

· 药物代谢 ·

基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析痰热清注射液在大鼠体内的入血成分

王志鹏¹, 孙亮^{1,2,3}, 张凤¹, 高守红¹, 陈万生^{1*}, 柴逸峰^{2*}

(1. 第二军医大学长征医院, 上海 200003; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433;
3. 中国人民解放军第98医院, 浙江湖州 313000)

[摘要] 目的:采用 UPLC-Q-TOF/MS 对大鼠血液中痰热清注射液成分进行定性鉴别分析,为该制剂的临床应用提供参考。方法:采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱进行色谱分离,流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱。在正、负离子模式下使用电喷雾离子源(ESI)模式获取数据,数据采集范围 m/z 100 ~ 1 100,通过同对照品对比、质谱分析、检索文献等方法进行物质鉴别。结果:共鉴别分析出 27 种入血成分,获得其中 5 种主要指标成分绿原酸、黄芩苷、咖啡酸、熊去氧胆酸与鹅去氧胆酸的主要代谢产物及代谢途径。咖啡酸、绿原酸可生成多种 I 相和 II 相消除产物,代谢途径多样;而熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸与黄芩苷则主要以 II 相消除为主。结论:痰热清注射液中仅有部分次要成分不会被吸收入血。建立的 UPLC-Q-TOF/MS 可对痰热清注射剂入血成分进行快速有效的定性鉴别,并可确定主要成分的代谢状态。

[关键词] 痰热清注射液; 入血成分; 代谢产物; 咖啡酸; 黄芩苷; 绿原酸; 熊去氧胆酸

[中图分类号] R24;R289;R283.6;R284;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0077-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180907

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1523.014.html>

[网络出版时间] 2018-02-14 20:21

Qualitative Analysis of Components Absorbed into Rat Blood After Administration of Tanreqing Injection by UPLC-Q-TOF/MS

WANG Zhi-peng¹, SUN Liang^{1,2,3}, ZHANG Feng¹, GAO Shou-hong¹,
CHEN Wan-sheng^{1*}, CHAI Yi-feng^{2*}

(1. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China;
2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;
3. The 98th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Huzhou 313000, China)

[Abstract] **Objective:** To qualitatively identify components of Tanreqing injection in rat blood based on UPLC-Q-TOF/MS. **Method:** The chromatographic separation was carried out on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column, mobile phase was 0.1% formic acid in water and acetonitrile for gradient elution. Electrospray ionization (ESI) was adopted to obtain data under positive and negative mode, the data was collected in the range of m/z 100-1 100, and components were identified by comparing with reference substances, analysing MS and retrieving literatures. **Result:** A total of 27 components from Tanreqing injection were identified in rat blood, main

[收稿日期] 20170827(002)

[基金项目] 国家杰出青年科学基金项目(81325924);国家自然科学基金面上项目(81470173)

[第一作者] 王志鹏,在读博士,从事结直肠肿瘤、中药质量分析与控制研究,Tel:021-60748761,E-mail:wangzhipeng3193@126.com

[通信作者] *陈万生,博士,教授,从事中药药效物质基础及品质评价、重要天然产物的生物合成与代谢调控、药物相互作用研究,Tel:021-81886181,E-mail:chenwansheng@smmu.edu.cn;

*柴逸峰,博士,教授,从事药物复杂体系分析与中药质量分析研究,Tel:021-81871201,E-mail:yfchai@smmu.edu.cn

metabolites and metabolic pathways of five main components (caffeic acid, chlorogenic acid, baicalin, ursodesoxycholic acid and chenodeoxycholic acid) were obtained. Caffeic acid and chlorogenic acid could product a variety of elimination products of phase I and II with diverse metabolic pathways; baicalin, ursodesoxycholic acid and chenodeoxycholic acid were mainly elimination of phase II. **Conclusion:** Only some of the secondary components in Tanreqing injection can not be absorbed into the blood. This UPLC-Q-TOF/MS can rapidly identify bioactive compounds of Tanreqing injection and the main metabolic status of them.

[Key words] Tanreqing injection; components absorbed into blood; metabolites; caffeic acid; baicalin; chlorogenic acid; ursodesoxycholic acid

痰热清注射液是一种中药复方制剂,由上海凯宝药业股份有限公司研制(国药准字 Z20030054),由连翘、黄芩、山羊角、金银花及熊胆粉组成^[1]。该制剂功效包括清热、解毒、化痰等,具有抑菌、抗病毒、解热、祛痰镇咳、镇静镇惊等药理作用^[2],临床上多用于治疗呼吸系统疾病、病毒性疾病、心血管疾病、尿路感染、风湿性关节炎等,也常用于增强免疫功能治疗、配合重症治疗等^[3];常见不良反应包括过敏性休克、药疹、高热反应等^[4]。

目前临床对于痰热清注射液的研究主要集中于采用循证医学和流行病学方法论证其临床使用的安全性和有效性,以提高临床医生对该制剂的认可,明确痰热清注射液的物质基础及作用机制对实现这一目标具有重大意义。本课题组前期通过 UPLC-Q-TOF/MS 技术确认了痰热清注射液所含的 53 种成分^[5],在此基础上,本实验拟通过 UPLC-Q-TOF/MS 技术对该注射液的大鼠入血成分进行鉴定与分析,考察该制剂中指标成分咖啡酸、绿原酸、黄芩苷、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸在大鼠体内的代谢过程,并对其代谢产物进行追踪与鉴别,以阐明上述 5 种指标成分可能的代谢途径。

1 材料

1290 Infinity 型超高效液相色谱和 6538 型超高分辨率和质量精度四极杆-飞行时间串联质谱仪(UPLC-Q-TOF/MS,美国 Agilent 公司),CPA255D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),Universal 32R 型台式冷冻高速离心机(德国 Hettich 公司),SB3200-T 型超声发生器(上海珂淮仪器有限公司),Milli-Q 型纯化水系统(美国 Millipore 公司)。

熊去氧胆酸、咖啡酸、鹅去氧胆酸、绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110755-9003, 110885-200102, 110806-200704, 110753-200413,纯度均 $\geq 95\%$),黄芩苷对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号 26695,纯度 $\geq 95\%$],痰热清注射液(上海凯宝药业股份有限公司,批号

110314,规格 10 mL/支),水为去离子水,乙腈为色谱纯或质谱纯,其余试剂均为分析纯。

健康雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。本研究涉及的动物实验经第二军医大学实验动物伦理委员会批准,批准号 20120313005。

2 方法

2.1 UPLC-Q-TOF/MS 分析条件 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),柱温 40 °C,流速 0.35 mL·min⁻¹,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱,入血成分和代谢产物鉴别的梯度程序分别为(0 ~ 3 min, 5% ~ 15% B; 3 ~ 6 min, 15% ~ 20% B; 6 ~ 10 min, 20% B; 10 ~ 13 min, 20% ~ 35% B; 13 ~ 17 min, 35% ~ 80% B; 17 ~ 19 min, 80% ~ 90% B)和(0 ~ 3 min, 5% ~ 15% B; 3 ~ 6 min, 15% ~ 23% B; 6 ~ 11 min, 23% B; 11 ~ 13 min, 23% ~ 35% B; 13 ~ 16 min, 35% ~ 80% B; 16 ~ 17 min, 80% ~ 90% B),进样量 2 μL。在正、负离子模式下,采用电喷雾离子源(ESI)采集数据,数据采集范围 *m/z* 100 ~ 1 100,毛细管电压 4 kV,雾化气压力 344.738 kPa,干燥气流速 11 L·min⁻¹,离子源温度 350 °C,碎片电压 150 V。

2.2 大鼠给药与生物样品的采集 6 只 SD 大鼠禁食 12 h(自由饮水)后给药,置于代谢笼中饲养,以实验大鼠标准饲料喂养,自由饮水,室温 22 ~ 24 °C,湿度 55% ~ 60%,光照 12 h,明暗交替。按剂量 5 mL·kg⁻¹尾静脉注射给予痰热清注射液^[5],分别于给药前(0 min),给药后 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 min 和 1, 2, 4, 8, 12 h 从眼眶后静脉丛取血约 0.3 mL,置于肝素抗凝管中,于 3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上层血浆, -20 °C 冰箱冻存。收集给药后 48 h 内的大鼠粪便与尿液, -20 °C 冰箱冻存。空白组大鼠 4 只,尾静脉注射给予等量生理盐水,同方法收集血样、尿液与粪便, -20 °C 冰箱冻存。

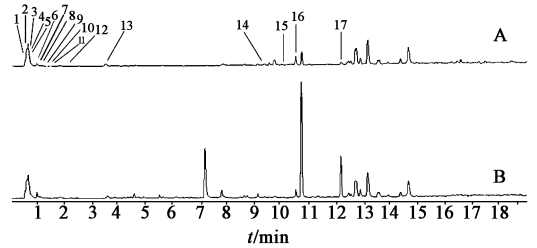
2.3 血浆样品的预处理 取大鼠血浆样本 100 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 300 μL 进行蛋白沉淀,涡旋振荡 2 min,高速离心(1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min,下同),移取上清液 100 μL 至含内衬管的进样小瓶中,待分析。

2.4 粪便及尿样的预处理 收集的粪便在烘箱中 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下烘干,研磨成粉过 80 目筛,加入 4 倍量甲醇,超声 1 h,高速离心,取适量上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进行分析。向尿液中加入 3 倍量甲醇,混合,超声 30 min,高速离心,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进行分析。

3 结果及讨论

3.1 入血成分的定性识别 大鼠血浆的内源性成分复杂,其含有的一些物质如胆酸类、氨基酸类等也是痰热清注射液中含有的成分,会对物质鉴别产生一定的扰乱,故采用正、负离子模式对空白组 4 只

大鼠的血浆样品进行分析,将所得数据同实验组大鼠血浆样品全扫描模式所得数据进行比对,以去除内源性物质的干扰。给药前后大鼠血浆总离子流图见图 1。利用 MassHunter(version B. 02. 00) 软件提供的信息及查阅文献[6-15],确定了大鼠空白血浆中内源性离子,见表 1。



A. 空白血浆; B. 供试品

图 1 痰热清注射液给药后 10 min 的血浆的总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatograms of rat plasma after administration of Tanreqing injection for 10 min

表 1 正、负离子模式下大鼠空白血浆中的内源性离子分析

Table 1 Endogenous ions in blank plasma of rats under positive and negative ion modes

No.	t_R/min	相对分子质量/Da	δ/ppm	离子模式	分子式	化合物英文名	化合物中文名
1	0.557	146.105 5	-0.93	正	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	L-lysine	L-赖氨酸
	0.539	146.105 5	-2.45	负			
2	0.627	119.058 2	-1.23	负	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	L-threonine	L-苏氨酸
3	0.627	155.069 5	4.18	负	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	L-histidine	L-组氨酸
4	0.637	146.069 1	1.75	负	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	L-glutamine	L-谷氨酰胺
5	0.670	180.063 4	1.17	负	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	inositol	环己六醇
6	0.961	117.079 0	1.35	正	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	L-valine	L-缬氨酸
7	0.994	181.073 9	-0.18	正	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	L-tyrosine	L-酪氨酸
	0.988	181.073 9	4.57	负			
8	1.005	164.047 3	-0.55	正	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	methyl 2-formylbenzoate	2-甲酰基苯甲酸甲酯
9	1.136	131.094 6	2.04	正	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	L-leucine	L-亮氨酸
	1.086	131.094 6	3.69	负			
10	1.136	131.094 6	2.04	正	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	L-isoleucine	L-异亮氨酸
	1.086	131.094 6	3.69	负			
11	1.097	118.026 6	-0.17	负	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	succinic acid	琥珀酸
12	1.869	165.079 0	-0.06	正	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	L-phenylalanine	L-苯丙氨酸
	1.797	165.079 0	3.98	负			
13	3.777	136.052 4	6.09	负	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	2-acetylphenol	邻羟基苯乙酮
14	10.221	278.151 8	0.81	正	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	dibutyl phthalate	邻苯二甲酸二丁酯
	8.952	278.151 8	2.74	负			
15	10.447	408.287 6	3.77	负	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$	cholic acid	胆酸
16	10.607	392.292 7	4.5	负	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$	ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸
17	12.103	392.292 7	4.5	负	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$	chenodeoxycholic acid	鹅去氧胆酸

在本课题组前期工作中,通过检索 SciFinder, Pubmed, CNKI 等数据库,建立了有关黄芩、连翘、金银花、山羊角及熊胆粉的化合物数据库,利用 Formula Database Generator 软件平台建立了痰热清注射液的化学成分信息数据库。同时与绿原酸、咖啡酸等物质的对照品质谱信息进行比对,最终明确了痰热清注射液中所含的 53 种成分^[5],采用相同的方法确认了进入大鼠血浆的 27 种药物成分,见表 2。其中胆酸、鹅去氧胆酸和熊去氧胆酸不仅为痰热清注射液内主要成分,也是大鼠体内内源性成分,在空白基质中上述化合物存在一定的响应,因此,通

过对比空白大鼠血浆与注射液给药后上述化合物的响应情况,发现上述化合物离子响应明显增大,从而判断上述化合物均为入血成分。另有部分成分(如 β -谷甾醇、连翘酯苷 C 等)既没有在空白血浆中检测到相应的物质响应,也没有在给药后的血浆中找到特征离子响应,推测一方面可能是由于其含量没有达到仪器的检测下限,另一方面可能是在进入血浆后快速代谢而生成其他物质。在检测到的成分中,绝大多数入血成分在 1 h 内失去信号响应,可能已被快速消除,提示这种现象可能与大鼠体内快速发生的 I, II 相消除反应相关。

表 2 痰热清注射液中 27 种入血成分的信息

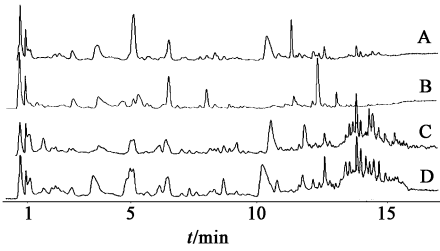
Table 2 Information of 27 components from Tanreqing injection in plasma

No.	t_R /min	相对分子质量/Da	δ /ppm	分子式	成分英文名	成分中文名
1	0.562	328.094 7	-2.78	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	salvigenin	三裂鼠尾草素
2	0.623	174.111 7	-6.35	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	L-arginine	L-精氨酸
3	0.662	105.042 6	4.07	C ₃ H ₇ NO ₃	L-serine	L-丝氨酸
4	0.666	192.063 4	3.90	C ₇ H ₁₂ O ₆	quinic acid	奎尼酸
5	0.667	133.037 5	-9.98	C ₄ H ₇ NO ₄	L-aspartic acid	L-天门冬氨酸
6	0.972	115.063 3	2.08	C ₅ H ₉ NO ₂	L-proline	L-脯氨酸
7	3.703	354.095 1	4.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	chlorogenic acid	绿原酸
8	4.036	300.120 9	4.85	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	salidroside	毛柳苷
9	4.527	354.095 1	4.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	neochlorogenic acid	新绿原酸
10	4.655	354.095 1	4.31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	cryptochlorogenic acid	隐绿原酸
11	4.874	152.047 3	5.78	C ₈ H ₈ O ₃	p-hydroxyphenyl acetic acid	对羟基苯乙酸
12	4.874	180.042 3	4.86	C ₉ H ₈ O ₄	caffeic acid	咖啡酸
13	6.044	462.079 8	5.85	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	scutellarin	野黄芩苷
14	6.060	594.158 5	3.71	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	lonicerin	忍冬苷
15	6.274	516.126 8	4.89	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,4-dicaffeoylquinic acid	3,4-二咖啡酰奎尼酸
16	6.405	520.194 5	0.74	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	matrairesinoside	马苔树脂醇苷
17	6.493	516.126 8	4.89	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,5-dicaffeoylquinic acid	3,5-二咖啡酰奎尼酸
18	6.624	516.126 8	4.89	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	4,5-dicaffeoylquinic acid	4,5-二咖啡酰奎尼酸
19	7.120	446.084 9	5.81	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	baicalin	黄芩苷
20	7.718	284.068 5	7.60	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	wogonin	汉黄芩素
21	7.722	460.100 6	6.22	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	3,4,5-trihydroxy-6-(5-hydroxy-6-methoxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxyoxane-2-carboxylic acid	-
22	7.733	430.090 0	5.58	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	chrysin-7-O- β -D-glucuronide	白杨素-7-O- β -D-葡萄糖苷酸
23	7.734	448.100 6	4.93	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	quercitrin	斛皮苷
24	8.969	270.052 8	6.28	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	baicalein	黄芩素
25	10.447	408.287 6	6.89	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	cholic acid	胆酸
26	10.654	392.292 7	4.76	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	ursodeoxycholic acid	熊去氧胆酸
27	12.127	392.292 7	4.76	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	chenodeoxycholic acid	鹅去氧胆酸

3.2 指标成分代谢产物的确定 黄芩苷、绿原酸、咖啡酸、鹅去氧胆酸和熊去氧胆酸为痰热清注射液的 5 种指标成分^[16-17],按照生物体内发生 I, II 相消除

反应常见的质量迁移数^[18],利用 Formula Database Generator 软件平台建立指标成分发生上述反应可能生成的代谢产物数据库,同所收集的尿液与粪便样品

所含物质信息进行对比分析,筛选出可能的代谢产物,并同空白尿液与粪便进行比较,指标成分潜在的代谢产物应在空白样品中无特征离子峰出现。给药前后大鼠尿液及粪便总离子流图见图 2。



A. 空白尿液; B. 给药 5 h 后尿液; C. 空白粪便; D. 给药 5 h 后粪便

图 2 给予痰热清注射液前后大鼠尿液、粪便的总离子流

Fig. 2 Total ion current chromatograms of urine and faeces after administration of Tanqing injection

咖啡酸的苯环包含邻二酚羟基结构,而对位上存在不饱和羧基结构,整体形成长共轭体系,化学

性质活泼,在不饱和键、羧基及酚羟基处可发生加成、取代、酯化等反应,可形成多种 I 相消除产物,并且在多种酶的催化下,还易生成葡萄糖醛酸化、硫酸酯化、甘氨酸化等多种 II 相消除产物。由于苯环结构上多个取代基均有较强的化学活性,因此消除反应并不局限于 1 个取代基上,而是有可能同时或先后发生在多个取代基上,从而生成复杂多样的代谢产物。在给药后的尿样中扫描到 $M + 2, M + 14, M + 18, M + 28, M + 42, M + 57, M + 80, M + 107, M + 176$ 等多种代谢产物离子,证实了咖啡酸在大鼠体内有着十分广泛的代谢途径。将咖啡酸代谢物数据库中的特征离子响应同空白尿液的总离子流图进行对比,证明对特征离子测定不受干扰离子的影响,之后将代谢产物特征离子同给药后的尿样进行对比,共鉴定出 21 种大鼠体内的咖啡酸代谢产物,见图 3 和表 3。

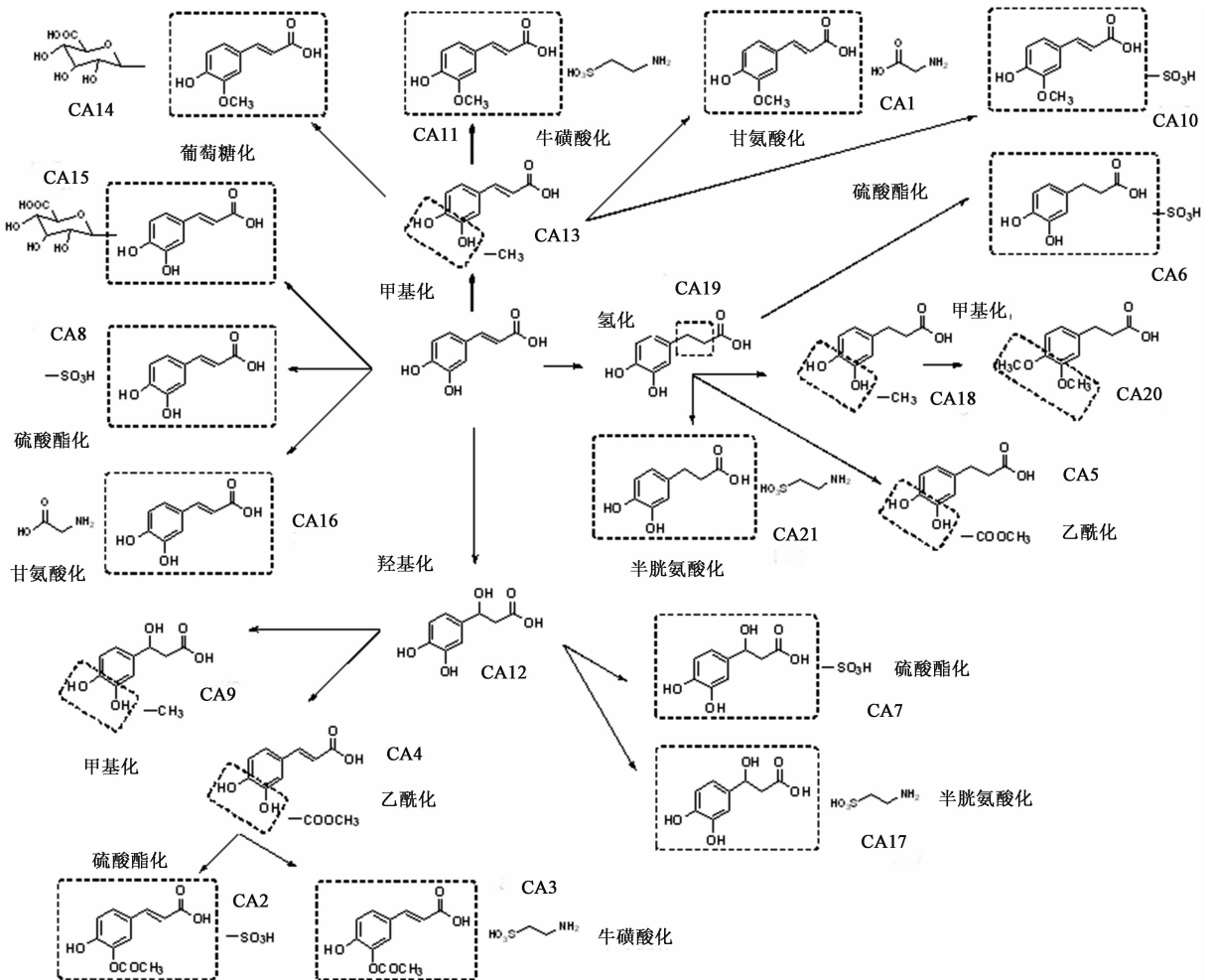


图 3 咖啡酸可能的代谢途径

Fig. 3 Possible metabolic pathways of caffeic acid

表 3 痰热清注射液中 5 种主要指标成分可能的代谢产物

Table 3 Possible metabolites of five marker components in Tanreqing injection

代谢产物	t_R/min	δ/ppm	相对分子质量/Da	分子式	代谢产物	t_R/min	δ/ppm	相对分子质量/Da	分子式
CA1	1.053	-1.07	251.079 4	$C_{12}H_{13}NO_5$	CH6	9.293	5.00	372.105 6	$C_{16}H_{20}O_{10}$
CA2	2.430	3.20	320.020 2	$C_{11}H_{12}O_9S$	CH7	10.443	4.08	382.126 4	$C_{18}H_{22}O_9$
CA3	2.997	2.86	347.067 5	$C_{13}H_{17}NO_8S$	CH8	11.448	3.03	453.127 1	$C_{20}H_{23}NO_{11}$
CA4	3.327	-5.40	240.063 4	$C_{11}H_{12}O_6$	CH9	11.448	2.44	499.132 6	$C_{21}H_{25}NO_{13}$
CA5	4.395	6.82	224.068 5	$C_{11}H_{12}O_5$	CH10	11.519	-5.03	517.125 4	$C_{21}H_{27}NO_{12}S$
CA6	4.559	3.62	262.014 7	$C_9H_{10}O_7S$	CH11	12.045	-1.16	463.114 8	$C_{18}H_{25}NO_{11}S$
CA7	4.665	5.61	278.009 6	$C_9H_{10}O_8S$	CH12	13.021	1.53	461.099 2	$C_{18}H_{23}NO_{11}S$
CA8	4.665	6.00	259.999 1	$C_9H_8O_7S$	CH13	13.021	1.11	479.109 7	$C_{18}H_{25}NO_{12}S$
CA9	5.275	3.19	212.068 5	$C_{10}H_{12}O_5$	CH14	13.116	3.91	436.067 5	$C_{16}H_{20}O_{12}S$
CA10	5.343	6.91	274.014 7	$C_{10}H_{10}O_7S$	CH15	13.162	6.58	410.121 3	$C_{19}H_{22}O_{10}$
CA11	5.600	4.59	301.062 0	$C_{12}H_{15}NO_6S$	CH16	14.890	-5.82	370.126 4	$C_{17}H_{22}O_9$
CA12	5.646	3.68	198.052 8	$C_9H_{10}O_5$	BA1	10.366	3.54	622.117 0	$C_{27}H_{26}O_{17}$
CA13	6.512	1.45	194.057 9	$C_{10}H_{10}O_4$	BA2	10.642	3.65	462.079 8	$C_{21}H_{18}O_{12}$
CA14	6.818	4.41	370.090 0	$C_{16}H_{18}O_{10}$	BA3	11.326	2.16	622.117 0	$C_{27}H_{26}O_{17}$
CA15	7.120	3.86	356.074 3	$C_{15}H_{16}O_{10}$	BA4	12.065	2.69	526.041 7	$C_{21}H_{18}O_{14}S$
CA16	7.744	1.01	237.063 7	$C_{11}H_{11}NO_5$	BA5	13.032	-0.43	460.100 6	$C_{22}H_{20}O_{11}$
CA17	8.297	2.99	255.074 3	$C_{11}H_{13}NO_6$	BA6	14.116	-2.05	591.122 4	$C_{26}H_{25}NO_{15}$
CA18	8.658	4.53	196.073 6	$C_{10}H_{12}O_4$	UR1	13.142	-0.51	499.296 8	$C_{26}H_{45}NO_6S$
CA19	8.817	-0.94	182.057 9	$C_9H_{10}O_4$	UR2	13.497	3.46	472.249 5	$C_{24}H_{40}O_7S$
CA20	9.353	-0.69	210.089 2	$C_{11}H_{14}O_4$	UR3	13.929	0.82	408.287 6	$C_{24}H_{40}O_5$
CA21	11.466	0.05	239.079 4	$C_{11}H_{13}NO_5$	UR4	14.057	0.38	568.324 7	$C_{30}H_{48}O_{10}$
CH1	5.788	3.27	368.110 7	$C_{17}H_{20}O_9$	UR5	14.316	5.21	449.314 1	$C_{26}H_{43}NO_5$
CH2	6.472	5.30	425.132 2	$C_{19}H_{23}NO_{10}$	UR6	14.810	0.65	406.308 6	$C_{25}H_{42}O_4$
CH3	7.423	-4.47	396.105 6	$C_{18}H_{20}O_{10}$	UR7	14.833	2.53	434.303 2	$C_{26}H_{42}O_5$
CH4	7.944	2.52	546.151 9	$C_{22}H_{30}N_2O_{12}S$	UR8	15.509	-4.38	537.330 2	$C_{29}H_{47}NO_8$
CH5	9.279	-1.38	414.116 2	$C_{18}H_{22}O_{11}$					

注:CA. 咖啡酸;CH. 绿原酸;BA. 黄芩苷;UR. 熊去氧胆酸与鹅去氧胆酸;数字为其代谢产物数字标识。

绿原酸具有广泛的抗菌作用,结构中含有酚羟基、醇羟基、羧基及共轭双键等结构,化学性质较为活泼,可发生反应的位点较多。研究发现绿原酸在进入大鼠血液后,可在胆汁中形成 *O*-甲基绿原酸谷胱甘肽结合物,而在尿液中生成水解代谢产物和绿原酸 *O*-甲基结合产物、葡萄糖醛酸结合产物,在粪便中则生成半胱氨酸结合物及绿原酸 *O*-甲基结合物,留存在血液中主要为绿原酸原型^[19]。在大鼠粪便、尿液样本中检测发现了 $M + 14, M + 16, M + 18, M + 56, M + 125, M + 192$ 等多个代谢产物分子特征,结合文献报道可能发生甘氨酸化、甲基化、乙酰化、牛磺酸化、谷氨酸化、羟基化等多种 I, II 相消除产物,共获得可能的代谢产物 16 个,见图 4 和表 3。

黄芩苷是一种具有抑菌、抗炎、降胆固醇、抗血栓生成等活性的黄酮类化合物。其在人体内代谢产物包含 5,6,7-三羟基黄酮-7-*O*-葡萄糖醛酸苷,5,7-二羟基-6-甲氧基黄酮-7-*O*-葡萄糖醛酸苷和 5,6,7-三羟基黄酮-6-*O*-葡萄糖醛酸苷等^[20]。在大鼠的粪便和尿液样本中发现黄芩苷主要以 II 相代谢为主,可生成硫酸酯化、谷氨酸化、葡萄糖化的 II 相消除产物。其 7 位上的葡萄糖可在 6 位和 7 位之间反复脱离与结合,因此在机体滞留的时间较长,另外苯环的性质也比较活泼,可发生甲基化、羟基化等 I 相消除反应,获得的代谢产物特征峰包括 $M + 13, M + 15, M + 79, M + 144, M + 175$ 等,共获得可能的代谢产物 6 个,见图 5 和表 3。

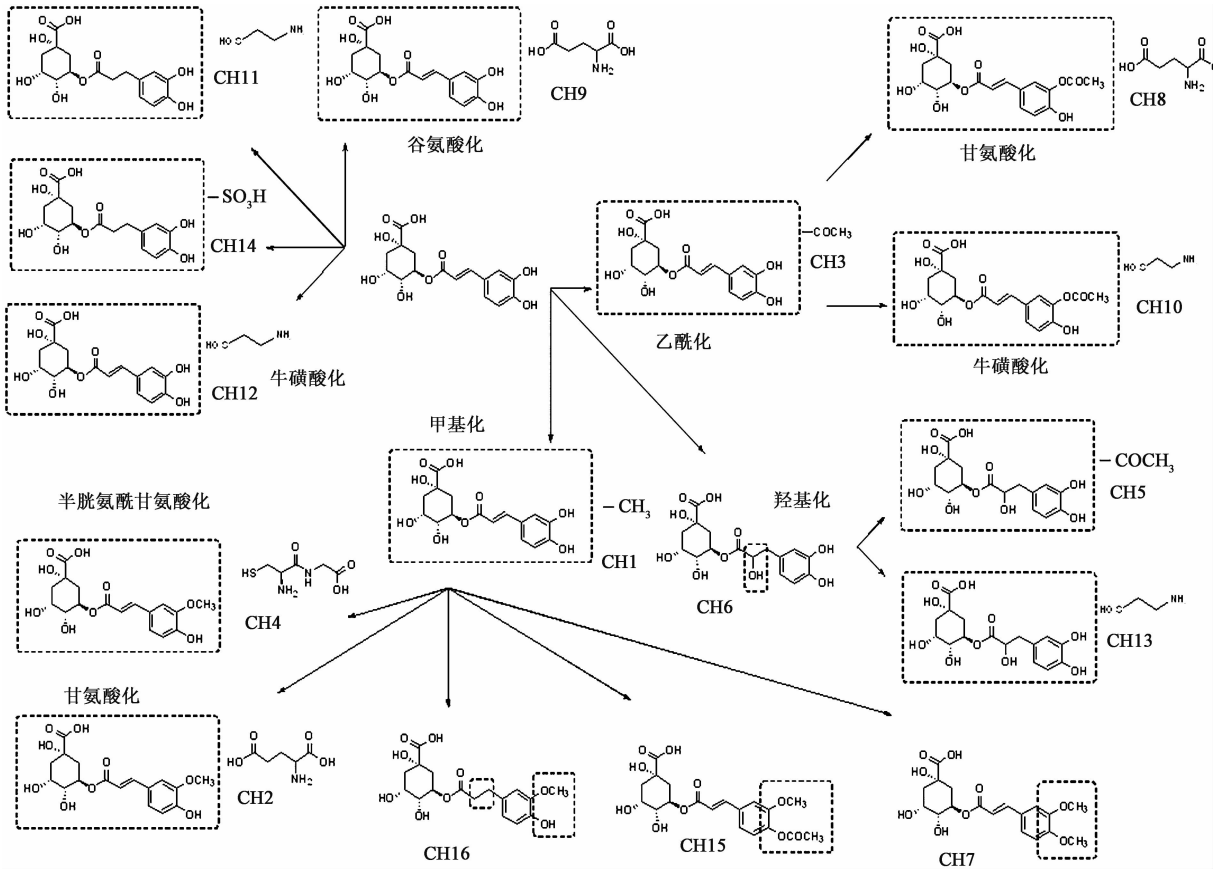


图 4 绿原酸可能的代谢途径

Fig. 4 Possible metabolic pathways of chlorogenic acid

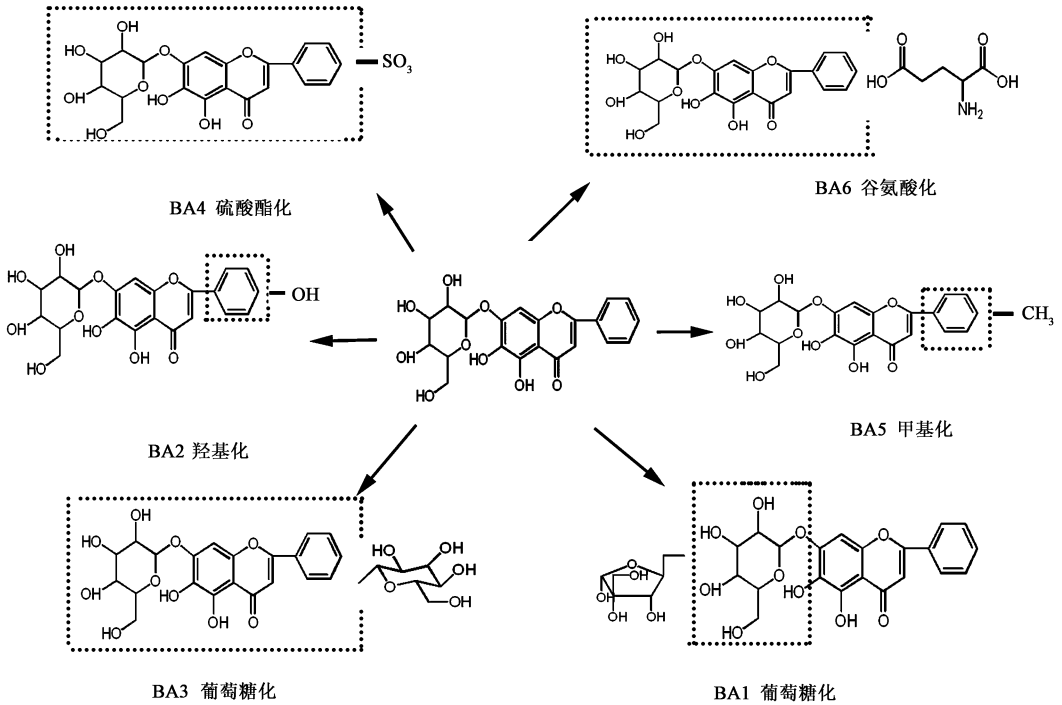


图 5 黄芩苷可能的代谢途径

Fig. 5 Possible metabolic pathways of baicalin

熊去氧胆酸在临床上多用于胆汁淤积性肝病的治疗,可增加胆汁的分泌^[21-22]。鹅去氧胆酸主要作用是降低胆汁内胆固醇的饱和度。二者同为甾体类结构,主要有羟基化、甲基化、乙酰化等I相消除产物,本

实验中发现二者主要生成以牛磺酸化产物为主要代谢产物的II相消除反应。另外,也包含谷氨酸化、葡萄糖醛酸化、甘氨酸化、硫酸酯化等II相消除产物,共获得可能的代谢产物 8 个,见图 6 和表 3。

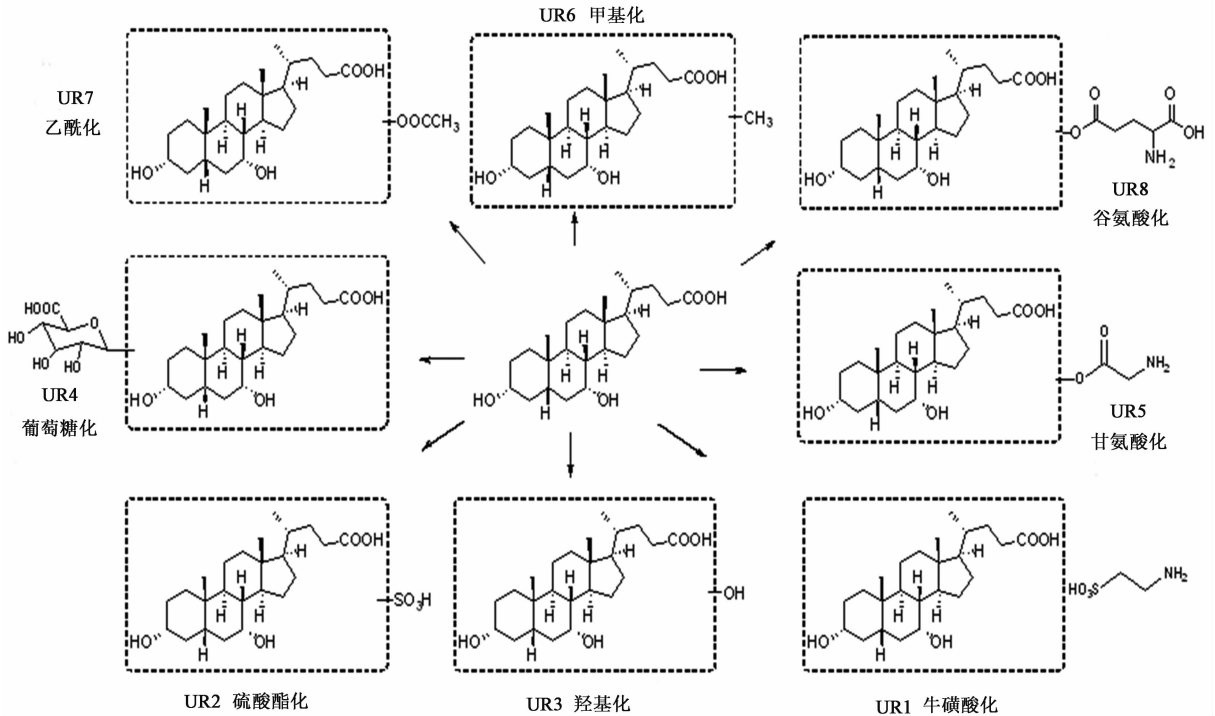


图 6 熊去氧胆酸与鹅去氧胆酸可能的代谢途径

Fig. 6 Possible metabolic pathways of ursodesoxycholic acid and chenodeoxycholic acid

4 结论

中药注射剂是中药在长期应用和发展的基础上形成的一种新制剂,具有成分多、药理作用复杂、临床适应证广泛的特点。在临床应用中也常被不良反应所困扰。因此,阐明其体内分布特点和消除过程有助于提高中药注射剂临床应用的安全性和有效性。在本课题组前期研究基础上^[5],本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 对痰热清注射液的体外物质组(原型成分群)和体内物质组(血浆、尿液、粪便中的成分)进行对比和关联分析,初步鉴定了 27 种入血成分。此外,对指标成分黄芩苷、绿原酸、咖啡酸、熊去氧胆酸与鹅去氧胆酸的代谢产物进行了初步鉴别,咖啡酸、绿原酸可生成多种 I 相和 II 相消除产物,代谢途径多样。而熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸与黄芩苷则主要以 II 相消除为主。本研究明确了痰热清注射液部分指标成分的在大鼠体内代谢过程及代谢衍生物,可为临床上对该注射液的安全使用和机制研究提供一定的参考。

[参考文献]

- [1] 杨武韬. 痰热清注射液药理与临床作用观察[J]. 中医临床研究, 2015, 7(1): 22-23.
- [2] 李富善, 黄晓玲. 痰热清注射液的作用机理和临床应用[J]. 青海医药杂志, 2011, 41(5): 78-79.
- [3] 黎梅. 痰热清注射液的临床应用[J]. 中国当代医药, 2014, 21(4): 194-196.
- [4] 陈莉. 痰热清注射液的不良反应分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(14): 679-681.
- [5] SUN L, WEI H, ZHAGN F, et al. Qualitative analysis and quality control of traditional Chinese medicine preparation Tanreqing injection by LC-TOF/MS and HPLC-DAD-ELSD [J]. Anal Methods-UK, 2013, 5(22): 6431-6440.
- [6] 魏玲, 周茂金, 张铁军, 等. 咖啡酸在大鼠体内两个葡萄糖醛酸结合物的分离与鉴定[J]. 中草药, 2010, 41(6): 949-952.
- [7] 陈永新, 李峰, 周正礼, 等. 金银花脂溶性成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(9): 37-38.

- [8] 赵尤,刘鑫钰.金银花的化学成分及药理作用研究[J].黑龙江科技信息,2012(15):14.
- [9] 范毅,陈玲,朱杰,等.连翘叶化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(24):22-25.
- [10] 朱姮,于金倩,刘倩,等.基于 RRLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS 技术的山东金银花多指标定量指纹图谱分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19):82-89.
- [11] 刘力,张晖,胡嵘,等.山羊角研究概述[J].长春中医药大学学报,1994,10(4):109.
- [12] 姜清华,翟延君.羚羊角与山羊角药理作用比较[J].山西医药杂志,2006,34(7):582-583.
- [13] 张英杰,苑述刚,阮时宝,等.熊胆中药学及临床文献研究概述[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(10):107-108.
- [14] 罗强,陈全成,吴瑶,等.熊胆的化学成分研究[J].中国中药杂志,2010,35(18):2416-2419.
- [15] 王丽影,高昕,佟子林,等.熊胆的化学成分、药理作用及临床研究概况[J].中医药信息,2005,22(4):30-33.
- [16] 王珏,瞿海斌,邵青. HPLC-UV-ELSD 法同时测定痰热清注射液中主成分含量[J].药物分析杂志,2009,29(11):1804-1807.
- [17] 蒋红丽,杨红梅,董守金,等.痰热清注射液有效成分在大鼠肺组织靶向性研究[J].成都中医药大学学报,2015,38(1):8-12.
- [18] 王钰,李中峰,王碧柠,等.基于 UPLC-MS 的白花蛇舌草化学成分大鼠体内代谢产物研究[J].首都师范大学学报:自然科学版,2014,35(1):15-18,24.
- [19] 聂雪凌,唐鸿志,许平.绿原酸的检测及代谢途径研究进展[J].广州化工,2013,41(1):3-6.
- [20] 陈腾飞,刘建勋,孙明谦,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析通络清脑注射剂在大鼠体内的代谢产物[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):98-103.
- [21] 何瑶,王丽娟,刘婷婷,等.基于代谢组学技术分析四物汤治疗原发性痛经证的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):82-89.
- [22] 刘云凤,邹朝春.熊去氧胆酸治疗早产儿胃肠外营养相关性胆汁淤积症的疗效及对患儿血清内毒素水平的影响[J].中国医院药学杂志,2017,37(5):459-461.

[责任编辑 刘德文]