维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0325-04

右美沙芬的体外代谢方法研究

张黎黎[1,2],刘颖菊[1,2],袁 佩[3],杨贵忠[1,2],周岐新[1,2],廖 飞[2]

(1.重庆医科大学药学院药理教研室;2.重庆市生物化学与分子药理重点实验室;3.药学院医药研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究体外代谢右美沙芬的方法,并用高效液相色谱法(High performance piqid chromatography,HPLC)对右美沙芬及其产物进行测定。方法:使用正常人的肝脏匀浆在体外对右美沙芬进行代谢,用 HPLC 以阿霉素为内标,流动相为甲醇-10mmol/L 磷酸二氢钠溶液(50∶50,含 0.01%庚烷磺酸钠,5%三乙胺,pH3.5),对右美沙芬及其代谢产物进行测定。结果:在适当的 pH 值和温度下,加入辅酶和 Mg^{2+},使用人肝脏匀浆可在体外有效代谢右美沙芬,并可以用高效液相色谱法对右美沙芬及其产物进行测定。经测定,右美沙芬平均代谢率为 16.09%。结论:这种体外代谢右美沙芬的方法简便灵敏,精密度高,可用于右美沙芬的体外代谢实验。

【关键词】右美沙芬;体外代谢;高效液相色谱法

【中国图书分类法分类号】R965.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-18

Metabolism method of dextromethorphan in vitro

ZHANG Li-li, et al

(*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate in vitro metabolism method and HPLC method for the dextromethorphan. *Methods*: Total protein of normal liver specimens metabolismed dextromethorphan in vitro. An HPLC method with fluorescence was developed to study the contents of dextromethorphan and metabolites by joining an internal standard(Adriamycin). Methanol-10mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution(50:50, contain 0.01% sodium heptanesulfonate, 5% triethylamine, pH 3.5) was used to the mobile phase. *Results*: Total protein of normal liver specimens metabolismed dextromethorphan in vitro efficiently with coenzyme, Mg^{2+}, suitable temperature and pH value. Dextromethorphan and metabolites were analyed by HPLC method with fluorescence. The metabolic rate of dextromethorphan was 16.09%. *Conclusion*: It is suggested that the metabolism method of dextromethorphan in vitro is simple, convenient and accurate. It can be used for the determination of metabolism dextromethorphan in vitro.

【Key words】Dextromethorphan; In vitro metabolism; High performance liquid chromatography

药物在体内大多需要生物转化后才能被机体排泄,肝脏是最主要的生物转化场所。肝脏内存在多种酶系催化多种反应,其中细胞色素 P450 酶系是最主要的药物代谢酶系。细胞色素 P450 2D6(CYP2D6)是其中 1 个重要的亚型,右美沙芬(Dextromethorphan)是其特异的底物。右美沙芬是一种镇咳药物,毒性小,常作为探针药物用于观察新药对 CYP2D6 活性影响和 CYP2D6 的多态性研究,其代谢产物为 O-去甲右美沙芬(Dextrorphan)[1]。本实验建立体外代谢右美沙芬的方法,用 HPLC 对右美沙芬及其代谢产物进行测定。

作者介绍:张黎黎(1980-),女,硕士,研究方向:药物代谢。

通讯作者:刘颖菊,女,教授,E-mail:liuyingjbh@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

正常成人肝脏,来自于肝脏血管瘤手术患者,肝功能等各项指标均正常。该实验通过重庆医科大学伦理委员会批准。氢溴酸右美沙芬标准品(Divi's Laboratories Limitod 印度,含量测定:100.5%)。阿霉素(深圳万乐药业有限公司)。磷酸二氢钠、磷酸、氯化镁、三乙胺为分析纯。$NADP^+$、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶购自 SIGMA 公司。甲醇为色谱纯。庚烷磺酸钠购自汉邦公司。BCA 法蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 分析测试系统

Agilent1100 高效液相色谱仪配荧光检测器及数据处理系统(美国 Agilent 公司)。色谱条件:Welchrom-C18 柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:10mmol/L 磷酸二氢钠溶液-甲

维普资讯 http://www.cqvip.com

醇=50∶50(含 0.01%庚烷磺酸钠,5%三乙胺,pH3.5);流速:1.0ml/min。进样量:10μl。柱温:30℃。内标:阿霉素。荧光检测波长:右美沙芬检测的激发波长为 280nm,发射波长为 310nm;阿霉素检测的激发波长为 480nm,发射波长为 545nm。

1.3 药物代谢实验及生物样品处理

取正常成年人肝脏,制成匀浆,3 000r/min 离心 5min,离心后取上清液,使用 BCA 法进行蛋白定量(全部操作在 4℃下完成,以保持蛋白活性)。取 EP 管加入以上人肝脏匀浆上清液、$NADP^+$、6- 磷酸葡萄糖、6- 磷酸葡萄糖脱氢酶、磷酸盐缓冲液(pH7.4)、Mg^{2+} 和氢溴酸右美沙芬。总反应体积 250μl,其中含人肝脏匀浆蛋白 1mg/ml,$NADP^+$ 1mmol/ml,6- 磷酸葡萄糖 5mmol/ml,6- 磷酸葡萄糖脱氢酶 0.5U/ml,Mg^{2+} 3mmol/ml,磷酸盐缓冲液 10mmol/L,氢溴酸右美沙芬 0.04mg/ml。混匀后分别置于 37℃中孵育 5、10、15、30、60、90、120min。用冰甲醇 750μl 终止反应(含内标阿霉素 4μg)15 000r/min 离心 15min,取上清液进行 HPLC 分析。

1.4 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.0 统计软件进行组间均数 t 检验。

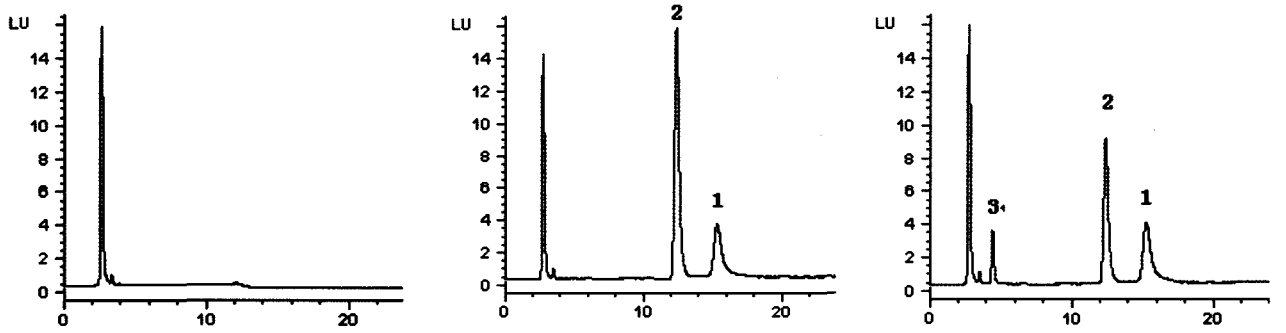
2 结 果

2.1 氢溴酸右美沙芬的光谱特征

经预试验右美沙芬在荧光激发波长为 280nm,发射波长为 310nm 时灵敏度较高,阿霉素在荧光激发波长为 480nm,发射波长为 545nm 时灵敏度较高。故分别选用以上波长为右美沙芬和阿霉素的检测波长。在此色谱条件下右美沙芬和阿霉素的保留时间分别为 12.35min 和 15.23min(图 1)。

2.2 标准曲线的绘制

按上述反应体系制备样品,使氢溴酸右美沙芬的终浓度分别为 1、2、4、8、12、20、40、80μg/ml,但不在 37℃下孵育,直接用冰甲醇(含内标阿霉素 4μg)终止反应,按样品预处理方法处理,做 HPLC 分析。药物质量浓度在 1～80μg/ml,药物与内标的峰面积比(Y)与药物质量浓度(X)呈线性关系,直线方程:Y=0.391 4X+0.060 3(r=0.999 98)。



A.空白样品;B.含右美沙芬和内标阿霉素的样品;C.含右美沙芬和内标阿霉素的样品在 37℃孵育 60min 后的色谱图。1.阿霉素(保留时间 15.23min);2.右美沙芬(保留时间 12.35min);3.右美沙芬代谢物(保留时间 4.64min)

图 1 右美沙芬、右美沙芬代谢物和内标阿霉素的色谱图

表 1 回收率和日内精密度实验结果

右美沙芬浓度(μg/ml)	右美沙芬的峰面积	阿霉素的峰面积	右美沙芬与阿霉素的峰面积比	测定值(μg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	日内精密度(RSD)
2	96.490 8	115.216 9	0.837 5	1.985 7	99.28%	99.58%	0.24%
	96.540 0	114.832 2	0.840 7	1.993 9	99.70%		
	96.770 3	115.033 3	0.841 2	1.995 2	99.76%		
8	416.415 2	129.921 5	3.205 1	8.034 8	100.44%	100.69%	0.43%
	408.694 3	127.531 2	3.204 7	8.033 6	100.42%		
	411.584 1	127.451 6	3.229 3	8.096 7	101.21%		
40	2 091.334 4	131.599 2	15.891 7	40.448 1	101.12%	100.30%	0.91%
	2 039.964 0	130.698 2	15.608 2	39.723 8	99.31%		
	2 102.052 7	133.124 0	15.790 2	40.188 8	100.47%		

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 5d 日间精密度实验结果

右美沙芬浓度 (μg/ml)	右美沙芬的峰面积	阿霉素的峰面积	右美沙芬与阿霉素的峰面积比	S	RSD
2	96.479 6	118.643 2	0.813 2	0.021 2	2.55%
	95.214 3	115.897 5	0.821 5		
	96.379 0	118.355 4	0.814 3		
	97.368 8	114.748 1	0.848 5		
	99.412 7	115.673 8	0.859 4		
8	415.412 2	122.134 6	3.317 3	0.166 8	5.21%
	409.270 5	123.423 7	3.114 5		
	415.567 2	123.379 4	3.428 2		
	416.071 5	127.239 2	3.013 7		
	417.494 0	120.625 8	3.141 3		
40	2 032.351 0	129.468 2	15.690 2	0.031 5	0.20%
	2 047.792 8	130.202 6	15.702 6		
	2 065.393 4	133.013 2	15.722 4		
	2 023.494 6	127.385 4	15.764 8		
	2 046.205 8	130.479 4	15.689 2		

表 3 不同孵育时间右美沙芬体外代谢实验结果

孵育时间 (min)	右美沙芬代谢物的峰面积	右美沙芬的峰面积	阿霉素的峰面积	右美沙芬与阿霉素的峰面积比	右美沙芬的测定值	实际加入右美沙芬的量 (μg/ml)	右美沙芬的代谢率
0	–	504.216 9	127.723 6	3.947 7	9.932 0	10	0.06%
5	–	501.797 9	127.614 2	3.932 1	9.892 2	10	1.08%
10	20.730 2	471.573 1	124.158 0	3.798 2	9.550 0	10	4.50%
15	26.259 7	465.482 8	125.548 3	3.707 6	9.318 6	10	6.81%
30	40.643 2	453.801 9	126.657 7	3.582 9	9.000 0	10	10.00%
60	71.705 6	433.880 8	129.591 7	3.348 1	8.400 0	10	16.00%
90	80.640 1	415.196 9	127.285 9	3.261 9	8.179 9	10	18.20%
120	85.537 9	411.566 3	126.911 8	3.242 9	8.131 4	10	18.69%

2.3 回收率和精密度试验

按上述反应体系分别制备 3 个浓度的样品，使氢溴酸右美沙芬的质量浓度分别为 2μg/ml、8μg/ml 和 40μg/ml(n=3)，按样品预处理方法处理，不在 37℃下孵育。HPLC 测定药品与内标的峰面积比值，代入标准曲线，计算氢溴酸右美沙芬质量浓度，以测定值与实际值之比计算回收率。3 个浓度的平均相对回收率分别为 99.58%、100.69%和 100.30%。本法的日内精密度(n=3)，RSD 在 0.24%～0.91%(表 1)；5d 的日间精密度，RSD 在 0.20%～5.21%(表 2)。

2.4 体外代谢实验

37℃中孵育后的样品(图 1C)与未孵育的样品(图 1B)分析比较，可以看到未孵育时，右美沙芬峰面积无变化，4.64min 处无代谢物峰。孵育 15～120min 时，右美沙芬峰面积明显降低，并在 4.64min 出现 1 个新的峰，确定为右美沙芬代谢产物(表 3)。测定右美沙芬与内标的峰面积比值，代入标准曲线，计算氢溴酸右美沙芬质量浓度，以测得的氢溴酸右美沙芬的含量和加入氢溴酸右美沙芬的量计算右美沙芬的代谢率。

孵育 60min 时右美沙芬的日内体外代谢率(n=5)和 5d 日间体外代谢率变异系数分别为 4.30%和 5.38%(表 4、5)。右美沙芬的平均代谢率为

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 日内体外代谢率实验结果

右美沙芬代谢物的峰面积	右美沙芬的峰面积	阿霉素的峰面积	右美沙芬与阿霉素的峰面积比	右美沙芬的测定值	加入右美沙芬的量(μg/ml)	右美沙芬的代谢率	变异系数
72.067 5	426.983 1	127.323 1	3.353 5	8.250 1	10	15.88%	4.30%
76.370 9	430.431 6	128.037 6	3.361 8	8.435 0		15.65%	
64.638 7	436.598 7	128.773 4	3.390 4	8.508 3		14.92%	
77.064 2	432.746 5	130.376 4	3.319 2	8.326 3		16.74%	
67.754 6	436.287 8	129.369 3	3.372 4	8.462 2		15.38%	

表 5 5d 日间体外代谢率实验结果

右美沙芬代谢物的峰面积	右美沙芬的峰面积	阿霉素的峰面积	右美沙芬与阿霉素的峰面积比	右美沙芬的测定值	加入右美沙芬的量(μg/ml)	右美沙芬的代谢率	变异系数
68.971 4	411.464 2	124.374 3	3.308 3	8.298 3	10	17.02%	5.38%
70.723 5	416.320 6	125.467 0	3.318 2	8.323 6		16.76%	
71.430 9	405.127 0	119.365 4	3.295 4	8.265 4		17.35%	
78.913 4	430.866 3	127.380 4	3.382 5	8.488 0		15.12%	
68.065 1	423.793 2	126.690 5	3.345 1	8.392 5		16.08%	

16.09%。

3 讨 论

CYP2D6 参与多种药物的代谢，由于 CYP2D6 的基因多态性及药物等因素的影响，其酶活性存在很大的差异。通过观察 CYP2D6 对右美沙芬代谢的变化，可了解 CYP2D6 酶活性的高低，以判断不同个体的基因型或药物对酶的影响。国内有文献报道，受试者口服右美沙芬后，在一定时间内采集受试者的尿样，经多次萃取后，HPLC 测定尿内右美沙芬和右美沙芬代谢物的含量，对 CYP2D6 的基因型、表型和个体差异进行研究[2,3]。这种方法步骤繁琐，需进行多步萃取，工作量大且易受机体内因素的干扰。CYP2D6 主要存在于人体肝脏细胞的微粒体中，国外有使用人肝脏微粒体在体外代谢右美沙芬，观察 CYP2D6 活性[6~9]。但是提取微粒体需将肝脏匀浆后进行反复梯度离心，且提取过程始终要在 4℃下完成，否则将会影响微粒体内蛋白的活性。本实验使用正常成人肝脏匀浆上清液，容易制备，且反应完成后，直接用甲醇终止反应，离心后去除蛋白质，即可直接进行样分析，方法简便，容易操作。加入的 $NADP^+$ 和 6- 磷酸葡萄糖在 6- 磷酸葡萄糖脱氢酶催化下可生成 NADPH，NADPH 作为辅酶参与右美沙芬的代谢后又生成 $NADP^+$，这 3 种物质构成 1个循环反应体系，为右美沙芬的代谢提供 NADPH[7]，使反应速率明显提高，且成本大大降低。

本实验中由于使用肝脏匀浆进行代谢，反应体系中的 CYP2D6 相对浓度较使用肝脏微粒体要低，代谢速度较慢，在孵育 5min 时，测不到产物峰。15～60min，右美沙芬的代谢速度上升较快，可以测到产物峰，且峰形较好。60min 后，由于肝脏蛋白和 NADPH 循环体系的活性降低，右美沙芬的代谢速度明显下降，故 60min 为最佳孵育时间，该时间可使反应体系中的右美沙芬有效代谢并产生足够量的代谢产物，便于之后的 HPLC 分析。

用 HPLC 分析中选用阿霉素为内标，阿霉素是临床常用的抗肿瘤药，获取比较方便，且在优化的色谱条件下，实现了内标物与右美沙芬、代谢产物峰和其它内源物质的良好分离。由于右美沙芬在荧光激发波长为 280nm，发射波长为 310nm 时灵敏度较高，阿霉素在荧光激发波长为 480nm，发射波长为 545nm 时灵敏度较高，故使用荧光变波检测[2~5]方法。在本方法的色谱条件下右美沙芬和阿霉素的保留时间分别为 12.45min 和 15.12min，故变波时间

（下转第 384 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

小导致移位),下腔静脉穿孔(滤器选择过大,对静脉壁压力增加导致静脉穿孔),滤器捕获栓子导致DVT(当滤器拦截较大、较多栓子时,血流缓慢致血栓形成)[3]。

DVT 往往表现为一侧肢体肿胀。如果放置 IVCF 后迅速出现双侧下肢肿胀,应考虑为滤器捕获或滤器移位所致 DVT,应通知医生紧急处理。下肢静脉穿孔表现为血压下降,甚至休克,应立即作抗休克的处理并紧急通知医生。

DVT 易伴发肺栓塞,多数患者症状不明显,肺动脉主干栓塞后患者常发生猝死。IVCF 的置入是预防肺栓塞发生的重要手段[4]。护士在预防和治疗肺栓塞中起重要作用。通过护士严密监测病情,做好各方面的护理[5],对患者的康复极为重要。

此外,放置永久性 IVCF 后往往需长期乃至终身口服抗凝药。在此过程中护士须配合医师,告知患者抗凝的要点。如何避免出血副反应药物的调整及随访等。

参 考 文 献

[1] Greenfield LJ, Cho KJ,Tauscher JR. Evolution of Hook Design for Fixation of the Titanium Greenfield Filter[J]. J Vasc Surg,1990;12(3):345-353.

[2] 姚翠玲,任立新,刘鹏骄,等. 急性肺血栓栓塞的治疗与标准化护理[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2003;2(2):107-110.

[3] 顾建平,花春英,何 旭,等. 下腔静脉血栓形成综合征的介入治疗[J]. 介入放射学杂志,2000;9(6):206-208.

[4] 郭曙光,陈翠菊,周兴立,等. 应用下腔静脉滤器预防肺栓塞的临床价值[J]. 中国现代医学杂志,2002;12(4):61-62.

[5] 张 平,李艳霞,张中和. 深静脉血栓形成患者下肢静脉滤器置入术后护理[J]. 护理学报,2006;13(5):58-59.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 328 页)

确定为 13.50min。由于使用了荧光变波检测,提高了检测的灵敏度,也降低了其他成分的干扰,使右美沙芬最低检测限达到 10ng/ml,且与代谢产物峰分离良好。

综上所述,本实验建立的右美沙芬体外代谢及测定的方法,简便、可靠并具有较高的灵敏度,可用于体外研究 CYP2D6 的多态性及其他药物和生物制品对 CYP2D6 活性的影响。

参 考 文 献

[1] 曾 苏,主编.药物代谢学[M]. 杭州:浙江大学出版社,2004.174-193.

[2] 陈枢青,蔡卫民,Peter J Wedlund.利用右美沙芬区分细胞色素 P450 2D6 纯合子与杂合子快代谢者 [J]. 药学学报,1997;32(12):924-927.

[3] 李国昌,洪成林,陈 文,等.反相高效液相色谱法测定尿中右美沙芬及去甲右美沙芬的含量与 CYP2D6 表型分析[J]. 中国药学杂志,2003;11(38):862-864.

[4] 黄其春,涂文升.高效液相色谱荧光法测定血浆中格拉司琼和阿霉素质量浓度[J]. 广西医科大学学报,2002;19(5):643-644.

[5] 张宏文,钱立新,王蔚青,等.反相高效液相色谱荧光检测法测定血浆及膀胱中的阿霉素的浓度[J]. 江苏药学与临床研究,2006;14(1):4-6.

[6] Bertelsen KM,Venkatakrishnan K,Von Moltke LL,et al.Apparent mechanism-based inhibi tion of human CYP2D6 in vitro by paroxetine:comparison with fluoxetine and quinidine[J]. Drug Metab Dispos,2003;31(3):289-293.

[7] Shen H,He MM,Liu H,et al.Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1,CYP2D6.10 and CYP2D6.17[J]. Drug Metab Dispos,2007;35(8):1292-1300.

[8] Madeira M,Levine M,Chang TK,et al.The effect of cimetidine on dextromethorphan O-demethylase activity of human liver microsomes and recombinant CYP2D6[J]. Drug Metab Dispos,2004;32(4):460-467.

[9] Mei Q,Tang C,Lin Y,et al. Inhibition kinetics of monoclonal antibodies against cytochromes P450[J]. Drug Metab Dispos,2002;30(6):701-708.

(责任编辑:谭乐勤)