

核磁共振谱技术在药物代谢研究中的应用

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)

核磁共振谱(NMRS)是一种无损伤的物理测试方法,它可直接用于体内和体外的生物样品测定,提供分子水平的信息。近二十年来,这种生物核磁技术有很快发展。NMRS 不仅可用于研究生物体内源性物质的代谢,还可研究外源性物质在体内的生物转化,如药物代谢。研究药物代谢时,方法有体外与体内两种,体外研究可用生物体液,如血浆、尿、胆汁、脑脊髓液、唾液,也可用切除的组织样品,还可用分离灌注的细胞和器官。体内研究可在完整的生物系统中进行,如在细菌、植物、动物及人体上进行测定。以下介绍 NMRS 在药物代谢研究中的应用进展。

用 NMRS 进行药物代谢的研究有以下几个条件:(1)所测的药物分子中需含有具核磁矩的核素,如 ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P 等。(2)这些核素在生物转化过程中不易脱下。(3)由于核磁共振仪灵敏度的限制,所研究的药物给药剂量应较大,如 ^{19}F 谱在体内测定时的含量要求在 $0.01 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(4)药物在给药后的较短时间内可发生一系列代谢,代谢物的量可在 NMRS 中被检测出来。

目前进行药物代谢研究最常用的方法是同位素标记法、气相色谱法(GC)和高效液相法(HPLC),均在体外进行。其实 GC 和 HPLC 较适合于跟踪研究原型药的吸收与分布,用其进行药物代谢研究时,由于要预先推测代谢物的结构以确定分离的方法,而多种代谢物结构的变化性,使它们难以在一种条件下同时获得分离与检测,而且样品的预处理及衍生化也常

会造成化合物结构的改变,对那些不含生色团的代谢物又难以用紫外检测,这些均使操作复杂。同位素标记法在技术上的要求则更高。NMRS 法与以上两种方法不同,它可用于体外和体内的研究,用体液测定时也常不需要作任何预处理,因此代谢产物不易被破坏和漏检,由于方法是非特异性的,在同一样品中所有代谢物(只要含量达到要求)可同时被检出,因此操作简单方便;尤其谱中化学位移的规律及偶合常数、弛豫时间等均可提供有关结构的信息,使 NMRS 方法比 GC 及 HPLC 方法更具可用性。另外用 ^{19}F 谱或 ^{31}P 谱研究分子中只含有一个氟原子或磷原子的药物时,谱中每一处峰代表一种代谢物,谱中位移范围均较宽,可给出好的信噪比,体外测定时还可作定量研究。以下分别介绍 ^1H 、 ^{19}F 、 ^{31}P 及 ^{13}C 谱在药物代谢研究中的应用与方法。

1 ^1H 谱在利用体液进行药物代谢研究时的应用

用 ^1H 谱进行体液测定时,药物代谢物的浓度应高于检测界限($10 \sim 100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$),一般要求约为 $50 \text{ mmol}/\text{dm}^3$,所需样品约为 0.3 ml (5 mm 测试管)。目前国际上用 ^1H 谱进行代谢研究的药物已有很多,由于人及大鼠尿液的 ^1H 谱中, $0.4 \sim 1.7 \text{ ppm}$ 区是内源性物质信号的相对简单区域,可用于观察代谢物的甲基、偕甲基信号,另外芳香氢区域也可方便用于研究。如用 ^1H 谱对布洛芬的研究^[1]。当用 ^1H 谱检测正常人给布洛芬 400 mg 后 $1.5 \sim 4 \text{ h}$ 的尿样时,可看到此尿液谱与未给药时的尿液谱有不同,新的信号均与布洛芬的代谢物有关,这里有在 $0.8 \sim 1.5 \text{ ppm}$ 区的多组偕甲基的双重峰和显

著的甲基单峰以及在 5.4 ppm 的双峰和在 7.25 ppm 处的一组布洛芬芳香氢信号等。其中 5.4 ppm 双峰是葡糖苷酸 β 异构体的偶合物的特征峰,是代谢物与葡萄糖醛酸偶合产生的。为进一步确证代谢物的结构,可用化学的或酶的方法来处理样品,如用 β -葡糖苷酸酶或碱水解样品,再将水解后的样品的谱图与原谱进行比较;也可加入某些化学试剂与样品中的代谢物进行反应,用谱图进一步确证代谢物中的功能基等。氨苄青霉素代谢的研究也是一很好的实例^[2],在 400 MHz NMR 仪器上用 Spin-Echo 方法(90° - τ - 180° - τ -acquire data),检测给药 3~6 h 的大鼠尿液,可清楚地观察到氨苄青霉素的偕甲基和 H-3 的信号,另外谱中还可看到其它三对尖锐的偕甲基双峰信号,它们是 5R-和 5S-青霉酸和氨苄青霉素吡嗪 2,5-二酮衍生物中的偕甲基信号(图 1)。以前从未报道氨苄青霉素吡嗪 2,5-二酮作为氨苄青霉素的代谢物,利用 ^1H 谱后第一次在尿液中观察到这个化合物的存在。

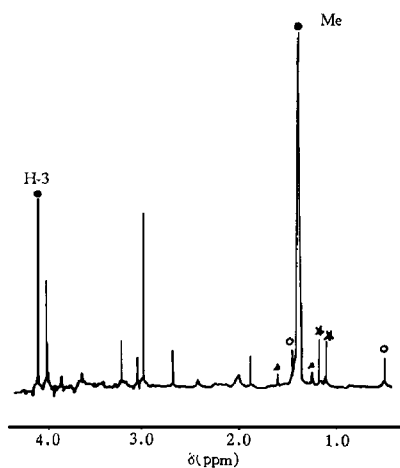


Fig 1 High-field region of the 400 MHz spin-echo ^1H NMR spectrum of the 3~6 h post-dose urine from a rat dosed intravenously with sodium ampicillin. Key to assignment of the gem-dimethyl resonances: ●, sodium ampicillin; ★, (5R)-ampicillin penicilloic acid; ○, (5S)-ampicillin penicillonic acid, and ▲, ampicillin diketopiperazine.

2 ^{19}F 谱在药物体内代谢研究中的应用

由于生物体内没有 ^{19}F 核素,因此 ^{19}F 谱中的峰均来自药物及其代谢物等外源性物质。研

究时常先测 ^{19}F 谱,然后配以 ^1H 谱等手段作确证。应用 ^{19}F 谱研究的药物已有许多,如抗菌素三氟甲基青霉素、消炎镇痛药氟比洛芬、镇静安定药氟奋乃静、抗精神病药三氟拉嗪、麻醉剂氟烷、甲氧氟烷和安氟醚等,其中研究得较为系统的是氟嘧啶类药物,如 5-氟尿嘧啶和氟胞嘧啶等。这些研究有在体液中进行的,也有在切除的组织中、分离的细胞中、灌注的器官中以及在对人体的监测中进行的,由此获得了许多用其它方法难以获得的结果。Sijens 采用了皮下荷 RIF-1 肿瘤的 C_3H 小鼠两组,用腹膜内给药的方式给 5-FU,剂量分别为 $260 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与 $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,2 h 后用 ^{19}F 谱对在体的肿瘤部位及小鼠的肝进行监测,以定量浓度的 NaF 作外标,通过峰面积积分测得了各代谢物的含量,并进行了研究^[3]。给药 $260 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 小鼠的肿瘤谱上可观察到 5-FU(0 ppm)和 Fnuc(4.8 ppm)的信号,其中 5-FU 的信号在 85 min 后消失,但 Fnuc 的信号却在 65 min 后不再随时间的延长而增长。给药 $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的小鼠肿瘤中未能观察到 Fnuc 的信号。肝部谱中可检测到四个信号(5-FU, FBAL, FUPA, Fnuc),连续监测可发现 5-FU 的信号在 125 min 后开始降低,同时 FBAL 和 FUPA 快速增长,而 Fnuc 增长缓慢(图 2 和 3)。将肿瘤中 Fnuc 的变化与肿瘤体积的减小进行相关时,可发现随着 Fnuc 的升高,肿瘤体积明显减小;将 5-FU 在肝中分解代谢的水平(FUPA + FBAL)和肿瘤中 Fnuc 水平进行相关时,结果为线性负相关,进一步表明 5-FU 在肝中代谢为非活化的 FUPA 和 FBAL 的途径与它在肿瘤中产生活化的 Fnuc 的途径的关系是竞争性的。

Malet-Martino 等人利用分离的兔子心脏,用 5-FU 和它的代谢物进行灌注,同时用 ^{19}F 谱监测,研究 5-FU 和它的代谢物对心脏的毒性作用^[4]是另一很好的实例。他们发现,用临床使用的 5-FU 药物灌注分离的兔子心脏可导致兔子心搏停止, ^{19}F 谱中显示灌注液中有氟乙酸(FAC)存在。为确定 FAC 是否是从 FBAL 代谢而来,灌注液中使用这种假设的前体,但未

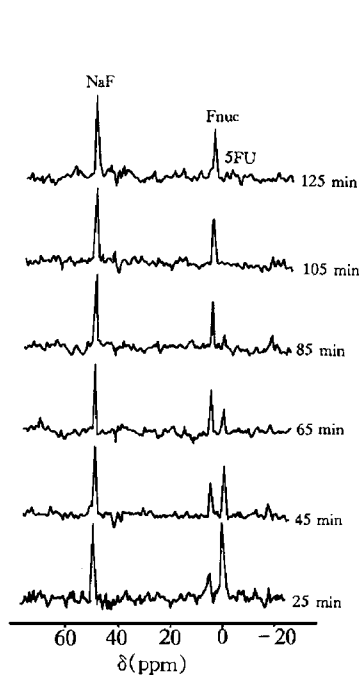


Fig 2 Sequential ^{19}F NMR spectra of a 1080 mm^3 RIF-1 tumor during the first 2 h after i. p. injection of 5-FU ($260 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). For each 20 min acquisition the mean post-treatment time is indicated chemical shifts are indicated in ppm.

发现心脏毒性,也未观察到 FAC 的存在。研究进一步发现,在 5-FU 的碱性溶液储样中(5-FU 溶解在 Tris buffer)有氟乙醛与 Tris buffer 反应产生的恶唑烷的 ^{19}F 信号,当兔子心脏用含这样的化合物的灌流液试验时,心搏停止并可观察到 FAC 的信号。FAC 在使用高剂量的 5-FU Tris Roche 的病人的尿中可测到,并发现随着用药时间的延长,尿中 FAC 的含量也增多。尽管引起心脏毒性的因素很多,但这一 ^{19}F 谱研究结果显现了 5-FU 药物可对心脏产生毒性的一个特点,并可作为延迟发作的临床心脏毒性的一种症状而受到重视。

3 ^{31}P 谱在药物代谢研究中的应用

用 ^{31}P 谱研究的药物尚不多,以下介绍抗肿瘤药环磷酰胺和异环磷酰胺用 ^{31}P 谱研究的结果。

环磷酰胺是一个广谱型的烷化抗肿瘤药,对它的代谢有许多假设,Ludeman 第一次用 ^{31}P 谱不仅在缓冲液中,也在人肿瘤细胞中直接监测了环磷酰胺对肿瘤有选择性的代谢物,为确

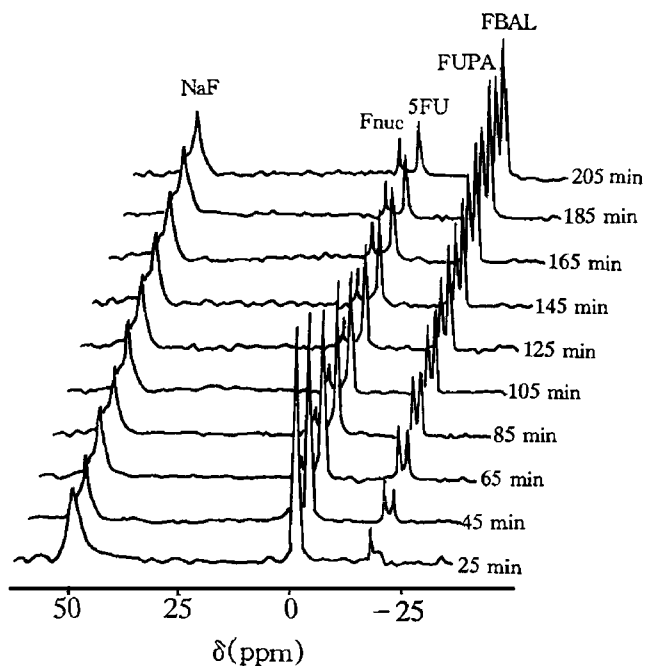


Fig 3 Sequential ^{19}F NMR spectra of the liver region of tumor-bearing C_3H mice during the first 2 h after i. p. injection of $260 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 5-FU.

证每一种代谢物,研究中还使用了 ^1H 谱和 ^{13}C 谱,最后确证了环磷酰胺代谢物 4-羟基环磷酰胺(2)、醛基环磷酰胺(3)和它的水合物(5),以及活化代谢产物磷酰芥(4)的存在(如图 4 所示)^[5]。

Ludeman 用体外灌注的细胞进行的环磷酰胺代谢的动态研究进一步表明这种方法有独特性。利用 U937 人组织淋巴瘤细胞,在灌注培养液中加入制备的代谢物 2/3 后,进行 ^{31}P 谱测定,可观测到化合物 2, 3/5 和 4 的信号。灌注 30 min 后, ^{31}P 谱中化合物 3/5 与 4 的比例达到稳定,为 43:57,表明化合物 4 的消失与生成的速率是类似的。当用去掉含代谢物 2/3 的营养液继续灌注细胞时, ^{31}P 谱中化合物 2 和 3 的信号消失, 4 的信号不因加入 Mn^{++} 而发生变化,(当用只含 4 的营养液灌注时,加入 Mn^{++} 后, 4 的信号全部消失)。这表明化合物 2/3 容易跨膜,细胞膜对化合物 4 是相对不渗透的,细胞内化合物 4 的浓度主要从细胞内的化合物 3 分裂而来。用 ^{31}P 谱继续跟踪细胞内化合物 4

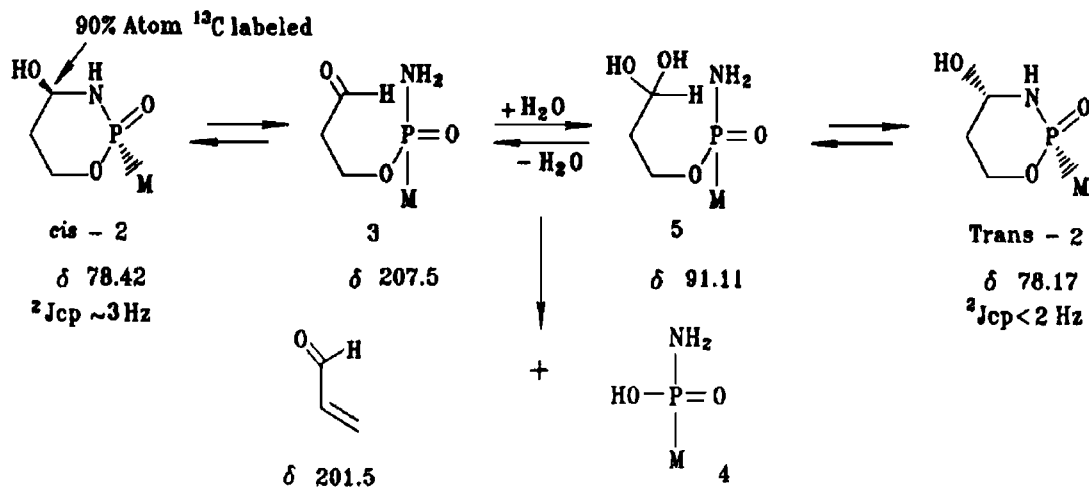


Fig 4 To obtain further supporting evidence for the decomposition of cis-2 in $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lutidine, pH 7.4, 37°C , ^{13}C and ^{31}P spectra were obtained in alternating fashion. According to the chemical shifts of the ^{13}C labeled atoms, metabolites **2**, **3**, **4** and **5** were determined.

的信号,可知化合物 **4** 在细胞内消除符合一级衰减公式,半衰期(约 2 h)比在 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Lutidine 缓冲液中(pH 7.4, 20°C)测出的半衰期(5 h)要短,这反映了化合物 **4** 在消除过程中有酶的干预。同样的实验在 K562 细胞上进行时,代谢物 **4** 的半衰期为 4 h,表明它在 K562 细胞株中的细胞毒反应性比在 U937 细胞株中要小。很明显,以上这些研究结果在缓冲体系中是无法获得的。

异环磷酰胺(IF)是一个具抗肿瘤活性的前药,经肝微粒体酶转化成 4-羟基异环磷酰胺(OHIF)而有活性。以前对 IF 及其代谢物的研究常用 GC 和 HPLC 法,现 Malet-Martino 用 ^{31}P 谱法以体液为样品,研究 IF 在体内的代谢途径^[6]。发现在具转移的软组织肌瘤的病人尿中,除有 IF,羧基异环磷酰胺(CARBOXYIF),2-脱氯乙基异环磷酰胺(2DECLIF),3-脱氯乙基异环磷酰胺(3DECLIF)和 4-羰基异环磷酰胺(KETOIF)外,还有异磷酰芥(IPM);未发现 2,3-双脱氯乙基异环磷酰胺(2,3DECLIF),但观察到它的两个降解产物,说明人体内有 IF 双脱氯乙基的次要代谢途径;在尿中还观察到另外一些 IF 降解的产物信号,但并没有 IF 活化的代谢物 OHIF,醛基异环磷酰胺(ALDOIF)或 IF 及它的代谢物与尿保护剂美司那的偶合物。在 24 h 内,尿排泄物中的 IF 和它的代谢物约

为注射剂量的 39~50%。其中在 0~8 h 及 8~16 h 的尿中,未代谢的 IF 均是主要被测得的化合物,而 2DECLIF 和 3DECLIF 则为其主要代谢产物。用 ^{31}P 谱在血浆中只观察到 IF,当在注射药物 16 h 后,血浆中的 IF 已消失时,在脑脊髓液中仍可观察到 IF 与 3DECLIF,表明 IF 在脑脊髓液中有较长时间的停留,同时这是用 ^{31}P 谱第一次在脑脊髓液中观察到 3DECLIF。

4 ^{13}C 谱在药物代谢研究中的应用

用 ^{13}C 谱进行药物代谢研究的主要困难是 ^{13}C 核素灵敏度低(仅相当于 ^1H 核素灵敏度的 1/32),虽用核磁 NOE 或 DEPT 等技术可提高其灵敏度,但因药物代谢可造成原药分子中标记的 ^{13}C 原子分散在多种代谢物分子中,仍可造成仪器检测的困难。Bhujwala 用选择性极化转移技术(SCPT),使含 ^{13}C 的代谢物获得较好的测定,由此开创了一个不需在药物分子中引入氟原子就可用核磁共振进行药物代谢研究的方法^[7],Bhujwala 用这种方法研究了抗肿瘤药泰莫佐罗(temozolomide,简称 TMZ)的药代动力学。TMZ 对鼠肿瘤、人肿瘤异种移植体、不能手术的人神经胶质瘤均有显著活性,当用皮下有 RIF-1 瘤的小鼠,静脉或腹腔给药 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量时(此剂量可与临床用药 $200\sim 920\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ 相比较),用 ^{13}C 谱对在体的小鼠瘤

体进行测定,可知药物在瘤体内的半衰期约为 60 min,这与 Stevens 在血浆中测得的药物半衰期相符。由于研究已表明 TMZ 的活性形式 MTIC 在缓冲液中的半衰期是 TMZ 的 1/50,因此它在¹³C 谱中是难以测到的。测定中发现用两种给药方式的小鼠瘤体中,药物的摄取与清除率有明显的不同,这种对同一瘤系在体测定所得的不同结果,表明了直接监测瘤体内的药代动力学是十分必要的。

NMRS 法虽有不需预处理样品、不需同位素标记、所有代谢物可同时被测得以及可跟踪药物的体内转化、有准确可重复等优点,但它不能测定对映体的比例(这时需加位移试剂),且与 GC, HPLC 等技术相比不够敏感等缺点。体内研究虽可直接监测体内各器官或部位中药物的代谢,但目前尚有三个障碍:一是分辨率不够高,信号变宽或重叠,造成结构类似的化合物不易识别;二是灵敏度不够高,对体内的药物浓度要求较高,另外为获得较好的信噪比,虽可将表面线圈加大,但这可使观察的信号不仅来自肿瘤组织,也会来自正常组织,使特异性削弱。三是准确的定量测定比较困难,目前进行体内定量研究的药物还只限于含氟和锂的化合物。

从以上进行的药物代谢研究可看出,核磁共振谱方法在进行药物代谢研究中确有其独特之处,目前由于仪器灵敏度的限制,首先选择用剂量较大的药物,或有氟或磷原子的药物,或在药物分子中引入氟原子、¹³C 原子等,都可利用 NMRS 进行药物代谢研究。从方法学考虑,体外的体液测定和细胞灌注法测定较易于掌握,且体外测定的方便性,不仅有助于我国缺少高分辨核磁共振仪器的医院与有此种仪器的研究单位进行合作研究,还有助于丰富目前我国药物代谢研究的手段,提高研究水平。体内测定因需有可放入动物及人体的宽腔仪器才可进

行,而目前我国尚缺少条件,因此可先从体外或体液开始,逐步过渡到体内研究。目前我国生物核磁技术的应用在生物学,药理学及医学等领域还刚刚起步,军事医学科学院已建立了用³¹P 谱进行大鼠体内监测研究的技术和体液¹H 谱测定的技术,并开展了一系列研究工作;我们则建立了体外悬浮细胞和灌注细胞的测试方法,开展了有关药物对人早幼粒白血病 HL-60 和 NB-4 细胞作用的研究等;这些均为用 NMRS 方法进行药物代谢的研究创造了很好的条件。我们相信,只要我国科学工作者在这一领域继续努力,在不久的将来,用 NMRS 进行药物代谢的研究不仅可成为常规的研究方法,在我国新药研究中发挥出重要的作用,也一定会使我国在这一领域的研究水平赶上目前世界的研究水平。

参 考 文 献

- 1 Wilson ID, Nicholson JK, Ghauri FYK, *et al.* *Anal Proc*, 1991, **28**:217
- 2 Everett JR. *Anal Proc*, 1991, **28**:181
- 3 Sijens PE, Huang YM, Baldwin NJ, *et al.* *Cancer Res*, 1991, **51**:1384
- 4 Malet-Martino MC, Martino R. *Biochimie*, 1992, **74**:785
- 5 Ludeman SM. In: Jaroszewski JW, ed. *NMR Spectroscopy in Drug Research, Alfrebenzon Symposium 26. Copenhagen: Munksgaard*, 1988:488~506
- 6 Martino R, Crasnier F, Chouini-Lalanne N, *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, **260**:1133
- 7 Artemov D, Bhujwalla ZM, Maxwell R, *et al.* *Magnet Reson Meth*, 1995, **34**:338