

东莨菪碱及其大鼠体内代谢物的电喷雾串联质谱研究

陈怀侠, 杜 鹏, 韩凤梅, 陈 勇

(湖北大学中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘要: 用液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MSⁿ)法检测东莨菪碱及其大鼠粪样中的代谢物。收集灌胃 50 mg · kg⁻¹ 东莨菪碱的大鼠粪样, 水浸泡后, 用乙酸乙酯萃取, 采用 LC-MS 及 LC-MSⁿ 等方法检测原药及其代谢物。与空白粪样及东莨菪碱比较, 根据代谢物分子量的变化(ΔM)及其多级质谱数据, 鉴定并阐述其结构。在服药后的大鼠粪样中发现 8 种代谢物, 分别为莨菪品、*N*-去甲基莨菪品、*N*-去甲基脱水东莨菪碱、脱水东莨菪碱、*N*-去甲基东莨菪碱、羟基东莨菪碱、*N*-氧化羟基东莨菪碱以及托品酸等。这些代谢物的鉴定可用于该药物体内代谢途径的研究。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 东莨菪碱; 代谢物

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2007)01-40-06

Scopolamine and Its Metabolites in Rats by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

CHEN Huai-xia, DU Peng, HAN Feng-mei, CHEN Yong

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

Abstract: A method was described for identification of scopolamine and its metabolites in rat feces by liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MSⁿ). The feces samples were collected after single administration of 50 mg · kg⁻¹ scopolamine to rats, and dipped in water for 1 h. The samples were extracted by ethyl acetate. Identification of the metabolites and their structural elucidation were performed by comparing their changes in molecular masses (ΔM), retention-times and full scan MSⁿ spectra with those of the parent drug and blank feces. The results reveal that the parent drug and its eight metabolites (norscopine, scopine, tropic acid, aponorscopolamine, aposcopolamine, norscopolamine, hydroxyscopolamine and hydroxyscopolamine *N*-oxide) exists in rat feces. The identification of these metabolites is useful for further study of metabolic pathway of the drug in vivo.

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

由于结构的复杂性和代谢物的多样性,中药活性成分代谢研究一直是中医药药动学研究的难点。LC-MSⁿ 联用技术灵敏度高、专属性好、样品处理简单、快速,而且多级质谱能够提供丰富的化合物结构信息。同时,电喷雾离子化(ESI)是一种软电离技术,特别适合热不稳定、不易挥发和强极性化合物的分析^[1-2],因此,该技术成为代谢物结构分析的首选方法之一^[3-5]。

东莨菪碱(Scopolamine)是从颠茄(*Atropa belladonna* L.)、曼陀罗(*Utura Stramonium* L.)及莨菪(*Hyosyamus niger* L.)等茄科植物中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^[6],主要用于治疗暴发性肝炎、流行性乙型脑炎、支气管哮喘、重症新生儿窒息、肺性脑病等,随着药理研究的进展,其用途越来越广。利用薄层色谱(TLC)及气相色谱(GC)分析东莨菪碱大鼠尿样中的代谢物已有报道^[7],但这些方法灵敏度低,选择性差,且样品处理复杂。应用 LC-MSⁿ 技术全面检测东莨菪碱大鼠尿样中的代谢物已有报道^[8],为进一步了解该药物的肠道代谢或肝肠循环等体内过程,本工作采用 LC-MSⁿ 技术,对服药后的大鼠粪样进行定性分析,利用串联质谱碎裂信息,鉴定大鼠粪样中的代谢物。

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,包括电喷雾电离(ESI)源,TSP P4000 泵及 TSP AS3000 自动进样器;LCQ Xcalibur 1.2 软件处理系统;TGL-16C 高速离心机:上海安亭科学仪器厂产品;BF2000 氮气吹干仪:北京八方世纪科技有限公司产品。

氢溴酸东莨菪碱:中国药品生物制品检定所提供;甲醇为色谱纯:美国 Fisher 公司产品;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.2 东莨菪碱标准溶液的配制

东莨菪碱标准溶液由其对照品配制成浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醇储备溶液,用流动相适当稀释后进行 LC-MSⁿ 分析。

1.3 生物样品的制备

六只健康 Wister 大鼠(250 ± 10) g,购于湖

北省实验动物研究中心,合格证:SCXK(鄂)2003-2005。将大鼠置于代谢笼中,禁食 12 h,收集空白粪样,以 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 东莨菪碱灌胃后,收集 0~24 h 粪便,该粪样以水搅拌均匀后浸泡 1 h,用乙酸乙酯萃取 2 次,合并有机相并用 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,流动相溶解, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心,上清液进行 LC-MSⁿ 分析。

1.4 色谱条件

Zorbax Extend C₁₈ 不锈钢色谱柱(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。

1.5 质谱条件

ESI 离子源,扫描范围 m/z 100~1 000,离子源喷射电压 4.5 kV,毛细管电压 21 V,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。仪器自动优化的二级及三级相对碰撞能量均为 30%。

2 结果与讨论

2.1 东莨菪碱的 LC-MS(MSⁿ) 分析

用东莨菪碱标准溶液直接注射进样,选择和优化东莨菪碱的质谱分析条件,结果见上述实验部分。

在优化的质谱条件下,选择色谱条件。首先优化流动相的组成,即以获得较大色谱峰面积和较好峰形为准,变换流动相中甲醇、乙腈、水的相对比例,确定甲醇/水体系较好,组成比为 V(甲醇):V(水)=70:30 最佳;在水相中添加乙酸铵、乙酸、甲酸、三乙胺等试剂进一步优化流动相,确定流动相组成为甲醇/乙酸铵最佳。乙酸铵浓度的变化对色谱峰面积的影响示于图 1,选择最佳浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以甲酸调节流动相中乙酸铵溶液的酸度,选择 pH 3.5 为最佳酸度,实验结果示于图 2。

柱温在 25~45 °C 范围内改变时,所得色谱

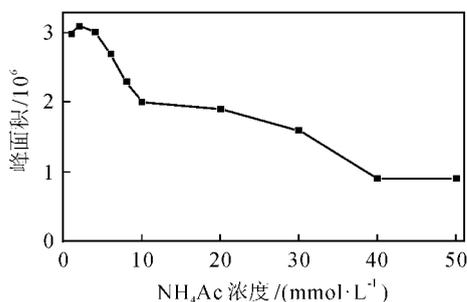


图 1 NH_4Ac 浓度对东莨菪碱色谱峰面积的影响
($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 东莨菪碱, 流动相为 V(甲醇) :
V($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Ac}$) = 70 : 30)

Fig. 1 Effect of the concentration of NH_4Ac
on the peak area of scopolamine

($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ scopolamine, mobile phase:

V(methanol) : V($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Ac}$) = 70 : 30)

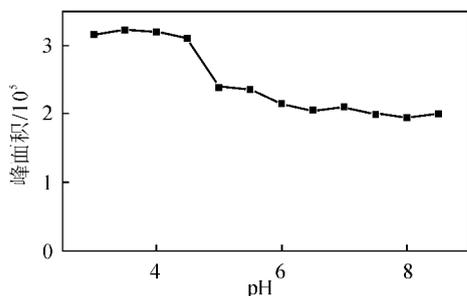


图 2 流动相 pH 值对东莨菪碱色谱峰面积的影响
($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 东莨菪碱, 流动相为 V(甲醇) :
V($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Ac}$) = 70 : 30)

Fig. 2 Effect of mobile phase pH on the
peak area of scopolamine

($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ scopolamine, mobile phase:

V(methanol) : V($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Ac}$) = 70 : 30)

峰面积变化不大,但随着温度的增加,色谱峰较窄,故柱温选用 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。考虑到东莨菪碱在电喷雾质谱中的有效离子化问题,流动相的流速选用 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

在上述优化的色谱、质谱条件下进行东莨菪碱的 LC-MS(MS^n)分析。

东莨菪碱的一级质谱以准分子离子峰 m/z 304 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为基峰,没有聚合及其他加合现象,结果示于图 3(A)。当以 HAc、 NH_3 或 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ 取代流动相中的乙酸铵时,东莨菪碱的一级质谱不变。为进一步了解东莨菪碱的二级质谱裂解规律,采用离子阱技术对东莨菪

碱的准分子离子 m/z 304 进行多级质谱分析,其二级质谱及其 LC- MS^2 全扫描色谱示于图 3(B) 和 3(C)。显然,东莨菪碱的准分子离子失水产生碎片 m/z 286 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$,失甲醛产生碎片 m/z 274 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCHO}]^+$,而 m/z 138 由其母分子离子失去托品酸($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$, 166 u)产生。 m/z 156 由其母分子离子的酯键断裂失去 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ (148 u) 产生。碎片 m/z 286 和 274 的三级质谱中均出现 m/z 156、138 和 110,由此说明, m/z 156、138 和 110 是东莨菪碱准分子离子的特征子离子,148 u 和 166 u 是其特征中性碎片丢失。

2.2 大鼠粪样中代谢物的鉴定

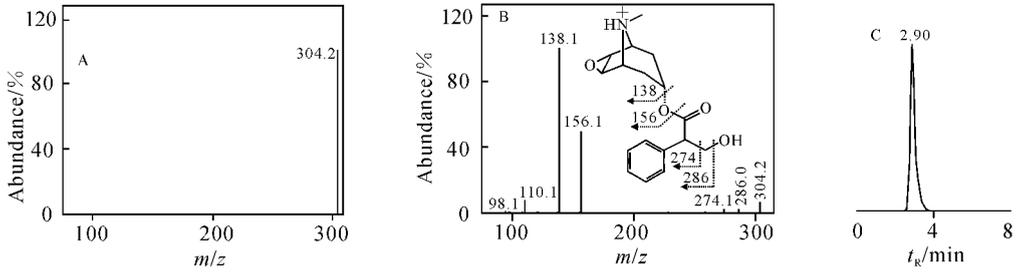
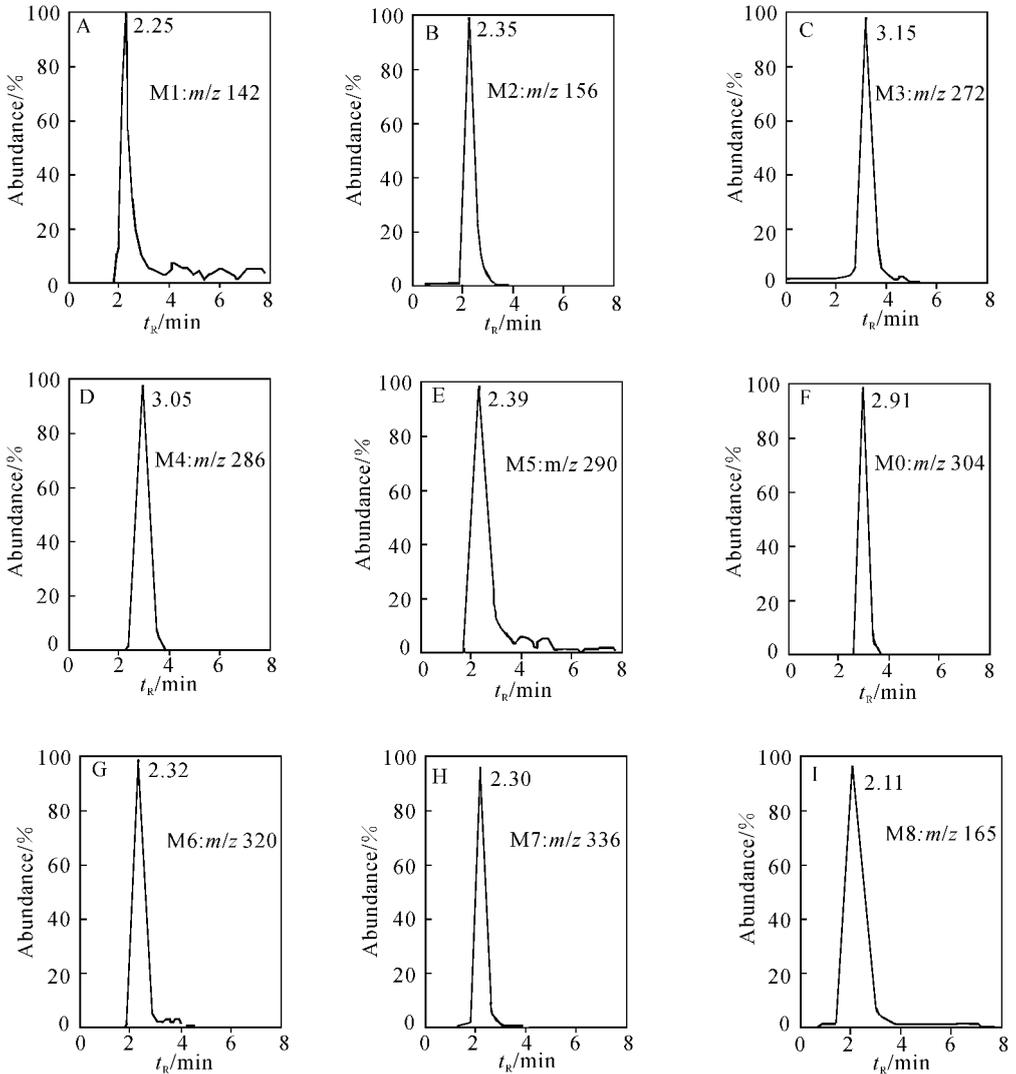
在粪样中发现了东莨菪碱及其代谢物,其质子化的分子离子分别为 m/z 142、156、272、286、290、304、320、336 以及负离子扫描中的去质子分子离子 m/z 165,这些被测物的 LC- MS^2 色谱及质谱分别示于图 2 和图 3。其中,质子化的分子离子 m/z 304(M0)的色谱保留时间(图 4F)及 MS^2 质谱(图 5F)和原药完全一致,由此断定, M0 即为未经代谢的东莨菪碱。

质子化的分子离子 m/z 156(M2)和原药 m/z 304 \rightarrow 156 的 MS^3 质谱相同,其二级质谱中出现了原药的特征碎片离子 m/z 138、110、98(图 5B)。所以, M2 可以鉴定为东莨菪碱大鼠体内水解产物,即莨菪品或东莨菪醇(Scopine)。

质子化的分子离子 m/z 142(M1)及其碎片离子 m/z 124、114、96、84、70(图 5A)分别比 m/z 156(M2)及其碎片离子 m/z 138、128、110、98、84 少 14 u。这种质谱碎片整体质量漂移的现象,说明 M1 应该是 M2 的去甲基产物,即 *N*-去甲基莨菪品(Norscopine)。

质子化的分子离子 m/z 286(M4)比原药分子量少 18 u,其 MS^2 质谱中存在原药的特征碎片离子 m/z 110 和 138(图 5D)。这些数据显示, M4 是东莨菪碱的脱水产物,称为脱水东莨菪碱(Aposcopolamine)。

组分 m/z 272(M3)及其子离子 m/z 254、124、96(图 5C)均比 m/z 286(M4)及其子离子 m/z 268、138、110 少 14 u。可以推论, M3 是 M4 的去甲基产物,称为脱水去甲基东莨菪碱(Aponorscopolamine)。

图 3 东莨菪碱一级(A)、二级(B)质谱及其 LC-MS² 色谱(C)图Fig. 3 MS (A), MS² (B) spectra and LC-MS² chromatogram (C) of scopolamine图 4 大鼠粪样中东莨菪碱 M0(F)及其代谢物 M1(A)、M2(B)、M3(C)、M4(D)、M5(E)、M6(G)、M7(H)、M8(I)的 LC-MS² 色谱图Fig. 4 LC-MS² chromatograms of scopolamine M0(F) and its metabolites M1(A), M2(B), M3(C), M4(D), M5(E), M6(G), M7(H), M8(I) in rat feces

质子化的分子离子 m/z 290(M5)具有原药的特征中性丢失 148 u 和 166 u 而产生其子离子 m/z 142 和 124(图 5E),显然, m/z 290 及其子离子 m/z 272、260、142、124、96 分别比 m/z 304(M0)及其子离子 m/z 286、274、156、138、110 少 14 u,因此,M5 应该是去甲基东莨菪碱(Norscopolamine)。

质子化的分子离子 m/z 320(M6)比原药分子量多 16 u,其二级质谱中出现原药的特征碎片离子 m/z 156、138,而且出现原药的特征中性丢失 164 u (148+16)(m/z 320→156)、182 u (166+16)(m/z 320→138)(图 5G)。即 M6 为东莨菪碱的氧化产物,而且氧化位置在托品酸部分。图 3G 呈现出 m/z 320 的失水子离子 m/z 302,说明苄基氢依然存在 M6 中,即 M6 应该是东莨菪碱的苯环氧化产物,即羟基东莨菪碱(Hydroxyscopolamine)。

原药的特征子离子 m/z 156、138、110 均出现在 m/z 336(M7)的 MS^2 质谱中(图 5H)。该组分比原药分子量多 32 u,结合其二级质谱中子

离子 m/z 172(156+16)的出现,说明 M7 是东莨菪碱的二氧化产物,而且,氧化位置分别在莨菪品和托品酸两个部分。另外,一对子离子 m/z 155(172-17)和 154(172-18)也出现在 M7 二级质谱中,显示 M7 应为 *N*-氧化物,因为同时丢失 17 u、18 u 是 *N*-氧化物的质谱碎裂特征^[9]。该特征由氧化苦参碱的二级裂解质谱得以证实^[10]。M7 的二级质谱中存在脱水碎片离子 m/z 318,说明,M7 中依然保留着苄基氢,即 M7 应为羟基东莨菪碱的 *N*-氧化物(Hydroxyscopolamine *N*-oxide)。

在负离子测试中, m/z 165(M8)的二级质谱中(图 5I),出现脱 H_2O 和 CO_2 碎片离子 m/z 147($[M-H-H_2O]^-$)和 121($[M-H-CO_2]^-$),由此推断,M8 对应于东莨菪碱水解产物的另一半,即托品酸(Tropic acid)。没有发现东莨菪碱及其各种一相代谢物的磺酸或葡萄糖醛酸结合等二相代谢物。

依据上述讨论,东莨菪碱在大鼠体内的主要代谢途径示于图 6。

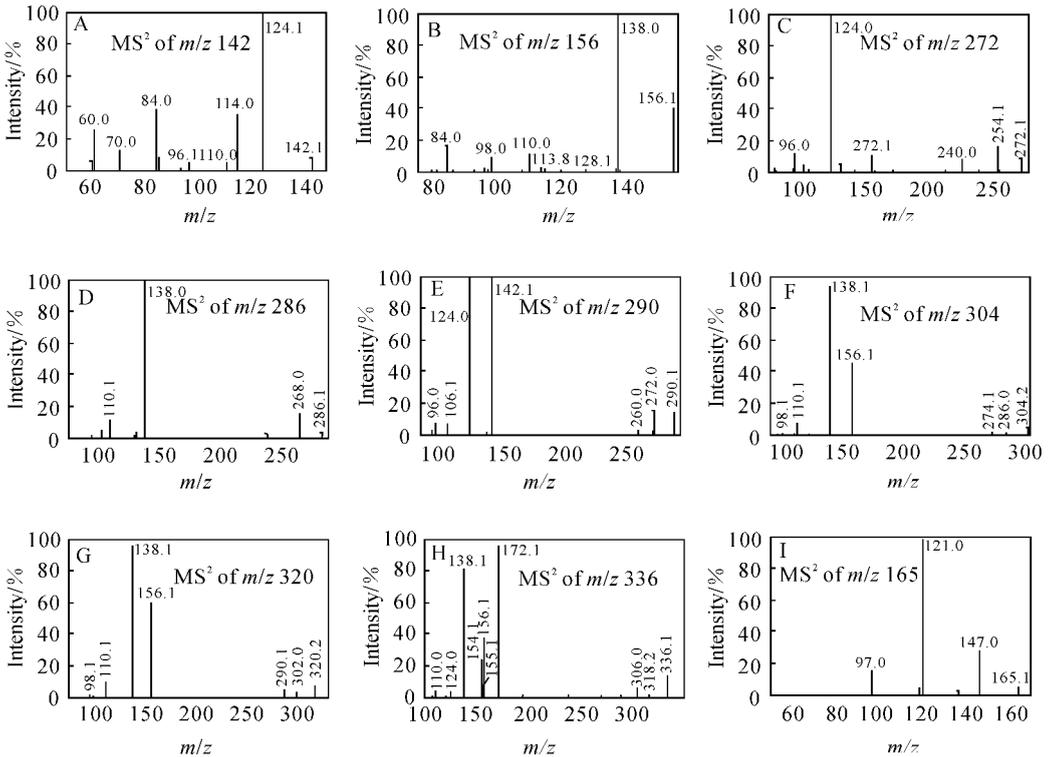


图 5 大鼠粪样中东莨菪碱 M0(F)及其代谢物 M1(A)、M2(B)、M3(C)、M4(D)、M5(E)、M6(G)、M7(H)、M8(I)的 MS-MS 质谱图

Fig. 5 MS-MS product ion spectra of scopolamine M0(F) and its metabolites M1(A)、M2(B)、M3(C)、M4(D)、M5(E)、M6(G)、M7(H)、M8(I) in rat feces

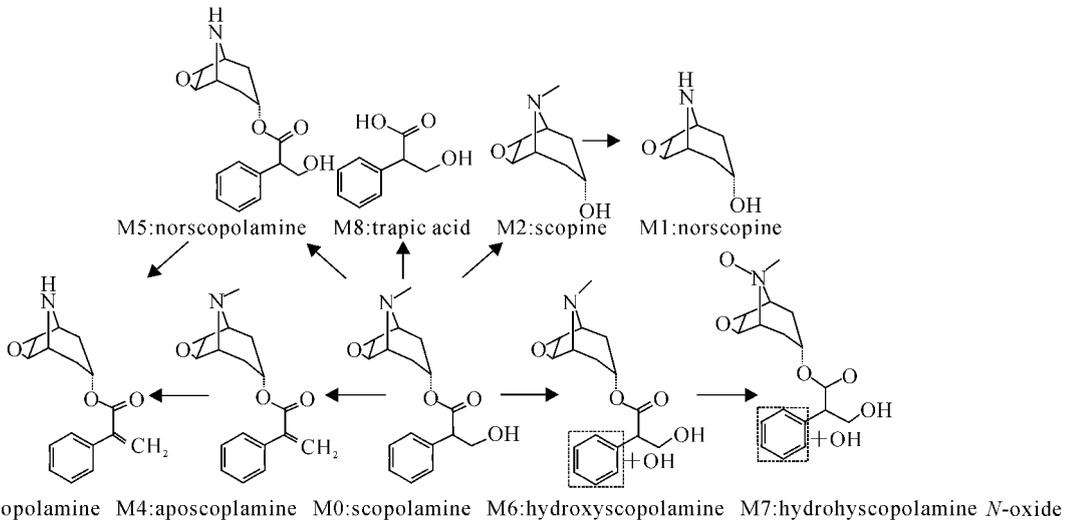


图 6 东莨菪碱大鼠体内代谢途径

Fig. 6 Proposed major metabolic pathway of scopolamine in rats

2.3 粪样萃取溶剂的选择

在粪样代谢物的提取中,选择了不同的提取溶剂如乙酸乙酯、氯仿及二氯甲烷等进行比较,提取液的 LC-MSⁿ 分析结果无差异。但以乙酸乙酯提取时,有机相乙酸乙酯在上层,易于移取,该溶剂毒性相对较小,易于吹干,故选择乙酸乙酯作为粪样的提取溶剂。

3 结论

通过对服药后大鼠的粪样进行定性分析,利用串联质谱碎裂信息,鉴定出了原药及其 8 种代谢物,对该药物体内代谢途径的进一步研究提供了依据。

参考文献:

- [1] 孙卫玲,倪晋仁,郝鹏鹏. 固相微萃取-气相色谱-质谱法测定水中双酚 A[J]. 质谱学报, 2005, 26(1): 22-26.
- [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] 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.

- [4] ESPEN M, GRETHE H B, 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(2): 275-285.
- [5] CHUNG E W, HO ENM, LEUNG DKK, et al. Detection of anti-ulcer drugs and their metabolites in hors urine by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chromatogra, 2004, 59: S29-S38.
- [6] 夏雨,汪长根. 莨菪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: 104-107.
- [7] 梁绍林. 东莨菪碱的新用途[J]. 新医学, 1999, 30(4): 228-229.
- [8] 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]. Chromatogr, 2005, 62(11/12): 563-569.
- [9] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 406.
- [10] 陈勇,陈怀侠,杜鹏,等. LC/MS分析大鼠体内氧化苦参碱及其主要代谢物[J]. 药学学报, 2005, 40(8): 740-745.