

· 药物动力学研究 ·

基于 LC-LITMS/MS 法分析白头翁皂苷 B7 在大鼠体内的代谢产物

欧阳辉^{1,2,3}, 郭宜城^{1,3}, 何明珍^{1,3}, 梁起栋^{1,3}, 饶小勇^{1,3}, 简 晖^{1,3}, 冯育林^{1,3}, 杨世林^{1,2,3} (1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 鉴定白头翁中齐墩果酸 3- α -L-吡喃鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)[β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖苷(B7)在大鼠粪便的代谢产物。**方法** 采用超高效液相色谱-三重四级杆线性离子阱复合质谱法(LC-LITMS/MS)检测大鼠灌胃 B7 后粪便中的代谢产物。使用 Waters-SunFire C₁₈ 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m), 以 0.1 % 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱进行色谱分离, 并与线性离子阱联用。选择增强型母离子扫描(EMS)和预测离子对扫描模式(pMRM)进行质谱扫描, 采用 Analyst 1.5 软件进行数据处理、鉴定代谢产物的化学结构。**结果** 在大鼠粪便检测到原型 M0(B7)及 M1(B7 去甲基葡萄糖醛酸化产物)、M2(齐墩果酸-3- β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷)、M3(鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷)、M4(齐墩果酸-3- α -L-吡喃阿拉伯糖)和 M5(齐墩果酸)等 5 个代谢产物。**结论** B7 在大鼠体内以脱糖代谢和葡萄糖醛酸化代谢为主。

关键词: 白头翁皂苷; 齐墩果酸; LC-LITMS/MS; 代谢产物

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0189-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.019

Analysis of Metabolites of Pulsatilla Saponin B7 in Rats by LC-LITMS/MS

OUYANG Hui^{1,2,3}, GUO Yicheng^{1,3}, HE Mingzhen^{1,3}, LIANG Qidong^{1,3}, RAO Xiaoyong^{1,3}, JIAN Hui^{1,3}, FENG Yulin^{1,3}, YANG Shilin^{1,2,3} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To identify the metabolites of Pulsatilla oleanolic acid 3- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) [β -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-pyran arabinoside (B7) in rat feces. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrogram (LC-ITMS/MS) was used for analyzing the metabolites of B7 in rat feces after oral administration. Separation of the metabolites was performed on a Waters-SunFire C₁₈ column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m) by using a binary gradient elution with the mobile phase of 0.1 % formic acid water (A) -acetonitrile (B), and the chromatographic separation was used together with linear ion trap. The samples were treated by enhanced MS scan (EMS) and predict multiple reaction monitoring (pMRM) mode, and then the data were processed with Analyst 1.5 software to identify the chemical structure of metabolites. **Results** B7 (M0) and five metabolites were identified, including M1 (glucuronidation desmethyl metabolite of B7), M2 (oleanolic acid 3- β -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 4)- α -L-pyranarabinoside), M3 (oleanolic acid 3- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) - α -L-pyranarabinoside), M4 (Oleanolic acid-3- α -L-arabinopyranosyl) and M5 (oleanolic acid). **Conclusion** The

收稿日期: 2013-11-11

作者简介: 欧阳辉, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 中药活性成分。Email: huiouyang@163.com。通讯作者: 冯育林, 教授, 研究方向: 中药活性成分研究。Email: fengyulin2003@126.com。

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX11102); 江西省优势科技创新团队计划项目(2010DQB01700); 江西省自然科学基金项目(20114BAB215045); 江西省教育厅产学研合作项目(GJJ11006)。

metabolic pathways of B7 in rats mainly are deglycosylation and demethylation glucuronidation.

Keywords: Pulsatilla saponin; Oleanolic acid; LC-LITMS/MS; Metabolite

白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 为毛茛科白头翁属植物白头翁的干燥根, 又名野丈人、粉草、老冠花、胡王使者等, 生于山野、荒坡及田野间, 喜生向阳处^[1]。中药白头翁具有抗阿米巴原虫、抗菌、抗病毒、抗滴虫、抗肿瘤、增强免疫、抗炎保肝等活性^[2-3]。近年来, 对白头翁的化学成分及药理作用的研究比较深入, 尤其是其抗肿瘤活性引起了广泛关注, 成为了国内外学者的一个研究热点^[4]。白头翁植物中主要成分为三萜皂苷, 国内外学者已从中分离鉴定出多种三萜皂苷, 包括扇豆烷型和齐墩果烷型三萜皂苷^[5-6]。本课题组为确定白头翁皂苷中的有效成分, 对白头翁总皂苷进行了系统分离, 对已分离得到的皂苷类化合物进行了体外和部分的体内抗肿瘤活性试验, 发现白头翁中齐墩果酸 3- α -L-吡喃鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)[β -D-吡喃葡萄糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖苷(B7, 结构式见图 1)具有较强的抗肿瘤活性, 且毒性较小, 但是口服生物利用度低于 5%^[7]。本实验利用超高效液相色谱-三重四级杆线性离子阱复合质谱(LC-LITMS/MS)技术, 对大鼠口服 B7 后粪便中的体内代谢产物进行鉴定, 以期 B7 的研究开发提供参考。

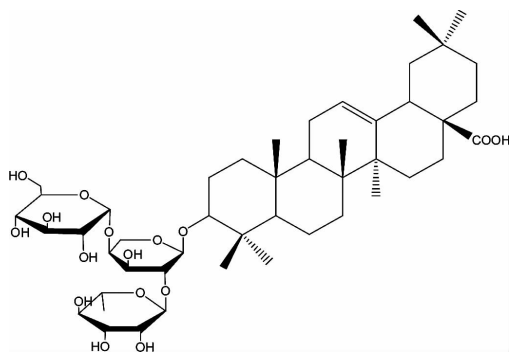


图 1 B7 的化学结构式

Figure 1 Chemical structure of B7

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Q-trap 4500 型三重四级杆线性离子阱质谱联用仪, 含 Analyst 1.5 数据处理系统, 美国 AB SCIEX 公司; Ekspertultra LC-100-XL 高效液相色谱仪, 美国 AB SCIEX 公司; Waters-SunFire C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m), 美国 Waters 公司; Thome

legend micro 17 R 型离心机, 德国赛默飞世尔公司; MTV-100 型多管漩涡混合仪, 杭州奥盛仪器有限公司; MTN-28000 型氮吹浓缩装置, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司; Sartorius BT25S 型十万分之一电子分析天平, 德国赛多利斯公司; KQ-500DE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂 B7(本实验室自制, 纯度 > 98 %), 乙腈、甲醇为色谱纯, 美国 Fisher 公司; 水为 Milli-Q 系统纯化水; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 生物样品采集 Sprague-Dawley 雄性大鼠 5 只, 体质量(250 $\pm$ 10)g, 北京维通利华实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2012-0001。适应性喂养 1 周后开始实验, 给药前禁食 24 h, 但自由饮水, 期间收集空白粪便。大鼠按 240 mg $\cdot$ kg⁻¹ 灌胃给药 B7, 置于代谢笼中, 继续禁食, 收集 0~24 h 的粪便并合并, -40 $^{\circ}$ C 冷冻保存, 待处理。

2.2 样品分析条件

2.2.1 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI), 负离子模式; 喷雾电压: -4500 V, 温度: 600 $^{\circ}$ C, 气帘气(CUR): 30 psi, 雾化气(GS1)和辅助气(GS2): 50 psi; 扫描方式为增强母离子触发的增强子离子扫描(EMS-IDA-EPI)以及预测离子对扫描触发的增强子离子扫描(pMRM-IDA-EPI), 去簇电压(DP): -150 V, 碰撞能量(CE): -70 eV, 碰撞能量叠加(CES): 15 eV。

2.2.2 液相条件 流动相: 含 0.1 % 甲酸的超纯水(A) - 乙腈(B), 以梯度洗脱, 0~1 min, 20 % B; 1~10 min, 20~52 % B; 10~12 min, 53~80 % B; 12~25 min, 80~95 % B; 25~27 min, 95~20 % B; 27.1~30 min, 20 % B。流速为 0.2 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温箱控温为 40 $^{\circ}$ C, 进样体积为 5 μ L。

2.3 粪便样品处理 粪便样品碾磨至粉末状, 称取约 1 g, 加入 4 mL 甲醇超声提取 30 min, 13000 r $\cdot$ min⁻¹ 高速离心, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤, 取 5 μ L 进样分析。

2.4 粪便中代谢产物质谱分析 代谢样品进行 LC-LITMS/MS 检测, 采用 EMS 和 pMRM 两种扫描模式,

通过提取离子信息，根据 B7 结构推测可能发生的裂解方式，检测到了 B7 原型及 5 个代谢产物 M1~M5，

B7 及其代谢产物质谱数据见表 1，二级质谱图见图 2，代谢途径推测见图 3。

表 1 大鼠灌胃 B7 后粪便中代谢产物的 LC-LITMS/MS 结果

Table 1 LC-LITMS/MS analysis result of metabolites in rats faces after oral administration of B7

编号	tR/min ⁻¹	质荷比 [M-H] ⁻¹	主要碎片离子	裂解特征	结构推测	相对峰面积(×10 ⁵)
M0	11.93	895.5	749.3, 733.6, 455.4	B7-162Da, B7-146Da, B7-162-146-132Da	B7	1.81
M1	11.21	1057.6	895.5, 749.3, 733.6, 455.4	[M-H] ⁻¹ 峰比 B7 多 162 Da (葡萄糖醛酸 + 去甲基化)	B7 去甲基葡萄糖醛酸化产物	0.70
M2	12.64	749.4	585.4, 455.4	[M-H] ⁻¹ 峰比 B7 少 146 Da(Rha)	齐墩果酸 3-β-D-吡喃葡萄糖基 (1→4)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷	0.69
M3	11.91	733.6	585.4, 455.4	[M-H] ⁻¹ 峰比 B7 少 162 Da(Glu)	齐墩果酸 3-α-L-吡喃鼠李糖基 (1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷	0.31
M4	22.46	585.1	455.4	[M-H] ⁻¹ 峰比 B7 少 310 Da(Glu+Rha)	齐墩果酸 3-α-L-吡喃阿拉伯糖	0.21
M5	23.74	455.1	437.2	[M-H] ⁻¹ 峰比 B7 少 440 Da(Glu+Rha+Ara)	齐墩果酸	0.62

在大鼠给药粪便代谢样品中检测 M0，分子离子峰 m/z 895.5 $[M-H]^{-1}$ ，推测相对分子量为 896，二级质谱数据显示主要的碎片离子峰 m/z 749.3、733.6、587.4、455，与 B7 标准品保留时间及二级质谱一致，M0 鉴定为 B7 原型。

MS 图谱中检测到 M1 的准分子离子峰 m/z 1057 $[M-H]^{-1}$ ，推测相对分子量为 1058，比原型化合物增加 162 Da，根据药物在体内代谢规律^[8]，可以推测为 B7 在大鼠体内经过去甲基化和葡萄糖醛酸化的二相代谢产物。

M2 的准分子离子峰 m/z 749 $[M-H]^{-1}$ ，推测相对分子量为 750，比原型化合物减少 146 Da，可以推测为 B7 脱去一分子鼠李糖的代谢产物，即齐墩果酸-3-α-L 吡喃阿拉伯糖苷(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖基。

M3 的准分子离子峰 m/z 733.6 $[M-H]^{-1}$ ，推测相对分子量为 734，比原型化合物减少 162 Da，可以推测为 B7 脱去一分子葡萄糖的代谢产物，即齐墩果酸-3-α-L 吡喃阿拉伯糖苷(1→2)-O-α-L-吡喃鼠李糖基。

M4 的准分子离子峰 m/z 585 $[M-H]^{-1}$ ，比 M0 减少 310 Da，比 M2 减少 164 Da，比 M3 减少 148 Da，可以推断为 B7 脱去一分子鼠李糖和一分子葡萄糖的代谢产物，相对分子量为 587，即齐墩果酸-3-α-L 吡喃阿拉伯糖。

M5 的准分子离子峰 m/z 455 $[M-H]^{-1}$ ，推测相对分子量为 456，比原型减少 440 Da，比 M2 减少 132 Da，可以推断为 B7 脱去一分子鼠李糖，一分子葡萄糖和一分子阿拉伯糖的代谢产物，与齐墩果酸标准

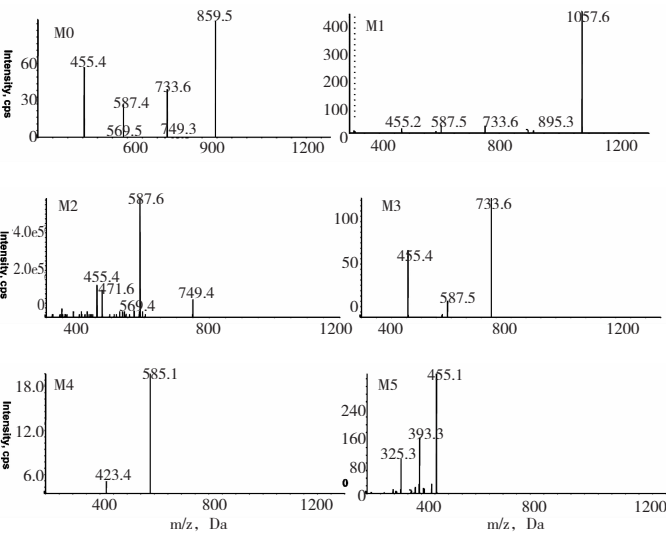


图 2 大鼠灌胃 B7 后粪便中代谢产物的二级质谱图
Figure 2 MS spectra of B7 and its metabolites in rats faces after oral administration of B7

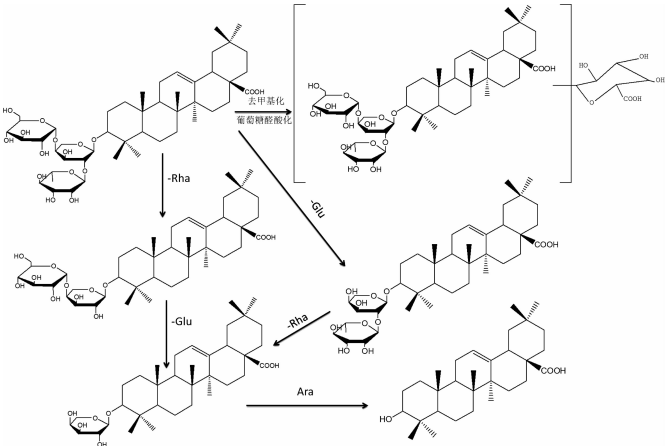


图 3 B7 在大鼠体内的代谢途径
Figure 3 In vivo metabolic pathways of B7 in rats

(下移至 221 页)