

HPLC-ESI-ITMSⁿ法鉴定麻黄碱及其大鼠体内主要代谢产物

陈 勇^{1*}, 沈少林¹, 陈怀侠², 韩凤梅¹

(1. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062; 2. 武汉大学 化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 目的 建立快速灵敏的 LC-ESI-ITMSⁿ分析检测麻黄碱及其大鼠体内代谢物的方法。方法 以麻黄碱对照品对 LC-ESI-ITMSⁿ色谱及质谱条件进行了优化,分析总结其电喷雾质谱的一级电离规律和多级质谱裂解规律,以此作为麻黄碱大鼠体内代谢物分析鉴定的依据。健康大鼠空腹灌胃麻黄碱 10 mg·kg⁻¹,收集 0~48 h 的尿样,经 C₁₈小柱固相萃取分离纯化后,直接采用 LC-ESI-ITMSⁿ方法对尿样进行测定。结果 根据生物体内药物代谢转化规律及母体药物的色谱-质谱行为规律,在尿样中鉴定出 3 个第 I 相代谢产物,未发现第 II 相代谢产物。结论 本方法灵敏、快速、选择性高、专属性好,可用于麻黄碱的代谢产物研究。

关键词: 高效液相色谱 电喷雾离子阱串联质谱; 麻黄碱; 代谢物

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)09-0838-04

Analysis of ephedrine and its metabolites in rat urine by HPLC-ESI-ITMSⁿ

CHEN Yong^{1*}, SHEN Shao-lin¹, CHEN Hua-xia², HAN Feng-mei¹

(1. Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine Key Lab of Hubei Province, Hubei University, Wuhan 430062, China;
2. College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: **Aim** To establish a rapid and sensitive LC-ESI-ITMSⁿ method for the identification of ephedrine and its main metabolites in rat urine. **Methods** After optimizing the detection condition of LC-ESI-ITMSⁿ chromatography and mass spectrometry by using a standard ephedrine, the ionization and cleavage rules of ephedrine in ESI-MS and ESI-MSⁿ modes were summarized, and then serving as the basis for the metabolite analysis of ephedrine in rat urine. Rat urine samples of 0-48 h were collected after giving 10 mg·kg⁻¹ ephedrine, then the samples were purified through C₁₈ solid-phase extraction cartridge. The purified samples were analyzed by LC-ESI-ITMSⁿ. **Results** The structures of ephedrine metabolites were elucidated according to the changes of the molecular weights of the metabolites (ΔM) and their cleavage pattern in ESI-ITMSⁿ. As a result, three phase I metabolites and the parent drug ephedrine were identified existing in rat urine, but no phase II metabolites were found. **Conclusion** The LC-ESI-ITMSⁿ method is rapid and highly sensitive and sepecific, it is suitable for the identification of ephedrine and its metabolites in rat urine.

Key words: HPLC-ESI-ITMSⁿ; ephedrine; metabolite

麻黄碱(图 1)具有松弛支气管平滑肌、兴奋心脏、收缩血管和升高血压等作用,临床主要用于支气管哮喘、过敏性鼻炎、鼻黏膜肿胀及低血压等病症的治疗^[1]。近年来,随着麻黄碱类药物导致心脏病、麻痹和中暑的案例报道^[2],人们对此类药物安全性十分关注。2004年4月,美国FDA宣布对含有麻黄碱(ephedrine)的药物全面禁售,包括含麻黄碱的减肥药和运动员营养补充食品等,对其取代性药物也进行严格监控,更使此类药物的使用具有争议。关

管哮喘、过敏性鼻炎、鼻黏膜肿胀及低血压等病症的治疗^[1]。近年来,随着麻黄碱类药物导致心脏病、麻痹和中暑的案例报道^[2],人们对此类药物安全性十分关注。2004年4月,美国FDA宣布对含有麻黄碱(ephedrine)的药物全面禁售,包括含麻黄碱的减肥药和运动员营养补充食品等,对其取代性药物也进行严格监控,更使此类药物的使用具有争议。关

收稿日期: 2004-11-22.

基金项目: 湖北省杰出青年基金资助项目(2002AC004); 湖北省中药生物技术重点实验室开放基金资助项目(2004CTM001).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 27 - 88663590,
E-mail: cy101610@npc.gov.cn

于麻黄碱的分离、含量测定、药理研究等已有许多报道^[3,4],但在生物体内的代谢转化则少有报道。

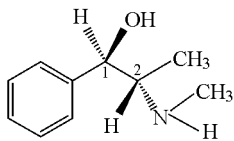


Figure 1 Structure of ephedrine

本文应用高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱法 (high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry, HPLC-ESI-ITMSⁿ) 研究了大鼠体内麻黄碱的代谢产物,方法灵敏、快速、选择性高、专属性好。

材料与方 法

药品与试剂 盐酸麻黄碱对照品 (中国药品生物制品检定所), 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

仪器 LCQ^{DUO}型液相色谱-离子阱质谱仪 (美国 Finnigan 公司), 包括电喷雾电离源 (ESI), TSP P 4000 泵及 TSP AS 3000 自动进样器; Mass Frontier 1.2 质谱解析软件 (Highchem 公司); AccuBond II SPE ODS-C₁₈ 固相萃取柱 (Agilent, 200 mg, 3 mL)。

标准溶液 用甲醇配制 1.0 mg·mL⁻¹ 麻黄碱储备液, 并稀释为 10 μg·mL⁻¹ 后直接进样。

色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 3.0 mm ID, 3.5 μm), 流动相为甲醇-甲酸水溶液 (pH 3.5, 70:30), 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

质谱条件 ESI 离子源; 扫描范围 m/z 100 ~ 1 000; 离子源喷射电压 4.5 kV; 毛细管电压 45 V; 毛细管温度 200 °C; 鞘气 (N₂) 流速 40 个单位; 自动进样器直接进样, 在正离子检测模式下采用全扫描一级质谱 (full scan) 及其源内碰撞诱导解离 (source collision induced dissociation, SCID)、全扫描二级质谱 (full scan MS²) 及三级质谱 (full scan MS³) 等方式进行测定。

实验动物 雄性 Wistar 大鼠, (200 ± 5) g, 购于湖北省实验动物研究中心。合格证: SCXK (鄂) 2003-2005。

尿样的收集及样品的预处理 取健康大鼠 6 只, 置于代谢笼中, 禁食 12 h, 收集空白尿样。麻黄碱 10 mg·kg⁻¹ 灌胃后, 收集 0 ~ 48 h 尿样, 放置于 -70 °C 中保存备用。测试前, 先将空白尿样及给药

后的尿样融化, 离心分离, 取上清液 1 mL, 均以经甲醇和水活化的固相萃取柱 (C₁₈) 固相萃取, 以蒸馏水 2 mL 冲洗, 再以甲醇 1 mL 洗脱, 收集洗脱液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤液直接用于 HPLC-MSⁿ 分析。

结果

1 麻黄碱对照品的 HPLC-MSⁿ 分析

麻黄碱经 HPLC-MS² 检测, 最低检测限在 1 ng·mL⁻¹ 以下, 其 HPLC-MS² 色谱及其各级质谱示于图 2。在其一级全扫描图中, 麻黄碱的准分子离子峰 m/z 166 [M + H]⁺ 为基峰, 同时出现较强的脱水峰 m/z 148 [M + H - H₂O]⁺。源内碰撞诱导解离 (SCID) 后脱水峰增强, 说明麻黄碱在 ESI 电离条件下很容易脱水。根据麻黄碱化学结构推测其脱水部位应为位于 C₁ 上的羟基与其相邻 C₂ 上的氢离去而形成 C=C 双键, 由于存在相邻苯环的共轭作用, 故脱水后的碎片结构较稳定。

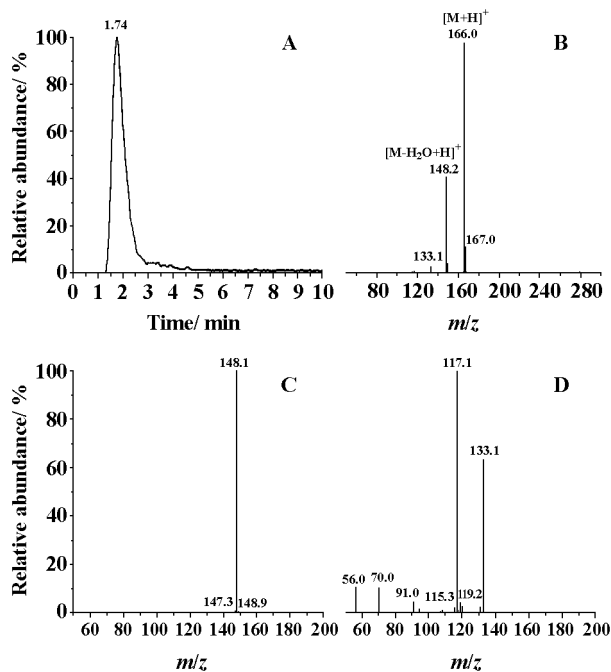


Figure 2 LC-MSⁿ chromatogram and spectra of ephedrine. A: LC-MS² chromatogram; B: MS spectrum; C: MS² spectrum; D: MS³ spectrum

为了研究麻黄碱多级质谱裂解规律, 本文采用碰撞诱导解离 (CID) 技术对其准分子离子 m/z 166 进行 LC/ESI-ITMSⁿ 分析。其二级质谱比较简单, 碎片很少 (图 2C), 主要为脱水峰 m/z 148 [M - H₂O + H]⁺, 而 m/z 148 的三级质谱的特征碎片有 m/z 133, 117, 90, 70 和 56 等 (图 2D), 此结果与麻黄碱一级质谱中 m/z 148 的二级裂解碎片完全一致。麻

黄碱各碎片峰的归属如图 3 所示。

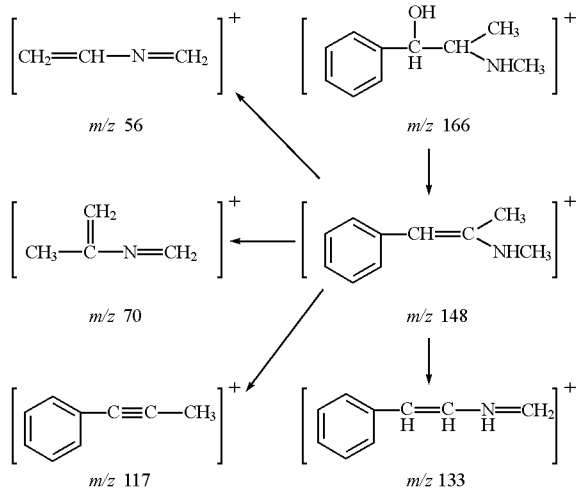


Figure 3 Tentative assignment of fragmentation of ephedrine

2 麻黄碱及其代谢物的 HPLC-MSⁿ分析

由于药物在生物体内的代谢转化主要是药物分子进行官能团化反应或与内源性极性分子的结合反应等,即代谢物仍保留了原药的基本骨架结构或亚结构,因而具有原药特征的质谱裂解碎片或中性丢失。因此,麻黄碱的上述质谱裂解规律可作为其生物体内代谢物结构分析的主要依据。结合药物的生物体内代谢规律^[5,6],本文对麻黄碱在大鼠体内的代谢物结构进行了如下分析与推测。

以正离子方式检测,用空白尿样及麻黄碱为对照,在大鼠尿样的一级全扫描质谱中发现与原药结构相关的组分有 m/z 148, 152, 166, 168 和 182 等。其中, m/z 166 (M0) 的色谱保留时间 (1.79 min) 及其二级、三级质谱和麻黄碱对照品相同,说明 m/z 166 对应于母药; m/z 148 的保留时间和二级碎片与母药脱水峰完全一致,是母药的一种质谱行为,而非

母药的一种代谢产物。

m/z 182 (M1, 保留时间 1.64 min, 图 4 M1) 的二级碎片主要是 m/z 164, 其中性丢失为 18 Da, 和母药二级碎片特征中性丢失 18 Da 一致; 将 m/z 164 进行三级质谱分析, 得到碎片峰 m/z 149 和 133 (图 5 M1), 分别比母药 m/z 166 \rightarrow m/z 148 的三级碎片峰 m/z 133 和 m/z 117 多 16 Da, 说明 m/z 182 应为麻黄碱的氧化产物。由于在其三级质谱中还出现了和母药完全一样的碎片 m/z 56 和 70, 说明氧化位置应该在苯环上。因为如果氧化位置在饱和碳链上, 则这两碎片峰也应该相应增加 16 Da。由于苯环侧链为吸电子基团, 其邻位和对位电负性较大, 容易被氧化, 同时 m/z 182 在色谱图中只有 1 个峰, 结合空间位阻效应, 推测 M1 应是对位被氧化为酚羟基的代谢物。

m/z 152 (M2, 保留时间 1.66 min, 图 4 M2) 失去 18 Da 产生其二级碎片 m/z 134, 和母药二级质谱特征中性丢失 18 Da 一致; m/z 152 \rightarrow m/z 134 的三级质谱中存在着和原药一样的特征碎片 m/z 117 和 56 (图 5 M2), 根据药物的氧化代谢规律, M2 应为母药的 N -去甲基代谢物, 而不是 C_2 -去甲基代谢物。因为, 如果 M2 是 C_2 -去甲基代谢物, m/z 134 的三级质谱不可能产生 C-N 键断裂后的碎片峰 m/z 117。

m/z 168 (M3, 保留时间 1.58 min, 图 4 M3) 的二级碎片主要为 m/z 150, 和母药特征中性丢失 18 Da 一致; 进一步进行 m/z 168 \rightarrow m/z 150 三级质谱分析, 得到碎片 m/z 135 和 119 (图 5 M3), 均比母药三级碎片 m/z 133 和 117 分别多 2 Da。从分子结构来看, 麻黄碱分子不可能直接加氢还原, 而其 LC-MS² 色谱图显示 M3 分子极性比母药大, 故推测 M3 应为母药同时 N -去甲基、苯环对位被氧化为酚羟基的代谢物。

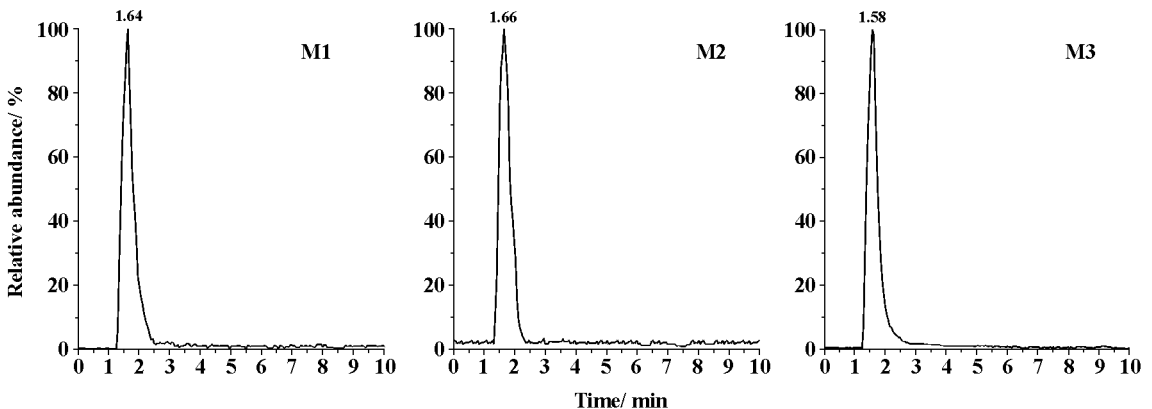


Figure 4 HPLC/MS chromatograph of ephedrine's metabolites in rat urine. M1: m/z 182, M2: m/z 152, M3: m/z 168

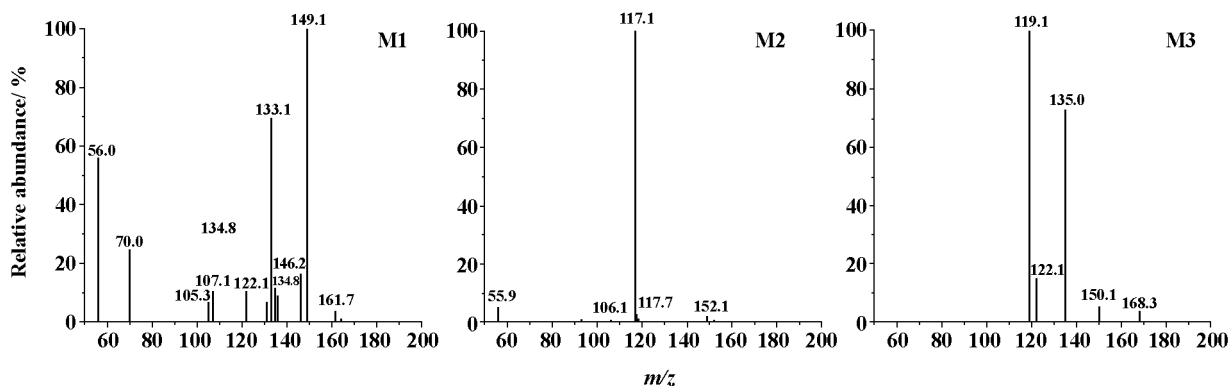


Figure 5 MS³ spectra of ephedrine's metabolites in rat urine

在大鼠 0 ~ 48 h 各段时间尿样的一级质谱中, 0 ~ 6 h 尿液中, m/z 166 为基峰, m/z 148 为较强峰, 其他代谢产物的分子离子峰强度相对极低; 24 ~ 48 h 尿样的一级质谱基本和原尿一样, 说明排泄完全, 主要排泄过程发生在 6 ~ 24 h。麻黄碱在大鼠体内代谢途径见图 6。

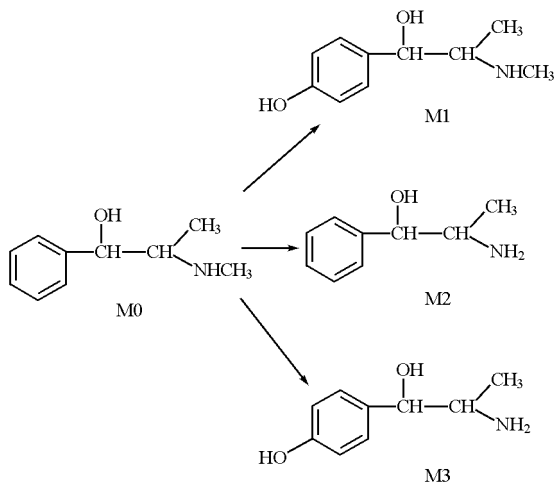


Figure 6 The proposed major metabolic pathway of ephedrine in rats

讨论

HPLC/MSⁿ联用技术集分离和检测于一体, 对被测物不需复杂的分离富集或衍生化前处理即可直接进样, 获得被测物的分子结构信息, 从而能够在没有对照品的情况下对未知物进行定性分析, 该方法已成为药物代谢物研究的首选方法之一^[7,8]。本文应用 HPLC/ESI-ITMSⁿ分析技术, 依据药物生物体内代谢规律, 结合麻黄碱的色谱保留时间和多级质谱碎片特征, 对其在大鼠体内的代谢进行了研究。实验结果表明, 麻黄碱大部分以原形药直接从大鼠尿

液中排出, 其在大鼠体内的生物转化主要是第 I 相代谢产物, 如 *N*-脱烷基化和苯环对位氧化产物, 未发现第 II 相代谢产物。这为进一步研究麻黄碱的生物体内代谢过程提供了科学依据。

References

- [1] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (中华人民共和国药典) [S]. 2000 Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 262 - 263.
- [2] Li X. American FDA declares drugs contain ephedrine will be forbidden on sale after May 12th [N]. *China News*, 2003-12-31.
- [3] Cha LH, Su ZG, Zhang GZ, *et al.* Application and research on *Ephedra* resource [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2002, 19(4): 396 - 405.
- [4] Song FR, Liu ZY, Sun WX, *et al.* New method of mass spectrometry for distinguishing ephedrine and isoephedrine [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 1999, 27(9): 1000 - 1002.
- [5] Jiang YY, Tian SJ, Chen BL. *Forum on Modern Medicinal Analysis (现代药物分析论坛)* [M]. Beijing: Xinhua Press. 1999. 128.
- [6] Lu JF, Yi T, Cao XM, *et al.* HPLC determination of five caffeine metabolites [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 1997, 32(8): 607 - 611.
- [7] Chu DF, Zhong DF, Li Y. Studies on the electrospray ion trap mass spectra of SFZ-47 and its metabolites for a novel anti-inflammatory and analgesic agent [J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2002, 23(2): 207 - 209.
- [8] Chen XY, Yang HY, Zhong DF, *et al.* Rapid analysis of terbutaline by combined solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2001, 36(9): 686 - 689.