

静脉给药热毒宁注射液大鼠血浆、胆汁、尿液和粪便中代谢产物的鉴定

王春雪¹, 王玲², 钱大玮^{1*}, 张黄琴³, 黄文哲⁴, 王团结⁴,
朱振华², 宿树兰³, 郭盛³, 段金廛²

(南京中医药大学 1. 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 3. 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023;
4. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

摘要: 研究热毒宁注射液在大鼠体内的代谢产物。采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电轨道阱串联质谱联用方法 (UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 对大鼠尾静脉注射热毒宁后血浆、胆汁、尿液和粪便进行分析, 利用质量亏损过滤 (MDF) 技术进行京尼平苷、京尼平苷酸、断氧化马钱子苷、绿原酸代谢产物分析鉴定, 推测出大鼠体内京尼平苷氧化、脱水、去甲氧基、水解、开环、半胱氨酸结合和苷元葡萄糖醛酸结合等 14 个代谢产物; 京尼平苷酸脱水、开环、双键还原和半胱氨酸结合等 9 个代谢产物; 断氧化马钱子苷水解、去甲氧基、羟基化和乙基化等 6 个代谢产物; 绿原酸脱羧、水解、甲基化、乙酰化、半胱氨酸甘氨酸结合和谷胱甘肽结合等 12 个代谢产物。为进一步探讨热毒宁注射液体内过程, 阐明其功效物质基础提供依据。

关键词: 热毒宁注射液; 京尼平苷; 京尼平苷酸; 断氧化马钱子苷; 绿原酸; 代谢产物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1148-08

Identification of metabolites of Reduning injection in rat plasma, bile, urine and feces after intravenous administration

WANG Chun-xue¹, WANG Ling², QIAN Da-wei^{1*}, ZHANG Huang-qin³, HUANG Wen-zhe⁴,
WANG Tuan-jie⁴, ZHU Zhen-hua², SU Shu-lan³, GUO Sheng³, DUAN Jin-ao²

(1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, 3. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
4. Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study was designed to determine the metabolites of Renduning injection in rats. The ultra-high performance liquid chromatography-LTQ Orbitrap mass spectrometric (UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS) and mass defect filter techniques were applied to analyze the metabolites of Reduning injection in rat plasma, bile, urine and feces. As a result, we determined 14 metabolites of geniposide, including oxidation, dehydration, hydroxymethylene loss, hydrolysis, ring-opened, cysteine conjugation and glucuronidation conjugation of aglycone; 9 metabolites of geniposidic acid, consisting of dehydration, ring-opened, double-bond reduction and cysteine

收稿日期: 2018-01-13; 修回日期: 2018-03-16.

基金项目: 基于药物相互作用研究热毒宁注射液联合用药 (FJGJS-2015-14); 热毒宁注射液标准化建设 (ZYBZH-C-JS-31); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811916, E-mail: qiandwnj@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0052

conjugation; 6 metabolites of secoxylogain including hydrolysis, hydroxymethylene loss, hydroxylation and ethylation; 12 metabolites of chlorogenic acid, containing decarboxylation, hydrolysis, methylation, acetylation, cysteinylglycine conjugation and glutathione conjugation. It provided information for the therapeutic effect of Reduning *in vivo*.

Key words: Reduning injection; geniposide; geniposidic acid; secoxylogain; chlorogenic acid; metabolite

热毒宁注射液由青蒿、栀子和金银花 3 味中药组合而成, 主要用于外感风热所致流感、高热不退、咳嗽及上呼吸道感染等症, 临床上退热作用迅速、抗病毒效果显著^[1]。研究表明, 其主要有效成分为京尼平苷、京尼平苷酸、断氧化马钱子苷和绿原酸等^[2, 3]。虽有京尼平苷、京尼平苷酸及绿原酸体内代谢的文献报道^[4, 5], 但这些报道仅限于对单味药提取物或单体成分的代谢研究, 而热毒宁注射液在体内代谢产物研究尚未见报道。

药物化学结构的多样性和体内生物转化途径的复杂性使得药物代谢产物鉴定研究具有挑战性, 且由于生物样品中代谢产物含量低, 将样品收集再经色谱等方法分离得纯品后鉴定结构的方法, 既费时又费力。LC-MS 联用技术由于兼有优秀的色谱分离能力和高灵敏度、高专属的质谱检测能力, 近年来在药物体内过程研究中的应用日益广泛, 其中高分辨质谱的应用使得代谢产物结构推测的可靠性得到极大的提高, 已成为药物代谢产物鉴定的主要方法之一^[6, 7]。而高分辨率的线性离子阱-静电轨道阱串联质谱 (LTQ-Orbitrap-MS) 在线性离子阱灵敏、快速的基础上增加了轨道阱技术的高分辨率、高质量准确度的特点, 可短时间内同时实现母、子离子的高分辨采集和多级质谱碎裂, 更适用于中药复杂物质体系中代谢产物的快速鉴定^[8]。本文采用 UHPLC 串联 LTQ-Orbitrap-MS 技术研究大鼠注射热毒宁注射液后主要化学成分在其体内代谢产物, 共鉴定出 36 个代谢物, 为进一步探讨热毒宁注射液的体内过程, 阐明其功效物质基础提供依据。

材料与方 法

仪器与试剂 UltiMate 3000 型超高效液相色谱、LTQ-Orbitrap Velos Pro 质谱仪 (美国 Thermo 公司); Xcalibur 3.0 质谱工作站软件、Networks 1.3 及 Mass Frontier 7.0 分析软件 (美国 Thermo 公司); DZ 30-32 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); WH-微型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器有限公司); 电子天平 (BT125, 赛多利斯科学仪器有限公司)。

京尼平苷 (批号 160729)、京尼平 (批号 160918)、

京尼平苷酸 (批号 160916)、断氧化马钱子苷 (批号 160720)、绿原酸 (批号 160903) 均购自上海融禾医药科技有限公司, 纯度均大于 98%。热毒宁注射液 (批号 161010, 10 mL/支) 由江苏康缘药业股份有限公司提供, 其中京尼平苷、京尼平苷酸、断氧化马钱子苷、绿原酸含量分别为 9.95、0.830、1.13 和 6.33 mg·mL⁻¹。乙腈、甲酸 (色谱级, 德国 Merck 公司)。

实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠, 约 8 周龄, 体重 (250±10) g, 由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供, 合格证号 SCXK (苏) 2017-0001。

UHPLC 检测条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH T₃ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 柱; 流动相: 0.1% 甲酸 (A)-乙腈 (B), 洗脱梯度 (0~3 min, 1% B; 3~9 min, 1%~10% B; 9~12 min, 10%~20% B; 12~13 min, 20%~25% B; 13~15 min, 25% B; 15~18 min, 25%~40% B; 18~20 min, 40%~99% B); 柱温 30℃; 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL。

MS 检测条件 电喷雾离子源 (ESI), 采用正离子检测模式, *m/z* 采集范围为 110~1000, 采集时间为 0.8~20.8 min。主要质谱参数: 毛细管温度 350℃, 蒸发器温度 350℃, 鞘气流 40 kPa, 辅助气流 15 kPa, 喷雾电压 3.5 V, 源电流 100 μA; MS² 质谱的触发方式为动态数据依赖分析模式, 选取上一级最高峰进行碰撞诱导碎裂解离碎片扫描 (CID), 碰撞能量设定为 30%, 以离子阱打拿极检测。

对照品溶液的制备 分别精密称取京尼平苷、京尼平、京尼平苷酸、断氧化马钱子苷、绿原酸 10 mg, 甲醇溶解并定容至 10 mL 得 1 mg·mL⁻¹ 的储备液。

动物分组及给药 SD 大鼠 15 只, 随机分为空白组、血浆组、胆汁组、尿液/粪便组, 空白组 6 只, 其余每组 3 只。根据临床剂量, 热毒宁注射液给药剂量为 2 mL·kg⁻¹。分别连续 3 天给予热毒宁注射液及空白组的等体积生理盐水。

生物样品的采集与供试液的制备 大鼠第 3 天给药前禁食不禁水 12 h, 取血浆组于 30 min 眼眶取血置于预先涂有 1% 肝素钠生理盐水的 EP 管中, 离心 10 min (4 000 r·min⁻¹), 取上清得血浆样品; 取胆汁组 10% 水合氯醛麻醉, 胆管插入并固定后即刻给大鼠

注射给药, 注射给药后开始收集 0~30 min 胆汁样品; 取尿液/粪便组分别置于代谢笼, 收集 0~12 h 的尿液和粪便。以上样品置于 -20 °C 保存。

大鼠血浆样品供试液的制备 取血浆样品 200 μL 混合均匀后, 加入 3 倍乙腈沉淀蛋白, 涡旋混匀 30 s, 离心 10 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液于 37 °C 氮气吹干, 以 5% 乙腈复溶, 离心 5 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液为血浆样品供试液。

大鼠胆汁、尿液样品供试液的制备 取尿液或胆汁 1 mL, 加等体积乙腈, 涡旋混匀 30 s, 离心 10 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液作为胆汁、尿液样品供试液。

大鼠粪便样品供试液的制备 取碾碎混匀的粪便 1 g, 加蒸馏水 3 mL 溶解, 超声 10 min, 取出后离心 10 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液, 加入等体积乙腈, 涡旋混匀 30 s, 离心 5 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液作为粪便样品供试液。

数据处理 利用 Networks 1.3 分析软件对空白和给药组的一级质谱进行自动比对, 结合待测化合物元素组成, 在误差小于 5 ppm 的条件下, 寻找符合代谢修饰的代谢产物准分子离子峰, 结合二级质谱分析代谢物结构特征, 并通过 Mass Frontier 7.0 谱图解析软件作进一步验证。

结果

1 血浆、胆汁、尿液、粪便 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析

给药血浆、胆汁、尿液、粪便样品正离子条件下原形化合物及其代谢产物总提取离子流图如图 1。

2 代谢产物分析

2.1 京尼平苷 (A) 代谢产物 大鼠体内共鉴定出 14 个京尼平苷代谢产物, 主要鉴定信息见表 1。

A0 为京尼平苷: m/z 411.124 8 为其加钠分子离子峰, m/z 249.072 8 为糖苷键断裂的碎片, m/z 231.062 1 由其进一步脱水形成, 与对照品相符合。A1 为京尼平苷苷元与葡萄糖醛酸结合产物: m/z 425.107 5 为其加钠分子离子峰, m/z 199.021 7 为葡萄糖醛酸正离子, 其余碎片与京尼平苷相同。A2 为 A1 开环产物: m/z 427.120 7 为其加钠分子离子峰, m/z 233.078 9 为脱葡萄糖和水的碎片。A3-1 和 A3-2 皆为 A2 去甲酸甲酯和羟基产物: m/z 345.153 7 为其加氢分子离子峰, m/z 169.121 8 为糖苷键断裂的碎片, m/z 151.111 3 由其进一步脱水形成。A4-1 和 A4-2 为半胱氨酸与京尼平苷不同碳位结合的同分异构产物^[9]: m/z 492.152 0 为其加氢分子离子峰, m/z 330.100 4 为糖苷键断裂的碎片, m/z 312.090 0 由其进一步脱水形成。A5 为京尼平苷去甲氧基产物: m/z 381.114 4 为其加钠分子离子峰, m/z 219.065 0 为糖苷键断裂的碎片, m/z 201.052 1 由其进一步脱水生成。

A6 为京尼平: m/z 227.090 9 为其加氢分子离子峰, m/z 213.076 2 为酯键断裂碎片, m/z 209.080 5 为其脱水的碎片, m/z 191.070 3 由其进一步脱水产生, 与对照品相符合。A7 为 A6 酯键水解产物: m/z 213.075 1 为其加氢分子离子峰, m/z 195.065 3 为其脱水的碎片, m/z 185.080 8 为脱羰基碎片, m/z 151.075 2 为其脱水并脱羧碎片。A8 为 A6 氧化脱氢产物: m/z 225.075 2 为其加氢分子离子峰, m/z 207.065 1 为其脱水的碎片, m/z 195.059 4 为脱甲氧基的碎片, m/z 151.075 5 由

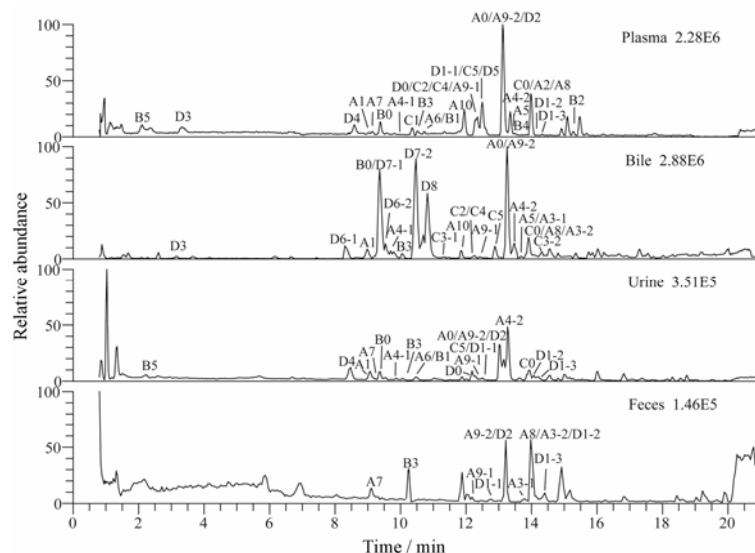


Figure 1 Combined ion chromatograms of the original compounds and metabolites in rat plasma, bile, urine and feces

Table 1 Metabolites of geniposide in rats after Reduning injection. GlucA: Glucuronic acid; Cys: Cysteine

No.	t_R /min	Ion form	Formula	m/z		Error /ppm	MS/MS fragment ion	Identification/ reaction	Source
				Theoretical	Experimental				
A0	13.14	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀ Na	411.126 1	411.124 8	-3.2	249.072 8 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 231.062 1 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Geniposide, parent	Plasma, bile, urine
A1	9.03	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₁ Na	425.105 4	425.107 5	4.9	249.072 8 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 231.062 5 [M+Na-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺ 199.021 7 [GlucA-H ₂ O+Na] ⁺	Glucuronidation of A0	Plasma, bile, urine
A2	13.97	[M+Na] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ Na	427.121 1	427.120 7	-0.9	233.078 9 [M+Na-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺	Ring-opened of A1	Plasma
A3-1	13.71	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₅ O ₈	345.154 4	345.153 7	-2.0	169.121 8 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 151.111 3 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺	Cleavage and dihy- droxylation of A2	Bile, feces
A3-2	14.01	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₅ O ₈	345.154 4	345.153 6	-2.3	169.121 8 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 151.111 3 [M+H-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺	Cleavage and dihy- droxylation of A2	Bile, feces
A4-1	9.57	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ NO ₁₁ S	492.153 4	492.152 0	-2.8	330.100 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 312.090 0 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Cys conjugation of A0	Plasma, bile, urine
A4-2	13.35	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ NO ₁₁ S	492.153 4	492.152 3	-2.2	330.100 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 312.090 0 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Cys conjugation of A0	Plasma, bile, urine
A5	13.50	[M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₉ Na	381.115 6	381.114 4	-3.1	219.065 0 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 201.052 1 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Hydroxymethylene loss of A0	Plasma, bile
A6	10.50	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₅ O ₅	227.091 4	227.090 9	-2.2	213.076 2 [M+H-CH ₂] ⁺ 209.080 5 [M+H-H ₂ O] ⁺ 191.070 3 [M+H-2H ₂ O] ⁺	Genipin	Plasma, urine
A7	9.13	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213.075 8	213.075 1	-3.3	195.065 3 [M+H-H ₂ O] ⁺ 185.080 8 [M+H-CO] ⁺ 151.075 2 [M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺	Hydrolysis of A6	Plasma, urine, feces
A8	13.95	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₃ O ₅	225.075 8	225.075 2	-2.7	207.065 1 [M+H-H ₂ O] ⁺ 195.059 4 [M+H-OCH ₂] ⁺ 151.075 5 [M+H-OCH ₂ -CO ₂] ⁺	Oxidation of A6	Plasma, bile, feces
A9-1	12.35	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209.080 8	209.080 4	-1.9	191.070 5 [M+H-H ₂ O] ⁺ 177.054 3 [M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺	Dehydration of A6	Plasma, bile, urine, feces
A9-2	13.09	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209.080 8	209.080 2	-2.9	181.085 8 [M+H-CO] ⁺ 177.054 5 [M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺	Dehydration of A6	Plasma, bile, urine, feces
A10	11.94	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ O ₄	197.080 8	197.080 2	-3.0	179.070 3 [M+H-H ₂ O] ⁺ 169.085 8 [M+H-CO] ⁺ 151.075 3 [M+H-CO-H ₂ O] ⁺	Hydroxymethylene loss of A6	Plasma, bile
A11	2.11	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ O ₅	215.091 4	215.090 7	-3.3	197.080 8 [M+H-H ₂ O] ⁺ 169.085 9 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	Ring-opened of A7	Plasma, urine

进一步脱羧产生。A9-1 和 A9-2 皆为 A6 不同位羟基脱水的同分异构产物: m/z 209.080 4 为其加氢分子离子峰, m/z 191.070 5 为其脱水的碎片, m/z 177.054 3 由其去甲基后脱水产生。A10 为 A6 脱甲氧基产物: m/z 197.080 2 为其加氢分子离子峰, m/z 179.070 3 为脱水的碎片, m/z 169.085 8 为其脱羰基的碎片, m/z 151.075 3 由其进一步脱水产生。A11 为 A7 开环产物, m/z 215.090 7 为其加氢分子离子峰, m/z 197.080 8 为脱水的碎片, m/z 169.085 9 为脱羰基的碎片。综上, 京尼平苷体内代谢途径见图 2a。

2.2 京尼平苷酸 (B) 代谢产物 大鼠体内共鉴定出 9 个京尼平苷酸代谢产物, 主要鉴定信息见表 2。

B0 为京尼平苷酸: m/z 397.109 0 为其加钠分子离子峰, m/z 235.052 6 为糖苷键断裂的碎片, m/z 217.047 1 由进一步脱水产生, 与对照品相符。B1 为半胱氨酸结合产物: m/z 478.136 1 为其加氢分子离子峰, m/z 316.076 4 为糖苷键断裂的碎片, m/z 298.074 4 和 m/z 280.063 5 由进一步连续脱水产生。B2 为羟基

化再乙基化产物: m/z 421.168 8 为其加氢分子离子峰, m/z 375.125 6 为脱乙基和水的碎片, m/z 213.075 7 由其进一步脱葡萄糖产生。B3 为双键还原产物: m/z 377.144 0 为其加氢分子离子峰, m/z 331.138 5 为脱羰基的碎片, m/z 215.091 4 为糖苷键断裂的碎片, m/z 197.080 8 由进一步脱水产生。B4 为京尼平苷酸开环后去甲酸甲酯产物: m/z 331.174 1 为其加氢分子离子峰, m/z 313.152 6 为脱水的碎片, m/z 169.122 3 为糖苷键断裂的碎片。B5 为 B0 糖苷键水解产物, B6 为 B4 脱糖与葡萄糖醛酸结合产物, B7-1 和 B7-2 为 B0 脱羰基产物, B8 则为 B5 开环产物, 产物 B5、B6、B7-1、B7-2、B8 与京尼平苷产物 A7、A5、A3-1、A3-2、A11 相同, 仅从结构无法判断基源, 其二级碎片详见表 1。综上, 京尼平苷酸体内代谢途径如图 2b。

2.3 断氧化马钱子苷 (C) 代谢产物 大鼠体内共鉴定出 6 个断氧化马钱子苷代谢产物, 主要鉴定信息见表 3。

C0 为断氧化马钱子苷: m/z 405.138 6 为其加氢

Table 2 Metabolites of geniposidic acid in rats after Reduning injection. The metabolite B5, B6, B7-1, B7-2 and B8 are same with A7, A5, A3-1, A3-2, A11 in the table 1

No.	t_R /min	Ion form	Formula	m/z		Error /ppm	MS/MS fragment ion	Identification/ reaction	Source
				Theoretical	Experimental				
B0	9.38	[M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀ Na	397.110 5	397.109 0	-3.8	235.052 6 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 217.047 1 [M+Na-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Geniposidic acid, parent	Plasma, bile, urine
B1	10.53	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₈ NO ₁₁ S	478.137 8	478.136 1	-3.6	316.076 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 298.074 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺ 280.063 5 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -2H ₂ O] ⁺	Cys conjugation of B0	Plasma, urine
B2	15.48	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₁	421.170 4	421.168 8	-3.8	375.125 6 [M+H-C ₂ H ₄ -H ₂ O] ⁺ 213.075 7 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₂ H ₄ -H ₂ O] ⁺	Hydroxylation and ethylation of B0	Plasma
B3	10.36	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₅ O ₁₀	377.144 2	377.144 0	-0.5	331.138 5 [M+H-CO ₂] ⁺ 215.091 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ 197.080 8 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Double-bond reduction of B0	Plasma, bile, urine, feces
B4	13.84	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₇ O ₇	331.175 1	331.174 1	-3.0	313.152 6 [M+H-H ₂ O] ⁺ 169.122 3 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	Ring-opened and cleavage of B0	Plasma

Table 3 Metabolites of secoxylogain in rats after Reduning injection

No.	t_R /min	Ion form	Formula	m/z		Error /ppm	MS/MS fragment ion	Identification/ reaction	Source
				Theoretical	Experimental				
C0	13.98	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₅ O ₁₁	405.139 1	405.138 6	-1.2	391.119 2 [M+H-CH ₂] ⁺ 373.121 6 [M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 243.085 4 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	Secoxylogain, parent	Plasma, bile, urine
C1	10.34	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₅ O ₆	243.086 3	243.085 5	-3.3	225.076 7 [M+H-H ₂ O] ⁺ 207.065 2 [M+H-2H ₂ O] ⁺	Glucoside removal of C0	Plasma, urine
C2	12.26	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ O ₆	229.070 7	229.069 9	-3.5	211.060 1 [M+H-H ₂ O] ⁺ 201.074 8 [M+H-CO] ⁺	Hydrolysis of C1	Plasma, bile
C3-1	11.51	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ O ₁₂	451.181 0	451.182 3	2.9	243.086 0 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-CO] ⁺ 225.112 3 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -2H ₂ O-CO] ⁺	Hydroxylation and ethylation of C0	Bile
C3-2	14.11	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ O ₁₂	451.181 0	451.181 3	0.7	243.086 0 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-CO] ⁺ 225.112 3 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -2H ₂ O-CO] ⁺	Hydroxylation and ethylation of C0	Bile
C4	12.18	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₃ O ₁₁	391.123 5	391.124 2	1.8	373.112 6 [M+H-H ₂ O] ⁺	Hydrolysis of C0	Plasma, bile, urine
C5	12.50	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₃ O ₁₀	375.128 6	375.127 5	-2.9	357.113 8 [M+H-H ₂ O] ⁺ 347.133 1 [M+H-CO] ⁺ 195.065 2 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Hydroxymethylene loss of C0	Plasma, bile, urine

分子离子峰, m/z 391.119 2 为酯键断裂的碎片, m/z 373.121 6 由其进一步脱水产生, m/z 243.085 4 为糖苷键断裂的碎片, 与对照品相符。C1 为断氧化马钱子苷昔元: m/z 243.085 5 为其加氢分子离子峰, m/z 225.076 7 为脱水的碎片, m/z 207.065 2 由其进一步脱水产生。C2 为 C1 酯键水解产物: m/z 229.069 9 为其加氢分子离子峰, m/z 211.060 1 为脱水的碎片, m/z 201.074 8 为脱羰基的碎片。C3-1 和 C3-2 同为不同碳位羟基化再乙基化的同分异构产物: m/z 451.182 3 为加氢分子离子峰, m/z 243.086 0 为其糖苷断裂后脱水脱羰基的碎片, m/z 225.112 3 由其进一步脱水产生。C4 为断氧化马钱子苷酯键水解产物: m/z 391.124 2 为其加氢分子离子峰, m/z 373.112 6 为其脱水的碎片。C5 为去甲氧基产物: m/z 375.127 5 为其加氢分子离子峰, m/z 357.113 8 为脱水的碎片, m/z 195.065 2 由进一步脱葡萄糖产生, m/z 347.133 1 为脱羰基的碎片。综上, 断氧化马钱子苷的体内代谢途径如图 2c。

2.4 绿原酸 (D) 代谢产物 大鼠体内共鉴定出 12 个绿原酸代谢产物, 主要鉴定信息见表 4。

D0 为绿原酸: m/z 355.101 6 为加氢分子离子峰, m/z 181.049 2 为酯键断裂的咖啡酸正离子, m/z 163.038 4 由其进一步脱水产生, m/z 149.022 8 为再去甲基产生, 与对照品相符。D1-1、D1-2 和 D1-3 同为绿原酸不同位羟基甲基化的同分异构产物: m/z 369.116 9 为其加氢分子离子峰, m/z 351.107 0 为脱水的碎片, m/z 195.065 1 为甲基化咖啡酸正离子, m/z 177.054 2 由其进一步脱水产生。D2 为甲基化咖啡酸: m/z 195.063 9 为其加氢分子离子峰, m/z 163.039 0 为其脱甲基和水的碎片, m/z 153.054 6 为其脱甲基和脱羰基的碎片。D3 为二氢咖啡酸: m/z 183.064 8 为其加氢分子离子峰, m/z 165.054 6 为脱水的碎片, m/z 137.059 2 由进一步脱羰基产生。D4 为绿原酸脱羧产物: m/z 311.112 0 为其加氢分子离子峰, m/z 183.065 0 为二氢咖啡酸正离子, m/z 165.054 4 由进一步脱水产生。D5 为绿

Table 4 Metabolites of chlorogenic acid in rats after Reduning injection. Cys-Gly: Cysteinylglycine; GSH: Glutathione

No.	t_R /min	Ion form	Formula	m/z		Error /ppm	MS/MS fragment ion	Identification/ reaction	Source
				Theoretical	Experimental				
D0	12.28	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	355.102 4	355.101 6	-2.3	181.049 2 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁺ 163.038 4 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺ 149.022 8 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -CH ₂ -H ₂ O] ⁺	Chlorogenic acid	Plasma, urine
D1-1	12.54	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₁ O ₉	369.118 0	369.116 9	-3.0	351.107 0 [M+H-H ₂ O] ⁺ 195.065 1 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁺ 177.054 2 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Methylation of D0	Plasma, urine, feces
D1-2	14.00	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₁ O ₉	369.118 0	369.117 0	-2.7	351.107 0 [M+H-H ₂ O] ⁺ 305.095 8 [M+H-CO-2H ₂ O] ⁺ 177.054 2 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Methylation of D0	Plasma, urine, feces
D1-3	14.33	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₁ O ₉	369.118 0	369.116 8	-3.3	351.107 0 [M+H-H ₂ O] ⁺ 195.065 1 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅] ⁺ 177.054 2 [M+H-C ₇ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Methylation of D0	Plasma, urine, feces
D2	13.12	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195.064 5	195.063 9	-3.1	163.039 0 [M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ 153.054 6 [M+H-CH ₂ -CO] ⁺	Hydrolysis and methylation of D0	Plasma, urine, feces
D3	3.34	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ O ₄	183.065 2	183.064 8	-2.2	165.054 6 [M+H-H ₂ O] ⁺ 137.059 2 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	Hydrolysis and double-bond reduction of D0	Plasma, bile
D4	8.53	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ O ₇	311.112 5	311.112 0	-1.6	183.065 0 [M+H-C ₆ H ₈ O ₃] ⁺ 165.054 4 [M+H-C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O] ⁺	Decarboxylation of D0	Plasma, urine
D5	12.50	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₁ O ₁₀	397.112 9	397.111 9	-2.5	379.102 4 [M+H-H ₂ O] ⁺ 353.086 7 [M+H-HCOCH ₃] ⁺	Acetylation of D0	Plasma
D6-1	8.30	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₁₂ S	547.159 2	547.157 5	-3.1	369.118 0 [M+H-Cys-Gly] ⁺ 351.106 9 [M+H-Cys-Gly-H ₂ O] ⁺ 179.047 9 [M+H-C ₁₇ H ₂₀ O ₉] ⁺	Methylation and Cys-Gly conjugation of D0	Bile
D6-2	9.43	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₁₂ S	547.159 2	547.157 7	-2.7	369.118 0 [M+H-Cys-Gly] ⁺ 177.054 6 [M+H-Cys-Gly-C ₇ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	Methylation and Cys-Gly conjugation of D0	Bile
D7-1	9.36	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₈ N ₅ O ₁₅ S	676.201 8	676.200 3	-2.2	369.117 8 [M+H-GSH] ⁺ 308.091 0 [M+H-C ₁₇ H ₂₀ O ₉] ⁺ 233.059 1 [M+H-C ₁₇ H ₂₀ O ₉ -C ₂ H ₅ NO ₂] ⁺	Methylation and GSH conjugation of D0	Bile
D7-2	10.47	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₈ N ₅ O ₁₅ S	676.201 8	676.200 4	-2.1	369.117 8 [M+H-GSH] ⁺ 308.091 0 [M+H-C ₁₇ H ₂₀ O ₉] ⁺ 233.059 1 [M+H-C ₁₇ H ₂₀ O ₉ -C ₂ H ₅ NO ₂] ⁺	Methylation and GSH conjugation of D0	Bile
D8	10.85	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ N ₅ O ₁₀ S	502.149 0	502.147 8	-2.4	308.091 1 [M+H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁺ 233.058 5 [M+H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄ -C ₂ H ₅ NO ₂] ⁺ 195.064 0 [M+H-GSH] ⁺	GSH conjugation of D2	Bile

原酸乙酰化产物: m/z 397.111 9 为其加氢离子峰, m/z 379.102 4 为其脱水碎片, m/z 353.086 7 为丢失乙酰基的碎片。

D6-1 和 D6-2 皆为绿原酸不同位羟基甲基化的同分异构体与半胱氨酰甘氨酸结合的产物: m/z 547.157 5 为其加氢分子离子峰, m/z 369.118 0 为甲基化绿原酸正离子, m/z 351.106 9 由其进一步脱水产生, m/z 179.047 9 为半胱氨酰甘氨酸正离子。D7-1 和 D7-2 同为绿原酸不同位羟基甲基化的同分异构体与谷胱甘肽结合的产物^[10]: m/z 676.200 3 为其加氢分子离子峰, m/z 369.117 8 为甲基化绿原酸正离子, m/z 308.091 0 为谷胱甘肽正离子, m/z 233.058 9 由其进一步脱甘氨酸产生。D8 为甲基化咖啡酸与谷胱甘肽结合产物: m/z 502.147 8 为其加氢分子离子峰, m/z 195.064 0 为甲基化咖啡酸正离子, 其余碎片与 D7 相同。综上, 绿原酸体内代谢途径如图 2d。

讨论

梔子药材中主要活性成分为环烯醚萜类, 代表性成分为含量达 3.06%~4.12% 的京尼平苷, 而其苷元京尼平的含量却只有 0.005%~0.01%^[11]。本文的研究结果显示, 热毒宁注射液中京尼平的含量低于检测限, 但在大鼠注射给药热毒宁注射液后的血浆与尿液中却检测到京尼平, 由此可确定此注射液中京尼平苷代谢为其苷元京尼平的这一代谢途径, 并可进行共存成分对这一代谢的影响研究。有文献分别研究京尼平苷在人体和大鼠中的代谢途径, 发现羟基化是人类特有的代谢途径^[12,13], 在本研究同样未在大鼠体内检测到京尼平苷羟基化产物。

大鼠静脉注射绿原酸后, 胆汁中存在大量其与氨基酸、谷胱甘肽结合的产物, 这是由于绿原酸的烯酮双键具有很强的亲电性, 可与谷胱甘肽结合^[14,15]。热毒宁注射液中的绿原酸在静脉注射给药后亦有如

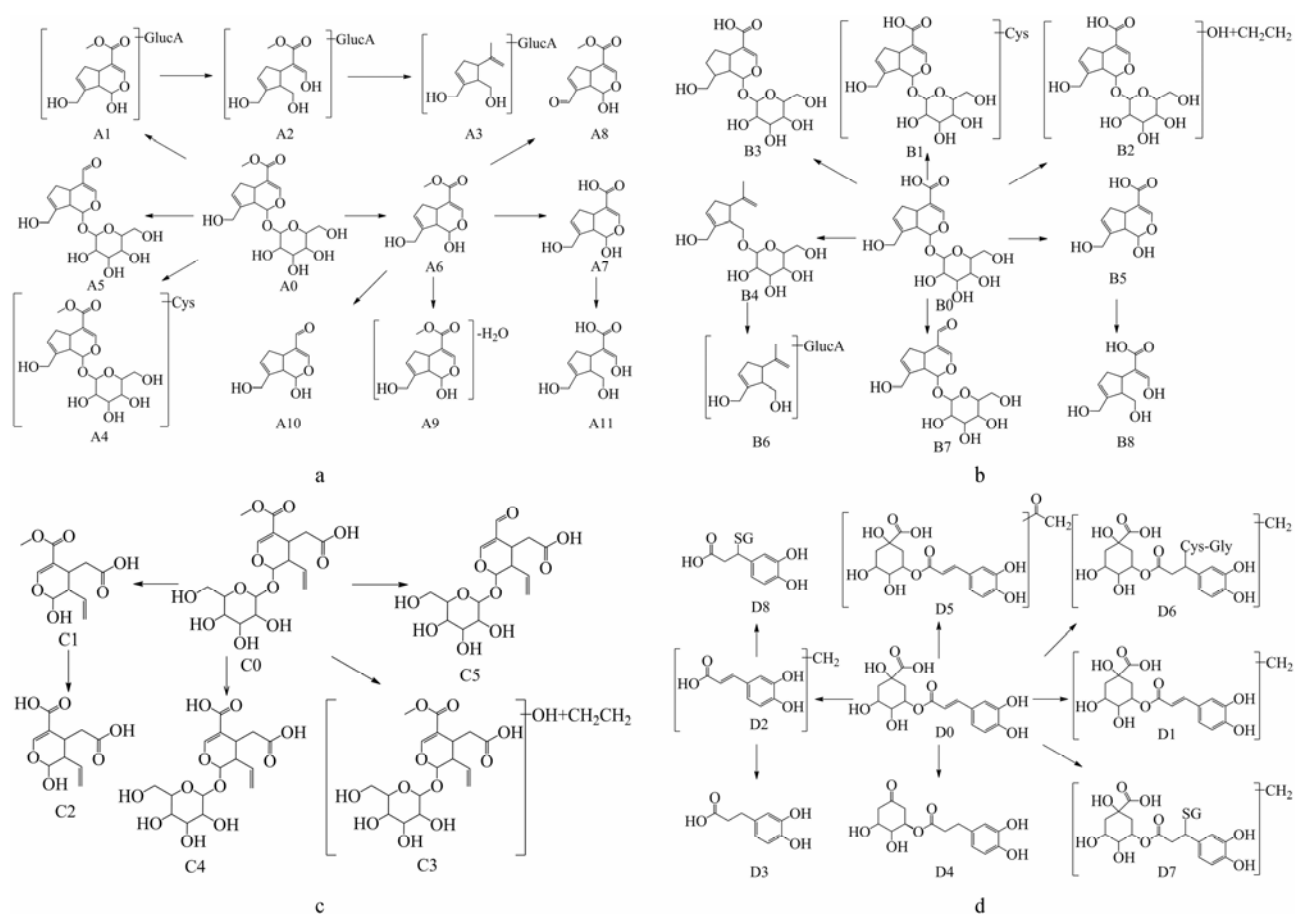


Figure 2 The possible metabolic pathways of geniposide (a); geniposidic acid (b); secoxylogain (c); chlorogenic acid (d) in rats

此的代谢途径。但口服给药却未检测到其与氨基酸、谷胱甘肽结合产物的报道，推测其原因可能是绿原酸口服给药后，由于肠道菌的代谢作用^[16]，使其原形进入体内的实际量减少，以致代谢产物量偏少而无法检测出。

本文研究结果显示，热毒宁注射液经静脉给药后，其主要成分在大鼠体内发生以下代谢反应：I相代谢主要包括氧化、水解和脱羟基等；II相代谢可直接共价结合；亦可在I相代谢基础上进一步生成甲基化、乙酰化、葡萄糖醛酸化、氨基酸或谷胱甘肽结合物等。

References

[1] Li HB, Yu Y, Wang ZZ, et al. Research on antiviral constituents in Re-Du-Ning Injection (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 1682–1688.
 [2] Wang Y, Wen J, Zheng W, et al. Simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and geniposide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of

Reduning injection [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29: 68–74.
 [3] Du WJ, Liu XS, Tao LY, et al. Multi-indicators rapid determination in alcohol precipitation of Lonicerae Japonicae Flos and Artemisiae Annuae Herba in Reduning Injection by near-infrared spectroscopy [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 61–65.
 [4] Zhu H, Bi K, Han F, et al. Identification of the absorbed components and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 111: 277–287.
 [5] Karine R, Candice SM, Philippe G, et al. Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218: 4678–4688.
 [6] Lu LL, Shu Y, Qian DW, et al. Identification of the metabolites of Sinisan extract in rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1374–1379.
 [7] Chen YX, Chen LM, Wang ZM, et al. Analysis of major bioactive components and their metabolites in rats' plasma,

- urine and feces after oral administration of the aqueous extract of *Euodiae Fructus* by UHPLC-QTOF-MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2017, 52: 1157–1164.
- [8] Li L, Chen XY, Zhong DF. Application of liquid chromatography-mass spectrometry in drug metabolite identification [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc* (质谱学报), 2017, 38: 375–378.
- [9] Li Y, Cai W, Cai Q, et al. Comprehensive characterization of the *in vitro* and *in vivo* metabolites of geniposide in rats using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer [J]. *Xenobiotica*, 2016, 46: 357–369.
- [10] Chen XY, Zhong DF, Chen XY. Metabolites of injected chlorogenic acid in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2011, 46: 88–95.
- [11] Kitano A. Genipin suppression of fibrogenic behaviors of the alpha-TN4 lens epithelial cell line [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32: 1727–1735.
- [12] Wang GW, Bao B, Han ZQ, et al. Metabolic profile of *Fructus Gardeniae* in human plasma and urine using ultra high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution LTQ-orbitrap mass spectrometry [J]. *Xenobiotica*, 2016, 46: 901–913.
- [13] Han H, Yang L, Xu Y, et al. Identification of metabolites of geniposide in rat urine using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 3339–3350.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Lardeau A, Poquet L. Phenolic acid metabolites derived from coffee consumption are unlikely to cross the blood-brain barrier [J]. *Pharm Biomed*, 2013, 76: 134–138.