

# 中 药 大 黄 的 生 化 学 研 究

## XVI. 大黄素甲醚在动物体代谢产物的分离和鉴定

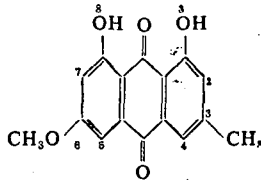
孙 阳 陈 琼 华

(南京药学院生物化学研究室)

**提要** 用离心薄层层析法从灌胃大黄素甲醚的大鼠和小鼠尿中分离了六种代谢产物。经质谱、高效液相色谱及光谱测定并与部分标准品对照, 确定其结构分别为大黄素、大黄酚, 3-羟甲基-1, 6, 8-三羟基蒽醌, 3-甲酰基-1, 6, 8-三羟基蒽醌, 3-羧基-1, 6, 8-三羟基蒽醌, 3-羧基-6-甲氧基-1, 8-二羟基蒽醌。大鼠和小鼠肝匀浆 9000 × g 上清液的体外代谢实验也获得了与上述前五种相同的代谢产物。实验表明大黄素甲醚在C-6位可脱去甲基或甲氧基; 在C-3位的甲基可相继氧化为羟甲基、甲酰基和羧基等极性更强化合物。

**关键词** 药物代谢; 大黄素甲醚; 大黄素; 大黄酚; 3-羟甲基-1, 6, 8-三羟基蒽醌; 3-甲酰基-1, 6, 8-三羟基蒽醌; 3-羧基-1, 6, 8-三羟基蒽醌; 3-羧基-6-甲氧基 1, 8-二羟基蒽醌

大黄素甲醚(physcion)为大黄所含的蒽醌衍生物之一。据报道对人体宫颈癌海拉(Hela)细胞有较强的抑制作用, 50%抑制率浓度为 0.1 μg/ml<sup>(1)</sup>其化学结构如下:



有关大黄素甲醚的体内过程目前未见报道, 为了阐明药物在体内的转化过程, 进一步研究其构效关系, 我们用离心薄层层析(CTLC), 质谱(MS), 高效液相色谱(HPLC)和光谱分析法分离并鉴定了大鼠和小鼠尿中及体外肝匀浆 9000 × g 上清液药物温育液中大黄素甲醚的主要代谢产物, 并对其代谢方式进行了讨论。

### 材 料 和 仪 器

**动物** 实验动物为 200~250 g Wistar 种大鼠和 22~25 g 华北种小鼠(均为雄性), 灌胃前禁食 12 h, 使自由饮水。体外实验大鼠腹腔注射苯巴比妥钠(38 mg/kg)每日两次共 3 日, 以诱导酶活性, 第 4 日断头处死后进行实验。

**药品及试剂** 大黄素甲醚及所用标准品均由本室提供, 其熔点及光谱数据均与文献<sup>(2)</sup>一致, 经质谱及高效液相色谱证明纯度 > 99%。灌胃药制剂用 0.5% CMC 钠液配成悬液。CTLC 所用硅胶 H 和 GF<sub>254</sub> 为青岛海洋化工厂产品。所用试剂均为分析纯。体外实验 NAD 为上海酵母厂出品, NADP 为 Sigma 出品, D-葡萄糖-6-磷酸为上海生化试剂厂出品, 尼克酰胺为上海试剂厂产品。

**仪器及条件** 岛津 UV-300 型紫外光谱仪, 岛津 IR-400 型红外光谱仪, JMS-D-300 型质谱仪; 离子源 EI, 轰击电压 70 eV, 加速电压 3 kV, 倍增电压 1.7 kV, 分辨率 1000。FX-90-Q 型核磁共振仪。LBC-1 型离心薄层层析仪(北京, 青云仪器厂); 转速 4000 r/min, 流速 2~7 ml/min, DLB-1 型定量注射泵。YSB-2 型高效液相色谱仪。

## 方法与结果

### 一. 体内实验

(一) 代谢产物的收集 大鼠 5 只和小鼠 48 只分别灌胃大黄素甲醚 57mg/kg 和 76mg/kg 后, 分组置于全玻璃代谢笼内, 尿收集器部分置于 0~4°C 冰水中, 室温  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , 收集 36 h 内尿样。用蒸馏水及醇-醚 (1:3) 混合液冲洗代谢笼数次后合并于尿样。收集液离心去沉淀后用 0.1 N·HCl 调 pH=3~4, 充氮 -20°C 保存、直至分析。

(二) 代谢产物的分离纯化 收集液用氯仿及乙酸乙酯提尽游离蒽醌, 水层以 20%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  水解后如上进行提取。提取液用 EDTA-2 Na 液处理后于 40°C 以下减压浓缩。残渣用丙酮溶解后分别在硅胶 GF<sub>254</sub> 板 (200×150×0.2 mm) 上对照层析, 以展开剂 I 石油醚 (bp 60~90°C)-乙酸乙酯 (9:1) 或 II 乙酸乙酯-甲醇 (100:16.5) 展开。合并相同组分后于离心薄层层析仪上分离纯化, 用展开剂 III 正己烷-乙酸乙酯-甲醇 (80:25:5) 洗脱。分别测定质谱及高效液相色谱, 高效液相色谱条件为 YWG-C<sub>18</sub> 柱 (5 μm, 15 cm×5 mm id), 检测波长 254 nm, 流动相为 A (100% 甲醇), B 甲醇-水 (94:6) 或 C 甲醇-水-冰醋酸 (78:22:0.08)。分离纯化后共得七个代谢产物 I~VII。

(三) 代谢产物的结构分析 I~VII 的质谱中均有 M-CO, M-2 CO, M-CHO, M-CO-CHO, M-2 CO-CHO 等特征峰, I~VII 的 Bornträger's 反应和醋酸镁反应均为阳性, 表明均为 1,8-二羟基蒽醌衍生物, 下面就取代基的不同分别讨论:

1. 未代谢原药 (I) 和大黄素 (II) 的鉴定 I 和 II 经熔点、紫外、红外光谱及 HPLC 测定并与标准品对照, 证明 I 为未代谢原药大黄素甲醚, II 为大黄素甲醚 O-脱甲基产物即大黄素 (emodin)

2. 3-羟甲基-1,6,8-三羟基蒽醌 (III) 的鉴定 III 的质谱分子量为 286, 无 M-15 (CH<sub>3</sub>) 的碎片峰, m/z 269(M-OH)<sup>+</sup>(3.0), 268(M-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>(3.1), 257(M-CHO)<sup>+</sup>(53.9), 255(M-CH<sub>2</sub>OH)<sup>+</sup>, 230(M-2 CO)<sup>+</sup> 等碎片峰表明分子中无甲基而有芳环上羟甲基(-CH<sub>2</sub>OH), 由于打掉碎片-CHO 后分子重排生成稳定六元环, 因此 m/z 257 峰的丰度较高。III 的分子量比原药多 2, 分子中无甲基而有羟甲基, 表明原药经 C-6 位 O-脱甲基为大黄素 (II) 后 C-3 位甲基继续氧化为羟甲基, 因此确定代谢物 III 结构为 3-羟甲基-1,6,8-三羟基蒽醌。

(四) 3-甲酰基-1,6,8-三羟基蒽醌 (IV) 的鉴定 IV 的质谱分子量为 284, 与原药相同, 但 TLC 和 HPLC 保留值均与原药不同, 质谱中无脱甲基 (M-15) 及脱甲氧基 (M-30) 碎片峰, 有较强的 M-1 峰 283(13.9)<sup>+</sup> 及甲酰基离子峰 m/z 29(H-C=O)<sup>+</sup> 及相应的一系列碎片峰 255(M-CHO)<sup>+</sup>(10.4), 227(M-2 CO-H)<sup>+</sup>(20.2), 199(M-2 CO-CHO)<sup>+</sup>(13.9) 及 171(M-4 CO-H)<sup>+</sup> 等。均表明分子中存在甲酰基, 分子量减去 1,8-二羟基蒽醌基本结构及甲酰基质量数后仅剩一羟基质量数, 表明 IV 是 III 的羟甲基进一步氧化为甲酰基的产物, 确定代谢物 IV 结构为 3-甲酰基-1,6,8-三羟基蒽醌。

(五) 3-羧基-1,6,8-三羟基蒽醌 (V) 的鉴定 V 的质谱分子量为 300, 碎片峰 m/z 283(M-OH)<sup>+</sup>(5.42), 255(M-COOH)<sup>+</sup>(12.62), 227(272-COOH)<sup>+</sup>(3.5) 等表明分子中有

一羧基。V 的乙酯衍生物质谱分子量 328,  $m/z$  300 以下碎片峰均与 V 相同, 表明羧基被酯化, 进一步证明了羧基的存在。分子量 300 减去 1,8-二羟基蒽醌基本结构及一羧基后仅剩一羟基质量数, 表明 V 为 IV 的甲酰基进一步氧化为羧基的产物, 确定代谢物 V 结构为 3-羧基-1,6,8-三羟基蒽醌。

**(六) 大黄酚 (chrysophanol VI) 的鉴定** VI 的 Bornträger's 反应及醋酸镁反应均表明为 1,8-二羟基蒽醌衍生物, VI 的 TLC 和 HPLC 保留值在三种不同极性展开剂 (I, II, III) 和洗脱剂 (A, B, C) 中均与标准品大黄酚完全相同, 质谱分子量 254, 证明代谢物 VI 为大黄酚, 结构为 3-甲基-1, 8-二羟基蒽醌。标准品的理化数据如下: 熔点: 196~196.5°C, 紫外光谱  $\lambda_{\max}$  nm ( $\log \epsilon$ ) EtOH 225(4.48), 255(4.30), 277(4.01), 287(4.03), 429(4.03)。红外光谱  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr) 1718 m, 1679 m, 1622 s, 1560 m, 1478 s, 1450 s, 1369 s。质谱 70 eV  $m/z$  (%) 254  $\text{M}^+$ (100), 239( $\text{M}-\text{CH}_3$ ) $^+$ (3.12), 237( $\text{M}-\text{OH}$ ) $^+$ (4.2), 226( $\text{M}-\text{CO}$ ) $^+$ (12.8), 225( $\text{M}-\text{CHO}$ ) $^+$ (5.2), 198( $\text{M}-2\text{CO}$ ) $^+$ (7.2)。核磁共振谱 ( $\text{CDCl}_3$ , TMS)  $\delta$  ppm, 12.09(1 H, 1-OH), 7.81(1 H, q,  $J=1.75$  Hz,  $J=7.32$  Hz, 5-H), 7.64(1 H, q,  $J=7.32$  Hz,  $J=7.91$  Hz, 6-H), 7.65(1 H, ds, 4-H), 7.28(1 H, q,  $J=1.75$  Hz,  $J=7.91$  Hz, 7-H), 7.08(1 H, ds, 2-H), 2.46(3 H, s, 3- $\text{CH}_3$ )。

**(七) 3-羧基-6-甲氧基-1,8-二羟基蒽醌 (VII) 的鉴定** VII 质谱分子量 314, 无脱甲基( $\text{M}-15$ )峰, 有甲氧基裂解特征峰  $m/z$  284( $\text{M}-\text{CH}_2=\text{O}$ ) $^+$ 及相应碎片峰 286( $\text{M}-\text{CO}$ ) $^+$ , 297( $\text{M}-\text{OH}$ ) $^+$ , 286( $\text{M}-\text{CO}$ ) $^+$ , 285( $\text{M}-\text{CHO}$ ) $^+$ , 269( $\text{M}-\text{COOH}$ ) $^+$ , 258( $\text{M}-2\text{CO}$ ) $^+$ , 257( $\text{M}-2\text{CO}-\text{H}$ ) $^+$ 表明分子中存在羧基及甲氧基, 羧基仅可能由 C-3 位甲基氧化产生, 因此根据以上数据, 推定代谢物 VII 的结构为 3-羧基-6-甲氧基-1,8-二羟基蒽醌。

体内实验共鉴定了七个化合物, 除 I 为原药外, II~VII 均为代谢产物。大鼠与小鼠实验结果相同。

## 二. 体外实验

小鼠及苯巴比妥预处理大鼠的肝用冷 1.15% KCl 液灌洗后剪碎, 加入 pH=7.4 0.1 M 磷酸缓冲液, 低温高速捣碎后 9000  $\times$  g 离心 35 min, 取上清液加入 NAD, NADP, 6-磷酸葡萄糖、尼克酰胺,  $\text{MgCl}_2$  及大黄素甲醚, 于 37°C 振摇温育 1 h。混合液的氯仿和乙酸乙酯提取物分别于 TLC 及 HPLC 以三种不同展开剂 (I, II, III,) 和洗脱剂 (A, B, C) 与标准品及已知物对照分析。共检出六个保留值分别与体内检出物 I, II, III, IV, V 和 VI 相同的化合物。证明体外实验除 I 为原药外, 代谢产物为 II~VI。大鼠与小鼠实验结果相同。HPLC 图谱见图 1。

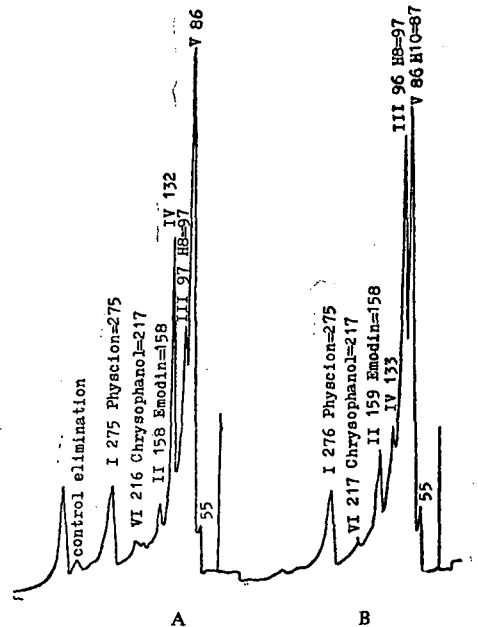


Fig 1. HPLC separation of physcion metabolites *in vitro* system B. A. In rat liver microsomes; B. In mouse liver microsomes

## 讨 论

以上实验结果表明：大黄素甲醚代谢产物 II~VII 的 Bornträger's 反应和醋酸镁反应及质谱中 M-CO, M-CHO, M-2 CO-H 等特征峰均表明所有代谢物中的 1,8-二羟基蒽醌结构未变。代谢产物分子量的不同主要是由于 C-3 位甲基的相继氧化和 C-6 位甲氧基的脱甲基或脱甲氧基化。这两个基团的不同变化理论上应形成两条代谢途径；即 C-6 位 O-脱甲基（或脱甲氧基）和甲氧基不变，而 C-3 位甲基均可相继氧化为羟甲基，甲酰基和羧基。本实验中检出的主要是前一条途径的产物 (I, II, III, IV, V 和 VI)，第二条途径的产物仅检出一个 (VII) 而且量很少（体外实验未检出）。表明前一条途径为主要代谢途径。关于大黄酚 (VI) 的 C-3 位甲基的相继氧化在以前报告<sup>(3)</sup>（大黄酚的代谢转化）已观察到。本实验由于进一步代谢产物量太少未能检出。从大鼠和小鼠体内外实验结果来看，代谢产物种类相同，体内实验小鼠各代谢产物量明显多于大鼠。本实验所探讨的为大黄素甲醚第一相代谢结果。有关第二相代谢及排泄研究另有专文报道。

本实验在大鼠和小鼠的体内外代谢产物中均检出大黄酚 (VI)，经光谱、质谱及高效液相色谱分析并与标准品及文献<sup>(4)</sup> 数据对照确证。这种芳环上脱甲氧基的代谢方式文献中还未见报道，其机制有待进一步研究。

大黄素甲醚在大鼠和小鼠体内代谢转化的途径综合如图 2 所示：

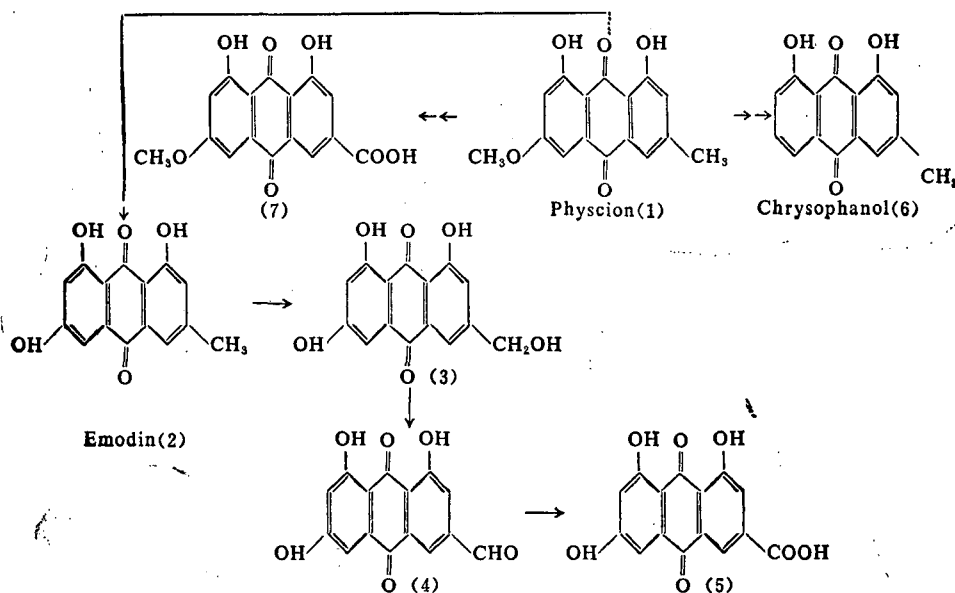


Fig 2. Proposed metabolic pathways of physcion in rat and mouse

我们过去的研究证明：大黄素比大黄素甲醚有较广的抗菌谱和较强的抗菌活性，例如对金黄色葡萄球菌和链球菌的抗菌活性大黄素比大黄素甲醚高 10~20 倍<sup>(5)</sup>。因此大黄素甲醚在体内转化为大黄素 (II) 具有重要的临床意义。其余代谢产物是否为活性代谢产物正在进一步研究。

致谢 代谢产物的质谱由上海医工院质谱室王慧敏代测；核磁共振由本院理化测试中心代测。

## 参 考 文 献

1. Podojil M, et al. Eurotium repens metabolites and their biological activity. *Folia Microbil* 1978; 23:438.
2. Rauwald H, et al. A new investigation on the composition of rhamni 1. Phytochemical investigation of anthraquinone. *Planta Med* 1981; 42:224.
3. 陈琼华等. 苈醌衍生物在体内的代谢转化. *生物化学与生物物理学报* 1966; 6:110.
4. Thomson R. *Naturally Occurring Quinone*. 2 ed. London: Academic press, 1971:388.
5. 陈琼华等. 苈醌衍生物抗菌效价研究. *药学报* 1962; 9:757.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF METABOLITES OF PHYSCION IN RATS AND MICE *IN VIVO* AND *IN VITRO*

SUN Yang and CHEN Qiong-Hua

(Division of Biochemistry, Nanjing College of Pharmacy, Nanjing)

**ABSTRACT** Six metabolites of physcion (3-methyl-6-methoxy-1, 8-dihydroxy-anthraquinone) in rats and mice urine were isolated and identified, viz. emodin (1), chrysophanol (2), 3-hydroxymethyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone (3), 3-formyl-1, 6, 8-trihydroxyanthraquinone (4), 3-carboxy-1, 6, 8-trihydroxyanthraquinone (5) and 3-carboxy-6-methoxy-1,8-dihydroxyanthraquinone (6).

Five metabolites in the incubation of physcion with liver 9000×g supernatant fraction from mice and phenobarbital-pretreated rats were isolated and identified, viz. 1,2,3,4 and 5.

CTLC, HPLC, MS, NMR, IR, UV and other methods were used to isolate and identify these metabolites.

**Key words** Physcion; Emodin; Chrysophanol; 3-Hydroxymethyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone; 3-Formyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone; 3-Carboxy-1,6,8-trihydroxyanthraquinone; 3-Carboxy-6-methoxy-1,8-dihydroxyanthraquinone; Demethoxyl metabolism