

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01104

· 论 著 ·

## 快速液相-高分辨飞行时间质谱技术鉴别大鼠血中淫羊藿及其代谢产物

吕磊, 赵亮, 张海, 李悦悦, 张国庆\*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 运用快速液相-高分辨飞行时间质谱(RRLC-TOF/MS)技术鉴别淫羊藿大鼠给药后的入血成分及代谢产物,以探索淫羊藿可能的药效成分及体内代谢过程。**方法** 色谱分离采用 SHISEIDO MG C<sub>18</sub> (3.0 mm×100 mm, 3 μm) 色谱柱;流动相为乙腈(A相)和 0.1%甲酸水溶液(B相),梯度洗脱:0~3 min(5%~19% A), 3~13 min(19%~32% A), 13~25 min(32%~52% A), 25~30 min(52%~70% A);柱温 25℃;流速 0.6 mL/min,柱后分流比为 3:1。质谱定性采用飞行时间质谱,电喷雾离子源(ESI),正离子模式,质量数扫描范围 m/z 100~1 000。**结果** 鉴别出淫羊藿中 3 种入血成分及 4 种代谢物。**结论** 所建方法快捷、有效,可用于淫羊藿体内成分鉴别,为进一步的药效试验提供了参考和依据。

**[关键词]** 淫羊藿;入血成分;代谢产物;飞行时间质谱**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1104-04

### RRLC-TOF/MS in identification of plasma constituents and metabolites of epimedium in rats after intragastric administration

LÜ Lei, ZHAO Liang, ZHANG Hai, LI Yue-yue, ZHANG Guo-qing\*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To identify the constituents and metabolites of epimedium in rat plasma by rapid-resolution liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (RRLC-TOF/MS) after intragastric administration, so as to explore the active ingredients and metabolites of epimedium *in vivo*. **Methods** The separation was performed on a SHISEIDO MG C<sub>18</sub> reverse phase column (3.0 mm×100 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid and acetonitrile was used as gradient elute. The flow rate was 0.6 mL/min, post-column split ratio was 3:1, and the temperature of column was 25℃. Time-of-flight mass spectrometer(TOF/MS) and electrospray ion source (ESI) were applied for qualitative analysis under positive ion mode, with the mass scan range being m/z 100-1 000. **Results** Three prototype constituents and 4 metabolites of epimedium were identified in rat plasma. **Conclusion** A rapid and efficient RRLC-TOF/MS method has been established for studying the constituents and metabolites of epimedium *in vivo*, which provides a reference for further pharmacodynamics experiments.

**[Key words]** *Epimedium brevicornum*; prototype constituents; metabolites; time of flight/mass spectrometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10):1104-1107]

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornum* Maxim.)的干燥地上部分,是我国传统的补益中药,在中医上常用于补肾阳,强筋骨,祛风湿<sup>[1]</sup>。迄今为止,已从淫羊藿中分离出来各种化学成分 100 种以上,其主要活性成分为黄酮类,以淫羊藿苷、朝霍定 A、朝霍定 B、朝霍定 C、淫羊藿次苷 II 为主<sup>[2-4]</sup>。近年来对于淫羊藿的体内分析以淫羊藿苷的药动学研究居多<sup>[5-6]</sup>,而对其药材入血成分及代谢物鉴别的

报道较少。血清药物化学研究表明<sup>[7]</sup>,药材中所含各种化学成分只有入血后才会产生相应的药理作用,因此,明确淫羊藿的入血成分及体内代谢对于体内药效研究具有重要意义。本研究在课题组前期采用飞行时间质谱(time of flight/mass spectrometry, TOF/MS)技术对淫羊藿体外 43 种化学成分鉴别的基础上<sup>[8]</sup>,对其入血成分及相应的代谢产物进行了进一步的鉴别和确认。

[收稿日期] 2013-06-05

[接受日期] 2013-07-01

[作者简介] 吕磊, 硕士, 主管药师. E-mail: k\_owen2002@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing\_zhang91@126.com

## 1 仪器、试剂和方法

1.1 仪器 Agilent 1200 系列快速液相色谱仪(美国安捷伦公司),配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器;Agilent 6220 高分辨飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司),配有标准电喷雾离子源(ESI),分析软件为 MassHunter 在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件。DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司);JY10001 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);KUDOS-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司);R-201 旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司);高速离心机(Abbott, USA);N-EVAP 型氮吹仪(Organomation Associates, USA)。

1.2 试剂 淫羊藿药材产自湖北,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黄宝康副教授鉴定为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornum* Maxim.)的干燥地上部分。乙腈和甲酸为色谱纯(Fisher, USA),乙醇为分析纯,水为纯水。

1.3 淫羊藿提取物的制备 称取淫羊藿药材粉末 50 g(过 40 目筛),置于 1 000 mL 烧杯中,加入 70% 乙醇 500 mL,用玻棒混匀,封口膜封好,放置过夜。次日将其超声 1 h,过滤掉药渣,得滤液。将滤液放置水浴加热,浓缩至 200 mL,加入 3 倍体积的无水乙醇,4℃ 放置过夜。次日过滤掉多糖等成分,于 50℃ 减压回收溶剂,大约得 25 mL 的提取物浓缩液,浓度相当于原药材约 2.0 g/mL。

1.4 体内样品的采集 6 只 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量(200±20) g,雄性,由第二军医大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(沪)2011-0003,受试前禁食 12 h,全程不禁水。灌胃前眼眶取血,收集空白血样 1 mL,然后灌胃给药淫羊藿提取液,每 100 g 体质量给药 2 mL,眼眶取血收集给药后 30、60 和 120 min 的血样各 1 mL,1 075×g 离心 5 min,分离血浆,置-40℃ 冰箱保存。

1.5 体内样品前处理 取血浆样品 200 μL,加入乙腈 400 μL,涡旋 30 s,7 830×g 离心 10 min。吸取 400 μL 上清液于 30℃ 水浴中 N<sub>2</sub> 流吹干,残渣加 100 μL 甲醇复溶,离心,取上清液 5 μL 进样分析。

1.6 色谱条件 色谱柱:SHISEIDO MG C<sub>18</sub> (3.0 mm×100 mm, 3 μm),保护柱 Agilent XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm×12.5 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A相)

和 0.1% 甲酸溶液(B相),梯度洗脱,A 相比比例随时间的变化:5%~19%(0~3 min);19%~32%(3~13 min);32%~52%(13~25 min);52%~70%(25~30 min)。进样量:5 μL。流速:0.6 mL/min。柱温 25℃。运行时间 30 min。柱后分流比为 3:1。

1.7 质谱条件 采用 ESI 源,正离子模式,雾化气为高纯氮气。具体质谱参数:毛细管电压 4 000 V,干燥气温度 350℃,干燥气流速 9 L/min,雾化气压力 35 psi (1 psi=6 894.8 Pa),碎片电压为 180~300 V;参比离子 m/z 121.050 8、m/z 922.009 7;质量数扫描范围 m/z 100~1 000。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 1×10<sup>-6</sup>。

## 2 实验结果

2.1 淫羊藿入血成分的基峰图(base peak chromatograms, BPC) 合并每只大鼠 30、60、120 min 的血样,按前述体内样品前处理条件处理,并按前述色谱及质谱实验条件进样,得血浆样品总离子流图(total ion chromatograms, TIC),由于本底较高,图谱均采用扣除本底和滤噪处理,见图 1。

2.2 淫羊藿原型成分及代谢产物的鉴别 比较空白血浆样品、给药后血浆样品及淫羊藿提取物体外鉴别的 TOF/MS 图谱,通过提取离子流图(extract ion chromatograms, EIC)分析差异峰,在淫羊藿给药后血浆样品中找到 7 个有鉴别意义的峰。通过图 1B 中色谱峰的 [M+H]<sup>+</sup>、[M+Na]<sup>+</sup> 等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 软件计算可能的分子组成(误差<5×10<sup>-6</sup>),结合核素分布情况与淫羊藿已知化学成分进行匹配,所得结果对比体外样品的鉴别结果<sup>[8]</sup>,确定其中 3 个峰(峰 1、5、7)为原型成分。对于其他 4 个可能的潜在代谢产物(峰 2、3、4、6),根据淫羊藿化学成分结构的特点(活性官能团),推测其在体内可能发生的代谢反应(Ⅱ相结合反应为主),通过质谱图中准分子离子峰在调节碎裂电压(300 V)后得到的碎片离子,以及淫羊藿化学成分的裂解规律推测这 4 个代谢产物为原成分的Ⅱ相代谢葡萄糖醛酸化的产物(质量数差值 176)。淫羊藿大鼠血浆代谢产物的质谱数据见图 2。7 种淫羊藿大鼠血浆入血成分及代谢产物的鉴别结果见表 1。

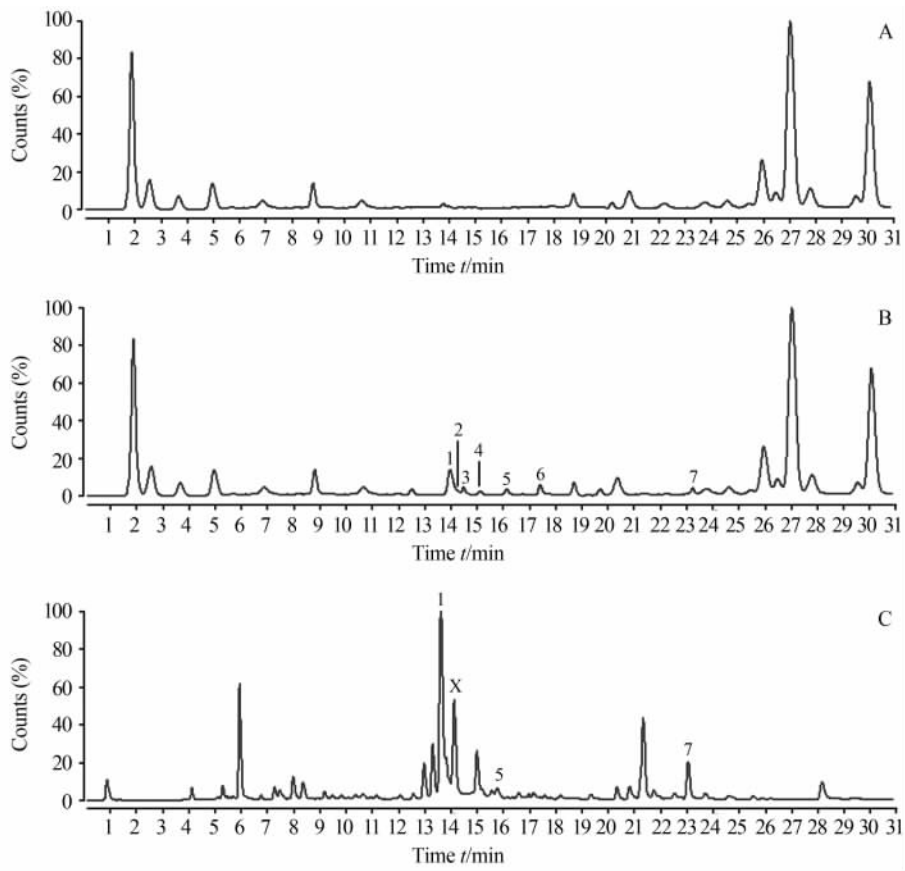


图 1 淫羊藿体内体外的 RRLC-TOF/MS 基峰图

Fig 1 RRLC-TOF/MS base peak chromatogram of blank sample of rat plasma (A),

plasma of rat given *Epimedium brevicornum* Maxim. (B), extract of *Epimedium brevicornum* Maxim. (C)

RRLC-TOF/MS; rapid-resolution liquid chromatography-time of flight/mass spectrometry. 1: Epimedin C; 2: Epimedin C (7-glycuronic acid); 3: Epimedin B (7-glycuronic acid); 4: Icariin (7-glycuronic acid); 5: Icariside I; 6: Epimedin A (7-glycuronic acid); 7: Icariside II; X: Icariin

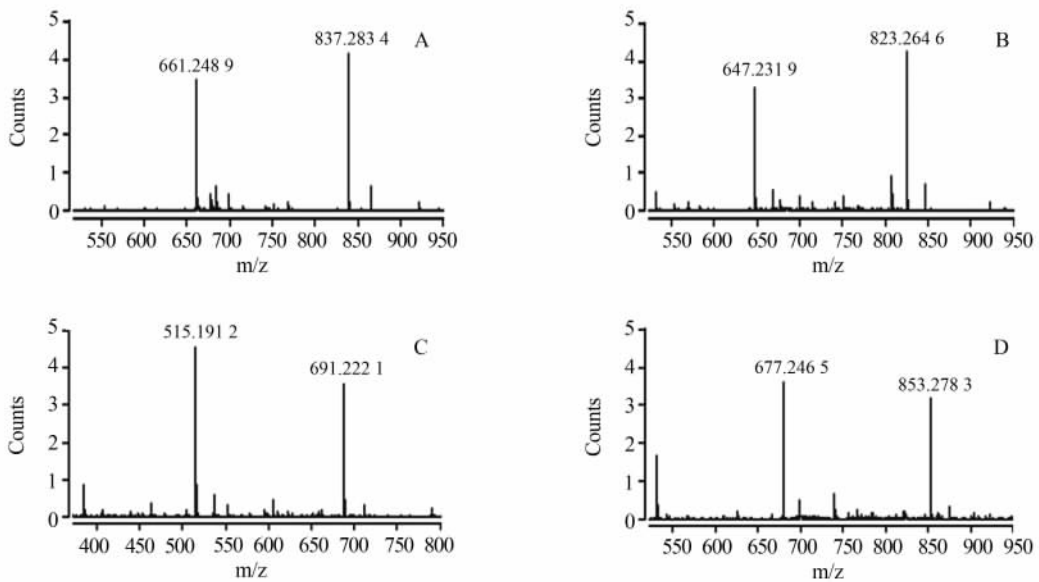


图 2 淫羊藿大鼠血浆代谢产物的质谱图

Fig 2 Mass spectra of potential metabolites of epimedium of dosed rat plasma

A: Epimedin C (7-glycuronic acid); B: Epimedin B (7-glycuronic acid); C: Icariin (7-glycuronic acid); D: Epimedin A (7-glycuronic acid)

表 1 淫羊藿入血成分与代谢产物鉴别结果

Tab 1 Prototypic constituents and metabolites of epimedium in rat plasma

Retention time <i>t</i> /min	Compound	Formular	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	Comment
13.91	Epimedin C	C <sub>35</sub> H <sub>50</sub> O <sub>19</sub>	823.303 1	845.285 5	Prototype
14.17	Epimedin C(7-glycuronic acid)	C <sub>39</sub> H <sub>48</sub> O <sub>20</sub>	837.283 4	859.265 1	Metabolite
14.38	Epimedin B(7-glycuronic acid)	C <sub>38</sub> H <sub>46</sub> O <sub>20</sub>	823.264 6	857.246 8	Metabolite
15.09	Icariin(7-glycuronic acid)	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	691.222 1	713.204 5	Metabolite
16.13	Icariside I	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	531.187 3	553.167 4	Prototype
17.32	Epimedin A(7-glycuronic acid)	C <sub>39</sub> H <sub>48</sub> O <sub>21</sub>	853.278 3	875.259 5	Metabolite
23.25	Icariside II	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	515.192 1	537.173 3	Prototype

### 3 讨论

3.1 实验条件的优化 淫羊藿提取物的制备采用了醇沉去多糖的方法,以最大化地对提取物进行浓缩。在采血点的设计上,考虑到药物在体内的吸收与代谢是一个动态变化过程,不同时间点血浆中的成分及其含量存在差异,为不遗失各时间点出现的原型成分及代谢物,分别采集了 30、60 和 120 min 三个时间点的血样,再混合后进样。在样品前处理的考察中,为了尽量减少血浆中内源性物质的干扰,获取更多的入血成分信息,对血浆样品预处理方法进行优化。结果发现液-液萃取虽然去除内源性物质的能力较强,但是淫羊藿中的主要成分在 TOF/MS 上不能得到较好的响应,不利于后续的分析;而蛋白沉淀的方法虽然不能完全去除内源性成分对分析的影响,但是主要的化合物能够得到较好的离子响应,所以最终确定了前述的血浆样品处理方法。

3.2 淫羊藿体内代谢分析 淫羊藿提取物大鼠灌胃给药后血浆样品中找到 7 个峰,相比于体外 43 种成分的鉴别结果,可推断大部分黄酮类成分入血后迅速代谢,无法找到原型成分。其中找到的 3 个原型成分分别是 epimedin C、icariside I 和 icariside II。其中 epimedin C 在药材中含量本来就非常高,而体外指标成分 icariin(图 1C,峰 X)却未在血中检测到,由此推测另外 2 个具有相同母核的入血成分 icariside I 和 icariside II 可能部分为 icariin 经体内代谢 3 位和 7 位脱糖的产物,而非全部来自药材中含的原型成分。其他 4 个潜在的代谢产物,根据质谱裂解规律和文献报道<sup>[3-4]</sup>,推测均为原型成分 7 位的葡萄糖醛酸化产物。由此看来,淫羊藿中的主要黄酮类成分入血后容易发生 7 位的脱糖及葡萄糖醛酸化,原型成分难以检测到。

本研究在淫羊藿化学成分体外鉴别的基础上,

应用 RRLC-TOF/MS 联用技术对淫羊藿的入血成分及代谢产物进行鉴别和确认,以探索其可能的药效成分及体内代谢过程,共找到 3 个人血成分和 4 个代谢产物。本研究为淫羊藿药材药效物质的筛选提供了参考和依据。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:229.
- [2] 孟 宁,孔 凯,李师翁. 淫羊藿属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 西北植物学报,2010,30:1063-1073.
- [3] Wang G J, Tsai T H, Lin L C. Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum*[J]. Phytochemistry,2007,68:2455-2464.
- [4] Zhao H Y, Sun J H, Fan M X, Fan L, Zhou L, Li Z, et al. Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A,2008,1190:157-181.
- [5] 孟繁华,郭继芬,李全胜,司端运,赵毅民. 液相色谱-串联质谱法测定比格犬血浆中淫羊藿苷元[J]. 中国新药杂志,2010,19:537-540.
- [6] 刘海培,孟繁华,郭继芬,司端运,朱晓薇,赵毅民. 淫羊藿素在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药理学杂志,2010,45:539-543.
- [7] 常存库,王喜军. 中药血清药物化学理论与方法的意义[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2010,12:634-637.
- [8] 吕 磊,张 海,赵 亮,贾 静,李悦悦,张国庆. RRLC-TOF/MS 快速鉴别中药淫羊藿中 43 种化学成分[J]. 第二军医大学学报,2011,32:306-310.  
Lǚ L, Zhang H, Zhao L, Jia J, Li Y Y, Zhang G Q. RRLC-TOF/MS in rapid identification of 43 chemical constituents of epimedium[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2011,32:306-310.

[本文编辑] 尹 茶