

• 实验研究 •

去甲斑蝥素体外肝细胞代谢产物的 HPLC-MS 分析

王晓辉, 刘利萍, 李光远, 王 瑛, 高 萍*, 陶遵威, 胡人杰, 李毅敏

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: 目的 建立去甲斑蝥素体外肝细胞代谢产物的 HPLC-MS 分析方法。方法 去甲斑蝥素进行体外肝细胞代谢, 透析得到代谢产物, 并用 HPLC-MS 对产物进行鉴定, 再通过半制备 HPLC 色谱仪分离纯化, 最后根据理化性质和波谱数据鉴定代谢物的结构。结果 共分离得到 7 个化合物, 对其中量较高的 2 个化合物进行结构鉴定, 分别为去甲斑蝥素与谷氨酸结合物(1)、去甲斑蝥酸钠(2)。结论 体外细胞代谢法由于反应条件相对单纯, 易于控制, 适合于制备去甲斑蝥素体外肝细胞代谢产物。

关键词: 去甲斑蝥素; 斑蝥素; 去甲斑蝥素与谷氨酸结合物; 去甲斑蝥酸钠; 体外代谢; HPLC-MS

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)09-0965-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.09.002

Analysis of liver cell metabolites of norcantharidin *in vitro* by HPLC-MS

WANG Xiao-hui, LIU Li-ping, LI Guang-yuan, WANG Ying, GAO Ping, TAO Zun-wei, HU Ren-jie, LI Yi-min
Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To identify the liver cell metabolites of norcantharidin *in vitro* by HPLC-MS. **Methods** The norcantharidin metabolized by liver cell *in vitro*, then the metabolites were obtained by dialysis, and the metabolites were identified. Then they were separated and purified by semi-preparing HPLC. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectroscopic data. **Results** Seven compounds were separated and two compounds with higher contents were identified as combination of norcantharidin and glutamic acid (1), and sodium demethylcantharidate (2). **Conclusion** The reaction conditions of cell metabolism *in vitro* are relatively simple and easy to control, therefore the method is suitable for the preparation of liver cell metabolites of norcantharidin *in vitro*.

Key words: norcantharidin; cantharidin; combination of norcantharidin and glutamic acid; sodium demethylcantharidate; metabolism *in vitro*; HPLC-MS

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是斑蝥素的衍生物,与斑蝥素相比,其对泌尿系统的刺激性显著降低,并具有独特的升高白细胞总数的作用,也是我国首先合成的新型抗肿瘤药物^[1],其衍生物众多而且很多衍生物都表现出抗肿瘤活性^[2-4],去甲斑蝥素的药物化学和新型制剂研发工作也取得了巨大进展^[5-7]。但由于去甲斑蝥素自身化学性质活泼、代谢快速以及代谢产物的复杂性,导致其代谢机制

和代谢物的深入研究非常困难,限制了去甲斑蝥素的开发应用。

体外代谢研究可在新药研发早期利用候选化合物的体外代谢参数合理预测候选化合物的体内药动学行为,指导后期药效、药动以及安全性评价的模型选择,缩小体内研究的筛选范围,具有广阔的应用前景^[8]。利用细胞株对药物进行体外代谢研究的方法可以排除体内多种因素的干扰,为整体药物研

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 天津市卫生局科技基金项目(2012KY31)

作者简介: 王晓辉,男,研究方向为药物分析。Tel: (022)27236182 E-mail: wangtxh@126.com

*通信作者 高 萍(1964—),女,副研究员,研究方向为医用高分子材料研究及监测。Tel: (022)27236105 E-mail: gaopingcao@sina.com.cn

率低、毒性大以及缺少灵敏检测方法的药物来说,体外细胞代谢法更是首选的研究方法,体外细胞培养体系成分相对简单,物质明确,易于代谢途径推断,易于代谢物质富集、分离、纯化,有利于代谢物的进一步研究。本文通过研究去甲斑蝥素经肝细胞体外代谢后的产物,从而建立一套简单、快速的体外代谢方法,适用于药物代谢物研究。并用 HPLC-MS 对产物进行初步分析鉴定,再通过半制备高效液相色谱仪分离纯化,最后根据理化性质和波谱数据鉴定代谢物的结构。共分离得到 7 个化合物,对其中量较高的 2 个化合物进行结构鉴定,分别为去甲斑蝥素与谷氨酸结合物(1)、去甲斑蝥酸钠(2)。

1 材料

Legend Micro 17R 微量高速冷冻离心机 (Thermo Electron 公司); MCO-18AIC CO₂ 培养箱 (日本三洋电机株式会社); Tensor 27 傅里叶红外光谱仪 (德国布鲁克公司); Agilent 1100 高效液相色谱/质谱联用仪 (安捷伦科技有限公司); Bruker AVANCE III 600 MHz 液体核磁共振谱仪 (德国布鲁克公司); LC-6AD 型半制备液相色谱仪 (岛津国际贸易上海有限公司)。

去甲斑蝥素原料药 (批号 JZ130421A, 质量分数 99%, 南京景竹生物科技有限公司); DMEM 培养基 (批号 12800-027, 美国 Gibco 公司); 甲醇 (色谱级)。BRL 细胞 (中国科学院典型培养物保藏中心上海细胞库)。

2 方法与结果

2.1 体外代谢物的制备

将 BRL 细胞实验前 1 周复苏,以含 10% 牛血清的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养。取对数生长期细胞用于实验,用培养液将细胞密度调为 $7 \times 10^5/\text{mL}$,按 10 mL/瓶接种于培养瓶。培养 24 h 后加入去甲斑蝥素,使其最终质量浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续培养 48 h 后,收集细胞培养液,浓缩。使用相对分子质量 1 000 的透析袋对浓缩培养液进行透析,收集透析液进行浓缩、冻干,得到相对分子质量小于 1 000 的代谢物,加入一定量 20% 甲醇充分溶解,滤过,滤液浓缩、冻干,取少量冻干代谢物复溶作为待测样品。按照上述方法,制备不含去甲斑蝥素的空白对照样品。

2.2 体外代谢物的 HPLC-MS 初步分析

色谱条件:博纳艾杰尔 Venusil ASB HPLC 液相色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为纯化

水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱, 0~5 min, 15%B; 5~10 min, 25%B; 10~15 min, 40%B; 15~20 min, 60%B; 20~40 min, 75%B; 40~50 min, 75%~15%B; 体积流量 0.2 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL 。

质谱条件: Micro Mass ZMD 400 型电喷雾质谱仪, 色谱柱流出组分进入质谱仪的体积流量为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$; 正离子质谱条件: 毛细管电压 3.88 kV, 锥孔电压 53 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶温度 200 °C; 负离子质谱条件: 毛细管电压 3.76 kV, 锥孔电压 48 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶温度 200 °C。采用 Masslynx 分析软件进行数据采集与分析

按照上述条件对待测样品进行分离, 得到总离子质谱图和 HPLC 色谱图, 见图 1。

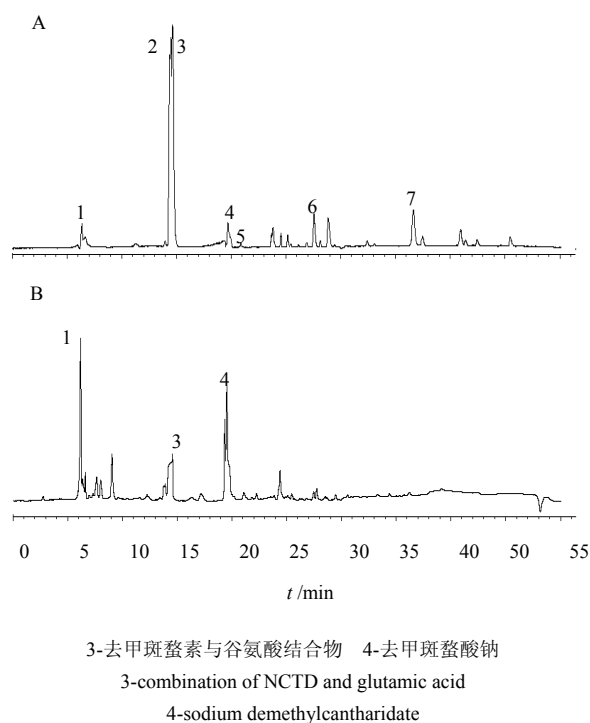


图 1 去甲斑蝥素体外代谢物的总离子质谱图(A)和 HPLC 色谱图 (B)

Fig. 1 Total ion mass spectra (A) and HPLC (B) of NCTD metabolites *in vitro*

通过与空白对照样品的质谱图比较,发现 7 个代谢产物,并获得这些代谢物的相对分子质量,见表 1。

2.3 体外代谢物的半制备 HPLC 纯化

2.3.1 色谱条件 博纳艾杰尔 Venusil ASB 半制备 HPLC 色谱柱 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm); 流动相为纯化水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱, 0~5 min, 15%B; 5~10 min, 25%B; 10~15 min, 40%B;

表1 NCTD 体外代谢物的质谱结果

Table 1 Mass-spectrum of NCTD metabolites *in vitro*

代谢物编号	t_R/min	离子	m/z	分子式
1	6.3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	261	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$
2	14.1	$[\text{M}-\text{H}]^-$	186	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_5$
3	14.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	297	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_7\text{N}$
4	19.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	368	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5\text{Na}_2$
5	21.3	$[\text{M}-\text{H}]^-$	315	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}$
6	28.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	279	$\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{N}$
7	36.5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	305	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}$

15~20 min, 60%B; 20~40 min, 75%B; 40~50 min, 75%~15%B; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 200 μL 。

2.3.2 代谢物的纯化 取得到的代谢物 10 g, 溶于 20% 甲醇 40 mL, 按照 2.3.1 项下色谱条件对代谢物进行分离制备, 收集制备液, 浓缩, 结晶, 得到代谢物 3、4 的单体分别为 14.2、8.4 mg, 收率为 23.7%、14.0%。

2.4 结构鉴定

代谢物 3: 白色无定型粉末。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 931.72 (C-O-C), 1 704.57 (C=O), 2 995.80 (COOH); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 4.87~4.84 (3H, m, H-1、4、9), 3.78 (2H, t, $J=6.4$ Hz, H-5、6), 2.38~2.22 (2H, m, H-11), 1.81~1.75 (1H, m, H-10), 1.69 (3H, dt, $J=13.3$ 、7.2 Hz, H-2、3、10), 1.59~1.55 (2H, m, H-2、3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ : 179.39 (C-12), 175.40 (C-7、8), 78.81 (C-1、4), 51.96 (C-5、6), 49.70 (C-9), 29.78 (C-11), 28.05 (C-2、3), 22.72 (C-10)。以上数据与文献报道^[9]基本一致, 确定代谢物 3 为去甲斑蝥素与谷氨酸结合物, 其结构见图 2。

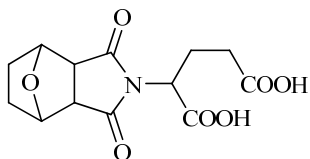


图2 代谢物3的结构式

Fig. 2 Structure of metabolite 3

代谢物 4: 白色针状结晶。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 997.08 (CH_2), 1 404.22 (C-O-C), 1 426.37 (O-C=O, vs), 1 606.52 (O-C=O, as), 3 421.64 (C-O-C); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 4.66 (2H, dd, $J=3.0$ 、2.4 Hz,

H-1、4), 2.81 (2H, s, H-5、6), 1.65~1.57 (2H, m, H-2、3), 1.52~1.43 (2H, m, H-2、3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ : 180.16 (C-7、8), 79.40 (C-1、4), 55.35 (C-5、6), 28.52 (C-2、3)。以上数据与文献报道^[10]基本一致, 确定代谢物 4 为去甲斑蝥酸钠, 其结构见图 3。

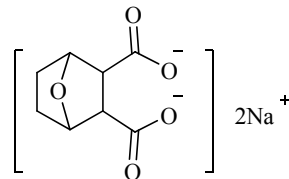


图3 代谢物4的结构式

Fig.3 Structure of metabolite 4

3 讨论

通过对色谱峰面积归一化法比较, 代谢物 3 的量很高, 说明该反应体系中结合酶活性很高, 导致体系中以结合反应为主, 生成谷氨酸酰胺化的结合物量高, 收率为 23.7%, 代谢物 4 的收率为 14.0%, 而氧化、还原酶系相对活性低, 所以其代谢物量少。DMEM 培养体系的成分明确, 便于代谢产物结构表征的推断确证, 其部分代谢物与 Wei 等^[11]发现的代谢物相似, 由于量较低, 不能进行结构表征确证, 有待进一步研究。因为谷氨酸量很高, 导致 NCTD 与谷氨酸结合物机率加大, 这是谷氨酸酰胺化的代谢产物生成较多的原因之一。

体外代谢的研究方法可以排除体内因素的干扰, 为整体实验提供可靠的理论依据。而普通肝细胞培养条件简单、细胞可无限增殖, 但细胞中的代谢酶活性较差, 表达量较低, 虽然 3-甲基胆蒎、利福平等可诱导相关代谢酶的表达, 但是酶的水平相较于原代培养肝细胞还有一定差距^[12]。但是外细胞株代谢法由于反应条件相对单纯, 易于控制, 适合于制备特定目标化合物。

参考文献

- [1] 李贺敏, 彭国平, 陈 农, 等. 新型斑蝥素羧酸衍生物的合成及其抗癌活性 [J]. 合成化学, 2013, 21(5): 518-521.
- [2] 余 涛, 刘曼曼, 侯风刚, 等. 去甲斑蝥素抗肿瘤分子机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(4): 73-75.
- [3] 杜恒飞, 于路佳, 蒙艳凤, 等. 去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2479-2483.
- [4] 吕鸿雁, 郝京生, 胡晓东, 等. 去甲斑蝥素增强马法兰抗

- 骨髓瘤作用机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 203-207.
- [5] 牛砚涛, 武冬雪, 董文娜, 等. 去甲斑蝥素新型制剂研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(9): 663-667.
- [6] 胡展红, 周 奕, 张学农. 乳糖化-去甲斑蝥素纳米粒的肝靶向抗癌活性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2005-2010.
- [7] 刘洪月, 杨 红, 吴秀凤, 等. 叶酸修饰去甲斑蝥素隐形泡囊的制备、表征及体外药效学评价 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(18): 2174-2178.
- [8] 吴 慧, 彭 英, 孙建国, 等. 体外代谢在新药早期评价中的应用与发展 [J]. 药学报, 2013, 48(7): 1071-1079.
- [9] 田少雷, 赵树伟, 朱爱堂, 等. 抗肿瘤药物研究 I: 去甲斑蝥素氨基酸衍生物的合成与抗癌活性 [J]. 药学报, 1993, 28(11): 870-875.
- [10] 孟祥军, 吕 洁, 齐 杰, 等. 去甲斑蝥酸钠的红外吸收光谱与质谱特征 [J]. 光谱实验室, 2005, 22(2): 379-381.
- [11] Wei C M, Teng Y N, Wang B J, *et al.* Separation and identification of norcantharidin metabolites *in vivo* by GC-MS method [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(4): 1741-1747.
- [12] Brandon E F, Raap C D, Meijerman I, *et al.* An update on invitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 189(3): 233-246.