

葛根素在大肠湿热证模型大鼠体内的代谢产物分析

陈丽红^{1*}, 唐于平², 卞勇¹, 杨念云¹, 井山林¹, 王强³

- (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;
2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210023;
3. 中国药科大学中药分析教研室, 南京 210009)

[摘要] **目的:**分析葛根素在大肠湿热证模型大鼠尿液中代谢产物。**方法:**建立大肠湿热证大鼠模型,采用 UPLC-DAD-MS 技术分析葛根素在大肠湿热证模型大鼠尿液中的代谢产物。**结果:**从灌胃葛根素的模型大鼠尿液中,发现并鉴定了 8 个主要代谢产物的化学结构,分别为葛根素葡萄糖醛酸苷同系物、葛根素葡萄糖醛酸苷、葛根素、大豆苷元-葡萄糖醛酸苷、甲基大豆苷元-葡萄糖苷、甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷同系物、甲基大豆苷元、甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷。**结论:**葛根素在模型大鼠尿液中除以原形排泄外,还有甲基化的一相代谢产物及形成葡萄糖结合物和葡萄糖醛酸结合物的二相代谢产物。

[关键词] 葛根素; 大肠湿热证; 代谢产物; 超高效液相色谱法; 结构分析

[中图分类号] R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0167-03

[doi] 10.11653/syfy2013210167

Metabolites Analysis of Puerarin in Rats Model with Syndrome of Dampness-Heat in Large Intestine

CHEN Li-hong^{1*}, TANG Yu-ping², BIAN Yong¹, YANG Nian-yun¹, JING Shan-lin¹, WANG Qiang³

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

3. Department of Chinese Meteria Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze metabolites of puerarin in rats model with syndrome of dampness-heat in large intestine. **Method:** Rats model with syndrome of dampness-heat in large intestine was established, metabolites of puerarin in urine from model rats with syndrome of dampness-heat in large intestine were analyzed by UPLC-DAD-MS. **Result:** Eight components were identified as isomer of puerarin-*O*-glucuronide, puerarin-*O*-glucuronide, puerarin, daidzein-*O*-glucuronide, methyl daidzein-*O*-glucoside, isomer of methyl daidzein-*O*-glucuronide, methyl daidzein, methyl daidzein-*O*-glucuronide. **Conclusion:** Puerarin was excreted in the form of two-phase metabolites with glucuronide conjugate and glucoside conjugate, methylated metabolite as well as prototype in urine of model rats with syndrome of dampness-heat in large intestine.

[Key words] puerarin; syndrome of dampness-heat in large intestine; metabolites; UPLC; structural analysis

葛根芩连汤始载于张仲景《伤寒论》,是中医药

经典方剂,由葛根、黄芩、黄连和炙甘草组成,临床用于治疗大肠湿热证,疗效显著^[1-2]。大肠湿热证为临床常见病、多发病,随着人们生活水平的不断提高、生活节奏的加快及饮食结构的改变,与大肠湿热证相关的疾病呈明显上升趋势。近几年,葛根芩连汤的成分、药效、入血成分及其治疗大肠湿热证作用

[收稿日期] 20130328(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901995)

[通讯作者] * 陈丽红,博士,讲师,从事中药、复方效应物质基础及质量评价研究, Tel:025-85811074, E-mail: clh_helen@163.com

机制的研究已有报道^[3-7],但尚无葛根芩连汤主要成分葛根素在大肠湿热证模型大鼠尿液中代谢产物研究的报道。本实验拟通过建立大肠湿热证大鼠模型,分析葛根素给药后在模型大鼠尿液中的代谢产物,为进一步研究葛根芩连汤配方颗粒治疗大肠湿热证的效应物质与作用机制提供实验依据。

1 材料

Acquity™型超高效液相色谱系统、Synapt™TOF型质谱仪(美国 Waters 公司),AY220 型电子分析天平(日本岛津公司)。葛根素(纯度 96%,南京泽朗医药科技开发有限公司),葛根素对照品(纯度 >98%,批号 110752-200912,购于中国食品药品检定研究院),羧甲基纤维钠(CMC-Na,购自珠海天鸿润生物工程有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,清洁级,体重(220 ± 20) g,雄性,由浙江省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(浙)2008-0033。

2 方法与结果

2.1 药液的配置

称取一定量葛根素置研钵中,加入少许 0.5% CMC-Na 溶液,研磨后定量加 0.5% CMC-Na 溶液制成混悬液,灌胃体积 0.02 mL·g⁻¹,给药剂量 0.19 g·kg⁻¹。

2.2 大肠湿热证大鼠造模^[8]

将 SD 大鼠 15 只适应性饲养 7 d,随机分为 3 组,分别为正常对照组、模型组与葛根素给药组。大肠湿热证模型组为加高糖、高脂饲料饲养模型鼠 10 d;将模型鼠置于高温仓中(35 ℃,相对湿度 95%),每天持续 8 h,连续 3 d;以肠产毒性大肠杆菌(10⁹ mL⁻¹)灌胃(2 mL/只),24 h 后再灌注 1 次。正常对照组为将大鼠加普通饲料于自然环境下饲养,灌胃等体积水。葛根素给药组为按上述方法造模后,灌胃给予葛根素(0.19 g·kg⁻¹),连续给药 3 d。根据大肠湿热证的临床特点,观察大鼠体温、毛发、精神状态、活动能力、食量、粪便、舌苔等情况。结果发现试验前所有动物状态良好,活动灵活,皮毛洁白有光泽,活动正常,摄食饮水正常,大便成形,体温正常。造模后,正常组无明显异常表现;造模组大鼠则随着造模时间的推移,大部分出现倦怠、嗜卧懒动,反应迟钝,毛发蓬松,颜色枯槁,饮食减少,排便次数增多,大便黏腻,灌胃侵袭性大肠杆菌后大鼠体温明显升高。

2.3 尿样收集

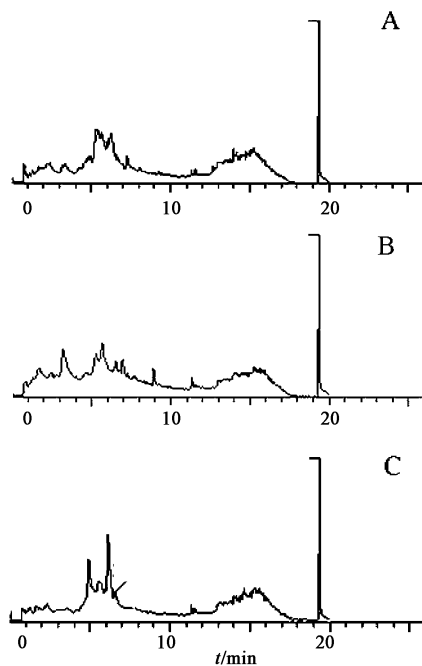
同时收集各组大鼠造模前 24 h 尿液及葛根素给药组给药后 24 h 尿液,放于 -80 ℃ 冰箱冰冻备用。

2.4 色谱条件

XTerra™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 270 nm,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,流动相 0.1% 甲酸水溶液与甲醇的混合液-乙腈(4:6)。

2.5 质谱条件

ESI 源,扫描方式 ESI-模式,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 40 V,离子源温度 120 ℃,脱溶剂气温度 350 ℃,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹,碰撞能量 6 ~ 40 V,离子能量 1 V,质量扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000,数据采集方式和模式为 Centroid 与 MSE,各样品的总离子流图见图 1。



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 葛根素给药组
图 1 大鼠给予葛根芩连汤后血浆样品的总离子流

2.6 生物样品制备

分别用甲醇和水各 3 mL 过 C₁₈ 固相萃取小柱进行活化,备用。吸取尿液 4 mL,上样,经活化的 C₁₈ 固相萃取小柱 1 mL 吸附,加水 5 mL 除去极性较大的杂质,用含 0.08% 甲酸的甲醇溶液 5 mL 洗脱,洗脱液挥去溶剂,残渣用甲醇 0.5 mL 溶解,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,制成 UPLC-MS 分析样品。

2.7 葛根素的裂解规律

葛根素中碳苷键相对稳定,其准分子离子峰 *m/z* 415 [M - H]⁻ 相对较强,还含有 2 个主要碎片离子峰 *m/z* 294.9 [M - H - 120]⁻ 和 *m/z* 266.9 [M - H - 120 - 28]⁻,遵循 [M - H - 120]⁻ 和 [M - H - 120 - 28]⁻ 裂解方式^[9]。

2.8 化合物的结构解析

化合物 1, 2 为一对同系物,MS 为 *m/z* 591 [M - H]⁻,其 MS² 为 *m/z* 415 [M - H - 176]⁻,相对分子质量比葛根素多 176,还有 3

个主要碎片离子峰 m/z 295 $[M-H-176-120]^-$ 、 m/z 267 $[M-H-176-120-28]^-$ 及 m/z 253, 裂解规律与葛根素相同,参照文献,最后推测化合物 1 可能为葛根素-葡萄糖醛酸苷同系物,化合物 2 可能为葛根素-葡萄糖醛酸苷^[9-10]。化合物 3 的 MS 为 m/z 415.0 $[M-H]^-$,其 MS² 为 m/z 295 $[M-H-120]^-$ 和 m/z 267 $[M-H-120-28]^-$,与葛根素对照品的 MS 数据相同,因此确定该化合物为葛根素^[11]。化合物 4 的 MS 为 m/z 429.083 3 $[M-H]^-$,其 MS² 为 m/z 253 $[M-H-176]^-$,参考文献,推测该化合物可能为大豆苷元-葡萄糖醛酸苷^[10]。化合物 5 的 MS 为 m/z 431 $[M-H]^-$,其

MS² 为 m/z 269 $[M-H-162]^-$ 、 m/z 268 及 m/z 255 $[M-H-162-14]^-$,参考文献,推测该化合物可能为甲基大豆苷元-葡萄糖苷^[10]。化合物 6,8 也是一对同系物,MS 为 m/z 443 $[M-H]^-$,其 MS² 为 m/z 267 $[M-H-176]^-$,化合物 8 还有 1 个主要碎片离子峰 m/z 253 $[M-H-176-14]^-$,参考文献,最后推测化合物 6 可能为甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷同系物,化合物 8 可能为甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷^[10]。化合物 7 的 MS 为 m/z 268 $[M-H]^-$,其 MS² 为 m/z 252.0 $[M-H-14]^-$ 和 m/z 172,推测该化合物可能为甲基大豆苷元^[10-12]。化合物的结构推测见表 1。

表 1 葛根素在湿热证大鼠尿液中代谢产物的 UPLC-MS 分析(负离子模式)

No.	t_R/min	$[M-H]^-$	碎片	鉴定	代谢物否
1	0.89	591	253,267,295,415	葛根素葡萄糖醛酸苷同系物	M
2	1.28	591.134 4	253,267,295,415	葛根素葡萄糖醛酸苷	M
3	1.63	415	267,295	葛根素	
4	2.31	429.083 3	253	大豆苷元葡萄糖醛酸苷	M
5	3.75	431.096 4	255,268,269	甲基大豆苷元葡萄糖苷	M
6	3.14	443.174 8	267	甲基大豆苷元葡萄糖醛酸苷同系物	M
7	3.36	268.061 9	172,252	甲基大豆苷元	M
8	5.29	443.189 8	253,267	甲基大豆苷元葡萄糖醛酸苷	M

3 讨论

运用 UPLC-DAD-MS 技术分析鉴定了葛根素在大鼠尿液中 8 个主要代谢物的化学结构,分别为葛根素葡萄糖醛酸苷同系物、葛根素葡萄糖醛酸苷、葛根素、大豆苷元-葡萄糖醛酸苷、甲基大豆苷元-葡萄糖苷、甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷同系物、甲基大豆苷元、甲基大豆苷元-葡萄糖醛酸苷。结果表明葛根素在模型大鼠尿液中除以原形排泄外,还有甲基化的一相代谢产物及形成葡萄糖结合物和葡萄糖醛酸结合物的二相代谢产物,为进一步明确葛根素连汤的药效物质基础提供参考。

[参考文献]

[1] 聂惠民. 伤寒论与临证[M]. 广州:广东科技出版社, 2001:55,85,153.
 [2] 张明俊,陈永灿. 葛根苓连汤临床应用[J]. 河南中医,2011,31(5):457.
 [3] Yu C P, Shia C S, Tsai S Y, et al. Pharmacokinetics and relative bioavailability of flavonoids between two dosage forms of Gegen-Qinlian-Tang in rats [J]. Evid-Based Compl Alt,2012,20(12):1.
 [4] FENG J, XU W, TAO X, et al. Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonin, berberine, palmatine and jatrorrhizine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application in pharmacokinetic studies after oral

administration of traditional Chinese medicinal preparations containing scutellaria-coptis herb couple [J]. J Pharma Biomed Anal,2010,53(3):591.

[5] 李学,魏连波,罗炳德,等. 葛根苓连汤对中医大肠湿热证模型大鼠血清 IL-1、IL-2 和 IL-6 的影响[J]. 武警医学,2004,15(8):586.
 [6] 金慧,王彦,阎超. 葛根苓连汤入血成分的归属[J]. 中国中药杂志,2008,33(22):2687.
 [7] 宋亚芳,苏春梅,杨红,等. HPLC 同时测定葛根苓连微丸中葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):64.
 [8] 杨运高,李智军,吴仕九,等. 温病湿热证动物模型研制的方法学比较[J]. 中国中医基础医学杂志,1984,4(3):172.
 [9] 李晓明,杨滨,黄璐琦. 高效液相色谱-质谱联用分析鉴别葛根的异黄酮成分[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1337.
 [10] CHEN L, TANG Y P, CHEN M J, et al. Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint [J]. Phytomedicine,2010,17(2):100.
 [11] 陈丽红,范慧佳,唐于平,等. 葛根苓连配方颗粒在大鼠体内的药物代谢产物研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):101.
 [12] Yasuda T, Kano Y, Saito K, et al. Urinary and biliary metabolites of puerarin in rats [J]. Biol Pharm Bull, 1995,18(2):300.

[责任编辑 全燕]