

去甲替林及其代谢产物的分析*

寿优芳 陈枢青¹ 孙红颖¹ 赵鲁杭¹ (杭州 310006 浙江省医药股份有限公司质管部, 浙江医科大学进修生;¹ 杭州 310006 浙江医科大学生物化学教研室)

细胞色素 P450 2D6 (Cytochrome P450 2D6, CYP2D6) 多态性已被广泛深入研究。欧洲白人发现有 6%~8% 的该酶慢代谢者^[1], 亚洲人中约有 1% 的该酶慢代谢者^[2]。慢代谢者是由于其酶缺陷等位基因造成表达产物缺陷所致的。CYP2D6 参与 50 多种药物的代谢, 其中十几种是抗抑郁药物^[3]。抗抑郁药物在临床使用中产生副作用的报道较多。由于产生副作用的机理不明, 为安全用药起见, 医生在发现有副作用时, 马上更换使用其他药物。因此, 其副作用发生机理的研究进展缓慢。CYP2D6 慢代谢者由于酶活性缺陷造成药物代谢不畅, 血药浓度过高, 易于引起血药浓度依赖的副作用。在抗抑郁药物中, 三环类化合物去甲替林较为有代表性。它进入体内后可被 CYP2D6 代谢生成其 E-10 羟化产物(E-10 羟化去甲替林); 同时可经其他途径代谢生成 Z-10 羟化去甲替林。当 CYP2D6 酶活性缺陷时, E-10 羟化产物代谢途径受阻, Z-10 羟化产物增加, Z-10 羟化产物可引起心血管系统副反应^[4]。因此, 建立去甲替林及其 E-10、Z-10 羟化代谢产物的分析方法, 对进一步阐明抗抑郁药物副作用的发生机理及 CYP2D6 多态性在其中的作用有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: 盐酸去甲替林(MW = 299.84), 苹果酸 E-10 羟化去甲替林(MW = 395.46), Z-10 羟化去甲替林(MW = 279.38) 和内标多虑平均为 ICN Biochemicals (Costa Mesa, USA) 的产品; β -葡萄糖醛酸酶, 正丁醇, 正己烷, 乙腈等均为 Sigma (St Louis, USA) 产品。

1.1.2 仪器: 液相色谱仪由岛津 LC-6A 液相泵、SPD-6A 紫外检测器、SIL-9A 自动进样器、Hewlett Packard HP 3394A 积分记录仪和 Ultrasphere ODS 5 μ (150 $\times$ 4.6mm) 高效液相色谱柱(Beckman, USA) 组成。

1.2 方法

1.2.1 血清样本提取: 1ml 血清样本(或 1ml 空白血清加 100 μ l 不同浓度的去甲替林、苹果酸 E-10 羟化去甲

替林和 Z-10 羟化去甲替林三种标准品)加 100 μ l 多虑平(2.26 mg/L)作为内标。再加 100 μ l 水, 200 μ l 3N NaOH 和 10ml 2% 正丁醇/98% 正己烷, 振摇 30min, 100r/min 离心 10min。将有机相转移到含 200 μ l 0.15 HCl 的试管中, 振摇 30 min, 1000r/min 离心 10min。取水相置于 HPLC 自动进样瓶中备用。

1.2.2 尿样提取: 1ml 尿样(或 1ml 空白尿样加 100 μ l 不同浓度的去甲替林、苹果酸 E-10 羟化去甲替林和 Z-10 羟化去甲替林三种标准品)加 100 μ l 多虑平(2.26 mg/L)作为内标。再加 1ml 0.1M 醋酸缓冲液(pH4.5)和 100 μ l 20,000 单位/ml 葡萄糖醛酸酶。混匀 37 $^{\circ}$ C 放置 12h, 加 200 μ l 3N NaOH 和 10ml 2% 正丁醇/98% 正己烷。振摇提取 30min, 1000r/min 离心 10min, 将有机相移至另一含 200 μ l 0.15N HCl 的试管, 再振摇抽提 30min, 1000r/min 离心 10min, 将水相移至 HPLC 进样瓶备用。

1.2.3 高效液相分析: 分析是在 C-18 层析柱(Ultrasphere ODS 5 μ 150 $\times$ 4.6mm)上进行的, 流动相是 35% 的乙腈和 65% 的 0.01M 磷酸缓冲液(pH2.8), 流速为 1.0ml/min, 检测波长 215nm, 灵敏度为 0.002。

1.2.4 结果计算: 利用标准组的峰面积比(y 轴)与其对应的标准浓度(x 轴)由 Cricket Graph 作图并计算标准曲线方程和回归系数 R², 其中峰面积比为样品(或标准)峰面积与内标峰面积的比值。再由未知样品峰面积比, 从标准曲线方程计算相对应的未知样品浓度。

2 结果

血清样本和尿样的提取效率均为 85%~90%。标准曲线在 100 倍范围内呈线性, 3 种化合物的检测灵敏度均为 1ng/ml, 定量极限为 5ng/ml, 标准曲线的 R² 均在 0.996~1.000 之间。 β -葡萄糖醛酸酶水解 12h 可使 β -葡萄糖醛酸酶结合物完全水解, 增加水解时间并不能提高提取率。

3 讨论

去甲替林经 CYP2D6 羟化代谢生成 E-10 羟化代

* 浙江省自然科学基金资助编号: 396473

代谢产物,同时可由其他途径生成 E-10 羟化代谢产物的同分异构体 Z-10 羟化产物。CYP2D6 多态性可影响去甲替林的清除,使治疗方案复杂化,引起副作用^[6],并且,Z-10 羟化代谢产物与心血管副反应有关^[4]。在 CYP2D6 代谢不畅时,去甲替林的其他代谢途径就相对加强,Z-10 羟化产物的增加易于引起心血管副反应,包括增加心率、QRS 间歇延长等。本实验参照已报道去甲替林测定方法^[7],建立了可以测定血样与尿样的去甲替林及其代谢产物的分析法。尿样中去甲替林及其 E-10、Z-10 羟化代谢产物的浓度,结合患者 CYP2D6 基因分型结果和表型分型结果,能够估计 CYP2D6 在去甲替林代谢中的作用。血样中去甲替林及其 E-10、Z-10 羟化代谢产物的浓度,可用于直接联系患者的副反应和治疗效果。从而评价 CYP2D6 多态性在去甲替林临床使用时的真正价值。

由于 E-10 和 Z-10 羟化代谢产物是同分异构体,在高效液相分离时较为困难。只有极性较大的洗脱液才使 E-10 和 Z-10 得以分离,同时使极性较小的去甲替林的洗脱时间较长,为 16.43min。如果利用梯度洗脱,先用极性较大的洗脱液将 E-10 和 Z-10 羟化产物分离,再渐渐减小洗脱液的极性,使去甲替林提早洗脱,便可减少分析时间,改善峰形,提高灵敏度与准确性。

羟化代谢产物在尿液中排出时的形式,大多是 β -葡萄糖醛酸酶的结合物。所以,尿样中有游离羟基的化合物的测定,均应考虑用 β -葡萄糖醛酸酶水解。实验证明,37℃放置 12h, β -葡萄糖醛酸酶便可充分将结合物水解,再延长水解时间并不能提高回收率。

样本抽提时,有机相中正丁醇的含量应适当调整。正丁醇的含量越高,回收率也越高,杂质的含量也越高。在接下来的 HPLC 分析时,会见到许多杂质峰,E

-10 和 Z-10 羟化产物洗脱时间较早,很受杂质峰干扰。反之,正丁醇含量越低,提取纯度较好,杂质峰少,但回收率也低,往往不易提高检测灵敏度。所以,在使用正丁醇时,应做一系列不同浓度正丁醇的提取实验,以无杂质峰干扰的情况下,回收率越高越好。

参考文献

- 1 Alvan G, Bechtel P, Iselius L, *et al.* Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol*, 1990, 39: 533.
- 2 Lou YQ, Liu Y, Bertilsson L, *et al.* Low frequency of slow debrisoquine hydroxylation in a native Chinese population. *Lancet*, 1987, ii(8563): 852.
- 3 Brosten K, Gram LF. Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989, 36: 537.
- 4 Pollock BG, Everett G, Perel JM. Comparative cardiotoxicity of nortriptyline and its isomeric 10-hydroxymetabolites. *Neuropsychopharm*, 1992, 6: 1.
- 5 Chen S, Chou WH, Blouin RA, *et al.* The cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharm Ther*, 1996, 60(5): 522.
- 6 Bertilsson L, Aberg - Wistedt A, Gustafsson LL, *et al.* Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: A case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monitor*, 1985, 7: 478.
- 7 Edelbrock PM, DeHaas EJM, Dewolff FA. Liquid chromatographic determination of amitriptyline and its metabolites in serum, with adsorption onto glass minimized. *Clin Chem* 1982, 28: 2143.

收稿日期: 1998-05-12