

去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在大鼠体内的生物转化

黄敏洁, 郝静超, 王继良, 王伟

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在大鼠体内的生物转化。 **方法** 去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱对大鼠经口投药 30 min 内收集到的胆汁样品进行高效液相色谱串联质谱仪 (LC-MS) 测定。 **结果** 发现去氢钩藤碱的底物和 2 个 I 相代谢物、2 个 II 相代谢物可以检出, 而异去氢钩藤碱的 I 相代谢物没有检出, 但 II 相代谢物检出 4 个。 **结论** 分析结果显示这 2 个四环氧化吡啶生物碱的代谢与钩藤碱、异钩藤碱的肝脏代谢非常相似, 并且都存在经口投药之后的肝首过效应。体外实验验证了以上代谢过程的结论, 并显示是肝微粒体酶 CYP450 对去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱在肝脏的生物转化起催化作用。

[关键词] 去氢钩藤碱; 异去氢钩藤碱; 生物转化; 代谢

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0026 - 06

Biotransformation of Corynoxine and Isocorynoxine in Rats

HUANG Min - Jie, HAO Jing - Chao, WANG Ji - Liang, WANG Wei

(School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Provincial Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the biotransformation of Corynoxine and Isocorynoxine in Rats. **Methods** Corynoxine and isocorynoxine were administered orally to rats, and the bile samples of rats were collected to analyze by LC-MS. **Results** It was found for the bile samples taken for first 30 mins that two phase I metabolites and two phase II ones were detected for corynoxine by LC-MS. However for isocorynoxine there were 4 phase II metabolites found but no phase I ones in the same sample. **Conclusions** There is a hepatic first-pass effect after their oral administration. According to analysis of samples in vivo and in vitro by LC-MS and comparison with the fate of rhynchophylline and isorhynchophylline in rats, corynoxine and isocorynoxine seem to have a similar biotransformation. Also incubation of the substrates with rat liver microsomes show that CYP450 plays a key role in their metabolic catalysis.

[Key words] Corynoxine; Isocorynoxine; Biotransformation; Metabolism

钩藤钩是茜草科钩藤属植物的带钩茎枝, 作为钩藤散与抑肝散等传统中药的主要成分广泛应用于治疗头痛、眩晕、高血压等临床症状。1999 年经过临床试验, Terasawa Katsutoshi 等推荐钩藤散作为治疗血管性痴呆的有效汉方药^[1]。2003 年 Watanabe Hiroshi 等论证了钩藤散的抗痴呆作用源于钩藤钩中所含有的四环氧化吡啶生物碱——钩藤碱 (Rhynchophylline)、异钩藤碱 (Isorhynchophylli-

ne)、去氢钩藤碱 (Corynoxine)、异去氢钩藤碱 (Isocorynoxine) 的消除自由基、抗高血压及抗兴奋毒素作用^[2]。

去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在化学结构上的唯一区别在于 C-7 的构型, 前者是 R 型, 后者是 S 型, 化学式都是 $C_{22}H_{26}N_2O_4$, 相对分子量都是 382.5, 见图 1。

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011Y177); 云南省高校药学重点实验室重点项目 (2011YXZD02)

[作者简介] 黄敏洁 (1986~), 女, 四川雅安市人, 在读硕士研究生, 主要从事药物代谢与药物动力学研究工作。

[通讯作者] 王伟. E-mail:wangwei.kmu@hotmail.com

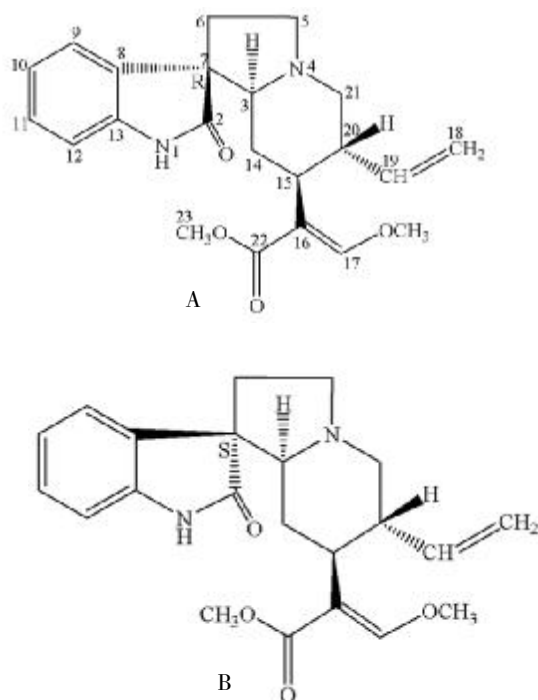


图 1 去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱的结构式

Fig. 1 Structures of corynoxine and isocorynoxine

A:去氢钩藤碱; B:异去氢钩藤碱.

经研究发现钩藤碱、异钩藤碱可以有效保护大鼠大脑海马由于脑缺血引起的神经元损伤的作用^[3]。2008 年去氢钩藤碱被发现具有抑制大鼠主动脉平滑肌细胞的增殖的作用^[4]。

钩藤钩中的四环氧化吡啶生物碱在体内的代谢活动、这些化合物及其代谢物、以及全部有效成分之间的药物相互作用引起了研究者的兴趣。王伟等对钩藤碱、异钩藤碱在大鼠体内的代谢和药物动力学进行了较为深入的研究。经高效液相质谱联用方法 (LC-MS) 测定, 发现在经口投药后, 在大鼠体内钩藤碱、异钩藤碱有肝首过效应, 并且在 I 相代谢中分别被羟基化为 10- 羟基钩藤碱、11- 羟基钩藤碱和 10- 羟基异钩藤碱、11- 羟基异钩藤碱, 在 II 相代谢中这些 I 相代谢物在同样的碳位上被葡萄糖醛酸化^[5-7]。尤其有趣的是在大鼠大脑中检测到钩藤碱和异钩藤碱^[5-7], 这对于解释这 2 个化合物对大鼠的脑保护作用以及钩藤钩应用于脑疾病的药理作用解释提供了物质基础。同时另一对四环氧化吡啶生物碱去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱在大鼠体内的动态也日渐进入研究者的视野。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪串联 Bruker Daltonics[®] Esquire 3 000 plus 质谱仪, β -葡萄糖醛酸酶 (B-1 型), 大鼠肝微粒体酶 (M9066), SKF-525A, β -NADPH, UDPGA 等购自美国 Sigma 公司。其它化学试剂都是分析纯级。LC-MS 的洗脱剂都是 HPLC 级。去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱的标准品由日本 Tsumura 公司提供, 该标准品使用前一直置于 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。钩藤钩购置于日本大阪 Tochimoto Tenkaido 公司。

1.2 方法

1.2.1 检测系统及方法 Agilent 1 100 系列高效液相色谱仪串联 Bruker Daltonics[®] Esquire 3 000 plus 质谱仪是本研究主要研究设备, 样品经高效液相色谱系统后 20% 的洗脱物分流到电喷雾离子化检测器 (ESI) 进行质谱分析, 离子化碎片设定在母离子的 27%, 离子阱扫描范围是正离子模式下质荷比 (m/z) 50 ~ 1 000, 干燥气流 10.0 L/min, 干燥温度 $360\text{ }^{\circ}\text{C}$; 高效液相色谱系统使用的色谱柱是 5C18-MS-II 型、Cosmosil 填充柱 (4.6 i.d. \times 150 mm), 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 紫外检测波长设定在 245 nm、254 nm、230 nm、208 nm 和 280 nm; 梯度洗脱系统由溶剂 B 和 A 组成, B 是含 0.01% 体积比的乙酸的乙腈溶液, A 是 0.01% 体积比的乙酸水溶液, B 在 15 min 内由 20% 匀速增至 70%, 之后 5 min 内增至 100%, 流速为 1.0 mL/min。所有的样品在 LC-MS 进样分析前要过滤 (0.45 μm) 处理, 进样量为 2.0 ~ 5.0 μL 。LC-MS 控制系统及数据处理采用 Agilent 化学工作站及 EsquireControl Version 5.1 和 DataAnalysis Version 3.1 软件。

标准品、样品的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱由 Jeol ECX-400 核磁共振仪检测, 溶剂是 CD_3OD , TMS 为内标。

1.2.2 去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱的提取、分离、纯化及投药 钩藤钩经乙酸乙酯回流提取 2 h (\times 3), 提取物经硅胶柱分离, 以及制备高效液相色谱分离纯化而得到去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱, 经与标准品的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱对照, 与标准品的 LC-MS 分子离子峰的保留时间和 m/z 对比, 确证为去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱, 其纯度达到 HPLC 测定的 98%。使用前的去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱置于 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱的投药量分别为 35 mg/kg、40 mg/kg, 投药载体为 DMSO。

1.2.3 实验动物、大鼠胆汁引流和样品处理 7 周龄雄性 Wistar 大鼠购置于日本 Sankyo Labo 公司, 在大鼠饲养室喂养 3 周, 实验前 3 d 在代谢笼中用

标准饲料喂养, 饮用水为 121 °C 高温消毒 15 min 之后的自然冷却水, 代谢室光照间隔为 12 h. 实验过程中未见实验动物有明显的不良反应, 动物实验结束后, 实验动物被大剂量注射戊巴比妥钠致死. 动物饲养和动物实验在富山大学动物实验中心进行, 符合富山大学生命科学研究中心制订的动物实验操作和伦理规范.

大鼠总胆管插管 (PE50: i.d. 0.58 mm, o.d. 0.96 mm) 后, 收集胆汁并记录单位时间内的分泌量. 胆汁分泌量稳定后, 对大鼠分别经口投去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱的 DMSO 溶液, 胆汁引流到在冰水浴中保存的收集管中, 大鼠的胆汁收集 30 min, 收集到的胆汁置于 -22 °C 的冰箱中保存待分析^[5-7].

收集到的胆汁一部分 (2.0 ~ 5.0 μ L) 直接进行 LC-MS 分析, 另取 100.0 μ L 加入 5 000 Sigma 单位 β -葡萄糖醛酸酶, 在 1 mL pH 值为 5.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲体系 (PBS) 中 37 °C 下水解 12 h. 混合物在用 3 mL 甲醇和 6 mL 水预处理好的 Waters Sep-Pak[®] Vac cartridge 固相萃取柱中进行固相萃取 (SPE), 3 mL 的甲醇洗脱物在室温下浓缩干燥后再次溶解在甲醇中进行 LC-MS 分析. 动物实验和 LC-MS 分析重复 3 次.

1.2.4 体外 I 相反应 由 100 μ M 去氢钩藤碱或异去氢钩藤碱、蛋白质含量 1.0 mg 的肝微粒体酶、pH 值为 7.4 的混有 5.0 mM 氯化镁的 0.1 M PBS 组成 1.0 mL 的反应体系, 该体系在 37 °C 下加热 3 min 后由 2.0 mM β -NADPH 触发反应, 之后在 37 °C 水浴环境以 100 次/min 的振荡速度维持反应. 反应 1 h 后, 反应体系中加入 1 mL 冰镇乙酸乙酯来终止反应, 该混合物经涡旋后提取上清液, 重复 3 次, 全部上清液经室温真空减压干燥后溶解在甲醇中进行 LC-MS 分析.

1.2.5 肝微粒体酶的活性 将 0.4 mM 肝微粒体酶抑制剂 SKF-525A 的 DMSO 溶液加入到上述反应体系中, DMSO 的总体积不超过培养体系的体积的 1%, 由去氢钩藤碱或异去氢钩藤碱来触发反应. 培养过程、反应终止和样品准备方法同上.

1.2.6 体外 II 相反应 将蛋白质含量 1.0 mg 的肝微粒体酶加入到 pH 值为 7.4 的 0.5 mL 0.1 M PBS 中在冰浴中由丙甲甘肽活化 15 min, 肝微粒体酶、2.0 mM β -NADPH、去氢钩藤碱或异去氢钩藤碱、丙甲甘肽、5.0 mM 的氯化镁在同样 1.0 mL 的缓冲体系中 37 °C 下预热 3 min, 然后加入 UDPGA 触发反应. 反应 2 h 后, 加入同样体积的冰镇甲醇来终止反应, 混合体系涡旋后在 6 000 r/min 下离心 5

min 钟, 收集上清液, 重复 3 次甲醇提取过程. 上清液在不高于 37 °C 下减压干燥, 部分残留物溶解在甲醇中进行 LC-MS 分析.

1.2.7 脱葡萄糖醛酸化反应 上述剩余部分的残留物加入到 pH 值为 5.0 的 0.1 M PBS 和 5 000 Sigma 单位的 β -葡萄糖醛酸酶组成 1 mL 的反应体系, 在 37 °C 水浴环境以 100 次/min 的振荡速度维持反应. 反应 6 h 后加入 1 mL 冰镇乙酸乙酯来终止反应, 该混合物经涡旋后提取上清液, 重复 3 次, 全部上清液经室温真空减压干燥后溶解在甲醇中进行 LC-MS 分析.

2 结果

去氢钩藤碱对大鼠经口投药之后, 经对 30 min 内收集到胆汁样品 LC-MS 检测分析, 发现在胆汁样品中同时出现去氢钩藤碱的 I 相代谢物 M1 和 M2、II 相代谢物 M3 和 M4, 见表 1 和图 2. M1-4 的质谱显示去氢钩藤碱的肝脏代谢与钩藤碱的肝脏代谢非常相似, I 相代谢物在正离子检测模式下是底物的相对分子量增加 16, 给判断 I 相代谢是底物的羟基化以有力的指引; II 相代谢物在正离子检测模式下是底物羟基化后的相对分子量增加 176, 同样预示了 II 相代谢过程极有可能是葡萄糖醛酸化^[5-7].

异去氢钩藤碱对大鼠经口投药之后, LC-MS 检测分析 30 min 内收集到胆汁样品未见 I 相代谢物的出现, 但发现 II 相代谢物有 4 个, 这显然要比去氢钩藤碱、钩藤碱、异钩藤碱的代谢要复杂. 但这 4 个代谢物的分子离子峰 m/z 值同样显示代谢过程可能是先羟基化, 再葡萄糖醛酸化^[5-7], 见表 1、图 3. 但是去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱的体外 I、II 相代谢、脱葡萄糖醛酸化反应研究确证了这两个化合物在大鼠体内在 I 相代谢中底物被羟基化后在 II 相代谢中被葡萄糖醛酸化的过程的可能性. 对于异去氢钩藤碱而言, 增加投药后的胆汁引流时间再进行 LC-MS 分析非常必要.

去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱对大鼠经口投药之后收集的胆汁样品中发现底物和它们的代谢物, 说明它们经口投药后, 在大鼠体内有肝首过效应. LC-MS 检测发现去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱经口投药后胆汁中有与钩藤碱、异钩藤碱 II 相代谢过程类似的代谢产物, 表明去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱的肝脏代谢与之有同样生物转化类型的可能性.

去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱在体外与肝微粒

体酶的培养实验中加入 CYP450 抑制剂 SKF-525A 相代谢是在 CYP450 酶的催化作用下进行的。的研究表明, 去氢钩藤碱和异去氢钩藤碱的 I、II

表 1 正离子模式检测到的去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱 I、II 相代谢物的主要分子离子峰碎片

Tab. 1 Main fragments of phase I, II metabolites of corynoxine and isocorynoxine detected with positive ion mode

底物	底物 I 相代谢物的 m/z			底物 II 相代谢物的 m/z		
	MS	MS/MS	MS3	MS	MS/MS	MS3
去氢钩藤碱	399	367, 335	335, 279	575	399	367, 335
异去氢钩藤碱		ND		575	399	367, 335

注: ND, 在投药 30 min 内收集的胆汁样品中经 LC-MS 未检出。

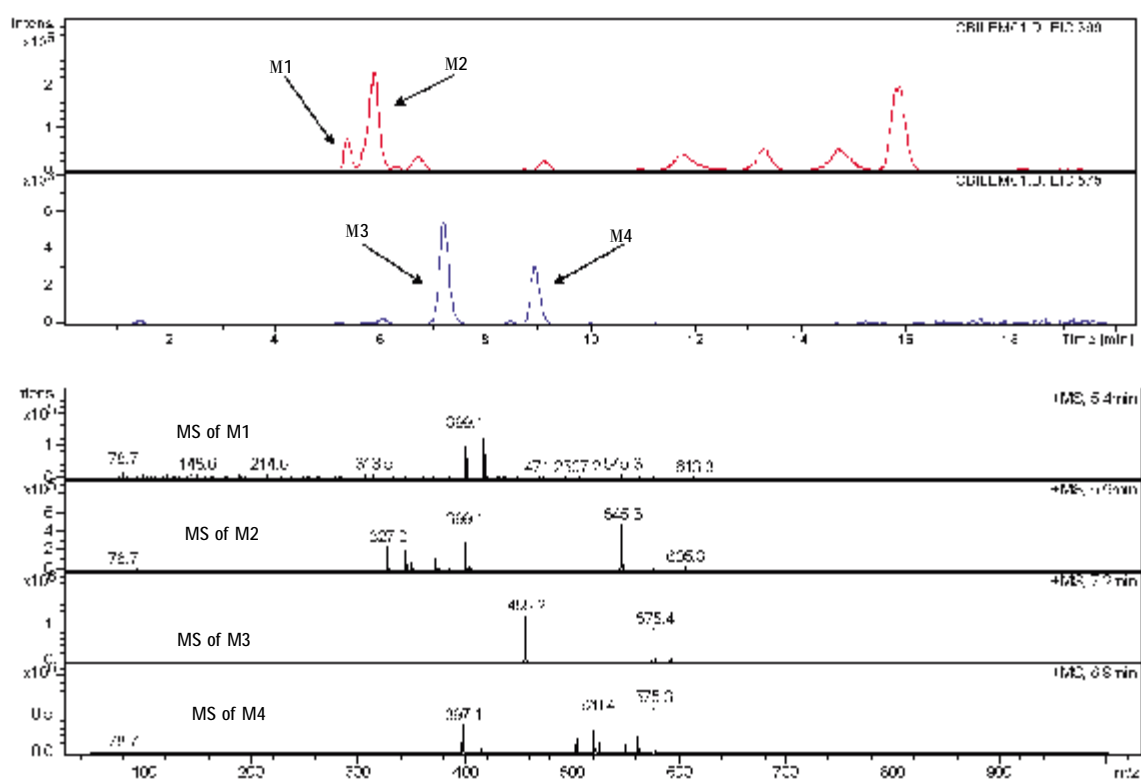


图 2 去氢钩藤碱经口投药 30 min 内大鼠胆汁样品中的 I、II 相代谢物抽提分子离子峰色谱图 (EIC) 和质谱图。正离子模式检测, M1 ~ 2: m/z (399 ± 0.5); M3 ~ 4: m/z (575 ± 0.5)

Fig. 2 Extracted ion chromatograms (EIC) and mass spectra of phase I, II metabolites of corynoxine for the bile sample collected in the first 30 mins after oral administration, detected with the positive ion mode, M1 ~ 2: m/z (399 ± 0.5); M3 ~ 4: m/z (575 ± 0.5)

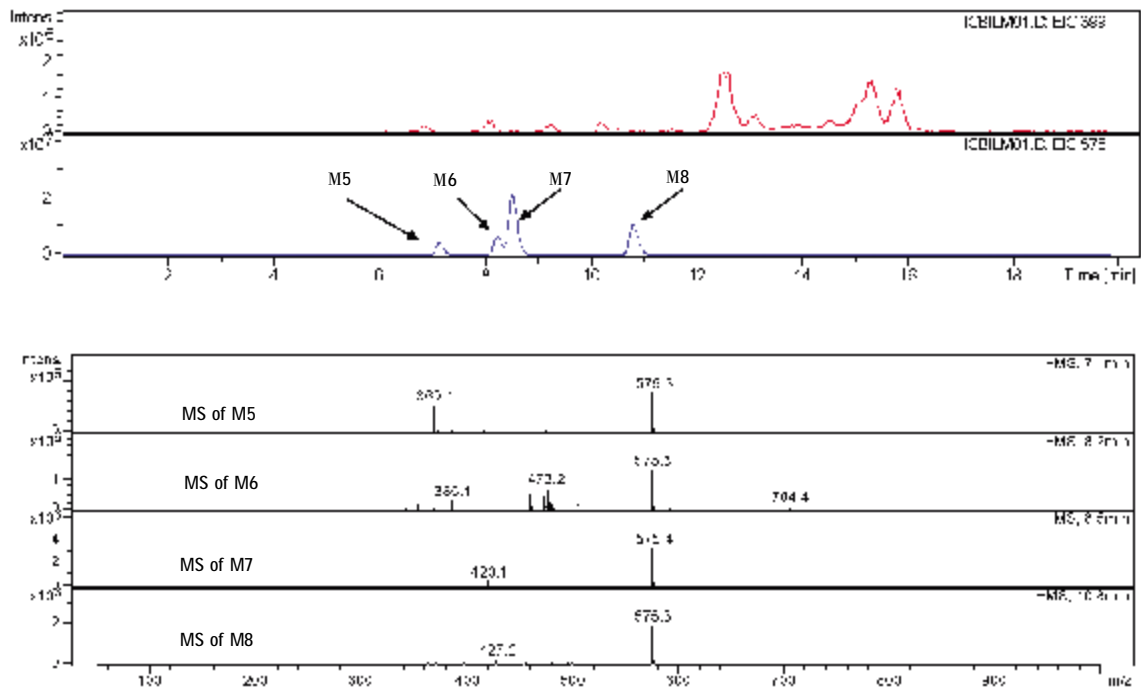


图 3 异去氢钩藤碱经口投药 30 min 内大鼠胆汁样品中的 II 相代谢物抽提分子离子峰色谱图 (EIC) 和质谱图。正离子模式检测, M5 ~ 8: m/z (575 ± 0.5)

Fig. 3 Extracted ion chromatograms (EIC) and mass spectra of phase II metabolites of isocorynoxine for the bile sample collected in the first 30 mins after oral administration, detected with the positive ion mode, M5 ~ 8: m/z (575 ± 0.5)

3 讨论

钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱作为钩藤钩中主要的 4 个四环氧化吡啶生物碱, 对钩藤钩的临床药效作用起着关键作用。钩藤碱、异钩藤碱与去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱的结构差别唯一在于前两者 C-18 与 C-19 之间是饱和键, 而后两者是碳碳双键, 它们在体内、外的代谢过程有一定的相似性是可以预期的。所以根据以上实验数据可以预测去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱的 I 相代谢过程是羟基化、II 相代谢过程是 I 相代谢产物的葡萄糖醛酸化过程对于指导下一步验证代谢物的结构有一定意义。

根据 LC-MS 图谱中的分子离子峰可以发现, 钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱的 I、II 相代谢过程有相似性。进一步确定去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱的 I、II 相代谢物的结构, 以及底物和代谢物在大鼠体内的吸收、分布、代谢、排泄机制、底物之间、代谢物之间的药物相互作用将有助于完全阐明这 4 个氧化吡啶生物碱的体内动态。

[致谢: 王伟受教育部第 44 批留学回国人员科研启动基金资助。王继良指导的昆明医科大学

大学生创新性实验计划项目 (No. CX201148) 参与了本文的部分工作。本项目的部分技术路线得到日本国立富山大学服部征雄教授、内蒙古大学马超美教授的指导]。

[参考文献]

- [1] TAKASHI ITOH, YUTAKA SHIMADA, KATSUTOSHI TERASAWA. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1999, 111(2-3): 155 - 173.
- [2] TAI-HYUN KANG, YUKIHISA MURAKAMI, HIROMITSU TAKAYAMA, et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus [J]. *Life Sciences*, 2004, 76(3): 331 - 343.
- [3] JU JIANG, TAKUJI YAMAGUCHI, NAOKO FUNAKUSHI, et al. Oral administration of Yukukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice [J]. *Journal of Dermatological Science*, 2009, 56(1): 37 - 42.

(下转第 41 页)