

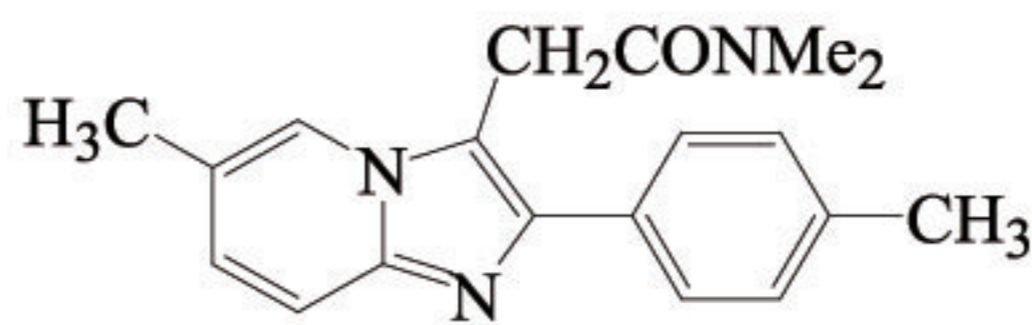
大鼠尿液中唑吡坦及其代谢物的LCMS-IT-TOF分析

No.LCMS-IT-TOF-010

摘要：采用离子阱-飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)对大鼠尿液中的唑吡坦原药以及相关代谢物进行研究。使用电喷雾电离源(ESI)在正离子检测模式获得唑吡坦 $[M+H]^+$ 离子的 MS^1-MS^5 级质谱数据。根据多级质谱检测结果,分析、总结唑吡坦的裂解规律。使用MetIDsolution代谢物分析软件自动检索样品中的唑吡坦相关代谢物,对其中7个物质进行解析,判断7个物质分别为唑吡坦的2个羧酸化、1去甲基化、2个氧化以及2个去甲基羟基化产物。

关键词：唑吡坦 代谢物鉴定 离子阱 飞行时间质谱 MetIDsolution

唑吡坦是一种非苯并二氮卓类的新型镇静安眠药,通过特异性激动 $\alpha 1$ 亚单位上的苯二氮卓(BZD)受体,引起镇静、催眠的效果,可用于短期失眠、长期失眠的治疗,对睡行症、缄默症、极度思睡、睑痉挛、肌强直和术后疼痛也有较好的效果。唑吡坦以咪唑吡啶为基本结构,化学名为N,N,6-三甲基-2-(4-甲基苯基)-咪唑[1,2-a]吡啶-3-乙酰胺。唑吡坦的结构、分子式以及准确分子量如图1所示:



唑吡坦

$C_{19}H_{21}N_3O$

Exact mass 307.1685

图1 唑吡坦分子式、结构式及准确分子量

近年来,在法医毒物分析工作中涉及唑吡坦的案件成日益上升趋势,常见的案件如麻醉抢劫等。国内有较多关于人体内唑吡坦含量测定的报道,主要为药代动力学方面的研究,且多使用GC-MS法和HPLC法,未见对唑吡坦代谢物使用LC-MS进行系统分析的研究。因此,本文使用LCMS-IT-TOF系统对唑吡坦进行多级质谱研究、总结其多级裂解规律,并在此研究基础上对唑吡坦在大鼠体内的代谢物进行分析鉴定。

实验部分

1、仪器与试剂

ShimadzuLCMS-IT-TOF系统,包括LC-20AD $\times 2$ (输液泵),SIL-20AC(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),SPD-M20A(二极管阵列检测器),CBM-20A(控制器),DGU-20A₃(在线脱气机),LCMS-IT-TOF(电喷雾电离-离子阱-飞行时间串级质谱仪)。LCMSsolution3.5工作站,MetIDsolution代谢物鉴定软件。

乙腈为色谱纯(美国Fisher公司),甲酸铵为分析纯(日本和光纯药公司),流动相用水由Milli-Q纯水系统(美国Milipore公司)制得。

2、仪器条件

HPLC: 色谱柱: Shim-Pack VP-ODS 150L × 2.0, 5μm

流动相: A 水+25nmol乙酸铵 B 乙腈

时间程序:

流速: 0.2ml/min

进样量: 1 μl

PDA检测波长: 190–800nm

柱温: 30°C

MS:

离子化模式: ESI源

分析模式: 正、负离子模式

雾化气流速: 1.50L/min

CDL温度: 200°C

加热模块温度: 200°C

检测器电压: 1.70kv

碰撞能量: 20%–50%

采集范围: m/z100–1000

自动调谐优化质谱条件, 外标法校正质量数

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)
0	90	10
20	70	30
30	40	60
30.1	90	10
45	90	10
45	STOP	

3、样品前处理步骤

尿液处理: 酸性提取 取25mL大鼠尿液于锥形瓶中, 用0.1mol/L盐酸调pH6, 加入pH4.8 醋酸钠-醋酸缓冲液5mL, 加入0.5mL β-葡萄糖醛酸酶溶液, 57°C下酶解30min, 离心(7000r/min, 10min), 上清液过Oasis®HLB3cc 固相萃取小柱(固相柱使用前依次过甲醇3mL、超纯水3mL、pH4.8缓冲液3mL, 进行活化), 用5%甲醇水溶液3mL清洗柱子, 离心(5000r/min, 5min), 除去柱中水分, 分别用5mL乙醚、3mL氯仿: 异丙醇(9: 1, V/V)洗脱。碱性提取将酸性提取后的尿液用6mol/LNaOH将溶液调节到弱碱性, 加pH9.2的Tris-HCl缓冲液10mL, 过Oasis® HLB3cc固相萃取小柱, 分别用5mL乙醚、3mL氯仿异丙醇(9: 1)洗脱。合并洗脱液于具塞玻璃试管中, 70 °C下氮气吹干, 残渣用100 μL丙酮溶解。

实验结果与讨论

大鼠尿液中各组分得到良好的分离。对大鼠尿液进行LCMS-IT-TOF正、负离子模式分析。样品在正离子模式具有较好的质谱响应, 各个主要色谱峰均有良好的信号强度。因此, 着重分析正离子模式检测结果(图2)。

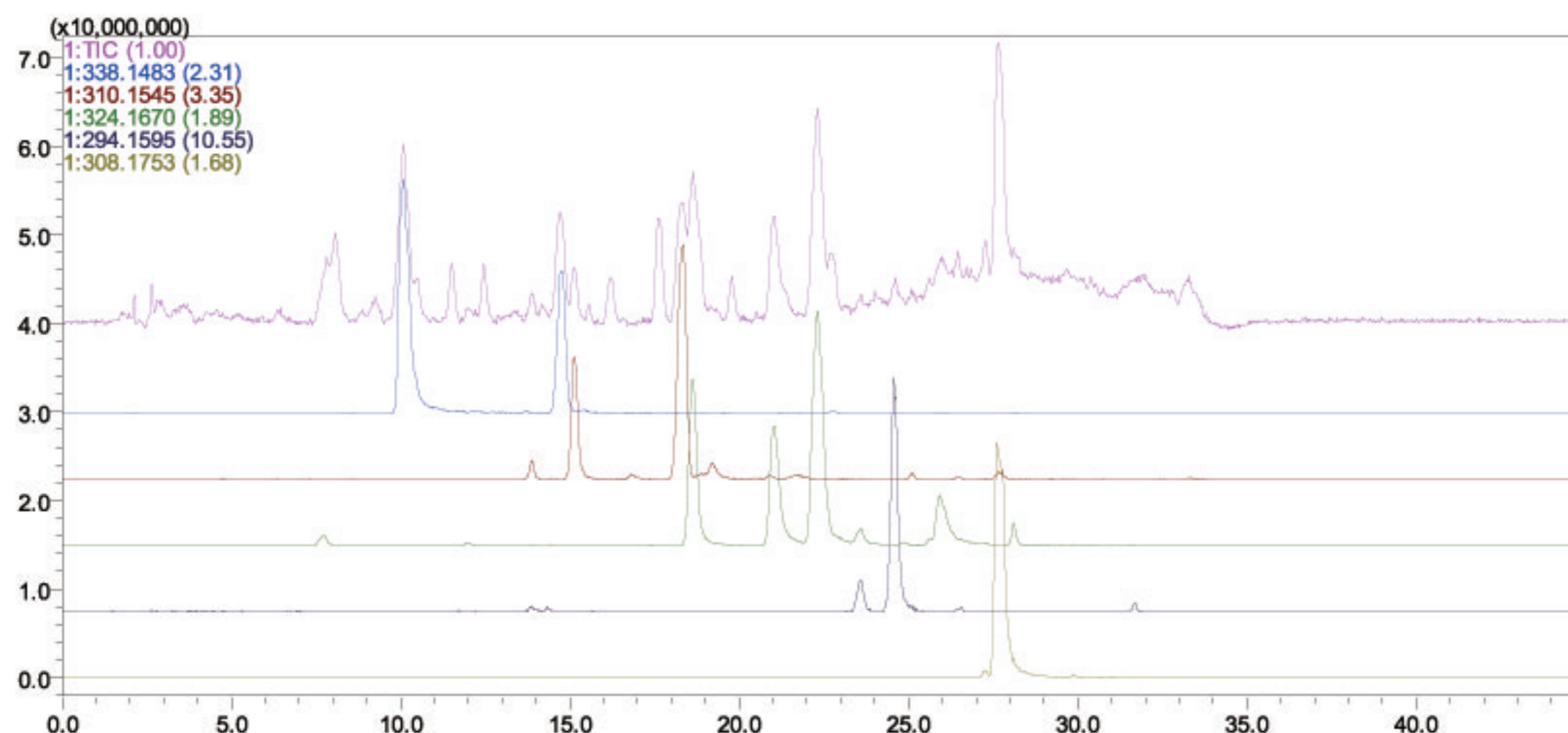


图2 正离子模式下的总离子流图及提取离子流图

在正离子模式对样品进行多级质谱分析，获得各个主要谱峰 MS^1-MS^5 的多级质谱数据，表2对8个谱峰的多级质谱数据进行总结，根据唑吡坦对照品的保留时间，确定峰8为唑吡坦，为大鼠尿液中的原药成分。

表2 8个谱峰 MS^1-MS^5 的主要多级质谱碎片

#	RT (min)	MS^n fragments				
		MS^1	MS^2	MS^3	MS^4	MS^5
1	10.2	338.1500	293.0909	249.1010	234.0781	205.0754
2	14.9	338.1497	293.0921	249.1039	234.0805	219.0892
3	15.0	310.1549	234.1152	219.0909	217.1831	190.0649
			279.1120	249.1010	248.0945	219.0920
4	18.3	310.1540	251.1170	236.0942	205.0733	151.0545
			279.1120	264.0872	235.0862	-
5	18.5	324.1692	279.1117	249.1011	234.0811	205.0760
6	21.0	324.1696	279.1122	264.0862	235.0866	-
7	24.6	294.1596	263.1173	234.1126	220.1018	-
8	27.7	308.1760	263.1162	248.0942	219.0922	151.0553
					205.0741	

由于大鼠尿液成分复杂，图3显示的总离子流图中有较多的谱峰，手动分析唑吡坦的代谢物难度较大且需要较长的解析时间。代谢物软件MetID solution是针对药物代谢物自动分析而专门开发的软件。由于代谢物与原药相比具有结构上的类似性，从而产生相似的多级质谱碎片。因此，MetID solution可自动进行原药与不同化合物之间多级质谱数据的比对，根据其多级碎片的相关性，确认与原药结构相似的物质。本文即采用MetID solution代谢物分析软件，对大鼠尿液样品中唑吡坦的可能代谢物进行自动分析，得到可能的代谢物列表。图4显示了MetID solution软件的工作原理。

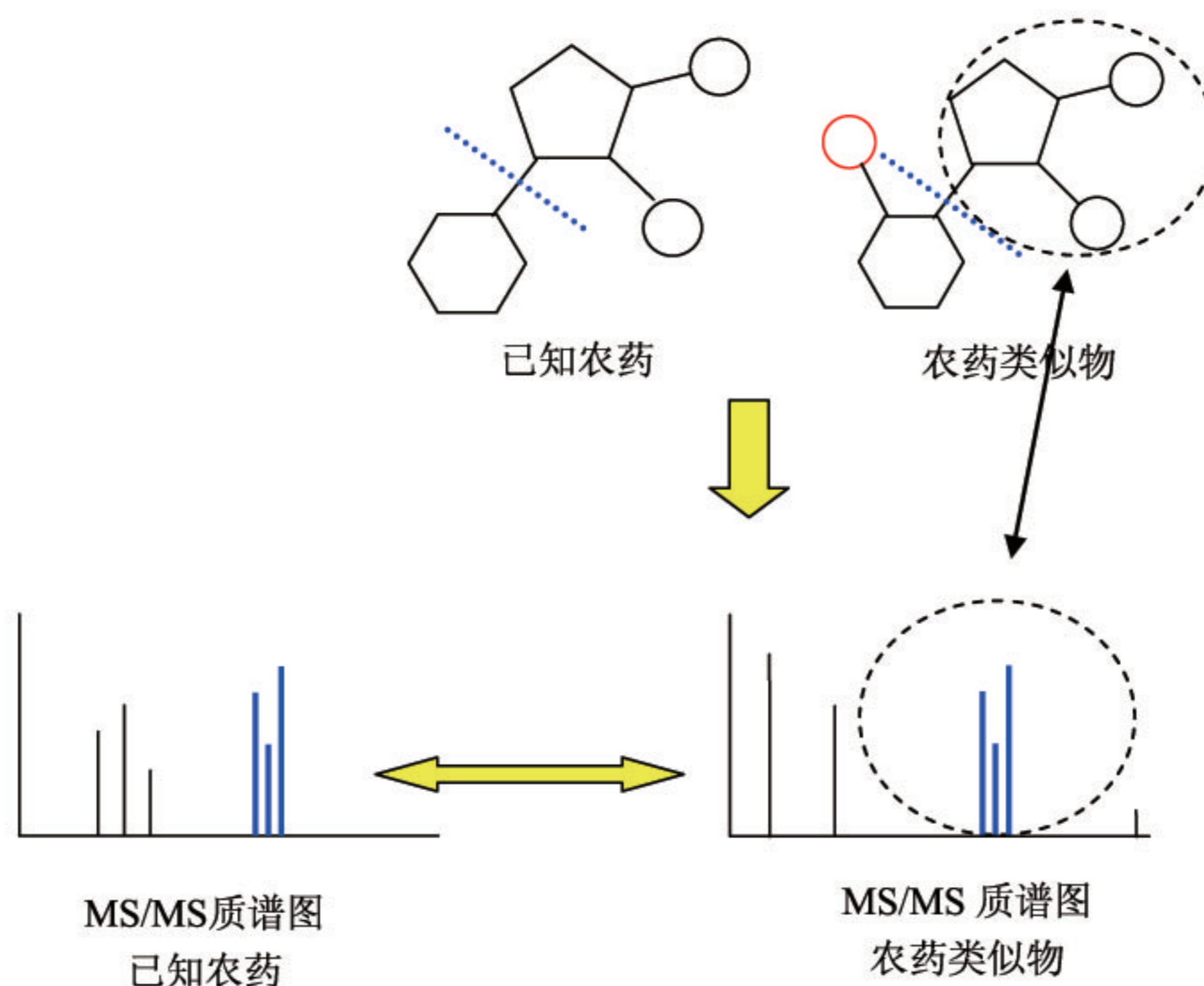


图3 代谢物鉴定软件MetID solution的工作原理

输入唑吡坦的分子式作为母药，自动对大鼠尿液样品进行分析，得到如表3显示的结果。显示了根据已知的代谢反应以及代谢方式得到的结果。

表3 大鼠尿液中唑吡坦代谢物MetID solution分析结果

#	RT	Meas. m/z	Pred. m/z	Iso Score	Biotransformation	Formula (M)	Diff (mDa)	Diff (ppm)
8	27.7	308.1757	308.1757		Parent	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	0.0	-0.13
1	10.2	338.1499	338.1499	95.41	carboxylation	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	0.0	-0.05
2	14.9	338.1490	338.1499	71.64	carboxylation	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	-0.9	-2.71
3	15.0	310.1544	310.1550	81.00	Demethylation + hydroxylation (Phase I)	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂	-0.6	-1.95
4	18.3	310.1547	310.1550	80.63	demethylation + hydroxylation (Phase I)	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂	-0.3	-0.98
5	18.5	324.1702	324.1707	95.33	oxidation	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	-0.5	-1.40
6	21.0	324.1705	324.1707	100.	oxidation	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	-0.2	-0.47
7	24.6	294.1596	294.1601	96.34	demethylation	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O	-0.5	-1.66

对MetID solution得到的结果进行分析, 其中27.7min的为唑吡坦原药, 与标准品保留时间一致。对唑吡坦的裂解方式进行研究, 得到以下可能的裂解规律示意图。以唑吡坦原药的裂解规律为基础, 对其它的预测结果进行分组分析。

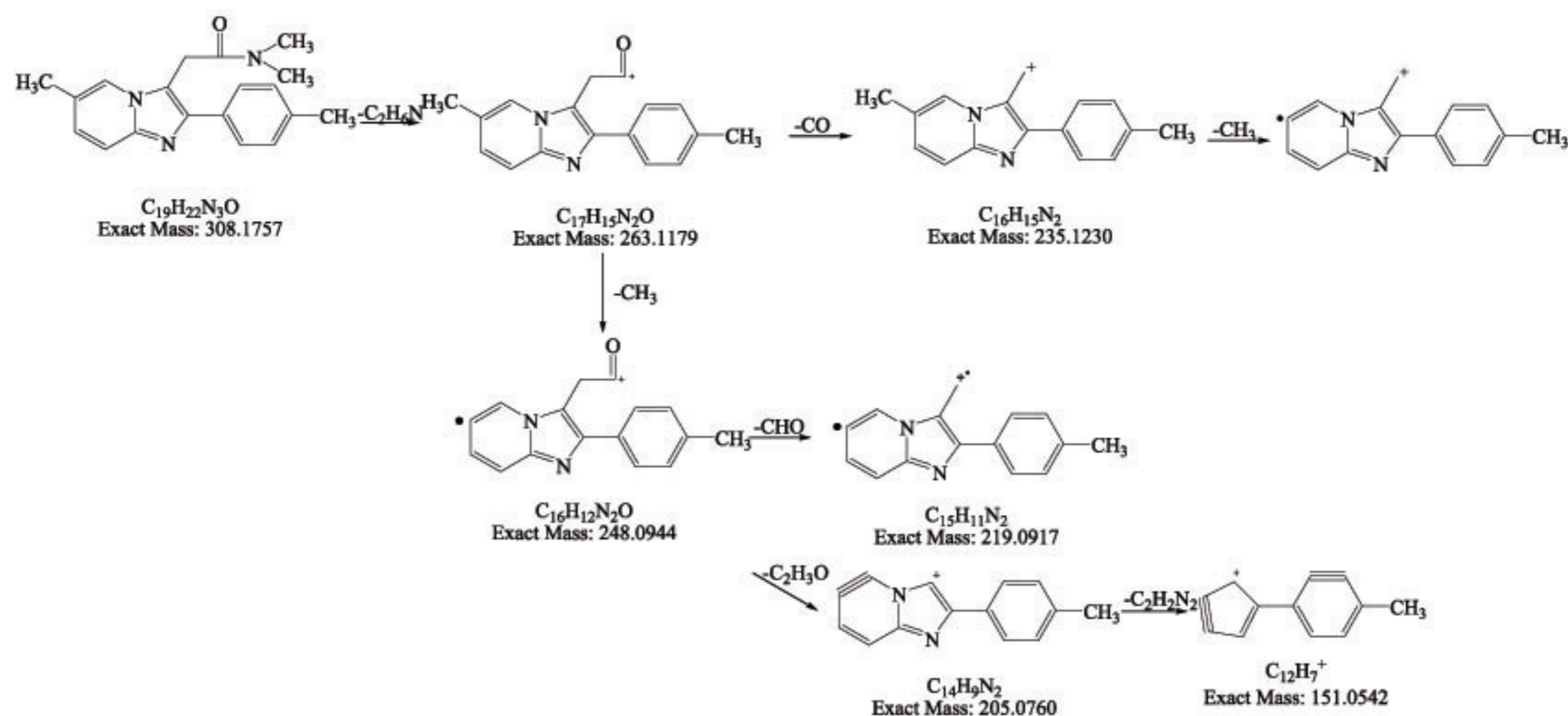


图4 唑吡坦原药可能的裂解规律示意图

1、羧酸化代谢产物分析结果 (峰1和峰2)

根据MetID solution得到的代谢物列表, 其中保留时间14.2和14.9的组分 (峰1, 峰2) 预测为羧酸代谢物。根据文献报道唑吡坦在生物体内主要代谢为ZPCA及ZCA这两种羧酸代谢物, 如图6所示。

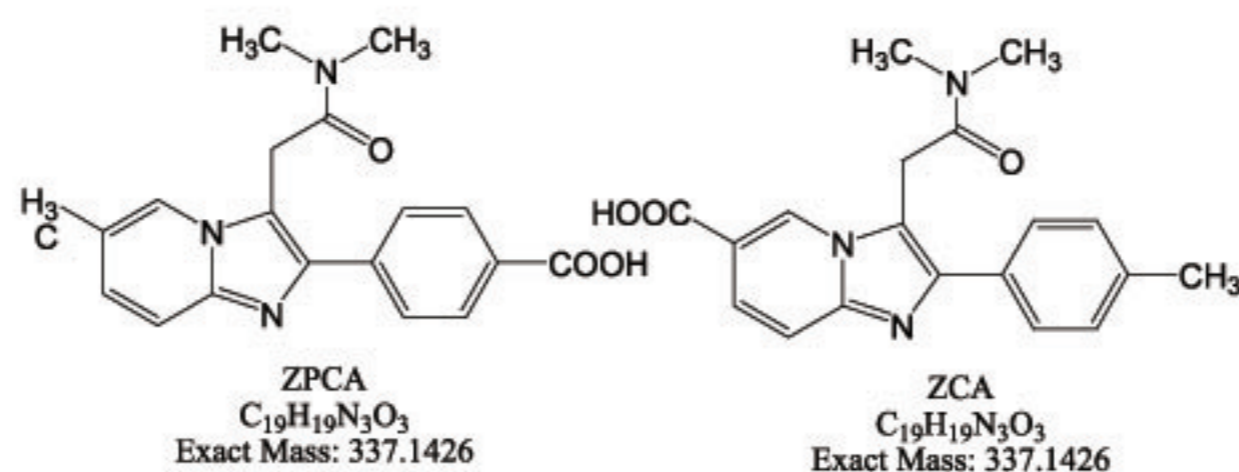


图5 ZPCA和ZCA的结构式

保留时间14.2min和14.9min的化合物及多级质谱碎片分别与ZCA和ZPCA对照品的保留时间一致，因此，峰1和峰2鉴别为ZCA和ZPCA。ZCA与ZPCA具有一致的多级质谱裂解过程，以ZPCA为例，图7显示了其可能的裂解规律。

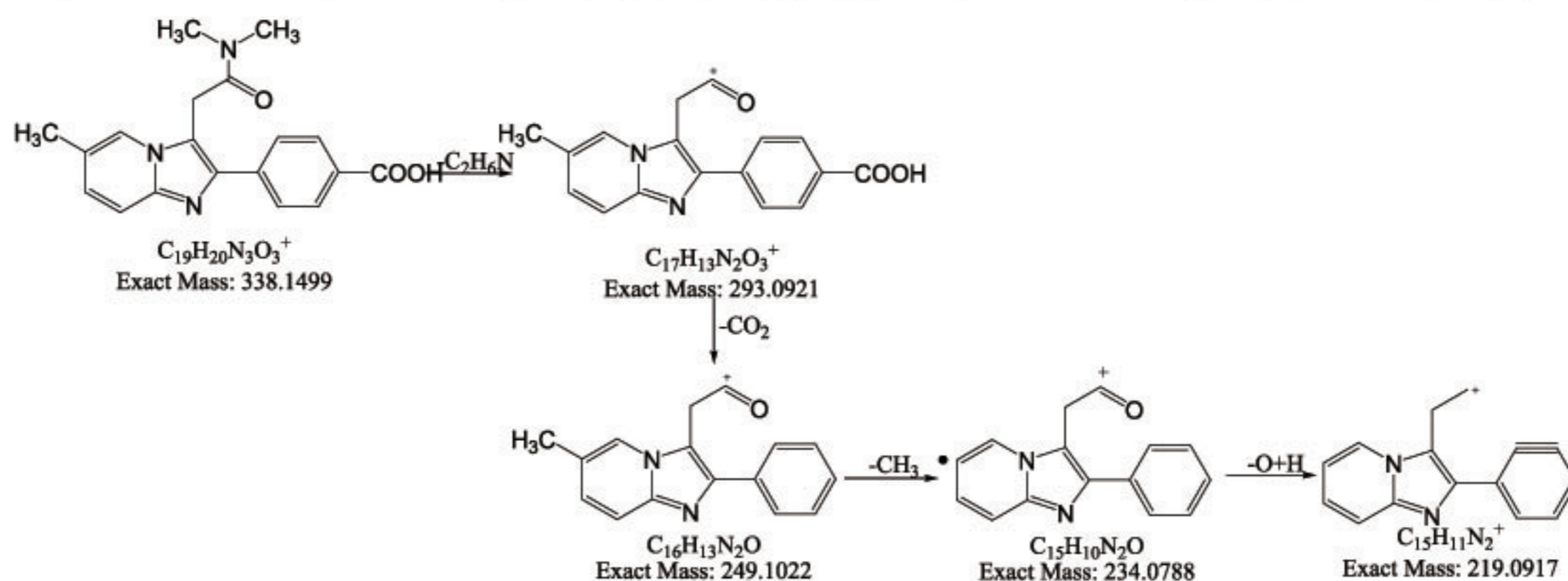


图5 ZPCA和ZCA的结构式

2、去甲基代谢产物（峰7）

峰7的准分子离子峰为m/z294.1596，经分子式预测软件可能的分子式为C₁₈H₁₉N₃O，根据其多级质谱数据判断为去甲基代谢产物。根据文献报道，将峰7鉴别为N-去甲基唑吡坦，其结构式及可能代谢途径如下所示：

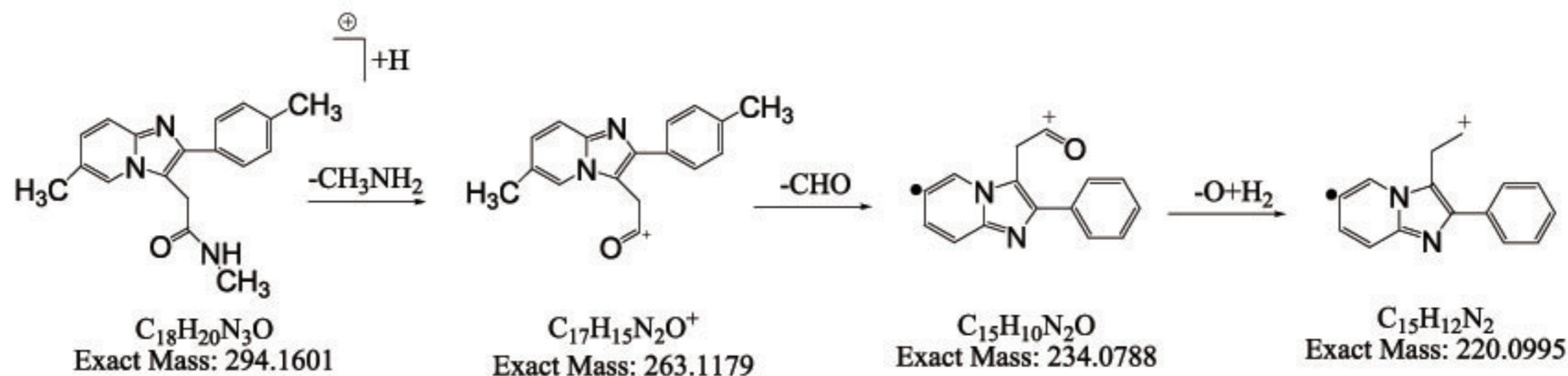


图7 峰7的可能结构式及碎裂过程示意图

3、去甲基化+羟基化代谢产物的分析结果（峰3，峰4）和氧化代谢物（峰5，峰6）

经LCMS-IT-TOF分析，大鼠尿液中存在去甲基+羟基化代谢产物和氧化代谢物，经分析，氧化代谢物为在唑吡坦的结构基础上增加了1个羟基取代基，因此将两种类型的代谢产物一同进行分析。

根据表2对比4个成分的多级质谱碎片，发现峰3与峰5，峰4和峰6具有相似的裂解过程，则峰3和峰5，峰4和峰6在结构上具有一定的相似性，因此，推测峰3和峰4为在峰5和峰6氧化代谢物的基础上去甲基化生成的代谢物。4个化合物均具有m/z 279.1128的谱峰，其可能分子式为C₁₇H₁₅N₂O₂，根据唑吡坦及其羧酸化、甲基化代谢物裂解规律的分析，N，N-二甲基或N-甲基首先发生断裂。则峰3、4、5和6均在母环上有羟基取代，而峰3和峰4的去甲基化位点为N-甲基。只有当去甲基反应发生在N-甲基的位置，才能够满足在MS2质谱产生m/z 279.1128的离子。

使用METLIN进行唑吡坦代谢物的检索，得到2个已确证的氧化代谢物，如图9所示。唑吡坦代谢物X-2的羟基与吡啶N原子可能形成分子内氢键，保留时间较长，因此，峰3为N-去甲基唑吡坦代谢物X-1，峰4为N-去甲基唑吡坦代谢物X-2，峰5和峰6分别为唑吡坦代谢物X-1和唑吡坦代谢物X-2。图10与图11显示了峰3和峰4可能的碎裂途径，氧化产物具有类似的裂解过程。

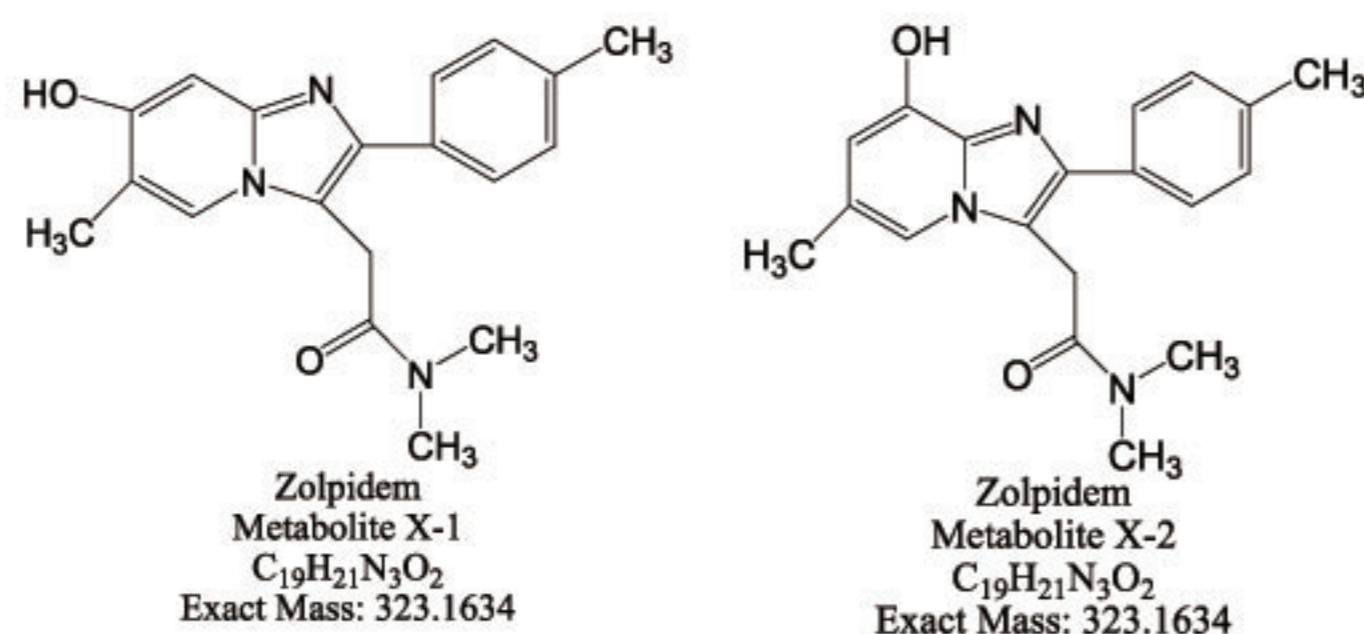


图8 唑吡坦氧化代谢物的结构式

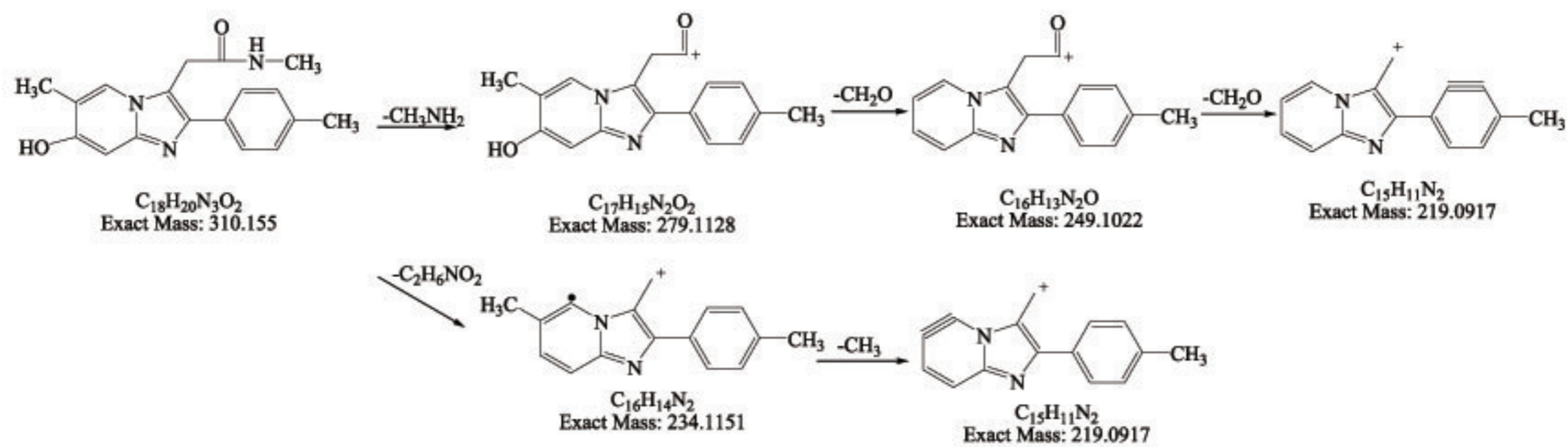


图9 峰3的可能裂解途径示意图

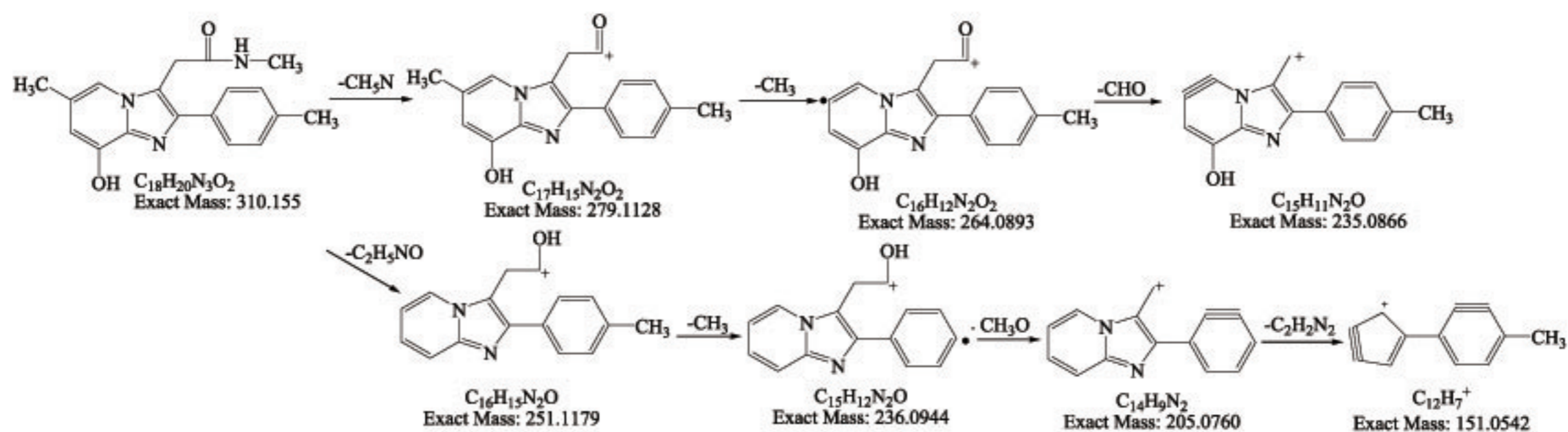


图10 峰4可能的裂解规律示意图

结论

使用LCMS-IT-TOF系统对大鼠尿液中唑吡坦原药及代谢物进行多级质谱分析, 结合MetIDsolution代谢物分析软件对数据进行筛选, 得到可能的代谢物列表。对根据列表得到的代谢物多级质谱数据进行系统分析, 推测鉴别了7个相关的代谢产物。

LCMS-IT-TOF系统以及MetIDsolution代谢物鉴定软件应用于代谢物分析研究领域, 通过自动比较代谢物与原药的多级质谱碎裂特征, 可快速分析提取相关的代谢产物。与传统液质联用技术相比, 由LCMS-IT-TOF系统获得的高精度多级质谱数据, 可提供更多的化学结构信息, 同时综合专用软件, 极大地提高了工作效率以及结构解析的准确性, 为代谢物的快速筛选和初步鉴定提供有利的支持。