

氧氟羧酸对映体的分离和光学纯度考察,为左氧氟沙星杂质 A 的光学纯度检测以及左氧氟沙星合成中间体的光学纯度检查提供了依据。

3 讨论

3.1 左氧氟羧酸分别在 238 和 325 nm 的波长处有最大吸收峰,但由于流动相的干扰,在 238 nm 波长处基线噪音较大,对样品的测定有很大干扰,而 325 nm 波长处几乎无干扰,因此本实验选择 325 nm 作为该方法的检测波长。

3.2 在进行方法选择时,考察了 *L*-异亮氨酸硫酸铜溶液-甲醇为流动相的色谱系统,具体色谱条件为:色谱柱 (Agilent ZORBAX Extend-C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μL); *L*-异亮氨酸硫酸铜溶液(取 *L*-异亮氨酸 1.31 g 和硫酸铜 1.5 g,加水 1 000 mL 使溶解)-甲醇 (65:35)。柱温为 40 °C,进样量 20 μL;检测波长定为 325 nm。该色谱系统同样也能够较好的拆分左氧氟羧酸及其对映体,不同的是在该色谱系统中左氧氟羧酸先出峰,与本实验中的出峰顺序恰好相反。在进行左氧氟羧酸手性鉴别时,该方法也可以作为验证方法来进一步确证左氧氟羧酸的手性。

REFERENCES

- [1] *Ch. P*(中国药典)[S]. 2010. VOL II :106.
- [2] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). *European pharmacopoeia 6th Edition* [S]. 2007. Nördlingen (German), 2007; 2541-2542.

(收稿日期:2012-05-07)

四氢小檗碱对映体在 MDCK-MDR1 细胞中的跨膜转运研究

廖跃华¹, 刘强², 乐健³, 洪战英^{2*}, 陈钧^{4*} [1. 上海医疗器械高等专科学校, 上海 200093; 2. 中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海市药物(中药)代谢产物重点实验室, 上海 200433; 3. 上海市食品药品检验所, 上海 200233; 4. 复旦大学药学院, 上海 201203]

关键词: 四氢小檗碱; 对映体; MDCK-MDR1 细胞模型; 跨膜转运

doi: 10. 11669/cpj. 2013. 11. 023 **中图分类号:** R944

文献标志码: A **文章编号:** 1001-2494(2013)11-0938-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173020)

作者简介: 廖跃华,女 研究方向:药物吸收研究 * 通讯作者:洪战英,女,博士,副教授 研究方向:生物体液药物分析 Tel:(010) 81871261 E-mail:hongzhy001@yahoo.com.cn; 陈钧,男,博士,副教授 研究方向:药物新剂型与吸收 Tel:(021)51980066 E-mail:chenjun@fudan.edu.cn

四氢小檗碱(tetrahydroberberine, *dl*-THB)来源于罂粟科紫堇属植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)的块根,属四氢异喹啉类生物碱。四氢小檗碱具有镇静、镇痛、催眠、降压等药理作用^[1]。四氢小檗碱的化学结构上有一个手性中心,图 1,研究表明,手性药物的单个对映体在体内的吸收、分布、代谢以及排泄等环节中,常因与机体内的具有高度立体特异性的生物大分子相互作用等,表现出不同的药动学特征,具有立体专一性^[2]。吸收是药物发挥药效的关键环节,在药物成分吸收研究模型中,已有利用 MDCK-MDR1 细胞模型来研究化学药物及中药活性成分吸收转运机制的报道^[3]。有关四氢小檗碱单一对映体的跨膜转运机制目前仍不明确,国内外尚未见报道相关研究。因此,本实验采用 MDCK-MDR1 细胞模型来探讨四氢小檗碱单一对映体的双向转运特性,对深入研究手性药物的药理和毒理作用具有重要的意义。

1 材料

1.1 仪器

二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司);3032 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂);DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司);HZ-9201K 型台式恒温振荡器(太仓市科教器材厂);Millicell ERS 跨细胞电阻测定仪(美国 Millipore 公司);25 cm² 细胞培养瓶和 24 孔细胞培养板(美国 Corning 公司);Transwell(美国 Corning 公司,规格 24 孔,3.0 μm Polycarbonate Membrane);超纯水发生器(美国 Millipore 公司);岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪和 SPD-10Avp 型可变波长紫外检测器(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

四氢小檗碱对照品由中国药科大学提供,四氢

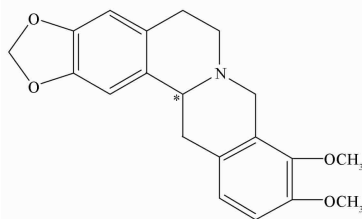


图 1 四氢小檗碱 THB 化学结构图

小檗碱单一对映体通过本实验室制备得到(纯度 > 98.5%); HEPES(Gibco 公司); HPLC 级 85% 磷酸(美国 TEDIA 公司); HPLC 级三乙胺(美国 TEDIA 公司); 含 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ *D*-葡萄糖; *L*-谷氨酰胺; $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium pyruvate 的 DMEM 培养液, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 0.25% Trypsin-EDTA, 青霉素-链霉素($10\,000 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$, 青霉素, $10\,000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 链霉素), 非必需氨基酸(nonessential amino acids, NEAA), 不含 CaCl_2 和 MgCl_2 的 PBS 缓冲液(Gibco 公司), MDCK-MDR1 细胞株购自中国医学科学院上海细胞库(原代来源于美国典型菌种保藏中心 ATCC, American Type Culture Collection), 实验所用细胞代数为 35 ~ 45 代, 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 MDCK-MDR1 细胞的培养

参考相关文献[4], 首先将 MDCK-MDR1 细胞培养在 25 cm^2 细胞培养瓶中, 置于体积分数为 5% 的 CO_2 、相对湿度为 90% 的二氧化碳培养箱中培养。细胞培养所用的完全培养液: 质量分数为 10% 的胎牛血清、1% 的谷氨酰胺、1% 的青霉素/链霉素以及 90% 的 DMEM 培养液。待细胞生长稳定后, 将培养瓶中融合度达到 70% ~ 90% 的细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次, 0.25% Trypsin-EDTA 消化, 接种到 24 孔 Transwell 板上, 接种密度为 5×10^5 个细胞 $\cdot \text{cm}^{-2}$ 。接种 24 h 后更换新的培养液。大约一个星期后, 用跨细胞电阻测定仪测定其跨膜电阻值, 如果跨膜电阻值大于 $300 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$, 则证明其已经形成细胞单层, 此时可以进行药物转运实验[5]。

2.2 HPLC 测定四氢小檗碱单一对映体的含量

色谱柱为 Welch Materials XD-C₁₈ 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$); 流动相为 0.1% 磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 5.0)-乙腈(30:70); 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温室温; 检测波长 230 nm; 进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

线性关系: 配制质量浓度为 1、2.5、5、10、 $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 (+)-THB 和 (-)-THB 对照品溶液, 以待测物质峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程。

2.2.1 回收率 配制 2.5、5、 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的 (+)-THB 和 (-)-THB 溶液, 以测得的浓度与已知浓度之比计算回收率, 测得其低、中、高 3 个浓度的回收率。

2.2.2 日内和日间精密度 配制 2.5、5、 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} 的低、中、高 3 个质量浓度 (+)-THB 和 (-)-THB 溶液, 每个浓度平行测定 6 次, 计算日内精密度的 RSD 值。配制 2.5、5、 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的 (+)-THB 和 (-)-THB 溶液, 每份样品测定 3 次, 连续 3 d 用同台仪器及当日的标准曲线进行测定, 求得日间精密度的 RSD 值。

2.2.3 稳定性 配制 2.5、5、 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个质量浓度的 (+)-THB 和 (-)-THB 溶液, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的环境中, 分别于 0、1、2、4 h 取样测定, 测得 3 个浓度样品含量的 RSD 值。

2.3 MDCK-MDR1 细胞模型双向转运实验

取符合转运实验的 Transwell 板, 吸弃旧的培养液, 加入无菌 HEPES 溶液洗 3 次, 同时测定 THB 单一对映体从 MDCK-MDR1 细胞单层顶端(apical, A)到基底端(basolateral, B) A→B 和从基底端到顶端(B→A)的转运情况。A→B 的测定, 将 $100 \text{ } \mu\text{L}$ $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 THB 单一对映体加到膜顶端作为供给池, $600 \text{ } \mu\text{L}$ 空白 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES 溶液加到基底端作为接收池; B→A 的测定, 将 $600 \text{ } \mu\text{L}$ 的 THB 单一对映体加到膜基底端作为供给池, $100 \text{ } \mu\text{L}$ 空白 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES 溶液加到顶端作为接收池。将 Transwell 板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温摇床上振荡, 取接收池中的样品溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ (对于 B→A 方向而言) 或 $600 \text{ } \mu\text{L}$ (对于 B→A 方向而言), 同时用空白的 HEPES 溶液补足, 以样品与甲醇(1:4, V/V) 沉淀蛋白, 涡旋, 离心, 取上清液进样, 按“2.2”项下的 HPLC 色谱条件测定 THB 单一对映体的浓度。采用下述公式计算 THB 单个对映体经 MDCK-MDR1 细胞单层的表观渗透系数 P_{app} ($\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$):

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times c_0)$$

式中 dQ/dt 为单位时间药物转运量; A 为转运膜面积; c_0 为 THB 单个对映体初始浓度。

外排率的计算公式: $\text{Efflux} = P_{\text{app}}(\text{B} \rightarrow \text{A}, \text{without inhibitor})/P_{\text{app}}(\text{A} \rightarrow \text{B}, \text{without inhibitor})$;

参考相关文献[6], 当 $P_{\text{app}} < 100 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, 表现为低渗透性; 当 $100 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1} < P_{\text{app}} < 200 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 表现为中等渗透性; 当 $P_{\text{app}} > 200 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 表现为高渗透性。

3 结果

3.1 HPLC 方法学评价结果

在“2.2”项色谱条件下空白 HEPES 溶液, 对照品溶液以及跨膜转运实验样品的色谱图见图 2,

THB 单个对映体的保留时间约为 8.0 min。

3.1.1 线性关系 (+)-THB 和(-)-THB 的标准曲线方程分别为: $y = 35\ 565x - 3\ 684.5$, $r = 0.999\ 5$ 和 $y = 32\ 425x + 6\ 464.1$, $r = 0.999\ 6$ 。结果表明, (+)-THB 和(-)-THB 在 $1 \sim 25\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

3.1.2 回收率 测得(+)-THB 和(-)-THB 低、中、高 3 个浓度的回收率分别为 100.1%、99.5%、98.7% 和 97.8%、104.6%、101.1%。

3.1.3 日内和日间精密度 (+)-THB 和(-)-THB 低、中、高 3 个浓度样品日内精密度的 RSD 值分别为 1.2%、1.8%、1.8% 和 0.9%、1.7%、1.6%；日间精密度的 RSD 值分别为 0.7%、1.5%、1.3% 和 0.6%、1.7%、1.7%，符合含量测定的要求。

3.1.4 稳定性 (+)-THB 和(-)-THB 3 个浓度样品含量的 RSD 值分别为 0.9%、1.8%、1.3% 和 0.5%、1.8%、1.5%，表明该样品在 37℃ 下 4 h 内稳定。

3.2 THB 单一对映体在 MDCK-MDR1 细胞中膜渗透性

THB 单个对映体在 MDCK-MDR1 细胞模型中的双向转运的表观渗透系数和外排率见表 1。由表 1 可以看出, THB 单个对映体的表观渗透系数从 A→B 和 B→A 两个方向而言, 均小于 $200\ \text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$, 因此 THB 单个对映体是低渗透性的药物。其外排率均大于 2, 推测 THB 单个对映体在 MDCK-MDR1 细胞中膜渗透性涉及到主动转运机制; 此外, (-)-THB 的外排率大于(+)-THB, 但没有显著性差异, 因此 THB 对映体在 MDCK-MDR1 细胞中的跨膜转运中存在一定的立体选择性。

4 讨论

MDCK-MDR1 细胞随着培养时间的增加, 在形

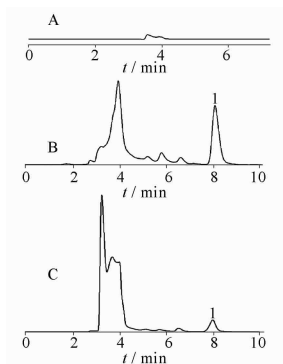


图 2 跨膜转运实验中 THB 单一对映体的 HPLC 图

A - 空白 HEPES 溶液; B - THB 单一对映体对照品溶液; C - 跨膜转运实验样品; 1 - THB 单一对映体

表 1 THB 单一对映体跨膜转运结果. $n = 3, \bar{x} \pm s$

组别	表观渗透系数/ $\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$		外排率 [$P_{\text{app}}(B \rightarrow A)$]
	A→B	B→A	/ $P_{\text{app}}(A \rightarrow B)$]
(+)-THB	1.27 ± 0.8	4.67 ± 0.4	3.7 ± 0.6
(-)-THB	1.27 ± 0.4	5.65 ± 0.6	4.5 ± 0.4

态结构方面会发生很大的变化, 经过 7 d 的培养后, 分子层结构具有极性特征。细胞模型是否成功建立主要从细胞单分子层的完整性和细胞内外生理结构等方面来进行评价。本实验主要是通过测定 Millicell™ 膜的 TEER 值, 以检测细胞单分子层的完整性。实验前经测定, TEER 值约为 $500\ \Omega \cdot \text{cm}^2$, 一般来说, 细胞种类、种植密度及培养条件都会影响 TEER 值, 然而, 一般认为 TEER 值大于 $300\ \Omega \cdot \text{cm}^2$ 即表示细胞已形成致密的单分子层, 本实验中 MDCK-MDR1 细胞培养 7 d 后, 测得 TEER 值约 $500\ \Omega \cdot \text{cm}^2$, 可以进行药物转运实验。

THB 单一对映体在 MDCK-MDR1 细胞中的膜渗透性的实验结果, 说明了其可能涉及到载体的作用, 究竟是何种载体在这个过程中起作用, 还需要进一步的实验。据相关文献^[7]报道, P-糖蛋白(P-gp)底物的结构特点具有疏水性, 脂溶性和弱极性, 而多药耐药相关蛋白 2(MRP2)识别的底物多数具有苯环的羟基或羧基, 从 THB 单一对映体的结构而言, 具有脂溶性和疏水性, 因此, 需进一步采用相应转运体专属抑制剂实验, 以确证 THB 单一对映体究竟是否为 P-gp 或 MRP2 的底物, 以及是否存在立体选择性差异。

REFERENCES

- JIN G Z, TANG X C, XU B. Studies on the pharmacological actions of corydalis VIII, relevance of chemical structures and pharmacological effects of tetrahydropalmatine analogs[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1962, 9(8):487-498.
- TAO L, LIU H, ZHONG B H. Chiral switch: Single enantiomer drugs from racemates [J]. *Chem Reagents* (化学试剂), 2008, 30(12):903-907.
- HE L, YANG J Y, HU L N. Transmembrane transport activity of paclitaxel regulated by fangchinoline in MDR1-MDCK II cells [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35(11):1478-1480.
- TRAN T T, ADITYA M, TRACY G, et al. Exact kinetic analysis of passive transport across a polarized confluent MDCK cell monolayer modelled as a single barrier [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(8):2108-2123.
- DONNA A V. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(2):713-720.
- ZHANG C Y, WANG D K, CUI W Q, et al. Determination of passive permeability of ML120B using MDCK-hMDR1 cell culture [J]. *Chin J Pharm* (中国药理学杂志), 2009, 7(5):404-406.
- WANG J R, WANG P, YANG Y M, et al. Intestinal absorption of aloe-emodin using single-pass intestinal perfusion method in rat [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(17):2393-2397. (收稿日期:2012-05-15)