

LC-MS/MS 及离子簇技术分析鉴定盐酸戊乙奎醚外消旋体在大鼠体内的代谢产物

薛明^{1,2*}, 阮金秀¹, 袁淑兰¹, 张振清¹, 乔建忠¹, 郭继芬¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 首都医科大学药理教研室, 北京 100054)

摘要: 目的 研究盐酸戊乙奎醚外消旋体在大鼠体内的代谢产物。方法 健康大鼠同时等量 im 盐酸戊乙奎醚外消旋体及其氙标盐酸戊乙奎醚, 收集尿样并处理。用 LC/MS/MS, GC-MS, FAB-MS 及氙标离子簇示踪技术分析鉴定盐酸戊乙奎醚在大鼠体内的代谢产物。结果 共检测到 8 个代谢产物, 分别为原形环戊基上的单氧化产物(M_1 与 M_1')、原形环戊基上的单羟基化产物(M_2 与 M_2')、原形环戊基间位上的氧化羟基化产物(M_3 与 M_3')及原形环戊基与奎宁环上的羟基化产物(M_4 与 M_4')。其中, M_1 与 M_1' , M_2 与 M_2' , M_3 与 M_3' 及 M_4 与 M_4' 互为异构体。结论 此法为临床合理用药及新抗胆碱能性药物研究提供有价值的信息。

关键词: 盐酸戊乙奎醚; 外消旋体; 代谢产物; LC-MS/MS

中图分类号: R917.103 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)10-0802-05

盐酸戊乙奎醚(penehyclidine hydrochloride, PH)是军事医学科学院研制的一种新型抗胆碱类手性药物, 对有机磷农药中毒有很好的疗效, 作用强度和作用时间都优于阿托品, 是一个很有前途的抗有机磷农药中毒新药^[1-4]。为探讨 PH 外消旋体在动物体内的代谢转化, 本文用 LC-MS/MS, GC-MS, FAB-MS 与稳定同位素离子簇技术, 根据代谢物质谱中的特征性双重峰及某些特征峰的质量变化来确认代谢产物的化学结构, 分析鉴定 PH 和氙标 PH 经代谢转化后在大鼠尿中的代谢产物。

材料与 方法

试剂与仪器 盐酸戊乙奎醚(PH)和氙标盐酸戊乙奎醚(PH-d₅, 氙标位在苯环), 由军事医学科学院毒物药物研究所合成室提供^[5,6]。其化学结构如图 3 所示。PH, 批号 951026; PH-d₅, 批号 9505, 氙标丰度 99.35%。甲醇、乙腈为色谱纯(天津试剂二厂); 其余试剂均为市售分析纯(天津试剂二厂)。

美国 PE 公司 API3000 型液相色谱-质谱联用仪(LC-MS/MS), 包括 TIS(热离子喷雾)源及 Analyst 1.0 数据处理系统。美国 HP 公司 5971A-5891 II 型气相色谱-质谱联用仪(GC-MS); 美国 HP 公司 HP1100 型色谱系统; 英国 Micromass 公司 Zabspec 质谱仪;

Highchem 公司 Mass Frontier 1.0 质谱解析软件。

分析方法 LC-MS/MS 分析条件: 色谱柱 Hypersil ODS₂ 柱(5 μm, 150 mm × 4.6 mm, ID 中国科学院大连化学物理研究所提供); 流动相: 甲醇-20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-三乙胺(5:5:0.05, pH 4.5); 流速 0.8 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。

API3000 型液相色谱-质谱联用仪质谱条件: 热离子喷雾离子源(TIS), 离子源喷射电压: 4.0 kV; DP 电压: 73 V; 雾化气(N₂): 8 L·min⁻¹ (gas 1); 6 L·min⁻¹ (gas 2)。选择正离子扫描方式, 用全扫描一级质谱及选择离子二级扫描质谱等方式进行测定。

GC-MS 分析条件: HP-5 毛细管柱, 12 m × 0.2 mm × 0.33 μm; 载气为氦气, 流速 1 mL·min⁻¹ (柱头压 107 kPa); 进样口温度 250 °C; 炉温程序升温 130 °C (保持 1 min) -18 °C/min -230 °C (保持 6 min); 质谱 EI(+), 源温度 200 °C; 电子轰击能量 70 eV。扫描范围 m/z 50 ~ 500。

样品采集与处理 Wistar 大鼠, ♂, 体重(200 ± 20) g, 给药前收集空白尿样。3 只大鼠分别 im PH 和氙标 PH-d₅ 等量混合药液(5+5) mg·kg⁻¹ (用生理盐水配制)。收集 24 h 尿样。

收集的尿样经过离心后, 取上清液 10 mL, 加入 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 1 mL, 再加入两倍体积的混合溶剂(无水乙醚-二氯甲烷为 4:1), 提取 2 次, 合并提取液, 再在 45 °C 水浴中用 N₂ 气吹干(分管提取, 最后将提取液合并浓缩富集)。残留物溶于流动相 100 μL 中, 取 10 μL 用于液相色谱-质谱分析, 气相色

收稿日期: 2001-12-03.

* 通讯作者 Tel: (010) 63051453, Fax: (010) 63058652,

E-mail: xuemd@163.net

谱-质谱分析,残留物用甲醇溶解,取 1 μL 进样分析。

结果与讨论

1 大鼠尿样中盐酸戊乙奎醚代谢产物的鉴定

大鼠 im 等量 PH 和 PH- d_5 混合液后,收集尿液,经提取富集后,采用稳定同位素与 LC-MS/MS 离子簇技术,鉴定了其代谢产物。

在 LC(+)-TIC-MS 全扫描一级质谱条件下,可得到多种成分,其中只有一部分可能为药物的代谢产物,本试验用氙标 PH- d_5 作为示踪剂,非标与氙标药物在质谱图上呈现相差 5 个质量单位的特征性离子峰簇(或称姐妹峰)。由此可以识别出可能存在的代谢产物。

在大鼠尿样中,共测得 5 组具有典型离子簇特征的总离子流质谱图。这是 PH 及氙标 PH- d_5 相关物质的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 分别为 m/z 348/353, 346/351, 332/337, 330/335 和母体药物 316/321;对上述质荷比的代谢产物进行选择离子检测(SIM),发现除母体 m/z 316 及 321 外,每个 SIM 色谱图中均出现一对 MS 和 MS² 质谱相同的色谱峰(图 1)。在所选择的色谱分离条件下,它们分别对应于 PH 代谢产物的非对映异构体,且有些代谢产物异构体的色谱峰分离度较好。由于每对异构体的各级质谱均相同,本文仅对 PH 及其代谢产物的异构体之一的质谱进行了较详细的解析。

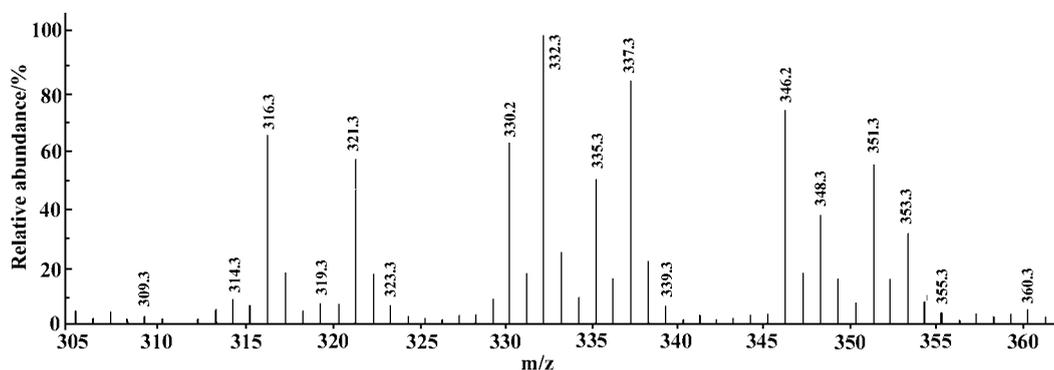


Figure 2 FAB mass spectrum of PH, PH- d_5 and their metabolites after im administration

2 尿样中盐酸戊乙奎醚及其代谢产物的质谱行为分析

图 3 是 PH 和氙标 PH- d_5 标准样品的 EI-MS 质谱图,显示有质子间隔 5 的离子簇峰,其分子离子 M^+ 为 m/z 315(PH) 和 320(PH- d_5);PH 碎片离子系列为[游离基离子 + H] m/z 246, 204, 175, 141, 126 和

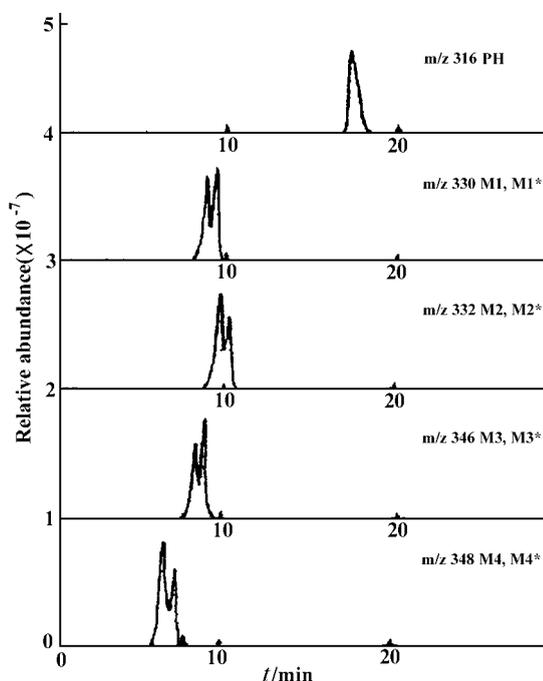


Figure 1 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of penheclidine hydrochloride (PH) and its metabolites ($M_1 \sim M_4$ and $M_1^* \sim M_4^*$) in rat urine

图 2 是大鼠肌注 PH 及 PH- d_5 后尿样的 FAB-MS 质谱,由此同样显示出质量间隔 5 的分子离子簇, m/z 316 与 321, 330 与 335, 332 与 337, 346 与 351, 348 与 353;表明这些化合物与 PH 的代谢产物有关。以上结果仅提供了较宏观的信息。详细结果还需用 LC-MS/MS, GC-MS 及其他技术方法加以研究。

110;PH- d_5 的离子系列相应地增加 5 u,即为 251, 209, 180, 146, 131 及 115。分析 PH 质谱断裂碎片规律如下,丢失 70 u(环戊基碎片),生成 m/z 246 或 251 的子离子;丢失 110 u(奎宁环碎片),生成 m/z 204 或 209 的子离子;丢失 140 u(甲基醚奎宁环),生成 m/z 175 或 180 的子离子。此外,还可形成一些碎片离子

或离子系列,如 m/z 128 为奎氧基; m/z 105 为 $C_6H_5CO^+$ 碎片; m/z 105, 91 和 77 为烷基苯系列。由 PH 的 TIS-MS 质谱图可知, PH 的 $[M+H]^+$ 准分子离子为 m/z 316, 并含有与 EF-MS 相类似的离子碎片系列。

在代谢产物中,发现 M5 有与原形药物完全一致的 MS 谱行为,并有 $PH-d_5$ 的特征离子簇,因此可确认 M5 为未转化的 PH 原形药物。

由图 4 M1 可见,代谢物 M1 与 $M1'$ 的 $[M+H]^+$

准分子离子峰为 m/z 330, 与原药相比,增加 14 u,应该是在原形 PH 上进行了氧化转化,存在 PH 的碎片离子系列 m/z 246, 146, 142, 128 及 110, 说明在苯基和奎宁环上没有发生变化。用 EF-MS^[7], 检测到 m/z 189(175+14) 与 194(180+14), 说明在 PH 环戊基上发生了氧化转化。 $M1'$ 的质谱特征与 M1 完全相同,仅是保留时间不同,表明 $M1'$ 与 M1 互为异构体,其分别由 PH 的一对对映体氧化而来。

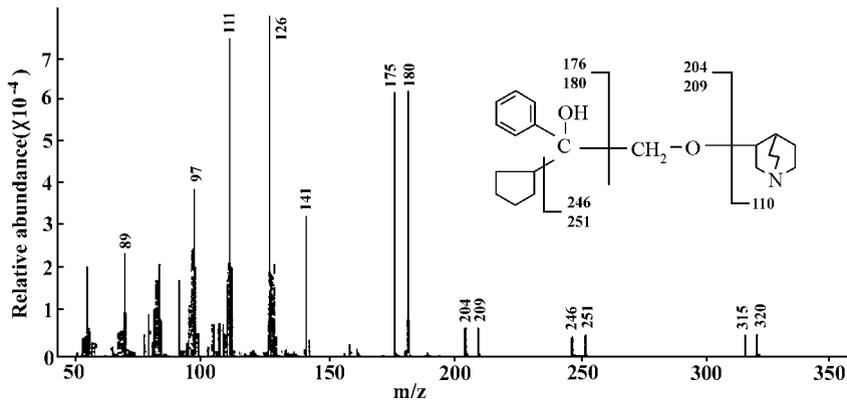


Figure 3 EF-MS mass spectrum of PH and PH- d_5

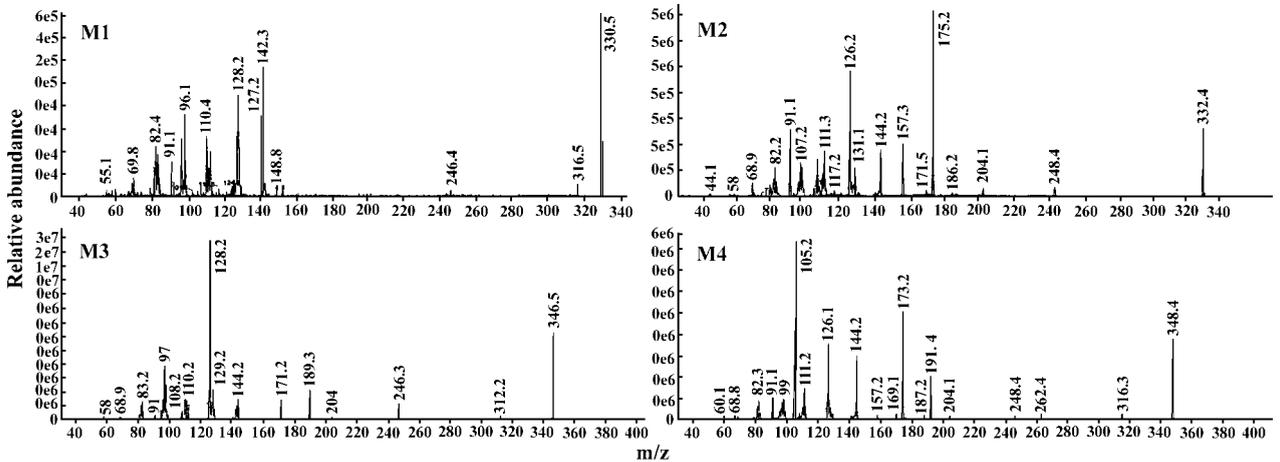


Figure 4 TIS-MS/MS mass spectra of PH metabolites (M1 ~ M4)

代谢物 M2 与 $M2'$ 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 m/z 332, 与 PH 原形 m/z 316 相差 16 u, 应是在 PH 上进行了羟基化反应。存在碎片离子系列 m/z 246, 204, 175, 171, 126 及 110, 说明在苯环及奎宁环上没有变化。如图 4 M2 所示, 由于存在 m/z 191 碎片离子, 可确定羟基化反应发生在环戊基上, 恰好比 PH 碎片基峰 m/z 175 多出 16 u。 m/z 157 为在环戊基上羟基化后再脱水形成的碎片离子()。

$M2'$ 的质谱特征与 M2 完全一样, 仅仅是保留时间有差异, 说明 $M2'$ 与 M2 互为异构体。

代谢物 M3 与 $M3'$ 的 $[M+H]^+$ 准分子离子为 346, 与原药 PH 比较, 相差 30 u, 可能是在 PH 上进行了氧化(14)加羟基化(16)转化。由于与 PH 碎片离子系列 m/z 246, 204, 171, 126 及 110 相同, 说明氧化羟基化反应不可能发生在苯环或奎宁环上。存在 m/z 189 碎片离子, 说明氧化反应发生在环戊基上, 碎片离子 m/z 312 为 M3 环戊基上羟基与相邻的质子失去 1 个 H_2O 分子(18), 再失去 1 个 O 原子(16), 发生重排形成。这说明氧化羟基化反应只可能发生在环戊基的间位上。碎片 m/z 171 为环戊基上丢失

1 分子水后断裂成碎片离子()。进一步证明在环戊基间位上发生了氧化羟基化反应。如图 4 M3。M3^{*} 的质谱特征与 M3 完全一致,保留时间不同,表明 M3^{*} 与 M3 互为异构体。

代谢物 M4 与 M4^{*} 的 [M+H]⁺ 准分子离子峰为 m/z 348,与原药 PH [M+H]⁺ m/z 相比差 32 u,应该是在 PH 上进行了双羟基化(16+16)反应。由于 M4 分子存在 m/z 191 碎片,说明在环戊基上发生了羟基化反应,碎片离子 m/z 173 为 m/z 191 在环戊基的羟基与相邻的质子脱去 1 分子水重排形成()。存在 m/z 262 碎片离子,说明在苯环上或奎宁环上也发生了羟基化反应(m/z

246+16),但由于存在 m/z 144 碎片离子(),羟基化反应应该在奎宁环上。由于存在 m/z 105()碎片离子,进一步说明在苯环上无变化。m/z 316 为 M4 失去 2 个羟基后形成的碎片离子,如图 4 M4。M4^{*} 的质谱特征与 M4 完全相同,仅仅是保留时间有差异,说明 M4^{*} 与 M4 互为异构体。

以上结果表明,PH 在大鼠体内的代谢产物主要为 PH 的单氧化产物 M1 与 M1^{*}、单羟基化产物 M2 与 M2^{*}、氧化羟基化产物 M3 与 M3^{*} 及双羟基化产物 M4 与 M4^{*}。同时证明存在着代谢产物的立体异构体。其代谢产物结构式如图 5 所示。

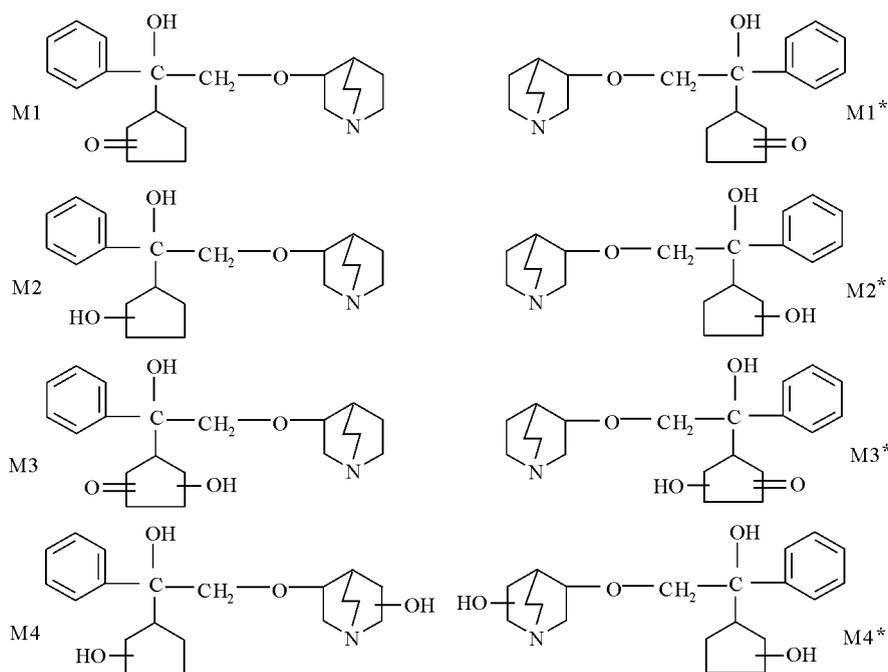


Figure 5 Structural formula of PH metabolites

比较 GC-MS 与 FAB-MS 及稳定同位素离子簇技术所得到的结果^[7],应用 LC-MS/MS 方法可以获得更为全面的信息。在 GC-MS 谱中未发现 M⁺ + 30 (氧化羟基化产物)和 M⁺ + 32 (双羟基化产物)的分子离子峰,可能是这两个成分极性大,难以气化。而 FAB-MS 不能识别在 GC-MS 中出现的分子离子峰相同的立体异构体。但用 LC-MS/MS 可同时获得多组样品的识别鉴定,起到了与 GC-MS 和 FAB-MS 的互补作用,见表 1。

各种 MS 电离方式与程度的不同,所得到的信息都不尽完全,尤其对手性药物,情况更为复杂,因此,在有条件的情况下,应该尽可能的利用不同质谱

离子源与电离电压,以获得更为详细可靠的结果。

在药物代谢转化研究中,按一般方法,需要收集大量的尿样或肝脏微粒体温孵物,通过 TLC 或 HPLC 等方法分离制备纯化单一成分,再进行光(波)谱鉴定,工作量大,周期长。用稳定同位素作为示踪剂并利用 LC-MS/MS 及 GC-MS 离子簇技术,使用的样品量少,可以直接进样或只经简单提取,对含量在毫微克的多种组分,可以快速地进行代谢产物化学结构的识别与鉴定,以获得药物在生物体内代谢转化的信息。当然,要完全归属 PH 代谢产物的氧化羟基化的确切位置,还需进一步富集纯化样品,作 ¹H NMR, ¹³C NMR 或 H-C COSY 全归属。此项工作有

待进一步研究。

Table 1 Ion cluster comparison of PH and its metabolites with LC-MS/MS, GC-MS and FAB-MS in rats

Spectra peak	Molecular ion cluster		
	LC-MS/MS	GC-MS	FAB-MS
M, PH	316, 321[M+H] ⁺	315, 320 M ⁺	316, 321[M+H] ⁺
M1	330(+14, = O)	329, 334(+14, = O)	330, 335(+14, = O)
M1 ⁺	330(+14, = O)	329, 334(+14, = O)	-
M2	332(+16, - OH)	331, 336(+16, - OH)	332, 337(+16, - OH)
M2 ⁺	332(+16, - OH)	331, 336(+16, - OH)	-
M3	346(+30, = O, - OH)	-	346, 351(+30, = O, - OH)
M3 ⁺	346(+30, = O, - OH)	-	-
M4	348(+32, 2 - OH)	-	348, 351(+32, 2 - OH)
M4 ⁺	348(+32, 2 - OH)	-	-

REFERENCES:

[1] Wen GL, Li ShX, Zhang QK. Synthesis of 2,2,2,-phenyl, hydroxyl, ethyl ether compounds [J]. *Bull Acad Mil Med Sci (军事医学科学院院刊)*, 1985, 9(16) :613 - 617.

[2] Lin YQ, Lu XQ. Screen of new anti-cholinergic drug from the synthesized compounds [J]. *Bull Acad Mil Med Sci (军事医学科学院院刊)*, 1987, 11(5) :356 - 360.

[3] Zen FZ. Curative effect of 8018 drugs for the pesticides poison of organic phosphorus [J]. *Chin J Intern Med (中华内科杂志)*, 1993, 32(9) :838 - 839.

[4] Niu WZ, Zhao DL, Liu CG, *et al.* The effects of a new cholinolytic 8018 and its optical isomers on the central muscarinic and nicotinic receptors [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1990, 304(1) :64 - 74.

[5] Gao JH, Wen GL, Zhang QK. Synthesis and separation of optical hydroxyl-ether compounds [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 1987, 22(11) :708 - 711.

[6] Gao JH, Wen GL, Zhang QK. Stereochemistry and relationship of structure and activity of anti-cholinergic drug 8018 [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 1990, 25(12) :891 - 897.

[7] Yuan SL, Qiao JZ. Identification of the metabolites of penehyclidine hydrochloride raceme by GC-MS and stable isotope ion cluster [A]. *Symposium on Hewlett Packard mass spectra in the northeast regions (China) [C]*. Changchun, 1998. 25.

IDENTIFICATION OF THE METABOLITES OF PENEHYCLIDINE HYDROCHLORIDE RACEME IN RATS BY LC-MS/MS AND ION CLUSTER

XUE Ming^{1,2}, RUAN Jir xiu¹, YUAN Shu-lan¹, ZHANG Zhen-qing¹, QIAO Jian-zhong¹, GUO Ji-fen¹

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China ;
2. Department of Pharmacology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the metabolites of penehyclidine hydrochloride (PH) raceme, a new anti-cholinergic drug invented by the Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences. **METHODS** Three healthy rat urine samples were collected within 24 h after a single im dose of PH raceme and PH d₅ [(5 + 5) mg • kg⁻¹] simultaneously. The eight metabolites of PH raceme were identified by the methods of LC-MS/MS, GC-MS, FAB-MS and the stable isotope ion cluster. Mass spectrometry was operated in the positive mode for the method of LC-MS/MS. **RESULTS** M⁺ and M⁺ were identified as the oxygenated products of PH in the cyclopentyl group; M⁺ and M⁺ were as the hydroxylated products of PH in the cyclopentyl group; M⁺ and M⁺ were as the oxygenated and hydroxylated products of PH at the meta-position of cyclopentyl group; M⁺ and M⁺ were identified as the dihydroxylated metabolites of PH, the hydroxylated position were at the cyclopentyl group and quinuclidinol ring of PH. Among them, M⁺ and M⁺, M⁺ and M⁺, M⁺ and M⁺, M⁺ and M⁺ were the isomers of each other. **CONCLUSION** These characteristics can be used for future structure elucidation in studies of the metabolites of PH optical isomers. The structure data of PH metabolites provide important information for the clinical use and for developing better anti-cholinergic drug.

KEY WORDS: penehyclidine hydrochloride; raceme; metabolites; LC-MS/MS