

## 地非三唑的 RP-HPLC 法测定及其体外代谢研究

姚彤炜\*, 胡云珍

(浙江大学药学院药物代谢研究室, 浙江 杭州 310031)

**摘要:** 目的 为研究抗早孕新药地非三唑(DLI11-IT)的代谢作用机理和进一步开发利用,建立其体外代谢的 RP-HPLC 测定法。方法 以 Lichrospher ODS-C<sub>18</sub> 为色谱柱,甲醇-pH 7.5 磷酸盐缓冲液(70:30)为流动相,检测波长:235 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,地西洋为内标,对鼠肝微粒体孵育液中 DLI11-IT 的 RP-HPLC 法进行方法学研究。应用建立的方法对 DLI11-IT 在不同来源的鼠肝微粒体中的体外代谢进行试验。结果 DLI11-IT 浓度在 1.01 ~ 101.0 μg·mL<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系,在不同浓度下测得平均绝对回收率和相对回收率分别为(92 ± 4)%和(100.3 ± 1.9)% (n = 5); DLI11-IT 在鼠肝微粒体中的代谢,β-萘黄酮组明显快于其他组。结论 本法简便、准确,可用于 DLI11-IT 的体外代谢研究。

**关键词:** 地非三唑; 高效液相色谱; 药物代谢; 肝微粒体

中图分类号: R917.101; R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)06 - 0458 - 04

地非三唑(diphenyltriazol, 简称 DLI11-IT)为三氮唑类化合物,化学名为 3-(2-乙基苯基)-5-(3-甲氧基苯基)-1H-1,2,4-三氮唑,结构见图 1。为非甾体、非前列腺素类终止早孕新药,曾用名抗孕唑,有终止早孕作用强、毒性低、安全界广等优点<sup>[1-3]</sup>,目前已进入临床试验阶段。在对 DLI11-IT 的研制过程中,发现其对鼠肝微粒体中细胞色素 P450 有一定的诱导作用。鉴于许多药物既是某种药酶的底物,也可能是该种酶或其他酶的诱导剂或抑制剂,因此,在新药研制过程中若能获得药物代谢酶的选择性催化作用信息和代谢作用机理,无疑对临床安全、合理、有效用药,避免不良反应有重要的指导意义。为此,本文建立了鼠肝微粒体孵育液中 DLI11-IT 的 RP-HPLC 测定法,并对 DLI11-IT 在不同诱导剂处理的鼠肝微粒体中的代谢进行了初步研究。

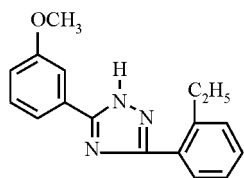


Figure 1 Structure of diphenyltriazol (DLI11-IT)

## 材 料 与 方 法

**仪器与试剂** Jouan MRI 822 自动高速冷冻离心机

机(日本日立公司),Agilent 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司,美国)。DLI11-IT(浙江仙居制药厂),地西洋(常熟药厂),苯巴比妥(PB),β-萘黄酮(β-NF)、异柠檬酸三钠盐和异柠檬酸脱氢酶和氧化还原辅酶 II(NADP/NADPH)均为美国 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯或生化试剂。

**色谱条件** Lichrospher ODS-C<sub>18</sub> 分析柱(4.6 mm ID × 25 cm, 5 μm);流动相为甲醇-pH 7.5 的 15 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠缓冲液(70:30),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;紫外检测波长 235 nm;进样量 5 μL;地西洋为内标。

**大鼠预处理** 体重 130 ~ 160 g 的 ♀ Sprague-Dawley 大鼠 9 只,由浙江大学湖滨校区动物房提供,按体重均匀分为 3 组:苯巴比妥组,β-萘黄酮组和空白对照组。苯巴比妥溶于生理盐水,ip 80 mg·kg<sup>-1</sup> 3 d;β-萘黄酮溶于茶油,ip 80 mg·kg<sup>-1</sup> 3 d;空白对照组不给任何药物。

**鼠肝微粒体的制备** 动物末次给药 8 h 后开始禁食,16 h 后,将动物断头处死,剖腹,用注射器吸取 20 mL 经冰浴冷却的生理盐水,经胸动脉或门静脉注入肝脏,灌流除去肝中血液。取出肝脏,按文献法<sup>[4]</sup>,用钙盐沉淀法制备鼠肝微粒体。以 Lowry 法测定蛋白质浓度<sup>[5]</sup>。

**DLI11-IT 的体外孵育试验** 取鼠肝微粒体,用新鲜配制的 NADPH 再生系统(每毫升含异柠檬酸三钠盐 2.8 mg,异柠檬酸脱氢酶 0.5 mg,0.5 mol·L<sup>-1</sup> 菸酰胺 0.1 mL,0.15 mol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 0.1 mL 和 0.1

收稿日期: 2001-07-16.

作者简介: 姚彤炜(1953-),女,教授.

\* Tel: (0571) 8721 7203, E-mail: Yaotw@cps.edu.cn

mol·L<sup>-1</sup> pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液 0.8 mL) 稀释成 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 蛋白浓度的混悬液, 充氧气 2 min, 加 DL111-IT 甲醇溶液适量, 使浓度为 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 混匀, 于 37 °C 预孵育 5 min, 加 NADP/NADPH 的 1% NaHCO<sub>3</sub> 溶液(终浓度为 1.8 mmol/0.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 启动反应, 并开始计时, 37 °C 孵育不同时间。于 0, 5 和 10 min 取反应液各 1.0 mL, 分别加氯仿 1.5 mL 终止反应并沉淀蛋白质, 加内标溶液(108 μg·mL<sup>-1</sup> 地西洋醇溶液) 100 μL, 旋涡提取 1 min 后, 3 500 × g 离心 20 min, 取有机层, 于空气流下挥干氯仿, 加流动相 1.0 mL 溶解残渣, 取 5 μL 进样。

## 结果与讨论

### 1 色谱条件选择

DL111-IT 的结构特点具有弱酸弱碱性, 本实验对不同组成, 不同有机相比比例, 不同 pH 和不同浓度磷酸盐缓冲液组成的流动相进行比较, 发现在甲醇-pH 7.5 的 15 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(70:30) 中 DL111-IT 峰形较对称, 柱效高, 内标与 DL111-IT 有较好的分离, 且保留时间适中, DL111-IT 在上述色谱条件下测得的色谱图和参数见图 2 和表 1。

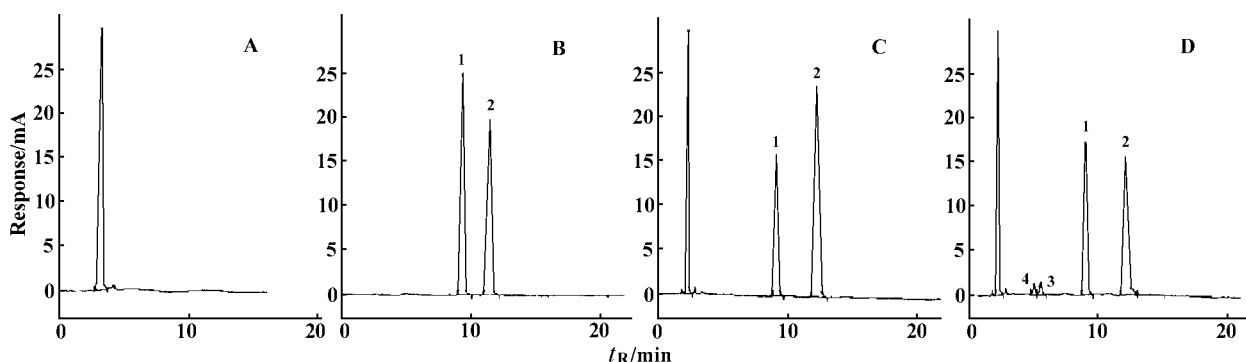


Figure 2 HPLC chromatograms of DL111-IT in rat hepatic microsome incubate induced by  $\beta$ -naphthoflavone  
A. Blank rat hepatic microsome incubate; B. DL111-IT and internal standard( diazepam) in mobile phase; C. Spiked rat hepatic microsome incubate; D. Incubated for 10 min in rat hepatic microsome induced by  $\beta$ -naphthoflavone  
Peaks :1. Diazepam( IS); 2. DL111-IT; 3, 4. Metabolites

Table 1 RP HPLC parameters of diphenyltriazol( DL111-IT)

Compound	Retention time/ min	Plate number ( <i>n</i> )	Tailing factor ( <i>T</i> )	Resolution ( <i>R</i> )	Capacity factor ( <i>k</i> )	Partition ratio ( $\alpha$ )
IS( diazepam)	9.327	10100	1.06		2.38	
DL111-IT	11.41	9950	1.07	1.625	3.14	1.32

### 2 线性范围与灵敏度

取不同浓度 DL111-IT 甲醇溶液, 加到失活的鼠肝微粒体悬浮液中, 使反应液中 DL111-IT 的最终浓度为 1.01, 5.05, 10.10, 20.20, 30.30, 50.50, 101.00 μg·mL<sup>-1</sup>。按“DL111-IT 的体外孵育试验”项下方法操作, 测定 DL111-IT 与内标物峰面积比值。以 DL111-IT 的浓度为横坐标, DL111-IT 与内标物峰面积比值为纵坐标, 计算曲线的回归方程,  $R = 0.05184 C + 0.01875$  ( $\gamma = 0.9998, n = 7$ )。DL111-IT 浓度在 1.01 ~ 101.00 μg·mL<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系。测得 DL111-IT 的定量限(LOQ) 为 1.01 μg·mL<sup>-1</sup> (RSD < 10%,  $n = 4$ ), 检测限为 0.15 μg·mL<sup>-1</sup> ( $S/N = 3$ )。

### 3 回收率试验

分别于失活微粒体中准确加入高、中、低浓度的

DL111-IT 对照品溶液适量, 按“线性范围”项下方法测定, 以 DL111-IT 和内标的流动相溶液为对照, 内标法计算相对回收率; 按“标准曲线”项下的回归方程计算方法回收率, 结果见表 2。

Table 2 Recoveries of DL111-IT in rat hepatic microsomes ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Spiked amount/ μg·mL <sup>-1</sup>	Assayed amount/ μg·mL <sup>-1</sup>	Relative recovery/ %	Method recovery/ %
5.05	5.07 ± 0.20	100 ± 3	85.6 ± 2.2
20.2	20.30 ± 0.20	100.2 ± 0.8	102.4 ± 1.2
50.5	51.1 ± 1.1	100.2 ± 1.8	102.0 ± 1.5

### 4 精密度试验

分别于失活微粒体中准确加入高、中、低浓度的

DL111-IT 对照品溶液适量,按“回收率试验”项下方法测定日内日间精密度的结果见表 3。

**Table 3** Precisions of DL111-IT in rat hepatic microsomes ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

DL111-IT/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Intra-day precision		Inter-day precision	
	Ratio of area ( $A_{\text{DL111}}/A_{\text{IS}}$ )	RSD %	Ratio of area ( $A_{\text{DL111}}/A_{\text{IS}}$ )	RSD %
5.05	$0.260 \pm 0.006$	2.4	$0.280 \pm 0.010$	3.6
20.2	$1.080 \pm 0.014$	1.3	$1.070 \pm 0.010$	1.1
50.5	$2.62 \pm 0.04$	1.7	$2.68 \pm 0.06$	2.4

### 5 内标的选择

内标的选择结果,快诺酮和地西洋与 DL111-IT 的分离度均较合适,但快诺酮主峰后有一杂质峰,当柱效较低时,不能基线分离,影响含量计算,故选择地西洋为内标,在上述色谱条件下测得的色谱参数见表 1。

### 6 提取方法的选择

比较不同蛋白沉淀剂和有机溶剂提取结果,以氯仿为提取溶剂时得到的色谱图较好,杂质峰少,氯仿有沉淀蛋白质和提取 DL111-IT 的双重功能,使操作得以简化。考虑到 DL111-IT 和内标均具碱性,水相 pH 值可能对提取率有影响,我们比较了水相中加不同量氢氧化钠溶液对提取率的影响。实验结果(图 3)表明,不同量 NaOH 的加入对地西洋的提取率影响不大,而 DL111-IT 的提取率随 NaOH 的浓度增加明显下降。其原因可能是 DL111-IT 为一两性化合物,在 NaOH 碱性条件下,部分成盐状态,不能被氯仿提取所致。

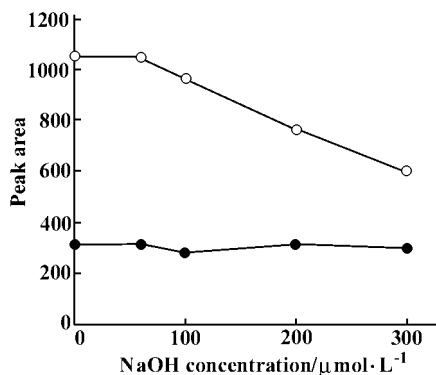


Figure 3 Effect of pH on the extraction recoveries of DL111-IT ( $\circ-\circ$ ) and diazepam ( $\bullet-\bullet$ )

### 7 DL111-IT 体外代谢试验

DL111-IT 在不同预处理的鼠肝微粒体中的代谢情况见图 4。图 4 表明 DL111-IT 在  $\beta$ -NF 诱导的鼠

肝微粒体中代谢速度明显大于其他两组微粒体,经 10 min 孵育后,DL111-IT 的浓度由最初的  $13.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  下降到  $2.817 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,代谢率为 78.6%;而空白对照组仅代谢 14.1%,PB 组仅代谢 29.3%。文献公认苯巴比妥(PB)主要诱导鼠肝微粒体细胞色素 P4502B1 (CYP2B1) 和 P4503A4 (CYP3A4), $\beta$ -萘黄酮( $\beta$ -NF) 主要诱导鼠肝微粒体细胞色素 P4501A2 (CYP1A2)。实验结果表明,CYP1A2 可能是催化 DL111-IT 代谢的主要酶。

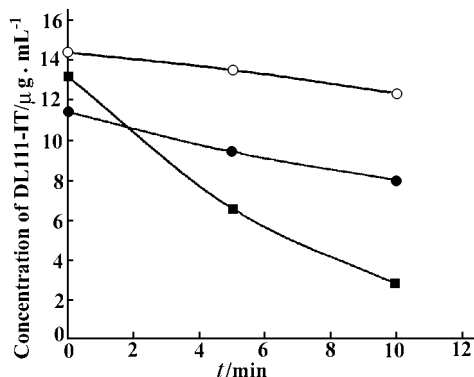


Figure 4 Elimination reaction of DL111-IT in rat hepatic microsomal incubates treated with different inducers

$\circ-\circ$  Control group;  $\bullet-\bullet$  Penobarbital group;  $\blacksquare-\blacksquare$   $\beta$ -Naphthoflavone group

生物样本中 DL111-IT 的含量测定大多采用色谱法,如骆文莹等<sup>[6]</sup>应用柱切换高效液相色谱法测定抗孕唑的药代动力学参数,Morrone<sup>[7]</sup>用气相色谱-氮磷检测法测定大鼠血浆中 DL111-IT 的含量。上述方法有一定的优点,例如柱切换高效液相色谱法在血样处理、检测灵敏度方面较一般 HPLC 法优越,GC-NPD 法对含氮物质具有专属、灵敏等优点,但需要一定的仪器装置,在色谱条件选择上也有一定难度。本文采用简便的 RP-HPLC 法建立了体外孵育液中 DL111-IT 的含量测定方法,可以准确、灵敏地测定孵育液中底物和代谢物的含量。从图 2 可知,底物、代谢物和干扰物质均能得到很好分离。完全可以应用于 DL111-IT 的代谢作用机理研究。

对于需终止妊娠的妇女往往在此期间或前后有可能服用其他药物。由于代谢性药物相互作用,有可能导致其中一种药物发生代谢障碍或加快代谢速度,使发生毒副作用或药物无效<sup>[8,9]</sup>。因此了解 DL111-IT 的药酶代谢作用机理,对临床合理选用合并用药和药物配伍具有重要的指导意义。

## REFERENCES:

- [1] Zhou HJ, Fang LY, Liu HC, *et al.* The general pharmacological effects of contragestazol (DL111-IT)-a new pregnancy-terminating agent [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2000, **9**(5):309 - 311.
- [2] Yang B, Zhou HJ, He QJ, *et al.* Termination of early pregnancy in the mouse, rat and hamster with DL111-IT and RU486 [J]. *Contraception*, 2000, **62**(4):211 - 216.
- [3] He QJ, Ying Y, Yang B, *et al.* Synergistic effects of DL111-IT combined with mifepristone on termination of early pregnancy in rhesus monkeys [J]. *Contraception*, 2000, **62**(4):189 - 193.
- [4] Gibson GG, Skett P. *Introduction of Drug Metabolism* [M]. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1994. 217 - 220.
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265 - 275.
- [6] Luo WY, Zhou B, Liu ZQ. Column switching HPLC method for determination of Pharmacokinetic parameter of diphenytriazol [J]. *J Zhejiang Med Univ* (浙江医科大学学报), 1991, **20**(1):23 - 26.
- [7] Morrone A. Gas chromatographic determination of DL111-IT, a new potential antifertility drug, in rat plasma [A]. Frigerio A. *Chromatography in Biochemistry, Medicine and Environmental Research* [M]. Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983. 83 - 94.
- [8] Zhou Q, Yao TW, Zeng S. The advancement in phenotyping study of drug metabolism [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2000, **17**(6):423 - 429.
- [9] Zhou Q, Yao TW, Zeng S. The base of drug metabolism in using the same series of drugs reasonably [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, **20**(10):621 - 623.

## RP HPLC DETERMINATION OF DIPHENYTRIAZOL IN RAT LIVER MICROSOMAL INCUBATES AND ITS APPLICATION IN IN VITRO METABOLISM

YAO Tongwei, HU Yunzhen

(School of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a RP-HPLC method for determination of diphenytriazol (DL111-IT) in rat hepatic microsomes. **METHODS** DL111-IT in rat hepatic microsomal incubates was extracted with chloroform, using diazepam as internal standard. The determination was performed on a Lichrospher ODS-G<sub>8</sub> reversed column (25 cm × 0.46 cm ID) with mobile phase of methanol-pH 7.5 phosphate buffer (70:30) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. A UV-VIS detector was operated at 235 nm. **RESULTS** The assay was linear from 1.01 ~ 101.0 μg·mL<sup>-1</sup> for DL111-IT. The limit of detection was 0.15 μg·mL<sup>-1</sup> (signal-to-noise ratio 3) and the limit of quantification was 1.01 μg·mL<sup>-1</sup> (RSD < 10%, n=4). The method afforded average recoveries of (100.3 ± 1.9)% (n=5), and intra-day and inter-day RSD were less than 5.0% (n=5). The method allowed study of the *in vitro* phase I metabolism of DL111-IT in rat liver microsomal incubates. The microsomes induced by β-naphthoflavone showed high enzymatic activity for DL111-IT phase I metabolism. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and can be used to study the metabolism of DL111-IT in rat hepatic microsomes.

**KEY WORDS:** diphenytriazol; HPLC; drug metabolism; hepatic microsomes