

中药枳壳葡萄内酯活性代谢产物的色谱筛选※

● 黄 群 杨改红 袁金斌[▲] 杨武亮 陈海芳 杨 明

摘 要 目的:建立生物基质中乙酰胆碱酯酶抑制剂(AchEI)分离、筛选和鉴定的色谱联用技术,筛选大鼠血浆中的葡萄内酯活性代谢产物。方法:基于乙酰胆碱酯酶的经典分析方法,构建 AchEI 的流动生化反应与检测系统。葡萄内酯口服给药后,制备得到的大鼠血浆样品经色谱分离后,同时进行质谱、紫外和生化检测,实现葡萄内酯活性代谢产物的分离、筛选和鉴定。结果:筛选得到几个活性代谢产物,发现 1 个具有较强生物活性的代谢产物。结论:所提出的色谱联用技术可以应用于生物基质中 AchEI 的在线筛选和鉴定。

关键词 色谱联用技术 葡萄内酯 代谢产物 活性筛选

老年痴呆严重影响老年人的健康和生活质量,同时给家庭和社会带来巨大经济压力和负担。乙酰胆碱酯酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitor, AchEI)是防治该病的主流药物,寻找新的 AchEI 一直是该类药物研究的热点^[1]。近年来,本实验室已从中药枳壳中筛选得到一种温和的 AchEI,即葡萄内酯。葡萄内酯在大鼠体内的药代动力学^[2-4]和代谢特性实验表明:葡萄内酯口服给药后,迅速被代谢转化,血浆中检测不到原形药物,几个代谢产物随给药时间呈规律变化,起药效作用的可能是其代谢产物。

药物代谢研究是药物早期筛选的重要研究内容。但是由于药物的代谢产物样品量少、基质复杂,使得活性代谢产物的筛选几乎不可能按照传统的“分离→纯化→筛选”模式进行^[5]。高效液相色谱(HPLC)具有分离效率高、灵敏度好、检测手段多等优点,是目前分离分析中最常用的方法,将其与活性筛选相结合可以对活性物质进行有目的的跟踪,使

活性物质被发现和分离的时间大大缩短^[6]。

近年来,各种色谱联用技术在天然产物包括中药活性物质筛选中的应用越来越多^[6-10]。本文拟开发一种色谱与生物活性检测、紫外检测和质谱检测的多维联用技术,筛选鉴定葡萄内酯的活性代谢产物,为其进一步开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与实验动物 葡萄内酯为从枳壳中分离纯化得到,采用高效液相色谱法检查其含量不低于 98%;乙酰胆碱酯酶(BR, 220U/mg)、联硫代双硝基苯甲酸(DTNB)购自国药集团化学试剂有限公司;牛血清蛋白(BSA)购自杭州四季青试剂公司;其它试剂均为分析纯。SD 大鼠,♂,体重 200~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,饲养管理条件:塑料盒饲养;自由饮水,光照 12 小时明暗交替。

1.2 实验仪器 Agilent 6410 液相色谱-三级四极杆质谱联用仪(Agilent 科技, USA)、Agilent 1200 液相色谱仪、Waters 510 色谱泵、0.5mm 内径 300μl 体积的 PFA 环管(反应器)、高速冷冻离心机(SIGMA-18, SIGMA 公司, 德国)、普通离心机(XiangYi L500, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.3 方法原理 如图 1 所示,在辅助泵的驱动下, AchE 和与巯基显色剂 DTNB 按比例混合,继而与

※基金项目 国家自然科学基金(No:81060326 & 81260605), 江西省自然科学基金(No:2010GZY0163)

▲通讯作者 袁金斌,男,理学博士,副教授。研究方向:中药物质基础与质量控制。E-mail: kings2008@163.com

• 作者单位 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室(330004)

ASch(硫代乙酰胆碱)混合,然后在反应环管中发生特异性反应,AchE 水解 ASch 生成硫代胆碱和乙酸。硫代胆碱与 DTNB 反应形成黄色化合物 TNB,其于 412nm 处有特征吸收。进样后,如果样品中含有 AchE 抑制剂,则其先与 AchE 反应,而与 ASch 反应

的 AchE 减少,生成的 TNB 减少,检测器信号降低,在色谱图上表现为负峰。在生物活性检测与 HPLC 在线联用的基础上,同步进行 HPLC 与二极管阵列检测(DAD)及质谱(MS)的联用分析,就能同时实现活性化合物的在线筛选和迅速的结构鉴定。

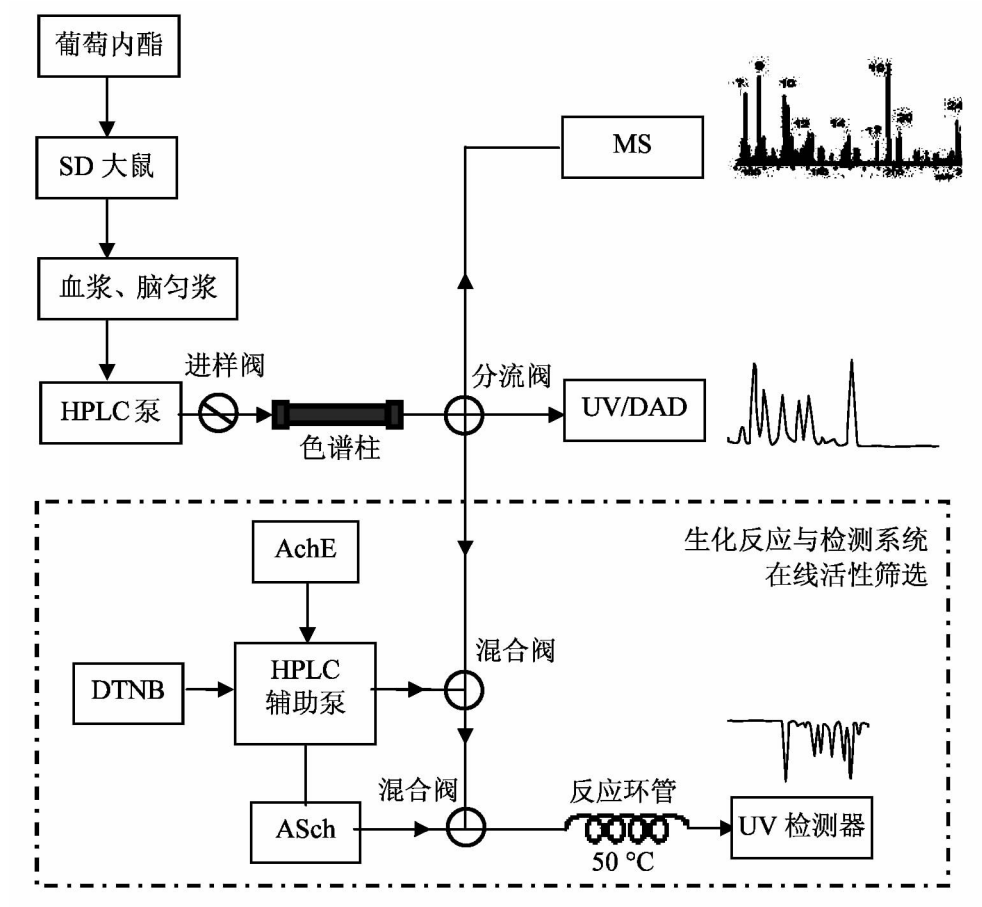


图1 仪器配置及分析流程图

1.4 溶液制备 实验全程使用 50mM 的 Tris - HCl 缓冲溶液。以缓冲溶液溶解 AchE 得到 1000U/mL 的储备溶液,储存于低温冰箱。用 0.1% BSA(溶于缓冲溶液)逐次稀释储备液,得到 AchE 工作溶液。含 0.1M NaCl 和 0.02M MgCl₂ 的缓冲溶液用于制备 DTNB 溶液。直接用重蒸水制备 ASch 溶液。

1.5 样品制备 葡萄内酯以 0.4% CMC - Na 溶液浑悬,灌胃给药,剂量为 30mg/kg,于 0,30,60 和 90min 自眼眶后静脉丛取血。血样经肝素抗凝,4000r/min 离心 10min 分离血浆。取血浆 200μL,加 1mL 乙酸乙酯,涡旋混匀,静置分层,4000r/min 离心 5min 分离乙酸乙酯层,重复 1 次,合并萃取液;乙酸乙酯层置氮气下吹干,加 100μL 甲醇溶解残渣;甲醇溶液于 15000r/min 离心 10min,上清液用于色谱

分析。

1.6 AchE 抑制剂的色谱筛选 色谱条件:Dikma Diamonsil C18 (4.6 × 250mm,5μm) 色谱柱;乙腈 - 0.1% 甲酸梯度洗脱(梯度条件见表 1);流速:1.0mL/min,分流至质谱 0.4mL/min,分流至生化反应与检测系统 40μL/min;322nm 为葡萄内酯及其代谢产物的检测波长。串联质谱条件:电喷雾离子化(ESI);毛细管电压 4.5kv;脱溶剂气温度:350℃;气体流量:10L/min;喷嘴压力:40psi。生化反应与检测系统:用低死体积的 PEEK 毛细管(内径 64μm)连接整个反应体系;反应物的浓度分别为 0.1mM DTNB、0.1U/mL AchE 和 0.1mM ASch;所有反应物的流速均为 40μL/min;反应环管置于 50℃ 的水浴中。检测波长为 412nm。

表 1 流动相的梯度洗脱程序

t/min	0	15	20	30	31
乙腈%	30	60	90	90	30

2 结果与讨论

2.1 生化反应条件的优化 硫代乙酰胆碱 (ASch) - 联硫代双硝基苯甲酸 (DTNB) 分光光度法是 AchE 的标准分析方法, 反应温度一般为 37℃。为加快反应速度, 本文采用 50℃ 作为反应环管的温度。如图 1 所示, 相对于代谢产物的质谱和 UV (322nm) 检测, 生化检测由于反应环管及整个管路的延长, 化合物的保留时间延迟了近 4min。我们以葡萄糖内酯为模型药物, 以 UV 信号为指标对各反应物的浓度、流速进行了系统比较, 结果发现当 DTNB 为 0.1mM,

AchE 为 0.1U/mL, ASch 为 0.1mM, 且流速为 40μL/min, 系统的背景噪音较小, 信噪比较大。

2.2 葡萄糖内酯主要代谢产物的分析 课题组在大鼠药代动力学研究中已经发现血浆中有疑似代谢产物随给药时间的变化而变化。为此着手建立了葡萄糖内酯原型药及其可能的代谢产物的色谱联用分析技术, 相关的色谱图见图 2, 图中两个代谢产物的分子结构已确认 (相关工作另文报道)。由于多数药物的代谢物保留了原药分子的骨架结构或一些亚结构, 因此, 代谢物可能进行与原药相似的裂解, 丢失一些相同的中性碎片或形成一些相同的特征离子。用串联质谱进行中性丢失扫描、母离子扫描以及子离子扫描, 即可迅速找到可能的代谢物, 并鉴定出结构。

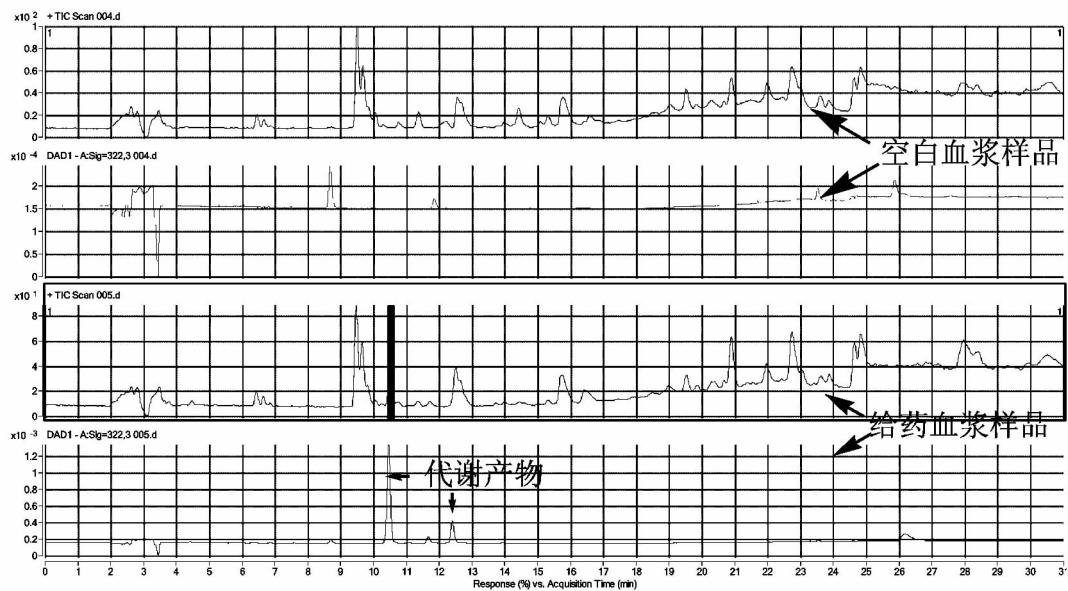


图 2 血浆样品的典型 HPLC - DAD - ESI - MS/MS 色谱图

2.3 活性代谢产物的筛选 葡萄糖内酯活性代谢产物的筛选结果见图 3, 色谱图中的负峰代表可能的活性代谢产物。经过系统比对, 发现保留时间 (tR) 为 14 和 16 分钟的两个负峰与图 2 中检出的两个代谢产物呈对应关系 (保留时间延迟 4min)。从图 2 可以看出, 前一个色谱峰大于后一个色谱峰, 而图 3 的结果正好相反, 后一个代谢产物的乙酰胆碱酯酶抑制活性更强。

3 结论

本文所提出来的色谱联用技术已成功地应用于葡萄糖内酯活性代谢产物的在线筛选, 为葡萄糖内酯的进一步开发利用提供了基础。如能继续改进灵敏度, 该法可以应用于生物体系中乙酰胆碱酯酶抑制剂的分离、筛选和鉴定。

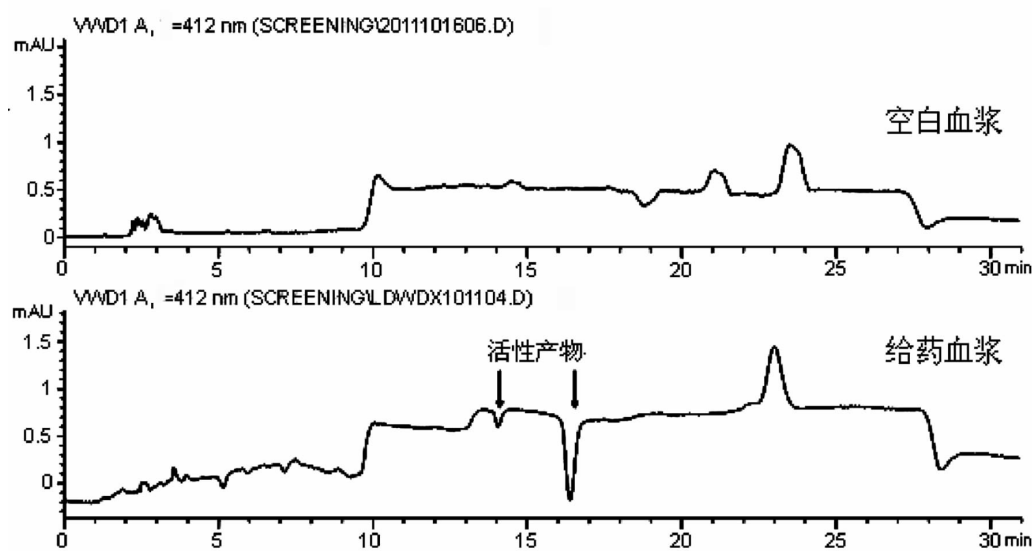


图3 葡萄内酯代谢产物(1h的血样)生化检测的典型色谱图

参考文献

- [1] 李祥鹏,姚文,赵杉杉,等.阿尔茨海默症治疗药物的研究进展[J].齐鲁药事,2011(08):475-477.
- [2] 袁金斌,王发英,李明,等.大鼠静注葡萄内酯的药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011(18):130-133.
- [3] 袁金斌,李明,陈海芳,等.葡萄内酯大鼠血浆蛋白结合率的测定[J].中国医院药学杂志,2012(02):94-96.
- [4] 袁金斌,李明,陈海芳,等.葡萄内酯在小鼠体内的组织分布[J].中国新药杂志,2011(23):2313-2315.
- [5] 姚新生.中药天然药物活性成分的研究方法[J].药学服务与研究,2003(04):205-209.
- [6] 靳艳,张卫,胡政,等.色谱在天然产物活性物质筛选中的应用[J].色谱,2004(06):616-619.

- [7] 张艳梅,康经武.毛细管电泳结合高效液相色谱-质谱用于天然产物活性成分的筛选[J].色谱,2013(07):640-645.
- [8] 方艺霖,张艺,肖小河,等.细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J].中草药,2008(07):1119-1121.
- [9] Liu S, Xing J, Zheng Z, et al. Ultrahigh performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry inhibitors fishing assay: a novel method for simultaneously screening of xanthine oxidase inhibitor and superoxide anion scavenger in a single analysis[J]. Anal Chim Acta, 2012, 715:64-70.
- [10] Shi S, Zhang Y, Jiang X, et al. Coupling HPLC to on-line, post-column(bio) chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures[J]. TrAC Trend Anal Chem, 2009, 28(7):865-877.

中药故事

马齿苋名称的由来

很早以前,有个有钱的大户人家,婆婆常常虐待自己的儿媳齿苋。儿子老实孝顺,从不声张。有一年,村中流行痢疾,齿苋得了此病。婆婆怕传染到自己及家人身上,把儿媳齿苋赶到菜园的茅草屋里,每天只给送点稀饭,根本吃不饱。

齿苋为充饥,只好去菜园挖些野菜放到稀饭中煮着吃。谁知连吃几天,痢疾病竟不治而愈。病好后,齿苋回到家中,发现婆婆、丈夫也染上了痢疾,卧床不起。齿苋忙去野外挖些野菜为婆婆、丈夫治病。经过几天的疗养,家人的病就痊愈了。

齿苋不但把婆婆、丈夫的病治好了,而且在婆婆患病时做饭、洗衣,也不怕传染自己。婆婆深受感动,为自己以前对儿媳的态度十分羞愧。从此婆婆再也不虐待儿媳了。村中流行痢疾期间,齿苋挖野菜送给村里患痢疾的乡亲们,不久村里的痢疾病人全治愈了。

齿苋挖的这种治疗痢疾的野菜外形像马的牙齿,又是齿苋首先发现的,因此,人们便把这种能治痢疾的野菜起名叫“马齿苋”。