

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00760

RRLC-TOF/MS 鉴别防风血浆、尿液中成分及代谢产物

李悦悦¹, 王 慧¹, 陈 俊¹, 赵 亮¹, 张 海¹, 柴逸峰², 张国庆^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材料科, 上海 200438
2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 应用高分离度快速液相-飞行时间质谱(RRLC-TOF/MS)联用技术鉴别防风入血成分及尿液中的原型成分及代谢产物,以探索防风可能的药效成分及体内代谢过程。**方法** 采用 Angilent Zorbax Extend-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm id),甲醇-水流动相体系梯度洗脱,在飞行时间质谱正离子模式下扫描,利用 TOF/MS 得到的准确相对分子质量,对照化学成分数据库,对血浆、尿液中的防风成分及代谢物进行鉴别。**结果** 鉴别出血浆中 6 个防风原型成分:蔗糖、升麻苷、升麻素、紫花前胡苷元、5-O-甲基维斯阿米醇苷和 3'-O-丁酰亥茅酚;尿液中 8 个原型成分:升麻苷、divaricataacid、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、(3S)-2,2-二甲基-3,5-二羟基-8-羟甲基-3,4-二氢-2H,6H-苯并-[1,2-b;5,4-b']双吡喃-6-酮、5-O-甲基维斯阿米醇、亥茅酚苷和汉黄芩素;及 2 个代谢产物:升麻素的葡萄糖醛酸苷和升麻素的同分异构体。**结论** 该方法可靠、有效,可成功用于防风体内成分鉴别,并为进一步的药效实验提供参考和依据。

[关键词] 快速液相-飞行时间质谱法;防风;血浆;尿;代谢产物

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0760-04

RRLC-TOF/MS in identification of constituents and metabolites of *Radix Saposhnikoviae* in rat plasma and urine

LI Yue-yue¹, WANG Hui¹, CHEN Jun¹, ZHAO Liang¹, ZHANG Hai¹, CHAI Yi-feng², ZHANG Guo-qing^{1*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze the constituents and metabolites of *Radix Saposhnikoviae* (RS) in rat plasma and urine by rapid-resolution liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (RRLC-TOF/MS), so as to explore the active ingredients and metabolites of RS *in vivo*. **Methods** The separation was performed on a Angilent Zorbax Extend-C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm id) column, with a methanol-water mobile phase system used for gradient elution. Time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS) was applied for qualitative analysis under positive ion mode. Based on the accurate molecular weight of TOF/MS detection and the compound list of RS established previously, the constituents and metabolites of RS in different matrix *in vivo* were identified. **Results** Six constituents of RS were identified in the plasma: sucrose, prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, nodakenetin, 5-O-methylvisamminol, and 3'-O-i-butyrylhammaudol. Eight constituents were identified in the urine: prim-O-glucosylcimifugin, divaricataacid, cimifugin, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisamminol, (3S)-2,2-dimethyl-3,5-dihydroxy-8-hydroxymethyl-3,4-dihydro-2H,6H-benzo-[1,2-b;5,4-b']dipyrans-6-one, 5-O-methylvisamminol, sec-O-β-D-glucosylhammaudol, and wogonin. Two metabolites were identified in the urine: glucuronide of cimifugin and an isomer of it. **Conclusion** The present method is reliable and effective for identifying compounds of RS *in vivo*, and it can provide a reference and evidence for the further pharmacodynamics experiments.

[Key words] rapid-resolution liquid chromatography-time of flight mass spectrometry; *Radix Saposhnikoviae*; plasma; urine; metabolites

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7): 760-763]

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 的未抽花茎植株的干燥根。味辛甘,性温,能解表祛风、胜湿、止痉。可用于治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒和破伤风。药理实验

研究表明,其具有解热、镇痛、镇静、抗炎、抗过敏、抗惊厥、抑菌和增强机体非特异性免疫功能的作用^[1-6]。防风主产于东北地区和华北地区,为我国常用中药材。迄今为止,已从生药防风中分离出来各种

[收稿日期] 2010-03-09 **[接受日期]** 2010-04-27

[作者简介] 李悦悦,硕士生. E-mail: liyue429@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

化学成分达100种以上,其中主要报道了挥发油、色原酮类、有机酸、香豆素类、聚炔类、多糖类、甾醇、胡萝卜甙、甘露醇、蔗糖、木蜡酸以及微量元素等化合物^[7-9]。但未见有对其入血和尿液中成分及代谢成分的鉴别报道。本研究采用RRLC-TOF/MS技术对防风入血成分和尿液中成分及相应的代谢产物进行鉴别和确认,进而探索防风可能的药效成分及其体内代谢过程,为进一步的药效物质研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器设备 安捷伦1200型液相色谱仪,包括在线脱气机、二元泵、高性能自动进样器(USA, Agilent);安捷伦G6220A飞行时间质谱仪,配有标准电喷雾离子源(ESI, Agilent USA), Qualitative analysis 质谱分析软件。

1.2 试验试剂 甲醇(Fisher, USA)和甲酸(Tedia, USA)为色谱纯。所有分析用水均使用超纯水。其他的化学试剂均为分析纯(Sinophar Chemical Reagent Co. Ltd)。所有的溶剂和样品在进入高效液相色谱之前均经过0.22 μm纤维滤膜滤过。

1.3 试验药材 防风药材产自黑龙江,购自上海德康大药房,经第二军医大学药学院生药学教研室孙连娜副教授鉴定为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 的干燥根。

1.4 色谱条件 色谱柱为Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm id),采用甲醇(A)-水(含0.1%的甲酸,B)流动相体系,梯度洗脱程序为:0~5 min, 5%~40% B; 5~13 min, 40%~60% B; 13~23 min, 60%~85% B; 23~33 min, 85%~100% B,分析时间40 min。柱温25℃,流速为1 ml/min,柱后分流比为1:3。

1.5 质谱条件 采用电喷雾正离子模式;质量扫描范围为m/z 110~1 000;毛细管电压4 000 V;雾化气压力30 psi(1 psi=6 894.8 Pa);干燥气流速10 L/min;干燥气温度350℃;碎片电压180 V。选择参比校准液做实时质量数校正。实验数据采用Qualitative Analysis软件处理。测定样品之前,使用调谐液校准质量轴,以保证质量精度误差小于 2×10^{-6} 。

1.6 样品的采集与制备 SD雄性大鼠12只,体质量均为240 g左右,禁食12 h。其中6只实验前先经眼眶静脉取血0.5 ml(空白对照血),然后灌胃防风水煎液4 ml(含升麻苷6.56 mg,升麻素3.612 mg,5-O-甲基维斯阿米醇苷7 mg)。30 min、1、2、4 h时再次经眼眶静脉取血0.5 ml。2 800×g离心10 min后,分离血清,置-40℃冰箱保存。另6只SD大鼠禁食12 h后取尿液10 ml(空白对照尿液),然后灌

胃相同防风水煎液,收集灌胃后10 h的尿液。尿液稀释5倍后离心(2 800×g, 10 min),取上清,置-40℃冰箱保存。

1.7 体内样品前处理 (1)血浆样品处理:加300 μl乙腈至100 μl血样中,涡旋3 min,于10 400×g高速离心5 min,取上清,混合不同时间点血样上清,氮气吹干(35℃),然后复溶于100 μl甲醇,10 400×g高速离心3 min,取上清20 μl,进样分析。(2)尿液样品处理:尿样置室温解冻后用纯水稀释1倍,10 400×g高速离心5 min,取上清液20 μl,进样分析。

1.8 防风入血成分的鉴别 由RRLC-TOF/MS得到大鼠空白血浆和灌胃给药后的血浆样品总离子流图谱(total ion chromatograms, TIC),比较空白和给药后血浆图谱,结合已建立的防风化学成分数据库,分析差异峰。根据正离子模式质谱图上得到的[M+H]⁺、[M+Na]⁺、[M+K]⁺和[2M+Na]⁺的准分子离子峰,确定被测物质的精确相对分子质量,应用Qualitative Analysis质谱分析软件计算可能的分子组成(误差 $<5\times 10^{-6}$),与防风化学成分进行匹配,并将分子式的理论同位素分布与实测值比对。

1.9 防风尿液中成分及代谢产物的鉴别 尿液中防风原型成分的寻找,同1.8项下防风入血成分的鉴别方法。根据防风化学成分结构的特点(如活性官能团的存在),推测其在体内可能发生的代谢反应,如Ⅱ相代谢反应,与葡萄糖醛酸的结合;以及可能发生的水解、氧化、还原等代谢反应。对比灌胃给药尿样与空白尿样的差异峰,将TOF/MS找到的未知峰化合物与防风主要成分可能产生的代谢产物分子式相匹配,找到主要代谢产物,推测出防风成分在体内的主要代谢反应。

2 结果

2.1 血浆中防风的成分 图1A为大鼠空白血浆总离子流图谱,图1B为大鼠灌胃防风水煎液后血浆总离子流图谱。对比两图,按1.8项下方法,共鉴别出6个防风入血成分,见表1。如图1B所示,防风的主要入血成分是升麻素(cimifugin)和5-O-甲基维斯阿米醇(5-O-methylvisamminol),尤其是升麻素在血浆中含量极高。

2.2 尿液中原型成分及相关代谢产物 图2A为大鼠空白尿样总离子流图谱,图2B为大鼠灌胃防风水煎液后尿样总离子流图谱。共鉴别出8个尿液中的防风原型成分,由图2B可见尿液中升麻素的含量极高,其为防风成分在大鼠体内的主要代谢形式。根据防风尿液中成分的结构特征,及药物在体内主要

发生的代谢反应,发现防风在大鼠尿液中的2个主要代谢产物:1'为升麻素的葡萄糖醛酸苷,推测其由升麻素经II相代谢反应葡萄糖醛酸化反应而得,其与升麻苷(prim-O-glucosylcimifugin),divaricataacid处同一色谱峰中,为基峰,占峰丰度的72.33%,升麻

苷和divaricataacid分别占5.01%和12.33%。峰2'为升麻素的同分异构体,紧靠升麻素峰之后,推测其可能是由升麻素的葡萄糖醛酸苷去葡萄糖醛酸化引起的苷元重构所生成。尿液中鉴别的原型成分和代谢产物列于表2。

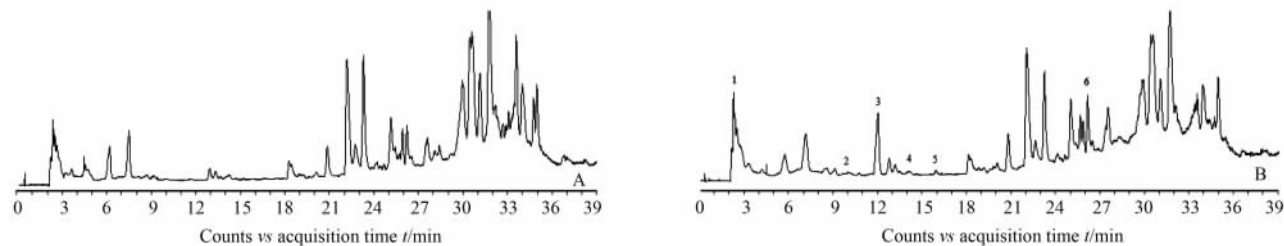


图1 大鼠血浆的RRLC-TOF/MS ESI⁺总离子流图谱

Fig 1 RRLC-TOF/MS ESI⁺ TIC of rat plasma

Blank sample of rat plasma(A) and plasma sample of rat given *Radix saposhnikoviae* (B). 1: Sucrose; 2: Prim-O-glucosylcimifugin; 3: Cimifugin; 4: Nodakenetin; 5: 5-O-methylvisamminol; 6: 3'-O-i-butyrylhammaudol

表1 防风入血成分

Tab 1 Constituents of *Radix saposhnikoviae* in rat plasma

No.	RT t/min	Compound	Formular	Mr	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
1	2.430	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.116 2	343.124 0	365.116 2
2	10.007	Prim-O-glucosylcimifugin	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	468.163 2	469.171 0	491.163 2
3	12.037	Cimifugin	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	306.110 3	307.118 2	329.110 3
4	14.099	Nodakenetin	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	246.089 2	247.097 0	269.089 2
5	15.954	5-O-methylvisamminol	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	290.115 4	291.123 2	313.115 4
6	26.184	3'-O-i-butyrylhammaudol	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346.141 6	347.149 5	369.141 6

RT: Retention time

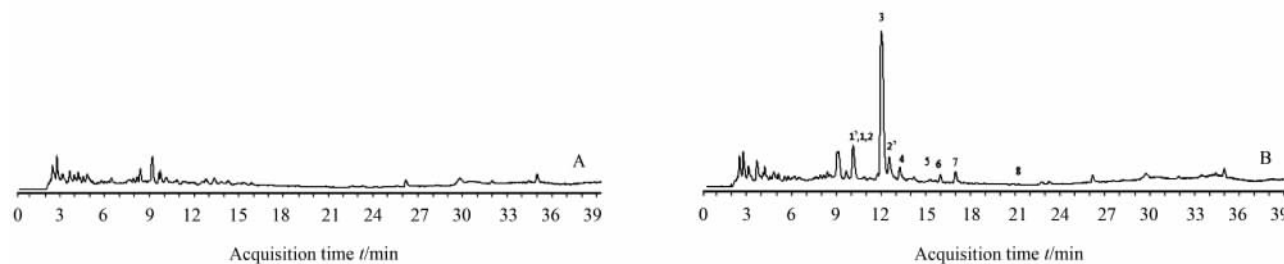


图2 大鼠尿样的RRLC-TOF/MS ESI⁺总离子流图谱

Fig 2 RRLC-TOF/MS ESI⁺ total ion chromatogram of rat urine

A: Blank sample of rat urine; B: urine sample of rat given *Radix saposhnikoviae*. 1: Prim-O-glucosylcimifugin; 2: Divaricataacid; 3: Cimifugin; 4: 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisamminol; 5: (3S)-2,2-dimethyl-3,5-dihydroxy-8-hydroxymethyl-3,4-dihydro-2H,6H-Benzo-[1,2-b;5,4-b']dipyrano-6-one; 6: 5-O-methylvisamminol; 7: Sec-O-β-D-glucosylhammaudol; 8: Wogonin; 1': Glucuronide of cimifugin; 2': An isomer of cimifugin

3 讨论

3.1 样品的采集 药物在体内的吸收与代谢是一个动态变化过程,因而不同时间点血浆与尿液中的成分及其含量各自存在差异。为充分了解血浆与尿液中出现的防风相关成分,不遗失较后时间点出现的代谢物,采集了不同时间点的样品。分别取30

min、1、2、4 h时间点的血样,然后混合进样。尿液连续收集10 h,亦在于充分收集所有代谢产物,并得以观察药物代谢成分的总排出量。

3.2 实验条件的优化 为了使防风中成分得到良好分离,建立快速简便的分析方法,分析条件的优化甚为重要。在方法建立的过程中,比较了3种色谱柱:Zorbax Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm

id), Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm id), Zorbax SB-C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 3.5 μm id), 考虑保留时间和分离效果, 最终选择了 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱作为分析柱。在流动相水中加入甲酸后质谱响应较好, 考察了 0.05%、0.1%、

0.2% 甲酸水溶液后发现 0.1% 甲酸水溶液比 0.05% 的甲酸水溶液响应强度高, 而 0.1%、0.2% 甲酸水溶液则没有明显不同, 所以在流动相水中加入了 0.1% 的甲酸。在正离子模式下的响应要高于负离子模式, 所以选择在正离子模式下检测。

表 2 防风入尿成分与代谢产物

Tab 2 Constituents of *Radix saposhnikovia* and metabolites in rat urine

No.	RT t/min	Compound	Formular	Mr	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
1	10.12	Prim-O-glucosylcimifugin	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	468.163 2	469.171 0	491.163 2
2	10.262	Divaricatacid	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	320.089 6	321.097 4	343.089 6
3	12.037	Cimifugin	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	306.110 3	307.118 2	329.110 3
4	13.252	4'-O-glucosyl-5-O-methylvisamminol	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	452.168 2	453.176 1	475.168 2
5	15.346	(3S)-2,2-dimethyl-3,5-dihydroxy-8-hydroxymethyl-3,4-dihydro-2H,6H-benzo-[1,2-b:5,4-b']dipyran-6-one	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	292.094 7	293.102 5	315.094 7
6	15.99	5-O-methylvisamminol	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	290.115 4	291.123 2	313.115 4
7	17	Sec-O-β-D-glucosylhamaudol	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	438.152 6	439.160 4	461.152 6
8	21.212	Wogonin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.068 5	285.076 3	307.068 5
1'	10.142	Cimifugin+glucuronate-H ₂ O	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂	482.145 4	483.153 2	505.145 4
2'	12.57	Isomer of cimifugin	C ₁₆ H ₁₈ H ₆	306.108 4	307.116 2	329.108 4

RT: Retention time

3.3 防风体内代谢分析 防风的主要入血成分为升麻素, 而药材中含量最高的升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷入血量极微, 根据化合物结构分析, 推测升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷主要转化为升麻素(苷元)吸收入血。因而单以升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷为检测标准的体外药材质控方法不够合理完善, 药材中升麻素的含量亦十分重要。尿液中的主要成分是升麻素及其葡萄糖醛酸苷, 说明升麻素为防风主要代谢形式, 且主要经过肝脏代谢, 防风药效成分可能为升麻素, 或其经肝脏代谢的产物。升麻素同分异构体的存在及其相关药代动力学研究^[10]说明其可能存在肝肠循环。防风主要成分的体内代谢过程可进一步通过水解尿液中的 II 相代谢产物及相关药效学实验得以证实。本文实验通过检测防风中化学成分在体液中的存在形式及含量情况, 为进一步的药动学实验及药效学实验提供参考和事实依据。

[参考文献]

- [1] 张宝娣, 万山红. 防风的化学成分与药理研究近况[J]. 中医药信息, 2003, 20: 23.
 [2] 王成章, 张崇禧. 防风国内外研究进展[J]. 人参研究, 2008, 1: 35-41.

- [3] Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, Fujimoto H, Ishibashi M, Yamazaki M. Analgesic components of saposhnikovia root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49: 154-160.
 [4] 薛宝云, 李文, 李丽, 肖永庆. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 25: 297-299.
 [5] 李文, 李丽, 是元艳, 殷小杰, 肖永庆. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12: 29-31.
 [6] 黎建斌, 刘丽萍, 丘振文. 防风挥发油抗炎止血作用的药理研究[J]. 新中医, 2007, 39: 105-106.
 [7] 姜艳艳, 刘斌, 石任兵, 涂光忠. 防风化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学报, 2007, 42, 5: 505-510.
 [8] 王松柏, 秦雪梅, 刘焕蓉, 郭小青, 张丽增. 防风多糖化学成分的研究[J]. 化学研究, 2008, 19: 66-68.
 [9] Kang J, Sun J H, Zhou L, Ye M, Han J, Wang B R, et al. Characterization of compounds from the roots of *Saposhnikovia divaricata* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 1899-1911.
 [10] Wang X J, Wang Z H, Sun H, Lv H T, Guan H Y, Meng X C, et al. Pharmacokinetics of cimifugin in rat plasma after oral administration of the extract of *Saposhnikovia divaricatae* root [J]. Arzneimittel-Forschung (Drug Research) 2008, 58: 445-450.

[本文编辑] 尹 茶