

鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物

谢 岑, 钟大放, 陈笑艳*

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 绿原酸为多种中药注射液的主要成分, 本文采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法 (UPLC/Q-TOF MS) 鉴定大鼠注射给予绿原酸后胆汁、尿、粪和血浆中的代谢产物。利用碰撞能量梯度 (MS^E) 和质量亏损过滤 (MDF) 技术, 在大鼠胆汁、尿、粪和血浆中共检测到 35 种代谢产物。胆汁中主要代谢产物为 *O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物, 其排泄量超过胆汁中全部代谢物的 80%, 尿中主要为原形、*O*-甲基结合物、水解代谢产物及葡萄糖醛酸结合物, 粪中主要为 *O*-甲基结合物及其半胱氨酸结合物, 血浆中主要为原形化合物。绿原酸及其代谢产物经尿和粪便排泄比例相近。实验结果表明, 绿原酸在大鼠体内代谢广泛, 主要途径之一是与谷胱甘肽结合, 提示绿原酸的烯酮双键具有亲电性, 可能与蛋白的巯基共价结合, 导致过敏性不良反应, 应予以关注。

关键词: 绿原酸; UPLC/Q-TOF MS; 代谢产物; 谷胱甘肽结合物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0088-08

Metabolites of injected chlorogenic acid in rats

XIE Cen, ZHONG Da-fang, CHEN Xiao-yan*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Chlorogenic acid (5-CQA) is one of the major components in some Chinese herbal injections. However, the metabolism of 5-CQA in rats after intravenous injection has not been determined. An ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS) method was applied to identify the metabolites in bile, urine, feces and plasma after a single intravenous administration of 10 mg·kg⁻¹ 5-CQA to rats. Using MS^E and mass defect filter techniques, a total of 35 metabolites were detected in bile, urine, feces and plasma. The predominant metabolites in bile were glutathione conjugates of *O*-methyl-5-CQA, accounting for approximately 80% of the metabolites excreted in bile. The major components in urine were parent drug, *O*-methyl-5-CQA, hydrolyzed metabolites and glucuronide conjugates. The major components in feces were *O*-methyl-5-CQA and its cysteine conjugates. The major component in plasma was the parent drug. The urinary and fecal excretion pathways were equally important to 5-CQA in rats. These results demonstrate that 5-CQA undergoes extensively metabolism in rats and are highly reactive to nucleophiles such as GSH. This finding indicates that attention should be paid on the injections containing 5-CQA, which may covalently bind to proteins, leading to allergenic drug reactions.

Key words: chlorogenic acid; UPLC/Q-TOF MS; metabolite; GSH conjugate

绿原酸 (chlorogenic acid, 5-caffeoylquinic acid, 5-CQA) 为清热解毒类中药注射液中最主要的咖啡酸衍生物, 是由咖啡酸和右旋奎尼酸的 5 位羟基形成的酯。绿原酸的化学结构如图 1 所示。

多种中药注射液如双黄连注射液、清开灵注射液、茵栀黄注射液、银黄注射液等均含有绿原酸, 静脉给药剂量为每次 12~40 mg。这些注射液的过敏性不良反应报道位居中药注射液的前列^[1-5]。已有一些研究表明, 绿咖啡中的绿原酸能产生过敏反应^[6, 7]。

目前, 文献^[8-10]报道了大鼠灌胃绿原酸或受试者饮用咖啡 (主要成分是绿原酸) 后血浆和尿中的

收稿日期: 2010-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873119).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50800738, E-mail: xyachen@mail.shcnc.ac.cn

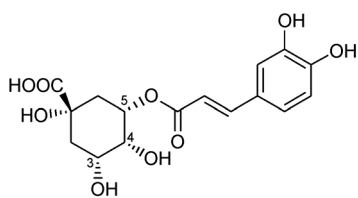


Figure 1 Structure of chlorogenic acid

代谢产物, 主要的代谢途径有水解、还原、甲基化、甘氨酸结合和葡糖醛酸结合等。静脉注射后, 绿原酸在动物或人体内的代谢尚未见报道。本文拟采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法 (UPLC/Q-TOF MS) 检测大鼠静脉注射绿原酸后, 胆汁、尿、粪和血浆中可能的代谢产物, 利用碰撞能量梯度 (MS^E) 功能, 同时完成对前体离子和产物离子的采集, 在低碰撞能量下获得精确分子量确定代谢产物的分子式组成, 在高碰撞能量下获得碎片离子^[11]; 采用质量亏损过滤 (MDF) 技术和去烷基化软件 (dealkylation) 去除内源性物质对检测代谢产物的干扰^[12]。代谢产物与原形药物具有相似的母核结构, 了解原形药物质谱裂解机制, 有助于代谢产物结构的推测, 为进一步药理学研究和安全性评价提供依据。

材料与方法

药品 绿原酸 (纯度大于 99.8%) 购于上海同田生物技术有限公司; 咖啡酸 (纯度大于 95%) 由中国科学院上海药物研究所提供; 甲醇和甲酸均为色谱纯; 水为 Millipore 超纯水, 其他试剂为市售分析纯。

仪器 美国 Waters 公司 Acquity Ultra 超高效液相色谱系统及 Synapt Q-TOF 质谱仪, 配有电喷雾电离源 (ESI)。控制软件为 Masslynx V4.1, 数据分析软件为 MetaboLynx 及 MassFragmentTM 数据处理系统。

动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 4 只, 体重 (300 ± 20) g, 由中国科学院上海药物研究所实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK-(沪) 2007-0005。

样品采集 雄性 SD 大鼠 2 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮水, 采用戊巴比妥钠麻醉后, 实施胆管插管手术, 收集空白胆汁样品。以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量经尾静脉注射绿原酸 (给药容积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 收集给药后 0~4、4~8 和 8~24 h 各时间段的胆汁样品, -80°C 冷冻保存, 待测。

雄性 SD 大鼠 2 只, 置于代谢笼中, 于给药前 12 h 禁食, 自由饮水, 收集空白尿样和粪样。以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量经尾静脉注射给予绿原酸 (给药容积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 给药后 2 h 自由进食与饮水, 分别收集给

药后 0~4、4~8 和 8~24 h 的尿样和粪样, 以及给药后 15 min 血浆样品, -80°C 冷冻保存, 待测。

收集胆汁、尿和血浆样品时, 所有的试管中均预先加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸溶液, 以维持代谢产物稳定。

生物样品处理 生物样品 (胆汁、尿和血浆) $100 \mu\text{L}$, 加入乙腈 $200 \mu\text{L}$, 涡流振荡 1 min 后, $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取出全部上清液置于 10 mL 试管中, 30°C 氮气流下吹干, 残留物以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇 (9:1) $100 \mu\text{L}$ 溶解, 取 $10 \mu\text{L}$ 进行分析。

将粪样品捣碎研磨后称取全部重量的 50%, 加入甲醇提取 (200 mg 粪样/ 1 mL 甲醇), 超声 10 min, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取出 $100 \mu\text{L}$ 上清液, 加入 $200 \mu\text{L}$ 乙腈, 涡流振荡 1 min 后, $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取出全部上清液置于 10 mL 试管中, 30°C 氮气流下吹干, 残留物以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇 (9:1) $100 \mu\text{L}$ 溶解, 取 $10 \mu\text{L}$ 进行分析。

色谱条件 色谱柱为 Luna C_{18} 柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$, $5 \mu\text{m}$), 美国 Phenomenex 公司; C_{18} 保护柱 ($3.0 \text{ mm} \times 4 \text{ mm ID}$, $5 \mu\text{m}$), 美国 Phenomenex 公司; 流动相为 A (0.1% 甲酸水溶液) 和 B (甲醇), 流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。采用梯度程序洗脱: 0~3 min, 10% B; 3~15 min, 10%~40% B; 15~16 min, 40% B; 16~18 min, 40%~90% B; 18~22 min, 90%~10% B。

质谱条件 离子源为 ESI 源, 负离子方式检测, 雾化气 (氮气) 流量为 $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 去溶剂温度为 400°C , 离子源温度为 120°C , 毛细管电压为 2.8 kV 。低能量扫描时传输碰撞能量为 3 eV , 阱碰撞能量为 5 eV ; 高能量扫描时传输碰撞能量为 10 eV 和 20 eV , 阱碰撞能量为 10 eV 。扫描范围为 m/z 80~1000。选取 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 亮氨酸-脑啡肽 (m/z 554.261 5) 作为质荷比的外标 (Lock SprayTM) 校正, 流速 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

结果

1 绿原酸对照品质谱分析

低碰撞能量质谱图 (图 2A) 中, 主要检测到绿原酸的 $[M-H]^-$ 离子 (m/z 353.087), 少量钠加合离子 $[M+Na-H]^-$ (m/z 375.069), 以及源内裂解产生的碎片离子 (m/z 191.054)。高碰撞能量质谱图 (图 2B) 中, 主要碎片离子为 m/z 191.054、179.034、135.045 和 85.029 等。 m/z 191.054 为前体离子酯键断裂生成的奎尼酸负离子, 相对丰度为 100%, 后者 C3-C4 和 C5-C6 键断裂且丢失一分子 CO_2 生成 m/z 85.029 的碎片离子; m/z 179.034 为前体离子的奎尼酸的 5 位

C-O 单键断裂产生的咖啡酸负离子, 后者进一步丢失一分子 CO_2 产生 m/z 135.045 的碎片离子。

2 大鼠胆汁中代谢产物鉴定

采用质量亏损过滤和去烷基软件技术对 UPLC/Q-TOF MS 数据进行处理。与空白生物样品相比, 在给药后大鼠胆汁中除原形药 (M0-1, m/z 353.087) 外, 检测到的代谢产物 (图 3A) 质荷比分别为 179.034 (M1)、545.144 (M2-1 和 M2-2)、488.123 (M3-1 和 M3-2)、660.171 (M4-1 和 M4-2)、674.187 (M5-1~M5-5)、500.134 (M6)、367.102 (M7-1~M7-5) 和

371.098 (M8-1 和 M8-2)。利用精确分子量和高能量下的碎片离子, 鉴定代谢产物结构。

M0-1: 在 m/z 353.087 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 15.2 min, 其色谱保留时间及高能量质谱图中的主要碎片离子均与绿原酸相同, 故确定 M0-1 为原形药物绿原酸。

M1: 在 m/z 179.034 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 16.7 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比原形减少 $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$ 。高碰撞能量下 (图 4A) 主要产生 m/z 135.043 的碎片离子, 由母体药物质谱裂解规律可知, 该碎片离子由咖啡酸负离子中性丢失一分子 CO_2 形成。通过与咖啡酸对照品比较, 确定 M1 为绿原酸酯键水解产物咖啡酸。

M7-1~M7-5: 在 m/z 367.102 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 5 个色谱峰, 保留时间分别为 15.5、16.6、18.1、18.9 和 19.6 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比原形增加 CH_2 , 推测 M7-1~M7-5 为绿原酸的甲基结合物。它们在高碰撞能量下均能生成 m/z 193.053、191.054、173.043、134.036 和 111.044 的碎片离子 (图 4B), m/z 193.053 的碎片离子分子式组成比咖啡酸负离子 (m/z 179.034) 增加 CH_2 , 为 *O*-甲基咖啡酸负离子, 它可以丢失乙酸自由基生成 m/z 134.036 的自由基离子, 因此推测甲基结合位点在儿茶酚上。体外实验发现绿原酸在中性和碱性条件下会发生酯基位置异构化, 所以推测 M7-1~M7-5 是绿原酸在大鼠体内生成 *O*-甲基结合物, 并在体内中性条件下发生酯基转移生成 3 位和 4 位的异构体。

M2-1 和 M2-2: 在 m/z 545.144 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间分别为 8.2 和 8.5 min (M2-1 和 M2-2)。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M7 增加 $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 推测 M2-1 和 M2-2 为 *O*-甲基绿原酸的半胱氨酰甘氨酸结合物。它们在高碰撞能量下均能生成 m/z 367.103 和 191.054 的碎片离子 (图 4C), 表明奎尼酸未发生代谢, 因此推测 M2-1 和 M2-2 由 *O*-甲基绿原酸的烯酮双键与半胱氨酰甘氨酸发生 Michael 加成反应形成, 结合后形成新的手性中心, 从而产生一对色谱峰。

M3-1 和 M3-2: 在 m/z 488.123 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间分别为 8.4 和 9.5 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M7 增加 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, 推测 M3-1 和 M3-2 为 *O*-甲基绿原酸的半胱氨酸结合物。它们在高碰撞能量下均能生成 m/z 387.084、367.102、191.053、173.043 和 120.011 (图 4D)。其中 m/z 387.084 的碎片离子的分子式组成

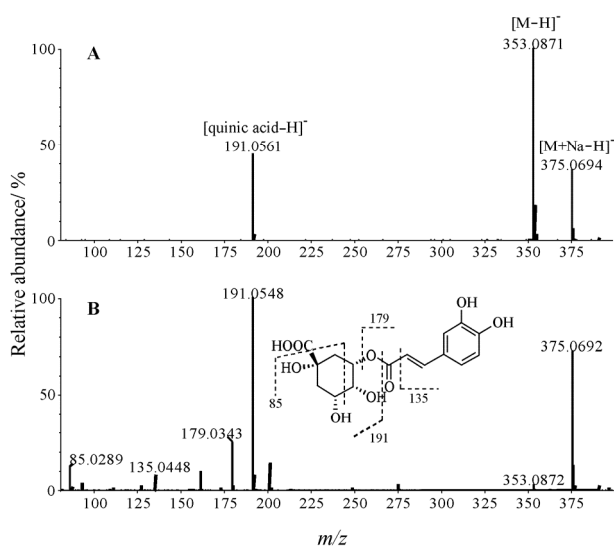


Figure 2 Q-TOF low collision energy (CE) MS^E mass spectrum (A) and high CE MS^E spectrum (B) of chlorogenic acid

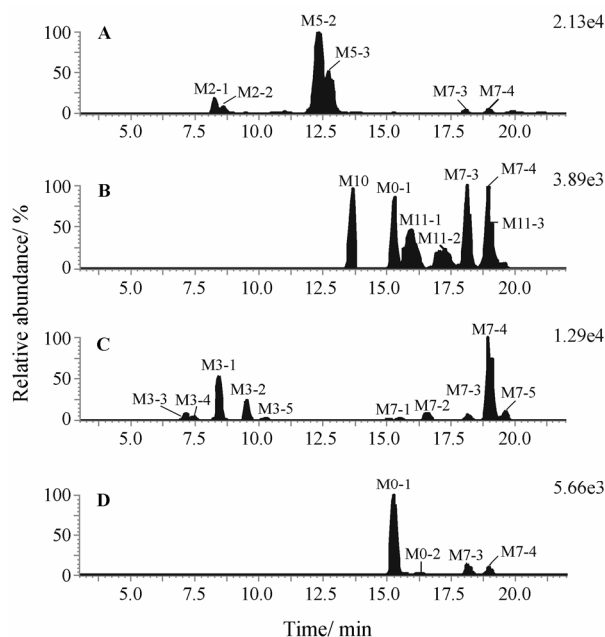


Figure 3 Combined UPLC/Q-TOF MS ion chromatograms for the metabolites in rat bile (A), urine (B), feces (C) and plasma (D)

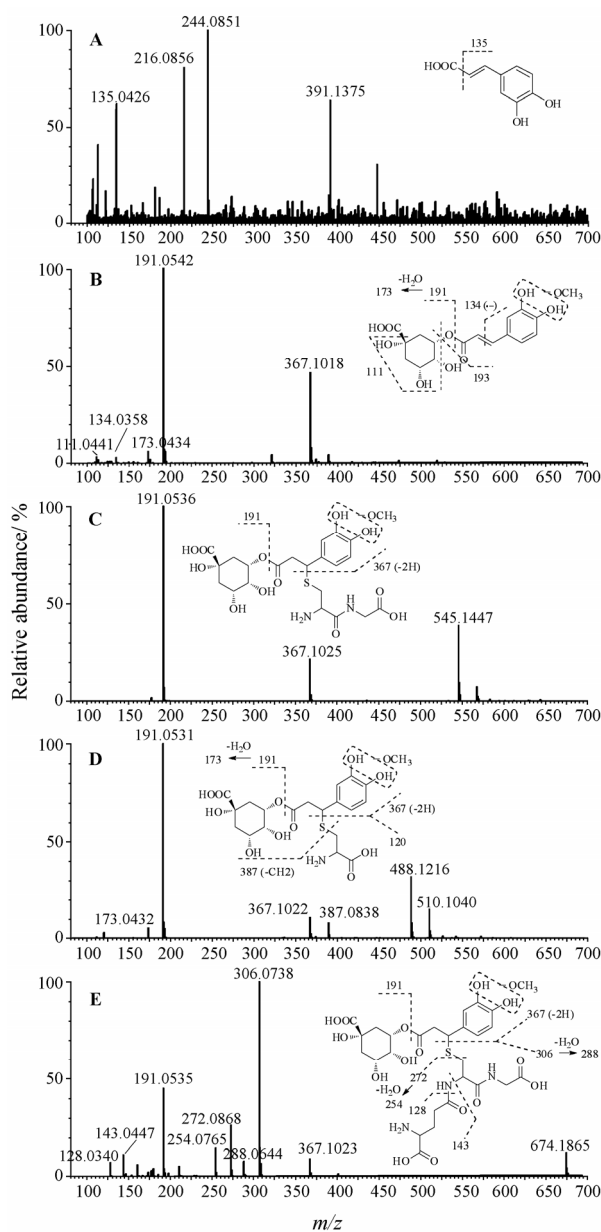


Figure 4 Q-TOF high CE mass spectra of major metabolites in rats. A: Caffeic acid, M1; B: *O*-Methyl-chlorogenic acid, M7-1~M7-5; C: Cysteinyglycine conjugates of *O*-methyl-chlorogenic acid, M2-1 and M2-2; D: Cysteine conjugates of *O*-methyl-chlorogenic acid, M3-1~M3-6; E: GSH conjugates of *O*-methyl-chlorogenic acid, M5-1~M5-5

比 M7 增加 H_2S , 减少 CH_2 , 表明巯基加成在烯酮双键上, m/z 120.011 为半胱氨酸负离子, 因此推测 M3-1 和 M3-2 由 *O*-甲基绿原酸的烯酮双键与半胱氨酸发生 Michael 加成反应形成。

M5-1~M5-5: 在 m/z 674.187 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 5 个色谱峰, 保留时间分别为 11.0、12.3、12.7、13.7 和 14.2 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M7 增加 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, 推测 M5-1~M5-5 为 *O*-甲基绿原酸的谷胱甘肽结合物。它们在高

碰撞能量下均能生成 m/z 367.102、306.074、288.064、272.087、254.077、191.054、143.045 和 128.034 的碎片离子 (图 4E)。其中 m/z 306.074、288.064、272.087、254.077、143.045 和 128.034 均为谷胱甘肽分子在负离子检测模式下的特征碎片离子, 推测 M5-1~M5-5 由 *O*-甲基绿原酸及其位置异构体的烯酮双键与谷胱甘肽发生 Michael 加成反应形成。在负离子检测模式下, 谷胱甘肽结合物会产生特征的碎片离子 (m/z 272.087 和 254.077), 对其进行前体离子扫描, 可以更有效地检测谷胱甘肽结合物^[13]。根据这一原理, 除 M5-1~M5-5 外, 还鉴定了绿原酸的谷胱甘肽结合物 (m/z 660.171, M4-1 和 M4-2) 和 *O*-甲基咖啡酸的谷胱甘肽结合物 (m/z 500.134, M6)。

M8-1 和 M8-2: 在 m/z 371.098 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间分别为 20.0 和 20.9 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M1 增加 $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。它们在高碰撞能量下均能生成 m/z 195.062 和 191.054 的碎片离子。根据 m/z 195.062 的碎片离子的分子式组成, 推测其为 *O*-甲基二氢咖啡酸负离子, 同时它比前体离子减少葡萄糖醛酸分子, 因此推测 M8-1 和 M8-2 为 *O*-甲基二氢咖啡酸的葡萄糖醛酸结合物。

3 大鼠尿中代谢产物鉴定

与空白生物样品相比, 在给药后大鼠尿中除原形药外检测到的代谢产物 (图 3B) 质荷比分别为 353.086 (M0-2 和 M0-3)、179.034 (M1)、545.144 (M2-1 和 M2-2)、367.102 (M7-1~M7-5)、371.098 (M8-1)、181.051 (M9)、357.083 (M10)、369.081 (M11-1~M11-3)、221.044 (M12) 和 236.056 (M13)。其中, 9 种代谢产物 (M1、M2-1 和 M2-2、M7-1~M7-5、M8-1) 与胆汁中相同, M0-2 和 M0-3、M9~M13 仅在尿中检测到。

M0-2 和 M0-3: 在 m/z 353.087 的提取离子流色谱图 (图 5) 中, 除 M0-1 外, 还可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间分别为 12.5 和 16.3 min。根据精确分子质量, 其分子式组成与原形相同, 推测 M0-2 和 M0-3 为绿原酸的异构体。M0-1 对应的高能量质谱图 (图 6A) 中, m/z 191.055 的碎片离子为基峰, m/z 179.034 的碎片离子的丰度 <5%; 与 M0-1 不同, 在 M0-2 对应的高能量质谱图 (图 6B) 中, m/z 191.055 的碎片离子为基峰, m/z 179.034 的碎片离子的丰度 >50%; 在 M0-3 的高能量质谱图 (图 6C) 中, m/z 173.044 的碎片离子为基峰。通过与参考文献^[14, 15]对

比, 确定 M0-2 和 M0-3 为绿原酸的位置异构体, 即新绿原酸 (3-caffeoylquinic acid, 3-CQA) 和隐绿原酸 (4-caffeoylquinic acid, 4-CQA)。对大鼠给药的溶液样品进行 UPLC/Q-TOF MS 分析, 在 m/z 353.087 的提取离子流色谱图 (图 5A) 中仅检测到绿原酸, 未检测到新绿原酸和隐绿原酸, 表明 M0-2、M0-3 是由绿原酸 (M0-1) 在体内发生酯基位置异构化而产生的。

M9: 在 m/z 181.051 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 16.1 min。根据精确

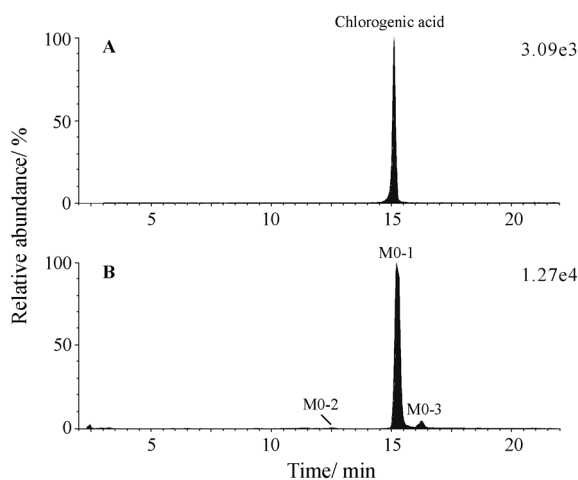


Figure 5 Extracted ion chromatograms for the ion at m/z 353.087 ($[M-H]^-$) in the injection solution (A) and rat urine (B)

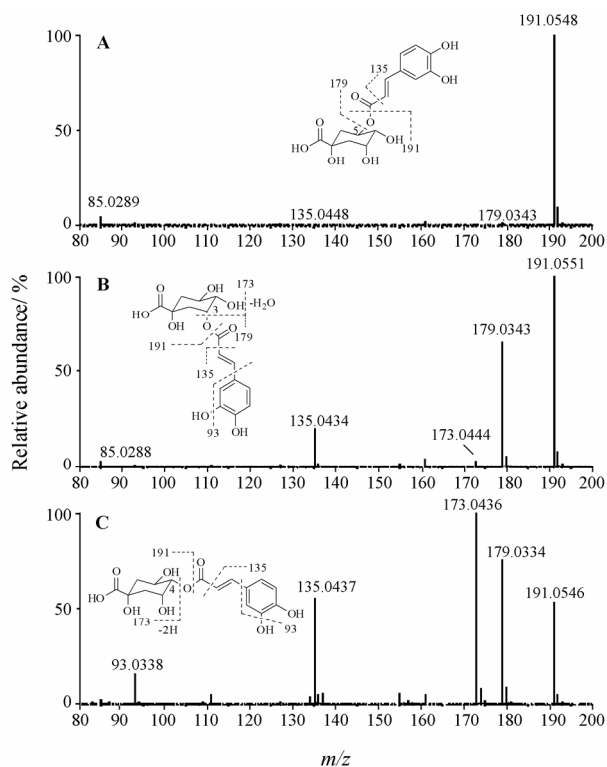


Figure 6 Q-TOF high CE mass spectra of M0-1 (A), M0-2 (B), and M0-3 (C) in urine

分子质量, 其分子式组成比 M1 增加 2H, 推测 M9 为 *O*-甲基二氢咖啡酸。

M10: 在 m/z 357.083 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 13.1 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M9 增加 $C_6H_8O_6$, 推测 M10 为 *O*-甲基二氢咖啡酸的葡萄糖醛结合物。

M11-1~M11-3: 在 m/z 369.081 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 3 个色谱峰, 保留时间分别为 15.9、17.3 和 19.0 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M1 增加 $C_7H_{10}O_6$, 它们在高碰撞能量下均能生成 m/z 193.048、191.054、173.044 等碎片离子。其中 m/z 193.048 的碎片离子比 M1 的分子式组成增加 CH_2 , 比前体离子 m/z 369.081 的分子式组成减少 $C_6H_8O_6$, 即葡萄糖醛酸分子, 因此推测 M11-1~M11-3 为 *O*-甲基咖啡酸的葡萄糖醛结合物。

M12: 在 m/z 221.044 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 17.0 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M1 增加 C_2H_2O , 推测 M12 为乙酰化咖啡酸。

M13: 在 m/z 236.056 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 17.8 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比 M1 增加 C_2H_3NO , 推测 M13 为咖啡酸的甘氨酸结合物。

4 大鼠粪中代谢产物鉴定

与空白生物样品相比, 在给药后大鼠粪中未检测到原形药, 检测到的代谢产物 (图 3C) 质荷比分别为 545.144 (M2-2)、488.123 (M3-1~M3-6)、367.102 (M7-1~M7-5)、355.100 (M14)。其中, 8 种代谢产物 (M2-2、M3-1 和 M3-2、M7-1~M7-5) 与胆汁中相同, 另 5 种代谢产物 (M3-3~M3-6 和 M14) 仅在粪中检测到。

M3-3~M3-6: 在 m/z 488.123 的提取离子流色谱图中, 除 M3-1 和 M3-2 外, 还可以检测到 4 个色谱峰, 保留时间分别为 7.1、7.5、10.3 和 11.2 min。它们与 M3-1 和 M3-2 具有相同的分子式组成和相近的碎片离子, 故推测 M3-3~M3-6 由 *O*-甲基绿原酸异构体的烯酮双键与半胱氨酸发生 Michael 加成反应形成。

M14: 在 m/z 355.100 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 14.9 min。根据精确分子质量, 其分子式组成比原形增加 2H, 推测 M14 为二氢绿原酸。

5 大鼠血浆中代谢产物鉴定

与空白生物样品相比, 在给药后 15 min 大鼠血浆中除原形药物外检测到的代谢产物 (图 3D) 质荷

比分别为 353.087 (M0-3) 和 367.102 (M7-3 和 M7-4), 与尿中检测到的代谢产物相同。

综上所述, 经过 UPLC/Q-TOF MS 分析, 在大鼠静脉注射给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 绿原酸后的胆汁、尿、粪和血浆样品中, 除原形药物外共检测到了 35 种代谢产物。胆汁中主要代谢产物为 *O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物, 尿中主要为原形、*O*-甲基结合物、水解代谢产物及葡萄糖醛酸结合物, 粪中主要为 *O*-甲基结合物及其半胱氨酸结合物, 血浆中主要为原形化合物。绿

原酸在大鼠体内的代谢产物信息见表 1, 推测的代谢途径见图 7。

讨论

Azuma 等^[16]报道, 大鼠以 $248 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予绿原酸后, 在血浆中只检测到少量咖啡酸和阿魏酸的结合物, 未检测到原形药物。而以 $248 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予咖啡酸, 吸收较好, 在血浆中可以检测到原形和多种代谢产物。因此推测绿原

Table 1 Identification of metabolites in rats after a single intravenous dose of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ chlorogenic acid using UPLC/Q-TOF MS

No.	Metabolic pathway	<i>m/z</i> Found	Formula	mDa	PPM	Time /min	Rel. peak area (%)				
							Bile 0-4 h	Urine		Feces 4-8 h	Plasma 15 min
								0-4 h	4-8 h		
M0-1	Parent (5-CQA)	353.086	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	-1.2	-3.3	15.2	0.4	31.9	16.4		81.9
M0-2	3-Caffeoylquinic acid (3-CQA)	353.084	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	-3.5	-9.8	12.5		0.1			
M0-3	4-Caffeoylquinic acid (4-CQA)	353.087	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	0.0	0.0	16.3		1.4	0.3		1.8
M1	Hydrolysis to caffeic acid	179.034	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	-0.5	-2.5	16.7	0.1	0.6			
M2-1	Methylation + cysteinylglycine conjugation	545.144	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}$	0.3	0.5	8.2	6.4	0.2			
M2-2	Methylation + cysteinylglycine conjugation	545.144	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}$	-0.4	-0.8	8.5	3.0	0.2		0.2	
M3-1	Methylation + cysteine conjugation	488.123	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	-0.2	-0.4	8.4	0.5			19.8	
M3-2	Methylation + cysteine conjugation	488.123	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	0.5	1.1	9.5	0.3			10.0	
M3-3	Methylation + cysteine conjugation	488.123	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	-0.1	-0.2	7.1				3.0	
M3-4	Methylation + cysteine conjugation	488.122	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	-0.8	-1.6	7.5				1.8	
M3-5	Methylation + cysteine conjugation	488.123	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	0.2	0.4	10.3				1.3	
M3-6	Methylation + cysteine conjugation	488.125	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	2.3	4.7	11.2				0.1	
M4-1	GSH Michael addition	660.172	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	0.5	0.8	10.6	0.7				
M4-2	GSH Michael addition	660.171	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	0.2	0.3	11.0	0.5				
M5-1	Methylation + GSH Michael addition	674.187	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	0.6	0.8	11.0	0.6				
M5-2	Methylation + GSH Michael addition	674.189	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	1.8	2.6	12.3	54.5				
M5-3	Methylation + GSH Michael addition	674.188	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	1.0	1.4	12.7	25.7				
M5-4	Methylation + GSH Michael addition	674.186	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	-0.5	-0.8	13.7	0.6				
M5-5	Methylation + GSH Michael addition	674.187	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{S}$	-0.2	-0.4	14.2	0.5				
M6	Methylation + GSH Michael addition of M1	500.134	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$	0.0	0.0	12.7	0.3				
M7-1	Methylation	367.101	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-1.6	-4.4	15.5	0.1	0.2		1.1	
M7-2	Methylation	367.101	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-1.7	-4.7	16.6	0.1	0.1		3.8	
M7-3	Methylation	367.100	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-3.1	-8.5	18.1	1.4	34.4	19.3	3.5	9.7
M7-4	Methylation	367.102	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-0.6	-1.7	18.9	2.5	26.2	13.7	48.9	6.7
M7-5	Methylation	367.101	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-2.0	-5.5	19.6	0.1	0.8	0.8	5.6	
M8-1	Methylation + glucuronidation of M9	371.098	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	0.6	1.5	20.0	1.5	0.6	2.7		
M8-2	Methylation + glucuronidation of M9	371.099	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	1.6	4.2	20.9	0.5				
M9	Hydrolysis to caffeic acid+reduction	181.051	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	-1.5	-9.1	16.7		2.1	0.2		
M10	Glucuronidation of M9	357.083	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	-1.8	-11.4	13.1		1.1	13.7		
M11-1	Methylation + glucuronidation of M1	369.081	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	-2.2	-5.9	15.9			18.5		
M11-2	Methylation + glucuronidation of M1	369.081	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	-1.1	-3.0	17.3			6.1		
M11-3	Methylation + glucuronidation of M1	369.081	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	-0.8	-5.6	19.0			4.2		
M12	Glycine conjugation of M1	236.056	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$	-0.1	-0.5	17.8			1.3		
M13	Acetylation of M1	221.044	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$	-1.4	-6.4	17.0			3.0		
M14	Reduction	355.100	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-2.5	-7.1	14.9				1.0	

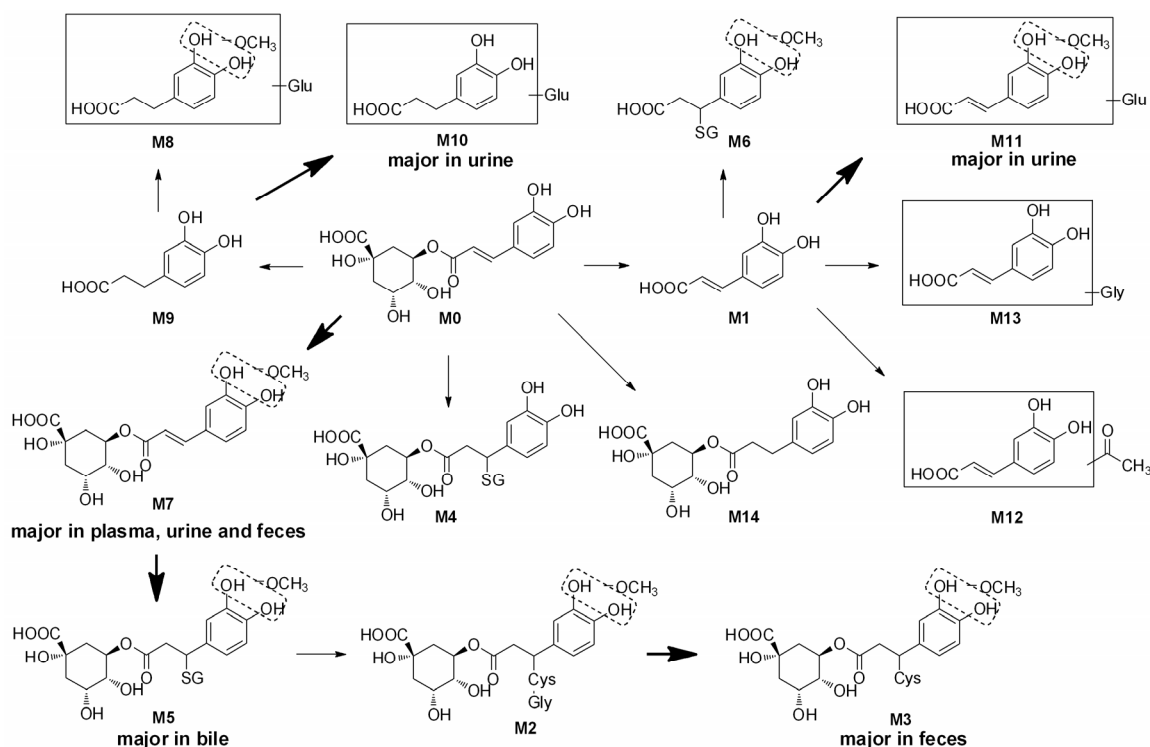


Figure 7 Proposed major metabolic pathways of chlorogenic acid in rats

酸口服不易吸收,但是可以在肠道菌群的作用下部分水解为咖啡酸后被吸收。Booth 等^[8]研究则表明,受试者口服 1 g 绿原酸后,尿中的主要代谢产物为咖啡酸、间羟基苯豆酸的甘氨酸结合物和葡萄糖醛酸结合物、二氢阿魏酸 (3-甲氧基二氢咖啡酸);大鼠灌胃给予绿原酸 100 mg 后,尿中的主要代谢产物为间羟基苯丙酸,少量的二氢咖啡酸、二氢阿魏酸、间羟基苯豆酸及其甘氨酸结合物。因此,口服绿原酸后,在血浆或尿中主要检测到水解产物咖啡酸及其代谢物。目前,没有文献报道绿原酸静脉注射后在动物或人体内的代谢情况。

与口服给药不同,大鼠静脉注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 绿原酸后,绿原酸发生广泛代谢。对比各代谢产物的紫外色谱峰面积可知,绿原酸及其代谢产物经尿和粪便排泄比例相近,主要代谢途径为 *O*-甲基化和谷胱甘肽结合。通常,分子质量大于 350 Da 的药物及其代谢物在大鼠体内难以经肾小球滤过,主要经胆汁排泄^[17]。谷胱甘肽结合物的分子质量大于 500 Da,不能从尿中排泄,而快速从胆汁清除,因此未能在尿中检测到。大鼠胆汁中主要的代谢产物为 M5 (*O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物),此外还能检测到少量的 M2 (*O*-甲基绿原酸半胱氨酸甘氨酸结合物)、M3 (*O*-甲基绿原酸半胱氨酸结合物) 和 M4 (绿原酸谷胱甘肽结合物),它们是由谷胱甘肽、半胱氨酸甘氨酸、半胱

氨酸的巯基与烯酮双键发生 Michael 加成反应形成的。*O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物在胆汁中的排泄量超过胆汁中全部代谢物的 80%。在大鼠尿、粪和血浆中主要代谢产物为 M7 (*O*-甲基绿原酸),在粪中还检测到大量的 M3 (*O*-甲基绿原酸半胱氨酸结合物),未检测到 M5 (*O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物),推测可能是胆汁排出的 M5 被肠道菌群水解生成 M3。绿原酸在大鼠体内主要形成结合型代谢物,极性较大,一经形成即快速消除。所以在血浆中主要检测到原形化合物及少量的 M7,未检测到其他的代谢产物。

大量的谷胱甘肽结合物的生成表明绿原酸的烯酮双键具有很强的亲电性,除能与谷胱甘肽结合外,也能与含巯基的蛋白共价结合。Kang 等^[18]和 Rawel 等^[19]证明绿原酸能与蛋白发生共价结合。当静脉注射含有绿原酸的药物时,可能造成绿原酸局部浓度过高,超出谷胱甘肽的保护能力,而可能与蛋白共价结合,引起毒性反应。绿原酸的口服生物利用度非常低,这可能是口服含绿原酸的药物不良反应发生率降低的原因。

结论

本文采用 UPLC/Q-TOF MS 法鉴定了绿原酸在大鼠胆汁、尿、粪和血浆中的代谢产物,实验结果表

明, 大鼠静脉注射绿原酸后, 除原形药物外共检测到 35 种代谢物, 主要代谢途径为 *O*-甲基化和谷胱甘肽结合等。绿原酸结构中含有烯酮双键的结构, 具有强的亲电性, 因此有可能与蛋白的巯基共价结合, 导致过敏性不良反应, 临床应用时应当注意。

References

- [1] Zhang H, Li X, Zhou HY, et al. Determination of six phenolic acids in mailuoning injection by RP-HPLC [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2009, 16: 54–56.
- [2] Liang SJ. Discussion on adverse effects and regulations of traditional Chinese medicine injections [J]. Med Inf (医药信息), 2009, 22: 2503.
- [3] Yan AR, Peng FC. Analysis of adverse effects and possible reasons of traditional Chinese medicine injections [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2008, 28: 765–766.
- [4] Fang SP, Wang YP, Yan L, et al. Quantitative analysis on adverse effect of Shuanghuanglian injection in the past ten years [J]. Chin J Pharmacoepidemiol (药物流行病学杂志), 2005, 14: 148–151.
- [5] Ji KM, Chen JJ, Li M, et al. Comments on serious anaphylaxis caused by nine Chinese herbal injections used to treat common colds and upper respiratory tract infections [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2009, 55: 134–138.
- [6] Freedman SO, Krupey J, Schon AH. Chlorogenic acid: an allergen in green coffee bean [J]. Nature, 1961, 192: 241–243.
- [7] Bariana DS, Krupey J, Scarpatti LM, et al. Chlorogenic acid: further evidence for its antigenic and allergenic activity [J]. Nature, 1965, 207: 1155–1157.
- [8] Booth AN, Emerson OH, Jones FT, et al. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids [J]. J Biol Chem, 1957, 229: 51–59.
- [9] Stalmach A, Mullen W, Barron D, et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37: 1749–1758.
- [10] Stanley EG, Bailey NJ, Bollard ME, et al. Sexual dimorphism in urinary metabolite profiles of Han Wistar rats revealed by nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics [J]. Anal Biochem, 2005, 343: 195–202.
- [11] Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, et al. UPLC/MSE: a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 1989–1994.
- [12] Bateman K, Castro PJ, Wrona M, et al. MSE with mass defect filtering for *in vitro* and *in vivo* metabolite identification [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 1485–1496.
- [13] Mahajan MK, Evans CA. Dual negative precursor ion scan approach for rapid detection of glutathione conjugates using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 1032–1040.
- [14] Clifford MN, Johnston KL, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 2900–2911.
- [15] Clifford MN, Kirkpatrick J, Kuhnert N, et al. LC-MSⁿ analysis of the *cis* isomers of chlorogenic acids [J]. Food Chem, 2008, 106: 379–385.
- [16] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 5496–5500.
- [17] Giulia G, Elaine ML, Kim LB. Methods to evaluate biliary excretion of drugs in humans: an updated review [J]. Mol Pharm, 2006, 3: 198–211.
- [18] Kang J, Liu Y, Xie MX, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1674: 205–214.
- [19] Rawel HM, Rohn S, Kruse HP, et al. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid [J]. Food Chem, 2002, 78: 443–455.