

加受损细胞的 PI。由此可见 TP 对 H_2O_2 所致 PC12 细胞损伤具有保护作用。但是 TP 抑制 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Chen H X, Zhang M, Xie B J. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea [J]. *Food Chem*, 2005, 90(1-2): 17-21.
- [2] 刘 俐, 隋丽华, 韩国柱, 等. 茶多酚乳膏治疗重症痤疮的临床疗效观察 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1448-1449.
- [3] Rajesh L, Anoop K, James W, et al. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1-2): 232-241.
- [4] 卢 敏. 茶多糖的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 67-69.
- [5] Nie G, Jin C, Cao Y, et al. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397: 84-90.
- [6] 陈继英, 郭嘉林, 张存彦, 等. 茶多酚的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 11-附 13.
- [7] Li Q S, Zou L L, Fu T, et al. Excretion of four catechins in tea polyphenols in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 59-65.
- [8] Lu J H, Guo J, Yang W H. Effect of green tea polyphenol on the behavior of Alzheimer's disease like mice induced by D-galactose and A β (25~35) [J]. *J Chin Med Mater*, 2006, 37(3): 251-254.
- [9] Cho E S, Jang Y J, Kang N J, et al. Cocoa procyanidins attenuate 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by directly inhibiting mitogen-activated protein kinase 4 activity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46: 1319-1327.
- [10] Katakura M, Hashimoto M, Shahdat H M, et al. Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells [J]. *Neurosci*, 2009, 160: 651-660.
- [11] 丁银秀, 田建英, 马江波. EGCG 对体外培养的胚鼠皮层神经细胞的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 105-108.
- [12] Silva J P, Gomes A C, Coutinho O P. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 601: 59-60.

咖啡酸在大鼠体内两个葡萄糖醛酸结合物的分离与鉴定

魏 玲^{1,3}, 周茂金^{2,4}, 张铁军³, 侯文彬³, 王丽莉³, 许 浚³

(1 天津医科大学, 天津 300070; 2 天津药物研究院 药效与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193;

3 天津药物研究院, 天津 300193; 4 山东省泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

摘 要: 目的 研究咖啡酸在大鼠体内的代谢, 并对咖啡酸在大鼠尿中两个葡萄糖醛酸结合物进行分离及结构鉴定。方法 大鼠按 100 mg/kg ig 给予咖啡酸后收集尿样, 以 LG-MS/MS 方法分析追踪代谢产物, 采用大孔树脂、ODS 开放柱、Sephadex LH-20 和制备型高效液相色谱分离代谢产物。结果 给药后尿样中检测到 4 种二相代谢产物, 分别为 2 个咖啡酸葡萄糖醛酸结合物和 2 个咖啡酸硫酸结合物。结论 咖啡酸在大鼠体内广泛代谢, 首次采用分离方法获得 2 个咖啡酸葡萄糖醛酸结合物, 并对其结构进行了鉴定。

关键词: 咖啡酸; 代谢; 咖啡酸-3-O- β -D-葡萄糖醛酸; 咖啡酸-4-O- β -D-葡萄糖醛酸

中图分类号: R285.51

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0949-04

咖啡酸 (caffeic acid, 3,4-二羟基肉桂酸) 属于酚酸类化合物, 存在于小蓟、金银花、杜仲、牛至、茵陈、蒲公英等多种药用植物中。研究表明咖啡酸具有广泛生物学活性, 如抗氧化^[1,2]、抗病毒^[3]、降血压^[4]、降血糖^[5]等。由于其多效低毒的特性, 在医药领域受到越来越多的关注。国内外关于咖啡酸代谢方面的研究也日趋增多。已有学者^[6,7]给大鼠 ig 咖啡酸后通过 LC/MSⁿ 方法在尿样中检测到了咖啡酸葡萄糖醛酸结合物、咖啡酸硫酸结合物、咖啡酸甲基化代谢产物 (阿魏酸和异阿魏酸) 及其葡萄糖醛酸

和硫酸结合物等。Azuma 等^[8]测定酶水解前后大鼠血浆中咖啡酸的浓度, 结果表明咖啡酸主要以葡萄糖醛酸和硫酸结合物形式存在, 其中葡萄糖醛酸结合物的浓度最高。但已有的研究^[6,7]只是根据质谱断裂规律推测了这些代谢产物的结构, 并没有对这些代谢产物的结构进行确认。为进一步研究咖啡酸在大鼠体内的代谢, 本研究采用 LG-MS/MS 分析追踪主要代谢产物, 用大孔树脂、ODS 等开放柱色谱及制备型高效液相色谱对其进行分离, 从大鼠尿中获得两个葡萄糖醛酸结合物, 并通过波谱学手

①收稿日期: 2009-12-29

作者简介: 魏 玲 (1984-), 女, 天津人, 硕士, 研究方向为天然药物体内代谢研究。

Tel: 15902262960 E-mail: sincereweilin@163.com

段对其结构进行鉴定。

1 仪器与材料

Finnigan LCQ advantage max 型液质联用仪 (美国 Thermo Quest 公司), 560 型红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司), KBr 压片; 1601 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); AV-400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); IONSPEC 7.0T FTICR 型高分辨质谱仪 (美国瓦里安公司), 创新通恒制备型高效液相色谱仪 (北京创新通恒科技有限公司), 大孔树脂 HPD-100 (沧州宝恩化工有限公司), ODS 填料 (天津博瑞键合色谱技术有限公司), Sephadex LH-20 (美国通用电气公司)。

咖啡酸 (质量分数 98%, 天津金测分析技术有限公司), 甲醇 (色谱纯), 其他试剂为分析纯, 均购于天津康科德科技有限公司。

SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 250~300 g, 由中国协和医科大学放射医学研究所提供。

2 方法

2.1 LG-MS/MS 方法测定二相代谢物: 两只大鼠按 100 mg/kg ig 给予咖啡酸, 收集 0~4 h 尿样, 取适量尿样加入等量乙腈, 涡旋震荡 1 min, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 吸取续滤液 20 μL 进行 LG-MS/MS 分析。

2.2 色谱及质谱条件: Welch 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-1% 冰醋酸 (20:80), 体积流量: 0.4 mL/min, 检测波长: 320 nm, 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱采用 ESI 负离子方式监测, ESI 源电压为 3.5 kV, 毛细管温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电流为 80.0 μA , 鞘气 (N_2) 体积流量为 30.0 arb, 载气 (N_2) 体积流量为 6.0 arb, 毛细管电压为 32.0 V, 管透镜补偿电压为 55.0 V。

2.3 动物实验: 20 只 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 250~300 g, 固定于代谢笼中, 按 100 mg/kg 剂量 ig 给予咖啡酸, 每天 ig 两次, 收集 0~12 h 尿样, 持续给药两周。将收集的尿样离心除去残渣, 冰箱中冷冻保存, 待分离用。

2.4 代谢产物的制备: 将尿样约 800 mL 加入 3 倍量甲醇沉淀蛋白等杂质, 上清液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下浓缩至约 400 mL, 用 10% 盐酸调节 pH 值至 3, 用相当 2 倍体积尿样的 HPD100 大孔树脂柱处理, 依次用水、40% 乙醇、95% 乙醇洗脱, 其中 40% 乙醇洗脱部分上样 ODS 开放柱色谱, 依次用水、3% 甲醇、5% 甲醇、10% 甲醇、20% 甲醇、30% 甲醇洗脱, 其中 5% 甲醇洗脱部分经 Sephadex LH-20 柱色谱反

复纯化后得到代谢物 I (20 mg), 3% 甲醇洗脱部分经制备型高效液相色谱纯化后得到代谢物 II (15 mg)。

3 结果

3.1 二相代谢物的 LG-MS/MS 方法测定: 大鼠 ig 给药后 0~4 h 尿样总离子流色谱图 (图 1) 中发现除原形药 (M0) 准分子离子 m/z 179 外, 还发现准分子离子 m/z 355 的代谢物 I (M1)、II (M2) 和准分子离子 m/z 259 的 III (M3)、IV (M4)。根据代谢物 I、II、III、IV 的二级扫描质谱图 (图 2) 推测 I、II 为咖啡酸的葡萄糖醛酸结合物, III、IV 为咖啡酸的硫酸结合物^[6,7]。

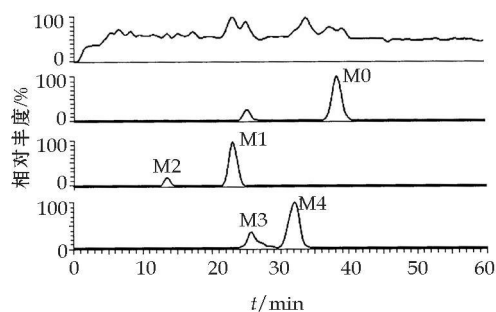


图 1 大鼠 ig 咖啡酸 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后 0~4 h 尿中原形药及其代谢物 I~IV 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of M0 and its metabolites I~IV in rat urine 0~4 h after ig caffeine acid ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

3.2 代谢产物结构鉴定

代谢物 I: 白色无定形粉末: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 395 ($-\text{OH}$), 1 687 ($\text{C}=\text{O}$)。由一级全扫描质谱分析 m/z : 355 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$, 比原形药咖啡酸相对分子质量多 176, 二级全扫描质谱分析中, 可得碎片离子 m/z 179, 脱去一分子葡萄糖醛酸基, 表明其为咖啡酸葡萄糖醛酸结合物。由 HR-ESI-MS m/z : 355.062 1 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$ 。从 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 推得葡萄糖醛酸的存在 [端基 H δ_{H} 5.03, 1H, d, $J=6.8 \text{ Hz}$; δ_{C} 101.4 (G-1'), 72.9 (G-2'), 75.4 (G-3'), 71.8 (G-4'), 76.4 (G-5'), 173.8 (G-6')]。代谢物 I 苷元结构的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与咖啡酸^[7] 是一致的 (表 1)。HMBC 谱 (图 3) 显示糖醛酸的端基质子 δ_{H} 5.03 与 G-3 (δ_{C} 145.6) 有远程相关性, 推测咖啡酸与葡萄糖醛酸的连接位置在 G-3 上。根据 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HSQC、HMBC 谱信号, 并参考文献 [9], 最终确定代谢物 I 的结构为咖啡酸-3- α -D-葡萄糖醛酸。

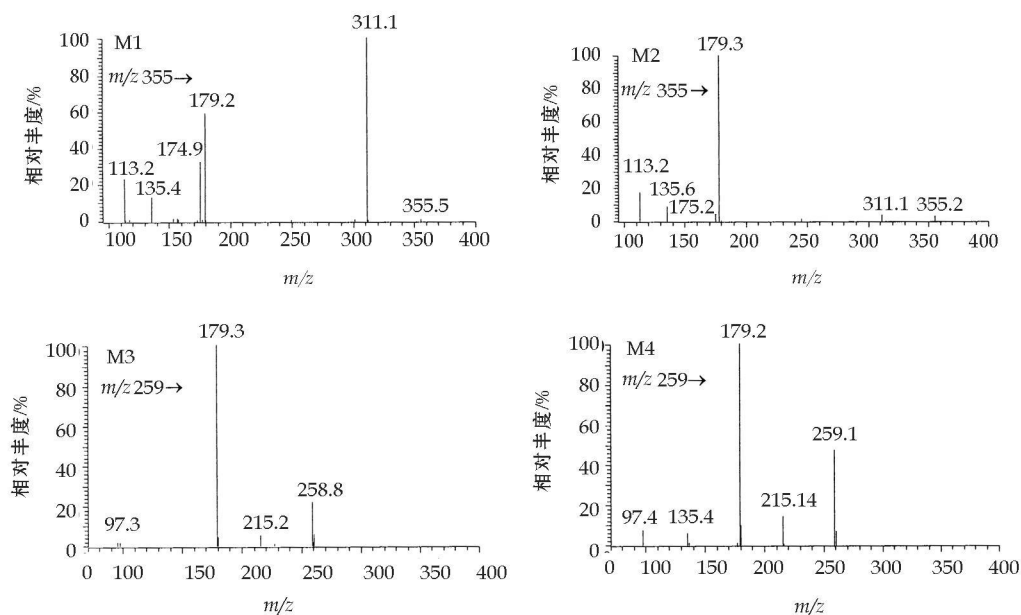


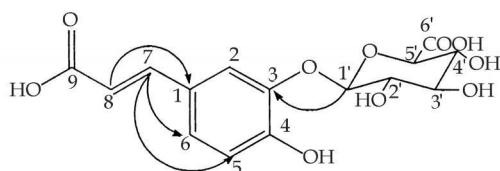
图 2 代谢物 I ~ IV 的二级全扫描质谱图

Fig. 2 Mass spectra of $[M-H]^-$ of metabolites I — IV

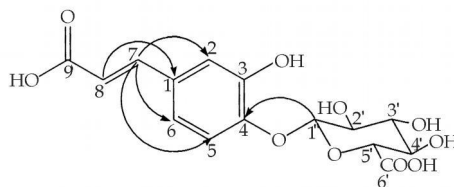
代谢物 II: 白色无定形粉末: IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 407 ($-\text{OH}$), 1 685 ($\text{C}=\text{O}$)。由一级全扫描质谱分析比原形药咖啡酸相对分子质量多 176, 表明其为咖啡酸葡萄糖醛酸结合物, 是代谢物 I 的同分异构体。由 HR-ESI-MS m/z : 355.063 7 $[M-H]^-$ 确定分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$ 。从 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 推得葡萄糖醛酸的存在[端基 H_{d} 5.09, 1H, d, $J=7.2\text{ Hz}$; δ : 100.8 (G'_1), 72.8 (G'_2), 75.4 (G'_3), 71.9 (G'_4), 76.5 (G'_5), 173.0 (G'_6)]。代谢物 II 苷元结构的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与代谢物 I 非常相似 (表 1), 只有苷元部分的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据略有不同。HMBC 谱 (图 3) 显示糖醛酸的端基质子 H_{d} 5.09 与 G_4 (δ 145.8) 有远程相关性, 推测咖啡酸与葡萄糖醛酸的连接位置在 G_4 上。根据 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HSQC、HMBC 谱信号, 并参照文献^[9], 最终确定代谢物 II 的结构为咖啡酸 4- β -D-葡萄糖醛酸。

表 1 代谢物 I 和 II 的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) 数据 (D_2O 为测试溶剂)Table 1 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) Data of metabolites I and II (in D_2O)

编号	代谢物 I		代谢物 II	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	127.3		130.5	
2	116.8	7.26(1 H, br s)	115.4	7.15(1 H, overlap)
3	144.9		146.5	
4	148.4		145.8	
5	117.0	6.88(1 H, d, 8.4 Hz)	116.7	7.10(1 H, overlap)
6	125.2	7.15(2 H, br d)	121.9	7.13(1 H, overlap)
7	145.6	7.45(1 H, d, 16 Hz)	143.6	7.43(1 H, d, 16 Hz)
8	116.0	6.21(1 H, d, 16 Hz)	119.4	6.35(1 H, d, 16 Hz)
9	171.8		170.0	
1'	101.4	5.03(1 H, d, 6.8 Hz)	100.8	5.09(1 H, d, 7.2 Hz)
2'	72.9	3.62(H, overlap)	72.8	
3'	75.4	3.58(H, overlap)	75.4	3.57~3.66(3 H, m)
4'	71.8	3.57(H, overlap)	71.9	
5'	76.4	3.88(1 H, d, 8.8 Hz)	76.5	3.86(1 H, d, 9.2 Hz)
6'	173.8		173.0	



代谢物 I



代谢物 II

图 3 代谢物 I 和 II 的结构及其关键 HMBC ($\text{H}^{\rightarrow}\text{C}$) 相关Fig. 3 Structure and key HMBC ($\text{H}^{\rightarrow}\text{C}$) correlations of metabolites I and II

4 讨论

4.1 用 LC/MSⁿ 方法分析鉴定咖啡酸在大鼠体内代谢产物,并推测其代谢规律已有文献报道^[6,7,10],但根据 LC/MSⁿ 质谱数据只能推测代谢产物的结构,一般要通过与化学合成或生物转化等方法得到的纯物质进行色谱及质谱特征对照确定其结构,或者通过化学分离手段获得代谢产物,并通过光谱学方法确证其结构。本研究从尿样中分离并通过 NMR 法确证了两个葡萄糖醛酸结合物的结构,与文献推测的结果是一致的^[6,7]。

4.2 实验过程中发现代谢物 I ~ IV 室温放置容易变化,须放至冰箱中冷冻保存,否则降解为原形药咖啡酸。

4.3 进行大孔树脂处理时,尿样调节 pH 3 不会对尿样中代谢产物产生影响。

4.4 代谢物 I 和 II 为国内首次分离得到的化合物,国外作者^[11]以咖啡酸甲酯为底物合成了这两个代谢物。

参考文献:

[1] Toshiya M, Kazuki Y, Jun A, *et al.* Antioxidation mechanism studies of caffeic acid: identification of antioxidation products of methyl caffeate from lipid oxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(14): 5947-5952

- [2] Mori H, Iwahashi H. Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under UVA irradiation [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45(1): 49-55
- [3] Wang G F, Shi L P, Ren Y D, *et al.* Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro* [J]. *Antivir Res*, 2009, 83(2): 186-190
- [4] 王峰,刘敏,杨连春,等.咖啡酸阿魏酸对高血压大鼠的降压作用[J].解放军药学报,1999,15(5):1-4
- [5] Jung U J, Lee M K, Park Y B, *et al.* Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(2): 476-483
- [6] Zhang Z C, Xu M, Sun S F, *et al.* Metabolic analysis of four phenolic acids in rat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871: 7-14
- [7] Zhou M J, Zhu Y X, Corredor P. Determination of the phase I and II metabolites of caffeic and chlorogenic acids in rats by LG-MS/MS [J]. *Asian J Pharmacody Pharmacok*, 2008, 8(1): 51-62
- [8] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, *et al.* Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11): 5496-5500
- [9] Cui L, Qiu F, Yao X S. Isolation and identification of seven glucuronide conjugates of andrographolide in human urine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(4): 555-562
- [10] 苏美英,周婷婷,周茂金. LC/MSⁿ 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物 [J]. 中国现代应用药理学, 2009, 26(6): 501-505
- [11] Timo S, Roman L, Daniela K, *et al.* Absorption of *N*-phenylpropenyl-L-amino acids in healthy humans by oral administration of cocoa [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1201-1214

土槿乙酸联合 9-顺式维甲酸促进白血病细胞凋亡的机制研究

郭 赞¹, 徐瑞成², 何 滔³

(1 武警医学院附属医院 内分泌血液科, 天津 300162; 2 武警医学院 科研部, 天津 300162; 3. 武警医学院附属医院 病理科, 天津 300162)

摘要:目的 观察过氧化物酶体激活物活化受体 γ (PPAR γ) 的配体土槿乙酸 (PLAB) 联合维甲类 X 受体 α (RXR α) 的配体 9-顺式维甲酸 (9-*cis* RA) 促进白血病细胞凋亡的作用, 探讨其作用机制。方法 应用透射电子显微镜、琼脂糖凝胶电泳分析 HL-60 细胞凋亡, RT-PCR 检测 HL-60 细胞 Cyclin D1 和 CDK4 mRNA 表达。结果 HL-60 细胞经配体联合作用后, 电镜下可见明显细胞凋亡的形态学变化, 琼脂糖凝胶电泳出现 DNA Ladder, Cyclin D1 及 CDK4 mRNA 的表达均降低, 且联合用药组下降程度明显较单独作用组大 ($P < 0.05$)。结论 PLAB 联合 9-*cis* RA 抑制 HL-60 细胞生长, 其机制与凋亡诱导效应相关。

关键词: 土槿乙酸; 9-顺式维甲酸; 白血病; 细胞凋亡; Cyclin D1; CDK4

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-0952-04

土槿乙酸 (pseudolaric acid B, PLAB) 是从土槿皮中分离出的主要成分之一, 是过氧化物酶体激活物活化受体 γ (peroxisome proliferators activated

receptor gamma, PPAR γ) 激动剂, 可介导肿瘤细胞生长抑制和凋亡^[1-3]。9-顺式维甲酸 (9-*cis* RA) 是改变多烯侧链结构合成的第 3 代维甲酸, 是维甲

①收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901985)

作者简介: 郭 赞 (1982-), 女, 硕士, 医师, 主要从事恶性血液病的防治研究。E-mail: 1982guoyun@163.com

* 通讯作者 徐瑞成 E-mail: xu_rc@sohu.com