

## 研究论文

## 抗痫灵在大鼠肝脏中代谢的研究

董善年 白芳\* 杨慧君\*\* 楼雅卿 梁伟升

(北京医科大学, 北京 100083)

**提要** 用离体大鼠肝脏灌流法,研究了抗痫灵在肝脏灌流过程中的代谢规律。用高效液相色谱法由灌流液中分离、制备得到了两种代谢物,经紫外吸收光谱与质谱鉴定,确定代谢物的结构为3,4-次甲基二氧桂皮酰羟基吡啶及阿魏酰吡啶,后者经化学合成得到了进一步的确定。本文还研究了肝循环过程中抗痫灵的代谢动力学,揭示了大部份抗痫灵以原形结合贮存于肝脏中。

**关键词** 抗痫灵; 肝脏灌流; 药物代谢; 高效液相色谱法; 3,4-次甲基二氧桂皮酰羟基吡啶; 阿魏酰吡啶

抗痫灵(3,4-次甲基二氧桂皮酰羟基吡啶)为一新型抗癫痫药物,临床及动物实验确定有抗惊厥作用和抗多种类型的癫痫作用<sup>(1,2)</sup>。我们曾报道抗痫灵在大鼠及犬的药代动力学规律<sup>(3,4)</sup>,并发现口服给药时有首过效应。为进一步研究其代谢,我们用离体大鼠肝脏循环灌流法研究了抗痫灵在肝脏中的代谢规律,用高效液相色谱法分离制取了两个代谢物并鉴定了其结构,还用高效液相色谱法研究了灌流过程中的药代动力学,说明了一些代谢过程中抗痫灵在体内的处置问题。

## 实验部分

## 一. 实验条件

高效液相色谱系统与前文所用一致<sup>(5)</sup>,只是色谱柱改为250 mm×4 mm(内径),填充 YWG-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>, 10 μm(天津化学试剂二厂)

离体大鼠肝脏灌流参照刘玉瑛等的一文<sup>(6)</sup>。蠕动泵为 RDB-IV 型(沙洲仪器仪表厂),乳胶管内径为 4.8 mm。灌流液为 Krebs-Henseleit 溶液(下简写 K-H 溶液)。药液灌流时用近饱和的抗痫灵的 K-H 溶液(500 ml K-H 溶液加入约 500 mg 抗痫灵,振摇 20 min 后滤过,配制后当天使用,抗痫灵浓度在 0.45 mg/ml 左右)。循环灌流,于不同时间吸取灌流液 2.0 ml,循环液总体积为 80 ml,灌流过程中保持灌流液及肝脏于 37°C,灌流液中通入氧气。大鼠选用 130~190 g 雄性大鼠。

抗痫灵及其代谢物的紫外吸收光谱用岛津 UV-260 分光光度计测定,质谱用 VG-ZAB-<sup>+</sup>HS 质谱仪测定。

## 二. 代谢物的分离与鉴定

将离体大鼠肝以抗痫灵近饱和的 K-H 溶液循环灌流,在 0, 5, 10, 30, 60 min 时取样,每份以乙酸乙酯提取三次,每次 1.5 ml,合并乙酸乙酯层,在 78~80°C 蒸干,用甲醇 100 μl 溶解后,进入高效液相色谱仪,每次 10 μl,记录色谱图。另做不含抗痫灵的 K-H 溶液灌流,

本文于 1988 年 1 月 13 日收到。

\* 药学院 1987 届毕业生

\*\* 药学院 1986 届毕业生

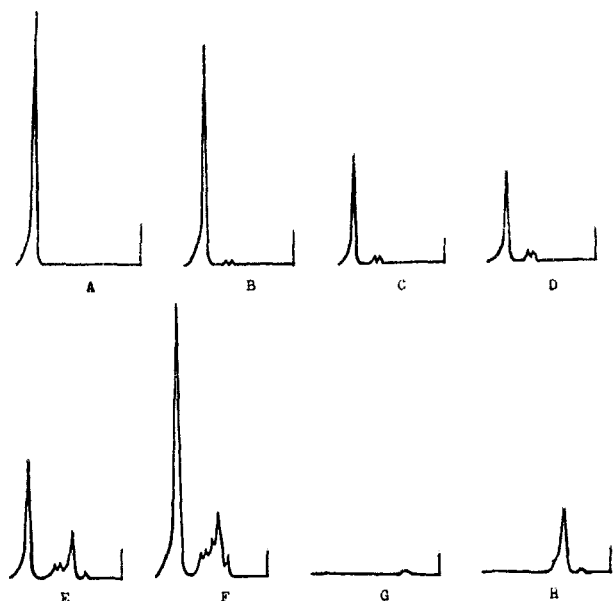


Fig 1. Chromatograms of antiepilepsine (AES) metabolism in isolated perfused rat liver: (A) Recirculating perfusion time 0 min, (B) 5 min, (C) 30 min, (D) 60 min, (E) Liver homogenate after 60 min of AES recirculating perfusion, (F) Liver homogenate after 60 min of AES recirculating perfusion and trypsin digestion, (G) Blank K-H solution after 60 min of recirculating perfusion, (H) Liver homogenate after 60 min of blank recirculating perfusion.

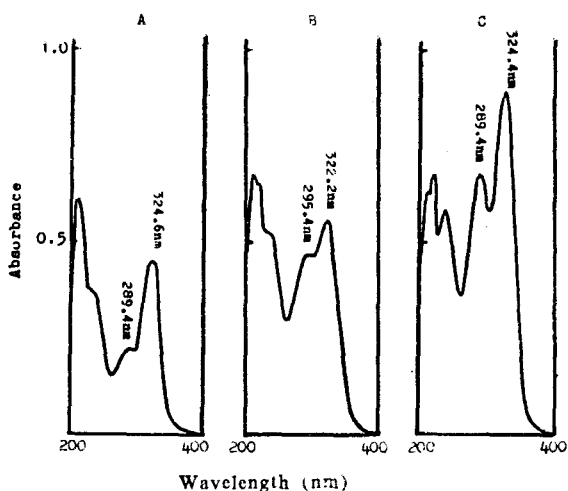


Fig 2. UV spectra of antiepilepsine (C), metabolite I (A) and metabolite II (B).

同法记录色谱图，以进行比较。可以见到，在灌流过程中逐渐产生两个代谢物（见图1），而用无药的K·H溶液灌流时则无此二峰，说明此二峰是抗痫灵的代谢产物。代谢物I保留时间为4.8 min，代谢物II保留时间为5.2 min。

经多次进样并分别收集此二峰，经浓缩蒸干，将浓缩物再溶于甲醇50  $\mu$ l中，重新进样，收集，得到精制的代谢物。将收集液测定两个代谢物的紫外吸收光谱，见图2。可以观察到它们的光谱与抗痫灵者很相似。若将此二代谢物的甲醇溶液在日光下曝晒，然后重新进样，则得到比原保留时间短的色谱峰。这与抗痫灵的性质

相同，即光照后可以转变成成为相应的顺式异构体<sup>(5)</sup>。这些现象说明，两个代谢物保留了抗痫灵的苯乙烯的基本结构。

将两次收集精制的代谢物蒸干，作质谱分析，得质谱图见图3。代谢物I分子离子峰的m/z为275，比抗痫灵分子离子峰的m/z大16，但两者都有m/z为175和145的碎片，它们来自次甲二氧桂皮酰基一侧。抗痫灵有一个m/z为84的碎片，而代谢物I则无此碎片，代之以m/z为100的碎片，质量数也是相差16。抗痫灵的m/z为84的碎片是

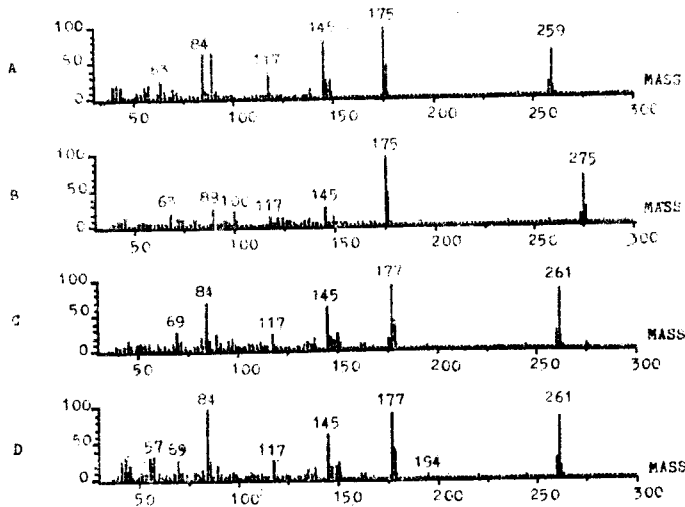


Fig 3. Mass spectra of antiepileptin (A), metabolite I (B), metabolite II (C) and synthesized standard sample of metabolite II (D).



说明代谢物 I 为抗痫灵的哌啶环上氧化的产物。哌啶的 N 与羧酸形成了酰胺，

不可能再形成氮氧化物，因此哌啶环氧化只可能是产生羟基化产物，其羟基的位置待定。代谢物 II 分子离子峰的  $m/z$  为 261，比抗痫灵分子离子峰的  $m/z$  259 大 2。两者都具有  $m/z$  为 84 的碎片，说明代谢物 II 与抗痫灵一样带有哌啶基。代谢物 II 的  $m/z$  为 177 的碎片相应地与抗痫灵  $m/z$  为 175 的碎片相差质量数 2，此碎片来自酰基一侧。如前所述，代谢物保留原有的苯乙烯结构，又根据药物代谢的一般规律，不可能是双键饱和后的产物。按类似药物的代谢行为<sup>(7)</sup>，可能是抗痫灵分子中次甲基二氧基第一步脱次甲基成邻苯二酚，第二步甲基化 3 位的酚羟基成阿魏酰哌啶。我们根据此推测，用阿魏酸与哌啶合成了阿魏酰哌啶，酰并与代谢物 II 作液相色谱保留时间及质谱的对照，结果完全一致，证明了代谢物 II 为阿魏哌啶。

### 三. 离体大鼠肝灌注过程中抗痫灵的代谢动力学

在离体大鼠肝灌注过程中，循环液中抗痫灵浓度随时间而降低，作动力学处理符合一级消除动力学， $k=0.0157 \pm 0.0043 \text{ min}^{-1}$ ， $t_{1/2}=46.7 \pm 11.9 \text{ min}$ ，(n=6)，参见表 1，但循环液中代谢物增量少(参看图 1)，无法补偿抗痫灵的减少量。

Tab 1. Pharmacokinetics parameters and recovery of antiepileptin in isolated perfused rat liver

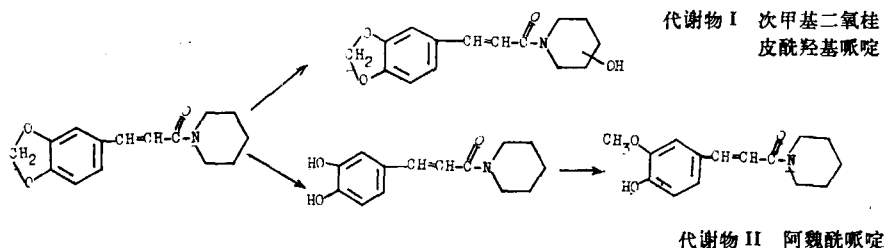
Experiment	$k, \text{min}^{-1}$	$t_{1/2}, \text{min}$	$C_0, \text{mg/ml}$	$r$	Recovery (%)	Digest.
1	0.0218	31.8	0.025	0.9431	50.0	no
2	0.0196	35.4	0.024	0.9678	68.2	no
3	0.0163	42.5	0.070	0.9666	72.7	no
					93.5	yes
4	0.0126	55.0	0.074	0.9667	95.8	yes
5	0.0129	53.7	0.174	0.9492	99.9	yes
6	0.0112	61.8	0.143	0.9995	96.3	yes
Average	0.0157	46.7				
	$\pm 0.0043$	$\pm 11.9$				

由于灌流过程中抗痫灵减少量与代谢物增加量不相关, 我们灌流后的肝脏制成匀浆, 用乙酸乙酯提取, 可测得较大浓度的抗痫灵(见图1), 但还不足以补偿抗痫灵减少量, 回收率在50~72.7%之间(见表1)。若用胰蛋白酶消化肝匀浆后提取<sup>(8)</sup>, 则回收率达93~99.1%, 参见图1与表1。这说明抗痫灵以较牢固的状态结合、贮留于肝脏中。

## 讨 论

本研究表明抗痫灵通过离体大鼠肝灌流时, 使抗痫灵浓度明显下降, 但只有少量代谢物生成, 胰蛋白酶消化肝匀浆的实验说明, 抗痫灵药浓下降的主要原因是原形药物以较牢固的状态结合、贮留于肝脏中, 而抗痫灵在肝内代谢并非药浓下降的主要原因。张远等发现口服抗痫灵时具有明显的首过效应<sup>(9)</sup>, 本研究的结果可以说明抗痫灵首过效应的原因。

抗痫灵在肝内以两条途径进行生物转化, 其一是抗痫灵的吗啉基被羟基化, 为一级代谢, 另一条途径是次甲二氧基的去次甲基的一级代谢, 随即进行甲基化的二级代谢。



我们以整体大鼠口饲抗痫灵, 在血液中也观察到相同的代谢物。

## 参 考 文 献

1. 裴印权, 等. 抗痫灵的药理研究. 中华医学杂志 1978; 59:216.
2. 北京医学院附属人民医院内科癫痫门诊. 抗痫灵治疗癫痫 73 例的疗效观察. 中华内科杂志 1977; 新 2:321.
3. 董善年, 等. 高压液相色谱法测定血浆与脑匀浆中抗痫灵的浓度. 北京医学院学报 1983; 15:330.
4. 楼雅卿, 等. 一次口服抗痫灵的药动力学研究. 同上 1984; 16:267.
5. 董善年, 等. 高效液相色谱法用于抗痫灵光化学动力学研究. 药学报 1987; 22:360.
6. 刘玉球, 等. 离体肝灌流方法及其活性的鉴定. 卫生研究 1984; 13:1.
7. Testa B and Jenner P. Chemical aspects of drug metabolism. Phase I reactions. Phase II reactions. In: *Drug Metabolism: Chemical and Biological Aspects*. New York and Basel: Marcel Dekker Inc., 1976:101-174.
8. 曾苏, 等. 酶增殖消化法测定血和肝中的安眠镇静类药物. 药物分析杂志 1987; 7:209.
9. 张远, 等. 抗痫灵的消除动力学及体内处置. 北京医科大学学报 1988; 20:175.

## STUDIES ON THE METABOLISM OF ANTIEPILEPSERINE IN ISOLATED PERFUSED RAT LIVER

SN Dong, F Bai, HJ Yang, YQ Lou and WS Liang

(Beijing Medical University, Beijing 100083)

**ABSTRACT** The metabolism of antiepilepsierine, 3,4-methylene dioxycinnamyl piperidine, was studied in isolated perfused rat liver. Two metabolites were separated and purified by means of HPLC. They were identified as 3,4-methylene dioxycinnamyl hydroxypiperidine and 4-hydroxy-3-methoxycinnamyl piperidine by UV and MS. The latter was further confirmed by chemical synthesis. The pharmacokinetics of antiepilepsierine in isolated perfused liver was also studied. Parameters obtained include a first order elimination constant,  $k=0.0157\pm 0.0043\text{ min}^{-1}$ , and a half-life,  $t_{1/2}=46.7\pm 11.9\text{ min}$ , ( $n=6$ ). The amount of antiepilepsierine lost during the perfusion could not be compensated by the increased amount of metabolites. Antiepilepsierine was found to be tightly bound and stored in the liver. This might be one of the explanations of the first pass effect of antiepilepsierine after oral administration.

**Key words** Antiepilepsierine (3,4-methylene dioxycinnamyl piperidine); Isolated perfused liver; Drug metabolism; HPLC; 3,4-Methylene dioxycinnamyl hydroxypiperidine; 4-Hydroxy-3-methoxycinnamyl piperidine