

· 药物代谢 ·

大鼠尿液中秦皮甲素和秦皮乙素代谢物的 HPLC-MSⁿ 分析

杨建华^{1,2}, 王晓梅², 迪丽拜尔·马木提², 杨秀娟², 胡君萍^{2*}

(1. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:探索秦皮乙素和秦皮甲素在大鼠尿液中的代谢物,以期阐明这 2 种药物在体内作用的化学基础。方法:单次灌胃给药秦皮乙素和秦皮甲素后收集 48 h 内大鼠尿液,经固相萃取法处理,采用 HPLC-MSⁿ 检测代谢产物,色谱条件为流动相甲醇-0.2% 甲酸(12:88),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,柱温 35 ℃,检测波长 339 nm;质谱条件为电喷雾离子化方式,正离子扫描模式,喷雾电压 3.0 kV,碰撞气流量 0.16 mL·min⁻¹,洗脱溶剂温度 350 ℃,离子源温度 450 ℃。结果:从大鼠尿液中发现并初步鉴定了 5 个代谢产物的化学结构,主要为秦皮乙素的水解产物、还原产物、甲基化产物及硫酸化产物。结论:推测秦皮甲素在体内先水解为秦皮乙素,再进行水解、还原、甲基化及硫酸化反应。

[关键词] 秦皮甲素; 秦皮乙素; 代谢产物; HPLC-MSⁿ

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110093

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160415.1005.010.html>

[网络出版时间] 2016-04-15 10:05

Study on Metabolites of Aesculin and Aesculetin in Rat Urine by HPLC-MSⁿ

YANG Jian-hua^{1,2}, WANG Xiao-mei², Dilibar·Mamuti², YANG Xiu-juan², HU Jun-ping^{2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;
2. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the metabolites of aesculin and aesculetin in rat urine. **Method:** After single oral administration of aesculin and aesculetin to rats, urine was collected within 48 h and pretreated by solid-phase extraction method. Metabolites were determined by a HPLC-MSⁿ method. **Result:** Five major metabolites were found and their chemical structures were elucidated as hydrolysate, reductate, methylated metabolite and sulfated product, respectively. **Conclusion:** According to the rule of metabolism, aesculin is hydrolyzed as aesculetin which were further metabolized *in vivo*. The method can be used to identify the structures of active components responsible for pharmacological effects.

[Key words] aesculin; aesculetin; metabolites; HPLC-MSⁿ

毛菊苣 *Cichorii glandulosum*, 维吾尔语名“卡森”,是维吾尔族药保肝药物——清热卡森颗粒和护肝布祖热颗粒的主药^[1]。秦皮甲素和秦皮乙素是毛菊苣中的有效成分^[2-3],秦皮甲素又名七叶苷,能显著缓解实验性溃疡性结肠炎大鼠结肠组织炎

症^[4]、抑制化学致癌物质 1,2-二甲胂诱导的大鼠结肠 DNA 的氧化损伤和肿瘤生长^[5];秦皮乙素又名七叶内酯,具有抑菌^[6]、抗肿瘤作用^[7],能诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡^[8],对小鼠 Hepa1-6 肝癌瘤生长起到一定的抑制作用^[9]。

[收稿日期] 20150624(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960526,81560688)

[第一作者] 杨建华,博士,教授,从事中药新药研究与开发研究,Tel:0991-4365605, E-mail: yjh-yft@163.com

[通讯作者] * 胡君萍,博士,教授,从事新疆特色药用资源的开发与利用研究,Tel:0991-4363345, E-mail: hjp-yft@163.com

药物代谢研究是发现新药的重要手段。Ding 等^[10]采用 LC/ESI-MS 探讨秦皮甲素在人体肠道菌群内的转化规律,发现秦皮乙素是秦皮甲素的代谢产物,并在大鼠尿液中发现 6 个代谢产物,将之归结为秦皮甲素的代谢物。本实验采用 HPLC-MS 联用技术对大鼠同时饲喂秦皮甲素和秦皮乙素后的尿样进行研究,以期阐明二者在大鼠体内的代谢途径。

1 材料

Q-TRAP 4000 型高效液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司), Microfuge 22R 型高速低温离心机(贝克曼科技发展有限公司), UB-7 型 pH 计和 S-114 型电子天平(北京丹佛仪器有限公司), VORTEX-5 型涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司), HSC-24A 型氮吹仪和 HPD 型无油真空泵(天津 Hengao 科技发展有限公司), Milli-Q 型超纯水系统(上海摩速科学器材有限公司)。

秦皮甲素、秦皮乙素对照品(上海同田生物技术有限公司,批号分别为 09040722,09040724),替硝唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号 10036-200703),甲醇、乙腈均为色谱纯试剂,水为自制超纯水。

SD 大鼠 6 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,由新疆医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2011-0004。实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水。

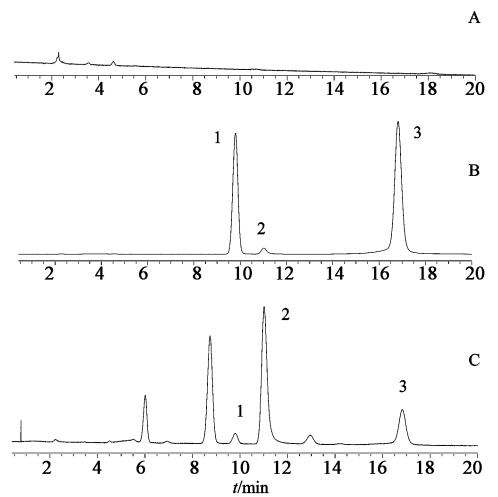
2 方法与结果

2.1 给药与样品采集 秦皮甲素和秦皮乙素分别以 $66.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $77.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予大鼠后,收集 0 ~ 1, 1 ~ 3, 3 ~ 6, 6 ~ 10, 10 ~ 24, 24 ~ 36, 36 ~ 48 h 的尿液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻储藏以备分析。

2.2 尿样处理^[11] 固相萃取小柱依次用甲醇和水各 3 mL 活化,取大鼠各时间段混合尿样 500 μL ,通过已活化的固相萃取小柱,加水 1 mL 淋洗,继用甲醇 1 mL 洗脱,收集洗脱液,于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴上氮气吹干,残渣用甲醇 100 μL 复溶,涡旋振荡 1 min,于 $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液进样。

2.3 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 甲酸(12:88),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 5 μL ,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 339 nm。在该色谱条件下,秦皮甲素、秦皮乙素与内标替硝唑及其代谢产物得到了良好分离,且空白尿样无干扰。见图 1。

2.4 质谱条件^[12] 采用电喷雾离子化(ESI)方式,检测离子为正离子,在全离子扫描状态下,传输电压 3.0 kV,观察总离子流图(TIC)中各峰所对应化合



A. 空白样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 秦皮甲素; 2. 替硝唑; 3. 秦皮乙素

图 1 大鼠给药后尿液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of rat urine after administration

物的准分子离子峰,以便确定各峰对应化合物的相对分子质量;另外选择源内碰撞气能量 20 eV,以便得到相应化合物的碎片离子并与对照化合物比较、鉴定。碰撞气流量 $0.16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱溶剂温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$,离子源温度 $450 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.5 尿样代谢产物分析 采用 HPLC-MSⁿ 联用技术对大鼠给药后尿样进行分析,结果表明在大鼠血浆中可检测到秦皮甲素、秦皮乙素及其代谢产物,尿样总离子流图见图 2。根据原形药及相关代谢产物的主要质谱裂解规律,结合骨架参考法、药物生物转化一般规律^[13],对原形药代谢物的结构进行分析,见图 3, 4。

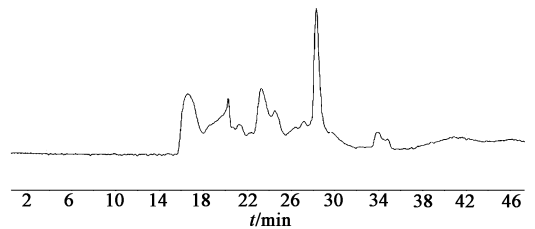


图 2 大鼠尿液样品 TIC

Fig. 2 Total ion current of rat urine sample

2.5.1 代谢物 M1 相对分子质量 198,保留时间 16.675 min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 的 m/z 199,较秦皮乙素增加 20,系秦皮乙素内酯结构开环双键加氢的还原产物。主要二级碎片有 m/z 183 和 m/z 139,其中 m/z 183 丢失相对分子质量 16,为 M1 的脱氧碎片, m/z 139 为 m/z 183 的脱羧基碎片。

2.5.2 代谢物 M2 相对分子质量 258,保留时间 18.647 min, $[\text{M} + \text{H}]^+$ 的 m/z 259,较秦皮乙素增加

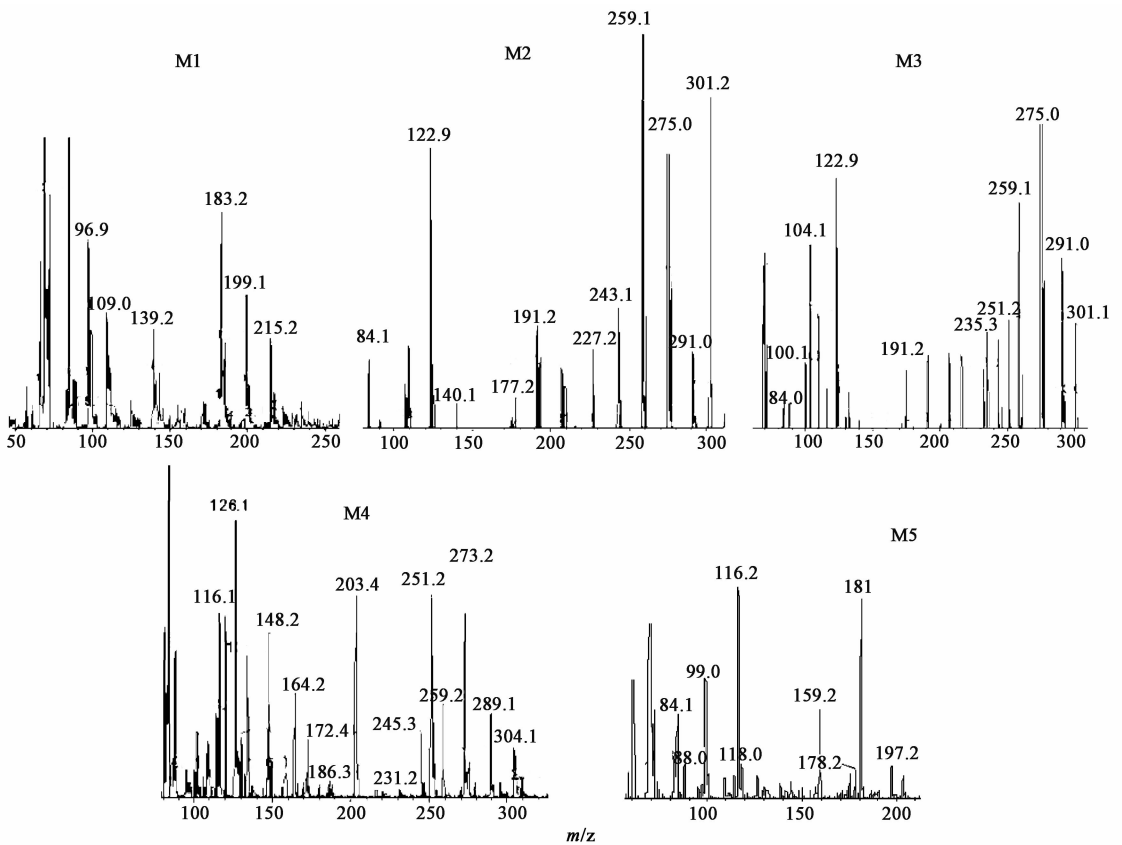


图 3 大鼠尿液中代谢物 MS/MS

Fig. 3 MS/MS spectra of metabolites in rat urine sample

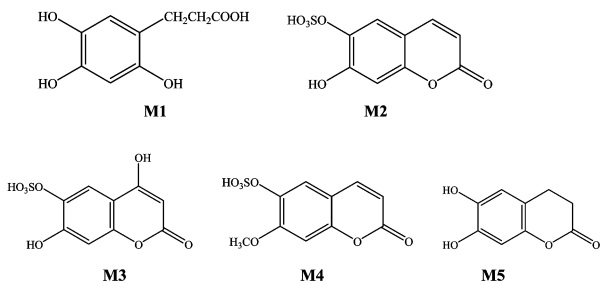


图 4 大鼠尿液中代谢物的结构式

Fig. 4 Chemical structures of metabolites in rat urine sample

80,说明其是秦皮乙素与硫酸结合生成的硫酸酯产物 (+SO₃)。主要二级碎片有 *m/z* 243, 丢失相对分子质量 16, 为 M2 的脱氧碎片。

2.5.3 代谢物 M3 相对分子质量 274, 保留时间 20.251 min, [M + H]⁺ 的 *m/z* 275, 主要二级碎片 *m/z* 259 丢失相对分子质量 16, 为 M3 的脱氧碎片, 而 *m/z* 259 为秦皮乙素硫酸酯产物, 故 M3 为 M2 的羟化产物。

2.5.4 代谢物 M4 相对分子质量 272, 保留时间 23.292 min, [M + H]⁺ 的 *m/z* 273, 主要二级碎片 *m/z* 259 系 M4 的脱甲基碎片; *m/z* 203 较 *m/z* 259 减少 56, 系其 *m/z* 203 碎片再脱去 2 个 CO 基团, 为

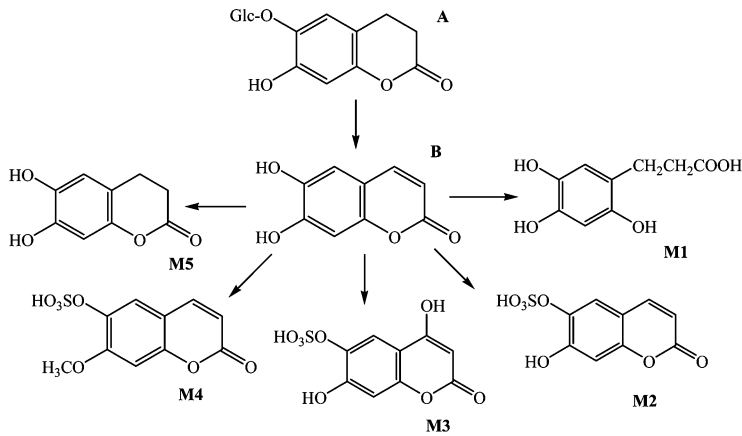
香豆素类成分特征裂解。

2.5.5 代谢物 M5 相对分子质量 180, 保留时间 25.567 min, [M + H]⁺ 的 *m/z* 181, 较秦皮乙素增加 2 (氢化产物), 可确定代谢物 M5 的结构为秦皮乙素还原产物。

2.6 尿样中秦皮甲素、秦皮乙素代谢途径分析 根据代谢产物结构分析, 对秦皮甲素与秦皮乙素在大鼠体内的代谢途径进行了推测, 见图 5。结果显示秦皮甲素与秦皮乙素灌胃给药进入大鼠体内后, 秦皮甲素脱葡萄糖成为秦皮乙素吸收进入血液。秦皮乙素进入大鼠体内后, 分别发生内酯水解反应 (M1), 或还原成二氢产物 (M5), 或直接与硫酸结合生成相应的硫酸酯产物 (M2), 或通过甲基化并硫酸结合而生成的 M4, 或硫酸化并羟化生成 M3。

3 讨论

研究药物在体内的代谢方式和代谢产物, 有助于探讨其药效物质基础、阐明药物体内吸收与代谢过程、发现新作用靶点及设计药物剂型等, 对新药发现、设计及开发均具有较高的理论价值^[14]。香豆素代谢时 C-3, C-4, C-6, C-7 位易于变化, 并通过内酯环开环生成多种代谢产物^[15]。本文发现了 5 个代



A. 秦皮甲素; B. 秦皮乙素

图 5 秦皮甲素和秦皮乙素在大鼠体内代谢途径分析

Fig. 5 Proposed metabolic pathways of aesculin and aesculetin in rats

代谢产物,均为秦皮乙素还原、水解及二相代谢产物,即转化为硫酸结合物和甲基结合物。

本文报道的 2 个代谢产物 M2 和 M4 被归属为秦皮甲素代谢产物^[10]。本文通过对大鼠同时灌胃给予秦皮甲素与秦皮乙素,发现随着给药时间(10~270 min)的延长,血中秦皮甲素浓度减小,秦皮乙素浓度增大,同时在大鼠尿液中检测到新的色谱峰,说明秦皮甲素在体内经苷键水解转化成秦皮乙素后进一步代谢,因此将上述化合物归属为秦皮乙素的代谢产物更为科学。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐: 新疆科技出版社, 1999:136,189.

[2] 胡君萍,迪丽拜尔·马木提,李渊,等. UPLC 同时测定维药毛菊苣和菊苣中 5 种化学成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(17):65-68.

[3] 朱金芳,兰卫,马晓娟,等. RP-HPLC 法测定菊苣提取物中秦皮乙素的含量[J]. 新疆医科大学学报,2010,33(8):871-873.

[4] 翁闪凡,刘娜,张晓林,等. 秦皮甲素对实验性溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(6):940-944.

[5] Kaneko T, Tahara S, Takabayashi F. Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons[J]. Biol Pharm Bull,2007,30(11):2052-2057.

[6] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 不同基原秦皮、香豆素单

体抗菌作用对比研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009,16(5):39-42.

[7] 曹舒雯,胡杨,朱小南,等. 秦皮乙素对 BALB/c 裸鼠体内胶质瘤生长的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版,2014,35(5):672-679.

[8] 王晶,伟忠民. 秦皮乙素诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的机制研究[J]. 中成药,2012,34(11):2059-2063.

[9] 王丽红,伟忠民. 秦皮乙素对小鼠皮下 Hepa1-6 肝癌移植瘤凋亡基因 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中国药房,2012,23(15):1356-1358.

[10] Ding W J, Deng Y, Feng H, et al. Biotransformation of aesculin by human gut bacteria and identification of its metabolites in rat urine [J]. World J Gastroenterol, 2009,15(12):1518-1523.

[11] 孔琦,张振清. 药物代谢转化和样品前处理技术的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(2):124-127.

[12] Li Y Y, Song Y Y, Liu C H, et al. Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B,2012. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.08.027.

[13] 张东鲁,朱明社,Humphreys W G. 药物设计和开发中的药物代谢-基本原理和实践[M]. 北京:人民军医出版社,2011:228-231.

[14] 刘斌. 中药成分体内代谢与分析研究[M]. 北京:中国中医药出版社,2011:6-14.

[15] 单进军,狄留庆,徐建亚,等. 天然香豆素类化合物的吸收和代谢研究进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):81-84.

[责任编辑 刘德文]