

柠檬苦素在大鼠体内的排泄途径分析

刘史佳¹, 冯丽雯², 戴国梁¹, 黄国栋², 孙冰婷², 居文政^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] **目的:**考察柠檬苦素在大鼠体内的代谢途径,为阐明该药物的作用机制提供参考。**方法:**大鼠按 80 mg·kg⁻¹ 灌胃给予柠檬苦素,收集胆汁、尿液和粪便,利用 HPLC 和 LC-MS/MS 测定大鼠胆汁、尿液和粪便中柠檬苦素的含量,计算其累积排泄量和累积排泄分数。**结果:**柠檬苦素在大鼠粪便、尿液和胆汁中的累积排泄分数合计约 50%,只有近一半的药物以原型形式排泄出体外。原药从尿液和胆汁中的总排泄量 < 1%,大部分以原型药物通过粪便排出。**结论:**柠檬苦素在大鼠体内的主要排泄途径为粪便,少量药物吸收进入血液后通过肝脏代谢,少量药物通过尿液排出体外。

[关键词] 柠檬苦素; 排泄; 尼莫地平; 药代动力学; 胆汁; 粪便

[中图分类号] R969.1; R284.1; R945; Q491 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0091-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010091

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1439.008.html>

[网络出版时间] 2016-10-27 14:39

Excretion Pathway Analysis of Limonin in Rats

LIU Shi-jia¹, FENG Li-wen², DAI Guo-liang¹, HUANG Guo-dong²,
SUN Bing-ting², JU Wen-zheng^{1*}

(1. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*
2. *School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate metabolic pathway of limonin in rats and its mechanism. **Method:** Bile, urine and feces of rats were collected after oral administration of limonin with dose of 80 mg·kg⁻¹. HPLC and LC-MS/MS were used to determine the concentration of limonin in bile, urine and feces of rats, then calculated the cumulative excretion and cumulative fractional excretion. **Result:** Total cumulative fractional excretion of limonin in feces, urine and bile was about 50%, only about half of the drug was excreted in the form of prototype. Limonin excreted from the urine and bile was less than 1%. Most of limonin excluded through feces with prototype. **Conclusion:** Feces is major excretion pathway of limonin in rats after oral administration, only a small portion of the drug is absorbed into rat plasma.

[Key words] limonin; excretion; nimodipine; pharmacokinetics; bile; feces

柠檬苦素又称吴茱萸内酯,主要存在于芸香科和楝科的多种植物中,是一种含呋喃环且高度氧化的四环三萜类化合物,具有抗菌、抗病毒、镇痛、抗炎和抗癌等活性^[1-4]。柠檬苦素在植物中主要以苷元和糖苷 2 种形式存在^[5]。吴茱萸主要有效成分为生

物碱和柠檬苦素,其中生物碱中主要成分为吴茱萸碱和吴茱萸次碱,具有镇痛和抗炎作用^[6-7]。近年来对柠檬苦素及柠檬苦素类化合物的研究报道很多,但主要集中在化学成分及药理学研究方面。柠檬苦素类化合物种类繁多、来源广泛、化学成分复

[收稿日期] 20160415(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403174,81470197);江苏省自然科学基金面上项目(BK20151602,BK20161610)

[第一作者] 刘史佳,副研究员,博士,从事中药临床药代动力学研究,Tel:025-86617141-60310,E-mail:liushijia2011@163.com

[通讯作者] *居文政,主任中药师,博士生导师,从事中药临床药代动力学研究,Tel:025-86617141-60310,E-mail:wzhju333@163.com

杂、应用多元化,具有很高的研究和实用价值。其镇痛、抗炎、抗肿瘤等方面的活性越来越受到人们的关注^[8-11]。

研究表明柠檬苦素在促进癌细胞凋亡、调控低密度脂蛋白、治疗结肠癌及抗菌方面具有显著功效,是二甲苯并蒽致癌的有效抑制剂^[12];长期给予柠檬苦素后能显著降低结肠癌的发病率,可抑制啮齿类动物的口腔、胃肠道、肺部及皮肤部位的癌细胞生长。前期研究结果表明柠檬苦素具有良好的消炎、镇痛、止血活性,对金色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌等具有较强的抑制作用^[13-15]。

多年来,对柠檬苦素的结构和活性研究已积累了丰富经验。但由于柠檬苦素结构特殊、药理学作用机制不够明确、缺乏体内研究资料,使其在临床上运用还不够广泛。前期研究结果表明柠檬苦素的口服吸收较差,主要因为 P-糖蛋白的主动外排和细胞色素 P450 肝药酶 3A4 的首过效应^[16]。柠檬苦素在大鼠和 Beagle 犬体内的药代动力学研究表明其口服吸收较差,只有少量药物吸收进入血液,个体差异较大,血药浓度达峰时间较长,但进入血液后迅速被代谢,消除半衰期短^[17-21]。本实验拟通过计算累计排泄量来推测柠檬苦素在大鼠体内的主要排泄途径,可能还有部分药物在体内经代谢产生新的代谢产物而发挥疗效,为阐明柠檬苦素发挥药效的作用机制提供理论依据。

1 材料

Quattro Micro 型液质联用仪和 Oasis HLB 型固相萃取柱(美国 Waters 公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),CentriVap 型离心浓缩仪(美国 Labconco 公司),AE240 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],Biofuge PrimoR 型冷冻高速离心机(德国 Heraeus 公司),Driect-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司),WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),T10 Basic S25 型匀浆器(德国 IKA 公司)。

柠檬苦素胶囊(浙江南洋药业有限公司,批号 120302,柠檬苦素质量分数 95%),柠檬苦素、尼莫地平对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110800-200404,100270-200002,纯度均为 95%),鬼臼毒素(美国 Sigma 公司,批号 010M3521),水为超纯水,甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雌雄各半,体重(230 ± 30) g,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXX(沪)2009-0008。

2 方法与结果

2.1 粪便和尿液排泄实验 取大鼠 12 只,雌雄各半,随机分成 2 组,每组 6 只,禁食 10 h,可自由饮水,分别按 80 mg·kg⁻¹灌胃给予柠檬苦素,放入代谢笼中,收集 0~12,12~24,24~36,36~48 h 尿液和 0~12,12~24,24~36 h 粪便。准确测量尿液体积,取尿液 0.1 mL 测定,计算尿液总药量、累积排泄量和累积排泄分数(累积排泄分数 = 累积排泄量/给药剂量 × 100%)。粪使用定量水制成匀浆后,取匀浆液 0.1 mL 稀释后进行分析,计算粪便药量、累积排泄量和累积排泄分数。

2.2 胆汁排泄实验 取大鼠 6 只,雌雄各半,禁食 10 h,可自由饮水,用乙醚浅麻后作胆管插管手术,待动物清醒后,按 80 mg·kg⁻¹灌胃给予柠檬苦素,收集给药后 0~2,2~4,4~6,6~8,8~12 h 的胆汁。胆汁经定量稀释后,利用 LC-MS/MS 分析胆汁中药物排泄量,计算累积排泄量和累积排泄分数。

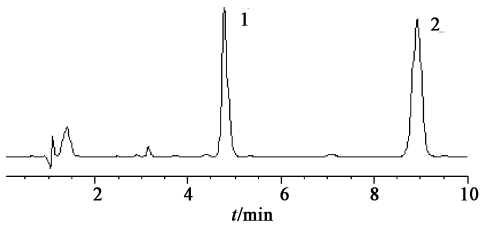
2.3 检测条件 色谱条件为 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm), MS C₈ 保护柱(2.0 mm × 12.5 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相甲醇-水(74:26),流速 0.2 mL·min⁻¹,运行时间 4.0 min。质谱条件为电喷雾离子化(ESI),负离子模式,多反应离子检测(MRM),柠檬苦素 *m/z* 469.4~229.3[M-H]⁻,锥孔电压 -45 V,碰撞电压 -28 eV;尼莫地平(内标) *m/z* 417.2~122.0[M-H]⁻,锥孔电压 -45 V,碰撞电压 -25 eV;毛细管电压 -2.70 kV,二级锥孔电压 -3.0 V,透镜电压 -0.1 V,离子源温度 110 °C,脱溶剂气温度 350 °C,锥孔气流速 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流速 450 L·h⁻¹,碰撞室压力(氩气)0.3 MPa^[19]。

由于大鼠粪便样品中柠檬苦素的浓度较高,故采用 1100 系列高效液相色谱仪测定。色谱条件为 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(51:49),流量 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 207 nm。见图 1。

2.4 大鼠的样品处理

2.4.1 尿液 向离心管中精密加入大鼠尿液 0.1 mL,精密加入 0.967 mg·L⁻¹尼莫地平溶液(内标)20 μL,旋涡 30 s,加入乙醚 1 mL,旋涡 3 min,于 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液 0.8 mL 于 50 °C 氮气下吹干,加流动相 100 μL 使溶解,于 12 000 r·min⁻¹离心 10 min 后进行 LC-MS/MS 分析,进样量 10 μL。

2.4.2 胆汁 取 100 μL 胆汁,按 2.4.1 项下方法



1. 鬼臼毒素; 2. 柠檬苦素

图 1 柠檬苦素和鬼臼毒素的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of limonin and podophyllotoxin

处理。

2.4.3 粪便 将粪便-水(1:4)进行匀浆,精密移取 1 mL,加 100 mg·L⁻¹ 内标 50 μL,混匀震荡 3 min,加入甲醇 2 mL,振荡 3 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,精密转移上清液 1 mL 至离心管中,于 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,精密转移上清液 100 μL,取其中 20 μL 进样,利用样品与内标的峰面积比值进行定量分析。

2.5 线性范围

2.5.1 尿液 取大鼠空白尿液 100 μL,加入 0.967 mg·L⁻¹ 内标 20 μL,加入不同质量浓度的柠檬苦素对照品溶液 10 μL,使尿液中柠檬苦素质量浓度分别为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μg·L⁻¹,以对照品与内标的峰面积比为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.0142X + 0.0165$ ($r = 0.996$),最低检测限 0.3125 μg·L⁻¹。

2.5.2 胆汁 取大鼠空白胆汁 100 μL,按 2.5.1 项下方法操作,得回归方程 $Y = 0.135X + 0.068$ ($r = 0.996$),最低检测限 0.3125 μg·L⁻¹。

2.5.3 粪便 取空白大鼠粪便匀浆 1 mL,加入 988 mg·L⁻¹ 内标 10 μL,加入不同质量浓度柠檬苦素对照品溶液 10 μL,使人粪便匀浆液中柠檬苦素质量浓度分别为 1.83, 3.67, 7.33, 14.66, 29.33, 58.65, 117.3, 234.6 mg·L⁻¹,按 2.4.3 项下方法处理,以对照品与内标的峰面积比为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.15X + 0.032$ ($r = 0.9995$),最低检测限 0.915 mg·L⁻¹。

2.6 检测分析 大鼠按 80 mg·kg⁻¹ 灌胃给予柠檬苦素后,柠檬苦素在不同时间段(0~6, 6~12, 12~24, 24~36, 36~48 h)尿液中排泄量分别为(1.95 ± 0.43), (1.11 ± 0.28), (0.69 ± 0.37), (0.39 ± 0.14), (0.20 ± 0.10) μg,在不同时间段(0~2, 2~4, 4~6, 6~8, 8~12 h)胆汁中排泄量分别为(61.50 ± 18.34), (72.14 ± 17.77), (75.53 ± 19.94), (39.51 ± 6.36), (36.59 ± 11.49) μg,在不

同时间段(0~12, 12~24, 24~36, 36~48 h)粪便中排泄量分别为(8.073 ± 1.083), (0.675 ± 0.758), (0.012 ± 0.012), (0.001 ± 0.002) mg。计算柠檬苦素在大鼠尿液、胆汁、粪便中累积排泄分数(累积排泄量/给药剂量 × 100%)分别为 0.022%, 0.001%, 49.77%,说明柠檬苦素在大鼠尿液和胆汁中的排泄较少,而约有近一半的药物由大鼠粪便以原型直接排出体外。

3 讨论

大鼠按 80 mg·kg⁻¹ 灌胃柠檬苦素后,在粪便(48 h),尿液(48 h)和胆汁(12 h)中的累积排泄分数合计约 50%,只有接近一半的药物以原型形式排泄出体外,提示口服柠檬苦素后有一半在体内代谢消除。其中原药从尿液和胆汁中的总排泄量 < 0.03%,大部分以原型药物通过粪便排出,提示只有很少部分柠檬苦素吸收入血后发生代谢转化^[22]。推测柠檬苦素在大鼠体内的主要排泄途径为粪便,少量药物吸收进入血液后通过肝脏代谢,少量药物通过尿液排出体外。口服药物在经过消化道时,由于胃酸、各种消化酶和肠道菌群的影响,可能会发生多种代谢反应,从而使部分药物在肠道代谢失活,吸收进入体内的原型药物相应减少。前期研究发现口服柠檬苦素后生物利用度极低,而体内外研究证明吸收环节和 P-糖蛋白外排是导致这一现象的主要原因。

本研究结果表明柠檬苦素在大鼠和人体的主要排泄途径均为粪便,少量药物吸收进入血液后通过肝脏代谢,少量药物通过尿液排出体外。柠檬苦素在动物体内物料不平衡可能有 2 个原因:①一部分药物可能进入肠道黏附在肠壁上;②一部分药物可能在肠道发生代谢转化。因此有必要进一步研究柠檬苦素的在动物和人体内的代谢转化方式及代谢途径,为阐明其在体内发挥抗炎、抗肿瘤药理效应的作用机制提供科学依据。

[参考文献]

[1] 章洛汗,廖晓峰. 柠檬苦素的类型和结构[J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(20): 42-43.
[2] 王贱荣,董美玲,郭跃伟. 芸香科柠檬苦素类化合物及其生物活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(5): 321-331.
[3] Hamdan D, El-Readi M Z, Tahrani A, et al. Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush. [J]. Food Chem, 2011, 127(2): 394-403.
[4] 董文博,王雪莹,杨洲. 柠檬苦素的性质及其生理功能的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2):

- 1-4.
- [5] 蒋俊平,袁芳,吴宾,等. 柠檬苦素类似物的研究进展综述[J]. 中国酿造,2012,31(7):10-14.
- [6] 王婷,陈菲,李溯,等. 吴茱萸提取物乳膏镇痛作用及其机制探讨[J]. 中国药学杂志,2013,48(2):106-110.
- [7] 陶兆燕,李涓,盛蓉,等. 吴茱萸碱分散片降尿酸及抗炎,镇痛的实验研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1147-1148.
- [8] 刘湘丹,蔡嘉洛,邹君华,等. 吴茱萸及其炮制品中吴茱萸碱,吴茱萸次碱和柠檬苦素成分含量对比分析[J]. 中医药导报,2016,22(3):39-41.
- [9] 周玉付,沈媛媛,周志钦,等. 柑橘类柠檬苦素抗癌活性研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2011(5):548-553.
- [10] 欧阳春,丁翔. 柠檬苦素通过抑制腺苷激酶活性改善小鼠迟发型超敏反应[J]. 免疫学杂志,2012,28(11):950-953.
- [11] 姚晓颖,韩永龙,张玉玺,等. 柠檬苦素的药理活性研究进展[J]. 中国伤残医学,2011,19(3):177-179.
- [12] Lam L K, Hasegawa S. Inhibition of benzo[a] pyrene-induced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids[J]. Nutr Cancer,1989,12(1):43-47.
- [13] 赵楠,李达翔,李占林,等. 吴茱萸化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2016,33(2):103-109.
- [14] 罗静,何中燕,裴瑾,等. 橘核中柠檬苦素类物质纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):13-16.
- [15] 高一勇. 吴茱萸柠檬苦素提取物的抑菌效果研究[J]. 广州化工,2011,39(21):93-95.
- [16] Tian Q, Kent K D, Bomser J A, et al. Characterization of limonin glucoside metabolites from human prostate cell culture medium using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2004,18(24):3099-3104.
- [17] Manners G D, Jacob R A, Breksa A P, et al. Bioavailability of citrus limonoids in humans[J]. J Agric Food Chem,2003,51(14):4156-4161.
- [18] LIANG Y, XIE L, LIU X D, et al. Determination of limonin in rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal,2005,39(5):1031-1035.
- [19] XU H, LI Q, YIN Y, et al. Simultaneous determination of three alkaloids, four ginsenosides and limonin in the plasma of normal and headache rats after oral administration of Wu-Zhu-Yu decoction by a novel ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to a comparative pharmacokinetics and ethological study [J]. J Mass Spectrom, 2013, 48(4):519-532.
- [20] WANG P, SUN J, GAO E, et al. Simultaneous determination of limonin, dictamnine, obacunone and fraxinellone in rat plasma by a validated UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Cortex Dictamni extract [J]. J Chromatogr B,2013,928:44-51.
- [21] ZHAO J J, HAN X, ZHAO X, et al. A sensitive liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of dehydroevodiamine and limonin from *Evodia rutaecarpa* in rat plasma[J]. Anal Bioanal Chem,2011,401(1):289-296.
- [22] 张秀云,柯学,何玲,等. 大鼠小肠原位灌流与 Caco-2 细胞法研究柠檬苦素吸收机制[J]. 药学学报,2012,47(2):229-232.

[责任编辑 刘德文]