

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.07.07

别隐品碱和原阿片碱在猪肝 S9 的代谢研究

赵雪娇, 黄亚军, 张明军, 刘兆颖*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南省兽药工程技术研究中心, 长沙 410128)

[收稿日期] 2020-03-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 07-0041-07 [中图分类号] S853.7

[摘要] 试验采用高效液相色谱/四极杆飞行时间质谱(HPLC-QqTOF-MS)技术,进行别隐品碱(ALL)和原阿片碱(PRO)在猪肝 S9 中的代谢研究。通过比较这些代谢物的精确分子量和产物离子与前体离子或代谢物的变化,进行了这些代谢物的结构鉴定。结果显示,在猪肝 S9 中检测到低浓度的 ALL 和 PRO,分别鉴定出 4 种 ALL 和 3 种 PRO 的代谢物,O-去甲基和 C2-C3 位亚甲二氧环裂后去甲基分别为 ALL 和 PRO 是猪肝体外的主要代谢途径,且 2,3-亚甲二氧环去甲基比 9,10-亚甲二氧环去甲基更占优势。其研究结果可为解释博普总碱的药动学和食品安全性评价提供理论依据。

[关键词] HPLC-QqTOF-MS; 别隐品碱; 原阿片碱; 猪肝; 代谢

Metabolism of Allocryptopine and Protopine in S9 of Pig Liver

ZHAO Xue-jiao, HUANG Ya-jun, ZHANG Ming-jun, LIU Zhao-ying*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Hunan Engineering Research Center of Veterinary Drugs, Changsha 410128, China)

Corresponding author: LIU Zhao-ying, E-mail: liu_zhaoying@sina.com

Abstract: High performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight (HPLC-QqTOF-MS) mass spectrometry method was used to study the metabolism of allocryptopine(ALL) and protopine(PRO) in pig liver S9. The structure of these metabolites was performed by comparing the exact molecular weights of these metabolites and the changes of productions with precursorions or metabolites. The results showed that 4 ALL metabolites and 3 PRO metabolites were detected in S9 of pig liver. It can be concluded that demethylation at O-demethylation and demethylation at C2-C3 were the main metabolic path ways of ALL and PRO, respectively. Moreover, 2, 3-methoxycyclodemethylation of All and PRO is more advantageous than 9, 10-methoxycyclodemethylation. The results can provide theoretical basis for the pharmacokinetic and food safety evaluation of Plume Poppy total alkaloid.

Key words: HPLC-QqTOF-MS; allocryptopine; protopine; pig liver; metabolism

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0501503)

作者简介: 赵雪娇, 硕士研究生, 从事药物分析方面研究。

通讯作者: 刘兆颖。E-mail: liu_zhaoying@sina.com

博落回,系罂粟科博落回属植物,又名土霸王、号筒树等,以异喹啉类生物碱为主要活性成分,具有较强的生物活性^[1]。在畜牧业中,以中国传统中医药理论为基础的中兽药饲料添加剂因具有效果好、无残留等优点被广泛关注。目前,作为中国首个二类中兽药制剂的博落回散已经得到了广泛应用,其主要活性成分为血根碱与白屈菜红碱。随着研究的深入,对博落回有效成分的研究也扩大了范围,普罗托品类生物碱在畜牧养殖与医药领域具有广阔的应用前景。至 2019 年,博普总碱及博普总碱散也被成功获批二类中兽药,推动了我国中兽药的现代化发展。

博普总碱的主要活性成分为 ALL 和 PRO,在罂粟科、菊科、小檗科和毛茛科植物中广泛存在,是博落回等药用植物中的生物活性物质^[2]。ALL 和 PRO 具有许多已证实的生物活性,ALL 具有抗菌^[3]、抗寄生虫活性^[4]、抗心律失常^[5]和防治动物肝纤维化^[6]等作用;PRO 具有保肝^[7]、抗寄生虫^[4]、抗血小板凝集^[8]、抗血栓和抗炎^[9]等作用。近年来,对 ALL 和 PRO 的代谢研究主要集中于大鼠。杨丹莉等^[10,11]对大鼠血浆和各组织进行了 PRO 的药效和药代学研究,证明 PRO 给药后在大鼠体内可迅速广泛分布和排泄。Huang 等^[2,12]用快速准确的 HPLC-QqTOF-MS 方法研究了大鼠肝 S9 样品中 ALL 和 PRO 的体外代谢和口服 ALL 和 PRO 后在大鼠尿液、血浆和粪便中的生物转化,在大鼠肝 S9 中共鉴定出 8 种 ALL 代谢物和 5 种 PRO 代谢物,在大鼠体内共鉴定了 10 种 ALL 代谢物和 10 种 PRO 代谢物,为 ALL 和 PRO 提供了更为全面的代谢特征。Guo 等^[13]研究了 PRO 大鼠药代动力学、组织分布和排泄,表明 PRO 只有于 1.0% 的排泄是 PRO 原形,即 PRO 主要是作为其代谢产物排泄的。目前可知,ALL 和 PRO 的生物利用度很低,在肝脏中经历了首过代谢,在血浆中的浓度很低,然在尿液和粪便中的残留要高于大部分组织。因此,ALL 和 PRO 在肝脏中的代谢机制研究就变得极为重要。为了扩大博落回在畜牧养殖中的应用范围,开展了 ALL 和 PRO 在猪肝 S9 中的

代谢研究,根据前期对 ALL 和 PRO 代谢的研究和报道,用 HPLC-QqTOF-MS 对形成的代谢物进行了表征^[12]。使用 HPLC-MS/MS 方法测定 ALL 和 PRO 在猪肝 S9 中的代谢物,与大鼠肝 S9 的体外代谢特点进行对比,总结各自的代谢规律和种属差异。其化学结构式如图 1 所示。

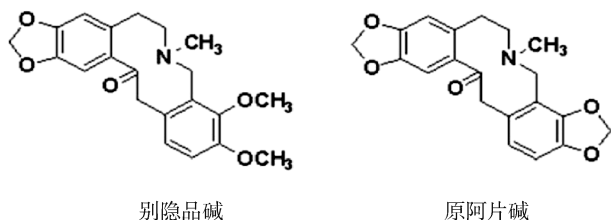


图 1 ALL 和 PRO 的结构图

Fig 1 Structures of ALL and PRO

1 材料与方法

1.1 仪器 CF16RX II 型台式高速冷冻离心机,日立工机商业有限公司;HH·S/1-2-5 数显恒温水浴锅,上海跃进医疗器械厂;AY220 型电子天平,日本 Electronic Balance 公司;安捷伦 (1290) HPLC-(6530) QTOF 液相色谱质谱联用仪,美国 Agilent 公司。

1.2 试剂 别隐品碱和原阿片碱购自湖南美可达生物资源有限公司,含量 $\geq 98\%$;还原型辅酶 II (NADPH) 购自 Roche 公司;甲酸和乙腈购自上海安谱科学仪器有限公司;二甲基亚砜 (DMSO)、蔗糖、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和氯化镁等试剂均为分析纯,水为 Milli-Q 水。试剂配制见表 1。

1.3 猪肝 S9 的制备 猪经颈静脉放血处死后,打开胸腔,暴露肝脏后取出,迅速吸取生理盐水冲洗样品表面残血。用锡箔纸包好后立即置于液氮中充分冷却,随即转入 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。试验时,放置室温解冻,称取 3.0 g 肝组织,用 Tris-HCl 溶液再次清洗除去表面血液成分后,用匀浆器以 1.0 g 肝组织加入 4 mL Tris-HCl 匀浆缓冲液的比例,制备得到肝匀浆。置于 9000 G, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min 取得上清液,此为肝 S9。将其保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。以上所有的操作都在冰浴上进行。

表 1 试验所需试剂的配制(保存于 4 ℃)

Tab 1 Preparation of reagents (stored at 4 ℃)

序号	试验溶液	浓度	溶质	溶剂
A	ALL	2.5 mg/mL	2.68 mg	DMSO 助溶, 甲醇稀释
B	PRO	2.5 mg/mL	3.32 mg	DMSO 助溶, 甲醇稀释
C	HCl	0.1 mol/L	4.31 mL	水溶解, 定容 500 mL
D	Tris	0.1 mol/L	6.0665 g	水溶解, 定容 500 mL
E	Tris - HCl	0.05 mol/L	210 mL C, 250 mL D	水定容 500 mL, pH 7.4
F	Tris - HCl 匀浆缓冲液	0.05 mol/L	0.15 g EDTA, 42.75 g 蔗糖	E 溶解, 定容 500 mL
H	MgCl ₂	25 mmol/L	51.0 mg	水溶解, 定容 10 mL
I	NADPH	10 mmol/L	25 mg	加 3 mL E 混匀

1.4 色谱和质谱条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD 柱 (150 mm×2.1 mm I. D., 粒径 5 μm); 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 水相: 0.1% 甲酸水; 有机相: 乙腈; 洗脱梯度 (水相比比例): 0 ~ 5 min, 90%; 5 ~ 20 min, 90% ~ 10%; 20 ~ 25 min, 10%; 25.1 ~ 30 min, 90%。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (EIC) (正离子模式) 扫描范围 50 ~ 1000 (m/z), 使用液氮作为雾化气 (流速: 9 L/min, 压力: 35 psig), 鞘气温度和流速分别为 350 ℃、11 L/min, 喷嘴电压和毛细管电压分别为 1 和 4 kv, 碰撞能量 30 eV。

1.5 ALL、PRO 分别与猪肝 S9 孵育代谢 取 1.5 mL 离心管, 分别加入 40 μL 的 MgCl₂、猪肝 S9、NADPH, 反应终浓度分别为 5 mmol/L、2 mg/mL、2 mmol/L, 再加入 40 μL Tris - HCl 溶液置于 37 ℃ 水浴锅中预反应 2 min, 最后加入 40 μL 终浓度 20 μg/mL 的 ALL 或 PRO, 恒温反应 60 min。待反应完全后, 加入 50 μL 15% 三氯乙酸终止反应, 混匀后于 4 ℃、12000 G 离心 15 min, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待用。

2 结果与分析

2.1 ALL 和 PRO 在猪肝 S9 中的代谢产物

2.1.1 ALL 在猪肝中的代谢产物分析 使用仪器自带软件预测 ALL 在猪肝 S9 中的碎片离子的分子组成和分子式, 研究得到 4 种代谢产物。ALL 在猪肝 S9 的 EIC 和 MS/MS 见图 2, 4 种代谢产物见图 3。与本实验室前期的试验结果对比可知, 分别为 AL1、AL3、AL4、AL5。ALL 的裂解途径、结构鉴定与代谢产物分析可详见本实验室前期试验文章^[12]。表 2 总结了 ALL 在猪肝 S9 中代谢物的保

留时间、分子组成及其结构鉴定。

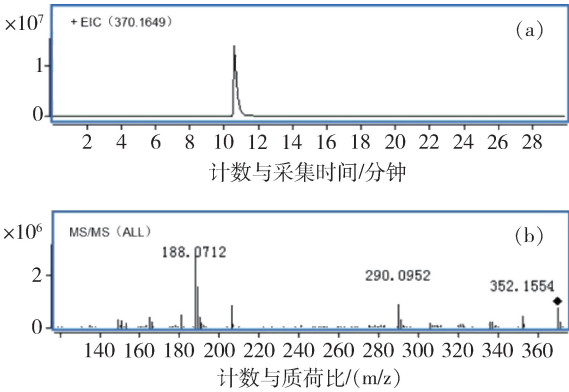


图 2 ALL 精确的 EIC (A) 和 MS/MS 图 (B)

Fig 2 Accurate EIC (A) and MS/MS (B) of ALL

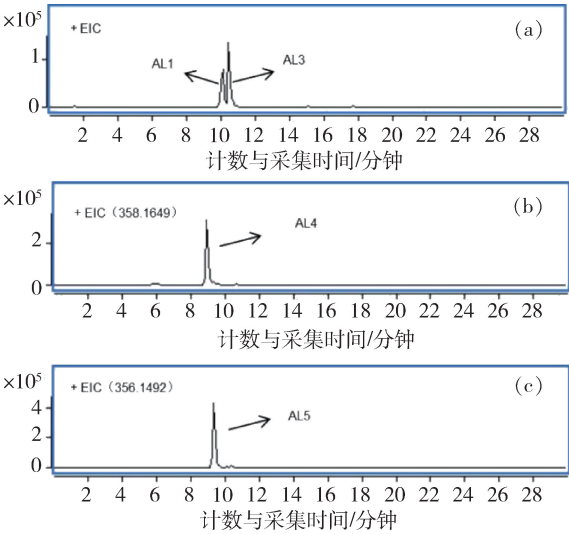


图 3 ALL 在猪肝 S9 中代谢物 AL1 + AL3 (A)、AL4 (B)、AL5 (C) 的 EIC 图

Fig 3 Accurate EIC of metabolites AL1 + AL3 (A), AL4 (B) and AL5 (c) in pig liver S9

表 2 ALL 在猪肝 S9 中代谢物的保留时间、元素组成、实测值、预测值及鉴定结果

ALL metabolites in S9 of pig liver					
代谢物	保留时间 Rt/min	元素组成	实测值	预测值	结构鉴定
AL1	9.4	C ₂₁ H ₂₄ NO ₆ ⁺ ([M+H] ⁺)	386.1582	386.1598	C-1、C-4、C-5 或 C-6 键上的羟基化代谢物
AL3	9.9	C ₂₂ H ₂₈ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	386.1959	386.1962	2-去甲基隐掌叶防己碱的甲基化产物
AL4	8.2	C ₂₀ H ₂₄ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	358.1633	350.1649	2,3-二去甲基隐掌叶防己碱
AL5	8.5	C ₂₀ H ₂₂ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	356.1482	356.1492	ALL 的甲氧基发生去甲基化的代谢物

2.2.2 PRO 在猪肝中的代谢产物分析 在猪肝 S9 中,对 PRO 的碎片离子的分子组成和分子式进行预测,PRO 的 EIC 和 MS/MS 见图 4,代谢产物见图 5。研究获得 PRO 的 3 种代谢产物。参考实验

室前期成果^[12]可知 PRO 详细的裂解途径、结构鉴定和代谢产物分析,3 种代谢物分别为 PR2、PR3、PR4。表 3 为 PRO 在猪肝 S9 中代谢物的保留时间、分子组成及其结构鉴定。

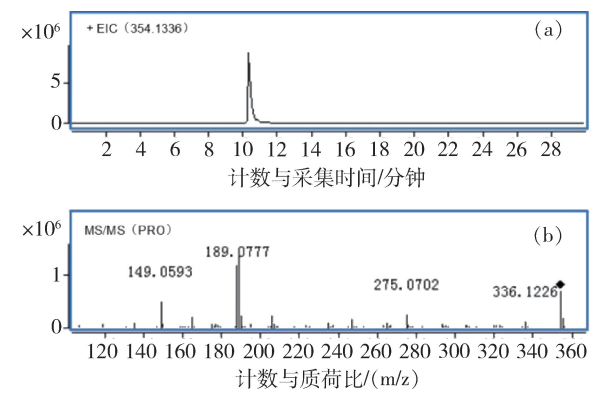


图 4 PRO 精确的 EIC(A) 和 MS/MS 图(B)
Fig 4 Accurate EIC (A) and MS/MS (B) of PRO

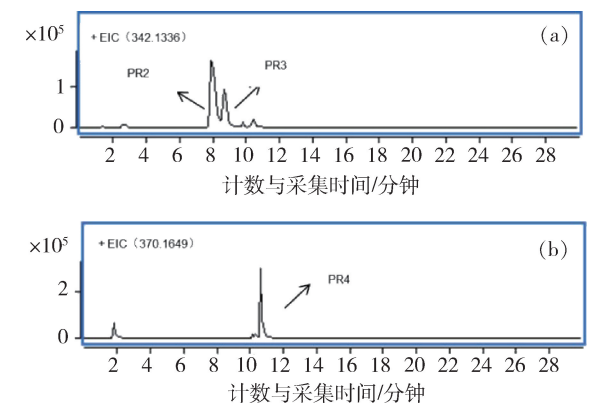


图 5 PRO 在猪肝 S9 中代谢物 PR2 + PR3(A)、PR4(B) 的 EIC 图
Fig 5 Accurate EIC of metabolites PR2 + PR3 (A) and PR4 (B) of PRO in pig liver S9

表 3 PRO 在猪肝 S9 中代谢物的保留时间、分子式、实测值、预测值及鉴定结果

PRO metabolites in S9 of pig liver					
代谢物	保留时间 Rt/min	元素组成	实测值	预测值	结构鉴定
PR2	6.6	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	342.1333	342.1336	PRO 的 C2 - C3 位亚甲二氧基去甲基化产物
PR3	8.0	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	342.1328	342.1336	PRO 的 C9 - C10 位亚甲二氧基去甲基化产物
PR4	10.2	C ₂₁ H ₄ NO ₅ ⁺ ([M+H] ⁺)	370.1642	370.1649	别隐品碱

3 讨论与结论

猪肝 S9 中检出了 ALL 的 4 种代谢产物。根据前期做过的结构鉴定^[12],通过保留时间与实测值 4 种代谢物可判定为 AL1、AL3、AL4、AL5,且 4 种代谢产物的含量很低,ALL 在猪肝 S9 中主要的代谢物同大鼠肝 S9 一样为 AL4 和 AL5,这两种代谢物在猪肝 S9 中的浓度约等于大鼠肝 S9 中代谢产物浓度的 1/10,而 AL1 和 AL3 则略低。表明 ALL 在

2 种动物肝 S9 中的代谢存在着种属差异。ALL 经环裂后产生的 AL2 在猪肝 S9 未检测到。但是检测到了其发生甲基化和 O - 去甲基化的代谢产物,这一有意思的现象表明在猪肝 S9 中 AL2 可能是 AL3 和 AL4 的主要来源途径。由图 3 和图 6 可知,O - 去甲基化在猪肝 S9 中是明显的代谢途径,其次为甲基化和氧化。亚甲二氧环环裂后的去甲基化在猪肝 S9 中可能是不可忽视的代谢途径。

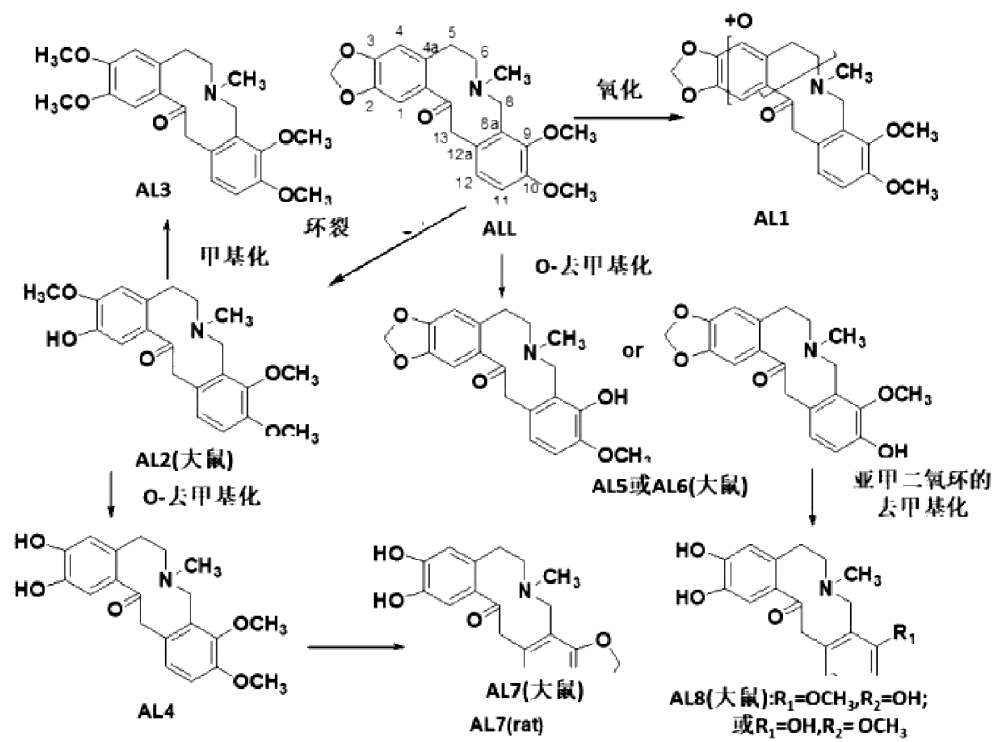
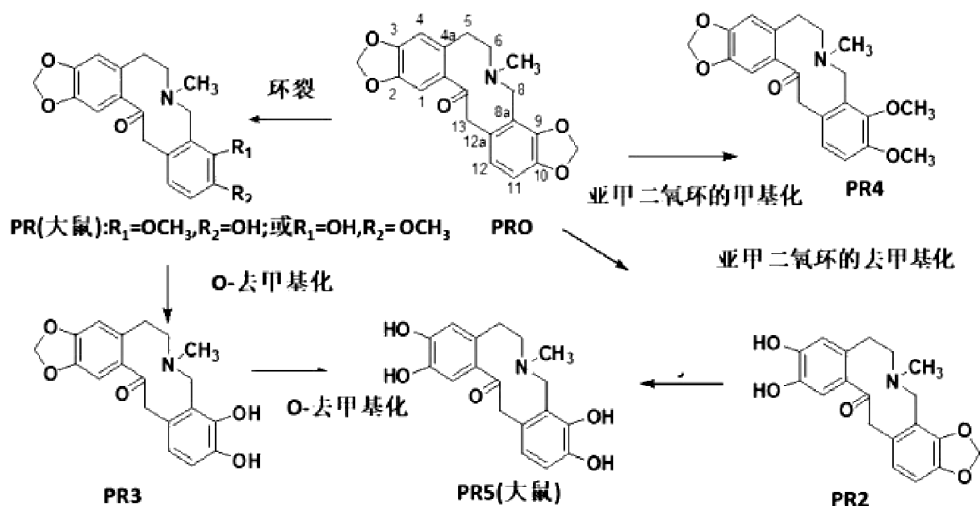


图 6 基于文献^[12],ALL 在大鼠和猪肝 S9 可能的代谢途径

Fig 6 The possible metabolic pathways of ALL in S9 of rat and pig liver based on literature^[12]

猪肝 S9 中检出了 PRO 的 3 种微量代谢产物。即 PR2、PR3 和 PR4,且均为已报道的代谢产物^[14,15]。对比 PRO 在 2 种动物肝 S9 中代谢物的 EIC 图发现^[12],PR4 代谢物的浓度在二者之间相近,但 PRO 在猪肝 S9 中的 PR2 和 PR3 代谢物浓度明显低于大鼠肝 S9 中的代谢物浓度,表明 PRO 在 2 种动物肝 S9 中存在着种属差异。PRO 在猪肝 S9 的代谢率要低于大鼠,可能是在猪肝 S9 中生物酶催化 PRO 去甲基化的能力低于大鼠肝 S9。同为环裂后的去甲基化,2,3 - 亚甲二氧环环裂后的去甲基化

代谢物 PR2 的含量要高于 9,10 - 亚甲二氧环的环裂后去甲基化代谢物 PR3,指向 PRO 在猪肝 S9 中的主要代谢产物是亚甲二氧环的去甲基代谢物 PR2 和 PR4,其次为 O - 去甲基化代谢物 PR3。结合图 5 和图 7 可知,亚甲二氧环的环裂后去甲基化是 PRO 在猪和大鼠肝 S9 中的主要代谢途径,其次为 O - 去甲基化。值得一提的是 PR4 经代谢产物分析鉴定为别隐品碱,两种生物碱之间的通过生物酶的作用进行生物转化的现象为普罗托品生物碱的深入研究提供方向。

图 7 基于文献^[12], PRO 在大鼠和猪肝 S9 可能的代谢途径Fig 7 The possible metabolic pathways of PRO in S9 of rat and pig liver based on literature^[12]

本研究采用体外肝 S9 体系研究了普罗托品类生物碱 ALL 和 PRO 在猪肝脏的体外代谢,在猪体外肝 S9 中共鉴定了 7 种 ALL 和 PRO 的代谢物,且均为已经报道过的代谢物。结果表明,ALL 和 PRO 在猪肝 S9 中存在低水平残留,与大鼠肝 S9 的体外代谢相比均存在种属差异,且在猪体外肝 S9 中的代谢率明显低于大鼠。这一现象可能与代谢酶种类和数量有关。ALL 和 PRO 在猪体外的主要代谢途径,与大鼠的主要代谢途径相同。二者的种属差异暗示着药物代谢酶 ALL 和 PRO 的关键酶。随着畜牧养殖和医药领域的不断应用,以及兽药科学的不断发展,对普罗托品类生物碱的代谢酶机制将会有更深入的研究。

参考文献:

- [1] 夏超笃,黄彦,湛穗璋,等. 博落回提取物对断奶仔猪生长性能、血清免疫指标及抗氧化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2018,45(11):3070-3076.
Xia C D, Huang Y, Zhan S Z, *et al.* Effects of *Macleaya cordata* Extract on Growth Performance, Serum Immune Indexes and Antioxidant Indexes of Weaning Piglets[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(11): 3070-3076.
- [2] Huang Y J, Cheng P, Zhang Z Y, *et al.* Biotransformation and tissue distribution of protopine and allocryptopine and effects of Plume Poppy Total Alkaloid on liver drug-metabolizing enzymes

[J]. Scientific reports, 2018, 8(1): 537.

- [3] 王斌. 博落回中普罗托品和苯并啡啉类生物碱的结构修饰与抗菌活性研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2013.
Wang B, Structural modification and antibacterial activity of protopine and benzophenanthridine alkaloids in *Macleaya* [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2013.
- [4] 李晓蕙. 小果博落回中原阿片碱、别隐品碱的杀螨构效关系研究[D]. 西安:西北农林科技大学,2009.
Li X H. Structure-acaricidal activity relationship of protopine and allocryptopine from *Macleaya Microcarpa* [D]. Xian: Northwest A&F University, 2009.
- [5] 刘谟焱,李洪,文毅,等. 别隐品碱抗心律失常作用及其单相动作电位的作用[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2006, (01):48-50+65.
Liu M H, Li Y, Wen Y, *et al.* The effect of allocryptopine on arrhythmia and monophasic action potential in animal models[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2006, (01):48-50+65.
- [6] 肖俐,曾建国,刘林,等. 别隐品碱抗肝纤维化作用[J]. 中草药,2011,(6):1158-1163.
Xiao L, Zeng J G, Liu L, *et al.* Effect of allocryptopine on antagonizing hepatic fibrosis [J]. Chinese herbal medicine, 2011, (6): 1158-1163.
- [7] Rathi A, Srivastava A K, Shirwaikar A, *et al.* Hepatoprotective potential of *Fumaria indica* Pugsley whole plant extracts, fractions and an isolated alkaloid protopine [J]. Phytomedicine, 2008, 15: 470-477

- [8] 李良国. 原阿片碱抗血小板聚集作用[J]. 国外医药(植物药分册), 1992, (2): 7-78.
- Li L G. Antiplatelet aggregation effect of protoopoids[J]. Foreign medicine (Phytomedicine), 1992, (2): 7-78.
- [9] Saeed S A, Gilani A H, Majoo R U, *et al.* Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine[J]. Pharmacological research, 1997, 36(1): 1-7
- [10] 杨丹莉, 黄燮南, 孙安盛, 等. RP-HPLC 法测普鲁托品在大鼠体内分布和排泄[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(4): 444-447.
- Yang D L, Huang X N, Sun A S, *et al.* Determination of the distribution and excretion of Pluto in rats by RP-HPLC[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19(4): 444-447.
- [11] 杨丹莉, 黄燮南, 孙安盛, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血浆的普鲁托品浓度及其药代动力学研究[J]. 药学报, 2001, 36(10): 790-792.
- Yang D L, Huang X N, Sun A S, *et al.* RP-HPLC method for determination of protopine in plasma and pharmacokinetics in rats[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2001, 36(10): 790-792.
- [12] Huang Y J, Xiao S, Sun Z L, *et al.* Identification of allocryptopine and protopine metabolites in rat liver S9 by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid communications in mass spectrometry, 2016, 30: 1549-1559
- [13] Guo C, Jiang Y, Li L, *et al.* Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to the pharmacokinetics, tissue distribution and excretion studies of Dactylicapnos scandens in rats[J]. Journal of pharmaceutical biomedical analysis, 2013, 74: 92-100.
- [14] Tao Y, Xu H, Wang S, *et al.* Identification of the absorbed constituents after oral administration of Yuanhu Zhitong prescription extract and its pharmacokinetic study by rapid resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 935: 1-9.
- [15] Liu P, Duan J A, Guo J M, *et al.* Identification of major chemical constituents and their metabolites in rat plasma and various organs after oral administration of effective Xiang-Fu-Si-Wu decoction fraction by UPLC-Q-TOF-MS and metabolynx[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(12): 1736-1749.

(编辑:陈希)