

# 绒毛崖豆藤中一种查尔酮提取物的 体内外代谢及药代动力学研究

倪恒凡<sup>1,2</sup>, 刘玲<sup>2</sup>, 万丽<sup>2\*</sup><sup>1</sup>四川大学华西医院药剂科, 成都 611137; <sup>2</sup>成都中医药大学药学院, 成都 610041

**摘要:**采用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 检测方法, 通过比较 2,5-二甲氧基呋喃[4'',5'':3,4]查耳酮(**1**)在体外大鼠、小鼠、恒河猴、Beagle 犬和人五个种属肝微粒体体系中孵育 0 min 和 60 min 的样品, 以及比较静脉注射该化合物及空白的 C57 小鼠的血浆、粪便、尿液样品, 研究其在体内外代谢产物。初步推断孵育后体外代谢产物有 **M1**、**M2** 共 2 种, 体内代谢产物 **M1**、**M2**、**M3**、**M4**、**M5** 共 5 种, 并且 **M5** 为 **M1** 进一步代谢而来, 采用化学合成方法制得代谢产物 **M1**。将大鼠随机分组并给药, 于设定的系列时间点取血, 采用超高速液相色谱质谱联用 (UFLC-MS/MS) 检测方法, 测定 **1** 及 **M1** 血药浓度, 定量研究该化合物及 **M1** 在大鼠体内的变化趋势并计算药代参数。用 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数, **1** 的  $C_{max} = 405.96 \mu\text{g/L}$ ,  $T_{max} = 0.083 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 190.64 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $T_{1/2} = 3.74 \text{ h}$ , **M1** 的  $C_{max} = 281.291 \mu\text{g/L}$ ,  $T_{max} = 0.083 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 561.30 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $T_{1/2} = 3.01 \text{ h}$ 。研究结果表明, 2,5-二甲氧基呋喃[4'',5'':3,4]查耳酮在体内代谢过程中主要发生了还原、去甲基、开环、加羟基等反应, 其中主要代谢产物为 **M1**, 并且 **M1** 进一步代谢为 **M5**, 本研究为揭示其药理药效作用奠定了物质基础。

**关键词:**绒毛崖豆藤; UPLC-QE-Orbitrap-MS; 肝微粒体; 代谢产物; 药代动力学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)7-1213-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.7.015

## Study on the metabolites and pharmacokinetics of a chalcone extract from *Millettia velutina* Dunn

NI Heng-fan<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>2</sup>, WAN Li<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Pharmacy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;<sup>2</sup>School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611134, China

**Abstract:** The UPLC-QE-Orbitrap-MS assay was used to compare the 2,5-dimethoxyfuran[4'',5'':3,4] chalcone (**1**) samples cultured in rat, mouse, rhesus monkey, Beagle dog and human liver microsomes for 0 min and 60 min *in vitro*, and compare the plasma, feces, and urine samples of intravenous injection of the compound and blank C57 mice to study its metabolites *in vitro* and *in vivo*. It was preliminarily concluded that there were two kinds of metabolites **M1** and **M2** *in vitro* after incubation, and five kinds of metabolites **M1**, **M2**, **M3**, **M4** and **M5** *in vivo*. **M5** was further metabolized from **M1**, and the metabolite **M1** was obtained by organic synthesis. Ultrafast liquid chromatography-mass spectrometry (UFLC-MS/MS) detection method was used to determine the plasma concentrations of **1** and **M1**. The change trend of the compound and **M1** in rats was quantitatively studied and the pharmacokinetic parameters were calculated. Rats were randomly divided into groups and given drugs, and blood was collected at a set series of time points. The plasma concentrations of **1** and **M1** were determined. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS2.0 software. The  $C_{max}$  of **1** was  $405.96 \mu\text{g/L}$ ,  $T_{max} = 0.083 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 190.64 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $T_{1/2} = 3.74 \text{ h}$ . The  $C_{max}$  of **M1** was  $281.291 \mu\text{g/L}$ ,  $T_{max} = 0.083 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 561.30 \mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $T_{1/2} = 3.01 \text{ h}$ . These results showed that 2,5-dimethoxyfuran[4'',5'':3,4] chalcone undergoes reduction, demethylation, ring opening, and hydroxylation reactions during the metabolism of the body. The main metabolite is **M1**, and **M1** is further metabolized

收稿日期: 2021-03-04 接受日期: 2022-05-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973142)

\* 通信作者 Tel: 86-28-87714869; E-mail: wanli@cdutcm.edu.cn

to **M5**. This study laid a material foundation for revealing its pharmacological effects.

**Key words:** *Millettia velutina* Dunn; UPLC-QE-Orbitrap-MS; liver microsomes; pharmacokinetics; metabolites

天然化合物对新药的发现做出了巨大贡献,黄酮类化合物是天然产物中的一大类<sup>[1]</sup>,因为其具有良好的抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗溃疡、保肝、保护心血管等活性备受大家关注<sup>[2-9]</sup>,从豆科崖豆藤属植物绒毛崖豆藤(*Millettia velutina* Dunn)茎中提取分离出的抗炎活性化合物 2,5-二甲氧基呋喃[4",5":3,4]查耳酮(2,5-dimethoxyfuran[4",5":3,4] chalcone, **1**)属于查耳酮类化合物。Ma 等<sup>[10]</sup>研究结果显示,该化合物具有较强的抗炎活性,其在体外细胞实验中主要通过抑制 IL-1 $\beta$  分泌和 Caspase-1 激活,并抑制 ASC 齐聚,从而表现出良好的抗炎活性。并在小鼠体内实验中可明显缓解 LPS 诱导的小鼠急性休克。在新药开发的早期阶段,进行药物代谢的相关研究有助于快速识别安全、有效、药代动力学性质良好的化合物,提前淘汰不合格的化合物,节约研发成本,目前尚未在国内外期刊上发现对该化合物的体内外代谢数据研究报道。本研究通过对 2,5-二甲氧基呋喃[4",5":3,4]查耳酮在大鼠、小鼠、恒河猴、Beagle 犬和人 5 个种属肝微粒体和大鼠体内的代谢产物研究,并通过对 2,5-二甲氧基呋喃[4",5":3,4]查耳酮及其代谢产物(**M1**)体内外药代动力学研究探究该化合物的主要物质作用基础,为其进一步的机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

美国 Thermo 公司 Q Exactive 高分辨质谱(含 ESI 源,软件 Xcalibur3.2、Compound Discover 2.0);美国 AB SCIEX 公司 QTRAP5500 三重四级杆质谱仪(软件 Analyst 1.6.2、M $\mu$ LiQuant 3.3);日本 Shimadzu 公司超高速液相色谱,美国 Waters 公司 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱。

样品 **1**(自制, No: 20190221, 纯度  $\geq 98\%$ , 结构见图 1), ESI-MS:  $m/z$  309. 122 1 (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, 309. 112 7) [M + H]<sup>+</sup>[<sup>10</sup>]。样品 **M1**(自制, No: 20190311, 纯度  $\geq 98\%$ , 结构见图 1), ESI-MS:  $m/z$  311. 1277 (calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, 311. 1283) [M + H]<sup>+</sup>。内标辛二酰苯胺异羟肟酸(大连美仑生物技术有限公司, No: 00502A, 纯度  $\geq 98\%$ )。人种属的肝微粒体(20 mg/mL)、大鼠种属的肝微粒(20 mg/mL)、比格犬种属的肝微粒体(20 mg/mL)、猴种属的肝微粒

体(20 mg/mL)、小鼠种属的肝微粒体(20 mg/mL), NADPH 反应启动液(武汉普莱特生物医药技术有限公司),于 -80 °C 冷冻保存。甲醇、乙腈(色谱纯, Sigma-Aldrich 公司)。甲酸(色谱纯, Fluka Analytical 公司)。

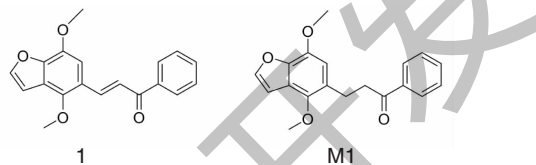


图 1 样品 **1** 及 **M1** 结构式

Fig. 1 Structures of sample **1** and **M1**

实验动物: SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重  $200 \pm 10$  g, SPF 级 C57 雄性小鼠, 体重  $22 \pm 2$  g 均购买于成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川) 2014-028。

### 1.2 溶液的配制

#### 1.2.1 给药溶液的配制

样品 **1** 注射液制备方法: 精密称取样品 **1** 适量, 加入生理盐水适量, 制备成浓度 1 mg/mL, 于 4 °C 冰箱密封保存, 备用。

#### 1.2.2 储备液的配制

精密称取样品 **1** 及 **M1** 适量, 用甲醇溶解制备成质量浓度为 1 mg/mL 的储备液, 于 4 °C 冰箱密封保存, 备用。

#### 1.2.3 内标溶液的配制

精密称取 SAHA 对照品适量, 用乙腈稀释成 20 ng/mL 的内标工作液。

### 1.3 LC-MS/MS 条件

#### 1.3.1 液相条件

QTRAP5500 三重四级杆质谱: ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu$ m), 流动相为: 0.1% 甲酸水(A 相), 乙腈(B 相)梯度洗脱(0 ~ 1 min, 10%  $\rightarrow$  90% B, 1 ~ 3 min, 90% B), 流速为 0.5 mL/min, 柱温 35 °C, 平衡 1.5 min, 进样体积 1  $\mu$ L。

Q Exactive 高分辨质谱: ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu$ m), 流动相为: 0.1% 甲酸水(A 相), 乙腈(B 相)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 10%  $\rightarrow$  90% B, 15 ~ 20 min, 90% B), 流速为 0.5 mL/min, 柱温 35 °C, 平衡 1.5 min, 进样体积 2  $\mu$ L。

### 1.3.2 质谱条件

QTRAP5500 三重四级杆质谱:采用 MRM(多反应检测模式)检测,质谱条件为:ESI<sup>+</sup>(正离子模式),样品 1 监测离子对为: $m/z$  309.1 $\rightarrow$  $m/z$  267.1,碰撞能量为 17.73 V;M1 监测离子对为: $m/z$  311.1 $\rightarrow$  $m/z$  191.1,碰撞能量为 15.27 V;内标 SAHA 监测离子对为: $m/z$  265.1 $\rightarrow$  $m/z$  232.1,碰撞能量为 20 V;去簇电压(DP)均为 100 V;离子束聚焦电压(EP):10 V;碰撞池出口电压(CXP):10 V;驻留时间为 0.10 s。

Q Exactive 高分辨质谱:质谱条件为:ESI<sup>+</sup>(正离子模式),喷雾电压(IS):4 500 V;雾化气压力(GS1):50 Psi;气帘气压力(CUR):15 Psi;辅助气压力(GS2):45 Psi;离子源温度(TEMP):550 ℃;簇裂解电压(DP):55 V;碰撞能量(CE):35 V。

### 1.4 样品 1 在各种属代谢产物研究

配制孵育体系为 200  $\mu$ L (PBS 188  $\mu$ L、NADPH 12  $\mu$ L),再加入样品 12  $\mu$ L(2 mmol/L),恒温水浴预孵育(37 ℃、5 min),再加入各种属的肝微粒体 5  $\mu$ L(20 mg/mL)启动反应。在 37 ℃水浴锅中继续孵育 60 min 后加入 400  $\mu$ L 含 SAHA(20 ng/mL)的冰乙腈终止反应。涡旋 3 min,离心 15 min(13 000 r/min),取上清液进样,实验平行 3 份<sup>[11]</sup>。样品进 UPLC-QE-Orbitrap-MS 检测,通过对比孵育 0 min 和 60 min 样品离子流图,寻找样品 1 在各种属肝微粒体中的代谢产物。

### 1.5 样品 1 在 C57 小鼠体内代谢产物研究

随机取 C57 小鼠分为对照组、血浆组和粪尿组,每组 3 只。将小鼠放置在代谢笼中,给药前 12 h 禁食不禁水,对照组尾静脉注射生理盐水,实验组注射样品 1(10 mg/kg)。血浆组分别于给药后 0.5、1.5 h 收集血液样品,尿液和粪便样品于给药后收集 48 h 内的粪便和尿液(每 8 h 收集一次)。取出离心转速为 3 500 r/min,时间 15 min,后取上清液即得血浆样品,样品保存于低温冰箱-80 ℃。样品预处理如下:

血浆样品:取 0.1 mL 血浆样品加入到预先活化的 SPE 小柱中,用 1 mL 10% 甲醇洗涤 3 次,弃去,再加入 1 mL 甲醇,将洗脱液进行氮吹,后加 100  $\mu$ L 甲醇复溶,13 000 r/min 离心 15 min,取上层清液进样分析。

尿液样品:取 0.5 mL 尿液样品加入到预先活化的 SPE 小柱中,用 1 mL 10% 甲醇洗涤 3 次,弃去,

再加入 1 mL 甲醇,将洗脱液进行氮吹,后加 100  $\mu$ L 甲醇复溶,13 000 r/min 离心 15 min,取上层清液进样分析。

粪便样品:将粪便干燥后研磨粉碎,每 0.1 g 粪便粉末加入 2 mL 醇浸提 12 h 后再超声 15 min,再取出 3 500 r/min 离心 15 min,取上层清液于 37 ℃进行氮吹,所得残渣加入 100  $\mu$ L 醇复溶,3 500 r/min 离心 15 min,取上层清液进样分析。

### 1.6 样品 1 及 M1 在大鼠体内的药代动力学研究

经过“1.3”项研究,在 5 个种属的肝微粒体的孵育结果中都找到了样品 1 的代谢产物样品 1 加氢还原物(M1),经过下文中的二级质谱确证后,推断出样品 1 还原物的结构,然后本课题组合成了该代谢产物,并在大鼠样品 1 静脉注射后进行样品 1 及 M1 的定量研究并计算药代动力学相关参数。

#### 1.6.1 大鼠颈静脉插管手术

大鼠用 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)进行麻醉处理,麻醉后固定于无菌操作台中,剔除左边颈部的毛发后,用酒精擦拭干净皮毛,待大鼠麻醉后,用手术剪剪开皮肤找到颈静脉,使用 1 mm 外径 0.5 mm 内径的聚乙烯管插入颈静脉中缝合固定,后将聚乙烯管从后颈部穿出固定于耳后,缝合后将大鼠静置 24 h,禁食不禁水。

#### 1.6.2 血浆样品收集

将 6 只 SD 大鼠从颈静脉注射给药样品 1,给药剂量为 10 mg/kg,分别于给药前和给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、10、24 h,从颈静脉插管中取血 0.2 mL 到 EP 管中,3 500 r/min 离心 15 min,分离出上层血浆冷藏于-40 ℃待用。

#### 1.6.3 血浆样品处理

取大鼠血浆 30  $\mu$ L 于 1.5 mL 的 EP 管中,加入含 20 ng/mL 内标 SAHA 的乙腈 120  $\mu$ L 涡旋 30 s 后 13 000 r/min 离心 15 min,取上层离心液 80  $\mu$ L 装入进样瓶中进 UFLC-MS/MS 分析。

### 1.7 方法学考察

样品 1 及 M1 方法学验证按照《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》进行方法学验证<sup>[12]</sup>,主要验证内容有专属性、线性范围、精密度与准确度、基质效应、稳定性等。

## 2 实验结果

### 2.1 方法学验证

#### 2.1.1 专属性

按照“1.6.3”项下条件,取空白大鼠的血浆 30

$\mu\text{L}$ , 分别制备空白样品和含内标和样品 **1** 标准溶液的对照品及含内标和 **M1** 标准液的对照品, 与实验血浆样品进行 UFLC-MS/MS 分析, 进行样品的专属性考察。结果显示: 空白样品无干扰峰, 内标 SAHA

与样品 **1** 及 **M1** 分离度好, 保留时间分别为 1.5、1.99 及 1.96 min, 证明该方法专属性良好, 特异性高(见图 2)。

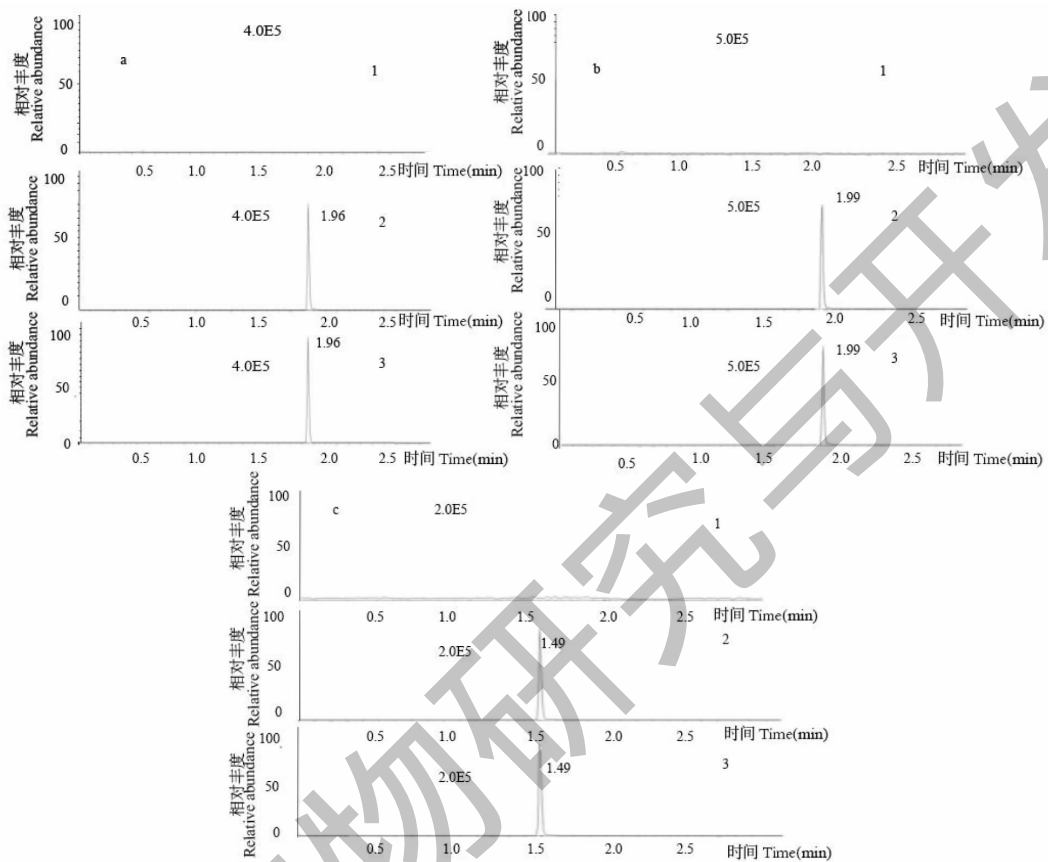


图2 样品**1**、**M1** 分别与内标 SAHA 的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of compound **1**, **M1** and internal standard SAHA

注: 空白血浆样品(1); 血浆中分别加入样品 **1** 对照品或 **M1** 对照品和 SAHA (2); 给药后血浆样品(3)。

Note: Blank plasma sample (1); Sample **1** or **M1** and SAHA were added to the plasma (2); Plasma sample after administration (3).

a: **M1**; b: Sample **1**; c: SAHA internal standard.

### 2.1.2 线性与范围

于空白的大鼠血浆中分别加入系列浓度的样品 **1**、**M1** 标准溶液, 终浓度配制成分别为 3、10、30、100、300、1 000 ng/mL 的标准品溶液, 进行 UFLC-MS/MS 分析, 将药物与内标峰面积比值与药物终浓度作线性回归, 以加权最小二乘法(权重系数为  $1/C^2$ ), 分别考察三条标准曲线, 样品 **1** 的结果分别为:  $y = 0.01204x - 0.00104$  ( $R = 0.99701$ ),  $y = 0.0127x + 0.00240$  ( $R = 0.99130$ ),  $y = 0.01255x - 0.00986$  ( $R = 0.99463$ ), 表明样品 **1** 质量浓度在 3 ~ 1 000 ng/mL 范围内成线性相关, 根据信噪比  $S/N \geq 10$  得到最低定量限为 3 ng/mL。 **M1** 考察三条标

准曲线结果分别为:  $y = 0.01236x - 0.00606$  ( $R = 0.99777$ ),  $y = 0.01221x + 0.00229$  ( $R = 0.99360$ ),  $y = 0.01163x - 0.00004$  ( $R = 0.99608$ ), 根据信噪比  $S/N \geq 10$  得到最低定量限为 3 ng/mL。

### 2.1.3 精密度与准确度

按照“1.6.3”项下方法, 分别配制样品 **1** 及 **M1** 质量浓度为 9、100、800 ng/mL 的低、中、高质量浓度的质控样品, 每个质量浓度质控样品平行 6 份, 进样分析, 测定样品 **1** 及 **M1** 的浓度, 考察日内精密度; 连续进样 3 天, 考察日间精密度; 同法制备该质量浓度质控样品, 进样分析, 计算各质控样品测得浓度与理论浓度的回收率, 评价该方法的准确度; 由表 1 可

知,低、中、高质量浓度质控样品的日内、日间 RSD 均小于 10%, 样品 **1** 的回收率在 100.96% ~ 103.21%, **M1** 的回收率在 99.20% ~ 105.83%, 符

合生物样品定量分析的相关要求<sup>[13]</sup>。表明该方法精密度、准确度良好,测得结果准确可信。

表 1 样品 **1** 及 **M1** 的精密度、准确度和基质效应测定 ( $n=6$ )

Table 1 Precision, accuracy and matrix effect of compound **1** and **M1** ( $n=6$ )

化合物 Compound	浓度 Concentration (ng/mL)	精密度 Precision (%)		准确度 Accuracy (%)	基质效应 Matrix effect (%)
		日内 Intraday	日间 Day-to-day		
<b>1</b>	9	6.19	7.66	100.96 ± 9.33	100.70 ± 8.24
	300	4.97	6.58	102.43 ± 5.19	98.37 ± 6.59
	800	3.29	5.72	103.21 ± 2.85	98.47 ± 11.08
<b>M1</b>	9	6.29	9.19	105.83 ± 4.04	95.34 ± 13.93
	300	4.15	5.29	99.20 ± 2.49	93.14 ± 14.86
	800	7.31	5.32	101.03 ± 2.01	96.02 ± 14.57

#### 2.1.4 基质效应

按照“1.6.3”项下方法,用大鼠空白血浆配制质量浓度分别为 9、300、800 ng/mL 的低、中、高质量浓度的质控样品,同时用流动相分别配制相同质量浓度的样品 **1** 对照品溶液,进样分析,分别得峰面积 A 和 B。每组平行 5 份。基质效应 =  $A/B \times 100\%$ 。由表 1 结果显示,样品 **1** 基质效应在 98.37% ~ 100.70%, **M1** 基质效应在 93.14% ~ 96.02%, 偏差

小于 15%, 表明此提取方法无基质效应。

#### 2.1.5 稳定性

按照“1.6.3”项下方法,配制质量浓度分别为 9、300、800 ng/mL 的低、中、高质量浓度的质控样品,进样分析。每组平行 5 份,考察各质控样品于自动进样室内放置 24 h 的稳定性, -80 °C 放置 15 天的长期稳定性,以及冻融 5 次后的冻融稳定性。表 2 结果显示在上述各条件下,样品 **1** 及 **M1** 样品稳定性良好。

表 2 样品 **1** 及 **M1** 的稳定性测定 ( $n=5$ )

Table 2 Stability measurement of compound **1** and **M1** ( $n=5$ )

化合物 Compound	质量浓度 Concentration (ng/mL)	12 h 稳定性 12 h stability (%)	长期稳定性 Long-term stability (%)	冻融稳定性 Freeze-thaw stability (%)
<b>1</b>	9	6.19	6.63	9.24
	300	4.97	4.34	8.95
	800	3.29	5.66	11.14
<b>M1</b>	9	6.29	4.50	5.02
	300	4.15	4.77	4.87
	800	7.31	1.72	3.63

#### 2.2 样品 **1** 在不同种属肝微粒体中的代谢产物

采用一级全扫描正离子方式检测 (MS scan), 比较 0、60 min 两个时间点的色谱图差异, 初步判断样品 **1** 的体外代谢产物。结果显示 5 个种属均有 2 个体外代谢产物: **M1** (8.36 min),  $m/z$  311.1277 ( $[M + H]^+$ ); **M2** (4.06 min),  $m/z$  299.1283 ( $[M + H]^+$ ) (见图 3)。由于体外代谢产物 **M1**、**M2** 与下

文体内代谢产物一致, 故在下文体内代谢产物中进行详细结构分析。

#### 2.3 样品 **1** 在小鼠体内的代谢产物

将处理后的小鼠的血浆、尿液、粪便样本进 UP-LC-QE-Orbitrap-MS 进行分析, 通过比较给药前后的质谱图谱, 结合各组分的保留时间、精确的一级母离子分子质量、碎片的分子质量等信息, 推断出各个代

谢产物的可能结构,预测代谢途径,在血浆样本中鉴定出原型药样品 **1** 及代谢产物 **M1**、**M2**、**M5** 共 4 个,在粪便样本中鉴定出原型药及代谢产物 **M1**、**M2**、**M3**、**M4**、**M5** 共 6 个,尿液样本中鉴定出原型药

及代谢产物 **M1**、**M3**、**M4** 共 4 个,各个代谢产物保留时间详见下图 4 中粪便样本的总离子流图,各个代谢产物及原药结构见图 5,各个代谢产物的二级碎片信息见表 3。

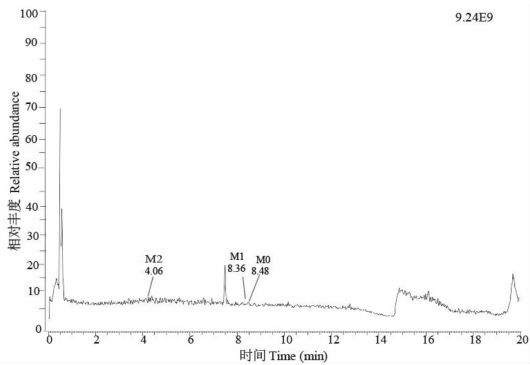


图 3 以人肝微粒体为代表的体外代谢产物总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of *in vitro* metabolites represented by human liver microsomes

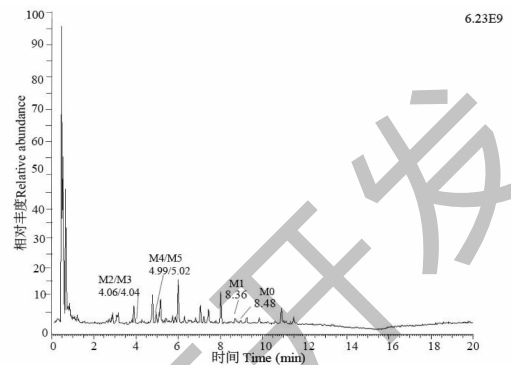


图 4 以粪便为代表的体内代谢产物总离子流图

Fig. 4 Total ion current diagram of metabolites in the body represented by feces

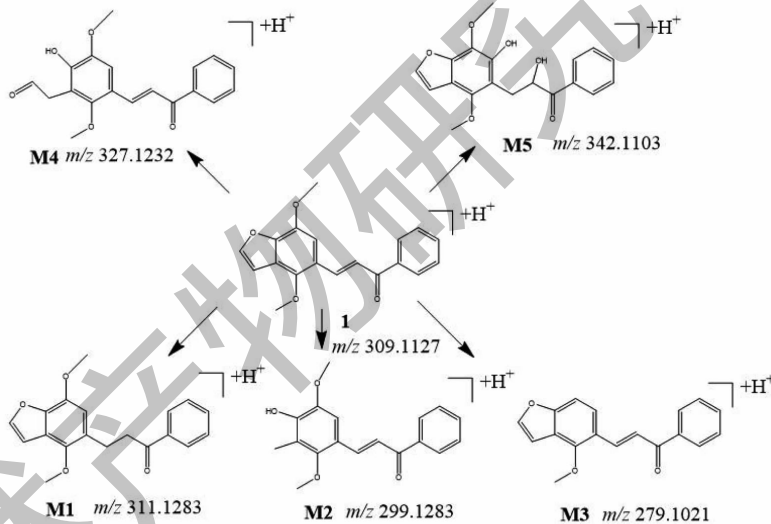


图 5 样品 **1** 及代谢产物产物结构图

Fig. 5 Structure of compound **1** and metabolite products

表 3 样品 **1** 代谢产物表征

Table 3 Metabolites characterization of compound **1**

化合物 Compound	分子式 Structure	$t_R$ (min)	[M + H] <sup>+</sup> ( $m/z$ )			[M + H] <sup>+</sup> / [M] <sup>+</sup> ( $m/z$ )	代谢途径 Metabolic pathway
			实测值 Measured value	理论值 Theoretical value	误差 Error		
<b>1</b>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	8.48	309.112 1	309.112 7	-1.9	267.101 6, 79.074 0, 131.049 3, 105.033 9	
<b>M1</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	8.36	311.127 7	311.128 3	-1.9	131.049 3, 105.033 9, 269.107 6	加氢还原
<b>M2</b>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	4.06	299.127 3	299.128 3	-3.0	105.033 8, 267.102 0	开环后去甲基
<b>M3</b>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	4.04	279.101 1	279.102 1	-3.5	105.034 0, 201.055 1, 251.106 7	去甲氧基
<b>M4</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	5.02	327.122 2	327.123 2	-3.0	105.034 0, 131.049 4, 267.101 3, 309.112 2	开环
<b>M5</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	4.99	343.117 1	343.118 1	-3.0	105.034 0, 207.066 2, 167.070 3	加羟基

如图 4 所示,样品 **1** ( $C_{19}H_{16}O_4$ ) 洗脱时间为 8.48 min,准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  309.1127 (见图 6a),其二级质谱主要的特征碎片离子有  $m/z$  267.1016  $[M-C_2HO]^+$ 、179.0740  $[M+H-C_9H_6O]^+$ 、131.0491  $[M-C_{10}H_9O_3]^+$ 、105.1155  $[M-C_{12}H_{11}O_3]^+$  (见图 7a);可能的裂解途径见图 8。利用代谢产物与原型药具有相似的断裂途径, $m/z$  131.0491、178.0630、105.1155 可作为快速鉴别样品 **1** 体内代谢产物的特征性离子。

**M1** 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  311.1277 (图 6b),推测其分子式为  $C_{19}H_{18}O_4$ ,比化合物 **1** 分子质量多 2 Da,推断为化合物 **1** 加上两个 H 而成。其二级质谱主要的特征碎片离子(见图 9)有  $m/z$  269.1076、191.0703、105.0335。其中  $m/z$  269.1076 为 **M1** 去掉左侧呋喃环结构,比化合物 **1** 的原药碎片  $m/z$  267.1016 多 2 Da,其中  $m/z$  191.0703 为 **M1** 左侧的苯环和呋喃环的结构, $m/z$  105.0335 为 **M1** 右侧的苯环外连接一个羰基的结构,从两个碎片上看还原所加的两个 H 原子未加到两侧的苯环、呋喃环及羰基上,由上推测 **M1** 可能为化合物 **1** 的中间双键加氢还原代谢产物,后经合成 **M1** 后确证。

**M2** 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  299.1273 (见图 6c),推测其分子式为  $C_{18}H_{18}O_4$ ,比化合物 **1** 分子质量少了 10 Da,推断为化合物 **1** 结构中呋喃环打开后掉甲基而形成。其二级质谱主要的特征碎片

离子(见图 10)有  $m/z$  267.1016、105.0335。其中  $m/z$  267.1016 为 **M2** 去掉左侧的呋喃环的结构, $m/z$  105.0335 为 **M2** 右侧的苯环外连接一个羰基的结构,掉的甲基确认在呋喃环上,由上推测 **M2** 可能为化合物 **1** 的呋喃环打开掉甲基形成。

**M3** 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  279.1011 (见图 6d),推测其分子式为  $C_{18}H_{14}O_3$ ,比化合物 **1** 分子质量少了 30 Da,推断为化合物 **1** 结构中去掉甲氧基而形成。其二级质谱主要的特征碎片离子(见图 11)有  $m/z$  251.1067、201.0551、105.0340。其中  $m/z$  251.1067 碎片可能为 **M3** 去掉左侧的呋喃环打开后去掉甲基及 O 原子的结构, $m/z$  201.0551 碎片可能为 **M3** 去掉右侧苯环的结构, $m/z$  105.0335 为 **M3** 右侧的苯环外连接一个羰基的结构,由上推测 **M3** 可能为化合物 **1** 去甲氧基形成。

**M4** 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  327.1222 (见图 6e),推测其分子式为  $C_{19}H_{18}O_5$ ,比化合物 **1** 分子质量多了 18 Da,推断为化合物 **1** 结构中加 O 及 2 个 H 原子而形成。其二级质谱主要的特征碎片离子(见图 12)有  $m/z$  309.1122、267.1013、131.0494、105.0340。其中  $m/z$  309.1122 碎片可能为 **M4** 去掉左侧的呋喃环打开后去掉 O 原子形成, $m/z$  267.1013 碎片可能为 **M4** 去掉左侧苯环的结构醛基, $m/z$  105.0335 为 **M4** 右侧的苯环外连接一个羰基的结构,由上推测 **M4** 可能为化合物 **1** 呋喃环开环形成。

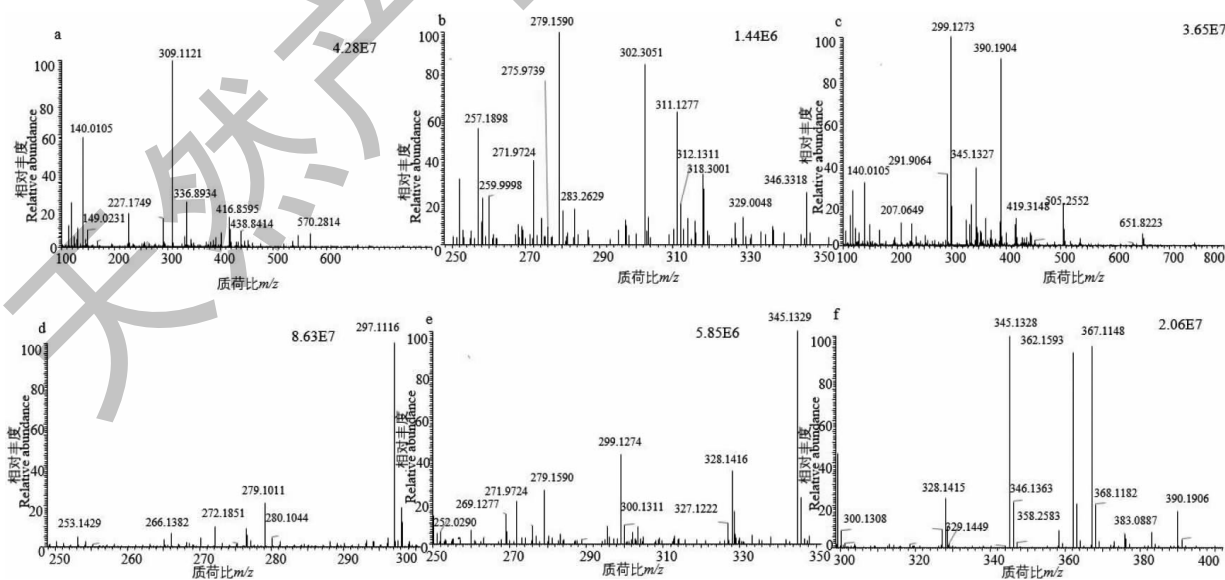


图 6 化合物 **1** 及代谢产物的一级质谱图

Fig. 6 The MS spectra of **1** and metabolites

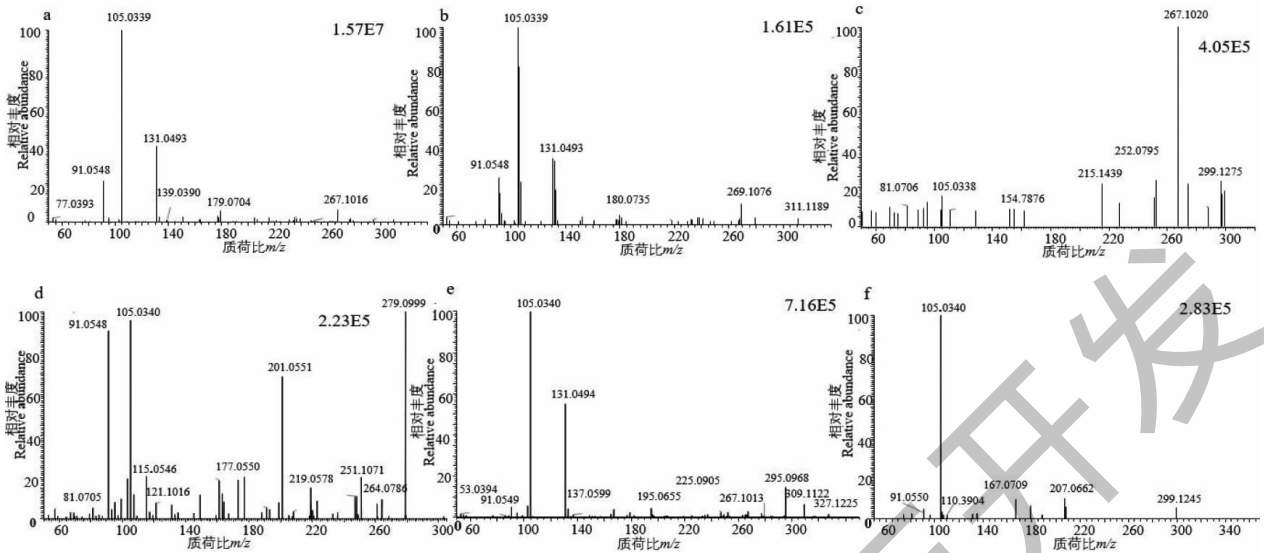


图7 化合物1及代谢产物的二级质谱图

Fig. 7 The MS/MS spectra of 1 and metabolites

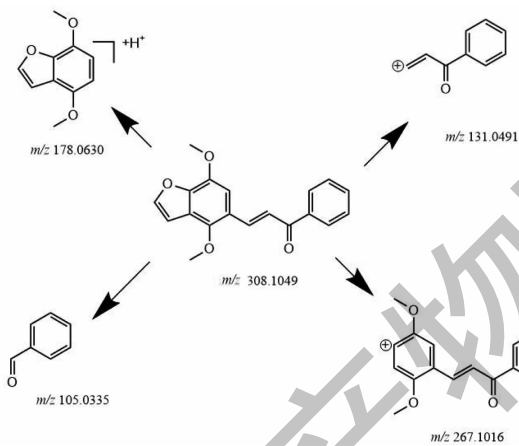


图8 样品1可能的裂解机制

Fig. 8 Possible fragmentation pathways of compound 1

**M5** 的准分子离子峰为  $[M + H]^+$   $m/z$  343.1181 (图 6f), 推测其分子式为  $C_{19}H_{18}O_6$ , 比化合物 **1** 分子质量多了 34 Da, 推断为 **M1** 结构中加 2 个羟基而形成。其二级质谱主要的特征碎片离子 (见图 13) 有  $m/z$  207.0662、167.0703、105.0340。其中  $m/z$  309.1122 碎片可能为 **M5** 中间链接羟基的碳链断裂形成,  $m/z$  167.0703 碎片可能为 **M5** 左侧苯环上的呋喃环打开形成,  $m/z$  105.0335 为 **M5** 右侧的苯环外连接一个羰基的结构, 由上推测 **M5** 为 **M1** 加两个羟基形成。

## 2.4 药代动力学

按照经过方法学验证的 UFLC-MS/MS 方法测定大鼠尾静脉样品 **1** 给药后 (10 mg/kg) 的各个时间

点的血药浓度, 采用 DAS 2.0 进行计算药代动力学参数, 并采用非房室模型对药物在大鼠体内的动力学过程进行拟合, 尾静脉注射样品 **1** 后, 测定大鼠血浆中的样品 **1** 及 **M1** 的浓度, 药时曲线见图 14。样品 **1** 的最大血药浓度  $C_{max} = 405.962 \mu\text{g/L}$ , 达峰时

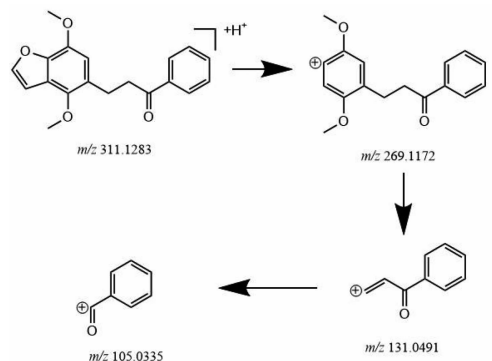


图9 M1可能的裂解机制

Fig. 9 Possible fragmentation pathways of M1

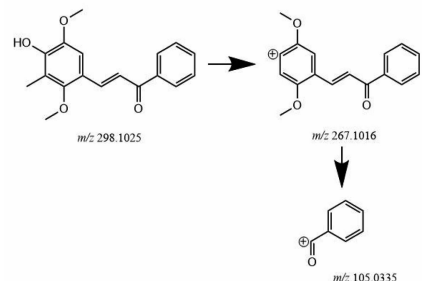


图10 M2可能的裂解机制

Fig. 10 Possible fragmentation pathways of M2



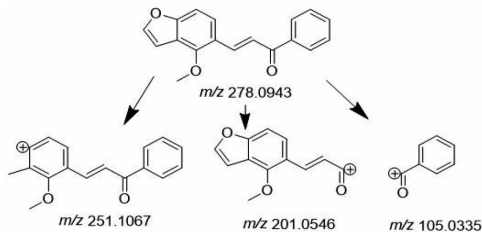


图 11 M3 可能的裂解机制

Fig. 11 Possible fragmentation pathways of M3

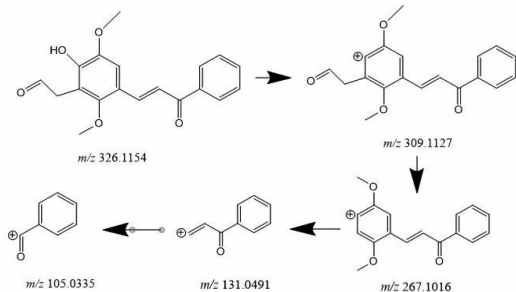


图 12 M4 可能的裂解机制

Fig. 12 Possible fragmentation pathways of M4

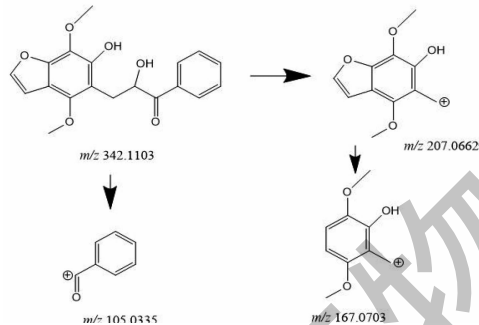


图 13 M5 可能的裂解机制

Fig. 13 Possible fragmentation pathways of M5

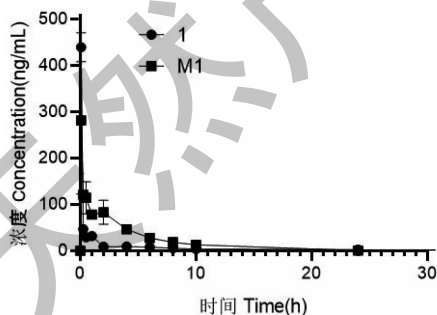


图 14 样品 1 及 M1 在大鼠体内的药时曲线图 (n = 6)

Fig. 14 Concentration-time profiles of compound 1 and M1 in rats (n = 6)

间  $T_{max} = 0.083$  h, 半衰期  $T_{1/2} = 3.738$  h, 药时曲线下面积  $AUC_{0-t} = 190.635$   $g/(L \cdot h)$ , 清除率  $Cl = 65.578$   $kg \cdot h/L$ , 表观分布容积为  $V_d = 299.378$   $L/kg$ , M1 的最大血药浓度  $C_{max} = 281.291$   $g/L$ , 达峰时

间为  $T_{max} = 0.083$  h, 半衰期  $T_{1/2} = 3.011$  h, 药时曲线下面积  $AUC_{0-t} = 561.302$   $g/(L \cdot h)$ , 清除率为  $Cl = 19.179$   $kg \cdot h/L$ , 表观分布容积为  $V_d = 79.032$   $L/kg$ , 结果表明 M1 在 5 min 时就达到了最大浓度, 样品 1 在体内转换成了代谢产物 M1, 而后 M1 浓度一直随样品 1 的减少而减少。

### 3 讨论与结论

绒毛崖豆藤是一味具有良好抗炎疗效的中药之一, 样品 1 作为其主要的抗炎成分, 国内外对其研究较少, 尚未见其体内外代谢研究相关报道。本实验使用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 方法具有较高的灵敏度及专属性, 对于代谢产物的发现及鉴定具有显著的优势, 同时鉴定出了样品 1 在小鼠、大鼠、猴、犬和人 5 个种属肝微粒体中的代谢产物为 M1、M2, 在体内有代谢产物 M1、M2、M3、M4、M5, 后根据质谱碎片推断出每个代谢产物的结构, 并采用合成的方法制得 M1, 证明推断的化合物结构准确可靠。采用 UFLC-MS/MS 法对体内样本进行定量分析, 通过方法学验证表明该方法稳定可靠, 可以快速定量检查出样本中的微量目标化合物, 相对于液相色谱法及紫外分析方法具有灵敏度更高等优势。

化合物的药代动力学参数是评价化合物的一个重要指标。通过体内外研究其主要代谢产物为 M1, 后在大鼠体内研究样品 1 及 M1 的代谢速率, 并计算其药代动力学参数, 发现样品 1 在体内转换为 M1 后再进行进一步代谢为 M5。本研究对样品 1 进行了体内外代谢产物研究, 推断出了 5 种代谢产物, 并在大鼠体内测定了样品 1 及主要代谢产物 M1 的药代动力学参数, 探究了样品 1 及 M1 在大鼠体内血浆中的变化趋势, 结果表明化合物 1 在体内不稳定, 快速代谢为 M1, 表明起抗炎作用的是其代谢产物而非自身, 本研究为其阐明体内抗炎作用物质机制提供理论依据。

### 参考文献

- 1 Shi X, Liu D, Zhang J, et al. Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara*, contribute to anti-tumor *in vitro* [J]. BMC Complem Altern M, 2016, 16 (1):245-253.
- 2 Wang CC, Wang HT, Chen LG, et al. Inhibitory effects of sindacon on rabbits atherosclerosis induced by hyperhomocysteinemia [J]. J Chin Pharm (中国药房), 2014, 25: 3866-3869.
- 3 Kwon EY, Lee J, Kim YJ, et al. Seabuckthorn leaves extract

- and flavonoid glycosides extract from Seabuckthorn leaves ameliorates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obesity[J]. *Nutrients*, 2017, 9: 569-582.
- 4 Peng Y, Tang M, Hu XM, et al. Advances in extraction of flavonoids in seabuckthorn[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 562-567.
  - 5 Qing LL, Wen XX, Li KZ, et al. A study on the anti-tumor mechanism of total flavonoids from *Radix Tetrastigmae* against additional cell line based on COX-2-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 54304-54319.
  - 6 Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 38(2): 99-107.
  - 7 Wan L, Jiang JG. Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury[J]. *J Funct Foods*, 2018, 44: 283-291.
  - 8 Garcíalafuente A, Guillamón E, Villares A, et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease[J]. *Inflamm Res*, 2009, 58: 537-552.
  - 9 Zeinali M, Rezaee SA, Hosseinzadeh H. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 998-1009.
  - 10 Ma X, Zhao M, Tang MH, et al. Flavonoids with inhibitory effects on NLRP3 inflammasome activation from *Millettia velutina*[J]. *J Nat Prod*, 2020, 1023: 8310-8319.
  - 11 Cohen LH, Remley MJ, Raunig D, et al. *In vitro* drug interactions of cytochrome P450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates[J]. *Comparative Study Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 1005-1015.
  - 12 CDE. The Guidance on Non-clinical Pharmacokinetic Study (药物非临床药代动力学研究技术指导原则)(2014-05-13). <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=21e45c8c5bacf662>.
  - 13 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol IV(中华人民共和国药典:第四部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 466.
- 
- (上接第 1260 页)
- 56 Yu ZX, et al. New phenylpropanoid and 6*H*-dibenzo[*b, d*]pyran-6-one derivatives from the stems of *Dasymaschalon rosstratum*[J]. *Fitoterapia*, 2017, 118: 27-31.
  - 57 Li CY, et al. Study the anti-HIV-1 activity of extracts from pinecone of *Pinus yunnanensis* Franch. *in vitro* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2016, 27: 774-776.
  - 58 Cui XQ, et al. Anti-HIV-1 activities of pine cone extract from *Pinus kesiya* var. *langbianensis* *in vitro*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47: 1914-1918.
  - 59 Cui XQ, et al. Anti-HIV-1 activities of extracts from walnut shell *in vitro*[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2016, 31: 2754-2758.
  - 60 Tan CJ, et al. Daphnane diterpenoids from *Trigonostemon lii* and inhibition activities against HIV-1 [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2020, 10(1): 37-44.