

学校编码: 10384
学号: 20520061151917

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

糖皮质激素与吩噻嗪类药物的超高压液
相色谱质谱联用分析与药物代谢研究

Study on Glucocorticoid & Phenothiazine and drug
metabolism by UPLC-MS-MS

齐士林

指导教师姓名: 朱尔一 副教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 6 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _

评 阅 人: _

2009 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

当前，食品、药品安全事件频发，由此造成的危害以及安全隐患严重危害大众的健康与生命安全，影响社会经济秩序。食品安全已经成为一个全球性的问题，如何完善食品安全检验检测体系，加强食品安全国际协作与发展等问题已成为食品行业发展的重中之重。

糖皮质激素是由肾上腺皮质分泌的一类甾体激素，在临床上用途十分广泛。目前人们在饲养牲畜中常加入此药作为动物生长调节剂,以达到促进动物蛋白质合成与代谢,从而增加产肉量的目的，此药在食品中残留会给人体健康带来危害。吩噻嗪类药物是一种比较常见的神经性药物，它们主要作用于大脑网状结构，以减轻焦虑紧张、幻觉妄想和病理性思维等精神症状。其在兽医临床上的药理作用广泛，饲料中添加此类药物，可间接起到催肥作用；另外，使用吩噻嗪类药物可减少动物运输过程中的死亡率。因该类物质脂溶性高，易蓄积于脂肪组织，停药后数周乃至半年后，尿中仍可检出其代谢物，且部分代谢物仍具有药物活性。残留的药物能引起白细胞减少和粒细胞缺乏症,从而引起人体肝脏、肾脏的病变，还会引起眼部并发症等。目前这些药物在养殖业中的使用已经引起了美国、欧盟和日本等国家的高度重视。

本论文发展了超高效液相色谱—电喷雾电离串联四级杆质谱分别对糖皮质激素、吩噻嗪类药物的检测方法。借助飞行时间质谱，论文对氯丙嗪、异丙嗪这两种吩噻嗪类药物在大鼠的体内、体外代谢进行了研究。

本论文由四部分组成：1. 文献综述；2. 液质联用检测糖皮质激素类药物地塞米松、倍他米松、倍氯米松；3. 固相萃取超高效液相色谱—电喷雾串联质谱对动物源食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷的测定；4 氯丙嗪，异丙嗪等药物的体内和体外代谢物的分析及动力学表征。

第一章文献综述，主要介绍了食品安全问题，吩噻嗪类药物的性质，用途，毒害和常用的检测方法以及代谢组学方面的知识，并对药物的体内体外代谢物研究的现状及意义进行了分析，并在此基础上提出了本论文的研究设想。

第二章建立了猪肉中糖皮质激素类药物地塞米松、倍他米松、倍氯米松同时测定的超高效液相色谱—电喷雾电离串联四级杆质谱（UPLC-MS-MS）方法，对样品前处理方法进行改进，确定了最佳提取剂。实验采用多反应监测（MRM）

正离子模式，超高压反相C18色谱柱分离，梯度洗脱，对猪肉中的地塞米松、倍他米松、倍氯米松进行定性和定量测定。在质量浓度1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内具有良好的线性。方法的回收率在83%~96%之间，定量线(S/N>10)地塞米松、倍他米松和倍氯米松分别为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第三章发展了一种固相萃取超高效液相色谱-电喷雾串联质谱方法对动物源食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷进行了测定。目前有关动物源性食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物的测定方法还较少，大部分研究都局限于法医学方面。随着我国加入WTO，迫切需要制定一些先进、准确的测定方法。本方法采用乙酸乙酯提取，经固相萃取，由UPLC-MS-MS测定，外标法定量动物源性食品中吩噻嗪类药物及其代谢物。所建立的方法具有快速、准确、抗干扰能力强的特点，其定量限(S/N>10)氯丙嗪、异丙嗪为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，氯丙嗪亚砷、异丙嗪亚砷为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足动物源性食品中吩噻嗪类药物及其代谢物检测的国际标准。

第四章对氯丙嗪，异丙嗪代谢的研究及代谢产物进行了表征。本部分的研究通过体外试验(in vitro)和体内试验(in vivo)两种方法。体外试验是提取了大鼠的肝脏，采用肝微粒体(microsome)等体系模拟动物体的肝代谢系统，药物在该体系中进行代谢反应，通过反应结果对代谢进行评估。体内试验中将药物灌喂到大鼠体内，通过对大鼠排泄物、血液、肝脏中药物及其代谢物的测定对药物及其代谢成分进行分析。

本文的创新点在于：

(1) 对糖皮质激素类药物地塞米松、倍他米松、倍氯米松的测定方法进行摸索，建立了超高压液相色谱串联电喷雾质谱的检测方法，操作简单快速，灵敏度高。

(2) 对动物源食品中氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷进行分析，建立了新的分析方法。对吩噻嗪类药物氯丙嗪、异丙嗪的体内、体外代谢进行了研究，找出了新的代谢产物，了解了药物的代谢过程。为此类药物的安全评价提供了一定的参考价值。

关键词：超高效液相色谱串联质谱；飞行时间质谱；糖皮质激素；吩噻嗪；代谢

Abstract

The increasing number of food and drug safety incidents occurred worldwide has endangered public health and safety, and exerting negative impact on our socio-economic order. With the ever faster pace toward economic globalization, food safety has thus become a globe issue facing every country in the world. How to improve the food safety inspection system, and to strengthen international collaboration on food security and development has become one of the most issues to be addressed for the healthy growing of food industry.

Glucocorticoid is a kind of steroid hormones excreted by adrenal cortex, which has been widely used in a variety of clinical applications. At present the medicine is used as a weightgaining additive to feed animals in farms. Unfortunately, it is found that even trace amount of the medicine could cause harm to human health. Phenothiazine is a type of common nerve medicine, it can reduce anxiety, produce illusion delusion, and pathological thoughts by targeting cerebrum network structure. It has also been used illegally as additive to feed animals to gain weight and to avoid animal death during transportation. It has been reported that the medicine and their metabolite could be found in the fat tissue and urine of animals a few weeks or more than half a year after feeding. The residual of the medicine could cause decrease of leucocyte and agranulemia, and cause pathological changes of liver and kidney. Today, the use of the medicine has already caused recognition of many countries, including U.S.A, European Union and Japan.

In this thesis, methods of ultra performance liquid chromatography coupled with electro-spray ionization triple-quadruple tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) were developed to analyze glucocorticoid and phenothiazine in meat products. Respectively, the metabolites of chlorpromazine and promethazine was studied through in vitro and in vivo experiments using time of flight mass spectrum (TOF).

This thesis is divided into four chapters. Chapter 1 is a literature review; Chapter 2 develops a

new method for the determination of Dexamethasone , Betamethasone and Beclomethasone residue in pork by Ultra Performance Liquid Chromatographywith Mass Spectrometry(UPLC-MS-MS); Chapter3, introduces new method of analyzing chlorpromazine promethazine and their metabolites; and Chapter 4 utilizes UPLC-MS-MS and TOF to study the metabolites of chlorpromazine and promethazine.

Chapter I is an overview of the research background. It discusses the property, application and analytical method of phenothiazine, the present situation and the significance of the research. Research plan of the thesis was outlined at the end of the Chapter.

In the second chapter, a method for simultaneous detection of Dexamethasone, Betamethasone and Beclomethasone in pork was developed by using ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization triple-quadruple tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS-MS). Extraction and chromatographic conditions for these drugs were optimized and the best separation was obtained. The MS-MS fragmentation conditions were carefully optimized for each compound in order to obtain both specific fragments and high signal intensity. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM) for qualitative and quantitative analysis. The average recovery rate of the drugs ranged from 83% to 96% (n=6) at the spiking levels of 1~100µg/L. The limit of quantification (S/N>10) were 1µg/kg, 1µg/kg, 2µg/kg for Dexamethasone, Betamethasone and Beclomethasone, respectively.

Chapter III describes a method of UPLC-ESI/MS/MS for the determination of chlorpromazine, promethazine, chlorpromazine sulphoxide and promethazine sulphoxide. The method has many merits, including rapid, accurate and less sensitive to interference. The limit of quantification (S/N>10) were 5µg/kg for chlorpromazine and promethazine, 1µg/kg for chlorpromazine sulphoxide and promethazine sulphoxide, and the method can satisfy the international standard.

In chapter IV, a method based on time of flight mass spectrometry (TOF MS) was developed for the study of the metabolites of chlorpromazine and promethazine. Based on the analytical method developed, metabolite parameters of chlorpromazine

and promethazine were studied. Mouse liver microsome was used for in vivo metabolic study. Livermicrosome of the mouse was used in vitro experiment to study on the metabolite. In vivo metabolic study of these two drugs were performed by analyzing metabolites in mouse excreta and blood collected after feeding mouse with these drugs. The novelty and significance of the thesis can be summarized as following two points:

(1) A simple, rapid, and sensitive method for the detection of Dexamethasone, Betamethasone and Beclomethasone in pork was developed. This method can be used for pork safty screening and can also be applied to other types of meats.

(2) A novel method was developed for the study of the in vitro and vitro metabolites of chlorpromazine and promethazine, The method provided a new way to study the drug acting mechanism.

Key words: UPLC-MS-MS, TOF, glucocorticoid, phenothiazine, metabolize

目 录

第一章 文献综述	1
1 引言.....	1
2 食品安全问题与检测	2
2.1 食品安全与评价	2
2.2 食品分析与检测	3
3 吩噻嗪类药物	6
3.1 吩噻嗪类药物的性质与应用	6
3.2 氯丙嗪、异丙嗪的检测	7
4 代谢组学的应用	11
4.1 样品的采集与制备	11
4.2 代谢数据的采集	12
5 液相色谱及液相色谱-质谱联用技术在代谢研究中的应用.....	13
5.1 液相色谱	14
5.2 质谱技术	15
5.3 液相色谱-质谱联用技术.....	16
6 大鼠代谢的研究	17
6.1 体外肝脏代谢	17
6.2 体内代谢	18
7 实验规划.....	20
参考文献.....	20
第二章 糖皮质激素的检测	24
1 引言.....	24
2 实验部分.....	24
2.1 主要试剂	24
2.2 主要仪器	25
2.3 标准工作液的配制	25

2.4 实验步骤	25
3 结果与讨论	26
3.1 仪器条件	26
3.2 色谱条件的选择	26
3.3 质谱条件的优化	29
3.4 样品提取方法的选择	31
3.5 线性关系	32
3.6 回收率与检出限	33
4 小结	34
第三章 固相萃取超高效液相色谱—电喷雾串联质谱对动源食品中 氯丙嗪、异丙嗪及其代谢物氯丙嗪亚砷和异丙嗪亚砷的测定	36
1 引言	36
2 实验部分	37
2.1 仪器与试剂	37
2.2 标准储备液的配制	38
2.3 实验步骤	38
2.4 仪器工作参数	38
3 结果与讨论	39
3.1 色谱条件的选择	39
3.2 质谱解析及质谱条件的优化	40
3.3 样品提取方法的选择	44
3.4 线性关系和检出限	45
3.5 回收率与精密度	45
3.6 实际样品的测定	47
3.7 结论	47
参考文献	47
第四章 高效液相色谱—电喷雾串联质谱联用技术用于氯丙嗪，异丙 嗪代谢物的鉴定、表征及药效性研究	49
1 引言	49

2 实验部分	51
2.1 主要试剂与材料.....	51
2.2 主要仪器.....	51
2.3 鼠肝微粒体 (microsome) 组分的制备.....	51
2.4 体外实验 (in vivo) 以及样品制备.....	52
2.5 体内试验 (in vivo) 以及样品的制备.....	52
2.6 大鼠代谢研究.....	52
3 结果与讨论	53
3.1 操作步骤.....	53
3.2 氯丙嗪代谢物的鉴定与表征.....	53
3.3 异丙嗪代谢物的鉴定与表征.....	57
3.4 氯丙嗪、异丙嗪体内代谢药效性研究.....	61
3.5 小结.....	61
参考文献.....	61
展 望	64

CONTENTS

Chapter I Literature review.....	1
1 Introduction.....	1
2 Food safety and inspect	2
2.1 Food safety and appraisal	2
2.2 Food inspection	3
3 Phenothiazine	6
3.1 Characteristic and application	6
3.2 Detection	7
4 Metabolomics.....	11
4.1 Sample preparation and acquisition	11
4.2 Data acquisition.....	12
5 Application of LC and LC/MS in metabolomics.....	13
5.1 Liquid chromatography	14
5.2 Mass spectrum.....	15
5.3 LC/MS technology	16
6 Metaboly research.....	17
6.1 In vitro study	17
6.2 In vivo study.....	18
7 Objective of this research	20
References.....	20
Chapter II Determination of glucorticoid	25
1 Introduction.....	25
2 Experiment	25
2.1 Equipment	25
2.2 Reagent and sample.....	26
2.3 Standard solution.....	26
2.4 Experiment step.....	26
3 Results and Discussion.....	27

3.1	Conditon of equipments	27
3.2	Liquid chromatography optimization	27
3.3	Mass spectrum optimization	30
3.4	Extraction method optimization	32
3.5	Linearity	33
3.6	Recovery and limit	34
4	Conclusion	35
Chapter III Determination of chlorpromazine、promethazine and their metabolite		
1	Introduction.....	37
2	Experiment	38
2.1	Equipment and reagent	38
2.2	Standard solution	39
2.3	Experiment step	39
2.4	Parameter of equipment.....	39
3	Results and Discussion.....	40
3.1	Liquid chromatography optimization	40
3.2	Mass spectrum optimization	42
3.3	Extraction method optimization	45
3.4	Linearity	46
3.5	Recovery and limit	46
3.6	Sample	48
3.7	Conclusion.....	48
	References	48
Chapter IV Study of metabolism and durative of chlorpromazine and promethazine by TOF		
1	Introduction.....	50
2	Experiment	52
2.1	Reagent and sample	52
2.2	Equipment	52

2.3 Preparation of the microsome fraction from rat liver.....	52
2.4 In vitro study and sample preparation	53
2.5 In vitro study and sample preparation	53
2.6 In vitro study of metabolize.....	53
3 Results and Discussion.....	54
3.1 Analysis step.....	54
3.2 Study of metabolism of chlorpromazine	54
3.3 Study of metabolism of promethazine.....	58
3.4 In vitro study of metabolize.....	62
3.5 Conclusion.....	62
Conclusion	62
Prospection	65

第一章 文献综述

1 引言

随着经济全球化的迅速发展,尤其是食品贸易的不断扩大,食品的安全问题也就越来越国际化。食品安全对人类健康的影响已成为各国政府和人民共同关注的焦点。三聚氰胺事件的发生,使人们对食品安全性的意识程度提高了。但是我们不能等着事情出现以后才去重视它。这就需要我们,尤其是政府部门,科研工作者要对食品的研究度要彻底,对添加在食物中的成分要有充分的认识。不仅要对这些成分本身的性质、作用有系统全方位的了解,还应对它们在进入人体后产生的变化,以及由此带来的一系列问题进行研究。药物代谢的研究和这方面的工作有很大的联系,只有对药物的代谢过程进行全方面的了解,才能对药物的安全性做出科学的评估,行政机构也可以以此为依据,对药物的可控性和实用性做出判定。

近年来,吩噻嗪类药物中毒事件常有报道。药物主要通过两种方式到达人体。一种是作为抗精神病药物,患者通过服用进入人体,尽管该类药物的安全限量比较高,但是药物口服后肠道吸收很不稳定,有抑制肠蠕动作用,肠内常可滞留很长时间。吸收后分布于全身组织、以脑及肺组织中含量最多,主要经肝脏代谢,大部分以葡萄糖醛酸盐或硫氧化物形式排泄。药物排泄时间较长,半衰期为 10~20 小时,作用可持续几天。另一种方式就是通过肉制品,不法商人将药物添加在饲料中或直接给动物注射,动物服用药物后有催眠增肥的效果,药物会残留在动物的体内,威胁人们的健康。这已经引起了国际安全组织的关注,我国也在 2007 年制定了国标^[1],对该类药物进行检测。

对于吩噻嗪类药物的研究,文献中大多是对氯丙嗪、异丙嗪的检测^[2-6],但对于它们的代谢物的检测以及这方面的研究我们鲜有看到。因此我们对该类药物检测方法的摸索以及代谢物的研究,是非常有意义的。

目前对吩噻嗪类药物的检测手段比较常见的有液相色谱法(LC)、气相色谱法(GC)、气相色谱质谱联用(GC-MS)等。高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS)集中了分辨率、灵敏度和专一性的优势,非常适用于极端复杂机制中代谢产物的

分析和坚定。采用 HPLC-MS，可以使用非常简单的样品预处理步骤，在很短的时间内对选定的化合物进行检测，能够实现对复杂机制中结构相似的化合物的同时分析，因此非常适用于药物及其代谢的检测分析。

2 食品安全问题与检测

如今，食品安全问题已经举国关注，世界各国政府大多将食品安全视为国家公共安全，并纷纷加大监管力度。2004年9月1日，国务院发布了《国务院关于进一步加强食品安全工作的决定》，决定采取切实有效的措施，进一步加强食品安全工作。食品安全涉及多部门、多层面、多环节，是一个复杂的系统工程。从当前来看，我们应尽快建立健全：食品安全法律体系；统一协调、权责明晰的监管体系；食品安全应急处理机制；完整统一的食品安全标准和检验检测体系；食品安全风险评估评价体系；食品安全信用体系；食品安全信息监测、通报、发布的网络体系；中介及研究单位的推动体系等九大体系，促进食品安全水平的全面提高。

民以食为天。食品是人类赖以生存和发展的最基本的物质条件。在我国国民经济中，食品工业已成为第一大产业。根据有关资料显示，1993年至1998年，我国食品工业总产值由3430亿元增至6000亿元，平均每年递增12%。2003年我国食品工业总产值更是首破12000亿元，远远超过汽车工业总产值9400亿元的水平。但是全球及我国接连不断发生的恶性食品安全事故却引发了人们对食品安全的高度关注，也促使各国政府重新审视这一已上升到国家公共安全高度的问题，各国纷纷加大了对本国食品安全的监管力度。

2.1 食品安全与评价

我国的食品安全标准和发达国家及国际组织相比接轨程度不够，从而导致标准的可信度在国际上不高。1961年召开的第十一届粮农组织大会和1963年召开的第十六届世界卫生大会均通过了创建食品法典委员会（CAC）的决议，现今食品法典已成为全球消费者、食品生产和加工者、各国食品管理机构和国际食品贸易唯一的和最重要的基本参照标准。虽然我国1986年就已正式成为CAC成员国，但对食品法典的研究、评估与应用工作开展并不十分理想。CAC标准都是以

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库