

用固相萃取-核磁共振氢谱法研究大鼠尿液中 *R*-(*-*)-布洛芬光活代谢产物

杨 春, 贺文义, 孔 漫, 徐瑞明, 张守仁, 司伊康*

(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-核磁共振氢谱法研究大鼠尿液中 *R*-(*-*)-布洛芬代谢产物及异构体的转化。方法 将服用 *R*-(*-*)-布洛芬后 0~24 h 大鼠尿液经固相萃取柱处理, 核磁共振氢谱测定代谢产物的结构。结果 尿液中含有 4 个主要代谢产物: 2-羟基-布洛芬及其葡糖苷酸结合物, 1-羧基-布洛芬葡糖苷酸和布洛芬葡糖苷酸。后两者为非对映异构体混合物。结论 *R*-(*-*)-布洛芬在大鼠体内发生了异构体转化, 异丁基侧链中末端甲基的氧化代谢具有立体选择性。

关键词: 固相萃取; 核磁共振氢谱; *R*-(*-*)-布洛芬; 代谢产物; 代谢活性转移

中图分类号: R917; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)11-0843-04

布洛芬 (ibuprofen, IBP) 为非甾体抗炎药, 可选择性抑制环氧酶, 从而抑制体内前列腺素的生物合成, 缓解炎症反应。体外实验显示 *S*-(*+*)-IBP 的抗炎活性是 *R*-(*-*)-IBP 的 160 倍, 但在体内, 这种比例却降到了 1.4 倍, 这是由于 *R* 异构体在体内存在向 *S* 异构体转化的“代谢活性转移”^[1]。本实验通过固相萃取法对大鼠服用 *R* 异构体的尿液进行预处理, 然后经核磁共振仪检测, 在不借助于手性位移试剂的情况下, 利用 *R*-(*-*)-IBP 代谢后引入大的葡糖苷酸光活基团而形成的非对映异构现象, 探讨了 *R*-(*-*)-IBP 在体内的代谢转化作用。

材 料 和 方 法

材料 (*±*)-布洛芬由本所开发室吴松研究员提供。*R*-(*-*)-布洛芬由化学拆分而得。(*+*)- α 苯乙胺为 Fluka 试剂。其他化学试剂均为分析纯。Wistar 大鼠体重 170~195 g, ♀, 由中国医学科学院动物中心提供。固相萃取分离柱为 Waters 公司的 SEP-PAK C₁₈ 柱。

消旋布洛芬的拆分^[2] 消旋布洛芬 6.4 g

(0.031 mol) 溶于异丙醇 13.6 mL 中, 水浴加热至 40 °C, 滴加 (*+*)- α 苯乙胺 2.0 mL (0.013 mol)。水浴 78~80 °C 回流 30 min。经 4 h 冷至室温。过滤得白色固体。异丙醇、无水乙醇重结晶得白色针状晶体。将 *R*-(*-*)-IBP-(*+*)- α 苯乙胺盐溶于水中, 滴加盐酸至 pH 3, 过滤得白色粉末。乙醇-水重结晶, 得 *R*-(*-*)-IBP 0.60 g (产率 9.48%, mp 45~48 °C, $[\alpha]_D = -56.9^\circ$, ee = 99.8%)。

药理实验 *R*-(*-*)-布洛芬用 5% Tween 80 和蒸馏水配成悬浮液。大鼠禁食过夜 ig 250 mg·kg⁻¹, 置代谢笼中。收集 0~24 h 尿液, 过滤后加入 98% 甲酸 (0.2%), 取尿液 5.0 mL 经 SEP-PAK C₁₈ 柱预处理。固相萃取柱预先用甲醇 10 mL 和蒸馏水 10 mL 活化, 尿液上样后, 分别用 10 mL 蒸馏水、不同比例 (10%, 30%, 40%, 50%, 60%) 甲醇-水混合液及甲醇洗脱。洗脱液用旋转蒸发仪除去甲醇后, 冷冻干燥除去水份, 置于 -20 °C 冰箱保存。

NMR 实验 所有 ¹H NMR 谱的测试都在 INOVA-500 核磁共振仪上完成。溶剂为 D₂O 或 DMSO-d₄, 外标为 TSP-d₄, 采样次数 100~300 次, 数据点 32 K, 谱宽 6 000 Hz。

结 果

与空白大鼠尿液的 ¹H NMR 谱相比, 大鼠服用 *R*-(*-*)-IBP 后 0~24 h 尿液的 ¹H NMR 谱中在 δ 0.8~1.5 和 δ 7.2~7.4 区域出现一些新的信号, 这

收稿日期: 2000-01-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870863)

作者简介: 杨 春, 女, 博士。

司伊康, 女, 研究员。

* 联系人 Tel: (010) 63038742, Fax: (010) 63017757,

E-mail: syk@imm.ac.cn

是外源性化合物 IBP 在体内发生生物转化的结果。下面结合各个梯度洗脱液中特征峰的变化,解析 R(-)-IBP 尿液中代谢物的结构。

1 2-羟基-布洛芬及其葡糖苷酸结合物的确认

与 R(-)-IBP 的图谱(图 1A)相比,10%甲醇洗脱液的¹H NMR(图 1B)中出现了一些新的信号,按照峰的相对积分比例可以把这些主要的信号分为两组峰进行解析。一组峰为 δ 1.20(单峰)、δ 1.45(双峰)、δ 2.79(单峰)及 δ 3.83(四重峰),这是 2-羟基-布洛芬的两侧主链信号峰。其中 δ 1.20 单峰是异丁基侧链中 2 位次甲基发生羟基化后,两个末端甲基失去偶合后显示为单峰,且向低场位移的结果;δ 2.79 单峰是 3 位亚甲基向低场位移的结果;δ 1.45 出现的末端甲基双峰与原型药完全相同,这说明丙酸侧链未发生变化。根据¹H-¹H COSY(图 2),可知丙酸侧链中的 2 位次甲基峰在 δ 3.83 处。即可确认此组分中含有 2-羟基-布洛芬代谢物。

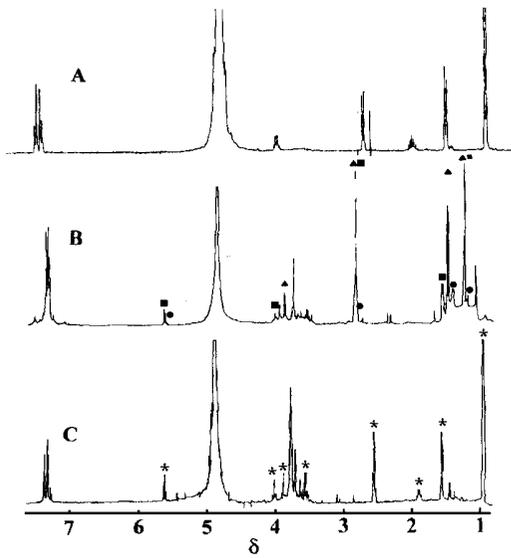


Fig 1 ¹H NMR spectrum (500 MHz) of R(-)-ibuprofen (A) and its metabolites in D₂O following isolation from urine using solid phase extraction with 10% MeOH-H₂O (B) and 60% MeOH-H₂O (C). ▲, ■, ● and ★ represent 2'-hydroxy-ibuprofen, 2'-hydroxy-ibuprofen glucuronide, 1'-carboxy-ibuprofen glucuronide and ibuprofen glucuronide, respectively

另一组特征峰为 δ 1.52(双峰)和 δ 5.59(双峰),积分比例为 3:1。其中 δ 1.52 双峰是丙酸侧链末端甲基峰,与原型药相比它向低场位移,说明丙酸侧链发生了变化。与之有关的 δ 5.59 为 β 葡糖苷酸的端基质子峰,说明末端羧基与葡糖苷酸发生了结合。即表明此组分中含有 2-羟基-布洛芬葡糖苷

酸。在¹H-¹H COSY(图 2)中,可以看到丙酸侧链中 2 位次甲基峰在 δ 3.90,葡糖苷酸中 2'',3''和 4''质子在 δ 3.50(多重峰),而 5''质子在 δ 3.98(双峰)。其异丁基侧链中末端甲基和 3 位亚甲基与 2-羟基-布洛芬的相同,分别为 δ 1.20(单峰)δ 2.79(单峰)。

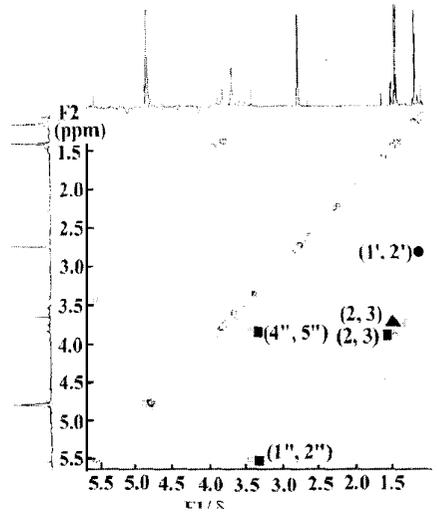


Fig 2 ¹H-¹H COSY NMR spectrum (500 MHz), obtained from 2'-hydroxy-ibuprofen and its glucuronide isolated from rat urine (see Fig 1) using solid phase extraction with 10% MeOH-H₂O. ▲, ■ and ● represent the cross peaks of 2'-hydroxy-ibuprofen, 2'-hydroxy-ibuprofen glucuronide and 1'-carboxy-ibuprofen glucuronide, respectively

2 1-羧基-布洛芬葡糖苷酸

在 10%组分的¹H NMR(图 1B)中,δ 1.15 处有一个含量较低的双峰,这是异丁基侧链中末端甲基峰。与布洛芬的氢谱相比,峰的裂分情况未发生变化,仅位移向低场移动,说明异丁基侧链中 2 位仍为次甲基,很可能是一个末端甲基发生了变化,如发生了羟基化或进一步氧化成羧基。在 10%组分的¹H-¹H COSY(图 2)中,可以看到异丁基侧链中 2 位次甲基在 δ 2.80(多重峰)。根据连续组分的图谱中 δ 1.45(双峰)和 5.48(双峰)与 δ 1.15(双峰)存在同步消长的关系,且保持匹配的积分比例,认为丙酸侧链中末端甲基峰在 δ 1.45,与布洛芬的化学位移相同,因此推测此代谢物丙酸侧链未发生变化;而 δ 5.48 葡糖苷酸端基质子说明异丁基侧链中末端甲基是氧化成了羧酸,并进一步与葡糖苷酸结合。积分比例显示代谢物中只连接了 1 个葡糖苷酸,进一步说明丙酸侧链未与葡糖苷酸结合。

3 布洛芬葡糖苷酸和布洛芬原型药的确认

在极性较大的洗脱液中,主要信号与 IBP 的信号峰极为相近,如 60%甲醇洗脱液的¹H NMR(图

1 C) 中, 异丁基侧链中末端甲基为 δ 0.88 (双峰), 2 位次甲基为 δ 1.84 (多重峰), 3' 位亚甲基为 δ 2.48 (双峰)。但丙酸侧链中末端甲基峰向低场位移至 δ 1.52 (双峰), 并且在 δ 5.57 可观察到与之相关的 β -葡萄糖苷酸的端基质子峰, 因此推测有布洛芬葡萄糖苷酸存在。其 2 位次甲基位于 δ 3.95 (四重峰), 葡萄糖苷酸中 2'', 3'' 和 4'' 质子在 δ 3.55 (多重峰), 5'' 质子在 δ 3.85 (双峰)。

在 60% 组分中已经开始有少量的 IBP 出现, 它的部分特征峰与布洛芬葡萄糖苷酸的重叠。以 DMSO 为溶剂, 甲醇洗脱液的 ^1H NMR 中主要为未代谢的原型药。

另外, 在 50% 和 60% 组分的氢谱中还含有少量的其他代谢物。由于其含量较低, 无法解析出完整的结构, 还有待灵敏度更高的方法进行检测。

4 1'-羧基-布洛芬葡萄糖苷酸和布洛芬葡萄糖苷酸的代谢转化

在一些图谱中某些代谢物的峰存在偏移的类似峰, 这些特征峰主要集中于 1'-羧基-布洛芬葡萄糖苷酸的异丁基侧链中末端甲基和布洛芬葡萄糖苷酸的丙酸侧链中末端甲基和 β -葡萄糖苷酸端基质子。5'' 位质子上。在未被柱子保留的组分的氢谱中 (图 3 A), 可以看到 1'-羧基-布洛芬葡萄糖苷酸中异丁基侧链的末端甲基在 δ 1.15 显示出一对双峰, 这是由于手性 β -葡萄糖苷酸的引入使得 $R(-)$ -IBP 的代谢物成为一对非对映异构体, 因此在核磁氢谱上出现了位移效应, 使手性分子可以被区分开。这种现象在布洛芬葡萄糖苷酸中更明显。如在 50% 和 60% (图 3 B 和 3 C) 组分中, 丙酸侧链中的末端甲基在 δ 1.52 也显示两个双峰。

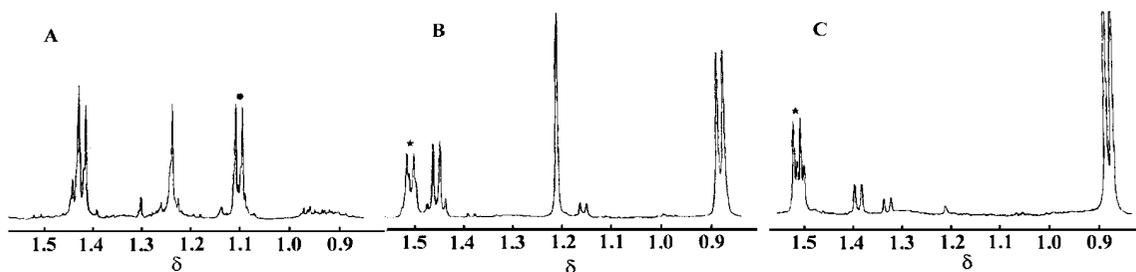


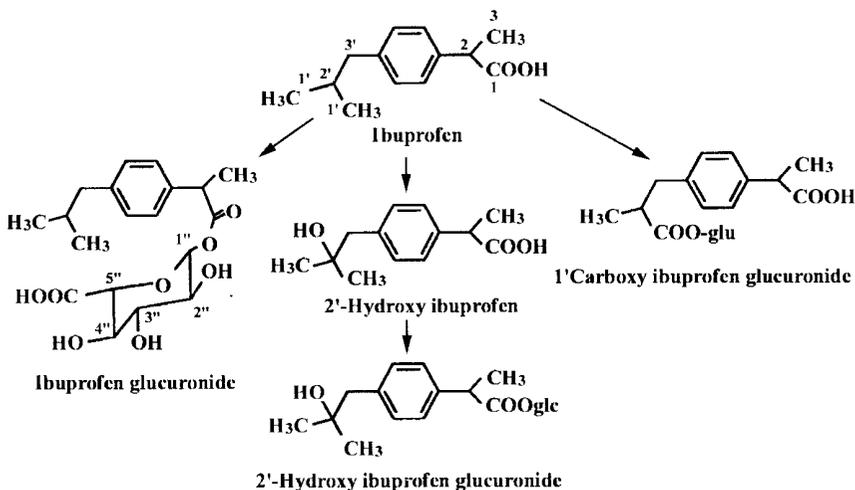
Fig 3 Part of 500 ^1H NMR spectrum of $R(-)$ -ibuprofen metabolites

A. Extract of rat urine that has been passed through the sorbent bed, the peak (\bullet) of δ 1.15 is 1'-methyl of 1'-carboxy-ibuprofen glucuronide; B, C. Solid-phase extraction of rat urine eluted with 50% and 60% MeOH-H₂O, the peak (\star) of δ 1.52 is 3'-methyl of ibuprofen glucuronide. 1'-Carboxy-ibuprofen glucuronide and ibuprofen glucuronide were diastereoisomers

讨 论

在服用 $R(-)$ -IBP 的大鼠尿液中除了发现少

量的原型药外, 还发现 4 个代谢物: 2-羟基-布洛芬及其葡萄糖苷酸结合物, 1'-羧基-布洛芬葡萄糖苷酸和布洛芬葡萄糖苷酸。代谢过程为:



根据异丁基和丙酸侧链中末端甲基峰的积分比例,在总的代谢物图谱中可以得到以上 4 个代谢物分别占 72.0%, 8.3%, 13.6% 和 6.0%。其中, 1'-羟基布洛芬为主要代谢物。

实验中发现 1'-羧基-布洛芬葡糖苷酸和布洛芬葡糖苷酸均为非对映异构体的混合物。结果证明,在体内二相代谢反应中,由于在手性中心附近引入了手性结合物如葡糖苷酸,不必加入位移试剂,就可以直接检测代谢物的手性状况,并进一步推测药物在体内是否发生了手性代谢转化。

由于大鼠仅服用了 *R*(-)-IBP,但布洛芬葡糖苷酸代谢物却显示为非对映异构体的混合物,说明 *R* 异构体在体内先转化成 *S* 异构体,然后在与葡糖苷酸结合时,才能显示出非对映异构体混合物。在 1'-羧基-布洛芬葡糖苷酸中发现异丁基侧链存在手性,说明在生物体内代谢酶对异丁基侧链中两个末端甲基的氧化存在选择性。由于此代谢物中丙酸侧

链中没有引入新的手性结构,在不加入位移试剂的情况下,从普通的核磁图谱中无法判断丙酸侧链的手性有无转化。由于分子中丙酸侧链的手性中心与异丁基侧链相距较远,未发现二者的相互影响。另外,实验中未发现 2-羟基-布洛芬葡糖苷酸有非对映异构体存在的现象,还不能完全肯定它是单一的异构体,还需要其他方法进一步证实。2-羟基-布洛芬由于未引入大的手性基团,没有造成非对映现象,因此在核磁测定中难以观察到有无对映体存在。

REFERENCES:

- [1] Knights KM, Talbot UM, Baillie TA. Evidence of multiple forms of rat liver microsomal coenzyme A ligase catalysing the formation of 2-arylpropionyl coenzyme A thioesters [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44(1): 2415 - 2417.
- [2] Kaiser DG, Vangiessen GJ, Reischer RJ, et al. Isomeric inversion of ibuprofen (*R*)-Enantiomer in humans [J]. *J Pharm Sci*, 1976, 65(2): 269 - 273.

USE OF HIGH FIELD NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY FOR THE ANALYSIS OF STEREOSELECTIVE METABOLITES OF IBUPROFEN (*R*)- ENANTIOMER IN RAT URINE

YANG Chun, HE Wenyi, KONG Man, XU Ruiming, ZHANG Shouren, SI Yikang

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

ABSTRACT: AIM To study the metabolic chiral inversion and chiral metabolites of *R*(-)-ibuprofen. **METHODS** Following administration of *R*(-)-ibuprofen (250 mg•kg⁻¹), analysis was performed on rat urine purified extracts obtained by solid phase extraction onto C-18 bonded silica gel, then the metabolites of ibuprofen were detected and identified by ¹H NMR spectroscopy. **RESULTS** Except for a little ibuprofen, there were 2-hydroxy-ibuprofen and its glucuronide, 1'-carboxy-ibuprofen glucuronide and ibuprofen glucuronide in rat urine. 2-hydroxy-ibuprofen is the main metabolite. 1'-carboxy-ibuprofen glucuronide and ibuprofen glucuronide were diastereoisomers. **CONCLUSION** There was the phenomenon of metabolic chiral inversion, whereby the *R*-enantiomer is transformed *in vivo* to its active *S*-antipode via an unusual process.

KEY WORDS: solid phase extraction; ¹H NMR; ibuprofen; drug metabolites; enantiomers; metabolic chiral inversion