

哈巴昔在大鼠体内代谢产物的鉴定与分析^Δ

刘震*,徐风,王静哲,刘广学,尚明英#,蔡少青(北京大学药学院,北京 100191)

中图分类号 R931.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1310-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.04

摘要 目的:研究玄参活性成分哈巴昔在大鼠体内的代谢产物及其分布、代谢类型和其可能的活性。方法:4只SD大鼠随机分为空白组(超纯水)和给药组(哈巴昔对照品溶液),每组2只,ig给药,160 mg/kg,每日2次,连用3 d。于给药前及首次给药后每12 h收集各组大鼠尿液和粪便,最后1次给药后0.5、1 h穿心取血8 mL并取出心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠等组织,分别制备血液、尿液、粪便及各组织样品溶液。采用高效液相色谱-质谱联用法检测和鉴定哈巴昔在大鼠体内的代谢产物并推测其代谢途径,采用Pharm Mapper软件预测代谢产物活性。结果:从大鼠体内鉴定出哈巴昔代谢产物12种,其原型及代谢产物主要分布在心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠中,其代谢类型主要包括水解、脱水、还原、甲基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸结合、一级香豆酸结合等。12种化合物可能具有治疗癫痫、肌萎缩侧索硬化、糖尿病、脑中风等活性。结论:哈巴昔可能是以原型和代谢产物的形式发挥药效的。本研究为归属玄参体内代谢产物来源、研究玄参显效形式、阐明玄参药理作用机制和炮制机制提供了依据。

关键词 玄参;哈巴昔;液质联用;代谢产物;代谢途径;活性

Identification and Analysis of Harpagide Metabolites in Rats *in vivo*

LIU Zhen, XU Feng, WANG Jingzhe, LIU Guangxue, SHANG Mingying, CAI Shaoqing (School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the metabolites, distribution, metabolic type and the possible activity of harpagide which is the active component from *Scrophularia ningpoensis* in rats *in vivo*. METHODS: 4 SD rats were divided into blank group (ultra-pure water) and administration group (harpagide reference solution), 2 in each group, ig, 160 mg/kg, twice a day, for 3 d. Urine and feces were collected every 12 h before administration and the first administration; sample blood 8 mL was taken after

- [2] Cuzzolin L, Zaccaron A, Fanos V. Unlicensed and off-label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003, 17(1): 125-131.
- [3] Voigt F, Goecke TW, Najjari L, et al. Off-label use of misoprostol for labor induction in Germany: a national survey [J]. *Eur J Obstet & Gynecol & Reprod Bio*, 2015, 187: 85-89.
- [4] Pisa FE, Cosano G, Giangreco M, et al. Prescribing practice and off-label use of psychotropic medications in post-acute brain injury rehabilitation centres: a cross-sectional survey [J]. *Brain Injury*, 2015, 29(4): 1-9.
- [5] 卢运超. 某院超说明书用药问题的现状与分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(24): 2247-2250.
- [6] 卫生部. 三级综合医院评审标准实施细则: 2011年版 [S]. 2011-11-25.
- [7] 广东省药学会. 医疗机构超药品说明书用药管理专家共识 [S]. 2014-11-06.
- [8] 张波, 郑志华, 李大魁. 超药品说明书用药参考 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 9-13.
- [9] 拜耳医药保健有限公司. 利伐沙班片说明书 [S]. 2015-04-29.
- [10] 广东省药学会. 药品未注册用法专家共识 [S]. 2010-03-18.
- [11] 中国药理学学会治疗药物监测研究专业委员会. 超说明书用药专家共识 [J]. *药物不良反应杂志*, 2015, 17(2): 101-103.
- [12] 中华医学会儿科学分会临床药理学组. 中国儿科超说明书用药专家共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(2): 101-103.
- [13] 劳海燕, 王启仪, 杨敏, 等. 广东省人民医院超说明书用药临床管理方法与流程研究 [J]. *中国循证医学杂志*, 2014, 14(9): 1025-1029.
- [14] 韩吉, 梁宇, 姜明燕. 我院超说明书用药情况分析与管理 [J]. *中国药房*, 2013, 24(14): 1318-1320.
- [15] 王丹, 彭炜, 焦园园, 等. 循证医学视角下的超说明书用药分级管理研究 [J]. *中国医院管理*, 2015, 35(7): 71-72.
- [16] 李玉堂, 杨昌云, 李炎丹, 等. 超说明书用药的审核分级与综合处理 [J]. *中国药房*, 2011, 22(17): 1574-1576.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81274074)

* 硕士研究生. 研究方向: 中药质量评价. 电话: 010-82802535.

E-mail: 386436070@qq.com

通信作者: 副教授, 博士. 研究方向: 中药质量评价. 电话:

010-82802535. E-mail: myshang@bjmu.edu.cn

(收稿日期: 2016-06-21 修回日期: 2016-09-20)

(编辑: 刘萍)

0.5, 1 h of last administration; heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach and small intestine were taken. The blood, urine, feces and other tissue solutions were prepared, HPLC-MS was conducted to detect and identify the harpagide metabolites in rats *in vivo* and presume metabolic pathways, and PharmMapper software was used to predict metabolites activity. RESULTS: 12 harpagide metabolites were identified in rats *in vivo*, the form of prototypes and metabolites were distributed in heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach and small intestine. The metabolic type mainly included hydrolysis, dehydration, reduction, methylation, sulfation, glucuronic acid binding, grade A coumaric acid binding, etc. The 12 compounds may have activities in the treatment of epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, stroke, etc. CONCLUSIONS: Harpagide may be effective in the form of prototypes and metabolites. The study has provided basis for attributing the origins of metabolite, studying the effective form of *S. ningpoensis* clarifying its pharmacological mechanism and processing mechanism.

KEYWORDS *Scrophularia ningpoensis*; Harpagide; LC-MS; Metabolite; Metabolic pathway; Activity

玄参为我国传统常用中药材,为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.的干燥根,具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结之功效^[1]。现代药理学研究表明,玄参具有抗炎^[2]、免疫调节^[3]、神经保护^[4]和抗脑缺血等活性^[5]。环烯醚萜类化合物为玄参中重要的化学成分类型,其中哈巴苷是玄参主要的环烯醚萜苷类成分之一。大量研究表明,哈巴苷的药理活性与玄参传统功效相关,哈巴苷可促进脾淋巴细胞-刀豆蛋白A诱导的增殖反应^[6],具有神经保护作用^[7]和抑制血小板凝聚作用^[8]。据文献报道,传统的产地加工和炮制手段可降低玄参中的哈巴苷含量^[9],升高哈巴苷含量^[10]。2015年版《中国药典》(一部)规定玄参中哈巴苷和哈巴苷的总含量不得少于0.45%^[1]。因此,进行哈巴苷的体内代谢研究有助于阐明其代谢产物及其分布、代谢途径以及代谢产物可能的活性,揭示其体内存在形式和发挥药效的机制,为归属玄参体内代谢产物来源、阐明药理作用机制和炮制机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱联用(HPLC-ESI-IT-TOF-MS)仪,包含2个LC-20AD输液泵、1个LC-20AB输液泵、CBM-20A系统控制器、脱气单元DGU-20A3、可制冷自动进样器SIL-20AC、柱温箱CTO-20A、二极管阵列检测器SPD-M20A、ESI离子源、ESI-IT-TOF-MS系统(日本Shimadzu公司);BP211D十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药材与试剂

哈巴苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:15031605,纯度:>98.00%);甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

1.3 动物

清洁级SD大鼠4只,♂,体质量200~250 g,购于北京大学医学部动物科学部,动物合格证号:SCXK(京)11-00-0006。所有动物实验均得到北京大学医学伦理委员会的许可,伦理审查许可证号:LA2015-007。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);保护柱:Zorbax SBC₁₈;流动相:纯水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序:0~10 min, 1% B; 10~15 min, 1%~2% B; 15~20 min, 2%~3.5% B; 20~25 min, 3.5% B; 25~35 min, 3.5%~6.5% B; 35~40 min, 6.5% B; 40~48 min, 6.5%~9% B; 48~60 min, 9%~11.5% B; 60~70 min, 11.5% B; 70~75 min, 11.5%~40.5% B; 75~81 min, 40.5% B; 81~95 min, 40.5%~100% B; 95~105 min, 100% B);柱温:35℃;检测波长:280 nm;进样量:10 μL;流速:1 mL/min。

2.1.2 质谱条件 检测范围:MS¹~MS³ m/z 100~1 000;离子累积时间:30 ms;N₂流速:1.5 L/min;曲型脱溶剂装置温度:200℃;检测压力:1.7 kV;干燥器电压:98.0 kV;最大压力:30 MPa;检测模式:负离子切换检测。

2.2 哈巴苷对照品溶液的制备

称取哈巴苷对照品适量,用超纯水溶解,制成质量浓度为40 mg/mL的哈巴苷对照品溶液,备用。

2.3 分组与给药

4只SD大鼠随机分为空白组和给药组(“2.2”项下哈巴苷对照品溶液),每组2只。适应性饲养6 d后,给药组大鼠ig给药,160 mg/kg(给药剂量根据预实验确定),每日上午9:00、晚21:00各1次,连用3 d;空白组大鼠ig等体积超纯水。给药期间正常喂食、喂水。收集给药组大鼠给药前的尿液、粪便,冷藏保存于4℃冰箱,与给药后进行比较。

2.4 样品的收集与处理

首次给药后,每12 h收集1次大鼠尿液和粪便,冷藏保存于4℃冰箱。末次给药后,分别在给药0.5、1 h后ip水合氯醛麻醉(380 mg/kg),穿心取血8 mL。取血后迅速取出心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠组织,以生理盐水灌洗,于-30℃冰箱冷冻保存。

将各组大鼠血液于4℃离心(离心半径为20 cm, 5 000 r/min)15 min,取上清液,加5倍量甲醇超声沉淀蛋白,离心(离心半径为20 cm, 10 000 r/min)15 min,取上清液,N₂吹至干,加入1/4倍量甲醇复溶,过0.45 μm微孔滤膜,进样分析。

将各组大鼠尿液样品浓缩,蒸干。取0.5 g尿液样品

蒸干物,加 2 mL 50% 甲醇复溶,即得质量浓度为 250 mg/mL 的尿液样品溶液,过 0.45 μm 滤膜,进样分析。

将各组粪便样品于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,研磨,取 7 g 研磨粉,用 20 倍 50% 甲醇于 20 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min,过滤后浓缩,蒸干。取 0.5 g 粪便样品蒸干物,加入 2 mL 50% 甲醇复溶,即得质量浓度为 250 mg/mL 的粪便样品溶液,过 0.45 μm 滤膜,进样分析。

取各组大鼠内脏组织,用生理盐水洗净血液并去除周围脂肪组织,称取相同组织 10 g,用 50 mL 50% 甲醇匀浆 3 min,20 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min,离心(离心半径为 20 cm,12 000 r/min)15 min,取上清液,减压浓缩,蒸干。取 0.25 g 内脏组织蒸干物,加 1 mL 甲醇复溶,即得质量浓度为 250 mg/mL 的内脏组织溶液,过 0.45 μm 滤膜,进样分析。

2.5 哈巴昔质谱裂解规律

哈巴昔具有 4-去甲基环烯醚萜苷的典型结构特征,其 HPLC-MS/MS 裂解规律见图 1^[11]。哈巴昔在负离子模式(NI)下会出现更多质谱离子碎片信息,且在中等强度碰撞电压(120 V)下,质谱图中易观察到 $[\text{M}+\text{HCOO}]^{-}$ 的加合离子基峰;较高的碰撞电压(320 V)下,易出现 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 的基峰^[10]。本研究以 NI 信息为主进行哈巴昔及其代谢产物的解析,发现本试验条件下的准分子离子多为 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 峰,此外还发现了 $[\text{M}+\text{Cl}]^{-}$ 峰。哈巴昔典型的裂解方式可概括为丢失葡萄糖与水分子形成 m/z 201、183 特征性碎片离子;此外,结构中的半缩醛环开裂形成 m/z 157、139 特征碎片离子。结合上述哈巴昔质谱裂解数据,笔者在大鼠血液、尿液、粪便和组织中都发现了哈巴昔,其具体裂解信息如下。

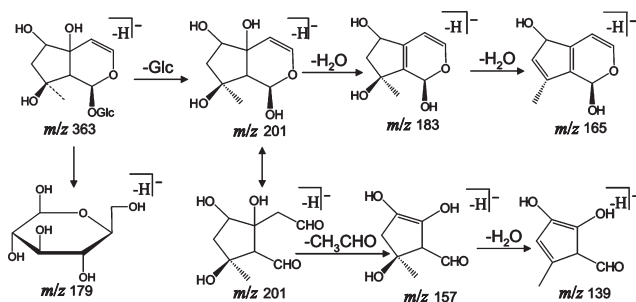


图 1 哈巴昔的裂解规律

Fig 1 Cracking rule of harpagide

哈巴昔(保留时间为 29.925 min),负离子一级质谱中显示准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 为 m/z 363.131 8,预测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ 。二级质谱碎片主要有 m/z 201.076 3、183.064 6、165.063 6、157.059 2、139.042 3。其中, m/z 201.076 3 为 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosyl}]^{-}$, m/z 183.064 6 为 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosyl}-\text{H}_2\text{O}]^{-}$, m/z 165.063 6 为 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosyl}-2\text{H}_2\text{O}]^{-}$, m/z 157.059 2 为 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosyl}-\text{CH}_3\text{CHO}]^{-}$, m/z 139.042 3 为 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosyl}-\text{CH}_3\text{CHO}-\text{H}_2\text{O}]^{-}$ 。

2.6 哈巴昔代谢产物的分析鉴定

采用 HPLC-ESI-IT-TOF-MS 分析技术对“2.4”项下样品在 NI 下进行检测,结果在 NI 模式下的基峰色谱(BPC)图中,发现了血液中代谢产物 1 种、尿中代谢产物 10 种、粪便中代谢产物 3 种。NI 模式下各组织的 BPC 图见图 2。去除重复代谢产物,共鉴定出代谢产物 12 种,详见表 1。

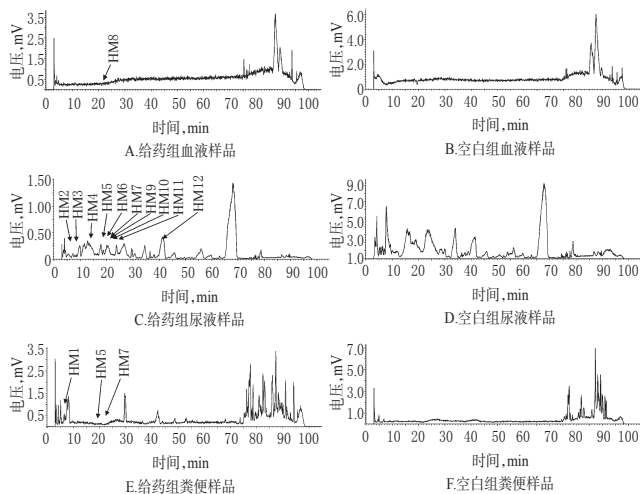


图 2 NI 模式下各组织的 BPC 图

Fig 2 Base peak chromatogram of each sample in negative ion mode

12 种化合物均属首次报道,分别为哈巴昔水解形成的哈巴昔昔元(HM1)、哈巴昔水解并与香豆酸结合产物(HM2)、哈巴昔脱水并与葡萄糖醛酸结合产物(HM3)、哈巴昔昔元脱水硫酸酯化产物(HM4、HM5、HM7)、哈巴昔昔元还原甲基化产物(HM6、HM12)、哈巴昔水解并还原产物(HM8)、哈巴昔水解并脱水产物(HM9、HM10)、哈巴昔昔元裂解并与葡萄糖醛酸结合产物(HM11)。

HM1 在小肠、肝和粪便中检测到,负离子一级质谱中显示准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 为 m/z 201.075 2,预测其分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_5$ 。根据文献^[10]中哈巴昔的裂解规律可知, m/z 201.075 2 为哈巴昔脱去葡萄糖基后形成的特征性裂解碎片离子;二级质谱中可见 m/z 157.135 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3\text{CHO}]^{-}$,与哈巴昔的特征裂解碎片离子 $[\text{Harpagide}-\text{H}-\text{glucosyl}-\text{CH}_3\text{CHO}]^{-}$ 一致^[11]。推测该代谢产物为哈巴昔脱去葡萄糖基后形成的水解产物哈巴素(Harpagenin),HM1 既是哈巴昔的代谢产物,也是玄参中的原型成分^[10],作为代谢产物未见文献报道。

HM2 为给药大鼠尿液中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 为 m/z 347.141 3,预测其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 。二级质谱可见碎片离子 m/z 319.155 6、201.113 6、145.120 2。其中 m/z 319.155 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^{-}$ 是准分子离子峰通过丢失 CO 形成的碎片离子, m/z 201.113 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{cumaric acid}]^{-}$ 为哈巴昔昔元的特征性离子, m/z 145.120 2 $[\text{Cumaric acid}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{-}$ 是香豆酸的特征性碎片离子。这表明该代谢产物含有香豆酸和

表1 哈巴昔在大鼠体内的代谢产物液质联用分析结果(负离子模式下)

Tab 1 Results of LC-MS analysis of harpagide metabolites in rats *in vivo* (negative ion mode)

序号	保留时间, min	分子式	准分子离子峰 [M-H] ⁻ <i>m/z</i>	偏差, ppm	不饱和度	碎片离子信息	化合物	分布	代谢途径
HM1	6.267	C ₉ H ₁₀ O ₃	201.075 2	1.49	3	157.135 4, 141.055 9, 85.871 3	Harpagenin	小肠、肝、粪便	水解
HM2	7.475	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	347.141 3	-2.88	4	319.155 6, 203.117 9, 201.113 6, 187.098 5, 145.120 2	8- <i>O</i> -courmaroyl harpagenin	尿液	水解、与香豆素结合
HM3	9.258	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	359.095 7	-1.11	6	183.064 7, 175.025 4, 147.045 6	5,9-dehydration-harpagenin glucuronide	尿液	水解、脱水、与葡萄糖醛酸结合
HM4	14.158	C ₉ H ₁₀ O ₅ S	263.023 5	1.52	4	228.023 8, 195.350 9, 183.068 0, 147.426 2	5,9-dehydration-harpagenin sulfate	尿液	水解、脱水、硫酸酯化
HM5	18.450	C ₉ H ₁₀ O ₈ S	245.011 5	-4.49	5	165.057 4, 121.066 4, 80.527 8	5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin sulfate	尿液、胃、小肠、粪便	水解、脱水、硫酸酯化
HM6	18.575	C ₁₁ H ₂₀ O ₅	231.123 7	-0.43	2	187.101 7, 154.011 7, 143.116 0, 130.093 0	Dihydrogen-6,8- <i>O</i> -dimethyl harpagenin	尿液、胃	水解、还原、甲基化
HM7	19.892	C ₉ H ₁₀ O ₈ S	245.010 8	-2.04	5	165.054 7, 121.067 0, 106.058 4	5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin-6-sulfate	尿液、胃、小肠、粪便	水解、脱水、硫酸酯化
HM8	20.922	C ₉ H ₁₀ O ₃	203.085 5	3.45	2	159.110 5, 142.074 8, 130.073 9, 116.074 2	Dihydrogen-harpagenin	血液、小肠	水解、还原
HM9	21.375	C ₉ H ₁₂ O ₄	183.066 3	0.00	4	121.201 3, 92.054 9	5,9-dehydration-harpagenin	尿液	水解、脱水
HM10	21.583	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.057 6	3.64	5	147.058 4, 111.081 8, 99.012 0	5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin	尿液、胃	水解、脱水
HM11	23.500	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	349.113 7	-0.86	4	193.036 2, 175.027 4, 173.082 2, 129.094 7	1,2,4-trihydroxy-4-methyl-1-acetaldehyde-cyclopentane-2- <i>O</i> -glucuronide	尿液	水解、裂解、与葡萄糖醛酸结合
HM12	40.092	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	217.108 9	3.22	2	190.100 0, 186.529 7, 157.092 3, 155.110 2, 137.061 1	Dihydrogen-6- <i>O</i> -methyl harpagenin	尿液、胃、小肠	水解、还原、甲基化

哈巴昔昔元结构单元,且 *m/z* 347 可能为[8-*O*-courmaroyl harpagide-H-glucosyl]⁻, 8-*O*-courmaroyl harpagide 又是玄参中的化学成分^[11],根据质谱信息并对比文献[11-12]推测该化合物可能为8-*O*-courmaroyl harpagenin。

HM3为给药大鼠尿液中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 359.095 7,预测其分子式为C₁₅H₂₀O₁₀。二级质谱中可见碎片离子 *m/z* 183.064 7、175.025 4、147.045 6。其中, *m/z* 183.064 7为母离子中性丢失葡萄糖醛酸基(176 Da)形成的碎片离子,且与哈巴昔昔元脱水形成的碎片离子一致; *m/z* 175.025 4为[Glucuronic acid-H-H₂O]⁻, *m/z* 147.045 6为[Glucuronic acid-H-H₂O]⁻,均为葡萄糖醛酸的特征性碎片离子。根据哈巴昔的裂解规律^[11],哈巴昔昔元母核上C-5位上羟基更容易脱水形成稳定的共轭结构,确定脱水的位置在5、9位,根据上述信息结合文献数据推测该代谢产物为哈巴昔昔元脱水后的葡萄糖醛酸化产物5,9-dehydration-harpagenin glucuronide。

HM4为给药大鼠尿液中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 263.023 5,预测其分子式为C₉H₁₂O₅S。二级质谱中可见 *m/z* 183.068 0[M-H-SO₃]⁻碎片离子,说明该化合物可能为硫酸酯化的代谢产物。对比文献[11]发现该碎片离子与哈巴昔失去葡萄糖基后再脱去1分子的水所形成的特征性结构单元 *m/z* 183[Harpagide-H-glucosyl-H₂O]⁻一致,故推测该代谢产物为哈巴昔昔元脱水后形成的硫酸酯化产物5,9-dehydration-harpagenin sulfate。

HM5、HM7为给药大鼠尿液、粪便、胃和小肠中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中均显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 245.01,预测其分子式均为C₉H₁₀O₈S。负离子模式下,二级碎片离子均可见 *m/z* 165.05[M-H-SO₃]⁻和 *m/z* 121.07[M-H-SO₃-CO₂]⁻。对比哈巴昔的裂解规律, *m/z* 165.05[M-H-SO₃]⁻与哈巴昔失去葡萄

糖基后再脱去2分子水所形成的结构单元 *m/z* 165[Harpagide-H-glucosyl-2H₂O]⁻一致。根据以上数据推测代谢产物HM5和HM7均为哈巴昔昔元脱去2分子水后的硫酸酯化产物,母核1位和6位均有羟基可发生硫酸酯化,但空间位阻1位羟基最小,其次为6位羟基,因此优势取代顺序为1位羟基>6位羟基。故推测峰面积较大的HM5为5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin sulfate,峰面积较小的HM7为5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin-6-sulfate。

HM6为给药大鼠尿液和胃中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 231.123 7,预测其分子式为C₁₁H₂₀O₅。二级碎片离子可见 *m/z* 187.101 7[M-H-CH₃CHO]⁻和 *m/z* 143.116 0[M-H-CH₃CHO-CO₂]⁻。根据以上数据并结合文献[12],推测该代谢产物可能为Dihydrogen-6,8-*O*-dimethyl harpagenin。

HM8为给药大鼠血液和小肠中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 203.085 5,预测分子式为C₉H₁₆O₅。在负离子模式的二级碎片离子可见 *m/z* 159.110 5[M-H-CH₃CHO]⁻。根据以上数据并结合文献[12-13]推测该代谢产物为哈巴昔昔元的还原产物Dihydrogen-harpagenin。

HM9为给药大鼠尿液中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 183.066 3,预测其分子式为C₉H₁₂O₄。其准分子离子峰与哈巴昔脱去葡萄糖和水分子后形成的特征性裂解碎片 *m/z* 183[Harpagide-H-glucosyl-H₂O]⁻一致,且二级质谱图中出现了哈巴昔昔元脱水后再失去-CH₃CHO形成的碎片离子 *m/z* 121.201 3。因此,推测该代谢产物为5,9-dehydration-harpagenin。

HM10为给药大鼠尿液和胃中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 *m/z* 165.057 6,预测其分子式为C₉H₁₀O₃。其准分子离子峰与

哈巴昔失去葡萄糖基后再脱去2分子水所形成 m/z 165 [Harpagide-H-glucosyl-2H₂O]⁻ 的碎片离子一致,且二级碎片离子可见 m/z 147.058 4[M-H-H₂O]⁻,哈巴昔昔元母核上C-5位的羟基更容易脱水形成稳定的共轭结构。综合上述信息及文献[11]推测该代谢产物为哈巴昔昔元的脱水产物5,9-dehydration-7,8-dehydration-harpagenin。

HM11 为给药大鼠尿液中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 349.113 7,预测其分子式为 C₁₈H₂₂O₇。二级碎片离子可见 m/z 193.036 2[Glucuronic acid-H]⁻、 m/z 175.027 4[Glucuronic acid-H-H₂O]⁻、 m/z 173.082 2[M-H-glucuronyl]⁻ 和 m/z 129.094 7[M-H-glucuronyl-CO₂]⁻,其中 m/z 173.082 2与哈巴昔昔元的碎片 m/z 173[Harpagenin-H-CO]⁻一致,因此推测该代谢产物为哈巴昔昔元脱羧基后形成的1,2,4-三羟基-4-甲基-1-乙醛-环戊烷与葡萄糖醛酸生成的昔。昔元1,2,4位均有羟基可发生葡萄糖醛酸化,2位羟基空间位阻最小,因此羟基取代可能发生在2位上。根据以上数据信息推测 HM11 为 1,2,4-trihydroxyl-4-

methyl-1-acetaldehyde-cyclopentane-2-O-glucuronide。

HM12 为给药大鼠尿液、小肠和胃中检测到的代谢产物,负离子一级质谱中显示准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 217.108 9,预测其分子式为 C₁₀H₁₈O₅。二级质谱信息中可见 m/z 199.100 0[M-H-H₂O]⁻、 m/z 186.529 7[M-H-CH₃O]⁻ 和 m/z 157.092 3[Harpagide-H-glucose-2H₂O]⁻。根据质谱信息及文献[12]推测该代谢产物可能为 Dihydrogen-methyl-harpagide 母离子中性丢失葡萄糖基(162 Da)形成;根据甲基取代基的空间位阻大小,甲基化最有可能发生在6位羟基。因此,推测该代谢产物为 Dihydrogen-6-O-methylharpagenin。

2.7 哈巴昔在大鼠体内的代谢类型

本研究结果显示,哈巴昔采用液质联用技术,从大鼠含药尿液、血浆和粪便中共鉴定出12种哈巴昔代谢产物,发现哈巴昔在大鼠体内的代谢类型主要包括水解、脱水、还原、甲基化、硫酸酯化、葡萄糖醛酸结合、一级香豆酸结合等。根据代谢产物的结构特点及代谢反应类型,推测哈巴昔在大鼠体内的代谢类型见图3。

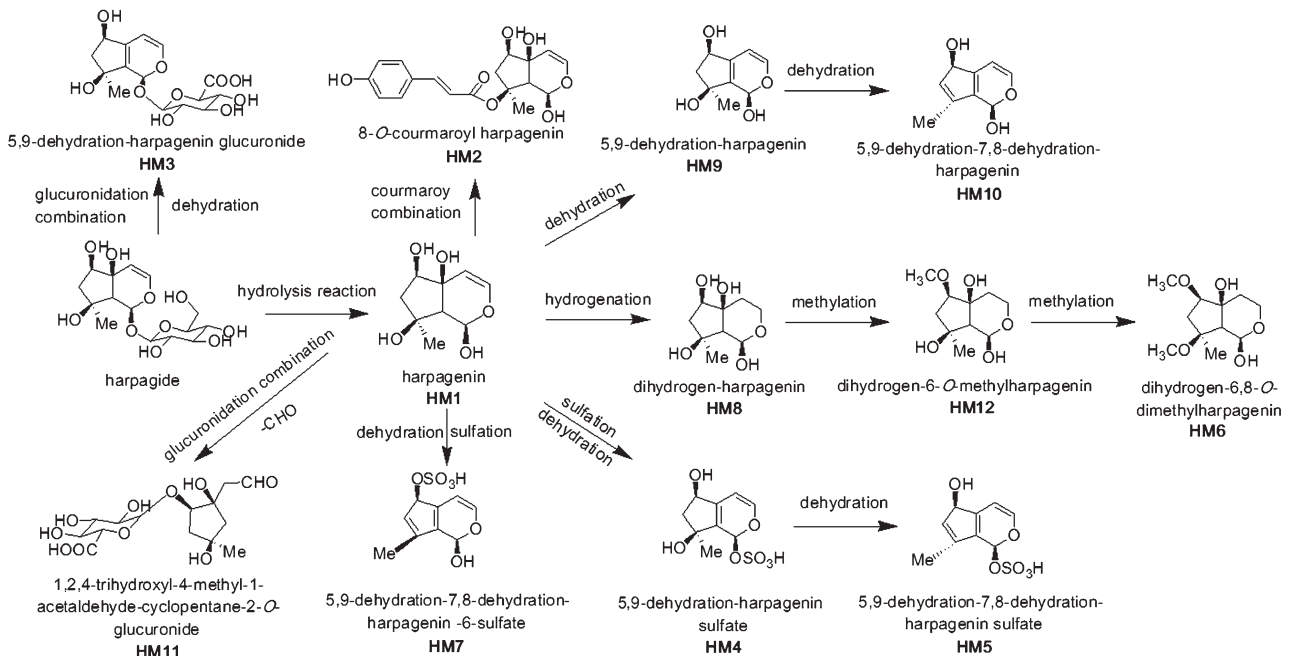


图3 哈巴昔在大鼠体内可能的代谢类型

Fig 3 The possible metabolic type of harpagide in rats *in vivo*

2.8 哈巴昔原型及其代谢产物在大鼠体内的分布

哈巴昔原型及其代谢产物体内分布研究发现,哈巴昔原型在心、肝、脾、肺、肾、胃和小肠中均有分布;在小肠中检测到 HM1、HM5、HM7、HM8 和 HM12 共 5 种代谢产物;在胃中检测到 HM5、HM6、HM7、HM10 和 HM12 共 5 种代谢产物;在肝脏中检测到 HM1。推测哈巴昔主要分布于胃、小肠和肝。

2.9 哈巴昔在大鼠体内代谢产物的活性预测

采用药物活性预测软件“Pharm Mapper”,对 12 种代谢产物进行活性预测分析。结果,多种代谢产物显示多

种不同的潜在活性,且不同代谢产物可能具有相同的潜在靶点和潜在活性。HM1、HM3、HM9 可能具有治疗癫痫的相关活性;HM1、HM6、HM9、HM12 可能具有治疗肌萎缩侧索硬化(ALS)的相关活性;HM2、HM3、HM10 可能具有治疗糖尿病的相关活性;HM5 和 HM8 可能具有治疗脑中风的相关活性等。这些代谢产物活性与哈巴昔的免疫调节作用和神经保护作用^[6,8],以及玄参的免疫调节、神经保护和调节血糖作用^[3,14-15]有一定的相关性。哈巴昔代谢产物结构多相似,结构相似的代谢产物也预测出其具有相同的作用靶点,如 HM1 和 HM9, HM6

和HM12,这与徐风等^[16]提出的多成分单靶点的中药显效形式新理论一致。哈巴昔代谢产物的主要活性预测结果见表2。

表2 哈巴昔在大鼠体内代谢产物的生物活性预测结果

Tab 2 Prediction results of biological activity of harpagide metabolites in rats *in vivo*

代谢产物	潜在靶点	潜在活性
HM1	Mitogen-activated protein kinase 10 Angiogenin	治疗癫痫 治疗ALS
HM2	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha Aldose reductase	治疗糖尿病 治疗糖尿病
HM3	Mitogen-activated protein kinase 10 Insulin receptor	治疗癫痫 治疗糖尿病
HM5	Angiotensin-converting enzyme	治疗脑中风
HM6	Angiogenin	治疗ALS
HM7	Angiogenin Angiotensin-converting enzyme	治疗ALS 治疗脑中风
HM9	Mitogen-activated protein kinase 10 Angiogenin	治疗癫痫 治疗ALS
HM10	Aldose reductase Glucokinase	治疗糖尿病 治疗糖尿病
HM12	Angiogenin	治疗ALS

3 讨论

环烯醚萜类成分的苷元结构相对稳定,因此哈巴昔在进入体内后通过各种代谢途径,产生了结构相似的代谢产物。经过活性预测,哈巴昔的多种代谢产物具有治疗癫痫、ALS、糖尿病和脑中风等疾病的潜在活性。这些代谢产物的潜在活性与哈巴昔的免疫调节作用和神经保护作用^[6,8]以及玄参的免疫调节、神经保护和血糖调节作用有一定的相关性^[3-4,15]。这说明采用PharmMapper软件预测代谢产物的生物活性具有一定参考价值。文献报道传统的产地加工炮制方法可使玄参中哈巴昔含量升高^[9-10]。王静哲等^[10]也发现,炮制玄参中哈巴昔含量为烘干玄参的124%。哈巴昔体内代谢研究有助于揭示玄参炮制机制,哈巴昔与其代谢产物可能为玄参发挥药效的重要物质基础。通过本研究发现的12种哈巴昔代谢产物及其可能代谢途径,为玄参“归胃经”、归属玄参在大鼠体内代谢产物的原型成分来源提供了重要依据,有助于揭示哈巴昔的体内显效形式及其作用机制。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:117.

[2] Qian J, Hunkler D, Safayhi H, *et al.* New iridoid-related constituents and the anti-inflammatory activity of *Scrophularia ningpoensis*[J]. *Planta Med*, 1991, 57(S2):56.

[3] Benito P, Lanza A, Sen A, *et al.* Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems[J]. *Planta Med*, 2000, 66(4):324-328.

[4] Sohn S, Ko E, Jeon S, *et al.* The genome-wide expression profile of *Scrophularia ningpoensis*-treated thapsigargin-stimulated U-87MG cells[J]. *Neuro Toxicology*, 2009, 30(3):368-376.

[5] Huang Q, Gong Q, Yao M, *et al.* Protective effect of *Scrophularia ningpoensis* extracts on cerebral ischemia injury in rats[J]. *Chin J New Drugs Clin Ren*, 2004, 23(6):323-327.

[6] 王建华,谢丽华,钱瑞琴,等.玄参中哈巴昔和哈巴俄昔滋阴作用的药理研究[EB/OL]. (2001-07-01)[2016-03-21].<http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail>.

[7] 应夏丽,钟晓明,徐慕蝶,等.哈巴昔对急性脑缺血小鼠神经保护作用及线粒体保护机制的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(20):1026-1031.

[8] 李医明,曾华武.玄参中环烯醚萜苷和苯丙素苷对LTB₄产生及血小板聚集的影响[J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20(5):301-303.

[9] 白云娥,袁鹏飞,王庆辉,等. HPLC-UV 波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴昔与哈巴俄昔的含量[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(19):2697-2702.

[10] 王静哲,刘震,马立满,等.基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析加工炮制对玄参化学成分的影响[J]. *质谱学报*, 2016, 37(1):1-9.

[11] Wu Q, Yuan Q, Liu E, *et al.* Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Radix Scrophulariae* by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Bio Chrom*, 2010, 24(8):808-819.

[12] 王静哲.炮制对玄参化学成分的影响及其体内代谢研究[D].北京:北京大学,2015.

[13] Yosioka I, Sugawara T, Yoshikawa K, *et al.* Soil bacterial hydrolysis leading to genuine aglycone. VII. Monoterpenoid glucosides of *Scrophularia buergeriana* MIQ. and *Paeonia albiflora*[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1972, 111(20):2450-2453.

[14] 杜晓煌,方勇飞,李莉,等.玄参主要成分生物活性研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(15):2158-2160.

[15] 王浴生.中药药理与应用[M].北京:人民卫生出版社,1983:370.

[16] 徐风,杨东辉,尚明英,等.中药药效物质的“显效形式”、“叠加作用”和“毒性分散效应”:由中药体内代谢研究引发的思考[J]. *世界科学技术:中医药现代化*, 2014, 16(4):688-703.

(收稿日期:2016-05-28 修回日期:2017-01-09)

(编辑:刘明伟)