

液相色谱-电喷雾离子阱质谱法分析 大鼠尿样中的黄芩苷及其异构体

邢 杰, 陈笑艳*, 张淑秋, 钟大放

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 采用液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(LC/MSⁿ)技术分析了大鼠分别灌胃和静脉注射给予黄芩苷后尿样中原形药及其异构体的化学结构以及其排泄情况。根据代谢物的多级质谱和紫外吸收光谱数据推测, 两种给药途径均检测到原形药黄芩苷及其异构体黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸。收集大鼠灌胃(100 mg/kg)和静脉注射(15 mg/kg)给予黄芩苷后 0~48 h 尿样, 以槲皮素作为内标, 经乙酸乙酯提取后, 以甲醇-水-甲酸(V(甲醇):V(水):V(甲酸)=60:40:1)混合液为流动相, 用 Diamonsil C₁₈ 柱进行分离, 采用电喷雾离子阱质谱, 以选择反应监测(SRM)方式检测尿中黄芩素的两种葡萄糖醛酸结合物。黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸的形成, 说明黄芩苷在胃肠道可水解成苷元形式重新与葡萄糖醛酸结合, 然后被排出体外。大鼠灌胃给予黄芩苷后, 黄芩苷和黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸的尿样累积排泄量分别为 1.49% 和 0.77%; 大鼠静脉注射给予黄芩苷后黄芩苷和黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸的尿样累积排泄量分别为 30.80% 和 0.28%; 以药物原形和尿药浓度评价黄芩苷在大鼠体内的绝对生物利用度为 4.84%。

关键词: 质谱学; 黄芩苷及其异构体分析; 液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(LC/MSⁿ); 葡萄糖苷酸; 累积排泄

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2004)03-129-05

Liquid Chromatography-Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry Analysis of Baicalin and Its Isomer in Rats Urine

XING Jie, CHEN Xiao-yan*, ZHANG Shu-qiu, ZHONG Da-fang

(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,
Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Examination was made of the urinary excretion of baicalin and its isomer in rats. The urine of rats administered baicalin orally and intravenously contained two metabolites, baicalin and baicalin 6-O-glucuronide, as determined from MSⁿ data and UV spectra. Urine samples obtained 0-48h after oral (100mg/kg) or intravenous (15mg/kg) administration of baicalin were collected and were extracted by ethyl acetate. The internal standard was quercetin and the mobile phase composed of methanol-water-formic acid (60:40:1, v/v).

收稿日期: 2003-11-05; **修回日期:** 2004-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271525)

作者简介: 邢杰(1978~), 女(汉族), 山东滨州人, 博士研究生, 从事药物代谢与药物动力学方面的研究

* **通讯作者:** 陈笑艳(1971~), 女(汉族), 黑龙江岁棱人, 副教授, 从事药物代谢和药物动力学研究。E-mail: zhongdf@china.com

Urine samples were investigated by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry (LC/MSⁿ). The formation of baicalein 6-O-glucuronide suggested that baicalin partly appeared to be hydrolyzed to aglycone after absorption in the body, then excreted in the urine or bile. Total cumulative amounts of the baicalin and baicalein 6-O-glucuronide excreted in the urine at 48h following the oral administration of baicalin were approximately 1.49% and 1.19%, respectively, and total cumulative amounts following the intravenous administration of baicalin were approximately 30.80% and 0.28%, respectively. The absolute availability of baicalin in rat was 4.84% according to the amount of baicalin.

Key words: mass spectrometry; analysis of baicalin and its isomer; liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry (LC/MSⁿ); glucuronides; cumulative excretion

黄芩苷是黄芩素的 7-O-葡萄糖醛酸结合物,临床上主要用于抗炎和抗过敏反应^[1]。由于结构中含有多个酚羟基,黄酮类化合物在体内易与葡萄糖醛酸结合^[2, 3]。已有研究表明^[4, 5],动物给予黄芩苷后,在胆汁和尿样中除检测到原形药黄芩素 7-O-葡萄糖苷酸(黄芩苷)外,还发现异构体黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸。为了更好地了解黄芩苷在体内发挥作用的机理,对药物在体内存在的形式以及动态过程进行研究是必要的。本工作拟采用简便的紫外光谱法确证大鼠给予黄芩苷后尿样中的代谢物黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸的结构,并且采用高专属性的液相色谱电喷雾离子阱质谱(LC/MSⁿ)法,考察大鼠分别灌胃和静脉注射给予黄芩苷后尿样中的原形药黄芩苷及其异构体的排泄情况,旨在估计小肠及胃肠道代谢等因素对黄芩苷口服生物利用度的影响大小,理解黄芩苷的吸收和代谢过程,此方面研究尚未见报道。

1 实验部分

1.1 主要仪器

LCQ 液相色谱质谱联用仪:美国 Finnigan

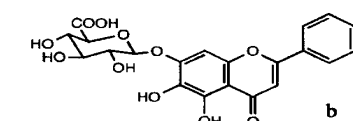
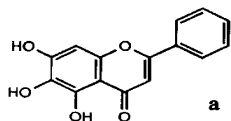


图 1 黄芩素及黄芩苷的分子结构

Fig 1 Geometric structures of baicalein and baicalin

a—黄芩素(baicalein); b—黄芩苷(baicalin)

1.3 尿样的采集

健康 Wistar 大鼠 12 只,体重 250 ± 20 g。随机分为 2 组,雌雄各半,分别灌胃(100 mg/kg)

公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 1.2 数据处理系统;LC-10A 高效液相色谱仪:日本岛津公司产品,包括 LC-10AD 泵和 7125 Rheodyne 进样阀;HP 1100 高效液相色谱系统:美国惠普公司产品,配有四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、可变波长紫外检测器和 Rev. A. 06 03 色谱工作站;UV 2201 紫外可见分光光度计:日本岛津公司产品;Bond Elute C₁₈ 固相萃取柱:天津开发区富集色谱技术开发公司提供。

1.2 主要药品、试剂与样品

黄芩苷原料药(含量 98.3%):购自四川什邡公司,实验前用甲醇配制成 1.0 mg/mL 的贮备液,分别稀释成系列标准溶液(0.1、0.5、2.5、10.0、50.0、80.0 g/mL);槲皮素对照品(含量>99.5%):购自四川协力制药公司;黄芩素对照品(含量>98.0%):由本实验室用酸水解方法制备,结构已经过 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 确证,黄芩素及黄芩苷的结构示于图 1;β-D-葡萄糖苷酸酶:购自美国 Sigma 公司;甲醇为色谱纯;其它化学试剂均为分析纯;健康 Wistar 大鼠 12 只:沈阳药科大学实验动物中心提供。

和静脉注射(15 mg/kg)给予黄芩苷。实验前置于代谢笼中,灌胃组大鼠于服药前夜禁食,自由饮水,次日给药并收集 0~2 h、2~6 h、6~10 h、

10~13 h、13~24 h、24~36 h 和 36~48 h 尿样, 静脉注射组不禁食, 自由饮水, 次日给药并收集 0~48 h 各时间段尿样, 于 20 °C 保存。

1.4 尿样的处理

1.4.1 用于代谢物鉴定的尿样预处理 取 Bond Elute C₁₈ 固相萃取柱(250 mg), 用 2 mL 甲醇和 2 mL 水依次洗涤活化待用; 将样品 1 mL 涡旋混合 30 s 后加到已活化的固相萃取柱上, 用 2 mL 水洗涤, 后用 1 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 取 20 μ L 用于 LC/MSⁿ 分析。取尿样, 按文献[7]方法, 用 β -D-葡萄糖苷酸酶进行水解, 取上清液过上述活化过的固相萃取柱, 依上法操作, 洗脱液用于 LC/MSⁿ 分析。

1.4.2 用于尿样累积排泄的尿样预处理 (a) 标准曲线的制备: 取空白尿样 150 μ L, 用 50 μ L 0.1 mol/L 盐酸酸化后, 加入 150 μ L 系列标准溶液, 加入 50 μ L 内标(槲皮素, 10 μ g/mL), 再加入 3 mL 乙酸乙酯进行提取, 涡流 30 s, 震荡 15 min, 离心(4 000 rpm) 5 min, 上清液于室温下 N₂ 吹干, 残留物用流动相 200 μ L 溶解后用于 LC/MSⁿ 分析。(b) 样品的处理: 取尿样 150 μ L, 除不加入标准溶液外(用 150 μ L 甲醇替代), 其余操作同(a)。

1.5 实验条件

1.5.1 黄芩素葡萄糖醛酸结合物 HPLC 流分采集的色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱(内径 200 mm $\times$ 4.6 mm, 粒径 5 μ m, 北京迪马公司产品); 流动相: 甲醇-水(63:37, 体积比); 流速 0.4 mL/min; 检测波长 278 nm; 柱温 25 °C。

1.5.2 LC/MSⁿ 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 柱(内径 200 mm $\times$ 4.6 mm, 粒径 5 μ m); 北京迪马公司产品); 流动相: 甲醇-水-甲酸(V(甲醇):V(水):V(甲酸)=60:40:1); 流速 0.4 mL/min; 柱温 25 °C。

1.5.3 LC/MSⁿ 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正离子检测方式; 鞘气(N₂)流速 0.75 L/min; 辅助气(N₂)流速 0.15 L/min; 源电压 4.5 kV; 毛细管温度 200 °C; 毛细管电压 25 V; 采用一级全扫描质谱(Full scan MS)、选择反应监测(SRM)和多级全扫描质谱(Full scan MSⁿ)方式

同时测定。

1.6 累积排泄数据处理

以待测物浓度为横坐标, 对待测物与内标的峰面积比为纵坐标, 进行加权最小二乘法线性回归($w = 1/c^2$)。采用尿药浓度法对黄芩苷的口服绝对生物利用度进行粗略计算。公式为: (口服黄芩苷后原形的尿样累积排泄量%)/(静脉注射黄芩苷后原形的尿样累积排泄量%) $\times$ 100%。

2 结果与讨论

采用 LC/MSⁿ 法检测葡萄糖醛酸结合物时, 可以用准分子离子在二级质谱中脱去中性碎片 176 u 生成的碎片离子, 作为该类结合物结构确证的依据。本实验采用 LC/MSⁿ 法对灌胃给予黄芩苷后大鼠尿样中的黄芩素葡萄糖醛酸结合物进行了定性检测。黄芩素单葡萄糖醛酸结合物分子量为 446 Da, 采用电喷雾质谱以正离子方式进行检测时, 可以获得 m/z 447 的准分子离子峰 $[M + H]^+$, 从尿样总离子流色谱图中选择性检测这类质荷比的化合物。

2.1 灌胃或静脉注射给予黄芩苷后大鼠尿样中葡萄糖醛酸结合物的检测

以空白尿样的总离子流色谱图为对照(示于图 2-1), 在灌胃或静脉注射给药后的大鼠尿样中均检测到质荷比为 m/z 447 的两个色谱峰, 保留时间分别为 6.10 min (M_0) 和 8.10 min (M_1), 对上述质荷比的代谢物进行 LC/MSⁿ ($n = 2, 3$) 检测, 获得各代谢物的多级全扫描质谱图(示于图 2-2)和多级质谱图(示于图 3)。对黄芩苷对照品进行 LC/MS₂ 分析, 得到二级碎片离子 m/z 271, 为脱去一分子葡萄糖醛酸(-176 u)所产生, 其主要的三级碎片离子为 m/z 253 和 m/z 225(示于图 3), 分别为脱去一分子水(-18 u)和相继脱去一分子 CO(-28 u)所产生。与黄芩苷对照品进行比较, M_0 具有相同的色谱保留行为和质谱特征, 推断 M_0 为黄芩苷, 即黄芩素 7-O-葡萄糖苷酸。 M_1 具有与黄芩苷相同的质谱特征和不同的色谱行为, 说明 M_1 为黄芩苷的同分异构体。

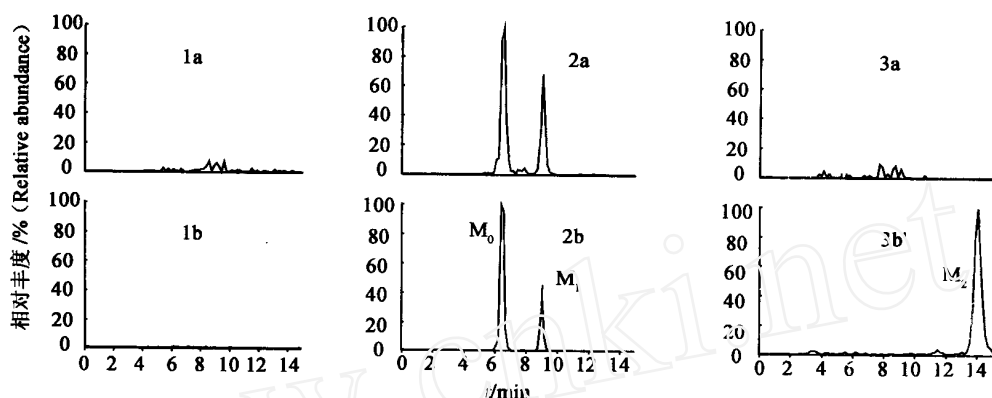


图 2 灌胃或静脉注射给予黄芩苷后, 大鼠尿样的典型 LC/MSⁿ 色谱图

Fig 2 LC/MSⁿ chromatogram spectra of the glucuronides of baicalin in rat urine

1—空白尿样(blank urine sample);

2—灌胃或静脉注射给药 100 mg/kg 黄芩苷后的大鼠尿样

(urine sample obtained after oral or intravenous administration of 100 mg/kg baicalin);

3—酶水解后的尿样(urine sample obtained after enzyme hydrolysis);

a— m/z 447 的选择离子检测模式色谱峰(selective ion monitoring (SM) chromatogram of m/z 447);

b— m/z 447 的二级全扫描质谱峰(full scan MS² chromatogram of m/z 447);

b'— m/z 271 的二级离子全扫描质谱峰(full scan MS² chromatogram of m/z 271)

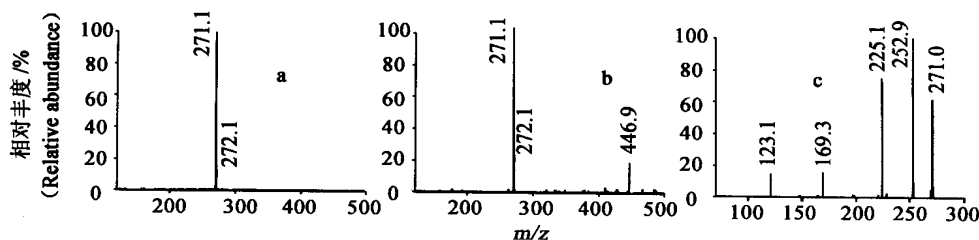


图 3 两种黄芩素葡萄糖醛结合物的二级和三级全扫描质谱图

Fig 3 Full scan MS² and MS³ spectra of the two baicalin glucuronides in rat urine

a—MS/MS spectrum of M₀; b—MS/MS spectrum of M₁; c—MS³ spectrum of the ion at m/z 271

2.2 灌胃或静脉注射给予黄芩苷后大鼠尿样的酶水解样品的分析

与酶水解前的尿样比较, 经 β -葡萄糖苷酸酶水解的大鼠尿样在相应的色谱保留时间处无黄芩苷及其异构体 M₁ 的色谱峰(示于图 2-3), 而在保留时间 13.80 min 处, 出现一新的色谱峰。与黄芩素对照品的色谱保留时间和质谱行为进行比较, 确定其为黄芩素, 由此进一步证明了 M₁ 为黄芩素的葡萄糖醛结合物。

2.3 葡萄糖醛结合物的结构确证

将固相萃取处理后的尿样进行 HPLC/UV 检测, 与空白尿样进行对照, 收集可能的代谢产物 HPLC 流分, 经质谱确证后将黄芩素葡萄糖醛结合物的流分进行紫外扫描(波长为 200~

500 nm)。

含有 5 位酚羟基的黄酮类化合物, 可以与 Al³⁺ 离子形成复合物, 造成紫外吸收光谱的峰带红移, 加入酸后, 紫外吸收光谱无明显变化。在 M₁ 的紫外吸收光谱图中, 带 I 和带 II 分别在 313 nm 和 273 nm 处有吸收; 加入铝盐后, 波带分别红移至 328 nm 和 283 nm, 这些信息与文献 [4] 基本一致; 再加入酸后, 波带无变化(示于图 4), 说明 5 位酚羟基游离, 证明 M₁ 为 6 位羟基葡萄糖醛结合物。

2.4 大鼠分别灌胃和静脉注射给予黄芩苷后尿样的累积排泄

分别给大鼠灌胃(100 mg/kg) 和静脉注射(15 mg/kg) 给予黄芩苷后的尿样累积排泄曲线

示于图5。灌胃给予黄芩苷后,原形药和黄芩素6-O-葡萄糖苷酸的累积排泄量分别为 $1.49 \pm 1.03\%$ 和 $0.77 \pm 0.34\%$;静脉注射给予黄芩苷后,原形药和黄芩素6-O-葡萄糖苷酸的累积排泄量分别为 $30.80 \pm 20.4\%$ 和 $0.28 \pm 0.24\%$ 。由数据可以看出,黄芩素6-O-葡萄糖苷酸在两种给药方式下的累积排泄量存在显著性差异

($p < 0.05$),说明此结合物的形成很可能与胃肠道有关,即黄芩苷很可能在胃肠道部分水解成苷元后再与葡萄糖醛酸结合,而后排出体外。此推测与以前文献报道^[5, 6]相符。以药物原形和尿样浓度评价黄芩苷在大鼠体内的绝对生物利用度为 4.84% 。

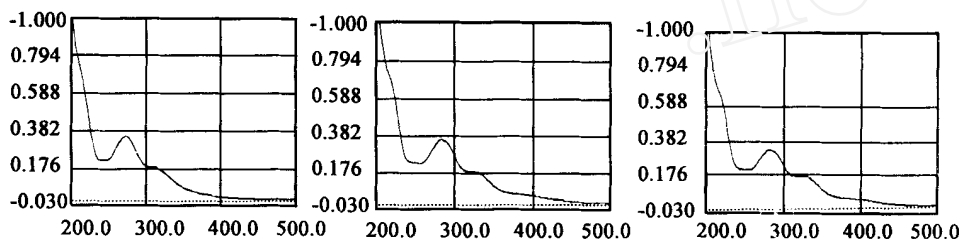


图4 M₁的紫外吸收光谱图

Fig 4 UV absorption spectra of the metabolite M₁ after oral administration of baicalin to rats

a—加入 $5 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3 之前(before addition of $5 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3);

b—加入 $5 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3 之后(after addition of $5 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3);

c—加入 $5 \mu\text{mol/L}$ $\text{AlCl}_3 + 100 \mu\text{L}$ HCl 之后(after addition of $5 \mu\text{mol/L}$ $\text{AlCl}_3 + 100 \mu\text{L}$ HCl)

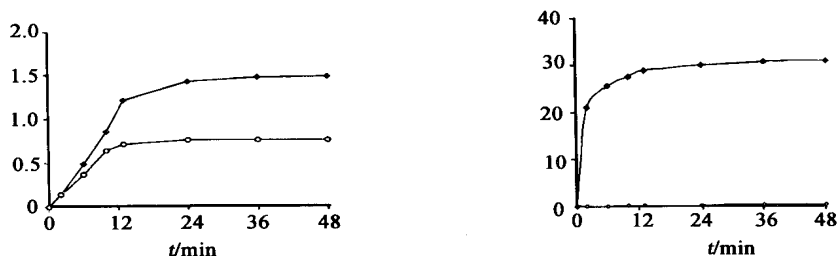


图5 大鼠分别灌胃和静脉注射给予黄芩苷后的尿样累积排泄曲线

Fig 5 Urinary excretion of baicalin in rats ($n = 6$) after oral or intravenous administration of baicalin

a—灌胃(oral administration); b—静脉注射(intravenous administration);

■—黄芩苷(baicalin); ○—黄芩素-6-O-葡萄糖醛酸结合物(baicalin-6-O-glucuronide)

3 结论

(1) 采用高专属的 LC/MS^n 检测方式,对大鼠分别灌胃和静脉注射给予黄芩苷后的尿样中的原形药及其异构体的化学结构以及它们的排泄进行了研究。在两种给药方式下的大鼠尿样中均检测到两种黄芩素的葡萄糖醛酸结合物。根据对照品的色谱和质谱行为以及代谢物的紫外光谱特征,推测出这两种结合物的结构分别为黄芩苷和黄芩素6-O-葡萄糖苷酸;

(2) 在本研究所选择的色谱和质谱条件下,

对两种结合物的尿样累积排泄进行了考察,由数据可以看出黄芩苷至少部分可以在胃肠道经过水解形成苷元后被吸收或进一步代谢;

(3) 关于黄芩苷在大鼠体内的药动学数据,文献^[1, 8]中已有报道,但所报道的结果往往出入较大,推测可能是由于文献中所采用的检测方法专属性不强所致。并且作者大多测的是水解后苷元的浓度。

(下转第154页)

- Sciences, 2002, 11(71): 1 321~1 330
- [5] 贺浪冲, 耿信笃 细胞膜受体色谱法-研究药物与受体作用的新方法[A] 生物医药色谱新进展[C], 1996, 3: 8~9
- [6] He Langchong, Wang Sicen, Geng Xindu Coating and Fusing Cell Membrane Onto a Silica Surface and Their Chromatographic Characteristics [J] Chromatographia, 2001, 54: 71~76
- [7] He Langchong, Yang Guangde, Geng Xindu Enzymatic Activity and Chromatographic Characteristics of the Cell Membrane Immobilized on Silica Surface [J] Chinese Science Bulletin, 1999, 44(9): 826~831
- [8] Hong Zhangying, Wang Xuezhao, Le Jian, et al Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil From Dry Rhizome of Ligusticum Chuanxiong Hort and Their Characterization by GC/MS [J] Journal of Chinese Pharmaceutical Science, 2002, 11(2): 31~34
- [9] 周本杰, 张忠义, 石 勇, 等 超临界萃取和分子蒸馏联用技术提取分离川芎挥发性成分及其 GC/MS 分析[J] 第一军医大学学报, 2002, 22(7): 652~653
- [10] 杨光明, 蔡宝昌, 潘 扬, 等 川芎药材指纹图谱研究与产地比较(I) [J] 南京中医药大学学报, 2002, 3 (18): 172~174
- [11] 吴玫涵, 聂凌云 气相色谱-质谱联用技术在我国中药研究中的应用[J] 解放军药学报, 2002, 18(2): 95~97
- [12] 袁久荣, 容 蓉, 杨 东 当归饮片挥发油成分的研究[J] 中国中药杂志, 1998, 23(10): 601~604
- [13] 梁鑫森, 肖红斌, 卢佩章 色谱联用技术在中药复方研究中的应用[J] 世界科学技术-中药现代化, 2002, 2(4): 18~21
- [14] 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲 用细胞膜色谱法筛选当归中的有效成分[J] 中国药理学杂志, 2000, 35 (1): 13~15
- [15] 赵小娟, 党高潮, 杨广德, 等 淫羊藿根与叶活性成分的比较[J] 分析化学, 2002, 30(8): 195~197
- [16] 高 琨, 贺浪冲, 杨广德 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分[J] 中国药理学杂志, 2003, 38(1): 14~16
- [17] Lin Longze, He Xianguo, Lian Lizhi, et al Liquid Chromatographic-Electrospray Mass Spectrometric Study of the Phthalides of Angelica Sinensis and Chemical Changes of Z-Ligustilide [J] Journal of Chromatography A, 1998, 810: 71~79
- [18] 路新华, 梁 鸿, 赵玉英 当归中藁本内酯类化合物的分离与结构鉴定[J] 中国中药杂志, 28 (5): 423~425

(上接第 133 页)

参考文献

- [1] Wakui Y, Yanagisawa E, Ishibashi E, et al Determination of Baicalin and Baicalein in Rat Plasma by High-performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection [J] J Chromatogr A, 1992, 575: 131~136
- [2] Wittig J, Herderich M, Graefe EU, et al Identification of Quercetin Glucuronides in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J] J Chromatogr B, 2001, 753: 237~243
- [3] Jaeger W, Zembach B, Wolschann P, et al Metabolism of the Anticancer Drug Flavopiridol, A New Inhibitor of Cyclin Dependent Kinases in Rat Liver [J] Life Sci, 1998, 62 (20): 1 861~1 873
- [4] Abe KI, Inoue O, Yumoto E. Biliary Excretion of Metabolites of Baicalin in Rats [J] Chem Pharm Bull, 1990, 38(1): 208~211
- [5] 车庆明, 黄新立, 李艳梅 黄芩苷的药物代谢产物研究[J] 中国中药杂志 2001, 26(11): 768~769
- [6] 顾景凯, 钟大放, 陈笑艳, 等 LC-MSⁿ 法鉴定乙氧苯柳胺在家兔体内的主要代谢产物[J] 高等学校化学学报, 2000, 21 (5): 690~693
- [7] 陈笑艳, 钟大放, 姜 浩, 等 电喷雾离子阱质谱法直接测定几种药物的葡萄糖苷酸型代谢物[J] 药理学学报, 1998, 33: 849~854
- [8] Lai M T, Hsiu S L, Hou Y C, et al Comparison of Metabolic Pharmacokinetics of Baicalin and Baicalein in Rats [J] J Pharm Pharmacol, 2003, 55: 205~209