

· 药物代谢 ·

## 羊耳菊提取物在大鼠粪便中的代谢产物分析

巩仔鹏, 吴林霖, 伍萍, 李梅, 侯靖宇, 陈亭亭, 兰燕宇, 李勇军, 李月婷, 王永林\*

(贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院, 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:研究羊耳菊提取物给药后在大鼠粪便中的代谢产物,为该药材的后续研究与开发提供参考。方法:采用超高效液相色谱-三重四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)检测大鼠口服羊耳菊提取物后粪便中的代谢产物,每次给药剂量  $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。使用 RRHD Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液梯度洗脱,选择电喷雾离子源,负离子模式进行扫描,准确质量测定采用甲酸钠校正标准液,采用 Metabolite Detect (micrOTOF 2.3)等软件进行数据处理,鉴定代谢产物的化学结构。结果:在大鼠粪便中检测到原型 M8(1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸),M1~M4(二氢单咖啡酰基奎宁酸异构化产物),M5(二氢咖啡酸的硫酸酯化产物),M6~M7(单咖啡酰基奎宁酸的甲基化产物)等 22 个代谢产物。结论:羊耳菊提取物给药后,咖啡酰基奎宁酸类活性成分在大鼠粪便中的代谢途径以甲基化、还原反应为主。

**[关键词]** 羊耳菊; 提取物; 咖啡酰基奎宁酸; 代谢产物; 超高效液相色谱-三重四级杆飞行时间质谱; 绿原酸

**[中图分类号]** R969.1; R945; R285.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0100-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240100

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1005.006.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-26 10:05

### Analysis of Metabolites of *Inula cappa* Extract in Rat Feces

GONG Zi-peng, WU Lin-lin, WU Ping, LI Mei, HOU Jing-yu, CHEN Ting-ting, LAN Yan-yu,

LI Yong-jun, LI Yue-ting, WANG Yong-lin\*

(National Engineering Research Center of Miao's Medicines, School of Pharmacy, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the metabolites of *Inula cappa* extract in rat feces after oral administration. **Method:** UPLC-Q-TOF-MS/MS was used for analyzing the metabolites of *I. cappa* extract in rat feces after oral administration at a dose of  $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Separation of the metabolites was performed on an RRHD Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) with the mobile phase of 0.1% formic acid-0.1% formic acid acetonitrile solution for gradient elution, and the samples were treated by electron spray negative ionization mode (ESI<sup>-</sup>). Then the data were processed with metabolite tools softwares to identify the chemical structure of

**[收稿日期]** 20170527(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360680);贵州省优秀青年科技人才培养项目(黔科合人字(2015)11号);贵州省教育厅民族药与中药开发应用产学研基地建设项目(黔科合 KY 字[2013]122)

**[第一作者]** 巩仔鹏,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药代动力学研究, Tel:0851-86908468, E-mail:gzp4012607@126.com

**[通讯作者]** \*王永林,教授,博士生导师,从事中药药效物质基础及中药药代动力学研究, Tel:0851-86908468, E-mail:gywyl@gmc.edu.cn

metabolites. **Result:** M8 (1, 3-*O*-dicaffeoylquinic acid) and 21 other metabolites were identified, including M1-M4 (hydrogenation of caffeoylquinic acid), M5 (sulfation of dihydrocaffeic acid), M6-M7 (methylation of caffeoylquinic acid) and so on. **Conclusion:** Hydrogenation and methylation are the major metabolic pathways of *I. cappa* extract in rat feces.

[ **Key words** ] *Inula cappa*; extract; caffeoylquinic acids; metabolites; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chlorogenic acid

羊耳菊为贵州道地药材,是贵州苗族、侗族等少数民族常用药物,目前以羊耳菊为主药研发的双羊喉痹通颗粒、鼻康片等制剂疗效显著。现代药理学研究表明,羊耳菊药材及其相关制剂有显著的抗菌、抗病毒等活性<sup>[1-2]</sup>。前期化学成分研究结果表明,羊耳菊中主要含有咖啡酰基奎宁酸酯类化合物<sup>[3]</sup>,此类化合物有突出的抗菌、抗炎、清除自由基及抗病毒等活性<sup>[4-6]</sup>,故推测这类成分可能是羊耳菊的活性成分。

本实验室前期进行了羊耳菊药材的口服药代动力学研究,在血浆中几乎检测不到咖啡酰基奎宁酸类成分的原型,相关文献表明这类成分的生物利用度低<sup>[7]</sup>。究其原因,一方面与该类化合物本身理化性质有关;另一方面与其在肠道及肝脏的代谢等也有很大关系,因此,研究羊耳菊药材中主要活性成分在体内的代谢将有助于了解其生物利用度低的原因。同时,药物在体内的代谢转化关系到药物的药理及毒理活性,研究羊耳菊药材中主要活性成分在体内的代谢产物,对于阐明羊耳菊药材的作用机制具有重要意义。本实验采用超高压液相色谱-三重四极杆飞行时间质谱技术分析口服羊耳菊提取物后粪便中可能的代谢产物,以了解该药材主要活性成分可能的体内代谢过程,为该药材的进一步研究与开发提供参考。

## 1 材料

1290 Infinity 型超高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司),micrOTOF-Q II 型电喷雾-四极杆-飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),EL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

羊耳菊药材购自贵州龙里县,经贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为菊科植物羊耳菊 *Inula cappa* 的干燥全草;新绿原酸,隐绿原酸,1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-*O*-二咖啡酰

基奎宁酸对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号分别为 X20-20141012, Y58-20141012, 1384-101215, 1384-101215, S34-110121, 1384-101215, 纯度均 $\geq 98\%$ );绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110753-201415, 纯度均 $\geq 98\%$ ),水为屈臣氏蒸馏水,甲酸、乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雌雄兼用,体重(250 $\pm$ 20) g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(渝)2015-0001。经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准编号 1602003。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu$ m),流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1 min, 5%~10% A; 1~13 min, 10%~28% A; 13~16 min, 28%~100% A; 16~17 min, 100% A; 17~18 min, 100%~5% A),柱温设置 40 $^{\circ}$ C,流速设定 0.3 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,进样量 5  $\mu$ L。

**2.2 质谱条件** 电喷雾离子源,扫描方式为负离子扫描(ESI<sup>-</sup>,  $m/z$  50~1 000),毛细管电压 3.5 kV,离子源温度 200 $^{\circ}$ C,雾化气(N<sub>2</sub>)压力 1.2 MPa,干燥气温度 200 $^{\circ}$ C,气体体积流量 6.0 L $\cdot$ min<sup>-1</sup>,准确质量测定采用甲酸钠校正标准液,校正模式选用 enhanced quadratic,数据分析采用 Data Analysis 软件和 Metabolite Tools<sup>®</sup> 等。

**2.3 羊耳菊提取物的制备** 取羊耳菊药材 12 kg,充分混匀,加 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次滤液,减压浓缩,回收乙醇,得浓缩液 12 L。该浓缩液过 D101 型大孔树脂吸附(径高比 1:4),加水洗脱至流出液呈无色,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,得浸膏,微波真空干燥,即得,计算得膏率 7% (参考文献[8]测得 1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,新绿原酸,绿原酸和隐绿原酸的质量分数分别为 2.01%, 3.82%, 3.56%, 3.87%, 2.17%, 0.99%, 3.36%), -4 $^{\circ}$ C 条

件干燥保存,备用。

**2.4 供试液的制备** 取羊耳菊提取物粉末(过 80 目筛)1 g,精密称定,加入 50% 甲醇 10 mL,超声 10 min,于 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,即得。

**2.5 对照品溶液的制备** 分别精密称取绿原酸等 7 种对照品于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声使溶解,定容,得绿原酸,新绿原酸,隐绿原酸,1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸质量浓度分别为 0.740, 1.032, 1.026, 1.064, 1.032, 1.194, 1.204 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,置冰箱 -20 °C 保存,备用。

**2.6 粪便样品的收集** 取健康 SD 大鼠 6 只,雌雄各半,饲养于代谢笼中,给药前禁食 12 h,自由饮水。口服给予羊耳菊提取物,每次按 100 g·kg<sup>-1</sup> (以生药量计)连续灌胃 3 d,每天 2 次,分别收集 0,12,24,36,48,72 h 时间段的粪便。空白组和给药组大鼠粪便样品分别置于 37 °C 真空干燥箱干燥,干燥后混匀,分别置于研钵中碾磨至粉末状,过 80 目筛,于 -20 °C 保存,备用。

**2.7 粪便样品的前处理** 称取粪便粉末约 0.5 g,用生理盐水制成 25% 匀浆,涡旋混合 3 min,超声处

理 5 min,6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上层匀浆液 500 μL,加入正丁醇 1 mL,涡混 3 min,超声 5 min,离心 (15 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min,下同),上清液于 37 °C 用 N<sub>2</sub> 吹干,残渣用甲醇 1 mL 溶解,涡旋混合 3 min,超声 5 min,离心,上清液于 37 °C 用 N<sub>2</sub> 吹干,残渣用 50% 甲醇 400 μL 溶解,涡旋混合 3 min,超声 5 min,离心,取上清液进样分析。

**2.8 UPLC-Q-TOF-MS/MS 色谱采集** 运用 Metabolite Predict 软件对单咖啡酰基奎宁酸类(绿原酸,新绿原酸,隐绿原酸)和二咖啡酰基奎宁酸类(1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸)等成分进行代谢产物预测,将生成的代谢产物的 Masslist 导入 Metabolite Detect(micrOTOF 2.3) 软件,结合对照品、质谱碎片信息和相关文献得到其可能的代谢产物,推测羊耳菊提取物中各成分在体内可能的代谢途径,见图 1。结果显示各成分能在 ESI<sup>-</sup> 下得到较好的响应信号。

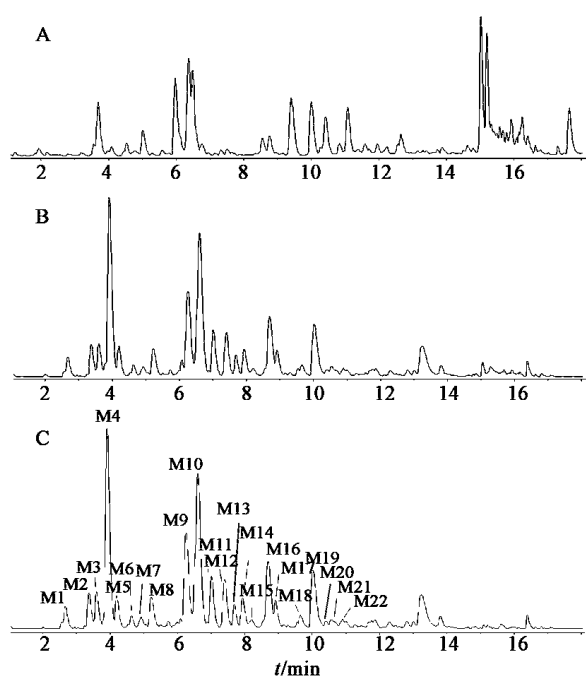
**2.9 代谢产物的鉴定** 由 Metabolite Detect (micrOTOF 2.3) 软件对差异图谱及响应的质谱碎片,并结合相关文献<sup>[9-10]</sup>,对羊耳菊提取物中部分代谢产物进行分析,见表 1。

表 1 羊耳菊提取物在粪便中主要代谢产物的鉴定

Table 1 Identification of metabolites of *Inula cappa* extract in rat feces

编号	<i>t</i> <sub>R</sub> /min	主要碎片离子 <i>m/z</i>	误差/ppm	分子式	推测代谢方式
M1	2.7	355.103 8	-1.1	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	二氢单咖啡酰基奎宁酸异构化
M2	3.4	355.104 5	-3.0	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	二氢单咖啡酰基奎宁酸异构化
M3	3.8	355.104 1	-1.8	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	二氢单咖啡酰基奎宁酸异构化
M4	3.9	355.108 4	0.4	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	二氢单咖啡酰基奎宁酸异构化
M5	4.2	261.006 5	3.5	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S	二氢咖啡酸的硫酸酯化
M6	4.6	367.103 3	2.5	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	单咖啡酰基奎宁酸甲基化
M7	4.9	367.102 8	0.6	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	单咖啡酰基奎宁酸甲基化
M8	5.2	515.119 5	-0.1	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	1,3- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸原型
M9	6.3	367.102 4	3.0	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	单咖啡酰基奎宁酸甲基化
M10	6.6	515.118 3	2.3	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	二咖啡酰基奎宁酸异构化
M11	7.0	543.151 2	2.7	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	二咖啡酰基奎宁酸二甲甲基化
M12	7.4	519.150 2	1.2	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M13	7.7	519.150 1	1.1	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M14	7.9	519.149 8	1.8	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M15	8.2	519.148 7	4.0	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M16	8.6	519.150 4	0.8	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M17	8.8	519.149 4	-2.1	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M18	9.7	517.134 1	4.0	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	二氢二咖啡酰基奎宁酸
M19	10.0	519.149 7	2.2	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	四氢二咖啡酰基奎宁酸
M20	10.6	517.134 4	1.4	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	二氢二咖啡酰基奎宁酸
M21	10.4	545.164 9	-2.8	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub>	二氢二咖啡酰基奎宁酸二甲甲基化
M22	10.9	677.149 1	3.1	C <sub>34</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	三咖啡酰基奎宁酸异构化

注:模式均为[M-H]<sup>-</sup>。



A. 空白样品; B. 供试品; C. 空白样品和供试品的差异谱  
图 1 ESI<sup>-</sup> 模式下羊耳菊提取物在大鼠粪便中的总离子流  
Fig. 1 Total ion current chromatograms of *Inula cappa* extract in rat feces under ESI<sup>-</sup> mode

由差异图谱中可知, M1 ~ M4 的  $t_R$  分别为 2.7, 3.4, 3.8, 3.9 min, 四者的准分子离子分别为  $m/z$  355.103 8 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  355.104 5 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  355.104 1 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  355.108 4 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式均为 C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> (Smart Formula 软件, micrOTOF 2.3, 下同), 裂解后, 产生的碎片分别为  $m/z$  181.050 6,  $m/z$  181.050 1,  $m/z$  181.050 3,  $m/z$  181.050 2, 比咖啡酸负离子模式多 2 Da, 同时均产生  $m/z$  137 的碎片, 故推断 M1 ~ M4 为单咖啡酰基奎宁酸异构后的双键还原产物。

M5 的  $t_R$  为 4.2 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  261.006 5 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub>S, 与  $m/z$  181.050 的碎片离子比较, 丢失 80 Da, 产生  $m/z$  181.050 的碎片, 说明存在硫酸酯化反应, 同时产生  $m/z$  179.049,  $m/z$  181 比  $m/z$  179 多 2 Da, 故推测 M5 可能为二氢咖啡酸的硫酸酯化结合物。

M6, M7 和 M9 的  $t_R$  分别为 4.6, 4.9, 6.3 min, 三者的准分子离子分别为  $m/z$  367.103 3 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  367.102 8 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  367.102 4 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式均为 C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>, 比单咖啡酰基奎宁酸分子式多 14 Da, 即 1 个 CH<sub>2</sub>, 裂解后, 分别产生碎片离子  $m/z$  193.050 4,  $m/z$  193.044 8,  $m/z$  193.050 0, 比咖啡酸负离子模式  $m/z$  179 多 14 Da, 故推测 M6, M7 和 M9 均为单咖啡酰基奎宁酸的甲基化产物。

M8 的  $t_R$  为 5.2 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  515.119 5 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>, 与 1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品的保留时间和碎片一致, 故确定 M8 为 1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸原型。M10 的  $t_R$  为 6.6 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  515.118 3 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式 C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>, 分子式与 1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸分子式一致, 裂解后, 产生  $m/z$  353.088 4 的碎片, 预测分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>, 与单咖啡酰基奎宁酸分子式和裂解碎片一致, 但保留时间不同, 由于实验数据有限, 无法确定其取代基的结合位点, 故推测 M10 可能为二咖啡酰基奎宁酸酯基位置异构的产物, 具体情况有待进一步研究确认。M11 的  $t_R$  为 7.0 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  543.151 2 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>O<sub>12</sub>, 比二咖啡酰基奎宁酸分子式 C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub> 多 28 Da, 即 2 个 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>。裂解后产生  $m/z$  529.131 1 的碎片离子, 继续裂解, 产生  $m/z$  515.119 7 的碎片离子, 其中  $m/z$  529.131 1 的碎片离子比  $m/z$  515.119 7 多 14 Da, 即 1 个 CH<sub>2</sub>, 故推测 M11 为二咖啡酰基奎宁酸的双甲基化产物。

M12 ~ M17 和 M19 的  $t_R$  分别为 7.4, 7.7, 7.9, 8.2, 8.6, 8.8, 10.0 min, 色谱峰的准分子离子分别为  $m/z$  519.150 2 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.150 1 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.149 8 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.148 7 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.150 4 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.149 4 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  519.149 7 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式均为 C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>12</sub>, 比二咖啡酰基奎宁酸多 4 Da, 可能为加氢还原反应, 故推测 M12 ~ M17 和 M19 可能均为二咖啡酰基奎宁酸的双键还原产物。

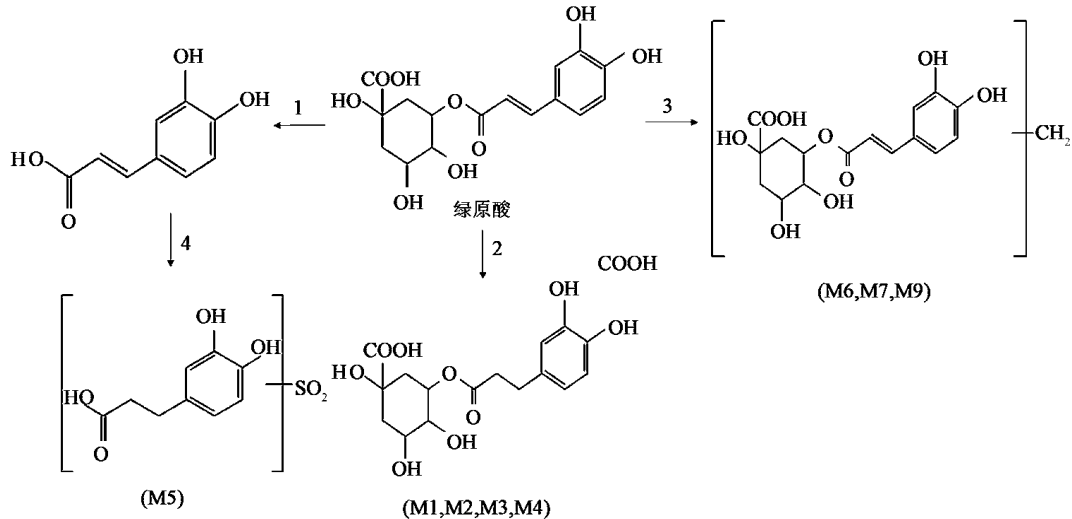
M18 和 M20 的  $t_R$  分别为 9.7, 10.6 min, 二者的准分子离子分别为  $m/z$  517.134 1 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  517.134 4 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式均为 C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>12</sub>, 准分子离子比二咖啡酰基奎宁酸准分子离子多 2 Da, 可能为加氢还原反应, 故推测 M18 和 M20 可能为二咖啡酰基奎宁酸的双键还原产物。

M21 的  $t_R$  为 10.4 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  545.164 9 [M - H]<sup>-</sup>, 预测分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>O<sub>12</sub>, 比 M11 的分子式多 2 Da, 因此推测 M21 可能为 M11 还原后产生; M21 继续裂解, 丢失 28 Da 后产生  $m/z$  517.129 2 的碎片, 同时产生  $m/z$  193.044 3 [M - H]<sup>-</sup> 的碎片。但本实验数据无法确定其取代基的结合位点, 推测 M21 可能为二甲甲基化二氢二咖啡酰基奎宁酸。M22 的  $t_R$  为

10.9 min, 色谱峰的准分子离子为  $m/z$  677.149 1  $[M - H]^-$ , 预测分子式为  $C_{34}H_{29}O_{15}$ , 分子式与三咖啡酰基奎宁酸一致, 产生  $m/z$  515.118 3,  $m/z$  353.087 4 的碎片离子, 但保留时间不同, 同时无法确定其取代基的结合位点, 推测 M22 为三咖啡酰基奎宁酸酯基位置异构的产物。

**2.10 代谢途径的分析** 根据上述分析, 发现羊耳

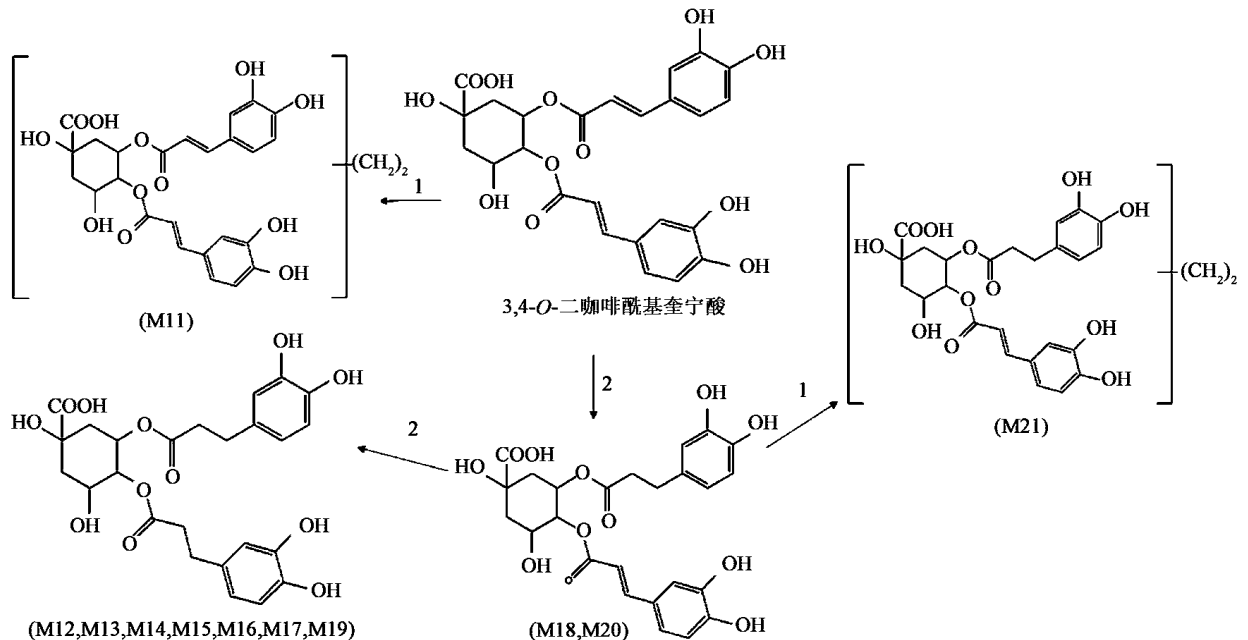
菊提取物在粪便中的代谢以提取物中含量较高的咖啡酰基奎宁酸类成分的代谢为主, 但由于提取物中同时存在单咖啡酰基奎宁酸和二咖啡酰基奎宁酸的同分异构体, 所得试验数据无法明确其具体取代基的位置, 因此, 以绿原酸和 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为例, 分析提取物中主要成分可能的代谢产物及代谢途径, 见图 2, 3。



1. 水解; 2. 还原; 3. 甲基化; 4. 硫酸酯化

图 2 绿原酸在大鼠粪便中可能的代谢途径

Fig. 2 Possible metabolic pathway of chlorogenic acid in rat feces



1. 二甲甲基化; 2. 还原

图 3 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸在大鼠粪便中下可能的代谢途径

Fig. 3 Possible metabolic pathway of 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid in rat feces

### 3 讨论

**3.1 大鼠粪便样品处理及检测条件的优化** 在预试验中, 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 比较了粪便样品在正、负离子模式下的质谱响应, 结果发现粪便中各

成分在负离子模式下响应更强, 故选用负离子模式检测羊耳菊提取物口服给药后大鼠粪便中的代谢产物。收集粪便样品时, 通过对不同时间段 (0 ~ 12, 12 ~ 24, 24 ~ 36, 36 ~ 48, 48 ~ 72 h) 粪便样品的质谱

信息(色谱图峰强度、峰数目及入血峰面积等)进行对比,最终选择 24~36 h 的样品作为实测样品并进行代谢产物结构分析。预试验还考察了不同样品处理方法对粪便样品测定结果的影响,比较了甲醇蛋白沉淀法、乙腈蛋白沉淀法、乙酸乙酯萃取法、正丁醇萃取法及固相萃取法处理样品的差异,结果发现先采用正丁醇萃取后 N<sub>2</sub> 吹干,再用 50% 甲醇溶解、离心后进样得到的色谱峰分离度较高,信息量较大,且干扰较小,能较丰富地反映粪便样品中各代谢产物的信息。

### 3.2 羊耳菊提取物在大鼠粪便中的代谢产物分析

在大鼠的粪便样品中检测到了 22 个代谢产物,包括 1 个原型成分 M8(1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸)和 21 个咖啡酰基奎宁酸类成分的异构、还原、水解、甲基化、硫酸酯化等代谢产物。单咖啡酰基奎宁酸在体内的主要代谢途径为水解、还原、甲基化以及水解后的硫酸酯化复合反应,二咖啡酰基奎宁酸在体内的主要代谢途径为还原、二甲基化及还原后的二甲基化复合反应。文献报道表明,口服后咖啡酰基奎宁酸类成分的 70% 通过胃、小肠,到达大肠,结肠对其吸收和代谢起关键作用<sup>[11-12]</sup>。此类成分容易与大肠中肠道菌群中的酯酶、还原酶等发生水解、异构化、还原等反应,未在大肠中发生降解的一部分绿原酸类成分,可能在大肠中发生甲基化反应<sup>[13]</sup>,这与本实验中检测到的代谢产物相吻合。

研究羊耳菊提取物给药后在大鼠粪便中的代谢产物来初步判断其主要活性成分在大鼠体内的代谢情况,具有一定的局限性,需要进一步研究羊耳菊提取物主要活性成分在血浆、胆汁和尿液中的代谢情况,从血浆、胆汁、尿液、粪便等角度全面反映耳菊提取物中主要活性成分在大鼠体内的代谢过程,对进一步研究羊耳菊的体内药动学过程和药效物质基础具有重要意义。再者,中药口服后,其不同化学成分进入体内会发生复杂的化学反应,可能产生与原型化合物生物活性不同的代谢物<sup>[14]</sup>。本实验结果表明,咖啡酰基奎宁酸类成分进入体内后,发生了剧烈的代谢反应,产生大量代谢产物,研究此类代谢产物的药理活性,对阐明羊耳菊的作用机制有一定的参考与指导意义。

#### [参考文献]

[1] WANG S, JIANG H, YU Q, et al. Efficacy and safety of Lian-Ju-Gan-Mao capsules for treating the common cold

with wind-heat syndrome; study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2017, doi: 10.1186/s13063-016-1747-9.

- [2] 莫佳佳,徐慕蝶,杨丹丹,等. 侗族药羊耳菊醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21): 258-260.
- [3] 关焕玉,兰燕宇,廖尚高,等. 羊耳菊中咖啡酰基奎宁酸类化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(12): 1948-1952.
- [4] 王丽萍,郭栋,王果,等. 中药绿原酸的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 961-963.
- [5] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. *中药材*, 2012, 35(7): 1180-1185.
- [6] 高茹,林以宁,梁鸽,等. 绿原酸的吸收与代谢研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 316-319.
- [7] LIU R, LAI K, XIAO Y, et al. Comparative pharmacokinetics of chlorogenic acid in beagles after oral administrations of single compound, the extracts of *Lonicera japonica*, and the mixture of chlorogenic acid, baicalin, and *Forsythia suspense* [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1234-1238.
- [8] 侯靖宇,陆苑,潘洁,等. UPLC-MS 法测定羊耳菊中 6 种成分的含量[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(11): 1917-1921.
- [9] Lafay S, Morand C, Manach C, et al. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats [J]. *Br J Nutr*, 2006, 96(1): 39-46.
- [10] YANG B, MENG Z, DONG J, et al. Metabolic profile of 1,5-dicaffeoylquinic acid in rats, an *in vivo* and *in vitro* study [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(7): 930-936.
- [11] Tomas-Barberan F, García-Villalba R, Quartieri A, et al. *In vitro* transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(5): 1122-1131.
- [12] Del Rio D, Stalmach A, Calani L, et al. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols [J]. *Nutrients*, 2010, 2(8): 820-833.
- [13] 李云,周明眉,邢丽娜,等. 绿原酸的肠道菌群代谢研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(4): 610-614.
- [14] Lampe J W, CHANG J L. Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(5): 347-353.

[责任编辑 刘德文]