

对映体选择性测定尿中N-甲基-1-(3,4-亚甲二氧苯基)-2-丙胺及其代谢物

曾 苏 (浙江医科大学药物分析教研室, 杭州 310031)

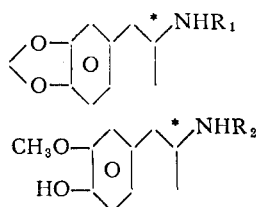
摘要 建立了尿中N-甲基-(3,4-亚甲二氧苯基)-2-丙胺及其代谢物对映体浓度的分析方法。药物经手性衍生化后,于非手性GC固定相上分离。采用该法测定了大鼠尿中各对映体浓度,结果表明药物及其代谢物均呈立体选择性代谢。

关键词 对映体选择性 手性衍生化试剂 药物代谢 药物分析

N-甲基-1-(3,4-亚甲二氧苯基)-2-丙胺(I)是一近年来被滥用的苯丙胺(Amphetamine)类药物,其生物体内主要代谢物有^[1]; 1-(3,4-亚甲二氧

苯基)-2-丙胺(II)、N-甲基-1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-2-丙胺(III)和1-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-2-丙胺(IV),等(图1)。据研究,药物的手性异构体可

呈现不同的药理作用和毒性^[2-4], 如 S-(+)-I 异构体显著减少脑中 5-羟色胺, 产生强烈且持久的中枢神经毒性, 而 R-(-)-I 异构体的作用则弱得多。本文应用 N-t 氟丁酰基-L-脯氨酸 (N-HFB-L-PCL) 作为衍生化试剂^[5-7], 于生物样品中进行衍生化反应, 然后用非手性 GC 毛细管柱分离各对映异构体, 其分离度为 1.3—4.0; 方法回收率在 64% 以上, 线性范围是 5—1000 ng/ml。大鼠尿中各对映体浓度的分析表明: 药物 I 及其代谢物呈立体选择性代谢。



I $R_1 = \text{CH}_3$ II $R_1 = \text{H}$ V 内标 $R_1 = \text{C}_3\text{H}_7$
 III $R_2 = \text{CH}_3$ IV $R_2 = \text{H}$ * 手性中心

图 1 药物及其代谢物的化学结构式

实验部分

试剂与仪器 β -葡萄糖苷酶、N-丙基-1-(3,4-二甲氧苯基)-2-丙胺(V 内标物)、MBTFA、化合物 I 和 II 等均购自 Sigma。N-HFB-L-PCL 按文献^[5]制备, 其它试剂均为分析纯。

Finigan MAT 4500 GC/MS, 色谱柱 DB 1301—15 M—0.25 μ 石英毛细管柱, 离子化方式: 负离子化学电离(NCI), CI 气体: CH_4 , 离子源温度: 100°C, 进样口温度: 275°C, 接口温度: 275°C, GC 载气: He, GC 升温程序: 100°C(4min) 10°C/min $\rightarrow$ 300°C

分析方法 1 ml 尿加入 800 ng 内标物, 调节 pH 至 5, 加 0.5 ml 含 1000 u β -葡萄糖苷酶的醋酸钠缓冲液(pH 4.8), 于 37°C 水浴恒温振荡 16 h。酶水解液的 pH 调至 2, 加 4 ml EtOAc 提取 15 min, 分取水层, 调 pH 至 9, 加入 0.5 ml pH 9.0 缓冲液和 40 μ l N-HFB-L-PCL, 立刻于室温反应 30 min。反应液加 KCl 至饱和后调 pH 至 9, 加 4 ml EtOAc 提取 15 min, 分取有机层并用 2 ml 去离子水洗涤, 有机层加无水 Na_2SO_4 干燥后, 挥干, 残渣加 50 μ l 乙腈/MBTFA (1:1), 密闭后于 80°C 反应 30 min, 吸取 1 μ l 供分析用。选择性离子监测

(SIM) 各药物的 m/z 是: 466(I), 472(II), 584(III)、570(IV), 494(V 内标物)

结果和讨论

各对映体对的保留行为、分离度和理论塔板数 将一定量标准品溶于 pH 9.0 缓冲液中, 依法操作, 各对映体进样量 2 ng, SIM 模式分析, 结果列于表 1 和图 2。

表 1 各对映体的色谱行为和柱效

对映体		RT	n	α	R
I	R	13.92	2.86	1.01	1.39
	S	14.07	2.91		
II	R	12.95	2.63	1.02	2.70
	S	13.27	2.73		
III	R	12.55	4.54	1.01	1.35
	S	12.43	4.47		
IV	R	11.72	3.78	1.03	4.00
	S	12.25	3.55		
V	R	13.99	3.14	1.01	1.43
	S	14.18	3.20		

RT: 保留时间(min), n: 理论塔板数(万/米), α : 分配系数比, R: 分离度

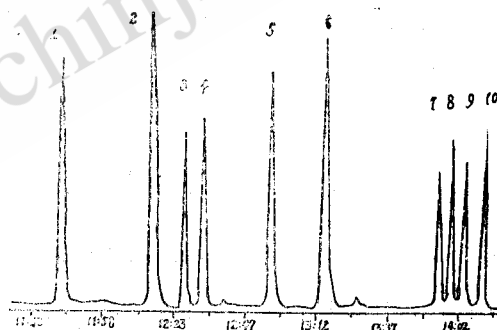


图 2 药物及其代谢物对映体的重建离子流色谱图(RIC)

1: R-IV, 2: S-IV, 3: S-III, 4: R-III,
 5: R-II, 6: S-II, 7: R-I, 8: R-V,
 9: S-I, 10: S-V

V 为内标

各对映体对的 NCI 质谱图完全一致, 用常规方法无法区别, 采用 N-HFB-L-PCL 衍生化后, 形成的酰胺类非对映体对由于相互间理化性质的差

异,而得以在非手性 GC 固定相上差速迁移获得分离(图3)。

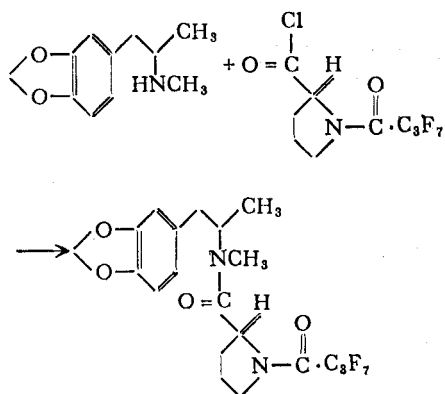


图3 N-HFB-L-PCl与手性胺类药物
形成酰胺类非对映体衍生物示意图

线性范围

取1 ml空白尿样加入不同浓度的对照品和800 ng内标,依法操作,以浓度对药物与内标的峰面积比求得回归方程(表2)。各对映体在5—1000 ng/ml浓度范围内线性良好, $r > 0.996$ 。

表2 药物对映体的线性回归方程

药 物		$Y = ac + b (n=8)$		r
I	R	8.302×10^{-4}	4.938×10^{-2}	0.9990
	S	5.076×10^{-4}	5.134×10^{-2}	0.9989
II	R	2.596×10^{-3}	5.920×10^{-2}	0.9979
	S	9.418×10^{-3}	4.892×10^{-3}	0.9983
III	R	6.831×10^{-4}	1.747×10^{-2}	0.9983
	S	7.033×10^{-4}	2.309×10^{-2}	0.9975
IV	R	6.464×10^{-5}	1.465×10^{-2}	0.9965
	S	6.726×10^{-5}	6.645×10^{-3}	0.9977

回收率试验

取16支干净试管,8支为一组。其中一组添加40 ng各对照品,另一组添加1000 ng各对照品。每组4支试管预先加有1 ml去离子水,另外4支则为1 ml空白尿样,依法操作,尿样于挥发前加入内标。以尿样与水样结果之比,计算得方法的回收率(%)。R-I 67.18 ± 3.27 , S-I 70.50 ± 4.12 ; R-II 64.59 ± 7.76 , S-II 67.74 ± 4.93 ; R-III 71.13 ± 8.43 , S-III 71.47 ± 5.94 ; R-IV 88.61 ± 11.59 , S-

S-IV 83.45 ± 7.69 。各对映体的回收率约在64%以上, $RSD < 13.1\%$ 。

采用逐步稀释法,测得的最低检测量(LOD)为1—2 ng/ml 信噪比 > 3 ; 最低定量浓度(LOQ)为5 ng/ml, $RSD < 16.1\%$ ($n=4$), 信噪比 > 10 。

尿中药物及其代谢物对映体分析

11只SD大白鼠(200—250 g),皮下给予I 10 mg/kg,于代谢笼中收集24 h尿样,过滤。取滤液1.0 ml,依法操作,测定结果列于表3。分析结果表明:毒性大的母体药物I的S-对映体从体内排泄较慢(R/S 1.37)易蓄积体内发生毒理作用,其它代谢物也呈现立体选择性代谢。主要代谢物为II和I。

表3 24h尿中各对映体的浓度($\mu\text{g/ml}$)

		$\bar{x} \pm s$	R/S
I	R	25.15 ± 16.33	1.37 ± 0.10
	S	18.75 ± 12.92	
II	R	5.08 ± 2.97	0.66 ± 0.08
	S	7.66 ± 4.03	
III	R	11.96 ± 8.51	1.35 ± 0.16
	S	8.73 ± 5.97	
IV	R	0.65 ± 0.31	0.31 ± 0.08
	S	2.29 ± 1.22	

参 考 文 献

- 1 Lim HK, Zeng S, Comparison of metabolism of MDMA in rats, Toxicologist, 1991, 11(1):50
- 2 曾苏. 手性色谱学与手性药物分析. 现代应用药学, 1993, 10(5):4
- 3 曾苏, 章立, 刘志强. RP-HPLC/CPA 分析尿中氧氟沙星对映体. 药学报, 1994, 29(3):223
- 4 曾苏. GC/MS 测定人尿和肝中的d-甲基苯丙胺. 中国法医学杂志, 1994, 9(1):25
- 5 曾苏. GC 手性衍生化试剂N-七氟丁酰基-L-脯氨酸的合成和应用. 色谱, 1994, 12(5)
- 6 曾苏, 沈向忠. 体内药物对映体的测定方法. 国外医药—合成药、制剂、生化药分册, 1994, 15(1):41
- 7 曾苏, 章立, 沈向忠, 刘志强. GC 拆分药物光学异构体. 色谱, 1994, 12(4)

收稿日期: 1994-04-19

Enantioselective Determination of N-methyl-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamine
and Its Metabolites in Rats Urine

Zeng Su

(College of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031)

Abstract It is described that a method for analysis of the enantiomeric concentrations of N-methyl-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamine and its primary metabolites in rats urine. The diastereomers were resolved on an achiral GC column after chiral derivatization. The experimental results indicated that the pairs of enantiomers of the drug and its metabolites showed the stereoselective disposition in rats.

Key words Enantioselective Chiral derivatization reagent Analysis of drug and metabolites

(on page 3)