

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

陈苹苹, 赵 宁, 徐秀玲, 阮叶萍, 魏颖慧, 李范珠*

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 研究新乌头碱在大鼠尿液中的主要代谢产物。大鼠灌胃给予新乌头碱, 连续收集尿液 24 h, 尿液经固相萃取法富集纯化后, 以液相色谱-电喷雾多级串联质谱法分析尿液中新乌头碱的代谢产物。在大鼠尿液中发现了新乌头碱原形药物和 5 个代谢产物, 分别推测为新乌头次碱葡萄糖醛酸结合物、10-羟基新乌头碱、1-*O*-去甲基新乌头碱、去氧新乌头碱、新乌头次碱。在新乌头碱的 5 个代谢产物中, 新乌头次碱葡萄糖醛酸结合物 (m/z 766) 为首次发现新的新乌头碱在大鼠体内的 II 相代谢产物, 揭示了新乌头碱在大鼠体内代谢新途径。

关键词: 新乌头碱; 代谢产物; 液相色谱-电喷雾串联质谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 08-1043-05

Analysis on the metabolites of mesaconitine in the rat urine by liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry

CHEN Ping-ping, ZHAO Ning, XU Xiu-ling, RUAN Ye-ping, WEI Ying-hui, LI Fan-zhu*

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: The mesaconitine and its major metabolites in the rat urine were identified by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. The rat urine was collected for consecutive 24 hours from the rat following intragastric infusion of mesaconitine, subsequently which were enriched and purified using solid phase extraction. The metabolites of mesaconitine in the rat urine were analyzed by the liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. It is shown that the parent drug mesaconitine and its metabolites were found in the rat urine, such as hypo-mesaconitine glucuronic acid conjugate, 10-hydroxy-mesaconitine, 1-*O*-demethyl mesaconitine, deoxy-mesaconitine and hypo-mesaconitine. Among the five of metabolites, the hypo-mesaconitine glucuronic acid conjugate (m/z 766) was first discovered as the aconitine in rats phase II metabolites, which revealed a new way of mesaconitine metabolism in rats.

Key words: mesaconitine; metabolite; liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry

新乌头碱 (图 1) 在附子中的含量较高, 附子及含附子的中药复方在临床应用广泛^[1]。新乌头碱既是附子的主要有效活性成分同时也是毒性成分, 且毒性极强, 治疗量与致死量接近^[2]。本文采用液相色谱-串联质谱法对大鼠灌胃给予新乌头碱后尿液中的代

谢产物进行分析, 以研究新乌头碱的体内代谢过程, 该研究对于阐明乌头类生物碱在体内的代谢途径及规律具有重要意义。

材料与amp;方法

药品与试剂 新乌头碱购自中国药品生物制品检定所 (批号 110799-200404); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Merck 公司); 超纯水。

实验动物 Sprague-Dawley 大鼠 10 只, 雌雄各

收稿日期: 2010-02-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (90409012); 浙江省自然科学基金资助项目 (R207722).

*通讯作者 Tel: 86-571-86633030, E-mail: lifanzhu@zjtcem.cn

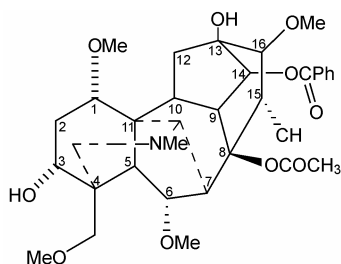


Figure 1 Structure of mesaconitine

半, 体重 (320 ± 20) g, 由浙江中医药大学动物实验研究中心提供 (合格证号 SCXK 沪 2007-0005); 所有动物实验均按照浙江大学动物饲养和使用指南进行。

实验仪器 Finnigan LCQ 离子阱质谱仪 (美国 ThermoFisher Scientific 公司), 配有电喷雾电离源 (ESI); Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Oasis MCX 固相萃取柱 (美国 Waters 公司); 纯水器 (美国 Millipore 公司)。

实验方法

尿液采集与处理 SD 大鼠 10 只, 禁食 12 h (自由饮水), 随机分为实验组和空白组, 实验组灌胃给予新乌头碱 1 mg·kg⁻¹, 空白组为生理盐水, 给药完毕后两组连续收集尿液 24 h。尿液经滤纸和 0.45 μm 微孔滤膜过滤后固相萃取。Oasis MCX 固相萃取柱经甲醇、水各 6 mL 活化后, 上样 (尿液 4 mL), 用 0.1 mol·L⁻¹ HCl、甲醇溶液 1 mL 淋洗杂质, 然后以 70% 甲醇溶液 (含 5% 氨水) 4 mL 洗脱生物碱。洗脱液用 N₂ 吹干, 复溶于甲醇溶液 100 μL 中, 待测。

HPLC 条件 色谱柱: Agilent Zorbax Extend-C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm ID, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (0.1% 氨水); 二元梯度洗脱: 0~25 min (35 : 65 → 90 : 10), 平衡 5 min; 检测波长 237 nm; 流速: 200 μL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

质谱检测条件 正离子模式: ESI 离子源, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 000, 离子源喷射电压 5.00 kV; 毛细管温度 300 °C; 毛细管电压 8.93 V; 鞘气 (N₂) 流量: 31.54 L·min⁻¹; 辅助气 (N₂) 流量 9.18 L·min⁻¹; 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 MS²) 及三级质谱 (Full scan MS³) 方式进行检测。

结果

1 新乌头碱在大鼠尿液中的主要代谢产物

将空白和给药大鼠尿液的总离子流图进行对比, 发现新乌头碱原形药物 (M₀) 及其 5 个可能的代谢

产物, 其质荷比及保留时间分别为: *m/z* 632 (*t_R* = 14.37 min)、*m/z* 766 (*t_R* = 14.17 min, M₁)、*m/z* 648 (*t_R* = 11.55 min, M₂)、*m/z* 618 (*t_R* = 11.45 min, M₃)、*m/z* 616 (*t_R* = 10.15 min, M₄)、*m/z* 590 (*t_R* = 11.23 min, M₅), 并经二级、三级串联质谱分析和有关文献^[3-8]推测了其化学结构。

2 大鼠尿液中的新乌头碱原形药物和 5 个代谢产物

2.1 新乌头碱原形药物 M₀ 准分子离子峰 *m/z* 632 的化合物, 与新乌头碱的[M+H]⁺一致, 经多级质谱检测到 *m/z* 572、*m/z* 540 和 *m/z* 512 等主要碎片离子, 分别为 *m/z* 632 的化合物先后失去醋酸、同时脱醋酸与甲醇以及同时脱醋酸, 甲醇和羰基中性分子所形成的碎片离子 (表 1), 与新乌头碱对照品的质谱断裂特征规律 (表 2) 相同, 因此推测为原形药物。

Table 1 MSⁿ data of metabolites of mesaconitine

[M+H] ⁺	<i>t_R</i> /min	MS ²	MS ³
632	14.37	572 (-AcOH)	512 (-CH ₃ OH,-CO)
766	14.17	572 (-C ₆ H ₁₂ O ₆ ,-H ₂ O)	512 (-CH ₃ OH,-CO)
648	11.55	588 (-AcOH)	570 (-H ₂ O)
618	11.45	558 (-AcOH)	526 (-CH ₃ OH)
616	10.15	556 (-AcOH)	540 (-O)
590	11.23	540 (-CH ₃ OH,-H ₂ O)	508 (-CH ₃ OH)

Table 2 MS² and MS³ data of mesaconitine standard substance

Fragment ion	MS ²	MS ³
M+H	632	572
M+H-H ₂ O	614	554
M+H-CH ₃ OH	600	540
M+H-CH ₃ OH-H ₂ O	582	522
M+H-AcOH	572 (100)	-
M+H-AcOH-H ₂ O	554	-
M+H-AcOH-CH ₃ OH	540	-
M+H-AcOH-CH ₃ OH-H ₂ O	522	-
M+H-AcOH-CH ₃ OH-CO	512	-
M+H-AcOH-2CH ₃ OH	508	-
M+H-AcOH-2CH ₃ OH-H ₂ O	490	-
M+H-AcOH-2CH ₃ OH-CO	480	-
M+H-CH ₃ OH-CO	-	512 (100)
M+H-2CH ₃ OH	-	508
M+H-2CH ₃ OH-H ₂ O	-	490
M+H-2CH ₃ OH-CO	-	480
M+H-2CH ₃ OH-CO-H ₂ O	-	462
M+H-3CH ₃ OH-H ₂ O	-	457
M+H-3CH ₃ OH-CO	-	-
M+H-CH ₃ OH-BzOH	-	418
M+H-3CH ₃ OH-BzOH	-	354

2.2 代谢产物 M₁ 准分子离子峰 m/z 766 的化合物, 与新乌头碱 (m/z 590) 的 $[M+H]^+$ 相差 176, 经多级质谱检测到 m/z 572、 m/z 512 等主要离子碎片 (图 2), 其质谱断裂特征规律与新乌头碱相似, 根据电子效应和空间位阻^[4], 因此推测是以新乌头碱为母核, 最易在发生 C₈ 位的酯键水解后通过羟基与葡糖醛酸结合而形成的新乌头次碱葡糖醛酸结合物。

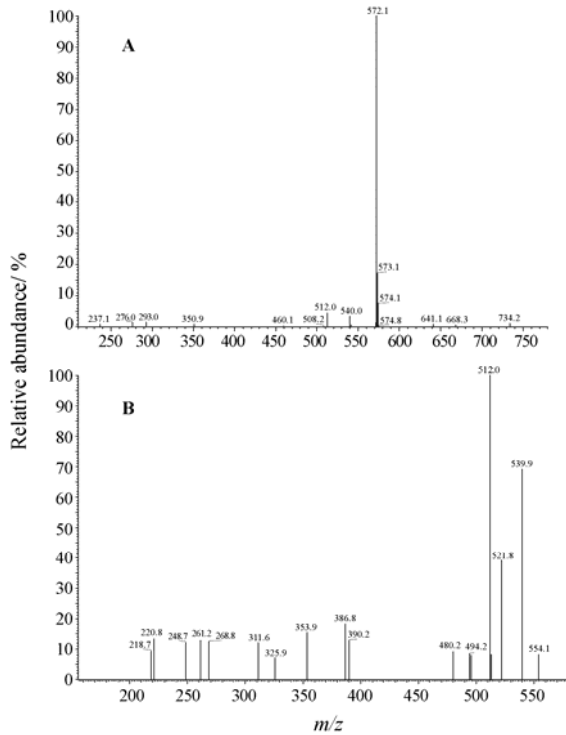


Figure 2 MS² (A) and MS³ (B) of m/z 766

2.3 代谢产物 M₂ 准分子离子峰 m/z 648 的化合物, 比新乌头碱 (m/z 632) 的 $[M+H]^+$ 多 16, 经多级质谱检测到 m/z 588、 m/z 570 等主要离子碎片 (图 3), 其 MS² 和 MS³ 质谱断裂规律与新乌头碱非常相似, 由于乌头类生物碱 C₁₀ 位羟基取代对其多级串联质谱规律无影响^[4], 因此推测为 10-羟基新乌头碱。

2.4 代谢产物 M₃ 准分子离子峰 m/z 618 的化合物, 与新乌头碱 (m/z 632) 的 $[M+H]^+$ 相差 14, 因此初步推测为新乌头碱的去甲基代谢物。经多级质谱检测到 m/z 558、 m/z 526、 m/z 476、 m/z 440 等主要离子碎片 (图 4)。在 MS² 中失去一分子乙酸, 形成特征峰, 因此推测为双酯型生物碱; 同时所检测到的 m/z 472、 m/z 470、 m/z 438 等离子碎片, 说明其在 C₆、C₁₆ 位存在甲氧基取代, 又根据乌头碱甲氧基结合能的计算以 C₁ 位的甲基最易失去^[5], 所以推测所去掉的甲基应来源于 C₁ 位的甲氧基, 因此推测为 1-O-去甲基新

乌头碱。

2.5 代谢产物 M₄ 准分子离子峰 m/z 616 的化合物, 比新乌头碱 (m/z 632) 的 $[M+H]^+$ 少 16, 经多级质谱

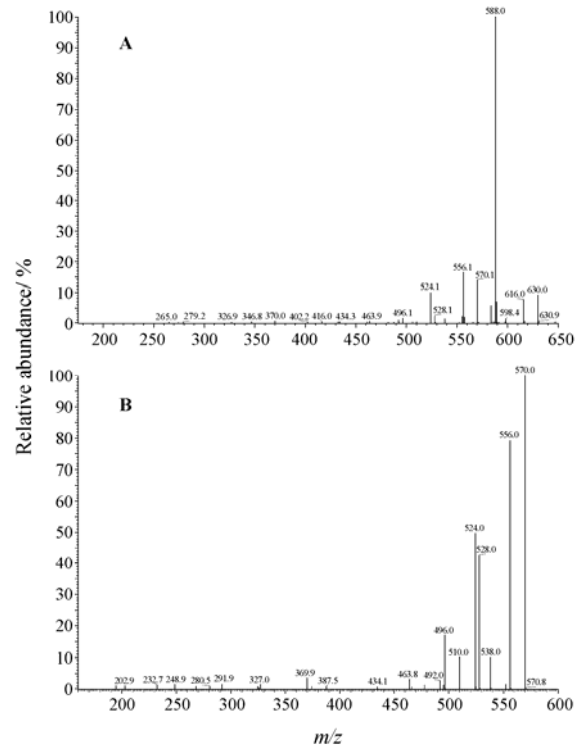


Figure 3 MS² (A) and MS³ (B) of m/z 648

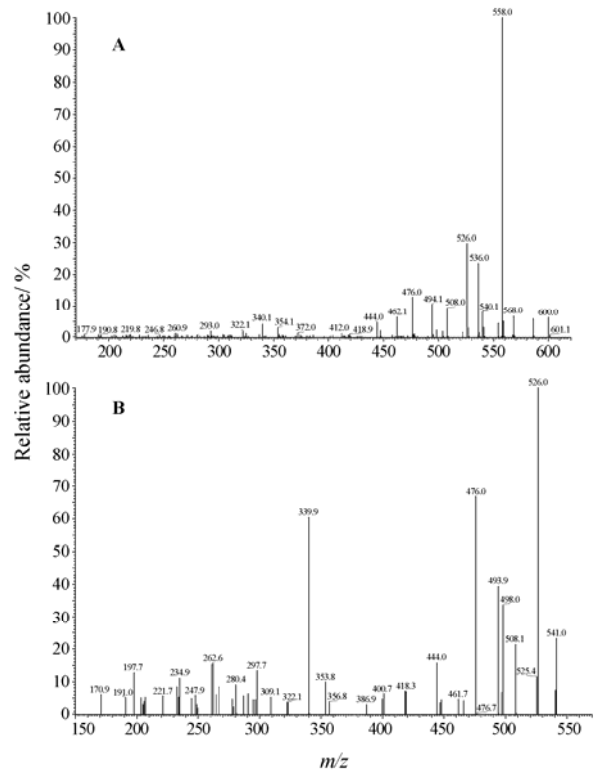


Figure 4 MS² (A) and MS³ (B) of m/z 618

检测到 m/z 556、 m/z 540 等主要离子碎片 (图 5), 在 MS^2 中失去一分子乙酸, 形成特征峰, 因此推测为双酯型生物碱, 其质谱行为与文献中报道的双酯型生物碱^[6]的质谱行为相一致, 推测为去氧新乌头碱。

2.6 代谢产物 M_5 准分子离子峰 m/z 590 的化合物, 比新乌头碱 (m/z 632) 的 $[M+H]^+$ 少 42, 在 MS^2 中特征峰为 m/z 540, 因此推测为单酯型生物碱, MS^2 中特征峰为 m/z 508 (图 6), 其质谱行为与文献中报道的单酯型生物碱^[7]的质谱行为相一致, 推测为 C_8 位酯键水解之后形成的新乌头次碱。

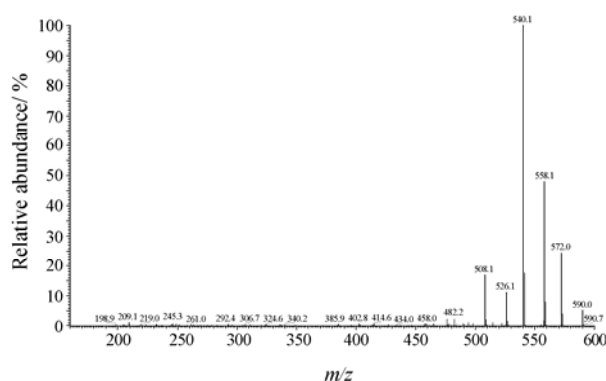


Figure 6 MS^2 of m/z 590

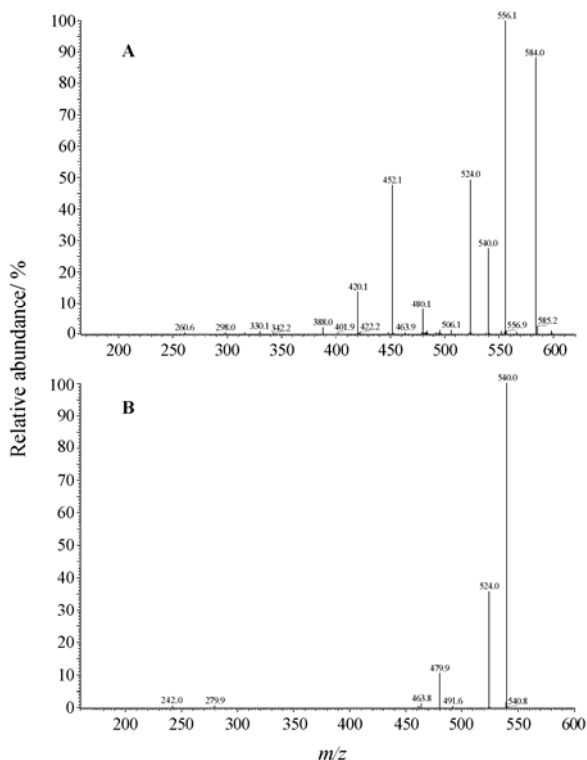


Figure 5 MS^2 (A) and MS^3 (B) of m/z 616

3 新乌头碱的代谢途径

新乌头碱及其代谢产物的结构及其代谢途径如图 7 所示。

讨论

5 个代谢产物的质谱裂解规律相似, 均易脱去甲醇和水等中性分子。 C_8 位酯键水解后的代谢产物做二级扫描时均失去甲醇和水^[8], 而 C_8 位酯键未水解的代谢产物, 在二级扫描时, 以失去乙酸为主, 几乎不失水^[7], 故推测 C_8 位酯键水解后的代谢产物在二级扫描中丢失的水来源于新乌头碱结构中形成的 C_8 位酯键水解后形成的羟基。新乌头碱在二级扫描时, 主要是去乙酸, 也有失水峰的出现^[9], 因此推测二级扫描过程中丢失的 H_2O 来自 C_3 位的羟基。

文献^[10]报道新乌头碱在兔体内代谢迅速, 但本实验在大鼠尿液中仍检测到了新乌头碱的原形药物, 结果说明新乌头碱在大鼠体内 24 h 并没有代谢完全, 同时也表明了新乌头碱在代谢转化中有着明显的种属差异, 代谢转化过程复杂。因此尚需进一步考察新

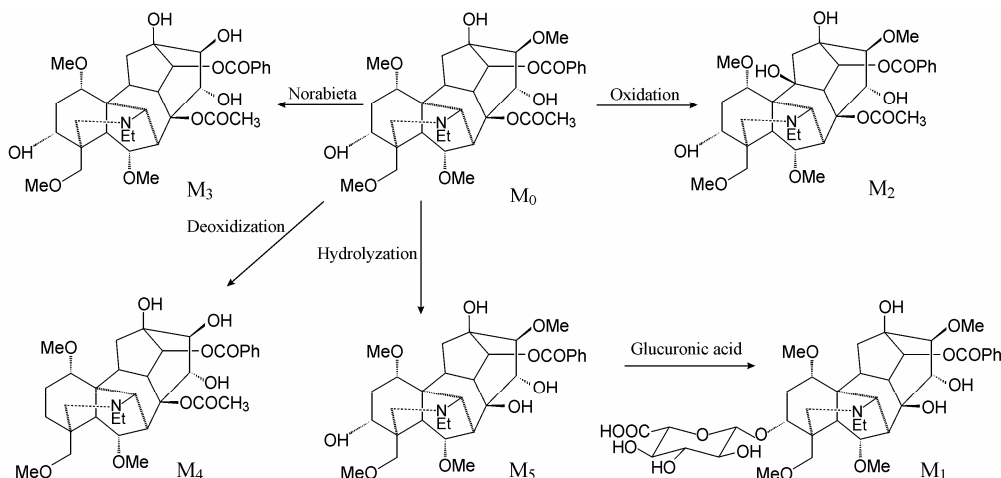


Figure 7 Possible metabolic process of mesaconitine in rats

乌头碱在人体内的代谢转化情况, 以便新乌头碱的临床合理应用和深入开发。

经过检测分析, 首次发现的新乌头次碱葡萄糖醛酸结合物 (m/z 766) 是给予新乌头碱后大鼠体内的 II 相代谢物, 揭示了新乌头碱在大鼠体内代谢可能的新途径。对于此化合物的推测是结合文献^[4]而得出的结论, 根据其推断结果该化合物的三级质谱碎片裂解规律应该与新乌头次碱的二级碎片裂解规律相同, 而新乌头次碱 (m/z 590) 的主要碎片离子中未找到 m/z 572、 m/z 512, 这可能是由于一个化合物在结合了某个基团之后, 裂解规律发生了某些变化, 因此需要进一步用实验去验证。

致谢: 上海中医药大学中药研究所王峥涛教授给予支持和帮助!

References

- [1] Liu F, Yu XH, Li F, et al. Determination of three kind of diester diterpenoid alkaloids (DDAs) in *Aconitum carmichaeli* and its processed products by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 1160–1162.
- [2] Wang R, Liu F, Sun YK, et al. Quantitative analysis of aconitine, mesaconitine, hypaconitine in diferent Radix Aconiti Lateralis Praeparata [J]. *China J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26: 1361–1363.
- [3] Xu QX, Wang Y, Liu ZQ, et al. Analysis of norditerpenoid alkaloids in roots of *aconitum kusnezoffii* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2005, 26: 638–641.
- [4] Zhang HG. *Metabolites of Poisonous Aconitum Alkaloids* (毒性乌头类生物碱代谢产物研究) [D]. Changchun: Jilin University, 2002.
- [5] Zhao YF, Song FR, Hao yue, et al. Studies on the biotransformation of 16-*O*-demethyldeoxyaconitine of the metabolite of aconitine in human intestinal bacteria [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学): 2007, 12: 1711–1715.
- [6] Zhao YF, Song FR, Wang XY, et al. Studies on the biotransformation of 16-*O*-demethylaconitine and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2008, 66: 525–530.
- [7] Wu W, Liang ZT, Zhao ZZ, et al. Alkaloid profiling in crude and processed *Strychnos nux-vomica* seeds by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrum [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 430–436.
- [8] Yue H, Pi ZF, Song FR, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSn [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1800–1807.
- [9] Zhao YF, Song FR, Yue H, et al. Biotransformation of deoxyaconitine of metabolite of aconitine by human intestinal bacteria and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2007, 28: 2051–2055.
- [10] Zhang GH, Teng K, Liu YG, et al. Study on the metabolites of mesaconitine in rabbit urine by LC-MSⁿ [J]. *China J Forensic Med* (中国法医学杂志), 2007, 22: 401–404.