

大鼠肝微粒体中有机锡抗癌化合物 DBDCT 的测定与酶促动力学研究

平耀东, 张丽锋, 李青山^{*} (山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 建立测定大鼠肝微粒体中有机锡抗癌化合物 DBDCT 的方法并研究其相应的酶促动力学。方法 采用 HPLC 测定 DBDCT 在体外代谢系统中的酶促动力学, 用 Eadie-Hofstee 法分析数据, 求算酶促动力学参数 K_m 和 V_{max} 以及肝代谢速率 C_{lin} 。结果 在体外代谢系统中, DBDCT 代谢酶促动力学参数 $K_m=159.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{max}=2.813 \mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ 以及肝清除率 $C_{lin}=V_{max}/K_m=0.017 \text{ L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ 。结论 此分析方法符合方法学验证要求且简单准确, 可满足 DBDCT 体外代谢的研究。

关键词: DBDCT; 高效液相色谱法; 大鼠肝微粒体; 酶促动力学

中图分类号: R954.2; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0571-04

基金项目: 国家自然科学基金(30772682); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-104)

作者简介: 平耀东, 男, 硕士生 Tel: (0351)4135243 E-mail: pingyaodong@hotmail.com ^{*}**通信作者:** 李青山, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0351)4690322 E-mail: qingshanl@yahoo.com

中国现代应用药学 2010 年 7 月第 27 卷第 7 期

Chin JMAP, 2010 July, Vol.27 No.7

• 571 •

Determination of Antitumor Diorganotin Compound DBDCT in Rat Liver Microsomes by HPLC and Its Enzymatic Kinetics

PING Yaodong, ZHANG Lifeng, LI Qingshan* (School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of an antitumor diorganotin(IV) compound DBDCT and study its enzymatic kinetics in rat liver microsomes. **METHODS** HPLC was employed to determine the enzyme kinetics of DBDCT *in vitro* metabolic system using the rat liver microsomes. The kinetic parameters, K_m , V_{max} and liver clearance rate (V_{max}/K_m) were calculated by Eadie-Hofstee plot. **RESULTS** In the metabolic system, the enzyme kinetics parameters of DBDCT were found as follows: $K_m=157.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{max}=2.189 \mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$ and liver clearance rate $V_{max}/K_m=0.014 \text{L}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** The method is satisfied to the requirement of methodological verification, and it is simple, accurate and can be used for the *in vitro* metabolism research of DBDCT.

KEY WORDS: DBDCT; HPLC; rat liver microsomes; enzymatic kinetics

药物进入生物体内后,与不同的酶相互作用,转化为活性或非活性的代谢物,从而显示药物的药理、毒理性质。因此,在药物设计、开发早期进行药物代谢研究将有助于获得安全有效的药物。DBDCT[二-(4-氯苯甲酰异羟肟酸)二正丁基合锡]是一种全新结构有机锡类抗癌化合物,前期研究结果表明,DBDCT 有较高的抗癌活性,体内排泄试验提示进入机体的有机锡化合物 DBDCT 可能主要经肝微粒体酶系脱烷基化^[1-2]。许多研究资料表明,一些药物既是酶的底物又是酶的诱导剂或抑制剂,用药过程中,这些药物可能因药酶的诱导或抑制作用发生药物相互作用,结果导致药物失活或产生不良反应,因此在新药临床前研究中确证药物与体内酶系统的相互介导作用十分重要^[3]。本试验建立了 HPLC 测定大鼠肝微粒体中的 DBDCT,并研究其在大鼠肝微粒体中的酶促动力学,为进一步阐明 CYP450 酶系统对 DBDCT 体外代谢的介导作用提供了研究基础。

1 仪器与材料

Waters 2695型高效液相色谱仪、2996型二极管阵列检测器(Waters公司);Empower色谱工作站;Hitach 20PR-52D低温高速离心机(日立公司)。

DBDCT对照品(由本课题组按文献[4]方法合成,3次重结晶,纯度 $\geq 99\%$);还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)(Roche公司);甲醇为色谱纯,水为自制重蒸水,其他试剂均为分析纯。

SD大鼠[体重230~260 g,♂,山西医科大学实验动物中心,实验动物合格证号:晋动(证)字第090101]。

2 方法与结果

2.1 大鼠肝微粒体的制备^[5]、蛋白及 CYP450 含量测定

SD 大鼠 6 只,禁食 16 h 后断头处死,开腹迅速取出肝脏,用滤纸吸干后称重,立即于冰蔗糖溶液中清洗,剪碎,反复洗至无色,加 4 倍重量的 Tris-HCl 缓冲液于冰浴中研磨成匀浆 4℃离心($4\,000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 20 min,上清液 4℃离心($30\,000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 60 min,取沉淀用 4 倍肝重的冰冷 Tris-HCl 缓冲液涡旋匀浆混悬均匀,再次 4℃离心($30\,000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 60 min,所得沉淀即为肝微粒体。用适量 Tris-HCl 缓冲液悬浮沉淀,-70℃保存备用。采用 Lowry 法^[6]测得肝微粒体悬浮液的蛋白浓度;紫外分光光度法测定 CYP450 的含量^[7]。

2.2 大鼠肝微粒体中 DBDCT 测定方法的建立

2.2.1 溶液配制 精密称取 DBDCT 对照品适量,用甲醇溶解并制成 $8.71 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液;精密量取适量,用甲醇稀释成 1 174.2, 871.0, 435.5, 174.2, 87.1, 34.8, 17.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,备用。

将肝微粒体高温灭活,并用 Tris-HCl 缓冲液(内含 $6 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.4)配制成蛋白浓度为 $1.0 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的空白温孵液。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil ODS(4.6 mm×200 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水(30:70, 用磷酸调节 pH 至 2.5);流速: $1.0 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长: 238 nm,柱温: 35℃;进样量: 20 μL 。

2.2.3 专属性试验 取肝微粒体温孵样品(加入 $43.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DBDCT)和空白温孵液,按“2.3.1”项下方法处理后测定,将 DBDCT 对照品溶液($435.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)稀释 10 倍后进样测定。色谱图见图 1。DBDCT 峰与其他峰分离良好,空白温孵液中无内源性物质干扰。

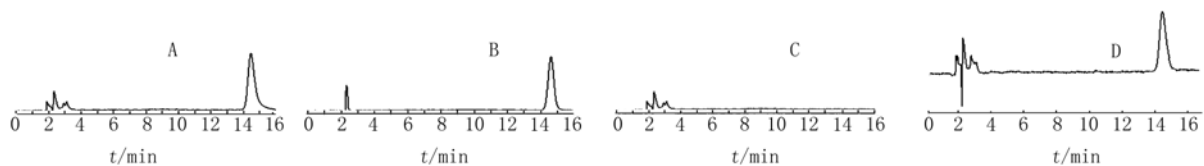


图1 DBDCT 的色谱图

A-肝微粒体温孵样品; B-DBDCT 对照品溶液; C-空白温孵液; D-肝微粒体孵育 20 min

Fig 1 Chromatograms of DBDCT

A-blank rat liver microsome incubate spiked with DBDCT; B-standard solution of DBDCT; C-blank rat liver microsome; D-microsome incubate spiked with DBDCT after 20 min

2.2.4 线性试验 在空白温孵液中加入不同浓度的 DBDCT 对照品溶液, 使 DBDCT 的浓度分别为 3.48, 8.71, 17.42, 43.55, 87.10, 174.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 按“2.3.1”项下方法处理后进样测定, 以浓度 C 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A=4\,413.1C+189.24$, $r=0.999\,1$ 。表明 DBDCT 在 3.48~174.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。测得 DBDCT 的定量限(LOQ)为 2.36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=5$, $\text{RSD}=6.76\%$), 检测限为 0.73 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2.5 回收率和精密度试验 在空白温孵液中加入不同浓度的 DBDCT 对照品溶液, 配制成低(8.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(43.55 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高(174.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度的溶液, 各 5 份, 按“2.3.1”项下方法处理后进样测定, 连续 5 d 测定, 记录 DBDCT 的峰面积, 求得回收率, 日内精密度: 选取低、中、高 3 个浓度, 在 1 d 内分别测定 5 份样品; 日间精密度: 选取低、中、高 3 个浓度各 1 份样品连续 5 d 测定并与标准曲线同时进行, 以当日标准曲线计算样品浓度, 结果见表 1。

表 1 回收率与精密度结果($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of recovery and precision ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

加入浓度 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	日内精密度 /%	日间精密度 /%
8.71	91.7 $\pm$ 6.48	6.87	2.53
43.55	93.2 $\pm$ 4.36	3.17	3.33
174.20	94.5 $\pm$ 6.34	3.96	3.44

2.2.6 稳定性试验 空白鼠肝微粒体孵育介质中加入 DBDCT 溶液, 室温放置, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 按“2.3.1”项下方法对样品进行处理, 测定 DBDCT 含量, RSD 为 5.1%, 表明样品在 12 h 内稳定。

2.3 DBDCT 在大鼠肝微粒体中的酶促动力学

2.3.1 微粒体温孵条件及孵育样品处理^[8] 微粒体混悬液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻。参考文献[8]条件, 反应体系(1.0 mL, 用 Tris-HCl 缓冲液溶解稀释)中含 NADPH 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、肝微粒体蛋白浓度为 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。每个

反应体系中加入不同浓度的 DBDCT 甲醇溶液 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡(150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)30 min, 每个样品平行温孵 2 次。取上述温孵后的反应体系 1.0 mL, 加入冰甲醇 1 mL 终止反应, 离心(4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min, 上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析。

2.3.2 孵育时间的影响 温孵体系中底物 DBDCT 的浓度为 43.55 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 肝微粒体蛋白浓度为 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 从开始振荡(37 $^{\circ}\text{C}$, 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)时计时, 分别于 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min 取样, 处理后进样测定。结果见图 2A。在 3~30 min 内, DBDCT 呈线性消除, 30~60 min 消除速率减缓, 60~120 min 几乎不再变化, 表明此时几乎被代谢完全。故本试验所选的温孵时间为 20 min。

2.3.3 蛋白浓度的影响 肝微粒体蛋白浓度为 0.25, 0.5, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, DBDCT 浓度为 43.55 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 温孵时间为 20 min 时, DBDCT 呈线性消除, 表明在 0.25~1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, DBDCT 的消除随肝微粒体蛋白浓度增加而加快。因此选择肝微粒体蛋白浓度为 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.4 底物浓度的影响 在肝微粒体温孵液中加入不同浓度的 DBDCT 对照品溶液, 使 DBDCT 的浓度分别为 8.71, 17.42, 43.55, 52.26, 87.10, 174.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡(150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)20 min。显示底物浓度为 8.71~43.55 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 反应速率随底物浓度增加而骤增, 两者呈正比; 随着底物浓度的升高, 反应速度的增幅不断下降。

2.3.5 酶促动力学 以温孵液中 DBDCT 浓度的减少量($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)除以温孵时间(min)表示 DBDCT 的代谢速率 V , $[S]$ 表示底物浓度, 根据 Eadie-Hofstee 方程 $V=V_{\text{max}}-K_{\text{m}}V/[S]$, 见图 2B。以 V 对 $V/[S]$ 采用最小二乘法进行线性回归, 得米氏常数(即直线斜率) $K_{\text{m}}=159.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最大反应速率(即纵轴的截距) $V_{\text{max}}=2.813 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和肝清除率 $C_{\text{lin}}=V_{\text{max}}/K_{\text{m}}=0.017 \text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

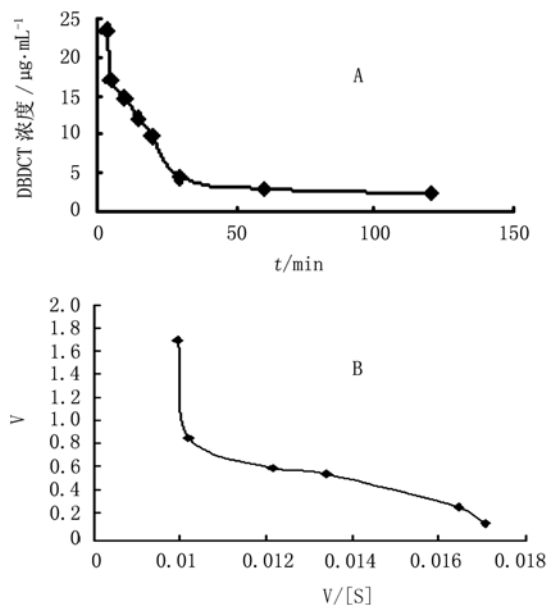


图 2 时间(A)和底物浓度(B)对 DBDCT 代谢速率的影响
Fig 2 Effect of DBDCT metabolic rate of time(A) and substrate concentration(B)

3 讨论

目前, 本课题组已经对 DBDCT 进行了体内体外抗肿瘤活性筛选, 进行了大鼠体内药物动力学研究, 结果表明其抗肿瘤活性良好, 并主要在肝脏中肝微粒体酶脱烷基作用代谢转化^[2]。本试验采用大鼠肝微粒体, 建立在大鼠肝微粒体中 DBDCT 体外代谢孵育方法, 应用高效液相色谱法测定 DBDCT 在鼠肝微粒体中的含量, 并首次研究了 DBDCT 在鼠肝微粒体的酶促动力学, 结果表明 DBDCT 在鼠

肝微粒体中代谢较快, 提示该药可能肝首过效应较强, 并得到了相关的体外动力学参数结果准确、有效, 为进一步阐明 CYP450 酶系统对 DBDCT 体外代谢的介导作用提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] LI Y L. Studies on Pharmacokinetics and Mechanism of Antitumor Di-n-butyl- (4-chlorobenzohydroxamate) Tin(IV) Chloride(DBDCT) [D]. School of Pharmaceutical Science: Shanxi Medical University, 2008.
- [2] ROSENBERG E, KMETOV V, GRASSERBAUER M. Investigating the potential high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry as an alternative method for the speciation analysis of organotin compounds [J]. Fresenius J Anal Chem, 2000, 366(4): 400-407.
- [3] YU L S, HU X Y, YAO T W. Determination of ipriflavone metabolism in rat hepatic microsomes by RP-HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2003, 20(6): 447-449.
- [4] LI Q S, DA SILVA MF, POMBEIRO A J. Diorganotin(IV) derivatives of substituted benzohydroxamic acids with a high antitumor activity [J]. Chemistry, 2004, 10(6): 1456-1462.
- [5] HE F, SU Q B, ZHAO L Z, et al. Characterization of rat cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of anticancer drug F318 [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2007, 16(10): 765-769.
- [6] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.
- [7] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. J Biol Chem, 1964, 239: 2379-2385.
- [8] SONG Z, HU Z H, CHEN Y Q, et al. Effects of anti-parasitic compound 9901 cytochrome P450 isoenzymes in dog and human [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2008, 39(1): 31-49.

收稿日期: 2009-10-10