

LC-MS/MS法研究 1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉氢溴酸盐在大鼠体内的代谢产物

王雷娜, 宋敏*, 杭太俊, 张正行

(中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 采用液相色谱-串联质谱法对大鼠灌胃 1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉氢溴酸盐(编号 P91024)后粪便、尿液、胆汁和血浆中的主要代谢产物进行研究。通过比较给药样品和空白样品的全扫描总离子流色谱和选择离子扫描色谱图差别寻找 I 相代谢产物;根据其一级和二级质谱图,确定 I 相代谢产物的分子结构。完全提取 I 相代谢产物后的样品溶液,再用葡糖醛酸酶酶解,得 II 相结合物的苷元部分,采用与 I 相代谢产物鉴定同样方法寻找和鉴定 II 相代谢产物苷元的结构,进而确证 II 相代谢产物的分子结构。从大鼠粪便中鉴定出 P91024 的 2 个 I 相代谢物,从胆汁中鉴定出 1 个 I 相和 5 个 II 相代谢产物,从尿液中鉴定出 1 个 I 相和 3 个 II 相代谢产物,从血浆中鉴定出 4 个 I 相和 1 个 II 相代谢产物;并分别分析推测出它们的结构。P91024 在大鼠体内被代谢转化为多种产物,利用 LC-MS/MS 可以快速寻找和鉴定。

关键词: 1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉氢溴酸盐; 代谢物; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2007)11-1176-07

Metabolites of 1-(1-(6-methoxy-2-naphthyl)ethyl)-2-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrobromide in rat by LC-MS/MS method

WANG Lei-na, SONG Min*, HANG Tai-jun, ZHANG Zheng-xing

(Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To investigate the principal metabolites of 1-(1-(6-methoxy-2-naphthyl)ethyl)-2-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrobromide (code designation: P91024) in rats after ig administration by LC-MS/MS, the phase I metabolites were discovered by comparing the fullscan and SIM chromatograms of the test samples with the corresponding blanks. The structures of phase I metabolites were identified by ESI-MS spectra and the product spectra of the corresponding adduct ions. The phase II metabolites were identified in the test samples after the phase I metabolites were completely removed with solvent extraction and then treated with glucuronidase for enzymolysis of phase II glucuronide conjugates and the hydrolysates. Two phase I metabolites of P91024 were identified in rat feces, one phase I and five phase II in bile, one phase I and three phase II in urine, and four phase I and one phase II in plasma. Their structures were elucidated, separately. P91024 was extensively metabolized in rat. The metabolites can be easily screened and identified by LC-MS/MS method.

Key words: 1-(1-(6-methoxy-2-naphthyl)ethyl)-2-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrobromide; metabolite; LC-MS/MS

1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉氢溴酸盐 ($C_{31}H_{32}O_5N_2 \cdot HBr$, Mw 593.49, 编号: P91024, 图 1) 为四氢异喹啉衍生物, 是中国药科大学新药研究中心正在研制的化学药物, 具有抑制血小板黏附聚集、抑制血栓形成、抑制动脉内膜粥样斑块形成和脑缺血保护作用。姜红等^[1]对其稳定性进行了研究, 徐新军等^[2,3]对 P91024 在 Beagle 犬体内的药理学进行了测定, 其吸收、分布、排泄的研究结果表明, 48 h 内原形药的排泄量约占给药量的 35%。

药物的体内代谢是药物临床前药代动力学研究的重要方面, P91024 的代谢研究尚未见文献报道。本文对大鼠灌胃 P91024 后的粪便、胆汁、尿液和血浆样品中的代谢产物进行研究。

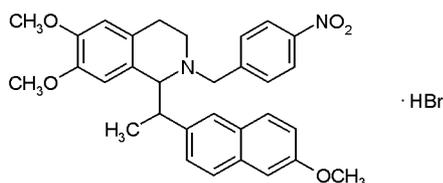


Figure 1 Chemical structure of 1-[1-(6-methoxy-2-naphthyl)ethyl]-2-(4-nitrobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrobromide (P91024)

材料与amp;方法

仪器与试药 TSQ Quantum Ultra AM 三重四极质谱仪 (美国 Thermo-Finnigan 公司); P91024 (中国药科大学新药研究中心, 批号 030601); β 葡糖醛酸酶 (美国 Sigma 公司, G-0251, Type B-1)。

实验动物 Sprague-Dawley 大鼠, 雌雄各半, 体重 220 ~ 250 g, 由南京医科大学实验动物中心提供 [SCXK(苏)2002-0031]。

LC-MS/MS 分析条件 日本岛津 Shimpack VP-ODS 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm ID, 5 μ m), 甲醇-水 (80:20) 流动相, 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 7:3 分流进行质谱扫描测定。质谱电喷雾离子化正离子检测, 喷雾电压 5 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}$ C, 雾化气 (N_2) 压 241 kPa, 辅助气压 34.5 kPa; CID 气 Ar 压力 0.2 Pa, 能量 30 eV。

给药溶液 称取 P91024 约 50 mg, 加入吐温-80 1 mL 研磨均匀, 并加 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 50 mL, 混合均匀, 即得 1 mg \cdot mL⁻¹ 灌胃溶液。

试验方案 Sprague-Dawley 大鼠 6 只, 雌雄各半, 禁食过夜 (12 h) 可自由饮水, 收集空白粪样、尿

液、血浆或插管收集胆汁后, 按 2 mg \cdot kg⁻¹ 灌胃给药, 分别采集给药后 3 h 和 6 h 血浆, 0 ~ 24 h 内尿液和粪便, 0 ~ 12 h 内胆汁样品, 于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存待测。

I 相代谢产物提取分离 取空白血浆与给药后 3 h 或 6 h 血浆各 1.0 mL, 空白尿液和给药后 0 ~ 24 h 尿样各 2.0 mL, 空白和给药后 0 ~ 24 h 粪便匀浆 (1:15) 各 1 mL, 空白和给药后 0 ~ 12 h 胆汁各 2.0 mL, 分别置 10 mL 具塞离心管中, 加甲醇 1 mL, 涡旋 1 min, 加 2 mol \cdot L⁻¹ 碳酸钠溶液 0.1 mL, 涡旋 1 min, 加环己烷 4.5 mL, 涡旋提取 3 min, 4000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 4 mL 置另一离心管中, 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气挥干, 残留物加甲醇 0.2 mL 涡旋溶解, 制得大鼠血浆、尿液、粪便和胆汁的空白及对应给药样品溶液, 取 40 μ L 进行 LC-MS/MS 测定。

II 相代谢产物提取分离 取大鼠给药 3 h 后的血浆样品和空白各 1.0 mL, 给药胆汁和空白各 2 mL, 给药尿样与空白各 2.0 mL, 分别置 10 mL 具塞离心管中, 各用环己烷 (4.5 mL) 涡旋提取, 重复 3 次, 分离完全 I 相代谢产物, 再用 40% 乙酸调节至 pH 5.0 左右, 分别加入葡糖醛酸酶 5 kU, 混合均匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C 温孵器中振荡反应 12 h 后, 照“I 相代谢产物提取分离”项下, 同样方法, 处理并测定。

代谢产物的 LC-MS 寻找方法 (1) 总离子流色谱 用 LC-MS 测定空白样品和给药样品的质谱全扫描总离子流色谱图, 比较空白样品与给药样品的总离子流色谱。通常与空白比较, 在给药样品色谱中新增加的峰相应的化合物即为代谢产物。(2) 选择性离子检测 利用样品的总离子流色谱图确定代谢物时, 由于全扫描对应的单个离子灵敏度较低 (TOF 质谱测定除外), 有内源性物质干扰, 容易漏检。本文根据 I 相代谢产物的形成通常是由原形药物结构中的官能团反应而形成的特点, 选择了本品可能形成的代谢产物的特征离子: m/z 483 (原形结构中硝基被还原为氨基)、 m/z 499 (原形结构中一个甲氧基被氧化为酚羟基)、 m/z 485 (原形结构中由 2 个甲氧基被氧化为酚羟基), 对供试品进行选择离子检测。比较空白样品及给药样品选择性离子检测的色谱图, 给药样品中新增色谱峰相应的化合物即是要寻找的代谢产物。本文同时采用这两种方法寻找并确证 P91024 在大鼠体内代谢产物, 获得的结果基本一致。

结果

1 大鼠粪便中的代谢产物

测定大鼠空白和给药后粪便样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱均表明, 给药大鼠粪便色谱中新增 3 个色谱峰, 相应色谱峰的一级质谱 m/z 分别为 483、499 和 513, 二级质谱见图 2 所示(色谱峰参见胆汁样品色谱图 5, t_r 分别为 4.4、8.7 和 21.9 min)。

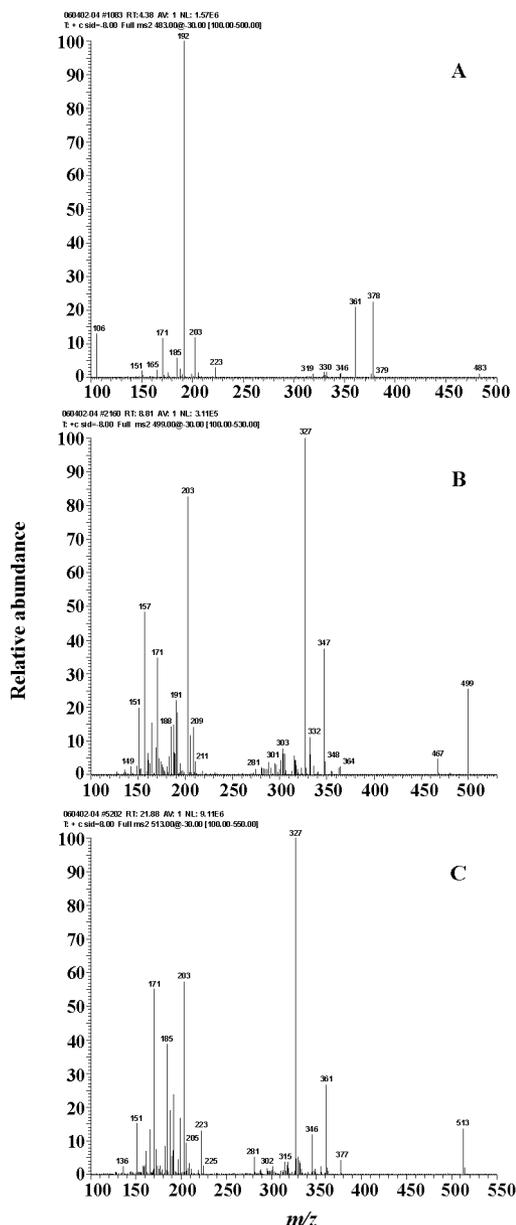


Figure 2 MS/MS spectra of the metabolites M1 (m/z 483, A), M2 (m/z 499, B), and the free alkali of P91024 (m/z 513, C) in rat feces

1.1 m/z 513 化合物的质谱鉴定

粪便样品中 m/z 513 离子为 $[M + H]^+$, 对应相

对分子质量 512, 与 P91024 原形药物游离碱相对分子质量及色谱保留相同, 主要特征碎片离子 (m/z 377、361、346、327、203、171 和 136) 亦一致。确证其为原形药物。其裂解过程见图 3。

1.2 粪便中 I 相代谢物 M1 的质谱鉴定

粪便样品中 t_r 4.4 min 色谱峰的 $[M + H]^+$ 离子 m/z 为 483, 对应相对分子质量 482, 比原形药物游离碱相对分子质量小 30 个质量单位, 推测该 I 相代谢物 (M1) 分子中仍保留了 2 个氮原子。根据体内代谢规律, 芳香硝基易被还原为氨基。代谢物 M1 与原形药物的二级质谱相比, 减少了对硝基苄基特征碎片离子 (m/z 136) 峰, 增加了对氨基苄基特征碎片离子 (m/z 106) 峰。推测该 I 相代谢物 M1 为: 1-[1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基]-2-(4-氨基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉。

I 相代谢物 M1 二级质谱中的主要特征碎片离子 (m/z 378、361、203、192、185、171 和 106) 与推测结构相符。其裂解过程见图 4。

1.3 粪便中 I 相代谢物 M2 的质谱鉴定

粪便样品中 t_r 8.7 min 色谱峰的 $[M + H]^+$ 离子 m/z 为 499, 对应相对分子质量 498, 比原形药物游离碱相对分子质量小 14 个质量单位, 推测该 I 相代谢物 (M2) 分子中仍保留了 2 个氮原子。根据体内代谢规律, 芳香环上取代的甲氧基易被代谢为酚羟基。由于原形药分子结构中有 3 个甲氧基取代, 代谢位置可采用二级质谱特征裂解分析确定。原形药物的二级质谱相比较, 代谢物 M2 具有相同的 m/z 327 特征碎片离子, 增加了 m/z 347 奇数质量偶电子特征碎片离子峰。推测该 I 相代谢物 M2 为 1-[1-(6-羟基-2-萘基)乙基]-2-(对硝基苄基)-6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉, 是由原形药物中 1-(6-甲氧基-2-萘基)乙基上的甲氧基被代谢成酚羟基所形成。

I 相代谢物 M2 二级质谱中的主要特征碎片离子 (m/z 467、347、332、327、203、191、171、157 和 151) 与推测结构相符。其裂解过程与 M1 相似。

2 大鼠胆汁中的代谢产物

2.1 胆汁中 I 相代谢物

测得大鼠空白及给药后胆汁样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药大鼠胆汁色谱中新增 1 个色谱峰, 经质谱鉴定相应代谢物与大鼠粪便中的 I 相代谢物 M1 相同。表明胆汁中亦存在 I 相代谢物 M1。

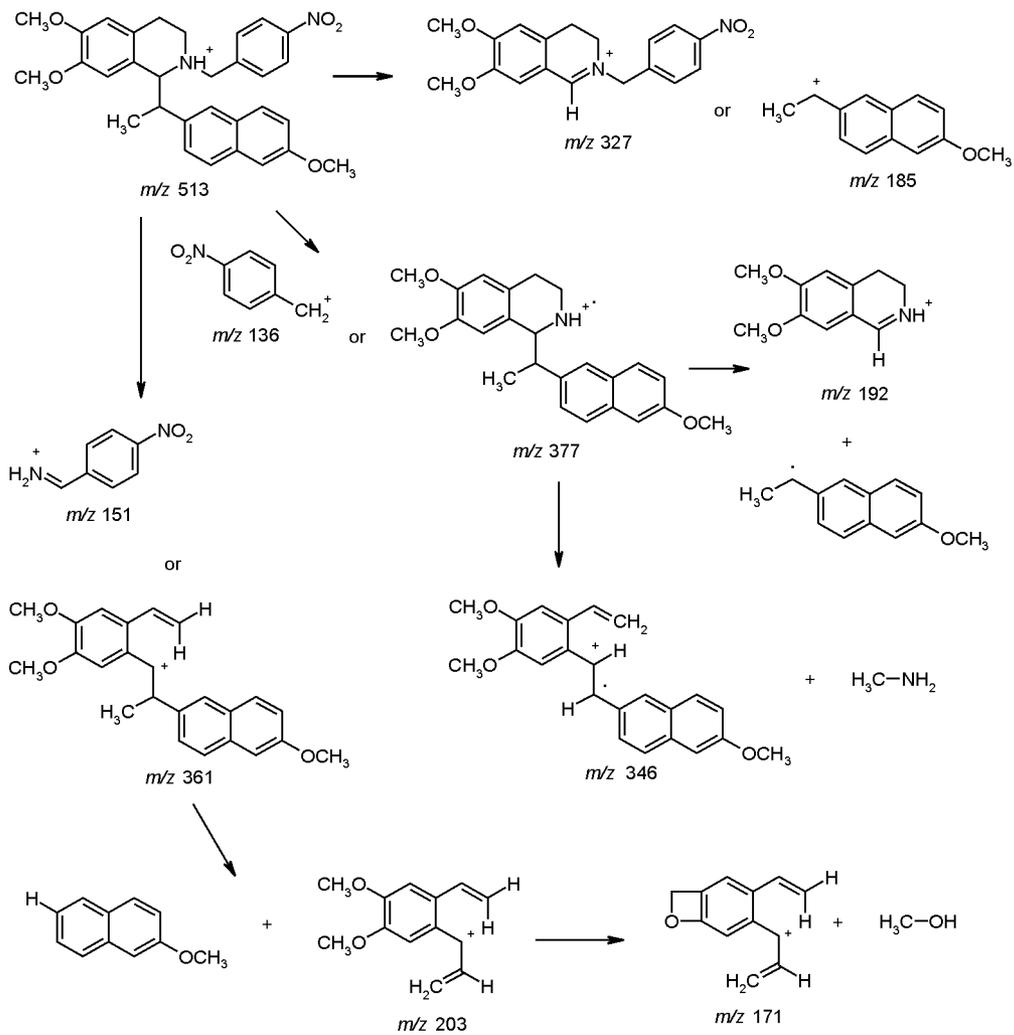


Figure 3 MS/MS fragmentation scheme of the free alkali of P91024 ($[M+H]^+$ m/z 513)

2.2 胆汁中 II相代谢物

测得大鼠空白及给药后胆汁 II相代谢物供试样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药胆汁样品新增 5 个色谱峰(图 5), 其保留时间 t_R 分别为 4.4、5.9、8.7、13.6 和 14.5 min, 相应峰的一级质谱 m/z 分别为 483、485、499、499 和 499。

2.2.1 t_R 4.4 min 的 II相代谢物 测得 t_R 4.4 min 的 II相代谢物苷元二级质谱与粪便中 I相代谢产物 M1(图 2A)的二级质谱相同, 表明胆汁中有 M1 以葡糖醛酸结合物形式存在的 II相代谢物。

2.2.2 t_R 5.9 min 的 II相代谢物 测得 t_R 5.95 min 的 II相代谢物苷元 $[M+H]^+$ 离子 m/z 为 485, 二级质谱如图 6。该苷元 $[M+H]^+$ 离子比原形药游离碱的 $[M+H]^+$ 少 28 个质量单位。即原形药游离碱中 3 个甲氧基中有 2 个甲氧基被代谢成酚羟基

的产物。其二级质谱中有 m/z 313 的特征碎片离子, 与 $[M+H]^+$ 离子 (m/z 485) 脱去质量数为 172 的对乙基萘酚中性分子相应 ($[M+H]^+ - C_{12}H_{12}O$, 基峰), 确证 t_R 5.9 min 的 II相代谢物苷元中 1 个酚羟基由 2 萘基上 6 位甲氧基转化, 而另一酚羟基则是由 6 位甲氧基转化 (M3) 或 7 位甲氧基转化 (M4) 而得, M3 或 M4 仅根据质谱信息不能区分, 需通过核磁共振或合成验证进一步确证。M3 与 M4 为同分异构体, 在本实验条件下只有 1 个色谱峰, 二级质谱也基本相同。其裂解过程与原形药物相似。

2.2.3 t_R 8.7、13.6 和 14.5 min 的 II相代谢物 m/z 499 离子在总离子流色谱和选择性离子检测色谱图(图 7)中均存在 3 个峰 (t_R 分别为 8.7、13.6 和 14.5 min), 这些苷元 $[M+H]^+$ 离子均比原形药游离碱的 $[M+H]^+$ 少 14 个质量单位, 与原形药游离

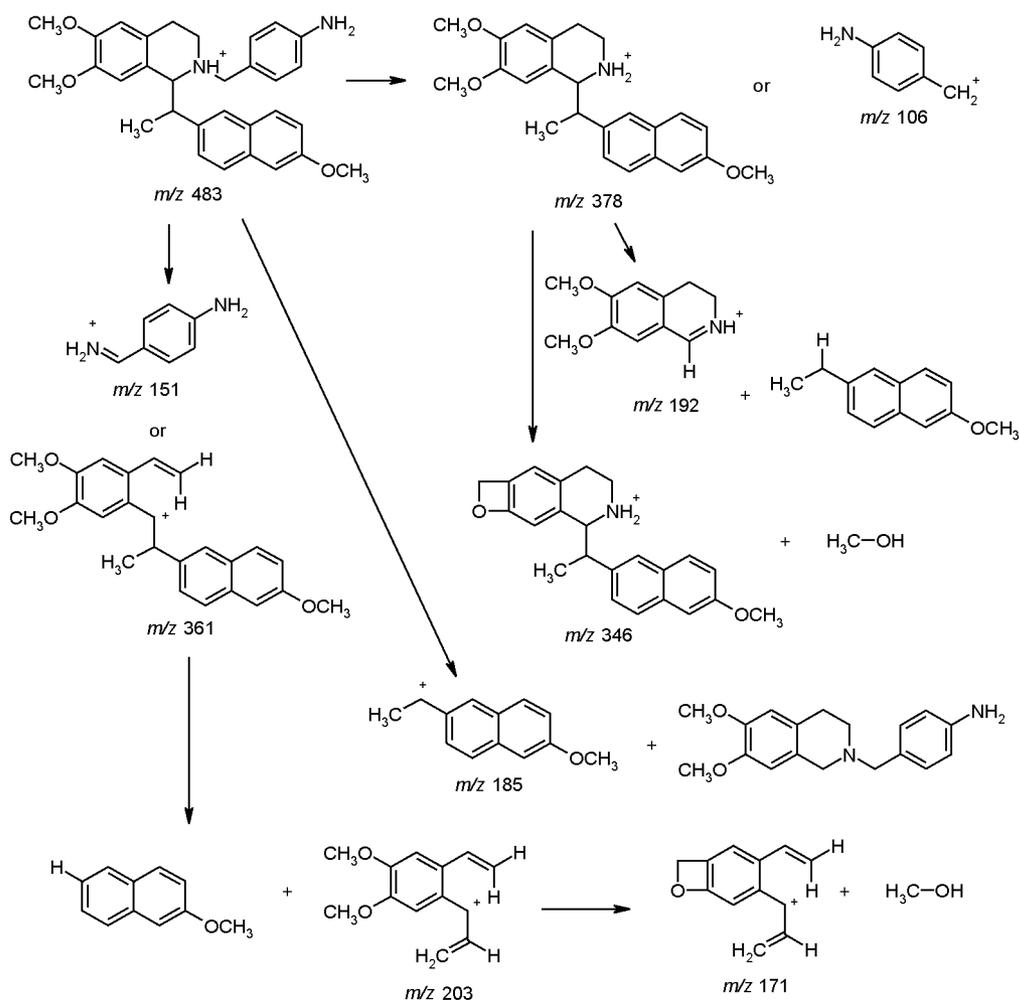


Figure 4 MS/MS fragmentation scheme of the metabolite M1 in feces ($[M + H]^+$ m/z 483)

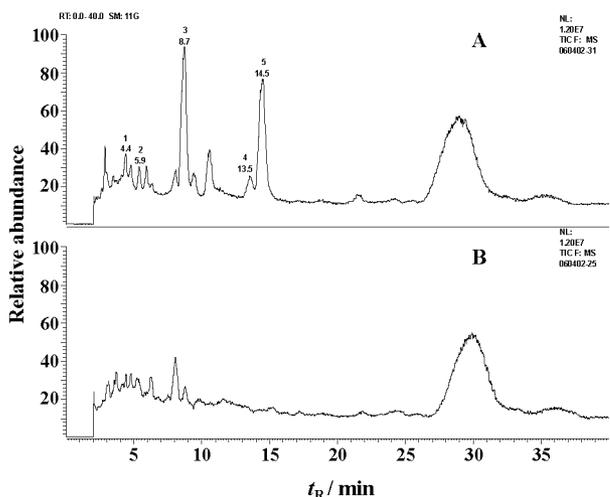


Figure 5 Total ion chromatogram of bile sample treated with glucuronidase (A) and the corresponding blank (B). Peak 1: M1; Peak 2: M3 or M4; Peak 3: M2; Peak 4: M5 or M6; Peak 5: M6 or M5

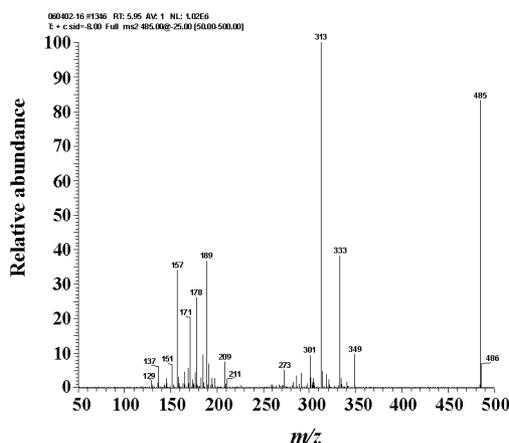


Figure 6 MS/MS spectrum of the metabolite M3/M4 in rat bile ($[M + H]^+$ m/z 485)

碱的 3 个甲氧基中有 1 个被转化成酚羟基所得的 3 种同分异构体产物分别相应。

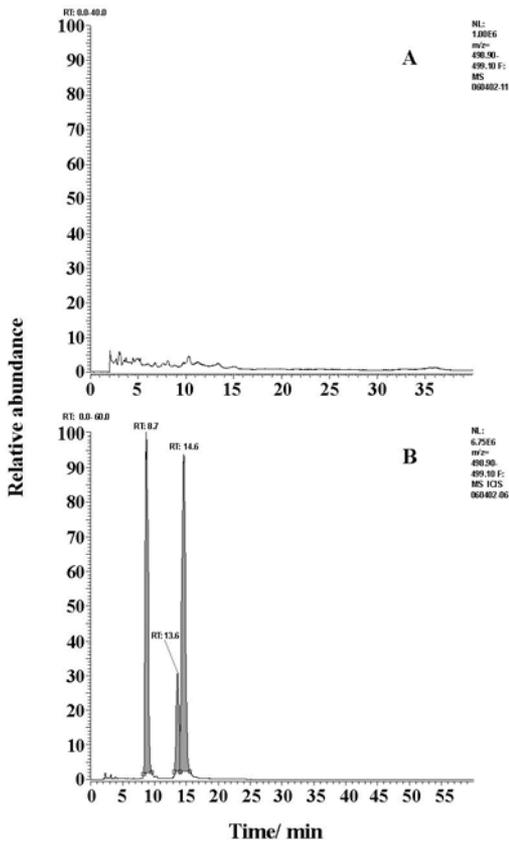


Figure 7 SIM chromatogram of blank bile ($[M + H]^+$ m/z 499, A), and bile sample after treating with glucuronidase ($[M + H]^+$ m/z 499, B)

t_R 8.7 min 的 II 相代谢物苷元二级质谱图与粪便中 I 相代谢物 M2 的二级质谱 (图 2B) 相同, 表明胆汁中有 M2 以葡糖醛酸结合物形式存在的 II 相代谢物。

t_R 13.6 和 14.5 min 的两个 II 相代谢物苷元的二级质谱图非常相似 (图 8, 9), 表明它们的化学结构相似。二级质谱中均出现 m/z 313 的碎片离子, 为 $[M + H]^+$ 离子脱去质量数为 186 的对甲氧基乙基萘中性分子的子离子 ($[M + H]^+ - C_{13}H_{14}O$, 基峰), 由此推断这两个 II 相代谢物苷元为原形药分子结构中 6 或 7 位的甲氧基分别被代谢成酚羟基的产物: M5 或 M6。二级质谱裂解过程基本相同, 与原形药物相似。

实验结果表明, 胆汁中存在苷元结构分别为 M1、M2、M3 (或 M4)、M5 及 M6 的 5 种葡糖醛酸结合物 II 相代谢物。

3 大鼠尿液中代谢物

3.1 尿液中 I 相代谢物

测得大鼠空白及给药后尿液样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药大鼠尿样新增

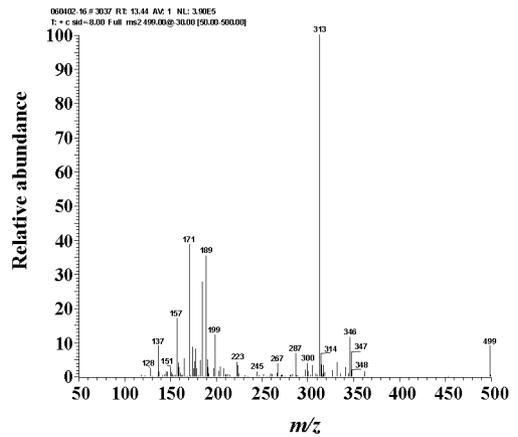


Figure 8 MS/MS spectrum of the phase II metabolite M5 or M6 in rat bile ($[M + H]^+$ m/z 499, t_R 13.6 min)

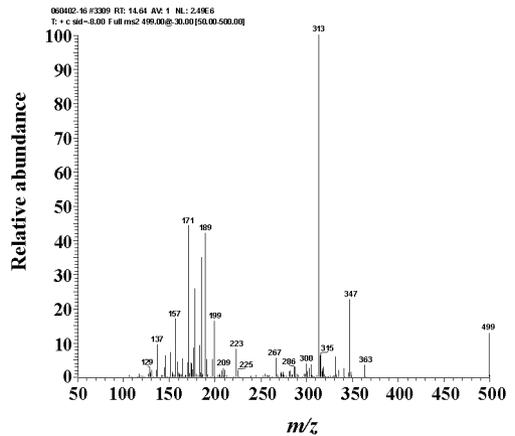


Figure 9 MS/MS spectrum of the phase II metabolite M6 or M5 in rat bile ($[M + H]^+$ m/z 499, t_R 14.5 min)

1 个色谱峰, 经质谱鉴定相应代谢物与大鼠粪便中的 I 相代谢物 M1 相同。表明尿液中亦存在 I 相代谢产物 M1。

3.2 尿液中 II 相代谢物

测得大鼠空白及给药后尿液 II 相代谢物供试样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药尿液中新增 3 个色谱峰 (t_R 分别为 8.7、13.6 和 14.5 min), 相应峰的一级质谱 m/z 均为 499, 与大鼠胆汁中的 II 相代谢物苷元 (M2、M5 和 M6) 的色谱及质谱结果相同。表明尿液中存在苷元结构分别为 M2、M5 和 M6 的葡糖醛酸结合物 II 相代谢物。

4 大鼠血浆中代谢物

4.1 血浆中 I 相代谢物

测得大鼠空白及给药后血浆样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药血浆样品中新

增 5 个色谱峰。经保留时间对照及质谱测定确证, 其中 4 个为 I 相代谢物, 分别与 M1、M2、M5 和 M6 相应; 另一个为原形药游离碱 (m/z 513)。

4.2 血浆中 II 相代谢物

测得大鼠空白及给药后血浆 II 相代谢物供试样品的总离子流色谱和选择性离子检测色谱表明, 给药血浆中含有苷元结构为 M2 的葡糖醛酸结合物 II 相代谢物。

综上所述, 代谢物测定结果表明, 大鼠灌胃后的粪便、胆汁、尿液及血浆样品中存在的 I 相代谢物和 II 相代谢物的苷元结构, 分别以 M1、M2、M3、M4、M5 和 M6 表示, 见表 1。

Table 1 Principal metabolites of P91024 in rats after ig adm in istration

Sample	Phase I metabolite	Phase II metabolite
Feces	M, M1, M2	-
Plasma	M, M1, M2, M5, M6	G-M2*
Bile	M1	G-M1, G-M2, G-M3 or G-M4, G-M5, G-M6
Urine	M1	G-M2, G-M5, G-M6

* G: Glucuronide conjugates

粪便和血浆中除上述代谢物外, 还存在原形药物。

结论与讨论

样本中代谢物的寻找, 一般采用空白样品与给药样品的总离子流色谱进行比较, 给药样品的总离子流色谱中新增色谱峰是由代谢产物所致。但总离子流色谱灵敏度、分辨力常常达不到代谢产物检出要求, 容易漏检。本文中采用总离子流扫描和预测

特征选择离子检测两种方法寻找供试品中的原形药或代谢物, 两种检测方法可达到相互佐证, 避免漏检, 并实现同分异构体区分鉴别。

代谢物一般含量甚微, 很难获取对照品供其他光谱鉴定。本文根据化合物质谱和体内代谢的规律性 (通常由原形药中的官能团发生反应), 结合有机质谱裂解反应规律 (氮规则、偶电子规则、产物稳定性规则和碎片离子的电荷与质量相关性) 鉴定其 I 相代谢产物。鉴定酶解后的苷元部分结构, 再推测 II 相代谢物。因此, 正确解析质谱碎片离子裂解反应途径是鉴定代谢产物正确与否的依据, 对于多数代谢物可用质谱鉴定结构, 但有时仅用质谱不能完全确证结构。如本文胆汁中 II 相代谢物苷元 M3 与 M4, 其二级质谱不能区分。又如胆汁和尿液中 II 相代谢产物苷元结构相似的 3 个异构体 M2、M5 和 M6, M2 与 M5 或 M6 结构有显著差异, 利用二级质谱很易区分; 而 M5 和 M6 为异喹啉环上 6, 7-二甲氧基分别被转化成酚羟基所得, 二者质谱不能区分, 此时需利用其他联用技术如 HPLC-NMR 或合成目标化合物对照确证。

References

- [1] Jiang H. Studies on the quality control of P91024 (P91024 的质量研究) [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2004.
- [2] Xu XJ, Zhang ZX, Hua WY, et al. Studies on *in vivo* pharmacokinetics of P91024 in Beagle dog [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 72 - 75.
- [3] Xu XJ. Studies on the quality control and pharmacokinetics of P91024·HBr (P91024 氢溴酸盐的质量研究及其药物动力学研究) [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2002.