

大鼠 ig 毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷后尿中代谢产物的分离和鉴定

王李俊¹, 杨 琴¹, 王 飞², 朱 盼¹

1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

2. 南昌大学抚州医学院, 江西 抚州 344000

摘要: **目的** 研究大鼠 ig 毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷后尿中代谢产物。**方法** 采用制备液相进行分离和纯化, 通过核磁和质谱数据确定化合物的结构。**结果** 从大鼠 ig 毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷后的尿中提取分离得到 5 个代谢产物, 分别为毛蕊异黄酮(M_1)、3',4',7-三羟基异黄酮(M_2)、大豆素(M_3)、毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(M_4)、毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸甲酯苷(M_5)。**结论** 代谢产物 M_5 为新的化合物。

关键词: 毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷; 代谢产物; 毛蕊异黄酮; 毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷; 毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸甲酯苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)12-2382-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.004

Isolation and identification of metabolites in rat urine after ig administration of calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside

WANG Li-jun¹, YANG Qin¹, WANG Fei², ZHU Pan¹

1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

2. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000, China

Abstract: **Objective** To study the metabolites from rats urine after ig administration of calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside. **Methods** The constituents were isolated and purified by preparative liquid chromatographic technique, and the structures were identified by spectroscopic analyses including ESI-MS, NMR, and 2D-NMR. **Results** Five metabolites were isolated from rats urine after ig administration of calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside. They were identified as calycosin (M_1), 3',4',7-trihydroxyisoflavone (M_2), daidzein (M_3), calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide (M_4), and calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide methyl ester (M_5). **Conclusion** M_5 is a new compound.

Key words: calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside; metabolite; calycosin; calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide; calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide methyl ester

毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷是中药黄芪中的主要活性成分, 具有广泛的药理活性, 包括抗肿瘤、降血压、调血脂、降血糖及抗氧化等^[1-3]。但是该化合物的体内药代过程并未进行较为系统的研究, 虽然有报道用液质联用的技术对该化合物的代谢产物进行了推测, 但是代谢产物的鉴定用 HPLC/MSⁿ 技术推测也有一定的误差, 尤其是对于异构体的分辨^[4]。本实验采用大鼠 ig 给药法, 采集了服用毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的大鼠 48 h 内尿液作为研究对象, 对它们的化学成分进行分离, 从大鼠尿液中分离出 5 个代谢产物, 经鉴定分别为

毛蕊异黄酮 (calycosin, M_1)、3',4',7-三羟基异黄酮 (3',4',7-trihydroxyisoflavone, M_2)、大豆素 (daidzein, M_3)、毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷 (calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide, M_4)、毛蕊异黄酮-3'-*O*- β -D-葡萄糖醛酸甲酯苷 (calycosin-3'-*O*- β -D-glucuronide methyl ester, M_5)。其中, 代谢产物 M_5 为新化合物。并对毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷的体内代谢规律进行了初步探讨, 为今后全面研究相似结构的药物代谢提供了参考。

1 仪器与材料

Bruker Avance 300 FT-NMR 核磁共振仪 (Bruker

收稿日期: 2017-01-31

作者简介: 王李俊 (1981—), 男, 江西东乡人, 硕士, 讲师, 主管中药师, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (0794)8228608 E-mail: www736@163.com

公司); Bruker micro TOFQ 飞行时间质谱仪 (Bruker 公司); 高效液相色谱仪: Waters 600 高效液相系统 (Waters 600 pump, 600 controller, 2487 双波长检测器), Alltech Alltima C₁₈ (250 mm×10 mm, 5 μm)。D101 大孔树脂柱为南开大学化工厂生产, 毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷购自中国食品药品检定研究院 (批号为 201520, 质量分数大于 98%)。分析纯乙腈为北京化工厂生产, 生理盐水为自制, 色谱纯乙腈为 Fisher Chemicals 公司产品, 纯净水为乐百氏公司饮用纯净水。Sprague-Dawley 雄性大鼠 (180~220 g), 清洁级, 购于江西中医药大学动物室, 许可证号 SCXK (赣) 2015-0015。

药品混悬液的制备: 称取毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 300 mg, 加入生理盐水 30 mL, 研磨并经超声使混悬均匀, 制成质量浓度为 10 mg/mL 的药物混悬液。

2 提取与分离

雄性纯种 SD 大鼠 6 只, 分别置于 6 个代谢笼中, 禁食 24 h 后分别经 ig 给予毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷混悬液 10 mL/kg, 12 h 后追加 1 次, 收集给药后 48 h 内尿样, 将尿样滤纸滤过后上 D101 大孔树脂柱, 水、50%乙醇、90%乙醇梯度洗脱。50%乙醇洗脱部位浓缩后经制备液相进行分离。色谱柱为 Alltech Alltima C₁₈ (250 mm×10 mm, 5 μm), 检测波长为 280 nm。流动相为乙腈-水, 含 0.2% 的乙酸, 体积流量 3 mL/min。在乙腈-水 (3:7) 条件下得到化合物 M₄ (*t_R*=24 min) 和 M₅ (*t_R*=32 min)。90%乙醇大孔树脂洗脱部位经制备液相分离, 条件同上, 在流动相为乙腈-水 (4:6) 的条件下, 分别洗脱得到化合物 M₁ (*t_R*=38 min)、M₂ (*t_R*=43 min) 和 M₃ (*t_R*=52 min)。

3 结构鉴定

代谢产物 M₄: ESI-MS *m/z*: 483 [M+Na]⁺, 比毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的相对分子质量多 14, 氢谱和碳谱信号两者比较类似, 比较明显的区别是糖上信号 M₄ 的 δ 172.4 (C-6'') 取代了毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的 δ 60.6 (C-6''), 提示该化合物为毛蕊异黄酮的葡萄糖醛酸化产物。至于葡萄糖醛酸基的结合位点, 可以从 HMBC 中得到启示: 葡萄糖醛酸基的端基氢信号 δ 5.09 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'') 与 δ 145.4 (C-3') 相关 (图 1)。因此该化合物的结构为毛蕊异黄酮-3'-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷。该化合物在文献中有报道^[5], 但是没有报道波谱数据,

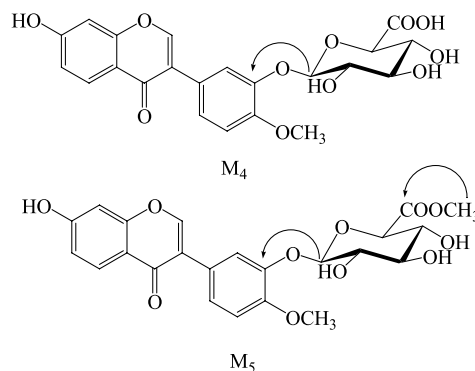


图1 M₄和M₅中关键HMBC相关信号

Fig 1 Key HMBC correlations for M₄ and M₅

本文为首次报道。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.29 (1H, s, H-2), 7.96 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.94 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6), 6.87 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.24 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 7.19 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 5.09 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1''), 3.30~3.50 (3H, m, H-2''~4''), 3.95 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-5''), 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 153.6 (C-2), 123.6 (C-3), 174.7 (C-4), 127.3 (C-5), 115.6 (C-6), 162.7 (C-7), 102.3 (C-8), 157.6 (C-9), 116.8 (C-10), 124.6 (C-1'), 116.3 (C-2'), 145.4 (C-3'), 149.6 (C-4'), 112.1 (C-5'), 123.6 (C-6'), 99.9 (C-1''), 72.9 (C-2''), 76.7 (C-3''), 72.4 (C-4''), 76.1 (C-5''), 172.4 (C-6''), 55.9 (4'-OCH₃)。M₅ 比 M₄ 相对分子质量多 14, 氢谱和碳谱信号两者比较类似, 较明显的区别是 M₅ 比 M₄ 多出一组甲基信号: δ_H 3.60 (3H, s, -COOCH₃) 和 δ_C 52.1 (COOCH₃)。提示该化合物为 M₄ 的甲酯化产物。这也可以从 HMBC 中得到证实: δ_H 3.60 (3H, s, H-COOCH₃) 与 δ_C 169.4 (C-6'') 相关 (图 1)。因此该化合物的结构为毛蕊异黄酮-3'-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸甲酯苷。

代谢产物 M₅: ESI-MS *m/z*: 497 [M+Na]⁺, 比 M₄ 相对分子质量多 14, 氢谱和碳谱信号两者比较类似, 较明显的区别是 M₅ 比 M₄ 多出一组甲基信号: δ_H 3.60 (3H, s, -COOCH₃) 和 δ_C 52.1 (COOCH₃)。提示该化合物为 M₄ 的甲酯化产物。这也可以从 HMBC 中得到证实: δ_H 3.60 (3H, s, H-COOCH₃) 与 δ_C 169.4 (C-6'') 相关 (图 1)。因此该化合物的结构为毛蕊异黄酮-3'-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸甲酯苷。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.29 (1H, s, H-2), 7.95 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6), 6.86 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 7.25 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 7.19 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 5.16 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1''), 3.30~3.50 (3H, m, H-2''~4''), 3.95 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-5''), 3.60 (3H, s, -COOCH₃), 3.76 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 153.6 (C-2), 123.2 (C-3), 174.7 (C-4), 127.5 (C-5), 115.3 (C-6), 162.6 (C-7), 102.3 (C-8), 157.6 (C-9),

116.8 (C-10), 124.6 (C-1'), 116.3 (C-2'), 145.6 (C-3'), 149.1 (C-4'), 112.5 (C-5'), 123.4 (C-6'), 99.9 (C-1''), 72.9 (C-2''), 75.3 (C-3''), 71.4 (C-4''), 75.7 (C-5''), 169.4 (C-6''), 55.9 (4'-OCH₃), 52.1 (COOCH₃)。经 Scifinder 检索, 该化合物为新化合物, 也无合成报道。

经与文献中氢谱、碳谱和质谱数据对照, M₁, M₂ 和 M₃ 分别鉴定为毛蕊异黄酮、3',4',7-三羟基异黄酮、大豆素^[4-6]。

综上所述, 可以推断毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷在大鼠体内的部分代谢途径如图 2 所示。

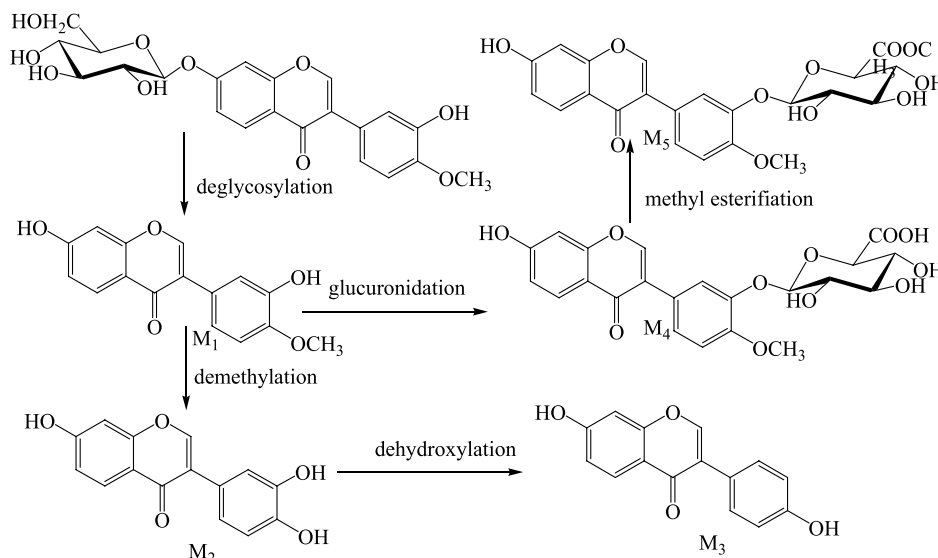


图 2 大鼠 ig 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷后尿中代谢产物结构及可能代谢途径推测

Fig. 2 Structures of metabolites in rats urine derived from calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside and proposed metabolic pathways for their production

4 讨论

毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷作为一个报道有多种药理活性的化合物, 体内代谢过程并没有做过系统的研究。本实验首次采用大鼠 ig 给药法, 采集了 ig 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷的大鼠 48 h 内尿液, 从中分离鉴定了 5 个代谢产物。其中 M₄ 虽然有文献报道^[5], 是从大鼠 ig 补阳还五汤后的尿液中分离得到, 并未指出该化合物具体来源于何化合物, 另外也无具体核磁数据报道, 本实验首次对其 NMR 数据进行了归属。另外, M₅ 是 1 个新化合物。这 5 个代谢产物中 M₁、M₂、M₃ 是 I 相代谢产物。M₄ 和 M₅ 为 II 相代谢产物。从中可以看出, ig 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷后, 在胃肠道经水解或肠内菌代谢后为毛蕊异黄酮后被吸收, 入血后在体内发生去羟基、去甲基反应以及葡萄糖醛酸化, 并进一步酯化。通过对毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷的体内代谢规律的初步探讨, 可以为研究相似结构的药物代谢提供参考。

参考文献

- [1] Fu S, Gu Y, Jiang J Q, *et al.* Calycosin-7-O-β-D-glucoside regulates nitric oxide/caveolin-1/matrix metalloproteinases pathway and protects blood-brain barrier integrity in

experimental cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 692-701.

- [2] Liu X H, Zhao J B, Guo L, *et al.* Simultaneous determination of calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, calycosin, formononetin, astragaloside IV, and astragaloside II in rat plasma after oral administration of *Radix Astragali* extraction for their pharmacokinetic studies by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 677-686.
- [3] Li W, Sun Y N, Yan X T, *et al.* Flavonoids from *Astragalus membranaceus* and their inhibitory effects on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(2): 186-192.
- [4] Chen L Y, Li Z X, Tang Y H, *et al.* Isolation, identification and antiviral activities of metabolites of calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(2): 382-389.
- [5] Yang D H, Ren X L, Xu F, *et al.* Absorptive constituents and their metabolites in drug-containing urine samples from Wuzhishan miniature pigs orally administered with Buyang Huanwu decoction [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(1): 11-21.
- [6] Du X G, Bai Y J, Liang H, *et al.* Solvent effect in ¹H NMR spectra of 3'-hydroxy-4'-methoxy isoflavonoids from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* [J]. *Magn Reson Chem*, 2006, 44(7): 708-712.