

UPLC-MS/MS 快速鉴定乔松素在人肝微粒体中的代谢产物

李元圆, 上官盈盈(浙江医学高等专科学校, 杭州 310053)

摘要: 目的 以超高效液相色谱质谱联用法(UPLC-MS/MS)快速鉴定乔松素在人肝微粒体中的代谢产物。方法 以人肝微粒体体外孵育体系对乔松素进行代谢研究,以 UPLC-MS/MS 鉴定乔松素的体外代谢产物。结果 建立了乔松素的体外代谢孵育体系,UPLC-MS/MS 在 6 min 内检测到乔松素的 4 个代谢产物,分别鉴定为柚皮素、5,6,7-三羟基二氢黄酮、5,7,8-三羟基二氢黄酮和乔松素-7-葡萄糖醛酸苷,这 4 个代谢产物均为首次发现的乔松素人肝微粒体体外代谢产物。结论 乔松素在人肝微粒体中的主要代谢途径为羟基化和葡萄糖醛酸化,5,7,8-三羟基二氢黄酮是其主要的羟基化产物,乔松素-7-葡萄糖醛酸苷可能为乔松素的主要代谢失活形式。

关键词: 乔松素; 人肝微粒体; 代谢产物; 超高效液相色谱质谱联用法

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)02-0159-05

UPLC-MS/MS Analysis of the Metabolites of Pinocembrin in Human Liver Microsome

LI Yuanyuan, SHANGGUAN Yingying(Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To characterize the metabolism of pinocembrin in human liver microsome by UPLC-MS/MS. **METHODS** Pinocembrin was incubated with human liver microsomal incubation system. UPLC-MS/MS was used to characterize the metabolites. **RESULTS** Naringenin, dihydrobaicalein, dihydronorwogonin and pinocembrin-7-O-glucuronide were identified within 6 min via UPLC-MS/MS. These 4 metabolites were first reported as the metabolites of pinocembrin in human liver microsomal incubation system. **CONCLUSION** The results indicated that pinocembrin can only be metabolized as the forms of hydroxylation and glucuronidation in human liver microsome. Dihydronorwogonin was the main hydroxylated metabolite. Pinocembrin-7-O-glucuronide was the predominant deactivated metabolic pathway.

KEY WORDS: pinocembrin; human liver microsome; metabolite; UPLC-MS/MS

姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 具有燥湿健脾、温胃止痛、止呕截疟的功能,主要用于治疗寒湿内阻、脘腹胀满、冷痛、暖气呕逆、不思饮食等症^[1]。前期研究表明,乔松素是草豆蔻发挥传统功效的药效物质基础之一,具有显著的抑制幽门螺旋杆菌、抗病毒、促进胃肠蠕动等药理活性^[2-5],有较好的开发应用前景。乔松素在草豆蔻中含量很高,前期研究建立的以乔松素为主要指标成分的草豆蔻药材质量标准已被《中国药典》(2010 版一部)收载^[6]。黄酮类化合物的代谢过程对生物活性的发挥、维持乃至毒性的产生都会产生重大影响,并具有多种药理活性^[7-8]。鉴于乔松素重要的质量控制意义和良好的药理活性,有必要对其代谢过程进行研究,阐明其在体内的作用形式。文献研究表明黄酮类化合物在人体内主要通过 P450 酶和 UGT 转移酶代谢^[9-10]。而乔松素在人肝微粒体中的代谢形式未见报道。本实验首次应用超高效液相色谱质谱联用技术(UPLC-

MS/MS)对乔松素在人肝微粒体中的代谢产物进行了鉴定,为其体内代谢研究提供了理论基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC ,Quattro Premier XE 质谱仪(Masslynx4.1 软件); VDRTEX-5 型调速振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Avanti J-25I 型高速冷冻离心机(美国 Beckmen); Himac CP100MX 型超高速冷冻离心机(日本 Hitachi); BP211D 型电子天平(德国 Sartorius)。

1.2 药品与试剂

乔松素、柚皮素对照品(上海中药标准化中心,纯度 $\geq 98\%$); 葡糖-6-磷酸(G-6-P)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(D-glucose-6-phosphate dehydrogenase)购于 Sigma-Aldric 公司; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADP⁺)、月桂醇聚氧乙烯醚(Brij)均购于 Fluka 公司; Tris 碱(上海美季生物技术有限公司,分析纯); 乙腈

基金项目: 浙江省教育厅资助项目(Y200909605)

作者简介: 李元圆, 男, 博士, 讲师 Tel: (0571)87692857

E-mail: lyy3207@163.com

(Merck 公司, 色谱纯); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 肝微粒体

人肝微粒体购于瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.4 色谱条件

Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm); Van Guard BEH C_{18} , 1.7 μm 预柱; 柱温 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相为 A(0.1%甲酸)和 B(乙腈), 梯度洗脱 0~0.5 min, A: 90%~75%; 0.5~2.0 min, A: 75%~70%; 2.0~3.0 min, A: 70%~60%; 3.0~4.0 min, A: 60%~20%; 4.0~5.0 min, A: 20%~5%(瞬时变化); 5.0~6.0 min, A: 5%~90%(瞬时变化); 流速: $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积: 5 μL 。

1.5 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 正离子方式, 毛细管电离电压: 3 kV, 锥孔电压: 40 V, 萃取电压: 2 V, 离子源温度: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气温度: $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 喷雾气: 氮气, 去溶剂气流速: $500\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 锥孔气流量: $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 碰撞气为氩气, 碰撞气流速: $0.15\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱扫描方式采用全扫、子离子扫描和选择离子监测(SIR)。

2 方法

2.1 肝微粒体 I 相反反应孵育体系

孵育体系包括肝微粒体 $0.5\text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$, G-6-P ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶($1\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), MgCl_2 ($4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 磷酸缓冲液($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.4), 乔松素($20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), NADP^+ ($1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 总体积 200 μL , 其中有机溶剂体积小于 1%。设反应组, 阴性组(NADP^+ 以磷酸缓冲液代替)和空白组(底物以甲醇代替)。反应从加入 NADP^+ 开始, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入冰冷乙腈 100 μL , 冰浴中止反应。 $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 进样分析。

2.2 肝微粒体 II 相反反应孵育体系

孵育体系包括肝微粒体 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Brij ($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), MgCl_2 ($4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), Tris-HCl ($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.4), 乔松素($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), UDPGA ($5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 总体积 200 μL , 其中有机溶剂体积 $<1\%$ 。设反应组, 阴性组(UDPGA 以 buffer 代替)和空白组(底物以甲醇代替)。将肝微粒体 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 Brij($0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混匀, 预孵 3 min, 反应从加入 UDPGA 开始, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入冰冷乙腈 100 μL , 冰浴中止反应。

$13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 进样分析。

3 结果

3.1 乔松素及其代谢产物的质谱裂解规律

乔松素为二氢黄酮类化合物, 易发生碳 1,3 和碳 1,4 断裂。二级质谱分析表明其 A 环主要裂解碎片为 m/z 153、 m/z 97, B 环主要裂解碎片为 m/z 131、 m/z 103, 结果见图 1。若乔松素的单羟基化发生在 A 环, 其 A 环裂解碎片增加 16, 为 m/z 169、 m/z 141(m/z 169-CO), 若单羟基化发生在 B 环, 其 B 环裂解碎片增加 16, 为 m/z 147、 m/z 119。

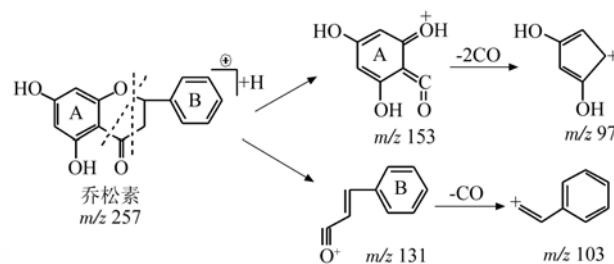


图 1 乔松素主要质谱裂解碎片

Fig 1 Main fragments of pinocembrin

柚皮素为乔松素 4'位羟基化产物, 对其进行二级质谱分析, 其主要裂解碎片为 m/z 153、 m/z 97、 m/z 147、 m/z 119 与上述推断一致。

3.2 乔松素在人肝微粒体中代谢产物的鉴定

将反应组、空白组、阴性组样品及乔松素、柚皮素标准品注入超高效液相质谱联用仪, 分别采用全扫(mass scan)、选择离子监测(SIR)和子离子扫描(daughter scan)模式对样品进行分析比较。在人肝微粒体 I 相代谢孵育体系中, 检测到 m/z 273 的 3 个代谢产物(M1~M3)。在人肝微粒体 II 相代谢孵育体系中, 检测到 m/z 433 的 1 个代谢产物(M4)。在 I 相及 II 相代谢孵育体系中都检测到了乔松素原型 m/z 257。见图 2~3。

M1 的准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 273, 比原药乔松素的准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 257 多 16, 其二级质谱主要碎片离子为 m/z 153, m/z 147、 m/z 119, 见图 4B。A 环碎片离子 m/z 153 与乔松素相同, B 环碎片离子 m/z 147, m/z 119 比乔松素 B 环碎片离子 m/z 131、 m/z 103 多 16, 说明 M1 为乔松素 B 环羟基化代谢产物。M1 的色谱保留时间、准分子离子及二级质谱主要碎片离子与柚皮素标准品相同, 见图 4A。因此鉴定代谢产物 M1 为柚皮素(naringenin)^[11]。

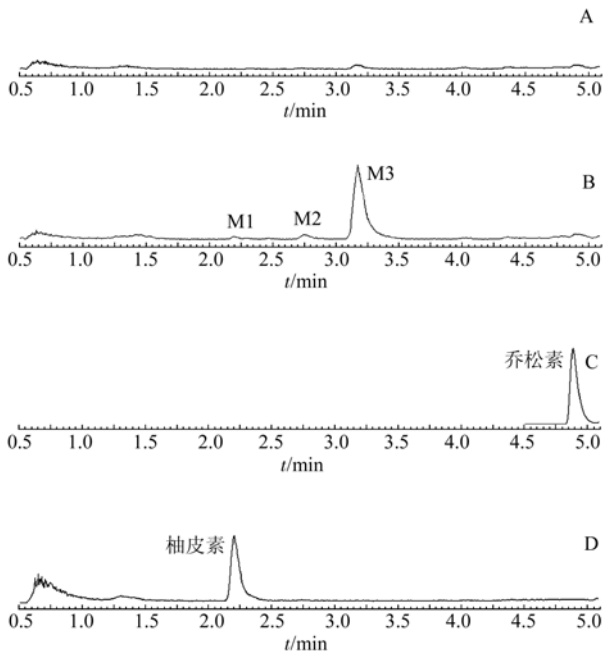


图2 乔松素 I 相代谢产物及原型的选离子流色谱图
A-阴性组选择离子 m/z 273; B-反应组选择离子 m/z 273; C-反应组选择离子 m/z 257; D-柚皮素对照品选择离子 m/z 273

Fig 2 Chromatograms of pinocembrin and its phase I metabolites in SIR mode

A-negative control m/z 273; B-reaction group m/z 273; C-reaction group m/z 257; D-naringenin standard m/z 273

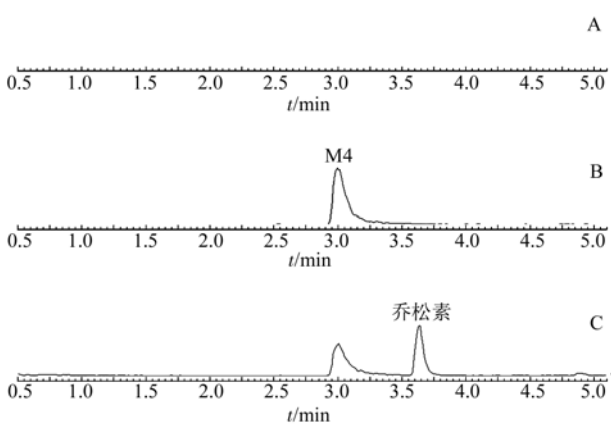


图3 乔松素 II 相代谢产物 M4 及原型的选离子流色谱图
A-阴性组选择离子 m/z 433; B-反应组选择离子 m/z 433; C-反应组选择离子 m/z 257

Fig 3 Chromatograms of pinocembrin and its phase II metabolites in SIR mode

A-negative control m/z 433; B-reaction group m/z 433; C-reaction group m/z 257

M2、M3 的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 273, 比原药乔松素的准分子离子 $[M+H]^+$ m/z 257 多出 16。M2 的二级质谱主要碎片离子为 m/z 169, m/z 141, m/z 131, M3 的二级质谱主要碎片离子为 m/z 169,

m/z 141, m/z 131, m/z 103, 见图 4C 和 4D。M2 和 M3 的 A 环碎片离子比乔松素多 16, 说明 M2、M3 为乔松素的 A 环羟基化产物。乔松素 A 环可以羟基化的位点为 6 位和 8 位, 文献表明黄酮类化合物的 5,6,7-三羟基取代产物较 5,7,8-三羟基取代产物极性略大, 保留时间短^[12]。代谢产物 M2 的保留时间为 2.77 min, M3 为 3.18 min, 因此, 推断 M2 为 5,6,7-三羟基二氢黄酮(dihydrobaicalein), M3 为 5,7,8-三羟基二氢黄酮(dihydronorwogonin)。

M4 的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 433, 比原药乔松素的准分子离子 $[M+H]^+$ m/z 257 多出 176, 二级质谱主要碎片离子为 m/z 257, m/z 153, m/z 131, m/z 103 与乔松素一致, 见图 4E。推断为乔松素的葡萄糖醛酸化代谢产物。黄酮类化合物上羟基发生葡萄糖醛酸化的优先顺序为 7-、3-、3'-或 4'-羟基上^[13-14]。在乔松素人肝微粒体 P450 酶 II 相代谢体系中只检测到一个葡萄糖醛酸化代谢产物, 根据优先顺序, 初步鉴定 M4 可能为乔松素-7-葡萄糖醛酸苷。

4 讨论

本实验首次建立了 UPLC-MS/MS 快速分析鉴定乔松素在人肝微粒体中代谢产物的方法, 在 6 min 内即可对乔松素的主要代谢产物进行分离、鉴定, 具有分析时间短、灵敏度高、选择性好的优点。实验结果表明, 乔松素在人肝微粒体中的主要代谢途径为 I 相代谢羟基化反应, 产物为 M1、M2、M3 及 II 相代谢葡萄糖醛酸化反应, 产物为 M4, 见图 5。未发现其甲基化和硫酸化代谢产物。其主要羟基化产物为 5,7,8-三羟基二氢黄酮, 仅有及少量代谢为柚皮素和 5,6,7-三羟基二氢黄酮, 说明 5,7,8-三羟基二氢黄酮可能是乔松素在人体内发挥药理活性的作用形式之一。乔松素在人肝微粒体中的 II 相代谢产物只检测到乔松素-7-葡萄糖醛酸苷, 其转化率较高, 可能为乔松素的主要代谢失活途径。本实验室也对乔松素大鼠灌胃给药后的体内代谢产物进行了研究, 在大鼠尿液、粪便样品中检测到柚皮素和乔松素-7-葡萄糖醛酸苷, 在胆汁样品中检测到乔松素-7-葡萄糖醛酸苷, 此结果与人肝微粒体体外代谢结果相近, 进一步验证了乔松素在人肝内代谢途径的推断, 为其体内代谢研究提供了理论基础。

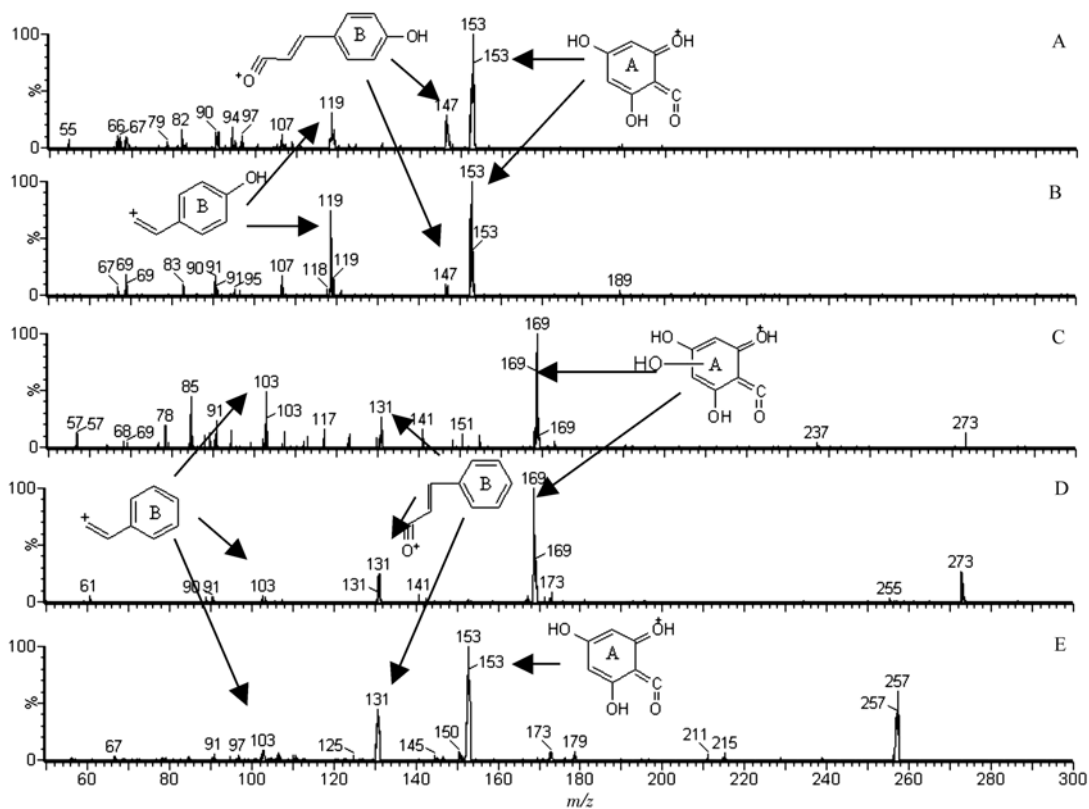


图4 乔松素代谢产物的二级质谱图

A-柚皮素对照品; B-M1; C-M2; D-M3; E-M4

Fig 4 MS/MS spectra of the metabolites from pinocembrin

A-naringenin standard; B-M1; C-M2; D-M3; E-M4

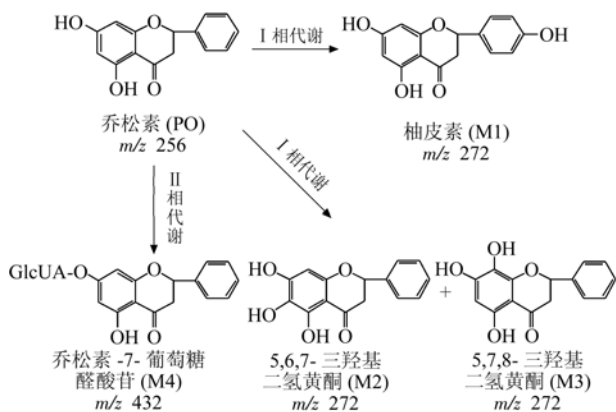


图5 乔松素人肝微粒体中的代谢途径

Fig 5 The metabolic pathway of pinocembrin in human liver microsomes

REFERENCES

[1] Ch.P (2010) Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 222.
 [2] HUANG W Z, DAI X J, LIU Y Q, et al. Studies on antibacterial activity of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai* [J]. J Plant Resour Environ(植物资源与环境学报), 2006, 15 (1): 37-40.
 [3] HUANG W Z. Biological constituents and quality evaluation of *Alpinia katsumadai* Semen [D]. Nanjing: China

Pharmaceutical University, 2006.

[4] DUAN Y B, QI Y, JI Z, et al. Synthesis and antimicrobial activity of pinocembrin and its derivatives [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2006, 16(6): 342-346.
 [5] BOSIO K, AVANZINI C, D'AVOLIO A, et al. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes* [J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31(2): 174-177.
 [6] LI Y Y, CHOU G X, YANG L, et al. Qualitative and quantitative methods for *Alpinia katsumadai* Semen [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(16): 2091-2094.
 [7] KANG H, KUANG R. Effects of total flavones of *Crataegus* leaves on experimental atherosclerosis in rabbits [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(11): 876-878.
 [8] MOURBOUL A, ANWAR M, RENA K. Advance in study on the preparation techniques and pharmacological actions of isoliquiritigenin [J] Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(4): 277-280.
 [9] BREINHOLT V M, OFFORD E A, BROUWER C, et al. *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(5): 609-616.
 [10] HE J K, YU Y, CHEN X J, et al. Research progress on drug metabolism of flavonoids [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(21): 2789-2794.
 [11] LÜ H, PEI Y P, LI W L. Studies on flavonoids from *Gynura bicolor* DC. [J] Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学),

- 2010, 27(10): 613-614.
- [12] GRADOLATTO A, CANIVENC-LAVIER M C, BASLY J P, et al. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(1): 58-65.
- [13] BOERSMA M G, VAN DER WOUDE H, BOGAARDS J, et al. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15(5): 662-670.
- [14] YODOGAWA S, ARAKAWA T, SUGIHARA N, et al. Glucurono- and sulfo-conjugation of kaempferol in rat liver subcellular preparations and cultured hepatocytes [J]. Biol Pharm Bull. 2003, 26(8): 1120-1124.

收稿日期: 2011-05-11