

柚皮素在大鼠体内的代谢途径研究

樊慧蓉¹, 李全胜², 张爱杰², 刘彦平², 魏广力², 司端运²

1. 中国医学科学院 北京协和医学院放射医学研究所 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 研究柚皮素在大鼠体内的代谢途径, 为柚皮素的进一步研究开发提供参考依据。**方法** 大鼠 ig 给予柚皮素, 收集不同时间段胆汁、尿液、粪便和血浆, 应用液相色谱-三重四级杆-线性离子阱串联质谱 (LC-QTRAP-MS) 寻找和解析柚皮素在大鼠体内各生物基质中的可能代谢产物。通过对柚皮素裂解规律的研究, 解析柚皮素在大鼠体内的可能代谢途径。**结果** 在 ig 给予柚皮素后大鼠的胆汁、尿、粪和血浆中共检测出 14 个可能的代谢产物, 其主要代谢途径包括氧化、甲基化以及葡萄糖醛酸化和硫酸化。**结论** 柚皮素在大鼠体内经历了广泛的 I 相和 II 相代谢, 代谢产物以 II 相的葡萄糖醛酸和硫酸结合型代谢产物为主, 通过尿排泄的代谢产物与原型相当, 胆汁中以结合型代谢产物为主, 在粪便中转化为原型排泄。

关键词: 柚皮素; 液相色谱-三重四级杆-线性离子阱串联质谱; 代谢产物; 代谢途径; 氧化; 甲基化; 葡萄糖醛酸化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)10-2093-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.026

In vivo metabolic pathway of naringenin in rats

FAN Hui-rong¹, LI Quan-sheng², ZHANG Ai-jie², LIU Yan-ping², WEI Guang-li², SI Duan-yun²

1. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To study the *in vivo* metabolic pathway of naringenin in rats, which would provide reference for its further research and development. **Methods** A liquid chromatography with hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometer (LC-QTRAP-MS) was applied to identify the metabolites of naringenin in bile, urine, feces and plasma after ig administration to rats. The fragmentation patterns of naringenin were also used to analyze possible metabolic pathways in the study. **Results** There were altogether 14 metabolites detected. The possible metabolic pathways of naringenin were oxidation, methylation, glucuronidation and sulfation in rats. **Conclusion** *In vivo* metabolism studies show that naringenin undergoes extensive metabolism, including phase I and phase II biotransformation, and the phase II glucuronide and sulfate conjugates are primary metabolites. The relative quantitative amounts of metabolites excreted from urine are almost equivalent to that of the parent naringenin, while a large majority of metabolites are conjugated ones in bile, which are subsequently transformed to the parent in intestinal tract and appeared in feces.

Key words: naringenin; LC-QTRAP-MS; metabolite; metabolic pathway; oxidation; methylation; glucuronidation

柚皮素(naringenin)是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于枳实、化橘红、桃叶、菝葜等植物中^[1],具有广泛的药理活性,包括抗菌、抗炎、抗氧化、抗癌和抗损伤作用等,在医药领域具有广阔的应用前景^[2-4]。然而,由于柚皮素具有水溶性及脂溶性较差、易氧化、体内吸收差等缺点,目前柚皮素相关

的产品还没有开发上市^[5]。

近年来,在药动学研究方面,柚皮素在大鼠体内的吸收研究为其给药系统、体内过程和药物相互作用等方面的研究提供了理论依据^[6-8];在体外培养细胞和微粒体的代谢研究亦有报道^[9-10];含有柚皮素的多成分中药给药后的柚皮素体内代谢过程方面

收稿日期: 2016-12-06

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81430096, 81302870); 国家科技重大专项(2012ZX09506001-006); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程协和创新团队(2016-I2M-3-022)

作者简介: 樊慧蓉(1972—),女,博士,副研究员,研究方向为药动学。Tel: (022)85682399 E-mail: fanhr99@163.com

也有学者进行了研究^[11-13]。然而, 柚皮素单体的体内代谢过程研究迄今未见报道。由于目前柚皮素毒理学方面的研究也相对欠缺^[5], 而黄酮类化合物的代谢过程对其生物活性的发挥、维持乃至毒性都会产生重大影响^[14], 为促进柚皮素的深度开发, 有必要对柚皮素的代谢过程进行深入研究, 为开发临床安全、有效的药物提供参考依据。本实验开展柚皮素的体内代谢研究, 在大鼠 ig 给予柚皮素后采集尿、粪、胆汁及血浆样本, 应用 QTRAP 型 LC-MS 寻找和推测柚皮素在大鼠体内的代谢产物和代谢途径, 为进一步的研究开发提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

柚皮素(质量分数为 99.6%), 批号 071100023, 河南天方药业有限公司提供; 色谱纯甲醇为天津康科德科技有限公司产品; 色谱纯甲酸和分析纯甲酸铵均为天津市光复精细化工研究所产品; 超纯水为实验室自制。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 7~10 周龄, 体质量 200~300 g, 北京市维通利华实验动物科技有限公司提供, 动物许可证号 SCXK(京)2012-0001, 动物质量合格证号 11400700043347、11400700049032。SPF 级屏障系统内饲养 1 周后称体质量、给药和取样。屏障系统的温度保持在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度保持在 $(60 \pm 5)\%$, 采用明暗各 12 h 间隔照明控制。

1.3 仪器

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), Dikma 科技公司产品; 液相色谱系统: 配备 LC-20AD 型输液泵、DGU-20A3 型脱气机、CTO-20A 型柱温箱、SIL-20A 型自动进样器和 CBM-20A 系统控制, 日本 Shimadzu 公司; 质谱系统: 配备 API 4000 QTRAP 质谱仪、电喷雾离子化源(ESI)和 Analysis 1.5.2 分析数据处理系统工作站, 美国 Applied Biosystems 公司; 17R 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; BM-40 型纯水制备系统, 北京中盛茂源科技发展有限公司; TARGINTM VX-II 型多管涡旋振荡器, 北京踏锦科技有限公司; XS105 型电子天平, 瑞士 Metter Toledo 公司; Turbo Vap LV 型样品浓缩仪, 美国 Caliper 公司; 代谢笼, 意大利 Tecniplast 公司。

2 方法

2.1 样品溶液配制

称量柚皮素 4.8 g, 在乳钵中研磨状态下缓缓加

入 0.5%羧甲基纤维素钠 20 mL, 制成质量浓度为 240 mg/mL 的溶液。

2.2 给药与生物样品采集

2.2.1 尿、粪采集 健康 Wistar 大鼠 4 只, 雌雄各半, 按性别分成 2 组, 分置于代谢笼, 给药前禁食, 实验期间自由进食与饮水。大鼠 ig 给予柚皮素 2.4 g/kg (给药体积为 10 mL/kg)。分别收集给药前(空白)及给药后 0~4、4~8、8~12 和 12~24 h 各时间段的尿样和粪样, 尿样记录体积, 粪样称定质量, -20°C 保存待测。

2.2.2 胆汁采集 健康 Wistar 大鼠 6 只, 雌雄各半, 给药前禁食, 自由饮水。以柚皮素 2.4 g/kg 的剂量 ig 给药。大鼠 ip 20%乌拉坦进行麻醉后, 实施胆汁插管引流手术。分别收集给药前(空白)及给药后 0~2、2~4、4~6、6~8、8~12、12~16 和 16~24 h 各时间段的胆汁样品, 记录体积, -20°C 保存待测。

2.2.3 血样采集 血浆样品为大鼠(6 只)ig 给予柚皮素 2.4 g/kg, 分别收集给药前空白及给药后 0.25、0.5、1、2、3、5、8、10、12、16、24 h 各时间点的血浆样品(颈静脉采血), 记录体积, -20°C 保存待测, 临用前将 0~24 h 不同时间点的血浆按比例混合即可。

2.3 生物样品处理与分析

2.3.1 粪样处理 粪样称定质量后研磨, 按 10 mL/g 的比例加入甲醇溶液提取, 超声 30 min, 即得粪匀浆液。吸取 300 μL 粪匀浆上清液样品, 加入 1.8 mL 甲醇, 涡旋混匀, 12 000 r/min 离心 10 min (4°C), 取全部上清液, 经 0.2 μm 针孔式微孔滤膜过滤器滤过, 40°C 氮气吹干, 50%甲醇水溶液 120 μL 复溶, 12 000 r/min 离心 5 min (4°C), 上清液进样 10 μL, 进行 LC-MS 分析。

2.3.2 血浆、尿和胆汁样品固相萃取(SPE)处理 吸取 1 mL 血浆、尿和胆汁原液样品, 分别加到经甲醇和水活化处理的固相萃取柱, 用 1 mL 水洗脱 2 次, 弃去洗脱液, 再用 1 mL 甲醇洗 2 次, 收集甲醇液, 40°C 氮气吹干, 50%甲醇水溶液 120 μL 复溶, 12 000 r/min 离心 5 min (4°C), 上清液进样 10 μL, 进行 LC-MS 分析。

2.4 LC-MS 条件

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30°C ; 流动相为甲醇(A)-10% 甲醇(含 0.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1%甲酸, B), 洗脱梯度: 0.01~3 min, 80% B; 3~15 min, 80%~

50% B; 15~23 min, 50%~10% B; 23~26 min, 10% B; 26~35 min, 10%~50% B; 35~42 min, 50%~80% B; 45 min 停止。体积流量为 0.5 mL/min。

2.4.2 质谱条件 ESI 源, 负离子方式检测; 离子喷雾电压为-3 000 V; 离子源温度为 500 °C; 入口电压为-12 V; 簇电压为-75 V; 碰撞能为-10 V; 卷帘气为 68.95 kPa (10 psi); 喷雾气为 344.74 kPa (50 psi); 加热气为 413.69 kPa (60 psi); 碰撞气为 55.16 kPa (8 psi)。扫描范围 m/z 50~1 000。扫描模式: 增强型全扫描 (EMS), 多离子监测/多反应监测-信息相关采集-增强型离子扫描 (MIM/MRM-IDA-EPI), IDA 阈值为 2 000 cps。

2.5 代谢产物结构解析方法与策略

本研究应用 QTRAP 型 LC-MS 寻找和推测柚皮素在大鼠体内的代谢产物, 过程如下: (1) 生物样品经前处理后进入仪器, 对空白样品和给药后生物样品进行负离子的增强型全扫描, 从给药后生物样品的总离子流图中手动筛选准分子离子的信息, 结合文献报道^[13,15], 并结合常规黄酮类化合物转化位点进行基于知识的代谢产物结构预测, 提取可能的代谢产物离子并与空白样品进行比对分析, 筛选和寻找可能的代谢产物的质荷比 (m/z); (2) 采用 QTRAP 独有的 MIM-IDA-EPI 和 MRM-IDA-EPI 扫描方法, 获得对应通道母离子的 MS/MS 谱图, 以此进行图谱解析, 根据特征碎片离子、特征中性丢失或者特征碎片离子间质量差可推测出代谢物的结构; (3) 通过在相同条件下色谱保留时间和质谱裂解行为的比对, 解析柚皮素在大鼠体内的可能代谢产物和代谢途径。

失或者特征碎片离子间质量差可推测出代谢物的结构; (3) 通过在相同条件下色谱保留时间和质谱裂解行为的比对, 解析柚皮素在大鼠体内的可能代谢产物和代谢途径。

3 结果

3.1 柚皮素的色谱与质谱行为

本研究对流动相的组成、比例及洗脱梯度进行优化, 确定的液相条件可以使柚皮素各代谢产物与生物介质中内源性物质分开。柚皮素的液相色谱保留时间为 25.3 min, 见图 1。

由于大多数代谢产物仍保留原型的基本骨架结构或亚结构, 因此研究柚皮素的质谱裂解规律是其代谢产物结构解析和鉴定的依据。本实验用蠕动注射泵将柚皮素对照品直接导入 QTRAP 质谱的 ESI 源, 采用负离子检测方式进行检测, 获得柚皮素的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰 (m/z 271), 对其准分子离子进行碰撞诱导解离 (CID) 分析, 获得二级全扫描质谱图, 柚皮素的主要碎片离子为 m/z 227、177、165、151、119、107、91, 其中 m/z 151 和 m/z 119 分别为柚皮素 C 环 O_1-C_2 和 C_3-C_4 键发生 RDA 裂解产生的 2 部分碎片离子, m/z 107 为 m/z 151 侧链脱氧及脱去 $C=O$ 键形成的 A 环特征性碎片离子, m/z 177 和 m/z 93 分别为连接柚皮素 B 环和 C 环的 C_2-C_1' 键断裂后形成的 2 部分碎片离子。柚皮素对照品的 EPI 二级全扫描质谱图及其可能的 CID 裂解途径见图 1。

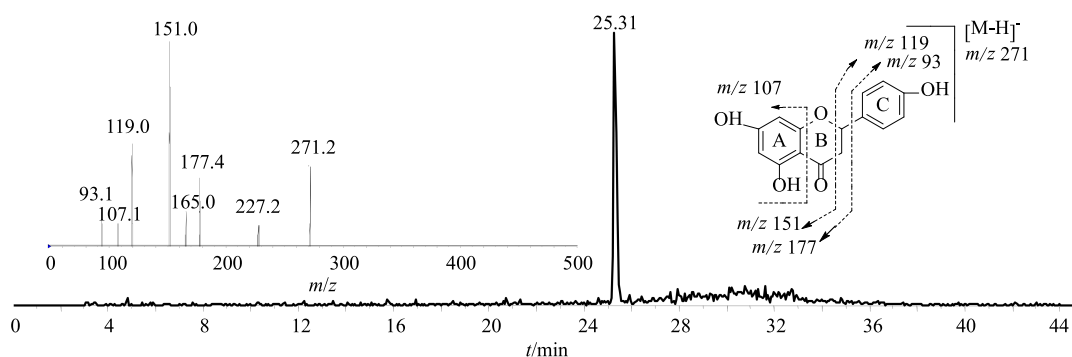


图 1 柚皮素对照品的多反应监测 (MRM) 色谱图、二级质谱图及其可能裂解途径

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatogram, MS/MS spectra of standard naringenin and its proposed fragmentation pathways

3.2 大鼠体内代谢产物结构解析

大鼠 ig 给予柚皮素后, 给药后的尿、胆汁、血浆和粪样品在 MRM-IDA-EPI 扫描方式下可能代谢产物的 MRM 色谱图见图 2。综合分析各代谢物的 EPI 二级全扫描质谱图, 并结合常规的 I 相和 II 相

反应特点, 在大鼠体内共找到 14 个可能的代谢产物, 各代谢产物结构推导如下。

M0: 在 m/z 271 的 MRM 色谱图中, 大鼠尿、胆汁、血浆和粪中均可检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 25.3 min, 其色谱峰与柚皮素对照品的保留时

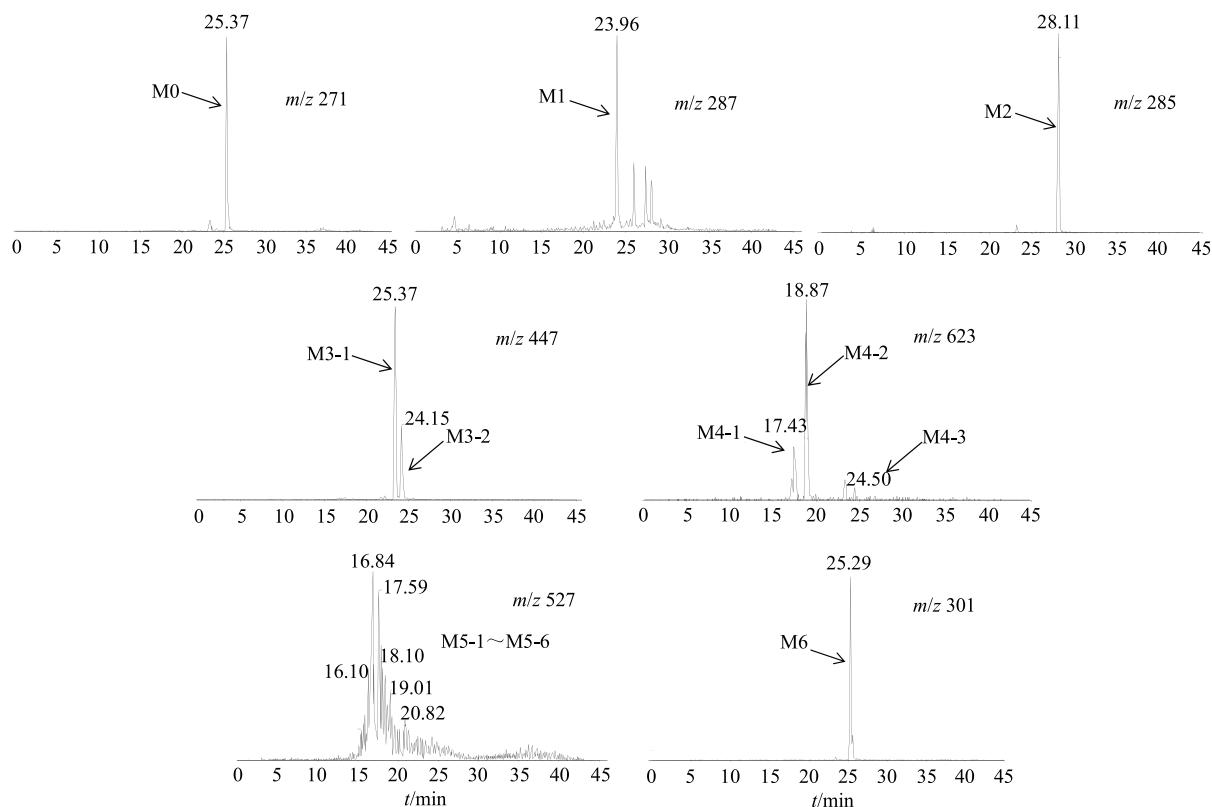


图 2 大鼠 ig 给予柚皮素后胆汁、尿液、粪便以及血浆中柚皮素及其代谢产物的多反应监测 (MRM) 色谱图

Fig. 2 Multiple reaction monitoring chromatograms for naringenin and its metabolites in bile, urine, feces and plasma after ig administration to rats

间一致, EPI 质谱图与柚皮素对照品有相同的二级碎片离子, 故确定 M0 为原型柚皮素。

M1: 在 m/z 287 的 MRM 色谱图中, 大鼠尿和粪中可以检测到 1 个代谢产物的色谱峰, 保留时间为 23.9 min, 主要碎片离子为 m/z 269、151、135、107, 其中 m/z 151、107 不变, 表明 A 环及 C 环 RDA 裂解后与 A 环连接的部分未发生变化; m/z 135 比原型 M0 的 B 环及 C 环 RDA 裂解后与 B 环连接部分的碎片离子 m/z 119 多 16, 推测氧化位点可能发生在 B 环或 C 环的 C_2-C_3 。由于 m/z 269 为 m/z 287 脱去 1 分子水后形成的, 而酚羟基不可能发生分子内脱水反应, 结合文献报道^[10], 推测 M1 可能是柚皮素 C 环 C_3 发生羟基化的代谢产物。

M2: 在 m/z 285 的 MRM 色谱图中, 大鼠尿和粪中可以检测到 1 个代谢产物的色谱峰, 保留时间为 28.1 min, 主要特征碎片离子为 m/z 243、164、151、107, 其中 m/z 151、107 与 M0 相比未发生变化, 表明代谢位点不在 A 环及 RDA 裂解后与 A 环连接的侧链部分; 由于 m/z 285 比原型 M0 多 14, 推测可能 B 环及 RDA 裂解后与 B 环连接部分发生

甲基化反应, 初步推测 M2 可能是 B 环 4'-OH 甲基化, 为柚皮素 M0 的甲基化代谢产物。

M3: 在 m/z 447 的 MRM 色谱图中, 大鼠尿、胆汁、血浆和粪中均可以检测到 2 个代谢产物的色谱峰, 保留时间为 23.4、24.1 min, 分别命名为 M3-1 和 M3-2。

M3-1 的保留时间为 23.4 min, 对其进行 EPI 二级质谱分析, 发现主要碎片离子为 m/z 271、227、177、151、119, 其中 m/z 271 为原型柚皮素 M0 的碎片离子峰; m/z 227、177、151、119 为 M0 的特征性碎片离子峰; 由于 m/z 447 比 m/z 271 多 176, 而 176 是葡萄糖醛酸结合的特征性中性丢失碎片离子。综上离子碎片特征, 可以推断 M3-1 为 M0 的葡萄糖醛酸结合物。

M3-2 的保留时间为 24.1 min, 对其进行 EPI 二级质谱分析, 发现其与 M3-1 的质谱信息基本相同, 只是丰度略有差别, 可能是与葡萄糖醛酸结合的位点不同, 使得保留时间和质谱丰度出现差别, 因此推断 M3-2 应同样为柚皮素的葡萄糖醛酸结合物。根据文献报道^[16], 黄酮化合物上的羟基容易发生葡萄糖醛酸化反应的优先顺序为 7、5、3'或 4'位羟基,

因此初步推测柚皮素的 3 个羟基均可能是发生葡萄糖醛酸化的结合位点,但本研究提供的质谱信息无法判断 M3-1 和 M3-2 具体发生葡萄糖醛酸化的位点,需进一步的实验确认。

M4: 在 m/z 623 的 MRM 色谱图中,可以检测到 3 个代谢产物的色谱峰,保留时间分别为 17.4、19.0、24.5 min,分别命名为 M4-1、M4-2、M4-3。

M4-1、M4-2 和 M4-3 的主要碎片离子均为 m/z 447、271、177,其中 m/z 177 是柚皮素 M0 的特征性碎片离子, m/z 271 为 M0 的碎片离子峰, m/z 447 比 m/z 623 少 176,二级全扫描质谱中产生脱去 176 的碎片离子是葡萄糖醛酸结合物的典型质谱裂解规律,推测 m/z 447 为 M0 结合 1 个葡萄糖醛酸的离子峰,而 m/z 623 比 m/z 447 多 176,意味着在 m/z 447 的基础上又结合了 1 个葡萄糖醛酸,因此推测 M4-1、M4-2 和 M4-3 均可能为 M0 的双葡萄糖醛酸结合物,但目前获得的质谱信息只能观察到离子丰度略有不同,无法判断其具体的葡萄糖醛酸结合位点。

M5: 在 m/z 527 的 MRM 色谱图中,大鼠尿、胆汁和粪中均可以检测到 1 个簇状色谱峰,保留时间在 17 min 左右,对其 MRM-IDA-EPI 的谱图进行分析,在 16.0、16.7、17.4、18.1、18.9、20.4 min 均可捕获到 EPI 二级质谱图,且主要碎片离子均为 m/z 447、351、271、177、151,其中 m/z 177、151 是 M0 的特征性离子碎片原型, m/z 351 比 M0 的分子离子峰 m/z 271 多 80, m/z 447 比 m/z 351 多 96 (16+80), m/z 527 比 m/z 447 多 80。二级全扫描质谱中

产生脱去 m/z 80 的碎片离子是硫酸结合物的典型质谱裂解规律,增加 m/z 16 通常情况下是氧化的特征性离子,综合上述离子碎片特征,推测 M6 是柚皮素 M0 的 7、5、4'位羟基发生 2 个位点的硫酸化,并在其他位点发生羟基化后硫酸化的代谢产物。

由于柚皮素结构中 A、B 和 C 环均有可以发生羟基化的位点,M0 在不同位点羟基化后硫酸化以及 M0 的 7、5、4'位羟基发生双硫酸化可以形成 3 个位点不同排列组合的柚皮素羟基化硫酸和双硫酸结合物,进而导致保留时间的微小变化,表现在色谱峰即为簇状,包含着至少 6 个可能的硫酸化结合的代谢产物(以可捕获的 EPI 二级质谱图为依据),命名为 M5-1~5-6。

M6: 在 m/z 301 的 MRM 色谱图中,大鼠尿、粪和血浆中均可以检测到 1 个色谱峰,保留时间在 25.2 min,命名为 M7。其 EPI 二级质谱的主要碎片离子为 m/z 285、243、199、164、151、107,除分子离子 m/z 301 外,其余碎片离子与 M2 (m/z 285) 相同,由于 M2 可能是柚皮素 4'-OH 甲基化的代谢产物,再加上 m/z 301 比 m/z 285 多 16,因此推测 M6 是柚皮素除发生甲基化反应外,还发生了氧化反应的代谢产物,但目前获得的质谱信息无法确定发生氧化反应的具体位点。

3.3 柚皮素大鼠体内的代谢产物和途径

柚皮素在大鼠胆汁、尿、粪和血浆中可能代谢产物的色谱质谱相关信息见表 1,经峰面积归一化法计算的可能代谢产物相对生成量见表 2,大鼠体内可能的代谢途径见图 3。

表 1 大鼠 ig 给予柚皮素后体内代谢产物的色谱质谱信息

Table 1 Chromatographic and mass spectra information for naringenin and its metabolites after ig administration to rats

峰号	[M-H] ⁻	<i>t_R</i> /min	MS/MS 碎片离子 (<i>m/z</i>)	代谢途径	胆汁	尿液	粪便	血浆
M0	271	25.31	227, 177, 151, 119, 93	—	+	+	+	+
M1	287	23.93	269, 151, 135, 107	羟基化	—	+	+	—
M2	285	28.08	243, 164, 151, 107	甲基化	—	+	+	—
M3-1	447	23.32	271, 177, 151, 119	葡萄糖醛酸化	+	+	+	+
M3-2	447	24.20	271, 177, 151, 119	葡萄糖醛酸化	+	+	+	+
M4-1	623	17.42	447, 271, 177	双葡萄糖醛酸化	+	+	—	—
M4-2	623	19.01	447, 271, 177	双葡萄糖醛酸化	+	+	—	—
M4-3	623	24.50	447, 271, 177	双葡萄糖醛酸化	+	+	—	—
M5-1	527	16.02	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M5-2	527	16.66	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M5-3	527	17.42	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M5-4	527	18.14	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M5-5	527	18.92	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M5-6	527	20.43	447, 351, 271, 177, 151	羟基化硫酸化+双硫酸化	+	+	+	—
M6	301	25.21	285, 243, 227, 164, 151, 107	羟基化+甲基化	—	+	+	+

“+”表示检测到,“—”表示未检测到

“+” detected, “—” undetected

表 2 柚皮素在大鼠体内主要代谢产物相对生成量

Table 2 Relative percentage of naringenin and its metabolites in rats *in vivo*

代谢产物	相对生成量/%			
	胆汁	尿	粪	血浆
M0	10.10	49.30	94.80	72.20
M1	—	5.30	3.09	—
M2	—	1.79	0.08	—
M3-1	59.80	25.60	0.32	24.20
M3-2	15.80	7.84	0.90	2.64
M4-1	1.72	0.13	—	—
M4-2	2.90	0.45	—	—
M4-3	0.36	0.02	—	—
M5-1	0.88	0.04	0.00	—
M5-2	1.82	0.19	0.17	—
M5-3	4.04	1.73	0.02	—
M5-4	1.68	1.87	0.05	—
M5-5	0.31	0.64	0.01	—
M5-6	0.55	0.52	0.03	—
M6	—	4.53	0.14	1.06
总和	99.96	99.95	99.61	100.10

4 讨论

近年来,液相色谱联用质谱仪,尤其是带有精密质量数的 TOF 或 Orbitrap 型质谱仪被广泛地应用于代谢产物的结构鉴定^[17-18]。基于 QTRAP 技术的质谱因具有独特的 IDA 软件及 EPI 扫描功能,不仅能实现 1 次进样即可获得“全部有效信息”,而且能提供丰富的碎片离子信息和高质量的 MS² 谱图,提高了代谢产物分析的效率和质量^[19-20],因此在代谢产物的结构鉴定方面也能提供有用信息。

本实验采用 QTRAP 质谱技术,通过比较给药前后大鼠尿、粪、胆汁和血浆的 MRM 色谱图,在 ig 给予柚皮素后大鼠的胆汁、尿、粪和血浆中共检测出 14 个可能的代谢产物,其主要代谢途径包括氧化、甲基化以及葡萄糖醛酸化和硫酸化。已有研究表明,对于大部分黄酮类化合物,肝脏和消化道是其代谢的主要部位^[14]。黄酮类化合物在肝脏或肠壁细胞色素 P450 作用下逐渐发生氧化反应,然后在 II 相酶催化下发生葡萄糖醛酸化、硫酸化或谷胱甘肽结合等结合反应^[21-23]。结合型代谢物水溶性更高,易于排出体外,这些代谢产物也能被再次吸收,最后经肾脏排出。柚皮素是二氢黄酮苷元,实验结果表明,柚皮素在大鼠尿中的代谢产物最多,涵盖体

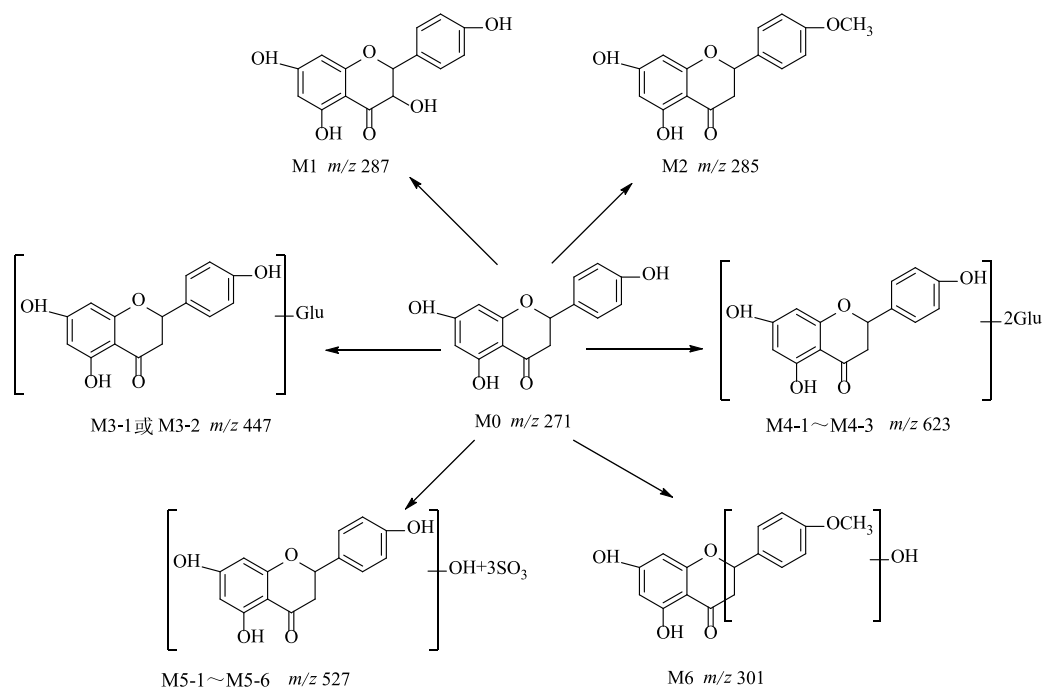


图 3 柚皮素在大鼠体内的可能代谢途径

Fig. 3 Proposed metabolic pathway of naringenin in rats *in vivo*

内发现的所有可能的代谢产物,其主要代谢产物为葡萄糖醛酸结合物,其次为羟基化和甲基化代谢产物,且各代谢产物相对量的总和与原型的相当;胆汁中代谢产物的主要存在形式为葡萄糖醛酸和硫酸结合物,原型较少;粪中的各代谢产物相对量非常低,几乎全部以原型的形式排泄,可能是经胆汁排至肠道的结合型代谢产物在大肠水解或经肠道菌代谢^[24],重新生成苷元柚皮素。该结果可为柚皮素的开发提供参考依据,对于促进黄酮类药物的开发与临床的应用也具有参考意义,但尚不能明确柚皮素在体内的代谢转化机制,还需要进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 吕爱新,于宏伟,赵志强,等.柚皮素的研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(13):7734-7735.
- [2] Mir I A, Tiku A B. Chemopreventive and therapeutic potential of "naringenin", a flavanone present in citrus fruits [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(1): 27-42.
- [3] Patel K, Singh G K, Patel D K. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, doi: 10.1007/s11655-014-1960-x.
- [4] Orhan I E, Nabavi S F, Daglia M, et al. Naringenin and atherosclerosis: A review of literature [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015, 16(3): 245-251.
- [5] 季鹏,赵文明,于桐.柚皮素的最新研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(12):1382-1386.
- [6] 马燕,林宝琴,李卫中,等.柚皮素大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中成药,2012,34(8):1487-1491.
- [7] Tsai Y J, Tsai T H. Mesenteric lymphatic absorption and the pharmacokinetics of naringin and naringenin in the rat [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(51): 12435-12442.
- [8] Ma Y, Li P, Chen D, et al. LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(2): 292-299.
- [9] Yamamoto H, Kuribayashi H, Seshima Y, et al. Metabolism of administered (2R)-naringenin in flavonoid producing cultured cells of *Sophora flavescens* [J]. *Plant Biotechnol*, 2004, 21(5): 355-359.
- [10] Nikolic D, Van Breemen R B. New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(4): 387-397.
- [11] 李哲,宋瑞,许凤国,等.大鼠灌服枳实提取液后体内黄酮类代谢产物的LC-MS/MS分析[J].中国药科大学学报,2010,41(6):539-547.
- [12] 陆林玲,束艳,钱大玮,等.大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定[J].药学报,2011,46(11):1374-1379.
- [13] 孙国玲,钱大玮,段金殿,等.毛橘红醇提取物中柚皮苷、柚皮素在大鼠尿液和粪便中的代谢和排泄[J].药学报,2010,45(6):761-766.
- [14] 何佳珂,于洋,陈西敬,等.黄酮类化合物的药物代谢研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(21):2789-2792.
- [15] Liu M, Zou W, Yang C, et al. Metabolism and excretion studies of oral administered naringin, a putative antitussive, in rats and dogs [J]. *Biopharm Drugs Dispos*, 2012, 33(3): 123-134.
- [16] Boersma M G, Van der Woude H, Bogaards J, et al. Regioselectivity of phase II metabolism of letuolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases [J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15(5): 662-670.
- [17] Pozo Ó J, Ibáñez M, Sancho J V, et al. Mass spectrometric evaluation of mephedrone *in vivo* human metabolism: Identification of phase I and phase II metabolites, including a novel succinyl conjugate [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 43(2): 248-257.
- [18] Ravindran S, Surve P, Lonsane G, et al. Technologies and strategies to characterize and quantitate metabolites in drug discovery and development [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(11): 1547-1553.
- [19] Yao M, Ma L, Duchoslav E, et al. Rapid screening and characterization of drug metabolites using multiple ion monitoring dependent product ion scan and postacquisition data mining on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1683-1693.
- [20] Yao M, Ma L, Humphreys W G, et al. Rapid screening and characterization of drug metabolites using a multiple ion monitoring-dependent MS/MS acquisition method on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(10): 1364-1375.
- [21] Graf B, Aeho C, Dolnikowig G, et al. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin [J]. *J Nutr*, 2006, 136(1): 39-44.
- [22] Van Derwoude H, Boersma M G, Vervoort J, et al. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II *in vitro* model systems [J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(11): 1520-1530.
- [23] Gradolatto A, Canynglavier M, Basly J P, et al. Metabolism of apigenin by liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(1): 58-65.
- [24] 张蔚,江曙,钱大玮,等.肠道细菌对柚皮苷的代谢研究[J].药学报,2013,48(12):1817-1822.