

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析吉马酮大鼠体内代谢产物及代谢途径

英译丹^{1a}, 禹明洋², 肖俊辉^{1a}, 沈倩^{1b} (1. 南华大学附属第二医院, a. 药剂科, b. 临床药学科, 湖南 衡阳 421001; 2. 郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

摘要: 目的 研究吉马酮在大鼠体内的代谢产物, 探讨其可能的代谢途径。方法 采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对灌胃给予吉马酮(10 mg·kg⁻¹)后大鼠的生物样品(血浆、尿液和粪便)进行分析, 色谱柱采用 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, Q-Exactive 高分辨质谱仪采用 HESI 离子源, 辅助气温度 300 °C, 离子传输管温度 320 °C, 喷雾电压为+3.50 kV 或者 -2.80 kV, 扫描方式 Full MS/dd-MS²。分析比对给药组和空白组中高分辨质谱提供的准分子离子峰和碎片离子信息, 使用 Xcalibur 3.0、Mass Frontier 2.0 和 Compound Discovery 2.1 软件进行数据处理, 筛选并鉴定其可能的代谢产物。结果 从大鼠生物样品中共筛选鉴定了包括原型在内的 23 个代谢产物, 推断吉马酮在大鼠体内发生的代谢类型主要有脱水反应、脱饱和反应、氧化反应、葡萄糖胺结合反应、葡萄糖醛酸化反应以及相关的复合反应等。结论 本研究较为详细地阐明了吉马酮在大鼠体内的代谢情况, 剖析了其代谢途径, 可为其进一步的药效学、药动学及毒理学研究提供理论依据。

关键词: 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术; 吉马酮; 代谢产物; 代谢途径

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)04-0430-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.04.009

引用本文: 英译丹, 禹明洋, 肖俊辉, 等. UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析吉马酮大鼠体内代谢产物及代谢途径[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(4): 430-438.

Metabolites and Metabolic Pathway Analysis of Germacrone in Rats by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

YING Yidan^{1a}, YU Mingyang², XIAO Junhui^{1a}, SHEN Qian^{1b} (1. The Second Affiliated Hospital of South China, a. Department of Pharmaceutical, b. Department of Clinical Pharmaceutical, Hengyang 421001, China; 2. Department of Pharmaceutical, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the metabolites of germacrone in rats and explore its possible metabolic pathway. **METHODS** The biological samples of rats(plasma, urine and feces) were analyzed after intragastric administration germacrone(10 mg·kg⁻¹) by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. The chromatographic Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column was used and the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution with gradient elution. The Q-Exactive high-resolution mass spectrometer equipped HESI ion source was adopted. Auxiliary temperature and ion transport tube temperature were set at 300 °C and 320 °C. Spray voltage was +3.50 kV or -2.80 kV and scanning mode was Full MS/dd-MS². The quasi-molecular ion peaks and fragment ion information provided by high resolution mass spectrometry in administration group and blank group were analyzed and compared. Xcalibur 3.0, Mass Frontier 2.0 and Compound Discovery 2.1 software were used for data processing to screen and identify potential metabolites. **RESULTS** Twenty three protocompound and metabolites were screened and identified in the biological samples of rats, and the main metabolic reactions of germacrone in rats were dehydration reaction, desaturation reaction, oxidation reaction, glucosamine binding reaction, glucosalddehyde acidification reaction and related complex reaction, etc. **CONCLUSION** In this study, the metabolic process of germacrone in rats is elucidated in detail, and its metabolic pathway is analyzed, which can provide theoretical basis for the further study of pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicology of germacrone.

KEYWORDS: UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; germacrone; metabolites; metabolic pathways

郁金为姜科植物温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)、姜黄(*Curcuma longa* L.)、广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)或蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Val.)的干燥块根; 具有活血止痛、行气解郁、清心凉血、利胆退黄的功效; 主要用于胸胁刺痛, 胸痹心痛,

经闭痛经, 乳房胀痛, 热病神昏, 癫痫发狂, 血热吐衄, 黄疸尿赤等^[1]。研究表明, 郁金的主要成分为挥发油与姜黄素类, 其中吉马酮作为主要的挥发油成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎等作用^[2-3]。吉马酮常被作为温郁金、广西莪术或者蓬莪术的指标性成分, 一般采用 GC 或者 HPLC 测定不同产地

作者简介: 英译丹, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 17838307128

E-mail: yingyidan2019@163.com

或者不同保存时间下吉马酮的含量来控制 and 评价药材的质量^[4-9]。然而,目前吉马酮在体内的代谢产物和代谢途径并不清楚,亟需进一步研究。

近年来,高分辨率质谱技术的快速发展,为药物代谢产物的分析和鉴定提供了更高的准确性。同时,数据处理技术的开发与发展,使得代谢产物的鉴定过程变得更加快速和智能^[10-13]。超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)集合了超高效液相色谱的优秀分离能力和质谱的高灵敏度、高质量精度、高专属性的检测能力,为数据的分析提供准确的相对分子质量和丰富的碎片离子信息,在药物代谢研究中具有独特的优势^[14-19]。本实验采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术结合 Xcalibur、Mass Frontier 2.0 和 Compound Discovery 2.1 数据处理技术对灌胃给予吉马酮后的大鼠血浆、尿液和粪便样品进行检测分析,鉴定吉马酮在大鼠体内的可能代谢产物,并探索其代谢规律及代谢途径,为后续吉马酮的药理学、药效学、毒理学及其代谢机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司); Q-Exactive 型高分辨质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Xcalibur 3.0 软件、Mass Frontier 2.0 软件、Compound Discovery 2.1 软件、HERAEUS FRESKO 17 低温高速离心机均购自美国 Thermo Scientific 公司; AL104 型万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司); BX7200HP 台式超声波清洗器(上海新苗医疗器械制造有限公司); Centrivap 冷冻离心浓缩仪器(美国 Labconco 公司)。

1.2 试剂

吉马酮对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:17012904;纯度>99%);甲醇、乙腈均为色谱纯,均购自美国 Fisher 公司;甲酸(色谱纯,阿拉丁试剂公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na, 分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.3 动物

SPF 级♂ SD 大鼠 12 只,体质量(200±20)g,

购于郑州大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002。动物于恒温恒湿房饲养,保持 12 h 光照循环,期间自由饮水进食,提供实验室标准动物饲料,所有实验操作按照河南省郑州大学第一附属医院动物伦理委员会的要求进行。给药前禁食 12 h,自由饮水。

2 方法

2.1 对照给药样品的制备

称取 250 mg 吉马酮对照品,加入 25 mL 的 0.5% CMC-Na,摇匀,制成浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的混悬液作为给药样品,备用。

2.2 色谱及质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱采用 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱,洗脱程序:0~3.0 min, 5%A, 3.0~35.0 min, 5%→100%A, 35.0~40.0 min, 100%A; 体积流量为 0.2 mL·min⁻¹; 进样量 5 μL; 柱温 40 °C。

2.2.2 质谱条件 UHPLC-Q Exactive 超高效液相-高分辨质谱联用仪:离子源为 HESI 源(heated ESI);辅助气温度和离子传输管温度分别为 300 °C 和 320 °C;鞘气流速和辅助气流速分别为 40 arb 和 10 arb;正离子模式下喷雾电压为 3.50 kV,负离子模式下喷雾电压 2.80 kV。S-lens 值为 50 V;扫描方式采用正、负离子下的 Full MS/dd-MS² 模式,其中包括一级全扫描(分辨率为 70 000 FWHM)和数据依赖的二级扫描(分辨率为 17 500 FWHM),碰撞能梯度设置为 20, 40, 60 eV,质荷比(*m/z*)的扫描范围为 80~1 200。

2.3 动物实验与样品采集

将 12 只大鼠随机等分为 2 组(采血组和集尿组),再将每组分为空白组和给药组,每组 3 只。在动物房内适应性喂养 1 周。实验前一晚,将大鼠置于代谢笼中,禁食 12 h,自由饮水。给药组以 10 mg·kg⁻¹ 的剂量灌胃给予大鼠吉马酮的 CMC-Na 混悬液;空白组大鼠灌胃等体积 0.5% CMC-Na 溶液。

灌胃给药后的 2 组大鼠,分别于 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 h 眼眶取血 0.5 mL,置于肝素钠抗凝 EP 管中,4 °C, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min。所有时间点合并上清液,涡旋振荡 3 min 得血浆样品;收集大鼠 0~24 h 尿液,4 °C, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,分别得到空白尿液和含药尿液;

收集大鼠 0~24 h 大鼠的粪便,干燥,分别得到空白粪便和含药粪便。所有样品置-20℃冷冻保存,待测。

2.4 生物样品的处理

血浆样品:取大鼠血浆 500 μL ,置于 4 mL EP 管中,加入 1.5 mL 甲醇沉淀蛋白,涡旋振荡 3 min 后,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,放置在冷冻离心浓缩仪器中浓缩(升温程序:0~30 min,25℃,30~100 min,30℃),浓缩完成后加入 100 μL 50%甲醇水溶液溶解残留物,超声 10 min,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样,分析。

尿液样品:取大鼠尿液 500 μL ,置于 4 mL EP 管中,加入 500 μL 甲醇。放置在冷冻离心浓缩仪器中浓缩(升温程序:0~30 min,25℃,30~100 min,30℃),浓缩完成后加入 100 μL 50%甲醇水溶液溶解残留物,超声 10 min,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样,分析。

粪便样品:取收集的粪便样品 0.5 g,研磨,加入 5 mL 甲醇,超声 30 min,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液。放置在冷冻离心浓缩仪器中浓缩(升温程序:0~30 min,25℃,30~100 min,30℃),浓缩完成后加入 100 μL 50%甲醇水溶液溶解残留物,超声 10 min,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样,分析。

2.5 高分辨质谱数据的预处理

以吉马酮的裂解碎片为母线,结合主要的离子碎片与中性丢失过滤等质谱鉴定方法,利用 Xcalibur 3.0 软件、Mass Frontier 2.0 软件和 Compound Discovery 2.1 软件对数据进行处理。首先,采用 Xcalibur 3.0 软件对所有的母离子和碎片离子的分子式进行初步预测,质量精度误差在 10 ppm 以内;再利用 Compound Discovery 2.1 软件,提取给药组的二级离子色谱图与空白组二级离子色谱图进行搜索比对,筛选出可能的代谢产物;最后利用 Mass Frontier 2.0 软件对可能的代谢物进行模拟质谱裂解得到二级碎片,将模拟得到的二级碎片与样品中提取得到的二级碎片离子比对确证,最终分析确认了吉马酮原型在内可能的 23 个代谢产物;其代谢途径有脱水反应、脱饱和反应(脱去 2 个 H)、氧化反应、葡萄糖胺结合反应、葡萄糖醛酸化反应以及相关的复合反应等。

3 结果与讨论

3.1 吉马酮对照品的质谱裂解规律分析

在正离子模式下,提取到吉马酮对照品($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$)的离子流色谱图,其产生 m/z 219.174 62 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准分子离子峰($t_{\text{R}}=23.65$ min,误差为-0.876),见图 1。在其 ESI- MS^2 谱中, m/z 219 经碰撞诱导裂解后产生碎片离子 m/z 201,推测其由 m/z 219 中性丢失 1 分子 H_2O 形成的。在随后的碰撞诱导裂解过程中,产生了 m/z 191,163,159,137,121 等碎片离子。推测 m/z 191 由 m/z 219 丢失 CO 基团形成,继而脱去 C_9H_{14} 基团形成碎片离子 m/z 69; m/z 165 由 m/z 219 丢失 C_4H_6 基团形成,继续脱去 C_2H_4 基团形成碎片离子 m/z 137; m/z 163 由 m/z 219 丢失 C_4H_8 基团形成,继续丢失 1 分子 CO 形成 m/z 135,又脱去 C_4H_6 基团形成碎片离子 m/z 81;碎片离子 m/z 121,95 推测是由 m/z 219 分别脱掉 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}$ 基团和 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}$ 形成的。由此,可推测吉马酮经碰撞诱导裂解易发生脱水,并且易产生脱烷基的碎片离子峰。吉马酮的质谱裂解图见图 2。

3.2 吉马酮在大鼠体内代谢产物的分析鉴定

基于 UHPLC-Q-Orbitrap 技术联合 Compound Discovery 2.1 分析给药后的大鼠血浆、尿液和粪便,通过对比给药前后的生物样本质谱图,结合色谱保留时间、精确相对分子质量、多级碎片离子等信息的分析,共鉴定了原型在内的 23 个代谢产物,其中大鼠血浆中鉴定得到 11 个代谢产物,尿液中鉴定 15 个代谢产物,粪便中鉴定 10 个代谢产物,具体代谢产物的质谱信息见表 1,所有代谢物的提取流色谱图见图 3。

3.2.1 大鼠血浆中代谢产物的鉴定 大鼠血浆中共鉴定代谢产物 11 个,分别为 $\text{M}_1\sim\text{M}_{11}$ 。

在正离子模式下, M_1 的准分子离子峰为 m/z 409.195 62 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8$,误差为-2.308)。在 ESI- MS^2 谱中,产生了 m/z 233 的碎片离子峰,可能是由 m/z 409 脱去葡萄糖醛酸而得到的离子碎片,初步推测吉马酮母核发生了葡萄糖醛酸结合反应。而 m/z 233 的碎片离子比母药吉马酮准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 219 分子量相差 32,而且分子式中多 2 个 O,进一步推测吉马酮母核同时又发生了 2 次氧化反应。因此,可将 M_1 鉴定为吉马酮发生二次氧化以及葡萄糖醛酸结合反应而得到的代谢产物。

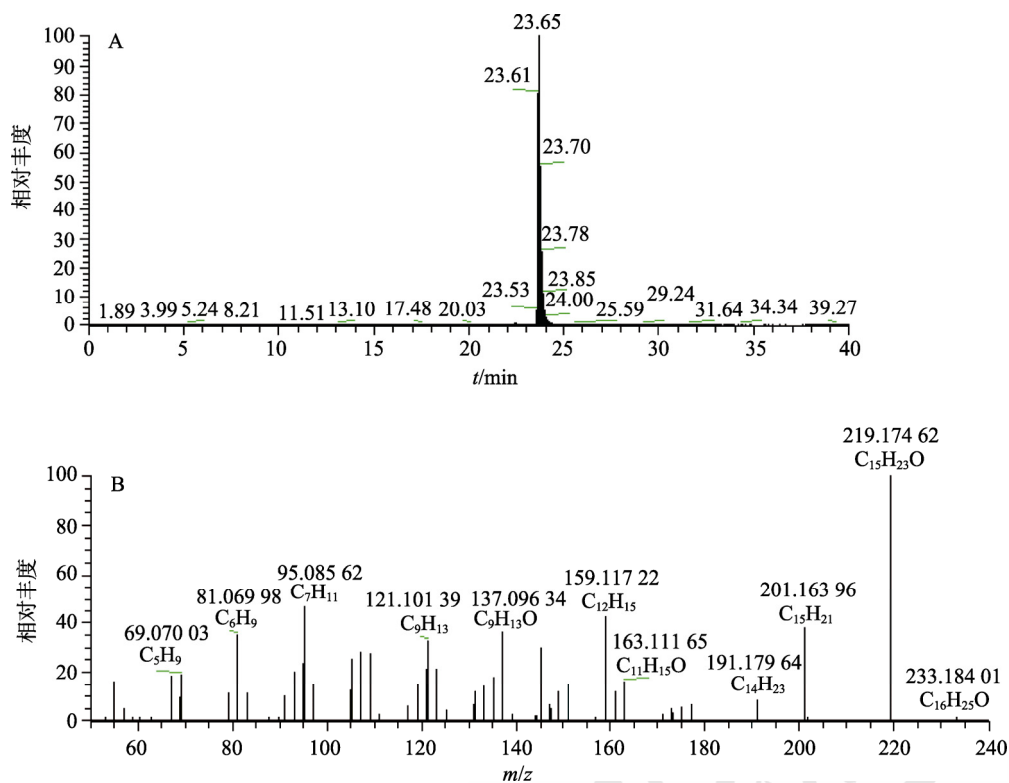


图 1 正离子模式下吉马酮的多级质谱图

A-总离子流色谱图; B-二级碎片离子图。

Fig. 1 Mass spectrogram of germacrone in positive ion mode

A-total ion current chromatogram; B-secondary fragment ion diagram.

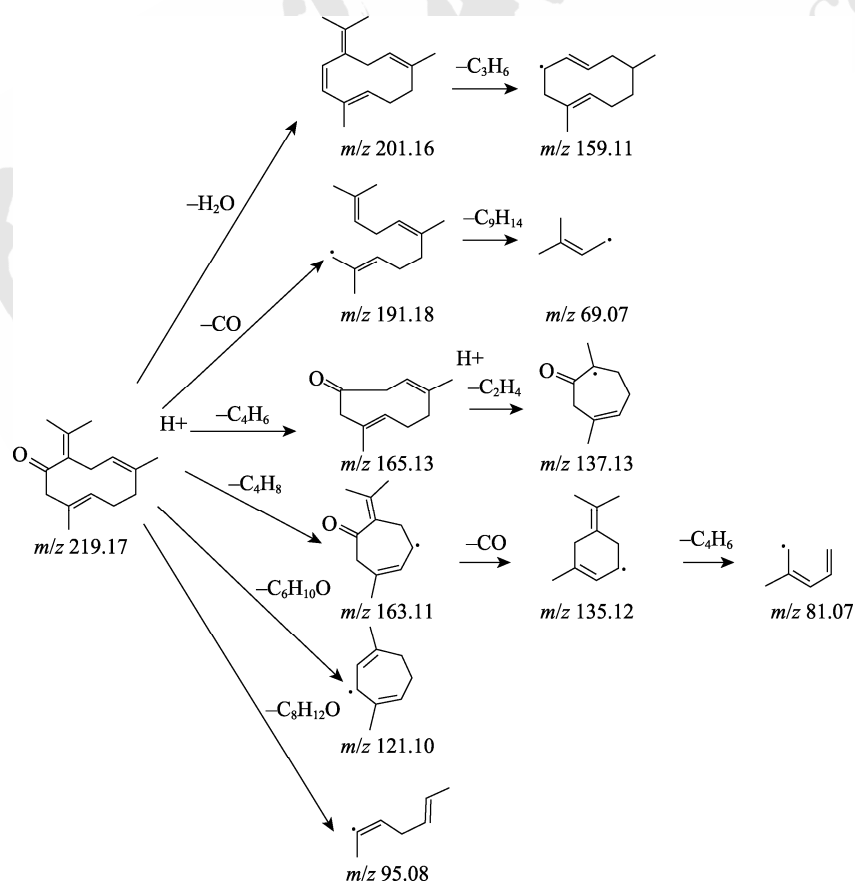


图 2 吉马酮的质谱裂解图

Fig. 2 Mass spectrogram of germacrone

表1 大鼠血浆、尿液和粪便中吉马酮的代谢产物质谱信息

Tab. 1 Mass spectrometric information of germacrone metabolites in rat plasma, urine and feces

化合物	分子式	模式	t_R/min	m/z 理论值	m/z 实测值	误差	碎片离子 m/z	血浆	尿液	粪便
M ₀	C ₁₅ H ₂₂ O	[M+H] ⁺	23.65	219.174 34	219.174 62	-0.876	201.16, 191.18, 177.16, 163.11, 159.11, 137.09, 121.10, 95.08, 81.07, 69.07	+	+	+
M ₁	C ₂₁ H ₂₈ O ₈	[M+H] ⁺	12.32	409.185 69	409.195 62	-2.308	233.15, 215.14, 197.13, 187.14, 157.10, 145.10, 85.02, 83.04, 69.06, 67.05	+	+	-
M ₂	C ₁₅ H ₂₂	[M+H] ⁺	22.17	203.179 42	203.178 99	-2.152	203.18, 175.14, 161.13, 147.11, 133.10, 123.11, 119.08, 107.08, 105.07, 95.08	+	-	-
M ₃	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	[M+H] ⁺	20.82	263.200 55	263.199 89	-2.533	263.20, 245.19, 203.18, 193.12, 175.11, 161.13, 147.11, 133.10, 121.10, 119.08, 107.08	+	-	-
M ₄	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	18.50	277.179 82	277.179 02	-2.890	277.17, 235.16, 179.10, 107.38, 79.05	+	-	-
M ₅	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	[M+H] ⁺	15.36	249.148 52	249.148 01	-2.051	231.10, 167.10, 149.09, 109.06, 107.08	+	+	-
M ₆	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	13.90	363.216 60	363.215 79	-2.232	363.22, 345.10, 327.13, 303.19, 287.16, 261.15, 247.13, 109.10, 107.08, 93.07, 81.07, 79.05	+	+	+
M ₇	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	[M+H] ⁺	14.89	363.216 60	363.215 64	-2.645	363.21, 345.20, 327.23, 287.16, 261.15, 247.13, 107.08, 93.07, 81.17, 79.08	+	+	+
M ₈	C ₂₁ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	14.97	379.211 51	379.210 30	-3.204	361.19, 343.19, 325.18, 301.17, 283.17, 255.17, 157.10, 119.08	+	+	+
M ₉	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	[M+H] ⁺	14.42	361.200 95	361.199 71	-3.434	361.19, 343.18, 325.23, 301.17, 283.16, 147.11, 133.10, 119.08	+	-	+
M ₁₀	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	10.67	235.169 25	235.168 64	-2.621	217.15, 199.17, 189.12, 175.14, 133.10, 119.08	+	-	+
M ₁₁	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	19.76	235.169 25	235.168 67	-2.494	217.15, 189.16, 147.11, 133.10, 119.08	+	-	+
M ₁₂	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	[M+H] ⁺	11.10	427.196 25	427.194 89	-3.204	251.16, 249.14, 233.15, 215.14, 205.15, 203.14, 193.12, 85.02, 81.07, 67.05	-	+	-
M ₁₃	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	[M+H] ⁺	12.32	427.196 25	427.195 62	-1.496	251.16, 233.15, 215.14, 205.15, 191.10, 81.07	-	+	-
M ₁₄	C ₁₅ H ₁₈ O	[M+H] ⁺	12.34	215.143 04	215.142 99	-0.241	197.13, 187.14, 173.09, 157.10, 145.10, 119.08, 107.08	-	+	-
M ₁₅	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	12.35	253.179 82	253.179 47	-1.387	235.17, 193.15, 109.10, 101.05, 95.08, 81.07	-	+	-
M ₁₆	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	9.92	310.201 28	310.200 68	-1.950	292.18, 274.18, 234.14, 154.08, 136.07	-	+	-
M ₁₇	C ₁₇ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺	10.08	308.185 63	308.185 36	-0.892	290.17, 272.16, 194.11, 126.02, 109.10, 107.08, 85.06, 81.07	-	+	-
M ₁₈	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	5.34	365.232 25	365.231 48	-2.110	347.22, 329.21, 311.19, 107.08, 83.04, 81.07, 71.04, 67.05	-	+	-
M ₁₉	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	8.78	365.232 25	365.231 45	-2.192	347.22, 317.21, 119.08, 107.08, 101.02, 85.0, 81.07, 73.02, 71.01, 67.05	-	+	+
M ₂₀	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	17.09	217.158 69	217.158 17	-2.403	199.14, 189.16, 175.11, 161.09, 147.11, 133.10, 119.08	-	+	+
M ₂₁	C ₁₅ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	16.38	217.158 69	217.158 22	-2.173	199.14, 189.16, 175.14, 161.09, 147.08, 133.10, 119.08	-	+	+
M ₂₂	C ₁₆ H ₂₄ O	[M+H] ⁺	19.92	233.189 99	233.189 44	-2.367	215.18, 187.14, 175.14, 173.13, 159.11, 145.10, 119.08	-	-	+

注：“+”代表样品中能检测到；“-”代表样品中未检测到。

Note: “+” meant detected in samples; “-” meant not detected in samples.

M₂的准分子离子峰为 m/z 203.178 99[M+H]⁺ (分子式 C₁₅H₂₂, 误差为-2.152)。其分子式较吉马酮母核(C₁₅H₂₂O)少 1 个 O, 推测由吉马酮发生还原和脱水 2 步反应而得到, 并且还原反应发生在羰基部分。因此, 可将 M₂ 鉴定为吉马酮发生还原反应和脱水反应而得到的代谢产物。

M₃的准分子离子峰为 m/z 263.199 89[M+H]⁺ (分子式 C₁₇H₂₆O₂, 误差为-2.533), 与母药吉马酮(C₁₅H₂₂O)相差 C₂H₄O。在 ESI-MS² 谱中, 产生了 m/z 203 的碎片离子峰, 可能是由 m/z 245 脱去乙酰基基团(C₂H₂O)而得到的离子碎片, 初步推测吉马酮母核发生了乙酰化结合反应。另外, M₃ 除了乙酰化外, 分子量与母药相比仍多 2, 且分子式多

2 个 H, 进一步推测吉马酮母核同时又发生了还原反应。因此, 可将 M₃ 鉴定为吉马酮发生还原反应及乙酰化结合反应而得到的代谢产物。同理, M₄ 的准分子离子峰为 m/z 277.179 02[M+H]⁺ (分子式 C₁₇H₂₄O₃, 误差为-2.890), 与母药吉马酮(C₁₅H₂₂O)相差 C₂H₂O₂。在其 ESI-MS² 谱中, 产生了 m/z 235 的碎片离子峰, 可能是由 m/z 277 脱去乙酰基基团(C₂H₂O)而得到的离子碎片, 初步推测吉马酮母核同样发生了乙酰化结合反应。而且 M₄ 除了发生乙酰化外, 分子量与母药相比仍多 16, 且分子式多 1 个 O, 进一步推测吉马酮母核同时又发生了氧化反应。因此, 可将 M₄ 鉴定为吉马酮发生氧化反应及乙酰化结合反应而得到的代谢产物。

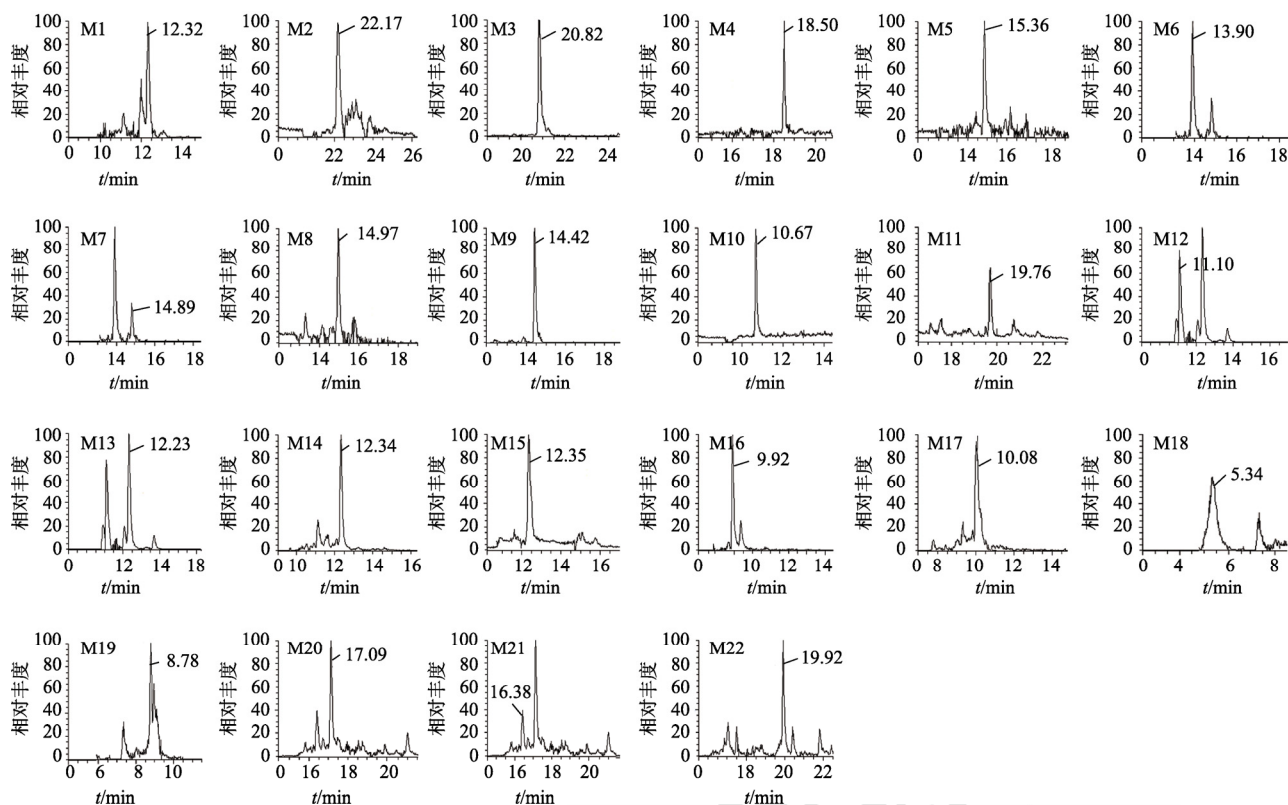


图3 22个代谢物的提取流色谱图

Fig. 3 Extraction ion chromatograms of 22 metabolites

M₅的准分子离子峰为 m/z 249.148 01[M+H]⁺ (分子式 C₁₅H₂₀O₃, 误差为-2.051), 与母药吉马酮 (C₁₅H₂₂O)相比少了2个H, 多了2个O。其分子式较吉马酮母核多2个O, 初步推测吉马酮母核经过了2次氧化反应, 但M₅的实测相对分子质量又缺少2, 推测母核同时又脱去2个H形成了1个双键。因此, 可将M₅鉴定为吉马酮的双氧化和脱饱和代谢产物。

在正离子模式下, 检测到2个色谱峰M₆(分子式 C₂₁H₃₀O₅, t_R =15.22 min, 误差为-2.232)、M₇(分子式 C₂₁H₃₀O₅, t_R =14.89 min, 误差为-2.645)。依据其分子式以及产生的离子碎片, 推测二者发生了鼠李糖苷结合并且糖苷部分发生脱水反应, 且均产生了 m/z 363, 345, 327, 287, 261, 247等碎片离子, 进一步推测二者可能互为同分异构。因此, 可将M₆、M₇鉴定为吉马酮发生鼠李糖苷结合反应和脱水反应的代谢产物。

M₈的准分子离子峰为 m/z 379.210 30[M+H]⁺ (分子式 C₂₁H₃₀O₆, 误差为-3.204), 其相对分子质量比M₂₀、M₂₁少162, 分子式较两者缺少C₆H₁₀O₅大基团, 推测M₈是由吉马酮母核发生葡萄糖苷结

合以及脱饱和反应而得到的代谢产物。由此, 可将M₈鉴定为吉马酮发生脱饱和反应和葡萄糖苷结合反应的代谢产物。M₉的准分子离子峰为 m/z 361.199 71[M+H]⁺ (分子式 C₂₁H₂₈O₅, 误差为-3.434)。其相对分子质量与M₈相比少18, 分子式少2个H、1个O, 初步推测M₉同样发生了葡萄糖苷结合以及脱饱和反应, 同时还发生了脱水反应。在M₈、M₉的ESI-MS²谱中, 对比两者的二级碎片离子进一步证明了上述推测。因此, 可将M₉鉴定为吉马酮发生脱水反应、脱饱和反应、葡萄糖苷结合反应的代谢产物。

在正离子模式下, 检测到2个色谱峰M₁₀(分子式 C₁₅H₂₂O₂, t_R =10.67 min, 误差为-2.621)、M₁₁(分子式 C₁₅H₂₂O₂, t_R =19.76 min, 误差为-2.494)。两者的实测相对分子质量较母药吉马酮 (C₁₅H₂₂O)均多16, 分子式多1个O, 推测由吉马酮母核发生氧化反应而得到。因此, 可将M₁₀、M₁₁鉴定为吉马酮的羟基化反应产物。

3.2.2 大鼠尿液中代谢产物的鉴定 大鼠尿液中共鉴定代谢产物15个, 分别为M₁、M₅~M₈和M₁₂~M₂₁。代谢产物M₁₂~M₂₁的鉴定结果如下。

在正离子模式下,检测到2个色谱峰 M_{12} (分子式 $C_{21}H_{30}O_9$, $t_R=11.10$ min, 误差为-3.204)、 M_{13} (分子式 $C_{21}H_{30}O_9$, $t_R=12.32$ min, 误差为-1.496), 两者的准分子离子峰分别为 m/z 427.194 89, 427.195 62, 经碰撞诱导裂解都产生 m/z 251, 233, 215, 205 等离子碎片, 其中 m/z 251 可能是由 m/z 427 脱去葡萄糖醛酸而得到离子碎片, 初步推测吉马酮母核发生了葡萄糖醛酸结合反应, 再依据其分子式及实测相对分子质量可推测吉马酮母核同时又发生了脱饱和反应(脱去2个H)以及氧化反应。因此, 可将 M_{12} 、 M_{13} 鉴定为吉马酮发生脱饱和反应(脱去2个H)、氧化反应以及葡萄糖醛酸结合反应而得到的代谢产物。

M_{14} 的相对分子质量比吉马酮母核少4, 其准分子离子峰为 m/z 215.142 99 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{15}H_{18}O$, 误差为-0.241), 分子式较母药吉马酮($C_{15}H_{22}O$)少4个H, 推测 M_{14} 是由吉马酮母核脱去4个H形成2个双键而得到的代谢产物。由此, 推测 M_{14} 为吉马酮的双脱饱和代谢产物。 M_{15} 的准分子离子峰为 m/z 253.179 47 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{15}H_{24}O_3$, 误差为-1.387)。其分子式较母药吉马酮($C_{15}H_{22}O$)多2个O、2个H, 经碰撞诱导裂解产生了 m/z 235 的二级碎片离子, 该碎片可能由 m/z 253 中性丢失1分子 H_2O 而得到, 推测吉马酮母核发生了水合反应, 实测相对分子质量较母药吉马酮($C_{15}H_{22}O$)多16, 推测吉马酮母核同时发生了氧化反应。由此, 可将 M_{15} 鉴定为吉马酮的水合反应和氧化反应产物。 M_{16} 的准分子离子峰为 m/z 310.200 68 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{17}H_{27}NO_4$, 误差为-1.950)。其分子式较 M_{15} 多2个C、3个H、1个O, 实测相对分子质量多57。推测吉马酮母核发生了甘氨酸结合反应(脱水结合)。因此, 可将 M_{16} 鉴定为吉马酮发生水合反应、氧化反应和甘氨酸结合反应的代谢产物。 M_{17} 的准分子离子峰为 m/z 308.185 36 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{17}H_{25}NO_4$, 误差为-0.892)。依据其二级裂解碎片, 推测 M_{16} 和 M_{17} 具有相似的结构, 同样发生了甘氨酸结合反应(脱水结合)和氧化反应。但 M_{16} 的分子式较 M_{17} 少2个H, 推测其并未发生水合反应, 而是进行了2次氧化反应。由此, 可将 M_{17} 鉴定为吉马酮的双氧化反

应和甘氨酸结合反应产物。

在正离子模式下, M_{18} 的准分子离子峰为 m/z 365.231 48 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{21}H_{32}O_5$, $t_R=5.34$ min, 误差为-2.110)。依据其分子式, 初步推测吉马酮母核发生了还原反应并与葡萄糖苷结合, 同时又发生了脱水反应。在其二级裂解的过程中, M_{18} 产生了 m/z 211 的碎片离子, 推测其由 m/z 347 脱去大基团 $C_6H_8O_6$ 而得到, 从而进一步验证了上述推测, 并且吉马酮脱水部位可能发生在葡萄糖苷部分。由此, 推测 M_{18} 是吉马酮的还原、脱水以及葡萄糖苷结合反应的产物。同理, M_{19} 的准分子离子峰为 m/z 365.231 45 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{21}H_{32}O_5$, $t_R=8.78$ min, 误差为-2.192), 其保留时间 t_R 与 M_{18} 不同, 在碰撞下产生的碎片离子与 M_{18} 的二级碎片离子基本相同。由此, 可将 M_{19} 鉴定为 M_{18} 的同分异构体, 推测为吉马酮的还原、脱水以及葡萄糖苷结合反应的产物。

在正离子模式下, 检测到2个色谱峰 M_{20} (分子式 $C_{15}H_{20}O$, $t_R=17.09$ min, 误差为-2.403)、 M_{21} (分子式 $C_{15}H_{20}O$, $t_R=16.38$ min, 误差为-2.173)。两者的实测相对分子质量均比 M_0 少2, 分子式较 M_0 少2个H, 推测两者为吉马酮的脱饱和和反应产物。由此, 可将 M_{20} 、 M_{21} 鉴定为吉马酮的脱饱和和反应产物。

3.2.3 大鼠粪便中代谢产物的鉴定 大鼠尿液中共鉴定代谢产物10个, 分别为 M_6 ~ M_{11} 和 M_{19} ~ M_{22} 。代谢产物 M_{22} 的鉴定结果如下。

在正离子模式下, M_{22} 的准分子离子峰为 m/z 233.189 44 $[M+H]^+$ (分子式 $C_{16}H_{24}O$, 误差为-2.367)。其实测相对分子质量较母药吉马酮($C_{15}H_{22}O$)多14, 分子式多1个C、2个H, 推测由吉马酮母核发生甲基化反应得到。因此, 可将 M_{22} 鉴定为吉马酮的甲基化反应产物。

3.3 吉马酮在大鼠体内的代谢途径分析

从大鼠的血浆、尿液与粪便中共鉴定了包括吉马酮原型在内的23个代谢产物, 其主要的体内代谢反应有脱水、脱饱和、氧化、水合、葡萄糖苷结合、葡萄糖醛酸化以及它们的复合反应等。其中少数代谢产物发生了甘氨酸结合和鼠李糖苷结合等结合反应。吉马酮较容易发生脱饱和、脱水、氧化等化学反应。其主要代谢途径见图4。

- 志), 2017, 23(13): 1-7.
- [10] NAKAZAWA T, OHSAWA K. Metabolism of rosmarinic acid in rats[J]. J Nat Prod, 1998, 61(8): 993-996.
- [11] ZHU M S, ZHANG H Y, HUMPHREYS W G. Drug metabolite profiling and identification by high-resolution mass spectrometry[J]. J Biol Chem, 2011, 286(29): 25419-25425.
- [12] DONG X N, MENG Z Y, GU R L, et al. Simultaneous determination of neorudin and its active metabolite hirudin vriant 2-Lys47 by UPLC-MS/MS in human urine[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(4): 427-436.
- [13] GODINHO A L A, MARTINS I L, NUNES J, et al. High resolution mass spectrometry-based methodologies for identification of etravirine bioactivation to reactive metabolites: *In vitro* and *in vivo* approaches[J]. Eur J Pharm Sci, 2018, 119: 70-82.
- [14] EZZELDIN E, TAMMAM M, ABO TALIB N F. New modified UPLC/tandem mass spectrometry method for determination of risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone in plasma: Application to dose-dependent pharmacokinetic study in sprague-dawley rats[J]. Int J Anal Chem, 2017(2017): 1-11.
- [15] GUO S B, XU L L, JIANG L J, et al. Profiling and identification of *in vivo* metabolism of rosmarinic acid in rats[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(21): 4704-4712.
- [16] CHEN X Y, XU L L, GUO S Z, et al. Profiling and comparison of the metabolites of diosmetin and diosmin in rat urine, plasma and feces using UHPLC-LTQ-Orbitrap MSn[J]. J Chromatogr B, 2019(1124): 58-71.
- [17] GONG J R, JIANG Z, YANG T, et al. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetics and metabolism of MK-8353 by liquid chromatography combined with diode array detector and Q-Exactive-Orbitrap tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019(168): 64-74.
- [18] SUN Z, ZHOU L, ZUO L H, et al. Chemical constituents study of Yixin granules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS technology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(10): 1197-1204.
- [19] SUN Z, ZHAO L L, ZUO L H, et al. Identification of various chemical constituents in Dandeng Tongnao capsule by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(2): 191-199.

收稿日期: 2020-02-25

(本文责编: 沈倩)