

[制 剂]

异佛司可林在人肝微粒体与人工胃肠液中的代谢与降解

汪亚勤¹, 殷嘉珺¹, 毛玉昌², 胡卓汉^{1,2*}, 黄建明^{1*}

(1. 复旦大学药学院, 上海 201203; 2. 瑞德肝脏疾病研究 [上海] 有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 研究异佛司可林在人肝微粒体及人工胃肠液中的代谢与降解动力学。**方法** 将异佛司可林与人肝微粒体、人工胃液、人工肠液进行体外共孵育, 采用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法测定人肝微粒体孵育体系中异佛司可林的剩余浓度, 高效液相色谱-紫外检测 (HPLC-UV) 法测定人工胃液、人工肠液中异佛司可林的剩余浓度。**结果** 异佛司可林在人肝微粒体的 $t_{1/2}$ 为 (34.90 ± 3.42) min, CL_{int} 为 (16.71 ± 1.64) mL/(kg · min); 在人工胃液和人工肠液中的 $t_{1/2}$ 分别为 (46.97 ± 6.46) h 和 (91.67 ± 8.26) h。**结论** 异佛司可林在人肝微粒体中代谢显著, 在人工胃液和肠液中较稳定。

关键词: 异佛司可林; 代谢; 降解; 人肝微粒体; 人工胃液; 人工肠液; HPLC-MS/MS; HPLC-UV

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)06-1244-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.009

Metabolism and degradation of isoforskolin in human liver microsomes and simulated gastrointestinal fluids

WANG Ya-qin¹, YIN Jia-jun¹, MAO Yu-chang², HU Zhuo-han^{1,2*}, HUANG Jian-ming^{1*}

(1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China; 2. Ruide Research Institute for Liver Diseases [Shanghai] Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the *in vitro* metabolism and degradation of isoforskolin in human liver microsomes and simulated gastrointestinal fluids. **METHODS** Isoforskolin was incubated with human liver microsomes, simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF), respectively. The residual concentrations of isoforskolin in microsomal incubates were determined by HPLC-MS/MS, and the concentrations in SGF and SIF were detected by HPLC-UV. **RESULTS** In human liver microsomes, the $t_{1/2}$ and CL_{int} of isoforskolin were (34.90 ± 3.42) min and (16.71 ± 1.64) mL/(kg · min), respectively. The $t_{1/2}$ values of isoforskolin in SGF and SIF were (46.97 ± 6.46) h and (91.67 ± 8.26) h, respectively. **CONCLUSION** Isoforskolin can be metabolized significantly in human liver microsomes, while it remains stable in SGF and SIF.

KEY WORDS: isoforskolin; metabolism; degradation; human liver microsomes; simulated gastric fluid; simulated intestinal fluid; HPLC-MS/MS; HPLC-UV

唇形科植物毛喉鞘蕊花 *Coleus forskohlii* (willd) Briq 具有下气平喘, 平肝之功效, 可用于治疗呼吸紊乱、心脏病、高血压等疾病^[1-4], 国内以其干燥全草为君药制成的复方制剂主治哮喘。该植物主产

于中国、印度等地, 中印品种的主要有效成分分别为异佛司可林和佛司可林, 均为半日花烷型二萜类化合物, 具有强大的腺苷酸环化酶激动活性, 显示出平喘解痉、强心、降低眼压、抗肿瘤、抗 HIV

收稿日期: 2015-08-17
基金项目: 上海市科学技术委员会科技支撑项目 (13401900502)
作者简介: 汪亚勤 (1983—), 女, 实验师, 从事中药质量评价与活性成分研究。Tel: 13585543024, E-mail: wangyq1219@126.com
* 通信作者: 胡卓汉 (1953—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药代谢性/转运性相互作用的研究。Tel: (021) 50800743, E-mail: huzh@rild-biotech.com
黄建明 (1971—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药有效成分及其体内外分析的研究。Tel: (021) 51980132, E-mail: jmhuang@shmu.edu.cn

活性等作用^[2-13]。虽然对这两种化合物药理作用的研究较多,但在代谢方面的报道很少。张曼等^[14]对佛司可林在肝微粒体中的体外代谢进行了研究,但尚未见到关于异佛司可林的体外代谢报道。

本实验建立了液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法和高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)法分别考察异佛司可林在人肝微粒体中和人工胃肠液中的代谢,并与相同条件下佛司可林的代谢结果作比较,为药物代谢性相互作用的研究以及国产毛喉鞘蕊花药材的进一步开发提供有价值的信息。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 系列液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);AB SCIEX API 4000 质谱仪(美国应用生物系统有限公司);GHP-9050 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);XW-80A 涡旋混合器(海门市麒麟医用仪器厂);TGL-16B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FE20 实验室PH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2 药品与试剂 异佛司可林(自制,纯度大于98%);人肝微粒体(上海瑞德肝脏疾病研究所);睾酮(上海淞虹化学试剂有限公司);还原型辅酶Ⅱ(β -NADPH,美国Sigma公司);Tris 缓冲液(国药集团化学试剂有限公司);胃蛋白酶(猪源,1:3 000)、胰酶(USP 级)(阿拉丁试剂有限公司)。乙腈、甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司);其他试剂均为分析纯;超纯水(Milli-Q 超纯水系统制得)。

2 方法与结果

2.1 体外代谢体系和处理方法

2.1.1 肝微粒体中的实验方法 温孵体系总体积为0.2 mL/份,含人肝微粒体(蛋白质量浓度6 mg/mL)50 μ L、4 μ mol/L 异佛司可林50 μ L、2 mmol/L β -NADPH 100 μ L,溶剂均为0.1 mol/L Tris 缓冲液,各溶液均在37 $^{\circ}$ C预孵育5 min后混匀。以不含 β -NADPH的样品为阴性对照,以睾酮为阳性对照,将配制好的温孵液置于37 $^{\circ}$ C下,于0、0.25、0.5、1、2 h取出,立即加入0.8 mL 甲醇(4 $^{\circ}$ C)终止反应,涡旋混匀,离心(4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min)5 min,取上清液进行LC-MS/MS分析。

2.1.2 人工胃液、肠液中的实验方法 取5.6 mmol/L异佛司可林溶液50 μ L与人工胃肠液(依据《中国药典》2010版一部附录XA配制)950 μ L,在37 $^{\circ}$ C预孵育5 min后混匀,于0、

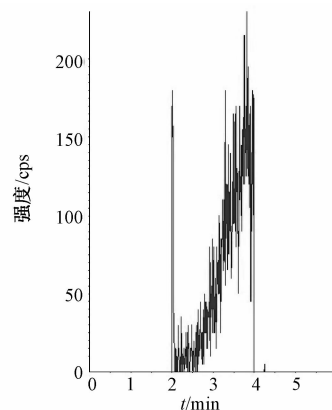
0.25、0.5、1、2、4、6 h取出0.1 mL,立即加入0.3 mL 冰乙腈(-20 $^{\circ}$ C)终止反应,离心(4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min)5 min,取上清液进行HPLC-UV分析。

2.2 HPLC-MS/MS法测定肝微粒体孵育体系中异佛司可林的浓度

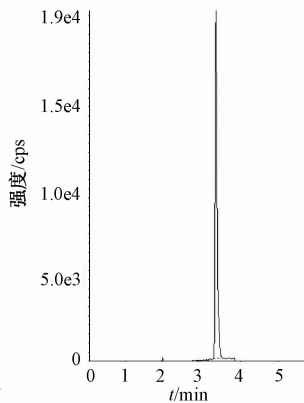
2.2.1 色谱与质谱条件 色谱分析采用Diamondsil C₁₈色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,5 μ m);流动相为甲醇(A)-10 mmol/L 乙酸铵(B),梯度洗脱(0~2 min,40%~98% A;2~4 min,98% A);柱温35 $^{\circ}$ C;体积流量0.45 mL/min;进样量5 μ L。

质谱检测采用电喷雾离子源(ESI),正离子扫描;定量分析采用多反应离子(MRM)模式, m/z 428.4 $\rightarrow$ 375.3;碰撞能量(CE)18 V;气帘气206.85 kPa;电压4 000 V;温度300 $^{\circ}$ C。

2.2.2 方法学考察 在选定的检测条件下,异佛司可林的保留时间为3.4 min(图1),孵育液中的杂质不干扰测定,方法专属性良好。



A.空白肝微粒体基质



B.肝微粒体孵育1 h后的样品

图1 LC-MS/MS 色谱图(人肝微粒体)

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms (human liver microsomes)

取不同浓度的异佛司可林溶液,加到失活的肝

微粒体溶液中,按“2.1.1”项下方法配制含10、20、40、100、200、400、1 000、2 000 nmol/L 该成分的标准样品,加入甲醇0.8 mL,涡旋混匀,离心,取上清液进行LC-MS/MS分析。以峰面积(A)对浓度(C , nmol/L)进行线性回归,得回归方程 $A = 513.56C - 3\ 086.74$, $r = 0.999\ 9$,表明异佛司可林在10~2 000 nmol/L 范围内线性关系良好,方法定量限为10 nmol/L ($S/N \geq 10$)。

配制含10、25、200、1 600 nmol/L 该成分的标准样品用于精密度、准确度和稳定性的考察。每个浓度日内测3次,连续测3 d,日内测定各浓度的RSD分别为2.7%、2.6%、2.3%、2.7%,日间分别为4.6%、1.1%、4.2%、2.3%,方法回收率在94.3%~109.8%之间。4℃贮存条件下,各浓度在0、8、16 h测定的RSD值均小于8.9% ($n=3$),表明异佛司可林在16 h内稳定。

按以下方法制备组1~组3样品,并分别计算提取回收率与基质效应。组1:异佛司可林对照品溶液;组2:取失活肝微粒体甲醇沉淀后的上清液,加入异佛司可林对照品溶液;组3:失活肝微粒体甲醇沉淀前加异佛司可林对照品溶液。基质效应 = (组2/组1) × 100%,提取回收率 = (组3/组2) × 100%。结果,25、200、1 600 nmol/L 异佛司可林的提取回收率分别为91.8%、101.1%、92.3%,基质效应分别为94.1%、93.8%、103.0% ($n=5$),RSD在0.9%~8.4%之间,表明该方法的提取回收率符合要求,而且无基质效应。

2.3 HPLC-UV 法测定人工胃液、肠液中异佛司可林的浓度

2.3.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),保护柱 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.0 mm × 3.0 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(65:35);柱温40℃;进样量20 μL;体积流量1 mL/min;检测波长210 nm。

2.3.2 方法学考察 在选定的检测条件下,异佛司可林的保留时间为4.9 min(见图2和图3),人工胃肠液对测定均无干扰,方法的专属性符合要求。

将含2.4、4.9、12.2、24.4、60.9、121.8 μmol/L 异佛司可林的对照品溶液按“2.3.1”项下方法测定,以峰面积(A)对浓度(C , μmol/L)作线性回归,得回归方程 $A = 0.857\ 3C + 0.531\ 8$, $r = 0.999\ 8$,表明异佛司可林在2.4~121.8 mmol/L

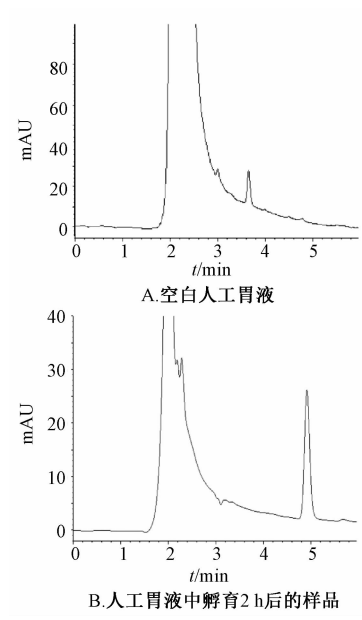


图2 HPLC-UV 色谱图(人工胃液)
Fig.2 HPLC-UV chromatograms (simulated gastric fluid)

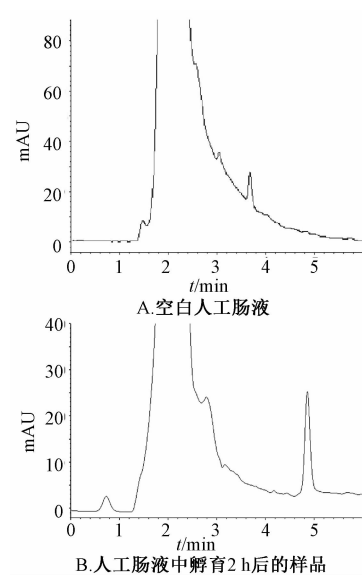


图3 HPLC-UV 色谱图(人工肠液)
Fig.3 HPLC-UV chromatograms (simulated intestinal fluid)

范围内线性关系良好,方法定量限为2.4 μmol/L ($S/N \geq 10$)。

取含4.9、24.4、121.8 μmol/L 异佛司可林的对照品溶液考察精密度、准确度和稳定性,每个浓度日内测3次,连续测3 d,日内测定各浓度的RSD分别为2.39%、0.88%、0.62%,日间分别为2.22%、1.27%、1.17%,日间和日内的方法回收率在97.6%~102.4%之间。室温(25℃)条件下,各浓度在0、1、2 h测定的RSD值均小于

2.44%；4℃贮存条件下，在0、24、48 h测定的RSD值均小于2.90%（ $n=3$ ）。

2.4 异佛司可林在人肝微粒体、人工胃肠液中的代谢与降解 按“2.1”项下方法，将异佛司可林与人肝微粒体或人工胃肠液共孵育，以各时间点母体剩余浓度相对于初始浓度的百分比对时间作图，结果见图4。

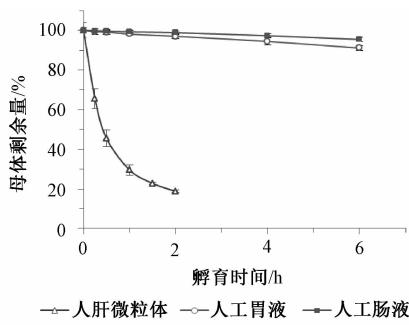


图4 浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Concentration-time curves ($\bar{x} \pm s, n=3$)

以浓度的自然对数（ $\ln C$ ）对反应时间（ t ）进行线性回归，如果线性关系良好则符合表观一级动力学过程，直线斜率的绝对值为一级降解速率常数（ k ），由公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 可得代谢半衰期 $t_{1/2}$ 。在肝微粒体孵育体系中，异佛司可林0~1 h的 $\ln C-t$ 线性关系良好，符合一级动力学；1 h后，肝微粒体酶因消耗而减少，活性也降低，从而使代谢速率逐渐减小，因此采用1 h内的数据计算 k 与 $t_{1/2}$ 。固有清除率 CL_{int} 和肝清除率 CL_h 按式（1）和（2）计算。

$$CL_{int} = \frac{0.693}{t_{1/2}} \times \frac{\text{孵育体系体积}(\text{mL})}{\text{孵育体系肝微粒体蛋白质量}(\text{mg})} \times \frac{\text{肝微粒体蛋白质量}(\text{mg})}{\text{肝重}(\text{g})} \times \frac{\text{肝重}(\text{g})}{\text{体重}(\text{kg})} \quad (1)$$

$$CL_h = \frac{Q_h \times CL_{int}}{Q_h + CL_{int}} \quad (2)$$

其中，相关的理化参数为肝微粒体蛋白质量（mg）/肝质量（g）25.7，肝质量（g）/体质量（kg）48.8，肝血流（ Q_h ）20.7 mL/（kg·min）^[15]。

结果，异佛司可林在人肝微粒体中的 k 为（0.020±0.002）/min， $t_{1/2}$ 为（34.90±3.42）min，孵育2 h的母体剩余量为（18.80±0.79）%（阳性对照睾酮孵育2 h的剩余量为9.2%）， CL_{int} 为（16.71±1.64）mL/（kg·min）， CL_h 为（9.23±0.50）mL/（kg·min），提示异佛司可林在肝脏的首过代谢显著。

异佛司可林在人工胃液和肠液中的 k 分别为（0.0149±0.0019）/h 和（0.0076±0.0007）/h， $t_{1/2}$ 分别为（46.97±6.46）h 和（91.67±8.26）h，孵育2 h的母体剩余量分别为（97.01±1.26）% 和（98.83±0.75）%（ $n=3$ ），提示异佛司可林在人工胃肠液中稳定。

3 讨论

3.1 分析方法的选择 本实验采用HPLC-UV法测定人工胃肠液中的降解样品，因为异佛司可林的浓度较高，人工胃肠液对测定无干扰。但是，对于肝微粒体的降解样品，异佛司可林的浓度较低，本底噪音较大，难以用HPLC-UV法准确测定，故建立了更专属、灵敏的HPLC-MS/MS法进行测定。

在HPLC-MS/MS的方法学考察中，比较了内标法（内标为柳胺酚）和外标法，发现两种计算方法的各项分析效能指标均符合分析要求，但外标法更简便，而且精密度略优于内标法，故选择外标法。另外，还比较了电喷雾离子源的正离子和负离子检测方式，发现异佛司可林在正离子模式下的响应显著高于负离子，因此选取正离子进行测定。

3.2 与佛司可林代谢动力学的比较 本实验同时考察了国外品种主要成分佛司可林的代谢稳定性，测得其 $t_{1/2}$ 为（18.37±1.16）min（文献[14]报道为[11.9±1.8] min），孵育2 h仅剩余（4.86±0.35）%， CL_{int} 为（31.63±2.01）mL/（kg·min）， CL_h 为（12.50±0.31）mL/（kg·min），提示佛司可林在肝脏的首过代谢显著。在人工胃液和肠液中，佛司可林的 $t_{1/2}$ 分别为（9.68±0.73）h 和（53.37±7.08）h，孵育2 h的母体剩余量分别为（89.52±1.73）% 和（96.60±0.80）%，表明佛司可林在人工胃液、肠液中较稳定。

由此可知，两者均可被肝微粒体药物代谢酶显著代谢，速度快，而在人工胃肠液中较稳定。并且在三种介质中，异佛司可林均比佛司可林稳定。

3.3 异佛司可林的代谢及其潜在的药物相互作用

异佛司可林可被人肝微粒体显著代谢，在2 h的孵育后，母体仅剩余18.80%，提示80%以上母体被代谢，其 CL_{int} 为16.71 mL/（kg·min），即为快代谢化合物。异佛司可林的代谢不稳定性对生物利用度及血浆浓度有潜在影响，一旦与其代谢途径的抑制剂同时服用，其血浆浓度及相应的药效可能会受到显著影响。因此，后续将进一步分析异佛司可林的代谢途径，为正确评估临床药物代谢性的相互作用提供数据。

异佛司可林在人工胃液和人工肠液中孵育 2 h，其母体剩余量分别为 97.01% 和 98.83%，即较为稳定，对潜在的临床药物相互作用影响不大。

参考文献：

[1] 王宗玉, 吴大刚. 我国毛喉鞘蕊花的发掘与研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2) : 73-75.

[2] Kavitha C, Rajamani K, Vadivel E. *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects [J]. *J Med Plant Res*, 2010, 4 (4) : 278-285.

[3] 夏伟, 刘江. 毛喉鞘蕊花的研究进展[J]. 云南中医药杂志, 2012, 33(7) : 64-67.

[4] Alasbahi R H, Melzig M F. *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology-Part 1 [J]. *Planta Med*, 2010, 76(7) : 653-661.

[5] 汪亚勤. 毛喉鞘蕊花提取物的化学成分及含量测定[D]. 上海: 复旦大学, 2009.

[6] 徐旻明, 陈蔚江, 李捷, 等. 鞘蕊苏有效成分的含量分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(2) : 38-39.

[7] 徐玲玲, 孔令义. 毛喉鞘蕊花中半日花烷型二萜成分的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6) : 344-347.

[8] 杨为民, 李新华, 陈植和, 等. 佛司可林类似物激动腺苷酸环化酶及抑制兔高血压探讨[J]. 眼科研究, 2001, 19(1) : 14.

[9] Yang W M, Qiang D J, Zhang M, *et al*. Isoforskolin pretreatment attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in animal models [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (6) : 683-692.

[10] 汪亚勤, 曹水娟, 殷嘉珺, 等. 佛司可林类化合物对离体豚鼠气管条舒张作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(5) : 714-717.

[11] González-Sánchez R, Trujillo X, Trujillo-Hernández B, *et al*. Forskolin versus sodium cromoglycate for prevention of asthma attacks: a single-blinded clinical trial [J]. *J Int Med Res*, 2006, 34(2) : 200-207.

[12] Ríos-Silva M, Trujillo X, Trujillo-Hernández B, *et al*. Effect of chronic administration of forskolin on glycemia and oxidative stress in rats with and without experimental diabetes [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(5) : 448-452.

[13] Astell K J, Mathai M L, Su X Q. A review on botanical species and chemical compounds with appetite suppressing properties for body weight control [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2013, 68(3) : 213-221.

[14] 张曼, 孟志云, 朱晓霞, 等. 毛喉鞘蕊花提取物福司可林的体外代谢研究[J]. 药学报, 2013, 48(3) : 383-389.

[15] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, 10 (7) : 1093-1095.

BP-ANN 结合正交试验法优化白附子多糖提取工艺

吴娜, 赵重博, 胡美变, 彭伟, 解达帅, 吴纯洁*
(成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137)

摘要：目的 采用反向传播人工神经网络（BP-ANN）结合正交试验法优化白附子多糖提取工艺。**方法** 水提醇沉法提取多糖后，苯酚-硫酸法测定含量。基于单因素试验的基础上，按照 $L_9(3^4)$ 正交表安排进行试验，考察提取温度、提取时间、料液比对多糖得率的影响，BP-ANN 技术优化提取工艺。**结果** 最佳条件为提取时间 3.5 h，提取温度 90℃，料液比 1:20，多糖得率达 5.20%。**结论** 该方法重复性良好，而且试验次数少。

关键词：白附子；多糖；提取工艺；BP-ANN；正交试验

中图分类号：R284.2 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2016)06-1248-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.010

Optimizing the extraction of polysaccharides from *Typhonii Rhizoma* by BP-ANN combined with orthogonal test

收稿日期：2015-09-29
基金项目：四川省教育厅科技基础性工作专项分项目（2014FY111100-4）
作者简介：吴娜（1988—），女，硕士生，从事中药炮制与制剂研究。Tel: (028) 61801001, E-mail: wunagood_2008@163.com
* 通信作者：吴纯洁（1965—），男，博士，教授，博士生导师，从事中药炮制与制剂研究。Tel: (028) 61801001, E-mail: wcj-one@