

基于 UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS 鉴定姜黄提取物在大鼠体内的代谢产物

王媛¹, 刘美娟², 王宏进¹, 殷光玲², 李妍¹, 张旭光², 孙立新¹

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 本溪 110016; 2. 汤臣倍健股份有限公司, 广东 广州 300146)

摘要:本研究基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS), 鉴定了姜黄提取物中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素 3 种姜黄素类化合物在大鼠体内的代谢产物。对健康雄性大鼠单剂量灌胃给予 1 703 mg/kg 姜黄提取物(相当于 480 mg/kg 总姜黄素), 收集粪便、尿液、胆汁、血浆生物样品, 采用 UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS 在负离子模式下鉴定代谢产物。在大鼠体内共鉴定出 59 个代谢物(B1~W12), 其中 B7、B8、B11~B13、C3、D3、D5、D8、D10、W1、W2、W4、W5、W7、W10 为新发现的代谢产物, W3/W6、W11/W12、W12 分别为血浆、粪便、尿液中首次发现的代谢产物。3 种姜黄素类化合物在大鼠体内的代谢途径主要为葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、还原氢化、氧化、还原、羟基化、去羟基化和多种反应类型的复合反应等。

关键词:姜黄提取物; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Extractive 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(2022)02-0155-13

doi: 10. 7538/zpxb. 2021. 0027

Identification of Metabolites of Turmeric Extract in Rats by UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS

WANG Yuan¹, LIU Mei-juan², WANG Hong-jin¹, YIN Guang-ling²,
LI Yan¹, ZHANG Xu-guang², SUN Li-xin¹

(1. *Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 110016, China;*

2. *BYHEALTH CO., LTD, Guangzhou 300146, China*)

Abstract: Turmeric extract is a β -diketone polyphenol extract isolated from the *Curcuma longa* L., a plant of the genus *Curcuma* of the Zingiberaceae family. It mainly includes curcumin (CUR), demethoxycurcumin (DMC), and bisdemethoxycurcumin (BDMC). It is a commonly used food, natural pigment and cosmetic additive, which has various pharmacological activities, such as hypolipidemia, antioxidant, anti-inflammation, anti-viral and anti-Alzheimer's disease. However, poor stability and low bioavailability limit the clinical application of curcuminoids. Curcumin hydrogenated metabolites also have pharmacological activity, and they are more stable and bioavailable than curcumin. The metabolites of curcuminoids (CUR, DMC and BDMC) in turmeric extract in rats were

identified. Turmeric extract was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na). Healthy male Sprague Dawley (SD) rats in drug group were gavaged with a single dose of 1 703 mg/kg turmeric extract (approximately 480 mg/kg curcuminoids), and the rats in control group were given equal volume of 0.5% CMC-Na solution. And then, plasma at different time points was collected after oral gavage. Urine, faeces and bile were collected after oral gavage in rats within 12 h. Plasma were prepared by protein precipitation method, the urine, faeces and bile were extracted by methanol. The biological samples of faeces, urine, bile and plasma were analyzed by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole extractive orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Extractive MS) in negative ion mode. The accurate molecular weight, primary and secondary mass spectrometry information of metabolites in faeces, urine, bile and plasma were identified. As a result, a total of 59 metabolites (B1-W12) were identified. B3, B7, B8, B11, B12, B13, C3, D3, D5, D8, D10, W1, W2, W4, W5, W7 and W10 were new metabolites. W3/W6, W11/W12 and W12 were firstly found in plasma, faeces and urine, respectively. The results showed that the main metabolic pathways of curcumin were glucuronidation, sulfation, reductive hydrogenation, oxidation, reduction, hydroxylation, dehydroxylation and their composite reactions. This method can provide a theoretical basis for the later screening of active metabolites of curcumin compounds.

Key words: turmeric extract; ultra high performance liquid chromatography quadrupole extractive Orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Extractive-Orbitrap MS); metabolites

姜黄提取物主要包括姜黄素(CUR)、去甲氧基姜黄素(DMC)、双去甲氧基姜黄素(BDMC)等姜黄素类化合物^[1],具有降脂、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗阿尔茨海默病、抗病毒等多种药理活性^[2]。有研究表明,姜黄素氢化代谢物四氢姜黄素表现出多种优于姜黄素的生物活性^[3],二氢姜黄素可抑制细胞凋亡^[4]、对油酸诱导的HepG2细胞的脂堆积、氧化应激损伤、胰岛素抵抗具有一定的预防作用^[5]。筛选出活性、稳定性、生物利用度高于CUR、DMC、BDMC的代谢产物,在一定程度上能够解决CUR、DMC、BDMC稳定性差、生物利用度低的问题。

目前,与CUR相关的代谢产物研究较多^[6-9],而DMC和BDMC的研究较少,且仅报道了其在大鼠粪便、尿液中的一相代谢物^[10-11]及其纳米制剂^[8]在大鼠粪便、尿液、血浆中的二相代谢物。对于姜黄提取物,仅报道了3种姜黄素类化合物在大鼠粪便、尿液中的一相代谢物^[11]和人血浆^[12]中的代谢产物,且分离出的代谢物较少^[10-11]、质谱数据不完善^[12]。因此,本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨

道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Extractive Orbitrap MS)技术鉴定姜黄提取物中3种姜黄素类化合物的代谢产物,以期对姜黄素类化合物的代谢产物进行补充,为后期筛选活性代谢物研究提供理论依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Vanquish Flex 超高效液相色谱仪、Q-Exactive™ 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪;美国 Thermo 公司产品,配有电喷雾离子源(HESI)、TraceFinder 4.1 工作站及 TraceFinder 4.1 General Quan 数据处理系统;CPA225D 型电子分析天平(1/10 万);德国赛多利斯科学仪器有限公司产品;TGL-16 型高速冷冻离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

姜黄素对照品(纯度 $\geq 98\%$):中国药品生物制品检定所产品;去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、二氢姜黄素、四氢姜黄素、六氢姜黄素、八氢姜黄素对照品(纯度 $\geq 98\%$):上海源叶

生物有限公司产品;姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠、姜黄素硫酸四叔丁基铵对照品(纯度 $\geq 98\%$);多伦多研究化学公司产品;甲醇、甲酸、乙腈(色谱纯);美国 Sigma 公司产品;纯净水;杭州娃哈哈集团有限公司产品。

姜黄提取物:汤臣倍健股份有限公司产品,主要由姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素 3 种化学成分组成,经工作曲线法测定,其含量分别为 192.5 ± 1.6 、 44.99 ± 0.56 、 44.29 ± 0.7 mg/g(平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$)。

1.3 实验动物

SPF 级 SD(Sprague-Dawley)大鼠(雄性,体质量 220~250 g,动物生产合格证号:SCXK(辽)2020-0001);由沈阳药科大学动物实验中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 对照品溶液的制备 取适量的姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、二氢姜黄素、四氢姜黄素、六氢姜黄素、八氢姜黄素、姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠、姜黄素硫酸四丁基铵对照品,分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,除姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠对照品用 20% 甲醇-水溶液溶解外,其他对照品均用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 87.0、72.0、102.0、61.0、80.0、109.0、99.0、89.0、107.0 mg/L 对照品储备液,于 4℃ 储存,待用。

混合对照品溶液的制备:精密量取各 0.2 mL 姜黄素、双去甲氧基姜黄素、六氢姜黄素、八氢姜黄素、姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠、姜黄素硫酸四丁基铵对照品储备液,各 0.3 mL 去甲氧基姜黄素、四氢姜黄素,0.4 mL 二氢姜黄素,置于 100 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 0.174、0.204、0.218、0.198、0.178、0.214、0.216、0.240、0.244 mg/L 混合对照品溶液,于 4℃ 储存,待用。

1.4.2 灌胃溶液的制备 精密称取适量的姜黄提取物,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液(取约 0.5 g 羧甲基纤维素钠,加入 100 mL 纯净水中,80℃ 加热使其溶解,制成质量分数约为 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液)混悬,配制成约 142 g/L 混悬液。

1.4.3 动物分组和给药 取 18 只健康雄性 SD 大鼠,随机分成 6 组($n=3$),依次编号为

K1、K2、K3、Y1、Y2、Y3。K1、K2、K3 组分别用于收集空白粪便和尿液、空白血浆、空白胆汁;Y1、Y2、Y3 组分别用于收集给药粪便和尿液、给药血浆、给药胆汁。

实验前所有动物于 SPF 级动物房中适应性饲养 7 天,给药前禁食 12 h,可自由饮水。禁食 12 h 后,Y1、Y2、Y3 组大鼠灌胃给予姜黄提取物-0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,给药剂量 1 703 mg/kg(姜黄素 327.8 mg/kg、去甲氧基姜黄素 76.6 mg/kg、双去甲氧基姜黄素 75.4 mg/kg)。K1、K2、K3 组大鼠灌胃给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。

1.4.4 生物样品采集 将 K1 和 Y1 组大鼠置于代谢笼中,分别收集 0~12 h 时空白粪便和尿液、给药粪便和尿液,并将收集的粪便样品置于室温下避光风干,所有样品于 -20℃ 储存,待用。

K2 和 Y2 组大鼠分别于灌胃后 0.25、1、2、3、4、6、8、12、24 h 时从眼眶后静脉丛取 0.5 mL 血,置于经肝素钠处理的 EP 管中,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,得到空白血浆和给药血浆样品,于 -20℃ 储存,待用。

K3 和 Y3 组大鼠经麻醉后做胆汁插管手术,分别收集 0~12 h 时空白胆汁和给药胆汁样品,于 -20℃ 储存,待用。

1.4.5 样品处理 血浆样品:避光操作。分别取 100 μ L 9 个不同时间点的血浆样品,置于同一棕色 EP 管中,加入 3 mL 甲醇,涡旋 2 min,4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至另一棕色 EP 管中,室温下氮气吹干;残渣用 200 μ L 75% 甲醇复溶,4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,离心 2 次,取上清液,备用。

粪便样品:避光操作。将风干后的粪便置于研钵中研碎,混合均匀。取约 1 g 混合均匀的粪便样品,置于 25 mL 烧杯中,加入 5 mL 甲醇,超声提取 30 min,4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,室温下氮气吹干;残渣用 2 mL 甲醇复溶,4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,离心 2 次,取上清液,备用。

尿液、胆汁样品:避光操作。精密量取各 1 mL 尿液、胆汁样品,分别置于 25 mL 烧杯中,加入 5 mL 甲醇,超声提取 30 min,4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,室温下氮

气吹干;尿液残渣用 200 μL 甲醇复溶,胆汁残渣用 2 mL 甲醇复溶,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,离心 2 次,取上清液,备用。

1.5 实验条件

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC[®] BEH C18 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 1.7 μm);流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为乙腈;梯度洗脱程序:0~6 min(10%~30% B),6~14 min(30%~65% B),14~17 min(65%~95% B),17~20 min(95% B),20~20.1 min(95%~10% B),20.1~23.1 min(10% B);流速 0.2 mL/min;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 2 μL 。

1.5.2 质谱条件 电喷雾离子源(HESI 源),负离子模式检测,鞘气流速 9 L/min,辅助气流速 3 L/min,喷雾电压 3.8 kV,毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$,辅助气温度 310 $^{\circ}\text{C}$ 。采用自动触发二级(Full scan-ddMS²(TopN))数据采集模式;一级质谱质量扫描范围 m/z 150.0~2 000.0,分辨率 70 000;二级质谱质量扫描范围 m/z 50~1 500,分辨率 17 500;碰撞气为高纯氮气;碰撞能 20、30、40 eV;Top(N):10,自动选择质谱产生的前 10 个最强离子峰作为二级质谱的母离子进行碎裂。

2 结果与讨论

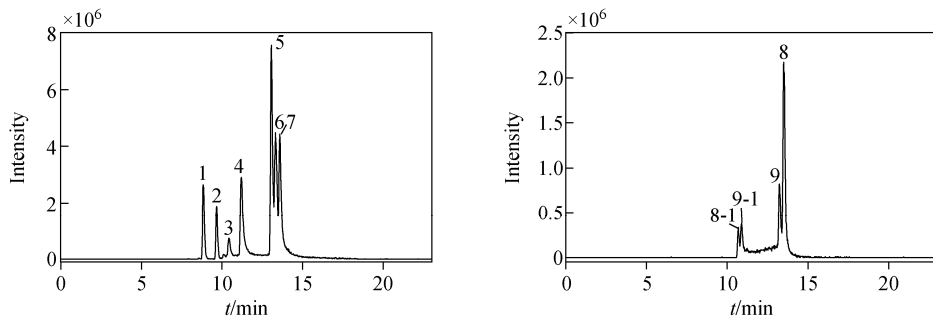
2.1 对照品质谱裂解行为

在负离子模式下,对照品 CUR、DMC、BDMC、二氢姜黄素、四氢姜黄素、六氢姜黄素、八氢姜黄素、姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠、姜黄素硫酸四叔丁基铵的色谱保留时间及准分子离

子峰 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 分别为 13.68、13.43、12.95、13.42、13.17、9.59、8.95、10.38、11.19 min 和 m/z 367.116 5、337.104 9、307.097 4、369.130 5、371.147 6、373.166 4、375.178 2、565.132 8、447.073 5。同时发现对照品二氢姜黄素与四氢姜黄素分别在 10.65、10.84 min 处有 1 个色谱峰,其各自的质谱数据(一级及二级质谱碎片)分别与二氢姜黄素、四氢姜黄素的质谱数据相同。研究表明,姜黄素类为庚二酮类化合物,在溶液中同时存在酮式和烯醇式结构^[13-16],推测保留时间 10.65、10.84 min 处分别为二氢姜黄素、四氢姜黄素烯醇式结构的色谱峰。各对照品提取离子流色谱图示于图 1。负离子模式下,姜黄素类化合物主要从碳碳单键处发生裂解,各对照品的具体裂解规律示于附图 1(请登录《质谱学报》网站 <http://www.jcmss.com.cn> 下载)。

2.2 代谢产物分析

首先,根据原型药物结构推测可能的代谢产物,检索姜黄素类化合物代谢产物文献,建立包括化合物名称、分子式、精确分子质量、一级和二级质谱碎片的代谢物数据库;其次,利用 TraceFinder 4.1 General Quan 数据处理软件,同时在空白样品和给药样品的总离子流图中提取数据库中代谢产物的相对分子质量,得到仅在给药样品中色谱峰的保留时间、质谱碎片信息,并结合文献、对照品质谱数据及姜黄素类化合物的裂解规律^[13-14],鉴定代谢产物,对照品质谱数据列于表 1。姜黄提取物在大鼠体内代谢产物扣除空白后的总离子流色谱图示于图 2。



注:1. 八氢姜黄素;2. 六氢姜黄素;3. 姜黄素- β -O-葡萄糖醛酸钠;4. 姜黄素四叔丁基铵;5. 双去甲氧基姜黄素;6. 去甲氧基姜黄素;7. 姜黄素;8. 二氢姜黄素(酮式);8-1. 二氢姜黄素(烯醇式);9. 四氢姜黄素(酮式);9-1. 四氢姜黄素(烯醇式)

图 1 各对照品提取离子流色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of references

表 1 负离子模式下,各对照品一级和二级质谱数据
Table 1 MS¹ and MS² data of references in negative ion mode

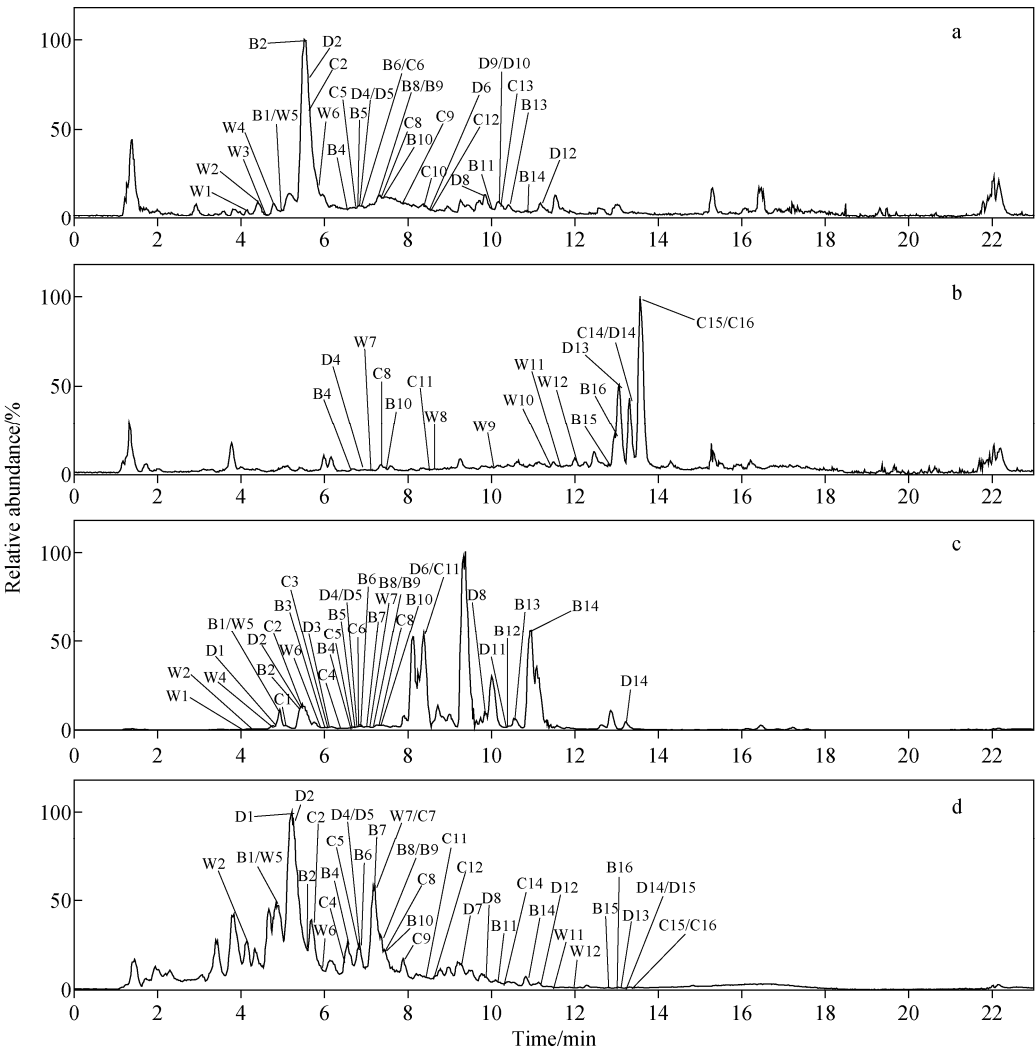
化合物 Compound	保留时间 <i>t</i> _R /min	化学式 Formula	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	误差 Error/ ×10 ⁻⁶	碎片离子(MS ²) Fragment ion (<i>m/z</i>)
			测得值	理论值		
			(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)		
姜黄素	13. 68	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367. 1165	367. 1182	-3. 0	367. 1165, 217. 0496, 202. 0258, 173. 0602, 158. 0368, 149. 0601, 134. 0368
去甲氧基姜黄素	13. 43	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	337. 1049	337. 1076	-6. 4	337. 1049, 217. 0497, 202. 0262, 187. 0395, 173. 0602, 158. 0368, 149. 0602,134. 0368,119. 0498
双去甲氧基姜黄素	12. 95	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	307. 0974	307. 0970	3. 0	307. 0974, 187. 0390, 143. 0497, 119. 0498
二氢姜黄素	13. 42	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	369. 1305	369. 1338	-7. 5	369. 1305, 219. 0651, 204. 0423, 191. 0705, 175. 0393, 149. 0601, 134. 0366
	10. 65 *	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	369. 1311		-5. 9	369. 1311, 191. 0707, 175. 0393, 149. 0601,134. 0364
四氢姜黄素	13. 17	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	371. 1476	371. 1495	-3. 6	371. 1376, 235. 0971, 193. 0862, 177. 0548
	10. 84 *	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	371. 1455		-9. 3	371. 1455, 235. 0967, 193. 0863, 177. 0556
六氢姜黄素	9. 59	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	373. 1664	373. 1651	5. 7	193. 0857,179. 0707,165. 0552
八氢姜黄素	8. 95	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	375. 1782	375. 1808	-5. 4	375. 1782, 179. 0705, 162. 0678, 134. 0447
姜黄素-β-O-葡萄糖醛酸钠	10. 38	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₂ Na	565. 1328	565. 1322	2. 2	565. 1328, 389. 0965, 367. 1143, 217. 0497,173. 0602,149. 0599
姜黄素硫酸	11. 19	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ S	447. 0735	447. 0750	-2. 0	447. 0735, 367. 1164, 217. 0496, 173. 0601,149. 0601,134. 0368
四叔丁基铵						

注: * 为化合物烯醇式结构色谱峰

2.3 姜黄提取物在大鼠体内代谢产物鉴定

本研究共鉴定出 59 个代谢产物,包括 16 个双去甲氧基姜黄素代谢产物(B1~B16)、15 个去甲氧基姜黄素代谢产物(D1~D15)、16 个姜黄素代谢产物(C1~C16)、12 个无法归属的代谢产物(W1~W12)。代谢产物的质谱数据列于附表 1。B3、B7、B8、B11~B13、C3、D3、D5、D8、D10、W1~W5、W7、W10、W12 代谢产物的鉴定如下(其他代谢物二级质谱数据均与文献^[8,10,17-23]数据一致)。

B3 保留时间为 6.14 min,其准分子离子峰 [M-H]⁻ *m/z* 565.099 9,推测分子式可能为 C₂₅H₂₅O₁₃S,比对照品 BDMC 准分子离子峰大 258 u(176+80+2),表明 B3 可能为 BDMC 硫酸酯化葡萄糖醛酸化氢化代谢产物。B3 的二级碎片离子 *m/z* 485.145 0、389.067 9 分别比准分子离子峰少 80 u、176 u,证实 B3 中含有硫酸和葡萄糖醛酸;碎片离子 *m/z* 309.111 6 比 BDMC 准分子离子峰多 2 u,表明 BDMC 双键处发生还原,其母核结构可能为二氢双去甲氧



注: a. 血浆; b. 粪便; c. 胆汁; d. 尿液

图 2 姜黄提取物在大鼠体内代谢产物扣除空白后的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of metabolites subtracted background of turmeric extract in rats

基姜黄素。进一步裂解发现, m/z 199.006 2由 m/z 565.099 9 从 C2、C3 处裂解得到, m/z 199.006 2失去 1 分子硫酸后得 m/z 119.049 7,因此,推测 B3 为二氢双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸硫酸酯。由碎片离子 m/z 199.006 2 可知,硫酸与双键左侧的羟基结合。

B7 保留时间为 7.05 min,其准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 491.191 3,推测分子式可能为 $C_{25}H_{32}O_{10}$,比对照品 BDMC 准分子离子峰大 184 u (176+8),表明可能为 BDMC 葡萄糖醛酸化氢化代谢物。B7 的二级碎片离子 m/z 315.158 3 比准分子离子峰多 176 u,比对照品 BDMC 准分子离子峰多 8 u,表明 B7 可能为八氢双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸代谢物。进一

步比较 B7 与 B1(八氢双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸硫酸)的质谱碎片,发现 B7 的二级质谱数据 m/z 491.191 3、315.158 3 与 B1 的碎片离子 m/z 491.191 0 $[M-H-SO_3]^-$ 、315.159 7 $[M-H-SO_3-GluA]^-$ 相同,且 B1 中 m/z 315.159 7 同样未进一步发生裂解,二者裂解方式相同。在保留时间 6.29 min 处,其准分子离子峰、碎片离子均与 B7 相同,因此推测 6.29 min 处为 B7 烯醇式结构色谱峰。

同理,可分别鉴定 B8、B11 为二氢双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸、四氢双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸。保留时间 7.91 min 处为 B11 烯醇式结构色谱峰。B8 碎片离子 m/z 203.070 5、119.049 8 由 B8 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z

487.159 1 失去 1 分子葡萄糖醛酸后,分别从 C6、C7 及 C2、C3 处发生断裂得到;B11 碎片离子 m/z 205.086 1、163.075 7 由 B11 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 487.159 1 失去 1 分子葡萄糖醛酸后,分别从 C6、C7 及 C4、C5 处发生断裂得到。

B12 保留时间为 10.49 min,其准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 389.067 7,推测分子式可能为 $C_{19}H_{17}O_7S$,比对照品 BDMC 准分子离子峰多 82 u(80+2),表明可能为 BDMC 硫酸酯化氢化代谢物。B12 碎片离子 m/z 309.112 1 比其准分子离子峰少 80 u,比对照品 BDMC 准分子离子峰多 2u,比对照品 BDMC 准分子离子峰多 2 u,推测可能为二氢双去甲氧基姜黄素硫酸酯代谢物。碎片离子 m/z 269.011 9 为准分子离子峰 m/z 389.067 7 从 C5、C6 处断裂得到,且可知硫酸与双键一侧羟基结合; m/z 203.070 6 为准分子离子峰 m/z 389.067 7 从双键处发生断裂得到,因此推测 B12 可能为二氢双去甲氧基姜黄素硫酸酯,其二级碎片离子 m/z 189.055 1 由 m/z 269.011 9 失去 1 分子硫酸得到。同理,B13 为四氢双去甲氧基姜黄素硫酸酯,保留时间 8.38 min 处为 B13 烯醇式结构色谱峰。

C3 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 625.120 7,推测分子式可能为 $C_{27}H_{29}O_{15}S$,与对照品 CUR 准分子离子峰相比多 258 u(176+80+2),推测为 CUR 硫酸酯化葡萄糖醛酸化氢化代谢物。C3 的碎片离子 m/z 545.165 6、449.091 0 与准分子离子峰分别相差 80 u、176 u,证实 C3 中含有葡萄糖醛酸和硫酸酯结构。二级碎片离子 m/z 369.131 3、219.065 5、149.060 2、113.024 1 与二氢姜黄素对照品的二级质谱碎片相同,因此推测 C3 为二氢姜黄素葡萄糖醛酸硫酸酯。 m/z 229.016 5 表明葡萄糖醛酸与双键左侧羟基结合。

D3 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 595.112 5,推测分子式可能为 $C_{26}H_{27}O_{14}$,与对照品 DMC 准分子离子峰相比多 258 u(176+80+2),推测为 DMC 葡萄糖醛酸硫酸酯化氢化代谢物。 m/z 419.078 7 $[M-H-GluA]^-$ 、339.120 2 $[M-H-GluA-SO_3]^-$ 证实结构中含有葡萄糖醛酸和硫酸,且其碎片离子 m/z 339.120 2

比去甲氧基姜黄素准分子离子峰多 2 u,因此推测 D3 为二氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸硫酸酯。 m/z 229.016 5 表明葡萄糖醛酸与双键左侧羟基结合、甲氧基位于双键左侧,由准分子离子峰从 C2、C3 处裂解得到。

D5 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 519.183 5,推测分子式为 $C_{26}H_{31}O_{11}$,利用 TraceFinder 4.1 General Quan 数据处理软件对 m/z 519.183 5 进行元素成分分析,发现 D5 与六氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸的分子质量误差小于 5×10^{-6} ,初步推测为六氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸。用 ChemDraw 软件绘制六氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸结构,并进行碎片裂解,发现 D5 碎片离子 m/z 179.070 7 为 m/z 519.183 5 失去 1 分子葡萄糖醛酸后,从 C3、C4 处发生断裂得到, m/z 179.070 7 进一步失去 1 分子 OCH_3 后,得到碎片离子 m/z 149.060 7,因此推测 D5 为六氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸。

D8 保留时间为 9.85 min,准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 421.095 6,推测分子式为 $C_{20}H_{21}O_8S$,比对照品 DMC 准分子离子峰多 84 u(80+4),表明其可能为 DMC 氢化硫酸酯化代谢物。碎片离子 m/z 341.136 5 $[M-H-SO_3]^-$ 证实存在硫酸酯,碎片离子 m/z 341.136 5 比 DMC 准分子离子峰多 4 u,因此推测 D8 为四氢去甲氧基姜黄素硫酸酯。其二级碎片离子 m/z 235.097 6 由准分子离子峰失去 1 分子硫酸后,从 C6、C7 处发生断裂得到; m/z 219.101 1 由准分子离子峰失去 1 分子硫酸后,从 C5、C6 处发生断裂,同时 C5 上羰基失去 1 分子氢与 C3 环合成丁烯内酯结构得到。同理,保留时间 7.13 min 处为 D8 烯醇式结构色谱峰, m/z 259.027 6 表明硫酸与甲氧基一侧的羟基结合,由 m/z 421.095 6 从 C3、C4 处裂解得到。

D10 与 D8 拥有相同的碎片离子 m/z 341.137 4、235.096 7,推测 D8 与 D10 具有相同的母核结构,且其准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 517.171 8 比碎片离子 m/z 341.137 4 多 176 u,表明 D10 为葡萄糖醛酸代谢物,因此推测其为四氢去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸。

W1~W5:W5 保留时间为 4.92 min,准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 273.043 8,推测分子

类化合物裂解规律^[7-8]进行碎片裂解,发现得到的碎片离子与实际得到的碎片离子不符,推测 W10 为 BDMC 去羟基化的同分异构体。尝试将 C3、C4 位置的双键结构换成三键,并去掉 C1、C2 位置的双键,再次进行裂解发现,准分子离子峰 m/z 291.102 6 分别从 C1 和 C2、C2 和 C4、C4 和 C5 处断裂得到 m/z 185.060 0、171.044 6、145.056 2。其中, m/z 249.091 1 为 m/z 291.102 6 失去 1 分子 CO 后重排得到,因此推测 W10 为 1,7-双(4-羟基苯基)庚-1-烯-4-炔-3-酮,其质谱裂解规律示于图 4。

同理,W12 准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 295.133 2,推测分子式为 $C_{19}H_{19}O_3$,与对照品 BDMC 准分子离子峰相比少 12 u(16-4),推

测由 BDMC 失去 1 分子双键氧和 1 分子双键得到。利用 ChemDraw 软件绘制 BDMC 去掉 1 分子双键氧和 1 分子双键的结构,并根据姜黄素类化合物的裂解规律^[13-14]进行碎片裂解,推测 W12 为四氢双去甲氧基姜黄素去羟基化代谢物,其质谱裂解规律示于图 5。

2.4 CUR、DMC、BDMC 在大鼠体内的代谢途径

姜黄提取物中 3 种姜黄素类化合物在大鼠血浆、胆汁中的代谢途径以母体药物还原氢化后与葡萄糖醛酸和硫酸结合为主;粪便中以母体药物还原氢化、还原氢化后与硫酸结合为主;尿液中以母体药物还原氢化、还原氢化后与葡萄糖醛酸和硫酸结合为主。姜黄提取物中 3 种姜黄素类化合物在大鼠体内可能的代谢途径示于图 6。

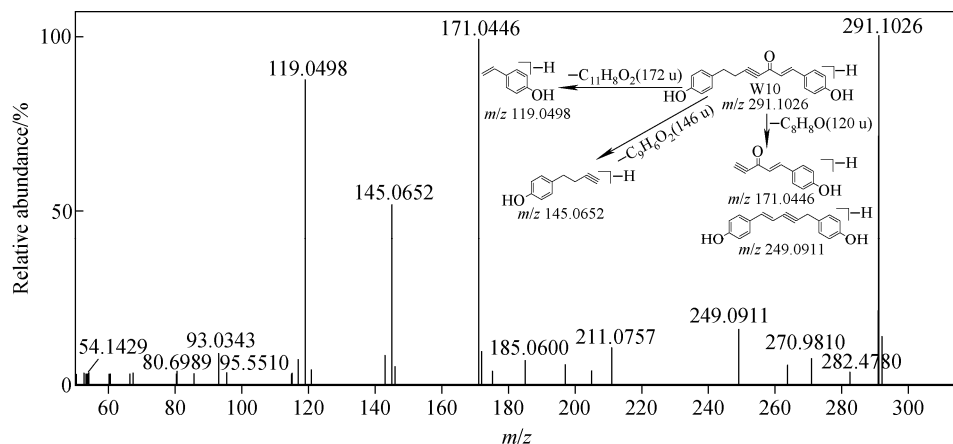


图 4 W10 二级质谱图及可能的裂解规律

Fig. 4 MS² spectrum and proposed fragmental pathways of W10

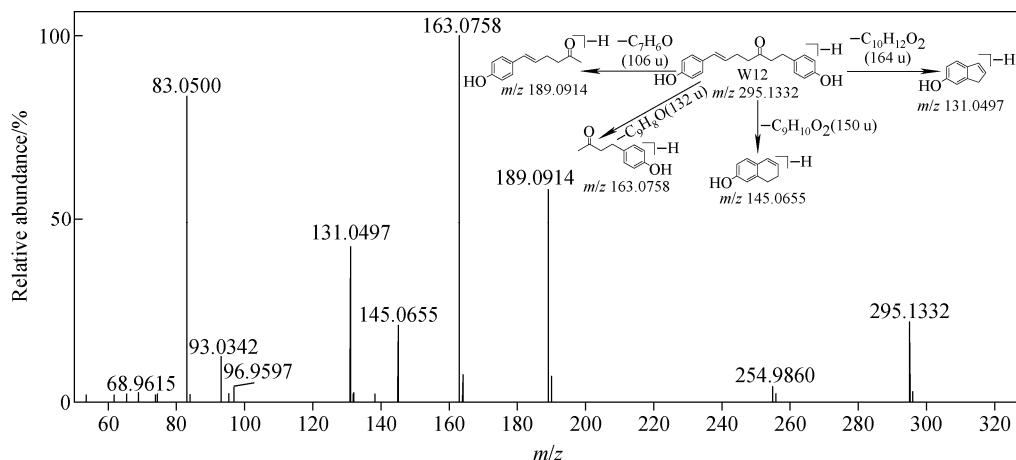


图 5 W12 二级质谱图及可能的裂解规律

Fig. 5 MS² spectrum and proposed fragmental pathways of W12

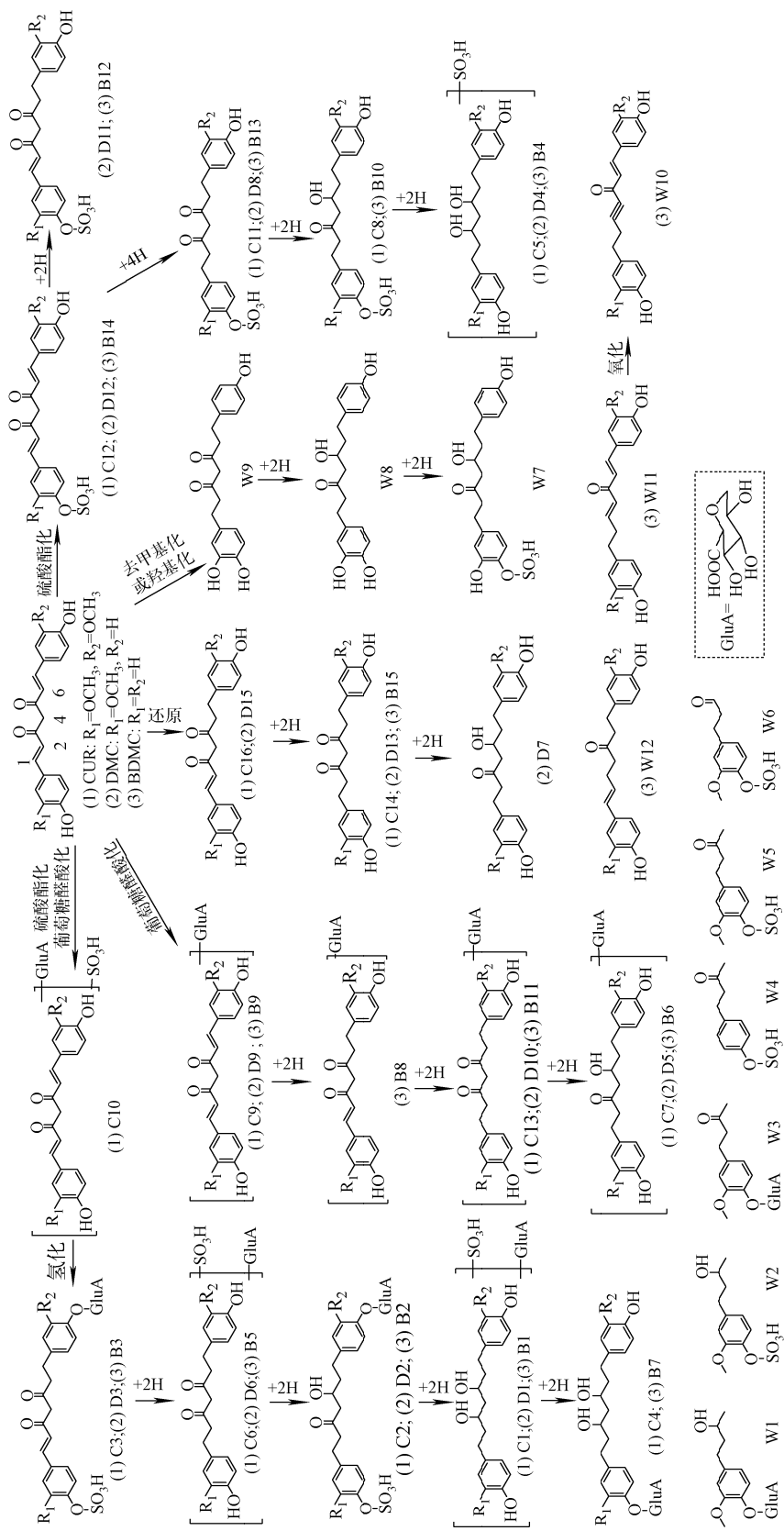


图 6 CUR、DMC、BDMC 在大鼠体内的代谢途径
Fig. 6 Proposed metabolic pathways of CUR, DMC, BDMC in rats

2.5 讨论

本研究在姜黄提取物中共鉴定出 59 个代谢产物,粪便中 18 个、尿液中 39 个、血浆中 33 个、胆汁中 36 个。其中,姜黄素代谢产物 16 个(血浆中 8 个、粪便中 5 个、尿液中 11 个、胆汁中 8 个);去甲氧基姜黄素代谢产物 15 个(血浆中 8 个、粪便中 3 个、尿液中 10 个、胆汁中 9 个);双去甲氧基姜黄素代谢产物 16 个(血浆中 11 个、粪便中 4 个、尿液中 12 个、胆汁中 13 个);无法归属的代谢产物 12 个(血浆、粪便、尿液、胆汁各 6 个)。

不同生物样品中,姜黄提取物各代谢产物在种类和数量上存在交叉。研究发现,同时存在于血浆、尿液、胆汁 3 种生物样品中的代谢物最多,有 14 个(B1、B2、B6、B8、B9、B14、C2、C5、D2、D5、D8、W2、W4、W5),为六氢或八氢原型药物的葡萄糖醛酸或硫酸结合物、六氢或八氢原型药物的葡萄糖醛酸和硫酸共同结合物;同时存在于粪便、尿液和胆汁生物样品中的代谢物有 3 个,分别为 C11(四氢双去甲氧基姜黄素硫酸)、D14(去甲氧基姜黄素)、W7(六氢羟基化双去甲氧基姜黄素硫酸酯)。粪便与尿液共同代谢产物有 8 个(B15、B16、C14、C15、C16、D13、W10、W12),为一相代谢物和原型药物;血浆与尿液共同代谢产物有 4 个(B11、C9、C12、D12),主要为原型药物葡萄糖醛酸或硫酸酯结合物;血浆与胆汁共同代谢产物有 4 个(B5、B13、C6、D6),主要为四氢原型药物的葡萄糖醛酸和硫酸共同结合物;尿液与胆汁生物样品中共同代谢产物有 3 个(B7、C4、D1),为八氢原型药物的葡萄糖醛酸结合物或葡萄糖醛酸和硫酸共同结合物;4 种生物样品中均可发现代谢物 B4、B10、C8、D4,为八氢或六氢原型药物的硫酸酯结合物。此外,D3、D11、C3、B3、B12 等二氢化原型药物的葡萄糖醛酸结合物或葡萄糖醛酸和硫酸共同结合物仅在胆汁中发现。

本研究未对 W1~W12 进行归属,是因为 W1~W5 化合物结构较小,无法判断是姜黄提取物中哪种成分的代谢产物;而 W8、W9 可能是去甲氧基姜黄素去甲基化代谢产物,也可能是双去甲氧基姜黄素羟基化代谢物;W10~W12 既可能是双去甲氧基姜黄素代谢物,也可

能是姜黄提取物中其他姜黄素类化合物以原型形式排出体外;W7 作为 W8 硫酸酯化代谢物同样无法进行归属。另外,由于 3 种姜黄素类化合物均可能产生 W6,因此本研究并未将 W6 归属为姜黄素代谢产物^[19]。

与文献^[6,8-11]对比,本研究在大鼠体内发现了 16 个新的代谢产物(B3、B7、B8、B11~B13、C3、D3、D5、D8、D10、W1、W2、W4、W5、W7、W10)、4 个已知代谢物(B6、W3、W11、W12)。但未鉴定出文献^[11](大鼠灌胃给予姜黄素类化合物)在大鼠粪便和尿液中分离出的六氢姜黄素、六氢双去甲氧基姜黄素、八氢姜黄素、八氢双去甲氧基姜黄素、1,5-环氧-3-羰基-1,7-双(4-羟基苯基)-4,6-庚二烯、八氢姜黄素二去甲基化二去羟基化代谢物、八氢双去甲氧基姜黄素去羟基化代谢物;未鉴定出文献^[10](大鼠灌胃给予去甲氧基姜黄素单体)在大鼠粪便和尿液中分离出的 5-去羟基二氢去甲氧基姜黄素、六氢去甲氧基姜黄素甲基化代谢物、六氢去甲氧基姜黄素去羟基化代谢物、八氢去甲氧基姜黄素去羟基化代谢物,这可能是因为上述代谢产物排出体外需要的时间较长(收集粪便和尿液时间为 48 h),而本研究仅收集了 0~12 h 的粪便和尿液;未鉴定出文献^[6,9](大鼠灌胃给予姜黄素单体)在大鼠血浆中分离出的六氢姜黄素^[6,9]、八氢姜黄素^[6]、4-(3-羟丙基-1-烯基)-2 甲氧基苯酚^[6]、4-(3-羟丙基)-2-甲氧基苯酚^[6]、1-羟基-4-(4-羟基-3-甲基苯基)-3-烯-2-酮^[6]、二氢姜黄素葡萄糖醛酸^[9],这可能是因为姜黄提取物中的其他成分会促进姜黄素在大鼠体内的代谢,加快了一相代谢物向二相代谢物的转变;未鉴定出文献^[8](大鼠分别灌胃给予姜黄素纳米制剂、去甲氧基姜黄素纳米制剂、双去甲氧基姜黄素纳米制剂)在大鼠体内分离出的去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸硫酸酯、双去甲氧基姜黄素葡萄糖醛酸硫酸酯、六氢去甲氧基姜黄素硫酸酯、二氢双去甲氧基姜黄素,这可能是因为本研究中去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的给药剂量比文献低。

3 结论

本研究共鉴定出 59 个大鼠血浆、粪便、尿液、胆汁中的姜黄提取物代谢产物,其中 16 个

新的代谢产物,粪便、血浆中新发现的代谢产物各 2 个,尿液中新发现 1 个代谢产物。研究表明,姜黄素类化合物原型成分及一相代谢产物主要存在于粪便、尿液中,二相代谢产物主要存在于血浆、胆汁中。本研究对去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素代谢产物进行了补充,可为后续活性代谢物的筛选提供依据。

参考文献:

[1] SIVIERO A, GALLO E, MAGGINI V, GORI L, MUGELLI A, FIRENZUOLI F, VANNACCI A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability[J]. *Herb Med*, 2015, 5(2): 57-70.

[2] 吴杰,李丹,沈秉正,刘刚,周本宏,宋金春. 姜黄素类化合物的药理活性研究进展[J]. *中国药师*, 2013,16(12):1 918-1 920.

WU Jie, LI Dan, SHEN Bingzheng, LIU Gang, ZHOU Benhong, SONG Jinchun. The pharmacological activities of curcuminoids (Review)[J]. *China Pharmacist*, 2013, 16(12): 1 918-1 920(in Chinese).

[3] 高峰,顾志良. 四氢姜黄素对糖脂代谢作用研究进展[J]. *食品科技*,2020,45(9):261-266.

GAO Feng, GU Zhiliang. Advances in studies on glycolipid metabolism effect of tetrahydrocurcumin[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45 (9): 261-266(in Chinese).

[4] 吴刚,陈训军,张万里,李芬. 二氢姜黄素体外处理 BRL-3A 细胞对细胞凋亡通路的影响[J]. *实用肝脏病杂志*,2020,23(5):622-625.

WU Gang, CHEN Xunjun, ZHANG Wanli, LI Fen. Effects of dihydrocurcumin on apoptotic pathway in palmitic acid-induced BRL-3A cell apoptosis in vitro[J]. *J Prac Hepatol*, 2020, 23 (5): 622-625(in Chinese).

[5] 喻青青,孟沫然,刘亚云,程银祥,陈勇. 二氢姜黄素对油酸诱导的非酒精性脂肪肝体外模型的预防作用与机制研究[J]. *中草药*,2018,49(5): 1 092-1 099.

YU Qingqing, MENG Moran, LIU Yayun, CHENG Yinxiang, CHEN Yong. Preventive effect and underlying mechanism of dihydrocurcumin on NAFLD in oleic acid-treated HepG2 cells[J]. *Chin Tradit Herbal Drug*, 2018, 49(5): 1 092-1 099(in Chinese).

[6] SHI M G, GAO T T, ZHANG T, HAN H.

Characterization of curcumin metabolites in rats by ultra-high-performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *RCM*, 2019, 33(13): 1 114-1 121.

[7] 刘安昌,娄红祥,赵丽霞. 姜黄素在大鼠体内的代谢研究[J]. *上海中医药杂志*,2008,42(8):74-77.

LIU Anchang, LOU Hongxiang, ZHAO Lixia. Study on metabolisms of curcumin in rats[J]. *SH J TCM*, 2008, 42(8): 74-77(in Chinese).

[8] LI R, WANG Q, FAN J R, HE B J, QIAO X, XIANG C, GUO D A, YE M. Metabolites identification of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in rats after oral administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2016, 2(4): 29-37.

[9] PAN M H, HUANG T M, LIN J K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice[J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(4): 486-494.

[10] ZENG Y, QIU F, LIU Y, QU G X, YAO X S. Isolation and identification of phase 1 metabolites of demethoxycurcumin in rats[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(9): 1 564-1 573.

[11] LI J, LIU Y, WEI J Q, WANG K, CHEN L X, YAO X S, QIU F. Isolation and identification of phase 1 metabolites of curcuminoids in rats[J]. *Planta Med*, 2012, 78(12): 1 351-1 356.

[12] MARACZYLO T H, STEWARD W P, GESCHER A J. Rapid analysis of curcumin and curcumin metabolites in rat biomatrices using a novel ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(3): 797-803.

[13] JIANG H L, SOMOGYIÁ, JACOBSEN N E, TIMMERMAN B N, GANG D R. Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry [J]. *RCM*, 2006, 20(6): 1 001-1 012.

[14] JIA S L, DU Z F, SONG C W, JIN Shuna, FENG Y L, XIONG C M, JIANG H L. Identification and characterization of curcuminoids in turmeric using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem

- mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2017, 1 521: 110-122.
- [15] TAMVAKOPOULOS C, SOFIANOS Z D, GARBIS S D, PANTAZIS P. Analysis of the *in vitro* metabolites of diferuloylmethane (curcumin) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a hybrid quadrupole linear ion trap system: newly identified metabolites[J]. Eur J Drug Metabol Pharmacokinet, 2007, 32 (1): 51-57.
- [16] LIU A, LOU H, ZHAO L, ZHAO L X, FAN P H. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(3): 720-727.
- [17] PFEIFFER E, HOEHLE S I, WALCH S G, RIESS A, SÓLYOM A M, METZLER M. Curcuminoids form reactive glucuronides *in vitro*[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(2): 538-544.
- [18] BRESCIAN L, FAVARI C, CALANI L, FRANCINELLI V, RIVA A, PETRANGOLINI G, ALLEGRINI P, MENA P, RIO D D. The effect of formulation of curcuminoids on their metabolism by human colonic microbiota[J]. Molecules, 2020, 25(4): 940-949.
- [19] NAKAGAWA K, ZINGG J M, KIM S H, THOMAS M J, DOLNIKOWSKI G G, AZZI A, MIYAZAWA T, MEYDANI M. Differential cellular uptake and metabolism of curcuminoids in monocytes/macrophages: regulatory effects on lipid accumulation[J]. Br J Nutr, 2014, 112(1): 8-14.
- [20] NAKAGAWA K, HARIGAE T, MIYAZAWA T, LNOUE N, KIMURA F, IKEDA I, MIYAZAWA T. Metabolic fate of poly-(lactic-co-glycolic acid)-based curcumin nanoparticles following oral administration[J]. Int J Nanomed, 2016, 11: 3 009-3 022.
- [21] XU L, LIU Y, WU H F, ZHOU A. Rapid identification of absorbed components and metabolites of Gandou decoction in rat plasma and liver by UPLC-Q-TOF-MS^E[J]. J Chromatogr B, 2019, 1 137: 121 934.
- [22] SUN Z Z, LI X Y, WANG S, SHEN L, JI H F. Bidirectional interactions between curcumin and gut microbiota in transgenic mice with Alzheimer's disease[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(8): 3 507-3 515.
- [23] 于治国, 赵云丽, 范荣华. 一种具有抗肿瘤活性的二芳基庚二酮类化合物的制备和用途: 中国, CN201110455684.0[P]. 2014-12-17.
- (收稿日期:2021-02-25;修回日期:2021-07-09)