

吲哚甙-C¹⁴ 在犬体内的代谢研究

趙 泰 鄭 瑞 刘吉生

(天津市药物研究所)

提要 本文报导利用纸上层析、放射性分布的测定及放射自显影法研究了吲哚甙-C¹⁴ 在犬体内的代谢产物。在犬尿液的检出物中,除尿兰母、吲哚酚-d-葡萄糖醛酸中不含葡萄糖-C¹⁴ 及 C¹⁴ 外,两个不同的极性大的吲哚酚类结合物皆含有葡萄糖-C¹⁴, 初步证明为 α -羟化及 γ -羟化的吲哚甙-C¹⁴。此外,在犬尿液中还检出了微量未经变化的吲哚甙-C¹⁴。

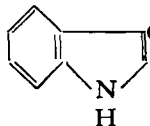
吲哚甙为新鲜大青叶及板兰根的主要成分,1900年 Hoogewerff 和 Meulen 即提出了此种结晶^[1]。近年来国内许多报导指出,板兰根、大青叶对由病毒引起的疾病有一定疗效和预防作用^[2-6]。本所从新鲜大青叶中提出了该化合物,经实验室抗病毒实验证明有一定活性^[7],并进行了毒性试验及代谢产物的研究。

我所关于吲哚甙代谢研究的前一报导^[8]指出,在人尿中的主要代谢物为尿兰母、吲哚酚-d-葡萄糖醛酸,另外还有两个不同的吲哚酚类结合物及微量未经变化的吲哚甙;在犬尿中的情况类似,但未进一步深究。本试验在前工作的基础上,将 C¹⁴ 标记的吲哚甙饲予犬后,研究其分子中葡萄糖基的体内转化机制,以进一步探讨吲哚甙在动物体中的代谢情况。

材 料 与 方 法

(一) 药品

吲哚甙: 由本所植化组从大青叶中提取。

吲哚甙-C¹⁴: 结构为  O-C¹⁴H₁₁O₅ · 3H₂O, 我们以葡萄糖-C¹⁴ 为原料和 3-

羟基吲哚-2-羧酸甲酯缩合而得,熔点为 56°C,比放射性为 750 脉冲/毫克/分钟,纸上层析 R_f 值与纯品吲哚甙完全一致,放射自显影黑点与层析谱显色斑点也完全符合,证明为放射层析纯。

(二) 投药方法及尿样的收集

试验用雄性 4 公斤幼犬一只,控制素食两天后,第三天清晨经胃管灌注非放射性吲哚甙 200 毫克,收集 24 小时尿液,以降活性炭法处理^[8],酚液洗脱,减压浓缩,作为预试验的检出样品;继续控制素食两天,再灌注吲哚甙-C¹⁴ 200 毫克,尿液的收集及处理同预试验,

所得浓缩液,作为分离及检出的样液。

(三) 代谢物的分离及检出

1. 紙上层析 取以上浓缩液微量(每次每分钟放射性约 300 脉冲左右),滴于 Whatman 1 号滤纸上,以正丁醇:醋酸:水(4:1:5 V/V)(以下简称丁醇系统)为推进剂,进行上行层析,层析谱再以 Ehrlich 试剂喷雾显色,然后喷氨使色斑转变^[9],为总代谢物的检出。另取较大量样液,滴于 Whatman 3 号滤纸上,仍以丁醇系统为推进剂进行层析分离一次,再分别用 50% 乙醇加热洗下层析谱之放射性物质,浓缩后,再用纸上层析,放射性分布的测定及放射自显影进行检出与鉴定。

2. 放射性分布的测定 将层析谱置于钟罩型计数管下,由起点开始,每隔 1 厘米计数一次测定放射性分布的位置。

3. 放射自显影 将层析谱紧贴于国产东方红 X 射线胶片上,放于暗室中曝光 60 天,随即进行显影和定影,干燥后即得出层析谱的放射自显影照片。

实验及结果

(一) 总代谢物的鉴定

给犬口服吲哚甙-C¹⁴后之处理尿液,滴于 Whatman 1 号滤纸上,于丁醇系统中层离,以 Ehrlich 试剂显色后,喷氨色斑转为红色,共有 5 个代谢物:吲哚甙 R_f 值为 0.55,尿兰母 R_f 值为 0.44,吲哚酚-d-葡萄糖醛酸 R_f 值为 0.34,以及 R_f 值为 0.25 和 0.06 的两点未知物(为 a, b),与前一报导^[8]完全一致,代谢物的层析谱经放射性分布测定, a, b 两点有较强的放射性,吲哚甙也微显放射性(见图 1, 2);其放射自显影黑点与放射性强度位置及显色斑点位置也完全符合,证明,除有微量吲哚甙-C¹⁴在动物体内直接排出外,大部为经过变化的代谢产物, a, b 两点并含有葡萄糖-C¹⁴或 C¹⁴。

(二) a, b 两放射性物质的鉴定

将 Whatman 3 号滤纸层析分离洗脱的 ab 相应部分的浓缩液,滴于 Whatman 1 号滤纸上,以醋酸戊酯-吡啶-水(3:3:1 V/V)为推进剂,上行层析分离,并与纯品葡萄糖-C¹⁴对照, a, b 两物质对 Ehrlich 试剂显蓝紫色,喷氨后变红色。 a 点 R_f 值为 0.031, b 点 R_f 值为 0.13, 葡萄糖-C¹⁴对 Ehrlich 试剂成阴性反应, R_f 值为 0.28, 层析谱放射性强度分布的测定位置,放射自显影黑点与 R_f 值也符合,证明两点均不含游离的葡萄糖-C¹⁴; a, b 两点并对碘试剂^[9]、KIO₄ 试剂^[10]和 Barton 试剂^[11]等显色均成阳性反应。

将两者浓缩液分别于封管内加酸水解,水解物以异丙醇-吡啶-水-醋酸(8:8:4:1 V/V)为推进剂^[12]进行上行层离测定,两者水解物都有一点对对甲氧基苯胺试剂^[13]的显色

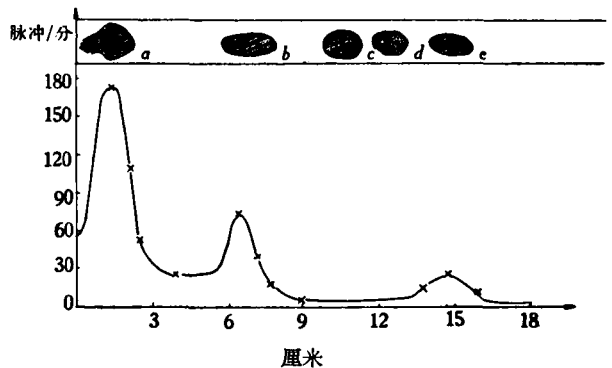


图 1 吲哚甙-C¹⁴在犬体内代谢产物层析谱的放射性分布情况
a, b. x-及 y-羟基吲哚甙-C¹⁴; c. 吲哚酚-d-葡萄糖醛酸; d. 尿兰母;
e. 吲哚甙-C¹⁴。层离溶剂系统为正丁醇-醋酸-水(4:1:5V/V);用上行法进行层离。

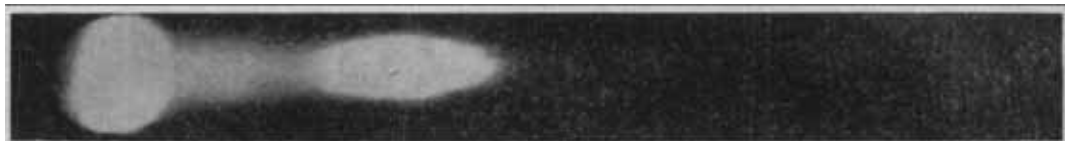


图2 吲哚酚- C_{14} 在犬体内代谢产物层析谱的放射自显影象片

成阳性反应, R_f 值为 0.48, 与纯品葡萄糖- C_{14} 相符, 其放射性强度的分布位置, 自显影黑点、显色斑点也均一致, 证明, 水解物含有葡萄糖- C_{14} , 推测 a, b 两点代谢物为 α -羟化及 γ -羟化的未经水解的吲哚酚- C_{14} , 羟基数量及其位置的进一步证明未予深究; 水解物除有葡萄糖- C_{14} 外, 还检出一极性大的 R_f 值为 0.083 的一放射性物质, 该物对 Ehrlich 试剂及醛酸糖显色剂^[14]等均成阴性反应, 层析谱 R_f 值与纯品葡萄糖醛酸的 R_f 值也不一致, 初步推测不为水解不完全的原代谢物, 也不为葡萄糖醛酸, 可能为水解时的破坏产物, 进一步证明未予追究。

讨 论

根据吲哚酚- C_{14} 在犬体内代谢产物的测定, 发现吲哚酚- d -葡萄糖醛酸、尿兰母不具放射性, 说明部分吲哚酚在动物体内水解为吲哚酚和葡萄糖, 前者又与动物体内的葡萄糖醛酸及硫酸盐结合排出体外, 达到解毒作用; 并证明吲哚酚- d -葡萄糖醛酸的形成, 并非吲哚酚分子中的葡萄糖基直接氧化所致。

根据放射性的测定 a, b 两点未知物皆具有较强的放射性, 并对检酚试剂及检甙试剂成阳性反应, 水解后均检出葡萄糖, 证明除有一部分吲哚酚通过动物体内水解又与动物体内物质结合排出体外, 有一部分则未经水解即氧化形成了 α -羟基及 γ -羟基的吲哚酚排出体外。

此外还检出有微量的放射性吲哚酚- C_{14} , 证明吲哚酚在动物体内尚有少量以不变形式排出。

本所前一报导^[8]: 吲哚酚在人尿中的两点未确定代谢物 A, B 均含有葡萄糖醛酸, 本试验未曾检出, 故证明犬尿中的 a, b 不同于人尿中的 A, B 代谢物, 可能与种属差异有关。

致谢 本文承程敬舆所长、李德华先生指正, 何绍雄同志提供资料与协助, 均此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hoogwerff and Ter Meulen Proc. K. Aked, Wetench, Amsterdam, 1900, (2), 520.
- [2] 桂承会: 板兰根治疗作用初步研究, 上海中医药杂志, 1957, (3), 24—27.
- [3] 福建中医研究所: 单味板兰根煎剂治疗流行性乙型脑炎 190 例的报告, 福建中医杂志, 1958, (11), 3—8.
- [4] 莱阳中心医院: 大青叶预防传染性肝炎、流感的观察报告, 山东中医药, 1960, (5), 17.
- [5] 莱阳中心医院: 单味大青叶治疗流行性乙型脑炎 43 例的初步观察, 山东中医药, 1960, (6), 39.
- [6] 刘学文: 板兰根治疗麻疹的初步观察, 天津医药杂志, 1959, 1(5), 379.
- [7] 徐振邦、蔡鼎华、刘启先: 吲哚酚的抗病毒作用, 本所资料, 待发表.
- [8] 李清华、何绍雄、王世贤: 吲哚酚的代谢研究, 药学报, 1963, 10, 581.
- [9] Block, R. J., Durrum, E. L. and Zweig, G.: A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2th Ed. 1958, p. 185, New York.
- [10] Cifonelli, J. A. and Smith, F.: Detection of Glycosides and other Carbohydrate Compounds on

- Paper Chromatography, *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1132.
- [11] Barton, G. M., Evans, R. S. and Gardner, J. A. F.: Paper Chromatography of Phenolic Substance, *Nature*, 1952, **170**, 249.
- [12] Gardon, H. T., Thornburg, W. and Werum, L.N.: Rapid Paper Chromatography of Carbohydrates and Related Compounds, *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 849—855.
- [13] Hough, L., Jones, J. K. N. and Wadman, W. H.: Quantitative Analysis of Mixture of Sugars by the Method of Partition Chromatography. part V. Improved Methods for the Separation and Detection of the Sugars and their Methylated Derivatives on the Paper Chromatography, *J. Chem. Soc.*, 1950, (7), 1702.
- [14] Partridge, S. M.: Filter-paper Partition Chromatography of Sugars, *Biochem. J.*, 1948, **42**, 238—249.

THE METABOLISM OF INDICAN-C¹⁴ IN THE DOG

CHAO TAI, CHENG JUI AND LIU CHI-SHENG

(*Institute of Materia Medica, Tientsin*)

ABSTRACT

An oral dose of 200 mg of indican-C¹⁴ (indoxyl- β -glucose-C¹⁴) was given to a dog. A 24 hour urine sample was collected and treated with Dalgies's deactive carbon method. Aliquots of urine were spotted on filter paper, and chromatographed. Radioactive metabolites were located by radioscanning and by radioautography. Two metabolites, urinary indican and indoxyl-*d*-glucuronic acid, were found on the chromatogram in addition to two strongly radioactive compounds which were identified as α - and γ -hydroxy-indican-C¹⁴. Furthermore, a small amount of unchanged indican-C¹⁴ was also found.