

白藜芦醇苷及其代谢物在Beagle犬体内的排泄动力学研究

苏美英^{1*},梅如冰¹,隋忠国²,周茂金^{1#}(1.泰安市中心医院,山东泰安 271000;2.青岛大学附属医院,山东青岛 266003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3514-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.16

摘要 目的:研究白藜芦醇苷(TRG)及其代谢物在Beagle犬粪样中的代谢与排泄情况,为TRG的新药开发提供实验依据。方法:4只Beagle犬ig TRG 20%聚乙二醇400溶液50 mg/kg,采用液相色谱-质谱联用法鉴定TRG给药后12~24 h粪样中的代谢物,采用高效液相色谱法测定给药后0~12、12~24、24~36、36~48、48~72、72~96 h TRG在粪样中主要代谢物[其昔元白藜芦醇(TR)]以及TR累积排泄率及排泄速率。结果:在犬粪中可测到TR及TR的2个硫酸结合物,其中TR为主要代谢物,未测到TRG。TR在犬粪中排泄速率于给药后12~24 h时最大,达到9.65 mg/h;其累积排泄率为39.3%,相当于TRG给药剂量的67.2%。结论:犬ig TRG后,TRG主要以TR形式从粪中排出体外。

关键词 白藜芦醇苷;白藜芦醇;犬;粪便;代谢;排泄

Study on the Excretion Pharmacokinetics of Polydatin and Its Metabolite in Beagle Dogs

SU Meiyi¹, MEI Rubing¹, SUI Zhongguo², ZHOU Maojin¹(1.Tai'an Central Hospital, Shandong Tai'an 271000, China; 2.The Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the metabolite and excretion of polydatin (Trans-resveratrol-3-O-glucoside, TRG) and its metabolites in Beagle dog feces, and provide experimental basis for the new drug development of TRG. METHODS: 4 Beagle dogs were intragastrically administrated TRG 20% polyethylene glycol 400 solution 50 mg/kg. LC/MS was used to identify the metabolites of TRG in dog feces after 12-24 h of administration, and HPLC was adopted to determine the cumulative excretion rate and excretion speed rate of the major metabolite resveratrol (TR) in feces samples after 0-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-72, 72-96 h of administration. RESULTS: TR and two sulfate conjugates of TR were found in dog feces, and TR was a major metabolite, while TRG was undetermined. The excretion speed rate of TR in dog feces was the fastest after 12-24 h of administration, reaching 9.65 mg/h. Its cumulative excretion rate was 39.3%, equivalent to 67.2% of TRG. CONCLUSIONS: After TRG is intragastrically administrated to dogs, TRG was mainly excreted in the form of TR via dog feces.

KEYWORDS Polydatin; Resveratrol; Dogs; Feces; Metabolism; Excretion

白藜芦醇苷(Trans-resveratrol-3-O-glucoside, TRG)属于二苯乙烯苷类化合物,具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤及心血管、神经和肝肺保护作用^[1-4]。该化合物广泛存在于虎杖^[5-6]等各种植物中,有望成为治疗心脑血管疾病的候选药物。为进一步探讨该化合物是否具有成药性,笔者研究了TRG在Beagle犬体内的代谢与排泄规律,为TRG的新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Hewlett-Packard 1100高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1322A四元梯度泵、G1314A紫外检测器、G1316A柱温箱、G1322A脱气机、Rev.A.06.03色谱工作站(美国惠普公司);LD5-2A离心机(北京医用离心机厂);LCQ液相色谱-质谱联用(LC/MSⁿ)仪,配有电喷雾离子源

*副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0538-6298258。E-mail:tasumeiyi@163.com

#通信作者:主任药师,博士。研究方向:药动学。电话:0538-6298258。E-mail:mjzhoutj@sina.com

(ESI)和Xcalibur1.2数据处理系统(美国Finnigan公司)。

1.2 药品与试剂

TRG原料药(批号:20030915,纯度:99.5%)、白藜芦醇(TR)对照品(批号:20030915,纯度:98.5%)均由沈阳市万嘉生物技术研究所提供;黄芩苷对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:20030621,纯度:99.6%);甲醇、乙腈为色谱纯。

1.3 动物

Beagle犬4只,♂♀各半,体质量(10.0~15.0)kg,由沈阳药科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(辽)2003-0011。

2 方法与结果

2.1 粪样中TRG的代谢物鉴定与含量测定条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:25℃。代谢物含量测定中,流动相:乙腈-0.25%甲酸(27:73, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;进样量:50 μL。代谢物鉴定中,流动相:

乙腈-10 mmol/L 醋酸铵溶液(25:75, V/V); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 320 nm; 进样量: 20 μ L。

2.1.2 质谱条件 采用ESI, 负离子方式检测, 离子源喷射电压: 4.25 kV; 毛细管温度: 200 $^{\circ}$ C; 毛细管电压: 6.25 V; 鞘气流速: 1.05 L/min; 辅助气流速: 0.15 L/min; 采用一级、二级和三级全扫描方式。

2.2 标准溶液的配制

精密称取 TR 10 mg, 乙腈溶解, 制成质量浓度为 400 μ g/mL 的 TR 贮备液; 精密量取 TR 贮备液适量, 用乙腈稀释成质量浓度分别为 0.100、0.250、1.00、4.00、20.0、100 μ g/mL 的系列标准溶液。精密称取黄芩苷 10.0 mg, 乙腈溶解, 制成质量浓度为 400 μ g/mL 的内标贮备液; 精密量取内标贮备液适量, 用乙腈稀释成质量浓度为 20.0 μ g/mL 的内标溶液。

2.3 给药与取样

实验前犬禁食 12 h, 自由饮水, 同时收集空白粪样。犬 ig TRG 20% 聚乙二醇 400 溶液 50 mg/kg 1 次(给药剂量为前期药效学实验所得剂量), 给药后 4 h 进食。分别收集给药后 0~12、12~24、24~36、36~48、48~72、72~96 h 各时间段粪样, 称定质量后, -20 $^{\circ}$ C 保存, 待测。

2.4 粪样预处理

2.4.1 代谢物鉴定 取给药后 12~24 h 粪样 1.0 g, 研磨均匀后加入甲醇 2 mL, 超声(功率: 1 000 W, 频率: 30 kHz, 下同)10 min, 离心(离心半径: 10 cm, 转速: 4 000 r/min, 下同)10 min, 取上清液 20 μ L 行 LC/MSⁿ 分析。

2.4.2 代谢物含量测定 将各时间段粪样研磨均匀后加入甲醇 2 mL, 超声 15 min, 离心 10 min, 制得 50% (V/V) 犬粪匀浆。取犬粪各时间段匀浆 100 μ L(其中 0~12、12~24、24~36、36~48 h 样品用空白粪样匀浆稀释 10 倍, 其余不稀释), 分别加入内标溶液 100 μ L、0.5% 甲酸 100 μ L、乙腈 100 μ L, 摆匀, 于 40 $^{\circ}$ C 氮气流吹干。残渣以流动相定容至 100 μ L, 取 50 μ L 进样测定。

TRG 和 TR 遇光不稳定, 易发生异构化, 因此整个实验过程中应避光操作。

2.5 粪样中代谢物的鉴定

犬给药后 12~24 h 粪样的总离子流(TIC)图和选择离子(SIM)谱图见图 1。

由图 1A 可以看出, 负离子模式下, 选择碎片离子 m/z 389 (TRG 的质荷比) 检测, 结果未检测出碎片离子, 说明粪样中未检测到原型药(TRG); 由图 1B 可知, 选择性检测碎片离子 m/z 227, 在保留时间 43.5 min 处发现 1 个色谱峰(M1), 分子量比 TRG 少 162 Da。对碎片离子 m/z 227 进行二级全扫描质谱分析, 其脱去中性分子 C_2H_4O (-42 Da), 主要得到碎片离子为 m/z 185, 推测 M1 为 TRG 脱去葡萄糖后形成的 TR。取“2.2”项下的 TR 贮备液行 LC/MSⁿ 分析, 所得的一级、二级全扫描质谱图及色谱保留时间与 M1 相同, 由此确认 M1 即为 TR。TRG

和 TR 的二级全扫描质谱图见图 2、图 3。

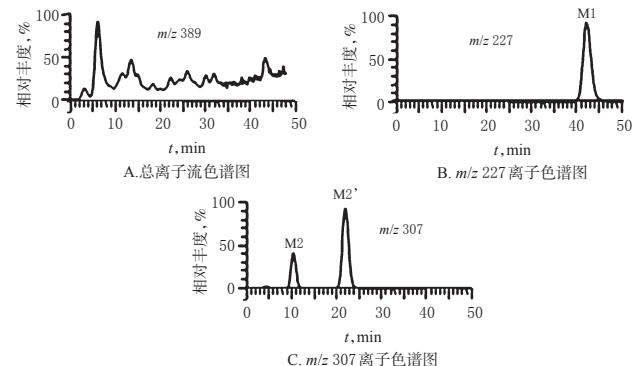


图 1 液相色谱串联质谱色谱图

Fig 1 LC/MS chromatograms

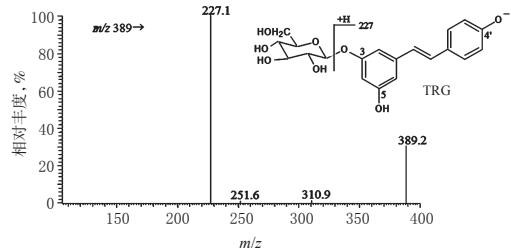


图 2 TRG 的二级全扫描质谱图

Fig 2 Mass spectrum of two-level full-scanning of TRG

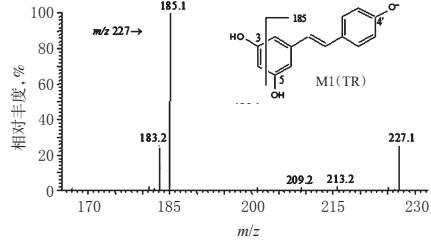


图 3 M1 (TR) 的二级全扫描质谱图

Fig 3 Mass spectrum of two-level full-scanning of M1 (TR)

由图 1C 可知, 选择性检测碎片离子 m/z 307, 在保留时间 11.1、22.8 min 处发现 2 个色谱峰(M2 和 M2'), 但二者的质谱断裂规律一致, 分子量均比 TR 多 80 Da, 推测二者为同分异构体。对碎片离子 m/z 307 进行二级全扫描质谱分析, 得到主要碎片离子均为 m/z 227 (-80 Da), 选择性对 m/z 227 进行三级全扫描质谱分析, 得到的质谱图与 TR 的二级全扫描质谱图相同, 结合文献[7] 推测 M2 和 M2' 为 TR 与硫酸结合后形成的 2 种硫酸结合物。M2 和 M2' 的二级全扫描质谱图见图 4、图 5。

2.6 粪样中 TR 分析方法学研究

2.6.1 方法的选择性 取犬空白粪样匀浆, 按“2.4.2”项下方法处理(不加内标), 获得空白样品; 将 TR 标准溶液 (0.250 μ g/mL) 和内标溶液 (20.0 μ g/mL) 分别加入犬空白粪样匀浆中, 按“2.4.2”项下方法操作, 进样测定, 获得相应的色谱图。结果, TR 和内标的保留时间分别为

18.1、15.9 min, 犬粪样匀浆样品中的内源性物质不干扰TR及内标的测定, 详见图6。

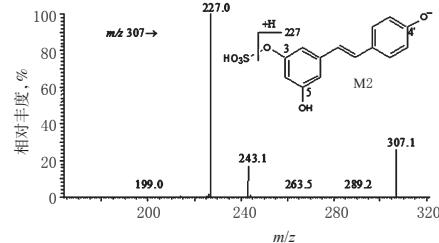


图4 M2的二级全扫描质谱图

Fig 4 Mass spectrum of two-level full-scanning of M2

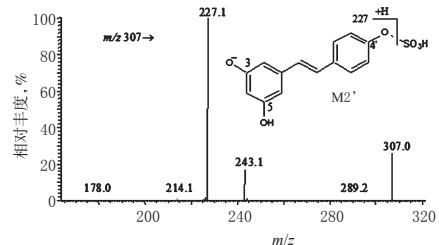


图5 M2'的二级全扫描质谱图

Fig 5 Mass spectrum of two-level full-scanning of M2'

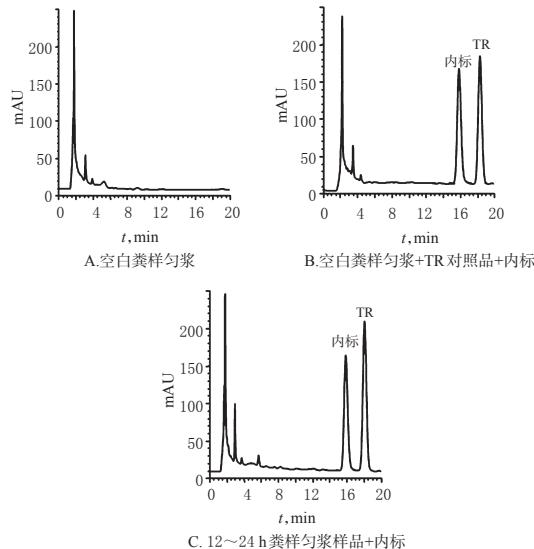


图6 高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms

2.6.2 粪样匀浆标准曲线的制备 取犬空白粪样匀浆100 μ L, 分别加入TR系列标准溶液100 μ L, 配制质量浓度为0.100、0.250、1.00、4.00、20.0、100 μ g/mL的样品溶液, 按“2.4.2”项下方法操作, 按“2.1.1”项下代谢物含量测定色谱条件进样测定, 记录色谱图。以TR质量浓度为横坐标(x)、TR与内标峰面积比值为纵坐标(y)进行线性回归, 得回归方程 $y=0.0712x+0.00682$ ($r=0.9981$)。结果表明, 犬粪样匀浆中TR的检测质量浓度线性范围为0.100~100 μ g/mL, 定量下限为0.100 μ g/mL。

2.6.3 精密度与准确度试验 按“2.6.2”项下方法分别制备含TR低、中、高浓度(0.250、4.00、80.0 μ g/mL)的犬

粪样匀浆质控样品溶液, 按“2.4.2”项下方法操作, 每个浓度样品浓度进样6次, 连续进样3 d。结果, 低、中、高浓度样品浓度日内精密度的RSD分别为4.32%、5.84%、6.13% ($n=6$), 日间精密度的RSD分别为3.18%、7.90%、4.33% ($n=18$), 准确度分别为-0.030%、-2.190%、-0.370% ($n=18$)。

2.6.4 绝对回收率试验 取“2.6.3”项下低、中、高浓度质控样品溶液, 各6份, 进样测定, 得相应峰面积 A ; 另用水代替粪样匀浆, 按“2.6.2”项下方法操作, 制备相应质量浓度的样品溶液, 各6份, 同法测定, 得相应峰面积, 并计算平均值 B ; 以 $A/B \times 100\%$ 计算绝对回收率。结果, 低、中、高浓度样品溶液的绝对回收率分别为91.8%、96.1%、93.5% ($n=6$)。

2.6.5 样品稳定性试验 取“2.6.3”项下低、中、高浓度质控样品溶液, 各5份, 分别考察-20 $^{\circ}$ C反复冻融3次、-20 $^{\circ}$ C冷冻30 d及室温避光放置12 h的稳定性。结果, 低、中、高浓度质控样品溶液-20 $^{\circ}$ C反复冻融3次的RSD分别为6.00%、4.50%、2.10% ($n=5$); -20 $^{\circ}$ C冷冻30 d的RSD分别为6.20%、5.40%、4.40% ($n=5$); 室温避光放置12 h的RSD分别为6.80%、5.90%、4.80% ($n=5$)。

2.7 TRG在犬粪中的排泄研究

计算粪样TR的排泄量、累积排泄率(累积排泄量/给药量 $\times 100\%$)及排泄速率, 并绘制犬粪样中TR的累积排泄率-时间曲线, 结果见图7。

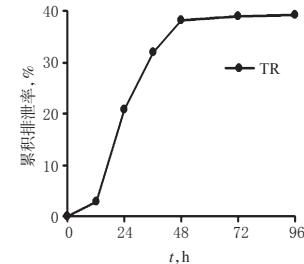


图7 累积排泄率-时间曲线

Fig 7 Cumulative excretion curves rate-time

由图7可知, 犬ig TRG 50 mg/kg后, 粪中TR的累积排泄率为39.3%, 相当于原型药TRG给药剂量的67.2% ($39.3\% \times 390/228$, 390和228分别是TRG和TR的物质的量)。TR在犬粪中排泄率于给药后12~24 h时最大, 达到9.65 mg/h。由此可见, 犬ig TRG后, 主要以TR的形式从粪中排出体外。

3 讨论

药动学研究是新药研究与开发过程中不可缺少的重要环节, 可为新药研究的其他阶段提供理论依据。药物代谢过快可导致生物利用度下降, 而代谢生成的代谢物是否具有活性和毒性都会影响到候选化合物是否具有成药性。TRG在大鼠体内的代谢^[7]及药动学和组织分布^[8~14]已有报道, 在猪^[15]和犬^[16]体内的药动学也有研究, 但基于犬粪内的代谢物与排泄的药动学研究至今尚未

见报道。因此,本文对犬 ig TRG 后,对其在犬粪中的代谢物与排泄物进行了研究。

Wang D 等^[8]研究表明,TRG 与大鼠肠内容物孵化后,在孵化液中可测到 3 种代谢物,一种是 TRG 的双键还原代谢物,另一种是脱糖代谢物 TR,TR 的双键又进一步还原形成 TR 还原代谢物;大鼠 ig TRG 后,在尿中可检测到 4 种代谢物,分别是 TR、TR 的单硫酸结合物、TRG 的单硫酸结合物和 TRG 的单葡萄糖醛酸结合物。Du QH 等^[3]报道大鼠 ig TRG 后,98.4% 的 TRG 在肠和肝内代谢,尿中主要代谢产物为 TR 的单葡萄糖醛酸结合物,含量达到 84.0%。但笔者曾在预实验中测得犬尿中除有原型药 TRG 外,还有 TRG 的 2 个单葡萄糖醛酸结合物和 TR,由于 TRG 及其代谢物的含量均很低,因此未进行定量分析;在粪中可测到 3 种代谢物,分别是 TR 和 TR 的 2 个单硫酸结合物,而原型药 TRG 未测到,其中 TR 为主要代谢物。这表明 TRG 在大鼠和犬体内的代谢存在着种属差异。根据预实验及本实验结果推测 TRG 在犬尿中代谢途径为:TRG 水解脱去葡萄糖形成 TR,或者直接与葡萄糖醛酸结合形成单葡萄糖醛酸结合物;在犬粪中代谢途径为:TRG 首先水解脱去葡萄糖形成 TR,TR 进一步与硫酸结合形成 2 个单硫酸结合物。M2、M2' 和 2 个 TRG 单葡萄糖醛酸结合物的结构还有待进一步研究证实。

关于 TRG 在犬粪样中的排泄研究,由于在粪样中未测到原型药 TRG,且 M2 和 M2' 的含量较低,而 TR 为主要代谢物,因此笔者仅对 TR 进行了定量分析。TRG 结构中含有 2 个共轭苯环,在 320 nm 波长处具有最大吸收,因此笔者以 320 nm 为检测波长,建立了犬粪样中 TR 的 HPLC 检测法。本法灵敏度高、操作简单,定量下限为 0.100 μg/mL,绝对回收率大于 90.0%,可用于 TR 在犬粪样中的排泄研究。

综上所述,犬 ig TRG 50 mg/kg 后,粪中可测到 3 个代谢物,TR 为主要代谢物,其累积排泄率为 39.3% (相当于 TRG 给药剂量的 67.2%)。在犬尿和粪中尚有其他未知代谢物未能测定,未知代谢物的结构及累积排泄率尚需深入研究,这对 TRG 的新药开发具有重要的意义。

参考文献

- [1] Xu G, Kuang G, Jiang W, et al. Polydatin promotes apoptosis through upregulation the ratio of Bax/Bcl-2 and inhibits proliferation by attenuating the β-catenin signaling in human osteosarcoma cells[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (2): 922–931.
- [2] Wang HL, Gao JP, Han YL, et al. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(5): 553–559.
- [3] Du QH, Peng C, Zhang H. Polydatin:a review of pharmacology and pharmacokinetics[J]. *Pharm Biol*, 2013, 51 (11):1347–1354.
- [4] 徐冰,林焕冰,王茜,等.白藜芦醇苷对脑缺血再灌注模型大鼠的保护作用[J].中国药房,2013,24(13):4040–4042.
- [5] 张明,鞠楷,孙琴,等.西南5个产区虎杖中虎杖苷和白藜芦醇含量比较[J].中国药房,2012,23(39):3723–3725.
- [6] 郭茜,孟宪生,包永睿,等. HPLC 双波长等基线融合结合校正因子法测定虎杖中 3 种成分的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(47):4461–4464.
- [7] Zhang ZC, Xu M, Sun SF, et al. Metabolic analysis of four phenolic acids in rat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871 (1): 7–14.
- [8] Wang D, Zhang Z, Ju J, et al. Investigation of piceid metabolites in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(1):69–74.
- [9] Ding XY, Hou XL, Gao SH, et al. Pharmacokinetics and bioavailability study of polydatin in rat plasma by using a LC-MS/MS method[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27 (6) : 1931–1937.
- [10] He H, Zhao Y, Chen X, et al. Quantitative determination of trans-polydatin, a natural strong anti-oxidative compound, in rat plasma and cellular environment of a human colon adenocarcinoma cell line for pharmacokinetic studies[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 855(2):145–151.
- [11] Lv CY, Zhang LT, Wang Q, et al. Determination of piceid in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatographic method with UV detection[J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(11):1260–1266.
- [12] Gao SH, Fan GR, Hong ZY, et al. HPLC determination of polydatin in rat biological matrices: application to pharmacokinetic studies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(1) : 240–245.
- [13] Zhou SY, Yang RT, Teng ZH, et al. Dose-dependent absorption and metabolism of trans-polydatin in rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(11):4572–4579.
- [14] Zhang WT, Li Q, Zhu M, et al. Direct determination of polydatin and its metabolite in rat excrement samples by high-performance liquid chromatography[J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(11):1592–1595.
- [15] 林建海,李笑宏,唐跃年,等.白藜芦醇苷的 HPLC 法分析及其在苗猪体内的药代动力学研究[J].药物分析杂志, 2001, 21(5):325–328.
- [16] 蔡苗,俞发,马安德,等.白藜芦醇苷在 Beagle 犬体内的药代动力学研究[J].南方医科大学学报, 2009, 29(8) : 1538–1540.

(收稿日期:2016-10-20 修回日期:2017-06-29)

(编辑:刘明伟)