

新型抗抑郁化合物 WJ-14 在大鼠体内和人肝微粒体中 代谢产物的 HPLC-MS/MS 分析*

黄卫胤¹, 杨礼寿^{2,3}, 张轶雯⁴, 杨小生^{2,3**}, 叶林虎^{1,5**}

(1. 浙江省人民医院毕节医院 药学部, 毕节 551700; 2. 贵州省天然产物研究中心, 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550025; 4. 浙江省人民医院药学部杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014; 5. 华南理工大学附属第六医院, 佛山 528000)

摘要 目的: 研究新型抗抑郁化合物 WJ-14 在大鼠体内和人肝微粒体中的代谢产物和代谢途径。**方法:** 采用 HPLC-MS/MS 对大鼠血浆和尿液, 以及人肝微粒体体外孵育体系样本进行分析。色谱条件: 采用 Hypersil BDS C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以含 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。结合 WJ-14 的碎裂方式和特征碎片离子对 WJ-14 的代谢产物进行鉴定, 并推测其代谢途径。**结果:** 共鉴定出 WJ-14 的代谢产物 12 个, 大鼠体内 6 个, 人肝微粒体中 6 个, 其中 2 个代谢物在大鼠体内和人肝微粒体中都被检测到。WJ-14 的代谢途径为羟基化、去甲基化、水合、葡萄糖醛酸化和甲基化。**结论:** 利用 HPLC-MS/MS 技术对 WJ-14 的代谢产物和代谢途径进行研究, WJ-14 的代谢途径包括 I 相和 II 相代谢, 其中以 I 相代谢中的羟基化为主。研究结果可为 WJ-14 的制剂开发和应用提供参考。

关键词: WJ-14; 高效液相色谱-质谱联用技术; 代谢产物; 人肝微粒体; 代谢途径

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)12-2023-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0276

Identification of novel anti-depressant compound WJ-14 metabolites in rats and human liver microsomes by HPLC-MS/MS*

HUANG Wei-yin¹, YANG Li-shou^{2,3}, ZHANG Yi-wen⁴,
YANG Xiao-sheng^{2,3**}, YE Lin-hu^{1,5**}

(1. Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital Bijie Hospital, Bijie 551700, China; 2. Natural Products Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550014, China; 3. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 4. Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; 5. The Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528000, China)

Abstract Objective: To investigate the metabolites and metabolic pathways of WJ-14, a novel anti-depressant compound, in rats and human liver microsomes by HPLC-MS/MS. **Methods:** Samples of rat plasma and urine, as well as *in vitro* incubation system of human liver microsomes were analyzed by HPLC-MS/MS.

* 国家自然科学基金资助项目(81860609); 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2021]一般 424); 毕节市科技局联合基金项目([2023] 61); 佛山市“十四五”医学重点专科; 毕节市科技局重大专项([2023]2-1)

** 通信作者 杨小生 Tel:(0851)83809055; E-mail: gzenp@sina.cn
叶林虎 Tel:(0857)8295803; E-mail: Yelinhu@126.com

第一作者 Tel:17588815422; E-mail: weiyinhuang@126.com

Chromatographic conditions; the chromatographic conditions were as follows: Hypersil BDS C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 3 μm) column, with 0.1% formic acid aqueous solution (A) – methanol (B) as the mobile phase, gradient elution flow rate 0.4 mL · min⁻¹, column temperature 40 °C, and injection volume 5 μL. The identification of metabolites and speculation on the metabolic pathways of WJ-14 were conducted by comparing the fragmentation mode and characteristic fragment ions of WJ-14. **Results:** A total of 12 metabolites of WJ-14 were identified, including 6 in rat and 6 in human liver microsomes, with two metabolites were detected in both rat and human liver microsomes. The major metabolic pathways of WJ-14 were identified as hydroxylation, demethylation, hydration, glucuronidation and methylation. **Conclusion:** In this work, we investigated the metabolites and metabolic pathways of WJ-14 using HPLC – MS/MS for the first time. The metabolism of WJ-14 occurred in phase I and phase II metabolic reactions, in which hydroxylation in phase I is dominant. The results of the current study may provide valuable information for the formulation development and application of WJ-14.

Keywords: WJ-14; HPLC – MS/MS; metabolites; human liver microsomes; metabolic pathways

抑郁症是以情感低落、思维缓慢、意志活动减弱和认知功能受损等为主要临床特征的疾病,现已成为全球第二大医疗隐患^[1-3]。抑郁症发病机制尚未完全阐明且发病因素复杂,目前使用的抗抑郁药物存在效率低,起效慢,服用周期长等不足^[4]。

近年来研究发现,氨基酸类神经递质,尤其是谷氨酸与抑郁症的发病机制密切相关,在抑郁症患者顶叶皮质中发现谷氨酸水平明显升高^[5-6]。N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体是一种离子型的谷氨酸受体,其抑制剂或是变构调节剂可产生快速、持久的抗抑郁效果^[7-9]。2019年美国FDA批准艾司氯胺酮(esketamine, NMDA受体拮抗剂)鼻内制剂上市,用于治疗重度抑郁症,2023年在中国获批上市,与其他口服抗抑郁药联合使用,用于缓解成人伴有自杀意念的抑郁状态,具有起效快,持续时间长等特点,但其使用的成瘾性和不良反应仍值得关注^[10-11]。

在此前的研究中,设计并合成了一系列新型1-苯基-吡咯并[1,2-b]异喹啉-3-酮衍生物,代表化合物为(1*R*,10*aR*)-1-(4-氟苯基)-吡咯并[1,2-b]异喹啉-3-酮(WJ-14),母核结构为吡咯并异喹啉,吡咯环上1位为对氟苯基取代,结构式见图1^[12]。体内活性评价显示在慢性不可预见性刺激模型的小鼠中,WJ-14有明显的抗抑郁效果;体外活性评价显示其作用于NMDA受体(拮抗NMDA受体,对其受体蛋白的表达有较好的抑制作用),并对NMDA诱导的PC12细胞损伤有明显的保护作用;分子虚拟对接显示,WJ-14母核结构吡咯并异喹啉、对氟苯基、N原子及酮羰基与NMDA受体氨基酸

残基存在多种相互作用,能有效的嵌入到NMDA受体的蛋白空腔中,发挥显著的NMDA受体拮抗活性,具有良好的开发前景^[12-14]。此外,WJ-14能快速透过血脑屏障,大鼠口服给药后5 min,即可在其大脑内检测到WJ-14,具备快速起效抗抑郁化合物的药代动力学基础^[15]。进一步研究发现WJ-14在大鼠体内具有广泛的分布和消除,且口服给药后主要分布在肝脏,而肝脏是人体主要的代谢器官,是机体代谢外源性物质的主要场所^[15-18]。

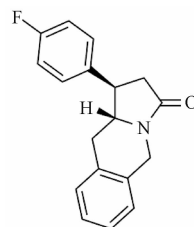


图1 WJ-14的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of WJ-14

因此,为了系统分析WJ-14在大鼠体内和人肝微粒体体外孵育体系中的代谢产物,本文基于HPLC – MS/MS方法,结合多反应监测 – 相关信息获取 – 增强产物离子扫描(MRM – IDA – EPI)技术对WJ-14的代谢产物进行系统分析^[19-21],并推测其代谢途径,为WJ-14深入的体内代谢研究、制剂开发和应用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 药物与试剂

WJ-14由贵州省天然产物研究中心提供(经

核磁共振氢谱、核磁共振碳谱以及 TLC 检测,纯度 >99%),人肝微粒体(批号 M10001.2018001,规格 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH,批号 814A022,纯度 >98%)均购自武汉普莱特生物医药技术有限公司;HPLC 级甲醇购自 Fisher Scientific 公司;HPLC 级甲酸购自上海 Macklin 公司;实验用水购自广东 Watsons 公司;Solutol HS-15 溶液购自上海 MedChemExpress 公司;其余试剂为分析纯,均购自国药集团化学试剂北京有限公司。

人肝微粒体在室温条件下解冻、分装并储存于液氮中。

1.2 仪器设备

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪,Agilent Technologies 公司;AB SCIEX 4500 QTRAP 质谱仪(配有 Metabolite ID 分析软件和 Analyst 1.6.3 数据处理系统),AB SCIEX 公司;ST16R 型高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific 公司;XP305AS 型十万分之一电子天平,上海析平科学仪器有限公司;THZ-82A 型水浴恒温振荡器,常州金坛良友仪器有限公司;离心浓缩仪,LABCONCO 公司;VORTEX-5 型漩涡混合器,海门其林贝尔仪器。

1.3 实验动物

16 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠[体质量 (200 ± 20)g]购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[合格证号:SCXK(湘)2019-0004],大鼠饲养于标准湿度、温度和光照条件下,实验开始前大鼠可自由进食饮水。本研究所有动物实验经浙江省人民医院毕节医院医学伦理委员会批准[批准号:伦理(2023)5-2号]。

2 方法与结果

2.1 WJ-14 大鼠体内代谢研究

2.1.1 WJ-14 给药液的配制 精密称取 WJ-14 粉末 20.0 mg,溶解于 1.0 mL 的 Solutol HS-15 溶液中,再加入 0.9% 生理盐水 19.0 mL,得到总体积为 20.0 mL,质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 WJ-14 给药液。

2.1.2 动物分组与给药 16 只大鼠随机分为 2 组(给药组和对照组),每组 8 只,给药开始前大鼠需禁食 12 h 但不禁水。给药组的给药剂量为 $8.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,取“2.1.1”项下 WJ-14 给药液进行口服灌胃给药(给药剂量依据为前期研究结

果,在给药 $8.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,在慢性不可预见性刺激模型中观察到较好的效果,并对 NMDA 受体蛋白表达有较好的抑制效果^[12-14])。对照组除不给予 WJ-14 外,其余与给药组平行。由于不同代谢物可能在给药后不同时间产生,因此本研究在给药后多点取血,以免遗漏可能的代谢产物。

2.1.3 生物样本的采集 大鼠灌胃给药后,分别在 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8 h^[15] 通过眼眶取血约 400 μL ,置于肝素化的离心管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得血浆样本,分别合并给药组、对照组 0~2 h、2~4 h、4~8 h 的血浆样本;收集并合并给药组、对照组大鼠 0~8 h 的尿液样本;将血浆和尿液样本保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,待用。

2.1.4 生物样本前处理 给药组取各时间段合并血浆或尿液样本 100 μL 。对照组取各时间段合并血浆或尿液样本 90 μL 加入 1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ WJ-14 给药液 10 μL 并混匀,使 WJ-14 在对照组血浆及尿液样本中的浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

采用液液萃取法,选择乙酸乙酯作为萃取试剂。在 100 μL 血浆或尿液样本加入乙酸乙酯 1.6 mL 后涡旋震荡萃取 10 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液转移至新的离心管中,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,挥干,再加入 80% 甲醇水溶液 200 μL 复溶,充分混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样分析。

2.2 WJ-14 体外代谢研究

2.2.1 WJ-14 给药液的配制 精密称取 WJ-14 粉末 10.0 mg,溶解于 1 mL 甲醇溶液中,得到 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ WJ-14 给药液。

2.2.2 体外孵育体系组成 建立人肝微粒体体外孵育体系,体系组成及终浓度为:人肝微粒体 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、NADPH ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾混合缓冲液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4)、氯化镁 ($3.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、WJ-14 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和水,控制反应总体积为 200 μL 。

2.2.3 分组及给药 体外孵育实验中设置 3 个对照组,分别是无人肝微粒体组、无底物组和无 NADPH 组,以充分考虑孵育体系组成中可能存在的干扰物,具体分组信息及各分组化合物组成见表 1,其中 WJ-14 给药液为“2.2.1”项下溶液,控制反应体系中甲醇的含量不超过 1%。实验组、对照组 1 及对照组 2 在不加入 NADPH 的条件下先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温

表 1 体外孵育体系分组 (μL)
Tab. 1 Grouping of *in vitro* incubation systems

组成 (constitute)	实验组 (experimental group)	对照组 1(无人肝微粒体) (control group 1, without human liver microsomes)	对照组 2(无 WJ-14) (control group 2, without WJ-14)	对照组 3(无 NADPH) (control group 3, without NADPH)
人肝微粒体(human liver microsomes) ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10	-	10	10
NADPH($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	40	40	40	-
磷酸氢二钠-磷酸二氢钾($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$) ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	100	100	100	100
氯化镁(MgCl_2) ($3.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	20	20	20	20
WJ-14($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2	2	-	2
水(H_2O)	28	38	30	68

振荡器中预孵育 5 min, 随后加入 NADPH 启动反应; 对照组 3 不含 NADPH, 直接启动反应。体外孵育实验反应时间为 4 h, 随后加入冰甲醇 200 μL 终止反应。

2.2.4 样本前处理 取“2.2.3”项下反应结束后的混合溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.3 实验条件

2.3.1 色谱条件 采用 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 ($100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, 3 μm), 以含 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B) 为流动相, 流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 采用梯度洗脱 (洗脱程序见表 2)。

表 2 WJ-14 的梯度洗脱程序
Tab. 2 Gradient elution program of WJ-14

t/min	流动相比例 (ratio of mobile phase)/%	
	流动相 A (mobile phase A)	流动相 B (mobile phase B)
0	90	10
2	90	10
4	35	65
12	35	65
12.1	90	10
14	90	10

2.3.2 质谱条件 使用电喷雾离子源在正离子模式, 喷雾电压 4 500 V, 离子化温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 气帘气压 68.95 kPa, 碰撞气氦气, 离子源雾化气 1 和离子源雾化气 2 气压均为 344.75 kPa, 去簇电压 120 V, 入口电压 10 V, 碰撞室出口电压 9 V, 碰撞能 50 eV, 碰撞能量变化范围 15 eV, 扫描范围为 m/z 50 ~ 1 000。

2.4 代谢产物分析

基于 MRM - IDA - EPI 技术对 WJ-14 进行代谢产物分析鉴定。首先记录 WJ-14 及其主要碎片离子的 m/z 信息, 随后使用 Metabolite ID 软件构建 WJ-14 可能进行的 I、II 相代谢的生物转化类型 (见表 3), 并建立转化后的代谢产物及其主要碎片离子的 m/z 信息。在分析过程中, 当 MRM 中某一通道的离子对产生的信号强度超过预设值, 则立即触发 IDA, 系统在 1 ms 内自动切换为线性离子阱模式, 触发 EPI, 离子阱阱集碎片离子并做质谱扫描, 得到相应 MRM 通道的母离子的二级质谱图, 从而用于该通道化合物的定性分析。数据采集处理系统采用 Analyst 1.6.3。

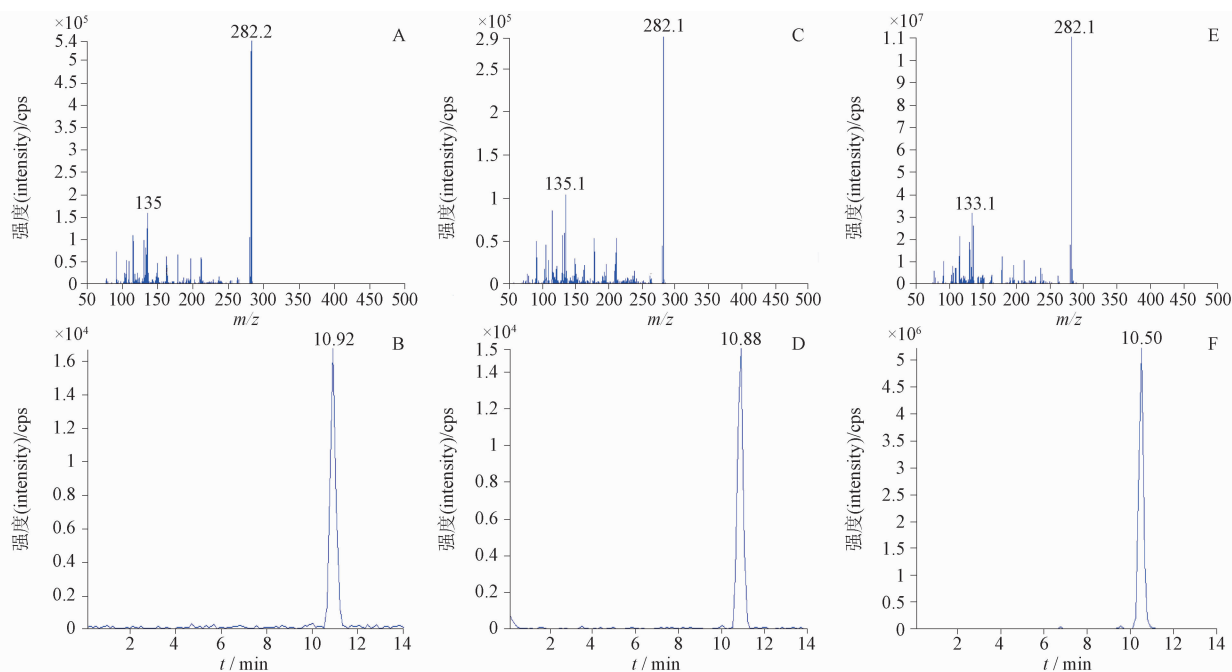
2.4.1 WJ-14 的质谱分析 在所述实验条件下, WJ-14 的保留时间分别为 10.92 min (血浆)、10.88 min (尿液) 和 10.50 min (体外孵育体系), 在不同样本基质中经碰撞后的碎片离子的 EPI 一致性高, 相关信息见图 2。WJ-14 的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NOF}$, 准分子离子为 m/z 282 $[\text{M} + \text{H}]^+$, WJ-14 的主要碎片离子 m/z 为 178、135、109、105、91。WJ-14 可能的裂解途径见图 3。根据药物体内代谢的一般规律, 代谢产物与原型药物具有相似的裂解途径, 且其碎片离子之间有很强的关联性。WJ-14 的裂解途径及主要碎片离子可为其代谢产物结构的表征提供结构信息。

2.4.2 WJ-14 的代谢产物分析 采用 MRM - IDA - EPI 技术对 WJ-14 的代谢产物进行分析。对比给药组和对照组的质谱图, 根据 WJ-14 的裂解途径和主要碎片离子信息, 结合 WJ-14 可能发生的代谢及其代谢产物与碎片离子的 m/z 信息, 对可能的代谢产物

表 3 常见的 I、II 相代谢的生物转化

Tab. 3 Biotransformation for common phase I and phase II metabolites

序号 (No.)	得到/失去 (gain/lose)	元素组成 (formula)	质量变化 (mass offset)	生物转化类型 (biotransformation type)
1	1	O	16	羟基化 (hydroxylation)
2	2	O	32	双羟基化 (di-hydroxylation)
3	3	O	48	三羟基化 (tri-hydroxylation)
4	1	H ₂ O	18	水合 (hydration)
5	1	H ₂	2	氢化 (hydrogenation)
6	-1	CH ₂	14	去甲基化 (demethylation)
7	-1	H ₂	2	脱氢 (dehydrogenation)
8	1	SO ₃	80	硫酸化 (sulfation)
9	1	CH ₂	14	甲基化 (methylation)
10	2	CH ₂	28	双甲基化 (di-methylation)
11	1	C ₆ O ₆ H ₈	176	葡萄糖醛酸化 (glucuronidation)
12	2	C ₆ O ₆ H ₈	352	双葡萄糖醛酸化 (bis-glucuronidation)
13	1	C ₆ O ₉ H ₈ S	256	葡萄糖醛酸-硫酸化 (gluc-sulfation)
14	1	C ₆ O ₇ H ₈	192	葡萄糖醛酸-羟基化 (gluc-hydroxylation)
15	1	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	305	谷胱甘肽结合 (gsh)
16	1	C ₆ H ₁₀ O ₅	162	糖基化 (glucose)



A, B. 血浆 (plasma) C, D. 尿液 (urine) E, F. 人肝微粒体 (human liver microsomes)

图 2 WJ-14 在不同样本中的 EPI 和保留时间

Fig. 2 EPI spectra and retention time of WJ-14 in different samples

进行定性分析。从样本分析结果的总离子流色谱图中得到 12 个代谢产物 (M1 ~ M12), 其中大鼠体内代谢产物有 6 个 (M1 ~ M6); 人肝微粒体外孵育体系中有 6 个 (M7 ~ M12)。相应代谢产物的保留时间、生

物转化类型、代谢产物及其主要碎片离子的 m/z 信息和来源见表 4, 大鼠体内代谢产物的空白样本图谱、提取离子流图谱及增强产物离子扫描图谱见图 4; 人肝微粒体外孵育体系中代谢产物的空白样本

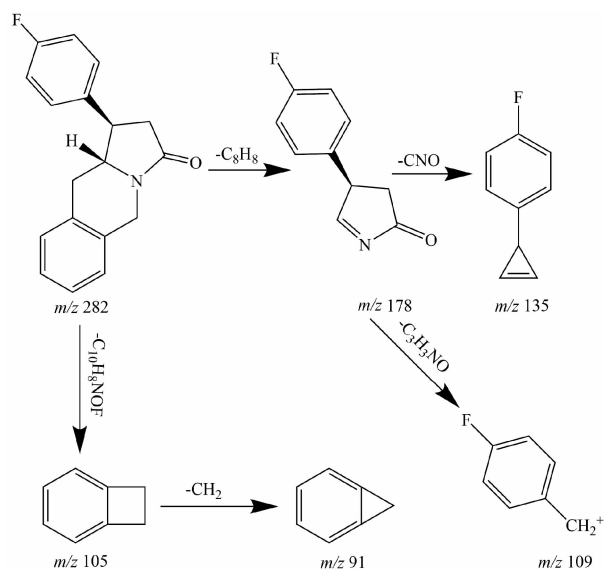


图3 正离子模式下 WJ-14 可能的裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of WJ-14 in positive ion mode

图谱、提取离子流图谱及增强产物离子扫描图谱见图5。WJ-14 在大鼠体内和人肝微粒体外孵育体系中的可能代谢途径见图6。

代谢物 M1 分析: 代谢物 M1 的保留时间为 4.71 min, 其分子式为 $C_{18}H_{18}NO_2F$, 准分子离子为 m/z 300 $[M+H]^+$, 比 WJ-14 多 18, 推测为 WJ-14 的水合代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M1 脱 H_2O 后的 WJ-14 原型药物; m/z 153 为 WJ-14 特征碎片离子 m/z 135 加 18 (H_2O) 后的离子; m/z 196 为 WJ-14 特征碎片离子 m/z 178 加 18 (H_2O) 后的离子。M1 在大鼠体内血浆和尿液中都能检测到。

代谢物 M2 分析: 代谢物 M2 的保留时间为 9.26 min, 其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_4F$, 准分子离子为 m/z 330 $[M+H]^+$, 比 WJ-14 多 48, 推测为 WJ-14 的三羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M2 脱 3OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 151 为

表4 WJ-14 在大鼠和人肝微粒体中的代谢产物

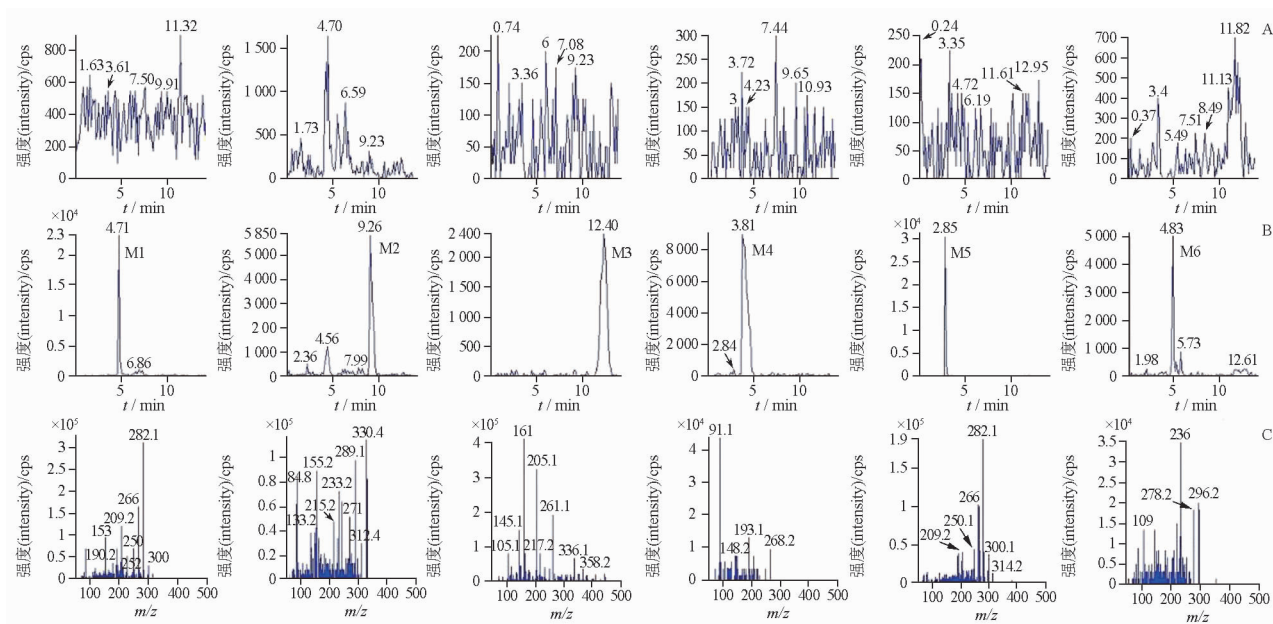
Tab. 4 Metabolites of WJ-14 in rats and human liver microsomes

代谢物 (metabolite)	保留时间 (retention time)/min	生物转化类型 (biotransformation type)	$[M+H]^+$ m/z	特征碎片离子 (major fragments ions) m/z	检测位置(detection location)				
					血浆 (plasma) (0~2 h)	血浆 (plasma) (2~4 h)	血浆 (plasma) (4~8 h)	尿液 (urine)	人肝微粒体 (human liver microsomes)
M1	4.71	水合(hydration)	300	282, 153, 196	+	+	-	+	-
M2	9.26	三羟基化(tri-hydroxylation)	330	282, 151, 105	-	+	+	+	+
M3	12.40	去甲基化-葡萄糖醛酸化 (demethylation-glucuronidation)	444	268, 163, 121	-	+	+	-	-
M4	3.81	去甲基化(demethylation)	268	121, 91, 109	+	-	-	+	+
M5	2.85	双羟基化(di-hydroxylation)	314	282, 167, 210	-	+	+	-	-
M6	4.83	甲基化(methylation)	296	135, 149, 192	-	+	-	+	-
M7	4.74	羟基化(hydroxylation)	298	282, 135, 121	-	-	-	-	+
M8	5.76	羟基化(hydroxylation)	298	282, 178, 121	-	-	-	-	+
M9	7.48	羟基化(hydroxylation)	298	282, 135, 121	-	-	-	-	+
M10	5.51	去甲基化(demethylation)	268	135, 109, 91	+	-	-	+	+
M11	5.70	三羟基化(tri-hydroxylation)	330	282, 312, 135	-	+	+	+	+
M12	7.46	三羟基化(tri-hydroxylation)	330	282, 312, 135	-	+	+	+	+

WJ-14 特征碎片离子 m/z 135 加 OH 后的离子; m/z 105 为 WJ-14 的特征碎片离子。M2 在大鼠体内血浆和尿液中都能检测到, 同时也在人肝微粒体中也检测到相同质荷比的准分子离子。

代谢物 M3 分析: 代谢物 M3 的保留时间为 12.40 min, 其分子式为 $C_{23}H_{22}NO_7F$, 准分子离子为 m/z 444 $[M+H]^+$, 比 WJ-14 多 162, 推测为 WJ-14

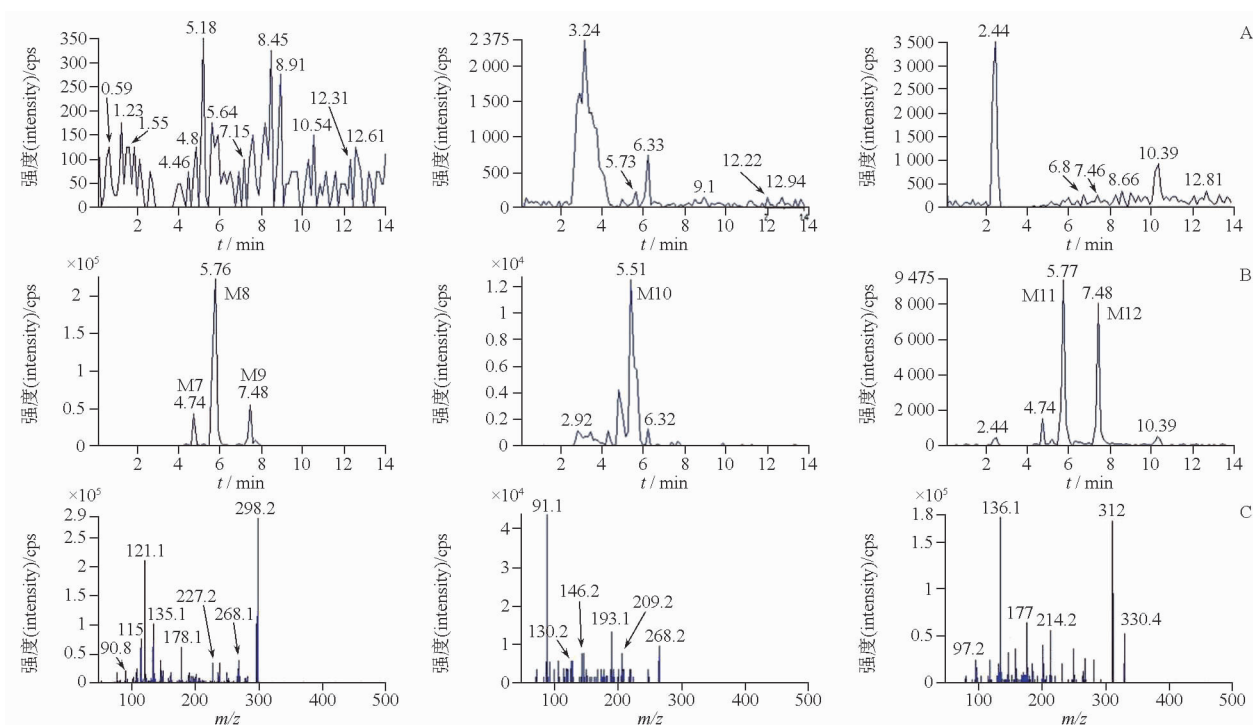
先发生一相代谢反应去甲基化(-14)后, 再发生二相代谢反应葡萄糖醛酸化结合(+176)代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 268 为 M3 脱葡萄糖醛酸化后的离子, 同时也是 WJ-14 去甲基后的离子; m/z 163 为 M3 特征碎片离子 m/z 268 丢失 105 碎片后的离子; m/z 121 为 WJ-14 特征碎片离子 m/z 135 丢失 14 (CH_2) 碎片后的离子。M3 只在大鼠体内血浆中检测到。



M1. 水合(hydration) M2. 三羟基化(tri-hydroxylation) M3. 去甲基化-葡萄糖醛酸化(demethylation-glucuronidation) M4. 去甲基化(demethylation) M5. 双羟基化(di-hydroxylation) M6. 甲基化(methylation)

图4 WJ-14大鼠体内代谢产物的空白样本图谱(A)、提取离子流图谱(B)及增强产物离子扫描图谱(C)

Fig. 4 Blank sample chromatograms(A), extracted ion chromatograms(B) and enhanced product ion scan chromatograms(C) of metabolites of WJ-14 in rats



M7. 羟基化(hydroxylation) M8. 羟基化(hydroxylation) M9. 羟基化(hydroxylation) M10. 去甲基化(demethylation) M11. 三羟基化(tri-hydroxylation) M12. 三羟基化(tri-hydroxylation)

图5 WJ-14在人肝微粒体中代谢产物的空白样本图谱(A)、提取离子流图谱(B)及增强产物离子扫描图谱(C)

Fig. 5 Blank sample chromatograms(A), extracted ion chromatograms(B) and enhanced product ion scan chromatograms(C) of metabolites of WJ-14 in human liver microsomes

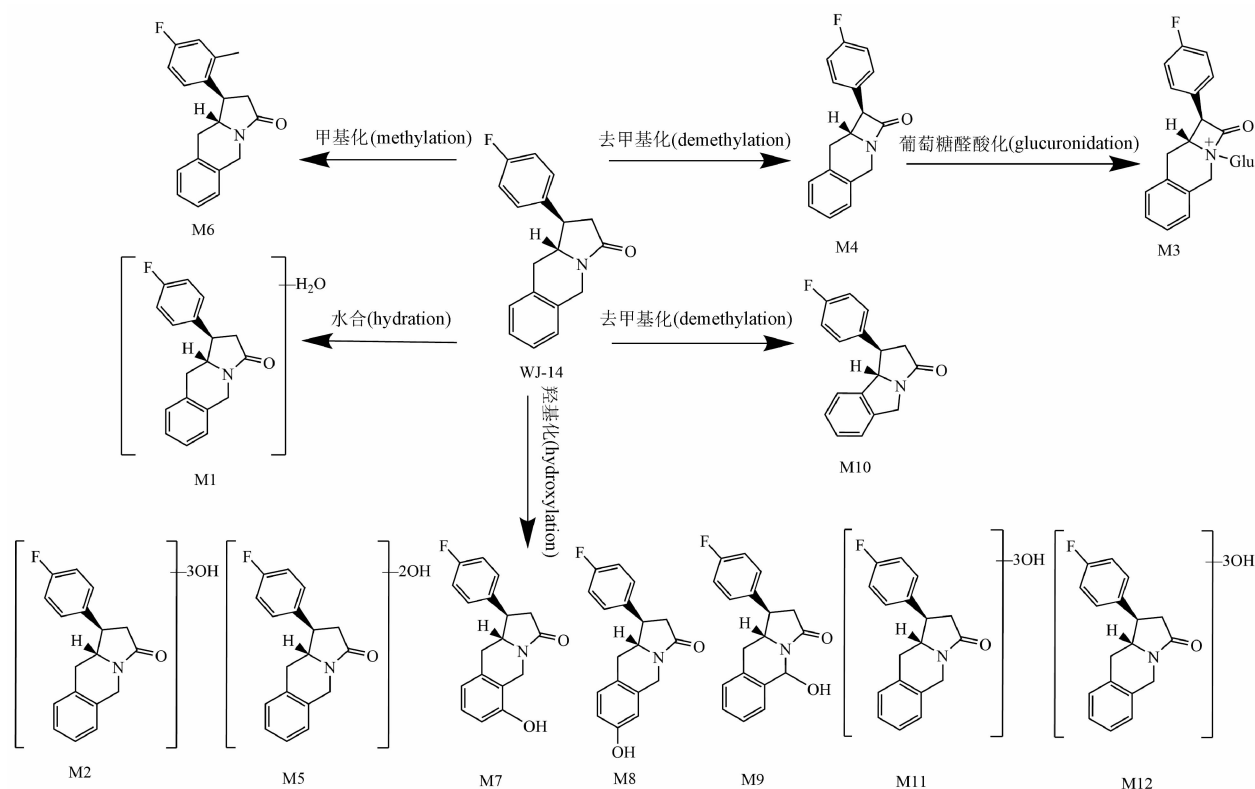


图6 WJ-14可能的代谢途径

Fig. 6 Proposed metabolic pathways of WJ-14

代谢物 M4 分析:代谢物 M4 的保留时间为 3.81 min, 其分子式为 $C_{17}H_{14}NOF$, 准分子离子为 m/z 268 $[M + H]^+$, 比 WJ-14 少 m/z 14, 推测为 WJ-14 的去甲基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 121 为 WJ-14 特征碎片离子 m/z 135 丢失 $14(CH_2)$ 碎片后的离子; m/z 91 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 109 为 WJ-14 的特征碎片离子。M4 在大鼠体内血浆和尿液中都能检测到, 同时在人肝微粒体中也检测到相同质荷比的准分子离子。

代谢物 M5 分析:代谢物 M5 的保留时间为 2.85 min, 其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_3F$, 准分子离子为 m/z 314 $[M + H]^+$, 比 WJ-14 多 32, 推测为 WJ-14 的双羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M5 脱 2OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 167 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 135 加 32(2OH) 后的离子; m/z 210 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 178 加 32(2OH) 后的离子。M5 只在大鼠体内血浆中检测到。

代谢物 M6 分析:代谢物 M6 的保留时间为 4.83 min, 其分子式为 $C_{19}H_{18}NOF$, 准分子离子为 m/z 296 $[M + H]^+$, 比 WJ-14 多 14, 推测为 WJ-14 的甲基

化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 149 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 135 加 $14(CH_2)$ 后的离子; m/z 192 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 178 加 $14(CH_2)$ 后的离子。M6 在大鼠体内血浆和尿液中都能检测到。

代谢物 M7 分析:代谢物 M7 的保留时间为 4.74 min, 其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_2F$, 准分子离子为 m/z 298 $[M + H]^+$, 比 WJ-14 多 16, 推测为 WJ-14 的单羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M7 脱 OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 121 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 105 加 OH 后的离子。M7 只在人肝微粒体中检测到。

代谢物 M8 分析:代谢物 M8 的保留时间为 5.76 min, 其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_2F$, 准分子离子为 m/z 298 $[M + H]^+$, 比 WJ-14 多 16, 推测为 WJ-14 的单羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M7 脱 OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 178 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 121 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 105 加 OH 后的离子。M8 只在人肝微粒体中检

测到。

代谢物 M9 分析:代谢物 M9 的保留时间为 7.48 min,其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_2F$,准分子离子为 m/z 298 $[M+H]^+$,比 WJ-14 多 16,推测为 WJ-14 的单羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M7 脱 OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 121 为 WJ-14 的特征碎片离子 m/z 105 加 OH 后的离子。M9 只在人肝微粒体中检测到。代谢物 M7~M9 中均发现较强的 m/z 121 的碎片离子,同时也出现 m/z 135 和 m/z 178 等 WJ-14 的特征碎片离子,推测代谢的位置为异喹啉骨架上。

代谢物 M10 分析:代谢物 M10 的保留时间为 5.51 min,其分子式为 $C_{17}H_{14}NOF$,准分子离子为 m/z 268 $[M+H]^+$,比 WJ-14 少 14,推测为 WJ-14 的去甲基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 109 为 WJ-14 的特征碎片离子; m/z 91 为 WJ-14 的特征碎片离子。M10 在人肝微粒体中检测到,同时在大鼠体内血浆和尿液中也检测到相同质荷比的准分子离子。

代谢物 M11 分析:代谢物 M11 的保留时间为 5.70 min,其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_4F$,准分子离子为 m/z 330 $[M+H]^+$,比 WJ-14 多 48,推测为 WJ-14 的三羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M11 脱 OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 312 为 M11 脱 H_2O 后的离子; m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子。M11 在人肝微粒体中检测到,同时在大鼠体内血浆和尿液中也检测到相同质荷比的准分子离子。

代谢物 M12 分析:代谢物 M12 的保留时间为 7.46 min,其分子式为 $C_{18}H_{16}NO_4F$,准分子离子为 m/z 330 $[M+H]^+$,比 WJ-14 多 48,推测为 WJ-14 的三羟基化代谢产物。主要的特征碎片离子 m/z 282 为 M12 脱 OH 后的 WJ-14 原型药物; m/z 312 为 M12 脱 H_2O 后的离子; m/z 135 为 WJ-14 的特征碎片离子。M12 在人肝微粒体中检测到,同时在大鼠体内血浆和尿液中也检测到相同质荷比的准分子离子。

3 讨论

本文采用 HPLC-MS/MS 结合 MRM-IDA-EPI 技术首次对新型 NMDA 受体拮抗剂 WJ-14 口服给药后大鼠体内以及人肝微粒体体外孵育体系中的代谢产物进行鉴定。在方法建立阶段,样本前处理方法我们考察了液液萃取法和蛋白沉淀法,后者通常使用甲醇或者乙腈作为沉淀试剂,前期分析中

发现该方法提取回收率低且有明显的基质效应,不利于定性分析 WJ-14 在大鼠体内的代谢产物,因此选择液液萃取法作为大鼠体内样本的前处理方法^[1]。

WJ-14 在 3 种基质中保留时间差异小,且碎片离子的 EPI 一致性高,色谱条件中梯度洗脱程序能对不同代谢物进行较好的分离;且在质谱条件中,每个代谢产物都有 3~5 个主要碎片离子以供结构解析。本文所建立的 MRM-IDA-EPI 方法稳定、可靠,重复性好,可用于 WJ-14 代谢产物的结构鉴定。

在大鼠给药模型中,通过在对照组血浆及尿液样本中加入 WJ-14 作为空白样本,与给药组样本进行比对来确定代谢产物,综合考虑 WJ-14 的溶液中本身存在的其他干扰物质对实验结果的影响。而在人肝微粒体体外孵育体系中,通过设置 3 个对照组——无人肝微粒体组、无底物组和无 NADPH 组,来充分考虑孵育体系组成中可能存在的干扰物质。

本实验共鉴定 12 个代谢产物,其中大鼠体内代谢产物有 6 个(M1~M6);人肝微粒体体外孵育体系中代谢产物有 6 个(M7~M12)。WJ-14 的代谢反应涉及 I 相代谢(羟基化、去甲基化、水合)和 II 相代谢(葡萄糖醛酸化、甲基化),其中以 I 相代谢为主,而 I 相代谢中,WJ-14 主要发生的代谢类型为羟基化。其中准分子离子为 m/z 268 $[M+H]^+$ 的代谢物 M4 和 M10,以及 m/z 330 $[M+H]^+$ 的代谢物 M2、M11、M12 在大鼠体内和人肝微粒体体外孵育体系中都检测到,但其保留时间不同,推测是发生了相同的代谢反应类型,由代谢反应的不同位置导致。代谢物 M3 结合了 I 相(去甲基化)和 II 相代谢反应(葡萄糖醛酸化)。代谢物 M7~M9 中均发现较强的 m/z 121 的碎片离子,同时也出现 m/z 135 和 m/z 178 等 WJ-14 的特征碎片离子,推测代谢的位置为异喹啉骨架上。

本文通过 HPLC-MS/MS 技术对新型 NMDA 受体拮抗剂 WJ-14 在大鼠体内和人肝微粒体体外孵育体系中的代谢产物和代谢途径进行了系统的分析鉴定,将为 WJ-14 的后续制剂开发和应用提供参考。但对于代谢反应相同而代谢位置不同或具有相似质谱碎裂方式的代谢产物,仅通过质谱技术难以确定其代谢位置,有待后续进一步研究。

参考文献

[1] 行浩然,张曦,张盈盈,等.青少年抑郁症使用抗抑郁药物的

- 临床进展[J]. 昆明医科大学学报, 2024, 45(7): 168
XING HR, ZHANG X, ZHANG YY, *et al.* Advancements in the clinical use of antidepressants for adolescent depression [J]. *J Kunming Med Univ*, 2024, 45(7): 168
- [2] 张咪雪, 刘莎. 抑郁症的药物治疗新进展[J]. 重庆医科大学学报, 2024, 49(5): 631
ZHANG MX, LIU S. Recent advances in pharmacotherapy for depression [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2024, 49(5): 631
- [3] 徐蕊, 黄兴兵. 难治性抑郁症非药物治疗新进展[J]. 实用医学杂志, 2024, 40(4): 439
XU R, HUANG XB. Progress of non-pharmacological treatments for treatment-resistant depression [J]. *J Pract Med*, 2024, 40(4): 439
- [4] 郑敏, 冯艳茹, 崔浩亮, 等. 抑郁症患者生物标志物检测技术的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 393
ZHENG M, FENG YR, CUI HL, *et al.* Research progress of biomarker detection technology in patients with depression [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(3): 393
- [5] ESPADINHA M, VIEJO L, LOPES R, *et al.* Identification of tetracyclic lactams as NMDA receptor antagonists with potential application in neurological disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 194: 112242
- [6] 吴翔, 张巧俊, 李立博. 海马 NMDA 受体在认知障碍中的研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2023, 23(8): 577
WU X, ZHANG QJ, LI LB. Research progress of hippocampal NMDA receptors in cognitive impairment [J]. *J Neurosci Ment Health*, 2023, 23(8): 577
- [7] WITKIN JM, CERNE R, NEWMAN AH, *et al.* *N*-substituted-3-alkoxy-derivatives of dextromethorphan are functional NMDA receptor antagonists *in vivo*: evidence from an NMDA-induced seizure model in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2021, 203: 173154
- [8] 何滕, 许向阳, 徐祥清, 等. 氯胺酮治疗抑郁症的过去、现在及未来[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(10): 1125
HE T, XU XY, XU XQ, *et al.* Ketamine for depression treatment: past, present, and future [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2022, 27(10): 1125
- [9] 叶玉莹, 罗扬文, 于沛. NMDA 受体及其拮抗剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2022, 41(4): 251
YE YY, LUO YW, YU P. Research progress of NMDA receptor and NMDA receptor inhibitors [J]. *J Pharm Res*, 2022, 41(4): 251
- [10] JHA MK, WILLIAMSON DJ, MAGHAREHABED G, *et al.* Intranasal esketamine effectively treats treatment-resistant depression in adults regardless of baseline irritability [J]. *J Affect Disord*, 2023, 321: 153
- [11] SWAINSON J, THOMAS RK, ARCHER S, *et al.* Esketamine for treatment resistant depression [J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(10): 899
- [12] 杨小生, 杨礼寿, 陈发菊, 等. 1-苯基-吡咯并异喹啉-3-酮类化合物及其制备方法和应用: 中国, CN112094267A [P]. 2020-12-18
YANG XS, YANG LS, CHEN FJ, *et al.* 1-Phenyl-Pyrrolo[1,2-b]Isoquinolines-3-Ketone, Preparing Method and Application: China, CN112094267A [P]. 2020-12-18
- [13] YANG L, LIU H, WANG E, *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel 1-phenyl-pyrrolo[1,2-b]isoquinolin-3-one derivatives as antagonists for the glycine binding site of the NMDA receptor [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 258: 115624
- [14] YANG L, YANG Q, WANG E, *et al.* Synthesis of novel 1-phenyl-benzopyrrolizidin-3-one derivatives and evaluation of their cytoprotective effects against NMDA-induced injury in PC12 cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, 59: 116675
- [15] HUANG W, ZHANG Y, YANG L, *et al.* Pharmacokinetics, absolute bioavailability, and tissue distribution of WJ-14, a novel *N*-methyl-d-aspartate receptor antagonist, in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. *Biomed Chromatogr*, 2023: e5823 [2024-02-09]. <https://doi.org/10.1002/bmc.5823>
- [16] 张雯雯, 刘鑫, 温成铭, 等. 体外代谢体系中中药及其成分对肝脏 CYP450 代谢酶抑制作用的研究进展 [J]. 药学学报, 2022, 57(2): 303
ZHANG WW, LIU X, WEN CM, *et al.* Review of the *in vitro* inhibitory effects of traditional Chinese medicine and its components on CYP450 enzymes in liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(2): 303
- [17] 师少军. 肝脏“代谢-转运互作”及其对药物药代动力学、疗效和毒性影响的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(5): 579
SHI SJ. Recent advances in hepatic “metabolism-transport interplay” and its effect on drug pharmacokinetics, clinical efficacy and toxicity [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2020, 40(5): 579
- [18] 赵世宇, 刘帅兵, 王月琴, 等. *m*-6A 修饰对药物代谢酶和药物转运体的调控作用 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(7): 1221
ZHAO SY, LIU SB, WANG YQ, *et al.* *m*-6A modification regulates drug-metabolizing enzymes and drug transporters [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(7): 1221
- [19] YE LH, XIAO BX, LIAO YH, *et al.* Metabolism profiles of nuciferine in rats using ultrafast liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(8): 1216
- [20] ZHANG S, CHEN S, ZHU F, *et al.* Rapid determination of five common toxic alkaloids in blood by UPLC-MRM-IDA-EPI: application to poisoning case [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2023, 63: 102267
- [21] FRANZIN M, DI LENARDO R, RUOSO R, *et al.* Simultaneous multi-targeted forensic toxicological screening in biological matrices by MRM-IDA-EPI mode [J]. *Arch Toxicol*, 2024, 98(10): 3231

(本文于2024年4月24日收到)