

代谢分析

黑骨藤主要化学成分在正常和类风湿性关节炎大鼠血浆、尿液、粪便中的代谢产物分析*

张熊莉^{1,2}, 夏涛^{1,2}, 郑林¹, 迟明艳², 李月婷¹, 巩仔鹏¹, 金阳³, 刘亭¹, 黄勇^{1**}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

摘要 目的: 研究黑骨藤在正常及佐剂性关节炎(AA)大鼠体内的代谢产物, 探究类风湿性关节炎(RA)对黑骨藤有效成分在大鼠体内代谢的影响。方法: 采用弗氏完全佐剂制备 AA 大鼠模型; 运用 UPLC-Q TOF MS^E 方法, 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.01% 甲酸水-0.01% 甲酸乙腈为流动相梯度洗脱, 流速 0.25 mL · min⁻¹, 采用电喷雾离子源, 在负离子模式下, 对正常和 AA 模型大鼠灌服黑骨藤提取物后的血浆、尿液和粪便进行分析。结果: 在正常大鼠体内和 AA 模型大鼠体内分别检测到 2、3 个原型成分, 32、35 个代谢产物, 代谢途径主要包括单咖啡酰基奎宁酸还原、甲基化、开环裂解、葡萄糖醛酸化, 二咖啡酰基奎宁酸还原、甲基化、乙酰化、异构化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸化等。结论: AA 模型大鼠血浆和尿液中的代谢产物比正常大鼠更具多样性, RA 疾病状态可能会影响黑骨藤有效成分在体内的代谢途径。

关键词: 类风湿性关节炎; 黑骨藤提取物; 单咖啡酰基奎宁酸; 二咖啡酰基奎宁酸; 代谢产物; 超高效液相色谱-串联电喷雾飞行时间质谱; 代谢途径

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)04-0594-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.04.06

Analysis of metabolites of the main chemical components of *Periploca forrestii* in normal and rheumatoid arthritis rats' plasma, urine and feces*ZHANG Xiong-li^{1,2}, XIA Tao^{1,2}, ZHENG Lin¹, CHI Ming-yan²,
LI Yue-ting¹, GONG Zi-peng¹, JIN Yang³, LIU Ting¹, HUANG Yong^{1**}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Medical University of Pharmacy, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract Objective: To investigate the metabolites of *Periploca forrestii* in plasma, urine, and feces of normal and adjuvant arthritis(AA) rats, and explore the effect of rheumatoid arthritis(RA) on the metabolism of active

* 国家自然科学基金项目(U1812403, 81660691); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才-GCC[2022]031-1, CXTD[2023]019); 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字[2021]033)

** 通信作者 Tel: (0851)86908468; E-mail: HUANGY2020@126.com

第一作者 Tel: (0851)86908468; E-mail: 793049231@qq.com

components of *P. forrestii*. **Methods:** AA rat model was made by means of Freund's complete adjuvant. Plasma, urine and feces of normal and AA rats were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS^E method using ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with 0.01% formic acid water-0.01% formic acid acetonitrile as mobile phase gradient elution at a flow rate of 0.25 mL · min⁻¹, and electrospray ion source under negative ion mode. **Results:** Two and three prototype components, 32 and 35 metabolites were detected in normal rats and AA model rats. The metabolic pathways mainly include monocaffeoylquinic acid reduction, methylation, ring-opening cleavage, glucuronidation, dicaffeoylquinic acid reduction, methylation, acetylation, isomerization, sulfation glucuronidation, etc. **Conclusion:** The metabolites in plasma and urine of AA model rats are more diverse than those in normal rats, and the disease state of RA may affect the metabolic pathway of effective components of *P. forrestii* in the body.

Keywords: rheumatoid arthritis; *Periploca forrestii* Schltr. extract; monocaffeoylquinic acid; dicaffeoylquinic acid; metabolite; UPLC-Q TOF MS^E; metabolic pathway

黑骨藤为萝藦科杠柳属植物黑龙骨 *Periploca forrestii* Schltr. 的干燥根或全株,主产贵州,具有祛风除湿、舒筋活血、消炎解毒的功效,收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003年版)中^[1],贵州苗族地区常用于治疗风湿麻木、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等症^[2]。研究表明,黑骨藤提取物及其复方制剂对风湿病及类风湿性疾病有较好的疗效^[3-4]。前期对其血清药物化学研究结果显示,咖啡酰基奎宁酸类化合物为主要入血成分,含药血清中检测到的代谢产物可能是黑骨藤在体内发挥抗炎作用有效组分群^[5]。目前,关于黑骨藤在大鼠体内代谢产物鉴定的研究尚无文献报道。

大量体内外研究结果显示,相比正常状态,疾病状态将导致药物的PK行为发生改变,对吸收、分布、代谢和排泄(ADME)过程产生影响,进而影响到药物的疗效和毒副作用^[6]。课题组前期基于佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)模型建立黑骨藤的PK-PD模型,结果入血成分的药理效应滞后于血药浓度,推测发挥药效的形式除了原型成分外,代谢产物也可能为其活性成分,二者共同发挥了药理作用^[7]。由此,推测RA可能影响黑骨藤在体内的代谢途径,使其体内代谢产物改变。因此,开展黑骨藤在正常与疾病状态下大鼠体内代谢产物的鉴别及比较,对于阐明黑骨藤的物质基础和疾病状态下药物代谢差异具有重要意义。基于此,本研究运用UPLC-Q TOF MS^E技术检测正常和AA模型大鼠灌服黑骨藤提取物后血浆、尿液及粪便中可能的代谢产物,并分析其

代谢规律,为探究RA对黑骨藤主要成分代谢途径的影响提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC/Xevo G2-S QTOF 系统,包括Acquity超高效液相系统和Xevo G2-S QTOF质谱(Waters公司);V-200型足趾容积测量仪(成都泰盟生物有限公司);NA-5L氮空一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司);Allegra64R低温高速离心机(Beckman Coulter公司);250A-TS超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);SC082767型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司);EL204万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 药品与试剂

黑骨藤药材(购自贵阳万东桥药材市场,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萝藦科植物黑龙骨 *Periploca forrestii* 的干燥根茎),黑骨藤提取物(自制,批号20171113);3-O-咖啡酰基奎宁酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110753-201415,纯度≥98%);4-O-咖啡酰基奎宁酸、5-O-咖啡酰基奎宁酸对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为AB7061002、AB7050442,纯度均≥98%)。弗氏完全佐剂(CFA, Sigma公司,批号F1289,规格10 mL);羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 成都金山化学试剂有限公司,批号20171013);甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量(220 ± 10) g,购于

长沙天勤生物技术有限公司, 许可证号 SCXK(湘)2014-0011, 经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准, 批准号 1503017。

2 方法与结果

2.1 黑骨藤提取物的制备^[8]

黑骨藤药材 30 kg, 加 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 提取时间分别为 1.5、1.0 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以生药计), $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥, 即得。提取率为 7.68%。

2.2 AA 模型的建立及给药方案

2.2.1 AA 模型的建立 取 SD 大鼠 24 只, 测定其足容积及踝关节周长作为基础值, 于每只大鼠右后足足垫皮内注射 CFA 试剂 0.1 mL, 7 d 后再次免疫, 造模 21 d。

在大鼠造模前及造模后, 用足趾容积测量仪测定大鼠踝关节及以下容积, 并用软尺对大鼠踝关节周长进行测定。造模结果显示, 正常组在造模过程中, 足容积以及踝关节周长几乎无变化, 模型组造模后约 2 h 造模侧开始轻微肿胀, 2~7 d 开始减轻, 二次免疫后第 2 天(第 9 天)各组大鼠足容积和足肿胀达峰值。与正常组相比, 模型组大鼠足容积及踝关节周长均明显增加。

2.2.2 动物的分组与给药 正常状态: 24 只 SD 大鼠, 随机分为 3 组, 空白组 12 只, 血浆组、粪便/尿液组各 6 只, 给药剂量为黑骨藤提取物 $87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (生药量计算)^[8], 给药组连续给药、空白组连续给予等体积 0.5% CMC-Na 水溶液 3 d, 每天 2 次。

病理状态: 24 只造模成功的大鼠, 分组和给药剂量同上。

2.3 生物样品的采集

大鼠给药前禁食 12 h, 不禁水, 血浆组末次给药后 1 h, 股动脉取血 5 mL 置于涂有 1% 的肝素钠的 EP 管中, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液即为血浆样品。尿液/粪便组分别置于代谢笼中, 收集 0、12、24、36、48、72 h 时间段的尿液及粪便, 记录各时间段的尿液体积以及烘干后粪便的质量, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 备用。

2.4 生物样品前处理方法

2.4.1 血浆样品处理 取血浆样品 1 mL, 加 10% 甲酸水溶液 200 μL , 涡混 2 min, 加甲醇 4 mL, 涡混 3 min, 超声(频率 40 kHz, 功率 300 W) 5 min, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 N_2 吹

干, 残渣加甲醇 1 mL 沉淀蛋白, 取上清液加甲醇 1 mL 再次沉淀蛋白, 上清液于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ N_2 下吹干, 残渣以 50% 甲醇水 200 μL 复溶, 离心 ($14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清液作为血浆样品供试液。

2.4.2 尿液样品处理 取尿液 1 mL, 加 10% 的甲酸水溶液 200 μL , 涡混 2 min, 超声(频率 40 kHz, 功率 300 W) 5 min, 加甲醇 4 mL, 涡混 3 min, 超声(频率 40 kHz, 功率 300 W) 10 min, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ N_2 下吹干, 残渣加甲醇 1 mL 沉淀蛋白, 取上清液加甲醇 1 mL 再次沉淀蛋白, 上清液于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ N_2 下吹干, 残渣以 50% 甲醇水 400 μL 复溶, 离心 ($14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清液做尿液样品供试液。

2.4.3 粪便样品处理 取烘干的大鼠粪便 0.5 g, 用生理盐水配制成 25% 的匀浆, 混匀, 超声(频率 40 kHz, 功率 300 W) 5 min, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 500 μL , 加入甲醇 2 mL, 涡混 5 min, 按“2.4.2”项目“超声(频率 40 kHz, 功率 300 W) 10 min”起操作, 制得粪便样品供试液。

2.5 检测条件

2.5.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 以 0.01% 甲酸水(A) - 0.01% 甲酸乙腈(B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~2 min, 5% B; 2~22 min, 5% B \rightarrow 15% B; 22~28 min, 15% B \rightarrow 30% B; 28~35 min, 30% B \rightarrow 98% B; 35~37 min, 98% B \rightarrow 5% B), 流速 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 1 μL 。

2.5.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为负离子扫描(ESI⁻, m/z 50~1200), 毛细管电压 4.5 kV (ESI⁻), 离子源温度 $120 \text{ }^\circ\text{C}$, 雾化气(N_2) 压力 0.12 MPa, 去溶剂气温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂气流量 $600 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 锥孔气流量 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 碰撞能量 15~32 V; 外标(Lock SprayTM) 亮氨酸脑啡肽 m/z 554.2620 作为实时采集校正; 质谱数据采集及处理软件 Masslynx V4.1 工作站, 扫描方式 MS^E Continuum 模式。

2.6 结果

2.6.1 黑骨藤提取物在正常和 AA 模型大鼠血浆、尿液、粪便中得的代谢产物鉴定分析 通过 UPLC-Q TOF MS^E 对各生物样品进行检测, 采用 Strip 软件(Masslynx V4.1) 对差异图谱进行分析, 结合 UNIFI 软件和相关文献报道, 推测可能的代谢产物。初步在

正常和 AA 模型大鼠血浆中分别检测到 2、3 个原型成分,正常大鼠血浆、尿液及粪便中分别检测到 6、10、16 个代谢产物,AA 模型大鼠血浆、尿液及粪便中分别检测到 8、12、15 个代谢产物,结果见表 1,代谢途径见图 1~3。结果表明,大鼠体内均可发生较广

泛的 I 相代谢(还原、水解、甲基化)和 II 相代谢(硫酸酯化、葡萄糖醛酸化、乙酰化)。2 种状态下大鼠血浆、尿液中的代谢产物存在一定差异,粪便中无明显差异,提示 RA 可能会影响黑骨藤活性成分在大鼠体内的代谢途径。

表 1 黑骨藤主要成分在正常和 AA 模型大鼠血浆、尿液、粪便中的主要代谢产物

Tab. 1 The main metabolites of the main chemical components of *P. forrestii* in plasma, urine and feces of normal and AA model rats of normal and AA model rats

编号 (No.)	t_R / min	离子化 方式 (ion form)	准分子 离子 (quasi- molecular ion) m/z	化学式 (formula)	误差 (error)/ $\times 10^{-6}$	碎片离子 (fragment ion)	代谢反应 (metabolite reaction)	正常组 (normal group)			AA 模型 (AA model group)		
								血浆 (plasma)	尿液 (urine)	粪便 (feces)	血浆 (plasma)	尿液 (urine)	粪便 (feces)
M1	0.84	[M-H] ⁻	277.0025	C ₉ H ₉ O ₈ S	2.5	233.0125	咖啡酸水合、硫酸酯化(hydrated reaction and sulfation of caffeic acid)	-					+
P1	1.43	[M-H] ⁻	353.0885	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	3.4	191.0561	5-O-咖啡酰基奎宁酸(5-O-caffeoyl quinic acid)	+					+
M2	2.18	[M-H] ⁻	373.1532	C ₁₄ H ₂₅ O ₉	9.8	355.1025	单咖啡酰基奎宁酸还原、脱水(reduction and dehydration of monocaffeoyl quinic acid)	+					+
M3	2.44	[M-H] ⁻	261.0087	C ₉ H ₉ O ₇ S	6.9	181.0512	二氢咖啡酸硫酸酯化(sulfation of dihydrocaffeic acid)	+					+
P2	2.57	[M-H] ⁻	353.0875	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	0.6	191.0559	3-O-咖啡酰基奎宁酸(3-O-caffeoyl quinic acid)	+					+
M4	2.89	[M-H] ⁻	258.9934	C ₉ H ₇ O ₇ S	8.5	179.0349	咖啡酸硫酸酯化(sulfation of caffeic acid)	-					+
P3	3.23	[M-H] ⁻	353.0875	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	0.6	179.0349	4-O-咖啡酰基奎宁酸(4-O-caffeoyl quinic acid)	-					+
M5	7.21	[M-H] ⁻	165.0557	C ₉ H ₉ O ₃	3.0	121.0652	间羟基苯甲酸(3-hydroxybenzoic acid)	+					+
M6	7.54	[M-H] ⁻	195.0653	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	-2.1	193.0492	二氢阿魏酸(dihydrocaffeic acid)	+					+
M7	8.69	[M-H] ⁻	163.0392	C ₉ H ₇ O ₃	-1.8	119.0489	咖啡酸脱羟基化(dehydroxylation of caffeic acid)	+					-
M8	11.56	[M-H] ⁻	167.0344	C ₈ H ₇ O ₄	-1.8	123.0448	香草酸(vanillic acid)	+					+
M9	28.16	[M-H] ⁻	543.2776	C ₂₇ H ₄₃ O ₁₁	-5.3	515.1187	二咖啡酰基奎宁酸二甲基化(bismethylation of dicaffeoyl quinic acid)	-					+
M10	1.39	[M-H] ⁻	305.0524	C ₈ H ₁₇ O ₁₀ S	5.9	291.0379	单甲基阿魏酸硫酸酯化、水合(sulfation and hydrated reaction of monomethyl ferulic acid)		+				+
M11	2.24	[M-H] ⁻	242.9957	C ₉ H ₇ O ₆ S	2.5	163.0397	咖啡酸脱羟基化、硫酸酯化(dehydroxylation and sulfation of caffeic acid)	-					+
M12	2.48	[M-H] ⁻	341.0871	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	-0.6	181.0493	二氢咖啡酸葡萄糖结合物(dihydrocaffeic acid bound glucose)	+					-
M13	2.54	[M-H] ⁻	242.9957	C ₉ H ₇ O ₆ S	2.5	163.0424	咖啡酸脱羟基、硫酸酯化(dehydroxylation and sulfation of caffeic acid)	-					+
M14	2.75	[M-H] ⁻	242.9957	C ₉ H ₇ O ₆ S	2.5	163.0424	咖啡酸脱羟基、硫酸酯化(dehydroxylation and sulfation of caffeic acid)	-					+
M15	2.90	[M-H] ⁻	341.0871	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	-0.6	181.0493	二氢咖啡酸葡萄糖结合物(dihydrocaffeic acid bound glucose)	+					+
M16	5.73	[M-H] ⁻	399.0931	C ₁₇ H ₁₉ O ₁₁	1.0	355.1031	单咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of monocaffeoyl quinic acid)	+					-
M17	7.67	[M-H] ⁻	357.1179	C ₁₆ H ₂₁ O ₉	2.0	181.0493	单咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of monocaffeoyl quinic acid)	+					+

表 1(续)

编号 (No.)	t_R / min	离子化 方式 (ion form)	准分子 离子 (quasi- molecular ion) m/z	化学式 (formula)	误差 (error)/ $\times 10^{-6}$	碎片离子 (fragment ion)	代谢反应 (metabolite reaction)	正常组 (normal group)			AA 模型 (AA model group)		
								血浆 (plasma)	尿液 (urine)	粪便 (feces)	血浆 (plasma)	尿液 (urine)	粪便 (feces)
M18	8.17	[M-H] ⁻	367.1056	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	-3.3	179.0349	单咖啡酰基奎宁酸甲基化(methylation of monocaffeoyl quinic acid)	-					+
M19	13.60	[M-H] ⁻	595.0756	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₅ S	-0.3	515.1175	二咖啡酰基奎宁酸硫酸酯化(sulfation of dicaffeoyl quinic acid)	+					+
M20	19.45	[M-H] ⁻	273.0061	C ₁₀ H ₉ O ₇ S	-2.3	193.0510	咖啡酸甲基化、硫酸酯化(methylation、sulfation of caffeic acid)	+					+
M21	22.76	[M-H] ⁻	343.1027	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₉	-0.6	181.0511	二氢咖啡酸葡萄糖结合物(dihydrocaffeic acid bound glucose)	+					+
M22	24.58	[M-H] ⁻	397.1355	C ₁₅ H ₂₅ O ₁₂	2.3	221.1021	二氢奎宁酸双甲基化、葡萄糖醛酸化(bismethylation and glucuronization of dihydroquinic acid)	+					+
M23	24.90	[M-H] ⁻	397.1355	C ₁₅ H ₂₅ O ₁₂	2.3	221.1021	二氢奎宁酸双甲基化、葡萄糖醛酸化(bismethylation and glucuronization of dihydroquinic acid)	+					+
M24	1.15	[M-H] ⁻	355.1042	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	3.7	181.0548	单咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of monocaffeoyl quinic acid)					+	+
M25	2.06	[M-H] ⁻	355.1041	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	3.4	181.0493	单咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of monocaffeoyl quinic acid)					+	+
M26	2.34	[M-H] ⁻	355.1045	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	4.5	181.0490	单咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of monocaffeoyl quinic acid)					+	+
M27	3.67	[M-H] ⁻	211.0589	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	-8.1	167.0710	咖啡酸甲基化、水合(methylation and hydrated reaction of caffeic acid)					+	+
M28	6.81	[M-H] ⁻	165.0558	C ₉ H ₉ O ₃	3.6	121.0652	间羟基苯甲酸(3-hydroxybenzoic acid)					+	-
M29	7.21	[M-H] ⁻	195.0653	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	-2.1	165.0545	二氢阿魏酸(dihydroferulic acid)					+	+
M30	8.60	[M-H] ⁻	529.1210	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₅	3.2	353.0872	单咖啡酰基奎宁酸葡萄糖醛酸化(glucuronization of monocaffeoyl quinic acid)					+	+
M31	10.15	[M-H] ⁻	575.1389	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄	-2.1	557.1972	二咖啡酰基奎宁酸乙酰化、水合(acetylation and hydrated reaction of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M32	11.45	[M-H] ⁻	515.1187	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	-0.6	353.0872	二咖啡酰基奎宁酸异构化(isomerization of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M33	12.36	[M-H] ⁻	561.1622	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₃	2.5	543.1509	二咖啡酰基奎宁酸二甲基化、水合(bismethylation and hydrated reaction of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M34	12.95	[M-H] ⁻	531.1487	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₂	3.0	529.1351	二咖啡酰基奎宁酸还原、甲基化(reduction and methylation of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M35	13.32	[M-H] ⁻	519.1475	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₂	-5.4	515.1187	二咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M36	19.99	[M-H] ⁻	519.1522	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₂	3.7	515.1234	二咖啡酰基奎宁酸还原(reduction of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M37	20.89	[M-H] ⁻	375.1309	C ₁₆ H ₂₃ O ₁₀	6.4	357.1166	单咖啡酰基奎宁酸还原、水合(reduction and hydrated reaction of monocaffeoyl quinic acid)					+	+
M38	26.51	[M-H] ⁻	719.1796	C ₃₃ H ₃₅ O ₁₈	-3.8	543.1534	二咖啡酰基奎宁酸葡萄糖双甲基化、葡萄糖醛酸化(bismethylation and glucuronization of dicaffeoyl quinic acid)					+	+
M39	27.95	[M-H] ⁻	543.1521	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₂	3.3	515.1187	单咖啡酰基奎宁酸双甲基化(bismethylation of monocaffeoyl quinic acid)					+	+

注(note): +. 检测到(detected); -. 未检测到(undetected)

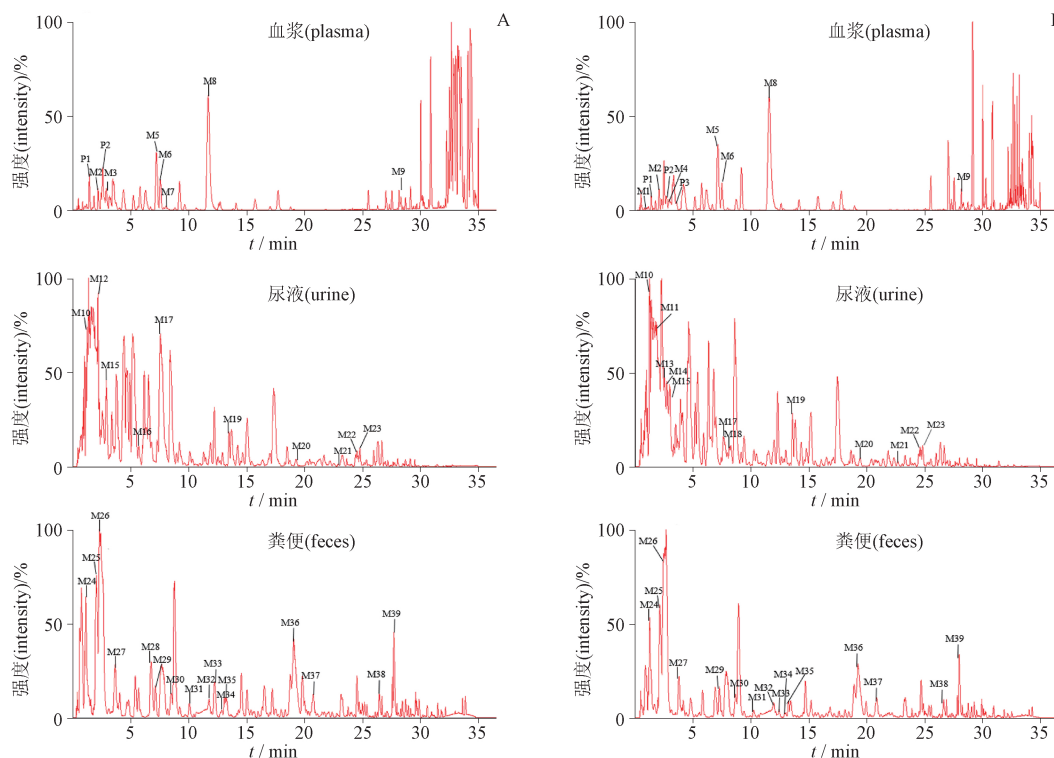


图1 黑骨藤提取物在正常大鼠(A)和AA模型大鼠(B)血浆、尿液、粪便中的代谢产物ESI⁻基峰差异图

Fig. 1 ESI⁻ base peak difference of metabolites in plasma, urine and feces of *P. forrestii* extract in normal rats(A) and AA model rats(B)

2.6.2 原型成分^[5,9] 化合物 **P1**、**P2**、**P3**, t_R 分别为 1.43、2.57、3.23 min, 三者准分子离子分别为 $[M-H]^- m/z$ 353.088 5、353.087 5、353.087 5, 预测分子式均为 $C_{16}H_{17}O_9$, 与 5-O-咖啡酰基奎宁酸、3-O-咖啡酰基奎宁酸、4-O-咖啡酰基奎宁酸对照品一致, 由此确定 **P1**、**P2**、**P3** 分别为 5-O-咖啡酰基奎宁酸、3-O-咖啡酰基奎宁、4-O-咖啡酰基奎宁酸。

2.6.3 单咖啡酰基奎宁酸的代谢产物 M2 的 t_R 为 2.18 min, 准分子离子为 $[M-H]^- m/z$ 373.153 2, 预测分子式为 $C_{14}H_{25}O_9$, 碎片离子 m/z 355 较准分子离子 m/z 373 少 18 (H_2O), 较单咖啡酰基奎宁酸 m/z 353 多 2 ($2H$), 故推测 **M2** 为单咖啡酰基奎宁酸还原、水合代谢产物。

M18 的 t_R 为 8.17 min, 准分子离子为 $[M-H]^- m/z$ 367.105 6, 预测分子式为 $C_{17}H_{19}O_9$, 较单咖啡酰基奎宁酸 m/z 353 多 14 ($-CH_2$), 出现 m/z 179 的碎片离子(单咖啡酰基奎宁酸的特征碎片离子), 故推测 **M18** 为单咖啡酰基奎宁酸的甲基化代谢产物。

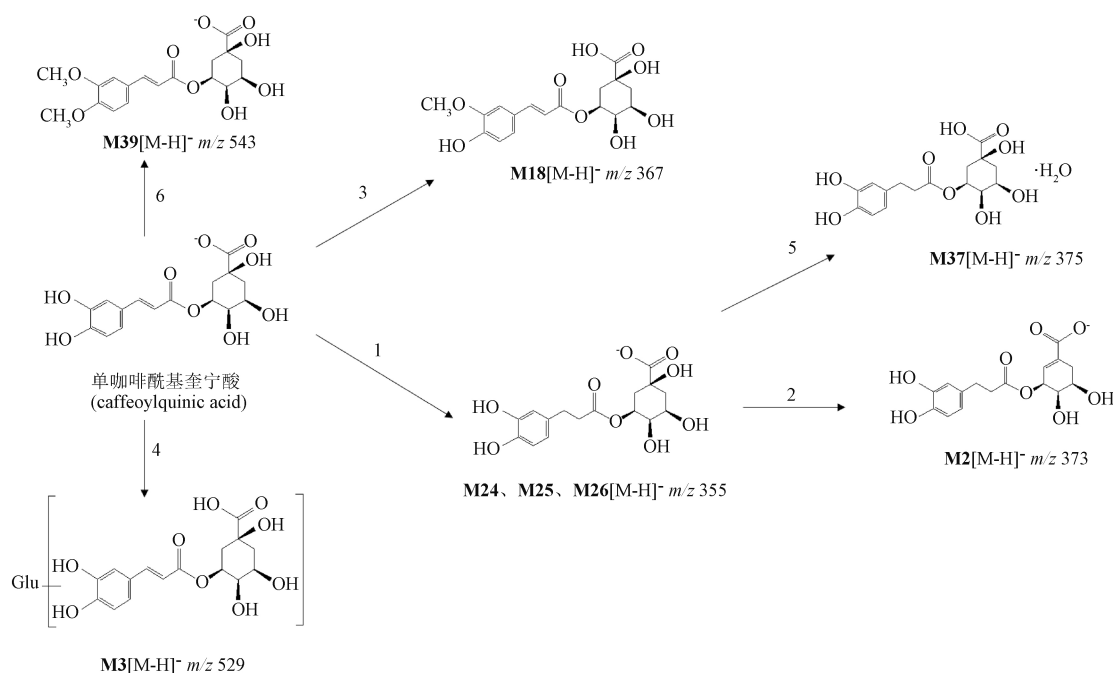
M24、**M25**、**M26** 的 t_R 分别为 1.15、2.06、2.34 min, 准分子离子分别为 $[M-H]^- m/z$ 355.104 2、

$[M-H]^- m/z$ 355.104 1、 $[M-H]^- m/z$ 355.104 5, 预测分子式均为 $C_{16}H_{19}O_9$, 三者有相同的碎片离子 m/z 353 较准分子离子 m/z 355 少 2 ($2H$), 碎片离子 m/z 181 为单咖啡酰基奎宁酸的特征碎片离子, 故推测 **M24**、**M26**、**M27** 均为单咖啡酰基奎宁酸的还原代谢产物。

M30 的 t_R 为 8.60 min, 准分子离子为 $[M-H]^- m/z$ 529.121 0, 预测分子式为 $C_{22}H_{25}O_{15}$, 碎片离子 m/z 353 较准分子离子 m/z 529 少 178 ($2H, -C_6H_8O_6$), 故推测 **M30** 为单咖啡酰基奎宁酸的还原、葡萄糖醛酸化的代谢产物。

M37 的 t_R 为 20.98 min, 准分子离子为 $[M-H]^- m/z$ 375.130 9, 预测分子式为 $C_{16}H_{23}O_{10}$, 碎片离子 m/z 357 较准分子离子 m/z 375 少 18 (H_2O), 碎片离子 m/z 353 较碎片离子 m/z 357 少 4 ($4H$), 故推测 **M37** 为单咖啡酰基奎宁酸还原、水合产物。

M39 的 t_R 为 20.98 min, 准分子离子为 $[M-H]^- m/z$ 543.152 1, 预测分子式为 $C_{27}H_{27}O_{12}$, 碎片离子 m/z 515 较准分子离子 m/z 543 少 28 ($-2CH_2$), 故推测 **M39** 为单咖啡酰基奎宁酸的双甲基化代谢产物。



1. 还原(reduction) 2. 脱水(dehydration) 3. 甲基化(methylation) 4. 葡萄糖醛酸化(gluconic acidification) 5. 水合(hydratization) 6. 双甲基化(bismethylation)

图2 单咖啡酰基奎宁酸在大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 2 Possible metabolic pathways of monocaffeoylquinic acid in rats

2.6.4 二咖啡酰基奎宁酸的代谢产物 M9 的 t_R 为 8.17 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 543.2776, 预测分子式为 $C_{27}H_{43}O_{11}$, 碎片离子 m/z 515 较准分子离子 m/z 543 少 28 ($-2CH_2$), 故推测 M9 为二咖啡酰基奎宁酸的双甲基化代谢产物。

M19 的 t_R 为 13.60 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 595.0756, 预测分子式为 $C_{25}H_{23}O_{15}S$, 碎片离子 m/z 515 较准分子离子 m/z 595 少 80 ($-SO_3$), 故推测 M19 为二咖啡酰基奎宁酸的硫酸酯化代谢产物。

M31 的 t_R 为 10.15 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 575.1389, 预测分子式为 $C_{27}H_{27}O_{14}$, 碎片离子 m/z 557 较准分子离子 m/z 575 少 18 (H_2O), 碎片离子 m/z 515 较碎片离子 m/z 557 少 42 ($-C_2H_2O$), 故推测 M31 为二咖啡酰基奎宁酸的乙酰化、水合代谢产物。

M32 的 t_R 为 11.45 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 515.1187, 预测分子式为 $C_{25}H_{23}O_{12}$, 碎片离子 m/z 353 为水解产生, 与 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的分子式和质谱信息^[5] 相似, 但保留时间不同, 推测 M32 为二咖啡酰基奎宁酸的异构体。

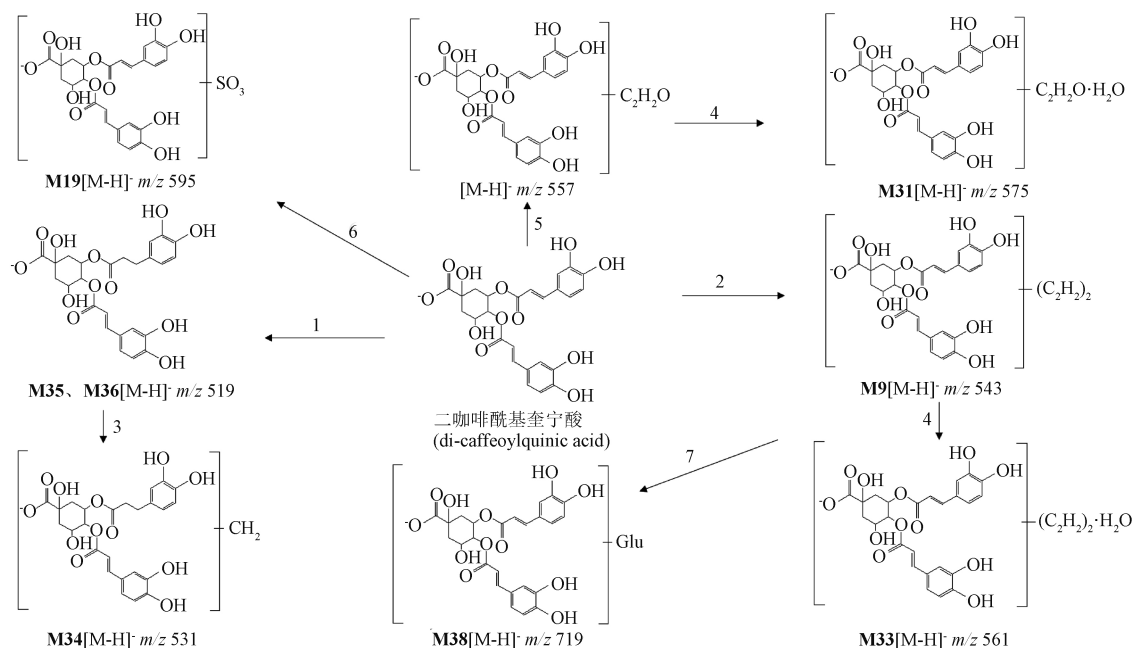
M33 的 t_R 为 12.36 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$

m/z 561.1622, 预测分子式为 $C_{27}H_{29}O_{13}$, 碎片离子 m/z 543 较准分子离子 m/z 561 少 18 (H_2O), 碎片离子 m/z 515 较碎片离子 m/z 543 少 28 ($-2CH_2$), 故推测 M33 为二咖啡酰基奎宁酸二甲基化的水合物。

M34 的 t_R 为 12.94 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 531.1487, 预测分子式为 $C_{26}H_{27}O_{12}$, 碎片离子 m/z 529 较准分子离子少 2 ($2H$), 碎片离子 m/z 529 较碎片离子 m/z 515 多 14 ($-CH_2$), 故推测 M34 为二咖啡酰基奎宁酸还原、甲基化代谢产物。

M35、M36 的 t_R 分别为 13.32、13.99 min, 准分子离子分别为 $[M-H]^-$ m/z 519.1475、 m/z 519.1522, 预测分子式均为 $C_{25}H_{27}O_{12}$, 准分子离子 m/z 519 较二咖啡酰基奎宁酸 m/z 515 多 4 ($4H$), 故推测 M35、M36 为二咖啡酰基奎宁酸的还原代谢产物。

M38 的 t_R 为 26.61 min, 准分子离子为 $[M-H]^-$ m/z 719.1796, 预测分子式为 $C_{33}H_{35}O_{18}$, 碎片离子 m/z 543 较准分子离子 m/z 719 少 176 ($-C_6H_8O_6$), 较二咖啡酰基奎宁酸 m/z 515 多 28 ($-2CH_2$), 故推测 M38 可能为二甲基化二咖啡酰基奎宁酸的葡萄糖醛酸化产物。



1. 还原(reduction) 2. 双甲基化(bismethylation) 3. 甲基化(methylation) 4. 水合(hydratization) 5. 乙酰化(acetylation) 6. 硫酸酯化(sulfation) 7. 葡萄糖醛酸化(gluconic acidification)

图3 二咖啡酰基奎宁酸在大鼠体内可能的代谢途径

Fig. 3 Possible metabolic pathways of dicaffeoylquinic acid in rats

3 讨论

本研究以 RA 模型中的 AA 模型为研究对象,采用 UPLC - Q TOF MS^E 技术,在负离子模式下,正常大鼠和 AA 模型大鼠血浆分别检测到 2、3 个原型成分, 32、35 个代谢产物。前期研究^[5,10]表明,黑骨藤中主要含有咖啡酰基奎宁酸类化合物,且为入血和发挥抗炎活性成分。本实验从正常和 AA 模型大鼠的血浆中分别检测到 2、3 个的原型成分,提示该类化合物不易被吸收且主要分布于血浆,这与文献报道^[11]一致,而化合物 P3 仅在 AA 模型大鼠血浆中检测到,提示 RA 可能会影响药物的吸收过程。

2 种状态下大鼠粪便中的代谢产物无明显差别,血浆和尿液中的代谢产物主要包括单咖啡酰基奎宁酸的还原、甲基化产物,水解产生的咖啡酸的还原、甲基化和硫酸酯化等代谢产物以及水解的小分子化合物,结合文献报道^[12-13],咖啡酰基奎宁酸类成分口服后在大肠中易与肠道菌群中的酯酶、还原酶等发生相关反应,并且在体内吸收过程中,可能会被肠道菌群代谢为小分子量的物质,如苯甲酸、苯乙酸等,再被吸收入血并发挥其药理作用^[14-16],因此推测,本文检测到的间羟基苯甲酸等小分子化合物可能具有药理作用。血浆中的差异

成分为 M1、M4、M9 (仅在模型大鼠血浆中检测到); M7 (仅正常状态下检测到),尿液中的差异成分为 M11、M13、M14、M18 (仅在模型大鼠尿液中检测到); M12、M16 (仅正常状态下检测到),提示 RA 可能会影响大鼠体内硫酸酯化酶、甲基化酶,进而影响黑骨藤在大鼠体内的代谢产物和药理作用。

据报道,中药的许多化学成分经过生物转化,其化学结构发生变化,产生的代谢产物许多具有生物活性^[17-19],而疾病状态可能影响到药物的疗效和毒副作用。但目前,尚无关于黑骨藤在正常和疾病状态下的代谢差异的报道。因此,本文通过研究口服给予黑骨藤提取物后在正常和 AA 模型大鼠血浆、尿液及粪便中的代谢规律和代谢途径及产物,明确了 RA 对黑骨藤体内代谢的影响,为进一步阐明黑骨藤在体内的药效物质奠定了基础。本文虽然未对 RA 影响黑骨藤提取物在体内代谢的因素和机制作深入讨论,但仍可为探究正常及疾病状态下药物体内代谢差异提供参考。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准

- [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 381
Guizhou Provincial Drug Administration. Quality Standards for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicinal Materials in Guizhou Province[M] Guiyang: Guizhou Science and Technology Publishing House, 2003: 381
- [2] 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):174
HUANG MJ, LUO CL, GUO G, *et al.* Effects and molecular mechanism of *Periploca forrestii* against rheumatoid arthritis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2011, 17(12):174
- [3] 包喜文, 李振英, 吴霞, 等. 黑骨藤追风活络胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠 IL-1 β 、IFN- γ 、IL-15 的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(2):293
BAO XW, LI ZY, WU X, *et al.* Effects of Heiguteng Zhufeng Huoluo capsules on serum IL-1 β , IFN- γ and IL-15 of rats with collagen-induced arthritis[J]. *J Emerg Tradit Chin Med* 2018, 27(2):293
- [4] 杨波, 张建锋. 苗药黑骨藤研究进展[J]. 中国现代中药, 2019, 21(8):1122
YANG B, ZHANG JF. Research progress of Miao medicine *Periploca forrestii*[J]. *Mod Chin Med*, 2019, 21(8):1122
- [5] 覃小丽, 陈浩, 夏涛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的黑骨藤血清药物化学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6):125
QIN XL, CHEN H, XIA T, *et al.* Serum pharmacochemical analysis of *Periploca forrestii* rhizomes based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(6):125
- [6] 张晓芳, 周芳, 王广基, 等. 疾病状态下的药物代谢处置变化及其机制研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(3):369
ZHANG XF, ZHOU F, WANG GJ, *et al.* Changes and related mechanisms of drug metabolism and disposition under diseases status[J]. *Drug Eval Res*, 2019, 42(3):369
- [7] 潘洁, 王昌权, 李奎, 等. 基于大鼠类风湿性关节炎模型建立黑骨藤的 PK-PD 模型[J]. 中草药, 2020, 51(20):5194
PAN J, WANG CQ, LI K, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic link model of *Periploca forrestii* based on rheumatoid arthritis rat model[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(20):5194
- [8] 夏涛, 王昌权, 李奎, 等. 黑骨藤提取物中 3 种活性成分在 AA 模型大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9):1270
XIA T, WANG CQ, LI K, *et al.* Pharmacokinetics of three active ingredients in *Periploca forrestii* extract after administrations in AA rats[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(9):1270
- [9] 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
WANG LP, GUO D, WANG G, *et al.* Advancement of chlorogenic acid in traditional Chinese medicine[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2011, 22(4):961
- [10] 覃小丽, 陈浩, 李奎, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析苗药黑骨藤提取物中的化学成分[J]. 中国药房, 2018, 29(21):2949
QIN XL, CHEN H, LI K, *et al.* Analysis of chemical compositions in Miao medicine *Periploca forrestii* extract by UPLC-Q-TOF-MS[J]. *China Pharm*, 2018, 29(21):2949
- [11] WITTEMER SM, PLOCH M, WINDECK T, *et al.* Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans[J]. *Phyto-medicine*, 2005, 12(1-2):28
- [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
- [13] TOMAS-BARBERAN F, GARCIA-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
- [14] 巩仔鹏, 侯靖宇, 李梅, 等. 大鼠肠道菌群对羊耳菊提取物的代谢作用研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18):3584
GONG ZP, HOU JY, LI M, *et al.* Analysis of metabolites of *Inula cappa* extract in rat feces[J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(18):3584
- [15] 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
LI Y, ZHOU MM, XING LN, *et al.* Advances in study on gut flora metabolism of chlorogenic acid[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(4):610
- [16] 谢芬, 钟大放, 陈笑燕. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物[J]. 药学报, 2011, 46(1):88
XIE Q, ZHONG DF, CHEN XY. Metabolites of injected chlorogenic acid in rats[J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(1):88
- [17] 刘子茵, 尚展鹏, 王喻淇, 等. UHPLC-HRMS 代谢组学研究硫熏麦冬对大鼠内源性代谢产物的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21):4713
LIU ZH, SHANG ZP, WANG YQ, *et al.* UHPLC-HRMS metabolomics to study effect of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* on endogenous metabolites in rats[J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(21):4713
- [18] 孙丽丽, 白海英, 郑文惠, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 的当归补血汤治疗 2 型糖尿病小鼠的代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3):636
SUN LL, BAI HY, ZHENG WH, *et al.* Metabolomics study of Danggui Buxue Tang on treatment of type 2 diabetes mice using UHPLC-Q-TOF-MS[J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(3):636
- [19] 王妮, 张娜, 李铁, 等. 人参干预脾虚体质的非靶向代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2):398
WANG N, ZHANG N, LI T, *et al.* Untargeted metabolomics study of ginseng in treatment of spleen-Qi deficiency[J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(2):398

(本文于 2024 年 3 月 2 日修改回)