

UHPLC-QTOF-MS 法分析鉴定止咳宝片在大鼠血浆中的代谢产物

乔 淦¹, 许海山¹, 石晓伟², 王 伟¹, 李清艳^{1*}

(1. 中国民用航空局民用航空医学中心(民航总医院), 北京 100123; 2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

摘要:采用 UHPLC-QTOF-MS 技术分析大鼠灌胃给予止咳宝片后的血浆生物样本。首先, 在正、负离子模式下分别全扫描, 通过信息依赖采集触发子离子的采集, 每一循环采集 8 个最强峰的二级质谱图。采集时进行, 实时多重质量亏损和动态背景扣除。其次, 应用 Metabolite Pilot 2.0 软件对止咳宝片君药罂粟壳, 配伍药物甘草中主要化学成分为目标建立分析模型, 分析各成分的保留时间、精确分子质量、二级质谱信息, 对代谢产物进行解析。鉴定 5 个阿片类生物碱、甘草昔和甘草酸, 及其相关代谢产物 31 个。5 种阿片类生物碱、甘草昔和甘草酸在大鼠体内的代谢途径包括葡萄糖醛酸化、硫酸化、脱甲基化、脱氨基甲基后羧基化、水解等。本文从定性角度对复方中药制剂中主要活性成分的体内代谢开展研究, 并与已有单一化学药物代谢途径比较, 为进一步阐明止咳宝片或含罂粟壳、甘草类复方中药制剂体内代谢过程提供基础。

关键词:止咳宝片; 罂粟壳; UHPLC-QTOF-MS; 代谢产物; 阿片类生物碱; 甘草

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 09-1536-09

Identification of major bioactive components and their metabolites in rat plasma after oral administration of Zhikebao tablet by UHPLC-QTOF-MS

QIAO Shi¹, XU Hai-shan¹, SHI Xiao-wei², WANG Wei¹, LI Qing-yan^{1*}

(1. Civil Aviation Medical Center, Civil Aviation Administration of China (Civil Aviation General Hospital), Beijing 100123, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: An ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS) method was established to identify the metabolites in rat plasma after oral administration of Zhikebao tablets. The high-resolution mass spectrometer was operated in positive and negative ion mode, respectively. First, full-scan was applied, which was dependent on a multiple mass defect filter (MMDF) combined with dynamic background subtraction (DBS). These were utilized to trigger the information dependent acquisition (IDA) function in the experiment. For the IDA criteria, the eight most intense candidate ions of per cycle were selected to do a product ion scan. Then Metabolite Pilot 2.0 software was utilized to load data to seek possible metabolites. The analytical models employed by Metabolite pilot 2.0 were established for representative compounds of the Papaveris Pericarpium and licorice in Zhikebao tablet. Finally, metabolites were identified according to accurate mass measurement and retention time. 38 components from the rat plasma after oral administration of the drug have been found, including 5 prototype opium alkaloids, liquiritin, glycyrrhizic acid and 31 relative metabolites. The metabolic transformation of Zhikebao tablet in rats was mainly induced by glucuronidation, sulfation, methylation, amine to carboxylic acid, hydrolysis and so on. In

收稿日期: 2018-05-13; 修回日期: 2018-07-17.

基金项目: 民航安全能力建设基金资助项目 (DFS20160604).

*通讯作者 Tel: 86-10-85762630, E-mail: liqingyan@camc-caac.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0343

this paper, the metabolites of the main active components of Zhikebao tablet were tentatively identified, and the metabolic pathway was compared with that of single chemical drugs. Moreover, it laid the fundamental elucidation of further metabolism study of Zhikebao tablet or other compound traditional Chinese medicine preparations which containing Papaveris Pericarpium or licorice.

Key words: Zhikebao tablet; Papaveris Pericarpium; UHPLC-QTOF-MS; metabolites; opium alkaloids; licorice

止咳宝片由“紫菀、橘红、桔梗、前胡、枳壳、百部、五味子、罂粟壳浸膏、甘草、薄荷素油、氯化铵”等 14 味中药组成, 具有宣肺祛痰, 止咳平喘的功效。用于外感风寒所致的咳嗽、痰多清稀、咳甚而喘、慢性支气管炎、上呼吸道感染见上述证候者^[1]。它于 2009 年被收录进岭南中药文化遗产, 其组方按照“君臣佐使”配伍, 君药是罂粟壳浸膏, 能够敛肺镇咳, 主治新咳、久咳。罂粟壳是罂粟科植物罂粟 (*Papaver somniferum L.*) 的干燥成熟果壳, 主要含有吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁等化学成分, 具有显著的镇痛、镇咳作用, 也是麻醉药品管理品种中唯一的中药饮片^[1, 2]。依据国家食品药品监督管理局《含兴奋剂目录所列物质的中药品种名单》(2008 年) 共计 1 165 种中药品种, 其中 102 种含有罂粟壳, 且常与中药甘草配伍使用。实验室前期也收集部分复方中药制剂, 并进行含量测定, 结果表明止咳宝片中罂粟壳和甘草主要成分的含量差异较小, 质量较为稳定^[3], 但并未有大鼠血浆中止咳宝片相关代谢产物研究的报道。

研究复方中药制剂在体内的代谢产物对阐明中药体内药效物质基础和作用机制发挥着重要作用^[4, 5]。其代谢物鉴定的主要难点, 一是基质复杂干扰较多; 二是代谢可能受药物之间相互作用的影响。因此, 鉴定此类代谢产物, 可从君药及代表药物着手, 研究其主要化学成分的代谢产物及代谢途径。2015 版《中国药典》以吗啡作为止咳宝片质量控制的指标成分。尽管有关吗啡体内代谢的研究已有报道^[6, 7], 但由于与单一化学药品体内过程不同, 复方中药制剂中的化学成分可相互影响或转化, 从而影响药物代谢。在我国, 目前复方中药制剂对疾病的治疗, 注重其整体作用优势和特点。因此, 描绘其体内代谢过程, 对揭示其潜在作用机制更有意义。

中药有效成分在生物体内通常发生广泛代谢, 且由于其代谢途径的多样性和复杂性, 以及内源性物质的干扰, 使得中药代谢物鉴定仍然存在很大的技术挑战^[7, 8]。高分辨-四级杆串联质谱具有扫描质量范围宽、速度快、灵敏度高等优点, 同时结合后数

据处理系统, 可提供母离子及子离子的精确分子质量和元素组成结构信息, 能较为可靠地快速鉴定复杂生物基质中的代谢产物^[8-13]。本文采用 UHPLC-QTOF/MS 技术对大鼠灌胃给予止咳宝片后血浆中君药(罂粟壳)和甘草中主要化学成分的代谢产物进行鉴定, 推测可能的代谢物结构, 共鉴定罂粟壳中 5 种阿片类生物碱, 甘草主要成分甘草昔和甘草酸的相关代谢产物 31 个, 并对比阿片类生物碱作为化学药品的代谢产物类型及途径的不同, 为深入探讨复方中药制剂有效成分之间的相互作用机制以及止咳宝片体内生物过程提供研究基础。

材料与方法

药品和试剂 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 德国 Sigma 公司); 超纯水(美国 Millipore 公司); 止咳宝片, 批号: 20150915(广东台城制药股份有限公司)。

仪器 TripleTOF™ 5600 型高分辨串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Shimadzu 液相色谱系统, 配有 LC-30AD 二元泵; 在线脱气机、SIL-30AC 自动进样器; CTO-30A 柱温箱(日本 Shimadzu 公司); Analyst 1.7 和 Metabolite Pilot 1.5 数据采集、分析软件(美国 AB SCIEX 公司); 3-18K 型台式离心机(德国 Sigma 公司); MIX-25P 型漩涡混合器(杭州米欧仪器有限公司)。

实验动物 雄性 SD 大鼠 4 只(体重 220~250 g)分成 2 组, 由北京大学实验动物中心提供, 室温饲养, 自由摄食饮水。于实验前 12 h 禁食不禁水。给药组(3 只)给予粉碎后的止咳宝片羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液($0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每只灌胃量 2 mL。空白组灌胃给予等量的 CMC-Na 溶液。

血浆样品的采集及制备 末次给药后 0.5、1、2、4、8、12 和 24 h 分别由眼眶静脉丛取血, 每次约 0.5 mL, 将血样收集于肝素化的 EP 管中, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清血浆转移, 将各个采血点血浆样本合并, 置于 -80°C 保存。取大鼠空白血浆及给药血浆各 1.0 mL, 甲醇-乙腈(1:1) 3.0 mL 沉淀蛋白, 涡旋

3 min, 4 °C、13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 40 °C 氮气流吹干, 残渣用甲醇 300 μL 复溶, 超声 1 min, 后于 4 °C、13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 进样 5 μL 供 UHPLC 分析。

色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC® HSS C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm; Waters, USA); 流动相为甲醇 (A) 和 0.01% 甲酸-水 (B), 梯度洗脱: 0~20 min, 5%~40% A; 20~30 min, 40%~65% A; 30~35 min, 65%~95% A; 35~40 min, 95% A。流速 0.5 mL·min⁻¹, 进样量 5.0 μL, 柱温 35 °C。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子化源, 正、负离子模式分别监测; 离子喷射电压: ± 4 500 V; 源内温度: 600 °C; 源内气体 1 (GS1, N₂) 和气体 2 (GS2, N₂) 压力: 50 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 气帘气体 (N₂) 压力: 30 psi。高分辨质谱扫描模式: TOF-MS-IDA-4MS/MS, 扫描质量范围: 100~1 000 amu, 高分辨质谱全扫描的累积时间: 250 ms, MS/MS 的累计时间: 100 ms。解簇电压分别为 60、-80 V; CE 电压为 30 eV, CES 为 15 V。IDA 的设置: MMDF (real time multiple mass defect filter) 和 DBS (dynamic background subtraction)。

数据处理 应用 Metabolite Pilot 2.0 软件进行数据处理。该软件由 AB Sciex 公司开发用于寻找和鉴定单体药物代谢物的软件。具有综合预测代谢物、一般峰发现、质量亏损、同位素类型、特征子离子和特征中性丢失等 6 种功能, 从而能够从复杂基质如生物样品的数据中寻找药物相关化合物。本研究以君药中典型化合物为研究基础, 建立相应化合物鉴定模板, 根据全扫描测得的精确相对分子质量, 在规定误差范围内 (± 5.0 ppm), 计算可能的元素组成, 并对比母药的子离子信息及文献报道的数据, 对各色谱峰进行定性分析。

代谢产物鉴定 ① 利用高分辨质谱采集的准确分子质量 (正、负离子模式下其准分子离子峰分别为 [M+H]⁺ 和 [M-H]⁻)、同位素峰形、误差值, 进行初步判断。② 代谢产物因与母药质谱信息很相似, 在相同质谱条件下存在类似裂解规律, 可能出现相似的子离子, 结合代谢产物子离子扫描信息进行推断。③ 依据罂粟壳和甘草中主要化学成分 (吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱、那可丁、甘草素和甘草酸) 为模板, 应用 Metabolite Pilot 2.0 建立相应的代谢物筛查模型, 结合其预测代谢物、一般峰发现、质量亏损、同位素类型、特征子离子和特征中性丢失功能进行代谢产物鉴定。

结果

鉴定出大鼠灌胃给予止咳宝片后 38 个化合物, 代谢产物结果见表 1, 包括吗啡、可待因相关代谢产物共 13 个、蒂巴因相关代谢产物 6 个、罂粟碱相关代谢产物 4 个、那可丁相关代谢产物 4 个、甘草素相关代谢产物 8 个和甘草酸相关代谢产物 3 个。

1 吗啡、可待因及其相关代谢产物

吗啡 (M1) 的保留时间为 4.32 min, 准分子离子峰为 ([M+H]⁺ m/z 286.145 1), 特征性碎片为 m/z 229 (C₁₄H₁₃O₃=C₁₇H₁₉NO₃-C₃H₇N), 与之对应的为哌啶环的断裂及 N-甲基的丢失 (C₃H₇N, 57 Da), 哌啶环断裂后进一步丢失 CO 或 H₂O, 产生一系列子离子分别为 m/z 211 (C₁₄H₁₁O₂=C₁₄H₁₃O₃-H₂O)、201 (C₁₃H₁₃O₂=C₁₄H₁₃O₃-CO)、185 (C₁₂H₉O₂=C₁₄H₁₃O₃-C₂H₄O) 和 165 (C₁₃H₉)^[14]。可待因 (M1) 为 3-甲基化吗啡, 与吗啡具有相似的代谢途径, 其二级质谱图的子离子主要为 m/z 282 (C₁₈H₂₀NO₂)、243 (C₁₅H₁₇NO₂)、225 (C₁₅H₁₃O₂)、215 (C₁₄H₁₅O₂)、199 (C₁₃H₁₁O₂)、165 (C₁₃H₉)。

共鉴定出吗啡相关代谢产物 10 个, 7 个 I 相代谢产物、3 个 II 相代谢产物, 代谢产物总离子流图和代谢途径见图 1。化合物 M1-1 和 M1-2 的准分子离子为 m/z 462.175 7, 保留时间分别为 2.25 min 和 3.11 min, 较吗啡多 176 Da, 其子离子 m/z 229、211 为吗啡的特征子离子, 推断 M1-1 和 M1-2 为吗啡的葡萄糖醛酸化代谢产物, 经与文献比较^[6,7], M1-1 和 M1-2 分别为吗啡-3-葡萄糖醛酸和吗啡-6-葡萄糖醛酸代谢产物。M1-6 的准分子离子峰为 m/z 446.182 4 ([M+H]⁺, C₂₃H₂₇NO₈), 保留时间为 15.47 min, 其准分子离子峰与 M1-1 和 M1-2 相差 16 Da, 推断其为吗啡丢氧后葡萄糖醛酸化代谢产物。M1-3 的保留时间为 7.57 min, 准分子离子峰为 m/z 258.111 5 ([M+H]⁺, C₁₅H₁₇NO₃), 特征子离子 m/z 240、184 推断为丢失 N-甲基后, 哌啶环断裂的代谢产物。M1-4 的保留时间为 8.19 min, 准分子离子峰为 m/z 366.109 8 ([M+H]⁺, C₁₇H₂₀NO₆P), 比吗啡的高 80 Da (PO₃H), 为其磷酸化代谢产物。M1-5 的保留时间为 9.51 min, 准分子离子峰为 m/z 328.156 0 ([M+H]⁺, C₁₉H₂₁NO₄), 较吗啡多 43 Da (COCH₃), 子离子为 m/z 237、165, 为其 N-乙酰化的代谢产物。吗啡哌啶环上的 N-甲基易于丢失后形成羧基, M1-7~M1-10 为其 N-甲基转化为羧基的代谢产物。M1-8 的保留时间为 23.35 min, 准分子离子峰为 m/z 315.122 4 ([M+H]⁺, C₁₈H₁₈O₅), 子离子为 m/z 279、123、107, 为吗啡丢失 N-甲基后羧酸化代谢产

Table 1 Identification of metabolites in rat plasma after a single oral administration of Zhikebao Tablet using UHPLC-Q-TOF/MS

Peak ID	Tentative identification	Formula	<i>m/z</i>	ppm	<i>t_R</i> /min	Fragment ion (<i>m/z</i>)
M1	Morphine	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.145 1	4.6	4.32	229 (C ₁₄ H ₁₃ O ₃), 211 (C ₁₄ H ₁₁ O ₂), 201 (C ₁₃ H ₁₃ O ₂), 185 (C ₁₂ H ₉ O ₂), 165 (C ₁₃ H ₉)
M1-1	3-Glucuronide conjugation	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	462.175 7	-0.2	2.25	286 (C ₁₇ H ₂₀ NO ₃), 268 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₂), 229 (C ₁₄ H ₁₃ O ₃), 211 (C ₁₄ H ₁₁ O ₂)
M1-2	6-Glucuronide conjugation	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	462.176 9	2.3	3.11	286 (C ₁₇ H ₂₀ NO ₃), 268 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₂), 229 (C ₁₄ H ₁₃ O ₃), 211 (C ₁₄ H ₁₁ O ₂)
M1-3	Loss of CH ₂ + demethylation	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃	258.111 5	-4.6	7.57	240 (C ₁₅ H ₁₃ NO ₂), 184 (C ₁₂ H ₁₀ NO ₂)
M1-4	phosphorylation	C ₁₇ H ₂₀ NO ₆ P	366.109 8	-0.9	8.19	321 (C ₁₅ H ₁₄ O ₆ P), 281 (C ₁₇ H ₁₅ NO ₃), 113 (CH ₆ O ₄ P)
M1-5	<i>N</i> -Acetylation	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.156 0	5.0	9.51	297 (C ₁₇ H ₁₅ O ₄), 237 (C ₁₆ H ₁₃ O ₂), 165 (C ₁₃ H ₉)
M1-6	Loss of O + glucuronide conjugation	C ₂₃ H ₂₇ NO ₈	446.182 4	3.3	15.47	428 (C ₂₃ H ₂₆ NO ₇), 365 (C ₁₈ H ₂₁ O ₈), 355 (C ₂₀ H ₁₉ O ₆), 352 (C ₂₀ H ₁₆ O ₆), 233 (C ₁₇ H ₁₅ N)
M1-7	Loss of O and amine to carboxylic acid	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	299.126 4	-3.4	21.91	281 (C ₁₈ H ₁₆ O ₃), 151 (C ₉ H ₁₁ O ₂), 93 (C ₇ H ₉)
M1-8	Amine to carboxylic acid	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	315.122 4	-0.8	23.35	279 (C ₁₈ H ₁₅ O ₃), 123 (C ₇ H ₇ O ₂), 107 (C ₇ H ₇ O)
M1-9	Loss of O and O and amine to carboxylic acid	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	283.132 0	-2.9	24.95	223 (C ₁₇ H ₁₉)
M1-10	Loss of O and amine to carboxylic acid	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	299.126 4	-4.7	27.92	281 (C ₁₈ H ₁₆ O ₃), 151 (C ₉ H ₁₁ O ₂), 93 (C ₇ H ₉)
M2	Codeine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300.160 1	2.4	7.23	282 (C ₁₈ H ₂₀ NO ₂), 243 (C ₁₅ H ₁₇ NO ₂), 225 (C ₁₅ H ₁₃ O ₂), 215 (C ₁₄ H ₁₅ O ₂), 199 (C ₁₃ H ₁₁ O ₂), 165 (C ₁₃ H ₉)
M2-1	Oxidative Deamination to Alcohol	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	301.142 6	-2.8	34.62	199 (C ₁₁ H ₁₉ O ₃)
M3	Thebaine	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	312.158 9	-1.7	12.89	281 (C ₁₈ H ₁₇ O ₃), 266 (C ₁₆ H ₂₁ NO ₃), 58 (C ₃ H ₈ N)
M3-1	Loss of CH ₂ + glucuronide conjugation	C ₂₄ H ₂₇ NO ₉	474.177 0	2.4	5.37	284 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₃), 259 (C ₁₆ H ₁₉ O ₃), 249 (C ₁₆ H ₁₁ NO ₂)
M3-2	Loss of CH ₂ + glucuronide conjugation	C ₂₄ H ₂₇ NO ₉	474.175 6	-0.6	6.32	284 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₃), 259 (C ₁₆ H ₁₉ O ₃), 249 (C ₁₆ H ₁₁ NO ₂)
M3-3	Loss of 2CH ₂ and amine to carboxylic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	297.113 6	4.9	9.49	237 (C ₁₆ H ₁₃ O ₂), 222 (C ₁₅ H ₁₀ O ₂), 205 (C ₁₅ H ₉ O), 189 (C ₁₁ H ₉ O ₃)
M3-4	Sulfate conjugation	C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S	392.115 2	-2.7	31.39	332 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₄ S), 330 (C ₁₇ H ₁₆ NO ₄ S), 274 (C ₁₁ H ₁₄ NO ₅ S), 246 (C ₁₇ H ₁₂ NO)
M3-5	Loss of CH ₂ and amine to carboxylic acid	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	327.124 0	4.0	36.19	227 (C ₁₄ H ₁₁ O ₃), 121 (C ₇ H ₅ O ₂)
M4	Papaverine	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	340.153 0	-1.8	15.04	324 (C ₂₀ H ₂₁ NO ₃), 202 (C ₁₂ H ₁₂ NO ₂), 187 (C ₁₂ H ₁₃ NO), 171 (C ₁₁ H ₉ NO), 156 (C ₁₀ H ₆ NO)
M4-1	Loss of 2CH ₂ O + loss of 2H	C ₁₈ H ₁₅ NO ₂	278.116 3	-4.3	3.11	215 (C ₁₆ H ₉ N), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N), 142 (C ₁₀ H ₈ N), 130 (C ₉ H ₈ N)
M4-2	Loss of 2CH ₂ and glucose conjugation	C ₂₄ H ₂₇ NO ₉	474.175 6	-0.6	6.32	327 (C ₁₉ H ₂₁ NO ₄), 284 (C ₁₇ H ₁₈ NO ₃), 249 (C ₁₆ H ₁₁ NO ₂)
M4-3	Loss of CH ₂ O + internal hydrolysis	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.1560	5.0	9.51	297 (C ₁₇ H ₁₅ NO ₄), 282 (C ₁₆ H ₁₂ NO ₄), 265 (C ₁₆ H ₁₁ NO ₃)
M5	Nascapinet	C ₂₂ H ₂₃ NO ₇	414.155 7	2.3	15.20	353 (C ₂₀ H ₁₉ NO ₅), 220 (C ₁₂ H ₁₄ NO ₃), 205 (C ₁₁ H ₁₁ NO ₃), 175 (C ₁₁ H ₁₃ NO)
M5-1	Loss of 2CH ₂ O and amine to carboxylic acid	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	382.114 2	4.5	14.62	308 (C ₁₉ H ₁₆ O ₄), 201 (C ₁₂ H ₁₉ O ₃), 188 (C ₁₁ H ₈ O ₃)
M5-2	Loss of 2CH ₂ O and amine to carboxylic acid	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	382.114 3	4.7	14.84	308 (C ₁₉ H ₁₆ O ₄), 201 (C ₁₂ H ₁₉ O ₃), 188 (C ₁₁ H ₈ O ₃)
M5-3	Amine to carboxylic acid	C ₂₃ H ₂₂ O ₉	442.131 6	-4.6	16.95	267 (C ₁₃ H ₁₅ O ₆), 199 (C ₁₂ H ₇ O)
M6	Liquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.117 1	-4.8	14.81	255 (C ₁₅ H ₁₁ O ₄), 241 (C ₁₅ H ₁₃ O ₃), 135 (C ₈ H ₇ O ₂), 121 (C ₇ H ₅ O ₂)
M6-1	Sulfate conjugation	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂ S	497.074 0	-3.9	12.03	417 (C ₂₁ H ₂₁ O ₉), 321 (C ₁₅ H ₁₃ O ₆ S), 241 (C ₁₅ H ₁₃ O ₃), 175 (C ₆ H ₇ O ₆)
M6-2	Hydrogenation	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	419.132 9	-4.3	16.92	243 (C ₁₅ H ₁₅ O ₃), 175 (C ₆ H ₇ O ₆), 117 (C ₄ H ₅ O ₄)
M6-3	Loss of C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.065 8	-1.8	17.95	135 (C ₈ H ₇ O ₂), 119 (C ₈ H ₇ O)
M6-4	Internal hydrolysis and di-oxidation	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₂	467.117 2	-5	19.35	421 (C ₂₀ H ₂₁ O ₁₀), 399 (C ₁₈ H ₂₃ O ₁₀), 256 (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)
M6-5	Loss of 2O	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	385.128 5	-2	22.85	249 (C ₁₇ H ₁₃ O ₂), 119 (C ₈ H ₇ O)
M6-6	Loss of C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.065 2	-4.2	23.33	135 (C ₈ H ₇ O ₂), 119 (C ₈ H ₇ O)
M6-7	Loss of O and O and methylation	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	399.145 3	0.9	25.10	217 (C ₁₆ H ₉ O), 163 (C ₆ H ₁₁ O ₅)
M7	Glycyrrhizic acid	C ₄₂ H ₆₁ O ₁₆	821.393 7	-3.4	24.48	645 (C ₃₆ H ₅₃ O ₁₀), 351 (C ₁₂ H ₁₅ O ₁₂), 289 (C ₁₁ H ₁₃ O ₉), 193 (C ₆ H ₉ O ₇)
M7-1	Loss of C ₁₂ H ₁₆ O ₁₃	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	453.336 5	-2.1	23.65	407 (C ₂₇ H ₃₅ O ₃), 405 (C ₂₈ H ₃₇ O ₂), 389 (C ₂₈ H ₃₇ O), 371 (C ₂₄ H ₃₅ O ₃)
M7-2	Loss of C ₁₂ H ₁₆ O ₁₂ and oxidation	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.326 1	-2.4	26.93	467 (C ₂₉ H ₃₉ O ₅), 371 (C ₂₅ H ₃₉ O ₂), 291 (C ₁₇ H ₂₃ O ₄), 213 (C ₁₂ H ₂₁ O ₃)

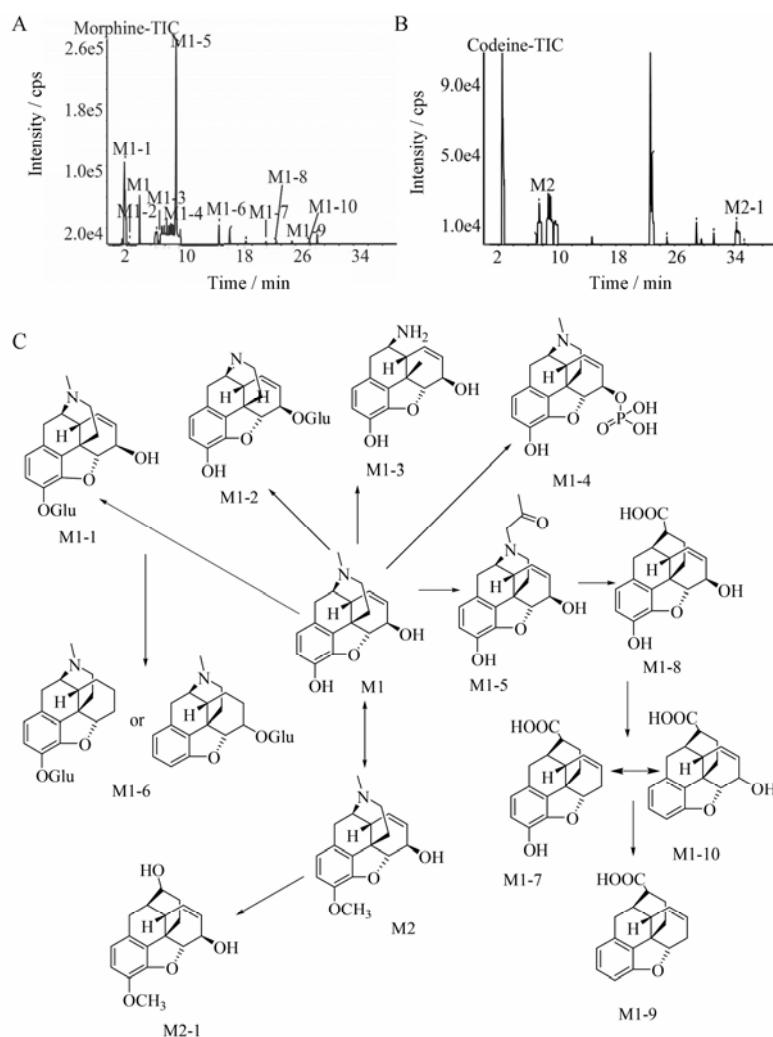


Figure 1 Total ion chromatogram (TIC) of Zhikebao Tablet in positive mode. (A) TIC of morphine-related metabolites; (B) TIC of codeine-related metabolites; (C) The possible metabolic pathways of morphine and codeine. The peak numbers were in accordance with Table 1

物。M1-7 和 M1-10 的保留时间为 21.91 min 和 27.92 min, 准分子离子峰为 m/z 299.126 4 ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{18}O_4$) , 较 M1-8 少 16 Da, 为吗啡丢失 O 和 N-甲基后羧酸化代谢产物。M1-9 保留时间为 24.95 min, 准分子离子峰为 m/z 283.132 0 ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{18}O_3$) 较 M1-8 少 32 Da, 吗啡丢失 2O 和 N-甲基后羧酸化代谢产物。代谢产物详细信息见表 1。

可待因与吗啡结果相似, 在体内两者可以相互转化, 以可待因为母药监测的绝大多数代谢产物, 同样在吗啡为母药的代谢物监测中。M2-1 的准分子离子峰为 m/z 301.142 6 ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{20}O_4$), 保留时间为 34.62 min, 推测其为 N-甲基丢失后变为醇的代谢产物。

2 蒂巴因及其相关代谢产物

蒂巴因 (M3) 的保留时间为 12.89 min, 准分子离子峰为 ($[M+H]^+$ m/z 312.158 9), 特征性碎片为 m/z

281 ($C_{18}H_{17}O_3$)、266 ($C_{16}H_{21}NO_3$)、58 (C_3H_8N)。共鉴定出蒂巴因 (M3) 相关代谢产物 5 个, 2 个 I 相代谢产物、3 个 II 相代谢产物, 总离子流图和代谢途径见图 2。

M3-1 和 M3-2 的准分子离子峰为 m/z 474.177 0 ($[M+H]^+$, $C_{24}H_{27}NO_9$), 保留时间分别为 5.37 min 和 6.32 min, 较蒂巴因多 162 Da ($M-CH_2+Glu$), 为其丢失 CH_2 后葡萄糖醛酸化代谢产物。M3-4 的准分子离子峰为 m/z 392.115 2 ($[M+H]^+$, $C_{19}H_{21}NO_6S$), 保留时间为 31.39 min, 其准分子离子峰与 M3 相差 80 Da (SO_3), 子离子为 m/z 332、274、246, 推断为其硫酸化代谢产物。蒂巴因同样存在丢失 N-甲基后羧酸化的代谢产物 (M3-3 和 M3-5)。M3-3 的保留时间为 9.49 min, 准分子离子峰为 m/z 297.113 6 ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{16}O_4$), 子离子为 237 ($C_{16}H_{13}O_2$)、222 ($C_{15}H_{10}O_2$) 和 205 ($C_{15}H_9O$)、189 ($C_{11}H_9O_3$), 为蒂巴因丢失 $2CH_2$ 和

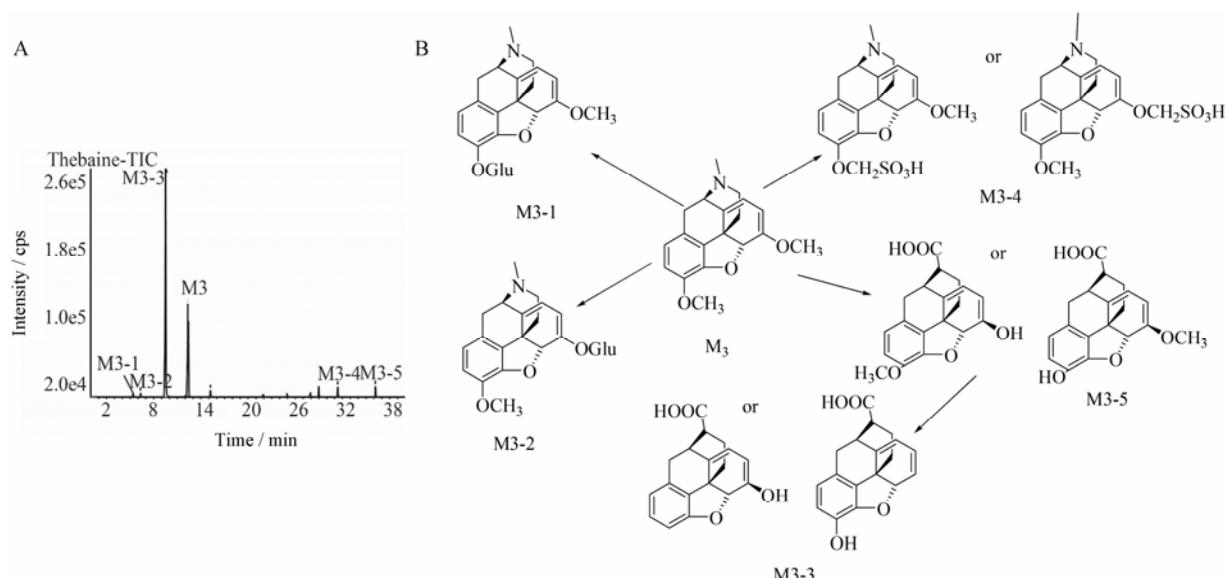


Figure 2 TIC of Zhikebao Tablet in positive mode. (A) TIC of thebaine-related metabolites; (B) The possible metabolic pathways of thebaine. The peak numbers were in accordance with Table 1

N-甲基后羧酸化代谢产物。M3-5 的保留时间为 36.19 min, 准分子离子峰为 m/z 327.124 0 ($[M+H]^+$, $C_{19}H_{18}O_5$), 子离子为 m/z 227 ($C_{14}H_{11}O_3$)、121 ($C_7H_5O_2$), 为蒂巴因丢失 CH_2 和 N-甲基后羧酸化代谢产物。

3 罂粟碱及其相关代谢产物

罂粟碱 (M4) 的保留时间为 15.04 min, 准分子离子峰为 ($[M+H]^+$ m/z 340.153 7), 特征性碎片为 m/z 324 ($C_{18}H_{17}O_3$)、202 ($C_{12}H_{12}NO_2$)、187 ($C_{12}H_{13}NO$)、171 ($C_{11}H_9NO$)、156 ($C_{10}H_6NO$)。共鉴定出 M4 相关代谢产物 3 个, 2 个 I 相代谢产物、1 个 II 相代谢产物。代谢产物总离子流图和代谢途径见图 3。

M4-1 的准分子离子峰为 m/z 278.116 3 ($[M+H]^+$, $C_{18}H_{15}NO_2$), 保留时间为 3.11 min, 子离子为 m/z 215 ($C_{16}H_9N$)、144 ($C_{10}H_{10}N$)、142 ($C_{10}H_8N$)、130 (C_9H_8N), 推断为丢失 2 个甲氧基后, 另外两个甲氧基形成的桥环代谢产物。M4-2 的准分子离子峰为 m/z 474.175 6 ($[M+H]^+$, $C_{24}H_{27}NO_9$), 保留时间为 6.32 min, 子离子为 m/z 327 ($C_{19}H_{21}NO_4$)、284 ($C_{17}H_{18}NO_3$)、249 ($C_{16}H_{11}NO_2$), 推断为丢失 $2CH_2$ 后加和葡萄糖的代谢产物。M4-3 的准分子离子峰为 m/z 328.156 0 ($[M+H]^+$, $C_{19}H_{21}NO_4$), 保留时间为 9.51 min, 子离子为 m/z 297 ($C_{17}H_{15}NO_4$)、282 ($C_{16}H_{12}NO_4$)、265 ($C_{16}H_{11}NO_3$), 推断为丢失 CH_2O 后水和的代谢产物。

4 那可丁及其相关代谢产物

那可丁 (M5) 的保留时间为 15.20 min, 准分子离子峰为 ($[M+H]^+$ m/z 414.155 7), 子离子为 m/z 353 ($C_{20}H_{19}NO_5$)、220 ($C_{12}H_{14}NO_3$)、205 ($C_{11}H_{11}NO_3$)、175

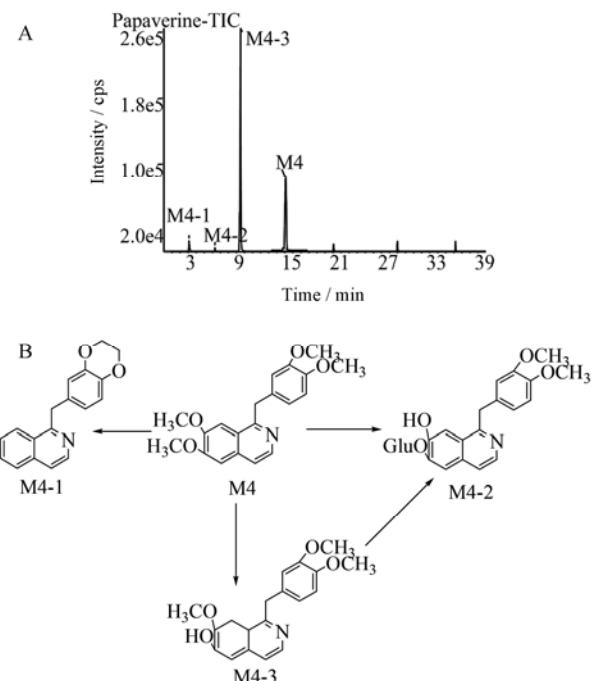


Figure 3 TIC of Zhikebao Tablet in positive mode. (A) TIC of papaverine-related metabolites; (B) The possible metabolic pathways of papaverine. The peak numbers were in accordance with Table 1

($C_{11}H_{13}NO$)。共鉴定出 M5 相关代谢产物 3 个 I 相代谢产物。代谢产物总离子流图和代谢途径见图 4。

那可丁的 3 个 I 相代谢产物, 为丢失 N-甲基后羧酸化代谢产物。M5-3 的准分子离子峰为 m/z 442.131 6 ($[M+H]^+$, $C_{23}H_{22}O_9$), 保留时间为 16.95 min, 较 M5 多 28 Da ($COOH-NH_3$), 子离子为 m/z 267 ($C_{13}H_{15}O_6$)、199 ($C_{12}H_7O$), 推断为 M5 丢失 N-甲基后

羧酸化代谢产物。M5-1 和 M5-2 的准分子离子峰为 m/z 382.114 2 ($[M+H]^+$, $C_{21}H_{18}O_7$), 保留时间分别为 14.62 和 14.84 min, 较 M5-3 少 60 Da ($2CH_2O$), 子离子为 m/z 308 ($C_{19}H_{16}O_4$)、201 ($C_{12}H_{19}O_3$)、188 ($C_{11}H_8O_3$), 推断其为 M5-3 丢失 $2CH_2O$ 后的代谢产物。

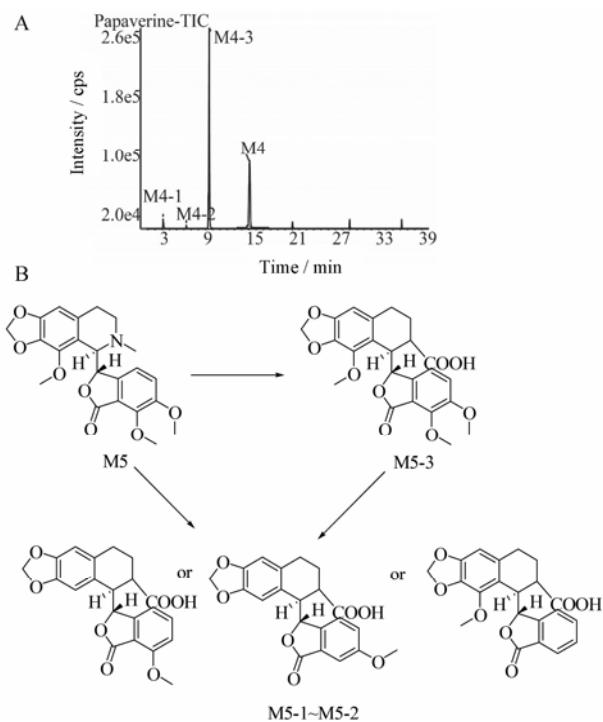


Figure 4 TIC of Zhikebao Tablet in positive mode. (A) TIC of nascapine-related metabolites; (B) The possible metabolic pathways of nascapine. The peak numbers were in accordance with Table 1

5 甘草昔及其相关代谢产物

甘草昔 (M6) 的保留时间为 14.81 min, 准分子离子峰为 ($[M-H]^- m/z$ 417.117 1), 子离子为 m/z 255 ($C_{15}H_{11}O_4$)、241 ($C_{15}H_{13}O_3$)、135 ($C_8H_7O_2$)、121 ($C_7H_5O_2$)。共鉴定出 M6 相关代谢产物 7, 其中 I 相代谢产物 6 个, II 相代谢产物 1 个。代谢产物总离子流图和代谢途径见图 5。

甘草昔结构中含有 1 分子葡萄糖, 在体内易于丢失葡萄糖而水解形成昔元^[16]。代谢产物 M6-3 和 M6-6 准分子离子峰为 m/z 255.065 8 ($[M-H]^-$, $C_{15}H_{12}O_4$), 保留时间分别为 17.95 和 23.33 min, 较 M6 少 162 Da, 与文献^[15]报道一致, 为其水解葡萄糖的代谢产物。M6-1 的准分子离子峰为 m/z 497.074 0 ($[M-H]^-$, $C_{21}H_{22}O_{12}S$), 保留时间为 31.39 min, 其准分子离子峰与 M6 相差 80 Da (SO_3), 特征子离子为 m/z 417、241, 与 M6 的子离子一致, 推断为其硫酸化代谢产物。M6-2 的准分子离子峰为 m/z 419.132 9

($[M-H]^-$, $C_{21}H_{24}O_9$), 保留时间为 16.92 min, 其准分子离子峰较 M6 多 2 Da, 特征子离子为 m/z 243, 也较 M6 多 2 Da, 推测其为 M6 的氢化代谢产物。M6-4 的准分子离子峰为 m/z 467.117 2 ($[M-H]^-$, $C_{21}H_{24}O_{12}$), 保留时间为 19.35 min, 较 M6 多 50 Da ($2O$ 和 H_2O), 子离子为 m/z 421 ($C_{20}H_{21}O_{10}$)、399 ($C_{18}H_{23}O_{10}$)、256 ($C_{15}H_{12}O_4$), 推断为 M6 双氧化后水合的代谢产物。M6-5 的准分子离子峰为 m/z 385.128 5 ($[M-H]^-$, $C_{21}H_{22}O_7$), 保留时间为 22.85 min, 较 M6 少 32 Da ($2O$), 子离子为 249 ($C_{17}H_{13}O_2$)、119 (C_8H_7O), 推断为 M6 丢失 $2O$ 的代谢产物。M6-7 的准分子离子峰为 m/z 399.145 3 ($[M-H]^-$, $C_{22}H_{24}O_7$), 保留时间为 25.10 min, 较 M6-5 多 14 Da, 子离子为 217 ($C_{16}H_9O$)、163 ($C_6H_{11}O_5$), 推断为 M6 丢失 $2O$ 后甲基化的代谢产物。

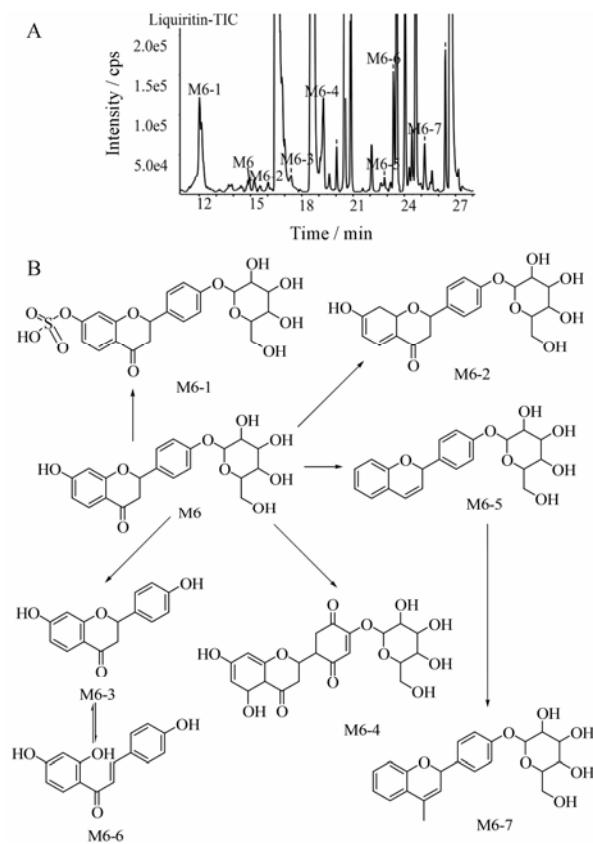


Figure 5 TIC of Zhikebao Tablet in negative mode. (A) TIC of liquiritin-related metabolites; (B) The possible metabolic pathways of liquiritin. The peak numbers were in accordance with Table 1

6 甘草酸及其相关代谢产物

甘草酸 (M7) 的保留时间为 24.48 min, 准分子离子峰为 ($[M-H]^- m/z$ 821.393 7), 子离子为 m/z 645 ($C_{36}H_{53}O_{10}$)、351 ($C_{12}H_{15}O_{12}$)、289 ($C_{11}H_{13}O_9$)、193 ($C_6H_9O_7$)。共鉴定出 M7 相关代谢产物 2 个 (I 相代

谢产物)。代谢产物总离子流图和代谢途径见图 6。

甘草酸为五环三萜类化合物, 其分子结构中含一分子甘草次酸和两分子葡萄糖醛酸组成, 在体内易于丢失 2 分子葡萄糖醛酸而水解形成甘草次酸^[15]。代谢产物 M7-1, 准分子离子峰为 m/z 453.336 5 ($[M-H]^-$, $C_{30}H_{46}O_3$), 保留时间为 23.65 min, 较 M7 少 368 Da, 子离子为 407 ($C_{27}H_{35}O_3$)、405 ($C_{28}H_{37}O_2$)、389 ($C_{28}H_{37}O$)、371($C_{24}H_{35}O_3$), 为其水解两分子葡萄糖醛酸丢失 O 的代谢产物。M7-2 的准分子离子峰为 m/z 485.326 1 ($[M-H]^-$, $C_{30}H_{46}O_5$), 保留时间为 26.93 min, 较 M7-1 多 32 Da, 子离子为 467 ($C_{29}H_{39}O_5$)、371 ($C_{25}H_{39}O_2$)、291 ($C_{17}H_{23}O_4$)、213 ($C_{12}H_{21}O_3$), 为 M7 水解两分子葡萄糖醛酸加 O 的代谢产物。

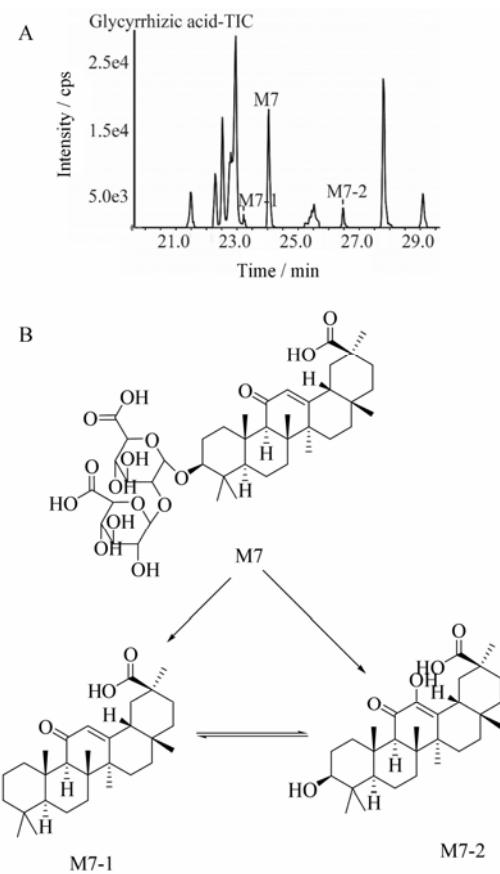


Figure 6 TIC of Zhikebao Tablet in negative mode. (A) TIC of glycyrrhetic acid-related metabolites; (B) The possible metabolic pathways of glycyrrhetic acid. The peak numbers were in accordance with Table 1

讨论

本研究利用 UHPLC-QTOF-MS/MS 技术鉴定了罂粟壳、甘草中 5 种生物碱、甘草素和甘草酸在大鼠体内的 31 个代谢产物。结果表明, 5 种生物碱、甘草素和甘草酸在大鼠体内的代谢途径包括葡萄糖醛酸化、

硫酸化、脱甲基化、脱氨基甲基后羧基化、葡萄糖水解等。

吗啡和可待因在结构上类似, 仅在 C-3 位相差一个 CH_3 , 因此在鉴定结果中上述两种化合物的代谢产物有重叠。文献^[7,8]已有报道吗啡体内代谢产物主要有吗啡-3-葡萄糖醛酸 (M1-1)、吗啡-6-葡萄糖醛酸 (M1-2)、N-去甲基代谢产物, 其中 M1-1 代谢产物含量大于 M1-2, 这与文献报道一致^[8]。大鼠灌胃给予止咳宝片后, 血浆中除葡萄糖醛酸化代谢产物外, 还发现主要代谢产物类型为丢失 N-甲基后变成羧酸代谢产物, 并未发现 N-去甲基代谢产物, 推测 N-去甲基吗啡可能为代谢产物的中间体, 后在体内转化为羧基, 其次可能与复方中药制剂的多成份体内相互作用有关。

在正离子扫描模式下 (5 种阿片类生物碱) 鉴定的 22 个代谢产物中有 9 个代谢产物为丢失 N-甲基后形成羧酸的代谢产物, 含有 N-甲基的阿片类生物碱 (吗啡、蒂巴因、那可丁) 易形成此类化合物, 这在阿片类体内代谢产物鉴定的研究中罕有报道。阿片类生物碱在结构中含有甲氧基, 其中可待因含有 1 个 OCH_3 , 蒂巴因含有 2 个 OCH_3 , 那可丁含有 3 个 OCH_3 , 罂粟碱含有 4 个 OCH_3 。鉴定的代谢结果显示, 代谢产物易于丢失甲氧基后在进一步与葡萄糖醛酸等结合形成极性大的 II 相代谢产物。大鼠血浆中阿片类生物碱体内主要以 I 相代谢物为主, II 相代谢产物以葡萄糖醛酸化代谢产物为主。

在负离子扫描模式下, 甘草的特征成分以甘草昔和甘草酸为主, 共鉴定出 9 个代谢产物, 主要为葡萄糖昔水解的代谢产物, 甘草昔可水解一份子葡萄糖 (M6-3 和 M6-6) 形成昔元^[15], 甘草酸的代谢产物为丢失 2 分子葡萄糖醛酸后再进行氧化、去氧化的代谢产物。甘草昔在大鼠血浆中的 II 相代谢以硫酸化为主。

结果表明, 复方中药制剂中代谢产物与单一化学药物体内代谢产物的种类有一定区别^[16]。中药有效成分在生物体内通常发生广泛代谢, 复方中药制剂药味繁多, 有效成分既可以在体内发生相互转化, 也可影响其他成分的代谢。因此, 应进一步对其作用机制进行深入分析, 以全面阐明止咳宝片或含罂粟壳、甘草类复方中药制剂的药体内代谢过程。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]*. Vol 1. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015:

- 624.
- [2] Chen M. Clinical application and management of *Papaver somniferum* [J]. China Pharm (中国药房), 2016, 27: 3461–3463.
- [3] Liu GR, Qiao S, Liu TB, et al. Simultaneous determination of 18 chemical constituents in traditional Chinese medicine of antitussive by UPLC-MS-MS [J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54: bmw099.
- [4] Geng JL, Dai Y, Yao ZH, et al. Metabolites profile of Xian-Ling-Gu-Bao capsule, a traditional Chinese medicine prescription, in rats by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 96: 90–103.
- [5] Zheng C, Hao H, Wang X, et al. Diagnostic fragmentation-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example [J]. J Mass Spectrom, 2009, 44: 230–244.
- [6] Bosch ME, Sánchez AR, Rojas FS, et al. Morphine and its metabolites: analytical methodologies for its determination [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 799–815.
- [7] Liu YZ. Metabolism of morphine *in vivo* [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医药), 2010, 23: 252–253.
- [8] Li L, Chen XY, Zhong DF. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in drug metabolite identification [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2017, 38: 375–387.
- [9] Wang YX, Hao HP, Wang GJ. Application of Q-TOF and IT-TOF mass spectrometry technology in identifying the natural products and the biological metabolites [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7: 394–400.
- [10] Wang N, Hassan H, Jia YM, et al. Identification of polygala oligosaccharide esters and their metabolites in rat plasma after oral administration of ethanol extract of Kai Xin San by UHPLC-MS [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 1592–1598.
- [11] Cheng YX, Chen LJ, 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.
- [12] Su LL, Cheng X, Ji D, et al. Analysis of lignans and their metabolites derived from *Schisandra chinensis* and vinegar *Schisandra chinensis* in rats' plasma, bile, urine and faeces based on UHPLC-QTOF/MS [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2016, 51: 1600–1608.
- [13] Li J, Hua ZD, Wang YM. Analysis of metabolites and metabolic pathway of 5F-AMB *in vitro* using UPLC-HR-MS [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2017, 52: 1743–1747.
- [14] Zhang Z, Yan B, Liu K, et al. Fragmentation pathways of heroin-related alkaloids revealed by ion trap and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 2851–2862.
- [15] Xiang C, Qiao X, Wang Q, et al. From single compounds to herbal extract: a strategy to systematically characterize the metabolites of licorice in rats [J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39: 1597–1608.
- [16] Xie PS, Leung AY. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216: 1933–1940.