

厚朴提取物 HK-1 在 5 个种属肝微粒体中的代谢

李小彬^{1,2}, 王海蓉^{1,2}, 杨楸楠^{1,2}, 汤明海², 万 丽^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 研究厚朴抗炎有效成分 (*E*)-5-allyl-3'-(prop-1-enyl) biphenyl-2, 4'-diol (HK-1) 在人、大鼠、比格犬、猴和小鼠的肝微粒体中的代谢稳定性, 确定 HK-1 在大鼠肝微粒体中代谢表型。**方法** 将 HK-1 在 5 个种属肝微粒体中孵育, 采用 UPLC-MS/MS 检测方法, 通过测定 HK-1 的剩余浓度, 考察它们的代谢稳定性并外推其体内代谢清除率。化学抑制剂法鉴定在大鼠肝微粒体中 HK-1 的代谢表型。**结果** HK-1 在人、大鼠、比格犬、猴和小鼠 5 个种属肝微粒体中半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 9.04、7.36、2.17、4.94、18.09 min; 肝微粒体中固有清除率 CL_{int} 分别为 153.40、188.20、639.02、280.60、76.60 mL/(min · mg 蛋白); 体内固有清除率 CL'_{int} 分别为 151.87、338.76、949.21、416.69、301.61 mL/(min · kg)。在大鼠肝微粒体中 HK-1 主要被细胞色素 CYP2E1、CYP2C、CYP1A2 催化代谢。**结论** HK-1 在肝微粒体中由多种酶代谢且代谢很快, 其中人肝微粒体和大鼠肝微粒体中半衰期和固有清除率相似, 可将大鼠肝微粒体预估人肝微粒体不良反应的风险。

关键词: (*E*)-5-allyl-3'-(prop-1-enyl) biphenyl-2, 4'-diol (HK-1); 肝微粒体; CYP450; 代谢稳定性; 代谢表型; UPLC-MS/MS

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)04-0723-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.002

Investigation of metabolism of HK-1 isolated from *Magnolia officinalis* in liver microsomes

LI Xiao-bin^{1,2}, WANG Hai-rong^{1,2}, YANG Qiu-nan^{1,2}, TANG Ming-hai², WAN Li^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the metabolic stability of (*E*)-5-allyl-3'-(prop-1-enyl) biphenyl-2, 4'-diol (HK-1) isolated from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. in human, rat, Beagle dog, monkey and mouse liver microsomes and to determine cytochrome P450 (CYP450) inhibitory potential of HK-1. **METHODS** The concentrations of HK-1 were measured by a UPLC-MS/MS method to evaluate the metabolic stability of HK-1. The CYP450 phenotyping of HK-1 was identified by specific inhibitors of isoforms in rat microsomal incubation system. **RESULTS** HK-1 could be metabolized in human, rat, Beagle dog, monkey and mouse liver microsomes. The corresponding half-life $t_{1/2}$ were 9.04, 7.36, 2.17, 4.94, and 18.09 min; intrinsic clearance (CL_{int}) were 153.40, 188.20, 639.02, 280.60, and 76.60 mL/(min · mg protein); intrinsic clearance (CL'_{int}) were 151.87, 338.76, 949.21, 416.69, and 301.61 mL/(min · kg), respectively. CYP2E1, CYP2C and CYP1A2 were found to be the major CYP isoforms involved in HK-1 metabolism. **CONCLUSION** HK-1 could be metabolically eliminated in a short amount of time and by multiple enzymes. Its metabolism is similar between human and rat liver microsomes. Therefore further study with rat liver microsomes can be used as a good indicator of the risks

收稿日期: 2015-08-31
基金项目: 十二五重大新药创制 (2012ZX09103101-066)
作者简介: 李小彬 (1989—), 女, 硕士生, 研究方向为中药质量标准。Tel: 15108204061, E-mail: binbinyougeli@163.com
* 通信作者: 万 丽 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量标准。Tel: 15982418713, E-mail: wanli8801@163.com

involved with human liver microsomes.

KEY WORDS: (*E*)-5-allyl-3'-(prop-1-enyl) biphenyl-2, 4'-diol (HK-1); liver microsomes; CYP450; metabolic stability; metabolic phenotyping; UPLC-MS/MS

从木兰科植物厚朴 (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.) 根茎和根皮中提取分离出的抗炎有效成分 (*E*)-5-allyl-3'-(prop-1-enyl) biphenyl-2, 4'-diol, 属于联苯型木脂素类化合物, 是和厚朴酚 (honokiol, HK) 的同分异构体, 本研究暂将其命名为 HK-1, 结构式见图 1^[1]。HK-1 主要通过抑制超氧阴离子的产生和弹性蛋白酶的释放, 以及抑制环氧合酶 COX-1、COX-2 与 5-脂氧合酶 (5-LOX) 介导的白三烯 B₄ (LTB₄) 形成而达到抗炎活性, 其对 COX-1、5-LOX 介导的 LTB₄ 形成的抑制能力比和厚朴酚更强^[1-2]。鉴于 HK-1 较强的抗炎活性, 对其进行研究具有重要意义。

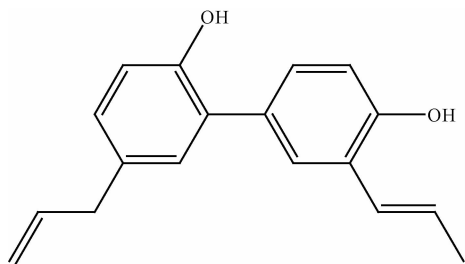


图 1 HK-1 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of HK-1

药物进入体内后主要在肝脏代谢, 而细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 enzyme, CYP450) 是肝代谢药物的主要酶系^[3]。肝微粒体含有肝脏表达的所有参与药物代谢的 CYP450 酶, 且其易得到, 可长期保存, 代谢时间短, 因此利用肝微粒体模型研究药物与 CYP450 酶系的关系应用较为普遍。而目前国内尚无 HK-1 体外代谢的相关报道, 本实验旨在研究 HK-1 在人、大鼠、犬、猴和小鼠肝微粒体中的代谢稳定性并外推其体内代谢清除率, 以及在大鼠肝微粒体中参与其代谢的酶表型, 为进一步研究该药的代谢性相互作用和临床前研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 三重四极杆质谱 (MS) (Waters xevo TQD), 购自美国 Waters 公司; 超高效液相色谱 (UPLC) 系统, 包括溶剂系统 (Waters Quaternary Solvent Manager)、进样系统 (Waters Sample Manager FTN)、色谱柱 (Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱, 2.1 mm × 100 mm 1.7 μm); 数据处理

软件 (Waters MassLynx V4.1 Software), 购自美国 Waters 公司; 天平 (AUW120D, Max: 120 g/42 g, d = 0.1 mg/0.01 mg), 购自日本岛津公司; 低温冷冻离心机 (Thermo Heraeus Fresco 17), 购自 Thermo Scientific 公司; 恒温水浴锅 (DF-101S), 购自郑州汇成科工贸有限公司。

1.2 药品与试剂 HK-1 (由四川大学生物治疗国家重点实验室提供, 纯度达 99.5%); 大黄酚 (批号 110796-200005) 购自中国食品药品检定研究院, 用作内标 (IS); 人肝微粒体 (HLM)、SD 大鼠肝微粒体 (RLM)、Beagle 犬肝微粒体 (DLM)、猴肝微粒体 (MLM)、小鼠肝微粒体 (MouLM)、NADPH 发生系统 (A 液、B 液), 购自武汉普莱特生物医药技术有限公司, 于 -80 °C 冷冻保存; α-萘黄酮 (ANF, 东京化成工业株式会社); 盐酸噻氯匹定 (TCP, 中国食品药品检定研究院); 奎尼丁 (QND, TCI 上海化成工业发展有限公司); 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDTC)、酮康唑 (KCZ, 德国 Dr Ehrenstorfer 公司); 甲醇为色谱纯; 水为纯化水; 其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 液相条件 Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-1 mmol/L 乙酸铵 (90:10) 等度洗脱, 体积流量为 0.2 mL/min, 进样时间为 3.5 min; 柱温 30 °C; 样品室温度为 10 °C; 进样体积 5 μL。

2.1.2 质谱条件 本实验采用 Quattro Premier XE™ 串联四极杆质谱仪的电喷雾离子源 (ESI⁺), 毛细管电压为 2.8 kV, 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 锥孔电压 40 V, 碰撞能量 30 eV, 萃取锥孔气 40 L/hr, 脱溶剂气 600 L/hr。多反应离子监测 (MRM) 模式, HK-1 及内标大黄酚离子对分别为 *m/z* 265.20 → *m/z* 223.20 和 *m/z* 253.20 → *m/z* 225.20。

2.2 HK-1 在各种属肝微粒体中的代谢稳定性 孵育体系总体积为 200 μL, 包含 K₂HPO₄ 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 和各种属肝微粒体 (蛋白含量 0.5 mg/mL), 冰浴上加入 HK-1 (终浓度为 1 μmol/L, 反应体系中甲醇体积分数 < 1%) 后在

37 ℃ 预孵育 5 min, 加入 NADPH 发生系统 (A 液和 B 液于冰浴上临时混合制得) 启动反应。在 37 ℃ 水浴振荡器中继续孵育 0、1、2、3、5、10、20 min 后, 立即加入 400 μL 含大黄酚 (300 ng/mL) 的冰甲醇溶液终止反应, 涡旋 3min, 离心 (4 ℃, 13 000 r/min) 15 min, 取上清液 5 μL 进样。

2.3 HK-1 在 RLM 中的代谢表型研究 首先确定成线性代谢的孵育时间、蛋白质量浓度和底物浓度。在上述孵育体系中加入不同肝微粒体蛋白质量浓度 (0.1 ~ 0.7 mg/mL) 和系列浓度的 HK-1 (0.1、0.5、1、2、5、15 μmol/L), 同法孵育 5 min, 检测 HK-1 的剩余浓度。

采用化学抑制剂的法: 用 RLM 与各 CYP450 同工酶特异性抑制剂和 HK-1 共孵育, 通过测定各抑制剂对 HK-1 代谢的影响, 考察参与 HK-1 代谢的主要 CYP 酶。实验组: 在含 100 mmol/L K₂HPO₄ 缓冲液 (pH 7.4), 蛋白含有量为 0.5 mg/mL RLM 的孵育体系中, 加入 HK-1 (终浓度为 1 μmol/L) 和各特异性抑制剂 ANF (CYP1A2 抑制剂,

1 μmol/L)、TCP (CYP2C 抑制剂, 25 μmol/L)、QND (CYP2D 抑制剂, 10 μmol/L)、DDTC (CYP2E1 抑制剂, 50 μmol/L)、KCZ (CYP3A 抑制剂, 1 μmol/L)^[4-5], 抑制剂浓度是以其对 CYP 酶的半数抑制浓度 (IC₅₀) 或抑制常数 (K_i) 值, 并确保有足够的选择性和最大抑制能力为依据选择的^[6-8]。其他孵育条件与“2.2”项相同。同时设置未发生反应的阴性对照组 (不加 NADPH 和抑制剂) 和完全反应的阳性对照组 (不加抑制剂) 同法孵育。每组平行 3 份。

2.4 数据处理与分析 HK-1 在各种属肝微粒体的代谢稳定性试验中, 将 HK-1 的零时浓度作为 100%, 各时间点浓度与零时浓度相比得剩余百分数。各时间点的底物剩余百分数的自然对数与孵育时间经线性回归, 求得斜率 (*k*), 由式 (1) 求得 HK-1 在各种属肝微粒中的消除半衰期 *t*_{1/2}, 由式 (2)、(3)、(4)、(5) 得到肝提取率 ER, 肝微粒体中固有清除率 CL_{int}, 体内固有清除率 CL_{int}', 肝清除率 CL_H。

$$\text{消除半衰期} = \frac{-0.693}{k} \quad (1)$$

$$\text{肝提取率} = \frac{\text{肝清除率}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}]}{\text{肝血流量}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}]} \quad (2)$$

$$\text{肝微粒体固有清除率} = \frac{0.693}{\text{消除半衰期}(\text{min})} \cdot \frac{\text{孵育体积}(\text{mL})}{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})} \quad (3)$$

$$\text{体内固有清除率} = \frac{0.693}{\text{消除半衰期}(\text{min})} \cdot \frac{\text{孵育体积}(\text{mL})}{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})} \cdot \frac{\text{肝质量}(\text{g})}{\text{体质量}(\text{kg})} \cdot \frac{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})}{\text{肝质量}(\text{g})} \quad (4)$$

$$\text{肝清除率} = \frac{\text{肝血流量}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}] \cdot \text{体内固有清除率}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}]}{\text{肝血流量}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}] + \text{体内固有清除率}[\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{kg})^{-1}]} \quad (5)$$

其中人、大鼠、比格犬、猴、和小鼠的相关的理化参数如下: 肝质量/体质量 [Liver (g) / BW (kg)] 分别为 22、40、33、33 和 87.5; 肝微粒体质量/肝质量 [Microsomes (mg) / Liver (g)] 为 45; 肝血流量 (Q) 分别为 20、66、44、38、90 mL/(min · kg)^[9-11]。

在代谢表型试验中, 以待测物消除速率表示药物在肝微粒体中的代谢速率, 抑制率 = (1 - 实验组代谢速率/阳性对照组样品代谢速率) × 100% = [1 - (阴性对照组浓度 - 实验组样品剩余浓度) / (阴性对照组浓度 - 阳性对照组剩余浓度)] × 100% (设阳性对照组抑制率为 0)。采用 Graphpad prism 5.0、EXCEL 处理数据和制图, 用 SPSS statistics 17.0 统计软件对数据进行方差分析 (ANOVA), *P* < 0.05 时认为该组数据具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 方法学验证

3.1.1 专属性验证 按“2.3”项下条件, 分别制备灭活肝微粒体空白液样品、灭活肝微粒体中加内标和 HK-1 标准液样品以及实验肝微粒体孵育液样品, 进行 LC-MS 分析, 考察该方法的专属性。HK-1 与内标大黄酚达到基线分离, 分离度良好; 且在 HK-1 和内标大黄酚峰保留时间 1.68 min、2.83 min 处, 空白组未见干扰峰 (图 2), 说明内源性杂质不干扰 HK-1 的测定, 该方法专属性良好。

3.1.2 线性与范围的考察 于灭活肝微粒体中加入系列浓度的 HK-1 标准溶液, 配置成含 5、10、50、100、500、1 000、2 000 ng/mL HK-1 的肝微粒体系列样品, 进行 LC-MS 分析测定。将药物与内标的峰面积比与加入药物终浓度做线性回归, 求得 HK-1 回归方程为 *Y* = 0.002 6*X* + 0.051 1, *r*² = 0.995 3, 其线性范围为 5 ~ 2 000 ng/mL。分别配

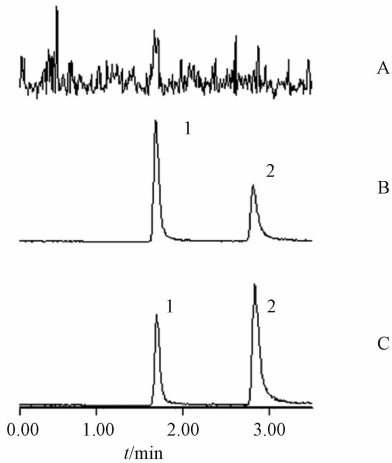


图 2 空白肝微粒体样品 (A)、灭活肝微粒体加 HK-1 (1) 和内标大黄酚 (2) 对照品 (B)、HK-1 和内标大黄酚肝微粒体孵育样品 (C) UPLC 图

Fig. 2 UPLC chromatograms of blank liver incubation (A), liver microsome spiked with HK-1 (1) and IS (2) (B) and incubation sample of HK-1 (C)

制 5、2.5、1 ng/mL 样品溶液进样，根据信噪比 $S/N \geq 10$ 、 $S/N \geq 3$ 得到最低定量限和最低检测限分别为 5、2.5 ng/mL。

3.1.3 准确度与精密度测定 于灭活肝微粒体中加入 HK-1 低、中、高 3 个质量浓度标准液，制得 15、500、1 600 ng/mL 的 HK-1 质控样品，每个质量浓度样品平行 5 份，进样分析，计算各质量浓度质控样品的回收率表示准确度。同法制备该系列质控样品并连续重复 3 d，计算日内、日间精密度，用相对标准偏差 (RSD%) 表示 (表 1)。由表 1 可知，其回收率为 95.19% ~ 101.87%，在 85% ~ 115% 范围内；日内精密密度为 3.25% ~ 7.04%，日间精密密度为 4.08% ~ 9.76%，均小于 15%，表明该方法具有较好的准确度和精密度。

表 1 HK-1 测定的准确度与精密度 (n=5)			
Tab. 1 Recovery and precision of HK-1 measurement (n=5)			
理论质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	检测质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	精密密度/ RSD%	回收率/ %
日内精密密度			
15	15.28 ± 1.08	7.04	101.87
500	475.94 ± 24.65	5.18	95.19
1 600	1 547.96 ± 50.31	3.25	96.75
日间精密密度			
15	15.21 ± 1.48	9.76	101.38
500	483.40 ± 34.13	7.06	96.68
1 600	1 537.71 ± 62.74	4.08	96.11

3.1.4 基质效应考察 肝微粒体灭活后，制得 15、500、1 600 ng/mL 的 HK-1 质控样品，同时配制含相同质量浓度的 HK-1 对照品溶液，进行 LC-MS 分析测得的峰面积分别为 A 和 B，基质效应表示为 $A/B \times 100\%$ ，基质抑制率为 $(1 - A/B) \times 100\%$ 。其基质抑制率为 2.79% ~ 4.21%，小于 15%，表明该提取方法并无基质效应。

3.2 HK-1 在各种属肝微粒体中的代谢稳定性 由 HK-1 在人、大鼠、犬、猴和小鼠肝微粒体中孵育时间和底物剩余百分数曲线 (图 3A) 可知，HK-1 在该 5 个种属肝微粒体中均有较明显代谢。将 HK-1 剩余百分数的自然对数与孵育时间经线性回归 (图 3B) 可得，HK-1 在各种属肝微粒体中 0 ~ 5 min 均呈良好的线性关系。

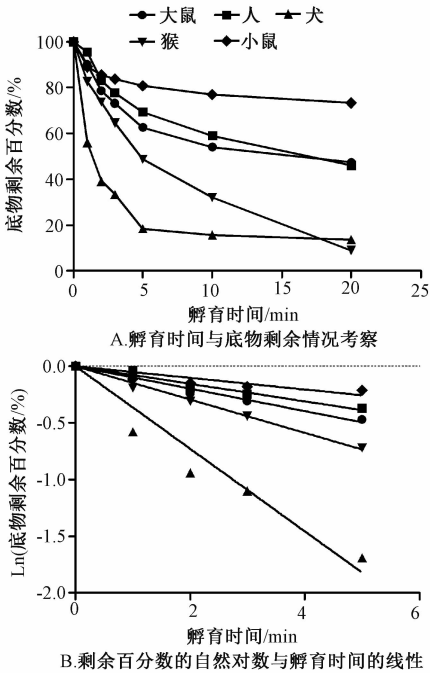


图 3 HK-1 (1 μmol/L) 在人、大鼠、犬、猴、小鼠肝微粒体中的代谢消除情况 (蛋白含有量均为 0.5 mg/mL)

Fig. 3 Metabolism of HK-1 (1 μmol/L) in human, rat, Beagle dog, monkey and mouse liver microsomes (protein concentration of 0.5 mg/mL)

在人、大鼠、犬、猴和小鼠肝微粒体中的线性回归方程分别为 $Y = -0.0767X - 0.0010$, $r^2 = 0.9679$; $Y = -0.0941X - 0.0186$, $r^2 = 0.9845$; $Y = -0.3196X - 0.1575$, $r^2 = 0.9623$; $Y = -0.1403X - 0.0218$, $r^2 = 0.9956$; $Y = -0.0383X - 0.0473$, $r^2 = 0.8155$ 。其代谢动力学参数见表 2。

表 2 HK-1 在各种属肝微粒体中代谢稳定性测定结果

Tab. 2 *In vitro* metabolic stability parameters of HK-1 in human, rat, Beagle dog, monkey and mouse liver microsomes

参数	单位	人	大鼠	犬	猴	小鼠
$t_{1/2}$	min	9.04	7.36	2.17	4.94	18.09
CL_{int}	$mL \cdot (min \cdot mg \text{ protein})^{-1}$	153.40	188.20	639.02	280.60	76.60
CL'_{int}	$mL \cdot (min \cdot kg)^{-1}$	151.87	338.76	949.21	416.69	301.61
CL_H	$mL \cdot (min \cdot kg)^{-1}$	17.67	55.24	42.05	34.82	69.32
ER	—	0.88	0.84	0.96	0.92	0.77

HK-1 在人、大鼠、犬、猴和小鼠 5 个种属肝微粒体中均代谢很快，半衰期 $t_{1/2} < 20$ min。其在人和大鼠肝微粒体中代谢情况相近， $t_{1/2}$ 分别为 9.04 min 和 7.36 min，ER 分别为 0.88 和 0.84，而在犬、猴和小鼠肝微粒体中的各代谢动力学参数 $t_{1/2}$ 、 CL_{int} 、 CL'_{int} 、 CL_H 、ER 与人的相差较大。

3.3 HK-1 在大鼠肝微粒体中代谢表型的确定 由蛋白质量浓度与底物剩余浓度、底物浓度与反应速率作图可知，HK-1 在大鼠肝微粒体中的代谢清除反应在 0.1 ~ 0.7 mg/mL 蛋白质量浓度范围内成线

性相关，在 0.1 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 底物浓度范围内成线性相关。考虑到 HK-1 代谢较快和减少蛋白结合率，最终选择 HK-1 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ ，大鼠肝微粒体蛋白质量浓度为 0.5 mg/mL，孵育时间为 5 min 进行代谢表型实验。以 Eadie-Hofstee 作图法对不同底物浓度的代谢结果进行比较，以反应速率对反应速率/底物浓度 ($v-v/[S]$) 作代谢动力学曲线图，呈现明显的“hooked”图形，表明 HK-1 不止由一种酶所催化代谢^[12]。见图 4 ~ 5。

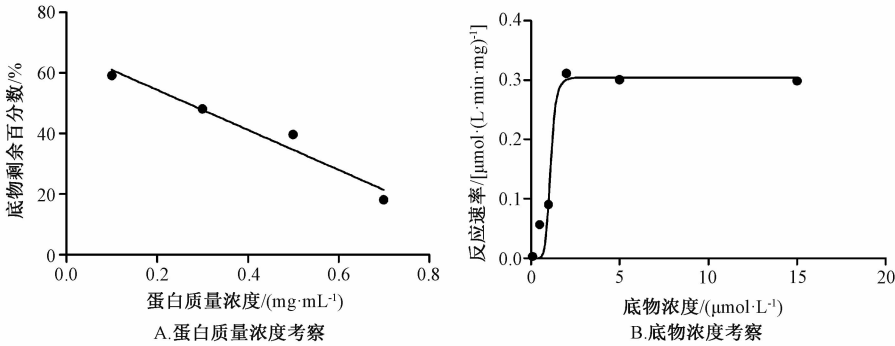
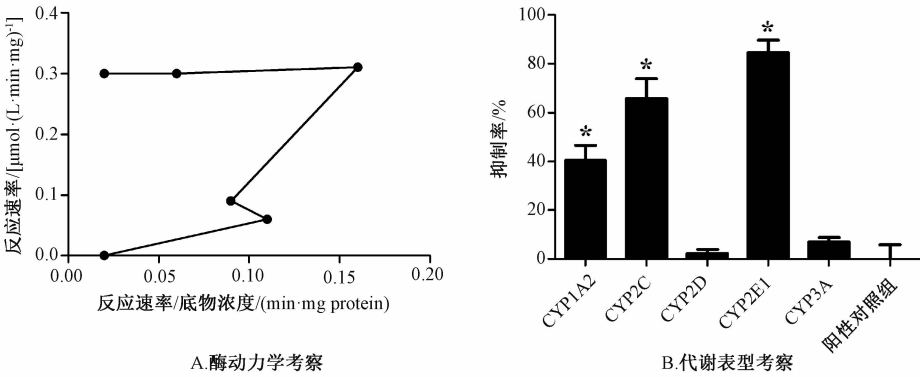


图 4 肝微粒体蛋白质量浓度及底物浓度对 HK-1 代谢的影响

Fig. 4 Effects of concentrations of protein and substrate on the metabolism of HK-1



注：与阳性对照组比较，* $P < 0.01$

图 5 HK-1 在大鼠肝微粒体中代谢的 Eadie-Hofstee 动力学曲线及各选择性抑制剂对大鼠肝微粒体代谢 HK-1 的影响
Fig. 5 Eadie-Hofstee curves of metabolism of the HK-1 in RLM and the inhibition of selective CYP inhibitors on HK-1 metabolism in RLM

化学抑制剂法中,不同酶抑制剂能对 CYP450 的各同工酶产生特异性的抑制,以此可以确定参与药物的代谢酶。各选择性 CYP450 酶抑制剂对 HK-1 在大鼠肝微粒体中代谢的影响见图 5B。与阳性对照组(抑制率为 0)相比,ANF(CYP1A2 抑制剂)、TCP(CYP2C 抑制剂)、DDTC(CYP2E1 抑制剂)能极显著抑制 HK-1 在 RLM 中的代谢($P < 0.01$),QND(CYP2D 抑制剂)和 KCZ(CYP3A 抑制剂)对 HK-1 没有明显抑制作用($P > 0.05$)。表明 CYP2E1、CYP2C 和 CYP1A2 是代谢 HK-1 的主要酶,而 CYP2D、CYP3A 没有明显参与 HK-1 的催化代谢。

4 讨论

厚朴是一味重要的传统中药, HK-1 是厚朴中抗炎的有效成分之一,而关于其体外代谢尚未见报道。本实验建立了大鼠肝微粒体中 HK-1 的 UPLC-MS/MS 检测方法,其专属性、线性、准确度和精密度以及基质效应均符合生物样品的测定要求。由肝微粒体代谢稳定性实验结果可知, HK-1 在人、大鼠、犬、猴和小鼠 5 个种属肝微粒体中均代谢很快,稳定性不好,其半衰期大小为小鼠 > 人 > 大鼠 > 猴 > 犬;肝微粒体中清除率为犬 > 猴 > 大鼠 > 人 > 小鼠;体内清除率为犬 > 猴 > 大鼠 > 小鼠 > 人;肝清除率为小鼠 > 大鼠 > 犬 > 猴 > 人;肝提取率为犬 > 猴 > 人 > 大鼠 > 小鼠。HK-1 在人、大鼠、犬和猴肝微粒体中的肝清除率与各种属对应的血流量接近,表明 HK-1 具有较高的肝提取率(0.84 ~ 0.96)^[9]。代谢稳定性实验结果也显示, HK-1 在人和大鼠肝微粒体中代谢半衰期相近,但外推至体内的各清除率差异较大,提示临床前实验数据推测临床给药方案时,要注意代谢速率的差异。

药物代谢表型研究是分析药物代谢酶和代谢相互作用的重要手段。HK-1 在大鼠肝微粒体表型实验中,根据肝微粒体代谢稳定性实验结果和蛋白质量浓度、底物浓度考察等预实验,确定最佳孵育时间、蛋白质量浓度和底物浓度。Eadie-Hofstee 作图法得到一明显的“hooked”图形,表明在大鼠肝微粒体中参与 HK-1 的代谢酶不止一个。而由化学抑制剂法结果可知,在大鼠肝微粒体中代谢 HK-1 的酶可能有 CYP2E1、CYP2C、CYP1A2,而 CYP2D、CYP3A 对 HK-1 没有明显的代谢作用。HK-1 由多种酶代谢,这将降低因体内某一种酶被诱导或抑制而导致严重不良反应

的风险。但由于种属不同而可能导致 CYP450 酶含有量和组成的差异^[13],本实验室将采用人肝微粒体和重组酶进行验证和比较,对 HK-1 进行更深入的代谢机制的研究。

参考文献:

- [1] Kuo W L, Chung C Y, Hwang T L, *et al.* Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities[J]. *Phytochemistry*, 2013, 85(2): 153-160.
- [2] Schühly W, Hüfner A, Pferschy-Wenzig E M, *et al.* Design and synthesis of ten biphenyl-neolignan derivatives and their *in vitro* inhibitory potency against cyclooxygenase-1/2 activity and 5-lipoxygenase mediated LTB₄-formation [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2009, 17(13): 4459-4465.
- [3] 李国昌,陈卫军,蒲宇红. 细胞色素 P450 酶系与药物的代谢[J]. 农垦医学, 2004, 26(1): 26-29.
- [4] 刘 倩,陈龙龙,马双成,等. 黄连碱在人肝微粒体中的代谢[J]. 中成药, 2015, 37(4): 689-693.
- [5] 温艳清,孟志云,陈淑珍,等. 力达霉素的体外代谢[J]. 药学报, 2011, 46(9): 1132-1136.
- [6] Kim H, Yoon Y J, Kim H, *et al.* Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of a new cardioprotective agent KR-33028 [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 166(2): 105-114.
- [7] Kim K B, Seo K A, Yoon Y J, *et al.* *In vitro* metabolism of a novel PPAR agonist, KR-62980, and its stereoisomer, KR-63198, in human liver microsomes and by recombinant cytochrome P450s[J]. *Xenobiotica*, 2008, 8(9): 1165-1176.
- [8] Tang J, Amin Usmani K, Hodgson E, *et al.* *In vitro* metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam[J]. *Chem Biol Interact*, 2004, 147(3): 319-329.
- [9] Jeon J S, Oh S J, Lee J Y, *et al.* Metabolic characterization of meso-dihydroguaiaretic acid in liver microsomes and in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 76: 94-102.
- [10] 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.
- [11] Pang K S, Rowland M. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a “well-stirred” model and a “parallel tube” model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance [J]. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 1977, 5(6): 625-653.
- [12] Moreira F de L, de Souza G H, Rodrigues I V, *et al.* A non-michaelian behavior of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2013, 84(5): 14-19.
- [13] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 43, 45, 52-53, 62.