

丹酚酸 B 大鼠体内代谢产物及途径分析

袁海建^{1*}, 陈宜刚¹, 安益强²

(1. 泰州职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2. 徐州医学院, 江苏徐州 221000)

【摘要】 目的:研究分析丹酚酸 B 在大鼠体内的代谢产物及途径。方法:取 SD 大鼠 12 只,分为两组。用于收集空白血浆、胆汁、尿液样品的大鼠各 2 只;尾静脉注射丹酚酸 B(100 mg·kg⁻¹)后,用于收集血浆、胆汁、尿液中丹酚酸 B 代谢产物的大鼠各 2 只;采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF)联用技术,对处理后的各样品进行检测,并对代谢产物进行定性及结构鉴定分析。结果:根据质谱信息,共检测到大鼠体内丹酚酸 B 相关代谢产物 11 个,其中血浆样品中检测到丹酚酸 B 酯键水解等 2 个代谢产物;胆汁样品中检测到丹参素、紫草酸和紫草酸的甲基化物等 5 个代谢产物;尿液样品中检测到丹酚酸 B 甲基化和硫酸化等 4 个代谢产物。结论:丹酚酸 B 可在大鼠体内代谢为丹参素等代谢产物;依据检测的代谢产物,推测丹酚酸 B 代谢反应位置主要在酯键和五元环上,代谢途径主要有酯键水解、分子内脱水、脱羧、羟化、甲基化和硫酸化等。

【关键词】 丹酚酸 B; 代谢产物; 丹参素; 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)09-0093-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090093

Metabolites and Pathways of Salvianolic Acid B in Rat YUAN Hai-jian^{1*}, CHEN Yi-gang¹, AN Yi-qiang² (1. Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300, China; 2. Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China)

【Abstract】 **Objective:** The aim of this study was to investigate the metabolites and pathways of salvianolic acid B (SAB) in rats. **Method:** In this study, 12 SD-rats were divided into 2 groups, with 6 rats used for collecting the blank plasma, bile, urine excretion samples, the others used for collecting the samples after intravenous administration of SAB (100 mg·kg⁻¹). UPLC-Q-TOF method was used to implement the qualitative analysis and identification of structure of the metabolites in each sample after treatment were. **Result:** According to the mass information, 11 metabolites were discovered, with 2 metabolites including SAB ester bond hydrolysis product in plasma, 5 metabolites including danshensu, lithospermic acid (LSA), the decarboxylation and methylation metabolites of LSA in bile, 4 metabolites including SAB methylation and sulfated products in urine excretion. **Conclusion:** SAB could metabolize into various metabolites including danshensu. The metabolic reaction of SAB occurs mainly in the ester bond and five-member ring, via ester bond hydrolysis, molecular dehydration, decarboxylation, hydroxylation, methylation and sulfate, etc.

【Key words】 salvianolic acid B; metabolites; danshensu; UPLC-Q-TOF

丹参药材在临床上使用较多,具有抗氧化、增强免疫力、护肝等多种功效^[1]。丹酚酸 B 是丹参中研究比较多的酚酸类成分之一^[2-3],也是丹参药材中的含量相对较高的成分之一。该物质分子式为 C₃₆H₃₀O₁₆,相对分子质量 718.62,是由 1 分子咖啡酸和 3 分子丹参素缩合而成,分子内有 2 个酯键和

1 个五元环,代谢方式主要有葡萄糖醛酸化、硫酸化、氧化、水解等方式^[4-5]。药理研究发现,丹酚酸 B 对急性局灶性脑缺血性损伤具有一定保护作用^[6],对海马神经细胞的存活与增殖,具有明显促进作用^[7],也有人 对大鼠体内丹酚酸 B 的代谢物质进行了初步鉴定^[8]。为了更全面的 研究丹酚酸 B 在动

【收稿日期】 20140820(018)

【基金项目】 泰州市科技局项目(1828666KY4);泰州职业技术学院“博硕基金”项目(TZYBS-12-7);2013 江苏省大学生创新创业训练计划项目(201312106012Y)

【通讯作者】 *袁海建,讲师,从事中药新剂型与新技术研究,E-mail:yuanjian8101@163.com

物体内代谢情况,实验采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF)技术,以SD大鼠为动物模型,分析鉴定尾静脉注射丹酚酸B后,大鼠血浆、尿液、胆汁中的代谢产物情况,并依据检测到的代谢产物,推测丹酚酸B可能的代谢途径,为丹酚酸B的临床应用、为合理解释该药物作用机制提供数据支撑。

1 材料

1.1 药物与试剂 丹酚酸B对照品(南京广润生物制品有限公司,批号GR-133-130909,纯度 $\geq 98\%$);乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 ACQUITY UPLC SYNAPT G2型高分辨液质联用系统(UPLC-Q-TOF),含电喷雾电离源(ESI),控制软件Masslynx V4.1,数据分析软件MetaboLynx及MassFragment™数据处理系统(美国Waters公司),METTLERAL MT5型1/100万天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),5430R小型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),Milli-Q纯水系统(美国Millipore公司),XW-80A型微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),GL-3250A型磁力搅拌器(其林贝尔仪器制造有限公司),OA-SYS型氮吹仪(美国Organomation Associates公司),KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器公司)。

1.3 动物 SD大鼠12只,雄性,体重(200 \pm 20)g,由上海斯莱克实验动物中心提供,合格证号SCXK(沪)2007-0005。

1.4 分组 将SD大鼠分为2组,其中用于收集空白血浆、胆汁、尿液样品的大鼠各2只;用于收集给药后血浆、胆汁、尿液样品的大鼠各2只。

2 方法

2.1 色谱条件 BEH C₁₈色谱柱(2.7 mm \times 50 mm, 1.7 μ m);流动相A乙腈,B为0.1%甲酸溶液,梯度洗脱条件:0~3 min,5%~15% A,3~7 min,15%~55% A;7~9 min,55%~95% A;9~11 min,95% A,流速0.3 mL \cdot min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,样品室温度10 $^{\circ}$ C,进样体积2 μ L。

2.2 质谱条件 质谱系统Synapt G2 MS,电离方式ESI⁻,毛细管电压2.5 kV,低能量扫描时传输碰撞能量为4 eV,高能量扫描时传输碰撞能量为25~40 eV,采样锥孔电压20 V,提取锥孔电压4 V,源温度40 $^{\circ}$ C,去溶剂化气流温度350 $^{\circ}$ C,锥孔气流50 L \cdot h⁻¹,去溶剂化气流量700 L \cdot h⁻¹,质谱检测质量范围m/z 50~1 200,扫描时间0.2 s。

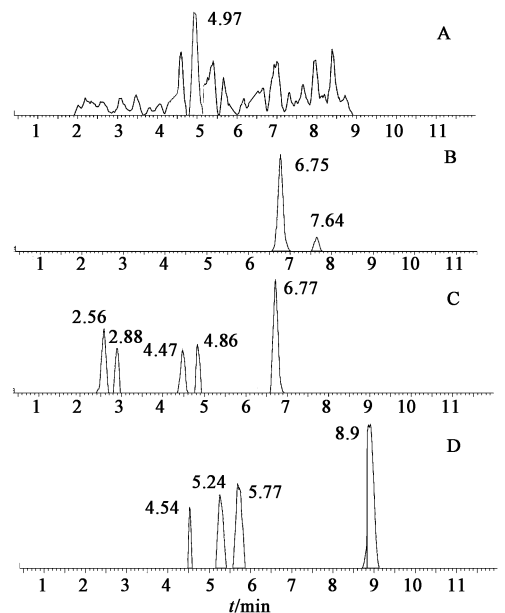
2.3 给药及取样 大鼠禁食12 h,自由饮水,收集空白血浆、胆汁、尿液。尾静脉注射丹酚酸B生理盐水100 mg \cdot kg⁻¹,分别在给药后10,20,30,60 min眼眶静脉处取血,同时收集大鼠0~24 h的胆汁、尿液,-70 $^{\circ}$ C冷冻保存,待测。

2.4 样品处理 分别取血浆、胆汁样品各200 μ L,尿液样品1 mL,用8倍量乙腈沉淀蛋白,11 000 r \cdot min⁻¹离心10 min,取上清液,氮气下吹干。残渣用200 μ L的甲醇超声溶解,离心后取上清液用于UPLC-Q-TOF分析。

2.5 质谱分析 对处理后的血浆、胆汁、尿液样品进行扫描,扣除空白背景后,通过Waters代谢物鉴定软件MetaboLynx及MS^E数据采集功能,对化合物进行定性结构与结构鉴定分析。

3 结果

3.1 对照品质谱分析 低碰撞能量质谱中,主要检测到丹酚酸B的[M-H]⁻离子(m/z 717.146),其保留时间为4.97 min(图2A)。高碰撞能量质谱图中,主要碎片离子为m/z 648.28,589.21,推测其可能为丹酚酸B分子上断裂羧基所形成的负离子。



A. 对照品;B. 血浆样品;C. 胆汁样品;D. 尿液样品

图1 丹酚酸B提取离子流色谱

Fig.1 Extracted mass spectrum of SAB of rat

3.2 血浆样品质谱分析 血浆的提取离子流色谱图(图1B)。结果显示丹酚酸B经大鼠尾静脉给药后,眼眶静脉血中出现了2个主要的色谱峰。通过Waters代谢物鉴定软件MetaboLynx及MS^E数据采集功能,对上述2个色谱峰进行定性分析,确证为2个代谢产物M1~M2^[6,9]。

M1: $C_{29}H_{16}O_{11}$, 在 m/z 539.062 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 7.64 min, 峰面积为 303。根据精确相对分子质量, 其分子式组成比 M0 减少 178 Da, 是在丹酚酸 B 分子的基础上脱掉 1 个酯键, 且五环开裂水解而得。高碰撞下主要产生 m/z 389.27, 313.02, 183.14。

M2: $C_{26}H_{18}O_{12}$, 在 m/z 521.072 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 6.75 min, 峰面积为 272。同时检测到 1 个同位素分子离子。根据精确相对分子质量, 其分子式组成比 M1 减少了 18 Da, 是 1 个 H_2O 的相对分子质量, 因此推测 M2 是 M1 脱去 1 个水形成的。

依据丹酚酸 B 大鼠血浆代谢提取离子流色谱和 waters 代谢物鉴定软件 Metabolynx 及 MS^E 数据采集功能分析的结果, 推测丹酚酸 B 在大鼠血浆中的主要代谢途径是酯键水解(A 途径)、分子内脱水(B 途径), 并形成相应产物(图 2)。

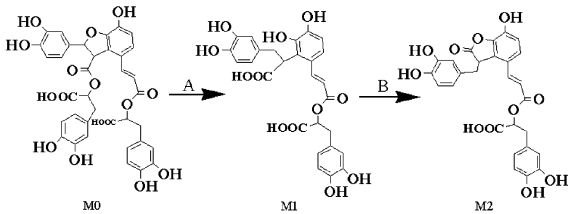


图 2 丹酚酸 B 大鼠血浆中主要代谢产物的代谢途径
Fig. 2 Proposed major metabolic pathway of SAB in plasma of rat

3.3 胆汁样品质谱分析 胆汁样品的提取离子流色谱图(图 1C), 结果表明, 经大鼠尾静脉给丹酚酸 B 后从其胆汁中检测出 5 个主要的色谱峰^[9]。通过 waters 代谢物鉴定软件 Metabolynx 及 MS^E 数据采集功能, 对化合物进行定性与结构鉴定分析后, 共发现 5 个代谢产物。丹酚酸 B 在大鼠胆汁中的主要代谢途径(图 3)。

M3: $C_{27}H_{22}O_{12}$, 在 m/z 537.103 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 4.49 min, 峰面积为 122。根据相对分子质量, 其分子式组成比丹酚酸 B 减少了 180 Da, 高碰撞下主要产生 m/z 526.25 和 m/z 411.18 碎片离子, 参考文献^[8]推测 M3 丹酚酸 B 酯键断裂后形成的紫草酸。

M4: $C_{28}H_{24}O_{12}$, 在 m/z 551.119 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 4.86 min, 峰面积为 123。根据精确相对分子质量, 其相对分子质量比 M3 增加了 14 Da, 为 1 个甲基的相对分子质量, 因此推测 M4 为 M3 即紫草酸甲基化后产物。

M5: $C_{29}H_{26}O_{12}$, 在 m/z 565.093 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 6.77 min。根据精确相对分子质量, 其分子比 M3 增加了 28 Da, 为 2 分子甲基的相对分子质量, 推测其为 M3 即紫草酸双甲基化后产物。

M6: 在 m/z 493.093 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 2.56 min。根据精确相对分子质量, 其相对分子质量比 M3 减少了 44 Da, 为 1 分子羧基的相对分子质量, 高碰撞下主要产生 m/z 222.10 碎片离子。

M7: $C_{10}H_{12}O_4$, 在 m/z 197.045 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 2.88 min。根据精确相对分子质量, 比 M6 减少了 296 Da, 高碰撞下产生的 m/z 150.03, 135.05, 为 M6 断裂 1 个酯键后的产物, 推测其为丹参素。

依据丹酚酸 B 大鼠胆汁样品提取离子流色谱和 waters 代谢物鉴定软件 Metabolynx 及 MS^E 数据采集功能分析的结果, 推测丹酚酸 B 在大鼠胆汁中的主要代谢途径是酯键水解(A 途径)、脱羧(B 途径)、羟化(C 途径)、甲基化(D 途径), 并形成相应产物(图 3)。

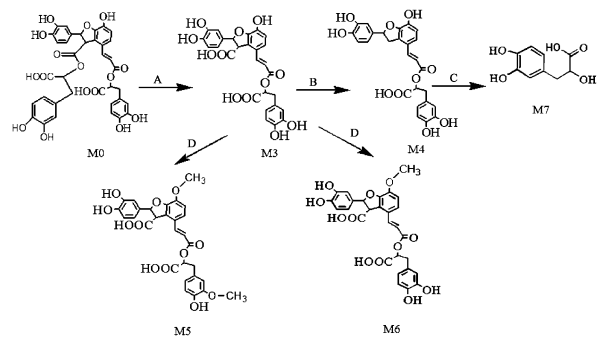


图 3 丹酚酸 B 大鼠胆汁中主要代谢产物的代谢途径
Fig. 3 Proposed major metabolic pathway of SAB in bile of rat

3.4 尿液样品质谱分析 尾静脉注射后尿液样品的提取离子流色谱图(图 1D), 未检测出丹酚酸 B ($M0, m/z$ 718.146)。通过 waters 代谢物鉴定软件 Metabolynx 及 MS^E 数据采集功能, 对样品中所含化合物进行定性与结构鉴定分析后, 共发现 4 个代谢产物。

M8: $C_{37}H_{32}O_{16}$, 在 m/z 731.161 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 5.24 min。其分子离子和高碰撞下主要产生碎片离子 m/z 512.27。根据精确相对分子质量, 其相对分子质量比 M0 增加了 14 Da, 正好为 1 分子甲基的相对分子质量, 推测其为丹酚酸 B 甲基化后产物。

M9: C₃₈H₃₄O₁₆, 在 *m/z* 745. 141 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 5.77 min。根据精确相对分子质量, 其分子式组成比 M0 增加了 14 × 2 Da。所以推测 M9 是丹酚酸 B 双甲基化后产物。

M10: C₃₉H₃₆O₁₆, 在 *m/z* 759. 114 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 4.54 min。根据精确相对分子质量, 其相对分子质量组成比 M0 增加了 14 × 3 Da。所以推测 M9 是丹酚酸 B 三甲基化后产物。

M11: C₃₆H₃₀O₁₉S, 在 *m/z* 797. 102 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 8.90 min。根据精确相对分子质量, 其相对分子质量组成比 M0 增加了 80 Da。所以推测 M11 是丹酚酸 B 硫酸化后产物。

依据丹酚酸 B 大鼠胆汁样品提取离子流色谱和 waters 代谢物鉴定软件 Metabolynx 及 MS^E 数据采集功能分析的结果, 推测丹酚酸 B 在大鼠血浆中的主要代谢途径是甲基化 (A 途径)、硫酸化 (B 途径), 并形成相应产物 (图 4)。

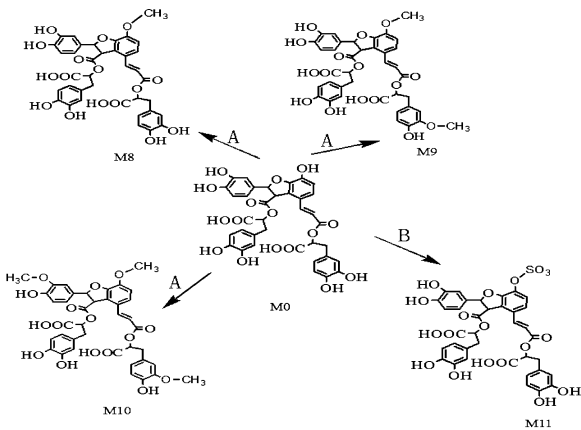


图 4 丹酚酸 B 大鼠尿样中主要代谢产物的代谢途径
Fig. 4 Proposed major metabolic pathway of SAB in urine of rat

4 讨论

研究通过综合优化色谱和质谱条件, 全面系统地研究了丹酚酸 B 经尾静脉注射后, 在大鼠血浆、胆汁、尿液中的代谢情况, 检测出 11 个丹酚酸 B 代谢产物。研究证实, 丹酚酸 B 在血浆和胆汁中的代谢反应主要发生在五元环和酯键上, 主要为氧化水解反应, 在尿液中主要发生甲基化反应, 这些结果与文献报道类似^[3,5]。同时, 实验还在大鼠尿液样品中检测到丹酚酸 B 的硫酸化产物, 该代谢物可使丹酚酸 B 易于从尿液中排泄。

从丹酚酸 B 结构可知, 该化合物由 1 分子咖啡酸和 3 分子丹参素缩合而成, 已有文献报道^[4,8]丹酚酸 B 在高温高压下可以降解为丹参素, 但在体内丹酚酸 B 和丹参素代谢的研究报道较少。实验通过检测丹酚酸 B 的大鼠体内代谢产物后, 依据数据分析出丹酚酸 B 体内可代谢为丹参素, 并推测其代谢途径。由于有文献报道^[10-11]指出, 丹酚酸 B 不能透过血脑屏障而丹参素可以顺利透过, 结合本研究实验结果, 推测丹酚酸 B 在体内可能通过代谢为丹参素进而发挥对脑部的治疗作用, 为丹酚酸 B 的临床应用、为合理解释该药物作用机制提供科学依据, 但还需要进一步开展相关研究加以证实。

[参考文献]

[1] 高枫, 孙桂波, 任小宇, 等. 丹酚酸 B 对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 358-361.

[2] 李伟, 张军平, 徐士欣, 等. 丹酚酸 B 对血小板聚集及释放 sP-sel 和 sCD40 L 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 48-50.

[3] 高青, 季红, 胡先同, 等. 5-氮胞苷联合丹酚酸 B 促进大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(1): 24-27.

[4] 万仁忠, 许妍妍, 谷元, 等. 丹酚酸 B 及其活性代谢产物在大鼠体内药动学研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 335-339.

[5] 王韶旭, 谭志诚, 车如心, 等. 丹酚酸 B 的热稳定性及其热分解动力学研究[J]. 化学学报, 2012, 70(2): 212-216.

[6] 肖文喜, 汪红, 钟晓明, 等. 丹酚酸 B 对小鼠急性局灶性脑缺血的神经保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 163-166.

[7] 杨赣军, 张小强, 孙弋. 丹酚酸 B 对培养的新生大鼠海马神经元的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(6): 705-708.

[8] 亓蓁, 郝琨, 李飞燕, 等. 大鼠静脉注射丹酚酸 B 后代代谢产物的鉴定及血浆药动学研究[J]. 中国天然药物杂志, 2013, 11(5): 560-565.

[9] Jin Zhang, Yu He, Ming Cu, et al. Metabolic studies on the total phenolic acids from the roots of *Salvia* in rats [J]. Bio Chrom, 2011, 59(19): 51-59.

[10] Yun-Jing Zhang, Liang Wu, Qun-Lin Zhang, et al. Pharmacokinetics of phenolic compounds of Danshen extract in rat blood and brain by micro dialysis sampling [J]. J Eth Pharm, 2011, 136(17): 129-136.

[责任编辑 邹晓翠]