

基于 HPLC-MS/MS 法研究马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的大鼠肝微粒体酶 S9 体外代谢

周 慧¹, 付 佳¹, 蔡宗苇²

(1. 吉林大学珠海学院, 广东 珠海 519041; 2. 香港浸会大学化学系, 香港特别行政区)

摘要: 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 广泛存在于马兜铃属植物中, 具有肾损伤毒性和致癌致突变毒性。为了研究马兜铃酸类化合物的毒性产生机制, 建立了马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 及其大鼠肝微粒体酶 S9 代谢物分离与鉴定的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)分析方法。采用体外代谢法分别研究了有氧和厌氧孵育条件下, 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 在大鼠肝微粒体酶 S9 作用下的代谢行为, 并对各代谢物进行结构表征。研究结果显示: 马兜铃酸 I 在有氧条件下生成的代谢产物为马兜铃酸 Ia, 在厌氧条件下生成的代谢产物为马兜铃内酰胺 I; 马兜铃酸 II 只在厌氧条件下生成了马兜铃内酰胺 II。马兜铃内酰胺类化合物的生成是马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 在肝微粒体酶 S9 代谢过程中毒性产生的主要原因。该结果对于更好地理解马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的毒性作用机制, 控制毒副反应的发生具有一定意义。

关键词: 马兜铃酸 I; 马兜铃酸 II; 肝微粒体; 代谢; 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)01-0030-07

doi: 10.7538/zpxb.2017.38.01.0030

Research of Aristolochic Acid I, Aristolochic Acid II and Their Metabolites in Rat Liver Microsomes Using HPLC-MS/MS

ZHOU Hui¹, FU Jia¹, CAI Zong-wei²

(1. Department of Chemistry and Pharmacy, Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China;

2. Department of Chemistry, Hong Kong Baptist University, Hong Kong SAR, China)

Abstract: Aristolochic acids (AAs), derived from aristolochia plant species, are a mixture of structural-related compounds. Aristolochic acid I and aristolochic acid II are reported to be the major components that are associated with kidney damage toxicity and carcinogenic mutagenicity toxicity. Since the toxicity mechanism of action of Aristolochic acids are still unclear, it is necessary to develop a sensitive analytical method to facilitate these studies. In this work, a rapid and sensitive method based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was applied for the determination of aristolochic acid I, aristolochic acid II and their major metabolites in samples from in vitro metabolism studies. Aristolochic acid I and aristolochic acid II

收稿日期: 2016-03-04; 修回日期: 2016-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81403077); 广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310494)资助

作者简介: 周 慧(1982—), 女(汉族), 吉林长春人, 副教授, 从事质谱分析研究。E-mail: zhouhuims@163.com

通信作者: 蔡宗苇(1962—), 男(汉族), 福建福州人, 教授, 从事质谱分析研究。E-mail: zwcai@hkbu.edu.hk

were incubated with rat liver microsome S9 fractions under aerobic and anaerobic conditions. The incubation samples were analyzed by HPLC-MS/MS. The obtained results showed that the in vitro metabolic pathways of aristolochic acid I and aristolochic acid II are different. The metabolites of aristolochic acid I was detected and characterized as aristolochic acid Ia under aerobic condition and aristololactam I under anaerobic condition, respectively; however, in the case of aristolochic acid II, the only metabolite of aristolochic acid II was identified as aristololactam II under the anaerobic condition. Besides, the fragmentation behaviors of aristolochic acid I, aristolochic acid II and their metabolites in rat liver microsomes S9 fractions were characterized and summarized. The results indicated that the production of aristololactams is the main cause of the toxicity of aristolochic acid I and aristolochic acid II in the metabolism of rat liver microsome S9. This study have a certain significance for better understanding of the toxicity mechanism of action of aristolochic acid I and aristolochic acid II, as well as for toxicity monitoring of aristolochia plants.

Key words: aristolochic acid I; aristolochic acid II; rat liver S9 fractions; metabolism; high perform liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

马兜铃属植物(马兜铃、关木通等)具有广泛的生物活性和药理作用,如抗肿瘤、抗菌、抗炎以及镇痛等。马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 是马兜铃科植物的活性成分,同时也被认为是肾毒性和致癌致突变性的主要成分^[1-7]。但是,关于马兜铃酸类化合物引起毒性的机制尚不明确,且该类化合物在人体内的吸收、分布、代谢及消除过程也未被充分阐明。因此,研究马兜铃酸类化合物的体外代谢行为,不仅有助于进一步阐释该类物质的体内代谢行为,并且也有助于深入研究马兜铃酸类化合物的毒理机制,从而为其毒副作用的防治提供理论依据。

肝脏是药物的重要代谢器官,是药物生物转化的主要场所,该系统富含参与药物代谢的庞大的依赖细胞色素的混合功能氧化酶,大多数药物的 I 相和 II 相代谢反应都是在肝药酶系统的参与下发生的。体外肝脏代谢研究不仅可以排除体内诸多因素的干扰,还具有反应干扰小、操作简单、代谢条件易于控制等优点;同时,体外代谢还能迅速有效地解决药物代谢中的关键问题,例如代谢物结构鉴定、代谢途径推断等,它可为体内代谢研究提供重要的线索和依据^[8-10]。

本研究拟采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法研究马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的代谢行为,并总结其质谱碎裂特征。在

此基础上,分析马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 与大鼠肝微粒体 S9 组分在有氧和厌氧条件下孵育产生的体外代谢产物,结合串联质谱信息,对其代谢物进行结构鉴定。希望该研究能够为明确马兜铃酸类化合物的毒理机制,控制毒副反应的发生提供方法学参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

HP 1100 液相色谱:美国 Hewlett-Packard 公司产品;Esquire 4000 离子阱质谱仪:德国 Bruker 公司产品;Sanorius BS110S 分析天平:北京赛多利斯有限公司产品;Eppendorf 5810R 台式高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;MDF-382E 型超低温冰箱:日本 SANYO 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 标准品:美国 Acros 公司产品;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH):日本 Oriental Yeast Co. 公司产品;二甲基亚砜(DMSO):澳大利亚 AJAX Chemicals 公司产品;甲醇、乙腈:均为色谱纯,美国 Tedia 公司产品;纯净水:由 Milli-Q 超纯水处理系统制得;其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠 10 只,其质量为(200±20) g,由香港中文大学实验动物中心提供。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters Symmetry C18 柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μ m); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A), 乙腈(B); 洗脱条件: 0~5 min(30%~42%B), 5~10 min(42%~46%B), 10~15 min(46%~50%B), 15~35 min(50%~65%B); 流速 0.3 mL/min; 柱温 28 $^{\circ}$ C; 进样体积 5 μ L。

1.3.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI), 正离子全扫描模式, 质量扫描范围 m/z 100~500, 喷雾电压 4.0 kV, 干燥气温度 300 $^{\circ}$ C, 干燥气流速 8.0 L/min, 雾化气压力 200 Pa, 源内碰撞诱导解离气为氦气。

1.4 肝微粒体 S9 组分的制备

雄性 SD 大鼠在湿度和温度可控制的动物房适应 1 周, 自由进水进食, 动物房灯光按 12 h 方式自动交替开关。一周后, 处死 SD 大鼠, 迅速取出肝脏, 用冰冷的生理盐水清洗并称其质量; 将肝脏剪成小块后, 用 4 倍质量的冰冷的磷酸缓冲液(PBS 缓冲液, pH 7.4, 100 mmol/L) 制成 20% 匀浆, 于 4 $^{\circ}$ C 下以 9 000 r/min 离心 10 min, 弃去上层脂质和下层沉淀物后的上清液即为大鼠肝微粒体 S9 组分。

1.5 体外代谢反应及样品制备

1.5.1 有氧条件下的体外孵育 分别取 60 μ mol 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 标准溶液于 1.5 mL 聚苯乙烯管中, 加入 4 μ mol NADPH, 5 μ mol 葡萄糖-6-磷酸, 8 μ mol 氯化镁和 1.65 μ mol 氯化钾, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预孵育 5 min, 再加入 500 μ L 蛋白质浓度为 2.0 g/L 肝微粒体 S9 组分的 KCl-PBS 缓冲溶液, 分别得到马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 在有氧条件下的孵育体系。将孵育体系置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中, 孵育 0 min 和 60 min 后, 分别取 100 μ L 孵育混合溶液, 加入 2 倍体积的冰冷的乙酸乙酯, 萃取 2 次, 收集上清液, 合并后于 37 $^{\circ}$ C 氮气干燥; 最后用 50 μ L 甲醇溶解样品, 供 LC/MS 测定。每组平行做 3 份。

1.5.2 厌氧条件下的体外孵育 厌氧条件下的孵育溶液的制备与有氧条件下的相同。接下来, 在孵育体系中通入 15 min 氩气并密封, 将孵育体系置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中, 孵育 0 min 和 60 min 后, 分别取 100 μ L 孵育混合溶液, 按照有氧条件下

的样品制备方法得到马兜铃酸 I 或马兜铃酸 II 在厌氧条件下的体外孵育样品。每组平行做 3 份。

2 结果与讨论

2.1 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的液相色谱-质谱分析

马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 及其代谢产物的 LC/MS 提取离子流色谱图示于图 1。

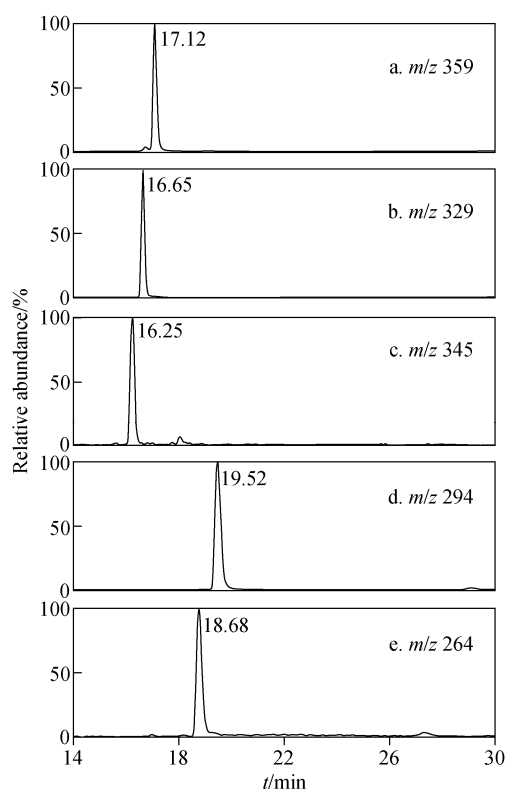


图 1 马兜铃酸 I (a) 和马兜铃酸 II (b) 及其代谢产物(c~e)的 LC/MS 提取离子流色谱图
Fig. 1 Selective ion chromatogram of aristolochic acid I (a), aristolochic acid II (b) and their in-vitro metabolites (c-e)

马兜铃酸 I 的保留时间为 17.12 min, 准分子离子为 $[M + NH_4]^+$ m/z 359 和 $[M + H]^+$ m/z 342。 m/z 359 离子在二级质谱中生成碎片离子 m/z 324 $[M + H - H_2O]^+$ 、 m/z 298 $[M + H - CO_2]^+$ 和 m/z 296 $[M + H - NO_2]^+$, 其中 m/z 298 离子的丰度最高, 其裂解途径示于图 2, 这与文献[11]报道的马兜铃酸 I 的碎裂方式一致。

马兜铃酸 II 的保留时间为 16.65 min, 准分子离子为 $[M+NH_4]^+$ m/z 329 和 $[M+H]^+$ m/z 312。 m/z 329 离子在二级质谱中生成碎片离子 m/z 294 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 268 $[M+H-CO_2]^+$ (基峰) 和 m/z 238 $[M+H-$

$CO_2-CH_2O]^+$, 其裂解途径示于图 3。可以看出, 马兜铃酸 II 与马兜铃酸 I 具有相似的电喷雾质谱规律, 即在一级质谱中易形成 $[M+NH_4]^+$ 加合离子, 在二级质谱中易发生 CO_2 中性碎片丢失。

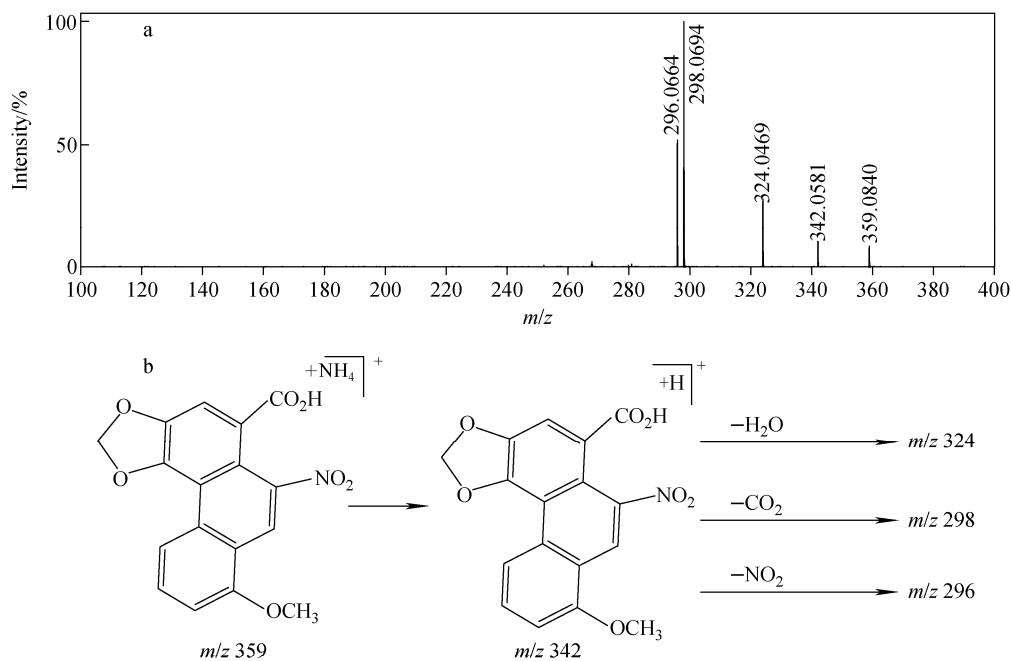


图 2 马兜铃酸 I 的二级质谱图(a)和裂解途径(b)

Fig. 2 MS² of aristolochic acid I $[M+NH_4]^+$ m/z 359 (a) and fragmentation pathways proposed (b)

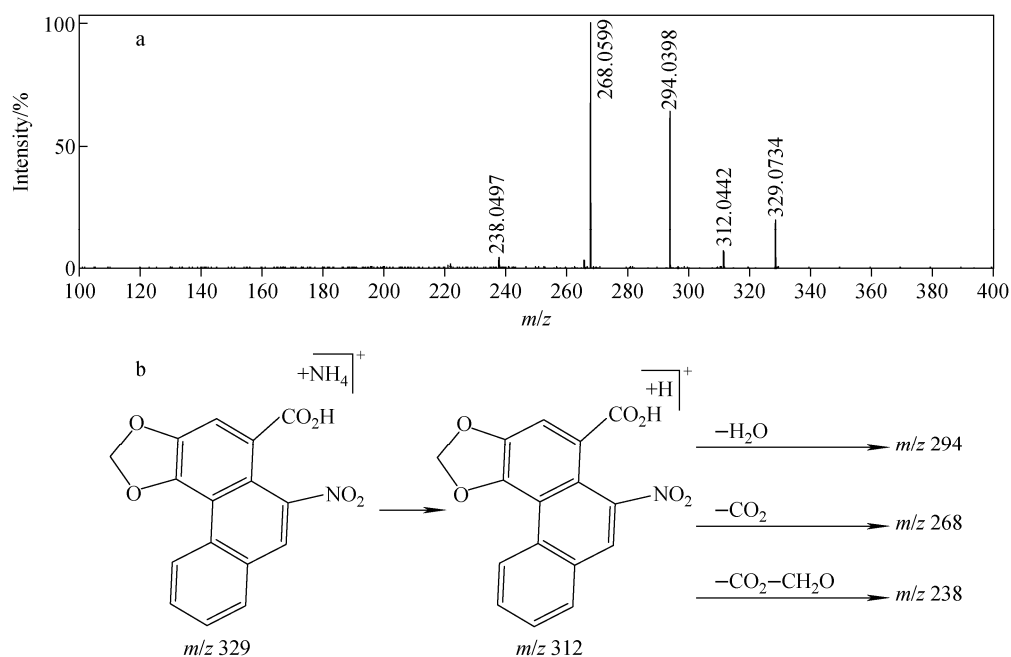


图 3 马兜铃酸 II 的二级质谱图(a)和裂解途径(b)

Fig. 3 MS² of aristolochic acid II $[M+NH_4]^+$ m/z 329 (a) and fragmentation pathways proposed (b)

2.2 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 体外大鼠肝微粒体 S9 代谢产物分析

马兜铃酸 I 和大鼠肝微粒体 S9 组分在有氧条件下孵育 60 min 后的反应体系与相同条件下孵育 0 min 后的反应体系相比,在总离子流色谱图中,保留时间 16.25 min 处检测到马兜铃酸 I 的代谢产物峰(图 1c),其准分子离子 $[M+NH_4]^+$ m/z 345 比马兜铃酸 I 的准分子离子 $[M+NH_4]^+$ m/z 359 减少了 14 u,这可能是马兜铃酸 I 的甲基基丢失亚甲基形成羰基所致。MS² 中的碎片离子为 m/z 328、310、284、282,均比对应的马兜铃酸 I 在同样条件下所得的 MS² 碎片离子 m/z 342、324、298、296 减少了 14 u,说明两者具有相似的断裂方式,故可初步推断其代谢产物与马兜铃酸 I 的结构相似。分析马兜铃酸 I 在有氧孵育下代谢产物的二级质谱发现,其裂解规律与文献[12-13]报道的马兜铃酸 Ia 相同,故鉴定为马兜铃酸 Ia,质谱图及裂解途径示于图 4a。其中, m/z 328 离子为马兜铃酸 Ia 的 $[M+H]^+$ 峰, m/z 310、284、282 离子为马兜铃酸 Ia $[M+H]^+$ 离子分别脱去水($-H_2O$)、二氧化碳($-CO_2$)以及丢失硝基($-NO_2$)而得到的碎片离子。

马兜铃酸 I 在厌氧条件下孵育的代谢产物保留时间为 19.52 min(图 1d),准分子离子为 $[M+H]^+$ m/z 294。 m/z 294 离子在二级质谱中分别丢失甲基($-CH_3$)、乙酰基($-CH_3CO$)以及同时丢失乙酰基和甲醛($-CH_3CO-CH_2O$)而生成 m/z 279、251、221 碎片离子,其质谱图及裂解途径示于图 4b。这与文献[12-13]报道的马兜铃内酰胺 I 的质谱裂解规律一致,据此推测马兜铃酸 I 在厌氧孵育条件下的代谢产物为马兜铃内酰胺 I。

同样,分别在有氧和厌氧条件下对马兜铃酸 II 和大鼠微粒体 S9 组分进行孵育,但仅检测到厌氧条件下孵育的代谢产物(图 1e),其保留时间为 18.68 min,准分子离子为 $[M+H]^+$ m/z 264。在二级质谱中, m/z 264 离子丢失一分子甲醛(CH_2O)产生 m/z 234 离子;同时丢失 CH_2O 和 CO 产生 m/z 206 离子;同时丢失 CH_2O 、CO 和 HCN 产生 m/z 179 离子,其质谱图及裂解途径示于图 4c。结合文献[12-13]报

道,推测马兜铃酸 II 在厌氧孵育条件下的代谢产物为马兜铃内酰胺 II。

以上研究结果表明,马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的代谢反应类型与孵育体系中是否含氧密切相关。马兜铃酸 I 在有氧条件下的代谢反应主要是去甲基化,生成无毒的马兜铃酸 Ia,从而起到解毒作用;而在厌氧条件下的代谢反应是硝基还原,生成毒性较强的马兜铃内酰胺 I。马兜铃酸 II 在有氧条件下没有发生变化,只有在厌氧条件下发生了硝基还原反应,生成毒性较弱的马兜铃内酰胺 II。由此可见,马兜铃酸的毒性成分主要来源于马兜铃酸在厌氧条件下的代谢产生的马兜铃内酰胺类成分。据文献^[14]报道,马兜铃内酰胺类成分能够入肾小管上皮细胞,并蓄积于胞浆内,进而发生毒性作用。另一方面,由于马兜铃内酰胺类成分具有较强的亲电能力,能与 DNA 碱基环外氨基亲电结合,生成相应的加合产物,直接损伤 DNA^[15]。

3 结论

本研究利用体外肝微粒体代谢方法结合高效液相色谱-串联质谱技术,建立了马兜铃酸及其体外代谢产物的分析方法。研究表明,马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 在体外肝微粒体代谢中主要发生硝基还原和去甲基反应。其中,由硝基还原反应形成的马兜铃内酰胺类化合物是马兜铃酸产生毒性作用的主要原因,该方法对于阐明马兜铃酸的毒理有重要意义。

参考文献:

- [1] XING G Z, QI X M, CHEN M, et al. Comparison of the mutagenicity of aristolochic acid I and aristolochic acid II in the gpt delta transgenic mouse kidney[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2012, 743(1/2): 52-58.
- [2] 王潇晗,张连学,部玉钢,等. 含马兜铃酸中药减毒的研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3 241-3 243.
WANG Xiaohan, ZHANG Lianxue, Bu Yugang, et al. Research progress on attenuation of aristolochic acid[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(22): 3 241-3 243(in Chinese).

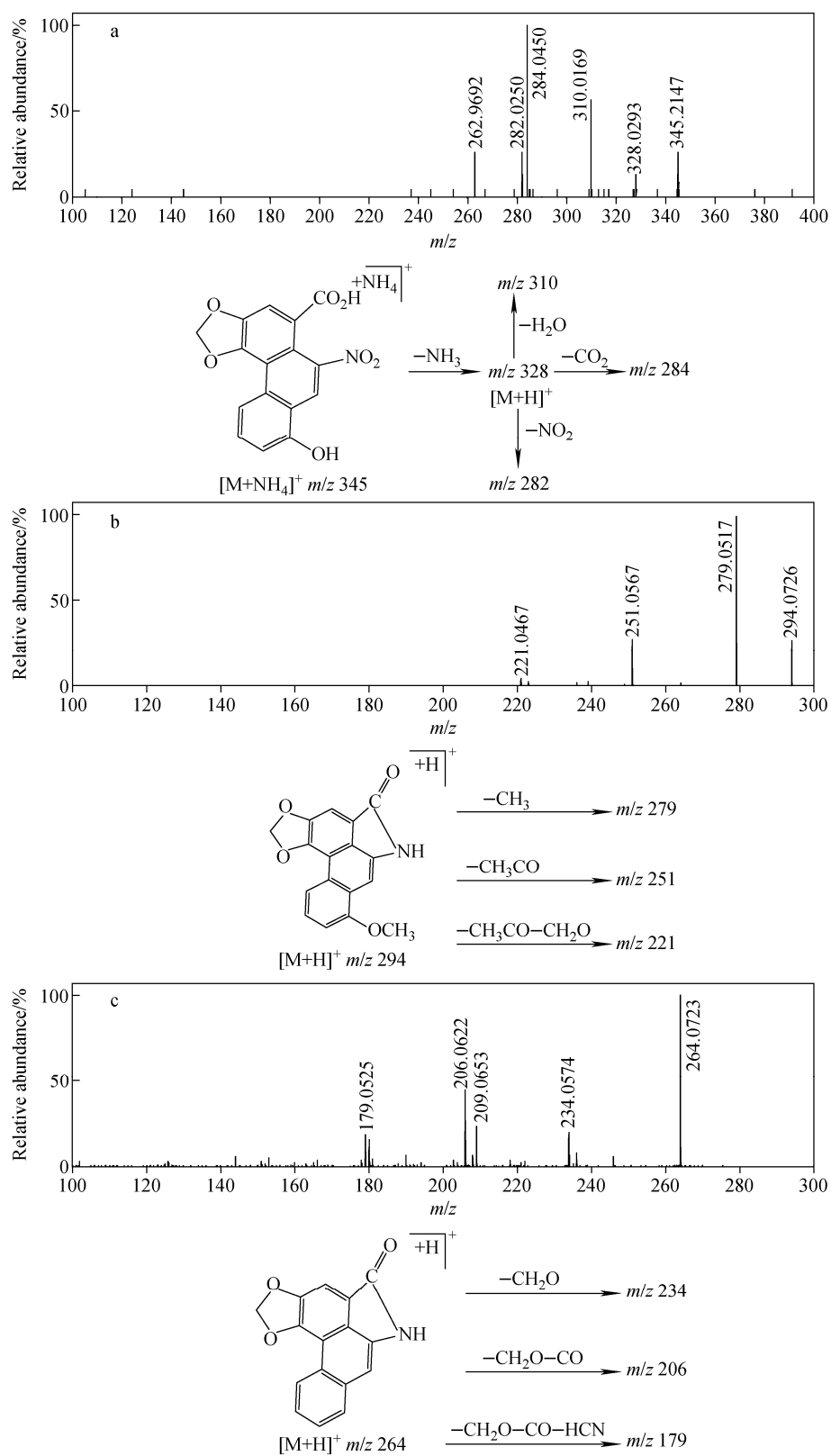


图 4 马兜铃酸 I 和马兜铃酸 II 的代谢产物的二级质谱图和裂解途径

Fig. 4 MS² and fragmentation pathways proposed of metabolites of aristolochic acid I and aristolochic acid II

- [3] CHEN L, MEI N, YAO L, et al. Mutations induced by carcinogenic doses of aristolochic acid in kidney of big blue transgenic rats[J]. *Toxicology Letters*, 2006, 165(3): 250-256.
- [4] COSYNS J P, DEHOUX J P, GUIOT Y, et al. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? [J]. *Kidney International*, 2001, 59(6): 2 164-2 173.
- [5] LI W, LI R. Rapid determination of aristolochic acids I and II in some medicinal plants by high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatographia*, 2004, 59: 233-236.
- [6] ARLT V M, FERLUGA D, STIBOROVA M, et al. Aristolochic acid arisk factor for Balkan endemic nephropathy-associatedurothelial cancer? [J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(5): 500-502.
- [7] BALACHANDRAN P, WEI F, LIN R C, et al. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells [J]. *Kidney International*, 2005, 67: 1 797-1 805.
- [8] GUO L, WU H Z, YUE H, et al. A novel and specific method for the determination of aristolochic acid-derived DNA adducts in exfoliated urothelial cells by using ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(2): 153-158.
- [9] MA Y H, XIE W W, TIAN T T, et al. Identification and comparative oridonin metabolism in different species liver microsomes by using UPLC-Triple-TOF-MS/MS and PCA[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 511: 61-73.
- [10] 王广甚, 刘晓东, 柳晓泉. 药物代谢动力学[M]. 北京: 北京工业出版社, 2001.
- [11] 韩凤梅, 梁智军, 陈勇. 马兜铃酸电喷雾质谱电离规律及其药材指纹图谱[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2006, 28(1): 65-68.
HAN Fengmei, LIANG Zhijun, CHEN Yong. The mass law and the fingerprint of aristolochic acids in *Aristolochiae* by electrospray ionization ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Hubei University: Natural Science*, 2006, 28(1): 65-68 (in Chinese).
- [12] YU J, MA C M, WANG X, et al. Analysis of aristolochic acids, aristololactams and their analogues using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14(8): 626-640.
- [13] CHAN S A, CHEN M J, LIU T Y, et al. Determination of aristolochic acids in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-ion trap mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2003, 60(4): 679-685.
- [14] STIBOROVA M, FREI E, ARLT V M, et al. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy[J]. *Mutation Research*, 2008, (658): 55-67.
- [15] CHAN W, ZHENG Y F, CAI Z W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of the DNA adducts of aristolochic acids[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(4): 642-650.