DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.1987.03.022

生物样品中吡喹酮的测定方法

血吸虫病研究室
一院传染科
钱明心 综述
邱宗荫 刘约翰 审校

吡喹酮(Praziquantel,简称PZQ)是近年研制由WHO推荐的一种广谱抗蠕虫病新药[1]。其突出特点为疗效高,毒性低,服用简便;不仅对体内外各种血吸虫、华支睾吸虫、肺吸虫和肠绦虫等有显著杀虫活性,而且对脑囊虫病和棘球蚴(包虫)病亦有一定疗效。[2-4]研究表明,作为PZQ靶体的上述各种寄生虫寄居于人体宿主的不同脏器和体液中,而到达这些部位的PZQ含量高低直接影响着临床疗效。[4-9]因此,测定PZQ在体内各种体液和组织中的含量,不仅仅是PZQ药代动力学和毒理学研究的必要环节,而且对深入评价该药的临床用途以及探讨合理用药方案均具有重要意义。

PZQ问世初期,Steiner和Andrews首先采用同位素示踪法和生物测定法来阐明该药在生物体内的吸收、分布和排泄等规律。[5,11-14]其后,根据不同的研究目的,放射性自显影技术[12],薄层色谱法,[11,13~15,34]气相色谱法[10,26],荧光光谱法[17-19,31]以及高效液相色谱法等[6-9,20-22,34]现代分析测定手段相继应用于PZQ的药理和临床研究,大大促进了对这一新药的开发,推广应用和深入研究。

根据PZQ的药代动力学性质和临床用药的特点,对测定方法本身提出了较高的要求:(1)由于肝脏对PZQ具有明显的"首过效应"(first pass effect)[5,13,28,31],体液中除原药外,还存在多种PZQ代谢产物,其化学结构与原药相似,但二者的体内浓度和药理活性相差甚大,故要求测定方法专一性强,能够将原药与代谢物完全分开;(2)临床上口服给药剂量较小,加上肝脏"首过效应",使体液中原药浓度更趋降低[11,31],因此检测灵敏度尽量要高。本文拟着重从生物样品的预处理、各种检测方法的特异性,灵敏性及精密度等方面加以概述和比较。

一、PZQ的有关理化性质

PZQ为2—环已甲酰—1,3,4,6,7,11b—六氢—2H吡嗪[2,1—a]并异喹啉—4—酮。分子量:312.42。本品为白色或类白色结晶性粉末,味苦。结构式如下:

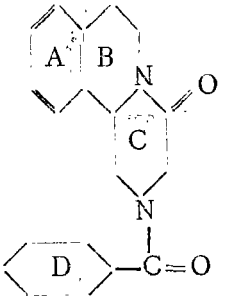


图1 吡喹酮分子结构

1. 溶解性[1]:室温(25℃)下,PZQ极易溶解于氯仿(56.7g/100ml),易溶于乙醇(9.7g/100ml)。略溶于乙醚,可溶于PEG—400;微溶于水(0.04g/100ml)。

2. 分配系数[17]:在pH1~10,PZQ的分配系数不受pH值影响。在磷酸盐缓冲

液与环已烷中的分配比为14:86。在强碱下，PZQ不稳定，因而不能准确测定减性溶液与有机溶剂间的分配系数。

3. 光学性质：经测定，PZQ在无水乙醇中的最大紫外吸收波长为264nm，在甲醇中的最大紫外吸收波长为210nm[22]。而选择不同的溶媒和紫外吸收波长对检测灵敏度影响较明显。在中性水溶液中，PZQ具有自激荧光(E_x=256nm，E_m=294nm)[17]，但荧光强度较弱。在PZQ乙晴溶液的荧光扫描光谱上，其最大激发波长E_x=265，发射波长E_m=287nm[22]。Putter等为了提高检测灵敏度，将PZQ与荧光试剂Dansyl-Cl衍生化后，测得最大E_x=346nm，E_m=460nm，荧光强度明显增强[17,19]。

4. 稳定性：PZQ在一般条件下稳定，136～139℃分解[1,15]。室温下，本品在中性、弱酸（碱）溶液中16小时内浓度无明显变化[17]。将PZQ和左旋PZQ甲醇溶液于阴凉处放置5月以上；其浓度几乎无改变[22]。然而，PZQ丹酰（Dansyl）衍生物的荧光强度容易衰减，避光条件下1h内不变，但在光束照射下测定荧光时，读数时间不宜超过2 min[19]。

二、生物样品的预处理

已用于PZQ测定的生物样品有血浆、血清、尿液、粪便、胆汁、脑脊液、乳汁、包虫囊液以及肝、脑、肾组织等。这些生物样品中化学组分极为复杂，而待测药物及其代谢物的含量甚微。因此，除了要求测定方法具有高度的灵敏性和特异性外，还应对生物样品的采集、贮存、分离提取等预处理环节充分重视，以保证测定结果准确、可靠。

生物样品的预处理视测定方法不同而有差别[23-26]。对含有PZQ的生物样品，尤应注意几点：

1. **样品采集**：一般认为，动物口服PZQ后粪便中可能有少量原形药，而尿液几无原药，含大量PZQ代谢产物[2,20,27]，因此采样时避免粪、尿混合污染对测定结果至关重要。鉴于某些麻醉药品对动物内环境干扰较大，如巴比妥类可诱导肝药酶，进而影响PZQ的代谢过程[27]，故进行有关实验时最好换用其它麻药。在代谢研究时，采用非离子型树脂（如Amberlite XAD-2）分离富集尿液中PZQ代谢物[13,20,27]，效果甚好；其它如固相浓缩柱Sep-pak Cartridge因其使用简便，亦可试用[22]。

2. **样品贮存**：稳定性实验表明，室温下血浆PZQ浓度在16小时内减少5%[17]。而血清、尿液等标本于－20°～－60℃放置4周～半年以上，PZQ含量亦未见变化[21,22]。

3. **样品的分离提取**：药物分析中，样品的分离提取所带来的干扰因素较多[23-26,33]。PZQ亦不例外，兹列表如下：

表1. 生物样品制备时使药物损失的可能因素

吸附：玻璃或金属器皿表面
共沉淀：红细胞或纤维旦白凝块
化学分解：①化学或生物不稳定性；②光化学不稳定性；③热不稳定性
衍生化：①不完全反应；②付产物；③过量试剂。
络合：重金属
挥发：①不溶性残留物；②药物挥发。

三、PZQ的测定方法

一、生物测定法：

本法系根据PZQ对绦虫、吸虫具有显著的体外杀灭作用，将活虫置于含不同稀释度PZQ的培养液中，观察药物对虫体活力的影响。然后采集给药后动物的体液和组织标本，经提取后以含虫培养液稀释，以培养液中虫体活动程度来推算PZQ浓度。Andrews和肖树华等分别用此法探讨了PZQ在动物体内的吸收、分布和排泄过程[5,28]。这种经典的测定方法，以PZQ的最低有效浓度作为灵

敏度，可低达5ng/ml[28]。测定结果有一定临床参考价值。不足之处为：（1）培养液中杀虫活性物质是PZQ抑或其代谢产物及其它成分，单凭该法殊难肯定；（2）虫体活动程度的判断较为主观，且可能存在一个稀释度的误差（±50%）[28]。但值得一提的是，由于本法能够直接观察药物杀虫活性，有人尝试用非离子型树脂提取技术和薄层色谱法将生物样品中PZQ与其代谢物分离，再用生物法测定各自的杀虫活性[27]，从而为PZQ的代谢研究提供了一种独特的分析手段。

二、放射性同位素示踪技术

国内外研究者先后将^{14}C标记在PZQ分子结构的哌嗪酮（=CO）上，并由此建立了PZQ-^{14}C同位素示踪法，主要用来阐明PZQ的药代动力学规律[11~14,30]。

本法的最低检测灵敏度达20ng/ml，样品制备较简便，如尿液、胆汁等不须纯化和提取即可直接测定[11]；若辅以大体标本放射自显影技术，尚可动态观察^{14}C—PZQ在动物心、肝、肾、脑等重要脏器内的分布和消长[12]；并且由于放射性标记药物化学量甚微（23～94.6μCi/mgPZQ）[11,14]，一般不至于扰乱或破坏机体内环境。本法的主要缺点在于只能测定体液和组织中PZQ的总放射活性，如欲了解原形药物的体内代谢过程，尚须借助薄层色谱法将原药与代谢物分离，再用同位素扫描仪直接测定，或分段刮取做液闪测定[13-14,27]。

三、薄层色谱法

薄层色谱法操作简便、迅速、分离效能高，广泛用于药物分析中。Diekmann等为了进一步测定PZQ原药含量并确定其体内代谢产物的分子结构，均首先借助薄层色谱法，从生物样品中分离出PZQ及其8种代谢产物[13,14]；王氏将此法与生物测定法结合，分别测定了PZQ及其主要代谢产物的杀虫活性[27]。此外，薄层色谱法还能将PZQ纯品，中间体和杂质完全分离[15]故被推荐为PZQ质量考察的主要定性手段之一。近年来，在薄层色谱基础上发展起来的高效薄层色谱法（HPTLC）颇引人注目[29]，它大大改进了前法在定量上的不足，在某些方面甚至不亚于气相色谱法和高效液相色谱法，对开展体液中PZQ及其代谢物的研究无疑将是一种理想的分析方法。

四、荧光光谱法

如前所述，PZQ是一种有荧光活性的药物分子。但其自身荧光较弱，难以满足单剂口服后临床药代动力学所需高灵敏度的检测要求。鉴于此，Putter建立了PZQ的荧光衍生化测定法[17]：将生物样品（血、尿、乳汁）中的PZQ用有机溶剂提取后，置于碱性溶剂中令其分子的特定部位水解，然后将PZQ水解产物与荧光试剂Dansyl-Cl反应以形成PZQ荧光衍生物，经分离后用荧光分光光度仪在E_x=346nm，E_m=460nm处检测。

本法的优点为检测灵敏度高，最低检出限可达3ng/ml；重现性好（CV=7.7%）；线性范围宽（0.025～2μg/ml），操作比较简便。高氏将该法的分离提取步骤简化，以苯—环已烷从血浆中一次提取PZQ，从而减少了操作中药物损失，回收率达84.7%～88.8%[19]。

值得注意的是，随着荧光光度法灵敏度增高，体内外多种因素干扰测定的机会亦同时增加[32]。诸如玻璃器皿不洁，试剂不纯以及分离提取不慎等均可产生非特异性荧光，造成测定空白值升高或影响回收率，进而影响测定结果的可靠性。因此，采用荧光法测定时，应尽量简化操作步骤，所用蒸馏水及试剂均须重蒸馏。

通常认为，荧光试剂Dansyl-Cl容易与含胺基化合物生成荧光衍生物。从PZQ的分子结构看（图1），C环上的二个氨基团均可能与Dansyl-Cl发生衍生化反应。而质谱分

析表明，PZQ的体内主要代谢产物是在该分子D环上发生羟基化[14,27]。由于PZQ羟化代谢产物的氨基团未被破坏，故仍可能与Dansyl-Cl反应生成荧光衍生化物。因此，单用荧光光谱法分不开PZQ原药与其代谢物，只能测出包含有代谢物的PZQ "最大值"[17]，显然难以准确反映体液中PZQ原药含量，此为本法的主要不足。

五、气相色谱法（GC）

GC是近年药物分析中常用的一种成熟可靠的测定方法。Diekmann利用PZQ的环庚基同系物作为内标物，用对含氮化合物敏感的火焰离子检测器（FID）测定了人体血清、尿液和粪便中PZQ的含量[16]。本法的最低检出限达5ng/ml，线性范围为0.01～1μg/ml，重现性好（CV=4.5%）。Patzschke等用本法与荧光法、同位素法比较，同时测定人血清PZQ浓度，以气相色谱法特异性最高，能将PZQ与其代谢物完全分离[31]。故该法很适宜于PZQ的药代动力学研究[10,31]。

六、高效液相色谱法（HPLC）

徐氏等以国产硅胶柱做吸附层析，用正丁醇-氯仿-乙酸乙酯-10% 氨水(20:20:60:3) 作为流动相，荧光检测器测定PZQ的自身荧光，由此建立了测定PZQ血药浓度的正相HPLC法[20]。色谱图上，PZQ原药与8个代谢产物完全分离；PZQ的最低检出限为20ng；操作较气相法和荧光法简便，基本满足了临床上对PZQ体液浓度的检测要求[6-9,20]。但是，该法流动相组成比较复杂；且由于测定时未采用内标物，故每次实验均须随行标准品以减少操作误差，这些都给操作带来不便。另外，检测灵敏度亦较前述气相法和荧光法为低[20]。

高效液相色谱法的多种分离模式为药物分析提供了较大的选择性。近年来，反相HPLC用于测定成分复杂的生物体液中药物浓度已显示出明显的优越性，例如可延长色谱柱使用寿命；被测物在分离中不易损失；甚至可以直接注入血浆、尿液或胆汁进行测定而不须预处理[25]，等等。肖氏等采用反相HPLC法，能将血清中PZQ与其代谢产物完全分离，这是由于PZQ体内代谢产物大多羟基化，极性增大，在C_{18}反相色谱柱上保留甚弱，先于PZQ流出[21]。故本法专属性甚好。我们用此法测定血清和胆汁的PZQ含量，分离效果理想，柱效长期保持不变[22]。

PZQ虽有自身荧光，但若选择好合适的紫外检测条件，其灵敏度可高于荧光检测，而且杂质干扰亦较小[38]。Jones还注意到，流动相的纯度对低浓度测定的灵敏度有显著影响[38]。肖氏用紫外检测血清PZQ，以高纯度的乙腈(色谱纯)作为流动相，最低检出限达2.5ng/ml[21]。但国内色谱纯乙腈价格高昂且不易获得。作为改进，我们选用分析纯甲醇经重蒸馏后作为流动相，仍得到较高灵敏度（12.5ng/ml），且分析费用减少了95%以上，有利于为时较长的分析测定[38]。

现将关于PZQ的2种HPLC测定方法比较如下（表2）。

四、结　语

自PZQ问世的短短10年内，若干现代分析方法相继用于该药的药理和临床研究。其中，同位素示踪技术和气相色谱法对阐明PZQ在体内的吸收、分布、代谢和排泄规律提供了极其有益的研究手段。而荧光测定法对仪器要求不高，操作简便，适于现场应用。但是，以上三种测定方法均不能区分开生物样品中PZQ原药及其代谢物，此为研究药物代谢动力学的一大不足。目前公认，高效液相色谱法是药物分析领域中最有潜力的一种测定方法，其在PZQ的药代动力学、临床评价以及合理用药研究诸方面的应用日渐增多[6-9,20-22,34]。新近，我校教研室将PZQ

表2 二种测定PZQ的HPLC方法学特点

	正相法[20]	反相法[21]
层折柱	青岛硅胶	十八烷基键合相 (ODS-C_{18})
流动相	正丁醇—氯仿—乙酸乙酯—10%氨水 20:20:60:3	38%乙睛
检测器	荧光 Ex:260nm, Em:285nm	紫外:210mm
专一性	原药与代谢物分离	同左
检测限	100ng/ml血浆	2.5ng/ml血清
标准曲线	外标法（每次实验均须随行外标准品）	内标法（减少了提取进样的误差）
线性范围	0.1～0.9ug/ml	0.05～0.8ug/ml
变异系数	8.1～9.1%	2.6～2.9%
回收率	98.3%(800ng/ml) 100.0%(400ng/ml)	93.1%

光学拆分后得到其左、右旋对映体[35]，动物和临床试验相继证明，PZQ及其光学对映体在疗效和毒性上存在着差别[35-37]。值得深入探讨的是，这种生物效应上的差异是否与消旋，左旋和右旋PZQ各自的体内转归有关？体内是否还存在着PZQ对映体的相互转化机制？欲寻求其答案，则有赖于建立起一种能将PZQ及其对映体分离并测定的方法。近几年来，高相液相色谱法手性固定相(HPLC-CSP)在拆分立体异构体上不断取得进展[39]，使药物对映体的快速分析成为可能。最近，Blazchke 等用高相液液相法对PZQ的光学拆分做了初步尝试[40]。可以预料，这方面的进展对阐明PZQ及其光学异构体的构—效关系和药代动力学规律具有重要意义。

参考文献

[1] Seubert J, et al: Experientia 1977; 33: 1076.

[2] Andrews P, et al: Med Res Rev 1983: 3: 147.

[3] Pearson RD, et al: Ann Int Med 1983; 99: 195.

[4] 刘约翰，等：中华医学杂志1984; 64: 243.

[5] Andrews P: Vet Med Nachr 1976; 2: 154.

[6] 魏承慈，等 上海医学1983; 6: 214.

[7] 陈国芬，等 中华传染病杂志1983; 1: 214.

[8] 潘孝彭，等 中华传染病杂志1987; 2; 78.

[9] 陈 刚，等硕士研究生毕业论文新疆医学院 1984

[10] Leopold G, et al: Europ J Clin pharmacol 1978; 14: 281.

[11] Steiner K, et al: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1976; 2: 85.

[12] Steiner K, et al: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1976; 2: 97.

[13] Diekmann HW, et al: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1976; 2: 107.

[14] Buhring KU, et al: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1978; 3: 179.

[15] 袁锡炳 药物分析杂志 1982; 2: 356.

[16] Diekmann HW; Europ J Drug Metab Pharmacokin 1979; 4: 139.

[17] Putter J: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1979; 4: 143.

[18] Putter J: Europ J Drug Metab Pharmacokin 1979; 4: 193.

[19] 高鸿飞，等 药物分析杂志 1984; 4: 144

[20] 徐佩佩，等 药学学报 1983; 18: 401.

[21] Xiao Shuhua, et al: J Chromatogr 1983; 275: 127.

[22] 饯明心，等 内部资料 1986.

[23] Jone CR: Solvent Extraction. In: Reid E, ed. Assay ofD rug and Other Trace Compound in Biological Fluids North-Holland 1976: 107.

[24] Silva JAF: Sample preparation for trace drug analysis In Reid E, ed. Trace-Organic Sample Handling Ellis Horwood Limit, 1981: 192.

[25] De Zeew R: Pharmazie 1981; 36: 178.

[26] 陈寿椿 药物分析杂志 1982; 2: 314.

[27] 王风翔，等 中国药理学报 1983; 4: 45.

[28] 肖树华，等药学学报 1980; 15: 135.

[29] Ritter W: Quantitative HPTLC in assaying body fliuds for drugs and metabolites. In: Reid E ed. Drug Metabolit e Isolation and Determination Pleuma

血清胆碱酯酶同功酶与肝病

陈道宏*综述　沈鼎明　审校

对于胆碱酯酶（ChE）的研究，其多分子形式是个颇令人感兴趣的领域。本世纪六十年代以来，不少学者从遗传学、生物学角度探讨了胆碱酯酶同功酶（ChEi），七十年代末，始有肝病患者的胆碱酯酶同功酶研究。

血清胆碱酯酶同功酶的一般特性

血清胆碱酯酶是主要由肝脏合成的一种含唾液酸的糖蛋白，又叫假性胆碱酯酶或非特异胆碱酯酶[1]，生理作用尚不清楚。它包括一组电泳、层析及动力学特征各异的同功酶，各分子形式的分布基本恒定[3]。

目前所知，至少有五种基因指导着血清ChE的生物合成，它们分别是：一般基因（E_1^u）、不典型基因（E_1^a）、抗氟化物基因（E_1^f）、不活动基因（E_1^s）和C_5基因（E_2）。其中E_1^a、E_1^f、E_1^s是E_1^u的复等位基因变异，E_2则在不同的基因位点即E_2位点[3]。

表1　血清ChEi的分子量[2]

ChE_1	82000 ±6600
ChE_2	110000±9200
ChE_3	170000±18000
ChE_4	200000±15000
ChE_5	260000±22000

超速离心测定结果证明血清各ChEi具有不同的分子量[2]，这种分子异型性支持血清ChE是类似于多肽亚单位的多分子复合体的假说[4]。血清ChEi各成分的洗提液经适当处理，表现出多分子形式之间的互变性，后者很可能由同一亚单位的分解与聚合所致[5]。

血清胆碱酯酶同功酶的检测

血清ChEi检测多采用电泳分离、组织

* 研究生

Press 1983: 55.
[30] 邵鹤生，等　中国药理学报　1981; 2: 49.
[31] Patzschke K, et al: Europ J Drug Metab pharmacoki 1979; 3: 149.
[32] 郭尧君　荧光实验技术及其在分子生物学中的应用　科学出版社　1979: 96.
[33] Jones CR: Problem arising from assaying low concentration by HPLC. In: Reid ed. EDrug Metabolite Isolation and Determination Pleum Press, 1983: 33.
[34] Xiao Shuhua, et al: J Inf Dis 1985; 151: 1130.
[35] 重庆医科大学血吸虫病研究室：内部资料　1985.
[36] 王小根，重庆医科大学学报　1987; 12:9.
[37] Liu Yu-han, et al: Chin Med J 1986; 99:935.
[38] 钱明心，等　重庆医科大学学报.（在印刷中）.
[39] Wainer IW, Doyle TD: 国外医学药学分册1986; 2: 65.
[40] Blazchke, et al: Chem Ber 1985; 118: 4620.

（本文承王其南教授、全钰珠教授指正，谨致谢忱）。