

LC/MSⁿ 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物

苏美英, 周婷婷, 周茂金* (山东省泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

摘要: 目的 研究咖啡酸(CA)在大鼠体内的代谢产物。方法 大鼠灌胃(50 mg·kg⁻¹)给予CA后采集0~4 h尿样, 用电喷雾离子阱多级质谱法对CA在大鼠体内的代谢产物进行分析。结果 大鼠灌胃给予CA后, 在体内可测到2个原形药的甲基化代谢物、2个原形药的单葡萄糖醛酸结合物、1个原形药的双葡萄糖醛酸结合物、2个原形药的单硫酸结合物、2个甲基化物的葡萄糖醛酸结合物和2个甲基化物的硫酸结合物。结论 CA在大鼠体内广泛代谢, 其代谢物的结构有待于进一步分析后确证。

关键词: 咖啡酸; 电喷雾离子阱多级质谱法; 代谢物

中图分类号: R917.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)06-0501-05

The Characterization of the Metabolites of Caffeic Acid in Rats by LC/MSⁿ

SU Meiyong, ZHOU Tingting, ZHOU Maojin* (Taian Central Hospital, Taian 271000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the metabolites of caffeic acid (CA) in rats. **METHODS** After an oral administration of CA (50 mg·kg⁻¹) to Wistar rats, 0-4 h rats urine was collected, and metabolites of CA in rats was determined by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry (LC/MSⁿ). **RESULTS** The results revealed that two methylated derivatives (ferulic and isoferulic acid) of CA, two CA-glucuronides, two CA-sulfates, one CA-di-glucuronide, two methylated CA-glucuronides, two methylated CA-sulfates were found in rats urine. **CONCLUSION** CA was extensively metabolized in rats and structures of the metabolites will be further confirmed.

KEY WORDS: caffeic acid; LC/MSⁿ; metabolites

咖啡酸属于苯乙炔酸类化合物, 在植物中广泛分布, 如金银花、杜仲、茵陈、玉米叶、蒲公英、野菊花、咖啡和茶叶等。国内外研究表明, 咖啡酸具有多种药理作用, 主要包括心血管保护、抗诱变抗癌^[1]、抗菌抗病毒、降脂降糖、抗白血病、免疫调节、利胆止血^[2]及抗氧化^[3-4]作用等。咖啡酸的生物活性依赖于其在肠道的吸收和代谢。目前, 关于咖啡酸代谢方面的文献报道较少, Azuma 等^[5]给大鼠灌胃咖啡酸(700 μmol·kg⁻¹), 血浆用葡萄糖醛酸苷酶和硫酸酯酶水解后, 分别测定酶水解前后咖啡酸的浓度。结果表明, 咖啡酸大部分以葡萄糖醛酸和硫酸结合物的形式存在, 其中葡萄糖醛酸结合物的浓度最高, 给药后 2 h 峰浓度达 26.1 μmol·L⁻¹, 而游离型咖啡酸浓度很低, 给药后 2 h 峰浓度仅为 1.6 μmol·L⁻¹。Lafay 等^[6]还通过小肠灌注模型研究了咖啡酸在大鼠小肠体内的吸收情况, 咖啡酸(50 μmol·L⁻¹, 0.75 mL·min⁻¹) 在空肠和回肠内灌注 45 min 后, 测定流出液、胆汁和血浆中的原形药及其代谢物浓度, 结果表明, 19.1% 的咖啡酸在小肠内吸收, 80.9% 的咖啡酸进入盲肠与葡萄

糖醛酸结合。为进一步研究咖啡酸在大鼠体内的代谢特征, 本研究用电喷雾离子阱多级质谱法(LC/MSⁿ)对咖啡酸在大鼠体内的代谢产物进行分析, 为其临床研究提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

美国 Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪(ThermoQuest, USA), 配有 ESI(电喷雾离子化)源及 LCQ1.2 数据处理系统, PM-90 泵(BASi, USA), 自动进样器(BASi, USA)。质谱条件: 负离子检测, 离子源喷射电压 4.25 kV, 毛细管温度 250 °C, 毛细管电压 4.5 V, 鞘气流速 0.75 mL·min⁻¹, 辅助气流速 0.15 mL·min⁻¹, 碰撞气体 He, 碰撞能量为 25 eV。

1.2 试剂

咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸(天津一方科技有限公司, 批号: 080723、080416 和 080712, 纯度分别为 99.5%、99% 和 99.5%), β-葡萄糖醛酸苷酶(1 084.4 U·mL⁻¹, 具有硫酸酯酶活性, 上海沪尚生物技术有限公司), PEG400、三氯乙酸、甲醇、醋

作者简介: 苏美英, 女, 主管药师 Tel: (0538)21382317 E-mail: tazhaoban_su@163.com *通信作者: 周茂金, 男, 教授, 主任药师, 博士, 硕士生导师 Tel: (0538)2138623 E-mail: mjzhoutj@sina.com

酸铵和醋酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Nova-Pak C₁₈ 柱 (150 mm × 3.9 mm, 3 μm)。检测甲基化代谢物时流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-醋酸(20:80:0.5), 检测葡萄糖醛酸和硫酸代谢物时流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-醋酸(5:95:0.5), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。

2.2 动物实验

取 Wistar 大鼠 6 只, ♀ ♂ 兼用, 体重 200 ~ 250 g(天津药物研究院动物实验中心提供, 实验动物许可证: 津动字第 001 号)。取咖啡酸适量, 用 PEG400 配成浓度为 40 mg·mL⁻¹ 的溶液, 按 50 mg·kg⁻¹ 灌胃给予咖啡酸溶液 1.0 mL, 分别采集大鼠给药前后的尿样, -20 °C 保存。

2.3 尿样处理

取大鼠尿样 100 μL, 加入 10% 三氯乙酸 50 μL, 摇匀, 涡流混合 1 min, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC/MSⁿ 分析。

2.4 大鼠尿样中甲基化代谢产物分析

比较大鼠灌胃前与给药后 0 ~ 4 h 尿样的总离子流色谱图, 见图 1, 发现给药后的尿样中除检测到原形药 M0(准分子离子 m/z 179)外, 还发现了 2 个准分子离子 m/z 193 的代谢物 M01 和 M01', 其保留时间分别为 17.7 和 25.8 min, 推测其为原形药的甲基化代谢物, 分别对其二级质谱分析, 主要得到碎片离子为 m/z 178(脱去甲基基团)和 m/z 149(脱去一分子 CO₂), 见图 2。将阿魏酸标准品溶液进行 LC/MS² 分析, 所得的一级和二级全扫描质谱及色谱保留时间与 M01 相同, 由此确认 M01 为阿魏酸, M01' 推测为异阿魏酸。

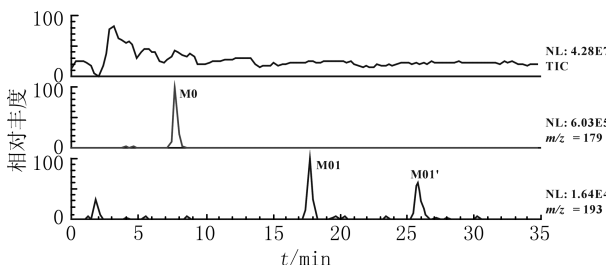


图1 大鼠灌胃给予咖啡酸 (50 mg·kg⁻¹) 后 0 ~ 4 h 尿中原形药及其甲基化代谢物的色谱图

Fig 1 The chromatograms of CA and its methylated metabolites in urinary sample 0-4 h after oral administration of CA (50 mg·kg⁻¹) to rats

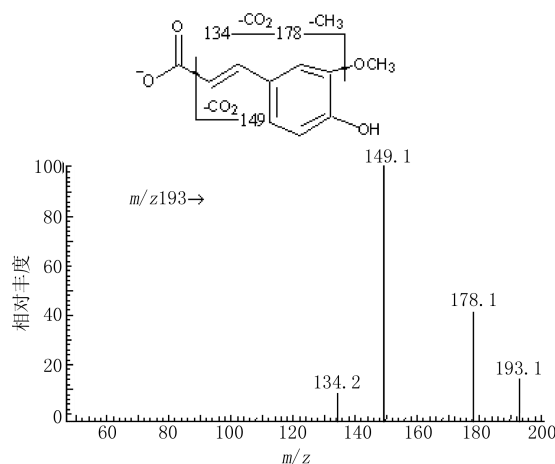


图2 阿魏酸 (M01) 的二级全扫描质谱图

Fig 2 MS² spectrum of [M - H]⁻ of FA (M01) at m/z 193

2.5 酶水解实验

取给药后的大鼠尿液 2 份各 100 μL, 一份加入 25 μL β-葡萄糖醛酸酶醋酸盐缓冲液 (pH 5.0), 另一份加入 25 μL 醋酸盐缓冲液 (pH 5.0), 37 °C 孵育 1 h, 各加入 10% 三氯乙酸 50 μL, 摇匀, 涡流混合 1 min, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC/MSⁿ 分析。结果表明, 大鼠尿液经过酶水解后, 咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸的葡萄糖醛酸和硫酸结合物明显减少, 而咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸相应的增加, 由此推测咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸在大鼠体内可与葡萄糖醛酸和硫酸结合。

2.6 大鼠尿样中葡萄糖醛酸和硫酸代谢产物分析

比较大鼠灌胃前与给药后 0 ~ 4 h 尿样的总离子流色谱图, 见图 3, 发现给药后的尿样中除检测到准分子离子 m/z 179 外, 还发现了一系列新的相关离子, 对这些离子进行多级质谱分析, 根据质谱及色谱行为推测代谢物的结构。

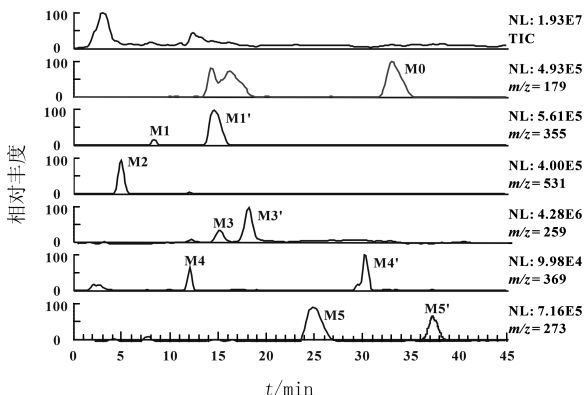


图3 大鼠灌胃给予咖啡酸 (50 mg·kg⁻¹) 后 0 ~ 4 h 尿中原形药及其葡萄糖醛酸和硫酸代谢物的色谱图

Fig 3 The chromatograms of CA and its glucuronide and sulfate conjugates in urinary sample 0-4 h after oral administration of CA (50 mg·kg⁻¹) to rats

原形药 M0 ($[M-H]^-$ m/z 179) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 179, 色谱保留时间为 33.3 min, 对其进行二级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 135 (脱去一分子 CO_2), 见图 4。将咖啡酸标准品溶液进行 LC/MS² 分析, 所得的一级和二级全扫描质谱及色谱保留时间与 M0 相同, 由此确认 M0 为原形药咖啡酸。

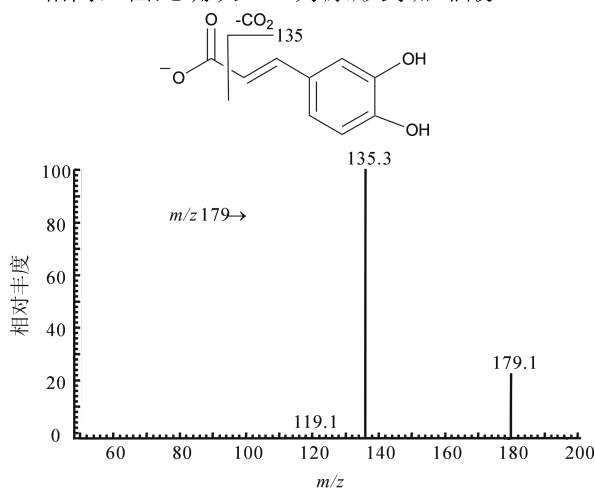


图 4 咖啡酸 (M0) 的二级全扫描质谱图

Fig 4 MS² spectrum of $[M-H]^-$ of CA (M0) at m/z 179

代谢物 M1 和 M1' ($[M-H]^-$ m/z 355) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 355, 色谱保留时间分别为 8.5 和 15.2 min, 分子量比原形药多 176 Da, 推测它们为同分异构体, 即原形药的葡萄糖醛酸结合物。对 M1 进行二级全扫描质谱分析, 均可得到碎片离子为 m/z 311 (脱去一分子 CO_2)、 m/z 179 (脱去一分子葡萄糖醛酸基团)、 m/z 175 (脱去一分子咖啡酸)、 m/z 113 (脱去一分子咖啡酸、一分子 CO_2 和一分子 H_2O)、 m/z 175 和 m/z 113 为负离子检测方式中葡萄糖醛酸结合物的诊断碎片^[7]。对 m/z 179 进行三级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 135 (脱去一分子 CO_2), 见图 5, 与原形药 M0 的二级质谱相同, 由此推测 M1 和 M1' 为原形药的葡萄糖醛酸结合物。

代谢物 M2 ($[M-H]^-$ m/z 531) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 531, 色谱保留时间分别为 5.1 min, 分子量比原形药多 352 Da, 推测其为原形药的双葡萄糖醛酸结合物。对 M2 进行二级全扫描质谱分析, 可得到碎片离子为 m/z 355 (脱去一分子葡萄糖醛酸基团, 基峰), 对 m/z 355 进行三级全扫描质谱分析, 可得到 m/z 311 (脱去一分子 CO_2) 和 m/z 179 (脱去一分子葡萄糖醛酸基团) 的碎片离子。对 m/z 179 进行四级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子

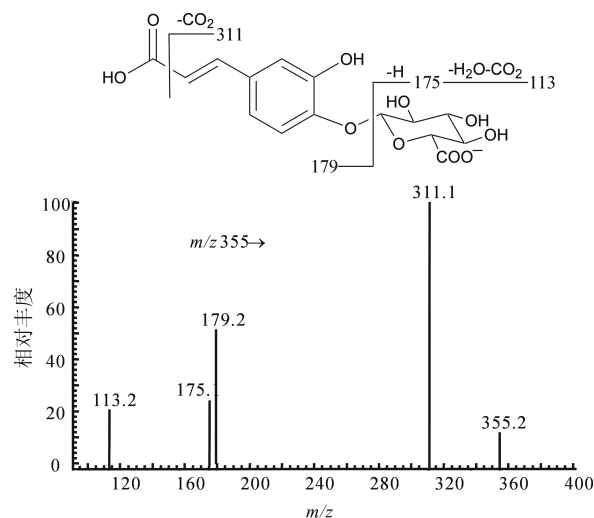


图 5 M1 的二级全扫描质谱图

Fig 5 MS² spectrum of $[M-H]^-$ of M1 at m/z 355

为 m/z 135 (脱去一分子 CO_2), 见表 1, 与原形药 M0 的三级质谱相同, 由此推测 M2 为原形药的双葡萄糖醛酸结合物。

代谢物 M3 和 M3' ($[M-H]^-$ m/z 259) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 259, 色谱保留时间分别为 15.5 和 18.2 min, 分子量比原形药多 80 Da, 推测它们为同分异构体, 即原形药的硫酸结合物^[8]。对 M3 和 M3' 进行二级全扫描质谱分析, 均可得到碎片离子为 m/z 179 (脱去一分子 SO_3), 对 m/z 179 进行三级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 135 (脱去一分子 CO_2), 见表 1, 与原形药 M0 的二级质谱相同, 由此推测 M3 和 M3' 为原形药的硫酸结合物。

代谢物 M4 和 M4' ($[M-H]^-$ m/z 369) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 369, 色谱保留时间分别为 12.5 和 30.5 min, 分子量比原形药多 190 Da, 推测它们为同分异构体, 即原形药甲基化后的葡萄糖醛酸结合物。对 M4 和 M4' 进行二级全扫描质谱分析, 均可得到碎片离子为 m/z 193 (脱去一分子葡萄糖醛酸基团), m/z 175 和 m/z 113。对 m/z 193 进行三级全扫描质谱分析, 得到主要碎片离子为 m/z 178 (脱去甲基基团) 和 m/z 149 (脱去一分子 CO_2), 见表 1, 与原形药 M01 或 M01' 的二级质谱相同, 由此推测 M4 和 M4' 为 M01 或 M01' 的葡萄糖醛酸结合物。

代谢物 M5 和 M5' ($[M-H]^-$ m/z 273) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 273, 色谱保留时间分别为 25.5 和 37.2 min, 分子量比原形药多 94 Da, 推测它们为同分异构体, 即原形药甲

表1 咖啡酸及其代谢物的多级质谱碎片离子

Tab 1 Multi-stage mass spectral data of TRG and its metabolites in rats

保留时间/min	代谢物	准分子离子	二级全扫描质谱碎片(相对丰度/%)	三级全扫描质谱碎片(相对丰度/%)
32.1	M0	179	135(100), M-H-CO ₂	
17.7 ¹⁾	M01	193	178(50), M-H-CH ₃ 149(100), M-H-CO ₂ 134(10), M-H-CH ₃ -CO ₂	
25.8 ¹⁾	M01'	193	178(50), M-H-CH ₃ 149(100), M-H-CO ₂ 134(10), M-H-CH ₃ -CO ₂	
8.35	M1	355	179(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ 175(20), M-H-C ₉ H ₈ O ₄ 135(10), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂ 113(10), M-H-C ₉ H ₈ O ₄ -CO ₂ -H ₂ O	135(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂
14.6	M1'	355	311(100), M-H-CO ₂ 179(50), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ 175(25), M-H-C ₉ H ₈ O ₄ 135(10), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂ 113(20), M-H-C ₉ H ₈ O ₄ -CO ₂ -H ₂ O	135(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂
5.15	M2	531	355(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ 311(10), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ .CO ₂	311(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂ 179(60), M-H-2 C ₆ H ₈ O ₆
15.4	M3	259	179(100), M-H-SO ₃ 135(100), M-H-SO ₃ -CO ₂	135(100), M-H-SO ₃ -CO ₂
18.2	M3'	259	179(100), M-H-SO ₃ 135(5), M-H-SO ₃ -CO ₂	135(100), M-H-SO ₃ -CO ₂
12.1	M4	369	193(70), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ 175(100), M-H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ 113(75), M-H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -CO ₂ -H ₂ O	149(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂
30.2	M4'	369	193(65), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ 175(75), M-H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -CO ₂ -H ₂ O 113(100), M-H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -CO ₂ -H ₂ O	178(100), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CH ₃ 149(50), M-H-C ₆ H ₈ O ₆ -CO ₂
25.6	M5	273	193(100), M-H-SO ₃ 149(2), M-H-SO ₃	178(100), M-H-SO ₃ -CH ₃ 149(100), M-H-SO ₃ -CO ₂
36.5	M5'	273	193(100), M-H-SO ₃ 142(2), M-H-SO ₃ -CO ₂	178(100), M-H-SO ₃ -CH ₃ 149(2), M-H-SO ₃ -CO ₂

注: ¹⁾ 流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-醋酸 (20 : 80 : 0.5)

Note: ¹⁾ Mobile phase consisted of methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate-acetic acid (20 : 80 : 0.5)

基化后的硫酸结合物。对 M5 和 M5' 进行二级全扫描质谱分析, 均可得到碎片离子 m/z 193 (脱去一分子 SO₃) 和 m/z 229 (脱去一分子 CO₂), 对 m/z 193 进行三级全扫描质谱分析, 得到主要碎片离子 m/z 178 (脱去甲基基团) 和 m/z 149 (继续脱去一分子

CO₂) (表 1), 由此推测 M5 和 M5' 为 M01 或 M01' 的硫酸结合物。咖啡酸在大鼠体内的代谢途径, 见图 6。

3 讨论

由于 CA 的甲基化物与其葡萄糖醛酸或硫酸

