

东莨菪碱及其大鼠肝匀浆代谢物的液相色谱-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 运用液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(LG-MSⁿ)联用技术研究东莨菪碱在大鼠肝匀浆中的代谢物。方法 采用离体实验的代谢研究方法, 将东莨菪碱与大鼠肝匀浆在富氧条件下温孵, 代谢物以醋酸乙酯萃取, 采用LG-MS及LG-MSⁿ等方法进行分析。和原药相比较, 根据温孵液中分析物相对分子质量的变化及其多级质谱数据, 鉴定代谢物并阐述其结构。结果 在东莨菪碱的大鼠肝匀浆培养液中发现了脱水东莨菪碱和去甲基东莨菪碱两种代谢物。结论 东莨菪碱在大鼠肝匀浆中的代谢主要有脱水和去甲基反应。

关键词: 东莨菪碱; 液相色谱-串联质谱法; 代谢物

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)05-0719-03

Analysis of scopolamine and its metabolites in homogenate of rat liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

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

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

Abstract: Objective A method is described for the investigation of scopolamine and its metabolites in homogenate of rat liver by combining liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LG-MSⁿ). **Methods** Scopolamine was incubated with homogenate of rat liver *in vitro* under rich oxygen condition. Its metabolites were extracted with ethyl acetate and analyzed by LG-MS and LG-MSⁿ. Identification and structural elucidation of the metabolites were performed by comparing their changes in molecular masses and full scan MSⁿ spectra with those of the parent drug and blank plasma. **Results** The results revealed that two metabolites (aposcopolamine and norscopolamine) were found in the incubation solution in homogenate of rat liver. **Conclusion** The major metabolic pathway of scopolamine in homogenate of rat liver are dehydration and demethylation.

Key words: scopolamine; LG-MSⁿ; metabolite

药物代谢研究对于人们认识药物体内作用规律, 指导临床合理用药以及新药设计具有重要的意义。肝脏是生物体对药物代谢的主要场所, 研究药物的肝脏代谢对于药物体内代谢途径研究有着重要的指导意义。LG-MSⁿ联用技术是进行药物代谢研究最有力的工具, 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结构分析的首选方法之一。

东莨菪碱是从茄科植物颠茄 *Atropa belladonna* L.、曼陀罗 *Datura Stramonium* L. 及莨菪 *Hyo-syamus niger* L. 中分离提取的一种托品烷类生物

碱, 有着广泛的药理活性, 如解痉、麻醉、止痛等^[1], 主要用于治疗暴发性肝炎、流行性乙型脑炎、支气管哮喘、重症新生儿窒息、肺性脑病等^[2]。利用薄层色谱及气相色谱分析东莨菪碱大鼠尿样中的代谢物已有报道^[3], 但这些方法灵敏度低, 选择性差, 且样品处理复杂。为全面阐述该药在大鼠肝脏代谢规律, 本实验应用LG-MSⁿ联用技术鉴定出了东莨菪碱在大鼠肝匀浆中的代谢物, 总结了东莨菪碱大鼠肝脏的主要代谢途径。

1 仪器与试剂

LCQ^{Duo}型液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用仪(美国 San Jose), 配有 TSP AS3000 自动进样器和

* 收稿日期: 2008-09-20

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项目(ky2006004)

作者简介: 陈怀侠(1966—), 女, 安徽人, 博士, 教授, 1985、1988年分别获得武汉大学化学系学士和硕士学位, 2005年获武汉大学化学与分子科学学院博士学位, 从事药物代谢分析。Tel/Fax: (027) 62056293 E-mail: hxch@hubu.edu.cn

LCQ Xcalibur 1. 2 软件处理系统; 上海安亭科学仪器厂 TGL-16C 高速离心机。

氢溴酸东莨菪碱(中国药品生物制品检定所, 批号: 049-8906), 甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠, 体质量 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 样品的准备: 大鼠禁食 24 h 后, 乙醚麻醉, 无菌条件下, 开腹取肝脏, 立即在 4 °C 以下的冰块上, 用生理盐水冲洗至灰色, 称定质量, 剪碎。加 4 倍体积灭菌后的磷酸缓冲溶液, 匀浆机上匀浆。双层纱布滤过, 滤液即为肝匀浆。Lowry 光度法测定蛋白。将东莨菪碱添加到肝匀浆中, 使东莨菪碱的质量浓度为 50 μg/mL, 充分振荡, 37 °C 孵育, 并同时以加热失活的肝匀浆做空白对照实验。每隔 30 min 在孵育溶液表面通氧气 1 min, 分别于 0、30、60、90、120、240 min 取样品 0.5 mL, 以醋酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 37 °C 氮气挥干, 以流动相溶解, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 LG-MS(MS^n) 分析。

2.2 色谱条件: Zorbax Extend C₁₈ 不锈钢色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm, Agilent 公司); 同种填料的色谱保护柱(2.1 mm × 12.5 mm, 5 μm, Agilent

公司); 流动相: 甲醇-2 mmol/L 乙酸铵水溶液(以甲酸调节 pH 3.5)(70:30); 体积流量: 0.2 mL/min, 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL。

2.3 质谱条件: ESI 离子源, 扫描范围 m/z 100~1 000, 自动进样器直接进样, 正离子方式检测。离子源喷射电压 4.5 kV, 毛细管电压 21 V, 毛细管温度 175 °C, 鞘气(N_2)流速为 40 个单位, 其他参数均由仪器自动优化完成。采用全扫描一级质谱(Full scan)及其源内碰撞诱导解离(S-CID)、全扫描二级质谱(Full scan MS^2)及三级质谱(Full scan MS^3)等方式进行测定。

2.4 东莨菪碱的 LG-MS 及 LG- MS^n 分析: 东莨菪碱的一级质谱以分子离子 m/z 304 [$M+H$]⁺ 出峰, 其二级质谱及其 LG- MS^2 色谱见图 1。显然, 东莨菪碱的分子离子失水产生碎片 m/z 286 [$M+H-H_2O$]⁺, 失甲醛产生碎片 m/z 274 [$M+H-HCHO$]⁺, 而 m/z 138 由其母分子离子失去托品酸(m/z 166)产生。 m/z 156 由其母分子离子的酯键断裂失去 $C_9H_8O_2$ (m/z 148) 产生。碎片 m/z 286 和 274 的三级质谱中均出现子离子 m/z 156、138、110, 由此说明, m/z 156、138、110 是东莨菪碱分子离子的特征子离子, m/z 148、166 是其特征中性碎片丢失。

2.5 大鼠肝匀浆中母体药物及其主要代谢物的鉴

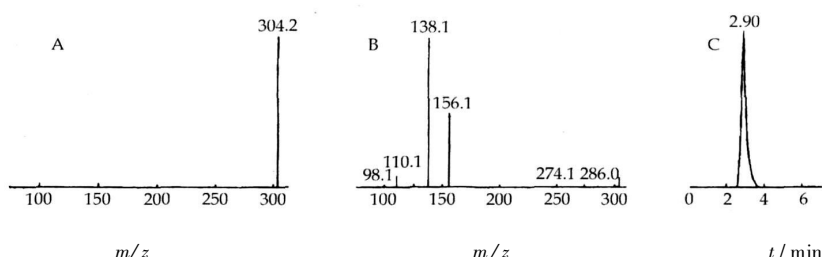


图 1 东莨菪碱的一级(A)、二级质谱(B)和 LG- MS^2 色谱图(C)

Fig. 1 MS (A), MS^2 (B) Spectra, and LG- MS^2 chromatogram (C) of scopolamine

定: 依据药物代谢一般规律, 推测出东莨菪碱代谢物的可能结构, 再将东莨菪碱的大鼠肝匀浆温孵液的一级全扫描质谱与空白样品以及东莨菪碱对照品溶液相比较, 寻找温孵液中可能的代谢物, 由这些可能代谢物的 LG- MS^n 数据鉴定代谢物, 并推测其结构。

依据上述方法, 在东莨菪碱的大鼠肝匀浆孵育液中发现和原药相关的质子化分子离子为 m/z 286、290、306, 其二级质谱(相对碰撞能量为 29%)

见图 2。其中分子离子 m/z 304 (M_0) 的保留时间及其二级质谱和东莨菪碱对照品完全相同, 由此可以确定, M_0 即为未被代谢的原药。 m/z 286 (M_1) 的相对分子质量比原药少 m/z 18, 而特征碎片 m/z 110、138 均出现在其二级质谱中, M_1 应该是东莨菪碱大鼠体内脱水产物。 m/z 290 (M_2) 丢失 m/z 148、166 分别产生碎片 m/z 142、124, m/z 290 及其二级碎片离子 m/z 272、260、142、124、96 分别比

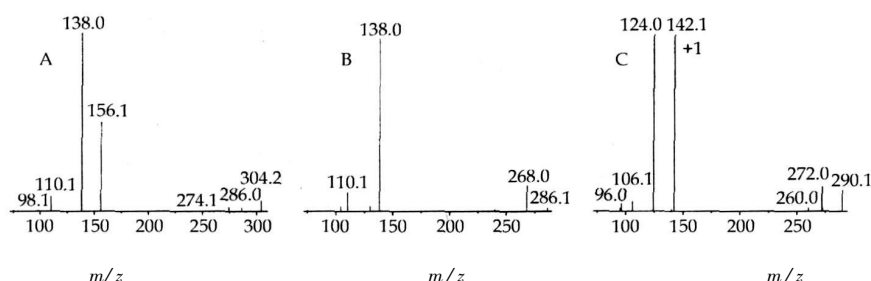


图 2 大鼠肝匀浆中东莨菪碱(A)及其代谢物 M1(B)、M2(C) 的 LEMS² 色谱图

Fig. 2 LEMS² Chromatograms of scopolamine (A), its metabolites M1 (B), and M2 (C) in homogenate of rat liver

m/z 304 (*M*₀) 及其二级碎片离子 m/z 286、274、156、138、110 少 m/z 14, 故 *M*₂ 可以鉴定为东莨菪碱的 N-去甲基代谢物。

两种代谢物的 LG-MS² 色谱峰面积随着孵育时间的变化状况见图 3。可见各代谢物在 30 min 时即开始出现, 之后峰面积均随反应时间的增加而增加, 60 min 或 90 min 后基本稳定。

在各时间点的样品中均未发现原药的水解产物、氧化产物或二相代谢物。依据上述实验结果, 东莨菪碱在大鼠肝脏中的主要代谢途径见图 4。

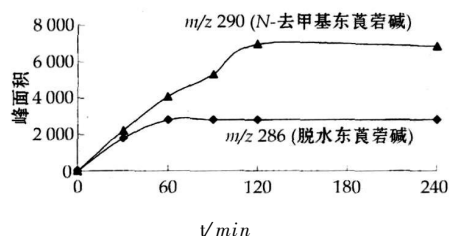


图 3 大鼠肝匀浆温孵液中东莨菪碱代谢物色谱峰面积-时间曲线

Fig. 3 Time-area curves of scopolamine metabolites in incubation solution in homogenate of rat liver

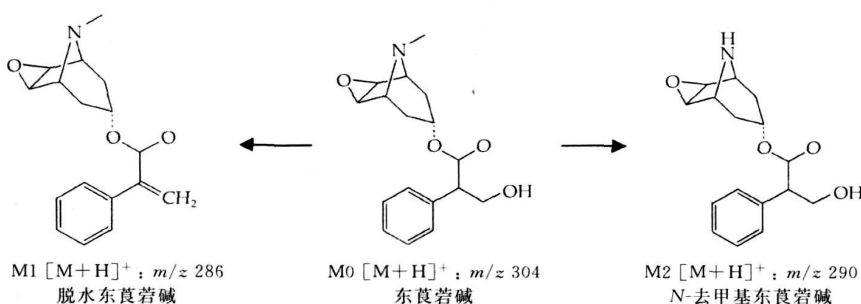


图 4 东莨菪碱在大鼠肝脏主要代谢途径

Fig. 4 Major metabolic pathway of scopolamine in rat liver

2.6 本法的灵敏度与专属性: 东莨菪碱对照品溶液用流动相稀释至不同的质量浓度, 经 LG-MSⁿ 检测, 检测限 LOD 为 5 ng/mL。本实验首先总结出东莨菪碱电喷雾质谱的电离和裂解规律, 由原药的特征碎片及特征中性丢失为依据, 通过 LG-MSⁿ 数据鉴别代谢物, 完全可以排除内源性物质的干扰。

3 讨论

3.1 东莨菪碱是含有醇羟基和 N-甲基的内酯型化合物, 实验结果显示了该药物在大鼠肝匀浆中的主要代谢脱水和去甲基作用, 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。

3.2 电喷雾离子阱多级质谱能够提供丰富的分子

结构信息, 而药物体内代谢时一般保留母药基本结构单元, 即药物与其代谢物分子结构存在密切的相关性, 因此, 本方法能够在没有对照品的情况下, 快速、简便、灵敏、可靠地鉴定东莨菪碱大鼠肝匀浆中的代谢物。

参考文献:

- [1] 夏雨, 江长根. 莨菪类药物实验研究和临床应用的进展[J]. 微循环技术杂志, 1994, 2: 104-107.
- [2] 梁绍林. 东莨菪碱的新用途[J]. 新医学, 1999, 30(4): 228-229.
- [3] Wada S, Yoshimitsu T, Koga N, et al. Metabolism *in vivo* of the tropane alkaloid, scopolamine, in several mammalian species[J]. *Xenobiotica*, 1991, 21: 1289-1300.