

微生物转化研究间尼索地平的代谢产物^{*}

孔德志¹, 韩学静², 景秀娟¹, 王娜¹, 张兰桐^{1*}

(1. 河北医科大学药学院药物分析教研室, 石家庄 050017; 2. 河北省药品检验所, 石家庄 050012)

摘要 目的: 建立微生物转化研究间尼索地平(MNS)代谢产物的方法, 确定代谢物的结构及转化途径。方法: 通过比较 15 种加药菌液样品和相对应的菌空白、药物空白的 HPLC-PDA 图谱, 发现代谢物并进行放大制备。结果: 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 ESI-MS² 确定了 MNS 2 个代谢产物的结构, 并推断出 MNS 的微生物转化途径。结论: 微生物转化可模拟间尼索地平的体内代谢, 是研究药物代谢的一种切实可行的方法。

关键词: 间尼索地平; 微生物转化; 代谢

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)02-0204-04

Study on metabolites of *m*-nisoldipine by microbial transformation^{*}

KONG De-zhi¹, HAN Xue-jing², JING Xiu-juan¹, WANG Na¹, ZHANG Lan-tong^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050012, China)

Abstract Objective To establish the microbial transformation method of *m*-nisoldipine(MNS), identify the chemical structures of the metabolites and propose the possible metabolic pathways of MNS. **Methods** The metabolites were discovered by comparing the HPLC-PDA chromatograms of 15 fungal strains samples with the corresponding blanks. Then they were prepared by preparative liquid chromatography. **Results** The chemical structures of two metabolites were identified by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and ESI-MS². Moreover, the possible metabolic pathways of MNS were proposed. **Conclusion** The method of microbial transformation may simulate the drug metabolism of MNS *in vivo*, which can be used as effective supplementary tools of drug metabolism research.

Key words *m*-nisoldipine; microbial transformation; metabolism

间尼索地平(*m*-nisoldipine, MNS)是河北医科大学药学院自主研发的国家一类新药, 是新的 1, 4-二氢吡啶类血管扩张性钙通道受体拮抗剂, 适用于心绞痛和高血压的治疗, 结构式见图 1。研究表明其药理活性与尼索地平相当, 但光稳定性明显优于尼索地平^[1]。通过灌胃给药研究大鼠的排泄, 结果显示仅有少量 MNS 经粪便和胆汁排泄, 尿中未检出, 提示 MNS 主要以代谢物形式排出体外^[2]。因此, 有必要对 MNS 代谢物进行研究, 进而阐明 MNS 在体内的代谢途径及转化规律, 为临床研究提供参考依据。研究药物的体内生物转化及代谢物的化学结构, 一般先通过体外代谢进行模拟, 常用的方法有肝微粒体温孵法、肠道菌转化法、微生物转化法等, 有研究表明某些微生物具有和人类相同的酶^[3], 而

利用微生物自身的酶来催化药物的代谢, 具有可放大的特点, 故可以达到制备代谢物的目的。本研究通过对 15 种真菌的筛选, 首次发现了 MNS 的 2 个代谢物, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 ESI-MS² 确定了它们的分子结构, 并推断出 MNS 的微生物转化途径。

1 仪器与试剂

分析型高效液相色谱仪: Agilent 1200 (Agilent G1315D Photodiode Array Detector); 分析柱 Diamon-sil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。制备型高效液相色谱仪: Waters 2690 (Waters 2487 Detector), 制备柱 Alltima C₁₈ column (10 mm × 250 mm × 10 μm), 预柱 (Alltech C₁₈)。美国 AB 公司 API-QTrap 3200 质谱仪; VARIAN NOVA-500 型核磁共振谱

* 国家自然科学基金 (30840098); 河北省自然科学基金项目 (C2008001073)

** 通讯作者 Tel/Fax: (0311) 86266419; E-mail: zhanglantong@263.net

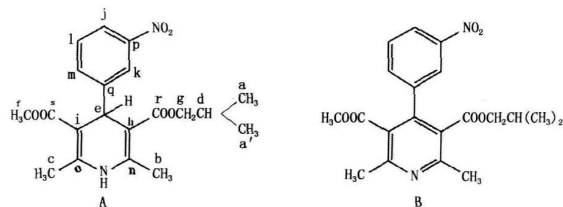


图 1 MNS(A)和 MNS脱氢产物(B)的结构式

Fig 1 The chemical structures of MNS(A) and its dehydrogenation product(B)

A. MNS B. MNS的脱氢产物 (dehydrogenation product of MNS)

仪。

MNS原料药 (纯度 > 99.5%) 由河北医科大学药学院药物化学教研室提供, MNS氧化产物按文献 [4] 合成, 即二氢吡啶环脱去 2 个 H, 结构式见图 1。土豆 (市售); 甲醇为色谱纯 (美国 Tedia 试剂); 水为超纯水 (Heal Force- PWVF, 上海康雷分析仪器有限公司), 其他试剂均为分析纯。

实验所用菌种黑曲霉 (*Aspergillus niger*, AS 3.1858)、短刺小克银汉霉 (*Cunninghamella blakesleeana*, AS 3.970)、葡枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*, AS 3.2050)、细孢毛霉 (*Mucor subtilissimus*, AS 3.2454)、燕麦镰孢 (*Fusarium avenaceum*, AS 3.4594)、雅致小克银汉霉 (*Cunninghamella elegans*, AS 3.1207)、总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum*, AS 3.264)、刺囊毛霉 (*Mucor alternata*, AS 3.3450)、刺囊毛霉 (*Mucor alternata*, AS 3.2450)、侧孢霉 (*Sporotrichum* sp., AS 3.2882)、球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*, AS 3.4273)、具柄矛囊孢霉 (*Doratomyces stenonitis*, AS 3.1411)、少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*, AS 3.2896)、链格孢 (*Alternaria alternata*, AS 3.4748) 购于中国科学院微生物研究所。

2 方法与结果

2.1 土豆培养基的制备 土豆去皮剁碎, 取 200 g 置水中, 煮沸后 80 °C 保温 1 h, 趁热纱布过滤, 向滤液中加入葡萄糖 25 g 最后加水至 1 L, 用玻璃棒搅匀, 每瓶 120 mL 滤液, 分装至 250 mL 三角瓶中, 三角瓶用 6 层干净纱布及牛皮纸封好后, 于 121 °C 高压灭菌 15 min。

2.2 微生物转化过程 将 4 °C 保存的不同菌株分别接种于相应的斜面培养基上, 25 °C 恒温培养, 得到菌丝生长旺盛、孢子丰富的培养物。用无菌接种环取 1 环含有大量孢子的菌丝体, 仅将孢子接入土豆培养基中, 于 25 °C 振荡 (120 r·min⁻¹) 预培养 2

d 然后加入 MNS 的丙酮溶液 1 mL (2 mg·mL⁻¹) 后继续培养 3 d。抽滤后, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 收集有机萃取液减压蒸干, 残渣用 5 mL 甲醇溶解后保存于 4 °C 冰箱待测。同时另设 2 组空白对照, 空白 1 (药物 + 培养基), 考察转化液中是否存在非微生物引起的药物分解, 同时确定药物在液相色谱检测时的出峰位置; 空白 2 (转化菌株 + 培养基 + 等量的丙酮), 排除转化菌株的发酵产物和培养基残留成分的干扰。空白对照组的处理方法同样品组, 避光操作。

2.3 HPLC-PDA 分析 色谱条件: 甲醇-水梯度洗脱, 甲醇在 0~8 min 为 45% → 60%; 在 8~30 min 为 60%; 在 30~35 min 为 60% → 80%, 在 35~40 min 为 80% → 98%。流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C。液相色谱分析, 发现所筛选的菌种中仅 AS 3.114 和 AS 3.4748 未观察到代谢物, 其他的菌种均仅有代谢物 M1、M2, 且 M1 是主要代谢产物, 但各菌属 M1 转化产率明显不同, 其中 AS 3.2896、AS 3.1207、AS 3.264 转化率最高。我们选择转化能力最高的 AS 3.2896 制备了 M1, 色谱图见图 2。

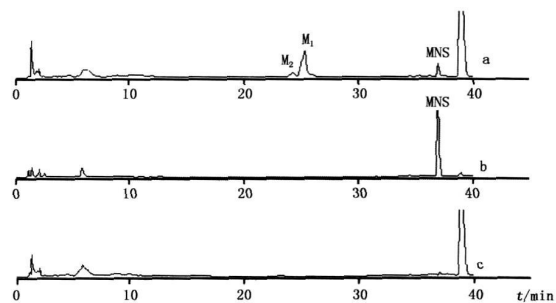


图 2 AS 3.2896 的 HPLC-PDA 图 (237 nm)

Fig 2 The HPLC-PDA chromatograms of AS 3.2896

a 样品 (sample) b 空白 1 (blank 1) c 空白 2 (blank 2)

2.4 代谢物的制备 HPLC 制备条件: 甲醇-水 (62:38) 等度洗脱; 流速: 2 mL·min⁻¹; 检测波长 237 nm; 进样量: 500 μL; 柱温: 25 °C。将收集到的馏分于 42 °C 减压蒸干, 用少量的甲醇溶解, 氮气吹干, 整个操作过程均需避光。

2.5 代谢物的结构确认

2.5.1 代谢物 M1 的结构确认 ESI-MS 可检测到 [M+H]⁺ (405 u)、[M+NH₄]⁺ (422 u)、[M+Na]⁺ (427 u)、[M+K]⁺ (443 u), 因此可以确定代谢物 M1 的相对分子质量为 404, 与 MNS 的二级质谱图比较, 具有相同的碎片离子峰 315, 且具有 [M+H-H₂O]⁺ 峰 (见图 3)。质谱提示 M1 比 MNS 多

了 1 个 O 原子, 根据一般代谢规律, M1 很可能为羟基化产物。 $^1\text{H} - \text{NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.12 (3H, s, H - a)、1.16 (3H, s, H - a'), 2.36 (3H, s, H - b)、2.42 (3H, s, H - c)、5.13 (1H, s, H - e)、3.67 (3H, s, H - f)、4.01 (2H, dd, $J = 11.5$, 11.5 Hz, H - g)、8.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H - j)、8.13 (1H, s, H - k)、7.41 (1H, t, $J = 7.5$, 8.0 Hz, H - l)、7.68 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H - m)、3.66 (1H, s, O - H)、5.79 (1H, s, N - H)。 $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 26.22 (C - a)、26.24 (C - a')、19.78 (C - b)、19.91 (C - c)、69.95 (C - d)、39.75 (C - e)、51.22 (C - f)、71.89 (C - g)、102.64 (C - h)、103.50 (C - i)、121.60 (C - j)、122.73 (C - k)、128.87 (C - l)、134.06 (C - m)、144.49 (C - n)、145.82 (C - o)、148.45 (C - p)、149.47 (C - q)、167.02 (C - r)、167.40 (C - s)。根据以上数据及 MNS 的 $^1\text{H} - \text{NMR}$ 、 $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ 可推断化合物 M1 的结构为 1,4-二氢-2,6-二甲基-4-(3-硝基苯)-3,5-吡啶二羧酸-2-羟基异丁基甲酯。

2.5.2 代谢物 M2 的结构确定 收集分析液相 M2 的馏分, 直接 ESI-MS 可检测到 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (403 u)、 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (425 u)、 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (441 u), 可以确定代谢物 M2 的相对分子质量为 402 比 M1 少了 2 个 H 原子, 比 MNS 的氧化产物仅多了 1 个 O 原子。与 MNS 氧化产物的二级质谱图比较, 具有相同的碎片离子峰 m/z 331, 385, 226, 168 (见图 3), 因此它们具有相同的母核结构, 且 O 原子在侧链上。参考 M1 的结构及尼索地平代谢^[5]可确定其结构为 2,6-二甲基-4-(3-硝基苯)-3,5-吡啶二羧酸-2-羟基异丁基甲酯, 为 M1 的脱氢产物。

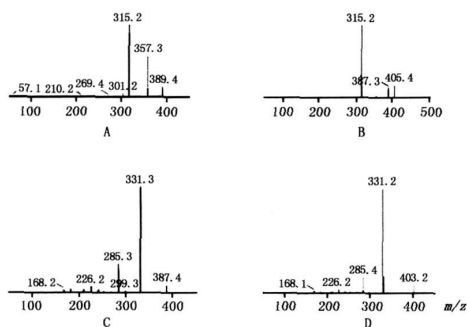


图 3 4 种物质的 ESI-MS² 质谱图

Fig 3 ESI-MS² scan spectra of 4 compounds

A. MNS B. M1 C. MNS 脱氢产物 (dehydrogenation product of MNS) D. M2

3 讨论

3.1 实验中发现, 代谢物 M1 在甲醇中较稳定, 但在甲醇-水 (62:38) 中不稳定, 放置 24 h 后, HPLC-PDA 显示 M1 的量减少, M2 的量增加, 故 M1 在空气中放置易被氧化成代谢产物 M2 因此, 微生物转化可能的途径见图 4

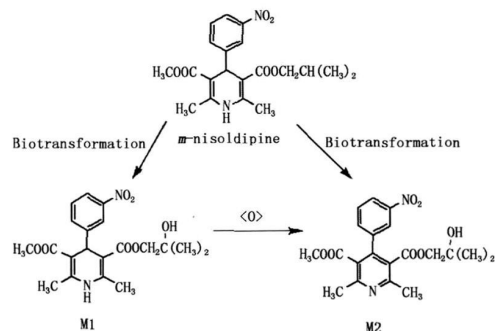


图 4 MNS 可能的微生物转化途径

Fig 4 The possible microbial transformation pathways of MNS

文献 [7] 报道, 尼索地平在大鼠及人体内也有类似的转化过程, MNS 是否也有类似的转化, 有待进一步的研究。然而, 微生物转化结果为进一步研究间尼索地平的体内代谢提供了思路和信息, 因此, 用微生物转化法模拟动物体内代谢具有现实意义。

3.2 实验表明, 15 种真菌的药物转化酶在种类、含量以及活性等方面均有差异, 利用这一特点可以选择性地对底物进行结构修饰。与哺乳动物生物转化相比, 微生物转化具有很强的专一性, 能够用来进行特定的药物代谢反应^[6]。此外, 微生物转化法还具有易调节、易放大等特点, 通过选择比较理想的转化菌株和优化转化条件可以强化某些转化途径, 用于较大规模地制备一定数量的代谢物纯品, 确定其化学结构与生物学活性, 为体内药物代谢产物的深入研究奠定实验基础。

参考文献

- YUAN Feng-yan (袁凤燕), YAN Ting-ren (颜廷仁), BAO Chun-he (鲍春和), et al. The preliminary photostability investigation of *m*-nisoldipine (间-尼索地平光稳定性的初步考察). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1989, 24(9): 540
- WANG Shu-hua (王树华), SHANG Qing (尚清), ZHANG Yong-jian (张永建). Tissue distribution and excretion of *m*-nisoldipine in rats and its plasma protein binding (间尼索地平在大鼠体内的组织分布、排泄及血浆蛋白结合率的测定). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2006, 37(11): 752
- WANG Xu (王旭), XU Wei (徐威), YOU Song (游松). Application of microbial transformation in pharmacology (微生物转化在药理学中的应用). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2006, 23

- (7): 477
- 4 CHEN Zi-ming(陈子明), BAO Chun-he(鲍春和), MA Zhi-bo(马志博), *et al* Separation and structure of the photodecomposition product of *m*-nisoldipine(间尼索地平光解产物的分离和结构). *J Hebei Med Univ*(河北医科大学学报), 2002, 23(4): 427
- 5 Scherling D, Karl W, Ahr G, *et al* Pharmacokinetics of nisoldipine III. Biotransformation of nisoldipine in rat, dog, monkey, and man. *Arzneimittelforsch Drug Res* 1988, 38(8): 1105
- 6 HUANG Hai-hua(黄海华), CHEN Xiao-yan(陈笑艳), CUI Hong-xia(崔洪霞), *et al* Synthesis of 5-hydroxypropionol by microbial transformation(采用微生物转化法合成 5-羟基普萘洛尔). *Pharm Biotech*(药物生物技术), 2001, 8(5): 268

(本文于 2009 年 4 月 27 日收到)

2010 年《药物分析杂志》第四届普析通用杯 全国药物分析优秀论文评选交流会征文通知

为不断发展我国的药物分析事业,促进国内外药物分析技术的交流,在中国药学会支持下,中国药学会药物分析专业委员会、《药物分析杂志》编辑部和普析通用仪器有限责任公司于 2004、2006、2008 年分别在深圳、成都、兰州举办了《药物分析杂志》第一届、第二届和第三届普析通用杯全国药物分析优秀论文评选交流会,并取得圆满成功。根据协议,定于 2010 年举办《药物分析杂志》第四届普析通用杯优秀论文评选交流会,现通知如下:

一、征文内容

1 药物分析新理论、新技术、新方法; 2 现代分析技术在化学药物、中药、抗生素、生化药物中的应用; 3 新药质量标准的建立及药物质量再评价; 4 药物原料、制剂及新剂型的研究、药用辅料、药包材和医疗器械质量分析; 5 药物、毒物快速分析检定; 6 计算机和数学在药物分析中的应用; 7 药物在体内代谢、药代动力学、生物利用度等方面的研究; 8 药物安全评价。

二、征文要求

- 1 未公开发表及未在全国性会议上交流过的论文;
- 2 论文体例、格式请登录本刊主页: www.ywfxzz.cn 查询。

三、其他

1 本次会议通过论文交流后由药物分析专家组成评委会,评选出优秀论文一等奖 2 名、二等奖 4 名、三等奖 8 名。获奖论文优先在《药物分析杂志》上发表。

2 征文截止时间: 2010 年 6 月 30 日(暂定)

3 会议地点: 上海

四、投稿方式及联系人

投稿请登陆药物分析杂志主页 www.ywfxzz.cn 点击“在线投稿”,按提示要求上传稿件。投稿方向请选择“普析通用杯征文”,并提供联系人电话、电子邮箱等信息,以便联系。

联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427, (010) 67095201; 传真: (010) 67012819