

不同剂量西瑞香素及其代谢产物在大鼠尿中的排泄

高金薇^{1,2}, 王小波¹, 王彩芬¹, 崔钰琪^{1,2}, 佟立今¹, 孙立新^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:** 研究不同剂量西瑞香素及其葡萄糖醛酸化代谢产物在大鼠尿中的排泄动力学。**方法:** 将西瑞香素制成混悬液, 按 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ 给大鼠灌胃, 于灌胃后不同时间收集尿液, 用 β-葡萄糖醛酸苷酶溶液处理尿液。采用高效液相色谱法测定尿液中西瑞香素及其葡萄糖醛酸化代谢产物的浓度。**结果:** 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ 3 种给药剂量时, 累积经尿液排泄的原形药物量为 (23.13 ± 2.36), (41.74 ± 2.02) 和 (80.01 ± 3.21) μg, 累积经尿液排泄的葡萄糖醛酸结合形药物为 (37.51 ± 4.51), (61.17 ± 3.90) 和 (131.25 ± 13.85) μg。**结论:** 西瑞香素在大鼠尿液中葡萄糖醛酸化代谢产物的排泄量大于原形排泄量, 原形及其葡萄糖醛酸化代谢产物的排泄呈现明显的剂量依赖性特征。

[关键词] 西瑞香素; 尿排泄; 葡萄糖醛酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0099-05

[doi] 10.11653/syfy2014030099

Urinary Excretion of Daphnoretin and its Metabolite at Different Doses in Rats

GAO Jin-wei^{1,2}, WANG Xiao-bo¹, WANG Cai-fen¹, CUI Yu-qi^{1,2}, TONG Li-jin¹, SUN Li-xin^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the urinary excretion of daphnoretin and glucuronidated daphnoretin in rats. **Method:** Suspended in solution, daphnoretin was orally administered to rats at the dose of 50, 100, 200 mg·kg⁻¹. At various time intervals, the urine was collected. The urine was treated with β-glucuronidase. The daphnoretin in urine was extracted by acetic ether. The organic phase was removed into the tubes and then dried in pressure blowing concentrator. The residue was dissolved in 200 μL of mobile phase. The solution of 20 μL was

[收稿日期] 20130419(018)

[基金项目] 国家“十一五”“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-012); 辽宁省高校创新团队支持计划项目(LT 2021018)

[第一作者] 高金薇, 硕士, 从事药代动力学研究, Tel: 024-23986365, E-mail: xiaowei850902@sina.com

[通讯作者] * 孙立新, 博士, 教授, 从事药物分析学研究, Tel: 024-23986365, E-mail: slx04@163.com

- [12] 向大雄, 李焕德, 胥新元. 中药复方药代动力学研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 61.
- [13] 田秀峰, 李鹏跃, 王宏洁, 等. 冰片对栀子在小鼠体内药代动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 135.
- [14] 王又红, 郭琳琳, 刘卫红, 等. 栀子苷在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中医研究, 2011, 24(6): 29.
- [15] 卢兴红, 张兰桐, 袁志芳, 等. RP-HPLC 法测定血浆中栀子苷浓度及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(2): 140.
- [16] 胡蝶, 郭宏宝, 王银叶, 等. 单用和复方中 5-单硝酸异山梨醇酯的药理学比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(24): 1891.
- [17] 聂雪凌, 唐鸿志, 许平. 绿原酸的检测及代谢途径研究进展[J]. 广州化工, 2013, 41(1): 3.
- [18] 李丹, 阎姝. 栀子苷的药代动力学研究进展[J]. 天津药理学, 2012, 24(6): 51.

[责任编辑 全燕]

drawn and detected by high-performance liquid chromatography. **Result:** The cumulative urine excretion of daphnoretin was (23.13 ± 2.36) , (41.74 ± 2.02) and (80.01 ± 3.21) μg at the dose of 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. The cumulative urine excretion of glucuronidated daphnoretin was (37.51 ± 4.51) , (61.17 ± 3.90) and (131.25 ± 13.85) μg at the dose of 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The cumulative urine excretion of glucuronidated daphnoretin is more than cumulative urine excretion of daphnoretin. The daphnoretin and glucuronidated daphnoretin are excreted in the manner of linear dose-dependent.

[**Key words**] daphnoretin; urinary excretion; glucuronidation; HPLC

西瑞香素(daphnoretin),化学名为 7-羟基-6-甲氧基-3,7'-双香豆素酯,又称双白瑞香素,属于香豆素类化合物,广泛分布于瑞香科、豆科及芸香科的许多种属中。西瑞香素对人肺腺癌细胞 AGZY-83-a、人喉癌细胞 Hep2 和人肝癌细胞 HepG2 等肿瘤细胞具有较强的抑制作用^[1],还可以抑制乙型肝炎病毒在人类肝癌细胞中的基因表达,降低心肌耗氧量,改善实验小鼠的心肌营养性血流量,抑制 DNA 聚合酶 β 的裂解活性等^[2]。本课题组^[3]采用 LC-MSⁿ 方法研究了西瑞香素在大鼠体内的代谢情况,结果表明在尿样中除西瑞香素原形外发现 3 种代谢物,分别是 7-羟基-6-甲氧基-3'-羟基-3,7'-双香豆素酯、7-羟基-6-甲氧基香豆素和葡萄糖醛酸结合物。在粪样中只有西瑞香素原形,在胆汁中原形、葡萄糖醛酸结合物和 7-羟基-6-甲氧基-3'-羟基-3,7'-双香豆素酯,在血浆中未检测到原形,但有葡萄糖醛酸结合物。本课题组^[3]对灌胃给予 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 西瑞香素的排泄研究中发现,粪便中西瑞香素原形的排泄量占给药量的 50% 以上,尿液和胆汁中原形的排泄率较低,分别为 0.13%,0.018%。为了进一步研究西瑞香素的排泄途径,本实验测定灌胃给予不同剂量西瑞香素的大鼠尿液中原形及葡萄糖醛酸结合物的排泄量,并观察剂量与排泄量的关系,为其进一步应用提供依据。

1 材料

LC-6A 型高效液相色谱仪、SPD-6A 型紫外检测器(日本岛津公司),Anastar 色谱工作站(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),L-128 型恒温氮吹浓缩仪(北京来亨科贸有限责任公司),ACO-009 型电磁式空气压缩机(广州海利集团有限公司),SK-1 型快速混匀器(江苏国华仪器厂),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),分析天平(1/10 万,湘仪天平仪器厂),HPX-160BSH-III 型恒温恒湿箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),大鼠代谢笼(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

西瑞香素精制品(自制,纯度 98.6%),补骨脂

素对照品(批号 120706,上海易利生物科技有限公司), β -葡萄糖醛酸苷酶(Sigma 公司购买),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雄性,质量 200 ~ 230 g,沈阳药科大学实验动物中心提供,合格证号 SCPK-(辽)-2010-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(40:60),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 345 nm,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

2.2 溶液的配制 标准溶液的制备:取西瑞香素对照品约 20 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 200.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的西瑞香素储备液。精密量取上述西瑞香素储备液适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成西瑞香素质量浓度分别为 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 160.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液。精密量取上述西瑞香素储备液适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成西瑞香素质量浓度分别为 4.0, 30.0, 130.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

内标溶液的制备:取补骨脂素约 5 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 100.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标储备液 I。精密吸取内标储备液 I 4 mL 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度 40.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液 II。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

pH 4.6 醋酸钠缓冲液的制备:取无水醋酸钠 10.8 g,加水 100 mL 溶解,用冰醋酸调节 pH 至 4.6,再加水稀释至 250 mL。

pH 9.0 碳酸钠缓冲液的制备:取无水碳酸钠 1.2 g,碳酸氢钠 7.4 g,加水溶解至 250 mL。

酶溶液的制备:称取 β -葡萄糖醛酸苷酶约 1 mg,溶于 pH 4.6 的醋酸钠缓冲液 5 mL 中,即得 340 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的酶溶液。

2.3 给药及尿样采集 取健康 SD 雄性大鼠 18 只,置于代谢笼中,给药前禁食 12 h,自由饮水,收集空白尿样。灌胃给予西瑞香素混悬液(二甲基亚砜-丙二醇-生理盐水 = 0.3:50:50),给药量 50,100,200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,于灌胃后 0~4,4~8,8~12,12~24,24~36,36~48,48~60 h 收集尿液标本并记录总量。

2.4 尿液样品的处理

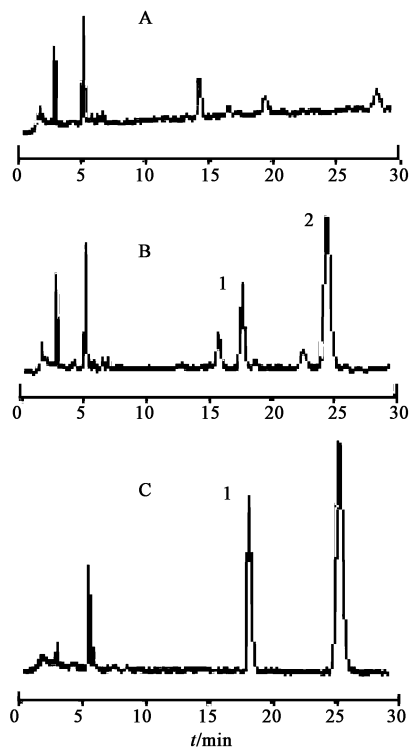
2.4.1 原尿液的处理 取尿样 100 μL ,置于 5 mL 离心管中,加入 pH 4.6 醋酸钠缓冲液 100 μL ,再加入 pH 9.0 碳酸钠缓冲液 100 μL 调至中性,涡旋混合 60 s,然后加入甲醇 10 μL 和内标溶液(补骨脂素溶液 40.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)10 μL ,涡旋混合 60 s,加入乙酸乙酯 1 mL,涡旋混合 10 min,以 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,吸取上清液转移于另一 1.5 mL 离心管中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干,残渣用流动相 200 μL 溶解,吸取上清液 20 μL 进样。测得尿液中西瑞香素浓度。

2.4.2 原尿液的酶解反应 取尿样 100 μL ,置于 5 mL 离心管中,加入 340 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -葡萄糖醛酸酶液 100 μL ,混匀后置于恒温水浴酶解(37 $^{\circ}\text{C}$,14 h),冰浴终止反应。加入 pH 9.0 碳酸钠缓冲液 100 μL 调至中性,其余步骤同 2.4.1,测得尿液中总西瑞香素(原形药物与其葡萄糖醛酸结合形药物)浓度。

2.5 方法学验证

2.5.1 方法专属性 取大鼠空白尿液,除不加内标溶液外,其余按 2.4.1 项下方法处理并分析,获得空白样品色谱图;将一定浓度的西瑞香素对照品溶液和内标溶液加入大鼠空白尿液,同法操作,获得相应的模拟样品色谱图;同法得到大鼠给药后(0~4 h)尿液样品色谱图。在上述色谱条件下,西瑞香素和内标物的保留时间分别约为 25.4,17.8 min,内源性物质对测定没有干扰,见图 1。

2.5.2 标准曲线与定量下限 取大鼠空白尿液 100 μL ,分别加入西瑞香素系列标准溶液各 10 μL ,使西瑞香素的质量浓度分别为 0.200,0.500,1.00,2.00,5.00,10.0,16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按 2.4.1 项下方法操作,每一质量浓度双样本分析,进样 20 μL ,记录色谱图。以西瑞香素与内标物的峰面积比值为纵坐标(Y),西瑞香素浓度为横坐标(ρ , $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),用加权($w = 1/X^2$)最小二乘法进行回归运算,求得回归方程。实验连续进行 3 d,西瑞香素第一天典型的回归方程为 $Y = 6.630 \times 10^{-1} \rho + 0.666 \times 10^{-2}$ ($\gamma =$



A. 空白样品;B. 向空白样品中加入西瑞香素和补骨脂素;
C. 口服给药后 0~4 h 尿样;峰 1. 补骨脂素(内标);峰 2. 西瑞香素
图 1 大鼠尿液中西瑞香素的典型色谱

0.995 4),西瑞香素在 0.200~16.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。方法的定量下限为 0.200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其准确度与精密度均符合要求。

2.5.3 精密度和准确度 取大鼠空白尿液 100 μL ,按 2.5.2 项下操作,制备西瑞香素在大鼠尿样的低、中、高 3 个质量浓度(0.40,3.00,13.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 QC 样品,每一浓度 5 样本分析,连续测定 3 个分析批,根据当批的标准曲线,计算 QC 样品质量浓度,与配制质量浓度对照,求得大鼠尿液样品测定方法的精密度与准确度,见表 1。结果表明,该方法符合生物样本分析方法的要求。

表 1 西瑞香素在大鼠尿液中的精密度和准确度($n = 5$) %

质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD		RE
	日间	日内	
0.40	8.5	6.9	1.6
3.00	8.0	5.4	0.8
13.0	7.6	13.7	-0.6

2.5.4 提取回收率 取大鼠空白尿液 100 μL ,按 2.5.2 条操作,制备西瑞香素低、中、高 3 个质量浓度的 QC 样品,每个质量浓度 5 样本分析,按 2.4.1

条件下处理样品,进样并记录色谱峰面积。另制备同样质量浓度与数量的对照样品,提取前不加标准溶液和内标溶液,在提取后的上层有机溶液里加入标准溶液和内标溶液,其他操作同 2.4.1 条件下处理,进样记录色谱峰面积,根据峰面积之比计算西瑞香素的提取回收率。3 个质量浓度下西瑞香素的提取回收率分别 $(75.5 \pm 4.1)\%$, $(82.7 \pm 9.8)\%$, $(85.1 \pm 9.1)\%$;内标物的提取回收率为 $(81.3 \pm 4.9)\%$ 。

2.5.5 稳定性考察 取大鼠空白尿液 100 μL ,按 2.5.2 项下操作,制备西瑞香素在大鼠尿样的低、中、高 3 个质量浓度的 QC 样品,每一浓度进行 3 样本分析,考察样品预处理后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 和 -20°C 保存 6 d 的稳定性。结果表明,样品在上述条件下稳定性良好。

2.6 数据处理分析^[4] 各时间段的尿浓度测定值与该时间段尿液体积相乘即得该时间段药物排泄量;各时间段药物排泄量与各时间段相应的时间之比为各时间段排泄速率;各时间段药物排泄量之和为药物的累积排泄量,其与给药剂量相比即得相应时间内的药物累积排泄百分率。

2.7 不同剂量西瑞香素及其代谢物在大鼠尿中的排泄 将尿液与葡萄糖醛酸酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中孵育 14 h,可使葡萄糖醛酸化西瑞香素水解,释放出西瑞香素,通过提取分析,测得尿液中总西瑞香素(原形药物与其葡萄糖醛酸结合形药物)的量,用总西瑞香素的量减原形药物量得到尿液中葡萄糖醛酸结合形药物量。按 2.6 项下方法计算尿药排泄参数,绘制原形药物及其葡萄糖醛酸结合形药物尿药累积排泄量-时间曲线(图 2,3)及平均尿药排泄速率-时间曲线(图 4,5)。50,100,200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3 种给药剂量时累积经尿液排泄的原形药物量为 (23.13 ± 2.36) , (41.74 ± 2.02) , (80.01 ± 3.21) μg ;累积经尿液排泄的药物总量(原形药物与其葡萄糖醛酸结合形药物)为 (60.64 ± 6.49) , (102.73 ± 5.11) , (211.26 ± 16.90) μg 。累积经尿液排泄的葡萄糖醛酸结合形药物量为 (37.51 ± 4.51) , (61.17 ± 3.90) , (131.25 ± 13.85) μg 。表明西瑞香素在大鼠尿液中葡萄糖醛酸化代谢产物的排泄量大于原形排泄量。原形及其葡萄糖醛酸结合形药物的排泄呈现明显的剂量依赖性特征。3 种剂量下,原形药物在 12 ~ 24 h 时间段排泄速率最大,60 h 内分别有 0.21%, 0.18%, 0.19% 原形药物从尿中排出;葡萄糖醛酸化药物在 8 ~ 12 h 时间段排

泄速率最大,60 h 内有 0.33%, 0.29%, 0.31% 葡萄糖醛酸化药物从尿中排出。

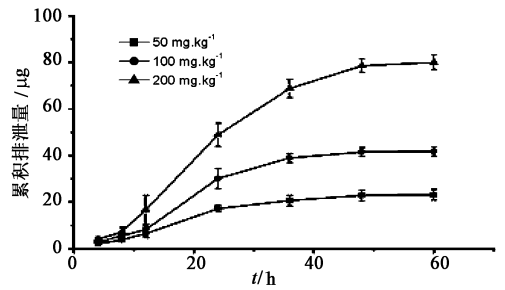


图 2 大鼠灌胃给予不同剂量西瑞香素原形药物累积尿排泄量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

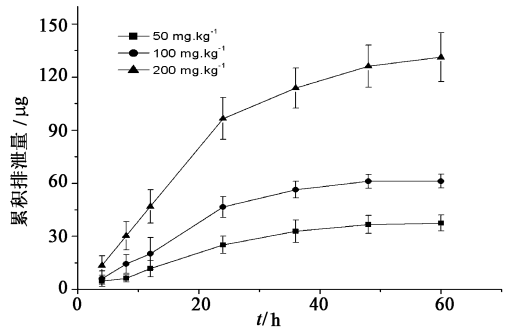


图 3 大鼠灌胃给予不同剂量西瑞香素葡萄糖醛酸化药物累积尿排泄量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

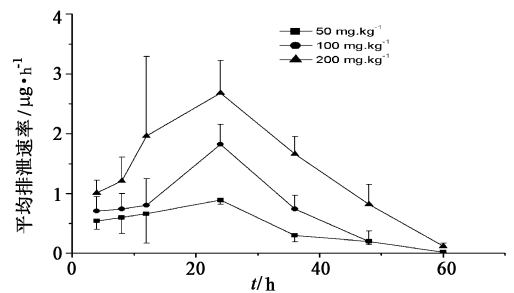


图 4 大鼠灌胃给予不同剂量西瑞香素原形药物平均排泄速率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

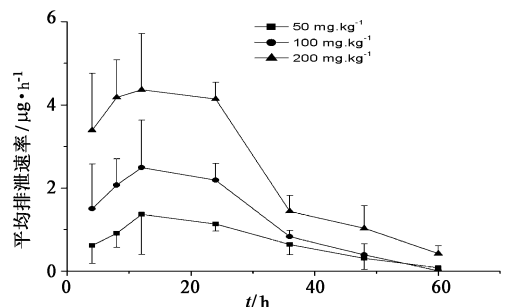


图 5 大鼠灌胃给予不同剂量西瑞香素葡萄糖醛酸化药物平均排泄速率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

本实验中大鼠灌胃给予 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ 3 种剂量经尿液排泄的原形药物的累积排泄率为 0.21%, 0.18%, 0.19%, 与前期研究结果基本相同。随着给药剂量增加, 原形及其葡萄糖醛酸结合物的排泄量也增加, 可以证明前期研究中西瑞香素以原形经粪便排泄量占 50% 以上^[3], 不是因为给药剂量过大而导致吸收不完全。此外, 虽然尿液中葡萄糖醛酸结合形的排泄量大于原形, 但排泄量也不大。葡萄糖醛酸结合物的另一个排泄途径为胆汁排泄, 胆汁中葡萄糖醛酸结合物的排泄还有待于进一步研究。

在西瑞香素抑癌实验中, 大鼠腹腔注射 12 mg·kg⁻¹ 西瑞香素混悬液可显著抑制埃氏腹水瘤生长^[5]。根据经验值, 口服剂量是腹腔注射量 3~4 倍, 所以西瑞香素口服剂量约为 50 mg·kg⁻¹, 因此本实验选择了上述 3 种剂量进行比较。

在选择液-液萃取溶剂时, 根据相似相溶原理, 先后考察了以乙酸乙酯、乙醚做萃取溶剂, 结果发现 10 倍量的乙酸乙酯萃取率较高, 且内源性物质对西瑞香素的测定无干扰。虽然西瑞香素 pKa 8.98 为弱碱性药物, 但因其结构中存在 α, β -不饱和和内酯结构, 在碱性条件下不稳定, 需在中性条件下进行提取, 因此本实验中将酸性的酶解液用碳酸盐缓冲液调至中性, 然后进行萃取。

温度高于 60 °C 可引起 β -葡萄糖醛酸苷酶变性而失活^[6], 因此所考察的水解温度上限定在 55 °C, 不宜再升高。但 55 °C 时西瑞香素又不稳定^[7], 因此将酶解温度设为 37 °C。关于酶水解所加的缓冲溶液, 大多数文献^[8-11]采用醋酸钠缓冲液, 故未优化选择。研究中还进一步考察了酶用量和水解时间。由于酶的价格较高, 在酶解完全的前提下, 以酶用量适当为原则, 最后确定了酶解时间。

[参考文献]

- [1] 李雨田, 顾雪竹, 张村. 了哥王中的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):252.
- [2] 陈扬, 孙立新. 中药了哥王研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(7):587.
- [3] SUN Lixin, GUO Junyang, YANG Wenwen, et al. Metabolism and excretion study of daphnoretin in rats after oral administration[J]. Latin American J Pharm, 2012, 31(3):399.
- [4] 陈燕, 朱全红, 罗家波, 等. 麻黄汤中麻黄生物碱在人尿中的排泄研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11):55.
- [5] Hall I H, Tagahara K, Lee K H. Antitumor agents LIII: The effects of daphnoretin on nucleic acid and protein synthesis of ehrlich ascites tumor cells [J]. J Pharm Sci, 1982, 71(7):741.
- [6] 郭胜才, 张玉荣, 郭幼梅, 等. 地西洋代谢物的结合物水解条件研究[J]. 医药导报, 2003, 22(6):374.
- [7] Zheng L, Yang W W, Sun L X, et al. Stability study of daphnoretin *in vitro* [J]. Die Pharmazie, 2012, 67(4):277.
- [8] 张颖, 刘建勋, 林立, 等. 大鼠口服西红花苷-1 后吸收入血成分及药动学[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(2):136.
- [9] 郭幼梅, 郭胜才, 郑力行, 等. 酶水解后高效液相色谱法测定尿中地西洋及其代谢物[J]. 中国药理学临床杂志, 2001, 10(5):303.
- [10] 杨悦武, 吴如今, 王宗廉, 等. 气相色谱-质谱法测定尿中去氢甲睾酮及其代谢物[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(5):282.
- [11] 张国民, 柏萍, 张秀琴, 等. 西瑞香素的心脏效应[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(12):751.

[责任编辑 邹晓翠]