

## 丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物在斑马鱼体内的代谢研究

韦英杰<sup>1\*</sup>, 贾晓斌<sup>1\*</sup>, 詹 扬<sup>1</sup>, 王长梅<sup>1</sup>, 马文泉<sup>2</sup>, 王 兵<sup>2</sup>, 徐丽丽<sup>2</sup>

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药口服释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

2. 潍坊高新区生物医药科技产业园, 山东 潍坊 261061

**摘要:** 目的 研究丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物(组合物)在斑马鱼体内的代谢, 探讨斑马鱼用于中药多组分代谢研究的可行性及合理性。方法 将斑马鱼暴露于组合物 1% DMSO 纯净水溶液中, 采用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱(HPLC-MS)检测, 根据准分子离子峰获得代谢物相对分子质量信息, 通过与文献数据或对照品比较, 鉴定组合物暴露于斑马鱼 24 h 后的药液及鱼体内的代谢产物。结果 组合物经斑马鱼作用后, 产生丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮的羟基化和脱氢产物, 未发现丹参酮 I 的代谢产物。结论 斑马鱼对组合物的代谢与大鼠或鼠肝微粒体的代谢机制高度一致, 提示斑马鱼对该组合物的代谢具合理性, 且具有化合物用量少、成本低、简单、高效等优点, 为斑马鱼用于更复杂的中药体系代谢研究提供依据。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 斑马鱼; 代谢; 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱

**中图分类号:** R965.2; R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)09-1149-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.016

## *In vivo* metabolic study on combination of tanshinone II<sub>A</sub>, cryptotanshinone, and tanshinone I in zebrafish

WEI Ying-jie<sup>1</sup>, JIA Xiao-bin<sup>1</sup>, ZHAN Yang<sup>1</sup>, WANG Chang-mei<sup>1</sup>, MA Wen-quan<sup>2</sup>, WANG Bing<sup>2</sup>, XU Li-li<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Biology & Medicine Science and Technology Industry Park of Weifang Hi-tech Development Zone, Weifang 261061, China

**Abstract: Methods** To investigate the *in vivo* metabolism of the combination of tanshinone II<sub>A</sub> (Tan II<sub>A</sub>), cryptotanshinone (Cry), and tanshinone I (Tan I) in zebrafish and discuss the possibility and rationality of using zebrafish in multi-component metabolism of Chinese materia medica (CMM). **Methods** The zebrafish was exposed to the 1% DMSO solution of the combinations with Tan II<sub>A</sub>, Cry, and Tan I. High performance liquid chromatography coupled with ion-trap mass spectrometry (HPLC-MS) method was used to calculate the relative molecular weight of the metabolites based on the excimer ion peak. The metabolites in solution and zebrafish after the combination being exposed to zebrafish for 24 h were identified through comparing with the literature data and reference substances. **Results** After the combination being exposed to zebrafish, hydroxylation and dehydrogenation products of Tan II<sub>A</sub> and Cry were obtained while the metabolites of Tan I was not found. **Conclusion** The metabolic mechanism of zebrafish against the combination highly consists with those in rats or rat liver microsomes, which indicates that the metabolism of zebrafish against the combination is rational with the advantages of less amount of compound, lower cost, simpler operation, and higher efficiency. The above results provide the reference for using zebrafish in the metabolic study on complex CMM system.

**Key words:** tanshinone II<sub>A</sub>; cryptotanshinone; tanshinone I; zebrafish; metabolism; high performance liquid chromatography coupled with ion-trap mass spectrometry

斑马鱼(zebrafish)是近年来广泛用于药物高通量筛选和毒性研究的热门模式生物, 具有简单、高效、成本低及化合物用量少等优点, 将斑马鱼用

于中药研究亦日益受到重视<sup>[1-4]</sup>。斑马鱼具有完善的器官系统、与哺乳动物相似的基因及相关代谢酶系, 这为将斑马鱼用于药物代谢研究提供了遗传学和生

收稿日期: 2012-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973978); 江苏省中医药领军人才项目(2006)

\*通信作者 韦英杰, 博士, 副研究员。Tel: (025)85637809 E-mail: wyj970@163.com

贾晓斌, 博士, 研究员。Tel: (025)85608672 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

理学依据。目前研究中药的代谢主要借助化学药物研究的基本理论和方法,由于体内代谢产物用量大,大量微量成分的在体代谢分析无法进行;而体外代谢作用环节单一,难以体现中药作用的整体性。因此建立能弥补现有模型不足的斑马鱼药物研究模型,对丰富中药代谢的研究思路与方法具有重要意义<sup>[5]</sup>。前期实验已成功将斑马鱼用于丹参二萜醌类、淫羊藿黄酮类及三七皂苷类单体成分的代谢研究<sup>[6-8]</sup>。

丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 是丹参中主要的二萜醌类活性成分,在大鼠体内的转化主要为羟基化或脱氢的 I 相代谢反应,该反应的发生与其分子骨架的饱和度密切相关:如脱氢反应是 A 环和 D 环均饱和的隐丹参酮的主要代谢路径,而羟基化反应则是具饱和 A 环的丹参酮 II<sub>A</sub> 的主要代谢途径,但同时具有不饱和 A 环和 D 环的丹参酮 I 则很难发生代谢转化<sup>[9]</sup>。本实验在前期研究<sup>[8]</sup>丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 在斑马鱼体内代谢转化的基础上,进一步研究这 3 个化合物的组合物在斑马鱼体内的代谢,以期对斑马鱼用于更复杂的中药体系代谢提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

丹参酮 II<sub>A</sub> (批号 110766-200518, 供定量用)、隐丹参酮 (批号 110852-200305, 供定量用) 对照品,购于中国药品生物制品检定所;丹参酮 I, 质量分数 >98%, 成都思科华生物科技有限公司。乙腈、磷酸、甲酸为色谱纯,德国 Merck 公司;甲醇为分析纯;水为纯净水。

### 1.2 仪器

Agilent 1200 型系列高效液相色谱仪(包括 G1312 A 二元梯度泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314B VWD 检测器), Agilent 6301 离子阱质谱仪, 6300 Series Iop Trap LC/MS Software 6.1 数据分析软件, 美国 Agilent 公司; Mettler Toledo AB135—S 分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; TGL—16G 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; TDZ5B—WS 低速自动平衡离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; XW—80A 旋涡混合器, 上海青浦沪西仪器厂; Organomation N-EVAP TM 112 氮吹仪, 美国 Organomation 公司。

### 1.3 动物

斑马鱼成鱼, 南京大学模式生物研究所提供。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

取斑马鱼成鱼, 平均分成 2 组, 每组 5 条, 分别置于 30 mL 含有 1% DMSO 纯净水(空白鱼组)、含丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物(丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、丹参酮 I 质量浓度分别为 1.57、1.02、2.09 μg/mL)的 1% DMSO 纯净水溶液(给药鱼组)棕色瓶中, 同时设空白药物组(组合物 1% DMSO 纯净水溶液)。

### 2.2 样品采集与处理

给药鱼组分别于斑马鱼暴露药液后 0、1、2、4、6、8、12、18、24 h 取药液 4 mL 各 2 份, 24 h 将鱼取出, 用纯净水迅速洗涤 3 次, 处死, 去除鱼鳍和鱼鳞, 称质量, 于 -70 °C 冰箱放置。各时间点斑马鱼药液各 2 份分别混合, 于 -70 °C 冰箱放置。空白药物组于斑马鱼暴露药液后 0、24 h 时同法取样。

将不同时间点取出的斑马鱼药液冷冻干燥, 残渣加 0.5 mL 甲醇溶解, 过 0.22 μm 滤膜, 滤液 20 μL 进行 HPLC-MS 分析。

取 24 h 空白鱼组和给药鱼组斑马鱼, 混合, 剪碎, 称取 1 g, 加 5 mL 生理盐水匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 上清液用等体积醋酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 氮气吹干, 残渣加 1 mL 甲醇溶解制成 1 g/mL 的溶液, 过 0.22 μm 滤膜, 滤液 20 μL 进行 HPLC-MS 分析。

### 2.3 色谱与质谱条件

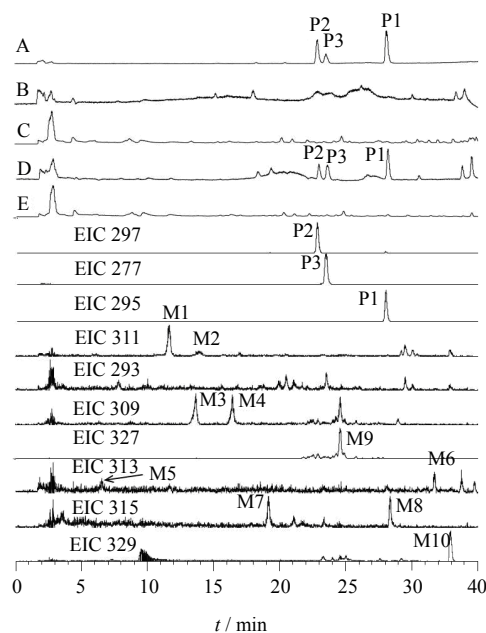
**2.3.1 色谱条件** Zorbax Extend C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 C<sub>18</sub> 预柱(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相 A 为纯净水(与质谱联用时改为 0.05%甲酸水溶液)、B 为乙腈, 采用梯度洗脱: 0~5 min, 45% B; 5~10 min, 45%~50% B; 10~30 min, 50%~90% B; 30~35 min, 90%~100% B; 36~45 min, 100%~45% B; 体积流量 1.0 mL/min, 液相到质谱 ESI 离子源的分流比为 2:1; 检测波长 270 nm; 记录时间 45 min; 进样量为 20 μL。

**2.3.2 离子阱质谱条件** 电喷雾离子源参数: 干燥气体温度 350 °C, 干燥气体流量 12.0 L/min, 雾化气压力 241.33 kPa, 裂解电压 100 V, 毛细管电压 3.5 kV; 扫描范围  $m/z$  100~600, 选择  $[M+H]^+$  为母离子进行 MS<sup>n</sup> 分析。

## 3 结果

采用 HPLC-MS 联用技术检测组合物经斑马鱼作用后的药液与鱼体中的代谢产物。与空白鱼组和

空白药物组对照,通过提取离子流,根据正离子模式准分子离子峰  $[M+H]^+$  和  $[M+Na]^+$ , 推测出可能的相对分子质量, 结果在斑马鱼体外药液或鱼体内检出原形成分 (P1~P3) 及 10 个羟基化或脱氢代谢产物 (M1~M10)。总离子流及代谢产物提取离子流图见图 1。



A-空白药物 B-空白鱼体外药液 C-空白鱼体内 D-给药鱼体外药液 E-给药鱼体内

A-blank drug B-in vitro solution of blank zebrafish C-in vivo of blank zebrafish D-in vitro solution of zebrafish with drug E-in vivo of zebrafish with drug

图1 组合物暴露斑马鱼 24 h 后的斑马鱼体外药液和斑马鱼体内总离子流图及代谢物提取总离子流图

Fig. 1 TIC of zebrafish *in vitro* solution and *in vivo* prototype components after combination being exposed to zebrafish for 24 h and TIC of extracted metabolites

### 3.1 来源于丹参酮 II<sub>A</sub> 的代谢产物鉴定

在斑马鱼体外药液或体内检测到原型成分丹参酮 II<sub>A</sub> (P1, 相对分子质量为 294) 及其单羟基化 (M1、M2)、双羟基化 (M9) 及脱氢 (M3、M4) 等代谢产物。M1、M2 均有准分子离子峰  $m/z$  311  $[M+H]^+$  和 333  $[M+Na]^+$ , 故相对分子质量为 310, 较其母体多 16, 通过与文献报道<sup>[9-11]</sup>对比, 鉴定分别为 3 $\alpha$ -羟基丹参酮 II<sub>A</sub> (3 $\alpha$ -hydroxytanshinone II<sub>A</sub>) 和紫丹参甲素 (przewatanshinquinone A)。M3 准分子离子峰为  $m/z$  309  $[M+H]^+$ , 其水合物准分子离子峰  $m/z$  为 327  $[M+H+H_2O]^+$ ; M4 准分子离子峰为  $m/z$  309  $[M+H]^+$  和 331  $[M+Na]^+$ , 推测 M3 和 M4 相对分子质量

为 308, 较丹参酮 II<sub>A</sub> 单羟基化产物少 2, 故为羟基化丹参酮 II<sub>A</sub> 的脱氢产物。图 1 中 EIC293 旨在检测是否有丹参酮 II<sub>A</sub> 的脱氢产物, 结果发现丹参酮 II<sub>A</sub> 羟基化后的脱氢产物 (EIC309), 可能是丹参酮 II<sub>A</sub> 的主要代谢途径为羟基化, 其脱氢后易羟基化造成。M9 的准分子离子峰为  $m/z$  327  $[M+H]^+$  和 349  $[M+Na]^+$ , 故相对分子质量为 326, 较丹参酮 II<sub>A</sub> 多 32, 其主要碎片离子为  $m/z$  309  $[M+H-18]^+$ , 由脱 H<sub>2</sub>O 形成, 提示为丹参酮 II<sub>A</sub> 的双羟基化产物。组合物中丹参酮 II<sub>A</sub> 在斑马鱼作用下的代谢与丹参酮 II<sub>A</sub> 在大鼠或大鼠肝微粒体的代谢高度一致<sup>[9-11]</sup>, 提示斑马鱼对组合物中的丹参酮 II<sub>A</sub> 代谢具合理性。组合物经斑马鱼作用后的代谢产物见表 1, 丹参酮 II<sub>A</sub> 在斑马鱼体内的可能代谢途径见图 2, 质谱图见图 3。

### 3.2 来源于隐丹参酮的代谢产物鉴定

在斑马鱼体外药液或体内检测到原形成分隐丹参酮 (P2, 相对分子质量为 296) 及其脱氢 (P1)、单羟基化 (M5、M6)、双羟基化 (M10) 及 D 环开环 (M7、M8) 的代谢产物。丹参酮 II<sub>A</sub> 是隐丹参酮的主要脱氢产物<sup>[9,12-13]</sup>, 通过与对照品及其质谱图对比, 并参考前期研究结果<sup>[8]</sup>, 推测丹参酮 II<sub>A</sub> 也是隐丹参酮的脱氢产物。M5、M6 的准分子离子峰均为  $m/z$  313  $[M+H]^+$  和 335  $[M+Na]^+$ , 推测相对分子质量均为 312, 较隐丹参酮多 16, 故为隐丹参酮的单羟基化产物。M10 的准分子离子峰为  $m/z$  329  $[M+H]^+$  和 351  $[M+Na]^+$ , 故相对分子质量为 328, 较隐丹参酮多 32, 其碎片离子峰  $m/z$  311  $[M+H-18]^+$ , 经脱水形成, 故推测为隐丹参酮双羟基化产物; M7、M8 的准分子离子峰均为  $m/z$  315  $[M+H]^+$  和 337  $[M+Na]^+$ , 相对分子质量为 314, 较隐丹参酮多 18, 通过与文献数据<sup>[9]</sup>对比, 推测为 D 环开环代谢产物。此外由于隐丹参酮转化成丹参酮 II<sub>A</sub>, 故推测丹参酮 II<sub>A</sub> 的代谢产物也是隐丹参酮的代谢产物。组合物中隐丹参酮在斑马鱼作用下的代谢与其在大鼠、猪体内的代谢高度相似<sup>[9,12]</sup>, 提示斑马鱼对组合物中隐丹参酮的代谢具合理性。其在斑马鱼体内的代谢途径见图 2。组合物经斑马鱼作用后的代谢产物见表 1, 质谱图见图 3。

### 3.3 来源于丹参酮 I 的代谢产物鉴定

除了原形成分丹参酮 I (P3, 相对分子质量 276), 未发现其他代谢产物, 这与其在大鼠体内的代谢相一致<sup>[9]</sup>。组合物经斑马鱼作用后的代谢产物见表 1, 质谱图见图 3。

表1 丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 组合物暴露斑马鱼 24 h 后的代谢产物Table 1 Metabolites of combination of Tan II<sub>A</sub>, Cry, and Tan I after being exposed to zebrafish for 24 h

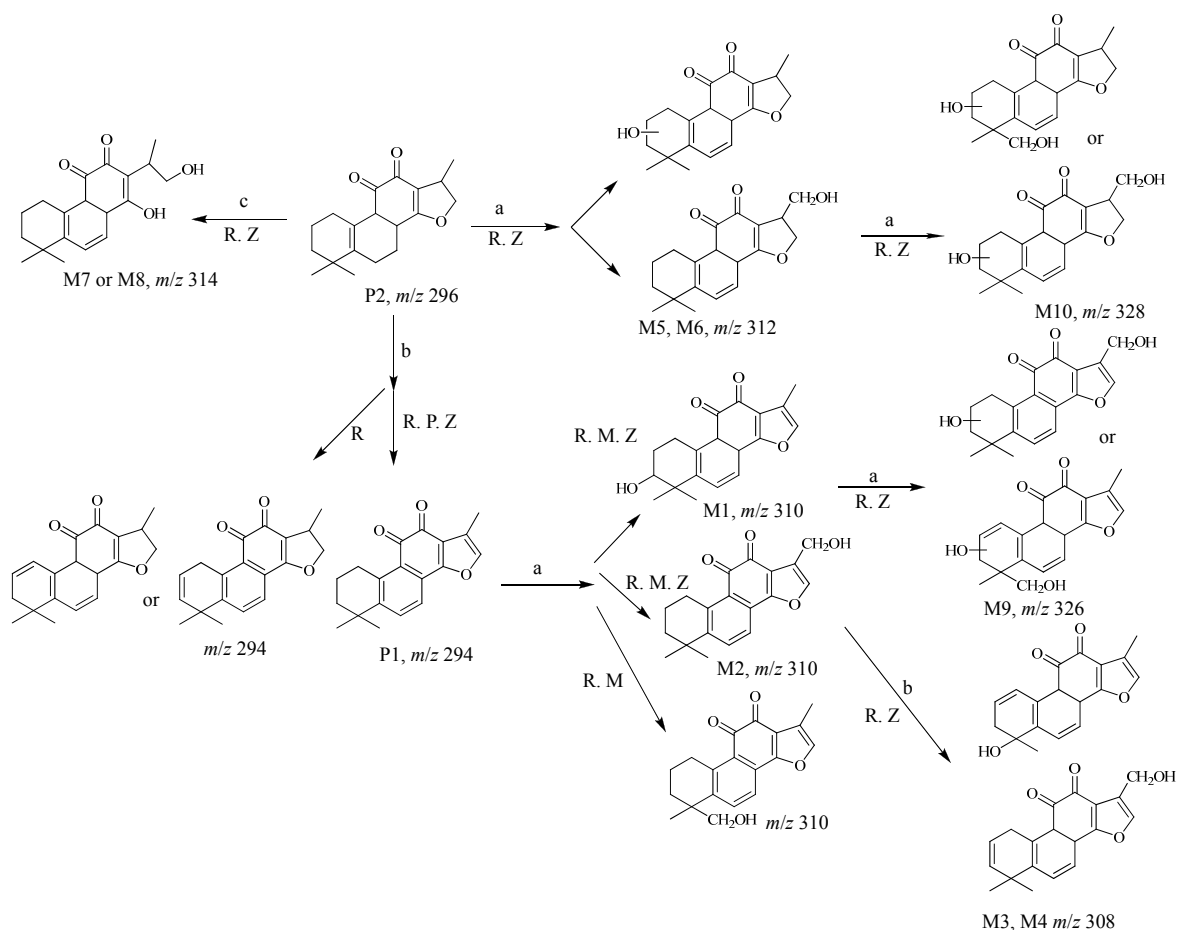
| 峰号 | <i>t</i> / min | 准分子离子峰             |                     | HPLC/ESI-MS <sup>a</sup> 或碎片离子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 相对分子质量 | 推测代谢物                          | 药液 | 斑马鱼体 | 参考文献 |
|----|----------------|--------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------|----|------|------|
|    |                | [M+H] <sup>+</sup> | [M+Na] <sup>+</sup> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |        |                                |    |      |      |
| P1 | 27.7           | 295.2              | 317.1               | MS <sup>2</sup> : 277.1 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>249.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup><br>MS <sup>3</sup> : 262.1 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>249.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,<br>231.1 [M+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,<br>221.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup> ,<br>206.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CO-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup><br>MS <sup>4</sup> : 234 [M+H-H <sub>2</sub> O-CO-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>221.1, 206.2,<br>191.2 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CO-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                      | 294.2  | 丹参酮 II <sub>A</sub>            | +  | +    | 9-11 |
| P2 | 22.8           | 297.2              | 319.2               | MS <sup>2</sup> : 297.2 [M+H] <sup>+</sup> ,<br>279.2 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>264.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>251.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,<br>237.1 [M+H-CO-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> ,<br>209.1 [M+H-2CO-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup><br>MS <sup>3</sup> [297→279]: 264.1, 251.1,<br>237.1, 209.1                                                                                                                                                                                                                                                     | 296.2  | 隐丹参酮                           | +  | +    | 9    |
| P3 | 23.4           | 277.1              | 299.1               | MS <sup>2</sup> : 259.1 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>249.1 [M+H-CO] <sup>+</sup> ,<br>231.1 [M+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup> ,<br>221.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CO] <sup>+</sup><br>MS <sup>3</sup> : 234.1 [M+H-CO-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>231.1 [M+H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>221.1 [M+H-2CO] <sup>+</sup> ,<br>203 [M+H-2CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>193.1 [M+H-3CO] <sup>+</sup> ,<br>178 [M+H-3CO-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                                                                                                         | 276.1  | 丹参酮 I                          | +  | +    | 9    |
| M1 | 11.6           | 311.2              | 333.2               | MS <sup>2</sup> : 293.1 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>275.1 [M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>263.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>251.1 [M+H-CO-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> ,<br>235.1 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CH <sub>3</sub> -CO] <sup>+</sup><br>MS <sup>3</sup> : 275.1 [M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>265.3 [M+H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>251.1 [M+H-CO-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> ,<br>247.2 [M+H-CO-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>229.1 [M+H-CO-3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>219.1 [M+H-2CO-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> | 310.2  | 3α-羟基丹参酮 II <sub>A</sub>       |    | +    | 9-11 |
| M2 | 13.9           | 311.2              | 333.3               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 310.2  | 紫丹参甲素                          |    | +    | 9-11 |
| M3 | 13.6           | 309.1              |                     | MS <sup>2</sup> : 291.1 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>277.2 [M+H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> ,<br>265.2 [M+H-2CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>247.0 [M+H-2CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> ,<br>235.2 [M+H-4CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup><br>MS <sup>3</sup> : 291.2 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>273.2 [M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>261.2 [M+H-H <sub>2</sub> O-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>245.1 [M+H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>+</sup>                                           | 308.1  | 羟基化丹参酮 II <sub>A</sub><br>脱氢产物 | +  | +    | 9    |
| M4 | 16.4           | 309.1              | 331.2               | MS <sup>2</sup> : 281.1 [M+H-CO] <sup>+</sup> ,<br>263.1 [M+H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>235.1 [M+H-2CO-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>211.0 [M+H-CH <sub>3</sub> OH-2H <sub>2</sub> O-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 308.1  | 羟基化丹参酮 II <sub>A</sub><br>脱氢产物 |    | +    | 9    |

续表 1

| 峰号  | <i>t</i> /min | 准分子离子峰             |                     | HPLC/ESI-MS <sup>n</sup> 或碎片离子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 相对分子质量 | 推测代谢物                   | 药液 | 斑马鱼 | 参考文献 |
|-----|---------------|--------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------|----|-----|------|
|     |               | [M+H] <sup>+</sup> | [M+Na] <sup>+</sup> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |        |                         |    |     |      |
| M4  | 16.4          | 309.1              | 331.2               | MS <sup>3</sup> : 263.1, 253.1 [M+H-2CO] <sup>+</sup> ,<br>239.1 [M+H-2CO-CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>211.0 [M+H-3CO-CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>201.2 [M+H-4CO-CH <sub>3</sub> OH+2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>183.0 [M+H-4CO-CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |        |                         |    |     |      |
| M5  | 6.4           | 313.2              | 335.2               | 295.2 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 283.2 [M+H-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                         | 312.2  | 羟基化隐丹参酮                 |    | +   | 9    |
| M6  | 34.0          | 313.3              | 335.3               | 256.3 [M+H-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-CO+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>230.3 [M+H-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                           | 312.3  | 羟基化隐丹参酮                 |    | +   | 9    |
| M7  | 19.1          | 315.3              | 337.3               | 300.3 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>286.2 [M+H-CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>270.3 [M+H-3CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                   | 314.3  | 丹参酮 V                   | +  | +   | 9    |
| M8  | 28.5          | 315.3              | 337.3               | 300.1 [M+H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ,<br>282.3 [M+H-CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>262.3 [M+H-2CO-CH <sub>3</sub> +H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                  | 314.3  | 丹参酮 V 异构体               |    | +   | 9    |
| M9  | 24.6          | 327.2              | 349.2               | 309.2 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 299.2 [M+H-CO] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                        | 326.2  | 双羟基化丹参酮 II <sub>A</sub> |    | +   | 9    |
| M10 | 32.8          | 329.3              | 351.2               | 311.3 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> ,<br>286.2 [M+H-CO-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                    | 328.3  | 双羟基化隐丹参酮                |    | +   | 9    |

“+” 表示存在此化合物

“+” represents existence of compounds

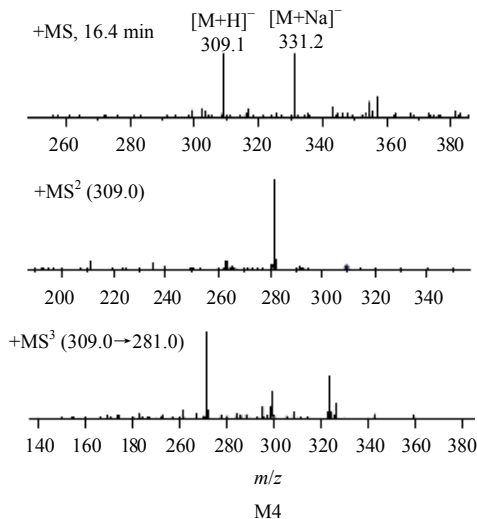
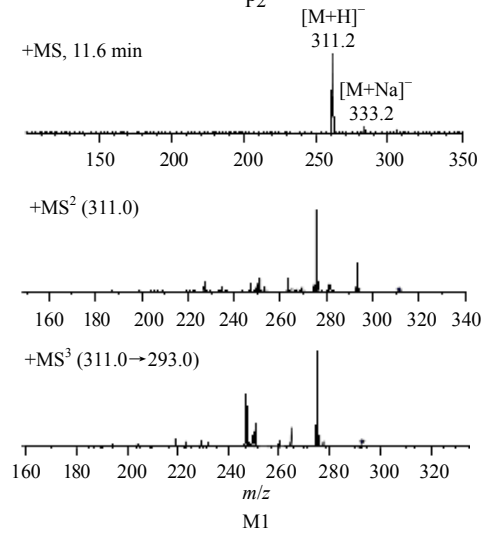
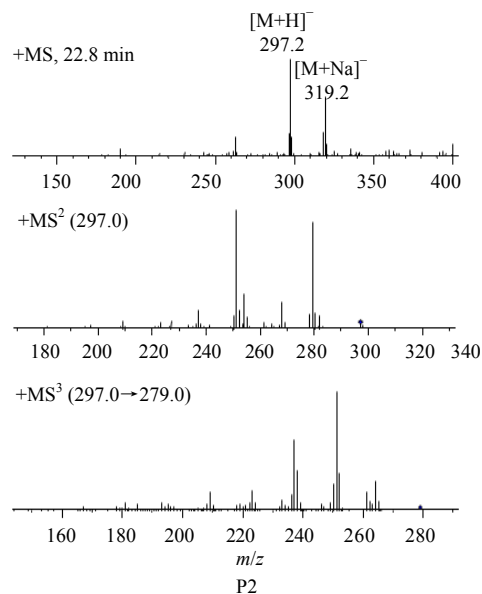
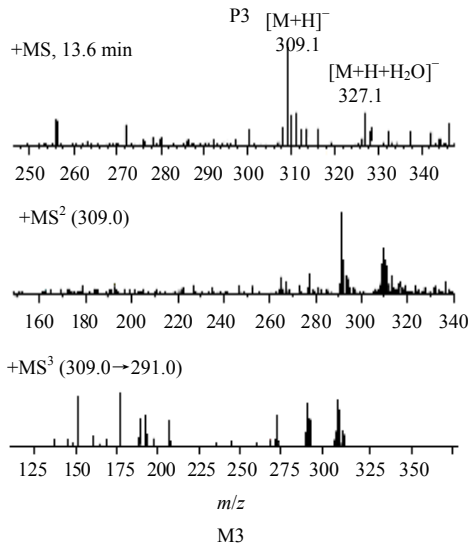
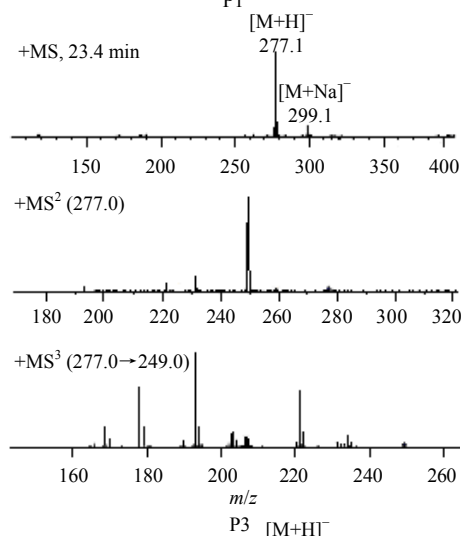
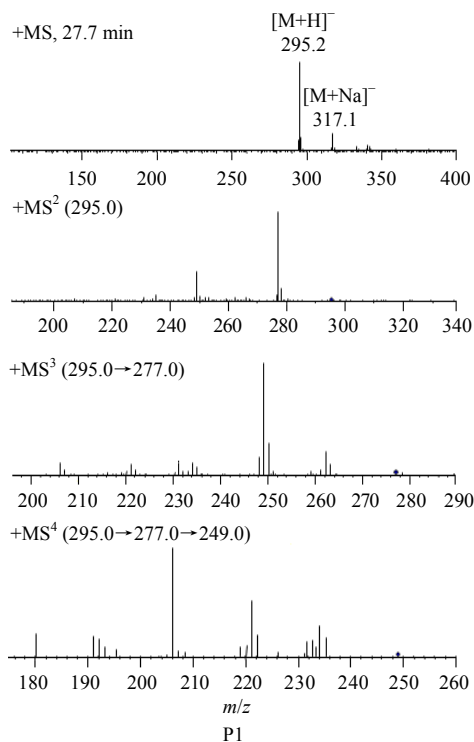


a-脱氢反应 b-羟基化反应 c-D 环开环 Z-斑马鱼模型 R-大鼠模型 P-猪模型 M-大鼠肝微粒体

a-dehydrogenation reaction b-hydroxylation reaction c-open-loop D ring Z-zebrafish model R-rat model P-pig model M-rat liver microsomes

图 2 隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 在斑马鱼体内及现有体内外研究代谢路径比较

Fig. 2 Comparison on metabolic pathways of Tan II<sub>A</sub> and Cry in *in vivo* zebrafish and present *in vitro* and *in vivo* study



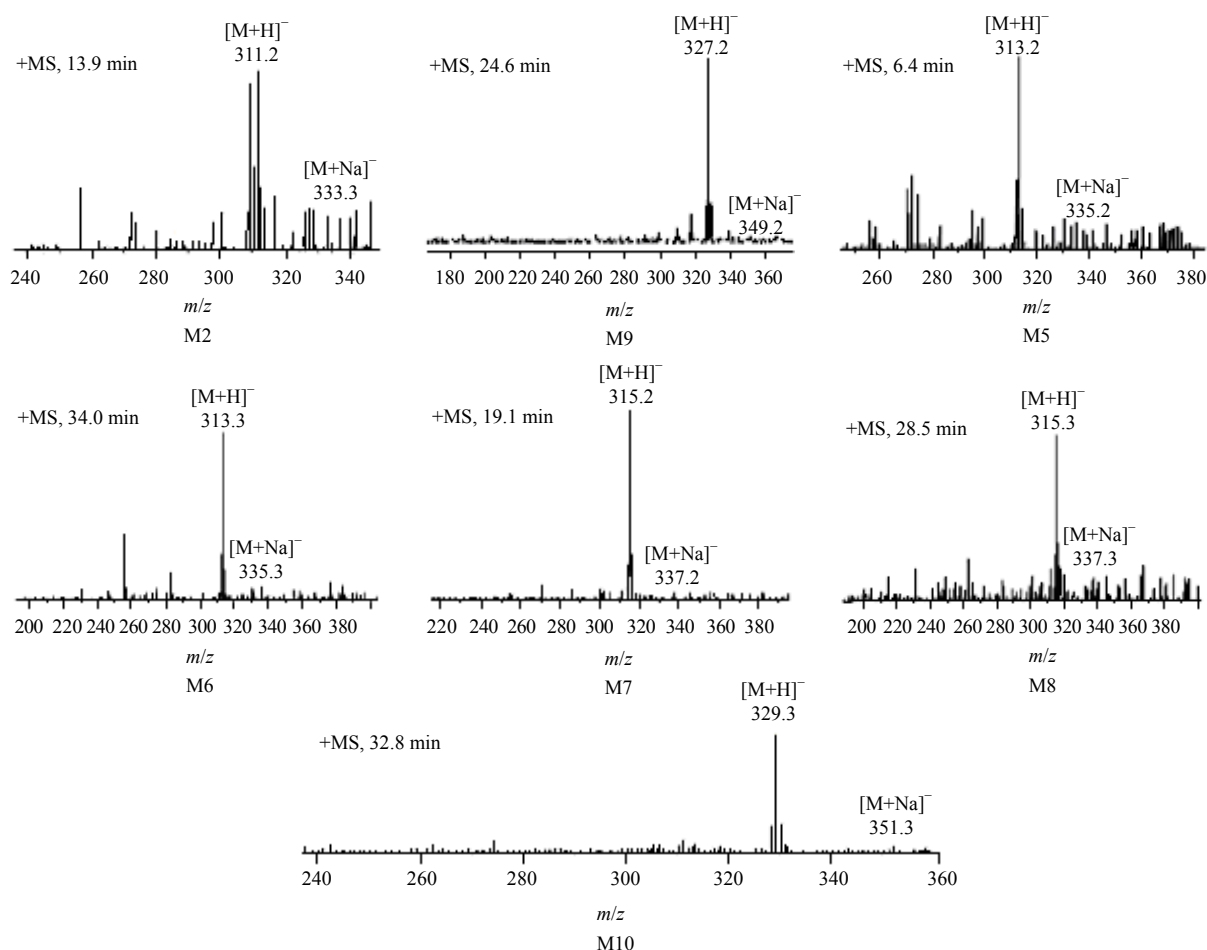


图3 隐丹参酮、丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹参酮 I 组合物暴露斑马鱼 24 h 后的代谢产物质谱图

Fig. 3 MS chromatograms of metabolites of combination of Cry, Tan II<sub>A</sub>, and Tan I after being exposed to zebrafish for 24 h

#### 4 讨论

本实验选择代谢机制相对明确的丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮和丹参酮 I 为模式药,探索将斑马鱼用于这 3 个化合物的组合物的多成分体系代谢的可行性及合理性。参考前期研究结果<sup>[6-8]</sup>,即药物经斑马鱼代谢 18~24 h 时的代谢产物较全面,因此本实验取 24 h 的样品分析,结果发现,3 个成分经斑马鱼作用后,除原形成分外,还检测到丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮的单羟基化、双羟基化及脱氢产物,以及隐丹参酮的 D 环开环产物,未检测到丹参酮 I 的转化产物,这与在大鼠及其肝微粒体、猪的代谢研究结果高度一致,提示斑马鱼用于这 3 个成分组合物的代谢研究具合理性。斑马鱼模型具有独特优势,与现有体内、外代谢模型相比,实验成本低,仅为大鼠的 1/1 000;化合物用量少(本实验各化合物用量 1~2 mg),仅约为大鼠经口给药研究用量的 1/30;实验条件简单、易控,在一般实验室均可进行,不需体外实验的苛刻条件;低劳动强度、高效率,可同时进行批量样

本的代谢研究。

综上所述,斑马鱼模型能够克服微量化合物及其多成分体系难以进行在体代谢的技术难题,是一种模式的在体研究药物代谢新的生物模型,对丰富中药代谢研究思路与方法具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(5): 504-512.
- [2] Kitambi S S, Nilsson E S, Sekyrova P, et al. Small molecule screening platform for assessment of cardiovascular toxicity on adult Zebrafish heart [J]. *BMC Physiol*, 2012, 12(1): 3-9.
- [3] 梁爱华. 斑马鱼——一种可用于中药药效和毒性筛选的鱼类模型 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2839-2842.
- [4] 陈秋霞, 曾 苏. 斑马鱼在药物代谢中的研究进展 [J]. *药学报*, 2011, 46(9): 1026-1031.
- [5] 韦英杰, 宁 青, 贾晓斌, 等. 基于斑马鱼模型的中药代谢研究思路与方法 [J]. *中草药*, 2009, 40(7): 1009-

- 1011.
- [6] Wei Y J, Li P, Fan H W, *et al.* Metabolism study of notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and ginsenoside Rb<sub>1</sub> of radix *Panax notoginseng* in Zebrafish [J]. *Molecules*, 2011, 16(8): 6621-6633.
- [7] Wei Y J, Li P, Fan H W, *et al.* Metabolite profiling of four major flavonoids of *Herba Epimidis* in Zebrafish [J]. *Molecules*, 2012, 17(1): 420-432.
- [8] 韦英杰, 李 萍, 贾晓斌, 等. 一种用模式生物斑马鱼研究药物代谢的新方法: 中国, CN101957346A [P]. 2010-08-20.
- [9] Sun J H, Yang M, Han J, *et al.* Profiling the metabolic difference of seven tanshinones using high-performance liquid chromatography/multi-stage mass spectrometry with data-dependent acquisition [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(14): 2211-2226.
- [10] Li P, Wang G J, Li J, *et al.* Identification of tanshinone II<sub>A</sub> metabolites in rat liver microsomes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1): 366-369.
- [11] Li P, Wang G J, Li J, *et al.* Characterization of metabolites of tanshinone II<sub>A</sub> in rats by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2006, 41(5): 670-684.
- [12] 薛 明, 崔 颖, 汪汉卿, 等. 隐丹参酮及其代谢物在猪体内的药代动力学研究 [J]. *药学报*, 1999, 34(2): 81-84.
- [13] Sun J H, Yang M, Wang X M, *et al.* Identification of tanshinones and their metabolites in rat bile after oral administration of TTE-50, a standardized extract of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-ESI-DAD-MS<sup>n</sup> [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2): 564-574.