

小分子药物Ⅱ相代谢缀合物水解方法及促进酶解反应方法的研究进展[△]

陈丽竹*, 卢金森, 郁颖佳, 段更利, 李智平[#](复旦大学附属儿科医院, 上海 201102)

中图分类号 R917;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3886-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.40

摘要 目的:为小分子药物Ⅱ相代谢过程研究及相关分析提供参考。方法:查阅近几年相关研究文献,归纳小分子药物Ⅱ相代谢常见结合反应的类型并总结其代谢缀合物水解方法及促进酶解反应方法的研究进展。结果与结论:Ⅱ相代谢是Ⅰ相代谢物在体内的结合反应,包括糖苷结合、硫酸化、甲基化、乙酰化、氨基酸结合、谷胱甘肽结合、脂肪酸结合、缩合反应等。其中,最常见的小分子药物Ⅱ相代谢反应是与葡萄糖醛酸结合或与硫酸结合,生成葡萄糖醛酸苷缀合物或硫酸酯缀合物。小分子药物Ⅱ相代谢缀合物常见的水解方法包括酸水解、碱水解和酶水解。其中,酶水解以其安全、温和、不会引起目标物分解、重复性好、药物回收率高等优点,成为目前使用最广泛的水解方法。促进酶解反应的方法目前主要有红外辐射法和超声波法,两种方法都对不同的酶系反应有促进作用。

关键词 小分子药物;Ⅱ相代谢缀合物;水解方法;酶解反应;红外辐射法;超声波法

药物在体内需要经历吸收、分布、代谢、排泄的过程。药物的代谢又称为药物的生物转化,是指药物在体内经过吸收、分布之后,在酶的作用下经历化学结构变化的过程。目前,该领域研究范围较广,包括:代谢产物的结构和活性研究、新代谢方法的研究、药物代谢酶的研究、代谢选择性的研究、药物代谢的影响因素研究,等等。一般来说,药物进入体内后都要发生各种酶的催化下的化学反应,这些反应可以最大程度地减少外源性物质对机体的不良影响,是生物体长期进化的结果。对药物的代谢及代谢物的研究有助于了解药物在体内的变化情况,阐明药物的有效性、毒性及作用机制。

药物代谢分为Ⅰ相反应和Ⅱ相反应^[1-4]。Ⅰ相反应包括氧化、还原和水解等反应。Ⅱ相反应也称为结合反应,包括糖苷结合、硫酸化、甲基化、乙酰化、氨基酸结合、谷胱甘肽结合、脂肪酸结合、缩合反应等。小分子药物经过Ⅰ相反应后,分子结构中增加了羟基、羧基等极性基团,使其水溶性增加,易于从泌尿系统和消化系统中排泄。同时,这些Ⅰ相代谢物还能够与体内的一些内源性化合物结合发生Ⅱ相代谢反应,生成极性更大的新的代谢物从尿液中排出体外。这些内源性化合物主要有葡萄糖醛酸、硫酸、甘氨酸、谷胱甘肽、S-腺苷甲硫氨酸和乙酰辅酶A等。其中,与葡萄糖醛酸或硫酸的结合反应最为常见,生成葡萄糖醛酸苷缀合物或硫酸酯缀合物。药理学、药动学、代谢组学等研究工作都需要对药物Ⅱ相代谢缀合物进行分析。但是,药物Ⅱ相代谢缀合物因为成分复杂且极性大不易被有机溶剂提取,故需要

先对这些缀合物进行水解,以便药物释放出来,从而进行后续处理与分析。笔者查阅近几年相关研究文献,总结了小分子药物Ⅱ相代谢缀合物水解方法及促进酶解反应方法的研究进展,旨在为小分子药物Ⅱ相代谢过程研究及相关分析提供参考。

1 小分子药物Ⅱ相代谢缀合物水解方法

常见的水解方法有酸水解、碱水解和酶水解。

酸水解通常使用高氯酸、盐酸或三氯乙酸等进行水解。李伟红、颜流水、吴永宁等^[5-7]就分别用以上3种不同的酸进行了Ⅱ相代谢缀合物的水解。

碱水解常用氢氧化钠(NaOH)溶液或碱性缓冲液进行水解。张雪曼等^[8]在测定动物尿液中克伦特罗和沙丁胺醇时,就先用0.5 mol/L NaOH溶液进行了前处理。

酶水解常使用 β -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶在pH 4.6~5.2的乙酸铵缓冲溶液中进行水解,水解时间为2~24 h不等,温度控制在37℃左右。王凤美、曾少东、李阳、王国民等^[9-12]就分别利用酶水解法处理了动物食品、尿液、肉制品、血液中的 β 受体激动药Ⅱ相代谢缀合物残留。其中,李阳等^[11]还比较了采用酶水解与不采用酶水解的情况下药物的提取率,发现采用酶水解后药物的提取率显著增加。

通过文献调研和总结发现,酸水解和碱水解的优点是:简便、快速、成本低廉,并能减少酶水解过程中酶制剂和其样品水解后产生的蛋白类物质对目标化合物的干扰;缺点是:水解反应较剧烈,可能会造成某些目标物的分解。酶水解的优点是:安全、条件比较温和,不会引起目标物分解,且重复性好,药物回收率高;缺点是:使用成本较高,反应时间较长,且酶水解过程中酶制剂和其样品水解后产生的蛋白类物质对目标化合物可能产生干扰。从目前的文献报道中可知,因酶水解具备酸水解和碱水解所不具备的诸多优点,故实际工作中最

[△] 基金项目:上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设计划项目(No.2016ZB0305)

* 博士研究生。研究方向:药物分析和药动学。E-mail: lzchen2016@126.com

[#] 通信作者:主任药师,教授,博士。研究方向:儿科临床药理学。E-mail: zplifudan@126.com

为常用。

2 促进酶解反应方法

酶水解因具有多种优点而在小分子药物Ⅱ相代谢缀合物研究中得到广泛的使用,但是酶解反应时间较长,一般为2~24 h,而这增加了整个研究工作的时间,并有可能导致部分生物样品变质,给相关研究带来不便。因此,加快酶解反应的速率对于缩短整个酶水解过程耗费的时间是有必要的。酶解反应相对其他水解反应来说具有较严格的温度控制要求,所以升温等常规加速反应的方法不适用,必须考虑在反应过程中增加其他能量源。目前用于促进酶解反应的方法主要有红外辐射法和超声波法。

2.1 红外辐射法

红外辐射是介于可见光与微波之间的电磁波,其波长范围在约0.76~1 000 μm 之间。传统上把红外光分为3个区域:波长为0.76~1.44 μm 的红外光称作近红外光;波长为1.44~3.00 μm 的红外光称作中红外光;波长为3.00~1 000 μm 的红外光称作远红外光^[13-14]。红外辐射相比较其他的能量源来说具有其独特的优点:(1)安全环保。与微波相比,红外辐射对人体的危害极小,无需考虑泄露的问题。波长为8~14 μm 的红外光更是生物生存必不可少的因素,被称为“生命光波”。(2)节能高效。红外辐射热量是以电磁波形式传递的,不需要任何媒介,同时也不会产生任何废弃物污染周围环境。同时,生物物料对红外光的吸收率较高。(3)节省成本。与微波等其他装置相比,红外辐射装置价格低廉,易于推广。

红外辐射促进酶解反应的机制在于大多数活性化合物和提取溶剂(水、有机溶剂)的吸收光谱均在2.5~25 μm 之间,处于红外辐射的范围内,因此红外辐射可到达物料内部,使基质内部温度上升,增加各个有效成分在介质中的溶解度,同时加速反应终产物向溶剂的扩散,从而缩短反应时间,提高效率^[15-18]。

Silveira PC等^[19-20]对大鼠经过溃疡和创伤后的细胞色素氧化酶的活性进行检测,发现在红外光(0.904 μm)作用下,细胞色素氧化酶活性增加。Hu WP等^[21]研究发现近红外光的照射能够使细胞色素氧化酶的氧化速率提高1倍。Yu W等^[22]也报道在红外光的照射下细胞色素氧化酶的氧化速率提高了80%。有研究者利用红外光频率与蛋白质分子、胰蛋白酶分子运动频率相一致的原理,可引起蛋白质分子骨架结构的共振效应,使蛋白质分子处于高能状态,同时增加胰蛋白酶分子的活性,从而加速了蛋白质的酶解反应,将蛋白质酶解时间从传统水浴酶解时间10 h左右缩短到几分钟^[23-24]。另有研究者研制了一个温度可控的红外辐射系统,以期在一个相对恒定的温度下运用红外辐射加速酶解反应,并通过模型样品蛇床子的酶解反应过程对该系统的可行性和性能进行了论证。在该试验中,采用红外辅助提取所得蛇

床子素和欧前胡素的提取率统计学上均显著高于采用超声辅助提取所得的提取率($P<0.05$),酶解反应时间由传统水浴酶解的1 h大幅缩短到了2 min^[25]。

2.2 超声波法

超声波是指频率大于19.2 kHz的声波,具有波动与能量双重属性,是一种均匀的球面机械波,可在液体内部产生强烈的冲击波和微射流,使出现局部高温、高压,导致诸多次级效应,如击碎、乳化、扩散、强烈的机械振荡等,从而可加速体系的传质、传热等过程。当超声波振动时会产生并传递强大的能量,使起媒质质点以极高的速度和加速度进入振动状态,媒质结构也会发生变化,促使有效成分进入溶剂中。当振动处于稀疏状态时,液体会被撕裂成很多的小空穴,这些小空穴瞬间闭合会产生高达几千大气压的瞬时压力,即空化现象。这种空化现象有利于提高目标物提取率^[26-27]。

一定条件下,超声波可以促进不同酶解反应体系中的酶解速率加快,从而缩短酶解反应时间。Adewale P等^[28]研究了超声波的不同功率对酶促酰基转移反应的影响,得到了促进该反应的最佳超声振幅;Badgujar KC等^[29]研究表明超声波能够提高生物催化中脂肪酶的活性,从而促进酶解反应;Bashar I M等^[30]研究表明超声波可以促进葡聚糖酶对葡萄糖聚合物的降解作用;Subheddar PB等^[31]研究证实了低强度的超声波提高了细胞中纤维素酶的活性,从而促进了酶解速率加快。

以上研究表明,超声时间、温度、功率、频率等条件均对超声波对于酶解反应的促进作用有影响。但超声参数选择不合适,反而可能会抑制酶解反应的进行。因此,要达到促进酶解反应的目的,必须根据具体情况选择适当的超声条件。

3 结语

研究药物的代谢,对新药研发、制剂工艺优化和临床安全用药都具有重要指导意义。药物在体内的代谢反应尤其是Ⅱ相代谢复杂且多变,从而导致了药物在体内存在的形式不同,又由于体内介质组成繁杂、待测药物浓度偏低等原因,样品的前处理一直是体内药物分析的重点及难点,因此有必要找到合适且便捷的前处理方法为药物的测定创造良好的条件。水解是小分子药物Ⅱ相代谢缀合物前处理的一个重要环节,而酶水解是最为常用的一种水解方法。在合适的条件下,红外辐射法和超声波法均能提高酶的活性从而加快酶解反应的速率,缩短酶解反应时间。其机制目前并未完全明确,仍需进一步的研究揭示。

参考文献

- [1] 李新,余应年.药物的Ⅱ相代谢与酶系及其进展[J].中国临床药理学杂志,2000,16(6):458-465.
- [2] de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, et al. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects[J]. Clin Pharmacokinetics, 1999, 36(6):439-452.

- [3] Burchell B, Coughtrie MW. Genetic and Environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation[J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(Suppl 4):739-747.
- [4] Zenser TV, Lakshmi VM, Davis BB. N-glucuronidation of benzidine and its metabolites. Role in bladder cancer[J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26(9):856-859.
- [5] 李伟红, 戴廷灿, 熊艳. HPLC法测定畜禽肉中沙丁胺醇的残留量[J]. *江西农业学报*, 2007, 19(3):102-103.
- [6] 颜流水, 温振东, 井晶, 等. 猪肝中克伦特罗和沙丁胺醇的毛细管电泳-质谱联用分析[J]. *分析测试学报*, 2006, 25(6):43-45.
- [7] 吴永宁, 苗虹, 范赛, 等. 高效液相色谱-线性离子阱质谱法测定畜禽肌肉中 β_2 -受体激动剂及 β -阻断剂类药物残留[J]. *中国科学(B辑:化学)*, 2009, 39(8):774-784.
- [8] 张雪曼, 程雪梅, 苏青云, 气相色谱-质谱联用法同时测定动物尿液中克伦特罗和沙丁胺醇[J]. *分析实验室*, 2007, 26(2):89-93.
- [9] 王凤美, 张鸿伟, 庞士平, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品和尿液中4种 β -受体激动剂残留[J]. *分析化学*, 2008, 36(12):1629-1635.
- [10] 曾绍东, 王明月, 杨春亮, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定猪肉中9种 β -受体激动剂残留量[J]. *分析仪器*, 2013(4):5-11.
- [11] 李阳, 苏晓鸥, 张维, 等. 酶解及有机溶剂提取对绵羊血浆和尿样中两种 β_2 -受体激动剂含量测定的影响[J]. *分析化学*, 2014, 42(5):717-722.
- [12] 王国民, 李应国, 郝存显, 等. 动物组织中沙丁胺醇残留检测的样品前处理方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4):400-404.
- [13] Rastogi NK. Recent Trends and Developments in infrared Heating in Food Processing[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(9):737-760.
- [14] Liu T, Bao H, Chen G. Inflation bulb-driven microfluidic reactor for infrared-assisted proteolysis[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(18):3070-3073.
- [15] Cho S, Lee MJ, Kim MS, et al. Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo[J]. *J Dermatol Sci*, 2008, 50(2):123-133.
- [16] Dekens MP, Foulkes NS, Tessmar-Raible K. Instrument design and protocol for the study of light controlled processes in aquatic organisms, and its application to examine the effect of infrared light on zebrafish[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0172038.
- [17] Feng Q, Zhang Y, Zhang W, et al. Tumor-targeted and multi-stimuli responsive drug delivery system for near-infrared light induced chemo-phototherapy and photoacoustic tomography[J]. *Acta Biomater*, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.04.024.
- [18] Quirk BJ, Whelan HT. Effect of red-to-near infrared light on the reaction of isolated cytochrome c oxidase with cytochrome c[J]. *Photomed Laser Surg*, 2016, 34(12):631-637.
- [19] Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2007, 86(3):279-282.
- [20] Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 95(2):89-92.
- [21] Hu WP, Wang JJ, Yu CL, et al. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(8):2048-2057.
- [22] Yu W, Naim JO, McGowan M, et al. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria[J]. *Photochem Photobiol*, 1997, 66(6):866-871.
- [23] Liu T, Bao H, Chen G. Inflation bulb-driven microfluidic reactor for infrared-assisted proteolysis[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(18):3070-3073.
- [24] Bao H, Lui T, Zhang L, et al. Infrared-assisted proteolysis using trypsin-immobilized silica microspheres for peptide mapping[J]. *Proteomics*, 2009, 9(4):1114-1117.
- [25] Li FJ, Ning SL, Li Y, et al. Enhanced extraction of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* by infrared-accelerated enzyme pretreatment[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(20):5669-5676.
- [26] 杨进妹, 王婷, 何荣海. 超声对酶解反应的影响[J]. *农产品加工*, 2010, 9(7):70-71.
- [27] 王忠合, 王军, 陈长流, 等. 超声波辅助酶解豌豆分离蛋白的动力学及酶解物功能特性研究[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4):103-109.
- [28] Adewale P, Dumont MJ, Ngadi M. Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow[J]. *Ultrason Sonochem*, 2015(27):1-9.
- [29] Badgujar KC, Pai PA, Bhanage BM. Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2016, 39(2):211-221.
- [30] Bashari M, Abdelhai MH, Abbas S, et al. Effect of ultrasound and high hydrostatic pressure (US/HHP) on the degradation of dextran catalyzed by dextranase[J]. *Ultrason Sonochem*, 2014, 21(1):76-83.
- [31] Subhedhar PB, Gogate PR. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations[J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2014, 101(2):108-114.

(收稿日期:2017-05-19 修回日期:2017-08-19)
(编辑:周 箐)