

采用UPLC-MS/MS法研究辣薄荷基厚朴酚在不同种属肝微粒体中的代谢特征^Δ

邓 星^{1,2*}, 罗莉娅^{1,2}, 苟立平^{1,2}, 温倩雯^{1,2}, 汤明海², 万 丽^{1#}(1.成都中医药大学药学院,成都 611137;2.四川大学华西医院肿瘤生物治疗研究室,成都 610041)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0170-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.06

摘要 目的:建立测定肝微粒体孵育体系中辣薄荷基厚朴酚浓度的方法,并探讨其在不同种属肝微粒体中的代谢特征。方法:分别将辣薄荷基厚朴酚溶解于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)启动的人、大鼠、小鼠、猴、犬肝微粒体孵育体系中,置于37℃水浴中进行孵育,分别于孵育的0、2、5、10、15、20、30、45、60 min时用甲醇终止反应,以厚朴酚为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定各孵育体系中辣薄荷基厚朴酚的质量浓度。色谱柱为Acquity UPLC™ CSH C₁₈,流动相为0.1%甲酸溶液-甲醇(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为30℃,进样量为2 μL;离子源为电喷雾离子源,以多反应监测模式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 m/z 401.2→331.1(辣薄荷基厚朴酚)、 m/z 265.1→247.0(内标)。以孵育0 min时辣薄荷基厚朴酚的质量浓度为参照,计算其在不同孵育体系中的药物剩余百分比、体外代谢半衰期($t_{1/2}$)和固有清除率(CL_{int})。采用化学抑制剂法探讨辣薄荷基厚朴酚的代谢途径;在上述色谱条件下,采用一级全扫描以正离子方式检测,初步分析其体外代谢产物。结果:辣薄荷基厚朴酚质量浓度检测的线性范围为3.91~500.00 ng/mL,定量下限为3.91 ng/mL;日内、日间RSD均小于10%,准确度为87.40%~103.75%,基质效应不影响待测物的测定。辣薄荷基厚朴酚在人、大鼠、小鼠、犬肝微粒体中代谢明显,而在猴肝微粒体中代谢不明显;孵育30 min后,其在各种属肝微粒体的药物剩余百分比趋于稳定。辣薄荷基厚朴酚在人、大鼠、小鼠、猴、犬肝微粒体中的 $t_{1/2}$ 分别为12.07、17.68、17.59、216.56、61.88 min, CL_{int} 分别为0.115、0.078、0.079、0.006、0.032 mL/(min·mg)。细胞色素P₄₅₀(CYP)2A6、CYP2D6、CYP2C19、CYP3A4、CYP2C9、CYP2E1、CYP1A2酶对该化合物代谢的抑制率分别为55.76%、93.94%、96.01%、93.69%、71.81%、23.25%、28.04%。辣薄荷基厚朴酚在人肝微粒体中两个主要代谢产物的准分子离子峰分别为 m/z 441.2([M+Na]⁺)、 m/z 337.2([M+H]⁺)。结论:本研究建立的UPLC-MS/MS法简便、快速、专属性强,可用于肝微粒体孵育体系中辣薄荷基厚朴酚浓度的测定及药动学的研究。该化合物在人、大鼠、小鼠、猴、犬等5种肝微粒体中的代谢特征有差异,且其代谢过程可能与CYP2D6、CYP2C19、CYP3A4、CYP2C9等酶有关。

关键词 辣薄荷基厚朴酚;不同种属;肝微粒体;体外代谢稳定性;代谢酶;代谢产物

Study on the Metabolic Characteristics of Piperitylmagnolol in Different Species of Liver Microsomes by UPLC-MS/MS

DENG Xing^{1, 2}, LUO Liya², GOU Liping^{1, 2}, WEN Qianwen^{1, 2}, TANG Minghai², WAN Li¹ (1. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Dept. of Cancer Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of piperitylmagnolol in the incubation system of liver microsomes, and to investigate the metabolic characteristics of it in different species of liver microsomes. **METHODS:** The piperitylmagnolol were respectively dissolved in NADPH activated liver microsome incubation systems of human, rat, mouse, monkey and dog, and then incubated in water at 37 °C. The reaction was terminated with methanol at 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes of incubation, respectively. Using magnolol as internal standard, UPLC-MS/MS method was used to determine the concentration of piperitylmagnolol in the incubation system. The determination was performed on Acquity UPLC™ CSH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and the sample size was 2 μL. The ion source was electrospray ion source, and the positive ion scanning was carried out in the multiple reaction monitoring mode. The ion pairs used for quantitative analysis were m/z 401.2→331.1 (piperitylmagnolol) and m/z 265.1→247.0 (internal standard), respectively. Using the concentration of piperitylmagnolol at 0 min of incubation as a reference, the residual percentage, metabolism half-life *in vitro* ($t_{1/2}$) and intrinsic clearance (CL_{int}) were calculated for different incubation systems. The metabolic pathway of piperitylmagnolol was studied by chemical inhibitor method. Under the above chromatographic conditions, the metabolites *in vitro* were preliminarily analyzed by first-order full scanning and positive ion detection. **RESULTS:** The linear

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673653)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: dxing1110@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析。E-mail: wanli8801@163.com

range of piperitylmagnolol was 3.91-500.00 ng/mL. The limit of quantitation was 3.91 ng/mL. RSDs of intra-day and inter-day were less than 10%. The accuracy ranged 87.40%-103.75%. Matrix effect didn't affect the determination of the substance to be measured. The piperitylmagnolol was metabolized significantly in human, rat, mouse and dog liver microsomes, but not in monkey liver microsomes. After incubating for 30 min, residual percentage of piperitylmagnolol kept stable in different species of liver microsomes. The $t_{1/2}$ of piperitylmagnolol were 12.07, 17.68, 17.59, 216.56 and 61.88 min in human, rat, mouse, monkey and dog liver microsomes; CL_{int} were 0.115, 0.078, 0.079, 0.006, 0.022 mL/(min·mg), respectively. Inhibitory rates of CYP2A6, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP2C9, CYP2E1 and CYP1A2 to compound metabolism were 55.76%, 93.94%, 96.01%, 93.69%, 71.81%, 23.25%, 28.04%, respectively. Quasi-molecular ion peaks of the two main metabolites of piperitylmagnolol in human liver microsomes were m/z 441.2([M+Na]⁺) and m/z 337.2([M+H]⁺), respectively. CONCLUSIONS: Established UPLC-MS/MS method is simple, rapid and specific, and can be used for the determination of piperitylmagnolol concentration in the incubation system of liver microsomes and pharmacokinetic study. The metabolic characteristics of the compound are different among liver microsomes of human, rat, mouse, monkey and dog. Its metabolism process may be associated with CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP2C9, etc.

KEYWORDS Piperitylmagnolol; Different species; Liver microsomes; Metabolic stability *in vitro*; Metabolic enzyme; Metabolites

木脂素类(Lignans)化合物由于其多样的结构和生物活性一直是目前研究的热点领域之一^[1]。相关研究指出,该类化合物具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、保肝及抑制血小板活化因子等药理作用^[2]。辣薄荷基厚朴酚(Piperitylmagnolol,化学结构式见图1)最早被发现于木兰科植物厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.)的干燥干皮、枝皮及根皮中^[3],具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化等活性^[4],属于木脂素中的新木脂素类化合物。Youn UJ等^[5]研究发现,辣薄荷基厚朴酚对宫颈癌细胞HeLa、慢性髓系白血病细胞K562、非小细胞肺癌细胞A549和结肠癌细胞HCT116等多种人肿瘤细胞具有一定的体外抑制活性,其半数抑制浓度(IC₅₀)为7.7~9.5 μg/mL;Syu WJ等^[6]研究表明,辣薄荷基厚朴酚和厚朴酚对耐万古霉素肠球菌(VRE)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)等耐药菌株均有一定的体外抑制作用,其最低抑制浓度(MIC)为6.25~25 μg/mL,且辣薄荷基厚朴酚的抑菌效果更好。由此可见,该化合物具有一定的开发价值。

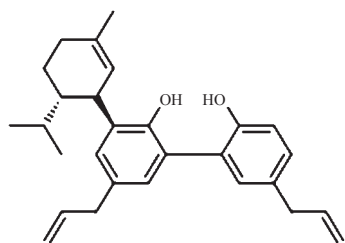


图1 辣薄荷基厚朴酚的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of piperitylmagnolol

与体内代谢研究相比,体外代谢研究具有操作简单方便、经济高效、检测多样化的特点,更适用于新药代谢特征的早期评价^[7]。目前,国内外对于辣薄荷基厚朴酚的相关研究尚少,为进一步明确其开发价值,本研究以超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)为检测手段,初步考察了该化合物在5个不同种属(人、大鼠、小鼠、猴、犬)肝微粒体中的体外代谢稳定性,并预测了参

与其代谢的主要同工酶和主要代谢产物,旨在获取辣薄荷基厚朴酚的体外代谢特征,为其后续研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UPLC系统,含SIL-30AC型自动进样器、LC-30AD型色谱仪、CBM-20A型系统控制器、CTO-20AC型柱温箱(日本Shimadzu公司);SCIEX QTRAP 5500型三重四级杆MS仪(美国AB公司);AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Heraeus Fresco 17型高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);S0200-230型涡旋混合仪(上海迪奥生物科技有限公司);Milli Q型超纯水系统(美国Merck Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

辣薄荷基厚朴酚对照品(批号:20170323,纯度:>99%)、厚朴酚对照品(内标,批号:20161103,纯度:>99%)均由四川大学生物治疗国家重点实验室提供;人肝微粒体(批号:M10001-2017002,质量浓度:20 mg/mL)、大鼠肝微粒体(批号:M10011-2017002,质量浓度:20 mg/mL)、小鼠肝微粒体(批号:M10017-2017002,质量浓度:20 mg/mL)、猴肝微粒体(批号:M10005-2017002,质量浓度:20 mg/mL)、犬肝微粒体(批号:M10007-2017002,质量浓度:20 mg/mL)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)孵育系统{含A液[β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸钠盐、葡萄糖-6-磷酸、氯化镁水溶液,批号:NRS(A)2017001]、B液[葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、柠檬酸钠溶液,批号:NRS(B)2017001]}均购自武汉普莱特生物医药技术有限公司;硝酸毛果芸香碱对照品(批号:100157-200201,纯度:供含量测定用)、盐酸噻氯匹定对照品(批号:100542-201002,纯度:>99.7%)均由中国食品药品检定研究院提供;奎尼丁对照品[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,批号:KVZTE-LQ,纯度:>98%];酮康唑对照品(德国Dr Ehrenstorfer公司,批号:

11208, 纯度: >99%); 磺胺苯吡唑对照品(批号: SL-BC7923V, 纯度: >99%)、二乙基二硫代氨基甲酸钠对照品(批号: MKBJ4989V, 纯度: 99%)均购自美国Sigma公司; α -萘黄酮对照品(东京化成工业株式会社, 批号: UEESA-JQ, 纯度: >98.0%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC™ CSH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相: 0.1% 甲酸溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~2 min, 80%B→90%B; 2~5 min, 90%B); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 2 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 离子喷雾电压: 5.5 kV; 离子源温度: 500 $^{\circ}$ C; 气帘气压力: 20 psi。采用多反应监测(MRM)模式扫描, 正离子方式检测。用于定量分析的离子对分别为 m/z 401.2→331.1(辣薄荷基厚朴酚)和 m/z 265.1→247.0(内标), 碰撞能量(CE)分别为 38、30 eV, 去簇电压(DP)均为 130 V; 离子束聚焦电压(EP): 10 V; 碰撞池出口电压(CXP): 10 V; 驻留时间: 0.20 s。

2.2 溶液的配制

2.2.1 辣薄荷基厚朴酚贮备液及系列工作液 取辣薄荷基厚朴酚对照品 10.00 mg, 精密称定, 用甲醇定容至 10 mL 棕色量瓶中, 混匀, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的辣薄荷基厚朴酚贮备液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中密封保存, 备用。临用前, 用甲醇逐级稀释至相应质量浓度, 即得辣薄荷基厚朴酚系列工作液。

2.2.2 内标贮备液及内标溶液 取内标对照品 10.00 mg, 精密称定, 用甲醇定容至 10 mL 棕色量瓶中, 混匀, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的内标贮备液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中密封保存, 备用。临用前, 用甲醇稀释至相应质量浓度, 即得内标溶液。

2.2.3 特异性抑制剂溶液 分别取细胞色素 P₄₅₀(CYP) 酶抑制剂硝酸毛果芸香碱、奎尼丁、盐酸噻氯匹定、酮康唑、磺胺苯吡唑、二乙基二硫代氨基甲酸钠、 α -萘黄酮对照品各 10.00 mg, 精密称定, 用甲醇分别定容至 10 mL 棕色量瓶中, 混匀, 即得质量浓度均为 1 mg/mL 的特异性抑制剂贮备液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中密封保存, 备用。临用前, 用甲醇稀释至相应质量浓度, 即得特异性抑制剂溶液。

2.3 样品孵育与处理

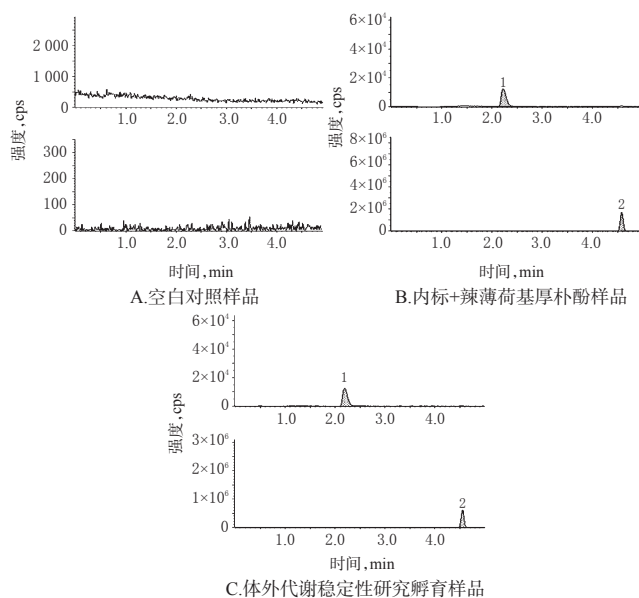
2.3.1 样品孵育 参照文献[8]配制孵育体系。其总体积为 200 μ L, 包含磷酸盐缓冲液(PBS, 100 mmol/L, pH 7.4)188 μ L 和 NADPH 孵育系统 12 μ L(含 A 液 10 μ L 和 B 液 2 μ L), 于冰浴上混合而得(现用现配), 随后加入质量浓度为 100 μ g/mL 的辣薄荷基厚朴酚工作液(该孵育体系中甲醇的体积分数应低于 1%), 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预

孵育 5 min 后, 加入肝微粒体 5 μ L 启动反应。

2.3.2 样品处理 取孵育后的样品 200 μ L, 于不同时间点加入 4 $^{\circ}$ C 甲醇(含内标 10 ng/mL)400 μ L 终止反应, 涡旋混匀 3 min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 下以 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液适量进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取人肝微粒体适量, 经高温灭活后, 分别按“2.3”项下方法制备不含待测物和内标的空白对照样品、含上述物质的样品以及体外代谢稳定性研究孵育样品(人肝微粒体, 孵育 5 min 时的样品), 再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录色谱图。结果显示, 辣薄荷基厚朴酚和内标的保留时间分别为 4.68、2.33 min, 分离度良好, 且没有受到空白基质的干扰, 表明本法专属性强, 详见图 2。



注: 1. 内标; 2. 辣薄荷基厚朴酚
Note: 1. internal standard; 2. piperitylmagnolol

图 2 典型 MRM 图

Fig 2 Typical MRM chromatograms

2.4.2 标准曲线的绘制与定量下限的考察 按“2.2.1”项下方法配制辣薄荷基厚朴酚系列工作液, 分别量取上述工作液 2 μ L, 加入 PBS 200 μ L, 混匀, 加至经高温灭活的人肝微粒体中, 制得辣薄荷基厚朴酚质量浓度分别为 3.91、7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 ng/mL 的系列标准样品, 按“2.3”项下方法处理后, 再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录峰面积。以待测物质量浓度为横坐标(x)、待测物与内标的峰面积比值为纵坐标(y), 采用加权法(加权系数为 1/x)进行线性回归, 得回归方程为 $y=0.409 6x+0.069 9$ ($R^2=0.999 6$)。结果表明, 辣薄荷基厚朴酚质量浓度检测的线性范围为 3.91~500.00 ng/mL, 定量下限为 3.91 ng/mL。

2.4.3 精密度与准确度试验 按“2.4.2”项下方法配制辣薄荷基厚朴酚低、中、高质量浓度(7.81、62.50、400.00

ng/mL)质控样品,每个质量浓度平行操作5次,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,考察日内精密密度;连续测定3 d,考察日间精密密度;将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,考察准确度。结果显示,低、中、高质量浓度质控样品的日内、日间RSD均小于10%,准确度分别为91.11%~100.37%、87.40%~103.75%、87.06%~98.67%,符合生物样品定量分析的相关要求^[9],详见表1。

表1 精密密度、准确度与基质效应试验结果

Tab 1 Results of precision, accuracy and matrix effect tests

| 理论质量浓度, ng/mL | 精密密度,% | | 准确度 ($\bar{x} \pm s, n=5$), % | 基质效应 ($\bar{x} \pm s, n=5$), % |
|------------------|----------------|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | 日内RSD($n=5$) | 日间RSD($n=15$) | | |
| 7.81 | 6.90 | 8.03 | 107.16 ± 5.25 | 96.99 ± 3.68 |
| 62.50 | 7.06 | 5.77 | 95.66 ± 6.01 | 95.52 ± 6.49 |
| 400.00 | 5.39 | 4.84 | 93.52 ± 4.48 | 94.60 ± 4.11 |

2.4.4 基质效应 按“2.4.2”项下方法配制辣薄荷基厚朴酚低、中、高质量浓度(7.81、62.50、400.00 ng/mL)质控样品,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,得相应峰面积(A);另用流动相配制与上述质控样品理论质量浓度对应的对照品溶液,进样测定,得相应峰面积(B)。每个质量浓度平行操作5次。基质效应 = $A/B \times 100\%$ 。结果显示,辣薄荷基厚朴酚的基质效应为85.40%~103.75% (RSD为3.72%~6.79%, $n=5$),内标基质效应为99.96%~100.37% (RSD为1.21%~2.03%, $n=5$),表明本法受基质效应的影响较小,详见表1。

2.4.5 稳定性试验 按“2.4.2”项下方法配制辣薄荷基厚朴酚低、中、高质量浓度(7.81、62.50、400.00 ng/mL)质控样品,再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,每个质量浓度平行操作5次,考察各质控样品于室温及自动进样室(4℃)内放置24 h的稳定性。结果显示,在上述条件下,辣薄荷基厚朴酚各质控样品起止时间点峰面积的比值为86.98%~96.51% (RSD为0.79%~3.70%, $n=5$),表明其稳定性良好,详见表2。

表2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 2 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

| 理论质量浓度,ng/mL | 室温 | 自动进样室(4℃) |
|--------------|--------------|--------------|
| 7.81 | 88.95 ± 2.88 | 88.12 ± 1.87 |
| 62.50 | 92.85 ± 1.92 | 91.51 ± 1.33 |
| 400.00 | 90.06 ± 0.79 | 95.57 ± 2.01 |

2.5 辣薄荷基厚朴酚体外代谢特征研究

2.5.1 代谢稳定性 取“2.2.1”项下辣薄荷基厚朴酚贮备液适量,用甲醇稀释至40 μg/mL,取上述稀释后的溶液2 μL,加至“2.3.1”项下孵育体系中,于37℃水浴中预孵育5 min后,加入肝微粒体5 μL启动反应。分别于孵育0、2、5、10、15、20、30、45、60 min时加入4℃甲醇(含内标10 ng/mL)各400 μL终止反应,涡旋混匀3 min后,于4℃下以13 000 r/min离心15 min,取上清液,按

“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,计算各体系中辣薄荷基厚朴酚的质量浓度。以孵育0 min时辣薄荷基厚朴酚的质量浓度为参照,其他时间点的质量浓度与之相比计算其药物剩余百分比;以药物剩余百分比为纵坐标、时间为横坐标,采用Excel 2016软件绘制辣薄荷基厚朴酚在5种肝微粒体孵育体系中的孵育曲线,详见图3。各种属肝微粒体孵育体系均平行操作3次。

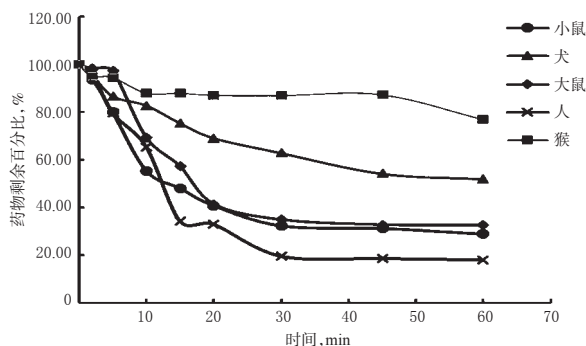


图3 辣薄荷基厚朴酚在人、大鼠、小鼠、猴、犬肝微粒体中的孵育曲线

Fig 3 Incubation curves of piperitylmagnolol in liver microsomes of human, rat, mouse, monkey and dog

由图3可见,辣薄荷基厚朴酚在人、大鼠、小鼠、犬等4种肝微粒体中的代谢明显,而在猴肝微粒体中的代谢不明显。孵育30 min后,其在各种属肝微粒体中的药物剩余百分比变化较小,代谢逐渐趋于稳定。

2.5.2 体外半衰期($t_{1/2}$)与固有清除率(CL_{int})的计算 计算辣薄荷基厚朴酚人、大鼠、小鼠、猴、犬肝微粒体中的代谢相关参数:将各时间点的药物剩余百分比的自然对数(y)与孵育时间(x)作线性回归,得相应回归方程;以上述线性回归方程的斜率(k)根据公式 $t_{1/2} = -0.693/k$ 计算得其 $t_{1/2}$,并按公式 $CL_{int} = 0.693 \times \text{孵育液体积}(\text{mL}) / [t_{1/2} \times \text{肝微粒体质量}(\text{mg})]$ 计算得其 $CL_{int}^{[10]}$,结果见表3。

表3 辣薄荷基厚朴酚在人、大鼠、小鼠、猴、犬肝微粒体中的回归方程、 $t_{1/2}$ 和 CL_{int}

Tab 3 Regression equations, $t_{1/2}$ and CL_{int} of piperitylmagnolol in liver microsomes of human, rat, mouse, monkey and dog

| 种属 | 回归方程 | R^2 | $t_{1/2}, \text{min}$ | $CL_{int}, \text{mL}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ |
|----|-------------------------|--------|-----------------------|--|
| 人 | $y = -0.0574x + 4.6356$ | 0.9670 | 12.07 | 0.115 |
| 大鼠 | $y = -0.0392x + 4.6482$ | 0.9534 | 17.68 | 0.078 |
| 小鼠 | $y = -0.0394x + 4.5470$ | 0.9549 | 17.59 | 0.079 |
| 猴 | $y = -0.0032x + 4.5544$ | 0.7661 | 216.56 | 0.006 |
| 犬 | $y = -0.0112x + 4.5352$ | 0.9420 | 61.88 | 0.022 |

2.6 辣薄荷基厚朴酚的代谢途径分析

参照“2.5”项下确定的辣薄荷基厚朴酚在不同种属肝微粒体中的代谢相关参数,采用化学抑制剂法^[11]对其代谢途径进行初步探讨。在“2.3.1”项下孵育体系中分别加入“2.5.1”项下40 μg/mL辣薄荷基厚朴酚溶液1 μL

和各特异性抑制剂(按“2.2.3”项下方法配制,并折算为摩尔浓度,即CYP2A6抑制剂硝酸毛果芸香碱25 μmol/L、CYP2D6抑制剂奎尼丁10 μmol/L、CYP2C19抑制剂盐酸噻氯匹定25 μmol/L、CYP3A4抑制剂酮康唑1 μmol/L、CYP2C9抑制剂磺胺苯吡唑20 μmol/L、CYP2E1抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸钠50 μmol/L以及CYP1A2抑制剂 α -萘黄酮1 μmol/L^[12-13])1 μL,于37 ℃水浴中预孵育5 min后,加入人肝微粒体5 μL启动反应,混匀后,于37 ℃水浴中继续孵育30 min,加入4 ℃甲醇(含内标10 ng/mL)400 μL终止反应;同时设置未发生反应的阴性对照(即不加NADPH孵育系统和特异性抑制剂,用甲醇补足剩余体积)和完全反应的阳性对照(即不加特异性抑制剂,但加NADPH孵育系统,用甲醇补足剩余体积),同法孵育。按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定,计算辣薄荷基厚朴酚质量浓度和抑制率[抑制率= $[1 - (\text{阴性对照样品质量浓度} - \text{试验组样品质量浓度}) / (\text{阴性对照样品质量浓度} - \text{阳性对照样品质量浓度})] \times 100\%$]^[12-13]。各种属肝微粒体孵育体系均平行操作3次。

采用Excel 2016软件进行数据处理。结果显示,辣薄荷基厚朴酚的代谢是由多种CYP酶介导的,其中CYP2D6、CYP2C19、CYP3A4、CYP2C9酶对辣薄荷基厚朴酚代谢的抑制率较高,分别为93.94%、96.01%、93.69%、71.81%,表明上述4种酶可能是参与该化合物代谢的主要同工酶;而CYP2A6、CYP2E1、CYP1A2酶的抑制率较低,分别为55.76%、23.25%、28.04%,提示上述3种酶可能与该化合物的代谢无关,详见表4。

表4 各种同工酶抑制剂对人肝微粒体中辣薄荷基厚朴酚代谢的影响($n=3$)

Tab 4 Effects of various isozyme inhibitors on the metabolism of piperitylmagnolol in human liver microsomes ($n=3$)

| 孵育体系 | 辣薄荷基厚朴酚质量浓度($\bar{x} \pm s$), ng/mL | RSD, % | 抑制率, % |
|-----------------------|---------------------------------------|--------|--------|
| 硝酸毛果芸香碱(CYP2A6) | 157.82 ± 10.77 | 6.82 | 55.76 |
| 奎尼丁(CYP2D6) | 185.11 ± 11.24 | 6.07 | 93.94 |
| 盐酸噻氯匹定(CYP2C19) | 186.59 ± 10.60 | 5.68 | 96.01 |
| 酮康唑(CYP3A4) | 184.93 ± 14.44 | 7.81 | 93.69 |
| 磺胺苯吡唑(CYP2C9) | 169.29 ± 10.51 | 6.21 | 71.81 |
| 二乙基二硫代氨基甲酸钠(CYP2E1) | 134.58 ± 6.85 | 5.09 | 23.25 |
| α -萘黄酮(CYP1A2) | 138.14 ± 1.39 | 1.01 | 28.04 |
| 阴性对照 | 189.44 ± 7.28 | 3.84 | - |
| 阳性对照 | 117.96 ± 4.60 | 3.90 | 0 |

注:“-”表示未发生反应

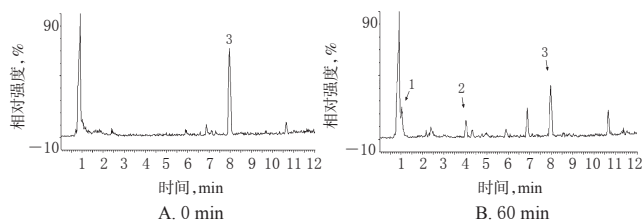
Note:“-”means no reaction

2.7 辣薄荷基厚朴酚体外代谢产物初探

按“2.3.1”项下方法,于冰浴上将质量浓度为2 mg/mL的辣薄荷基厚朴酚工作液2 μL(按“2.2.1”项下方法配制)加至孵育体系中,于37 ℃水浴中预孵育5 min后,加入人肝微粒体5 μL启动反应,混匀后,分别于孵育0、60 min时加入4 ℃甲醇(含内标)各400 μL终止反应,涡旋

混匀3 min后,于4 ℃下以13 000 r/min离心15 min,取上清液,在“2.1.1”项下色谱条件下,采用一级全扫描(MS Scan)以正离子方式检测,扫描范围为 m/z 100~1 000,比较上述两个时间点的色谱图差异,以初步判断辣薄荷基厚朴酚的体外代谢产物。

结果显示,与0 min时的色谱图(图4A)比较,60 min时的色谱图(图4B)新增2个色谱峰,其准分子离子峰分别为 m/z 441.2($[M+Na]^+$)、 m/z 337.2($[M+H]^+$);根据该化合物的碎片离子峰初步判断,4.347、6.903、10.653 min处的色谱峰则可能是由与肝微粒体有关的杂质所致,详见图4、图5。



注:1.代谢产物 m/z 337.2($[M+H]^+$);2.代谢产物 m/z 441.2($[M+Na]^+$);3.辣薄荷基厚朴酚 m/z 401.2

Note: 1. metabolite m/z 337.2 ($[M+H]^+$); 2. metabolite m/z 441.2 ($[M+Na]^+$); 3. piperitylmagnolol m/z 401.2

图4 辣薄荷基厚朴酚在人肝微粒体中代谢的色谱图
Fig 4 Metabolic chromatograms of piperitylmagnolol in human liver microsomes

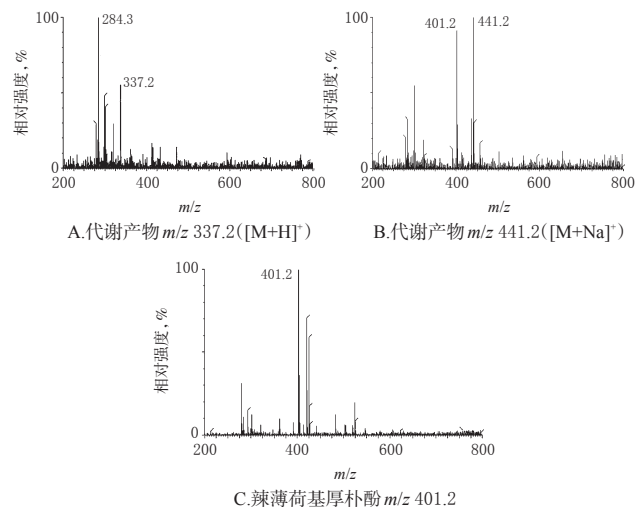


图5 辣薄荷基厚朴酚在人肝微粒体中代谢的特征性碎片离子峰
Fig 5 Characteristic fragment ion peak of piperitylmagnolol in human liver microsomes

3 讨论

在新药研发的早期阶段,学者可通过研究药物在体外肝微粒体中的代谢特征来比较其不同种属中代谢的差异,可为后期动物模型的选择和药物在人体内的代谢特征研究提供一定的参考^[14-15]。本研究建立了测定新木脂素类化合物辣薄荷基厚朴酚质量浓度的UPLC-MS/MS法。该方法专属性强、灵敏度及准确度高、基质效应

低、重复性好,可用于生物样品中该化合物浓度的测定及药动学的研究。

厚朴酚和辣薄荷基厚朴酚结构相近,且性质稳定,能与生物基质基线分离,且保留时间、响应值和峰形均较好,故本研究将厚朴酚选为内标。在前期条件筛选中,本课题组首先以甲醇-水、乙腈-水体系作为流动相进行考察,结果发现待测物峰形拖尾严重;而在水相中加入0.1%甲酸后,能使待测物的峰形得以改善,并同时使其具有较高的响应值和合适的保留时间。因此,本研究最终选择0.1%甲酸溶液-甲醇作为流动相。此外,在方法学考察中,肝微粒体是经高温灭活的,且含量极低,因此可忽略不同种属肝微粒体间的差异,故本研究最终选择了具有代表性的人肝微粒体作为生物样品基质,进行后续方法学考察。

参考《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》^[16],本研究选取5个种属的肝微粒体进行体外代谢特征研究。结果显示,辣薄荷基厚朴酚在犬和猴肝微粒体中的代谢时间较长($t_{1/2}$ 较大),在人和大鼠、小鼠肝微粒体中的代谢较为相似,提示在后续研究中可考虑以大鼠或小鼠作为临床前药动学和毒理学研究的模型动物。代谢途径试验结果表明,CYP2D6、CYP3A4、CYP2C19、CYP2C9酶可能参与了辣薄荷基厚朴酚的代谢过程,而CYP2A6、CYP2E1、CYP1A2酶可能与该化合物的代谢无关。这提示该化合物的体内代谢可能涉及多种同工酶,在联合用药时,应考虑上述同工酶共同作用所导致的药效增强或中毒情况的发生^[17]。体外代谢产物特征离子碎片峰可见准分子离子峰 m/z 441.2,推断其可能是原化合物被引入羟基(—OH),然后加 Na^+ 而得;此外,还可见准分子离子峰 m/z 337.2,推测其可能是原化合物环己烯结构开环,脱去 $-\text{C}_6\text{H}_8$,然后加 H^+ 而得。但其具体的代谢物结构及代谢过程仍有待后续研究进一步确证。

综上所述,本研究建立的UPLC-MS/MS法简便、快速、专属性强,可用于生物样品中辣薄荷基厚朴酚浓度的测定及药动学的研究。该化合物在人、大鼠、小鼠、猴、犬等5种肝微粒体中的代谢特征有所差异,且其代谢过程可能与CYP2D6、CYP3A4、CYP2C19、CYP2C9等酶有关。但其具体种属代谢差异、代谢产物结构等尚需后续研究进一步探讨。

参考文献

- [1] 于淼,曾光尧,谭健兵,等.木脂素类化合物的活性研究进展[J].中南药学,2013,11(6):452-456.
- [2] 张国良,李娜,林黎琳,等.木脂素类化合物生物活性研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(20):2089-2094.
- [3] YAHARA S, NISHIYORI T, KOHDA A, et al. Isolation and characterization of phenolic compounds from Magnolia

liae cortex produced in China[J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(8):2024-2036.

- [4] KUO WL, CHUNG CY, HWANG TL, et al. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities[J]. *Phytochemistry*, 2013. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.08.014.
- [5] YOUN UJ, LEE IS, CHEN QC, et al. A cytotoxic monoterpene-neolignan from the stem bark of *Magnolia officinalis* [J]. *Nat Prod Sci*, 2011, 17(2):95-99.
- [6] SYU WJ, SHEN CC, LU JJ, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of neolignans from *Magnolia officinalis*[J]. *Chem Biodivers*, 2004, 1(3):530-537.
- [7] 吴慧,彭英,孙建国,等.体外代谢在新药早期评价中的应用与发展[J].药学学报,2013,48(7):1071-1079.
- [8] COHEN LH, REMLEY MJ, RAUNING D, et al. In vitro drug interactions of cytochrome P₄₅₀: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8):1005-1015.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.
- [10] MOHUTSKY MA, CHIEN JY, RING BJ, et al. Predictions of the in vivo clearance of drugs from rate of loss using human liver microsomes for phase I and phase II biotransformations[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(4):654-662.
- [11] 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.
- [12] CARLILE DJ, ZOMORODI K, HOUSTON JB. Scaling factors to relate drug metabolic clearance in hepatic microsomes, isolated hepatocytes, and the intact liver: studies with induced livers involving diazepam[J]. *Drug Metab Dispos*, 1997, 25(8):903-911.
- [13] 李春正,林庆辉,庄笑梅,等.重组人源CYP同工酶介导的罗通定O-去甲基代谢[J].药学学报,2010,45(3):307-313.
- [14] 焦士勇,艾常虹,李艾芳,等.补骨脂酚的体外肝微粒体代谢及代谢减毒作用的种属比较[J].中国药理学通报,2011,27(2):216-220.
- [15] 樊慧蓉,董世奇,李全胜,等.甘草素在体外不同种属肝微粒体中的代谢差异研究[J].中草药,2017,48(2):320-326.
- [16] 国家食品药品监督管理局.化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[S].2005-03-18.
- [17] 刘晓东,柳晓泉.药物代谢动力学教程[M].南京:江苏凤凰科学技术出版社,2015:296-316.

(收稿日期:2018-06-06 修回日期:2018-11-10)

(编辑:张元媛)