

淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展

韩 惠¹, 单 洪^{2,3}, 周福军^{2,3}, 张新鑫^{2,3}, 侯文彬^{2,3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室(天津), 天津 300193

摘 要: 淫羊藿为我国传统中药, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。淫羊藿中主要活性成分是以淫羊藿苷为代表的黄酮苷类化合物。近年来研究发现淫羊藿给药后发挥功效的物质基础主要为其活性成分的代谢产物。综述近年来国内外对淫羊藿中活性成分的代谢产物的研究方法及代谢产物研究进展, 对进一步阐明淫羊藿药材的作用机制、研制新药具有直接指导意义。

关键词: 淫羊藿; 淫羊藿苷; 朝藿定 A; 宝藿苷 I; 代谢产物

中图分类号: R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)01-0078-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.022

Research progress in metabolites of active constituents from *Epimedii Herba*

HAN Hui¹, SHAN Qi^{2,3}, ZHOU Fu-jun^{2,3}, ZHANG Xin-xin^{2,3}, HOU Wen-bin^{2,3}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. State and Local Joint Engineering Laboratory of Preparation and Quality Control Techniques for TCM (Tianjin), Tianjin 300193, China

Abstract: *Epimedii Herba* is one of the traditional Chinese materia medica with the function of invigorating kidney, strengthening yang, and eliminating wind and dampness. Flavonoid glycosides of icariin as the representative, are the main active chemical components in *Epimedii Herba*. Recent studies have found that the material basis of these compounds may be their metabolites in vivo. The paper reviews the research progress in the metabolites of the active constituents in *Epimedii Herba*, which could provide the effective guidance for further understanding their mechanism and the development of the related drugs.

Key words: *Epimedii Herba*; icariin; epimedin A; baohuoside I; metabolites

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿作用^[1]。淫羊藿中主要化学成分为黄酮类化合物, 淫羊藿苷被认为是其特征成分, 《中国药典》2010 年版一部规定淫羊藿苷作为淫羊藿药材及其制剂的质控标准。药物代谢又称生物转化, 是指药物在体内化学结构改变的过程, 此过程决定着大多数药物的药理及毒理特性。很多黄酮类化合物可在肝脏和消化道中发生代谢反应。大部分口服给药的黄酮苷类化合物在胃肠道内代谢, 以其原形成分的代谢产

物吸收进入体内; 大部分静脉给药的黄酮苷类化合物在肝脏进行生物转化^[2]。淫羊藿的衍生物淫羊藿素和去甲淫羊藿素具有促 MCF-7 细胞和 T47D 细胞增殖的雌激素样作用, 而淫羊藿苷未体现该作用^[3]。有文献报道大鼠 ig 给予 100 mg/kg 淫羊藿苷后生物利用度为 12%; 淫羊藿苷 50 mg/kg ig 给药后 C_{max} 仅为 162.4 $\mu\text{g/L}$ ^[4-5]。刘健发现淫羊藿苷经口给药发挥主治功效的物质基础主要为其代谢产物^[6]。淫羊藿中黄酮类化合物在多种途径综合作用下转化次级糖苷形式, 更利于机体吸收, 从而提高了淫羊藿的药效^[7]。因此, 揭示淫羊藿主要成分的代谢产物对进一步了解其功效机制和开发新药将提供有效指导。

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09102)

作者简介: 韩 惠(1988—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为中药及天然产物研究。Tel: (022)23006903 E-mail: hanhui0202@126.com

*通信作者 侯文彬(1969—), 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药及天然产物的研究。Tel: (022) 23006295 E-mail: houwb@tjpi.com

本文将最近几年淫羊藿中主要成分代谢产物的研究进展做一综述。

1 代谢产物研究方法

1.1 体内实验

动物给药一定时间后将其处死,可通过分析消化道各部分内容物研究药物在胃肠道中的代谢。通过检查给药动物的尿、粪便、胆汁或汗液中各代谢物的结构及含量变化情况研究药物的代谢转化,并推断药物在消化道中的代谢过程。研究证明药物在大鼠与人的体内吸收有高度的相关性,因此可以用大鼠代替人体进行临床前药物体内吸收方面的研究^[8]。药物的代谢转化结果及药动学性质可能因给药途径的不同而不同。目前淫羊藿中活性成分代谢研究的实验文献主要以大鼠为实验动物。

1.1.1 灌胃给药 已有报道通过大鼠灌胃给以淫羊藿苷研究淫羊藿苷的体内代谢产物及代谢途径^[6,9-14]。有报道对大鼠灌胃给予淫羊藿提取物后,检测大鼠血浆、尿样、胆汁中淫羊藿苷及其代谢产物^[15]。刘海培等^[16]对大鼠灌胃给予淫羊藿素后检测血浆、尿样和粪便中的代谢产物。

1.1.2 体肠灌流 有研究通过大鼠体肠灌流实验研究淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿总黄酮的大鼠在体肠吸收及肠道菌代谢^[7,10,17]。也可利用大鼠原位单向肠灌注模型研究淫羊藿苷肠吸收代谢特性^[18]。

1.2 离体实验

在中药代谢研究中,体外代谢实验可以方便地控制某些代谢条件。因此在直接进行体内代谢不易操作时,可先进行体外代谢实验,确定代谢物结构及分析方法,以考察体内代谢情况^[8]。8-异戊烯基的淫羊藿黄酮苷类在生物体系酶及微生物的转化作用下会产生结构类似的一系列次级代谢产物,次级代谢产物较原形药物的肠渗透性好,更利于吸收入血发挥药效^[19]。在人和大鼠的肠道存在的 LPH 酶、 β -糖苷酶等水解酶能水解黄酮苷等成分,因此淫羊藿苷等成分也可能在肠黏膜表面被水解而产生代谢产物^[19-20]。通过体外重组肠道菌群代谢体系的方法研究淫羊藿活性成分的代谢转化,能很好地反映其体内代谢转化的真实情况且简便易行。

1.2.1 酶法 有报道淫羊藿苷加入 LPH 酶抑制剂葡萄糖酸内酯前后各肠段的吸收代谢情况时,发现葡萄糖酸内酯可以抑制淫羊藿苷在肠内的代谢,证明淫羊藿苷在肠内由受到 LPH 酶的水解作用而使得进

入体内的淫羊藿苷很少^[21-22]。有文献通过考察淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 的 LPH 酶酶解情况研究其代谢产物^[10]。常琪等^[23]通过测定 β -葡萄糖醛酸糖苷酶/硫酸酯酶水解前后血浆、尿液和胆汁中游离型淫羊藿素和总淫羊藿素的浓度考察淫羊藿素的代谢。

1.2.2 肠道菌群试验 有报道用体外孵育肠内容物与淫羊藿苷的混合物的方法考察大鼠肠道菌群对淫羊藿苷和宝藿苷 I 的代谢情况^[6,24]; Yao 等^[25]通过在 37 °C 条件下将淫羊藿总黄酮苷在家兔厌氧肠菌中培养研究其在家兔肠菌中的代谢;通过检测离体厌氧培养大鼠肠内菌对淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 的代谢情况考察大鼠整体肠内菌对淫羊藿中主要成分的代谢行为也有报道^[7,10]。此外,也有通过检测离体培养人肠道细菌对淫羊藿苷的代谢考察人肠道细菌对淫羊藿苷的代谢行为^[11,26]。

2 代谢产物检测方法

代谢物的检测分析一般是把收集的样品进行适当处理,用溶剂提取、柱色谱、制备高效液相等方法得到较纯品,用紫外、红外、质谱、核磁共振等光谱分析方法分析并推断原药及其代谢物的结构。有时也用化学方法合成代谢物对照品进行结构验证。已有大量关于淫羊藿代谢产物检测方法的报道。

2.1 同位素标记法

同位素标记法是利用放射性核素(或稳定性核素)作为示踪剂对研究对象进行标记的微量分析方法。用放射性同位素法观察复方中有效成分淫羊藿苷在小鼠体内的处置过程,结果表明 ^3H -淫羊藿苷以复方状态经灌胃给药后,体内作用较快,不易产生长时间蓄积^[12]。同位素标记法灵敏度良好、准确性较高、适用性广泛,但放射性同位素会污染环境,同时稳定性同位素标记物制作难度大、成本高。

2.2 LC/UPLC-MS

液质联用是将高效液相色谱仪与质谱仪用界面连接成一个完整的仪器,可以收到相辅相成的效果。液质联用技术有快速、专属、微量、准确的特点,能快速获得待测化合物的大量结构信息。利用液质联用技术研究淫羊藿活性成分的代谢产物时,只需较小的样品量即可根据 MS 的碎片信息快速地识别与鉴定代谢产物的化学结构^[5,13,16,27-33]。邓桂凤^[34]采用 UPLC/MS 对三七提取物与淫羊藿提取物配伍及单用时各活性成分在大鼠体内药动学行为进行研究,证明所建立的 UPLC/MS 法快速、准确、灵敏,

能在 9 min 内将几个组分完全分离。

2.3 GC/MS

GC-MS 联用分析的灵敏度高、特异性强、实验简单高效, 适合于低分子化合物分析, 尤其适合于挥发性成分的分析, 主要用于挥发性成分的鉴定等方面。可用 GC/MS 对样品处理液及衍生物进行分析, 推测确定代谢物结构, 如 Shen 等^[35]采用 GC/MS 测定人血清中淫羊藿苷和去甲淫羊藿素的水平。

2.4 其他方法

已有研究建立了毛细管区带电泳对淫羊藿苷体内药动学研究方法, 可同时进行多组分检测, 具有高效、快速、简便的优点^[6,14]。有文献^[6,36]证明毛细管区带电泳所得实验结果与 HPLC 法^[37-38]有较好的可比性; 将毛细管区带电泳、HPLC 与 LC-MS 相结合进行生物样品血清、尿液和粪便中淫羊藿苷及其代谢产物测定、HPLC 与 LC-MS 相结合进行肠内菌群代谢产物的测定简便易行^[6]。由于重现性、灵敏度尚有一些局限性, 毛细管电泳-MS 技术在中药代谢研究中的应用仍受到一定的限制。串联质谱技术因灵敏度高、专属性强、分析速度快, 正逐渐在药动学研究中发挥越来越大的作用。然而还需要进一步富集纯化样品, 并做 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 或 $^1\text{H-}^1\text{Hcosy}$ 全归属以完全归属代谢产物。

3 主要成分代谢产物

3.1 淫羊藿苷代谢产物

同位素示踪法发现标记的 ^3H -淫羊藿苷 48 h 内在肾上腺、肝脏以及肾脏分布明显高于其他器官, 脑组织中淫羊藿苷含量较低^[12]。有报道证实大鼠灌胃淫羊藿苷的主要代谢物为宝藿苷 I^[4,10-11,13-14]。淫羊藿苷的 LPH 酶酶解产物为宝藿苷 I。有报道对大鼠灌胃以淫羊藿苷 4 h 后检测出微量淫羊藿次苷 I 和宝藿苷 I, 而宝藿苷 I 为淫羊藿苷在肠道内的主要代谢产物, 并推断进入体内的宝藿苷 I 在肝脏发生 C₇-OH 葡萄糖醛酸化^[9]。刘健等^[6]对 SD 大鼠灌胃淫羊藿苷 LC-MS 分析得尿液和粪便样品中主要存在宝藿苷 I、淫羊藿素和去甲淫羊藿素, 离体培养大鼠肠内菌对淫羊藿苷的代谢实验中培养液中淫羊藿苷含量的下降与宝藿苷 I、淫羊藿素和去甲淫羊藿素含量的上升呈同步变化, 说明经肠内菌代谢为其可能的转化机制。体外孵育肠内容物与淫羊藿苷的混合物、淫羊藿苷与离体肠菌液共孵育、淫羊藿苷大鼠在体肠灌流和在大鼠肠道菌代谢实验结果均证明肠道菌群可迅速将淫羊藿苷代谢为宝藿苷 I^[7,10]。离体人肠道菌群中孵育 12 h 后淫羊藿苷被水解为淫羊藿素, 且伴随异戊烯基在 C₆ 和 C₈ 位异构体的产生^[11,26]。造成大鼠与人肠道菌实验结果差异的原因可能是大鼠与人肠道细菌在组成及相应的代谢酶种类上有不同。代谢途径及产物推测见图 1。

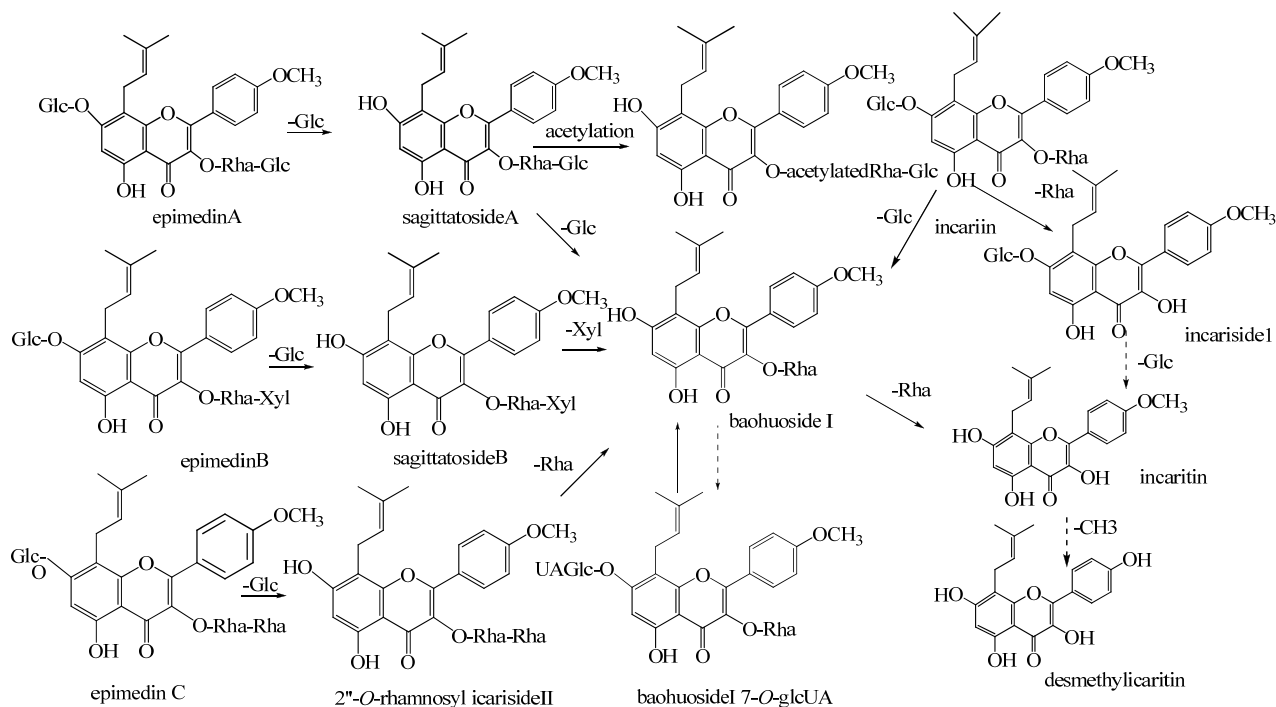


图 1 淫羊藿中主要活性成分在大鼠体内的代谢途径及产物推测

Fig. 1 Proposed metabolic pathways and metabolites of main active constituents from *Epimedii Herba* in rats in vivo

3.2 朝藿定 A、B、C 代谢产物

同等质量 4 个黄酮苷与离体肠菌液共孵育结果表明朝藿定 A、B、C 在离体肠菌作用下分别为脱掉 C₇ 位的葡萄糖基而转化为对应的次级苷，次级苷渗透性好，更利于收入血发挥药效；离体肠菌对同等质量的朝藿定 A、B、C 的代谢作用明显强于对淫羊藿苷的代谢作用^[7,15]。

3.3 其他产物

淫羊藿总黄酮中有多种成分在大鼠肠段会发生代谢转化^[10]，淫羊藿总黄酮苷能被家兔肠道菌群迅速水解成宝藿苷 I 和淫羊藿素^[25]。大鼠灌胃或静脉注射给予淫羊藿素后发现淫羊藿素给药后在体内主要以结合形式存在，生物利用度较低，主要通过粪便排泄，在血浆和尿样中可检测到双葡萄糖醛酸结合物 M1、单葡萄糖醛酸结合物 M2 和 M3，在粪便中仅检测到 M2 和 M3^[16,27]。大鼠给以淫羊藿次苷 I 尾静脉注射给药后以原型形式在心脏和肌肉组织有一定程度的蓄积^[39]。

4 结语

药物经代谢转化后，必须通过原药、代谢物的药理作用比较研究，才能确定产生药理作用是原药还是其代谢产物。因此探索淫羊藿活性成分的代谢产物，并评价其经历代谢前后的构效关系，明确药材淫羊藿主治功效的物质基础对阐明其作用机制、研制新药提供依据有直接指导意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 306-308.
- [2] 张国辉, 马辰. 黄酮类化合物药动学研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 582-585.
- [3] Chen Y, Wang J, Jia X, Tan X, *et al.* Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo [J]. *Molecules*, 2011, 16(2): 1336-1348.
- [4] 叶丽卡, 陈济民, 刘四海, 等. 淫羊藿苷在大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(1): 33-36.
- [5] Xu W, Zhang Y, Yang M, *et al.* LC-MS/MS method for the simultaneous determination of icariin and its major metabolites in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(4): 667-672.
- [6] 刘健, 楼宜嘉. 淫羊藿苷体内代谢行为及其代谢产物相关活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [7] 王亚乐, 贾晓斌. 淫羊藿黄酮苷类物理、生物转化及其机理研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2008.
- [8] Zhao Y H, Abraham M H, Le J, *et al.* Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption [J]. *Eur J Med Chem*, 2003, 38(3): 233-243.
- [9] 邱峰, 陈英杰, 鹿野美弘, 等. 淫羊藿苷在大鼠体内的代谢 [J]. 药学报, 1999, 34(3): 222-226.
- [10] 赵艳红, 贾晓斌. 主成分肠吸收代谢动力学研究淫羊藿炮制机理 [D]. 镇江: 江苏大学, 2007.
- [11] 刘铁汉, 王毅, 吴立军, 等. 淫羊藿苷的肠菌代谢研究 I. 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化 [J]. 中草药, 2000, 31(11): 834-837.
- [12] 邹节明, 孟杰, 彦正华, 等. 中药复方有效成分淫羊藿苷的药代动力学研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 55-58.
- [13] Zhang Y P, Xu W, Li N, *et al.* LC-MS-MS method for simultaneous determination of icariin and its active metabolite icariside II in human plasma [J]. *Chromatographia*, 2008, 68(3/4): 245-250.
- [14] Liu J, Lou Y J. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administration of icariin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 36(2): 365-370.
- [15] 吴彩胜, 周同惠. 淫羊藿有效成分分析及其体内代谢的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [16] 刘海培, 孟繁华, 郭继芬, 等. HPLC-MS/MS 法分析大鼠体内淫羊藿素葡萄糖醛酸结合物 [J]. 质谱学报, 2010, 31(6): 376-379.
- [17] 陈彦, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 大鼠在体肠灌注模型研究淫羊藿不同黄酮苷的吸收代谢 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2928-2931.
- [18] 蔡垠, 贾晓斌, 陈彦, 等. 大鼠原位单向肠灌注模型研究淫羊藿苷肠吸收代谢特性 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(13): 985-988.
- [19] Liu Y, Liu Y, Dai Y, *et al.* Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids. [J]. *J Altern Complement Med*, 2003, 9(5): 631-640.
- [20] Jeong E J, Jia X, Hu M. Disposition of formononetin via enteric recycling: metabolism and excretion in mouse intestinal perfusion and Caco-2 cell models [J]. *Mol Pharm*, 2005, 2(4): 319-328.
- [21] Chen Y, Zhao Y H, Jia X B, *et al.* Intestinal absorption mechanisms of prenylated flavonoids present in the heat-processed *Epimedium koreanum* Nakai (Yin Yanghuo) [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(9): 2190-2199.
- [22] 赵艳红, 贾晓斌, 陈彦. 淫羊藿黄酮类化合物的大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(3): 188-191.
- [23] 常琪, 王庚南, 李妍, 等. 淫羊藿素在大鼠体内的吸收与排泄 [C]. 2011 年中国药学会暨第 11 届中国药师周论文集, 烟台: 中国药学会, 2011.

- [24] 徐文, 张亚萍, 张卫东, 等. 离体大鼠肠道菌群对淫羊藿苷的代谢研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8(6): 98-100.
- [25] Yao Z H, Liu M Y, Dai Y, *et al.* Metabolism of Epimedium-derived flavonoid glycosides in intestinal flora of rabbits and its inhibition by gluconolactone [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(6): 461-465.
- [26] 刘晓燕, 郭瑞臣. 淫羊藿苷体内处置及代谢动力学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2009.
- [27] 张依, 姚志红, 秦子飞. LC-MS/MS 测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2012, 33(3): 305-310.
- [28] Shen P, Wong S P, Li J, *et al.* Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of five Epimedium prenylflavonoids in rat sera [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(1/2): 71-78.
- [29] Wong S P, Shen P, Lee L, *et al.* Pharmacokinetics of prenylflavonoids and correlations with the dynamics of estrogen action in sera following ingestion of a standardized Epimedium extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(2): 216-223.
- [30] 孟华, 王广基, 孙建国, 等. 体外及在体方法研究淫羊藿苷吸收特性和机制 [J]. 中国药理学通讯, 2004, 21(3): 45-46.
- [31] Liu M, Liu H, Lu X, *et al.* Simultaneous determination of icariin, icariside II and osthole in rat plasma after oral administration of the extract of Gushudan (a Chinese compound formulation) by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 860(1): 113-120.
- [32] Li F, Lu X, Liu H, *et al.* A pharmaco-metabonomic study on the therapeutic basis and metabolic effects of Epimedium brevicornum Maxim. on hydrocortisone-induced rat using UPLC-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(4): 397-405.
- [33] Gong Y, Yip S C, Thamarai S K, *et al.* Trace analysis of icariin in human serum with dansyl chloride derivatization after oral administration of Epimedium decoction by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 860(2): 166-172.
- [34] 邓桂凤, 姚彤伟. 七藿通窍片的质量分析及其代谢动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [35] Shen P, Wong S P, and Yong E. Sensitive and rapid method to quantify icaritin and desmethylicaritin in human serum using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 857(1): 47-52.
- [36] 赵春丽, 刘建芳, 刘会臣. 中药药物动力学研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2003, 19(2): 125-128.
- [37] Pozharitskaya O N, Karlina M V, Shikov A N, *et al.* Determination of icariin in rat plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography after oral administration of a lipid-based suspension of Epimedium koreanum extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(6): 625-629.
- [38] Cheng S, Qiu F, Wang S, *et al.* HPLC analysis and pharmacokinetics of icariin in rats [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(9): 1307-1312.
- [39] 刘子琛, 徐英, 陈世忠. 淫羊藿次苷 I 在大鼠体内的药动学和组织分布研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 43(11): 848-851.