

9-(对甲苯胺基)吡啶在家兔体内的生物转化

何绍雄 王殿英 史桂兰 杜小英 (天津药物研究所, 天津 300070)

提要 采用薄层层析法结合荧光光谱测定研究了抗癌剂 9-(对甲苯胺基)吡啶在家兔体内的代谢途径。将 ig 给药后的尿及粪分别以氯仿和正丁醇提取, 经分离鉴定, 除原形药外, 检出 8 个代谢产物。由此推论其代谢途径为: 其一通过一不稳定代谢物转化为吡啶酮, 部分吡啶酮进一步氧化为 2-羟基吡啶酮; 另一部分与葡萄糖醛酸, 半胱氨酸与硫酸形成结合物而排出体外。另一途径转化为 9-氨基吡啶, 后者再转化为 N-葡萄糖醛酸结合物。还用组织培养法比较了本药与主要代谢物的抗癌活性, 表明 9-氨基吡啶为活性代谢物, 而吡啶酮途径则使活性下降。

关键词 9-(对甲苯胺基)吡啶; 代谢物; 9-氨基吡啶; 吡啶酮; 2-羟基吡啶酮

鉴于 9-胺基吡啶类化合物是一类抗癌有效机率较高的化合物, 本所合成了一系列此类化合物⁽¹⁾, 经动物筛选发现, 9-(对甲苯胺基)吡啶(PMAA)对多种瘤谱有效, 且临床试用对毛细胞白血病明显有效⁽²⁾。本文研究 PMAA 在体内的代谢转化途径及其主要代谢物的抗肿瘤活性, 试图探讨体内代谢转化与抗肿瘤活性的

关系, 为设计疗效较好, 毒性较低的 9-胺基吡啶类药物提供参考。

材料和方法

药品及参比品

PMAA: 本所合成室提供, 样品用甲醇反复重结晶, 经薄层层析鉴定为单一斑点。

吡啶酮及 2-羟基吡啶酮: 依文献方法⁽³⁾合成。

9-氨基吡啶: 上海新中化学厂出品, 系盐酸盐, 经用 NaOH 中和, 收集沉淀, 甲醇重结晶而得。

动物 ♂性家兔 3 只, 体重 2—3 kg, 给药前 1 d 空腹 ig PMAA 100 mg/kg, 收集 48 h 尿及粪。

薄层层析及柱层析

薄层层析: 硅胶 G 板。展开剂: A 氯仿:

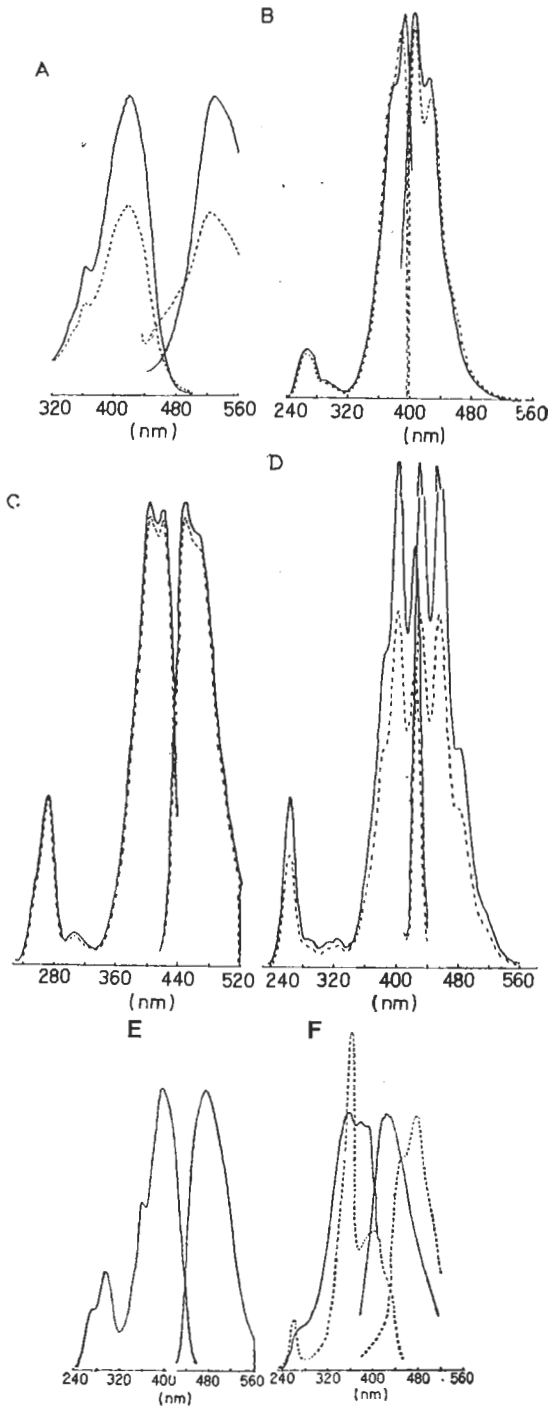


Fig 1. Excitation spectrum (left) and fluorescence spectrum (right). Solvent CHCl_3 for A, B, E, F; MeOH for C, D. Solid line: A) PMAA; B) acridone; C) 2-hydroxyacridone; D) 9-aminoacridine; E) metabolite B; F) metabolite F detected immediately after elution, $G = 5$. Dotted line: A) eluent of metabolite C; B) eluent of metabolite E; C) eluent of metabolite D; D) eluent of metabolite A; F) metabolite F detected 30 min after elution, $G = 1$.

甲醇(8:2 v/v), B. 氯仿:甲醇(9:1 v/v), C. 氯仿:丙酮(1:1 v/v), 倾斜上行室温层离。

柱层析: 以层析用硅胶与氯仿湿法制成 $1 \times 30 \text{ cm}$ 的层析柱, 将样品溶液与少量硅胶吸着混均, 温热干燥, 加于柱顶, 以氯仿或氯仿:甲醇(9:1 或 8:2 v/v)混合液洗脱。

薄层或柱层的样品斑点(或区带)均由其本身的色泽或在 UV 灯下观察其荧光面检定。

纸上层析 Whatman No 1 滤纸, 展开剂: A. 甲醇:吡啶:水(3:3:1 v/v); B. 正丁醇:醋酸:水(4:1:1 v/v), 上行室温层离。样品斑点除观察 UV 灯下的荧光外, 检出葡萄糖醛酸时采用 3% 对甲氧基苯胺正丁醇液显色; 检出氨基酸时采用 0.5% 茚三酮正丁醇液显色。

PMAA 及其参比物的荧光光谱 将 PMAA ($2-5 \mu\text{g/ml}$)、吡啶酮 ($0.02-0.05 \mu\text{g/ml}$)、2-羟基吡啶酮 ($0.04-0.1 \mu\text{g/ml}$) 和 9-氨基吡啶 ($0.02-0.05 \mu\text{g/ml}$) 的氯仿或甲醇溶液, 在岛津 RF-510 型荧光分光光度计上测定其激发及发射光谱, 如图 1 A-D 所示。

实验与结果

尿液及粪便中代谢物的提取及分离 将离心 ($1000 \times g$) 澄清之尿液, 调节 pH 至 8.0, 以 2-3 倍容量之氯仿分次振荡提取, 分出氯仿, 室温挥发, 浓缩液为尿氯仿液; 再对此已用氯仿提取的尿液以 2-3 倍容量之正丁醇分次振荡提取, 分出正丁醇, 减压蒸馏, 浓缩液为尿正丁醇液。

将粪干燥后, 研磨成粉, 以 10-15 倍重量之氯仿和正丁醇先后分别分次提取, 离心 ($1000 \times g$) 得澄清之有机溶剂层, 同上挥发浓缩, 得粪氯仿及丁醇液。

将上述各提取液以展开剂 A 进行薄层层离, 4 种样品共可得 8 个主要色斑, 其层析谱如图 2。在 B 点至 D 点间尚可见个别荧光甚微的色斑, 因含量甚微, 未予深究。

此 8 个色斑在 4 种提取液中存在情况如下: 尿氯仿液: A, E 和微量 D; 尿丁醇液,

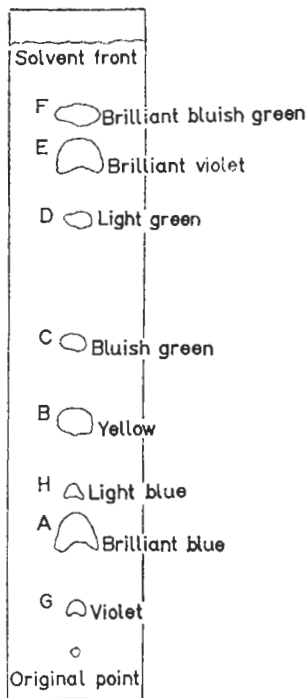


Fig 2. TLC of PMAA & its metabolites ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH } 8:2 \text{ v/v}$) Except spot B, all spots are fluorescent.

A, B, D, E, F, G 和 H: 粪氯仿液: A, E 和 B;
粪丁醇液: A, B, C, D, E 和 F.

同时将不给药的家兔收集 48 h 尿粪, 同法提取分离, 所得提取液中未见上述各色斑.

代谢物的鉴定 4 种提取液中各色斑用硅胶 G 制备板进行分离, 切下相应区带, 以氯仿或甲醇提取, 浓缩液再在硅胶板上层析一次, 洗脱相应色斑进行荧光光谱测定. 对含量较少的色斑, 进行柱层分离后, 相应区带的洗脱液浓缩后, 再薄层层离, 然后洗脱相应色斑测定荧光光谱.

代谢物 A: R_F 值、荧光色泽及洗脱液的荧光光谱与 9-氨基吡啶相一致(图 1 D), 证示代谢物 A 为 9-氨基吡啶.

代谢物 B: 其荧光光谱如图 1 E 所示. 将洗脱液挥发至干, 加 1 N NaOH 1 ml, 置封闭管内, 沸水浴中水解, 水解液经薄层层离后, 从色斑 R_F 荧光色泽及洗脱液的荧光光谱证示含吡啶酮(如用 1 N HCl 水解亦含吡啶酮).

另将水解液同时与半胱氨酸参比品进行纸上层析, 示有半胱氨酸之存在. 证示代谢物 B 为吡啶酮的半胱氨酸结合物.

代谢物 C: R_F 、荧光色泽及洗脱液荧光光谱均与 PMAA 相一致(图 1 A), 证示本点为未变化的原药.

代谢物 D: R_F 、荧光色泽及洗脱液荧光光谱均与 2-羟基吡啶酮相一致(图 1 C), 证示本代谢物为 2-羟基吡啶酮.

代谢物 E: R_F 、荧光色泽及荧光光谱均与吡啶酮相一致(图 1 B), 证示本点为吡啶酮.

代谢物 F: 本点层离后呈绿兰色荧光, 放置后变为紫色荧光. 斑点以氯仿洗脱, 立即测定荧光光谱如图 1 F 实线所示. 室温放置 30 min 后, 荧光光谱即发生明显变化, 如图 1 F 虚线所示, 且荧光强度增强约 5 倍. 将放置后的代谢物 F 以氯仿洗脱, 再行薄层层离, 发现除 F 外, 尚有吡啶酮, 放置时间越长吡啶酮越多, 放置 3 个月以上者, 全部变为吡啶酮.

另取家兔 1 只, 迅速解剖分离 10 cm 左右小肠一段, 结扎两端, 均匀注入 3 mg PMAA, 置 Ringer 氏液中 37°C 温孵 2 h, 即制成匀浆, 调节 pH 至 8.0, 用氯仿抽提, 提取液经薄层分离及荧光光谱鉴定, 除未变化为 PMAA 外, 尚有明显的代谢物 F 及吡啶酮.

由上可见, 代谢物 F 为一不稳定的能在室温条件下变为吡啶酮的物质, 而 PMAA 在肠道中即能变为 F, 再转化为吡啶酮.

代谢物 G: 将 G 点以甲醇洗脱, 挥干后加 1 N HCl 封闭管内沸水浴中水解. 水解液中无 SO_4^{2-} (以 10% BaCl_2 液鉴定), 但与葡萄糖醛酸参比品以同样条件水解后的溶液进行纸上层析, 示含葡萄糖醛酸. 将水解液调节 pH 8.0, 以氯仿抽提(再以正丁醇抽提), 提取液经薄层分离及荧光光谱鉴定含 9-氨基吡啶(正丁醇提取液未见其他荧光斑). 证示本代谢物为 9-氨基吡啶的葡萄糖醛酸结合物.

代谢物 H: 将 H 点以甲醇洗脱, 挥干后加 1 N HCl 置封闭管内, 沸水浴中水解. 将水

解液与葡萄糖醛酸参比品以同样条件水解后的溶液同时进行纸上层析, 示含葡萄糖醛酸。又将此酸性水解液加 10% BaCl₂ 溶液, 呈明显浑浊, 示 SO₄²⁻ 的存在。再将此水解液调节 pH 8.0, 以氯仿抽提(再以正丁醇抽提), 抽提液经薄层分离及荧光光谱鉴定含有吡啶酮(正丁醇提取液中未见其他荧光斑)。由此似可认为 H 点为吡啶酮葡萄糖醛酸结合物及硫酸结合物的混合色斑。由于两者极性相近, 难以分开。曾试用双相层析法将两物分开, 但荧光微弱, 不易确认。

主要代谢物抗肿瘤活性的比较 在体外培养的人肝癌细胞株 BEL-7402 中, 加入待试药物, 根据培养物中蛋白质的含量, 与对照组相比较以计算药物的半数抑制剂量(ID₅₀)。实验结果: PMAA 的 ID₅₀ 为 20—50 μg/ml, 9-氨基吡啶 0.5 μg/ml, 吡啶酮及 2-羟基吡啶酮为 50—100 μg/ml。

讨 论

对于一些具有荧光性质的药物来说, 由于荧光方法灵敏度较高, 专属性较强, 便于与参比物的光谱相比较, 如与薄层分离相结合以研究药物的代谢产物, 可使分离步骤相对简化, 鉴定结果比较可靠。对于一些未能用参比物光谱来确证的代谢物, 亦可因其荧光特性之存在, 可确定其基本结构, 有助于深入鉴定。

阿的平在体内可形成不稳定的 9.10 二氢吡啶, 此种吡啶烷类可在大气中变为吡啶类化合物⁽⁴⁾。根据代谢物 F 荧光光谱的变化及其在空气中逐渐变为吡啶酮的性质, 似也是一种不稳定的吡啶烷类化合物。且根据离体肠段试验结果, 代谢物 F 可能是 PMAA 转化为吡啶酮的中间产物。

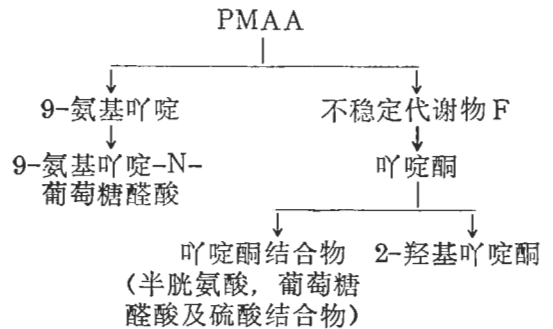
阿的平与硫醇类相作用可得到相应的 9-硫代吡啶类化合物⁽⁵⁾。9-(2'-甲氧基-4'-甲磺酰胺苯胺基)吡啶(m-AMSA, NSC 156303)在吡啶 9 位碳上的取代基团裂解后, 可与血浆蛋白质上的-SH 共价结合而形成加成物, 此加成物

经酸碱水解均释出吡啶酮⁽⁶⁾。为此, 可认为代谢物 B 可能也是吡啶环上 9 位碳与半胱氨酸的-SH 共价结合而成。

在尿液中尚能检出 2-羟基吡啶酮以及吡啶酮的葡萄糖醛酸和硫酸结合物。前者显然是吡啶酮进一步氧化的产物, 使其极性增加便于排出。而两种结合物可认为是吡啶酮烯醇式上的羟基与葡萄糖醛酸和硫酸发生结合反应而生成。吡啶在家兔体内亦可能转化为吡啶酮及其葡萄糖醛酸结合物⁽⁷⁾。由此似可认为, 9-氨基吡啶类化合物在体内当 9 位碳上的取代基团裂解后, 即可依与吡啶类似的途径进行转化。

由于代谢物中有 9-氨基吡啶及其葡萄糖醛酸结合物的存在, 故可认为 PMAA 的另一代谢途径是先转化为 9-氨基吡啶, 再结合为 N-葡萄糖醛酸结合物。

由上述结果, 我们设想 PMAA 的代谢途径如下:



由于仅在粪中检出少量原形药物, 似可认为 PMAA 在家兔体内大部分都经代谢转化。9-氨基吡啶和吡啶酮的结合代谢物(除吡啶酮半胱氨酸结合物外)只在尿中检出, 可能这些结合物主要经肾排出, 粪中含量甚微所致。

从主要代谢物抗癌活性比较可见, 9-氨基吡啶为有效代谢物, 而吡啶酮代谢途径则使活性下降。为此, 可认为提高 9-氨基吡啶类化合物抗癌作用的途径之一是应使所设计的新化合物尽量减少吡啶酮代谢途径, 增加 9-氨基吡啶的代谢率。最好还应有一定缓释作用, 使体内放出的 9-氨基吡啶浓度不致太高, 有利于毒副作用的降低。

致谢 本所合成室刘纪云同志协助合成吡啶酮, 免疫室王述姮同志协助进行组织培养工作。

参 考 文 献

- 1 张葆珣、谢克勤、刘纪云. 药学学报 1980年1月, 15(1):40
- 2 天津市白血病协作组. 血液病资料汇编(二), 1978年全国白血病防治研究会议资料. 南宁, 1978:9
- 3 Allen CFH, McKee GHW. Acridone. In: Blatt

- AH, ed. *Organic synthesis*, vol 2. 2nd ed. NY: Wiley, 1955:15-7
- 4 King EJ, Gilchrist M, Tarnoky AL. *Biochem J* 1946 Oct; 40 (4):706
 - 5 Wild F, Young JM. *J Chem Soc* 1965 Dec; (12):7261
 - 6 Wilson WR, Cain BF, Baguley BC. *Chem Biol Interact* 1977 Feb; 18 (2):163
 - 7 熊坂幹. 日大医志 1960; 19:3726

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Mar; 4 (1) : 63—67

BIOTRANSFORMATION OF 9-(*p*-METHYLANILINO) ACRIDINE IN RABBIT

HE Shao-xiong, WANG Dian-ying, SHI Gui-lan, DU Xiao-ying

(*Tianjin Institute of Materia Medica, Tianjin 300070*)

ABSTRACT The metabolic pathway of PMAA was studied with TLC and spectrofluorophotometric method in rabbits. After ig 100 mg/kg the urine and feces were collected and extracted with CHCl_3 and BuOH successively. Besides PMAA, 8 metabolites were identified.

It is supposed there are 2 metabolic pathways of PMAA in rabbits. The first, PMAA is converted to acridone through an unstable metabolite. The greater part of acridone is conjugated with sulfuric acid, glucuronic acid and cysteine; the smaller part of acridone is oxidized to 2-hydroxy-

acridone. In the second process, a part of PMAA is converted to 9-aminoacridine which is, in turn, conjugated with glucuronic acid.

The antitumor activity of PMAA was compared with that of the main metabolites by cultured BEL-7402 cells. The metabolic biotransformation of acridone decreased the activity, but 9-aminoacridine was more active than PMAA.

KEY WORDS 9-(*p*-methylanilino)acridine; metabolite; 9-aminoacridine; acridone; 2-hydroxyacridone