

粉防己碱及5-溴粉防己碱在大鼠体内的代谢产物分析

周茂金^{1,2}, 万仁忠^{1,2}, 苏美英³, 刘昌孝^{1*}

(1. 天津药物研究院 药代动力学与药效动力学省部级共建国家重点实验室, 天津 300193; 2. 沈阳药科大学 药代实验室, 辽宁 沈阳 110016; 3. 山东省泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

摘要:目的 研究粉防己碱(Tet)及5-溴粉防己碱(BrTet)在大鼠体内的代谢物。方法 大鼠分别iv Tet及BrTet(20 mg/kg)后采集尿液、粪便、胆汁和肝脏,用电喷雾离子阱多级质谱法(LC/MSⁿ)对Tet及BrTet在大鼠体内的代谢产物进行分析。结果 大鼠iv Tet后,在体内可测到2个单去甲基、1个双去甲基、2个单羟化代谢物和2个氮氧化物;大鼠iv BrTet后,在体内可测到3个单去甲基、2个双去甲基、2个单羟化代谢物和2个氮氧化物,还测到脱溴代谢物(Tet)和进一步脱甲基代谢物,另外还测到4个I相代谢物,分别是BrTet双去甲基硫酸结合物,单去甲基葡萄糖醛酸结合物,单羟化硫酸结合物和单羟化葡萄糖醛酸结合物。结论 Tet和BrTet在大鼠体内广泛代谢,二者具有相似的代谢途径,其代谢物的结构有待于进一步分析后确证。

关键词:粉防己碱; 5-溴粉防己碱; 代谢产物

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1531-05

Metabolites of tetrandrine and 5-bromotetrandrine in rat *in vivo*ZHOU Mao-jin^{1,2}, WAN Ren-zhong^{1,2}, SU Mei-ying³, LIU Chang-xiao¹

(1. The State Key Laboratories of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Taian Central Hospital of Shandong Province, Taian 271000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the metabolites of tetrandrine (Tet) and 5-bromo-tetrandrine (BrTet) in rat *in vivo*. **Methods** After rats were iv administered a single dose of Tet and BrTet (20 mg/kg), respectively, the samples of urine, feces, bile, and liver were collected. The metabolites of Tet and BrTet in rats *in vivo* were identified by LC/MSⁿ. **Results** After Tet was iv administered to rats, in addition to Tet itself, two nor-Tets, one di-nor-Tet, two hydro-Tet, and two Tet-N-oxides were found. After iv administration of BrTet to rats, a total of sixteen metabolites, including phase I and phase II metabolites, were found in rat bile. Phase I metabolites were three nordemethyl-BrTets, two dinordemethyl-BrTets, Tet, two nor-Tets, two hydroxy-BrTets, and two BrTets-N-oxides, respectively. Phase II metabolites were di-nor-BrTets-sulfate, nor-BrTet-glucuronide, hydro-BrTet-sulfate, and hydro-BrTet-glucuronide, respectively. **Conclusion** Both Tet and BrTet are extensively metabolized and have similar metabolic pathways in rat. The structures of the metabolites will be further confirmed.

Key words: tetrandrine (Tet); 5-bromotetrandrine (BrTet); metabolites

粉防己碱(汉防己甲素, tetrandrine, 下文简称 Tet, 结构式见图1)是从防己科植物粉防己的块根中提取的双苄基四氢异喹啉生物碱。近年来研究表明, Tet具有对抗心肌、脑、肾缺血, 抗高血压, 抗肝、肺纤维化, 降低门静脉高压, 抗肿瘤多药耐药性(multidrug resistance, MDR), 抗缺血性肺动脉高压和抗炎等作用^[1,2]。5-溴粉防己碱(溴泰君, 5-

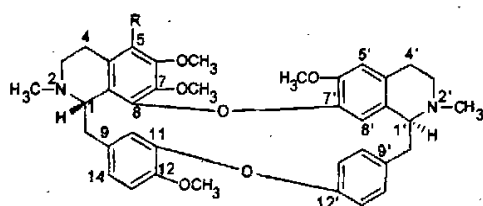
bromotetrandrine, 下文简称 BrTet, 结构式见图1)是以 Tet为先导物进行结构修饰、活性筛选改造而成的一种新型的抗肿瘤药增敏剂, 具有活性强、毒副作用低等特点, 对荷瘤耐药肿瘤裸鼠抑瘤率达40%, 在多药耐药的 P388/adr 细胞中对长春新碱有明显的增敏作用^[3]。体内外实验表明, BrTet抑制P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)高度表达而逆转

收稿日期: 2007-05-30

基金项目: 国家“973”项目(2004CB518902); 天津重点基金项目(0YFJZJC01101)

作者简介: 周茂金(1964-), 男, 博士, 主要从事药物代谢研究。

* 通讯作者 刘昌孝, 中国工程院院士 Tel: (022) 23006863 E-mail: liuchangxiao@163.com



R=H, 粉防己碱 (Tet)

R=Br, 5-溴粉防己碱 (BrTet)

图 1 Tet 和 BrTet 的结构式

Fig. 1 Structures of Tet and BrTet

多药耐药,从而增强耐药细胞对抗肿瘤药物的敏感性^[4]。关于 Tet^[5]及 BrTet^[6-9]在动物体内的药动学已有报道,国内 20 世纪 80 年代初曾对 Tet 在大鼠体内的代谢进行了初步研究^[10,11],但对 BrTet 的代谢研究至今尚未见报道。本实验用电喷雾离子阱多级质谱法 (LC/MSⁿ) 对 Tet 及 BrTet 在大鼠体内的代谢产物进行分析,为其临床研究提供依据。

1 仪器与方法

1.1 药品与试剂:粉防己碱(质量分数 99.5%,中国药品生物制品鉴定所),防己诺林碱(质量分数 98.5%,中国药品生物制品鉴定所),5-溴粉防己碱(质量分数 99.7%,四川大学华西药学院)。醋酸铵和冰醋酸(分析纯,沈阳化学试剂厂),甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),双蒸水自制。

1.2 质谱条件:美国 Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪 (San Jose, CA),配有 ESI (电喷雾离子化) 源及 LCQ1.2 数据处理系统,正离子检测,离子源喷射电压 4.25 kV,毛细管温度 180 °C,毛细管电压 6.5 V,鞘气体积流量 0.75 mL/min,辅助气体体积流量 0.15 mL/min,碰撞气体 He,碰撞能量 25 eV。

1.3 色谱条件:LC-10 AD 泵 (Shimadzu, 日本),色谱柱: C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Dikma, 中国)。分析 Tet 时流动相为甲醇-10 mmol/L 醋酸铵溶液-稀醋酸 (50:50:0.15),体积流量 0.5 mL/min;分析 BrTet 时流动相为甲醇-10 mmol/L 醋酸铵溶液-稀醋酸 (60:40:0.25),体积流量 0.5 mL/min (分析 I 相代谢物时体积流量为 0.3 mL/min),进样量 20 μL。

1.4 样品的采集及处理:大鼠按 20 mg/kg 分别 iv Tet 和 BrTet,采集不同时间的尿液、粪便、胆汁和肝脏,取各种生物样品 (组织为 25% 匀浆) 1.0 mL,用 C₁₈ 柱固相萃取,收集 1.0 mL 甲醇洗脱液,粪便取 50% 甲醇溶液离心后的上清液 1.0 mL,40 °C 空气流吹干,用流动相复溶后,进行 LC/MSⁿ 分析。

2 结果与分析

2.1 Tet 在大鼠体内的 I 相代谢产物:比较大鼠 iv Tet 前与给药后 0~12 h 肝脏组织样品的总离子流色谱图 (图 2),发现给药后的肝脏组织中除检测到准分子离子 m/z 623 外,还发现了一系列新的相关离子,对这些离子进行多级质谱分析,根据质谱及色谱行为,并与原形药对比,推测代谢物的结构。

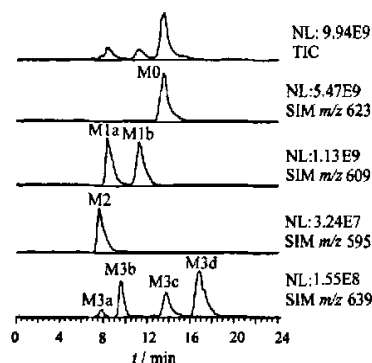


图 2 大鼠 iv Tet (20 mg/kg) 后 0~12 h 肝组织中
原形药及其代谢物色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Tet and its metabolites
in liver tissue in 0—12 h after iv adminis-
tration of Tet (20 mg/kg) to rats

原形药 M0 ($[M+H]^+$ m/z 623) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 623,色谱保留时间为 13.3 min,对其进行二级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子为 m/z 592 (脱去一分子 NH_2CH_3),还有 m/z 580 (脱去一分子 $CH_2=NCH_3$),对 m/z 592 进行三级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子为 m/z 561 (继续脱去一分子 NH_2CH_3) (图 3)。将 Tet 对照品溶液进行 LC/MSⁿ 分析,所得的一级、二级和三级全扫描质谱及色谱保留时间与 M0 相同,由此确认 M0 为原形药 Tet。

代谢物 M1a 和 M1b ($[M+H]^+$ m/z 609) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 609,色谱保留时间分别为 8.4、11.3 min,相对分子质量比原形药少 14,推测为同分异构体,即原形药脱去 1 个甲基后形成的代谢物。对 M1a 进行二级全扫描质谱分析,主要得到碎片离子为 m/z 578 (脱去一分子 NH_2CH_3 ,基峰),还得到碎片离子 m/z 566 (脱去一分子 $CH_2=NCH_3$)。对 m/z 578 进行三级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子为 m/z 547 (继续脱去一分子 NH_2CH_3) (见图 4)。将防己诺林碱 (汉防己乙素, fangchinoline, Fan) 对照品溶液进行 LC/MSⁿ 分析,所得的一级、二级和三级全

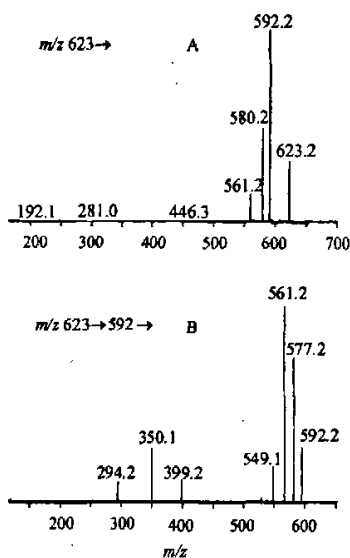


图 3 Tet (M0) 的二级 (A) 和三级 (B) 全扫描质谱图
Fig. 3 MS²(A) and MS³(B) spectra on [M+H]⁺ of Tet (M0) at m/z 623

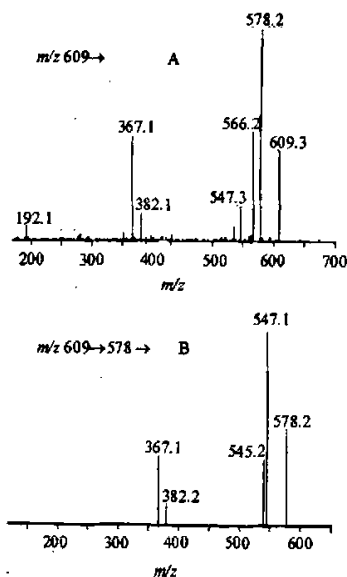


图 4 Fan (M1a) 的二级 (A) 和三级 (B) 全扫描质谱图
Fig. 4 MS²(A) and MS³(B) spectra of [M+H]⁺ of Fan (M1a) at m/z 609

扫描质谱及色谱保留时间与 M1a 相同, 由此确认 M1a 为 Fan。对 M1b 进行二级全扫描质谱分析, 主要得到碎片离子为 m/z 367 (基峰), 还得到碎片离子 m/z 566 (脱去一分子 $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$) 和 m/z 578 (脱去一分子 NH_2CH_3)。由于无对照品, 无法确定原形药在氧原子或氮原子上去甲基的位置。

代谢物 M2[M+H]⁺ m/z 595) 在一级全扫描

质谱分析中其准分子离子为 m/z 595, 色谱保留时间为 7.8 min, 相对分子质量比原形药少 28, 推测 M2 为原形药脱去 2 个甲基后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 564 (脱去一分子 NH_2CH_3), 还得到碎片离子 m/z 552 (脱去一分子 $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$)。由于无对照品, 无法确定氧原子或氮原子上去甲基的位置。

代谢物 M3a、M3b、M3c 和 M3d ([M+H]⁺ m/z 639) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 639, 推测它们为同分异构体, 色谱保留时间分别为 7.9、9.9、14.0、16.8 min, 相对分子质量比原形药多 16, 推测它们为原形药羟化或氮氧化后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, M3a 主要得到的碎片离子为 m/z 621 (脱去一分子 H_2O , 基峰), M3b 除了得到碎片离子 m/z 621 外 (基峰), 还得到碎片离子 m/z 592 (脱去一分子 NH_2CH_3)。由于无对照品, 无法确定 M3a 和 M3b 羟化的位置。M3c 和 M3d 主要得到碎片离子 m/z 592, (脱去一分子 $\text{O} \leftarrow \text{NH}_2\text{CH}_3$, 基峰), 均无脱水峰, 推测它们为原形药的氮氧化物。

在尿液、粪便和胆汁样品中, 均测到 M0、M1a、M1b、M3a、M3b、M3c, 未测到 M2 和 M3d。

2.2 BrTet 在大鼠体内的 I 相代谢产物: 比较大鼠 iv BrTet 前与给药后 0~12 h 胆汁样品的总离子流色谱图 (图 5), 除原形药外还发现一些代谢物。原形药 M0 ([M+H]⁺ m/z 701 和 703, 溴的同位素峰) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 701 和 703, 色谱保留时间为 21.7 min, 对其进行二级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 621 (脱去一分子 HBr)、 m/z 590 (脱去一分子 HBr 和 NH_2CH_3) 和 m/z 578 (脱去一分子 $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$), 对 m/z 621 进行三级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 590 (脱去一分子 NH_2CH_3) (图 6)。将 BrTet 对照品溶液进行 LC/MSⁿ 分析, 所得的一级、二级和三级全扫描质谱及色谱保留时间与胆汁样品中 M0 相同, 由此确认 M0 为原形药 BrTet。

代谢物 M1a、M1b 和 M1c ([M+H]⁺ m/z 687 和 689) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 687 和 689, 色谱保留时间分别为 9.6、11.4、12.6 min, 相对分子质量比原形药少 14, 推测为同分异构体, 即原形药脱去 1 个甲基后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 607 (脱去一分子 HBr) 和 m/z 564 (脱去一分子 $\text{CH}_2=\text{NCH}_3$)。由于无对照品, 无法确

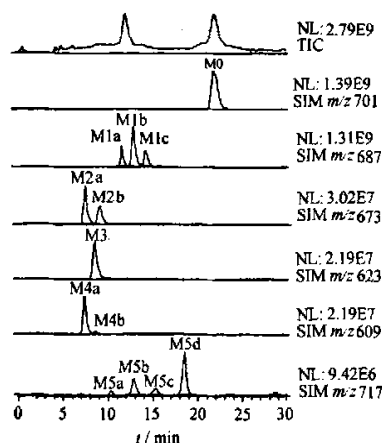


图5 大鼠 iv BrTet (20 mg/kg) 0~12 h 后胆汁中原形药及其代谢物色谱图

Fig. 5 Chromatograms of BrTet and its metabolites in bile in 0~12 h after iv administration of BrTet (20 mg/kg) to rats

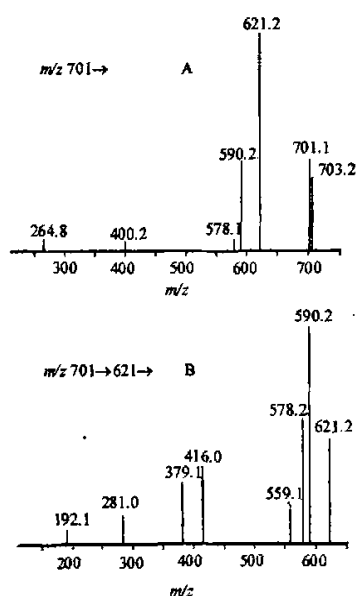


图6 BrTet (M0) 的二级 (A) 和三级 (B) 全扫描质谱图
Fig. 6 MS² (A) and MS³ (B) spectra on [M+H]⁺ of BrTet (M0) at m/z 609

定氧原子或氮原子上去甲基的位置。

代谢物 M2a 和 M2b ([M+H]⁺ m/z 673 和 675) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 673 和 675, 色谱保留时间为 7.4、8.9 min, 相对分子质量比原形药少 28, 推测它们为同分异构体, 即原形药脱去 2 个甲基后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, 得到的主要碎片离子为 m/z 593 (脱去一分子 HBr)。由于无对照品, 无法确

定氧原子或氮原子上去甲基的位置。

代谢物 M3 ([M+H]⁺ m/z 623) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 623, 色谱保留时间为 8.5 min, 相对分子质量比原形药少 78, 推测它们为原形药脱去溴后形成的代谢物。其二级和三级全扫描质谱及色谱保留时间与 Tet 相同, 由此确认 M3 为 Tet。

代谢物 M4a 和 M4b ([M+H]⁺ m/z 609) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 609, 色谱保留时间分别为 7.4、8.5 min, 相对分子质量比原形药少 92, 推测它们为同分异构体, 即原形药脱去溴和 1 个甲基后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, M4a 的二级和三级全扫描质谱及色谱保留时间与 Fan 相同, 由此确认 M4a 为 Fan, M4b 得到的主要碎片离子为 m/z 593 (脱去一分子 HBr)。由于无对照品, 无法确定氧原子或氮原子上去甲基的位置。

代谢物 M5a、M5b、M5c 和 M5d ([M+H]⁺ m/z 717 和 719) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 717 和 719, 色谱保留时间分别为 10.5、12.8、15.2、19.2 min, 相对分子质量比原形药多 16, 推测它们为同分异构体, 即原形药羟化或氮氧化后形成的代谢物。对其进行二级全扫描质谱分析, M5a 和 M5b 均主要得到的碎片离子为 m/z 699 (脱去一分子 H₂O, 基峰) 和 667 (脱去一分子 H₂O 和 NH₂CH₃), 推测 M5a 和 M5b 为原形药的羟化物; M5c 和 M5d 均主要得到的碎片离子 m/z 670 (脱去一分子 O←NH₂CH₃, 基峰), 还得到碎片离子 m/z 637 (脱去一分子 HBr), 均无脱水峰。推测 M5c 和 M5d 为原形药的氮氧化物。

在尿液、粪便和肝匀浆样品中, 均测到 M0、M1a、M1b、M2a、M3、M4a、M5b、M5d, 未测到 M1c、M2b、M4b、M5a、M5c。

2.3 BrTet 在大鼠体内的 I 相代谢产物: 比较大鼠 iv BrTet 前与给药后 0~12 h 胆汁样品的总离子流色谱图 (图 7), 发现一些 I 相代谢物。M1 ([M+H]⁺ m/z 753 和 755) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 753 和 755, 色谱保留时间为 6.8 min, 相对分子质量比原形药 (BrTet) 的双去甲基代谢物多 80, 对 m/z 753 进行二次全扫描质谱分析, 其碎片离子为 m/z 673 和 675 (−80, 基峰), 对 m/z 673 进行三级全扫描质谱分析, 主要得到的碎片离子为 m/z 593 (脱去一分子 HBr)。推测 M1 为双去甲基硫酸结合物。

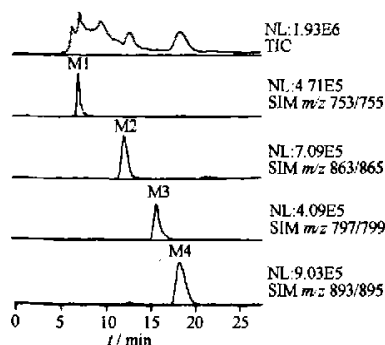


图7 大鼠 iv BrTet (20 mg/kg) 0~12 h 胆汁中原形药 I 相代谢物色谱图

Fig. 7 Chromatograms of phase I metabolites of BrTet in bile sample 0~12 h after iv administration of BrTet (20 mg/kg) to rats

M2 ($[M+H]^+$ m/z 863 和 865) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子均为 m/z 863 和 865, 色谱保留时间分别为 12.1 min, 相对分子质量比原形药 (BrTet) 的单去甲基代谢物多 176, 对 m/z 863 进行二级全扫描质谱分析, 其碎片离子为 m/z 687 和 689 (-176 , 基峰), 对 m/z 687 进行三级全扫描质谱分析, 主要得到的碎片离子为 m/z 607 (脱去一分子 HBr)。推测 M2 为单去甲基葡萄糖醛结合物。

M3 ($[M+H]^+$ m/z 797 和 799) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 797 和 799, 色谱保留时间为 15.8 min, 相对分子质量比原形药 (BrTet) 的单羟化物多 80, 对 m/z 797 进行二级全扫描质谱分析, 其碎片离子为 m/z 717 和 719 (-80 , 基峰)。对 m/z 717 进行三级全扫描质谱分析, 主要得到的碎片离子为 m/z 699 (脱去一分子 H_2O , 基峰) 和 667 (脱去一分子 H_2O 和 NH_2CH_3), 推测 M3 为单羟化硫酸结合物。

M4 ($[M+H]^+$ m/z 893 和 895) 在一级全扫描质谱分析中其准分子离子为 m/z 893 和 895, 色谱保留时间为 18.2 min, 相对分子质量比原形药 (BrTet) 的单羟化合物多 176, 对 m/z 893 进行二级全扫描质谱分析, 其碎片离子为 m/z 717 和 719 (-176 , 基峰), 对 m/z 717 进行三级全扫描质谱分析, 主要得到的碎片离子为 m/z 699 (脱去一分子 H_2O , 基峰) 和 667 (脱去一分子 H_2O 和 NH_2CH_3), 推测 M4 为单羟化葡萄糖醛结合物。

尿液中测到 M0、M1、M2、M4; 粪便中测到 M0、M1、M2、M3、M4; 而肝匀浆中未测到 I 相代谢物。

林沐彬等^[11]报道, 大鼠 ig 给予 Tet (200 mg/

kg) 后用薄层色谱法从尿中可检测到两个 Tet- N -2'-氧化物差向异构体和 N -2'-去甲基 Tet, 本实验用 LC/MSⁿ法从大鼠肝组织中发现 7 种代谢物, 可能与本实验使用先进的检测手段有关。BrTet 与 Tet 结构相似, 在动物体内具有相似的代谢途径。肖淑华等^[8]报道, 大鼠 iv BrTet (20 mg/kg) 后从尿、粪和胆汁中排泄的原形药很少, 分别占给药总量的 0.15%、2.1% 和 0.63%, 主要以代谢物的形式排出体外, 在胆汁中发现 4 个代谢物, 尿、粪中也存在类似的代谢物。本实验结果与上述报道一致, 推测大鼠 iv BrTet 后, 主要以 I 相和 II 相代谢物的形式存在。

3 结论

大鼠 iv Tet 后, 在体内可测到 2 个单去甲基、1 个双去甲基、2 个单羟化代谢物和 2 个氮氧化物; 大鼠 iv BrTet 后, 在体内可测到 3 个单去甲基、2 个双去甲基、2 个单羟化代谢物和 2 个氮氧化物, 还测到脱溴代谢物 (Tet) 和进一步脱甲基代谢物, 另外还测到 4 个 I 相代谢物, 分别是 BrTet 双去甲基硫酸结合物, 单去甲基葡萄糖醛结合物, 单羟化硫酸结合物和单羟化葡萄糖醛结合物。由于代谢物无对照品 (Tet 和 Pan 除外), 且质谱断裂规律较为复杂, 所以这些代谢物结构只有获得对照品通过核磁共振谱 (NMR) 分析后进一步确证。

References:

- [1] Chen Y J. Potential role of tetrandrine in cancer therapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12): 1102-1106.
- [2] Wei G L, Wang F. Progress in the pharmacological actions studies of tetrandrine [J]. *J. Shaanxi Coll Tradit Chin Med* (陕西中医药大学学报), 2004, 27(4): 66-68.
- [3] Li R, Zhou Y, Huang S X, et al. Rapid identification of trace impurities in 5-bromotetrandrine with ESI tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2005, 24(4): 24-29.
- [4] Jin J, Wang F P, Wei H, et al. Reversal of multidrug resistance of cancer through inhibition of P-glycoprotein by 5-bromotetrandrine [J]. *Cancer Chem Pharmacol*, 2005, 55(2): 179-188.
- [5] Zeng F D, Shaw D H Jr, Ogilvie R I. Kinetic disposition and hemodynamic effects of tetrandrine in anesthetized dogs [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985, 7(6): 1034-1039.
- [6] Xiao S H, Wei G L, Lu R, et al. Pharmacokinetics of bromotetrandrine (W198) in rats and Beagle dogs [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2004, 39(4): 301-304.
- [7] Xiao S H, Wei G L, Lu R, et al. Studies on toxicokinetics of single or combination administration of and adriamycin in Beagle dogs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学和治疗学杂志), 2004, 9(11): 1121-1125.
- [8] Xiao S H, Wei G L, Lu R, et al. Tissue distribution and excretion of bromotetrandrine in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2005, 40(5): 453-456.
- [9] Xiao S H, Wei G L, Lu R, et al. Studies on pharmacokinetics of bromotetrandrine in animal (I). Effect of coadministration of bromotetrandrine with adriamycin on the pharmacokinetics [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 4(1): 63-66.
- [10] Lin M B, Zhang W, Zhao X W, et al. Biotransformation of tetrandrine in rats and in men [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1982, 17(10): 728-734.
- [11] He S X, Huang Z J. The biotransformation of tetrandrine [J]. *Tianjin Med J* (天津医药), 1983, 4(1): 231-233.