

固相萃取—核磁氢谱法研究曲美布汀的代谢产物

司伊康*, 杨春, 孔漫, 徐瑞明, 张守仁, 贺文义

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 用固相萃取—核磁共振谱法探索曲美布汀在体内的代谢产物。方法: 用固相萃取柱将大鼠尿液的内源性物质从样品中去除, 然后进行连续样品¹H NMR 谱的测定, 经结构片段的解析, 将其峰积分进行匹配, 推断可能的代谢产物, 并指出未发生代谢的部位。结果: 曲美布汀酯水解产物在代谢产物中是主要成分, 其中醇部分的进一步代谢是主要的代谢途径。与文献报道的同位素方法研究结果相同。结论: 代谢产物混合物的¹H NMR 谱可经结构片段解析和峰积分匹配来推测代谢产物, 此法简便, 提供的信息可帮助了解药物在体内的转化。

关键词 固相萃取; 核磁共振谱; 曲美布汀; 药物代谢

固相萃取—核磁共振谱法是近十几年来国际上正在探索的可用于药物代谢产物研究的新方法, 已有十几种药物用此法进行了研究。但大多数是用¹⁹F谱研究含氟的药物, 用¹H谱的测试技术研究的药物不多。前文^[1]曾建立¹H谱法进行了溴莫普林代谢产物的研究。现选用曲美布汀继续进行方法学探讨。此药曾有用同位素标记法对其体内代谢产物研究的报道^[2], 发现主要是通过酯水解、氮脱甲基及与内源性物质结合3种途径进行代谢。同位素标记法虽有灵敏度高的特点, 但操作较繁琐。固相萃取—核磁氢谱法操作较简便快速。

材料与 方法

药品与试剂 曲美布汀马来酸盐由上海医药工业研究院制备。Wistar大鼠体重210~220 g, ♀; 260~280 g, ♂, 均由中国医学科学院动物中心提供。固相萃取柱为Supelco公司的ENVI-C₁₈柱。

样品的采集与处理 实验用♂大鼠2只, 禁食过夜。曲美布汀马来酸盐用5% Tween 80和蒸馏水配成悬浮液, 以250 mg·kg⁻¹剂量给大鼠ig。将大鼠置于代谢笼中, 收集0~24 h的尿液。尿液过滤后, 取2 ml经ENVI-C₁₈反相柱分离, 所用溶剂为2 ml水、甲醇—水(5%, 10%, 15%, 30%, 60%)和甲醇。洗脱液经室温除去甲醇后用冷冻干燥仪除去水, 样品置于-20℃冰箱中保存。

核磁共振氢谱测试 所有¹H NMR谱均在Bruker AM-500核磁共振仪上完成, 溶剂为D₂O, 外

标TSP-d₄, 累加次数为100~300次。

结 果

1 代谢产物结构推测

水洗样品及甲醇—水梯度洗脱的样品(共5份)均进行了¹H NMR谱测定和图谱解析。虽仍有少量内源性物质的干扰, 但曲美布汀马来酸盐原药在δ 8~0.5间的7组信号峰, 在代谢产物的图谱中仍可以指认出6组, 即芳环质子(δ 7.60~7.29), 2-二甲氨基-2-苯基丁醇部分的1位前手性亚甲基质子(δ 4.2~3.7)、甲氧基质子(δ 3.85~3.82)、氮甲基质子(δ 2.85~2.36)、2-二甲氨基-2-苯基丁醇部分的3位前手性亚甲基质子(δ 2.28~1.87)以及δ 0.87左右的甲基质子, 马来酸信号已消失。这些按照结构类型被指认的每一组信号峰, 可作为进行代谢产物的结构推测的基础。

2 曲美布汀水解途径的确认

曲美布汀结构(图1)可分为由酯键连接的两部分, 即没食子酸三甲醚部分和2-二甲氨基-2-苯基丁醇部分。¹H谱上有芳环质子、N-甲基、O-甲基, 饱和烃甲基及两个前手性亚甲基的特征峰等。其中没食子酸部分的芳环质子由于分子的对称性而为单峰, 处于δ 7.28处; 2-二甲氨基-2-苯基丁醇部分的芳环质子为多重峰, 处于δ 7.57~7.64之间。由于这两组峰不发生重叠, 因此它们间的积分比是判断酯水解与否的主要依据。在经固相萃取柱梯度洗脱的多组样品图谱中, 这两组信号峰的积分比均相差很大, 图谱中N-甲基区的信号具有多样性, 在δ 2.73, δ 2.54和δ 2.46处共有3种信号峰, 推测存在N,N-二甲基质子和NH-甲基质子并连在不同的片段上, 提示样品中同时存在2-二甲氨基-2-苯基丁

醇和 2-甲胺基-2-苯基丁醇结构(图 1)等,因而可以推测曲美布汀分子的酯水解产物在代谢产物中是主

要的成分,其中醇部分的进一步代谢又是主要的代谢途径(图 2A, B)。

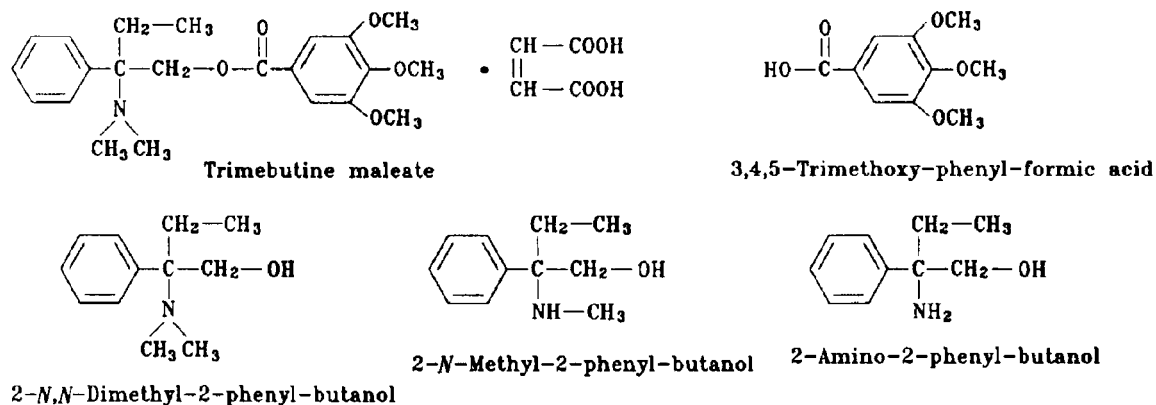


Fig 1 Structures of trimebutine maleate and its metabolites.

3 没食子酸三甲醚(图 1)和 2-二甲胺基-2-苯基丁醇的指认

5% 甲醇—水组分的图谱中 *N*-甲基信号区有 3 组信号,对照原药的图谱可推断 δ 2.73 处的质子是 *N,N*-二甲基质子, δ 2.46 处的质子是 *NH*-甲基质子。根据图谱中 *N,N*-二甲基信号峰和甲氧基的信号峰均明显高于 *NH*-甲基的信号,可以判断 5% 组分含有两个主要代谢产物,即原药水解后的没食子酸三甲醚和 2-二甲胺基-2-苯基丁醇产物。其中没食子酸三甲醚的芳质子与甲氧基的质子积分比为 2:9,表明了这一结构分子的存在。另 2-二甲胺基-2-苯基丁醇的初步指认,除依据芳质子与 *N,N*-二甲基的信号外,还依据 δ 2.1~2.3 处(多重峰)的 C_3 位前手性 $-\text{CH}_2-$ 的存在及 δ 0.85 处(多重峰)的 C_4 甲基信号以及它们的信号峰积分可以匹配这一事实。 C_1 位前手性 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 的信号峰因重叠在 δ 3.94~3.36 区域,难于指认,但在 5 个样品的图谱中均未发现有 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 基团氧化成 $-\text{CHO}$ 的质子峰,可证实代谢产物中保存有 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 基团的推测(图 2C)。

4 2-甲胺基-2-苯基丁醇(图 1)的指认

15% 甲醇—水组分的图谱中 2-二甲胺基-2-苯基丁醇的含量减少,其相应的各信号峰都明显减弱,不仅证实了以上对这一分子结构各信号峰指认的正确,也从另一组信号的同时增强可以指认出 2-甲胺基-2-苯基丁醇(δ 0.76, m, C_4 -甲基; δ 2.2~2.1, m, C_3 -亚甲基; δ 2.46, s, *NH*- CH_3 ; δ 7.57~7.64, m, 芳质子)(图 3A)。

5 2-氨基-2-苯基丁醇(图 1)的指认

15% 甲醇—水组分的图谱中显示了一组新的在 δ 2.05 和 δ 1.95 处出现的 C_3 -亚甲基信号,同时 δ 0.76 处的 C_4 -甲基信号明显增强,可推断这两组信

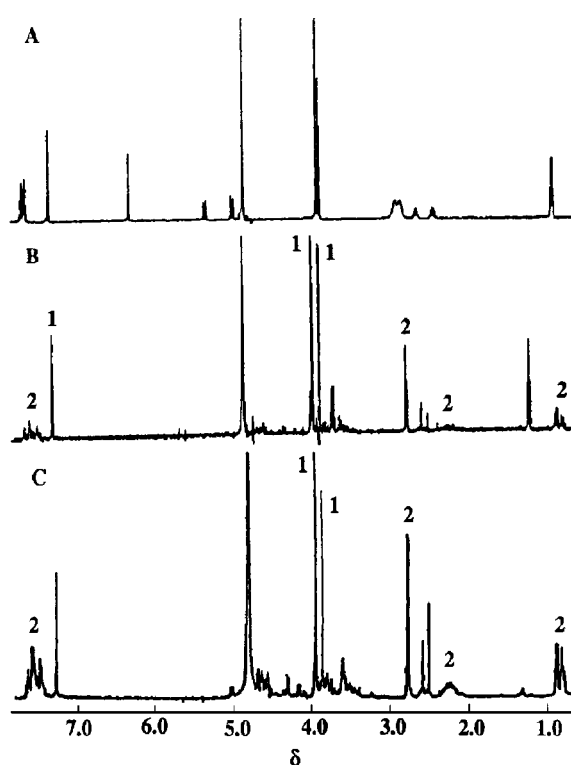


Fig 2 Partial 500 MHz ^1H NMR spectra of trimebutine maleate (A) and trimebutine metabolites (B and C) in D_2O . Sample obtained from solid phase extraction chromatography with 5% $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (B), 10% $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (C). 1 and 2 represent metabolites 3,4,5-trimethoxy-phenyl-formic acid and 2-*N,N*-dimethyl-2-phenyl-butanol, respectively.

号来源于一个新的代谢产物。在 30% 甲醇—水组分的图谱中,这两组信号成为主要代谢产物信号,但 *N*-甲基信号积分太低,难与这两组信号从积分上相配,因而推断新的代谢产物结构应为 2-氨基-2-苯基丁醇(图 3B)。

讨 论

1 本研究用固相萃取—核磁共振谱法判断了曲美布汀分子的酯键断裂,提示此法可用以判断前药及帮助寻找活性代谢产物。

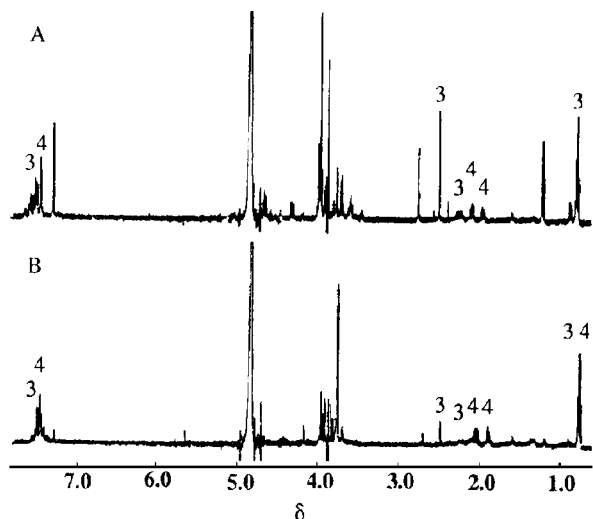


Fig 3 Partial 500 MHz ^1H NMR spectra of trimebutine maleate in D_2O . Sample obtained from solid phase extraction chromatography with 15% MeOH- H_2O (A) and 30% MeOH- H_2O (B). 3 and 4 represent metabolites 2-N-methyl-2-phenylbutanol and 2-amino-2-phenylbutanol respectively.

2 代谢产物混合物的图谱之所以可以解析,是因为代谢产物结构间的关系有规律可循,本实验不仅证实了这一点,还建立了以原药图谱为基础,在将信号按结构单元分类识别后,利用各代谢产物的含量变化必然引起谱中同分子各信号的同时增强或减弱的规律(即积分匹配),完成代谢产物结构的推测的方法。

3 由于从5个样品图谱中未发现具AA'BB'特点的酚类芳氢信号,可推断曲美布汀无4'-羟基-2-苯基丁醇类代谢产物;未发现 $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ 和

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 的信号,也可知无 ω 或 $\omega-1$ 氧化类的代谢产物;未发现1位 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 的信号和3位、4位 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 的信号明显地向低场移动,表明曲美布汀无脱氮氧化的产物。

4 实验证明在含多个结构类似的代谢产物的图谱解析中,由于信号的重叠,很难将每一代谢产物的信号峰积分比一一核实,这与用HPLC将每一代谢产物分纯后再进行测定与解析的结果相比是明显不足的。但我们认为在未发现新结构的信号峰情况下,该方法提供的可能发生代谢的部位及未发生代谢的部位的信息,已可了解药物在体内的转化方式。如在结构片段解析中发现有可能存在新的代谢片段及途径时,还应进行确切的代谢产物解析,此时可采取第2次固相萃取柱分离,并进行再测定和再解析来完成^[1],即使这样,整体实验的完成时间与花费也是较少的。

5 此法适用于含量较高的代谢产物主要成分的研究,由于核磁仪器灵敏度的限制,微量成分的测定仍需采用其它方法。

参 考 文 献

- 1 司伊康,徐瑞明,孔漫,等.用固相萃取-核磁共振谱法研究大鼠尿中溴莫普林的代谢产物.药理学报,1998,33:698
- 2 Miura YJ, Yoshikawa MY, Hayashida KK, *et al.* Metabolism of trimebutine maleate, a gastrointestinal tract motility regulator, in dogs and man. Yakubutsu Dotai, 1989,4:515; CA, 1990,113:17427u

STUDY ON METABOLITES OF TRIMEBUTINE WITH SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) — ^1H NMR COMBINATION

Si Yikang (Si YK), Yang Chun (Yang C), Kong Man (Kong M), Xu Ruiming (Xu RM), Zhang Shouren (Zhang SR) and He Wenyi (He WY)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT AIM: In order to assess the applicability of combined usage of solid phase extraction (SPE) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) in the study of metabolites, trimebutine was selected, which is a compound composed of two parts by ester linkage. **METHODS:** With SPE the endogenic compounds were removed efficiently, and ^1H NMR was performed for the eluates. After resolving the structure of each piece, the metabolites were predicted, and the non-metabolized positions were pointed out. **RESULTS:** The hydrolyzed products were the main metabolites of trimebutine, and the main pathway of the metabolism occurred in the part of butanol. The results agree with those by using isotopic method reported in the literature. **CONCLUSION:** The experiment showed that if the structures of the pieces were confirmed, and they were fitted together with the matching principle of the peak area integral in one compound, the metabolites could be predicted. This method can provide information of the metabolism and it is convenient in operation.

KEY WORDS solid phase extraction; nuclear magnetic resonance spectrum; trimebutine; drug metabolism