

· 药物代谢 ·

# 芦西丁在不同种属肝微粒体和肝S9中I相代谢及II相磺酸化代谢的稳定性考察

马跃新<sup>1,2</sup>, 张莹<sup>1,2</sup>, 杨静<sup>1,2</sup>, 冯有龙<sup>2</sup>, 黄青<sup>2\*</sup>, 曹玲<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019)

**[摘要]** 目的:采用4个种属体外肝微粒体和肝S9孵育体系评价芦西丁I相代谢、II相磺酸化代谢稳定性,比较其体外代谢的种属差异。方法:建立并验证了基于超高效液相色谱-高分辨质谱法(UHPLC-HRMS)的芦西丁定性、定量检测方法,将芦西丁与大鼠、小鼠、比格犬、人肝微粒体和肝S9分别进行孵育,考察其代谢稳定性参数、代谢产物和代谢途径。结果:在I相和II相磺酸化孵育体系中,芦西丁代谢的肝清除率大小排序为小鼠>大鼠>比格犬>人,在大鼠、比格犬、人肝微粒体和肝S9中,其代谢稳定性均良好,而在小鼠肝微粒体和肝S9中,分别表现为代谢不稳定和代谢稳定性中等;在4个种属中快速识别了5个代谢产物,其中I相氧化产物3个,II相磺酸化产物2个,代谢产物的生成速率与代谢稳定性结果较为一致。结论:建立的UHPLC-HRMS简便、专属性强,可用于芦西丁的代谢稳定性和代谢产物研究。芦西丁I相和II相磺酸化的体外代谢稳定性、代谢产物生成速率存在明显的种属差异,其在人、大鼠、比格犬中的代谢特征较为相近,可为芦西丁体内代谢研究、安全性评价及动物模型选择提供参考依据。

**[关键词]** 芦西丁; 肝微粒体; 蒽醌类; 磺酸化代谢; 稳定性; 茜草; 种属差异

**[中图分类号]** R22;R28;R96;Q485 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0113-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220347 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220214.1706.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-02-15 14:38

## Investigation of Metabolic Stability of Phase I and II Sulfation of Lucidin in Liver Microsomes and Liver S9 from Different Species

MA Yuexin<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, YANG Jing<sup>1,2</sup>, FENG Youlong<sup>2</sup>, HUANG Qing<sup>2\*</sup>, CAO Ling<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the metabolic stability of lucidin by incubating liver microsomes and liver S9 from 4 species, and to compare the species differences in metabolism of lucidin *in vitro*. **Method:** A qualitative and quantitative method of lucidin based on ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) was established and verified. Lucidin was incubated with rat, mouse, beagle dog, human liver microsomes and liver S9 to investigate the metabolic stability parameters, metabolites, metabolic pathways. **Result:** Hepatic clearance ( $CL_h$ ) of lucidin was in order of mouse>rat>beagle dog>human in both phase I and phase II incubation system. Its metabolic stability was good in rat, beagle dog and human, while it showed metabolic instability and moderate metabolic stability in mouse microsomes and liver S9, respectively. A total of 5 metabolites were rapidly identified, including 3 oxidation metabolites of phase

**[收稿日期]** 2021-12-15

**[基金项目]** 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ204121,KJ207558)

**[第一作者]** 马跃新,在读硕士,从事食品药品中高风险物质检测与安全性评价研究,E-mail:mayuexin1997@hotmail.com

**[通信作者]** \*黄青,博士,副主任药师,从事食品药品中高风险物质检测与安全性评价研究,E-mail:67658869@qq.com;

\*曹玲,博士,主任药师,从事药品的质量控制和质量标准研究,E-mail:clide@sina.com

I and 2 sulfation metabolites of phase II. The production rate of metabolites was consistent with the results of metabolic stability. **Conclusion:** The established UHPLC-HRMS is simple and specific, which can be used for the study on the metabolic stability and metabolites of lucidin. Its metabolic stability and metabolite production rate *in vitro* are significantly different among species, the metabolic characteristics of rat and beagle dog are similar to human, which provides an important reference for subsequent research *in vivo*, safety evaluation and animal model selection of lucidin.

**[Keywords]** lucidin; liver microsomes; anthraquinones; sulfonic metabolism; stability; Rubiae Radix et Rhizoma; species differences

茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* 的干燥根及根茎,常用于外伤出血、关节痹痛等,临床应用广泛;药理实验证明其具有抗肿瘤、抗氧化和抑菌等活性<sup>[1]</sup>,且活性成分主要为蒽醌类化合物。然而,近年来一些研究表明<sup>[2-4]</sup>,蒽醌色素中的芦西丁可能具有遗传毒性,能以与DNA共价结合的形式来产生

致癌和致基因突变作用,见图1。2002年,国际癌研究机构(IARC)将茜草根列入三类致癌物<sup>[5]</sup>。之后,美国和日本也将其列入禁用药物或禁止茜草制剂中检出芦西丁<sup>[6]</sup>。我国在2020年版《中华人民共和国药典》(一部)“茜草”项下,规定了大叶茜草素和羟基茜草素含量限度,但尚未对芦西丁规定限值。

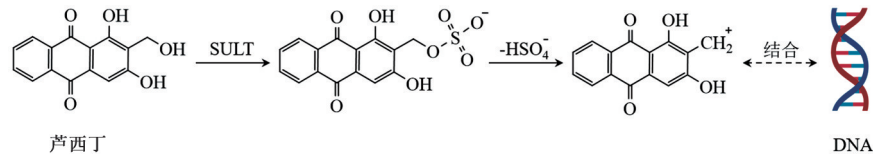


图1 芦西丁的可能代谢活化致毒机制

Fig. 1 Proposed pathways for metabolic activation of lucidin leading to genotoxicity

磺酸化是一类由磺酸基转移酶(SULT)介导的II相代谢反应,许多含有羟基与氨基的中药单体均存在此种代谢途径<sup>[7-8]</sup>。相较于其他代谢途径,目前对磺酸化代谢的研究较少,而随着马兜铃酸、吡咯里西啶类生物碱等毒性研究的逐渐深入,该代谢途径与毒性作用之间的关联正逐渐暴露<sup>[9-10]</sup>。已有研究表明,芦西丁的DNA反应活性可能是通过II相的磺酸化代谢产生<sup>[11]</sup>。代谢稳定性则代表了化合物生物转化的难易程度,是影响化合物暴露量和生物利用度的关键因素,对化合物代谢稳定性的评估也是药物早期研发的关键,因此,亟需以体内外实验多平台、多角度探讨芦西丁遗传毒性及其与I相、II相代谢的关联,厘清药物的代谢轮廓,明确其主要代谢通路和代谢产物。

考虑到I相细胞色素P450同工酶(CYP)、II相SULT的表达及底物特异性等都存在显著的种属差异<sup>[12-14]</sup>,从动物实验获取的药物代谢、药效数据向人体放大和推导时,可能会获得不准确的药理、毒理数据。因此,本实验拟采用不同种属体外孵育体系(大鼠、小鼠、比格犬、人)对芦西丁I相代谢、II相磺酸化代谢的稳定性和代谢产物进行研究,以确定其代谢途径和在不同种属中的代谢特征,为芦西丁体内毒性研究中选择与人具有相似代谢性质的实

验动物种属提供实验依据,并填补其相关代谢数据的空白。

### 1 材料

Q-Exactive™组合型四极杆Orbitrap™质谱仪、Digital型数字式金属浴和Sorvall™ Stratos型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司), UltiMate 3000型超高效液相色谱系统(美国Dionex公司), XPR2型1/10万电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司), Milli-Q型纯水仪(美国Millipore公司)。

芦西丁(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号ST05450120,纯度≥98%),1,8-二羟基蒽醌(中国食品药品检定研究院,批号D286824,纯度≥98%,作内标用),4-硝基苯酚(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号N304726,纯度≥99.7%),咪达唑仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司,批号20190705),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH,瑞士Roche公司,批号10107824001),腺苷3'-磷酸5'-磷酰硫酸(PAPS,美国Sigma公司,批号A1651),雄性SD大鼠肝微粒体及肝S9、雄性ICR/CD-1小鼠肝微粒体及肝S9、雄性比格犬肝微粒体及肝S9、混合性别人源肝微粒体和肝S9[瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司,批号分别为LM-DS-02M、LS-DS-

02M、M00501、LS-XS-02M、LM-BGQ-02M、LS-BGQ-02M、X008061、X008023], 水为超纯水, 甲醇、二甲基亚砜(DMSO)为色谱纯, 甲酸铵、甲酸为质纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 代谢稳定性样品孵育与处理

**2.1.1 NADPH启动的I相代谢反应体系** 孵育体系总体积200  $\mu\text{L}$ , 包含50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.75  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 肝微粒体、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦西丁。于37  $^{\circ}\text{C}$ 、250  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下预孵育5 min, 加入NADPH溶液(终浓度1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )启动反应, 分别于0、5、15、30、45、60 min加入3倍量含内标(质量浓度100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的冰甲醇终止反应, 剧烈振荡15 min, 离心(22 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min, 离心半径6.12 cm, 下同), 上清液过0.2  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 待测。每个样品平行制备3份, 肝微粒体阳性对照样品的底物为咪达唑仑, 阴性对照样品不加NADPH启动子。

**2.1.2 PAPS启动的II相代谢反应体系** 孵育体系的总体积200  $\mu\text{L}$ , 包含50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦西丁、5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.75  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 肝S9。于37  $^{\circ}\text{C}$ 、250  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 预孵育5 min后加入PAPS溶液(终浓度0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )启动反应, 分别于0、15、30、60、90、120 min加入3倍量含内标(质量浓度100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的冰甲醇终止反应, 剧烈振荡15 min, 离心, 上清液过0.2  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 待测。每个样品平行制备3份, 肝S9阳性对照样品的底物为4-硝基苯酚, 阴性对照样品不加PAPS启动子。

**2.2 检测条件** 采用超高效液相色谱-高分辨质谱法(UHPLC-HRMS)检测。色谱条件为ACE EXECL  $\text{C}_{18}$ -PFP色谱柱(3 mm $\times$ 100 mm, 2  $\mu\text{m}$ ), 以0.1%甲酸水溶液-5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液(A)-甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱(0~25 min, 0~95%B; 25~35 min, 95%B), 柱温40  $^{\circ}\text{C}$ , 流速0.25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量2  $\mu\text{L}$ 。质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 离子源温度325  $^{\circ}\text{C}$ , 离子喷雾电压3.5 kV, 鞘气( $\text{N}_2$ )流速40 arb, 辅助气( $\text{N}_2$ )流速10 arb, 吹扫气( $\text{N}_2$ )流速1 arb, S-lens RF为55, 辅助气温度350  $^{\circ}\text{C}$ ; 扫描方式采用数据依赖型扫描(DDA)的Full MS/ddMS<sup>2</sup>(TopN), 在负离子模式下采样, 一级全扫描的分辨率7万, 扫描范围 $m/z$  100~600; 数据依赖的二级扫描分辨率17 500, 碰撞能量为20%、40%、60%的混合能量。

**2.3 溶液的制备** 精密称取芦西丁适量, 用甲醇-

DMSO(1:1)混合溶液溶解并定容, 得1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芦西丁贮备液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。临用前用甲醇逐级稀释至相应质量浓度, 即得芦西丁系列工作液。精密称取1, 8-二羟基蒽醌适量, 用甲醇稀释成100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标工作液。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性** 取大鼠肝S9适量, 经高温灭活后按照2.1项下方法制备不含待测物和内标的空白孵育样品、芦西丁对照样品(包含125  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 待测物和100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标)、代谢稳定性孵育样品(孵育60 min时的样品), 按2.2项下条件测定, 记录色谱图。

**2.4.2 标准曲线绘制** 分别精密量取2.3项下芦西丁工作液适量, 加至经高温灭活的大鼠肝S9体系中, 制得芦西丁质量浓度分别为5、12.5、25、50、125、250、500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准曲线对照溶液, 按2.1项下方法孵育15 min并处理, 按2.2项下条件测定, 记录峰面积。以芦西丁质量浓度为横坐标、芦西丁与内标的峰面积比值为纵坐标, 计算回归方程。

**2.4.3 准确度和精密度** 按2.4.2项下方法配制芦西丁低、中、高质量浓度(12.5、50、250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )质控样品各5份, 按2.1项下方法孵育15 min并处理, 按2.2项下条件连续进样5次, 考察日内精密度; 连续测定3 d, 考察日间精密度。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较, 考察准确度。

**2.4.4 提取回收率和基质效应** 按照2.4.2项下方法分别配制芦西丁低、中、高质量浓度(12.5、50、250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )质控样品, 按2.1项下方法孵育15 min并处理, 按2.2项下条件测定, 记录峰面积(A); 按2.4.1项下方法制备经灭活的大鼠肝S9孵育体系并处理, 加入适量芦西丁工作液和内标溶液, 使所得样品质量浓度与上述芦西丁低、中、高质量浓度一致, 按2.2项下条件测定, 记录峰面积(B); 用甲醇配制相应质量浓度的芦西丁样品, 按2.1项下方法孵育15 min并处理, 按2.2项下条件测定, 记录峰面积(C)。每个质量浓度平行操作5次, 计算提取回收率及基质效应。公式为提取回收率= $A/B\times 100\%$ 、基质效应= $B/C\times 100\%$ 。

**2.4.5 稳定性** 按2.4.2项下方法分别配制芦西丁低、中、高质量浓度(12.5、50、250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的质控样品5份, 按2.1项下方法孵育15 min并处理, 按2.2项下条件测定, 考察各质控样品于自动进样器(10  $^{\circ}\text{C}$ )内放置12 h和24 h的稳定性。

### 2.5 数据处理与分析

**2.5.1 体外消除半衰期及清除率计算** 原始数据

由 Xcalibur 4.3 软件采集,以 0 min 时芦西丁浓度为 100%, 计算不同时间点的芦西丁剩余浓度,与 0 min 时浓度相比得到其剩余百分比。将各时间点剩余百分比的自然对数与孵育时间作图,经直线回归求得斜率( $k$ ),由公式体外消除半衰期( $t_{1/2}$ )= $-0.693/k$ 求得芦西丁经微粒体/S9 代谢的  $t_{1/2}$ ,应用 well-stirred 模型<sup>[3,15]</sup>的公式  $CL_{int}=(0.693/t_{1/2}) \times (\text{孵育体系体积}/\text{肝微粒体质量}) \times (\text{肝微粒体质量}/\text{肝质量}) \times (\text{肝质量}/\text{体质量})$  和  $CL_h=(Q_h \times CL_{int})/(Q_h+CL_{int})$  对数据进行外推,式中  $Q_h$  为肝血流量,  $CL_{int}$ 、 $CL_h$  分别为芦西丁在大鼠、小鼠、比格犬、人肝微粒体/S9 中的固有清除率和肝清除率,其中相关理化参数经验值见表 1<sup>[16]</sup>。使用 GraphPad Prism 8.3 和 Origin 2021 对数据进行分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析或  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**2.5.2 代谢产物分析流程** 将原始数据导入 Compound Discoverer 3.2 软件,根据仪器采集的精确相对分子质量,匹配预期产生的 I 相、II 相代谢产物,通过母体化合物的碎片离子预测代谢产物的结构,并结合结构相似性算法,对候选化合物进行结构归类评分,进行化合物筛选。同时,使用 Mass Frontier 8.0 软件和相关文献信息进一步验证,从而对代谢产物进行鉴定,推测可能的代谢途径。

表 2 芦西丁含量测定的方法学验证 ( $n=5$ )

Table 2 Method validation for determination of lucidin ( $n=5$ )

质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	准确度( $\bar{x} \pm s$ )	精密度 RSD		提取回收率( $\bar{x} \pm s$ )	基质效应( $\bar{x} \pm s$ )	稳定性试验准确度( $\bar{x} \pm s$ )	
		日内	日间			12 h	24 h
12.5	91.35±4.84	1.0	1.7	90.51±0.82	109.88±2.39	100.82±1.92	106.12±5.53
50	99.62±0.74	0.9	1.9	92.19±0.70	104.62±0.55	98.43±1.86	102.31±4.08
250	97.80±1.84	1.7	2.6	92.70±1.39	103.25±1.09	95.26±1.98	99.37±3.55

### 3.2 孵育体系的优化

**3.2.1 孵育时间** 以大鼠肝微粒体和肝 S9 为代表,在芦西丁浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,肝微粒体(I 相代谢)和肝 S9(II 相代谢)蛋白质质量浓度均为  $0.5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  条件下,考察孵育时间(0、20、40、60、120、180 min)对芦西丁代谢的影响,底物剩余量与孵育时间的变化曲线见图 2。结果发现 I 相代谢时,在 0~40 min 内,芦西丁呈线性消除,40~60 min 时,消除速率减慢;60~120 min 变化较小,故 I 相代谢孵育时间选 60 min;II 相代谢时,芦西丁在 180 min 内呈线性消除,考虑到肝 S9 在孵育时间较长情况下,酶蛋白可能失活,故以 120 min 作为 II 相代谢的反应时间。

**3.2.2 蛋白质质量浓度** 孵育体系中芦西丁的浓度

表 1 肝清除率计算的相关理化参数

Table 1 Physiological parameters used for calculation of hepatic clearance

种属	肝微粒体质量-肝质量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	肝质量-体质量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$Q_h/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$
大鼠	44.8	40.0	55.2
小鼠	45.0	87.5	90.0
比格犬	77.9	32.0	30.9
人	48.8	25.7	20.7

### 3 结果

**3.1 方法学验证** 在设定的检测条件下,芦西丁和内标的峰形良好,二者保留时间( $t_R$ )分别为 25.84、29.71 min,孵育体系中内源性物质并未干扰待测物的测定,方法专属性良好,见增强出版附加材料。线性范围为  $5 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,芦西丁标准曲线的回归方程为  $Y=0.0537X+1.0953$  ( $R^2=0.9962$ ),线性关系良好。此外,芦西丁低、中、高质量浓度质控样品日内、日间精密度的相对标准偏差(RSD)均  $< 5\%$ ,准确度在  $91.35\% \sim 99.62\%$ ,提取回收率和基质效应均在  $85\% \sim 115\%$ ,样品放置 12 h 和 24 h 的稳定性良好(准确度  $95.26\% \sim 106.12\%$ ),符合生物样品定量分析的相关要求,检测结果准确可信,样品提取方法、基质效应不会影响芦西丁的分析,见表 2。

为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,孵育时间 180 min,考察肝微粒体和肝 S9 酶蛋白质量浓度( $0.5、0.75、1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )对芦西丁代谢的影响,见图 2,结果发现蛋白质质量浓度在  $0.5 \sim 1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其对芦西丁代谢影响较小,考虑酶浓度过高可能会造成母药与蛋白非特异性结合,影响其检测,从而高估清除率<sup>[17]</sup>,综合二者情况,选择微粒体或 S9 蛋白质质量浓度  $0.75 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.2.3 底物浓度** 当肝微粒体/肝 S9 蛋白质质量浓度为  $0.75 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,I 相和 II 相代谢反应体系的孵育时间分别为 60、120 min 时,考察芦西丁浓度( $0.5、1、2.5、5、10、25、50、100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对芦西丁代谢的影响,见图 2。结果发现底物浓度为  $0.5 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其底物消除量呈线性减少,底物浓度  $> 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

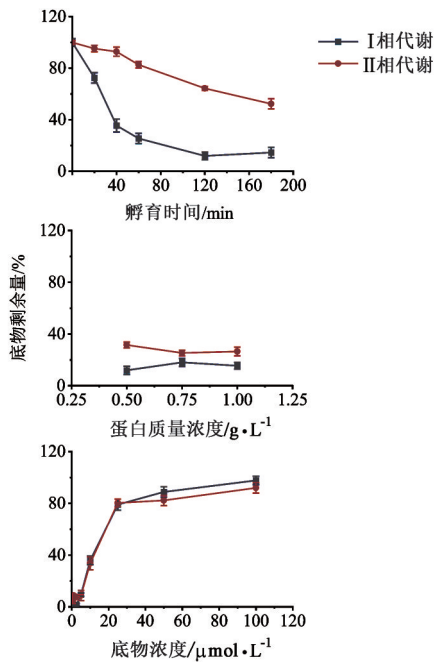


图2 芦西丁孵育体系的优化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 2 Optimization of incubation system of lucidin ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时,消除速率减慢,呈饱和动力学特性。使用GraphPad Prism 8.3对底物消除速率和底物浓度进行非线性酶动力学拟合,计算I相代谢和II相代谢的米氏常数( $K_m$ )分别为11.39、12.24  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而在代谢稳定性试验中,测试化合物浓度应低于 $K_m$ ,以防由于底物过量或产物积累导致反应遵循非线性一级动力学<sup>[3]</sup>。综上考虑,底物浓度选10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.3 代谢稳定性

**3.3.1 肝微粒体 I 相代谢稳定性研究** 分别考察芦西丁在2种不同体系下的代谢消除情况,并比较种属间的差异。肝微粒体 I 相代谢体系的底物剩

表3 芦西丁在不同孵育体系中的代谢清除参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

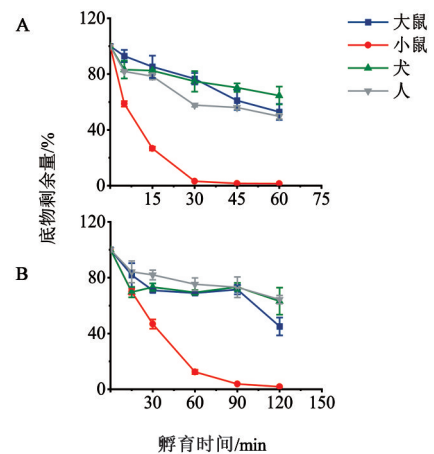
Table 3 Metabolic clearance parameters of lucidin in different incubation systems ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

孵育体系	参数	大鼠	小鼠	比格犬	人
肝微粒体 I 相代谢	$k$	$-0.0046 \pm 0.0009$	$-0.0334 \pm 0.0015$	$-0.0027 \pm 0.0003$	$-0.0048 \pm 0.0002$
	$t_{1/2}/\text{min}$	$157.65 \pm 30.79$	$20.76 \pm 0.93^{(2)}$	$264.75 \pm 33.72^{(2)}$	$145.45 \pm 7.36$
	$CL_{\text{int}}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$10.9 \pm 2.07$	$175.60 \pm 7.85^{(2)}$	$8.84 \pm 1.11$	$7.99 \pm 0.40$
	$CL_{\text{h}}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$9.06 \pm 1.45^{(1)}$	$59.48 \pm 0.90^{(2)}$	$6.86 \pm 0.67$	$5.76 \pm 0.21$
肝 S9 II 相代谢	$k$	$-0.0022 \pm 0.0004$	$-0.0154 \pm 0.0004$	$-0.0010 \pm 0.0001$	$-0.0013 \pm 0.0001$
	$t_{1/2}/\text{min}$	$325.02 \pm 60.39^{(2)}$	$45.09 \pm 1.17^{(2)}$	$688.01 \pm 66.19^{(1)}$	$527.11 \pm 42.84$
	$CL_{\text{int}}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$5.27 \pm 0.97$	$80.75 \pm 2.10^{(2)}$	$3.38 \pm 0.33$	$2.21 \pm 0.18$
	$CL_{\text{h}}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$4.80 \pm 0.80^{(2)}$	$42.55 \pm 0.58^{(2)}$	$3.04 \pm 0.26$	$2.00 \pm 0.15$

注:与人肝微粒体或与人肝 S9 组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

**3.3.2 肝 S9 II 相代谢稳定性研究** 芦西丁在不同种属肝 S9 进行 II 相孵育,底物剩余量-时间曲线见

余量-孵育时间曲线见图3,结果表明大鼠、比格犬、人在0~60 min内,底物消除满足一级动力学,而在小鼠肝微粒体中,代谢较快,在0~30 min内呈线性消除,30 min时底物消除约97%,代谢反应速率有明显种属差异。按2.6.1项下方法计算得到芦西丁的 $t_{1/2}$ 和 $CL_{\text{int}}$ ,外推得到 $CL_{\text{h}}$ ,见表3。判断化合物代谢稳定性的标准为 $t_{1/2} < 30$  min时,表明代谢不稳定; $t_{1/2}$ 为30~90 min时,表明代谢稳定性中等; $t_{1/2} > 90$  min时,表明代谢稳定性良好<sup>[18]</sup>。结果说明芦西丁在小鼠肝微粒体中代谢不稳定,在大鼠、比格犬、人肝微粒体中则代谢稳定性良好,其中小鼠 $t_{1/2}$ 显著低于人( $P < 0.01$ ),比格犬 $t_{1/2}$ 则显著高于人( $P < 0.01$ ),大鼠和小鼠的 $CL_{\text{h}}$ 均明显高于人( $P < 0.05, P < 0.01$ )。



注:A.肝微粒体中的I相代谢孵育体系;B.肝S9中的II相代谢孵育体系

图3 芦西丁在大鼠、小鼠、比格犬、人肝微粒体或肝 S9 中的体外代谢消除曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Metabolic elimination curves of lucidin in rat, mouse, beagle dog, human liver microsomes or liver S9 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

图3,结果发现大鼠、比格犬、人在0~120 min内呈线性消除,小鼠在0~60 min内呈现线性消除,小鼠的

消除速率较大鼠、比格犬、人快。芦西丁在小鼠肝S9中代谢稳定性中等,在大鼠、比格犬、人肝S9中代谢稳定性良好,见表3。与人肝S9相应参数比较,大鼠、小鼠  $t_{1/2}$  显著降低 ( $P < 0.01$ ),比格犬  $t_{1/2}$  明显增加 ( $P < 0.05$ ),大鼠、小鼠的  $CL_b$  显著增加 ( $P < 0.01$ )。相较于I相代谢,II相代谢4个种属的  $t_{1/2}$  偏高,清除率偏低,说明CYP对芦西丁的代谢转化强于SULT。

### 3.4 芦西丁体外代谢产物分析

#### 3.4.1 芦西丁的质谱裂解规律 在负离子模式下,

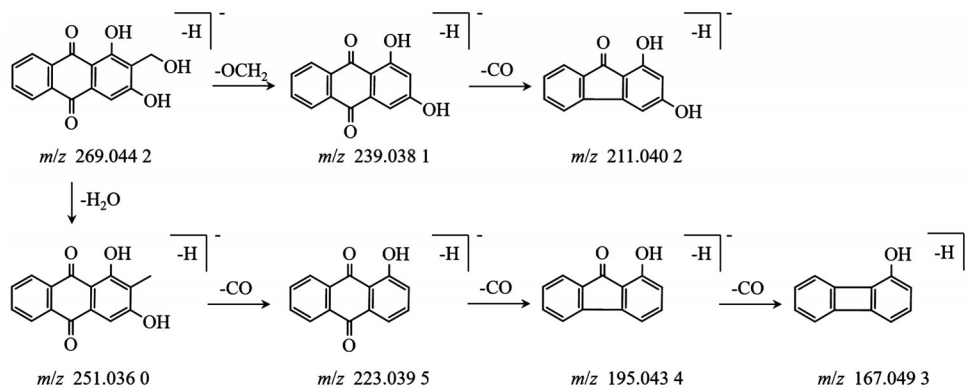


图4 芦西丁的质谱裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathways of lucidin

3.4.2 代谢产物分析 根据上述提到的分析流程,对得到的代谢产物信息进行分析,谱峰归属和鉴定结果见增强出版附加材料及表4。芦西丁作为底物与4个种属肝微粒体启动I相代谢后,其主要代谢产物为母核上不同活性位点发生的氧化产物(M1~M3);而在4个种属肝S9启动的II相代谢中,蒽醌环外碳链上的羟基作为活性位点,引入磺酸基

芦西丁准分子离子峰为  $[M-H]^-$   $m/z$  269.044 2,分子式  $C_{15}H_{10}O_5$ ,其主要特征碎片离子、可能的MS裂解途径见图4和增强出版附加材料。脱去CO或CO<sub>2</sub>留下共轭体系是蒽醌类化合物的特征裂解方式之一<sup>[19-21]</sup>,芦西丁特征碎片离子是识别其代谢产物的重要信息,在MS图谱中,通过标记有共同特征碎片的化合物,使用化合物结构相似性判定,并结合药物体内代谢规律和相关文献等,可较为便利地寻找代谢产物。

团(-SO<sub>3</sub>H),从而生成了磺酸化代谢产物M4和M5,5种代谢产物在4个种属孵育体系中均有检出。对于上述2种II相的磺酸化代谢产物,通过内标归一化法对代谢产物相对含量的经时变化进行计算,结果发现不同种属间磺酸化代谢产物M4、M5存在含量上的差异,且小鼠孵育体系中含量最高,这与上述II相代谢稳定性的实验结果较为一致,见图5。

表4 芦西丁I相和II相代谢产物

Table 4 Phase I and phase II metabolites of lucidin

孵育体系	代谢产物	$t_R$ /min	化学式	$m/z$ 理论值	$m/z$ 实测值	$\delta$ /ppm	代谢转化	主要碎片离子
肝微粒体 I相代谢	M1	21.52	$C_{15}H_8O_7$	299.021 8	299.021 6	-0.67	氧化、氧化、氧化	281.011 0, 255.029 0, 227.034 7, 211.040 3, 183.044 6
	M2	24.27	$C_{15}H_8O_6$	283.024 5	283.024 7	0.71	氧化、氧化	239.038 2, 211.040 4, 195.043 5, 167.049 8
	M3	30.44	$C_{15}H_8O_5$	267.029 5	267.029 4	-0.37	氧化	239.038 2, 211.040 2, 195.043 4, 167.049 3
肝S9 II相代谢	M4	20.83	$C_{15}H_{10}O_8S$	349.002 4	349.002 4	0.00	磺酸化	269.044 5, 251.036 4, 239.035 0, 223.039 2, 195.043 7
	M5	24.26	$C_{15}H_{10}O_7S$	333.007 6	333.007 1	-1.50	脱水、还原、磺酸化	253.051 9, 225.055 1, 209.062 7, 181.636 7

## 4 讨论

在新药研发早期阶段,可通过研究药物在体外肝微粒体或肝S9中的代谢稳定性和代谢特征,比较不同种属或不同代谢阶段的差异,为后期动物模型的选择及相关体内代谢研究提供有价值的参考。由于早期阶段代谢产物信息缺乏或不明确、对样品

不易获得,常用底物消除法进行代谢稳定性考察<sup>[22]</sup>。本研究建立了检测蒽醌类化合物芦西丁的UHPLC-HRMS,并在前期工作中对检测条件和内标进行了优化,所建方法专属性强、准确度高,可用于生物样品中芦西丁的含量测定及药理学相关研究。

根据非临床药理学相关指导原则<sup>[23]</sup>,本文选取

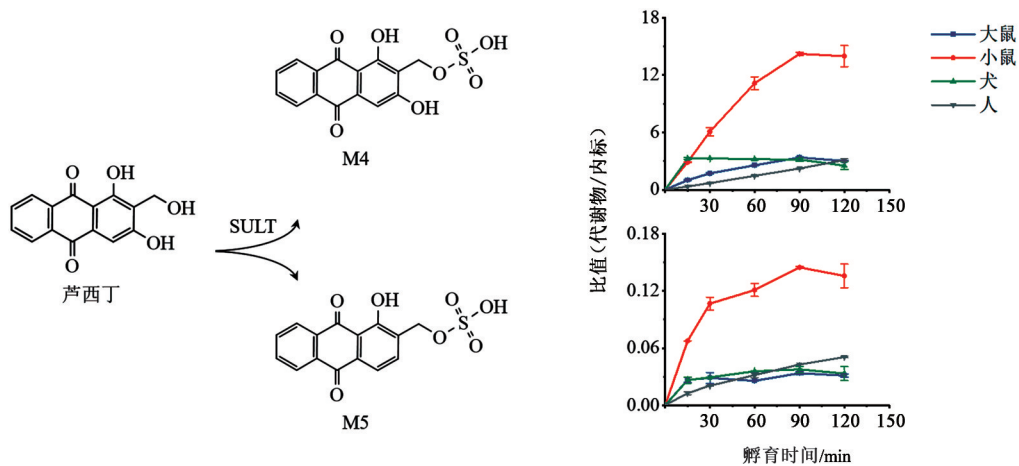


图5 芦西丁的Ⅱ相磺酸化代谢产物及其种属间生成量差异( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 5 Phase II sulfation metabolites of lucidin and differences of their production among species ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

了大鼠、小鼠、比格犬、人4个种属的肝微粒体和肝S9进行代谢稳定性考察,以分析芦西丁被代谢的难易程度。结果表明芦西丁在大鼠、小鼠、比格犬、人4种肝微粒体和肝S9中的代谢特征有所差异,在小鼠肝中较易被代谢且代谢不稳定,而在大鼠、比格犬和人肝中代谢稳定性良好,这可能与人类、啮齿动物间CYP和SULT的表达水平、底物特异性的生物学差异相关<sup>[11-12]</sup>。大鼠、比格犬与人的I、Ⅱ相代谢 $CL_h$ 和代谢消除曲线较为相似,三者的代谢特征相近,提示后续研究可考虑这2种物种作为体内相关代谢和临床前毒理研究的模型动物。

CYP催化的I相代谢反应和SULT催化的Ⅱ相代谢反应是药物在体内生物转化的关键步骤,本研究对芦西丁在CYP、SULT介导的I相、Ⅱ相代谢反应中生成的产物进行了探索,共识别了3种I相氧化代谢物和2种Ⅱ相磺酸化代谢物,不同种属中磺酸化产物的生成趋势与芦西丁的消除趋势相一致,表明Ⅱ相代谢确实存在芦西丁向磺酸化产物的生物转化。其中,生成的磺酸化代谢物引入了具有强亲电性的磺酸基团,有研究表明,正丁基苯酚<sup>[24]</sup>、马兜铃酸<sup>[25-26]</sup>等正是由于代谢产生的磺酸结合物易裂解,生成了高度反应性的阳离子中间体,可与蛋白或DNA共价结合,从而造成肝毒性或致癌作用。对于此类经过磺酸化代谢激活,生成可能的前致癌物或致癌物,从而参与毒性作用的化合物应予以关注。

综上所述,本研究建立并验证了生物样品中芦西丁的定性、定量检测方法,对芦西丁的体外代谢稳定性进行评价,对可能的代谢产物和代谢途径进行研究,发现大鼠、比格犬与人的体外代谢相近,可

作为相关模型动物的候选。对于这类蒽醌化合物的代谢,除了常见的I相CYP代谢体系,本研究同时考察了与含羟基、氨基中药化合物毒性作用可能相关的Ⅱ相磺酸化代谢,并对磺酸化代谢产物给出了谱峰归属和初步鉴定,但具体的结构表征及代谢过程仍有待后续研究进一步确认。此外,体外微粒体和S9代谢模型与体内真实代谢情况存在一定差异,体外代谢模型无法从机体的整体水平对代谢物进行分析并得到完整的代谢轮廓信息,后续将针对这一不足,结合模型动物的体内实验,从多层次、多角度探讨芦西丁遗传毒性及其与I相、Ⅱ相代谢的关系,厘清毒性机制,以期为芦西丁及相似蒽醌类化合物的体内代谢研究、安全性评价及动物模型选择提供参考依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] MORGAN I, WESSJOHANN L A, KALUDEROVIC G N. *In vitro* anticancer screening and preliminary mechanistic study of a-ring substituted anthraquinone derivatives[J]. Cells, 2021, 11(1): 168.
- [2] ISHII Y, INOUE K, TAKASU S, et al. Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-O-primeveroside[J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(5): 1112-1118.
- [3] CHAO P Y, USS A S, CHENG K C. Use of intrinsic clearance for prediction of human hepatic clearance[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010, 6(2): 189-198.
- [4] ISHII Y, TAKASU S, KURODA K, et al. Combined

- application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of gpt delta rats given madder color or its constituents[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(9/10):2467-2475.
- [ 5 ] WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL AGENCY for RESEARCH on CANCER. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [M]. Lyon: IARC Press, 2002, 82: 147.
- [ 6 ] INOUE K, YOSHIDA M, TAKAHASHI M, et al. Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1):184-191.
- [ 7 ] REN G H, CHEN H L, ZHANG M, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of oroxylin A, oroxylin A 7-O-glucuronide and oroxylin A sodium sulfonate in rats after administration of oroxylin A[J]. *Fitoterapia*, 2020, 142: 104480.
- [ 8 ] LIANG S C, XIA Y L, HOU J, et al. Methylation, glucuronidation, and sulfonation of daphnetin in human hepatic preparations *in vitro*: Metabolic profiling, pathway comparison, and bioactivity analysis [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2):808-816.
- [ 9 ] OKUNO Y, BONALA R, ATTALURI S, et al. Bioactivation mechanisms of *N*-hydroxyaristolactams: Nitroreduction metabolites of aristolochic acids [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2019, 60(9):792-806.
- [ 10 ] 熊爱珍, 杨莉, 张芳, 等. LC-MS<sup>n</sup> 鉴定肝毒性吡咯里西啶类生物碱千里光碱大鼠体内代谢产物[J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(1):54-60.
- [ 11 ] ISHII Y, KIJIMA A, TAKASU S, et al. Effects of inhibition of hepatic sulfotransferase activity on renal genotoxicity induced by lucidin-3-*O*-primeveroside [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4):650-657.
- [ 12 ] SACHSE B, MEINL W, GLATT H, et al. The effect of knockout of sulfotransferases 1A1 and 1D1 and of transgenic human sulfotransferases 1A1/1A2 on the formation of DNA adducts from furfuryl alcohol in mouse models [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(10):2339-2345.
- [ 13 ] TANEJA I, KARSAULIYA K, RASHID M, et al. Species differences between rat and human *in vitro* metabolite profile, *in vivo* predicted clearance, CYP450 inhibition and CYP450 isoforms that metabolize benzantrone: Implications in risk assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 111: 94-101.
- [ 14 ] 郭兆娟, 张晶璇, 康倩君, 等. 补骨脂对大鼠、小鼠肝毒性的比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22):16-25.
- [ 15 ] SŁOCZYŃSKA K, GUNIA-KRZYŻAK A, KOCZURKIEWICZ P, et al. Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities[J]. *Acta Pharm*, 2019, 69(3):345-361.
- [ 16 ] 刘琼艳, 张美琴, 卿晨, 等. 喜树碱衍生物NCP4在不同种属肝微粒体中代谢稳定性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(11):1968-1974.
- [ 17 ] BARANCZEWSKI P, STAŃCZAK A, SUNDBERG K, et al. Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development [J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(4):453-472.
- [ 18 ] 张丽, 蔡进, 班玉娟, 等. 采用UPLC-MS/MS法研究树豆酮酸A在不同种属肝微粒体中的代谢差异[J]. *中国药房*, 2019, 30(18):2497-2502.
- [ 19 ] 刘梦娇, 王云, 李玲云, 等. 三黄片化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS快速鉴定分析[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9):1685-1692.
- [ 20 ] 罗思妮, 彭致铖, 范倩, 等. 经典名方小承气汤中化学成分成分的UPLC-Q-Orbitrap-MS分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23):1-10.
- [ 21 ] 牛燕燕, 陈光英, 罗由萍, 等. 密度泛函理论辅助研究大黄素型蒽醌化合物电喷雾质谱的裂解过程[J]. *分析科学学报*, 2017, 33(3):367-372.
- [ 22 ] 刘志宝, 吴耽, 唐娟, 等. 辛芍组方效应成分在正常和脑缺血再灌注损伤大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1):169-176.
- [ 23 ] 黄凯, 刘志浩, 贺晴. 黄芩苷对大鼠和人肝微粒体CYP450酶的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3):20-23.
- [ 24 ] DIAO X, PANG X, XIE C, et al. Bioactivation of 3-*N*-butylphthalide via sulfation of its major metabolite 3-hydroxy-NBP: Mediated mainly by sulfotransferase 1A1[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(4):774-781.
- [ 25 ] HASHIMOTO K, ZAITSEVA I N, BONALA R, et al. Sulfotransferase-1A1-dependent bioactivation of aristolochic acid I and *N*-hydroxyaristolactam I in human cells[J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(7):647-655.
- [ 26 ] GAN J P, MA S G, ZHANG D L. Non-cytochrome P450-mediated bioactivation and its toxicological relevance[J]. *Drug Metab Rev*, 2016, 48(4):473-501.

[责任编辑 刘德文]