

液相色谱-串联电喷雾离子阱质谱鉴定阿比朵尔的代谢物

王玉亚, 陈笑艳, 李 强, 钟大放

(中国科学院上海药物研究所, 上海 203201)

Liquid Chromatography-Tandem Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometric Assay for the Metabolites of Arbidol

WANG Yu-ya, CHEN Xiao-yan, LI Qiang, ZHONG Da-fang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 203201, China)

Abstract: A method was described for identification of arbidol and its metabolites in biological samples by liquid chromatography-tandem electrospray ionization ion trap mass spectrometric (LC-ESI-MSⁿ). Identification of metabolites and their structure elucidation were performed by comparing the *m/z* of their relative isotope and their changes in molecular mass, retention times and full-scan MSⁿ spectra with those of parent drugs and blank matrix. At least five phase I metabolites (such as de-methyl, sulfoxide, sulfone metabolites and so on) and twelve phase II metabolites (such as glucuronide conjugations and sulfuric acid conjugations) were identified in human urine. The identification of these metabolites is useful for further study of definitive metabolic pathways of this drug in vivo.

Key words: LC-ESI /MSⁿ; arbidol; metabolite

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-66-04

阿比朵尔(arbidol)是一种新型非核苷类抗病毒药物。它通过抑制病毒在细胞中心的复制而发挥疗效,具有耐受性好,不良反应少等特点,在临床上多用于防治流行性感冒及其他急性呼吸道感染,具有较好的应用前景^[1-2]。目前,阿比朵尔的体内外代谢研究未见文献报道。本工作采用 LC-ESI/MSⁿ 技术,对服药后受试者尿液以及人肝微粒体孵化液中阿比朵尔及其代谢物进行定性分析,利用质谱碎裂信息鉴定生物样品中的代谢物。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

LC/MSD Trap XCT ultra 电喷雾-离子阱质谱仪:美国 Agilent 公司产品,配有电喷雾离子源 (ESI),用正离子模式进行检测;阿比朵尔对照品(纯度>99.5%):沈阳中海科技开发有限公司提供;盐酸阿比朵尔胶囊:石家庄四药有限公司提供;甲醇(色谱纯):美国 Sigma 公司产品;甲酸(色谱纯):美国 Tedia 公司产品;水为 milli-pore 的纯净水;M2 和 M4 是上海药物所合成,结构由 NMR 确定;枸橼酸钠为(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;β-葡萄糖苷酶:美国 Sigma 公司产品。

1.2 生物样品的制备

两名男性健康受试者,在签署知情同意后,经医疗史、体格、生命体征、胸透、心电图检查以及血常规、血生化、血清病毒学检查确定为健康状况良好,符合入选标准。试验方案已通过本院伦理委员会批准。给药前禁食 12 h,收集空白尿液,口服给药盐酸阿比朵尔 400 mg,收集 24 h 尿液。向 200 μL 尿液加入 400 μL 甲醇,涡流 1 min,离心 5 min (11000 r·min⁻¹),取 500 μL 上清液置

10 mL的试管中, 40 °C 空气流下吹干, 加入 V (100 μL 甲醇): V (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺) = 30: 70 的溶液溶解, 取 5 μL 进行 LC-MSⁿ 分析。

称取 14.7 g 枸橼酸钠, 溶解于 500 mL 重蒸水中, 以 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸调 pH 至 5.0 即得。称取 385 mg β -葡萄糖苷酸酶, 溶于 pH 5 枸橼酸缓冲液 50 mL 中, 获得 2 000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 β -葡萄糖苷酸酶溶液。向 200 μL 血浆中加入 2 000 U β -葡萄糖苷酸酶 200 μL , 涡流混合, 37 °C 水浴下孵化 16 h。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Ultimate-XB-C₁₈ 柱, 5 μm 粒径, 200 \times 4.6 mm I.D.: 美国 welch materials 公司产品; 预柱为 C₁₈ 保护柱, 4 \times 3.0 mm I.D.: 美国 Phenomenex 公司产品; 流动相为梯度洗脱: 0~15 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (30: 70, V/V), 15~15.5 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (50: 50, V/V), 15.5~25 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (50: 50, V/V), 25~25.5 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (70: 30, V/V), 25.5~30 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (70: 30, V/V), 30~30.5 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (30: 70, V/V), 30.5~40 min 甲醇: 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸胺 (30: 70, V/V); 流速 0.50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 进样量 5 μL 。

1.4 质谱条件

ESI 离子源, 扫描范围 m/z 100~700; 辅助气流速 1 400 kPa; 干燥气流速 12 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气温度 350 °C; 毛细管电压 3 500 V。自动进样器直接进样, 正离子方式检测。

2 结果与讨论

2.1 阿比朵尔的 LC-MSⁿ 分析

阿比朵尔 (M0) 的一级质谱准分子离子峰为 m/z 477, 479 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 色谱保留时间是 41.9 min。为进一步了解阿比朵尔的质谱裂解规律, 采用离子阱技术对其准分子离子 m/z 477 进行多级质谱分析。在二级质谱中, 阿比朵尔的准分子离子脱水产生碎片 m/z 459 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 失去二甲胺基 (45 u) 产生碎片 m/z 432 $[\text{M}+\text{H}-(\text{CH}_3)_2\text{NH}]^+$ 。对 m/z 432 进行三级质谱分析, 主要得到失去乙醛 (44 u) 的碎片离子 m/z 388。对 m/z 388 进行四级质谱分析主要得到失去苯硫自由基 (109 u) 的碎片 m/z 279。由此说明, m/z 432、388 和 279 是阿比朵尔准分子离子 m/z 477 的特征碎片离子, 45 u、44 u 和 109 u 是其特征的中性丢失碎片。同时对 m/z 323 进行了四级质谱分析以及对 m/z 279 进行了五级质谱分析, 其结果列于表 1。由上述多级质谱推测的阿比朵尔裂解途径示于图 1。

2.1 生物样品中代谢物的鉴定

与尿样和酶空白样品对照, 在尿样和酶孵化样品中发现了阿比朵尔及其代谢物, 其质子化的分子离子分别 m/z 463/465、479/481、493/495、495/497、509/511、543/545、557/559、559/561、573/575、575/577、589/571、639/641、653/655、655/657、669/671、671/673 和 685/687, 总共有 5 个一相代谢物和 12 个二相代谢物。这 17 种代谢物的多级质谱断裂碎片见表 1, 其中 M2、M3、M9 和 M13 的断裂规律与 M0 不同, 因此以 M2 和 M9 为例, 推测裂解途径, 结果示于图 2。阿比朵尔在人体内的主要代谢途径示于图 3。

3 结论

通过对口服阿比朵尔胶囊后人的尿样进行定性分析, 利用离子阱质谱碎裂信息, 鉴定出了原药及 17 种代谢物, 并对原药和代谢物的多级质谱图进行了分析, 总结了此类化合物的断裂规律。

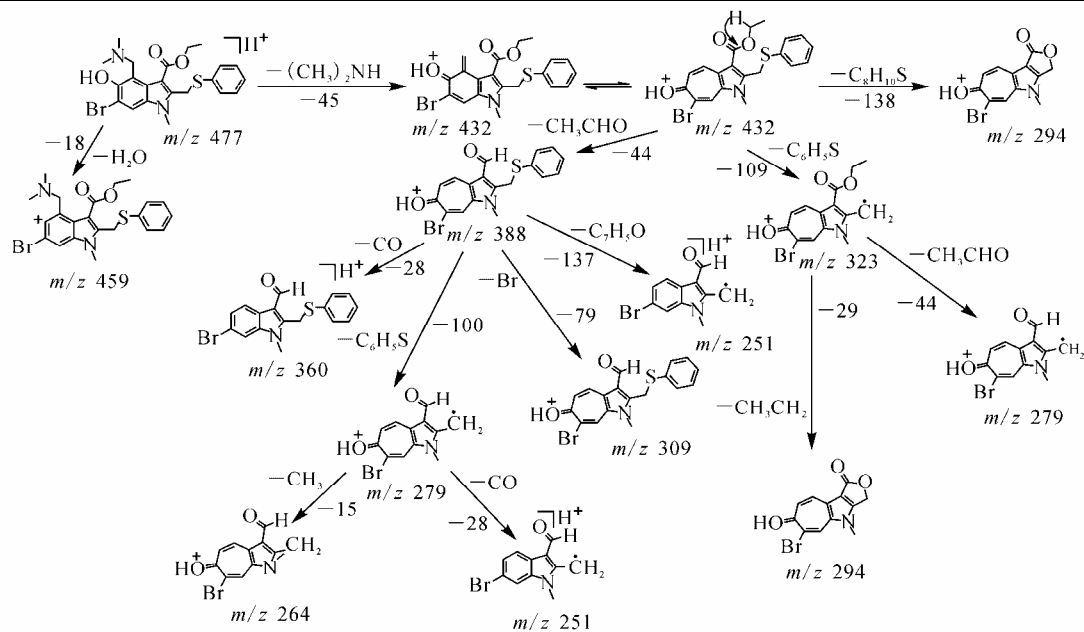


图1 推断的阿比朵尔的裂解途径

Fig.1 Proposed CID pathway of arbidol at the precursor of m/z 477

表1 阿比朵尔及其代谢物色谱保留时间及多级断裂质碎片离子

Table 1 The retention time and fragmentation of MS^n for arbidol and its metabolites

	$[M+H]^+$	保留时间/min	多级的主要碎片离子
阿比朵尔	477, 479	41.9	$MS^2/477$: 459, 432 (100%); $MS^3/432$: 388 (100%), 323, 294; $MS^4/388$: 360, 279 (100%), 309, 251; $MS^4/323$: 279 (100%), 294; $MS^5/279$: 251 (100%), 264
(M0)			
M1	463, 465	38.7	$MS^2/463$: 432 (100%), 445; $MS^3/432$: 388 (100%), 323, 294, 279
M2	493, 495	31.6	$MS^2/493$: 368 (100%); $MS^3/368$: 353, 323 (100%); $MS^4/323$: 294, 279 (100%), 251
M3	479, 481	41.9	$MS^2/479$: 434, 354 (100%), 323
M4	509, 511	31.9	$MS^2/509$: 464 (100%), 332, 269; $MS^3/464$: 420 (100%), 323, 294; $MS^4/420$: 295, 279 (100%), 266
M5	495, 497	30.9	$MS^2/495$: 464 (100%), 332, 269
M6	557, 559	34.0	$MS^2/557$: 477 (100%), 432, 388
M7	653, 655	35.1	$MS^2/653$: 477 (100%), 432, 388, 294
M8	573, 575	23.3	$MS^2/573$: 448; $MS^3/448$: 433, 368, 323 (100%)
M9	669, 671	22.6, 24	$MS^2/669$: 544; $MS^3/544$: 529, 368, 323 (100%), 279
M10	543, 545	37.7	$MS^2/543$: 463, 432 (100%), 388
M11	639, 641	36.6	$MS^2/639$: 463, 432 (100%), 388
M12	559, 561	29.4	$MS^2/559$: 434; $MS^3/434$: 419, 419, 354, 323 (100%), 310
M13	655, 657	25.3 26.9	$MS^2/655$: 530; $MS^3/530$: 515, 486, 354, 323 (100%), 310, 279, 251
M14	575, 577	28.9	$MS^2/575$: 495, 464 (100%), 332, 269
M15	671, 673	26.3	$MS^2/671$: 495, 464 (100%), 332, 269
M16	589, 571	24.1	$MS^2/589$: 509 (100%), 464, 420
M17	685, 687	24.5	$MS^2/685$: 509 (100%), 464, 420, 294

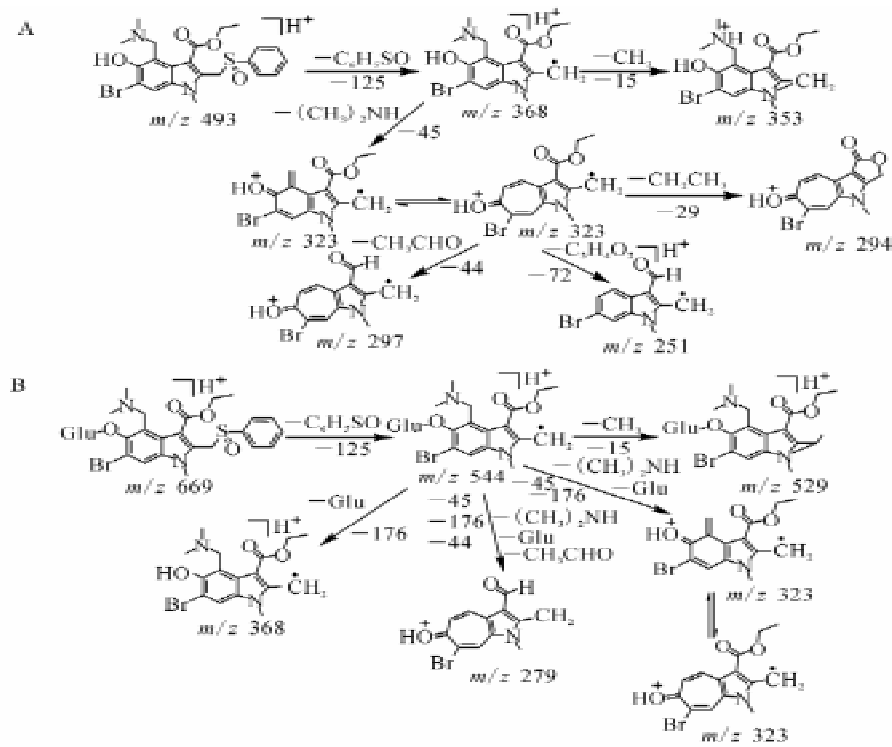


图2 推断的M2 (A)和M9 (B)的裂解途径

Fig.2 Proposed CID pathway of M2 at the procurer of *m/z* 493 (A) and M11 at the procurer of *m/z* 669 (B)

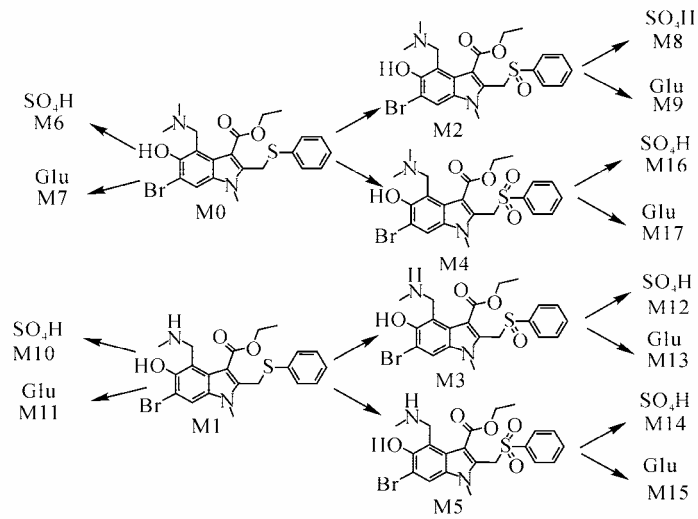


图3 推测阿比朵尔人体内的的代谢途径

Fig. 3 Proposed major metabolic pathway of arbidol in human urine

参考文献:

[1] 王孟昭, 蔡柏菁. 阿比朵尔治疗流行性感冒的随机、双盲、安慰剂对照、多中心临床研究[J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(3): 289-293.

[2] 靳玉琴, 孙非, 张淑芹, 等. 盐酸阿比朵尔抗流感病毒感染的药效学研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(10): 1150-1152.