

## 喘可治注射液在大鼠体内的药物代谢研究

冯倩茹<sup>1</sup>, 余捷婧<sup>1,2</sup>, 詹晶晶<sup>1,2</sup>, 许艺鏊<sup>2</sup>, 周若龙<sup>1</sup>, 许舜军<sup>2\*</sup>, 杨柳<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东省中医院/广东省中医药科学院, 广东 广州 510120; 2. 广州万正药业有限公司, 广东 广州 510663)

**摘要:** 探讨喘可治注射液在大鼠体内的代谢转化。选择 SD 大鼠 12 只, 分为两组, 分别为对照组和肌肉注射给药组, 收集给药后 0~24 h、24~48 h 粪便和尿液样品, 给药后 0.5、2 和 24 h 血样, 甲醇超声提取, 沉淀蛋白, 高效液相色谱-串联线性离子阱静电场轨道阱质谱仪检测。通过比较给药组和对照组的总离子流色谱图, 对粪便、尿液以及血浆中推测的代谢物和标准物质的出峰时间及相关化合物的多级串联质谱数据进行了分析, 结果在大鼠尿液中未检测到相关代谢产物; 在大鼠给药后 0.5 h 血样中可检测到在喘可治注射液中含量较大的原形药物, 如朝藿定 C 和淫羊藿苷, 但未能检测到其他原形药物和相关代谢产物, 而大鼠给药后 2 和 4 h 血样中则均未能检测到原形药物和相关代谢产物; 在大鼠粪便中发现了 12 种黄酮类代谢产物, 系统分析了这些代谢产物的代谢转化规律及可能结构。大鼠体内喘可治注射液所含化学成分的主要代谢转化途径为脱糖、脱水、氧化、甲基化和异构化代谢反应等。

**关键词:** 喘可治注射液; 淫羊藿黄酮; 液相色谱-串联质谱; 药物代谢

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0449-07

## *In vivo* study of Chuankezhi metabolism in rat

FENG Qian-ru<sup>1</sup>, YU Jie-jing<sup>1,2</sup>, ZHAN Jing-jing<sup>1,2</sup>, XU Yi-juan<sup>2</sup>, CHOW Yeuk-lung<sup>1</sup>,  
XU Shun-jun<sup>2\*</sup>, YANG Liu<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine/Guangdong Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510120, China; 2. Guangzhou ImVin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** To study the metabolic products of main compounds of Chuankezhi injection in rat, 12 Sprague Dawley rats were classed into 2 groups, a blank control group and an intermuscular administration group, respectively. Rat feces and urine samples were collected from 0–24 h and 24–48 h after administration. All the samples were ultrasonically treated with methanol and then analyzed using LC-LTQ Orbitrap MS<sup>n</sup>. By comparison with the total ion chromatogram of samples from the blank control group, the metabolites in the samples of drug-treated group were screened. These metabolites were further analyzed by multistage product ion scanning and comparison of retention time with reference substances. As a result, a total of 12 flavonoid metabolites were tentatively identified from the rat feces and no metabolite was discovered in the rat urine. Epimedin C and icariin were detected in the rat blood samples after 30 min of administration, but their metabolites and other original flavones were not detected. Furthermore, no original flavones and their metabolites were detected in rat blood samples after 2 and 4 h of administration. The potential metabolism paths were further characterized and the principal *in vivo* transformation of flavones from Chuankezhi injection were deglycosylation, dehydration, methylation, oxidation and isomerization in rats.

收稿日期: 2016-09-28; 修回日期: 2016-11-07.

\*通讯作者 Tel: 86-20-61002339, E-mail: shjxu2002@hotmail.com;

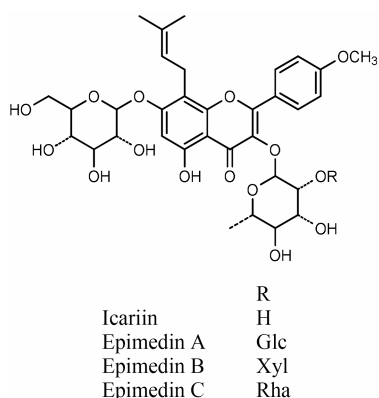
Tel: 86-20-39318778, E-mail: yangliu979@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0955

**Key words:** Chuankezhi injection; flavonoid; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; drug metabolism

喘可治注射液由中药淫羊藿和巴戟天配伍组成, 具有温肾补阳、止咳平喘之功, 主治哮喘属肾虚挟痰证。现代药理学研究表明, 喘可治注射液可以通过下丘脑-内分泌-免疫网络发挥多环节调节作用, 改善机体免疫功能, 提高机体免疫能力, 减少呼吸道感染及提高机体的应激能力, 对于哮喘和反复性呼吸道感染的治疗临床有效率高, 可达到长期缓解或根治的效果<sup>[1-4]</sup>; 不仅如此, 喘可治注射液在肿瘤的辅助治疗方面也表现出很好的疗效<sup>[5-7]</sup>, 在中医临床上具有非常重要的应用价值。

黄酮类化合物是淫羊藿的代表性成分, 也是喘可治注射液中的主要黄酮类成分, 其中以朝藿定 A, B, C 和淫羊藿苷含量最高, 也是喘可治发挥药理作用的主要效应成分, 其化学结构见图 1。国内外学者已对其中的一些黄酮苷单体化合物进行了药物代谢研究, 但对淫羊藿提取物及其制剂的体内代谢研究尚未见报道。本文采用高效液相色谱-串联线性离子阱静电场轨道阱质谱仪, 创新性探讨复方制剂喘可治注射液在大鼠体内的代谢研究, 实验参照喘可治注射液临床给药途径, 通过肌肉注射给予药物, 考察药物在体内的清除形式。研究表明, 给药后在大鼠尿液中未能检测到相关代谢产物, 而在粪便中共检出了喘可治注射液 12 种可能的代谢产物, 并系统分析和推断了这些代谢物的转化规律和可能结构。



**Figure 1** Chemical structures of main flavones in Chuankezhi injection

## 材料与方法

**材料与仪器** 喘可治注射液由广州万正药业有限公司提供, 每支 2 mL (批号: 11072502); 朝藿定 A

(epimedin A)、朝藿定 B (epimedin B) 和脱水淫羊藿素 (anhydroicaritin) 购自上海融禾医药科技有限公司; 朝藿定 C (epimedin C) 和淫羊藿苷 (icariin) 购自中国食品药品检定研究院; 宝藿苷 I (icariside II)、宝藿苷 II (baohuoside II)、箭藿苷 B (sagittatoside B)、鼠李糖淫羊藿次苷 II (2"-O-rhamnosyl-icariside II) 和淫羊藿素 (icaritin) 购自宝鸡市晨光生物科技有限公司, 所有对照品纯度均 $\geq 98\%$  (HPLC 归一化法)。甲醇、乙腈为 Fisher 公司产品, 甲酸为美国天地公司产品, 色谱纯; 其余化学试剂均为分析纯, 购自广州市化学试剂厂; 超纯水经 Milli-Q 系统纯化制备。

美国 Thermo 公司 LTQ Orbitrap 液质联用仪, 配有电喷雾离子源 (ESI); Thermo ACCELA 液相色谱系统; 瑞士梅特勒-托利多 AB 135-S 型电子分析天平 (十万分之一); Eppendorf 台式高速离心机; 美国 Techne DB-30 型样品浓缩仪; Branson 8510 型超声波清洗仪。

**色谱和质谱条件** 色谱柱: Agilent SB-C<sub>18</sub> (100 mm $\times$ 2.1 mm ID, 1.8  $\mu$ m, 美国 Agilent 公司); 流动相为 0.1% 甲酸溶液 (A)-乙腈 (B), 35 min 内由 15% B 线性梯度升至 30% B, 35~55 min 由 30% B 升至 50% B, 维持 50% B 等度洗脱 10 min, 65~85 min 由 50% B 线性梯度升至 100% B, 等度洗脱维持 5 min。每次进样前色谱柱在起始流动相比例条件下平衡 15 min; 流速: 0.2 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 5  $\mu$ L。优化的质谱条件如下, 负离子模式下检测, 鞘气流量: 40 arb; 辅助气流量: 5 arb; 离子源电压: 3.5 kV; 毛细管电压: -32 V; 毛细管温度, 300 $^{\circ}$ C。

**实验方法** 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 12 只, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 体重 200 $\pm$ 20 g, 分为 2 组: ① 对照组 ( $n=6$ ), 给予标准饲料; ② 肌注给药组 ( $n=6$ ), 给予标准饲料和喘可治注射液 12 天 (按临床给药剂量折算给予大鼠, 约为 0.5 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 体重, 肌肉注射给药)。所有动物自第 13 天开始禁食过夜, 并给予: ① 对照组, 注射用水; ② 肌注给药组, 两倍剂量喘可治注射液。粪便和尿液样品分别在给药后 0~24 h 和 24~48 h 收集; 血样于给药后 0.5、2 和 6 h 于眼底静脉丛采集, 离心分离血浆, 样品置 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱储存待测。

**粪便、尿样和血样处理** 精密称取大鼠粪便样品

0.2 g, 包括空白和给药后粪便样品, 分别置入 2 mL 试管中, 加入甲醇 1.0 mL, 超声提取 90 min 并混合均匀, 高速离心 10 min, 取上清液通过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 转移至进样瓶中, 待测。

精密吸取血浆样品或尿样 200  $\mu\text{L}$ , 包括空白和给药后血浆样品或尿样, 置入 2 mL 试管中, 加入甲醇 0.8 mL 充分混合均匀, 高速离心 10 min, 取上清液通过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 转移至进样瓶中, 待测。喘可治注射液采用上述步骤同法处理和操作。

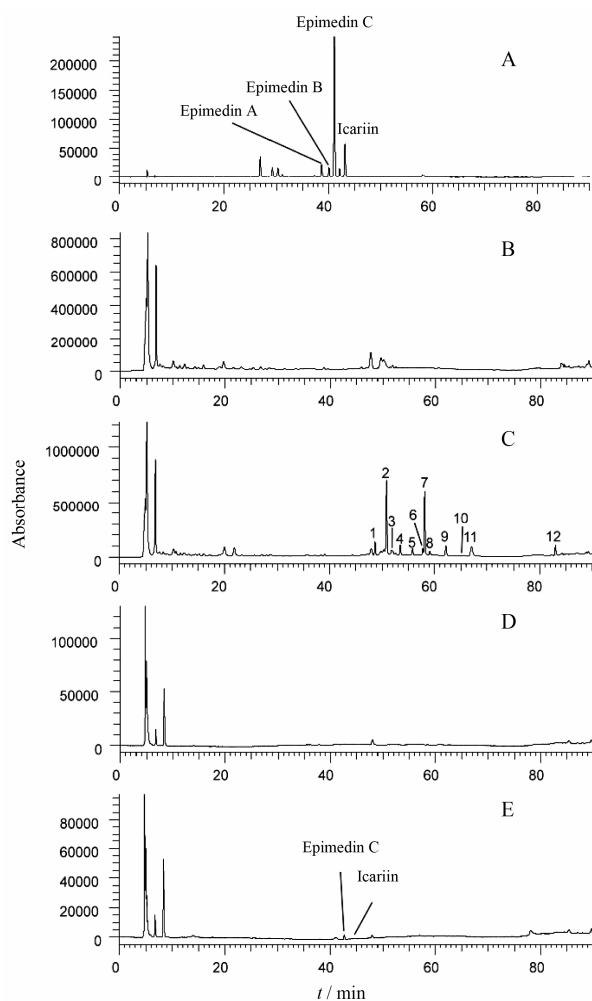
## 结果

### 1 确定大鼠体内喘可治注射液的代谢产物

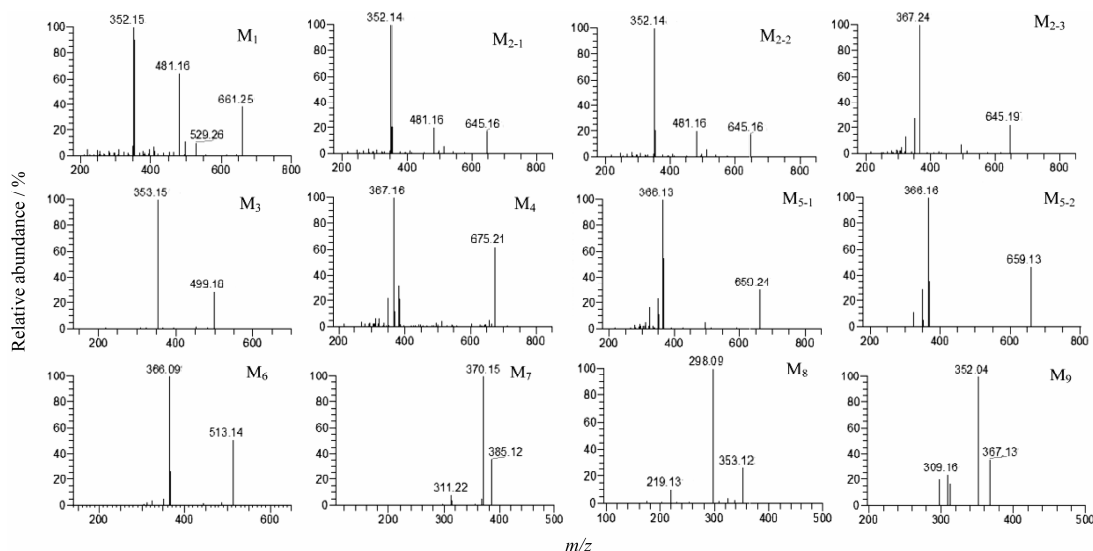
将处理后的喘可治注射液、粪便、尿样和血样通过液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 检测, 结果表明在给药后 0.5 h 血样中可以检测到喘可治注射液含量较大的原形药物峰, 如朝藿定 C 和淫羊藿苷, 但未能发现药物代谢物, 而在给药后 2 和 6 h 血样中则既未能检测到原形药物, 也未能检测到药物代谢物; 给药后尿样中亦未能发现原形药物和药物代谢物。但在肌注给药后的大鼠粪便中可以检测到一系列的代谢产物, 喘可治注射液、大鼠空白粪便及肌肉注射给药后 0~24 h 粪便样品、大鼠空白血浆及肌肉注射给药后 0.5 h 血浆样品的 HPLC-UV 色谱图, 如图 2 所示。通过比较色谱图, 可以确定喘可治注射液的原形药物峰及可能的代谢物峰, 它们的二级质谱谱图如图 3 所示, 它们的多级串联质谱数据见表 1。

### 2 粪便和尿液中药物代谢物的鉴定

通过对粪便、尿液和血浆样品进行 LC-MS 检测,



**Figure 2** HPLC chromatograms of Chuankezhi injection and rat fecal samples (UV270 nm): (A) Chuankezhi injection; (B) fecal sample collected from control rat; (C) fecal sample after intramuscular administration of Chuankezhi injection (0–24 h); (D) plasma sample collected from control rat; (E) plasma sample after intramuscular administration of Chuankezhi injection (0.5 h)



**Figure 3** Representative LC-MS<sup>2</sup> spectra of metabolites M<sub>1</sub>–M<sub>9</sub> in rat feces

**Table 1** Characterization of metabolites of Chuankezhi injection in rat feces. \*Compared with chemical standards

No.	Compound	<i>t<sub>R</sub></i> /min	UV	Formula	Mass		Error ppm	LC-MS <sup>n</sup> data
					Observed	Calculated		
1 (M <sub>1</sub> )	Noricarliin	48.69	236, 270	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>15</sub>	661.211 43	661.213 55	-1.916	MS <sup>2</sup> [661] 481 (55), 352 (100) MS <sup>3</sup> [661–352] 323 (45), 309 (55), 296 (65), 281 (100), 268 (60) MS <sup>4</sup> [611–352–281] 263 (20), 253 (100), 237 (80), 209 (25)
2 (M <sub>2-1</sub> )	Sagittatoside B isomer	50.76	234, 270	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>14</sub>	645.216 92	645.218 63	-1.336	MS <sup>2</sup> [645] 481(20), 352 (100) MS <sup>3</sup> [645–352] 323 (45), 309 (60), 296 (90), 281 (100), 268 (60), 255 (25)
3 (M <sub>2-2</sub> )	Sagittatoside B isomer	51.91	238, 271	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>14</sub>	645.216 43	645.218 63	-2.096	MS <sup>2</sup> [645] 481 (30), 352 (100) MS <sup>3</sup> [645–352] 323 (50), 309 (65), 296 (70), 281 (100), 268 (60), 255 (25)
4* (M <sub>3</sub> )	Baohuoside II	53.38	237, 270	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	499.159 39	499.161 64	-0.968	MS <sup>2</sup> [499] 353 (100) MS <sup>3</sup> [499–353] 325 (20), 298 (40), 284 (100), 255 (30) MS <sup>4</sup> [499–353–284] 255 (100)
5 (M <sub>4</sub> )	Baohuoside VII	55.74	238, 271	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>15</sub>	675.227 11	675.229 28	-1.832	MS <sup>2</sup> [675] 367 (100), 352 (25) MS <sup>3</sup> [675–367] 352 (100) MS <sup>4</sup> [675–367–352] 323 (30), 309 (100), 296 (45), 281 (65), 268 (50)
6* (M <sub>2-3</sub> )	Sagittatoside B	57.69	238, 271	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>14</sub>	645.216 74	645.218 63	-1.615	MS <sup>2</sup> [645] 367 (100), 352 (25) MS <sup>3</sup> [645–367] 352 (100) MS <sup>4</sup> [645–367–352] 323 (35), 309 (100), 296 (55), 281 (60), 267 (50)
7* (M <sub>5-1</sub> )	2"-O- Rhamnosylcariside II	58.05	234, 270	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>14</sub>	659.232 06	659.234 36	-2.081	MS <sup>2</sup> [659] 366 (100), 351 (25), 323 (20) MS <sup>3</sup> [659–366] 351 (100), 323 (75), 311 (55), 305 (20) MS <sup>4</sup> [659–366–351] 323 (100), 307 (20), 296 (38), 217 (75)
8 (M <sub>5-2</sub> )	2"-O- Rhamnosylcariside II isomer	59.02	239, 271	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>14</sub>	659.231 81	659.234 36	-2.461	MS <sup>2</sup> [659] 366 (100), 352 (25), 323 (20) MS <sup>3</sup> [659–366] 351 (90), 337 (20), 323 (100), 311 (60), 305 (25) MS <sup>4</sup> [659–366–323] 308 (100)
9* (M <sub>6</sub> )	Baohuoside I	62.13	237, 270	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>10</sub>	513.174 68	513.175 94	-1.644	MS <sup>2</sup> [513] 366 (100) MS <sup>3</sup> [513–366] 351 (100), 323 (80), 311 (55), 305 (20) MS <sup>4</sup> [513–366–351] 323 (100), 296 (35), 217 (70)
10* (M <sub>7</sub> )	Icaritin	65.8	239, 272	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	385.128 14	385.129 35	-0.102	MS <sup>2</sup> [385] 370 (100) MS <sup>3</sup> [385–370] 311 (100) MS <sup>4</sup> [385–370–311] 283 (50), 267 (55), 177 (100)
11 (M <sub>8</sub> )	Dimethylcaritin	67.05	240, 272	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	353.101 96	353.103 01	-0.013	MS <sup>2</sup> [353] 298 (100) MS <sup>3</sup> [353–298] 279 (65), 269 (40), 253 (100), 241 (32), 225 (30), 164 (70) MS <sup>4</sup> [353–298–253] 225 (100)
12* (M <sub>9</sub> )	Anhydroicaritin	82.97	246, 272	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	367.117 46	367.118 78	-0.422	MS <sup>2</sup> [367] 352 (100), 309 (25), 297 (20) MS <sup>3</sup> [367–352] 309 (100), 297 (65) MS <sup>4</sup> [367–352–309] 281 (95), 265 (100), 175 (65)

比较喘可治注射液、空白粪便样品、空白尿液、空白血浆样品和给药后粪便、尿液以及血浆样品液相色谱和总离子流色谱图，发现肌肉注射给予喘可治注射液后 0~24 h 大鼠粪便样品比空白和注射液样品多 12 个色谱峰，24~48 h 大鼠粪便样品中未检测到更多的代谢产物，在给药后 0.5 h 血样中可以检测到原形药物峰，如朝藿定 C 和淫羊藿苷，但未能发现药物代谢物，在给药后 2 和 6 h 血样中则未能检测到原形药物和药物代谢物，而在大鼠尿液中也未检测到原药和相关代谢物。根据其分子离子峰，与对照品的色谱和质谱行为比较，推测这 12 个色谱峰为喘可治注射液的代谢产物，分别为 *m/z* 661、645、499、675、659、

513、385、353 和 367 (包含 3 个同分异构体)。通过与已有标准物质色谱保留时间和质谱行为比较，并参考有关文献<sup>[8, 9]</sup>，推测它们为喘可治注射液组成药味淫羊藿所含黄酮苷的脱糖、脱水、氧化、去甲基化及异构化代谢产物，分别对应于去甲基淫羊藿苷、宝藿苷 II、宝藿苷 VII、箭藿苷 B 及其同分异构体、鼠李糖淫羊藿次苷 II 及其同分异构体、淫羊藿次苷 II、淫羊藿素、去甲基淫羊藿苷元以及脱水淫羊藿素 (表 1)，其二级质谱图如图 3。

### 3 粪便中代谢产物的质谱行为分析

代谢物 M<sub>1</sub> 鉴别为去甲基淫羊藿苷，精确质量数为 *m/z* 661.213 55，分子式为 C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>15</sub>，其二级质谱

的主要碎片为  $m/z$  481 (中性丢失葡萄糖) 和 352 (丢失葡萄糖基、鼠李糖基), 三级质谱 [ $m/z$  661→352] 的主要碎片为  $m/z$  323 (丢失一氧化碳和游离氢)、309 (丢失一氧化碳和甲基)、296 (中性丢失异丁烯)、281 (丢失异丁烯和甲基) 和 268 (中性丢失异丁烯和二氧化碳)。代谢物  $M_{2-1}$ 、 $M_{2-2}$  和  $M_{2-3}$  互为同分异构体, 它们分别在保留时间 50.76、51.91 和 57.69 min 流出, 精确质量数为  $m/z$  645.218 63, 分子式为  $C_{32}H_{37}O_{14}$ 。经与化学对照品的色谱保留时间、紫外吸收特征以及质谱行为比对,  $M_{2-3}$  鉴别为箭藿昔 B, 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  367 (丢失鼠李糖基和木糖基), 三级质谱 [ $m/z$  645→367] 的主要碎片为  $m/z$  352 (脱去甲基), 四级质谱 [ $m/z$  645→367→352] 的主要碎片为  $m/z$  323、309、296、281 和 268, 与代谢物  $M_1$  的碎片和裂解模式类似。它们为淫羊藿黄酮的水解和异构化代谢产物。 $M_3$  鉴别为宝藿昔 II, 其精确质量数  $m/z$  499.161 64, 分子式为  $C_{26}H_{27}O_{10}$ , 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  353 (丢失鼠李糖基), 三级质谱 [ $m/z$  499→353] 的主要碎片为  $m/z$  325 (丢失一氧化碳)、298 (丢失异丁烯基) 和 284 (丢失异戊烯基), 四级质谱 [ $m/z$  499→353→284] 的主要碎片为  $m/z$  255 (丢失一氧化碳和游离氢)<sup>[10]</sup>。 $M_4$  鉴别为宝藿昔 VII, 其精确质量数  $m/z$  675.229 28, 分子式为  $C_{33}H_{39}O_{15}$ , 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  367 (丢失葡萄糖基和鼠李糖基), 三级质谱 [ $m/z$  675→367] 的主要碎片为  $m/z$  352 (丢失甲基), 四级质谱 [ $m/z$  675→367→352] 的主要碎片为  $m/z$  323、309、296、281 和 268, 与代谢物  $M_1$  的碎片和裂解模式类似。代谢物  $M_{5-1}$  和  $M_{5-2}$  互为同分异构体, 它们分别在保留时间 58.05 和 59.02 min 流出, 精确质量数为  $m/z$  659.234 36, 分子式为  $C_{33}H_{39}O_{14}$ 。通过与化学对照品的色谱保留时间、紫外吸收特征以及质谱行为比对,  $M_{5-1}$  确定为 2"-*O*-鼠李糖淫羊藿次苷 II, 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  366 (丢失两个鼠李糖基和游离氢), 三级质谱 [ $m/z$  659→366] 的主要碎片为  $m/z$  351 (丢失甲基), 四级质谱 [ $m/z$  659→366→351] 的主要碎片为  $m/z$  323 (丢失一氧化碳)、 $m/z$  296 (丢失异丁烯基) 和 217 (C 环 RDA 裂解中性丢失对羟基苯乙炔)。代谢物  $M_7$ 、 $M_8$  和  $M_9$  均为淫羊藿黄酮的水解代谢产物,  $M_7$  鉴别为淫羊藿素, 其精确质量数  $m/z$

385.129 35, 分子式为  $C_{21}H_{21}O_7$ , 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  370 (丢失甲基), 三级质谱 [ $m/z$  385→370] 的主要碎片为  $m/z$  311 (丢失异丙醇基), 四级质谱 [ $m/z$  385→370→311] 的主要碎片为  $m/z$  283 (丢失一氧化碳)、267 (丢失二氧化碳) 和 177 (C 环 RDA 裂解中性丢失  $C_8H_6O_2$ )。 $M_8$  鉴别为去甲基淫羊藿素, 其精确质量数  $m/z$  353.103 01, 分子式为  $C_{20}H_{17}O_6$ , 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  298 (丢失异丁烯基), 三级质谱 [ $m/z$  353→298] 的主要碎片为  $m/z$  253 (丢失二氧化碳和游离氢), 四级质谱 [ $m/z$  353→298→253] 的主要碎片为  $m/z$  225 (丢失一氧化碳)。 $M_9$  鉴别为脱水淫羊藿素, 其精确质量数  $m/z$  367.118 78, 分子式为  $C_{21}H_{19}O_6$ , 其二级质谱的主要碎片为  $m/z$  352 (丢失甲基), 三级质谱 [ $m/z$  367→352] 的主要碎片为  $m/z$  309 (A 环 RDA 裂解丢失  $C_2H_2O$  和游离氢) 和 279 (丢失异丁烯基和  $H_2O$ ), 四级质谱 [ $m/z$  367→352→309] 的主要碎片为  $m/z$  281 (丢失一氧化碳)、265 (丢失二氧化碳) 和 175 (C 环 RDA 裂解中丢失  $C_8H_6O_2$ )。代谢物  $M_1$ – $M_9$  化学结构式见图 4。

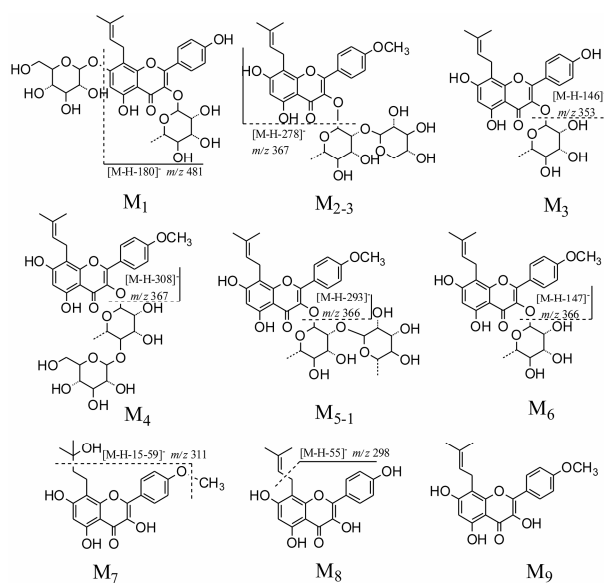


Figure 4 Chemical structures of metabolites  $M_1$ – $M_9$

## 讨论

淫羊藿黄酮苷是淫羊藿药材也是喘可治注射液发挥药理作用的主要效应成分, 根据已有的文献报道, 淫羊藿黄酮苷的生物利用度非常低, 如淫羊藿的主要效应成分朝藿定 C 的口服生物利用度仅 0.13% (大鼠口服给予淫羊藿提取物)<sup>[11]</sup>, 我们课题组的研究也表明, 淫羊藿黄酮在大鼠尿液中的回收率非常低, 朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷的尿累积排泄量/给药量

比值均低于 0.5%，说明淫羊藿黄酮类成分在体内很少以原形药物的形式吸收和消除<sup>[12]</sup>。生物利用度如此之低，但中药淫羊藿经过上千年的中医临床验证，却能有效地发挥作用，说明药物的代谢转化以及代谢后的吸收是其发挥作用的重要环节。淫羊藿黄酮代谢产物和代谢转化途径的阐明可为探索该类成分的体内生物活性形式起到重要作用。本文首次尝试探索中药复方的代谢研究方法，通过肌注给予大鼠喘可治注射液，在连续给药两周后的 0~24 h 粪便样品中找到 12 种原药的代谢产物，发现脱糖、脱水、氧化、去甲基化及异构化代谢反应是淫羊藿黄酮的主要代谢转化途径。

本课题组曾应用 LC-MS/MS 法测定了 15 个批次喘可治注射液中 4 种主要成分：朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷的含量，结果显示，朝藿定 A、B、C 和淫羊藿苷在注射液中的平均含量分别为 60.40、79.63、663.9 和 141.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[13]</sup>。从注射液中原形药物的含量测定结果来看，其主要原形药物成分的含量以朝藿定 C 最为突出，其次是淫羊藿苷。但即便是研究采用生物利用度较高的肌肉注射给药途径<sup>[14]</sup>，药物在进入体内后，也仅能在 0.5 h 血样中检测到微量的朝藿定 C 和淫羊藿苷，而其他所收集的样品，包括血样、尿样和粪便样品中均未能检测到原药，说明药物在体内消除非常迅速，而粪便中较高含量的代谢物(如图 2C 所示) 则提示药物主要以代谢形式消除。

为了与临床用药方式保持一致，研究过程中未对喘可治注射液进行浓缩处理，而是采用肌肉注射，连续给药两周，收集样品前再加大给药剂量(2 倍剂量)的给药方式，在体内逐步累积代谢物后再行收集粪便、尿样和血样，处理后检测。研究结果显示，单次给药后 0~24 h 在粪便和尿样中均未能检测到代谢产物，可能因单次给药药物剂量较小所致。连续给药后的 0~24 h 和 24~48 h 尿样中均未能检测到原形药物和代谢产物，再一次证实该类化合物并非经过肾脏消除，而连续给药后的 0~24 h 粪便样品中检测到一系列的代谢物，提示粪便是淫羊藿黄酮的主要排泄途径，淫羊藿黄酮主要通过胃肠道菌群和肝脏代谢后经粪便排出。连续给药后的 0.5 h 血样中可检测到微量的原形药物朝藿定 C 和淫羊藿苷，而给药后 2 和 4 h 血样则未能检测到原形药物，所有收集的血样中均未能检测到药物代谢物，其原因主要是一淫羊藿黄酮在大鼠体内呈现快速吸收和消除的药物动力学特征，且体内血药浓度均维持在较低水平<sup>[15]</sup>；

其二淫羊藿黄酮主要通过胃肠道菌群和肝脏代谢，代谢后的重吸收含量有限，又受限于当前条件下仪器灵敏度的限制，故在在血样中未能检测到药物代谢物。

本文通过分析喘可治注射液原形药物及其代谢产物的质谱裂解规律，发现在负离子检测模式下，各化合物的质谱断裂方式存在共性，其主要碎片为丢失糖、甲基、一氧化碳、水以及中性丢失丙烯后得到的分子离子。通过对这些化合物 MS<sup>n</sup>、UV、色谱行为、精确质量和分子式等数据的分析，同时结合文献和已有对照品的相关信息，共确认了 9 个代谢物的化学结构。这些相关信息的阐明不仅有利于更深入地研究淫羊藿黄酮在体内的代谢转化和活性形式，也可为中药复方的代谢研究提供可借鉴的方法，同时也为临床更好地应用喘可治注射液提供科学数据的支撑。

## References

- [1] Hu ZB, Chen LJ, Lu HB, et al. Systematic evaluation on Chuankezhi injection for treating chronic obstructive pulmonary disease [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2013, 22: 9–12.
- [2] An HM, Ding H, Hu B. Clinical research on treatment of acute attack of bronchial asthma in children with Chuankezhi injection [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2002, 13: 71–74.
- [3] Zhang HY. Clinical observation of “Chuankezhi” in treating remittent asthma of spleen-kidney Yang deficiency [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志)*, 2002, 36: 13–14.
- [4] Xia M, Cai YB, Fei X, et al. Mechanisms of “Chuankezhi injection” in suppressing inflammatory reaction in asthmatic rats [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志)*, 2013, 47: 70–73.
- [5] Tao L. Clinical Study of Chuankezhi Injection of Cure on Medium or Late Stage Primary Liver Cancer (喘可治注射液用于中晚期原发性肝癌的临床研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2005.
- [6] Hu, Y. Clinical study of Chuankezhi injection of cure on IIIb–IV non-small cell lung cancer (喘可治注射液用于IIIb–IV非小细胞肺癌的临床研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2006.
- [7] Deng YY, Wu L, Wang X, et al. Chuankezhi injection relieves adriamycin induced myocardial damage to 4T1 tumor-bearing mice [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2013, 35: 875–879.
- [8] Chen Y, Wang JY, Jia XB, et al. Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo [J]. *Molecules*, 2011, 16:1336–1348.

- [9] Cui L, Sun E, Zhang Z, et al. Metabolite profiles of epimedin C in rat plasma and bile by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-TOF-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28: 1306–1312.
- [10] Ablajan K, Abliz Z, Shang XY, et al. Structural characterization flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2006, 41: 352–360.
- [11] Lee CJ, Wu YT, Hsueh TY, et al. Pharmacokinetics and oral bioavailability of epimedin C after oral administration of epimedin C and Herba Epimedii extract in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28: 630–636.
- [12] Yu JJ, Liu YJ, Xu SJ, et al. Simultaneous quantitative determination of four epimedium flavonoids in rat urine by LC-MS/MS [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2016, 27: 543–547.
- [13] Zhu YL, Xu SJ, Feng Y, et al. Simultaneous quantification of four flavonoid glycosides in Chuankezhi injection using LC-MS/MS [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2015, 26: 244–248.
- [14] Xu SJ, Yu JJ, Yang L, et al. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of epimedin C in rat after intramuscular administration of epimedin C, a combination of four flavonoid glycosides and purified Herba Epimedii extract [J]. *J Anal Methods Chem*, 2016. DOI: 10.1155/2016/5093537.
- [15] Xu SJ, Zhu YL, Yu JJ, et al. Simultaneous determination of 4 prenylflavonoids of Chuankezhi injection in rat plasma by LC-MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 637–641.