

3-乙酰基-11-羧基- β -乳香酸在大鼠体内的代谢途径研究

蔡悠悠^{1,2}, 夏媛媛², 谷元², 刘昌孝², 司端运^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 研究 3-乙酰基-11-羧基- β -乳香酸 (AKBA) 在大鼠体内的代谢途径。方法 大鼠 ig AKBA 60 mg/kg 后, 收集胆汁、尿液及粪便, 应用高效液相色谱-四级杆-离子阱质谱 (HPLC-QTRAP-MS) 技术分析 AKBA 在大鼠体内的代谢途径。结果 共检测到除原形药物外的 15 个代谢产物, 提示 AKBA 在大鼠体内的主要代谢途径为去乙酰化、单羟基化、脱氢化及葡萄糖醛酸结合物。结论 AKBA 在大鼠体内经历了广泛的 I 相、II 相代谢, 产生的代谢产物主要通过粪便及胆汁排泄; 利用 QTRAP 技术的自动切换扫描 (IDA) 软件及增强型产物离子 (EPI) 扫描功能, 能够快速得到高质量的 MS² 谱图, 为 AKBA 代谢产物的鉴定提供了有效的检测手段。

关键词: 3-乙酰基-11-羧基- β -乳香酸; 增强型产物离子扫描; 代谢途径; 代谢产物; 高效液相色谱-四级杆-离子阱质谱

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)17-2427-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.016

Analysis on *in vivo* metabolic pathways of 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid in rats

CAI You-you^{1,2}, XIA Yuan-yuan², GU Yuan², LIU Chang-xiao², SI Duan-yun²

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

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the *in vivo* metabolic pathways of 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) in rats. **Methods** An HPLC-QTRAP-MS method was applied to identifying the metabolites of AKBA in bile, urine, and feces after ig administration of AKBA 60 mg/kg to rats. **Results** A total of 15 metabolites were found in rats. The major metabolic pathways of AKBA were deacetylation, mono-hydroxylation, dehydrogenation, and glucuronide conjugates. **Conclusion** AKBA undergoes the extensive phases I and II metabolism in rats; The metabolites produced mainly excrete through feces and bile; The information-dependent acquisition (IDA) and enhanced product ion (EPI) scan were used on a linear ion trap mass spectrometer to get high quality MS² picture and provide an effective method for identifying the metabolites of AKBA.

Key words: 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid; enhanced product ion scan; metabolic pathway; metabolites; HPLC-QTRAP-MS

3-乙酰基-11-羧基- β -乳香酸 (AKBA) 为乌苏烷型五环三萜类化合物, 是由 11-羧基- β -乳香酸 (KBA) 的 3 位羟基乙酰化而形成的衍生物。药理研究表明, AKBA 具有抗炎、诱导细胞凋亡及抗肿瘤等作用, 其在低浓度时即对恶性胶质瘤表现出细胞毒活性, 是抗癌名方西黄丸的主要有效成分^[1-5]。大鼠 ig AKBA 2 h 后, 血浆、肝脏及脑组织中均未检测到代谢产物; 而体外代谢研究表明, 应用大鼠及人肝微粒体孵育体系发现 AKBA 的 3 个单羟基代

谢产物^[6]。本实验室采用液相色谱-四级杆-离子阱质谱 (HPLC-QTRAP-MS) 联用技术, 利用自动切换扫描软件 (IDA), 结合多种扫描模式, 包括增强型一级全扫描 (EMS)、中性丢失扫描 (NL)、多重反应检测 (MRM) 及增强型产物离子扫描 (EPI), 对大鼠 ig AKBA 后的胆汁、尿液和粪便进行分析, 鉴定 AKBA 可能的代谢产物, 分析其在大鼠体内的代谢途径, 为深入了解 AKBA 在体内的代谢过程提供实验依据。

收稿日期: 2013-01-08

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX09304002); 973 项目 (2010CB933900)

作者简介: 蔡悠悠 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: (022)84845243 E-mail: normacai@163.com

*通信作者 司端运 Tel: (022)84845261 E-mail: sidy@tjipr.com

1 材料

1.1 药品与试剂

AKBA (质量分数>99.5%), 山东生物药物研究院提供; KBA (质量分数>98.9%), 宝鸡辰光生物有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 甲酸铵, 分析纯; 超纯水, 实验室自制(BM—40型科诺纯水制备系统, 电阻率 18.2 MΩ·cm)。

1.2 动物

SPF级Wistar大鼠, 雌雄各半, 体质量(200±20)g, 由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供, 动物生产许可证号SCXK(津)2009-0001。大鼠在20~22℃、相对湿度为45%~65%、光照/黑暗各12h条件下饲养, 自由饮食、饮水, 适应性饲养一周后开始实验。

1.3 仪器

Phase pro Elut-C₁₈固相萃取小柱, 迪马科技有限公司; LC—20A液相系统, 日本Shimadzu公司; API 4000Q—TRAP型质谱仪(配备有ESI离子源及Analyst 1.5数据处理系统), 美国Applied Biosystems公司。

2 方法

2.1 给药、样品采集与处理

Wistar大鼠, 雌雄各半, 分别置于代谢笼中, 于给药前12h禁食, 自由饮水, 收集空白尿样和粪样; 分别ig 60 mg/kg AKBA混悬液, 收集给药后0~24h大鼠粪便及尿液。Wistar大鼠ip乌拉坦麻醉后固定在鼠板上, 实施胆管插管手术, 分别收集空白胆汁及ig 60 mg/kg AKBA混悬液后0~24h胆汁样品。上述生物样品均于-20℃冷冻保存。

将大鼠粪便样品称质量后分别置于研钵内捣碎研磨, 加入50%乙腈溶液, 超声提取10min; 胆汁及尿液室温融化后, 4℃、12 000 r/min离心5min。取粪便、胆汁及尿液上清液0.5 mL, 经已活化的C₁₈小柱萃取, 收集洗脱液, 40℃氮气流吹干, 0.1 mL流动相复溶后进行HPLC-QTRAP-MS分析。

2.2 色谱条件

色谱柱为Waters Symmetry C₈柱(100 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温40℃; 流动相A相为甲醇-乙腈(1:1), B相为10 mmol/L甲酸铵溶液(含10%乙腈)。梯度洗脱: 0~15 min, 80%→10% B; 15~24 min, 10% B; 24~25 min, 10%→80% B; 25~30 min, 80% B。体积流量0.6 mL/min, 进样量10 μL。

2.3 质谱条件

ESI电喷雾离子源, 负离子检测; 离子喷雾电压-4 500 V; 离子源温度500℃; 气帘气压为82.74 kPa; 雾化气压为413.70 kPa; 辅助加热气压为275.80 kPa; 去簇电压-80 V; 入口电压-10 V; 碰撞出口电压-12 V; 碰撞能为-40 eV; 气帘气、雾化气、辅助气、碰撞气均为氮气。扫描模式: EMS、NL、MRM及EPI。扫描范围 m/z 50~1 000。

3 结果

3.1 AKBA及KBA色谱与质谱行为特征

在ESI条件下, AKBA能形成 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 2种准分子离子。比较2种离子, 发现负离子检测方式下的质谱响应更强, 因此选用负离子检测方式分析该类化合物。优化CID断裂方式, 得到产物离子质谱图。由于AKBA为KBA的衍生物, 推测其可能在体内转化为KBA, 因此对AKBA及KBA的质谱色谱行为均进行分析。分别取AKBA和KBA对照品溶液, 按上述梯度洗脱程序进行HPLC-MS/MS分析, 保留时间分别为19.1、17.8 min。AKBA准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z : 511, MS²下产生特征碎片离子 m/z : 59; KBA准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z : 469.2, MS²下产生特征碎片离子 m/z : 451、407、391、376。结果见图1。

3.2 AKBA在大鼠尿液、粪便和胆汁中的代谢产物

应用上述HPLC-QTRAP-MS条件, 对给药前及给药后的胆汁、尿液及粪便进行平行分析, 寻找可能的代谢产物母离子, 再对其进行多级质谱裂解, 分析比较AKBA与各代谢产物的CID质谱图, 并结合常规代谢反应规律, 推测其结构, 共检测到15个代谢产物, 其提取离子流色谱图见图2。

3.2.1 大鼠粪便中代谢产物的鉴定 与给药前空白生物样品相比, 给药后大鼠粪便中除原形药物(M0)外检测到6个代谢产物, 其 m/z 分别为485(M1)、527(M2~M5)、469(M6)。

M0: 在 m/z 为511的提取离子流色谱图中, 检测到1个色谱峰, 保留时间为19.1 min, 与AKBA对照品的保留时间及CID碎片离子特征一致, 推测其为AKBA原形。

M1: 在 m/z 为485的提取离子流色谱图中, 检测到1个色谱峰, 保留时间为11.3 min, 其CID主要碎片离子为 m/z : 467、423、407。M1的准分子离子 m/z : 485, 比KBA质荷比多16, 且主要碎片 m/z : 467、423、407均分别比KBA的碎片 m/z : 451、407、391

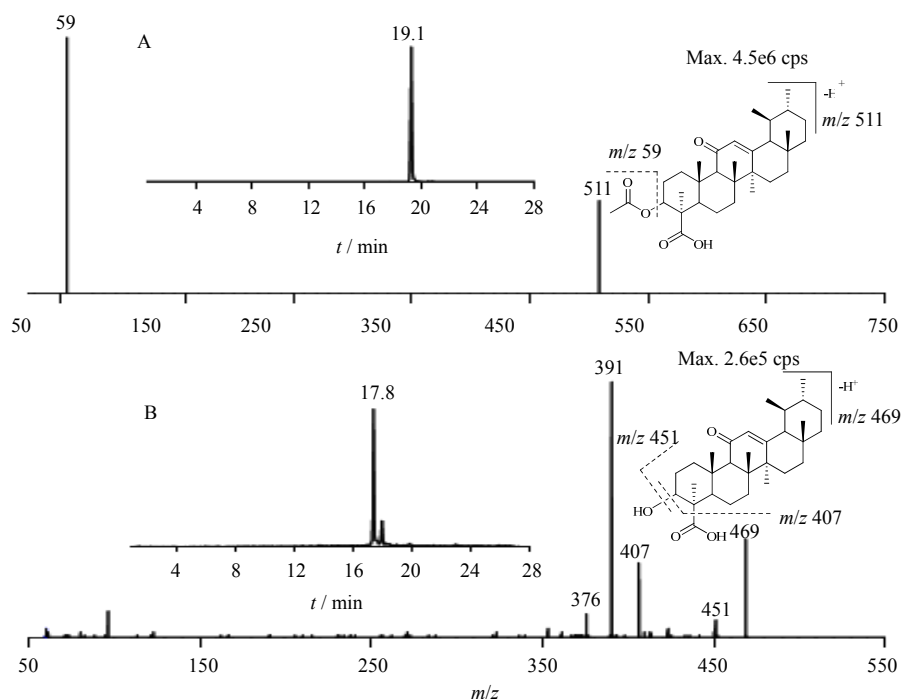


图1 AKBA (A) 和 KBA (B) 提取离子色谱图及二级质谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms and MS² spectra of AKBA (A) and KBA (B)

多 16, 提示其可能为 KBA 的羟基化代谢产物。推测 M1 为 AKBA 去乙酰化并羟基化后的代谢产物, 但羟基化位点根据现有数据无法确定。

M2~M5: 在 m/z 为 527 的提取离子色谱图中, 检测到 4 个色谱峰, 保留时间分别为 13.3、14.2、14.9、15.6 min, 其 CID 主要碎片离子为 m/z : 527、59。由于 m/z 59 为 AKBA 的特征性碎片离子, 且 m/z 527 比 AKBA 原形多 16, 推测 M2~M5 为 AKBA 的羟基化代谢产物。

M6: 在 m/z 为 469 的提取离子色谱图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 17.8 min, 其 CID 主要碎片离子为 m/z : 451、423、407、391、376。由于 m/z : 451、407、391、376 与 KBA 的特征性碎片离子一致, 且 m/z : 469 比 AKBA 少 42, 推测 M6 为 AKBA 的去乙酰化后的代谢产物。

3.2.2 大鼠胆汁中代谢产物的鉴定 与给药前空白胆汁样品相比, 在给药后的大鼠胆汁中找到 9 个代谢产物, 其 m/z 分别为 661 (M7)、659 (M8)、703 (M9~M12)、645 (M13)、643 (M14)、687 (M15)。

M7: 在 m/z 为 661 的提取离子流图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 7.8 min, 其 CID 主要碎片离子为 m/z : 485、467、423、407、113。M7 的准分子离子 m/z : 661, 比其主要碎片离子 m/z 485 多 176, 且在碎片离子中发现 m/z 为 175 及 m/z 为 113

的葡萄糖醛酸特征性碎片, 推测 M7 为 m/z 为 485 的葡萄糖醛酸结合物。且碎片离子 m/z : 467、423、407 与 M1 碎片离子一致, 推测 M7 为 AKBA 去乙酰化并羟基化后与葡萄糖醛酸的结合物。

M8: 在 m/z 为 659 的提取离子流图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 9.7 min, 其 CID 主要碎片离子为 m/z : 483、465、421、405、113。M8 的准分子离子 m/z : 659, 比其主要碎片离子 m/z : 483 多 176。在 CID 谱中找到 m/z 为 465、421、405, 均比 KBA 的特征性碎片离子 m/z 为 451、407、391 多出 14, 推测 M8 为 AKBA 去乙酰并羟基化脱氢后与葡萄糖醛酸结合的产物。

M9~M12: 在 m/z 为 703 的提取离子流图中, 检测到 4 个色谱峰, 保留时间分别为 10.5、11.1、11.4、11.8 min, 且它们的 CID 全扫描质谱图基本一致, 主要碎片离子均为 m/z : 527、113、59。其准分子离子 m/z : 703, 比其主要分子离子 m/z : 527 多 176, m/z : 527 比原形 m/z : 511 多 16, 推测 M9~M12 为 AKBA 单羟基化后与葡萄糖醛酸结合的代谢产物。

M13: 在 m/z 为 645 的提取离子色谱图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 14.6 min, 其 CID 的主要碎片离子为 m/z : 469、451、407、391、175、113。M13 的准分子离子 m/z : 645, 比其主要碎片离

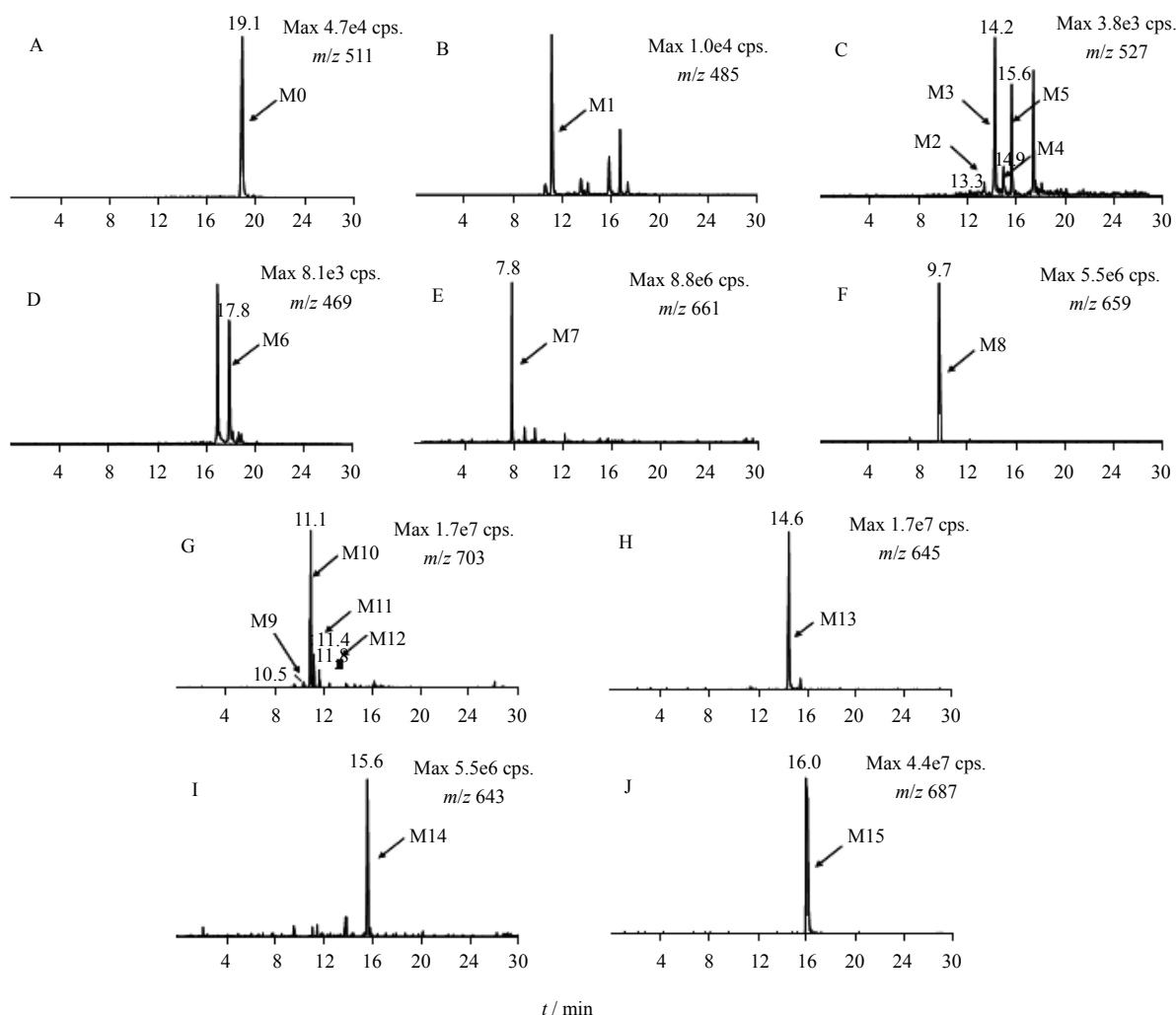


图2 大鼠 ig 给药后粪便及胆汁中 AKBA 原形 (A)、粪便中 AKBA 代谢产物 (B~D)、胆汁中 AKBA 代谢产物 (E~J) 的提取离子流色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatogram, for parent AKBA component in feces and bile (A), AKBA metabolites in feces (B~D), and AKBA metabolites in bile of rats after ig administration (E~J)

子 m/z : 469 多 176, 同时因碎片离子 m/z : 451、407、391 与 KBA 的特征性碎片离子一致, 推测 M13 为 AKBA 去乙酰化后与葡萄糖醛酸的结合产物。

M14: 在 m/z 为 643 的提取离子流色谱图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 15.6 min, 其 CID 主要碎片离子为 m/z : 467、449、421、405、175、113。M14 的准分子离子 m/z : 643 比其主要碎片离子 m/z : 467 多 176, 同时因碎片离子 m/z : 467、449、421、405 比 KBA 的特征性碎片离子均少 2, 推测 M14 为 AKBA 去乙酰化、脱氢化并与葡萄糖醛酸结合的产物。

M15: 在 m/z 为 687 的提取离子流色谱图中, 检测到 1 个色谱峰, 保留时间为 16.0 min, 其 CID

主要碎片离子为 m/z : 511、451、407、113、59。M15 的准分子离子 m/z : 687, 比其主要碎片离子 m/z : 511 多 176, 碎片离子 m/z : 59 为 AKBA 的特征性碎片离子, 推测 M15 为 AKBA 的葡萄糖醛酸结合物。

3.2.3 在大鼠尿液中代谢产物的鉴定 与给药前空白生物样品相比, 在给药后大鼠的尿液中未检测到原形及任何代谢产物。

3.3 AKBA 在大鼠体内的代谢途径分析

AKBA 在大鼠体内经历了广泛的 I 相、II 相代谢转化, 可能的代谢产物的色谱与质谱信息见表 1。可见在粪便中 AKBA 代谢主要以 I 相代谢为主, 在胆汁中主要以 II 相代谢为主, 主要的代谢途径关系见图 3。

表 1 大鼠 ig 给予 AKBA 后其代谢产物的质谱色谱信息

Table 1 Chromatographic and MS information for AKBA and its metabolites after ig administration to rats

代谢物	$[M-H]^- (m/z)$	t / min	MS^2 碎片 (m/z)	粪便	胆汁
M0	511	19.1	59	+	+
M1	485	11.3	467, 423, 407	+	-
M2	527	13.3	59	+	-
M3	527	14.2	59	+	-
M4	527	14.9	59	+	-
M5	527	15.6	59	+	-
M6	469	17.8	451, 407, 391, 376	+	-
M7	661	7.8	485, 467, 423, 407, 113	-	+
M8	659	9.7	483, 465, 421, 405, 113	-	+
M9	703	10.5	527, 113, 59	-	+
M10	703	11.1	527, 113, 59	-	+
M11	703	11.4	527, 113, 59	-	+
M12	703	11.8	527, 113, 59	-	+
M13	645	14.6	469, 451, 407, 391, 175, 113	-	+
M14	643	15.6	467, 449, 405, 175, 113	-	+
M15	687	16.0	511, 175, 113, 59	-	+

+/- 检测出; -/- 未检测出

+/-detected -/-undetected

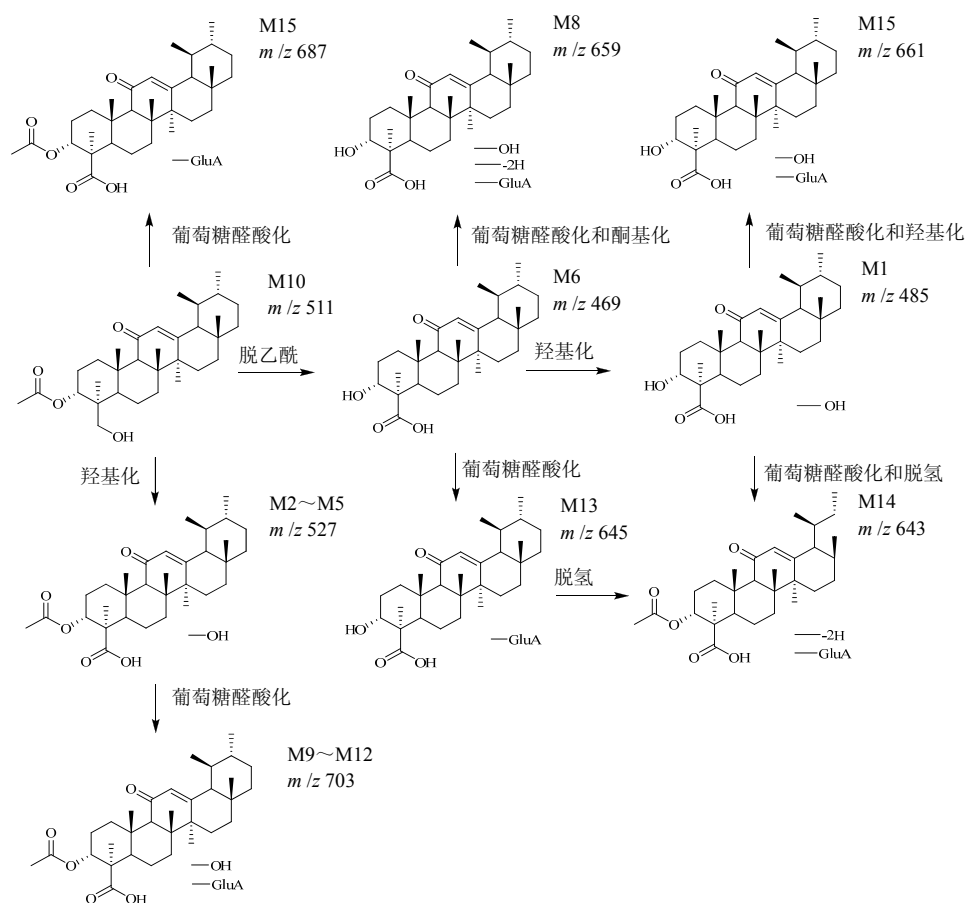


图 3 AKBA 在大鼠体内的代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathways of AKBA in rats

4 讨论

药物的多数代谢产物在结构上与原形药物相似,且具有原形药物的特征质谱裂解碎片或中性丢失,所以可以通过特征碎片离子、特征中性丢失或者特征碎片离子间质量差推断代谢产物结构。本实验应用 QTRAP 的 IDA 软件及 EPI 扫描功能,实现 1 次进样即可获得“全部有效信息”,即如果发现预设代谢物的 m/z ,仪器自动切换至 EPI,快速得到高质量的 MS^2 谱图,提高了代谢分析的效率和质量^[7-8]。药物作为外源性异物,在体内大都需要经过一系列反应转化为水溶性高的物质后排出体外。本实验共检测到 AKBA 的 15 个代谢产物,其中 I 相代谢产物 6 个,II 相代谢产物 9 个。I 相代谢主要为去乙酰化、羟基化及羟基氧化为酮基化,II 相代谢主要为葡萄糖醛酸结合物。AKBA 及其 I 相代谢产物在大鼠肝脏中与葡萄糖醛酸结合,生成极性较大的葡萄糖醛酸结合物后随胆汁排泄进入肠道,因此在胆汁中检测到的主要为 II 相结合物。经胆汁排泄进入肠道的代谢产物,在肠道中水解脱去葡萄糖醛酸,故在粪便中检测到的代谢产物均为 I 相代谢产物。由于 AKBA 的跨膜吸收能力较弱^[9],口服生物利用度低^[10],在肠道原形药物及水解产生的 I 相代谢产物的重吸收比例均较低,而吸收进入体内的药物又经历了肝肠循环,因此药物以 I 相代谢形式经粪便排泄构成了 AKBA 的主要排泄方式,而尿液中未检测到代谢产物。

参考文献

- [1] Sailer E R, Subramanian L R, Rall B, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity [J]. *Br J Pharmacol*, 1996, 117(4): 615-618.
- [2] Shao Y, Ho C T, Chin C K, *et al.* Inhibitory activity of boswellic acids from *Boswellia serrata* against human leukemia HL-60 cells in culture [J]. *Planta Med*, 1998, 64(4): 328-331.
- [3] 崔锐,周金云. 乳香化学和药理的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(6): 7-10.
- [4] Glaser T, Winter S, Groscurth P, *et al.* Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(5/6): 756-765.
- [5] 朱晓静,李峰,欧阳兵. 西黄丸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(1): 83-85.
- [6] Kruger P, Daneshfar R, Eckert G P, *et al.* Metabolism of boswellic acids *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(6): 1135-1142.
- [7] Yao M, Ma L, Duchoslav E, *et al.* Rapid screening and characterization of drug metabolites using multiple ion monitoring dependent product ion scan and postacquisition data mining on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1683-1693.
- [8] Yao M, Ma L, Humphreys W G, *et al.* Rapid screening and characterization of drug metabolites using a multiple ion monitoring-dependent MS/MS acquisition method on a hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43(10): 1364-1375.
- [9] Kruger P, Kanzer J, Hummel J, *et al.* Permeation of *Boswellia* extract in the Caco-2 model and possible interactions of its constituents KBA and AKBA with OATP1B3 and MRP2 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36(2/3): 275-284.
- [10] Buchele B, Simmet T. Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 795(2): 355-362.