

阿魏酸人体内代谢产物定性分析

潘倩¹, 李玮^{2,3}, 杨阳¹, 赵勇强¹, 连俐¹,
丛晴晴¹, 王立红¹, 宋月林², 洪倩¹

(1. 徐州医科大学附属淮海医院/中国人民解放军陆军第七十一集团军医院, 江苏 徐州 221004;

2. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 102401; 3. 北京中医药大学中药学院, 北京 102401)

摘要: 阿魏酸(FA)是当归等多种中药的药效成分, 其钠盐阿魏酸钠在临床上主要用于缺血性脑血管病等相关疾病的辅助治疗, 但其体内的代谢产物并未被彻底阐明。因此, 本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF MS)技术鉴定人体口服 FA 后的体内代谢产物, 并推测可能的代谢途径。通过收集轻度认知障碍受试者口服阿魏酸钠后不同时间点(段)的血浆、尿液及粪便样品, 在负离子模式下采集质谱数据, 结合对照品比对、体外孵育代谢产物、质谱裂解规律及相关文献, 鉴定不同样品中代谢产物的结构。结果表明, 从体内样品中发现并初步鉴定了 31 个代谢产物, 其中 9 个来源于血浆、15 个来源于粪便、27 个来源于尿液。FA 在体内的主要代谢途径包括甲基化、去甲基化、羟基化、脱羟基化、还原、葡萄糖醛酸化、硫酸化等。本研究系统地鉴定了 FA 在人体内的代谢产物, 并揭示其代谢途径, 可为临床精准用药和体内药效形式的深入探讨提供科学依据和参考。

关键词: 阿魏酸; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF MS); 代谢产物; 代谢途径

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)03-0265-12

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0165

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0165

Identification of Metabolites of Ferulic Acid in Human after Oral Administration

PAN Qian¹, LI Wei^{2,3}, YANG Yang¹, ZHAO Yong-qiang¹, LIAN Li¹,
CONG Qing-qing¹, WANG Li-hong¹, SONG Yue-lin², HONG Qian¹

(1. The Affiliated Huaihai Hospital of Xuzhou Medical University, The 71st Group Army Hospital of the Chinese PLA, Xuzhou 221004, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China)

Abstract: Ferulic acid (FA) is an active component in various traditional Chinese medicines, such as Angelicae sinensis Radix. Previous studies showed that FA exhibits multiple pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects. Due to its significant antioxidant capacity, FA is utilized as an antioxidant food additive. Additionally, its sodium salt, sodium ferulic, is primarily used in clinic as an adjunct treatment for ischemic cerebrovascular diseases and associated disease. However, its metabolites in human after oral administration have not been

thoroughly elucidated. Therefore, this study aims at identifying the metabolites of FA after oral administration and speculating on possible metabolic pathways. Plasma, urine and feces at different times (segments) from subjects with mild cognitive impairment in clinic were collected after oral administration of sodium ferulic. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) combines the high-efficiency separation capabilities of LC with the powerful qualitative analysis advantage of MS, playing a vital and irreplaceable role in the in-depth study of chemical profiles in complex systems. The coupling of a quadrupole with time-of-flight mass spectrometry can offer high sensitivity and high resolution, and has become one of the important analytical tools for the identification of metabolites. In this study, the structural identification of metabolites was conducted using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF MS) under negative ion mode. In order to enhance the structural annotation of metabolites, the *in vitro* incubation system serving as the classic and simple model for the study of liver metabolic enzymes and drug metabolism, were employed in combining use of available authentic standards, including ferulic acid, caffeic acid, 3-hydroxycinnamic acid, and dihydroferulic acid, to produce the targeted metabolite profiles. In the *in vitro* incubation system, the focus was on phase I and phase II metabolism, including reduction, hydroxylation, glucuronidation and sulfation of FA. As expected, a total of 10 metabolites are identified with retention time in the *in vitro* samples. The subsequent LC-MS analysis of the clinic samples identifies 31 metabolites of FA, among which 9 ones are detected in plasma, 15 ones in feces, and 27 compounds in urine. The primary metabolic pathways of FA are enriched to include methylation, demethylation, hydroxylation, dehydroxylation, reduction, glucuronidation, and sulfation of FA. This study systematically identifies the metabolites of FA *in vivo*, providing scientific evidence and reference for further studies in the pharmacological mechanism of FA.

Key words: ferulic acid; ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q/TOF MS); metabolites; metabolic pathways

阿魏酸(ferulic acid, FA)是植物体内含量最丰富的一种酚酸类化合物,广泛存在于谷物及中药中^[1],是当归等多种中药的主要药效成分,具有抗氧化、抗炎、降血糖等多种药理活性。由于FA较强的抗氧化能力,其已作为抗氧化的食品添加剂使用^[2]。同时,FA也被开发成单体药物,药用形式为其钠盐阿魏酸钠,临床上主要用于缺血性脑血管病等相关疾病的辅助治疗。

FA又称3-甲氧基-4-羟基肉桂酸,属于肉桂酸的衍生物,在生物体内经莽草酸途径产生。莽草酸首先转化为苯丙氨酸或L-酪氨酸,在酶作用下进一步转化为反式肉桂酸,然后经羟基化、甲基化转化为FA^[3]。根据FA的化学结构判断,其在体内代谢较快,经口服给药后,主要在肝脏中代谢,发生羟基化、甲基化、葡萄糖醛酸化、硫酸化等代谢反应,大部分以结合形式通过尿液排

出^[4]。然而,由于FA体内代谢产物的同分异构体较多,难以实现结构的准确鉴定,限制了其体内药效形式的深入探究。

液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)结合了液相色谱的高效分离能力与质谱强大的定性能力,在复杂体系化学成分研究中发挥着不可替代的作用^[5-8]。将四极杆与飞行时间质谱联用,具有高灵敏度、高分辨率等优点,已成为鉴定代谢产物的重要工具^[9-10]。此外,体外孵育是一种简单、快速获取体内代谢产物混合“对照品”的策略,已成为肝脏代谢酶与药物代谢研究的常用体外模型^[11-12]。

本研究以对照品为底物,肝微粒体为葡萄糖醛酸转移酶供体,肝细胞浆为磺酰基转移酶供体,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸和3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐为启动因子,获取葡萄糖醛酸化及硫酸化混合“对照品”,辅助鉴定FA的体内代谢产物。

采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF MS)法分析轻度认知障碍受试者口服FA后的血浆、尿液及粪便样品,鉴定体内代谢产物的化学结构,阐明代谢途径,旨在揭示FA体内药效形式提供科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

LC-20AD_{XR}系列高效液相色谱仪:日本Shimadzu公司产品,配备2台LC-20AD_{XR}泵、SIL-20AC自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-M20A紫外检测器、DGU-20A脱气机、CBM-20A控制器;Triple TOF 6600⁺高分辨质谱仪:加拿大SCIEX公司产品,配备电喷雾离子源(ESI)及PeakviewTM1.2数据处理系统;Ultimate 3000超高效液相色谱仪:美国Thermo Fisher公司产品;5424型Eppendorf离心机:德国Eppendorf公司产品;METTLER XS105型电子分析天平:瑞士Mettler-Toledo有限公司产品;XW-80A型漩涡混合器:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司产品;UP2200H型超声波清洗器:南京垒君达超声电子设备公司产品;Milli-Q超纯水净化系统:美国Millipore公司产品。

1.2 主要材料与试剂

Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4, 批号JR2100LA)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 批号GA24040243369)、葡萄糖-6-磷酸(G-6-P, 批号W3107E23311)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD, 批号M19GS148951)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH, 批号0760102911)、D-葡萄糖二酸-1,4-内酯-一水合物(批号J31IS205185)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA, 批号JS241196)、阿魏酸(ferulic acid, 批号G13S11L124423)、异阿魏酸(isoferulic acid, 批号R19D10D106238)、咖啡酸(caffeic acid, 批号2681)、咖啡酸甲酯(methyl caffeate, 批号D30N10G104165)、二氢咖啡酸(dihydrocaffeic acid, 批号M23GS14703)、二氢阿魏酸(dihydroferulic acid, 批号JB272747)、4-羟基苯丙酸(4-hydroxyphenylpropionic acid, 批号X11A6X1)、3-羟基苯丙酸(3-hydroxyphenylpropionic acid, 批号H10M8P31009)、3-羟基肉桂酸(3-hydroxycinnamic acid, 批号A17J7L16340):上海源叶生物科技有限公司产品;氯化镁(MgCl₂, 批号RH302910):上海易恩化学技术有限公司产品;丙甲菌素(批号

C16266513):上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;二硫苏糖醇(DTT, 批号0000021293)、3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐(PAPS, 批号C16362259):美国Sigma公司产品;商品人源肝微粒体(20 g/L, 批号TBL)、商品C57BL/6J小鼠肝微粒体(20 g/L, 批号WJJW)、商品人源胞浆(20 g/L, 批号QROX):瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司产品;二氢阿魏酸(dihydroferulic acid, 批号BD12062):上海毕得医药科技股份有限公司产品;所有对照品经UPLC-Q/TOF MS检测,纯度均大于98%;乙腈、甲醇、甲酸:均为质谱级,美国Thermo Fisher公司产品;超纯水:由Milli-Q超纯水系统制备。

各组临床样本均由第七十一集团军医院疾病预防控制中心收集,人体实验经伦理委员会批准(批准号LL-2023YX01)。受试者信息如下:2022年6月~2023年6月收治25例患者,年龄60~85岁,平均年龄62.4岁,男性12例(48.00%),女性13例(52.00%)。纳入标准:1)年龄60~85岁,体重50~75 kg,性别不限;2)符合轻度认知功能障碍的诊断标准;3)自愿签署知情同意书;4)有足够的视听分辨力且能够接受认知功能测评;5)既往能阅读和书写简单文字。排除标准:1)有严重神经功能缺损,如帕金森、癫痫、脑肿瘤、脑水肿、脑积水、亨廷顿病、慢性硬膜下血肿及多发性硬化等;2)甲状腺疾病、严重的心脏疾病、肝肾功能不全、严重贫血或营养不良;3)近3个月内口服过可能影响认知功能的药物;4)无法配合完成检查者,如严重视觉和听觉障碍;5)过敏体质者;6)存在抑郁、精神分裂等精神方面的疾病。受试者口服阿魏酸钠(0.1 g/粒,1粒/次,3次/日),12周为1个疗程,服用2个疗程。

1.3 样品制备

1.3.1 生物样品收集 给药后分别采集1、2、5、6、7、8、9、12、13、15、17、24 h时间点的志愿者血浆、尿液及粪便样品,其中,粪便样品经真空冷冻干燥机干燥后,于-80℃保存,待用。

1.3.2 生物样品制备 血浆样品的制备:将血浆样品置于冰上解冻后,分别等量取1、2 h,5、6、7、8、9、12 h和13、15、17、24 h时间点的血浆样品,分别将3组时间点的血浆样品混合;分别取500 μL 3组混合时间点的血浆样品,加入1 500 μL乙腈溶液,涡旋1 min以充分沉淀蛋白,于4℃以12 000 r/min离心15 min,取上清液,

吹干,浓缩;用50 μL 乙腈-水溶液(50:50, V/V)复溶,涡旋2 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心15 min,取上清液,得到血清样品;于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待分析。

尿液样品的制备:将尿液样品置于冰水中解冻后,等量取1、2 h,5、6、7、8、9、12 h和13、15、17、24 h时间点的尿液样品,分别将3组时间点的尿液样品混合;分别取500 μL 3组混合时间点的尿液样品,加入1 500 μL 乙腈溶液,涡旋1 min以充分沉淀蛋白,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心15 min,取上清液,吹干,浓缩;用100 μL 乙腈-水溶液(50:50, V/V)复溶,涡旋2 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心15 min,取上清液,得到尿液样品;于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待分析。

粪便样品的制备:精密称取适量的各时间点粪便样品,研磨,加入10倍体积甲醇,冰浴超声提取30 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心15 min,取上清液。等量取1、2 h,5、6、7、8、9、12 h和13、15、17、24 h时间点的粪便提取物样品,分别将3组时间点的粪便提取物样品混合;分别取200 μL 3组混合时间点的粪便提取物样品,吹干,用100 μL 甲醇-水溶液(50:50, V/V)复溶,涡旋2 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心15 min,取上清液,得到粪便提取物样品;于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待分析。

1.3.3 对照品溶液配制 精密称取各2 mg阿魏酸、异阿魏酸、咖啡酸、咖啡酸甲酯、二氢咖啡酸、二氢阿魏酸、3-羟基-肉桂酸、4-羟基-苯丙酸及3-羟基-苯丙酸对照品,分别配制成2 g/L储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待用。

1.3.4 I相代谢孵育样品制备 NADPH反应体系由50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)组成,其中包括3.3 mmol/L MgCl_2 、1.0 mmol/L NADPH、5.0 mmol/L G-6-P、1.0 U/mL G-6-PD、1.0 g/L肝微粒体,各底物浓度10 mmol/L,终体积200 μL ,甲醇终浓度小于1%。孵育体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡,预孵育5 min后,加入NADPH还原系统启动反应,继续孵育2 h后,加入100 μL 冰乙腈终止反应,涡旋1 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心10 min,取上清液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待LC-MS/MS分析。

同时设立对照组和空白组,对照组以等量灭活肝微粒体代替有活性肝微粒体,空白组以等量甲醇溶液代替对照品溶液,平行孵育。

1.3.5 II相代谢孵育样品制备 UDPGA反应体系由50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)组成,其

中包括5.0 mmol/L MgCl_2 、2.0 mmol/L UDPGA、2.5 mmol/L D-葡萄糖-二酸-1,4-内酯-一水合物、25 mg/L 丙甲菌素、1 g/L肝微粒体,各底物浓度10 mmol/L,终体积200 μL ,甲醇终浓度小于1%。孵育体系在冰上反应15 min后,于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡预孵育5 min,加入UDPGA启动反应,继续孵育2 h后,加入100 μL 冰乙腈终止反应,涡旋1 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心10 min,取上清液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待LC-MS/MS分析。

PAPS反应体系由50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)组成,其中包括5.0 mmol/L MgCl_2 、5.0 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)、1.0 g/L肝胞浆液,各底物浓度10 mmol/L,终体积200 μL ,甲醇终浓度小于1%。孵育体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡,预孵育5 min后,加入PAPS启动反应,继续孵育2 h后,加入100 μL 冰乙腈终止反应,涡旋1 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 以12 000 r/min离心10 min,取上清液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待LC-MS/MS分析。

同时设立对照组和空白组,对照组以等量灭活肝微粒体代替有活性肝微粒体或肝胞浆液,空白组以等量甲醇溶液代替对照品溶液,平行孵育。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 AcclaimTM C30色谱柱(3.0 mm $\times$ 150 mm, 3.0 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和0.1%甲酸乙腈溶液(B);洗脱程序:0~2 min(0%B),2~6 min(0%~10%B),6~18 min(10%~20%B),18~22 min(20%~80%B);预平衡时间5 min;流速0.5 mL/min;柱温40 $^{\circ}\text{C}$;进样器控温4 $^{\circ}\text{C}$;进样量2 μL 。

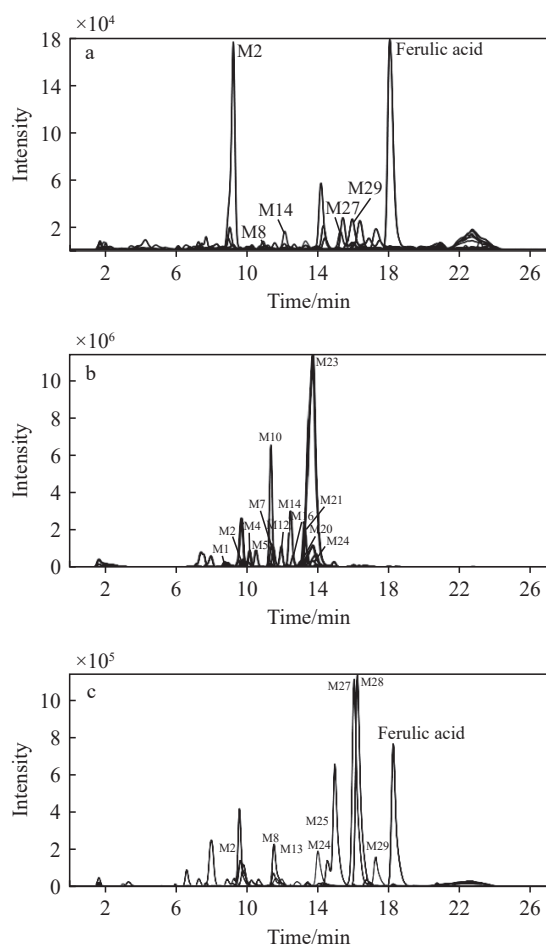
1.4.2 Q/TOF MS条件 ESI源,负离子模式,雾化气(GS1)压强379 211 Pa,辅助加热气(GS2)压强379 211 Pa,气帘气(CUR)压强241 316 Pa,碰撞气(CAD)为High,喷雾室电压4 500 V,离子源温度(TEM)500 $^{\circ}\text{C}$,MS¹质量扫描范围 m/z 100~500,MS²质量扫描范围 m/z 50~500,碰撞能(CE)-20 eV,碰撞扩展能(CES) $\pm$ 15 V,去簇电压(DP)-80 V。使用PeakviewTM1.2进行色谱峰识别等数据处理。

2 结果与讨论

2.1 阿魏酸体内代谢分析

采用LC-Q/TOF MS检测各组样品,从血浆、尿液及粪便样品中检测到阿魏酸原型(M0)及

31个代谢产物(M1~M31),分别有9、27、15个代谢产物,其提取离子流图示于图1,具体鉴定结果列于表1。原型成分在血浆、尿液及粪便中均有检出。



注: a. 血浆; b. 尿液; c. 粪便

图1 不同生物样品中阿魏酸体内代谢产物的提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion current chromatograms of FA metabolites in different biological samples

FA的准分子离子峰为 m/z 193.05[M-H]⁻, 预测分子式为C₁₀H₁₀O₄(误差为 3.5×10^{-6})。二级质谱图中可见中性丢失CO₂(43.99 u)产生的碎片离子 m/z 149.06[M-H-CO₂]⁻, 丢失CH₃·(15.02 u)产生的碎片离子 m/z 178.02[M-H-CH₃]⁻, 以及丢失CO₂与CH₃·产生的碎片离子 m/z 134.03[M-H-CO₂-CH₃]⁻, 示于图2。

2.1.1 阿魏酸体内代谢成分鉴定 M28(t_R =15.87 min)的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 195.06, 预测分子式为C₁₀H₁₂O₄(误差为 2.1×10^{-6})。与FA的准分子离子峰[M-H]⁻仅相差2 u, 推测为阿

魏酸的还原产物。二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 136.05[M-H-CH₃·-CO₂]⁻、135.04[M-H-CH₄-CO₂]⁻、121.02[M-H-C₃H₆O₂]⁻, 经对照品指认为二氢阿魏酸(dihydroferulic acid)。

M14的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 275.02, 与M28相差79.96 u, 且产生 m/z 195.06碎片离子, 推测为M28的硫酸化产物。由于二氢咖啡酸结构中含有羟基和羧基, 硫酸化反应一般发生在C4位羟基, 推测为二氢咖啡酸-4-*O*-硫酸酯。此外, 通过与体外孵育二氢咖啡酸硫酸化产物的保留时间比对, 推测M14为二氢咖啡酸-4-*O*-硫酸酯, 示于图3。

M12和M22的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 371.09, 与M28的准分子离子峰[M-H]⁻相差176.03 u, 二级质谱图中碎片离子有 m/z 195.06、175.02、113.02。其中, m/z 371.09中性丢失1分子葡萄糖醛酸基形成 m/z 195.06碎片离子, 葡萄糖醛酸基进一步中性丢失1分子CO₂(44 u)和1分子H₂O(18 u)形成 m/z 113.02碎片离子。推测M12和M22为M28的葡萄糖醛酸化产物。根据二氢阿魏酸的结构特点, 葡萄糖醛酸化位点可能发生在C4位羟基或侧链羧基。结合相关文献^[13], 芥子酸结构与二氢阿魏酸结构相似, 葡萄糖醛酸基与羟基形成的醚型葡萄糖醛酸苷的保留时间小于与羧基形成的酰型葡萄糖醛酸苷。因此, 推测M12为二氢阿魏酸-4-*O*-葡萄糖醛酸苷, M22为二氢阿魏酸-9-*O*-葡萄糖醛酸苷。

M10和M21的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 369.08, 与FA的准分子离子峰[M-H]⁻相差176.03 u, 二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 193.05、134.03、175.02、113.02。准分子离子峰[M-H]⁻中性丢失1分子葡萄糖醛酸基产生 m/z 193.05碎片离子, 进一步丢失甲基自由基及CO₂形成 m/z 134.03碎片离子。并且, 还可以观察到葡萄糖醛酸基的特征碎片离子 m/z 175.02、113.02。因此, 初步推测二者均为FA的葡萄糖醛酸化产物。根据FA的结构特点, 葡萄糖醛酸化位点可能发生在C4位羟基及侧链羧基。结合相关文献^[13], 并与体外孵育阿魏酸葡萄糖醛酸化产物的保留时间比对, 推测M10和阿魏酸-4-*O*-葡萄糖醛酸苷和阿魏酸-9-*O*-葡萄糖醛酸苷, 示于图4。

M23的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 273.00,

续表

序号 No.	保留时间 Retention time/min	准分子 离子 Quasi- molecular ion[M-H] ⁻ (m/z)	分子式 Formula	误差 Error/ ×10 ⁻⁶	碎片离子 Fragment ion (m/z)	鉴定结果 Identity	血浆 Plasma			尿液 Urine			粪便 Feces		
							1~2 h	5~12 h	13~24 h	1~2 h	5~12 h	13~24 h	1~2 h	5~12 h	13~24 h
M15	13.06	179.0350	C ₉ H ₈ O ₄	0.1	135.0448, 134.0363	咖啡酸*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M16	13.06	245.0132	C ₉ H ₈ O ₆ S	2.7	165.0562, 121.0657	苯丙酸3-O-硫酸酯	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M17	13.33	181.0513	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.7	137.0608, 122.0375	3,4-二羟基苯丙酸同分异构体	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M18	13.35	242.9967	C ₉ H ₈ O ₆ S	-0.8	199.0087, 163.0397, 119.0500	羟基肉桂酸4-O-硫酸酯*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M19	13.42	357.0856	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	8.1	181.0511, 175.0241, 113.0242	二氢咖啡酸-3-O-葡萄糖醛酸苷	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M20	13.48	383.2056	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	1.9	207.0672, 175.0236, 3,4-二甲氧基肉桂酸-9-O-葡萄糖醛酸苷同分异构体	阿魏酸-9-O-葡萄糖醛酸苷*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M21	13.61	369.0831	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	1.0	193.0476, 175.0259, 113.0243	阿魏酸-9-O-葡萄糖醛酸苷*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M22	13.70	371.0997	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	3.6	195.0670, 193.0357, 175.0244, 113.0245	二氢阿魏酸-9-O-葡萄糖醛酸苷	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M23	13.74	273.0076	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	0.6	193.0511, 178.0267, 149.0616, 134.0364, 96.9605, 79.9573	阿魏酸-4-O-硫酸酯*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M24	13.97	287.0238	C ₁₁ H ₂₀ O ₇ S	2.4	207.0667, 163.0766, 122.0369, 79.9565	3,4-二甲氧基-肉桂酸-9-O-硫酸酯	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M25	14.37	165.0556	C ₉ H ₁₀ O ₃	-1.3	121.0656, 106.0431	4-羟基苯丙酸*	-	-	-	-	-	-	+	+	+
M26	14.45	242.9973	C ₉ H ₈ O ₆ S	1.7	199.1022, 163.0404, 119.0513	羟基肉桂酸-3-O-硫酸酯*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M27	15.87	165.0556	C ₉ H ₁₀ O ₃	-0.7	121.0659, 106.0420	3-羟基苯丙酸*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M28	15.97	195.0667	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	2.1	136.0529, 135.0448, 121.0292	二氢阿魏酸*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M29	16.32	209.0453	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	-1.2	165.0565, 121.0290	5-羟基阿魏酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M30	18.21	163.0398	C ₉ H ₈ O ₃	-1.6	119.0501	3-羟基肉桂酸*	-	-	-	+	+	+	-	-	-
M31	20.97	193.0502	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-2.2	149.0620, 121.0322, 107.0516	咖啡酸甲酯*	-	+	+	-	-	-	-	-	-

注: *表示与对照品和孵育产物比对; +表示检出; -表示未检出

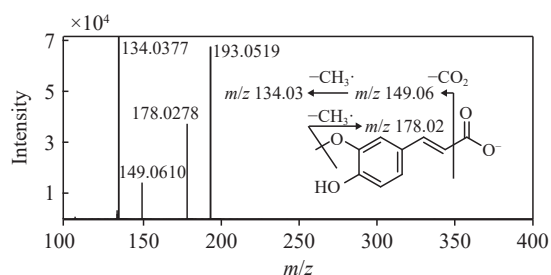


图2 阿魏酸的二级质谱图及可能的裂解途径

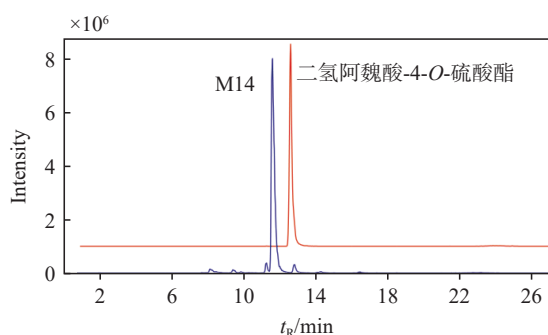
Fig. 2 MS² spectrum and possible fragmentation pathways of FA

图3 阿魏酸的体内代谢产物(M14)及二氢阿魏酸体外孵育硫酸化产物(二氢阿魏酸-4-O-硫酸酯)的提取离子流图

Fig. 3 Extracted ion current chromatograms of *in vivo* metabolites (M14) of ferulic acid and *in vitro* sulfation of dihydroferulic acid (dihydroferulic acid-4-O-sulfate)

与FA的准分子离子峰[M-H]⁻相差79.95 u, 二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 193.05、178.02、149.06、134.03、96.96。准分子离子峰[M-H]⁻中性丢失硫酸基形成 m/z 193.05 碎片离子, 而 m/z 178.02、149.06、134.03 为FA的特征碎片离子, m/z 96.96 为HSO₄⁻。因此, 推测M23为FA的硫酸化产物。通过与体外孵育阿魏酸硫酸化产物的保留时间比对, 鉴定M23为阿魏酸-4-O-硫酸酯。

M29的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 209.04, 与FA的准分子离子峰[M-H]⁻相差15.99 u, 二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 165.05、121.02。准分子离子峰[M-H]⁻中性丢失1分子CO₂形成 m/z 165.05 碎片离子, 进一步丢失C₂H₄O形成 m/z 121.02 碎片离子, 推测M29为FA的羟基化产物。根据FA的结构特点, 羟基化可能发生在C2位或C5位。由于C2位的空间位阻较大, 推测羟基化位点发生在C5位。此外, 通过与体外

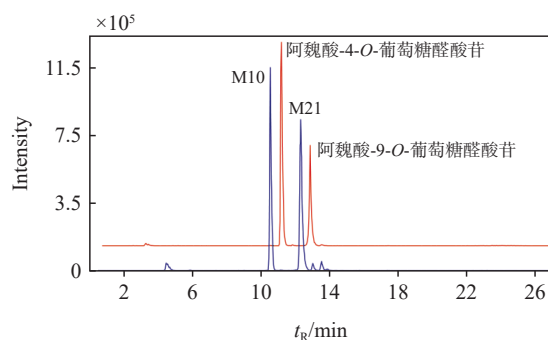


图4 阿魏酸体内代谢产物(M10和M21)及体外孵育葡萄糖醛酸化产物(阿魏酸-4-O-葡萄糖醛酸苷和阿魏酸-9-O-葡萄糖醛酸苷)的提取离子流图

Fig. 4 Extracted ion current chromatograms of *in vivo* metabolites (M10 and M21) of ferulic acid and *in vitro* glucuronidation of ferulic acid (ferulic acid-4-O-glucuronide and ferulic acid-9-O-glucuronide)

孵育阿魏酸的I相代谢产物保留时间比对, 鉴定M29为5-羟基阿魏酸。

M24的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 287.02, 二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 207.06、163.07、122.03、79.95。其中, m/z 207.06 与FA的准分子离子峰[M-H]⁻相差14.01 u, 特征离子 m/z 79.95 为SO₃⁻, 且 m/z 287.02 与 m/z 207.06 相差79.96 u。因此, 推测M24为阿魏酸发生甲基化后进一步发生硫酸化的产物。根据阿魏酸的结构特点, 甲基化可能发生在C4羟基形成3,4-二甲氧基-肉桂酸或羧基端形成阿魏酸甲酯, 经阿魏酸甲酯对照品确认, 未发现FA在体内代谢为阿魏酸甲酯。因此, 推测甲基化发生在C4羟基, 硫酸化发生在羧基端形成3,4-二甲氧基-肉桂酸-9-O-硫酸酯。

M15的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 179.03, 预测分子式为C₉H₈O₄, 与FA的准分子离子峰[M-H]⁻相差14.02 u, 推测为FA的去甲基化产物。通过与对照品比对, 鉴定M15为咖啡酸。

M11和M9的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 258.99, 与M15的准分子离子峰[M-H]⁻相差79.96 u, 推测为M15的硫酸化产物。根据咖啡酸的结构特点, 硫酸化位点可能发生在C3位或C4位羟基。结合相关文献^[14], 同时与体外孵育咖啡酸硫酸化产物的保留时间比对, 推测M11为咖啡酸-3-O-硫酸酯, M9为咖啡酸-4-O-硫酸酯。

M31的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 193.05, 预测分子式为C₁₀H₁₀O₄, 与FA阿魏酸互为同分

异构体,与咖啡酸相差 14.02 u。通过与对照品比对,鉴定 **M31** 为咖啡酸甲酯(methyl caffeate)。

M30 的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 163.03,与咖啡酸相差 16 u,推测为其脱羟基化产物,可能发生在 C3 位或 C4 位。通过与对照品比对,鉴定 **M30** 为间羟基肉桂酸(3-hydroxycinnamic acid)。

M18 和 **M26** 的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 242.99,与 **M30** 相差 79.96 u,主要碎片离子有 m/z 199.10、163.04、119.05,推测为其硫酸化产物。根据 3-羟基肉桂酸的结构特点,硫酸化位点可能发生在 **M30** 的 C3 位羟基或 4-羟基肉桂酸的 C4 位羟基。采用硫酸化孵育进行验证,3-羟基肉桂酸孵育产物与 **M26** 匹配,鉴定其为 3-羟基肉桂酸-3-*O*-硫酸酯;**M18** 的保留时间与 4-羟基肉桂酸硫酸化产物一致,鉴定其为 4-羟基肉桂酸-4-*O*-硫酸酯。

M8 的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 181.05,与咖啡酸相差 2 u,可能为其还原产物。通过与对照品保留时间对比,鉴定 **M8** 为二氢咖啡酸(dihydrocaffeic acid)。

M6 和 **M7** 为 1 组同分异构体,准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 261.00,预测分子式为 C₉H₁₀O₇S,与 **M8** 相差 79.96 u。二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 181.05、137.06、79.95,分别归属为准分子离子峰[M-H]⁻中性丢失硫酸基产生 m/z 181.05 碎片离子,进一步丢失 1 分子 CO₂ 形成 m/z 137.06 碎片离子,特征离子 m/z 79.95 为 SO₃⁻,推测二者均为 **M8** 的硫酸化产物。根据二氢咖啡酸的结构特点,结构母核中含有 C3 位及 C4 位羟基,羟基位置更容易发生硫酸化反应,且一般在反相色谱柱的出峰顺序为 C4 位硫酸化产物先于 C3 位。同时,通过与二氢咖啡酸硫酸化孵育产物的保留时间比对,鉴定 **M6** 为二氢咖啡酸-4-*O*-硫酸酯,**M7** 为二氢咖啡酸-3-*O*-硫酸酯。

M1 和 **M19** 的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 357.08,预测分子式为 C₁₅H₁₈O₁₀,二级质谱图中可观察到 m/z 181.05、175.02、113.02 碎片离子。 m/z 357.08 中性丢失 1 分子葡萄糖醛酸形成 m/z 181.05 碎片离子,与 **M8** 的准分子离子峰一致,而 m/z 175.02、113.02 为葡萄糖醛酸的特征碎片离子。根据 **M6** 和 **M7** 的鉴定流程,推测 **M1** 为二氢阿魏酸-4-*O*-葡萄糖醛酸苷,**M19** 为二氢阿魏酸-3-*O*-葡萄糖醛酸苷。

M25 和 **M27** 的准分子离子峰[M-H]⁻均为 m/z 165.05,与 **M8**(二氢咖啡酸)相差 16 u,推测为脱羟基化产物。在二级质谱图中可观察到 m/z 121.06、106.04 碎片离子,分别归属为由 m/z 165.05 中性丢失 CO₂ 产生的 m/z 121.06 碎片离子,及进一步丢失甲基自由基形成的 m/z 106.04 碎片离子。基于二氢咖啡酸的结构特点,脱羟基位点可能发生在 C3 位或 C4 位。通过与对照品比对,鉴定 **M25** 为 4-羟基苯丙酸,**M27** 为 3-羟基苯丙酸。

M16 的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 245.01,二级质谱图中主要的碎片离子有 m/z 165.05、121.06。 m/z 245.01 与 m/z 165.05 相差 79.96 u,推测为 **M25** 或 **M27** 的硫酸化产物。由于 3-羟基苯丙酸在体内暴露量较大,故初步推测 **M16** 为苯丙酸-3-*O*-硫酸酯。

由于缺少对照品,无法准确鉴定 **M2**、**M3**、**M4**、**M5**、**M13**、**M17** 及 **M20**。

2.1.2 阿魏酸的体内代谢途径 阿魏酸为酚酸类化合物,在人体内生物利用度较低^[15-17],同时代谢较快,平均半衰期仅为 0.2~0.42 h^[18-20]。阿魏酸及其代谢产物主要通过肾脏排泄^[21-22]。研究表明^[20],FA 在结肠中主要代谢为系列苯丙酸衍生物,进入肝脏后生成苯甲酸及其衍生物。虽然 FA 在体内的主要代谢途径已被揭示,但其详细的代谢途径尚未见报道。此外,FA 的体内代谢产物存在较多同分异构体,其结构的准确鉴定有待进一步研究。综上,经口服 FA 后共鉴定了 31 个代谢产物,其中利用对照品及体外孵育产物准确鉴定了 17 个代谢产物,从血浆、尿液和粪便中分别鉴定到包含原型在内的 10、28、16 个化合物。基于 FA 的体内代谢产物鉴定结果,推测可能的代谢途径示于图 5。甲基化、去甲基化、羟基化、脱羟基化、还原、葡萄糖醛酸化、硫酸化为 FA 的主要代谢途径。

本实验从血浆中共鉴定了 9 个代谢物(**M2**、**M7**、**M14**、**M23**、**M24**、**M27**、**M28**、**M29**、**M31**)。FA 给药 24 h 内,血浆中主要以原型及其代谢产物 **M2**(3,4-二羟基苯丙酸的同分异构体)的形式存在。研究表明^[2,23-24],FA 在肝脏内主要生成阿魏酸-4-*O*-硫酸酯或阿魏酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸,本实验也检测到这 2 种代谢物。从尿液中鉴定了 27 个代谢物(**M1**~**M5**、**M7**、**M9**~**M24**、**M26**~**M30**),表明 FA 进入体内后大部分通过肾脏排

泄,在2 h内主要以3,4-二甲氧基-肉桂酸-9-*O*-硫酸酯(M24)形式排出体外,而在5 h后主要以阿魏酸-4-*O*-硫酸酯(M23)形式排出体外。从粪便中共鉴定到15个代谢产物(M2、M6~M9、M11、M14~M16、M23~M25、M27~M29),给药12 h内主要以3-羟基苯丙酸(M27)形式存在,而在13~24 h内FA主要被代谢为3-羟基苯丙酸(M27)和二氢阿魏酸(M28)。研究表明^[25-27],FA的肠道菌群代谢途径为FA被还原成二氢阿魏酸(M28),C3位脱羟基生成3,4-二羟基苯丙酸(M8);随后,

其C3或C4位在脱羟基化酶的作用下生成3-羟基苯丙酸(M27)或4-羟基苯丙酸(M25)。除苯甲酸及3-羟基苯乙酸外,其余代谢产物在粪便中均被检测到。

从FA可能的体内代谢途径来看,一部分代谢产物自身发生硫酸化、葡萄糖醛酸化等II相反应,或还原、羟基化等I相代谢反应;另一部分代谢产物主要为FA去甲基化产生咖啡酸,进一步发生甲基化、脱羟基化、还原、硫酸化等系列反应。

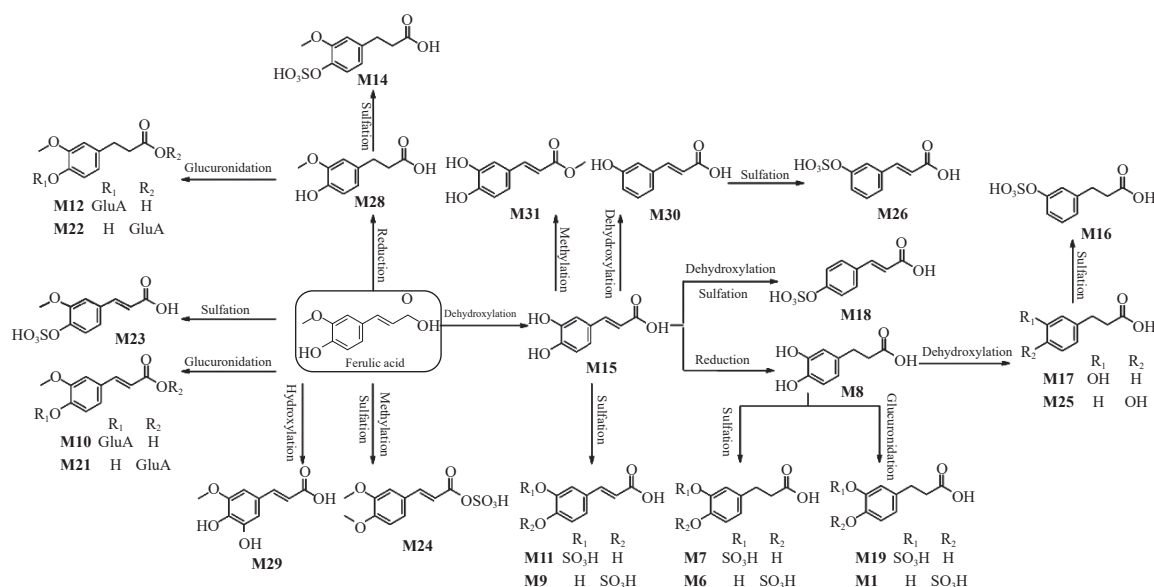


图5 阿魏酸的体内代谢途径

Fig. 5 Proposed metabolism pathways of ferulic acid in human

3 结论

本研究采用UPLC-Q/TOF MS技术对阿魏酸的体内代谢产物进行深入解析,从生物样品中鉴定了31个代谢产物,包括血浆中9个化合物,尿液中27个化合物,粪便中15个化合物。根据FA在体内的代谢途径,发现FA给药后主要发生硫酸化、葡萄糖醛酸化、去甲基化、脱羟基化及还原等反应。为了提高代谢产物鉴定的准确性,本实验利用体外孵育方法获取部分代谢产物的混合“对照品”,通过保留时间比对并结合相关文献,从FA给药后的血浆、尿液及粪便中准确鉴定了24个代谢产物,其中利用对照品指认了17个代谢产物。由于缺少对照品,无法准确鉴定代谢产物M2、M3、M4、M5、M13、M17及M20,后续可采用能量分辨质谱结合量子化学计

算等技术对其结构进行鉴定^[5,28-29]。本研究初步阐明了阿魏酸体内代谢途径,可为其他酚酸类化合物的体内代谢研究提供参考。

参考文献:

- [1] BURANOV A U, MAZZA G. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1 542-1 548.
- [2] BARONE E, CALABRESE V, MANCUSO C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases[J]. Biogerontology, 2009, 10(2): 97-108.
- [3] KWON E Y, DO G M, CHO Y Y, PARK Y B, JEON S M, CHOI M S. Anti-atherogenic property of ferulic acid in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diet:

- comparison with clofibrate[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2010, 48(8/9): 2 298-2 303.
- [4] ZHAO Z, EGASHIRA Y, SANADA H. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(5): 1 355-1 361.
- [5] SONG Q, LI J, HUO H, CAO Y, WANG Y, SONG Y, TU P. Retention time and optimal collision energy advance structural annotation relied on LC-MS/MS: an application in metabolite identification of an antidementia agent namely echinacoside[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(23): 15 040-15 048.
- [6] JIA Z, QIU Q, HE R, ZHOU T, CHEN L. Identification of metabolite interference is necessary for accurate LC-MS targeted metabolomics analysis[J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(20): 7 985-7 992.
- [7] WANG Y, FENG R, WANG R, YANG F, LI P, WAN J B. Enhanced MS/MS coverage for metabolite identification in LC-MS-based untargeted metabolomics by target-directed data dependent acquisition with time-staggered precursor ion list[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 992: 67-75.
- [8] WANG Y, FENG R, HE C, SU H, MA H, WAN J B. An integrated strategy to improve data acquisition and metabolite identification by time-staggered ion lists in UHPLC/Q-TOF MS-based metabolomics[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 157: 171-179.
- [9] LUO P, DAI W, YIN P, ZENG Z, KONG H, ZHOU L, WANG X, CHEN S, LU X, XU G. Multiple reaction monitoring-ion pair finder: a systematic approach to transform nontargeted mode to pseudotargeted mode for metabolomics study based on liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(10): 5 050-5 055.
- [10] ZHOU Y, HU C, ZHAO X, LUO P, LU J, LI Q, CHEN M, YAN D, LU X, KONG H, JIA W, XU G. Serum metabolomics study of gliclazide-modified-release-treated type 2 diabetes mellitus patients using a gas chromatography-mass spectrometry method[J]. Journal of Proteome Research, 2018, 17(4): 1 575-1 585.
- [11] 王亮, 郭姣, 石忠峰, 江涛. “Cocktail” 探针药物法的研究思路与应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(11): 30-34.
- WANG Liang, GUO Jiao, SHI Zhongfeng, JIANG Tao. Research route and utilization of cocktail probe drugs[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2010, 12(11): 30-34(in Chinese).
- [12] 李兰, 张丹参. 药物体外肝代谢研究方法[J]. *神经药理学报*, 2020, 10(4): 10-13, 28.
- LI Lan, ZHANG Danshen. Research methods of drug *in vitro* liver metabolism[J]. *Acta Neuropharmacologica*, 2020, 10(4): 10-13, 28(in Chinese).
- [13] YANG X, SHI J, LI H, ZHANG K, LI J, SONG Q. Characterization of the metabolic fate of sinapic acid in rats[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2023, 415(26): 6 511-6 523.
- [14] LIU W, LI W, ZHANG P, GONG X, TU P, TANG L, LI J, SONG Y. Quality structural annotation for the metabolites of chlorogenic acid in rat[J]. Food Chemistry, 2022, 379: 132 134.
- [15] 李本岳. 当归芍药散提高阿魏酸生物利用度的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [16] 潘璐琳. 脑得生片有效成分葛根素及阿魏酸的胃肠吸收代谢及其药代动力学研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2009.
- [17] 刘晓峰. 不同溶媒提取川芎活性成分阿魏酸的药动力学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [18] ZHAO Z, EGASHIRA Y, SANADA H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver[J]. The Journal of Nutrition, 2004, 134(11): 3 083-3 088.
- [19] LI J, BAI Y, BAI Y, ZHU R, LIU W, CAO J, AN M, TAN Z, CHANG Y X. Pharmacokinetics of caffeic acid, ferulic acid, formononetin, cryptotanshinone, and tanshinone IIA after oral administration of Naoxintong capsule in rat by HPLC-MS/MS[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017(1): 9 057 238.
- [20] ZHAO Z, MOGHADASIAN M H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(4): 691-702.
- [21] RECHNER A R, KUHNLE G, BREMNER P, HUBBARD G P, MOORE K P, RICE-EVANS C A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 33(2): 220-235.
- [22] VETRANI C, RIVELLESE A A, ANNUZZI G, ADIELS

- M, BORÉN J, MATTILA I, OREŠIČ M, AURA A M. Metabolic transformations of dietary polyphenols: comparison between *in vitro* colonic and hepatic models and *in vivo* urinary metabolites[J]. [The Journal of Nutritional Biochemistry](#), 2016, 33: 111-118.
- [23] ZHANG J L, ZHANG G D, ZHOU T H. Metabolism of ferulic acid in rats[J]. [Journal of Asian Natural Products Research](#), 2005, 7(1): 49-58.
- [24] ANSON N M, SELINHEIMO E, HAVENAAR R, AURA A M, MATTILA I, LEHTINEN P, BAST A, POUTANEN K, HAENEN G R M M. Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds[J]. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), 2009, 57(14): 6 148-6 155.
- [25] PEREIRA-CARO G, BORGES G, KY I, RIBAS A, CALANI L, del RIO D, CLIFFORD M N, ROBERTS S A, CROZIER A. *In vitro* colonic catabolism of orange juice (poly)phenols[J]. [Molecular Nutrition & Food Research](#), 2015, 59(3): 465-475.
- [26] PHAN A D T, WILLIAMS B A, NETZEL G, MIKKELSEN D, D'ARCY B R, GIDLEY M J. Independent fermentation and metabolism of dietary polyphenols associated with a plant cell wall model[J]. [Food & Function](#), 2020, 11(3): 2 218-2 230.
- [27] LU S, CHENG D, YAO H, WEN Y, YU Y, LI H, WANG J, SUN B. Cascade microbial metabolism of ferulic acid *in vitro* fermented by the human fecal inoculum[J]. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), 2024, 72(17): 9 807-9 817.
- [28] LEOGRANDE P, BOTRÈ F, TORRE X, JARDINES D, PARR M K, MARINI F. Coupling high-resolution mass spectrometry and chemometrics for the structural characterization of anabolic-androgenic steroids and the early detection of unknown designer structures[J]. [Talanta](#), 2021, 227: 122 173.
- [29] MAHROUS E A, FARAG M A. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: a review[J]. [Journal of Advanced Research](#), 2015, 6(1): 3-15.

(收稿日期: 2024-09-13; 修回日期: 2024-11-06)