

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0068-03

芬苯达唑前药的体外代谢研究

温爱丹, 段李平, 刘丛珊, 陶奕, 薛剑, 吴宁波, 姜斌, 张皓冰*

【提要】 以人工胃液、人工肠液和小鼠肝匀浆为体外模型, 采用高效液相色谱法, 对合成的芬苯达唑前药 MPT 在上述 3 种生物基质中的代谢进行定量研究, 绘制代谢曲线, 并测定其对细粒棘球蚴原头节的杀伤作用。结果表明, 芬苯达唑前药在人工胃液、人工肠液和小鼠肝匀浆中均可发生代谢, 在肝脏匀浆中代谢为有活性的芬苯达唑, 代谢率为 7.92%。在 10 $\mu\text{g/ml}$ 芬苯达唑前药的体外作用下, 细粒棘球蚴原头节死亡率为 45.9%。

【关键词】 芬苯达唑前药; 体外代谢; 棘球蚴; 原头节

中图分类号: R383.33

文献标识码: B

In vitro Metabolism of Fenbendazole Prodrug

WEN Ai-dan, DUAN Li-ping, LIU Cong-shan, TAO Yi, XUE Jian, WU Ning-bo,
JIANG Bin, ZHANG Hao-bing*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Synthesized fenbendazole prodrug N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-4-phenylthiophenyl) thiourea (MPT) was analyzed *in vitro* in artificial gastric juice, intestinal juice and mouse liver homogenate model by using HPLC method, and metabolic curve was then generated. MPT was tested against *Echinococcus granulosus* protoscolices *in vitro*. The result showed that MPT could be metabolized in the three biological media, and to the active compound fenbendazole in liver homogenate, with a metabolic rate of 7.92%. Besides, the prodrug showed a weak activity against *E. granulosus* protoscolices with a mortality of 45.9%.

【Key words】 Fenbendazole prodrug; *In vitro* metabolism; *Echinococcus granulosus*; Protoscolex

* Corresponding author, E-mail: liu_wq2002cn@yahoo.com.cn

前药是指本身无活性或活性很低, 在体内经过酶和/或化学作用, 转变为有活性原药的化合物^[1]。前药广泛应用于肿瘤、心血管、神经系统和感染性疾病等药物的研究, 主要用以改善药物渗透性、溶解性和提高药物的生物利用度等^[1,2]。芬苯达唑作为一种广谱抗寄生虫药物, 主要用于动物(家禽、羊和马等)驱虫^[3,4]。用于治疗动物棘球蚴病时, 芬苯达唑及其体内代谢物奥芬达唑均有较好疗效^[5-7]。抗感染药物发展的历史表明, 动物用药通常在治疗相似的人类感染性疾病中起到了无可估量的作用, 如抗肠道寄生虫药物吡喹酮^[8]。苯并咪唑类药物阿苯达唑和甲苯达唑自 20 世纪 80 年代用于治疗人棘球蚴病以来, 目前仍是世界卫生组织首推的棘球蚴病治疗药物, 但疗效不佳, 治愈率仅 30% 左右, 因此, 开展对芬苯达唑的研究十分必要^[9,10]。有研究表明, 阿苯达唑的开环硫脲类化合物可在体内转化为阿苯达唑和阿苯达唑亚砷^[11,12], 但其他苯并咪唑类药物的前药少有文献提及。为探索改善该类药物的溶解度并增

加其生物利用度的途径, 本研究设计合成了一类新型芬苯达唑开环硫脲类前药, 并对其中一个衍生物 MPT (N-methoxycarbonyl-N'-(2-nitro-4-phenylthiophenyl) thiourea) 进行了初步的体外代谢试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和虫源 昆明雌性小鼠(16~18 周, 30~34 g)购自中国科学院上海实验动物中心; 羊源细粒棘球蚴原头节为青海省地方病预防控制所提供。

1.1.2 药物、主要试剂与仪器 芬苯达唑前药 MPT ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 363 g/mol) 由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所合成, 采用质谱、磁共振 H 谱和 C 谱以及高效液相色谱(HPLC)验证其结构和纯度。芬苯达唑和甲苯达唑购自德国 Sigma Aldrich 公司, 胃蛋白酶和胰蛋白酶购自加拿大 Bio Basic 公司, 乙腈(色谱级)购自德国 Merck 公司, 乙酸乙酯、浓盐酸和磷酸二氢钾购自上海凌峰化学试剂有限公司, 冰醋酸购自国药集团化学试剂有限公司, 甲酸购自美国 Dikma Technologies 公司。离心机(Eppendorf 5804R)为德国艾本德公司

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: zhanghaobing@hotmail.com

产品,液相色谱仪(泵:Waters 1525、检测器:Waters 2487)和色谱柱(Waters Sunfire™ C18, 5.0 μm , 4.6 mm \times 250 mm)为美国沃特世公司产品,高速离心机(BECKMAN COULTER Avanti J-26XPI)为美国贝克曼公司产品。

1.1.3 生物基质的配制 按照《中华人民共和国药典》的方法^[13]配制人工胃液,其中胃蛋白酶的浓度为 10 g/L。按照《中华人民共和国药典》的方法^[14]配制人工肠液, pH 6.8, 其中磷酸二氢钾和胰蛋白酶的浓度分别为 6.8 g/L 和 10 g/L。采用文献^[15]的方法配制小鼠肝脏匀浆,具体方法为:昆明小鼠禁食 12 h 后,断颈处死,取肝脏,用预冷的 PBS (pH 7.4) 缓冲液灌注至灰白色,称重后剪块,再用 PBS 缓冲液将血洗净,冰浴条件下制成肝匀浆(1 g 肝脏/4 ml 缓冲液),4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\times g$ 离心 20 min,取上清液用于体外代谢。

1.1.4 药物储备液 称取前药 MPT、芬苯达唑和内标甲苯达唑各 0.012 5 g,分别加入 1 ml 乙酸乙酯、冰醋酸和甲酸于 25 ml 容量瓶助溶,摇动使其完全溶解,加入乙腈定容、混匀,使其总浓度为 0.5 mg/ml。

1.2 前药体外代谢 取上述制备的人工胃液、人工肠液或小鼠肝脏匀浆各 2 ml 分别加入具塞试管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下于恒温振荡器(200 r/min)中预热 10 min,再加入 20 μl 待测药物储备液进行涡旋混合 1 min,在不同的时间点(人工胃液和肠液在 0、1、2、4、6、8 和 10 h,小鼠肝脏匀浆在 0、30、60、90、120 和 240 min)取样 200 μl ^[16-18],在取出的样品中加入 800 μl 预冷至 0 $^{\circ}\text{C}$ 的乙腈,置于冰浴中以终止反应,涡旋混合 2 min 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 500 $\times g$ 离心 10 min 以除去蛋白质,取上清液 800 μl ^[18],加入内标,经 0.22 μm 滤膜过滤后即可检测。

1.3 仪器分析

1.3.1 高效液相-紫外(HPLC-UV)色谱条件 色谱柱为 Waters Sunfire™ C18 (5.0 μm , 4.6 mm \times 250 mm),流动相为乙腈-醋酸铵(pH 4.5)(57:43),检测波长为 296 nm,流速为 1.0 ml/min,进样量为 20 μl 。

1.3.2 方法学验证

1.3.2.1 标准曲线 将配制好的储备液用流动相稀释至浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,经 0.22 μm 滤膜过滤,进样,以峰面积比-浓度绘制标准曲线。

1.3.2.2 定量限和检出限 按信噪比为 10 确定最低检测量,检测限=定量限 \times 3/10。

1.3.2.3 精密度 配制浓度为 0.25、1 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品各 5 份,分别于日间和日内进样,计算日内和日间精密度。

1.3.2.4 方法回收率 配制浓度为 0.25、1 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品各 3 份,分别测定 5 次,将待测化合物与内标峰面积之比代入标准曲线计算浓度,以测得浓度与理论浓度之比计算回收率。

1.3.2.5 MPT 和芬苯达唑的含量测定 MPT 的测定:测定 0 时间点从生物基质中提取的 MPT 含量,并除以相对分子质量以换算成摩尔数作为初始量,其他时间点测定的药物含量转换为剩余的摩尔百分数。

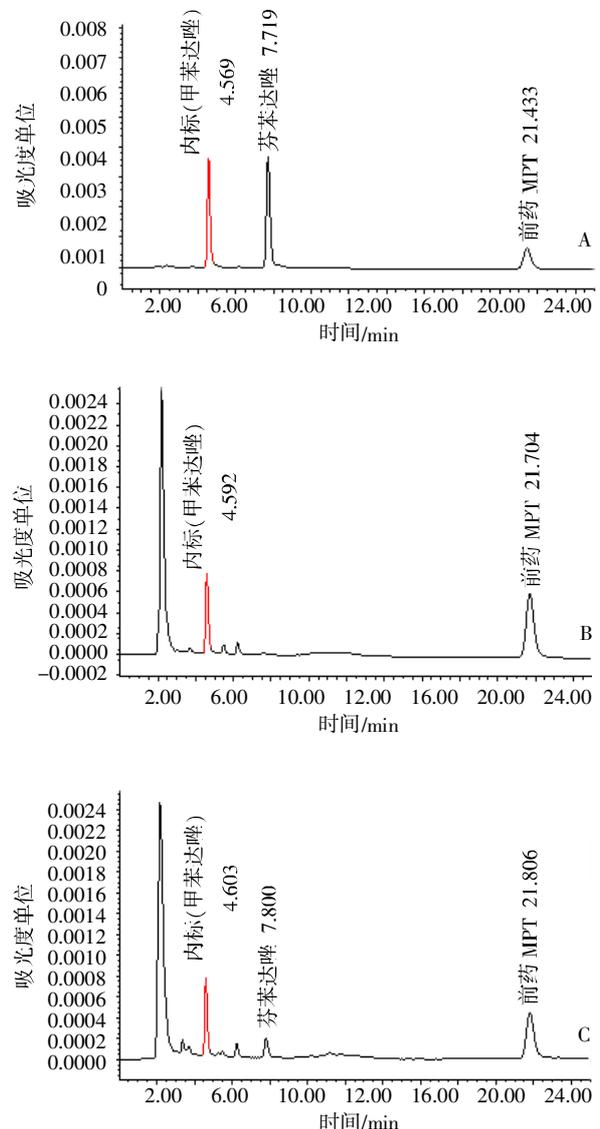
芬苯达唑的测定:加入含相同摩尔数的芬苯达唑于各生物基质中,经提取分离并测定其含量,作为目标代谢物芬苯达唑的含量测定基准。各时间点测定的芬苯达唑含量转换为生成的摩尔百分数。

1.4 前药体外抗细粒棘球蚴原头节活性 按 Walker 等^[19]和 Elisondo 等^[20]的方法体外培养细粒棘球蚴原头节。在 96 孔培养板中培养,每孔原头节约 50 个,其中 3 孔加入前药 MPT (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$),观察原头节的活动和体表损害情况。药物作用后 3 d,美兰染色,观察原头节的死亡率。

2 结果

2.1 前药 MPT 和芬苯达唑前药的方法学验证 MPT 和目标代谢物芬苯达唑在 0.05~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 内呈良好的线性关系,相关系数分别为 0.999 7 和 0.999 8,定量限和检测限分别为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。两种化合物在 3 个浓度水平的回收率为 96%~106%,日间和日内精密度的均 $<$ 4%。方法学验证结果表明,该方法专属性、灵敏度和精密度均能满足本研究要求。

2.2 前药在人工胃液、人工肠液和小鼠肝脏匀浆中的代谢 MPT 在人工胃液和人工肠液中未发生预期转化,在肝脏匀浆中代谢为目标化合物芬苯达唑(图 1),最大代谢率为 7.92%(图 2)。



A: 前药 MPT; B、C: 分别为 MPT 加入肝脏匀浆 0 h 和 4 h。

图 1 MPT 的 HPLC 图谱

2.3 前药 MPT 体外抗细粒棘球蚴原头节活性 以 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度作用于原头节, 作用后 3 d, 原头节死亡率为 45.9%。

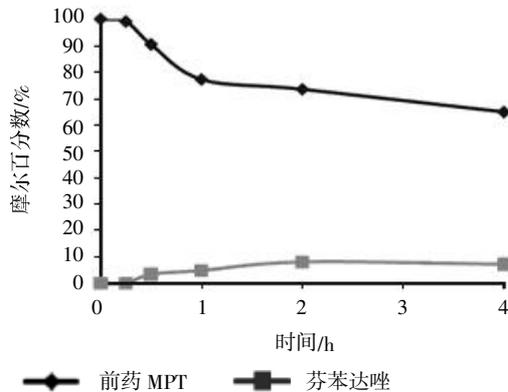


图 2 MPT 在肝脏匀浆中的代谢

3 讨论

除了传统的动物实验以外, 一些体外实验技术亦用于新药的研发筛选, 如组合给药技术、代谢预测模型和体外肝代谢研究等, 这些技术的应用将有助于药物代谢及动力学的筛选, 尤其是几种技术的联合应用将大大加快新药研发的进程。本研究构建体外代谢模型用于前药代谢的初步评价, 实验中选择 3 种生物基质进行前体药物的体外代谢研究, 结果表明, 在肝脏匀浆中发生了预期的代谢转化, 提示该前体药物在体内有可能通过肝脏代谢成芬苯达唑。此外, 本研究采取摩尔生成和减少率来对前药和母药的代谢进行定量分析, 在选取的 6 个时间点中, 2 h 时可观察到芬苯达唑浓度最高, 但 4 h 时有所下降。由于芬苯达唑易代谢为奥芬达唑^[21, 22], 所以推测其浓度的下降与进一步代谢有关。初步试验的结果表明, 前药 MPT 在体外具有一定的抗原头节活性。有关该类开环化合物值得进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Müller CE. Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility [J]. Chem Biodivers, 2009, 6(11): 2071-2083.
- [2] Stella VJ, Borchardt RT, Hageman M, et al. Prodrugs: Challenges and Rewards[M]. USA: Springer, 2007, XVII: 10-12.
- [3] Kyle LE. Fenbendazole formulations[P]. USA, WO/1995/013065. 1995-05-18.
- [4] Testa B. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps [J]. Curr Opin Chem Biol, 2009, 13(3): 338-344.
- [5] Hinz E. Fenbendazole therapy of experimental larval echinococcosis. I. The effect of fenbendazole on worm burden and proto-scolex development of *Echinococcus multilocularis*(author's translation)[J]. Zentralbl Bakteriolog Orig A, 1978, 240 (4): 542. (in German)
- [6] Blanton RE, Wachira TM, Zeyhle EE, et al. Oxfendazole treatment for cystic hydatid disease in naturally infected animals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42 (3): 601-605.
- [7] Dueger EL, Moro PL, Gilman RH. Oxfendazole treatment of sheep with naturally acquired hydatid disease [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(9): 2263-2267.
- [8] Selzer PM. Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery: from Molecular Targets to Drug Candidates [M]. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009: 1-6.
- [9] 蒋次鹏, 钟惠澜. 芬苯达唑治疗 9 例棘球蚴病的初步观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1988, 6(3): 232.
- [10] Schantz PM, Bossche H, Eckert J. Chemotherapy for larval echinococcosis in animals and humans: report of a workshop[J]. Parasitol Res, 1982, 67 (1): 5-26.
- [11] Hernández-Luis F, Castillo R, Yépez-Mulia L, et al. Preparation of N-methoxycarbonyl-N'-[2-nitro-4 (5)-propylthiophenyl] thiourea as prodrugs of albendazole [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1996, 6 (18): 2231-2236.
- [12] Yépez-Mulia L, Morales-Hurtado R, Viveros-Guzmán NI, et al. Evaluation of albendazole prodrugs in experimental trichinellosis [J]. Arch Med Res, 1999, 30(5): 368-374.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 85.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 177.
- [15] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 184-185.
- [16] Sparidans RW, Vlaming MLH, Lagas JS, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for sorafenib and sorafenib-glucuronide in mouse plasma and liver homogenate and identification of the glucuronide metabolite [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(3): 269-276.
- [17] An G, Morris ME. HPLC analysis of mitoxantrone in mouse plasma and tissues: Application in a pharmacokinetic study[J]. J Pharmaceut Biomed, 2010, 51(3): 750-753.
- [18] 孔亮. 体外代谢用于中药活性成分筛选的研究 [D]. 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所), 2005.
- [19] Walker M, Rossignol JF, Torgerson P, et al. In vitro effects of nitazoxanide on *Echinococcus granulosus* proto-scolexes and metacystodes[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(3): 609-616.
- [20] Elissondo MC, Ceballos L, Alvarez L, et al. Flubendazole and ivermectin in vitro combination therapy produces a marked effect on *Echinococcus granulosus* proto-scolexes and metacystodes [J]. Parasitol Res, 2009, 105(3): 835-842.
- [21] Prichard R, Hennessy D, Steel J, et al. Metabolite concentrations in plasma following treatment of cattle with five anthelmintics[J]. Res Vet, 1985, 39(2): 173.
- [22] Lanusse C, Gascon L, Prichard R. Comparative plasma disposition kinetics of albendazole, fenbendazole, oxfendazole and their metabolites in adult sheep [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1995, 18 (3): 196-203.

(收稿日期: 2012-05-09 编辑: 杨频)