

小鼠尿中沙美特罗及其代谢物的 LC/MS 研究

徐友宣, 秦 旻, 刘 欣, 张亦农,
张建丽, 吴侔天, 朱绍棠

(国家体育总局运动医学研究所兴奋剂检测中心, 北京 100029)

摘要: 采用较大剂量小鼠灌胃给药, 得到的尿样经固相提取后用 LC/APCI/MS 分析, 根据代谢知识及比较空白尿和阳性尿的响应数据, 得出了沙美特罗的原型和四种代谢产物。结果表明: 小鼠尿中沙美特罗可能的
主要代谢途径为羟基化、甲氧基化以及两者的加合。

关键词: 质谱学; 沙美特罗及其代谢物研究; LC/MS; β_2 -激动剂; 大气压化学电离 (APCI)

中图分类号: O 657. 63; R 974. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2003)02-417-04

沙美特罗 (Salmeterol, SAL) 属 β_2 -激动剂, 临床上用于治疗哮喘及慢性支气管炎。当大剂量使用这类药物时, 会对中枢神经系统产生刺激和兴奋作用, 同时还会产生蛋白同化激素样的作用^[1]。由此, 某些运动员使用这些药物来达到提高成绩的目的。国际奥委会从 1995 年起开始禁止使用这类药物^[2]。SAL 使用剂量很小同时又有多重代谢途径, 所以是检测的难点之一。研究表明^[3] 仅从 24 h 内的人尿中检出一种代谢物。本工作拟采用小鼠进行较大剂量给药, 找出对检测有意义的代谢产物, 最终建立可用于运动员尿样检测的方法。

1 实验部分

1.1 药品与试剂:

沙美特罗 羟基萘甲酸酯 (Salmeterol hydroxynaphthoate) 标准品 (Glaxo welcome reference substance); XAD-2 树脂: 德国 Serva 公司产品; β -葡萄糖醛酸酐酶: 美国 Sigma 公司产品; 其它均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器

高效液相色谱仪: 美国惠普公司 1090, 配有

二极管阵列检测器, 淋洗梯度 0.01 mol/L; pH 3.5 甲酸铵缓冲液 (A): 乙腈 (B)。0.01 min B 10%, 15 min B 40%, 18 min B 70%, 柱流速: 0.25 mL/min; 质谱仪: Finnigan TSQ-7000 及 ICS 数据系统, 扫描范围: 100~600 D, 接口: Finnigan LC/MS 大气压化学电离 (APCI) 接口; APCI 仪器参数: 蒸发气温度 450~500 °C, 加热毛细管温度 250~300 °C, 鞘气流压力 40 Pa, 喷雾电压 4 500 V; 正离子模式; XAD-2 柱制备: 将 100~200 目 XAD-2 树脂先以丙酮回流抽提 24 h, 继以甲醇回流抽提 24 h, 然后用水洗多次, 用水浸泡待用。取小柱 (10×1.0 cm, 下置滤板), 以 XAD-2 悬浮液装柱, 装好后树脂层约高 3 cm, 用 5 mL 水洗后即可处理样品。

1.3 空白尿和阳性尿取样

取 15 mg SAL 溶解于 15 mL 水中, 灌胃于 10 只小鼠 (约 25 g, ICR) 中, 分两次间隔 4 h 给药。将小鼠置于代谢笼中, 灌药前 24 h 及灌药后每 24 h 收集一次尿液, 收集得到的空白尿和阳性尿储存于 -20 °C 冰箱中待用。

1.4 尿样前处理

尿样前处理流程图示于图 1。

收稿日期: 2002-11-26

作者简介: 徐友宣 (1963~), 男 (汉族), 安徽淮南人, 研究员, 从事兴奋剂检测研究

E-mail: xyx00@sina.com



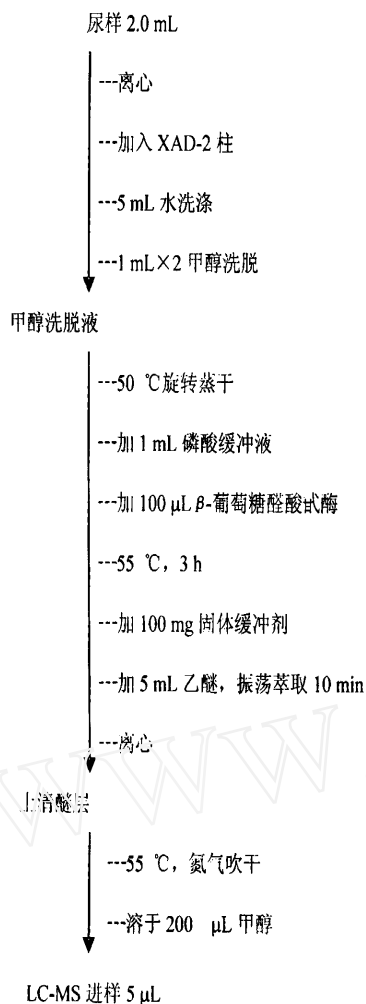


图 1 尿样前处理流程图

Fig 1 Scheme of the extraction procedure

2 结果与讨论

2.1 确定小鼠体内的 SAL 代谢物

将小鼠尿样通过上述流程图进行处理, 得到的溶液在 LC/MS 上进样。得到空白尿、阳性尿的总离子流色谱图分别示于图 2、图 3。通过比较这些总离子流色谱图, 得到 SAL 的原型峰及代谢物峰。其质谱图示于图 4~8。

2.2 代谢物结构的推断

APCI 属于软电离技术, 在 SAL 及其代谢物的质谱图中, MH⁺ 峰一般是基峰, 且其低端出现系列的脱水峰, 高端多出现 M + Na⁺ 峰, 所以代谢物的分子量容易确定。根据药物代谢的基本知识推断, SAL 应产生羟基化、羟基甲氧基化以及羟基氧化等多种代谢物。通过比较空白尿及阳性尿, 发现在阳性尿中多出 6 个峰。经与标准品

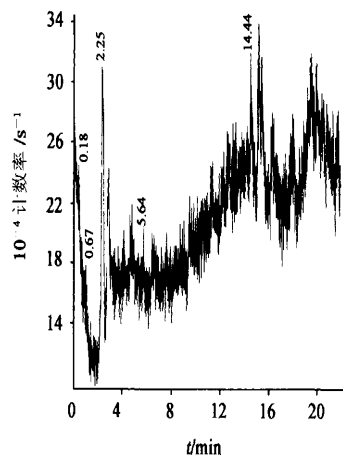


图 2 空白尿的总离子流色谱图

Fig 2 Total ion chromatogram of blank urine

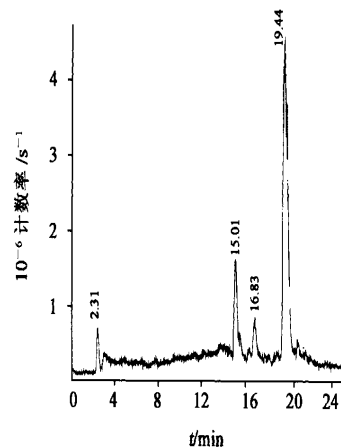


图 3 小鼠尿的总离子流色谱图

Fig 3 Total ion chromatogram of rat urine

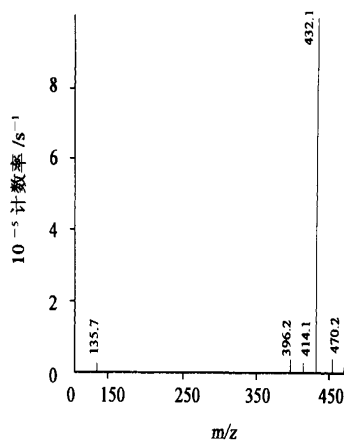


图 4 SAL 的代谢物 M1 的质谱图 (羟基-SAL)

Fig 4 Mass spectrum of metabolite 1 of SAL (hydroxyl-SAL)

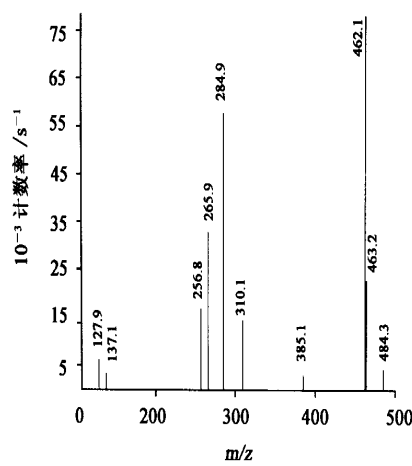


图 5 SAL 的代谢物 M 2 的质谱图
(羟基-甲氧基-SAL)
Fig 5 Mass spectrum of metabolite 2 of SAL
(hydroxyl-methoxyl-SAL)

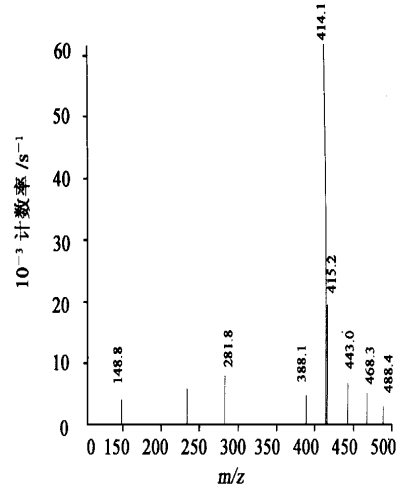


图 8 SAL 的代谢物 M 3 的质谱图(羰基-SAL)
Fig 8 Mass spectrum of metabolite
3 of SAL (carbonyl-SAL)

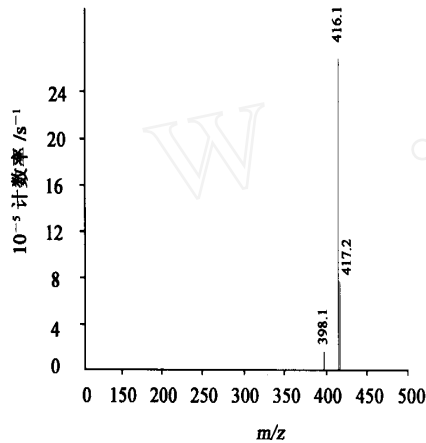


图 6 SAL 原型的质谱图
Fig 6 Mass spectrum of SAL

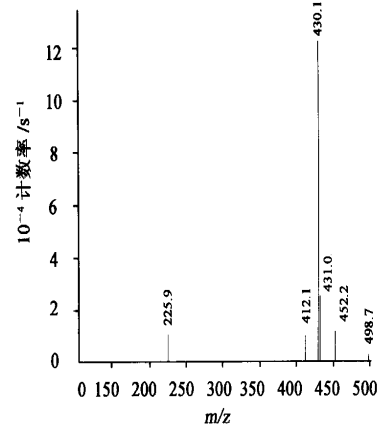


图 9 SAL 的代谢物 M 4 的质谱图(羰基-羟基-SAL)
Fig 9 Mass spectrum of metabolite
4 of SAL (carbonyl-hydroxyl-SAL)

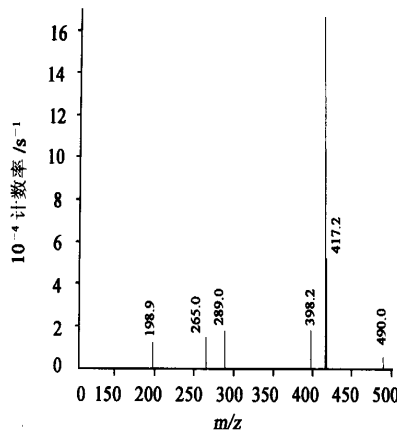


图 7 SAL 异构体的质谱图
Fig 7 Mass spectrum of SAL isomer

的质谱对照, 确认其中的两个峰是 SAL 及其异构体的色谱峰(示于图 6、7)。其余 4 个峰的质谱图示于 4、5、8、9。这些质谱图显示的分子量与以上分析的代谢途径产生的代谢物分子量相吻合: m/z 432 为羟基-SAL 的 MH 峰(M 1); m/z 462 为羟基-甲氧基-SAL 的 MH 离子(M 2); m/z 414 为羰基-SAL 的 MH 离子(M 3); m/z 430 为羰基-羟基-SAL 的 MH 离子(M 4)。由此推断, SAL 可能的代谢途径示于图 10。

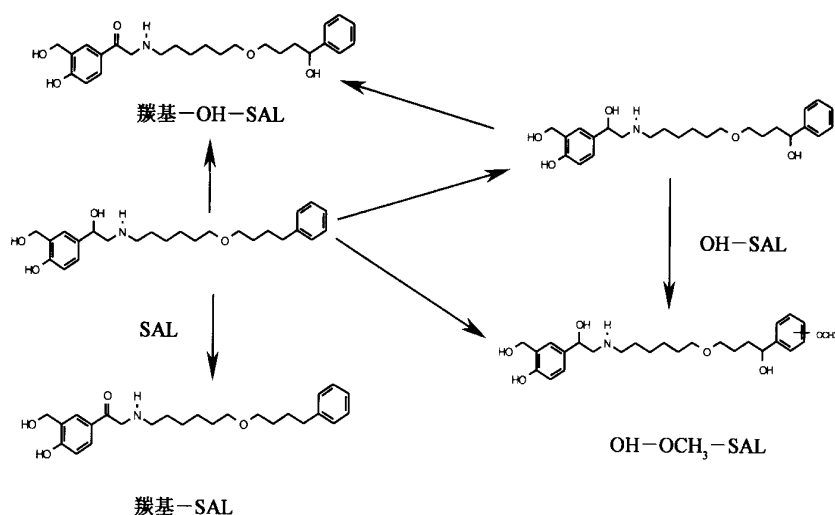


图 10 SAL 可能的代谢途径

Fig 10 Metabolization pathway of SAL

参考文献

- [1] Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ, et al. Salbutamol, a Beta₂-Adrenoceptor Agonist, Increases Skeletal Muscle Strength in Young Men[J]. Clin Sci, 1992, 8: 615
- [2] International Olympic Committee. Prohibited Classes of Substances and Prohibited Methods[J]. DC Medical Code and Explanatory Document,

DC, Lausanne, Switzerland, 1995

- [3] Ventura R, Damasceno L, Fare M, et al. Analytical Methodology for the Detection of β_2 -Agonists in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Application in Doping Control[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 418: 79

Detem ination of Salmeterol and Its Metabolites in Rat Urine by LC/MS

XU You-xuan, Q N Yang, L U Xin, ZHANG Yi-nong,
ZHANG Jian-li, WU Mou-tian, ZHU Shao-tang

(China Doping Control Center, N ational Research Institute of Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract 15 mg of salmeterol is administered to 10 rats, which weighs about 25 g each. The urine of the rats is extracted by solid-phase column and analyzed by liquid chromatography-APCI mass spectrometry. Parent drug and four metabolites are identified by comparing total ion chromatograms of the blank with the metabolic urine as well as their mass spectra. Its main metabolic pathways are the hydroxylation and/or methoxylation from the experiments.

Key words mass spectrometry; detem ination of salmeterol and its metabolic products; β_2 -agonist; LC/MS; APCI