

## 参考文献:

- [1] 宫涛,刘阳,张伯礼. 310 例双黄连注射剂不良反应分析[J]. 天津中医学院学报, 2003, 22 (1): 49
- [2] Bos R, Hendriks H, Bruins A. P., Koofteman J., et al. Isolation and identification of valerenane sesquiterpenoids from Valeriana officinalis[J]. Phytochemistry, 1986, 25 (1): 133
- [3] 张勉,张朝凤,王峥涛. 侧金盏花化学成分的研究[J]. 药学报, 2005, 40 (6): 529
- [4] 王焕弟,谭成玉,杜昱光,等. 藏药湿生扁蕾的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 40 (14): 1059
- [5] 曾建伟,钱士辉,吴锦忠,等. 薄荷非挥发性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (5): 400
- [6] 孙连娜,陈万生,陶朝阳,等. 泽兰化学成分的研究(一)[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25 (9): 109
- [7] 黄恩喜,徐卯力,杨吉贤,等. 长白瑞香化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15 (10): 33
- [8] 田军,吴凤镒,丘明华,等. 匙叶翼首花的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12 (1): 35
- [9] Chiba M, Hisada S. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus" (一)[J]. Shoyakugaku Zasshi, 1978, 32 (3): 194
- [10] 李永梅,王天志,王志霄. 细毡毛忍冬花蕾化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26 (1): 45
- [11] 周成萍,何宝林,廖蔚珍,等. 连翘化学成分的分析[J]. 中国民族学院学报(自然科学版), 1998, 17 (2): 22
- [12] 陈惠芳.  $\beta$ -谷甾醇的消炎解热作用[J]. 国外医药植物药分册, 1980, (02): 13
- [13] 刘慧琼,郭书好,沈英森,等. 半夏中  $\beta$ -谷甾醇的抗氧化作用研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20 (3): 281
- [14] 言岩.  $\beta$ -谷甾醇蔬菜中的抗肿瘤成分[J]. 国外医学情报, 1982, 3 (15): 262
- [15] Choi C Y, You H J, Jeong H G. Nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by oleanolic acid via nuclear factor- $\kappa$ B activation in macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288 (1): 49
- [16] 田丽婷,马龙,堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (12): 884
- [17] 孙燕. 齐墩果酸的促免疫作用[J]. 中国临床病理学杂志, 1988, (1): 26
- [18] Chattopadhyay D, Anunachalam G, Mandal A B, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore Mallotus peltatus leaf extract[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 82 (2/3): 229
- [19] Tapondjou L A, Lontsi D, Sondengam B L, et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxy ursolic acid, from Cussonia bancoensis[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26 (2): 143
- [20] Lee I, Lee J, Lee Y H, et al. Ursolic acid-induced changes in tumor growth,  $O_2$  consumption and tumor interstitial fluid pressure[J]. Anticancer Res, 2001, 21 (4A): 2827
- [21] Martin Aragon S, DelasHeras B, Sanchez Reus M I, et al. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes[J]. Exp Toxicol Pathol, 2001, 53 (2/3): 199

(收稿日期: 2008-10-14;修回日期: 2009-02-04)

(本文编辑 魏 萍)

文章编号: 1008-9926(2009)03-0227-04 中图分类号: R927. 2; R963 文献标识码: A

# 以双氯酚酸为探针采用高效液相色谱法快速测定 CYP450 2C9 的酶活性

李慎谦, 张少燕, 梁秉文

(青岛大学医学院附属医院 泌尿外科 检验科 山东 青岛 266003; 北京中研同仁堂医药研发有限公司 北京 100075)

**摘要:**目的 建立一种快速、高效的以双氯酚酸作为探针药物评价细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 酶活性的高效液相色谱紫外检测方法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (50mm × 4.6mm I.D., 5 $\mu$ m); 流动相为乙腈 (含 0.01% 七氟丁酸) 水 (含 0.01% 七氟丁酸) (65:35, V/V), 流速 2.0 mL/min; 检测波长为 280nm。双氯酚酸与人 CYP2C9 酶在 37℃ 温孵适当时间后, 加入 100 $\mu$ L 乙腈-冰乙酸 (94:6, V/V) 终止反应, 10 000g 离心后取上清液进样分析测定。结果 4'-羟基双氯酚酸的保留时间为 1.35min, 线性范围为 1.00~200 $\mu$ mol/L ( $r=0.9999$ ), 最低定量限为 1.00 $\mu$ mol/L, 回收率为 99.5%~100.8%; 双氯酚酸的保留时间为 2.25min, 线性范围为 1.00~200 $\mu$ mol/L ( $r=0.9999$ ), 最低定量限为 1.00 $\mu$ mol/L, 回收率为 99.3%~101.1%。两者的日内、日间 RSD 均 <15%, 温孵体系中的其他内源性物质不干扰测定。结论 该方法快速、稳定、灵敏度高, 适合体外双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的测定, 可应用于体外 CYP2C9 酶活性的评价及酶动力学研究。

**关键词:** RP-HPLC; 双氯酚酸; 4'-羟基双氯酚酸; 细胞色素 P450 2C9

作者简介: 李慎谦 (1963-), 男, 山东莱西人, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 肾移植, 泌尿系统临床用药监测、安全性和有效性研究。Tel: (0532) 82911330

# Rapid Determination of Cytochrome P450 2C9 Activity with Diclofenac Probe Using High-performance Liquid Chromatography

LI Shen-Qian, ZHANG Shao-Yan, LANG Bing-Wen

(Department of Urology, Department of Clinical Analysis, Hospital Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong China)

(Beijing Zhongyan Tongrentang Pharmaceutical Research and Development Co. Ltd, Beijing 260003 China)

**ABSTRACT:** **Aim** To establish an HPLC method for the evaluation of cytochrome P450 2C9 activity using diclofenac as the probe compound in vitro. **Methods** An Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (50mm × 4.6mm I.D., 5 μm) column was used as the stationary phase. The mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.01% heptafluorobutyric acid) and water (containing 0.01% heptafluorobutyric acid) (65:35, V/V). The flow rate was 2.0 mL/min, and the UV detector was set at 280nm. **Results** The retention time of 4'-hydroxydiclofenac was 1.35min. The linear calibration curves of 4'-hydroxydiclofenac were obtained in the concentration range of 1.00 ~ 200 μmol·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ). The lower limit of quantification of 4'-hydroxydiclofenac was 1.00 μmol·L<sup>-1</sup>. The average recovery was 99.5% ~ 100.8%. The retention time of diclofenac was 2.25min. The linear calibration curves of diclofenac were obtained in the concentration range of 1.00 ~ 200 μmol·L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ). The lower limit of quantification of 4'-hydroxydiclofenac was 1.00 μmol·L<sup>-1</sup>. The average recovery was 99.3% ~ 101.1%. The intra- and inter-day relative standard deviations were all less than 15%. There were no endogenous substances existing in the incubation system which interfered with the determination of the analyses of interest. **Conclusion** The method is simple, rapid and suitable for the evaluation of cytochrome P450 2C9 activity in vitro.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; diclofenac; 4'-hydroxydiclofenac; cytochrome P450 2C9

细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 是最重要的 P450 酶之一, 约占肝微粒体 CYP450 总量的 20%。参与多类药物的代谢, 因此准确地评价 CYP2C9 的酶活性十分重要<sup>[1~3]</sup>。降糖药甲苯磺丁脲 4 羟化代谢是最常用的 CYP2C9 探针底物, 但 CYP2C9 抗体仅抑制了 78% ~ 93% 的甲苯磺丁脲 4 羟化代谢, 余下的反应活性与 CYP2C19 有关<sup>[4]</sup>。CYP2C19 在正常肝脏中的含量远低于 CYP2C9, 因此它在甲苯磺丁脲 4 羟化代谢中的作用可以被忽略。但在 CYP2C9 缺陷人群, CYP2C19 对甲苯磺丁脲的催化作用不容忽视。二氯芬酸 4' 羟化代谢也常用来检测 CYP2C9 活性。利用 cDNA 表达的 CYP2C9 酶和 CYP2C9 抑制剂, 证实二氯芬酸 4' 羟化代谢几乎完全由 CYP2C9 介导<sup>[5,6]</sup>。因此本研究在体外 CYP2C9 活性研究中, 选用双氯酚酸作为 CYP2C9 的探针底物, 通过体外代谢测定其在 P450 酶中的代谢物 4' 羟基双氯酚酸 (双氯酚酸 4' 羟基化反应, Diclofenac 4'-hydroxylation), 来评价 CYP 2C9 酶的活性。本研究建立了快速、高效、稳定的测定 CYP450 2C9 酶孵育体系中双氯酚酸和 4' 羟基双氯酚酸的 RP-HPLC, 该法能同时对代谢产物及双氯酚酸在 CYP450 2C9 酶孵育体系中代谢的酶动力学进行分析。

## 1 实验部分

**1.1 仪器与试剂** 高效液相色谱仪, 配有自动进样器、紫外可见分光光度检测器和 X-calibur 液质联用工作站 (美国 Thermo Finnigan 公司); XW-80 型旋涡混合器 (上海第一医学院仪器厂); TGL-16G 型高速台式离心机 (上海医用分析仪器厂); 十万分之一天平 (美国 METTLER TOLEDO 公司)。

双氯酚酸 (Diclofenac, 纯度 > 99.0%, Sigma-Aldrich 公司, 批号: 037K1588); 4' 羟基双氯酚酸 (4'-hydroxydiclofenac, 纯度 > 99.0%, Sigma-Aldrich 公司, 批号: 117K1408); CYP 2C9 酶 (BD Gentest™ 公司, 批号: 97546); NADPH 产生系统溶液 A (含有 26.1 mmol·L<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup>、66 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖-6-磷酸和 66 mmol·L<sup>-1</sup> 氯化镁的水溶液) 和 NADPH 产生系统溶液 B (含有 40 U·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 5 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠的水溶液) (均购于美国 BD GentestIM 公司)。乙腈为色谱纯; Tris (hydroxymethyl) aminomethane (纯度 99.8%, 购于 Alfa Aesar 公司, 批号: G10S005); 七氟丁酸、氢氧化钠和盐酸均为市售分析纯; 水为纯化水。

**1.2 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱

(50mm ×4 6mm I.D., 5μm, Agilent公司产品);流动相为 A-乙腈 (含 0.01% 七氟丁酸) 和 B-水 (含 0.01% 七氟丁酸) 组成, 两者的比例为 65:35 (V/V)。流速: 2.0 mL/min; 检测波长: 280nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10μL。

**1.3 CYP450 2C9酶的孵育试验** 精密吸取 CYP 450 2C9 酶 10μL, 置于塑料离心管中, 依次加入 440μL 浓度为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris 缓冲液 (pH 7.5)、25μL NADPH 产生系统溶液 A 和 5μL NADPH 产生系统溶液 B, 再精密加入底物双氯酚酸对照品溶液 20μL, 在 37℃ 水浴中进行孵育。

**1.4 样品处理** 在上述体系孵育适当时间后, 向反应体系中加入 100μL 乙腈-冰乙酸 (94:6, V/V) 终止反应, 在 5000r/min 下离心 3min, 取上清液进样测定。测定时, 每批样品随行建立标准曲线和质控 (QC) 样品, 这些样品须有规则地分散在待测样品的分析序列中。

**1.5 对照品溶液的配制** 分别精密称取双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸对照品 15.9mg 和 15.6mg, 置于 10mL 量瓶中, 加 0.5mL 乙腈溶解, 并以 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris 缓冲液 (pH 7.5) 稀释至刻度, 即得双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸浓度为 5 mmol·L<sup>-1</sup> 的对照品储备溶液。分别精密吸取上述对照品储备液 0.02、0.04、0.10、0.20、1.00、2.00、4.00mL 分别置于 7 个 100mL 量瓶中, 用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris 缓冲液 (pH 7.4, PBS) 定容, 配成浓度为 1.00、2.00、5.00、10.0、50.0、100、200μmol·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液。

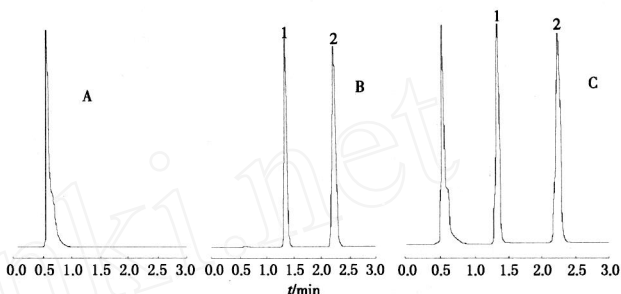
**1.6 空白酶溶的配制** 精密吸取 CYP450 2C9 酶 10μL, 置塑料离心管中, 依次加入 440μL 浓度为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris 缓冲液 (pH 值 7.57), 25μL NADPH 产生系统溶液 A 和 5μL NADPH 产生系统溶液 B, 再精密加入 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris 缓冲液 (pH 值 7.4, PBS) 20μL, 在 37℃ 水浴中进行孵育 60min, 即得。

## 2 结果与讨论

**2.1 方法的专属性** 4'-羟基双氯酚酸的保留时间约为 1.25min, 双氯酚酸的保留时间约为 2.25min, 两者与双氯酚酸的其他代谢产物分离良好, 且空白 CYP450 2C9 酶孵育液中的内源性物质不干扰测定, 见图 1。

**2.2 线性关系与检测限** 取浓度为 1.00、2.00、5.00、10.0、50.0、100、200μmol·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液, 除不进行孵育, 并在加入 CYP 2C9 酶后立即加乙腈终止反应 (即灭活 CYP450 2C9 体系) 外, 其余操作均按照 1.3 和 1.4 项下, 并进样依法测定, 分别以双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸的色谱峰面积 (Y)

为纵坐标, 其各自对应的摩尔浓度 (X, μmol·L<sup>-1</sup>) 为横坐标, 用最小二乘法进行线性回归, 求算孵育体系中双氯酚酸在 1.00~200μmol·L<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为:



A 空白酶的孵育溶液 B 对照品溶液 C 以 CYP 450 2C9 酶孵育的双氯酚酸 1 4'-羟基双氯酚酸 2 双氯酚酸

图 1 双氯酚酸色谱图

Fig 1 Chromatograms of diclofenac

$$Y = 2721.6X - 93.275, r = 0.9999$$

最低定量限为 1.00μmol·L<sup>-1</sup>; 4'-羟基双氯酚酸在 1.00~200μmol·L<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为:

$$Y = 2122.8X - 42.706, r = 0.9999$$

最低定量限为 1.00μmol·L<sup>-1</sup>。

**2.3 回收率试验** 取浓度为 2.00、50.0、180μmol·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 除不进行孵育, 并在加入 CYP 2C9 酶后立即加乙腈终止反应 (即灭活 CYP450 2C9 体系) 外, 其余操作均按照 1.3 和 1.4 项下, 并进样依法测定, 每个浓度水平测定 5 次, 取药物含量均值计算该浓度样品的药物回收率及 RSD。结果见表 1。

表 1 双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸的方法回收率 (n=5)

Tab 1 Recovery of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac (n=5)

| 成分            | 加入量<br>(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 测得量<br>(μmol·L <sup>-1</sup> ) | 回收率<br>(%) | 聊     | RSD<br>(%) |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|-------|------------|
| 双氯酚酸          | 2.000                          | 2.022                          | 101.1      | 100.0 | 0.91       |
|               | 50.00                          | 49.65                          | 99.3       |       |            |
|               | 180.00                         | 179.3                          | 99.6       |       |            |
| 4'-羟基双<br>氯酚酸 | 2.000                          | 2.004                          | 100.2      | 100.2 | 2.49       |
|               | 50.00                          | 50.40                          | 100.8      |       |            |
|               | 180.00                         | 179.1                          | 99.5       |       |            |

**2.4 精密度试验** 取浓度为 2.00、50.0、180μmol·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 除不进行孵育, 并在加入 CYP 2C9 酶后立即加乙腈终止反应 (即灭活 CYP450 2C9 体系) 外, 其余操作均按照 1.3 和 1.4 项下, 并分别在 1d 内和连续 3d 内进样, 依法测定 (n=6)。结果, 双氯酚酸的日内精密度 RSD 均 ≤ 3.54%, 日间精密度 RSD 均 ≤ 8.14%; 4'-羟基双氯酚酸的日内精密度

RSD 均  $\leq 3.28\%$ , 日间精密度 RSD 均  $\leq 5.40\%$ 。

**2.5 稳定性试验** 取浓度为  $2.00, 50.0, 180 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照品溶液, 除在加入 CYP 2C9 酶后立即加乙腈终止反应 (即灭活 CYP450 2C9 体系) 外, 其余操作均按照 1.3 项下, 制备灭活孵育体系, 置于  $37^\circ\text{C}$  水浴中孵育, 并分别于 0、2、4、8、12、24h 取样, 按照 1.4 项下操作, 依法测定, 结果发现各浓度的 RSD 均  $< 5.0\%$ , 表明样品中双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸在 24h 内稳定。同法将 3 种浓度的灭活孵育体系置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中保存, 分别于第 1、5、15、30 天解冻, 依法处理、测定, 结果双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸各浓度的 RSD 均  $< 15\%$ , 说明该样品在  $-70^\circ\text{C}$  条件下至少稳定 1 个月。

**2.6 双氯酚酸在 CYP450 2C9 酶中的代谢酶动力学试验** 取浓度为  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的双氯酚酸, 在人 CYP450 2C9 酶体系中孵育, 分别于 5、10、20、30、40、50、60min 后终止反应, 按上述方法测定其中产生的 4'-羟基双氯酚酸的浓度, 绘制不同时间产生代谢物 4'-羟基双氯酚酸的浓度曲线, 结果见图 2。

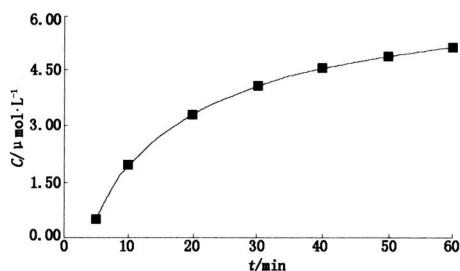


图 2 4'-羟基双氯酚酸浓度的曲线图

Fig 2 Plot of reaction time vs resulting metabolite 4'-hydroxydiclofenac concentration

### 3 讨论

CYP450 酶通常采用磷酸缓冲液作为孵育体系, 但是有研究证明 CYP 2C9 酶在磷酸盐缓冲液中的活性较差, 因此本研究改用 Tris 缓冲液 (pH 7.5) 作为孵育体系的缓冲液。

在双氯酚酸和 4'-羟基双氯酚酸测定的文献报道方法中, 两者的保留时间均较长, 色谱运行时间大多超过 10min。而目前分析方法研究的重点集中于在保证适当的分离效率和色谱性能的前提下能够快速地对大量样品进行分析。因此本文建立了一种反相高效液相色谱法用于快速测定 CYP 2C9 酶孵育体系中的双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸。本方法使用乙腈-水体系, 色谱柱为较短的 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (50mm  $\times$  4.6mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ), 适用的流速可达  $2.0 \text{ mL/min}$ ,

因此为快速的分离测定提供了基础。另外在流动相中加入七氟丁酸作为离子对试剂, 以改善峰形, 增加待分析物在色谱柱上的保留。

CYP 2C9 酶孵育体系的预处理方法可以有固相萃取、液液提取和沉淀蛋白等方法。然而用固相萃取法进行处理, 尽管能够去除大部分的内源性极性杂质, 但是方法烦琐, 不适用于本研究的快速测定目的。本研究又考察了液液萃取法, 但是考察了乙醚、乙酸乙酯、二氯甲烷等多种溶剂的萃取效果, 但由于双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的极性差别, 结果发现均不能同时获得二者的较高而稳定的提取率。因此本试验最终选择沉淀蛋白法, 方法极为简便, 仅需加入  $100 \mu\text{L}$  乙腈-冰乙酸 (94:6, V/V), 然后离心 3min 即可同时达到终止反应和沉淀蛋白的目的, 一举两得, 并且色谱分析表明其中存在的内源性物质并不会影响双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的测定。

### 4 结论

本研究建立了一种快速、灵敏、准确的人 CYP 450 2C9 中双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的 HPLC 紫外检测法。该法适合双氯酚酸及其代谢物 4'-羟基双氯酚酸的定量测定, 为体外 CYP2C9 酶活性的评价及酶动力学研究提供了方法学依据。本方法的最大优点是简单快速, 色谱峰间分离效果好, 每个样品的测试时间仅为 5min。因此本文所建立的方法适用于快速评价体外 CYP2C9 酶的活性。

### 参考文献:

- [1] Nebert DW, Jaiswal AK, Meyer UA, et al Human P450 genes: evolution, regulation and possible role in carcinogenesis [J]. *Biochem Soc Trans*, 1987, 15 (4): 586
- [2] Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, et al Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28 (12): 1203
- [3] Farin RM, Omiecinski CJ. Regiospecific expression of cytochrome P450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1993, 40 (223): 317
- [4] Weste M R, Lasker J M, Johnson E F, et al CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28 (3): 354
- [5] Bort R, Mace K, Boobis A, et al Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58 (5): 787
- [6] 郭喻, 汪晖. 人细胞色素 P450 同工酶探针底物特异性的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23 (7): 851

(收稿日期: 2008-09-26; 修回日期: 2008-12-01)

(本文编辑 魏萍)