

LC/MS分析大鼠体内氧化苦参碱及其主要代谢物

陈 勇^{*}, 陈怀侠, 杜 鹏, 韩凤梅

(湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 目的 研究氧化苦参碱在大鼠体内的主要代谢产物。方法 以氧化苦参碱和苦参碱为对象优化液相色谱/电喷雾离子阱质谱(LC/ESI-ITMSⁿ)实验条件,分析总结其电喷雾质谱的一级电离规律和二级质谱裂解规律,作为氧化苦参碱大鼠体内代谢物结构分析的依据。健康大鼠腹腔肌注 40 mg·kg⁻¹氧化苦参碱,收集 0~24 h的尿样,尿样中的代谢物经 C₁₈小柱进行富集与纯化后,在优化的 LC/ESI-ITMSⁿ条件下进样分析。代谢物的结构推导主要依据代谢物的色谱保留时间及其电喷雾离子阱质谱(ESI-ITMSⁿ)电离规律。结果 在大鼠尿样中有原药及其 6种 I相氧化及还原代谢产物,且主要代谢物为苦参碱。未发现 II相代谢物。结论 本法不仅操作简便、快速,而且灵敏度高、专属性强。该分析技术是研究药物代谢最有效的方法之一。

关键词: LC/ESI-ITMSⁿ; 氧化苦参碱; 代谢物

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)08 - 0740 - 06

HPLC-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry analysis of oxymatrine and its metabolites in rat urine

CHEN Yong^{*}, CHEN Huai-xia, DU Peng, HAN Feng-mei

(Hubei Province Key Lab of Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: **Aim** To identify the main metabolites of oxymatrine (OMT) in rats. **Methods** To optimize the conditions of LC/ESI-ITMSⁿ chromatograms and spectra by oxymatrine and matrine (MT), and summarize their ionization and cleavage rules in ESIMS, then serving as the basis for the metabolite analyses of oxymatrine in rats. To collect the 0-24 h urine samples of the rats after ip 40 mg·kg⁻¹ oxymatrine, the samples were enriched and purified through C₁₈ solid-phase extraction cartridge. The purified samples were analyzed by LC/ESI-ITMS. The structures of OMT metabolites were identified according to their retention times and ESI-ITMSⁿ rules. **Results** Six phase I metabolites and the parent drug OMT were found in the rat urine, and the main metabolite was MT. No phase II metabolites were found. **Conclusion** The developed LC/ESI-ITMSⁿ methods to identify the metabolites of oxymatrine in rats is not only simple and rapid but also sensitive and specific. This technology is one of the most efficient methods for the analysis of drug metabolites.

Key words: LC/ESI-ITMSⁿ; oxymatrine; metabolite

药物在生物体内的代谢物含量很小,不易分离制备获取纯品,且代谢物结构较复杂,通过化学合成

获得代谢物亦很困难,因而药物在生物体内的代谢物研究受到很大限制。电喷雾离子阱质谱(ESI-ITMS)是近年来迅速发展的一种软电离质谱,特别适用于极性大、热不稳定化合物的结构分析,具有灵敏度高、特异性强及多级质谱(MSⁿ)等技术特点,可直接用于混合物中微量或痕量成分的定性分析。LC/ESI-ITMSⁿ技术集色谱分离与质谱定性检测能力

收稿日期: 2004-10-29.

基金项目: 湖北省杰出青年基金资助项目(2002AC004); 湖北省中药生物技术重点实验室开放基金资助项目(2004CTM001).

^{*} 通讯作者 Tel / Fax 86 - 27 - 88663590,
E-mail: cy101610@npc.gov.cn

于一体,不仅可将复杂混合物一一分开,而且对分离物不需要较复杂的衍生化等前处理即可直接获得被测物的分子结构信息,从而可在无对照品的情况下对未知物进行定性分析,已成为药物代谢物研究的首选方法之一^[1-3]。

氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT)是从豆科槐属植物苦豆子 (*Sophora dopecuroides* L.)、苦参 (*Sophora flavescens* Ait.)和山豆根 (*Radix sophorae subprostratae*)等植物中提取分离得到的一种喹诺里西啶类生物碱。现代药理学研究表明氧化苦参碱具有抗心率失常、抗炎、保肝、抗肿瘤免疫调节等作用^[4,5]。有文献^[6-9]对氧化苦参碱在兔体、人体中的药代动力学进行了研究;离体实验表明,氧化苦参碱可被人肠内菌代谢成为苦参碱 (matrine, MT)^[10],但氧化苦参碱在生物体内的代谢转化研究未见报道。本文应用 LC/ESI-ITMSⁿ技术研究了氧化苦参碱在大鼠体内的代谢物,为进一步研究氧化苦参碱的生物体内作用过程提供了一定的科学依据。

材料与方 法

仪器与试剂 美国 Finnigan公司 LCQ 离子阱型质谱仪 (LC/ESI-ITMSⁿ),包括 ESI(电喷雾电离)源, TSP P 4000泵及 TSP AS 3000自动进样器; Highchem公司 Mass Frontier 1.0质谱解析软件。

苦参碱、氧化苦参碱对照品购于中国药品生物制品检定所(含量测定用),苦参素注射液(山东新华制药股份有限公司,生产批号:0212006)。甲醇(色谱纯)为美国 Fisher公司产品;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

氧化苦参碱和苦参碱溶液由其对照品配制,质量浓度分别为 1.0 mg·mL⁻¹甲醇溶液,用甲醇稀释 1 倍后直接进样分析。

实验动物 Wistar大鼠 (200 ~ 250 g),购于湖北省实验动物研究中心,合格证: SCXK(鄂) 2003-2005。

尿样预处理 取健康大鼠 6 只置于代谢笼中,禁食 12 h,收集空白尿样。腹腔肌注 OMT 40 mg·kg⁻¹后,收集 0 ~ 24 h 尿样,置于 -70 °C 保存备用。测试前,先将空白尿样及给药后的尿样融化,离心并取上清液 1 mL;再经 C₁₈小柱萃取(蒸馏水 2 mL 洗去杂质之后,1 mL 甲醇洗脱),收集洗脱液,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液用于 HPLC-MS/MS 分析。

色谱条件 Aichrom ReliAsil C₁₈ 不锈钢色谱柱 (150 mm × 2 mm ID, 5 μm),甲醇 - 0.01% 三乙胺水

溶液流动相 (60:40), 0.2 mL·min⁻¹ 流速,室温洗脱,进样量 20 μL。

质谱条件 ESI 离子源,扫描范围 100 ~ 1 000 *m/z*,离子源喷射电压 4.5 kV,毛细管电压 45 V,毛细管温度 200 °C,鞘气 (N₂) 流速 40 个单位。自动进样器直接进样,正离子方式检测: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)等方式进行测定。

结 果

1 氧化苦参碱和苦参碱的 HPLC-MSⁿ分析

氧化苦参碱和苦参碱经 HPLC-MS/MS 检测,最低检测限均在 5 pg 以下。氧化苦参碱一级质谱以 *m/z* 529 [2M + H]⁺ 为基峰,同时出现较强峰 *m/z* 265 [M + H]⁺ 以及很弱的聚合体加合离子峰 *m/z* 551 [2M + Na]⁺, *m/z* 815 [3M + Na]⁺; S-CID 后上述聚合体加合离子峰消失,说明氧化苦参碱在电喷雾电离条件下易聚合且聚合体更易加合 Na⁺。苦参碱一级全扫描质谱以 *m/z* 519 [2M + Na]⁺ 为基峰,同时出现强峰 *m/z* 249 [M + H]⁺, 较强峰 *m/z* 497 [2M + H]⁺, *m/z* 767 [3M + Na]⁺ 和极弱峰 *m/z* 271 [M + Na]⁺, *m/z* 287 [M + K]⁺, *m/z* 535 [2M + K]⁺ 等; S-CID 后聚合体加合离子峰消失,说明苦参碱易聚合,且随聚合度增大,其与 Na 的加合性增强。在流动相中加入 0.01 mol·L⁻¹ HAc 或 NH₄Ac,一级质谱全扫描时氧化苦参碱和苦参碱的基峰均为其准分子离子峰 [M + H]⁺, 聚合体加合离子峰减弱,且三聚体加合离子峰减弱最明显。这是因为流动相中加入 HAc 时,溶液酸度增加,分子更易质子化;加入 NH₄Ac 时,尽管分子不易加合 NH₄⁺,但 NH₄⁺ 能够提供质子,分子质子化程度增强,聚合能力相对下降。

为进一步了解其二级质谱裂解规律,本文采用离子阱技术对苦参碱和氧化苦参碱准分子离子 *m/z* 249 和 *m/z* 265 进行多级质谱分析,两者的 LC-MS/MS 总离子流色谱及其二级全扫描质谱见图 1。结果发现苦参碱保留时间为 10.82 min (图 1B-1),其二级质谱特征碎片有 *m/z* 247 ([M + H - 2H]⁺), 231 ([M + H - H₂O]⁺) 及各环逐渐裂解的产物 *m/z* 176, 150, 148, 138, 112 和 98,其中以具有共轭结构的碎片离子 *m/z* 148 为基峰 (图 1B-2),在 *m/z* 247, 231 的三级质谱中均产生 *m/z* 150, 148, 因此, *m/z* 150, 148 是该化合物的特征裂解碎片。氧化苦参碱的保

留时间为 4.40 min(图 1A-1),其二级质谱中 m/z 248($[M+H-OH]^+$)较强, m/z 247($[M+H-H_2O]^+$)为基峰(图 1A-2),其中 m/z 248的三级质谱和苦参碱的二级质谱不同,而是和苦参碱的电子轰击质谱相似^[11],即 m/z 248为氧化苦参碱准分子离子(m/z 265) N原子上的 O离去,同时失去氧化苦参碱分子加合的 H而产生的正离子;而氧化苦参碱分子失去 N原子上的 O及其加合的 H之后,与 N相邻的碳原子上的 H离去,即失去一分子水而产生稳定的具有双键结构的季铵离子 m/z 247。总结文献[11]和 OMT的ESI-MS²质谱图谱特征可知, $[M+H-17]^+$ 及 $[M+H-18]^+$ 为含有 N氧化结构的氧化苦参碱分子电喷雾质谱的特征裂解。氧化苦参碱二级质谱的其他碎片离子及其峰相对强度和苦参碱相似,说明两者具有相同的裂解方式。氧化苦参碱和苦参碱的质谱裂解规律是氧化苦参碱生物体内代谢物结构分析的依据。

2 尿样中 OMT及其代谢物的 HPLC-MSⁿ分析

依据药物的生物体内代谢规律^[12]对 OMT在生物体内的可能代谢物结构进行推测。和空白尿样相比较,以正离子方式检测,寻找原药物可能的 I相及 II相代谢物,然后进行这些可能代谢物的多级质谱

分析以阐述其结构,负离子方式可以验证 II相代谢物。结果正、负离子扫描质谱图中均没有发现 II相代谢物。本文以 OMT和 MT的质谱特征裂解为依据,对 OMT及其 I相代谢物结构进行了分析。

图 2是空白尿样及大鼠腹腔注射氧化苦参碱后的尿样一级全扫描质谱图。

显然,与空白尿样(图 2A)相比,在服药后的大鼠尿样(图 2B)的一级全扫描质谱中发现了与母药有关的组分: m/z 243, 247, 249, 265和 281。各组分的色谱及二级质谱见图 3和图 4,其中 m/z 265(M_0)的保留时间(4.56 min,图 3D)及二级质谱(图 4D)和原药 OMT对应的图 1A相同,说明 m/z 265是 OMT的准分子离子。 m/z 249(M_5)的保留时间(10.82 min,图 3C)和二级质谱(图 4C)和 MT对应的谱图 1B完全相同,说明氧化苦参碱分子中 N→O基上的 O原子在大鼠体内被还原离去。尿样采集时间研究表明:在 0~7.5 h内 m/z 265是基峰, m/z 249丰度则随采尿时间延长逐渐增强;7.5~24 h内 m/z 249为基峰, m/z 265逐渐减弱,且 m/z 249比其他代谢物的分子离子峰强很多,说明 OMT在大鼠体内的主要代谢物为 MT。

m/z 243(M_1 , 保留时间为 2.85 min,图 3A)及

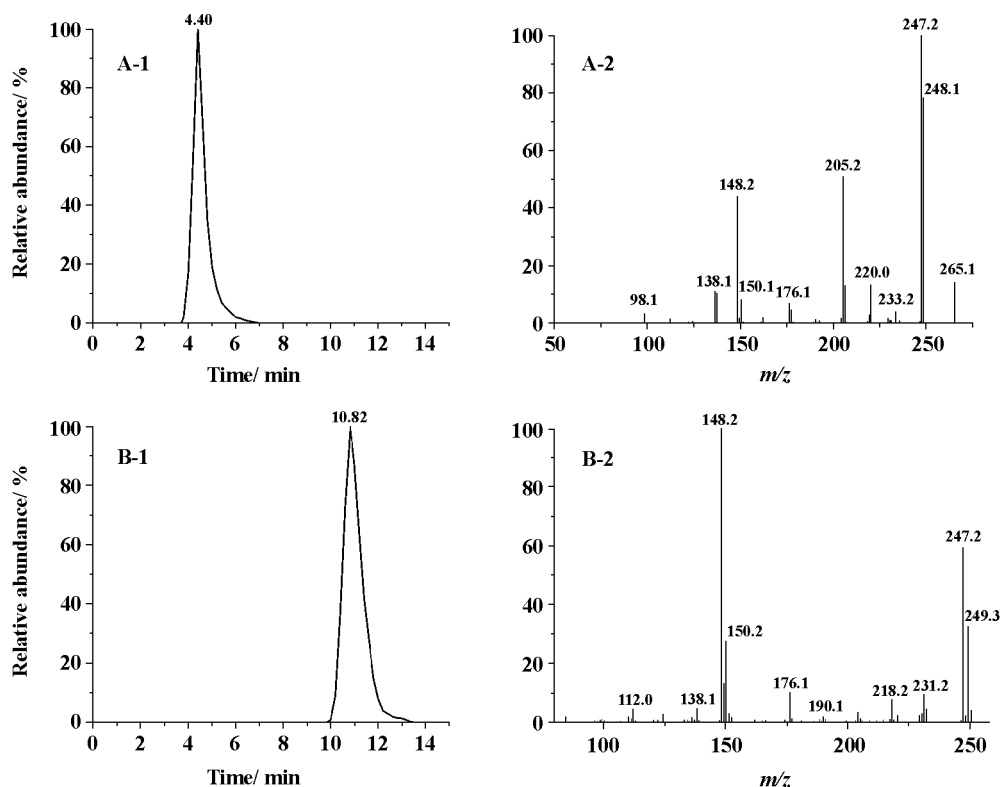


Figure 1 LC-MS² total ion chromatograms (1) and fullscan mass spectra (2) of OMT (oxymatrine, A) and MT (matrine, B)

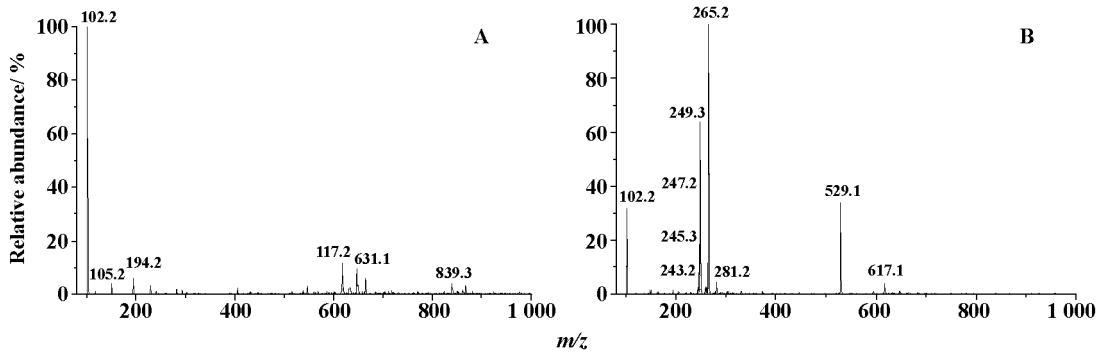


Figure 2 Full scan MS spectra of blank rat urine (A) and rat urine after injecting 40 mg·kg⁻¹ OMT (B)

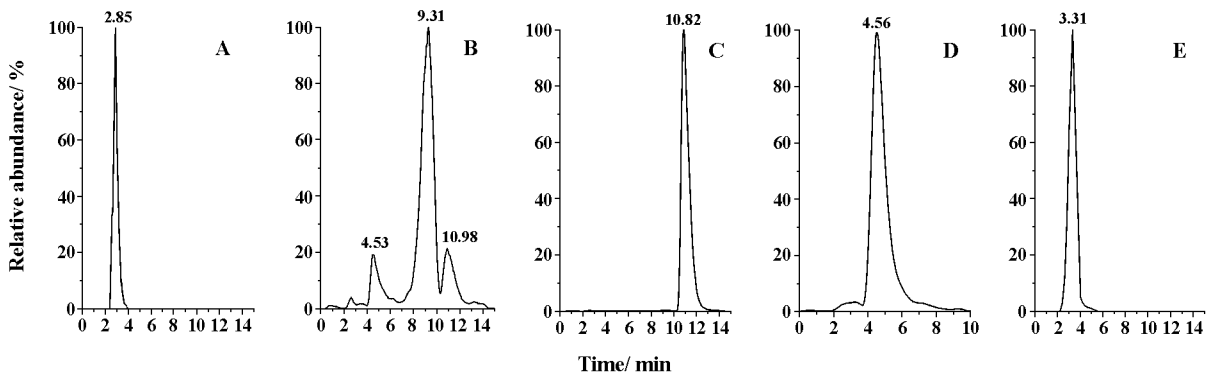


Figure 3 LC-MS² chromatograms of OMT and its metabolites in rat urine. A: m/z 243 (M1); B: m/z 247 (M2-M4); C: m/z 249 (M5); D: m/z 265 (M0); E: m/z 281 (M6)

其二级质谱碎片 m/z 225 和 215 分别比 MT 的 m/z 249 及其二级碎片 m/z 231 和 221 少 6 Da, 推测 m/z 243 应为 m/z 249 组分脱氢而具有 3 个碳碳双键的产物。而 m/z 243 的其他二级碎片 m/z 186, 172 和 146 又分别比 m/z 249 的二级碎片 m/z 190, 176 和 150 少 4 Da (图 4A), 说明 m/z 243 与原药的代谢产物 MT 具有相同的碎片丢失, 而这些中性碎片应包含 m/z 243 分子结构中的一个双键。

m/z 247 比 m/z 249 少 2 Da, 其 LC-MS/MS 色谱图中出现 3 个峰, 保留时间分别为 4.53 min (M2), 9.31 min (M3) 和 10.98 min (M4), 见图 3B。各组分的二级质谱 (图 4B-1, 2, 3) 均有 OMT 和 MT 的特征碎片 m/z 150, m/z 148 (图 1A-2, 1B-2), 这表明 OMT 在大鼠体内有 3 个相对分子质量为 246 的脱氢代谢物。根据药物代谢反应的选择性, 其脱氢位置应分别在母药代谢产物苦参碱中羰基的 α 碳原子及 A 和 B 环上的叔胺 N 相邻碳原子上。仅靠 LC-MS/MS 联用方法无法将 M2, M3, M4 与 3 个色谱峰一一归属。

m/z 281 (M6, 保留时间为 3.31 min) 二级碎片中出现了一对碎片离子 m/z 264 (281-17) 和 m/z

263 (281-18) (图 4E), 而且后者比前者强度大, 这和氧化苦参碱的特征裂解一致, 说明该分子离子对应于 N 氧化物。 m/z 281 比母药 m/z 265 多 16 Da, 应为 OMT 的氧化产物。由于 OMT 分子中羰基的 α 碳原子受到了羰基的活化作用, 具有较强的氧化性, 在 CYP-450 酶系的催化下, 易发生氧化生成羟基化合物。因此, 可以推测 m/z 281 可能是 OMT 分子中羰基 α 碳原子的氧化产物。在 m/z 281 的二级质谱中, 出现了母离子失去一个水分子和两个水分子后的碎片离子 m/z 263 和 m/z 245, 也支持以上的推论。

显然, 每一种代谢物都有其与原药相关的特征 ESI-ITMS 指纹图谱, 这是液相色谱-串联质谱分析鉴定代谢物的依据。氧化苦参碱大鼠体内的代谢途径见图 5。

讨论

本文应用 HPLC-MS/MS 分析技术, 分析了 OMT 和 MT 对照品的色谱行为规律及多级质谱碎裂规律, 结果表明, 两者的特征碎片均为 m/z 148 和 m/z 150, 而且 OMT 易产生一对碎片离子 $[M+H-17]^+$ 和 $[M+H-18]^+$, 结合文献^[12] 认定这种碎片的产生

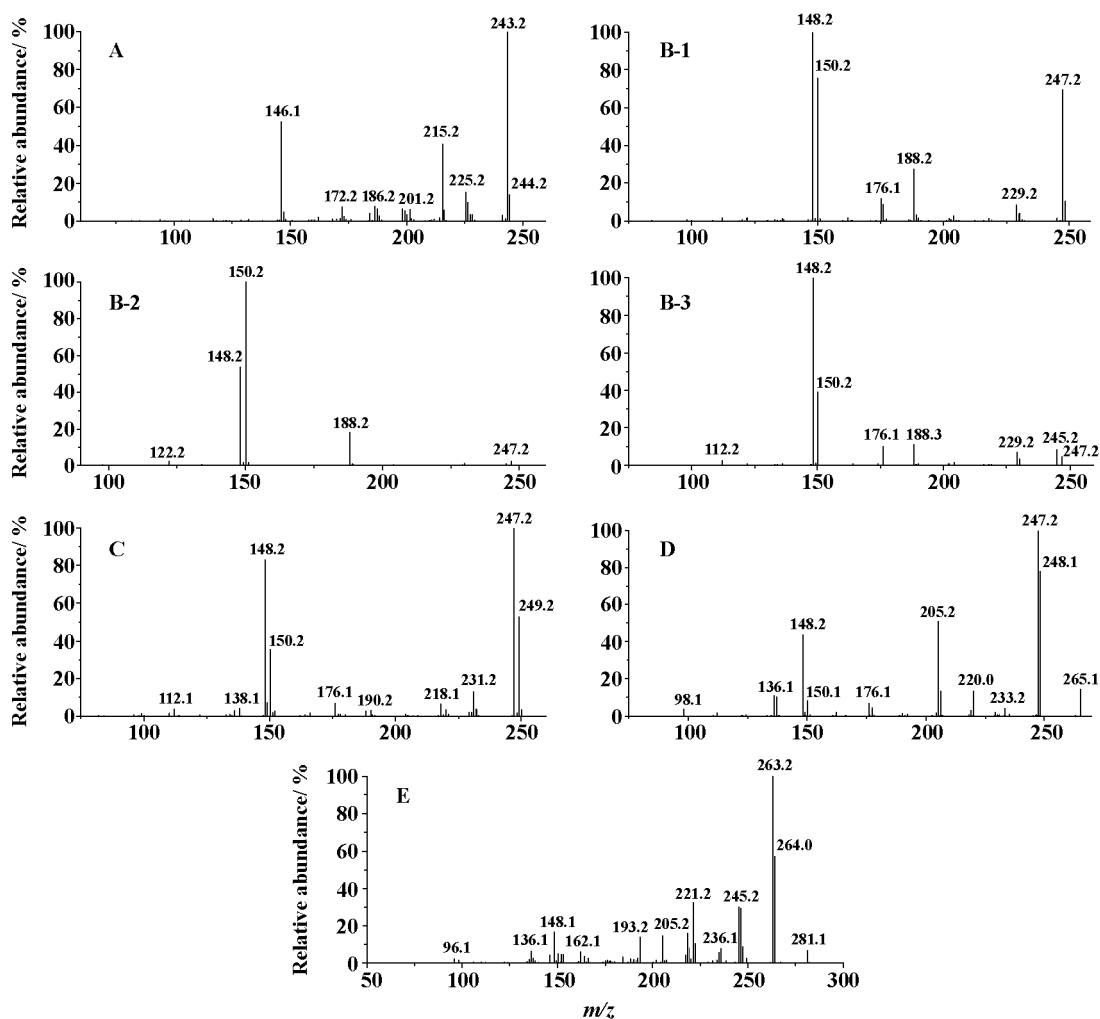


Figure 4 MS² spectra of OMT and its metabolites in rat urine. A: M1; B: M2-M4; C: M5; D: M0; E: M6

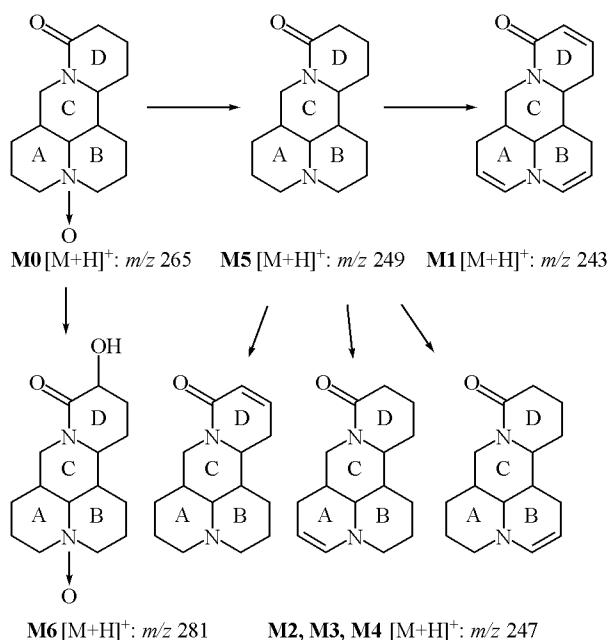


Figure 5 Proposed major metabolic pathway of OMT in rats

是具有 N 氧化结构的分子质谱碎裂特征,此特征可作为该类化合物定性分析的依据。

根据药物生物体内代谢特征结合以上 OMT 及 MT 的色谱保留时间和多级质谱碎片特征对 OMT 大鼠体内的原药及其代谢物进行了鉴定。该方法灵敏度高,专属性好,整个分析时间不超过 15 min。

References

[1] Appolpnova SA, Shpak AV, Semenov VA. Liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for analysis of mesocarb and its metabolites in human urine [J]. *J Chromatogr B*, 2004, **800**: 281 - 289.

[2] Molden E, Helen Boe G, Christensen H, et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of diltiazem and 11 of its phase I metabolites in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, **33** (2): 275 - 285.

[3] Sun Y, Zhang HG, Shi XG, et al. Study on metabolites of aconitine in rabbit urine [J]. *Acta Pharm Sin* (药

- 学报), 2002, **37**(10): 781 - 783.
- [4] Zhang W, Mo RG, Xun HZ, *et al.* Study on the constituents and separation of alkaloids from *Nei Menggu Sophom alopecuroides* [J]. *Acta Sci Nat Univ Neimenggu* (内蒙古大学学报 自然科学版), 1994, **25**(4): 661 - 664.
- [5] Na PJ, Mao XF, Chen P, *et al.* Determination of matrine and oxytrine in *Radix Sophorae Tonkinensis* by micellar capillary electrophoresis [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2003, **22**(2): 63 - 65.
- [6] Pang ZG, Wang CY, Wang BQ, *et al.* Study on pharmacokinetics of matrine and oxymatrine by MAA fluorescence quenching [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2000, **19**(5): 56 - 58.
- [7] Huang SK, Liu XD, Yang YB, *et al.* Pharmacokinetics of oxymatrine in rats [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs* (中草药), 1987, **18**(9): 18 - 20.
- [8] Fei YQ, An FA, Sun L, *et al.* Pharmacokinetics of matrine injection in healthy volunteers [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2003, **23**(1): 21 - 22.
- [9] Wang J, Li J, Kan QM, *et al.* Studies on the hemodynamics of oxymatrine [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, **17**(2): 140 - 142.
- [10] Wang ML, Zhou QL, Wang BX. Studies on metabolism of oxymatrine by human intestinal bacteria [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, **26**(4): 272 - 274.
- [11] Chong PH. *The Application of Mass Spectroscopy in the natural Organic Chemistry* (质谱学在天然有机化学中的应用) [M]. Beijing: Science Press, 1997. 406 - 407.
- [12] Zhang WS, Li AL. *Medicinal Chemistry* (药物化学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999. 42 - 44.