

基于分子动力学的十二烷基硫酸钠对黄酮醇糖苷增溶作用及对体内药动学的影响

黄欢¹, 宁洪鑫², 姚薛超¹, 赵雅芝¹, 侯文彬^{2*}, 王阳^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

摘要: 目的 通过分子动力学模拟黄酮醇糖苷(DF3G)在十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)水溶液中的增溶行为, 通过HPLC-MS/MS法比较DF3G及DF3G的5%SDS水溶液(SDS-DF3G)的药动学差异。方法 通过GROMACS软件与GROM OS 54A7联合原子力场进行分子动力学模拟。健康SD大鼠随机分为DF3G(60 mg/kg)和SDS-DF3G(DF3G 60 mg/kg)2组, ig给药1次, 于给药后0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、24.00、30.00 h从SD大鼠眼眶后静脉丛取血, 样品处理后, 采用HPLC-MS/MS法测定血浆中DF3G的血药浓度。通过DAS 2.0软件拟合计算药动学参数。结果 分子动力学模拟结果显示, DF3G分子中苯环部分可以自发地增溶到胶束的疏水栅栏层, 而其糖环中的羟基分别与2个SDS的硫酸基中的氧原子形成2个氢键, 从而增加DF3G在水中的溶解性。与DF3G组比较, SDS-DF3G组AUC_(0-t)、AUC_(0-∞)增大, 且具有显著性差异($P < 0.05$); CL_z/F显著降低($P < 0.05$); C_{max}升高, t_{max}、MRT延长, t_{1/2}缩短。结论 从理论上证实了添加表面活性剂可以对药物分子在胶束溶液中增溶, 以为该类体系的实验研究提供理论依据。从实验角度证实了加入SDS可以提高DF3G体内生物利用度。

关键词: 黄酮醇糖苷; 十二烷基硫酸钠; 药动学; 分子动力学模拟; 增溶

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)01-0025-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.01.004

Influence of SDS on DF3G solubilizing behavior by molecular dynamics simulation and pharmacokinetics *in vivo*

HUANG Huan¹, NING Hongxin², YAO Xuechao¹, ZHAO Yazhi¹, HOU Wenbin², WANG Yang¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To explore the solubilization of DF3G in SDS micelle by molecular dynamics software. To determine the concentration in rat plasma by HPLC-MS/MS of DF3G, and to study the pharmacokinetics of DF3G and SDS-DF3G in rats. **Methods** Molecular dynamics simulation by GROMACS and Grom OS 54A7 combined atomic force field for DF3G and SDS. Rats were divided into DF3G (60 mg/kg), SDS-DF3G (60 mg/kg) groups. Blood samples were collected from inner canthus at 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 24.00, 30.00 h. Samples were treated, and the concentrations of DF3G were determined by HPLC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 Software. **Results** Molecular dynamics simulation showed that the benzene ring structure penetrates into the carbon chains of SDS, and the hydrophilic -OH groups of glucopyranoside formed two hydrogen-bond (H-bond) with oxygen atoms of the two SDS molecules respectively to form a better hydrophilic effect. Compared to DF3G group, AUC_(0-t) and AUC_(0-∞) of SDS-DF3G group increased, and had significant difference ($P < 0.05$); CL_z/F was significantly decreased ($P < 0.05$); C_{max} was increased, t_{max} and MRT were prolonged, t_{1/2} was shortened.

收稿日期: 2020-02-20

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(3332018117); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-022; 2017-I2M-3-019); 天津市科技计划项目(18ZXXYSY00110); 天津市自然科学基金资助项目(18JCQNJC09500)

第一作者: 黄欢(1995—), 女, 重庆市人, 在读硕士研究生。E-mail: 1479080914@qq.com

*通信作者: 侯文彬(1969—), 研究员, 硕士生导师。E-mail: houwenbin@irm-cams.ac.cn

王阳(1968—), 教授, 硕士生导师。E-mail: wangy9902@163.com

Conclusion This work provided one convincing evidence that adding certain surfactants in water could effectively release the solubilization of some drugs, and thus give one helpful guidance for those corresponding experimental studies accordingly. The addition of SDS has the effect of increasing the absorption of DF3G *in vivo*.

Key words: DF3G; sodium dodecyl sulfate; pharmacokinetics; molecular dynamics simulation; solubilization

黄酮醇糖苷(DF3G)化学名称为3',4'-二甲氧基黄酮醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷,化学结构式见图1,是在黄酮醇的基础上合成的。药效学研究表明,DF3G不仅可以显著降低血脂,还可以显著降低小鼠主动脉粥样硬化病变和四氯化碳引起的肝损伤。药动学研究表明,DF3G生物利用度仅为6.63%^[1]。该产品为创新性新药,其理化特性等均未见研究报道,研究团队针对其体外平衡溶解度和油水分配系数进行了实验,结果表明,DF3G在水中的平衡溶解度为0.116 8 mg/mL,lgP为0.56;采用多种常见助溶剂后发现其在十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)中的平衡溶解度为1.559 1 mg/mL,lgP为0.91。

从微观角度来看,分子动力学计算可用于阐明表面活性剂对药物增溶的影响^[2-4]。许多研究已将分子动力学计算用于研究增溶作用,已经有数篇关于使用SDS进行分子模拟的报道,研究了固-液^[5]、液-液^[6]和液-气^[7]的聚集行为。经查阅文献,还未有文献报道使用分子动力学研究SDS对于DF3G的增溶机理。本研究采用分子动力学模拟方法阐释了SDS对DF3G的增溶作用机制,并且考察了DF3G及SDS-DF3G在大鼠体内的药动学特征。

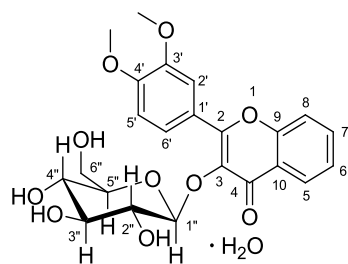


图1 DF3G化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of DF3G

1 材料

1.1 主要仪器

KQ2200E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP211D天平(德国Sartorius公司);纯水机(美国Millipore公司);Agilent 6410B三重四级杆液质联用系统(安捷伦科技有限公司);Centrifuge 5804R高速低温离心机(德国Eppendorf);Microfuge 22R Centrifuge离心机(Beckman

Coulter);HH-ZK-4智能数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);Quintix65-1CN电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与主要试剂

DF3G原料药(批号201801,质量分数99.16%,自制);泮托拉唑钠对照品(批号525624,湖北九洲康达生物科技有限公司);SDS(批号101420160607,湖南尔康制药股份有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯;水为实验室自制蒸馏水和超纯水。

1.3 实验动物

成年、健康的SD大鼠10只,SPF级,体质量220~250 g,雄性,由斯贝福(北京)生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0002。

2 方法

2.1 模拟体系和方法

该体系用于研究一个DF3G分子在SDS胶束中自发增溶的行为。在构建过程中,首先将一个由60个SDS表面活性剂单体组成的链状胶束置于6 nm×6 nm×6 nm的立方盒子中,并在盒内其他地方插入6 000个水分子。然后,再在盒子中心添加1个DF3G分子,见图2-A。为了方便观察,图2中内部所填充的水分子未显示,其中DF3G显示为绿色碳棍状模型,SDS显示为天蓝色碳线状模型。

所有模拟都采用GROMACS软件包与GROMOS 54A7联合原子力场^[8]。在模拟过程中,采用可很好描述水分子介电性质和热力学性质的SPC模型,使用最速下降法进行能量最小化,NPT的温度采用V-rescale耦合方法,设定温度为26.85 °C;压力采用Parrinello-Rahman耦合方法,设定压力为100 kPa。采用LINCS算法约束各分子的键长^[9],采用PME方法描述各原子间的静电相互作用力^[10],Lennard-Jones势的范德华力截断半径设定为1.40 nm,模拟步长设定为2 fs,每隔20 ps收集一次动力学轨迹信息。

2.2 HPLC-MS/MS测定条件

2.2.1 色谱条件 参考文献报道^[11],参照其液质条件进行血浆样品测定。色谱柱为Agilent ZORBAX Bonus-RP柱(150 mm×2.1 mm, 5 μ m),柱温为

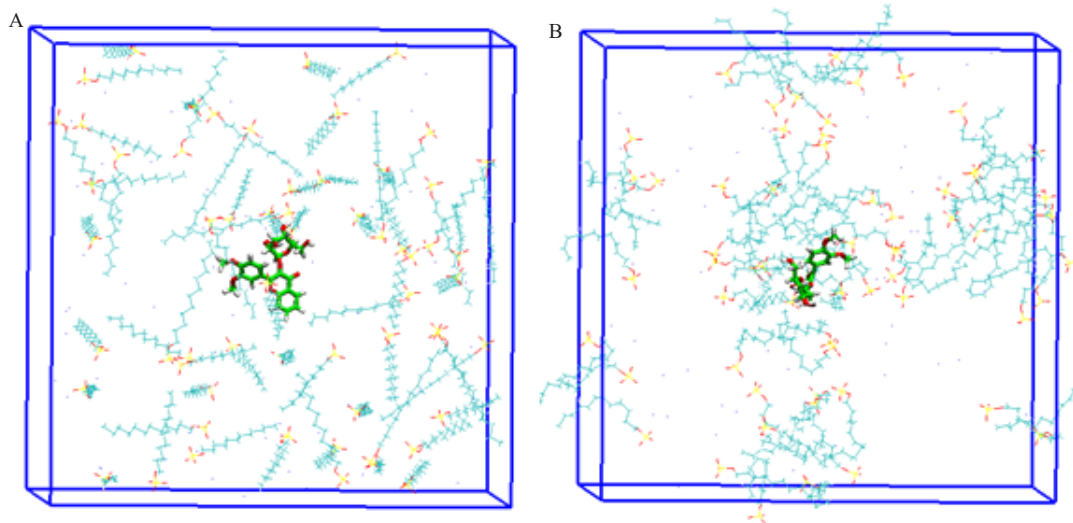


图2 SDS-DF3G初始结构(A)及分子动力学最终结构(B)

Fig. 2 Associated initial (A) and equilibrium configuration (B) of DF3G and SDS

25 °C;流动相为含有0.1%甲酸的去离子水(A)、含有0.1%甲酸的甲醇(B);采用梯度洗脱方式:0 min, 40% B, 体积流量0.4 mL/min;0~5 min, 40%~95% B, 体积流量0.4 mL/min;5~7 min, 95% B, 体积流量0.4 mL/min;7.00~7.01 min, 95%~40%B, 体积流量0.4~1.0 mL/min;7.01~10.00 min, 40%B, 体积流量1.0~0.4 mL/min, 进样量5 μ L, 分析时间10.0 min。

2.2.2 质谱条件 采用ESI离子源,正离子检测,选择MRM工作方式进行一/二级质谱分析。质谱检测工作参数如下:DF3G和内标泮托拉唑钠 Q_1 (Mass)分别是461、406; Q_3 (Mass)分别是299、300;碰撞能量分别为10、31;峰宽为0.07 min;雾化气为氮气,193.05 kPa;干燥气为氮气,300 °C,103.42 kPa;毛细管电压4 000 V;Rough Vac: 2.25 Torr;High Vac 7.34×10^6 Torr。

2.3 溶液配制及给药、取血

取DF3G原料药适量于25 mL量瓶中,加水适量,超声10 min,定容至刻度,摇匀备用,制成质量浓度为6 mg/mL的DF3G溶液。取含0.5% SDS的DF3G原料药适量于25 mL量瓶中,加水适量,超声10 min,定容至刻度,摇匀备用,制成含DF3G为6 mg/mL的SDS-DF3G溶液。

取雄性SD大鼠8只,体质量220~270 g,随机分为2组:DF3G(60 mg/kg)组和SDS-DF3G(60 mg/kg)组,每组4只大鼠,给药前禁食12 h,自由饮水,单次ig给药,给药体积10 mL/kg。分别于给药后0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、24.00、30.00 h从大鼠眼眶后静脉丛快速、准确取血

0.5 mL,置于1.5 mL Eppendorf塑料离心管中(加肝素抗凝),4 500 r/min离心10 min分离血浆,吸取上清液置于0.5 mL Eppendorf管中,-80 °C冰箱保存待测。

2.4 血浆样品处理

SD大鼠血浆样品37 °C水浴下解冻后,4 500 r/min离心5 min。取其中50 μ L置于0.5 mL Eppendorf塑料离心管中,加入含有内标泮托拉唑钠标准溶液(约1 μ g/mL)的乙腈沉淀剂100 μ L,涡旋振荡3 min,于10 000 r/min离心15 min,分取上清液100 μ L置于另一塑料离心管中,12 000 r/min离心15 min,取上清液自动进样5 μ L进行HPLC-MS/MS分析,峰面积内标法定量检测。

2.5 数据处理方法

采用药动学程序软件DAS 2.0,以非房室模型分析方法计算DF3G的药动学参数,统计学差异用SPSS 23.0采用 t 检验进行分析。

3 结果

3.1 分子动力学模拟

3.1.1 体系 为了研究DF3G在SDS胶束溶液中的增溶行为,通过分子动力学程序发现,如图2-B所示,体系会在20 ns内达到平衡,完成DF3G分子从水溶液体系中逐渐向胶束接近、直到完全嵌入胶束的整个过程。

3.1.2 DF3G与SDS的相互作用能 SDS-DF3G胶束系统的相互作用能如图3所示,在整个模拟时间,DF3G与SDS之间的范德华作用明显低于库伦作用,即范德华作用起主导作用。从范德华能量的演变可以看出,SDS-DF3G络合物的相互作用几乎没

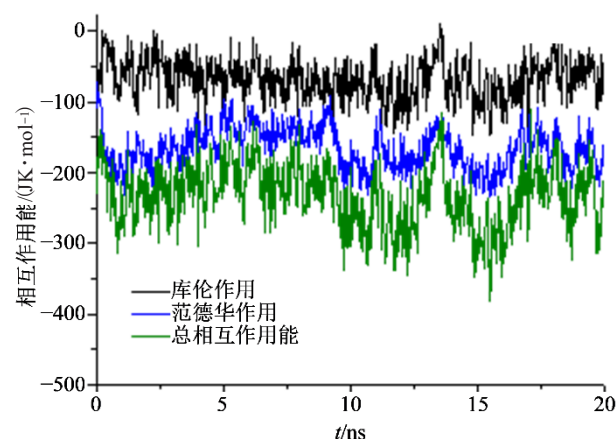


图3 DF3G与SDS的相互作用能

Fig. 3 Interaction energies of DF3G and SDS

有变化。总能量在15.28 ns处有最低值,说明该时间点构象最为稳定,因此取该处构象观察DF3G与SDS的作用模式。

3.1.3 作用模式 图4中DF3G显示为黄色碳模型,SDS显示为绿色碳模型,DF3G糖环上的羟基分别与2个SDS的硫酸基中的氧原子形成2个氢键。其苯环结构深入多个SDS的碳链之间,形成较好的疏水作用,而其亲水端羟基部分则处在整个胶束的浅层表面上,与胶束外的分子有直接接触的可能,促进了DF3G的溶解性。

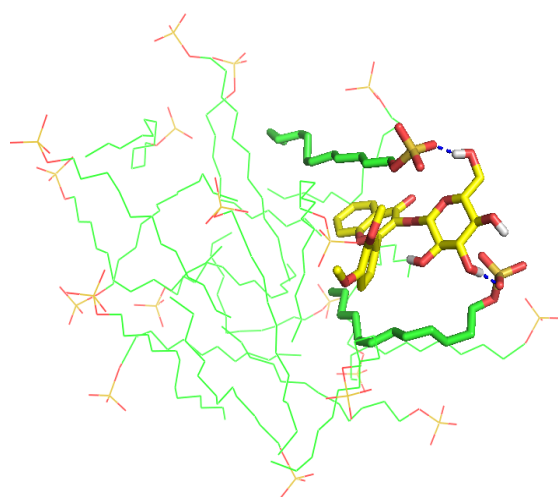


图4 DF3G与SDS的作用模式

Fig. 4 A schematic drawing for bridging geometry between DF3G and SDS

3.2 药动学研究

DF3G的药-时曲线见图5、6,采用药动力学程序软件DAS 2.0,以非房室模型分析方法计算DF3G的药动力学参数,结果见表1。与DF3G组比较,SDS-DF3G组 $AUC_{(0-t)}$ 、 $AUC_{(0-\infty)}$ 增大且具有显著性差

异($P<0.05$); CL_z/F 显著减慢($P<0.05$); C_{max} 升高, t_{max} 、MRT延长, $t_{1/2}$ 缩短。结果表明,加入SDS提高了DF3G体内生物利用度,SDS-DF3G为DF3G组的1.4倍。

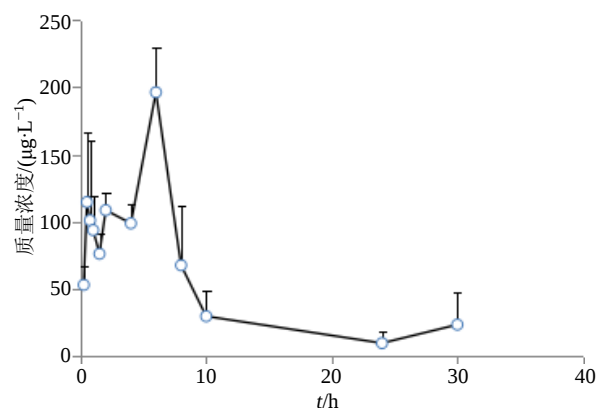
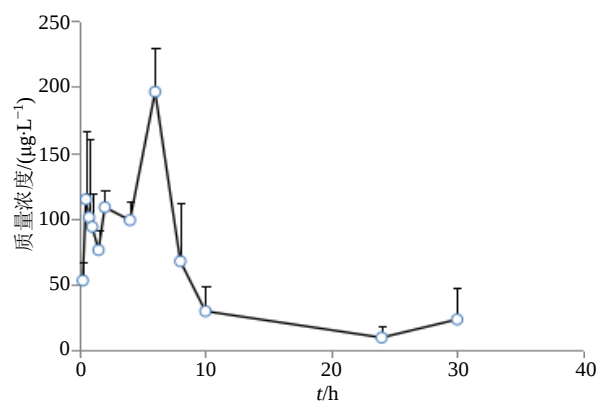
图5 DF3G在大鼠体内的平均药-时曲线($\bar{x}\pm s, n=4$)Fig. 5 Mean plasma concentration-time curves of DF3G in rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)图6 SDS-DF3G在大鼠体内的平均药-时曲线($\bar{x}\pm s, n=4$)Fig. 6 Mean plasma concentration-time curves of SDS-DF3G in rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

表1 主要药动学参数

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of DF3G in rats

参数	单位	DF3G	SDS-DF3G
$AUC_{(0-t)}$	$ng\cdot L^{-1}\cdot h$	$1\ 262.64\pm 329.92$	$1\ 760.29\pm 22.99^*$
$AUC_{(0-\infty)}$	$ng\cdot L^{-1}\cdot h$	$1\ 348.64\pm 293.18$	$1\ 894.71\pm 160.95^*$
$t_{1/2\alpha}$	h	11.10 ± 13.24	6.68 ± 3.39
t_{max}	h	6	8
C_{max}	$ng\cdot L^{-1}$	188.59 ± 32.75	192.51 ± 34.54
CL_z/F	$L\cdot h^{-1}\cdot kg^{-1}$	45.85 ± 8.367	$31.83\pm 2.59^*$
MRT _(0-t)	h	7.51 ± 1.733	9.31 ± 0.60
VRT _(0-t)	h^2	48.86 ± 24.06	46.88 ± 6.46

与DF3G组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs DF3G group

4 讨论

本研究结果显示,SDS可以促进DF3G在水中的溶解,增加DF3G的溶解度。采用分子动力学的方法探讨了DF3G在SDS胶束中的增溶行为。通过体系平衡时分子构型直观图的观察与两者相互作用模式图的分析,发现在SDS表面活性剂中,DF3G分子中苯环部分可以自发地增溶到胶束的疏水栅栏层,而其糖环中的羟基分别与2个SDS的硫酸基中的氧原子形成2个氢键,从而增加DF3G在水中的溶解性。

DF3G血浆浓度在0.5 h内迅速达到了第一个最大峰值,然后在6 h出现了较高浓度的第二个峰值,结果与先前的研究一致^[1]。口服制剂出现双峰的可能原因如下:(1)由于胃按一定时间排空,药物分成2次达到小肠,造成药物先后入血,出现双峰;(2)药物在胃肠道的2个部位吸收,有快有慢,因而出现双峰;(3)肝-肠循环即经胆汁或部分经胆汁排入肠道的药物,在肠道中又重新被吸收,经门静脉又返回肝脏;(4)制剂原因,如含有速释成分和缓释成分;(5)脂溶性药物吸收后,迅速分布到组织中,在血液中药代代谢到一定程度后,又出现二次入血^[11]。由DF3G和DF3G-SDS两组实验结果可知,DF3G的药-时曲线出现双峰,可排除制剂因素。同时根据本品胆汁代谢物的研究表明,其代谢量很少,不足以形成肝-肠循环。研究表明^[12],某些类黄酮,主要是具有葡萄糖分子的类黄酮,可能会被完整吸收。双峰现象表明DF3G可能主要从空肠吸收,而从十二指肠吸收较少^[13]。由此推测,DF3G可能存在2个吸收部位,故而出现双峰。目前DF3G的药-时曲线出现双峰的机制尚不明确,亦有可能是综合作用所致。

据报道,去甲基化、去糖基化和去糖基化再结合葡萄糖醛酸苷是DF3G在体内的主要代谢途径,生物利用度低可能归因于DF3G的广泛代谢^[12]。水解是DF3G代谢的第一步,然后DF3G的去糖基化代谢物可能会在肠细胞或肝脏中与葡萄糖醛酸重新结合。

本研究采用分子动力学的方法探讨了DF3G在SDS胶束中的增溶行为。结合药动学参数,SDS-DF3G药-时曲线特征与DF3G相似, $t_{\max}$ 、MRT、 $C_{\max}$ 等主要药动学参数特征变化不显著,但是SDS-DF3G中AUC、CL显著高于DF3G。说明SDS与DF3G结合能延长DF3G在体内的滞留时间的情况下显著降低血浆清除率,减缓其扩散的时长和被扩

散的速率,使其作用更长效、持久,从而提高了DF3G生物利用度。其中SDS-DF3G的 $t_{1/2}$ 较DF3G的缩短,CL也显著降低,究其原因,CL除了与半衰期相关以外,与表观分布容积也相关,按所得数据推测SDS的加入改变了DF3G的体内表观容积。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lou Q, Wen J, Jiang Y Y, et al. Rapid determination of 3', 4'-dimethoxy flavonol-3- β -d-glucopyranoside in rat plasma by LC-MS/MS method followed by protein precipitation [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1086: 47-55.
- [2] 白艳艳, 曹月欣, 张宪玺, 等. SDS对香豆素在SB-16胶束增溶行为影响 [J]. 山东大学学报: 工学版, 2016, 46(3): 99-105.
Bai Y Y, Cao Y X, Zhang X X, et al. The influence of SDS on C-343 solubilizing behavior in SB-16 micelle [J]. J Shangdong Univ: Eng Sci, 2016, 46(3): 99-105.
- [3] Takeda K, Fujimoto K, Yoshii N, et al. Molecular dynamics study of solubilization of cyclohexane, benzene, and phenol into mixed micelles composed of sodium dodecyl sulfate and octaethylene glycol monododecyl ether [J]. J Comput Chem, 2019, 40(31): 2722-2729.
- [4] Mondal S, Ghosh S, De S. Atomistic level molecular dynamics simulation on the solubilization mechanism of aromatic molecules in anionic micelles [J]. RSC Adv, 2015, 5(126): 104493-104501.
- [5] Domínguez H. Self-aggregation of the SDS surfactant at a solid-liquid interface [J]. J Phys Chem B, 2007, 111(16): 4054-4059.
- [6] Dominguez H, Berkowitz M L. Computer simulations of sodium dodecyl sulfate at liquid/liquid and liquid/vapor interfaces [J]. J Phys Chem B, 2000, 104(22): 5302-5308.
- [7] Tummala N R, Striolo A. SDS surfactants on carbon nanotubes: aggregate morphology [J]. ACS Nano, 2009, 3(3): 595-602.
- [8] Oostenbrink C, Villa A, Mark A E, et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 [J]. J Comput Chem, 2004, 25(13): 1656-1676.
- [9] Hess B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation [J]. J Chem Theory Comput, 2008, 4(1): 116-122.
- [10] Nam K. Acceleration of ab initio QM/MM calculations under periodic boundary conditions by multiscale and multiple time step approaches [J]. J Chem Theory Comput, 2014, 10(10): 4175-4183.

- [11] 马越鸣, 孙瑞元. 药物 C-T 曲线的双峰现象 [J]. 国外医学: 药学分册, 1987(3): 168-173.
Ma Y M, Sun R Y. Double peak phenomenon of drug C-T curve [J]. Foreign Med Sci: Med, 1987(3): 168-173.
- [12] Zhu Y, Wen J, Cao Y Q, et al. Identification of 3', 4'-dimethoxy flavonol-3- β -d-glucopyranoside metabolites in rats by liquid chromatography-electrospray ionization *Ion trap* mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2016, 21 (4): 470.
- [13] Matuschek M C, Hendriks W H, McGhie T K, et al. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(1): 31-36.

[责任编辑 兰新新]