

LC-ESI-MS-MS 法同时测定大鼠血浆中甲苯磺丁脲/ 4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗及其药代动力学研究

候丛颂^{1,2}, 杨志宏^{2*}, 孙晓波^{2*}

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的:建立灵敏、快速、稳定的测定大鼠血浆中“Cocktail”探针药物甲苯磺丁脲及其代谢产物 4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗的液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS-MS)方法。方法:100 μL 血浆样品加入内标格列齐特及乙酸铵,以乙酸乙酯进行液液萃取,离心取上清挥发复溶,LC-ESI-MS-MS 检测。选用 Agilent Eclipse Plus- C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm),乙腈和 0.01% 甲酸(1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵)作为流动相,梯度洗脱,流速 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 10 μL 。采用电喷雾电离源(ESI),扫描方式为多反应离子监测模式(MRM),甲苯磺丁脲 m/z 269.1/170.0;4-羟基甲苯磺丁脲 m/z 285.1/186.0;氯唑沙宗 m/z 168.1/132.1;格列齐特 m/z 322.3/170.2。结果:甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲和氯唑沙宗的线性范围分别为 0.98 ~ 4 000,0.25 ~ 125,0.98 ~ 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。提取回收率均 >70%,稳定性 RSD <11% 且无基质效应。结论:该方法快速、灵敏、重复性好,可用于血浆中探针药物甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗浓度的测定,有助于深入进行代谢酶 CYP2C9 和 CYP2E1 的研究。

[关键词] 鸡尾酒探针法; 甲苯磺丁脲; 氯唑沙宗; 液相色谱-电喷雾串联质谱; 肝代谢酶

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0144-07

[doi] 10.11653/syjf2013120144

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130412.0946.007.html>

[网络出版时间] 2013-04-12 9:46

Simultaneous Determination of Tolbutamide and Its Metabolite 4-hydroxytolbutamide, Chlorzoxazone in Rat Plasma by LC-MS-MS and Application to Pharmacokinetic Study

[收稿日期] 20130114(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102879,81273654);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20101106120049);国家重大新药创制专项(2013ZX09103002-022);国家科技支撑计划课题(2008BAI51B02)

[第一作者] 候丛颂,硕士研究生,Tel:18911956286,E-mail:houcongsong@126.com

[通讯作者] * 杨志宏,副研究员,从事药物代谢动力学及中药复方配伍机制研究,Tel:010-57833219,E-mail:zhyang@implad.ac.cn;

* 孙晓波,研究员,从事中药药效物质基础与作用机制研究、创新药物研究,Tel:010-57833013,E-mail:sxbimplad@gmail.com

- [4] 王莉. 丹参、人参标准提取物复方配伍在大鼠体内的药理学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2010.
- [5] 张文静,曹琦琛,曹珂. 丹酚酸 B 的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(7):608.
- [6] 刘嘉,李俊松,狄留庆. 丹 B 及其磷脂复合物在 SD 大鼠的生物利用度研究[J]. 中国药理学杂志,2010,45(18):1408.
- [7] 王欣眉,蒋慧,徐小平. HPLC 同时测定乐脉颗粒中的丹酚酸 B 和丹参素钠[J]. 华西药理学杂志,2008,23(4):476.
- [8] 高秀朋,蒋倩,王鹏娇. HPLC 测定大红袍妇炎宁胶囊中的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B[J]. 华西药理学杂志,2008,23(4):478.
- [9] 王小平,刘峰,杨东华. HPLC 测定丹红注射液中迷迭香酸在大鼠血浆中的浓度[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):220.
- [10] 王秀丽,赵保胜. 复方丹参注射液中丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,16(2):110.
- [11] 张蕾,刘剑刚,史大卓. 丹参红花有效部位配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):37.

[责任编辑 顾雪竹]

HOU Cong-song^{1,2}, YANG Zhi-hong^{2*}, SUN Xiao-bo^{2*}

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] Objective: To set up an LC-MS-MS method for the simultaneous determination of Cytochrome P450 probe substrates, including tolbutamide and its metabolite 4-hydroxytolbutamide for CYP2C9, chlorzoxazone for CYP2E1. **Method:** Probe drugs with the IS gliclazide were extracted using ethyl acetate. Gradient elution was performed on an Agilent Eclipse Plus-C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm). The mobile phase consisted of 0.01% formic acid (1 mmol · L⁻¹ ammonium formate) and acetonitrile. The flow-rate was 0.3 mL · min⁻¹, and the injection volume was 10 μL. The probe drugs were analyzed by ESI MS in MRM mode. The MS-MS reaction selected ions 269.1/170.0 *m/z* for tolbutamide, 285.1/186.0 *m/z* for 4-hydroxytolbutamide, 168.1/132.1 *m/z* for chlorzoxazone and *m/z* 322.3/170.2 ions for gliclazide. **Result:** The tolbutamide, 4-hydroxytolbutamide and chlorzoxazone had good linear relationship within the range of 0.98-4 000, 0.25-125, 0.98-2 000 μg · L⁻¹, respectively. The extraction recoveries for all probe drugs were more than 70%. The stability RSD were less than 11% and matrix effects in plasma on the ionization of probe drugs were negligible. **Conclusion:** The method described in this report has accuracy, sensitivity and reproducibility. The established LC-MS-MS method was suitable for pharmacokinetic study of tolbutamide and chlorzoxazone as a cocktail probe group and could be applied to hepatic microsomal enzyme study.

[Key words] Cocktail probe method; tolbutamide; chlorzoxazone; LC-MS-MS; liver metabolism enzyme

1990年, Breimer^[1]首次提出了“Cocktail”探针药物法用于研究药物氧化代谢的新策略。“Cocktail”探针药物法,是指同时给予多种相对低剂量 CYP450 同工酶底物探针药物,测定生物样本中各探针药物的代谢率或其他代谢分型指标,获取多个 CYP450 同工酶表型信息的方法。“Cocktail”探针药物法快速、简单、经济,能在同一只动物上得到多个数据,减小个体差异对数据波动性影响,是药物研发早期高通量筛选、药物代谢机制研究以及上市药物再评价等有效方法。《化学药物非临床药代动力学研究指导原则》中指出:“对于创新性的药物,应观察药物对药物代谢酶,特别是细胞色素 P450 同工酶的诱导或抑制作用^[2]”。因此,在评价创新药物的临床前药代动力学研究中,“Cocktail”探针药物法快速评价肝药酶活性具有广阔的应用前景。CYP2C9 和 CYP2E1 参与代谢和活化许多种临床药物、前致癌物和前毒物。CYP2C9 含量约占 CYP450 总量的 20%,代谢约 12% 常用临床药物,如氟西汀、氯沙坦、苯妥英、甲苯磺丁脲、托拉塞米、S-华法林、众多的非甾体抗炎药和磺酰脲类口服降糖药。CYP2C9 基因多态性影响格列本脲、格列齐特的药代动力学行为,从而增加个体在接受药物的常规治疗时发生低血糖等严重不良反应的风险^[3]。由于人和动物的 CYP2E1 活性十分相近,大鼠已经成为

研究 CYP2E1 基因表达和底物筛选的理想动物模型^[4]。在一些高营养代谢如大鼠肥胖、过量喂食、糖尿病情况下,CYP2E1 表达升高^[5]。低剂量尼古丁也会诱导 CYP2E1 活性。CYP2E1 活性增高本身并不造成肝损伤,但可增强铁和多不饱和脂肪酸诱导的肝脏毒性^[6],产生氧化性肝损伤,对机体造成严重伤害。近年,关于中药及其活性成分对 CYP2C9 和 CYP2E1 酶的研究逐渐增多^[7-9]。伴随着化药-化药、中药-化药相互作用引发不良反应及药物中毒事件日益增多,肝代谢层面上的药物药物相互作用倍受关注。

本研究选取甲苯磺丁脲/4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗作为 CYP2C9 和 CYP2E1 的探针药物,建立的评价 CYP2C9 和 CYP2E1 活性的体内研究方法。通过测定对 CYP2C9 和 CYP2E1 的诱导或抑制作用,进行化药或重要肝药酶亚型影响的早期预评,为临床合理用药提供科学有效的实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);3200QTrap 型串联四级杆线性离子阱质谱仪(美国 AB SCIEX 公司),Turbo Ionspray 离子源,Analyst 1.4.2 数据处理系统;Milli-Q Gradient A10 型超纯水器(美国 Millipore 公司),真空旋转蒸发器(美国 Labconco 公司),Labofuge 400R 型高速离心

机(美国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂 氯唑沙宗(CZX)和格列齐特(GCZ)对照品购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 100364-200301,00269-201004,纯度 $\geq 99\%$; 甲苯磺丁脲(TOL)和 4-羟基甲苯磺丁脲(4OH-TOL)购自美国 Cerilliant 公司,批号分别为 1758990, FN061311-01,纯度 $\geq 99\%$; 乙腈和甲醇购自美国 Fisher Scientific 公司,色谱纯; 乙酸乙酯购自美国 Honeywell 公司,色谱纯; 甲酸购自德国 Merck 公司,色谱纯; 甲酸铵购自美国 Roe Scientific 公司,色谱纯; 其他试剂均为市售分析纯,实验用水为超纯水。

1.3 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 240 ~ 270 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 标准溶液 分别准确称定探针药物 TOL 和 CZX 对照品 1 mg,置于 1 mL 甲醇中,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液作为贮备液(于 4 °C 下避光保存)。精密量取 TOL 贮备液适量用甲醇稀释成 40 000, 20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 391, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液; 精密量取 4OH-TOL 贮备液适量用甲醇稀释成 1 250, 625, 391, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.8, 4.9, 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液; 精密量取 CZX 贮备液适量用甲醇稀释成 20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 391, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液。

2.1.2 内标溶液 准确称取 GCZ 对照品 1 mg,置于 1 mL 甲醇中,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液作为贮备液(于 4 °C 下避光保存)。用甲醇稀释成 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

2.1.3 静脉注射用混合探针药物溶液 精密称取 TOL 10 mg, CZX 5 mg 分别溶于 1 mL 乙醇中,配制成 $10, 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 探针药物溶液。分别精密量取 0.3 mL 探针药物溶液,溶于 2.4 mL 生理盐水中,配制成混

合探针药物溶液。

2.2 血浆样品的处理 100 μL 血浆精密加入内标 GCZ 10 μL ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 混匀,加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液 100 μL 及 4 mL 乙酸乙酯,振荡提取 5 min,离心,吸取上清液真空挥干,用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠水和乙腈混合液 200 μL 复溶,高速离心取上清 10 μL 进样分析。

2.3 测定条件 色谱条件: Agilent Eclipse Plus- C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm); 流动相 A 0.01% 甲酸水 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵), B 乙腈,梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 20 ~ 85% B; 4 ~ 4.2 min, 85% B; 4.2 ~ 4.5 min, 85 ~ 20% B; 4.5 ~ 9 min, 20% B), 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 10 μL , 柱温 30 °C。

质谱参数: 电喷雾离子化 (ESI), 离子极性 Negative, 多反应离子监测 (MRM), 离子喷雾电压 (-4 500 V), 离子源温度 (450 °C), Gas1 (60 psi), Gas2 (65 psi), 气帘气压力 (20 psi), TOL m/z : 269.1/170.0; 4OH-TOL m/z 285.1/186.0; CZX m/z 168.1/132.1; GCZ m/z 322.3/170.2。

2.4 血浆中标准曲线及最低定量限 100 μL 血浆精密加入不同量的对照品,使血浆中 TOL 质量浓度为 0.98, 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 62.5, 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 62.5, 125, 250, 500, 1 000, 4 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。4OH-TOL 质量浓度为 0.25, 0.49, 0.98, 1.95, 3.91, 15.63, 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CZX 质量浓度为 0.98, 1.95, 7.81, 31.25, 62.5, 125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 62.5, 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按 2.2 项下处理样品,利用样品与内标峰面积比 R 对样品质量浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 作线性回归。在上述条件下 TOL, 4OH-TOL, CZX 最低定量限分别为 0.98, 0.25, 0.98 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 见表 1。

2.5 专属性 本实验条件下, TOL, 4OH-TOL, CZX 及内标 GCZ 色谱峰形良好, 血浆中内源性物质不干扰待测物及内标物的测定。结果如图 1, 2 所示, 本方法具有较好的专属性。

表 1 大鼠血浆中探针药物的标准曲线、保留时间及灵敏度

药物	t_R/min	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	R^2	LLOQ/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
TOL	5.76	0.98 ~ 125	$R = 0.0075C + 0.0231$	0.9993	0.98
		62.5 ~ 4 000	$R = 0.0075C + 0.2914$	0.9987	
4OH-TOL	2.84	0.25 ~ 125	$R = 0.0017C - 0.00004$	0.9999	0.25
CZX	4.26	0.98 ~ 62.5	$R = 0.0007C + 0.0043$	0.9971	0.98
		62.50 ~ 2 000	$R = 0.0007C + 0.0115$	0.9978	

2.6 精密度和准确度 100 μL 血浆精密加入不同量的标准品,使 TOL 的质量浓度为 3.91,62.5,250,2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,4OH-TOL 的质量浓度为 0.98,15.63,62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,CZX 的质量浓度为 1.95,31.25,125,1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按照 2.2 项下处理样品,测定批内和批间差异。结果见表 2。

2.7 提取回收率 100 μL 空白血浆精密加入不同量的对照品,使 TOL 的质量浓度为 3.91,62.5,250,2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,4OH-TOL 的质量浓度为 0.98,15.63,62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,CZX 的质量浓度为 1.95,31.25,125,1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 2.2 项下处理样品,测

得血浆中 TOL,4OH-TOL,CZX 的提取回收率。结果见表 3。

2.8 稳定性 100 μL 空白血浆精密加入不同量的对照品,使 TOL 的质量浓度为 3.91,62.50,250,2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,4OH-TOL 的质量浓度为 0.98,15.63,62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,CZX 的质量浓度为 1.95,31.25,125,1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 7 d,用 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴解冻后,测定药物浓度;4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 后,测定探针药物浓度。结果显示测定数据的 RE < 14% 和 RSD < 11%,表明 TOL,4OH-TOL,CZX 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置及 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 均稳定。结果见表 4。

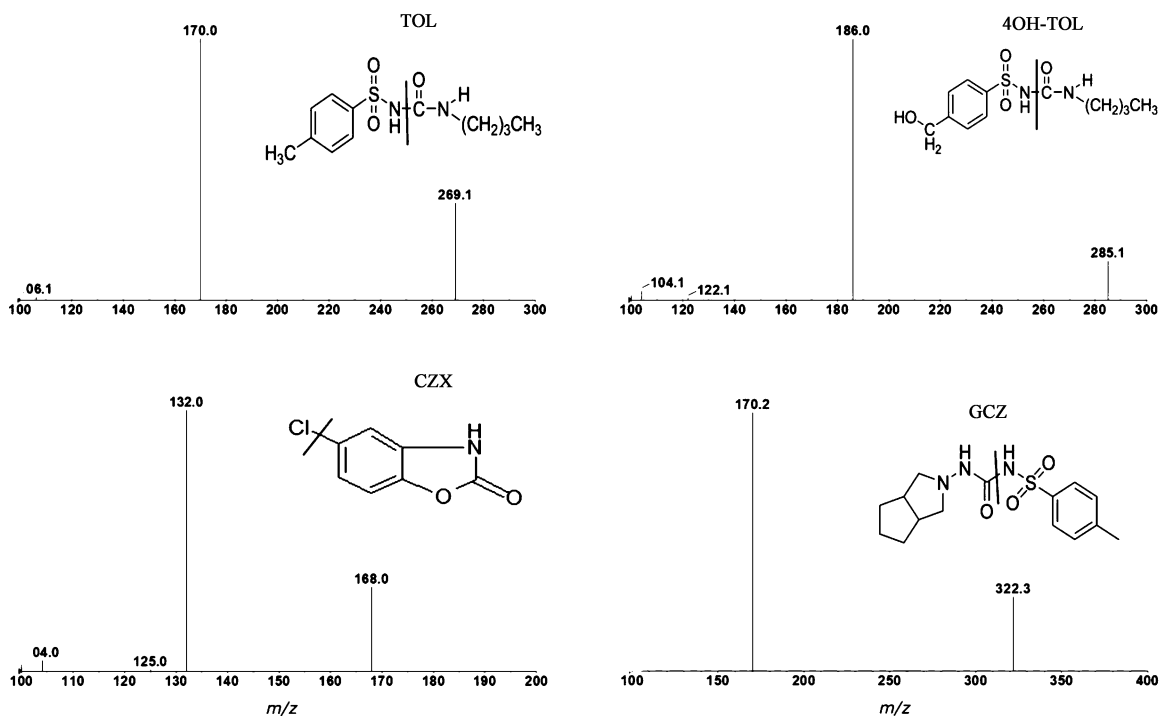


图 1 大鼠血浆中探针药物、代谢产物及内标的二级质谱

表 2 不同探针药物批内、批间精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

探针药物	加入量 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	批外			批内		
		测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	RE/%	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	RE/%
TOL	3.91	3.54 \pm 0.17	4.75	9.49	4.10 \pm 0.40	9.64	4.97
	62.50	59.93 \pm 0.69	1.16	-4.11	58.69 \pm 2.32	3.95	-6.09
	250.0	260.3 \pm 2.7	1.03	4.13	243.3 \pm 19.2	7.89	-2.69
	2 000.0	2 032.3 \pm 24.8	1.22	1.62	1 976.0 \pm 68.8	3.48	-1.20
4OH-TOL	0.98	0.89 \pm 0.05	5.13	-9.24	1.14 \pm 0.18	15.42	16.82
	15.63	14.69 \pm 0.33	2.23	-6.05	14.94 \pm 1.09	7.32	-4.36
	62.50	59.48 \pm 1.87	3.14	-4.84	56.64 \pm 3.29	5.81	-9.38
CZX	1.95	1.85 \pm 0.11	5.87	-5.08	1.96 \pm 0.37	18.77	1.10
	31.25	33.63 \pm 0.82	2.43	7.60	34.05 \pm 1.08	3.16	4.78
	125.0	128.4 \pm 5.3	4.16	0.82	123.9 \pm 5.9	4.79	-0.83
	1 000.0	1 030.8 \pm 21.2	2.06	3.08	1 045.7 \pm 71.5	6.84	4.58

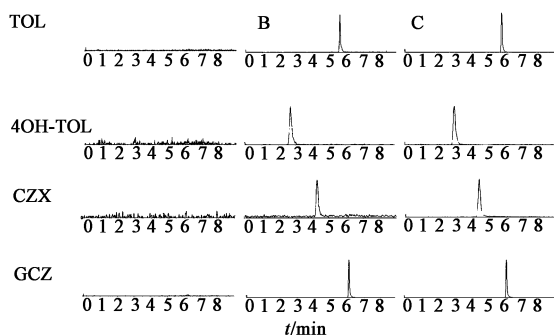


图 2 TOL,4OH-TOL,CZX 和 GCZ 提取离子流
A. 空白血浆;B. 空白血浆加入 3 种混合标液和内标 GCZ(TOL:
0.98 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;4OH-TOL:0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;CZX:0.98 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;GCZ:
100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);C. 大鼠 iv. 探针药物后血浆和内标 GCZ(TOL:
24 h;4OH-TOL:24 h;CZX:4 h)

图 2 TOL,4OH-TOL,CZX 和 GCZ 提取离子流

表 3 大鼠血浆中探针药物的提取回收率($\bar{x} \pm s, n=6$)

探讨药物	加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 $\%$
TOL	3.91	3.06 \pm 0.23	77.69 \pm 5.53
	62.50	53.50 \pm 4.35	90.29 \pm 5.02
	250.0	237.5 \pm 23.6	95.00 \pm 9.43
	2 000.0	1 894.2 \pm 131.2	94.71 \pm 6.56
4OH-TOL	0.98	0.69 \pm 0.02	74.24 \pm 4.44
	15.63	13.96 \pm 0.95	91.36 \pm 3.80
	62.50	50.56 \pm 1.86	80.90 \pm 2.98
	31.25	29.72 \pm 3.63	99.31 \pm 11.00
CZX	1.95	1.93 \pm 0.15	92.77 \pm 5.55
	31.25	29.72 \pm 3.63	99.31 \pm 11.00
	125.0	110.1 \pm 9.5	88.11 \pm 7.58
	1 000.0	970.8 \pm 45.2	97.82 \pm 4.25

表 4 大鼠血浆中探针药物的稳定性($\bar{x} \pm s, n=6$)

探针药物	加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	7 d at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$			24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$		
		测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$	RE/ $\%$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$	RE/ $\%$
TOL	3.91	4.29 \pm 0.18	4.30	9.72	3.45 \pm 0.28	8.21	11.76
	62.5	59.6 \pm 1.31	2.21	-4.70	59.4 \pm 1.52	2.55	-4.99
	250.0	232.5 \pm 8.36	3.60	-6.97	269.2 \pm 5.45	2.03	7.68
	2 000.0	2 101.5 \pm 57.5	3.74	5.08	1 993.7 \pm 24.5	1.23	0.31
4OH-TOL	0.98	0.93 \pm 0.10	11.00	5.10	1.15 \pm 0.07	5.92	17.34
	15.63	15.48 \pm 0.34	2.17	-0.96	15.16 \pm 0.55	3.66	-3.01
	62.5	58.3 \pm 1.90	3.25	-6.67	69.0 \pm 0.77	1.09	10.29
CZX	1.95	2.12 \pm 0.23	10.90	8.72	1.95 \pm 0.11	5.60	0.00
	31.25	31.50 \pm 1.64	5.20	0.80	30.33 \pm 0.98	3.23	-2.94
	125.0	121.0 \pm 4.88	4.03	-3.13	131.9 \pm 1.93	1.46	5.56
	1 000.0	1 134.0 \pm 38.6	3.40	13.41	978.6 \pm 14.6	1.49	-2.14

2.9 基质效应 6 只大鼠血浆和超纯水各 100 μL , 按照 2.2 项下处理样品,不加内标,挥干后加入标准工作液,挥干复溶,使 TOL 质量浓度为 3.91,62.5,250,2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;4OH-TOL 质量浓度为 0.98,15.63,62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,CZX 质量浓度为 1.95,31.25,125,1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,各基质每个浓度平行设置 6 个样品,分别记录峰面积为 A_1 和 A_2 。内标 GCZ(100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 同时进行考察。如表 5 所示,TOL,4OH-TOL,CZX 基本无基质效应。

3 药代动力学研究

6 只大鼠于给药前一天禁食 12 h,股静脉给予混合探针药物,剂量为 TOL 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,CZX 0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,于给药后 0.05,0.12,0.25,0.5,1,2,4,6,8,10,12,16,24 h 由眼内眦取血 250 μL 于肝素化试管中,离心取血浆,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。测定探针药物浓度,绘制药时曲线,见图 3。WinNonlin 软件以非房室模型计算其主要的代谢动力学参数,见表 6。

表 5 大鼠血浆样品的基质效应($n=6$)

探针药物	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_1/A_2/\%$
TOL	3.91	87.48
	62.50	80.30
	250.0	98.91
	2 000.0	100.6
4-OH-TOL	0.98	102.2
	15.63	86.84
	62.50	104.2
CZX	1.95	106.8
	31.25	99.62
	125.0	104.1
	1 000.0	95.74
GCZ(IS)	100.0	92.10

4 讨论

4.1 探针底物选择 “Cocktail” 探针药物法用于研究 CYP450 活性,有多种探针药物选择和组合,如 “Pittsburgh Cocktail” 法、“GW Cocktail” 法、

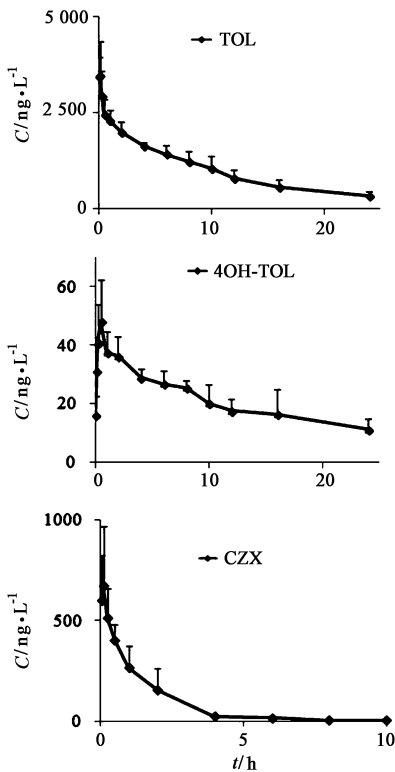


图3 大鼠静脉注射混合探针药物后 TOL, 4OH-TOL, CZX 的药时曲线 (n = 6)

表6 TOL, 4OH-TOL, CZX 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	TOL	4OH-TOL	CZX
K_e/h^{-1}	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.46 ± 0.15
$t_{1/2}/h$	9.10 ± 3.68	13.22 ± 3.25	1.77 ± 0.96
$AUC_{0-t}/ng \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	24 276.2 ± 3 348.1	525.7 ± 76.9	864.0 ± 257.9
$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	28 719.5 ± 4 875.5	759.2 ± 167.1	871.1 ± 263.4
$CL/mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	17.85 ± 3.28	-	623.7 ± 215.1
$Vd/mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	228.3 ± 88.36	-	1 531.9 ± 792.9
MRT_{0-t}/h	7.80 ± 0.92	9.36 ± 0.81	1.49 ± 0.26
$MRT_{0-\infty}/h$	12.42 ± 3.58	19.55 ± 5.19	1.58 ± 0.29

“Cooperstown 5 + 1 Cocktail”法等^[9-13]。考虑探针药物的安全性、灵敏度和特异性的基础上,本实验选择了TOL和CZX作为CYP2C9和CYP2E1的探针药物。这种组合探针底物之间不发生药物相互作用,且能准确反映CYP2C9和CYP2E1酶活性。

CYP2C9:由于双氯芬酸在体内的吸收呈现多变性^[14],华法林的代谢则由CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4共同参与特异性不强^[15],故未采用双氯芬酸和华法林作为CYP2C9的探针药物实验方案,而采用了TOL及其特异性反应TOL4-羟基化反应作为活性指标^[16]。CYP2E1:CZX是目前唯一可用于测定CYP2E1酶活性的特异性探针药物。它在体内主要经羟基化代谢生成6-OH氯唑沙宗,再迅速与葡萄糖醛酸结合从尿中排出^[17]。实验中没有测定代

谢产物6-OH氯唑沙宗,因为CZX几乎全部被代谢并且快速消除,使其成为一个可靠的在体CYP2E1活性检测的探针药物^[18];而且实验中前处理方法选择较为快速的液液萃取,故在血浆前处理过程中不考虑6-OH氯唑沙宗与葡萄糖醛酸结合物的提取。

4.2 前处理方法 采用一次萃取的方式提取探针药物和代谢产物。与经多次提取和固相萃取^[19]的前处理方法相比较,成本低、操作简单。在预实验中首先选择了乙醚和乙酸乙酯进行比较,发现乙酸乙酯的提取率高于乙醚。其次根据探针药物和代谢产物的化合物性质不同,在血浆样品中加入了乙酸铵、碳酸钠、磷酸二氢钠处理,发现加入乙酸铵的提取回收率稳定且>70%。

4.3 色谱质谱条件优化 质谱条件下选择多反应监测(MRM)进行质谱扫描,确定TOL/4OH-TOL, CZX在负离子模式响应更好。在流动相选择方面,乙腈的洗脱强度大于甲醇,在流动相中加入0.01%甲酸和1 mmol·L⁻¹甲酸铵,能提高各离子对的质谱响应值。采用梯度洗脱,有利于待测药物以较好的峰形在较短时间内出峰,缩短分析时间。

4.4 相对较低的给药剂量 “Cocktail”探针药物法研究肝药酶活性,目前主要集中在通过同时测定探针药物原型或者代谢产物来反映肝药酶活性。由于单一探针药物的特异性较差,不能保证对肝药酶活性的准确反映。所以选择探针药物和代谢产物同时测定,能准确反映肝药酶活性。与以往文献报道探针药物给药剂量比较,TOL的范围为2~20 mg·kg⁻¹^[20-24],CZX的范围为1~10 mg·kg⁻¹^[21,23],而本实验TOL 1 mg·kg⁻¹;CZX 0.5 mg·kg⁻¹相对较低,可以使探针药物对大鼠生理状况的影响降至更低水平,有利于得到更为准确的肝药酶代谢活性数据。

LC-ESI-MS-MS方法测定TOL, 4OH-TOL, CZX最低定量限在0.98, 0.25, 0.98 μg·L⁻¹,该检测方法灵敏,准确,稳定,适用于药物对肝药酶CYP2C9和CYP2E1代谢活性影响的深入研究。

[参考文献]

[1] Breimer D D, Schellens J H. A ‘cocktail’ strategy to assess *in vivo* oxidative drug metabolism in humans [J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(6):223.
 [2] GPT5-1. 化学非临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005.
 [3] Ragia G, Petridis I, Tavridou A, et al. Presence of CYP2C9 * 3 allele increases risk for hypoglycemia in Type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas [J].

- Pharmacogenomics, 2009, 10(11):1781.
- [4] Gokalp O, Gunes A, Cam H, et al. Mild hypoglycaemic attacks induced by sulphonylurea related to CYP2C9, CYP2C19 and CYP2C8 polymorphisms in routine clinical setting [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2011, 61(12):1223.
- [5] Baumgardner J N, Shankar K, Hennings, et al. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1):G27.
- [6] Micu AL, Miksys S, Sellers E M, et al. Rat hepatic CYP2E1 is induced by very low nicotine doses: an investigation of induction, time course, dose response, and mechanism [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(3):941.
- [7] 艾常虹, 孙汉雄, 李桦, 等. 中药有效成分对细胞色素 P450 酶的抑制活性评价 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4):519.
- [8] 武佰玲, 刘萍, 高月, 等. 酸枣仁、远志和桔梗水提液对大鼠肝 CYP450 酶活性剂 mRNA 表达的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):235.
- [9] 姚珏成, 倪健, 韩婧, 等. 黄芩提取物对细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):202.
- [10] Frye R F, Matzke G R, Adedoyin A, et al. Validation of the five-drug ‘Pittsburgh cocktail’ approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes [J]. Clin Pharmacol Ther, 1997, 62(4):365.
- [11] Scott R J, Palmer J, Lewis I A, et al. Determination of a ‘GW cocktail’ of cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in plasma and urine using automated solid phase extraction and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, 13(23):2305.
- [12] Chainuvati S, Nafziger A N, Leeder J S, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the ‘Cooperstown 5 + 1 cocktail’ [J]. Clin Pharmacol Ther, 2003, 74(5):437.
- [13] Ardjomand-Woelkart K, Kollroser M, Li L, et al. Development and validation of a LC-MS/MS method based on a new 96-well Hybrid-SPE[®]-precipitation technique for quantification of CYP450 substrates/metabolites in rat plasma [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(8):2371.
- [14] Morin S, Lorient M A, Poirier J M, et al. Is diclofenac a valuable CYP2C9 probe in humans [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2001, 56(11):793.
- [15] Yuan R, Madani S, Wei X X, et al. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(12):1311.
- [16] 谭朝丹, 马越鸣, 石荣, 等. 黄芩对大鼠体内甲苯磺丁脲药动学的影响 [J]. 中成药, 2011, 33(7):1153.
- [17] Conney A H, Burns J J. Physiological disposition and metabolic fate of chlorzoxazone (paraflex) in man [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1960, 128(4):340.
- [18] 王新敏, 景欣悦, 彭蕴茹, 等. 体内、体外相结合评价 CYP2E1 酶活性的方法学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):189.
- [19] Wohlfarth A, Naue J, Lutz-Bonengel S, et al. Cocktail approach for *in vivo* phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: development of an effective sampling, extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping [J]. J Clin Pharmacol, 2012, 52(8):1200.
- [20] Jurica J, Konecny J, Zahradníková L Z, et al. Simultaneous HPLC determination of tolbutamide, phenacetin and their metabolites as markers of cytochromes 1A2 and 2C6/11 in rat liver perfusate [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(4):557.
- [21] Liu Y, Jiao J, Zhang C, et al. A simplified method to determine five cytochrome p450 probe drugs by HPLC in a single run [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(4):717.
- [22] Liu R, Qin M, Hang P, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins on the activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 in rats *in vivo* [J]. Phytother Res, 2012, 26(8):1113.
- [23] Han YL, Li D, Ren B, et al. Evaluation of impact of Herba Erigerontis injection, a Chinese herbal prescription, on rat hepatic cytochrome P450 enzymes by cocktail probe drugs [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(1):104.
- [24] Zhang S, Song N, Li Q, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous evaluation of activities of five cytochrome P450s using a five-drug cocktail and application to cytochrome P450 phenotyping studies in rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 871(1):78.

[责任编辑 邹晓翠]