

LCMS-8040/GCMS-QP2010 Ultra/LCMS-IT-TOF 联合应用小檗碱肠道代谢研究

LCMSMS-174

摘要：通过多种仪器（LCMS-IT-TOF、LCMS-8040、GCMS-QP2010 Ultra）联合检测大鼠口服给药、体外温孵代谢后血浆、排泄物、组织器官、温孵体系内的小檗碱（BBR）、二氢小檗碱（dhBBR）以及小檗碱主要代谢物，研究小檗碱在肠道的代谢情况。初步解释小檗碱在肠道菌丛中的代谢机理，提出肠道菌丛以“器官”形式将 BBR 代谢为容易被肠道上皮细胞吸收的 dhBBR，而后 dhBBR 再次转化为更具药理活性的 BBR 进行药理作用。

关键词：小檗碱；二氢小檗碱；肠道菌丛；药物代谢动力学；超高效液相色谱串联质谱法

小檗碱（BBR）（结构式如图 1）是一种异喹啉类生物碱，是从毛茛科黄连属植物黄连的根状茎中提取的主要有效成分，具有广谱抗菌作用，临床上一般使用其盐酸盐治疗肠道感染与腹泻。Weijia Kong 等人 2004 年报道小檗碱具有降血脂作用。动物实验及细胞实验同样证明小檗碱在降脂方面效果显著。通过进一步的机制研究发现小檗碱的降脂原理与他汀类药物并不相同：小檗碱则是通过稳定 LDLR mRNA 从而增加 LDL 受体的表达来降低胆固醇，以达到降血脂的目的。小檗碱在水中

的溶解性较差，很难在小肠上皮细胞吸收，但口服 BBR 后在主要器官以及尿液中均有小檗碱的检出。根据前期应用报告提及的方法学（LCMSMS-119~121）在本报告阐述肠道中小檗碱及代谢物的代谢情况。

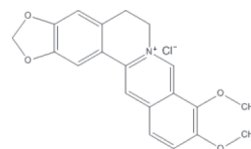


图1 盐酸小檗碱结构式

实验部分

1.1 主要药物

盐酸小檗碱购自 J&K Scientific Ltd，内标巴马汀购自中国食品药品检定研究院，纯度均大于 98 %。唐松草分定（M1）、小檗红碱（M2）、去亚甲基小檗碱（M3）、药根碱（M4）、二氢小檗碱（dhBBR，M17）购自成都 Herbpurity 公司

1.2 动物

SD 雄性大鼠（SPF 级），180~200 g，购买于中国食品药品检定研究院实验动物资源中心，合格证号 SCXK（京）2009-0017；实验前大鼠 12 h 禁食，但自由饮水。

1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC

自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站；AG-135 电子天平（瑞士 Mettler 公司）；XW-80A 型微型漩涡混合仪（金坛市盛蓝仪器制造有限公司）；TH2-100 型恒温培养摇床（上海一恒科技有限公司）；氮气吹扫仪 MD200-2（杭州奥盛仪器有限公司）；Heraeus Pico 21 离心机（Thermo Scientific，德国）。

1.4 试剂

乙腈购自美国 Fisher 公司（Fairlawn, NJ, USA）；实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度 99 %，LCMS 级，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯，购自北京化学试剂公司。

方法

2.1 BBR 大肠道菌体内代谢

6 只大鼠结肠内容物匀浆，称取 5 g 样品转移至含有厌氧培养基的烧瓶（100 mL）中，经过彻底混匀，在厌氧条件下进行预培养。加入 10 μ L 浓度为 1.0 mg/mL 芦丁甲醇溶液作为阳性对照。10 μ L 不同浓度的 BBR 分别加入新鲜的人或大鼠的肠道菌培养物（990 μ L）。于 37 $^{\circ}$ C 下温孵 72 小时。而后 1 mL 乙腈终止反应，于 BBR 样品中加入 50 μ L、2.0 mg/mL 的内标甲醇溶液。涡旋 30s，10,000rpm 离心 15 min。上清液室温 N₂ 吹干，残渣 100 μ L 甲醇溶解，10,000rpm 离心 15 min。LCMS-IT-TOF 上样分析。

2.2 体内及体外肠道菌丛可能代谢物定量分析

以甲醇稀释 10 mg/mL BBR 储备液制成系列工作液，绘制标准曲线。以 LCMS-8040 定量分析经代谢菌丛转化的 BBR 及代谢物。

以甲醇稀释 1 mg/mL dhBBR 储备液制成 1、10、20、50、100、200、500 μ g/mL 工作液，由于 dhBBR 在 LCMS 分析中分解，因此以 GCMS-QP2010 Ultra 分析肠道菌丛温孵的样品。在不同时间段收集六只经口服给药的 SD 大鼠粪便并进行前处理，计算 dhBBR 含量。

2.3 大鼠小肠道菌丛 BBR 的代谢

十只 SD 大鼠小肠内容物匀浆，加入厌氧培养基进行培养。加入 BBR 进行温孵，其终浓度为 100、50、10 μ g/mL，反应持续 6、12、24 h。以 LCMS-8040 及 GCMS-QP2010 Ultra 进行 BBR、dhBBR 以及 BBR 代谢物的检测。

2.4 小肠内 BBR、dhBBR 及其他代谢物分布

分别收集大鼠口服给药 BBR 后不同时间段的小肠的三部分（十二指肠、空肠和回肠）。生理盐水对小肠进行洗涤并干燥，与等比甲醇水按 1:2 混合并匀浆。10,000 rpm 离心 10 min，40 $^{\circ}$ C 水浴旋转蒸发仪蒸干。250 μ L 甲醇复溶组织残渣，涡旋 5 min，14,000rpm 离心 5 min，上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤。GCMS-QP2010 Ultra 及 LCMS-8040 进行分析，按照各自标曲计算其含量。

2.5 十种肠道兼性厌氧菌 BBR 体外代谢培养

采集病人肠道内的包括金黄色酿脓葡萄球菌、屎肠球菌、粪肠球菌、阴沟肠杆菌等在内的十种肠内兼性厌氧菌。将细菌分别转移至含有厌氧培养基的烧瓶中，加入 10 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 BBR 溶液，其终浓度为 50 μ g/mL，于 37 $^{\circ}$ C 下进行温孵。在不同时间段进行取样，使用 LCMS-8040 及 GCMS-QP2010 Ultra 进行 BBR、dhBBR 的定量分析。

2.6 BBR 体内吸收

5 只 SD 大鼠禁食 12 h，dhBBR 灌胃 200 mg/kg 并于不用时间段采集眼球静脉血样 0.5 mL 至肝素管中，5000 rpm 离心 5 min，100 μ L 血浆等体积乙腈沉淀蛋白后加入 10 μ L 内标物，LCMS-8040 测定血浆中 BBR 及 dhBBR 浓度。

2.7 数据分析

统计分析采用 GraphPad Prism Version 5 进行双因素方差分析，数据以平均值 \pm 标准差表示，p 值小于 0.05 判定为存在显著性差异。

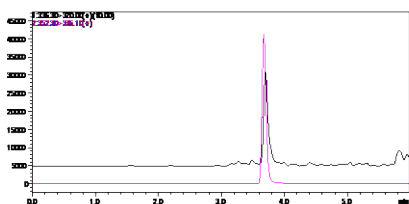


图1 LCMS-8040 检测大鼠胆汁 BBR0.05 ng/mL 色谱图

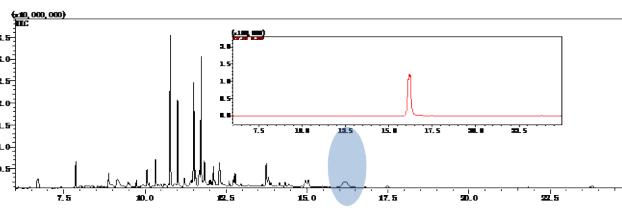


图2 GCMS-QP2010 Ultra 检测大鼠粪便 dhBBR 色谱图及提取离子流图(小图)

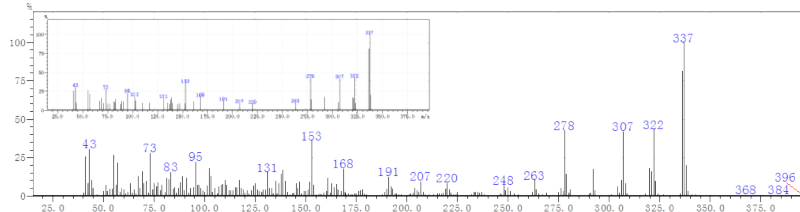


图3 GCMS-QP2010 Ultra 检测质谱图与谱库 dhBBR 检索质谱图(小图)

结果

3.1 dhBBR 是 BBR 在肠道生态系统系统的代谢产物

为全面研究 BBR 在体内的代谢途径，前期已经对大鼠口服给药 BBR，尿液、胆汁以及粪便的代谢情况，所涉及的化合物于 LCMS-8040 与 GCMS-QP2010 Ultra 均可检测到。17 种 BBR 代谢产物在排泄过程中检测到，其中 dhBBR 较为引人注意，见图 3。dhBBR 仅在粪便中检出，此其一；第二，dhBBR 是众多代谢物中唯一改变结构母核的化合物。

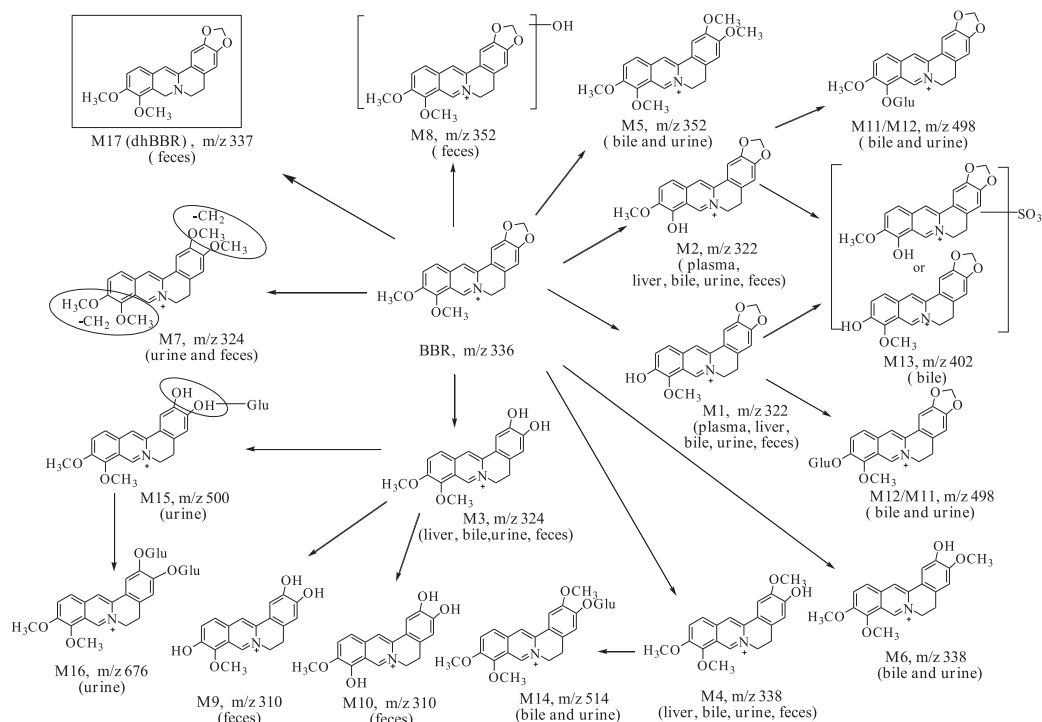


图 3 BBR 代谢途径

因此推测可能是由大鼠肠道菌丛引起的代谢。大鼠经口服给药检测 72 小时内的 BBR、dhBBR、以及排泄代谢产物，如图 4 所示，尿液、胆汁以及粪便中检测到 BBR 的主要代谢产物 M1-M4，dhBBR 仅在粪便样品中有检出。dhBBR 于 12-24 小时达峰，而后降低。

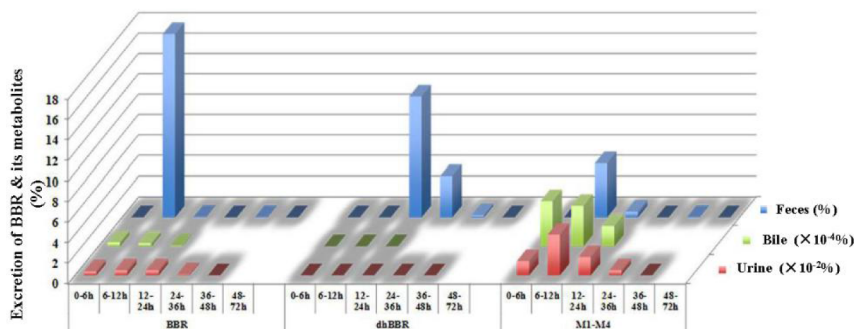


图 4 BBR、dhBBR 及主要代谢产物排泄药时图

为进一步确证 dhBBR 为 BBR 肠道代谢产物，检测了大鼠各个脏器组织的 dhBBR 含量。如图 5 所示，BBR 口服 (200mg/kg) 24 小时后，dhBBR 仅在肠道组织中检出。因此认为大鼠肠道菌可能以“器官”的角色将 BBR 转化为 dhBBR。

为进一步确证 dhBBR 为 BBR 肠道代谢产物，检测了大鼠各个脏器组织的 dhBBR 含量。如图 5 所示，BBR 口服 (200 mg/kg) 24 小时后，dhBBR 仅在肠道组织中检出。因此认为大鼠肠道菌可能以“器官”的角色将 BBR 转化为 dhBBR。

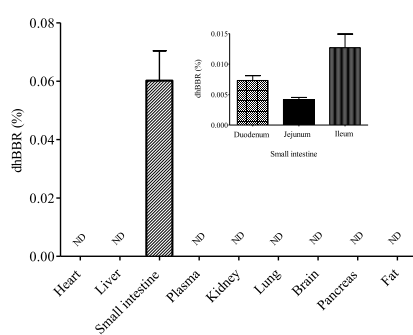


图5 BBR 组织分布图

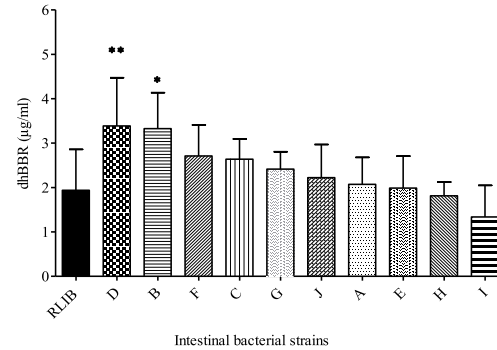


图6 BBR 经十种菌株温孵代谢后 dhBBR 含量

3.2 肠道 dhBBR 由肠道菌丛生成

为研究 BBR-dhBBR 转化反应是否由肠道菌丛导致，对 2.5 所涉及的十种菌株进行了 BBR (50 µg/mL) 温孵培养。结果如图 6 显示，十种菌株在 BBR 温孵代谢 72 小时均产生 dhBBR。结果显示肠道微生物以“组织”形态工作进行 BBR-dhBBR 的转化。

3.3 dhBBR 肠道吸收率优于 BBR

体外系统 dhBBR 较 BBR 而言具有更优的吸收。如图 7 所示，dhBBR 的表观渗透系数 P_{app} (AP-BL) 高于 BBR 的 11.9 倍，这表明 dhBBR 吸收生物利用度显著提升。此外如图 8，dhBBR 的外排率明显低于 BBR (1.58 vs 32.39) 表明该化合物具有较低的细胞外排性。

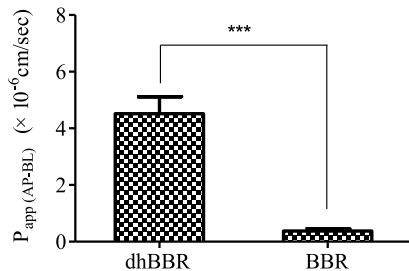


图7 dhBBR 与 BBR 的表观渗透系数比较

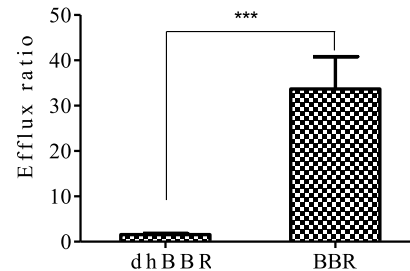


图8 dhBBR 与 BBR 的外排率比较

如图 9 所示，在 dhBBR 体内吸收研究中，检测到 dhBBR 血浆浓度低于 10 ng/mL，而血浆中 BBRAUC(0-t) 为 261.8 ng/mL，达峰浓度 (C_{max}) 为 52.47 ng/mL。结果显示，由于肠道较好的 dhBBR-BBR 转化导致血液中 dhBBR 含量远低于 BBR。两者 AUC (0-t) 以及 C_{max} 相比较表明较 BBR 而言，dhBBR 具有更好的肠道吸收效果。

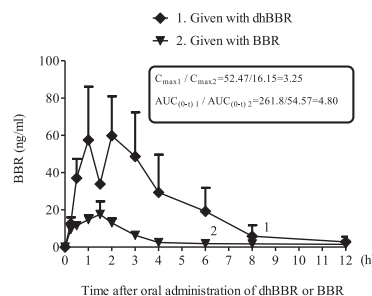


图9 dhBBR 与 BBR 的吸收情况比较

■ 讨论

通过建立使用 LCMS-IT-TOF、LCMS-8040 以及 GCMS-QP2010 Ultra 测定大鼠血浆、各组织、排泄物、体外温孵体系中 BBR、dhBBR 以及主要代谢产物，进行 BBR 肠道代谢研究。研究显示，肠道菌丛以“器官”形式进行 BBR-dhBBR 的转化。dhBBR 具有更好的肠上皮细胞吸收效果，而后再次转化为 BBR，以更具药效的形式进行药理活性作用。

■ 致谢

论题是岛津分析中心同中国医学科学院药物研究所王琰教授课题组合作完成，两单位对此课题均做出了巨大贡献。在此感谢王琰教授课题组对本论题的辛勤劳作。