

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.16.0918

·论著·

LC-MS/MS 法测定大鼠口服缩泉胶囊后胆汁中的代谢物(Ⅱ)

陈峰^{1,2},李海龙^{1,2},赖伟勇^{1,2},谭银丰^{1,2}

(1.海南省药用植物研究与开发重点实验室,海南 海口 571101;

2.海南医学院药学院,海南 海口 571101)

【摘要】目的 研究大鼠灌胃缩泉胶囊后,益智黄酮(杨芽黄素、伊砂黄素、白杨素、山奈素和芹菜素-4',7-二甲氧醚)二相结合产物的酶水解。**方法** 雄性 Sprague-Dawley 大鼠胆管插管手术完毕后经灌胃给予缩泉胶囊(1.64 g/kg)后收集0~4 h胆汁。胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶(1000 U/ml, pH 为 5 的乙酸钠缓冲液)处理后,利用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS/MS)进行分析。**结果** 益智黄酮的葡萄糖醛酸结合物在酶水解处理后,代谢物的色谱峰消失,释放出黄酮的原形物质形式。虽然脱甲基反应后形成葡萄糖醛酸结合物也被水解,但并未能检测到脱甲基产物。**结论** β -葡萄糖醛酸水解酶处理可进一步确定益智黄酮在大鼠胆汁中的物质形式,也为定量分析奠定基础。

【关键词】 缩泉胶囊;益智;黄酮;酶水解;液相色谱-质谱联用仪**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2014)16—2347—04

Identification of known chemicals and their metabolites in rat plasma after oral administration of SuoQuan capsules using LC-MS/MS (Ⅱ). CHEN Feng^{1,2}, LI Hai-long^{1,2}, LAI Wei-yong^{1,2}, TAN Yin-feng^{1,2}. 1. Hainan Provincial Key Laboratory of R&D of Tropical Herbs, Haikou 571101, Hainan, CHINA; 2. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571101, Hainan, CHINA

[Abstract] **Objective** To study enzymatic hydrolysis of the flavonoids' (tectochrysin, izalpinin, chrysin, kaempferide and apigenin-4',7-dimethylether) metabolites in rat bile after oral administration of SuoQuan capsules. **Methods** Cannulas were surgically inserted into the bile duct of male Sprague-Dawley rats ($n=3$) under anesthesia (pentobarbital, 50 mg/kg, i.p.), and the bile was collected for 4 h after oral administration of SuoQuan capsules (1.64 g/kg, suspended in 0.5% w/v sodium carboxymethylcellulose). After β -glucuronidase (1000 units/ml in pH 5 acetate buffer) treatment, these phase II metabolites in rat bile samples were hydrolyzed and their aglycones were analyzed using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with selected reaction monitoring mode. **Results** After β -glucuronidase treatment, the mono-or di-glucuronide metabolites of Yizhi flavonoids (tectochrysin, izalpinin, chrysin, kaempferide and apigenin-4', 7-dimethylether) could not be detected. On the contrast, the corresponding aglycones were liberated from their conjugated forms. However, the O-demethylation metabolites of izalpinin and apigenin-4', 7-dimethylether could not be measured, although their glucuronidated conjugates had been found in the rat bile samples. **Conclusion** The enzymatic hydrolysis via β -glucuronidase is helpful for the identification of Yizhi flavonoids' phase II metabolites. Meanwhile, this paper also lays a partial foundation for quantitative analysis of these aglycones.

【Key words】 SuoQuan capsules; *Alpinia oxyphylla* (Yizhi); Flavonoids; Enzymatic hydrolysis; LC-MS/MS

尿失禁主诉为尿液不自主的流出,是一种常见的、令人苦恼的疾病,给患者的生活质量带来不利影响^[1]。尿失禁有多种致病因素,如膀胱功能障碍(过度活动或活动低下)、物理性的梗阻、感染或者药物的副作用(如咖啡因)。某些较为严重的疾病如癌症、糖尿病、中风、帕金森氏疾病、多发性硬皮病等也可引起尿失禁。根据全国六大的流行病学调查结果推断,中国女性尿失禁患者平均发病率为 30.9%,且年龄越大发病率越高。目前,人们对尿失禁的报道、诊断和治疗显著不足,对尿失禁的重视程度远远不够。我国已经进入老龄化社会,老年人口所占比例日趋增加,尿

失禁问题将对个人、家庭及社会带来巨大困扰。

尿失禁的药物治疗越来越受到重视,化学药物(如托特罗定、达非那新和奥昔布宁等)在整个药物治疗市场份额中占据主导地位,而缩泉丸及改进制剂缩泉胶囊是为数不多的治疗尿失禁的中药品种。缩泉丸源于宋代的《魏氏家藏方》^[2],由益智仁、乌药和山药三味中药组成,用于治疗多尿、尿频、遗尿,被 2010 版《中国药典》一部收载^[3]。缩泉丸在国内 9 家企业生产(其中 8 个为水丸,1 个为胶囊),其中缩泉胶囊在 2012 年的销售额达到 5 000 万元。缩泉丸多成分体内过程研究较为薄弱,机体如何处置缩泉丸中的化学

物质尚待阐明。我们分析了缩泉丸中主要成分的含量^[4],并对大鼠灌胃缩泉丸后主要成分益智酮甲在大鼠系统中的暴露进行了初步研究^[5]。缩泉丸中黄酮类物质的胆汁排泄研究有助于我们了解这些物质的转运过程,作为这项研究的第一部分,本课题组已经测定了大鼠胆汁中的二相结合产物,本文主要探讨这些二相代谢产物的酶水解。

1 材料与方法

1.1 试药 β -葡萄糖醛酸水解酶(HP-2型,来自海曼蜗牛,每毫升含有100 000 U的 β -葡萄糖醛酸水解酶和7 500 U的硫酸酯酶水解酶)购自Sigma公司。其他同“LC-MS/MS法测定大鼠口服缩泉胶囊后胆汁中的代谢物(I)^[6]。

1.2 实验动物、给药及样品采集 同“LC-MS/MS法测定大鼠口服缩泉胶囊后胆汁中的代谢物(I)。

1.3 胆汁样品的酶水解^[7] 取100 μ l胆汁样品,加入200 μ l β -葡萄糖醛酸水解酶(1 000 U/ml,pH为5的乙酸钠缓冲液),再加入50 μ l抗坏血酸(5 mg/ml),轻轻振摇后,在水浴上37°C孵育60 min。孵育结束后,加入1 000 μ l乙酸乙酯放在漩涡振荡器上震荡5 min,结束后将样品至于离心机中,离心10 min,吸取上清液900 μ l,在N₂下吹干,加入50 μ l甲醇,在漩涡振荡器上震荡5 min,再离心10 min,吸取40 μ l样品溶液置于样品瓶的内衬管中,进样量为10 μ l。

1.4 LC-MS/MS分析方法 色谱条件和质谱条件同“LC-MS/MS法测定大鼠口服缩泉胶囊后胆汁中的代谢物(I)。

2 结果

2.1 白杨素二相代谢产物的水解 大鼠灌胃缩泉胶囊后,大鼠胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶水解后白杨素及其可能的代谢产物见图1。经水解后,大鼠胆汁中处于结合状态的白杨素被释放出来(保留时间为5.94 min),原来胆汁中的白杨素单葡萄糖醛酸

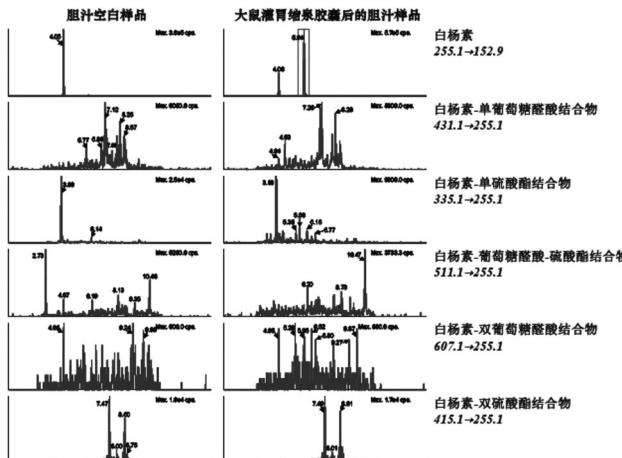


图1 大鼠胆汁中白杨素二相代谢产物的水解

化代谢物(保留时间为4.14 min)和双葡萄糖醛酸代谢物(保留时间为3.11 min)的色谱峰消失。

2.2 杨芽黄素二相代谢产物的水解 大鼠灌胃缩泉胶囊后,大鼠胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶水解后杨芽黄素及其可能的代谢产物见图2。胆汁中杨芽黄素的单葡萄糖醛酸化代谢物(保留时间为4.84 min)的色谱峰消失,释放出杨芽黄素的原形产物(保留时间为7.06 min)。保留时间为5.23 min的色谱峰结构需要进一步的研究。

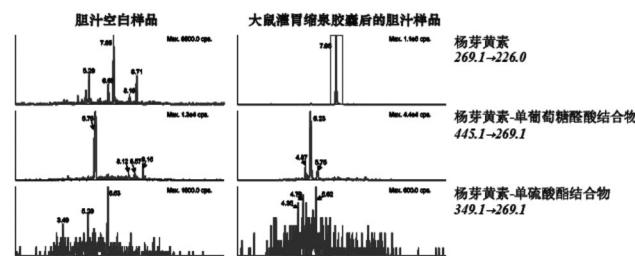


图2 大鼠胆汁中杨芽黄素二相代谢产物的水解

2.3 伊沙黄素二相代谢产物的水解 大鼠灌胃缩泉胶囊后,大鼠胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶水解后伊沙黄素及其可能的代谢产物见图3和图4。胆汁样品经甲醇沉淀后未出现伊沙黄素原形物质形式,但酶水解后伊沙黄素从结合物中被释放出来(保留时间为7.30 min)。保留时间为4.28 min的伊沙黄素单葡萄糖醛酸化代谢物以及保留时间为3.79 min双葡萄糖醛酸代谢物的色谱峰消失,但5.29 min的色谱峰在酶水解时未完全消失。由图4可知,保留时间为

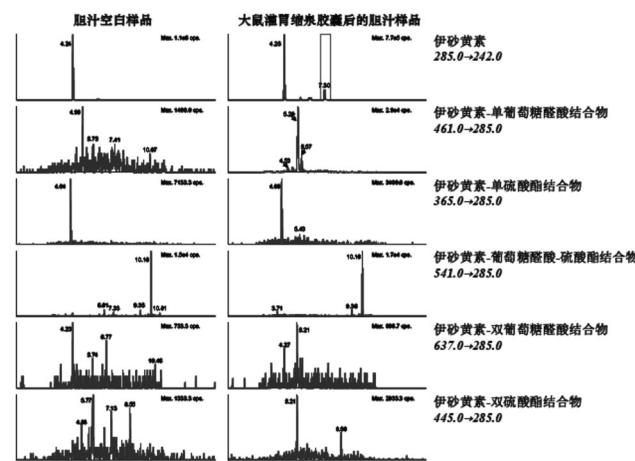


图3 大鼠胆汁中伊沙黄素二相代谢产物的水解

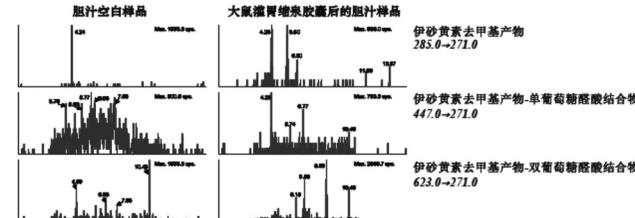


图4 大鼠胆汁中伊沙黄素脱甲基后的二相代谢产物的水解

4.62 min 和 4.84 min 的单葡萄糖醛酸结合物以及保留时间为 3.16 min 双葡萄糖醛酸结合产物的色谱峰在酶水解处理后均消失,但并未检测到伊砂黄素的脱甲基化产物。

2.4 芹菜素-4',7-二甲氧醚二相代谢产物的水解 大鼠灌胃缩泉胶囊后,大鼠胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶水解后芹菜素-4',7-二甲氧醚及其可能的代谢产物见图 5。经酶水解后,胆汁中的硫酸酯化的代谢物(保留时间为 3.29 min)和芹菜素-4',7-二甲氧醚的单葡萄糖醛酸化代谢物(保留时间为 5.11 min)均消失,此时的胆汁样品可以检测到芹菜素-4',7-二甲氧醚的原形物质形式(保留时间为 7.22 min)。由图 6 可知,在胆汁样品中未发现芹菜素-4',7-二甲氧醚的脱甲基化产物,芹菜素-4',7-二甲氧醚脱甲基后所形成的二相结合产物,包括单葡萄糖醛酸结合物(保留时间为 4.28 min)和双葡萄糖醛酸结合产物(保留时间为 3.25 min 和 3.79 min)在酶水解处理后均消失。保留时间为 5.29 min 单葡萄糖醛酸结合物在该样品中依然可以检测到。但是,水解后的样品中未检测到芹菜素-4',7-二甲氧醚的脱甲基化产物。

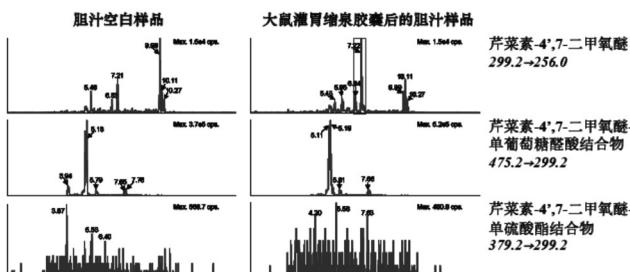


图 5 大鼠胆汁中芹菜素-4',7-二甲氧醚二相代谢产物的水解

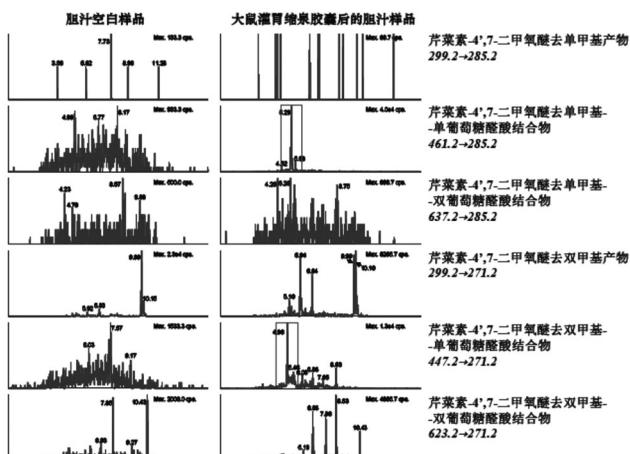


图 6 大鼠胆汁中芹菜素-4',7-二甲氧醚脱甲基后二相代谢产物的水解

2.5 山奈素二相代谢产物的水解 大鼠灌胃缩泉胶囊后,大鼠胆汁样品经 β -葡萄糖醛酸水解酶水解后山奈素及其可能的代谢产物见图 7。胆汁样品经酶水解处理后,山奈素的单葡萄糖醛酸化代谢物(保留时间为 4.80 min)和双葡萄糖醛酸代谢物(保留时间为

3.16 min)的色谱峰均消失,在胆汁中发现山奈素的原形物质形式(保留时间为 6.15 min),但浓度较低。保留时间为 6.05 min 的色谱峰结构需要进一步的研究。

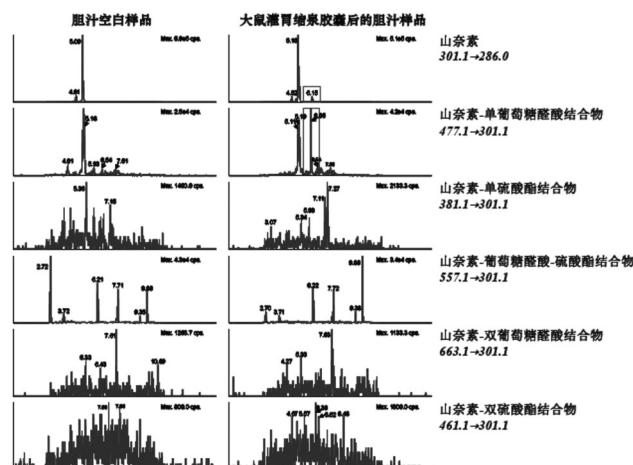


图 7 大鼠胆汁中山奈素二相代谢产物的水解

3 讨 论

二相代谢产物(如葡萄糖醛酸结合物、硫酸酯结合物等)的水解可采用酸水解或酶水解的方法进行。酸水解时,将样品和酸溶液在一定的温度下反应一定时间,导致酯键断裂。酸水解受酸的种类、浓度、水解温度和水解时间的影响。酶水解相对比较温和,但比较高效,实验费用也比较高。酶的来源、酶浓度、水解温度和时间的也影响水解效果^[8]。总的来说,药物二相代谢产物的水解首选酶水解的方法。因此本文采用酶水解的方法,研究益智黄酮二相代谢产物的水解。

白杨素、杨芽黄素、伊砂黄素、芹菜素-4',7-二甲氧醚和山奈素的葡萄糖醛酸结合物在酶水解后释放出相应的苷元。因为伊砂黄素和芹菜素-4',7-二甲氧醚去单甲基后的单葡萄糖醛酸结合物有不同的结合位置,各有两个色谱峰,水解后其中一个(保留时间为 4.28 min)消失,另一色谱峰(保留时间为 5.29 min)依然可测。另外,伊砂黄素和芹菜素-4',7-二甲氧醚脱甲基后形成的二相代谢产物在酶处理后也消失,但相应的脱甲基后的黄酮苷元却检测不到。这些现象值得深入研究。

综上所述,我们通过研究发现胆汁中益智黄酮葡萄糖醛酸结合物被 β -葡萄糖醛酸水解酶水解,释放出相应的苷元,进一步确定了益智黄酮在大鼠胆汁中的物质形式,也为这些黄酮苷元的定量分析奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Robinson D, Cardozo L. New drug treatments for urinary incontinence [J]. Maturitas, 2010, 65(4): 340-347.
- [2] 孙世发. 缩泉丸方来源浅析[J]. 中医杂志, 1994, 35(7): 439.
- [3] 国家药典委员会.《中国药典》2010 版.一部.中国医药科技出版社, 2010: 1218.

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.16.0919

·论著·

维生素 C 对三氧化二砷抑制上皮性卵巢癌增殖的增敏效应研究

高克非¹,曾根²

(1.广州中医药大学第一附属医院妇科,广东 广州 510405;

2.海南省中医院妇产科,海南 海口 570203)

【摘要】目的 观察维生素 C 对三氧化二砷(As₂O₃)抑制上皮性卵巢癌细胞株的化疗增敏效应并探讨其凋亡蛋白相关机制。**方法** 以上皮性卵巢癌细胞株 OVCAR-3 为研究对象,以噻唑蓝(MTT)药敏试验、流式细胞仪以及蛋白质印迹法检测维生素 C 对 As₂O₃ 化疗的增敏效应及其机制。**结果** As₂O₃ 和 Vitamin C 单药对上皮性卵巢癌细胞株均具有剂量依赖性的生长抑制作用,IC50 值分别为 4.72 μmol/L 和 21.85 μmol/L。As₂O₃ 联合 Vitamin C 的实验中,OVCAR-3 细胞株的增殖抑制率均大于同浓度 As₂O₃ 单药的抑制率,P 值分别为 0.001 和 0.012;两组联合用药的 q 值分别为 2.71 和 1.63,均大于 1.15,提示两药联合具有协同抑制效应。流式细胞检测显示,As₂O₃ 联合 Vitamin C 后 S 期阻滞效应明显,凋亡率增加。蛋白质印记法结果显示,两药联合作用后,Bcl-2 表达明显下调,Bax 表达明显上调。**结论** 在上皮性卵巢癌细胞株,一定浓度范围的 Vitamin C 对 As₂O₃ 具有较好的化疗增敏效应,As₂O₃ 和 Vitamin C 的联合应用具有进一步研究的价值。

【关键词】 维生素 C;三氧化二砷;化疗;卵巢癌

【中图分类号】 R737.31 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003—6350(2014)16—2350—04

Role of Vitamin C as a sensitizer for arsenic trioxide in epithelial ovarian cancer cells. GAO Ke-fei¹, ZENG Gen².

1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, CHINA; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Hainan Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Haikou 570203, Hainan, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Vitamin C as a sensitizer for arsenic trioxide in epithelial ovarian cancer cells and the apoptotic mechanisms. **Methods** In OVCAR-3 cells, the anti-cancer effects were observed when Vitamin C or As₂O₃ was given alone, and the sensitizing effects of Vitamin C were observed when it was used in the combination with arsenic trioxide. MTT chemosensitivity test, Flow Cytometry for examination of apoptosis and cell cycle status and Western-blots were applied. **Results** Dose-dependent antiproliferative effect on epithelial ovarian cancer cell lines was observed when Vitamin C or As₂O₃ was applied as single agent, the IC50 value was 4.72 μmol/L and 21.85 μmol/L respectively. When the two agents were applied simultaneously, the growth inhibition rate was significantly higher than that of the group treated with As₂O₃ alone, and the P value of the two combined regimen experiments were 0.001, 0.012 respectively, the q value of the combined effects was 2.71, 1.63 respectively. These results showed synergistic effect of the two agents. Flow Cytometry testing showed significant S phase block and increased apoptosis rate in the combination treatment group. In Western-blots experiments, Bcl-2 expression of the combination treatment group was down-regulated, and Bax expression was up-regulated compared with the group treated by As₂O₃ alone. **Conclusion** Vitamin C has sensitizing effect on arsenic trioxide in the treatment of epithelial ovarian cancer cell lines, which should be promising in the further study.

【Key words】 Vitamin C; Arsenic trioxide; Chemotherapy; Ovarian carcinoma

通讯作者:高克非。E-mail:schsums@163.com

-
- [4] Chen F, Li HL, Li YH, et al. Quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation SuoQuan formulae by ultra fast high performance liquid chromatography/quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Chem Cent J, 2013, 7(1): 131.
[5] Chen F, Li HL, Tan YF, et al. Validated method to measure yakuchinone A in plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in rats [J]. Chem Cent J, 2014, 8(1): 2.
[6] Qing ZJ, Yong W, Hui LY, et al. Two new natural products from the fruits of Alpinia oxyphylla with inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharideactivated RAW264.7 macrophage cells [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(12): 2143-2146.
[7] Shia CS, Hou YC, Tsai SY, et al. Differences in pharmacokinetics and ex vivo antioxidant activity following intravenous and oral administrations of emodin to rats [J]. J Pharm Sci, 2010, 99(4): 2185-2195.
[8] Wang LX, Yuan WW, Scott R, et al. "Hydrolysis of Phase II Conjugates for LC-MS Bioanalysis of Total Parent Drugs." [J] Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations, 2013, 1:471-477.

(收稿日期:2014-03-27)