

· 基础研究 ·

地榆鞣质在大鼠尿液中代谢产物分析

周本宏^{1,2*}, 汪静¹, 吴玥¹, 易慧兰¹, 谭珺², 张红盼¹

(1. 武汉大学 人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉大学 药学院, 湖北 武汉 430072)

[摘要] 目的: 采用 HPLC-Q-TOF/MS 研究地榆鞣质在尿液中的代谢产物。方法: 收集给药后大鼠尿样, 采用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 在飞行时间质谱负离子模式下扫描, 利用 TOF/MS 得到的准确相对分子质量及一级、二级质谱信息, 对照化学成分数据库, 鉴定地榆鞣质在大鼠尿液中可能的代谢产物, 结合相关文献, 推测地榆鞣质在大鼠体内可能的代谢途径。结果: 从大鼠尿液中共检测到 9 个代谢产物, 分别为: M1 (Pyrogallol)、M2 (Urolithin B)、M3 (Methyl-Urolithin C)、M4 (Urolithin A)、M5 (Methyl-Urolithin A)、M6 (Urolithin C-Glucuronidation)、M7 (Dimethyl-EA)、M8 (Urolithin M5)、M9 (没食子酸), 其中 M9 为原型药物。结论: 地榆鞣质经灌胃给予大鼠后, 先经过 I 相代谢反应生成尿石素等极性偏小的代谢产物吸收入体内, 再发生 II 相结合反应, 与葡萄糖醛酸等结合, 变成极性较大的物质, 从尿液排除体外, 进一步阐明了地榆鞣质在体内发挥药理作用的机理。

[关键词] 地榆; 鞣质; 代谢产物; 尿石素; 液质联用

Metabolites of Tannins from *Sanguisorba officinalis* L. in Rat UrineZHOU Benhong^{1,2*}, WANG Jing¹, WU Yue¹, YI Huilan¹, TAN Jun², ZHANG Hongpan¹

(1. Department of pharmaceutical, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Pharmaceutical College of Wuhan University, Wuhan 430072, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the metabolites in urine of rats administrated with tannins extracted from *Sanguisorba officinalis* L. (STE) by gavage, liquid chromatography time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF-MS) was employed. **Methods:** Rat's urine samples were collected and analyze by liquid chromatography time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF-MS). The analysis was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column with an acetonitrile-water gradient elution. Time of flight mass spectrometer (TOF/MS) was applied for qualitative analysis under negative ion mode. Based on the accurate molecular weight, MS and MS² information of TOF/MS detection and the compound list established previously, the possible metabolites of STE were identified. **Results:** Nine metabolites were detected in the rat urine: pyrogallol (M1), urolithin B (M2), methyl-urolithin C (M3), urolithin A (M4), methyl-urolithin A (M5), urolithin C-glucuronidation (M6), dimethyl-EA (M7), urolithin M5 (M8), gallic acid (M9). M9 was the prototype drug. **Conclusion:** Tannins from *S. officinalis* set off I phase metabolic reactions first to generate weak polarity metabolites such as urolithins after entering *in vivo*, then the II phase reaction were happened to combined with glucuronide to increase its polarity, so as to excrete out through urine, which further clarifies the function mechanism of tannins from *S. officinalis*.

[Keywords] Tannins; *Sanguisorba officinalis* L.; metabolites; urolithins; HPLC-MS

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.6.011

地榆是我国传统的中药, 是蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *Sanguisorba officinalis* L. var. *longifolia* 的干燥根茎, 性微寒, 具有凉血止血、解毒敛疮的功效, 临床上用于便血、痔血、水火烫伤等的治疗^[1]。随着人们对地榆深入研究,

发现地榆中主要含有鞣质(约 17%)、三萜皂苷(约 2.0% ~ 4.1%) 和黄酮(约 15%) 三大类化学成分, 其中鞣质类成分主要为没食子酸、鞣花鞣质等可水解鞣质和原花青素类缩合鞣质^[2], 是一类生物活性较强的物质, 对其药理作用的发挥起着重要作用。

* [通信作者] 周本宏, 博士, 教授, 主任药师, 研究方向: 中药及天然药物活性成分; E-mail: benhongzh@whu.edu.cn

研究证实地榆鞣质具有抗肝癌细胞增殖^[3]、抑制肾小管上皮细胞增殖^[4]、改善环磷酸酰胺诱导的小鼠骨髓抑制^[5]等作用。药物的活性与其在体内的代谢转运密切相关,目前尚未见地榆鞣质代谢成分的报道,本研究采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 对地榆鞣质在尿液中代谢产物进行初步鉴别,进而探讨可能的代谢过程,有助于阐明其发挥药理活性的物质基础,为地榆鞣质的进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HPLC1200-Q-TOF 6520MS (Agilent, USA), 配有电喷雾离子源 (ESI); UV-1800 紫外分光光度计 (SHIMADZU CORPORATION); HPD-400 大孔吸附树脂 (沧州宝恩化工有限公司); Generik C₁₈ 固相萃取小柱 (Sepax, 200 mg/3mL); SK5200H 型超声波清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司); W2-100S 型旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); ALPHAI4/RZ-2 冷冻干燥机 (德国 Martin Christ)。

1.2 药材

生地榆饮片 (湖北盛德堂中药饮片股份有限公司), 经武汉大学张洪教授鉴定符合《中华人民共和国药典》2015 年版一部标准; 没食子酸 (成都行标生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 甲醇、乙腈 (Agilent, HPLC 级), 水 (娃哈哈纯净水), 磷钼钨酸 (自制), 乙醇、丙酮等试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

雌性 SD 大鼠 10 只, 体重为 220 ~ 260 g, 由湖北省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(鄂)2008-0005。动物饲养于武汉大学动物中心 SPF 级动物房中, 适应性喂养一周后开始实验。

2 方法

2.1 地榆鞣质样品的制备

干燥生地榆饮片, 粉碎机粉碎, 称取适量, 加入 10 倍量的 70% 丙酮, 室温浸泡过夜, 50 °C 下回流提取 2 次, 每次 30 min, 合并滤液, 减压浓缩除

去丙酮, 浓缩液冷冻干燥, 制备得到地榆粗提取物。经 HPD-400 大孔吸附树脂纯化, 70% 乙醇洗脱, 洗脱液冷冻干燥, 得地榆鞣质提取物 (STE), 冻干粉 4 °C 冰箱保存, 备用^[6]。

2.2 动物分组与给药

雌性 SD 大鼠 10 只, 随机分为给药组和空白组, 每组 5 只, 饲养于 SPF 级动物房中, 实验开始前适应性饲养一周, 自由进食饮水。大鼠给药前禁食 12 h, 给药后置于代谢笼中, 自由饮水, 收集各组尿液。给药组按 400 mg · kg⁻¹ 剂量灌胃地榆鞣质, 空白组给予等量 0.9% 氯化钠溶液, 收集大鼠给药后 0 ~ 8、8 ~ 24、24 ~ 48 h 的尿液, -20 °C 冷冻保存, 备用待测^[7-9]。

2.3 尿液样品预处理

低温解冻尿液, 取尿液 2 mL, 加 10 μ L 6 mol · L⁻¹ HCl 酸化, 离心, 取上清液, 过反相 C₁₈ 固相萃取小柱 (经 5 mL 甲醇, 5 mL 水活化), 纯水 (5 mL) 淋洗后, 用甲醇 (2 mL) 洗脱, 收集洗脱液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 滤液直接进 HPLC-ESI-Q TOF MS 分析^[10]。

2.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150mm × 2.1 mm, 5 μ m); 流动相 A(水)和 B(乙腈), 按程序梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 5% ~ 15% B; 15 ~ 25 min, 15% ~ 40% B; 25 ~ 40 min, 40% ~ 45% B; 40 ~ 55 min, 45% ~ 50% B; 55 ~ 60 min, 50% ~ 55% B; 60 ~ 65 min, 55% ~ 60% B; 65 ~ 75 min, 60% ~ 90% B; 75 ~ 85 min, 90% ~ 30% B; 85 ~ 90 min, 30% ~ 5% B); 流速: 0.2 mL · min⁻¹; 进样体积: 10 μ L; 柱温: 30 °C。

2.5 质谱条件

采用电喷雾 (ESI) 离子源, 负离子模式检测; 毛细管电压: 3500 V; 雾化气压力: 30 Psi (1 Psi = 6.895 kPa); 干燥气流速: 10 L · min⁻¹; 干燥气温度: 300 °C; 碎片电压: 125 V。采用全扫描一级质谱、选择离子二级全扫描质谱方式同时进行, 扫描范围 m/z : 100 ~ 800。

2.6 尿液中代谢产物的鉴别

根据药物在体内代谢的一般规律, 即 I 相反应和 II 相结合反应, 查阅相关文献, 预测地榆鞣质在大鼠体内的代谢产物。运用质谱软件上自带的相对

分子量计算功能,即输入分子式计算出相应相对分子质量,算出预测代谢产物的 $[M-H]^-$ 、 $[M+Cl]^-$ 、 $[M+Br]^-$ 的精确分子质量(精确到小数点后5位)。大鼠尿样过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜后,进行HPLC-ESI-Q-TOF-MS分析,得到大鼠空白尿样和灌胃给药后尿样总离子流色谱图,通过系统自带的提取离子流色谱(EIC)功能提取出预测代谢产物的 $[M-H]^-$ 、 $[M+Cl]^-$ 、 $[M+Br]^-$ 峰,比较空白和给药后尿液EIC图谱,确定给药后多出来的峰或给药后峰强度变强的峰为差异峰,由差异峰与预测代谢产物间对比(质量偏差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 范围内),初步鉴定尿液中代谢产物。可能的话,进一步对差异峰中离子打碎,做二级质谱,结合二级谱图分析验证代谢产物的结构^[11-12]。

3 结果

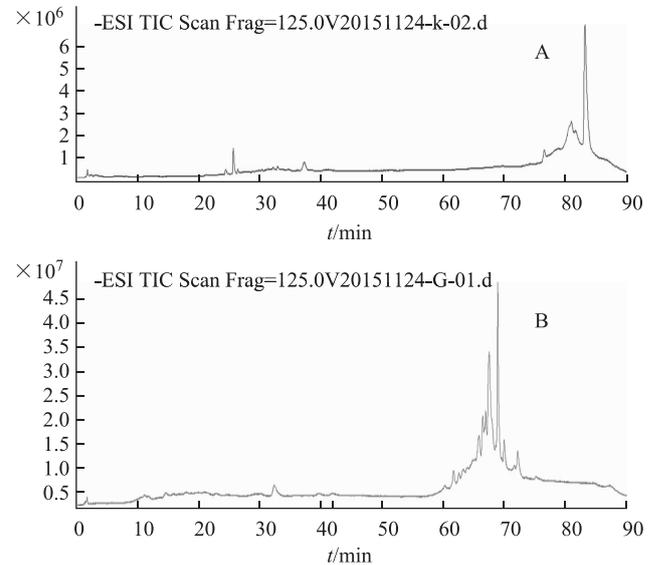
3.1 LC-MS 条件的选择与优化

考察了甲醇-水、乙腈-水系统对谱图的影响,发现以乙腈为有机相洗脱时,各色谱峰分离效果较好,基线较平稳,故选用乙腈-水作为梯度洗脱的流动相。比较了正负离子模式下的总离子流色谱图,发现负离子模式下峰容量大,质谱响应更好,故实验

选择负离子模式下进行检测。

3.2 地榆鞣质尿液中代谢产物初步鉴定

大鼠空白尿样和灌胃给药后尿样总离子流色谱图见图1。通过提供的精确分子质量和二级碎片信息,在大鼠尿样中共检测到9个代谢产物,结果见表1。



注: A. 空白尿样; B. 给药组尿样。

图1 大鼠空白尿样和灌胃给药后尿样总离子流色谱图

表1 地榆鞣质提取物在大鼠尿液中代谢产物鉴定结果

编号	t_R/min	鉴定结果	分子式	m/z ($[M-H]^-$)			m/z ($[M+Cl]^-$)		
				实测值	理论值	偏差	实测值	理论值	偏差
M1	1.604	Pyrogallol	$C_6H_6O_3$	125.024 27	125.024 42	-1.2	161.001 1		
M2	5.890	Uro-B	$C_{13}H_8O_3$	211.040 97	211.040 07	4.26	247.016 75		
M3	31.942	Methyl-Uro-C	$C_{14}H_{10}O_5$	257.045 92	257.045 55	1.44	293.022 22		
M4	32.423	Uro-A	$C_{13}H_8O_4$	227.035 83	227.034 98	3.74	263.011 66		
M5	39.534	Methyl-Uro-A	$C_{14}H_{10}O_4$	241.051 48	241.050 63	3.53	277.027 31		
M6	31.926	Uro-C-Glu	$C_{19}H_{16}O_{11}$		419.061 98		455.038 15	455.038 66	-1.12
M7	38.876	Dimethy-EA	$C_{16}H_{10}O_8$	329.029 08	329.030 29	-3.68	365.006 97		
M8	62.793	Uro-M5	$C_{13}H_8O_7$	275.019 09	275.019 73	-2.33	310.996 4		
M9	84.302	Gallic acid	$C_7H_6O_5$	169.014 06	169.014 25	-1.12	204.990 92		

注: Uro—Urolithin; Glu—Glucuronidation; EA—Ellagic acid。

代谢产物 M1: 保留时间 $t_R = 1.604\ \text{min}$, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 125.024 27, 与预测代谢产物相应的精确分子质量 125.024 42 对比, 初步推测其为 Pyrogallol, 同时 MS^2 谱图中显示碎片离子 m/z 81.034 3, 其分子量与 M1 相比减少了 44 Da, 可推测 M1 分子离子失去了一个 CO_2 , 产生碎片离子 $[M-COO-H]^-$, 与文献报道的 Pyrogallol 二级质

谱碎片一致^[13], 进一步证实该代谢产物为焦性没食子酸(Pyrogallol)(见图2、3)。可能的裂解途径见图4。

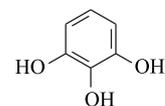
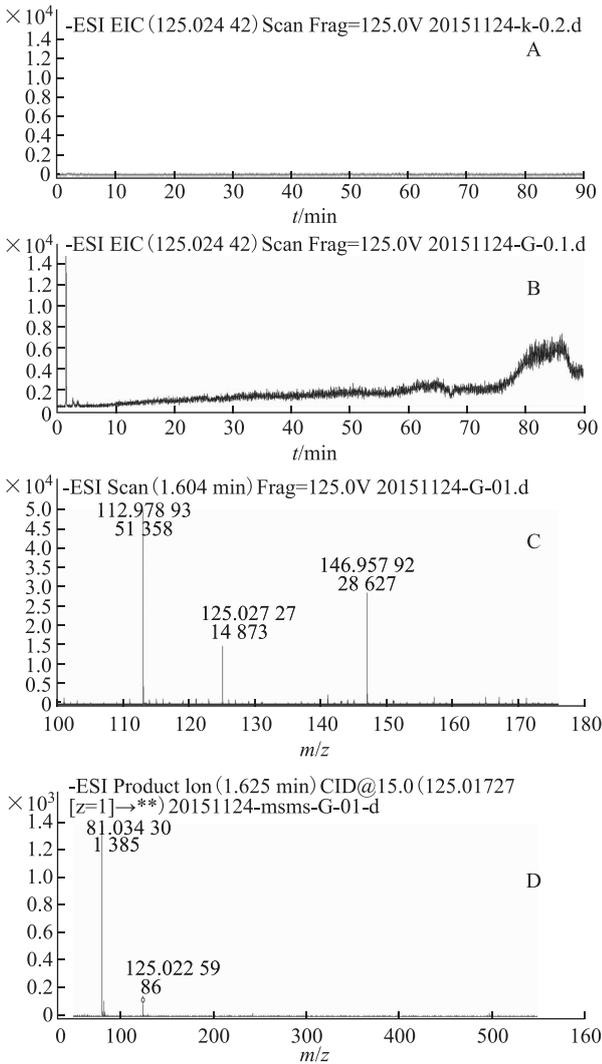


图2 代谢产物 M1 结构式



注: A. 空白尿样在 m/z 125.024 42 的提取离子流色谱图 (EIC); B. 给药组尿样在 m/z 125.024 42 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 1.604$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图; D. 碎片离子 m/z 125 的二级 (MS/MS) 质谱图。

图3 代谢产物 M1 的质谱图

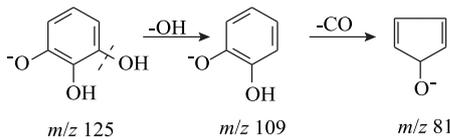


图4 代谢产物 M1 的裂解途径

代谢产物 M2: 保留时间 $t_R = 5.890$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 211.040 97, 与预测代谢产物相应的精确分子质量 211.040 07 对比, 初步推测其为 Uro B, 同时 MS² 谱图中显示碎片离子 m/z 166.980 58, 其分子量与 M2 相比减少 44 Da, 推测 M2 分子离子失去了一个 CO₂, 产生碎片离子

$[M-COO-H]^-$, 与文献^[14]报道的代谢产物 Uro B 二级质谱碎片一致, 进一步证实该代谢产物为尿石素 B (Urolithin B) (见图 5、6)。可能的裂解途径见图 7。

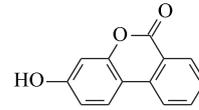
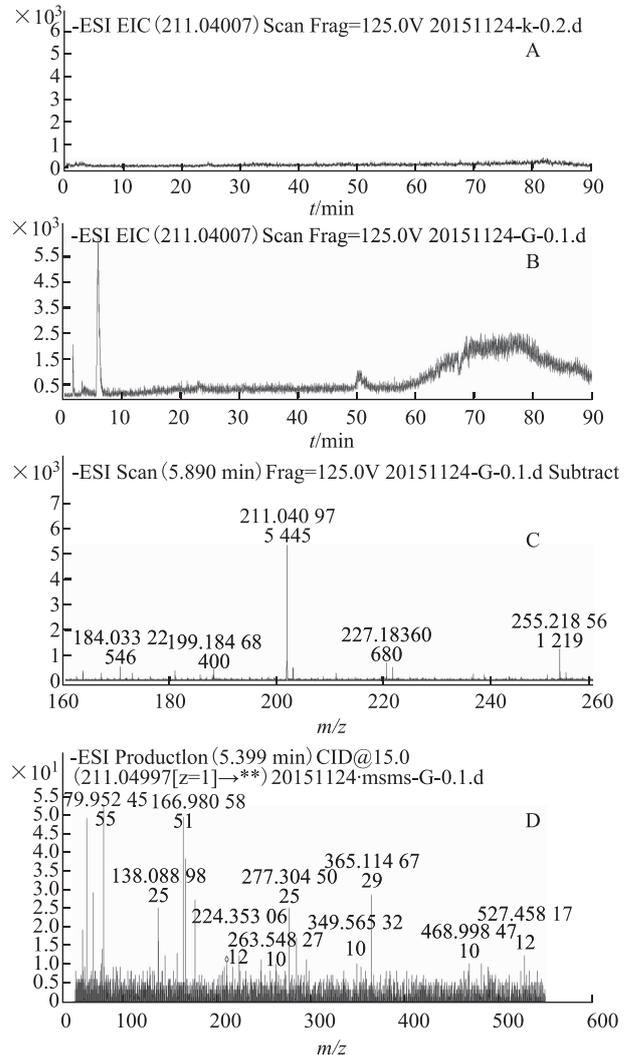


图5 代谢产物 M2 结构式



注: A. 空白尿样在 m/z 211.040 07 的提取离子流色谱图 (EIC); B. 给药组尿样在 m/z 211.040 07 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 5.890$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图; D. 碎片离子 m/z 211 的二级 (MS/MS) 质谱图。

图6 代谢产物 M2 质谱图

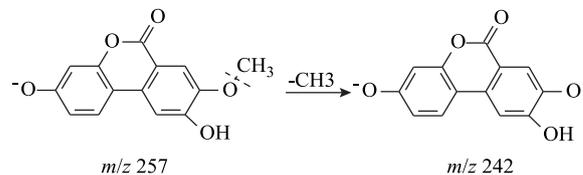


图7 代谢产物 M2 裂解途径

代谢产物 M3: 保留时间 $t_R = 31.942$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 257.045 92, 与预测代谢产物相应的精确分子质量 257.045 55 对比, 初步推测其为 Methyl-Uro C, 同时 MS^2 谱图中显示碎片离子 m/z 242.016 81, 与 M3 相比其分子量减少 15 Da, 推测分子离子失去一个甲基生成碎片离子 $[M-CH_3-H]^-$, 与文献^[15]报道的代谢产物 Methyl-Uro C 二级质谱碎片一致, 进一步证实该代谢产物为甲基化尿石素 C (Methyl-Urolithin C) (见图 8、9)。可能的裂解途径见图 10。

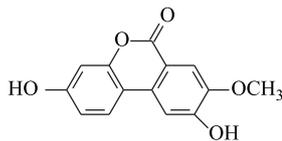
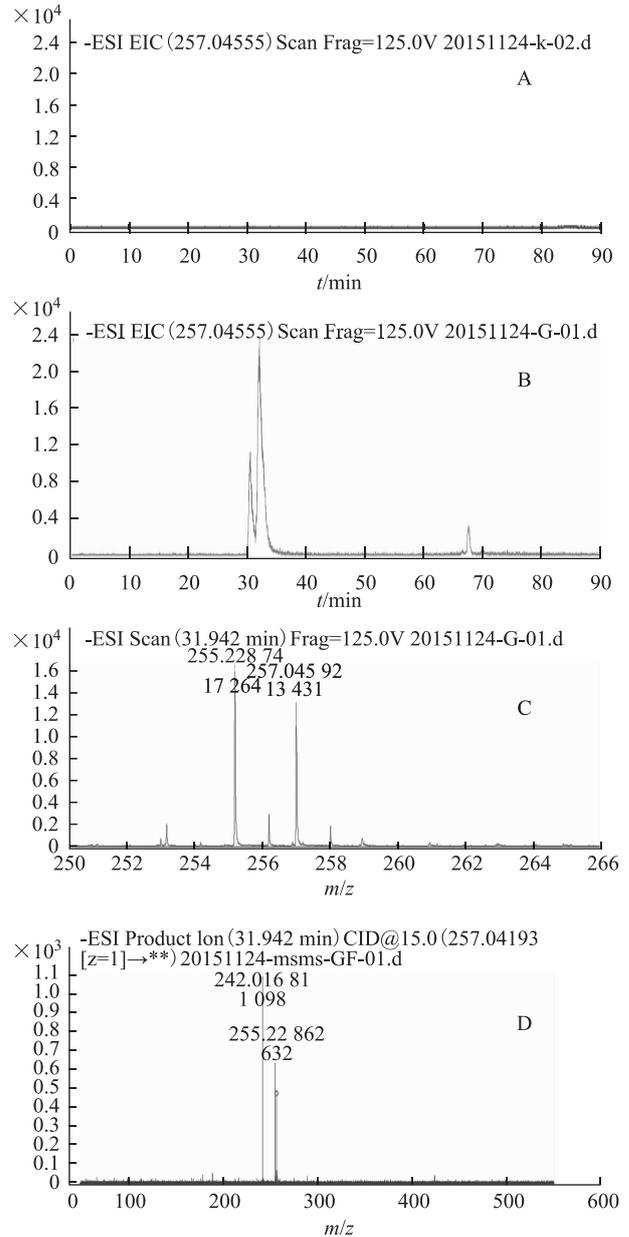


图 8 代谢产物 M3 结构式

代谢产物 M4: 保留时间 $t_R = 32.423$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 227.035 83, 与预测代谢产物相应的精确分子质量 227.034 98 对比, 初步推测其为 Uro-A 或 Iso-Uro-A, 同时 MS^2 谱图中显示存在碎片离子 m/z 199.039 47 $[M-CO-H]^-$, 与文献报道的代谢产物 Uro-A 二级质谱碎片一致^[14], 进一步证实该代谢产物为尿石素 A (Urolithin A) (见图 11、12)。可能的裂解途径见图 13。

代谢产物 M5: 保留时间 $t_R = 39.534$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 241.051 48, 与预测代谢产物相应的精确分子质量 241.050 63 对比, 初步推测其为 Methyl-Uro-A, 同时 MS^2 谱图中显示碎片离子 m/z 210.903 96 $[M-OCH_2-H]^-$, m/z 196.986 02 $[M-COO-H]^-$ 与文献报道的代谢产物 Methyl-Uro-A 二级质谱一致^[14], 进一步证实该代谢产物为甲基化尿石素 A (Methyl-Uro-A) (见图 14、15)。可能的裂解途径见图 16。

代谢产物 M6、M7、M8、M9: 因其二级质谱不稳定, 故只通过分子离子峰与预测代谢产物精确相对分子质量对比, 进行初步的判断。其中 M6 保留时间 $t_R = 31.926$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M+Cl]^-$ m/z 为 455.038 15, 与预测代谢产物相应的计算值 455.038 66 对比, 初步推测其为 Uro-C-Glur; 代谢产物 M7 保留时间 $t_R = 38.876$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 329.029 08, 与预测代谢产物相应的计算值 329.030 29 对比, 初步推测其为 Dimethyl-EA; 代谢产物 M8 保留时间 $t_R =$



注: A. 空白尿样在 m/z 257.045 55 的提取离子流色谱图 (EIC); B. 给药组尿样在 m/z 257.045 55 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 31.942$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图; D. 碎片离子 m/z 257 的二级 (MS/MS) 质谱图。

图 9 代谢产物 M3 质谱图

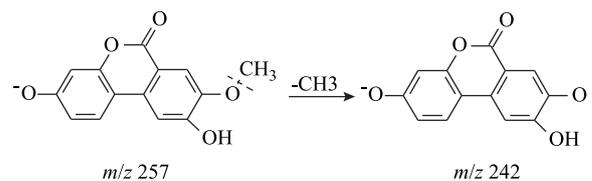


图 10 代谢产物 M3 裂解途径

62.793 min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 275.019 09, 与预测代谢产物相应的计算值 275.019 73

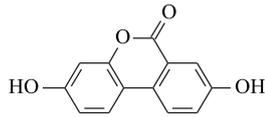


图11 代谢产物 M4 结构式

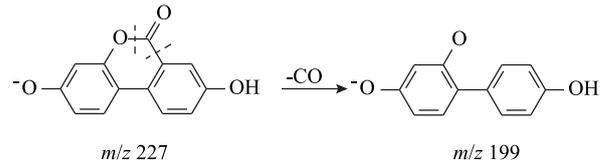


图13 代谢产物 M4 裂解途径

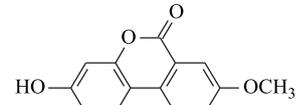
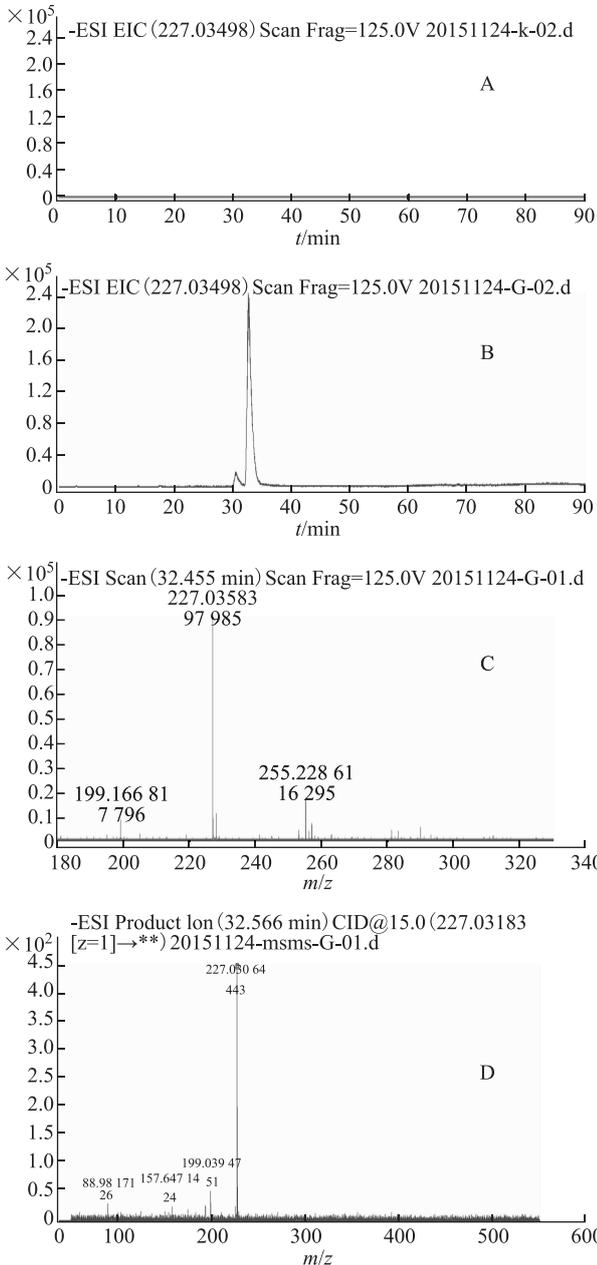
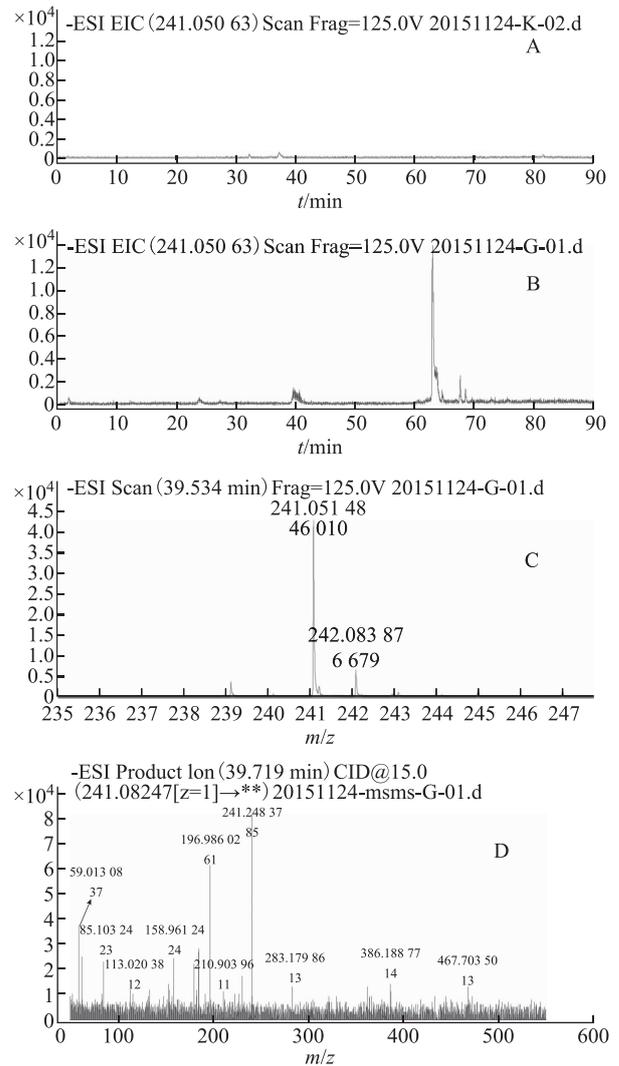


图14 代谢产物 M5 结构式



注: A. 空白尿样在 m/z 277.03498 的提取离子流色谱图 (EIC);
C. 给药组尿样在 m/z 227.03498 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 32.455$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图; D. 碎片离子 m/z 227 的二级 (MS/MS) 质谱图。

图12 代谢产物 M4 质谱图



注: A. 空白尿样在 m/z 241.05063 的提取离子流色谱图 (EIC);
B. 给药组尿样在 m/z 241.05063 的提取离子流色谱图 (EIC);
C. 保留时间 $t_R = 39.534$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图; D. 碎片离子 m/z 241 的二级 (MS/MS) 质谱图。

图15 代谢产物 M5 的质谱图

对比, 初步推测其为 Uro-M5; 代谢产物 M9 保留时间 $t_R = 84.302$ min, ESI/MS 分子离子峰 $[M-H]^- m/z$ 为

169.01406, 与预测代谢产物相应的计算值 169.01425 对比, 初步推测其为 Gallic acid (见图 17~21)。

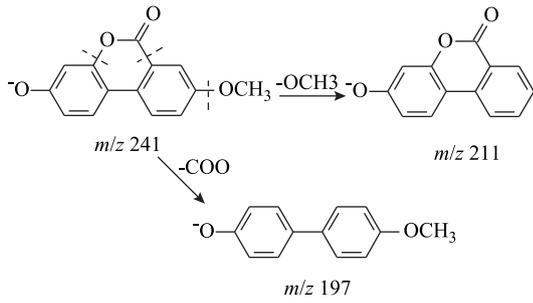


图16 代谢产物M5裂解途径

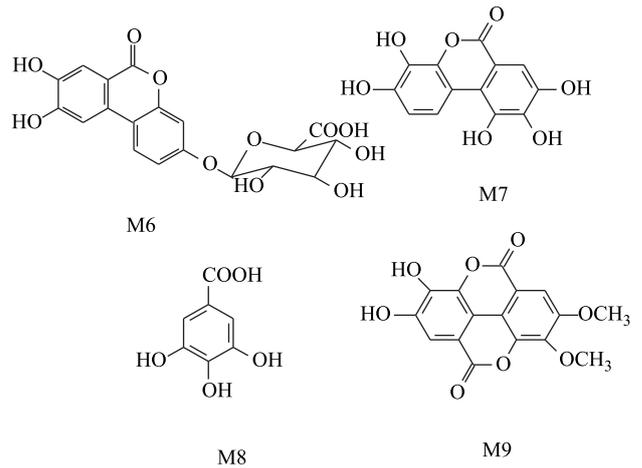
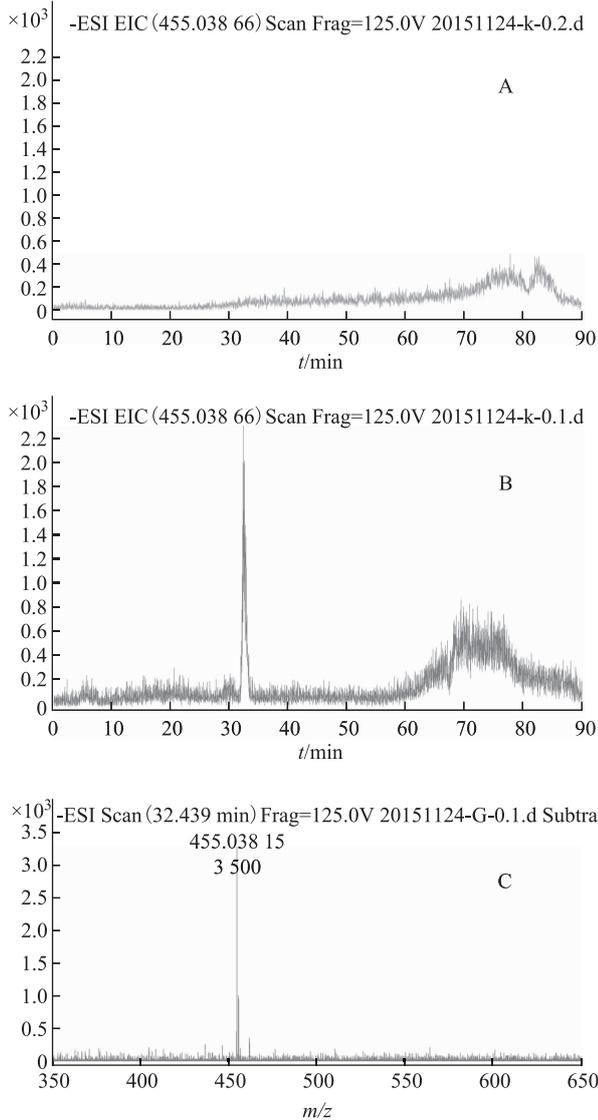
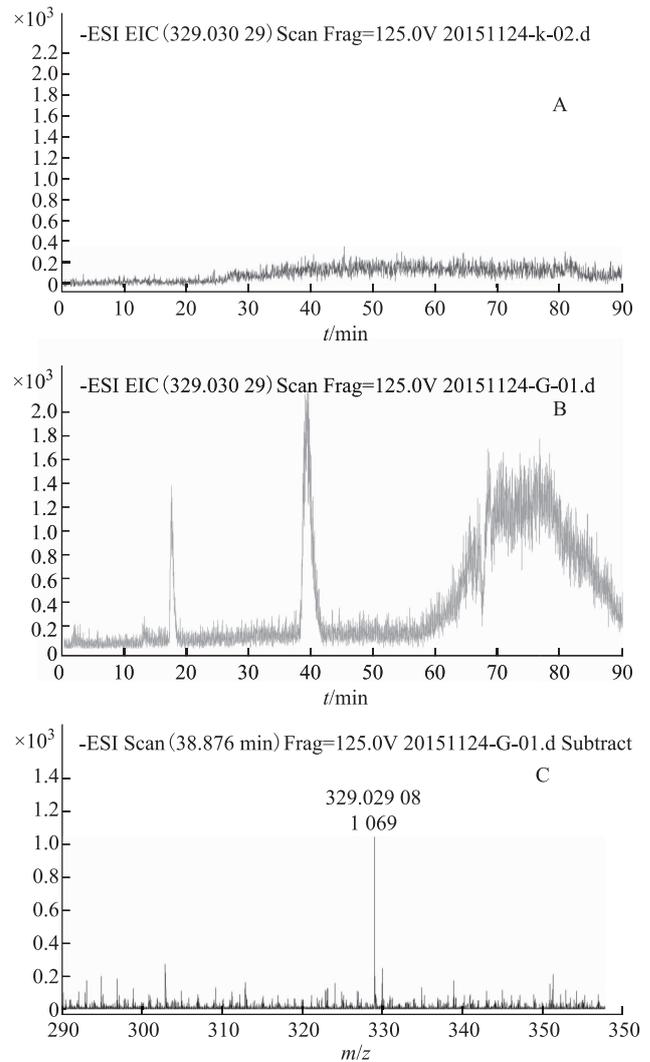


图17 代谢产物M6、M7、M8、M9结构式



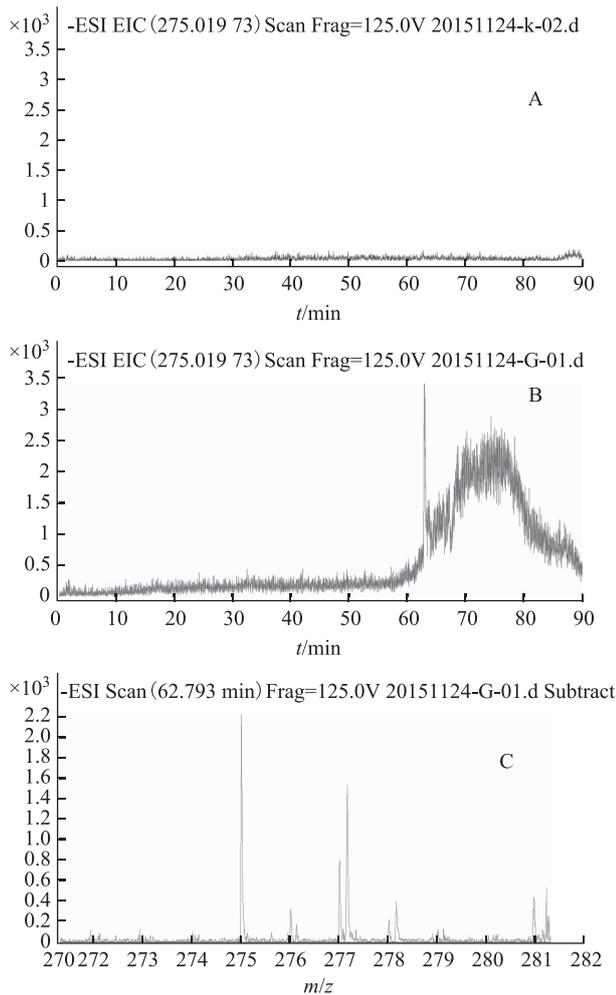
注: A. 空白尿样在 m/z 455.038 66 的提取离子流色谱图 (EIC); B. 给药组尿样在 m/z 455.038 66 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 39.534$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图。

图18 代谢产物M6的质谱图



注: A. 空白尿样在 m/z 329.030 29 的提取离子流色谱图 (EIC); B. 给药组尿样在 m/z 329.030 29 的提取离子流色谱图 (EIC); C. 保留时间 $t_R = 39.534$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图。

图19 代谢产物M7的质谱图

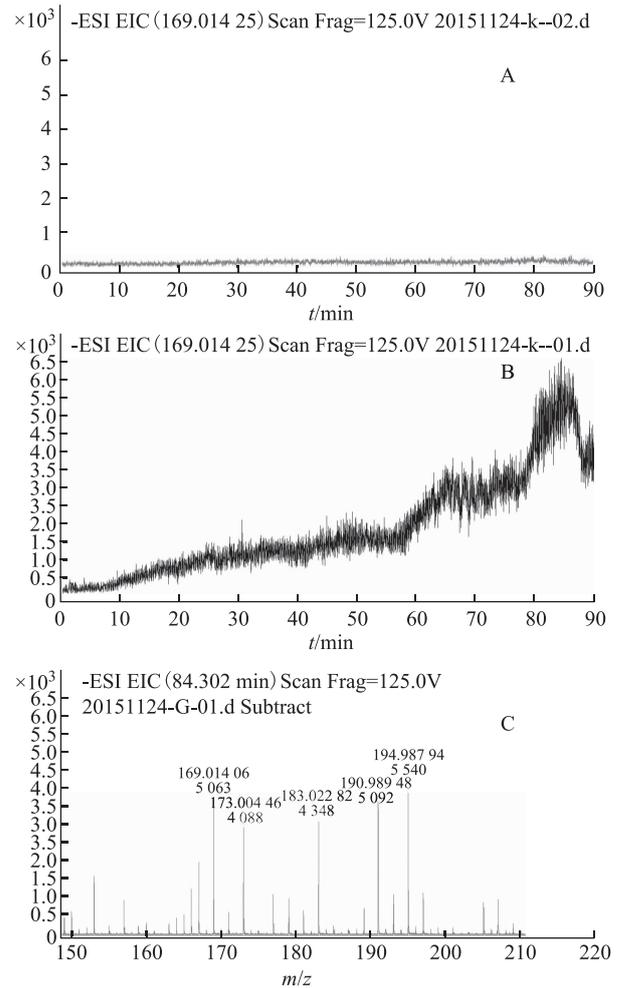


注: A. 空白尿样在 m/z 275.01973 的提取离子流色谱图 (EIC);
B. 给药组尿样在 m/z 275.01973 的提取离子流色谱图 (EIC);
C. 保留时间 $t_R = 39.534$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图。

图 20 代谢产物 M8 的质谱图

4 讨论

液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS) 是近些年发展起来的一种现代分析技术, 它以高效液相色谱为分离手段, 以质谱为检测器, 既具有液相色谱高分离能力的特性, 又具有质谱高灵敏度、高专属性优点^[16]。在药物代谢转化研究中, 生物样品中的药物和代谢产物分离纯化、分析和鉴定工作非常重要, 传统的分离纯化工作常需借用大孔树脂、凝胶柱、制备型色谱柱等柱色谱技术来进行, 工作量大、耗时、且需要的样品量大。而生物样品中药物及代谢产物往往浓度较低, 加上内源性杂质的干扰, 使得目标物的分离、分析难度加大, 从而对分析方法的灵敏度和特异性提出更高的要求。液质联用技术为



注: A. 空白尿样在 m/z 169.01425 的提取离子流色谱图 (EIC);
B. 给药组尿样在 m/z 169.01425 的提取离子流色谱图 (EIC);
C. 保留时间 $t_R = 39.534$ min 时, 给药组尿样 EIC 图的一级 (MS) 质谱图。

图 21 代谢产物 M9 的质谱图

药物代谢研究提供了强有力的手段, 目前 HPLC-Q-TOF-MS 越来越多地被用于中药成分及代谢产物的快速检测^[17-18]。

生物样品具有成分复杂、干扰物多且待测物含量低的特点, 故而在对生物样品进行分析前, 需要进行一系列预处理。固相萃取 (SPE)^[19] 是固液萃取和柱液相色谱技术结合的一种预处理技术, 主要用于样品的分离、纯化和浓缩, 与传统萃取相比可提高待测物的回收率, 更有效分离杂质, 且操作简单、省时省力。为了快速除去尿液样品中的蛋白质及杂质等干扰物, 本实验采用 C₁₈ 固相萃取小柱对尿液样品中进行了简单的预处理。

实验过程中, 通过比较不同有机相及调整有机相-水相比例后谱图中出峰情况, 确定液相色谱的流动相和

洗脱条件,同时通过对比正负离子条件下谱图中响应值大小和出峰的数目,最终选择负离子扫描模式,这可能与代谢产物中大多含有羟基等官能团有关。

大鼠灌胃给予地榆鞣质提取物后,经 HPLC-Q-TOF/MS 分析,从其尿液中共检测到 9 个代谢产物,分别为焦性没食子酸(Pyrogallol)(M1)、尿石素 B(Urolithin B)(M2)、甲基化尿石素 C(Methyl-Urolithin C)(M3)、尿石素 A(Urolithin A)(M4)、甲基化尿石素 A(Methyl-Urolithin A)(M5)、葡萄糖醛酸化尿石素 C(Urolithin C-Glucuronidation)(M6)、二甲甲基化鞣花酸(Dimethy-EA)(M7)、尿石素 M5(Uro-

lithin M5)(M8)、没食子酸(Gallic acid)(M9),其中 M9 为原型药物。地榆鞣质进入大鼠体内,一方面没食子酸类鞣质水解产生没食子酸(Gallic acid),没食子酸在肠道菌群的作用下进一步代谢成焦性没食子酸(Pyrogallol),另一方面鞣花鞣质经水解形成鞣花酸(EA),鞣花酸在肠道菌群的作用下进一步代谢成尿石素类化合物(urolithins)。推测地榆鞣质首先经 I 相代谢形成尿石素等极性偏小的代谢产物吸收进入体内,再发生 II 相结合反应,与葡萄糖醛酸等结合增大极性,进而从尿液排除体外^[20]。地榆鞣质在体内可能的代谢途径见图 22。

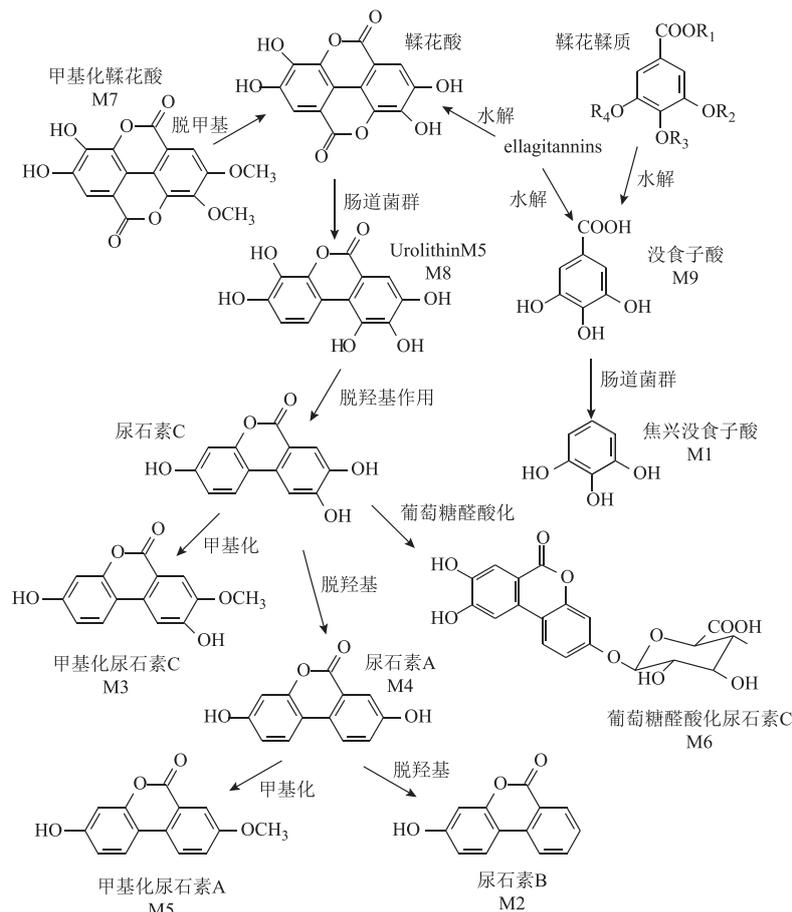


图 22 地榆鞣质在体内的代谢途径

鞣质是一类结构比较复杂的多元酚类化合物,按结构式可分为水解鞣质、缩合鞣质和复合鞣质^[21]。鞣花鞣质(Ellagitannins)是水解鞣质中的一种,水解后可产生鞣花酸(逆没食子酸, Ellagic acid),广泛存在于石榴、草莓、蓝莓等食物中。随着人们对其研究的不断深入,发现其具有抗氧化、抗病毒、抗炎、雌激素受体拮抗等诸多生物活性^[22-25],人们进一步对其在体内的生物转化进行研究,发现其主要代谢产物尿

石素(urolithins)同样具有较强的生物活性^[26-28],推测尿石素可能是鞣花鞣质在体内发挥作用的物质基础。地榆中含有大量的鞣质类成分,主要是水解鞣质和缩合鞣质,其水解鞣质中就包含没食子鞣质和鞣花鞣质^[2]。通过对其代谢产物进行分析,可推测地榆鞣质在体内的代谢转运途径,进一步阐明了其发挥作用的机理。接下来将对其代谢产物进行进一步活性研究,为新药的开发利用提供依据。

参考文献

- [1] 袁振海,孙立立.地榆现代研究进展[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):90-92.
- [2] 姜贵全.地榆中药用活性成分提取工艺及稳定性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2005.
- [3] 胡毅,夏天,赵建斌.地榆鞣质抗肝癌细胞 SMMC-7721 的 MTT 及 FCM 分析[J].第四军医大学学报,1998(5):550-552.
- [4] 易慧兰,周本宏,涂杰,等.地榆鞣质提取物对 TGF- β_1 诱导人肾小管上皮细胞增殖的影响[J].中国药师,2015,18(10):1668-1670.
- [5] 熊永爱,邹俊波,杨明.地榆鞣质对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制的保护作用研究[J].天然产物研究与开发,2014(4):499-503.
- [6] 周本宏,张琛霞,沈恒,等.大孔吸附树脂对地榆中总鞣质的纯化[J].中国药师,2011,14(5):685-688.
- [7] 丁雯,钱大玮,段金廛,等.当归赤芍药对中阿魏酸和没食子酸在大鼠血浆和尿液中的代谢物研究[J].中国中药杂志,2012,37(3):366-372.
- [8] 陈勇,沈少林,陈怀侠,等.HPLC-ESI-ITMSⁿ法鉴定麻黄碱及其大鼠体内主要代谢产物[J].药科学报,2005,40(9):838-841.
- [9] 赵秀丽,陈大为,孙璐,等.LC/MSⁿ鉴定丁香酚布洛芬酯在大鼠尿中的主要代谢产物[J].中国药理学杂志,2005,40(21):1662-1665.
- [10] 马婧怡.苗药头花蓼活性鞣质成分 FR429 的代谢特征研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- [11] Ouyang H, Zhou M, Guo Y, et al. Metabolites profiling of Pulsatilla saponin D in rat by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS/MS) [J]. Fitoterapia, 2014, 96(47): 152-158.
- [12] 李悦悦,王慧,陈俊,等.RRLC-TOF/MS 鉴别防风血浆、尿液中成分及代谢产物[J].第二军医大学学报,2010,31(7):760-763.
- [13] Bueno F G, Panizzon G P, Mello E V, et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from Poincianella pluviosa stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts [J]. Fitoterapia, 2014, 99:252-260.
- [14] Nunez-Sanchez M A, Garcia-Villalba R, Monedero-Saiz T, et al. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients [J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(6): 1199-1211.
- [15] Espin J C, Gonzalez-Barrio R, Cerda B, et al. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(25): 10476-10485.
- [16] 李晓东,林琳,丁丽霞.液质联用技术在药品质量控制中的应用(上)[J].中国药师,2010,13(5):645-647.
- [17] Yi T, Leung K S, Lu G H, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant Polygonum multiflorum thunb by HPLC coupled with PAD and ESI/MS [J]. Phytochem Anal, 2007, 18(3): 181-187.
- [18] Jaiswal R, Jayasinghe L, Kuhnert N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC-MS [J]. J Mass Spectrom, 2012, 47(4): 502-515.
- [19] 童珊珊,余江南,刘文英,等.体内药物分析中的样品预处理技术[J].药学进展,2001,25(1):24-27.
- [20] 周本宏,涂杰,金龙,等.石榴皮鞣质在大鼠体内的代谢产物分析[J].中国药理学杂志,2014,49(10):821-824.
- [21] 徐勤.鞣质的研究进展[J].华夏医学,2004,17(1):113-115.
- [22] Larrosa M, Tomas-Barberan F A, Espin J C. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and up-regulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(16): 4576-4584.
- [23] Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(16): 8867-8872.
- [24] Adams L S, Seeram N P, Aggarwal B B, et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 980-985.
- [25] Ross H A, McDougall G J, Stewart D. Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts [J]. Phytochemistry, 2007, 68(2): 218-228.
- [26] Vicinanza R, Zhang Y, Henning S M, et al. Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(1): 70-75.
- [27] Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Garcia-Conesa M T, et al. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(5): 1611-1620.
- [28] Qiu Z, Zhou B, Jin L, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 59(6): 878-889.

(收稿日期 2016-08-20)