

HK-5 的体外代谢研究

杨沮勤^{1,2}, 夏媛媛^{1,2}, 汤明海², 万丽^{1*}

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137;

2. 四川大学华西医学院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要:目的 考察 HK-5 在人、SD 大鼠、比格犬、小鼠和猴肝微粒体中的代谢稳定性; 测定人肝微粒体中 HK-5 代谢表型。方法 采用 LC-MS 测定 HK-5 在五个种属肝微粒体中孵育不同时间点后的剩余浓度; 在人肝微粒体中使用化学抑制剂对各 CYP 亚酶特异性抑制, 比较化学抑制剂对 HK-5 的抑制率。结果 HK-5 在 5 个种属的肝微粒体中体外代谢半衰期 ($T_{1/2}$) 分别为 42.5, 38.3, 70.7, 70.0, 60.9 min, 肝微粒体固有清除率 (CL_{int}) 分别为 0.033, 0.036, 0.020, 0.020, 0.023 $ml \cdot (min \cdot mg \text{ 蛋白})^{-1}$, 体内固有清除率 (CL'_{int}) 分别为 32.7, 64.8, 29.7, 78.8, 34.2 $ml \cdot (min \cdot mg)^{-1}$ 。HK-5 在 SD 大鼠肝微粒体和人肝微粒体代谢速率相近, 相对较快; 在猴、比格犬和小鼠肝微粒体中代谢速率相近, 均比较慢; 代谢速率存在一定的种属差异。代谢表型实验中发现 HK-5 在人肝微粒体中主要经 CYP3A4, CYP2D6 和 CYP2A6 三种亚酶催化代谢。结论 HK-5 在人和 SD 大鼠肝微粒体中有相近的 $T_{1/2}$ 和 CL_{int} , 后期体内代谢实验可选用 SD 大鼠进行研究; HK-5 由多种 CYP 亚酶代谢, 代谢性药物相互作用发生概率降低。

关键词: LC-MS; HK-5; 肝微粒体; 代谢稳定性; 代谢表型

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2017.12.015

中图分类号: R96.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2017)12-2859-03

随着新药研发的途径由天然产物的分离到化学合成新化合物再到对已知化合物的结构修饰, 人们开始把寻找新药的目光逐渐转移到对已知化合物的再次开发^[1]。本实验组从木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 根茎和根皮中提取分离出的和厚朴酚 (honokiol, HK), 具有抗菌^[2]、抗炎^[3]、抗衰老^[4]、抗焦虑^[5]和抗肿瘤^[6,7]等药理活性作用, 但在前期实验中本课题组发现 HK 代谢快, SD 大鼠口服半衰期为 4.7h, 静脉半衰期为 0.7h。为改善 HK 代谢速率, 我们以构效关系为依据, 对 HK 衍生化后合成目标化合物 HK-5, HK 和 HK-5 见图 1。为了初步检验合成效果, 确用体外药物代谢研究具有试验简便、周期短等特点^[8], 选择人、SD 大鼠、比格犬、小鼠和猴肝微粒体, 研究 HK-5 在不同种属肝微粒体中的代谢速率。如果药物代谢时参与亚酶较少, 则会增加药物合用时的副作用, 同时我们采用体外化学抑制剂法来预测 HK-5 在人体参与代谢的 CYP 亚酶。本文实验将有助于确认 HK-5 的体外代谢速率和代谢亚酶, 用以预测在人体内的代谢速率和参与代谢的亚酶, 选择替代动物来进一步实验, 从而为临床前实验提供参考数据。

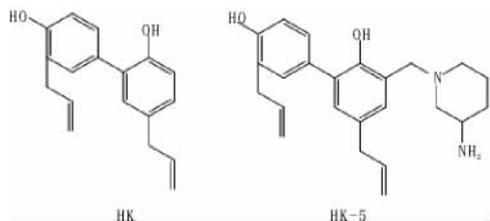


图 1 HK 和 HK-5 的化学结构

收稿日期: 2017-04-21; 修订日期: 2017-09-12

基金项目: 国家自然科学基金 (81673653)

作者简介: 杨沮勤 (1992-), 女 (汉族), 四川内江人, 成都中医药大学在读硕士研究生, 主要从事药物分析研究工作。

* 通讯作者简介: 万丽 (1965-), 女 (汉族), 重庆人, 成都中医药大学教授, 博士学位, 主要从事药物分析和中药质量标准研究工作。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 UFLC 液质联用仪, 包括: LC-30AD 高压输液泵, SIL-30AC 自动进样器, CBM-20A 连接器, CTO-20AC 柱温箱 (日本岛津公司); AB SCIEX QTRAP 5500 三重四级杆质谱仪 (美国 AB 公司); Thermo Heraeus Fresco 17 低温高速离心机 (Thermo Scientific 公司); 230V-UK 涡旋混合器 (Labnet International 公司); BT125 D 电子天平 (北京赛多利斯仪器有限公司); Milli Q 超纯水系统 (美国 Merck Millipore 公司)。

1.2 试剂试药 HK-5 由四川大学生物治疗国家重点实验室合成的抗肿瘤药物, 经 HPLC 测定, 其纯度大于 98%; 内标 SAHA (大连美仑生物技术有限公司, 批号: 00502A); α -萘黄酮 (ANF, 东京化成工业株式会社); 磺胺苯吡唑 (SUL, Sigma 公司); 奎尼丁 (QND, TCI 上海化成工业发展有限公司); 毛果芸香碱 (PCP), 盐酸噻氯匹定 (TCP, 中国食品药品检定研究院); 酮康唑 (KCZ, Dr Ehrenstorfer 公司); 二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDTC, Sigma 公司); 人、比格犬、SD 大鼠、小鼠和猴肝微粒体 (浓度均为 $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 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; 甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 储备液和内标液的制备

2.1.1 HK-5 储备液的配制 精密称定 HK-5 10.00 mg, 使用甲醇作为溶剂定容至 10 ml 棕色量瓶中, 混匀, 即得 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 HK-5 储备液, 密封, 4°C 冰箱保存备用。

2.1.2 内标溶液的配制 精密称定 SAHA 10.00 mg 使用甲醇作为溶剂定容至 10 ml 棕色量瓶中, 混匀, 即得质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 SAHA 储备液, 密封, 4°C 冰箱保存。

2.2 液质条件

2.2.1 液相条件 Waters Acquity UPLC™ BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 柱温 30°C ; 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱, 0-2.5 min, 70% ~ 80% B; 流速 $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积 5 μl 。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子化 (ESI) 方式, 检测离子为正离子; 离子喷雾电压 4500V, 离子源温度 500°C , 雾化气 20psi, 去簇电压

(DP) 为 130V, 离子束聚焦电压(EP) 为 10V, 碰撞池出口电压(CXP) 为 15V, 驻留时间为 0.20s。采用多级反应监测(MRM) 测定 HK-5 和内标 SAHA, 对应的监测离子对和碰撞能量分别是 HK-5 (m/z379.2→279.1, 32 eV), SAHA (m/z265.2→232.2, 18 eV)。

2.3 HK-5 在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性

2.3.1 代谢稳定性 参照文献^[9] 建立代谢稳定性孵育模型。孵育体系总体积为 207 μl, 有机溶剂少于 1%, 包括 0.1 mol 的 PBS 缓冲液(pH 7.4) 188 μl, NADPH 发生系统 12 μl (10 μl 的 A 液和 2 μl 的 B 液临时用冰浴上混合制得)。冰浴上将 2 μl 100 μmol·L⁻¹ 的 HK-5 加入孵育体系中, 37℃ 水浴中预孵 5 min; 然后冰浴上分别加入 5 μl 不同种属的肝微粒体酶, 混匀, 37℃ 水浴中孵育, 在 0, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90min 时间点加入 400 μl 的冰乙腈(含 50 ng/ml 内标) 终止反应, 平行实验 3 次。考察 HK-5 化合物在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性。

将三组孵育时间与底物剩余百分比做孵育曲线, 见图 2。HK-5 在 5 个种属的肝微粒体中均有较明显的代谢。HK-5 在人、SD 大鼠、比格犬、小鼠、猴肝微粒体酶中均发生代谢, 60 min 内代谢较快, 孵育 60~90 min, 剩余底物的量变化趋势减小。

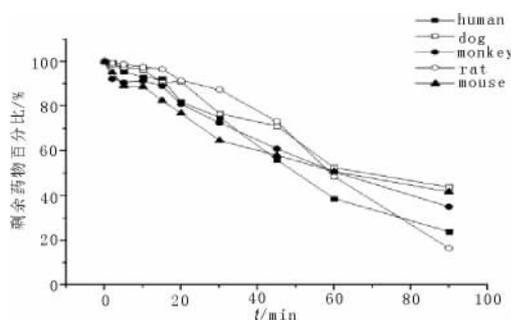


图 2 孵育时间与底物剩余浓度考察

2.3.2 体外半衰期 将孵育 0 min HK-5 的浓度作为 100%, 其他孵育时间点的浓度与 0 min 浓度相除, 得到各时间点的百分剩余量, 将各时间点百分剩余量的自然对数孵育时间作线性回归, 求得斜率 k, 并由文献^[10] 中公式计算消除半衰期 ($t_{1/2}$) =

$$-0.693/k, \text{肝微粒体中固有清除率 } CL_{int} = \frac{0.693}{t_{1/2}(\text{min})} \cdot$$

$$\frac{\text{孵育体积}(\text{ml})}{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})}, \text{体内固有清除率 } CL'_{int} = CL_{int} \cdot$$

$$\frac{\text{肝质量}(\text{g})}{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})} \cdot \frac{\text{肝微粒体质量}(\text{mg})}{\text{肝质量}(\text{g})}.$$

公式中人、SD 大鼠、比格犬、小鼠和猴的肝质量/体质量分别为 22、40、33、87.5 和 33, 肝微粒体质量/肝质量为 45。

在 5 个种属的代谢稳定性实验中, 每个种属的以底物剩余百分比的自然对数与孵育各时间点作线性回归。人肝微粒体线性回归方程为 $Y = -0.0163X + 4.6912, r = 0.995$; SD 大鼠肝微粒体线性回归方程为 $Y = -0.0181X + 4.792, r = 0.964$; 比格犬肝微粒体线性回归方程为 $Y = -0.0098X + 4.6414, r = 0.993$; 小鼠肝微粒体线性回归方程为 $Y = -0.0099X + 4.5524, r = 0.993$; 猴肝微粒体线性回归方程为 $Y = -0.0114X + 4.6061, r = 0.997$, 各线性公式斜率记作 K, 由 $T_{1/2} = -0.693/K$, 计算各种属半衰期, 肝微粒体固有清除率 (CL_{int}) 和体内固有清除率 (CL'_{int})。结果见表 1。

• 2860 •

表 1 HK-5 在人、SD 大鼠、比格犬、猴和小鼠肝微粒体中的代谢参数

实验对象	$t_{1/2}/\text{min}$	$CL_{int}/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$	$CL'_{int}/\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$
人	42.5	0.033	32.7
SD 大鼠	38.3	0.036	64.8
比格犬	70.7	0.020	29.7
小鼠	70.0	0.020	78.8
猴	60.9	0.023	34.2

2.4 HK-5 在 CYP450 酶中的代谢表型研究 根据文献^[11], 选择化学抑制剂包括: 二乙基二硫代氨基甲酸钠(CYP2E1 抑制剂, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 盐酸噻氯匹定(CYP2C19 抑制剂, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); a-萘黄酮(CYP1A2 抑制剂, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 奎尼丁(CYP2D6 抑制剂, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 酮康唑(CYP3A4 抑制剂, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 毛果芸香碱(CYP2A6, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 磺胺苯吡唑(CYP2C9 抑制剂, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。根据“2.3.1”项下孵育系统, 冰浴上加 1 μl 浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HK-5 溶液, 1 μl 各选择性化学抑制剂, 相同方法处理, 平行实验 3 次。另设定未发生反应样品为阴性对照组(不加 NADPH 发生系统和抑制剂, 只加入等量甲醇), 设定完全发生反应为阳性对照组(加入 NADPH 发生系统, 但不加抑制剂, 只加入等量甲醇)。考察不同选择性抑制剂对 HK-5 代谢的影响。

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 = $[(1 - \text{实验组代谢速率}/\text{阳性对照组剩余浓度}) / (\text{阴性对照组浓度} - \text{阳性对照组剩余浓度})] \times 100\%$ 。采用 OriginLab 9.0、EXCEL 制图和处理数据。

由公式计算可得 HK-5 对 CYP 各亚型的抑制率。结果见表 2, 人肝微粒体中各种抑制剂对 HK-5 代谢的影响见图 3。

表 2 各抑制剂对大鼠肝微粒体中 HK-5 代谢的影响

抑制剂 (CYP 亚型)	HK-5 质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$			HK-5 平均质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD / %	抑制率 / %
	1	2	3			
DDTC (CYP2E1)	3.62	3.79	3.75	3.72 ± 0.07	2.38	4.60
TCP (CYP2C19)	3.74	3.80	3.85	3.79 ± 0.04	1.48	32.00
ANF (CYP1A2)	3.62	3.79	3.80	3.74 ± 0.08	2.75	10.50
KND (CYP2D6)	3.72	3.56	3.76	3.68 ± 0.09	2.84	-11.70
KCZ (CYP3A4)	4.06	3.88	3.94	3.95 ± 0.07	2.40	90.90
PCP (CYP2A6)	3.69	3.51	3.70	3.63 ± 0.09	3.00	-28.36
SUL (CYP2C9)	3.83	3.81	3.80	3.81 ± 0.01	0.30	39.25
阳性对照组	3.69	3.68	3.75	3.71 ± 0.03	1.01	
阴性对照组	4.04	3.94	3.97	3.98 ± 0.04	1.29	

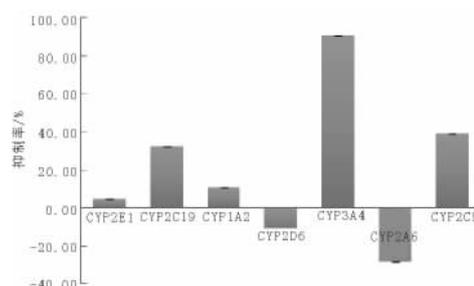


图 3 各种抑制剂对 HK-5 代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 取 PBS 缓冲液 188 μl, 加入 5 μl 高温灭活的肝微粒体, 10 μl 的 A 液和 2 μl 的 B 液, 记作“孵育体系 I”。取“孵育体系 I”, 加入 400 μl 乙腈溶液, 按“2.3.1”项下的方法处理, 即得空白对照样品 A。另取“孵育体系 I”, 然后加入 400 μl 内标质量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的乙腈溶液, 加入 2 μl $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HK-5 溶液, 相同方法处理, 得对照样品 B。

在本实验条件下, HK-5 和内标 SAHA 的保留时间分别为 0.84, 0.58 min, 达到基线分离, 且没有受到空白基质的干扰, 说明其专属性良好。

2.5.2 线性关系 精密量取 HK-5 对照品贮备液, 用甲醇稀释到质量浓度分别为 781, 1563, 3125, 6250, 12500, 25000, 50000 ng · ml⁻¹ 的系列对照品溶液。于“孵育体系 1”中分别加入 2 μl 上述系列浓度的对照品溶液按“2.3.1”项下方法处理, 以“2.2”项下条件进样分析。以待测物 HK-5 浓度为横坐标, HK-5 与 SAHA 峰面积比值为纵坐标, 采用最小二乘法进行回归计算, 求得直线回归方程: $Y = 0.02458X - 0.04178$, $r = 0.999$, 各浓度的准确度偏差均小于 15%, 表明 HK-5 在 7.81 ~ 500 ng · ml⁻¹ 范围内的浓度与响应值呈良好的线性关系, 符合要求。

2.5.3 准确度 按“2.5.2”项下方法, 将浓度为 15.6, 62.5, 400.0 ng · ml⁻¹ 的低、中、高三组质控样品按“2.3.1”项下方法处理后进样分析, 计算各浓度质控样品的回收率, 平行实验 5 份, 结果见表 3。

2.5.4 精密度 采用“2.5.3”项下的三组质控样品每隔 2h 测定一组低、中、高浓度样品, 共测定 5 次, 计算日内精密度。连续 3d 测定 3 个浓度, 每个浓度平行实验 5 份来计算日间精密度。结果见表 3。

2.5.5 基质效应 采用“2.5.3”项下的三组质控样品, 分别测定峰面积 A, 另取 HK-5 对照品溶液, 加流动相制成相同浓度溶液, 分别测定峰面积为 B, 每组平行实验 5 份, 结果见表 3。基质效应公式: $A/B \times 100\%$, 此值应在 85% ~ 115% 之间。

表 3 HK-5 的准确度、精密度和基质效应

质量浓度 /μg · L ⁻¹	准确度 /%	精密度 RSD/%		基质效应 (HK-5) /%
		日内	日间	
15.6	112.96 ± 0.49	0.94	6.32	91.55 ± 5.13
62.5	100.99 ± 1.35	1.11	1.97	96.22 ± 3.02
400.0	101.81 ± 0.93	2.61	3.67	90.70 ± 2.17

$n = 5$

3 讨论

本文建立了 HK-5 的 LC-MS 测定方法, 该方法专属性、线性、准确度、精确度和基质效应均符合生物样品的测定要求。HK-5 在人、SD 大鼠、比格犬、小鼠和猴 5 个种属的肝微粒体中 $T_{1/2}$ 分别为 42.5, 38.3, 70.7, 70.0, 60.9 min; CL_{int} 分别为 0.033, 0.036, 0.020, 0.020, 0.023 ml · (min · mg protein)⁻¹; CL'_{im} 分别为 32.7, 64.8, 29.7, 78.8, 34.2 ml · (min · mg)⁻¹。由实验结果可知, HK-5 在人和 SD 大鼠肝微粒体中有相似的 $T_{1/2}$, 在人和 SD 大鼠体内容易被代谢; 人和 SD 大鼠 CL_{int} 较接近, 比格犬、小鼠和猴较接近; 人、比格犬和猴 CL'_{im} 相差不大, SD 大鼠和小鼠相近。在后续实验中可用 SD 大鼠进行 HK-5 的体内药物代谢研究, 但两者体内清除率差异较大, 后期实验前用 SD 大鼠推测给药方案时, 应注意与人代谢速率的差异。

两种或以上药物同时用药时容易发生代谢性药物相互作用,

约占药理学相互作用 40%, 若药物由多种 CYP 亚酶代谢, 则会降低这种风险^[12]。代谢表型结果: CYP3A4、CYP2D6 和 CYP2A6 是代谢 HK-5 主要亚酶; HK-5 能诱导 CYP2D6 和 CYP2A6 亚酶的活性; CYP2E1、CYP2C19、CYP1A2 和 CYP2C9 没有参与 HK-5 的代谢。结果显示 HK-5 由三种亚酶代谢, 这将降低某一种 CYP 亚酶被诱导或抑制而导致严重不良反应的风险, 同时由于 HK-5 对三种亚酶的抑制作用, 提示其他经这些亚酶代谢的药物, 在联合用药时会减慢它们的代谢, 增强药效, 甚至出现中毒后果; HK-5 对 CYP2D6 和 CYP2A6 亚酶的诱导作用在联合用药时, 则会加快其他药物的代谢时间, 降低药效。良好的代谢表型也表明 HK-5 有进一步开发利用的可能。

参考文献:

- [1] 苏建, 李小娜, 张兰桐. 药物代谢研究与新药开发 [J]. 河北医科大学学报, 2007, 28(6): 471.
- [2] Tianjin Institute of Pharmaceutical Research. Plant Active Constituent Database [M]. Beijing: China Medico-Pharmacological Sciences and Technology Publishing House, 2000.
- [3] Matsuda H, Kageura T, Oda M, et al. Effects of constituents from the bark of Magnolia obovata on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(6): 716.
- [4] Liou K T, Shen Y C, Chen C F, et al. The anti-inflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 475(1-3): 19.
- [5] Kuribara H, Stavinoha W B, Maruyama Y. Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effects in mice [J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(1): 97.
- [6] Nagase H, Ikeda K, Sakai Y. Inhibitory effect of magnolol and honokiol from Magnolia obovata on human fibrosarcoma HT-1080 [J]. Planta Med, 2001, 67(8): 705.
- [7] Bai X, Cerimele F, Ushio-Fukai M, et al. Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo [J]. J Biol Chem, 2003, 278(37): 35501.
- [8] 汤明海, 王海蓉, 王春燕, 等. 抗肿瘤化合物 E7 在不同种属肝微粒体酶中的体外代谢研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1739.
- [9] Cohen L H, Remley M J, Raunig D, et al. In vitro drug interactions of cytochrome p450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(8): 1005.
- [10] 李小彬, 王海蓉, 杨楸楠, 等. 厚朴提取物 HK-1 在 5 个种属肝微粒体中的代谢 [J]. 中成药, 2016, 38(4): 723.
- [11] 刘治军, 傅得兴, 汤光. FDA 药物相互作用研究指南(草案) 2006 版解读 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(1): 50.
- [12] 刘彦卿, 洪燕君, 曾苏. 代谢性药物-药物相互作用的研究进展 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2009, 38(2): 215.