

金丝桃素在大鼠体内的代谢产物

赵娟芝^{1,2}, 王 聰^{1,2}, 李进典^{1,2}, 张东建², 张 健², 殷志琦^{1*}

(¹中国药科大学天然药物化学教研室 & 天然药物活性组分与药效国家重点实验,南京 210009;

²江苏省中医药研究院转化医学实验室,南京 210028)

摘要 分离鉴定金丝桃素在大鼠胆汁中的代谢产物以及在坏死肝脏组织中的存在形式。正常大鼠和肝脏缺血再灌注损伤模型大鼠经静脉注射 10 mg/kg 金丝桃素后, 收集正常大鼠 0~12 h 胆汁以及坏死模型大鼠 24 h 坏死肝脏组织, 对生物样品预处理后, 采用高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱 (HPLC-TOF/MS) 联用技术进行分析。在大鼠胆汁中鉴定出金丝桃素原形 (M0) 和 3 个葡萄糖化代谢产物 (M1、M2、M3), 而在坏死肝脏组织中仅鉴定出金丝桃素原形。结果表明, 金丝桃素在大鼠胆汁中主要以原形和葡萄糖化形式存在, 在坏死组织中主要以原形存在。

关键词 金丝桃素; 代谢产物; 高效液相色谱-飞行时间质谱; 葡萄糖化; 分离鉴定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)04-0457-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160411

引用本文 赵娟芝, 王聪, 李进典, 等. 金丝桃素在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4):457-462.

Cite this article as: ZHAO Juanzhi, WANG Cong, LI Jidian, et al. Metabolites of hypericin in rats *in vivo* [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(4): 457-462.

Metabolites of hypericin in rats *in vivo*

ZHAO Juanzhi^{1,2}, WANG Cong^{1,2}, LI Jindian^{1,2}, ZHANG Dongjian², ZHANG Jian², YIN Zhiqi^{1*}

¹Department of Natural Medicinal Chemistry & State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract The study aimed to separate and identify the metabolites of hypericin in the bile and necrotic tissues in rats. After intravenous injection of 10 mg/kg hypericin, 0-12 h bile of normal rats and 24 h necrotic liver of rats with reperfused hepatic infarction were collected, and metabolites of rats were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS). The prototype (M0) and three glycosylation metabolites (M1, M2, M3) of hypericin in rat bile and the parent compound in rat necrotic liver were detected and identified. Results indicated that prototype and glycosylation of hypericin were the major metabolic form in rat bile and the parent compound was found only in necrotic tissues.

Key words hypericin; metabolites; HPLC-TOF/MS; glycosylation; isolation and identification

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81473120); and Graduate Student Innovation Fund from Huahai Pharmaceuticals

组织坏死是大多数恶性实体瘤共有的特点, 坏死组织重量约占肿瘤的 30%~80%^[1]。坏死组织细胞膜崩解、胞浆内容物外泄、DNA 暴露等, 与活组织细胞有很大差别, 因此, 坏死组织是抗肿瘤药物的理想靶标之一^[2]。已应用于临床的人鼠嵌合

单克隆抗体(商品名: 唯美生)就是针对肿瘤坏死区域暴露在细胞外的 DNA 组蛋白设计的肿瘤靶向药物^[3]。金丝桃素为天然小分子萘骈二蒽酮类化合物, 研究发现其能选择性聚集在肿瘤内的坏死组织上, 并具有高效的靶向分布能力^[4]。与单抗相

比,金丝桃素无免疫原性,靶向效率高。因此,金丝桃素在肿瘤的诊断和治疗上具有良好的临床应用潜力^[5]。

虽然金丝桃素具有潜在的应用前景,但关于其代谢方面的研究报道较少。Kerb 等^[6]发现人体口服或静脉注射金丝桃素后,在尿液中未检测到金丝桃素原形以及金丝桃素的代谢产物。Appolinary 等^[7]发现人体膀胱内给予金丝桃素后,在血浆和尿液均未检测到金丝桃素的代谢产物。这些研究表明金丝桃素在血浆、尿液或泌尿道中都不被代谢。本课题组前期研究发现金丝桃素主要经肝脏代谢,胆汁排泄,最后经粪便排出^[5]。但金丝桃素在胆汁中的代谢产物形式仍不明确,有待深入研究。

因此,本研究采用 HPLC-TOF/MS 联用技术,鉴定金丝桃素静脉注射后在大鼠胆汁中的代谢产物以及在大鼠坏死模型的坏死组织中的存在形式。本研究结果有助于阐明金丝桃素体内代谢产物和代谢途径,对于明确金丝桃素的体内显效形式、研究其药理作用机制具有重要意义。

1 材 料

1.1 药品和试剂

金丝桃素(纯度大于 98%,中国成都普瑞法科技开发公司);甲醇、乙腈、DMSO(色谱纯,德国 Merck 公司);戊巴比妥钠(法国赛诺菲公司);乙酸铵、丙酮、PEG400 和丙二醇(分析纯,南京化学试剂有限公司);超纯水自制。

1.2 仪 器

Agilent 1100 高效液相-6210 高分辨飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司);数据采集及处理:Masshunter Data Acquisition 在线工作站,Qualitative Analysis 离线分析软件;固相萃取装置:GracePureTM SPE C₁₈-Low(200 mg/3 mL,美国 Grace 公司);Centrifuge 5424 高速离心机(德国 Eppendorf 公司);AL204 电子天平(上海 Mettler Toledo 公司);Millipore-Simplicity 超纯水处理系统(德国默克密理博公司)。

1.3 动 物

清洁级雄性 SD 大鼠,体重(220 ± 10) g,由江苏省中西医结合医院动物实验中心提供,许可证编号:SCXK(苏)12014-000。实验前,所有大鼠放置在温度为 25 ℃,相对湿度为 60% 的环境中适应性

喂养 1 周,给予食物并自由饮水。

2 方 法

2.1 色谱条件

色谱柱:AltimaTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:5 mmol/L 乙酸铵(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0 ~ 17 min, 10% ~ 75% B, 17 ~ 25 min, 75% ~ 90% B, 25 ~ 30 min, 90% ~ 100% B。流速:1.0 mL/min,进样量:5 μL,柱温:30 ℃,检测波长:322 nm。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化(ESI)源;采用负离子模式检测,质量扫描范围:*m/z* 100 ~ 1 000;离子源温度:120 ℃;雾化器压力 40 psi(1 psi = 6.895 kPa);干燥气(N₂)流速:10 L/min;干燥气温度:350 ℃;毛细管电压:3 000 V。

2.3 金丝桃素溶液的配制

精密称取金丝桃素粉末 40 mg,加入 DMSO 溶液 2 mL,超声溶解,再加入 PEG400 和丙二醇溶液各 1 mL,涡旋混匀,配制成 10 g/L 的溶液,以 10 mg/kg 剂量静脉给药。

2.4 生物样品采集

2.4.1 胆汁收集 取 SD 大鼠 6 只,随机分为空白组和给药组,每组 3 只。实验前禁食 12 h,自由饮水。大鼠分别腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠溶液麻醉,麻醉后仰位固定于老鼠板上,在剑突下做纵行切口 2 ~ 3 cm,找到十二指肠上段黏膜的胆管,做胆总管插管手术,将胆汁引流。待动物清醒后,给药组大鼠分别尾静脉注射 10 mg/kg 的金丝桃素溶液,空白组大鼠则给予相同体积的生理盐水,给药后分别用干净的离心管收集 12 h 的胆汁样品。

2.4.2 大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型 10 只 SD 大鼠随机平均分为空白组和给药组,给药前禁食 12 h,自由饮水。大鼠分别腹腔注射戊巴比妥钠溶液 40 mg/kg 麻醉,麻醉后将其固定在老鼠板上。打开腹腔,剥离肝脏右侧的两小肝叶,用细线结扎通往这两小肝叶的血管,3 h 后抽掉细线,用棉签轻柔按摩结扎的血管和两小肝叶,使肝血流灌注引起损伤,手术后双层缝合腹腔并恢复 8 ~ 24 h^[8]。

2.4.3 坏死肝脏组织采集 坏死模型给药组大鼠静脉注射 10 mg/kg 的金丝桃素溶液,坏死模型空白组大鼠则给予相同体积的生理盐水。文献报道

金丝桃素给药后 24 h 在坏死肝脏组织中的分布较高^[8]。给药 24 h 后处死老鼠, 用生理盐水把血液冲洗干净, 取出坏死肝脏组织。

所有生物样品在处理之前放在 -80 °C 储存。

2.5 生物样品处理

2.5.1 胆汁样品处理 取胆汁样品 1 mL, 加入丙酮 1 mL, 超声提取 2 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 沉淀蛋白, 将上清液转移至干净的离心管中, 反复提取 2~3 次, 合并上清液, 氮气吹干, 得胆汁样品。固相萃取小柱上样前用甲醇 1 mL 活化和水 1 mL 平衡^[9]。胆汁混合物用甲醇 1 mL 溶解, 分别用 5 根小柱上样, 每根小柱上样体积 200 μL, 待样品吸附完全后, 先用水 2 mL 冲洗, 再用甲醇 2 mL 洗脱, 收集洗脱液, 氮气吹干, 加入甲醇 300 μL 复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 然后取上清液注入到 HPLC-TOF/MS 系统进行胆汁样品分析。

2.5.2 坏死肝脏组织处理 取坏死肝脏组织 2 g, 加入丙酮 2 mL, 用组织匀浆机匀浆, 超声提取 2 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 沉淀蛋白, 将上清液转移至干净的离心管中, 反复提取 2~3 次, 合并上清液, 氮气吹干, 得到混合物残渣。残渣用甲醇 300 μL 复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 然后取上清液样品注入 HPLC-TOF/MS 系统分析。

3 结果

3.1 金丝桃素的质谱分析

将金丝桃素甲醇溶液直接进样, 采用负离子扫描模式, 获得金丝桃素的准分子离子为 $[M - H]^-$ 503.084 8, 质谱图如图 1 所示。

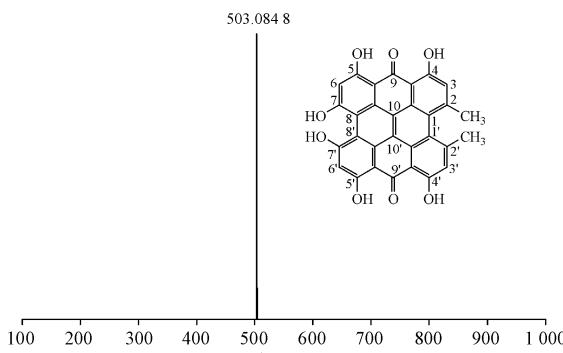


Figure 1 Mass spectrum of hypericin

3.2 金丝桃素在大鼠胆汁中代谢产物的分析鉴定

采用 HPLC-TOF/MS 对处理后的空白胆汁和给药后的胆汁样品分别进行检测, 结果发现与空白组(图 2-A)比较, 在给药胆汁样品中, 在 24.2 min 处检测到 M0 化合物, 分子离子峰 $[M - H]^-$ 为 m/z 503, 且保留时间与金丝桃素标准品(图 2-B)一致, 可以鉴定 M0 为金丝桃素, 表明在大鼠胆汁中有金丝桃素原形成分出现。

通过与空白样品色谱比较, 在给药后样品中新出现的色谱峰所对应的化合物有可能是金丝桃素在体内代谢所产生的代谢产物。结果在大鼠胆汁样品中在保留时间 6.6、11.1 和 12.8 min 分别鉴定了 3 个可能的金丝桃素代谢产物 (M1、M2、M3) (图 2-C)。另外, 这 3 个代谢产物的紫外吸收特征也与金丝桃素相似(图 3)。

代谢产物 M1 的质谱图(图 4-A), 分子离子峰 $[M - H]^-$ m/z 665.133 4, 比金丝桃素离子 m/z 503.084 8 高出 162, 碎片离子 m/z 514, 498, 469, 387, 305, 223; 代谢产物 M2 的分子离子峰 $[M - H]^-$ m/z 665.133 4(图 4-B), 高出原形 162 D, 碎片离子 m/z 514, 498, 325; 代谢产物 M3 的分子离子峰 $[M - H]^-$ m/z 665.133 1(图 4-C), 高出原形 162, 主要碎片离子为 m/z 514, 498, 325; 据此推测 M1、M2 和 M3 均为金丝桃素的葡萄糖结合物。M1、M2 和 M3 的质谱裂解规律一致, 说明三者互为同分异构体, 推测 M1、M2 和 M3 可能为金丝桃素-4-O-葡萄糖苷或金丝桃素-5-O-葡萄糖苷或金丝桃素-7-O-葡萄糖苷。通过对大鼠胆汁样品中金丝桃素代谢产物的分析鉴定, 其在大鼠体内可能的代谢途径如图 5 所示。

3.3 金丝桃素在大鼠坏死肝脏组织中代谢产物的分析鉴定

将处理后的空白坏死肝脏组织和给药后的坏死肝脏组织分别进样分析检测, 与空白组比较, 在给药的坏死肝脏组织样品中, 在 22.5 min 处检测到化合物 M0, 分子离子峰 $[M - H]^-$ 为 m/z 503.084 8, 且保留时间与金丝桃素标准品一致, 可以鉴定 M0 为金丝桃素, 表明金丝桃素在大鼠坏死肝脏组织中主要以原形存在。

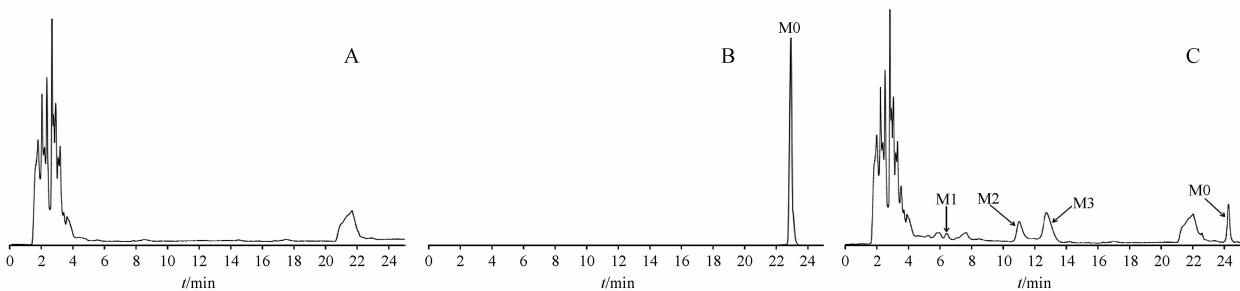


Figure 2 Total ion current chromatography of blank bile (A), hypericin (B) and bile of rats (C) after intravenous administration

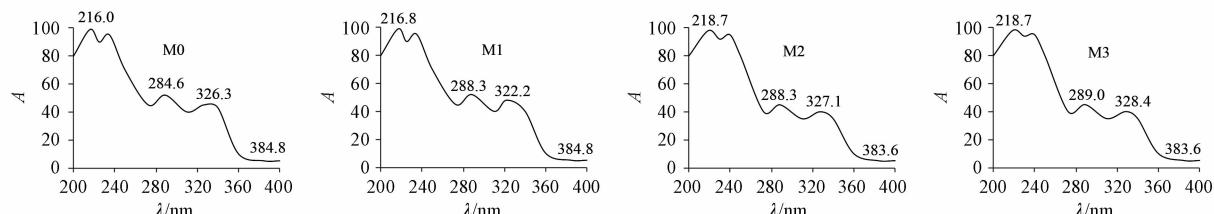


Figure 3 Total ion current chromatography of hypericin (A), blank bile (B) and bile of rats after intravenous administration (C)

M0: Hypericin; M1-M3: Metabolites

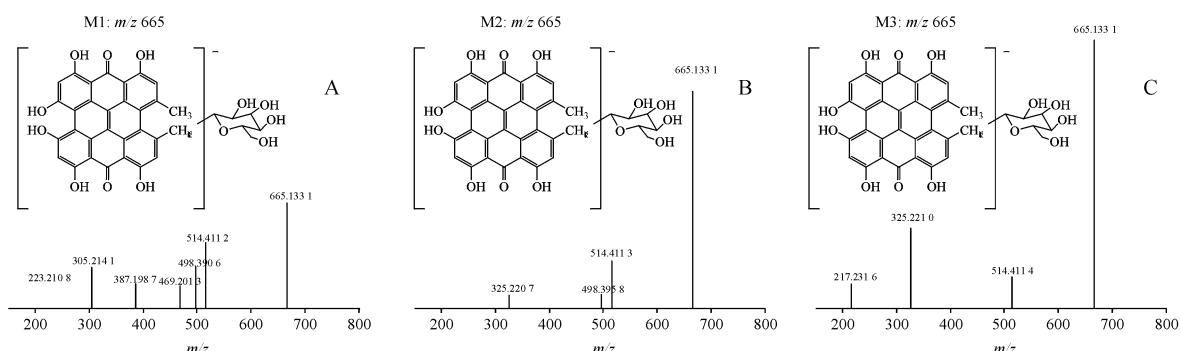


Figure 4 Mass spectra of M1-M3

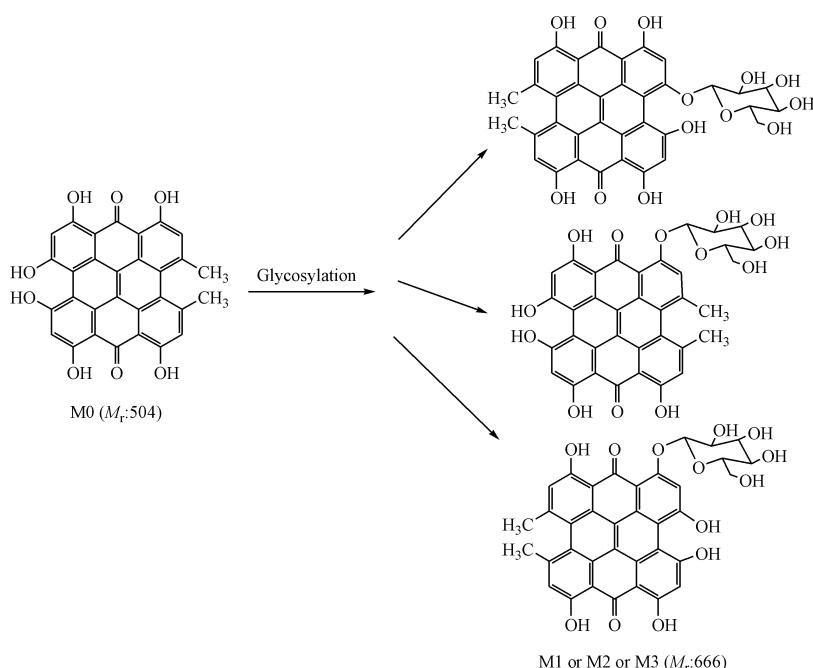


Figure 5 Proposed metabolic pathways of hypericin in rat bile

4 讨 论

双蒽醌类化合物金丝桃素在体内的代谢反应和代谢产物相对比较简单,可能是因为其具有大的平面共轭结构,不易被代谢。相比之下,单蒽醌类化合物结构简单,易在体内发生复杂的代谢反应,且代谢产物多样。如大黄酸在体内的主要代谢方式为苯环上的乙酰化、氢化和甲基化反应;大黄素的体内代谢,苯环上除了乙酰化、氢化、羟化和甲基化反应外,还发生了Ⅱ相代谢的葡萄糖醛酸化和硫酸化反应;芦荟大黄素及其苷在血浆中以葡萄糖醛酸苷的形式存在,其苯环上也易发生乙酰化、氢化、羟化以及醛基化反应^[10-14]。

金丝桃素和番泻苷同属于二蒽酮类化合物,但由于它们化学结构的差异,导致其体内代谢产物不同。金丝桃素为萘骈二蒽酮类,具有高度稠合的八元环系统,结构稳定,代谢产物主要是苯环上的羟基发生葡萄糖基化反应。番泻苷是中位二蒽酮类,由于中间连接两分子单蒽醌的碳碳单键不稳定,易断裂,因此在体内易被代谢降解生成相应的单蒽酮类。如番泻苷A和番泻苷B在肠内细菌的作用下先转变成番泻苷元A、B,最后在黄素酶的作用下降解为大黄酸蒽酮;而番泻苷C为芦荟大黄素-大黄酸杂二蒽酮苷,其经口服给药后在肠内细菌的作用下,最后降解为芦荟大黄素蒽酮和大黄酸蒽酮^[10,15,18]。

研究药物代谢过程和发现活性代谢物是寻找更有效、成药性更好的先导化合物途径之一。金丝桃素的大平面共轭结构,导致其极性小,溶解度差,在含水溶剂中易形成自聚体,从而在网状内皮系统(如肺、脾)聚集,降低了其坏死组织靶向性^[16-17]。药物在体内代谢通常会生成极性更大、水溶性更好的代谢产物。因此可以从药物代谢的角度来寻找新的、极性增大、活性更好的金丝桃素代谢产物。金丝桃素在胆汁中的代谢产物金丝桃素葡萄糖苷有可能成为较好的候选药物,但有待进一步研究。

本实验对粪便样品进行了分析,发现金丝桃素在大鼠粪便中几乎全部以原形存在。这可能是因为胆汁中的金丝桃素葡萄糖苷进入肠道后能被肠道菌群分泌的酶水解,将其还原成金丝桃素原形。有文献报道苷类成分因含有糖基,相对分子质量大,不易被肠道吸收,而是经肠道细菌的糖苷酶水

解为相应的苷元和糖,如黄酮苷、木脂素苷、萜苷等^[18]。

然而,本实验条件下无法区分代谢产物M1,M2和M3这3个同分异构体。本实验中代谢产物仅根据其色谱和质谱信息进行结构鉴定,依据不够充分,还需要在后续实验中通过核磁共振等技术最终确定其结构。

参 考 文 献

- [1] Cooper EH, Bedford AJ, Kenny TE. Cell death in normal and malignant tissues [J]. *Adv Cancer Res*, 1975, **21**: 59-120.
- [2] Smith BA, Smith BD. Biomarkers and molecular probes for cell death imaging and targeted therapeutics [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, **23**(10): 1989-2006.
- [3] Chen SL, Yu LK, Jiang CY, et al. Pivotal study of iodine-131-labeled chimeric tumor necrosis treatment radioimmunotherapy in patients with advanced lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(7): 1538-1547.
- [4] Li J, Oyen R, Verbruggen A, et al. Small molecule sequential dual-targeting theragnostic strategy (SMSDTTS): from preclinical experiments towards possible clinical anticancer applications [J]. *J Cancer*, 2013, **4**(2): 133-145.
- [5] Van de Putte M, Marysael T, Fonge H, et al. Radiolabeled hypericin as tumor necrosis avid tracer: diagnostic and therapeutic potential [J]. *Int J Cancer*, 2012, **131**(2): E129-E137.
- [6] Kerb R, Brockmller J, Staffeldt B, et al. Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, **40**(9): 2087-2093.
- [7] Kamuhawwa AAR, Di Mavungu JD, Baert L, et al. Determination of hypericin in human plasma by high-performance liquid chromatography after intravesical administration in patients with transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, **59**(3): 469-474.
- [8] Kong M, Zhang J, Jiang CH, et al. Necrosis affinity evaluation of ¹³¹I-hypericin in a rat model of induced necrosis [J]. *J Drug Target*, 2013, **21**(6): 604-610.
- [9] Yan YT, LaiChang JS, Li P, et al. Metabolites of salvianolic acid C in rats [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(5): 442-446.
- [10] Zhang YQ, Long T, Niu YJ, et al. Research progress in oral absorption and metabolism of natural anthraquinones [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2014, **26**(7): 1-5.
- [11] Song R, Xu L, Xu FG, et al. Metabolic analysis of rhubarb extract by rat intestinal bacteria using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, **25**(3): 417-426.
- [12] Song R, Lin H, Zhang ZJ, et al. Profiling the metabolic differences of anthraquinone derivatives using liquid chromatography/tandem

- mass spectrometry with data-dependent acquisition [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, **23**(4):537-547.
- [13] Song R, Xu FG, Zhang ZJ, et al. Structural elucidation of *in vitro* metabolites of emodin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, **22**(11):1230-1236.
- [14] Liu W, Zheng ZJ, Liu X, et al. Sensitive and robust UPLC-MS/MS method to determine the gender-dependent pharmacokinetics in rats of emodin and its glucuronide [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, **54**(5):1157-1162.
- [15] Wan JB, Bai X, Cai XJ, et al. Chemical differentiation of Da-Cheng-Qi-Tang, a Chinese medicine formula, prepared by traditional and modern decoction methods using UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2013, **83**:34-42.
- [16] Bánó G, Staničová J, Jancura D, et al. On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures—the effect of aggregation [J]. *J Phys Chem B*, 2011, **115**(10):2417-2423.
- [17] Liu XJ, Jiang CH, Li Y, et al. Evaluation of hypericin: effect of aggregation on targeting biodistribution [J]. *J Pharm Sci*, 2015, **104**(1):215-222.
- [18] Yang J, Qian DW, Duan JA, et al. Advances in studies on metabolism of constituents in Chinese materiamedica by intestinal bacteria [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2011, **42**(11):2335-2344.