

电喷雾串联质谱法分析阿托品在大鼠肠内菌中的代谢产物

陈怀侠^{1,2}, 杜 鹏², 韩凤梅², 陈 勇²

(1. 湖北大学化学化工学院, 湖北 武汉 430062; 2. 湖北大学中药生物技术湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要:用液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(LC-ESIIT-MSⁿ)联用法研究阿托品在大鼠肠内菌中的代谢,以阿托品优化色谱及质谱条件,总结其色谱及质谱行为规律。将阿托品与大鼠肠内菌体外厌氧温孵培养,与空白样品及阿托品标准品相比较,根据被测物的多级质谱数据,鉴定代谢物并阐述其结构。在温孵液中发现阿托品的脱水及水解代谢产物,即脱水阿托品、托品和托品酸。该方法灵敏、快速、简单,适合于药物代谢分析。

关键词:液相色谱-串联质谱法;阿托品;代谢物

中图分类号:O657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2007)03-169-05

Analysis of the Metabolites of Atropine in Rat Intestinal Flora by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

CHEN Huai-xia^{1,2}, DU Peng², HAN Feng-mei², CHEN Yong²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineer, Hubei University, Wuhan 430062, China;

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

Abstract: Atropine and its metabolites in rat intestinal flora were identified by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MSⁿ). The conditions of chromatographic and mass spectrometric were optimized using atropine standard. The chromatographic and mass spectrometric behavior patterns of atropine were summarized. Atropine was incubated with rat intestinal flora in vitro under lack of oxygen. Identification and structural elucidation of the metabolites were performed by comparing the full scan MSⁿ spectra of analyzes with those of the parent drug and blank sample. The results reveal that the parent drug and its dehydrolyzed and hydrolyzed metabolites are found in the incubation solution. This method is sensitive, rapid, simple and suitable for analyzing metabolites of drugs.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; atropine; metabolite

传统中药多以汤剂为主,研究中药有效成分的肠道代谢对于人们了解药物体内作用过程,指

导临床合理用药具有重要的理论意义。液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(Liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry, LC-ESI-MSⁿ)联用技术是现今药物分析及其代谢物研究最有力的工具^[1-3]。该方法具有灵敏度高,专属性好,样品处理简单、快速等优点,而且多级质谱能够提供化合物丰富的结构信息,因此,该联用技术已成为代谢物研究的首选方法之一^[4-6]。

阿托品(Atropine)是从茄科植物颠茄(*Atropa belladonna* L.)、曼陀罗(*Datura Stramonium* L.)及莨菪(*Hyosyamus niger* L.)等分离提取的一种托品烷类生物碱,有着广泛的药理活性,如解痉、麻醉、止痛等,主要用于抗休克,治疗心、肝、肺等疾病^[7]。随着药理研究的深入,其用途越来越广,而阿托品在生物体肠道内的代谢至今未见报道。本工作拟采用离体实验的代谢研究方法,用富含肠内菌的大鼠肠内容物与阿托品在厌氧条件下温孵,以 LC-MSⁿ 技术在温孵液中鉴定阿托品在大鼠肠内菌中的代谢产物。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LCQ^{Duo} 离子阱型质谱仪:美国 Finnigan 公司产品,配有 TSP AS3000 自动进样器和 LCQ Xcalibur 1.2 软件处理系统;高速离心机(TGL-16C):上海安亭科学仪器厂产品;厌氧培养袋及厌氧培养发生袋(AnaeroPouchTM-Anaero 08G05A-23):日本三菱瓦斯化学株式会社产品;氮气吹干仪(BF2000):北京八方世纪科技有限公司产品。

阿托品:美国 Sigma 公司产品;甲醇(色谱纯):美国 Fisher 公司产品;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.2 肠内菌的制备及阿托品的代谢

1.2.1 厌氧培养液的配制^[8-9] 37.5 mL A 液(0.78% K₂HPO₄), 37.5 mL B 液(0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄ · H₂O), 50 mL C 液(8% Na₂CO₃), 0.5 g L-半胱氨酸, 2 mL 25% L-抗坏血酸, 1 g 牛肉膏, 1 g 蛋白胨, 1 g 营养琼脂, 以上各种溶液和试剂混合后,加蒸馏水至 1 L,用盐酸调节溶液 pH 为 7.5~8.0。

1.2.2 肠内菌培养液的制备^[10] Wistar 大鼠

200 g,购于湖北省实验动物研究中心,合格证:SCXK(鄂)2003-2005。取大鼠肠内容物,按 0.5 g : 1.5 mL 的比例加入厌氧培养液,用玻璃棒快速搅拌均匀,用医用纱布过滤得到含菌培养液。

1.2.3 阿托品的代谢 在装有上述肠内菌培养液的培养皿中加入阿托品,使培养液中阿托品的浓度为 50 mg · L⁻¹,同时做空白对照实验。将培养皿放入厌氧培养袋中,打开厌氧发生袋的外袋,迅速将其内袋置于厌氧培养袋中,密封,恒温 37 °C 培养。分别于 4 h 和 24 h 取样 1 mL,以乙酸乙酯萃取 2 次,合并有机相,37 °C 氮气中挥发至干,残留物用流动相溶解后,13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液进行 LC-MSⁿ 分析。

1.3 色谱条件

Zorbax extend C₁₈ 不锈钢色谱(3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm),同种填料的色谱保护柱(2.1 mm × 12.5 mm, 5 μm);美国 Agilent 公司产品;流动相:V(甲醇):V(2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液)=70:30,以甲酸调节 pH 3.5;流速:0.2 mL · min⁻¹;柱温:40 °C;进样量 20 μL。

1.4 质谱条件

ESI 离子源,质量扫描范围 m/z 100 ~ 1 000,离子源喷射电压 4.5 kV,毛细管电压 21V,毛细管温度 175 °C,鞘气(N₂)流速 40 个单位。自动进样器直接进样,正、负离子方式检测。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。

2 结果与讨论

2.1 阿托品的 LC-MS 及 LC-MSⁿ 分析

阿托品的一级质谱以分子离子峰 m/z 290 [M+H]⁺ 基峰,没有聚合及其他加合现象,示于图 1A,二级质谱(相对碰撞能量为 30%)及其 LC-MS² 全扫描色谱示于图 1B 和 1C。由图 1B 可见,阿托品的分子离子失去一分子水产生碎片 m/z 272 [M+H-H₂O]⁺,而分子离子失去一分子甲醛产生碎片 m/z 260 [M+H-HCHO]⁺。其二级质谱中丰度最高的碎片 m/z 124 是由其母分子离子失去托品酸(C₉H₁₀O₃, 166 Da)产生的。该碎片离子 m/z 124 失去 NH₂CH₃(31 Da)产生碎片离子 m/z 93。而其二级碎片 m/z 272 和 m/z 260 的三级质谱中均

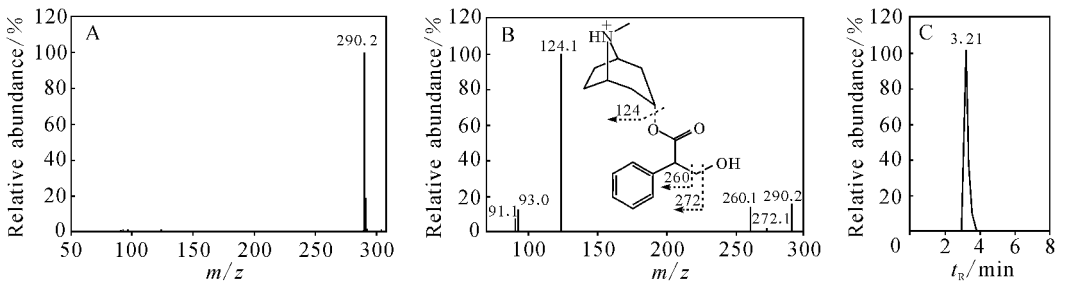


图 1 阿托品的一级质谱(A)、二级质谱(B)及其 LC-MS² 色谱图(C)

Fig. 1 Full scan MS (A), MS² (B) spectra and LC-MS² chromatogram (C) of atropine

出现 m/z 124、93 和 91, 由此说明, m/z 124、93 和 91 是阿托品分子离子的特征子离子, 30 Da 和 166 Da 是其特征中性碎片丢失, 这种特征子离子和特征中性碎片丢失是阿托品生物体内代谢物鉴定的依据。

阿托品对照品溶液用流动相稀释至不同的浓度, 经 LC-MS² 检测, 检测限 (LOD) 为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 培养液中阿托品及其代谢物分析

按实验方法获得阿托品大鼠肠内菌培养液, 样品经预处理后, 进行 LC-MSⁿ 分析, 将分析结果与空白实验及阿托品对照品相比较, 确定药物的肠内菌代谢产物。空白样品和温孵液的 LC-MS 色谱和质谱图示于图 2 和图 3, 在培养液中发现了原药及其代谢物, 其质子化的分子离子分别是 m/z 142、272、290, 以及负离子扫描中的去质子分子离子 m/z 165。大鼠肠内菌培养液中阿托品及其代谢物的 LC-MS² 色谱和质谱图示于图 4 和图 5, 其中, 质子化的分子离子 m/z

290

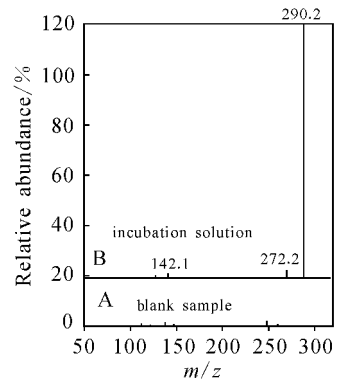


图 3 空白样品(A)和温孵液(B)MS 图谱

Fig. 3 Full scan MS spectra of blank (A) and incubation solution (B)

(M⁰) 的色谱保留时间 (图 4C) 和 MS² 质谱 (图 5C) 与原药完全相同, 即 m/z 290 对应于原药。

原药的特征碎片离子 m/z 124、93、91 均出现在质子化的分子离子 m/z 142 (M¹) 的 MS² 质谱中 (图 5A), 而且 m/z 142 → 124 的 MS³ 质谱和原药阿托品 m/z 290 → 124 的 MS³ 质谱相同, 所以, 该组分应为阿托品的水解产物, 即托品 (Tropine)。分子离子 m/z 272 (M²) 比原药的分子离子 m/z 290 少 18 Da, 在其二级质谱中出现了原药的特征碎片离子 m/z 124、93、91 (图 5B), 由此推论, 该组分对应于原药的脱水产物, 即脱水阿托品 (Apoatropine)。

在负离子测试中, m/z 165 (M³) 的 MS² 质谱中存在 m/z 147 [M-H-H₂O]⁻ 和 121 [M-H-CO₂]⁻ (图 5D), 说明该组分对应于阿托品水解产物的另一部分, 即脱品酸 (Tropic acid)。

综上所述, 阿托品大鼠肠内菌的代谢主要是

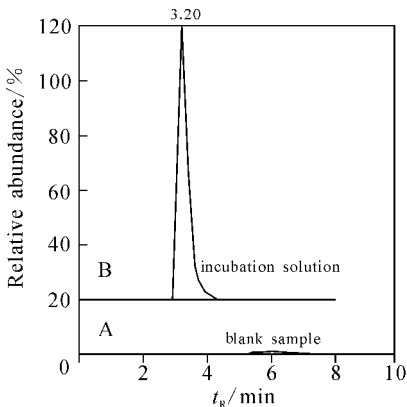


图 2 空白样品(A)和温孵液(B)LC-MS 色谱图

Fig. 2 LC-MS chromatograms of blank (A) and incubation solution (B)

水解及脱水,其代谢途径示于图 6。实验结果表明,4 h 及 24 h 温孵溶液的测定结果没有差异,

原药的色谱及质谱峰都很强,而代谢物的峰强度都非常弱,即阿托品肠内菌的代谢很弱。

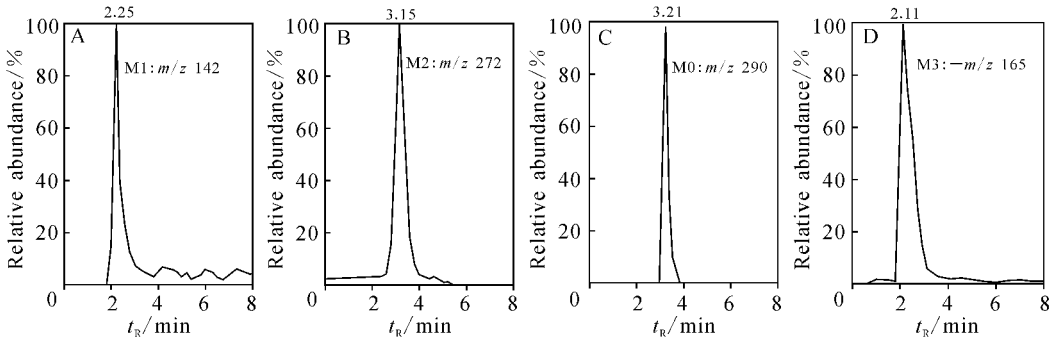


图 4 大鼠肠内菌培养液中阿托品及其代谢物的 LC-MS² 色谱图 (24 h)

Fig. 4 LC-MS² chromatograms of atropine (C) and its metabolites M1 (A), M2 (B) and M3 (D) in rat intestinal flora for 24 h

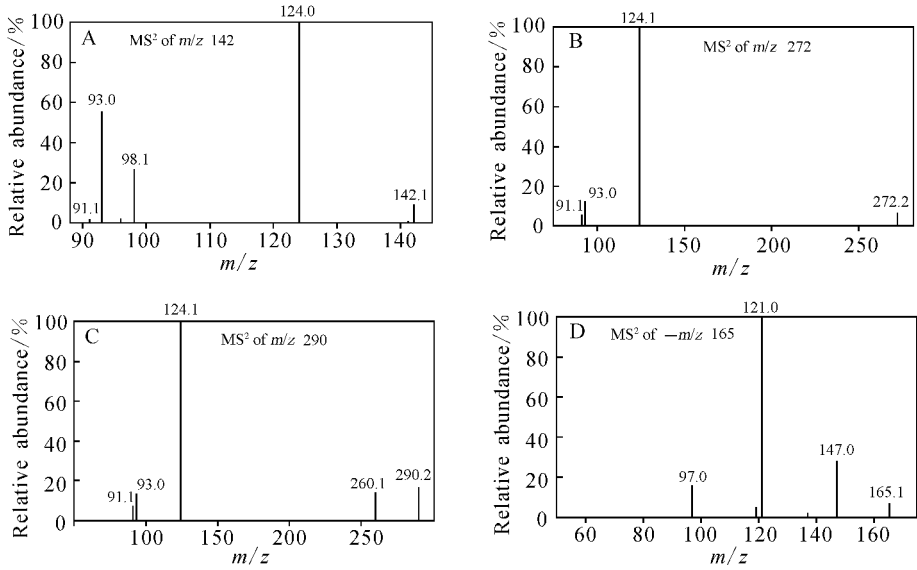


图 5 大鼠肠内菌中阿托品(C)及其代谢物 M1(A)、M2(B)和 M3(D)的 MS-MS 质谱图 (24 h)

Fig. 5 MS-MS product ion spectra of atropine (C) and its metabolites M1 (A), M2 (B) and M3 (D) in rat intestinal flora for 24 h

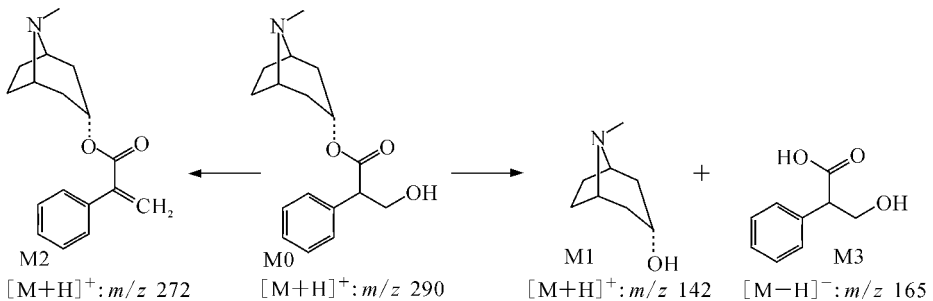


图 6 阿托品大鼠肠道代谢途径

Fig. 6 The proposed major metabolic pathway of atropine in rat intestinal flora

3 结 论

利用离子阱串联质谱技术对阿托品在大鼠肠内菌体外温孵中代谢物进行了结构分析,鉴定出原药及其水解和脱水产物,为该药物体内代谢途径和代谢部位的进一步研究提供了依据。

参考文献:

- [1] 邢 杰,张淑秋,钟大放,等. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱法快速鉴定刺五加提取物中的四种组分[J]. 质谱学报,2004,25(4):198-203.
- [2] 郭继芬,钟大放,乔善义,等. 液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷[J]. 质谱学报,2003,46(4):477-481.
- [3] CHAN S A, CHEN M J, LIU T Y, et al. Determination of aristolochic acid in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-ion trap mass spectrometry [J]. Talanta, 2003,60:679-685.
- [4] CHEN H X, CHEN Y, DU P, et al. Sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(1): 142-150.
- [5] CHEN Y, CHEN H X, DU P, et al. Analysis of

anisodine and identification of twenty of its metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chromatographia, 2005, 62(11/12): 563-569.

- [6] ESPEN M, GRETHER HB, HEGE C, et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of diltiazem and 11 its phase I metabolites in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33: 275-285.
- [7] 夏 雨,江长根. 萜萜烷类药物实验研究和临床应用的进展[J]. 微循环技术杂志,1994,2:104.
- [8] ODANI T, TANIZAWA H, TAKINO Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. IV. Decomposition of ginsenoside-Rg1 and Rb1 in the digestive tract of rats[J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31: 3 691-3 701.
- [9] HATTORI M, SHU Y Z, SHIMIZU M, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9): 3 838-3 846.
- [10] 沈 岚,徐德生,冯 怡,等. 大鼠肠内菌对麦冬皂苷 D' 代谢的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(8):618-620.

=====
(上接第 168 页)

- [2] 徐东群,刘晨明,张爱军,等. Tenax TA 吸附/二次热解吸/毛细管气相色谱法测定环境空气中苯系物的方法[J]. 卫生研究,2004,33(4):425-427.
- [3] 朱静波. 热解吸-气相色谱法测定室内空气中的总挥发性有机化合物[J]. 浙江万里学院学报,2004,17(5):105-107.
- [4] YOU J, CHEN Y X, WANG G J. Analysis of atmosphericemi-volatile organic compounds by adsorptive enrichment and lin supercritical fluid extraction-gas chromatography [J]. Chromatographia,1999,50:306-310.
- [5] MENG C, PAWLISJUN J. Analysis of environmental air sample by solid-phase microextraction and gas chromatography ion trap mass spectrometry [J]. Environ Sci Technol, 1995, 29(3): 693-701.
- [6] 吴风武, C HRISENSEN T, HAUNSO N. 23 种挥发性有机化合物在 3 种吸附剂上漏出容量的测

定评价[J]. 分析测试学报,2000,19(5):67-69.

- [7] MASTROGIACOMO A R, PIERTINI E, SAM-PAOLO L, et al. Evaluation of a new graphitized carbon black employed in sampling volatile organic compounds [J]. Chromatography A, 1998, 810(1):131-139.
- [8] BISHOP R W, VALIS R J. A laboratory evaluation of sorbent tubes for use with a thermal desorption gas chromatography-mass selective detection technique[J]. Chromatogr Sci,1990,28:589-593.
- [9] 王治仁,林 道,潘家栋. 混合吸附剂在环境监测中分析苯系物的性能考察[J]. 分析测试技术与仪器,2001,7(4):246-249.
- [10] 冯 丽,贾瑜玲,翟 莉,等. 气相色谱法测定空气中苯系物的热解吸和溶剂解吸比研究[J]. 中国测试技术,2005,31(6):125-129.