

者常为免疫及排毒代谢能力均较弱的体虚者或老人,过量的防腐剂会对他们的健康产生严重威胁,需要严格控制其用量。《中国药典》2010年版附录中规定:中药合剂和糖浆剂中苯甲酸、山梨酸的含量不得超过0.3%,对羟基苯甲酸酯类的含量不得超过0.05%^[4],但未收载相关的含量测定方法。GB 16740-1997 保健(功能)食品通用标准中规定:食品添加剂的添加量应符合 GB 2760 的规定,但在 GB 2760-2011《食品添加剂使用卫生标准》中,未见口服液类保健食品中防腐剂的限量规定。因此,建议有关部门对口服液类保健食品中防腐剂的使用、测定方法及限量作出明确规定,为确保使用者的安全

提供法定依据。

参考文献:

- [1] 钱木水,叶兴法,倪赤杭. 液体制剂中防腐剂选用的体会[J]. 海峡药学,2009,21(3):32-34.
- [2] 兰金苹,宁丽峰,张益文,等. 高效液相色谱法测定口服液类药品中苯甲酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(1):4-6.
- [3] 罗晶,施法,陈晓辉,等. HPLC法同时测定抗病毒口服液中4种防腐剂[J]. 西北药学杂志,2012,27(1):38-40.
- [4] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录8-9.

收稿日期:2014-03-03

水黄皮素在大鼠肝微粒体中的代谢研究

王春艳^{1,2}, 汤明海², 李容¹, 李小彬^{1,2}, 王海蓉^{1,2}, 万丽^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研究水黄皮素在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性, 确定水黄皮素的代谢酶表型。方法 将水黄皮素与大鼠肝微粒体于 37 °C 孵育, 应用 UPLC-MS/MS 法检测孵育液中水黄皮素的含量, 考察水黄皮素的代谢稳定性。将水黄皮素与各细胞色素 P450 (CYP) 酶中的各同工酶 CYP2E1、2C19、1A2、2D6、2C9 和 3A4 的特异性抑制剂共孵育, 确定其代谢酶表型。结果 在大鼠肝微粒体中, 水黄皮素的 $t_{1/2} = 1.97$ h, $Cl = 0.70$ mL·h⁻¹·mg⁻¹, CYP1A2 是其代谢酶。结论 水黄皮素在大鼠肝微粒体中是由多个 CYP 同工酶介导代谢的, 其中, CYP1A2 酶的介导作用最强。

关键词: 水黄皮素; 大鼠肝微粒体; 代谢; 稳定性; 代谢酶表型; 超高效液相色谱-串联质谱; 细胞色素 P450 酶; 清除率

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2015)03-0333-03

DOI: 10.13375/j.cnki.wcjps.2015.03.025

Study on the metabolism of karanjin in the rat liver microsome

WANG Chun - yan^{1,2}, TANG Ming - hai², LI Rong¹, LI Xiao - bin^{1,2}, WANG Hai - rong^{1,2}, WAN Li^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 611137 P. R. China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the metabolic stability of karanjin in the rat liver microsomes *in vitro*, and to identify the metabolic phenotyping. **METHODS** Karanjin was incubated at 37 °C with rat liver microsome. The concentrations of karanjin in the incubation systems were determined by a UPLC-MS/MS method to evaluate the metabolic stability of karanjin. The cytochrome P450 (CYP) phenotyping of karanjin was identified using specific inhibitors of CYP isoforms (CYP2E1, 2C19, 1A2, 2D6, 2C9 and 3A4) in the rat microsomal incubation system. **RESULTS** In rat liver microsome, karanjin could be metabolically eliminated in the presence of NADPH. The $t_{1/2}$ of karanjin was 1.97 hour. The extrapolated hepatic clearance was 0.70 mL·h⁻¹·mg⁻¹. The results of CYP phenotyping indicated that CYP1A2 was mainly involved in the metabolism of karanjin. **CONCLUSION** Karanjin was mainly metabolized by a number of CYP isoenzymes in rat liver microsome, CYP1A2 was the major metabolic enzymes responsible for the metabolism of karanjin.

Key words: Karanjin; Rat liver microsome; Metabolic; Stability; Metabolic phenotyping; UPLC-MS/MS; CYP450; Clearance

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2015)03-0333-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:81374017)

作者简介:王春艳(1988—),女,正攻读药物分析专业的硕士学位。Email:18280189233@163.com

* 通信作者(Correspondent author), Email:wanli8801@163.com

豆科水黄皮属水黄皮 *Pongamia pinnata* (L.) Merr. 广泛分布于印度、马来西亚及中国广东、广西、海南等省区。其种子油可治疗疥癬、脓疮、白斑病、麻风病、风湿等症^[1]。水黄皮种子油的有效成分为水黄皮素,是第一个从该属植物中分离出来的呋喃黄酮化合物^[2]。水黄皮素可治疗疥疮、麻风等疾病,具抗炎、抗氧化、抗溃疡、DNA 保护等作用^[3]。目前未见水黄皮素体外代谢的相关报道,现考察了水黄皮素在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性及细胞色素 P450 (CYP450) 的代谢表型,为深入了解水黄皮素的代谢特征和对其开发利用提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

三重四极杆质谱仪、超高效液相色谱仪(美国 Waters)。水黄皮素对照品、pongaflavone 内标(四川大学生物治疗国家重点实验室,纯度分别为 99.81%、99.43%); α -萘黄酮(ANF,东京化成工业株式会社);盐酸噻氯匹定(TCP,中国药品生物制品检定所);奎尼丁(QND,TCI 上海化成工业发展有限公司);二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDTC)、磺胺苯吡唑(SPP)(美国 Sigma);酮康唑(KCZ,Dr Ehrenstorfer 公司);SD 大鼠肝微粒体(20 mg·mL⁻¹),NADPH(武汉普莱特生物医药技术有限公司,置-80℃冷冻保存);甲醇为色谱纯;水为纯化水;其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC™ BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为甲醇-水,梯度洗脱(0~4.0 min,70%~90%甲醇,4.0~6.5 min,90%甲醇)。流速 0.2 mL·min⁻¹,柱温 30℃,样品室的温度 10℃,进样量 5 μL。质谱采用电喷雾离子源(ESI⁺),毛细管电压 2.8 kV,离子源温度为 100℃,脱溶剂气温度为 300℃,萃取锥孔电压为 40 V,锥孔气为 40 L·h⁻¹,脱溶剂气为 600 L·h⁻¹;SIR 监测离子对为水黄皮素 m/z 315.22 [M+Na]⁺、内标 m/z 357.34 [M+Na]⁺。

1.2.2 溶液的配制 精密称取水黄皮素对照品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得 1 mg·mL⁻¹的对照品贮备液;精密量取上述贮备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,以甲醇稀释,得 0.2 mg·mL⁻¹的工作液。精密称取内标对照品适量,用甲醇溶解得 100 μg·L⁻¹内标溶液。

1.2.3 肝微粒体代谢的稳定性 按 FDA 指导文件进行试验^[4]。孵育体系为 200 μL K₂HPO₄ 缓冲液(0.1 mol·L⁻¹,pH7.4),含 5 mmol·L⁻¹氯化镁、2.8

μmol·L⁻¹水黄皮素、SD 大鼠肝微粒体(含蛋白 0.5 g·L⁻¹),于 37℃ 预孵育 5 min,加入同法预孵育的 NADPH 启动反应,每组平行操作 3 个样品。于 37℃ 继续孵育 0、5、10、20、40、60 min,立即加入 4℃ 的 100 μg·L⁻¹内标溶液 400 μL 终止反应,涡旋 3 min,离心(4℃、1.3×10⁴ r·min⁻¹) 15 min,取上清液 5 μL 进样,检测水黄皮素的含量。1 h 内水黄皮素的代谢剩余量为 68%。以剩余百分比对孵育的时间作线性回归,得回归方程为: $Y = -0.352X + 4.602$ ($r^2 = 0.957$), k 值为 -0.352,计算水黄皮素的 $t_{1/2} = 1.97$ h, Cl 为 0.70 mL·h⁻¹·mg⁻¹(图 1)。

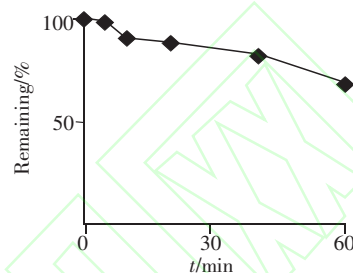


图1 水黄皮素在大鼠肝微粒体中孵育的代谢剩余量($n=3$)

Figure 1 Metabolic remaining of karanjin in the rat microsomes ($n=3$)

1.2.4 水黄皮素在大鼠肝微粒体内的代谢酶表型

采用化学抑制剂法研究代谢酶表型。用 SD 大鼠肝微粒体与 CYP 同工酶特异性抑制剂和水黄皮素共孵育,考察抑制剂对水黄皮素代谢的影响。用 0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ 缓冲液(pH 7.4)配制含蛋白 0.5 g·L⁻¹的大鼠肝微粒体孵育液。将水黄皮素与孵育液混合得终浓度为 2.8 μmol·L⁻¹溶液,共 6 组,分别加入选择性抑制剂:KCZ 1 μmol·L⁻¹、QND 10 μmol·L⁻¹、ANF 1 μmol·L⁻¹、SPP (20 μmol·L⁻¹、NADPH 100 μmol·L⁻¹、TCP 50 μmol·L⁻¹^[5-6],于 37℃ 预孵育 5 min 后加入大鼠肝微粒体(含蛋白 0.5 g·L⁻¹)启动反应。60 min 后,用含内标的终止液终止反应,涡旋,于 1.3×10⁴ r·min⁻¹离心,取上清液 5 μL 进样。平行设置空白对照组和零时组,空白对照组不含抑制剂,零时组先将肝微粒体酶灭活后,同法孵育,每组平行操作 3 个样品。不同酶抑制剂能对 CYP450 酶不同亚家族产生特异性的抑制。与空白对照组相比,CYP 同工酶 CYP2E1、2C19、1A2、2D6、2C9 和 3A4 的抑制剂均能抑制水黄皮素在大鼠肝微粒体内的代谢($P < 0.05$)。其中,水黄皮素与 CYP1A2 特异性抑制剂 ANF 共孵育,其代谢清除率为 2.68% 表明 ANF 能显著抑制水黄皮素在大鼠肝微粒体中的代谢($P < 0.001$)(表 1)。

1.2.5 方法的专属性考察 按“1.2.1”“1.2.3”项方法测定对照组与试验组在试验条件下的色谱行

表1 CYP抑制剂对水黄皮素在大鼠肝微粒体中代谢的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of CYP inhibitors on the metabolism of karanjin in rat liver microsome ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Inhibitors	Remaining of karanjin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Clearance rate/%
DDTC (CYP2E1)	2.31 ± 0.07	45.89 ± 8.49
TCP (CYP2C19)	2.24 ± 0.05	51.24 ± 3.23
ANF (CYP1A2)	2.79 ± 0.05	2.68 ± 3.92
QND (CYP2D6)	2.29 ± 0.06	47.15 ± 4.40
KCZ (CYP3A4)	2.33 ± 0.05	43.99 ± 4.66
SPP (CYP2C9)	2.22 ± 0.08	53.28 ± 6.72
空白对照组	1.69 ± 0.06	100
零时组	2.82 ± 0.01	-

为,考察该方法的专属性。结果孵育液中的内源性成分不干扰测定,水黄皮素、内标的 t_R 分别为 3.68、4.98 min(图2)。

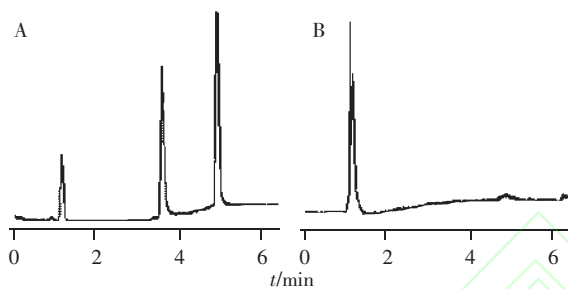


图2 水黄皮素孵育样品(A)和空白肝微粒体(B)的色谱图
Figure 2 Chromatograms of incubation sample of karanjin (A) and blank rat liver microsome (B)

1.2.6 线性关系和最低检测限的测定 精密量取“1.2.2”项下水黄皮素工作液,置 37 °C 下预孵育 5 min 后的大鼠肝微粒反应体系中,配制含 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水黄皮素的系列样品,总体积为 0.2 mL,立即加入 400 μL 含内标的甲醇溶液,于 4 °C、 $1.3 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液进样。以水黄皮素峰面积与内标峰面积之比对其浓度进行线性回归,得回归方程为: $Y = 2 \times 10^3 X + 0.124$ ($r = 0.9989$),水黄皮素的线性范围为 0.025 ~ 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别同法配制并处理含 0.25、2.5、25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水黄皮素的样品,计算最低检测限($S/N = 10$)为 2.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.7 回收率及精密度试验 按“1.2.6”项下方法配制含 0.07、0.2、0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水黄皮素的样品,处理后进样,计算方法的回收率。同法分别平行测定 5 个样品,并连续重复 3 d,计算日内、日间精密度。水黄皮素的回收率为 96% ~ 101%,回收率及精密度良好,符合生物样品的测定要求(表2)。

1.2.8 数据处理 用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

表2 水黄皮素回收率及精密度的试验结果($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=5$)

Table 2 Results of recovery test and precision test of karanjin ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=5$)

Added	Detected	Recovery/%	RSD/%	
			intra-day	inter-day
70.00	67.68	96.96 ± 4.51	7.16	7.79
200.00	203.56	101.78 ± 2.34	5.05	7.06
800.00	790.12	98.77 ± 2.15	2.11	3.62

2 讨论

文中成功建立了 SD 大鼠肝微粒体孵育液中水黄皮素含量的检测方法。孵育时间过长会影响酶的活力,还可能导致样品变质,因此,水黄皮素在大鼠肝微粒体中的孵育时间设定为 1 h。水黄皮素在大鼠肝微粒体孵育液中呈一定程度的线性消除, $t_{1/2} = 1.97 \text{ h}$, $Cl = 0.70 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,根据药物在各种属体内的代谢清除评价标准^[7],初步确定水黄皮素在大鼠肝微粒体孵育系统中属于中等清除率药物,具有一定的代谢稳定性。文中通过化学抑制剂法初步确定了 CYP 同工酶均能介导水黄皮素在大鼠肝微粒体中的代谢,其中, CYP1A2 的介导作用最强。

参考文献:

- [1] 黄欣碧,龙盛京. 半红树植物水黄皮的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2004,35(9):1073-1076.
- [2] Al MLMR, Ahmat N, Ruzaina SAS, et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: A review[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2):395-420.
- [3] Arshad N, Rashid N, Absar S, et al. UV-absorption studies of interaction of karanjin and karanjachromene with ds DNA: Evaluation of binding and antioxidant activity[J]. Cent Eur J Chem, 2013, 11(12):2040-2047.
- [4] 刘治军,傅得兴,汤光. FDA 药物相互作用研究指南(草案) 2006 版解读[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(1):50-58.
- [5] 温艳清,孟志云,陈淑珍,等. 力达霉素的体外代谢[J]. 药理学学报,2011,46(9):1132-1136.
- [6] 杨旭平,赖丹,黄毅岚,等. 5 种抗肿瘤中药注射液对 CYP3A4 酶代谢的影响[J]. 华西药理学杂志,2014,29(5):550-552.
- [7] Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, et al. Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans [J]. Drug Metabolism Disposition, 2001, 29:1316-1324.

收稿日期:2014-11-17