

# UPLC-Q-TOF/MS 法分析鉴定对叶百部碱在大鼠体内的代谢产物<sup>Δ</sup>

董巍\*, 巫秋萍, 梁鑫, 崔涛, 潘虹(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1218-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.16

**摘要** 目的:分析鉴定大鼠灌胃对叶百部碱后血浆、尿液和粪便中的代谢产物,阐明对叶百部碱的代谢途径。方法:将大鼠随机分为空白组(0.3%羧甲基纤维素)与给药组(灌胃给予对叶百部碱,50 mg/kg),每组6只。分别采集大鼠灌胃给药后0.25、0.5、1、2、4、6、12 h的血浆以及给药后0~12 h、12~24 h的尿液和粪便并制备样品,采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法和Triple TOF™高分辨率质谱自带的软件联合分析、鉴定各样品中代谢产物的化学结构。结果:从大鼠血浆中检测到4个化合物,包括1个原型化合物和3个代谢产物,在尿液中检测到4个代谢产物,在粪便中被检测到2个代谢产物,且代谢产物主要为I相的水合代谢产物和羟基化代谢产物,未检测到II相代谢产物。结论:对叶百部碱灌胃后在大鼠体内主要经水合、羟基化等途径代谢。

**关键词** 对叶百部碱;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法;代谢产物;鉴定

## Identification and Analysis of Tuberostemonine Metabolites in Rats by UPLC-Q-TOF/MS

DONG Wei, WU Qiuping, LIANG Xin, CUI Tao, PAN Hong (College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To analyze and identify the metabolites of tuberostemonine in rats plasma, urine and feces, and to clarify metabolic pathway of tuberostemonine. METHODS: Rats were randomly divided into blank group (0.3% carboxymethyl cellulose) and medication group (tuberostemonine 50 mg/kg, i.g.), with 6 rats in each group. The plasma of rats was collected 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 h after intragastric administration to prepare samples. Urine and feces were collected 0-12 h and 12-24 h after administration to prepare samples. UPLC-Q-TOF/MS and software of Triple TOF™ high resolution mass spectrometry were used to analyze and identify chemical structure of metabolites in samples. RESULTS: A total of 4 compounds were detected in rat plasma, including one prototype compound and 3 metabolites. 4 metabolites were detected in urine and 2 metabolites in feces. Phase I metabolites of tuberostemonine mainly included hydration and hydroxylation. Phase II metabolites were not found. CONCLUSIONS: Hydration and hydroxylation are the major metabolic transformation forms of tuberostemonine in rats *in vivo*.

**KEYWORDS** Tuberostemonine; UPLC-Q-TOF/MS; Metabolite; Identification

百部为我国传统的常用中药材,始载于《名医别录》,2015版《中国药典》(一部)共收载有直立百部[*Stemona sessilifolia* (Miq) Miq.]、蔓生百部[*Stemona japonica* (BL) Miq.]和对叶百部(*Stemona tuberosa* Lour.) 3个品种<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,百部具有镇咳、祛痰、平喘<sup>[2]</sup>、杀虫<sup>[3-4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>和抗肺结核<sup>[6]</sup>等作用。百部属植物中的生物碱类成分是镇咳<sup>[7-10]</sup>、杀虫<sup>[3,11]</sup>的主要活性成分,非生物碱类成分是抗菌的主要活性成分<sup>[12-15]</sup>,其中对叶百部碱是对叶百部主要的百部属生物碱类成分之一,具有显著的镇咳活性<sup>[9]</sup>和杀虫活性,并且未见毒性<sup>[9]</sup>,具有较好的开发应用价值。本研究拟通过收集大鼠灌胃百部新碱后的生物样品(血浆、尿液和粪便),通过超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术寻找对叶百部碱在大鼠体内的代谢产物和推测代谢途径,初

步探索对叶百部提取物中的效应成分对叶百部碱在大鼠体内的代谢过程,为对叶百部碱的临床应用以及合理解释该化合物的作用机制提供数据支撑。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

高效液相色谱(HPLC)仪(包括LC-30AD泵、CTO-30A柱温箱、SIL-30AC自动进样器、DGU-20A3脱气机、CBM-20A控制系统)、Triple-TOF™ 4600 TOF/MS仪(美国AB SCIEX公司);WTL-10K离心机(湖南湘仪有限公司);KQ5200DE数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

#### 1.2 对照品与试剂

对叶百部碱对照品(成都维克安科技有限公司,批号:6879-1-2,纯度:>98%);甲醇、乙腈为色谱纯,水为蒸馏水。

#### 1.3 动物

健康清洁级Wistar大鼠24只,♂,体质量(200±

<sup>Δ</sup> 基金项目:齐齐哈尔市科学技术计划项目(No.SFGG-201544)

\* 讲师,博士。研究方向:中药药效物质基础。电话:0452-2664571。E-mail:pingguoweiveiwei@126.com

20) g, 购于黑龙江中医药大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(黑)2008-004。

## 2 方法与结果

### 2.1 对叶百部碱混悬液的制备

称取对叶百部碱对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加入适量 0.3% 羧甲基纤维素钠溶液溶解并定容, 即得。

### 2.2 分组与给药

将 24 只大鼠随机分为空白组和给药组, 每组 12 只, 适应性饲养 7 d 后, 给药组大鼠按 50 mg/kg 的剂量(给药剂量根据预实验结果确定)灌胃给予对叶百部碱对照品(溶剂为 0.3% 羧甲基纤维素钠溶液), 空白组大鼠给予等体积 0.3% 羧甲基纤维素钠溶液。

### 2.3 样品采集及处理

2.3.1 血浆样品 随机取空白组和给药组大鼠各 6 只, 分别在给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、12 h 于眼眶后静脉丛取血 0.3 mL, 置于肝素化的离心管中, 在 4 °C 下以离心半径为 20 cm、10 000 r/min(下同)离心 10 min, 取上清液, 放入 -20 °C 冰箱中, 备用。临用时, 取各组大鼠血清 0.5 mL, 加入 10 μL 磷酸溶液涡旋 60 s, 上样到经活化处理的固相萃取柱, 1 mL 水洗脱后弃去洗脱液, 再用 1 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, N<sub>2</sub> 吹干后残渣以 50 μL 甲醇溶解, 然后以离心半径为 20 cm、10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。

2.3.2 尿液和粪便 取空白组和给药组余下的大鼠各 6 只, 置于代谢笼中, 分别收集两组大鼠 0~12 h 和 12~24 h 两个时间段的尿液和粪便。尿液在 4 °C 条件下离心, 收集上清液, 放入 -20 °C 冰箱保存, 备用。(1) 粪便样品的处理。临用时, 分别取两组大鼠的干燥粪便样品碾磨, 称取 1 g 碾磨粉, 加入 4 mL 甲醇超声(功率: 150 W)提取 30 min, 离心, 收集上清液, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 收集滤液。(2) 尿液样品的处理。取两组大鼠尿液用蒸馏水稀释 5 倍, 然后加入甲醇适量, 离心, 收集上清液, 将上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 收集滤液。

### 2.4 色谱与质谱条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 水(A)-乙腈(含 0.1% 甲酸, B) (100:0.1, V/V), 梯度洗脱(0~2 min, 99%~90% A; 2~5 min, 90% A; 5~15 min, 90%~85% A); 柱温: 40 °C; 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 3 μL。

2.4.2 MS 条件 电喷雾离子源(ESI 源), 正离子模式检测; 离子喷雾电压为 5 500 V, 离子源温度为 500 °C; 雾化气体为 N<sub>2</sub>, 雾化气(GAS 1, N<sub>2</sub>)为 50 psi, 辅助加热气(GAS 2, N<sub>2</sub>)为 50 psi, 气帘气(Cur, N<sub>2</sub>)为 35 psi; 解簇电压(DP)为 100 V; 碰撞能为 35 eV。扫描范围质荷比(*m/z*)为 50~1 000, IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级 MS 扫描。

### 2.5 对叶百部碱的 MS 裂解规律分析

取对叶百部碱对照品溶液 3 μL, 按照“2.4”项下条件进样分析, 结果见图 1。

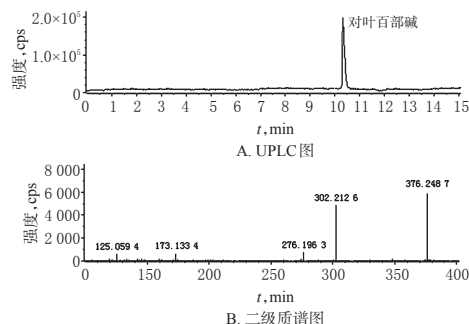


图 1 对叶百部碱的 UPLC 图和二级 MS 图

Fig 1 UPLC chromatogram and MS/MS spectrum of tuberostemonine

由图 1 可见, 低碰撞能量 MS 图中给出准分子离子峰[M+H]<sup>+</sup>为 *m/z* 376.249 6, 保留时间为 10.45 min; 高碰撞能量 MS 图中主要碎片离子 *m/z* 为 376.248 7、302.212 6、276.196 3 等。对叶百部碱属于典型的百部属 stenine I 型生物碱结构, 其典型的裂解方式因含有  $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -内酯环, 除能生成脱内酯环离子[M-100]<sup>+</sup>外, 还能得到与其相应的特征离子[M-74]<sup>+</sup>的特征性碎片离子<sup>[6]</sup>。由于大多数代谢产物仍保留原型的基本骨架结构或亚结构, 因此以上对叶百部碱的 MS 裂解规律将为其代谢产物结构鉴定提供重要参考依据。

### 2.6 大鼠血浆、尿液、粪便样品的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

2.6.1 取“2.3”项下样品经 UPLC 色谱分离, 利用 Analyst TF 1.7.1 软件的 PeakView 2.2 和 Formula-finder、XIC Manager 等数据处理功能, 经过峰提取和解析, 根据血浆、尿液、粪便样品的一级 MS 和二级 MS 扫描信息, 并与空白血浆、尿液、粪便对比寻找潜在的代谢产物。结果, 在血浆样品中共检测到 4 个化合物, 包括 1 个原型和 3 个代谢产物, 在尿液中检测到 4 个代谢产物, 在粪便中被检测到 2 个代谢产物, 不同样品的提取离子流图见图 2。

2.6.2 化合物的结构解析 (1) M<sub>0</sub>: 一级 MS 图中显示准分子离子峰[M+H]<sup>+</sup>为 *m/z* 376.248 2, 保留时间为 10.41 min, 仅在大鼠血浆样品中检测到, 其 MS、二级 MS 和保留时间与对叶百部碱对照品基本一致, 故推测 M<sub>0</sub> 为对叶百部碱原型药物。(2) M<sub>1</sub>~M<sub>2</sub>: 在一级色谱图 *m/z* 为 392.243 7 的提取离子流色谱图中, 可以检测到 2 个色谱峰, 保留时间分别为 8.85、9.02 min。比对叶百部碱[M+H]<sup>+</sup>多 16 Da, 其二级 MS 的主要特征碎片为 *m/z* 376.229 3、376.252 7、302.208 4、302.212 6, 与对叶百部碱碎片基本一样, 所以推测 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 为对叶百部碱的羟基化产物, 羟基化的位置可能发生在  $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -内酯环。由于对叶百部碱结构中存在 2 个  $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -内酯环, 现有 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 的 MS 信息只能观察到离子丰度略有不同, 无法

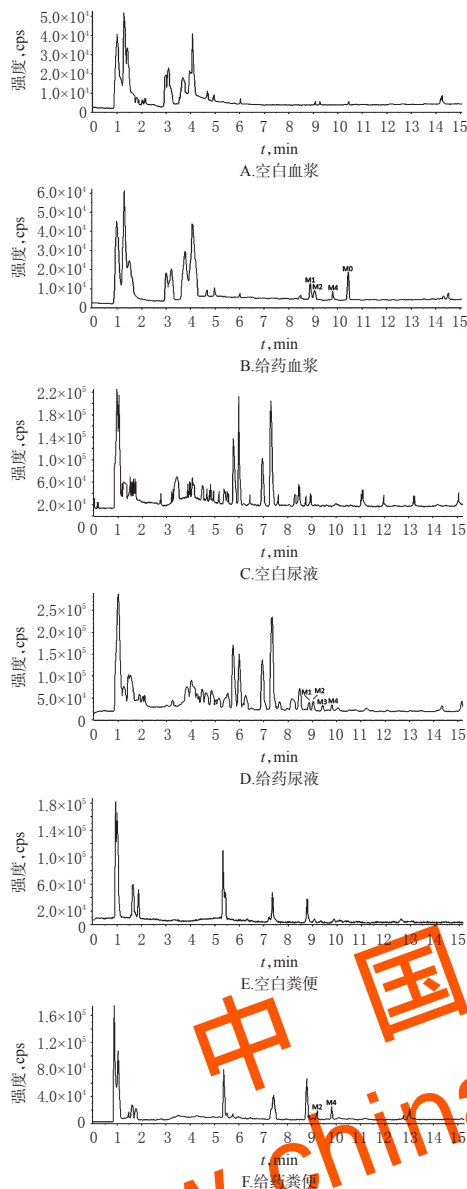


图2 大鼠血浆、尿液和粪便样品中对叶百部碱代谢产物的提取离子流色谱图

Fig 2 The extraction chromatograms of tuberostemnine metabolites in rats plasma, urine and feces

判断M1、M2的具体结合位点。M3~M4:在一级色谱图  $m/z$  为 394.259 8 的提取离子流色谱图中,可以检测到 2 个色谱峰,保留时间分别为 9.43、9.81 min,比对叶百部碱  $[M+H]^+$  多 18 Da; 其二级 MS 的主要特征碎片为  $m/z$  376.239 5、376.247 4、302.208 3、302.209 5 等,与对叶百部碱碎片基本一样,所以推测 M3、M4 为对叶百部碱的水合产物,水合的位置可能发生在  $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -内酯环。但现有 M3、M4 的 MS 信息只能观察到离子丰度略有不同,无法判断 M3、M4 的具体结合位点。对叶百部碱代谢产物的二级 MS 图见图 3,色谱、MS 信息和代谢途径分析见表 1,推测的代谢途径示意图见图 4。

### 3 讨论

UPLC-Q-TOF/MS 不仅具有分析速度快、选择性强、

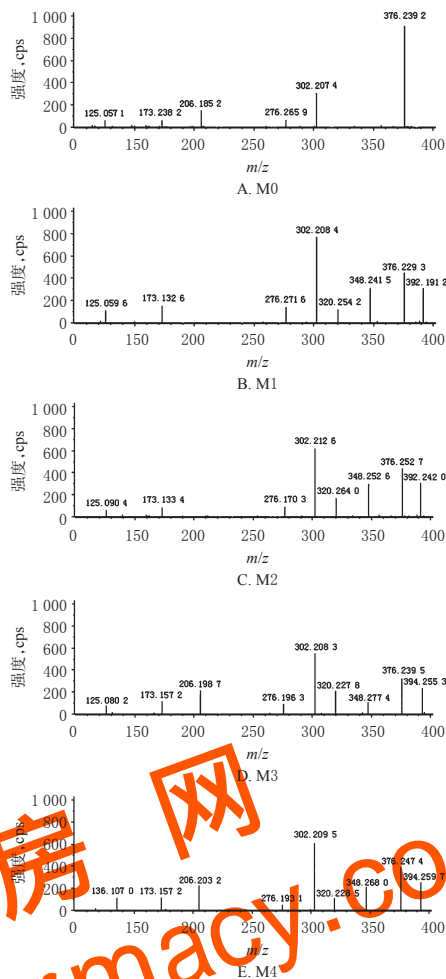


图3 对叶百部碱体内代谢产物的二级 MS 图

Fig 3 MS/MS spectrums of tuberostemnine metabolites *in vivo*

表1 大鼠血浆、尿液和粪便样品中对叶百部碱代谢产物的色谱、MS 信息和代谢途径

Tab 1 Chromatographic and mass spectra information and biotransformation pathways for tuberostemnine metabolites in rats plasma, urine and feces

峰号	保留时间, min	分子式	准分子离子峰 ( $m/z$ )	偏差, ppm	MS/MS 碎片离子 ( $m/z$ )	分布	代谢途径
M1	8.85	$C_{22}H_{33}NO_3$	392.243 5	-0.5	392.191 2, 376.229 3, 348.241 5, 320.254 2, 302.208 4	血浆、尿液	羟基化
M2	9.02	$C_{22}H_{33}NO_3$	392.243 8	0.3	392.242 0, 376.252 7, 348.252 6, 320.264 0	血浆、尿液、粪便	羟基化
M3	9.43	$C_{22}H_{35}NO_3$	394.257 8	-3.8	394.255 3, 376.239 5, 348.277 4, 320.227 8, 302.208 3	尿液	水合
M4	9.81	$C_{22}H_{35}NO_3$	394.258 5	-2.0	394.259 7, 376.247 4, 348.268 0, 320.228 5, 302.209 5	血浆、尿液、粪便	水合
M0	10.41	$C_{22}H_{33}NO_4$	376.248 2	-1.6	376.239 2, 302.207 4, 276.265 9, 206.185 2	血浆	原型

准确度高、灵敏度高的特点,而且能提供丰富的碎片离子信息和二级 MS 信息,精确鉴定代谢产物,已广泛用于生物样品的体内代谢研究中<sup>[17-19]</sup>。根据对叶百部碱的性质,本研究选择在流动相中加入 0.1% 甲酸,得到的色谱

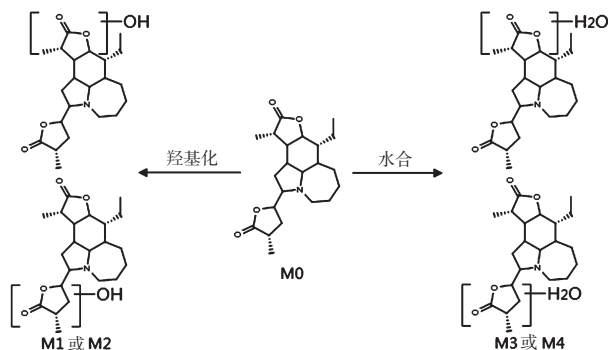


图4 对叶百部碱在大鼠体内推测的代谢途径

Fig 4 Proposed metabolic pathway of tuberostemonine in rats *in vivo*

峰峰形较好且响应值高。笔者前期考察了正、负离子模式扫描,发现正离子模式扫描下百部属生物碱类成分响应较好;同时优化了洗脱梯度,使样品在15 min内即可以完成检测。

本研究在优化色谱和MS条件后,系统研究对叶百部碱经灌胃给药后在大鼠血浆、尿液和粪便中的代谢情况。结果,在大鼠血浆中检测到4个化合物,包括1个原型和3个代谢产物,在尿液检测到4个代谢产物,在粪便中检测到2个代谢产物。在代谢物的鉴定中,对叶百部碱的原型仅在血浆样品中检测到,推测可能是由于含量低,或者该成分响应较低,所以在其他两个样品中没有检测到。本研究结果表明,对叶百部碱的I相代谢产物较多,在大鼠体内的代谢途径为水合、羟基化,没有发现II相代谢产物。

#### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015, 132-133.

[2] 吴旂, 江仁望, 赵斌, 等. 百部新碱与罗汉果皂苷V联用对小鼠的镇咳、祛痰作用研究[J]. 中国药房, 2017, 28(13): 1755-1757.

[3] TANGG CP, CHEN T, VELTEN R, et al. Alkaloids from stems and leaves of *Stemona japonica* and their insecticidal activities[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(1): 112-116.

[4] 刘涛, 李慧, 张一凡, 等. 中药生、蜜百部杀灭玉米螟作用研究[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(12): 137-138.

[5] JUNG KH, KIL YS, JUNG J, et al. Tuberostemonine N, an active compound isolated from *Stemona tuberosa*, suppresses cigarette smoke-induced sub-acute lung inflammation in mice[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(1): 79-86.

[6] 王莉新, 吴燕燕, 王易. “芩部丹”中三种单体对结核分枝杆菌作用下TLR2表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(9): 1284-1287.

[7] YANG XZ, ZHU JY, TANG CP, et al. Alkaloids from roots of *Stemona sessilifolia* and their antitussive activities[J]. *Planta Med*, 2009, 75(2): 174-177.

[8] WANG P, LIU AL, AN Z, et al. Novel alkaloids from the roots of *Stemona sessilifolia*[J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(3): 523-530.

[9] YANG XZ, TANG CP, YE Y. Stilbenoids from *Stemona japonica*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(1/2): 47-53.

[10] GE F, KE C, TANG W, et al. Isolation of chlorogenic acids and their derivatives from *Stemona japonica* by preparative HPLC and evaluation of their anti-AIV (H5N1) activity *in vitro*[J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(3): 213-218.

[11] ZHANG YZ, XU GB, ZHANG T. Antifungal stilbenoids from *Stemona japonica*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(7): 634-639.

[12] LIN LG, ZHONG QX, CHENG TY, et al. Stemoninines from the roots of *Stemona tuberosa*[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(7): 1051-1054.

[13] CHUNG HS, HON PM, LIN G, et al. Antitussive activity of *Stemona* alkaloids from *Stemona tuberosa*[J]. *Planta Med*, 2003, 69(10): 914-920.

[14] LEE KY, SUNG SH, KIM YC. Neuroprotective bibenzyl glycosides of *Stemona tuberosa* roots[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 679-681.

[15] LIN LG, LI KM, TANG CP, et al. Antitussive stemoninine alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa*[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(6): 1107-1110.

[16] 胡君萍, 张因, 毛一脚, 等. 《中国药典》3种百部的止咳作用比较[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3096-3104.

[17] 刘震, 徐凤, 王静哲, 等. 哈巴昔在大鼠体内代谢产物的鉴定与分析[J]. 中国药房, 2017, 28(10): 1310-1315.

[18] 伍明江, 吴晓磊, 张德芹, 等. UPLC-Q-TOF/MS鉴定芦丁在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 91-97.

[19] 张亚洲, 王涛, 邹树良, 等. 芹菜素在大鼠体内代谢产物的鉴定与分析[J]. 中国药房, 2016, 27(4): 479-482.

(收稿日期:2017-10-19 修回日期:2018-03-19)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅