

人胆汁中罗红霉素代谢产物的研究

李雪庆, 钟大放*, 吴硕东¹, 王爱民, 田 蕾, 于 宏¹(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳 110015; ¹ 中国医科大学第二附属医院, 沈阳 110001)

摘要 目的: 研究人胆汁中罗红霉素的代谢转化产物。方法: 采用高效液相色谱-离子阱质谱法, 对患者 *po* 罗红霉素后的胆汁样品进行了分析。结果: 发现了 13 个代谢产物, 分别为罗红霉素的(9Z)-异构体及其(9E)-, (9Z)-*N*-去甲基和 *N*-双去甲基衍生物和(9E)-及(9Z)-脱克拉定糖衍生物, (9E)-和(9Z)-红霉素肟及其(9E)-和(9Z)-*N*-去甲基及 *N*-双去甲基衍生物, 其中 9 种为新发现的代谢物。结论: 罗红霉素及其代谢物均可在体内发生几何异构化。

关键词 罗红霉素; 代谢物; 人胆汁; 高效液相色谱-离子阱质谱法

罗红霉素(RXM)化学名为(9E)-[O-[(2-甲氧基乙氧基)甲基]肟基]红霉素, 属半合成大环内酯类抗生素。临床主要用于治疗呼吸道及泌尿道感染、皮肤和软组织感染等^[1]。对罗红霉素代谢产物的分析和检测已有报道^[2~6], 在尿中检出 4 种代谢产物, 分别为罗红霉素的 *N*-去甲基和 *N*-双去甲基衍生物、罗红霉素脱克拉定糖衍生物以及红霉素肟。尽管证明罗红霉素主要经胆汁排泄, 但未见对胆汁中代谢产物的报道。近年来发展起来的 LC/MS 联用技术能直接分析溶液样品, 特别适合分析复杂介质中极性高、难挥发或热不稳定的化合物, 在药物代谢研究中得到了越来越广泛的应用。本文采用 (+) ESI-MSⁿ 离子阱技术, 对一名患者 *po* 罗红霉素后胆汁中罗红霉素的代谢物进行了定性分析, 并用 HPLC/MSⁿ 联用法对代谢物及其相对含量进行了初步研究。在实验中共检出 13 种代谢物, 其中 9 种未见报道。

材 料 与 方 法

试剂与仪器 罗红霉素片(沈阳埃默药业有限公司); 罗红霉素对照品(粗品, 含量 95.4%)及红霉素肟对照品(粗品, 含量 96.0%)由沈阳华泰药物研究所提供; 其余化学品均为市售分析纯; 流动相所用有机溶剂为色谱纯。

美国 Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪, 包括 APCI(大气压化学电离)、ESI(电喷雾电离)源以及 LCQ 数据处理系统, 并配有直接进样用注射泵和 250 μ l 进样器; 日本岛津公司 LC-10AD 泵, 包括 7125 Rheodyne 进样阀。

胆汁样品收集 胆管结石患者(女性, 60 岁, 肾功能正常, 肝功能恢复正常)胆囊切除、胆管切开取石、T 形管引流术后, 于恢复稳定期 *po* 罗红霉素片 150 mg(bid)。由 T 形引流管收集服药后 1.5~5 h 流出的胆汁, 于冰箱 -30 $^{\circ}$ C 冷冻保存, 待测。

胆汁样品的前处理 方法 1: 取 Sep-Pak C₈ 固相萃取柱, 用水 3 ml、甲醇 3 ml、水 3 ml 依次进行洗涤, 待用。取胆汁样品 0.5 ml, 以蒸馏水 0.5 ml 稀释后, 用微孔滤膜(0.45 μ m)过滤。滤液以 30 滴 \cdot min⁻¹的速度通过上述已活化的 Sep-Pak C₈ 固相萃取柱。用水 3 ml 洗涤后, 再用甲醇 2 ml 洗脱。洗脱液用于 (+) ESI-MSⁿ 分析。方法 2: 另取胆汁样品 0.5 ml, 加入 Na₂CO₃ 溶液(0.1 mol \cdot L⁻¹)100 μ l 及重蒸乙醚 3 ml, 涡流混合 3 min, 离心 10 min。分取有机层, 于 40 $^{\circ}$ C 下氮气流吹干。残留物以流动相 100 μ l 溶解, 用于 HPLC/MSⁿ 分析。

(+) ESI-MSⁿ 分析条件 离子源喷射电压: 4.0 kV; 毛细管温度: 150 $^{\circ}$ C; 毛细管电压: 27 V; 鞘气(N₂); 流速: 0.3 L \cdot min⁻¹; 注射泵进样速度: 10 μ l \cdot min⁻¹; 采集范围: *m/z* 150~1000。

样品的 (+) ESI-MSⁿ 分析方法 取胆汁固相萃取洗脱液, 用注射泵将其直接导入 ESI 离子源, 选择正离子方式检测。先用全扫描一级质谱方式获得待测物的准分子离子峰 [M+H]⁺, 然后利用 (+) ESI-MSⁿ 离子阱技术对准分子离子峰及其碎片离子峰进行多级质谱分析, 获得相应的子离子质谱图。

HPLC-MSⁿ 分析条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 不锈钢柱(5 μ m 粒径, 200 mm \times 4.6 mm ID, 天津凯德公司); 流动相: 甲醇-乙腈-水(含 10 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵)(10:43:47); 流速: 0.3 ml \cdot min⁻¹; 柱温: 20 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ l。质谱参数设置: 离子源喷射电压 4.25 kV; 毛细管温度 180 $^{\circ}$ C; 毛细管电压 30 V; 鞘气

收稿日期: 1998-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39625025)

* 联系人 Tel: (024)23843711-3445, Fax: (024)23891576,

E-mail: zhongdf@inw.com.cn

流速 0.75 L·min⁻¹; 辅助气流速 0.15 L·min⁻¹。采用全扫描一级质谱、选择离子检测(SIM)及选择离子二级全扫描质谱(full scan MS²) 3种方式同时测定。

结 果

1 胆汁中代谢产物的(+)ESI-MSⁿ 分析

在(+)ESI-MS 全扫描一级质谱条件下,测得胆汁中有一组罗红霉素相关物质的准分子离子峰,分别为 m/z 837, 823, 749, 735 和 679, 其中 m/z 837, 823, 679 和 749 分别与罗红霉素及文献报道^[2]的 3 个代谢产物(罗红霉素的 N-去甲基衍生物、脱克拉定糖衍生物及红霉素脲)的质荷比相符,均为 [M+H]⁺ 峰。根据报道的另一个代谢产物(罗红霉素的 N-双去甲基衍生物,其分子量为 808)及上述观察结果推测还可能存在红霉素脲的 N-双去甲基衍生物(分子量为 720)。本文采用全扫描检测时局部放大及选择离子检测的方法,观察到 m/z 809, 721 质荷比处均有较弱的准分子离子峰[M+H]⁺ 存在。为进一步了解这些物质的质谱断裂规律,本文采用 ESI-MSⁿ 离子阱技术分别对这 7 个准分子离子进行 MS² 级质谱分析。发现除 m/z 679 离子外,均有丢失中性碎片 158 u 的子离子产生,它们可能是由母离子脱去克拉定糖生成。对 m/z 837, 749 进一步进行 MS³ 级质谱分析,并与罗红霉素及红霉素脲同样条件下所得的各级质谱对照,质谱断裂规律完全一致,证明胆汁样品中存在罗红霉素及代谢物红霉素脲。根据文献报道及质谱断裂规律,判断 m/z 823 和 809 两准分子离子是罗红霉素 N-去甲基和 N-双去甲基代谢物, m/z 679 为罗红霉素脱克拉定糖代谢物。新发现的 m/z 735 和 721 两准分子离子分别比红霉素脲少 14 和 28 个质量数,即分子中分别脱去 1 个及 2 个甲基,根据其质谱断裂情况及上述代谢物的质谱特征,可判断二者为红霉素脲 N-去甲基和 N-双去甲基代谢物。胆汁中各化合物相应的(+)ESI-MS² 全扫描质谱图见图 1。

2 胆汁中代谢物的 HPLC/MSⁿ 色谱-质谱行为

在(+)ESI-MSⁿ 的研究基础上,本文选择 m/z 837, 823, 809, 749, 735, 721 和 679 7 个离子进行 HPLC/MSⁿ 分析。图 1 包括了胆汁样品经色谱分离后得到的总离子流色谱图和选择离子检测(SIM)色谱图。从各 SIM 色谱图观察,并经总离子流质谱和 MS² 级质谱确认,发现每个 SIM 色谱图中均出现一对 MS¹ 级和 MS² 级质谱完全相同的色谱峰。因为罗红霉素结构中具有一个(9E)-构型的脲醚结

构,推测它很可能在代谢过程中发生异构化,生成(9Z)-异构体,因而出现两个色谱峰。本文考察了罗红霉素对照品,发现除在 30.3 min 保留时间的主峰外,在 19.4 min 处还有一个含量小于 1% 的小峰,其 MS¹ 级和 MS² 级质谱与罗红霉素完全相同,判断即为合成过程中引入的(9Z)-异构体(罗红霉素片中未检出该异构体);而胆汁中 SIM 方式检测 m/z 837 离子观察到的两色谱峰的保留时间与对照品中观察到的色谱峰一致,因而可认为 19.4 min 色谱峰对应的物质是罗红霉素的(9Z)-异构体代谢物。同理,通过红霉素脲对照品的研究,证明保留时间 12.2 及 15.7 min 分别为(9Z)-和(9E)-红霉素脲代谢物。推测其余各对代谢物也均为(9Z)-和(9E)-异构体代谢物,(9Z)-较(9E)-异构体先出峰。罗红霉素及其代谢产物的 HPLC/MSⁿ 数据见表 1。本文采用 HPLC-ECD 法对胆汁样品的色谱行为进行考察,发现质谱检测中 m/z 679 和 749 所对应的色谱峰在电化学检测器上都有响应,说明它们结构中的氨基糖没有发生变化,进一步证明 m/z 679 峰为罗红霉素脱克拉定糖代谢物。

Tab 1 HPLC/MS data of roxithromycin (RXM) and its metabolites (M1~M13)

Compound	<i>t</i> _R /min	MS ¹	MS ²		
		m/z(M+H) ⁺	m/z (%)	m/z (%)	m/z (%)
RXM(9E)	30.3	837	679(100)	661 558	522
M7 (9Z)	19.4	837	679(100)	661 558	522
M3 (9E)	15.1	823	665(100)	647 558	522
M10 (9Z)	11.5	823	665(100)	647 558	522
M5 (9E)	11.8	809	651(100)	544	508
M12 (9Z)	10.3	809	651(100)	544	508
M2 (9E)	15.7	749	591(100)	558 540	434
M9 (9Z)	12.2	749	591(100)	558 540	434
M4 (9E)	12.3	735	577(100)	544 508	434
M11 (9Z)	10.7	735	577(100)	544 508	434
M6 (9E)	11.6	721	563(100)	494	434
M13 (9Z)	10.3	721	563(100)	494	434
M1 (9E)	15.1	679	558	540 522(100)	504
M8 (9Z)	11.7	679	558	540 522(100)	504

MS¹: Full scan MS; MS²: Full scan MS/MS.

3 代谢途径

综合以上的研究结果,推测罗红霉素在人体内的代谢途径见图 2。

将同一加样胆汁样品(罗红霉素 4 μg·ml⁻¹)经方法 2 提取后所得溶液重复进样 6 次,计算仪器响应的重现性,罗红霉素峰面积的相对标准偏差(RSD)为 3.1%,说明仪器定量的重现性良好。根据胆汁中各代谢物以 SIM 方式检测的色谱峰面积,

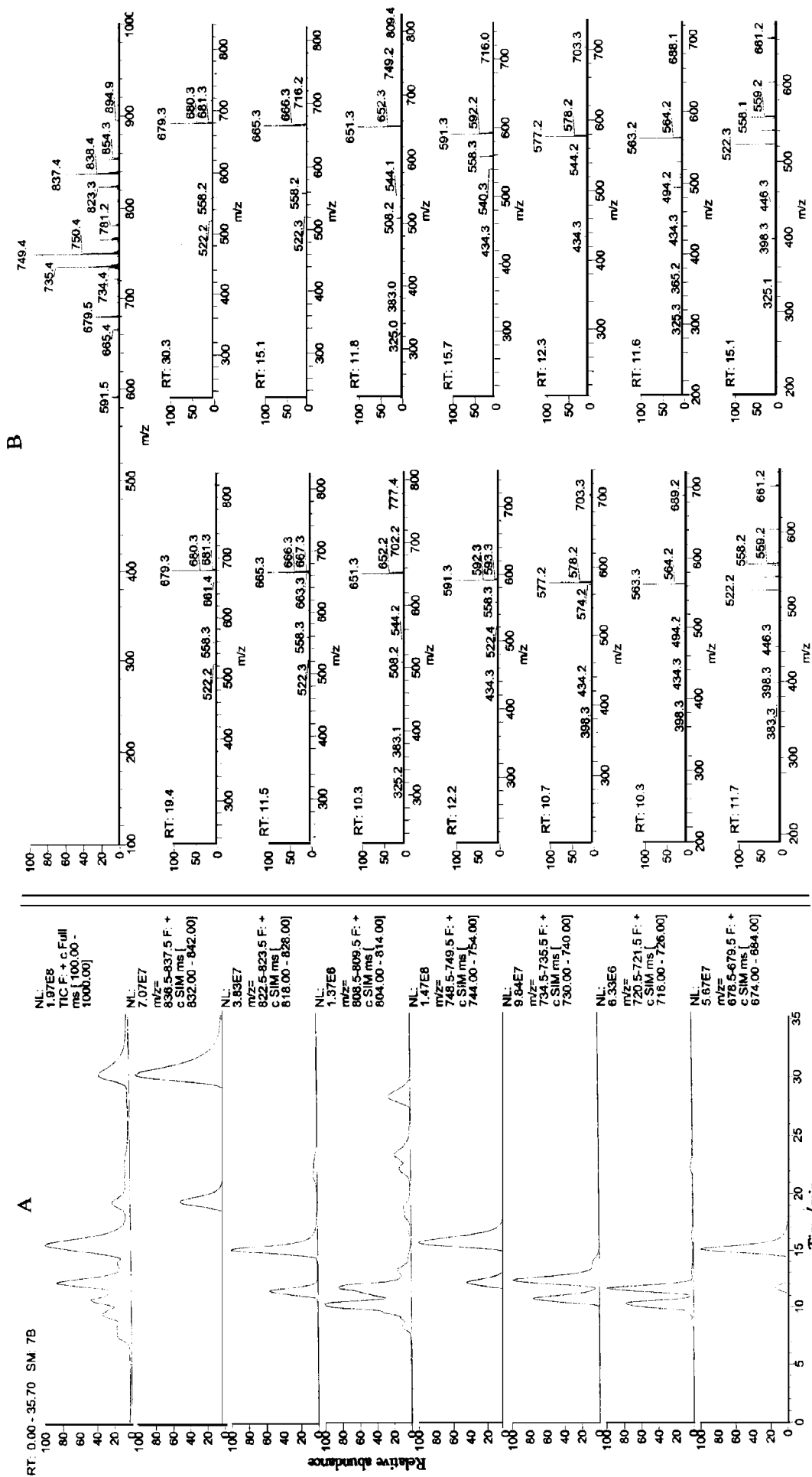


Fig 1 TIC, SIM chromatograms (A) and full scan MS¹(B, top) and MS² spectra (B, bottom) corresponding to the chromatographic peaks in the same row in A) of roxithromycin (RXM) and its metabolites in human bile. The ionic species monitored were m/z 837 for RXM and M7, m/z 823 for M3 and M10, m/z 809 for M5 and M12, m/z 749 for M2 and M9, m/z 735 for M4 and M11, m/z 721 for M6 and M13, m/z 679 for M1 and M8.

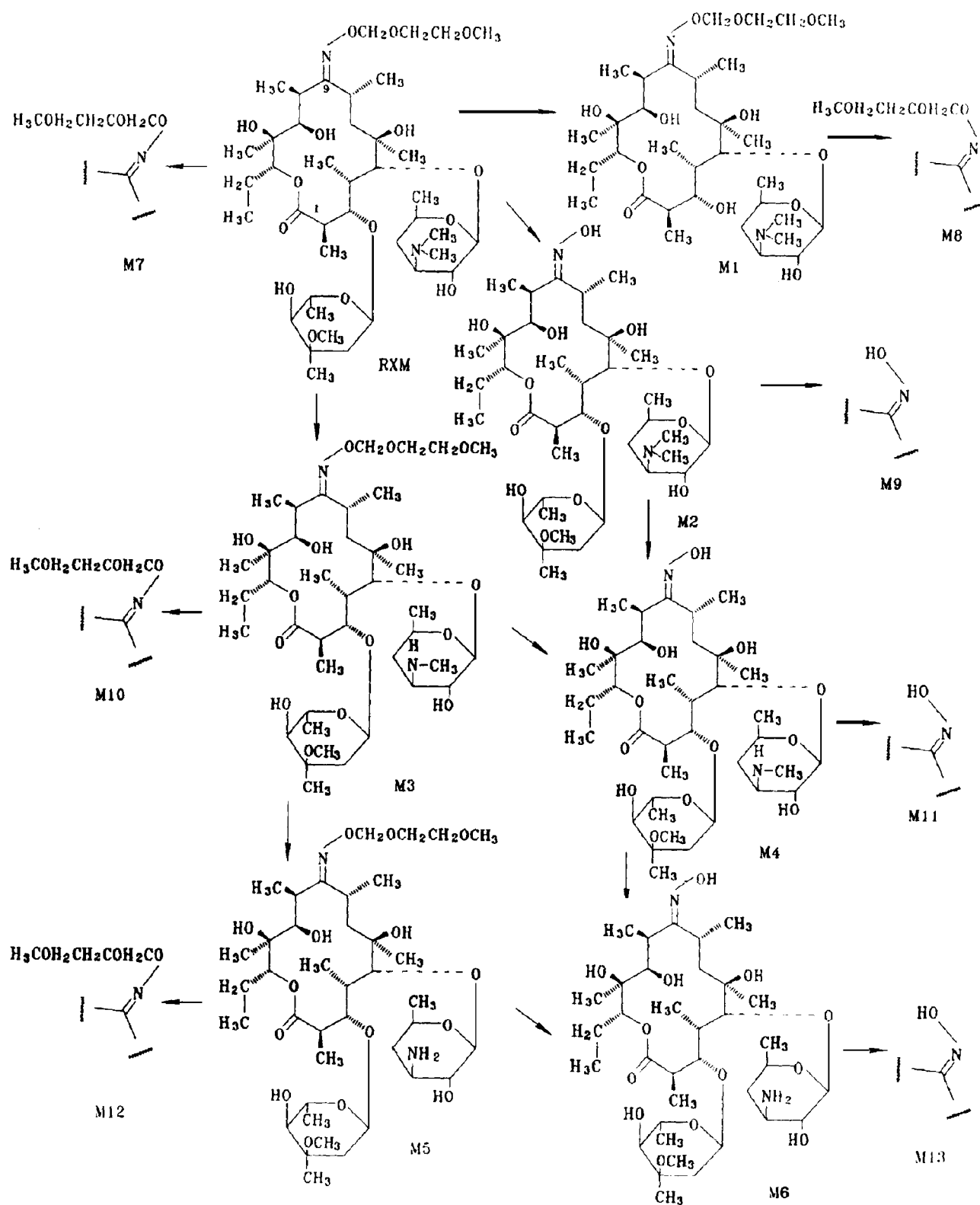


Fig 2 Proposed metabolic pathways of roxithromycin (RXM) in human.

估算各组分相对含量,结果见图3。通过与加样胆汁样品比较,求出胆汁样品中罗红霉素浓度为 $4.26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

讨 论

ESI 是一种软电离方式,利用 ESI-MSⁿ 离子阱

技术可在温和条件下获得待测物的准分子离子峰。MSⁿ 多级质谱可给出丰富的化合物分子的结构信息,特别由于其选择性强,碎片离子质谱图重现性好,使这项技术在未知化合物的推测中具有非常重要的意义。本文采用 HPLC/MSⁿ 联用技术,进一步从色谱行为上确证了代谢产物,并发现了发生构型

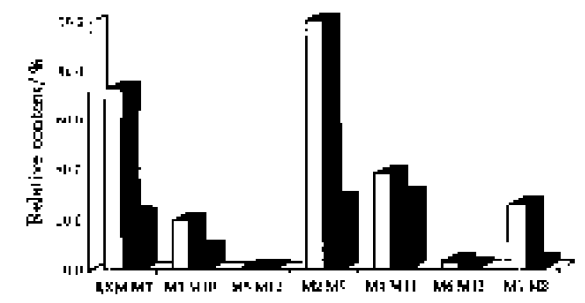


Fig 3 Relative contents of roxithromycin (RXM) and its metabolites (M1 ~ M13) in human bile.

Compounds with 9E configuration:

Compounds with 9Z configuration.

转化的代谢产物,丰富了对药物代谢产物立体选择性规律的认识。

本项研究结果初步表明在人胆汁中罗红霉素代谢产物的量远大于原形药,这与文献^[2,3]报道的血浆及尿中的代谢情况有所不同。胆汁中罗红霉素原形药浓度占总代谢物的20%左右,罗红霉素及代谢物含量由多到少依次排列为:M2, RXM, M4, M11, M9, M1, M7, M3, M10, M6, M8, M13, M12, M5。值

得注意的是,罗红霉素及其代谢物均可在体内发生几何异构化,(9Z)-与(9E)-异构体的浓度比值介于0.11~0.79之间,进一步的研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 任淑萍,孟雅君.罗红霉素国内临床应用研究进展.中国临床药理学杂志,1997,13:124
- 2 Koyama M, Tateno M, Shiotsuka M, *et al.* Absorption, metabolism and excretion of RU28965 in humans. *Chemotherapy*, 1988, 36(Suppl 4):164
- 3 Shiotsuka M, Yamamoto T, Hirayama M, *et al.* High performance liquid chromatography of RU28965 and its metabolites in body fluid. *Chemotherapy*, 1988, 36(Suppl 4):138
- 4 Esumi Y, Zin Y, Ban S, *et al.* Absorption, distribution, metabolism and excretion of RU 28965 in animals. *Chemotherapy*, 1988, 36(Suppl 4):148
- 5 Young RA, Gonzalez JP, Sorkin EM. Roxithromycin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*, 1989, 37:8
- 6 Markham A, Faulds D. Roxithromycin. An update of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 1994, 48:297

STUDIES ON METABOLITES OF ROXITHROMYCIN IN HUMAN BILE

Li Xueqing (Li XQ), Zhong Dafang (Zhong DF)*, Wu Shudong (Wu SD)¹,
Wang Aimin (Wang AM), Tian Lei (Tian L) and Yu Hong (Yu H)¹

(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015; ¹The Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001)

ABSTRACT AIM: To study the metabolites of roxithromycin (RXM) in the bile of a patient, who had received an oral dose of 150 mg RXM after gallbladder operation. **METHODS:** High-performance liquid chromatography/ion trap mass spectrometry was used to determinate RXM and its metabolites in human bile. The bile sample was collected, extracted with diethyl ether and separated on a C₁₈ reversed-phase column with (+)ESI-MSⁿ detection. **RESULTS:** RXM and its thirteen metabolites were identified in the sample based on reference substances and mass spectra. These include descladinose-RXM (M1), erythromycin-oxime (M2) and its N-mono- and N-didemethylated derivatives (M4 and M6), N-mono- and didemethylated derivatives of RXM (M3 and M5), as well as the (9Z)-epimeric isomers of RXM and all its above metabolites (M7~M13). The ratios of (9Z)- to (9E)-isomers were found to be between 0.11~0.79. The parent drug remained was about 20% of the total bile metabolites. **CONCLUSION:** The metabolic pathways of RXM observed in the human bile are therefore quite different to those in human plasma and urine. The identification of the isomerization of the oximes of RXM derivatives represents a novel biotransformation pathway.

KEY WORDS roxithromycin; metabolites; human bile; HPLC/MS

* Corresponding author