

UPLC-Q-TOF-MS/MS 法鉴定大鼠中树豆酮酸 A 代谢产物

程 瑶^{1,2}, 班玉娟¹, 陈 瑞¹, 张 丽¹, 胡克荣^{1,2}, 黄 静^{2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004;

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 本研究建立一种简便、快速、灵敏度高的超高效液相色谱串联四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 法, 研究树豆酮酸 A (CAA) 在大鼠体内的代谢特征。通过灌胃给予大鼠 CAA (30 mg·kg⁻¹) 后, 收集血浆、尿液、胆汁和粪便采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测生物样品, 收集和处理相关数据, 将代谢产物的精确质量数和 MS² 质谱与母体化合物进行比较。结果共检测到 23 种代谢物, 其中尿液中有 15 种, 胆汁中有 11 种, 粪便中有 11 种, 血浆中有 9 种。与 CAA 相关的主要代谢途径包括脱氢、还原、羟基化、甲基化和葡萄糖醛酸结合。本实验获得贵州医科大学动物伦理委员会批准 (编号: 1603137)。

关键词: 树豆酮酸 A; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 代谢产物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1382-09

Identification of cajanonic acid A metabolites in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS

CHENG Yao^{1,2}, BAN Yu-juan¹, CHEN Rui¹, ZHANG Li¹, HU Ke-rong^{1,2}, HUANG Jing^{2*}

(1. Guizhou Medical University, Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R & D, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract: This research established a simple, rapid and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) method to investigate the metabolic profiles of cajanonic acid A (CAA) in rats. After intragastric administration of CAA (30 mg·kg⁻¹) to rats, the biological samples were detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS. Relevant data was collected and processed, the accurate mass and MS² spectra of the metabolites were compared with the parent compound. As a result, a total of 23 metabolites were detected, including 15 in urine, 11 in bile, 11 in feces, and 9 in plasma. The major metabolic pathways related to CAA included dehydrogenation, reduction, hydroxylation, methylation and glucuronide conjugation. This experiment was approved by Animal Ethics Committee of Guizhou Medical University (approval number: 1603137).

Key words: cajanonic acid A; UPLC-Q-TOF-MS/MS; metabolite

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种由于胰岛素

分泌绝对或相对不足, 胰岛素对靶组织的敏感性降低而导致葡萄糖、蛋白质和脂肪代谢紊乱的疾病^[1-3]。2019年, 糖尿病约导致 420 万 20~79 岁人群死亡, 占全因死亡率的 11.3%^[4]。此外, 糖尿病患者由于持续高血糖, 伴有肝损害、血脂水平异常、心血管疾病、眼部病变、肾脏疾病等多种并发症^[5-10]。这表明, DM 正成为威胁人类健康的主要疾病, 因此, 开发更多安全、有效的降糖药

收稿日期: 2023-12-27; 修回日期: 2024-03-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660573); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑[2017]2842); 贵州省科技计划项目 (黔科中引地[2022]4017); 贵州省教育厅服务“四新”“四化”科技攻关项目 (黔教技[2022]004).

*通讯作者 E-mail: 1104849720@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1451

具有重要意义。

树豆酮酸A (cajanonic acid A, CAA, 图1) 是从豆科植物树豆 *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp. 中提取的一种萜类化合物。已证明CAA具有良好的血糖控制和脂质代谢调节作用。CAA治疗可显著逆转地塞米松诱导和/或蛋白酪氨酸磷酸酶1B (PTP1B) 介导的胰岛素抵抗; CAA通过抑制PTP1B和下调过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR γ) 的表达, 抑制激素介导的脂肪形成。同时, PPAR γ 下调有助于预防典型噻唑烷二酮类PPAR γ 激活剂引起的不良反应^[11-15]。因此, CAA是治疗糖尿病的潜在候选药物, 也是开发更多新型糖尿病药物的有利先导化合物。研究CAA的药代动力学、毒性和疗效变得越来越重要。根据前期研究, CAA在体内可被快速吸收, 但在大鼠尿液、胆汁、粪便中只有5.17%的CAA作为原型被排除, 此外, 据组织分布研究, 在口服CAA12 h后, 各组织中仅有11.86%的CAA原型, 推测CAA可能以代谢物^[16]的方式排出。药物代谢可能会导致活性或毒性反应, 药物代谢研究可以帮助识别药物的活性或毒性成分, 在新药的发现和开发中占有重要的地位^[17]。关于CAA的代谢数据尚未被报道。因此, 有必要对CAA代谢物进行检测, 以便更好地探索其安全性和有效性。

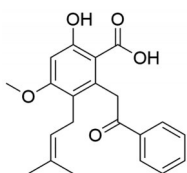


Figure 1 Structure of cajanonic acid A (CAA)

在众多数据采集和挖掘技术中, UPLC-Q-TOF-MS/MS由于其速度快、检测灵敏度高、分辨率高, 在药物代谢研究中发挥着至关重要的作用^[18,19]。UPLC系统具有峰容量大、分离效率高的特点, 广泛应用于复杂样品的分离。此外, Q-TOF-MS系统能够产生精确的质量数据, 并确定代谢产物的元素组成, 在Q-TOF-MS体系中, MS/MS和MS^E获取技术为母体化合物和相应代谢物提供碎片离子, 是推测可能结构的必要数据资源^[20-25]。MS^E获取技术是Waters质谱独有的数据采集模式, 可以在“无碰撞能”和“高碰撞能”两种功能之间快速切换, 从而在单次分析中无缝收集母离子和碎片离子的全面信息, 具有全面、精准、简单和灵活的特点。

本研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术, 建立了一种高效、快速检测和表征大鼠血浆、胆汁、尿液和粪便中CAA代谢物的方法, 为进一步研究CAA的药理作用和机制提供有用的信息, 也为CAA的初步安全性

评价提供了必要的数据库。

材料与方 法

主要仪器 代谢笼 (意大利Tecniplast公司), UPLC-Q-TOF (型号Xevo G2-XS, 美国Waters公司), 氮气吹扫仪 (型号JN300-2, 苏州吉米诺仪器有限公司), 高速离心机 (型号X1, 香港基因有限公司), 十万分之一电子天平 (型号FA805N, 上海菁海仪器有限公司) 等。

化学品和试剂 CAA (贵州医科大学药物化学重点实验室制备, 纯度>98%), 水为屈臣氏蒸馏水, HPLC级乙酸乙酯 (上海泰坦科技股份有限公司), LC/MS级甲酸 (美国赛默飞公司), HPLC级甲醇和乙腈 (德国Merck公司), OASIS HLB固相萃取 (SPE) 柱 (美国Waters公司)。

动物及药物管理 雄性SD大鼠, 体重200~230 g, 由长沙天勤生物技术有限公司 (中国长沙) 提供, 实验动物许可证号: SCXK (湘) 2019-0014。实验前7天, 在室温 (22±2 °C) 进行12 h的光照和黑暗循环饲养。实验前禁食12 h, 自由饮水。将18只SD大鼠随机分为3组, 分别为1组 (血浆样品)、2组 (尿液和粪便样品) 和3组 (胆汁样品)。CAA (7.5 mg·mL⁻¹) 溶于*N-N*-二甲基乙酰胺:PEG400:水 (2:4:1), 以30 mg·kg⁻¹的剂量进行灌胃给药。本实验获得贵州医科大学动物伦理委员会批准 (编号: 1603137)。

样品采集 口服CAA, 给药前取空白血, 给药后0.1、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24 h从肝门静脉取实验血浆样品放入肝素化的聚乙烯管内, 立即在3 000 r·min⁻¹, 4 °C下离心10 min, 分离血浆。

将2组6只大鼠置于代谢笼中, 于给药前12 h采集空白尿液和粪便样品, 在给药后4、8、12、24、36、48 h分别采集尿液和粪便样品。采集的粪便样品在37 °C下干燥, 粉碎成粉末, 再将所得粉末以冰甲醇/水 (7:3, v/v) 按1:10的比例 (w/v) 均质, 20 000 r·min⁻¹离心10 min, 收集粪便上清液。

三组6只大鼠在给药前腹腔注射10%水合氯醛溶液。腹部切开, 用聚乙烯管连接胆总管收集胆汁, 然后缝合切口, 采用加热灯保持大鼠体温。给药前2 h获得空白胆汁, 给药后1、2、4、6、8、10、12、24、36 h取大鼠胆管胆汁。所有采集的样品均保存在-80 °C下, 以备后续使用。

样品制备 采用HLB固相萃取柱对粪便、尿液和胆汁样本进行预处理。首先, 取HLB固相萃取柱, 向其加1 mL甲醇, 再加1 mL水进行活化小柱后备用。然后将1 mL尿样加入到HLB固相萃取柱中, 用3倍柱体积水淋洗, 而后加3倍柱体积甲醇进行洗脱, 收集甲

醇洗脱液,将其置于37 °C氮气下吹干,用200 μL 甲醇溶解残渣,20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。取2 μL 上清液用于UPLC-Q-TOF-MS/MS分析。粪便和胆汁样本(1 mL)采用相同的方法处理。

采用液-液萃取法从大鼠血浆中提取CAA。用800 μL 乙酸乙酯沉淀100 μL 的血浆样品,涡旋震荡5 min,20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。收集上清液,加入离心管(1.5 mL),将其置于37 °C氮气下吹干。用200 μL 甲醇溶解残渣,20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。取2 μL 上清液用于UPLC-Q-TOF-MS/MS分析。

色谱条件 采用Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C18色谱柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)。梯度洗脱采用溶剂A(由0.01%甲酸和水组成, v/v)和溶剂B(由0.01%甲酸和乙腈组成, v/v)。梯度洗脱过程为0~2 min 5% B, 2~3 min 5%~35% B, 3~6.5 min 35%~48% B, 6.5~12 min 48%~95% B, 12~13 min 95%~98% B, 13~15 min 98%~5% B。进样量2 μL , 流速0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温40 °C。

质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 负模式采集, 毛细管电压-1.5 kV, 溶剂气温度400 °C, 离子源温度120 °C, 脱溶剂气(N_2)流量800 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, 锥孔气流量50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, 质量范围为 m/z 50~1 200。使用亮氨酸脑啡肽作为校正液, 在4 eV恒定碰撞能量下, 获得低能 MS^E 模式下的所有MS数据, 得到母离子数据。然后, 利用20~25 eV碰撞能量在高能 MS^E 模式下获得最佳碎裂数据。同时, 采用美国Waters公司的MassLynx V 4.1进行系统控制。

数据处理 数据采集由Masslynx[™] v4.1软件以负离子模式执行, 并由UNIFI[™]v1.8软件进行处理。 MS^E 模式下的参数设置如下: 化合物的选择, 负模式为 H^- 、 Cl^- 、 HCOO^- 。保留时间范围: 0~15 min; 保留时间容差为0.1 min; 目标质量匹配容差为2.0 mDa; 结构预测片段的匹配容差为5.0 mDa; 在高能量下 ≥ 100 个计数的强度阈值, 在低能量下 ≥ 500 个计数的强度阈值; 质量缺陷过滤器, 50 mDa。将不同类型的特征片段和中性分子设置为普通片段和普通中性损失模式, 质量容差在2.0 mDa以内。预期使用的潜在生物转化规则为去饱和、还原、氧化、脱水、水合、葡萄糖醛酸化、甲基化、乙酰化、硫酸化、去甲基化、脱羧、脱羟基、谷胱甘肽结合、甘氨酸结合、半胱氨酸结合和乙酰半胱氨酸结合。基于精确的质量离子和碎片离子, 在UNIFI平台上进行了自动匹配分析。

结果

采用UPLC-Q-TOF-MS/MS和 MS^E 模式对每个生

物样品进行检测,可在一个质谱周期内同时对高、低碰撞能量进行全扫描。该方法可简单、快速地获得了该组分的母离子和子离子信息, 将获得的质谱数据与UNIFI软件结合, 对CAA代谢产物进行分析。在UNIFI软件中, 首先从样品色谱图中减去空白基质色谱图, 由原型化合物CAA建立的专属数据库显示了特有的质谱信息。结果表明, 口服CAA后, 在大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁样本中测定了23种代谢物。主要代谢物的基峰强度(base peak intensity, BPI) 色谱图和 MS^2 质谱分别如图2、3所示。图4所示为大鼠尿液、粪便、胆汁、血浆中CAA的代谢途径。保留时间、元素组成、 MS/MS 片段、计算的 m/z 值和质量误差见表1。

1 CAA标准品的碎裂

为鉴定CAA代谢物, 本实验首先研究了其母体化合物的质量碎裂行为。质谱检测采用电喷雾离子源, 负离子模式采集。图5为CAA的质谱, 图6为CAA的碎裂路径。全扫描质谱分析显示, 在 m/z 353.138 9处检测到准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。从质谱图上可以看出, 主要的碎片离子有 m/z 311.155 6、 m/z 309.152 3、 m/z 293.118 1、 m/z 251.071 0和 m/z 239.070 9。推测 m/z 311.155 6处的碎片离子是由于异戊烯基上的双键断裂。而CAA中羧基的缺失导致了 m/z 309.152 3处的碎片离子, m/z 293.118 1处的碎片离子则是进一步失去一个羟基而生成的, m/z 251.071 0处的碎片离子是由 m/z 293.118 1上的异戊烯基双键断裂引起的, m/z 239.070 9处的碎片离子是由进一步失去一个 CH_3 分子而得到的。

2 CAA代谢产物的结构解析

M1、M7、M14: 代谢物M14在10.85 min洗脱, 在 m/z 355.154 5处观察到准分子离子峰, 元素组成为 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$, 比CAA多2 Da ($+\text{H}_2$)。从其 MS^2 质谱中可以观察到典型的碎片离子在 m/z 146.966 0(异戊基苯)处, 推测M14是通过CAA的异戊基上的双键还原得到的。此外, 如果CAA的酮羰基被还原, 应提高其极性, 缩短保留时间。但M14的保留时间比CAA长($\text{RT} = 8.57$ min), 证明在酮羰基上没有发生还原反应。在 m/z 369.170 2处检测到M7的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子($\text{RT} = 6.02$ min), 比CAA多16 Da。M7的元素组成为 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$, 相当于 $\text{CAA} + \text{H}_2 + \text{CH}_2$ 。结合UNIFI数据库分析, 推断M7为CAA的 $\text{C}=\text{C}$ 双键还原和甲基化代谢产物。M1的保留时间为5.19 min, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子在 m/z 385.165 1处, M1比CAA多32 Da, 元素组成为 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$, MS^2 质谱中, 在 m/z 313.115 8 ($[\text{M}0-\text{C}_3\text{H}_6]^-$)和214.035 2 ($[\text{M}0-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{CH}_3-\text{OH}-\text{COOH}]^-$)处观察到产物离子。结合UNIFI数据库分析, 初步鉴定M1为CAA的还原、甲基

Table 1 Results of UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of cajanonic acid A (CAA). M0 denotes the prototype of the compound. P: Plasma; B: Bile; U: Urine; F: Feces

No.	RT /min	Metabolite description	Calculated (m/z)	Measured (m/z)	Error (ppm)	Formula	MS/MS fragment ion	Source
M0	8.57	M0	353.138 9	353.138 7	-0.6	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	311.155 6, 309.152 3, 293.118 1, 251.071 0, 239.070 9	P, B, U, F
M1	5.19	M0+H ₂ +O+CH ₂	385.165 1	385.167 2	8.7	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	313.115 8, 214.032 5	U
M2	5.29	M0+C ₂ H ₈ O ₆	529.171 0	529.170 2	-1.7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	452.146 7, 409.140 6, 385.086 5 353.139 5	B, U
M3	5.41	M0+SO ₃	433.095 7	433.095 5	-0.5	C ₂₁ H ₂₂ O ₈ S	146.996 0	U, F
M4	5.53	M0+H ₂ +C ₆ H ₈ O ₆	531.186 6	531.186 5	-0.1	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₁	401.087 9, 311.129 0, 269.045 7, 241.050 2, 225.055 1	U
M5	5.65	M0+O+O	385.128 7	385.128 9	0.6	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	341.139 4, 323.128 7, 311.128 7, 281.117 8, 240.079 0	P, B, U, F
M6	6.01	M0+H ₂ -H ₂ O+C ₆ H ₈ O ₆	513.176 1	513.175 7	-0.8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	401.087 6	U
M7	6.02	M0+H ₂ +CH ₂	369.170 2	369.173 2	8.7	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	351.123 5	U
M8	6.70	M0+O	369.133 8	369.134 1	0.7	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	351.124 1, 325.144 8, 295.134 0, 251.071 4	P, B, U, F
M9	6.78	M0-H ₂ O+CH ₂	349.144 0	349.143 4	-1.9	C ₂₂ H ₂₂ O ₄	339.123 8, 295.134 0, 279.102 6	U
M10	6.79	M0+O+O-H ₂	383.113 1	383.113 4	0.6	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	339.123 8, 321.113 1, 295.134 0, 279.102 6	P, B, U, F
M11	6.86	M0+H ₂ +O	371.149 5	371.148 7	-2.1	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	255.102 3, 146.965 9	P, U
M12	7.30	M0+O-H ₂	367.118 2	367.118 3	0.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	349.108 0, 334.084 1, 323.128 9, 295.133 8, 251.071 1	P, B, U
M13	7.71	M0+H ₂ +H ₂ +C ₂ H ₂ O	399.180 8	399.180 4	-0.9	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	249.149 5	P, B, U
M14	10.85	M0+H ₂	355.154 5	355.157 2	7.6	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	311.167 9, 293.160 5, 146.966 0	P, B, U, F
M15	11.32	M0+H ₂ +H ₂ -O+C ₂ H ₂ O	383.185 8	383.187 7	5.0	C ₂₃ H ₂₈ O ₅	325.183 3, 311.167 5, 265.247 2	P, B, U
M16	10.51	M0+H ₂ -H ₂ O+C ₂ H ₂ O	379.154 5	379.157 3	7.3	C ₂₃ H ₂₄ O ₅	361.147 5	P, B, F
M17	6.20	M0+C ₂ H ₃ NO+C ₃ H ₃ NO ₂ S	529.164 5	529.166 7	4.2	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₈ S	353.139 5	B
M18	5.06	M0-H ₂ O+C ₃ H ₃ NOS	438.137 5	438.136 0	-3.5	C ₂₄ H ₂₅ NO ₃ S	425.169 7, 413.162 9, 357.101 2, 343.132 9	B
M19	5.70	M0+H ₂ +SO ₃	435.111 4	435.111 0	-1.0	C ₂₁ H ₂₄ O ₈ S	353.138 5, 341.138 4, 323.127 2, 321.112 3, 307.094 2, 285.112 7, 267.102 0, 241.122 7	F
M20	5.71	M0+O-H ₂ +SO ₃	447.075 0	447.074 1	-2.0	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ S	353.138 5, 321.112 3	F
M21	4.95	M0+H ₂ +O+SO ₃	451.106 3	451.106 6	0.8	C ₂₁ H ₂₄ O ₉ S	313.108 3, 253.050 6, 149.024 3	F
M22	5.61	M0+O+SO ₃	449.090 6	449.089 8	-1.9	C ₂₁ H ₂₂ O ₉ S	357.060 2, 313.070 7, 269.044 7	F
M23	3.99	M0-CH ₃ +C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	644.191 4	644.197 3	9.6	C ₃₀ H ₃₅ N ₃ O ₁₁ S	601.216 0, 209.045 3	F

化、羟基化代谢产物,为M7的羟基化产物。在CAA结构中,羰基双键与相邻的苯环形成共轭键,比异戊烯基的孤立双键更稳定。因此,还原可能首先发生在异戊烯基的双键上。由于苯环上的羰基是一个吸电子基团,使得苯环上的羟基化反应更难发生。相比之下,烯丙基更容易发生羟基化,推测是在异戊烯基末端的一个甲基上发生羟基化。

M2、M4、M6、M16: m/z 529.171 0 ([M-H]⁻) 代谢物 M2 在 5.29 min 洗脱,元素成分为 C₂₇H₃₀O₁₁,比 CAA 多 176 Da。M2 在 m/z 353.139 5 处有特征产物离子,与 CAA 的 [M-H]⁻ 相同。因此,它可能来源于 CAA 的葡萄糖醛酸结合反应。此外, m/z 452.146 7 ([M2-OCH₃-COOH]⁻),409.140 6 ([M2-C₈H₈O]⁻) 和 385.086 5 ([M2-C₅H₁₀-C₆H₆]⁻) 的典型碎片离子表明,葡萄糖醛酸结合反应发生在 CAA 的酚羟基上。M4 (RT = 5.53 min) 在 m/z 531.186 6 处有 [M-H]⁻ 离子,元素组成为 C₂₇H₃₂O₁₁,比 M2 多 2 Da (+H₂),比 CAA 多 178 Da (+C₆H₈O₆+H₂)。因此,M4 被确定为 CAA 的葡萄糖醛酸结合反应和还原代谢物。从 MS² 质谱中观察到,在 m/z 269.045 7

([M0-CH₃-C₅H₁₀]⁻) 处检测到一个产物离子,推测还原反应发生在异戊烯基的双键上。此外,还发现了 m/z 401.087 9 ([M4-CH₃-C₅H₁₀-COOH]⁻) 和 225.055 1 ([M0-CH₃-C₅H₁₀-COOH]⁻) 两种典型的产物离子,表明葡萄糖醛酸结合反应发生在 CAA 的酚羟基上。M6 (RT = 6.01 min) 在 m/z 513.176 1 处有一个 [M-H]⁻ 离子,分子式为 C₂₇H₃₀O₁₀,比 M2 少一个 O 元素。由此推测,M6 可能是 CAA 的葡萄糖醛酸结合和脱氧代谢物。结合 UNIFI 数据库分析,通过氢化还原、葡萄糖醛酸结合得到 M6。根据文献^[1],在 CAA 合成的最后一步,不饱和内酯水解得到最终产物 CAA。由此推断 CAA 是通过脱水得到不饱和内酯,并通过异戊烯基的氢化还原和对酚羟基的葡萄糖醛酸结合得到 M6。M16 (RT = 10.51 min) 在 m/z 379.154 5 处检测到 [M-H]⁻ 离子,元素组成为 C₂₃H₂₄O₅。结合 UNIFI 数据库分析,M16 被鉴定为 CAA 的乙酰化和脱氧代谢产物。与 M6 一样,M16 也经历了相同的脱水和加氢还原反应。

M3、M19、M21、M22: M3 在 5.41 min 洗脱,在 m/z 433.095 7 处检测到 [M-H]⁻ 离子,分子式为 C₂₁H₂₂O₈S,

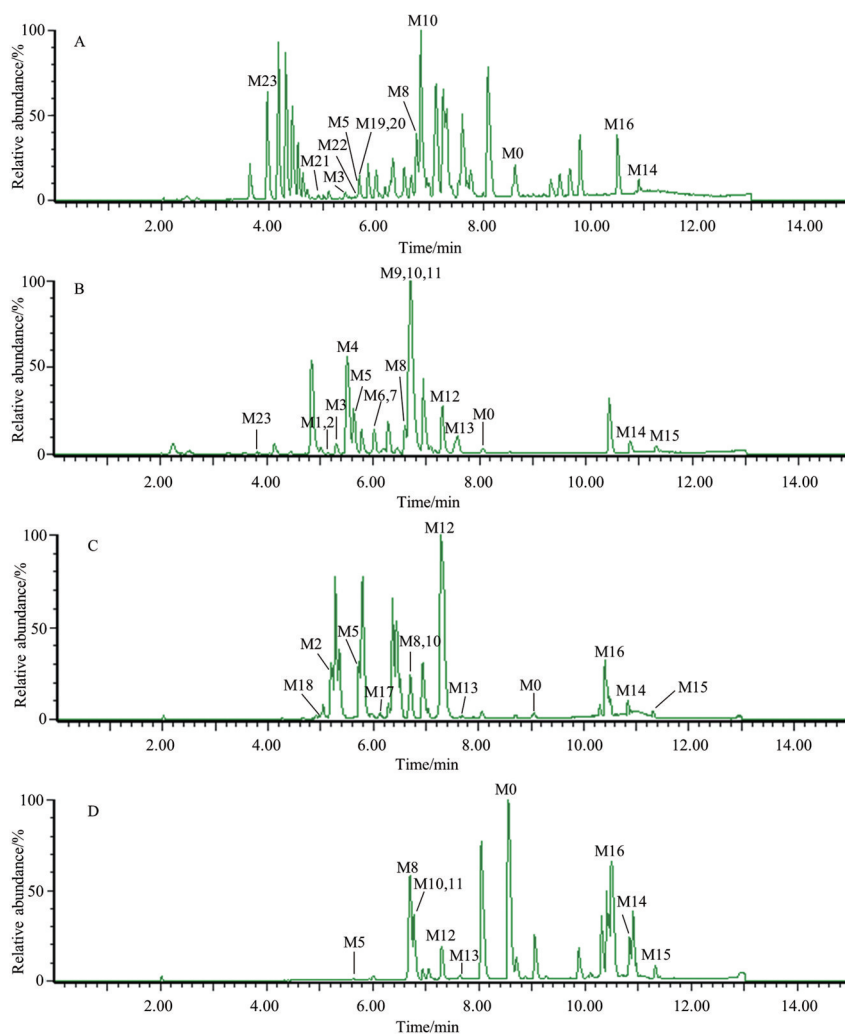


Figure 2 Base peak intensity (BPI) of metabolites in feces (A), urine (B), bile (C) and plasma (D). The names of M0–M23 were listed in Table 1

比CAA多80 Da (+SO₃)。因此, M3被鉴定为CAA的硫酸盐结合代谢物。M19 (RT = 5.70 min) 在 *m/z* 435.111 4 处有一个 [M-H]⁻ 离子, 其元素组成为 C₂₁H₂₄O₈S, 比CAA多82 Da (+H₂+SO₃), 比M3多2 Da (+H₂)。因此, 初步确定M19为CAA的还原和硫酸盐结合代谢物。代谢物M21在 *m/z* 451.106 3 处有 [M-H]⁻ 离子, 元素组成为 C₂₁H₂₄O₉S, 在 4.95 min 检测到, 比M19多16 Da (+O), 推测M21比M19多进行了一次羟基化。5.61 min 洗脱产物M22, 在 *m/z* 449.090 6 处检测到 [M-H]⁻ 离子, 分子式为 C₂₁H₂₂O₉S, 比M3多16 Da (+O)。因此, M22被确定为CAA的羟基化和硫酸盐结合产物。

M5、M10: M5在5.65 min 检测到, [M-H]⁻ 离子在 *m/z* 385.128 7 处。M5的分子式为 C₂₁H₂₂O₇, 比CAA多了两个O原子。同时, 其典型的碎片离子包括 *m/z* 341.139 4 ([M5-COOH]⁻), 323.128 7 ([M5-OH-COOH]⁻), 311.128 7 ([M5-(CH₂OH)₂-CH₃]⁻), 281.117 8

([M5-OH-COOH-C₂H₂(CH₂OH)₂]⁻) 和 240.079 0 ([M5-OH-COOH-C₂H₂(CH₂OH)₂]⁻), 判断是在异戊烯基末端的两个甲基上羟基化。此外, 代谢产物M10 (RT = 6.79 min) 在 *m/z* 383.113 1 处出现 [M-H]⁻ 离子, 比M5少2 Da, 比CAA多30 Da。从MS²质谱中可以看出, M10在 *m/z* 339.123 8 和 321.113 1 处出现了产物离子, 均比M5少2 Da, 说明它是M5的脱氢代谢物。M10的其他产物离子在 *m/z* 处分别为 295.134 0 ([M10-OH-COOH-CH₂OH]⁻) 和 279.102 6 ([M10-OH-COOH-CH₂OH]⁻)。因此, 判断M10是由M5的一个醇羟基氧化成醛而来的。

M8、M12、M20: M8 (RT = 6.70 min), [M-H]⁻ 离子在 *m/z* 369.133 8 处检测到。M8的元素组成为 C₂₁H₂₂O₆, 比CAA多1个O元素。此外, 其典型的碎片离子包括 *m/z* 351.124 1 ([M8-OH]⁻), 325.144 8 ([M8-COOH]⁻), 295.134 0 ([M8-COOH-OCH₃]⁻) 和 251.071 4 ([M8-

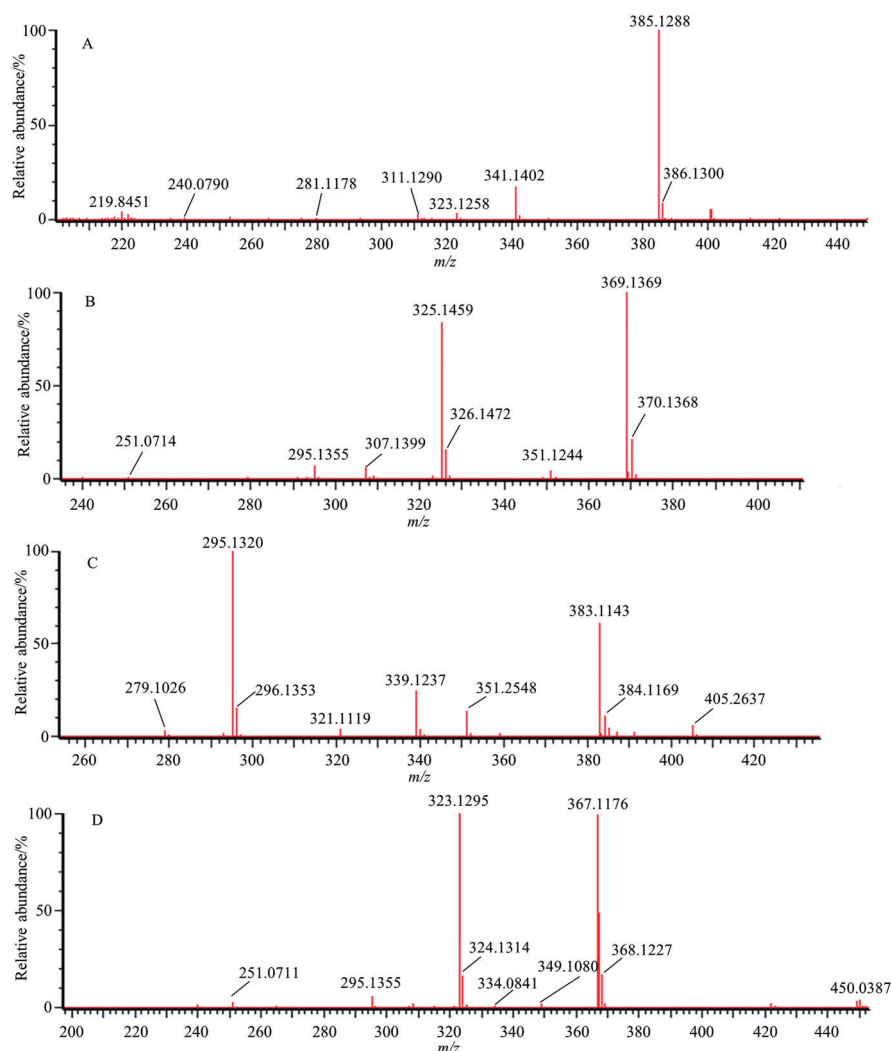


Figure 3 The MS² spectrum of major metabolite, M5 (A), M8 (B), M10 (C), M12 (D)

COOH-OH-C₃H₅OH]⁻), 这表明它是在CAA的异戊烯基末端的一个甲基上被羟基化的。M12 (RT = 7.30 min) 在 m/z 367.118 2 处有 [M-H]⁻ 离子, 元素组成为 C₂₁H₂₀O₆, 比M8少 2 Da (-H₂)。同时在 m/z 295.133 8 和 251.071 1 处检测到M12的典型碎片离子, 与M8相同。在 m/z 349.108 0 处检测到另一个碎片离子, 比M8少 2 Da。因此, 可以推断M12是由M8的醇羟基氧化生成醛而来的。M20在 5.71 min 检测到, [M-H]⁻ 离子在 m/z 447.070 5 检测到, 元素组成为 C₂₁H₂₀O₉S, 比M12多 80 Da (+SO₃)。因此, 确定M20为M12的硫酸盐结合产物。

M9: 代谢产物M9在 6.78 min 洗脱, 在 m/z 349.144 0 处观察到 [M-H]⁻ 离子, 其元素组成为 C₂₂H₂₂O₄。M9的MS²质谱中, 在 m/z 处分别检测到 339.123 8 ([M9-CH₂]⁻), 295.134 0 ([M₉-CH₂-C₃H₆]⁻) 和 279.102 6 ([M9-CH₂-C₄H₉]⁻) 的典型碎片离子。结合UNIFI数据库分析, 推断M9为CAA脱水和甲基化代

谢产物。推测脱水反应包括两个步骤, 羰基酮-烯醇互变反应, 然后脱水形成不饱和和内酯。

M11: 代谢产物M11在 6.86 min 洗脱, 在 m/z 371.149 5 处观察到 [M-H]⁻ 离子, 其元素组成为 C₂₁H₂₄O₆, 比CAA多 18 Da (+H₂, +O)。因此, 初步推测M11来源于CAA的还原和羟基化。

M13、M15: M13和M15分别在 7.71 和 11.32 min 检测到。M13在 m/z 399.180 8 处观察到 [M-H]⁻ 离子, 其元素组成为 C₂₃H₂₈O₆。结合UNIFI数据库分析, 推测M13是通过两个双键上的还原反应和乙酰化反应得到的。由于CAA的两个苯环相对稳定, 可能会在异戊烯基和羰基的双键上发生还原反应。M15在 m/z 383.185 8 处观察到 [M-H]⁻ 离子。M15的元素组成为 C₂₃H₂₈O₅, 比M13少 1 个 O 原子。同时, 在 m/z 325.183 3 ([M15-COOH-CH₃]⁻) 和 265.247 2 ([M15-OH-COOH-OCH₃-(CH₃)₂]⁻) 处检测到其碎片离子, 推测M15比M13多进行了一次脱羟基反应。

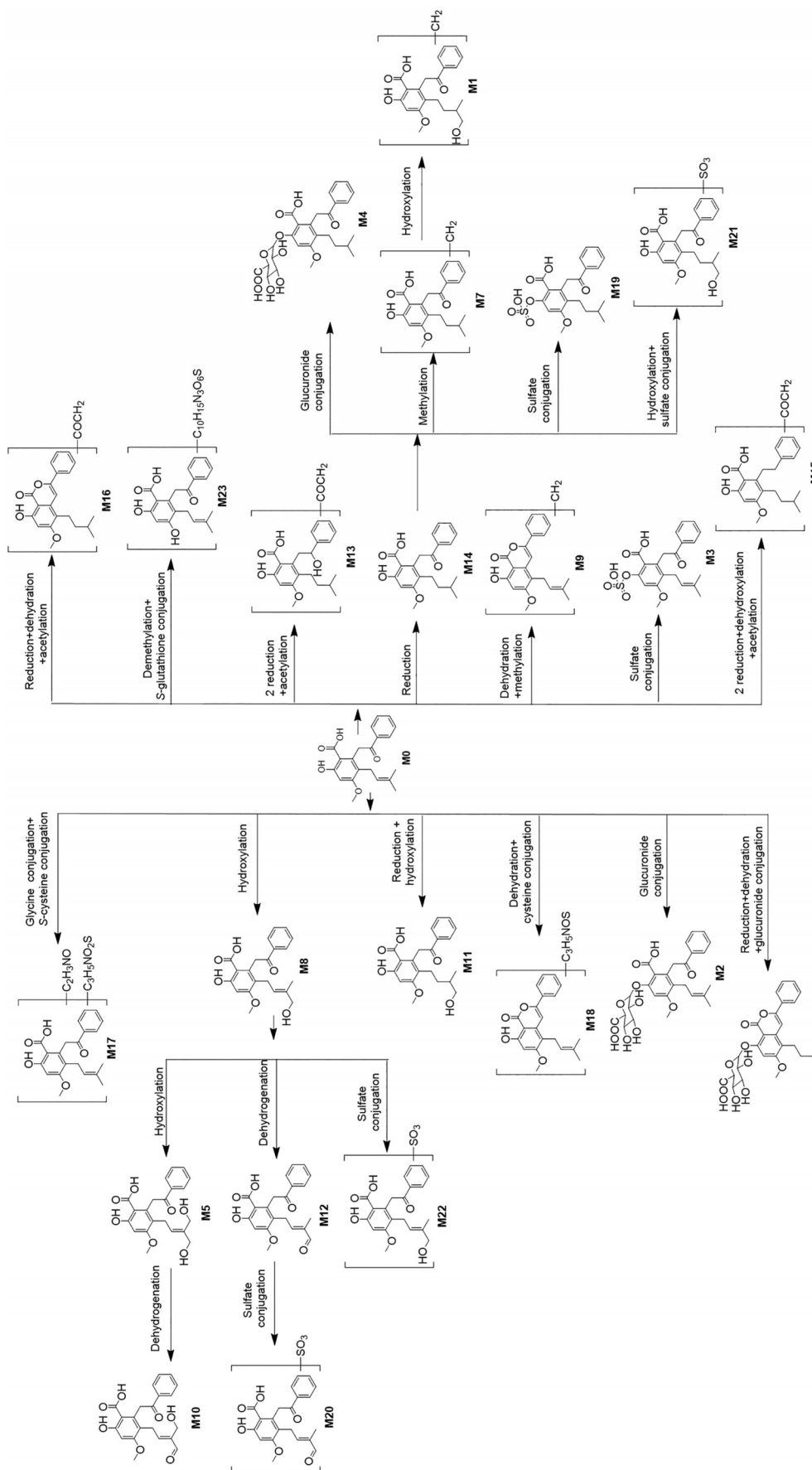


Figure 4 Metabolic pathways for CAA in rat

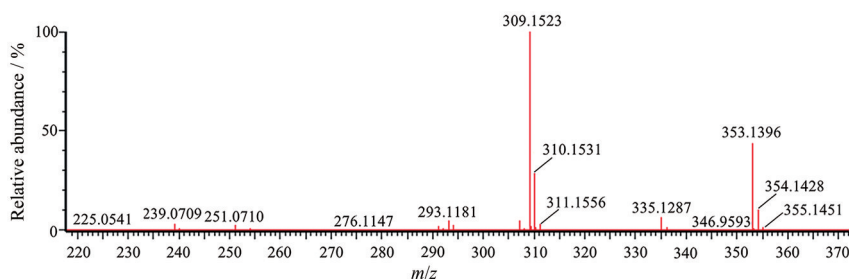


Figure 5 Mass spectrum of CAA

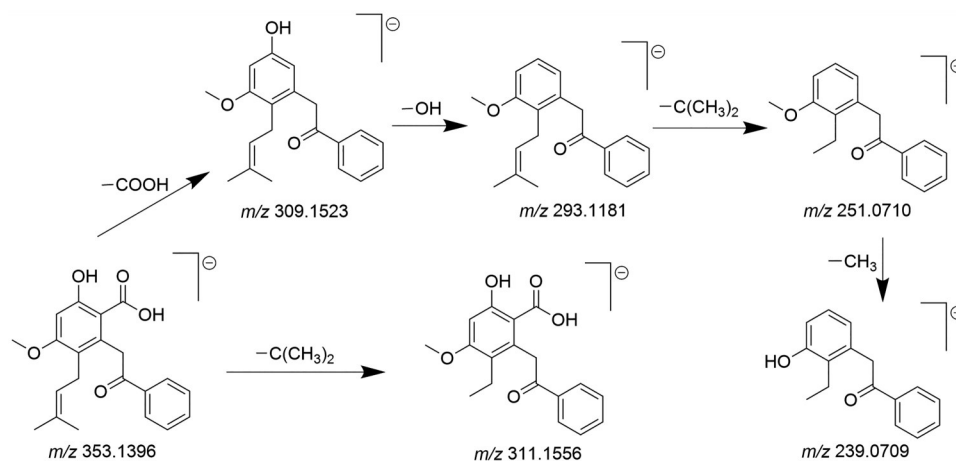


Figure 6 Fragmentation pathways of CAA in negative ion mode

M17: M17在6.20 min洗脱, M17在 m/z 529.165 4处有 $[M-H]^-$ 离子, 元素组成为 $C_{26}H_{30}N_2O_8S$ 。比CAA多176 Da ($+C_2H_3NO$ 、 $+C_3H_5NO_2S$)。在 m/z 353.139 5处发现了主要的碎片离子, 与母体化合物的准分子离子相同。因此, 初步确定M17为CAA的甘氨酸结合和S-半胱氨酸结合代谢物。

M18: M18在5.06 min洗脱, 在 m/z 438.137 5处有 $[M-H]^-$ 离子, 分子式为 $C_{24}H_{25}NO_5S$ 。比CAA多85 Da ($+C_3H_5NOS$ 、 $-H_2O$)。因此, 初步确定M18为CAA的脱水和半胱氨酸结合代谢物, 脱水反应过程与M9相同。

M23: 在3.99 min洗脱, M23在 m/z 644.191 4处有 $[M-H]^-$ 离子, 分子式为 $C_{30}H_{35}N_3O_{11}S$ 。与CAA相比, M23的 $[M-H]^-$ 离子增加了291 Da ($+C_{10}H_{15}N_3O_6S$ 、 $-CH_2$), 在 m/z 601.216 0 ($[M23-OH-(CH_3)_2]^-$) 和 209.045 3 ($[M23-OH-COOH-C_5H_{10}-C_{10}H_{15}N_3O_6S]^-$) 处可见典型的碎片离子。因此, 初步确定M23为CAA的去甲基化和S-谷胱甘肽结合代谢物。根据文献^[26], 当甲氧基附着在苯环上时, 很容易失去一个甲基, 推测CAA的甲氧基失去了一个甲基分子。

讨论

本研究建立了一种快速、高效、可靠的UPLC-Q-

TOF-MS/MS方法, 并结合UNIFI软件对口服CAA后大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁样本中的代谢物进行鉴定。基于精确的质量测量、相关药物转化数据和特征碎片离子, 本文方法共检测了23个代谢物。与CAA相关的代谢途径包括I相(羟基化、水解和还原)和II相(硫酸盐结合、葡萄糖醛酸结合、半胱氨酸结合、甘氨酸结合和S-谷胱甘肽结合)代谢途径。基底峰强度(BPI)谱图显示, 代谢产物M5、M8、M10和M12的反应明显高于CAA。说明在体内, 脱氢和羟基化是CAA的主要代谢途径。结合既往研究, 只有5.17%的CAA以原型^[16]的形式排出, 推测CAA主要以代谢物的形式排出。本实验结果为了解CAA在大鼠体内的代谢和安全性提供了研究基础。关于蒽类化合物的报道较少, 本研究有助于了解该类化合物在体内的生物转化规律, 可为该类化合物的进一步研究和开发提供参考。

作者贡献: 程瑶、班玉娟完成数据收集、分析及文章撰写; 张丽、胡克荣协助完成动物实验; 陈瑞设计实验并提供学术指导; 黄静协助指导实验并审核文章。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2

- diabetes [J]. Nature, 2019, 576: 51-60.
- [2] He JH, Chen LX, Li H. Progress in the discovery of naturally occurring anti-diabetic drugs and in the identification of their molecular targets [J]. Fitoterapia, 2019, 134: 270-289.
- [3] Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 1835.
- [4] Saeedi P, Salpea P, Karuranga S, et al. Mortality attributable to diabetes in 20-79 years old adults, 2019 estimates: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 162: 108086.
- [5] Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16: 377-390.
- [6] Iatcu CO, Steen A, Covasa M. Gut microbiota and complications of type-2 diabetes [J]. Nutrients, 2021, 14: 166.
- [7] Pop-Busui R, Januzzi JL, Brummer D, et al. Heart failure: an underappreciated complication of diabetes. A consensus report of the American Diabetes Association [J]. Diabetes Care, 2022, 45: 1670-1690.
- [8] Yang W, Wang C. Long-term complications in youth-onset type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2021, 385: 2014-2015.
- [9] van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, et al. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2020, 8: 325-336.
- [10] Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: a pre-clinical and clinical investigation [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112563.
- [11] Yang R, Wang L, Xie J, et al. Treatment of type 2 diabetes mellitus *via* reversing insulin resistance and regulating lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo* using cajanonic acid A [J]. Int J Mol Med, 2018, 42: 2329-2342.
- [12] Wang L. Effect and Mechanism of Cajanonic Acid A on Regulating Blood Glucose and Serum Lipid (树豆酮酸 A 调节血糖血脂的作用和机理研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2012.
- [13] Xie J. To Explore the Effect of Cajanonic Acid A on Insulin Resistance (树豆酮酸 A 改善胰岛素抵抗的作用研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [14] Li X. To Explore the Effect of Cajanonic Acid A on the Insulin Signaling Pathway in HepG2 Cells with PTP1B Overexpression (树豆酮酸 A 对 PTP1B 过表达 HepG2 细胞胰岛素信号通路的作用研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [15] Luo M, Liang B, Chen WZ, et al. Effect of cajanonic acid A on glucose metabolism of HepG2 cells *in vitro* [J]. Chin J Public Health (中国公共卫生), 2016, 32: 928-930.
- [16] Zhang L, Chen R, Ban Y, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion study of cajanonic acid A in rats by UPLC-MS/MS [J]. Planta Med, 2020, 86: 312-318.
- [17] Zhang Y, Sun Y, Mu X, et al. Identification of metabolites of vindoline in rats using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1060: 126-137.
- [18] Wen B, Zhu M. Applications of mass spectrometry in drug metabolism: 50 years of progress [J]. Drug Metab Rev, 2015, 47: 71-87.
- [19] Xu LL, Xu JJ, Zhong KR, et al. Analysis of non-volatile chemical constituents of Menthae Haplocalycis Herba by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Molecules, 2017, 22: 1756.
- [20] Wu T, Lv H, Wang F, et al. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS (E) and their antioxidant activity in Caco-2 cells [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 2280-2288.
- [21] Jin H, Liu Y, Guo Z, et al. Recent development in liquid chromatography stationary phases for separation of traditional Chinese medicine components [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 130: 336-346.
- [22] Wei YQ, Wang TY, Li YT, et al. Metabolites of schaftoside in mouse plasma, bile, urine and feces after oral administration by UPLC-Q/TOF-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2022, 57: 2811-2820.
- [23] Zhao ZW, Peng F, Zhang K, et al. Selection of chemical markers for identification of different species of Juniperri Caulis et Folium based on UPLC-Q-TOF-MS/MS metabonomics technology [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2023, 58: 1880-1893.
- [24] Zhang XY, Liu Y, Wu H, et al. Identification of major bioactive components and metabolites of Gandou decoction in rat urine by an integrative approach based on UPLC-Q-TOF-MS^E coupled with xenometabolomics analytical platform [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2020, 55: 971-978.
- [25] Wei R, Yang LJ, Qin XM, et al. Rapid identification of chemical constituents in the dried stem bark of *Asparagus officinalis* L. based on UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2022, 57: 2839-2850.
- [26] Luo J, Chen G, Liu D, et al. Study on the material basis of Houpo Wenzhong decoction by HPLC fingerprint, UHPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, and network pharmacology [J]. Molecules, 2019, 24: 2561.