

超高效液相色谱-质谱联用法分析 α -常春藤皂苷在大鼠体内的代谢产物

梁起栋¹, 何明珍^{1,2,3}, 欧阳辉¹, 黄文平³, 郭宜城¹, 冯育林^{1,3*}, 周欣⁴, 黄何松¹, 杨世林^{1,3}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

4. 贵州师范大学天然药物质量控制研究中心, 贵州 贵阳 550001

摘要: 目的 研究大鼠口服 α -常春藤皂苷后粪便中的代谢产物。方法 大鼠 ig α -常春藤皂苷 150 mg/kg 后, 采集其 0~24 h 粪便样品, 应用超高效液相色谱-复合三重四级杆线性离子阱质谱 (UPLC-Q/Trap-MS) 联用技术对样品进行分析。结果 检测到原形药物、原形药物的同分异构体及 7 个可能的代谢产物, 包括去甲基化代谢物 (M1)、脱糖代谢物 (M2、M3)、葡萄糖醛酸化代谢物 (M4) 和双键加成代谢物 (M5、M6-1、M6-2)。结论 α -常春藤皂苷在大鼠胃肠道内会发生多种代谢反应, 主要有脱糖代谢、葡萄糖醛酸化代谢、去甲基化代谢等。

关键词: α -常春藤皂苷; 代谢产物; 超高效液相色谱-复合四级杆离子阱质谱; 脱糖代谢; 葡萄糖醛酸化; 去甲基化代谢

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)13-1883-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.014

Analysis on *in vivo* metabolites of α -hederin in rats by UPLC-MS/MS

LIANG Qi-dong¹, HE Ming-zhen^{1,2,3}, OUYANG Hui¹, HUANG Wen-ping³, GUO Yi-cheng¹, FENG Yu-lin^{1,3}, ZHOU Xin⁴, HUANG He-song¹, YANG Shi-lin^{1,3}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China

3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

4. Reseach Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To investigate the metabolites of α -hederin in feces of rats after ig administration. **Methods** An UPLC-Q/Trap-MS method was used for the identification of metabolites of α -hederin in feces of rats after ig administration of α -hederin (150 mg/kg). **Results** Seven metabolites were detected in rat feces, including demethylation of α -hederin (M1), 3-*O*- α -L-arabinopyranoside hederagenin (M2), hederagenin (M3), glucuronideconjugate of α -hederin (M4), and double bond bonus of α -hederin (M5, M6-1, and M6-2). **Conclusion** α -Hederin experiences a variety of metabolic reactions in rat gastrointestinal tract, mainly including deglycosylation, glucuronidation, demethylation, etc.

Key words: α -hederin; metabolites; UPLC-Q/Trap-MS; deglycosylation; glucuronidation; demethylation

α -常春藤皂苷 [3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基(1→2)- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷] 为五环三萜皂苷 (结构见图 1), 存在于多种植物中, 为洋常春藤 *Hedera helix* Linn.^[1]、预知子 *Akebia quinata* (Houtt.) Decne.^[2]、黑种草 *Nigella sativa* Linn.^[3] 等多种植物的有效成分。据研究报道其具有解痉^[1]、抗炎^[2]、

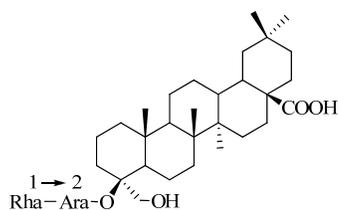
抗癌^[3]等多种药理活性。本课题组前期研究从预知子中分离得到 α -常春藤皂苷单体^[4], 经药理活性研究发现其具有很强的抗肺癌、结肠癌等活性, 但初步的体内药动学研究发现, 其口服生物利用度极低。皂苷类成分口服生物利用度普遍较低, 一方面与该类化合物本身理化性质有关, 另一方面与其在肠道

收稿日期: 2013-12-24

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09103201-008); 江西省卫生厅中医药科研项目 (2012A028); 南昌市科技支撑计划 (洪财企 [2012]80 号社发支撑-3); 贵州省药物代谢研究平台建设项目 (黔科合 ZY [2011] 3013 号); 贵州省科技创新人才团队建设项目 (黔科合人才团队 (2011) 4008)

作者简介: 梁起栋 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分研究。Tel: 15070800049 E-mail: lqdyx2010@hotmail.com

***通信作者:** 冯育林, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分研究。Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@126.com

图1 α -常春藤皂苷结构式Fig. 1 Structure of α -hederin

及肝脏的代谢等也有很大关系^[5-7]。因此,研究 α -常春藤皂苷在体内的代谢有助于了解 α -常春藤皂苷生物利用度低的原因。同时,药物在体内的代谢转化关系到药物的药理及毒理活性^[8-9],研究 α -常春藤皂苷在体内的代谢产物对于阐明 α -常春藤皂苷的作用机制具有重要意义。本实验采用超高效液相色谱-复合三重四级杆线性离子阱质谱 (UPLC-Q/Trap-MS) 技术分析大鼠 ig α -常春藤皂苷后粪便中的代谢产物,以初步了解 α -常春藤皂苷体内代谢过程,为 α -常春藤皂苷的进一步开发研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

NexeraX2 LC-30A 超高效液相色谱仪,包含在线脱气机、高压二元泵、自动进样器、柱温箱 (Shimadzu, 日本); Q/Trap 4500 复合三重四极杆线性离子阱质谱,配备 ESI 离子源及 Analyst 1.6 数据处理软件 (AB SCIEX, 美国); KQ-4000B 型超声清洗机 (巩义市予华仪器有限责任公司); AL204 电子天平 [Mettler Toledo 仪器 (上海) 有限公司]; HC-3018R 型高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); VORTEX3 旋涡混匀器 (德国 IKA 公司); Millipore-Simplicity 超纯水处理系统 (默克密理博, 德国)。

1.2 试药

α -常春藤皂苷 (自制,批号 20130924,经 ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 谱鉴定为 α -常春藤皂苷,经 HPLC 测定其质量分数 >98%), 甲醇、乙腈 (HPLC 级,美国 Fisher Scientific 公司), 甲酸 (HPLC 级,阿拉丁试剂), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 其余试剂为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠, 清结级, 雄性, 体质量 (250±10) g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001。大鼠适应性喂养 1 周后开始实验, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法

2.1 溶液的配制

α -常春藤皂苷混悬液的配制: 称取 300 mg α -常春藤皂苷粉末, 置于 25 mL 量瓶中, 加入适量 0.5% 羟甲基纤维素钠溶液超声溶解, 定容, 即得。

2.2 样品采集

取禁食 12 h SD 大鼠 6 只, 体质量 (250±10) g, 随机分为对照组和给药组, 每组 3 只。给药组大鼠分别 ig 150 mg/kg α -常春藤皂苷混悬液, 对照组大鼠 ig 给予等体积的生理盐水。分别收集两组大鼠 0~24 h 的粪便, 置 -40 °C 冰箱保存, 备用。

2.3 生物样品处理

对照组及给药组大鼠干燥粪便样品分别混匀后, 分别置于研钵中碾磨至粉末状, 各称取约 1 g, 加入 4 mL 甲醇超声提取 30 min, 15 000 r/min、5 °C 温度下高速离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过, 取 5 μ L 进样分析。

2.4 样品分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Shim-packXR-ODS III 柱 (75 mm×2.0 mm, 1.6 μ m); 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 90% B; 1~22 min, 90%~5% B; 22~25 min, 5% B; 25~26 min, 5%~90% B; 26~30 min, 90% B; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 5 μ L。

2.4.2 质谱条件 ESI 电喷雾离子源, 负离子检测; 离子源温度 550 °C; 离子喷雾电压 -4 500 V; 气帘气压为 172.4 kPa; 雾化气和辅助气气压为 344.8 kPa; 去簇电压: -150 V; 碰撞能量: -70 eV; 其中气帘气、雾化气、辅助气均为氮气。扫描模式: EMS、NL、EPI。扫描范围 m/z : 300~1 200。

3 结果与分析

3.1 α -常春藤皂苷色谱及质谱行为特征

使用质谱针泵系统直接进样, 比较 α -常春藤皂苷在 ESI 源正负离子模式下的质谱响应, 分析发现 α -常春藤皂苷在负离子模式下响应更强, 故选用负离子模式检测 α -常春藤皂苷及其代谢产物。按“2.4”项下的分析条件, 对 α -常春藤皂苷对照品进行 UPLC-MS/MS 分析, t_R 为 13.6 min。 α -常春藤皂苷准分子离子峰 m/z 749.4 [M-H]⁻, MS² 下产生特征碎片离子峰 m/z : 603.4、585.4、471.7、423.2。结果见图 2。

3.2 大鼠 ig α -常春藤皂苷后粪便中的代谢产物

按“2.4”项下的分析条件, 采用 EMS-IDA-EPI

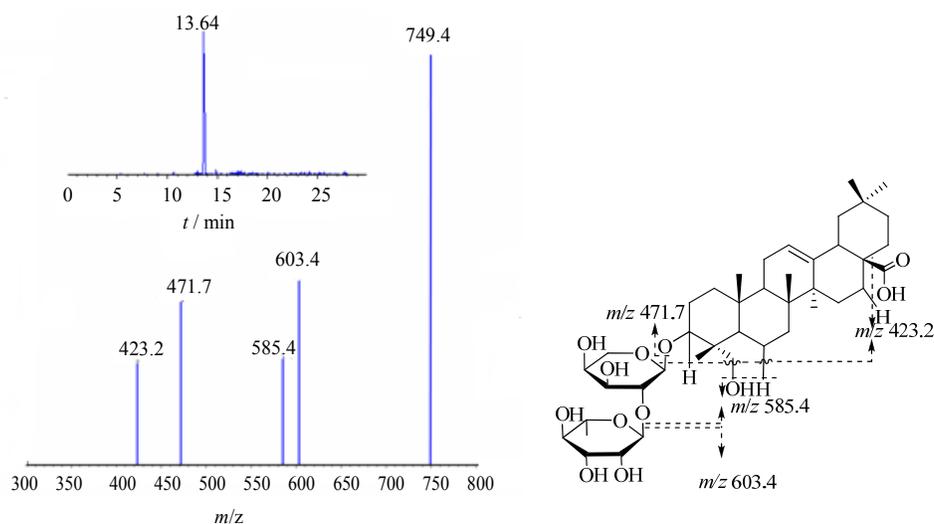


图 2 α -常春藤皂苷负离子模式下二级质谱图、提取离子流图及裂解图

Fig. 2 Negative ion MS/MS spectrum, extracted ion chromatogram, and proposed fragmentation pattern of α -hederin

及 NL-IDA-EPI 两种扫描模式对对照组及给药组大鼠粪便样品进行平行分析。质谱扫描过程中，首先寻找可能的代谢产物的母离子，当其强度达到预设值时，触发对其进行多级质谱裂解 (IDA)，由此得到样品的总离子流图及相关化合物的二级质谱图。比较对照组及给药组样品总离子流图差异，根据得

到的 α -常春藤皂苷及其代谢产物的质谱信息并结合药物生物体内代谢规律，推测 α -常春藤皂苷代谢产物及其结构。结果共检测到原形药物、原形药物的同分异构体及 7 个可能的代谢产物，各化合物信息见表 1，其提取离子流色谱图和二级质谱图见图 3 和 4。

表 1 α -常春藤皂苷在大鼠粪便中代谢产物的 UPLC-Q/Trap-MS 定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis on metabolites of α -hederin in feces of rats by UPLC-Q/Trap-MS

编号	分子式	t_R / min	$[M-H]^-$	主要碎片离子 (m/z)	裂解特征	推测代谢方式
M0-1	$C_{41}H_{66}O_{12}$	13.68	749.4	603.2, 585.4, 471.2, 423.1	与药物对照品一致	药物原形
M0-2	$C_{41}H_{66}O_{12}$	12.99	749.4	603.3, 585.4, 471.3, 423.4	同 M0-1	原形同分异构
M1	$C_{40}H_{64}O_{12}$	13.48	735.5	603.4, 471.3, 423.2	$[M-H]^-$ 比 M0-1 减少 14, 其他碎片一致	鼠李糖去甲基化
M2	$C_{35}H_{56}O_8$	14.45	603.4	471.3	$[M-H]^-$ 比 M0-1 减少 146 (Rha), 其他碎片一致	脱糖代谢
M3	$C_{30}H_{48}O_4$	17.71	471.2	471.2	$[M-H]^-$ 比 M0-1 减少 278 (Rha+Ara)	脱糖代谢
M4	$C_{47}H_{74}O_{18}$	10.01	925.6	907.6, 605.2, 473.2	$[M-H]^-$ 比 M0-1 增加 176 (葡萄糖醛酸)	葡萄糖醛酸化
M5	$C_{41}H_{68}O_{12}$	12.16	751.3	605.2, 587.2, 473.1	$[M-H]^-$ 比 M0-1 增加 2, 其他碎片均增加 2	双键加氢
M6-1	$C_{41}H_{68}O_{13}$	11.12	767.3	605.4, 473.5, 425.1	$[M-H]^-$ 比 M0-1 增加 18 (H_2O), 其他碎片均增加 2	水合加成
M6-2	$C_{41}H_{68}O_{13}$	12.13	767.4	605.4, 473.5	$[M-H]^-$ 比 M0-1 增加 18 (H_2O), 其他碎片均增加 2	水合加成同分异构

M0-1 和 M0-2: 在 m/z 749.4 的提取离子流色谱图上可见 t_R 分别为 13.68 min (M0-1) 和 12.99 min (M0-2) 的 2 个色谱峰 (图 3-A)。其中 M0-1 的 t_R 和二级质谱碎片与 α -常春藤皂苷对照品一致，故判断其为 α -常春藤皂苷原形。M0-2 的 t_R 与原形接近，结合其二级质谱碎片离子，推测可能为 α -常春藤皂苷的同分异构体。

M1: 在 m/z 735.5 的提取离子流色谱图中，检

测到 1 个色谱峰， t_R 为 13.48 min (图 3-B)。其主要碎片离子为 m/z 603.4、471.3、423.2，与原形药物有相似的中性碎片丢失。M1 准分子离子峰 m/z 735.5 $[M-H]^-$ 比原形化合物准分子离子峰 m/z 749.4 $[M-H]^-$ 减少 14，提示 M1 为 α -常春藤皂苷去甲基化产物。又由于其先丢失 m/z 132 (阿拉伯糖) 的中性碎片，而 α -常春藤皂苷先丢失 m/z 146 (鼠李糖) 的中性碎片，说明去甲基可能发生在 α -常春藤

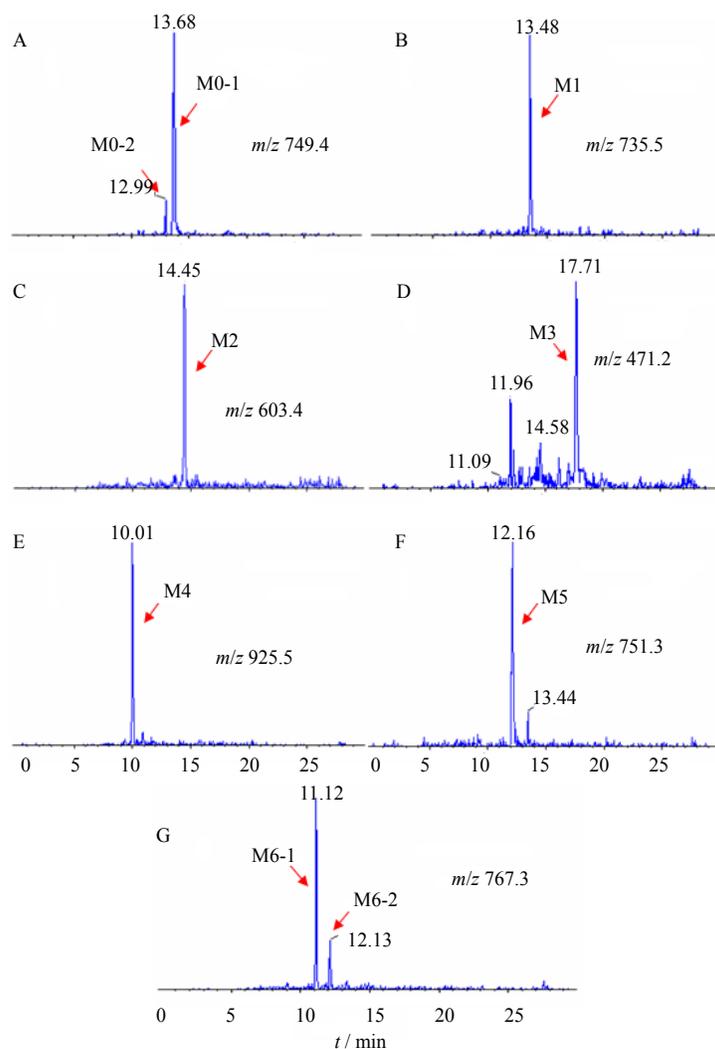


图 3 大鼠 ig 给药后粪便中 α -常春藤皂苷原形及其代谢产物的提取离子流色谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatograms of α -hederin and its metabolites in feces of rats after ig administration

皂苷的鼠李糖上。故推测 M1 为 α -常春藤皂苷的鼠李糖去甲基产物。

M2: M2 的 t_R 为 14.45 min (图 3-C), 出峰比原形药物晚, 说明其极性比原形药物小。其准分子离子峰 m/z 603.4 $[M-H]^-$ 比原形药物准分子离子峰 m/z 749.4 $[M-H]^-$ 减少 146, 可以推测其为 α -常春藤皂苷脱去鼠李糖的代谢产物, 即为 3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷。

M3: 在 m/z 471.2 的提取离子流色谱图中, 检测出 4 个色谱峰 (图 3-D)。 t_R 为 17.71 min (M3) 的色谱峰二级碎片离子为 m/z 453.3、407.3。根据 M3 的 t_R 及碎片信息推测其为 α -常春藤皂苷脱去鼠李糖和阿拉伯糖的代谢产物, 即为常春藤皂苷元。其他色谱峰没有二级质谱信息而无法推测其结构,

很有可能为内源性物质。

M4: M4 的 t_R 为 10.01 min (图 3-E), 提示其极性较大。其准分子离子峰 m/z 925.5 $[M-H]^-$ 比原形药物准分子离子峰 m/z 749.4 $[M-H]^-$ 增加 176, 结合其二级碎片离子, 推测其可能为 α -常春藤皂苷葡萄糖醛酸化产物。

M5: 在 m/z 751.3 的提取离子流色谱图中, 检测出 2 个色谱峰 (图 3-F), 保留时间为 12.16 min (M5) 和 13.44 min。由于 13.4 min 的色谱峰无二级质谱信息, 故无法推测其结构, 可能为 M5 的同分异构体或内源性物质。M5 的主要二级碎片离子为 m/z 605.2、587.2、473.1, 与原形药物相比具有相同的中性碎片丢失。并且其碎片离子依次比 α -常春藤皂苷特征碎片离子多 2, 故推测其为 α -常春藤皂苷

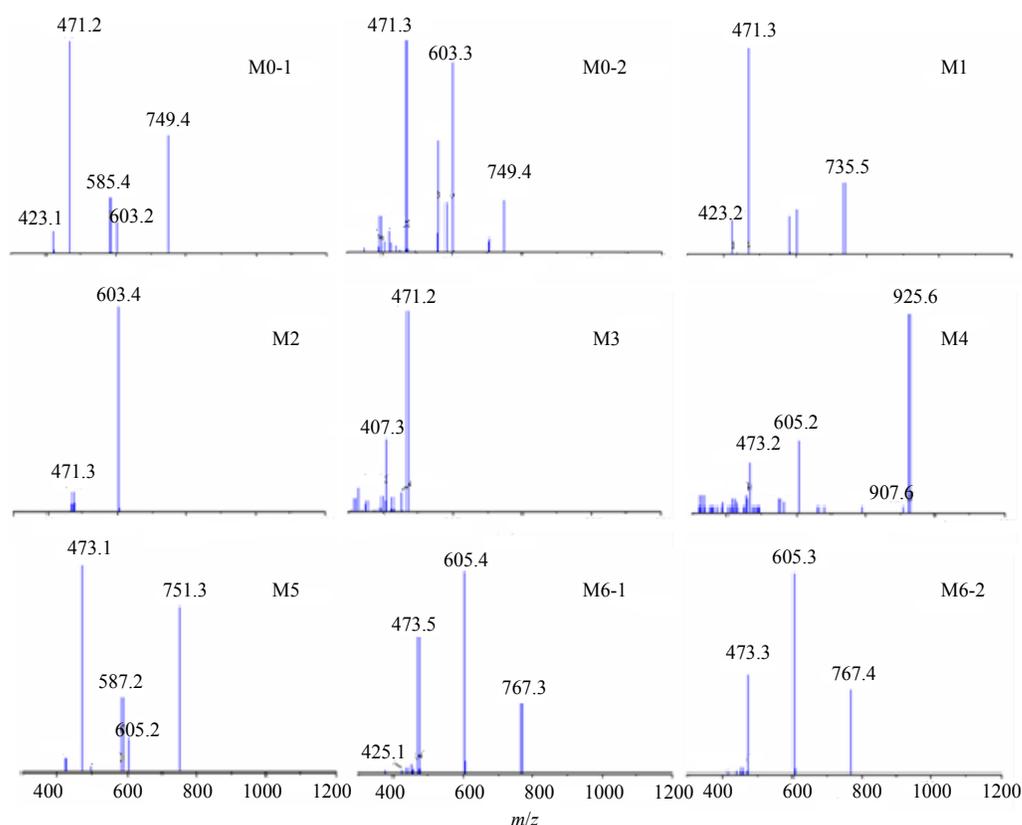


图 4 大鼠 ig α -常春藤皂苷后粪便中代谢产物的二级质谱图

Fig. 4 MS² spectra of α -hederin metabolites in feces of rats after ig administration

双键加氢产物。

M6-1 和 M6-2: 在 m/z 767.3 的提取离子流色谱图中, 检测到 t_R 分别为 11.12 min (M6-1) 和 12.13 min (M6-2) 的 2 个色谱峰 (图 3-G), 极性皆比 α -常春藤皂苷大。二者的主要离子碎片基本一致, 可能为同分异构体。M6-1 和 M6-2 的准分子离子峰 m/z 767.3 [M-H]⁻ 比原形准分子离子峰 m/z 749.4 [M-H]⁻ 多 18, 推测二者为 α -常春藤皂苷双键水加成产物, 水加成后羟基连接位置不同而产生同分异构体。

通过以上分析结果推测, α -常春藤皂苷在大鼠胃肠道中发生了多种代谢反应, 主要有脱糖代谢 (M2、M3)、葡萄糖醛酸化代谢 (M4)、去甲基化代谢 (M1) 和加成反应 (M5、M6-1、M6-2)。 α -常春藤皂苷在大鼠粪便中的代谢途径推测见图 5。

4 讨论

LC-MS 法是目前研究药物体内代谢的常用方法。该方法具有样品前处理简单, 同时得到化合物的保留时间、相对分子质量及特征结构碎片等丰富信息的特点。本实验采用的 UPLC-Q/Trap-MS 法除

具有以上优点外, 还能结合 Q/Trap 系统自带的增强母离子扫描 (EMS)、信息依赖性扫描 (IDA) 及增强子离子扫描 (EPI) 功能, 实现单次进样获取各代谢产物全部主要有效信息^[10]。其中, EMS 扫描可得到全面精确的质谱信息, EPI 扫描帮助产生高质量的 MS² 谱图, 而 IDA 使该过程动态自动完成。由此, 确保了样品分析的效率和质量。

皂苷类成分本身的理化性质和机体生理屏障是导致皂苷口服生物利用度低的两个主要原因, 而皂苷的体内代谢是其中一个重要因素^[5]。研究表明, 皂苷类药物在口服进入胃肠道后, 易发生水解脱糖等代谢反应^[11-12]。本实验推测, α -常春藤皂苷也容易在胃肠道发生一系列类似的代谢反应, 导致其生物利用度低。同时, 本课题组前期研究发现, 在口服生物利用度很低 (小于 1%) 的情况下, 大鼠 ig 给药 α -常春藤皂苷后仍表现出良好的抗肿瘤活性, 提示可能是 α -常春藤皂苷的代谢产物在体内发挥药效。本研究分析鉴定了大鼠 ig α -常春藤皂苷后在粪便中的原形药物、原形药物的同分异构体及 7 个可

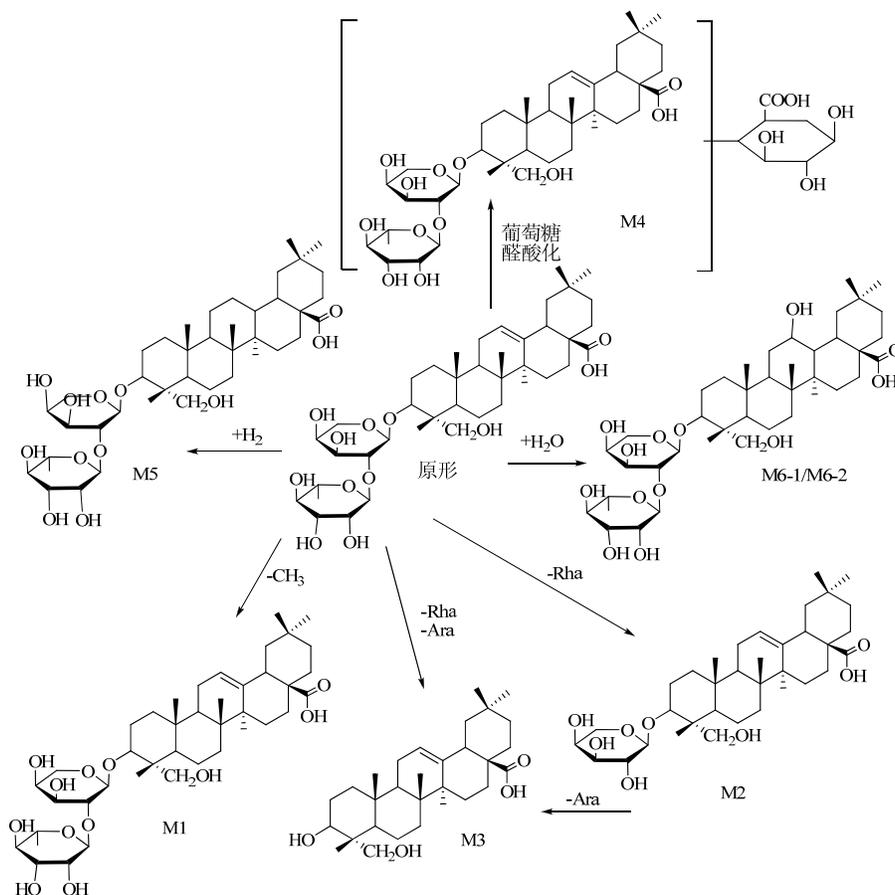


图5 α -常春藤皂苷在大鼠体内(粪便)的代谢途径推测

Fig. 5 Proposed metabolic pathways of α -hederin in feces of rats *in vivo*

能的代谢产物,包括脱糖基代谢物、葡萄糖醛酸结合物等,初步揭示了 α -常春藤皂苷体内代谢过程,对进一步阐明 α -常春藤皂苷作用机制具有指导意义。

参考文献

[1] Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N, *et al.* The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera helix*) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 796-802.

[2] Choi J, Jung H J, Lee K T, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata* [J]. *J Med Food*, 2005, 8(1): 78-85.

[3] Kumara S S, Huat B T. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(1): 29-32.

[4] 侯雄军, 刘岩庭, 张武岗, 等. 预知子中 α -常春藤皂苷提取工艺研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(2): 204-207.

[5] 王娟, 单进军, 狄留庆, 等. 五环三萜皂苷类活性成分口服吸收与代谢研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(1):

196-200.

[6] Gao S, Basu S, Yang Z, *et al.* Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(14): 1885-1899.

[7] 何明珍, 梁起栋, 欧阳辉, 等. α -常春藤皂苷大鼠在体肠吸收特性研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(6): 807-812.

[8] Yang M, Cheng C R, Yang J L, *et al.* Metabolite profiling and characterization for medicinal herbal remedies [J]. *Curr Drug Metab*, 2012, 13(5): 535-557.

[9] Baillie T A, Cayen M N, Fouda H, *et al.* Drug metabolites in safety testing [J]. *Toxicol App Pharm*, 2002, 182(3): 188-196.

[10] 蔡悠悠, 夏媛媛, 谷元, 等. 3-乙酰基-11-羧基- β -乳香酸在大鼠体内的代谢途径研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(17): 2427-2432.

[11] Tawab M A, Bahr U, Karas M, *et al.* Degradation of ginsenosides in humans after oral administration [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8): 1065-1071.

[12] Takeda S, Ishihara K, Wakui Y, *et al.* Bioavailability study of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats; relevance to the intestinal bacterial hydrolysis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48(9): 902-905.