

稳定同位素

——药理学、毒理学和临床研究中的应用



T. A. Baillie 著 马立人 景沛 夏宗勤等译 上海科学技术出版社

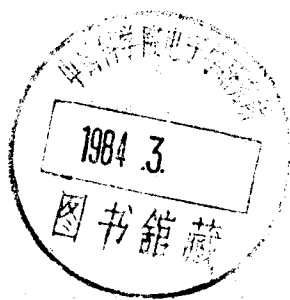
64.936
285

稳定同位素

药理学、毒理学和临床研究中的应用

T. A. Baillie 著

马立人 景沛 夏宗勤 等译



上海科学技术出版社

1111236

Dt 72/10

Stable Isotopes
Applications in Pharmacology,
Toxicology and Clinical Research
T. A. Baillie

责任编辑 吴德才
封面设计 董黎明

稳定同位素
药理学、毒理学和临床研究中的应用
T. A. Baillie 著
马立人 景沛 夏宗勤 等译
上海科学技术出版社出版
(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 上海新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 11 字数 242,000
1983年8月第1版 1983年8月第1次印刷
印数: 1—5,100

统一书号: 14119·1599 定价: (科五)1.25元

序

近年来在生物医学科学中，稳定同位素标记化合物的应用有了巨大的发展；其部分原因是由于在检测和精确测定同位素丰度的分析仪器方面有了进展的直接结果。在这一领域中气相色谱-质谱联用(GC-MS)起着比其他物理化学技术更为关键的作用；用于 GC-MS 测定方法的稳定同位素标记的内标准物其需要量持续增长。它已经成为而且看来将继续成为促使碳、氢、氮和氧的稳定同位素商业生产的主要因素。

在代谢研究中使用稳定同位素作为示踪剂继续成为应用中的主要方面；同时给予一种放射性的和相应的稳定同位素标记的化合物的方法，很快就发展成为观察动物体内药物代谢的首选方法。而在许多国家中对于在人体代谢研究中使用放射性示踪剂所带来的健康问题日益关切，促使许多研究者主要依靠应用稳定同位素标记的化合物来达到这一目的。事实上，尤其研究幼儿或孕妇时，往往必须应用稳定同位素。

稳定同位素标记法的新用途是研究药物的各种光学活性对映体的代谢转归，以及观察对机体的同位素效应。关于“代谢(途径)转换”的假设是由氘取代特定位置的氢原子而产生的，它有可能用于毒理学和未来的药物设计中。稳定同位素的另一个具有很大潜力的用途是将该项技术用于使氘在体内标记辅酶；曾用该法以取得关于生物合成途径动力学以及细胞水平酶反应的分布范围的大量知识。

在本书中可以看到稳定同位素在上述各领域中的应用实

例。这本书是 1977 年 1 月 3~4 日在伦敦召开的稳定同位素国际讨论会的论文集。重点是在药理学、毒理学和临床研究方面的应用。我们希望本书能广泛地向读者介绍在这些学科中各方面的应用，并能成为积极从事这一领域研究的科学家们有用的参考书。

最后应当感谢参与组织这一讨论会的各位人士，尤其是 H. Draffan 博士，这次会议是在他的倡导下召开的。并要感谢 D. Boland, A. Davis 和 H. Hughes 诸女士，她们对大会的安排和准备这些报告作出了重要贡献；尤其要深切感谢的是在清单中所列的各单位所给予的经济上的支持，没有他们的支持，这次会议是无法召开的。

伦敦, 1978

T. A. B.

马立人 译

目 录

第一篇 稳定同位素：应用范围和分析技术	1
第 1 章 稳定同位素——生物学和医学研究中的基本工 具	1
第 2 章 测定同位素的质谱方法	14
第 3 章 稳定同位素在人体药物代谢研究中的应用	28
第二篇 在药理学和毒理学中的应用	49
第 4 章 氘标记在克洛尼丁(Clonidine)的药物动力学和 浓度效应研究中的应用	49
第 5 章 代谢途径上的同位素效应	60
第 6 章 稳定同位素标记化合物在药物研究中的应用	71
第 7 章 研究代谢活化机理时氘标记法的应用	95
第 8 章 经环磷酸胺治疗的病人血浆和尿中环磷酸胺、磷 酰胺氮芥和去甲氮芥的气相色谱-化学电离-质 谱定量测定	107
第 9 章 大鼠体内度冷丁和去甲度冷丁的药物动力学研 究：用氘代内标准物作选定离子监测的应用实 例	119
第 10 章 应用氮-15和氘标记的药物进行人体药物代谢和 药物动力学研究：噌诺沙辛(cinoxacin)的代谢 和达而丰(propoxyphene)的药物动力学	125
第 11 章 应用冷标记研究生物利用率：关于一种新抗痢 药 SC-27166 的研究	141
第 12 章 应用稳定同位素更好地验证对羟基乙酰苯胺(乙 酰氨基苯酚)*和对乙氧基乙酰苯胺(非那西汀)	

	的毒性代谢途径	154
第 13 章	药物代谢中观察个体差异的新方法	165
第 14 章	人口服十一烷酸睾丸素治疗后用稳定同位素标记化合物和质谱分析区分血浆中的内源与外源睾丸素	172
第三篇	临床研究中应用	183
第 15 章	辅酶标记的应用和展望	183
第 16 章	用氘标记技术研究体内类固醇代谢的通路	191
第 17 章	用稳定同位素标记的胆汁酸研究人体胆酸代谢的特点	205
第 18 章	高分辨质谱法和 ^{13}C (^2H , ^3H) 差分核磁共振波谱法对稳定同位素参入的检测和定量。乙醇中的碳和氢原子在胆汁酸生物合成中的利用	224
第 19 章	小鼠胚胎的整体和离体移植实验中植入前 C-13 的参入对植入后发育影响的畸形学研究	237
第 20 章	正常和糖尿病儿童摄入 ^{13}C -葡萄糖后 $^{13}\text{CO}_2$ 呼吸试验	246
第 21 章	体内氘标记法研究人的儿茶酚胺代谢	255
第 22 章	氘标记酪胺在人体内的代谢	267
第 23 章	半示踪剂量氘标记苯丙氨酸和酪氨酸的人体研究: 用氘代苯丙氨酸负荷试验研究苯丙酮尿症的复杂性	274
第 24 章	化学电离质谱和稳定同位素在研究 α -甲基多巴代谢方面的应用	282
第 25 章	用稳定同位素法研究前列腺素在人类疾病发病原因中的作用	303
第 26 章	氘标记在人体内前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 的合成和代谢研究中的应用	310
第 27 章	腹膜透析时水、尿素和肌酐的平衡	324
索 引		

第一篇

稳定同位素： 应用范围和分析技术

第1章 稳定同位素——生物学和 医学研究中的基本工具

P. D. Klein 和 D. L. Hachey M. J. Kreek 和 D. A. Schoeller

最近十年间,在氢、碳、氮、氧、硫的稳定同位素方面兴趣的复兴是由于发展了新仪器、浓缩同位素的较易取得以及在人体研究中采纳了合乎道德原则的非放射性的技术。为了解目前应用的稳定同位素的前途,我们应当调查它的过去和未来,使我们能对它预期的利益作出估计。

如果我们按时间顺序追溯有关稳定同位素的一系列的论文,追溯到五十年前的1927年,当时Aston首次描述了一种新的分辨能力为600的质谱仪。这种仪器显示了质量为32、33和34的三种同位素硫的存在(Aston, 1927)并促使Aston提出元素的整数规律,这是与当时用化学分析获得的非整数质量相反的规律。以后不久接着就检测到石墨弧光光谱中的

^{13}C (King 和 Birge, 1929)。大气层太阳光谱中的 ^{18}O 和 ^{17}O (Babcock, 1929; Giague 和 Johnston, 1929), NO 吸收带中的 ^{15}N (Naudé, 1930) 和最后发现的重氢 (Urey, Brickwedde 和 Murphy, 1932), 在短短的五年内连续地出现这一系列的新发现决不是偶然的。它取决于每种同位素的丰度和是否有有效的检测手段, 因而从能测出含 4.3% 的 ^{34}S 开始逐渐发展至能发现 0.15% 的 ^2H 。

另一方面, 稳定同位素富集部分的生产则是根据物理或化学过程中各种同位素所产生的影响大小而定的, 最后发现的同位素——氘却首先在 Urey 的实验室制得高度浓缩的形式。据 Clarke (1948) 的报道关于 D_2 的毒理学的研究是在发表氘存在的第一篇报告之后一年之内进行的, 并试验了金鱼、蚯蚓和原生动物在 92% 的 D_2O 中生存的能力 (Taylor 等, 1933)。Urey 充分认识到氘作为示踪剂的潜在可能, 并由洛克菲勒基金会拨款解决了重水的生产问题。并引起了一位年青的博士 David Rittenberg 的注意, 他受委托来探索该同位素的应用。Schoenheimer 和 Rittenberg 协作用该基金所取得的成就是很难估价的, 他们创建了代谢过程动态平衡的概念, 而在当时还只有静态生理化学认识。Clarke 记载了从 1933 年直到 1942 年间这些富有成效的报道值得定期反复重读, 并记住使用氘及以后使用 ^{13}C 和 ^{15}N 的研究结果何等广泛, 并对现代生物化学的领域作出贡献。

1947 年 9 月在威斯康星大学举行了一次名为“同位素在生物学和医学中的应用”的专题讨论会。它标志着稳定同位素使用的分界线。在 1945 年首次由新成立的原子能委员会开始 ^{14}C 的发货。在这次历史性的会议上同时介绍了有关稳定同位素和放射性同位素这两类化合物的制备方法、合成步

骤、仪器使用和定量测定等技术。在当时新介绍的放射性示踪物的潜在可能性在会议报告中是有极明显的启发性的，在其后十年期间，放射性示踪研究文章的大量增加，完全超越了氘和 ^{18}O 的应用。

关于放射性示踪物使用激增的原因是十分清楚的：检测是较简易的，如我们大家所知，它需要较少的样品制备工序，而且这项技术不久就完全自动化了。而稳定同位素则取决于因质量差异而产生的同位素的效应，还取决于所需同位素的原始丰度；至于放射性同位素则不存在这些限制因素。最后，稳定同位素的生产还受热力学条件的限制，而放射性同位素仅取决于有效的中子通量，通量愈大，产生的同位素比活性愈高。五十年代后期液体闪烁计数的引入可以认为是示踪方法学上重大进展，因为这种仪器使任何研究人员（不论其过去经验如何）都有可能进入这个领域。

所有这些历史事实发生在 25 年以前，而我们目前的情况则是面临着对稳定同位素应用重要性的探索。显然 1940 年那种每次示踪实验都是充满着创新的机会的美好日子已经过去了，也不太可能再现。放射性同位素的大多数应用者也不会放弃方便易用的液体闪烁计数法，而采用我们大家每天都了解和使用的令人头痛的气相色谱-质谱法。当确实没有另外的可供选择的方法时，只有不计代价地应用缓慢而耗费劳动的质谱测定稳定同位素比率的方法。为了充分了解这一点，我们只要统计农业科学杂志上关于 ^{15}N 应用的论文数即可。由于缺乏能用的放射性同位素氧，产生了对无法替代的 ^{18}O 和 ^{17}O 的需求量。氘和 ^{18}O 对于裂解途径的测定也确实是不可缺少的，但是，应该强调，这些典型的研究通常都不需要反复进行的，正如将 ^{18}O 引入抗菌素进行核磁共振研究是

一项专题研究一样。

那末，在我们周围究竟有哪些领域值得我们提倡将它作为常规来应用的呢？显然，在人体的研究中，稳定同位素也不是唯一的手段；对成人而言并不禁止使用 $1\sim 10\mu\text{Ci}$ 的 ^{14}C 或 $10\sim 50\mu\text{Ci}$ 的 ^3H ，在当前利弊之比，也不象是理由。我们需要提醒自己注意医生的意见，如果一个程序显然有利于病人的诊断或预后而需要使用辐射或放射性时就应当采用。这些程序包含对婴儿或孕妇施行外源性放射的扫描技术，这比在大多数应用示踪剂情况中受到的辐射剂量要大得多。

另一方面，医生需要从道德上考虑对一般病人避免采用任何有害且又引起损伤的程序。无疑，当研究涉及不足月或足月婴儿、儿童以及有可能怀孕或实际已怀孕的妇女时，这些限制条件则更应当严格地执行。由于怀孕只是分娩前的一个短暂的情况，只有极少数要求用示踪剂技术来评价妊娠或胎儿的情况，以及实际应用稳定同位素的报告。另一方面，稳定同位素标记的药物已被应用于哺乳期的母亲的研究 (Horning 等, 1973)；并对一些婴儿进行了包括胆汁酸代谢动态测定的研究 (Watkins 等, 1973, 1975)；丙氨酸和葡萄糖的转换 (Bier 等, 1973) 以及氘代芳香氨基酸的代谢途径 (Curtius, Völlmin 和 Baerlocher, 1972) 的研究。有一大批有关成年人代谢过程的资料，由此可以推知儿童和婴儿的情况；在许多情况下，这些资料的推断，使从成年人取得的经验能为儿童提供诊断和治疗上的益处。儿科中应用稳定同位素看来肯定值得重视发展。

可是，在药理学的领域内有两种类型的应用看来似乎特别需要在经常性的测定中应用稳定同位素（其中不包括在 1968 年由 Hammar, Holmsted 和 Ryhage 为鉴定药物代谢

产物而发展的制取离子对的稳定同位素标记法, 但对该分子不作重复测定)。第一种类型的应用是测定血浆中药物或其代谢产物的浓度, 此时在血液循环中的药物浓度等于或低于微克水平, 并用标记形式的药物作为载体和内标准物。第二种类型的应用是测定血浆中的药物动力学变化, 尤其是出现低水平时和体内的池容量过大时。说明这两种应用最好的例子是我们自己, 在洛克菲勒大学由 M. J. Kreek 博士指导下进行的人体美沙酮 (methadone, 又名美散痛) 代谢的研究的体验。

五个氘原子标记的美沙酮是 Hachey 博士按照图 1.1 中列示的方案合成的。这种物质可以是消旋物, 也可以制成两种光学异构体。可以用作内标准物以定量测定血浆和尿中的水平, 也可以用于动力学测定中药物的维持剂量 (Hachey, Mattson 和 Kreek, 1976)。类似的研究也由 Ånggård 和他的同事 (Ånggård 等, 1976) 报告过。图 1.2 和 1.3 分别表示

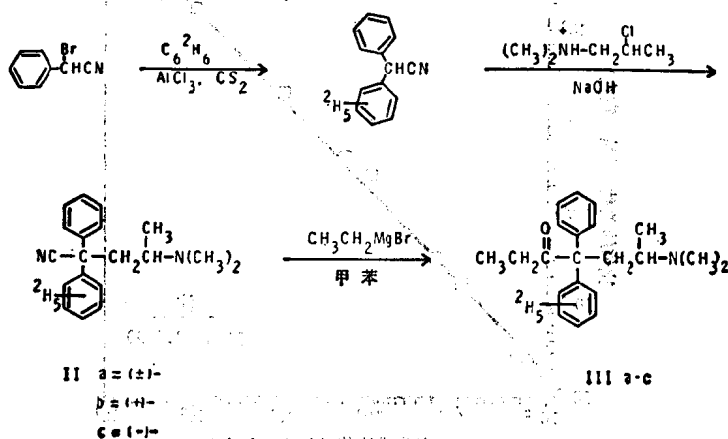


图 1.1 d₅-标记美沙酮的合成。

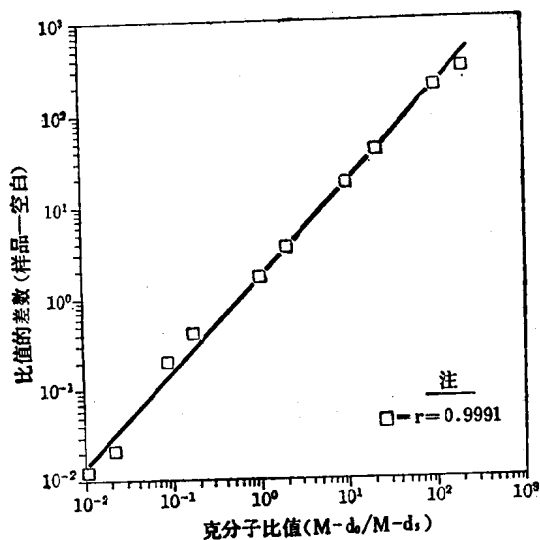


图 1.2 血浆中美沙酮与同位素反稀释曲线(540ng 内标准)。

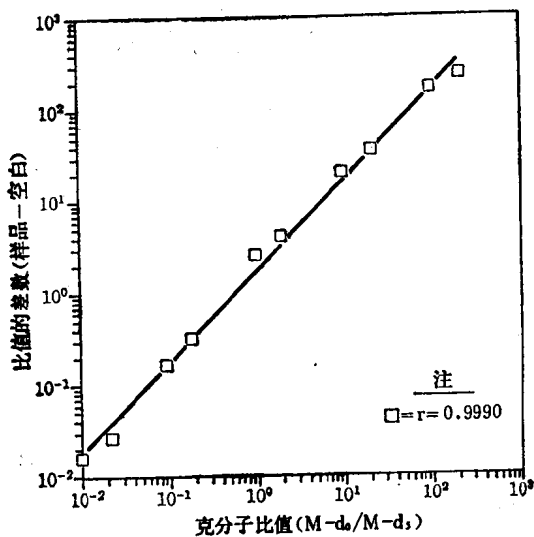


图 1.3 尿中的美沙酮的同位素反稀释曲线(540ng 内标准)。

血浆和尿中美沙酮的含量,并说明在用这种 d_5 内标准物时线性范围能达到三个数量级以上。

美沙酮的代谢作用是不寻常的,因为血浆中药物的水平波动在比较窄的范围内,而且水平较低。一般说来在 $100 \sim 150 \text{ ng/ml}$,即使每天口服大约 1 mg/kg 的剂量亦是如此。图 1.4 表示连续两天内一个病人血浆值的变动情况。把气相层析(GC)所获得的数值(利用 ^{14}C -美沙酮监测血浆提取率)与气相层析-化学电离-质谱 (GC-CI-MS) 所获得的数值相比较,用 GC-CI-MS 测定的水平总是高于单独用 GC 所测定的水平。当把这些结果绘制成相关图(图 1.5)时,看来好象 GC-CI-MS 法比 GC 法能够测得更多的美沙酮。因为这种不一致现象在尿的测定中并不出现,看来象是反映了血浆蛋白质基质的作用,也可以作为是血浆中药物结合的一种佐证。我们想到了两种可能的解释:前者与方法学有关,后

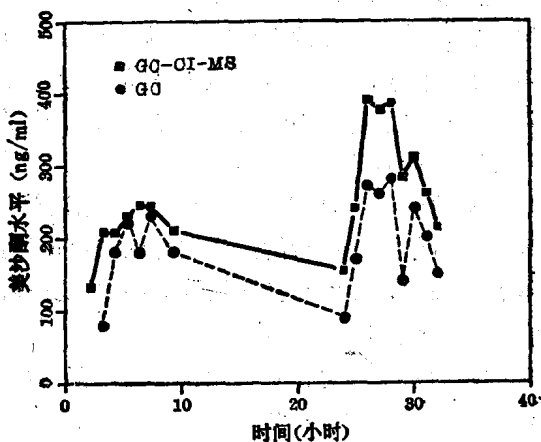


图 1.4 用气相色谱法和气相色谱-质谱法所测得某病例 36 小时内血浆中美沙酮含量水平。

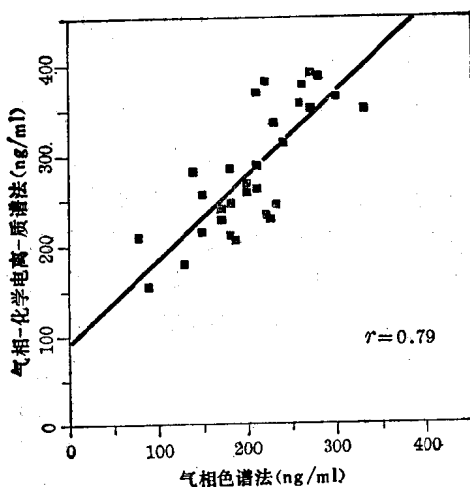


图 1.5 用气相色谱法与用气相色谱-质谱法测得的血浆美沙酮数值的相关情况。

者与样品处理经过有关。第一种情况中，内标准物与内源代谢的美沙酮的比值 d_i 是 d_0 的 1~5 倍，而 ^{14}C -美沙酮的比只是 1/10~1/20 那样多。如果与血浆蛋白的结合在吸收系数上有差别，在提取之前较小的测试信号不能充分平衡。为了验证这一点而进行的预试验并不支持这种可能性。第二种可能性基于这样的事实，即 GC-CI-MS 测定是用冻熔了 2~3 次之后的同一个血浆样品进行的。而这种处理可能使蛋白上生成某些变性的部位，而使交换和提取时能得到更多的美沙酮，这种可能性目前还正在研究中。

当循环的药物水平与总体负荷相比较处于偏低状况时，计算究竟需要多少放射活性的量才能进行血浆中药物动力学的研究是有意义的。表 1.1 列举了 Schoeller 博士在计算放射活性需要达到 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 的计算精度时所采用的假设。

表 1.1 计算血浆中药物动力学测定所需的示踪剂的量

假设:		
池大小: 1g		分子量: 400
计数效率: 100%		计数时间: 10 分
本底计数率: 10d.p.m.		标记物/分子: 1
中间数据		
计数准确性 $\pm 1\%$ 需 1005d.p.m. 或 457pCi		
$\pm 5\%$ 需 44d.p.m. 或 20pCi		
对 1ml 血浆样品, 需要服药的剂量		
浓度	1% 准确性	5% 准确性
1mg/ml	0.46 μ Ci	0.02 μ Ci
1 μ g/ml	457 μ Ci	20 μ Ci
1ng/ml	超过无载体物的比放射性	20000 μ Ci

求得的放射性的量分别是 20pCi 和 457pCi。根据药物在血浆中的浓度水平, 要达到上述活性水平所需放射性的量, 当体内的负荷量是 1 克时, 其范围是 0.02 μ Ci* 直到比无载体物质的比活性还要超过的水平。由此可见, 即使只要求 $\pm 5\%$ 的计算精度, 要追踪观察浓度范围为 10~100ng/ml 的某一代谢物的血浆动力学变化也是困难的。在另一方面, 整个剂量的药物都以稳定同位素标记的形式给药。不论该剂量是一次或多次给药, 都是适宜而没有危险的。因为标记物质的物理量不是一种限制因素, 我们就能用 1 毫升血浆中可以测定的标记药物的量进行稳定同位素比值的测定。这样就可以在较长一段时间内监测标记药物。图 1.6 说明一个服用维持量的病人不是用一次剂量的美沙酮-d₅, 而代之以规定的口服剂量时血浆中美沙酮的同位素丰度。计算机提示结果符合双指数函数, 说明存在半衰期分别为 1.9 小时和 31.4 小时的两个蓄积池。

* 译校者注: 原书误值为 0.2 μ Ci

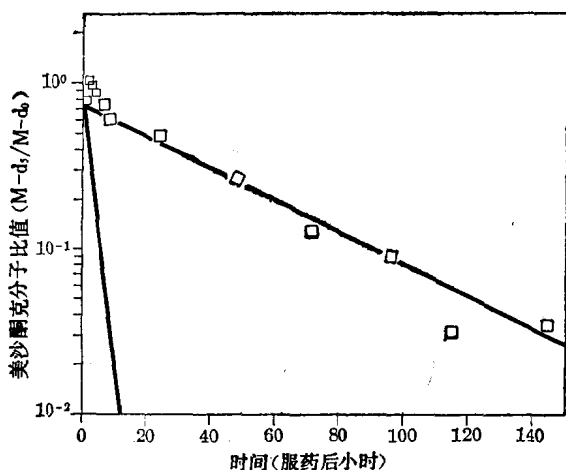


图 1.6 一次口服 100mg 美沙酮-d₅ 后血浆中药物消失曲线。

可以在超过一星期样品体积限制前的时间内进行同位素比值的测定。尿中药物的浓度是较高的，标记物消失情况可以追踪观察十天以上，如图 1.7 所示。这些测定也分别提示着具有半衰期分别为 7.2 和 46.2 小时的两种动力学组分。

应用美沙酮-d₅ 曾对不少病人进行过研究，而我们对在服用维持量美沙酮的病人中研究药物—药物相互作用特别感到兴趣。例如并用醇或巴比土酸盐，或用利福平治疗(Kreek 等, 1976)。然而，根据稳定同位素使用的观点，美沙酮动力学研究中有几个方面值得作进一步的讨论，因为它们影响到这些技术的未来。第一，即使在这些研究中只用比较简单的提取过程，气相色谱的保留时间也很短暂，它们仍然是样品处理速度的限制因素。如果考虑到包括血浆、尿和粪便的动力学测定时样品的总数，显然，进行这些研究比在动物上进行放射性研究需要更多的劳动。此外，由于检测仪器价格高昂，在多