Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

ISPITIVANJE STRUKTURE METABOLITA ALPRENOLOLA METODOM GASNA HROMATOGRAFIJA — SPEKTROMETRIJA MASA

MELIHA LEKIĆ, LJILJANA KUDRA, MIROSLAV ŠOBER, BRANKO NIKOLIN
Institut za hemiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo
Farmaceutski fakultet, Sarajevo

UDC 615.014

Apstrakt. Alprenolol, kao i većina beta-adrenergičnih blokatora, podliježe brzoj metaboličkoj transformaciji u humanom organizmu. Kao rezultat metaboličkih promjena alprenolola, do sada su u urinu identifikovani slijedeći metaboliti: 4-hidroksi-alprenolol, N-dezizopropil-alprenolol i odgovarajući glukuronidi (1).

U radu je prikazana identifikacija novog metabolita alprenolola, metoksi-hidroksi-alprenolola, koja je provedena priređivanjem derivata i ispitivanjem njihove strukture sa vezanim sistemom gasna hromatografija — spektrometrija masa.

Ključne riječi: alprenolol, metaboliti, gasna hromatografija — spektrometrija masa, identifikacija.

UVOD

Ispitivanje sudbine beta-adrenergičnih blokatora u humanom organizmu, praćenje njihovog metabolizma i njihovo određivanje u tjelesnim tečnostima neophodno je za pravilno doziranu terapijsku primjenu, ali i za kontrolu eventualne zloupotrebe. Većina beta-adrenergičnih blokatora se ekstenzivno metabolizira po tipu »prvog prolaza kroz jetru« (2), pri čemu nastaju neki farmakološki aktivni metaboliti (3). Značajno je da pri ovom tipu metabolizma znatno varira sadržaj beta-adrenergičnih blokatora i njihovih metabolita u tjelesnim tečnostima kod pojedinih osoba nakon uzimanja iste doze.

Za identifikaciju i određivanje beta-adrenergičnih blokatora najčešće se upotrebljavaju gasna hromatografija i hromatografija pod povišenim pritiskom, a za ispitivanje strukture metabolita gasna hromatografija — spektrometrija masa.

Tankoslojnom hromatografijom može se određivati pindolol u plazmi i urinu (4). Hromatografija pod visokim pritiskom uz upotrebu

Rad je finansiran sredstvima SIZ-a nauke BiH.

ultraljubičastog ili fluorescentnog detektora koristi se za određivanje propranolola (5), labetalola (6), metoprolola (7), sotalola (8) i njihovih metabolita.

Pri identifikaciji i određivanju pojedinih beta-adrenergičnih blokatora u biološkim uzorcima gasnom hromatografijom upotrebljavane su punjene i kapilarne kolone sa različitim stacionarnim fazama (9), uz upotrebu plameno-jonizacionog i elektron-apsorbujućeg detektora (10). Radi poboljšanja hromatografskih osobina, beta-adrenergični blokatori i njihovi metaboliti određivani su u urinu u obliku trifluoracetil- (11), heptafluorbutiril- i trimetilsilil-derivata (12).

Metabolizam beta-adrenergičnih blokatora vrlo intenzivno se proučava zahvaljujući razvoju spektrometrije masa i njenim povezivanjem sa gasnom hromatografijom uz primjenu brzih i moćnih računarskih sistema. Upotrebom ovakvog sistema provedeno je razdvajanje i određivanje strukture metabolita oksprenolola (9), metoprolola (13), timolola (12), alprenolola (1) i nadolola (14).

U ovom radu ispitani su ekstrakti urina zdravih osoba sakupljeni u vremenskim intervalima od 3, 6, 9 i 12 sati nakon jednokratne oralne doze od 50 mg alprenolol hidrohlorida (»Aptin«, SBS »Bosnalijek«) radi identifikacije prisutnih metabolita.

Radi dobivanja što boljih hromatografskih karakteristika, povećanja masa ispitivanih supstanci i dobivanja karakterističnih fragmenata na osnovu kojih je moguća brza i pouzdana identifikacija, provedena je selektivna derivatizacija ispitivanih supstanci. Dobiveni N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivati identificirani su na temelju analize karakterističnih fragmentnih jona dobivenih vezanim sistemom gasna hromatografija — spektrometrija masa na visoko selektivnoj kapilarnoj koloni.

MATERIJAL I METODE

Ekstrakcija

5 ml urina podvrgne se kiselinskoj hidrolizi sa HCl, 6 mol/dm^3 (»Kemika«) uz dodatak 50 mg cisteina (»Merck«) na 100°C u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi hidrolizatu se doda 5 ml etera (»Merck«) i dobro promućka. Eterski sloj se odbaci, a zaostala vodena faza neutralizira se sa KOH, koncentracije 12 mol/dm^3 (»Merck«). Podešavanje pH-vrijednosti na 9,6 postiže se dodatkom krutog pufera $NaHCO_3/Na_2CO_3$ u omjeru 2:1.

Ekstrakcija alprenolola i njegovih metabolita vrši se dodatkom 5 ml svježe destiliranog etera i ekstrahuje 10 minuta. Nakon centrifugiranja na 3000 obr/min. u trajanju od 5 minuta, eterski sloj se odvoji i upari u struji nitrogena na 45°C, a ostatak se suši u vakuum-eksikatoru sa P_2O_5 i KOH.

Derivatizacija

1. Priređivanje N, O-trifluoracetil derivata (N,O-TFA-derivati)

Na suhi eterski ekstrakt doda se 20 µl anhidrida trifluoracetatne kiseline (»Merck«) i grije 2 minute na 60°C. Smjesa se upari do suha, a ostatak se otopi u 100 µl etilacetata (»Merck«) i podvrgne analizi metodom gasna hromatografija — spektrometrija masa (GC-MS analizi).

2. Priređivanje N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivata (N-TFA,O-TMS — derivati)

Suhi eterski ekstrakt tretira se sa 10 µl MSTFA* (»Merck«) 2 minuta na 60°C, a zatim se doda 10 µl MBTFA** (»Merck«) i zagrijava 5 minuta na 80°C.

Dobiveni N-TFA,O-TMS — derivati ispitani su GC-MS metodom.

Identifikacija

Za određivanje strukture metabolita alprenolola korišten je vezani sistem gasni hromatograf DANI 3800 HR — dvostrukofokusirajući spektrometar masa VG 7070 E (VG ANALYTICAL) uz upotrebu računara DIGITAL PDP 8-a i PDP 11/23 (Digital Equipment Corporation).

Separacija metabolita provedena je na kapilarnoj koloni DB-1 dimenzija 25 m x 0,32 mm (John and Wihayl Scientific) uz protok helijuma kao gasa nosača od 2 ml/min. i temperaturu injektora od 260°C. Korišten je temperaturni program pećnice:

160°C/1 min. — (16°C/min.) — 290°C/8 min.

Injicirano je po 1 µl uzorka splitless-tehnikom. Jonizacija uzoraka provedena je udarom elektrona energije 70 eV na temperaturi od 200°C.

REZULTATI I DISKUSIJA

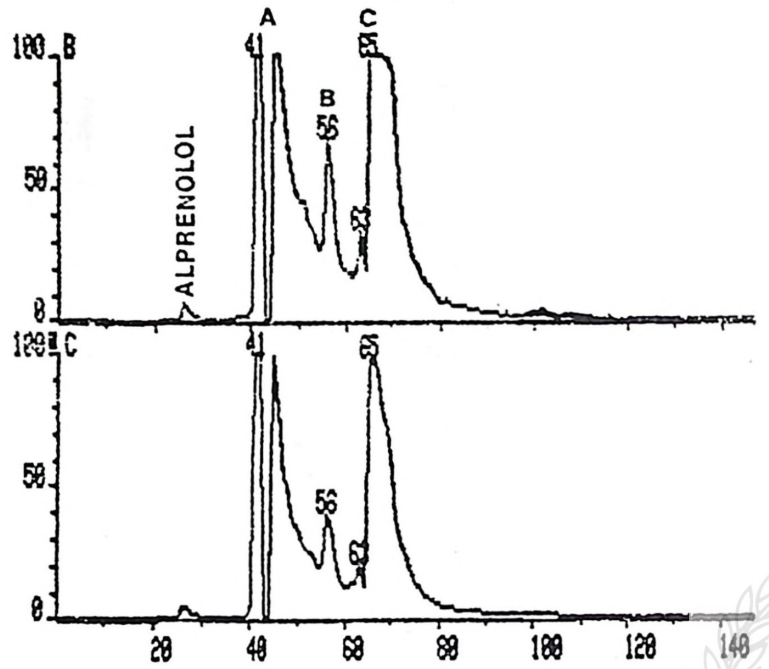
Ispitivanjem je utvrđeno da se alprenolol izlučuje putem urina uglavnom u formi metabolita i da je količina nemetaboliziranog alprenolola veoma mala i može da se identifikuje u urinu samo u prva tri sata nakon uzimanja jednokratne doze preparata (1). Pored već poznatih metabolita alprenolola: hidroksi-alprenolola i epihidroksi-alprenolola, u sakupljenim uzorcima urina identifikovali smo i novi metabolit alprenolola.

Na slici 1 prikazani su hromatogrami jonske struje fragmentnih jona m/z 266 i m/z 308, jona koji su signifikantni za N,O-TFA derivate beta adrenergičnih blokatora sa bočnim lancem koji sadrži izopropilnu grupu (15). Značajni hromatografski signali označeni su slovima A, B i C. Signali A i C odgovaraju N,O-TFA derivatima metabolita alprenolola poznate strukture hidroksi-alprenololu i epihidroksi-alprenololu.

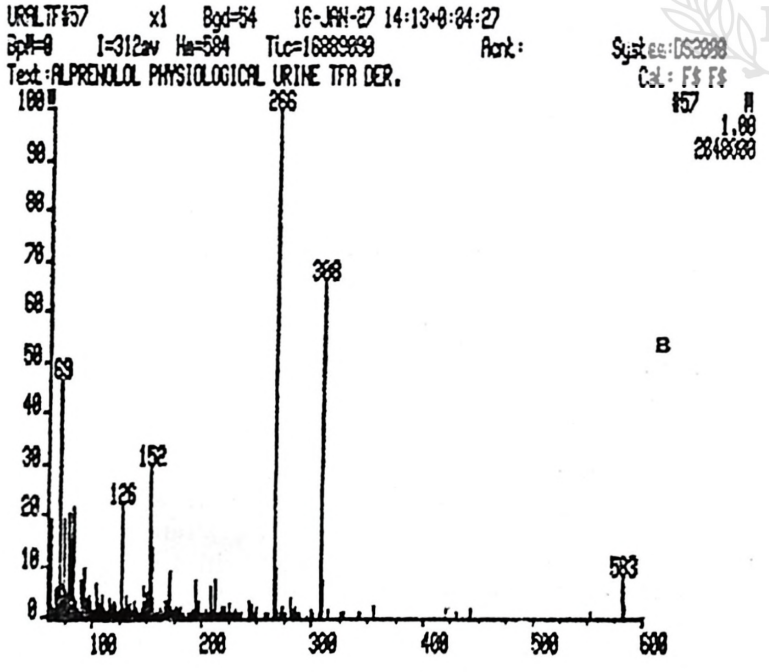
---

* MSTFA = N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamid.

** MBTFA = N-metil-bis-trifluoracetamid.



Slika 1. Hromatogram jonskih struja jona m/z 266 i m/z 308



Slika 2. Spektogram masa N, O-TFA derivata koji odgovara hromatografskom signalu B

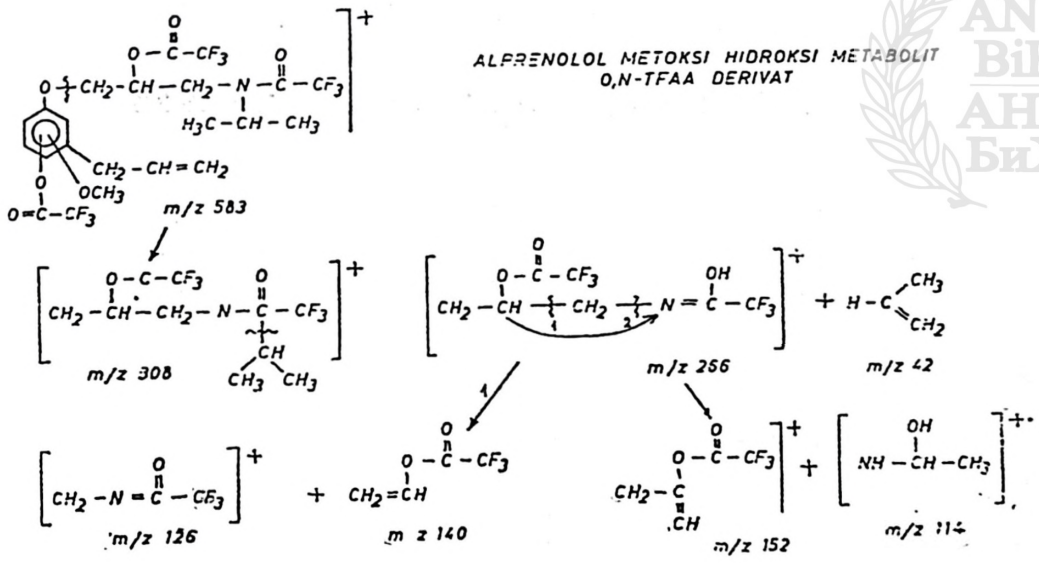
Cilj naših istraživanja bio je hromatografski signal B, za koji smo pretpostavili da pripada metabolitu alprenolola nepoznate strukture. Detaljnom analizom spektograma masa prikazanog na slici 2 i na osnovu do sada poznatih principa fragmentacije N,O-TFA-derivata ovog tipa beta-adrenergičnih blokatora pokušali smo riješiti strukturu ovog metabolita alprenolola.

Na spektrogramu masa jasno se uočavaju signali koji potiču od karakterističnih jona m/z 308 i m/z 266. Jon mase 308 nastaje odcjepljenjem bočnog lanca od molekulskog jona. Kao najintenzivniji javlja se signal na m/z 266 koji nastaje daljom fragmentacijom jona m/z 308 uz izdvajanje fragmenta m/z 42. Jon mase 266 podliježe daljem procesu cijepanja koji teče u dva pravca i kao rezultat toga nastaju fragmentni joni m/z 152 i m/z 126.

Kao važan signal u rješavanju strukture nepoznatog metabolita poslužio nam je signal koji se nalazi na kraju spektograma masa a potiče od molekulskog jona m/z 583.

Na osnovu ovih informacija pretpostavili smo da se radi o metoksi-hidroksi alprenololu.

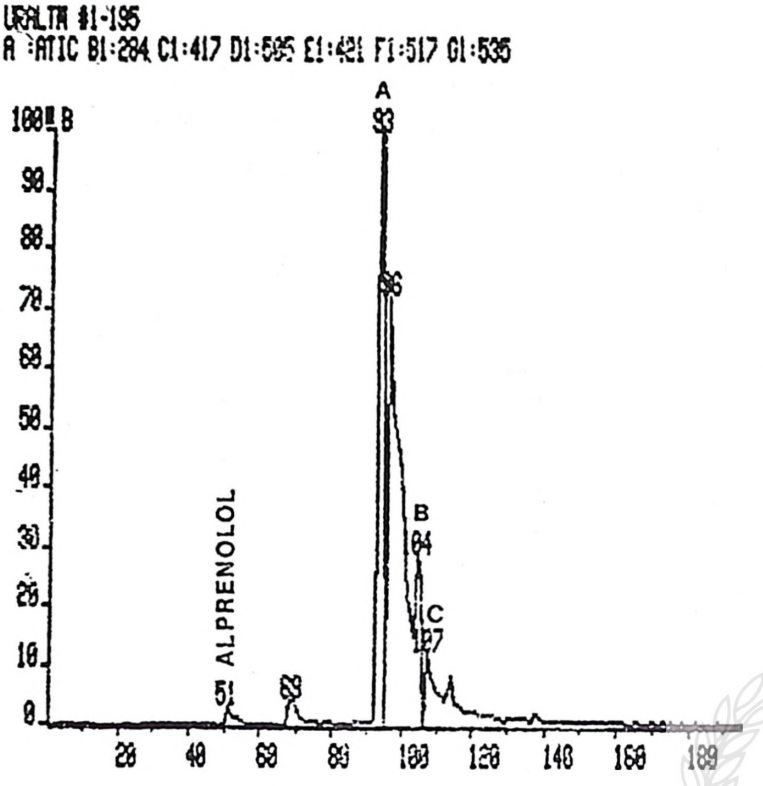
Na shemi 1. prikazana je fragmentacija N,O-TFA-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture.



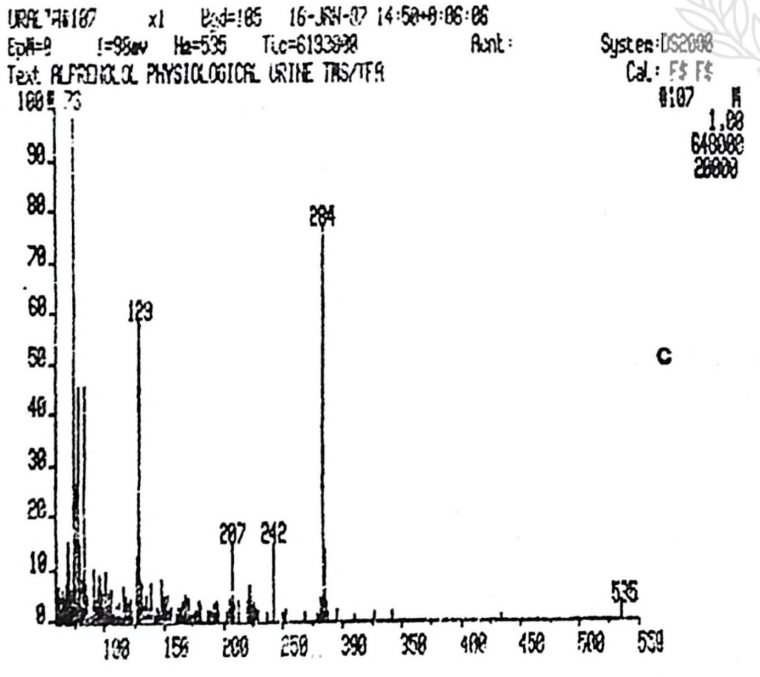
Shema 1. Fragmentacija N,O-TFA-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture

Da bi se pouzdano mogla riješiti struktura nepoznatog metabolita pristupilo se selektivnoj derivatizaciji ekstrakta urina sakupljenih u različitim vremenskim intervalima nakon uzimanja alprenolola. Detaljnom GC-MS analizom priređenih N-TFA,O-TMS-derivata došli smo do sljedećih zaključaka.

ANU BiH АНУ БиХ



Slika 3. Hromatogram jonske struje fragmentnog jonam/z 284

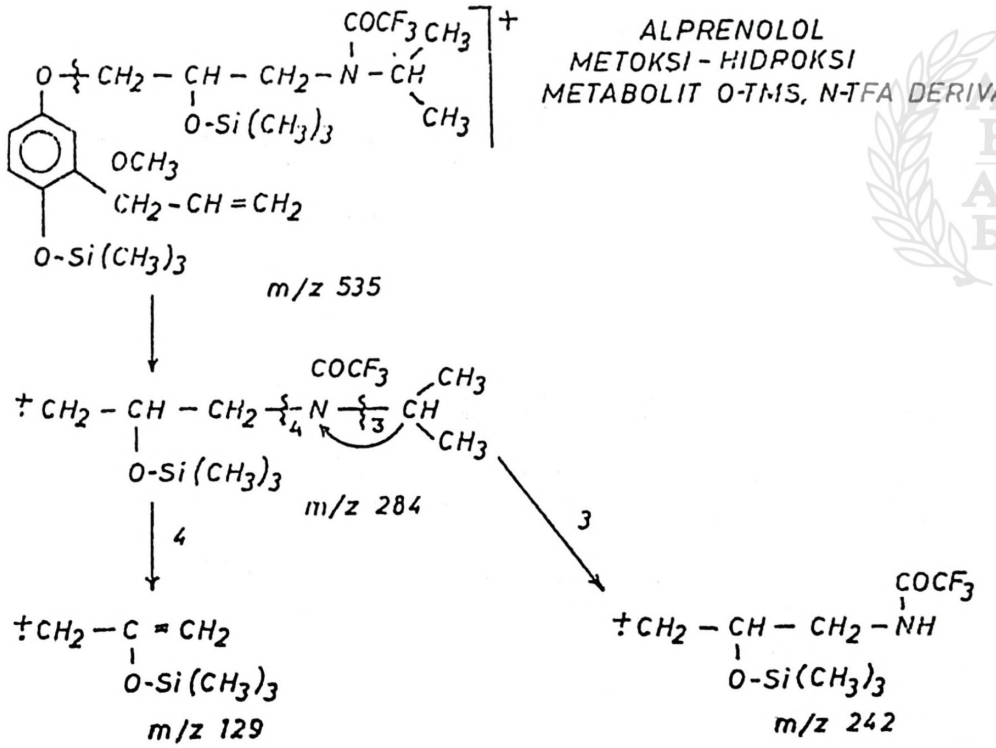


Slika 4. Spektogram masa hromatografskog signala C

Na slici 3. prikazan je hromatogram jonske struje fragmentnog jona m/z 284, koji je karakterističan za fragmentaciju N-TFA,O-TMS--derivata ovog tipa beta-andrenergičnih blokatora (16).

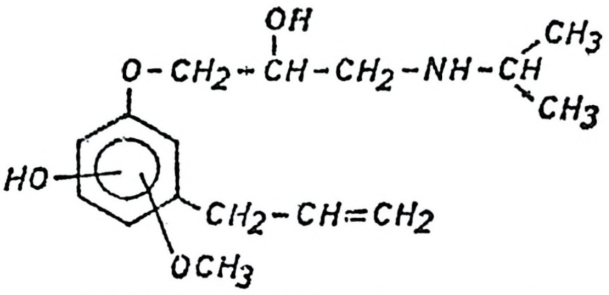
Na hromatogramu se jasno uočavaju signali koji potiču od nemetaboliziranog alprenolola i njegovih metabolita hidroksi-alprenolola i epihidroksi-alprenolola (signali A i B) i signal označen sa C, koji najvjerovatnije potiče od do sada neidentifikovanog metabolita alprenolola.

Na spektogramu masa hromatografskog signala C (slika 4) uočava se signal koji potiče od jona mase 284 a predstavlja ocjepljeni bočni lanac od molekulskog jona. Fragmentacija jona m/z 284 odvija se dalje u dva pravca i kao rezultat takvog cijepanja nastaju joni m/z 242 i m/z 129 koji se nalaze u spektrogramu masa hromatografskog signala C. Kao bazni signal prisutan je jon m/z 73, koji nastaje kao rezultat odcjepljenja trimetilsilil grupe. Na kraju spektograma masa jasno se uočava signal koji potiče od molekulskog jona m/z 535.



Shema 2. Fragmentacija N-TFA,O-TMS-derivata metabolita alprenolola pretpostavljene strukture

Analizom dobivenog spektograma masa i proučavanjem procesa fragmentacije N-trifluoracetil, O-trimetilsilil derivata ovog metabolita, prikazanog na shemi 2,potvrdili smo pretpostavku da se radi o metoksi-hidroksi alprenololu sljedeće strukture:



Slika 5. Metoksi-hidroksi alprenolol

ALPRENOLOL METABOLITES STRUCTURE STUDY BY USING THE METHOD OF GASS CHROMATOGRAPHY — MASS SPECTROMETRY

Summary

Alprenolole is subject to a fast metalobic transformation like other beta-blocking agents. Until now 4-hidroxy alprenolol and N-desizopropyl alprenolol are identified as products of such metabolic transformations.

In the paper identification of methoxy-hidroxy alprenolol, a new metabolite of alprenolol, perfomed by selective derivatization and GC-MS structure examination, is described.

LITERATURA

(1) Bodin, N. O.: *Identification of the Major Urinary Metabolite of Alprenolol in Man, Dog and Rat,* Life Sci., 1974, 14, 685—692.

(2) Grundin, R., Moldeus, P., Orrenius, S., Borg, K. O., Skanberg, I. and Bahr, C.: *The Possible Role of Cytohrom P-450 in the Liver »First-Pass Elimination« of a Beta-Receptor Blocking Drug,* Acta Pharmacol. Toxicol., 1974, 35, 242—260.

(3) Carlson, E.: *Cited by Regardh C. G. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics of Some Adrenergic Beta-Receptor Antogonists, With Special Emphasis on Alprenolol and Metoprolol,* Acta Pharmac. Toxicol., 1975, 37 (1), 1—39.

(4) Spahn, H., Prinoth, M. and Mutschler, E.: *Determination of Pindolol in Plasma and Urine by Thin-Layer Chromatography,* J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1985, 342, 458—464.

(5) Koshakji, R. P. and Wood, A. J. J.: *Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Propranolol and 4-Hydroxypropranolol in Plasma with Fluorescence Detection,* J. Chromatog. (Biomed. Applic), 1987, 422, 294—300.

(6) Wang, J., Bonakdar, M. and Deshmukh, B. K.: *Measurment of Labetalol by High-Performance Liguid Chromatography with Electrochemical Detection,* J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1985, 344, 412—415.

(7) Pflugmann, G., Spahn, H. and Mutschler, E.: *Rapid Determination of the Enantiomers of Metoprolol, Oxprenolol and Propranolol in Urine*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1987, 416, 331—339.

(8) Bartek, M. J., Vekshteyn, M., Boarman, M. P. and Gallo, D. G.: *Liquid Chromatographic Determination of Sotalol in Plasma and Urine Employing Solid-Phase Extraction and Fluorescence Detection*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1987, 421, 309—318.

(9) Ervik, M., Kylberg-Hanssen, K. and Johansson, L.: *Determination of Metoprolol in Plasma and Urine Using High-Resolution Gas Chromatography and Electron-Capture Detection*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1986, 381, 168—174.

(10) Himber, J., Anderman, G., Bouzoubua, M. and Leclerc, G.: *Determination of Falintolol, a New Aliphatic Beta-Adrenergic Antagonist in Whole Blood by Gas Chromatography with Electron Capture Detection*, J. Chromatog. Sci., 1987, 25 (1), 33—37.

(11) Gyllenhaal, O., Konig, W. and Vessman, J.: *Enantiomer Separation of Metoprolol and its Analogues and Metabolites by Capillary Column Gas Chromatography After Derivatization with Phosgene*, J. Chromatog., 1985, 350, 328—331.

(12) Fourtillan, J. B., Lefebire, M. A., Girault, J. and Courtois, Ph.: *Mas Fragmentographic Determation of Timolol in Human Plasma and Urine*, J. Pharm. Sci., 1981, 70, 573—575.

(13) Hoffmann, K. J., Gyllenhaal, O. and Vessman, J.: *Analysis of α — Hydroxy Metabolites of Metoprolol in Human Urine after Phosgene Trimethylsilyl Derivatization*, Biomed. Mass. Spectrom., 1987, 14, 543—543.

(14) Ribick, M., Ivashkiv, E., Jemal, M. and Cohen, A. J.: *Use of an Inexpensive Mass-Selective Detector for the High-Sensitivity Gas Chromatographic Determination of Nadolol in Plasma*, J. Chromatog. (Biomed. Applic.), 1986, 381, 419—423.

(15) Walle, T.: *GLC Determination of Propranolol, Other β — Blocking Drugs, and Metabolites in Biological Fluids and Tissues*, J. Pharm. Sci., 1974, 63 (12), 1886—1891.

(16) Šober, M., Lekić, M., Nikolin, B.: *Ispitivanje lekovitih supstanci i njihovih metabolita u biološkom materijalu metodom gasna hromatografija-spektrometrija masa*, Pharmacia, 1988, 9 (1—2), 37—53.