

液质联用技术分析次乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物

辛杨*, 张滢, 张哲, 张伟光, 吕君

(齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:检测次乌头碱在大鼠体内的代谢产物及代谢途径。方法:采用液-液萃取法对灌胃给予次乌头碱的大鼠尿液样品进行纯化,利用高效液相色谱-离子阱串联质谱检测纯化样品,根据各保留时间对应化合物的多级串联质谱数据,并与文献对照,推断次乌头碱在大鼠尿液中代谢产物的结构。结果:与空白组大鼠尿液相比,在次乌头碱给药大鼠的尿液中共检测到4个乌头类生物碱,分别为次乌头碱原型化合物,18-*O*-去甲基次乌头碱,*N*-去甲基次乌头碱,被标识为羟基化的代谢物(结构有待确证)。结论:次乌头碱在大鼠体内可能发生了去甲基、羟基化代谢反应,为该成分的药效作用研究提供参考。

[关键词] 次乌头碱; 代谢产物; 高效液相色谱-质谱联用; 代谢途径

[中图分类号] R969.1;R284.1;R446.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0094-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040094

Analysis on Metabolites of Hypaconitine in Rats' Urine by LC-MSⁿ XIN Yang, ZHANG Ying, ZHANG Zhe, ZHANG Wei-guang, LYU Jun (College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze metabolites of hypaconitine in rats' urine. **Method:** Urine samples of rats were purified by liquid-liquid extraction, they were detected by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. HPLC was performed by applying gradient elution with mobile phase composed of buffer of 2% ammonia combined with 0.2% acetic acid (A) -methanol blended with acetonitrile of equal volume (B) -methanol (C). **Result:** Prototype (M_1) and three metabolites (M_2 , M_3 , M_4) of hypaconitine were detected, M_2 was identified as 18-*O*-demethylhypaconitine, M_3 was identified as *N*-demethylhypaconitine, M_4 was identified as a hydroxylated metabolite. **Conclusion:** Hypaconitine may occur demethylation, hydroxylation metabolic reactions, which could provide a reference for further research on pharmacodynamics of hypaconitine.

[Key words] hypaconitine; metabolites; liquid chromatography-ion trap mass spectrometry; metabolic pathways

乌头类生物碱常见于毛茛科乌头属植物中,具有镇痛、抗炎、抗癌等作用^[1-3]。但该类化合物有一定毒性,主要表现为心肌毒性^[4]及神经毒性^[5],极大地限制了其临床应用。乌头类生物碱结构中的 C_8 与 C_{14} 位酯键是其毒性的主要来源,当 C_8 与 C_{14} 位酯键被水解时,其毒性显著降低^[6]。据 C_8 与 C_{14} 位取代基的不同可将乌头类生物碱分成4种类型,分别为 C_8 取代乙酰氧基与 C_{14} 取代苯甲酰氧基的双酯型生物碱, C_8 取代羟基与 C_{14} 取代苯甲酰氧基的单酯型生物碱, C_8 取代长链脂肪酰氧基与 C_{14} 取代苯甲酰氧基的脂型生物碱, C_8 取代羟基与 C_{14} 取代

羟基的胺醇型生物碱。乌头类生物碱的结构与药理活性密切相关,Angélica等^[7]研究了11种乌头类生物碱的局部麻醉机制,认为 C_{14} 取代芳香基团时局麻作用较强。

近年仍有关于乌头类生物碱中毒事件^[8],含有此类化合物的中药处方的安全应用受到重视,药物代谢研究可为低毒高效化合物的合成提供新方法。目前,液质联用技术在中药化学成分的各项研究中均发挥了重要作用^[9],且在某些有毒乌头类生物碱成分的代谢研究方面取得了一定成果^[10-11]。而关于次乌头碱的研究多见于含量测定^[12]、体内吸

[收稿日期] 20141206(007)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科技研究项目(12541874)

[第一作者] 辛杨,博士,讲师,从事中药化学成分质谱分析, Tel:13504521632, E-mail:cc.xinyang@163.com

收^[13]、体外代谢^[14]方面,由于该成分在附子及其复方中含量较高,故对次乌头碱体内代谢方面的研究应得到重视。本实验利用液相色谱-质谱联用仪分析次乌头碱在大鼠尿液中代谢产物的结构,为发现新活性成分及揭示次乌头碱的新体内代谢途径提供参考。

1 材料

6320 型液相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司)。乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110798-200504),甲醇、乙腈、乙酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。清洁级 SD 大鼠,购自吉林大学实验动物中心,合格证号 SCXK(吉)-2003-0001。

2 方法与结果

2.1 试验分组与给药 雄性 SD 大鼠共 12 只,体重 200 ~ 220 g,适应环境 1 周(25 ℃,相对湿度 50%),实验前禁食 12 h,正常给水,试验组 6 只大鼠按 0.5 g·L⁻¹灌胃给予次乌头碱生理盐水溶液,对照组 6 只大鼠灌胃给予等体积空白生理盐水。将 2 组大鼠置于代谢笼中,收集给药后 24 h 尿液,于 -20 ℃冰箱保存备用。

2.2 样品制备 取大鼠尿液 15 mL,于 2 000 × g 离心 10 min,取上清液,用 10% 氨水调 pH 10,用乙醚萃取 2 次,每次 15 mL,合并萃取液,40 ℃挥去溶剂,残渣用流动相 1 mL 使溶解,待检测。

2.3 样品检测 液相条件为 Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 30 ℃,流动相含 0.2% 乙酸的 2% 氨水溶液(A)-甲醇和乙腈等体积混合液(B)-甲醇(C)梯度洗脱(0 min, 35% A, 65% B, 0% C; 30 min, 20% A, 80% B, 0% C; 45 min, 10% A, 90% B, 0% C; 60 min, 0% A, 95% B, 5% C; 120 min, 0% A, 100% B, 0% C),流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm。质谱条件为电喷雾离子源,毛细管电压 4 kV,喷雾压力 241 kPa,干燥气流速 9.0 mL·min⁻¹,干燥气温度 350 ℃,扫描范围 m/z 50 ~ 2 000。待测样品进行全扫描的同时进行二、三级串联扫描,以获得检出化合物的结构信息。

2.4 样品测定 取处理好的对照组与试验组大鼠尿液样品 30 μL,按 2.3 项下条件进行检测,见图 1~3。结果与对照组相比,试验组大鼠尿液中共检出 4 个新化合物,在保留时间(t_R)11.5 min 处,检测到 m/z 616 的离子,记为 M₁,见图 1B,图 2 给出了此离子的二、三级串联质谱图,发现 m/z 616 离子的二、三级断裂规律与次乌头碱(图 3)完全一致,说明其准分子离子在断裂过程中分别丢失 CH₃COOH,

CH₃OH, CH₃COOH + CH₃OH, CH₃COOH + CH₃OH + CO, CH₃COOH + CH₃OH + CO + CH₃OH, CH₃COOH + 3 × CH₃OH + PhCOOH, 分别对应 m/z 556, 584, 524, 496, 464, 338, 故确定 M₁ 为次乌头碱原型。

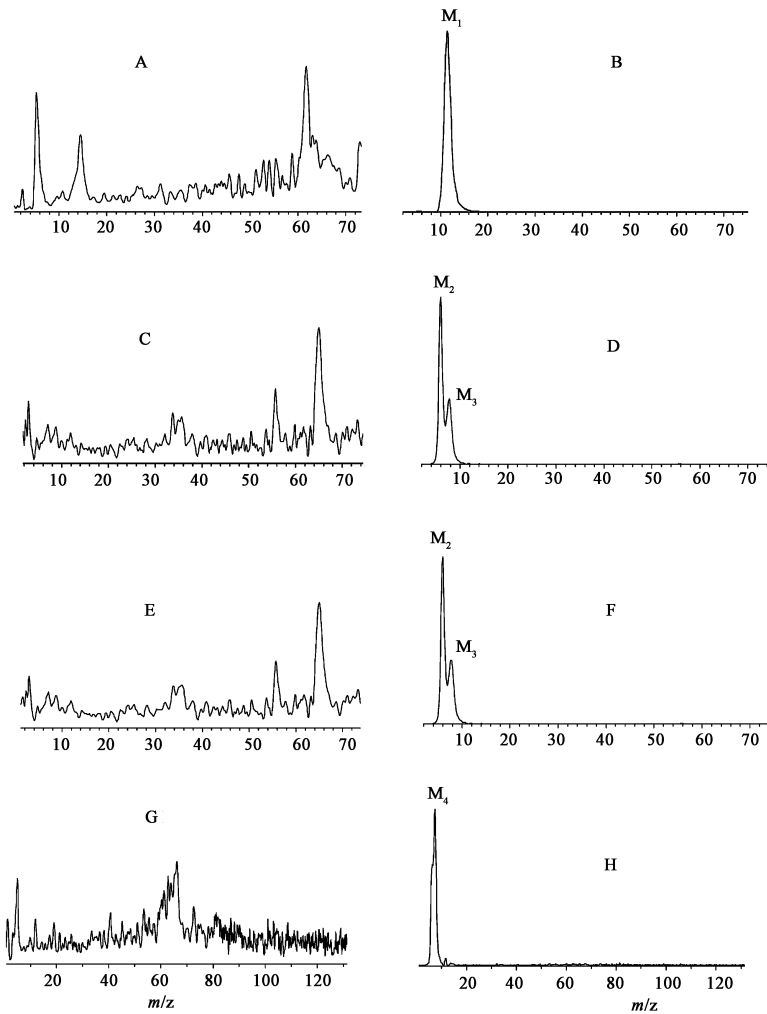
在 t_R 5.9 min 处,检测到 m/z 602 的离子,记为 M₂,见图 1D,其 [M + H]⁺ 较次乌头碱的 [M + H]⁺ 少 14,初步推断其可能为次乌头碱发生去甲基化反应产生的代谢产物。M₂ 的二、三级串联质谱见图 4,结果发现二、三级碎片离子的 m/z 均较相应次乌头碱的碎片离子少 14,即断裂规律与次乌头碱完全一致,说明其具有与次乌头碱相同的结构母核。化合物结构中的甲氧基被认为是发生去甲基化反应的活性基团^[15],但在次乌头碱原型化学结构中共有 4 个甲氧基取代位点,分别为 C₁, C₆, C₁₆, C₁₈。假设去甲基化反应发生在 C₁, C₆ 或 C₁₆,则在三级串联质谱图中应该检测到 m/z 338 离子,这是由于去甲基化后产生的 C₁-OH, C₆-OH 或 C₁₆-OH 会产生脱掉 1 个分子 H₂O 的碎片离子。但在 M₂ 的三级串联谱图中未检测到 m/z 338 离子,而检测到 m/z 324 离子,故判断 M₂ 的去甲基化位点未发生在 C₁, C₆ 或 C₁₆,间接推断去甲基化位点发生在 C₁₈。基于此,鉴定 M₂ 为 18-O-去甲基次乌头碱。

在 t_R 7.8 min 处,检测到 m/z 602 离子,记为 M₃,其为 M₂ 的同分异构体,见图 1F。在其三级串联质谱图中发现了 m/z 324 碎片离子,推断去甲基化反应未发生在 C₁, C₆ 或 C₁₆,其二级串联质谱图中未检测到 [M + H - 46]⁺ 碎片离子,可排除 M₃ 为 8-甲酰氧基次乌头碱。推断 M₃ 为 N-去甲基化次乌头碱。

在 t_R 7.9 min 处,检测到 m/z 632 离子,记为 M₄,其 [M + H]⁺ 较次乌头碱多 16,见图 1H,初步推测其为次乌头碱的羟基化代谢产物。若羟基化位点发生在次乌头碱结构中的苯环上,在 M₄ 的二、三级串联质谱图中均应检测到 m/z 338 离子,但图中未检测到该离子,故可排除苯环上发生羟基化的可能。由于其峰强度较弱,具体的羟基化位点尚有待确证。

3 讨论

次乌头碱是一种具有较强毒性的乌头类生物碱,是附子的主要成分,本文采用液相色谱-质谱联用技术检测该成分给药后在大鼠尿液中代谢产物,充分体现了液-质联用技术在生物样品恒量组分的定性研究中的优势。在试验组大鼠的尿液样品中,同时检测到了原型药物及 3 个代谢产物,经串联质谱分析结构,其中 2 个是互为同分异构体的去甲基



A, C, E, G. 对照组; B, D, F, H. 试验组

图 1 大鼠给予次乌头碱后尿样中不同化合物的提取离子色谱

Fig. 1 Extracted ion chromatography of different compounds in urine samples of rat after administrating hypaconitine

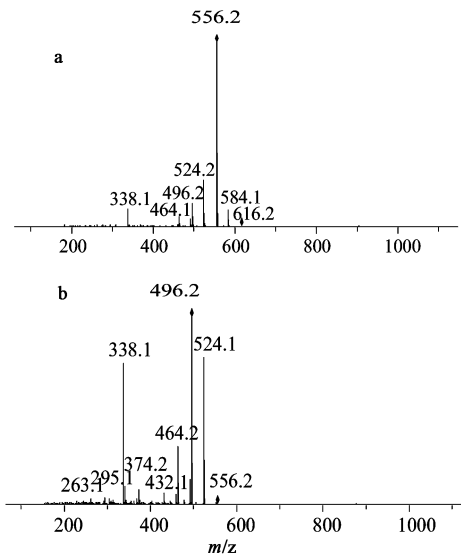


图 2 化合物 M₁ 的二 (a)、三 (b) 级串联质谱

Fig. 2 MS² (a) and MS³ (b) spectra of M₁

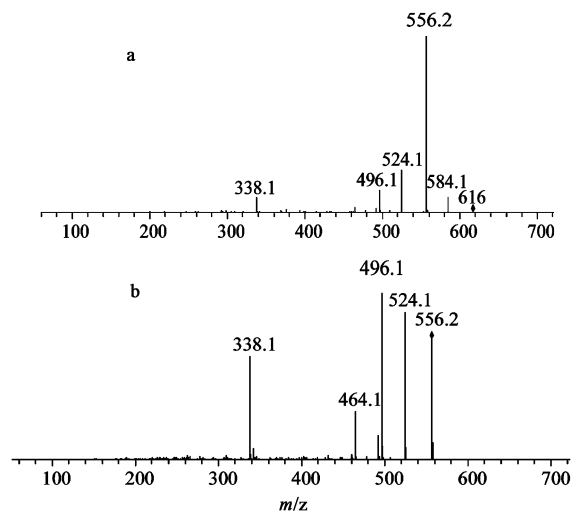


图 3 次乌头碱对照品的二 (a)、三 (b) 级串联质谱

Fig. 3 MS² (a) and MS³ (b) spectra of hypaconitine standard

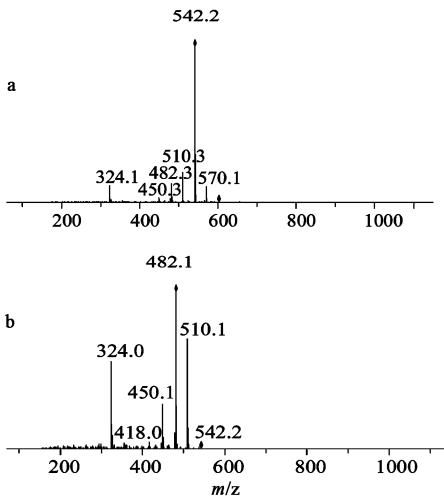


图 4 化合物 M₂ 的二 (a)、三 (b) 级串联质谱

Fig. 4 MS² (a) and MS³ (b) spectra of M₂

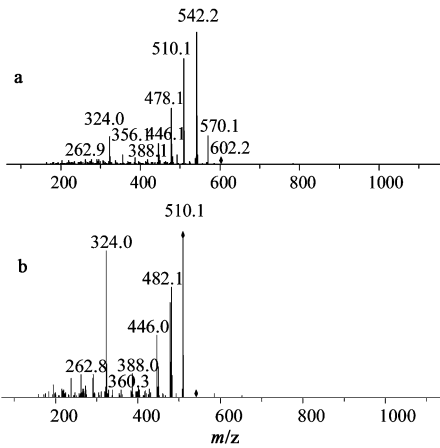


图 5 化合物 M₃ 的二 (a)、三 (b) 级串联质谱

Fig. 5 MS² (a) and MS³ (b) spectra of M₃

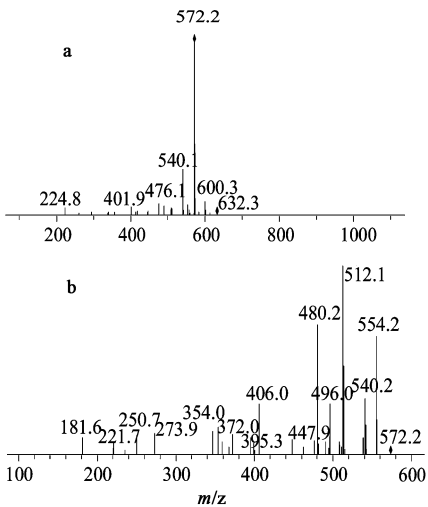


图 6 化合物 M₄ 的二 (a)、三 (b) 级串联质谱

Fig. 6 MS² (a) and MS³ (b) spectra of M₄

乌头碱在大鼠体内的代谢途径,为揭示次乌头碱的体内代谢过程研究提供参考。

[参考文献]

[1] Desai H K, Hart B P, Caldwell R W, et al. Certain Norditerpenoid alkaloids and their cardiovascular action [J]. J Nat Prod, 1998, 61(6): 743-748.

[2] Suzuki Y, Oyama T, Ishige A, et al. Antinociceptive mechanism of the aconitine alkaloids mesaconitine and benzoylmesaconine [J]. Planta Med, 1994, 60(5): 391-394.

[3] Ameri A. Inhibition of stimulus-triggered and spontaneous epileptiform activity in rat hippocampal slices by the Aconitum alkaloid mesaconitine [J]. Eur J Pharmacol, 1998, 342(2/3): 183-191.

[4] 刘艳,章诗伟,周兰,等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展 [J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(6): 398-401.

[5] 饶朝龙,彭成. 乌头类生物碱对 bcl-2 基因表达的影响 [J]. 毒理学杂志, 2010, 24(2): 94-96.

[6] 周远鹏. 从双酯型生物碱的水解来看附子的解毒 (二) [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 154-157.

[7] Angélica M, Bello R, Alejandro A, et al. The local anesthetic activity of Aconitum alkaloids can be explained by their structural properties; a QSAR analysis [J]. Fund Clin Pharmacol, 2004, 18(2): 157-161.

[8] 赵见文,田军彪,张颜伟. 乌头中毒致双侧面神经麻痹 1 例 [J]. 中西医结合研究, 2010, 2(3): 134.

[9] 张齐家,孙文军. 串联质谱及液质联用技术在药物分析研究中的应用 [J]. 中医药学报, 2009, 37(6): 111-113.

[10] 陈莘莘,赵宁,徐秀玲,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法分析新乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物 [J]. 药理学学报, 2010, 45(8): 1043-1048.

[11] 陈学国,赖永权,蔡宗苇. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱分析乌头碱及其代谢物 [J]. 质谱学报, 2012, 33(2): 65-73.

[12] 马芳,赵东,吴晓霞,等. LC-MS-MS 法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 95-97.

[13] 辛杨,皮子凤,宋风瑞,等. 超高效液相色谱-质谱法比较黑顺片单煎液及其复方煎煮液中次乌头碱在大鼠体内的吸收 [J]. 色谱, 2011, 29(5): 389-393.

[14] Wang X Y, Pi Z F, Liu W L, et al. Effect of pH on the metabolism of aconitine under rat intestinal bacteria using HPLC/MS-MSn technical [J]. Chinese J Chem, 2010, 28(12): 2494-2500.

[15] 王广基. 药物代谢动力学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 56.

[责任编辑 刘德文]

化代谢产物,一个是羟基化代谢产物,初步推断了次