

新型胰岛素增敏剂 ZG02 在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性研究[△]

陈瑞^{1,2*}, 张丽², 蔡进², 朱高峰^{1,2}, 汤磊^{1,2}, 黄静^{2#}(1.贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3359-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.11

摘要 目的: 建立测定大鼠肝微粒体孵育体系中新型胰岛素增敏剂 ZG02 质量浓度的方法, 并探讨 ZG02 的体外代谢稳定性。方法: 分别将 ZG02 溶解于还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)启动的大鼠肝微粒体 I 相孵育体系、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)启动的 II 相孵育体系以及二者联合启动的两相孵育体系中, 置于 37 °C 水浴中进行孵育, 分别于孵育 0、5、10、15、20、30、45 min 时终止反应; 以吲哚美辛为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定 ZG02 的质量浓度。色谱柱为 Waters BEH C₁₈, 流动相为水(含 0.01% 甲酸)-乙腈(含 0.01% 甲酸)(35:65, V/V), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 35 °C, 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负离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 458.115 9→323.073 0(ZG02)、*m/z* 356.069 0→312.080 4(内标)。以孵育 0 min 时 ZG02 的质量浓度为参照, 计算其在不同孵育体系中的剩余百分比、酶动力学参数和各代谢酶的贡献率。结果: ZG02 检测质量浓度线性范围为 1~400 μg/L, 定量下限为 1 μg/L, 最低检测限为 0.25 μg/L; 日内、日间 RSD 均小于 10%, 准确度为 87.26%~94.58%, 提取方法和基质效应均不影响待测物的测定。孵育 45 min 时, ZG02 在 I 相、II 相和两相孵育体系中的剩余百分比分别为 (73.33 ± 1.53)%、(50.63 ± 3.42)%、(45.81 ± 2.56)%, 半衰期分别为 67.28、30.26、25.57 min, 清除率分别为 20.60、45.80、54.20 μL/(mg·min), I 相、II 相代谢酶的贡献率分别为 38.01%、84.50%。结论: 本研究建立的 UPLC-MS/MS 法简便、快速、专属性强, 可用于大鼠肝微粒体孵育体系中 ZG02 质量浓度的测定及体外代谢稳定性的研究。ZG02 在 I、II 相孵育体系中的代谢稳定性中等, 在两相孵育体系中的代谢稳定性较差, 其代谢反应可能以 II 相代谢酶介导的葡萄糖醛酸化结合反应为主。

关键词 ZG02; 超高效液相色谱-串联质谱法; 肝微粒体; 大鼠; 体外; 代谢稳定性; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸

Study on Metabolic Stability of Novel Insulin Sensitizer ZG02 in Rat Liver Microsomes

CHEN Rui^{1, 2}, ZHANG Li², CAI Jin², ZHU Gaofeng^{1, 2}, TANG Lei^{1, 2}, HUANG Jing² (1. Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of novel insulin sensitizer ZG02 in liver microsomes of rats, and to study its metabolism stability *in vitro*. METHODS: ZG02 was respectively dissolved in phase I incubation system of rat liver microsomes initiated by NADPH, in phase II incubation system initiated by UDPGA and in two-phase incubation system initiated by NADPH and UDPGA. After incubated in 37 °C water bath for 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min, the reaction was terminated. Using indometacin as internal standard, UPLC-MS/MS method was used to determine the concentration of ZG02. The determination was performed on Waters BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of water (0.01% formic acid)-acetonitrile (0.01% formic acid) (35:65, V/V) at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the sample size was 2 μL. The ion source was electrospray ion source and negative ion scanning carried out with multiple reaction monitoring mode. The ion pairs used for quantitative analysis were *m/z* 458.115 9→323.073 0 (ZG02) and *m/z* 356.069 0→312.080 4 (internal standard), respectively. The residual percentage and enzyme kinetic parameters of ZG02, contribution rates of metabolic enzymes in different incubation systems were calculated with the concentration of ZG02 incubated for 0 min as reference. RESULTS: The linear range of ZG02 was 1-400 μg/L; the limits of quantitation and detection were 1 μg/L and 0.25 μg/L. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 10%, accuracies were 87.26%-94.58%. The extraction method and the matrix effect didn't affect the determination of the tested substance. At 45 min of incubation, the residual percentages of ZG02 were (73.33 ± 1.53)% in phase I incubation system, (50.63 ± 3.42)% in phase II incubation system and (45.81 ± 2.56)% in two-phase incubation system. Half-time period of phase I incubation system, phase II incubation system and two-phase system were 67.28, 30.26, 25.57 min; clearance rate were 20.60, 45.80, 54.20 μL/(mg·min), respectively. The contribution rates of phase I incubation system and phase II incubation system were 38.01% and 84.50%. CONCLUSIONS: Established UPLC-MS/MS method is simple, rapid and specific. It can be used for the concentration determination of ZG02 and *in vitro*

△ 基金项目: 贵州省科技计划项目(No.黔科合[2016]支撑2819、黔科合支撑[2017]2839、黔科合 LH 字[2016]7379、黔科合[2016]平台人才5402); 贵州省普通高等学校工程研究中心建设任务(No.黔教教 KY 字[2014]219)

* 硕士研究生。研究方向: 创新型化合物的药理学。E-mail: 464268222@qq.com

通信作者: 副教授。研究方向: 药物新剂型、新技术及药理学。电话: 0851-86550366。E-mail: 1104849720@qq.com

metabolism stability study in rat liver microsomes incubation system. The metabolism stability of ZG02 is moderate in phase I and phase II incubation systems, but poor in two-phase incubation system. The main metabolic reaction may be phase II metabolic enzyme mediated glucuronization.

KEYWORDS ZG02; UPLC-MS/MS; Liver microsomes; Rat; *in vitro*; Metabolism stability; NADPH; UDPGA

胰岛素增敏剂是一类针对胰岛素抵抗的2型糖尿病的治疗药物,也是目前降糖药研发的热点之一^[1]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种重要的代谢应激蛋白激酶,在调节代谢和能量平衡特别是在胰岛素抵抗发生过程中发挥着重要的作用^[2-3]。本课题组在前期研究中发现一系列四氢吡唑类化合物具有明显的降糖作用,其中的代表性化合物ZG02[6-苄氧基-9-(4-氯甲苯酰基)-四氢吡唑-3-羧酸,化学结构见图1]具有较好的胰岛素增敏活性,可通过激活AMPK途径来降低db/db小鼠的血糖和胰岛素水平^[4];同时,ZG02在体内活性测试中并未表现出罗格列酮样体质量增加等不良反应^[5],是一种极具开发价值和前景的化合物。

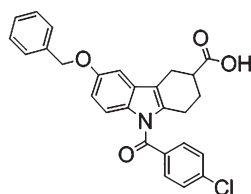


图1 ZG02的化学结构

Fig 1 Chemical structure of ZG02

与体内代谢研究不同,体外代谢研究可在新药研发早期利用体外代谢参数合理预测候选化合物的体内药动学行为,指导其后期药效学、药动学研究以及安全性评价模型的选择,有助于缩小体内研究的筛选范围^[6-7]。化合物代谢稳定性差意味着其在体内较易被代谢,往往导致不良的药动学性质,如体内生物利用度低、作用时间短等^[8]。药物代谢可分为I相和II相:I相代谢最重要的酶系为细胞色素P₄₅₀(CYP),该酶系包含两个重要的蛋白组分,即含铁血红素蛋白和黄素蛋白,后者能将还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(即还原型辅酶II, NADPH)的电子转移至CYP-底物复合体上,完成药物的氧化、还原反应^[9-11];II相代谢的结合代谢酶为尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖醛酸转移酶(UGT),其中UGT是一类位于内质网膜上的超家族代谢酶,也是II相代谢过程中的主要酶系,可以将尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDP-GA)上的葡萄糖醛酸转移至内源性或外源性化合物上,完成药物的葡萄糖醛酸化结合反应^[12-13]。为初步预测ZG02在大鼠体内的代谢情况,本研究以超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)为检测手段,对ZG02在大鼠肝微粒体孵育体系(包括I相、II相及两相孵育体系)中的体外代谢特征进行分析,以期为其体内消除规律研究、代谢产物确证以及药物应用等提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Xevo G2-XS型超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱仪(UPLC-QTOF-MS),配有MassLynx V4.1质谱工作站、UNIFI 7.0数据库(美国Waters公司);JN300-2型氮气吹扫仪(苏州吉米诺仪器有限公司);X1型高速离心机(香港基因有限公司);KH-600E型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);FA805N型十万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司);DW-86L486型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

ZG02对照品[贵州医科大学药物化学重点实验室制备,纯度:>98%];吡啶美辛对照品(内标,批号:J0526A5,纯度:>98%)、雄性SD大鼠肝微粒体(批号:J0202A)均购自大连美仑生物技术有限公司;葡萄糖-6-磷酸二钠(G-6-P-Na₂,批号:116B039)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-P-DH,批号:20160725)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠(NADP-Na₂,批号:718B0225)均购自北京索莱宝科技有限公司;UDPGA(美国Sigma-Aldrich公司,批号:SLBT1945);1,4-单内酯(上海源叶生物科技有限公司,批号:S10M8I31074);丙甲菌素(加拿大Toronto Research Chemicals公司,批号:8-JIN-165-1;临用前用适量二甲基亚砷溶解,再用水稀释至相应浓度);甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,氯化镁、柠檬酸钠等均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 待测物和内标溶液 精密称取ZG02对照品适量,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为20 mg/L的ZG02贮备液;同法配制质量浓度为10 mg/L的内标贮备液;上述溶液均置于4℃冰箱中保存,备用。临用前,将ZG02贮备液用适量甲醇稀释后,再以磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4,下同)稀释至孵育浓度,并确保孵育体系中甲醇的含量不超过1%^[14];将内标贮备液用甲醇稀释,得质量浓度为100 μg/L的内标溶液。

2.1.2 NADPH辅酶溶液 A液:依次取NADP-Na₂ 200 mg、G-6-P-Na₂ 200 mg、氯化镁 133 mg,用水溶解并定容至10 mL,于-20℃保存。B液:依次取柠檬酸钠 44 mg、G-6-P-DH 1 000 U,用水溶解并定容至25 mL,于-20℃保存。临用前,取A、B液按体积比5:1混匀,得浓度为1 mmol/L(按反应产物NADPH计)的NADPH辅酶溶液^[15]。

2.1.3 UDPGA辅酶溶液 精密称取UDPGA适量,临用前用水溶解并定容,配制成浓度为5 mmol/L的UDPGA辅酶溶液。

2.2 体外孵育体系的建立

2.2.1 由NADPH启动的I相孵育体系 取大鼠肝微粒体适量,用PBS稀释至0.5 g/L,随后加入“2.1.1”项下经稀释的ZG02贮备液适量,使ZG02的最终质量浓度为100 μg/L。将上述溶液置于37 ℃水浴中静置5 min后,加入“2.1.2”项下NADPH辅酶溶液30 μL以启动反应。该体系总体积为200 μL,有机溶剂的含量不得超过5%。

2.2.2 由UDPGA启动的II相孵育体系 取大鼠肝微粒体适量,用PBS稀释至0.5 g/L,加入丙甲菌素[0.025 g/L(最终质量浓度,下同)],混匀,于冰浴中孵育15 min;随后加入1,4-单内酯(5 mmol/L)、氯化镁(5 mmol/L)以及“2.1.1”项下经稀释的ZG02贮备液适量,使ZG02的最终质量浓度为100 μg/L。将上述溶液置于37 ℃水浴中静置5 min后,加入“2.1.3”项下UDPGA辅酶溶液30 μL以启动反应。该体系总体积为200 μL,有机溶剂的含量不得超过5%。

2.2.3 由NADPH和UDPGA联合启动的两相孵育体系 取大鼠肝微粒体适量,用PBS稀释至0.5 g/L,加入丙甲菌素(0.025 g/L),混匀,于冰浴中孵育15 min;随后加入1,4-单内酯(5 mmol/L)、氯化镁(5 mmol/L)以及“2.1.1”项下经稀释的ZG02贮备液适量,使ZG02的最终质量浓度为100 μg/L。将上述溶液置于37 ℃水浴中静置5 min后,加入“2.1.2”项下NADPH辅酶溶液和“2.1.3”项下UDPGA辅酶溶液30 μL以启动反应。该体系总体积为200 μL,有机溶剂的含量不得超过5%。

2.2.4 大鼠肝微粒体孵育及样品处理 取“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下经启动的孵育体系各适量,置于37 ℃水浴中,分别于孵育0、5、10、15、20、30、45 min时加入含内标100 μg/L的乙腈溶液400 μL终止反应,涡旋混匀30 s后,于4 ℃下以16 000×g离心10 min;取上清液以氮气流吹干,残渣用甲醇复溶,以16 000×g离心10 min;取上清液适量进行UPLC-MS/MS分析,考察各时间点孵育体系中ZG02的质量浓度。各孵育体系均平行操作3次。

2.3 UPLC-MS/MS方法学考察

2.3.1 色谱与质谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);保护柱:Waters VanGuard BEH C₁₈(5 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:水(含0.01%甲酸)-乙腈(含0.01%甲酸)(35:65,V/V);流速:0.4 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:2 μL;采集时间:3 min。离子源:电喷雾离子源(ESI);以多反应监测(MRM)模式进行负离子扫描;毛细管电压:1.5 kV;锥孔电压:30 V;离子源温度:100 ℃;脱溶剂气温度:300 ℃;锥孔气流速:50 L/h;脱溶剂气流速:600 L/h;扫描范围:*m/z* 50~1 000;二级碰撞能量:16.5 eV;用于定量分析的离子对分别为*m/z* 458.115 9→323.073 0(ZG02)、*m/z* 356.069 0→312.080 4(内标)。ZG02和内标的二级质谱图见图2。

2.3.2 专属性 取空白孵育样品(即“2.2.3”项下不含

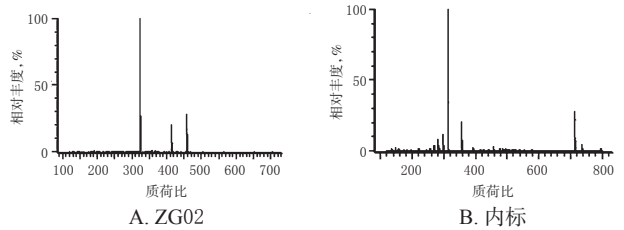
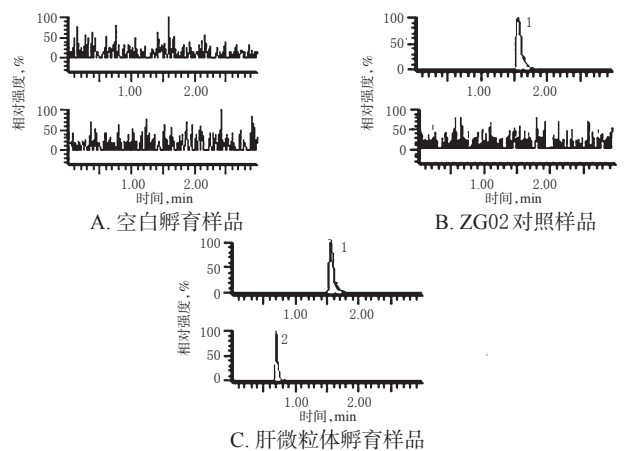


图2 ZG02和内标的二级质谱图

Fig 2 Secondary mass spectrums of ZG02 and internal standard

ZG02的两相孵育体系)、ZG02对照样品(即“2.2.3”项下含ZG02的两相孵育体系)、肝微粒体孵育样品[即“2.2.3”项下含ZG02两相孵育体系按“2.2.4”项下方法处理后(孵育30 min时)所得样品]各适量,按“2.3.1”项下色谱与质谱条件进样分析,色谱图见图3。结果,内标和ZG02的峰形均良好,保留时间分别为0.70、1.57 min,孵育体系中的内源性物质并未干扰待测物的测定,提示本方法的专属性良好。



注:1.ZG02;2.内标

Note:1. ZG02;2. internal standard

图3 典型MRM图

Fig 3 Typical MRM chromatograms

2.3.3 标准曲线的绘制、定量下限及最低检测限的考察 取“2.1.1”项下ZG02贮备液适量,分别用PBS稀释成质量浓度为10、20、50、200、500、1 000、2 000、4 000 μg/L的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各适量,加至“2.2.3”项下经甲醇灭活的大鼠肝微粒体两相孵育体系(200 μL)中,配制成ZG02质量浓度分别为1、2、5、20、50、100、200、400 μg/L的系列样品溶液,按“2.2.4”项下方法孵育2 h后,再按“2.3.1”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积。以待测物与内标的峰面积比值(*y*)为纵坐标、待测物质量浓度(*c*, μg/L)为横坐标,采用加权最小二乘法(权重系数为1/*c*²)进行线性回归。另同法配制并处理得质量浓度分别为1、0.5、0.25 μg/L的样品溶液,考察定量下限(信噪比为10:1)和最低检测限(信噪比为3:1)。结果,回归方程为 $y=0.0972c+0.0027$ ($r^2=0.9992$),ZG02检测质量浓度线性范围为1~400 μg/L,

定量下限为 1 μg/L,最低检测限为 0.25 μg/L。

2.3.4 精密度与准确度试验 按“2.3.3”项下方法配制 ZG02 低、中、高质量浓度(2、100、200 μg/L)的质控样品各 5 份,按“2.2.4”项下方法孵育 2 h 后,进样分析,考察日内精密度;连续测定 3 d,考察日间精密度。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,各质控样品的日内、日间 RSD 均小于 10%,准确度为 87.26%~94.58%,详见表 1。

表 1 精密度、准确度及稳定性试验结果

Tab 1 Results of accuracy, precision and stability tests

理论质量浓度, μg/L	精密度,%		准确度,% (n=5)	稳定性(n=5)	
	日内RSD(n=5)	日间RSD(n=15)		回收率,%	RSD,%
2	4.31	6.61	94.86±3.23	86.65±6.33	7.31
100	5.39	7.28	88.87±4.79	95.21±3.79	3.98
200	3.25	9.89	91.13±8.28	85.65±5.08	5.93

2.3.5 提取回收率及基质效应考察 按“2.3.3”项下方法配制 ZG02 低、中、高质量浓度(2、100、200 μg/L)的质控样品各 5 份,按“2.2.4”项下方法孵育 2 h 后,进样分析,得色谱峰峰面积(A_1)。取“2.2.3”项下两相孵育体系适量,按“2.2.4”项下方法孵育 2 h 后,加入 ZG02 对照品溶液适量,使最终质量浓度与质控样品对应,进样分析,得色谱峰峰面积(A_2)。以甲醇配制对应质量浓度的 ZG02 样品,按“2.2.4”项下方法孵育 2 h 后,进样分析,得色谱峰峰面积(A_3)。每个质量浓度平行操作 5 次。提取回收率= $A_1/A_2 \times 100\%$,基质效应= $A_2/A_3 \times 100\%$ 。结果,低、中、高质量浓度质控样品和内标的提取回收率分别为(82.86±3.23)%、(88.87±4.79)%、(81.13±8.28)%、(87.28±6.29)%、RSD 分别为 4.01%、5.39%、10.21%、7.16% (n=5);基质效应分别为(84.22±3.58)%、(88.72±5.22)%、(93.56±4.28)%、(93.81±5.06)%、RSD 分别为 4.25%、5.88%、4.57%、5.39% (n=5),表明提取方法和基质效应均不会影响 ZG02 质量浓度的测定。

2.3.6 稳定性试验 按“2.3.3”项下方法配制 ZG02 低、中、高质量浓度(2、100、200 μg/L)的质控样品各 5 份,按“2.2.4”项下孵育 2 h 后,考察其在室温下放置 12 h 的稳定性(以实测质量浓度与理论质量浓度的比值即回收率表示)。结果,各质控样品回收率的 RSD 均小于 10% (n=5),表明其在室温下放置 12 h 稳定,详见表 1。

2.4 ZG02 体外代谢稳定性研究

按“2.2.4”项下方法进行体外代谢稳定性研究,采用底物消除法考察 ZG02 的代谢情况。以孵育 0 min 时 ZG02 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,采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制 ZG02 在 3 种孵育体系中的药物剩余百分比-时间曲线,详见图 4。由图 4 可见,ZG02 在 I 相孵育体系中代谢较慢,而在两相孵育体系中代谢较快。

将各时间点的药物剩余百分比的自然对数对孵育

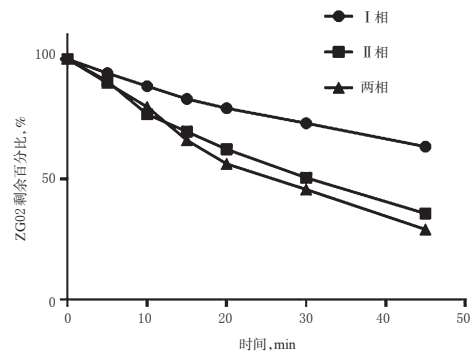


图 4 ZG02 在大鼠肝微粒体不同孵育体系中的药物剩余百分比-时间曲线

Fig 4 Residual percentage-time curves of ZG02 in liver microsomes of rats in different incubation systems

时间作线性回归,得斜率 k ,并以此计算 ZG02 的酶动力学参数[包括半衰期($t_{1/2}$)和清除率(CL_{int})]和各代谢酶的贡献率(F)。其中, $t_{1/2} = -0.693/k$, $CL_{int} = [(0.693/t_{1/2}) \times \text{孵育体系体积}(\mu\text{L})]/\text{肝微粒体质量}(\text{mg})^{[14]}$; $F_{\text{I相}} = CL_{int(\text{I相})}/CL_{int(\text{两相})} \times 100\%$, $F_{\text{II相}} = CL_{int(\text{II相})}/CL_{int(\text{两相})} \times 100\%$ 。以 $t_{1/2}$ 评估代谢稳定性: $t_{1/2} < 30 \text{ min}$,为代谢不稳定; $30 \text{ min} \leq t_{1/2} \leq 90 \text{ min}$,为代谢稳定性中等; $t_{1/2} > 90 \text{ min}$,为代谢稳定^[15],结果详见表 2。

表 2 ZG02 在大鼠肝微粒体不同孵育体系中的酶动力学参数

Tab 2 Enzyme kinetic parameters of ZG02 in liver microsomes of rats in different incubation systems

孵育体系	ZG02 剩余百分比(45 min 时), %	$t_{1/2}$, min	CL_{int} , μL/(mg·min)
I 相	73.33±1.53	67.28	20.60
II 相	50.63±3.42	30.26	45.80
两相	45.81±2.56	25.57	54.20

由表 2 可见,孵育 45 min 时,在 NADPH 启动的 I 相孵育体系和 UDPGA 启动的 II 相孵育体系中,ZG02 的剩余百分比分别为(73.33±1.53)%、(50.63±3.42)%, $t_{1/2}$ 分别为 67.28、30.26 min,表明其在单相孵育体系中的代谢稳定性中等,且在 II 相中的代谢稳定性较 I 相差;在 NADPH 和 UDPGA 联合启动的两相孵育体系中,ZG02 的剩余百分比为(45.81±2.56)%, $t_{1/2}$ 为 25.57 min,提示其在两相孵育体系中的代谢稳定性差。

另外, F 值的分析结果显示,CYP 酶(I 相代谢酶)、UGT 酶(II 相代谢酶)的 F 值分别为 38.01%、84.50%,后者的 F 值更大,提示 ZG02 在大鼠肝微粒体中的代谢反应可能以 UGT 酶介导的葡萄糖醛酸化结合反应为主。

3 讨论

与体内代谢稳定性研究相比,药物体外代谢稳定性研究可排除体内诸多干扰因素(如磷脂、脂肪酸、尿素等)的影响,有助于更直接地观察药物的代谢特征,具有省时、稳定、高效的特点,适用于体内代谢转化率低且缺

乏高灵敏度检测方法的药物,亦可用于候选化合物的高通量筛选^[6-7,14]。但现有药物体外代谢稳定性研究多集中在CYP酶介导的I相代谢上,而对UGT酶介导的II相代谢相关研究较少^[16]。为此,本研究分别以NADPH启动的I相孵育体系、UDPGA启动的II相孵育体系、二者共同启动的两相孵育体系为介质,借助UPLC-MS/MS法考察了新型胰岛素增敏剂ZG02的体外代谢稳定性。

3.1 II相孵育体系的建立

经正常离心后得到的微粒体有部分为微粒体小囊泡,UGT酶的活性位点被封闭在其中,因此需要将其与适量的丙甲菌素混合,并通过在冰浴中孵育(15 min)来为内质网膜“打孔”,以释放肝微粒体中的UGT酶^[14]。

3.2 UPLC-MS/MS法的条件筛选

本研究在前期预试验中考察了水-甲醇、水-乙腈、水(含甲酸)-甲醇、水(含甲酸)-乙腈、水(含甲酸)-甲醇(含甲酸)、水(含甲酸)-乙腈(含甲酸)等流动相体系对ZG02定量分析的影响。结果显示,当以水(含0.01%甲酸)-乙腈(含0.01%甲酸)(35:65, V/V)为流动相进行洗脱时,ZG02和内标的色谱峰峰形均良好,且不受内源性物质的干扰,同时分析时间较短,故最终选择其作为定量分析的流动相体系。

3.3 孵育体系中药物质量浓度的确定

底物消除法是一种常用的检测药物代谢酶动力学参数的方法^[17]。由于本课题组暂未能确证ZG02的代谢产物,故采用底物消除法来评估该化合物的体外代谢情况。为了能够排除系统误差的干扰以准确检测ZG02的代谢情况,本课题组在预试验中对孵育体系中的药物质量浓度(25、100、1 000 μg/L)进行了优化。结果发现,当ZG02的质量浓度为100 μg/L时,孵育后剩余药物质量浓度并不算太高,且至少有20%的药物被清除^[15],故以此作为孵育体系中ZG02的质量浓度。

3.4 ZG02在大鼠肝微粒体中的代谢特征分析

本研究结果显示,在NADPH启动的I相孵育体系、UDPGA启动的II相孵育体系、二者共同启动的两相孵育体系中,ZG02的 $t_{1/2}$ 分别为67.28、30.26、25.57 min,CL_{int}分别为20.60、45.80、54.20 μL/(mg·min)。这提示在3种孵育体系中,ZG02的代谢稳定性依次为I相>II相>两相。CYP酶及UGT酶的F值分别为38.01%、84.50%。这提示ZG02在大鼠肝微粒体中的代谢反应可能以UGT酶介导的葡萄糖醛酸化结合反应为主。

综上所述,本研究建立的UPLC-MS/MS法简便、快速、专属性强,可用于大鼠肝微粒体孵育体系中ZG02质量浓度的测定及其体外代谢稳定性的研究。新型胰岛素增敏剂ZG02在NADPH和UDPGA联合启动的两相孵育体系中的代谢稳定性较差,且代谢反应可能以UGT酶介导的葡萄糖醛酸化结合反应为主。后续本课题组将借助高分辨质谱、波谱等手段确证ZG02的代谢产物,并结合体内外研究进一步阐明其代谢过程及特征,以期

为其开发利用提供更多的参考。

参考文献

- [1] SHAW JE, SICREE RA, ZIMMET PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] LEE WJ, SONG KH, KOH EH, et al. Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(3): 885-891.
- [3] XIAO B, SANDERS MJ, UNDERWOOD E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP[J]. *Nature*, 2011, 472(7342): 230-233.
- [4] 杨宗圯, 李述敏, 李云艳, 等. 新型降糖化合物ZG02的合成方法改进及其手型分离[J]. *化学试剂*, 2017, 39(11): 1233-1236.
- [5] ZHANG JQ, LI SM, MA X, et al. Discovery of tetrahydrocarbazoles with potent hypoglycemic and hypolipemic activities[J]. *Eur J Med Chem*, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.069.
- [6] 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]. *药学报*, 2013, 48(7): 1071-1079.
- [7] 袁春平, 侯惠民, 曾杉. 丹酚酸B及二甲酯在人肝微粒体中代谢稳定性研究及代谢产物鉴定[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(13): 1543-1549.
- [8] 夏媛媛, 杨沮勤, 朱伊婷, 等. UPLC-MS/MS研究抗肿瘤化合物HK-7在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性和代谢酶表型[J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(2): 178-183.
- [9] TAKEUCHI A, SAITO R, HIMENO Y, et al. A theoretical study on the roles of Ca²⁺ in the energy metabolite stability during cardiac workload transition[J]. *Biophysical J*, 2017. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.11.728.
- [10] PETERSEN AB, ANDERSEN NS, KONOTOP G, et al. Synthesis and formulation studies of griseofulvin analogues with improved solubility and metabolic stability[J]. *Eur J Med Chem*, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.055.
- [11] 饶静, 刘剑敏, 吴鹏飞, 等. 新型他克林衍生物ST09与ST10的体外代谢研究[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(11): 965-970.
- [12] ESPOSITO S, MELE R, RAFFAELE INGENITO, et al. An efficient liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach for the optimization of the metabolic stability of therapeutic peptides[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(10): 2685-2696.
- [13] ROBERTS M, HATTWELL J, CHOW CWK, et al. Tartrate inhibition of prostatic acid phosphatase improves seminal fluid metabolite stability[J]. *Metabolomics*, 2016. DOI: 10.1007/s11306-016-1102-x.
- [14] 潘洁, 陆苑, 孙佳, 等. 艾迪注射液对体外人和大鼠肝微粒体中CYP₄₅₀酶的抑制作用[J]. *中成药*, 2016, 38(11): 2332-2337.
- [15] 钟大放, 李桦, 艾常虹. 药物设计和开发中的药物代谢: 基本原理和实践[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 24-37.

Box-Behnken Design 响应面法结合遗传算法和直接搜索算法优化丹栀逍遥散的提取工艺^Δ

苏本正*, 江波, 崔宁, 于宗渊[#](山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R283.6;R284.1;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3364-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.12

摘要 目的:优化丹栀逍遥散的提取工艺。方法:采用加热回流提取法提取丹栀逍遥散组方药材样品粉末,以乙醇体积分数、提取时间和液料比(V/m)为考察因素,以栀子苷、芍药苷和丹皮酚3个指标成分的综合评分为评价指标,先采用Box-Behnken Design (BBD)响应面法进行试验设计,建立数学模型并获得目标函数后,结合遗传算法和直接搜索算法求解各因素的最优取值。结果:丹栀逍遥散中3个指标成分的最优提取工艺条件为60.8%乙醇提取3.1 h,液料比为15.72:1(mL/g)。采用BBD响应面法或结合遗传算法和直接搜索算法所得的综合评分比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:经优化的工艺可用于丹栀逍遥散中3个指标成分的提取。BBD响应面法结合遗传算法和直接搜索算法在优化中药提取工艺方面具有一定优越性。

关键词 丹栀逍遥散;Box-Behnken Design;响应面法;遗传算法;直接搜索算法;提取工艺

Optimization of Extraction Technology of Danzhi Xiaoyao Powder by Box-Behnken Design Response Surface Methodology Combined with Genetic Algorithm and Direct Search Methods

SU Benzhen, JIANG Bo, CUI Ning, YU Zongyuan (Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Danzhi xiaoyao powder. METHODS: The medicinal powder in the formula of Danzhi xiaoyao powder was extracted by using the heating reflux method. Box-Behnken Design (BBD) response surface methodology (RSM) was adopted for trial design with ethanol volume fraction, extraction time and ratio of water to material (V/m) as factors by using comprehensive scores of geniposide, paeoniflorin and paeonol as evaluation indexes. After mathematical model and objective function were obtained, genetic algorithm and direct search method were used to obtain the optimum ranges and value of extraction process parameters. RESULTS: The optimal extraction technology of three indexes in Danzhi xiaoyao powder included 60.8% ethanol, extraction time of 3.1 h, water-material ratio of 15.72:1 (mL/g). There was no statistical significance in the difference of comprehensive scores by BBD RSM alone or combined with genetic algorithm and direct search method ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The technology can be used for the extraction of index from Danzhi xiaoyao powder. BBD-RSM combined with genetic algorithm and direct search method has certain superiority in optimizing the extraction process of TCM.

KEYWORDS Danzhi xiaoyao powder; Box-Behnken Design; Response surface methodology; Genetic algorithm; Direct search method; Extraction technology

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由白芍、当归、茯苓、白术、柴胡、薄荷、炙甘草等多味药材组合而成。明代薛己在此基础上加入牡丹皮和栀子,制成加味逍遥散,又名丹栀逍遥散,具有养血健脾、疏肝清热之功效,是调和肝脾的代表方剂^[1]。

有研究表明,白芍中的芍药苷对模型大鼠脑缺血后的血脑屏障具有保护作用^[2],对肿瘤细胞的生长有一定

抑制作用^[3],对肝脏具有保护作用^[4];牡丹皮中的丹皮酚具有抗肿瘤^[5]、抗神经系统氧化应激损伤^[6]、抗动脉粥样硬化^[7]和改善血液循环^[8]等作用;栀子中的栀子苷具有保肝利胆^[9]、改善脑缺血^[10]、调节血糖^[11]和镇痛抗炎^[12]等作用。由此可见,栀子苷、芍药苷和丹皮酚这3个成分与丹栀逍遥散养血健脾、疏肝清热的功效相呼应,均为该方重要的活性成分。此外有研究表明,该方中栀子苷、芍

[16] 王海蓉,李小彬,杨楸楠,等. UPLC-MS/MS 研究披针灰

^Δ 基金项目:山东省重点研发计划项目(No.2017GSF19117);山东省中医药科技发展计划项目(No.2013-111)

* 副研究员。研究方向:中药分析与质量控制。E-mail:subenzheng@163.com

[#] 通信作者:研究员,博士。研究方向:中药化学。电话:0531-82949805。E-mail:yuzys@sohu.com

叶素B在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性及代谢酶表型[J]. 中国中药杂志,2016,41(1):124-128.

[17] 蹇阳,陈琳,原梅,等. 欧前胡素肝微粒体代谢动力学和细胞色素P₄₅₀代谢表型分析[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(8):848-854.

(收稿日期:2018-03-21 修回日期:2018-09-01)

(编辑:张元媛)