

降香总黄酮的体内Ⅱ相代谢反应研究^{*}

□刘荣霞 (中科院上海生命科学研究院上海药物研究所/上海中药现代化研究中心 上海 201203)

崔亚君 (上海中医药大学中药学院 上海 201203)

果德安^{**} (中科院上海生命科学研究院上海药物研究所/上海中药现代化研究中心 上海 201203)

摘要:对灌胃给予大鼠降香总黄酮后,进入体内的化学成分和Ⅱ相代谢产物进行了初步研究。采用酶水解的方法将Ⅱ相代谢产物水解为原型形式,以HPLC-DAD和HPLC-MS技术进行样品分析,采用对照品对照的方法,在水解前、后的生物样品中分别定性分析了18个黄酮类成分。结果表明大鼠灌胃降香总黄酮后,黄酮类成分在体内发生了Ⅱ相代谢反应,药物在体内同时存在原型和Ⅱ相代谢产物两种形式,Ⅱ相代谢产物又以硫酸酯结合物为主。

关键词:降香 黄酮 体内代谢 Ⅱ相代谢反应 HPLC-DAD HPLC-MS

黄酮类化合物广泛分布于自然界,是一类重要的天然有机化合物。绝大多数植物体内都含有黄酮类化合物,其对植物的生长、发育、开花、结果及防菌防病等方面起着重要的作用。黄酮类化合物具有多种生物活性,如降低血管脆性及异常的通透性,扩冠、抗血小板凝集、抗心律失常、抗菌、抗病毒、抗自由基氧化、抗炎镇痛、抗癌和保肝等作用。

降香为豆科黄檀属植物降香檀(*Dalbergia odorifera* T. Chen)树干和根的干燥心材,其主要成分是挥发

油和黄酮体化合物。降香中的黄酮类成分如芒柄花素(formononetin)、甘草素(liquiritigenin)、异甘草素(isoliquiritigenin)、李属异黄酮(prunetin)、紫柳素(butin)、紫柳查尔酮(butein),具有抗氧化、抗癌、抗炎、镇痛和松弛血管等作用,是降香不可忽视的重要活性成分,黄酮类成分对于降香的质量控制和作用物质基础研究具有重要意义^[1-5]。目前,对降香的研究工作大多集中在挥发油部分,而对黄酮类成分研究较少。本课题组采用溶剂法和各种色谱分离技术,对降香的化学成分进行了较为系统的研究,从降香中分离得到22个黄酮类化合物。在前期工作中,本课题组对大鼠灌胃降香总黄酮后,原型成分在血清和尿液样本中的浓

收稿日期:2006-12-19

修回日期:2006-12-20

^{*} 科学技术部“创新药物与中药现代化”重大专项(2001BAC01A56);70种中药注射剂指纹图谱研究及其技术平台的建立,负责人:钱忠直,果德安;国家中医药管理局专项基金(2004ZX01):中药指纹图谱关键技术与对照谱库建立的方法学研究,负责人:果德安;科学技术部科技基础性工作专项(2002DEA20021):食品、中药与天然药物有效成分检测技术研究,负责人:王晶。

^{*} 联系人:果德安,本刊副主编,教授,博士生导师,国家杰出青年基金获得者,从事中药质量控制及体内代谢研究,Tel:021-50271516; Fax:021-50272789, E-mail: gda@bjmu.edu.cn

度进行了测定,初步探讨了其药代动力学规律^[6,7]。在对大鼠灌胃降香总黄酮的药代动力学研究中发现,被测的4个主要原型成分都符合具有第一吸收相的二室模型,被测成分均可被迅速吸收,血药峰值出现在22 min左右,在80 min左右血药浓度二次达峰;2个主要成分(3R)-4'-methoxy-2',3,7-trihydroxy-isoflavanone和vestitone在尿中96h内的累计排泄量仅为给药量的7.23%和6.56%。以上结果表明,大鼠灌胃降香总黄酮后,黄酮类成分经过体内代谢过程,主要以代谢产物的形式存在,而原型成分很少。查阅文献^[8-20]发现,黄酮苷元在体内易发生Ⅱ相代谢反应,母药或其代谢物的极性基团与体内水溶性较大的内源性物质结合,常形成葡萄糖醛酸苷与硫酸酯等结合物。以结合状态存在的药物大多存在于尿中,但也存在于血液中。这些结合物极性大,水溶性强,并且在生理PH条件下呈电离状态,不能用经典的液-液萃取法将其自尿或血液中分离出来,通常需将样品作水解处理,使结合物中的药物或代谢物游离出来,呈游离状态的药物或代谢物脂溶性增强,才有可能用溶剂萃取法将其自生物样品溶液中分离出来。常用的结合物水解的方法有酸水解、酶水解和溶剂解。本课题组针对降香中含有的大量黄酮苷元成分,在体内代谢过程中极有可能形成大量Ⅱ相代谢结合物的特点,采用了水解的方法,考察体内代谢过程中药物可能存在的原型和结合物形式,以期进一步研究降香总黄酮的体内Ⅱ相代谢反应。

一、实验仪器与材料

1. 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪:德国 Agilent Technologies 公司。

Finnigan LCQ 质谱仪:美国 ThermoFinnigan 公司。

N-1000V-W 旋转蒸发仪:日本 EYELA 公司。

Satorious 电子分析天平:德国 Satorious 公司。

XW-80 型涡旋混合器:上海第一医学院仪器厂。

TGL-16G-A 型高速冷冻离心机:北京安亭科学仪器厂。

2. 试剂及试药

乙腈为色谱纯(Merck Company, Darmstadt, Ger-

many),重蒸水(Millipore, Bedford, MA, USA),其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

降香药材购自北京同仁堂药店,由果德安教授鉴定。

β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase):EC 3.2.1.31, 1240000 unit/g solid, 购自 Sigma 公司;硫酸酯酶(sulfatase):EC 3.1.6.1, 15100 unit/g solid, 购自 Sigma 公司。

3. 实验动物

Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体重 200-220 g,中国科学院上海药物研究所动物中心提供。实验前禁食 20 h。

4. 色谱条件

(1)液相色谱条件。

Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm, 5mm)(Palo Alto, CA, USA);

Zorbax SB-C₁₈ 保护柱(20×4 mm, 5mm)(Palo Alto, CA, USA);

血清样品流动相条件:(A)乙腈-(B)0.3% 醋酸水溶液进行梯度洗脱

0-20 min:A 25% 升至 30%, B 75% 降至 70%;

20-37 min:A 30% 升至 50%, B 70% 降至 50%;

37-45 min:A 80%, B 20%;

尿液样品流动相条件:(A)乙腈-(B)0.3% 醋酸水溶液进行梯度洗脱

0-12 min:A 25%, B 75%;

12-30 min:A 25% 升至 33%, B 75% 降至 67%;

31-40 min:A 80%, B 20%;

流速:1.0 ml·min⁻¹;检测波长:275 nm;

全波长扫描范围:190-400 nm;柱温:40℃;

(2)质谱条件。

ESI 源;负离子检测;

扫描范围:80-1000 m/z amu;

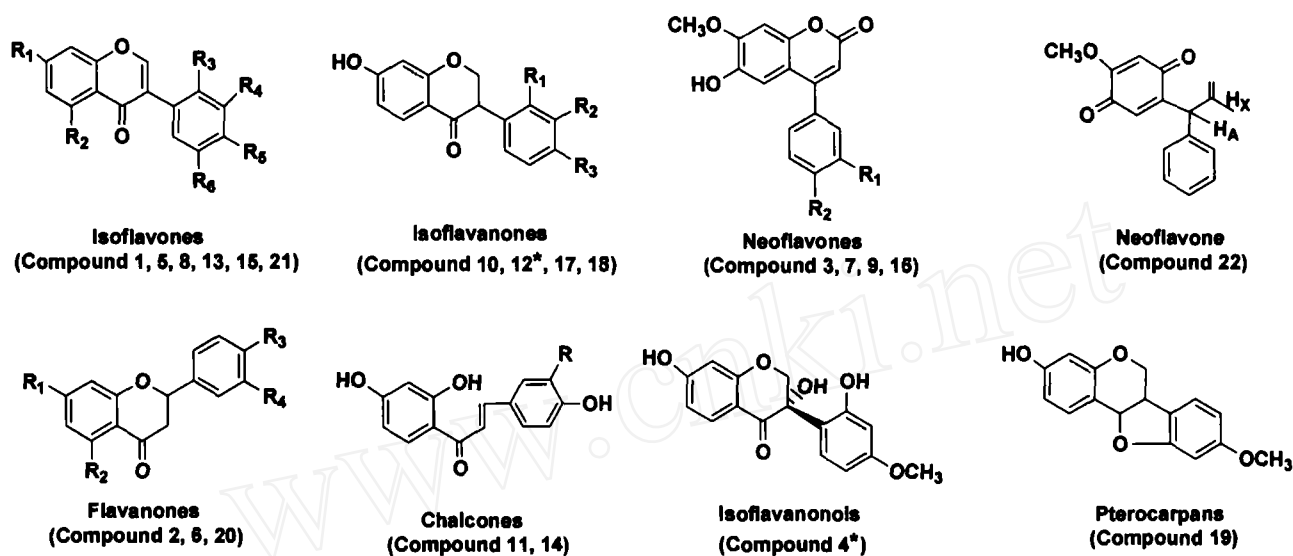
鞘气流:50 arb;辅助气流:15 arb;

源电压:5.00 kV;

毛细管温度:350℃;

毛细管电压:-12.00 V;

管透镜补偿电压:-10.00 V。



Type	No.	Name	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Isoflavone	1	3' - hydroxydaidzein	OH	H	H	OH	OH	H
	5	koparin	OH	H	OH	OH	OCH ₃	H
	8	2', 7 - dihydroxy - 4', 5' - dimethoxyisoflavone	OH	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃
	13	2' - hydroxyformononetin	OH	H	OH	H	OCH ₃	H
	15	formononetin	OH	H	H	H	OCH ₃	H
	21	prunetin	OCH ₃	OH	H	H	OH	H
Isoflavanone	10	violanonone	OCH ₃	OH	OCH ₃	-	-	-
	12 *	vestitone	OH	H	OCH ₃	-	-	-
	17	3' - O - methylviolanonone	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	-	-
	18	sativanone	OCH ₃	H	OCH ₃	-	-	-
Neoflavone	3	3' - hydroxymelanettin	OH	OH	-	-	-	-
	7	melanettin	H	OH	-	-	-	-
	9	stevenin	OH	H	-	-	-	-
	16	dalbergin	H	H	-	-	-	-
Flavanone	22	4 - methoxydalbergione	-	-	-	-	-	-
	2	butin	OH	H	OH	OH	-	-
	6	liquiritigenin	OH	H	OH	H	-	-
	20	pinocembrin	OH	OH	H	H	-	-
Chalcone	11	butein	OH	-	-	-	-	-
	14	isoliquiritigenin	H	-	-	-	-	-
Isoflavanonol	4 *	(3R) - 4' - methoxy - 2', 3, 7 - trihydroxyisoflavanone	-	-	-	-	-	-
Pterocarpan	19	medicarpin	-	-	-	-	-	-

图1 模型 M_{Manual}1 之结构

二、实验方法

1. 降香中黄酮类单体成分的分离与结构鉴定

本课题组采用溶剂法和各种色谱技术对降香 (*Dalbergia odorifera* T. Chen.) 的化学成分进行了研究,从降香中分离得到 22 个黄酮类化合物,利用化学和光谱方法 (UV、IR、NMR、MS 等) 鉴定了它们的结构,分别为: 3'-hydroxydaidzein (1), butin (2), 3'-hydroxymelanettin (3), (3R)-4'-methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone (4), koparin (5), liquiritigenin (6), melanettin (7), 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (8), stevenin (9), violanone (10), butein (11), vestitone (12), 2'-hydroxyformononetin (13), isoliquiritigenin (14), formononetin (15), dalbergin (16), 3'-O-methylviolanone (17), sativanone (18), medicarpin (19), pinocembrin (20), prunetin (21), 4-methoxydalbergione (22)。化合物具体结构见图 1。

2. 降香总黄酮有效部位的提取与分离

(1) 降香总黄酮提取与分离方法考察。

分别考察了聚酰胺法和大孔树脂法对降香的分离效果,采用液相色谱法对所得样品进行分析:聚酰胺和大孔吸附树脂均能对降香总黄酮实现良好的分离纯化,聚酰胺柱层析的 10% - 50% EtOH 洗脱部位和大孔吸附树脂柱层析的 30% - 70% EtOH 洗脱部位为总黄酮的富集部位。最后确定使用大孔树脂法,因为其成本低,可重现性好。

(2) 大孔树脂法分离纯化降香总黄酮。

降香药材粗粉 1 kg, 分别用 8, 6, 6 倍量 75% 乙醇溶液热回流提

取 3 次, 每次 2h, 合并 3 次提取液, 减压浓缩, 得 130g 浸膏, 将其用大孔树脂拌样后, 经 3 kg AB-8 型大孔树脂柱层析, 用 4 倍柱床体积 (4BV) 的 20% EtOH 洗脱除去水溶性杂质, 用 4BV 的 60% EtOH 洗脱得到总黄酮部位, 采用液相色谱监测, 发现 4BV 的 60% EtOH 之后的洗脱液中黄酮类化合物的量明显降低, 而脂溶性杂质被大量洗脱下来, 故之后的 60% EtOH 洗脱部位被舍弃。上样比例和洗脱溶剂用量参考 AB-8 型大孔树脂工艺参数及相关文献报道^[140-143]。经 AB-8 树脂得到的总黄酮洗脱部位, 即 60% EtOH 洗脱部位 (1), 与降香中 24 黄酮化合物混合对照品的 HPLC 图谱对比 (见图 2), 可以发现, 降香总黄酮洗脱部位包含已有对照品的所有黄酮类成分。综合以上结果说明大孔树脂法可以有效的纯化降香总黄酮, 除去干扰杂质。

3. 体液中黄酮类成分结合物的水解研究

本节实验针对降香中含有的大量黄酮苷元成分, 在体内代谢过程中极有可能形成大量 II 相代谢结合物的特点, 采用了水解的方法, 考察体内代谢过程中药物可能存在的原型和结合物形式。

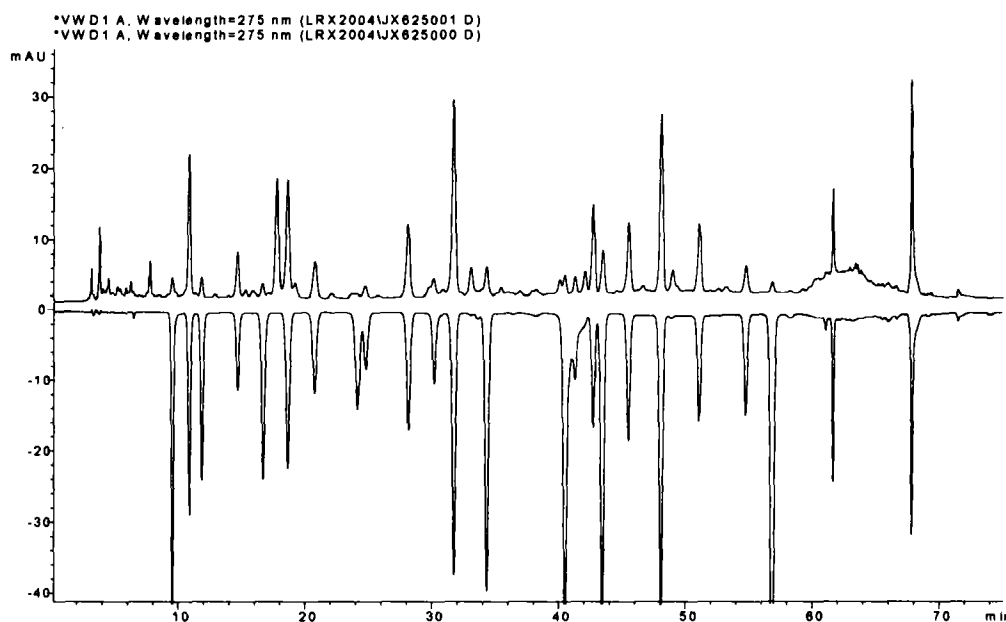


图 2 AB-8 树脂得到的总黄酮洗脱部位与降香黄酮化合物混合对照品对比的 HPLC 色谱图

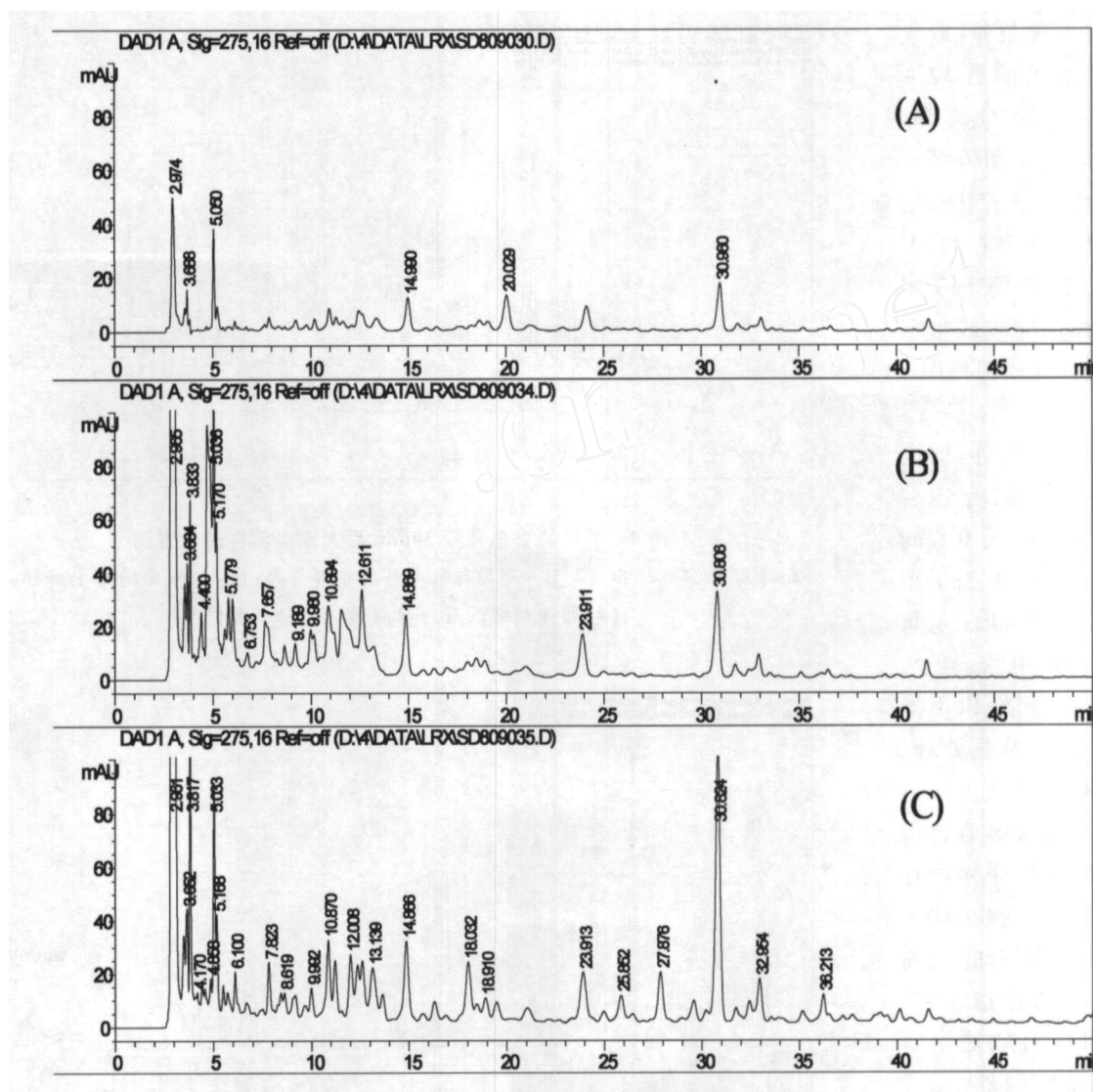


图3 灌胃降香总黄酮后12-24h大鼠尿样色谱图

(A) 未经水解、(B) 温和条件酸水解样品、(C) 剧烈条件酸水解样品

(1) 生物样品的采集和预处理。

降香总黄酮提取物(提取分离过程如2所述)用10%阿拉伯胶水溶液分散,得浓度为0.83 g/ml的混悬液。将总黄酮提取物按1.5 g/kg的剂量灌胃给予大鼠。

血清样品的采集和预处理 血样在大鼠灌胃降香总黄酮后,于不同时间点断头取血。血样放置30min,离心分离得血清样品,存于-20℃备用。

尿样的采集和预处理 尿样在大鼠灌胃降香总黄

酮后,于不同时间段收集,存于-20℃备用。

(2) 结合物水解方法考察。

酸水解方法。

未经水解样品预处理:取大鼠灌胃降香总黄酮后12-24h尿液1ml,加3ml乙酸乙酯,涡旋混合10min,离心($3000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)10min,分取上清液,于50℃氮气流下吹干,残渣加入30%乙腈500ml,涡旋溶解60s,离心($6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)3min,取上清液10ml,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图3(A)。

温和酸水解条件:取大鼠灌胃降香总黄酮后 12 - 24h 尿液 1ml, 加入 0.5ml 盐酸 (0.5mol/l) 和 0.5ml 甲醇后, 室温下放置 1h, 用 1mol/l 氢氧化钠溶液调 pH 中性, 蒸干, 残渣用 1ml 水分散, 以下操作同未经水解样品预处理。色谱图见图 3 (B)。

剧烈酸水解条件:取大鼠灌胃降香总黄酮后 12 - 24h 尿液 1ml, 加入 0.2ml 盐酸 (1mol/l) 和 0.8ml 甲醇, 煮沸 1h, 用 1mol/l 氢氧化钠溶液调 pH 中性, 蒸干, 残渣用 1ml 水分散, 以下操作同未经水解样品预处理。色谱图见图 3 (C)。

结果表明, 水解后色谱峰明显增多, 说明尿样中存在着大量的结合物。欲了解母体药物在体内的代谢情况, 必先将结合物水解。酸水解虽可以有效地水解结合物, 但反应激烈, 也容易造成成分分解。与此相比, 酶水解专属性强, 反应温和, 一般不会引起被测药物分解。在通过简单的酸水解方法确认灌胃降香总黄酮后大鼠体内存在着大量 II 相代谢产物后, 进一步通过酶水解实验考察最佳水解方案。

酶水解方法。

水解酶溶液的配制:β-葡萄糖醛酸苷酶 (β-glu-curonidase); EC 3.2.1.31, 1240000 unit/g solid, 购自 Sigma 公司。取 β-葡萄糖醛酸苷酶 3.8mg, 加醋酸 -

醋酸铵缓冲液 (pH 4.8) 0.5ml 溶解, 得到 9424 u/ml β-葡萄糖醛酸苷酶溶液 (以下用 β-glu 表示)。硫酸酯酶 (sulfatase); EC 3.1.6.1, 15100 unit/g solid, 购自 Sigma 公司。取硫酸酯酶 19.2mg, 加醋酸 - 醋酸铵缓冲液 (pH 4.8) 0.5ml 溶解, 得到 579.8 u/ml 硫酸酯酶溶液 (以下用 sulf 表示)。

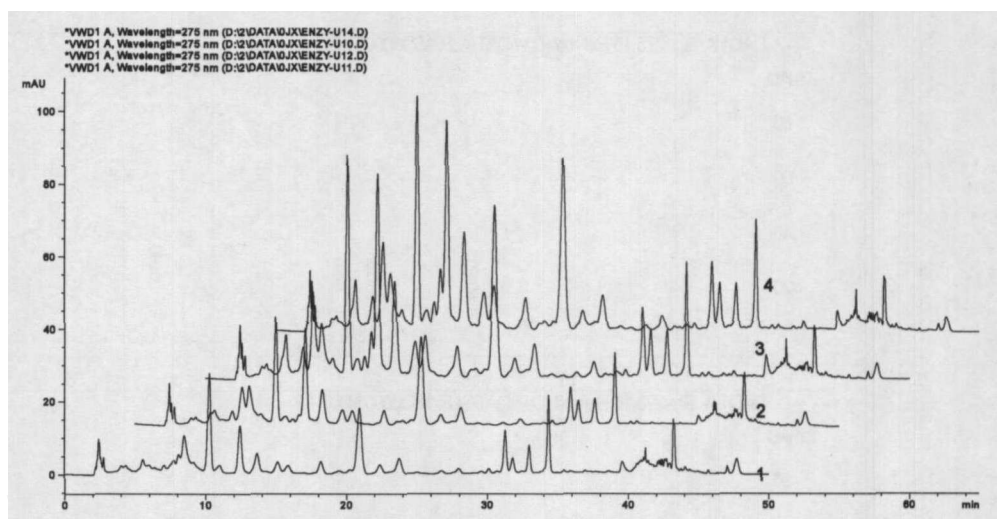


图 4 灌胃降香总黄酮 30min 后大鼠血清样品色谱图

(1) 未经酶水解样品、(2) β-葡萄糖醛酸苷酶水解样品、(3) 硫酸酯酶水解样品、
(4) 葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶水解样品

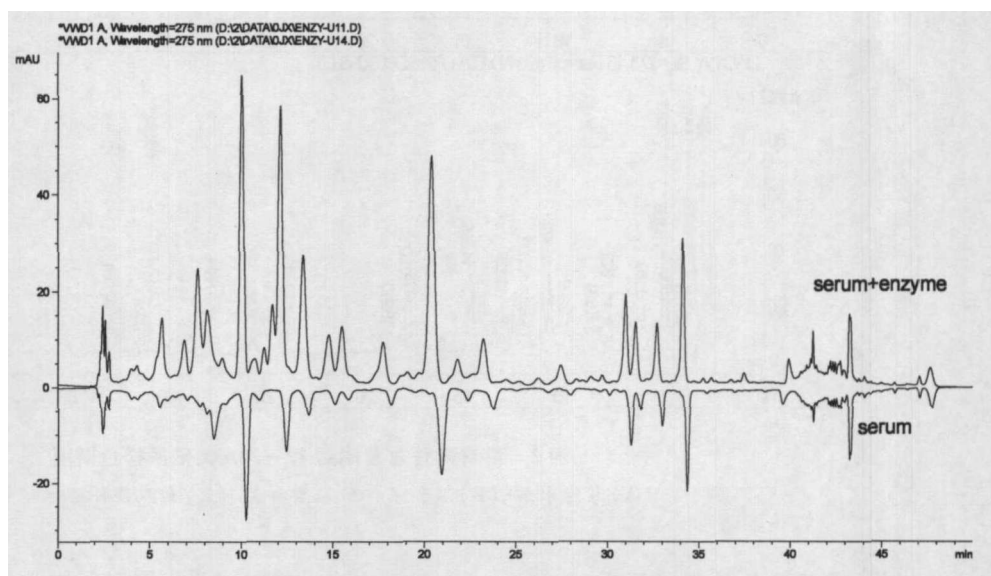


图 5 灌胃降香总黄酮 30 min 后大鼠血清酶水解样品、未经酶水解样品色谱图

水解酶所用剂量考察:在生物样品中加入水解酶,之后处理方法同未经水解样品预处理方法。参考文献中^[8-15]对黄酮类成分水解所用酶的剂量,分别考察了仅加入 β -葡萄糖醛酸苷酶和仅加入硫酸酯酶情况下所用剂量,当增加酶的量而色谱峰面积不再明显增加时确定为最佳剂量;然后将两种酶以各自的最佳剂量混合,作为葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶使用。图4为血样未经酶水解、经葡萄糖醛酸苷酶水解、经硫酸酯酶水解、经葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶水解色谱图,由色谱图分析,经葡萄糖醛酸苷酶水解与未经酶水解色谱图差别不明显,经硫酸酯酶水解后色谱峰明显增强,经葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶水解与经硫酸酯酶水解色谱图相似;尿样情况与血样相似。

血清样品处理:取大鼠灌胃降香总黄酮后30 min血清100 ml,加入50 ml β -glu和50 ml sulf,37℃放置3 h,加800 ml 乙酸乙酯,涡旋混合10 min,离心(3000 $r \cdot \min^{-1}$)10 min,分取上清液,于50℃氮气流下吹干,残渣加入30%乙腈100 ml,涡旋溶解60 s,离心(6000 $r \cdot \min^{-1}$)3 min,取上清液30 ml,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。对照组样品未加入水解酶,而是加入100 ml 醋酸-醋酸铵缓冲液,其它操作相同。色谱图见图5。

尿液样品处理:取大鼠灌胃降香总黄酮后12-24 h尿液100 ml,操作同上述血清样品预处理。对照组样品未加入水解酶,而是加入100 ml 醋酸-醋酸铵缓冲液,其它操作相同。色谱图见图6。

4. HPLC-MS 技术对体内代谢过程中的Ⅱ相代谢反应的分析

(1) 对照品的制备和生物样品的预处理。

对照品溶液的制备:分别精密称取22个黄酮化合物对照品适量,置于5 ml 量

瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成浓度已知的混合标准溶液(30-130 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

生物样品的预处理:血样、尿样的获得和预处理过程以及酶水解样品处理方法同3。

(2) 样品分析。

采用HPLC-MS方法分析了22个黄酮对照品、降香总黄酮样品、血清样品(空白血清、给药后血清及酶水解血清)、尿液样品(空白尿样、给药后尿样及酶水解尿样)等。图7给出了代表性图谱:(A)为黄酮对照品混合溶液图谱,(B)为给药30 min后血清经酶水解后样品图谱,(C)为给药后12-24 h尿液经酶水解后样品图谱。

三、实验结果

查阅大量文献^[8-20]发现,黄酮类成分在体内通常以结合物形式存在,主要为葡萄糖醛酸苷结合物和硫酸酯结合物,而甲基化结合物很少,故本实验采用葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶水解的方法,检测生物样品中可能存在的Ⅱ相代谢物。常用水解酶是 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase)和硫酸酯酶(sulfatase),

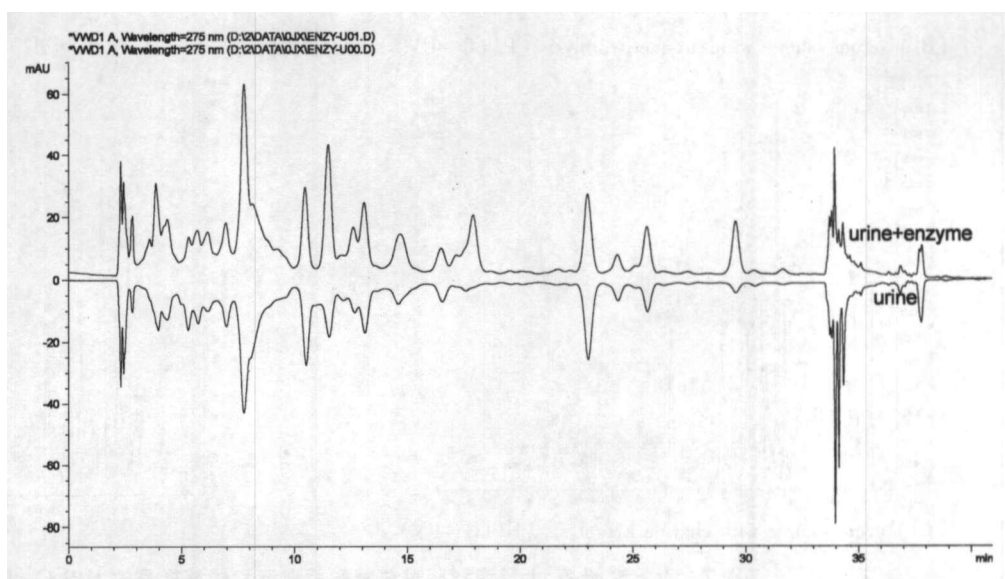


图6 灌胃降香总黄酮后12-24 h大鼠尿样酶水解样品、未经酶水解样品色谱图

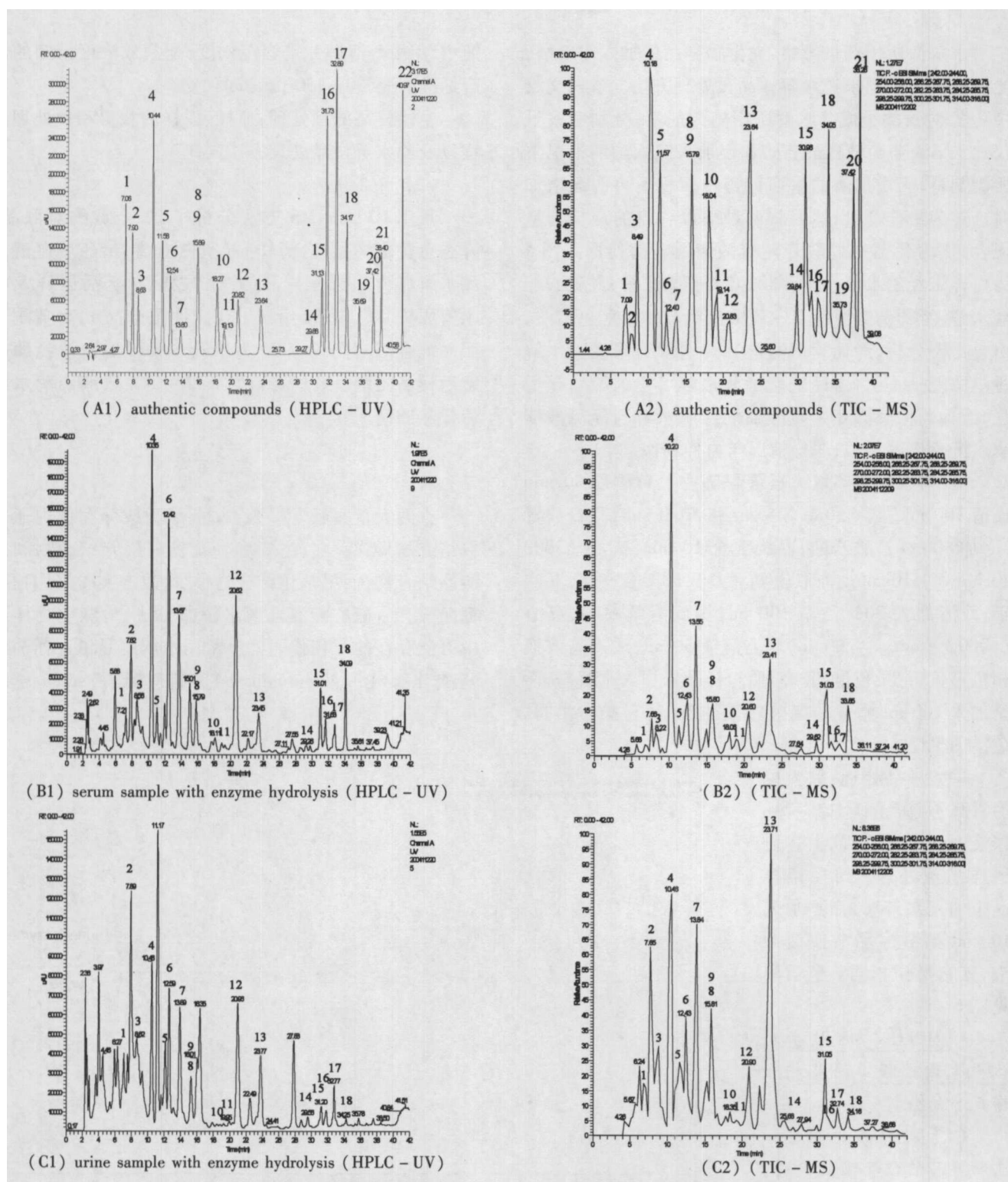


图7 黄酮对照品、大鼠灌胃降香总黄酮后血清和尿液样品的 HPLC - MS 色谱图

黄酮对照品混合溶液 HPLC - UV 图(A1), 总离子流(TIC - MS)图(A2);
 给药 30min 后血清经酶水解后样品 HPLC - UV 图(B1), TIC - MS 图(B2);
 给药后 12 - 24h 尿液经酶水解后样品 HPLC - UV 图(C1), TIC - MS 图(C2)。

前者可专门水解药物的葡萄糖醛酸苷,后者水解药物的硫酸酯。在水解酶所用剂量考察时发现,生物样品经葡萄糖醛酸苷酶水解与未经酶水解色谱图差别不明显,经硫酸酯酶水解后色谱峰明显增强,经葡萄糖醛酸苷-硫酸酯混合酶水解与经硫酸酯酶水解色谱图相似,这说明降香中黄酮类成分在大鼠体内Ⅱ相代谢反应以硫酸酯结合为主,而葡萄糖醛酸苷结合不显著。由图5和图6可知,绝大多数黄酮类成分在酶水解前后都被检出,但酶水解反应后,色谱峰的数目和峰高均有明显增加。以上结果表明大鼠灌胃降香总黄酮后,

黄酮类成分在体内发生了Ⅱ相代谢反应,药物在体内同时存在原型和Ⅱ相代谢产物两种形式,Ⅱ相代谢产物又以硫酸酯结合物为主。

表1给出了22个已知黄酮类化合物的 t_R 、MS数据和UV λ_{max} 。通过将生物样品数据与对照品数据对比,可以明确判定生物样品中是否含有这些化合物的原型或Ⅱ相代谢产物。此外,还可以通过已有信息推测生物样品中含有的其它化合物,由于缺乏对照品验证,此部分推测结果未在本文给出。

采用HPLC-MS方法对黄酮对照品、降香总黄酮

表1 HPLC-MS对黄酮类成分的分析结果

No.	t_R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	λ_{max} (nm)	Identity
1	7.06	269	220, 292	3'-hydroxydaidzein
2	7.90	271	232, 278	butin
3	8.63	299	340	3'-hydroxymelanettin
4	10.44	301	280	(3R)-4'-methoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone
5	11.58	299	240, 290	koparin
6	12.54	255	230, 276, 310	liquiritigenin
7	13.80	283	294	melanettin
8	15.89	283	286, 350	2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone
9	15.89	313	290	stevenin
10	18.27	315	274, 310	violanone
11	19.13	271	262	butein
12	20.83	285	278, 312	vestitone
13	23.64	283	248, 290	2'-hydroxyformononetin
14	29.88	255	240, 372	isoliquiritigenin
15	31.13	267	250, 302	formononetin
16	31.73	267	232, 352	dalbergin
17	32.89	329	232, 274, 320	3'-O-methylviolanone
18	34.17	299	230, 276, 310	sativanone
19	35.69	269	228, 286	medicarpin
20	37.42	255	232, 290	pinocembrin
21	38.40	283	260	prunetin
22	40.97	—	260	4-methoxydalbergione

—: MW = 270, ESI-MS未检出。

样品、血清样品和尿液样品进行了分析,典型图谱见图7。结果表明:在降香总黄酮中可以检测到所有22个已知黄酮化合物;分析空白血清、给药30min后血清样品、给药30min后血清酶水解样品发现,空白不干扰测定,在给药30min后血清样品及酶水解样品中均指认了18个黄酮化合物,酶水解后峰强度明显增加,说明大鼠血清中同时存在原型和结合物两种形式,化合物19-22在血清及其他生物样品中均未检测到可能是由于其在降香总黄酮中含量太低的原因;分析空白尿样、给药后12-24h尿样、给药后12-24h尿样酶水解样品发现:空白不干扰测定,在给药后12-24h尿样及酶水解样品中均指认了18个黄酮化合物,酶水解后峰强度明显增加,说明大鼠尿样中同时存在原型和结合物两种形式。

四、讨论

临床及实验研究表明,大多数中药通过灌胃起效,其直接发挥药效的化学成分与灌胃前中药里的化学成分相比很可能有显著的不同,因此中药的药效是其原型药物与其代谢产物共同作用的结果。对中药的物质基础的研究,不仅包括药物的体外研究,更包括中药进入体内后的代谢过程研究。中药作为一个复杂体系,在作用机理尚不明确的情况下,体内代谢研究难度较大,目前仍处于开创性研究阶段,需要借鉴化学药物体内代谢研究的方法,在中医药理论的指导下,在逐渐探索过程中构建中药体内代谢研究的理论和技术体系。也正是其研究的难度和困难,为我们在中药体内代谢方面提供了广阔的研究空间和机遇。

本实验针对降香中含有的大量黄酮苷元成分,在体内代谢过程中极有可能形成大量Ⅱ相代谢结合物的特点,以酶水解的方法,采用HPLC-DAD和HPLC-MS技术,分析了血清和尿样中的原型药物和Ⅱ相代谢产物,对中药复杂体系的体内Ⅱ相代谢反应过程进行了有益探索。这是对降香中黄酮类成分体内Ⅱ相代谢反应的首次报道。为进一步深入研究降香的体内代谢过程和作用物质基础,阐明降香的治疗机理、评价药材的内在质量提供了实验依据。

此外,值得一提的是LC/UV-DAD/ESI-MS技

术的高灵敏度和高选择性,在降香总黄酮的分析中发挥了重要作用,从而实现快速、简单、准确的分析药材提取物及体内样品中的黄酮类成分。LC-MS技术的高灵敏度也使生物样品中原本难于辩识的痕量成分得以明确鉴定。

参考文献

- 1 Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC et al. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1392: 291-299.
- 2 Ogata T, Yahara S, Hisatsune R, Konishi R, Nohara T. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38: 2750-2755.
- 3 Chan SC, Chang YS, Kuo SC. Neoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. *Phytochemistry*, 1997, 46: 947-949.
- 4 Wang W, Weng XC, Cheng DL. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Pharmacol Toxicol*, 2001, 88: 261-266.
- 5 Yukihiro G, Madoka K, Kazuo I, Masaaki S, Fumiyuki K, Ushio S. Novel bi-isoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. *Chem. Pharm. Bull*, 1985, 33: 5606-5609.
- 6 Liu RX, Sun JH, Bi KS, et al. Identification and determination of major flavonoids in rat serum by HPLC-UV and HPLC-MS methods following oral administration of *Dalbergia odorifera* extract. *J. Chromatogr. B*, 2005, 829: 35-44.
- 7 Liu RX, Wang W, Wang Q, et al. Identification and determination of major flavonoids in rat urine by HPLC-UV and HPLC-MS methods following oral administration of *Dalbergia odorifera* extract. *Biomed. Chromatogr.* 2006; 20: 101-108.
- 8 Lee HW, Ji HY, Lee HI, Kim HK, Sohn DH, Kim YC, Chung HT, Lee HS. Determination of butein in rat serum by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2004, 34: 227-231.
- 9 Wilkinson AP, Wähälä K, Williamson G. Identification and quantification of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *J. Chromatogr. B*, 2002, 777: 93-109.
- 10 Tolleson WH, Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Roberts DW. Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. *J. Agric. Food Chem*, 2002, 50: 4783-4790.
- 11 Walle T. Free Radic. Serial review: Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biol. Med*, 2004, 36: 829-837.
- 12 Wang FM, Yao TW, Zeng S. Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administrated tablet of ginkgo biloba extract by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2003, 33: 317-321.

- 13 Rijke ED, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UA. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple - quadrupole and ion - trap instruments. *J. Chromatogr. A*, 2003, 984: 45 - 58.
- 14 Choudhury R, Srai SK, Debnam E, Rice - Evans CA. Urinary Excretion of hydroxycinnates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27: 278 - 286.
- 15 Ishii K, Furuta T, Kasuya Y. Determination of naringin and naringenin in human urine by high - performance liquid chromatography utilizing solid - phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 1997, 704: 299 - 305.
- 16 Li C, Homma M, Oka K. Chromatographic identification of phenolic compounds in human urine following oral administration of the herbal medicines Daisaiko - to and Shosaiko - to. *J. Chromatogr. B*, 1997, 693: 191 - 198.
- 17 Wittemer SM, Veit M. Validated method for the determination of six metabolites derived from artichoke leaf extract in human plasma by high - performance liquid chromatography - coulometric - array detection. *J. Chromatogr. B*, 2003, 793: 367 - 375.
- 18 Chen XY, Du Y, Zhong DF. Quantitation of the flavonoid wogonin and its major metabolite wogonin - 7 - D - glucuronide in rat by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2002, 775: 169 - 178.
- 19 Cimino CO, Shelnett SR, Ronis MJJ, Badger TM. An LC - MS method to determine concentrations of isoflavones and their sulfate and glucuronide conjugates in urine. *Clin. Chim. Acta*, 1999, 287: 69 - 82.
- 20 Coward L, Kirk M, Albin N, Barnes S. Analysis of plasma isoflavones by reversed - phase HPLC - multiple reaction ion monitoring - mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 1996, 247: 121 - 142.

Phase II Reactions of *Dalbergia Odorifera* Total Flavornoids in Rats

Liu Rongxia¹, Cui Yajun², Guo Dean¹

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Research Center for TCM Modernization, Shanghai 201203;

2. College of Chinese Pharmacology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

In this paper, flavonoids in free form and phase II reactive metabolites in rats, after oral administration of *D. odorifera* extract, are investigated. The sulfate and glucuronide conjugates of the flavonoids in rat are studied by hydrolysis with β - glucuronidase/sulfatase utilizing HPLC - DAD and HPLC - MS techniques. By comparison with the authentic standards, eighteen flavonoids in free form are found in rat serum and urine, both before and after the enzyme treatment. It shows that the phase II reaction has taken place in rats, after oral administration of *D. odorifera* total flavornoids. Flavonoids are present in rats in both free and conjugated forms. Further studies show that sulfation is the primary conjugation in rat, while glucuronidation is not noticeable.

Keywords: *Dalbergia odorifera*, flavornoids, phase II reactions, metabolism, HPLC - DAD, HPLC - MS

(责任编辑:张志华,责任编审:张志华,责任译审:邹春申)

世卫组织敦促各国重视药品打假

世界卫生组织日前敦促各国政府严厉打击制造和出售假药的行为,以保护公民健康。世卫组织在一份声明中说,假药种类很多,不但不能治病,还可能增加患者的抗药性,甚至威胁生命。据估计,在拉美、东南亚和撒哈拉沙漠以南非洲的某些贫困地区,药品市场上的假药比例占30%以上。在一些东欧国家,这一比例达20%。此外,很多网上非法药店也在出

售假药。世卫组织认为,目前大多数国家的法律、法规仍对制售假药的行为约束不够,在一些发达国家,制造假药受到的惩罚比制造假T恤衫还要轻。声明说,世卫组织与国际刑警组织、欧盟委员会、世界海关组织等多个国际合作伙伴,已联合发起一项帮助各国政府打击制售假药的计划,并计划在2007年底之前建立一个世卫组织所有成员参加的合作机制,以彻底根除市场上的假药。

(文摘)