为 3-HCA 还原后的磺酸化产物, 即 3-磺基-苯丙酸 (3-sulfo-phenylpropionic acid), 是 M19 的同分异构体, 通过体外孵育间羟基苯丙酸 (3-hydroxyphenylpropionic acid, 3-PPA) 得到其磺酸化产物, 从而验证了该结果。

3.2.2 葡萄糖醛酸化代谢产物的鉴定 以 FBMN 网络中 M9 为核心节点, 说明与其相连的葡萄糖醛酸化代谢产物的鉴定过程。M9、M21 和 M26, 其准分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 399.09, 预测分子式均为 C₁₇H₂₀O₁₁, M9 与 M26 相连, 主要碎片离子为 m/z 223 [M-H-C₆H₈O₆]⁻、208 [M-H-C₆H₈O₆-CH₃]⁻、193 [M-H-C₆H₈O₆-2CH₃]⁻、164 [M-H-C₆H₈O₆-CH₃-CO₂]⁻ 和 149 [M-H-C₆H₈O₆-2CH₃-CO₂]⁻, 由于 M21 峰度低, 其碎片离子数量少, 为网络中单节点。根据碎片离子归属, 表明 M9、M21 和 M26 为葡萄糖醛酸化产物, 且出现酰基中芥子酰基的诊断离子 m/z 223, 表明其可能为 SA 的葡萄糖醛酸化产物及异构体。文献研究表明, 体外葡萄糖醛酸化反应可在 HCA 的酚羟基和羧基上通过不同的 UGTs 转移酶生成 [19-21]。通过葡萄糖醛酸

化的体外孵育 SA, 结果显示, 生成的 2 个葡萄糖醛酸化产物保留时间、MS² 图谱与 M9 和 M21 相符合 (图 5-C、D), 且以上结果与前期课题组对 SA 代谢产物解析结果一致 [15]。因此, M9 和 M21 鉴定为 4-葡萄糖醛酸基-芥子酸和 9-葡萄糖醛酸基-芥子酸。对于 M26, 文献研究显示 TMCA 在体内会发生去甲基化同时生成 SA 和 3-羟基-4,5-三甲氧基肉桂酸, 因此推测 M26 为 3-葡萄糖醛酸基-4,5-二甲氧基肉桂酸, 但由于对照品的限制, 无法对其进行验证, 需要更多的结构信息辅助鉴定。M43、M46 和 M47 同样具有类似情况, 其准分子离子峰 [M-H]⁻ 均为 m/z 413.11, 被推测为 TMCA 的葡萄糖醛酸化产物, 仅 M46 与孵育结果匹配, 通过保留时间的顺序判断 M47 为 *cis*-TMCA 的结合产物, 但 M43 结构无法确定。以上现象, 可能是由于寡糖酯中其他酰基水解后, 在体内发生甲基化、异构化或羟基化等多种 I 相和 II 相代谢反应后相互转化生成的结果。

此外, 寡糖酯类化合物结构特征以及代谢特性, 该类化合物在体内发生酯键水解, 生成的有机酸单元部分以原型直接入血, 部分可发生还原反应后进入血液, 然而, 通过对 FBMN 簇的分析, 发现游离有机酸较少。因此, 以寡糖酯结构中游离有机酸分子离子峰 [M-H]⁻ 为检索条件, 在分子网络中进行检索, 筛选到 14 个游离有机酸, 其中 9 个代谢物为单节点。经对照品以及合成产物比对鉴定了其中 10 个游离有机酸 (M7、M32、M33、M34、M38、M39、M50、M55、M56、M59)。由于酚酸类化合物结构简单, 获得的碎片离子有限, 且多数代谢物在血浆中含量低, 导致其 MS² 图谱质量较差, 从而在 FBMN 中无法进行聚类。

4 讨论

随着对远志研究的不断深入, 寡糖酯类成分良好的神经保护活性受到广泛关注, 通过系统分析入血成分和体内代谢产物, 对于阐明其药效成分和进一步开发具有重要意义。前期有研究初步分析了远志药材及其总苷 (包括寡糖酯、吡啶苷、皂苷) 的体内代谢, 通过对照品比对发现了 TMCA、3,4,5-三甲氧基肉桂酸甲酯、对甲氧基肉桂酸、4-羟基-3,5-二甲氧基苯丙酸等代谢物, 但这些代谢物可能同时来源于寡糖酯与皂苷共同的代谢产物途径, 因此难以准确归属寡糖酯类成分的代谢形式 [6,9]。针对于单体成分 DISS 的研究较为深入, 有研究在 AD 模型小鼠上的肾脏、肝脏、大脑、血浆、尿液和粪便中鉴

定了包括原型在内的 20 种代谢物,涵盖了 DISS 的 I 相代谢产物及水解后有机酸的不同代谢形式,但并未对结构进行进一步验证^[6-7]。远志蔗糖酯 A 在肠道菌中的代谢研究,由于代谢物含量低,采用稳定同位素标记结合 UHPLC-TQ MS 靶向监测了 TMCA、对羟基苯甲酸和苯甲酸,并推测可能存在远志蔗糖酯 A 的还原产物以及 TMCA 的脱甲氧基产物,同样缺乏验证^[8]。由此可见,现有研究均虽提示 PROEs 在体内会发生水解生成相应的有机酸及其衍生物,但代谢物的结构鉴定尚不充分,且都集中于 I 相代谢产物,对 II 相代谢产物缺乏系统关注。

有机酸尤其是 PROEs 结构中常见的羟基肉桂酸类成分,其体内代谢规律已被广泛报道。该类成分口服后吸收迅速,在体内代谢速度较快且代谢途径广泛,绝大部分在肝脏、肠粘膜、肾脏中发生广泛的 II 相代谢,以磺酸化和葡萄糖醛酸化结合物为主要形式存在于血液循环中,且磺酸化产物数量通常多于葡萄糖醛酸化产物^[13,21]。当游离酚酸与糖基连接形成糖酯时,其在体内的循环时间延长,推测其原因在于糖酯形式可在体内经糖苷酶缓慢释放游离酚酸,从而延长有效成分暴露时间^[22]。此外,已有研究表明 II 相结合物并非简单无活性的失活或解毒产物,部分结合物可在靶组织中经内源性 β -葡萄糖醛酸酶或硫酸酯酶水解,再生为游离酚酸发挥药理作用,也有的 II 相结合物本身就具有生物活性^[22-24]。因此,II 相结合物很可能是体内的真实存在形式,而非单纯的失活或解毒产物。

本研究利用 UPLC-QTOF-MS/MS 技术表征远志寡糖酯类成分在大鼠体内的代谢产物,建立基于 MS-DIAL 的 FBMN 可视化代谢产物网络图谱,系统鉴定了 21 个有机酸磺酸化产物、17 个有机酸葡萄糖醛酸化产物以及 14 个游离有机酸,明确了 PROEs 体内入血形式主要为水解后有机酸的 II 相结合产物。这一发现补充了以往研究对 II 相结合物系统鉴定的空白,表明了寡糖酯类成分体内代谢以水解生成的酚酸类化合物为前体,进一步发生广泛的 I 相和 II 相代谢转化,且磺酸化和葡萄糖醛酸化结合物为体内主要存在形式,原型成分没有检出^[21,23]。因此,本研究提示寡糖酯可能作为前体实现酚酸的靶向递送,游离酚酸为直接活性形式,而酚酸的 II 相结合物可在靶组织中去结合再生为游离酚酸,从而延长有效成分的作用时间。为 PROEs 药效物质基础的深入阐明提供了新的研究视角。II

相代谢的底物选择性及区域选择性进一步丰富了代谢产物的组成。本研究中磺酸化产物(21 个)略多于葡萄糖醛酸化产物(17 个),这可能与酚酸类成分的结构特征有关。酚羟基是 SULT 酶的优选底物,而 UGT 酶更倾向于羧基或醇羟基的糖苷化^[17-18]。由于酚酸结构中常存在多个酚羟基以及羧基, SULT 和 UGT 不同亚型在体内协同作用,同一底物会产生多个位置异构体(如芥子酸 4-位和 9-位磺酸化产物)。这类同分异构体二级质谱碎片几乎完全一致,仅保留时间存在差异,因此难以直接采用 GNPS 在线数据库匹配鉴定,也无法仅凭质谱信息进行准确的结构归属,针对这一问题,本研究利用易得的有机酸对照品进行化学合成(顺反异构化、氢化反应)以及体外酶孵育等反应,对鉴定的代谢物进行验证,有效提高了结构鉴定的可靠性。此外,本研究所用 PROEs 经大孔树脂及葡聚糖凝胶柱色谱纯化,仍残留少量极性相似的吡啶类成分,根据分子式以及 MS² 图谱,将簇 1 中少量边缘节点鉴定为吡啶类化合物的代谢产物(M30、M31、M35、M48、M49、M57 和 M58)。但因对照品缺乏,以及体外酶孵育受限于酶的种类和反应条件,本研究中部分同分异构体代谢产物尚无法完全验证,后续研究可通过胃肠液或肠道菌群等体外孵育等方式进一步补充验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhao X, Cui Y L, Wu P, et al. *Polygalae Radix*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics [J]. *Fitoterapia*, 2020, 147: 104759.
- [2] 桑旭星, 杨依, 方芳. 远志寡糖酯类化合物药理活性研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(18): 1576-1579.
- [3] 杨学东, 张丽杰, 梁波, 等. 远志科植物中的寡糖酯类成分 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 954-958.
- [4] Chen X Y, Wang R F, Liu B. An update on oligosaccharides and their esters from traditional Chinese medicines: Chemical structures and biological activities [J]. *Evidence-Based Complementary Altern Med*, 2015, 2015: 512675.
- [5] Xu B X, Qu C C, Zheng W H, et al. UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of *Radix Polygalae* glycolipids and organic acids in rat plasma and application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1100: 165-173.
- [6] 梁键谋. 远志总苷及 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯在大鼠体内代谢的初步研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [7] Yuan J Q, Wang H, Wang Y T, et al. Rapid identification

- of 3,6'-disinapoyl sucrose metabolites in Alzheimer's disease model mice using UHPLC-orbitrap mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 114.
- [8] Zhao N N, Zhao T T, Fan M L, *et al.* Stable isotope labeling derivatization combined with multiple-mass spectrometry technologies to monitor metabolites of tenuifolioside A incubated with intestinal bacteria incubation model [J]. *Talanta*, 2021, 224: 121791.
- [9] 汪娜, Hassan AHMAD, 贾永明, 等. UHPLC-MS 法鉴定大鼠灌服开心散后血中远志糖酯类化合物及其代谢产物 [J]. *药学学报*, 2017, 52(10): 1592-1598.
- [10] 乔雪, 张亚群, 果德安, 等. 中药药效物质研究方法及其进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(6): 908-919.
- [11] 孙嘉文, 李广涛, 陈斌, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合分子网络技术的浙江红山茶花成分分析及其抗炎活性评价 [J]. *中草药*, 2025, 56(12): 4187-4205.
- [12] Yu J S, Nothias L F, Wang M X, *et al.* Tandem mass spectrometry molecular networking as a powerful and efficient tool for drug metabolism studies [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(2): 1456-1464.
- [13] Hakeem Said I, Truex J D, Heidorn C, *et al.* LC-MS/MS based molecular networking approach for the identification of cocoa phenolic metabolites in human urine [J]. *Food Res Int*, 2020, 132: 109119.
- [14] Salum M L, Robles C J, Erra-Balsells R. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: One-pot synthesis-isolation of Z-cinnamic acids [J]. *Org Lett*, 2010, 12(21): 4808-4811.
- [15] Yang X F, Shi J J, Li H, *et al.* Characterization of the metabolic fate of sinapic acid in rats [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(26): 6511-6523.
- [16] Wong C C, Meinel W, Glatt H R, *et al.* *In vitro* and *in vivo* conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(11): 1060-1068.
- [17] Fumeaux R, Menozzi-Smarrito C, Stalmach A, *et al.* First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8(22): 5199.
- [18] Wu B J, Basu S, Meng S N, *et al.* Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: Insights into the structural basis [J]. *Curr Drug Metab*, 2011, 12(9): 900-916.
- [19] 潘倩, 李玮, 杨阳, 等. 阿魏酸人体内代谢产物定性分析 [J]. *质谱学报*, 2025, 46(3): 265-276.
- [20] Li X J, Shang L, Wu Y H, *et al.* Identification of the human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of the phytochemical ferulic acid [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(4): 341-350.
- [21] Calani L, Ounnas F, Salen P, *et al.* Bioavailability and metabolism of hydroxycinnamates in rats fed with durum wheat aleurone fractions [J]. *Food Funct*, 2014, 5(8): 1738-1746.
- [22] Zhao Z H, Moghadasian M H. Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Phytochem Rev*, 2010, 9(1): 133-145.
- [23] Ding Y, Peng M, Zhang T, *et al.* Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase: A review of bio-analytical methods [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(10): 1280-1295.
- [24] Patel K R, Andreadi C, Britton R G, *et al.* Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(205): e3005870.

[责任编辑 王文倩]