

金莲花酚酸类成分的大鼠肝微粒体生物转化研究

王青青, 安燕南, 丁鹏敏, 刘斯琪, 王如峰*

北京中医药大学 生命科学院, 北京 102488

摘要: 目的 研究金莲花中酚酸类化合物在大鼠肝微粒体内的转化特征。方法 建立体外大鼠肝微粒体转化模型, 模拟金莲花中原金莲酸、金莲花苷、藜芦酸在大鼠肝脏内的代谢过程, 采用液相色谱质谱联用 (LC-MS) 法对代谢成分进行检测和分析。结果 在大鼠肝微粒体的作用下, 原金莲酸转化为1个产物, 分子式为 $C_{19}H_{23}O_{10}$, 推测为原金莲酸的葡萄糖醛酸化反应产物; 金莲花苷转化为2个产物, 分别为 $C_{25}H_{36}O_{14}$ 和 $C_{18}H_{24}O_9$, 推测分别为增加1糖基和脱甲基生成的转化产物; 藜芦酸转化为1个产物, 分子式为 $C_8H_8O_4$, 推测2种结构, 各为脱掉1个甲基的产物。结论 金莲花酚酸类化合物在大鼠肝微粒体中主要发生脱甲基化、糖苷化、葡萄糖醛酸化反应, 为明确金莲花酚酸类成分的体内转化规律和代谢特征提供依据。

关键词: 金莲花; 酚酸类; 生物转化; 肝微粒体; 液相色谱质谱联用 (LC-MS); 原金莲酸; 金莲花苷; 藜芦酸

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 01-0082-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.014

Rat liver microsomal metabolism of phenolic acids from the flowers of *Trollius chinensis*

WANG Qingqing, AN Yannan, DING Pengmin, LIU Siqu, WANG Rufeng

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the metabolic characteristics of phenolic acids from the flowers of *Trollius chinensis* in rat liver microsomes. **Methods** The rat liver microsomal transformation model was established *in vitro* to simulate the metabolic process of proglobeflowery acid, trollioside, and veratric acid in rat liver. LC-MS method was employed to detect and analyze the metabolic components. **Results** Under the action of rat liver microsomes, proglobeflowery acid was transformed into one product, with the molecular formula of $C_{19}H_{23}O_{10}$, which was supposed to be the glucuronization reaction product of proglobeflowery acid. Trollioside was transformed into two products, $C_{25}H_{36}O_{14}$ and $C_{18}H_{24}O_9$, which were supposed to be the transformation products after adding one glycosyl group and removing one methyl group, respectively. Veratric acid was transformed into one product, with the molecular formula of $C_8H_8O_4$, which was supposed to have two structures. It is supposed to be the product of removing one methyl group. **Conclusion** Glucuronidation, demethylation and glycosylation are mainly involved in the rat liver microsomal transformation of phenolic acids from the flowers of *Trollius chinensis*. It provides a basis for the characterization of metabolic profiling of the phenolic components from the flowers of *Trollius chinensis*.

Key words: *Trollius chinensis*; phenolic acids; biotransformation; liver microsomes; LC-MS; proglobeflowery acid; trollioside; veratric acid

金莲花为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花, 分布于河北、山西、内蒙和东北等地^[1], 具有清热解毒、消肿明目的功效^[2], 用以治疗呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎和支气管炎^[3]。金莲花化学成分明确, 主要含黄酮、酚酸和生物碱等成分。其中, 酚酸类成分大多是苯甲酸的衍生物, 这类化合物又可分为两类。其中一类由于甲

基化和糖基化而没有游离的羟基, 如藜芦酸^[4]、苯甲酸^[5]、金莲酸、金莲花苷^[6]; 另一类有游离的羟基, 如香草酸、原金莲酸和3,4-二羟基苯甲酸甲酯^[7]。金莲花酚酸类成分具有抗菌、抗炎、抗病毒活性。原金莲酸、藜芦酸和金莲花苷对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌有一定的抑制作用^[8], 金莲花苷和藜芦酸都有抗炎作用^[9], 原金莲酸对3型副流感病毒有

收稿日期: 2019-09-07

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7172129)

*通信作者: 王如峰, 教授, 研究方向为中药化学。E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

很好的抑制作用^[10-11]。

越来越多的证据表明,中药化学成分的体内代谢对其功效有重要影响。肝脏是药物代谢的主要器官,在肝微粒体、线粒体及胞浆中均有参与药物代谢的酶类,其中细胞色素P450酶与药物代谢的关系最为密切^[12]。目前肝微粒体体外温孵法在肝脏代谢研究中应用较广泛,该方法通过在肝微粒体中加入还原型辅酶II(NADPH)来体外模拟生理环境下的代谢反应^[13]。NADPH是肝微粒体中发生I相代谢的重要中间供能体,是I相代谢不可缺少的辅助因子。因此,肝微粒体体外温孵法是研究肝代谢的理想体外方法。除此之外,该方法还具有制备方法简单成熟、代谢条件可控、重现性好、易于操作和便于代谢产物的积累和分离等特点。鉴于此,本研究采用体外大鼠肝微粒体转化模型及液相色谱质谱联用(LC-MS)法,对金莲花中3个主要酚酸类化合物进行了模拟肝代谢研究。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(Waters公司); Thermo LTQ ORBITRAP XL 质谱仪(Thermo公司); 匀浆器(德国IKA); 超速离心机CP100WX(日本株式会社日立制作所); 氮吹仪(北京市优晟联合科技有限公司); AE240十万分之一电子天平(Mettler公司); 涡旋混匀器(海门市气林贝雨仪器厂); 水浴振荡器(金坛市华立实验仪器厂)。

氧化型辅酶II(NADP)、还原型辅酶I(NADH)、葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)均购于Sigma公司; 二巯苏糖醇(DTT)购于北京拜尔迪生物技术有限公司; 苯巴比妥钠注射液购于中国中医科学院望京医院; 氯化钾、氯化镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、乙二胺四乙酸二钠、乙酸乙酯、甲醇、乙腈均购于北京高华伟业食品添加剂有限公司; Folin-酚试剂盒购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 金莲花酚酸类化合物均为本实验室分离得到的单体化学成分,3个化合物结构如图1所示。

1.2 实验动物

清洁级SD大鼠,20只,体质量(220±20)g,由北京大学医学部实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2006-0008。

2 方法

2.1 肝微粒体制备

20只SD大鼠ip苯巴比妥钠生理盐水溶液(80 mg/kg),连续3 d,禁食12 h,自由饮水。于

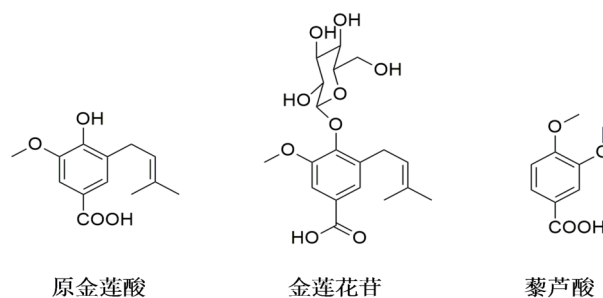


图1 3个酚酸类化合物的结构式

Fig. 1 structural formula of three phenolic acids

第4天脱颈椎处死,快速剖取大鼠肝脏,用4℃的磷酸盐缓冲液I冲洗,再用滤纸吸干残余缓冲液,称肝质量。将肝组织剪成小碎块,按质量体积比1:3加入50 mmol/L磷酸盐缓冲液,用电动匀浆器匀浆。然后将匀浆液置于4℃、12 500×g条件下离心15 min。取上清液再于105 000×g条件下离心70 min,沉淀部分即为肝微粒体^[14]。将肝微粒体沉淀重悬浮于磷酸盐缓冲液II中,分装,于-80℃低温冰箱中贮存^[15-16]。

2.2 肝微粒体总蛋白浓度测定

按Lowry法,测定大鼠肝微粒体中蛋白浓度,以梯度浓度的牛血清白蛋白(BSA)作标准液,测定吸光度(A)值,并制作浓度-A值标准曲线,得到回归方程 $Y = 0.968 1X + 0.033 9$, $r = 0.999 1$,线性范围为0.025~0.25 mg/mL。以1 mL水溶液代替样品作为空白对照,根据上述结果计算,所制备的肝微粒体蛋白浓度为22.8 mg/mL。

2.3 肝微粒体CYP450酶含量及活性测定

采用CO还原差示光谱法测定CYP450酶含量^[15],所测CYP450蛋白的浓度为0.55 nmol/mL。根据CYP450酶能氧化氯唑沙宗生成6-羟基氯唑沙宗的原理进行活性验证,用HPLC测定转化后样品^[17],从而间接地证明所制备的肝微粒体具有CYP450酶活性。

2.4 肝微粒体模型体外转化实验

采用酶法再生辅酶NADPH系统,用磷酸盐缓冲液配制辅酶体系,再适量称取各单体化合物,溶于0.6 mL磷酸盐缓冲液中,即为底物化合物原液。在配制的辅酶体系中定量加入肝微粒体(灭活组:将肝微粒体于80℃水浴加热处理10 min),摇匀后,37℃水浴中温孵5 min,定量加入底物化合物开始反应,实验反应体系见表1。反应120 min后加入等量预冷的乙酸乙酯终止反应。

2.5 LC-MS分析

2.5.1 样品预处理 将反应终止后的样品在16 162×g离心10 min除去肝微粒体,加等量乙酸乙酯萃取3

表1 肝微粒体模型体外代谢反应体系

Table 1 *in vitro* metabolic reaction system of liver microsome model

组别	体积/mL				总体积
	辅酶体系	肝微粒体	底物化合物原液	磷酸盐缓冲液	
空白对照	1	0.2	0	0.2	1.4
灭活对照	1	0.2	0.2	0	1.4
转化	1	0.2	0.2	0	1.4
阴性对照	0	0	0.2	1.2	1.4

次,合并乙酸乙酯层,氮气吹干。再加入1 mL 甲醇超声溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤,待 HPLC-LTQ Orbitrap MS 检测。

2.5.2 色谱/质谱条件 Phenomenex 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μm),流动相乙腈-水,体积流量1.0 mL/min,进样量10 μL ,各组待测样本分别按照相应的流动相比比例梯度洗脱。

Thermo LTQ Orbitrap XL 质谱仪,Accela 600 泵,电喷雾离子源(ESI),正负离子扫描模式,扫描范围 m/z 100~800。毛细管温度350 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压-35 V,气化温度300 $^{\circ}\text{C}$ 。

3 结果

根据肝微粒体转化组与各对照组的 LC-MS 结果,推测出酚酸类化合物的可能转化产物,对各产物的一级质谱和二级质谱碎片信息进行分析,总结化合物的质谱裂解规律,并推测转化产物的转化途径。

3.1 原金莲酸

原金莲酸,分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$,相对分子质量为236,LC-MS 测定结果见图2,其保留时间为12.60 min,准分子离子峰为 m/z 237.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。二级碎片 m/z 193.06 $[\text{M}-\text{COO}+\text{H}]^+$ 即为 $[\text{M}+\text{H}-44]^+$,碎片 m/z 222.06 $[\text{M}-\text{CH}_3+\text{H}]^+$ 即为 $[\text{M}+\text{H}-15]^+$,碎片 m/z 180.95 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$ 即为 $[\text{M}+\text{H}-56]^+$,碎片 m/z 136.97 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{COO}+\text{H}]^+$ 即为 $[\text{M}+\text{H}-56-44]^+$ 。碎片 m/z 121.97 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2+\text{H}]^+$ 即为 $[\text{M}+\text{H}-115]^+$,推测其断裂方式如图3所示。该化合物经大鼠肝微粒体转化检测到1个转化产物。

转化产物1,分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$,相对分子质量为411,准分子离子峰为 m/z 412.29 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。LC-MS 测定结果如图4所示,保留时间11.07 min,推测为原金莲酸的葡萄糖醛酸化反应产物。葡萄糖醛酸与原金莲酸的酚羟基或羧基缩水结合,其转化途径见图5。

3.2 金莲花苷

金莲花苷,分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_9$,相对分子质量为398,LC-MS 测定结果如图6所示,其保留时间为13.72

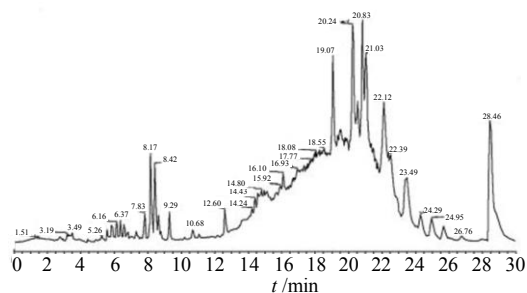


图2 原金莲酸的LC-MS总离子流图

Fig. 2 LC-MS total ion current of proglobeflowery acid

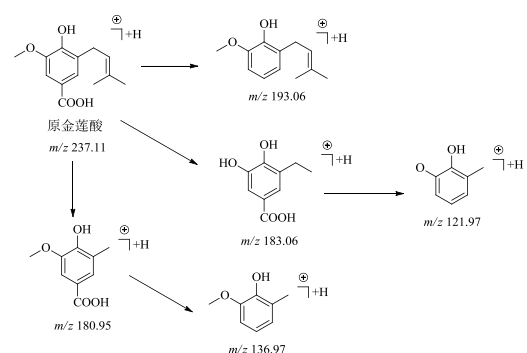


图3 原金莲酸的质谱断裂途径

Fig. 3 mass spectrum fracture pathway of proglobeflowery acid

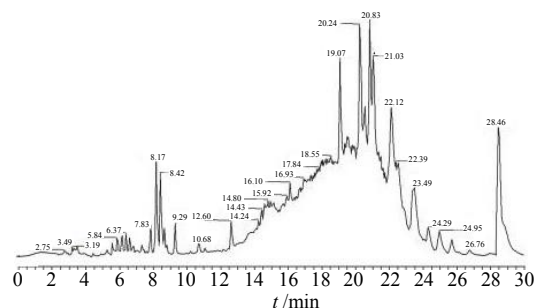


图4 原金莲酸转化产物的LC-MS总离子流图

Fig. 4 LC-MS total ion current of transformation product of proglobeflowery acid

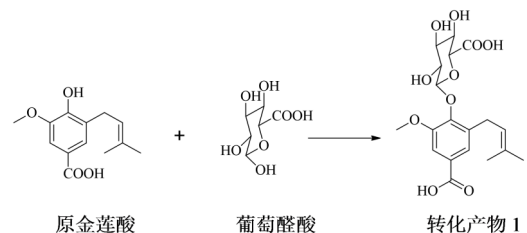


图5 原金莲酸的转化途径

Fig. 5 transformation pathway of proglobeflowery acid

min,准分子离子峰为 m/z 397.15 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。二级碎片 m/z 235.05 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}]^-$ 即为 $[\text{M}-\text{H}-162]^-$,碎片 m/z 220.09 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CH}_3-\text{H}]^-$ 即为 $[\text{M}-\text{H}-162-15]^-$,碎片 m/z 191.05 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{COO}-\text{H}]^-$ 即为

$[M-H-162-44]^-$, 碎片 m/z 176.04 $[M-C_6H_{10}O_5-CH_3-COO-H]^-$ 即为 $[M-H-162-15-44]^-$ 。推测其断裂方式如图7所示。该化合物经大鼠肝微粒体转化后检测到2个转化产物,但其提取离子流图的信号强度都很低,无二级质谱,可能因为其转化量太少或者不易出峰所致。

转化产物2,分子式为 $C_{25}H_{36}O_{14}$, 相对分子质量为560,准分子离子峰为 m/z 559.20 $[M-H]^-$ 。LC-MS测定结果如图8所示,保留时间12.69 min,推测其为增加1糖基而生成的转化产物,转化途径如图9所示。

转化产物3,分子式为 $C_{18}H_{24}O_9$, 相对分子质量为384,准分子离子峰为 m/z 383.13 $[M-H]^-$ 。LC-MS测定结果如图10所示,保留时间为13.90 min,推测为其脱甲基生成的转化产物,转化途径如图9所示。

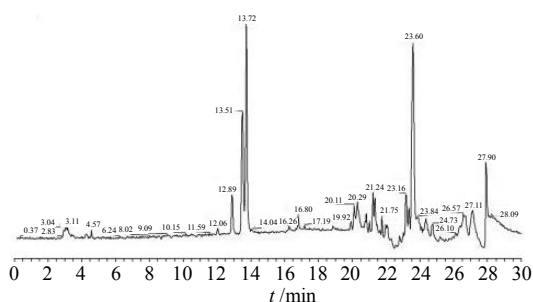


图6 金莲花苷的LC-MS总离子流图

Fig. 6 LC-MS total ion current of trolloside

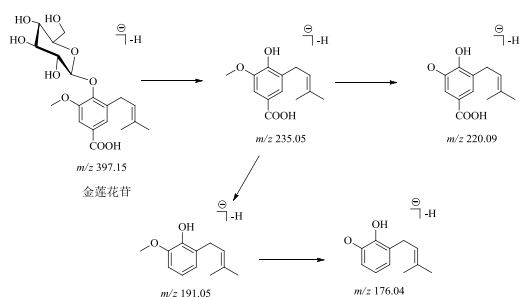


图7 金莲花苷的质谱断裂途径

Fig. 7 mass spectrum fracture pathway of trolloside

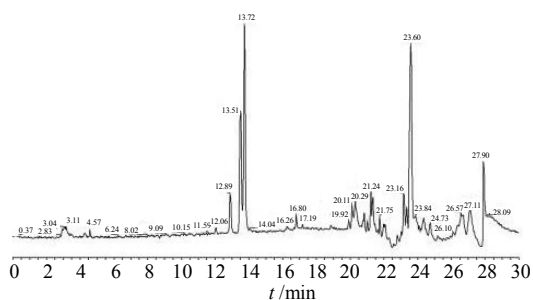


图8 金莲花苷转化产物1的LC-MS总离子流图

Fig. 8 LC-MS total ion current of trolloside transformation product 1

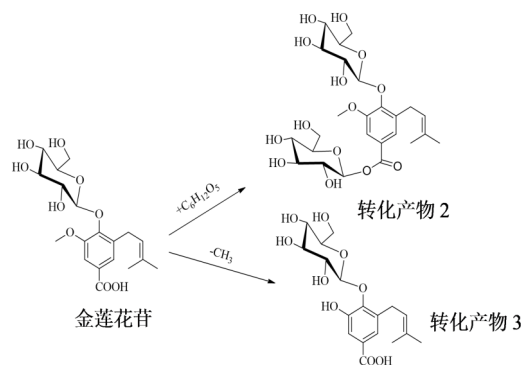


图9 金莲花苷的转化途径

Fig. 9 transformation pathway of trolloside

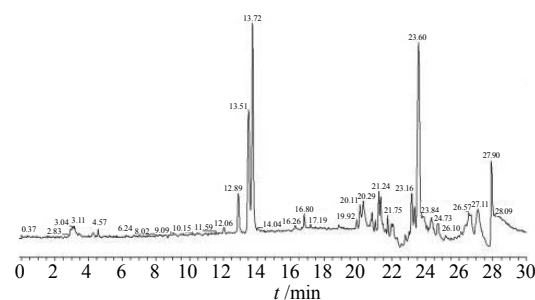


图10 金莲花苷转化产物2的LC-MS总离子流图

Fig. 10 LC-MS total ion current of trolloside transformation product 2

3.3 藜芦酸

藜芦酸,分子式为 $C_9H_{10}O_4$, 相对分子质量为182, LC-MS测定结果如图11所示,其保留时间为9.98 min,准分子离子峰为 m/z 181.05 $[M-H]^-$ 。二级碎片 m/z 136.96 $[M-COOH-H]^-$ 即为 $[M-H-44]^-$, 碎片 m/z 165.97 $[M-CH_3-H]^-$ 即为 $[M-H-15]^-$, 碎片 m/z 107.08 $[M-COO-CH_2-H]^-$ 即为 $[M-H-74]^-$ 。推测藜芦酸断裂方式如图12所示。藜芦酸经肝微粒体转化后检测到1个转化产物,LC-MS结果如图13所示。

转化产物的分子式为 $C_8H_8O_4$, 相对分子质量为168,保留时间为7.93 min,准分子离子峰为 m/z 167.03 $[M-H]^-$ 。其二级碎片 m/z 122.89 $[M-COO-H]^-$ 即为 $[M-H-44]^-$, m/z 151.91 $[M-CH_3-H]^-$ 即为 $[M-H-15]^-$, m/z 107.96 $[M-COO-CH_2-H]^-$ 即为 $[M-H-59]^-$, m/z 93.07 $[M-COO-OCH_2-H]^-$ 即为 $[M-H-74]^-$ 。推测该转化产物是藜芦酸脱掉1个甲基的产物,杂原子脱烷基化是肝微粒体常见的生物转化反应之一。由于藜芦酸有两个 $-OCH_3$,故其脱甲基的位置不能确定,推测其转化途径如图14所示。

4 讨论

金莲花中酚酸类化合物比如藜芦酸、金莲花苷、原金莲酸的苯环上常含有甲氧基,在大鼠肝微

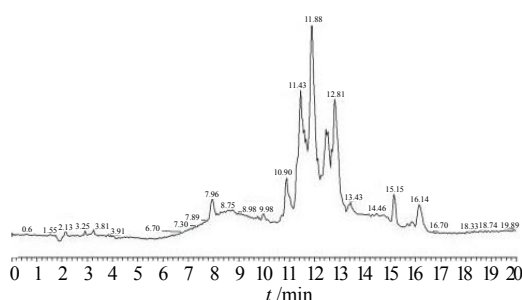


图 11 藜芦酸的LC-MS总离子流图

Fig. 11 LC-MS total ion current of veratric acid

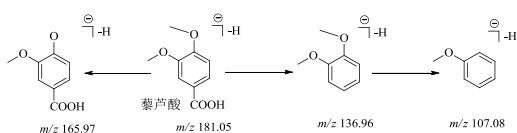


图 12 藜芦酸的质谱断裂途径

Fig. 12 mass spectrum fracture pathway of veratric acid

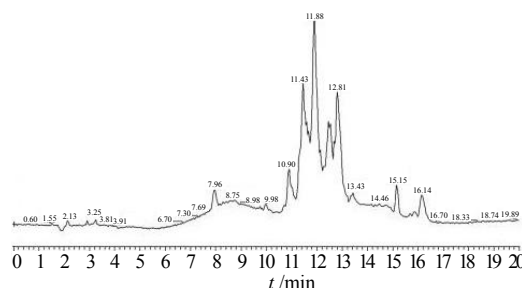


图 13 藜芦酸转化产物的LC-MS总离子流图

Fig. 13 LC-MS total ion current of veratric acid transformation products

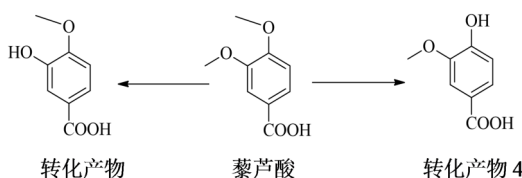


图 14 藜芦酸的转化途径

Fig. 14 transformation pathway of veratric acid

粒体的作用下,其甲基容易脱去。藜芦酸和金莲花苷都发生了脱甲基反应形成酚羟基。由于藜芦酸有两个 $-OCH_3$,而只检测到了一个脱去一甲基的转化产物,因此脱甲基的位置不能确定。金莲花苷除了发生脱甲基反应之外,还发生了苯环上酚羟基或糖上醇羟基的糖苷化反应。然而,原金莲花酸苯环上的甲氧基并没有发生脱甲基反应,而是其他位置发生了葡萄糖醛酸化反应。由此可见,脱烷基化、糖苷化和葡萄糖醛酸化是金莲花中酚酸类化合物大鼠肝微粒体生物转化的常见反应,通过这些反应增大了化合物的极性,有利于其排泄,从而缩短化合物在体内的滞留时间,降低其毒性。同时,也可能

进一步产生活性成分,增强药效。本研究探讨了金莲花酚酸类化合物的大鼠肝微粒体转化规律,明确了其主要转化途径及转化产物,为进一步研究金莲花的活性成分奠定了基础。

参考文献

- [1] 赫玉芳,吕娜,南敏伦,等. 短瓣金莲花研究进展 [J]. 中国医药科学, 2016, 6(9): 28-31.
- [2] 曹欣欣,王书华. 金莲花药理活性及临床应用研究进展 [J]. 神经药理学, 2014, 4(4): 59-64.
- [3] 郭丽娜. 金莲花三类成分的血清药物化学及血清药理学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [4] 任晓蕾,霍金海,孙国东,等. 短瓣金莲花化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3475-3481.
- [5] 严力群,朱殿龙,丁万隆. 金莲花和短瓣金莲花茎叶中总黄酮含量的动态测定 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(9): 12-13.
- [6] 刘颖,王如峰,袁铭,等. HPLC测定金莲花中金莲花苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 75-77.
- [7] Yuan M, Wang R F, Wu X W, et al. Investigation on *Flos Trollii*: constituents and bioactivities [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(5): 449-455.
- [8] 赵灿,杜娜娜,郭丽娜,等. 金莲花总黄酮和总酚酸的抗炎活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(11): 2634-2638.
- [9] 王如峰,唐迪,吴秀稳,等. 金莲花中四种主要成分的抗炎活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2115-2116.
- [10] Li Y L, Ma S C, Yang Y T, et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 79(3): 365-368.
- [11] 林秋凤,冯顺卿,李药兰,等. 金莲花抑菌抗病毒活性成分的初步研究 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2004, 31(4): 412-415.
- [12] 向云亚. 6-姜酚在大鼠肝微粒体中的代谢研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [13] 张德昌. 医学药理学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 96.
- [14] 乔姗姗,郑时奇,方明月,等. 肝微粒体和肝S9转化藜芦酸葡萄糖酯比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 60-63.
- [15] 朱曼,王睿,张永青,等. 大鼠肝微粒体细胞色素P450酶系检测方法学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 500-503.
- [16] 郭炜. 盐酸双苯氟嗪在大鼠肝微粒体内的代谢特征研究 [D]. 河北: 河北医科大学, 2011.
- [17] 李飞,杨秀伟,程燕,等. 肉豆蔻木脂素的体外代谢初步研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 17(7): 560-564.