

· 药物代谢 ·

体内、体外相结合评价 CYP2E1 酶活性的方法学研究

王新敏¹, 景欣悦¹, 彭蕴茹¹, 薛娟², 段金廛^{1*}

(1. 南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 南京 210046;
2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的:以氯唑沙宗(chlorzoxazone, CZX)为“探针药物”,建立一种快速、准确的体内、体外相结合评价细胞色素 P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)酶活性的 HPLC-DAD 检测方法。方法:体内实验为大鼠静脉注射 CZX,剂量 20 mg·kg⁻¹,按时间点眼眶取血,检测 CZX 与其代谢产物 6-羟基氯唑沙宗(6-hydroxy chlorzoxazone, 6-OHCZX)的血浆药物浓度。体外实验为不同浓度 CZX 与大鼠肝微粒体温孵后,检测温孵体系中 6-OHCZX 的浓度,计算酶动力学参数来评价 CYP2E1 酶的活性。采用 Agilent Extend-C₁₈色谱柱(6 mm×100 mm, 5 μm),以非那西丁为内标,流动相为乙腈-0.6% 乙酸水溶液,流速 1.0 mL·min⁻¹,紫外检测波长 290 nm,柱温 30 ℃。结果:体内、体外实验结果发现 CZX, 6-OHCZX 的线性范围、日内和日间精密密度、相对回收率、稳定性均符合生物样品的检测要求。结论:大鼠血浆及肝微粒体温孵体系中的其他内源性物质不干扰待测物的测定。该方法快速、稳定、灵敏度高,适合 CZX 及其代谢产物 6-OHCZX 的测定。

[关键词] CYP2E1 酶活性; 氯唑沙宗; 探针药物法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0187-07

Method for *in vivo* and *in vitro* Evaluation of CYP2E1 Activities

WANG Xin-min¹, JING Xin-yue¹, PENG Yun-ru¹, XUE Juan², DUAN Jin-ao^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Department of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] Objective: Using chlorzoxazone (CZX) as the ‘probe drug’, to establish a rapid and accurate method for evaluating the activities of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) by the high-performance liquid chromatography-UV detection. Method: *In vivo* study: 20 mg·kg⁻¹ of CZX was given to the rats via the tail vein. Blood samples were collected at designed time points post dose and plasma samples were obtained. CZX and 6-hydroxy chlorzoxazone (6-OHCZX) were determined by an HPLC method. *In vitro* study: After incubation, the formation rate of 6-OHCZX was used to evaluate the function of CYP2E1. The analysis was performed on the Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm×100 mm, 5 μm), with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.6% acetic acid in water at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Phenacetin was used as the internal standard. The detection wavelength was 290 nm, and column temperature was set at 30 ℃. Result: *In vivo* and *in vitro* experiments revealed that the methods had good linear ranges and their intra-and inter-day relative standard deviations, relative recoveries, stabilities met the requirement of biological estimation. Conclusion: Other endogenous substances in the plasma and incubation system did not interfere with the determination. The method is rapid, stable and highly sensitive. It is suitable for determination of CZX and its metabolites 6-OHCZX and can be used for *in vivo* and *in vitro* evaluation

[收稿日期] 20120618(003)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973 计划”)(2011CB505300-03);江苏省博士后科研资助计划(1002022C)
[第一作者] 王新敏, 硕士, Tel: 13813919589, E-mail: yatou8880@126.com
[通讯作者] * 段金廛, 教授, 博士生导师, 从事中药资源化学与方剂效应物质基础研究, Tel: 025-85811116, E-mail: dja@njutem.edu.cn

of CYP2E1 activitise and research of enzyme kinetics.

[**Key words**] CYP2E1; chlorzoxazone; probe drug method

细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 是由许多同工酶组成的超基因家族,在药物代谢和生物转化中起着重要的作用^[1-3]。许多药物现已被证明是肝药酶的诱导剂或抑制剂,可诱导或者抑制 CYP450 酶的活性^[4],从而影响其他药物的代谢、生物活性和毒性。因此,研究药物对 CYP450 酶的影响,对于评价药物安全性和药物间相互作用有重要的意义^[5]。

CYP2E1 主要在肝脏表达^[6],大鼠 CYP2E 家族的唯一成员是 CYP2E1,并且大鼠 CYP2E1 和人 CYP2E1 有很好的相关性,因此具有重要的毒理学意义。CYP2E1 虽然只占 CYP450 总量的 7%^[7],但是对药物及毒物的活性转化至关重要。致癌物在体内的代谢活化通常都是由 CYP2E1 和 CYP1A1/2 所介导的^[8]。CYP2E1 参与体内许多不同结构化合物的代谢,尤其是催化一些亲脂性小分子化合物转化为细胞毒性或者致癌性中间体^[9]。氯唑沙宗 (chlorzoxazone, CZX) 为一种口服中枢性肌松剂^[10],在体内主要经羟化代谢生成 6-羟基氯唑沙宗 (6-hydroxy chlorzoxazone, 6-OHCZX),再与葡萄糖醛酸结合从尿中排出^[11]。此代谢过程已被证实是由肝脏微粒体 CYP2E1 特异催化反应^[12],如图 1 所示。由于氯唑沙宗几乎全部被代谢并且迅速消除,使其成为一个可靠的在体 CYP2E1 活性检测的探针药物。同时,在体外以氯唑沙宗与微粒体温孵的方法也可以评价 CYP2E1 活性。

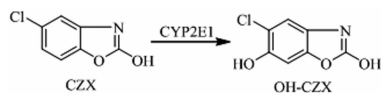


图 1 CZX 和 6-OHCZX 的化学结构

本实验采用氯唑沙宗作为探针药物,建立了评价 CYP2E1 酶活性的体内、体外研究方法,为进一步确证药物及化学异物对 CYP2E1 酶活性的影响提供可靠的方法学基础。

1 仪器、试剂及动物

1.1 仪器 Waters 2690 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 2996 PDA 二极管阵列检测器 (美国 Waters 公司), 自动进样器; Empower 色谱工作站 (美国 Waters 公司), XW-80A 型漩涡混合器 (上海沪西分析仪器有限公司), METTER AL104 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), Allegra™

21R Centrifuge 台式离心机 (BECKMAN COULTERTM), Milli-Q Gradient A10 超纯水器 (Millipore Inc. USA)。

1.2 试剂 氯唑沙宗 (chlorzoxazone, CZX) 对照品购于东京化成工业株式会社 (批号 100364-200301, Tokyo, Japan), 6-羟基氯唑沙宗 (6-hydroxy chlorzoxazone, 6-OHCZX, 批号 H825120) 对照品购于多伦多化学品公司 (Toronto, Canada), 非那西丁对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号 100095-200204; 甲醇 (色谱纯)、乙酸乙酯由南京化学试剂有限公司生产; 辅酶 II (NADP)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Type V)、葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P)、 β -葡萄糖醛酸酶 (Type H-1) 购于美国 Sigma 公司 (St Louis, USA); 其他试剂为市售分析纯, 实验用水为自制超纯水。

1.3 动物 雄性 SD 大鼠, 180 ~ 220 g, 由上海西普尔-必凯实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2008-0016。自然昼夜环境饲养, 给予标准饲料及自由饮水, 室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 50% ~ 60%。动物实验由南京中医药大学动物伦理委员会批准实施。

2 体内实验方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 标准溶液 分别准确称取 CZX 和 6-OHCZX 对照品 10 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 配成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液 (于 4 °C 下避光保存)。精密量取 CZX 贮备液适量用甲醇稀释成 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, $1.5625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液; 精密量取 6-OHCZX 贮备液适量用甲醇分别稀释成 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, $1.5625, 0.78125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液。

2.1.2 内标溶液 准确称取非那西丁对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 配制成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮备液 (于 4 °C 下避光保存)。再吸取适量用乙腈稀释成 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

2.1.3 尾静脉注射用氯唑沙宗溶液 精密称取氯唑沙宗 80 mg, 加入 150 μL $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 和 7 850 μL 生理盐水, 涡旋混匀, 配制成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供尾静脉注射用溶液。

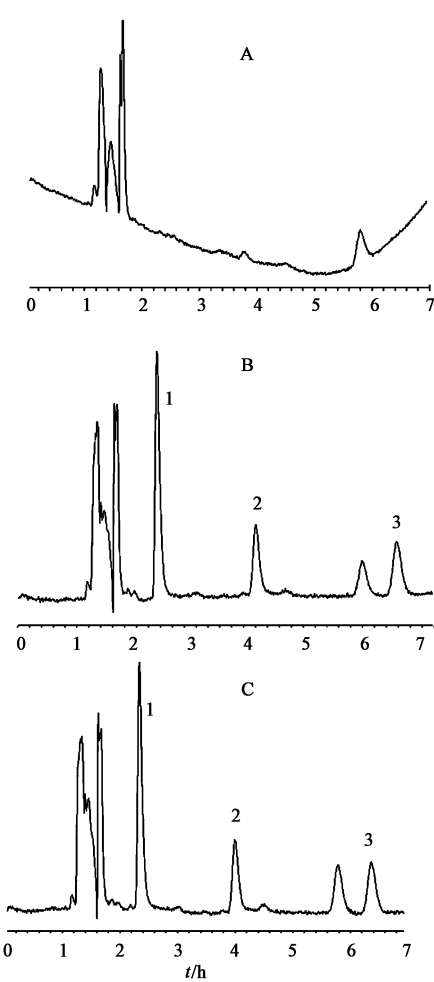
2.2 血浆样品处理 精密吸取 100 μL 血浆于 EP 管中, 加入 300 μL 含 500 U 的 β -葡萄糖醛苷酶的磷酸盐缓冲液 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.5), 37 °C 温孵 2 h 后,

加入 100 μL 上述 2.1.2 含内标的乙腈终止反应并沉淀蛋白。加入 1 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 1 min, 3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清 950 μL,于 40 ℃水浴中氮气吹干。以 120 μL 甲醇复溶,涡旋振荡 1 min,15 000 r·min⁻¹离心 10 min,取 10 μL 上清供 HPLC 分析。

2.3 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.6% 乙酸 (30:70),紫外检测波长 290 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,在该色谱条件下,探针底物 CZX 和其代谢产物 6-OHCZX 及内标非那西丁分离明确,各色谱峰形尖锐且对称,血浆中内源性杂质不干扰其测定。6-OHCZX、非那西丁和 CZX 保留时间分别约为 2.3, 4.0,6.3 min,色谱图见图 2。

2.4 标准曲线制备 精密吸取 2.1.1 项下各浓度 CZX 和 6-OHCZX 标准溶液 20 μL,分别加到含有空白血浆 80 μL 的 EP 管中,配成血浆中 CZX 质量浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 5, 0.156 25 mg·L⁻¹;6-OHCZX 质量浓度分别为 10,5, 2.5,1.25,0.625,0.312 5,0.156 25,0.078 125 mg·L⁻¹的样品。按 2.2 项下对配制的 100 μL 含药血浆进行处理后进行 HPLC 分析,记录结果。以测得样品与内标峰面积比 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归,得标准曲线方程分别为: $Y_{\text{CZX}} = 0.390\ 2X_{\text{CZX}} + 0.142\ 5$ ($R^2 = 0.999\ 6, n = 5$); $Y_{6\text{-OHCZX}} = 1.226\ 8X_{6\text{-OHCZX}} + 0.061\ 3$ ($R^2 = 0.999\ 5, n = 5$)。结果表明,CZX、6-OHCZX 血浆药物质量浓度分别在 0.312 5 ~ 20,0.156 25 ~ 10 mg·L⁻¹线性关系良好。而二者的最低检测质量浓度分别为 0.156 25, 0.078 125 mg·L⁻¹。

2.5 回收率试验 精密吸取 2.1.1 项下对应 CZX 和 6-OHCZX 标准溶液 20 μL,分别加到 80 μL 空白血浆中,配成 CZX 和 6-OHCZX 质量浓度分别为 10, 2.5,0.625 mg·L⁻¹和 5,1.25,0.312 5 mg·L⁻¹的加样标本,每个质量浓度各制备 6 份,按 2.2 项下对制备的 100 μL 含药血浆进行处理后进行 HPLC 分析,



A. 空白血浆;B. 空白血浆添加 CZX、6-OHCZX 及非那西丁;
C. 血浆样品;1. 6-OHCZX;2. 非那西丁;3. CZX

图 2 血浆样品 HPLC

测定 CZX、6-OHCZX 的浓度,以实测浓度与加入浓度之比乘以 100% 计算回收率,结果见表 1。

2.6 精密度试验 按 2.5 项下制备 CZX 和 6-OHCZX 高、中、低 3 种浓度样品各 6 份,按照 2.2 项下血浆样品处理方法处理后测定,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度,结果见表 1,日内精密度和日间精密度的 RSD 均 <10%。

2.7 稳定性考察 按 2.5 项下制备 CZX 和 6-OHCZX 高、中、低 3 种浓度血浆质控样品各 6 份,

表 1 血浆中 CZX 和 6-OHCZX 的回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

测定物	加入质量浓度/mg·L ⁻¹	测得质量浓度/mg·L ⁻¹	回收率/%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
CZX	10	9.930 ± 0.113	99.30 ± 1.13	1.14	1.26
	2.5	2.438 ± 0.142	97.53 ± 5.69	5.84	4.25
	0.625	0.607 ± 0.053	97.07 ± 8.45	8.70	5.69
6-OHCZX	5	4.917 ± 0.214	98.33 ± 4.27	4.35	2.59
	1.25	1.222 ± 0.040	97.73 ± 3.22	3.29	4.51
	0.3125	0.299 ± 0.028	95.73 ± 9.07	9.48	8.67

分别在室温下放置 4, 24 h 后及冷冻(- 20 ℃) 1 周
的条件下测定含量, 考察其稳定性, 结果见表 2。结
果表明样品在上述试验条件下均稳定。

表 2 血浆中 CZX 和 6-OHCZX 的稳定性(<i>n</i> = 6) %				
测定物	质量浓度 /mg·L ⁻¹	室温放置 4 h RSD	室温放置 24 h RSD	- 20 ℃ 保存 7 d RSD
CZX	10	1. 96	2. 38	1. 29
	2. 5	2. 30	1. 33	4. 65
	0. 625	4. 56	6. 98	6. 95
6-OHCZX	5	2. 06	2. 65	1. 58
	1. 25	4. 31	4. 03	3. 95
	0. 312 5	8. 28	8. 32	7. 96

2. 8 在体实验方法 6 只大鼠于实验前一天禁食
12 h, 尾静脉注射 10 g·L⁻¹ 的 CZX 溶液, 给药剂量及
给药体积分别为 20 mg·kg⁻¹ 和 2 μL·g⁻¹。分别在
给药后的 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 min 于眼
底静脉丛取血 0. 3 mL, 血样肝素抗凝, 3 000 r·
min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆。按 2. 2 项操作处理血
浆样品, 进行 HPLC 测定。大鼠血浆中 CZX 与
6-OHCZX 药物浓度检测结果见图 3。药代动力学参
数见表 3。

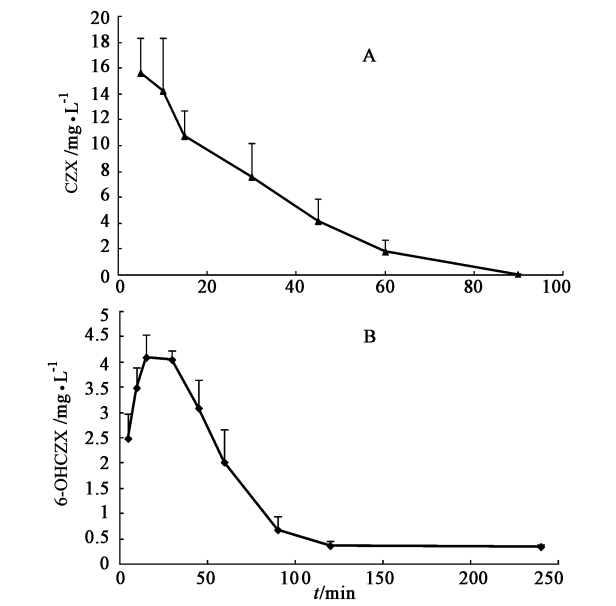


图 3 大鼠静脉注射 CZX 后 CZXR(A) 及其代谢物
6-OHCZX(B) 的药物浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 体外实验方法与结果

3. 1 溶液的配制

3. 1. 1 标准溶液的配制 准确称取 6-OHCZX 对照
品 10 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 配
成 1. 0 g·L⁻¹ 的贮备液(于 4 ℃ 下避光保存)。精密
量取 6-OHCZX 贮备液适量用甲醇稀释成质量浓度

表 3 大鼠静脉注射 20 mg·kg⁻¹ CZX 后 CZX
及其代谢产物 6-OHCZX 的药动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	AUC _{0~120 min} /μg·min ⁻¹ ·mL ⁻¹	T _{1/2} /min	MRT /min
CZX	503. 30 ± 62. 61	23. 74 ± 6. 43	23. 62 ± 4. 69
6-OHCZX	321. 07 ± 30. 07	20. 18 ± 4. 13	93. 44 ± 12. 28

为 125, 62. 5, 31. 25, 15. 625, 7. 812 5, 3. 936 3,
1. 953 1 mg·L⁻¹ 的标准溶液。

3. 1. 2 内标溶液 准确称取非那西丁对照品
10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 配制
成 1 g·L⁻¹ 贮备液(于 4 ℃ 下避光保存)。再吸取适
量用乙腈稀释成 70. 0 mg·L⁻¹ 的内标溶液。

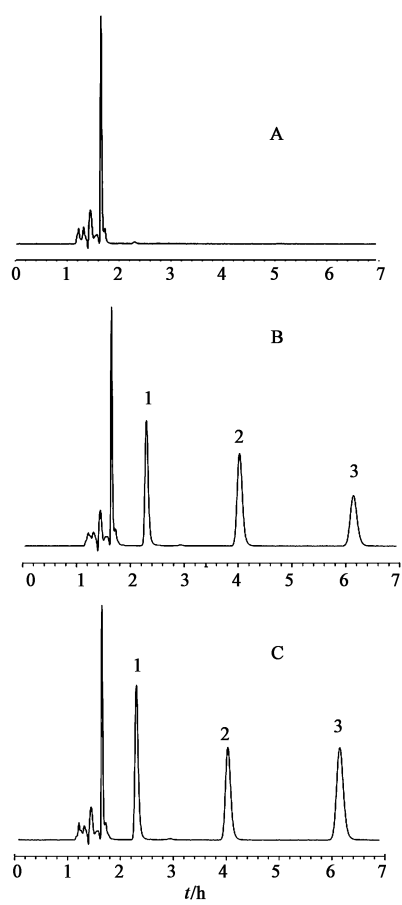
3. 1. 3 磷酸盐缓冲液(PBS) 0. 1 mol·L⁻¹ KCl,
0. 080 9 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄·12H₂O, 0. 018 9 mol·L⁻¹
NaH₂PO₄·2H₂O, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 加蒸馏水至
1 L, 调 pH 7. 4。

3. 2 肝微粒体的制备 采用差速离心法制备肝微
粒体。大鼠股动脉放血后, 颈椎脱臼处死, 取下肝组
织后迅速置于 0 ~ 4 ℃ 冰板上。首先将肝组织剪碎
用 3. 1. 3 项下 PBS 反复冲洗 3 次, 除去血红蛋白后
加入 PBS 制成肝匀浆, 先将肝匀浆在 4 ℃ 下以 9 000
r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液于 4 ℃ 下以 10 万 r·
min⁻¹ 离心 60 min, 得到粉红色沉淀即为所需的肝微
粒体, 将沉淀物悬浮于含 30% 甘油的磷酸盐缓冲液
中, 使用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定肝微粒体
蛋白浓度, 分装后置 - 80 ℃ 冰箱内保存。

3. 3 肝微粒体温孵体系样品处理 大鼠肝脏微粒
体反应体系总体积为 200 μL。加入 50 μL 3. 1. 2 项
下含内标的乙腈涡旋混匀终止反应, 再加 1 mL 乙酸
乙酯, 涡旋混匀 1 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取
上清 950 μL, 于 40 ℃ 水浴中氮气吹干。以 120 μL
甲醇复溶, 涡旋混匀 1 min, 15 000 r·min⁻¹ 离心
10 min, 取 10 μL 上清供 HPLC 分析。记录各峰面
积结果, 用样品峰面积进行定量分析。

3. 4 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱
(4. 6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0. 6% 冰醋
酸(30: 70), 紫外检测波长 290 nm, 流速 1. 0 mL·
min⁻¹, 柱温 30 ℃, 在该色谱条件下, 探针底物 CZX
和其代谢产物 6-OHCZX 及内标非那西丁分离明确,
各色谱峰形尖锐且对称, 微粒体中内源性杂质不干
扰其测定。6-OHCZX、非那西丁和 CZX 保留时间分
别约为 2. 3, 4. 0, 6. 1 min, 色谱图见图 4。

3. 5 标准曲线制备 精密吸取 3. 1. 1 项下各浓度
标准溶液 20 μL, 分别加到含有 20 μL 灭活微粒体



A. 空白微粒体温孵体系;B. 微粒体温孵体系中添加 CZX,6-OHCZX 和非那西丁;C. 微粒体温孵体系样品;
1. 6-OHCZX;2. 非那西丁;3. CZX

图 4 微粒体温孵体系 HPLC

和 160 μL PBS 的 EP 管中,配制含 6-OHCZX 质量浓度分别为 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 5, 0.781 25, 0.390 6, 0.195 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的微粒体样品,按 3.3 项下操作处理,记录结果。以测得样品与内标峰面积比 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归,得标准曲线方程为 $Y=0.138\ 3X-0.026\ 1$ ($R^2=0.999\ 8, n=5$)。结果表明,6-OHCZX 肝微粒体体系中药物在 0.390 6 ~ 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。最低检测质量浓度为 0.195 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.6 回收率试验 精密吸取 3.1.1 项下对应标准溶液适量,分别加到含有 20 μL 灭活微粒体和 160 μL PBS 的 EP 管中,配成质量浓度分别为 6.25,

1.562 5, 0.390 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的加样标本,每个浓度各制备 6 份。按 3.3 项下操作处理,测定 6-OHCZX 的质量浓度,以实测质量浓度与加入浓度之比乘以 100% 计算回收率,结果见表 4。

3.7 精密度试验 按 3.6 项下制备 6-OHCZX 高、中、低 3 种质量浓度微粒体样品,每个浓度各制备 6 份,按 3.3 项下操作处理,测定 6-OHCZX 的质量浓度,计算日内精密度;连续测定 5 d,计算日间精密度,结果见表 4,日内精密度和日间精密度的 RSD 均 $<10\%$ 。

3.8 稳定性考察 按 3.6 项下制备 6-OHCZX 高、中、低 3 种质量浓度微粒体样品,每个质量浓度各制备 6 份。分别在室温下放置 4, 24 h 后及冷冻 ($-20\ ^\circ\text{C}$) 1 周的条件下按 3.3 项下操作处理,测定含量,考察其稳定性,结果见表 5。结果表明样品在上述试验条件下均稳定。

表 5 肝微粒体体系中 6-OHCZX 的稳定性 ($n=6$)

测定物	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	室温放置	室温放置	$-20\ ^\circ\text{C}$ 保存
		4 h RSD /%	24 h RSD /%	7 d RSD /%
6-OHCZX	6.25	6.90	1.84	2.05
	1.562 5	3.79	3.95	3.67
	0.390 6	1.77	8.99	9.91

3.9 体外孵育实验 CZX 可以由 CYP2E1 代谢为 6-OHCZX^[10-11],以此表征 CYP2E1 活性。CZX 与肝微粒体共孵育。反应体系总体积为 200 μL ,其中含微粒体蛋白终质量浓度为 0.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NADPH 再生系统 (NADP 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, G-6-P 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, G-6-P-OH 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, MgCl_2 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及不同质量浓度的 CZX。反应体系于 $37\ ^\circ\text{C}$ 预温孵 5 min,加入不同浓度的 CZX 启动反应,温孵 30 min 后,加入含非那西丁 (内标) 的冰乙腈中止反应。CZX 的终质量浓度为 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。肝微粒体样品处理同 3.3 项。酶底物 CZX 代谢物 6-OHCZX 在肝微粒体的生成速率图见图 5。相应的酶动力学参数为 $V_{\text{max}}\ 1.51\ \text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $k_{\text{m}}\ 101.36\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 肝微粒体体系中 6-OHCZX 的相对回收率 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

测定物	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	相对回收率/%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
6-OHCZX	6.25	6.248 ± 0.087	99.97 ± 1.40	1.40	2.15
	1.562 5	1.493 ± 0.060	95.57 ± 3.90	4.03	3.95
	0.390 6	0.366 ± 0.039	93.87 ± 10.10	9.7	9.75

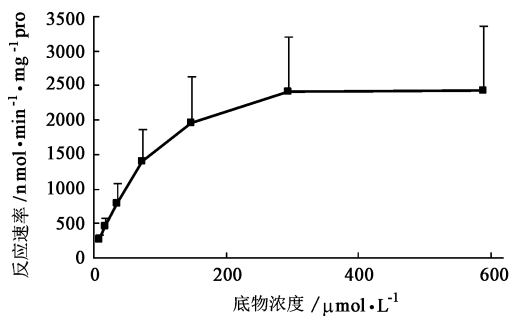


图 5 大鼠肝微粒体体系中 6-OHCZX 的生成速率曲线 ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

CYP2E1 在体内负责 6 大类,70 余种低相对分子质量化学物质的代谢^[13],包括苯胺、乙醇、丙酮、乙醚、四氯化碳、茶碱、氯唑沙宗、氟烷、醋氨酚、氨苯砜及亚硝胺类化合物等,其中大部分为前致癌物和前毒物,小部分为临床药物^[14-15]。CYP2E1 主要通过催化前致癌物去烷基、去硝基等反应使之转化为致癌物,具有毒理学意义。

使用探针药物通过体外、体内实验方法可以测定 CYP2E1 的活性,反应底物主要包括对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol)^[16-17]、*N*-亚硝基二甲胺 (*N*-nitrosodimethylamine) 和 CZX^[18-19]、水杨酸 (salicylate),其中只有中枢肌松药 CZX 可作为人类体内试验的安全底物^[20]。本研究建立了大鼠血浆及微粒体样品中 CZX 及其代谢产物 6-OHCZX 的高效液相测定方法。与以往文献相比,本方法使用实验室普遍具备的高效液相系统^[21],同时测定了原型和代谢物^[22],使用短柱在本方法下进行分离又使血浆或微粒体样品在 7 min 内达到完全分离,节约了分离时间^[23-24]。

血浆样品预处理中常用乙醚、氯仿、二氯甲烷和乙酸乙酯等有机溶剂来萃取被测药物。我们的实验发现,使用乙酸乙酯来萃取后,血浆中内源性杂质不干扰 CZX 和 6-OHCZX 的测定,方法学评价也具有好的精密度和准确度。乙酸乙酯做萃取剂毒性低,污染小,方法简便快捷,故选用乙酸乙酯作为血浆样品的萃取剂。

CZX 的代谢物 6-OHCZX 在血浆中均以葡萄糖醛酸结合的形式存在,血浆样品中几乎完全检测不到,所以血浆样品测定前必须使用 β -葡萄糖醛酸酶进行水解使之游离^[25]。选用乙腈-0.5% 乙酸作为流动相等度洗脱,CZX、6-OHCZX 及内标非那西丁峰形对称,可以达到完全分离,血浆和微粒体中的内源性成分均不干扰 CZX、6-OHCZX、及内标非那西丁的测定。样品的测定可在 7 min 内完成,故可达到

快速测定的目的。

综上,本方法具有快速、灵敏、干扰少等优点。利用本方法可以从体内、体外两方面评价外源性化合物(药物或毒物)对 CYP2E1 酶活性的影响,也可以为一些经 CYP2E1 代谢的化学物质的代谢及与其他药物的相互作用研究提供参考。

[参考文献]

- [1] Kang J J, Wang H W, Liu T Y, et al. Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides* [J]. Food Chem Toxicol, 1997, 35 (10/11): 957.
- [2] 翁小刚,朱晓新,梁日欣,等. 中草药代谢与细胞色素 P450 的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (12): 105.
- [3] 成龙,王岚,王彦礼,等. 金铃子散不同配比方对大鼠肝药酶 CYP450A4 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (22): 117.
- [4] Estabrook R W. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450) [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31 (12): 1461.
- [5] 景欣悦,彭蕴茹,王新敏,等. 基于药物代谢酶探讨中药“十八反”配伍制毒/增毒机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (7): 281.
- [6] Pentiuk O O, Kachula S O, Herych Okh. Cytochrome P450E1. Polymorphism, physiological function, regulation, and role in pathology [J]. Ukr Biokhim Zh, 2004, 76 (5): 16.
- [7] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals; studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1994, 270 (1): 414.
- [8] Costas Ioannides. Cytochrome P450: metabolic and toxicological aspects [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996.
- [9] Gonzales F J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress; studies with CYP2E1 [J]. Mutat Res, 2005, 569 (1/2): 101.
- [10] Roszkowski A P. A pharmacological comparison of therapeutically useful centrally acting skeletal muscle relaxants [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1960, 129: 75.
- [11] Conney A H, Burns J J. Physiological disposition and metabolic of chlorzoxazone (paraflex) in man [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1960, 128: 340.
- [12] Peter R, Böcker R, Beaune P H, et al. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P450IIE1 [J]. Chem Res Toxicol, 1990, 3 (6): 566.

高车前甘油水分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究

孙启文¹, 陈军², 陈明磊¹, 方芸^{3*}

- (1. 南京中医药大学中西医结合鼓楼临床医学院, 南京 210029;
2. 南京中医药大学药学院药剂学教研室, 南京 210046;
3. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008)

〔摘要〕 目的:测定高车前苷的油水分配系数,考察其在大鼠肠道的吸收动力学特性。方法:采用高效液相(摇瓶法)测定高车前苷在正辛醇(水、正辛醇)不同 pH 缓冲液体系中的油水分配系数;采用大鼠单向在体肠灌注法研究高车前苷吸收特性,用紫外分光光度法测定酚红浓度以标定体积,用高效液相色谱法测定高车前苷在大鼠不同肠段中的浓度。结果:在正辛醇(水体系中,高车前苷的油水分配系数为 18.07($\lg P=1.26$),在正辛醇(缓冲液体系中分配系数受溶液 pH 值影响不大。高、中、低浓度高车前苷的吸收速率常数(K_a)、有效渗透系数(P_{eff})无显著性差异,且在大鼠各肠段的 K_a 、 P_{eff} 均为空肠>十二指肠>回肠>结肠。结论:高车前苷在全肠段均有不同程度的吸收,其吸收机制为被动扩散。

〔关键词〕 高车前苷; 油水分配系数; 在体肠灌注模型; 吸收
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0193-05
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0910.007.html>
〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:10

〔收稿日期〕 20120619(003)
〔基金项目〕 江苏省中医药管理项目(HZ1016KY)
〔第一作者〕 孙启文,硕士研究生,从事生物药剂学研究
〔通讯作者〕 * 方芸,主任药师,硕士生导师, Tel:025-83105677 , E-mail:njglfy@163.com

[13] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1 [J]. FASEB J, 1992, 6 (2): 724.

[14] 田维毅,王庆学,王文佳,等. 葛根散对急性酒精性肝损伤小鼠肝微粒体 CYP450 含量及 CYP2E1 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (4): 183.

[15] Lieber C S. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role [J]. Physiol Rev, 1997, 77 (2): 517.

[16] 武佰玲,刘萍,高月,等. 酸枣仁远志和桔梗水提液对大鼠肝 CYP450 酶活性及 mRNA 表达的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (18): 235.

[17] Tassaneeyakul W, Veronese M E, Birkett D J, et al. Validation of 4-nitrophenol as an *in vitro* substrate probe for human liver CYP2E1 using cDNA expression and microsomal kinetic techniques [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 46 (11): 1975.

[18] 周昆,朱桃桃,马志会,等. 乳香没药对细胞色素 P450 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (22): 131.

[19] 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.

[20] 王爱红,夏昭林. 细胞色素 P450 活性的测定方法[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (6): 354.

[21] 杜瑜,王峰,朱荣华,等. HPLC-MS/ESI 同时测定人血浆中氯唑沙宗及其代谢物的浓度[J]. 中国药杂志, 2007, 42 (13): 1011.

[22] 张玮芳,郁韵秋. 血浆氯唑沙宗的反相高效液相色谱法测定[J]. 郑州大学学报:医学版, 2002, 37 (5): 660.

[23] 李玲,张远. 氯唑沙宗及其代谢物的 HPLC 测定方法和药代动力学研究[J]. 药学学报, 1998, 33 (10): 731

[24] 齐双岩,金若敏,梅彩霞,等. 川楝子对大鼠肝细胞色素 P450 诱导作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27 (3): 62.

[25] Frye R F, Stiff D D. Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 686 (2): 291.

〔责任编辑 邹晓翠〕