

# LC/MS<sup>n</sup> 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物

苏美英，周婷婷，周茂金<sup>\*</sup>(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( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )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/MS<sup>n</sup>

SU Meiyng, ZHOU Tingting, ZHOU Maojin<sup>\*</sup>(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 ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 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/MS<sup>n</sup>). **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/MS<sup>n</sup>; metabolites

咖啡酸属于苯乙烯酸类化合物，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<sup>[1]</sup>、抗菌抗病毒、降脂降糖、抗白血病、免疫调节、利胆止血<sup>[2]</sup>及抗氧化<sup>[3-4]</sup>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<sup>[5]</sup>给大鼠灌胃咖啡酸( $700 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ )，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 $26.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而游离型咖啡酸浓度很低，给药后2 h 峰浓度仅为 $1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Lafay等<sup>[6]</sup>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( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )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/MS<sup>n</sup>)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 仪器与试药

#### 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  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，辅助气流速  $0.15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，碰撞气体 He，碰撞能量为 25 eV。

#### 1.2 试药

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%)， $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $1084.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，具有硫酸酯酶活性，上海沪尚生物科技有限公司)，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: mjzhouj@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 C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液-醋酸(5 : 95 : 0.5), 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> 的溶液, 按 50 mg·kg<sup>-1</sup> 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, 摆匀, 涡流混合 1 min, 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC/MS<sup>n</sup> 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 CO<sub>2</sub>), 见图 2。将阿魏酸标准品溶液进行 LC/MS<sup>2</sup> 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。

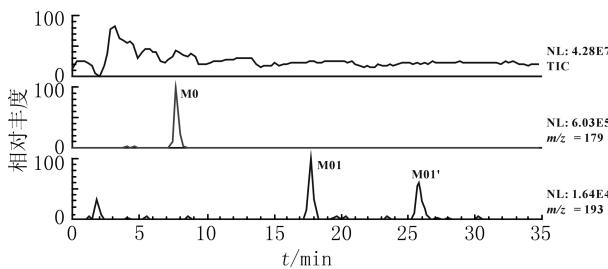


图1 大鼠灌胃给予咖啡酸 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 后 0 ~ 4 h 尿中原形药及其甲基化代谢物的色谱图

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

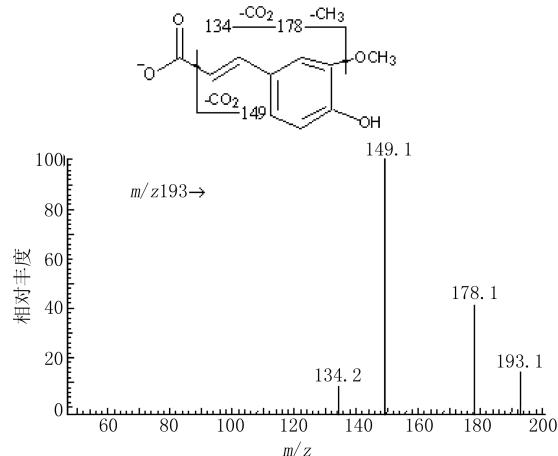


图2 阿魏酸 (M01) 的二级全扫描质谱图

**Fig 2**  $MS^2$  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, 摆匀, 涡流混合 1 min, 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC/MS<sup>n</sup> 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。

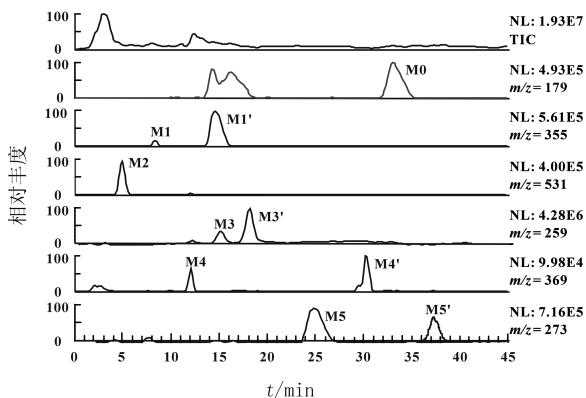


图3 大鼠灌胃给予咖啡酸 (50 mg·kg<sup>-1</sup>) 后 0 ~ 4 h 尿中原形药及其葡萄糖醛酸和硫酸代谢物的色谱图

**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<sup>-1</sup>) 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  $\text{CO}_2$ ), 见图 4。将咖啡酸标准品溶液进行 LC/MS<sup>2</sup> 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。

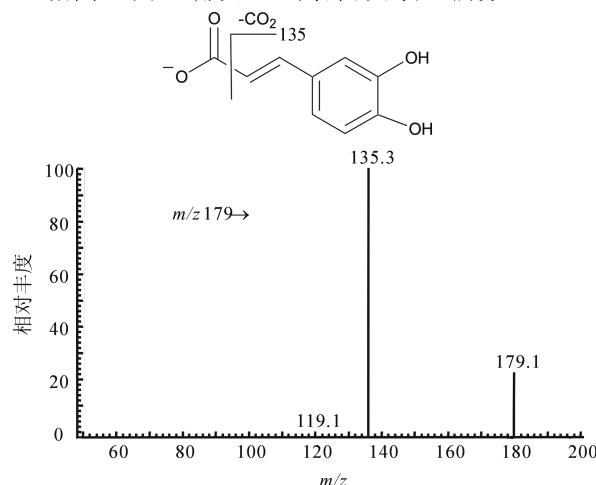


图 4 咖啡酸 (M0) 的二级全扫描质谱图

Fig 4 MS<sup>2</sup> 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  $\text{CO}_2$ )、 $m/z 179$ (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  $\text{CO}_2$  和一分子  $\text{H}_2\text{O}$ )， $m/z 175$  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<sup>[7]</sup>。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  $\text{CO}_2$ ), 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  $\text{CO}_2$ ) 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

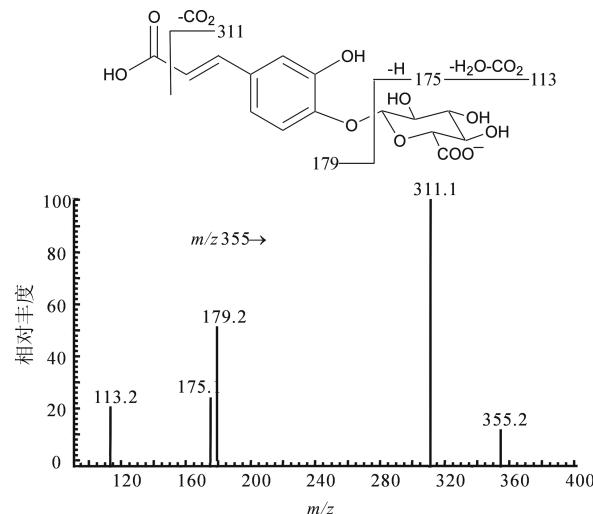


图 5 M1 的二级全扫描质谱图

Fig 5 MS<sup>2</sup> spectrum of  $[M - H]^-$  of M1 at  $m/z 355$

为  $m/z 135$ (脱去一分子  $\text{CO}_2$ ), 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<sup>[8]</sup>。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  $\text{SO}_3$ ), 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  $\text{CO}_2$ ), 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  $\text{CO}_2$ ), 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 <sub>2</sub>	
17.7 <sup>1)</sup>	M01	193	178(50), M-H-CH <sub>3</sub> 149(100), M-H-CO <sub>2</sub> 134(10), M-H-CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	
25.8 <sup>1)</sup>	M01'	193	178(50), M-H-CH <sub>3</sub> 149(100), M-H-CO <sub>2</sub> 134(10), M-H-CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	
8.35	M1	355	179(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 175(20), M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> 135(10), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub> 113(10), M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	135(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub>
14.6	M1'	355	311(100), M-H-CO <sub>2</sub> 179(50), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 175(25), M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> 135(10), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub> 113(20), M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	135(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub>
5.15	M2	531	355(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 311(10), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub>	311(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub> 179(60), M-H-2 C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
15.4	M3	259	179(100), M-H-SO <sub>3</sub> 135(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	135(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>
18.2	M3'	259	179(100), M-H-SO <sub>3</sub> 135(5), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	135(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>
12.1	M4	369	193(70), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 175(100), M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> 113(75), M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	149(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub>
30.2	M4'	369	193(65), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 175(75), M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O 113(100), M-H-C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	178(100), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub> 149(50), M-H-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> -CO <sub>2</sub>
25.6	M5	273	193(100), M-H-SO <sub>3</sub> 149(2), M-H-SO <sub>3</sub>	178(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> 149(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>
36.5	M5'	273	193(100), M-H-SO <sub>3</sub> 142(2), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	178(100), M-H-SO <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> 149(2), M-H-SO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>

注: <sup>1)</sup>流动相为甲醇-10 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液-醋酸(20:80:0.5)Note:<sup>1)</sup>Mobile phase consisted of methanol-10 mmol·L<sup>-1</sup> 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SO<sub>3</sub>)和m/z 229(脱去一分子CO<sub>2</sub>),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

CO<sub>2</sub>) (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

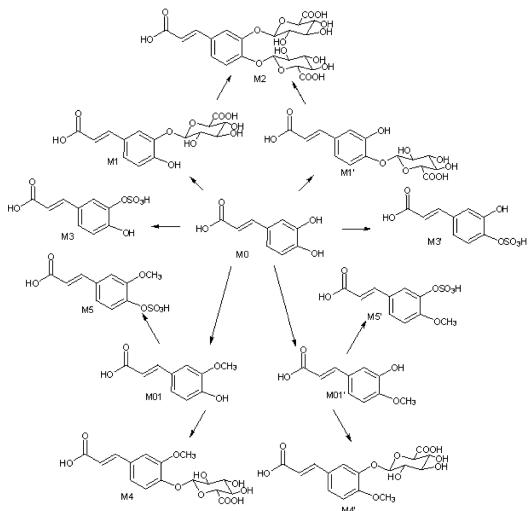


图 6 咖啡酸在大鼠体内的代谢途径

Fig 6 Proposed metabolic pathways of CA in rats

结合物极性差别较大，在等梯度色谱条件下保留时间相差甚远，因此，测定甲基化物与葡萄糖醛酸或硫酸结合物时分别采用了 2 种不同的流动相系统。大鼠灌胃给予 CA 后，在体内可测到 2 个甲基化代谢物、2 个单葡萄糖醛酸结合物、1 个双葡萄糖醛酸结合物、2 个单硫酸结合物、2 个甲基化后的葡萄糖醛酸结合物和 2 个甲基化后的硫酸结合物。

大鼠尿液经过葡萄糖醛酸苷酶和硫酸酯酶水解后，二相结合物明显减少，而原形药咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸相应的增加，进一步说明咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸与葡萄糖醛酸和硫酸发生结合。

CA 在结构上有 2 个酚羟基和 1 个羧基，其甲基化物、葡萄糖醛酸或硫酸结合物在二级或三级全扫描质谱分析中均有脱羧基碎片，由此推测咖啡酸的酚羟基与葡萄糖醛酸和硫酸成苷或者发生甲基

化，而不是咖啡酸侧链的羧酸基团发生了代谢转化。

CA 在大鼠体内广泛代谢，由于无代谢物对照品（阿魏酸除和异阿魏酸外），所以这些代谢物结构只有获得对照品通过核磁共振谱（NMR）分析后进一步确证。

## REFERENCES

- [1] TANAKA T, KOJIMA T, KAWAMORI T, et al. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids [J]. Carcinogenesis, 1993, 14(7): 1321-1325.
- [2] SU M Y, ZHOU M J, ZHOU T T, Pharmacokinetics of caffeic acid in rat [J]. J China pharm (中国药房), 2008, 19(16): 1220-1221.
- [3] TSUCHIYA T, SUZUKI O, IGARASHI K. Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(5): 765-768.
- [4] LAFAY S, GUEUX E, RAYSSIGUIER Y, et al. Caffeic acid inhibits oxidative stress and reduces hypercholesterolemia induced by iron overload in rats [J]. Int J Vitam Nutr Res, 2005, 75(2): 119-125.
- [5] AZUMA K, IPPUSHI K, NAKAYAMA M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5496-5500.
- [6] 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.
- [7] DEBRAUWER L, RATHAHAO E, BOUDRY G, et al. Identification of the major metabolite of prochloraz in rainbow trout by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(8): 3821-3826.
- [8] CUI D, RANKIN G O, HARVISON P J. Metabolism of the nephrotoxicant *N*-(3,5-dichlorophenyl)succinimide in rats: evidence for bioactivation through alcohol-*O*-glucuronidation and *O*-sulfation [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(6): 991-1003.

收稿日期：2009-02-10