

基于 UHPLC-LTQ/Orbitrap MS 法的 苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的 大鼠肝微粒体体外代谢产物鉴定

张秀平¹, 蔡伟², 姚泓¹, 张加余³, 王子健³, 卢建秋⁴, 刘颖³

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 湖南医药学院侗医药研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000;

3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029;

4. 北京中医药大学图书馆, 北京 100029)

摘要:苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 是苦苣菜(*Ixeris sonchifolia* (Bunge) Hance)中 2 种重要的倍半萜内酯类成分。为研究它们在大鼠肝微粒体中的代谢产物,采用 Waters Acquity UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm \times 1.7 μ m)分离,以 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱,采用高效液相色谱-线性离子阱静电轨道场质谱(UHPLC-LTQ/Orbitrap MS)技术,在 ESI 负离子模式下分析样品。筛选出 18 个化合物(包括苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z,及其 16 个代谢产物),并对其中 15 个代谢产物进行结构鉴定。结果表明,苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 经大鼠肝微粒体主要发生了羟基化、加氢和脱氢的 I 相代谢反应。该结果初步阐明了苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 在大鼠肝微粒体中的代谢规律,可为新药、毒理学研究提供支持。

关键词:苦苣菜内酯 Z; 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z; 大鼠肝微粒体; 高效液相色谱-线性离子阱静电轨道场质谱(UHPLC-LTQ/Orbitrap MS); 代谢产物

中图分类号:O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-2997(2018)03-0257-11

doi:10.7538/zpzb.2017.0118

Profiling and Identification of the Metabolites of Ixerin Z and 11,13 α -Dihydroixerin Z in Rat Liver Microsomes by UHPLC-LTQ/Orbitrap MS

ZHANG Xiu-ping¹, CAI Wei², YAO Hong¹, ZHANG Jia-yu³,
WANG Zi-jian³, LU Jian-qiu⁴, LIU Ying³

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Dong Medicine,

收稿日期:2017-07-06;修回日期:2017-12-07

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81503244)资助

作者简介:张秀平(1987—),女(汉族),安徽人,硕士研究生,中药分析专业。E-mail: 17801085367@163.com

蔡伟(1985—),男(汉族),湖南人,副教授,从事体内药物分析研究。E-mail: 20120941161@bucm.edu.cn

通信作者:卢建秋(1965—),男(汉族),黑龙江人,研究员,从事中药质量控制与中药代谢研究。E-mail: lujq@vip.sina.com

刘颖(1979—),女(汉族),辽宁人,副研究员,从事中药药代动力学研究。E-mail: liuyingtem@gmail.com

网络出版时间:2018-03-22;网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180322.1348.010.html

Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China;

3. Beijing Research of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

4. Library of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Ixerin Z and 11,13 α -dihydroixerin Z are the important ingredients of sesquiterpene lactones in Kudiezi. In this study, the metabolites of Ixerin Z and 11,13 α -dihydroixerin Z in rat liver microsomes were screened and identified using high performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap MS) at negative ion mode. The separation was conducted on Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm \times 50 mm \times 1.7 μ m) with the gradient elution of 0.1% formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile (B). As a result, Ixerin Z, 11,13 α -dihydroixerin Z and 16 metabolites were selected out, among which 15 metabolites were characterized based on the retention time, accurate mass measurements and fragmentation patterns. The results showed that there were two possible metabolic pathways of Ixerin Z in rat liver microsomes: 1) Metabolites 2, 5 and 12 were generated from Ixerin Z after hydroxylation; 11,13 α -dihydroixerin Z was generated from Ixerin Z after hydrogenated on its double bond, then metabolites 8, 14 and 15 were generated from 11,13 α -dihydroixerin Z after hydroxylation. 2) The metabolites were generated from the prototype via addition reaction, such as cysteine combination (1 and 4), glutathione combination (7 and 9). There were also two possible metabolic pathways of 11,13 α -dihydroixerin Z in rat liver microsomes: 1) Ixerin Z was generated from 11,13 α -dihydroixerin Z after hydrogenated on its double bond, then the metabolites 12 was generated from Ixerin Z after hydroxylation. Metabolites 3, 8, 10, 13, 14 and 15 were generated from 11,13 α -dihydroixerin Z after hydroxylation, followed by hydrogenation to produce 6 and 11. 2) Metabolite 7 was generated in conjugation reaction. The results demonstrate that they mainly undergo oxidation, reduction, hydrolysis *via* phase I in rat liver microsomes, which will help to clarify the metabolic pattern of Ixerin Z and 11,13 α -dihydroixerin Z, and can also provide support for further new drug and toxicology research.

Key words: Ixerin Z; 11,13 α -dihydroixerin Z; rat liver microsomes; high performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap MS); metabolites

苦碟子为菊科苦苣菜属抱茎苦苣菜 *Ixeris sonchifolia* (Bunge) Hance 的全草^[1],具有清热、凉血活血、消肿排脓^[2-3]等功效。倍半萜内酯类化合物为苦碟子的主要有效成分之一^[4-6],广泛存在于菊科、八角科及木兰科等植物中^[7-9],具有抗氧化、抗炎、抗菌及抗肿瘤等活性^[10-12]。其中,苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 为苦碟子中 2 种主要的倍半萜内酯类成分。

在早期的药物-药物相互作用确定中,体外

肝微粒体孵育体系是研究药物代谢的重要模型。近年来,有学者^[15-17]通过研究次乌头碱、马兜铃酸 I、马兜铃酸 II 和补骨脂二氢黄酮甲醚等在大鼠肝微粒体中的代谢过程,推测各成分及其代谢产物对机体发挥作用的机理机制,对探究其在肝微粒体中的代谢规律具有重要的参考价值。

本研究拟采用大鼠肝微粒体体外孵育模型,利用超高效液相色谱-线性离子阱静电轨道场质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap MS)技术在负

离子模式下研究苦苣菜内酯Z和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z在大鼠肝微粒体中的代谢产物,以完善苦苣菜内酯Z和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z的代谢规律。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Accela600 pump 高效液相色谱仪与 LTQ-Orbitrap XL 质谱仪:美国 Thermo Scientific 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI),Xcalibur2.1 工作站;R200D 型电子分析天平(十万分之一):德国 Sartorius 公司产品;KQ-250DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;TGL20M 型高速冷冻离心机:长沙湘智离心机仪器有限公司产品;TTM-1 型旋涡混合器:日本 SIBATA 公司产品;Millipore Synergy UV 型超纯水机:美国 Millipore 公司产品;DY89-1 型电动玻璃匀浆机:宁波新芝科器研究所产品;超高速离心机:日本日立公司产品;SIM-F124 制冰机:日本 SANYO Electric 公司产品;FRESCO 21 微量离心机、-80 °C 超低温冷冻储藏箱:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

1.2 材料与试剂

苦苣菜内酯Z和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z:由本实验室从苦碟子药材中分离得到,通过¹H-NMR、¹³C-NMR 和 MS 等鉴定结构并与文献^[18]数据对照,采用 HPLC 面积归一化法测定其纯度均大于 98%;苦碟子注射液(批号 141209,规格为 10 mL):吉林通化华夏药业有限责任公司产品,凭处方购自北京中医药大学东方医院;甲醇和乙腈:均为质谱级,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;超纯水:由 Millipore Synergy UV 型超纯水机制备;其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

6 只 SD 大鼠(许可证号:SCXK(京)2012-0001,体质量(200±20)g):购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于北京中医药大学屏障环境实验动物室(温度(24±2)°C,湿度(70±5)%。

1.4 溶液的配制

供试品溶液的配制:精密称取适量的苦苣

菜内酯Z和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z的对照品,用甲醇溶解并配制成浓度分别为 1.12、1.09 g/L 的对照品溶液。

磷酸盐缓冲液的配制:精密称取 13.6 g KH₂PO₄,用超纯水溶解,制得 1 mol/L KH₂PO₄ 溶液;称取 22.8 g K₂HPO₄·3H₂O,用超纯水溶解,制得 1 mol/L K₂HPO₄ 溶液;精密移取 8.02 mL 1 mol/L K₂HPO₄ 和 1.98 mL 1 mol/L KH₂PO₄,用超纯水稀释并配制成 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液。

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的配制:精密称取适量的 NADPH,用磷酸盐缓冲液配制成浓度为 10 mmol/L 的溶液,现配现用。

MgCl₂ 溶液的配制:精密称取适量的 MgCl₂,用磷酸盐缓冲液配制成浓度为 50 mmol/L 的溶液。

1.5 大鼠肝微粒体的制备

大鼠肝微粒体的制备参见文献^[19]。大鼠禁食不禁水 12 h 后,股动脉放血处死,迅速剪开腹腔,经肝门静脉小心插入细塑料管,通过蠕动泵用 4 °C 的 0.9% 生理盐水灌洗肝脏。剪开心脏便于液体流出,同时小心按压肝脏便于生理盐水流过,持续灌洗肝脏至土黄色,取出肝脏。用 4 °C 的 0.9% 生理盐水冲洗新鲜的肝脏,滤纸擦干并称质量、剪碎。加入 Tris-HCl 缓冲液(1:4, V/V),冰浴中制成肝匀浆。在 4 °C,以 7 700 r/min 离心 20 min,取出上清液并转移至超速离心管中,以 25 000 r/min 离心 60 min,弃去上清液,沉淀即为大鼠肝微粒体。将微粒体重悬于 Tris-HCl 中(按初始匀浆时每克肝组织加入 1 mL),均匀分散后分装于 EP 管中,于 -80 °C 保存。以小牛血清白蛋白为标准品,采用 BCA 试剂盒法测定微粒体蛋白含量^[20]。

1.6 大鼠肝微粒体混合酶孵化反应体系

微粒体孵化体系的实验总反应体积为 1 mL。实验分为空白组(不含苦苣菜内酯Z和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z)和不同浓度实验组(苦苣菜内酯Z或11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z的浓度均为 100、50、10、1 mg/L)。分别将苦苣菜内酯Z、11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z置于 EP 管中,氮气吹干后,依次加入 pH 7.4 的 0.1 mol/L

磷酸盐缓冲液、50 mmol/L MgCl₂ 和蛋白浓度为 0.5 g/L 的肝微粒体。孵化体系在 37 °C 水浴中预孵育 5 min, 分别加入 100 μL 10 mmol/L NADPH 后, 启动反应。在 5、10、15、30、45、60、120、240、360、480 min 时, 每次取 100 μL 系统体积, 并加入 200 μL 冰冷乙腈终止反应。在 4 °C 下, 以 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 待分析。所有样品平行制备 3 份。

1.7 实验条件

1.7.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C18 柱 (2.1 mm × 50 mm × 1.7 μm); 柱温 35 °C; 流动相: 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱条件: 0~2 min (95% A), 2~3 min (95%~92% A), 3~8 min (92%~88% A), 8~18 min (88%~85% A), 18~18.1 min (85%~20% A), 18.1~23 min (20% A), 23~23.1 min (20%~95% A), 23.1~25 min (95% A); 进样体积 2 μL; 流速 0.3 mL/min。

1.7.2 质谱条件 ESI 离子源, 负离子检测模式; 毛细管电压 35 V; 喷雾电压 3.0 kV; 毛细管温度 350 °C; 鞘气流速 30 个单位, 辅助气流速 10 个单位; 源内碰撞诱导裂解池碰撞能量 (CID) 35%。样品采用高分辨全扫描 (Full scan, FS), 一级扫描分辨率 30 000, 二级扫描分辨率 15 000, 质量扫描范围 m/z 100~1 000。

1.8 数据处理

利用 Xcaliber 2.1 工作站进行数据处理, 采用分子式预测模块预测所有母离子和碎片离子的分子式, 相关参数设定为 C[0~35]、H[0~50]、O[0~15]、S[0~1]、N[0~3], 环和不饱和和双键数 (RDB equivalent value) [0~15]。由于在该属植物的化学成分中未见 P、Cl 以及 Br 等元素的报道, 因此在分子式预测时未考虑这些离子, 质量精度误差在 5×10^{-6} 以内。

2 结果与讨论

2.1 苦苣菜内酯 Z 和 11, 13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 检测条件的优化及其裂解规律推断

本研究考察了不同比例的甲酸作为流动相改性剂对色谱-质谱分析的影响, 结果表明, 采用 0.1% 甲酸可获得良好的倍半萜内酯色谱峰形和质谱信号响应。

苦苣菜内酯 Z 和 11, 13 α -二氢苦苣菜内酯

Z 在负离子检测模式下产生的碎片离子种类和强度优于正离子检测模式^[21-22]。在负离子模式下, 苦苣菜内酯 Z 的准分子离子峰为 $[M-H]^-$ m/z 421.150 3, 经 CID 碰撞裂解, 母离子丢失 C3 位上的糖基, 形成基峰 $[M-H-Glu]^-$ m/z 259.097 3, 此外还形成碎片离子 m/z 377.161 2 ($-CO_2$)、 m/z 241.086 9 ($-C_6H_{10}O_5-H_2O$)、 m/z 226.063 5 ($-C_6H_{10}O_5-H_2O-CH_3$)、 m/z 215.107 6 ($-C_6H_{10}O_5-CO_2$) 和 m/z 197.097 0 ($-C_6H_{10}O_5-CO_2-H_2O$); 11, 13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的准分子离子峰为 $[M-H]^-$ m/z 423.166 6, 经 CID 碰撞裂解, 母离子丢失 C3 位上的糖基, 形成基峰 $[M-H-Glu]^-$ m/z 261.113 3, 此外还形成碎片离子 m/z 379.176 0 ($-CO_2$)、 m/z 217.123 3 ($-C_6H_{10}O_5-CO_2$)、 m/z 199.112 7 ($-C_6H_{10}O_5-CO_2-H_2O$) 和 m/z 187.076 2 ($-C_6H_{10}O_5-CO_2-2CH_3$), 其裂解途径示于图 1。

2.2 苦苣菜内酯 Z 的代谢产物分析与鉴定

根据精确分子质量数据推测可能的元素组成, 并结合质谱裂解碎片信息, 从苦苣菜内酯 Z 孵育样品中共筛选并鉴定出 1 个原型和 12 个代谢产物, 离子流图示于图 2, 代谢产物信息列于表 1。

代谢产物 1 和 4 的保留时间分别为 5.02、6.42 min, 准分子离子峰分别为 $[M-H]^-$ m/z 542.168 9 (-0.1×10^{-6} , C₂₄H₃₂O₁₁NS)、 m/z 542.168 5 (-1.1×10^{-6} , C₂₄H₃₂O₁₁NS)。经 CID 裂解, 发生了 121 u 的特征性中性丢失, 从而产生 m/z 421 碎片离子峰, 说明代谢产物 1 和 4 可能是苦苣菜内酯 Z 的半胱氨酸结合产物。由于苦苣菜内酯 Z 结构中 C11~C13 位存在双键, 因此推测代谢产物 1 和 4 为 13-半胱氨酸苦苣菜内酯 Z 或其同分异构体。

代谢产物 2、5 和 12 的保留时间分别为 6.18、6.94、9.47 min, 准分子离子峰分别为 m/z 437.144 2 (0.0, C₂₁H₂₅O₁₀)、 m/z 437.144 0 (-0.4×10^{-6} , C₂₁H₂₅O₁₀) 和 m/z 437.144 2 (0.0, C₂₁H₂₅O₁₀), 比苦苣菜内酯 Z 的准分子离子峰多 16 u。在二级质谱中, 产生了 m/z 275 $[M-H-Glu]^-$ 的特征性苷元离子, 说明代谢产物 2、5 和 12 中存在葡萄糖配基。苷元离子继续丢失 1 分子 CO₂ 形成 m/z 231 离子, 根据文献^[21], 推测此为倍半萜内酯类化合物的质谱

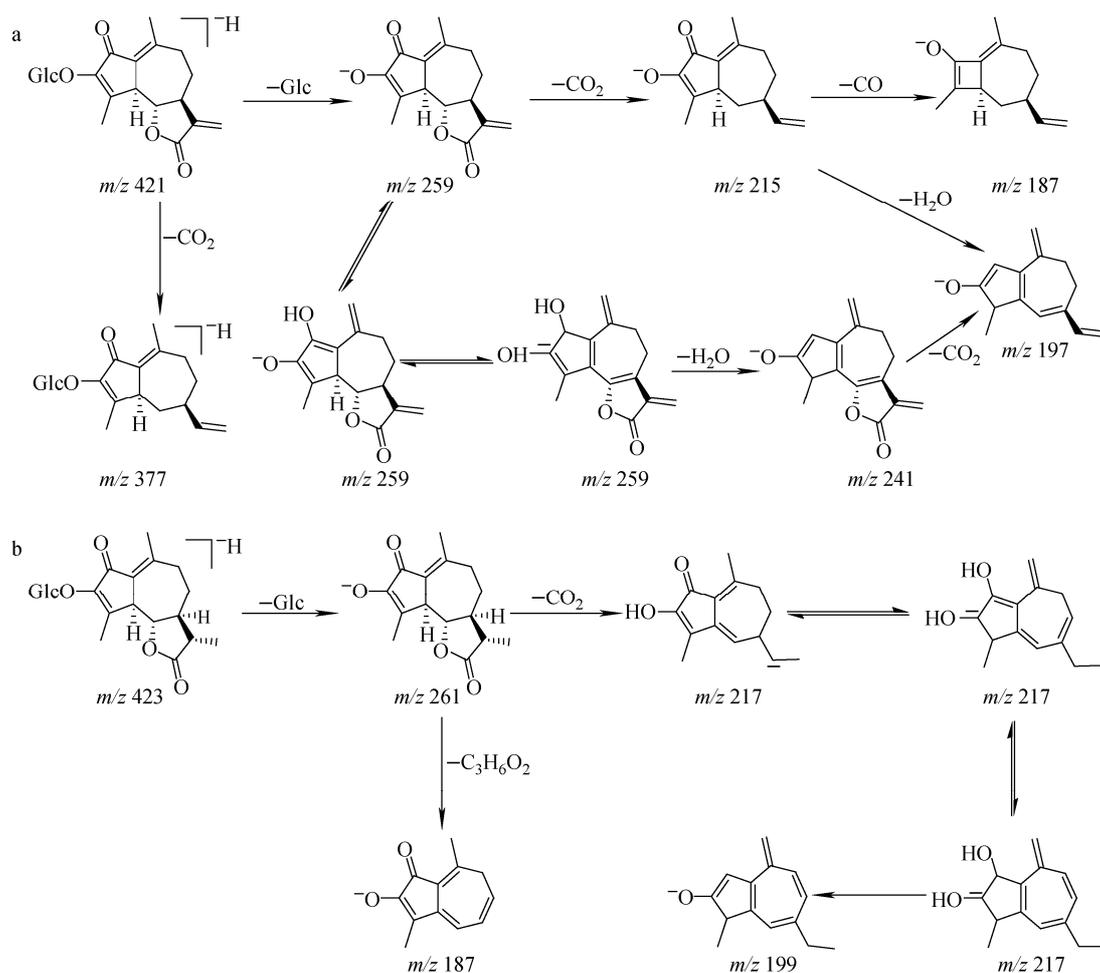


图1 苦苣菜内酯Z(a)和11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z(b)可能的裂解规律
 Fig.1 Fragmentation pathways of Ixerin Z (a) and 11,13 α -dihydroixerin Z (b)

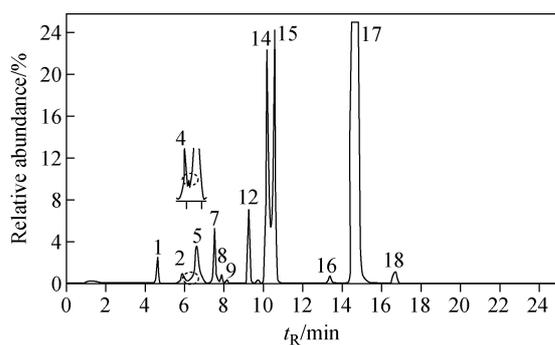


图2 苦苣菜内酯Z经肝微粒体代谢产物的提取离子流图
 Fig.2 Extracted ion chromatogram of Ixerin Z in liver microsomal samples

裂解特征。结合分子式,推测苷元发生了氧化还原反应,因此,代谢产物2、5和12为苦苣菜内酯Z的羟基化产物。

代谢产物8、14和15的保留时间分别为8.15、9.85和10.81 min,其准分子离子峰分别为 m/z 439.160 0 (0.3×10^{-6} , $C_{21}H_{27}O_{10}$), m/z 439.160 1 (0.6×10^{-6} , $C_{21}H_{27}O_{10}$), m/z 439.160 1 (0.6×10^{-6} , $C_{21}H_{27}O_{10}$), 比苦苣菜内酯Z多18 u。产生了二级碎片离子 m/z 277 $[M-H-Glu]^-$, 表明存在葡萄糖配基。根据文献^[22], 推测苷元上发生氧化还原反应, 代谢产物8、14和15为11,13 α -二氢苦苣菜内酯Z的羟基化产物。

代谢产物7和9的保留时间分别为7.73、8.37 min, 准分子离子峰均为 m/z 728.23 ($C_{31}H_{42}O_{15}N_3S$), 比苦苣菜内酯Z多307 u, 表明存在谷胱甘肽配基。在二级质谱图中, 均出现了 m/z 306.074 8 碎片离子。因此, 推测代谢产物7和9为苦苣菜内酯Z的谷胱甘肽结合物。

表 1 UHPLC-LTQ/Orbitrap MS 检测苦苣菜内酯 Z 的肝微粒体代谢产物表征

Table 1 Characteristic fragment ions of Ixerin Z metabolites in rat liver microsomes by UHPLC-LTQ/Orbitrap MS

峰号 No.	保留 时间 t_R /min	理论质荷比 Theoretical value(m/z)	实验质荷比 Experimental value(m/z)	误差 Error/ 10^{-6}	化学式 Formula [M-H] ⁻	苦苣菜内酯 Z Ixerin Z/(mg/L)				串联质谱 MS/MS	鉴定/反应 Identification/ Reactions
						100	50	10	1		
1	5.02	542.169	542.1689	-0.1	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₁ NS	+	+	+	-	MS ² [542]: 421(100), 377(44), 259(30), 215(24)	半胱氨酸结合
2	6.18	437.1442	437.1442	0	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	+	+	+	+	MS ² [437]: 231(100), 275(34)	羟基化反应
4	6.42	542.169	542.1685	-1.1	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₁ NS	+	-	-	-	MS ² [542]: 421.1494(100), 259(76), 241(52), 215(43), 197(30)	半胱氨酸结合
5	6.94	437.1442	437.144	-0.4	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [437]: 231(100), 275(73)	羟基化反应
7	7.73	728.2331	728.2321	-1.5	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₅ N ₃ S	+	+	+	+	MS ² [728]: 306.0748(100)	谷胱甘肽共轭
8	8.15	439.1599	439.16	0.3	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [439]: 277(100), 233(30), 215(8)	羟基化反应和 加氢反应
9	8.37	728.2331	728.2329	-0.9	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₅ N ₃ S	+	+	+	-	MS ² [728]: 306.0748(100)	谷胱甘肽共轭
12	9.47	437.1442	437.1442	0	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	+	+	-	-	MS ² [437]: 231(100), 275(63)	羟基化反应
14	9.85	439.1599	439.1601	0.6	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	+	MS ² [439]: 421(100), 259(66), 277(41), 233(31), 215(22)	羟基化反应和 加氢反应
15	10.81	439.1599	439.1601	0.6	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	+	MS ² [439]: 421(100), 259(74), 277(50), 215(23)	羟基化反应和 加氢反应
16	13.72	421.1493	421.1491	-0.4	C ₂₁ H ₂₅ O ₉	+	-	-	-		
17	14.85	421.1493	421.15	1.6	C ₂₁ H ₂₅ O ₉	+	+	+	+	MS ² [421]: 259(100), 215(91), 241(79), 197(35)	苦苣菜内酯 Z
18	16.83	423.165	423.1658	1.9	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	+	+	+	+	MS ² [423]: 261(100), 217(47), 187(12)	11,13 α -二氢苦 苣菜内酯 Z

注：“+”表示检出，“-”表示未检出

代谢产物 17 和 18 的保留时间分别为 14.85、16.83 min,其碎片离子和保留时间都与苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 对照品一致。因此,推测代谢产物 17 和 18 分别为苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z。

2.3 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的代谢产物分析与鉴定

根据精确分子质量数据,结合质谱裂解碎片信息,在 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 孵育样品中共筛选并鉴定出 1 个原型化合物和 11 个代谢产物,提取离子流图示于图 3,各代谢产物质谱数据列于表 2。

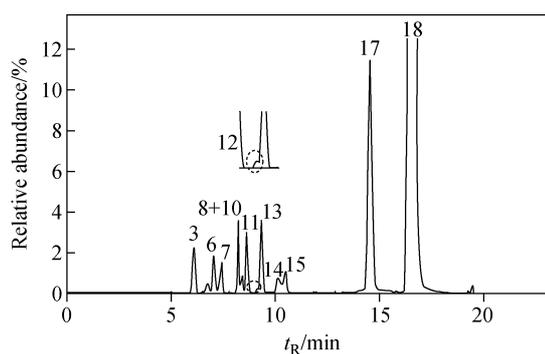


图 3 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 经肝微粒体代谢产物的提取离子流图

Fig. 3 Extracted ion chromatogram of 11,13 α -dihydroxerin Z in liver microsomal samples

表 2 UHPLC-LTQ/Orbitrap MS 检测 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的肝微粒体代谢产物表征

Table 2 Characteristic fragment ions of 11,13 α -dihydroxerin Z metabolites in rat liver microsomes by UHPLC-LTQ/Orbitrap MS

峰号 No.	保留 时间 t_R /min	理论质荷比 Theoretical value(m/z)	实验质荷比 Experimental value(m/z)	误差 Error/ 10^{-6}	化学式 Formula [M-H] ⁻	11,13 α -二氢苦苣 内酯 Z				串联质谱 MS/MS	鉴定/反应 Identification/ Reactions
						11,13 α -Dihydroxerin Z/(mg/L)					
						100	50	10	1		
3	6.24	439.1599	439.1598	-0.3	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [439]: 215(100), 277(43), 233(30)	羟基化反应
6	7.52	441.1755	441.1754	-0.2	C ₂₁ H ₂₉ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [441]: 279.1238(100), 423.1659(30), 261(24), 261(28), 199(10)	羟基化反应和 加氢反应
7	7.73	728.2331	728.2321	-1.5	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₅ N ₃ S	+	+	+	-	MS ² [728]: 306.0748(100)	谷胱甘肽共轭
8	8.15	439.1599	439.16	0.3	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	-	-	MS ² [439]: 277(100), 233(30), 215(8)	羟基化反应
10	8.49	439.1599	439.16	0.3	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [439]: 215(100), 233(57), 277(55)	羟基化反应
11	8.76	441.1755	441.1758	0.5	C ₂₁ H ₂₉ O ₁₀	+	-	-	-	MS ² [441]: 279(100), 235(21), 261(19)	羟基化反应和 加氢反应

续表 2

峰号 No.	保留 时间 t_R/min	理论质荷比 Theoretical value(m/z)	实验质荷比 Experimental value(m/z)	误差 Error/ 10^{-6}	化学式 Formula [M-H] ⁻	11,13 α -二氢苦苣菜 内酯 Z				串联质谱 MS/MS	鉴定/反应 Identification/ Reactions
						11,13 α -Dihydroxerinin Z/(mg/L)					
						100	50	10	1		
12	9.47	437.1442	437.1442	0	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	+	+	+	+	MS ² [437]: 231(100), 275(63)	羟基化反应
13	9.58	439.1599	439.1601	0.6	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [439]: 277(100), 233(63), 215(50)	羟基化反应
14	9.85	439.1599	439.1601	0.6	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	-	-	MS ² [439]: 421(100), 259(66), 277(41), 233(31), 215(22)	羟基化反应
15	10.81	439.1599	439.1601	0.6	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₀	+	+	+	-	MS ² [439]: 421(100), 259(74), 277(50), 215(23)	羟基化反应
17	14.85	421.1493	421.15	1.6	C ₂₁ H ₂₅ O ₉	+	+	+	+	MS ² [421]: 259(100), 215(91), 241(79), 197(35)	苦苣菜内酯 Z
18	16.83	423.165	423.1658	1.9	C ₂₁ H ₂₇ O ₉	+	+	+	+	MS ² [423]: 261(100), 217(47), 187(12)	11,13 α -二氢苦 苣菜内酯 Z

注：“+”表示检出，“-”表示未检出

代谢产物 3、8、10、13、14、15 的保留时间分别为 6.24、8.15、8.49、9.58、9.85、10.81 min，它们的准分子离子峰分别为 [M-H]⁻ m/z 439.1599 (-0.3×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀)、439.1599 (0.3×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀)、439.1599 (0.3×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀)、439.1599 (0.6×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀)、439.1599 (0.6×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀) 和 439.1599 (0.6×10^{-6} , C₂₁H₂₇O₁₀)，比 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 多 16 u。经 CID 裂解，丢失 162 u 的中性基因，产生了 m/z 277 (C₁₅H₁₇O₅) 的二级碎片离子，说明存在葡萄糖基团。因此，推测化合物 3、8、10、13、14 和 15 为 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的羟基化产物。

代谢产物 6 和 11 的保留时间分别为 7.52、8.78 min，准分子离子峰为 m/z 441.175 4

(-0.2×10^{-6} , C₂₁H₂₉O₁₀) 和 441.175 8 (0.5×10^{-6} , C₂₁H₂₉O₁₀)，比 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 多 18 u，表明产物中有 H₂O 结构。根据二级碎片信息可知，其子离子碎片均有 m/z 279 (C₁₅H₁₉O₅)，比母离子少 162 u，推测产物中含有葡萄糖基团，化合物 6 和 11 分别为 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 羟基化和氢化反应的同分异构体产物。

代谢产物 12 的保留时间为 9.47 min，准分子离子峰为 m/z 437.144 2 (0.0 , C₂₁H₂₅O₁₀)，比 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 多 14 u。二级碎片显示存在 m/z 275、231 离子，表明 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 分别失去了 C₆H₁₀O₅ (162 u) 和 C₆H₁₀O₅ + CO₂ (206 u) 中性碎片。因此，化合物 12 可能为 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 脱氢和羟基化产物。

代谢产物 7 的保留时间为 7.73 min，准分

子离子峰为 m/z 728.23 ($C_{31}H_{42}O_{15}N_3S$), 比 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 多 306 u, 并且产生了 m/z 306.074 8 (-2.4×10^{-6} , $C_{10}H_{16}N_3O_6S$) 碎片离子。因此, 推测化合物 7 为 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的谷胱甘肽结合物。

代谢产物 17 和 18 的保留时间分别为 14.85、16.83 min, 其质谱碎片离子和保留时间

均与苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 一致。因此, 推测化合物 17 和 18 分别为苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z。

2.4 代谢途径分析

根据原型化合物及代谢产物的质谱裂解信息, 推测苦苣菜内酯 Z 及 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的代谢途径示于图 4。

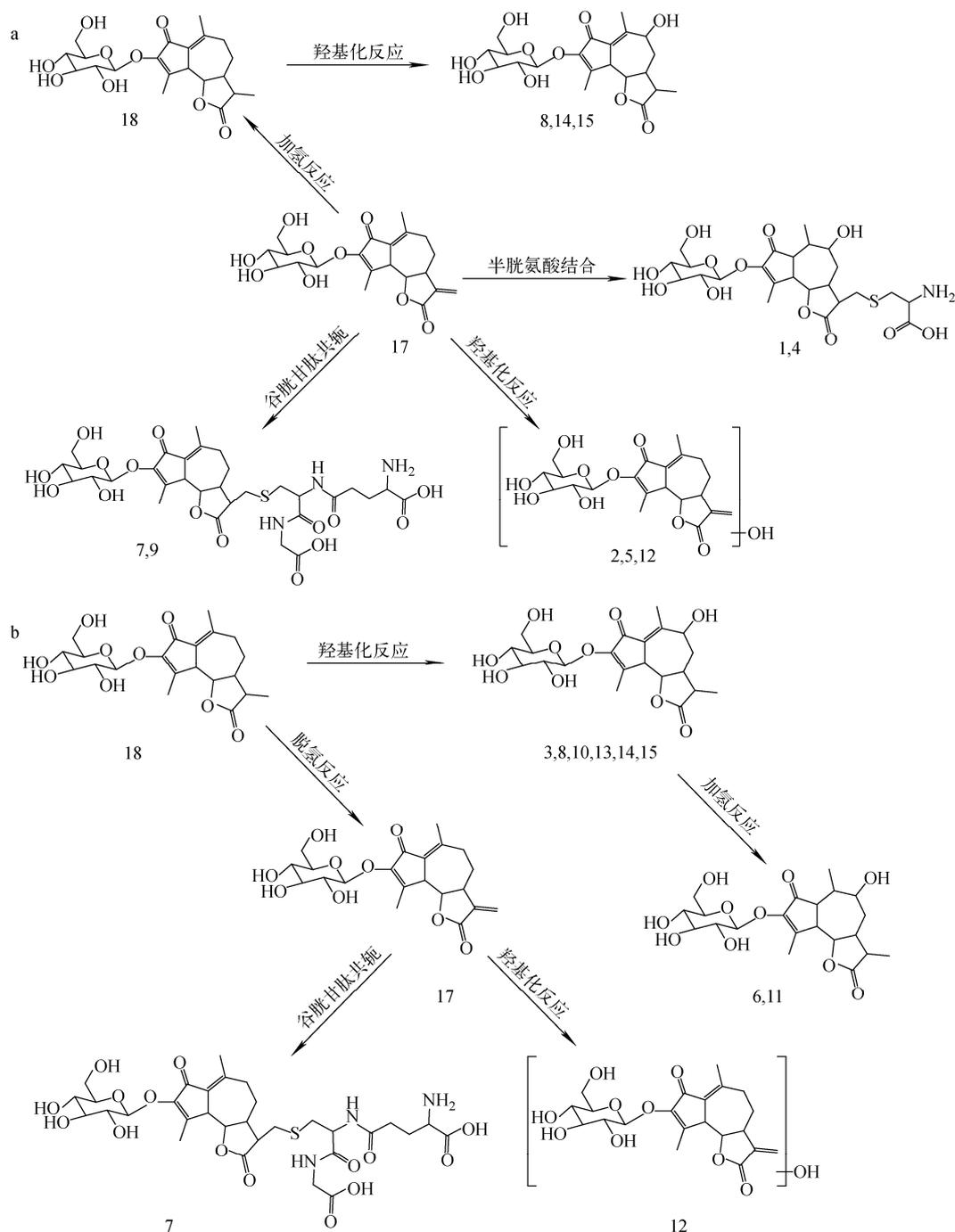


图 4 苦苣菜内酯 Z(a)、11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z(b) 经大鼠肝微粒体的代谢途径

Fig. 4 Metabolic pathways of Ixerin Z (a) and 11,13 α -dihydroixerin Z (b) in liver microsomal samples

苦苣菜内酯 Z 体外主要经历 2 个代谢途径:1) 苦苣菜内酯 Z 发生羟基化反应生成化合物 2、5 和 12;苦苣菜内酯 Z 的 C11、C13 位上双键发生加氢反应生成 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z(化合物 18),然后发生羟基化反应生成化合物 8、14 和 15。2) 苦苣菜内酯 Z 发生加成反应,如半胱氨酸结合产物(化合物 1 和 4),谷胱甘肽结合产物(化合物 7 和 9)。

11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 体外主要经历 2 个代谢途径:1) 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 的 C11、C13 位上的单键发生去氢反应生成苦苣菜内酯 Z(化合物 17),随后又发生羟基化反应产生化合物 12;11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 通过羟基化反应生成化合物 3、8、10、13、14 和 15,随后又发生加氢反应产生化合物 6 和 11。2) 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 与谷胱甘肽发生结合反应,生成化合物 7。谷胱甘肽结合反应通常属于 II 相代谢反应,而在体外代谢研究中检测到了此类代谢产物,可能是由于此类反应也可以在没有相关代谢酶的情况下自发进行^[23],或者是由于苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 中的环氧结构可与谷胱甘肽发生结合反应。通常认为,谷胱甘肽结合反应为机体的解毒反应,推测一定剂量的 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 可能具有毒性。

3 结论

本研究应用 UHPLC-LTQ/Orbitrap 高分辨质谱技术快速筛选并鉴定了苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z 经大鼠肝微粒体体外代谢的产物。通过分析各代谢产物的色谱保留时间、高分辨质谱数据及碎片离子信息,共筛选出 18 个化合物(包括 2 个原型化合物和 16 个代谢产物),对其中 15 个代谢产物进行了初步鉴别,并阐述了苦苣菜中 2 种主要的倍半萜内酯类成分(苦苣菜内酯 Z 和 11,13 α -二氢苦苣菜内酯 Z)的肝微粒体代谢规律。该结果可为早期新药开发、评价新药候选物的代谢行为提供借鉴。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006: 1 783.
- [2] 杨嘉颢,王少杰,白文,等. 苦碟子注射液治疗缺血性脑血管病的研究进展[J]. 北京中医药, 2010,29(7):566-568.
YANG Jiayi, WANG Shaojie, BAI Wen, et al. Research progress of Kudiezi injection for treatment of ischemic cerebrovascular disease[J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(7): 566-568(in Chinese).
- [3] 吴晶晶,李天祥,李庆和,等. 抱茎苦苣菜化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天津中医药, 2015,32(4):247-252.
WU Jingjing, LI Tianxiang, LI Qinghe, et al. Research progress on chemical constituents of *Ixeris sonchifolia* (Bge.) Hance and their pharmacological effects[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 32(4): 247-252 (in Chinese).
- [4] 刘颖,卢建秋,张加余,等. 苦碟子药材及其注射液中化学成分的 HPLC-ESI-MSⁿ 分析[J]. 中国中药杂志,2013, 16(38): 2 675-2 681.
LIU Ying, LU Jianqiu, ZHANG Jiayu, et al. Identification of chemical component from *Ixeris sonchifolia* and its injection by HPLC-ESI-MSⁿ [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 16(38): 2 675-2 681(in Chinese).
- [5] SUH J, JO Y, KIM N D, et al. Cytotoxic constituents of the leaves of *Ixeris sonchifolia* [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(3): 289-292.
- [6] ZHANG Y C, ZHOU L, NG K Y. Sesquiterpene lactones from *Ixeris sonchifolia* Hance and their cytotoxicities on A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(4): 294-298.
- [7] 刘清华,杨峻山,索茂荣. 斑鸠菊属的倍半萜内酯类及甾体皂苷类化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):10-17.
LIU Qinghua, YANG Junshan, SUO Maorong. Analysis of and counter measures against traditional Chinese medicines adulterated by synthetic drugs[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(1): 10-17(in Chinese).
- [8] 胡岩,段天璇,曹枫,等. 八角科植物果皮化学成分的 LC-MS 图谱特征及其在分类和药材鉴别上的意义[J]. 中国中药杂志,2010,35(14):1 836-1 839.
HU Yan, DUAN Tianxuan, CAO Feng, et al. Evaluation of LC-MS chromatograms of pericarps

- from Illium species[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(14): 1 836-1 839(in Chinese).
- [9] 杨茜. 金沸草含量测定以及倍半萜内酯类成分的药动学研究[D]. 上海:第二军医大学,2012.
- [10] 左爱学,饶高雄. 地胆草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药业,2014,23(17):3-7.
ZUO Aixue, RAO Gaoxiong. Research progress on chemical constituents of *Elephantopus Scaber* Linn. and their pharmacological effects[J]. China Pharmaceuticals, 2014, 23(17): 3-7(in Chinese).
- [11] 谢沈阳,杨晓源,丁章贵,等. 蒲公英的化学成份及其药理作用[J]. 天然产物研究与开发,2012, 24(S1):141-151.
XIE Shenyang, YANG Xiaoyuan, DING Zhanguigui, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(S1): 141-151(in Chinese).
- [12] 代英辉,崔征,李建林. 苍耳属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2006,24(8):541-546.
DAI Yinghui, CUI Zheng, LI Jianlin. Research progress in the chemical constituents and pharmacological activities of *Xanthium* L. [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2006, 24(8): 541-546(in Chinese).
- [13] 林妮妮. 基于肝微粒体的T-2毒素体外代谢研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [14] 刘高峰,郭兴蕾. 中药对细胞色素P450调控作用的研究进展[J]. 中草药,2008,39(1):139-143.
LIU Gaofeng, GUO Xinglei. Advances in studies on regulation of Chinese materia medica on cytochrome P450 system[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2008, 39(1): 139-143(in Chinese).
- [15] 毕云枫,李雪,皮子凤,等. UPLC-MS/MS方法研究次乌头碱在大鼠肝微粒体CYP450中的体外代谢产物及代谢酶亚型[J]. 质谱学报,2013, 34(6):330-337.
BI Yunfeng, LI Xue, PI Zifeng, et al. Analysis of hyaconitine's metabolites and related metabolic CYP isoforms in rat liver microsomal by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2013, 34(6): 330-337(in Chinese).
- [16] 周慧,付佳,蔡宗苇. 基于HPLC-MS/MS法研究马兜铃酸I和马兜铃酸II的大鼠肝微粒体酶S9体外代谢[J]. 质谱学报,2017,38(1):30-36.
ZHOU Hui, FU Jia, CAI Zongwei. Research of aristolochic acid I, aristolochic acid II and their metabolites in rat liver microsomes using HPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(1): 30-36(in Chinese).
- [17] FAN X, DU G, MA S, et al. Structural elucidation of in vitro metabolites of bavachinin in rat liver microsomes by LC-ESI-MSⁿ and chemical synthesis[J]. Xenobiotica, 2016, 46(4): 296-306.
- [18] CAI W, ZHANG J Y, LI G L, et al. Isolation and purification of sesquiterpene lactones from *Ixeris sonchifolia* (Bunge) Hance by high-speed countercurrent chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 13(12): 2 065-2 069.
- [19] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2010:184-185.
- [20] 简墩昱,徐帆,廖春龙,等. 3种方法测定大鼠肝微粒体蛋白含量的比较[J]. 中国药师,2011,14(3):342-345.
JIAN Tunyu, XU Fan, LIAO Chunlong, et al. Comparison of three methods for determining rat liver microsomal protein content[J]. China Pharmacist, 2011, 14(3): 342-345(in Chinese).
- [21] 王放. 基于LC-HR-MSⁿ的苦碟子及血栓通注射剂化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [22] 蔡伟. 苦碟子倍半萜内酯类似物靶向分离及体内代谢研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.
- [23] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2008.