

大鼠肝微粒体中芬氟拉明对映体氧化代谢的立体选择性研究

茅海琼^{1,2}, 曾苏¹ (1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031; 2. 宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315041)

摘要:目的 建立大鼠肝微粒体孵育液中 *l*-和 *d*-芬氟拉明的对映体选择性测定的方法, 并用于研究芬氟拉明 I 相代谢的立体选择性。方法 将 *dl*-芬氟拉明与大鼠肝微粒体孵育后, 采用柱前衍生化毛细管气相色谱-氢火焰离子化检测法进行对映体的分离, 测定时间反应曲线和酶动力学参数。结果 单个对映体的线性范围是 1~50 μg/mL; *l*-和 *d*-芬氟拉明的方法平均回收率分别为 92.4% 和 95.5%, 检测限和定量限分别为 0.1 μg/mL 和 1.0 μg/mL, 方法精密度的 RSD < 10% (*n* = 6)。 *l*-和 *d*-芬氟拉明的 K_m , V_{max} , Cl_{int} 值分别为 (0.15 ± 0.01) 和 (0.27 ± 0.02) μmol · mL⁻¹, (4.99 ± 0.52) 和 (9.53 ± 0.87) nmol · g⁻¹ · min⁻¹, (33.3 ± 3.0) 和 (35.3 ± 3.1) mL · min⁻¹ · g(蛋白)⁻¹。结论 方法准确可靠, 已用于 *l*-和 *d*-芬氟拉明在大鼠肝微粒体孵育液中的代谢及其动力学研究; 结果表明, 芬氟拉明在大鼠的 I 相代谢具有对映体选择性。

关键词: 芬氟拉明; 对映体; 肝微粒体; 代谢

中图分类号: R917.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06-0439-03

Study on stereoselectivity of fenfluramine enantiomers in rat liver microsome

MAO Hai-qiong^{1,2}, ZENG Su¹ (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Ningbo Institute for Drug Quality Control, Ningbo 315041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an enantioselective assay method for *l*- and *d*-fenfluramine and study the stereoselectivity of the phase I metabolism of fenfluramine enantiomers in rat liver microsome. **METHODS** Separation and quantitation of the diastereomeric fenfluramine derivatives were carried out by a capillary gas chromatographic system with flame ionization detection. The time course and the parameters of enzymatic kinetics of fenfluramine enantiomers in the phase I metabolism were determined. **RESULTS** The assay was linear from 1 to 50 μg/mL for each enantiomer. The analytical method affords average recoveries of 92.4% and 95.5% for *l*- and *d*-fenfluramine, respectively. The limits of detection and quantitation of the assay were 0.1 and 1.0 μg/mL for *l*- and *d*-fenfluramine, respectively. The reproducibility of the assay was RSD < 10% (*n* = 6). K_m , V_{max} , Cl_{int} measured were (0.15 ± 0.01) and (0.27 ± 0.02) μmol · mL⁻¹, (4.99 ± 0.52) and (9.53 ± 0.87) nmol · g⁻¹ · min⁻¹, (33.3 ± 3.0) and (35.3 ± 3.1) mL · min⁻¹ · g(protein)⁻¹ for *l*- and *d*-fenfluramine, respectively. **CONCLUSION** The method allowed study of the depletion of *l*- and *d*-fenfluramine in rat liver microsomal incubates. The stereoselectivity of fenfluramine phase I metabolism was observed.

KEY WORDS: fenfluramine; enantiomer; liver microsome; metabolism

盐酸芬氟拉明, 化学名 *N*-乙基-α-甲基-3-氟甲基苯乙基胺盐酸盐, 是一种治疗单纯性肥胖的苯丙胺类食欲抑制剂。结构式见图 1。芬氟拉明、右芬氟拉明(由于左旋体会产生头晕和催眠等不良反应, 右芬氟拉明被分离出来作为单个对映体给药)为 5-羟色胺通路抑制剂, 它们同芬特明联用可有效减轻体重, 中枢神经系统及胃肠道刺激较弱, 易于接受, 因此在 1996~1997 年的欧美市场甚为流行。但后来发现它们可增加原发性肺动脉高压(PPH)及心瓣膜病的发病率, 故于 1997 年 FDA 宣布禁用; 国际奥委会 2000 年宣布严禁使用, 但到目前为止, 该药物的处方药身份并没有在我国撤销。鉴于盐酸芬氟拉明可导致心血管系统的严重不良反应, 国家药品不良反应监测中心在 2004 年 5 月建议患者必须在医师指

导下使用此类药物, 严格掌握适应症和禁忌症。

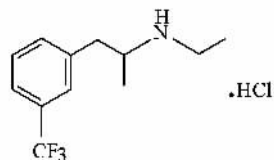


图 1 盐酸芬氟拉明结构式

Fig 1 The molecule of fenfluramine

盐酸芬氟拉明的分子结构中含有 1 个手性中心, 临床上以外消旋体和右旋体给药。有关芬氟拉明对映体在血浆、脑组织和尿中的 HPLC 和 GC 定量检测方法只有少量报道^[1-7]。盐酸芬氟拉明在肝药酶系统的 I 相代谢主要由

CYP 2D6 介导。本实验以丙基安非他明为内标,以 *N*-三氟乙酰-*S*-脯氨酰氯(*S*-TFPC)为衍生化试剂,采用柱前手性衍生化毛细管柱气相色谱-氢火焰离子化检测器法研究了大鼠肝微粒体中芬氟拉明体外 I 相代谢的对映体选择性。

1 仪器与试剂

日本岛津 GC-15A 气相色谱仪, FID 检测器, HP-1 (15m × 0.25mm × 0.25μm) 弹性石英毛细管柱, C-R4A 色谱数据处理机, FZQ-2 旋涡混合器, 80-1 型离心沉淀机(上海手术器械厂), PHS-10B 数字酸度计。

盐酸芬氟拉明, 盐酸丙基安非他明(中国药品生物制品检定所); *S*-TFPC, 三羟甲氨甲烷(Tris), 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II, 氧化型: β-NADP, 还原型: β-NADPH), 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)(Sigma 公司提供); 其他试剂均为国产分析纯和色谱纯。

色谱条件: 载气: 高纯氮气 1kg/cm² 空气: 0.5 kg/cm² 氢气: 0.5 kg/cm² 尾吹: 15mL/min; 进样口温度: 280℃ 检测口温度: 280℃; 柱温: 100℃ (4min), 8℃/min 升至 280℃ (1min); 进样量: 1μL。

2 实验方法

2.1 大鼠肝微粒体制备^[8]

SD 雄性大鼠 4 只, 体重(200 ± 10)g(浙江大学医学院实验动物中心), 断头处死, 剖腹, 用注射器吸取 25mL 经冰浴冷却的生理盐水, 经肝门静脉灌注法除去肝中残血, 剪下肝脏, 用冰生理盐水浸洗, 吸干, 称重, 剪碎(以下均在 4℃ 以下操作), 加约 4 倍肝重的溶液 1[蔗糖(0.25mol/L) 100mL + pH7.4Tris-HCl (1 mol/L)缓冲液 1mL], 制成匀浆, 9 000 × g 离心 15min, 取上清液, 12 500 × g 离心 15min, 取上清液按 10 : 1 加入溶液 2[CaCl₂ 溶液(88mmol/L)], 冰浴 5min, 振摇, 25 000 × g 离心 15min, 取沉淀, 用溶液 3[蔗糖(0.25 mol/L) 95mL + pH 7.4 Tris-HCl (1 mol/L)缓冲液 5mL]清洗后, 加溶液 3 适量制成匀浆, 分装, 置 -30℃ 低温冰箱中保存。其蛋白质含量按 Lowry 法测定^[9], 为 27.62mg/mL。

2.2 测定步骤

精密量取微粒体溶解于 10.5mL 再生系统中, 使最后的蛋白质浓度为 2mg/mL, 混匀, 缓缓通 O₂ 3min, 即得孵育液; 精密量取 1mL 孵育液到 5mL 干净试管中, 分别加入底物溶液, 混匀, 加 40% NaOH 3 滴, 混匀, 每管加内标溶液(1.0mg/mL 的盐酸丙基安非他明水溶液)50μL, 混匀, 加氯仿 2mL, 旋转振摇 1min, 提取, 4000r/min 离心 10min, 吸去上层水层及蛋白层, 氯仿层用无水 Na₂SO₄ 脱水, 4000r/min 离心 10min, 移取氯仿层至干净试管, 各加 10μL 三乙胺和 40μL *S*-TFPC, 立即密塞, 于室温下振荡 15min 使反应完全, 各加 1.5 mL 水洗涤, 旋转振摇半分钟, 吸去水层, 氯仿层于 60 ~ 70℃ 水浴加热, 吹气使挥干; 临分析前, 各加 40μL 乙酸乙酯溶解, 混匀, 注射 1μL 入 GC, 记录色谱图^[10]。

3 结果与讨论

3.1 分析方法的认证

精密量取 1mL 失活的空白微粒体孵育液到 5mL 干净试

管中, 分别加入底物溶液, 按“测定步骤”项下操作, 量取药物和内标物的峰高, 计算后以相应的峰高比(*y*)对底物浓度(*x*)回归, 得标准曲线。l-芬氟拉明的回归方程为 *y* = 0.4461 *x* - 0.1735, *r* = 0.999 8; d-芬氟拉明的回归方程为 *y* = 0.4010 *x* - 0.1367, *r* = 0.999 4。结果表明, 在芬氟拉明对映体浓度为 1.0 ~ 50μg/mL 内, 底物浓度对底物与内标的峰高比呈良好的线性关系。同时配制失活的空白微粒体和加有芬氟拉明和内标的微粒体样品, 依法操作, 在相同条件下测定, 结果试剂及杂质峰不干扰样品的测定。

按上述方法进行处理, 使芬氟拉明单个对映体孵育浓度为 1, 25, 50μg/mL(低、中、高三种浓度各 5 管)作为样品溶液, 依法操作, 与不经处理的水溶液标准曲线比较, 求出回收率, 见表 1。代入相应的空白微粒体标准曲线求得浓度值(μg/mL), 计算标准差, 见表 2。

表1 芬氟拉明对映体在大鼠肝微粒体孵育液中的回收率 (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

Target concentration (μg / mL)	Rescovery (%)	
	l-fenfluramine	d-fenfluramin
1	91.0 ± 2.7	97.6 ± 6.8
25	92.8 ± 7.6	93.6 ± 8.4
50	93.5 ± 5.8	95.3 ± 3.2

表2 芬氟拉明对映体测定值的精密度和准确度 (*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The reproducibility and precision of the assay for l-fenfluramine and d-fenfluramin enantiomers in the microsomal incubates(*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

Target concentration (μg / mL)	Measured concentration(μg / mL)	
	R- (-)-mexiletine	S- (+)-mexiletine
Within-day		
1	0.910 ± 0.09	0.976 ± 0.08
25	23.2 ± 1.9	23.4 ± 2.1
50	46.8 ± 4.3	47.6 ± 3.5
intra-day		
1	0.878 ± 0.12	0.956 ± 0.11
25	22.6 ± 2.9	22.3 ± 2.6
50	48.2 ± 5.6	47.5 ± 6.1

结果表明, 提取回收率大于 92%, 日内精密度(RSD)在 10% 以内, 日间精密度(RSD)在 15% 以内。

在失活的空白微粒体中加入微量芬氟拉明, 按照逐步稀释法, 测得芬氟拉明对映体的 LOD 为 0.1μg / mL, LOQ 为 1.0μg/mL(RSD < 15%, *n* = 4)。

3.2 时间反应曲线

精密吸取 1mL 孵育液到 5mL 干净试管中, 分别加入底物溶液(1.0mg/mL 的盐酸芬氟拉明水溶液)80μL, 混匀后, 按“测定步骤”项下操作, 反应时间分别为 3, 5, 10, 30min。量取底物和内标物的相应峰高, 以各对映体残留量对反应时间作图, 见图 2, 并将 l-/d-对映体残留量的比率对反应时间作图, 见图 3。

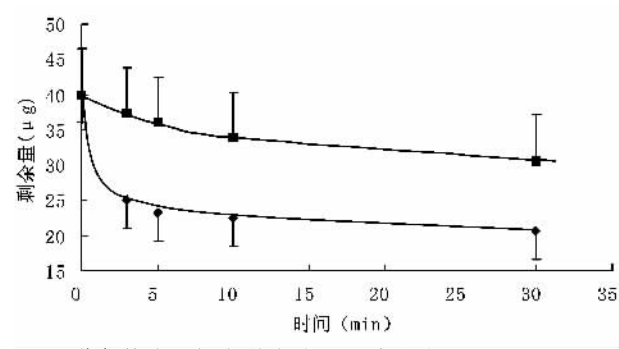


图2 芬氟拉明 I 相代谢的时间-反应曲线
Fig 2 The reaction-time curve of oxidation metabolism of fenfluramine
 ■ d-fenfluramine ◆ l-fenfluramine

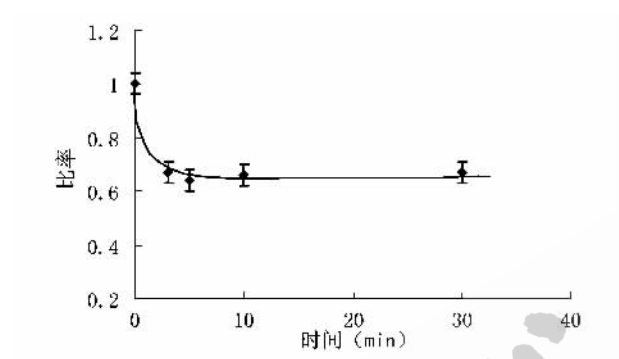


图3 芬氟拉明体外 I 相代谢的 l-/d-对映体残留量比率的变化
Fig 3 The time course of the concentration ratio between the l- and the d- enantiomers (l/d) of oxidation metabolism

结果表明,在 40μg/mL 底物浓度水平, l-芬氟拉明的消除比 d-芬氟拉明快,且随着反应时间的增加这种两种对映体的代谢比率基本不变(0.66±0.02)。

3.3 酶动力学参数测定

样品孵育与处理方法同“测定步骤”项下,底物溶液(1.0mg/mL 的盐酸芬氟拉明水溶液)的加入量分别为 5, 10, 25, 50, 100μL,反应时间为 10min。量取底物和内标物的相应峰高,计算后用 Eadie-Hofstee 双倒数法求 V_m 和 K_m 值。结果见表 3。

表3 芬氟拉明对映体在大鼠肝微粒体中 I 相反应的酶动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Enzymatic parameters in fenfluramine enantiomer metabolism($\bar{x} \pm s, n = 3$)

enantiomer	K_m ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	V_{max} ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	Cl_{int} ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}(\text{protein})^{-1}$)
l-	0.15 ± 0.01	4.99 ± 0.52	33.3 ± 3.0
d-	0.27 ± 0.02	9.53 ± 0.87	35.3 ± 3.1

配对 t 检验结果表明,在 I 相代谢中,两对映体的最大反应速度、米氏常数均有显著差异($P < 0.01$)。这表明 P-450 亚族与两对映体的亲和力及催化能力有立体选择性差

异。

4 结论

本实验建立了大鼠肝微粒体孵育液中 l-和 d-芬氟拉明的对映体选择性测定的衍生化气相色谱法方法,结果准确、有效;并用于研究芬氟拉明的体外代谢动力学。实验结果表明,从两个对映体随时间代谢量的恒定比率看,左旋体与右旋体与特定酶结合的能力是 3:2,从 30min 时的代谢量看,左旋体的代谢量要比右旋体约多 25%;这表明,药物进入大鼠体内后,左旋体先被快速代谢,发挥药效的基本为右旋体。两种对映体在大鼠肝微粒体中的氧化代谢呈现立体选择性差异。

参考文献

- [1] Belas FJ, Phillips MA, Srinivas NR, *et al.* Simultaneous determination of nadolol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection[J]. Biomed. Chromatogr, 1995, 9: 140.
- [2] Clausang P, Rushing LG, Newport GD, *et al.* Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysate using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 692(2): 419.
- [3] Zeng JN, Dou L, Duda M, *et al.* New chiral high-performance liquid chromatographic methodology used for the pharmacokinetic evaluation of dexfenfluramine [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 654(2): 231.
- [4] Kaddoumi A, Nakashima MN, Takahashi M, *et al.* Chiral HPLC determination of dl-Fenfluramine and dl-Norfenfluramine in biological fluids using DIB-Cl as a label [J]. Anal Sci, 2001, 17 (Suppl): 907.
- [5] Srinivas NR, Hubbard JW, Cooper JK, *et al.* Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for dl-fenfluramine and dl-norfenfluramine in plasma [J]. J Chromatogr, 1988, 433: 105.
- [6] Marchant NC, Breen MA, *et al.* Comparative biodisposition and metabolism of ^{14}C -($\pm$)-fenfluramine in mouse, rat, dog and man. Xenobiotica, 1992, 22(11): 1251.
- [7] 刘基宁, 方文仪, 陈日南. 盐酸芬氟拉明对映体的柱前衍生化 GC 法分析[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(5): 218.
- [8] Gibson GC, Skett P. Introduction to drug metabolism[M], 2nd ed. London, Chapman and Hall. 1994: 219.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265.
- [10] 茅海琼, 曾苏. 大鼠肝微粒体中美西律对映体氧化代谢的立体选择性研究. 中国现代应用药理学, 2005, 22(5): 360.

收稿日期: 2005-06-30