异欧前胡素在大鼠体内代谢产物的 UHPLC-HRMS 鉴定分析

王红^{1,2},崔议方²,徐静²,李亚男²,林永强³,李启艳^{3*},张加余^{1*}(1. 溪州医学院药学院,山东 溪州 264003;2. 山东中医药大学药学院,济南 250300;3. 山东省食品药品检验研究院,济南 250101)

摘要:目的 分析鉴定异欧前胡素在正常大鼠体内的代谢产物。方法 大鼠灌胃给药后,收集正常组和给药组大鼠的血浆、尿液和粪便样本,并以固相萃取柱提纯生物样品。采用 UHPLC-HRMS(Q-Exactive Orbitrap MS)高分辨质谱对生物样品进行分析,并对代谢产物筛选鉴定。结果 在正、负离子模式下,根据所获得的精确分子质量、色谱保留行为、质谱裂解规律、特征碎片离子、对照品比对以及文献报道,最终分析鉴定了 32 个代谢产物。其代谢途径主要包括呋喃环开环、内酯水解、氧化、甲基化、葡萄糖醛酸化、硫酸酯化以及它们的复合反应。其中,葡萄糖醛酸化产物为首次发现。结论 本研究较为全面地阐明了异欧前胡素在正常大鼠体内的代谢转化情况,可为其进一步的药效学研究提供依据,并为呋喃香豆素类物质的代谢产物分析提供借鉴。

关键词:异欧前胡素;体内代谢; UHPLC-HRMS(Q-Exactive Orbitrap MS);代谢产物

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)19-2677-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222326

引用本文: 王红, 崔议方, 徐静, 等. 异欧前胡素在大鼠体内代谢产物的 UHPLC-HRMS 鉴定分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2677-2686.

UHPLC-HRMS Identification and Analysis of the Metabolites in Vivo of Isoimperatorin in Rats

WANG Hong^{1,2}, CUI Yifang², XU Jing², LI Yanan², LIN Yongqiang³, LI Qiyan^{3*}, ZHANG Jiayu^{1*}(1.College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Binzhou 264003, China; 2.School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China; 3.Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze and identify the metabolites of isoimperatorin in normal rats *in vivo*. **METHODS** After the rats were intragastrically administered, the plasma, urine and feces samples of rats in normal and dosed groups were collected, and the samples were processed by solid phase extraction. Then, UHPLC-HRMS(Q-Exactive Orbitrap MS) high-resolution mass spectrometry was used to analyze biological samples, and the metabolites were screened and identified. **RESULTS** In both positive and negative ion modes, a total of 32 metabolites were accurately analyzed and identified based on the precise molecular masses obtained, chromatographic retention behavior, control mass spectral cleavage patterns, characteristic fragment ions, and relevant literature reports. The main metabolic pathways were furan ring opening, lactone hydrolysis, oxidation, methylation, glucuronidation, sulfation and their complex reactions. Among them, the glucuronidation product was discovered for the first time. **CONCLUSION** This study comprehensively clarifies the transformation pathways of isoimperatorin in rats, which can provide a basis for its pharmacodynamic study and metabolism study analysis of the other furocoumarins.

KEYWORDS: isoimperatorin; metabolism in vivo; UHPLC-HRMS(Q-Exactive Orbitrap MS); metabolites

异欧前胡素主要存在于白芷、羌活和北沙参等 常见中药中,是一种具有苯并α-吡喃酮结构的呋喃 香豆素类化合物^[1]。既往研究发现,异欧前胡素具 有诸多药理作用,如抑制黑色素细胞的活性,降 低纤维细胞中肿瘤坏死因子的表达,改善线粒体 功能,防止肝损伤,舒张血管,抗炎,镇痛,抗 痉挛和抗肿瘤等^[2-5]。

中药化学成分代谢转化可能会影响中药活性

成分的产生、分布和排泄。然而,中药代谢产物 的预测、筛选和识别通常较为困难。LC-MS 凭借 其优异的灵敏度获取复杂物质体系中的微量成分 信号,常被用于检测和识别药物体内外代谢物^[4]。 柯璐琳等^[6]采用 LC-MS/MS 建立了测量异欧前胡 素血药浓度的方法。本研究采用的 Q-Exactive Orbitrap 质谱具有极高的轨道质量分辨率、质量精 度、MSⁿ扫描函数和线性离子阱的高捕获能力,可

基金项目:山东省泰山学者青年专家项目(tsqn202103110);山东省青创人才引育计划(10073004);山东省重点研发计划项目 (2021CXGC010511)

作者简介:王红,女,硕士生 E-mail: wanghong20201002@163.com *通信作者:张加余,男,博士,教授,硕导 E-mail: zhangjiayu0615@163.com 李启艳,女,博士,主任中药师,硕导 E-mail: liqiyan.com@163.com

用于预测片段离子和识别未知代谢产物[7]。

目前,已有学者对异欧前胡素的主要活性代 谢产物氧化前胡素和水合氧化前胡素进行了研 究^[8],但尚未系统、全面地对异欧前胡素的体内 代谢进行探究。本研究借助超高压液相色谱-高分 辨质谱(UHPLC-HRMS)技术,深入阐明异欧前胡 素的体内代谢产物和代谢途径,以期为其进一步 的药效学和作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

UHPLC-Q Exactive-Orbitrap 高分辨质谱,配 有电喷雾离子源(HESI),X Calibur2.2 质谱工作站 (Thermo Scientific 公司);C₁₈固相萃取小柱[Grace Davison Discovery Science 公司,500 mg·(3 mL)⁻¹]; BT25S 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯 仪器有限公司);-80 ℃超低温冰箱(Thermo Fisher Scientific 公司)。Ultimate 3 000 UHPLC 液相色谱 仪(德国 Dionex Softron GmbH-Thermo Fisher Scientific),配备 WPS-3000 TRS 自动进样器, TCC-3000RS 柱温箱和 HPG-3400RS 二元泵。TG 20W 型台式高速冷冻式离心机(博科精密仪器有限 公司,离心半径 125 mm)

1.2 试剂

异欧前胡素(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-19032420; 纯度≥98%); 乙腈、甲 醇均为质谱级, 购自美国 Thermo Fisher 公司; 甲 酸(色谱级, 德国 Merck 公司); 纯净水(杭州娃哈 哈集团有限公司)。

1.3 动物

SPF级 SD 大鼠,雄性,体质量(200±10)g,购 自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可 证号: SCXK(鲁)20190003。动物实验获得滨州医学 院实验动物委员会的批准(批准号: 2021-087)。

2 方法

2.1 对照品溶液制备

精密称取异欧前胡素对照品 5 mg 于 50 mL 量 瓶中,加入甲醇超声使溶解,定容,混匀,过0.22 μm 微孔滤膜。

2.2 灌胃混悬液的制备

称取异欧前胡素对照品 60 mg,加入 6 mL 生理盐水,超声至充分混悬,配成质量浓度为 10 g·L⁻¹的溶液(每天现配现用)。

2.3 动物分组和给药

取 6 只健康雄性 SD 大鼠,随机分为空白组 (*n*=3)和给药组(*n*=3),分别收集粪便和尿液、空白 血浆样本。实验前所有动物于 SPF 级动物房内适 应性饲养 1 周,昼夜循环 12 h,温度 22~24℃,相 对湿度 55%~65%。给药前禁食 12 h,全程不禁水。 给药组按 250 mg·kg⁻¹体质量分 3 d 灌胃给药,空 白组给予等体积的生理盐水。

2.4 生物样品采集

将空白组和给药组分别置于代谢笼中,于灌 胃后 0.5, 1, 2, 4 h 后眼眶取血 200 μL,置于肝 素钠抗凝 EP 管中,混合均匀,在冷冻离心机中 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,分别取上清液,得空白 血浆和含药血浆;收集 2 组大鼠 24 h 的累积尿样, 3 500 r·min⁻¹离心 15 min 后取上清液,分别得到空 白尿样与含药尿液;收集 2 组大鼠 24 h 的累积粪 样,晾干后碾碎,装于离心管中。所有生物样品 均置于—80 ℃冰箱保存,备用。

2.5 供试样品溶液的制备

分别取空白组和给药组粪便 1g,研磨,加入 5 mL 生理盐水超声提取 30 min, 3 500 r·min⁻¹离 心 15 min 后取空白粪样与含药粪样上清液。取依 次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水预活化的固相萃取柱, 分别吸取血、尿、粪样品 1 mL 上样,依次采用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,在室温下 用氮气吹干。残渣用 100 μL 的初始流动相复溶, 涡旋 3 min 后,4℃下以 14 000 r·min⁻¹离心 15 min 后取上清液。

2.6 色谱条件

HYPERSIL GOLD C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 µm); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 40 ℃; 进样 量: 2 µL。流动相: 含 0.1%甲酸的水(A)和乙腈(B); 梯度洗脱: 0~2 min, 95%A; 2~3 min, 95%→60%A; 3~7 min, 60%→35%A; 7~15 min, 35%→5%A; 15~18 min, 5%A; 18~18.1 min, 5%→95%A; 18.1~20 min, 95%A。

2.7 质谱条件

正离子、负离子检测模式;离子源参数:氮 气(纯度≥99.99%)分别作为鞘气和辅助气体,流速 分别为 30 和 10(任意单位),毛细管温度为 320 ℃, 蒸发器温度为 400 ℃,喷涂电压为 4 500/3 800 V(+/-);质谱质量扫描范围 *m/z* 50.0~800.0,分辨率 70 000;碰撞能为 30 eV。

2.8 数据处理

数据处理工作站为 X Calibur 2.2。母离子和碎 片离子的分子式预测参数如下: C[10~100], H[30~100], O[1~30], S[1~10]。质量精度误差在 5× 10⁻⁶以内。ChemDraw 18.0、亿图图示绘图软件用 于代谢产物的裂解规律分析。

3 结果与讨论

3.1 对照品质谱裂解行为

在正负离子模式下,对照品异欧前胡素的色 谱峰保留时间及准分子离子峰[M+H]⁺/[M-H]⁻分 别为 8.66, 8.67 min 和 *m/z* 203.03(-2.676×10⁻⁶, $C_{16}H_{15}O_6$)、*m/z* 269.08(4.551×10⁻⁶, C₁₆H₁₃O₆),见 图 1。正离子检测模式下检测到特征离子碎片: *m/z* 203[M+H-C₅H₈]⁺,*m/z* 159[M+H-C₅H₈-CO₂]⁺, *m/z* 147[M+H-C₅H₈-2CO]⁺,*m/z* 131[M+H-C₅H₈-CO₂-CO]⁺和*m/z* 69[C₅H₈+H]⁺;负离子检测模式下 检测到特征离子碎片:*m/z* 269[M-H]⁻,*m/z* 254 [M-H-CH₃]⁻,*m/z* 214[M-H-CH₃-C₃H₄]⁻,*m/z* 201[M-H-C₅H₈]⁻和*m/z* 175[M-H-C₅H₈-CO]⁻,其可能的裂 解途径见图 1。

3.2 异欧前胡素在大鼠体内代谢产物鉴定 异欧前胡素进入生物体体内后极易被吸收,



m/z 269

图1 异欧前胡素对照品的提取离子流色谱图(A)和质谱裂解规律分析(B) 1-正离子模式; 2-负离子模式。

Fig. 1 Extracted ion chromatogram(A) and mass fragmentation behavior(B) of isoimperatorin control 1-positive ion mode; 2-negative ion mode.

并进一步经生物酶的催化发生一系列代谢反应。 Wang 等^[9]研究发现,异欧前胡素以灌胃给药方式 给予大鼠,随后可在其大脑、小脑以及肝脏等组织 检测到不同浓度的原药。本研究根据在正、负离子 模式下所获得的精确分子质量、色谱保留行为、质 谱裂解规律、特征碎片离子、对照品比对以及文献 报道,共鉴定 32 个代谢产物,具体见表 1。

M1和M6在正离子模式下的准分子离子分别 为 m/z 203.033 40和 m/z 203.033 48,保留时间分 别为 1.11,5.18 min,推测其分子式可能为 C₁₁H₇O₄,误差分别是-2.390×10⁻⁶,-1.996×10⁻⁶。 根据文献[9]和对照品裂解规律,结合 M1 在反相 色谱柱上较早被洗脱下来,将 M1 推断为 8-OH 补 骨脂素(花椒毒酚),M6为 5-OH 补骨脂素。在负 离子模式下,M4于 4.97 min 洗脱下来,分子式为 C₁₁H₅O₄,误差为 1.914×10⁻⁶。M4 与 M6 有相似的 碎片离子,且分子式相差 2H,推测 M4 为负离子 模式下的 5-OH 补骨脂素。在它们的二级质谱谱图 中,两者均出现 *m/z* 147、*m/z* 159 和 *m/z* 131 等特 征碎片离子,且与异欧前胡素对照品的碎片离子 相似,进一步对上述推断进行了确证。进一步的 分析发现,M21 较 M4 多 1 分子亚甲基,推测其 可能为佛手酚内酯^[10]。具体鉴定过程见图 2。

M3 在负离子模式下的准分子离子为 *m/z* 331.118 96,推测其分子式为 C₁₈H₁₉O₆,误差为 4.063×10⁻⁶。在二级质谱图谱中,丰度较高的碎片 离子峰为 *m/z* 331([M-H]⁻)、*m/z* 301([M-H-OCH₃]⁻)、*m/z* 215([M-H-2OCH₃-C₄H₈]⁻)和 *m/z* 258([M-H-2OC H₃-CH₃]⁻)等,由可鉴定 M3 为异欧前胡素的烯烃形 成二氢二醇与甲基化代谢产物^[11],见图 3。

表1 异欧前胡素在大鼠血、尿、粪中的代谢产物定性分析表

Tab. 1 (Qualitative analysis of th	e metabolites of isoimperatorin	n in blood, urine and feces of rats
----------	----------------------------	---------------------------------	-------------------------------------

序号	保留时间/ min	分子式	离子 模式	理论质 荷比	实际质 荷比	误差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片	ш	尿	粪
M0*	8.65	$C_{16}H_{15}O_4$	Р	271.096 49	271.095 86	-2.307	203.03(100), 147.04(57.46), 131.05(23.44), 159.04(15.81), 91.05(9.82), 69.07(9.39), 119.05(4.69), 175.04(3.86)	\checkmark		
	8.66	$C_{16}H_{15}O_4$	Р	271.096 49	271.095 98	-1.864	203.03(100), 147.04(55.59), 131.05(24.82), 159.04(14.76), 69.07(12.55), 91.05(9.49), 119.05(4.10), 175.04(3.66)		\checkmark	
M1	1.11	$\mathrm{C}_{11}\mathrm{H}_7\mathrm{O}_4$	Р	203.033 34	203.033 40	-2.390	203.03(100), 147.04(96.86), 131.05(33.02), 91.05(27.92), 159.04(18.18), 119.05(10.83)	\checkmark		
M2	2.61	$\mathrm{C_{16}H_{15}O_{4}}$	Ν	271.097 58	271.094 91	-1.575	271.09(100) , 125.03(9.26) , 241.99(4.67) , 239.07(4.01) , 181.06(3.35) , 228.09(1.97)		\checkmark	
M3	4.74	$\mathrm{C}_{18}\mathrm{H}_{19}\mathrm{O}_{6}$	Ν	331.118 16	331.118 96	4.063	331.12(100), 80.96(80.84), 257.12(55.52), 122.04(43.66), 79.96(33.33), 215.11(21.53), 283.10(16.75), 301.11(10.72)			\checkmark
M4	4.97	$C_{11}H_5O_4$	N	201.018 78	201.018 62	1.914	201.11(100), 201.02(27.09), 145.03(2.20), 173.02(2.04)			\checkmark
M5	5.04	$C_{15}H_{15}O_5$	Р	275.091 41	275.090 85	-2.000	107.05(100), 169.05(5.27), 151.04(1.78), 275.09(0.91), 118.07(0.57), 85.03(0.58)	\checkmark		
M6	5.18	$\mathrm{C}_{11}\mathrm{H}_7\mathrm{O}_4$	Р	203.033 34	203.033 48	-1.996	203.03(100), 147.04(93.35), 131.05(32.77), 159.04(20.05), 119.05(10.80), 175.04(5.24)	\checkmark		
M7	5.23	$C_{22}H_{19}O_{12}$	Ν	475.088 20	475.088 26	2.437	201.02(100), 113.02(25.98), 175.02(6.47), 131.03(4.06), 157.01(1.70), 145.03(1.41), 99(1.31), 299.06(0.27)		\checkmark	
M8	5.31	$C_{11}H_5O_7S$	Ν	280.976 15	280.976 17	3.987	201.02(100), 117.03(4.16), 280.98(3.61), 173.02(3.31), 145.03(2.35), 147.04(1.07), 119.05(0.41)		\checkmark	
M9	5.36	$C_{16}H_{13}O_5$	Р	285.075 69	285.075 04	-2.491	285.08(100), 270.05(43.05), 242.06(28.01), 225.05(11.73), 229.09(8.72), 118.04(4.01), 196.05(3.84), 91.05(1.88), 253.05(1.80)		\checkmark	
M10	5.38	$C_{11}H_5O_7S$	Ν	280.976 15	280.976 23	4.414	201.02(100) , 280.98(4.44) , 117.03(3.58) , 173.02(3.51) , 145.03(2.55) , 119.05(1.26) , 69.06(0.60)			

续表1

序号	保留时间/ min	分子式	离子 模式	理论质 荷比	实际质 荷比	误差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片 血	尿	粪
M11	5.41	C ₁₆ H ₁₅ O ₇	Р	319.081 21	319.080 57	-0.659	203.03(100), 147.04(50.21), 131.05(18.95), 319.08(9.49)		
M12	5.44	$C_{16}H_{15}O_{7}$	Ν	319.082 33	319.082 55	4.139	205.01(100), 176.01(20.96), 217.01(19.16), 189.02(15.32), 245.08(12.74), 319.08(9.45) \checkmark		
M13	5.44	$\mathrm{C}_{11}\mathrm{H}_5\mathrm{O}_7\mathrm{S}$	Ν	280.976 15	280.976 23	4.201	201.02(100) , 117.03(4.48) , 280.98(3.72) , 173.02(3.60) , 202.02(1.01) , 147.04(0.80) , 119.05(0.56)	\checkmark	
	5.48	$C_{16}H_{15}O_7$	Р	319.081 19	319.080 60	-1.972	203.03(100), 147.04(49.42), 131.05(20.39), 159.04(14.78), 319.08(10.00), 117.09(4.87)		
M14	5.48	$C_{16}H_{15}O_{7}$	Р	319.081 21	319.080 60	-0.629	203.03(100), 147.04(49.42), 131.05(20.39), 159.04(14.78), 319.08(10.00)	\checkmark	
M15	5.53	$C_{16}H_{13}O_9S$	Ν	381.027 48	381.028 72	3.257	201.02(100) , 80.96(44.35) , 381.03(9.13) , 117.03(2.88), 173.02(2.30)		\checkmark
M16	5.57	$C_{16}H_{17}O_{6}$	N	305.103 06	305.103 21	4.082	205.01(100), 245.08(15.64), 203.00(10.31), 305.10(3.72), 190.03(1.87), 150.03(2.58)	\checkmark	
M17	5.71	$C_{16}H_{13}O_7$	Р	317.065 31	317.065 00	-1.827	203.03(100), 147.04(64.71), 131.05(26.12), 159.04(14.66), 317.06(12.60), 289.07(12.48) \checkmark		
M18	5.73	$C_{16}H_{13}O_7$	Р	317.065 31	317.064 91	-0.669	203.03(100), 147.04(53.08), 131.05(23.13), 317.06(11.25), 289.07(9.60), 175.04(5.87)		
M19	5.80	$C_{16}H_{11}O_7$	N	315.051 21	315.051 30	4.066	201.02(100) , 117.03(6.85) , 79.96(6.56) , 145.03(3.34) , 173.02(4.68) , 163.04(2.57) , 315.00(2.32) , 299.98(1.49)		
M20	5.81	$C_{17}H_{15}O_6$	Р	317.065 31	317.065 00	-0.579	203.03(100), 147.04(48.48), 317.06(17.86), 289.07(11.65), 174.03(9.60)		
M21	5.85	$C_{12}H_7O_4$	N	215.034 98	215.033 98	0.441	215.13(100), 153.13(58.22), 197.12(45.36), 125.10(3.41), 116.07(3.13), 131.09(2.82)		\checkmark
M22	5.97	C ₁₆ H ₁₇ O ₆	Р	305.101 41	305.103 21	-1.818	191.03(100), 219.03(31.09), 237.04(14.59), 163.04(6.23), 149.10(5.11), 69.07(4.85), 137.02(4.69), 93.07(4.34), 173.02(4.06), 79.05(3.40), 105.07(2.29)	\checkmark	
M23	5.97	$C_{16}H_{17}O_{6}$	Р	305.101 96	305.10141	-1.818	191.03(100), 219.03(31.09), 237.04(14.59), 149.10(5.11), 69.07(4.85)		
M24	6.10	$C_{16}H_{19}O_4$	Р	275.127 24	275.127 20	-2.128	105.07(100), 275.20(65.63), 119.09(48.83), 133.10(31.93), 147.12(23.39)		\checkmark
M25	6.20	$C_{16}H_{13}O_{6}$	Р	301.070 59	301.069 98	-2.274	202.03(100), 174.03(33.21), 146.04(6.69), 118.04(8.36), 301.07(3.56), 91.05(3.32)	\checkmark	
M26	6.22	$C_{16}H_{15}O_{6}$	Р	303.08629	303.085 72	-1.962	203.03(100), 147.04(53.15), 101.06(29.52), 303.09(8.01), 312.58(1.74) \checkmark		
M27	6.22	$C_{16}H_{15}O_5$	Р	287.091 40	287.090 85	-1.916	203.03(100), 147.04(48.74), 131.05(21.80), 159.04(12.18), 119.05(4.47), 175.04(4.20)	\checkmark	
M28	6.95	$C_{16}H_{17}O_5$	N	289.108 15	289.108 43	4.773	220.04(100), 161.02(55.25), 176.05(33.14), 289.11(17.31)		
M29	7.18	$C_{16}H_{15}O_5$	Р	287.091 40	287.091 09	-1.080	146.06(100), 241.13(21.21), 174.05(13.29), 287.14(7.99), 223.12(5.30), 69.07(4.34)	\checkmark	
M30	7.93	$C_{16}H_{13}O_7$	Ν	317.066 61	317.066 96	4.355	273.08(100), 243.03(24.52), 215.03(20.19), 176.01(4.63), 227.03(2.85)	\checkmark	
M31	12.61	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	N	285.076 90	285.076 35	2.105	285.17(100) , 116.93(9.01) , 59.01(7.16) , 273.52(5.30) , 194.20(5.14) , 167.20(4.60)		

注:√-能检测到;*-与对照品比对鉴定。

Note: $\sqrt{-Detected}$; *-comparison and identification with the reference substance.

中国现代应用药学 2023 年 10 月第 40 卷第 19 期





Fig. 3 Mass fragmentation behavior of M3 in negative ion mode

在正离子模式下, M9 的准分子离子为 m/z 285.075 04, 推测分子式为 C₁₆H₁₃O₅, 误差为 -2.491×10⁻⁶。在其二级质谱图中,可见特征碎片 离子 m/z 270[M+H-CH₃]⁺、m/z 242[M+H-CH₃-CO]⁺。 参考文献[12],可推测 M9 为异欧前胡素的醛基化 产物。在负离子模式下, M31 在 12.61 min 被检测 到, X Calibur 给出的元素组成同样是 C₁₆H₁₃O₅, 误差为 2.105×10⁻⁶,初步判定 M31 是 M9 的还原 产物。在其 ESI-MS² 谱图中,其碎片离子 *m/z* 273[M-H-CH₃+2H]⁻以及 *m/z* 59[C₃H₈O-H]⁻则 证实了 M31 为异欧前胡素的羟基化产物。

在负离子模式下,M7在5.23 min 被洗脱下来,

X Calibur 给出的元素组成为 $C_{22}H_{19}O_{12}$,误差为 2.437×10⁻⁶。在 ESI-MS²中,m/z 201[M-H-C₅H₈]⁻、 m/z 131[M-H-C₅H₈-CO₂-CO]⁻、m/z 157[M-H-C₅H₈-CO]⁻以及 m/z 145[M-H-C₅H₈-2CO]⁻都证明了异欧 前胡素基本母核的存在。碎片离子 m/z 299 证实了 m/z 475→299 的葡萄糖醛酸(GluA)化过程。因 此,M7 被鉴定为异欧前胡素的醛基化+葡萄糖 醛酸化产物。

M10 和 M13 分别在大鼠血样和尿样中被检测 出来,推测其在负离子模式下可能的分子式为 C₁₁H₅O₇S,误差分别为 4.414×10⁻⁶ 和 4.201×10⁻⁶。 在负离子模式下,两者均出现 80(*m*/*z* 281→201)的 中性丢失,推断其为硫酸酯类物质。碎片离子 *m*/*z* 145 和 *m*/*z* 175 皆为 *m*/*z* 201 连续丢失 CO 所得, 这与异欧前胡素裂解行为相似。最终,M10 和 M13 可鉴定为 M0 脱异戊烯基与硫酸化产物,M8 可鉴 定为花椒毒酚的硫酸化产物^[13]。

M11 和 M14 在正离子模式下拥有相同的分子 式,分别在 5.41 min 和 5.48 min 被洗脱出来,根 据建立的模板推测 M11 为异欧前胡素先双羟基化 再一羟基化最终形成 3OH 产物 M14。在 ESI-MS² 中,两者均出现了 m/z 203,147,131 和 319 等异 欧前胡素母核的特征碎片离子。碎片离子 m/z 117 说明此 3 个羟基于 5 位异戊烯氧基上的取代。因 此, M11 和 M14 为异欧前胡素-3OH 产物。

正离子模式下在大鼠血样中检测到 M17,负 离子模式下于大鼠尿样中检测到 M19,分子式分 别为 C₁₆H₁₃O₇和 C₁₆H₁₁O₇,且都具有呋喃香豆素 母核的特征碎片离子,二者保留时间相似,推测 二者可能是相似物质。在 M17 的二级质谱中,由 *m/z* 289→201 可见 C₅H₁₀O 的中性丢失,推断异戊 烯氧基上有羟基取代。在 M19 的二级质谱中,由 *m/z* 300→201 可见 C₅H₈O₂ 的中性丢失,推断异戊 烯氧基上有羧基取代。综上分析,M17 和 M19 为 异欧前胡素的羧基化并羟基化产物。

M22 在 5.97 min 处被洗脱出来,正离子模式 下的分子式为 C₁₆H₁₇O₆。在 ESI-MS²中,碎片离 子 *m*/z 105 说明异戊烯氧基上的双键被 2 个羟基取 代。结合文献[13],可确定 M22 为水合氧化前胡 素内酯。以 M22 为模板,进一步鉴定出 M29 为 M22 脱水后的产物,M30 在 M22 的基础上亚甲基 成酮,而 M5 发生了内酯环脱羰基变成五元呋喃 环,M2 则为 M22 脱去 2 个氧原子而得。此外, M2 也有可能由异欧前胡素氢化而来。

正离子模式下,M23的分子式为 $C_{16}H_{17}O_6$, 误差为--1.818×10⁻⁶。参考 X Calibur 给出的二级碎 片发现并无异欧前胡素的基本母核离子,推测此 产物可能发生呋喃环或内酯环的开环反应。在 M23 的 ESI-MS² 中,出现的碎片离子 $m/z 236[M+H-C_5H_{10}]^+ 和 m/z 219[M+H-C_5H_{10}-H_2O]^+$ 验证了 M23 是 M0 呋喃环开环产物。同理,在负 离子模式下,根据 M28 的碎片离子 $m/z 220[M-H-C_5H_9]^-$ 、 $m/z 176[M-H-C_5H_9-CO_2]^-$ 及 $m/z 161[M-H-C_5H_9-CO_2-CH_3]^-可以推断 M28 同为$ M0 呋喃环开环产物^[14]。

M26 在血液中被检测出来,正离子模式下其 分子式为 C16H15O6,误差为-1.962×10-6。与异欧 前胡素分子式对比发现, M26 分子式中多 2 个氧 原子。利用 ChemDraw 18.0 绘图软件分析, 碎片 离子 m/z 101 为异戊烯氧基双羟基化取代后产生。 参考二级质谱中的其他碎片离子,可以鉴定 M26 为异欧前胡素的双羟基取代产物[12]。负离子模式 下, M12 的准分子离子为 m/z 319.082 33, 推测分 子式为 C16H15O7,误差为 4.139×10⁻⁶。在 ESI-MS² 谱中,碎片离子 m/z 245[M-H-C₂H₂O₃]-, m/z 205 [M-H-C₂H₂O₃-C₃H₄]⁻, *m/z* 189[M-H-C₂H₂O₃-C₃H₄-O]⁻ 以及 m/z175[M-H-C2H2O3-C3H4-O-CH3] 可推测 M12 的裂解行为。根据上述裂解途径, 推测 M12 为 M26 的内酯环开环产物,具体裂解过程见图 4。 M15 在 5.53 min 被洗脱下来,负离子模式下给出 其分子式 C₁₆H₁₃O₉S,误差为 3.257×10⁻⁶。在 ESI-MS² 谱中,碎片离子 m/z 81 说明了 SO₃H 的存 在,结合异欧前胡素母核特征碎片离子 m/z 201 和 m/z 173, 推测 M15 是 M26 的硫酸化产物; M18 和 M20 分别在 5.73 min 和 5.81 min 被洗脱,正离 子模式下分子式为 C16H13O7(误差为-0.669×10-6) 和 C₁₆H₁₃O₇(误差为-0.579×10⁻⁶)。在二级质谱中, 碎片离子 m/z 289 比 m/z 317 少 28, 证明羰基的存 在。结合异欧前胡素母核碎片离子 m/z 203 和 m/z 147, 推测 M18 和 M20 是 M0 发生羰基取代并 双羟基化后的代谢产物,二者为同分异构体。

3.3 异欧前胡素的体内代谢途径分析

肝脏是香豆素类化合物代谢的主要部位。口 服进入体内的香豆素类化合物,少部分会以原型 排出体外,大部分经过胃肠道吸收入血,并经肝 脏代谢后随尿液排出体外^[15]。在本研究中,在给 予异欧前胡素后的大鼠血液中检测到 8 个代谢 产物,在尿液中检测到 18 个代谢产物,在粪便 中检测到 6 个代谢产物,推测其相关的代谢途 径见图 5。其中,在血液中主要发生了羟基化 (M26)、内酯环开裂(M5、M12)、羧基化(M17) 以及硫酸化(M10)等代谢转化反应;尿液中检出 的代谢产物最多^[16],主要发生了氧化(M11、 M14、M29、M30)、还原(M2)、呋喃环开裂(M23、 M28)以及甲基化(M20)反应,同时还检测到了葡 萄糖醛酸化代谢产物(M7)。粪便中鉴定得到的代 谢产物较少,主要为脱异戊烯基产物(M4)和甲基 化产物(M3、M21)。



图 4 M12 在负离子模式下的质谱裂解过程 Fig. 4 Mass fragmentation behavior of M12 in negative ion mode



图 5 异欧前胡素在体内可能的代谢途径 Fig. 5 Proposed isoimperatorin metabolic patterns *in vivo* 4 讨论

本研究为了检测尽可能多的代谢物,建立了 异欧前胡素代谢产物 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 整合定性分析策略。结合正、负离子模式下的 色谱保留行为、碎片离子及对照品比对等,对大 鼠血浆、尿液和粪便中的异欧前胡素代谢物进行 了全面的分析和鉴定,并阐明了其主要的体内代 谢通路。

研究结果显示,异欧前胡素等香豆素类化合 物进入体内,主要通过肝脏进行代谢^[17]。肝脏 代谢可分为2个阶段,第1阶段主要发生羟基 化、内酯环开环、脱氢等一系列氧化还原反应; 第2阶段为结合反应,在葡萄糖醛酸转移酶和 CYP2A6 等酶的参与下,可与葡萄糖醛酸、硫 酸结合、生成水溶性较大的化合物、最后经肾 脏排出体外^[16]。在本次实验中,异欧前胡素经 口服给药后, 共检测到原型在内的 32 种代谢产 物。值得一提的是, 葡萄糖醛酸化产物为首次发 现,其作为人体主要的Ⅱ相代谢通路,参与体内 潜在毒性化合物的解毒过程[18]。有报道揭示[19], 异欧前胡素具有较高的血脑屏障通透性,并具有 治疗中枢神经系统疾病的药动学潜力,而本研究 在血浆中检测到了原型药物。此外, 尿液中的代 谢产物较多,提示肾脏可能是异欧前胡素代谢转 化和排泄的主要器官。

本研究发现的代谢产物呈现出各种生物活性,也可被视为异欧前胡素的"显效形式"。 Kubrak、Mottaghipisheh等^[20-21]则研究发现,氧化前胡素、佛手柑内酯具有良好的抗肿瘤作用;Liu 等^[22]发现水合氧化前胡素内酯和花椒毒酚对核受体维甲酸 X 受体-α 基因的转录功能有促进作用, 进而促进前体脂肪凋亡;Shen等^[23]发现佛手酚成 分能够抑制 LPS 诱导的炎症反应和 ox-LDL 诱导的脂质沉积。

综上,本实验研究了异欧前胡素在大鼠体内 代谢情况,可为呋喃香豆素类化合物在体内代谢 的相互转化研究提供依据,同时为香豆素类药物 的临床安全用药提供参考。

REFERENCES

- YANG H B, GAO H R, REN Y J, et al. Effects of isoimperatorin on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 7993-7998.
- [2] WIJERATHNE C U B, SEO C S, SONG J W, et al.

中国现代应用药学 2023 年 10 月第 40 卷第 19 期

Isoimperatorin attenuates airway inflammation and mucus hypersecretion in an ovalbumin-induced murine model of asthma[J]. Int Immunopharmacol, 2017(49): 67-76.

- [3] LIU J, HE L, HU J, et al. Isoimperatorin induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via the MAPK/ERK1/2 signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020(2020): 2138186.
- [4] CABRAL B, GONÇALVES T A F, ABREU L S, et al. Cardiovascular effects induced by fruit peels from *Passiflora* edulis in hypertensive rats and fingerprint analysis by HPLC-ESI-MSⁿ spectrometry[J]. Planta Med, 2022, 88(5): 356-366.
- [5] OUYANG J Y, JIANG H J, FANG H, et al. Isoimperatorin ameliorates osteoarthritis by downregulating the mammalian target of rapamycin C1 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9636-9644.
- [6] 柯璐琳, 冯先铨, 黄品芳, 等. LC-MS/MS 法同时测定欧前 胡素与异欧前胡素血药浓度[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(12): 885-888.
- [7] WANG Y, LIU M J, WANG H J, et al. Identification of metabolites of turmeric extract in rats by UPLC-Q-extractive orbitrap MS[J]. J Chin Mass Spectrom Soc(质谱学报), 2022, 43(2): 155-167.
- [8] 蹇阳. 欧前胡素和异欧前胡素的体内外代谢研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [9] WANG F, CAO G S, LI Y, et al. Characterization of forsythoside A metabolites in rats by a combination of UHPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer with multiple data processing techniques[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32(5): e4164.
- [10] JIANG H G, ZHAO X K, LIN W Y, et al. Qualitative analysis of multiple cumarins in Angelicae Sinensis Radix based on HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国 实验方剂学杂志), 2019, 25(13): 157-162.
- [11] WANG S C, CHEN Q H, HE L C. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of isoimperatorin in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 852(1/2): 473-478.
- [12] SHI X W, et al. Identification of *in vitro* and *in vivo* metabolites of isoimperatorin using liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Food Chem, 2013, 141(1): 357-365.
- [13] WANG K, LIU X, XU H R, et al. Research progress in pharmacology, pharmacokinetics and toxicity of natural furanocoumarins[J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与 毒理学杂志), 2021, 35(4): 312-320.
- [14] LI L L, CHEN J X, YANG X Y, et al. *In vivo* metabolite profiles of isoimperatorin and phellopterin in rats analyzed using HPLC coupled with diode array detector and electrospray ionization ion trap time-of-flight mass spectrometry technique[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32(8): e4236.
- [15] LEI Z, MA W D, YU K Q, et al. Pharmacokinetics research advances of coumarin compounds *in vivo*[J]. China Pharm(中 国药业), 2016, 25(23): 5-8.
- [16] TAN S R S, ESER B E, HAN J. Gut metabolism of furanocoumarins: Proposed function of co O-methyltransferase[J]. ACS

Omega, 2020, 5(47): 30696-30703.

- [17] XU Q, XU G B. Metabolism research review of coumarin compounds[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学 杂志), 2015, 21(3): 222-225.
- [18] HUYT, WUQL, HUANGL, et al. Advances in phase II metabolism of bile acids[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床 药理学杂志), 2021, 37(13): 1742-1748.
- [19] WAN L L, SUN Y H, YU Q, et al. *In vitro* permeability analysis, pharmacokinetic and brain distribution study in mice of imperatorin, isoimperatorin and cnidilin in Radix Angelicae Dahuricae[J]. Fitoterapia, 2013(85): 144-153.
- [20] KUBRAK T, CZOP M, KOŁODZIEJ P, et al. The effect of furanocoumarin derivatives on induction of apoptosis and multidrug resistance in human leukemic cells[J]. Molecules,

2019, 24(9): 1824.

www.chinjmap.cu

- [21] MOTTAGHIPISHEH J, NOVÉ M, SPENGLER G, et al. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of Ducrosia anethifolia[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 658-664.
- [22] LIU D P, LUO Q, WANG G H, et al. Furocoumarin derivatives from Radix Angelicae Dahuricae and their effects on RXR α transcriptional regulation[J]. Molecules, 2011, 16(8): 6339-6348.
- [23] SHEN C Y, WANG T X, JIANG J G, et al. Bergaptol from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. Amara Engl inhibits LPS-induced inflammatory responses and ox-LDL-induced lipid deposition[J]. Food Funct, 2020, 11(6): 4915-4926.

收稿日期: 2022-07-01 (本文责编:沈倩)