

右旋黄皮酰胺在大鼠肝微粒体中的代谢转化

姚庆强^{*}, 王慕邹

(中国医学科学院·中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的:研究黄皮酰胺的主要代谢途径,为进一步研究黄皮酰胺代谢的立体选择性打下基础。方法:用大鼠肝微粒体体外温孵法对右旋黄皮酰胺((+)-clausena mide)进行温孵,用硅胶柱色谱、制备 TLC 分离纯化代谢产物并通过光谱分析鉴定其结构。结果:分离得到 5 个代谢产物 CM1, CM3, CM4, CM5 及 CM6,其结构分别鉴定为 6-羟基,4-羟基,4,6-二羟基,4-苯环邻位羟基,4,7-苯环间位-二羟基黄皮酰胺。结论:黄皮酰胺的代谢主要发生羟化或双羟化,CM3 是其主要代谢产物,量较少的 CM4,CM6 为其进一步代谢产生的双羟基代谢产物;另 2 个代谢产物 CM1, CM5 产生的量也较少;CM2 未分离得到,但通过 HPLC 分析知其为右旋黄皮酰胺的微量代谢产物。

关键词 右旋黄皮酰胺;肝微粒体;体外代谢;高效液相色谱法

黄皮酰胺是芸香科黄皮属植物黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels 叶水浸膏中分离得到的有效成分^[1],经不对称合成和拆分得到左旋和右旋黄皮酰胺^[2],其中左旋体有较好的促智作用,右旋体作用不明显且毒性较强^[3,4],其化学结构见图 1。

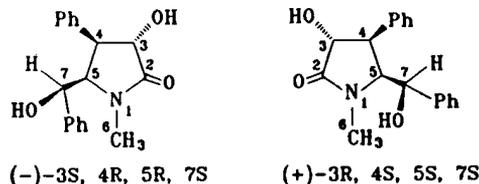


Fig 1 Structures of (-) and (+)-clausena mide.

前文^[5]曾报道左旋黄皮酰胺的代谢转化。为进一步了解黄皮酰胺的代谢途径,且为研究手性黄皮酰胺代谢转化的立体选择性打下基础,以推测其作用机制,本文用肝微粒体温孵法,以 RP-HPLC

收稿日期:1998-08-24

基金项目:国家自然科学基金重大项目(29790120)

* 现址:山东省医学科学院药物研究所,济南 250062

Tel:(0531)2607043, Fax:(0531)2954015,

E-mail:tianran@jn-public.sd.cninfo.net

DAD系统分离与检测右旋黄皮酰胺及其代谢产物,研究了右旋黄皮酰胺的代谢转化过程。

实 验 部 分

1 材料与仪器

右旋黄皮酰胺由本所合成室提供,其结构经光谱鉴定。

NADP(氧化型辅酶 II)及 NADH(还原型辅酶 I)均为进口分装,购自北京百泰生化试剂公司;G-6-P(6-磷酸葡萄糖)及 G-6-P 脱氢酶(G-6-PDH)为 Sigma 公司产品。其他化学品均为市售分析纯,流动相的有机溶剂为色谱纯,水为蒸馏水经 Milli Q Labo 纯水器处理。

纯种 Wistar 大鼠, δ (250 ± 10) g,由中国医学科学院实验动物中心提供。

惠普公司 HP 1100 HPLC-DAD 系统,HP Rev. A.04.01 化学工作站。

2 动物的诱导与肝微粒体的制备

Wistar 种大鼠, ip 苯巴比妥生理盐水溶液 60 mg·kg⁻¹, qd × 3。

按文献报道的二次离心法制备肝微粒体^[6],用 Lowry 法测定蛋白含量^[7]。

3 温孵体系的组成

按前文^[5]所优化的温孵体系组成对右旋黄皮酰胺进行温孵:微粒体蛋白 2.0 mg·ml⁻¹;G-6-P 10 mmol·L⁻¹;NADP 1 mmol·L⁻¹;NADH 0.5 mmol·L⁻¹;G-6-P DH 1 U·ml⁻¹;MgCl₂ 4.0 mmol·L⁻¹;右旋黄皮酰胺 1.5 mg·ml⁻¹。按以上组成配制 500 ml 进行温孵。

4 样品制备与代谢产物 HPLC 分析

取温孵产物 10 ml 用乙酸乙酯 10 ml × 3 提取,合并有机层,无水 Na₂SO₄ 干燥,减压蒸干,残留物溶于甲醇 1 ml 中,供 HPLC 分析。

用 HP 1100 高效液相色谱仪及二极管阵列检测器进行分析。色谱柱:Inertsil ODS-3, 5 μm, 250 mm × 4.6 mm (GL Science Cop., Japan),流动相:MeCN-H₂O(26:74),流速:1 ml·min⁻¹,检测波长 210 nm。

5 代谢物纯品的制备及结构测定

代谢体系用乙酸乙酯萃取,浓缩蒸干乙酸乙酯,残留物加少量硅胶拌样,进行硅胶柱色谱分离,硅胶(160~200目)10 g 湿法装于内径 1.5 cm 色谱柱中,CHCl₃-CH₃OH(100:1,100:2,100:3,100:4,

100:5 各 100 ml)梯度洗脱,每 5 ml 接收 1 份,N₂吹干后少量甲醇溶解,HPLC 分析,19~27 份为母体药,29~43 份为 t_R 17.105 min(CM1)和 t_R 12.249 min 的峰,制备 TLC 分离纯化得 CM1 和 CM3;46~52 份主要为 t_R 10.196 min 的峰,制备 TLC 纯化得 CM4;53~62 份含 t_R 10.196 min(CM4)和 t_R 6.376 min 的峰,高效 TLC 分离制备得 CM4(与前面得到的 CM4 合并)和 CM5;63~73 份主要含 t_R 5.254 min 的峰,制备 TLC 纯化得 CM6。

制备得到的代谢产物的 FAB-MS 分别在 ZabSpec E 质谱仪上测定;¹H NMR 在 Bruker AM-500 核磁共振仪上测定。

结 果

1 大鼠肝微粒体中右旋黄皮酰胺代谢产物的 HPLC 分离

图 2 是右旋黄皮酰胺体外温孵提取物的 HPLC 图谱,与对照品的 HPLC 图谱比较可判断 t_R 23.014 min 的峰为右旋黄皮酰胺,根据 HPLC-DAD 检测分析, t_R 为 17.105,15.290,12.249,10.196,6.376,5.254 min(图 2 中 CM1,CM2,CM3,CM4,CM5,及 CM6)的峰与右旋黄皮酰胺紫外图谱相同,判断为右旋黄皮酰胺的代谢产物。

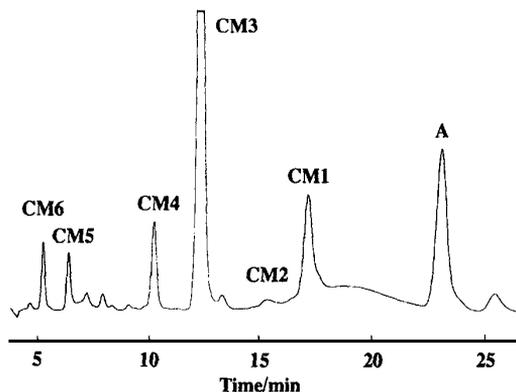


Fig 2 HPLC profile of (+)-clausenamide (A) and its metabolites (CM1 ~ CM6) in rat liver microsomal incubate.

2 右旋黄皮酰胺代谢产物的光谱分析及结构确证

2.1 CM3 的光谱分析 FAB-MS 给出 336(M^+ + Na), 314(M^+ + H) 的准分子离子峰,其分子量比母体药增加 16 个质量数,说明为黄皮酰胺的单羟化代谢产物。¹H NMR 谱(表 1)与黄皮酰胺比较可知, δ 4.772(1H, d, J = 2.8 Hz) 归属为 7-H, 与其相偶合的

δ 4.103 呈现一个氢的 d 峰,应为 5-H,其与 4-H 的偶合消失,而 3-H 于 δ 4.196 处呈现单峰。故推断

CM3 为 4-位羟基取代的黄皮酰胺, FAB-MS 裂解规律(表 2)完全支持以上推断。

Tab 1 ¹HNMR spectral data (δ) for (+)-clausenamide and its metabolites CM3, CM4, CM5, CM6

(+)-Clausenamide	CM3	CM4	CM5	CM6
6-H 3.208(3H, s)	3.043(3H, s)	4.819(1H, d, J=10.5 Hz) 5.188(1H, d, J=10.5 Hz)	3.053(3H, s)	3.029(3H, s)
4-H 3.695(1H, dd, J=8.6, 11 Hz)	-	-	3.524(1H, dd, J=8.4, 11 Hz)	-
3-H 4.047(1H, d, J=11 Hz)	4.196(1H, s)	3.939(1H, s)	3.854(1H, d, J=11 Hz)	4.189(1H, s)
5-H 4.432(1H, dd, J=2.6, 8.6 Hz)	4.103(1H, d, J=2.8 Hz)	4.390(1H, d, J=2.8 Hz)	4.315(1H, dd, J=2.6, 8.4 Hz)	4.072(1H, d, J=3 Hz)
7-H 4.829(1H, d, J=2.6 Hz)	4.772(1H, d, J=2.8 Hz)	4.723(1H, d, J=2.8 Hz)	4.826(1H, d, J=2.6 Hz)	4.643(1H, d, J=3 Hz)
Ar-H 6.763(2H, d, J=8 Hz)	6.684(2H, d, J=7.8 Hz)	6.688(2H, d, J=7.4 Hz)	6.722(2H, d, J=8.5 Hz) 6.759(1H, d, J=6.8 Hz)	6.323(1H, d, J=1.8 Hz) 6.035(1H, d, J=7.6 Hz) 6.591(1H, ddd, J=0.9, 2.5, 8 Hz) 6.855(1H, t, J=7.8 Hz)
7.114 ~ 7.199(3H, m)	7.035 ~ 7.106(3H, m)	7.031 ~ 7.148(3H, m)	7.014 ~ 7.134(4H, m)	7.257 ~ 7.371(5H, m)
7.237 ~ 7.328(5H, m)	7.228 ~ 7.336(5H, m)	7.289 ~ 7.329(5H, m)	7.308 ~ 7.336(2H, m)	

Tab 2 FAB MS data for the metabolites (CM3, CM4, CM5, CM6) of (+)-clausenamide

Metabolite	Fragment / %, Ions
CM3	336(31, M ⁺ + Na), 314(100, M ⁺ + H), 296(18, 314 - H ₂ O), 280(3, 296 - OH + H), 266(2, 280 - CH ₃ + H), 250(3, 266 - OH + H), 222(9, 250 - CO), 206(9, M ⁺ - PhCHOH), 190(52, 206 - OH + H), 172(57, 190 - H ₂ O), 160(5, 266 - PhCHO), 149(9, 206 - O = C = NCH ₃), 133(8, 190 - O = C = NCH ₃), 115(6, 133 - H ₂ O), 107(14, PhCH = O + H), 105(16, PhCO ⁺), 91(8, PhCH ₂ ⁺), 77(6, Ph ⁺)
CM4	352(100, M ⁺ + Na), 330(82, M ⁺ + H), 312(52, 330 - H ₂ O), 294(40, 312 - H ₂ O), 248(10, 294 - H ₂ O - CO), 223(20, 330 - PhCHOH), 207(56, 223 - OH + H), 188(33, 207 - H ₂ O - H), 172(8, 188 - OH + H), 160(11, 188 - CO), 158(16, 188 - HCHO), 131(23, 158 - CO + H), 115(98, 131 - OH + H), 105(22, PhCO ⁺), 91(20, PhCH ₂ ⁺), 77(8, Ph ⁺)
CM5	336(10, M ⁺ + Na), 314(100, M ⁺ + H), 282(10, 314 - CH ₃ OH), 249(8, M ⁺ - 2H ₂ O, - CO), 247(7, 282 - H ₂ O - OH), 222(16, 249 - CO + H), 207(32, 314 - PhCHOH), 190(24, 207 - OH), 172(14, 190 - H ₂ O), 149(17, 207 - CONHCH ₃), 131(13, 149 - H ₂ O), 115(73, 172 - O = C = NCH ₃), 107(6, PhCH = O + H), 105(9, PhCO ⁺), 91(7, PhCH ₂ ⁺), 77(4, Ph ⁺)
CM6	352(42, M ⁺ + Na), 330(27, M ⁺ + H), 312(14, 330 - H ₂ O), 282(16, 312 - HCHO), 264(54, 282 - H ₂ O), 207(14, 330 - HOPhCHOH), 190(22, 207 - OH), 176(42, 190 - CH ₃ + H), 172(42, 190 - CO), 148(14, 176 - CO), 95(48, C ₆ H ₇ O), 93(18, HOPh ⁺), 83(76, C ₅ H ₇ O), 69(100, C ₄ H ₄ O)

2.2 CM4 的光谱分析

FAB-MS 给出准分子离子峰 352(M⁺ + Na) 和 330(M⁺ + H), 其分子量比黄皮酰胺增加 32 个质量数, 说明为黄皮酰胺的双羟化代谢产物。¹HNMR 谱(表 1)显示, δ 3.208(3H, s)的 -CH₃ 信号消失, 而 δ 4.819 和 δ 5.188 处出现 2 个相互偶合的单氢信号的 d 峰, 偶合常数为 10.5 Hz, 为同碳偶合。说明 6-位碳发生了羟化反应。其它的高场氢信号 δ 3.939(1H, s)(3-H), δ 4.390(1H, d, J=2.8 Hz)(5-H), δ 4.723(1H, d, J=2.8 Hz)(7-H) 与 CM3 一致, 表明 4-H 也被羟基取代。因此, CM4 为 4-和 6-位双羟基取代的黄皮酰胺。其质谱裂解规律(表 2)支持上述结构推断。

2.3 CM5 的光谱分析

FAB-MS 给出 336(M⁺ + Na), 314(M⁺ + H) 的准分子离子峰, 其分子量比黄皮酰胺大 16 个质量数, 表明为单羟基代谢产物。¹HNMR 谱(表 1)中, δ 3.053(3H, s)(N-CH₃), δ 3.854(1H, d, J=11 Hz)(3-H), δ 3.524(1H, dd, J=8.4, 11 Hz)(4-H), δ 4.315(1H, dd, J=2.6, 8.4 Hz)(5-H), δ 4.826(1H, d, J=2.6 Hz)(7-H) 化学位移及偶合常数与黄皮酰胺均相符, 故羟化反应于苯环上发生。FAB-MS 中的碎片峰(m/z 207, 190, 172, 149, 131, 115)的裂解规律(表 2): 准分子离子峰 m/z 314 减去 m/z 107 的碎片 PhCHOH 得到 m/z 207 的峰, 说明 7-位苯环的质量数没有增加, 证明该羟基连接于 4-位苯环上。

与母体药相比,¹H NMR谱(表1)中,有一个芳氢发生明显高场位移,出现在 δ 6.759处,呈一个氢的d峰,偶合常数为6.8 Hz,只有一个邻位氢与之发生偶合,根据核磁共振的一般规律,芳环上的羟基使得邻位氢产生高场位移,故判断羟基的邻位只有 δ 6.759一个氢。而只有羟基取代于邻位才能满足以上条件,因此,推断CM5为4位苯环的邻位发生羟化反应。

2.4 CM6的光谱分析

FAB-MS给出准分子离子峰352($M^+ + Na$), 330($M^+ + H$),比母体药大32个质量单位,为双羟基代谢产物。¹H NMR谱(表1)中, δ 4.643(1H, d)和 δ 4.072(1H, d)相互偶合, $J = 3$ Hz,归属为7-和5-位氢,与母体药相比5-位氢和4-位氢的偶合消失,表明4-位氢被羟基取代。 δ 4.189(1H, s)(3-H), δ 3.029(3H, s)(N-CH₃)与母体药相符,另一个羟基应连接于苯环上。FAB-MS中的一组碎片 m/z 207, 190, 176, 172, 148(表2),由准分子离子 $M^+ + H$ (m/z 330)减去HOPhCHOH(m/z 123)碎片得到 m/z 207的碎片,继续裂解得到 m/z 190, 176, 172,

148的碎片,与CM5中准分子离子 $M^+ + H$ (m/z 314)减去PhCHOH(m/z 107)得到的碎片相同,故7-位苯环上发生了羟化反应。¹H NMR谱中, δ 6.591呈现一个氢的ddd峰,而母体药相应处(δ 6.323)为2个氢的d峰,其中的一个氢发生高场位移,也说明羟基连接于7-苯环上。解析¹H NMR低场有关的峰, δ 6.855(1H, t, $J = 7.8$ Hz)的氢受两个邻位氢的偶合,因偶合常数相近而呈现t峰(正常时为dd峰), δ 6.035(1H, d, $J = 7.6$ Hz), δ 6.591(1H, ddd, $J = 8.0, 2.5, 1.0$ Hz)两个邻位偶合常数之和(7.6 + 8.0)是 δ 6.855的偶合常数的2倍,表明这两个氢均处于 δ 6.855氢的邻位。¹H NMR谱中 δ 6.323(1H, d, $J = 1.8$ Hz)只表现出一个氢的间位偶合,无邻位氢。以上数据均表明,羟基取代于7-位苯环的间位。所以,CM6的两个羟基分别连接在4-位和7-位苯环的间位。

综上所述,(+)-黄皮酰胺主要产生6个代谢产物,其中CM1及CM2曾于(-)-黄皮酰胺温孵体系中分离得到^[5],CM2的量较小,本文未分离得到。其主要代谢途径见图3。

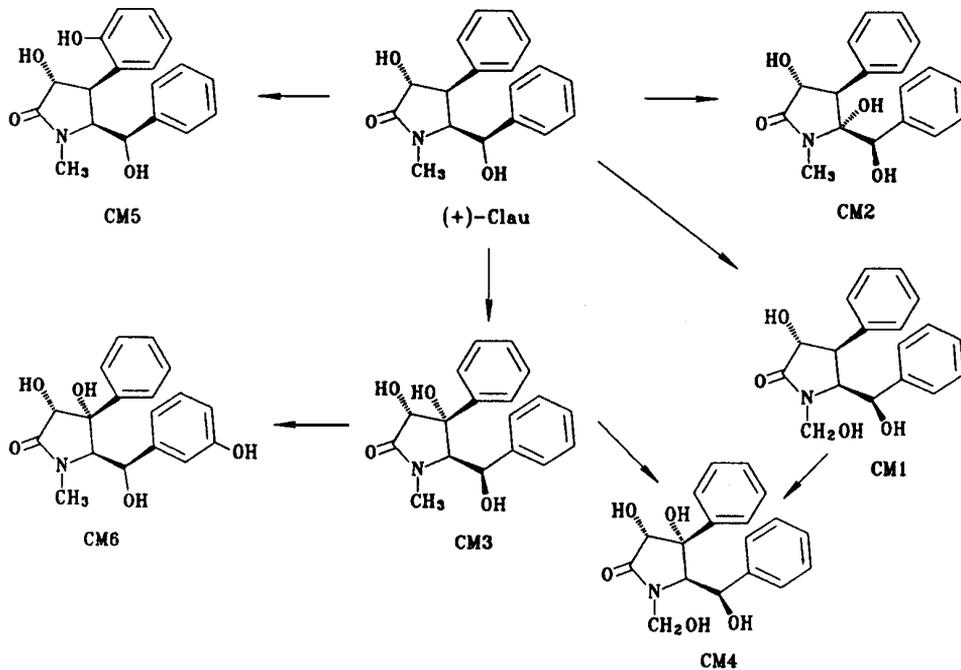


Fig 3 Proposed main metabolic pathway of (+)-clausenamamide (clau) in rat liver microsomal incubate.

讨论

药理试验表明,左旋黄皮酰胺有较好的促智作

用,而右旋黄皮酰胺作用却不明显^[3,4],本实验在前文研究的基础上对右旋黄皮酰胺代谢转化进行了研究,阐明了其主要代谢产物(其中CM1曾于左旋黄

皮酰胺温孵体系中分离到; CM3, CM4, CM5, CM6 为首次分离得到) 的结构, 从而完善了黄皮酰胺的代谢转化途径。通过定性比较左、右旋黄皮酰胺的代谢差异, 发现 CM1, CM2 为左旋黄皮酰胺的主要代谢产物, 产生的 CM3 较少^[5], 而 CM3 为右旋黄皮酰胺的主要代谢产物, 产生极微量的 CM2, 说明药物代谢酶系(P-450 酶系) 对手性黄皮酰胺代谢具有立体选择性, 推测手性黄皮酰胺与其他生物活性酶或受体的结合也具有立体选择性。这一结论从代谢角度阐明了左旋和右旋黄皮酰胺药理作用及毒性方面的差异的原因。

前文^[5]曾报道 CM2, 通过 HPLC 分析发现在右旋体温孵体系中也存在, 但含量较低而未能分离得到, 从左旋黄皮酰胺曾分离得到 CM3, 但因量小而未能鉴定其结构^[5], 本文分离纯化且鉴定了其结构。

致谢 中国惠普公司提供 HP1100 高效液相色谱仪; ¹H NMR 由本所仪器分析室代测; FAB-MS 由中国军事医学

科学院仪器分析中心代测。

参 考 文 献

- 1 杨明河, 曹延怀, 李伟勋, 等. 黄皮叶中黄皮酰胺的分离和结构测定. 药学学报, 1987, 22: 33
- 2 饶尔昌, 程家宠, 杨光中, 等. 黄皮酰胺的合成. 药学学报, 1994, 29: 502
- 3 张均田, 蒋学英. 黄皮酰胺促智作用机制的研究. 中国医学科学院、中国协和医科大学年会论文集. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 356 ~ 365
- 4 段文贞, 张均田. (-), (+)-黄皮酰胺对樟柳碱引起的小鼠脑内乙酰胆碱含量降低及记忆障碍的影响. 药学学报, 1998, 33: 259
- 5 姚庆强, 王慕邹. 左旋黄皮酰胺在大鼠肝微粒体中的代谢转化研究. 药学学报, 1998, 33: 296
- 6 Gibson GG, Skett P. *Introduction to Drug Metabolism*, London: Chapman and Hall, 1986. 240 ~ 241
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265

METABOLIC TRANSFORMATION OF (+)-CLAUSENAMIDE IN RAT LIVER MICROSOMES

Yao Qingqiang (Yao QQ) and Wang Muzou (Wang MZ)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT **AIM:** To find the metabolic pathway of (+)-clausenamide in rat liver microsomal incubate and give the basis of studying the stereoselectivity of the metabolism of clausenamide. **METHODS:** (+)-Clausenamide was incubated in rat liver microsomal incubate containing NADPH-generating system and the metabolites were isolated and purified by using silica gel column and preparative TLC and then their structures were determined by ¹H NMR and MS. **RESULTS:** Five metabolites, CM1, CM3, CM4, CM5 and CM6, were obtained, and their structures were determined as 6-hydroxy-, 4-hydroxy-, 4,6-dihydroxy-, 4-phenyl-ortho-hydroxy-, 4,7-phenyl meta-dihydroxy- clausenamide by ¹H NMR and FAB-MS. **CONCLUSION:** The metabolism of (+)-clausenamide were hydroxylation or dihydroxylation. CM3 is the main monohydroxy- metabolite, both CM4 and CM6 are dihydroxy- metabolites generated from CM3. The amount of the other two metabolites, CM1 and CM5, is much less. Although CM2 is not isolated from the incubate it is also detected by HPLC.

KEY WORDS (+)-clausenamide; liver microsomes; metabolism *in vitro*; HPLC