

· 药物代谢 ·

巴西苏木素在大鼠体内的代谢产物与代谢途径分析

梁光焰¹, 吴云山², 陈伟英², 刘博^{1,2*}, 果德安^{1,2,3*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 附属第二医院, 广东省中医药科学院, 广州 510006; 3. 中国科学院 上海药物研究所, 上海中药现代化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的:通过研究巴西苏木素在大鼠体内的代谢产物,探析其代谢途径。方法:采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对灌胃巴西苏木素(30 mg·kg⁻¹)后大鼠的生物样品(粪便、尿液、血浆、胆汁)进行分析,流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱,流速 0.4 mL min⁻¹,电喷雾离子源,负离子模式,信息依赖性采集模式进行检测,离子喷雾电压 -4.5 kV,离子源温度 500 °C,碰撞电压 100 eV,碰撞能量 -35 eV,锥孔气流 50 L·h⁻¹,*m/z* 100 ~ 1 100,使用 PeakView 1.2 软件进行数据处理,提取给药样品的总离子流图谱与空白生物样品对比,通过保留时间、精确相对分子质量及二级质谱的比较与分析,筛选并鉴定其可能的代谢产物。结果:共检测出 23 个代谢产物,这 23 个代谢产物是巴西苏木素在大鼠体内甲基化、脱氧、缩氢、羧酸化、水合作用、硫酸化、葡萄糖醛酸化后产生的,其中以硫酸化、葡萄糖醛酸化为主。结论:本实验首次对巴西苏木素在大鼠体内的代谢情况进行研究,能够为该药物的药效学和药理学研究提供一定的物质基础。

[关键词] 巴西苏木素; 苏木; 代谢; 硫酸化; 葡萄糖醛酸化; 尿液; 胆汁

[中图分类号] R969.1;R945;R285.5;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0067-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010067

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1352.012.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 13:52

Metabolites and Metabolic Pathway Analysis of Brazilin in Rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS

LIANG Guang-yan¹, WU Yun-shan², CHEN Wei-ying², LIU Bo^{1,2*}, GUO De-an^{1,2,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. The 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006, China; 3. Shanghai Research Center of Modernization of Chinese Materia Medica, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** The metabolites of brazilin were detected and identified *in vivo*. **Method:** The metabolic profiles of brazilin in plasma, urine, bile and feces samples after oral administration (30 mg·kg⁻¹) were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The mobile phase was consisted of water (containing of 0.1% formic acid) -acetonitrile and eluted in gradient mode. The mass was detected in negative ion mode and information dependent acquisition (IDA) model was used. The data were analyzed by PeakView 1.2 software. Total ion chromatogram of sample was extracted and compared with the blank biological sample, possible metabolites were

[收稿日期] 20170730(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202398);广东省科技计划项目(2014A020221035,2015A030310490,2015A020211025,2015B020211013);广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2014ZHR209,YN2015MS03);国家中医药管理局临床基地科研专项(JDZX2015207);广东省高水平大学建设项目(A1-AFD018171Z11097)

[第一作者] 梁光焰,在读硕士,从事中药质量分析与评价,Tel:13765244928,E-mail:1004390045@qq.com

[通信作者] * 果德安,教授,博士生导师,从事中药质量控制及体内代谢研究,Tel:021-50271516,E-mail:daguao@simm.ac.cn;

* 刘博,研究员,博士生导师,从事中药活性物质化学研究与结构优化研究,Tel:020-39318571,E-mail:doctliu@263.net

screened and identified by comparison and analysis of retention time, precise molecular mass, elemental composition and secondary mass spectrometry. **Result:** Twenty-three metabolites of brazilin were detected by comparing with the blank sample. The pathways to these metabolites were methylation, deoxygenation, hydrogenation, carboxylation, hydration, sulfation and glucuronide conjugation, in which sulfation and glucuronide conjugation were the main transitions. **Conclusion:** This study provides the metabolism of brazilin in rats for the first time, which can be useful for its pharmacology and pharmacodynamics.

[**Key words**] brazilin; Sappan Lignum; metabolites; sulfation; glucuronide conjugation; urine; bile

苏木为豆科云实属植物苏木 *Caesalpinia sappan* 的干燥心材,具有活血祛瘀、舒筋通络的功效^[1-2]。巴西苏木素是苏木的活性成分,也是评价该药材质量的重要指标成分。现代研究表明巴西苏木素有较强的药理活性,如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、扩张血管、降血糖等^[3-5];而且巴西苏木素作为天然染色剂,已被广泛应用于食品、日化、皮革及织物染色等行业,在病理实验中还被用作细胞组织切片的染色剂^[6-7]。巴西苏木素现不仅能从苏木中获得,其合成路线也有文献报道^[8];基于巴西苏木素药理活性良好且较易获得,目前对巴西苏木素进行了大量的药效学、药理学研究,并从分子层面探析其作用机制^[9-10]。同时,也有学者对巴西苏木素的组织分布进行研究^[11]。但目前关于巴西苏木素的代谢产物、代谢途径相关的研究尚未见报道。因此,本实验在参考药代动力学研究的基础上^[11],采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对灌胃巴西苏木素后大鼠的生物样品(血浆、尿液、粪便、胆汁)进行检测与分析,寻找其代谢产物,分析其可能代谢途径,为巴西苏木素的药理学、药效学及代谢机制研究提供一定的物质基础^[12-14]。

1 材料

ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Triple TOF™ 5600 型质谱仪(美国 AB Sciex 公司,包含 PeakView 1.2 软件),5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Milli-Q 型纯水机(美国 Millipore 公司)。水合氯醛(天津市大茂化学试剂厂),巴西苏木素(自制,经¹H-NMR,¹³C-NMR,HR-MS/MS 进行鉴定,采用 HPLC 面积归一化法测定,纯度 >98%),乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只,体重(245 ± 20) g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,实验在 SPF 级条件下进行,所有实验操作按照广东省中医院动物伦理委员会的要求进行。

2 方法和结果

2.1 药物的配制 取适量巴西苏木素,加入适量生理盐水,超声至全部溶解,放入 4 °C 冰箱存放,存放时间宜 <24 h。

2.2 生物样品的制备与处理

2.2.1 血浆样品^[11] 取 3 只大鼠,给药前先取 0 min 空白血样,并分别于给药后 10, 20, 30, 45 min 和 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 取血,每次取 0.75 mL,用 3 mL 肝素钠采血管抗凝;完成 4 h 取血后,灌胃生理盐水 2 mL 以补充水分流失;所得血样放入离心机中,常温下以 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上层血浆,将所有 0 min 血浆合并为空白血样,其余各时间段的血液样品合并为实验样品,于 -80 °C 冰箱保存。

2.2.2 胆汁样品 取 6 只大鼠随机分 2 组(空白组和实验组),实验组按 30 mg·kg⁻¹ 灌胃巴西苏木素,空白组灌胃等量生理盐水,腹腔注射 10% 水合氯醛,待大鼠麻醉后,将其固定。在腹部切口后插入胆管,收集 0 ~ 4 h 胆汁样品,将空白组、实验组分别合并为 1 个样品,于 -80 °C 冰箱保存。

2.2.3 排泄物 取 6 只大鼠随机分 2 组(空白组和实验组),放于代谢笼中适应性饲养 24 h,实验组按 30 mg·kg⁻¹ 灌胃巴西苏木素,空白组灌胃等量生理盐水,收集 24 h 排泄物(粪便和尿液分别收取),实验组和空白组分别合并为 1 个样本,于 -80 °C 冰箱保存。

2.2.4 生物样品的处理 所有样品存放于 -80 °C 冰箱内的时间均 <48 h。取生物样品室温溶解,加 6 倍量甲醇沉淀蛋白,涡旋 3 min,以 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,减压浓缩至干,加甲醇 2 mL 使溶解,精密吸取 4 μL 进样分析。

2.3 色谱条件 采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min, 5% B; 3 ~ 4.5 min, 5% ~ 6% B; 4.5 ~ 6.5 min, 6% ~ 6.5% B; 6.5 ~ 8.5 min, 6.5% B; 8.5 ~ 10 min, 6.5% ~ 7% B; 10 ~ 12 min, 7% ~ 15% B; 12 ~ 15 min, 15% ~ 25%

B; 15 ~ 20 min, 25% ~ 35% B; 20 ~ 30 min, 35% ~ 95% B; 30 ~ 35 min, 95% ~ 5% B), 柱温 30 °C, 进样器温度 4 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 4 μL。

2.4 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 信息依赖性采集 (IDA) 模式进行检测, 高纯度氮气 (N₂) 为雾化气, 高纯度氦气 (He) 为碰撞气, 离子喷雾电压 -4.5 kV, 离子源温度 500 °C, 碰撞电压 100 eV, 碰撞能量 -35 eV, 碎裂电压 20, 50, 50 eV, 毛细管电压 -4.5 kV, 锥孔气流 50 L·h⁻¹, *m/z* 100 ~ 1 100。

2.5 生物样品的检测 应用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测大鼠粪便、尿液、血浆、胆汁样品, 采用负离子 IDA 模式进行全扫描采集数据^[15]。以巴西苏木素裂解碎片为母线, 结合主要的离子碎片与中性丢失过滤等质谱鉴定方法, 对灌胃巴西苏木素后大鼠体内代谢产物进行研究; 使用 PeakView 1.2 软件进行代谢产物筛选, 通过总离子流和提取离子流方法, 基于精确质荷比来测定相对分子质量和元素组成; 此外, 通过提取样品组的二级离子色谱图与空白组图谱进行搜索比较, 筛选出可能的代谢产物, 最终分析并确认了可能的 23 个代谢产物; 其代谢途径有甲基化、脱氧、缩氢、水合作用、脱水反应、硫酸化和葡萄糖醛酸化等; 另外, 分析后发现巴西苏木素在大鼠体内代谢产物以 II 相代谢为主。

2.5.1 巴西苏木素的质谱特征分析 在除粪便外的所有样品中均能检测到巴西苏木素原型, 保留时间 5.36 min, 分子离子峰 *m/z* 285.077 2 [M - H]⁻, 主要碎片离子有 *m/z* 267.066 2, 229.060 0, 163.040 3, 135.045 5, 121.030 0, 109.030 3, 裂解途径见图 1。结果表明碎片离子 *m/z* 267.066 2 为巴西苏木素脱去一分子水产生的; 而 *m/z* 229.060 0 为巴西苏木素脱去一分子 C₄H₈ 产生的; *m/z* 163.040 3 为巴西苏木素分子离子脱去 C₇H₆O₂ 产生的; *m/z* 163.040 3 丢失一分子 CO 后产生离子峰 *m/z* 135.045 5; *m/z* 135.045 5 脱去 CH₂ 后形成不饱和中间体 *m/z* 121.030 0。

2.5.2 代谢产物的鉴定 从大鼠血液、尿液、粪便和胆汁样品中共检测到 23 个代谢物 (M1 ~ M23) 及原型成分巴西苏木素, 各个代谢产物的详细信息见表 1 和图 2。

M1 分子离子 *m/z* 265.049 2 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₁₆H₁₀O₄, 相对分子质量比巴西苏木素少 20 Da, 其主要碎片离子 *m/z* 121.029 2, 可推断其为巴西苏木素脱去 H₂, 再脱去一分子 H₂O 后的产物。

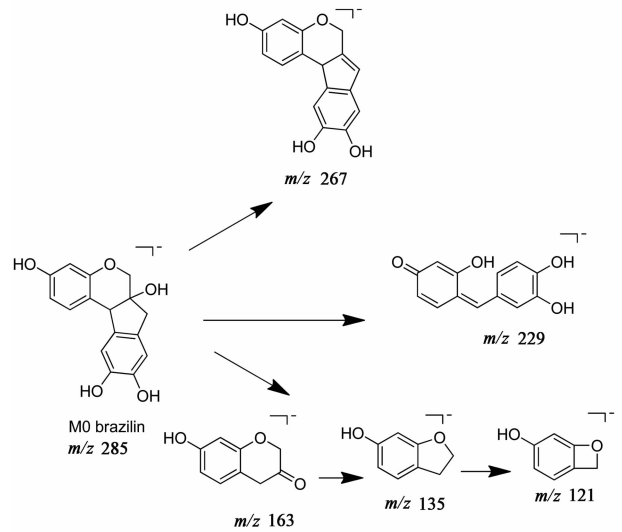


图 1 巴西苏木素的裂解机制分析

Fig. 1 Fragment pathways of brazilin in negative ion mode with ESI source

M2 分子离子 *m/z* 283.060 7 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₁₆H₁₂O₅, 相对分子质量比巴西苏木素少 2 Da, 其主要碎片离子有 *m/z* 265.048 8, 161.023 2, 135.043 6, 根据保留时间和主要的离子碎片, 可推测其为巴西苏木素脱去 H₂ 后产物。M7 分子离子 *m/z* 363.017 3 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₁₆H₁₂O₈S, 相对分子质量比 M2 多 80 Da, 其主要碎片离子为 *m/z* 283.061 0, 268.035 1, 可推测 M7 为 M2 发生硫酸化后的产物。M10 分子离子 *m/z* 381.026 3 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₁₆H₁₄O₉S, 相对分子质量比 M7 多 18 Da, 其主要碎片离子有 *m/z* 363.015 8, 283.058 4, 可推测 M10 为 M7 发生水合反应后的产物。

M13 分子离子 *m/z* 459.093 3 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₂₂H₂₀O₁₁, 相对分子质量比 M2 多 176 Da, 其主要碎片离子有 *m/z* 283.060 6, 265.047 4, 可推测 M13 为 M2 发生葡萄糖醛酸化后的产物。M18 分子离子 *m/z* 477.103 9 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₂₂H₂₂O₁₂, 相对分子质量比 M2 多 194 Da, 其主要碎片离子有 *m/z* 459.095 7, 283.060 9, 265.047 3, 可推测 M18 为 M2 发生葡萄糖醛酸化后再发生水合反应后的产物。M3 分子离子 *m/z* 299.092 6 [M - H]⁻, 经计算分子式为 C₁₇H₁₆O₅, 相对分子质量比巴西苏木素多 14 Da, 其主要碎片离子有 *m/z* 284.068 9, 266.057 9, 227.034 5, 161.023 9, 可推测其为巴西苏木素甲基化后的产物。M23 分子离子 *m/z* 299.092 6 [M - H]⁻, 经计算分子式为

表 1 巴西苏木素及其代谢产物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

Table 1 Fragment ions of brazilin and its metabolites detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS

代谢产物	分子式	m/z 实测值	误差 /ppm	t_R /min	碎片离子	代谢方式	检测部位
M0	$C_{16}H_{14}O_5$	285.077 2	5.09	5.36	267.066 2, 229.060 0, 163.040 3, 135.045 5, 121.030 0, 109.030 3	原型	N, X, D
M1	$C_{16}H_{10}O_4$	265.049 2	-1.27	10.90	121.029 2	缩氢, 脱水	N
M2	$C_{16}H_{12}O_5$	283.060 7	2.12	8.40	265.048 8, 161.023 2, 135.043 6	缩氢	N
M3	$C_{17}H_{16}O_5$	299.092 6	4.01	8.20	284.068 9, 266.057 9, 227.034 5, 161.023 9	甲基化	N
M4	$C_{17}H_{16}O_6$	315.086 7	1.22	7.44	297.076 8, 283.061 5, 265.066 7	甲基化, 羟基化	D
M5	$C_{17}H_{16}O_6$	315.086 8	1.54	8.62	297.078 8, 269.043 0	甲基化, 羟基化	N
M6	$C_{17}H_{14}O_5$	297.076 4	0.82	12.21	282.053 5, 269.043 4	缩氢, 甲基化	N
M7	$C_{16}H_{12}O_8S$	363.017 3	1.06	6.22	283.061 0, 268.035 1	缩氢, 硫酸化	D
M8	$C_{16}H_{14}O_8S$	365.033 6	1.60	3.97	285.076 5, 163.039 2	硫酸化	X, D, N
M9	$C_{17}H_{16}O_8S$	379.049 5	3.39	5.08	299.092 8, 284.069 0, 162.032 0, 79.959 6	甲基化, 硫酸化	X, D, N
M10	$C_{16}H_{14}O_9S$	381.026 3	-3.10	3.61	363.015 8, 283.058 4	缩氢, 硫酸化, 水合反应	D
M11	$C_{18}H_{16}O_6$	327.087 3	3.01	15.62	283.096 6, 145.065 2	脱氧, 甲基化, 羧酸化	N, X
M12	$C_{18}H_{16}O_9S$	407.045 0	4.60	14.30	327.086 8, 283.098 9, 163.039 7	脱氧, 甲基化, 羧酸化, 硫酸化	N
M13	$C_{22}H_{20}O_{11}$	459.093 3	0.30	6.12	283.060 6, 265.047 4	缩氢, 葡萄糖醛酸化	X
M14	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.110 8	1.00	2.54	285.077 5, 175.024 8, 163.039 0, 113.024 5	葡萄糖醛酸化	N
M15	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461.110 2	1.00	4.17	285.076 3, 175.024 0, 163.039 7, 113.024 4	葡萄糖醛酸化	X, N
M16	$C_{23}H_{22}O_{11}$	473.109 2	2.67	7.91	297.077 9, 282.054 3, 175.023 6, 113.023 6	缩氢, 甲基化, 葡萄糖醛酸化	D
M17	$C_{23}H_{24}O_{11}$	475.124 2	3.81	7.44	299.089 3, 284.068 8, 266.058 3, 175.024 3,	甲基化, 葡萄糖醛酸化	D
M18	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.103 9	0.20	2.87	459.095 7, 283.060 9, 265.047 3, 113.026 2	缩氢, 葡萄糖醛酸化, 水合反应	X
M19	$C_{18}H_{18}O_9S$	409.060 3	3.72	7.89	329.104 0, 297.076 8, 282.053 1, 135.007 9	双甲基化, 羟基化, 硫酸化	D, X, N
M20	$C_{22}H_{22}O_{14}S$	541.066 4	3.22	1.82	461.111 4, 365.030 1, 285.075 1, 172.993 4	硫酸化, 葡萄糖醛酸化	N
M21	$C_{23}H_{24}O_{14}S$	555.082 2	3.42	2.98	475.125 3, 379.049 5, 299.090 4	甲基化, 硫酸化, 葡萄糖醛酸化	N
M22	$C_{28}H_{30}O_{17}$	637.213 4	1.10	2.01	461.109 1, 285.079 6	双葡萄糖醛酸化	D, X, N
M23	$C_{17}H_{16}O_5$	299.092 6	4.01	8.97	163.039 5, 135.044 4, 109.029 3	甲基化	N

注: D. 胆汁; X. 血浆; N. 尿液。

$C_{17}H_{16}O_5$, 相对分子质量比巴西苏木素多 14 Da, 其主要碎片离子有 m/z 163.039 5, 135.044 4, 109.029 3, 推测为巴西苏木素甲基化产物, 同时也与 M3 互为同分异构体。M9 分子离子 m/z 379.049 5 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{17}H_{16}O_8S$, 相对分子质量比 M3 多 80 Da, 其主要碎片离子有 m/z 299.092 8, 284.069 0, 162.032 0, 79.959 6, 可推测其为 M3 或 M23 硫酸化后的产物, 由 162.032 0 碎片进一步分析, 其实 M23 硫酸化的可能性更大。

M17 分子离子 m/z 475.124 2 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{23}H_{24}O_{11}$, 分子量比 M3 多 176 Da, 其主

要碎片离子有 m/z 299.089 3, 284.068 8, 266.058 3, 175.024 3, 可推测其为 M3 或 M23 葡萄糖醛酸化后的产物, 由二级碎片进一步分析, 其为 M3 硫酸化的可能性更大。M21 分子离子 m/z 555.082 2 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{23}H_{24}O_{14}S$, 相对分子质量比 M17 多 80 Da, 其主要碎片离子有 m/z 475.125 3, 379.049 5, 299.090 4, 可推测其为 M3 硫酸化及葡萄糖醛酸化后的产物。M4 分子离子 m/z 315.086 7 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{17}H_{16}O_6$, 相对分子质量比巴西苏木素多 30 Da, 其主要碎片离子有 m/z 297.076 8, 283.061 5,

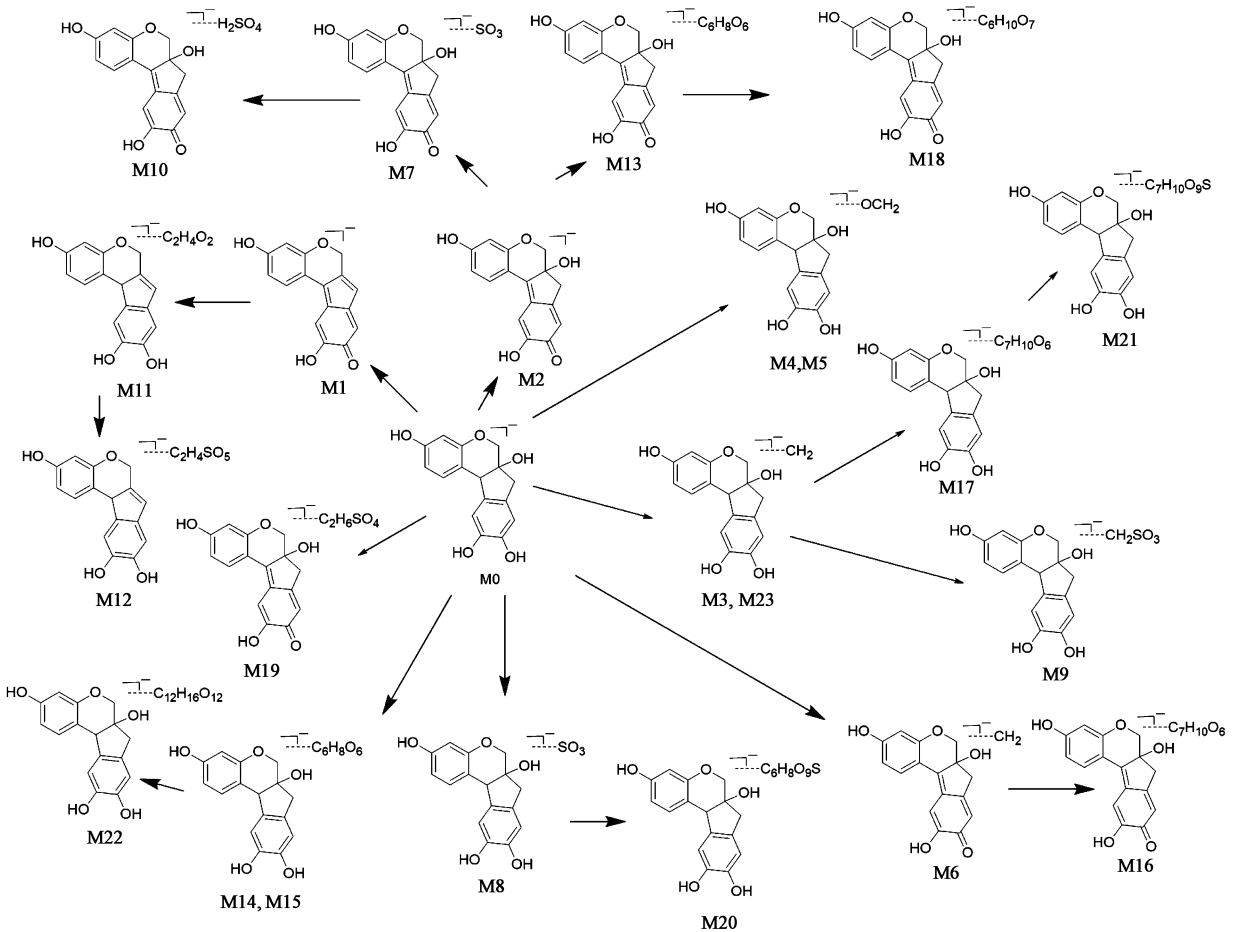


图 2 巴西苏木素的代谢途径分析

Fig. 2 Proposed metabolic pathways of brazilin *in vivo*

265.066 7,可推测 M4 为巴西苏木素发生甲基化、羟基化后的产物。M5 分子离子 m/z 315.086 8 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{17}H_{16}O_6$, 其主要碎片离子有 m/z 297.078 8, 269.043 0, 可推测 M4 与 M5 互为同分异构体。M6 分子离子 m/z 297.076 4 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{17}H_{14}O_5$, 相对分子质量比巴西苏木素多 14 Da, 其主要碎片离子有 m/z 282.053 5, 269.043 4, 可推测 M6 为巴西苏木素发生缩氢、甲基化后的产物。

M16 分子离子 m/z 473.109 2 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{23}H_{22}O_{11}$, 相对分子质量比 M6 多 176 Da, 其主要碎片离子有 m/z 297.077 9, 282.054 3, 175.023 6, 113.023 6, 可推测其为 M6 葡萄糖醛酸化后的产物。M8 分子离子 m/z 365.033 6 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{16}H_{14}O_8S$, 相对分子质量比巴西苏木素多 80 Da, 其主要碎片离子有 m/z 285.076 5, 163.039 2, 可推测 M8 为巴西苏木素发生硫酸化后的产物。M14 分子离子 m/z 461.110 8 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{22}H_{22}O_{11}$, 相对分子

质量比巴西苏木素多 176 Da, 其主要碎片离子有 m/z 285.077 5, 175.024 8, 163.039 0, 可推测 M14 为巴西苏木素发生葡萄糖醛酸化后的产物。M15 分子离子 m/z 461.110 2 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{22}H_{22}O_{11}$, 相对分子质量比巴西苏木素多 176 Da, 其主要碎片离子有 m/z 285.076 3, 175.024 0, 163.039 7, 可推测 M15 与 M14 为同分异构体。

M20 分子离子 m/z 541.066 4 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{22}H_{22}O_{14}S$, 相对分子质量比巴西苏木素多 256 Da, 其主要碎片离子有 m/z 461.111 4, 365.030 1, 285.075 1, 可推测 M20 为巴西苏木素发生硫酸化、葡萄糖醛酸化后的产物。M22 分子离子 m/z 637.213 4 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{28}H_{30}O_{17}$, 相对分子质量比巴西苏木素多 352 Da, 其主要碎片离子有 m/z 461.109 1, 285.079 6, 可推测 M22 为巴西苏木素发生 2 次葡萄糖醛酸化后的产物。M11 分子离子 m/z 327.087 3 $[M - H]^-$, 经计算分子式为 $C_{18}H_{16}O_6$, 其主要碎片离子有 m/z 283.096 6, 145.065 2, 可推测 M11 为巴西苏木素

脱氧、甲基化、羧酸化后的产物。M12 分子离子 m/z 407.045 0 $[M-H]^-$, 经计算分子式为 $C_{18}H_{16}O_9S$, 其主要碎片离子有 m/z 327.086 8, 283.098 9, 163.039 7, 可推测 M12 为 M11 硫酸化后的产物。M19 分子离子 m/z 409.060 3 $[M-H]^-$, 经计算分子式为 $C_{18}H_{18}O_9S$, 其主要碎片离子有 m/z 329.104 0, 297.076 8, 282.053 1, 135.007 9, 其中 m/z 329.104 0 为巴西苏木素发生羟基化和双甲基化后的产物, M19 为 m/z 329.104 0 发生硫酸化后的产物。

3 讨论

巴西苏木素作为苏木的主要成分, 2010 年版《中国药典》规定其在苏木干燥品中质量分数不得少于 0.5%。国内外学者对巴西苏木素药理活性开展了多方面的研究, 证实巴西苏木素在降血糖、抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、清除自由基、抑制脂质过氧化^[16-17]等方面均有显著的药理活性。也有学者对其药代动力学及生物利用度进行研究, 但对其代谢途径、代谢产物的研究还未见报道; 本实验应用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 使用巴西苏木素对照品对质谱方法进行优化, 同时在空白生物样品中加入巴西苏木素对照品进行液相方法优化, 在避免基质效应的同时建立了更为简洁的检测方式。

本实验对给药大鼠的血液、胆汁、尿液、粪便收集合并进行检测, 以巴西苏木素原型的质谱特征和保留时间为参考值, 对代谢产物的保留时间及二级裂解进行分析, 从而探析巴西苏木素可能的代谢产物及代谢途径。经分析发现可能的代谢产物有 23 种, 代谢途径有甲基化、脱氧、缩氢、水合作用、脱水反应、硫酸化和葡萄糖醛酸化等, 其中又以硫酸化和葡萄糖醛酸化为主要代谢途径。对巴西苏木素自身结构进行分析, 含羟基数多达 4 个, 而酚羟基有 3 个, 自身极性较大, 其在体内易发生甲基化、脱氧、缩氢、脱水反应; 对原型药物及非硫酸化、非葡萄糖醛酸化的代谢产物进行分析, 发现其结构中都存在活跃的羟基基团, 为硫酸化、葡萄糖醛酸化的发生提供了基础; 实验中还检测到水合作用的代谢产物, 其有可能是药物在体内产生的变化, 也有可能是分析检测过程中与流动相结合产生的, 具体原因还需进一步实验验证。

通过对巴西苏木素及其代谢产物的分布进行分析, 结果发现巴西苏木素原型在尿液、血液、胆汁中都有检出, 代谢产物在尿液、血液、胆汁也有分布, 但在粪便中却皆未能检测到, 出现以上结果可能的原

因是巴西苏木素极性较大, 不易经过粪便排出体外。进一步分析发现 23 个代谢产物中, 有 16 个经过尿液排泄到体外, 而且在收集排泄物时, 发现前 2 h 尿液与空白组相比较呈现明显的淡红色, 结合药代动力学文献^[11], 这可能是巴西苏木素快速消除, 经尿液排泄到体外产生的现象, 同时这也可能是造成其生物利用度低的原因之一。一般情况下, 相对分子质量在 500 ~ 600 Da 的药物会优先经胆汁排泄, 而巴西苏木素在负离子模式下测得 m/z 285.077 2, 与众多的多酚类化合物结构相似, 其在体内易发生硫酸化、葡萄糖醛酸结合反应, 水溶性增加, 所以主要通过尿液排出体外。

本实验初步阐明了巴西苏木素的代谢产物, 探讨了巴西苏木素的代谢途径和规律, 可为巴西苏木素类化合物的代谢研究提供参考。同时, 由于巴西苏木素是苏木的主要有效成分, 可为苏木及含有苏木的复方的药效物质基础、作用机制、临床应用提供研究基础。本实验以质谱手段对代谢产物进行结构推测, 但对立体构型的阐释有限, 还需要进一步研究分析。

[参考文献]

- [1] Nirmal N P, Rajput M S, Prasad R G, et al. Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: a review [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8 (6): 421-430.
- [2] 郑佳新. 苏木及其用药精华考析初探 [J]. *中医药管理杂志*, 2006, 14 (11): 68-69.
- [3] 孙响波, 于妮娜, 杨子东, 等. 马钱子配伍苏木对佐剂关节炎大鼠滑膜组织 IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 的影响 [J]. *实用中医药杂志*, 2014, 30 (2): 86-87.
- [4] Mekala K, Radha R. Herbal formulation development for hypolipidemic and anti-obesity activity on heartwood of *Caesalpinia sappan* Linn [J]. *IJMRA*, 2016 (4): 409-420.
- [5] Nirmal N P, Panichayupakaranant P. Antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of standardized brazilin-rich *Caesalpinia sappan* extract [J]. *Pham Biol*, 2015, 53 (9): 1339-1343.
- [6] 杨月红, 袁静萍, 文登虎. 三种类型的苏木精在 HE 染色中的效果比较 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2015, 31 (3): 345-346.
- [7] 涂琦, 刘勇, 袁晟. 苏木素伊红染色一步法的研究及应用 [J]. *江西医药*, 2012, 47 (2): 175-176.
- [8] 汪学全, 刘卫, 段素月, 等. 巴西木素类天然产物的合成研究进展 [J]. *有机化学*, 2015, 35 (8): 1585-1597.

- [9] Choi B M, Lee J A, GAO S S, et al. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1 [J]. *Biofactors*, 2007, 30(3) :149-157.
- [10] Kim B, Kim S H, Jeong S J, et al. Brazilin induces apoptosis and G2/M arrest via inactivation of histone deacetylase in multiple myeloma U266 cells [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60(39) :9882-9889.
- [11] JIA Y, WANG H, SONG Y, et al. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the pharmacokinetics, tissue distribution and excretion studies of brazilin in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 931 :61-67.
- [12] LIU M, ZHAO S, WANG Z, et al. Identification of metabolites of deoxyschizandrin in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data processing techniques [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 949-950 :115-126.
- [13] 刘亚丽, 宋永贵, 魏韶锋, 等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析白头翁皂苷 B₃ 在大鼠肠道菌群中的代谢产物 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(23) :72-76.
- [14] 迟明艳, 向文英, 杨武, 等. UPLC-Q-TOF/MS 分析头花蓼提取物在大鼠尿液中的代谢产物 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(17) :77-80.
- [15] QIAO S, SHI X, SHI R, et al. Identification of urinary metabolites of imperatorin with a single run on an LC/Triple TOF system based on multiple mass defect filter data acquisition and multiple data mining techniques [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21) :6721-6738.
- [16] Lee Y R, Noh E M, HAN J H, et al. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2/3) :80-86.
- [17] CAO J, LI L S, LIU B, et al. Activation of growth-associated protein by intragastric brazilein in motor neuron of spinal cord connected with injured sciatic nerve in mice [J]. *Chem Res Chinese U*, 2011, 27(2) :254-257.

[责任编辑 刘德文]