

LC-MS 鉴定大鼠血浆山柰酚代谢产物^{*}陈峰, 符乃光, 谭银丰, 张俊清^{**}

(海南医学院药学系 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海口 571101)

摘要 目的: 采用液相色谱-质谱联用技术鉴定大鼠给药山柰酚单体后血浆中代谢产物。方法: 取给药后大鼠的血浆样品经酶水解、酸水解后, 进行色谱分离, 采用液相色谱-质谱联用仪检测, 大气压电喷雾离子源(EPI) 负离子条件下进行扫描, 鉴定大鼠给药山柰酚($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 单体后血浆中代谢产物的结构。结果: 通过与山柰酚对照品谱图比较, 结合质谱仪扫描结果分析, 在大鼠给药山柰酚单体后血浆中鉴定出山柰酚(m/z 286.0) 代谢产物结构。结论: 采用酶水解、酸水解的方法可快速、有效地鉴定出大鼠血浆中山柰酚代谢产物, 为进行含山柰酚中药及其复方的药物代谢动力学研究奠定科学基础。

关键词: 山柰酚; 液相色谱-质谱联用法; 代谢物; 药代学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1094-04

LC-MS determination of nimbecetin metabolites in rat plasma^{*}CHEN Feng, FU Nai-guang, TAN Yin-feng, ZHANG Jun-qing^{**}

(Department of Pharmacy, Hainan Medical College, Hainan Provincial Key Laboratory of R&D of Tropical Herbs, Haikou 571101, China)

Abstract Objective: To determine the metabolites of nimbecetin in rat plasma after an oral administration by Liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS). **Methods:** The rats were administrated with nimbecetin monomer solution($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) by oral administration and the blood sample were collected. After enzymolysis and acid hydrolysis the analytes were separated and detected by LC-MS. A mass spectrometry equipped with an Atmospheric Pressure Ionization-Electrospray(EPI) source was used as detector and was operated in negative ion mode to identify the metabolites in plasma. **Results:** Nimbecetin were identified by comparing with the standard spectrum and the results of mass spectrometry, i. e. m/z 286.0 was nimbecetin. **Conclusion:** Enzymolysis and acid hydrolysis were fast feasible method and could be used to identify the nimbecetin metabolites in rat plasma. Still this method could be acted as referring during pharmacokinetics studies upon Chinese material medica.

Key words: nimbecetin; LC-MS; metabolites; pharmacokinetics

黄酮是广泛存在于植物中的多酚类化合物, 这些化合物中黄酮醇类化合物具有广泛的生物活性, 比如抗癌、抗氧化等活性。人们日常饮食中的洋葱、苹果、红酒中就含有大量的黄酮醇类化合物。流行病学研究表明, 通过日常饮食所摄入的黄酮的多少与心血管疾病、癌症的发病率有密切的关系, 摄入的量多则发病率低^[1]。

山柰酚为黄酮醇类化合物, 广泛分布于植物中, 具抗氧化、抗炎、抗辐射、抗癌和预防心血管疾病等药理活性^[2]。药理研究表明, 它可抑制金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、伤寒杆菌和痢疾杆菌的生长; 对醛糖还原酶有抑制作用; 能止咳祛痰; 利尿^[3]。本

实验通过液相色谱-质谱联用技术测定大鼠血浆中的山柰酚及其代谢产物, 主要是想弄清楚山柰酚在大鼠血浆中的物质存在形式, 为含山柰酚等黄酮类成分中药及其复方的药动学研究奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠由海南省药物研究所提供。每笼 2 只, 饲养环境温度控制在 20°C , 适应时间为 1 周, 每天控制自由进食、饮水时间为 8 h。

1.2 仪器与试剂

仪器: Bruker Esquire 2000 型质谱仪(瑞士布鲁克公司); 美国 waters 公司液相色谱仪(包括 515 型

* 2007 国家自然科学基金资助项目(No. 30760298); 海南省科技计划项目(No. 061006)

** 通讯作者 Tel: (0898) 66895337; E-mail: jgzhang2011@163.com

输液泵,2996 型光电二极管阵列检测器,717 型自动进样器);美国 PALL 公司 CascadeIX 超纯水器;日本 KUBOTA 公司 KR-702 型离心机;美国 Organomation N-EVATM111 氮吹仪。

药品与试剂: 山奈酚对照品购自天津一方科技有限公司。甲醇与乙腈均为色谱纯,磷酸、乙酸、盐酸、乙酸乙酯等试剂均为分析纯,水为高纯水。

1.3 血浆样品采集 取 SD 大鼠(180~220 g)置于代谢笼中,禁食 12 h,自由饮水,以 30 mg·kg⁻¹ 的剂量灌胃(ig)给药山奈酚 0.5% CMC-Na 混悬溶液,给药后 4 h 内从肝门静脉取血(约 5 mL),全血样品置已肝素化的试管中,于 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min 以分取血浆,置 -40℃ 冷冻贮存,备用。

1.4 色谱条件 色谱柱: Gemini 5 μ C6-Phenyl 110A;柱温: 30℃;流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(30:70);流速为 1.0 mL·min⁻¹;波长 365 nm。

1.5 质谱条件 EPI 离子源,阴离子方式检测,扫描范围 *m/z* 50~2200,用于定性分析的离子分别为 *m/z*→285(山奈酚)。

1.6 血浆样品处理

1.6.1 甲醇沉淀蛋白处理 精密吸取血浆样品 0.2 mL 置硅烷化离心管中,加入甲醇 0.6 mL 旋混 3 min,12000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液 80 μL 直接进样分析^[4]。

1.6.2 酶水解处理 取 0.9 mL 血浆于 4 mL 小瓶(Waters,P/N186000838C,)中,加入 0.1 mL 浓度为 0.583 mol·L⁻¹ 的乙酸溶液调 pH 至 4.9,漩涡混匀,加入 2.5×10⁴ U·L⁻¹ Sulfatase(G1512)水解酶,密闭。在 37℃ 水浴中水平振荡 60 min,加入 6 倍于取样体积的丙酮水平振荡 30 min,样品在 4℃ 下以 4000 r·min⁻¹ 离心 20 min,合并上清液 N₂ 吹干,再用 0.4 mL 甲醇溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜,得样品,进样 20 μL^[5,6]。

1.6.3 酸水解处理 取 1.0 mL 甲醇与 0.4 mL 10 M HCl 于 4 mL 小瓶(#WAT022468,Waters,Milford,MA)中混合均匀,加入血浆 0.6 mL,小瓶用带隔膜(#72714,Waters,Milford,MA)的瓶帽(#72711,Waters,Milford,MA)密闭,漩涡 3 min,于 90℃ 水浴中反应 5 h,放冷,加入乙酸乙酯 2.0 mL,漩涡均匀后于 4℃ 下 5000 r·min⁻¹ 离心 10 min 得上清液, N₂ 吹干,再用 0.4 mL 甲醇溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜,得样品,进样 40 μL^[7-10]。

2 结果

2.1 色谱结果 山奈酚给药大鼠血浆经“1.6.1”项下方法处理后,未检测到山奈酚原形药物,但经过“1.6.2”项、“1.6.3”项处理后,均检测到山奈酚原形药物。结果见图 1~3。

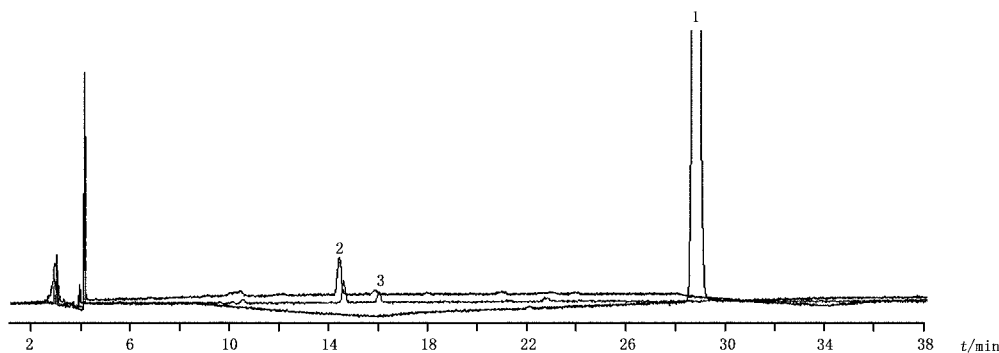


图 1 未水解血浆样品色谱图

Fig 1 Chromatogram of plasma sample without hydrolysis

1. 山奈酚对照品(kaempferol reference substances) 2. 2 h 血浆样品(plasma sample) 3. 空白血浆样品(blank)

2.2 质谱结果 采用电喷雾离子源,以负离子方式对大鼠给药山奈酚单体后经酶、酸水解血浆样品及山奈酚对照品进行检测。从一级全扫描质谱图中均获得山奈酚的分子离子峰,分别为 *m/z* 285.1, 284.9, 285.0。结果见图 4。

3 讨论

3.1 对大鼠给药山奈酚单体(30 mg·kg⁻¹) 后血浆

中代谢产物的研究表明,血浆中检测不到山奈酚原形药物,经酶、酸水解后仅检测到山奈酚,而未检测到其他黄酮类物质,说明血浆中山奈酚主要以结合物的形式存在。这与文献报道^[1] 山奈酚在体内与葡萄糖醛酸及硫酸形成结合物基本一致。

3.2 课题组前期对大鼠给药槲皮素单体(100 mg·kg⁻¹) 后血浆中代谢产物亦进行了研究,结果发现血

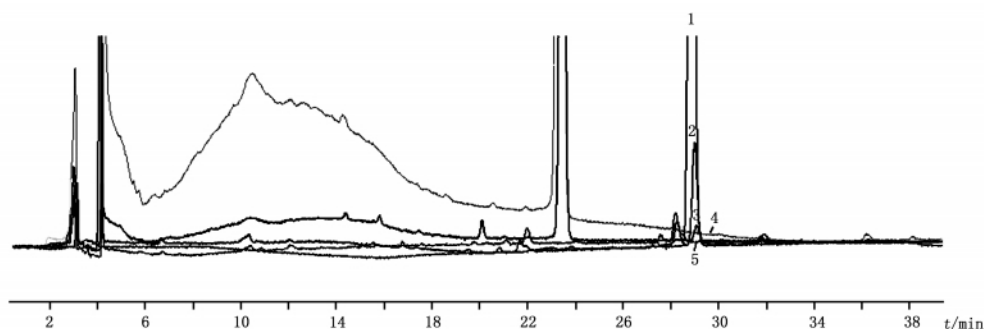


图2 经酶、酸水解血浆样品色谱图

Fig 2 Chromatogram of plasma sample after acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis

1. 山奈酚对照品(kaempferol reference substances) 2. 2 h 血浆酶水解样品(enzymatic hydrolysis plasma sample) 3. 2 h 血浆酸水解样品(acid hydrolysis plasma sample) 4. 血浆酸水解空白样品(blank of acid hydrolysis plasma sample) 5. 血浆酶水解空白样品(blank of enzymatic hydrolysis plasma sample)

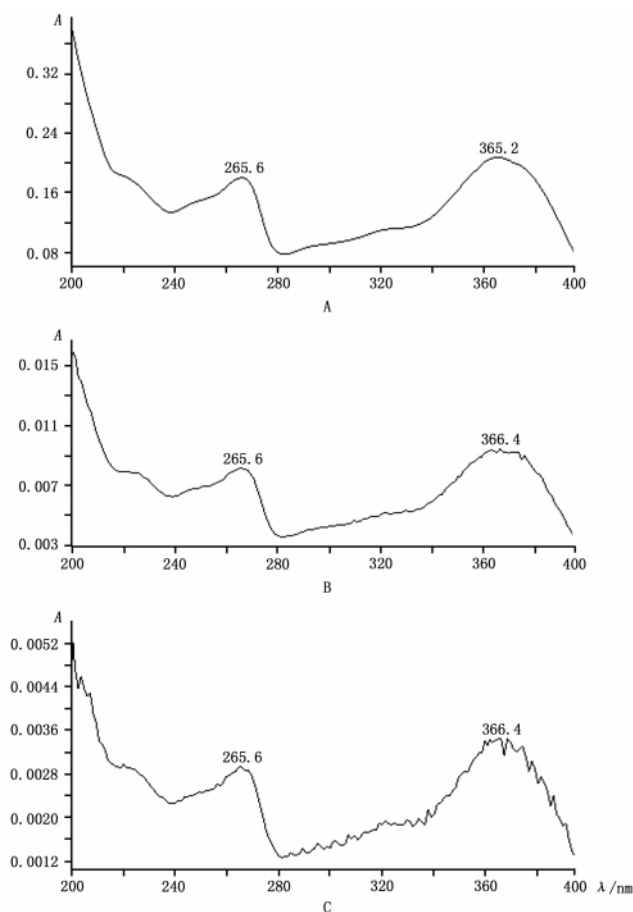


图3 紫外吸收图谱

Fig 3 The UV spectral

A. 山奈酚对照品(kaempferol reference substances) B. 酶水解血浆样品(plasma sample after enzymatic hydrolysis) C. 酸水解血浆样品(plasma sample after acid hydrolysis)

浆中也检测不到槲皮素原形药物,但经酶水解后检测到槲皮素、异鼠李素等几种黄酮类物质,说明槲皮素部分是以原形吸收,而另一部分是经过胃肠道微

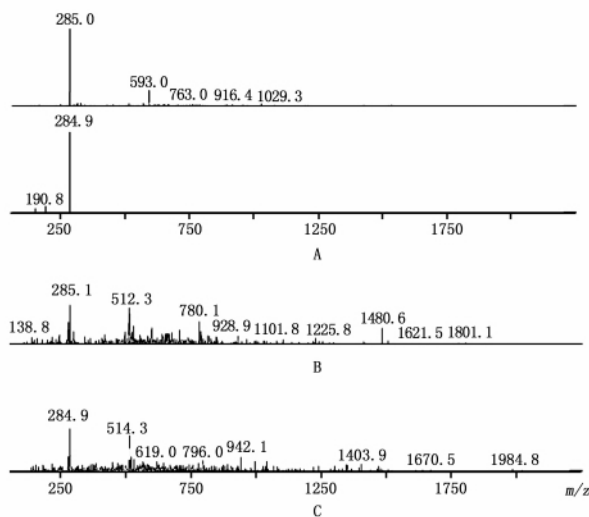


图4 质谱图

Fig 4 Mass spectrograms

A. 山奈酚对照品(kaempferol reference substances) B. 酶水解血浆样品(plasma sample after enzymatic hydrolysis) C. 酸水解血浆样品(plasma sample after acid hydrolysis)

生物菌群或酶转化为异鼠李素等其他黄酮类物质后进入血液的,这与山奈酚的代谢情况是不同的。

3.3 课题组前期对海南枫蓼肠胃康复方体外化学成分的研究工作证明,该复方有效成分有槲皮素、山奈酚等5种黄酮单体存在。因此,对该两种黄酮单体的体内代谢产物情况的研究工作基础,将为研究该复方药物代谢动力学寻找合理的指标成分奠定科学基础。

参考文献

- 1 Erlund, Kosonen T, Alfthan G, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Pharmacol*, 2000, 56(8): 545

- 2 Young Jin Moon, Xiaodong Wang, Marilyn E. Morris. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol Vitro*, 2006, (20): 187
- 3 YANG Xiu-wei (杨秀伟). Metabolite analysis for chemical constituents of traditional Chinese medicines(中药成分代谢分析). Beijing(北京): China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 2003. 566
- 4 MA Guo(马国). Shancha leaf total flavonoid absorb mechanism and absorption to adjust to control a research(山碴叶总黄酮吸收机理与吸收调控研究). Thesis(学位论文). Sichuan University(四川大学), 2007
- 5 Ader P, Wessmann A, Wolfram S, et al. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(7): 1056
- 6 Manach C, Morand C, Demigné C, et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Febs Lett*, 1997, 409: 12
- 7 Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MN, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *Febs Lett*, 1997, 418(1): 152
- 8 Michael G L Hertog, Peter C H Hollman, Dini P Venema. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem*, 1982, 40(9): 1591
- 9 Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6): 1276
- 10 Jin D, Hakamata H, Takahashi K, et al. Determination of quercetin in human plasma after ingestion of commercial canned green tea by semi-micro HPLC with electrochemical detection. *Biomed Chromatogr*, 2004, 18(9): 662
- 11 LU Xin-yan(鲁鑫焱), JIANG Hui-di(蒋惠娣), ZENG Su(曾苏). Advances in the study of metabolism and drug-drug interactions of flavonoids in primary cultured hepatocytes(黄酮类化合物在原代肝细胞上的代谢和药物相互作用研究进展). *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2006, 41(12): 1130

(本文于 2010 年 11 月 22 日收到)

《药物分析杂志》编辑部电话变更通知

尊敬的作者/读者:

您好!

因《药物分析杂志》编辑部业务发展需要,本编辑部将联络电话和传真进行了调整,编辑部电话总机为 010-67058427/010-67012819。如您需要与负责稿件的编辑联系,请拨分机号:

办公室拨 1, 栗晓黎副主任拨 2, 于宝珠拨 3, 陈唯真拨 5, 赵慧芳拨 6, 陈立亚拨 7, 刘小帅拨 8。

广告业务拨 3; 传真拨 4

如需咨询缴费等财务事宜,请拨 8 咨询刘小帅。

查询稿件进度请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 自行查询。

特此通告,感谢您对我们工作一如既往的支持。

《药物分析杂志》编辑部