

高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法分析瑞香素在大鼠肠壁的代谢产物

单进军¹, 邓海山², 文红梅², 吴皓², 汪受传¹, 狄留庆^{2*}

(南京中医药大学 1. 第一临床医学院, 2. 药学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 研究瑞香素在大鼠肠壁产生的代谢产物。采用大鼠在体肠灌流模型, 分别收集瑞香素 0~2 h 内的十二指肠、空肠、回肠和结肠灌流液, 以液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法分析肠道灌流液中瑞香素的代谢产物。在大鼠十二指肠、空肠、回肠灌流液中共发现瑞香素原形药物和 4 个代谢产物, 分别推测为瑞香素-7-硫酸酯、瑞香素-8-硫酸酯、瑞香素-7-葡糖醛酸结合物和瑞香素-8-葡糖醛酸结合物; 而在结肠灌流液中未发现代谢产物。在瑞香素的 4 个代谢产物中, 瑞香素-7-硫酸酯和瑞香素-8-硫酸酯 (m/z 257) 为首次发现的瑞香素在大鼠体内的 II 相代谢产物, 揭示了其在大鼠体内代谢的新途径。

关键词: 瑞香素; 肠壁; 代谢产物

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1366-04

Analysis of metabolites of daphnetin in the intestinal wall of rats by liquid chromatography and quadrupole-time of flight mass spectrometry

SHAN Jin-jun¹, DENG Hai-shan², WEN Hong-mei², WU Hao², WANG Shou-chuan¹, DI Liu-qing^{2*}

(1. The First Medical College, 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: In this study, daphnetin and its major metabolites in the intestinal wall of rats were identified by liquid chromatography and quadrupole-time of flight mass spectrometry. Perfusion fluid of duodenum, jejunum, ileum and colon were collected separately for 2 hours from the rat intestine following perfusion with daphnetin. The metabolites of daphnetin in the perfusion fluid of different intestine segments were analyzed by the liquid chromatography and quadrupole-time of flight mass spectrometry. It is shown that the parent drug daphnetin and four metabolites were found in the perfusion fluid of duodenum, jejunum and ileum. However, no metabolites were found in the colon. Among the four metabolites, two daphnetin sulfates (m/z 257) were first discovered as the phase II metabolites of daphnetin in rats, which revealed a new way of daphnetin metabolism in rats.

Key words: daphnetin; intestinal wall; metabolite

瑞香素 (又称祖师麻甲素) 具有较好的抗炎、镇痛及免疫调节作用, 是祖师麻治疗类风湿关节炎的主要活性成分^[1]。作者^[2-4]前期研究发现, 瑞香素在

大鼠体内能快速分布并消除, 其在肠壁内的吸收机制以被动扩散为主; 其在肠壁发生了代谢, 但具体代谢产物尚未见报道。本实验在前期研究的基础上, 以大鼠在体肠灌流为模型, 采用高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱为检测技术分析瑞香素在大鼠各肠壁的代谢产物, 进一步揭示瑞香素的肠道吸收和代谢机制, 从而为瑞香素的药理作用机制研究和剂型选择奠定基础。

收稿日期: 2011-04-11.

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (208051); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划。

*通讯作者 Tel: 86-25-85811071, Fax: 86-25-86798226,

E-mail: diliuqing@yahoo.com.cn

材料与amp;方法

试剂与药品 瑞香素购自中国药品生物制品检定所 (批号: 0900-200102), 甲醇为色谱纯, 超纯水。

实验动物 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 10 只, 体重 300~350 g。由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物许可证号 SCXK (沪) 2007-0005。

仪器 美国 Waters 2695 高效液相色谱仪-Q-TOF 高分辨质谱联用仪; BT00-300M 恒流蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司)。

大鼠肠灌流液的收集^[3]与处理 SD 大鼠 10 只, 实验前禁食过夜 (自由饮水), 随机分为空白组和实验组。10%水合氯醛溶液麻醉 (3 mL·kg⁻¹), 固定, 沿腹中线打开腹腔, 分离出十二指肠、空肠、回肠和结肠, 取约 10 cm 于两端切口插管, 结扎, 用生理盐水 (37 °C) 将肠内容物冲洗干净, 再排净生理盐水。实验时取一定量的供试液 (质量浓度为 20 μg·mL⁻¹, 预热至 37 °C), 先以 1.0 mL·min⁻¹ 的流速灌流 10 min, 再将流速调为 0.2 mL·min⁻¹, 预平衡 30 min 后, 开始收集各肠段 120 min 内的灌流液。分别精密吸取各肠段的灌流液 1 mL, 加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 10 μL, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后, 上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 续滤液备用。

HPLC 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5% 醋酸 (22 : 78); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; DAD 扫描波长: 190~400 nm。

质谱条件 负离子模式: ESI 离子源, 质量范围 *m/z* 50~500, 离子源喷射电压 -4.50 kV; 毛细管温度 200 °C; 毛细管电压 -10 V。以氦气为碰撞气, 鞘气 (N₂) 流速 550 L·h⁻¹。一级质谱 (Full scan) 采用全扫描模式, 二级质谱 (Full scan MS²) 采用区段扫描模式。

结果

1 瑞香素在大鼠肠壁的主要代谢产物

通过与大鼠空白肠灌流液比较, 在 HPLC 色谱图中观察到瑞香素的 4 个代谢产物 M1 (*t_R* = 2.9 min)、M2 (*t_R* = 3.9 min)、M3 (*t_R* = 5.3 min) 和 M4 (*t_R* = 7.6 min), 保留时间 *t_R* 均小于原形药瑞香素 M0 (*t_R* = 12.4 min), 如图 1。由于采用的是反相色谱柱, 因此代谢物的极性均大于瑞香素。紫外光谱显示 M1、M2、M3 和 M4 的 λ_{max} 分别为 326、319、309 和 323 nm, 与原形药瑞香素的 λ_{max} (325 nm) 基本相似, 推断 4 个代

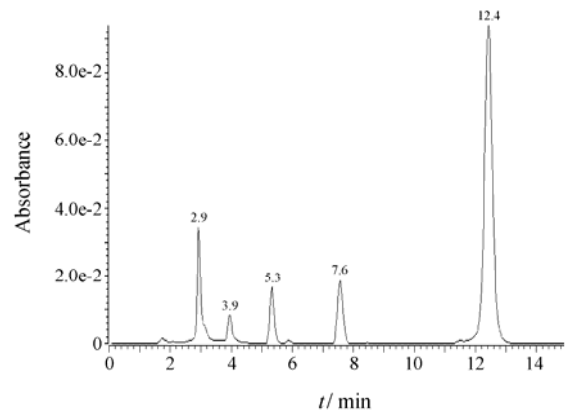


Figure 1 HPLC chromatogram of intestine perfusate with daphnetin

谢产物的母核结构与瑞香素基本一致。

1.1 原形药物 M0 准分子离子峰 *m/z* 177 的化合物, 与瑞香素的 ([M-H]⁻) 一致, 经二级质谱检测到 *m/z* 93、105、121、149 等主要碎片离子, 相对应的特征中性碎片离子丢失分别为 84、72、56、28 u 等, 与瑞香素质谱断裂特征规律相同^[5], 因此推测为原形药物瑞香素。

1.2 代谢产物 M1 和 M2 在一级全扫描质谱中, 代谢产物 M1 和 M2 的准分子离子峰 ([M-H]⁻) *m/z* 均为 257, 比瑞香素的准分子离子 [M-H]⁻ (*m/z* 177) 多 80 u, 说明 M1 和 M2 可能为瑞香素结构中增加了一分子硫酸 (+80 u) 而形成的代谢产物。在此基础上, 对 M1 和 M2 进行二级质谱分析 (图 2), 二级质谱主要碎片离子均有 *m/z* 177, 丢失一分子硫酸 (-80 u); 同时还发现了 *m/z* 149、121、105 和 93 等主要碎片离子, 其质谱断裂特征规律与原瑞香素相似。推测一

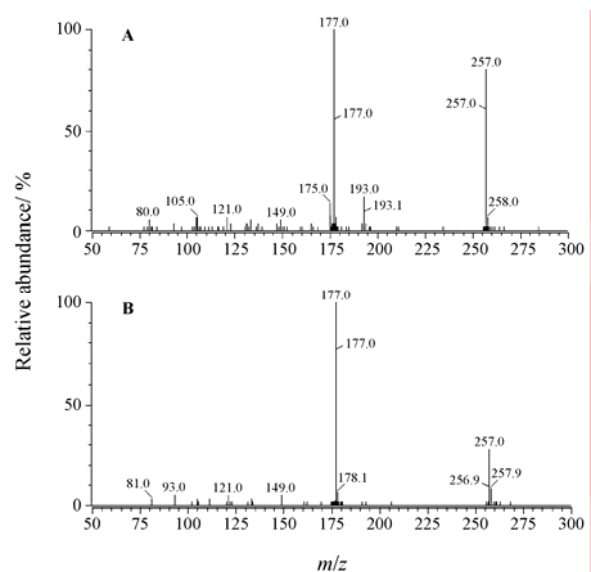


Figure 2 MS² spectra of M1 (A) and M2 (B)

分子硫酸与瑞香素的7位或8位酚羟基结合, 结合文献^[6], 初步确定代谢产物 M1 为瑞香素-7-硫酸酯, M2 为瑞香素-8-硫酸酯。

1.3 代谢产物 M3 和 M4 在一级全扫描质谱中, 代谢产物 M3 和 M4 的准分子离子峰 ($[M-H]^-$) m/z 均为 353, 比瑞香素的准分子离子 ($[M-H]^-$) 多 176 u, 说明 M3 和 M4 可能为瑞香素结构中增加了一分子葡萄糖醛酸 (+176 u) 而形成的代谢产物。在此基础上, 对 M3 和 M4 进行二级质谱分析 (图 3), 二级质谱主要碎片离子均有 m/z 177, 丢失一分子葡萄糖醛酸 (-176 u); 同时还发现了 m/z 149 碎片离子。推测一分子葡萄糖醛酸与 7 位或 8 位酚羟基结合, 结合文献^[6], 初步确定代谢产物 M3 为瑞香素-7-葡萄糖醛酸结合物, M4 为瑞香素-8-葡萄糖醛酸结合物。

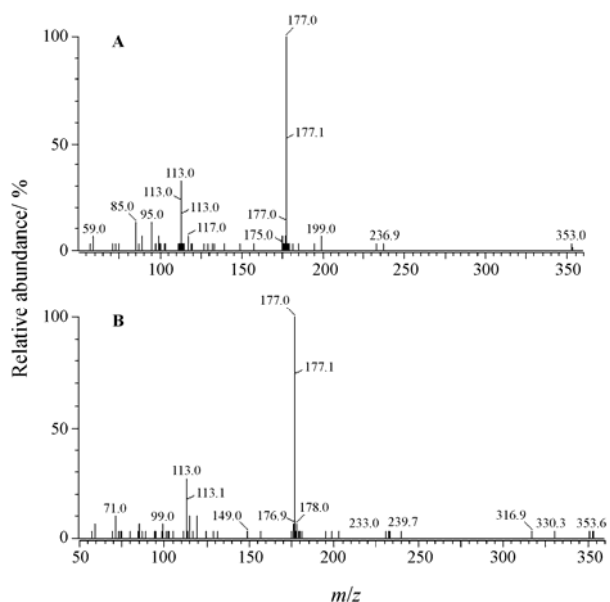


Figure 3 MS² spectra of M3 (A) and M4 (B)

2 瑞香素在大鼠肠壁的代谢产物与途径

瑞香素与小鼠肠黏膜上皮细胞中含有的葡萄糖醛酸转移酶、硫酸转移酶发生 II 相代谢结合反应 (图 4), 分别生成瑞香素-7-硫酸酯 (M1)、瑞香素-8-硫酸酯 (M2)、瑞香素-7-葡萄糖醛酸结合物 (M3) 和瑞香素-8-葡萄糖醛酸结合物 (M4), 其中瑞香素-7-硫酸酯和瑞香素-8-硫酸酯为瑞香素在大鼠体内首次发现的 II 相代谢产物。

讨论

本实验结果表明, 瑞香素在大鼠小肠壁发生了代谢, 可能是导致其口服生物利用度不高的一个重

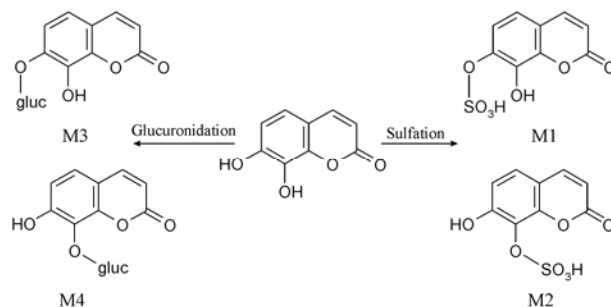


Figure 4 Metabolic pathway of daphnetin in the intestinal wall of rat

要因素。国外近年来研究发现, 肠道黏膜上皮细胞中除分布了与吸收相关的转运体 (如 P-gp、MRP 和 BCRP) 外, 还存在着一些与肝脏相同的代谢酶如 CYP450s、UGTs 和 SULTs 等^[7]。虽然肠道代谢酶的种类及含量均低于肝脏, 但由于药物口服后, 先于肝脏而通过小肠, 因此小肠对口服药物的首过效应不容忽视。国内一些学者已认识到肠道对口服药物的代谢作用在体内处置中占有重要地位^[8], 但国内对肠道的代谢作用多集中于肠道菌群代谢研究, 有关肠壁代谢的研究报道较少^[9-11]。

大鼠在体肠灌流模型不仅很大程度地保证了肠壁神经以及内分泌输入, 同时也保证了血液及淋巴液的供应, 提高了生物活性^[12]。大鼠肠壁含有 UGTs 和 SULTs 等代谢酶, 可和酚羟基、醇羟基发生 II 相代谢结合反应。瑞香素结构中 7, 8 位连接两个酚羟基, 因此在肠壁极易与上述代谢酶发生结合反应^[13]。代谢产物瑞香素葡萄糖醛酸结合物与文献^[6]报道一致, 而瑞香素硫酸酯为首次发现的瑞香素在大鼠体内的 II 相代谢产物。

十二指肠、空肠和回肠的 UGTs、SULTs 的表达水平相似^[7], 本实验在大鼠十二指肠、空肠和回肠的灌流液中均检测到了瑞香素葡萄糖醛酸结合物和硫酸结合物, 说明瑞香素在小肠黏膜上皮细胞中含有的 UGTs 和 SULTs 作用下, 与瑞香素发生了结合反应。但在结肠灌流液中未检测到代谢产物, 原因可能为: ① UGTs 和 SULTs 在结肠中的表达水平远低于小肠段^[7]; ② 实验前用生理盐水将大鼠肠道内容物冲洗干净和实验中灌流液的冲洗会造成部分菌群流失和破坏, 从而使肠道菌群对瑞香素的代谢处置作用减弱或消失; ③ 整个实验系统处于一个较为开放的有氧环境状态, 而肠道菌 99% 为厌氧菌, 即使冲洗不造成菌群流失, 在如此有氧状态下, 菌群代谢作用会大大减弱^[14]。

References

- [1] Gao Q, Shan JJ, Di LQ, et al. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120: 259–263.
- [2] Liu J, Di LQ, Shan JJ, et al. Study on the pharmacokinetics of different administration of daphnetin in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2009, 40: 106–108.
- [3] Du Q, Di LQ, Shan JJ, et al. Intestinal absorption of daphnetin by rats single pass perfusion *in situ* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 922–926.
- [4] Shan JJ, Sha XY, Fang XL, et al. Mechanism of daphnetin absorption across Caco-2 monolayer model [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2009, 18: 2151–2154.
- [5] Daphnetin; LC-ESI-QTOF-MS/MS; CE:30V; [M-H]⁻ [EB/OL]. Tsuruoka, Japan: Institute for Advanced Biosciences, Keio University. 2006 [2011-04-11]. <http://www.massbank.jp/jsp/FwdRecord.jsp?type=disp&id=PR100937>
- [6] Liang SC, Ge GB, Liu HX, et al. Identification and characterization of human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the *in vitro* glucuronidation of daphnetin [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 973–980.
- [7] Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 12: 3–12.
- [8] Li J, Wang GJ. Intestinal absorption barrier and novel strategies for absorption enhancement [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 600–605.
- [9] Liu Z, Ma YM, Wang TM, et al. *In vitro* metabolic interconversion between baicalin and baicalein in the liver, kidney, intestine and bladder of rat [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 664–668.
- [10] Zhuang XM, Wen YY, Li H, et al. Metabolism of 3-cyanomethyl-4-methyl-DCK, a new anti-HIV candidate, in human intestinal microsomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 1116–1122.
- [11] He PJ, Li KP, Yang J, et al. *In vitro* metabolic transformation characteristics of cinnamaldehyde in rat intestine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2010, 41: 2014–2018.
- [12] Jeong EJ, Liu Y, Lin HM, et al. *In situ* single-pass perfused rat intestinal model for absorption and metabolism [M] // Yan ZY, Caldwell GW. *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*. Totowa: Humana Press, 2004: 65–76.
- [13] Antonio L, Grillasca JP, Taskinen J, et al. Characterization of catechol glucuronidation in rat liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 199–207.
- [14] van der Bijl P, van Eyk AD. Comparative *in vitro* permeability of human vaginal, small intestinal and colonic mucosa [J]. *Int J Pharm*, 2003, 261: 147–152.