

· 药物代谢 ·

异钩藤碱 ESI-MS 裂解规律及其在代谢产物鉴定中的应用

李军茂¹, 何明珍², 黎田儿¹, 李艳¹, 欧阳辉^{1*}, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;

2. 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 南昌 330006)

[摘要] 目的:分析异钩藤碱在大鼠体内的代谢途径及产物。方法:异钩藤碱按剂量 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药后,收集血浆,在正离子模式下,采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析异钩藤碱在大鼠体内的代谢途径,流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱。结果:通过与空白生物样品和对照品的提取离子色谱图、质谱碎片裂解信息比对,共鉴别出 13 个成分,其中 1 个原型,12 个代谢产物,包括 I 相代谢产物 11 个,II 相代谢产物 1 个。结论:异钩藤碱在大鼠体内的代谢途径为氧化、立体异构、羟基化、脱氢、水解及葡萄糖醛酸化等,丰富了吲哚类生物碱的 ESI-MS 裂解规律,为此类化合物的质谱解析提供参考。

[关键词] 异钩藤碱;裂解规律;代谢产物;吲哚类生物碱;立体异构;电喷雾离子源;钩藤

[中图分类号] O657.63;R969.1;R945;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)15-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016150078

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160603.1125.002.html>

[网络出版时间] 2016-06-03 11:25

Fragmentation Behavior of Isorhynchophylline in ESI-MS and Its Application in Identification of Metabolites

LI Jun-mao¹, HE Ming-zhen², LI Tian-er¹, LI Yan¹,
OUYANG Hui^{1*}, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze *in vivo* metabolic pathways and products of isorhynchophylline in rats. **Method:** UPLC-Q-TOF-MS with positive ion mode was established and applied to identify the metabolites of isorhynchophylline in rat plasma after intragastric administration of $37.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, mobile phase was 0.1% formic acid and acetonitrile for gradient elution. **Result:** A total of 13 compounds, including 1 prototype and 12 metabolites (11 of phase I and 1 of phase II) were identified by compared with the blank biological samples and the fragmentation mechanism of MS spectra of reference substances. **Conclusion:** The metabolic pathway of isorhynchophylline in rats is summarized as oxidation, stereoisomerism, hydroxylation, dehydrogenation, hydrolyzation and glucuronidation. This paper enriches ESI-MS fragmentation rules of indole alkaloids and provides reference for further mass spectrometry analysis of such compounds.

[Key words] isorhynchophylline; fragmentation rule; metabolites; indoles alkaloids; stereoisomerism; electrospray ionization source; Uncariae Ramulus Cum Uncis

[收稿日期] 20160304(008)

[基金项目] 江西省青年自然科学基金项目(20151BAB215039);江西省卫生厅中医药科研计划项目(2013A004);江西中医药大学校级课题道地药材专项(ZX1004);江西省青年科学家培养对象项目(20142BCB23022)

[第一作者] 李军茂,在读硕士,从事中药活性成分研究,Tel:0791-87119632,E-mail:ljm3039@163.com

[通讯作者] *欧阳辉,博士,讲师,从事中药活性成分及其代谢研究,Tel:0791-87119652,E-mail:huiouyang@163.com

异钩藤碱是从茜草科植物钩藤的带钩茎枝中提取的生物碱类成分^[1],对大鼠缺血性神经元损伤具有保护作用^[2],对小鼠大脑 5-羟色胺 2A (5-HT_{2A}) 受体有抑制作用^[3]和扩张血管作用^[4],对血管紧张素 II 诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖也具有抑制作用^[5]。异钩藤碱目前主要作为降压的候选化合物在研究^[6]。一般认为,在药物的研发各阶段,代谢特征研究有重要的指导作用,而目前关于异钩藤碱在生物体内代谢产物的研究报道还较少。有文献报道异钩藤碱的代谢产物有 10-羟基异钩藤碱,11-羟基异钩藤碱,异钩藤碱-10-*O*-葡萄糖醛酸,异钩藤碱-11-*O*-葡萄糖醛酸,异钩藤碱立体异构化和氧化等^[7-9],这些代谢产物主要是异钩藤碱苯环上羟基化,同时其已被发现的代谢途径较少,且文献中主要通过低分辨质谱进行研究,这在一定程度上影响了异钩藤碱体内代谢的分析结果。本实验采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS) 对异钩藤碱的裂解规律进行分析,并应用到该成分的体内代谢产物测定中,推测了异钩藤碱在体内的代谢途径。

1 材料

Nexera X2 LC-30A 型超高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Q-TOF 5600 型高分辨质谱仪 (美国 AB 公司, 配备 ESI 离子源, Analyst TF 1.6 数据处理软件, PeakView 数据处理软件), AL204 型电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司], HC-3018R 型高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司), Vortex 3 型旋涡混匀器 (德国 IKA 公司), Simplicity 型超纯水处理系统 (美国密理博公司)。

异钩藤碱 (中国固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1056-080526, 纯度 > 98%), 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、乙腈及甲酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠, 体重 (180 ± 10) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (湘) 2013-0004, 大鼠适应性喂养 1 周后开始实验, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法和结果

2.1 动物给药与生物样品采集

根据前期药效学试验结果, 确定给药量 37.5 mg · kg⁻¹, 给药前采集空白血浆, 给药后 0.5, 2, 4, 8, 24 h 进行眼眶取血, 取血后立即在 4 °C, 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上层血浆, 储存在 -20 °C 冰箱中, 待测。

2.2 LC-MS 检测

2.2.1 色谱条件

Welch C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 90% B; 1 ~ 22 min, 90% ~ 5% B; 22 ~ 25 min, 5% B; 25 ~ 26 min, 5% ~ 90% B; 26 ~ 30 min, 90% B), 流速 0.2 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C。

2.2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 质量扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500, 喷雾电压 -4.5 kV, 雾化气温度 600 °C, 气帘气 172.36 kPa, 雾化气和辅助气 344.74 kPa, 去簇电压 (DP) -120 V。采用 TOF-MS-IDA-MS/MS 采集数据, TOF/MS 一级预扫描和触发的二级扫描 TOF/MS/MS 离子累积时间分别为 200, 100 ms, 碰撞能量 (CE) 70 eV, 碰撞能量叠加 (CES) (70 ± 15) eV, 触发二级的方法为信息依赖扫描 (IDA), 多重质量亏损 (MMDF) 和动态背景扣除 (DBS) 为触发二级的条件, 满足该条件的优先进行二级扫描。

2.3 数据处理

采用 PeakView 1.6 软件中 XIC Manager 对 UPLC-Q-TOF-MS 采集的数据进行处理。

2.4 样品处理

将 0.5, 2, 4, 8, 24 h 的血浆样品分别置于塑料离心管中, 加入 4 倍量甲醇, 充分振荡涡旋 3 min, 于 13 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 进样 5 μL 供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.5 异钩藤碱裂解规律研究及总结

异钩藤碱有 *m/z* 353.187 4, 269.165 7, 241.134 1, 226.144 2, 160.075 8, 110.096 4 等子离子特征碎片及 *m/z* 46.041 9, 116.047 3, 142.063 0 等特征中性丢失, 见图 1。也有文献报道异钩藤碱碎片离子为 *m/z* 353, 269^[7-8]。异钩藤碱的相对分子质量、元素组成和不饱和度见表 1, 根据子离子碎片以及中性丢失的信息, 可推导出异钩藤碱的质谱裂解途径, 见图 2。准分子离子 ([M + H]⁺, *m/z* 385.214 4) 较易失去 CH₃OH, C₅H₈O₃ 和 C₅H₈O₃ + C₂H₄ 分别生成碎片离子 *m/z* 353.187 4 ([C₂₁H₂₄N₂O₃]⁺), *m/z* 269.165 7 ([C₁₇H₂₀N₂O]⁺), *m/z* 241.134 1 ([C₁₅H₁₆N₂O]⁺); 准分子离子较易发生 RDA 裂解生成 2 个

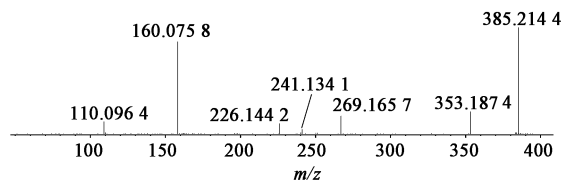


图 1 异钩藤碱的 MS/MS

Fig. 1 MS/MS spectrum of isorhynchophylline

表 1 异钩藤碱的 [M + H]⁺ 及其主要碎片离子的元素组成、相对分子质量、不饱和度和质量偏差

Table 1 Element composition, exact masses, unsaturation and mass deviation of [M + H]⁺ of isorhynchophylline

元素组成	相对分子质量/Da		不饱和度	质量偏差
	实际值	理论值		
C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	385.214 4	385.212 2	10	3.0 × 10 ⁻⁶
C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	353.187 4	353.186 0	11	4.1 × 10 ⁻⁶
C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O	269.165 7	269.164 8	9	3.2 × 10 ⁻⁶
C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O	241.134 1	241.133 5	9	2.3 × 10 ⁻⁶
C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	226.144 2	226.143 8	4	1.9 × 10 ⁻⁶
C ₁₀ H ₉ NO	160.075 8	160.075 7	7	0.7 × 10 ⁻⁶
C ₇ H ₁₁ N	110.096 4	110.096 4	3	0.2 × 10 ⁻⁶

碎片离子 m/z 160.075 8 ([C₁₀H₉NO]⁺), m/z 226.144 2 ([C₁₂H₁₉NO₃]⁺), 碎片离子 m/z 226.144 2 较易断键失去 C₅H₈O₃ 生成碎片离子 m/z 110.096 4 ([C₇H₁₁N]⁺)。其中碎片离子 m/z

表 2 大鼠血浆样品中异钩藤碱及其代谢产物的色谱-质谱信息和代谢途径

Table 2 LC-MS information and biotransformation pathways of isorhynchophylline and its metabolites in rat plasma

代谢产物	<i>t_R</i> /min	[M + H] ⁺		质量偏差	元素组成	代谢途径
		相对分子质量 实际值/Da	相对分子质量 理论值/Da			
异钩藤碱 (M0)	6.518	385.214 4	385.212 2	3.0 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	原型
M0-1	6.021	385.214 2	385.212 2	0.6 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	对映异构
M1	6.331	383.197 6	383.196 5	2.3 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	去氢化
M2	5.110	371.197 3	371.197 3	-2.1 × 10 ⁻⁶	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	水解
M3-1	5.209	401.208 3	401.207 1	3.5 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₅	羟基化
M3-2	5.656	401.207 7	401.207 1	1.0 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₅	羟基化
M3-3	6.329	401.208 4	401.207 1	3.2 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₅	羟基化
M4	5.537	399.197 8	399.191 4	2.1 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	氧化
M5	5.930	381.181 3	381.180 9	4.8 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	去氢化
M6-1	4.923	399.191 0	399.191 4	-1.2 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	去氢化和羟基化
M6-2	5.233	399.192 6	399.191 4	2.9 × 10 ⁻⁶	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	去氢化和羟基化
M7	5.123	577.239 6	577.239 2	0.8 × 10 ⁻⁶	C ₂₈ H ₃₆ N ₂ O ₁₁	羟基化后葡萄糖醛酸
M8	5.593	385.176 0	385.176 8	0.5 × 10 ⁻⁶	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	去氢化, 水解和羟基化

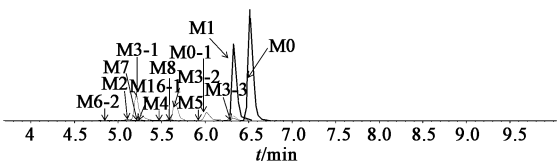


图 3 大鼠血浆中异钩藤碱代谢产物 (M1 ~ M8) 的 EIC
Fig. 3 EICs of metabolites (M1 ~ M8) of isorhynchophylline in rat plasma

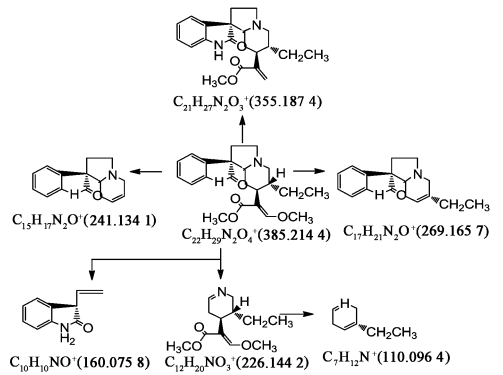


图 2 异钩藤碱的质谱裂解途径

Fig. 2 Proposed fragmentation pathways of isorhynchophylline

160.075 8 存在稳定结构, 是强度最高的碎片离子。

2.6 代谢产物鉴定 除异钩藤碱原型外, 在大鼠血浆样品中测到 12 个主要代谢产物, 其中 I 相代谢产物 11 个, II 相代谢产物 1 个, 相关信息见表 2。另外, 13 种代谢产物的提取离子流图谱 (EIC) 见图 3。

2.6.1 I 相代谢产物

M0-1: 通过与异钩藤碱碎片离子 m/z 353.184 2, 269.173 7, 241.136 0, 226.144 2, 160.074 3, 110.091 2 进行比较, 发现 M0-1 与原型碎片离子一样, 见图 4, 5A。所以推测 M0-1 为钩藤碱, 是异钩藤碱对映异构的代谢产物。研究报道钩藤提取物中有钩藤碱和异钩藤碱。说明异钩藤碱在

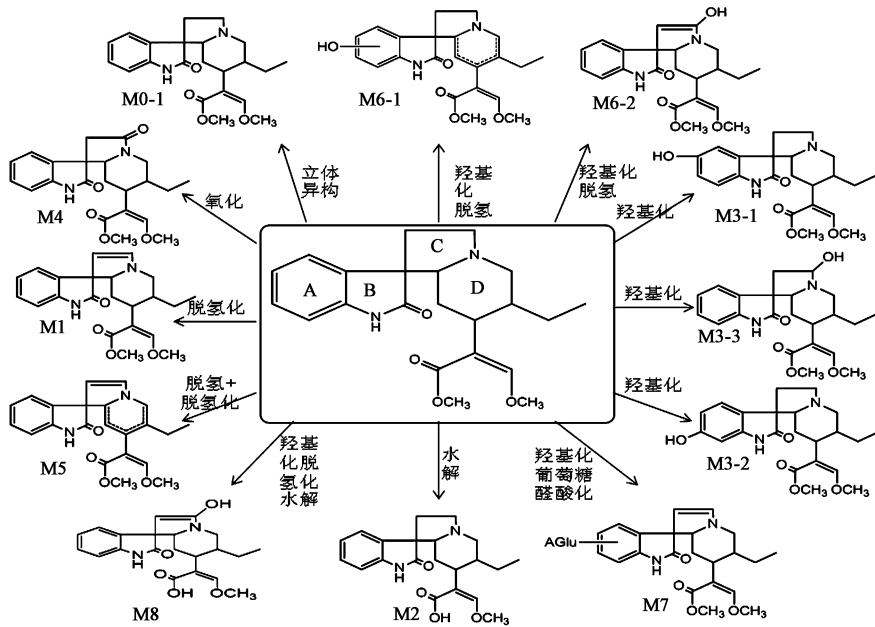


图 4 异钩藤碱推测的代谢途径
Fig. 4 Proposed metabolic pathway of isorhynchophylline

体内可转化为钩藤碱。

M1: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 383.197 6, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 少 2 Da, 推测 M1 为异钩藤碱脱氢化的产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 351.173 4, 267.149 9, 226.143 4, 158.060 1, 110.099 7, 见图 4。 m/z 383.197 6 丢失中性分子 CH_3OH 和 $C_5H_8O_3$ 产生碎片离子 m/z 351.173 4, 267.149 9。其 $[M + H]^+$ m/z 383.197 6 发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 158.060 1, 226.143 4, 而 m/z 226.143 4 进一步裂解丢失 $C_5H_8O_3$ 产生碎片离子为 m/z 110.099 7。M1 碎片离子 m/z 351.173 4, 267.149 9, 158.060 1 与原型 M0 m/z 353.197 6, 269.165 7, 160.075 8 比较都少 2 Da; m/z 226.143 4, 110.099 7 与原型一样, 故推测 M1 为 C 环脱氢产物, 见图 5B。

M2: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 371.197 3, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 少 14 Da, 推测为异钩藤碱脱甲基化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 339.173 7, 269.160 4, 160.075 1, 110.097 3, 见图 4。 m/z 371.197 3 丢失中性分子 CH_3OH 和 $C_4H_6O_3$ 分别产生碎片离子为 m/z 339.173 7, 269.160 4; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 160.075 1; M2 碎片离子 m/z 339.173 7 与原型 m/z 353.187 4 少 14 Da; m/z 269.160 4, 160.075 1, 110.097 3 与原型一样, 故推测 M2 为酯键水解产物, 见图 5C。

M3-1: 准分子离子峰 $[M + H]^+$ m/z 401.208 3,

比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 16 Da, 推测为异钩藤碱的羟基化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 369.179 5, 285.158 7, 226.140 6, 176.070 4, 158.064 0, 110.097 4, 见图 4。 m/z 401.208 3 丢失中性分子 CH_3OH 和 $C_5H_8O_3$ 分别产生碎片离子为 m/z 369.179 5, 285.158 7; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 176.070 4, 226.140 6, 而 m/z 176.070 4 和 m/z 226.140 6 分别裂解生成 m/z 158.064 0 和 m/z 110.097 4。M3-1 碎片离子 m/z 369.179 5, 285.158 7, 176.070 4 与原型 m/z 353.187 4, 269.165 7, 160.075 8 比较都多 16 Da; m/z 226.140 6, 110.097 4 与原型一样, 故推测 M3-1 为 11-羟基异钩藤碱, 见图 5D。

M3-2: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 401.207 7, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 16 Da, 推测为异钩藤碱的苯环羟基化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 369.181 5, 285.160 0, 226.141 6, 176.075 7, 160.077 8, 110.096 7, 见图 4。 m/z 401.207 7 丢失中性分子 CH_3OH 和 $C_5H_8O_3$ 分别产生碎片离子为 m/z 369.181 5, 285.160 0; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 176.075 7, 226.141 6, 而 m/z 176.075 7 和 m/z 226.141 6 分别进一步裂解生成 m/z 160.077 8 和 m/z 110.096 4。M3-2 碎片离子 m/z 369.181 5, 285.160 0, 176.075 7 与原型 m/z 353.187 4, 269.165 7, 160.075 8 比较都多 16 Da, m/z 226.141 6, 160.077 8, 110.096 7 原型一样, 故

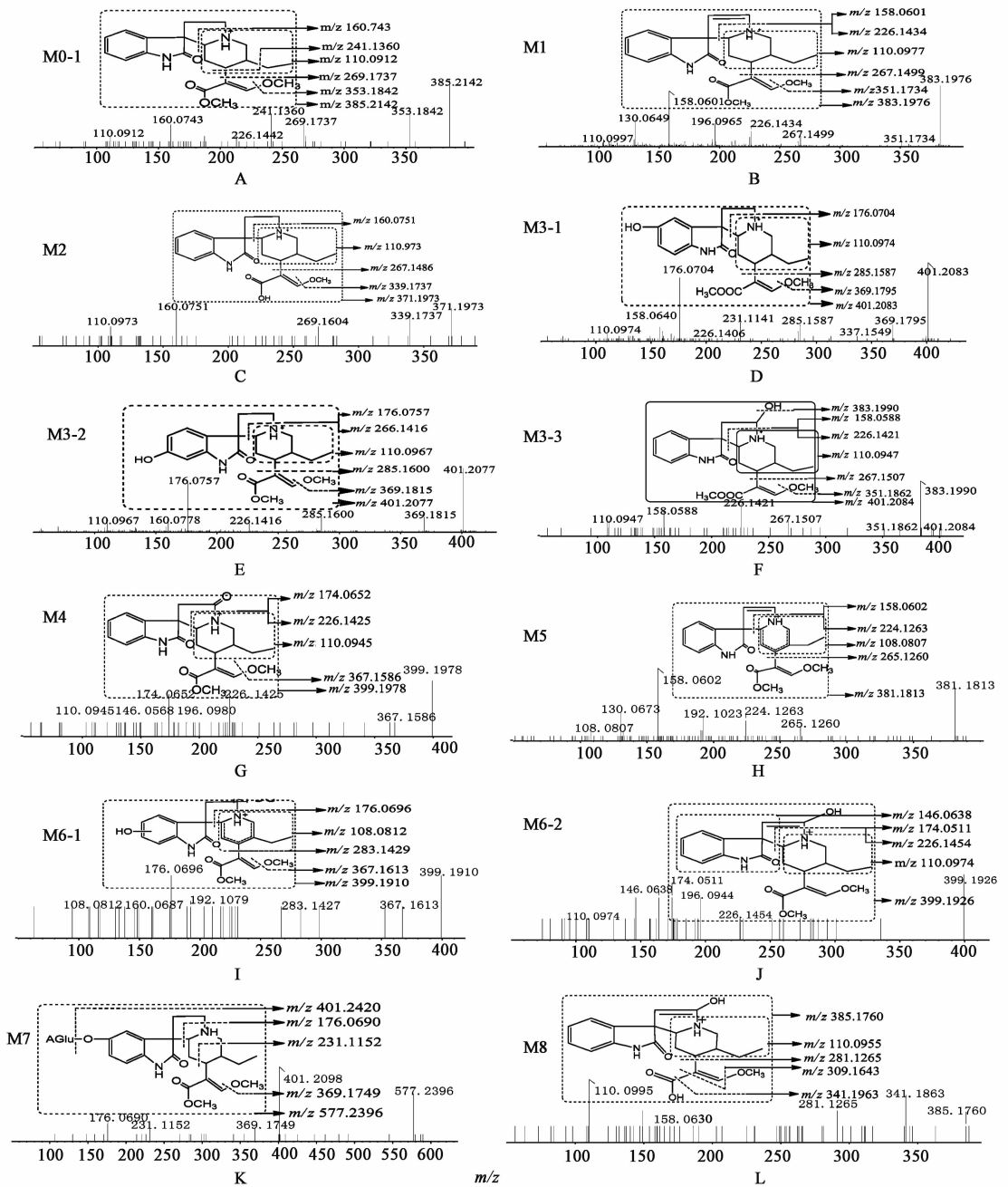


图 5 异钩藤碱代谢产物的二级谱及结构推测

Fig. 5 MS/MS of metabolites of isorhynchophylline

推测 M3-2 为 10-羟基异钩藤碱。有文献报道 M3-1 保留时间比 M3-2 要早^[7],进一步证明了 M3-1 为 11-羟基异钩藤碱, M3-2 为 10-羟基异钩藤碱, 见图 5E。

M3-3: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 401.2084, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 16 Da, 推测为异钩藤碱的羟基化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 383.1990, 351.1862, 267.1507, 226.1421, 158.0588, 110.0947, 见图 4。 m/z 401.2084 丢失中性分子 H_2O 产生碎片离子 m/z

383.1990, 而 m/z 383.1990 进一步丢失中性分子 CH_3OH 和 $C_5H_8O_3$ 分别产生碎片离子 m/z 351.1862, 267.1507, 同时 m/z 383.1990 发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 158.0588, 226.1421, 而 m/z 226.1421 进一步裂解生成 m/z 110.0947。M3-3 首先脱去一分子 H_2O 生成 m/z 383.1990; 碎片离子 m/z 351.1862, 267.1507, 158.0588 与原型比较少 2 Da, m/z 226.1421, 110.0947 与原型一样, 故推测 M3-3 为 C 环羟基化产物, 见图 5F。

M4: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 399.1978,

比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 14 Da, 推测为异钩藤碱的氧化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 367.158 6, 226.142 5, 196.098 0, 174.065 2, 146.056 8, 110.094 5, 见图 4。 m/z 399.197 8 丢失中性分子 CH_3OH 产生碎片离子为 m/z 367.158 6; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 174.065 2, 226.142 5, 而 m/z 174.065 2 进一步裂解生成 m/z 146.056 8, m/z 226.142 5 进一步裂解生成 m/z 196.098 0, 110.094 5。M4 碎片离子 m/z 367.158 6, 174.065 2 与原型比较都多 14 Da, 而 m/z 174.065 2 碎片离子进一步失去 CO , 产生 m/z 146.056 8; m/z 226.142 5, 110.094 5 原型一样, 故推测 M4 为 C 环氧化产物, 见图 5G。

M5: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 381.181 3, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 少 4 Da, 推测为异钩藤碱的脱四氢产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 265.126 0, 224.126 3, 192.102 3, 158.060 2, 130.067 3, 108.080 7, 见图 4。 m/z 381.181 3 丢失中性分子 $C_5H_8O_3$ 产生碎片离子 m/z 256.126 0; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 158.060 2, 224.126 3, 而 m/z 158.060 2 进一步裂解生成 m/z 130.067 3, m/z 224.126 3 进一步裂解生成 m/z 192.102 3, 108.080 7。M5 碎片离子 m/z 224.126 3, 108.080 7 与原型 m/z 226.144 2, 110.096 4 比较都少 2 Da, 推测为 D 环脱氢; m/z 158.060 2 与原型 m/z 160.075 8 比较少 2 Da, 推测为 C 环脱氢; 故推测 M5 为异钩藤碱脱四氢产物, 见图 5H。

M6-1: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 399.191 0, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 14 Da, 推测为异钩藤碱的脱氢和羟基化结合产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 367.161 3, 283.142 7, 192.107 9, 176.069 6, 160.068 7, 108.081 2, 见图 4。 m/z 399.191 0 丢失中性分子 CH_3OH , $C_5H_8O_3$ 分别产生碎片离子 m/z 367.161 3, 283.142 7; 其发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 176.069 6, 而 m/z 176.069 6 进一步裂解生成 m/z 160.068 7。M6-1 碎片离子 m/z 176.069 6 与原型 m/z 160.075 8 比较多 16 Da, 而 m/z 176.069 6 进一步裂解生成 m/z 160.068 7, 推测为苯环羟基化, 但不能确定具体位置; m/z 108.081 2 与原型 m/z 110.096 4 比较少 2 Da, 推测为 D 环脱氢, 但不知道具体位置; 故推测 M6-1 为异钩藤碱羟基化和脱氢产物, 见图 5I。

M6-2: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z

399.192 6, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 14 Da, 推测为异钩藤碱的脱氢 + 羟基化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 226.145 4, 196.094 4, 174.051 1, 146.063 8, 110.097 4, 见图 4。 m/z 399.192 6 发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 174.051 1, 226.145 4, 而 m/z 174.051 1 进一步裂解生成 m/z 146.063 8, m/z 226.145 4 裂解生成 m/z 196.094 4 和 m/z 110.097 4。M6-2 碎片离子 m/z 174.051 1 比原型 m/z 160.075 8 多 14 Da, 而 m/z 174.051 1 进一步裂解生成 m/z 146.063 8; m/z 226.145 4, 110.097 4 与原型一样, 故推测为 C 环羟基化和脱氢产物, 见图 5J。

M8: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 385.176 0, 其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 341.186 3, 309.164 3, 281.126 5, 158.063 0, 110.099 5, 见图 4。 m/z 385.176 0 丢失中性分子 CO_2 和 $C_4H_6O_3$ 分别产生碎片离子 m/z 341.186 3, 281.126 5, 而 m/z 341.186 3 进一步裂解生成 m/z 309.164 3, 故推测为异钩藤碱脱甲基化; m/z 385.176 0 发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 158.063 0。根据 m/z 385.176 0, 341.186 3, 309.164 3, 281.126 5 确定脱甲基、脱氢和羟基化; 而 m/z 385.176 0, 341.186 3 进一步确定了脱甲基的具体位置酯键的断裂, m/z 385.176 0, 158.063 0 进一步确定脱氢和羟基化为 C 环, 见图 5L。

2.6.2 II 相代谢产物 M7: 准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 577.239 6, 比异钩藤碱的 $[M + H]^+$ 多 192 Da, 故推测为异钩藤碱的羟基化 + 葡萄糖醛酸化产物。其二级质谱的主要特征碎片为 m/z 401.209 8, 369.174 9, 231.115 2, 176.069 0, 见图 4。 m/z 577.239 6 丢失 $C_6H_{10}O_6$ 产生碎片离子为 m/z 401.209 8, 而 m/z 401.209 8 进一步裂解生成 m/z 369.174 9, 231.115 2, 176.069 0。M7 母离子比碎片离子 m/z 401.209 8 多 176 Da, 推测为葡萄糖醛酸碎片离子; 而碎片离子 m/z 401.209 8 为异钩藤碱的羟基化产物, 根据碎片离子 m/z 369.174 9, 231.115 2, 176.069 0 推测为苯环羟基化, 但不能确定苯环具体位置, 故推测 M7 为异钩藤碱的羟基化后再葡萄糖醛酸化产物, 见图 5K。

3 讨论

药物在体内代谢过程中, 代谢产物多数在结构上与原型药物相似, 可分析原型药物的特征质谱裂解碎片或中性丢失, 再根据原型药物特征碎片离子、特征中性丢失或者特征碎片离子间质量差推断代谢

产物结构。故本文采用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定了大鼠血浆中异钩藤碱及其代谢产物。根据异钩藤碱的质谱裂解途径及其特征性碎片离子 m/z 353.187 4, 269.165 7, 241.134 1, 226.144 2, 160.075 8, 110.096 4 和特征性的中性丢失 m/z 46.041 9, 116.047 3, 142.063 0, 推测异钩藤碱代谢产物 12 个。异钩藤碱在大鼠体内的代谢途径为氧化、立体异构、羟基化、脱氢、水解及羟基化后葡萄糖醛酸化。

根据文献报道, 吲哚类生物碱在体内的代谢途径及反应有很多, 如水解, *O*-去甲基化^[10], 葡萄糖醛酸化^[7-8], 硫酸化^[11], 羟基化^[12-13], 脱氢化^[14]等, 而异钩藤碱在大鼠体内主要是苯环上羟基化及羟基化后再葡萄糖醛酸化的代谢产物^[7-8]。本文运用高分辨质谱对异钩藤碱代谢产物研究, 丰富了异钩藤碱的代谢途径。本文应用 UPLC-Q-TOF-MS 的高分辨率、相对分子质量、元素组成和不饱和度可得到药物的特征质谱裂解碎片或中性丢失, 总结了原型药物 ESI 的质谱裂解规律, 将此规律应用到代谢产物推测中, 极大地提高了代谢产物结构鉴定的准确性。本文根据此方法分析异钩藤碱的体内代谢过程, 为该化合物的新药开发提供了参考数据。

[参考文献]

[1] 吴伟明, 李志锋, 欧阳辉, 等. 钩藤化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 56-58.

[2] Kang T H, Murakami Y, Takayama H, et al. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on *in vitro* ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action [J]. Life Sci, 2004, 76 (3): 331-343.

[3] Matsumoto K, Morishige R, Murakami Y, et al. Suppressive effects of isorhynchophylline on 5-HT_{2A} receptor function in the brain: behavioural and electrophysiological studies [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 517(3): 191-199.

[4] Zhang W B, Chen C X, Sim S M, et al. *In vitro* vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* (Miquel) [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2004, 369(2):

232-238.

[5] 李运伦. 钩藤碱和异钩藤碱抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖及相关机制 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 1-6.

[6] 唐庆, 马晓芳, 赵桂香, 等. 天麻钩藤降压胶囊降压及镇静作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 241-243.

[7] Wang W, Mao Z X, Hattori M. Metabolism of isorhynchophylline in rats detected by LC-MS [J]. J Pharm Pharm Sci, 2010, 13(1): 27-37.

[8] Wang W, Ma C M, Hattori M. Simultaneous determination of rhynchophylline, isorhynchophylline, and their eight metabolites in rats [J]. J Trad Med, 2010, 27(1): 15-29.

[9] Chen F F, Qi W, Sun J H, et al. Urinary metabolites of isorhynchophylline in rats and their neuroprotective activities in the HT22 cell assay [J]. Fitoterapia, 2014, doi:10.1016/j.fitote.2014.05.022.

[10] Philipp A A, Wissenbach D K, Weber A A, et al. Metabolism studies of the kratom alkaloids mitraciliatine and isopaynantheine, diastereomers of the main alkaloids mitragynine and paynantheine, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion trap-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879 (15/16): 1049-1055.

[11] Zhao T, Zheng S S, Zhang B F, et al. Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. Food Chem, 2012, 134(2): 1096-1105.

[12] Ueng Y F, Yu H J, Lee C H, et al. Identification of the microsomal oxidation metabolites of rutaecarpine, a main active alkaloid of the medicinal herb *Evodia rutaecarpa* [J]. J Chromatogr A, 2005, 1076(1/2): 103-109.

[13] Nakazawa T, Banba K, Hata K, et al. Metabolites of hirsuteine and hirsutine, the major indole alkaloids of *Uncaria rhynchophylla*, in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(8): 1671-1677.

[14] 余俊先, 谢笑龙, 吴芹, 等. 异钩藤碱代谢产物的质谱鉴定及药理活性的探讨 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(1): 7-9.

[责任编辑 刘德文]