

吡喹酮代谢产物对体外日本血吸虫的作用

王凤翔 朱廷勤 姚全胜 严汉英 (南京药物研究所, 南京 210009)

潘尚仁 李卫一 冯瑛瑛 (江苏省原子医学研究所, 无锡 214001)

摘要 研究了日本血吸虫病患者和健康大白鼠 po 吡喹酮后尿液中的药物代谢产物. 应用非离子型树脂提取技术, 从病人尿中分得代谢物——结晶 I, 经紫外、红外, 质谱分析, 确定了基本结构. 用薄层层析和放射自显影技术, 从大鼠尿液中分得 [^{14}C] 吡喹酮的 6 种代谢产物 ($u_1 - u_6$) 进行体外杀虫试验. 结果表明结晶 I 和 u_3, u_4, u_6 有不同程度的抗日本血吸虫活性, 但均低于吡喹酮.

关键词 吡喹酮代谢物; 日本血吸虫; 体外抗血吸虫活性; 非离子型树脂提取

吡喹酮(praziquantel)是一种新的广谱抗寄生虫药物, 疗效高、毒副作用小、疗程短⁽¹⁾. 国内已扩大试用^(2,3). 我们曾对其动物体内吸收、分布和排泄进行了研究⁽⁴⁾. 国外曾用正常人 po 该药后, 分离尿内代谢产物⁽⁵⁾. 本文报告大白鼠 po [^{14}C]吡喹酮和日本血吸虫病患者 po 吡喹酮后, 尿内代谢产物的分离及其对体外日本血吸虫的作用.

材 料 和 方 法

材 料

[^{14}C]吡喹酮: 由黄枕亚等合成⁽⁶⁾.

吡喹酮片: 每片含原药 200 mg, 南京制药厂生产. 批号: 790227 和 800701.

大网孔吸附树脂: 上海医药工业研究院制品(以下简称树脂).

硅胶 G: 青岛海洋化工厂生产.

方 法

1. 大白鼠尿代谢产物的提取与分离 取

体重为 $176 \pm (\text{SD}) 7 \text{ g}$ 的 σ^7 性大白鼠 4 只, ig [^{14}C]吡喹酮的 1% CMC 混悬液(每鼠 4 mg), 置代谢笼中, 收集 24 h 尿液. 大网孔吸附树脂于使用前, 先以蒸馏水——丙酮——甲醇预处理并装柱. 然后将尿液经过树脂柱⁽⁷⁾. 流速 1.5—2.0 ml/min. 经提取、过柱完毕, 用少量蒸馏水洗涤 1 次, 然后以 A. R. 甲醇: 丙酮 (1:1) 混合液洗脱. 洗脱液减压浓缩. 用硅胶 G 薄板, 以氯仿: 正丁醇: 乙酸乙酯: 10% 氨水 (2:2:6:0.3) 为展开剂, 条状点样, 进行薄层层析, 按放射自显影图象, 以 A. R. EtOH 分段洗脱各代谢产物.

2. 人尿代谢产物的提取与分离 将无泌尿系统疾患和其他夹杂症的日本血吸虫病男性患者, po 吡喹酮片 15 mg/kg, bid \times 2 d. 首次服药后开始排尿, 直至末次服药后 24 h 为止. 服药前收集 24 h 尿液作为空白对照. 尿液以 NaOH 调节至 pH 7—8, 然后同 1. 法, 用树脂柱提取, 得提取液. 将此液减压浓缩至干. 加 A. R. EtOH 于水浴回流 0.5 h 过滤, 分提取物为醇溶部分与醇不溶部分. 将醇溶部分液体减压蒸馏至干, 然后用少量 MeOH 温热、溶解、冷却、静置. 分离结晶与液体.

3. 各代谢产物的定量 取人尿中所得代谢物结晶 I 10.0 mg, 以 1 滴 Tween-80 助

溶, 然后用虫体培养液配制成 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液备用. 大白鼠尿中分离得各代谢产物的定量, 系按同位素放射量换算为相当于 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮量, 然后同上稀释成所需浓度.

4. 日本血吸虫体外培养与观察⁽⁸⁾ 家兔体重 $3-4 \text{ kg}$, 每兔感染日本血吸虫尾蚴 $1500-2000$ 条, 感染 $5-7$ 周后, 无菌条件下取血吸虫成虫, 先用台氏液清洗 $2-3$ 次, 后置于盛有台氏液的平皿内. 在解剖镜下, 用解剖针挑选一对完整无损, 活动度好的 σ σ 合抱虫体, 放入含有不同浓度的各种代谢产物及吡喹酮的改良卡氏培养瓶中(每瓶内培养液量 2.0 ml), 培养液为新鲜配制的小牛血清——台氏液(1:7)混合液, 加入青、链霉素各 $500 \text{ U}/\text{ml}$. 虫体放入培养瓶后, 立即观察其活动情况, 然后置 $36-37^\circ\text{C}$ 温箱中培养, 于 $4, 8, 12, 24 \text{ h}$ 后再观察. 以后每 d 观察 1 次, 分别记录虫体活动及死亡情况.

结 果

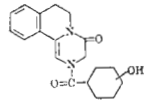
$[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮各代谢产物的分离

1. 定性 将 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮和大鼠尿中提取物, 于同一层析板点样, 薄层层析, 其放射自显影图如图 1A. 由图 1A 可知 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮在

大鼠体内迅速吸收、代谢、排泄. 尿中树脂提取物只含有 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮代谢产物而未见原药. 原药 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮 R_F 值为 0.94 .

2. 分离 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮代谢产物提取液经薄层层析后, 其放射自显影图如图 1B. 根据图 1B, 以 A.R. 的 EtOH 分段洗脱, 将洗脱液分别浓缩至干, 得大白鼠 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮尿中代谢产物 u_{1-6} . 图 1B 可见 8 条显影带, 说明 $[^{14}\text{C}]$ 吡喹酮有 8 种以上代谢产物.

结晶 I 的提取与化学分析 人尿中吡喹酮代谢产物主要存在于方法 2 洗脱液的醇溶部分, 从中分离得结晶 I, 其母液尚待另行分离提取.

结晶 I 经甲醇反复重结晶得白色片晶, mp $181.5-182^\circ\text{C}$ (分解), 遇三氯化铁——高铁氰化钾呈蓝色. $\text{UV} \lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \text{nm}: 207, 238, 318$. (见图 2). $\text{IR} \nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}: 3400, 1304 (\text{OH}); 2945, 2860, 1418 (\text{CH}_2); 1660, 1640 (\text{C}=\text{O}); 1066 (\text{C}-\text{O}); 762 (\text{Ar}-\text{H})$ (见图 3). MS 主要碎片峰 $m/e: 326, 1633 (\text{M}^+), 200$ (基峰), $171, 81$ (见图 4), 与 Bühring⁽⁶⁾ 所得代谢产物之一的质谱分析完全一致, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$, 基本骨架为:  羟基位置尚待确定.

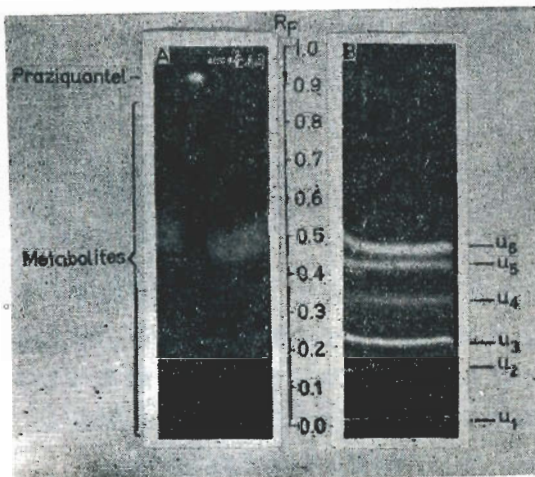


Fig 1. TLC radioautograph A) $[^{14}\text{C}]$ praziquantel and crude extracts from rat urine. B) $[^{14}\text{C}]$ praziquantel metabolites. Solvent system: $\text{CHCl}_3: n\text{-BuOH}: \text{EtAc}: 10\% \text{ aq } \text{NH}_3 (2:2:6:0.3)$

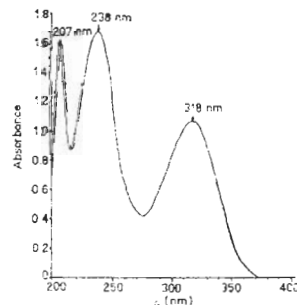


Fig 2. UV of crystal I (solvent: MeOH)

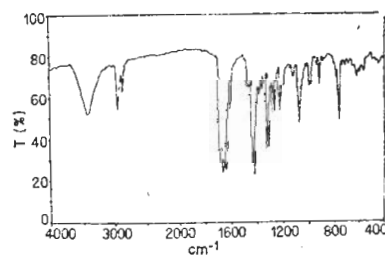


Fig 3. IR of crystal I

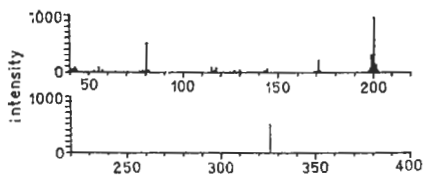


Fig 4. MS of crystal I

尿内代谢产物对体外培养日本血吸虫的作用

1. 活动变化

1.1 ♀ ♂ 血吸虫与大白鼠尿内代谢产物 u_1, u_2, u_5, u_6 和人尿内代谢产物结晶 I 不同浓度接触时, 仅 u_6 和结晶 I 分别于试验最高浓度 125 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 约 3 min 后虫体活动开始增加, 整个虫体不停地扭动、伸缩, ♂ 虫更为明显, 但吸盘仍能吸着瓶壁。其他浓度对虫体活动无明显改变。

1.2 大白鼠尿内代谢产物 u_3, u_4 于 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虫体活动稍有增加, 有些立即出现合抱分离, 有些从口、生殖孔排出黑色液体。 u_3

Table 1. Effects of praziquantel metabolites on survival time of *Schistosoma japonicum*. $N=10. \bar{x} \pm \text{SD}$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

	Concn of metabolite ($\mu\text{g/ml}$)	Survival time (day)	
		♀	♂
Control	—	14.6 \pm 3.7	14.4 \pm 3.1
u_1	100	9.3 \pm 1.8*	11.6 \pm 1.8*
	50	10.3 \pm 2.7*	9.5 \pm 5.1*
	10	14.4 \pm 4.3*	15.1 \pm 5.9*
u_2	50	11.4 \pm 2.5*	12.5 \pm 3.9*
	10	14.7 \pm 4.5*	18.4 \pm 5.4*
u_3	100	5.6 \pm 0.7***	4.9 \pm 0.6***
	50	8.4 \pm 1.6*	4.8 \pm 2.5***
	10	13.8 \pm 4.4*	10.2 \pm 6.5*
u_4	100	1.0 \pm 0.4***	2.1 \pm 0.8***
	50	3.8 \pm 1.0***	4.1 \pm 1.5***
	10	13.0 \pm 3.4*	12.4 \pm 5.8*
u_5	50	9.5 \pm 3.4*	11.9 \pm 3.8*
	10	12.8 \pm 3.1*	14.0 \pm 4.6*
u_6	125	7.4 \pm 2.4**	8.9 \pm 2.8**
	60	10.8 \pm 3.1*	9.0 \pm 4.1*
	12	9.3 \pm 2.8*	9.8 \pm 5.1*
Crystal I	100	6.3 \pm 2.0**	4.6 \pm 2.2***
	50	8.6 \pm 1.7*	8.9 \pm 3.4*
	10	12.1 \pm 2.7*	9.8 \pm 5.2*

于 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 约 2—3 min 后, 虫体先卷曲、而后缩短, 即发生团缩, 尤以 ♂ 虫明显。 u_4 于 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 约 3 min 虫体即不动, 强烈团缩, 作用与 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 吡喹酮接触时相近。 u_3 于 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虫体立即团缩不动, 作用与 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 吡喹酮接触时相近。细心观察, 可见 ♂ 虫吸盘仍微微抖动。 ♀ 虫除吸盘抖动外, 尾部不停地扭动。 24 h 后, ♂ 虫仍团缩不动, ♀ 虫的活动则较刚接触时稍增加。 u_4 于 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 虫体团缩现象更加明显。

2. 存活时间 u_3 浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 时, ♂ 虫存活天数为 4.8 \pm 2.5 d, ♀ 虫为 8.4 \pm 1.6 d, 与相应对照 ♂ 虫 14.4 \pm 3.1 d, ♀ 虫 14.6 \pm 3.7 d 相比, ♂ 虫存活时间的差异非常显著, ♀ 虫则无显著差异, 当浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, ♂ ♀ 虫存活时间与对照相比均有非常显著差异。 u_4 的作用更强, 浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, ♂ ♀ 虫的存活时间与对照相比差异均非常显著, 见表 1。

在一定浓度时, 吡喹酮对体外日本血吸虫的存活时间的影响与对照相比均有非常显著差异, 见表 2。吡喹酮对虫体的作用特点及其对虫体存活时间的影响, 与肖树华等所得结果⁽⁸⁾相似。

讨 论

近年来, 国外广泛应用非离子型树脂提取 (nonionic resin extraction) 技术, 由生物样品中分离和富集药物及其代谢物⁽⁷⁾。我们用国产树脂分离大白鼠和血吸虫病患者服用吡喹酮

Table 2. Effects of praziquantel on survival time of *Schistosoma Japonicum*. $N=10. \bar{x} \pm \text{SD}$.

** $P<0.05$, *** $P<0.01$

Drug concn ($\mu\text{g/ml}$)	Survival time (day)	
	♀	♂
0	18.5 \pm 3.9	20.5 \pm 2.9
0.05	11.1 \pm 3.9**	11.1 \pm 4.9**
0.1	10.5 \pm 4.2**	9.0 \pm 3.5***
0.5	2.2 \pm 0.6***	1.3 \pm 0.6***
1.0	1.1 \pm 0.4***	0.8 \pm 0.1***
10.0	0.8 \pm 0.1***	0.7 \pm 0.1***

后尿中的代谢产物, 取得成功, 表明该法简单易行, 并有一定技术特点。

吡喹酮的代谢产物结晶 I 和 u_1-u_6 中, 主要是 u_3 、 u_4 对体外日本血吸虫具有活性, 其作用特点是: (1) 低浓度引起虫体兴奋; 高浓度时, 虫体先卷曲, 而后缩短, 即团缩, 尤以 ♂ 虫明显。与吡喹酮引起虫体缩短, 即挛缩有所不同。其作用强度大致各为喹吡酮的 1/400, 1/150; 而结晶 I、 u_3 各仅为 1/500 和 1/1000。(2) 在一定浓度时, 明显缩短体外血吸虫的存活时间。本研究表明: 吡喹酮杀灭日本血吸虫的作用, 主要为原药, 其代谢产物大部无杀虫活性, 或活性甚弱。结晶 I 几乎无杀虫活性, 其结构与吡喹酮相比主要是 D 环上羟基化。Bühring 等⁽⁵⁾ 从正常人血清和尿中分得的几种代谢产物也是羟基化合物, 但皆未进行杀虫作用试验。代谢产物的杀虫活性降低是否与羟基化有关, 有待进一步研究。

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Mar; 4 (1): 45-48

EFFECT *IN VITRO* OF METABOLITES OF PRAZIQUANTEL ON *SCHISTOSOMA JAPONICUM*

WANG Feng-xiang, ZHU Yan-qin, YAO Quan-sheng, YAN Han-ying

(Nanjing Institute of Materia Medica, Nanjing 210009)

PAN Shang-ren, LI Wei-yi, FENG Ying-ying

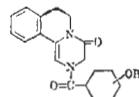
(Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214001)

ABSTRACT The metabolites of praziquantel were studied in urine of patients infested with *Schistosoma japonicum* and healthy rats. The patients were given orally praziquantel 30 mg/kg/d \times 2 d and the metabolites in urine were isolated by non-ionic resin extraction techniques. Crystal-I thus obtained was subjected to UV-visible absorption, IR and mass spectrum analysis. The chemical structure of crystal-I appears as follows.

致谢 南京药物研究所钱绍祯副研究员提供宝贵意见; 何林兴助理研究员协助图谱分析; 南京市血防医院协助收集尿液。

参 考 文 献

- 1 严汉英. 江苏医药 1978 年 12 月; 4 (12):35
- 2 江苏省吡喹酮会战组. 吡喹酮治疗血吸虫病的临床观察. 血吸虫病防治专辑. 南京: 江苏医学杂志社, 1979:84-9
- 3 南方十三省市自治区血研会吡喹酮协作组. 中华医学杂志 1980 年 3 月; 60 (3):129
- 4 邵鹤生、潘尚仁、景锡南、许南星、殷兰琴、朱海燕、钱燮铭、严汉英、姚全胜. 中国药理学报 1981 年 3 月; 2(1):49
- 5 Bühring KU, Diekmann HW, Muller H, Garbe A, Nowak H. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1978; Jul-Sep; 3 (3):179
- 6 黄枕亚、潘尚仁、张海营. 医药工业 1981 年 1 月; (1):10
- 7 严汉英、曾衍霖. 同上 1981 年 1 月; (1):22
- 8 肖树华、邵葆若、徐月琴. 药学报 1980 年 2 月; 15 (2):105



In rats, after po [^{14}C]praziquantel, 6 metabolites (u_1-u_6) were isolated from the urine by TLC and radioautography.

Among these metabolites, crystal-I, u_3 , u_4 , and u_6 showed various degrees of antischistosomal activity *in vitro*, but less active than praziquantel.

KEY WORDS metabolites of praziquantel; *Schistosoma japonicum*; antischistosomal activity *in vitro*; nonionic resin extraction