

# 用 GC、GC/MS 方法检测人尿中 Selegiline 及其代谢物

崔凯荣 王 杉 吴侔天

(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]** 本文采用 GC、GC/MS 技术对口服 Selegiline Hydrochloride, 一种单胺氧化酶抑制剂的尿中代谢物进行分析测定, 确认检出 10 种代谢产物, 其中三种为新检测到的羟基化代谢物。

**关键词:** 兴奋剂 Selegiline GC/MS

Selegiline 系一种选择性的不可逆单胺氧化酶抑制剂。临床上常与 L-dopamine 联合用药, 用于治疗帕金森氏症<sup>[1,2]</sup>。由于 selegiline 在人体内代谢生成苯丙胺、甲基苯丙胺等中枢神经刺激剂物质, 因而被国际奥委会于 1998 年 1 月列入禁用药物之列。

关于 selegiline 在人体内的代谢, Reynolds 等人<sup>[3]</sup>较为早期的研究报道了口服 selegiline 后尿中排泄产物为 methylamphetamine (甲基苯丙胺) 和 amphetamine (苯丙胺)。而后 Heinonen 等人<sup>[4]</sup>另检测到代谢物 desmethylselegiline。新近, HO-SANGSHIN<sup>[5]</sup>采用 GC/MS 技术由口服 selegiline 的人尿中确认了包括未变化的 selegiline 在内的十种代谢物, 并对代谢物进行了立体化学研究。这十种代谢物为: selegiline, (R)-desmethylselegiline, (R)methylamphetamine, (R)-amphetamine, (1R, 2R)-norpseudoephedrine, (1S, 2R)-norephedrine (1R, 2R)-pseudoephedrine, (1S, 2R)-ephedrine, (R)-p-hydroxyamphetamine 和 (R)-p-hydroxyamphetamine。

本文以健康男性志愿者一次口服 10mg selegiline hydrochloride 的阳性尿为样本, 采用 GC、GC/MS 技术, 检出并确认上述十种代谢物中的七种, Pseudoephedrine, norephedrine 和 norpseudoephedrine 除外。此外, 还检出三种新的羟基化代谢物: p-OH-norselegiline, m-(or o-)-OH-norselegiline 及 m-(or o-)-OH-methylamphetamine。对它们的质谱碎片裂解方式及 selegiline 可能的代谢过程作了讨论的假设。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂药品

\* 1999-11-22 收

\*\* 联系人

Selegiline 5 药片内含 5mg selegiline hydrochloride。购自德国 Hexal 公司。标准品 selegiline HCl(德国科隆兴奋剂检测中心赠送), amphetamine · HCl, methylamphetamine · HCl, p-OH methylamphetamine 及 ephedrine · HCl(均由加拿大兴奋剂检测中心赠送)。其它所有试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器及条件

气相色谱仪(GC): HP5890A, 配有氮磷检测器。气相色谱/质谱联用仪(GC/MSD): HP5890/5970

### 仪器条件:

GC: HP-5 16m × 0.2mm × 0.33μm 5% 交联聚苯甲基硅醚熔融石英毛细管柱, 载气氮气, 柱头压 150kPa, 进样口温度 250 , 检测器温度 280 , 柱温: 100 (1min)  $\frac{10}{\text{min}}$  200  $\frac{20}{\text{min}}$  300 (6min)。GC/MSD: HP-5 25m × 0.2mm × 0.33μm 毛细管柱。柱头压: 75kPa, 柱温: 80 (1min)  $\frac{15}{\text{min}}$  240  $\frac{5}{\text{min}}$  280 (7min)。余同 GC。

## 1.3 尿样收集

健康男性(体重 65Kg)口服单次剂量 10mg Selegiline 5 片剂。分别收集所排各次尿液的全部及服药前的空白尿, 于- 20 。

## 1.4 样品制备

取尿样 5ml, 加入 100mgL 一半胱氨酸, 0.5ml 浓 HCl, 于 100 下水解 30min。冷却后以 3ml 叔丁基甲醚提取, 分离, 弃去醚层。于水相加 0.5ml 12M NaOH, 2g 固体缓冲剂(NaHCO<sub>3</sub>: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>= 3: 2, pH9.6)。以 3ml 含二苯胺为内标的叔丁基甲醚/异丙醇(9: 1)溶液, 振摇。分离提取液, 于 N<sub>2</sub> 气下吹干, 以 1ml 乙酸乙酯溶解残渣, GC/MSD 进样 2μl。之后于 N<sub>2</sub> 气下浓缩至约 50μl。于 GC/MSD 进样 2μl。然后吹干, 于残渣中加入 100μl 乙酸乙酯和 100μl 三氟乙酰酐(TFAA), 70 反应 20min。于 N<sub>2</sub> 气下吹干, 再以 100μl 乙酸乙酯溶解, GC/MSD 进样 2μl。在进行 selegiline 代谢物 amphetamine, methylamphetamine 及 norSelegiline 尿中排泄趋势试验中, 尿样提取程序如下: 分别取 0- 72 小时收集的各份尿样 5ml, 加入 0.5ml 5M KOH, 3gN aCl, 2ml 15ppm 二苯胺(内标)的叔丁基甲醚溶液, 振摇, 离心, 分离醚层, 于 GC 进样 2μl

## 2 结果与讨论

### 2.1 代谢物的确认

Selegiline 的化学结构决定了其在体内可以通过去甲基化, 羟基化和分子裂分生成多种代谢产物。已知 selegiline 的代谢主要发生在肝内, 通过微粒体细胞色素 P450 系统进行<sup>[6]</sup>。为寻找代谢物, 本文将服药后的尿提取物 GC/MSD, GC/MS 分析及提取物经 TFAA 衍生化后的 GC/MS 结果与空白尿进行比较。对已知的 selegiline 代谢物, 将其色谱保留时间及 EI 质谱与标准化合物进行比较, 未知代谢物由所得的 EI 谱进行解析, 推测结构。共检测并确认含未变化的 selegiline 在内的 10 种代谢物。

以服药 3.5 小时尿为例, 提取物 GC/MSD, GC/MS 结果分别见图 1(服用 selegiline 前的空白尿(上图), 服药后 3.5 小时尿(下图)的气相色谱图)及图 2(服药后 3.5 尿中

selegiline 代谢物的  $m/z$  44, 82, 58, 96 提取离子色谱(前 4 图)用 EI 质谱图)。TFAA 衍生化后的 GC/MSD 结果见图 3(服药后 3.5 小时尿中 selegiline 代谢物-TFA 衍生物的  $m/z$  140, 154, 178 提取离子色谱(前 3 图)及 EI 质谱图)。图 1 中 A 1, A 2, A 4, A 5, A 6 分别与 amphetamine, methylamphetamine, selegiline, p-OH-amphetamine, pholedrine (p-OH-methylamphetamine) 标准品的 GC 相对保留时间(以二苯胺为内标)相一致,并由 GC/MS 分析得到的 EI 谱(见图 2A 1, A 2, A 4, A 6 及图 3B 1, B 2, B 5, B 6)得到确认。其中 selegiline 分子中叔氨结构决定了其不被 TFAA 衍生化。代谢物 p-OH-amphetamine 因尿中浓度太低而没有得到它的 EI 谱,由其 TFAA 衍生化后得到的衍生物 p-OH-amphetamine, N-TFA, O-TFA 的 EI 谱得到确认。图 1 中 A 3 由图 2A 3 及图 3B 3 所示 EI 谱推测为 selegiline 的去甲基代谢物 norselegiline。A 3 EI 谱中  $m/z$  82(基峰), 91, 148, 172(M-1) 为 norselegiline 的特征离子。其 TFA 衍生物 B 3 EI 谱中  $m/z$  178(基峰), 91, 118, 150 为特征

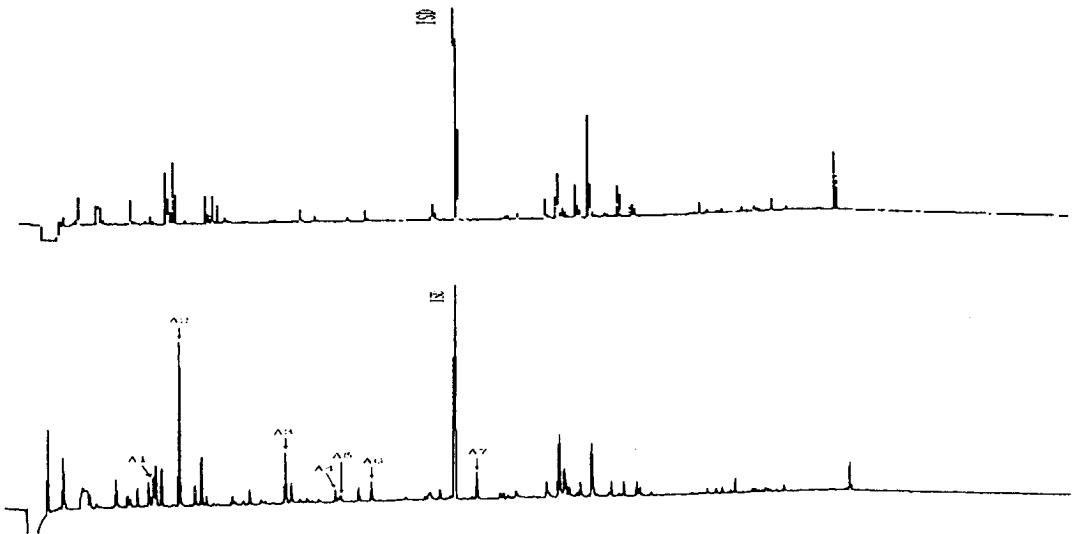


Fig 1 GC-NPD Chromatograms of urine blank (top) and urine sample-3.5 h after administration of selegiline [bottom, retention time (min)]

- |                               |                                    |
|-------------------------------|------------------------------------|
| A 1 amphetamine(2.954),       | A 2 methylamphetamine(3.562),      |
| A 3 norselegiline(5.653),     | A 4 selegiline(6.672),             |
| A 5 p-OH-amphetamine(6.774),  | A 6 p-OH-methylamphetamine(7.404), |
| A 7 p-OH-norselegiline(9.487) |                                    |

离子。其碎片可能的裂解方式见图 4A 3, B 3。图 1 中 A 7 经 GC/MS 分析得到的 EI 谱见图 2A 7。具有与图 2A 3 相同的  $m/z$  82 基峰, 提示该代谢物具有 N-去烷基结构。 $m/z$  107 非常特征, 提示分子中苯环发生了羟基化, 由  $\beta$  裂解产生。按照羟基化代谢一般规律, 羟基化可发生在苯环的不同位置, 而以对位羟基化为主要产物, 推测其为新的代谢物, 即 p-OH-norselegiline。A 7 EI 谱中的  $m/z$  135, 174 分别由 C-N 键开裂和分子失去  $-CH_3$  基生成。TFAA 衍生化的 EI 谱见图 3B 7。 $m/z$  178, 230, 203, 271 为特征离子, 其可能的裂解方式见图 4A 7, B 7。与其相邻的保留时间处, 检到另一痕量代谢物(见图 3B 8)。其质谱特征与图 3B 7 极为相近, 推测其为苯环的间位或邻位羟基化产物, 即 m-(or o)-OH-norselegiline。同样的情

况,在TFAA衍生化的GC/MS分析中,在pholedrine-N-TFA, -O-TFA相邻的保留时间处,检到另一新的痕量代谢物,见图3B9。其质谱特征与图3B6极为相近,推测为甲基苯丙胺分子中苯环间位或邻位羟基化产物,即m-(or o)-OH methylamphetamine。

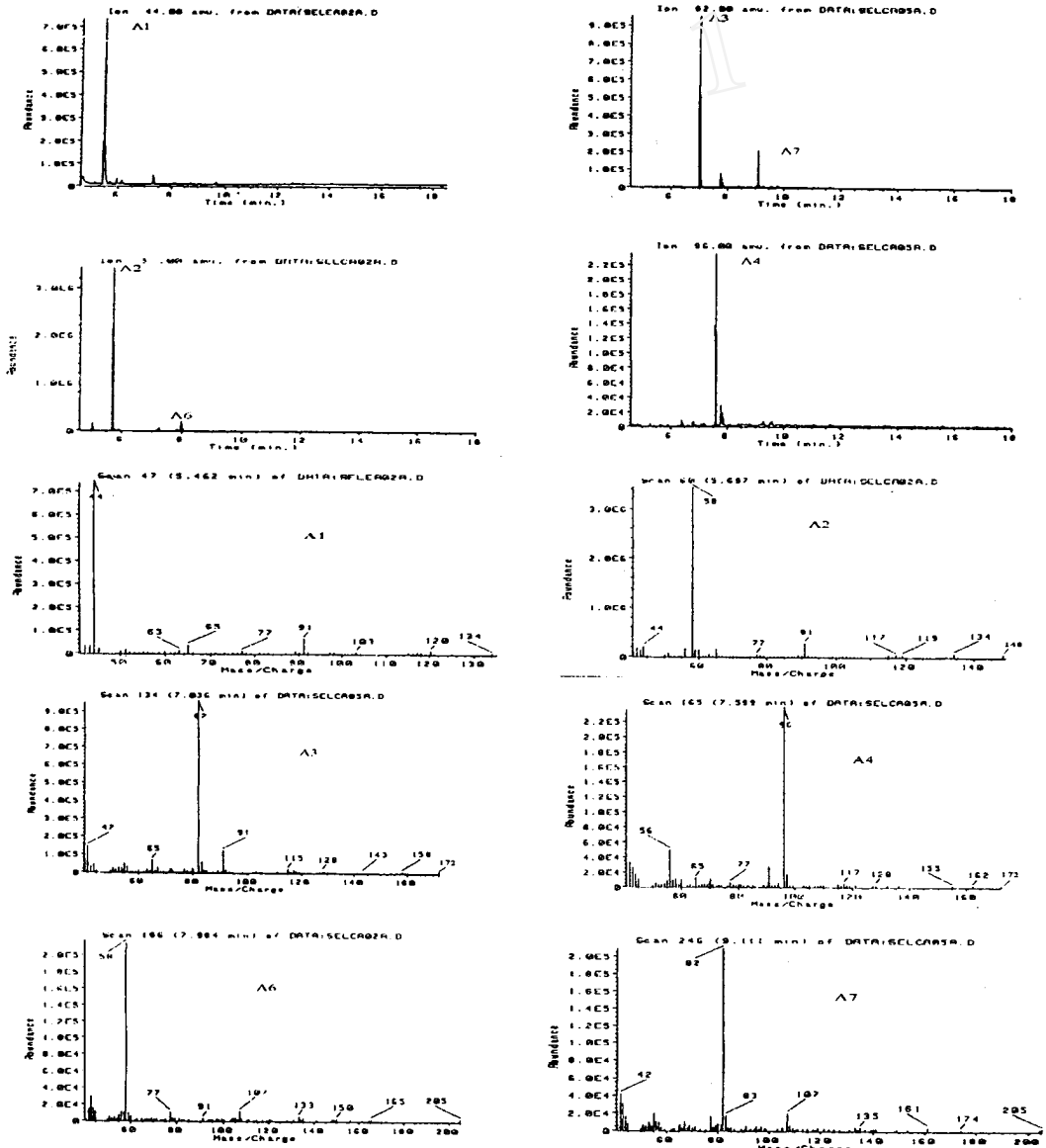


Fig 2 Ion chromatograms and EI spectra of metabolites of selegiline[retention time(m in) ] obtained from the extract of urine 3 5h after adm inistration of selegiline

A1 amphetam ine (5.462),

A2 methylamphetam ine (5.697),

A3 norselegiline (7.036),

A4 selegiline (7.599),

A6 p-OH methylamphetam ine(7.984),

A7 p-OH-norselegiline(9.111)

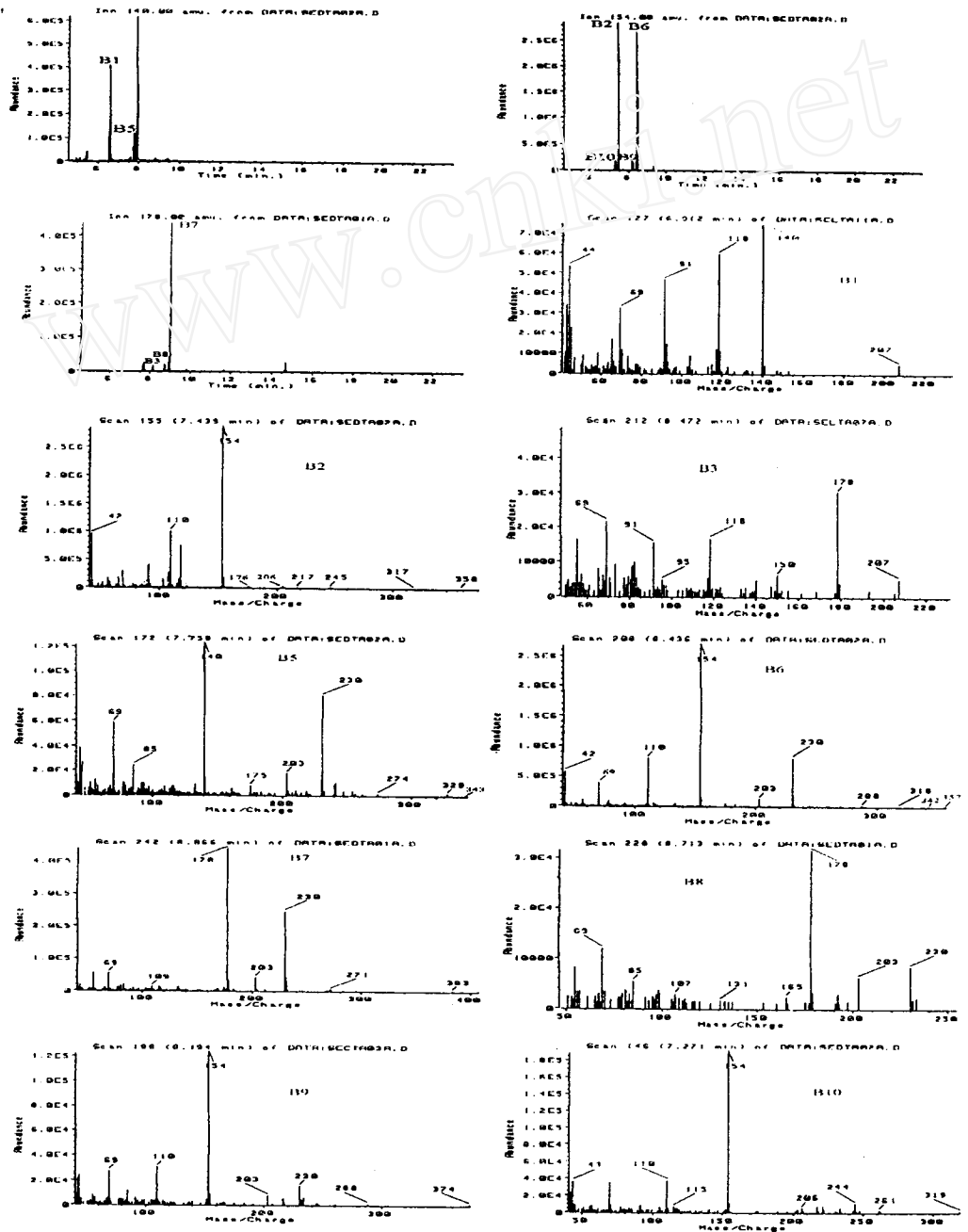


Fig 3 Ion chromatograms and EI spectra of metabolites of selegiline [tetention time(m in )] obtained from TFA derivatized extract of urine 3 5h after administration of selegiline

B1 amphetamine,N-TFA (6 912);B2 methylamphetamine,N-TFA (7. 439);B3 norselegiline,N-TFA (8 472);B5 p-OH-amphetamine,N-TFA,O-TFA (7. 758);B6 p-OH-methylamphetamine,N-TFA,O-TFA (8 436);p-OH-norselegiline,N-TFA,O-TFA (8 966);B8 m-(or o)OH-norselegiline,N-TFA,O-TFA (8 713);B9 m-(or o)OH-methylamphetamine,N-TFA,O-TFA (8 194);B10 ephedrine,N-TFA,O-TFA (7. 271)

已知在 selegiline 的代谢过程中, 羟基化还可发生在苯基碳原子上<sup>[5]</sup>, 即  $\beta$  羟基化。在本文实验条件下, 仅在 TFAA 衍生化后, 检测到痕量 ephedrine 的 TFA 衍生物, 见图 3B 10。由于含量低, 未检测到它的游离形式。同时亦未检测到前文提到的 HO-SANGSHIN 等人所报道的 pseudoephedrine, norephedrine 及 norpseudoephedrine。

实验表明, selegiline 在体内主要代谢物为 methylamphetamine 及 amphetamine, 尿中仅能检测到痕量未变化的母体药物。在国际奥委会禁用的刺激剂类药物中, 有多种药物以 amphetamine 或/及 methylamphetamine 为主要代谢产物。因此, 寻找能够证明所服原始药物的其它代谢物常为兴奋检测所关注的问题, 尤其是在遇到检测到共同代谢物的阳性尿时, 它能成为判断、区分、确认阳性尿样来自服用何种母体药物的重要依据。selegiline 尿中新的代谢物的检出, 尤其是 p-OH-norselegiline (依据羟基化代谢的一般规律, 推测它是苯环上不同位置羟基化中的主要代谢产物), 对于判断确认 selegiline 阳性具有重要意义。

由上述检到的代谢物推测 selegiline 在人体代谢的主要途径由图 5 图所示。

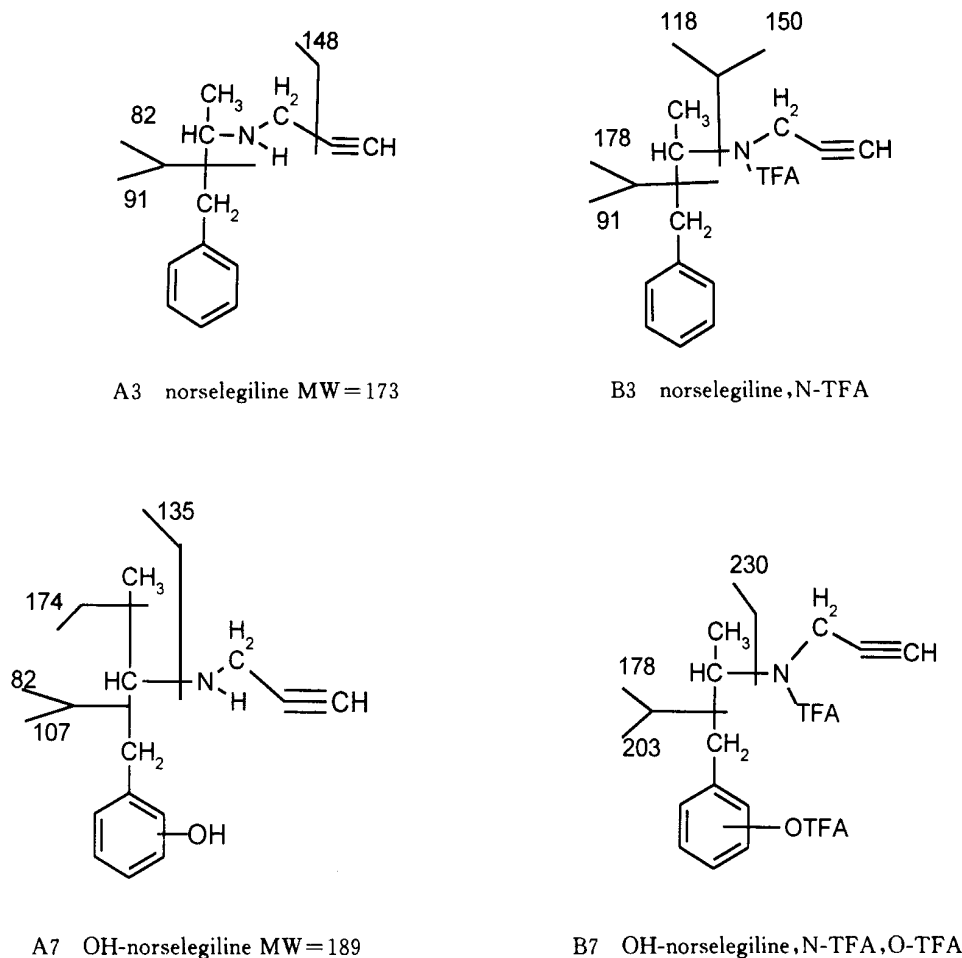


Fig 4 The possible fragmentation pattern of the metabolites of selegiline

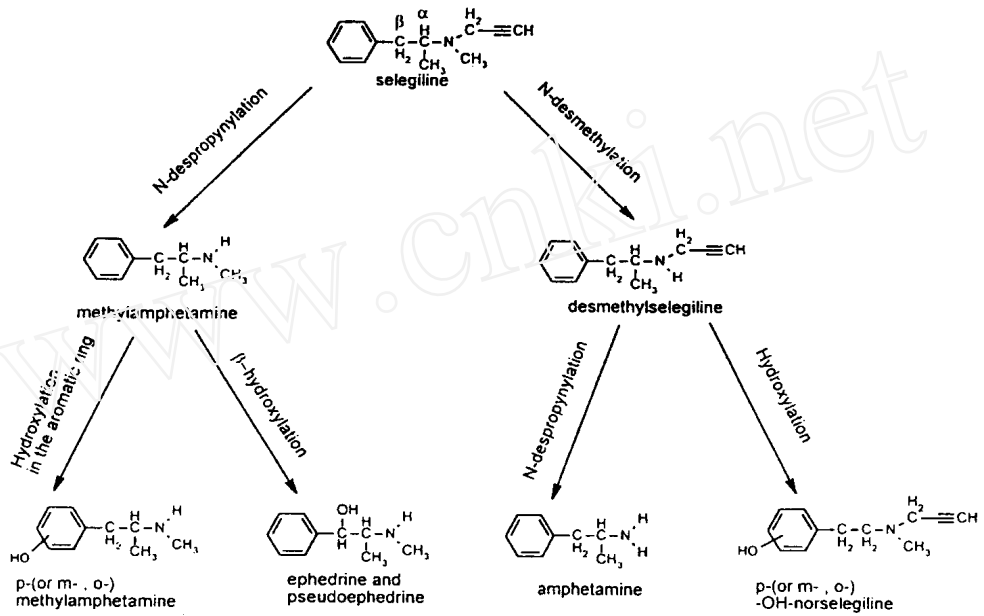


Fig 5 Metabolic pathways of selegiline in human

### 2.2 代谢物尿中排泄趋势

selegiline 的主要代谢物 methylamphetamine, amphetamine 及 norselegiline 在尿中的排泄曲线如图 6 所示。由排泄曲线可知, 代谢物 methylamphetamine, amphetamine 分别于 41.5h 和 14.5h 达到排泄高峰。由于缺少 norselegiline 标准品, 因此以不同的时间测定得到的 norselegiline 相对内标的面积比相对时间作图, 取得 norselegiline 在尿中的排泄趋势, 于服药后 3.5h 为最高。

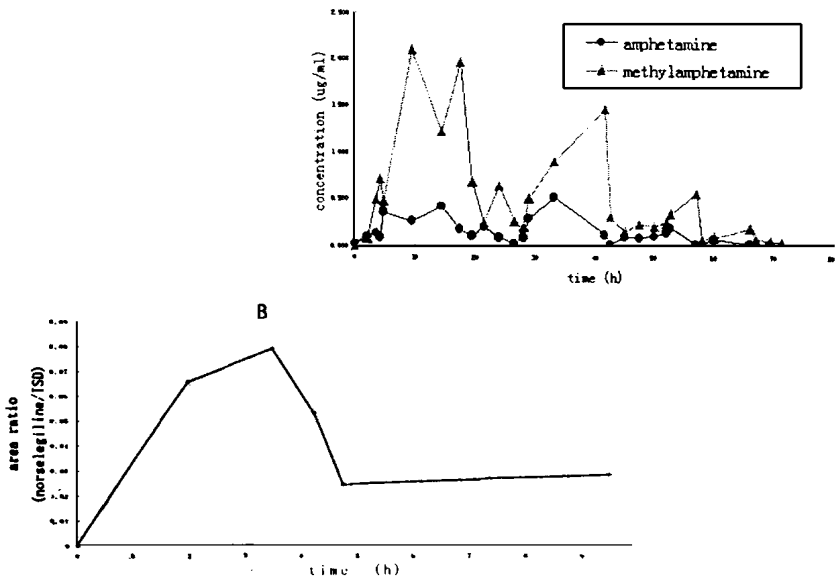


Fig 6 A. Excretion curve of metabolites methylamphetamine and amphetamine  
 B. Excretion tendency of norselegiline in urine after oral administration of 10mg selegiline · HCl

## 参 考 文 献

- 1 J Knoll The pharmacology of (-) deprenyl, *J Neural Transm* 22 (suppl), 75- 89(1986)
- 2 W Birkmayer, P Reiderer, L Ambrozi and M B H Youdim. Implications of Combined Treatment With "M adopar " and L - deprenyl in Parkinson's Disease—Long Term Study, *Lancet* 26, 439- 443(1977)
- 3 G P Reynolds, J D Elsworth, K Blau, M Sandler, A J Lees and G M Stern Deprenyl Is Metabolized to Methamphetamine and Amphetamine in Man, *Br J Clin Pharmacol* 6, 542- 544(1978)
- 4 E H Heinonen, V Mylly and K Sotaniemi Pharmacokinetics and Metabolism of Selegiline, *Acta Neuro Scand* 80(suppl 126)93- 99(1989)
- 5 Ho - Sang Shin Metabolism of Selegiline in Humans, Identification, Excretion and Stereochemistry of Urine Metabolites, *Drug Metabolism and Disposition* 25, 657- 662(1997)
- 6 Yoshida T, Yamada Y, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Metabolism of Deprenyl, a Selective Monoamine Oxidase (MAO) B Inhibitor in Rat: Relationship of Metabolism to MAO - B Inhibitory Potency, *Xenobiotica* 16, 129- 36(1986)

## Determination of Selegiline and Its Metabolites in Human Urine by GC, GC/MS

Cui Kairong, Wang Shan, Wu Moutian

(National Institute of Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Received 1999-11-22

### Abstract

Three new metabolites of selegiline were found: p - OH - norselegiline, m - (or o - ) - OH - norselegiline and m - (or o - ) - OH - methylamphetamine in excretion urine for study . Their structures were identified by GC/MS and the probable metabolism scheme of selegiline was proposed

Key Words: selegiline, GC/MS, metabolite