

# LC-MS-MS 研究氧化白藜芦醇在大鼠胆汁中的代谢

于斌<sup>1</sup>, 梁芳<sup>2</sup>, 黄光玉<sup>2</sup>, 李凤琴<sup>2</sup>, 黄慧莲<sup>2\*</sup>

(1. 南昌大学第二附属医院, 南昌 330006; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 氧化白藜芦醇药理活性显著, 研究其在体内的代谢过程有助于临床的开发利用。方法: 采用液液萃取法对大鼠胆汁样品进行预处理, 建立以卡马西平为内标的液相色谱-质谱联用(LC-MS-MS)检测方法。Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.2% 甲酸水, 以 40:60 等度洗脱, 流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 温度为 35 °C, 进样量为 10 μL。MS 测定条件: 采用电喷雾离子源 ESI<sup>+</sup>, MS 检测模式为 MRM。脱溶剂气为高纯氮气, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气流速 700 L·h<sup>-1</sup>。气体流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 27 V, 离子源温度 100 °C。结果: 给药后 0.5 ~ 1 h 胆汁中的药物排泄量最高, 12 h 基本排泄完。结论: 该方法耗时短(每个样品仅用 3 min), 专属性强, 且准确度和精密度均可满足体内药物分析的要求。

**[关键词]** 氧化白藜芦醇; 液相色谱-质谱联用; 胆汁; 药动学

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0116-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210116

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1101.002.html>

**[网络出版时间]** 2014-09-15 11:01

**[收稿日期]** 20131211(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160507, 81360628); 江西省卫生厅中医药科研基金课题(2011A015)

**[第一作者]** 于斌, 硕士, 副主任药师, Tel: 0791-8629873, E-mail: efyrsk2007@163.com

**[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

- [3] 刘塔斯, 杨先国, 龚力民, 等. 药食两用中药玉竹的研究进展[J]. 中南药学, 2008, 6(2): 216.
- [4] Dong W, Shi H B, Ma H, et al. Homoisoflavanones from *Polygonatum odoratum* rhizomes inhibit advanced glycation end product formation. Arch Pharm Res, 2010, 33(5): 669.
- [5] Wang W, Shi H B, Zhu R N, et al. Simultaneous determination of three bioactive homoisoflavanones in rhizomes of *Polygonatum odoratum* [J]. J Med Plant Res, 2011, 5(20): 5184.
- [6] 付琛, 陈程, 周光雄, 等. 阳春砂仁化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2410.
- [7] 何志恒, 罗应刚, 李洪娟, 等. 攀援孔药花化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 238.
- [8] 李帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等. 鬼针草化学成分的研究(I)[J]. 中草药, 2003, 34(9): 782.
- [9] 刘丽娟, 周小平, 王广树, 等. 分蘖葱头中含氮化合物的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(5): 368.
- [10] 陈华, 阿吉艾克拜尔·艾萨, 李援朝. 短叶假木贼中化学成分分离和结构鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(6): 958.
- [11] 常小龙, 李军, 吴立军, 等. 白花银背藤化学成分的研究[J]. 中草药, 2006, 37(2): 178.
- [12] 冯卫生, 李红伟, 郑晓珂, 等. 构树叶的化学成分[J]. 药学学报, 2008, 43(2): 173.
- [13] 张琳, 邵赞, 赵晓辉, 等. 藏药斑唇马先蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 40.
- [14] 冯育林, 吴蓓, 李云秋, 等. 骆驼蹄瓣茎的化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 536.
- [15] 张涛, 李彬, 陈立, 等. 肺形草化学成分研究[J]. 军事医学, 2012, 36(12): 920.
- [16] 张敬莹, 王世盛, 宋其玲, 等. 糙龙胆地上部分化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(1): 24.
- [17] Hosoya T, Yun Y S, Kunugi A. Five novel flavonoids from *Wasabia japonica* [J]. Tetrahedron, 2005, 61(29): 7037.

[责任编辑 邹晓翠]

# LC-MS-MS Method for Determination of Oxyresveratrol in Bile of Rats

YU Bin<sup>1</sup>, LIANG Fang<sup>2</sup>, HUANG Guang-yu<sup>2</sup>, LI Feng-qin<sup>2</sup>, HUANG Hui-lian<sup>2\*</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** An sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method was developed and validated for the determination of oxyresveratrol in rat bile. **Method:** The analyte and the internal standard (carbamazepine) were extracted from bile samples using simple liquid-liquid extraction technique with ethyl acetate, separated on a ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) with mobile phase of acetonitrile and water containing 0.2% formic acid. Detected by triple quadruple mass spectrometry with an positive electrospray ionization interface, and quantified using multiple reaction monitoring (MRM) mode. A guard column was used and the flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** It showed the highest biliary excretion at 0.5-1 h after administration. The biliary excretion rate of oxyresveratrol was 0.737% within 12 hours. **Conclusion:** This analytical method is rapid (3 min for each sample), selective, precise, accurate, and reliable for *in vivo* analysis of oxyresveratrol.

**[Key words]** oxyresveratrol; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; bile; determination

氧化白藜芦醇(2,4,3',5'-四羟基二苯乙烯)是一种广泛存在的天然多酚类化合物。药理研究表明其具有多种生物活性,抗酪氨酸酶<sup>[1]</sup>,抗病毒<sup>[2]</sup>,保护肝脏<sup>[3]</sup>,抗氧化<sup>[4]</sup>和抗炎作用<sup>[5]</sup>。氧化白藜芦醇还可以透过血脑屏障,并且已经建议作为预防神经性退行性疾病,如阿尔茨海默症和帕金森病的辅助治疗剂<sup>[6]</sup>。近年来,由于其显著的药理活性而备受关注。目前有关氧化白藜芦醇的药代动力学研究甚少。本实验建立了大鼠胆汁中氧化白藜芦醇的 LC-MS-MS 分析方法,以及灌胃给药后,在不同的时间段收集大鼠的胆汁样品,得到氧化白藜芦醇在胆汁中的排泄率。

## 1 材料

1200-agilent6410 三重四级杆液质联用,配四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DDL 检测器(三重四极杆,ESI 电离源,Agilent),Sigma 3-18K 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),XW-80A 型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂),TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂),BF-2000 型氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司)。

氧化白藜芦醇(自制,纯度 98%),卡马西平(内标,购自中国食品药品检定研究院,批号 0412-9503),甲醇和乙酸乙酯(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈和甲酸(色谱纯,Tedia 公司)。

健康雄性 SD 大鼠(200~230 g,清洁级)购自江西中医药大学实验动物中心,合格证号为 SCXK

(赣)2010-0063。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称定氧化白藜芦醇 2.8 mg,置于 5 mL 的棕色量瓶中,加入甲醇溶解,得到 0.56 g·L<sup>-1</sup>储备液。用甲醇稀释质量浓度分别为 21.87, 43.75, 87.5, 175, 350, 700, 1 400, 3 500 μg·L<sup>-1</sup>的对照溶液,用于标准曲线的制备。

精密称定卡马西平 2.3 mg,置于 5 mL 的棕色量瓶中,用甲醇定容至刻度,得到 0.46 g·L<sup>-1</sup>储备液,用甲醇稀释质量浓度为 69 μg·L<sup>-1</sup>。

**2.2 质控样品(QC)的准备** 取质量浓度为 87.5, 700, 3 500 μg·L<sup>-1</sup>的对照溶液 100 μL,加入 200 μL 空白胆汁中,涡旋混合,配成质量浓度为 43.75, 350, 1 400 μg·L<sup>-1</sup>的质控样品。

**2.3 动物给药方案及胆汁收集** SD 雄性大鼠 5 只,实验前适应性喂养 7 d,给药前禁食 12 h,不禁水。大鼠以 20% 乌拉坦麻醉后(0.5 mL·kg<sup>-1</sup>)背式固定,在剑突下做纵行切口 2~3 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 mm 的 PE 管,结扎固定。待胆汁成功流出缝合创口,分别按 50 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃给药氧化白藜芦醇,收集给药后 0~0.5, 0.5~1, 1~2, 2~3, 3~4, 4~6, 6~8, 8~11, 11~22, 23~30, 30~36, 36~48 h 胆汁,在 -20 °C 下保存。

**2.4 大鼠胆汁样品处理方法** 精密移取 50 μL 胆汁样品于 5 mL 离心管中,精密加入 100 μL 的卡马

西平内标 ( $69 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl  $100 \mu\text{L}$  涡旋混合 1 min; 加入 2 mL 乙酸乙酯, 涡旋混合 5 min,  $6\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 将上层有机相转移至新的 5 mL 离心管中, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下用氮气吹干仪使乙酸乙酯全部挥干, 残渣用  $200 \mu\text{L}$  流动相 (乙腈-0.2% 甲酸水 40:60) 溶解, 涡旋混合 5 min, 用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤至液相小瓶中, 进样  $10 \mu\text{L}$ 。

**2.5 LC-MS 色谱及质谱条件** 色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 ( $2.1 \text{ mm}\times 50 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈-0.2% 甲酸水, 以 40:60 等度洗脱, 流速为  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 温度为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量为  $10 \mu\text{L}$ 。MS 测定条件: 采用电喷雾离子源 ESI<sup>+</sup>, MS 检测模式为 MRM。脱溶剂气为高纯氮气, 脱溶剂气温度  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , 脱溶剂气流速  $700 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。气体流速  $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 毛细管电压  $3.0 \text{ kV}$ , 锥孔电压  $27 \text{ V}$ , 离子源温度  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , 氧化白藜芦醇和卡马西平的碎片离子图, 见表 1 和图 1。

表 1 氧化白藜芦醇和卡马西平的质谱条件

化合物	<i>m/z</i>	相对分子质量	碰撞能量 /eV
氧化白藜芦醇	245.2	107.2	20
卡马西平	237.5	194.2	15

注: 碎片离子均为 120; 碰撞电压均为  $200 \text{ V}$ 。

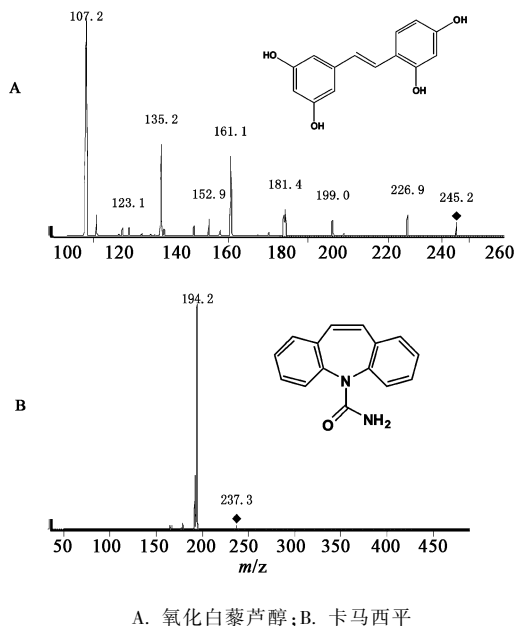
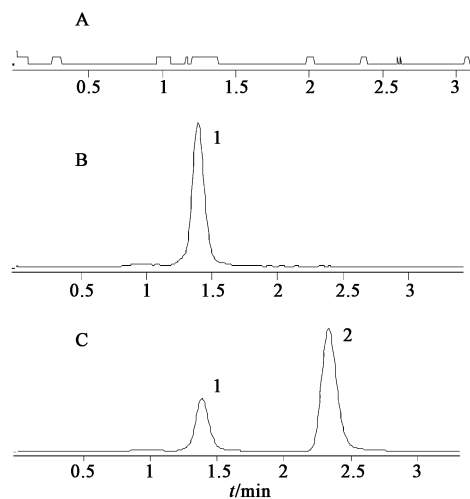


图 1 氧化白藜芦醇 (*m/z* 107.2) 和卡马西平 (*m/z* 194.2) 碎片离子

**2.6 专属性试验** 分别取空白大鼠胆汁 (不加内标)、空白大鼠胆汁加氧化白藜芦醇标准对照液 (不加内标) 和胆汁样品, 按照 2.4 胆汁样品处理方法

项下所述方法处理后进样, 总离子流图见图 2。氧化白藜芦醇的保留时间为 1.45 min, 内标保留时间为 2.41 min, 分离良好, 且胆汁中的杂质不干扰样品的测定, 方法专属性良好。



A. 空白胆汁样品; B. 空白胆汁加对照品 ( $175 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); C. 体内胆汁样品加内标; 1. 氧化白藜芦醇; 2. 卡马西平  
图 2 氧化白藜芦醇和卡马西平在胆汁中检测的色谱

**2.7 线性关系考察** 精密移取  $50 \mu\text{L}$  空白胆汁于  $5 \text{ mL}$  离心管中, 精密加入不同浓度的氧化白藜芦醇对照品溶液  $100 \mu\text{L}$  涡旋混合 1 min; 加入  $100 \mu\text{L}$  的卡马西平内标和  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl  $100 \mu\text{L}$  涡旋混合 1 min; 样品处理方法同 2.4 项。按照最小二乘法原则, 以氧化白藜芦醇峰面积与内标卡马西平峰面积的比值) 为纵坐标, 以相应的氧化白藜芦醇浓度 (*X*) 为横坐标进行线性回归, 计算标准曲线的回归方程及相关系数。回归方程为  $Y = 0.0004X - 0.0079$  ( $r = 0.9989$ ), 最低定量限是  $10.94 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.8 回收率试验** 取 QC 高、中、低 3 个不同浓度的氧化白藜芦醇胆汁样品, 同时配制等浓度未经处理的对照品液, 以峰面积比值计算其回收率, 见表 2。

表 2 氧化白藜芦醇和卡马西平在胆汁样品中的回收率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

样品	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%
氧化白藜芦醇	43.75	$86.43 \pm 4.19$
	350	$80.71 \pm 5.21$
	1400	$77.52 \pm 3.23$
卡马西平	69	$85.81 \pm 1.16$

**2.9 日内和日间精密度试验** 取 QC 样品, 按照 2.4 项下所述方法处理, 进样测定, 记录图谱, 将测得的峰面积按照随行测定的标准曲线计算得到实测

表3 日内、日间精密度和准确度( $\bar{x} \pm s$ )

加入量 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内( $n=6$ )			日间( $n=5$ )		
	实测量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	准确度/%	RSD/%	实测量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	准确度/%	RSD/%
43.75	49.94 $\pm$ 1.32	114.14	2.7	46.70 $\pm$ 2.54	106.74	5.4
350	312.29 $\pm$ 4.61	89.23	1.5	313.63 $\pm$ 7.81	89.61	2.5
1 400	1 278.45 $\pm$ 48.81	91.32	4.5	1 231.14 $\pm$ 67.05	87.93	5.8

浓度,计算方法的日内和日间精密度。结果表明方法的日内、日间精密度和准确度均符合要求。见表3。

**2.10 稳定性试验** 取低、中、高浓度的 QC 样品,分别在以下条件下放置或处理:①反复冻融 3 次(冻融稳定性);②室温下放置 6 h(短期稳定性);③  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下放置 45 d(长期稳定性)。结果显示,样品的稳定性符合要求(表4)。

表4 氧化白藜芦醇在胆汁样品中的稳定性( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

稳定性	加入量 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	实测量 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	平均准 确度/%	RSD /%
冻融	43.75	49.98 $\pm$ 1.19	114.24	2.3
	350	320.49 $\pm$ 9.71	91.57	3.0
	1 400	1 219.93 $\pm$ 92.37	87.14	8.3
短期	43.75	48.41 $\pm$ 2.38	110.65	4.5
	350	317.39 $\pm$ 9.83	90.68	3.1
	1 400	1 311.04 $\pm$ 48.54	93.65	4.8
长期	43.75	46.78 $\pm$ 3.23	106.92	6.9
	350	300.82 $\pm$ 13.62	85.95	4.5
	1 400	1 258.01 $\pm$ 141.95	89.86	11.3

**2.11 氧化白藜芦醇在大鼠胆汁中浓度测定** 灌胃给药后各个时间段胆汁的排泄量和氧化白藜芦醇的含量见图3。胆汁中药物含量在给药后 0.5 ~ 1 h 内比较高,12 h 的总排泄量为 110.56  $\mu\text{g}$ ,12 h 内氧化白藜芦醇在大鼠体内的胆汁排泄率为 0.737%。

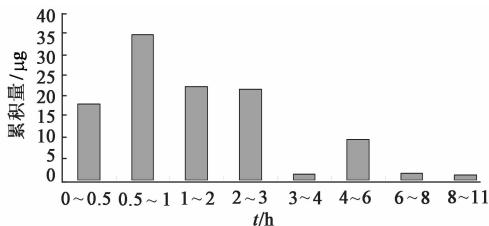


图3 灌胃给药后不同时间段胆汁样品中氧化白藜芦醇的含量

### 3 讨论

胆汁排泄是药物的排泄途径之一,是肾外排泄中最主要过程。胆汁排泄虽然是原形药物的次要排泄途径,但却是很多药物的代谢产物尤其是水溶性代谢产物的主要排泄途径。本实验建立了大鼠胆汁中氧化白藜芦醇的 LC-MS-MS 测定方法。测定了灌胃给药氧化白藜芦醇 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  后不同时间段内大鼠胆汁中的含量,0.5 ~ 1 h 给药后胆汁中的药物排泄量最高,随时间推移排泄量逐渐下降,12 h 内药物总排泄量约为总给药量的 0.737%。

### [参考文献]

- [1] Maneechai S, Likhitwitayawuid K, Sritularak B, et al. Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and Puag-Haad [J]. *Medical Principles Practice*, 2009, 8(3):223.
- [2] Chuanasa T, Phromjai J, Lipipun V, et al. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant; mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice [J]. *Antiviral Research*, 2008, 80(1):62.
- [3] Andrabi S A, Spina M G, Lorenz P, et al. Oxyresveratrol (*trans*-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia[J]. *Brain Research*, 2004, 1017(1/2):98.
- [4] Chung K O, Kim B Y, Lee M H, et al. *In-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(12):1695.
- [5] Breuer C, Wolf G, Andrabi S A, et al. Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 393(2/3):113.
- [6] Chao J, Yu M S, Ho Y S, et al. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity [J]. *Free Rad Biol Med*, 2008, 45(7):1019.

[责任编辑 邹晓翠]