

左旋黄皮酰胺在大鼠肝微粒体中的代谢转化研究

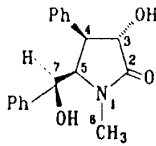
姚庆强 王慕邹

(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 用大鼠肝微粒体体外温孵法进行了左旋黄皮酰胺[(-)-clausena mide]代谢转化研究,优化了温孵体系,建立了反相 HPLC-DAD 同时分离检测左旋黄皮酰胺及其体外代谢产物的分析方法。用硅胶低压柱色谱、制备 TLC 及制备 HPLC 分离纯化了两个代谢产物并进行了光谱鉴定。结果表明,两个代谢物分别确定为 6-和 5-位羟基取代的黄皮酰胺。

关键词 左旋黄皮酰胺;肝微粒体;高效液相色谱法

黄皮酰胺是从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],其化学结构如下:



经不对称合成和拆分得到左旋和右旋黄皮酰胺^[2]。其中左旋黄皮酰胺有较好的促智作用^[3,4]。为进一步阐明药物的作用机制,现对左旋黄皮酰胺的代谢转化过程进行了研究。并拟通过药物代谢产物的分离和结构鉴定,对药物结构与代谢及药效间的关系进行探讨,为进一步改造现有药物的结构,合成药效更高、毒性更低的新药提供信息。代谢研究采用了肝微粒体温孵法,以 RP-HPLC-DAD 系统完成了左旋黄皮酰胺及其未知代谢产物的分离与检测,并利用硅胶低压柱色谱、制备 TLC 及 HPLC 分离纯化了 2 个代谢产物,通过光谱分析鉴定了其结构,确定了左旋黄皮酰胺体外代谢转化的主要途径。

实验部分

1 材料与仪器

左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);NADH(还原型辅酶 I)(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),G-6-P dehydrogenase(G-6-P DH,G-6-P 脱氢酶)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。

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

惠普公司 HP 1090 M HPLC-DAD 系统,1994A 化学工作站;Waters 公司 510 泵 HPLC-UV 系统,Baseline 810 化学工作站。

2 动物的诱导与肝微粒体的制备

Wistar 种大鼠,ip 苯巴比妥钠生理盐水溶液 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 3 d。

按文献报道的二次离心法制备肝微粒体^[5],用 Lowry 法测定蛋白含量^[6]。

3 温孵体系的优化

采用 NADPH 再生系统(表 1),HPLC 研究代谢情况,比较代谢效果,以筛选出最佳代谢体系。

具体操作:(-)-黄皮酰胺用 Tween-80 助溶于 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 2 ml 中,在适量的 Tris-HCl 缓冲液中加入肝微粒体、NADP,NADH,G-6-P,G-6-P DH 及 Mg^{2+} ,于 37°C 水浴中振摇 2 min 后,加入(-)-黄皮酰胺溶液,继续振摇,每 20 min 在液面上通 O_2 半分钟,1.5 h 后,撤去水浴,中止代谢反应。

本文于 1997 年 7 月 11 日收到。

本文为卫生部高等院校博士点专项基金资助项目。

Tab 1 Incubation system with liver microsomes and cofactor solution (10 ml)

Group	Microsome protein ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	NADP ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NADH ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G-6-P ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G-6-P DH ($\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Mg^{2+} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	(-)-Clousena mide ($\text{mg} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$)
I	2.0	1.0	-	10.0	1.0	4.0	1.0
II	2.0	1.0	1.0	10.0	1.0	4.0	1.0
III	2.0	1.0	0.5	10.0	1.0	4.0	1.0
IV	2.0	0.5	0.5	10.0	1.0	4.0	1.0
V	2.0	1.0	0.5	10.0	1.0	4.0	1.5
VI	4.0	1.0	0.5	10.0	2.0	4.0	1.5
Control	2.0	1.0	0.5	10.0	1.0	4.0	1.5

NADP: Oxidised nicotina mide adenine dinucleotide phosphate; NADH: Reduced nicotina mide adenine dinucleotide; G-6-P: Glucose-6-phosphate; G-6-P DH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

对照组在配制好代谢体系后,沸水浴中加热使酶失活,然后加入 Tris-HCl 助溶的黄皮酰胺,其他操作同样品组。

4 样品制备与代谢产物 HPLC 分析

温孵产物用乙酸乙酯 10 ml \times 3 提取,合并有机层,无水 Na_2SO_4 干燥,减压蒸干,残留物溶于 1 ml 甲醇中,供 HPLC 分析。

采用 HP 1090 M 高效液相色谱仪及二极管阵列检测器进行分析。色谱柱(250 mm \times 4.6 mm)内填 5 μm LiChrospher RP-18 固定相,流动相为 MeCN-H₂O(25:75),检测波长 257 nm。

5 代谢物纯品的制备及结构测定

根据以上实验结果,选用比较理想的实验条件,扩大代谢规模至 500 ml:肝微粒体 2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, NADP(1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); NADH(0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); G-6-P(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); G-6-P DH(1 $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$); Mg^{2+} (4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及 Tween-80 助溶的左旋黄皮酰胺溶液 0.15 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。进行制备级体外代谢实验。

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,进行硅胶低压柱色谱分离,硅胶(10~40 μm) 20 g 湿法装于内径 2.5 cm 色谱柱中, CHCl_3 - CH_3OH (100:3) 洗脱,每 5 ml 接收 1 份,放置使溶剂逐渐挥干,19~22 份析出片状结晶,滤出,得 CM1; 23~28 份合并,制备 TLC, HPLC 纯化得 CM2。

制备得到的代谢产物的 EI-MS 和 FAB-MS 分别在 VG-ZAB 2F 质谱仪和 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 温孵体系的选择

通过比较左旋黄皮酰胺在几种温孵体系中的代谢情况,确定了如下温孵体系组成:微粒体蛋白 2.0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; G-6-P 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; NADP 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; NADH 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; G-6-P DH 1 $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$; MgCl_2 4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 左旋黄皮酰胺 1.5 $\text{mg} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$ 。

2 大鼠肝微粒体中左旋黄皮酰胺代谢产物的 HPLC 分离

图 1 是左旋黄皮酰胺体外温孵提取物的 HPLC 图谱,与对照品的 HPLC 图谱比较后可以判断图 1 中 t_R 为 16.96 min 的峰为左旋黄皮酰胺,根据 HPLC-DAD 检测分析, t_R 为 12.51, 10.90 及 9.68 min(图 1 中 CM1, CM2, CM3) 的峰与左旋黄皮酰胺具有相同的紫外图谱,判断为左旋黄皮酰胺的代谢产物。

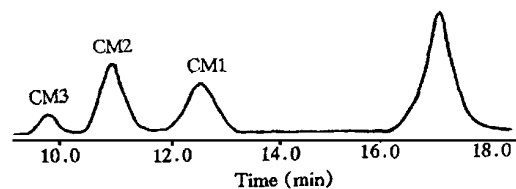


Fig 1 HPLC profile of (-)-clousena mide and its metabolites in rat liver microsomal incubate. CM1, CM2 and CM3 represent the metabolities 1, 2 and 3 of (-)-clousena mide, respectively.

3 左旋黄皮酰胺代谢产物的光谱分析及结构确证

3.1 CM1 的光谱分析 CM1 的 FAB-MS 给出准分子离子峰 314 ($M^+ + 1$), 说明其为左旋黄皮酰胺的羟化产物, $^1\text{H NMR}$ 谱与左旋黄皮酰胺比较(表 2), δ 3.208 (N-CH_3 信号)峰消失, 而于 δ 5.102, δ 5.151 处各出现一个氢信号, 均

为双峰, 偶合常数为 10 Hz, 说明 N-CH_3 的一个氢被羟基取代, 另两个氢受羟基的影响发生低场位移且为同碳异位质子, 出现相互偶合关系。其他氢信号及偶合关系与左旋黄皮酰胺基本一致(表 2), 推断 CM1 的结构为 6 位羟基取代的黄皮酰胺。CM1 的 FAB-MS 碎片峰的裂解规律分析(表 3) 完全支持上述推断。

Tab 2 $^1\text{H NMR}$ spectral data for (-)-clausenamide and its metabolites CM1 and CM2 (δ , ppm)

	(-)-Clausenamide	CM1	CM2
6-H	3.208(3H,s)	5.102(1H,d,J=10 Hz), 5.151(1H,d,J=10 Hz)	3.052(3H,s)
4-H	3.695(1H,dd,J=8.6, 11 Hz)	3.686(1H,dd,J=8.5, 11 Hz)	3.448(1H,d,J=11 Hz)
3-H	4.047(1H,d,J=11 Hz)	3.924(1H,dd,J=11 Hz)	3.512(1H,d,J=11 Hz)
5-H	4.432(1H,dd,J=2.6, 8.6 Hz)	4.680(1H,dd,J=8.5, 2.7 Hz)	-
7-H	4.829(1H,d,J=2.6 Hz)	4.794(1H,d,J=2.7 Hz)	4.710(1H,s)
Ar H	6.753 ~ 6.771(d,2H)	6.781 ~ 6.795(d,2H)	6.602 ~ 6.616(d,2H)
Ar H	7.114 ~ 7.199(m,3H)	7.118 ~ 7.205(m,3H)	7.058 ~ 7.184(m,3H)
Ar H	7.237 ~ 7.328(m,5H)	7.247 ~ 7.363(m,3H)	7.283 ~ 7.420(m,5H)

CM1: Metabolite 1 of (-)-clausenamide; CM2: Metabolite 2 of (-)-clausenamide.

Tab 3 MS data for (-)-clausenamide and its metabolites CM1 and CM2

(-)-Clausenamide*		CM1		CM2	
Peak(m/z)	Ion	Peak(m/z)	Ion	Peak(m/z)	Ion
298	$M^+ + 1$	314	$M^+ + 1$	314	$M^+ + 1$
191	298-Ph•CHOH	296	314-H ₂ O	296	314-H ₂ O
190	M-Ph•CHOH	284	314-CH ₂ O	266	296-CH ₂ O
174	191-•OH	266	284-H ₂ O	238	266-CO
162	190-CO	250	266-•OH + H	208	314-PhCHO
144	162-H ₂ O	238	266-CO	190	208-H ₂ O
134	191-•CONCH ₃	220	238-H ₂ O	181	238-•CONCH ₃
133	190-•CONCH ₃	193	266-•CONCH ₂ OH	149	208-HCONHCH ₃
119	134-•CH ₃	177	284-Ph•CHOH	131	149-H ₂ O
107	Ph•CHOH	160	266-PhCHO	121	149-CO
105	PhCO ⁺	148	177-•CHO	107	Ph•CHOH
91	PhCH ₂ ⁺	131	148-•OH	105	PhCO ⁺
77	Ph ⁺	120	148-CO	91	PhCH ₂ ⁺
		107	Ph•CHOH	77	Ph ⁺
		105	PhCO ⁺		
		91	PhCH ₂ ⁺		
		77	Ph ⁺		

* MS data of (-)-clausenamide in literature^[1]. CM1: Metabolite 1 of (-)-clausenamide; CM2: Metabolite 2 of (-)-clausenamide.

3.2 CM2 的光谱分析 EI-MS 显示 $M^+ + 1$ 峰 314, 推断 CM2 为左旋黄皮酰胺的羟化产物。 $^1\text{H NMR}$ 谱与左旋黄皮酰胺比较(表 2), 3, 4, 5, 7 位 4 个氢的偶合关系发生较大变化, 图

谱中, δ 3.512(1H,d) 和 δ 3.448(1H,d) 两个氢相互偶合, 偶合常数为 11 Hz, 与左旋黄皮酰胺中 3-H 和 4-H 偶合常数相同, 与左旋黄皮酰胺相比, 5-H 与 4-H 之间的偶合关系消失, 并且 δ

4.710 为 1 个氢的单峰, 归属为 7-H 信号, 没有耦合发生, 推断 5 位氢被羟基取代。其质谱裂解规律分析(表 3) 也支持上述结构推断。

综上所述, 左旋黄皮酰胺通过体外代谢, 主要转化为 6-羟基黄皮酰胺和 5-羟基黄皮酰胺。图 2 表示了其主要代谢途径。

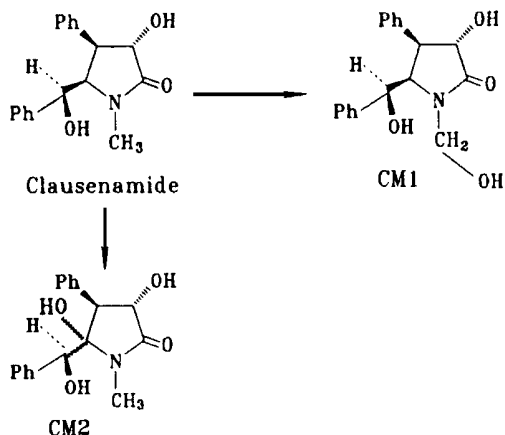


Fig 2 The main metabolic pathway of (-)-clausenamide in rat liver microsomal incubate.

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], 本实验通过体外代谢转化研究, 阐明了左旋黄皮

酰胺主要代谢物的结构, 从而以指导体内代谢的研究, 为比较左旋和右旋黄皮酰胺代谢方面的差异, 推测机体对不同立体构型黄皮酰胺代谢的异同及其代谢机制, 进而从代谢角度阐明左旋和右旋黄皮酰胺药理作用方面的差异打下了初步的基础。

通过制备 HPLC 得到的 CM3 其紫外光谱与左旋黄皮酰胺相同, 确定其为黄皮酰胺的代谢产物, 因量少没有确定其结构。

致谢 ¹H NMR 和 EF-MS 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. 药理学报, 1987, 22: 33
- 2 饶尔昌, 程家宠, 杨光中, 等. 黄皮酰胺的合成. 药理学报, 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
- 4 段文贞, 张均田. (-), (+)-黄皮酰胺对鼠脑内 NMDA 受体的影响. 药理学报, 1997, 32: 259
- 5 Gibson GG, Skett P. *Introduction to Drug Metabolism*. London: Chapman and Hall, 1986: 240
- 6 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 The metabolic transformation of (-)-clausenamide, isolated from the leaves of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, was studied *in vitro* with phenobarbital-induced rat liver microsomal incubate containing the NADPH-generating system. The constitution of the incubation system was optimized and a RP-HPLC-DAD method was developed for the on-line analysis of (-)-clausenamide and its metabolites. The major metabolites were isolated and purified by silica gel column chromatography, preparative TLC and HPLC and their structures were determined as 6-OH clausenamide (CM1) and 5-OH clausenamide (CM2) by ¹H NMR and MS.

KEY WORDS (-)-Clausenamide; Liver microsomes; HPLC