

大鼠尿中硝基安定与尼美西泮及其代谢物的 GC - MS 检测

潘智文¹, 黄克建², 林翠梧¹, 刘晓锋², 李璐², 罗正坚², 陈而廉³

(1. 广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区公安厅 物证鉴定中心, 广西 南宁 530012; 3. 广西壮族自治区公安厅 科技处, 广西 南宁 530012)

摘要: 采用 GC - MS 比较了硝基安定和尼美西泮在大鼠体内产生的代谢产物, 确定了尼美西泮在大鼠体内的代谢途径。给大鼠急性喂食硝基安定和尼美西泮, 收集 24 h 内尿液, 尿样用 β 葡萄糖醛酸酶水解, Oasis[®] HLB 柱固相提取, 以 DB-35 MS 柱为分离柱, 气相色谱 - 质谱联用检测。从大鼠尿液中检出 3 种硝基安定代谢物: 7-乙酰氨基硝基安定、7-氨基硝基安定和 2-氨基-5-硝基苯基苯甲酮; 4 种尼美西泮代谢物: 7-乙酰氨基尼美西泮、7-乙酰氨基硝基安定、7-氨基尼美西泮和 2-氨基-5-硝基苯基苯甲酮, 检出少量尼美西泮原体。并推断出 2 种药物在大鼠体内的代谢途径。

关键词: 尼美西泮; 硝基安定; 尿液; 代谢物; 固相提取; 气相色谱 - 质谱

中图分类号: O657.63; R971.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)08 - 0881 - 04

Determination of the Metabolites of Nimetazepam and Nitrazepam in Rat Urine Using Gas Chromatography and Mass Spectrometry

PAN Zhiwen¹, HUANG Ke-jian², LIN Cuiwu¹, LIU Xiao-feng²,
LI Lu², LUO Zheng-jian², CHEN Er-lian³

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Institute of Forensic Science, Public Security of Guangxi Province, Nanning 530012, China;

3. Department of Technology, Public Security of Guangxi Province, Nanning 530012, China)

Abstract: The metabolic pathways of nimetazepam and nitrazepam in rat were studied by comparing the metabolites of them. Wistar rats were administered with nimetazepam and nitrazepam, respectively, and urine samples within 24 h were collected. After β -glucuronidase hydrolysis, the urine samples were extracted by 3 cc Oasis[®] HLB solid-phase column and analyzed by gas chromatography - mass spectrometry with DB-35 MS column. 7-acetylamino nitrazepam, 7-amino nitrazepam and 2-amino-5-nitrophenyl phenylmethanone were identified as metabolites of nitrazepam. 7-acetylamino nimetazepam, 7-acetylamino nitrazepam, 7-amino nimetazepam, 2-amino-5-nitrophenyl phenylmethanone were identified as metabolites of nimetazepam and a little nimetazepam was detected in rat urine. The metabolic pathways of 2 drugs in rat were confirmed.

Key words: nimetazepam; nitrazepam; urine; metabolite; solid phase extraction; gas chromatography - mass spectrometry

硝基安定和尼美西泮 (又名硝甲西泮) 结构相似, 同属于苯并二氮杂卓类药物, 均为中枢神经抑制剂, 临床医疗上用来治疗焦虑、失眠、酒精戒断和肌肉紧缩等病症, 具有镇静、安眠和抗焦虑作用。硝基安定是一种广泛使用的安眠镇静药物, 容易获得, 因而用此类药物进行自杀、他杀等的案件时有发生; 尼美西泮是近年来在我国出现的一种新型安眠镇静药, 目前该药有滥用现象。

国内外对硝基安定和尼美西泮两种药物代谢物的研究报道较少^[1-6]。为更详细了解尼美西泮在生物体内的代谢情况, 本研究在前期对尼美西泮研究工作的基础上^[7], 比较分析了硝基安定在大鼠尿液

收稿日期: 2007 - 12 - 18; 修回日期: 2008 - 01 - 20

基金项目: 公安部应用创新计划资助项目 (2007YYCXGXST081)

第一作者: 潘智文 (1983 -), 男, 安徽天长人, 硕士

通讯作者: 林翠梧, Tel: 0771 - 3275878, E-mail: lincuiwu@gxu.edu.cn

中的代谢物，确定了尼美西泮在大鼠体内的代谢途径。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

QP2010 气质联用仪 (日本岛津公司); 3-18R 高速冷冻离心机 (美国 Tomos 公司); 固相萃取仪 (美国 Supelco 公司); WD900CSL23-2 微波炉 (广东格兰仕集团有限公司)。

β 葡萄糖醛酸酶购自美国 Sigma 公司，临用时用 pH 4.8 的乙酸 - 乙酸钠缓冲溶液配制成 5 000 U / mL; Oasis® HLB3cc 固相萃取柱购自美国 Waters 公司; Wistar 大鼠由广西医科大学提供; 硝基安定对照品 (徐州恩华药业集团有限责任公司); 尼美西泮对照品 (公安禁毒部门查获的尼美西泮药丸); 其他试剂均为分析纯。

阳性鼠尿的收集：取两只 Wistar 大鼠 (各约 400 g)，分别急性喂食 4 粒硝基安定和尼美西泮药丸，收集 24 h 内尿液，将尿液冷藏于冰箱中直至分析。

1.2 GC - MS 条件

色谱条件：色谱柱：J&W DB-35MS 石英毛细柱 (30 m ×0.25 mm ×0.25 μm); 柱温：180 保持 1 min，以 15 /min 程序升温至 280 ，保持 35 min; 进样口温度：280 ；载气：He; 线速度：44 cm / s; 进样方式：不分流进样。

质谱条件：EI 源；电子能量：70 eV; 倍增器电压：0.95 kV; 传输线温度：250 ；离子源温度：200 ；扫描方式：全扫描；扫描范围：40 ~ 500 u。

1.3 样品处理

1.3.1 样品酶水解 取 10 mL 鼠尿于 250 mL 锥形瓶中，调 pH 至中性，加 5 mL pH 4.8 的乙酸 - 乙酸钠缓冲液和 0.5 mL β 葡萄糖醛酸酶溶液，57 下酶水解 30 min，离心 (4 000 r · min⁻¹，10 min)，取清液供固相萃取。

1.3.2 酸性液过柱 Oasis® HLB 固相萃取柱依次用 2 mL 甲醇、2 mL 蒸馏水、2 mL pH 4.8 乙酸 - 乙酸钠缓冲液活化，将上述酶解后的尿液过柱，用 2 mL 5% (体积分数) 甲醇水溶液清洗柱子，以 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min，除去柱中的水后，分别用 3 mL 乙醚、氯仿 - 异丙醇混合液 3 mL (体积比 9 : 1) 洗脱，合并洗脱液，得到酸性组分提取物。

1.3.3 碱性液过柱 另取一支活化好的 Oasis® HLB 固相萃取柱，将上述滤液用 NaOH 溶液调 pH 至 9 后上样，用 2 mL 5% (体积分数) 甲醇水溶液清洗柱子，以 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min，除去柱中的水后分别用 3 mL 乙醚、3 mL 氯仿 - 异丙醇 (体积比 9 : 1) 洗脱，合并洗脱液，得到碱性组分提取物。将酸碱提取液合并，65 下用氮气吹干，残渣用 100 μL 甲醇溶解，供 GC - MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 结 果

从硝基安定阳性鼠尿中检出 2 氨基 -5 硝基苯基苯甲酮、7 氨基硝基安定和 7 乙酰氨基硝基安定 3 种代谢产物，未检出硝基安定原体。在尼美西泮阳性鼠尿中检出 2 氨基 -5 硝基苯基苯甲酮、7 氨基尼美西泮、7 乙酰氨基尼美西泮和 7 乙酰氨基硝基安定 4 种代谢产物，检出少量的尼美西泮原体。它们的主要特征离子及其来源见表 1，质谱图见图 1。

表 1 尼美西泮和硝基安定代谢物的主要特征离子来源及其相对强度

Table 1 Main characteristic ions and their relative abundance of nitrazepam, nitrazepam and their metabolites					
Ions	<i>m/z</i> (<i>I_R</i> / %)				
	Nitrazepam	7-Acetylam inonitrazepam	7-Acetylam inonimetazepam	7-Am inonitrazepam	7-Am inonimetazepam
M ⁺	295 (75)	293 (100)	307 (100)	251 (100)	265 (100)
[M - CO] ⁺	267 (100)	265 (87)	279 (96)	223 (60)	237 (74)
[M - CO - CH ₂ CO] ⁺		223 (39)	237 (27)		

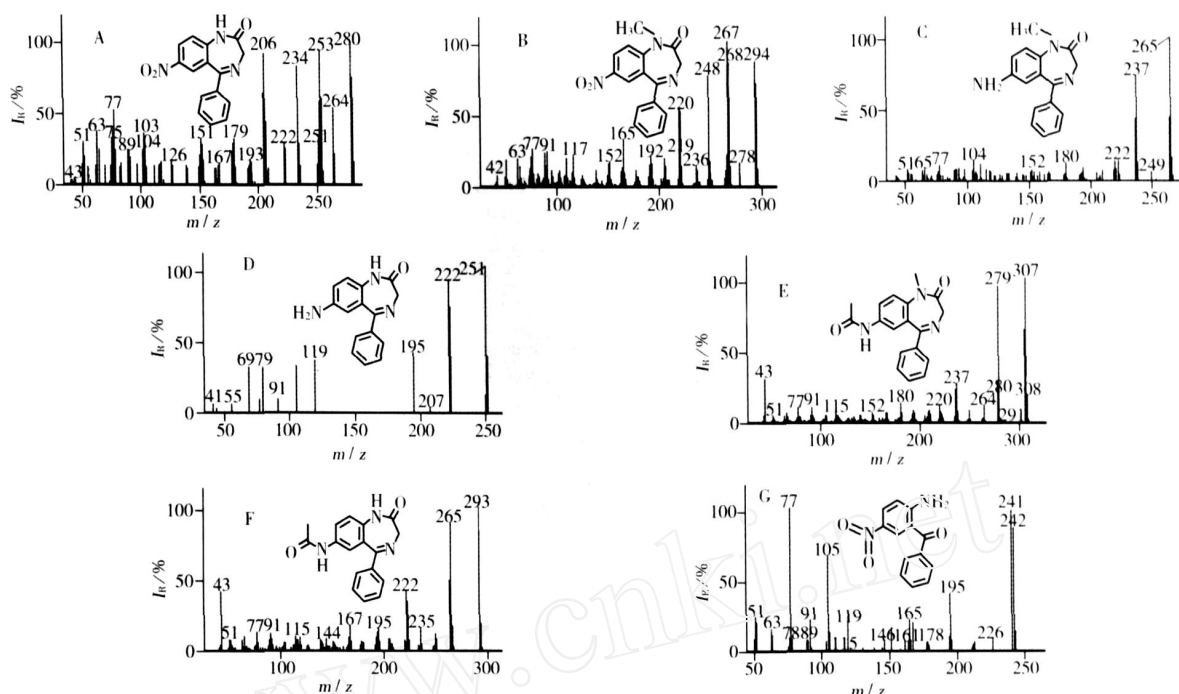


图 1 硝基安定、尼美西泮及其代谢物质谱图

Fig. 1 Mass spectra of nitrazepam, nimetazepam and their metabolites

A. nitrazepam (硝基安定); B. nimetazepam (尼美西泮); C. 7-aminonimetazepam (7-氨基尼美西泮); D. 7-aminonitrazepam (7-氨基硝基安定); E. 7-acetylamionimetazepam (7-乙酰氨基尼美西泮); F. 7-acetylamionitrazepam (7-乙酰氨基硝基安定); G. 2-amino-5-nitrophenylphenylmethanone (2-氨基-5-硝基苯基苯甲酮)

2.2 讨论

尿中硝基安定的代谢产物主要为 7-乙酰氨基硝基安定。根据检测结果推定，硝基安定在大鼠体内代谢至少经历 2 个代谢途径：7 位硝基被还原为氨基，生成 7-氨基硝基安定，氨基再被乙酰化，生成 7-乙酰氨基硝基安定；杂环被破坏生成 2-氨基-5-硝基苯基苯甲酮。

尼美西泮代谢产物尿中主要为 7-乙酰氨基尼美西泮和 7-乙酰氨基硝基安定。根据检测结果推定，尼美西泮在大鼠体内至少经历 3 个代谢途径：7 位硝基被还原为氨基，生成 7-氨基尼美西泮，氨基再被乙酰化，生成 7-乙酰氨基尼美西泮，接着 1-N 上去甲基化，生成 7-乙酰氨基硝基安定。尼美西泮代谢为硝基安定，硝基安定进而代谢为 7-乙酰氨基硝基安定。虽然在尼美西泮阳性鼠尿中未检出硝基安定和 7-氨基硝基安定，但是通过对大鼠给药尼美西泮 3 h 后的肝组织进行检测，检出少量硝基安定和 7-氨基硝基安定。杂环被破坏生成 2-氨基-5-硝基苯基苯甲酮。尼美西泮代谢示意图如图 2 所示。

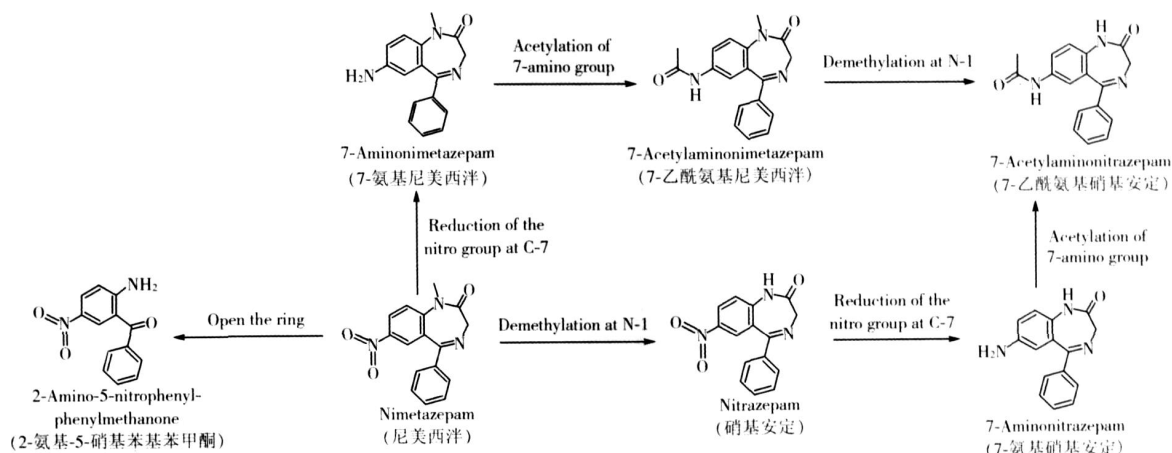


图 2 尼美西泮在大鼠体内的代谢示意图

Fig. 2 Metabolic pathways of nimetazepam in rat

硝基安定和尼美西泮进入大鼠体内后, 易在生物体内代谢。因此对此类药物中毒后生物体内的检验, 应注意其代谢物的检验, 特别是麻醉抢劫、麻醉强奸等案件受害人尿液等检材, 代谢物的量往往比原形药物量大, 因此, 在原形药物未检出时, 应重点分析其代谢物。

参考文献:

- [1] YANAGI Y, HAGA F, ENDO M, et al Comparative metabolic study of nimetazepam and its desmethyl derivative (nimetazepam) in rats[J]. Xenobiotica, 1975, 5(4): 245 - 247.
- [2] YANAGI Y, HAGA F, ENDO M, et al Comparative metabolic study of nimetazepam and its desmethyl derivative (nimetazepam) in dogs[J]. Xenobiotica, 1976, 6(2): 101 - 112.
- [3] SCHOLERMAN K, SCHUTZ H. Screening and detection of nimetazepam and its chief metabolite[J]. Beitr Gerichtl Med, 1990, 48: 657 - 665.
- [4] TAKENO S, HIRANO Y, KITAMURA A, et al Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1993, 121(2): 233 - 238.
- [5] BARTOE I, TNA K J, GUAIUAN IA, et al Comparative study of nitrazepam metabolism in perfused isolated liver of laboratory animals[J]. Eur J Pharmacol, 1970, 11(3): 378 - 382.
- [6] LAURI K. Determination of nitrazepam and its main metabolites in urine by gas - liquid chromatography: Use of electron capture and nitrogen-selective detectors[J]. J Chromatogr. A, 1979, 172(1): 273 - 278.
- [7] 黄克建, 李宏森, 潘智文, 等. GC/MS检测大鼠尿液中尼美西泮及其代谢物[C]. 岛津公司第七届质谱用户学术交流会议论文集, 2007: 174 - 177.

“仪器信息网 1 + 1 实战式培训 ” 十月计划

信息网培训中心针对目前仪器培训仅仅注重理论的灌输, 没有真正的实践操作的情况, 开展了“仪器信息网 1 + 1 实战式培训”。

“1 + 1 实战式培训”, 突破传统的以理论为主的旧有模式, 更加注重对学员实际动手能力的培养, 将理论与实践结合的同时, 加大整个学习班中学员能够亲自动手做实验的课程比例。即理论与实践各成体系却又彼此关联, 在有专家进行知识讲解的同时, 也有专家进行实验指导, 将学员以往工作中产生的疑惑及时解决, 同时对刚刚学习到的新知识在实践中进行验证, 每位学员都有与专家进行切磋交流、得到专家亲身指导的机会。理论与实践不脱节, 从而做到融会贯通。

“仪器信息网 1 + 1 实战式培训”启动以来, 仅 08 年上半年就在北京和上海两地开办了气相色谱、液相色谱、样品前处理、测量不确定度及实验室管理等培训班共七个 (<http://www.instrument.com.cn/news/2008/021047.shtml>), 7 月末在长春与国家电化学和光谱研究分析中心合作举办了红外光谱学习班。 (<http://www.instrument.com.cn/news/2008/021105.shtml>)。注重理论与实践两手抓的课程设置获得学员的一致好评。

应广大学员要求, “仪器信息网 1 + 1 实战式培训”下半年首先于十月在北京举办“气相色谱学习班”和“样品前处理学习班”。详情请咨询: 010 - 51299927 - 112; 传真: 010 - 51299927 - 108。Email: training@instrument.com.cn。更多请查阅 <http://www.instrument.com.cn/training/>。

(仪器信息网供稿)