

- 6 Xue KX, Sun YJ, Zhou P, Ji GF. Preliminary studies on the relationship between micronucleus formation and cell cycle II. Studies on micronucleus formation by autoradiography and microscopy. *Acta Genet Sin* 1986; 13 : 460-3
- 7 Xue KX, Ma GJ, Wu JZ, Shen ZL. Preliminary studies on the relationship between micronucleus formation and cell cycle IV. Chemical mutagens induce micronucleus formation at G₀, G₁, S and G₂ phases of human lymphocytes. *Carcinog Teratogen Mutagen* 1990; 2 (3) : 4-7.
- 8 Xue KX, Wang S, Zhou P, Ma GJ. Comparative studies on several indices of nuclear damage in human peripheral lymphocytes. *Acta Genet Sin* 1990; 17 : 70-4.
- 9 Xue KX, Wang S, Zhou P, Ma GJ. Comparative studies on several indices of nuclear damage in human peripheral lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1989; 14 suppl 15 : 224.
- 10 Xue KX, Zhou P, Ma GJ, Wang S. Improvement of method for counting micronucleated lymphocytes in human peripheral blood. *Radiat Protect* 1988; 8 : 224-7.
- 11 Wang YZ, Li ZX, Yan MR, Liu WS, Guo XY. Preliminary study on the mechanism of inducing leukemia. *Chin J Hematol* 1989; 10 : 19-21.
- 12 Migliore L, Nieri M, Amodio S, Loprieno N. The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1989; 227 : 167-72.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; 13 (5) : 467-470

467-470

用高效液相色谱法研究环氧司坦在兔的药物动力学

刘昌官、武镇忆、李伟康、白秀梅、吴晓云、薛涛、林中明 R969.1

(上海市计划生育科学研究所药理及毒理研究室, 上海 200032, 中国)

Pharmacokinetics of epostane in rabbits by HPLC method

LIU Chang-Guan, WU Zhen-Yi, LI Wei-Kang, BAI Xiu-Mei, WU Xiao-Yun, XUE Tao, LIN Zhong-Ming (Department of Pharmacology & Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Epostane (Epo), a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor, interrupted pregnancy in rats, rhesus monkeys, and women. Epo concentrations in serum were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 48 h after intragastric Epo 96 mg · kg⁻¹ in rabbits. The concentration-time curve exhibited a 2-compartment open model. The pharmacokinetic parameters were: $T_{1/2ka}$ 0.79 ± 0.08 h, $T_{1/2\alpha}$ 0.96 ± 0.08 h, $T_{1/2\beta}$ 6.6 ± 1.5 h, V_c 14 ± 3 ml · kg⁻¹, AUC 12.0 ± 1.9 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, T_{max} 1.8

± 0.5 h, C_{max} 3.3 ± 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

After rat corpora luteum were incubated with hCG 10 IU · ml⁻¹ and Epo 10 or 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 18 and 48 h, luteal cells showed various degrees of degeneration and progesterone production was significantly inhibited.

KEY WORDS epostane; high pressure liquid chromatography; pharmacokinetics; progesterone; corpus luteum

摘要 用高效液相色谱法测定兔 ig Epo 96 mg · kg⁻¹ 后 0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 及 48 h 的血清中 Epo 浓度, 其血药-时间曲线符合 2 室开放模型。主要药物动力学参数: $T_{1/2ka}$ 0.79 ± 0.08 h, $T_{1/2\alpha}$ 0.96 ± 0.08 h, $T_{1/2\beta}$ 6.6 ± 1.5 h, V_c 14 ± 3 ml · kg⁻¹, AUC 12.0 ± 1.9 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, T_{max} 1.8 ± 0.5 h, C_{max} 3.3 ± 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。Epo 可使离体大鼠黄体细胞变性和退化, 孕酮生成减少。

关键词 环氧司坦; 高压液相色谱法; 药物动力学; 黄体酮; 黄体

Received 1991-09-09

Accepted 1992-04-23

环氧司坦(epostane, Epo)的结构式为 $4\alpha,5$ -环氧- $3,17\beta$ -二羟基- $4,17$ -二甲基- 5α -雄甾- 2 -烯- 2 -腈 ($4\alpha,5$ -epoxy- $3,17\beta$ -dihydroxy- $4,17$ -dimethyl- 5α -androst- 2 -ene- 2 -carbonitrile), 它在体内能竞争性抑制 3β -羟甾脱氢酶活性, 阻断卵巢及胎盘的孕酮生成, 从而在大鼠、猕猴及妇女上起着避孕作用⁽¹⁻⁶⁾. Epo 的药物动力学研究尚未见报道. 本文用高效液相色谱法测定兔 ig Epo 后不同时间的血药浓度, 计算其药物动力学主要参数, 同时应用体外培养技术, 研究 Epo 对大鼠黄体的形态和功能的影响.

MATERIALS AND METHODS

药品与试剂 Epo, 由上海医药工业研究院合成, 纯度为 99%, mp $172-175$ °C. CH_3OH , AR 级, 上海化学试剂总厂产品, 经过滤. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, AR 级, 上海化学试剂总厂产品. 孕酮 RIA 药箱由 WHO 提供. Eagle 培养液, Sigma 产品. hCG, 上海生物制品研究所提供. Sprague-Dawley 大鼠, 中英合资 SIPPR/BK 实验动物有限公司供应, 合格证书号: 沪医实动单准第 65 号, 1991 (清洁级).

仪器 Water 510 泵高效液相色谱仪, Rheodyne 7125 进样器, 岛津 SPD-6AV uv 检测器岛津 CRIB 数据处理机.

色谱条件 Whatman 表面膜 ODS 4.5×45 mm 予柱, μ Bondapac C_{18} 分析柱. 流动相为 $\text{CH}_3\text{OH} / \text{KH}_2\text{PO}_4$ $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 缓冲液 (pH 7) 50/50, vol/vol. 流速 $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. 纸速 $3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. 衰减 2^2 , 检测波长 285 nm.

方法 取 New Zealand 大耳兔 16 只, 其中 8 只分别 ig Epo $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 于给药后 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 及 48 h 耳静脉采血, 放置 2 h, 离心, 分离出血清, -20 °C 备用. 另 8 只兔取正常血清. 在所有的血清样品中, 各加入 1 ml KH_2PO_4 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 5.5) 及 5 ml 经重蒸馏的 $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$, 提取 3 次, 将醚层转移到经硅烷化处理过的试管内,

42 °C 恒温水浴蒸干. 残留物用定量 CH_3OH 溶解后, 进行 HPLC 分析, 以外标法定量.

大鼠黄体组织培养 取成年、健康的 Sprague-Dawley 大鼠, 以♀♂ 2:1 合笼, 每晨作阴道涂片, 以发现精子的当天作妊娠 d 1. 于妊娠 d 8, 处死动物, 取卵巢, 在无菌条件下分离黄体⁽⁷⁾, 按每个培养孔 3-4 只黄体, 将其随机接种于铺有茶叶纸的钢丝架上, 置于 CO_2 培养箱 (37 °C, $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$) 内. 黄体予培养 3 h 后, 更换培养液. 实验组加 hCG $10 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及不同剂量的 Epo, 对照组加同剂量的 hCG, 但不加 Epo, 只加等容量的培养液, 继续培养 18 h 及 48 h. 此后称取黄体重量, 并进行组织学观察. 用 RIA 法测定培养液中孕酮含量⁽⁸⁾.

RESULTS

Epo 的药物动力学

1 Epo 的色谱图 在 Fig 1 中, A 为空白血清提取物; B 为 Epo CH_3OH 溶液, Epo 的出峰时间为 5.99 min; C 为空白血清 + Epo 后的提取物, Epo 的出峰时间为 5.95 min; D 为兔 ig Epo $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的血清提取物, Epo 的出峰时间为 5.98 min.

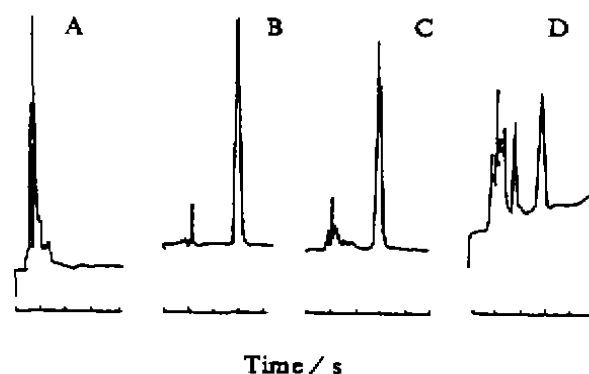


Fig 1. Chromatographs of epostane. A) Extract of rabbit blank serum. B) Epostane in methanol. C) Extract of rabbit serum added with epostane. D) Extract of rabbit serum after ig epostane $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

2 Epo 的定量标准曲线及最低检出量
在 $0.8-20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的范围内, Epo 的浓度与其色谱峰面积呈良好的线性关系, $\hat{Y} = 1.70X - 0.50$, $r = 0.9997$.

3 精密度 Epo 的浓度为 $1002 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 进样量为 $20 \mu\text{l}$, $n = 10$, $\bar{x} = 9597$, $s = 152.4$, $\text{CV} = 1.59\%$; Epo 的浓度为 $6012 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 进样量 $20 \mu\text{l}$, $n = 10$, $\bar{x} = 104895$, $s = 2993$, $\text{CV} = 2.85\%$.

4 回收率 将定量的 Epo 加到兔的空白血清中, 使其浓度分别为 38.5 , 19.2 , 9.6 及 $2.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 用上述方法提取处理后, 进行 HPLC 定量分析, 以血清中 Epo 的实际浓度为横坐标, 测得的 Epo 浓度为纵坐标作图, 其回归方程式为 $\hat{Y} = 0.079X + 0.948$, $r = 0.995$.

5 Epo 的血药浓度-时间曲线及药物动力学参数 结果见 Fig 2 及 Tab 1, 其特点符合开放型二室模型.

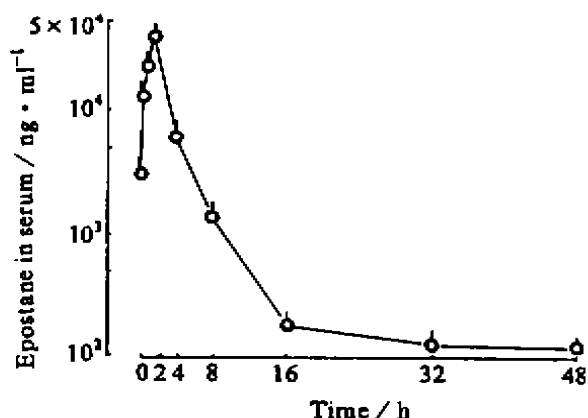


Fig 2. Serum concentrations of epostane in rabbits after ig $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$.

Epo 对大鼠离体黄体的影响

1 黄体细胞经 18 h 培养

1.1 组织学观察 光镜检查显示, 对照组黄体生长良好, 微血管丰富, 黄体细胞结构清楚, 含有丰富的颗粒. Epo 的剂量为 0.01 , 0.1 及 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 黄体的情况与对照组相

Tab 1. Pharmacokinetic parameters after ig epostane $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in 8 rabbits.

Parameter	Mean \pm s
K_{10} / h^{-1}	0.61 ± 0.04
K_{12} / h^{-1}	0.09 ± 0.04
K_{21} / h^{-1}	0.13 ± 0.04
$T_{1/2\alpha} / \text{h}$	0.79 ± 0.08
$T_{1/2\beta} / \text{h}$	0.96 ± 0.08
$T_{1/2\gamma} / \text{h}$	6.6 ± 1.5
$\text{AUC} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$	12.0 ± 1.9
$\text{AUMG} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$	47 ± 7
$T_{\text{max}} / \text{h}$	1.8 ± 0.5
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	3.3 ± 0.5
K_a / h^{-1}	0.89 ± 0.09
$V_c / \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	14 ± 3
MRT / h	3.9 ± 0.4

似. Epo 的剂量增加至 10 及 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 颗粒黄体细胞呈现轻度变性和退化, 个别细胞出现较多的中心基质.

1.2 Epo 对 hCG 引起孕酮生成的影响

黄体培养液中加入 hCG $10 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及 Epo 0.01 , 0.1 , 1 , 10 , $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 每 g 黄体的孕酮生成量见 Tab 2. 因此 Epo 在一定浓度下, 可以明显抑制 hCG 的促黄体生成孕激素的作用.

Tab 2. Effects of epostane on hCG ($10 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$) induced progesterone production of rat corpora luteum. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

Epo / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	n	Progesterone / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
-	5	$18.9 \pm 7.8^*$
0.01	5	$15.0 \pm 4.8^*$
0.1	5	$12.4 \pm 5.5^*$
1	5	$10.8 \pm 4.8^*$
10	7	$5.2 \pm 2.8^{***}$
100	6	$4.3 \pm 1.7^{***}$

2 黄体细胞经 48 h 培养

2.1 组织学观察 光镜下, 对照组黄体与 18 h 培养的对照组相似, Epo $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

组的黄体呈现不同程度的变性和退化, 细胞变小, 细胞间隔增宽, 细胞形态不规则, 出现空泡, 核固缩或消失。

2.2 Epo 对 hCG 引起孕酮生成的影响
黄体经 48 h 培养后, 对照组每克黄体的孕酮生成量为 $22.0 \pm 6.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 Epo $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 组每克黄体的孕酮生成量为 $7.3 \pm 5.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)。

DISCUSSION

本文建立了测定血清中 Epo 浓度的 HPLC 法, 具有良好的线性关系、重现性和回收率, 可用于测定体液和组织中 Epo 的含量。由于 pH 可以明显影响 Epo 的 uv 吸收光谱、色谱行为和血清中的回收率, 因此在实际操作中, 严格控制 pH 是本测定方法的关键。

兔 ig Epo $96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 其 $T_{1/2\alpha}$ 及 $T_{1/2\beta}$ 均较短, 分别为 0.96 ± 0.08 及 $6.6 \pm 1.5 \text{ h}$, 可作为临床用药的参考。我们建议, Epo 在临床上应用, 每 4-6 h 给药 1 次的方案, 可能有较佳的止孕效果。Epo 的临床用药量较大, 常达 $600-800 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 5-7 d, 是其明显的缺点。为了提高 Epo 的抗生育效果, 降低其用药剂量, 除了考虑与其它药物(如 RU 486 或前列腺素)合并使用外, 还应该提高其生物利用度。

实验结果表明, Epo 可以抑制 hCG 引起离体黄体生成孕酮的作用, 这与体内实验结果一致, 可能与 Epo 抑制黄体 3β -羟甾脱氢酶

活性有关。本文还发现 Epo 使离体黄体变性退化, 有直接的溶黄体作用, 进一步导致孕酮减少, 这可能是 Epo 止孕作用的原因之一。

ACKNOWLEDMENT 上海市计算机技术研究所江乃雄研究员协助计算药物动力学参数, 特此致谢

REFERENCES

- Creange JE, Anzalone AJ, Potts GO, Schane HP. Win 32,729, a new, potent interceptive agent in rats and rhesus monkeys. *Contraception* 1981; 24 : 289-99.
- Liu CG, Li WK, Xu RY, Shen QC, Lin ZM. A pharmacological study on interceptive effects of epostane in rats. *Reprod Contracep* 1989; 9 : 42-6.
- Liu CG, Lin ZM, Li WK, Shen PJ, Wang ZX, Bao CY. Interceptive activity of epostane in pregnant rats and rhesus monkeys. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 62-5.
- Birgerson L, Odland V, Johansson EDB. Effects of epostane on progesterone synthesis in early human pregnancy. *Contraception* 1986; 33 : 401-10.
- Birgerson L, Olund A, Odland V, Somell C. Termination of early human pregnancy with epostane. *Contraception* 1987; 35 : 111-20.
- Webster MA, Gillmer MDG. Induction of abortion in early first trimester of human pregnancy using epostane. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96 : 340-45.
- Chen HG, Gu DY, Zhou W. The morphological effects of anordrin on the follicles and corpus luteum of cultured rabbit ovaries. *Reprod Contracep* 1986; 6 : 49-51.
- Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL. *Method Manual: Programme for the provision of matched assay reagents for the radio-immunoassay of hormones in reproductive physiology*. 13th ed. Geneva: WHO, 1989

3rd International Meeting on Metallothionein

1992 Dec 8-10

Tsukuba, Japan

Please contact Professor IMURA Nobumasa, c/o 3rd Int Meeting on Metallothionein, Department of Public Health, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan.

Phone 81-3-3444-6178.

Fax 81-3-3442-4146.