

# 原儿茶酸在大鼠体内代谢产物的分析

陈家全<sup>1</sup>, 王慧<sup>1,2,3</sup>, 李冬玉<sup>1</sup>, 翟小婷<sup>1,2,3</sup>, 朱粉霞<sup>2,3\*</sup>

(1. 中国药科大学分析化学教研室, 江苏南京 210009; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏南京 210028; 3. 江苏省中医药研究院, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏南京 210028)

**摘要:** 目的 分析原儿茶酸在大鼠体内的代谢产物。方法 大鼠灌胃原儿茶酸-0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液后, 通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF/MS) 法分析该成分在大鼠血浆、尿液、胆汁、粪便中的代谢产物。结果 在大鼠血浆、尿液、胆汁中, 分别发现了9、4、1个原儿茶酸代谢产物, 而粪便中未发现。结论 原儿茶酸在大鼠体内吸收入血代谢, 不经粪便原形排出。

**关键词:** 原儿茶酸; 代谢产物; 血浆; 尿液; 胆汁; 粪便; 大鼠; UPLC-QTOF/MS

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0561-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.025

## Analysis of metabolites of protocatechuic acid in rats *in vivo*

CHEN Jia-quan<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1,2,3</sup>, LI Dong-yu<sup>1</sup>, ZHAI Xiao-ting<sup>1,2,3</sup>, ZHU Fen-xia<sup>2,3\*</sup>

(1. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3. State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**KEY WORDS:** protocatechuic acid; metabolites; plasma; urine; bile; feces; rats; UPLC-QTOF/MS

原儿茶酸是天然存在于许多食品和中药中的一种水溶性酚酸成分<sup>[1-4]</sup>, 并且是很多中药的活性物质, 其不仅具有抗血小板凝集、降低心肌耗氧量、提高心肌耐氧能力、减慢心率、抑菌、镇痛等药理活性<sup>[5-7]</sup>, 还具有抗氧化、抗肿瘤和神经保护作用<sup>[8-9]</sup>。

天然药物有效成分在体内代谢方式和途径的研究是阐明其作用机理、实现中药现代化的重要内容, 故有必要对其体内代谢过程进行系统地研究, 阐明其作用形式。目前, 有关原儿茶酸体内代谢的研究较少<sup>[10]</sup>, 并未系统考察其在体内的代谢情况。

体内代谢研究的传统方法是采用柱色谱分离代谢产物, 再以核磁、质谱等技术鉴定, 这种方法虽然准确性高, 但非常耗时费力。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF/MS) 法具有快速准确、灵敏度高、专属性好等特点, 可提供多

种结构相关信息, 结合基于质量亏损滤过为基础的代谢物寻找软件可快速寻找目标代谢物, 已广泛用于生物样品的体内代谢研究<sup>[11-14]</sup>。本实验采用该方法系统地鉴定原儿茶酸在大鼠血、尿、胆汁和粪便中的代谢物, 以探索其体内代谢途径和机制。

### 1 仪器与试药

1.1 仪器 UPLC Acuity<sup>TM</sup> 系统、Synapt G2-S Q-TOF/MS 仪 (配有 Lock-spray 接口、电喷雾离子源、MassLynx 4.1 质谱工作站软件) (美国 Waters 公司); Micro CL 21 离心机 (美国 ThermoFisher Scientific 公司); IKA Vortex Genius 3 涡旋混合器 (德国 IKA 公司); MT5 分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); N-EVAP 112 氮吹仪 (美国 Organamation 公司); Milli-Q 超纯水纯化系统 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试药 原儿茶酸购自上海原叶生物有限公司。

收稿日期: 2016-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81203001)

作者简介: 陈家全 (1978—), 男, 硕士, 副教授, 从事中药体内物质基础和质量控制研究。Tel: (025) 86185150, E-mail: brunochen@cpu.edu.cn

\* 通信作者: 朱粉霞 (1977—), 女, 副研究员, 从事药效物质基础研究。Tel: (025) 85637809, E-mail: zfxcj@126.com

甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯（德国 Merck 公司）；其他试剂均为市售分析纯。

1.3 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠，体质量  $(250 \pm 10) \text{ g}$ ，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，许可证号 SYXK (苏) 2016-0011。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm)；流动相 0.1% 甲酸 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 2% ~ 10% B; 5 ~ 17 min, 10% ~ 38% B; 17 ~ 18 min, 38% ~ 100% B)；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；自动进样器温度 4 °C；进样量 4 μL。

2.2 质谱条件 ESI 离子源；扫描方式为负离子模式；毛细管电压 -2.5 kV；锥孔电压 40 V；离子源温度 100 °C；去溶剂化气体积流量 800 L/h；去溶剂化气流温度 450 °C；锥孔气体积流量 50 L/h；母离子碰撞能量 4 V；碎片离子碰撞能量 20 ~ 50 V；质量扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 000；扫描时间 0.2 s。

2.3 样品采集 取健康 SD 大鼠，随机平均分成空白组和给药组。给药组于给药前禁食 12 h，按 50 mg/kg 剂量灌胃给予原儿茶酸-0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液，空白组灌胃给予 0.5% 羧甲基纤维素钠。一组空白组和给药组大鼠灌胃后，于 0.5、1、2、4、8、12 h 后眼眶取血；一组置于代谢笼中，收集 0 ~ 12 h 内的尿液和粪便样品；最后一组随即进行胆管插管手术，收集 0 ~ 4、4 ~ 8、8 ~ 12 h 的胆汁样品。

## 2.4 生物样品处理

2.4.1 血浆 眼眶取血，置于含 1% 肝素钠生理盐水的离心管中，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液 200 μL，加入 3 倍量甲醇，涡旋 3 min，12 000 r/min 离心 10 min，45 °C 水浴下氮气吹干，-70 °C 冰箱中保存。分析前，200 μL 甲醇复溶，涡旋，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

2.4.2 尿液 取尿液 2 mL，加入 3 倍量甲醇摇匀，超声 30 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，45 °C 水浴下氮气吹干，-70 °C 冰箱中保存。分析前，1 mL 甲醇复溶，涡旋，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

2.4.3 胆汁 取胆汁 1 mL，加入 3 倍量甲醇摇匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，45 °C 水浴下氮气吹干，-70 °C 冰箱中保存。分析前，1 mL 甲醇复溶，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

2.4.4 粪便 称取粪便约 1 g，加入 5 mL 甲醇，超声提取 30 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，45 °C 水浴下氮气吹干，-70 °C 冰箱中保存。分析前，1 mL 甲醇复溶，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

## 3 结果

3.1 原儿茶酸质谱行为 图 1 显示，原儿茶酸色谱峰保留时间为 3.75 min。负离子检测模式下，其分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^- m/z 153.0195$ ，主要碎片离子  $m/z 109.0293$ ，为原儿茶酸丢失 1 分子  $\text{CO}_2$  所产生的碎片离子。

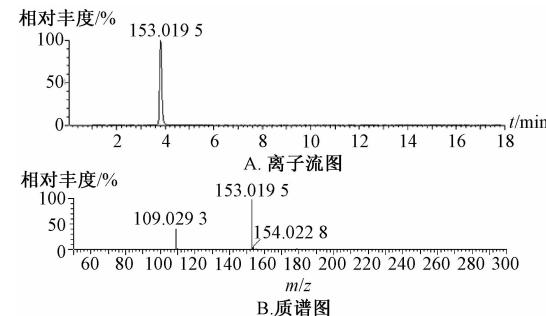


图 1 UPLC-QTOF/MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-QTOF/MS chromatograms

3.2 大鼠血浆中代谢产物鉴定 与空白生物样品相比，给药后大鼠血浆中除了原形药 (P0) 外，还检测到 9 个代谢产物 (P1 ~ P9)，具体见图 2 和表 1。

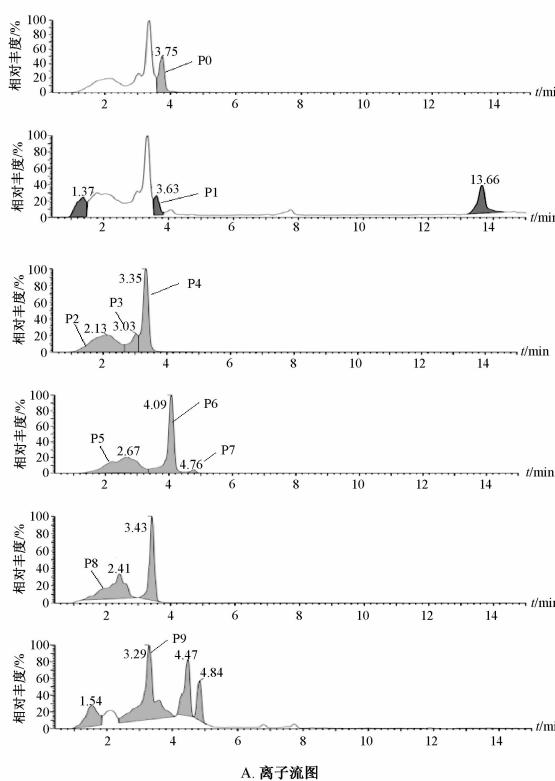
表 1 大鼠血浆中代谢产物的质谱数据

Tab. 1 MS data of metabolites in rat plasma

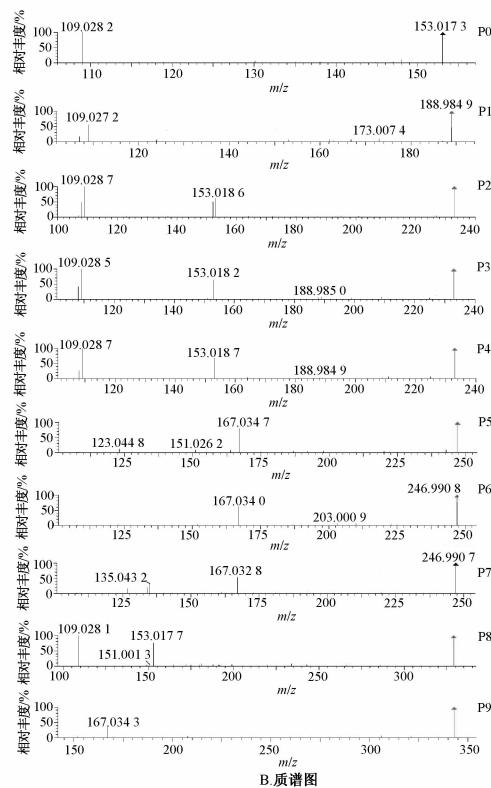
序列	分子式	$t_{\text{R}}/\text{min}$	理论值 $m/z$	测量值 $m/z$	偏差 ( $\times 10^{-6}$ )
P0	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	3.75	153.0182	153.0173	-1.4
P1	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_5\text{S}$	3.63	188.9852	188.9849	-4.2
P2	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_7\text{S}$	2.13	232.9750	232.9747	-3.9
P3	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_7\text{S}$	3.03	232.9750	232.9750	-2.7
P4	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_7\text{S}$	3.35	232.9750	232.9751	-2.2
P5	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_7\text{S}$	2.67	246.9906	246.9911	-0.7
P6	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_7\text{S}$	4.09	246.9906	246.9908	-1.5
P7	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_7\text{S}$	4.76	246.9906	246.9907	-1.5
P8	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_{10}$	2.41	329.0503	329.0501	-2.4
P9	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$	3.29	343.0660	343.0658	-2.2

P0：保留时间、质谱图均和原形药相同，原形药的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^- m/z 153$  和特征碎片离子  $m/z 109$  也均出现。由此可知，其是未经代谢的原形药。

P1：原儿茶酸有 3 个-OH，易与硫酸结合。根据 TOF/MS 给出的分子组成以及碎片信息，其为原儿茶酸失去 1 分子  $\text{CO}_2$  后形成的  $O$ -硫酸酯化合物，



A. 离子流图



B. 质谱图

图2 大鼠血浆中的代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways in rat plasma

2个碎片峰 $m/z$  173、109分别为P1丢失-OH、-SO<sub>3</sub>所致。

P2~P4: 在 $m/z$  232的离子流图中, 可以检测到3个色谱峰, 保留时间分别为2.13、3.03、3.35 min。根据准确相对分子质量, 其分子式组成比原形增加SO<sub>3</sub>, 故推测其为原儿茶酸的硫酸结合物, 由于有3个羟基, 故就生成3个异构体。而且, 它们均能生成原形 $m/z$  153和特征碎片 $m/z$  109, 前者是代谢产物失去-SO<sub>3</sub>所致, 而后者为代谢产物进一步失去一分子CO<sub>2</sub>所致。

P5~P7: 在 $m/z$  246的离子流图中, 可以检测到3个色谱峰, 保留时间分别为2.67、4.09、4.76 min。根据准确相对分子质量, 其分子式组成比P2~P4增加CH<sub>2</sub>, 故推测其为P2~P4在大鼠体内生成的O-甲基结合物, 由于有3个羟基, 故产生3个异构体代谢产物。其中, P5产生碎片离子 $m/z$  167、151, 分别为失去-SO<sub>3</sub>、OH; P6产生碎片离子 $m/z$  203、167, 分别为失去CO<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>; P7产生碎片离子 $m/z$  167、135, 分别为失去-SO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O。

由于原儿茶酸上有羟基, 故容易发生葡糖醛酸化。P8为原儿茶酸的葡糖醛酸化产物, 其产生的2

个碎片离子为 $m/z$  153、109, 分别为失去葡糖醛酸基GlcUA、CO<sub>2</sub>所致。

P9( $m/z$  343.065 8)比P8多14, 其极性比P8小, 而且其产生的碎片离子 $m/z$  167也比P8 $m/z$  153多14, 故推测P9为P8的O-甲基结合物。

3.3 大鼠尿液中代谢产物鉴定 与空白生物样品相比, 给药后大鼠尿中未检测到原形药, 但检测到4种代谢产物, 见表2和图3。其中, 3种代谢产物(U1、U3和U4)与血浆中相同, 而U2仅在尿中检测到。

表2 大鼠尿液中代谢产物的质谱数据

Tab. 2 MS data of metabolites in rat urine

序列	分子式	$t_R$ /min	理论值 $m/z$	测量值 $m/z$	偏差 ( $\times 10^{-6}$ )
U1	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	3.63	188.985 2	188.985 6	0.6
U2	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S	3.25	230.995 7	230.995 8	0.2
U3	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	2.67	246.990 6	246.990 9	-1.5
U4	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	3.29	343.066 0	343.066 2	-1.0

U2的保留时间为3.25 min, 其准确相对分子质量比P6少16, 而且其碎片离子 $m/z$  151也比P6 $m/z$  167少16, 确认其是去羟基产物。同时, 碎片离子 $m/z$  137为失去-CH<sub>2</sub>所致。

3.4 大鼠胆汁中代谢产物鉴定 与空白生物样品

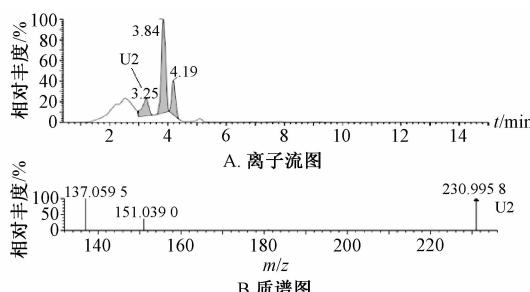


图3 大鼠尿液中的代谢途径

Fig.3 Metabolic pathways in rat urine

相比,给药后大鼠胆汁中仅检测到1个代谢产物B1(表3), $m/z$  343.0652,其准确相对分子质量和离子碎片都与血浆中的P9相同,故推测为同一代谢产物。

表3 大鼠胆汁中代谢产物的质谱数据

Tab. 3 MS data of metabolites in rat bile

序列	分子式	$t_R$ /min	理论值 $m/z$	测量值 $m/z$	偏差 ( $\times 10^{-6}$ )
B1	$C_{14}H_{16}O_{10}$	3.29	343.0660	343.0652	-0.7

3.5 大鼠粪便中代谢产物鉴定 未检测到代谢产物。

#### 4 讨论和结论

根据待测成分的性质,本实验选择乙腈和0.1%甲酸作为流动相, pH适宜,峰形良好,响应值较高。再采用正负离子模式扫描,发现负离子模式响应较好。

本实验利用UPLC-QTOF/MS法对原儿茶酸在大鼠体内的代谢产物进行了全面研究,发现其主要代谢途径是原儿茶酸上的羟基与硫酸和葡萄糖醛酸结合,以及生成O-甲基化结合物。而且,在大鼠不同部位检测到的代谢产物有一定差异,其中血浆和尿液中的代谢产物较丰富,前者检测到9个代谢产物,后者检测到4个,同时胆汁中检测到1个,而该成分在大鼠体内吸收入血代谢,不经粪便原形排出。具体见图4。

#### 参考文献:

- [1] Irakli M N, Samanidou V F, Biliaderis C G, et al. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction [J]. *Food Chem*, 2012, 134(3): 1624-1632.  
 [2] 游勇基,程广强,陈铭辉.丹参注射剂中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛和丹酚酸B的同时测定[J].药物分析杂志,2004,24(1): 46-49.

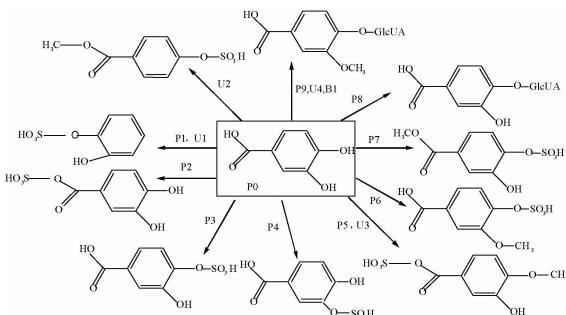


图4 原儿茶酸在大鼠体内的代谢产物

Fig.4 Metabolites of protocatechuic acid in rats *in vivo*

- [3] 张敏,刘翠婷,严萍,等.快速液相法同时测定鸡血藤原儿茶酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J].广州中医药大学学报,2014,31(3): 439-447.  
 [4] Zhu F, Chen J, Wang J, et al. Qualitative and quantitative analysis of the constituents in Danmu preparations by UPLC-PDA-TOF-MS[J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(8): 862-871.  
 [5] Zhou Z, Liu Y, Miao A D, et al. Protocatechuic aldehyde suppresses TNF-alpha-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 513(1-2): 1-8.  
 [6] 周燕园. HPLC法测定烫狗脊配方颗粒中原儿茶酸和原儿茶醛[J]. 中成药, 2012, 34(9): 1822-1825.  
 [7] Shin M S, Kang E H, Lee Y I. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes[J]. *Antiviral Res*, 2005, 67(3): 163-168.  
 [8] 贾晓斌,朱静,黄洋,等. HPLC法同时测定透骨灵橡胶膏中槲皮素、原儿茶酸和乌头碱[J]. 中成药, 2011, 33(11): 1927-1930.  
 [9] 于洁,董娟妮,吴一振,等.石菖蒲对大鼠中丹参素和原儿茶酸药动学的影响[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2126-2129.  
 [10] 姜璇,金艺,袁波,等.复方丹参滴丸的体内代谢产物分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(2): 126-131.  
 [11] 赵磊,陈剑,印敏,等.UPLC-Q-TOF-MS法分析枇杷叶的倍半萜苷类化合物[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1498-1502.  
 [12] 杜迎翔,殷蓉,朱粉霞,等.UPLC-PDA-QTOF/MS分析肌注胆木注射液后大鼠血浆中的分布[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2339-2344.  
 [13] Ni S, Qian D, Duan J, et al. UPLC-QTOF/MS-based screening and identification of the constituents and their metabolites in rat plasma and urine after oral administration of *Glechoma longituba* extract[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(28): 2741-2750.  
 [14] Jin X, Li S L, Zhang Z H, et al. Characterization of metabolites of 20 (S)-protopanaxadiol in rats using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 933: 59-66.