

文章编号: 1006-2858(2007)01-0032-05

大鼠肝微粒体中葛根素的液相色谱-质谱 测定法及药物代谢动力学

崔升森¹, 赵春顺², 高 坤³, 毛晶晶³, 何仲贵³

(1. 广东药学院 中药系, 广东 广州 510006; 2. 中山大学 药学院, 广东 广州 510080;
3. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立大鼠肝微粒体中葛根素及其代谢物的液相色谱-质谱测定法, 并研究葛根素在大鼠肝微粒体中的药物代谢动力学。方法 色谱柱为 Waters C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(体积比为 50:50), 通过电喷雾电离源(ESI), 以正离子方式进行检测。结果 方法的回收率为 95.6%~96.8%, 其日内、日间的 RSD 分别为 4.9%~7.6%和 3.7%~6.2%, 葛根素的质量浓度在 0.5~20 mg L⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系。在温孵时间 0~40 min 内, 微粒体蛋白质量浓度在 0.5~2.0 g L⁻¹内, 葛根素呈线性消除, 随着肝微粒体蛋白质量浓度的增大, 葛根素呈线性消除, 葛根素可被肝微粒体代谢成大豆苷元。其代谢机理为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)依赖性的氧化代谢。还原型烟酰胺二核苷酸(NADH)对葛根素代谢基本没有催化作用。结论 葛根素在大鼠肝微粒体内被迅速代谢, 大鼠肝微粒体 P450 酶参与了葛根素的代谢。

关键词: 葛根素; 液相色谱-质谱联用法; 肝微粒体; 代谢; 药物代谢动力学

中图分类号: R 969.1; R917 文献标志码: A

葛根素是从豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)中提取的有效成分, 有扩张冠脉、增加冠脉血流量、降低血压、减慢心率、降低心肌耗氧量等作用^[1]。临床使用时常用输液稀释后静滴, 治疗冠心病、心绞痛并发呼吸道和肺部感染、眼底病、心肌炎等多种疾病。葛根素是肝细胞中细胞色素 P450 的底物^[2], 但有关葛根素在大鼠肝微粒体中的代谢国内外尚未见报道。作者建立了葛根素及其代谢物的液相色谱-质谱测定法, 并研究葛根素在大鼠肝微粒体中的代谢, 以便人们了解其代谢规律, 为今后的临床合理用药提供依据。

1 仪器与材料

Micromass 液相色谱-质谱联用仪、Waters 1525 泵、Micromass ZQ 检测器、配有 API(大气压离子化)源、Masslynx 4.0 版数据处理系统(美国 Waters 公司)。色谱柱: Waters C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司)。

葛根素(含量: 质量分数为 99.2%, 烟台鲁银药业有限公司), 大豆苷元(沈阳药科大学药化实验室提供), 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

(NADPH, 美国 Sigma 公司), 还原型烟酰胺二核苷酸(NADH, 美国 Sigma 公司), 实验中所用其他试剂均为市售色谱纯。

2 方法与结果

2.1 肝微粒体制备

大鼠颈颈椎处死, 开腹取肝脏, 用滤纸吸干水分, 称质量。立即放入冰冷的蔗糖溶液中清洗, 用剪刀剪成碎块, 反复清洗至无血色。加 4 倍肝质量的蔗糖溶液, 在冰浴中用组织匀浆机制成匀浆, 再超声分散 30 s, 4 下 10 000 r · min⁻¹ 离心 20 min。上清液用四层纱布过滤除漂浮脂类物, 滤液在 4 下 50 000 r · min⁻¹ 离心 60 min, 弃上清液, 沉淀用焦磷酸钾缓冲液悬浮均匀, 在 4 下 50 000 r · min⁻¹ 离心 60 min, 沉淀即为肝微粒体。用 Tris-HCl 缓冲液悬浮均匀, 体积为原上清液的 1/4 即可, 分装于塑料管中, 于 -80 保存, 采用 Lowry 法测定肝微粒体蛋白浓度^[3]。

2.2 温孵条件

肝微粒体孵体系由 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.4)组成, 含葛根素 10 mg L⁻¹、肝

收稿日期: 2006-02-28

作者简介: 崔升森(1974-), 女(汉族), 辽宁大连人, 博士, 主要从事药物新剂型的研究, Tel. 020-39352169, E-mail cuihengmiao@yahoo.com; 何仲贵(1965-), 男(汉族), 宁夏盐池人, 教授, 博士生导师, 主要从事药物新剂型和生物药剂学研究, Tel. 024-23986321, E-mail cnhzg@tom.com。

微粒体蛋白 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 MgCl_2 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NADPH $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37°C 下,加入 NADPH 开始反应,定时取样 $100 \mu\text{L}$,样品立即与 2 倍量冰冷的甲醇混合终止反应,在 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min ,上清液备用。

2.3 色谱及质谱条件

色谱条件:流动相为甲醇-水(体积比为 50:50),流速为 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为室温,进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

质谱条件:电喷雾电离源(ESD),正离子扫描方式,毛细管电压 5 kV ,锥孔电压 30 V ,去溶剂电压 5 V ,透镜电压 0.5 V ,去溶剂气流速 $610 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,锥孔气流速 $60 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,去溶剂温度 500°C ,源温度 150°C ,扫描质量范围 $115 \sim 600 \text{ m/z}$ 。

2.4 色谱行为

在上述色谱条件下,葛根素(化学结构式见图 1)

峰与空白肝微粒体温孵液中的杂质峰及代谢物峰达到良好分离(图 2)。在大鼠肝微粒体孵液液中检测到 m/z 为 255 的准分子离子峰(图 3),与对照物大豆苷元(化学结构式见图 1)比较,其准分子离子峰和保留时间均与大豆苷元相一致,故此可初步确定葛根素的其中一个代谢产物为大豆苷元,且在该色谱条件下孵液液中未发现葛根素的其他代谢产物。

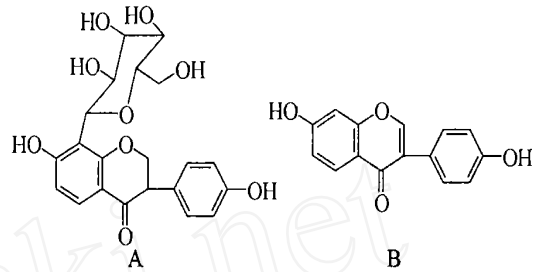
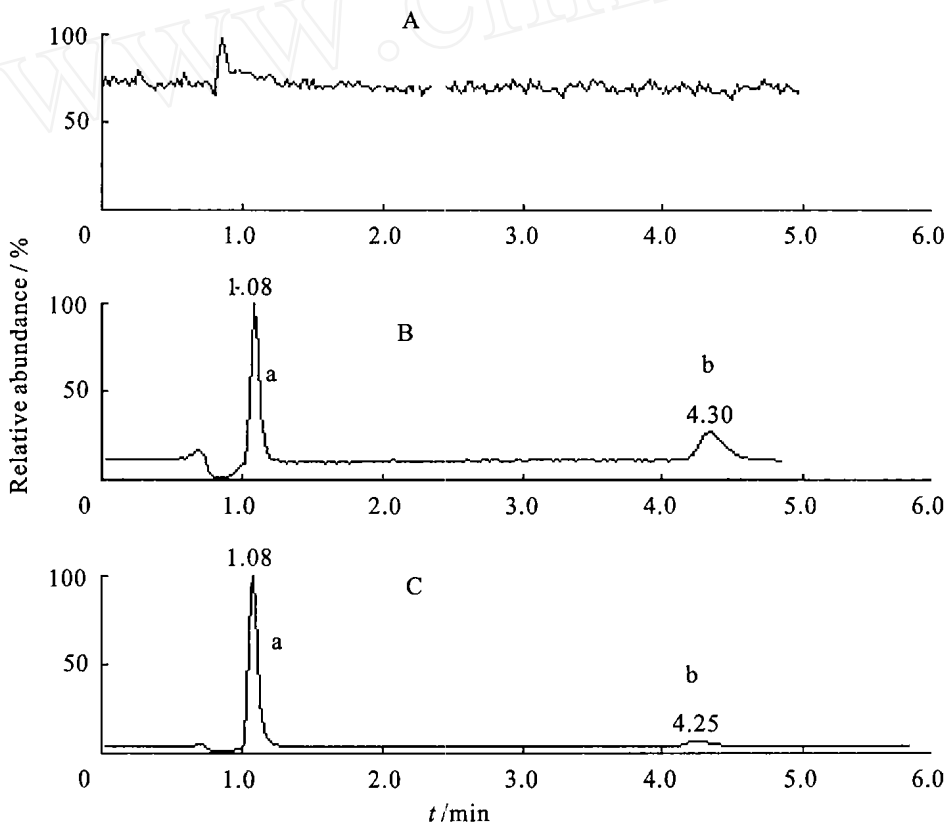


Fig. 1 Structures of puerarin (A) and daidzein (B)



A—A blank rat liver microsome sample; B—A blank rat liver microsome sample spiked with puerarin and daidzein; C—Incubation of puerarin with rat liver microsome; a—Puerarin; b—Daidzein

Fig. 2 Chromatograms of puerarin and daidzein rat liver microsome samples determined by LC-MS method

2.5 标准曲线的制备

在肝微粒体温孵液中加入葛根素标准液(称取适量葛根素用甲醇溶解),使葛根素的质量浓度分别为 0.5 、 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10.0 、 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,取 $100 \mu\text{L}$ 上述溶液与 2 倍量冰冷的甲醇混合后,在

$3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min ,上清液进行 LC-MS 分析,以质量浓度()为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行回归,得到肝微粒体温孵液中的标准曲线: $A = 3.333 \times 10^3 + 3.870 \times 10^2$, $r = 0.9995$ 。

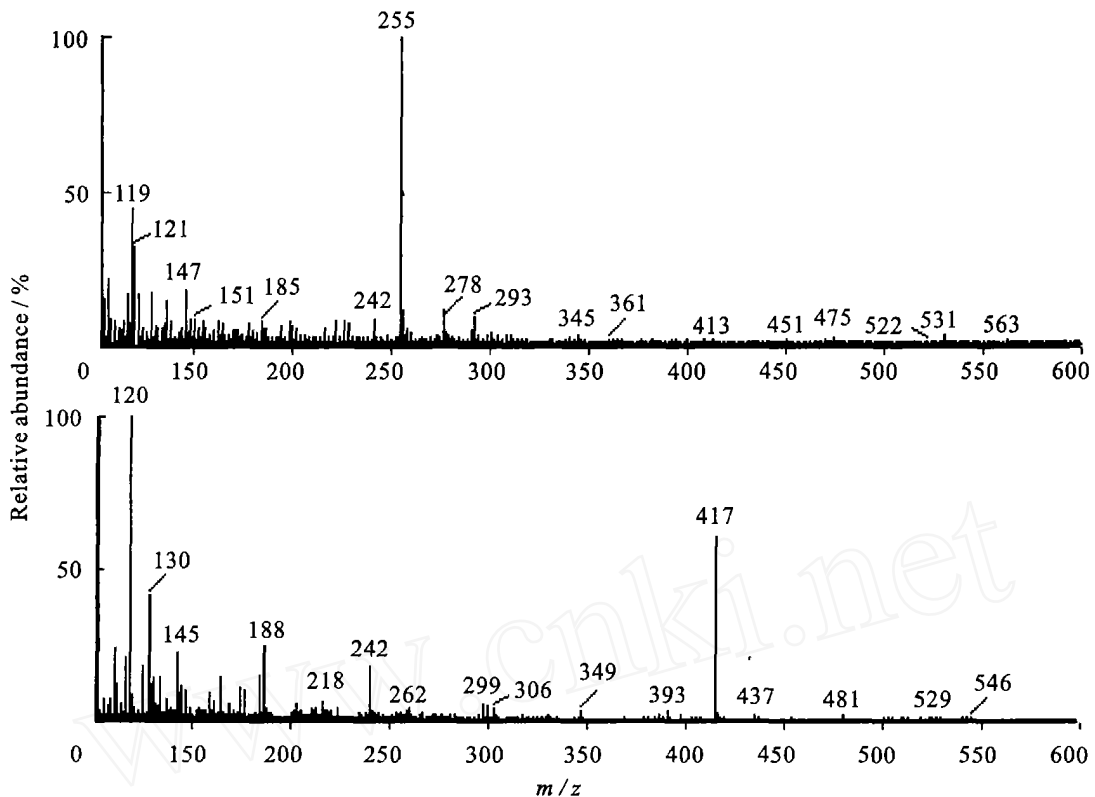


Fig. 3 MS spectra of puerarin and its metabolite daidzein $[M+H]^+$ after incubation of puerarin in rat liver microsome for 40 min

2.6 方法回收率和精密度

在肝微粒体温孵液中加入葛根素标准液,使葛根素的质量浓度分别为 0.5 、 5 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,按“2.5”条操作测定葛根素的回收率及日内、日间 RSD。葛根素高、中、低 3 种质量浓度的日内 RSD 分别为 6.3% 、 4.9% 、 7.6% , 日间 RSD 分别为 6.2% 、 5.1% 、 3.7% 。回收率分别为 $(95.6 \pm 3.4)\%$ 、 $(96.2 \pm 2.6)\%$ 、 $(96.8 \pm 2.8)\%$ 。

2.7 葛根素在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学

2.7.1 温孵时间对葛根素代谢速率的影响

质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葛根素在大鼠肝微粒体中经 37°C 水浴温孵振荡 40 min, 葛根素呈线性消除, 而葛根素在灭活的肝微粒体中质量浓度无明显变化, 可见葛根素经大鼠肝微粒体代谢, 结果见图 4。

2.7.2 肝微粒体蛋白质质量浓度对葛根素代谢速率的影响

肝微粒体蛋白质质量浓度在 $0.5 \sim 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 葛根素质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、温孵时间为 40 min 时, 葛根素的消除情况见图 5。结果表明随着肝微粒体蛋白质质量浓度的增大, 葛根素呈线性消除。

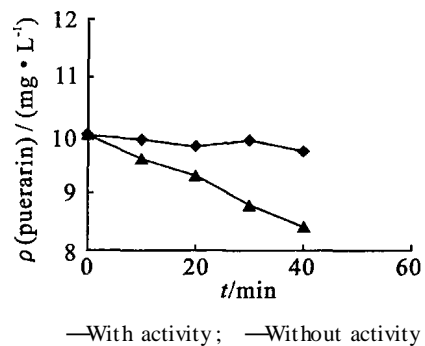


Fig. 4 Effect of incubation time on the rate of puerarin metabolism in rat liver microsomes

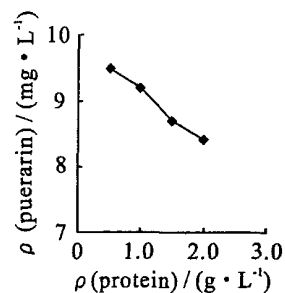


Fig. 5 Effect of microsomal protein concentration on the metabolic rate of puerarin in rat liver microsomes

2.7.3 底物质量浓度对葛根素代谢速率的影响

在肝微粒体温孵液中加入葛根素标准液,使

其质量浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 经 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温孵振荡 40 min, 当底物质量浓度达 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 葛根素的消除速率并不随底物质量浓度的增加而增加, 而具有一定的饱和性(图 6)。

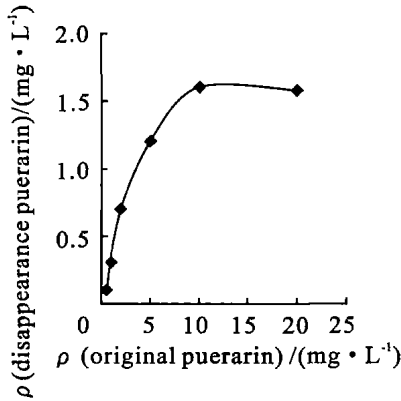


Fig. 6 Effect of original concentration of puerarin on the concentration of disappeared puerarin in rat liver microsomes

2.7.4 辅助因子对葛根素代谢的影响

为进一步探讨葛根素在大鼠肝微粒体中的代谢机理, 考察了 NADPH 和 NADH 作为氧化反应体系中的辅助因子对葛根素代谢的影响。以 NADPH 或 NADH 单独作为辅助因子、或以两者共同作为辅助因子进行孵化实验。结果表明(表 1) NADH 与 NADPH 合用时与单独使用 NADPH 相比, 对葛根素的代谢量没有明显影响, 而 NADH 单独使用时, 葛根素不发生代谢。因此, 葛根素的代谢表现为 NADPH 依赖性氧化代谢机理。

Table 1 The concentration of puerarin after incubation in rat liver microsomes with NADPH and NADH at 40 min

Group	/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
NADPH	8.64
NADPH + NADH	8.72
NADH	9.94

3 讨论

作者所建立的方法可同时测定葛根素及其代谢物, 方法回收率高, 高、中、低 3 个质量浓度下测得的回收率均大于 90%, 日间和日内精密度好,

且葛根素在大鼠肝微粒体中稳定性良好。

葛根素在大鼠肝微粒体内经 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温孵振荡 40 min, 葛根素呈线性消除, 而葛根素在灭活的大鼠肝微粒体中未发生代谢, 说明葛根素是经大鼠肝微粒体代谢的。当底物葛根素质量浓度大于 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 葛根素的代谢不随底物质量浓度的增加而呈线性增加, 表现出明显的饱和性。葛根素的消除率随 P450 质量浓度的增加而增加, 呈线性相关。CYP450 催化药物氧化的过程, 需要一定的辅助因子完成整个循环^[4]。NADPH 是 CYP450 催化药物代谢过程中的必要辅助因子, 起传递电子的作用, 引发氧化反应的发生。作者考察了 NADPH 和 NADH 两种辅助因子对葛根素代谢的影响, 结果表明两种途径均表现为 NADPH 依赖型, NADH 对葛根素代谢基本无催化作用。从上述结果可以看出, 大鼠肝 P450 酶参与了葛根素的代谢。那么进一步研究葛根素与细胞色素 P450 相关的药物相互作用, 探讨与细胞色素 P450 相关的药物相互作用的机制, 对于预防和减轻药物间的相互作用, 最大限度的提高药物的有效性和安全性, 对临床合理用药具有重要意义。

参考文献:

- [1] 吴凯. 葛根素注射液的临床应用[J]. 天津药学, 2002, 14(6): 14-15.
- [2] GUERRA M C, SPERONI E, BROCCOLI M, et al. Comparison between Chinese medical herb pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. Life Sciences, 2000, 67: 2997-3006.
- [3] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [4] GIBSON G G, SKETT P. Introduction to drug metabolism [M]. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1996: 35.

Determination of puerarin in rat liver microsomes by LC-MS and its pharmacokinetics

CUI Sheng-miao¹, ZHAO Chun-shun², GAO Kun³, MAO Jing-jing³, HE Zhong-gui³

(1. Department of Traditional Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou

510006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To develop a LC-MS method for the determination of puerarin and its metabolite and study the kinetics of its metabolism in rat liver microsomes. **Methods** Chromatography was performed on a Waters C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). A methanol-water (V/V = 50/50) as the mobile phase was used. A Waters Micromass ZQ detector equipped with an ESI interface was used and operated in the positive ion mode. **Results** The recovery of puerarin for the proposed method was 95.6% - 96.8%. The relative standard deviation for the within-day and between-day were 4.9% - 7.6% and 3.7% - 6.2%. The calibration curve was linear in the range from 0.5 mg L⁻¹ to 20 mg L⁻¹ with *r* = 0.9995. The elimination of puerarin was linear. Microsomal protein concentration had significant effect on puerarin metabolism. One metabolite of puerarin was found to be daidzein. The metabolism of puerarin exhibited NADPH-dependent oxidation mechanism. NADH as cofactor had no catalytic effect on the metabolism of puerarin. **Conclusions** Puerarin is rapidly metabolized in rat liver microsomes. The result suggests that CYP450 is involved in the metabolism of puerarin.

Key words : puerarin ; LC-MS ; liver microsomes ; metabolism ; pharmacokinetics

(上接第15页)

[6] MAXWELL D M, LENX D F, GROFF W A, et al. The effect of blood flow and detoxification on *in vivo* cholinesterase inhibition by soman in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987, 88(1) : 66 - 76.

[7] 邓意辉, 李焕秋, 顾学裘. 聚乙二醇单甲醚(2000)胆固醇琥珀酸酯包衣脂质体的研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2000, 17(6) : 391 - 394.

Stabilities of azidothymidine palmitate and its liposome preparations in mice and rats blood plasma

LEI Jie-jie¹, TIAN Wen-yan², SUN Hong-wei³, ZHOU Xin-yu¹, SHI Li¹, DENG Yi-hui¹
(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Zhejiang Kanglaite GROUP CO., LTD Quality guarantee department, Hangzhou 310013, China; 3. Shenyang Shanri Pharmaceutical Research Institute, Shenyang 110013, China)

Abstract : Objective To investigate the enzymatic degradation kinetics of azidothymidine palmitate solution and liposome preparations. **Methods** Azidothymidine palmitate solution, liposomes and modified liposomes were prepared and their degradations in rodents blood plasma were determined by HPLC. **Results** Degradations of azidothymidine palmitate were shown to apparent first-order kinetics in blood plasma of mice and rats, and the rate constants of azidothymidine palmitate solution > liposomes > modified liposomes. **Conclusions** The stability of AZTP in rodents plasma is greatly raised when it is encapsulated in liposomes.

Key words : azidothymidine palmitate ; plasma stability ; liposome preparation ; modified liposomes ; HPLC