

固相萃取-核磁共振氢谱法研究乙哌立松的代谢产物

杨 春, 孔 漫, 徐瑞明, 张守仁, 贺文义, 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 探讨用固相萃取-核磁共振氢谱法研究乙哌立松体内药物代谢产物的可能性。方法 用两次固相萃取除去大鼠尿液中的内源性物质, 并将药物及其代谢产物分配到几个组分中, 然后进行核磁共振氢谱检测。结果 共检测到 4 个代谢产物, 其中 2 个代谢产物未见文献报道。结论 用固相萃取与核磁共振谱技术结合的方法, 在不完全分离代谢产物的情况下, 根据核磁共振谱提供的特征峰和化学位移变化可以解析乙哌立松代谢产物结构, 也可依据发现的结构片段推测它在体内发生的生物转化过程。

关键词: 核磁共振谱; 固相萃取; 乙哌立松; 代谢产物

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)05-0374-04

乙哌立松(eperisone)为胃肠道解痉药。其分子结构为在苯环两侧分别连有一个乙基和一个 3-哌嗪基-异丁酮。Taka matsu 等^[1]报道乙哌立松在体内生物转化主要为羟基化、氮脱烷基以及与葡糖醛酸的结合。由于乙哌立松的两个烷基侧链都可以发生代谢转化, 可造成体内代谢产物多且结构类似, 致使采用高效液相色谱法难以将全部代谢产物完全分离, 因此研究其体内代谢产物较困难。我们曾建立研究体内代谢产物的固相萃取与核磁共振谱结合方法, 不依赖于代谢产物的完全分离, 而是根据图谱中原型药特征峰的化学位移与裂分的改变, 推测药物的代谢位点及生物转化后的结构^[2,3]。虽然这种方法有时不能完全将每一个代谢产物的结构确切解析, 但它方便、快速, 且可获得多种结构信息, 可以帮助了解药物在体内发生的变化。本文采用此方法对大鼠体内乙哌立松代谢产物进行研究。

材 料 和 方 法

材料 乙哌立松由本所开发室吴松研究员提供; Wistar 大鼠, 体重 240~260 g, ♂, 由中国医学科学院实验动物研究中心提供; 固相萃取柱为欧亚新技术公司的氰丙基键合硅胶柱(CN), 体积 3 mL, 填料重量为 600 mg, 粒度为 200~300 目。

药理实验方法 乙哌立松用 1% Tween 80 配成悬浮液。大鼠禁食过夜, 300 mg·kg⁻¹ ig, 放置代谢笼中。收集 0~24 h 的尿液。尿液过滤后经 CN 柱分离。CN 柱预先用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化后, 将尿液 10 mL 上样。洗脱液分别为水及 10%, 20%, 40% 和 60% 甲醇-水及甲醇, 每次用量为 5 mL。用真空旋转蒸发器在室温除去洗脱液中甲醇, 再冷冻干燥除去水分。样品以重水溶解后进行核磁共振检测。将检测中含有内源性物质的样品去除, 将含代谢产物的样品合并, 经 CN 柱再次分离。洗脱液改为 5 mL 的水、10%, 15%, 20%, 25%, 30% 和 40% 甲醇-水及甲醇。样品的处理方法同上, 然后进行核磁共振检测。

核磁共振氢谱的测定方法 所有的核磁共振氢谱的测定都在 Bruker AM500 仪器上完成。每份样品干重不低于 0.2 mg。溶剂为重水 0.5 mL, 内标为 TSP-d₄, ¹H 的 90° 脉宽为 11.9 μs, 谱宽 6 000 Hz。累加次数为 100~300 次。

结 果 和 讨 论

1 乙哌立松的核磁共振氢谱

乙哌立松盐酸盐在以 D₂O 为溶剂的核磁共振氢谱中(图 1A), δ 8.0~1.0 都有特征峰存在, 这为代谢产物的检测提供了大量的可对比信息。以上各处特征峰的改变均可用于代谢产物的结构解析, 特别是 δ 1.31 处 4 位甲基的双峰和 1.27 处 2' 位甲基的三重峰可以特征地显示出苯环两侧取代基团的变化。

收稿日期: 1999-07-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870863)

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

E-mail: syk@imm.ac.cn

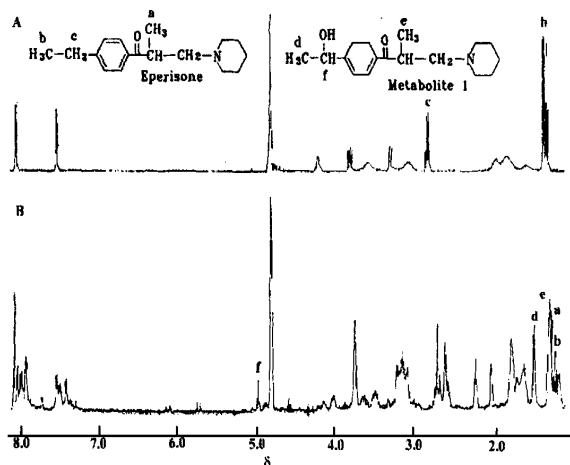


Fig 1 500 MHz ^1H NMR spectra of (A) eperisone in D_2O and (B) its metabolites from solid phase extraction chromatography with 10% MeOH - H_2O

2 第2次固相萃取后样品的核磁共振氢谱解析

将10%组分的图谱(图1B)与原药的图谱进行比较,可发现在 δ 1.45处出现一个新的甲基双峰($J = 6.5$ Hz),说明它的邻位碳上只含有一个氢原子。推测是原1'位亚甲基受氧化成为羟基化后的2'位甲基峰,相应的1'位次甲基的多重峰可在 δ 4.97处看到,而原 δ 2.79处已没有相应比例的1'位亚甲基四重峰。与它们积分可配比的苯环质子峰为 δ 7.91(双峰)和7.54(双峰),4位甲基在 δ 1.25(双峰)。由此可推测出代谢产物1的结构。另外,根据 δ 1.15处仍存在的2'位甲基三重峰, δ 7.91(双峰)和7.43(双峰)处出现的另一组AA'BB'苯环特征峰,及 δ 1.25处4位甲基双峰,推测此样品中还有原型药存在。从积分比例上可以发现1'-羟基化代谢产物的含量远大于原型药。

30%甲醇-水组分的图谱中(图2A),在 δ 0.82(三重峰),1.26(多重峰)和4.95(三重峰)处出现了一组与原型药完全不同的特征峰,它们的积分比为3:2:1。推测这个片段为 $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}_3$,它的产生过程推测如图3所示。根据可能发生的代谢反应,认为是由乙哌立松的3位碳发生氮脱烷基后产生了末端醛基,醛基经氧化脱羧后形成了丙酮基侧链。而 δ 4.95的三重峰可推测是羰基还原成羟基后形成的。从图谱观察,这一片段在此组分中为主要成分。由于未发现原药的乙基信号,且从 δ

7.50~7.28处为苯环质子的多重峰判断,苯环应处于单取代状态,因而推测可有代谢产物2(图3)。

40%甲醇-水组分的图谱中(图2B)低场有两组苯环特征峰,均显示AA'BB'系统。从积分比判断, δ 7.74(双峰, $J = 8.2$ Hz)和7.50(双峰, $J = 8.2$ Hz)与高场中2.00(单峰)、5.70(单峰)和6.09(单峰)成比例,积分比为2:2:3:1:1。从乙哌立松的结构推测,这一片段应当为 $\text{pH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ 。推测它的产生过程如图3所示,其双键是通过氮脱烷基的同时脱去了一分子水而形成。由于图谱中未发现相应积分比的原药乙基信号,因此推测苯环的乙基取代发生了变化。由于苯环质子AA'BB'特征峰系统表明苯环上连有两取代基,而图谱中又未发现可与另一侧信号积分比相对应的其他信号,由此推测苯环上连有核磁氢谱难以测出的基团,如羧基,它可由乙基氧化而来。以上片段的特征峰在10%,15%和30%的组分中均存在,只是在这一组分中含量最高,由此推测出为代谢片段1(图3)。低场处另一组峰为 δ 8.04(双峰, $J = 8.0$ Hz),7.54(双峰, $J = 8.0$ Hz),高场处与之成比例的特征峰是与原药相同的3-哌嗪基-异丁酮侧链特征峰。但在 δ 3.12(三重峰)和4.85(多重峰)处出现了两组新的特征峰。推测是由于2'位的甲基羟基化后,致使1'位的亚甲基形成了三重峰(δ 3.12),并导致了两个特征峰向低场的位移,此为代谢产物3(图3)。

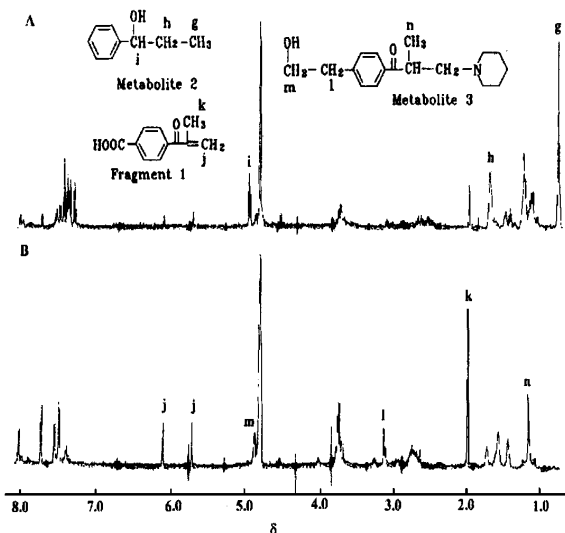


Fig 2 500 MHz ¹H NMR spectra of eperisone metabolites in D₂O. The sample was obtained from solid phase extraction chromatography with 30 % MeOH—H₂O (A) and 40 % MeOH—H₂O (B)

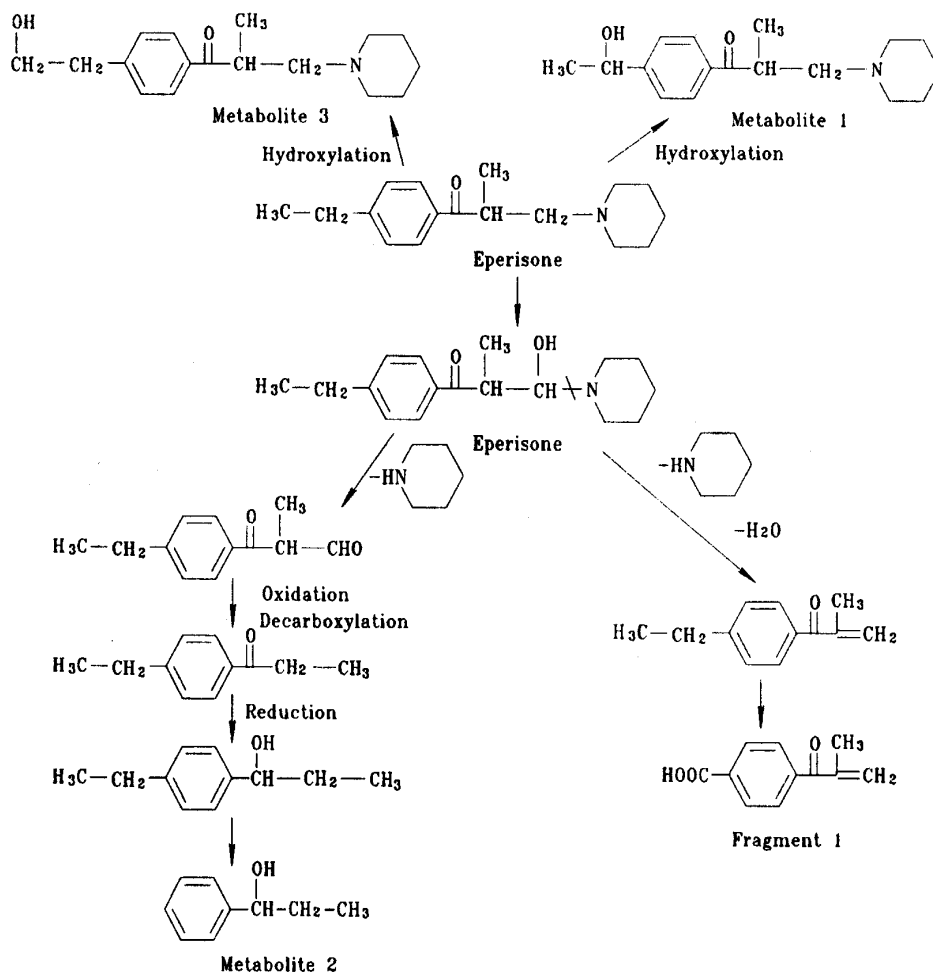


Fig 3 Structure of eperisone and its route of metabolism

其他组分所含有的代谢产物与以上 3 个组分所含有的代谢产物类似。图谱中还有一些含量较低的峰目前未能解析,因此可能还存在有其他的代谢片段。

我们利用两次固相萃取分离和¹H NMR谱技术从大鼠尿液中检测出 ω-1 羟基化 羰基还原成羟基、氮脱烷基并氧化脱羧和氮脱烷基及再脱水等 3 个主要代谢产物和一个代谢片段。其中氮脱烷基并氧化脱羧形成烷烃片段(代谢产物 2)和末端羟基化代谢产物(代谢产物 3)未见报道。

综上所述,用固相萃取配合¹H NMR谱技术进行乙哌立松体内代谢产物的研究,可以在未将代谢产物完全分离的情况下,通过发现与原药不同特点的

特征峰,推断出代谢产物的结构或代谢片段。这不仅可以帮助了解乙哌立松在体内可能的转化和代谢位点,对进一步认识它的体内代谢途径也是有意义的。

参考文献:

- [1] Takamatsu T, Horce T, Tsutsumi J, *et al.* The metabolism of eperisone hydrochloride in laboratory animals and man [J]. *Iyakukin Kenkyu*, 1993, 24: 520.
- [2] 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[J].药学报,1998, 33: 697.
- [3] 司伊康,杨春,孔漫,等.固相萃取-核磁共振谱法研究曲美布汀的代谢产物[J].药学报,1999,34: 376.

STUDY ON METABOLITES OF EPERISONE WITH SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED WITH ¹H NMR SPECTROSCOPY

YANG Chun, KONG Man, XU Rui-Ming, ZHANG Shou-Ren, HE Wen-Yi, SI Yi-Kang

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

ABSTRACT: **AIM** To explore the possibility of identifying the metabolites of eperisone by using solid phase extraction (SPE) and NMR spectrometry. **METHODS** The endogenous compounds in rat urine were eliminated with SPE column and ¹H NMR was performed on the eluates for the identification of the metabolites. **RESULTS** Three metabolites and one fragment were deduced, two of the metabolites were found for the first time. **CONCLUSION** The results showed that, using the above methods, the structures of the metabolites could be elucidated by comparing the changes of specific NMR signals without complete separation of the metabolites. The biotransformation *in vivo* could also be inferred from the structural fragments found in the NMR spectra.

KEY WORDS: eperisone; solid phase extraction; nuclear magnetic resonance spectrum; metabolites