

短小舌根草苷的制备及其在大鼠体内代谢产物的 UPLC-QTOF/MS 鉴定

陈家全¹, 王 慧^{1,2}, 张志远³, 翟小婷^{1,2}, 殷 蓉^{1,2}, 朱粉霞^{2*}

(¹中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009; ²江苏省中医药研究院国家中医药管理局
中药口服释药系统重点实验室, 南京 210028; ³海南医学院药学院, 海口 570102)

摘 要 通过 AB-8 大孔吸附树脂对胆木药材水提液进行吸附, 用不同比例的乙醇水溶液对其梯度洗脱, 通过分离纯化获得纯度较高的短小舌根草苷单体。用 UPLC-QTOF/MS 分析技术鉴定大鼠灌胃短小舌根草苷后, 尿液、粪便以及胆汁中该成分可能的代谢产物。采用全扫描方式采集所有成分准确 MS/MS 数据, 利用 MetaboLynx 软件分析处理, 获得了纯度较高的短小舌根草苷单体并鉴定出了其在大鼠体内的 4 种代谢产物。

关键词 短小舌根草苷; 制备; 代谢产物; UPLC-QTOF/MS 法

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0677-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150607

Preparation of pumiloside and identification of its metabolites in rats by UPLC-QTOF/MS

CHEN Jiaquan¹, WANG Hui^{1,2}, ZHANG Zhiyuan³, ZHAI Xiaoting^{1,2}, YIN Rong^{1,2}, ZHU Fenxia^{2*}

¹Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028; ³College of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 570102, China

Abstract In this paper, water extract of *Nauclea officinalis* was absorbed by AB-8 macroporous resin and subsequently gradient-eluted with alcoholic solution of different proportion to prepare pumiloside monomer of high purity. The metabolites in urine, feces and bile of rats with gavage administration were analyzed by UPLC-QTOF/MS. Accurate MS/MS data of all components were collected with full scan mode, and analyzed by MetaboLynx software. Results showed that the monomer of high-purity pumiloside was prepared and four metabolites in rats were identified.

Key words pumiloside; preparation; metabolites; UPLC-QTOF/MS

The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81203001, No. 81160558)

胆木(*Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard), 又名山熊胆、熊胆树、乌檀, 是茜草科植物胆木的枝、树皮。其性味苦、寒, 具有清热解毒、消肿止痛之功效。胆木中的主要活性成分为生物碱类化合物^[1-2], 又以短小舌根草苷和异常春花苷内酰胺含量最高^[3], 且皆能入血^[4], 为药效活性成分。已有不少学者对异长春花苷内酰胺进行了系统研

究^[5], 而短小舌根草苷(pumiloside)却鲜有报道, 据文献报道, 短小舌根草苷具有抗菌、抗增殖、抑制肿瘤等多种药理作用^[6]; 而且短小舌根草苷还是抗肿瘤药物喜树碱生物合成的重要中间体, 具有重要的研究价值。

本研究在已有报道^[7]的基础上, 以 AB-8 树脂制得纯度达 98.89% 的短小舌根草苷单体。进而

以 UPLC-QTOF/MS 法研究短小舌根草苷在大鼠体内的代谢产物, 并利用 MetaboLynx 软件分析处理, 根据原形成分质谱裂解机制以及代谢产物具有相似母核的结构特征, 对代谢产物结构进行鉴定。本文首次阐明了短小舌根草苷在大鼠体内的主要代谢排泄途径, 为其药理学研究、临床应用及安全性评价提供了依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

胆木药材为茜草科乌檀属乔木乌檀 *Nauclea officinalis* Pierre ex Pitard 的干燥茎皮, 由海南制药有限公司提供, 经自然风干后切片, 批号: 110101。AB-8 大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料有限公司); 95% 工业乙醇(南京南奥科技有限公司); 乙腈、甲醇、甲酸(德国 Merck 公司)为色谱纯; 水为 Milli-Q 超纯水, 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Acquity™ UPLC 系统(美国 Waters 公司), 包括二元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器、柱温箱; Synapt™ G2-S QTOF 质谱仪(美国 Waters 公司), 配有 Lock-spray 接口, 电喷雾离子源(ESI), MassLynx 4.1 质谱工作站软件(Version 4.1, 美国 Waters 公司); N-EVAP 112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); IKA Vortex Genius 3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); KQ5200 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); MicroCL 21 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Avance AV-300 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); NewClassic MF MS105DU 半微量天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.3 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠, 体重 220~250 g, 由江苏省中医药研究院实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2012-0002。

2 方法

2.1 色谱条件

Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 采用梯度洗脱方式: 0~6 min, 5%~30% B; 6~11 min, 30%~100% B; 11~11.5 min, 100%~5% B; 11.5~13 min, 5% B。流速为 0.3 mL/min,

柱温 30 ℃, 自动进样器温度 4 ℃, 进样体积为 4 μL。

2.2 质谱条件

ESI 离子源, 扫描方式: 正离子模式, 毛细管电压: 3 kV, 锥孔电压: 50 V, 离子源温度: 105 ℃, 脱溶剂气流量: 700 L/h, 脱溶剂气温度: 350 ℃, 锥孔气流量: 50 L/h, 母离子碰撞能量: 4 V, 碎片离子碰撞能量: 20~50 V, 质量扫描范围: 50~1 000, 扫描时间: 0.2 s。

2.3 短小舌根草苷的分离制备

2.3.1 大孔树脂预处理 取 AB-8 大孔树脂, 用 95% 工业乙醇浸泡 24 h, 湿法装柱, 用 95% 乙醇淋洗大孔树脂至洗出液加水不产生浑浊为止, 再用蒸馏水冲洗至无醇味, 静置备用。

2.3.2 制备 取胆木药材粗粉约 1 kg, 加水 30 L, 分 3 次煎煮, 每次 1 h, 合并 3 次提取液, 放冷, 过滤。称取 AB-8 大孔树脂 0.5 kg, 预处理后湿法装柱, 提取液以每小时 2 倍柱体积(BV)的流速上样, 先用 2 BV 蒸馏水和 2 BV 10% 乙醇溶液过柱洗涤, 除去部分杂质, 再用 6 BV 30% 乙醇溶液以 2 BV/h 的流速洗脱, 合并第 3~6 BV 的 30% 乙醇洗脱液, 减压法回收溶剂至有固体析出, 残液放冷, 过滤, 残渣用水多次洗涤至淡黄色, 干燥称重得单体 0.35 g。以 UPLC-PDA 测定纯度, 结果显示最终得到的短小舌根草苷纯度较高, 为 98.89%。

2.3.3 结构鉴定 淡黄色粉末, 微溶于甲醇, 不溶于水; 紫外吸收图谱 λ_{\max} : 243.6 nm; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 法测定结果如下: 12.08(1H, s, N1-H), 4.75(1H, br. d, J = 11.1 Hz, C3-H), 4.40(2H, dd, J = 14.1 Hz, J = 2.1 Hz, C5-CH₂), 8.12(1H, d, J = 7.8 Hz, C9-H), 7.34(1H, t, J = 7.2 Hz, C10-H), 7.64(1H, dt, J = 15 Hz, J = 7.5 Hz, C11-H), 7.60(1H, d, J = 8.1 Hz, C12-H), 2.50(2H, s, C14-CH₂), 2.01(2H, dt, J = 23.7 Hz, J = 12 Hz, C14-CH₂), 3.30(1H, m, C15-H), 7.05(1H, d, J = 2.1 Hz, C17-H), 5.48(2H, dd, C18-CH₂), 5.36(2H, dd, C18-CH₂), 5.80(1H, dt, C19-H), 2.66(1H, dd, C20-H), 5.40(1H, d, C21-H), 4.58(1H, d, C1'-H), 3.01(1H, m, J = 5.4 Hz, C2'-H), 3.18(1H, m, C3'-H), 3.07(1H, m, C4'-H), 3.21(1H, m, C5'-H), 3.72(1H, ddd, C6'-H); 149.701(C2), 59.415(C3), 47.438(C5), 112.968(C6), 172.960(C7),

125.280 (C8), 124.718 (C9), 123.224 (C10), 131.588 (C11), 118.308 (C12), 140.355 (C13), 28.139 (C14), 23.650 (C15), 108.890 (C16), 145.085 (C17), 120.486 (C18), 132.470 (C19), 43.594 (C20), 94.846 (C21), 163.933 (C22), 97.810 (C1'), 73.156 (C2'), 77.267 (C3'), 70.084 (C4'), 76.475 (C5'), 61.076 (C6'); 与文献[8]数据一致,结构确证该化合物为短小舌根草苷。

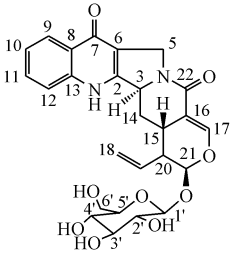


Figure 1 Structure of pumiloside

2.4 生物样品的采集与制备

取健康 SD 大鼠,随机平均分成空白组和给药组,给药前禁食 12 h 但不禁水,给药组按 50 mg/kg 剂量大鼠灌胃给予短小舌根草苷 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液,空白组灌胃给予蒸馏水。一组大鼠给药后置于代谢笼中,收集 12 h 内的尿液和粪便样品;另一组空白和给药组大鼠灌胃后,随即进行胆管插管手术,收集 0 ~ 12 h 胆汁样品。

尿液:收集 0 ~ 12 h 的大鼠尿液,取 2 mL 加入 4 倍体积的甲醇摇匀,超声 30 min,4 000 r/min 离心取上清液,45 ℃ 水浴下氮气吹干, - 70 ℃ 保存,

分析前用甲醇 1 mL 复溶,12 000 r/min 离心取上清液进样分析。

粪便:收集 0 ~ 12 h 的大鼠粪便,称取粪便约 1 g 捣碎,加入甲醇 5 mL,超声提取 30 min,于 4 000 r/min 离心取上清液,45 ℃ 水浴下氮气吹干, - 70 ℃ 保存,分析前用甲醇 1 mL 复溶,12 000 r/min 离心取上清液进样分析。

胆汁:收集 0 ~ 12 h 的大鼠胆汁,取 2 mL 加入 4 倍体积的甲醇,摇匀涡旋 2 min,4 000 r/min 离心取上清液,45 ℃ 水浴下氮气吹干, - 70 ℃ 保存,分析前用甲醇 1 mL 复溶,12 000 r/min 离心取上清液进样分析。

3 结果

3.1 短小舌根草苷单体质谱分析

精密称取制得的短小舌根草苷单体适量,用甲醇超声溶解,配制成质量浓度约为 5 μg/mL 的对照品溶液。采用 UPLC-QTOF/MS 以“2.1”、“2.2”项下液质条件对短小舌根草苷分析,获得其液质图谱,如图 2-A,短小舌根草苷的保留时间为 5.06 min,一级质谱图中主要检测到短小舌根草苷的[M + H]⁺ 离子(*m/z* 513.187 9),二级质谱图中,主要碎片离子为 *m/z* 351.134 7、333.124 5、281.093 0、185.072 0、158.061 1,其质谱图及裂解途径如图 2-B、C。与文献[8 - 9]报道碎片一致,进一步确定此化合物为短小舌根草苷,同时质谱裂解也为后面进行体内代谢提供了依据。

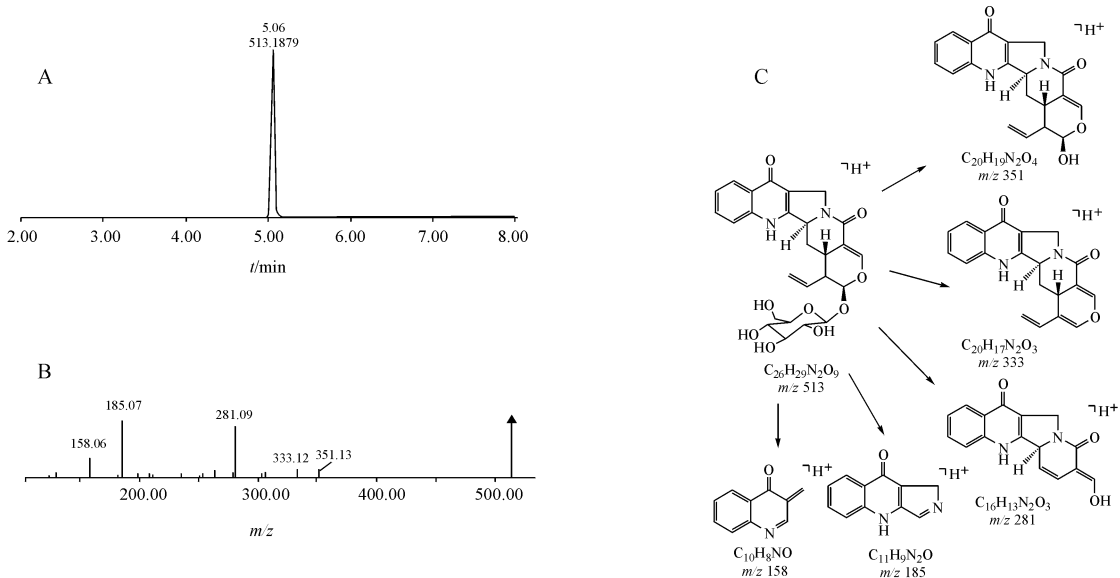


Figure 2 Total ion chromatogram of pumiloside (A), mass spectrum (B) and fragmentation pathways(C) of pumiloside

3.2 短小舌根草苷体内代谢产物 UPLC-QTOF/MS 分析

采用 UPLC-QTOF/MS 法对样品进行分析,在正离子模式下,短小舌根草苷对照品的响应较强,因此选择正离子条件分析,获得空白生物样品与给药后生物样品的总离子流图。由于生物样品中内源性物质干扰较多并且目标成分含量较低,运用 MetaboLynx 软件质量亏损过滤(MDF)技术可去除内源性物质干扰,获得高分辨率的质谱信息,根据处理后色谱图及质谱裂解信息寻找可能的代谢物^[10–11]。

3.2.1 尿液中代谢产物分析 运用 MetaboLynx 软

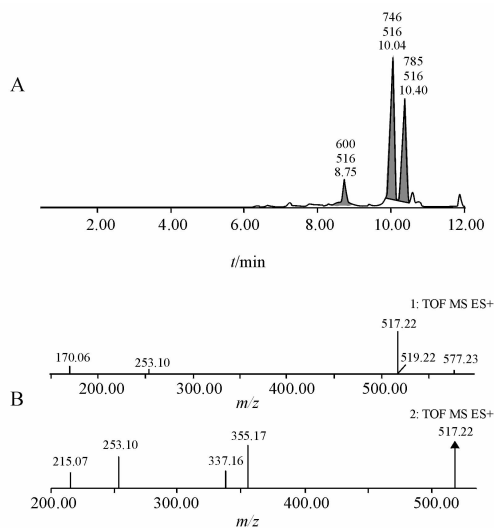
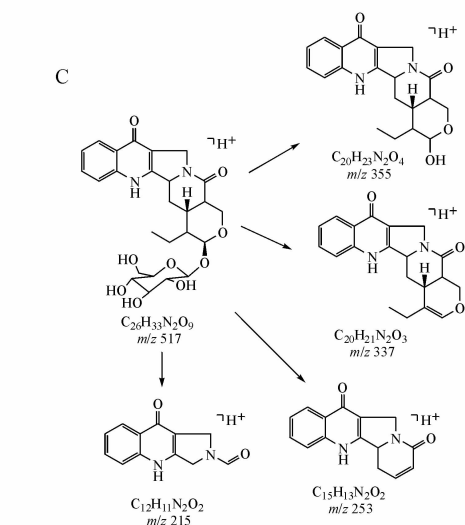


Figure 3 Extracted-ionic chromatogram (A), mass spectrum (B) and fragmentation pathways (C) of the metabolite ($M_r = 516$) of pumiloside in rat urine

3.2.2 粪便中代谢产物分析 大鼠灌胃短小舌根草苷后,对收集的粪便样品进行分析,发现了除原型成分以外的另外 3 个化合物,经过质谱解析判断它们很可能是短小舌根草苷的代谢产物。在 m/z 335.14 的提取离子流图中,保留时间 5.14 min 处,如图 4-A,B,根据精确分子质量,其分子式组成为 C₂₀H₁₈N₂O₃,相对分子质量为 334,在高碰撞下能量下产生的碎片离子 m/z 333.12, 281.09, 185.07, 158.06 与短小舌根草苷脱去一分子葡萄糖(m/z 333)后的碎片离子相同,说明它们母核相同,分子离子脱氢后产生 m/z 333 碎片,推测此化合物很可能为短小舌根草苷脱去葡萄糖分子后的加氢还原产物,还原发生在 E 环侧链乙烯基上,其结构及裂解途径如图 4-C 所示。

在 m/z 353.15 的提取离子流图中,发现了两个短小舌根草苷代谢物,如图 5-A,B,C,保留时间

件处理含药尿液和空白尿液样品图谱,扣除空白背景,获得给药后 12 h 大鼠尿液样品中可能的代谢产物提取离子流图,结果显示短小舌根草苷经灌胃后,大鼠尿液中主要含有其原型成分外,经筛选还发现了另一化合物,在 m/z 517.2 的提取离子流色谱图中,其保留时间为 10.40 min,如图 3-A,B。根据精确分子质量,其分子式组成为 C₂₆H₃₂N₂O₉,相对分子质量比短小舌根草苷大 4,在高碰撞下能量下主要产生 m/z 355.17, 337.16, 253.10, 裂解途径与短小舌根草苷相似,因此推测该化合物为短小舌根草苷的加氢还原产物,其裂解途径如图 3-C 所示。



5.16 min 处代谢物记为 M-1,根据精确分子质量,其分子式组成为 C₂₀H₂₀N₂O₄,相对分子质量为 352,在高碰撞下能量下产生的碎片离子 m/z 335.14, 283.06 比短小舌根草苷脱去糖苷(m/z 351)后产生的碎片离子 m/z 333.12, 281.09 质量数大 2,提示该化合物母核结构上发生了加氢还原,碎片离子 m/z 185.07, 158.06 与短小舌根草苷母核裂解碎片相同,说明还原发生在 D 环或 E 环上,如果还原发生 E 环上, m/z 283 碎片易脱水产生 m/z 265 碎片,但质谱图中未发现该离子碎片,因此推测加氢还原产物发生在 D 环羰基上,其结构及裂解途径如图 5-D 所示。

保留时间 5.48 min 处代谢物记为 M-2,根据精确分子质量,其分子式组成也为 C₂₀H₂₀N₂O₄,表明该化合物也是短小舌根草苷脱去糖苷后的加氢还原产物,其碎片离子有 m/z 335.14, 281.09,

185.07,158.06,仅分子离子 m/z 353.15 和碎片离子 m/z 335.14 比短小舌根草苷碎片离子 m/z 351.13,333.12 质量数大 2,其余都一致,提示 E 环

侧链乙烯基发生了加氢还原,其结构及裂解途径如图 5-E 所示。

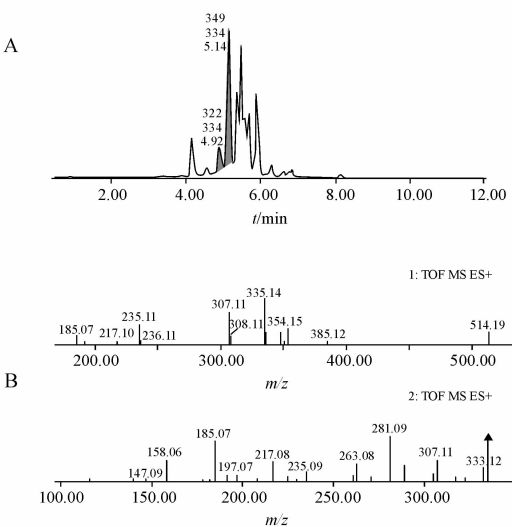


Figure 4 Extracted-ionic chromatogram (A), mass spectrum (B) and fragmentation pathways (C) of the metabolite ($M_r = 334$) of pumiloside in rat feces

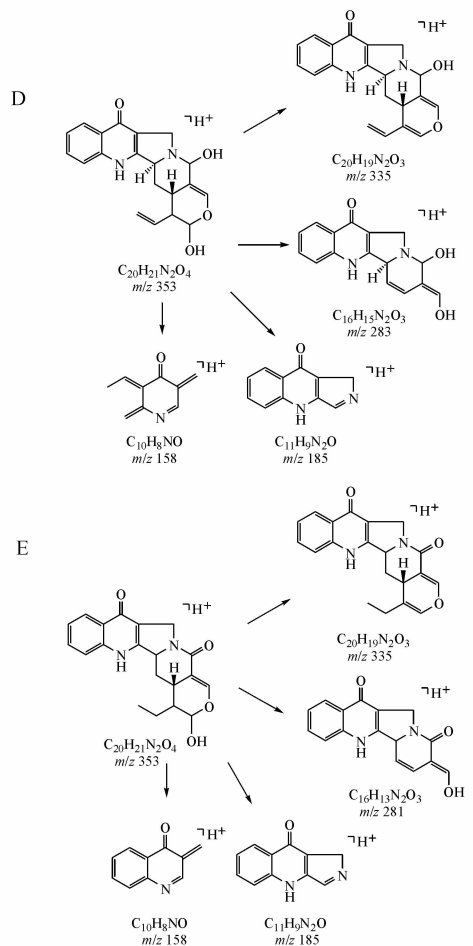
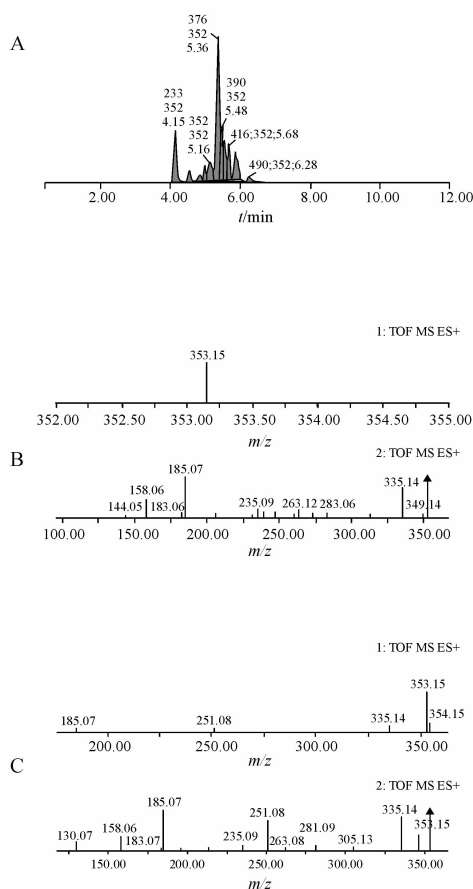
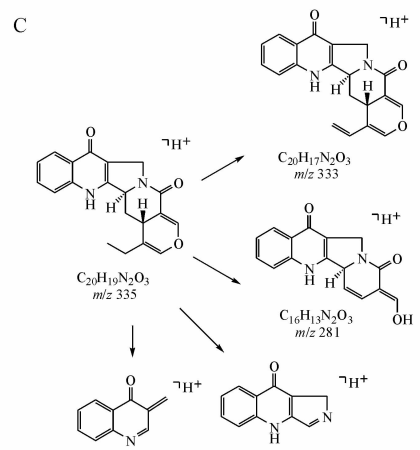


Figure 5 Extracted-ionic chromatogram (A), mass spectrums (B, C) and fragmentation pathways (D, E) of the metabolite ($M_r = 352$, M-2) of pumiloside in rat feces

3.2.3 胆汁中代谢产物分析 对胆汁样品进行扫描分析后发现,短小舌根草苷在胆汁中主要以原形形式存在,并未发现其他代谢产物。

综上所述,短小舌根草苷在尿液中主要以原形药形式存在,另外鉴定了 1 个加氢还原代谢产物;在粪便中,除原形成分外,共鉴定了 3 个代谢产物,而在胆汁中只检测到原形成分,未检测到相关代谢产物。短小舌根草苷在大鼠尿液、粪便、胆汁中的代谢产物汇总图见图 6。

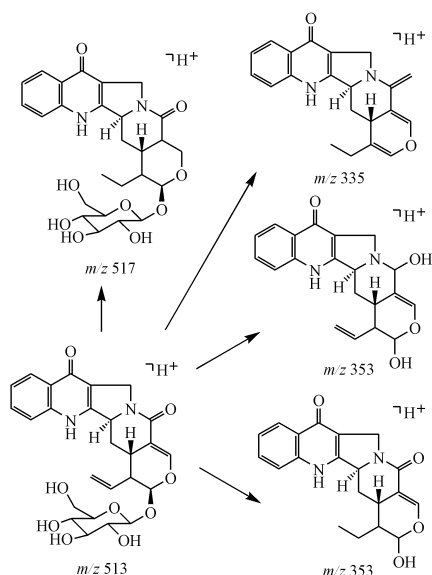


Figure 6 Total metabolites of pumiloside in rat urine, feces and bile

4 讨论

短小舌根草苷在大鼠体内的代谢主要为 I 相代谢产物,易于水解脱去糖苷,同时还易发生还原反应。前期研究表明,胆木的两种制剂即胆木注射液和胆木浸膏片中的短小舌根草苷均能以原型成分入血,但是吸收较差^[4]。本研究在大鼠粪便、尿液、胆汁中均发现了短小舌根草苷的原型成分,且在粪便中检测到其苷元类代谢产物,推测苷元可能为短小舌根草苷在体内吸收的主要形式。本研究阐明了短小舌根草苷在胆汁、尿液、粪便中主要代谢排泄途径,揭示了其在体内的变化规律,为进一步体内物质基础研究提供一定参考依据。

参考文献

- [1] Hu X. *Nauclea officinalis*: Chemical components and pharmacological effects (乌檀化学成分分离分析与相关成分活性、药动学研究) [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2007.
- [2] Zhu FX, Wang JJ, Song J, et al. Chemical constituents of *Nauclea officinalis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2013, 48(2): 276–280.
- [3] Chen JQ, Xu GF, Wang H, et al. Simultaneous determination of six main compounds in *Nauclea officinalis* by ultra-performance liquid chromatography [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, 45(4): 434–437.
- [4] Du YX, Yin R, Zhu FX, et al. Analysis of the constituents absorbed into rat blood after intramuscular administration of *Danmu* injection by UPLC-PDA-QTOF/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36(11): 2339–2344.
- [5] Meng Z, Ding G, Liu Y, et al. Study on purification of stricotosamide from *Nauclea officinalis* by macroporous resin [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(8): 1007–1010.
- [6] Kitajima M. Chemical studies on monoterpenoid indole alkaloids from medicinal plant resources *Gelsemium* and *Ophiorrhiza* [J]. *J Nat Med*, 2007, 61(1): 14–23.
- [7] Xuan WD, Bian J, Chen HS. Studies on the separation and purification of pumiloside from *Nauclea officinalis* by macroporous resin [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30(10): 1301–1304.
- [8] Wang JJ. *The chemical constituents and material basis investigation of Nauclea officinalis on anti-inflammatory effects* (胆木注射液化学成分及其抗炎物质基础研究) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2012.
- [9] Zhu FX, Chen JQ, Wang JJ, et al. Qualitative and quantitative analysis of the constituents in *Danmu* preparations by UPLC-PDA-TOF-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(8): 862–871.
- [10] Lu LL, Shu Y, Qian DW, et al. Identification of the metabolites of *Sinisan* extract in rat plasma, urine, feces and bile after intragastric administration [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2011, 46(11): 1374–1379.
- [11] Zhang H, Zhang D, Ray K, et al. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44: 999–1016.