

LC/DAD/MSD 技术研究大鼠服药胆汁中盐酸非洛普 I 相代谢产物

丁黎^{1*}, 张正行¹, 倪沛洲², 王广基³, 安登魁¹

(1. 中国药科大学药物分析教研室; 2. 有机化学教研室; 3. 新中新药研究中心, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 研究大鼠服药后胆汁中盐酸非洛普(DDPH) I 相代谢物。方法 大鼠做胆管插管, 分别收集 ip DDPH 之前的空白胆汁及服药后 12 h 内的服药胆汁, 将大鼠胆汁以葡糖醛酸酶水解后进 C-18 SPE 小柱进行纯化富集, 再进行 LC/DAD/MSD 分析; 同时将合成的 6 个 DDPH 模拟代谢物 $M_1 - M_6$ 的对照品混合液按相同条件进行 LC/DAD/MSD 分析对照。结果 大鼠服药胆汁色谱图中峰 A, B, C, D, E 和 F 分别与 M_1, M_2, M_3, M_5, M_4 和 M_6 的保留时间、紫外吸收光谱、分子量及碎片离子完全一致。结论 M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 和 M_6 为大鼠 ip DDPH 后产生的体内 I 相代谢物。

关键词: 盐酸非洛普; I 相代谢物; LC/DAD/MSD; 药物代谢

中图分类号: R917; R914 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2001)03 - 0205 - 05

盐酸非洛普(phenoprolamine hydrochloride) 化学名为 1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙氨基)丙烷盐酸盐, 简称 DDPH, 为一种新的 α_1 受体拮抗剂, 有良好的降压活性^[1,2]。现正进行 II 期临床研究。DDPH 在体内代谢较快, 大鼠 ig DDPH 后达峰时间 T_{max} 为 20 min, 消除半衰期 $T_{1/2}$ 为 64 - 88 min, 大鼠 iv DDPH 后以原型药物排出体外的量不足 0.5%。为研究 DDPH 在体内的生物转化过程, 本文研究了大鼠 ip DDPH 后胆汁中的 I 相代谢产物。

材料与 方法

仪器、试剂及动物 Hewlett Packard 1100 系列 LC/DAD/MSD; Hypersil ODS2 5 μm , 30 cm \times 4.6 mm ID 液相色谱柱(大连依利特科学仪器有限公司); 500 mg 6 mL C-18 SPE 小柱(美国 Alltech 公司); β -葡糖醛酸酶(Sigma G 5897 Lot57H6825); 1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3-甲氧基-4-羟基苯乙氨基)丙烷(M_1), 1-(2,6-二甲基-3-羟基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙氨基)丙烷(M_2), 1-(2,6-二甲基-4-羟基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙氨基)丙烷(M_3), 1-(2,6-二甲基-4-羟基苯氧基)-2-(3-羟基-4-甲氧基苯乙氨基)丙烷(M_4), 1-(2,6-二甲基-3-羟基苯氧

基)-2-(3-羟基-4-甲氧基苯乙氨基)丙烷(M_5) 和 1-(2,6-二甲基-4-羟基苯氧基)-2-(3-甲氧基-4-羟基苯乙氨基)丙烷(M_6) 对照品由中国药科大学有机化学教研室合成; δ Sprague-Dawley 大鼠 220 - 250 g 购于中国药科大学动物室。

DDPH 溶液的配制: 称取 DDPH 1 g 置 100 mL 量瓶中, 以 0.2% 吐温-80 水溶液溶解并定容, 摇匀, 得浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDPH 溶液。

给药方案及样品采集 SD 大鼠以乌拉坦麻醉后固定于鼠板上, 打开腹腔做胆管插管, 收集空白胆汁 2 mL 后, 每 3 h ip 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DDPH 水溶液(10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及生理盐水 8 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 收集第 1 次给药后 12 h 内的服药胆汁。

胆汁样品酶水解及纯化方法 取胆汁 2 mL, 置 10 mL 离心管中, 加入 pH 4.6 的醋酸盐缓冲液 1 mL 及 2 000 U (6 mL) 葡糖醛酸酶, 涡旋 10 s 使混匀, 加塞密闭, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中温孵 16 h, 取出, 分置于 5 支离心管中, 各管中分别加入 4 倍量甲醇, 涡旋 10 s, 放置 1 h 以沉淀蛋白, 3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 倾取上清液, 置 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中以氮气流吹至余水层, 经活化的 C-18 SPE 小柱, 弃去滤液, 小柱以甲醇-水(1:10) 6 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 小柱继续以甲醇 6 mL 洗脱, 收集甲醇洗脱液, 置 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中以氮气流吹干, 加入 200 μL 流动相, 涡旋 20 s, 以 15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, 供 LC/DAD/MSD 分析用。

HPLC 条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 5 μm , 30 cm \times 4.6 mm ID, 柱温 22 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为甲醇-水-冰

收稿日期: 2000-07-11

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK970077)

作者简介: 丁黎, 男, 副教授。

* Tel: (025) 3225913, Fax: (025) 3301655,

E-mail: dingli88@public1.ppt.js.cn

乙酸三乙胺(150: 350: 1: 1), 流速 1 mL·min⁻¹。

DAD 条件 检测波长(波长/波宽): 278/16 nm; 参比波长(波长/波宽): 360/100 nm; UV 光谱数据采集范围为 210 - 400 nm, 步长 2 nm; 阈值 1.0 mAU。

MSD 条件 采用电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)模式, 雾化器压力为 276 kPa, 电喷雾接口干燥气(N₂)流速为 10 L·min⁻¹, 干燥气温度为 350 °C, 毛细管电压 4 000 V。LC/ESI-MS 分析采用正离子检出模式, HPLC 柱后洗脱液经分流后以 0.3 mL·min⁻¹ 的流速到达雾化器, 质谱数据采用扫描型检测模式获得, 质谱扫描范围 m/z 110 - 450。源内碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)电压根据不同的试验目的分别采用二种方式:

① 采用 70 V CID 电压, 观察总离子流色谱图(TIC)中各峰所对应化合物的系列准分子离子峰, 即 [M + H]⁺, [M + Na]⁺ 和 [M + K]⁺ 峰, 以确定各峰对应化合物的分子量 M。② 采用 150 V CID 电压, 使准分子离子峰裂解成相应的碎片离子, 观察准分子离子的裂解模式, 根据特征碎片离子谱鉴定 DDPH 代谢产物结构。

结果与讨论

1 DDPH 及其代谢物的 MS 裂解模式及特征碎片离子

DDPH 及其代谢物的一级 MS 裂解模式见图 1, 相应特征碎片的质荷比及 ESI-MS 中可检测出的准分子离子(apparent ions)的 m/z 值见表 1。

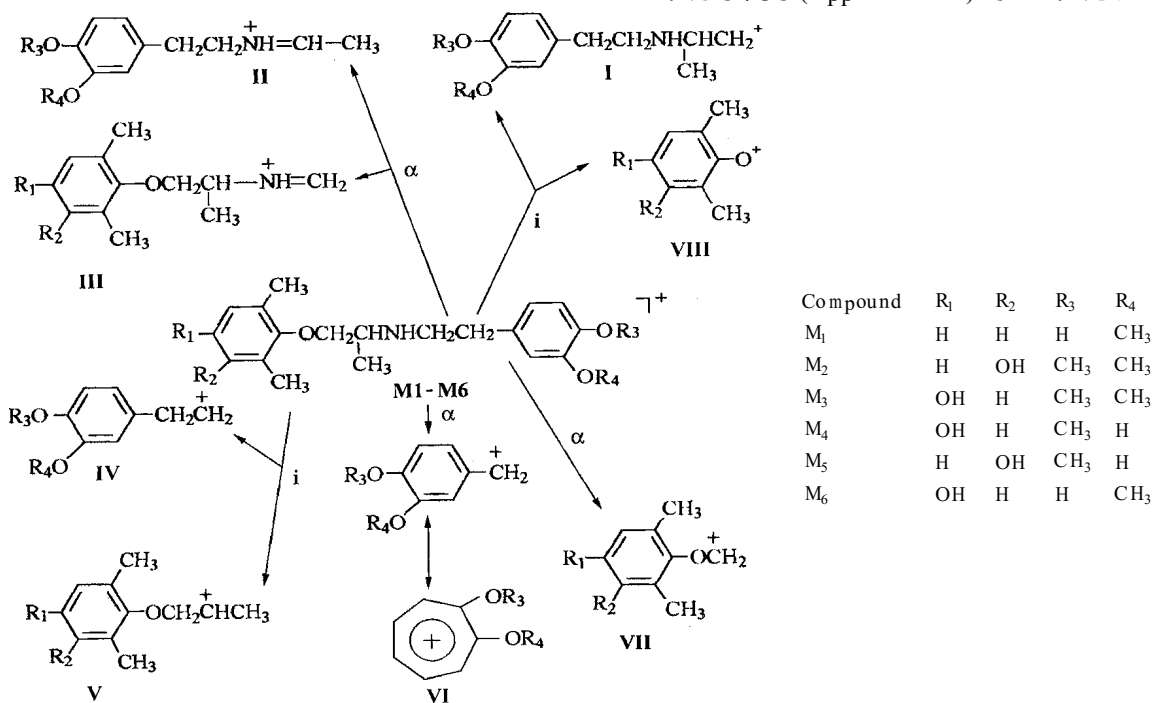


Fig 1 Typical fragmentation of phenoprolamine (DDPH) and its metabolites (M₁ - M₆). I - VIII are the MS fragments of M₁ - M₆. The m/z values of fragment I - VIII of M₁ - M₆ are listed in Tab 1. "α" and "i" mean the two different fragmentation patterns of DDPH

Tab 1 Summary of key MS fragmentation for phenoprolamine (DDPH) metabolites after electrospray ionization (ESI) and collision induced dissociation (CID)

Metabolite	ESI apparent molecular ion (m/z)			CID fragment (m/z)							
	[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + K] ⁺	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
M ₁	330	352	368	208	194	192	151	163	137	135	121
M ₂	360	382	398	222	208	208	165	179	151	151	137
M ₃	360	382	398	222	208	208	165	179	151	151	137
M ₄	346	368	384	208	194	208	151	179	137	151	137
M ₅	346	368	384	208	194	208	151	179	137	151	137
M ₆	346	368	384	208	194	208	151	179	137	151	137

M₁ - M₆ are the metabolites of DDPH. I - VIII are the MS fragments of M₁ - M₆

2 LC/ESI-MS法中CID电压的选择

为观察 LC/ESI-MS 的总离子流色谱图(TIC)中各峰所对应化合物的准分子离子峰,及准分子离子峰被撞碎后的特征碎片离子谱(product ion spectrum),须对CID的电压进行选择。试验中选择70,100,130,150,200 V 5种CID电压,以DDPH的3个代表性I相代谢物 M_1 , M_2 和 M_4 对照品为对象进行试验。结果表明,当CID电压为70 V时, M_1 , M_2 和 M_4 几乎不裂解,它们的质谱图中基本只能观察到各自的2个准分子离子峰,即 $[M+H]^+$ (基峰)和 $[M+Na]^+$ 峰(MS谱局部放大后 $[M+K]^+$ 峰也可观察到,但强度很小)。由此可见,将CID电压设为70 V时,可通过寻找 $[M+H]^+$ (基峰)、 $[M+Na]^+$ (次基峰)和 $[M+K]^+$ 3个系列准分子离子峰来判断DDPH I相代谢物的分子量。当CID电压为100 V时,它们的质谱图中 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰仍为基峰和次基峰,而特征碎片离子峰很少。当CID电压为130 V时,质谱图中出现较多的碎片离子,且特征碎片离子也可见到,但强度较弱。当CID电压增至150 V时,3个代谢物的质谱图中均有较多碎片离子峰产生,特征碎片离子相对丰度较大,基峰也为特征碎片离子,准分子离子 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰的相对丰度降至20%-40%。当CID电压继续增至200 V时,碎片离子峰太多,且特征碎片离子相对丰度并不强,准分子离子峰的相对强度也很小,这种情况反而不利于代谢物的结构鉴定。

3 大鼠服药胆汁中DDPH代谢产物的鉴定

取大鼠空白胆汁及服药胆汁分别按“胆汁样品酶水解及纯化方法”项下操作后进行LC/DAD/MSD分析。另取 M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 和 M_6 适量以流动相配成分别含 M_1 和 M_2 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; M_3 , M_4 , M_5 和 M_6 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的代谢物对照品混合溶液,按与分析胆汁样品相同的LC/DAD/MSD条件进行分析。

大鼠空白胆汁酶水解样品、服药胆汁酶水解样品、代谢物对照品混合溶液的总离子流色谱图见图2。图2结果显示,大鼠服药胆汁色谱图中峰A,B,C,D,E,F的保留时间分别与代谢物对照品混合液总离子流色谱图中 M_1 , M_2 , M_3 , M_5 , M_4 , M_6 的保留时间一致,而大鼠空白胆汁酶水解样品色谱图在这些峰位处并无干扰峰出现。

以下对色谱馏分A-F进行结构鉴定。由于篇幅有限,本文只列A(即 M_1)的有关色谱及光谱图。

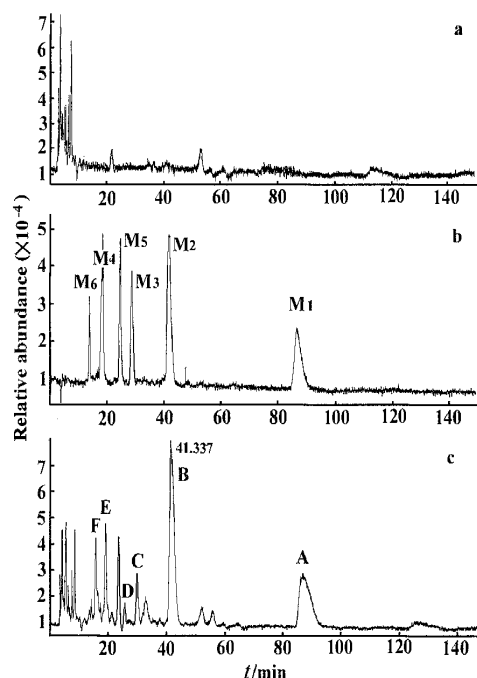


Fig 2 Total ion chromatograms of β -glucuronidase treated blank rat bile (a), solution of mixture reference standards of DDPH metabolites (b) and β -glucuronidase treated rat bile after ip DDPH (c). M_1 - M_6 are the synthesized reference standards of phenoprolamine metabolites. A - F are phenoprolamine metabolites in rat bile

馏分A 将DAD采集的A的紫外光谱图与在相同的LC/DAD条件下采集的 M_1 的紫外光谱图进行对照比较(图3)。结果显示A的紫外光谱图与

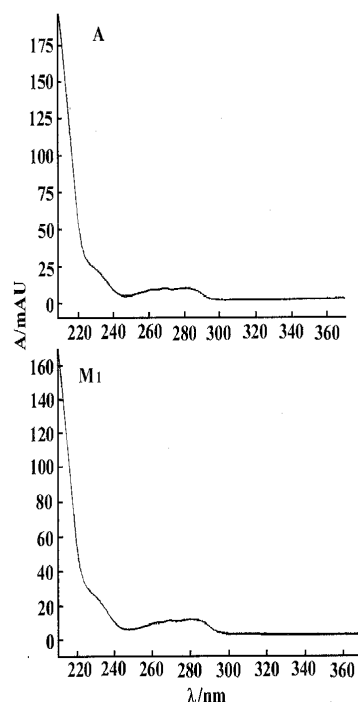


Fig 3 DAD UV spectrum of peak A and M_1

M₁ 的紫外光谱图一致,均在 278 nm 附近有吸收峰,这是 DDPH 母体结构骨架的特征吸收。以上结果说明 A 可能为 DDPH 的代谢物。A 采用 70 V CID 电压获得的反映分子量信息的质谱图见图 4。

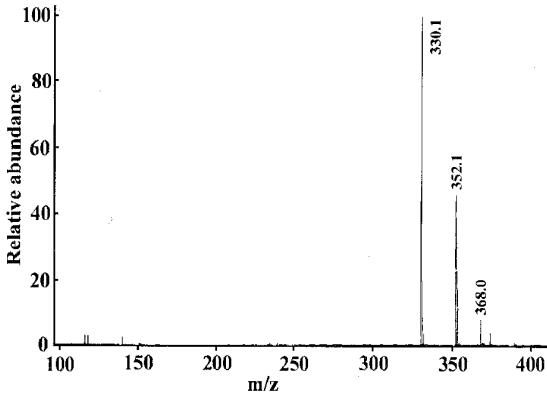


Fig 4 70 V CID mass spectrum of peak A

图 4 显示 A 在 70 V CID 电压条件下获得的 ESI-MS 图中有准分子离子峰 m/z 330[M + H]⁺, 352[M + Na]⁺ 和 368[M + K]⁺, 说明其对应化合物的分子量与 M₁ 相同,为 329。A 及 M₁ 在相同 LC/DAD/MSD 条件下采用 150 V CID 电压获得的反映准分子离子峰特征裂解途径的质谱图见图 5。图 5 显示

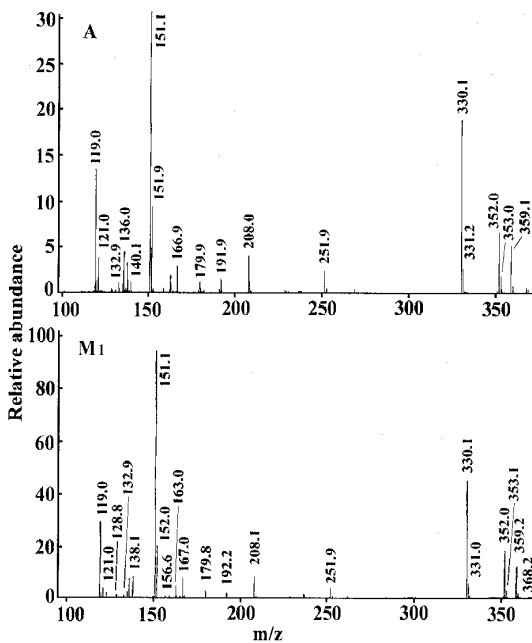


Fig 5 150 V CID mass spectrum of peak A and M₁

A 在 150 V CID 电压条件下获得的准分子离子的裂解模式与 M₁ 相同,它们的 CID MS 图谱一致,两者有相同的特征碎片离子峰 m/z 330[M + H]⁺, 352[M + Na]⁺, 368[M + K]⁺, 208, 194, 192, 163, 151

(基峰), 137, 135, 121。根据 A 与 M₁ 的保留时间、紫外吸收光谱、分子量及分子离子裂解模式均完全一致,故鉴定 A 即为 M₁。

馏分 B-F 的鉴定步骤同 A, 结果见表 2。

Tab 2 ESI-MS fragments, UV spectra and identified conclusions of fraction A-F

Fraction	70 V CID fragment (m/z)	150 V CID fragment (m/z)	UV spectrum	Identified as
A	330[M + H] ⁺ 352[M + Na] ⁺ 368[M + K] ⁺	368[M + K] ⁺ , 352[M + Na] ⁺ , 330[M + H] ⁺ , 208, 194, 192, 163, 151, 137, 135, 121 Consistent with M ₁	Consistent with M ₁	M ₁
B	360[M + H] ⁺ 382[M + Na] ⁺ 398[M + K] ⁺	398[M + K] ⁺ , 382[M + Na] ⁺ , 360[M + H] ⁺ , 222, 208, 179, 165, 151, 137, 121 Consistent with M ₂	Consistent with M ₂	M ₂
C	360[M + H] ⁺ 382[M + Na] ⁺ 398[M + K] ⁺	398[M + K] ⁺ , 382[M + Na] ⁺ , 360[M + H] ⁺ , 222, 208, 182, 179, 165, 152, 151, 137, 135, 121 Consistent with M ₃	Consistent with M ₃	M ₃
D	346[M + H] ⁺ 368[M + Na] ⁺ 384[M + K] ⁺	384[M + K] ⁺ , 368[M + Na] ⁺ , 346[M + H] ⁺ , 208, 179, 151, 137, 121 Consistent with M ₅	Consistent with M ₅	M ₅
E	346[M + H] ⁺ 368[M + Na] ⁺ 384[M + K] ⁺	384[M + K] ⁺ , 368[M + Na] ⁺ , 346[M + H] ⁺ , 208, 179, 167, 151, 138, 137, 121 Consistent with M ₄	Consistent with M ₄	M ₄
F	346[M + H] ⁺ 368[M + Na] ⁺ 384[M + K] ⁺	384[M + K] ⁺ , 368[M + Na] ⁺ , 346[M + H] ⁺ , 208, 194, 179, 165, 151, 138, 137, 121 Consistent with M ₆	Consistent with M ₆	M ₆

综上所述, M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ 和 M₆ 为大鼠 ip DDPH 后产生的体内 I 相代谢物,即非结合型代谢物,其中 M₂ 为主要代谢物(量最多),其次为 M₁。有关 DDPH 在大鼠体内的 II 相代谢物(葡糖醛酸结合物)将另文报道。

REFERENCES:

[1] Ni PZ, Peng JH, Xia L, et al. Synthesis and antihypertensive activity of α_1 -adrenoceptor antagonist DDPH analogs [J]. *J China Pharm Univ* (in Chinese), 1996, 27(7): 395 - 400.

[2] Peng JH, Ni PZ, Xia L, et al. Synthesis and antihypertensive activities of aroxyalkylamines related to α_1 -adrenoceptor antagonist DDPH [J]. *J China Pharm Univ* (in Chinese), 1998, 29(2): 81 - 91.

STUDY ON THE PHASE I METABOLITES OF PHENOPROLAMINE HYDROCHLORIDE IN RAT BILE BY LC/ DAD/ MSD

DING Li¹, ZHANG Zheng-xing¹, NI Pei-zhou², WANG Guang-ji³, AN Deng-kui¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis; 2. Department of Organic Chemistry;
3. Xinzhong New Drug Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: AIM To study the phase I metabolites of phenoprolamine hydrochloride (DDPH) in rat bile. **METHODS** DDPH was administered ip to bile duct-cannulated rats. Bile samples were collected before administration and up to 12 h after administration. After being treated with β glucuronidase, the bile samples were purified and enriched with C-18 SPE columns, and then were analyzed by LC/ DAD/ MSD. The samples containing synthesized reference standards of DDPH metabolite 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenylethylamino)-propane (M_1), 1-(2,6-dimethyl-3-hydroxyphenoxy)-2-(3,4-methoxyphenylethylamino)-propane (M_2), 1-(2,6-dimethyl-4-hydroxyphenoxy)-2-(3,4-methoxyphenylethylamino)-propane (M_3), 1-(2,6-dimethyl-4-hydroxyphenoxy)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenylethylamino)-propane (M_4), 1-(2,6-dimethyl-3-hydroxyphenoxy)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenylethylamino)-propane (M_5) and 1-(2,6-dimethyl-4-hydroxyphenoxy)-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenylethylamino)-propane (M_6) were analyzed by LC/ DAD/ MSD under identical conditions. **RESULTS** The retention times, UV spectra, molecular weights and production spectra (obtained by collision-induced dissociation) of the apparent ions of peak A, B, C, D, E and F in the total ion chromatogram of DDPH treated rat bile sample were consistent with those of M_1 , M_2 , M_3 , M_5 , M_4 and M_6 , respectively. **CONCLUSION** M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 and M_6 were identified as the phase I metabolites of DDPH in the rat.

KEY WORDS: phenoprolamine hydrochloride; phase I metabolite; LC/ DAD/ MSD; drug metabolism