

超高效液相色谱-质谱联用法分析川陈皮素在大鼠体内的代谢产物

徐玲玲¹, 何芋岐², 郭 忻³, 卢艳花⁴, 王长虹^{2*}, 王峥涛^{1, 2*}

(1. 中国药科大学药理学研究室, 江苏 南京 211198; 2. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201210; 3. 上海中医药大学中药学院, 上海 201210; 4. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用 (UPLC-MS/MS) 技术分析了川陈皮素在大鼠体内的代谢产物。通过比较给药前后大鼠血浆、胆汁和尿液样品的总离子流色谱图, 观察到川陈皮素的 7 个代谢产物。进一步通过综合分析代谢产物的色谱保留行为、一级和二级质谱信息, 推定其中 3 个为 I 相代谢产物, 分别为川陈皮素脱去一个和两个甲基而得。另外 4 个被推定为 II 相代谢产物, 分别为 I 相代谢产物进一步通过硫酸化和葡萄糖醛酸化生成。上述产物中, 4 个 II 相代谢产物属首次报道。结果提示了 II 相代谢尤其是葡萄糖醛酸化在川陈皮素代谢通路中的重要作用, 提示葡萄糖醛转移酶的基因多态性以及相关的药物相互作用引起的潜在的川陈皮素活性及毒副作用的变化值得进一步的关注。

关键词: 川陈皮素; 代谢产物; 超高效液相色谱-质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1483-05

Identification of metabolites of nobiletin in rats using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry

XU Ling-ling¹, HE Yu-qi², GUO Xin³, LU Yan-hua⁴, WANG Chang-hong^{2*}, WANG Zheng-tao^{1, 2*}

(1. Research Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China; 3. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China; 4. The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200273, China)

Abstract: In this study, metabolism of nobiletin in rats was studied using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). As a result, seven major metabolites were found in bile, urine and serum of rats. Three phase I products were assigned to be demethyl and di-demethyl products, and other four phase II products were assigned to be glucuronic and sulfonic conjugates. The four phase II metabolites were reported for the first time. Among the metabolites found in the present study, the glucuronic conjugates of demethyl-nobiletin played a predominant role in the metabolic pathway, indicating that its potential role for glucuronidation-related factors, such as gene polymorphism, drug-drug interaction, etc., in changing the active and toxic effect of nobiletin and that it should be paid more attention in further development.

Key words: nobiletin; metabolite; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2011-05-23.

基金项目: 上海-联合利华研究与发展基金资助 (09540715800); 上海市教育委员会创新团队第二期项目资助.

*通讯作者 Tel: 86-21-51322513, Fax: 86-21-41322507, E-mail: wchcxm@hotmail.com;

Tel: 86-21-51322507, Fax: 86-21-51322519, E-mail: wangzht@hotmail.com

川陈皮素 (nobiletin, NOB) 是一种多甲氧基黄酮^[1](图 1), 主要来源于芸香科植物川橘 (*Citrus nobilis* Lour)、酸橙 (*C. aurantium* Lour) 的果皮和柑橘 (*C. reticulata* Blanco) 叶、茎等。Tseng 首次从橙皮中分离出 NOB, 国内外学者对 NOB 的研究取得了很大进展。NOB 具有显著的抗炎、抑菌、抗氧化和抗肿瘤、以及抑制癌细胞增生的功效和较强的降胆固醇效果^[2], 其降胆固醇作用甚至超过某些已上市的处方药物, 并且毒副作用报道^[3]较少。此外, 因具有扩张气管平滑肌的作用, NOB 还具有祛痰、镇咳、平喘等功效^[4]。因此, NOB 在多方面都具有新药开发的前景。

药代动力学研究可以提供药物的代谢稳定性、药物体内的变化过程及机制信息, 是新药开发过程中一项重要的研究内容。迄今为止, 尽管对 NOB 的药理作用研究比较深入, 但对其代谢研究却较少报道^[5, 6]。在仅有的研究中, 只发现了去甲基化生成的 I 相代谢产物^[4, 5, 7]。由于去甲基化后生成的酚羟基很活泼, 可以预测其易发生进一步的葡萄糖醛酸和硫酸结合等 II 相代谢。II 相代谢是体内代谢过程中一个重要的组成方面, 缺乏 II 相代谢的数据, 对药物体内整体代谢稳定性的评估将存在严重缺陷。因此, 本研究将系统地分析大鼠口服 NOB 后体内的 I 相及 II 相代谢产物, 进一步完善 NOB 的体内代谢通路, 为 NOB 的代谢稳定性研究、药代动力学研究以及更进一步的新药开发奠定基础。

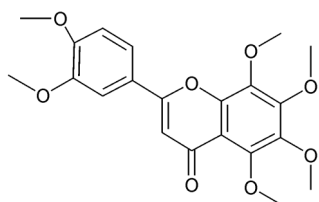


Figure 1 Structure of nobiletin (NOB)

材料与方法

仪器、试剂与实验动物 美国 Waters 超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪; 美国 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); NOB 购自上海融禾医药科技有限公司, 批号 090910, 纯度 >98%; 美国 Milli-Q 超纯水纯化系统; 雄性 SD 大鼠 (上海中医药大学实验动物中心提供, 体重: 200 ± 20 g, 合格证号: SYXK (沪) 2009-0069)。

UPLC 参数 柱温 45 °C, 流动相为乙腈 (B) 和 0.1% 的甲酸水溶液 (A), 洗脱梯度如下, 0~0.5 min, 5% B; 0.5~2 min, 5%~25% B; 2~3 min, 25%~80%

B; 3~4 min, 80%~95% B。流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。

质谱参数 电喷雾离子化源, 毛细管电压为 3.8 kV, 锥孔电压为 30 V, 去溶剂化温度为 300 °C, 离子源温度为 120 °C, 去溶剂化气流速为 600 L·h⁻¹, 锥孔气流为 50 L·h⁻¹, 碰撞气为氦气。

样品处理 取血浆、尿液或胆汁样品, 加入等体积 10% 三氯乙酸 (含 10% 乙腈), 涡旋 3 min 后, 离心 (10 min, 4 °C, 20 000 × g), 离心后取上清液分析。

尿液、胆汁、血浆的收集及代谢产物分析 雄性 SD 大鼠 12 只, 随机分为给药组及空白组 (每组 6 只), 禁食 12 h 后, 给药组口服给予 NOB (30 mg·kg⁻¹, 称取 NOB 30 mg 溶于 0.5 mL DMSO 中, 再加生理盐水至 10 mL), 空白组口服给予等体积生理盐水。给药后, 大鼠置于代谢笼。给药后 1 h 经眼底静脉丛采集血液 5 mL 于肝素钠浸润的聚乙烯离心管。血液经 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后得血浆。同批大鼠给药后收集 24 h 内尿液。

另取雄性 SD 大鼠 12 只, 随机分为给药组及空白组 (每组 6 只), 禁食 12 h。乌拉坦 (20%) 麻醉后进行胆管插管手术。手术后给药组口服给予 NOB (30 mg·kg⁻¹), 空白组口服给予等体积生理盐水。收集 12 h 内胆汁。

尿液、胆汁、血浆各取 200 μL, 分别按样品处理方法处理后进样分析。给药组及空白组样品均分别在正、负离子下采用一级扫描 (m/z 100~1 000) 获得总离子流图。比较给药组及空白组总离子流图, 鉴别出代谢产物色谱峰及其准分子离子。分别对其准分子离子进行二级质谱碎裂, 获得二级质谱图。结合其准分子离子信息、二级离子碎片信息以及原形化合物结构, 对代谢产物结构进行分析。

结果

1 大鼠体内 NOB 代谢产物的 LC-MS/MS 分析

在给药后的大鼠胆汁、尿液及血浆中共发现了 8 个具有给药依赖性的色谱峰 (M0~M7)。尿样的总离子流色谱图见图 2, 大鼠尿样、血样、胆汁样品中 NOB 及其代谢产物的 MRM 色谱图见图 3。其中以尿样中的代谢产物量最大, 种类最多 (图 2)。从色谱图上可以看出, M2 的响应相对较高, 提示生成 M2 的通路可能是 NOB 代谢的重要途径。

1.1 原形 M0 M0 的色谱保留时间为 3.50 min, 在尿液、血浆以及胆汁中均能观察到 (图 2、3)。在一

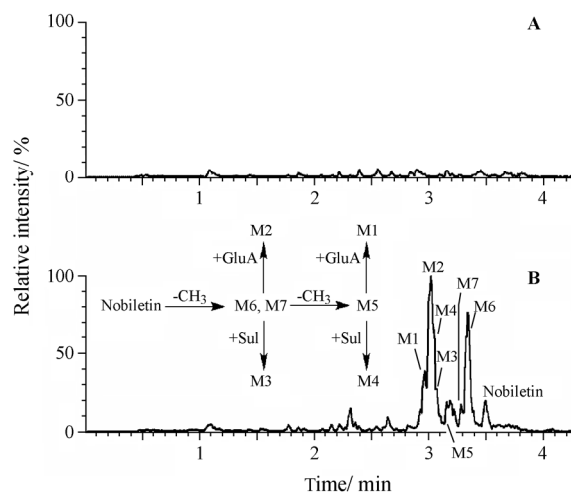


Figure 2 Total ion chromatogram of rat urine by UPLC-MS. A: Blank; B: Urine sample after administration of NOB

级正离子全扫描质谱中观察到其准分子离子质荷比为 m/z 403.3。进一步对其进行二级质谱碎裂, 生成 m/z 388、373、358 的碎片离子 (表 1)。其色谱行为、准分子离子质荷比以及碎片离子均与 NOB 对照品一致, 据此确定 M0 为 NOB 原形。

1.2 代谢物 M1 M1 的色谱保留时间为 2.96 min, 在尿样、血样和胆汁样品中都能检测到 (图 2、3)。在一级正离子全扫描质谱中观察到其准分子离子 m/z 551。进一步的二级质谱碎裂模式中, 观察到质量数为 176 u 的中性丢失, 生成了 m/z 375 的碎片离子 (表 1), 是典型的葡糖醛酸化产物的质谱信号, 因此推测其为准分子离子 m/z 375 的葡糖醛酸苷。碎片离子 m/z 375 较 NOB 准分子离子 m/z 403.3 少 28, 推测其

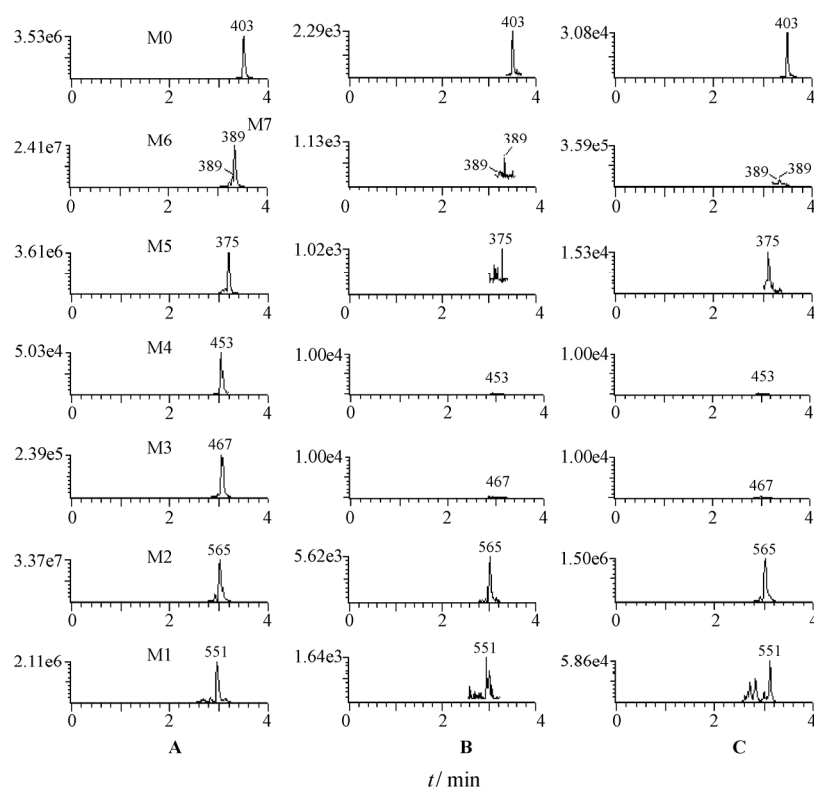


Figure 3 MRM chromatograms of NOB and its metabolites in rat urine (A), serum (B) and bile (C) samples. M0: NOB; M1–M7: Metabolites

Table 1 UPLC-MS data of nobiletin and its metabolites in rat urine after oral administration of nobiletin at dose of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Metabolite	t/min	$[M]^+ m/z$	Fragment m/z
M0	3.50	403	388 $[M+H-CH_3]$, 373 $[M+H-2CH_3]$, 358 $[M+H-3CH_3]$
M1	2.96	551	375 $[M+H-Glu]$, 360 $[M+H-Glu-CH_3]$, 345 $[M+H-Glu-2CH_3]$
M2	3.03	565	389 $[M+H-Glu]$, 374 $[M+H-Glu-CH_3]$, 359 $[M+H-Glu-2CH_3]$
M3	3.06	467	387 $[M+H-SO_3H]$, 372 $[M+H-SO_3H-CH_3]$, 357 $[M+H-SO_3H-2CH_3]$
M4	3.05	453	373 $[M+H-SO_3H]$, 358 $[M+H-SO_3H-CH_3]$, 343 $[M+H-SO_3H-2CH_3]$
M5	3.18	375	360 $[M+H-CH_3]$, 345 $[M+H-2CH_3]$, 317 $[M+H-2CH_3-H_2O]$
M6	3.33	389	374 $[M+H-CH_3]$, 359 $[M+H-2CH_3]$, 341 $[M+H-2CH_3-H_2O]$
M7	3.29	389	374 $[M+H-CH_3]$, 359 $[M+H-2CH_3]$, 341 $[M+H-2CH_3-H_2O]$

为 NOB 的双脱甲基产物。因此推测 M1 为 NOB 经过双脱甲基及葡糖醛酸化两步反应的 II 相代谢产物。

1.3 代谢物 M2 M2 的色谱保留时间为 3.03 min, 在尿样、血样和胆汁样品中都能检测到 (图 2、3)。从尿液的总离子流图中可以看出, M2 是所有代谢产物中质谱响应较高的产物 (图 2)。在一级正离子全扫描中观察到其准分子离子为 m/z 565.4。二级全扫描质谱中观察到 m/z 389 的碎片离子 (表 1), 经分析为准分子离子通过质量数为 176 u 的中性丢失生成, 故推测其为一葡糖醛酸苷。由于苷元 (m/z 389) 较 NOB (m/z 403) 质量数少 14, 推测苷元为 NOB 的单脱甲基产物。故推测 M2 为 NOB 准分子通过单脱甲基与葡糖醛酸化两步反应生成的 II 相代谢产物。

1.4 代谢物 M3 M3 的色谱保留时间为 3.06 min, 仅在尿液中测到 (图 2、3)。在一级负离子全扫描质谱中观察到其准分子离子为 m/z 467.29。在准分子离子的二级全扫描质谱中观察到质量数为 80 u 的中性丢失, 推测其为硫酸苷化合物, 苷元为 m/z 387 (表 1)。由于苷元 (m/z 387) 较 NOB (m/z 401.3) 质量数少 14, 推测其为 NOB 的单脱甲基产物。故推测 M3 为 NOB 通过单脱甲基及硫酸结合两步生成的硫酸化产物。

1.5 代谢物 M4 M4 的色谱保留时间为 3.05 min, 仅在尿液中测到 (图 2、3)。在一级负离子全扫描质谱中观察到其准分子离子为 m/z 453 (表 1)。在准分子离子的二级全扫描质谱中观察到质量数为 80 u 的中性丢失, 推测其为硫酸苷化合物, 苷元为 m/z 373 (表 1)。由于苷元 (m/z 373) 较 NOB (m/z 401.3) 质量数少 28, 推测其为 NOB 的双脱甲基产物。故推测 M4 为 NOB 通过双脱甲基及硫酸结合两步生成的硫酸化产物。

1.6 代谢物 M5 M5 的色谱保留时间为 3.18 min, 在尿样、血样和胆汁样品中都能检测到 (图 2、3)。在一级正离子全扫描质谱中观察到其准分子离子为 m/z 375.3 (表 1), 比 NOB 的准分子离子 m/z 403.3 少 28, 推测其为 NOB 的双脱甲基产物, 与文献^[4, 5, 7]报道一致。

1.7 代谢物 M6 和 M7 M6 的色谱保留时间为 3.33 min, M7 的色谱保留时间为 3.29 min, 在尿样、血样和胆汁样品中都能检测到 (图 2、3)。在一级正离子全扫描质谱中观察到 M6 和 M7 的准分子离子 m/z 389.4 (表 1), 比 NOB 的准分子离子 (m/z 403.3) 少 14, 推测 M6 和 M7 均为 NOB 单去甲基产物, 与文

献^[4, 5, 7]报道一致。

综上, 作者对 8 个药物依赖的色谱峰进行了分析。结果表明, M0 为 NOB 原形, M1 为 NOB 经过双脱甲基及葡糖醛酸化两步反应的 II 相代谢产物。M2 为 NOB 准分子通过单脱甲基与葡糖醛酸化两步反应生成的 II 相代谢产物。M3 为 NOB 通过单脱甲基及硫酸结合两步生成的硫酸化产物。M4 为 NOB 通过双脱甲基及硫酸结合两步生成的硫酸化产物。M5 为 NOB 双脱甲基产物。M6 和 M7 均为 NOB 单去甲基产物。

2 代谢途径

根据上述结果, 作者推测了 NOB 在大鼠体内的代谢通路图, 见图 4。

讨论

本文利用 UPLC-MS/MS 技术, 在大鼠体内共分析出 7 个主要代谢产物。根据一级及二级质谱信息推测其中 3 个为单脱甲基或双脱甲基生成的 I 相代谢产物, 与文献^[4, 5, 7]报道一致。Li 等曾报道 NOB 的主要代谢通路为脱甲基, 并生成 3'-去甲基产物、4'-去甲基产物和 3', 4'-双去甲基产物^[4, 5, 7]。因此, 本文分析的 3 个 I 相代谢产物的代谢位点最可能是 3', 4' 位。据文献^[8]报道, 4'-去甲基产物 (4'-demethylnobiletin) 为活性代谢物, 抗炎活性比 NOB 强, 可明显抑制 iNOS 和 COX-2 基因的表现而发挥其抗炎和抗癌功能。此外, 本研究还发现了 4 个 II 相代谢产物, 分别为单脱甲基或双脱甲基 NOB 的葡糖醛酸结合物及硫酸结合物。这些 II 相代谢产物为本文首次报道。已有的大量研究表明, 黄酮类化合物分子结构上普遍存在的酚羟基结构是葡糖醛酸结合的理想位点, 较易发生葡糖醛酸化代谢。NOB 无游离的酚羟基结构, 但是通过 I 相代谢酶的催化, 通过脱甲基反应使得部分酚羟基暴露出来, 使得进一步的葡糖醛酸化代谢得以发生。因此, 本研究的结果表明, NOB 的代谢特征, 并未脱离黄酮类化合物体内代谢的普遍性规律。

长期以来, P450 酶被认为是参与外源性化合物代谢的最主要酶。因此, 大部分的代谢研究均集中于 P450 酶所催化的 I 相代谢反应。而近年来, II 相代谢酶在外源性化合物代谢中的贡献越来越引起人们的关注。对参与代谢过程的代谢酶的研究将有助于进一步的药物代谢稳定性考察以及潜在药物相互作用的预测。本研究结果提示, 除了 P450 酶参与的 I 相

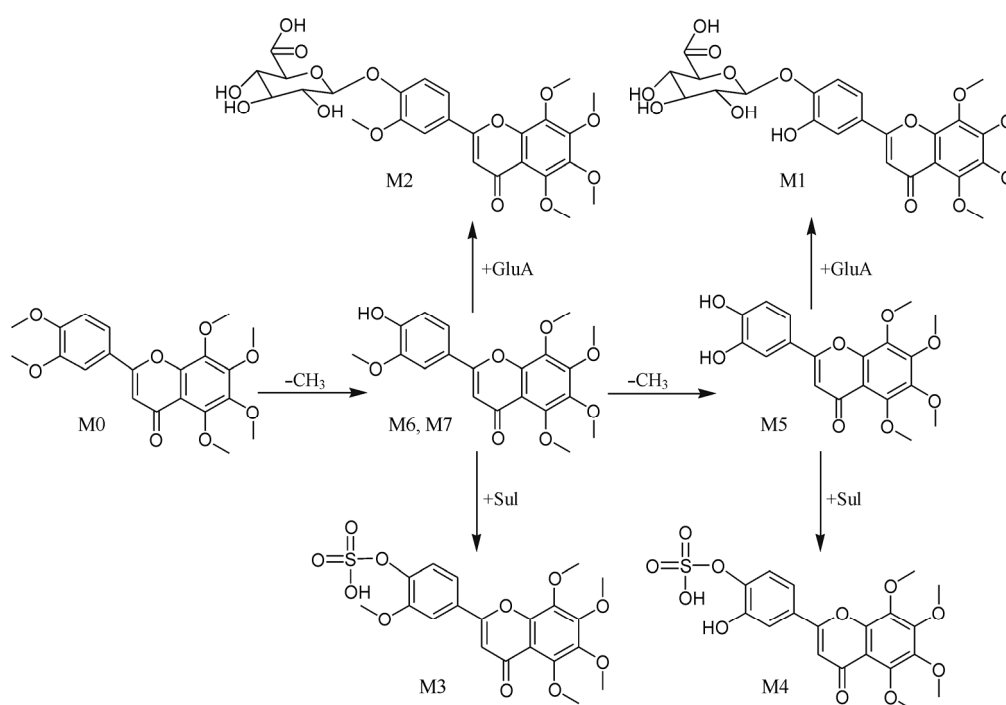


Figure 4 Proposal metabolic pathways of nobiletin in rats

代谢外, 葡萄糖醛酸转移酶、硫酸转移酶参与的 I 相代谢之后的 II 相代谢过程也同样显著的影响 NOB 的代谢甚至进一步的动力学过程。尤其是葡萄糖醛酸转移酶, 催化了 NOB 的 I 相代谢产物的绝大部分结合反应。因此, 葡萄糖醛酸转移酶的基因多态性, 以及对该酶的抑制、诱导, 均有可能对 NOB 的体内过程、疗效及毒副作用造成显著影响, 并值得进一步的关注和研究。

References

- [1] Li SM, Yu HQ, Ho CT. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20: 133-138.
- [2] Choi SY, Wang JH, Ko HC, et al. Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- κ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113: 149-155.
- [3] Kurowska EM, Manthey JA. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia [J]. Agric Food Chem, 2004, 52: 2879-2886.
- [4] Wang ZY, Li S, Jonca M, et al. Comparison of supercritical fluid chromatography and liquid chromatography for the separation of urinary metabolites of nobiletin with chiral and nonchiral stationary phases [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20: 1206-1215.
- [5] Yasuda T, Yoshimura Y, Yabuki H, et al. Urinary metabolites of nobiletin orally administered to rats [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51: 1426-1428.
- [6] Yao J, Zhou JP, Ping QN. Characteristics of nobiletin-loaded nanoemulsion and its *in vivo* distribution in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 663-668.
- [7] Li SM, Wang ZH, Sang SM, et al. Identification of nobiletin metabolites in mouse urine [J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50: 291-299.
- [8] Okuno Y, Miyazawa M. Biotransformation of nobiletin by *Aspergillus niger* and antimutagenic activity of metabolite, 4'-hydroxy-5, 6, 7, 8, 3'-pentamethoxyflavone [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 1876-1878.