

# LC-MS法鉴定槲皮素在大鼠体内的主要代谢产物\*

符乃光, 陈峰, 魏娜, 任守忠, 刘明生, 张俊清\*\*

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

**摘要** 目的: 采用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)鉴定大鼠口服(ig)槲皮素单体后血浆中的代谢产物。方法: 血浆样品经过 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/硫酸酯酶(G1512)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(APESI)负离子条件下进行扫描, 鉴定大鼠给药槲皮素( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )单体后血浆中代谢产物的结构。结果: 通过与对照品比较, 结合质谱仪扫描结果分析, 在大鼠给药槲皮素单体后血浆中鉴定出槲皮素( $m/z$  300.9)、异鼠李素( $m/z$  314.9)及槲柳素( $m/z$  314.9)等代谢产物。结论: 采用酶水解的方法鉴定出大鼠血浆中槲皮素代谢多种产物, 为进行含槲皮素中药及其复方的药物代谢动力学研究提供参考。

**关键词:** LC-MS 槲皮素; 代谢物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0764-05

## LC-MS determination of brief quercetin metabolites in rat plasma\*

FU Nai-guang CHEN Feng WEI Na REN Shou-zhong LIU Ming-sheng 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 quercetin in rat plasma after an oral administration by LC-MS. **Methods** The rats were administered quercetin monomer solution ( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) by oral administration and the blood sample were prepared. Quercetin, isorhamnetin and tamarixetin were extracted from rat plasma after enzymatic hydrolysis using  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase(G1512) in aqueous methanol. After enzymatic hydrolysis, the analytes of interest were separated on a Diamonsil C<sub>18</sub> column. The mobile phase was acetonitrile-1% acetic acid (29:71) with a flow rate of  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A Bruker mass spectrometry equipped with an atmospheric pressure electrospray ionization (APESI) source was used as detector and was operated in negative ion mode. **Results** Quercetin, isorhamnetin and tamarixetin were identified through comparing with the standard spectrum and the results of mass spectrometry, i.e.  $m/z$  300.9 was quercetin,  $m/z$  314.9 was isorhamnetin and  $m/z$  314.9 was tamarixetin. **Conclusion** Enzymatic hydrolysis can be used to identify the quercetin metabolites in rat plasma. And this method can be a guidance for pharmacokinetics studies upon traditional Chinese medicine.

**Key words** LC-MS; quercetin; metabolites

黄酮类化合物因其具有重要的生物学和药理学性质而受到广泛关注, 如槲皮素能竞争性地抑制 ATP、GTP, 为磷酸供体的酪蛋白的磷酸化, 对酪氨酸蛋白激酶活性具有抑制作用, 可能起到抗肿瘤的作用。研究表明槲皮素在体内可能发生甲基化、葡萄糖醛酸化及硫酸化反应, 报道过盐酸水解大鼠血浆中槲皮素代谢物的情况<sup>[1]</sup>, 鉴定出槲皮素和异鼠李素等物质。本文采用较为温和、专一的酶水解法来处理大鼠血浆, 去除内源性结合物, 释放出药物的基本母核结构, 以便更深入了解槲皮素在大鼠血浆中

的代谢情况。槲皮素及甲基化产物异鼠李素、槲柳素和香叶木素结构式见图 1。

### 1 材料与amp;方法

**1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠从四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所购买, 许可证号: SCXK(川)2004-15。每笼 2 只, 饲养环境温度控制在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 适应时间为 2 周, 每天控制自由进食、饮水时间为 8 h。大鼠饲料从长沙市开福区东创实验动物科技服务部购买, 主要组成为: 粗蛋白 24.2%, 粗脂肪 4.5%, 粗纤维 4.2%, 钙 1.33%, 磷 0.8%, 含水量 6.8%。

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

\*\* 通讯作者 Tel: (0898) 66895337 E-mail: junqzhang2004@hotmail.com

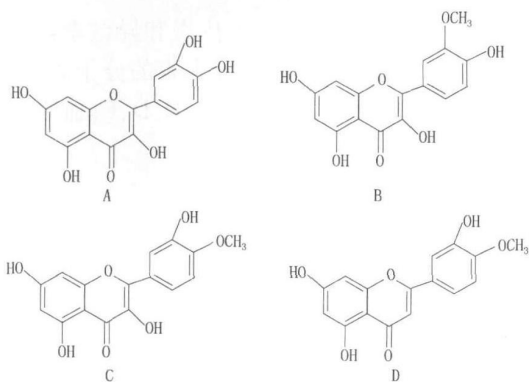


图 1 槲皮素(A)及其甲基化物异鼠李素(B)、柞柳素(C)和香叶木素(D)的结构

Fig 1 Structures of quercetin (A), isohannetin (B), tamarixetin (C), and diosmetin (D)

### 1.2 仪器与试剂

Bruker Esquire 2000型液-质联用仪(瑞士布鲁克公司);美国 Waters公司液相色谱仪(包括 515型输液泵, 2996型光电二极管阵列检测器, 717型自动进样器);美国 PALL 公司 Cascade IX 超纯水器;日本 KUBOTA 公司 KR-702型离心机;美国 Organomation N-EVA™ 111 氮吹仪。

槲皮素由海南医学院药学系药物化学教研室提供,含量大于 98%。对照品槲皮素与异鼠李素购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 100081-200406和 110860-200407;柞柳素(tamarixetin)和香叶木素(diosmetin)购自法国公司 Extrasynthese,纯度 99%(HPLC含量测定用)。β-葡萄糖醛酸酶/硫酸酯酶(G1512)从 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司购买。甲醇与乙腈均为色谱纯,磷酸、醋酸、盐酸、丙酮等试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

1.3 血浆样品采集 称取 SD 大鼠(180~220 g)置于代谢笼中,禁食 12 h,自由饮水,以 100 mg·kg<sup>-1</sup>的剂量灌胃(ig)给药槲皮素 0.5% CMC-Na 混悬液,给药后 4 h 内从腹腔静脉取血(约 5 mL),全血样品置已肝素化的试管中,于 4℃下 3000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 以分取血浆,置 -40℃冷冻贮存,备用。

1.4 HPLC 条件 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-1% 醋酸溶液(29:71),检测波长 365 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,温度 30℃,进样量 40 μL。

1.5 LC-MS 条件 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-1% 醋酸溶液(29:71),检测波长 337 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,温度 30℃,进样量 20 μL。APESI 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* 301(槲皮素)和 *m/z* 315(异鼠李素)。

1.6 血浆样品处理 取 900 μL 血浆加入 4 mL 小瓶(Waters P/N 186000838C)中,加入香叶木素溶液(10 μg·mL<sup>-1</sup>,甲醇溶解。内标)10 μL,用浓度为 0.583 mol·L<sup>-1</sup>的醋酸溶液调节 pH 约 4.9,漩涡混匀,加入适量 β-葡萄糖醛酸酶 硫酸酯酶(G1512)水解酶(1单位 β-葡萄糖醛酸酶 硫酸酯酶能水解 1.0 μmol 底物),密闭。在 37℃水浴中水平振荡 60 min,平均分成 2 份,每份加入 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<sup>-1</sup>离心 30 min,合并上清液 N<sub>2</sub>吹干,再用 0.5 mL 甲醇溶解残渣,过 0.45 μm 滤膜,即得<sup>[2,3]</sup>。

### 2 结果

2.1 色谱结果 大鼠 ig 槲皮素(100 mg·kg<sup>-1</sup>)单体后,血浆经 β-葡萄糖醛酸酶 硫酸酯酶(G1512)酶处理后与空白血浆样品比较,在 365 nm 下,可观察到多个具有典型黄酮类吸收峰化合物。血浆样品经过酶水解后,通过与对照品槲皮素、异鼠李素以及柞柳素的保留时间对比,初步确定水解产物中含有槲皮素、异鼠李素和柞柳素 3 种有对照品的化合物,其他代谢物有待进一步研究。见图 2-A, B, C。

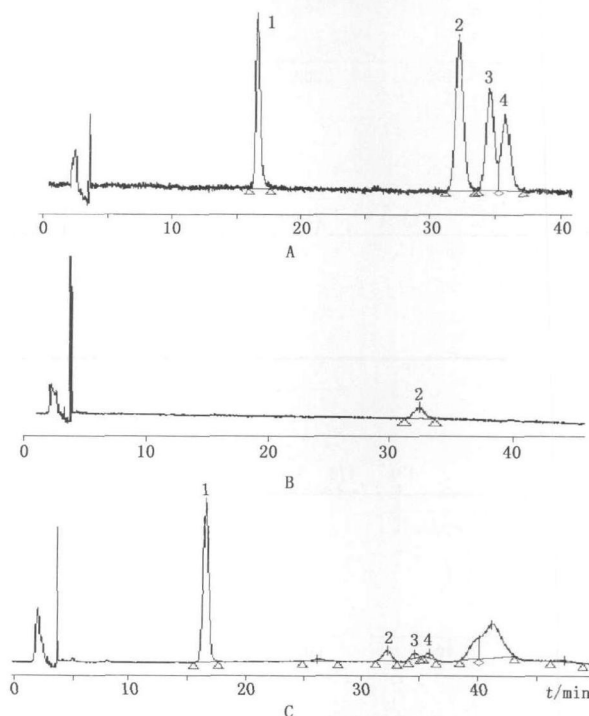


图 2 对照品(A)、空白(B)及样品(C)HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substances(A), blank(B) and sample(C)

1. 槲皮素(quercetin, 0.32 μg·mL<sup>-1</sup>)
2. 内标香叶木素(diosmetin, 0.20 μg·mL<sup>-1</sup>)
3. 异鼠李素(isohannetin, 0.45 μg·mL<sup>-1</sup>)
4. 柞柳素(tamarixetin, 0.42 μg·mL<sup>-1</sup>)

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槲皮素单体后经酶水解血浆样品进行检测。从质谱图中获得样品中槲皮素、异鼠李素和柞柳素(二者为同分异构体)的分子离子峰,分别为  $m/z$  300.9 314.9 314.9 并与对照品质谱图相比

对,可确定样品中确实存在槲皮素和异鼠李素及柞柳素,  $m/z$  298.9是内标物香叶木素的分子离子峰。对照品 LC-MS图见图 3-A、B、C、D、E;血浆样品 LC-MS图见图 4-A、B、C、D、E。

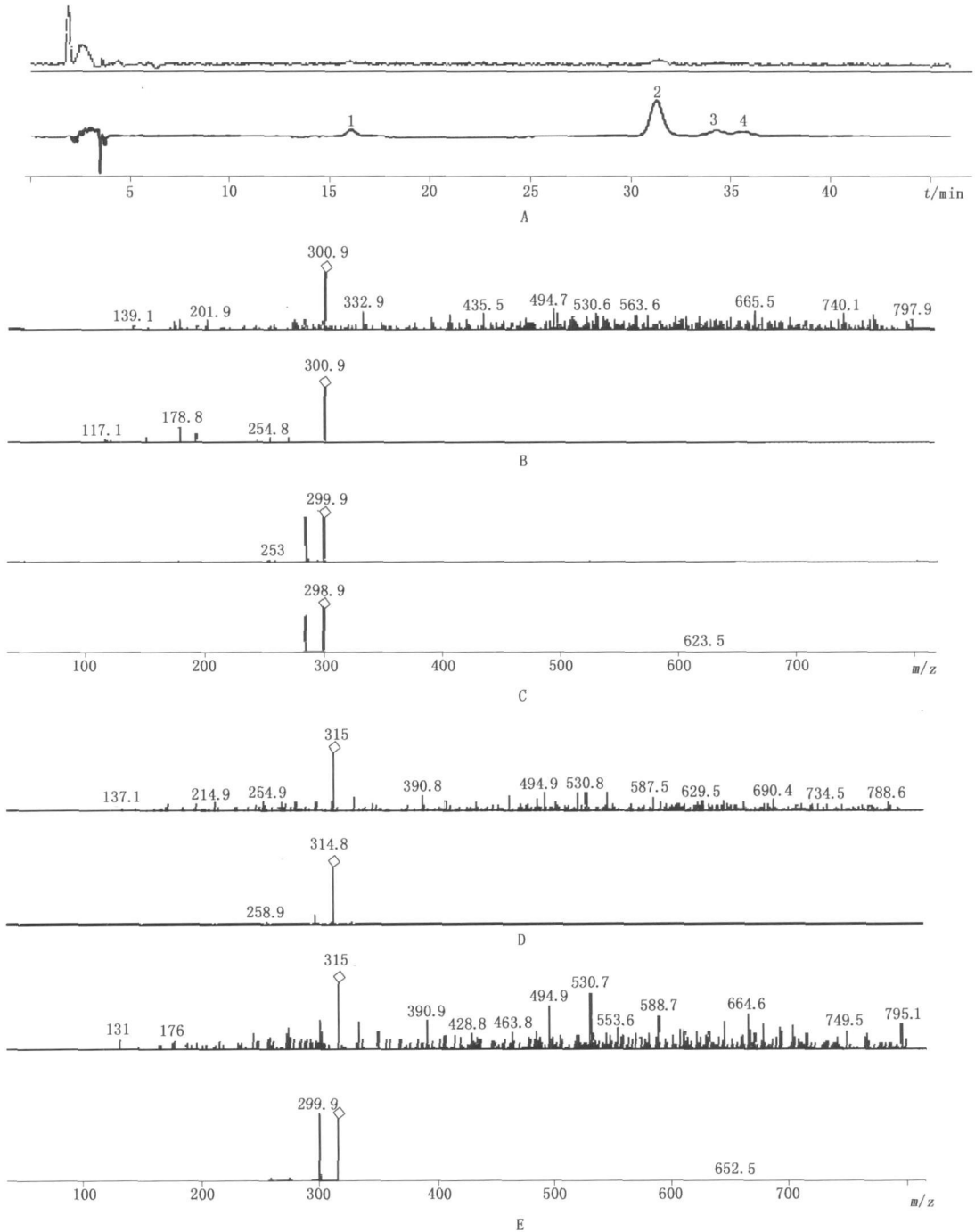


图 3 对照品 LC-MS图

Fig 3 LC-MS chromatograms of reference substances

A. 离子流图及 HPLC 色谱图 (ion chromatogram and HPLC chromatogram): 1 槲皮素 (quercetin) 2 香叶木素 (diosmetin) 3 异鼠李素 (isorhanetin) 4 柞柳素 (tamarixetin)

B 槲皮素质谱图 (mass spectrum of quercetin) C 香叶木素质谱图 (mass spectrum of diosmetin) D. 异鼠李素质谱图 (mass spectrum of isorhanetin) E 柞柳素质谱图 (mass spectrum of tamarixetin)

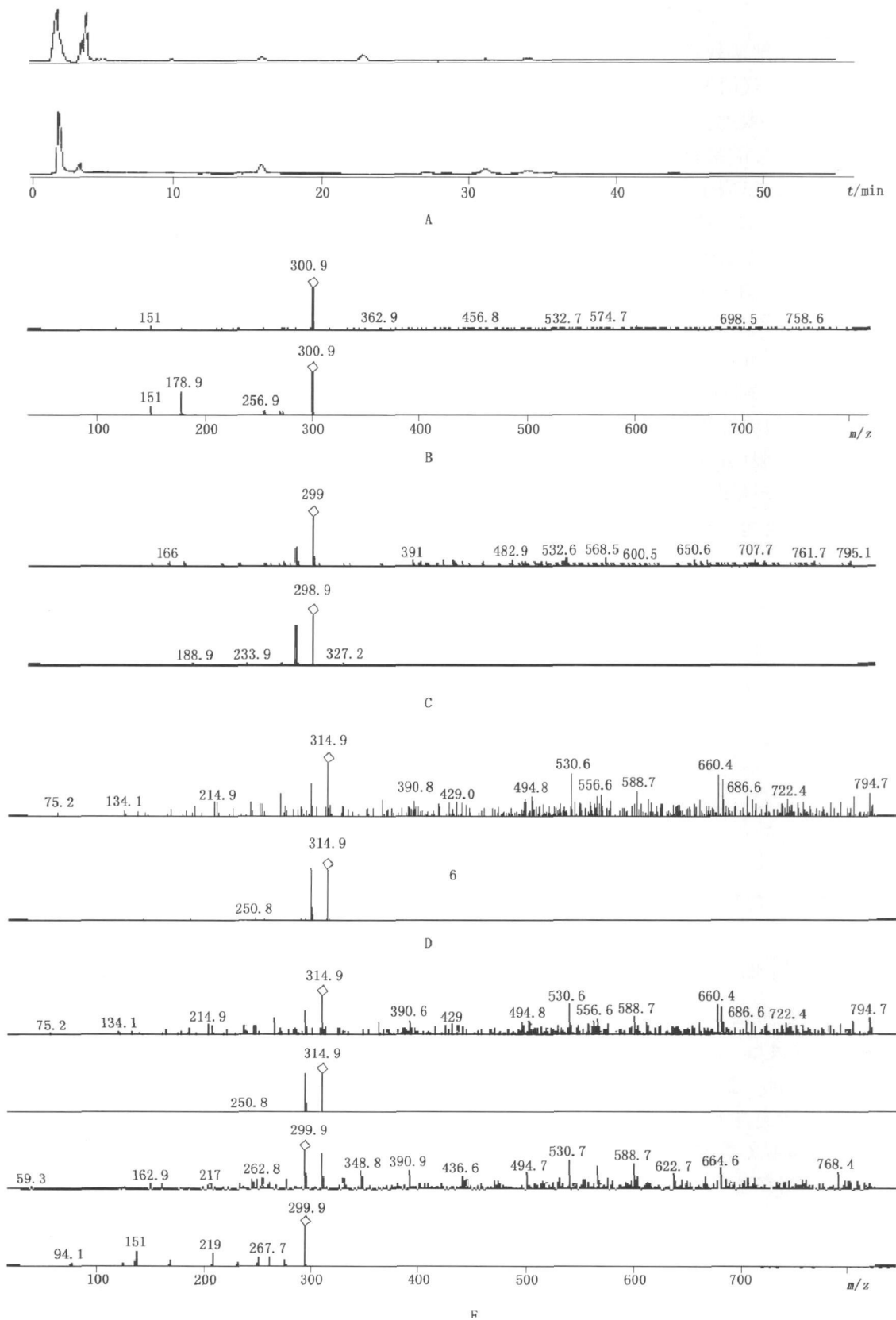


图 4 血浆样品 LC-MS 图

Fig 4 LC-MS chromatograms of plasma sample

A. 离子流图及 HPLC 色谱图 (ion chromatogram and HPLC chromatogram) B 槲皮素质谱图 (quercetin mass spectrogram) C. 香叶木素质谱图 (diosmetin mass spectrogram) D. 异鼠李素质谱图 (isohannettin mass spectrogram) E. 柝柳素质谱图 (tamarixetin mass spectrogram)

### 3 讨论

**3.1** 本文选用酶水解法处理大鼠血浆以释放母核药物。槲皮素在 II 相代谢中可能被葡萄糖醛酸化也可能被硫酸酯化。一般地, 硫酸酯化在低底物浓度下占主导, 而葡萄糖醛酸缀合在高底物浓度时占主导。又考虑到槲皮素口服生物利用度低<sup>[4]</sup>, 故选用具有复合水解性质的  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 硫酸酯酶 (G1512) 处理血浆样品, 以获得更有价值的信息。

**3.2** 液相色谱、质谱结果表明, 槲皮素的血浆代谢物中含有槲皮素、异鼠李素和槲柳素等黄酮类化合物。这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生物菌群或酶转化为异鼠李素或槲柳素等其他黄酮类物质后进入血液的。

**3.3** 通过对大鼠口服 (ig) 槲皮素单体后血浆中的代谢产物的研究, 了解槲皮素的入血形式, 为含有槲皮素成分的中药材及其复方制剂的药代动力学研究提供科学依据。

致谢: 感谢清华大学深圳研究院王乃利老师在质谱测定研究中给予的大力支持!

### 参考文献

- 1 CHEN Feng(陈峰), FU Nai-guang(符乃光), LIU Ming-sheng(刘明生), *et al* Determination of quercetin metabolites in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry(液-质联用测定大鼠血浆槲皮素代谢物). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43(3): 69
- 2 Ader P, Wesmann A, Wollfram S, *et al* Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(7): 1056
- 3 Manach C, Morand C, Demign C, *et al* Bioavailability of rutin and quercetin in rats *FEBS Lett* 1997, 409: 12
- 4 Claudine M, Gary W, Christine M, *et al* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans I. Review of 97 bioavailability studies *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(Suppl): 230

(本文于 2008 年 7 月 23 日收到)

## 全国药检所微生物检验重点实验室建设研讨会在杭州顺利召开

4月 22日至 24日中检所会同北京、天津、上海、黑龙江、江苏、浙江、广州、四川、总后共 9家药检所的主管业务所长及微生物检验部门负责人在浙江省杭州市首次对药品检验所微生物检验重点实验室的建设问题开展研讨。会议由浙江省食品药品检验所承办, 浙江省食品药品监督管理局副局长吴宁一到会并讲话, 中检所党委书记、所长李云龙出席会议并讲话。

近年来药品不良事件频发, 在每次事件中均涉及药品微生物的应急检验, 为应对日益突出的药品微生物应急检验, 增强整个药品检验系统的微生物检验能力已经成为一项十分紧迫的任务。为此, 中检所特组织上述 9 个药检所就探索药品微生物检验重点实验室建设问题开展讨论。

会议组织了药品微生物检验的现状与发展专题讲座, 来自全国各药检所的代表就保证微生物检验结果准确可靠的条件、如何实现对污染菌的快速追踪、鉴定, 以及药品微生物应急检验操作规程展开了深入讨论。会议还对微生物检验重点实验室的硬件装备问题进行了研究, 展望了药品微生物检验的发展方向。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>