

UPLC-MS/MS 测定地西洋对大鼠 CYP450 酶活力的影响

庄开赞¹, 孙金辉¹, 王幼萍¹, 缪千状¹, 何俏军² (1.宁波市奉化区人民医院药剂科, 浙江 宁波 315500; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 基于 UPLC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中的 5 种探针药物(安非他酮、美托洛尔、咪达唑仑、非那西丁和甲苯磺丁脲), 5 种探针药物分别是细胞色素 P450 同工酶 CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2 和 CYP2C9 底物, 评价地西洋对大鼠细胞色素 P450 酶活性影响。方法 将大鼠随机分成地西洋低剂量组(1 mg·kg⁻¹)、高剂量组(5 mg·kg⁻¹)和对照组。地西洋低剂量组、高剂量组腹腔注射地西洋 10 d, 对照组腹腔注射生理盐水 10 d。5 种探针药物通过灌胃给予大鼠, 用 UPLC-MS/MS 测定血浆药物浓度。结果 与对照组相比, 地西洋组安非他酮、美托洛尔和非那西丁药动学参数均有统计差异。地西洋组安非他酮、非那西丁的 AUC 比对照组高, 但美托洛尔 AUC 比对照组低。结论 地西洋可能会抑制大鼠 CYP2B6 酶活性, 抑制 CYP1A2 酶活性, 诱导大鼠 CYP2D6 酶活性, 而对大鼠 CYP3A4、CYP2C9 酶活性无影响。

关键词: 细胞色素 P450; 探针药; 地西洋; 超高效液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)03-0274-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.003

引用本文: 庄开赞, 孙金辉, 王幼萍, 等. UPLC-MS/MS 测定地西洋对大鼠 CYP450 酶活力的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 274-277.

Effect of Diazepam on CYP450 Activity in Rats Determined by UPLC-MS/MS

ZHUANG Kaizan¹, SUN Jinhui¹, WANG Youping¹, MIAO Qianzhuang¹, HE Qiaojun² (1. Pharmacy Department, Fenghua People's Hospital, Ningbo 315500, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To simultaneously determine bupropion, metoprolol, midazolam, phenacetin and tolbutamide in rat plasma by UPLC-MS/MS, which are the five probe drugs of the five cytochrome P450 (CYP450) isozymes (CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2 and CYP2C9), to evaluate the effect of diazepam on rat CYP450 enzyme activity. **METHODS** The rats were randomly divided into diazepam low dose group (1 mg·kg⁻¹), diazepam high dose group (5 mg·kg⁻¹), and control group. The rats in diazepam group were given 1 and 5 mg·kg⁻¹ diazepam by intraperitoneal administration for 10 d, control group was given saline solution by intraperitoneal administration for 10 d. Five probe drugs were administered to rats by gavage and plasma drug concentrations were determined by UPLC-MS/MS. **RESULTS** Compared with control group, there was statistical pharmacokinetic difference for bupropion, metoprolol and phenacetin in diazepam group. In diazepam group, AUC of bupropion and phenacetin were higher than that in the control group, but AUC of metoprolol was lower than that in the control group. **CONCLUSION** Diazepam may slightly inhibit CYP2B6 enzyme activity, may inhibit CYP1A2 enzyme activity, may induce CYP2D6 enzyme activity, but has no effect on CYP3A4, CYP2C9 enzyme activity in rats.

KEYWORDS: CYP450; probe drugs; diazepam; UPLC-MS/MS

地西洋是一种具有多种临床用途的苯二氮卓类药物, 包括治疗焦虑、失眠、肌肉痉挛、癫痫发作和酒精戒断^[1]。与所有苯二氮卓类药物类似, 地西洋是一种受控物质, 长期使用, 无论是标准治疗剂量还是高剂量, 均可导致身体依赖。如果地西洋治疗突然停止, 可能会出现停药症状, 严重的会出现癫痫发作。

细胞色素 P450 酶系(CYP450)是肝脏中最重要药物代谢酶, 数量大, 具有丰富的 CYP 亚型^[2]。CYP450 是一类以铁卟啉为辅基的血红素-硫醇盐

蛋白, 人鼠保持高度同源性, 代谢功能基本一致。对于人类, 与药物或外源性物质代谢密切相关的 CYP450 酶主要为 CYP1A2(占总 CYP 药物代谢的 4%)、CYP2C9(10%)、CYP2C19(2%)、CYP2D6(30%)、CYP2E1(2%)和 CYP3A4(50%)等, 主要分布在肝脏, 这几种 CYP450 酶占肝脏中所有 CYP450 含量的 75%以上, 参与临床 90%以上药物的代谢^[3]。探针药物是一种特殊的 CYP 亚型催化物, 其催化率可以用来评估 CYP 亚型的活性^[4-5], 已被广泛用于临床研究中, 特别是在药动力学和药

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2017A610265)

作者简介: 庄开赞, 女, 主任药师

Tel: 13736053347

E-mail: zhuangkaizan@sina.com

理学领域^[6]。

本研究利用 UPLC-MS/MS 技术同时检测大鼠血浆中 5 个探针药底物(安非他酮、美托洛尔、咪达唑仑、非那西丁和甲苯磺丁脲),根据药动学参数变化反映地西洋对大鼠的 CYP45 酶亚型如 CYP2B6、CYP2D6、CYP3A4、CYP1A2 和 CYP2C9 酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

咪达唑仑(批号:171250-200401;纯度:99.8%)、安非他酮(批号:100671-201001;纯度:99.8%)、地西洋(批号:171225-200903;纯度:99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;非那西丁(批号:STBB2177M9;纯度>98%)、美托洛尔(批号:3-HBN-193-1;纯度:98%)和甲苯磺丁脲(批号:078K0725,纯度>98%)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。色谱级乙腈和甲醇均购自 Merck 公司。超纯水(电阻>18 MΩ)由 Milli-Q 纯化系统制备。UPLC-MS/MS ACQUITY UPLC 和 Xevo TQ-S Micro 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司)。

1.2 动物

SD 大鼠,♂,体质量(220±20)g,购自上海 SLAC 实验动物有限公司,实验动物许可证号:KS02165。动物饲养在自然光循环、温度 22℃条件下。所有大鼠在温州医科大学实验动物中心饲养,实验步骤通过温州医科大学实验动物委员会批准。

1.3 色谱条件

UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),柱温:40℃。初始流动相:乙腈-0.1%甲酸;流速:0.4 mL·min⁻¹;进样量:2 μL。梯度洗脱:初始乙腈 10%,0.2~1.5 min,乙腈 10%→80%,保持 0.5 min,然后在 0.5 min 内,乙腈 80%→10%,并保持 1.5 min,总运行时间为 4.0 min。

1.4 质谱条件

氮气作为脱溶剂气(800 L·h⁻¹)和锥形气体(50 L·h⁻¹)。毛细管电压 2.5 kV;源温度 150℃;去溶剂化温度 400℃。多反应监测(MRM)方式进行定量分析。电喷雾离子化(ESI)正离子;MRM 的监测离子:0~3 min, *m/z* 152.1→110.1(对乙酰氨基酚),3~7 min, *m/z* 235.1→150.1(4'-羟基美芬妥英),380.3→91.0(内标多奈哌齐)和 258.3→157.0(右啡烷),7~13.5 min, *m/z* 342.2→324.2(1-羟基咪达唑

仑)和 305.3→269.3(6β-羟基睾酮);各检测对象的 MRM 条件(裂解电压/碰撞能量)为:对乙酰氨基酚,100 V/16 eV;4'-羟基美芬妥英,100 V/16 eV;右啡烷,125 V/40 eV;1-羟基咪达唑仑,180 V/20 eV;6β-羟基睾酮,125 V/12 eV;内标多奈哌齐,105 V/46 eV。

1.5 分组及给药

SD 大鼠随机分成地西洋低剂量组、高剂量组和对照组 3 组,每组 8 只。地西洋低剂量组、高剂量组给予大鼠地西洋(1, 5 mg·kg⁻¹),对照组给予大鼠生理盐水,连续给药 10 d,采用腹腔注射方式给药。第 11 天,3 组灌胃给予大鼠 5 种探针药物(安非他酮、非那西丁、甲苯磺丁脲、美托洛尔、咪达唑仑分别为 10, 10, 0.1, 10 和 10 mg·kg⁻¹)。

1.6 取样测定

在 5 种探针药物灌胃后 5 min, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h, 从尾静脉收集血液(0.3 mL)到 1.5 mL 肝素化离心管。血液样品以 4 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取 100 μL 血浆,-20℃保存。在 1.5 mL EP 管中,100 μL 血浆加入 200 μL 乙腈,涡旋混合 1 min 后,13 000 r·min⁻¹离心 10 min,取 2 μL 上清液注 UPLC-MS/MS 系统分析。

1.7 统计学方法

探针药物浓度-时间,通过 DAS 2.0 软件非房室模型分析。地西洋组和对照组主要药物代谢动力学参数由 SPSS 18.0 统计软件分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察结果

线性范围 5~5 000 ng·mL⁻¹,定量限 5 ng·mL⁻¹,日间和日内精密度均<15%,准确度 85%~115%,加样回收率为 96.8%~103.2%,基质效应考察结果为 87.5%~110.6%。5 种探针药在室温 2 h,自动进样器 12 h,-80℃30 d 以及 3 次冷冻和融化循环,变异在±14%之内,RSD<13%。采用的 UPLC-MS/MS 符合探针药检测要求。血浆样品 UPLC-MS/MS 典型色谱图见图 1,内源性物质未干扰分析物检测。

2.2 地西洋对 CYP450 酶活力影响

结果显示,地西洋组中安非他酮、甲苯磺丁脲 *C*_{max} 和 AUC 比对照组高,但美托洛尔 *C*_{max} 和 AUC 比对照组低。安非他酮、美托洛尔、咪达唑仑、非那西丁、甲苯磺丁脲主要药动学参数见表 1,药物浓度-时间曲线见图 2。

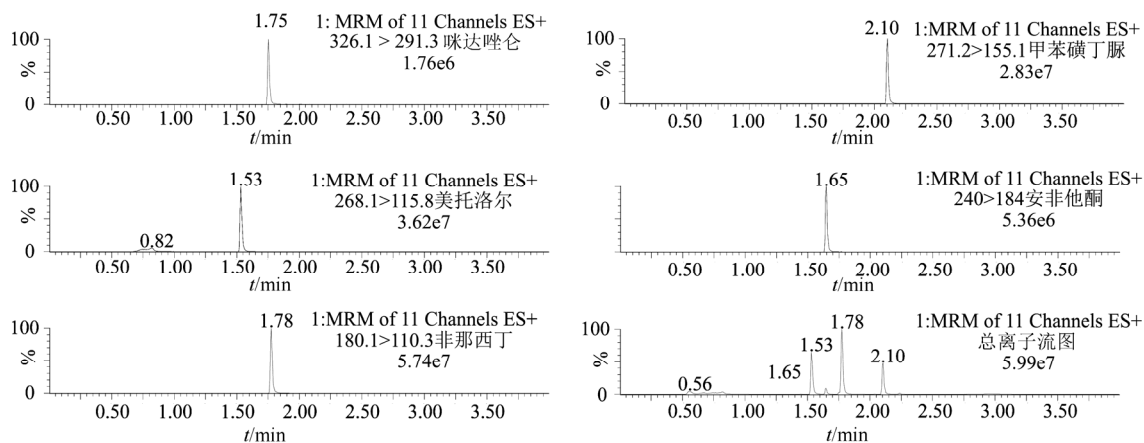


图 1 大鼠血浆中咪达唑仑、甲苯磺丁脲、美托洛尔、安非他酮和非那西汀 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of midazolam, tolbutamide, metoprolol, bupropion and phenacetin in plasma sample

表 1 大鼠药动学参数

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters in rats

组别	AUC ₍₀₋₄₎ / ng·mL ⁻¹ ·h	AUC _(0-∞) / ng·mL ⁻¹ ·h	MRT ₍₀₋₄₎ /h	MRT _(0-∞) /h	t _{1/2} /h	CL _{z/F} /L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	V _{z/F} /L·kg ⁻¹	C _{max} /ng·mL ⁻¹
安非他酮								
低剂量组	8.6±1.0 ¹⁾	9.1±1.2	1.0±0.2	1.2±0.2	1.0±0.2	1118.6±148.5	1527.4±283.0	11.9±2.8
高剂量组	10.1±4.1	10.2±4.2	0.8±0.2	0.9±0.2	0.7±0.1	1117.0±440.5	1057.7±417.5	17.3±5.2
对照组	7.3±0.7	7.7±1.2	0.9±0.2	1.2±0.6	1.0±0.7	1315.6±181.7	1734.5±910.5	14.9±1.9
美托洛尔								
低剂量组	130.0±59.3	159.8±75.1	1.7±0.4	3.2±1.9	2.6±1.4	74.7±30.9	260.5±115.7 ¹⁾	150.5±26.1
高剂量组	92.7±9.1 ²⁾	100.3±12.3 ²⁾	1.5±0.2	2.0±0.6	1.8±0.5	101.0±12.2 ²⁾	256.1±68.3 ¹⁾	137.4±25.1
对照组	158.3±31.8	176.4±48.1	1.7±0.2	2.3±0.6	1.8±0.5	59.6±12.8	147.1±37.2	189.7±63.3
咪达唑仑								
低剂量组	17.2±5.1	17.7±5.5	0.6±0.2	0.7±0.3	0.8±0.4	616.1±210.9	674.0±196.6	52.8±16.6
高剂量组	16.8±3.4	17.1±3.6	0.6±0.1	0.7±0.1	0.8±0.2	602.2±110.1	658.5±102.3	48.2±14.9
对照组	14.6±2.2	15.1±2.0	0.6±0.1	0.8±0.2	0.9±0.4	670.5±79.9	912.0±441.0	45.2±5.3
非那西汀								
低剂量组	629.6±88.7	632.8±88.8	0.5±0.1 ¹⁾	0.6±0.1 ¹⁾	0.5±0.1	16.0±2.3	12.7±3.8	1630.6±583.6
高剂量组	725.8±54.0 ²⁾	732.7±59.2 ²⁾	0.5±0.1	0.5±0.1	0.6±0.2	13.7±1.1 ¹⁾	12.0±3.7	3002.9±782.6
对照组	515.9±66.7	520.9±68.7	0.4±0.1	0.4±0.1	0.7±0.3	19.5±2.9	20.1±8.4	2010.6±615.5
甲苯磺丁脲								
低剂量组	768.6±225.4	872.3±250.6	4.1±0.3	5.7±1.4	3.7±1.4	0.12±0.03	0.6±0.2	142.6±33.1
高剂量组	801.7±120.2	994.4±134.6	4.3±0.2	7.3±1.4	5.1±1.2	0.10±0.02	0.8±0.2	179.5±36.3
对照组	770.2±203.1	982.2±411.5	4.2±0.4	7.2±2.9	5.1±2.1	0.11±0.03	0.8±0.2	159.3±28.0

注：与对照组相比，¹⁾P<0.05，²⁾P<0.01。

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

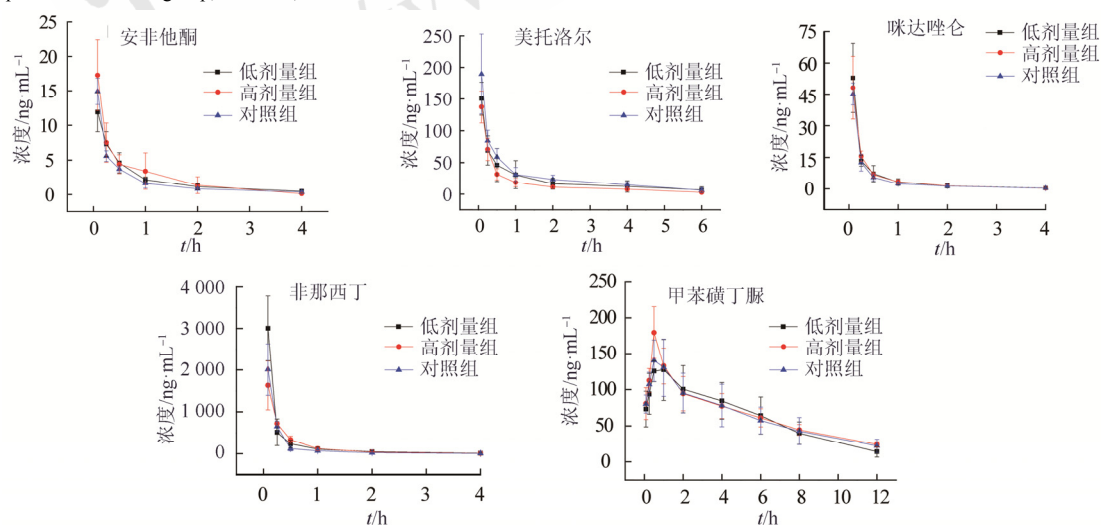


图 2 对照组和地西洋组大鼠安非他酮、美托洛尔、咪达唑仑、非那西汀、甲苯磺丁脲药动学曲线

Fig. 2 The pharmacokinetics profiles of bupropion, metoprolol, midazolam, phenacetin and tolbutamide in rats of control-group and diazepam-group

由表 1 可知,与对照组相比,地西洋低剂量组安非他酮 $AUC_{(0-t)}$ 升高($P<0.05$),高剂量的也升高,但是没有统计学差异。这表明地西洋可能对大鼠 CYP2B6 酶活性有一定的抑制作用。

与对照组相比,地西洋组低剂量组美托洛尔无统计学差异,高剂量组美托洛尔 $AUC_{(0-t)}$ 降低($P<0.01$),CL 升高($P<0.01$)。这表明地西洋可能会诱导大鼠 CYP2D6 酶活性。

与对照组对比,地西洋组低剂量组非那西汀 $AUC_{(0-t)}$ 与 CL 无统计学差异,高剂量组非那西汀 $AUC_{(0-t)}$ 升高($P<0.01$),CL 降低($P<0.01$)。这表明地西洋可能会抑制大鼠 CYP1A2 酶活性。

与对照组相比,地西洋组咪达唑仑、甲苯磺丁脲药动学参数无统计学差异。表明地西洋对大鼠 CYP3A4, CYP2C9 酶活性无影响。

3 讨论

地西洋主要通过 CYP2C19 和 CYP3A4 代谢成主要的活性代谢产物(去甲基安定)和 2 种次要的活性代谢物(替马西洋和奥沙西洋)^[7-8]。参与地西洋代谢的其他 CYP 酶包括 CYP2C9, CYP2B 和 CYP3A5^[1]。一般情况下,药动学变化被认为是引起药物-药物或者药物-食物相互作用的原因。在药动学相互作用中,大约 65% 的药物相互作用发生在代谢位点,药物代谢酶被认为是最重要的相互作用位点^[9-10]。大量药物通过 CYP 酶在肝脏代谢,超过 90% 的药物互相作用发生在 CYP 催化步骤^[11]。同样的,涉及 CYP 活性的药物相互作用会引起大量不良反应^[12]。由于这些原因,笔者通过体内 CYP 酶活性评估给予地西洋 10 d 后对大鼠的影响。

本研究采用 UPLC-MS/MS 技术同时检测大鼠血浆中安非他酮、美托洛尔、咪达唑仑、非那西汀和甲苯磺丁脲,这是 5 探针药 CYP450 的亚型 CYP2B6、CYP2D6、CYP3A4、CYP1A2 和 CYP2C9 底物。本研究结果表明,地西洋可能会稍抑制大鼠 CYP2B6 酶活性,可能会抑制大鼠 CYP1A2 酶活性,诱导 CYP2D6 酶活性,而对大鼠 CYP3A4、CYP2C9 酶活性无影响。

REFERENCES

- [1] DEAN L. Diazepam Therapy and CYP2C19 Genotype [M]// PRATT V, MCLEOD H, DEAN L, et al. Medical Genetics Summaries Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2012: 1-9.
- [2] THAKUR M, GROSSMAN I, MCCRORY D C, et al. Review of evidence for genetic testing for CYP450 polymorphisms in management of patients with nonpsychotic depression with selective serotonin reuptake inhibitors [J]. Genet Med, 2007, 9(12): 826-835.
- [3] RAVYN D, RAVYN V, LOWNY R, et al. CYP450 pharmacogenetic treatment strategies for antipsychotics: a review of the evidence [J]. Schizophr Res, 2013, 149(1-3): 1-14.
- [4] DE ANDRES F, A L L. Simultaneous determination of Cytochrome p450 oxidation capacity in humans: A review on the phenotyping cocktail approach [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2016, 17(13): 1159-1180.
- [5] CHEN A, ZHOU X, TANG S, et al. Evaluation of the inhibition potential of plumbagin against cytochrome P450 using LC-MS/MS and cocktail approach [J]. Sci Rep, 2016(6): 28482.
- [6] LI T Y, LIU W, CHEN K, et al. The influence of combination use of CYP450 inducers on the pharmacokinetics of voriconazole: a systematic review [J]. J Clin Pharm Ther, 2017, 42(2): 135-146.
- [7] SAKAI N, ISHIZUKA M. Impact of rat P450 genetic polymorphism on diazepam metabolism [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009, 5(11): 1421-1433.
- [8] ANDRESEN H, AUGUSTIN C, STREICHERT T. Toxicogenetics--cytochrome P450 microarray analysis in forensic cases focusing on morphine/codeine and diazepam [J]. Int J Legal Med, 2013, 127(2): 395-404.
- [9] REINEN J, POSTMA G, TUMP C, et al. Application of a cocktail approach to screen cytochrome P450 BM3 libraries for metabolic activity and diversity [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(5): 1425-1443.
- [10] WANG X, LIU G T, SONG J Z. QuECHERS-HPLC-MS determination of three macrolide antibacterials and their metabolites in human plasma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 16(9): 1289-1295.
- [11] DERUNGS A, DONZELLI M, BERGER B, et al. Effects of Cytochrome p450 inhibition and induction on the phenotyping metrics of the basel cocktail: A randomized crossover study [J]. Clin Pharmacokinet, 2016, 55(1): 79-91.
- [12] ZHANG G B, SHAO Y F, YANG X L, et al. Design and implementation of a new discharge-flow procedure based on one-stop service model [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(6): 899-902.

收稿日期: 2018-01-04

(本文责编: 曹粤锋)