

LC-MSⁿ 鉴定大鼠体内 SIPI 的代谢产物

张鹏¹, 仇峰^{1,3}, 魏广力³, 刘昌孝³, 钟大放^{1,2*} (1. 沈阳药科大学药物代谢与药理学实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 天津药物研究院, 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 考察 SIPI 在大鼠体内的代谢转化。方法 采用液相色谱-质谱(LC-MSⁿ)联用技术,检测在单剂量静脉注射给予 SIPI 后大鼠尿,粪及胆汁中的 SIPI 及代谢物。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱;流动相为甲醇-水-甲酸(40:60:0.5),流速为 0.5 mL·min⁻¹;质谱仪离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测。代谢物经 LC-MSⁿ 方法分离和分析,通过质谱和色谱行为推测其结构。结果 在大鼠尿样中共检测到 8 种代谢物,在大鼠粪样中共检测到 4 种代谢物,在大鼠胆汁样品中共检测到 3 种代谢物。结论 SIPI 在大鼠体内广泛代谢,形成多种代谢产物。

关键词:SIPI;液相色谱-质谱;代谢;大鼠

中图分类号:R969 文献标识码:A 文章编号:1001-2494(2007)03-0219-05

Characterization of Metabolites of SIPI in Rat by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

ZHANG Peng¹, QIU Feng^{1,3}, WEI Guang-li³, LIU Chang-xiao³, ZHONG Da-fang^{1,2*} (1. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT;OBJECTIVE To investigate the metabolic profile of SIPI in rats. **METHODS** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSⁿ) was used for the separation and analysis of SIPI and its metabolites in rats urine, feces and bile after an intravenous dose of SIPI. The metabolites were separated using a mobile phase consisting of methanol-water-formic acid (40:60:0.5) at 0.5 mL·min⁻¹ with a Diamonsil C₁₈ column. The instrument was operated in positive electrospray ionization (ESI) mode. The metabolites were identified by comparisons of their mass spectra and LC behavior. **RESULTS** Totally, 8 metabolites were detected in rats urine, 4 metabolites were detected in rats feces and 3 metabolites were detected in rats bile. **CONCLUSION** SIPI underwent extensive metabolic pathways in rats.

KEY WORDS:SIPI; liquid chromatography-mass spectrometry; metabolism; rats

SIPI 为正在研制开发的抗肿瘤新药,其化学名为 *N*-苄基-2-[4-(2-氧代-2-苯基乙基)-哌嗪-1]-乙酰胺,其结构见图 1。

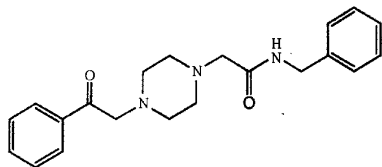


图 1 SIPI 的结构

Fig 1 Structure of SIPI

药物代谢研究是新药开发中的重要一环。本实验拟采用液相色谱-质谱(LC-MSⁿ)联用技术,检测在静脉注射给予 SIPI 后大鼠尿,粪及胆汁中的新药 SIPI 及代谢产物,阐明该新药在大鼠体内代谢产物的结

构,为该新药的进一步药理和药效研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

美国 Thermo 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪,包括 ESI 源及 Xcalibur 1.2 数据处理系统、日本岛津公司 LC-10AD 色谱系统。甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.2 动物

健康 Wistar 大鼠 12 只,雌雄各半(沈阳药科大学实验动物中心),体重 250 ± 20 g。将 12 只大鼠随机分为 3 个剂量组,每组 4 只,雌雄各半。分别静脉注射给予 10, 20 或 40 mg·kg⁻¹ SIPI,于给药后 0 ~ 12 h 内收集尿样,粪样和胆汁样品。

基金项目:国家 863 项目(2003AA2Z347)

作者简介:张鹏,男,硕士,助教 * 通讯作者:钟大放,男,教授,博士生导师 Tel:(021)50800738 Fax:(021)50800738 E-mail:zhongdf@china.com

1.3 样品预处理

取 Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱,用水 2 mL,甲醇 2 mL,水 2 mL 依次洗涤活化,待用;将尿样或胆汁涡旋混合 30 s,用蒸馏水稀释一倍,经 0.3 μm 微孔滤膜过滤,滤液以每分钟 30 滴的速度加到上述已活化的固相萃取柱上,用水 2 mL 洗涤,用甲醇 2 mL 洗脱,收集甲醇洗脱液,取 20 μL 用于 LC-MSⁿ 分析;将粪样研细,加入一定量的甲醇,超声 10 min 后,离心,取 20 μL 上清液直接进行 LC-MSⁿ 分析。

1.4 LC-MSⁿ 分析

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 北京迪马公司);流动相为甲醇-水-甲酸(40:60:0.5),流速为 0.5 mL · min⁻¹,柱温为室温;质谱仪离子源为电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测,离子源喷射电压 4.25 kV;毛细管温度为 200 °C;毛细管电压 30 V;管透镜补偿电压 30 V;碰撞气为 He;鞘气和辅助气均为 N₂,流速分别为 0.75 和 0.15

L · min⁻¹。采用一级全扫描质谱(full scan MS)、选择离子二级全扫描质谱(full scan MS²)两种方式同时测定。

2 实验结果

2.1 判断代谢物是否存在雌雄差异或剂量组间差异

分别对各剂量组的雄性和雌性 Wistar 大鼠的尿样、胆汁和粪样进行 LC-MSⁿ 分析,未见代谢物存在雌雄差异或剂量组间差异。

2.2 静脉注射给药后大鼠尿样中的代谢物

在一级全扫描质谱条件下,与静脉注射给药前空白尿样比较,静脉注射给药后的大鼠尿样中除检测到 SIPI 原形的准分子离子峰 m/z 352 外,还检测到一组与 SIPI 相关物质的准分子离子峰,质/荷比分别为 m/z 530, 368, 262, 354, 370, 386 和 108。然后以上述质荷比进行 LC-MSⁿ 检测,获得各代谢物的色谱图见图 2 和多级质谱诊断信息,见表 1。

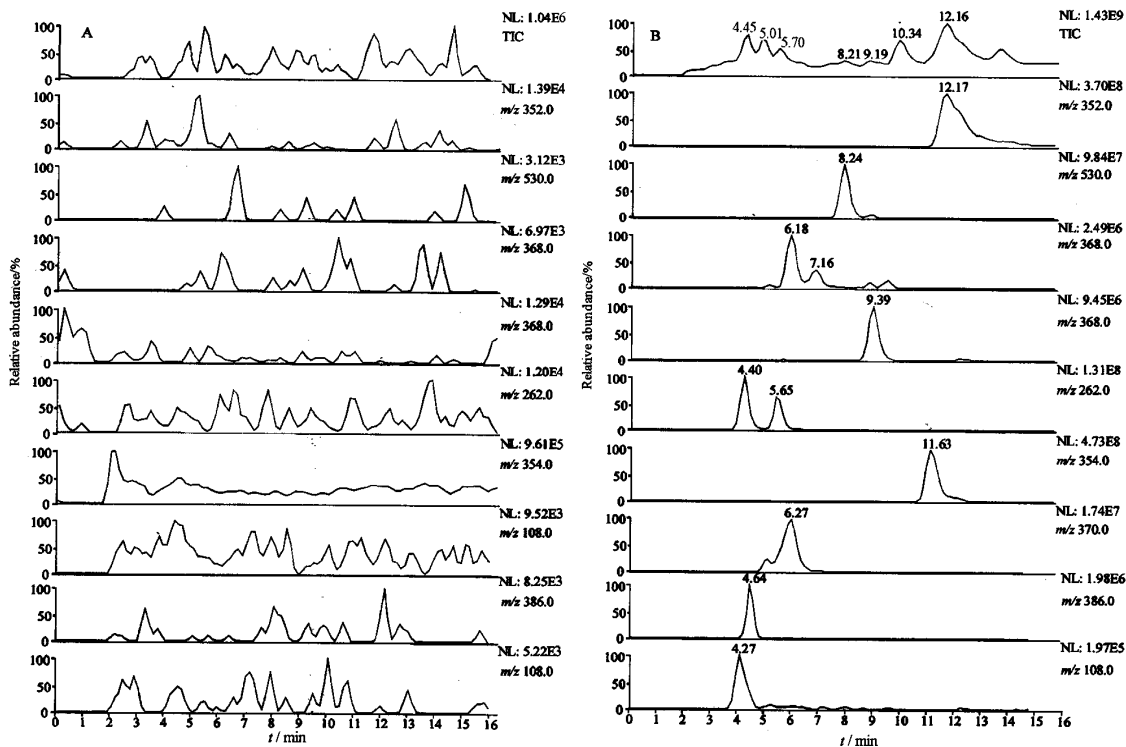


图 2 大鼠尿中 SIPI 及其代谢物的总离子流色谱图和二级全扫描色谱图

A - 空白尿; B - 大鼠静脉注射给予 40 mg · kg⁻¹ SIPI 后 0 ~ 12 h 的尿样

Fig 2 Total ion current (TIC) and full scan MS² chromatograms of SIPI and its metabolites in rat urine

A - blank urine; B - the rat urine collected during 0 ~ 12 h after an iv dose of 40 mg · kg⁻¹ SIPI

2.2.1 SIPI(MO) 准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 352, HPLC 保留时间为 12.1 min。对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 m/z 217, 为准分子离子脱 N-(苄基)-甲酰胺所产生, 见图 3。进一步

与 SIPI 对照品比较其色谱和质谱行为, MO 确定为 SIPI。

2.2.2 代谢物 M1 准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 530, HPLC 保留时间为 8.2 min。 $[M + H]^+$ 峰较

表1 大鼠静脉注射给予 40 mg · kg⁻¹ SIPI 后 0~12 h 尿样中 SIPI 及其代谢物的多级质谱数据

Tab 1 LC-MSⁿ data of SIPI and its metabolites in rat urine after a single iv dose of 40 mg · kg⁻¹ SIPI

| Compound | [M + H] ⁺ (<i>m/z</i>) | Main MS ² fragmentions(<i>m/z</i>) | Main MS ³ fragmentions(<i>m/z</i>) | Main MS ⁴ fragmentions(<i>m/z</i>) |
|----------|--|--|--|--|
| M0 | 352 | 217 | | |
| M1 | 530 | 354 | 336 | 201 |
| M2 | 368 | 217 | | |
| M3 | 368 | 233 | | |
| M4 | 262 | 217 | | |
| M4' | 262 | 217 | | |
| M5 | 354 | 336 | 201 | |
| M6 | 370 | 352 | 217 | |
| M7 | 386 | 217 | | |
| M8 | 108 | 91 | | |

注: M0 - SIPI; M1 - M8 - 代谢物 1 - 8

Note: M0 - SIPI; M1 - M8 - Metabolites 1 - 8

SIPI 增加 178 u; 其 MS² 碎片离子为 *m/z* 354, 较 SIPI 增加 2 u; MS³ 碎片离子为 *m/z* 336; MS⁴ 碎片离子为 *m/z* 201。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 可以确定 M1 的结构为酮羰基还原后与葡萄糖醛酸的结合产物^[1]。

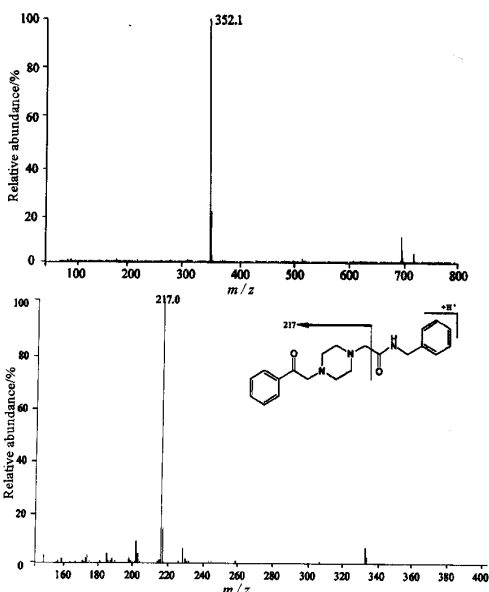


图3 SIPI 产生的准分子离子峰 *m/z* 352 及其二级全扫描质谱图

Fig 3 [M + H]⁺ ions of SIPI (*m/z* 352) and its full MS/MS spectra

2.2.3 代谢物 M2 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 368, HPLC 保留时间为 6.2 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 增加 16 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 217, 与 M0 的 MS² 碎片离子相同。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M2 的结构为苄基的苯环羟基化的产物。

2.2.4 代谢物 M3 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 368, HPLC 保留时间为 9.4 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 增加 16 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 233, 比 M0 的 MS² 碎片离子多 16 u。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M3 的结构为与羰基相连的苯环的羟基化产物。

2.2.5 代谢物 M4 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 262, HPLC 保留时间为 4.4 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 减少 90 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 217, 与 M0 的 MS² 碎片离子相同。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M4 的结构为 *N*-去苄基的产物。

2.2.6 代谢物 M4' 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 262, HPLC 保留时间为 5.6 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 减少 90 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 217, 与 M0 的 MS² 碎片离子相同。可见 M4' 与 M4 的质谱行为完全相同, 但是色谱保留时间上有一定差别, 推测是 M4 的某种异构体形式。

2.2.7 代谢物 M5 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 354, HPLC 保留时间为 11.6 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 增加 2 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 336; MS³ 碎片离子为 *m/z* 201。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M5 的结构为酮羰基还原产物。

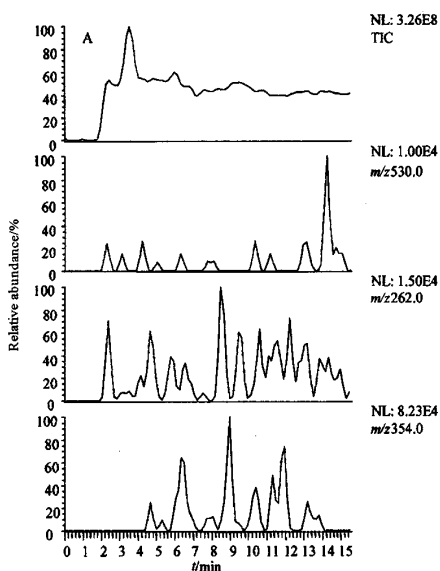
2.2.8 代谢物 M6 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 370, HPLC 保留时间为 6.3 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 增加 18 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 352; MS³ 碎片离子为 *m/z* 217, 与 M0 的 MS² 碎片离子相同。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M6 的结构为酮羰基还原且与之相连的苯环羟基化的产物。

2.2.9 代谢物 M7 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 386, HPLC 保留时间为 4.6 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 增加 34 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 217, 与 M0 的 MS² 碎片离子相同。结合 SIPI 的质谱断裂规律, 推测 M7 的结构为酮羰基还原且两个苯环分别单羟基化的产物。

2.2.10 代谢物 M8 准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 108, HPLC 保留时间为 4.3 min。[M + H]⁺ 峰较 SIPI 减少 244 u; 对其进行 LC-MS² 分析得到的主要二级碎片离子为 *m/z* 91, 为准分子离子脱 NH₃ (-17 u) 所产生。根据 M8 的色谱和质谱行为, 推测 M8 的结构为苄胺, 由原形的酰胺键断裂所产生。

2.3 静脉注射给药后大鼠胆汁中的代谢物

静脉注射给予 SIPI 后,在大鼠胆汁中可检测到



M1, M4'和 M5,其色谱图见图4。

2.4 静脉注射给药后大鼠粪样中的代谢物

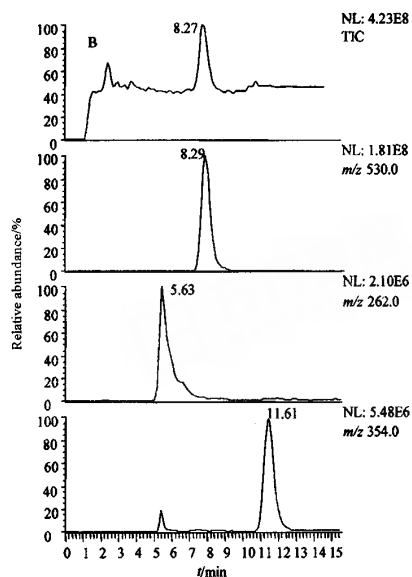


图4 大鼠胆汁中 SIPI 及其代谢物的总离子流色谱图和二级全扫描色谱图

A - 空白胆汁; B - 大鼠静脉注射给予 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIPI 后 0 ~ 12 h 的胆汁样品

Fig 4 Total ion current (TIC) and full scan MS² chromatograms of SIPI and its metabolites in rat bile

A - blank bile; B - rat bile collected during 0 ~ 12 h after an iv dose of $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIPI

静脉注射给予 SIPI 后,在大鼠粪样中可检测

到 M0, M1, M3, M4, M4'和 M5,其色谱图见图5。

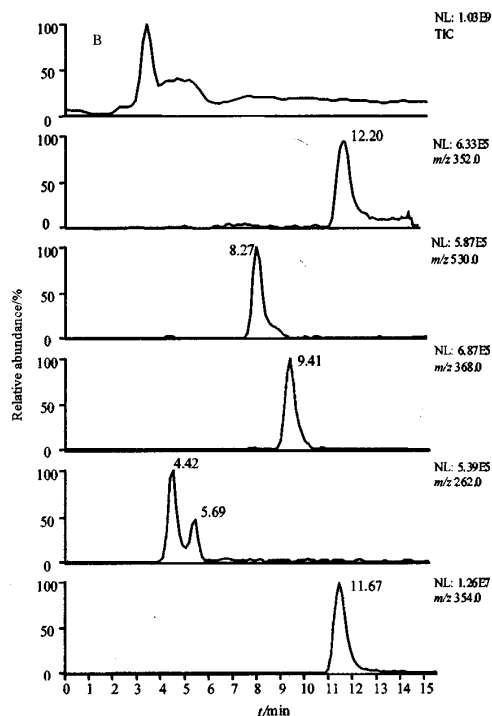
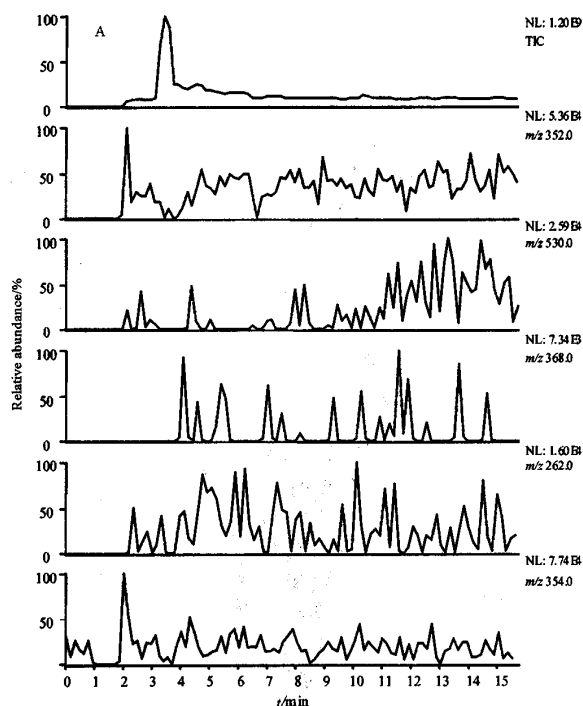


图5 大鼠粪中 SIPI 及其代谢物的总离子流色谱图和二级全扫描色谱图

A - 空白粪样; B - 大鼠静脉注射给予 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIPI 后 0 ~ 12 h 的粪样

Fig 5 Total ion current (TIC) and full scan MS² chromatograms of SIPI and its metabolites in rat bile feces

A - blank feces; B - rat feces collected during 0 ~ 12 h after an iv dose of $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SIPI

根据以上实验结果,推测 SIPI 在大鼠体内的代谢途径见图 6。SIPI 在大鼠体内主要通过尿排泄,其在

大鼠体内的主要代谢物为 SIPI 还原后结合葡萄糖醛酸的产物。

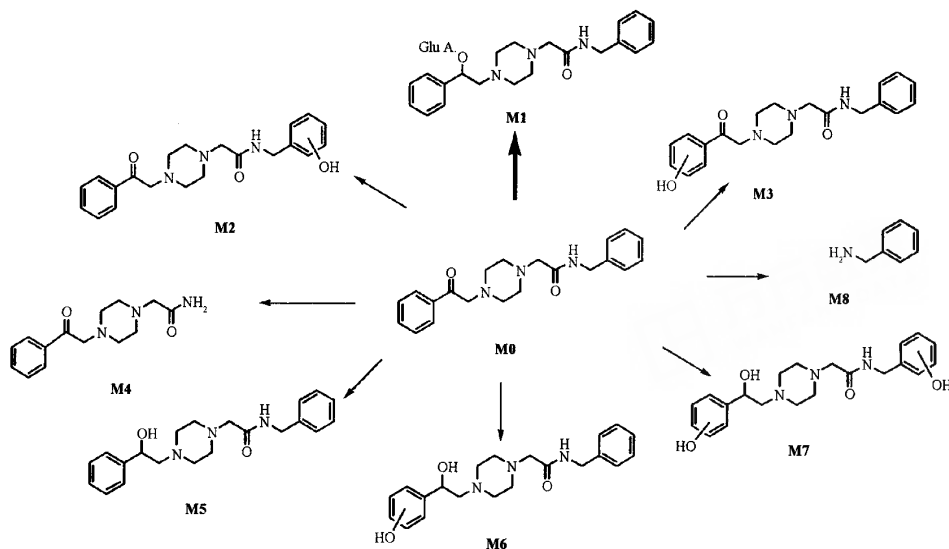


图 6 SIPI 在大鼠体内的代谢途径

Fig 6 Proposed metabolic profile of SIPI in rats

3 讨论

利用 ESI-MSⁿ 离子阱技术可以在温和的条件下获得待测物的准分子离子峰。本试验采用的是正离子检测方式,SIPI 离子化后形成的主要的准分子离子峰为 [M + H]⁺。在分析过程中选定母离子后,逐步提高相对碰撞能量,使碎片离子的丰度逐渐提高,从而直接给出母离子与碎片离子的关系^[24]。利用 LCQ 仪器的 MSⁿ 离子阱技术最多可以进行 MS¹⁰ 测试,本实验中使用到 MS⁴ 测试即可以确定代谢物的结构。

本实验通过对 SIPI 及其代谢物的 MS1 ~ MS4 多级质谱分析发现,在正离子检测方式下,各化合物均可生成脱去 N-(苄基)-甲酰胺的碎片离子 (m/z 217) 或其衍生物,即酰胺键所连的碳-碳键易于断裂。应用该断裂规律可以方便地推测出各代谢物的结构。这也是利用 ESI-MSⁿ 离子阱技术鉴定药物代谢产物的一个优势所在;根据质谱的断裂规律,在没有标准品的情况下,也可以确定部分代谢物的结构。

从本实验的结果看,静脉注射给药后,大鼠尿中的代谢物明显多于胆汁和粪中的代谢物,这就说明除肝脏外,体循环中的其他器官也是 SIPI 代谢的场所。这些器官可能包括肾脏,肺脏,血液等^[5]。另外,静脉注射给药后,大鼠粪样中的代谢物略多于胆

汁中的代谢物,我们推测大鼠的肠道对 SIPI 也有一定的代谢作用。

静脉注射给药后,大鼠胆汁中未发现原形药物,在粪样中发现存在原形药物,由此推测 SIPI 存在着肠壁分泌,可能是肠壁的某种转运载体蛋白的底物。

从质谱的响应情况来看,SIPI 在还原后与葡萄糖醛酸结合是一个重要的代谢途径,且该代谢物在大鼠的尿样、粪样和胆汁中均可检测到。肝脏中多种 UDP-葡萄糖醛酸转移酶可催化该类反应。这些酶存在于内质网中,直接与细胞色素 P450 相邻,故 I 相代谢产物可以立即被部分地葡萄糖醛酸化^[5]。推测肝脏仍是 SIPI 代谢的主要器官。

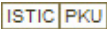
REFERENCES

- [1] CHEN X Y, ZHAO L M, ZHONG D F. A novel metabolic pathway of morphine: formation of morphine glucosides in cancer patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, 55(6): 570-578.
- [2] BRUINS A P. Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry: II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry [J]. *Trends Analyt Chem*, 1994, 13(2): 81-90.
- [3] LEE M S, KERNS E H. LC/MS applications in drug development [J]. *Biomed Chromatogr*, 1999, 18(3-4): 187-279.
- [4] OLIVEIRA E J, WATSON D G. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics [J]. *Biomed Chromatogr*, 2000, 14(6): 351-372.
- [5] ZHONG D F. *Drug Metabolism* (药物代谢) [M]. Beijing: China Medical Technology Press, 1996: 9.

(收稿日期:2005-12-24)

作者: 张鹏, 仇峰, 魏广力, 刘昌孝, 钟大放, ZHANG Peng, QIU Feng, WEI Guang-li, LIU Chang-xiao, ZHONG Da-fang

作者单位: 张鹏, ZHANG Peng (沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳, 110016), 仇峰, QIU Feng (沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳, 110016; 天津药物研究院, 天津药代动力学与药效动力学学部共建国家重点实验室, 天津, 300193), 魏广力, 刘昌孝, WEI Guang-li, LIU Chang-xiao (天津药物研究院, 天津药代动力学与药效动力学学部共建国家重点实验室, 天津, 300193), 钟大放, ZHONG Da-fang (沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳, 110016; 中国科学院上海药物研究所, 上海, 201203)

刊名: 中国药学杂志 

英文刊名: CHINESE PHARMACEUTICAL JOURNAL

年, 卷(期): 2007, 42(3)

被引用次数: 1次

参考文献(5条)

1. ZHONG D F 药物代谢 1996
2. OLIVEIRA E J; WATSON D G Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics 2000(06)
3. LEE M S; KERNS E H LC/MS applications in drug development [外文期刊] 1999(3-4)
4. BRUINS A P Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry: II. Applications in pharmacy, biochemistry and general chemistry [外文期刊] 1994(02)
5. CHEN X Y; ZHAO L M; ZHONG D F A novel metabolic pathway of morphine: formation of morphine glucosides in cancer patients 2003(06)

本文读者也读过(10条)

1. 陈怀侠. 沈少林. 韩凤梅. 陈勇. CHEN Huai-xia. SHEN Shao-lin. HAN Feng-mei. CHEN Yong 高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱分析水苏碱及其大鼠体内代谢物 [期刊论文]-药科学报 2006, 41(5)
2. 刘会臣. 杜玉民. 王永利. LIU Hui-chen. Du Yu-min. WANG Yong-li 双苯氟嗪在大鼠体内的代谢途径 [期刊论文]-药科学报 2005, 40(2)
3. 夏红军. 朱珊. 梁键谋. 陈丽霞. 邸欣. 姚新生. 邱峰 大鼠灌胃灯盏花素胆汁、血浆、尿液以及粪便样品中代谢产物的分析鉴定 [会议论文]-2007
4. 王雷娜. 宋敏. 杭太俊. 张正行. WANG Lei-na. SONG Min. HANG Tai-jun. ZHANG Zheng-xing LC-MS/MS法研究1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉溴酸盐在大鼠体内的代谢产物 [期刊论文]-药科学报 2007, 42(11)
5. 刘晓. 卢中秋. 胡国新. 徐雪松. 林宏亮. LIU Xiao. LU Zhong-qiu. HU Guo-xin. XU Xue-song. LIN Hong-liang 溴苯腈在兔的血药浓度GC-MS法测定及其药动学研究 [期刊论文]-中国临床药理学与治疗学 2006, 11(1)
6. 陈广通. 杨敏. CHEN Guang-tong. YANG Min 三七皂苷R₁在大鼠体内的代谢产物分析 [期刊论文]-时珍国医国药 2010, 21(2)
7. 陈勇. 沈少林. 陈怀侠. 韩凤梅. CHEN Yong. SHEN Shao-lin. CHEN Huai-xia. HAN Feng-mei HPLC-ESI-ITMSn法鉴定麻黄碱及其大鼠体内主要代谢产物 [期刊论文]-药科学报 2005, 40(9)
8. 董庆光. 顾景凯. 钟大放. 初大丰. 孙璐 新抗炎镇痛剂SFZ-47在家兔体内主要代谢产物的分离与鉴定 [期刊论文]-药科学报 2002, 37(2)
9. 潘智文. 黄克建. 林翠梧. 刘晓锋. 李璐. 罗正坚. 陈而廉. PAN Zhi-wen. HUANG Ke-jian. LIN Cui-wu. LIU Xiao-feng. LI Lu. LUO Zheng-jian. CHEN Er-lian 大鼠尿中硝基安定与尼美西泮及其代谢物的GC-MS检测 [期刊论文]-分析测试学报 2008, 27(8)

10. 钟大放, 姜浩, 顾景凯, 周慧. Zhong Dafang. Jiang Hao. Gu Jingkai. Zhou Hui 用电喷雾离子阱质谱法对SFZ-47在家兔体内两主要代谢物的分析[期刊论文]-沈阳药科大学学报1999, 16(1)

引证文献(1条)

1. 张永正, 徐晓林, 张海琪, 方美娟, 潘立新, 陆红法 HPLCMS/MS法检测中华鳖中磺胺类药物残留[期刊论文]-水生生物学报 2008(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgyxzz200703017.aspx