

· 论 著 ·

柠檬苦素体外代谢的种属差异

张枝霄^{1,2}, 胡佳音³, 单慧娇⁴, 施宪宝^{2,3}, 王玉华^{1*}

- (1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059;
2. 锦州医科大学附属第一医院临床药学科, 辽宁 锦州 121000;
3. 锦州医科大学药学院, 辽宁 锦州 121000;
4. 葫芦岛市药品检验所, 辽宁 葫芦岛 125000)

【摘要】目的 研究柠檬苦素代谢的种属差异,为柠檬苦素体内代谢研究提供实验动物选择的依据。方法 代谢组用人、狗、猪、猴、兔、大鼠、小鼠7种肝微粒体分别与柠檬苦素孵育。对照组用灭活的肝微粒体与柠檬苦素孵育。空白组不加柠檬苦素。用高效液相紫外检测器检测柠檬苦素标准品溶液和上述样品,观察代谢组样品有无代谢产物峰。通过酶动力学实验结果计算不同种属肝微粒体酶对柠檬苦素的清除率。用高效液相高分辨质谱检测器检测代谢产物,推测代谢产物结构及反应类型。结果 HPLC图谱显示人、犬、猪、兔、大鼠、小鼠有共同的代谢产物峰M1(RT13.3min);大鼠还有两个代谢产物峰M2(RT10.6min)和M3(RT8.6 min);猴的代谢产物峰为M4(RT8.1 min)和M5(RT10.1 min)。柠檬苦素在人、犬、猪、大鼠、小鼠肝微粒体中的清除分别为0.608、0.454、0.501、4.249、1.831 $\mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。高分辨质谱检测结果推测M1为柠檬苦素的C-16位羰基被还原为羟基的化合物。结论 猪、犬、大鼠、小鼠清除率与人类接近。我们推测柠檬苦素的人肝微粒体酶主要代谢产物是其16位碳羟基化合物。

【关键词】柠檬苦素;体外代谢;吴茱萸;种属差异;肝微粒体

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)04-0337-06

IN VITRO METABOLIC DIFFERENCES OF LIMONIN IN
DIFFERENT SPECIESZHANG Zhixiao^{1,2}, HU Jiayin³, SHAN Huijiao⁴, SHI Xianbao^{2,3}, WANG Yuhua^{1*}

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 3. College of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 4. Huludao Pharmaceutical Control Institute, Huludao 125000, China)

【Abstract】Objective To study which species experimental animal are similar to human about the metabolism of limonin, and it will be a basis for the selection of experimental animals for the metabolism of limonin in vivo. **Methods** Limonin was incubated separately with liver microsomes, such as the humans liver microsomes, the dogs liver microsomes, the pigs liver microsomes, the monkeys liver microsomes, the rabbits liver microsomes, the rats liver microsomes and the mice liver microsomes, that were as experimental groups. In contrast, limonin was incubated with inactivated liver microsomal enzymes served as control groups. And the limonin were not added to the blank group. All above samples and limonin standard solution were detected by HPLC-UV detector to observe the metabolism of limonin. According to the results of enzyme kinetics experiments, the clearance rate of limonin by liver microsomal enzymes of different species was calculated. The above samples were detected by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (HPLC-MS) detector to infer the metabolite structure. **Results** M1 peak was found in human, dog, pig, rabbit, rat and mouse by UV detection chromatogram, and the retention time

收稿日期: 2023-03-27; 修回日期: 2023-06-10

第一作者: 张枝霄(1989—),女,2020级在读硕士研究生。E-mail:1351459973@qq.com

*通信作者: 王玉华,女,博士,教授,硕士研究生导师。研究方向:药物分析。E-mail:YuHuawang59@163.com

was 13.3 minutes. In addition, rats had two metabolite peaks (M2:10.6 min, M3:8.6 min). However, it was interesting that the metabolite peaks in monkeys were different from those in humans, with retention times of 8.1 min and 10.1 min (M4 and M5). The clearance of limonin in human, dog, pig, rat and mouse liver microsomes was 0.608, 0.454, 0.501, 4.249 and 1.831 $\mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. And the results of high resolution mass spectrometry suggested that M1 was a hydroxyl compound at C-16 position.

Conclusions The clearance rate of pigs, dogs, rats and mice is close to that of human. It is speculated that the main metabolite of limonin catalyzed by liver microsomal enzymes is its 16-carbon hydroxyl compound.

[Keywords] Limonin; In vitro metabolism; Evodia fructus; Species differences; Liver microsomes

柠檬苦素是中药吴茱萸的指标成分^[1],它属于萜类化合物。吴茱萸有小毒会造成小鼠肝损伤^[2-4],甘草炮制后柠檬苦素含量明显下降,毒性减轻^[5-8],推测柠檬苦素可能与吴茱萸的“小毒”有关^[9-11]。在一项对比研究中发现^[12],昆明小鼠和Wistar大鼠被吴茱萸水煎液灌胃28 d后,只有小鼠肝脏有损伤,吴茱萸水煎液的肝毒性表现出种属差异。前期实验结果表明,柠檬苦素在人、犬、猪、猴、兔、大鼠、小鼠7种肝微粒体中Ⅱ相代谢微弱,以Ⅰ相代谢为主。本文章按Ⅰ相代谢条件,进行柠檬苦素Ⅰ相代谢的种属差异实验、孵育时间对酶促反应的影响、肝微粒体蛋白浓度对代谢产物生成的影响、酶促动力学试验等4方面实验内容的设计与实施,比较以上7个种属肝微粒体对柠檬苦素的代谢差异,推测与人类肝脏代谢柠檬苦素相近的、适用于体内药效学和毒理学评价的实验动物。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB型高效液相色谱仪(日本岛津公司); Thermo Q exactive orbitrap型液质联用系统; THERMO-SHAKER型金属混匀仪(英国Grant仪器有限公司); STM-F140AY65制冰机(大连三洋电器); UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Synergy UV型纯水仪(美国Millipore公司); BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg); XZ133-SB-800D型超声波清洗机(北京海富达科技有限公司); VORTEX Genius 3型涡旋振荡器(德国IKA公司); BKY920型冰箱(青岛海尔); HERAEUS X1R型高速离心机(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 药品与试剂

柠檬苦素(成都普菲德生物技术有限公司,批号:17111701,纯度>98%); β -磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水合物(β -NADP,纯度>95%); D-葡萄糖-6-磷酸二钠二水(G-6-P,纯度 \geq 98%)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)(均为美国Sigma公司); 乙腈、

磷酸、甲酸均为色谱纯(德国Merck公司);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

比格犬、大鼠、迷你猪、恒河猴、小鼠、兔和人的肝微粒体(分别简称DLMs、RLMs、PLMs、MLMs、MIMs、RAMs、HLMs,北京汇智和源生物技术有限公司,蛋白浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

柠檬苦素贮备液:称取柠檬苦素5.00 mg,加甲醇354.2 μL , DMSO 177.1 μL ,制成 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液。

MgCl_2 溶液:称取 $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{ H}_2\text{O}$ 0.4066 g,加超纯水溶解并定容至50 mL,制成浓度为 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

磷酸盐缓冲液(pH 7.4):称取磷酸氢二钾4.5701 g,磷酸二氢钾0.6735 g,加适量超纯水溶解,配成250 mL溶液。用pH计测定pH值,用盐酸调节pH至7.4。其简称Buffer。

G6PDH、G-6-P和 β -NADP分别用Buffer配成溶液,浓度分别为 $10\text{ KU}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 孵育体系及样品处理

NADPH发生系统: MgCl_2 溶液、G-6-P溶液、G6PDH溶液各20 μL ,加入20 μL β -NADP溶液启动反应。

孵育体系共200 μL 。取1.5 mL EP管置于碎冰之中,加入Li溶液1 μL , MgCl_2 溶液、G6PDH溶液和G-6-P溶液各20 μL , Buffer 114 μL 。代谢组加入肝微粒体5 μL ,混匀后 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育3 min,加入 β -NADP溶液20 μL 启动反应,混匀后以 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育60 min。孵育结束后向EP管中加200 μL 预冷乙腈震荡终止反应。将EP管置于冰浴中静置20 min。对照组肝微粒体先用200 μL 预冷乙腈混合震荡,使酶蛋白失活后再加入20 μL β -NADP震荡,冰浴20 min。空白组不加入样品,Buffer加115 μL ,使孵育体系液量保持200 μL 。

样品处理:将代谢组、对照组、空白组EP管于

4 ℃、12 000 rpm 离心 20 min, 取 200 μL 上清液用于检测。

2.3 检测条件

2.3.1 HPLC-UV 色谱条件 Hypersil BDS C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 大连依利特); 流动相为 0.1 % 磷酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序为 0 ~ 12 min, 25 % ~ 50 % B; 12 ~ 12.5 min, 50 % ~ 95 % B; 12.5 ~ 17.0 min, 95 % B; 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 210 nm; 进样量为 10 μL。

2.3.2 HPLC-MS 色谱条件 流动相: 0.1 % 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序为: 0 ~ 10 min, 10% ~ 50%B; 10 ~ 12 min, 50% ~ 80%B; 12 ~ 15 min, 80%B; 15 ~ 16 min, 80% ~ 10%B; 16 ~ 18 min, 10%B; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL。质谱条件: 正离子全扫描。扫描范围为 100 ~ 800 m/z; 毛细管温度为 350 ℃; 喷雾电压为 3.5 kV; S-lens 电压为 50 kV 源电压和平均电压为 5 kV; 鞘气(N₂)流量为 35 psi; 辅助气体流量为 10 psi。在此条件下柠檬苦素保留时间为 12.9 min。

2.4 HPLC-UV 法测定柠檬苦素含量的方法学考察

2.4.1 专属性试验 按“2.2、2.3.1 方法”制备并检测代谢组、对照组、空白组样品, 柠檬苦素溶液浓度为 5 mmol·L⁻¹。将代谢组、对照组、空白组、10 μg·mL⁻¹ 柠檬苦素标准品溶液图谱相互比较。如图 1 所示, 柠檬苦素的保留时间为 16.2 min, 理论塔板数 > 90 000, 分离度 > 1.5。以 RLMs 为例, 图中 M1、M2、M3 是代谢产物峰。色谱峰 a 是与柠檬苦素相关的峰, 因为该峰在不同浓度的标准品图谱中均出现。因此, 柠檬苦素与代谢产物专属性良好, 不存在基质效应。

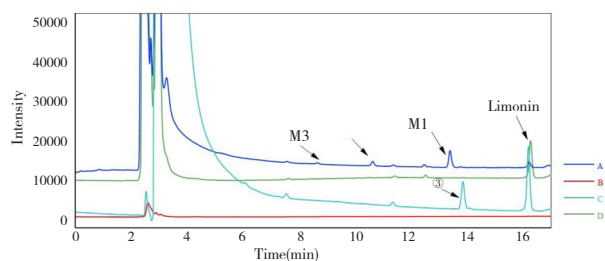


图 1 柠檬苦素标准品溶液、代谢组样品、对照组样品、空白样品的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of limonin standard solution, metabolic group sample, control sample and blank sample

A. 代谢组样品; B. 空白组样品; C. 10 μg·mL⁻¹ 柠檬苦素标准品溶液; D. 对照组样品

A. Metabolic group sample; B. Blank group sample; C. 10 μg·mL⁻¹ limonin standard solution; D. Control group sample

2.4.2 线性范围 用乙腈稀释柠檬苦素贮备液至浓度分别为 10 μg·mL⁻¹、5 μg·mL⁻¹、1 μg·mL⁻¹、0.5 μg·mL⁻¹、0.1 μg·mL⁻¹。按“2.3.1”进样检测, 记录色谱峰面积, 以 Li 的峰面积(Y)对浓度(X)做回归, 得到回归方程为 $Y = 12293 X - 331.44$ ($r = 0.9995, 0.1 \sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将浓度单位换算成 μmol·L⁻¹, 则方程为 $Y = 5784.1 X - 331.44$ ($0.21 \sim 21.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 此方程用于酶动力学计算。柠檬苦素在 0.1~10 μg·mL⁻¹ 或 0.21 ~ 21.25 μmol·L⁻¹ 范围内, 浓度与峰面积呈线性。

2.4.3 精密度试验 配制 0.3 μg·mL⁻¹、5 μg·mL⁻¹、7.5 μg·mL⁻¹ 柠檬苦素的乙腈溶液, 日间、日内不同时间内重复测定 5 次。测得仪器日内精密度 RSD 小于 1.27 %, 日间精密度 RSD 小于 1.27 %。仪器精密度良好。

2.4.4 回收率试验 按“2.2 对照组操作方法”操作, 取终浓度为 0.1 μg·mL⁻¹、5 μg·mL⁻¹、10 μg·mL⁻¹ 的柠檬苦素进行回收率考察。回收率在 94.07 % ~ 98.70 % 之间, RSD < 2.0 %。

2.5 柠檬苦素 I 相代谢的种属差异^[13]

按“2.2、2.3.1”代谢组方法分别制成 HLMs、DLMs、PLMs、MLMs、RAMs、RLMs、MIMs 7 个代谢组, 对照组灭活肝微粒体用 RLMs。柠檬苦素溶液浓度为 5 mmol·L⁻¹。

柠檬苦素的代谢率和代谢产物 M1 转化率按公式 1、2 计算。其他种属结果与 HLMs 比较, 采用 SPSS 统计软件对代谢率进行独立样本 t 检验 ($n=3$), 检验水准为 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

$$\text{柠檬苦素代谢率} = 100\% - \frac{\text{柠檬苦素峰面积(代谢组)}}{\text{柠檬苦素峰面积(对照组)}} \times 100\%$$

公式 1

$$\text{代谢产物 M1 转化率} = \frac{\text{M1 峰面积}}{\text{对照组柠檬苦素峰面积}} \times 100\%$$

公式 2

人、犬、猪、猴、兔、大鼠、小鼠代谢组的经典 HPLC-UV 色谱图如图 2 所示。

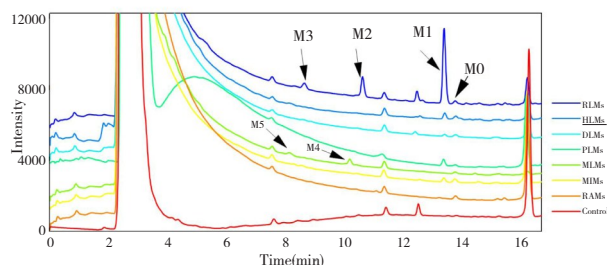


图 2 不同种属 LMs 对 Li 代谢的 HPLC-UV 色谱图

Fig.2 HPLC-UV chromatogram of Li metabolism by LMs of different species

由代谢组色谱图与对照组色谱图比较可知, M0~M5是柠檬苦素的代谢产物峰。M0峰在各种属肝微粒体代谢组中都有检出。M1为柠檬苦素的主要代谢产物,在HLMs、DLMs、PLMs、MIMs、RLMs代谢组中有检出,色谱峰保留时间(RT)为13.3 min。根据流动相梯度可知, M1极性比柠檬苦素略小,被95%乙腈洗脱。推测M1应该保持了柠檬苦素的萜类骨架。M1在各代谢组中存在量的差别。除此之外,RLMs比HLMs代谢组多了M2、M3代谢峰,RT分别为10.6 min、8.6 min,极性较大。再者,RLMs中M1峰面积大约是HLMs的13倍。这提示相同实验条件下,RLMs产生的M1比HLMs多。另外发现,MLMs、RAMs代谢组谱图与HLMs差异最大。在MLMs中未检测到M1,而检测到了M4、M5,这些产物峰的RT为8.1 min和10.1 min,极性比RLMs中的M2、M3还大些。RAM代谢组中无M1代谢产物。

柠檬苦素在各种属肝微粒体中代谢率的差异见图3。独立样本t检验中,RLMs孵育体系对柠檬苦素的代谢率与HLMs相近, $P = 0.843 > 0.05$, 差异没有统计学意义。PLMs代谢体系对柠檬苦素的代谢率与HLMs比较, $P = 0.041$, 虽具有显著性差异,但比其余种属更接近HLMs。RAMs中未检测到代谢产物峰M1,柠檬苦素代谢率也很低。这提示RAMs对柠檬苦素的代谢与HLMs差异性最大。

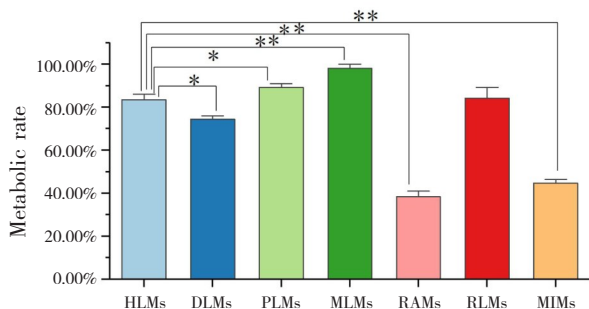


图3 柠檬苦素在各种属肝微粒体中代谢率的比较
Fig.3 Comparison of metabolic rates of limonin in liver microparticles of various genera

注: **代表 $P < 0.01$ 。*代表 $P < 0.05$ 。Note: ** represents $P < 0.01$. * represents $P < 0.05$.

M1或许并不是各种属孵育体系中唯一的代谢产物。对M1的转化率和柠檬苦素的代谢率比较发现,MLMs和MIMs温孵体系中有约42%的Li通过其他代谢途径产生了未检测到的代谢产物。HLMs、DLMs、PLMs温孵体系中有约70%~80%柠檬苦素代谢,但未检测到产物。有可能这些未检测到的代谢产物没有紫外吸收峰,或者产生了其他波长吸收峰

的代谢产物。

2.6 孵育时间对酶促反应的影响^[14]

HLMs孵育体系中, Li溶液浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按“2.2代谢组”方法,加 β -NADP溶液涡旋混匀,立即吸取 $40 \mu\text{L}$ 液体,剩余孵育体系按 37°C 孵育并计时,每隔 10 min 取出 $40 \mu\text{L}$ 液体。取出的 $40 \mu\text{L}$ 液体加 $40 \mu\text{L}$ 预冷乙腈强烈震荡,终止反应。冰浴 20 min , 其他操作按“2.2样品处理”继续进行,取 $40 \mu\text{L}$ 上清液检测。最终选择 10 min 为最佳反应孵育时间。

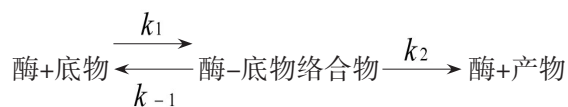
2.7 肝微粒体蛋白浓度对代谢产物生成的影响

选择 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬苦素溶液,按“2.2代谢组”方法操作。分别加入 HLMs $1, 3, 5, 8, 10 \mu\text{L}$, Buffer 体积随 HLMs 体积改变,维持孵育体系为 $200 \mu\text{L}$, 孵育时间为 10 min 。其他操作按“2.2”继续进行。最终选择 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳肝微粒体蛋白浓度。

2.8 酶促动力学试验^[15]

结合“2.2代谢组”操作方法,柠檬苦素溶液浓度分别为 $0.02, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 孵育 10 min 。

基于“中间产物”假说,酶和底物的作用是通过酶和底物生成络合物而进行的,络合物被看作稳定的过渡态物质,然后络合物进一步分解,最终形成产物和游离态酶,即



因此,代谢产物与底物的摩尔比例为 $1:1$, 将M1生成速率与对应的柠檬苦素浓度输入到 Graph-Pad Prism5 软件中,以 Michaelis-Menten 方程算法做散点图,可以得到经拟合的 K_m 和 V_{\max} 值。然后,根据公式 5 计算肝微粒体对柠檬苦素的清除率 CL_{int} 。此清除率是指在没有其他生理决定因素的情况下,肝脏微粒体酶蛋白在单位时间内对药物清除的速率。

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \text{公式 3}$$

$$V = V_{\max} - K_m \frac{V}{[S]} \quad \text{公式 4}$$

$$CL_{\text{int}} = \frac{V_{\max}}{K_m} \quad \text{公式 5}$$

式中 V 为反应速率、 V_{\max} 为最大反应速度、 $[S]$ 为柠檬苦素浓度、 K_m 为反应速率达到最大速率一半时柠檬苦素的浓度,即米氏常数。

各种属酶动力结果见图4。在HLMs、DLMs、PLMs、RLMs、MIMs代谢体系中,柠檬苦素在浓度较低时,代谢速率随柠檬苦素浓度的升高而呈线性增长;当柠檬苦素浓度较高时,反应速率接近最大速率,随柠檬苦素浓度升高而变化不大,符合经典酶促反应米氏曲线。Eadie-Hofstee图可以检测是否有多种酶参与了酶促反应。弯曲的Eadie-Hofstee图表示有多种酶参与了代谢反应,而直线图则表示单一酶或两种具有相似 K_m 值的酶参与了反应^[16]。

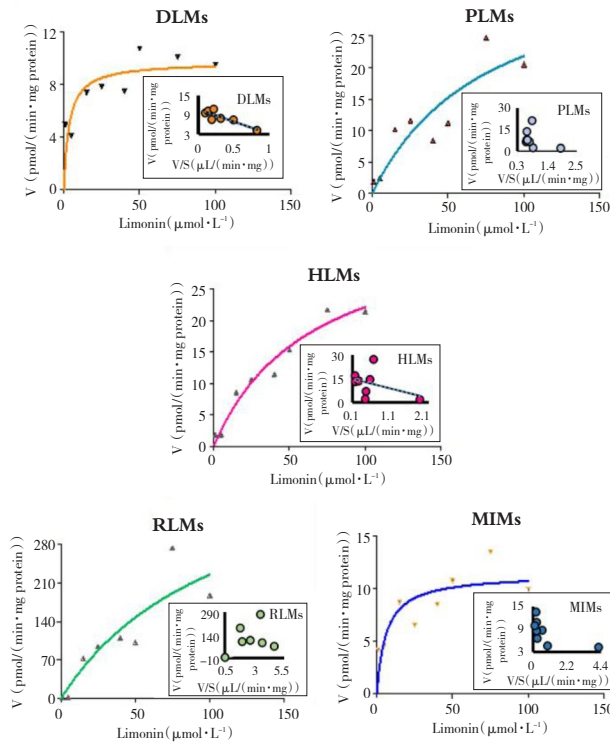


图4 各种属LMs中M1的经典酶促反应动力学米氏图和Eadie-Hofstee图

Fig.4 Michaelis-Menten diagram and Eadie-Hofstee diagram (V-V/S) of enzymatic reaction kinetics of M1 in liver microsomes of various genera

在相同实验条件下,犬、猪、大鼠、小鼠肝微粒体与HLMs相比较,产生M1的酶对柠檬苦素体外固有清除率的种属差异无统计学意义($n=3, P>0.05$)。

2.9 HPLC-MS推测代谢产物^[17]

一级质谱显示M1的 m/z 为473.2070,柠檬苦素的 m/z 为470.381。柠檬苦素和代谢产物M1的二级质谱图如图5。查阅文献发现柠檬苦素的裂解过程如图6,推测M1为C-16位上内酯环上的羰基还原成羟基。

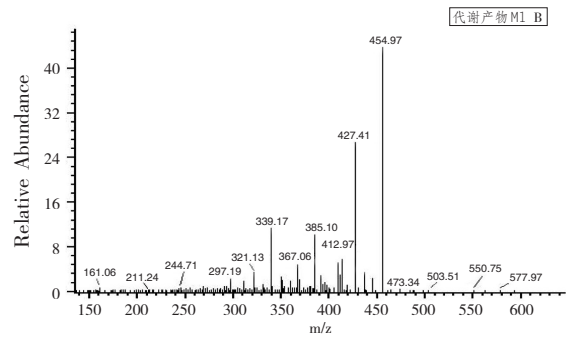


图5 柠檬苦素及代谢产物M1的二级质谱图
Fig.5 Secondary mass spectra of limonin and metabolites M1

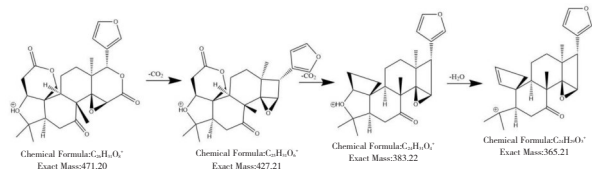


图6 柠檬苦素二级质谱裂解过程
Fig.6 Cleavage of limonin by secondary mass spectrometry

3 讨论

3.1 柠檬苦素标准曲线范围的选择

柠檬苦素作为酶催化反应的底物,一般底物剩余量按1/5计算^[18],酶促反应动力学实验柠檬苦素终浓度为1~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,因此标准曲线范围选择0.21~21.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 孵育时间对酶促反应的影响

酶促反应动力学的速度应为反应的初速度,反应时间应在底物消耗15%以前。我们对孵育时间做了考察,发现10 min满足底物封面减少15%的要求,且可见代谢产物。所以选择孵育时间为10 min。

3.3 肝微粒体蛋白浓度对代谢产物生成的影响

肝微粒体蛋白浓度一般选择0.1~1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。蛋白浓度过大,会对底物产生吸附作用^[9],蛋白浓度过低,会使底物反应不完全。通过对肝微粒体蛋白浓度的考察发现0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 肝微粒体蛋白浓度为柠檬苦素最适宜蛋白浓度。

3.4 酶促反应动力学研究的意义

酶促反应动力学研究酶对底物的亲和力(K_m ,单位用浓度单位 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示)和酶促反应的最大反应速率 $[V_{\text{max}}$,单位用 $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$ 表示]。 K_m 值越小代表酶对底物的亲和力越高。然而,肝微粒体酶不是单酶,是混合酶,其 K_m 值代表

肝微粒体混合酶对柠檬苦素催化的总体效果;V_{max}值越高说明单位时间单位酶蛋白浓度时,底物被清除的量越大。肝微粒体对柠檬苦素的清除率等于V_{max}除以K_m,表示肝微粒体对底物的清除的速率。通过转化公式,我们可以通过肝微粒体清除率推测体内肝脏对底物的清除率。例如,柠檬苦素的体内肝脏清除率公式为^[20]:

$$CL_{\text{int in vitro}} = \sum_{i=1}^n \frac{V_{\text{max}(Li)}}{K_{m(Li)}} \quad , \quad CL_{\text{int in vivo}} = CL_{\text{int in vitro}} \cdot SF、$$

$CL_{\text{H}} = \frac{Q_{\text{H}} \cdot f_u \cdot CL_{\text{int in vivo}}}{Q_{\text{H}} + f_u \cdot CL_{\text{int in vivo}}}$ 。其中SF是每克肝脏微粒体蛋白含量乘以肝脏重量;CL_H是肝脏清除率;f_u是血液中的未结合分数(由于缺乏柠檬苦素的数据,f_u的值设为1);Q_H是肝脏中的血流量;Li是柠檬苦素的代谢产物。计算内在清除率的生理参数如下。犬、大鼠和人肝脏重量分别为32、40和25.7 g·kg⁻¹;微粒体蛋白含量分别为77.9、44.8、48.8 mg·g⁻¹;肝脏血流量分别为30.9、55.2、20.7 mL·(kg·min)⁻¹。

在本文研究中,M1是HLMs中检测到的代谢产物,其同样存在于DLMs、PLMs、RLMs、MIMs代谢组。当蛋白浓度、孵育时间等条件一定时,酶对底物的亲和力是酶的特性,不会改变。如果其他种属的LMs与HLMs对柠檬苦素代谢相似,则K_m应该与HLMs的K_m相似。通过实验发现,柠檬苦素在PLMs中代谢谱图、代谢率、酶促反应的V_{max}、K_m以及体外固有清除率与HLMs较相似,其次为DLMs。非啮齿类动物中,MIMs与HLMs代谢图谱相似,CL_{int}与HLMs相近。与MIMs相比,RLMs对柠檬苦素的代谢率与HLMs更相近,但是RLMs中产生了HLMs中没有的代谢产物M2、M3。此外,有研究证明,柠檬苦素在大鼠体内代谢存在性别差异^[21]。以大鼠为实验动物时,应结合以上情况,判断柠檬苦素的药效学和毒理学结果。

参考文献

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典2020年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:178
 [2]魏舒婷,刘元乾,黄坚,等.吴茱萸化学成分、药效及肝毒性的研究进展[J].世界中医药,2020,15(23):3580-3585+3592
 [3]陈洋,董嘉皓,李斐,等.吴茱萸毒性概述与思考[J].时珍国医国药,2017,28(9):2215-2217
 [4]朱兰兰,黄伟,黄幼异,等.基于功效和物质基础的吴茱萸

毒性研究思考[J].中国药物警戒,2011,8(6):366-369
 [5]湖南省卫生厅.湖南省中药材炮制规范[S].长沙:湖南科学技术出版社,1983:136
 [6]北京市公共卫生局.北京市中药饮片切制规范(下册)[S].北京:人民卫生出版,1974:70
 [7]王鹏,赵芳菲,陈俊潘,等.不同比例甘草炮制吴茱萸毒性剂量下对小鼠肝脏氧化应激及自噬影响的比较[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(16):188-196
 [8]张敏.甘草炮制降低吴茱萸肝毒性的物质基础与作用机理研究[D].南昌:江西中医药大学,2022
 [9]王亮,孙凯滨,吴晓文,等.吴茱萸水煎液肝毒质量标志物确认研究[J].中草药,2019,50(19):4547-4555
 [10]尹利顺,孙蓉.吴茱萸挥发油化学成分与药理毒理研究进展[J].中国药物警戒,2016,13(3):162-164
 [11]Zhang W, Wang M, Song H, et al. CYP3A4 inducer aggravates big flower Evodiae Fructus-induced hepatotoxicity whereas limonin attenuates its hepatotoxicity[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 264: 113277
 [12]周璐,姚广涛,曹智丽,等.吴茱萸水煎液致小鼠肝毒性机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(22):269-272
 [13]Shan L, Shi X, Hu T, et al. In vitro differences in toddalolactone metabolism in various species and its effect on cytochrome P450 expression[J]. Pharm Biol. 2022, 60(1):1591-1605
 [14]何文娟,刘秀菊,孙倩,等.瑞格列奈在人肝微粒体中的酶促反应动力学及葛根素对其代谢的影响[J].中南药学,2022,20(10):2242-2246
 [15]Shan L, Zhang G, Guo Z, et al. In vitro investigation of permeability and metabolism of licoricidin[J]. Life Sci. 2019, 234: e116770
 [16]上海药明康德新药开发有限公司译.药物代谢动力学技术在药物设计和开发中的应用[M].北京:科学出版社,2020:187-188+200-201
 [17]田显庭,董馨,张秀艳,等.基于HPLC-Q-Exactive MS/MS的二味杜仲汤血浆成分研究[J].内蒙古医科大学学报,2022,44(1):1-7+22
 [18]胡巧红.生物药剂学与药物动力学实验[M].北京:科学出版社,2019:32-38
 [19]钟大放,刁星星,田倩倩,等.创新药物代谢和药动力学研究[M].北京:科学出版社,2021:61-47
 [20]胡婷婷.细辛脂素体外代谢的种属差异及其对细胞色素P450酶活性的作用[D].锦州:锦州医科大学,2021
 [21]李雪敏,龚倩倩,郑振兴,等.柠檬苦素在大鼠体内代谢产物与代谢途径的UHPLC-Q-Orbitrap HRMS分析[J].中国实验方剂学杂志,2023:1-8