

山莨菪碱及其大鼠肠内菌体外代谢物的液相色谱-质谱法分析

陈怀侠^{1,2}, 杜鹏¹, 韩凤梅¹, 陈勇^{1*}

(1. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062; 2. 湖北大学化学化工学院, 湖北 武汉 430062)

摘要:目的 用液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱联用法研究山莨菪碱在大鼠肠内菌中的代谢。方法 以山莨菪碱优化色谱及质谱条件, 总结其色谱及质谱行为规律。将山莨菪碱与大鼠肠内菌体外厌氧温孵培养, 并与空白样品及山莨菪碱对照品进行比较, 依据被测物的多级质谱数据, 鉴定代谢物并阐述其结构。结果 在温孵液中发现了山莨菪碱的脱水及水解代谢产物, 即脱水山莨菪碱、6-羟基托品和托品酸。结论 该方法灵敏、快速、简单, 适合于药物代谢分析。

关键词: 山莨菪碱; 液相色谱串联质谱法; 代谢物

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)04-0563-03

Analysis of anisodamine and its *in vitro* metabolites in rat intestinal flora by LC-MSⁿ

CHEN Huai-xia^{1,2}, DU Peng¹, HAN Feng-mei¹, CHEN Yong¹

(1. Hubei Province Key Laboratory of Bio-Technology of Chinese Materia Medica, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract : Objective Anisodamine and its metabolites in rat intestinal flora were analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSⁿ). **Methods** The chromatographic and mass spectrometric conditions were optimized using anisodamine standard, The chromatographic and mass spectrometric behavior patterns of anisodamine were summarized. Anisodamine was incubated together with rat intestinal flora *in vitro* under lack of oxygen condition. Analysis and structural identification of the metabolites were performed by comparing their changes in molecular masses, retention-time, and full scan MSⁿ spectra with those of the parent drug and blank plasma. **Results** The results revealed that the parent drug and its dehydrolyzed and hydrolyzed metabolites (apoisodamine, 6-hydroxytropicine, and tropic acid) were found in the incubation solution. **Conclusion** This method is sensitive, rapid, and simple, and suitable for the analyses of drugs metabolites.

Key words: anisodamine; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSⁿ); metabolites

传统中药多以汤剂为主, 研究中药活性成分的肠道代谢对于了解药物体内作用过程, 指导临床合理用药具有重要的理论意义。液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(Liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry, LC-ESI/ITMSⁿ) 联用技术是现今对药物代谢研究最有力的工具之一^[1-3]。该方法具有灵敏度高, 专属性好, 样品处理简单、快速等特点, 特别是多级质谱能够提供化合物丰富的结构信息, 因此, 该联用技术已经成为代谢物研究的首选方法之一。山莨菪碱是从茄科植物唐古特山莨菪 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher 根中分离提取的一种托品烷类生物碱。山莨菪碱有着广泛的药理活性, 如解痉、抗休克、

改善微循环、对细胞的保护作用等, 主要用于治疗心、脑、肝、肾、神经系统疾病等^[4]。本实验采用离体实验的代谢研究方法, 用富含肠内菌的大鼠肠内容物与山莨菪碱在厌氧条件下温孵, 以 LC-MSⁿ 技术, 在温孵液中鉴定出了原药及其脱水和水解代谢物。

1 仪器与试剂

LCQ^{Duo} 型液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用仪 (USA, San Jose), 配有 TSP AS3000 自动进样器和 LCQ Xcalibur 1.2 软件处理系统; TGL-16C 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); Anaero PouchTM-Anaero 08 G05A-23 厌氧培养袋和厌氧培养发生袋 (日本三菱瓦斯化学株式会社); BF2000 氮气吹干仪 (北京八方世纪科技有限公司)。

* 收稿日期: 2008-06-09

基金项目: 湖北省中药生物技术重点实验室开放基金(2004CTM001); 湖北大学人才专项经费资助(ky2006004)

作者简介: 陈怀侠(1966—), 女, 安徽人, 博士, 副教授, 分析化学研究室主任, 1985年毕业于武汉大学化学系, 1988年获武汉大学化学系硕士学位, 2005年获武汉大学化学与分子科学学院博士学位, 研究方向为药物代谢分析。

Tel/Fax: (027) 62056293 E-mail: hxch@hubu.edu.cn

溴氨酸山莨菪碱(中国药品生物制品检定所,批号 051-9404)。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。Wistar 大鼠 200 g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证:SCXK(鄂)2003-2005。

2 方法与结果

2.1 厌氧培养液的配制^[5,6]:37.5 mL A 液(0.78% KH_2PO_4),37.5 mL B 液(0.47% KH_2PO_4 ,1.18% NaCl ,1.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.12% CaCl_2 ,0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$),50 mL C 液(8% Na_2CO_3),0.5 g *L*-半胱氨酸,2 mL 25%的 *L*-抗坏血酸,牛肉膏 1 g,蛋白胨 1 g,营养琼脂 1 g。将以上各种溶液和试剂混合后,加蒸馏水至 1 L,用盐酸调节溶液的 pH 值为 7.5~8.0。

2.2 肠内菌培养液的制备^[7]:取大鼠肠内容物,按 0.5 g : 1.5 mL 的比例加入厌氧培养液,用玻璃棒快速搅拌均匀,用医用纱布滤过得到含菌培养液。

2.3 山莨菪碱的代谢:于装有上述肠内菌培养液的培养皿中加入山莨菪碱,使培养液中山莨菪碱的质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并同时做空白对照实验。将培养皿放入厌氧培养袋中,打开厌氧发生袋外袋,迅速将其内袋置于厌氧培养袋中,密封,恒温 37 培养。分别于 4、24 h 取样 1 mL,以醋酸乙酯萃取 2 次,合并有机相,37 时氮气挥干,残留物用流动相溶解后,以 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行 LC-MSⁿ 分析。

2.4 色谱条件:Agilent 公司 AICHROMTM ReliAsil C₁₈柱(150 mm × 2 mm, 5 μm),并配有 Agilent 公司相同柱填料的保护柱(12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇/0.01%三乙胺溶液(用甲酸调节至 pH 3.5)(60 : 40),柱温为 40 ,体积流量为 0.2 mL/min。

2.5 质谱条件:采用电喷雾离子化方式,检测离子为正离子。扫描范围 m/z 100~1 000,自动进样器进样,离子源喷射电压 5.0 kV,毛细管电压 45 V,毛细管温度 200 ,氮气为鞘气,其流速为 40 个单位,其他参数均由质谱自动优化程序得到。通过碰撞诱导解离获得母分子的多级质谱,离子阱中的碰撞气体为氦气,优化的多级质谱相对碰撞能量为 30%。采用全扫描一级质谱、全扫描二级质谱及三级质谱等方式进行测定。

2.6 山莨菪碱的 LC-MS 及 LC-MSⁿ 分析:山莨菪碱的一级质谱以分子离子峰 m/z 306 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 为基峰,没有聚合及其他加合现象,其二级质谱(相对

碰撞能量为 30%)及其 LC-MSⁿ 全扫描色谱见图 1。可见山莨菪碱的分子离子失去一分子水产生碎片 m/z 288 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$,而分子离子失去一分子甲醛产生碎片 m/z 276 $[\text{M} + \text{H} - \text{HCHO}]^+$ 。其二级质谱中丰度最高的碎片 m/z 140 是其母分子离子失去托品酸产生的。碎片离子 m/z 122 是母离子 m/z 306 失去中性碎片 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 而产生。该碎片离子 m/z 122 失去 NH_2CH_3 产生碎片离子 m/z 91。显然,碎片 m/z 140、122、91 是山莨菪碱分子离子的特征子离子,而 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ 、 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ 是其特征中性碎片丢失。这些特征分子离子和特征中性碎片丢失是山莨菪碱生物体内代谢物鉴定的依据。

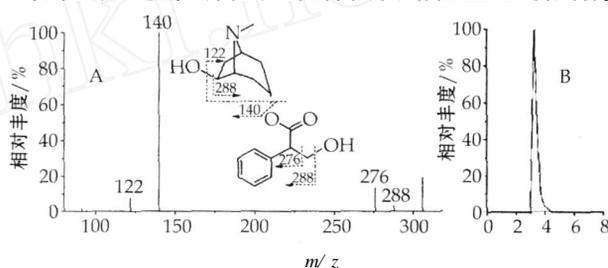


图 1 山莨菪碱的二级质谱(A)和 LC-MS² 色谱图(B)

Fig. 1 Full scan MS² spectra (A) and LC-MS² chromatogram (B) of anisodamine

2.7 培养液中阿托品及其代谢物分析:按实验方法获得山莨菪碱大鼠肠内菌培养液,样品经预处理后,进行 LC-MS² 分析。将分析结果与空白实验、山莨菪碱对照品相比较,确定药物的肠内菌代谢产物。如此,在培养液中发现了原药及其代谢物,其质子化的分子离子分别是 m/z 158、288、306,以及负离子扫描中的去质子分子离子 m/z 165。这些组分的 LC-MS² 色谱及质谱图见图 2、3。其中质子化的分子离子 m/z 306 的色谱保留时间、MS² 质谱和原药完全相同,即 m/z 306 对应于原药。

质子化的分子离子 m/z 158 的 MS² 质谱中出现原形药的特征碎片离子 m/z 140、122,而且该二级质谱和原药的 m/z 306 158 MS³ 质谱完全相同,因此,该分子离子对应于山莨菪碱大鼠肠内菌作用的水解产物,即 6-羟基托品,在负离子测试中, m/z 165 的 MS² 质谱中存在 m/z 147 ($[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$)和 121 ($[\text{M} - \text{H} - \text{CO}_2]^-$),说明该组分对应于山莨菪碱水解产物的另一部分,即托品酸。

质子化的分子离子 m/z 288 比原药的分子离子 m/z 306 少 m/z 18,在其二级质谱中出现了原形药的特征碎片离子 m/z 140、122,由此推论该组分对应于山莨菪碱的脱水产物,而且脱水位置在托品酸

部分,即脱水山茛菪碱。

综上所述,山茛菪碱大鼠肠内菌的代谢主要是水解及脱水,山茛菪碱大鼠肠内菌代谢途径见图 4。

实验结果显示,4 h 及 24 h 温孵溶液的测定没有差异,而且原药的色谱及质谱峰都很强,代谢物的峰强度都非常弱,即山茛菪碱在肠内菌中的代谢很弱。

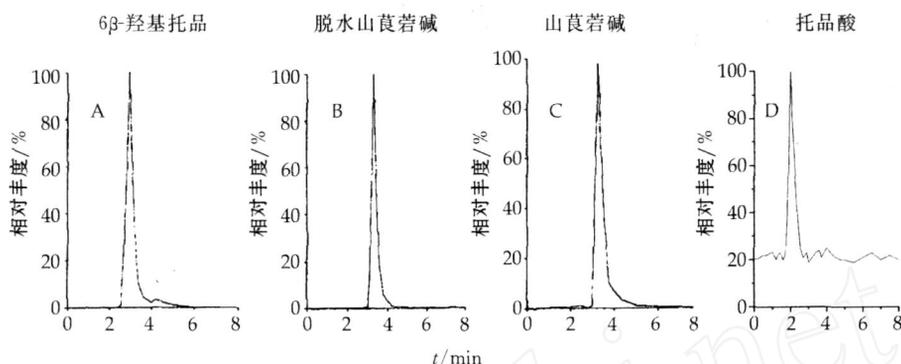


图 2 大鼠肠内菌培养液中山茛菪碱及其代谢物的 LC-MS² 色谱图

Fig. 2 LC-MS² Chromatograms of anisodamine and its metabolites in incubation solution of rat intestinal flora

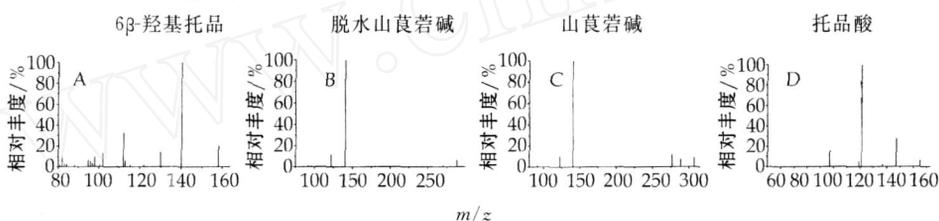


图 3 大鼠肠内菌培养液中山茛菪碱及其代谢物的 MS² 质谱图

Fig. 3 MS² Spectra of anisodamine and its metabolites in incubation solution of rat intestinal flora

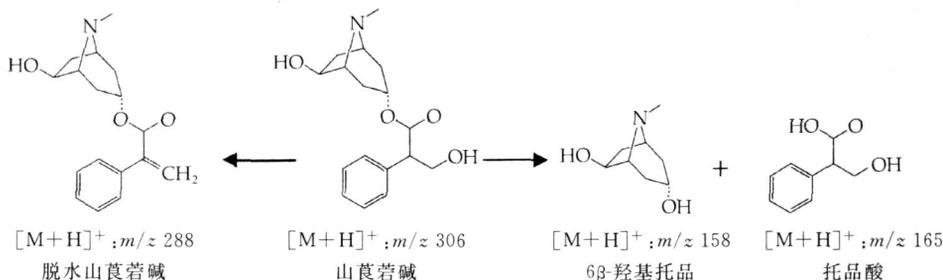


图 4 山茛菪碱大鼠肠道代谢途径

Fig. 4 Major metabolic pathway of anisodamine in rat intestinal flora

3 讨论

山茛菪碱是含有醇羟基的内酯型化合物,实验结果显示了该药物在大鼠肠内菌中的主要代谢是水解和脱水作用,符合药物代谢一般规律,为该药物的临床应用和药理研究提供理论依据。

电喷雾离子阱多级质谱能够提供丰富的分子结构信息,依托药物体内代谢规律,即药物与其代谢物分子结构存在相关性,能够在没有对照品的情况下,快速、简便、灵敏地鉴定代谢物,阐述代谢物分子结构,总结药物代谢规律。

参考文献:

[1] 陈勇,陈怀侠,杜鹏,等. LC/MS 分析大鼠体内氧化苦参碱及其主要代谢物[J]. 药学学报,2004,40(8): 740-745.
 [2] Chan S A, Chen M J, Liu T Y, et al. Determination of aris-

tolchic acid in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-ion trap mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2003, 60: 679-685.

[3] Lam W, Ramanathan R. In electrospray ionization source hydrogen/deuterium exchange LC-MS and LC-MS/MS for characterization of metabolites [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2002, 13: 345-353.
 [4] 苑华,王焱,刘云. 山茛菪碱的药理研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2004,13(16): 2210-2211.
 [5] Odanit T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins, IV. Decomposition of ginsenoside-Rg₁ and Rb₁ in the digestive tract of rats [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31: 3691-3701.
 [6] Hattori M, Shu Y Z, Shimizu M, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33 (9): 3838-3846.
 [7] 沈岚,徐德生,冯怡,等. 大鼠肠内菌对麦冬皂苷 D 代谢的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(8): 618-620.