

胺碘酮活性代谢物去乙基胺碘酮的生物制备及定量分析

刘学红¹, 郭瑞臣², 王本杰² (1. 山东省交通医院药剂科, 济南 250031; 2. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012)

摘要: 目的 建立以胺碘酮对照品间接定量去乙基胺碘酮及反相高效液相制备色谱分离、纯化去乙基胺碘酮的方法。方法 取胺碘酮分别每日 40 mg/kg, 共 10 d, 30 mg/kg, 共 4 d 喂服的杂种狗肺组织, 经匀浆、萃取、浓缩, 在下述条件纯化、定量、定性: Waters C₁₈ 制备柱 (25 mm × 250 mm, 10 μm), 流速 10.0 mL/min; 依利特分析柱 Hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL/min, 流动相乙腈-100 mmol/L 醋酸 (含 15 mmol/L 二乙胺) (55:45), 检测波长 237.5 nm, 柱温室温; 质谱条件, 正离子模式, 离子源 AP-ESI, 离子扫描范围 300 ~ 700 amu。结果 去乙基胺碘酮摩尔校正因子 (f_1) 与胺碘酮分别为 1.104 ± 0.02 和 1.020 ± 0.01 。喂服胺碘酮的狗肺组织, 经萃取、浓缩、纯化, 可获得纯度较高的去乙基胺碘酮单一化合物。结论 从动物组织中提取

制备去乙基胺碘酮样品为去乙基胺碘酮生物制备提供了依据;根据摩尔校正因子,胺碘酮对照品可用于间接定量去乙基胺碘酮。

关键词:胺碘酮;去乙基胺碘酮;高效液相色谱法;液相色谱-质谱法;定量;制备

中图分类号:TQ464.5 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)05-0396-04

Preparation and quantification of desethylam iodarone

LIU Xue-hong¹, GUO Rui-chen², WANG Ben-jie² (1. Pharmaceutical Department of Shandong Traffic Hospital, Jinan 250031, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the indirect quantification of desethylam iodarone with am iodarone as a standard by HPLC and to isolate and purify desethylam iodarone from tissues of am iodarone fed-dog with preparation-HPLC column. **METHODS** The selected hybrid dog was orally given 40mg/kg am iodarone per day for 10 days and then 30mg/kg for 4 days, then executed and lung tissue collected, in which the active metabolite, desethylam iodarone, was isolated, concentrated and purified under the following conditions: Waters C₁₈ column (25mm × 250mm, 10μm) was used to separate and purify desethylam iodarone, with mobile phase of acetonitrile-100mmol/L acetic acid containing 15mmol/L diethylamine (55:45, v/v), and at room temperature and a flow rate of 1.0 mL/min; Hypersil ODS₂ column (4.6mm × 250mm, 5μm) was used to analyze am iodarone and desethylam iodarone, with the same mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 237.5nm; atmospheric pressure electronic spray ionization (AP-ESI) and ion mass spectral (*m/z*) of 618.1 (*M* + *H*) were selected. **RESULTS** The *f*₁ of desethylam iodarone and that of am iodarone were 1.04 ± 0.02 and 1.020 ± 0.01, respectively. Desethylam iodarone was separated and purified from the lung tissue of am iodarone-fed-dog by preparational HPLC and its content was determined by HPLC. **CONCLUSION** The results of the study supply assistance for the preparation of desethylam iodarone. Desethylam iodarone can be quantified according to *f*₁ of am iodarone indirectly.

KEY WORDS: am iodarone; desethylam iodarone; high performance liquid chromatography (HPLC); HPLC-MS; quantification; preparation

胺碘酮 (am iodarone, AM)为临床常用的抗心律失常药,半衰期长,经人体多态酶代谢,其活性代谢物去乙基胺碘酮 (desethylam iodarone, DEA)具有与母体相似的生物活性和电生理效应,存在 AM效应的较大个体差异。因此,根据 AM及 DEA血浓度制定、修饰、调整 AM剂量方案,可最大限度地增加治疗效应,降低不良反应,克服经验用药,或仅根据 AM血浓度用药的不足和局限性。

DEA在市场上尚无商品流通,从而限制了其药理作用、相对活性及血浓度等相关研究和临床应用。由于 AM与 DEA主结构基本一致,本研究拟探讨无 DEA对照品时以 AM间接定量 DEA的可行性,寻找简单实用的 AM和 DEA定量方法。

狗大剂量灌服 AM,在肝药酶作用下,AM代谢生成 DEA,广泛分布于各组织,以狗肺组织含量最高^[1]。本研究拟采用 DEA生物制备方法采用生物样本纯化法,从狗肺组织分离、制备、纯化 DEA样品,为 AM活性代谢物的研究、开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器试剂

Waters 600E高效液相色谱仪, Millennium32数据处理系统 (美国 Waters分析仪器公司); HPL100LC-MSD液相色谱-质谱联用仪, 1100 Series色谱工作站 (美国 Agilent分析仪器公司); J11型高速离心机 (上海分析仪器厂); CX-250超声

波清洗器 (北京医疗设备厂); AX205梅特勒天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海)有限公司)。

盐酸胺碘酮片 (江苏晨牌药业有限公司, 200mg/片, 批号 011113); AM对照品 (山东省平原制药厂提供, 99.5%); DEA对照品 (赛诺菲公司提供, 99.7%); 他莫西芬对照品 (济南东风制药厂提供, 99.5%)。甲醇、乙腈 (色谱纯, TEDIA, USA), 醋酸、二乙胺、异辛烷、异丙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾 (分析纯, 市售), 娃哈哈纯净水 (27层净化), 市售。

工作液配制: 分别精密称取 AM, DEA, 他莫西芬对照品适量, 置 50mL量瓶中, 甲醇溶解定容, 配制 1mg/mL工作液, 冷藏备用。

1.2 色谱、质谱条件

分析条件: 流动相为乙腈-100mmol/L醋酸 (内含 15mmol/L二乙胺) (55:45), Waters 996二极管阵列检测器, ODS₂ C₁₈柱 (4.6mm × 250mm, 5μm, 大连依利特), 流速 1.0 mL/min, 进样体积 50μL, 柱室温度^[2]。

制备条件: 流动相为乙腈-100mmol/L醋酸 (内含 15mmol/L二乙胺) (55:45), Waters 996二极管阵列检测器, Waters C₁₈柱 (25mm × 250mm, 10μm), 流速 10.0 mL/min, 进样体积 1.5mL, 氮气 50mL/min在线脱气。

定性条件: 流速 1.0 mL/min, 分流比 2:1, 进样体积 20μL, 正离子模式, 离子源 AP-ESI, 离子源温度 100℃, 雾化压力 30psi, 氮气保护气 10L/min, 毛细管电压 4000V, 碎裂电

压 130V,离子采集 DEA(m/z)扫描范围 300 ~ 700aum。

1.3 波长选择

AM与 DEA相对分子质量分别为 645.32, 616.26, 分子

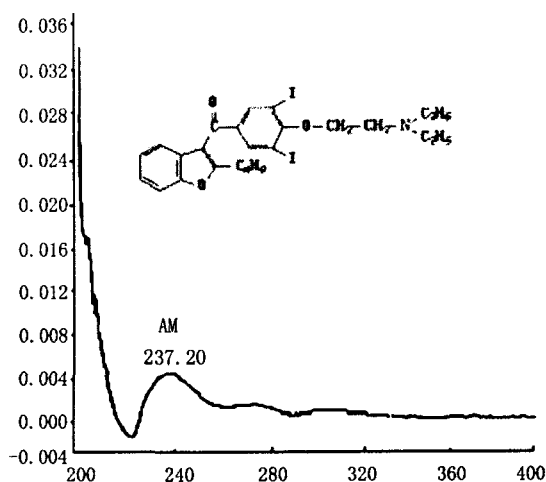


图 1 AM和 DEA化学结构和 195 ~ 400nm 扫描图

Fig 1 Chemical structure and UV spectrogram of AM and DEA

取 AM及 DEA储备液分别稀释至 1.50 nmol/mL, 加入 1 μ g/mL他莫西芬标准溶液 20 μ L, 上述“色谱条件”下, 平行操作 30次, 记录色谱图和峰面积数据。根据公式 $f_i = A_s \cdot m_i / A_i \cdot m_s$ (i 为 AM或 DEA, s 为内标他莫西芬, A 为峰面积, m 为组分和标准物质含量) 求算平均值。

1.5 DEA样品的制备

1.5.1 动物喂养 普通级试验动物房单笼饲养雄性健康成年杂种狗一只, 以 40 mg/kg喂服 10d, 再以 30 mg/kg连续喂服 4d。第 14天服药后 7h, 3%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 静脉麻醉。处死后取肺组织, 生理盐水冲洗, 吸水纸吸去表面水分, 立即液氮冷冻, -20℃保存。

1.5.2 DEA的提取 取肺组织适量, 加 8倍量甲醇 (按重量体积比), 匀浆 5 min, 4500 r/min离心 20 min, 取上清液浓缩干燥。浓缩物于 60℃水浴加入 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液 (pH5.4 甲醇等体积) 酸化, 涡旋 5 min。取酸化液适量, 加 5倍量异辛烷:异丙醇 (80:20) 提取液, 得提取液。

1.5.3 DEA浓缩 提取液涡旋 2 min, 4500 r/min离心 15 min, 取上清液浓缩干燥, 得 DEA粗品。

1.5.4 DEA的纯化 将上述 DEA粗品于 60℃加适量甲醇, 4500 r/min离心 15 min, 取上清液采用制备型高效液相色谱纯化。按“1.2 色谱条件”项下操作, 收集含有 DEA目标点的组分, 减压浓缩干燥, 得纯化后 DEA样品。

2 结果

2.1 DEA标准品、狗组织提取液、粗品、纯化后色谱图及纯化后样品质谱图

AM及 DEA以及内标他莫西芬分析色谱图见图 2。狗肺组织提取液制备、粗品分析、粗品经纯化后 DEA分析色谱图见图 3。纯化后样品质谱图见图 4。

结构及其对照品 195 ~ 400 nm 波长范围光谱扫描图, 见图 1。

237.5 nm 为 AM和 DEA共有最大吸收波长。

1.4 AM与 DEA对照品摩尔校正因子 (f_i) 测定

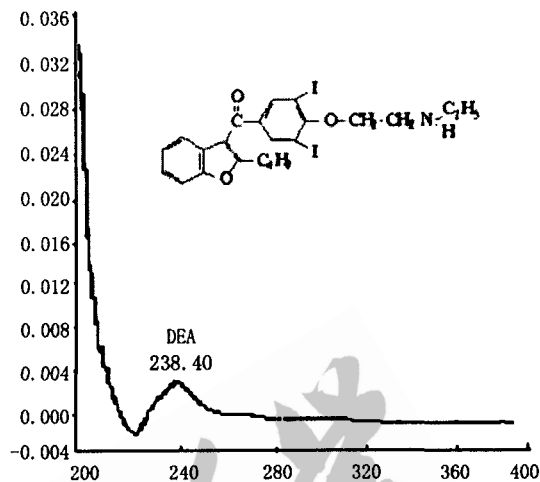


图 1 AM和 DEA化学结构和 195 ~ 400nm 扫描图

Fig 1 Chemical structure and UV spectrogram of AM and DEA

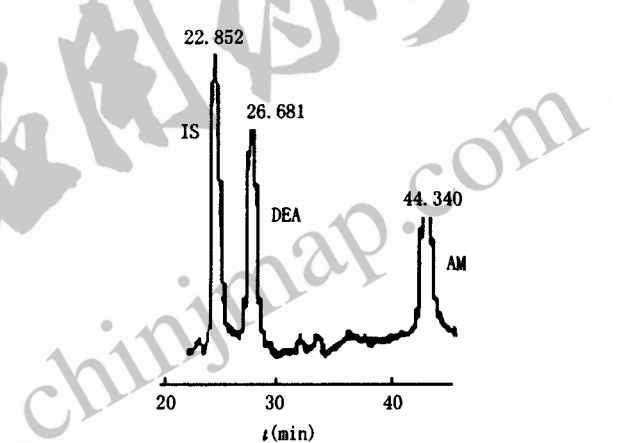


图 2 AM、DEA对照品和内标色谱图

Fig 2 Chromatogram of standard AM, DEA and IS

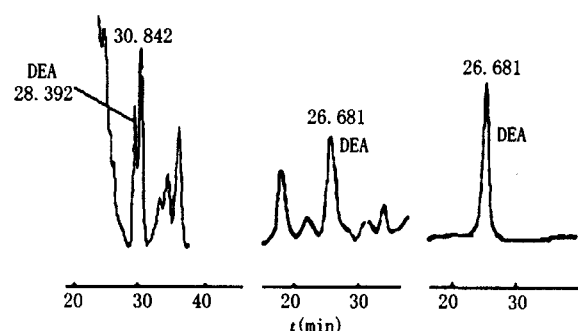


图 3 狗肺组织提取液、粗品和纯化后 (从左到右) DEA色谱图

Fig 3 Chromatograms of DEA extract, before and after purified (from left to right)

纯化后样品 DEA经二极管阵列纯度鉴别、质谱 ($M + H$) 峰扫描范围 300 ~ 700aum, 提示所得 DEA峰为单一化合物峰。

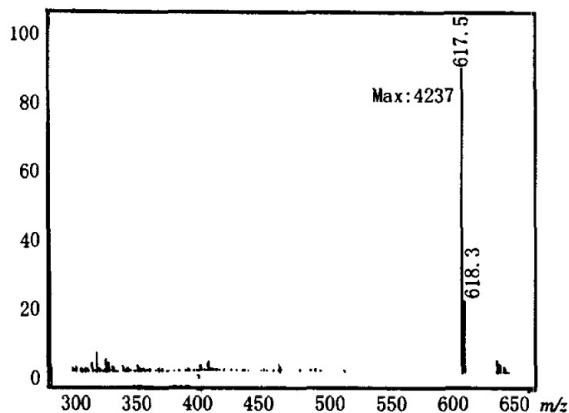


图 4 纯化后 DEA 质谱图

Fig 4 Mass spectrum of purified DEA

2.2 摩尔校正因子

AM 的摩尔校正因子 1.014 ± 0.02 DEA 的摩尔校正因子 1.020 ± 0.01 , 按 $\alpha = 0.05$ 水准, $P > 0.05$ 无统计学意义, 可认为 DEA 摩尔校正因子与 AM 相同。提示可采用 AM 对照品定量 DEA, 从而为 AM 活性代谢物 DEA 血浓度的测定提供了一种新的简单实用的方法。

3 讨论

狗肺组织成分复杂, DEA 含量低, 从喂服 AM 的杂种狗肺组织提取、分离、制备 DEA, 必须严格掌握提取液组成、比例及酸碱度, 才能获得最佳效果。DEA 在 pH 3.5~5.5 有最大脂溶性, 先行样品酸化处理, 可提高萃取率; 异丙醇可破坏样品中表面活性物质, 发生乳化作用, 选用异辛烷: 异丙醇 (80:20) 混合溶液为提取溶剂, 既可有效除去内源性杂质, 又能避免乳化作用发生。酸性介质中, 为增加软 PVC 管柔顺性而添加的酞酸二丁酯等成分极易溶出, 影响 DEA 的提取和测定, 本试验样品处理过程全部采用硬 PVC 管或玻璃管, 从而可最大限度地避免增塑剂影响^[3]。本试验条件下, DEA

与杂质峰分离完全, 峰形良好, 分离度达 70%。但试验耗时长, 提取液量大, 反复浓缩干燥, 为本法不足和局限之处。

本研究成功建立从动物组织分离、纯化 AM 活性代谢物 DEA 方法, 为模拟 DEA 合成的生物环境及条件, 采用生物制备方法体外生物合成 DEA 提供了一条新思路, 即模拟生物条件, 在肝微粒体酶作用下, 使 AM 转化为 DEA, 可避免生物组份干扰, 简化 DEA 制备过程。但如何获取价廉、易得、可反复应用的活性酶尚需进一步研究。

AM 及 DEA 具有特殊的药代动力学及药效学特性, 同时监测两者血浓度可最大限度地发挥 AM 治疗效应, 降低其毒性效应^[4]。AM 活性代谢物的获得, 有助于开展其药理作用、相对活性、临床效应的进一步研究, 实现 AM 治疗的个体化。

参考文献

- [1] Brien JE, Jimmo S, Brennan FJ, Armstrong PW, Abdollah H. Disposition of an idarone and its proximate metabolite, desethyl-an idarone, in the dog for oral administration of single-dose and short-term drug regimens[J]. *Drug Metab Dispos* 1990; 18(6): 846-51.
- [2] Hanioka N, Saito Y, Soyama A, et al. High-performance liquid chromatographic assay for an idarone N-deethylation activity in human liver microsomes using solid-phase extraction[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 774(1): 105-113.
- [3] Peters PG, Hayball PJ. A comparative analysis of the loss of an idarone from small and large volume PVC and non-PVC infusion systems[J]. *Anaesth Intensive Care* 1990; 18(2): 241-245.
- [4] Pollak PT. Altered metabolite concentrations with an idarone generic substitution cannot be observed without monitoring[J]. *Can J Cardiol* 2001; 17(11): 1159-1163.

收稿日期: 2005-02-28