

奥拉西坦对肝微粒体酶CYP2C9活性的影响研究[△]

陈 玮*, 张志清#, 贡 莹, 何文娟, 韩玉冰(河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1937-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.06

摘 要 目的:考察奥拉西坦对肝微粒体酶CYP2C9活性的影响。方法:将大鼠随机分为对照组和实验组,每组18只,对照组每天灌胃蒸馏水,实验组每天灌胃奥拉西坦80 mg/kg,每日2次,连续8 d。第8天灌胃后两组大鼠均立即灌胃给予CYP2C9的探针药物甲苯磺丁脲50 mg/kg,并于给予甲苯磺丁脲后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、10、12、24 h内眼内眦取血。采用高效液相色谱法测定血药浓度,拟合药动学参数,并对两组药动学参数进行比较。结果:对照组与实验组主要药动学参数 $t_{1/2}$ 分别为(5.45±1.98)、(6.54±1.45) h, c_{max} 分别为(169.12±58.14)、(146.19±49.44) mg/L, AUC_{0-24h} 分别为(1 113.01±264.32)、(1 120.14±208.91) mg·h/L, V_d 分别为(0.77±0.32)、(0.91±0.40) L/kg,CL分别为(0.08±0.03)、(0.08±0.02) L/(h·kg),两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:奥拉西坦对甲苯磺丁脲在大鼠体内的药动学未见明显影响,初步认为奥拉西坦对经CYP2C9代谢的药物的药动学无明显影响。

关键词 高效液相色谱法;奥拉西坦;甲苯磺丁脲;药动学;大鼠

Effects of Oxiracetam on the Activity of Hepatocytosome Enzyme CYP2C9

CHEN Wei, ZHANG Zhi-qing, GONG Ying, HE Wen-juan, HAN Yu-bing(The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of oxiracetam on the activity of hepatocytosome enzyme CYP2C9. METHODS: Rats were randomly divided into control group and test group with 18 rats in each group. Control group was given distilled water intragastrically, while test group was given oxiracetam (80 mg/kg) intragastrically, twice a day, for consecutive 8 d. Both groups were given hepatocytosome enzyme CYP2C9 probe tolbutamide (50 mg/kg) intragastrically on the eighth day immediately after gavage; the blood samples were collected from epicanthal folds within 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 10, 12, 24 h after tolbutamide. The blood concentrations of tolbutamide were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters of the two groups were calculated and compared. RESULTS: The main pharmacokinetic parameters of control group and test group were as follows: $t_{1/2}$ were (5.45±1.98) h vs. (6.54±1.45) h; c_{max} : (169.12±58.14) mg/L vs. (146.19±49.44) mg/L; AUC_{0-24h} : (1 113.01±264.32) mg·h/L vs. (1 120.14±208.91) mg·h/L; V_d : (0.77±0.32) L/kg vs. (0.91±0.40) L/kg; CL: (0.08±0.03) L/(h·kg) vs. (0.08±0.02) L/(h·kg). There was no significant difference between 2 groups ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The pharmacokinetics of tolbutamide in rats has no significant change after treated with oxiracetam; it is preliminary considered that oxiracetam has no obvious effect on the products metabolized by CYP2C9.

KEYWORDS HPLC; Oxiracetam; Tolbutamide; Pharmacokinetics; Rats

奥拉西坦(Oxiracetam)为智能促进药,可以通过血脑屏障对特异性中枢神经通路有刺激作用,提高大脑对氧的利用能力,增强学习和记忆能力,还能够提前预防长时记忆的损害,恢复神经功能^[1]。自上市以来,由于其疗效肯定而得到广泛应用,已有的剂型包括注射剂、胶囊剂等^[2]。目前,奥拉西坦的药理作用和安全性已经得到确认,但其药动学研究较少,尚未见奥拉西坦对CYP2C9活性影响的研究。CYP2C9酶蛋白在肝脏、肠道和呼吸道等均有表达,但以肝微粒体表达为主,是人

类肝脏中含量丰富的一种CYP₄₅₀酶,仅次于CYP3A,占总量的20%^[3]。因此有必要对奥拉西坦的代谢机制及对CYP2C9活性的影响进行研究,完善其药动学试验,为奥拉西坦与其他药物的临床联合应用提供有力依据。

甲苯磺丁脲(Tolbutamide)是第一代磺酰脲类降糖药,研究证实甲苯磺丁脲口服后在肝脏内几乎仅以单一途径由CYP2C9催化代谢为羟基甲苯磺丁脲,因此该药被广泛用作研究CYP2C9活性的探针药物^[4]。本实验以甲苯磺丁脲为CYP2C9的探针药物,考察奥拉西坦对甲苯磺丁脲在大鼠体内的药动学影响,以为确定奥拉西坦对经CYP2C9代谢的药物的影响提供基础理论。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱系统,包括515泵、486紫外检测器、Empow-

[△]基金项目:2011年河北省自然科学基金资助项目(No.C2011206186)

*药师。研究方向:临床药理学。电话:0311-66002882。E-mail: weixiao761890@126.com

#通信作者:主任药师,硕士研究生导师,博士。研究方向:临床药理学、临床药理学、药物新制剂。电话:0311-66002771。E-mail: zhang-zhq@medmail.com.cn

er Application 操作平台(美国 Waters 公司);GL-20G-II 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);KL512J 数控恒温水浴氮吹仪(北京康林科技有限公司);MDF-U2086S 低温冰箱(日本三洋公司);CPA225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

甲苯磺丁脲对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:20110601,纯度:99.8%);甲苯磺丁脲片(山东仁和堂药业有限公司,批号:120302,规格:每片 0.5 g);卡马西平对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100142-201105,纯度:99.7%);注射用奥拉西坦(商品名:欧来宁,石药集团欧意药业有限公司,批号:262121213,规格:每支 1.0 g);甲基纤维素-M450(天津市博迪化工有限公司,批号:20100515);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

健康 SD 大鼠,清洁级,♂,体质量 220~230 g,由河北省动物实验中心提供,许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。

2 方法与结果

2.1 给药方案和生物样品采集

取大鼠 36 只,随机分为对照组(蒸馏水+甲苯磺丁脲)和实验组(奥拉西坦+甲苯磺丁脲),每组 18 只。对照组大鼠灌胃蒸馏水 1.4 ml,实验组灌胃奥拉西坦 80 mg/kg,每日 2 次,连续 8 d;第 8 天灌胃后两组大鼠均立即再分别灌胃甲苯磺丁脲 50 mg/kg(临床常用剂量)。所有大鼠分别于给予甲苯磺丁脲后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、10、12、24 h 眼内眦取血 0.5 ml 于装有肝素钠抗凝的离心管中,10 800 r/min(离心半径为 50 mm,下同)离心 2 min,取上层液,−40 °C 冰箱保存待测。

2.2 溶液的制备

2.2.1 奥拉西坦灌胃液:取 1 支注射用奥拉西坦,稀释至 75 ml,摇匀,配制成质量浓度为 13.3 mg/ml 的溶液,4 °C 避光保存,备用。

2.2.2 甲苯磺丁脲灌胃液:取甲苯磺丁脲片研成粉末,精密称取甲苯磺丁脲粉末于 0.5% 甲基纤维素溶液中,配制成质量浓度约为 8.3 mg/ml,超声至呈均匀溶液,4 °C 避光保存,备用。

2.2.3 内标溶液:精密称取卡马西平对照品 10 mg,置于 50 ml 量瓶中,流动相稀释至刻度,配制成质量浓度为 200 μg/ml 的溶液,4 °C 保存待用。

2.2.4 甲苯磺丁脲贮备液:精密称取甲苯磺丁脲对照品 100 mg,置于 100 ml 量瓶中,乙腈稀释至刻度,配制成质量浓度为 1 mg/ml 的溶液,4 °C 保存待用。

2.2.5 甲苯磺丁脲溶液:分别精密量取甲苯磺丁脲贮备液适量,用乙腈稀释成质量浓度分别为 1 000、500、250、100、25、10、5 μg/ml 的溶液。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品 100 μl,置于 5 ml 塑料离心管中,加入内标溶液 20 μl,加入提取剂二氯甲烷 1 ml,涡旋震荡 3 min,10 800 r/min 离心 2 min,取有机相 950 μl 于 1.5 ml 塑料离心管中,40 °C 水浴氮气吹干,100 μl 流动相复溶,进样测定。

2.4 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测器: Waters 486 紫外检测器; 流动相: 乙腈-水-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.4:0.5, V/V/V/V), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.5 专属性考察

分别取空白血浆、空白血浆+甲苯磺丁脲、给药后 1 h 的血浆样品,除空白血浆不加内标外其余按“2.3”项下处理,进样测定,记录色谱。结果表明,在该色谱条件下,大鼠血浆中内源性物质对甲苯磺丁脲的测定无干扰,内标及甲苯磺丁脲峰形良好,分离完全,保留时间分别约为 7、11 min,色谱图见图 1。

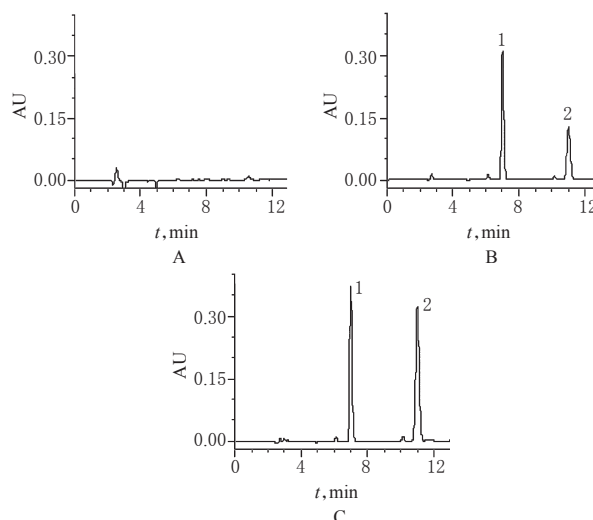


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+甲苯磺丁脲+内标; C. 血浆样品+内标; 1. 内标; 2. 甲苯磺丁脲

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+tolbutamide+internal standard; C. plasma sample+internal standard; 1. internal standard; 2. tolbutamide

2.6 线性关系考察

取 7 份空白血浆于 5 ml 塑料离心管中,每份 80 μl,分别加入 1 000、500、250、100、25、10、5 μg/ml 的甲苯磺丁脲溶液 20 μl,配制成质量浓度为 200、100、50、20、5、2、1 μg/ml 的模拟血浆样品,按“2.3”项下处理,进样测定,记录色谱。以测得的甲苯磺丁脲峰面积与内标峰面积的比值(y)为纵坐标,药物质量浓度(x)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0099x+0.0016$ ($r=0.9996$)。结果表明,甲苯磺丁脲检测质量浓度的线性范围为 1~200 μg/ml。

2.7 检测限与定量限检测

在“2.4”项色谱条件下,进样甲苯磺丁脲溶液,结果检测限为 0.1 μg/ml(信噪比为 3),定量限为 0.5 μg/ml(信噪比为 10)。

2.8 回收率与精密度试验

制备低、中、高 3 种质量浓度(2、20、160 μg/ml)的甲苯磺丁脲模拟血浆样品,按“2.3”项下处理,进样测定,记录峰面积。按回归方程计算实测质量浓度,与理论质量浓度比较计算方法回收率,以提取后的药物峰面积与等量未提取的药物峰面积之比计算提取回收率;每个浓度 5 个样本,每日进样 1 次考察日内精密度,连续 5 d 处理考察日间精密度,结果见表 1。

表 1 回收率与精密度试验结果(n=5)

Tab 1 Results of precision and recovery tests(n=5)

理论值, μg/ml	测得值, μg/ml	方法回收率, %	提取回收率, %	日内RSD, %	日间RSD, %
2	2.16±0.12	109.8±4.54	52.27±0.83	5.70	4.66
20	19.65±0.98	101.6±3.28	60.98±3.70	5.01	5.44
160	165.36±10.3	104.9±4.23	69.32±5.16	6.23	7.38

2.9 稳定性考察

分别考察质量浓度为20 μg/ml的甲苯磺丁脲模拟血浆样品在室温放置4 h、反复冻融3次及-40℃冻存5 d的稳定性,其RSD分别为0.86% (n=4)、4.68% (n=3)、5.55% (n=5),均小于10%,表明在上述条件下甲苯磺丁脲的稳定性良好。

2.10 药动学考察

取“2.1”项下各时间点血浆,按“2.3”项下方法处理,进样测定,记录色谱,各组甲苯磺丁脲的药-时曲线见图2。

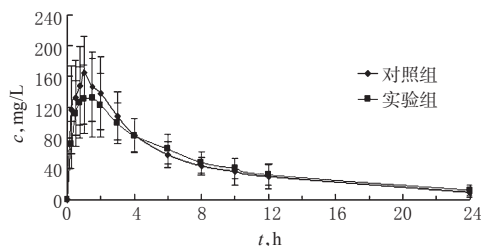


图2 两组大鼠体内甲苯磺丁脲的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves of tolbutamide in rats of 2 groups

由图2可见,甲苯磺丁脲在大鼠体内的药动学特征符合二室模型。根据回归方程计算每只大鼠各个时间点的血药浓度,采用DAS 2.1.1药动学软件进行拟合,分别得到两组大鼠的药动学参数。并采用SPSS 13.1统计学软件,运用 t 检验及非参数检验进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$,结果见表2。

表2 两组大鼠体内甲苯磺丁脲的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=18$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of tolbutamide in rats of 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=18$)

参数	对照组	实验组
$AUC_{0-24h}, mg \cdot h/L$	1113.01 ± 264.32	1120.14 ± 208.91
$AUC_{0-\infty}, mg \cdot h/L$	1215.40 ± 444.55	1253.05 ± 256.65
$t_{1/2}, h$	5.45 ± 1.98	6.54 ± 1.45
t_{max}, h	1.15 ± 0.64	1.51 ± 0.72
$CL, L/(h \cdot kg)$	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.02
$V_d, L/kg$	0.77 ± 0.32	0.91 ± 0.40
$c_{min}, mg/L$	169.12 ± 58.14	146.19 ± 49.44

由表2结果显示,两组大鼠体内甲苯磺丁脲的药动学参数间差异无统计学意义($P>0.05$),表明奥拉西坦不影响甲苯磺丁脲的代谢。

3 讨论

本研究采用高效液相色谱法测定大鼠血浆中甲苯磺丁脲的含量。参考文献中检测波长为230 nm^[5],在此检测波长下,甲苯磺丁脲有最大吸收,卡马西平也有较好吸收,且内源性杂质的吸收较小,故将检测波长定为230 nm。

血浆样品成分复杂,存在诸多内源性干扰物,在进行分析检测之前应对其进行处理。常用的血浆样品处理方法有溶剂提取法,常用的提取剂为乙醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯。经文献参考,甲苯磺丁脲易溶于丙酮、三氯甲烷,可溶于乙醇,几乎不溶于水^[6]。考虑到三氯甲烷不易挥发,二氯甲烷与三氯甲烷性质相似且易挥发,故选用二氯甲烷进行萃取,结果显示其提取回收率较好。

参考文献^[7-9],本实验先试用甲醇-水作为流动相,结果显

示甲苯磺丁脲保留时间过长,且内源性杂质干扰测定;后改用乙腈-水,结果显示其保留时间缩短,且与内源性杂质分离良好,但其峰形稍拖尾;因此在流动相中加入三乙胺以防止拖尾^[10],另为了保护色谱柱,在流动相中加入冰醋酸使其接近中性。最终确定流动相为乙腈-水-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.4:0.5, V/V/V/V)。该流动相下保留时间适宜,内源性杂质不影响含量测定,内标和药物分离良好,能满足实验要求。

甲苯磺丁脲的 $t_{1/2}$ 为5.5~6.5 h,整个采血时间应至少持续3~5个 $t_{1/2}$,因此设定采血时间为0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、10、12、24 h,并进行预实验,结果显示该取血时间点可以反映甲苯磺丁脲在大鼠体内的药动学特点,且大鼠耐受良好,满足实验要求。

奥拉西坦在人体内的给药剂量为每次800 mg,每日2~3次,因大鼠给药量为人给剂量的6倍,人的体质量以60 kg计,计算得出实验组大鼠的给药剂量为80 mg/kg,每日2次。为了使奥拉西坦在大鼠体内对CYP2C9的作用达到稳定,连续给药奥拉西坦8 d。

本研究结果提示,合用奥拉西坦前后甲苯磺丁脲的药动学参数差异无统计学意义,即奥拉西坦对甲苯磺丁脲在大鼠体内的药动学未见明显影响,初步认为奥拉西坦对经CYP2C9代谢的药物的药动学无明显影响。

参考文献

- [1] 齐洪武,王政刚,程建业.促智药奥拉西坦的研究进展[J].实用医院临床杂志,2010,7(5):147.
- [2] 金磊,李博,叶雷,等.奥拉西坦的临床前药理学研究[J].中国临床药理学与治疗学,2011,16(3):354.
- [3] 李锐,邱健.细胞色素氧化酶CYP2C9基因多态性及其与心血管药物代谢及疾病关系研究进展[J].心血管病学进展,2010,31(2):279.
- [4] Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P₄₅₀ 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, 45(6): 525.
- [5] 陈骥,王睿,王静.固相萃取HPLC检测生物样品中甲苯磺丁脲和代谢产物及其人体药代动力学研究[J].药物分析杂志,2005,25(1):50.
- [6] 衡先培,杨柳清,吴立风,等.磺脲类降糖药的临床应用[J].中国乡村医药杂志,2006,13(3):33.
- [7] 张香凝,李想,刘高峰.RP-HPLC法同时测定大鼠血浆中4种CYP450探针药物的浓度[J].药物分析杂志,2012,32(11):1903.
- [8] 邵雪力.高效液相色谱法测定甲苯磺丁脲片的含量[J].中国医药指南,2011,9(14):13.
- [9] 李健,文思远,王睿,等.细胞色素P₄₅₀ CYP2C9基因多态性对甲苯磺丁脲代谢动力学的影响[J].药学学报,2005,40(8):695.
- [10] 杨德智,徐维盛,张丽,等.优化《中国药典》罗红霉素HPLC含量测定方法研究[J].中国药房,2011,22(17):1604.

(收稿日期:2013-08-19 修回日期:2013-09-09)