

HPLC-MS/MS 法分析大鼠体内淫羊藿素葡糖醛酸结合物

刘海培^{1,2}, 孟繁华¹, 郭继芬¹, 司端运³, 朱晓薇², 赵毅民¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850;
2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要:应用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法鉴别大鼠血浆及尿粪中淫羊藿素葡糖醛酸结合物。生物样品经固相萃取法处理后,以 V(乙腈):V(水):V(乙酸)=45:55:1.5 为流动相,通过 Dikma C₁₈ 柱分离,采用电喷雾离子四极杆串联质谱在负离子检测方式下进行一级和二级全扫描质谱分析。通过提高离子源内的 DP 电压,使待测物发生源内裂解产生碎片离子,再对产生的碎片离子进行子离子扫描,可获得相当于三级质谱分析的结果。根据待测物的色谱和质谱信息,发现淫羊藿素在大鼠体内可代谢为 1 种双葡糖醛酸结合物 M1 和 2 种单葡糖醛酸结合物 M2、M3。大鼠灌胃给予淫羊藿素后,在血浆和尿样中可检测到 M1、M2 和 M3,在粪便中仅检测到 M2 和 M3。

关键词:高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS);淫羊藿素;葡糖醛酸结合物;代谢产物

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2010)06-0376-04

Analysis of Glucuronide Conjugates of Icaritin in Rat by LC-MS/MS

LIU Hai-pei^{1,2}, MENG Fan-hua¹, GUO Ji-fen¹,
SI Duan-yun³, ZHU Xiao-wei², ZHAO Yi-min¹

(1. *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China;*
2. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;*
3. *Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China*)

Abstract: The glucuronide conjugates of icaritin in rat plasma, urine and feces were analyzed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Samples were extracted using C₁₈ solid-phase extraction cartridges, and then separated on a Dikma C₁₈ column. The mobile phase was consisted of V(acetonitrile):V(water):V(acetic acid)=45:55:1.5. Electrospray ionization (ESI) source was applied. Full scan and second stage mass scan were performed in the negative ion mode. According to the chromatography and MS data, a di-glucuronide conjugate (M1) and two mon-glucuronide conjugates (M2 and M3) of icaritin are identified in rat. M1, M2 and M3 can be detected in plasma and urine, while M2 and M3 can be found in feces after oral administration of icaritin to rat.

Key words: high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); icaritin; glucuronide conjugate; metabolite

收稿日期:2009-12-31;修回日期:2010-06-13

基金项目:国家自然科学基金(81001468)资助

作者简介:刘海培(1983~),女(汉族),河北衡水人,硕士研究生,药物分析专业。E-mail: liuhaopei2007@163.com

通信作者:郭继芬,女(汉族),内蒙林西人,副研究员,药物分析专业。E-mail: guojifen@sohu.com

淫羊藿素(icaritin, ICT)为来源于小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(Epimedium)植物的一种黄酮类成分,也可由淫羊藿苷经纤维素酶水解得到,能明显降低黑色素的浓度^[1],且具有促进 MCF27 细胞和 T47D 细胞增殖的雌激素样作用^[2],其结构示于图 1。为了了解淫羊藿素的体内过程,我们已建立了 HPLC-MS/MS 法^[3]测定血浆样品中淫羊藿素的浓度,并将此方法应用到药代动力学研究中。灌胃给予大鼠 80 mg·kg⁻¹淫羊藿素后,血浆中结合型淫羊藿素的 C_{max}和 AUC_{0-∞}分别约为原形的 44 倍和 23 倍,提示淫羊藿素在大鼠体内主要以结合物形式存在。在上述研究的基础上,本工作采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法对淫羊藿素在大鼠血浆、尿、粪中的代谢产物进行分析,发现淫羊藿素在大鼠体内可代谢为 1 种双葡糖醛酸结合物 M1 和 2 种单葡糖醛酸结合物 M2、M3。

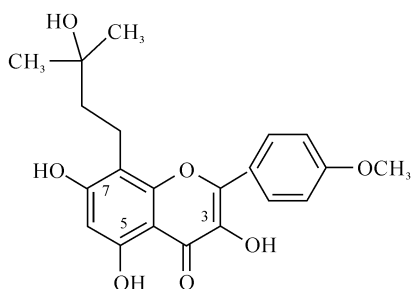


图 1 淫羊藿素的结构

Fig. 1 Structure of icaritin

1 实验部分

1.1 仪器

API 3000 液相色谱-串联质谱仪:美国 AB 公司产品,配有 Turbo Ionspray 离子化源;Agilent 1100 四元梯度泵和自动进样器:美国安捷伦公司产品。

1.2 试剂和材料

淫羊藿素对照品(99.9%):由天津药物研究院提供;抗坏血酸(分析纯):购自北京化学试剂公司;乙腈(色谱纯):购自美国 Sigma 公司;乙酸(色谱纯):购自美国 Tedia 公司;甲醇(色谱纯):购自美国 Fisher 公司;Bakerbond 固相萃取柱(C₁₈, 100 mg/1 mL):购自美国 Baker 公司。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 Dikma C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm×5 μm):美国 Dikma 公司产品;C₁₈ 保护柱(4 mm×3.0 mm):美国 Phenomenx 公司产品;流动相为 V(乙腈):V(水):V(乙酸)=

45:55:1.5;流速 0.6 mL·min⁻¹;进样量 50 μL;柱温 25 ℃。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源,负离子检测,喷射电压-4 000 V,源温度 400 ℃,雾化气为 6 unit,帘气为 11 unit,碰撞气为 7 unit,采用一级和二级全扫描质谱法分析。

1.4 样品处理

取 200 μL 生物样品(血、尿、粪),50 μL 2.5 g·L⁻¹ 抗坏血酸溶液和 100 μL 磷酸二氢铵缓冲溶液(pH 3.99),加入 200 μL 纯净水,涡流 3 min,离心 10 min(9 500 r·min⁻¹),取上清液至已活化好的 SPE C₁₈ 柱,先用 2×1 mL 水冲洗,再用 2×1 mL 甲醇洗脱,将甲醇洗脱液于 40 ℃ 下空气吹干。残余物用 150 μL 流动相溶解后,吸取 50 μL 进行 HPLC-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

负离子检测模式下,在大鼠灌胃给药后的血样和尿样一级全扫描色谱图上均可检测到 1 个准分子离子 m/z 737(M1)和 2 个准分子离子 m/z 561(M2 和 M3)的色谱峰。在粪样的一级色谱图上检测到 2 个准分子离子 m/z 561(M2 和 M3)的色谱峰。M1 的相对分子质量比原形药物多 2×176 u, M2 和 M3 的相对分子质量比原形药物均多 176 u。色谱保留时间顺序为 $t_{R(M1)} < t_{R(M2)} < t_{R(M3)} < t_{R(\text{icaritin})}$ 。初步推测 M1 为淫羊藿素的双葡糖醛酸结合物, M2 和 M3 为淫羊藿素的单葡糖醛酸结合物。

对 m/z 737(M1)和 m/z 561(M2 和 M3)继续进行二级质谱分析,相应的二级全扫描质谱图和质谱图示于图 2 和图 3。在 M1 的二级质谱图中,有基峰为 m/z 737 脱去一分子葡糖醛酸(176 u)后的 m/z 561,还有脱去二分子葡糖醛酸后的 m/z 385,以及葡糖醛酸离子 m/z 175 和 m/z 113。 m/z 385 与淫羊藿素在负离子模式下的准分子离子相同。有文献^[4-5]报道,在负离子模式下,碎片离子 m/z 175 和其脱去一分子水和一分子二氧化碳后的 m/z 113 可以作为确定药物葡糖醛酸结合物的直接证据,据此推定 M1 为淫羊藿素的双葡糖醛酸结合物。在 M2 和 M3 的二级质谱图中,基峰均为 m/z 561 脱去一分子葡糖醛酸后的 m/z 385,另外还均有 m/z 175 和 m/z 113 离子,因此推定 M2 和 M3 为淫羊藿素的单葡糖醛酸结合物。

为进一步证明 M1、M2 和 M3 的二级质谱中所产生的碎片离子 m/z 385 为原形药物淫羊藿素的碎片离子,还需对其进行下一级质谱分

析。但由于三重四极杆质谱仪只能进行二级质谱分析,因此通过将离子源内的 DP 电压由 70 V 提高到 160 V,使 M1、M2 和 M3 在离子源内裂解产生 m/z 385 碎片,然后使 m/z 385 在第 2 个四极杆(即碰撞室)中发生碰撞诱导裂解,获得相当于三级质谱分析的结果。在淫羊藿素对照品的二级质谱图中发现,淫羊藿素脱去 B 环 3' 位甲基后的 m/z 370、脱去 C 环 8 位 2-羟基-2-甲基丙基后的 m/z 311、脱去 B 环 3' 位甲基和 C 环 8

位 2-羟基-2-甲基丙基后的 m/z 297 等碎片离子。将 M1、M2 和 M3 的三级质谱图与淫羊藿素对照品的二级质谱图进行比较,发现它们具有相同的质谱裂解特征,示于图 4,因此进一步证明了 M1、M2 和 M3 是淫羊藿素的葡糖醛酸结合物。M2 和 M3 具有相同的相对分子质量和质谱裂解碎片,但色谱保留时间不同,说明 M2 和 M3 为同分异构体。

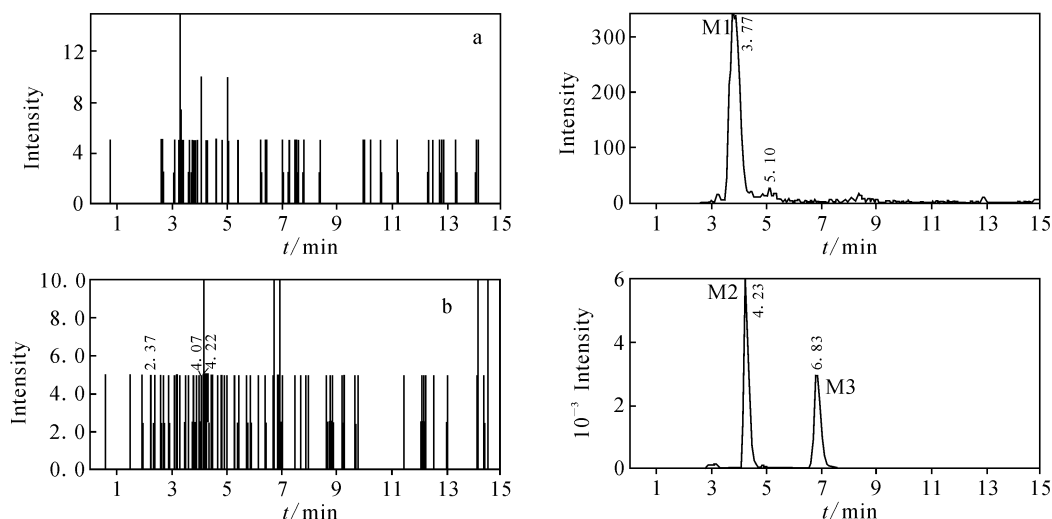


图 2 灌胃给予大鼠淫羊藿素后尿样中 M1、M2 和 M3 的二级全扫描色谱图

a. 空白尿样; b. 灌胃给予 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 淫羊藿素后的大鼠尿样

Fig. 2 Product ion scan chromatograms spectra of M1, M2 and M3 in rat urine after oral administration

a. blank urine sample; b. urine sample obtained after oral administration of $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ icaritin

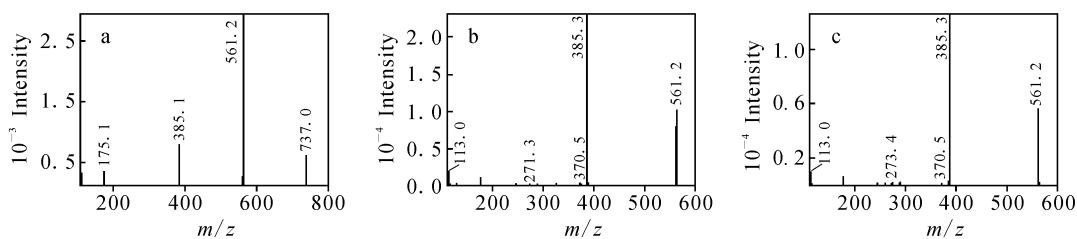


图 3 M1、M2 和 M3 的二级全扫描质谱图

Fig. 3 Product ion scan spectra of M1, M2 and M3

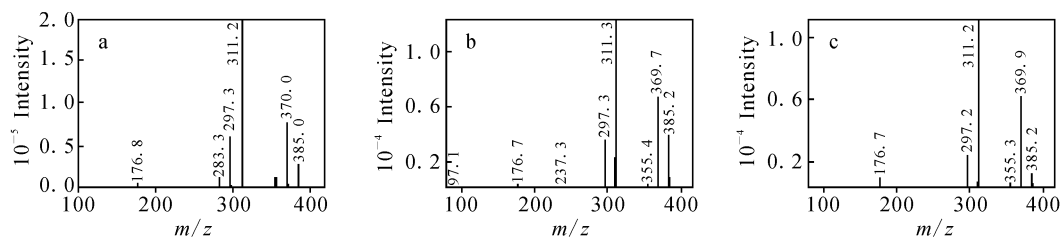


图 4 淫羊藿素的二级质谱图及代谢物的三级质谱图

a. 淫羊藿素的二级质谱图; b. M1 的三级质谱图; c. M2 和 M3 的三级质谱图

Fig. 4 product ion scan spectra of icaritin and full scan MS^3 spectra of conjugates

a. product ion scan spectrum of icaritin; b. MS^3 spectrum of M1; c. MS^3 spectrum of M2 and M3

鉴于不易得到葡糖醛酸结合物对照品,我们只能依靠质谱信息对 M1、M2 和 M3 的化学结构进行推测。淫羊藿素结构中含有 4 个羟基,其中包括 3 个酚羟基(黄酮母核的 3,5,7 位)和 1 个醇羟基。据文献^[6]报道,酚羟基较醇羟基的反应活性强,而黄酮类化合物的酚羟基反应顺序通常为 7 位>3 位>5 位。因此推测 M1 为淫羊藿素的 3,7 位羟基与葡糖醛酸结合而成的代谢产物;M2 和 M3 为淫羊藿素的 3,7 位羟基分别与葡糖醛酸结合而成的代谢产物,但具体结合位点还有待进一步研究。

参考文献:

[1] PARK J S, PARK H Y, RHO H, et al. Statistically designed enzymatic hydrolysis for optimized production of icaraside II as a novel melanogenesis inhibitor [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18

(1): 110-117.

- [2] 叶海涌, 刘健, 楼宜嘉. 淫羊藿苷衍生物的制备及其雌激素样作用研究[J]. 浙江大学学报, 2005, 34(2): 131-136.
- [3] 刘海培, 孟繁华, 郭继芬, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中淫羊藿素[J]. 药学学报, 2009, 44(10): 1140-1144.
- [4] 王玲, 王英武, 陈刚, 等. 电喷雾-串联四极杆-飞行时间质谱法测定药物的葡萄糖醛酸结合物[J]. 质谱学报, 2002, 23(2): 93-95.
- [5] 邢杰, 陈笑艳, 张淑秋, 等. 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[J]. 质谱学报, 2004, 25(3): 129-133.
- [6] MOHAMED B, STÉPHANE L, AZIZ A, et al. Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions [J]. Tetrahedron 2002, 58: 10 001-10 009.

仪器信息网“人物专访”栏目介绍

“人物专访”栏目是仪器信息网的品牌栏目之一,自 2005 年创办以来,已经采访了 150 余位业内知名专家、仪器厂商负责人,及时准确地报道了为中国仪器行业做出突出贡献的精英人物,并以其专业性、独特性深得读者喜爱。

目前,“人物专访”栏目重点关注的专家包括:

- 1) 仪器研发专家,正在承担国家重大科研课题,或近期有突破、其研究成果急待转让或刚被厂商采用的专家;
- 2) 仪器应用专家,长期致力于仪器应用研究、开发出新分析方法、并有较大社会推广价值的,以及主持或参与仪器相关标准制(修)订的专家;
- 3) 仪器市场专家,对仪器行业市场现状与产业发展有独到见解的,以及热衷于对行业热点问题或事件发言的专家;
- 4) 行业内有一定影响力的仪器厂商负责人,以及企业内从事仪器新产品研制的中青年专家等。

我们真诚期待您的关注,热烈欢迎您为本栏目推荐相关业界精英,并诚挚地希望您对该栏目提出宝贵意见。

仪器信息网“人物专访”栏目: interview.instrument.com.cn

热线电话:010-51654077-8020 E-mail: editor@instrument.com.cn

(仪器信息网 供稿)