

诃子酸在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性和代谢酶表型研究

刘羽康^{1,2}, 张东旭^{1,2}, 李 偲^{1,2}, 张志丹³, 张爱杰², 董世奇^{2*}, 孙际宾³, 樊慧蓉^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院 放射医学研究所, 天津 300192

3. 中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要: **目的** 建立测定肝微粒体孵育体系中诃子酸浓度的方法, 并比较其在人、犬、猴、小鼠、大鼠肝微粒体中的I相、II相代谢稳定性及种属差异, 确定其在人肝微粒体中的代谢表型。**方法** 将诃子酸与不同种属肝微粒体共同孵育, 应用UPLC-MS/MS检测孵育液中诃子酸的含量, 考察其代谢稳定性及体外动力学参数。采用化学抑制剂法确定其在人肝微粒体中的代谢表型。将诃子酸与各CYP450同工酶CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1和CYP3A4的特异性抑制剂(α -萘黄酮、香豆素、磺胺苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、二乙基二硫代氨基甲酸钠、酮康唑)共同孵育, 确定其代谢酶表型。**结果** 诃子酸在I相、II相孵育体系中均可代谢, 在I相代谢中, 犬肝微粒体孵育与人最为相似, 半衰期($t_{1/2}$)分别为115.50 min和121.58 min; II相代谢中5个种属代谢稳定性均中等, 其中猴与人肝微粒体代谢趋势最为相近。诃子酸在人肝微粒体中的代谢是由多种CYP酶共同介导的, 其中CYP2C9、CYP2E1和CYP3A4是主要的同工酶。**结论** 建立的UPLC-MS/MS方法简便、快速、专属性强、灵敏度高, 可用于肝微粒体孵育体系中诃子酸浓度的测定及体外代谢的研究。诃子酸在人、犬、猴、小鼠、大鼠肝微粒体中代谢存在一定种属差异, 且其代谢过程与多种CYP酶相关。

关键词: 诃子酸; 肝微粒体; 细胞色素P450酶; 代谢稳定性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)05-0864-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.007

Investigation of metabolic stability and metabolic enzyme phenotypes of chebulinic acid in different species of liver microsomes

LIU Yukang^{1,2}, ZHANG Dongxu^{1,2}, LI Cai^{1,2}, ZHANG Zhidan³, ZHANG Aijie², DONG Shiqi², SUN Jibin³, Fan Huirong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medicine Sciences, Tianjin 300192, China

3. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Objective To establish a method for the concentration determination of chebulinic acid (CA) in liver microsomes, and to compare its phase I and phase II metabolic stability and species differences in human, dogs, monkeys, mice and rats liver microsomes, to predict the metabolic phenotypes of CA in human liver microsomes. **Methods** The remaining concentrations of CA incubated in various species of liver microsomes were determined to evaluate their metabolic stability and *in vitro* pharmacokinetic parameters. Selective chemical inhibition was used to predict the metabolic phenotypes of CA in human liver microsomes. CA was incubated with specific inhibitors of CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 isoforms (α -naphthoflavone, coumarin, sulfaphenazolum, ticlopidine, quinidine, sodium diethyldithiocarbamate, ketoconazole) to determine the phenotypes of metabolic enzymes. **Results** CA can be metabolized in phase I and phase II incubation systems. In phase I metabolism, the metabolic properties of dogs and human liver microsomes were the most resembles, and the half-lives are 115.50 min

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资助项目(3332021064); 国家重点研发计划资助项目(2018YFC1708203); 内蒙古自治区科技重大专项资助(2019ZD004)

第一作者: 刘羽康, 硕士, 研究方向为药物分析。E-mail: lyk_elle@163.com

*共同通信作者: 樊慧蓉, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药动学。E-mail: fanhr99@163.com

董世奇, 研究方向为药动学。E-mail: dongsq1314@126.com

and 121.58 min, respectively. Metabolic stability in phase II metabolism is moderate, and dogs, monkeys and human liver microsomes have the similar metabolic characteristic. CA is metabolized by a variety of enzymes in human liver microsomes, among which CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 are the primary isoenzymes. **Conclusion** A UPLC-MS/MS method was established to determine the concentration of CA, and it is simple, rapid and specific. It can be used for the concentration determination of CA in liver microsomes incubation system. The metabolic characteristics of the compound are different among human, dogs, monkeys, mice and rats liver microsomes. It is metabolized by a variety of enzymes in human liver microsomes.

Key words: chebulinic acid; liver microsomes; cytochrome P450; metabolic stability

诃子是使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *T. chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实,其味苦、酸、涩,性平,归肺、大肠经,具有涩肠止泻、敛肺止咳、降火利咽之功效,为《中国药典》所收载^[1]。早在《金匱要略》《本草纲目》等著作中,就对其性味、功能及主治有详细描述,可用于治疗心脏疾病、糖尿病、哮喘、血栓和痛风等^[2-3]。诃子在蒙、藏医药中都有广泛应用,被视为“药中之王”^[4]。诃子所含的化学成分十分广泛,包括鞣质类、酚酸类、三萜类等^[4]。诃子酸为诃子的鞣质类主要成分之一,具有多种药理活性,包括抗癌^[5-6]、抗病毒^[7]、抗氧化^[8]、抗炎^[9]、保肝^[10]等,具有良好开发前景。药物代谢是成药性的重要指标,新药开发的早期阶段开展药物代谢研究,可提高新药开发的成功率^[11-12]。为进一步阐释诃子酸的代谢特征,本实验拟研究诃子酸在人、犬、猴、小鼠、大鼠5个不同种属的代谢稳定性与其在人肝微粒中的代谢表型,旨在为诃子酸的进一步研究与开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ExionLC AD UPLC(美国 AB SCIEX 公司); AB Sciex QTRAP 6500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(上海右一仪器有限公司); Quintix65-1CN 十万分之一的电子分析天平(德国 Sartorius 公司); TARGIN VX-II 多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司); MS-100 恒温混匀仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

诃子酸对照品(批号 C20PA77510C,质量分数 $\geq 98\%$,北京谨明生物科技有限公司);芸香苷对照品(批号 SYGC-36H2,质量分数 $> 98\%$,成都瑞芬思生物科技有限公司); α -萘黄酮(批号 ZZS16121302,质量分数 $\geq 98\%$,甄淮生物科技有限公司);盐酸噻氯匹定(批号 100542-201002,质量分数为 99.7% ,中国食品药品检定研究院);奎尼丁(批号 wkq17041006,质量分数 $\geq 98\%$,维克奇生物科技有

限公司);香豆素(批号 40703,质量分数 98.5%)、磺胺苯吡唑(批号 50211,质量分数 $\geq 98\%$)、二乙基二硫代氨基甲酸钠(批号 170821,质量分数为 98.1%)、酮康唑(批号 40930,质量分数为 99.5%),均购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH;肝微粒体:小鼠肝微粒体(批号 YMN, Bioreclamationivt 公司),犬肝微粒体(批号 FDY, Bioreclamationivt 公司),大鼠肝微粒体(批号 LXJL, 上海瑞得肝病研究所),猴肝微粒体(批号 GHWA, RILD 公司),50 人混合人肝微粒体(批号 2010065, XENOTECH 公司),以蛋白计质量浓度均为 $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;烟酰胺腺嘌呤双核苷酸磷酸盐(NADP,批号 SLBZ0419)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(批号 SLBP6138V)、D-葡萄糖-6-磷酸钠盐(批号 SLBP5158V)、丙甲菌素(批号 055M4004V)、尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸三钠盐(UDPGA,批号 SLBL9210V)、氯化镁(批号 MKBS7715V),Sigma 公司;Tris-HCl 缓冲液(批号 20201016)、PBS 缓冲液干粉(批号 20201110),北京索莱宝科技有限公司;甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(分析纯,康科德公司);甲酸(色谱纯,天津大茂化学试剂有限公司);纯化水(屈臣氏公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 诃子酸溶液的配制 精密称取诃子酸对照品 2.0 mg 溶于 1.0 mL 甲醇溶液中,配得 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品储备液。

2.1.2 内标溶液的配制 精密称取芸香苷对照品 2.0 mg 溶于 1.0 mL 甲醇溶液中,配得 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标标准液,用甲醇稀释成 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液。

2.2 样品孵育与处理

2.2.1 I相孵育体系的建立 孵育体系总体积为 1.0 mL ,包括 $740 \mu\text{L}$ Tris-HCl 缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4), $50 \mu\text{L}$ 各种属肝微粒体(蛋白质量浓度 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $10 \mu\text{L}$ 诃子酸($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温混匀仪中预孵育 5 min ,加入 $200 \mu\text{L}$ 同样预孵 5 min 的 NADPH 再生系统(包括 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 、 $1.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NADP}^+$ 、 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、 $0.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$

6-磷酸葡萄糖脱氢酶)启动反应^[13],使形成总体积为1.0 mL的孵育系统,其中有机溶剂不超过1%。

2.2.2 II相孵育体系的建立 孵育体系总体积为1.0 mL,包括725 μL Tris-HCl缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4),50 μL 大鼠肝微粒体(蛋白质质量浓度 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),并加入5 μL 丙甲菌素($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)在冰上预孵30 min,加入10 μL 诃子酸($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),在37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温混匀仪中预孵育5 min,加入200 μL 同样预孵5 min的NADPH再生系统(包括 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $1.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADP^+ 、 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢钠、 $0.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶)以及10 μL UDPGA($500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)启动反应^[14-15],使形成总体积为1.0 mL的孵育系统,其中有机溶剂不超过1%。

2.2.3 诃子酸在P450酶中代谢表型的研究 孵育体系总体积为0.2 mL,包括148 μL Tris-HCl缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4),10 μL 人肝微粒体(蛋白质质量浓度 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),1 μL 诃子酸($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),1 μL 各特异性抑制剂: α -萘黄酮($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP1A2抑制剂),香豆素($25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2A6抑制剂),磺胺苯吡唑($20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2C9抑制剂),噻氯匹定($25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2C19抑制剂),奎尼丁($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2D6抑制剂),二乙基二硫代氨基甲酸钠($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP2E1抑制剂),酮康唑($1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP3A4抑制剂)^[16-17],37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温混匀仪中预孵育5 min,加入40 μL 同样预孵5 min的NADPH再生系统(包括 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $1.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADP^+ 、 $3.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢钠、 $0.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶)启动反应,使形成总体积为0.2 mL的孵育系统,其中有机溶剂不超过1%。另外设置完全发生反应的阳性对照组(不加抑制剂)与不发生反应的阴性对照组(不加抑制剂与NADPH再生系统)。

2.2.4 样品孵育与处理 将“2.2.1”项和“2.2.2”项孵育体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温混匀仪中继续孵育,并于0、15、30、60、90、120 min取出50 μL ,立即加入100 μL 的冰甲醇及50 μL 含内标($1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芸香苷)冰甲醇溶液,涡旋振荡2 min终止反应,上述样品每组均平行操作2份。将“2.2.3”项孵育体系于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温混匀仪中孵育30 min后取出50 μL ,立即加入100 μL 的冰甲醇及50 μL 含内标($1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芸香苷)冰甲醇溶液,涡旋振荡2 min终止反应,上述样品每组均平行操作3份。在整个实验过程中,应保持试管开放,以保证实验过程中氧的参与。将终止反应后的孵育液于12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(4 $^{\circ}\text{C}$)后取上清液,进样检测诃子酸的剩余浓度。

2.3 UPLC-MS/MS定量分析

2.3.1 色谱与质谱条件 色谱柱为Waters Atlantis UPLC™ BEH T3色谱柱($100 \text{ mm}\times 2.1 \text{ mm}$, $3 \text{ }\mu\text{m}$),流动相为0.1%甲酸水(A)-甲醇(B)溶液,梯度洗脱,0~2.5 min,80%~50% A;2.5~6.5 min,50%~10% A;6.5~6.6 min,10%~80%A;6.6~8.0 min,80%A。体积流量 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量1 μL ,柱温40 $^{\circ}\text{C}$ 。离子源为电喷雾离子源(ESI),电离检测方式全扫描(MS Scan),毛细管电压5.50 kV,离子源温度为550 $^{\circ}\text{C}$,气帘气压力:151.69 kPa,去簇电压(DP)为72 V。采用正离子多反应监测(MRM)模式监测诃子酸和内标芸香苷,监测离子对分别为 m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+ 979.4\rightarrow 809.0$ 和 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ 611.4\rightarrow 303.1$,碰撞能量(CE)分别为43 eV和27 eV^[18]。

2.3.2 专属性考察 按“2.2.1”项下条件,将所需的肝微粒体高温灭活,制得不加诃子酸与内标的空白孵育样品、诃子酸对照样品、肝微粒体孵育样品,按“2.3.1”项下色谱与质谱方法进行测定,考察该方法的专属性。结果,内标和诃子酸的色谱峰峰形良好,其保留时间分别约为3.91、4.31 min,内源性物质不干扰待测物的测定,表明该方法专属性好,色谱图见图1。

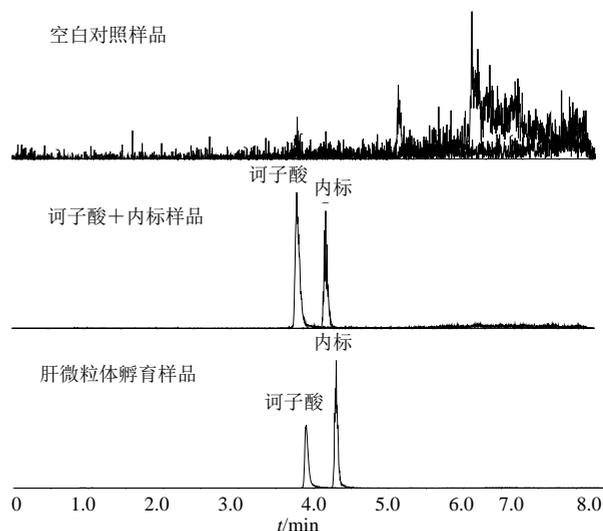


图1 UPLC-MS/MS测定混合肝微粒中诃子酸色谱图
Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of chebulinic acid

2.3.3 线性范围与定量下限 精密量取诃子酸工作液至灭活的人、犬、猴、小鼠、大鼠混合肝微粒体孵育体系中,配制成诃子酸质量浓度为50、80、200、500、1 000、3 000、4 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准曲线对照溶液,按“2.2.3”项下条件处理样品,取上清液按“2.3.1”项下条件进样分析,考察该方法的线性关

系与定量下限。以诃子酸质量浓度($x, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标、采用加权最小二乘法(权重系数为 $1/x^2$)进行线性回归,得回归方程为 $y=0.00039x+0.00563(r=0.9933)$,结果表明诃子酸检测质量浓度的线性范围为 $50\sim 4000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限为 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.4 准确度与精密度 精密量取诃子酸工作液至灭活的肝微粒体孵育体系中,制得质量浓度为 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的定量下限孵育样品溶液和质量浓度分别为 $100, 500, 3200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高3组质控浓度样品。按“2.2.3”项下条件处理样品,取上清液按“2.3.1”项下条件进样分析,考察该方法的准确度与批内、批间精密度,每组样品平行操作6份。结果表明,定量下限质量浓度孵育样品与各质控样品的批内、批间RSD均小于15%,表明方法准确度和精密度良好,结果见表1。

2.3.5 基质效应和提取回收率 考察低(LQC)、高(HQC)浓度水平的诃子酸和内标芸香苷的基质效应和提取回收率。样品A:按“2.2.1”项下,制得质量浓度分别为 $100, 3200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、高两组质控浓度样品,按“2.2.3”项下条件处理样品。样品B:以纯水配制相应质量浓度且不含辅酶溶液的样品溶液,按“2.3.1”项下条件处理样品。样品C:向 $50 \mu\text{L}$

高温灭活肝微粒体体系中加入 $150 \mu\text{L}$ 甲醇,涡旋1 min, $4^\circ\text{C}, 12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min;取上清液 $100 \mu\text{L}$ 于玻璃试管中,氮气吹干后,用 $100 \mu\text{L}$ 样品B复溶,按“2.3.1”项下条件处理样品。其中样品C与样品B待测物和内标的峰面积比(C/B)即为相应待测物和内标的基质效应,样品A与样品C待测物和内标的峰面积比(A/C)即为相应待测物和内标的提取回收率。结果见表2。

2.3.6 稳定性试验 按“2.2.1”项下方法配制诃子酸低、高质量浓度质控样品,再按“2.3.1”项下色谱与质谱条件进样测定,每个质量浓度平行操作6次,考察各质控样品于室温及自动进样室(4°C)内放置12 h的稳定性。结果见表3。

2.4 诃子酸在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性

分别考察了诃子酸在人、猴、犬、大鼠及小鼠5个种属中肝微粒体的I相、II相代谢稳定性,以各时间点的底物剩余量与相对应的时间作图可知,诃子酸在5个种属之间均能发生代谢,由图2-A可知,在I相代谢中,犬肝微粒体孵育与人最为相似,120 min分别代谢到51.8%和48.6%;在小鼠肝微粒体中代谢最快,30 min内几乎代谢完全。II相代谢稳定性如图2-B所示,II相代谢趋势比I相代谢快,其中犬、

表1 精密度与准确度试验结果

Table 1 Results of accuracy and precision tests

理论质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	实测质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	精密度RSD/%		准确度/%
		批内	批间	
50	52.56±3.62	5.82	12.21	105.11
100	105.08±5.89	3.16	13.84	105.08
500	498.44±27.41	3.10	13.60	99.69
3200	3415.00±185.83	5.11	7.47	106.72

表2 提取回收率与基质效应试验结果($n=6$)

Table 2 Results of extraction recovery and matrix effect tests ($n=6$)

代谢物	理论质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	提取回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
诃子酸	100	102.36±5.87	5.74	91.83±4.64	5.05
	3200	103.88±5.31	5.11	81.60±1.74	2.13
内标	1000	100.35±7.89	7.86	100.84±8.75	8.68

表3 稳定性试验结果($n=6$)

Table 3 Results of stability tests ($n=6$)

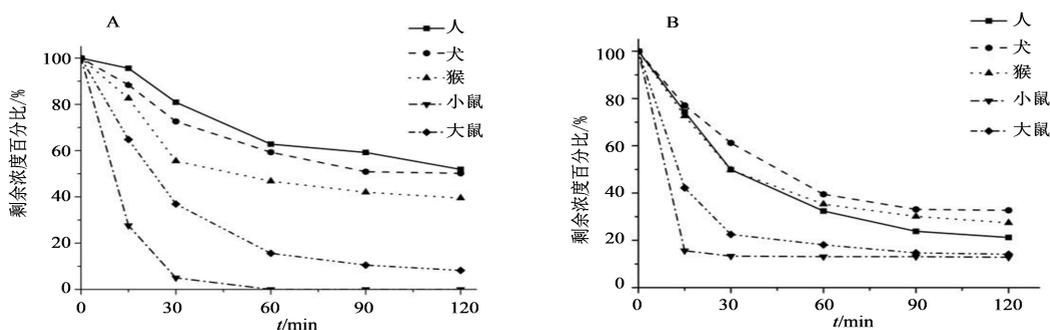
理论质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	室温放置12 h			4°C 放置12 h		
	实测质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	RSD/%	实测质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	RSD/%
100	92.40±4.46	92.40	4.83	87.97±2.30	87.97	2.62
3200	3426.67±107.64	107.08	3.14	3243.33±75.01	101.35	2.31

猴和人肝微粒体代谢较为相似;在大鼠、小鼠肝微粒体中代谢比人、犬、猴快,孵育30 min后代谢逐渐趋于稳定。

2.5 诃子酸在肝微粒中的酶动力学参数计算

将各时间点的药物剩余浓度百分比的自然对数(y)与孵育时间(x)进行线性回归分析,求得斜率(k),半衰期($t_{1/2}$)= $-0.693/k$,固有清除率(CL_{int})= $[(0.693/t_{1/2}) \times \text{孵育体系体积(mL)}]/\text{肝微粒体质量(mg)}$ ^[19]。当 $t_{1/2} < 30$ min,表明受试物代谢不稳定; $t_{1/2}$ 在30~90 min时,表明受试物代谢稳定性中等;当 $t_{1/2} > 90$ min,表明受试物代谢稳定性良好^[20]。由表4和5结果可知,在I相肝微粒体孵育体系中,诃子酸在人和犬肝微粒体中代谢稳定性良好;在II相肝微粒体孵育体系中,诃子酸在5个种属中代谢稳定性中等。

猴和人肝微粒体代谢较为相似;在大鼠、小鼠肝微粒体中代谢比人、犬、猴快,孵育30 min后代谢逐渐趋于稳定。



A-I相代谢;B-II相代谢
A-phase I metabolism; B-phase II metabolism

图2 诃子酸在人、犬、猴、小鼠、大鼠肝微粒体中代谢曲线

Fig. 2 Metabolic curve of chebulinic acid in human, dogs, monkeys, mice and rats liver microsomes

表4 诃子酸在人、犬、猴、小鼠和大鼠5个种属肝微粒体中I相代谢酶动力学参数

Table 4 Phase I metabolic half-life *in vitro* and intrinsic clearance of chebulinic acid in human, dogs, monkeys, mice and rats liver microsomes

种属	回归方程	R^2	$t_{1/2}/\text{min}$	$CL_{int}/(\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$
人	$y = -0.0057x - 0.0177$	0.9522	121.58	0.0057
犬	$y = -0.006x - 0.0745$	0.9180	115.50	0.0060
猴	$y = -0.0078x - 0.1859$	0.9049	88.85	0.0078
小鼠	$y = -1.4968x + 1.5671$	0.9934	0.46	1.4968
大鼠	$y = -0.0214x - 0.2176$	0.9425	32.38	0.0214

表5 诃子酸在人、犬、猴、小鼠和大鼠5个种属肝微粒体中II相代谢酶动力学参数

Table 5 Phase II metabolic half-life *in vitro* and intrinsic clearance of chebulinic acid in human, dogs, monkeys, mice and rats liver microsomes

种属	回归方程	R^2	$t_{1/2}/\text{min}$	$CL_{int}/(\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$
人	$y = -0.0131x - 0.1616$	0.9369	52.90	0.0131
犬	$y = -0.0096x - 0.1445$	0.8998	72.19	0.0096
猴	$y = -0.0105x - 0.2064$	0.8879	66.00	0.0105
小鼠	$y = -0.0108x - 1.1015$	0.3685	64.17	0.0108
大鼠	$y = -0.0141x - 0.5812$	0.7369	49.15	0.0141

2.6 诃子酸在人肝微粒体中的代谢表型

抑制率 = $1 - (\text{阴性对照样品质量浓度} - \text{试验组样品质量浓度}) / (\text{阴性对照样品质量浓度} - \text{阳性对照样品质量浓度})$ ^[21],各抑制剂对人肝微粒中诃子酸代谢的影响结果见表6。由结果可知,诃子酸

的代谢是由多种CYP酶共同介导的,其中CYP2C9、CYP2E1和CYP3A4是主要的同工酶,代谢抑制率分别为82.21%、53.2%和52.57%。

3 讨论

在新药开发阶段中研究代谢的目的是选择吸

表6 CYP抑制剂对诃子酸在人肝微粒体中代谢的影响
Table 6 Effects of CYP inhibitors on metabolism of chebulinic acid in human liver microsomes

CYP亚型	抑制剂	抑制率/%
CYP1A2	α -萘黄酮	36.76
CYP2A6	香豆素	22.13
CYP2C9	磺胺苯吡唑	82.21
CYP2C19	噻氯匹定	18.31
CYP2D6	奎尼丁	15.42
CYP2E1	二乙基二硫代氨基甲酸钠	53.23
CYP3A4	酮康唑	52.57

收、分布、代谢、排泄(ADME)性质优越的化合物,淘汰具有潜在风险的化合物。在药物发现早期阶段,对候选化合物的要求之一就是代谢稳定性,因为当其药理学及药理学性质未知时,代谢及代谢清除率虽然不是唯一决定因素,也是预测整体清除率的决定性因素^[22]。许多在体外实验中表现出高活性的化合物也可能因其不良的代谢特征导致在体内无效,因此研究药物代谢在新药开发中具有重要意义。合理的药物设计应考虑药物代谢途径及相关的代谢酶,可以通过结构改造增加代谢稳定性,提高生物利用度以及药物的安全性^[12]。诃子酸作为诃子主要鞣质类成分之一,具有多种药理活性^[5-10],有良好开发前景,但对其体内代谢的报道较少。因此本研究通过体外肝微粒体孵育实验来考察诃子酸代谢稳定性、鉴别参与其代谢的CYP酶表型。

肝微粒体因其制备简单、易于操作、结果清晰、酶蛋白含量高等优点,是体外代谢最常用的酶源,但其孵育体系组成复杂,为获得准确可靠的数据,有必要建立稳定、准确的生物样品分析方法。本研究成功建立了肝微粒体中诃子酸的UPLC-MS/MS定量分析方法,该方法的专属性、线性关系、定量下限、精密度、准确度、稳定性、提取回收率和基质效应均符合生物样品定量分析的相关要求^[1]。

本研究通过肝微粒体体外孵育模型考察代谢稳定性,比较5个种属(人、猴、犬、大鼠、小鼠)间的种属差异。对于固定时间点的实验,通常设置平行3样本以计算标准差;如果实验设置5~6个时间点,每个时间点平行双样本即可;最后1~2个时间点药物代谢消除率最好超过50%^[23]。因此本实验在代谢稳定性设立平行双样本,设置7个时间点。由代谢稳定性结果可知,诃子酸在人和犬肝微粒体中I相代谢稳定性良好且 $t_{1/2}$ 相近,分别为121.58 min和115.50 min,而在大鼠和小鼠中代谢较快;II相代谢

中5个种属代谢稳定性均中等,其中犬、猴与人肝微粒体代谢趋势相近。根据肝微粒体代谢趋势、体外代谢 $t_{1/2}$ 以及 CL_{int} 对比分析,提示诃子酸在肝微粒体代谢中存在一定种属差异,在选取与人代谢性质相近的动物进行非临床药理学评价时,应充分考虑这一差异的存在。

以代谢消除为主的药物,如果仅由单一酶消除或者比例较大时,当与其他药物联合用药,尤其是该代谢酶的抑制剂或诱导剂时,就会产生药物-药物相互作用,影响治疗效果,严重时甚至引起不良反应^[24]。本实验采用选择性化学抑制剂法考察诃子酸在人肝微粒体中代谢酶表型。实验结果表明,采用的7种CYP酶的强抑制剂均对诃子酸有一定的抑制作用,其中CYP2C9为最主要的代谢酶,抑制率高达82.21%;CYP2E1和CYP3A4贡献率也较高,代谢抑制率分别为53.23%和52.57%。上述结果提示诃子酸在体内可能涉及多种CYP酶共同代谢,将减少药物合用时因某一种酶被抑制或诱导而发生严重的不良反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 史瑞仙,董振宇,张东. 蒙药诃子药理作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2020, 26(5): 33-35. Shi R X, Dong Z Y, Zhang D. Study on the pharmacological action of *Terminalia chebula* [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2020, 26(5): 33-35.
- [3] 宋志博,陈涛,王岱杰,等. 藏药诃子质量标志物诃子酸的分离分析及标准化研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2021, 27(3): 165-173. Song Z B, Chen T, Wang D J, et al. Separation and standardization of chebulinic acid as quality marker of Tibetan medicine *Terminalia chebula* [J]. Anal Test Technol Instrum, 2021, 27(3): 165-173.
- [4] 赵鹿,廖翠萍,杨秀娟,等. 诃子的研究进展及质量标志物的预测[J]. 中草药, 2020, 51(10): 2732-2744. Zhao L, Liao C P, Yang X J, et al. Research progress in *Terminalia chebula* and its predictive analysis on Q-marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2732-2744.
- [5] Sharma A, Mishra T, Thacker G, et al. Chebulinic acid inhibits MDA-MB-231 breast cancer metastasis and promotes cell death through down regulation of SOD1 and induction of autophagy [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(12): 2553-2569.
- [6] Wang M, Li Y R, Hu X D. Chebulinic acid derived from triphala is a promising antitumour agent in human colorectal carcinoma cell lines [J]. BMC Complement

- Altern Med, 2018, 18(1): 342.
- [7] Li P, Du R K, Wang Y Y, et al. Identification of chebulinic acid and chebulagic acid as novel influenza viral neuraminidase inhibitors [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 182.
- [8] Biradar S P, Tamboli A S, Khandare R V, et al. Chebulinic acid and Boeravinone B act as anti-aging and anti-apoptosis *Phyto*-molecules during oxidative stress [J]. Mitochondrion, 2019, 46: 236-246.
- [9] Shanmuganathan S, Angayarkanni N. Chebulagic acid Chebulinic acid and Gallic acid, the active principles of Triphala, inhibit TNF α induced pro-angiogenic and pro-inflammatory activities in retinal capillary endothelial cells by inhibiting p38, ERK and NF κ B phosphorylation [J]. Vascul Pharmacol, 2018, 108: 23-35.
- [10] Feng X H, Xu H Y, Wang J Y, et al. *In vivo* hepatoprotective activity and the underlying mechanism of chebulinic acid from *Terminalia chebula* fruit [J]. Phytomedicine, 2021, 83: 153479.
- [11] 刘春, 蒋煜, 刘洋, 等. 中药成药性本质分析及其与重大新药创制的关系 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(3): 434-437.
- Liu C, Jiang Y, Liu Y, et al. Analysis on druggability of Chinese materia medica and its relationship with major new drug innovation and development [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2015, 17(3): 434-437.
- [12] 刘瑶, 洪岚, 余露山, 等. 创新药物转化研究中 ADME 的评价 [J]. 药学报, 2011, 46(1): 19-29.
- Liu Y, Hong L, Yu L S, et al. The role of ADME evaluation in translation research of innovative drug [J]. Acta Pharm Sin, 2011, 46(1): 19-29.
- [13] 陈健龙, 张玉玲, 董宇, 等. 小檗碱的酶反应动力学及其代谢酶表型和代谢产物研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3334-3340.
- Chen J L, Zhang Y L, Dong Y, et al. Enzyme reaction kinetics, metabolic enzyme phenotype, and metabolites of berberine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(23): 3334-3340.
- [14] 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.
- Fan H R, Dong S Q, Li Q S, et al. *In vitro* metabolism of liquiritigenin in liver microsomes of different species [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(2): 320-326.
- [15] 曾华平, 陈红, 陈丹, 等. 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分大鼠肝微粒体代谢特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 819-826.
- Zeng H P, Chen H, Chen D, et al. Metabolic characteristics of active parts of lipid-lowering flavonoid extract of Daidai in liver and intestinal microsomes of rats [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(4): 819-826.
- [16] 苟立平, 邓星, 罗莉娅, 等. UFLC-MS/MS 研究胡椒碱在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性和代谢表型 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(2): 216-221, 353.
- Gou L P, Deng X, Luo L Y, et al. Investigation of metabolic stability and metabolic enzyme phenotype of piperine in different species of liver microsomes by UFLC-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(2): 216-221, 353.
- [17] Wang P, Zhao Y L, Zhu Y D, et al. Metabolism of dictamnine in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 119: 166-174.
- [18] Lu Y, Yan H Y, Teng S Y, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of hydrolyzable tannins chebulinic acid and chebulagic acid in rats [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(3): e4425.
- [19] Mohutsky M A, Chien J Y, Ring B J, 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.
- [20] Qi Y, Li S Z, Pi Z F, et al. Chemical profiling of wu-Tou decoction by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Talanta, 2014, 118: 21-29.
- [21] 邓星, 罗莉娅, 苟立平, 等. 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 [J]. 中国药房, 2019, 30(2): 170-175.
- Deng X, Luo L Y, Gou L P, et al. Study on the metabolic characteristics of piperitylmagnolol in different species of liver microsomes by UPLC-MS/MS [J]. China Pharm, 2019, 30(2): 170-175.
- [22] Zhang D L, Zhu M S, Humphrey W G. 药物设计和开发中的药物代谢基本原理和实践 [M]. 钟大放, 李桦主译. 北京: 人民军医出版社, 2011.
- Zhang D L, Zhu M S, Humphrey W G. *Drug Metabolism In Drug Design And Development* [M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2011.
- [23] Zhao S X, Forman D, Wallace N, et al. Simple strategies for reducing sample loads in *in vitro* metabolic stability high-throughput screening experiments: A comparison between traditional, two-time-point and pooled sample analyses [J]. J Pharm Sci, 2005, 94(1): 38-45.
- [24] 林奕凯, 张耕. 药物代谢酶表型鉴定的研究现状 [J]. 中南药学, 2019, 17(4): 579-585.
- Lin Y K, Zhang G. Phenotype of drug-metabolizing enzymes [J]. Central South Pharm, 2019, 17(4): 579-585.

[责任编辑 刘东博]