

# 关附壬素在 Caco-2 细胞上的摄取特性研究

王瑞<sup>1,2</sup>, 于彤<sup>1</sup>, 褚延乐<sup>1</sup>, 王琳茜<sup>1</sup>, 李晓天<sup>1\*</sup>

(1. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 2. 漯河市中心医院, 河南 漯河 462000)

**[摘要]** 目的:研究关附壬素在 Caco-2 细胞上的摄取特性。方法:采用液相色谱质谱联用(LC-MS)测定法, COSMOSIL C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 2.0 mm, 5 μm), 流动相:乙腈-水(含 0.2% 冰乙酸)30:70, 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 电喷雾离子化(ESI)方式, 采用选择性离子检测法, 检测离子为正离子, 关附壬素的选择性离子:[M + H], *m/z* 388。考察了温度、药物浓度、时间和 pH 对关附壬素在 Caco-2 细胞上摄取的影响。结果:关附壬素在 0.2 ~ 50.0 μmol·L<sup>-1</sup> 内呈良好的线性关系(*r* = 0.996 7), 最低定量限为 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>。关附壬素在 Caco-2 细胞上的摄取具有一定的浓度、时间和 pH 依赖性。结论:该方法灵敏、操作简单, 选择性强, 关附壬素在 Caco-2 细胞上摄取良好, 其摄取表现为被动扩散。

**[关键词]** 关附壬素; LC-MS; Caco-2 细胞; 摄取

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0282-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013160282

## Uptake Determination of Guanfu Base I in Caco-2 Cells

WANG Rui<sup>1,2</sup>, YU Tong<sup>1</sup>, CHU Yan-le<sup>1</sup>, WANG Lin-xi<sup>1</sup>, LI Xiao-tian<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Luohe Center Hospital, Luohe 462000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the uptake status of Guanfu Base I (GFI) in Caco-2 cells. **Method:** To establish Liquid Chromatography with Mass Spectrometry (LC-MS) assay, A LC procedure was carried out using an C<sub>18</sub> (150 mm × 2.0 mm, 5 μm) and an eluate of 0.2% acetic acid-acetonitrile (30:70) at the flow rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup>. The MS portion was set with ESI ion source in the positive ion polarity mode and the selective ion monitoring (SIM). A protonated molecules [M + H] were detected at *m/z* 388.10 for GFI. The GFI concentrations in Caco-2 cells at various time, concentration, temperature and pH values were measured. **Result:** The linearity of GFI concentration curve was found in the range of 0.2-50.0 μmol·L<sup>-1</sup> (*r* = 0.996 7). The minimal detection limit was 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>. The GFI uptakes in Caco-2 cells obeyed a passive diffusion in a time, concentration and pH-dependent manner. **Conclusion:** This sensitive and specific LC-MS assay can be applied to determine GFI concentrations in Caco-2 cells.

**[Key words]** GFI; liquid chromatography-mass spectrometry; Caco-2 cells; uptake

关附壬素(guanfu base I, GFI)为毛茛科植物黄花乌头 *Aconitum coreanum* Rapaics 的块根—关白附子中提取分离的活性单体化合物<sup>[1]</sup>。药理研究表明,关附壬素具有明显的抗心律失常作用<sup>[2-3]</sup>,其抗心律失常作用与关白附子中提取分离的另一单体化

合物关附甲素相比,疗效减弱,但其毒性与关附甲素相比明显降低<sup>[4]</sup>,关附甲素作为一类抗心律失常新药已经应用于临床<sup>[4]</sup>,有实验证实关附甲素在大鼠及人体内可代谢产生关附壬素<sup>[5-7]</sup>,关附壬素在机体内的药动学特征也有文献报道<sup>[8-9]</sup>但是,到目前为止,有关关附壬素的吸收机制未见报道,由于该化合物与关附甲素相比具有毒副作用较小的特点,为了对此类化合物作系统深入的研究和对关附壬素作进一步的开发,本实验采用 LC-MS 测定法首次对关附壬素在 Caco-2 细胞上摄取特性进行了研究。

**[收稿日期]** 20130114(029)

**[第一作者]** 王瑞, 硕士, 从事临床药理研究, Tel:13569680263, E-mail: WangRui56116@163.com

**[通讯作者]** \* 李晓天, 博士, 副教授, 从事临床药理研究, Tel: 13783606716, E-mail: lixt@edu.cn

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** LC-MS2010 型液相-质谱联用系统,包括双高压泵,在线真空脱气机,自动进样器,柱温箱,LC-MS solution version 2.04 Sul-H3 工作站(日本,岛津公司);SX-40扫描电子显微镜(日本,日立公司);752C 紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);BB16 型二氧化碳培养箱(德国,Hearous 公司);SUPER T 21高速冷冻离心机(美国,Sorvail 公司);24 孔培养板(美国 Costar 公司)。关附壬素(批号 20100812)和内标 DDPH(批号 0185-7508,中国药科大学新药研究中心提供,纯度均 >99%);DMEM 培养基(Dulbecco'S Modified Eagle'S medium,Gibico);胎牛血清,非必需氨基酸(Hyclone 公司);谷氨酰胺,胰蛋白酶(Sigma 公司);考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue G-250,Amresco);牛血清白蛋白(Amresco 公司);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

**1.2 细胞培养的条件及方法** Caco-2 细胞株(American Type Culture Collection, Rockville),传代数在 40 代之内。将细胞接种于培养瓶,培养液为 DMEM 高糖培养基(葡萄糖  $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,含 10% 胎牛血清,1% 非必需氨基酸,1% L-谷氨酰胺以及青霉素-链霉素双抗液,置于 5%  $\text{CO}_2$ ,37 °C 培养箱中。细胞按  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  接种于 24 孔培养板,隔天换培养液 1 次,1 周后每天换液 1 次,待细胞单层膜铺满后加药。

**1.3 药物摄取试验** 加药前各孔加入 37 °C 的 HBSS(Hanks balanced salt solution)1 mL 荡洗 3 次并吸干孔内液体。将待测药物加入各孔,置于 37 °C 培养箱(考察 4 °C 温度对摄取影响时置于冰箱),按设定时间迅速吸出药物,并用 4 °C 的 HBSS 荡洗 3 次后加入 1 mL 水,-80 °C 反复冻融 3 次和超声 15 min 以破碎细胞, $15\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,取 0.2 mL 过滤液,加入  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  关附壬素溶液 20  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s,离心 15 min,取上清液 5  $\mu\text{L}$  进样测定,另取 0.5 mL 未过滤细胞悬液以考马斯亮蓝法测定蛋白<sup>[10]</sup>。

### 1.4 LC-MS 分析

**1.4.1 色谱条件**  $\text{C}_{18}$  色谱柱(150 mm  $\times$  2.0 mm,5  $\mu\text{m}$ )(泉岛公司,日本),流动相乙腈-水 30:70,用 0.2% 冰乙酸溶液,加入二乙胺适量调 pH 至 4.0 左右,流速  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温 25 °C。

**1.4.2 质谱检测条件** 检测模式:电喷雾离子化方式(ESI),采用选择性离子检测(SIM),检测离子为

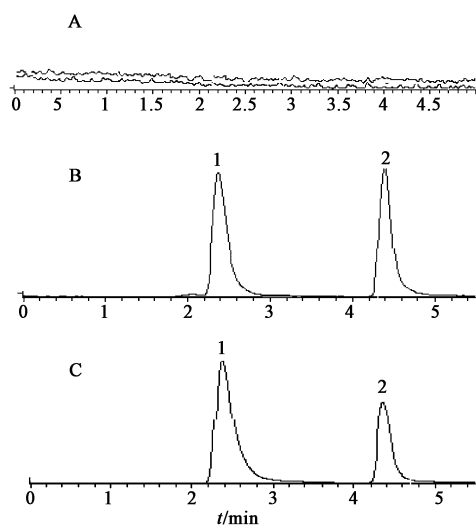
正离子,关附壬素  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , $m/z$  388,DDPH  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , $m/z$  344。干燥气流速  $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;雾化室压力 172 kPa;干燥气温度 350 °C;曲形脱溶剂装置(CDL)温度 250 °C,毛细管电压:4 000 V。

**1.5 统计学处理** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据统计软件为 SPSS 16.0,采用双侧  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 方法学研究

**2.1.1 色谱行为** 在上述试验条件下关附壬素和 DDPH 的保留时间  $t$  分别为 2.36,4.47 min,且溶液中无杂质峰干扰样品的测定,见图 1。



A. 空白细胞悬液; B 空白细胞悬液加关附壬素和 DDPH;  
C. 关附壬素  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  细胞样品;1. 关附壬素;2. DDPH

图 1 关附壬素 HPLC-MS 图谱

**2.1.2 标准曲线** 取滤膜过滤后空白细胞悬液 0.2 mL,加入不同量的关附壬素,加入  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  内标溶液 20  $\mu\text{L}$ ,使样品浓度分别为 0.2,0.5,2.0,5.0,20.0,50.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,LC-MS 分析。关附壬素在 0.2 ~ 50.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内线性关系良好,标准曲线方程为: $Y = 0.014X - 0.0568$ , $R = 0.9967$ , $X$  和  $Y$  分别代表样品中关附壬素浓度及关附壬素与内标峰面积的比值。

**2.1.3 精密度** 按 1.2 项配制低、中、高(0.2,2.0,50.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )3 种浓度的关附壬素样品,分别于 1 d 内和连续 5 d 进行 5 次 LC-MS 分析,求得日内 RSD 分别为 4.18%,4.26%,3.37%,日间 RSD 分别为 6.13%,5.89%,5.02%。关附壬素在低、中、高的 3 种浓度水平下,日内变异和日间变异均 <15%,符合生物样本的测定要求。

**2.1.4 回收率** 按 1.2 项配制低、中、高(0.2,2.0,

50.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3 种浓度的关附壬素样品,但不加入内标,经 LC-MS 测定值与相应浓度直接用流动相配制的样品溶液测定值的比值计算回收率,每个浓度重复 5 次,低、中、高 3 种浓度的回收率分别为  $(91.6 \pm 4.4)\%$ ,  $(90.8 \pm 4.2)\%$  和  $(91.9 \pm 3.6)\%$ 。

**2.2 时间对 Caco-2 细胞摄取关附壬素的影响** 关附壬素的摄取量受孵育时间的影响,每孔中加入含关附壬素  $(2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$  药液的 HBSS 后按 10, 20, 30, 40, 60, 120 min 取样,每个时间点平行操作 3 份样品。Caco-2 细胞对关附壬素的摄取量在 40 min 内随时间近似线性地增加,因此在以下实验中,细胞摄取时间定为 40 min。随后 Caco-2 细胞随着时间的增加吸收量逐渐趋于饱和,见图 2。

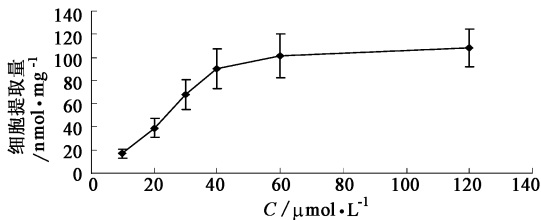


图 2 关附壬素在 Caco-2 细胞摄取的时间依赖性曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.3 浓度对 Caco-2 细胞摄取关附壬素的影响** 摄取量是指药物进入细胞内的量,与药物的吸收机制有关。本实验采用 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20.0, 50.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  系列浓度进行 Caco-2 细胞摄取研究,每个浓度平行操作 3 份,结果表明,细胞摄取量与药物浓度成正比,如图 3 所示,细胞摄取量与药物浓度具有较好的线性关系,表明关附壬素的摄取为一级速率过程,表现为被动扩散。

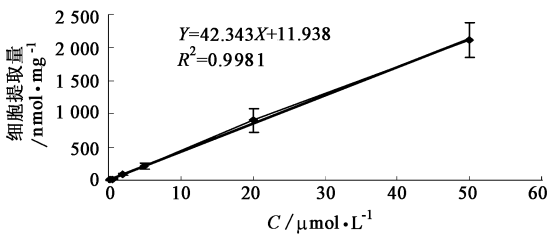


图 3 药物浓度对关附壬素在 Caco-2 细胞摄取中的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.4 温度 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 对 Caco-2 细胞摄取关附壬素的影响** 关附壬素各浓度 (每个浓度平行操作 3 份) 在 4  $^{\circ}\text{C}$  时的 Caco-2 细胞摄取量与 37  $^{\circ}\text{C}$  时各浓度的细胞摄取量相似,各浓度点摄取量经统计学处理无显著差异,方程直线斜率与 37  $^{\circ}\text{C}$  时摄取方程的直线斜率相比略微减小但无统计学差异,见图 4,表明温度降低对关附壬素的摄取没有明显影响。

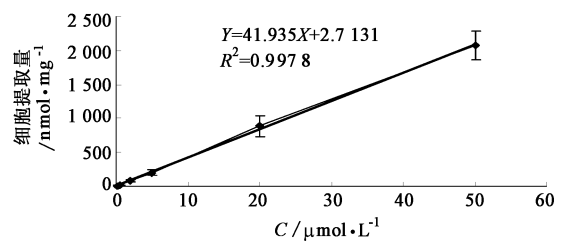
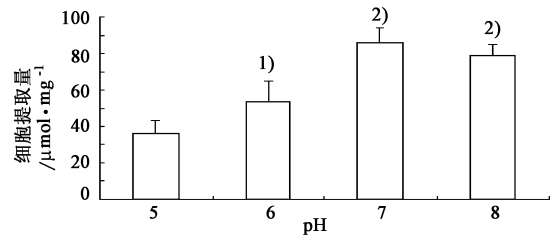


图 4 4  $^{\circ}\text{C}$  时关附壬素在 Caco-2 细胞中的摄取 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.5 pH 对 Caco-2 细胞摄取关附壬素的影响** 在介质 pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的条件下,测定加药 (每孔中加入含关附壬素  $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后 40 min 时间点 Caco-2 细胞对关附壬素的摄取量。发现摄取量在 pH 5.0 ~ 7.0 内,随着 pH 增高而增加,但是当 pH 在 8.0 时,摄取量与 pH 7.0 相比反而减少,但是无统计学差异,结果提示碱性条件下不利于 Caco-2 细胞对关附壬素的摄取。实验结果经统计学处理, pH 5.0 与其他 pH 的摄取量均有统计学差别, pH 值 7.0 的摄取量大于其他 pH 时的摄取量,结果见图 5。



与 pH 5.0 比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 5 关附壬素在 Caco-2 细胞摄取的 pH 依赖性 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

本实验采用 LC-MS 联用技术首次对关附壬素在 Caco-2 细胞上的摄取特性进行了研究。在细胞摄取试验中,首先考察了时间对关附壬素摄取的影响,观察到 Caco-2 细胞对关附壬素摄取约在 40 min 达峰,随后趋于饱和,表明该药能较容易被肠上皮细胞吸收,吸收速度较快。在摄取速度-浓度试验中,在较大浓度范围内,关附壬素单体摄取量均随着浓度升高而增加,两者呈正比关系,表现出一级速率过程的特征,且该药的摄取与温度没有明显关系,表明其摄取机制为被动扩散。结果提示该药在体内的吸收量可能与其给药量成正比。最后考察了 pH 对关附壬素摄取的影响,关附壬素摄取量在 pH < 7.0 时,随着 pH 值升高而增加,此后摄取量随 pH 值的升高反而下降,实验结果表明碱性条件下,不利于药物的摄取,具体原因正在进一步研究之中。研究结果提示该药在 pH < 7.0 的中性偏酸性环境中吸收

# 桃仁提取物对痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用的影响

金慧玲<sup>1</sup>, 张红英<sup>2\*</sup>

(1. 延吉市中医医院医生办公室, 吉林 延吉 133000;

2. 延边大学医学院机能学实验中心, 吉林 延吉 133002)

**[摘要]** 目的: 研究桃仁乙醇提取物对三氯化铝( $\text{AlCl}_3$ )致痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳的作用及机制。方法: 采用  $\text{AlCl}_3$  ( $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ig, 40 d) 以复制痴呆小鼠模型。以 Morris 水迷宫、疲劳仪, 观察桃仁乙醇提取物 ( $2.8, 1.4, 0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ig, 40 d) 对小鼠空间学习记忆和抗疲劳的作用, 测定脑组织丙二醛(MDA)含量和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性。结果: 桃仁乙醇提取物 ( $2.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 使 1 min 站台穿越次数明显增加; 并提高痴呆小鼠的抗疲劳能力, 桃仁乙醇提取物使痴呆小鼠脑组织 MDA 含量和 AchE 活性明显降低。结论: 桃仁乙醇提取物对痴呆小鼠空间学习记忆有明显的改善作用和抗疲劳能力, 其机制可能与降低 MDA 含量和 AchE 活性有关。

**[关键词]** 桃仁乙醇提取物; 学习记忆; 痴呆; 丙二醛; 乙酰胆碱酯酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0285-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013160285

## Effects of Extract from Persicae Semen Spatial Learning Memory and Anti-fatigue in Dementia Mice

JIN Hui-ling<sup>1</sup>, ZHANG Hong-ying<sup>2\*</sup>

**[收稿日期]** 20121212(010)

**[第一作者]** 金慧玲, 硕士, 主治医师, 从事中医内科学, Tel: 15567630925, E-mail: ihlxh02102006@163.com

**[通讯作者]** \* 张红英, 高级实验师, 从事心脑血管药理学研究, Tel: 0433-13843366516, E-mail: zhang-hongying52@163.com

较好, 在碱性环境中吸收较差, 预示着此药在胃中吸收较少, 在肠道环境中将会有较多的吸收。

### [参考文献]

[1] 刘静涵, 王洪诚, 高耀良. 中国乌头之研究 XVI. 关白附子中的新生物碱[J]. 中草药, 1981, 12(3): 1.  
[2] 张陆勇, 季惠芳, 常晓时, 等. 关附甲素与 I 类抗心律失常药对豚鼠乳头肌动作电位的作用比较[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(1): 49.  
[3] 后德辉, 邬利娅, 徐为人, 等. 关附庚素与关附甲素及关附壬素抗心律失常的比较[J]. 中国药科大学学报, 1987, 18(4): 268.  
[4] 刘静涵, 侯德辉, 王秋娟, 等. 抗心律失常药盐酸关附甲素的研究[J]. 中国科技奖励, 2008, 3: 57.  
[5] A Ji-Ye, Wang G J, Sun J G, et al. Identification of guanfu base A hydrochloride phase I and phase II metabolites in rat bile by liquid chromatography mass spectrometry [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(11): 1045.

[6] A J Y, Wang G J, Sun J G, et al. Identification of phase I and phase II metabolites of Guanfu base A hydrochloride in human urine [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2003, 28(4): 265.  
[7] A J Y, Wang G J, Liu X Q, et al. Study on the metabolites of guanfu base A hydrochloride in rat urine by high performance liquid chromatograph-mass spectrum [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 37(4): 283.  
[8] 李晓天, 王广基, 王素军. 盐酸关附甲素代谢产物关附壬素的药代动力学研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 366.  
[9] LI X T, Wang G J, WANG S J, Pharmacokinetics of guanfu base I, a metabolite of guanfu base A, in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 28(8): 1363.  
[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(7): 248.

[责任编辑] 聂淑琴