

反式曲马朵在大鼠肝微粒体 O 去甲基代谢中的立体选择性

王 娜, 刘会臣*, 刘长锁, 侯艳宁

(白求恩国际和平医院临床药理室, 河北 石家庄 050082)

摘要: 目的 研究反式曲马朵 O 去甲基代谢的立体选择性。方法 高效毛细管电泳法测定大鼠肝微粒体孵育液中反式曲马朵和 O 去甲基曲马朵对映体的浓度, 酶促动力学方法研究 O 去甲基曲马朵对映体的生成。结果 (-)-O 去甲基曲马朵生成有较大的 V_{max} ; 反式曲马朵两对映体间存在相互作用, 使 (+)-O 去甲基曲马朵生成的 V_{max} 明显减慢; 奎宁及奎尼丁对 (+)-O 去甲基曲马朵生成的抑制作用较强。结论 反式曲马朵 O 去甲基代谢有立体选择性, 对映体间的相互作用及酶抑制剂使其立体选择性程度加强。

关键词: 反式曲马朵; 肝微粒体; 高效毛细管电泳; 酶促动力学

中图分类号: R971.1; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)03-0169-06

反式曲马朵[*trans* tramadol, (±)-*trans*-T]是一种新型中枢镇痛剂, 以外消旋体盐酸盐供药用。(±)-*trans*-T 在肝内代谢, 主要生成 O 去甲基曲马朵(O de methyltramadol, M_1)和 N-去甲基曲马朵等 5 种 I 相代谢物^[1]。 M_1 是唯一的活性代谢物, 有药效学立体选择性: (+)- M_1 有较强的激活 μ 阿片受体的作用, 与阿片受体的亲和力是母体药的 4 ~ 200 倍, 镇痛强度是母体药的 2 ~ 4 倍; 而 (-)- M_1 无药理活性, 在体内不发挥效应^[2,3]。以前的研究表明, M_1 的体内过程有立体选择性, 这一现象可能与 (±)-*trans*-T 肝脏代谢有立体选择性有关^[4]。目前已经证实: (±)-*trans*-T O 去甲基代谢是由细胞色素氧化酶 P4502D6 介导的, 该酶的显著特征是有遗传多态性, 是引起药物代谢个体差异的主要原因^[5]; 人 *po* 盐酸 (±)-*trans*-T 后, 个体间 P4502D6 酶活性的不同可导致血中 (+)- M_1 的浓度有明显差异, 从而直接影响镇痛效果的产生^[6]。因此, 对 (±)-*trans*-T O 去甲基代谢的立体选择性及其影响因素的探讨有重要意义。

本文用大鼠肝微粒体孵育法, 以高效毛细管电泳法 (HPCE) 测定孵育液中 (±)-*trans*-T 和 M_1 对映体的浓度, 研究了 (±)-*trans*-T O 去甲基代谢的立体选择性及其与酶活性的关系, 并通过酶促动力学

方法探讨了映体间的相互作用和药酶抑制剂对其代谢立体选择性的影响。

材 料 和 方 法

试剂 盐酸 (±)-*trans*-T, 石家庄制药集团第一制药厂提供; 盐酸 (+)-*trans*-T, 盐酸 (-)-*trans*-T 及 M_1 , 德国 Grünenthal 公司惠赠; 盐酸顺式曲马朵 [(±)-*cis*-T], 锦州医学院化学教研室合成; 磺丁基- β -环糊精(手性拆分剂), 中国科学院兰州化学物理研究所合成; 还原型辅酶 II (NADPH), 盐酸奎宁和盐酸奎尼丁一水合物均为美国 Sigma 公司产品。

仪器 DIA × 900 型电动细胞匀浆机, 德国 Heidolph 公司; 80P-7 型超速离心机, 日本 Hitachi 公司; P/ACE 5000 型 HPCE, 配紫外检测器及 GOLD 色谱软件, 未涂层石英毛细管 37 cm × 75 μ m (有效长度 30 cm), 美国 Beckman 公司。

肝微粒体的制备及孵育条件 体重 200 ~ 250 g Sprague-Dawley δ 大鼠 12 只, 购自河北医科大学实验动物中心(动物等级: II 级; 合格证号: 04057), 禁食不禁水。12 h 后断头处死, 打开腹腔作门静脉插管, 用生理盐水灌注后取肝, 差速离心法制备肝微粒体^[7]。用 Lowry 等法测定微粒体蛋白含量, 以牛血清白蛋白为标准品^[8]。孵育体系总体积 250 μ L, 含微粒体蛋白 0.6 $g \cdot L^{-1}$, 三羟氨基甲烷 (Tris) 29 $mmol \cdot L^{-1}$, 浓盐酸调至 pH 7.4, $MgCl_2$ 6 $mmol \cdot L^{-1}$, 底物 (+)-*trans*-T, (-)-*trans*-T 或 (±)-*trans*-T, 及不同种类和浓度的抑制剂; 37 °C 预孵 3 min 后, 加入 4 $mmol \cdot L^{-1}$ NADPH 25 μ L 启动反应; 孵育 90 min 后,

收稿日期: 2001-06-18.

作者简介: 王 娜(1967 -), 女, 硕士, 现址: 秦皇岛市第一医院;

刘会臣(1963 -), 男, 主任药师, 硕士生导师.

* 通讯作者 Tel: (0311) 7998380, Fax: (0311) 3023466,

E-mail: lhcl@heinfo.net

加入 25% 氨水 10 μL, 并放于冰上终止反应。以上均做复管。

孵育液中样品的提取及测定 取孵育液 100 μL (高底物浓度样品提取前适当稀释), 加 1 μg·mL⁻¹ 盐酸(±)-*cis*-T 溶液(内标) 100 μL, 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 200 μL, 乙酸乙酯 5 mL, 充分混匀 2 min, 10 000 × g 离心 10 min, 取上清液 4 mL 于 40 °C 水浴上用氮气流吹干, 残渣用超纯水 200 μL 溶解, 取 30 μL 用 HPCE 法测定(±)-*trans*-T 和 M₁ 对映体的浓度^[9]。

数据分析 孵育液中(±)-*trans*-T 和 M₁ 对映体浓度用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以孵育液中 M₁ 对映体浓度除以孵育时间表示 M₁ 对映体的生成速率。根据 Eadie-Hofstee 方程 $V = V_{max} + K_m [V/S]$, 对数据用最小二乘法线性回归, 计算酶动力学参数 K_m (米氏常数)、V_{max} (最大反应速率) 和 Cl_{int} (肝内清除率, Cl_{int} = V_{max}/K_m)。抑制性研究用 Dixon 作图法判断抑制

类型, 并计算抑制常数 K_i (根据 Dixon 图, 不同底物浓度时直线交点的横坐标即为 -K_i 值)。

结 果

1 M₁ 生成的立体选择性及其与酶活性的关系

12 只大鼠肝微粒体(RL₁ ~ RL₁₂) 分别与(±)-*trans*-T(25 μmol·L⁻¹) 孵育后, 所有样品孵育液中(-)-M₁ 的浓度明显高于(+)-M₁, (-)-M₁/(+)-M₁ 比值平均为 5.3 (表 1)。说明在大鼠肝微粒体中(±)-*trans*-T 的 O 去甲基代谢有立体选择性, 优先代谢(-)-*trans*-T, 生成高浓度的(-)-M₁。此外, 以孵育液中 M₁ 与(±)-*trans*-T 浓度的比值(M₁/T) 作为(±)-*trans*-T O 去甲基化的代谢酶活性指标, 对 M₁/T 与(-)-M₁/(+)-M₁ 进行了相关性检验, $r = -0.4728$ ($P > 0.05$), 表明酶活性与 M₁ 生成的立体选择性无明显的相关性。

Table 1 Mean concentrations and enantiomeric ratios of (±)-*trans* tramadol [(±)-*trans*-T] and O-demethyltramadol (M₁) in incubates after incubating (±)-*trans*-T (25 μmol·L⁻¹) with rat liver microsomes *in vitro*

Concentration/μg·mL ⁻¹				Ratio	
(+)-M ₁	(-)-M ₁	(+)- <i>trans</i> -T	(-)- <i>trans</i> -T	(-)-M ₁ /(+)-M ₁	M ₁ /T
0.21 ± 0.04	1.07 ± 0.16 ^{***}	1.86 ± 0.21	0.93 ± 0.19 ^{***}	5.3 ± 0.9	0.49 ± 0.09

$n = 12, \bar{x} \pm s, \text{***} P < 0.001$ compared with (+)-enantiomer by paired *t* test

2 酶动力学实验结果

以 7 个不同浓度的(-)-*trans*-T 及(+)-*trans*-T 为底物(两对映体浓度一致, 浓度范围 2.5 ~ 100 μmol·L⁻¹) 分别与 3 只大鼠肝微粒体(RL₇, RL₉, RL₁₂) 孵育后, 得到底物浓度-M₁ 对映体生成速率图(图 1A), 相应的 Eadie-Hofstee 图(图 2) 及酶动力学常数(表 2)。结果表明: M₁ 对映体生成的 Eadie-Hofstee 图均呈良好的线性, 可以确定为单酶催化; (-)-M₁ 与(+)-M₁ 生成的 K_m 值一致, 而 V_{max} 和 Cl_{int} 有显著差异, (-)-M₁ 的 V_{max} 比(+)-M₁ 的 V_{max}

约大 1 倍, 表明 M₁ 对映体的生成是由同一个酶以不同速率代谢的, 存在较强的立体选择性。以消旋体为底物(浓度范围 2.5 ~ 100 μmol·L⁻¹) 分别与肝微粒体孵育后, (-)-M₁ 的生成速率基本不变, (+)-M₁ 的生成速率明显减慢(图 1B); 酶动力学参数显示两对映体的 K_m 均有所增加, (-)-M₁ 的 V_{max} 略有增加, (+)-M₁ 的 V_{max} 显著降低, (-)-M₁ 与(+)-M₁ 的 V_{max} 比值从 1.7 (50.6/29.3) 增加至 4.7 (59.3/12.5), 表明(±)-*trans*-T 对映体之间存在相互作用。

Table 2 Kinetic parameters for the formation of O-demethyltramadol (M₁) from the enantiomers of (±)-*trans* tramadol [(±)-*trans*-T] in three rat liver microsomes *in vitro*

Sample No	K _m /μmol·L ⁻¹		V _{max} /pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹		Cl _{int} /mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹	
	(+)-M ₁	(-)-M ₁	(+)-M ₁	(-)-M ₁	(+)-M ₁	(-)-M ₁
RL ₇ [#]	39.4	43.9	12.5	59.3	0.3	1.4
RL ₇	33.3	30.0	29.3	50.6	0.9	1.7
RL ₉	42.9	44.7	33.3	57.8	0.8	1.3
RL ₁₂	37.5	37.8	30.6	53.1	0.8	1.4
$\bar{x} \pm s$ ^Δ	38 ± 5	38 ± 7	31.1 ± 2.0	54 ± 4 ^{**}	0.80 ± 0.10	1.50 ± 0.20 [*]

[#] The substrate was the racemate of (±)-*trans*-T; ^Δ Not including the values of RL₇[#]; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with (+)-enantiomer by paired *t* test

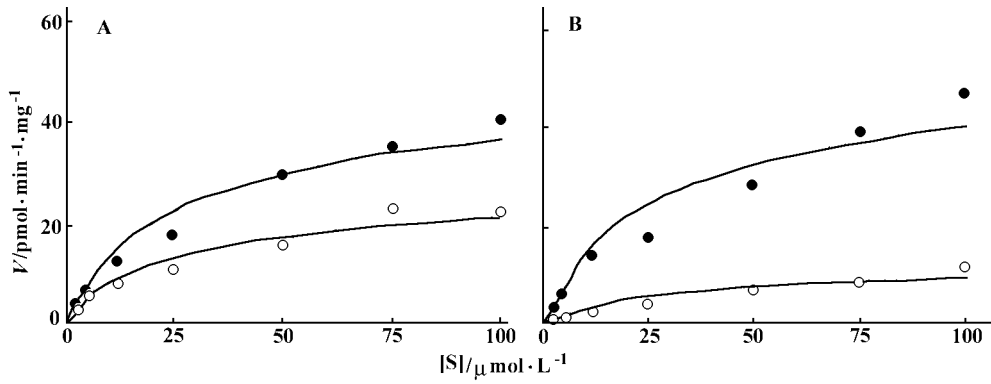


Figure 1 Plot of substrate concentrations *vs* the velocities for the formation of *O*-de methyltramadol (M₁) from the enantiomers of (±)-*trans* tramadol [(±)-*trans*-T] (A) or the race mate of (±)-*trans*-T (B) in rat liver microsomes (RL₇). Each point represents the mean of duplicate determinations. • (-)-M₁ formation; ○ (+)-M₁ formation

3 奎宁及奎尼丁对 *O*-去甲基曲马朵生成的抑制作用

以奎宁及奎尼丁为抑制剂,分别加入(+)-*trans*-T或(-)-*trans*-T与肝微粒体的孵育体系中,所得数据绘制 Dixon 图(图 3,4)及抑制作用曲线(图 5)。结果表明:奎宁和奎尼丁对 M₁ 对映体的生成均有抑制作用,抑制类型均为竞争性抑制;奎宁和奎尼丁抑制(+)-M₁ 生成的 K_i 分别为 0.8 和 3.4 μmol·L⁻¹,抑制(-)-M₁ 生成的 K_i 分别为 1.6 和 10.8 μmol·L⁻¹,均远小于(+)-M₁ 和(-)-M₁ 生成的 K_m 值(表 2),说明它们均是强效抑制剂,且奎宁的抑制作用较奎尼丁强;在所使用的底物及抑制剂浓度范围内,奎宁和奎尼丁均对(+)-M₁ 生成的抑制程度较强(图 5),提示它们对 M₁ 生成的抑制作用具有立体选择性;奎宁抑制(-)-M₁ 与(+)-M₁ 生成的 K_i 比值为 2.0(1.6/0.8),奎尼丁抑制(-)-M₁ 与(+)-M₁ 生成的 K_i 比值为 3.2(10.8/3.4),表明奎尼

丁抑制 M₁ 生成的立体选择性较奎宁强。

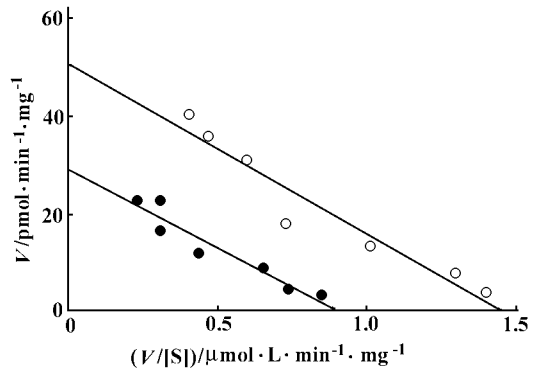


Figure 2 Eadie-Hofstee plot for the formation of *O*-de methyltramadol (M₁) from (±)-*trans* tramadol [(±)-*trans*-T] in rat liver microsomes (RL₇)
○: (-)-M₁ formation when the substrate was (-)-*trans*-T; •: (+)-M₁ formation when the substrate was (+)-*trans*-T. Each point represents the mean of duplicate determinations

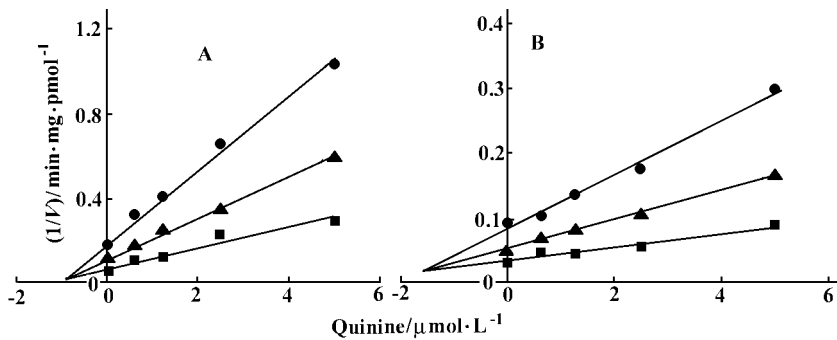


Figure 3 Dixon plots analysing the inhibitory effects of quinine on *O*-de methylase activity in rat liver microsomes (RL₁₂)

A: The substrate was (+)-*trans* tramadol [(+)-*trans*-T]; B: The substrate was (-)-*trans*-T. The high (■), median (▲) and low (●) concentrations were 50, 25 and 12.5 μmol·L⁻¹, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations

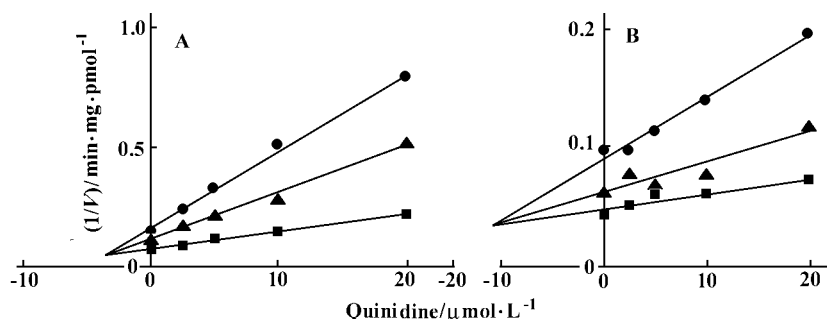


Figure 4 Dixon plots analysing the inhibitory effects of quinidine on *O*-demethylase activity in rat liver microsomes (RL₁₂)

A: The substrate was (+)-*trans* tramadol [(+)-*trans*-T]; B: The substrate was (-)-*trans*-T. The high (■), median (▲) and low (●) concentrations were 50, 25 and 12.5 μmol·L⁻¹, respectively. Each point represents the mean of duplicate determinations

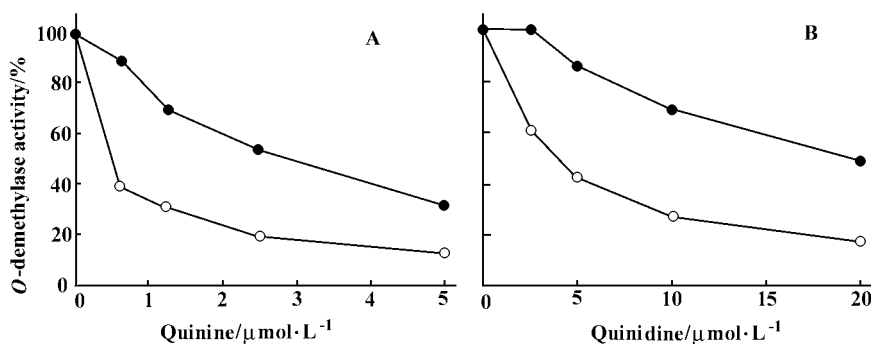


Figure 5 Effects of quinine and quinidine on the *O*-demethylase activity when 12.5 μmol·L⁻¹ of (+)-*trans* tramadol [(+)-*trans*-T] (○) or (-)-*trans*-T (●) was incubated with rat liver microsomes (RL₁₂). The effect of each inhibitor was compared with the control values determined by incubating the enantiomers of (±)-*trans*-T alone and expressed as the percentage of control values. Each point represents the mean of duplicate determinations

讨 论

有关(±)-*trans*-T肝脏代谢立体选择性的研究,目前只有一篇文献报道。Paar等^[10]分别以(+)-*trans*-T和(-)-*trans*-T与人肝微粒体孵育,发现(±)-*trans*-T的*O*-去甲基途径有立体选择性,(-)-M₁和(+)-M₁生成的V_{max}分别为210和125 pmol·min⁻¹·mg⁻¹,K_m值均为210 μmol·L⁻¹。本文用相同孵育条件,以大鼠肝微粒体进行实验,结果亦表明(±)-*trans*-T的*O*-去甲基途径有较强的立体选择性,优先代谢(-)-*trans*-T,生成高浓度的(-)-M₁。说明M₁生成立体选择性的方向在人与大鼠间不存在种属差异。目前已经证实,在大鼠体内与人P4502D6相对应的代谢酶为P4502D1,但二者在结构及功能上的差异还有待研究^[11]。此外,比较本文与上述文献结果可以发现:P4502D6在人肝微粒体催化(±)-*trans*-T*O*-去甲基代谢的K_m和V_{max}与

P4502D1在大鼠肝微粒体催化这一代谢的相应值有很大差异,这是否源于二者催化效应的不同还有待进一步研究证实。

手性药物在代谢过程中出现的立体选择性,可能是由于对映体由不同代谢酶催化的不同途径所致,也可能是由同一种酶以不同速率代谢所致。在后一种情况下,对映体可以竞争同一代谢酶,从而发生对映体间的相互抑制作用。本文以消旋体为底物孵育后,发现(±)-*trans*-T的*O*-去甲基代谢过程存在这种相互作用。表现为(-)-*trans*-T抑制(+)-*trans*-T的*O*-去甲基代谢;(-)-M₁的生成速率没有明显变化,(+)-M₁的生成速率显著降低,从而使(±)-*trans*-T的*O*-去甲基代谢立体选择性的程度加强。由于(+)-M₁具有较高的药理活性,这种相互作用可能会影响(±)-*trans*-T的临床疗效。

奎宁和奎尼丁互为对映体,对许多由P4502D6(在大鼠体内为P4502D1)参与代谢的药物可产生竞

竞争性抑制,却不是该酶的底物^[12,13];而且二者对酶的抑制具有种属和立体特异性,其中奎宁是大鼠 P4502D1 的特异性抑制剂,奎尼丁是人类 P4502D6 的特异性抑制剂^[14]。本文结果亦支持这一观点,表现为奎宁抑制 M_1 两对映体生成的 K_i 值远小于奎尼丁的相应值,说明手性药物对药酶的作用具有立体选择性。此外,本文还发现奎宁和奎尼丁对(±)-*trans*-T O 去甲基代谢的抑制作用也具有立体选择性,均主要抑制(+) - M_1 的生成。

药物代谢酶的遗传多态性会影响某些手性药物在人群中代谢的立体选择性,如美多洛尔 美芬妥因在弱代谢个体中的立体选择性消失或与强代谢者相反^[15,16]。我们以前研究也发现,大鼠 ip 盐酸(±)-*trans*-T (文章待发表) 及人 po 盐酸(±)-*trans*-T 后^[4],血中(-) - M_1 / (+) - M_1 比值均有较大个体差异,大于 1 者较多。本文结果未能证实(±)-*trans*-T O 去甲基代谢的立体选择性与代谢酶活性呈相关性。其原因可能是本文所用的大鼠 P4502D1 酶活性较为接近($M_1/T = 0.49 \pm 0.09$);此外,体内 M_1 立体选择性的个体差异也可能是肝外因素所致。对 M_1 生成立体选择性是否与遗传多态性有关值得进一步探讨。

REFERENCES:

- [1] Lintz W, Erlacin S, Frankus E, *et al.* Biotransformation of tramadol in man and animal [J]. *Arzneimittelforsch*, 1981, **31**(11):1932 - 1943.
- [2] Hennies HH, Friderichs E, Schneider J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids [J]. *Arzneimittelforsch*, 1988, **38**(7):877 - 880.
- [3] Lai J, Ma S, Porreca F, *et al.* Tramadol, M_1 metabolite and enantiomer affinities for cloned human opioid receptors expressed in transfected HN9.10 neuroblastoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, **316**(2 - 3):369 - 372.
- [4] Liu HC, Yang YY, Liu TJ, *et al.* Pharmacokinetics of the enantiomers of O-demethyltramadol, the active metabolite of *trans* tramadol in healthy subjects [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2000, **9**(2):151 - 154.
- [5] Paar WD, Poche S, Gerloff J, *et al.* Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, **53**(3 - 4):235 - 239.
- [6] Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brosen K, *et al.* The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, **60**(6):636 - 644.
- [7] Zhang JT. *Modern Experimental Methods in Pharmacology* (现代药理实验方法) [M]. Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1996. 1643 - 1644.
- [8] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265 - 275.
- [9] Liu HC, Hou YN, Liu TJ, *et al.* Stereoselectivity in pharmacokinetics of the enantiomers of *trans* tramadol [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2000, **35**(1):40 - 43.
- [10] Paar WD, Frankus P, Dengler HJ. The metabolism of tramadol by human microsomes [J]. *Clin Investig*, 1992, **70**(8):708 - 710.
- [11] Laurenzana EM, Sorrels SL, Owens SM. Antipeptide antibodies targeted against specific regions of rat CYP2D1 and human CYP2D6 [J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, **23**(2):271 - 278.
- [12] Brosen K, Davidsen F, Gram LF. Quinidine kinetics after a single oral dose in relation to the sparteine oxidation polymorphism in man [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, **29**(2):248 - 253.
- [13] Wanwimolruk S, Chalcraft S. Lack of relationship between debrisoquine oxidation phenotype and the pharmacokinetics of quinine [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, **32**(5):617 - 620.
- [14] Tu ZG, Zhao LL. Inhibitory effects of quinidine and quinine on liver microsome oxidation enzymes in man and rat [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, **17**(6):541 - 544.
- [15] Lennard MS, Tucker GT, Woods HF, *et al.* Stereoselective metabolism of metoprolol in caucasians and nigerians-relationship to debrisoquine oxidation phenotype [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1989, **27**(5):613 - 616.
- [16] Meier UT, Dayer P, Male PJ, *et al.* Mephenytoin hydroxylation polymorphism: characterization of the enzymatic deficiency in liver microsomes of poor metabolizers phenotyped *in vivo* [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1985, **38**(5):488 - 494.

STERESELECTIVITY IN *O* DEMETHYLATION OF *TRANS* TRAMADOL IN RAT LIVER MICROSOMES *IN VITRO*

WANG Na, LIU Hui-chen, LIU Chang-suo, HOU Yan-ning

(Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the stereoselectivity in *O* demethylation of *trans* tramadol. **METHODS** With or without quinine and quinidine as inhibitors, rat liver microsomes were incubated *in vitro* with the enantiomers or the racemate of *trans* tramadol. The concentrations of the enantiomers of *trans* tramadol and *O* demethyltramadol in the incubates were determined by high performance capillary electrophoresis. The *O* demethylation processes were assayed by using the enzyme kinetic analysis method. **RESULTS** After incubation, the concentrations of (-)-*O* demethyltramadol were higher than those of (+)-enantiomer in all rat liver microsomal incubates. Enzyme kinetic analysis showed that the K_m of the formation of the enantiomers of *O* demethyltramadol were similar; The V_{max} and C_{int} of the formation of (-)-*O* demethyltramadol were significantly higher than those of the formation of (+)-enantiomer. When the racemate of *trans* tramadol was used as the substrate, there was interaction between the two enantiomers. The K_m of the formation of the enantiomers of *O* demethyltramadol increased, the V_{max} of the formation of (+)-*O* demethyltramadol decreased, the V_{max} of the formation of (-)-*O* demethyltramadol increased slightly. The *O* demethylation of the enantiomers of *trans* tramadol was shown to be inhibited competitively by quinine and quinidine. The K_i of quinine and quinidine were 1.6 and 10.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to the formation of (-)-*O* demethyltramadol, 0.8 and 3.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to the formation of (+)-*O* demethyltramadol, respectively. Furthermore, quinine and quinidine were found to have stereoselective inhibition on the formation of *O* demethyltramadol, both mainly inhibited the formation of (+)-*O* demethyltramadol. **CONCLUSION** The *O* demethylation of *trans* tramadol was found to be stereoselective in rat liver microsomes *in vitro*, preferentially metabolized (-)-enantiomer. The stereoselectivity could be influenced by the interaction between the two enantiomers and the enzyme selective inhibitors.

KEY WORDS: *trans* tramadol; liver microsomes; high performance capillary electrophoresis; enzyme kinetic analysis