

· 化学与分析 ·

# LC-MS-MS 分析白藜芦醇在大鼠胆汁和尿液中的代谢产物

黄慧莲<sup>1\*</sup>, 姚舜<sup>2</sup>, 黄小英<sup>1</sup>, 梁永红<sup>1</sup>, 邵峰<sup>1</sup>, 任刚<sup>1</sup>, 刘荣华<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 四川大学化学工程学院, 成都 610065)

**[摘要]** 目的: 研究白藜芦醇的体内代谢产物。方法: 采用液质联用法, 通过分析原型化合物及代谢产物的液相分析保留时间、二级质谱裂解数据以及紫外吸收光谱, 推测单次给药白藜芦醇后的代谢产物。色谱条件: Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Zorbax SB-C<sub>18</sub> 保护柱 (4 mm × 20 mm, 5 μm), 流动相 (A) 乙腈-(B) 水梯度洗脱: 0 ~ 20 min, 3% ~ 18% A, 20 ~ 40 min, 18% ~ 35% A, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 320 nm, 柱温 30 °C。质谱条件 Finnigan Surveyor<sup>TM</sup> HPLC-Finnigan TSQ, ESI 源, Xcalibur 1.2 数据软件 LCQ 数据处理软件, ESI 离子源, 负离子扫描模式扫描范围 *m/z* 100 ~ 800, 鞘气流 15 arb, 辅助气流 15 unit, 喷雾电压 4 000 V, 毛细管温度 300 °C。结果: 推测了大鼠尿液和胆汁中 5 个代谢产物的相对分子质量、保留时间、紫外最大吸收波长、二级质谱裂解规律及化学结构。结论: 在尿液排泄中以硫酸酯化为主要的代谢途径, 而在胆汁排泄中以葡萄糖醛酸化为主要的代谢方式。

**[关键词]** 白藜芦醇; 代谢产物; 液相色谱-串联质谱; 胆汁; 尿液

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0056-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140056

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1337.016.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-28 13:37

## Identification of Metabolites of Resveratrol in Rat Urine and Bile Using LC-MS-MS

HUANG Hui-lian<sup>1\*</sup>, YAO Shun<sup>2</sup>, HUANG Xiao-ying<sup>1</sup>, LIANG Yong-hong<sup>1</sup>, SHAO Feng<sup>1</sup>, REN Gang<sup>1</sup>, LIU Rong-hua<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**[Abstract]** **Objective:** Identified the metabolites of resveratrol *in vivo*. **Method:** A method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) analysis was established for the identification of metabolites of resveratrol. The rat urine and bile samples were pretreated by solid-phase extraction (SPE) method after oral administration at a dose of 100 mg·kg<sup>-1</sup> of resveratrol. **Result:** Five metabolites were identified on their MS fragmentation behaviors by LC-MS-MS method with electrospray ionization (ESI) in negative ion mode. **Conclusion:** The results indicated the method could be used to rapid screen and identify the conceivable structures of active components responsible for pharmacological effects of resveratrol.

**[Key words]** resveratrol; metabolites; LC-MS-MS; bile; urine

白藜芦醇(resveratrol)是存在于菝葜、葡萄、虎杖等多种药用和食用植物中的一种多酚类化合物。现代药理研究表明,白藜芦醇具有抗菌、抗氧化、清除自由基、预防肿瘤、保护心血管、保护肝脏以及抑制花生四烯酸及其代谢物生成等作用<sup>[1-8]</sup>。其抑制癌细胞、降低血脂、防治心血管疾病、抗氧化、延缓衰老等作用比较明显,被喻为继紫杉醇之后的又一新型绿色抗癌

药物。近年来,欧美各国已将其开发成保健食品上市,剂型有片剂、胶囊、口服液等。最近,国内也出现了一些相关产品,如四川的“天狮活力胶囊”和西安的“紫金胶囊”等。白藜芦醇的药理作用及机制已经有大量的研究文献报道,而其在体内的代谢过程一直鲜有关注<sup>[9-10]</sup>,代谢产物的推测也仅有1篇文献报道<sup>[11]</sup>。

本文采用固相萃取的方法提取生物样品,用液

**[收稿日期]** 20130717(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160507,81360628);江西省青年科学家培养对象计划项目(20112BCB23012)

**[通讯作者]** \*黄慧莲,博士,副教授,从事中药药效物质基础研究,Tel:0791-87118658,E-mail:huilianh@163.com

相色谱-电喷雾质谱法对大鼠灌胃白藜芦醇后的尿液和胆汁样品进行分析,通过分析原型化合物及代谢产物液相保留时间、二级质谱裂解数据以及紫外吸收光谱,共推测了 5 个代谢产物的结构。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 乙腈为色谱纯(Burdick & Jackson, Honeywell International Inc., USA),甲醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),纯净水由 Millipore Simplicity 纯水制备系统制备,固相萃取小柱(Alltech 公司,  $C_{18}$   $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),芪类化合物白藜芦醇由作者从菝葜中分离得到,经 HPLC 分析其纯度  $>98\%$ 。

**1.2 动物** Sprague-Dawley 大鼠,雌性,体重  $(200 \pm 20)\text{ g}$ ,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物合格证号 SCXK(沪)2008-0005。实验前禁食 16 h,自由饮水。

**1.3 样品准备** 精密称取白藜芦醇,用生理盐水配制成  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,供灌胃给药用。SD 大鼠正常饲养 3 d 后,禁食 16 h,以  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量单次灌胃白藜芦醇溶液,灌胃后置于代谢笼中收集尿液共 12 h。

SD 大鼠,实验前禁食 16 h,自由饮水。大鼠用 10% 的乌拉坦溶液腹腔麻醉后仰位固定于鼠板上,在剑突下做纵行切口  $2\sim 3\text{ cm}$ ,找到十二指肠上段黏膜的胆管,分离,在胆管远端作一小切口向肝方向插入内径为  $0.8\text{ mm}$  的 PE 管,结扎固定。待胆汁成功流出缝合创口,75% 医用乙醇消毒伤口。待动物清醒后按  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重单次灌胃白藜芦醇溶液,给药后收集胆汁共 12 h。

先用甲醇和水活化固相萃取小柱,然后取  $1\text{ mL}$  尿液或者胆汁样品上小柱,完全吸附后用  $4\text{ mL}$  水洗去大极性杂质,最后用  $2\text{ mL}$  甲醇将目标成分洗脱,洗脱液用氮气吹干,残渣溶解于甲醇中, $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,滤液用于液质分析。

**1.4 色谱条件** 1100 高效液相色谱仪(Agilent Technologies, Germany),配有四元泵、真空脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器。Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ )(Palo Alto, CA, USA),Zorbax SB-C<sub>18</sub> 保护柱( $4\text{ mm}\times 20\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ )(Palo Alto, CA, USA),流动相(A)乙腈-(B)水梯度洗脱: $0\sim 20\text{ min}, 3\%\sim 18\%\text{ A}, 20\sim 40\text{ min}, 18\%\sim 35\%\text{ A}$ ,流速  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长  $320\text{ nm}$ ,柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 。

**1.5 质谱条件** Finnigan Surveyor™ HPLC (Electron, San Jose, CA)-Finnigan TSQ, ESI 源, Xcalibur 1.2 数据软件, LCQ 数据处理软件(均为

Thermo), ESI 离子源,负离子扫描模式扫描范围  $m/z$   $100\sim 800$ ,鞘气流  $15\text{ arb}$ ,辅助气流  $15\text{ unit}$ ,喷雾电压  $4\text{ }000\text{ V}$ ,毛细管温度  $300\text{ }^\circ\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

**2.1 白藜芦醇的二级质谱分析** 将白藜芦醇甲醇溶液( $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )直接进样,分析其裂解规律。实验中,分别尝试了正离子和负离子扫描模式,结果表明白藜芦醇更适合负离子模式。在负离子模式下扫描,获得了白藜芦醇的准分子离子峰  $m/z$  227,并通过碰撞诱导解离(CID)产生一系列特征碎片离子  $m/z$  185, 159, 143, 119(图 1)。

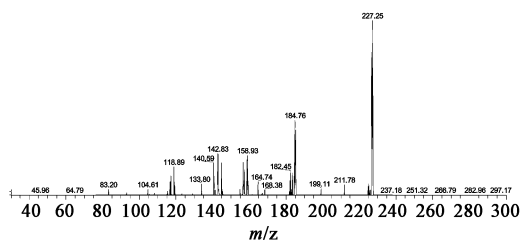
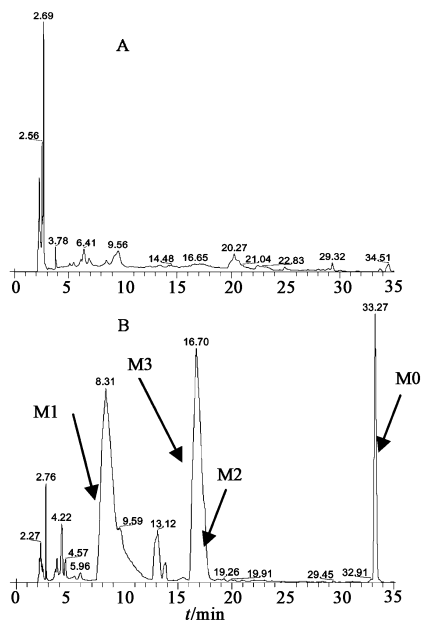


图 1 负离子模式下白藜芦醇的二级质谱

**2.2 白藜芦醇在大鼠尿液中代谢产物的 LC-MS-MS 分析** 将处理后的空白尿液和给药后的尿液样品分别进样分析比较,结果表明内源性物质不干扰测定结果。33.2 min 的峰为原型白藜芦醇(M0),其二级质谱显示具有白藜芦醇的特征碎片。保留时间 8.25, 16.62, 15.22 min 的 3 个峰可能为代谢产物(M1, M2, M3),这 3 个峰的二级质谱都显示具有白藜芦醇的特



A. 空白尿样; B. 给药后尿样; M0. 白藜芦醇; M1 ~ M3. 代谢产物(图 3, 4 同)

图 2 固相萃取样品质谱总离子流

征裂解行为(图 2),另外,这 3 个代谢产物的紫外吸收特征也与氧化白藜芦醇相似(图 3)。

307 Da,高出原型白藜芦醇 80 Da,二级 MS 显示一系列碎片离子  $m/z$  227,185,143 Da,推断其为白藜芦醇的硫酸酯化合物。

代谢产物 M1 的质谱图(图 4),分子离子峰  $m/z$

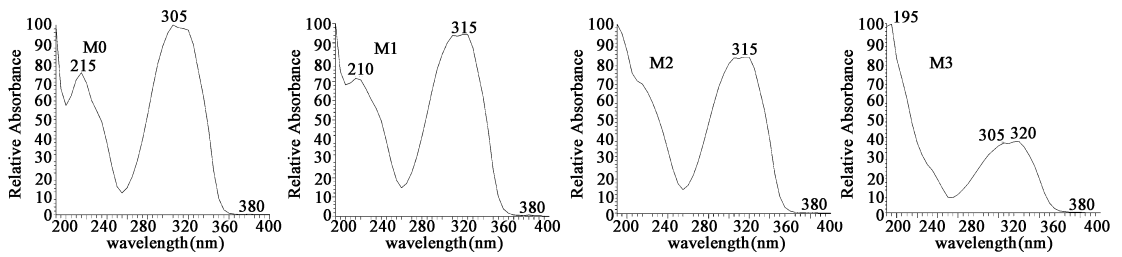


图 3 M0 ~ M3 的紫外吸收

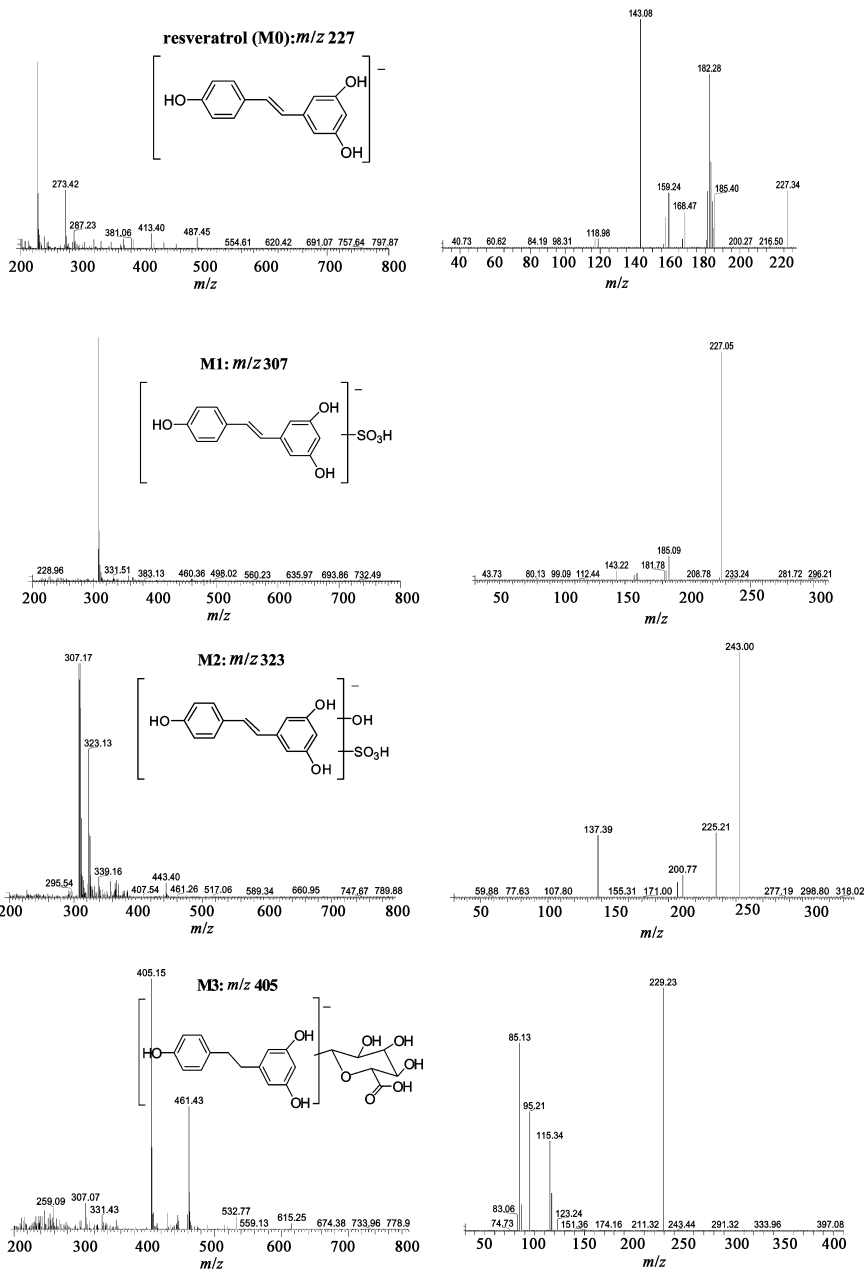
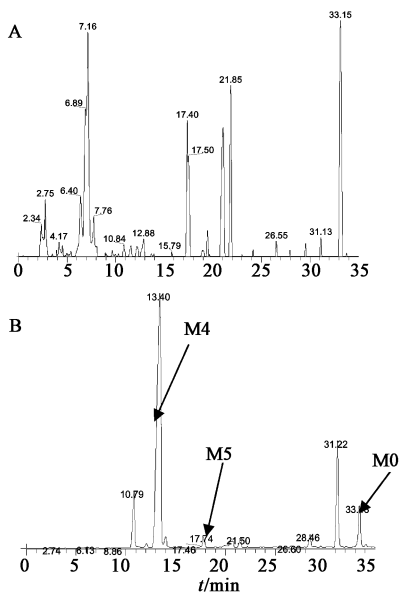


图 4 尿样中白藜芦醇及其代谢产物二级质谱

代谢产物 M2 的分子离子峰  $m/z$  323(图 4),高出代谢物 M1 16 Da,二级 MS 中有丰度很高的分子碎片  $m/z$  243 Da,提示代谢物可能为母核发生羟化反应和硫酸化反应的结果。

代谢产物 M3 的分子离子峰  $m/z$  为 405 Da(图 4),高出原型 178 Da,二级 MS 出现丰度较高的碎片质子  $m/z$  229 Da,推测该代谢物为还原反应和葡萄糖醛酸化反应的结果。

**2.3 白藜芦醇在大鼠胆汁中代谢产物的 LC-MS-MS 分析** 将处理后的空白胆汁和给药后的胆汁样品分别进样分析比较,结果表明内源性物质不干扰测定结果。22.8 min 的峰为原型白藜芦醇(M0),其二级质谱显示具有白藜芦醇的特征碎片。保留时间 13.13,16.89 min 的 2 个峰可能为代谢产物(M4, M5),这 2 个峰的二级质谱都显示具有白藜芦醇的特征裂解行为(图 5),另外,这 2 个代谢产物的紫外吸收特征也与氧化白藜芦醇相似(图 6)。



A. 空白胆汁;B. 给药后胆汁;

M0. 白藜芦醇;M4-M5. 代谢产物(图 6 同)

图 5 固相萃取样品质谱总离子流

代谢产物 M4 的分子离子峰  $m/z$  403 Da,高出原型 176 Da,二级 MS 碎片出现  $m/z$  227 Da,推测该代谢物为葡萄糖醛酸化反应的结果(图 7)。

代谢产物 M5 的分子离子峰  $m/z$ 417 Da,高出代谢物 M4 14 Da,二级 MS 出现白藜芦醇的特征裂解碎片,推测该代谢物为甲基化反应和葡萄糖醛酸化反应共同作用的结果。

综上,大鼠灌胃白藜芦醇单体化合物后,从收集的尿液和胆汁中,用 LC-ESI-MS 分析,推测了 5 个代谢产物,这些化合物的相对分子质量、保留时间、紫

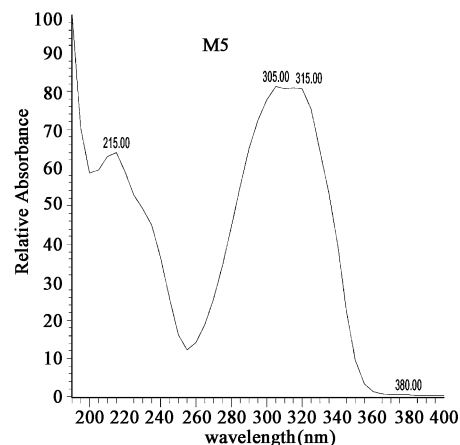
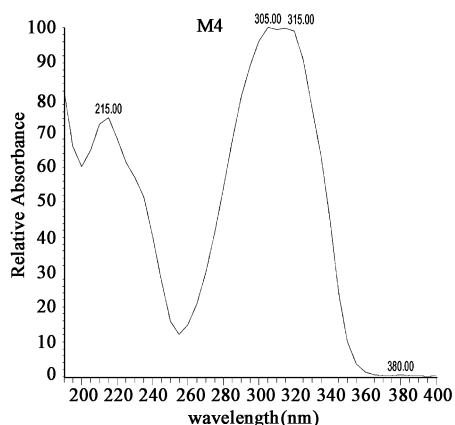


图 6 M4 和 M5 的紫外吸收

外最大吸收波长和二级质谱裂解规律,见表 1。

表 1 白藜芦醇及其代谢产物的色谱和质谱特征

代谢物	相对分子质量	$\lambda_{\max}$ /nm	$t_R$ /min	代谢产生的特征碎片 离子/ $m/z$
M0	227.18	305	33.21	185, 169, 159, 143
M1	307.26	315	8.25	227, 185, 143
M2	323.13	315	16.62	243, 225, 201, 137
M3	405.15	320	15.22	229, 123, 115, 95, 85
M4	403.32	315	13.13	227, 185, 143
M5	477.43	315	16.89	227, 225, 183, 143

### 3 结论

本文选择在大鼠胆管手术后灌胃给药,主要是因为白藜芦醇在大鼠体内代谢很快,如果术前给药胆汁中的代谢产物将很快流出。通过分析原型化合物及代谢产物的液相保留时间、二级质谱裂解数据以及紫外吸收光谱,大鼠给药白藜芦醇后在胆汁和尿液中共推测了 5 个代谢产物的结构。笔者同时还发现,在尿液排泄中以硫酸酯化为主要的代谢途径,而在胆汁排泄中以葡萄糖醛酸化为主的代谢方式(图 8)。

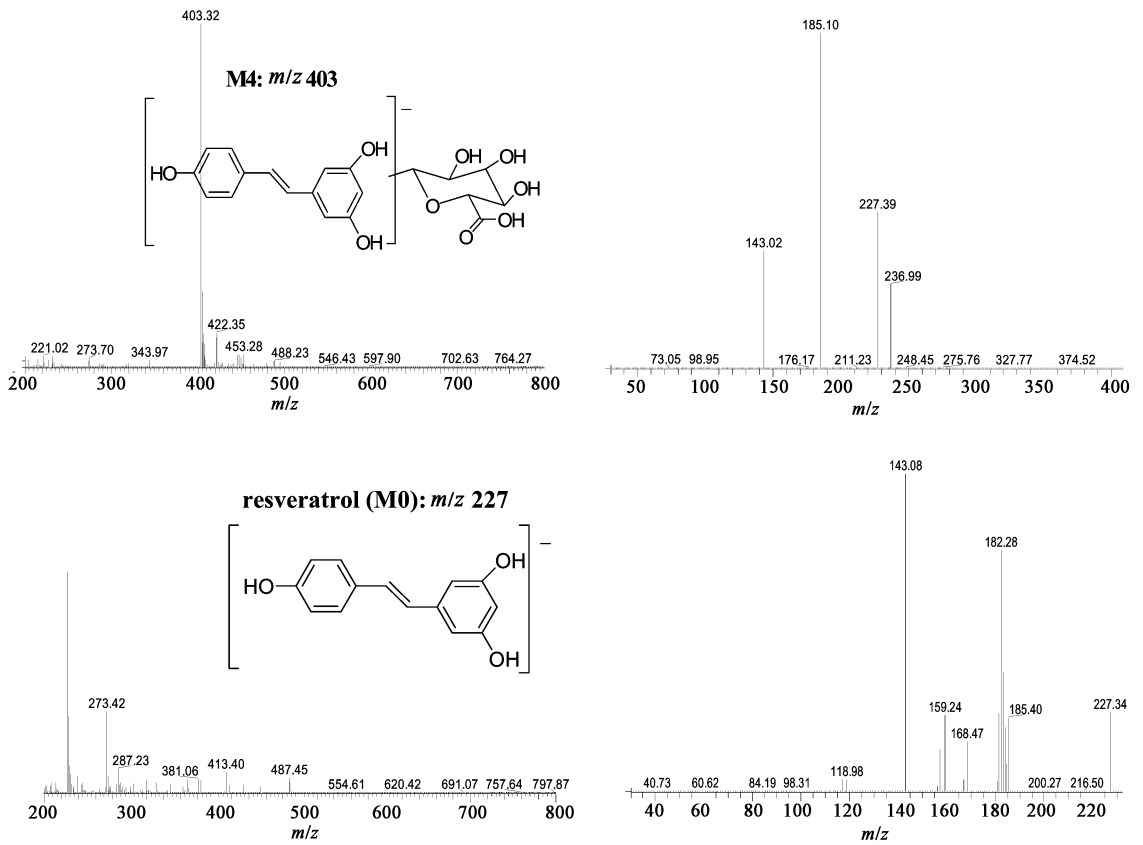


图 7 胆汁中代谢产物二级质谱

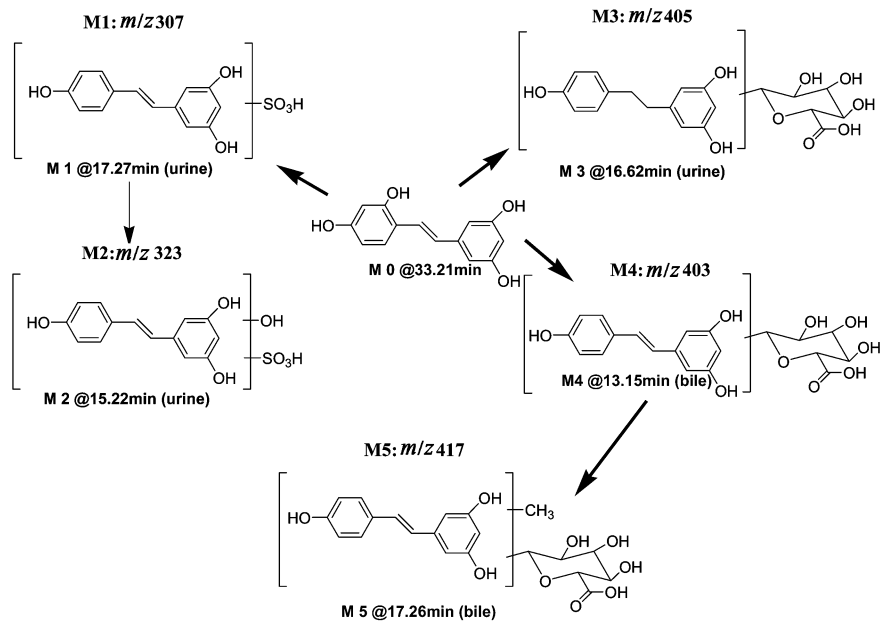


图 8 大鼠给药后尿液及胆汁中可能的代谢途径

[参考文献]

[1] Bertelli A A E, Giovannini L, Bernini W, et al. Antiplatelet activity of cis-resveratrol [J]. *Drugs Exp Clin Res*, 1996, 22(1):61.

[2] Ferrero M E, Bertelli A A, Pellegatta F, et al. Phytoalexin resveratrol (3-4'-5-trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion [J]. *Transplant Proc*, 1998, 30(8):4191.

# 离子色谱法测定维生素 B<sub>1</sub> 注射液中的 EDTA 及硝酸根离子

陈柳生, 蔡自由\*, 周伟明

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

**[摘要]** 目的: 建立测定维生素 B<sub>1</sub> 注射液中 EDTA 及硝酸根离子含量的离子色谱法。方法: 采用 IonPac AS 11-HC 色谱柱 (4.0 mm × 250 mm), IonPac AS 11-HC guard 保护柱 (4.0 mm × 50 mm) 和 ASRS 300 抑制器 (4 mm), 淋洗液为 12 mmol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 抑制电流 60 mA, 电导检测器温度 35 ℃, 柱温 30 ℃, 进样体积 25 μL。结果: EDTA 和硝酸根离子检出限分别为 0.29, 0.01 mg·L<sup>-1</sup>, EDTA 在 1.19 ~ 23.8 mg·L<sup>-1</sup>, 线性关系良好 ( $r=0.9997$ ), 回收率为 98.2% ~ 100.6%; 硝酸根离子在 1.0 ~ 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好 ( $r=0.9996$ ), 回收率为 97.9% ~ 99.5%。结论: 该实验方法选择性高, 灵敏度高, 测定结果准确, 并且简便, 快速, 可用于注射液中 EDTA 及硝酸根离子的测定研究和质量控制。

**[关键词]** 离子色谱; 乙二胺四乙酸; 硝酸根离子; 维生素 B<sub>1</sub> 注射液

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0061-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140061

## IC Determination of EDTA and Nitrate Ion in Vitamin B<sub>1</sub> Injection

CHEN Liu-sheng, CAI Zi-you\*, ZHOU Wei-ming

(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method by ion chromatography with suppressed conductivity detection for the determination of EDTA and nitrate ion in vitamin B<sub>1</sub> injection. **Method:** Chromatographic

**[收稿日期]** 20140204(001)

**[基金项目]** 广东省医学科学技术研究基金项目(A2012155)

**[第一作者]** 陈柳生, 硕士, 实验师, 从事天然产物化学和药物分析研究, Tel: 020-28854900, E-mail: chenls@gdzy.edu.cn

**[通讯作者]** \* 蔡自由, 教授, 从事药物分析研究, Tel: 020-28854975, E-mail: caizy@gdzy.edu.cn

- [3] Frankel E N, Waterhouse A L, Kinsella J E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol [J]. *Lancet*, 1993, 341(3):1103.
- [4] Pace-Asciak C R, Hahn S, Diamandis E P, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis; implications for protection against coronary heart disease [J]. *Clin Chim Acta*, 1995, 235(3):207.
- [5] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(6):218.
- [6] Giovannini L, Migliori M, Longoni B M, et al. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 2001, 37(3):262.
- [7] Shao B, Guo H Z, Cui Y J, et al. Steroid saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(4):623.
- [8] 陆瑶, 黄志军, 袁洪. 白藜芦醇对细胞色素 P450 酶活性影响的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(5):653.
- [9] Zhu Z, Klironomos G, Vachereau A, et al. Determination of trans-resveratrol in human plasma by HPLC [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 724(2):389.
- [10] Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(3):495.
- [11] Wang D G, Hang J, Wu C Y, et al. Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 829(1/2):97.

[责任编辑 邹晓翠]