[2] Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatits[J]. Sernin Live Dis，2004，24：3-20.
[3] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志，2006，14：161-163.
[4] 黎永胜，文军. 白藜芦醇的药理作用研究进展[J]. 医学综述，2008，14(3)：469-471.
[5] 刘锋，向志钢，许继凡，等. 高脂饲料结合 CCl_4 诱导小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J]. 江苏医药，2010，36(1)：69-71.
[收稿日期]2010-11-11

舒芬太尼在体外人肝微粒体中代谢速率的测定

吴巧玲，王俊科，马虹，王玲玲　（中国医科大学附属第一医院麻醉科，辽宁 沈阳 110001）

[摘要]　目的：建立高效液相色谱法(HPLC)测定人肝脏微粒体中舒芬太尼的药物浓度，为进一步研究舒芬太尼的药物代谢提供新方法。方法：于人体肝组织微粒体孵育液中加入舒芬太尼，用 HPLC 测定孵育液中不同时点的舒芬太尼浓度，以芬太尼为内标，用正己烷-无水乙醇(19∶1)进行萃取，采用 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×200 mm，5 μm)，以乙腈-0.015 mol·L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液(31∶69，pH 3.0)为流动相，流速1.0 mL·min^{-1}，检测波长 205 nm，进样量 50 μL。结果：在0.125～3 mg·L^{-1} 范围内，舒芬太尼线性关系良好(r=0.999 5)，最低检测为0.1 mg·L^{-1}，回收率为90.66%～100.02%，24 例人肝脏微粒体中平均每毫克蛋白的舒芬太尼的代谢速率为(0.19±0.06)nmol·min^{-1}；舒芬太尼与内标芬太尼分离完全，不受微粒体内源性物质的干扰，保留时间分别为9.588 min 和4.765 min。结论：HPLC 检测体外孵育液中肝微粒体中的舒芬太尼灵敏度高，专一性强，适用于药物体外代谢速率的研究。

[关键词]　舒芬太尼；高效液相色谱；肝微粒体
[中图分类号] R917　[文献标识码] A　[文章编号] 1001-5213(2011)16-1342-03

Measurement of metabolic rate of sufentanil *in vitro* of human hepatic microsome

WU Qiao-ling，WANG Jun-ke，MA Hong，WANG Ling-ling (Departmental of Anesthesiology，the First Affiliated Hospital of China Medical University，Liaoning Shenyang 110001，China)

ABSTRACT：OBJECTIVE　To establish an HPLC method for determining the concentrations of sufentanil in human liver microsomes，and to provide a new way for investigating the metabolism of sufentanil. **METHODS**　Sufentanil in an incubation mixture with human liver microsomes was determined by high performance liquid chromatography(HPLC) at the different time points，to calculate the metabolic rate of sufentanil. Fentanyl was used as an internal standard. The samples were extracted by liquid-liquid extraction method using n-hexane and ethanol (19∶1). Sufentanil was determined by HPLC using of 0.015 mol·L^{-1} potassium，acetonitrile (31∶69，pH 3.0)was pumped at 1.0 mL·min^{-1} and the wavelength of detection was set at 205 nm，50 μL of sample was injected. **RESULTS**　The assay was linear over the range of 0.125－3 mg·L^{-1} for sufentanil (r=0.999 5)，the limit of detection was 0.1 mg·L^{-1}. The method afforded recoveries was 90.66%－100.02%. The metabolic rate of sufentanil in the twenty four cases of microsomes was (0.19±0.06) nmol·min^{-1}. On the condition of this study sufentanil was totally separated with internal standard fentanyl and suffered no endogenous material intervention. Retention time of sufentanil and internal standard fentanyl was 9.588 min and 4.765 min respectively. **CONCLUSION**　HPLC method is sensitive and specific to detect the metabolic rate of sufentanil in human hepatic microsome and helpful to investigate the metabolism of drugs *in vitro*.

KEY WORDS：sufentanil；high-performance liquid chromatography；hepatic microsomes

舒芬太尼(sufentanil，Suf)是芬太尼(fentanyl) *N*-4 位取代的衍生物，其化学和药理作用于 1976 年首次报导[1]。舒芬太尼是一种高选择性、高强度阿片受体激动剂[2]，在阿片类药物中其镇痛效应最强，起效时间短。舒芬太尼的分布容积小，清除半衰期短，清除率高，反复应用后很少蓄积[3]。舒芬太尼与 μ_1 受体的结合较芬太尼具有更高的选择性，镇痛作用约为芬太尼的 5～10 倍[2]，心血管系统功能稳定、无组胺释放。基于以上优点舒芬太尼广泛的应用于心胸外科、神经外科、腹部外科等复杂大手术，作为术前用药、神经阻滞的辅助药、麻醉镇痛药、诱导麻

[基金项目] 贝朗麻醉科学研究基金(2008 年 1 月)　[作者简介] 吴巧玲，女，博士，电话：024-83283100，E-mail：ling.1983.st@163.com　[通讯作者] 王玲玲，女，博士，主治医师，电话：024-83283100，E-mail：lwang030@hotmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

醉、麻醉维持、术后镇痛药及 ICU 中重症患者的镇静、镇痛药。目前，国内外主要通过监测患者血液[4-5]、尿液[6]等生物样品中的舒芬太尼浓度来研究舒芬太尼的药代、药效学，这不可避免的受到体内诸多因素的干扰，特别是配伍药物的影响。因此建立新的分析和检测方法对进一步研究舒芬太尼药动学及指导该药的合理应用十分重要。本实验建立了舒芬太尼在人体肝脏微粒体中的体外孵育代谢体系及应用 HPLC 检测微粒体中舒芬太尼药物浓度的分析方法，为舒芬太尼的体外代谢提供了新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪（Waters－600 泵，Waters－2487 紫外检测仪，Waters 脱气机）；UV300 紫外-可见光分光光度计（PYE-UNICAM/SPECTRONIC）。

1.2 药物与试剂 舒芬太尼对照品（纯度：99%，湖北宜昌人福药业有限责任公司）；芬太尼对照品（纯度：99.9%，湖北宜昌人福药业有限责任公司）；乙腈为色谱纯（山东禹王实业有限公司，规格：500 mL/瓶，批号 2010041306）；牛血清蛋白（规格：250 mg），6 磷酸葡萄糖（G6P，规格：1 g/瓶），6 磷酸葡萄糖脱氢酶（G6PDH，规格：500 U/瓶），NADP（规格：100 mg/瓶），均购于 Sigma 公司。

1.3 肝脏微粒体制备 人体肝组织来自中国医科大学附属第一医院肝血管瘤行部分切除病例。患者男 12 例，女 12 例，年龄 25～65 岁。均排除肝功能异常的病例，取直径为 1～2 cm 的正常肝脏组织（经 HE 染色证实），10 min 内液氮冰冻，－70 ℃冰箱保存备用。

通过差速离心法制备肝微粒体[7]。将微粒体沉淀板重悬于含 20%（v/v）甘油的 KCl（0.15 mol·L^{-1}）磷酸钾缓冲液（0.1 mol·L^{-1}，pH 7.4）中，置于－70 ℃冰箱内保存备用。用考马斯亮蓝法测微粒体内的蛋白含量。

1.4 孵育条件 孵育混合液包括 1 mg·mL^{-1} 微粒体稀释液 50 μL，100 mmol·L^{-1} 磷酸钾缓冲液 50 μL 和在聚乙烯试管中孵育过的 100 μL 底物（舒芬太尼 5 mg·L^{-1}），37 ℃水浴摇床先预孵育 3 min，反应从加入 1 mmol·L^{-1} NADPH 辅酶再生系统（0.5 mmol·L^{-1} NADP＋，5 mmol·L^{-1} G6P，2 U·mL^{-1} G6PDH，6 mmol·L^{-1} $MgCl_2$）100 μL 开始，分别孵育 0，5，15，30，60，90，120 min。各管中加入 100 μL 冷 NaOH（2 mol·L^{-1}）置－20 ℃冰箱终止反应。

1.5 样品处理及色谱条件 取终止反应的孵育混合液 300 μL，加入 2.5 μg·mL^{-1} 的芬太尼 50 μL，旋涡混合 10 s，最后加入 2 mL 正己烷-无水乙醇（19∶1，v/v），涡旋 5 min，3 500 g 离心 10 min，静置 10 min 后，移取上清液于 5 mL 玻璃试管中，于 35 ℃水浴上用氮气吹干。取 100 μL 流动相溶解残渣，涡旋混合 3 min，移至 1.5 mL 离心管中，1.2×10^4 g 离心 5 min，采用 Diamonsil C_{18} 色谱柱（4.6 mm×200 mm，5 μm），以乙腈-0.015 mol·L^{-1} KH_2PO_4 缓冲液（31∶69，v/v，pH 3.0）为流动相，流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 205 nm，取上清液 50 μL 进样。

1.6 标准曲线 精取空白微粒体孵育液 200 μL，分别精密加入 100 μL 舒芬太尼对照品的系列浓度，使之成 3 000，2 000，1 000，500，250，125 μg·L^{-1} 的含药液，每种浓度分别配置 3 份，涡旋混合 10 s。余下步骤同“1.5”项下操作。样品峰面积和内标峰面积比值（Y）为纵坐标，样品浓度（X）为横坐标，以 $1/X^2$ 为权重，作线性回归。将待测物峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线计算出待测物的浓度。

1.7 舒芬太尼代谢速率测定 肝脏微粒体中舒芬太尼的代谢速率可通过下面公式计算，消除速度 $R=C\times0.693/t_{1/2}$，其中 C 为舒芬太尼在孵育液中的初始浓度，$t_{1/2}$ 为舒芬太尼在孵育液中的消除半衰期（从各时间点舒芬太尼剩余浓度的均值对时间作半对数图形进行线性相关分析计算而得）。

1.8 精密度、提取回收率及稳定性试验 将质量浓度为 125，1 000，3 000 μg·L^{-1} 的舒芬太尼（每个浓度平行配置 5 份）进行日内精密度、连续 5 d 的日间精密度、提取回收率试验。舒芬太尼的冻/融、短时期、长时期的稳定性测定，使成 125，1 000，3 000 μg·L^{-1} 的含药液，每种浓度分别配置 3 份（$n=5$），其中第 1 份先储存于－40 ℃，24 h 后被放在室温下 60 min，然后再冻上，经过第 3 个循环后进行上述提取和测定；第 2 份在室温下放置，分别于 0，6，24 h 后进行测定；第 3 份储存于－70 ℃下，分别于 7，14，45 d 进行上述提取和测定，根据当日的标准曲线计算测得浓度。

2 结果

2.1 舒芬太尼标准曲线和定量下限 舒芬太尼峰面积和芬太尼峰面积比值（Y）为纵坐标，舒芬太尼浓度（X）为横坐标，行线性回归，得标准曲线回归方程为：$Y=0.012\,5X-0.013\,4$，$r=0.999\,5$。即在试验测定范围内，进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.2 舒芬太尼测定方法专一性 在本试验条件下，舒芬太尼与内标芬太尼分离完全，不受微粒体内源性物质的干扰，其保留时间分别为 9.558，4.765 min，见图 1。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

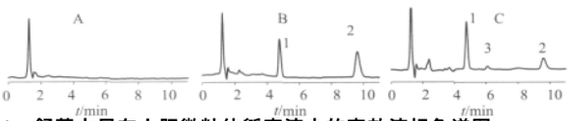

图 1　舒芬太尼在人肝微粒体孵育液中的高效液相色谱图

A. 微粒体孵育液；B. 孵育反应 0 min 时；C. 孵育反应 30 min 时；1-芬太尼；2-舒芬太尼；3-舒芬太尼的代谢产物

Fig 1　The high performance liquid chromatograms of sufentanil in incubation media of human liver microsomes

A. incubation of microsome; B. incubation reaction at 0 min; C. incubation reation 30 min; 1-fentanyl; 2-sufentanil; 3-the metabolity of sufentanil

2.3　舒芬太尼测定的精密度、提取回收率、稳定性试验　0.125，1，3 mg·L^{-1} 3 种舒芬太尼浓度，日内精密度分别为(5.84±4)%，(3.0±0.6)%，(1.2±0.9)%；日间精密度分别为 10.33%，5.11%，1.41%；提取回收率在90.66%～100.02%。稳定性试验结果表明，舒芬太尼在微粒体孵育液中－70 ℃贮存下 45 d 内基本稳定，结果差异均在 6%之内。

2.4　舒芬太尼在微粒体孵育液中的代谢速率　舒芬太尼在 24 例人体肝微粒体中平均每毫克蛋白的代谢速率是(0.19±0.06)nmol·min^{-1}。

3　讨论

与体内代谢研究相比，药物体外代谢的研究有下列优点：可排除体内诸多干扰因素，直接观察到代谢酶对底物的选择性代谢，为体内代谢研究提供重要的线索和依据；适用于对体内代谢转化率低而且缺乏灵敏检测手段的药物进行研究；具有快速简便的特点，适合于大批量化合物的药动学筛选；不需要消耗大量的样品和实验动物，研究费用相对较低。

舒芬太尼主要是在肝脏代谢，肝摄取率高，通过 *N*-脱烷基化和 *O*-去甲基化而失活，然后随尿和胆汁排出。Tateishi[8] 报道舒芬太尼的代谢与 CYP3A4 相联系。因此本实验从肝组织中提取肝微粒体，来研究舒芬太尼在微粒体的代谢速率。肝脏微粒体法是由制备的肝脏微粒体辅以氧化还原型辅酶，在模拟正常生理内环境下进行体外生化反应的体系，可以排除体内因素干扰，直接观察酶对底物的选择代谢性，已应用多种药物的代谢研究中[9-10]。目前，肝微粒体法在舒芬太尼药物代谢研究中的应用国内尚无报道。本实验将舒芬太尼在人肝微粒体中进行孵育，应用 HPLC 检测微粒体中舒芬太尼的浓度，该检测方法具有测得峰与肝脏微粒体峰分离完全、灵敏度高的特点。用内标法测定舒芬太尼的浓度，在 0.125～3 mg·L^{-1} 范围内线性关系良好，重复性和准确性好，适用于舒芬太尼的药动学研究。

参考文献：

[1] Niemegeers CJ, Schellekens KH, Van Bever WF, *et al*. Sufentanil, a very potent and extremely safe intravenous morphine-like compound in mice, rats and dogs[J]. Arzneimittelforschung, 1976, 26(8): 1551-1556.

[2] 倪诚，岳云，戈晓东. 舒芬太尼应用于术后硬膜外镇痛的研究进展[J]. 麻醉与监护论坛，2004，1(2)：129-131.

[3] 姚尚龙，王俊科. 临床麻醉学[M]. 北京：人民卫生出版社，2004：98.

[4] Martens-Lobenhoffer J. Very sensitive and specific determination of sufentanil in human serum applying liquid chromatography-two stage mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 769(2): 227-233.

[5] Zhao Y, Wu XM, Duan JL, *et al*. Pharmacokinetics of sufentanil administered by target-controlled infusion in Chinese surgical patients[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(3): 291-295.

[6] Van Nimmen NF, Poels KL, Veulemans HA. Highly sensitive gas chromatographic-mass spectrometric screening method for the determination of picogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil and their major metabolites in urine of opioid exposed workers[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 804(2): 375-387.

[7] Lang T, Klein K, Fischer J, *et al*. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver[J]. Pharmacogenetics, 2001, 11(5): 399-415.

[8] Tateishi T, Krivoruk Y, Ueng YF, *et al*. Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil *N*-dealkylation[J]. Anesth Analg, 1996, 82(1): 167-172.

[9] Lee AJ, Mills LH, Kosh JW, *et al*. NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3): 838-849.

[10] Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, *et al*. Utilization of human liver microsomes to explain individual differences in paclitaxel metabolism by CYP2C8 and CYP3A4[J]. J Pharmacol Sci, 2005, 97(1): 83-90.

[收稿日期]2010-11-26

不同医疗机构紫草饮片质量评价

胡国冰[1,2]，雒琪[1]，赵雪梅[1]　(1. 山东大学附属省立医院，山东 济南 250021；2. 山东中医药大学，山东 济南 250355)

[摘要]　目的：调查不同医疗机构的紫草饮片的质量。方法：参照中国药典 2010 年版的方法，用薄层色谱法对购自不同医疗机构的紫草进行鉴别，采用紫外分光光度法、高效液相色谱法对上述紫草饮片进行含量测定。结果：通过对紫草饮片样品与

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目(编号：2009-148)　[作者简介] 胡国冰，男，硕士研究生，电话：15154146386，E-mail：huguobing33@163.com　[通讯作者] 赵雪梅，女，硕士研究生导师，主任药师，电话：0531-85186465，E-mail：zxm_vip@126.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net