

催醒安在大鼠尿内代谢产物的研究

李 桦 阮金秀 汤炳生* 武力民* 贾敬山*

(军事医学科学院毒物药物研究所, *仪器测试中心, 北京 100850)

提要 催醒安是一种新的中枢性抗胆碱酯酶药。给大鼠灌胃后, 用 HPLC 分离纯化尿提取液中的代谢产物, 得到四个组分。经 MS 鉴定分别为原形药物, N-羟甲基, N-甲基氨基甲酸-[间-(2-二甲氨基)]乙氧基苯酯 (简称羟基化催醒安), N-甲基氨基甲酸-[间-(2-二甲氨基)乙氧基]苯酯 (去甲基催醒安) 及间-(2-二甲氨基)乙氧基苯酚 (催醒安水解物)。原药及产物对电鳗乙酰胆碱酯酶抑制率的实验表明, 去甲基催醒安抑酶活性与原药相近, 羟基化催醒安活性比原药低, 水解物无抑酶活性。

关键词 催醒安; 代谢产物; 高效液相色谱; 质谱; 胆碱酯酶抑制剂

催醒安[m-(2-dimethylamino)]ethoxy phenyl N,N-dimethyl carbamate hydrochloride) 是一种新型的氨基甲酸酯类中枢性抗胆碱酯酶药, 主要用于中麻催醒和青光眼的治疗^(1,2)。早期代谢研究表明, 该药主要以代谢转化的形式从体内消除, 尿中排出的原形药物仅占注射量的 13%⁽³⁾。为了搞清大部分药物的体内代谢过程, 并了解生物体内代谢产物的化学结构和药效关系, 我们用溶剂萃取、高效液相色谱分离纯化大鼠尿中的代谢产物, 用高分辨质谱鉴定结构, 对催醒安的体内转化过程进行了研究, 并测定了代谢产物对酶的抑制活性。

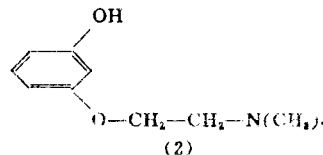
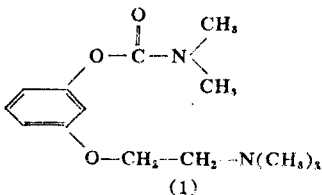
材料与方 法

一. 仪器与试药

Shimadzu LC-5 A 型高效液相色谱仪, Shimadzu SPD-2 AM 型紫外检测器。色谱条件: Zorbax-NH₂ 柱(7 μm)4.6 mm x 15 cm, 流动相为二氯甲烷-甲醇(95:5), 流速 1 ml/min, UV 270 nm 检测。Varian MAT 711 型高分辨磁质谱计, 电子能量 70 eV, 低分辨质谱分辨率为 900, 高分辨质谱分辨率为 10000。美国 Flow Laboratories 公司微量多道扫描仪

所用试剂均为分析纯。二氯甲烷用前经酸、碱处理后重蒸。甲醇用前重蒸。

催醒安(1)由本所合成, 用前经乙醇-乙醚重结晶; 间-(2-二甲氨基)乙氧基苯酚(2)由本所合成; 电鳗乙酰胆碱酯酶(AchE)由本所纯化制备。



大鼠, 雄性, 240 ± 40 g (本院动物场)。灌胃前禁食 12 h。

二. 尿样收集与处理

给大鼠灌胃催醒安 40 mg/kg, 置代谢笼中收集 24 h 尿液。尿样 (pH 8~9) 先用二氯甲烷萃取, 0.1 mol/L HCl 反提, 氨水调至 pH 8~9, 再用二氯甲烷萃取, 减压蒸去溶剂, 残渣用流动相溶解, 用 HPLC 分离纯化。收集各峰上半部的流出液, 氮气流下浓缩后, 进行质谱鉴定。

三. 胆碱酯酶抑制实验

将不同浓度的催醒安及代谢产物分别加入 1:300 稀释的溶液化电螯 AchE 中, 37°C 孵温 10 min, 加入 0.014 mol/L 溴化乙酰胆碱, 用微量羟胺法⁽⁴⁾测定 AchE 活性。由抑制曲线得到 pI₅₀。

结 果

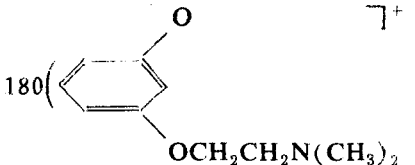
一. HPLC 分离纯化代谢产物

大鼠给药后的尿提取液在上述色谱条件下, 与空白尿样比较, 可得到五个峰组分 (图1), 依次称为产物 I, II, III, IV, V。I, IV 的保留时间分别与催醒安和间-(2,2-二甲氨基)乙氧基苯酚相同, 产物 V 未纯化鉴定。各组分流液浓缩后直接用质谱分析鉴定。

二. 代谢产物的 MS 分析鉴定

产物 I 场解吸质谱 (FD-MS) 和电子轰击质谱 (EI-MS) 均得到分子离子峰 m/z 252, 与催醒安的分子量相同。产物 I 的主要特征碎片有 m/z 58 (基峰, CH₂=N⁺(CH₃)₂), 这是叔胺

的特征碎片离子, 通常表现为基峰), m/z 72 (C⁺=N(CH₃)₂ 和 CH₃-CH⁺=N(CH₃)₂), m/z



被转化的原形药物。

产物 II 由 FD-MS 得到分子量为 238, HREI-MS 确定 M 的元素组成比原形药物少一个 CH₂, 推测 II 为去甲基产物。EI-MS 的主要离子有 m/z 238 (M⁺), 180, 72, 58 等。由于无论甲基从催醒安两个侧链的任一个氮上脱去, EI-MS 都能得到 m/z 58, 72 的碎片离子, 因此 LREI-MS 不能确定去甲基的部位, 需用 HREI-MS 来分析两个侧链断裂得到的碎片离

子的元素组成变化。在产物 II 中 m/z 58.0272 (计算值 58.0127, C⁺=N(CH₃)₂) 是由于羰基

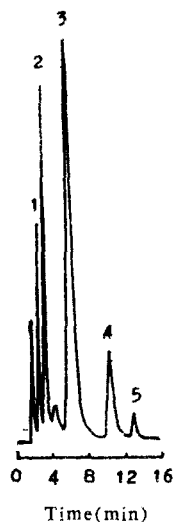
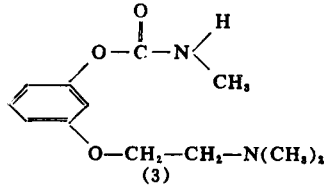
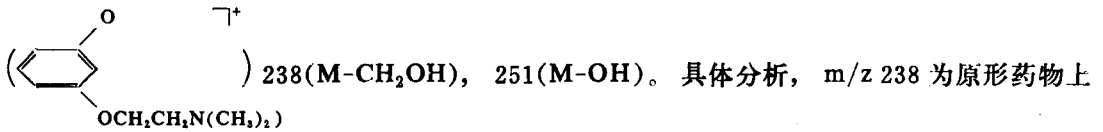


Fig 1. High performance liquid chromatogram of the extract of rat urine after oral administration of Cui-Xing-an. 1. Metabolite I; 2. Metabolite II; 3. Metabolite III; 4. Metabolite IV; 5. Metabolite V. Zorbax-NH₂ column: 4.6 mm × 15 cm. Mobile phase: Dichloromethane-methanol (95:5). Flow rate: 1 ml/min.

α 断裂产生, 而原药相同键 α 断裂所形成的碎片 m/z 72.0450 (计算值 72.0446, $\text{C}-\overset{\text{O}^+}{\parallel}\text{N}(\text{CH}_3)_2$) 已消失。原药中其余两个碎片 58.0572 [计算值 58.0467, $\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$], 72.0842 (计算值 72.0813, $\text{CH}_3\text{CH}=\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$) 在产物 II 中仍存在。证明 II 为氨基甲酸酯侧链氮上去甲基的产物 (3)。

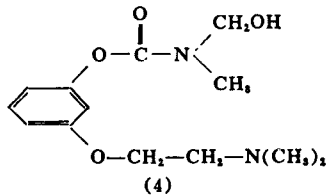


产物 III 产物 III 在尿中的含量相对较高, 由 FD-MS 得到分子量为 268, 比催醒安增加 16 个质量单位, HREI-MS 确定其分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, 比原药多一个氧原子, 表明有氧化反应发生, EI-MS 的主要碎片有 m/z 58 (基峰, $\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$), 180



去掉羟甲基或甲氧基而形成的碎片峰, 而 m/z 251 只能由原药去羟基而得到, 其余碎片, 如 m/z 180, 72, 58 等的 HREI-MS 数据均与产物 II 相同, 这提示可能在去甲基的同一侧链上发生氧化反应。进一步用醋酐、吡啶对产物 III 作乙酰化处理, 得到乙酰化物。FD-MS 确定乙酰化物的分子量为 310, 恰为 III 加上乙酰基。在 FD-MS 中未出现 m/z 268 峰, 说明产物 II 确为羟基取代, 且乙酰化完全。基峰仍为 m/z 58 ($\text{CH}_2=\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$), 其余碎片有 m/z

180, 251 ($\text{M}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_3$), 268 ($\text{M}-\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$), 将产物 III 乙酰化物的 EI-MS 图谱及 HREI-MS 数据与产物 III、产物 II 及原形比较, 可看到它们的不同之处仅在氨基甲酸酯侧链的碎片上, 由此可证明产物 III 为氨基甲酸酯侧链上甲基羟化产物, 结构如 (4)。



产物 IV 产物 IV 经 EI-MS 和 FD-MS 分析鉴定, 分子量为 181, 主要碎片有 m/z 181, 72, 58 等, 与间-(2-二甲氨基)乙氧基苯酚的标准谱相符, 表明是氨基甲酸酯键水解的产物 (2)。

三. 催醒安及其代谢产物对酶的抑制作用

催醒安对电鳗 AchE 的 pI_{50} 为 5.3 ± 0.2 ; 催醒安-II 为 5.8 ± 0.45 , 抑酶活性与原药相似; 催醒安-III 仍具有抑酶活性, 但低于原药, pI_{50} 为 4.3 ± 0.29 ($P < 0.01$); 催醒安-IV 由

于其抑酶活性基团氨基甲酸酯水解，在浓度为 10^{-4} mol/L 时对酶无抑制作用。

讨 论

催醒安属于氨基甲酸酯类可逆性胆碱酯酶抑制剂，在体内水解失活是该类药物的主要代谢途径。产物的分离鉴定结果说明，催醒安在体内的转化不是一个简单的水解过程，它可能经历了二步氧化、一步水解的转化过程。黄如衡等⁽³⁾曾从大鼠尿中分离得到产物 IV (结构 2)，并发现其以葡萄糖醛酸苷的结合形式大量存在于尿中。我们可将催醒安可能的体内转化途径描述如图 2。

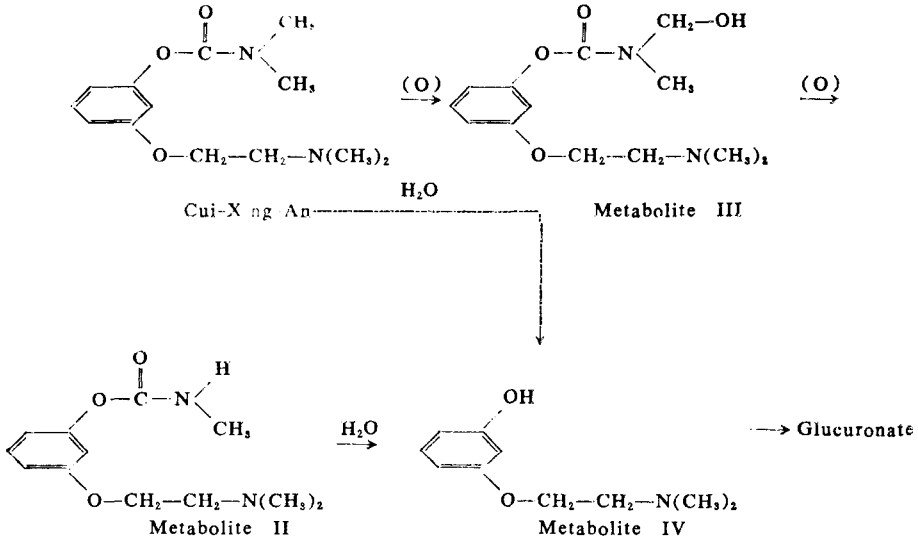


Fig 2. The metabolic pathway of Cui-Xing-An in rat.

根据代谢转化规律，氮上脱甲基反应一般经过两步氧化反应完成。第一步氧化得到的羟甲基产物不稳定，能迅速氧化为醛基，以脱甲醛的形式脱去甲基，在产物的分离中不易得到羟甲基产物。而催醒安的羟甲基产物相对稳定，在尿中可分离得到且含量较高，这可能与氨基甲酸酯酯键的电荷效应有关。

催醒安是对依色林进行结构改造后得到的新型胆碱酯酶抑制剂，其中氨基甲酸酯基团是它们共有的抑酶活性部位。依色林是单甲基取代的氨基甲酸酯，抑酶活性强，但稳定性差，酯键易代谢水解，因而体内作用时间短。而催醒安属于 N,N-二甲基取代的氨基甲酸酯。双甲基的结构提高了酯键的稳定性，在体内可能需经两步氧化反应脱去一个甲基生成单甲基取代产物后再水解失活，而且氧化产物仍有较高的抑酶活性。这可能是催醒安体内作用时间比依色林长、稳定性较好的一个原因。这一认识为氨基甲酸酯类抑酶剂的结构改进提供了新的依据。产物 II 及 III 在血及组织中也可分离得到，其量效关系将进一步研究。

参 考 文 献

- 董永明, 等. 中麻催醒剂 I. 二甲氨基甲酸间-(烷氧基)烷氧基苯酯的合成. 药理学报 1981; 16:105.
- 杨宝铃, 等. 催醒安降眼压和缩瞳作用的研讨. 中华眼科杂志 1984; 20:14.
- 黄如衡, 袁淑兰. 催醒安的代谢. 军事医学科学院院刊 1981; (13):89.
- 李凤珍, 等. 微量羟胺比色法测量胆碱酯酶的活性. 同上, 1986; 10:211.

STUDY ON THE METABOLITES OF CUI-XING-AN IN RAT URINE

H Li, JX Ruan, BS Tang*, LM Wu* and JS Jia*

(Institute of Pharmacology and Toxicology,* Instrument Analysis Centre, Academy of Military Medical Sciences, P L A, Beijing 100850)

ABSTRACT m-[(2-Dimethylamino) ethoxy] phenyl-N, N-dimethyl carbamate (Cui-Xing-An) is a new central anticholinesterase drug. After oral administration of Cui-Xing-An to rats, four components were isolated and purified from urine extract by HPLC. They were identified by MS to be the parent drug, m-[2-dimethylamino) ethoxy] phenyl-N-hydroxymethyl-N-methyl carbamate (hydroxylated Cui-Xing-An), m-[(2-dimethylamino) ethoxy] phenyl-N-methyl carbamate (N-demethylated Cui-Xing-An) and m-[(2-dimethylamino) ethoxy] phenol (hydrolysate).

Experiment on *Torpediniforms Nacline timilei* AchE inhibitory rate showed that the N-demethyl Cui-Xing-An had the same anticholinesterase activity as the parent drug. The hydroxylated Cui-Xing-An exhibited lower activity, and the hydrolysate was inactive.

Key words Cui-Xing-An; Metabolite; High performance liquid chromatography; Mass spectrum; Anticholinesterase agent