氮烯乙茶在离体大鼠肝脏灌流中的生物转化

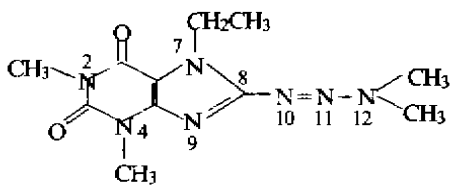
张振清 阮金秀 徐卫明* 闵庆旺**

（军事医学科学院毒物药物研究所，北京 100850；*兰州军区后勤部军事医学研究所，兰州 730020；**国防科工委后勤部军事医学研究所，北京100101）

提要 用离体大鼠肝脏灌流方法，研究了抗癌新药氮烯乙茶（EDMTP）的生物转化过程。经HPLC和TLC分离纯化及光谱分析，鉴定了两个主要的代谢产物，EDMTP-I为未经转化的原型药物，EDMTP-II的结构为7-乙基-8-氨基茶碱。另外在静注EDMTP的小鼠血中也分离到EDMTP-II，似可说明大鼠与小鼠对EDMTP生物转化的种属差异较小。

关键词 氮烯乙茶；抗癌药物；生物转化

氮烯乙茶（etheofazine）为一新抗癌药物，有合成简便，活性较高和毒副作用小等优点[1]。其化学名称为7-乙基-8-二甲基三氮烯茶碱，简称EDMTP，化学结构式为：



Etheofazine（EDMTP）M W = 279

药代动力学研究表明[2]，此药体内消除很快，小鼠iv 10 mg/kg，30 min后难以测得血药浓度，连续收集给药后48 h尿液和粪便，原型药物总排泄量仅占总给药量的10%左右。由此推断药物在体内快速转化为代谢产物。为进一步探讨药物作用机制和为设计合成新药提供参考依据，本文研究了EDMTP在大鼠离体肝脏灌流中的生物转化过程。

材料与方法

药品 EDMTP由兰州军区后勤部军事医学研究所合成，并配制成20 mg/ml注射液。

动物 雄性上海种大鼠和小鼠，体重分别为200～230 g和18～22 g，均由本院动物中心提供。

仪器 LC-4A高效液相色谱（HPLC），SPD-2AS可变波长紫外检测器，C-R2A积分仪，Zorbax氨基柱（7 μm，15×0.46 cm），均为日本Shimadzu产品。自制氨基预置柱（40 μm，5×0.21 cm）。硅胶层柱板：GF_{254}（10～40 μm，青岛海洋化工厂），每100 g加入饱和$NaHCO_3$溶液10 ml，加适量水调成匀浆，铺在17×17 cm玻璃板上，室温自然风干。质谱（MS）：MAT 711；核磁共振（NMR）：JUM-G400；红外光谱（IR）：

本文于1991年5月3日收到。

Nicolet CO．5DX；离体器官灌流装置由本所自制。

离体大鼠肝脏灌流[3,4] 25% 乌拉坦 0.5 ml/100 g 给大鼠ip 麻醉，切开腹部暴露肝脏，结扎胃静脉侧支，用20 G 针头做门静穿刺扎牢，立即用不含药物的Krebs-Henseleit 液灌流，以冲洗肝脏内残血，然后改用含有EDMTP 1 mg/ml 的灌流液做循环灌流至1.5 h，流速为2.5～3.0 ml·min^{-1}·g^{-1}肝，同时在灌流液中通入95% O_2-5% CO_2 混合气饱和。

代谢产物提取与分离 灌流液用饱和$NaHCO_3$ 溶液调至pH 9～10，用等体积乙酸乙酯提取三次，合并有机相用氮气流吹干，氯仿溶解残渣，滤去不溶性杂质，用 HPLC 和TLC 分离。HPLC 流动相为乙酸乙酯—二氯乙烷—环己烷(55∶11∶15)，TLC 展开剂为氯仿—甲醇(90∶10)。

结 果

代谢产物的分离

灌流液经上述方法处理，HPLC 分离为两个主要色谱峰，TLC 也同样为两个主要斑点(图1)。TLC 两主要成分分别用甲醇洗脱并浓缩，经 HPLC 验证均为单一成分，其保留时间也与两色谱峰相吻合。以其极性大小分别为EDMTP－I 和II。

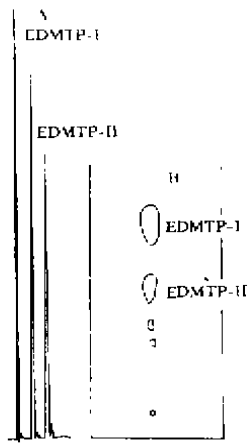


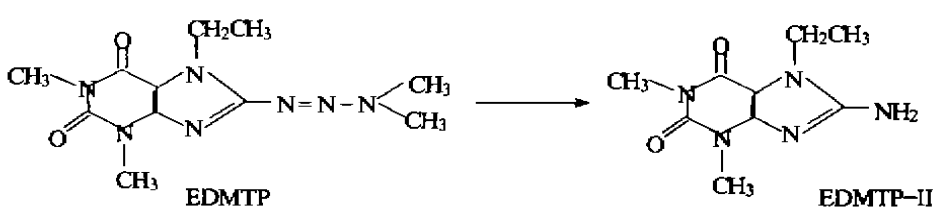
Fig 1. HPLC (A) and TLC (B) of EDMTP metabolites from the isolated perfused rat liver.

代谢产物化学结构鉴定

EDMTP－I 分离后的样品经反复提取，丙酮加温溶解，冷却后放置冰箱过夜，呈黄色针状结晶，mp188°～191℃(EDMTP 188°～190℃)。^{1}H-NMR($CDCl_3$)：δ ppm 1.38(t，3H)，4.44(q，2H，N_7-CH_2-CH_3)；3.31、3.40、3.59、3.70 分别为(s，3H，$N_{2,4}$-CH_3，N_{12}-2×CH_3)。MS(FD)：m/z 29(16%)，43(29%)，279(100%)。IR(KBr)：EDMTP-I 与EDMTP 完全吻合。以上参数足以证明两者为同一化合物，即 EDMTP-I 为肝脏中未经转化的原型药物。

EDMTP-II 样品经处理，用乙酸乙酯重结晶，晶形为白色粒状，mp 265°～268℃。MS(FD)：m/z 29(20%)，43(42%)，223(100%)。^{1}H-NMR(丙酮)：δ ppm 1.24(t，3H)，4.13(q，2H，N_7-CH_2-CH_3)，3.18，3.32 分别为(s，3H)。由以上数据推断，δ ppm 1.24，4.13 的三重峰和四重峰为N_7-CH_2-CH_3 的偶合作用，3.18，3.22 为两组单峰，从氢积分数目来看，可能为$N_{2,4}$ 或N_{12} 上任何两个甲基。但MS 数据表明EDMTP-II 分子离子峰比EDMTP 少56个质量单位，除丢失两个甲基外，仍保留着奇数个氮原子，$N_{10,11}$ 间双键断裂，形成7-乙基-8-氨基茶碱(m/z 223)。

根据以上分析结果，EDMTP 的生物转化及产物结构表示如下：



小鼠血中EDMTP-II 鉴于药理及药代实验中通常以小鼠为药物作用机体，根据药理实验条件，小鼠iv EDMTP (10 mg/kg)后，于15 min活杀取血，血样中代谢产物的提取分离方法与灌流液相同。由于样品量较少，仅做了MS (m/z 223)和 HPLC (RT=5.45 min)，结果与EDMTP-II完全吻合。

讨 论

三氮烯类化合物目前主要的研究趋势是通过电子效应修饰和寻找特异性载体，设计高效低毒的抗癌剂。EDMTP是一以嘌呤为载体的新型三氮烯药物。文献曾先后报道过以咪唑[5]、苯基和取代苯基[6]为载体三氮烯药物的代谢机制，基本已趋于定论。一致认为此类药物在体内有两种代谢途径，第一，当药物载体为一供电体时，三氮烯侧链易发生质子化，$N_{11,12}$断裂水解产生重氮阳离子($\geqslant^{8}$- N $\equiv$ $N^{\oplus}$)，在体内产生较大的毒副作用；第二，当载体母核为一吸电体时，药物在体内首先以酶促氧化脱甲基的方式进行代谢，$N_{10,11}$键断裂，载体部分成一伯氨取代基化合物($\geqslant^{8}$- NH_2)，体内毒副作用小，三氮烯侧链上的甲基最后生成活性甲基阳离子($CH_3^{\oplus}$)，参与DNA和RNA的烷化作用，并且这一反应是在肝脏或肺器官的微粒体中进行的。Preussmann[6]同时还在实验中发现，这两种代谢机制并不能完全以供电子效应和吸电子效应截然分开，具有过强的吸电子效应或过强的供电子效应的三氮烯类药物均不能发生酶促进氧化脱甲基反应或质子化作用，只有具有适当的供电子或吸电子效应者才有可能在体内发生反应，从而生成活性甲基阳离子来杀伤癌细胞。

实验结果表明，EDMTP是以第二种方式进行代谢，其终产物为7-乙基-8-氨基茶碱(EDMTP-II)，而不是重氮阳离子，所以该药毒副作用较小，表明该药设计的合理性。从实验结果中也可看出，EDMTP在离体大鼠肝脏和整体小鼠中均能生成同一代谢产物，可初步说明两者对该药生物转化的种属差异性较小。肝脏可能是该药进行生物转化的主要器官，小鼠血中的代谢产物可能是经肝脏进入循环系统。至于其它器官是否也有转化作用，尚待进一步研究。

具有活性的抗癌因子是经生物转化后所形成的甲基阳离子，而不是EDMTP本身或其它代谢产物。由于甲基阳离子不稳定，直接分析其生成和转运过程是不可能的，如果N_{12}上甲基用同位素标记，观察对DNA和RNA的烷化作用，可进一步确定甲基阳离子的生成和作用部位。

参 考 文 献

1 张万年，8-三氮烯嘌呤类化合物的合成和抗肿瘤活性的研究．药学学报 1982；17：909．

2 张振清，等．氮烯乙茶在家兔及小鼠体内的药代动力学．药物分析杂志 1990：10：322．

3 赵明，等．催醒宁在大鼠离体灌流肝脏中的生物转化．药学学报 1990；25：801．

4 Coleman MD，et al．Disposition of the antimalarial mefloquine in the isolated perfused rat liver．*Biochem Pharmacol* 1988；37：235．

5 Shealy YF，et al．Imidazole II：5(or 4)-(monosubstituted triazeno)imidazole-4(or 5)-carboxamides．*J Med Chem* 1966；9：34．

6 Preussmann R，et al．Mechanism of carcinogenesis with 1-aryl-3，3-dialkyltriazenes，enzymatic dealkylation by rat liver microsomal fraction *in vitro*．*Biochem Pharmacol* 1969；18：1．

STUDIES ON BIOTRANSFORMATION OF ETHEOFAZINE IN ISOLATED PERFUSED RAT LIVER

ZQ Zhang，JX Ruan，WM Xu* and QW Min**

(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; *Lanzhou Military Areas Logistics Department, Institute of Military Medical Sciences, Lanzhou 730020; **Institute of Military Medical Sciences, Logistics Department, Commission of Sciences, Technology and Industry for National Defence, Beijing 100101)

ABSTRACT The biotransformation of etheofazine (EDMTP), a new anticancer drug, was studied by using isolated perfused rat liver. Two main metabolites were separated from the perfusate by HPLC and TLC and their chemical structures were determined by MS, ^{1}H-NMR and IR. EDMTP-I is the parent compound. EDMTP-II is 7-ethyl-8-aminotheophylline. EDMTP-II was also separated and identified from the blood of mice after iv of 10 mg/kg. Species difference of biotransformation of EDMTP between rat and mouse seems to be not significant in this study.

Key words Etheofazine; Anticancer drug; Biotransformation