

# UPLC-Orbitrap HRMS 法测定小鼠血液中 香豆素及其代谢物

李琛, 王荣浩, 王丁众, 毛健, 刘帅东, 张建功

(中国烟草总公司 郑州烟草研究院, 郑州 450001)

**摘要:**以香豆素为探针底物,建立了测定小鼠血液中香豆素及其代谢物的超高效液相色谱-轨道阱高分辨质谱(UPLC-Orbitrap HRMS)法.以4-甲基伞形酮为内标,样品用乙腈沉淀蛋白后,直接进入XDB-C<sub>18</sub>色谱柱分离并采用一级全扫描和数据依赖二级扫描(Full MS/ddMS<sup>2</sup>)模式进行质谱分析.通过测定7-羟基香豆素的生成量评估5-甲氧基补骨脂素(5-MOP)对小鼠CYP2A5酶活性的影响.结果表明:各目标物的检出限为0.011~0.016 ng/mL,回收率和日内精密度分别为90.2%~110.4%和1.86%~7.08%.方法选择性好,分析效率高,适合于小鼠血液中香豆素及其代谢物的测定.5-MOP组小鼠香豆素的最大血药浓度C<sub>max</sub>为对照组的1.42倍( $P < 0.01$ ),药时曲线下面积AUC<sub>0-∞</sub>为1.59倍( $P < 0.05$ ),半衰期 $t_{1/2}$ 为1.05倍( $P < 0.01$ ),5-MOP能够显著抑制小鼠CYP2A5酶活性.

**关键词:**香豆素;5-MOP;CYP2A5;小鼠;血液;Orbitrap 高分辨质谱

**中图分类号:**O657

**文献标志码:**A

细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)是在动植物、微生物的各组织中广泛存在的一类含有铁卟啉辅基的b族细胞色素,参与多种内、外源性物质的代谢,在药理学和毒理学方面具有十分重要的地位<sup>[1-3]</sup>.细胞色素酶P450 2A6(cytochrome P450 2A6, CYP2A6)是人体重要的药物代谢酶,约占人类CYP450酶系统的5%,参与环磷酸胺、丙戊酸钠、咖啡因及尼古丁等代谢,能将烟草中大量的亚硝胺致癌原如N-亚硝基二甲胺、NNK、NNN等激活为强致癌物<sup>[4-6]</sup>.小鼠CYP2A5是与人类CYP2A6起源相同的代谢酶,其氨基酸序列与CYP2A6有84%同源,结构和功能极为相似<sup>[7]</sup>.2012年Zhou等<sup>[8]</sup>对野生型和去除CYP2A5基因的小鼠做了体内和体外研究,表明CYP2A5对小鼠肺中NNK的生物激活起到非常重要的作用.香豆素是CYP2A5的特异性底物,能被CYP2A5代谢为7-羟基香豆素排出.将香豆素用作CYP2A5的探针底物,通过测定其特异性代谢产物7-羟基香豆素含量来评价其酶活性,是公认的CYP2A5酶活性检测方法.与传统检测方法荧光分光光度法、HPLC-UV等相比,超高效液相色谱-轨道阱高分辨质谱法具有检测限低、选择性好、灵敏度高等优点,近年来已多应用于药物分析及复杂生物基质检测领域<sup>[9-14]</sup>.本文建立了UPLC-Orbitrap HRMS法测定小鼠血液中香豆素及其代谢产物,以此为基础用香豆素为探针药物评估5-甲氧基补骨脂素(5-MOP)对CYP2A5酶活性的影响,旨在为课题后期研究5-MOP对烟草特有亚硝胺的代谢影响提供支持.

## 1 实验部分

### 1.1 材料及仪器

C57BL/6 雌性小鼠[SPF级,6~8周龄,体质量(17±1)g,常州卡文斯实验动物有限公司提供,SCXK(苏)

收稿日期:2016-10-08;修回日期:2017-02-02.

基金项目:国家自然科学基金(21175153;21307163);中国烟草总公司郑州烟草研究院院长科技发展基金项目(602011CA0310).

作者简介:李琛(1992-),女,河南开封人,中国烟草总公司郑州烟草研究院在读研究生,研究方向为烟草化学成分及烟草特有亚硝胺代谢分析,E-mail:1-c2004@126.com.

通信作者:张建功,E-mail:jxzh258@sina.com.

2011-0003]. 本实验条件符合 GB 14925-2010《实验动物环境及设施》对动物实验设施的相关要求,动物实验操作及动物饲养管理经在许可和监督的条件下严格进行.

甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck);甲酸(色谱纯,德国 Serva);香豆素(>98%,加拿大 TRC);7-羟基香豆素、4-甲基伞形酮、5-甲氧基补骨脂素(>99%,美国 Aldrich);氯化钠(分析纯,郑州派尼试剂).

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪, Q-Exactive 轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Scientific); Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪(美国 Millipore); Sigma 2-16KL 型高速冷冻离心机, CPA225D 型电子天平(感量 0.000 01 g, 德国 Sartorius); S25 型圆周振荡器(德国 IKA); 有机相针式滤器(13 mm×0.22 μm, 天津津腾); Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(2.1×150 mm, 3.5 μm, 美国 Agilent).

## 1.2 标准溶液的制备

准确称取香豆素、7-羟基香豆素及内标物 4-甲基伞形酮标准品, 甲醇溶解后采用乙腈定容, 配制浓度为 100 μg/mL 的标准储备液并于 -20 °C 避光保存. 依次移取一定量的目标物和内标物的标准储备液, 加入小鼠空白血清, 配制一系列不同浓度的标准溶液, 其中香豆素和 7-羟基香豆素的质量浓度梯度依次为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000 ng/mL, 内标 4-甲基伞形酮质量浓度为 5 ng/mL.

## 1.3 分组给药与血液样品处理

取 C57BL/6 小鼠 100 只, 随机分为对照组和 5-MOP 组各 50 只, 两组分别再以每组 5 只随机分为 10 个小组. 每日上午 9 时, 5-MOP 组灌胃 5-MOP 溶液(溶于玉米油, 25 mg/kg, 1 mL/100 g 体质量), 对照组则灌胃等体积生理盐水. 连续给药 3 次, 每次间隔 24 h. 第 3 次给药 12 h 前, 将小鼠饲料移除. 实验期间小鼠可自由饮水.

最后一次给药 1 h 后, 每只小鼠通过腹腔注射 CYP2A5 探针药物香豆素溶液(100 mg/kg, 1 mL/100 g 体质量). 于不同时间(5、10、15、30、45、60、90、120、180、240 min)后, 眼眦取血 0.5 mL 注入 1.5 mL 离心管, 于 4 °C、3000 g 下离心处理 10 min; 之后取 100 μL 上清血清注入盛有 20 μL 100 ng/mL 的内标溶液和 280 μL 乙腈的 1.5 mL 离心管中, 涡旋 30 s 混合均匀, 并超声 10 min; 最后于 4 °C、12 000 g 下离心处理 10 min 后, 移取上清用 0.22 μm 有机相针式滤器过滤后进样分析.

## 1.4 分析条件

色谱柱采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB - C<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 柱温 25 °C, 进样量 2 μL, 流速 0.2 mL/min; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, B: 乙腈(A:B=70:30). 质谱条件为: 电加热喷雾离子源(HESI), 喷雾电压 3.5 kV, 毛细管加热温度 320 °C, 加热器温度 300 °C. 鞘气(Sheath gas)流速 1.67 L/min, 辅助气(Aux gas)流速 1 L/min; 采用 Full MS/ddMS<sup>2</sup> 正离子模式进行扫描, 一级全扫描范围(200±100) amu, 分辨率 7×10<sup>4</sup>, 离子最大注入时间 50 ms, 自动增益控制(AGC)1×10<sup>6</sup>; 二级扫描分辨率为 1.75×10<sup>4</sup>, 自动增益控制 1×10<sup>5</sup>, 最大注入时间 50 ms, 归一化碰撞能量(NCE)60%.

## 1.5 数据处理

实验数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 并通过非房室模型的统计矩原理计算药代动力学参数.

# 2 结果与讨论

## 2.1 方法选择性

血液样品和标准溶液中香豆素及其代谢物的色谱图如图 1 所示, 目标物分离完全, 峰形较好, 无明显杂质干扰. 10 min 之内即可完成单次测定, 适合复杂生物基质样品的高通量分析, 分析效率高. 表 1 列出了目标物质量数的理论值和测量值, 误差均小于 1.3×10<sup>-6</sup>, 且在上述碰撞能量下, 各目标物均有足够的特征碎片离子辅助定性. 由图 1 和表 1 可知, 该方法可靠性较高, 选择性较好, 能够有效排除杂质干扰.

## 2.2 工作曲线、检出限和定量限

以 4-甲基伞形酮为内标, 采用内标法定量, 以目标物与内标的色谱峰面积之比(Y)对相应的目标物浓度(X)进行线性回归, 即可得到各目标物的工作曲线方程及相关系数. 重复进样最低浓度的标准工作溶液 10 次, 计算其标准偏差, 以标准偏差的 3 倍和 10 倍值为方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ). 结果如表 2

所示,香豆素及其代谢物在 0.2~1000 ng/mL 范围内线性良好,方法检出限在 0.011~0.016 ng/mL 之间,定量限在 0.036~0.052 ng/mL 之间,说明该方法适用于香豆素及其代谢物的定量分析。

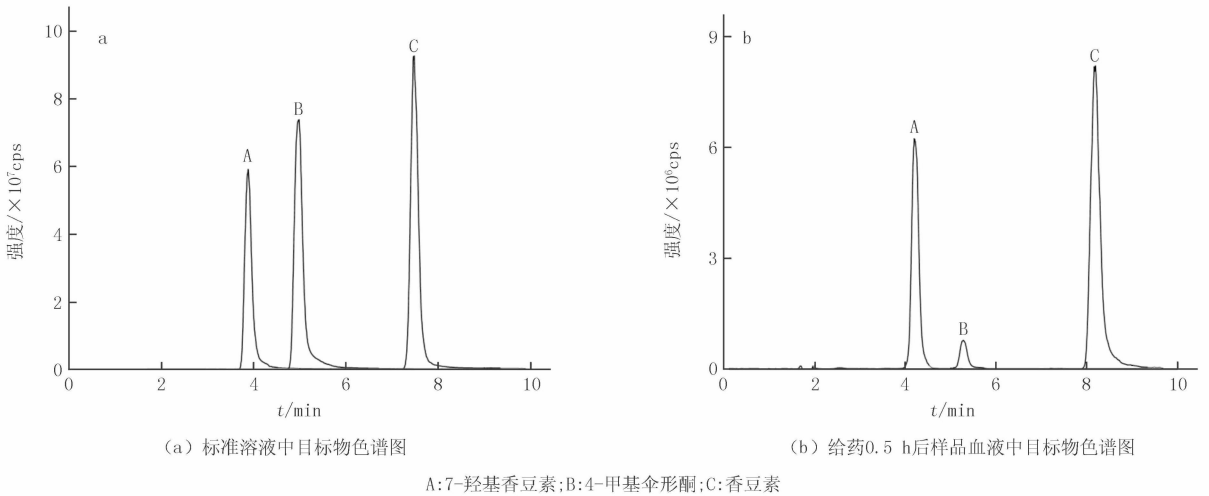


图1 香豆素及其代谢物色谱图

表1 各目标化合物质量数和主要二级子离子

目标物	母离子[M+H] <sup>+</sup>		质量误差/( $\times 10^{-6}$ )	主要二级子离子( $m/z$ )
	理论值	测量值		
香豆素	147.044 1	147.044 0	0.7	91.054 7/103.054 6
7-羟基香豆素	163.039 0	163.038 8	1.2	91.054 7/116.966 4
4-甲基伞形酮	177.054 6	177.054 8	1.1	121.064 9/149.022 9

表2 各目标物工作曲线、相关系数、检出限和定量限

目标物	线性回归方程	相关系数	LOD/(ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ/(ng·mL <sup>-1</sup> )
香豆素	$Y=0.060\ 2X+0.027\ 45$	0.999 8	0.011	0.036
7-羟基香豆素	$Y=0.040\ 4X+0.074\ 14$	0.999 5	0.016	0.052

### 2.3 重复性和回收率

取空白血清,加入目标物标准溶液,制备高、中、低3种浓度的质控样品,香豆素及其代谢物质量浓度为1、50和500 ng/mL,内标质量浓度为5 ng/mL,采用上述方法进行前处理和内标法定量分析.于同一天内,对高、中、低3个浓度的质控样品分别进行6次重复进样分析,定量测定目标物含量,进而计算出3个浓度水平下目标物的日内精密度和回收率,如表3所示,3种浓度的质控样品回收率为90.2%~110.4%,精密度(RSD)在1.86%~7.08%之间,说明该方法准确度较高,重复性较好,能够满足复杂基质中痕量目标物检测的方法学要求。

表3 各目标物在不同浓度水平回收率和精密度( $n=6$ )

目标物	浓度水平	回收率/%	精密度/%
香豆素	高	110.4	7.08
	中	101.3	4.14
	低	90.2	4.46
7-羟基香豆素	高	99.4	1.86
	中	97.8	2.64
	低	102.5	2.72

## 2.4 小鼠血液中目标物的测定

以香豆素及其代谢物的浓度为纵坐标,以采样时间为横坐标,绘制对照组和 5-MOP 组小鼠血液中香豆素及代谢物质量浓度随时间的变化曲线,如图 2 所示。

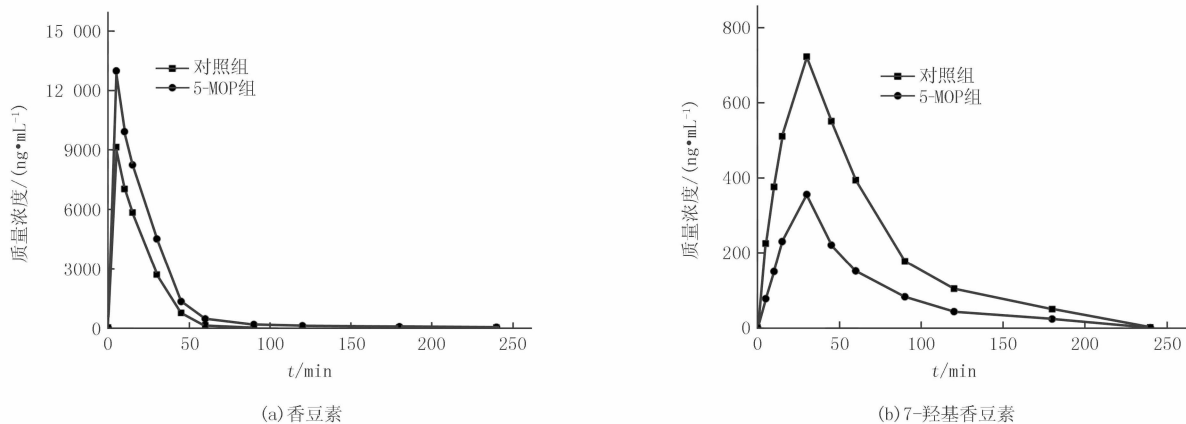


图2 小鼠腹腔注射香豆素后,对照组(■)、5-MOP组(●)血浆中香豆素及其代谢物的浓度-时间曲线

5-MOP 组各时间点香豆素的平均血药浓度均明显高于对照组,且 7-羟基香豆素的平均血药浓度均明显低于对照组. 对小鼠血液中香豆素及代谢物浓度随时间变化的数据进行非房室模型分析,其主要药代动力学参数见表 4. 5-MOP 组的最大血药浓度  $C_{max}$  为对照组的 1.42 倍 ( $P < 0.01$ ), 药时曲线下面积  $AUC_{0-\infty}$  为 1.59 倍 ( $P < 0.05$ ), 香豆素半衰期  $t_{1/2}$  为 1.05 倍 ( $P < 0.01$ ). 结果表明,5-MOP 处理延缓了香豆素在小鼠体内的代谢速率,使得香豆素的最高血药浓度和分布含量明显升高. 由于香豆素代谢与 CYP2A5 酶活性诱导相关,由此表明 5-MOP 可使小鼠体内 CYP2A5 酶活性明显降低,与文献[15]一致.

表 4 香豆素及代谢物在两组小鼠血浆中的主要药代动力学参数

参 数	对照组	5-MOP 组
$C_{max}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$9155.61 \pm 11.37$	$13001.56 \pm 15.26^*$
$AUC_{0-\infty}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min})$	$195408.43 \pm 235.1$	$310454.09 \pm 465.31^{**}$
香豆素 $t_{1/2}/\text{min}$	$18.54 \pm 1.14$	$19.52 \pm 1.02^*$

注:与对照组相比,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.05$ .

## 3 结 论

建立了检测小鼠血液中香豆素及其代谢物的 UPLC-Orbitrap HRMS 方法,目标物检出限在  $0.011 \sim 0.016 \text{ ng/mL}$  之间,定量限在  $0.036 \sim 0.052 \text{ ng/mL}$  之间,精密度为  $1.86\% \sim 7.08\%$ ,回收率为  $90.2\% \sim 110.4\%$ ,方法的分析效率高,线性范围宽,选择性和准确性好;与对照组相比,5-甲氧基补骨脂素(5-MOP)处理后小鼠体内香豆素的血药浓度明显升高,同时 7-羟基香豆素的血药浓度显著降低,表明 5-MOP 能够明显抑制小鼠 CYP2A5 酶活性. 该方法适合于小鼠血液中香豆素及其代谢物的检测与分析,为小鼠体内 CYP2A5 的活性检测和评估研究提供了新的支持.

## 参 考 文 献

- [1] Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan R A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment[J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(8): 342-349.
- [2] Thummel K E, Kunze K L, Shen D D. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 27(2): 99-127.
- [3] Kamataki T, Fujita K, Nakayama K, et al. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives; application of genetically engineered Salmonella expressing human CYP[J]. Drug Metab Rev, 2002, 34(3): 667-676.

- [4] Patten C J, Smith T J, Friesen M J, et al. Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for N-nitrososornicotine alpha-hydroxylation by human liver microsomes[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(8): 1623-1630.
- [5] Yamazaki H, Inui Y, Yun C H, et al. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes[J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(10): 1789-1794.
- [6] Siu E C K, Wildenauer D B, Tyndale R F. Nicotine self-administration in mice is associated with rates of nicotine inactivation by CYP2A5[J]. *Psychopharmacology*, 2006, 184(3-4): 401-408.
- [7] Murphy S E, Raulinaitis V, Brown K M. Nicotine 5-oxidation and methyl oxidation by P450 2A enzymes[J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(8): 1166-1173.
- [8] Zhou X, D'Agostino J, Xie F, et al. Role of CYP2A5 in the bioactivation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(1): 233-241.
- [9] 殷耀, 陈惠兰, 陈磊, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法测定蜂蜜中的3种马桑内酯[J]. *色谱*, 2015, 33(7): 711-714.
- [10] 安卓玲, 史忱, 赵瑞, 等. 基于超高效液相色谱-质谱的药物性肝损伤患者血清代谢组学研究[J]. *分析化学*, 2015, 43(9): 1408-1414.
- [11] 冯明飞, 刘俊辉, 卢斌斌, 等. UPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱法测定小鼠血液中的NNN及其7种代谢物[J]. *烟草科技*, 2015, 48(6): 40-44.
- [12] 刘帅东, 王丁众, 冯明飞, 等. LC-HRMS 法检测 C57BL/6 小鼠血液中 NNK 及其 7 种代谢物[J]. *烟草科技*, 2016, 49(5): 69-74, 89.
- [13] Ngongang A D, Duy S V, Sauvé S. Analysis of nine N-nitrosamines using liquid chromatography-accurate mass high resolution-mass spectrometry on a Q-Exactive instrument[J]. *Anal Meth*, 2015, 7(14): 5748-5759.
- [14] Concheiro M, Anizan S, Ellefsen K, et al. Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(29): 9437-9448.
- [15] 王二豪. 芹菜提取物对 CYP2A6 酶活性的影响[D]. 重庆:重庆医科大学, 2014.

## Determination of Coumarin and Its Metabolite in Mouse Blood with UPLC-Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry

Li Chen, Wang Ronghao, Wang Dingzhong, Mao Jian, Liu Shuaidong, Zhang Jianxun

(Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In order to accurately determine coumarin and its metabolite in mouse blood, a UPLC-Orbitrap high resolution mass spectrometry method with coumarin as the probe substrate was established. Using 4-methylumbelliferone as internal standard, immediately after protein precipitating with acetonitrile, the samples were separated by an XDB-C<sub>18</sub> column in UPLC spectrometer with mass spectrometry under full scan/data-dependent MS<sup>2</sup> mode. The effect of 5-Methoxypsoralen (5-MOP) on the activity of cytochrome P450 2A5 (CYP2A5) enzyme in mouse was evaluated by the production of 7-hydroxycoumarin. The results showed that the limits of detection of analytes ranged from 0.011 to 0.016 ng/mL, and the recoveries ranged from 90.2% to 110.4% with the intra-day precision of 1.86% to 7.08% respectively. The developed method was suitable for the simultaneous analysis of coumarin and its metabolite in mouse blood with good selectivity and high efficiency. Compared with the control group, the maximum plasma concentration of 5-MOP-treated group was increased by 1.42 fold ( $P < 0.01$ ), the area under the curve was increased by 1.59 fold ( $P < 0.05$ ), the elimination half-life was increased by 1.05 fold ( $P < 0.01$ ). The results indicate that the activity of CYP2A5 is markedly inhibited by 5-MOP.

**Keywords:** coumarin; 5-methoxypsoralen; CYP2A5; mouse; blood; Orbitrap high resolution mass spectrometry

[责任编辑 王凤产]