

去甲异波尔定在大鼠肝微粒体中葡萄糖醛酸化 代谢动力学研究

陈建忠^{1,2}, 俞桂新^{2,3*}, 王长虹², 王峥涛^{2,3}

- (1. 福建中医药大学药学院, 福州 350108;
2. 上海中医药大学教育部中药标准化重点实验室, 上海 201203;
3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究去甲异波尔定在大鼠肝微粒体中的葡萄糖醛酸化酶促反应动力学。**方法:**优化去甲异波尔定与大鼠肝微粒体的反应体系,采用超高效液相色谱-质谱联用技术定量检测孵育体系中去甲异波尔定代谢产物去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的浓度,并应用 Lineweaver-Burk 作图分析数据,计算酶促动力学常数。**结果:**去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的酶促反应动力学参数 K_m 40.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{\max} = 909.1 $\text{pmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg pro})^{-1}$, 肝清除率 $CL_{\text{int}}(V_{\max}/K_m)$ = 22.3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。**结论:**该方法简单、快速、可靠,适用于去甲异波尔定的葡萄糖醛酸化代谢研究;葡萄糖醛酸化是去甲异波尔定代谢的重要途径之一,提示葡萄糖醛酸转移酶的基因多态性及相关性的药物相互作用引起的去甲异波尔定活性和毒性作用的变化值得进一步关注。

[关键词] 去甲异波尔定; 去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷; 肝微粒体; 葡萄糖醛酸化; 酶促反应动力学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0149-05

Enzyme Kinetics of Norisoboldine Glucuronidation in Rat Liver Microsomes

CHEN Jian-zhong^{1,2}, CHOU Gui-xin^{2,3*}, WANG Chang-hong², WANG Zheng-tao^{2,3}

- (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;
2. MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201213, China;
3. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201213, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the enzyme kinetics of norisoboldine glucuronidation in rat liver microsomes. **Method:** An UPLC-MS method was developed for determination of norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide, a major metabolite of norisoboldine, in liver microsomes incubation system with sinomenine as internal standard. An optimum incubation system was found and the enzyme kinetics parameters of norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide were analyzed and calculated with Lineweaver-Burk graphic method. **Result:** The K_m , V_{\max} and $CL_{\text{int}}(V_{\max}/K_m)$ of norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide were 40.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 909.1 $\text{pmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg pro})^{-1}$ and 22.3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This method is simple, specific and reliable, which is suitable for the *in vitro* research of norisoboldine glucuronidation.

[Key words] norisoboldine; norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide; liver microsomes; glucuronidation; enzyme kinetics

[收稿日期] 20120605(001)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2009ZX09103);国家自然科学基金项目(81102882);上海市科委中药现代化专项(09dZ1972100)

[第一作者] 陈建忠, 博士, 讲师, 从事中药活性成分与体内过程研究, Tel:0591-22861135, E-mail:chenjz1977@126.com

[通讯作者] * 俞桂新, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel:021-50271706, E-mail:chouguixin@yahoo.com.cn

去甲异波尔定为阿朴菲类异喹啉生物碱,由樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根中分离得到^[1]。体外药理实验发现去甲异波尔定能够显著减少 RAW264.7 巨噬细胞释放一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β),其作用机制为通过下调 MAPKs 信号通路的活性从而抑制了巨噬细胞的活化和致炎因子的释放^[2]。动物实验表明该化合物能够显著减轻胶原关节炎小鼠(CIA)的疾病严重程度,保护关节受损,减低血清中抗胶原蛋白抗体的含量等^[3]。去甲异波尔定在大鼠体内能够发生广泛的生物转化。经质谱和核磁共振分析鉴定,共发现 5 种二相代谢产物,其中去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷是其最主要的代谢产物^[4]。本课题组采用 UPLC-MS 法,建立了血浆中去甲异波尔定和去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的血药浓度测定方法^[5],用于去甲异波尔定的不同给药途径的药动学研究。结果表明,原形药物的生物利用度仅有 2.77%;而代谢产物去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的血药浓度大大高于原形药物,并且在体内的停留时间也大大长于原形药物^[6]。因此,有必要对该化合物的代谢机制进行进一步研究。本文运用大鼠肝微粒体温孵法,进行去甲异波尔定的体外葡萄糖醛酸化代谢研究,旨在为深入探讨去甲异波尔定的代谢机制及新药开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Waters ZQ-2000 型超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC-MS, Waters, Milford, USA), VDRTEX-5 型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器公司),HCG-24A 型氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);Avanti J-25I 型离心机(Beckman Coulter, Inc.)。

1.2 试药 去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷由本实验室从大鼠尿液中自制获得(纯度 >99%)^[4];去甲异波尔定(批号 20080210)和青藤碱(内标物,批号 20080320)由上海中药标准化研究中心提供(纯度 >99%);6-磷酸-葡萄糖(G-6-P)、6-磷酸-葡萄糖脱氢酶、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)和辅酶 II(NADP⁺)等购自 Sigma 公司;大鼠肝微粒体(20 g·L⁻¹,批号为 BDVH)购自上海瑞德肝脏疾病有限公司;乙腈、甲醇和甲酸由德国默克公司提供(色谱纯),水为自制重蒸水,其余药品和溶剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制 去甲异波尔定溶液的配制:精密

称定去甲异波尔定对照品适量,溶于含 50% 甲醇的水溶液,配制成 200 mmol·L⁻¹ 的母液,存放于 4 ℃ 冰箱中备用,临用前稀释成所需浓度。

去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷溶液的配制:精密称取适量去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷对照品,用蒸馏水配置成 1.02 mmol·L⁻¹ 的对照品母液,存放于 4 ℃ 冰箱中备用,临用前稀释成所需浓度。

内标溶液的配制:精密称定青藤碱适量,用甲醇配成浓度为 0.15 μ mol·L⁻¹ 的内标液,存放于 4 ℃ 冰箱中备用。

空白温孵液:肝微粒体高温灭活,用缓冲液稀释成蛋白质浓度为 0.5 g·L⁻¹ 的空白温孵液。

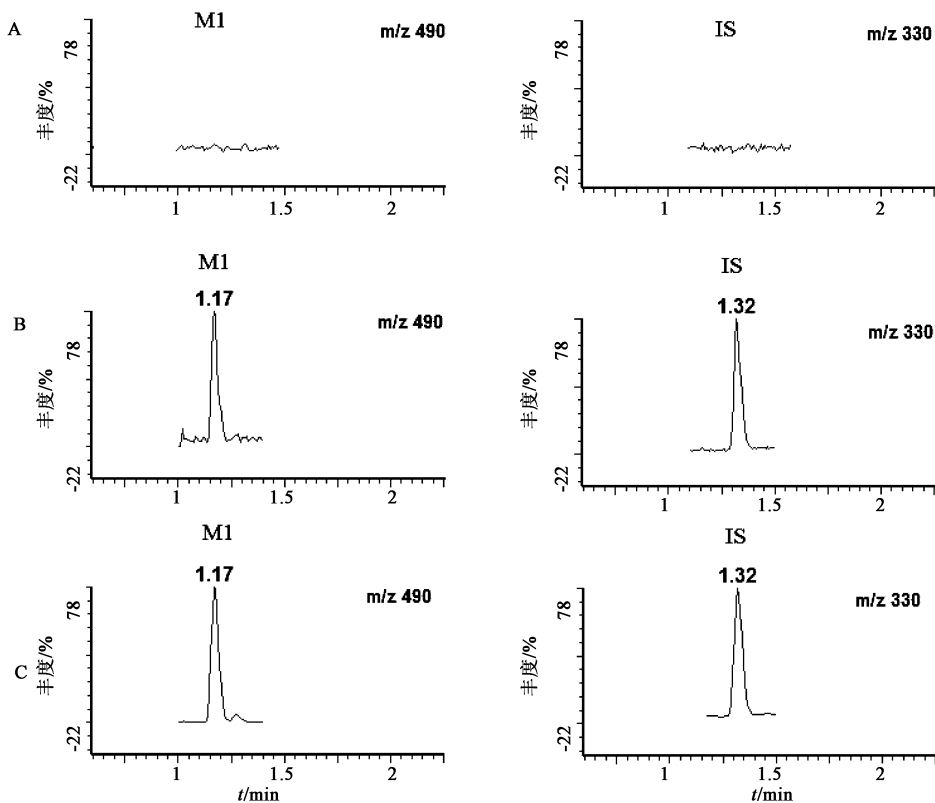
2.2 温孵体系及样品处理方法 葡萄糖醛酸化代谢孵体系包括肝微粒体 0.5 g·L⁻¹, 鲸蜡基醚(Brij, 0.05 g·L⁻¹), MgCl₂ (4 mmol·L⁻¹), Tris-HCl buffer (50 mmol·L⁻¹), 去甲异波尔定(相应浓度)和 UDPGA (5 mmol·L⁻¹), 总体积 200 μ L。反应体系中有有机溶剂的含量均 < 0.5%。反应从加入 UDPGA 开始,37 ℃ 振荡水浴中孵育 30 min 后,加入冰冷甲醇 300 μ L 和内标溶液 100 μ L,冰浴终止反应,涡旋混匀 60 s,20 000 $\times g$ 离心 10 min,吸取上清液 550 μ L,在 50 ℃ 氮气流下吹干,用 100 μ L 含 0.1% 甲酸的水溶液复溶,再 20 000 $\times g$ 离心 10 min,吸取上清液,进行分析。

2.3 色谱与质谱条件 液相色谱条件:UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m, Waters, USA),柱温 45 ℃,流速 0.5 mL·min⁻¹,流动相乙腈(A)-含 0.1% 甲酸的水溶液(B),梯度洗脱(时间/A%):0/5, 2/18.5, 2.5/95, 4.5/95, 4.5/5, 6/5;进样体积 5 μ L。

质谱条件:电喷雾离子化源(ESI),正离子模式检测;毛细管电压 2.8 kV,锥孔电压 35V,离子源温度 120 ℃,去溶剂温度 350 ℃,去溶剂气体流速 500 L·h⁻¹,锥孔气体流速 50 L·h⁻¹。扫描方式为选择离子反应检测(SIR)模式;用于定量分析的目标离子均为质子化的准分子离子峰[M + H]⁺, m/z 490(去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷), m/z 330(青藤碱,内标)。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取空白温孵液、添加去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷对照品的空白温孵液(0.4 g·mL⁻¹)和肝微粒体温孵样品(加入 20 μ mol·L⁻¹ 去甲异波尔定),按 2.2 项下方法处理后测定,见图 1。结果表明空白温孵液中无内源性物质干扰目标化合物的测定。



A. 空白温孵液;B. 添加对照品的空白温孵液;C. 温孵样品

图1 温孵液中去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷(M1, m/z 490)和青藤碱(内标, m/z 330)的SIR色谱

2.4.2 线性关系 精密量取适量去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷对照品母液,用蒸馏水稀释成不同浓度的标准液,加入空白温孵液,使其终浓度分别为0.21, 0.42, 0.84, 2.04, 4.08, 10.2, 20.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,其余的步骤按2.2项下方法处理测定。以峰面积比值为纵坐标,浓度为横坐标作直线回归,得标准曲线回归方程 $Y = 0.2027X - 0.0025$ ($r = 1$)。结果表明去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷在0.21 ~ 20.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性良好。

2.4.3 提取回收率 按2.4.2项下方法分别制备去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷的低、中和高三个浓度(0.21, 2.04, 10.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的肝微粒体温孵样品,每个浓度平行6份分析,获得相应的平均峰面积。另取空白温孵液198 μL ,按2.2项操作,获得的上清液中加入相应浓度的标准品溶液2 μL ,吸取上清液550 μL ,在50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干,用100 μL 含0.1%甲酸的水溶液复溶,再20 000 $\times g$ 离心10 min,吸取上清液,进行分析。以每一浓度下两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。经测定,本

法在低、中和高3个浓度的提取回收率分别为75.5%, 78.5%, 78.3%。同法考察内标的回收率为80.2%。

2.4.4 基质效应 取空白温孵液198 μL ,按2.2项操作,获得的上清液中加入相应浓度的标准品溶液2 μL ,其余步骤同上,获得相应的平均峰面积。另取相应浓度的用超纯水溶解的去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷溶液,吸取5 μL 进样分析,获得相应的峰面积。去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷在低、中和高3个浓度的峰面积比值分别为105.3%, 95.5%, 94.3%。同法考察了内标的比值为100.3%, 97.6%, 97.5%。说明在色谱流出过程中肝微粒体中的内源性物质并不会对目标分析物和内标的测定造成离子抑制或增强作用。

2.4.5 精密度与准确度 在空白温孵液中制备去甲异波尔定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷浓度分别为0.21, 2.04, 10.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的肝微粒体温孵样品各6份,其他操作步骤同2.2项下处理方法,连续测定3 d,计算日内、日间精密度和准确度。结果见表1。

表 1 去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷日间、日内精密度和准确度

化合物名称	加入量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	准确度 /%	日间精密度 RSD/%	日内精密度 RSD/%
去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷	0.21	0.21 ± 0.00	102.2	2.1	2.0
	2.04	2.1 ± 0.03	102.8	2.9	2.5
	10.2	9.98 ± 0.35	97.8	2.8	2.2

2.5 酶促动力学研究

2.5.1 温孵时间的影响 温孵体系中底物去甲异波尔多定浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 肝微粒体蛋白浓度为 $0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 37°C 温孵, 分别于 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min 取样, 处理后进样测定。结果去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的生产量在 0 ~ 30 min 内呈线性增加。因此, 选择 30 min 为最佳温孵时间。

2.5.2 蛋白浓度的影响 温孵体系中底物去甲异波尔多定的浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 肝微粒体蛋白浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 37°C 温孵 30 min, 处理后进样测定。结果去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的生产量在 0.1 ~ 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈线性增加。因此, 选择 $0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最佳蛋白浓度。

2.5.3 底物浓度的影响 去甲异波尔多定选用 2, 4, 10, 20, 100, 200, 400, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的体系浓度, 肝微粒体蛋白质量浓度 $0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 37°C 孵育 30 min, 处理后进样测定, 每个浓度平行 3 份, 每份进样 3 次。结果见图 2。去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的生产量在底物浓度为 2 ~ 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈线性增加; 100 ~ 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增加缓慢; 400 ~ 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时速率下降, 说明酶已饱和。

2.5.4 酶促动力学参数的测定 实验数据采用 Lineweaver-Burk 作图法, 即双倒数作图法(图 3), 以 V^{-1} 对 $[S]^{-1}$ 作图, 得到直线, 其纵截距为 V_{max}^{-1} , 横截距为 K_m^{-1} 进行计算, 代谢清除率为 V_{max}^{-1}/K_m 。去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的回归方程为 $Y = 0.0448 X + 0.0011$ ($r = 0.9979$), 计算得 $V_{\text{max}} = 909.1 \text{pmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg pro})^{-1}$, $K_m = 40.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CL_{\text{int}} = 22.3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

3 讨论

前期研究表明, 去甲异波尔多定具有良好的抗炎活性, 在大鼠体内能够与葡萄糖醛酸和硫酸结合形成二相代谢产物, 而未发现一相代谢产物。这可能主要是与其结构中含有两个酚羟基有关, 在体内极易发生结合反应。药动学研究表明去甲异波尔多定的生物利用度极低, 仅有 2.77%, 而代谢产物去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的血药浓度大大高于

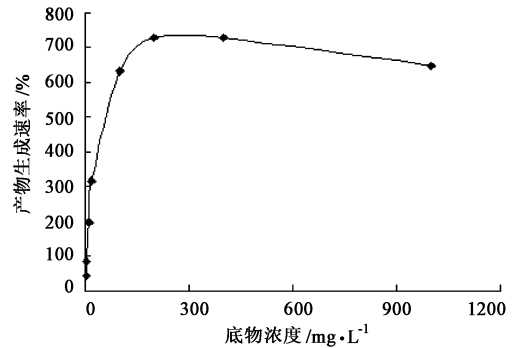


图 2 去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷的生成速率和底物浓度的变化曲线

原形药物, 并且在体内的停留时间也大大长于原形药物^[6]。本实验结果表明去甲异波尔多定在大鼠肝微粒体中葡萄糖醛酸化代谢快, 提示去甲异波尔多定生物利用度低与其遭受肝脏葡萄糖醛酸转移酶代谢有关, 因此葡萄糖醛酸转移酶的基因多态性及相关性的药物相互作用引起的去甲异波尔多定活性和毒性作用的变化值得进一步关注。同时该动力学参数结果, 为进一步阐明葡萄糖醛酸化转移酶对去甲异波尔多定体外代谢的机制提供了实验基础。

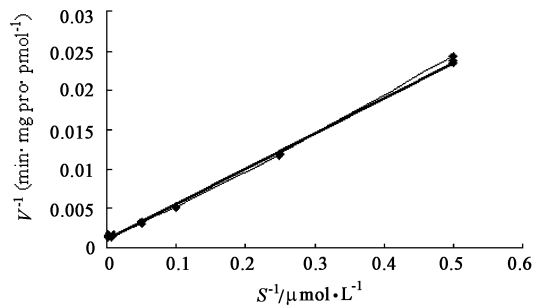


图 3 去甲异波尔多定-9-O-α-葡萄糖醛酸苷 V^{-1} 随 S^{-1} 变化曲线

[参考文献]

- [1] Chou G X, Norio N, Ma C M, et al. Isoquinoline alkaloids from *Lindera aggregate* [J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(5):272.
- [2] Luo Y B, Liu M, Dai Y, et al. Norisoboldine inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells by down-regulating the activation of MAPKs but not NF-κB [J]. Inflammation, 2010, 33(6):389.

基于液质联用技术的 HIV/AIDS 患者 尿液代谢组学研究

马素娜, 许前磊, 谢世平*, 刘伟, 崔永霞
(河南中医学院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 探寻艾滋病及人类免疫缺陷病毒携带(HIV/AIDS)患者尿液的代谢组变化, 探讨代谢组学方法在预防和延缓 HIV 病毒感染者病程进展研究中的应用前景。方法: 运用液质联用技术(LC-MS), 检测 55 例 HIV/AIDS 患者和 20 例健康人的尿液代谢成分, 结合主成分分析(PCA)和 *t* 检验分析技术, 分析 HIV/AIDS 患者尿液的特异性代谢物质(或群谱)。结果: HIV/AIDS 患者组与健康对照组经代谢组学的方法在尿液代谢轮廓上得到了良好区分, 发现了 10 个可能存在的潜在生物学标记物。结论: 代谢组学的研究方法可以将 HIV/AIDS 患者与健康人进行良好的区分, 综合代谢标记物变化趋势构成了 HIV/AIDS 的代谢特征, 代谢组学的方法在预防和延缓 HIV 病毒感染者病程进展的研究中将有很好的应用前景。

[关键词] 代谢组学; 艾滋病; 主成分分析; 液质联用技术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0153-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1046.010.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:46

Research on Urine Metabonomics of HIV/AIDS Patients Based on HPLC-MS Technique

MA Su-na, XU Qian-lei, XIE Shi-ping*, LIU Wei, Cui Yong-xia
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate human immunodeficiency virus (HIV/AIDS) in urine of patients with metabolic changes and to explore future application value of metabonomics technique in research of preventing and delaying the acquired immunodeficiency syndrome. **Method:** Using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), urine metabolic components in 55 HIV/AIDS patients and 20 healthy human beings were studied by metabonomics method, and combined with principal component analysis (PCA) and *t* test analysis

[收稿日期] 20120508(334)

[基金项目] 国家“十一五”科技重大专项(2009ZX10005-21)

[第一作者] 马素娜, 硕士, 助教, 从事中医药防治感染性疾病的研究, Tel:0371-65676858, E-mail:907702957@qq.com

[通讯作者] * 谢世平, 博士, 教授, 从事中医药防治感染性疾病的研究, Tel:0371-65926508, E-mail:xspzz@126.com

[3] Luo Y B, Liu M, Xia Y, et al. Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloid isolated from Radix Linderae, on collagen-induced arthritis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10):726.

[4] Chen J Z, Chou G X, Wang C H, et al. Characterization of new metabolites from *in vivo* biotransformation of norisoboldine by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5):687.

[5] Chen J Z, Xu Y, Chou G X, et al. Simultaneous

determination of norisoboldine and its major metabolite in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(3):367.

[6] 陈建忠, 俞桂新, 王长虹, 等. 去甲异波尔多及其代谢产物的药理学与生物利用度研究[J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(6):473.

[责任编辑 邹晓翠]