

液相色谱-串联质谱法分析抗肿瘤新药乙烷硒啉 在大鼠体内的代谢产物

周海燕¹, 孟志云², 窦桂芳², 马金兰¹, 楼雅卿³, 章国良^{3*}

(1. 中国医学科学院肿瘤医院, 北京 100021; 2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850;
3. 北京大学医学部药理系, 北京 100083)

摘要: 本研究对抗肿瘤新药 1,2-[二(1,2-苯并异硒唑-3(2H)-酮)]乙烷(乙烷硒啉, BBSKE) 在大鼠体内的代谢产物进行鉴定。在灌胃给予大鼠单剂量乙烷硒啉 200 mg·kg⁻¹ 后, 采用液相色谱-串联质谱法(LC-MSⁿ) 对大鼠尿液、粪样、胆汁和血浆中的代谢产物进行检测, 通过全扫描和选择离子扫描, 以及根据多级质谱裂解规律对代谢物的结构进行分析。研究发现在大鼠尿样、粪样、胆汁和血浆中检测到 3 种 I 相代谢产物和 1 种 II 相代谢产物, 其代谢途径分别为氧化、甲基化、硫甲基化和葡萄糖醛酸化反应, 提示乙烷硒啉在大鼠体内的代谢方式可能是通过氧化、甲基化及葡萄糖醛酸化反应形成代谢产物。

关键词: 1,2-[二(1,2-苯并异硒唑-3(2H)-酮)]乙烷(乙烷硒啉); 液相色谱-串联质谱法; 代谢产物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2010)05-0627-05

LC-MSⁿ analysis of metabolites of 1, 2-[bis (1, 2-benzisoselenazolone-3(2H)-ketone)]-ethane, a novel anti-cancer agent in rat

ZHOU Hai-yan¹, MENG Zhi-yun², DOU Gui-fang², MA Jin-lan¹, LOU Ya-qing³, ZHANG Guo-liang^{3*}

(1. Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;

2. Beijing Institution of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;

3. Department of Pharmacology, Basic Medical School, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract: This study is to elucidate the metabolic pathway of 1, 2-[bis (1, 2-benzisoselenazolone-3 (2H)-ketone)]-ethane (BBSKE) in rats. Rats were administrated with a single dose of BBSKE 200 mg·kg⁻¹. The metabolites in rat urine, feces, bile and plasma were identified by LC-MSⁿ analysis. The characterization of fragment ions from LC-MSⁿ chromatography and mass spectrometry was applied to the investigation of structures of metabolites. Three phase I metabolites were detected in rat urine and feces. Two of them were also found in plasma and one existed in bile. These products were derived from oxidized, methylated and S-methylated BBSKE, separately. One phase II glucuronide of BBSKE was also found in bile. Therefore, it is possible that BBSKE was metabolized by oxidization, methylation and glucuronidation.

Key words: 1, 2-[bis (1, 2-benzisoselenazolone-3 (2H)-ketone)]-ethane; LC-MSⁿ; metabolite

1,2-[二(1,2-苯并异硒唑-3(2H)-酮)]乙烷(乙烷硒啉, BBSKE) 是一种具有我国自主知识产权的双氮杂苯并异硒唑酮类有机硒化合物, 属化学药品的第一类新药。药理学研究结果显示, 该化合物对多种体

外培养的人肿瘤细胞株, 如 HeLa 细胞、KB 细胞^[1]、PC-3 和 DU145 细胞^[2, 3]、Tca8113 细胞^[4]等的生长和增殖具有明显的抑制作用, 进一步对其抗肿瘤作用机制进行研究结果表明乙烷硒啉的细胞内作用靶点为硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)^[1-8]。乙烷硒啉能通过抑制 TrxR 达到下调 NF- κ B 活性^[8]以及影响调节细胞周期的关键因子 Cyclin B1、Cyclin

收稿日期: 2009-10-25.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-82802725, E-mail: ZhangGL168@bjmu.edu.cn

D1、CDK4 等蛋白的表达,使肿瘤细胞停滞于 S 期的作用^[2];此外还能影响肿瘤细胞及瘤内血管内皮细胞的增殖,从而抑制肿瘤在体内的侵袭和转移^[9]。因此,乙烷硒啉有望开发成为一类新型的抗肿瘤药物。目前,乙烷硒啉在大鼠和比格犬体内的药代动力学研究已经完成,但未见乙烷硒啉在生物体内代谢转化的研究报道,而研究乙烷硒啉生物体内代谢转化过程,对于阐述该药物的药效机制及指导临床合理用药具有重要意义。本文采用液相色谱-串联质谱法(LC-MSⁿ)对大鼠经口服给予乙烷硒啉后,其在尿液、粪便、胆汁和血浆中的代谢产物进行了相对分子质量和结构的初步鉴定,探讨了乙烷硒啉在大鼠体内的代谢途径和处置过程。

材料与方 法

药品与试剂 乙烷硒啉原料药,纯度 > 98.6%,由北京大学医学部药学院化学生物学系元素有机及无机药物药理学研究室提供;枯草杆菌蛋白酶,购于 Sigma 公司。

实验动物及样本采集 雄性 SD 大鼠,200~220 g (由维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号: SCXK(京)2002-0003),置于代谢笼中自由进食和饮水,收集空白尿样、粪样、胆汁和血浆样本。给药前禁食 12 h 后,给予大鼠乙烷硒啉羧甲基纤维素钠溶液灌胃,剂量 200 mg·kg⁻¹,并分别于给药后 0~4, 4~8, 8~12, 12~24, 24~36, 36~48 h 收集尿液和粪便,各时间段内收集尿样体积约 0.5~9 mL,粪便重量约 0.2~5 g 左右,其中粪样用含 10% 甲醇水溶散,尿液和粪样均离心后待测。胆汁样本在大鼠经灌服乙烷硒啉后于 0~2, 2~4, 4~8, 8~12, 12~24, 24~36 和 36~48 h 收集,2 h 间隔内收集的胆汁少于 1 mL,12 h 间隔内收集的胆汁约 4 mL 左右。血浆为给药后 2、4、8、12 和 24 h 收集,所有样本均于 -20 °C 保存待测。

实验仪器 美国 Finnigan LCQ Advantage 液相色谱-质谱联用仪 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA),配有电喷雾电离源 (electrospray ionization, ESI)、自动进样装置、柱温箱、真空脱气机、二级管阵列检测器、直接进样用注射泵及 Navigator 1.2 数据处理系统 (Thermo Electron)。

ESI-MSⁿ 方法 生物样品预处理方法:取大鼠尿样 0.5 mL,用 3 倍体积的甲醇沉淀后,15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取出上清液于氮气下吹至约 1.5 mL 后直接用于 ESI-MSⁿ 分析。质谱参数设置:使用的离子

源为 ESI 源,采用正离子方式检测。离子源喷射电压 4.5 kV;毛细管温度 250 °C;毛细管电压 3 V。以氦气为碰撞气,鞘气 (N₂) 流速 35 arb,辅助气 (N₂) 流速为 0,一级全扫描质量范围为 m/z 150~1 000。扫描模式:采用全扫描一级质谱和全扫描多级质谱同时测定。

LC-MSⁿ 方法 尿、粪和胆汁预处理方法:取大鼠尿样 0.7 mL 于具塞大试管,加入甲醇 1 mL,混匀后 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将上清液于氮气流下吹至约 250 μL 后直接上样,进样量 10 μL;同法处理大鼠粪样,粪样经处理后上样,进样量为 10 μL;胆汁样本则在 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后直接上样分析,进样量为 10 μL。血样预处理方法:血浆 0.5 mL 中加入 Tris-HCl 缓冲液 (pH 9) 120 μL 溶解的枯草杆菌蛋白酶 10 mg·kg⁻¹,于 37 °C 水浴孵育 14 h 后用二氯甲烷 5 mL 萃取 3 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上层有机相于氮气下吹干,甲醇 50 μL 复溶残渣,进样 20 μL 分析。质谱参数设置:离子源喷射电压 4.5 kV;毛细管温度 250 °C;毛细管电压 3 V;以氦气为碰撞气,鞘气 (N₂) 流速 35 arb;辅助气 (N₂) 流速为 0。在正离子模式下扫描,一级全扫描质量范围为 m/z 150~1 000。扫描模式:采用全扫描,选择离子监测,数据依赖性扫描。色谱条件:分析柱:Kromasil C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm ID, 5 μm),流速:0.2 mL·min⁻¹;流动相中 0.1% 甲酸水 (A) 与甲醇 (B) 的比例依次为:98 : 2 (0~5 min)、70 : 30 (5.1 min)、40 : 60 (37 min)、0 : 100 (47 min) 和 98 : 2 (47.1~55 min)。

结果

1 大鼠体内乙烷硒啉代谢产物分析

乙烷硒啉分子中含有两个硒原子,在一级质谱图上表现为同位素峰,其 M_r 为 424,采用 ESI-MSⁿ 技术得到该物质的质谱断裂特征,乙烷硒啉分子离子 M0 (m/z 425) 的主要特征性碎片离子为 m/z 226、185 和 157^[10]。

本研究结果显示,与空白样本相比,灌胃给药后大鼠粪便和尿样本中均能检测出与乙烷硒啉相关的分子离子峰,其质荷比分别为 M1 m/z 457, M2 m/z 473 和 M3 m/z 487,选择离子监测扫描确定其保留时间分别约为 40.7、21.8 和 21.6 min (图 1)。采用数据依赖性扫描和选择离子二级质谱扫描,得到这 3 种物质的质谱断裂信息。

M1 (m/z 457): 比 M0 (m/z 425) 多 32 u,而它的二级碎片离子 439 比 457 少 18 u,提示 M1 分子中可

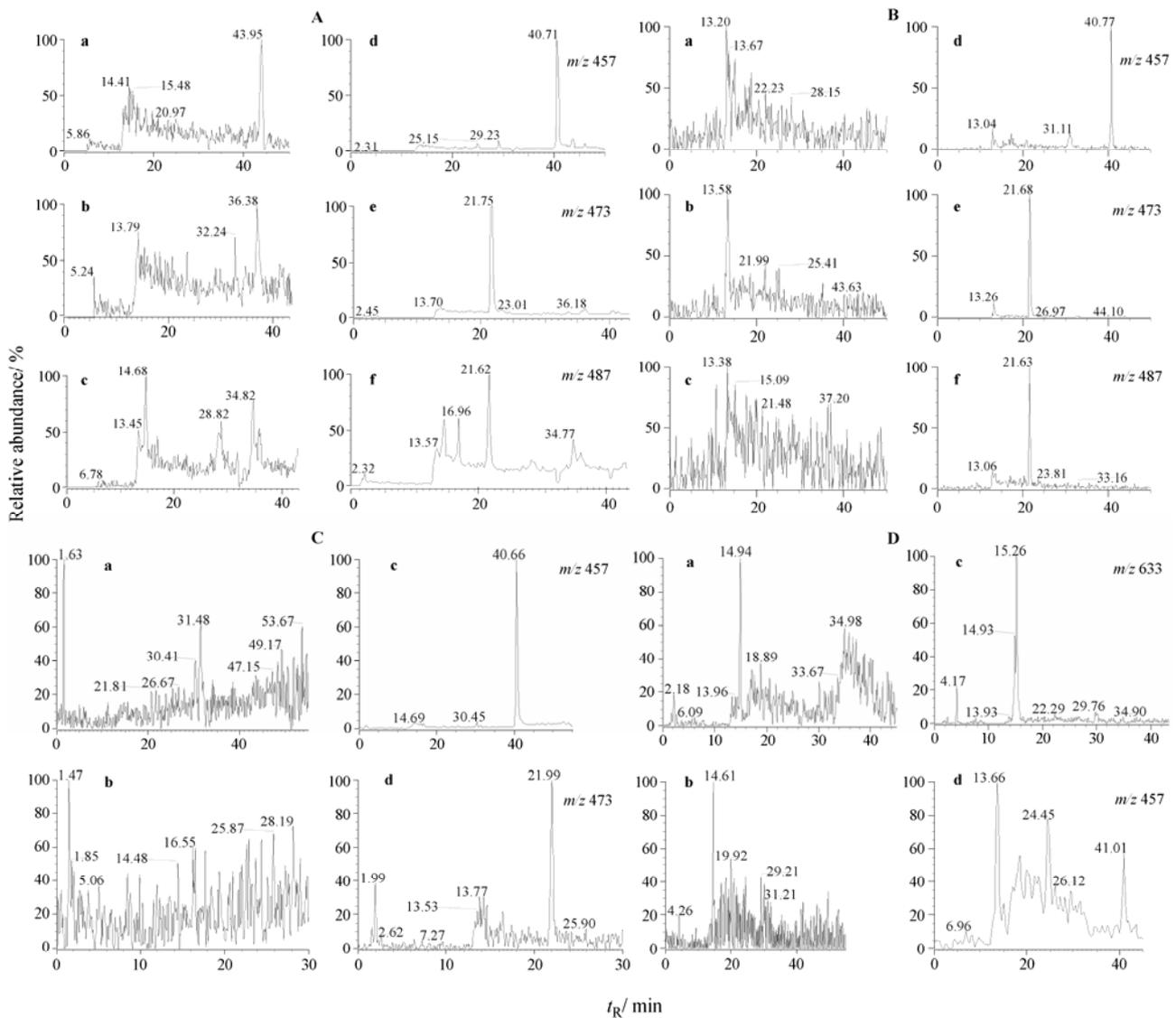


Figure 1 Representative chromatograms of M1 (m/z 457), M2 (m/z 473) and M3 (m/z 487) in rat blank feces (A, a-c), feces samples (A, d-f), and in rat blank urine (B, a-c) and urine samples (B, d-f) after an oral administration of $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ BBSKE; and M1, M2 in rat blank plasma (C, a and b, respectively) and plasma samples (C, c and d, respectively), and M4 (m/z 633) and M1 in rat blank bile (D, a and b, respectively) and bile sample (D, c and d, respectively) after the same administration

能含有羟基; 而另一个二级碎片离子 242 比 M0 的碎片离子 226 多 16 u, 提示在乙烷硒啉分子的一侧可能结合上羟基或 Se-N 键打开后结合甲基; 在采用 ESI-MSⁿ 方式扫描下进一步得到 m/z 457 三级质谱图, 显示碎片离子 439 断裂成 242、199 和 421, 其中碎片 242 比 M0 的碎片离子 226 多 16 u, 而 199 比 M0 的碎片离子 185 (碎片 184 结合 H⁺) 多 14 u, 提示在乙烷硒啉分子一侧的 Se 原子上可能结合甲基; 碎片 421 的产生可能是因为 Se-N 开环一侧的羰基与邻位 N 上发生互变异构 [CONH 和 C(OH)=N 互变] 后脱去一分子水所致。因此, 推测 M1 为乙烷硒啉的氧化、甲基化产物, 其结构如图 2 所示。

M2 (m/z 473): 比 M0 (m/z 425) 多 48 u, 根据其

二级质谱信息 (图 3A), 其碎片离子 455 比 m/z 473 少 18 u, 可能丢失一分子水, 提示 M2 分子中可能含有羟基; 此外另一个二级碎片 215 比原药碎片离子 185 (碎片 184 结合 H⁺) 多 30 u, 而 242 比原药的碎片离子 226 多 16 u, 提示增加的 16 u 和 30 u 的基团应分布在乙烷硒啉分子的两侧, 进一步对碎片 215 进行三级质谱扫描, 得到碎片离子 200 (图 3B), 丢失 15 u 提示该碎片结构中可能存在一个甲基, 推测 M2 结构如图 3A 所示。

M3 m/z 487: 比 M0 m/z 425 多 62 个质量数, 其二级碎片中含有与原药相同的碎片离子 226, 此外碎片 242 (240 加上 2H⁺) 也反映出与原药一致的断裂特征 (图 3C), 提示其结构变化发生在乙烷硒啉分子结

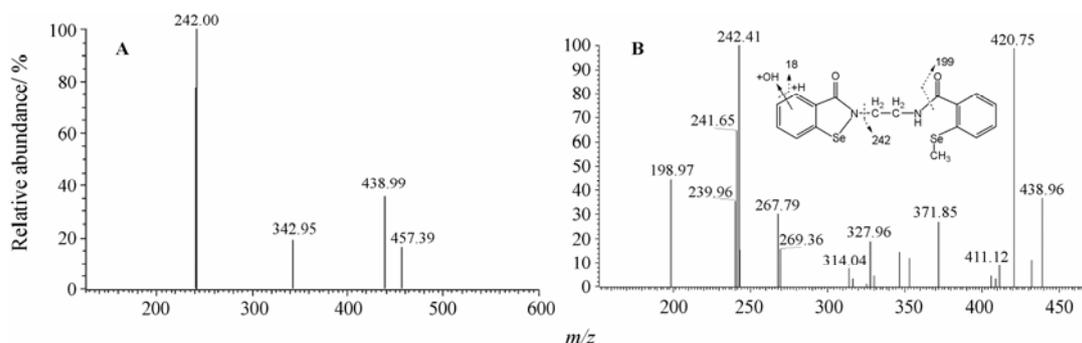


Figure 2 MS² (A) and MS³ (B) spectra of M1 *m/z* 457 in rat urine after oral administration of BBSKE at 200 mg·kg⁻¹

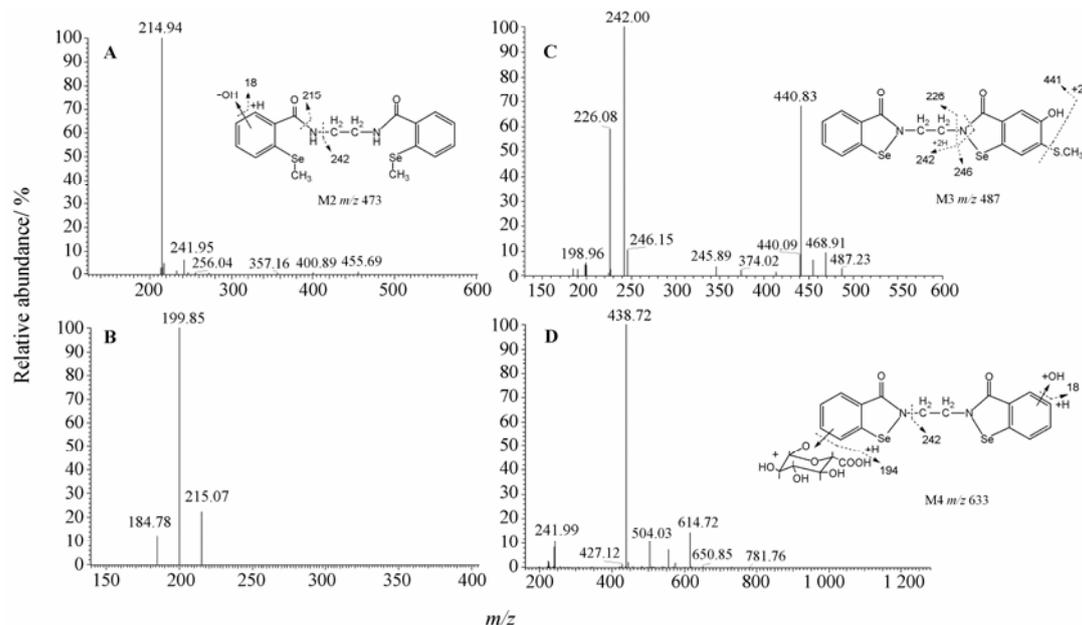


Figure 3 MS² and MS³ spectra of the M2 *m/z* 473 in plasma (A and B), and MS² spectra of the M3 *m/z* 487 in urine (C) and M4 *m/z* 633 in bile (D) after oral administration of BBSKE at 200 mg·kg⁻¹

构的一侧;此外, M3 的其他二级碎片 469 比 487 少 18 u, 441 比 487 少 46 u, 推测 M3 结构中可能含有一个羟基和一个硫甲基。推测 M3 *m/z* 487 的结构如图 3C 所示。

不仅在尿样和粪便中检测到上述 3 种代谢产物, 在胆汁和血浆中也发现了存在其中一种或两种产物, 其中在血浆中检测到 M1 和 M2, 而胆汁中仅检测到 M1 存在, 其选择离子扫描图和二级质谱图均与尿样和粪样中的一致 (图 1)。

此外, 在胆汁中还发现一种物质 M4 *m/z* 633, 采用选择离子监测扫描确定其保留时间为 15.26 min (图 1D), 其二级质谱图显示碎片为 439、615 和 242; 其中 615 比 633 少 18 u, 而 242 比原药的碎片离子 226 多 16 u, 提示 M4 结构中可能存在一个羟基; 碎片 439 为 633 丢失 194 u, 194 u 可脱去水分子生成葡萄糖醛酸中性碎片 (176 u)^[11-13], 提示 M4 分子中可能含有一个葡萄糖醛酸片段, 因此推测 M4 结构如图

3D 所示。

2 大鼠体内乙烷硒啉代谢途径分析

大鼠在灌服给予乙烷硒啉 200 mg·kg⁻¹ 后在粪便、尿液、胆汁和血浆中检测到 4 种代谢产物, 其分子的裂解方式和可能的代谢途径如表 1 所示。从结果分析中可以看出乙烷硒啉进入体内后, 被机体代谢为多种甲基化和羟基化产物, 其中 M1 和 M2 在粪便、尿液和血浆中均可见, 胆汁中亦可见少量 M1, 提示乙烷硒啉可能在肝脏发生甲基化和羟化反应, 生成产物可进入血液, 并经肾脏、胆汁以及肠道排出体外, 还有可能生成葡萄糖醛酸化产物。此外, M4 (*m/z* 633) 的发现也提示大鼠体内可能还有更多葡萄糖醛酸化的产物, 并需进一步实验加以证实。

讨论

本文采用 LC-MSⁿ 联用技术, 对大鼠口服乙烷硒啉后体内可能的代谢产物进行了相对分子质量及结

Table 1 Mass spectrometry (MSⁿ) data of metabolites of BBSKE in rat feces, urine, plasma and bile after oral administration of 200 mg·kg⁻¹ BBSKE

| Compound | [M+H] ⁺ | Existed in | MS ⁿ fragment | Possible metabolic pathway |
|----------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| M1 | <i>m/z</i> 457 | feces, urine, plasma and bile | 242, 439 (18), 199 | Oxidization |
| M2 | <i>m/z</i> 473 | feces, urine and plasma | 215, 242, 200, 455 (18) | Oxidization, methylation |
| M3 | <i>m/z</i> 487 | feces, urine | 242, 226, 441 (46), 469 (18) | Oxidization, S-methylation |
| M4 | <i>m/z</i> 633 | bile | 439 (194), 615 (18), 242 | Oxidization, glucuronidation |

构的初步鉴定。在以往的研究中发现, 乙烷硒啉能与血浆中蛋白发生牢固结合, 因为乙烷硒啉结构中的 Se 原子能与蛋白中巯基相结合, 因此其代谢产物也有可能具有与原药相似的化学性质, 所以采用枯草杆菌蛋白酶消化, 将代谢物与蛋白分离。本文采用全扫描和选择离子扫描方式, 对被测物一级电离规律和多级质谱裂解规律进行分析, 结果显示, 在血液、尿液、胆汁和粪样本中发现存在 3 种可能途径 (氧化, 甲基化及硫甲基化反应) 形成的 I 相代谢产物, 在胆汁中发现 II 相代谢产物, 提示肝脏可能是乙烷硒啉在体内代谢转化的场所, 而氧化反应可能是乙烷硒啉代谢的主要途径之一。该结果为进一步研究乙烷硒啉体内代谢提供实验依据。

目前, 乙烷硒啉已作为一类新型的抗肿瘤药物进入 I 期临床研究。本文通过考察乙烷硒啉在大鼠体内的代谢转化研究, 为进一步分析其在人体内的代谢提供了实验依据。本研究结果亦提示, 乙烷硒啉在体内生成多种相对分子质量小、极性大、且较难提取的代谢物, 故还需探索针对不同极性的化合物的提取条件, 以及探索采用更为灵敏和更具特异性的检测手段, 亦需考察和比较大鼠与人之间代谢特点是否具有种属差异性。此外, 对其代谢产物的结构和代谢途径, 还需更深入的体内外的研究, 如体内代谢产物的收集或体外合成代谢产物的研究, 参与的代谢酶种类、代谢稳定性及代谢表型的研究等, 这些研究将对全面分析乙烷硒啉代谢转归及临床合理用药具有重要参考价值。

References

- [1] Zhao F, Yan J, Deng SJ, et al. A thioredoxin reductase inhibitor induces growth inhibition and apoptosis in five cultured human carcinoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2006, 236: 46–53.
- [2] Shi CJ, Yu LZ, Yang FG, et al. A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 578–583.
- [3] Shi CJ, Zeng HH, Li HW, et al. Induction of apoptosis in prostate cancer cell line PC-3 by BBSKE, a novel organoselenium compound, and its effect *in vivo* [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2003, 83: 1984–1988.

- [4] Xing F, Li S, Ge X, et al. The inhibitory effect of a novel organoselenium compound BBSKE on the tongue cancer Tca8113 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oral Oncol*, 2008, 44: 963–969.
- [5] Wang YR, Xiao JJ, Dong XM, et al. Immune regulating activity of a novel organoselenium compound ethaselen-1 in C57/BL mice [J]. *J Peking Univ* (北京大学学报), 2006, 38: 634–639.
- [6] Deng SJ, Kuang B, Zhou X, et al. 1, 2-[Bis (1, 2-benzisoxelenazolone-3 (2H)-ketone)]-ethane, induced cell death in tumor cells [J]. *J Peking Univ* (北京大学学报), 2003, 35: 108–109.
- [7] Yan J, Deng SJ, Kuang B, et al. Selenium distribution pattern, antineoplastic and immunostimulatory activities of a novel organoselenium compound Eb [J]. *J Chin Pharm Sci* (中国药理学杂志), 2004, 13: 199–204.
- [8] Lan LX, Zhao F, Wang Y, et al. The mechanism of apoptosis induced by a novel thioredoxin reductase inhibitor in A549 cells: possible involvement of nuclear factor-κB-dependent pathway [J]. *Eur J Pharmacol* 2007, 555: 83–92.
- [9] Wang YR, Xiao JJ, Dong XM, et al. The antitumor activity of Shuang-Xi-Zuo-Wan-1 in C57/BL mice [J]. *J Peking Univ* (北京大学学报), 2005, 37: 421–424.
- [10] Zhou HY, Dou GF, Meng ZY, et al. High performance liquid chromatographic determination of 1, 2-[bis (1, 2-benzisoxelenazolone-3 (2H)-ketone)]-ethane (BBSKE), a novel organoselenium compound, in dog plasma using pre-column derivatization and its application in pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 617–624.
- [11] Mattammal MB, Lakshmi VM, Dawley RM, et al. Thermospray high performance liquid chromatography/mass spectrometric identification of a bladder carcinogen metabolite isolated from guinea pig urine [J]. *Biol Mass Spectrom*, 1990, 19: 601–608.
- [12] Draper WM, Brown FR, Bethem R, et al. Thermospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of polar, urinary metabolites and metabolic conjugates [J]. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1989, 18: 767–774.
- [13] Wu W, Zhou YH, Liu ZQ, et al. Studies on baicalin-Al³⁺ complexes using electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33: 683–686.