

编者按: 2012 年, 济宁医学院迎来了建校 60 华诞。为此, 本刊自第 1 期开辟“杰出校友学术论坛”专栏, 特邀有突出贡献的校友撰文, 以展现他们博学至善, 求索进取, 在医学研究领域取得的骄人成绩和丰硕成果, 作为献给学校 60 周年庆典的礼物, 以飨读者。

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.05.001

· 杰出校友医学学术论坛 ·

粉防己碱在大鼠体内的代谢途径研究*

谷 元 司端运

(天津药物研究院, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193)



司端运研究员, 1984 年毕业于山东医学院药学系药学专业本科, 2001 年在沈阳药科大学获得理学博士学位。曾于 1984 年-2005 年期间在济宁医学院工作, 担任济宁医学院药学系主任、教授。现任天津药物研究院研究员, 释药技术与药代动力学国家重点实验室常务副主任。主要学术兼职包括国家新药评审专家、中国药理学学会药物代谢专业委员会副主任委员、中国药学会系列期刊《药物评价研究》副主编等。

主要从事药物代谢动力学和生物药剂学研究, 近年来主持并完成国家自然科学基金课题、国家 973 课题和“十一五”、“十二五”国家科技重大专项的新药药物代谢动力学研究技术平台建设项目。2008 年被评为天津市优秀留学回国人员, 2009 年被授予天津市劳动模范光荣称号, 2010 年被评为全国优秀科技工作者。

摘 要 目的 研究双苄基异喹啉类生物碱药物粉防己碱在大鼠体内的代谢途径。**方法** 大鼠灌胃 50 mg/kg 粉防己碱后, 收集 0~24 h 尿样, 应用 UPLC-MS 法对粉防己碱在大鼠尿中的代谢产物进行鉴定, 从而进一步分析在大鼠体内的代谢产物。**结果** 在大鼠尿中共检测到 14 个可能的代谢产物, 其中 7 个代谢产物属于首次发现。主要的代谢途径包括 N-去甲基化、O-去甲基化、芳环碳羟基化、脂肪碳羟基化、N-氧化等。**结论** 粉防己碱在大鼠体内经历了广泛代谢, UPLC-MS 法具有较高的分离度以及简化的质谱图, 为粉防己碱代谢产物的鉴定提供了有效的检测手段。

关键词 粉防己碱; 代谢产物; 大鼠

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)10-306-06

Study on the metabolic pathway of tetrandrine in rats in vivo

GU Yuan, SI Duan-yun

(State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics,
Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective The objective of this study is to investigate metabolism of tetrandrine, a bis-benzylisoquinoline alkaloid isolated from the root of *Stephania tetrandra* S. Moore of the Menispermaceae, in rat urine by ul-

* [基金项目] 国家重大专项资助(2009ZX09304005, 2012ZX09506001)

tra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS). **Methods** After oral administration of 50 mg/kg tetrandrine to rat, urine samples were collected and pretreated by direct protein precipitation with methanol for UPLC-MS analysis. The structure of the metabolites was elucidated by comparing the changes of molecular masses(ΔM), retention times and MS2 spectral patterns of metabolites with those of parent drug. **Results** Fourteen metabolites were detected and characterized by UPLC-MS/MS in rat urine, and seven metabolites were found for the first time. Tetrandrine metabolites were mainly formed via two main pathways: demethylation (N-demethylation and O-demethylation) and isoquinoline ring oxidation(hydroxy-tetrandrine and oxo-tetrandrine). **Conclusion** The rapid UPLC/MS/MS is a powerful approach for detecting and identifying metabolites in complex biological matrix with high speed and sensitivity, good resolution and simplified MS spectra.

Key words: Tetrandrine; Metabolite; Rat urine

粉防己碱(Tetrandrine)是从防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)干燥块根中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱。早在 1931 年粉防己就已被发现能降低血压, 1953 年在粉防己根中提纯到多种生物碱, 其中有效成分为粉防己碱。在此后的半个世纪研究过程中, 相继发现、证明了粉防己碱具有降压、抗炎、镇痛、抗矽肺、抗纤维化等广泛的药理作用, 其中降压作用的作用机制是钙拮抗作用。临床上, 粉防己碱主要用于治疗早期轻度高血压, 亦可用于重症高血压及高血压危象等, 对实验性矽肺也有明显的治疗作用^[1-4]。但粉防己碱对机体也具有一定的肝毒性^[5]。通常药物在体内的代谢过程与药物毒性紧密相关, 而粉防己碱的代谢研究报道较少^[6]。本文采用 UPLC-MS/MS 法分析粉防己碱在大鼠尿中的代谢产物, 进一步完善粉防己碱的体内研究, 并为双苄基异喹啉类生物碱的代谢研究奠定基础。

1 实验方法

1.1 药品与试剂

粉防己碱(纯度 99.2%)购买自西安山川生物技术有限公司; 甲醇(色谱纯)购自美国 Fisher Scientific 公司; 甲酸(色谱纯)购自天津康科德科技有限公司; 其他试剂均为分析纯; 超纯水由 BM-40 型纯水制备系统制备, 电阻率 18.2 M Ω ·cm。

1.2 实验仪器

美国 Waters 公司 Waters ACQUITY TQDTM UPLC/MS/MS 型液质联用仪, 配有 Masslynx 4.1 数据处理软件。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(50 mm $\times$ 2.1 mm, i. d., 1.7 μ m); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 流动相为 A(甲醇)及 B(水, 0.1% 甲酸), 流速为 0.25 ml/min, 梯度洗脱, 在 0~5 min 内 A 的

比例由 20% 升至 45%。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)正离子模式, 毛细管电压: 3 kV, 锥孔电压: 40 V, 离子源温度: 110 $^{\circ}$ C, 去溶剂气温度: 350 $^{\circ}$ C, 去溶剂气(N₂)流速: 500 L/h, 锥孔气(N₂)流速: 30 L/h。

1.4 尿样收集

6 只 Wistar 大鼠(200 $\pm$ 10)g, 雌雄各半, 购买于中国医学科学院放射医学研究所, 实验前一周饲养于清洁的动物房中, 温度控制在(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 光暗周期为 12 h。健康大鼠分置于代谢笼中, 实验前禁食 12 h, 自由饮水, 收集空白尿。粉防己碱以 5% CMC-Na 混悬后灌胃, 剂量为 50 mg/kg。收集 0~24 h 的尿样。尿样经简单的甲醇沉淀后进行 UPLC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 粉防己碱原型的色谱、质谱行为

2.1.1 色谱行为 良好的液相分离条件可以使极性相近的化合物有不同的色谱保留时间, 改善样品的离子化程度, 增加检测的灵敏度, 同时也可以防止同分异构体在同一时间出峰, 避免质谱解析复杂化。UPLC 系统(最高操作压力可达 15 000 psi)和小粒径(<2 μ m)填料色谱柱, 与 5 μ m 填料的色谱柱相比, 可将常规 30 min 的分析时间缩短到 3.3 min 以内, 分析速度提高 9 倍, 灵敏度提高 3 倍, 分离度增加 1.7 倍^[7-8]。因此, 本文选用 UPLC 系统及 1.7 μ m 的色谱柱, 并通过调节流动相的组成、比例及洗脱梯度, 选择合理的保留时间, 使各代谢物实现较好的分离。在选定的色谱条件下, 粉防己碱原形的保留时间为 3.25 min。

2.1.2 质谱行为 多数代谢产物在结构上与原形药物很相似, 具有原药的特征质谱裂解碎片或中性丢失, 可以通过特征碎片离子、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。因此,

原形药物经碰撞诱导裂解(CID),对碎片离子进行透彻的归属研究,获得原形药物的质谱裂解规律,是应用质谱技术进行代谢产物结构确证的基础。

生物碱类化合物在 ESI 源正离子条件下很容易质子化,一级全扫描(扫描范围 m/z 100~1000)可以检测到较强的粉防己碱($C_{38}H_{42}O_6N_2$)原药的分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 623,以及 $[M+2H]^{2+}$ m/z 312。对准分子离子峰 m/z 623 进行 CID,产生丰富的特征碎片离子。

参考相关文献报道^[9],对各碎片离子解析如下: m/z 592($C_{37}H_{39}O_5N_2$, 623-COMe), m/z 580($C_{36}H_{39}O_5N_2$, 623-COMe), m/z 381($C_{22}H_{25}O_4N_2$, 双异喹啉 ABCD 环), m/z 227($C_{15}H_{15}O_2$, 双苄基 EF 环), m/z 206($C_{12}H_{16}O_2N$, 异喹啉 AB 环), m/z 204($C_{12}H_{14}O_2N$, 206-2H), m/z 192($C_{11}H_{14}O_2N$, 206-CH₂ 或异喹啉 CD), m/z 191($C_{11}H_{13}O_2N$, 192-H 或 206-CH₃), m/z 176($C_{10}H_{10}O_2N$, 192-CH₄), m/z 174($C_{11}H_{12}ON$, 192-H₂O), m/z 162($C_9H_8O_2N$, 176-CH₂) 及 m/z 146($C_{10}H_{12}N$, 174-CO)。其中丰度最强的碎片离子为 m/z 381,是双异喹啉 ABCD 环部分特征碎片离子; m/z 206、204 是单异喹啉 AB 环的特征碎片离子,而 m/z 192、191、176、174、162 及 146 是单异喹啉环 AB 或 CD 共有的特征碎片离子; m/z 227 是双苄基 EF 环的特征碎片离子。粉防己碱 MS/MS 二级全扫描质

谱图及相应的质谱断裂规律解析见图 1。

2.2 粉防己碱代谢产物结构推断

2.2.1 代谢产物寻找 应用上述 UPLC/MS 条件对给药前后的尿样进行平行分析,采用正离子一级全扫描(m/z 100~1000),共检测到 14 种可能的代谢产物,相应的提取离子色谱图见图 2。与原形药物相似,除了双脱甲基产物,其它代谢产物的一级全扫描均检测到丰度很强的 $[M+2H]^{2+}$ 分子离子峰,分别为 m/z 305、319 和 320。

2.2.2 代谢产物结构推断 原形及各代谢产物的质荷比(m/z)、保留时间(t_R)及主要的 MS/MS 碎片离子见表 1。

分析比较粉防己碱原形与各代谢产物的质谱断裂规律,并结合常规代谢反应规律,分析各个代谢产物的 CID 质谱图,分别推测其化学结构。

M0:色谱、质谱行为均与粉防己碱相同,故推断 M0 为粉防己碱原形。

M1~M3:通过对给药前后的尿样进行 MS 一级全扫描平行分析,寻找到 3 个 m/z 609 的分子离子,保留时间分别为 2.61 min(M1)、2.73 min(M2)、3.44 min(M3)。与原形相比,M1~M3 质荷比的奇偶性未发生变化,准分子离子 m/z 609 及碎片离子 m/z 578、566 均比原形 m/z 623 及相应的碎片离子 m/z 592、580 少 14 Da,推测其可能是粉防己碱的脱甲基代谢产物。

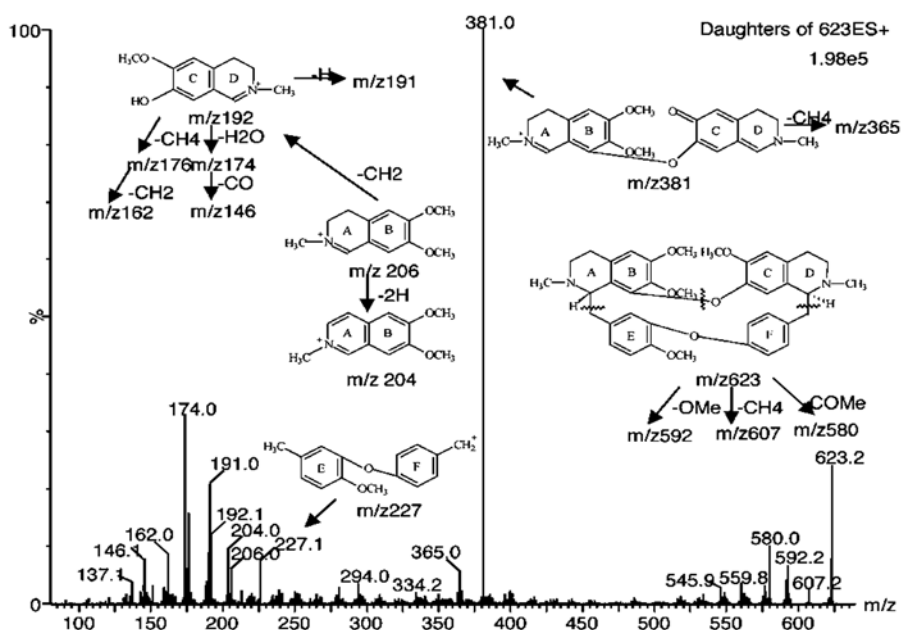


图 1 粉防己碱原形的 MS/MS(m/z 623 $\rightarrow$)CID 质谱图及其可能的裂解途径分析

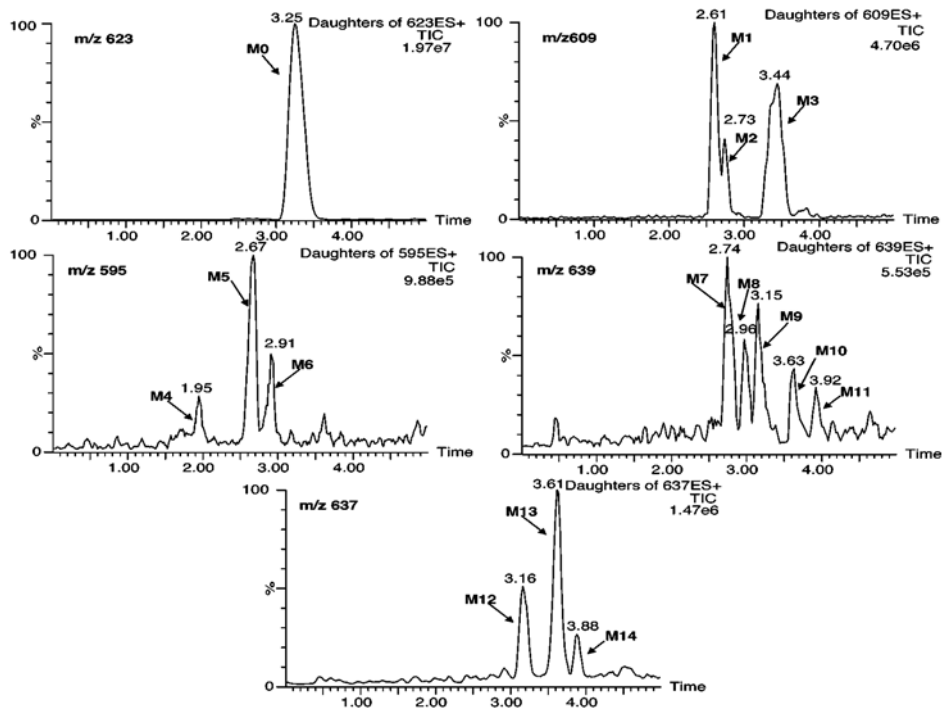


图 2 大鼠尿中粉防己碱及其代谢产物的 UPLC-MS/MS 提取总离子流色谱图

表 1 UPLC-MS/MS 鉴定出粉防己碱可能代谢产物的色谱、质谱数据

Analyte	[M+H] ⁺	t _R (min)	Daughter ions(m/z)
M0	623	3.25	592,580, 381 ,227,206,204,192,191,176,174,162,146
M1	609	2.61	578,566, 381 ,213,206,204, 192 ,191,176,174,162,146
M2	609	2.73	578,566, 367 ,227,206,204,192,191,176, 174 ,162,146
M3	609	3.44	578,566, 367 ,227,190,178,177,162,160,148,132
M4	595	1.95	564,552, 367 ,192,190,176,174,162,146
M5	595	2.67	564,552, 367 ,204, 178 ,177,174,162,160,146
M6	595	2.91	552, 353 ,194,178,177,162,160,148
M7	639	2.74	621 , 379 ,204,202,192,174,162,146
M8	639	2.96	621 , 379 ,204,202,192,174,162,146
M9	639	3.15	621 , 381 ,204,192,176,174,146
M10	639	3.63	381 ,222
M11	639	3.92	621, 367 ,222
M12	637	3.16	379 ,174,146
M13	637	3.61	379 ,190,174,172,160,144
M14	637	3.88	365 ,220

注:加重标识的为丰度最强的碎片离子

M1 丰度最强的碎片离子 m/z 381 及其他单异喹啉环特征碎片离子 m/z 206、204、192、191、176、174、162、146 均与原形药物相同,而双苄基 EF 环的特征碎片离子 m/z 227 并未出现,取而代之的是 m/z 213(227-14=213 Da)。因此,推断 M1 应该是苄基 E 环的氧脱甲基产物。M2 及 M3 丰度最强的碎片离子为 m/z 367(381-14=367

Da),双苄基 EF 环的特征碎片离子 m/z 227 未发生变化,表明去甲基位点在异喹啉 AB 环或 CD 环。其中 M2 的二级全扫描质谱图中,AB 环的特征碎片离子 m/z 206、204、192、191、176、174、162、146 与原形相同。说明 M2 可能是 D 环 N-去甲基产物。而 M3 的特征碎片离子 m/z 190、178、177、162、160、148 及 132 均比原形 AB 环的特征碎片

离子 m/z 206、204、192、191、176、174、162 及 146 少 14 Da, 表明 M3 为粉防己碱 A 环 N-脱甲基产物。

M4~M6: 通过对给药前后的尿样进行 MS 一级全扫描平行分析, 寻找到 3 个 m/z 595 的分子离子, 保留时间分别为 1.95 min (M4)、2.67 min (M5)、2.91 min (M6)。其准分子离子 m/z 595 及特征碎片离子 m/z 564、552 均比原形 m/z 623 及相应的碎片离子 m/z 592、580 少 28 Da, 推测其可能是粉防己碱的双脱甲基代谢产物。

M4 及 M5 (m/z 595 $\rightarrow$ 367) 与 M1 (m/z 609 $\rightarrow$ 381) 具有相同的中性丢失碎片 228 Da (双苄基 EF 环部分), 推断 M4 及 M5 为 M1 的 A 环或 D 环的 N-脱甲基产物。M4 的特征碎片离子 m/z 192 及 190 比 M1 的 AB 环特征碎片离子 m/z 206 及 204 少 14 Da, 而 M5 的特征碎片离子 m/z 178 及 162 比 M1 的 CD 环特征碎片离子 m/z 192 及 176 少 14 Da, 说明 M4 可能是 M1 的 A 环 N-脱甲基产物或原形 A、E 环 N、O-双脱甲基产物, M5 可能是 M1 的 D 环 N-脱甲基产物或原形 D、E 环 N、O-双脱甲基产物。M6 的特征碎片离子 m/z 353 比原形 M0 的双异喹啉 ABCD 环特征碎片离子 m/z 381 少 28 Da, 推断 M6 应该是原形的 A、D 环双 N-脱甲基产物。

M7~M11: 通过对给药前后的尿样进行 MS 一级全扫描平行分析, 寻找到 5 个 m/z 639 的分子离子, 保留时间分别为 2.74 min (M7)、2.96 min (M8)、3.15 min (M9)、3.63 min (M10)、3.92 min (M11)。M7~M11 的准分子离子 m/z 639 比原形 m/z 623 多 16 Da, 为原形的单羟基化或氧化产物。

M7 与 M8 的丰度最强的碎片离子为脱水峰 m/z 621, 表明分子中具有羟基官能团, 但未出现原形 ABCD 环特征碎片离子 m/z 381, 取而代之的是丰度较强的碎片离子 m/z 379, 该碎片离子是羟基化后的异喹啉与苄基 C—C 键断裂后, 双异喹啉环继续脱去水和甲基后形成, 因此 M7 与 M8 是 A 环或 D 环脂肪碳发生羟基化。由于 M7 与 M8 经 CID 后形成较弱的 m/z 204 及 202, 比原形相应的离子对 m/z 206 及 204 少 2 Da, 是 AB 异喹啉环羟基化后脱水形成的, 而 CD 异喹啉环的主要特征碎片离子 m/z 192、174、162、146 均未发生改变, 故推测 M7 与 M8 的羟基化位点在 A 环。

M9 具有较强的脱水峰 m/z 621, 表明分子中具有羟基官能团, 双异喹啉 ABCD 环特征碎片离

子 m/z 381、及单异喹啉环 AB 或 CD 的特征碎片离子 m/z 204、192、176、174、146 均未改变, 推测其为苄基 E 或 F 发生羟基化。

M10 未形成脱水峰 m/z 621, 其特征碎片离子 m/z 222 比原形 AB 异喹啉环特征碎片离子 m/z 206 多 16 Da, 碎片离子 m/z 381 是 N-氧化后的异喹啉与苄基 C—C 键断裂后, 双异喹啉环继续脱去甲氧基后形成的, 且其保留时间为 3.63 min, 在反向色谱柱上的保留强于原形药物 3.25 min。一般 N-氧化合物具有与羟基化反应相同的质荷比, 但其保留强于原形, 因此, 推测 M10 可能为粉防己碱 A 环部分的 N-氧化物。

M11 具有脱水峰 m/z 621, 但没有 M7 和 M8 更容易形成脱水峰, 碎片离子 m/z 222 比原形 AB 异喹啉环特征碎片离子 m/z 206 多 16 Da, 丰度最强的碎片离子 m/z 367 是羟基化后的异喹啉与苄基 C—C 键断裂后, 双异喹啉环继续脱去甲基和甲氧基后形成, 推测 M11 是 AB 环羟基化产物。

M12~M14: 通过对给药前后的尿样进行 MS 一级全扫描平行分析, 寻找到 3 个 m/z 637 的分子离子, 保留时间分别为 3.16 (M12)、3.61 (M13)、3.88 (M14)。M12~M14 的准分子离子比原形的羟基化产物 m/z 639 少 2 Da, 经 CID 后未形成相应的脱水峰 m/z 619, 推测 M12~M14 是粉防己碱羟基化产物进一步脱氢氧化形成。

M13 的特征碎片离子 m/z 190、174、172、144 均比 M7 或 M8 的特征碎片离子 m/z 192、176、174、146 少 2 Da, 丰度最强的碎片离子 m/z 379 是羟基化及脱氢氧化后的异喹啉环 (m/z 381+16-2) 与苄基 C—C 键断裂, 并脱去甲烷后形成的 (m/z 381+16-2-16); 与 M13 相比, M12 的转化量及特征碎片离子种类均较少, 只有较明显的 m/z 379、174 和较弱的 146, 推测 M12 及 M13 分别为 M7 和 M8 的脱氢氧化产物, M12 不如 M13 容易形成。M14 的特征碎片离子 m/z 365 及 220 均比 M11 的特征碎片离子 m/z 367 及 222 少 2 Da, 推测 M14 为 M11 的脱氢氧化产物。

2.2.3 粉防己碱在大鼠体内的代谢途径 通过鉴定大鼠尿液样品中粉防己碱的代谢产物, 分析粉防己碱在大鼠体内可能的代谢途径如图 3 所示。包括 N-去甲基化、O-去甲基化、芳环碳羟基化、脂肪碳羟基化、N-氧化等, 其中 O-去甲基化、芳环碳羟基化、脂肪碳羟基化等是首次发现的粉防己碱的代谢途径。

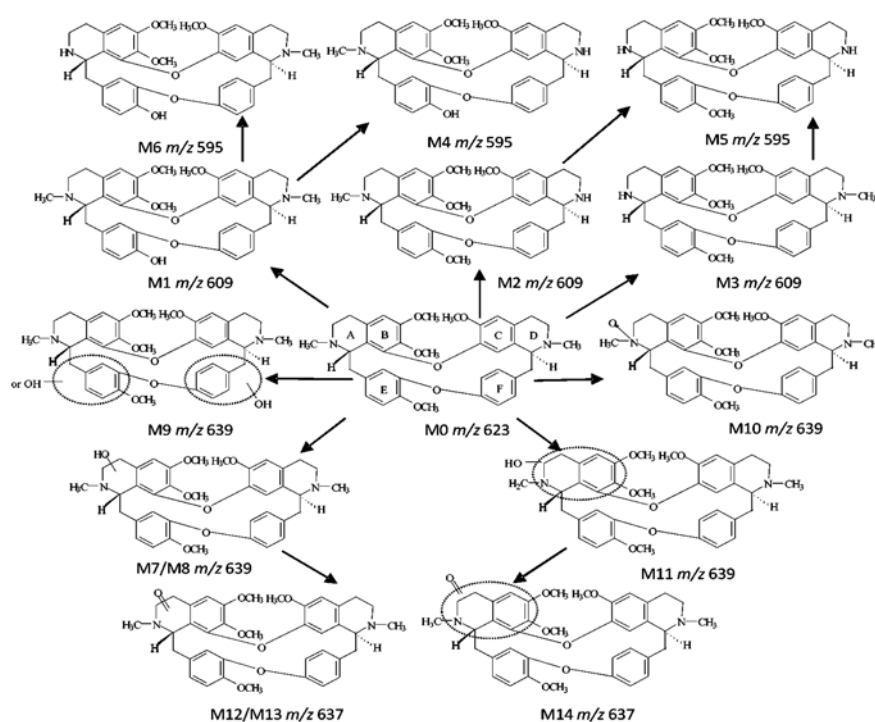


图 3 粉防己碱在大鼠体内的可能代谢途径

3 结论

粉防己碱的代谢产物多数属于同分异构体,本文建立的灵敏、快速的 UPLC-MS 方法,具有较高的分离度,可以避免同分异构体在同一时间出峰,防止遗漏可能的代谢产物,并且可简化质谱图,利于结构解析,为粉防己碱代谢产物的鉴定提供了有效的检测手段。大鼠灌胃粉防己碱后,在尿液中共检测到 14 种可能的代谢产物,其中 7 种属于首次发现。粉防己碱在大鼠体内的主要途径有二类,去甲基化(N-去甲基化及 O-去甲基化)和加氧氧化(脂肪族及芳环羟基化或 N-氧化)。

参考文献:

- [1] Schiff PL Jr. Bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. J Nat Prod, 1987,50(4):529-599.
- [2] Shen YC, Chou CJ, Chiou WF, et al. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix Stephaniae tetrandrae; comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions[J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(5):1083-

1090.

- [3] Rao MR. Effects of tetrandrine on cardiac and vascular remodeling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12):1075-1085.
- [4] Reist RH, Dey RD, Durham JP, et al. Inhibition of proliferative activity of pulmonary fibroblasts by tetrandrine[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1993, 122(1):70-76.
- [5] Yan C, Xin MQ, Li KG, et al. Tetrandrine-induced apoptosis in rat primary hepatocytes is initiated from mitochondria: caspases and endonuclease G(Endo G) pathway[J]. Toxicology, 2006, 218(1):1-12.
- [6] Zhou MJ, Wan RZ, Su MY, et al. Metabolites of tetrandrine and 5-bromatetrandrine in rat in vivo[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(10):1531-535.
- [7] Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis[J]. Talanta, 2006, 68(3):908-918.
- [8] Mazzeo J R, Neue U D, Kele M, et al. Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure [J]. Anal Chem, 2005, 77(23):460 A-467 A.
- [9] Wu WN, Moyer MD. API-ionspray MS and MS/MS study on the structural characterization of bisbenzylisoquinoline alkaloids[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(1):53-66.

(收稿日期 2012-09-25)