

土荆皮乙酸的代谢产物和代谢途径

刘 鹏^{1,2}, 徐 曼¹, 郭洪祝^{1,3*}, 孙江浩¹, 郭 慧¹, 孙士丰¹, 果德安^{1*}

(1. 北京大学医学部药学院天然药物学系, 北京 100083; 2. 国家知识产权局, 北京 100088;
3. 北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要: 综合运用体内实验和多种体外实验模型, 分析了土荆皮乙酸 (pseudolaric acid B, PB) 的代谢情况。在口服和静脉注射给药实验中, 使用 HPLC 和 HPLC-ESI/MSⁿ 方法在大鼠血、尿、粪和胆汁样品中都检测到去甲基土荆皮乙酸 (土荆皮丙₂酸, pseudolaric acid C₂, PC₂), 各种样品中几乎都检测不到原形药物, PC₂ 是 PB 特异性的代谢产物。PB 在肠内菌抑制大鼠模型中的代谢情况与正常组一致, 说明其代谢与肠内菌无关。在人工胃、肠液中分别孵育 48 h 均无明显变化, 说明胃蛋白酶和胰蛋白酶都不是主导 PB 代谢的因素, 在胃肠道的 pH 环境下 PB 也是稳定的。在体外大鼠肝微粒体孵育模型中, PB 仅有极少部分被代谢成为脱甲氧基或脱甲氧基脱羧基的产物, 说明其代谢也不是由肝微粒体酶主导的。在体外全血孵育模型中, PB 在 1 h 内被逐渐代谢成 PC₂, 并表现出了与孵育时间相关的动力学特点。由此推测土荆皮乙酸一进入血液就被迅速代谢成 PC₂, 以致于在各种样品中都几乎检测不到原形药。这种快速的代谢应该是通过血浆酯酶对 PB 的 C-19 酯键的迅速水解而实现的。本文首次初步阐明了 PB 在体内的代谢途径, 对于明确中药土荆皮的有效物质基础、体内活性形式及其作用机制都具有重要意义。

关键词: 土荆皮; 土荆皮乙酸; 代谢; 血浆酯酶; 水解; 去甲基土荆皮乙酸

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1361-05

Metabolic pathway and metabolites of pseudolaric acid B

LIU Peng^{1,2}, XU Man¹, GUO Hong-zhu^{1,3*}, SUN Jiang-hao¹, GUO Hui¹, SUN Shi-feng¹, GUO De-an^{1*}

(1. Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China; 2. State Intellectual Property Office of the People's Republic of China, Beijing 100088, China;
3. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

Abstract: The metabolic profile of pseudolaric acid B (PB) was investigated by using *in vivo* and *in vitro* tests. Pseudolaric acid C₂ (PC₂) was identified as the specific metabolite of PB in plasma, urine, bile and feces using HPLC and HPLC-ESI/MSⁿ after both oral and intravenous administration to rats, and almost no prototype was detected in all kinds of samples. The metabolic behaviors of PB orally administered in rats treated with antibiotics to eliminate intestinal microflora were identical with those in untreated rats, demonstrating that the metabolism of PB is independent of intestinal microflora. PB was stable in 48 h respective incubation with artificial gastric juice and artificial intestinal juice, suggesting that neither pepsin nor trypsin is in charge of metabolism of PB, and also demonstrating that PB is stable in both pH environments of gastric tract and intestinal tract. *In vitro* research on metabolism of PB in rat liver microsomes incubation revealed that little PB was metabolized and that the proposed metabolites were the demethoxy and demethoxydecarboxy products of the prototype. The amount of metabolites was extremely low compared with the prototype, indicating that liver microsomes are not responsible for the metabolism of PB either. PB was gradually metabolized into PC₂ during

收稿日期: 2011-04-01.

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2003AA2Z2030); 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (985-2-063-112).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-82805107, E-mail: guohz@bjmu.edu.cn

Tel / Fax: 86-10-82802700, E-mail: gda@bjmu.edu.cn

1 h in whole blood incubation *in vitro*, and the metabolic process showed dynamically dependent manner with incubation time. Once absorbed into blood, PB was quickly metabolized into PC₂, accordingly, little prototype was detected in all kinds of samples. The metabolism was attributed to the rapid hydrolysis of C-19 ester bond by plasma esterase. These results clarified the metabolic pathway of PB for the first time, which was of great significance to identify the *in vivo* active form and interpret acting mechanism of the active compounds of *P. kaempferi*.

Key words: Cortex Pseudolaricis; pseudolaric acid B; metabolism; plasma esterase; hydrolysis; pseudolaric acid C₂

活性化合物的体内过程研究, 包括吸收、分布、代谢、排泄以及毒性等 (ADME/T), 对新药研发、临床合理用药都具有重要的指导意义。当前, 随着各种体内外代谢模型和现代分析技术的广泛应用, 天然活性成分的此类研究不断展开, 促进了天然活性物质研究的不断深入发展。来源于中药材的天然活性物质的代谢研究, 可以揭示中药材的有效物质基础、作用机制和体内过程, 为临床安全、有效、合理用药提供基础。

土荆皮 (Cortex Pseudolaricis) 来源于松科植物金钱松 (*Pseudolarix kaempferi* Gord.) 的根皮和近根树皮, 性辛温, 有毒, 用于治疗手足癣、神经性皮炎、湿疹等^[1]。现代研究表明, 土荆皮中特征性的二萜酸类成分是其抗真菌、抗肿瘤和抗生育的主要有效成分, 其中土荆皮乙酸 (pseudolaric acid B, PB) 的含量最高、活性最强^[2-5]。

但是, 土荆皮二萜酸类化合物进入生物体内以后的代谢情况如何, 一直未得到关注, 在一定程度上影响了此类成分和土荆皮的深入研究。为了阐明其在机体中的代谢过程, 作者结合体内实验和多种体外实验模型, 首次阐明了 PB 在体内的代谢产物和代谢途径, 对于明确土荆皮的有效物质基础、体内活性形式及作用机制都具有重要意义。

材料与方法

仪器与试剂 美国 Agilent 1100 液相色谱仪; Finnigan LCQ Advantage 离子阱质谱仪 (美国 Thermo 公司); Agilent Zorbax Extend (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱; YMC (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Inertsil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。土荆皮乙酸自制, 纯度大于 97%; 还原型 NADPH 辅酶、考马斯亮蓝 G250 和牛血清白蛋白购于 Sigma 公司。

实验动物 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 (250 ± 20) g, 北京大学医学部实验科学动物部, 许可证号: SYXK (京) 2006-0008。

给药方法 大鼠分组后, 置于代谢笼中正常饲养 3 天, 实验前禁食 24 h。PB 溶解于 60% 1, 2-丙二醇中, 分别以 100 mg·kg⁻¹ 体重和 10 mg·kg⁻¹ 体重的剂量口服和尾静脉注射给药, 分别以等体积的 60% 1, 2-丙二醇溶液作为空白给药。肠内菌抑制的模型中, 先连续 6 天口服给予大鼠新霉素 (200 mg·kg⁻¹)、链霉素 (200 mg·kg⁻¹), 每日两次, 最后一次给予抗生素后 4 h, 以前述同样的方法口服给药 PB^[6, 7]。

样品采集 肝微粒体: 超高速离心法制备肝微粒体^[8]。血浆、尿、粪及胆汁: 给药后分别于 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90 min 和 2, 3, 4, 6, 8, 10 h 眼眶取血 700 μL, 离心收集血浆。给药后置于代谢笼中, 分别于 12, 24, 36 和 48 h 收集尿液和粪便。给药后固定于鼠板上, 腹腔注射乌拉坦麻醉, 胆管插管, 分别于 12, 24, 36 和 48 h 收集胆汁, 均于 -80 °C 保存。人工胃液和肠液: 人工胃、肠液按药典方法配制^[9]。将 PB (10 mg·mL⁻¹) 100 μL 分别加入人工胃液和肠液 10 mL 中, 置于 37 °C 培养箱中振荡培养, 分别于 4, 8, 12, 24 和 48 h 取 0.5 mL, 于 -80 °C 保存。体外全血孵育^[10]: 向预先肝素化的 Eppendorf 管中加入 PB (10 mg·mL⁻¹) 20 μL, 再加入新鲜全血 1 mL, 混匀, 迅速置于 37 °C 培养箱静置培养, 分别于 1, 5, 10, 30, 60 min 和 2, 4, 8, 12, 24 h 取出, 离心收集血浆, 于 -80 °C 保存。

样品处理 肝微粒体孵育样品: 用考马斯亮蓝染色法测定微粒体蛋白含量^[11, 12], 测定微粒体 P450 酶含量^[13]。孵育方法为: 在 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲体系 (pH 7.4) 中加入肝微粒体酶 (1.2 mg·mL⁻¹) 和 PB (0.01 mmol·L⁻¹), 于 37 °C 预热 5 min 后, 加入还原型 NADPH 辅酶 (1 mmol·L⁻¹), 反应终体积为 500 μL, 于 37 °C 振荡反应 2 h。冰浴终止反应, 向反应体系加入 3 倍体积乙酸乙酯萃取两次, 合并乙酸乙酯层, 常温下 N₂ 吹干, 以甲醇 100 μL 重新溶解, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品液。

血样: 取大鼠血浆 250 μL, 置于 10 mL 离心管中, 加入 5% 盐酸 20 μL 酸化, 以乙酸乙酯 750 μL 萃

取, 离心, 取上层有机相, 下层水相再用乙酸乙酯萃取 1 次, 合并有机相, 35 °C N₂ 吹干, 残渣以 60% 甲醇 250 μ L 溶解, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得供试品液。以同样方法制备体外全血孵育样品供试品液, 以类似方法制备尿样、胆汁和人工胃、肠液供试品液。粪样: 大鼠粪便置于研钵中研碎, 称取 0.50 g (不足 0.50 g 的使用全部并记录重量), 加入 10 倍体积的 60% 甲醇, 超声提取 30 min, 离心, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得供试品液。

样品分析 肝微粒体孵育样品: ① HPLC。采用 YMC 色谱柱; 流动相为 40% MeOH-1% HAc, 20 min 后为 80% MeOH-1% HAc; 检测波长 254 nm。② HPLC-ESI/MSⁿ。Agilent Zorbax Extend 色谱柱; 流动相为 40% MeOH-0.25% HAc, 20 min 后为 80% MeOH-0.25% HAc; 检测波长 254 nm; ESI 负离子扫描模式; 离子源喷射电压 4.5 kV; 全扫描质谱记录范围为 m/z 200~700; 多级质谱设定 $n=3$ 。

血、尿、粪、胆汁和人工胃、肠液以及体外全血孵育样品: ① HPLC。Inertsil ODS-3 色谱柱; 流动相为 55% MeOH-0.5% HAc, 40 min 后为 90% MeOH-0.5% HAc; 检测波长 262 nm。② HPLC-ESI/MSⁿ。Inertsil ODS-3 色谱柱; 流动相为 55% MeOH-0.3% HAc, 40 min 后为 90% MeOH-0.3% HAc; 检测波长 262 nm; ESI 正离子扫描模式; 其他条件同肝微粒体孵育样品。

结果与讨论

1 肝微粒体孵育

测定肝微粒体蛋白浓度为 144.7 μ g·mL⁻¹, P450 含量为 (0.737 $\pm$ 0.125) nmol·mg⁻¹ 蛋白, 表明制备得到的肝微粒体蛋白含量适合用于孵育研究。

HPLC 分析显示, 孵育以后 PB 绝大部分以原形药物存在, 与对照组相比, 实验组存在 3 个可能的代谢产物, 如图 1 所示。峰 1 的准分子离子峰 m/z 401, 提示可能是原形药物 PB (M_r 432) 脱去 $\cdot$ CH₃O 的产物, 二级质谱中准分子离子能再脱去一个或两个 $-COO^-$, 分别得到 m/z 357 和 m/z 313 的离子, 提示可能是 PB 的代谢产物。峰 2 的准分子离子峰 m/z 357, 提示可能是原形药物同时脱去 $\cdot$ CH₃O 和 $-COO^-$ 的产物, 其二级离子也能得到 m/z 313 的离子, 提示可能是 PB 的代谢产物。峰 3 在总离子流图中无法确定对应的峰, 未找到可能的代谢产物的信息。

因此, PB 在体外肝微粒体孵育的模型中仅有极少部分被代谢, 产物的结构可能为脱甲氧基和脱甲

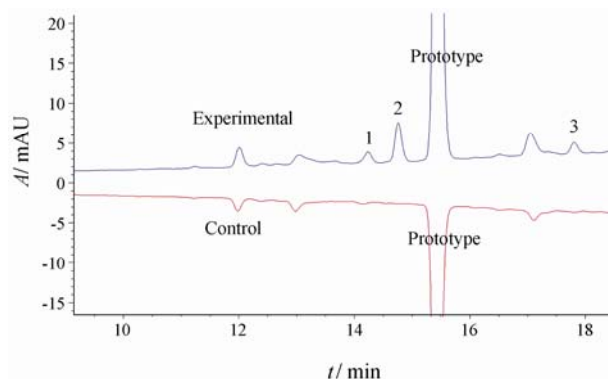


Figure 1 HPLC-UV chromatograms of pseudolaric acid B (PB) and its metabolites after liver microsomes incubation. Peak 1: Metabolite m/z 401; Peak 2: Metabolite m/z 357; Peak 3: Unknown

氧基脱羧基的化合物。在该模型中, 肝微粒体酶对 PB 的代谢很少, 原形化合物仍然以很高的比例存在, 提示可能还存在其他的主要代谢途径。

2 口服给药

2.1 血样分析 口服给药 3 min 以后, 即可看到明显的代谢产物的峰, 无原形化合物的峰; 30 min 时, 代谢产物的峰达到最高, 并且可见少量原形药物 PB; 4 h 时, 代谢产物从血中基本清除。通过与已知化合物对比, 确定该代谢产物与 PB 的脱甲基产物去甲基土荆皮乙酸具有相同的保留时间。ESI/MSⁿ 分析的结果显示该代谢产物和 PC₂ 对照品具有相同裂解行为, 准分子离子都为 m/z 441 ([M+Na]⁺), 二级质谱均得到 m/z 397, m/z 381 和 m/z 337 的离子, 如图 2 所示。综上, 确定该代谢产物为 PC₂^[14]。

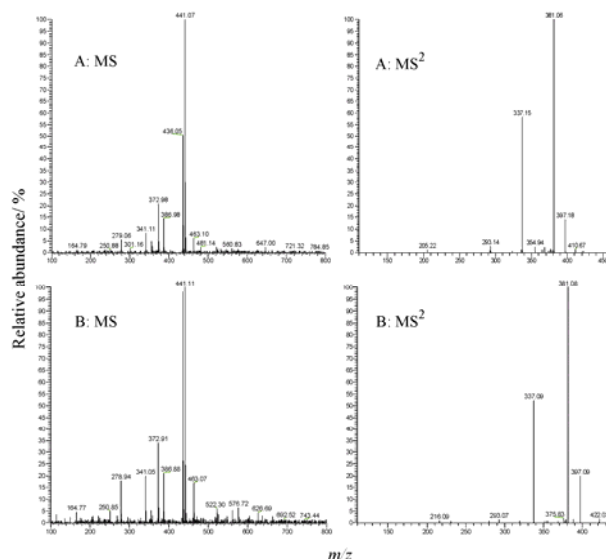


Figure 2 MS and MS² spectra of metabolite and reference substance. A: Metabolite with retention time at 15.21 min in plasma sample collected from rats orally administrated by PB for 30 minutes; B: Reference substance of pseudolaric acid C₂ (PC₂)

2.2 尿、粪、胆汁样品分析 给药后 0~12 h 内, 代谢产物大量从尿液和胆汁排泄, 以原形的形式排泄的很少; 12 h 以后, 代谢产物的峰逐渐降低。给药后 12~24 h 内, 代谢产物开始少量经粪便排泄, 24~48 h 代谢产物持续大量通过粪便排泄, 以原形排泄的较少。通过保留时间和裂解行为的比较, 确定尿、粪、胆汁样品中代谢产物与血中均为 PC_2 。

综上, PB 口服给药后即被迅速吸收, 3 min 即可在血中检测到明显的代谢产物, 血中代谢产物 30 min 达到峰值, 而原形药物始终很少。尿液、胆汁和粪便中有大量该代谢产物的排泄, 而原形排泄非常少。经鉴定, 口服给药的代谢产物为 PB 的脱甲基产物 PC_2 。

3 肠内菌抑制模型大鼠口服给药

按前述方法抑制肠内菌并给药, 检测尿、粪样品, 发现 PB 仍以代谢产物 PC_2 的形式从尿、粪便中大量排泄, 与肠内菌正常组的代谢情况基本一致, 提示 PB 在体内的代谢应该与肠内菌无关。

4 人工胃液、肠液的体外孵育模型

人工胃液、肠液孵育结果表明, PB 在体外的人工胃液和肠液中都非常稳定, 在 24 h 以后, t_R 15.1 min 和 19.9 min 的小峰才开始比较明显, 但是与原形药物相比, 含量仍然非常少。提示 PB 在体内的代谢不是由胃、肠道内的胃蛋白酶和胰蛋白酶所主导, PB 在胃、肠道的 pH 环境下 48 h 内基本稳定。

5 注射给药

5.1 血样分析 给药后 1 min, 即无原形药物的峰, 而代谢产物的峰最高, 其后随着时间的延长, 代谢产物逐渐消除, 原形药物始终未检测到。通过与已知化合物的 HPLC 和 ESI/MSⁿ 图谱对比, 确定代谢产物同样为 PC_2 。

5.2 尿、粪、胆汁样品分析 给药后 0~4 h 内代谢产物从尿液排泄, 以原形排泄的很少, 4 h 以后代谢产物基本检测不到。给药后 15 h, 代谢产物开始大量经粪便排泄, 24~48 h 内代谢产物持续大量排泄, 原形排泄始终很少。给药后 0~12 h 内, 代谢产物大量经胆汁排泄, 以原形排泄的很少, 12 h 后胆汁排泄基本完成。通过保留时间和裂解行为的比较, 确定尿、粪、胆汁中代谢产物为 PC_2 。

综上, PB 静脉注射给药后, 1 min 的血样中已检测不到原形, 之后血中也始终检测不到原形药物, 同时代谢产物的峰在 1 min 时最高, 之后随时间延长, 代谢产物逐渐排泄出体外。尿、粪、胆汁中有代谢产物的大量排泄, 原形的排泄很少。注射给药的代谢产物同样为 PC_2 。鉴于注射给药仍然不能在血液中检测

到原形药物, 且代谢产物 PC_2 为 PB 的水解产物, 推测 PB 可能在入血后被血浆酯酶迅速水解, C-19 酯键断裂脱掉甲基生成 PC_2 。

6 体外全血孵育模型

为验证 PB 在体内由血液中的血浆酯酶代谢的推测, 建立了体外全血孵育模型, 考察 PB 在体外新鲜全血中的变化情况, 样品分析的结果如图 3 所示。PB 在体外接触到全血后, 同样被快速代谢, 1 min 即可检测到代谢产物, 此时代谢产物仍然少于原形药物。随着孵育时间的延长, 10 min 时代谢产物的峰开始高于 PB, 30 min 时远高于 PB, 60 min 时 PB 彻底消失。ESI/MSⁿ 分析表明此代谢产物的裂解行为与 PC_2 一致, 准分子离子都为 m/z 441, 二级质谱都能得到 m/z 397, m/z 381 和 m/z 337 的离子。因此, 可推测 PB 在体内被代谢成 PC_2 是在血液中完成的。由此可进一步解释 PB 进入血液就被迅速代谢成 PC_2 , 以至于在体内实验的各种样品中都几乎检测不到原形。这种快速的代谢可能是通过血浆酯酶对 PB 的 C-19 酯键的迅速水解来实现的, 这与文献^[10]报道的血浆酯酶对含酯键化合物的快速代谢一致。

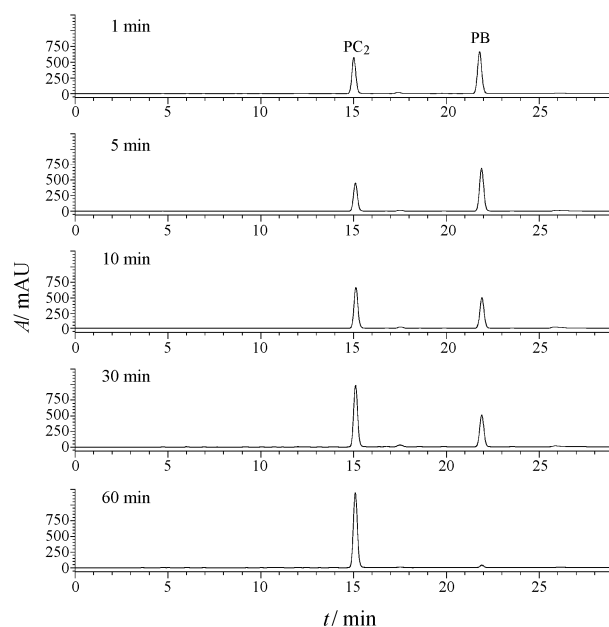


Figure 3 HPLC-UV chromatograms of samples collected from whole blood incubation tests of PB *in vitro* at different times

结论

本文综合应用体内和体外实验模型, 对土荆皮二萜酸类化合物 PB 的体内过程进行了分析, 确定其特异性的代谢产物为 C-19 脱甲基产物 PC_2 , 并且这一代谢过程主要在血液中完成。

鉴于以往的研究均认为 PB 是中药土荆皮的主要有效成分^[2-4], 其在二萜酸类化合物中含量最高^[5], 活性和作用机制研究都以 PB 为主要对象, 作者的这一发现对于明确土荆皮的有效物质基础、体内活性形式及作用机制具有重要意义。结果提示, 在天然活性物质的研究中, 应尤其关注其进入生物体内后的代谢过程, 这样才能更好的阐明其有效物质基础和作用机制。此外, 根据目前已有的报道, PC₂ 基本无体外抗真菌和细胞毒活性^[4, 15], 但是由于已知的主要活性成分 PB 一进入血液就迅速代谢成 PC₂, 因此 PC₂ 在其他模型中的体外和体内活性, 值得进一步研究, 以确定其是否是体内的主要活性形式。

References

- [1] Song YF, Chen H, Li LZ. Research progress of *Pseudolarix kaempferi* [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2001, 13: 9-10.
- [2] Yang SP, Dong L, Wang Y, et al. Antifungal diterpenoids of *Pseudolarix kaempferi* and their structure-activity relationship study [J]. Bioorg Med Chem, 2003, 11: 4577-4584.
- [3] Wang WC, Lu RF, Zhao SX, et al. Antifertility effect of pseudolaric acid B [J]. Acta Pharmacol Sin, 1982, 3: 188-192.
- [4] Liu P, Guo HZ, Wang WX, et al. Cytotoxic diterpenoids from the bark of *Pseudolarix kaempferi* and their structure-activity relationships [J]. J Nat Prod, 2007, 70: 533-537.
- [5] Liu P, Guo H, Guo HZ, et al. Simultaneous determination of seven major diterpenoids in *Pseudolarix kaempferi* by high-performance liquid chromatography DAD method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44: 730-736.
- [6] Kinouchi T, Kataoka K, Miyanishi K, et al. Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene [J]. Carcinogenesis, 1993, 14: 869-874.
- [7] Xing J, Chen XY, Sun YM, et al. Interaction of baicalin and baicalein with antibiotics in the gastrointestinal tract [J]. J Pharm Pharmacol, 2005, 57: 743-750.
- [8] Jeanette RH. *In vitro* drug metabolism using liver microsomes [M]/Enna SJ. Current Protocols in Pharmacology. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- [9] Chinese Pharmacopeia Commission. Pharmacopeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 2. 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: Appendix 72, 158.
- [10] Feng WZ, Lu YP. Metabolic degradation of cabexate mesilate in whole blood *in vitro* [J]. J Guangdong Coll Pharm (广东药学院学报), 1998, 14: 30-32.
- [11] Lovrien R. Assays for total protein [M]/Matulis D, Enna SJ. Current Protocols in Pharmacology. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [13] Hickman D, Wang JP, Wang Y, et al. Evaluation of the selectivity of *in vitro* probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities [J]. Drug Metab Dispos, 1998, 26: 207-215.
- [14] Liu P, Sun JH, Xu M, et al. Characterization of diterpenoids in the bark of *Pseudolarix kaempferi* by HPLC-ESI/MSⁿ [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 213-220.
- [15] Li E, Clark AM, Hufford CD. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi* [J]. J Nat Prod, 1995, 58: 57-67.