

## HPLC-ESI/MS 分析 5-羟基黄酮在大鼠体内的代谢产物

韦英杰<sup>1</sup>, 姜金生<sup>2</sup>, 谭晓斌<sup>1</sup>, 陈斌<sup>1</sup>, 刘炜<sup>1</sup>, 胡春萍<sup>1</sup>, 马世平<sup>2</sup>, 贾晓斌<sup>1\*</sup> (1.江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 南京 210028; 2.中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009)

**摘要:** 目的 研究 5-羟基黄酮在大鼠体内的代谢产物。方法 应用高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)检测大鼠灌胃 5-羟基黄酮后血浆、尿液、胆汁和粪便中的代谢产物。实验采用 Zorbax C<sub>18</sub> 色谱柱, 0.05% 甲酸乙腈-0.05% 甲酸水二元线性梯度洗脱进行色谱分离, 并与电喷雾质谱联用, 根据正离子模式的分子离子峰获得化合物分子量信息, 推测化合物的可能结构。结果 仅在大鼠粪便中检测到原形成分, 在大鼠尿液、粪便、血浆、胆汁中检测到 5-羟基黄酮葡萄糖醛酸结合物。结论 5-羟基黄酮吸收差, 在大鼠体内主要以 II 相代谢产物葡萄糖醛酸结合物的形式存在。

**关键词:** 5-羟基黄酮; 代谢; 大鼠; 高效液相色谱-电喷雾质谱

中图分类号: R917.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)01-0060-04

### Metabolites Analysis of 5-Hydroxyflavone in Rat by HPLC-ESI/MS

WEI Yingjie<sup>1</sup>, JIANG Jinsheng<sup>2</sup>, TAN Xiaobin<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, HU Chunping<sup>1</sup>, MA Shiping<sup>2</sup>, JIA Xiaobin<sup>1\*</sup> (1.Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2.Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the metabolites of 5-hydroxyflavone in rat. **METHODS** High performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) was used for analysis of metabolites of 5-hydroxyflavone in rat after oral administration. The separation was performed with a Zorbax C<sub>18</sub> column using a binary gradient elution of 0.05% formic acid acetonitrile-0.05% formic acid water. The quasi-molecular ions of compounds in positive mode were observed for molecule mass information, and the potential structures were presumed. **RESULTS** Parent component 5-hydroxyflavone was found only in rat feces, while glucuronide conjugates of 5-hydroxyflavone were found in rat urine, feces, plasma and bile. **CONCLUSION** Absorption of 5-hydroxyflavone is poor, and the major forms of 5-hydroxyflavone in rat are metabolites of phase II glucuronide conjugates.

**KEY WORDS:** 5-hydroxyflavone; metabolism; rat; LC-ESI/MS

黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一类多酚化合物, 具有抗肿瘤、抗心血管疾病、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒、免疫调节等潜在药用价值<sup>[1-4]</sup>。5-羟基黄酮是广泛存在于食物、水果等中的重要单羟基黄酮, 具有抗氧化性能、对光致辐射具有稳定性、兴奋状态质子转移反应<sup>[5]</sup>, 以及抗冠脉痉挛、冠脉缺血危象等药理作用<sup>[6-7]</sup>。国内对 5-羟基黄酮的化学合成研究已引起重视<sup>[8]</sup>, 但对其在体内吸收代谢研究尚不全面, Zhang 等<sup>[9]</sup>对 5-羟基黄酮等几种单羟基黄酮化合物在人空肠微粒体中葡萄糖醛酸代谢进行了研究; Shia 等<sup>[10]</sup>在大鼠血

浆中检测到大鼠口服 5-羟基黄酮后的葡萄糖醛酸结合产物。本实验旨在采用高灵敏、高选择性的高效液相色谱和电喷雾质谱联用技术(LC-ESI/MS)鉴定 5-羟基黄酮在大鼠尿、粪便、血浆和胆汁中的代谢产物, 对全面系统的了解 5-羟基黄酮的代谢规律具有重要意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

5-羟基黄酮对照品(SIGMA-ALDRICH, 纯度 >97%)。

肝素(江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号:

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973978)

作者简介: 韦英杰, 女, 博士, 副研究员 Tel: (025)85637809  
Tel: (025)85608672 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

E-mail: wyj970@163.com \*通信作者: 贾晓斌, 男, 博士, 教授, 博

0601104); 生理盐水(氯化钠注射液, 南京小营药业集团有限公司, 批号: 2010070203); 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 超纯水(Milli-Q), 乐百氏纯净水。其余试剂均为分析纯。

## 1.2 动物

SD 大鼠, ♂, 体质量 200~300 g。上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验动物许可证号: SYXK(苏)2007-0026。

## 1.3 仪器

Waters Alliance 2695-ZQ 2000 液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司), 包括双高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 电喷雾离子化接口, 2695 型液相色谱仪, Masslynx 4.0 色谱工作站。TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); TDZ5B-WS 低速自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); XW-80A 旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); METTLER AB135-S 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); N-EVAP TM 112 氮吹仪(美国 Organomation Associates)。

## 1.4 供试药制备

称取 5-羟基黄酮适量, 加 0.8% CMC-Na 配成  $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 供大鼠灌胃用。

## 1.5 分析条件

**1.5.1 液相分析条件** 色谱柱: Agilent  $\text{C}_{18}$  柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相: A 为 0.05% 甲酸乙腈, B 为 0.05% 的甲酸水; 采用梯度洗脱: 0~5 min, 90%B, 5~7 min, 90% $\rightarrow$ 80%B, 7~20 min, 80% $\rightarrow$ 75%B, 20~35 min, 75% $\rightarrow$ 25%B, 35~37 min, 25% $\rightarrow$ 90%B, 37~40 min, 90%B; 流速:  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**1.5.2 质谱分析条件** 电喷雾离子源参数: 毛细管电压 2.50 kV, 锥孔电压 35 V, 干燥气流速 320  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 离子源温度 120  $^{\circ}\text{C}$ , 辅助气温度 310  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子检测方式: 全扫描检测; 离子极性: 正离子 (positive); 提取离子流(EIC):  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  和  $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ ; 离子化方式: 气动辅助电喷雾离子化(ESI); 扫描范围: 100~800  $m/z$ 。

## 1.6 给药方法和样品采集

**1.6.1 大鼠尿样** 取 SD 大鼠 6 只, ♂, 体质量 200~300 g, 分为 2 组, 空白组和给药组, 每组 3 只。实验前禁食不禁水 12 h。给药组单次灌胃 25

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  5-羟基黄酮的 0.8% CMC-Na 溶液, 空白组给予等体积 0.8% CMC-Na 水溶液。分别收集 24 h 尿液。置 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

**1.6.2 大鼠粪便** “1.6.1”项下大鼠在收集 24 h 尿液同时, 分别收集 24 h 内大鼠粪便。置 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

**1.6.3 大鼠血浆** “1.6.1”项下大鼠在收集尿样和粪便同时, 分别于给药后 0.5, 1, 2, 4, 6 h, 眼眶取血, 置肝素试管中, 充分混匀。 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清液, 各时间点血浆分别合并, 置 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

**1.6.4 大鼠胆汁** “1.6.1”项下大鼠经取血后饲养 10 d 以上的恢复期。给药前禁食不禁水 12 h, 用乌来糖  $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  肌肉注射麻醉, 腹部胆管插管手术。待大鼠清醒时分别灌胃给予供试药和 0.8% CMC-Na 水溶液, 收集 12 h 胆汁, 置 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存备用。

## 1.7 样品处理

**1.7.1 大鼠尿样、血浆、胆汁处理** 分别取大鼠各时间段混合尿液、血浆或胆汁 2 mL, 加 3 倍量乙腈, 涡旋混匀 3 min,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清液, 40  $^{\circ}\text{C}$  下  $\text{N}_2$  吹干, 残渣加 1 mL 乙腈溶解,  $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取上清液, 进样 20  $\mu\text{L}$  分析。

**1.7.2 大鼠粪便处理** 各时间段粪便混合, 用研钵研碎, 称取 2 g, 加 10 倍量 70% 乙腈浸泡并超声 30 min,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清液, 40  $^{\circ}\text{C}$  下  $\text{N}_2$  吹干, 残渣加 2 mL 乙腈溶解,  $13\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取上清液, 进样 20  $\mu\text{L}$  分析。

## 2 结果与分析

按“1.5”项下条件对 5-羟基黄酮的大鼠尿液、粪便、血浆和胆汁的成分进行 LC-MS 分析, 与空白组对照, 通过提取离子流, 根据正离子模式分子离子峰  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$  推测出可能分子量, 检出 3 个代谢产物(M1~M3), 大鼠血浆、尿液、胆汁和粪便的总离子流图及代谢产物提取离子流图见图 1。

结果仅在大鼠粪便中检测到原型成分 5-羟基黄酮 M1, 准分子离子峰  $[\text{M}+\text{H}]^{+}239.1$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^{+}261.1$ , 分子量为 238; 在大鼠血浆和粪便中均检测到代谢成分 M2, 准分子离子峰  $[\text{M}+\text{H}]^{+}415.3$ ,

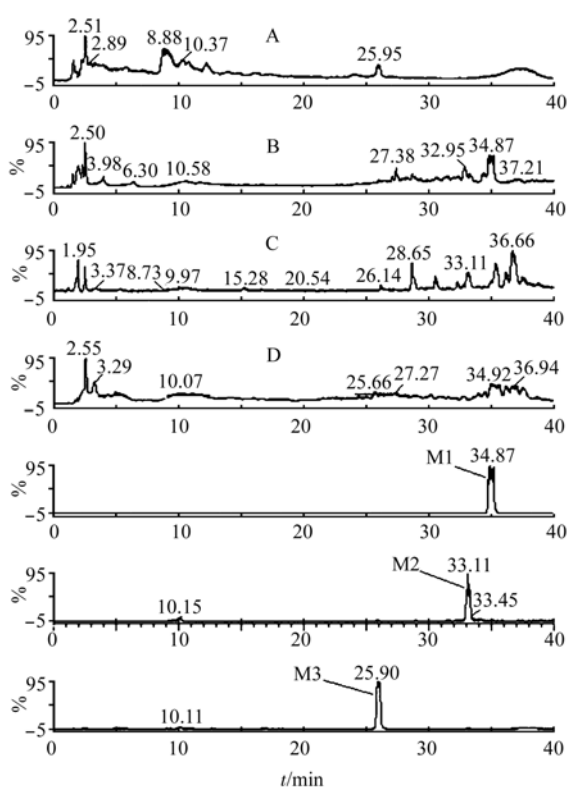


图1 大鼠口服5-羟基黄酮的尿、粪便、血、胆汁质谱总离子流图及代谢产物提取离子流图

A-鼠尿; B-鼠粪; C-鼠血; D-鼠胆汁; M1-5-羟基黄酮(鼠粪); M2-5-羟基黄酮葡萄糖醛酸结合物(鼠血); M3-5-羟基黄酮葡萄糖醛酸结合物(鼠尿)

Fig 1 Mass spectrometry total ion current chromatograph for rat urine, fence, plasma and bile and extract ion current for 5-hydroxyflavone and its metabolites

A-rat urine; B-rat fence; C-rat plasma; D-rat bile; M1-5-hydroxyflavone (rat fence); M2-glucuronide conjugate of 5-hydroxyflavone (rat plasma); M3-glucuronide conjugate of 5-hydroxyflavone (rat urine)

$[M+Na]^+$  437.3, 推测分子量为 414, 较原型成分多 176, 推测为 5-羟基黄酮与葡萄糖醛酸的结合物; 在大鼠尿、胆汁中均检测到与 M2 分子量一致的代谢物 M3, 准分子离子峰 $[M+H]^+$  415.2, 中性丢失 176 Da 得到碎片峰 $[M+H]^+$  239.1, 推测为 5-羟基黄酮与葡萄糖醛酸的结合物, M2 和 M3 可能为同分异构体。5-羟基黄酮及其代谢产物质谱图见图 2。

### 3 讨论

本实验采用 HPLC-ESI/MS 检测大鼠单次灌胃 5-羟基黄酮后血浆、尿液、胆汁和粪便中的代谢产物, 结果仅在鼠粪中检测到原形成分 5-羟基黄酮, 在鼠血和粪中检测到 5-羟基黄酮的葡萄糖醛酸结合物, 而在鼠尿和胆汁中却检测到另一种 5-羟基黄酮的葡萄糖醛酸结合物, 推测两者为

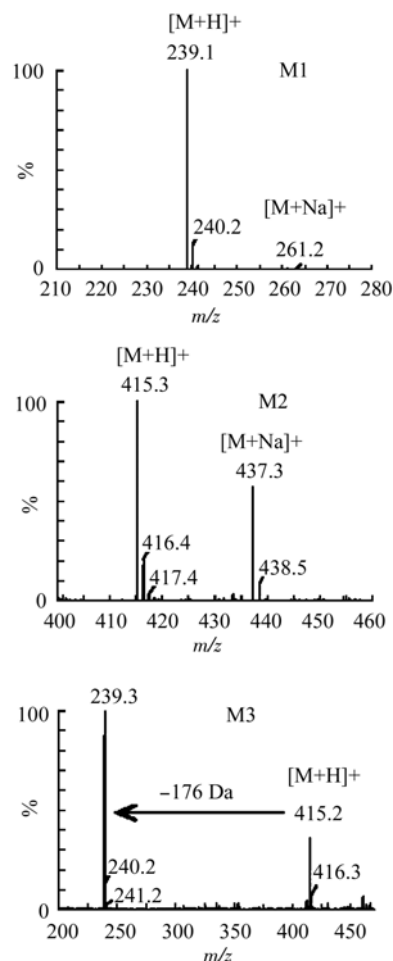


图2 大鼠口服5-羟基黄酮后的代谢产物质谱图

Fig 2 MS spectra of metabolites of 5-hydroxyflavone after oral administration to rat

研究。实验结果提示 5-羟基黄酮吸收差, 在体内主要以 II 相代谢产物葡萄糖醛酸结合物的形式存在。

### REFERENCES

- [1] WANG H. Progress in bioactivity of flavonoids [J]. Food Drug (食品与药品), 2010, 12(9): 347-450.
- [2] ZHOU X, LI H J. Bioactivities and clinical applications of flavonoids [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2007, 5 (16): 350-355.
- [3] ABLISE M, MAMET A, KASIM R. 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.
- [4] 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(7): 613-614.
- [5] YASUO N, HIROKI I, TATSUO A. Photophysical properties of 5-hydroxyflavone [J]. J Photochem Photobio A: Chem, 2004, 161(2/3): 163-168.
- [6] THIRUGNANASAMBANTHAM P, VISWANATHAN S,

- RAMASWAMY S, et al. Analgesic activity of certain flavone derivatives: a structure-activity study [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1993, 20(1): 59-63.
- [7] OCCHIUTO F, BUSA G, RAGUSA S, et al. Comparative antiarrhythmic and antiischemic activity of some flavone in the guinea-pig and rat [J]. Phytother Res, 1991, 5(1): 9-14.
- [8] SHI Q, WANG Z Q, YAO Z L, et al. Synthesis of 5-hydroxyflavone by phase-transfer catalysis [J]. Fine Chem Intermed(精细化工中间体), 2009, 39(5): 47-49.
- [9] ZHANG L, LIN G, ZUO Z. Position preference on glucuronidation of mono-hydroxyflavones in human intestine [J]. Life Sci, 2006, 78(24): 2772-2780.
- [10] SHIA C S, TSAI S Y, KUO S C, et al. Metabolism and pharmacokinetics of 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone and antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(1): 83-89.

收稿日期: 2011-07-08