

尿中 Bromantane 代谢物的研究与 GC/MS 测定

崔凯荣 张亦农 吴侔天 刘欣 徐友宣 杨树民
(国家体委运动医学研究所 北京 100029)

[摘要]采用 GC/MS 分析技术对一种新的免疫刺激剂 Bromantane 检出 3 种单羟基代谢物,并用 SIM 方式测定了代谢物在人尿中的排泄趋势。

关键词:Bromantane GC/MS 代谢物

Bromantane [N-(adamant-2-yl)-4-bromoaniline] 是一种问世不久的具有精神刺激作用的免疫刺激剂^[1]。化学结构见图 1。在近年来的体育比赛中,有的运动员将该药物作为兴奋剂服用,且该药物的服用影响尿中睾酮/表睾酮即 T/ET 比值的正常测定^[2]。鉴于该药具有精神刺激作用及其对尿中 T/ET 比值的正常测定有干扰作用,国际奥委会于 1996 年将 Bromantane 作为刺激剂和掩蔽剂正式列入禁用药物表中。有关 Bromantane 的研究报导多集中于药理作用方面^[1,2,3]。本文以口服 Bromantane (50mg) 后的尿样为样本,对该药进行代谢产物的 GC/MS 分析研究,检出 3 个羟基化产物 (I)、(II)、(III)。采用 SIM 方式测定,取得这 3 种代谢物的排泄曲线。实验表明 Bromantane 的主要代谢途径为分子结构中金刚烷环上的羟基化,其主要代谢物于服药后约 12 小时尿中排泄达到高峰。本方法适用于兴奋剂控制中心对 Bromantane 的检测。

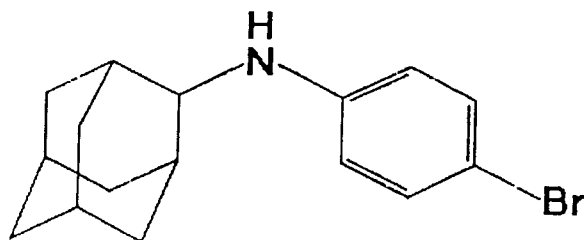


图 1 化学结构式
Fig.1 Structure of Bromantane

1 实验部分

1.1 试剂药品

L-半胱氨酸 MSTFA MBTFA(美国 Sigma 公司),安眠酮(美国)Alltech 公司),Bromantane 片剂(50mg/片)由莫斯科兴奋剂实验室赠送,其它试剂均为国产分析纯规格。

1.2 仪器及色谱条件

HP-5890/5972 气相色谱-质谱联用仪配备 HP7673 自动样器 .HP-5 25m × 0.2mm × 0.33 μ m 5% 交联聚苯甲基硅醚熔融石英毛细管柱。载气为氦气,柱前压 19psi,进样口温度 250 $^{\circ}$ C,GC/MS 接口温度 290 $^{\circ}$ C,柱温由 180 $^{\circ}$ C 以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 220 $^{\circ}$ C,再以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 260 $^{\circ}$ C,然后以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C,保持 6min。

1.3 尿样收集

健康男性(体重 65kg)口服单次剂量(50mg)Bromantane 片剂,分别收集 0~72 小时内所排各次尿液的全部。于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 尿样的提取及衍生化

分别取 0~72 小时收集的各份尿样 5mL,加入 100mg L-半胱氨酸,0.5mL 浓 HCl,于 100 $^{\circ}$ C 下水解 30min。以 3mL 乙醚提取分离除去尿中酸性物质。于水相加入 0.6mL 12N NaOH,2g 固体缓冲剂(NaHCO₃:K₂CO₃ = 3:2),调节 pH 为 9.6。以含有安眠酮为内标的 3mL 乙醚/异丙醇(9:1)提取。N₂ 下吹干提取液。加入 100 μ L MSTFA,70 $^{\circ}$ C 下反应 10min;加入 30 μ L MBTFA,70 $^{\circ}$ C 下反应 10min。GC/MSD 进样 2 μ L,分别进行 SCAN 及 SIM 方式测定。

2 结果与讨论

2.1 代谢物的推测与寻找

将服药前后的尿样得到的总离子流图进行比较,于保留时间 RT15.026,15.530 及 15.707 检测到基峰为 m/z 393、395 的 MS 谱图极为相近的 3 个峰(见图 2)。

m/z 393、395 二者丰度比约为 1:1,提示它们与含 N 原子的 Bromantane 相关。按分子量计算,推测为 Bromantane 单羟基化代谢物的硅烷基衍生物。质谱图中 m/z 171、173(丰度比约为 1:1)及 m/z 184、186(丰度比约 1:1)碎片离子的产生说明羟基化发生在 Bromantane 分子中的金刚烷环上。由于金刚烷环上可羟基化碳原子所处化学环境不同,发生羟基化的难易不同,因而有不同比例的代谢物异构体(I)、(II)、(III)产生。其中以(II)为主要代谢产物。羟基化的具体位置有待进一步实验确认。它们的 TMS 衍生物裂解机理如图 3 所示。

2.2 三种单羟基化代谢物的排泄曲线

以 m/z 393 为代谢物选择离子,以 m/z 235 为内标物安眠酮选择离子,对 0~72 小时收集的各份尿作 SIM 方式测定。将 3 种代谢物与内标面积的比值 Area Ratio(met./IS)用相应时间的尿体积加以校正,对时间(h)作图,得到它们的排泄曲线(见图 4a 及 4b)。

结果表明单羟基化代谢物主要产物(II)于服药后约 12 小时尿中排泄达到高峰。于 72 小时尿样中依然可以检测到。本方法适用于兴奋剂控制中对 Bromantane 药物的检测。

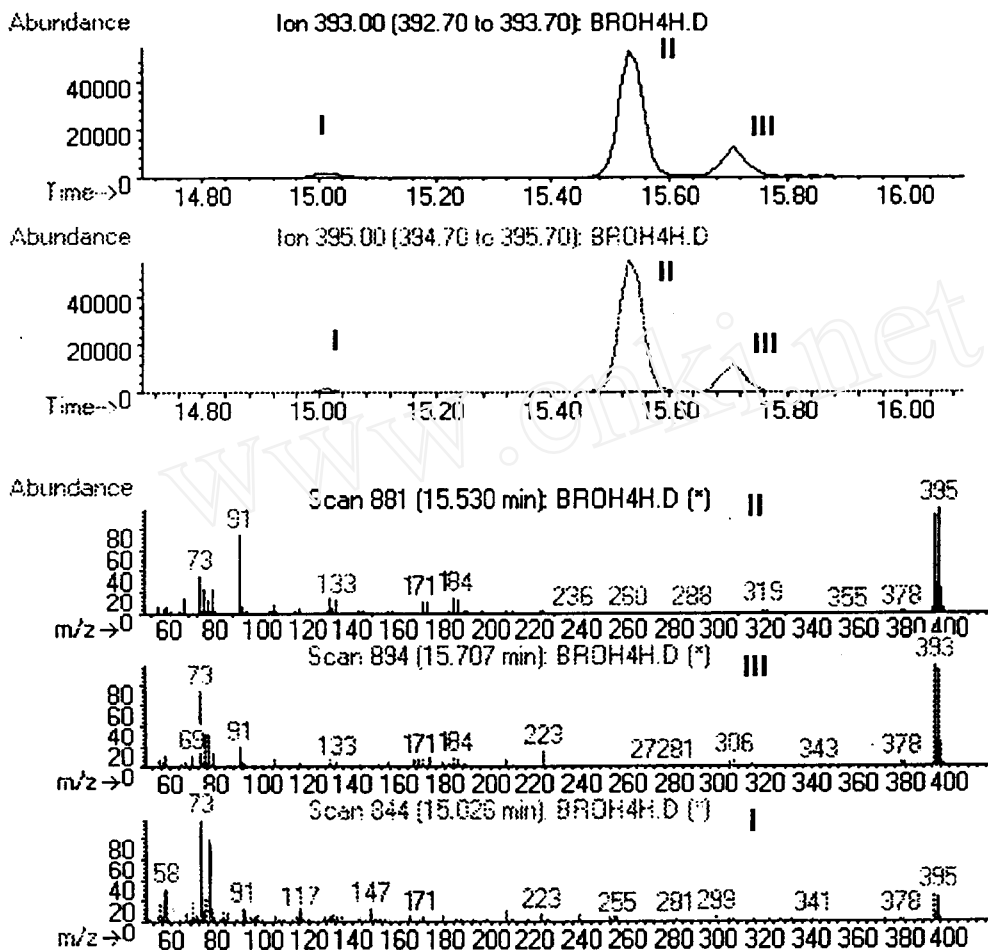


图 2 总离子流图及质谱图

Fig.2 The Extracted Ion Chromatography and MS Spectrum of TMS-derivatized Bromantane Metabolites

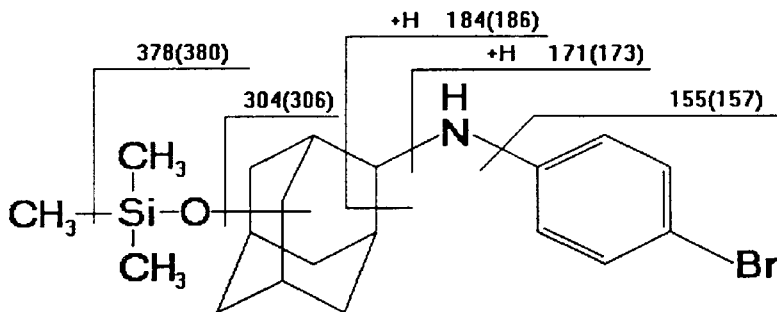


图 3 特征离子碎裂方式

Fig.3 Characteristic Ion Fragmentation of OH-Bromantane-TMS

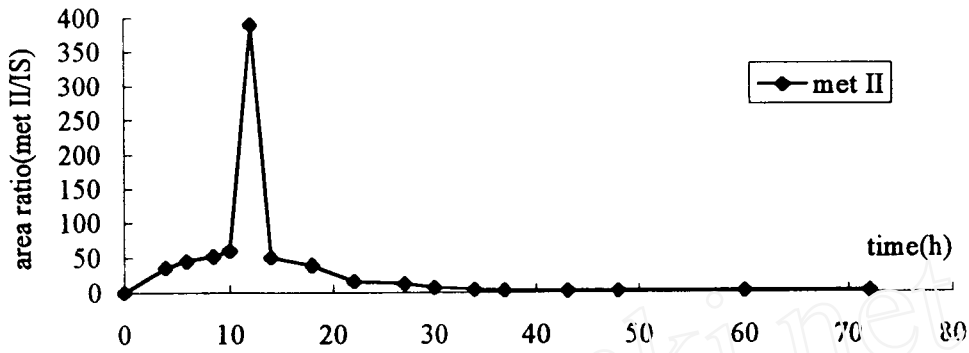


图 4a 代谢物 II 的排泄曲线

Fig. 4a Excretion: Variation of Bromantane Metabolite II

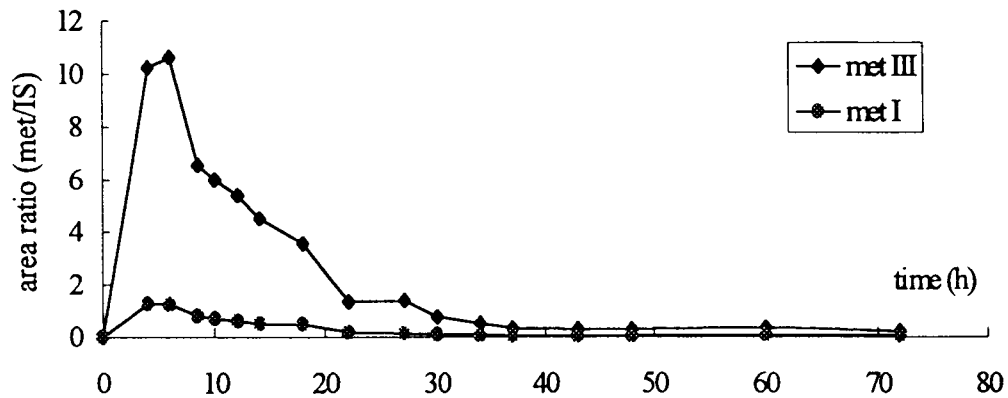


图 4b 代谢物 I、III 的排泄曲线

Fig. 4b Excretion Variation of Bromantane Metabolite I and III

参 考 文 献

- 1 Badyshov B A *et al.* Vopr Med Khim, 1995, 41(2): 54 ~ 57
- 2 Makoto Ueki *et al.* 15th Cologne Workshop on Dope Analysis, 1997 Feb.
- 3 Kudrin V S *et al.* Eksp Klin Farmakol, 1995, 58(4): 8 ~ 11
- 4 Krapivin S V *et al.* Biull Eksp Biol Med, 1993, 116(11): 515 ~ 8.

Study on Bromantane Metabolites by GC/MS

Cui Kairong, Zhang Yinong, Wu Mutian, Liu Xin, Xu Youxuan, Yang Shumin
(National Research Institute of Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Received 1997-08-11

Abstract

The metabolism of bromantane [N-(adamant-2-yl)-4-bromoaniline] and excretion dynamics of the metabolites have been investigated. Three kinds of monohydroxylated metabolites in urine after administration of single dose of the drug were found. It is established that during metabolism the hydroxylation takes place, the hydroxy group is added to the adamantan ring.

Key Words: bromantane, GC/MS, metabolites