

白及有效成分 Militarine 在肝微粒体中的体外代谢途径及其酶促动力学特征^Δ

夏涛^{1,2*}, 王昌权², 陈浩², 郑林¹, 巩仔鹏¹, 李月婷¹, 李勇军³, 黄勇¹, 潘洁^{3#}(1.贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3.民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R965;R917;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1316-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.05

摘要 目的:研究白及有效成分 Militarine 在肝微粒体中的体外代谢途径及其酶促反应动力学特征。方法:建立大鼠和人肝微粒体体外孵育体系,对 Militarine 进行体外孵育反应;采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术,结合 UNIFI 数据库并参考文献对其代谢产物进行结构鉴定。同时,以葛根素为内标,采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用技术对 Militarine 在大鼠肝微粒体中的代谢转化量进行定量分析,通过 GraphPad Prism 5.0 软件拟合代谢转化曲线,并计算在有/无还原性辅酶 II (NADPH) 参与的反应条件下的 Militarine 酶促动力学参数[最大清除速率(v_{max})、米氏常数(k_m)、固有清除率(CL_{int})]。结果:Militarine 在大鼠和人肝微粒体中孵育后,生成了 1 个化学式为 $C_{21}H_{29}O_{11}$ 的化合物,推测其为 Militarine 的酯键水解代谢产物。酶促动力学研究显示,有/无 NADPH 参与的 Militarine 酶促反应的 v_{max} 分别为 1.955、2.129 nmol/(h·mg), k_m 分别为 8.601、9.854 nmol/mL, CL_{int} 分别为 0.227 3、0.216 1 mL/(h·mg), 两者无明显差异。结论:Militarine 在肝微粒体中的主要代谢途径为 C1 或 C4 位酯键的水解;其代谢不依赖于由 NADPH 启动反应的细胞色素 P₄₅₀ 酶代谢途径。

关键词 白及; Militarine; 肝微粒体; 代谢途径; 酶促动力学

in vitro Metabolism Pathway of Effective Component of *Bletilla striata* as Militarine in Liver Microsomes and Kinetics Characteristics of Enzyme-catalyzed Reactions

XIA Tao^{1,2}, WANG Changquan², CHEN Hao², ZHENG Lin¹, GONG Zipeng¹, LI Yueting¹, LI Yongjun³, HUANG Yong¹, PAN Jie³(1. Guizhou Provincial Key Lab of Pharmaceutics/State Key Lab of Efficacy and Utilization of Medicinal Plants, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study *in vitro* metabolism pathway of effective component of *Bletilla striata* as Militarine in liver microsomes and kinetics characteristics of enzyme-catalyzed reactions. METHODS: The *in vitro* incubation system of rat and human liver microsomes was established, and incubation reaction of Militarine was performed. UPLC-QTOF-MS was used to identify the structure of its metabolites in combination with UNIFI database and references. Using puerarin as internal standard, UPLC-Triple Quad-MS was used to quantitatively analyze metabolic transformation of Militarine in rat liver microsomes. The kinetic parameters (v_{max} , k_m , CL_{int}) of Militarine enzyme-catalyzed reactions with/without reducing coenzyme II (NADPH) were calculated by fitting the curves with GraphPad Prism 5.0 software. RESULTS: After incubation in rat and human liver microsomes, Militarine produced a chemical formula $C_{21}H_{29}O_{11}$, which was presumed to be a metabolite of Militarine ester bond hydrolysis. The kinetic study of enzyme-catalyzed reactions showed that v_{max} of Militarine enzyme-catalyzed reactions with/without NADPH were 1.955, 2.129 nmol/(h·mg); k_m were 8.601, 9.854 nmol/mL; CL_{int} were 0.227 3, 0.216 1 mL/(h·mg); there was no significant difference between with NADPH and without NADPH. CONCLUSIONS: The main metabolic pathway of Militarine in liver microsomes is the hydrolysis of C1 and C4 ester bonds. Its metabolism does not depend on the pathway of cytochrome P₄₅₀ enzymes initiated by NADPH.

KEYWORDS *Bletilla striata*; Militarine; Liver microsomes; Metabolism pathway; Kinetics of enzyme-catalyzed reactions

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460630、U1812403);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613、[2016]5677、[2017]5601);贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(No.黔教合KY字[2018]050);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-29)

* 硕士研究生。研究方向:中药民族药药效物质基础及质量控制。电话:0851-86908468。E-mail:2848180188@qq.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药的药效物质基础及药动学。电话:0851-86908468。E-mail:1103644970@qq.com

白及为兰科植物白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的干燥块茎,是 2015 年版《中国药典》(一部) 收录的常用药材,具有收敛止血、消肿生肌的作用,可用

于治疗咯血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等病症^[1-2]。目前,以白及为主药制备并上市的药品有白百抗癆颗粒、百贝益肺胶囊、结核丸等多个品种。本课题组前期研究发现,白及有效部位可通过促进血小板活化、形变、聚集、凝血来增加血液黏度,从而发挥止血作用^[3-4]。Militarine 为白及有效部位中含量较高的活性成分,其在白及药材中的含量达 1.45%~3.32%^[5-6]。药理研究证实,Militarine 能改善慢性脑缺血模型大鼠的认知功能障碍,减轻其脑白质缺血性损伤,并具有舒张血管的作用^[7-8]。由此可见,Militarine 是一种具有药物开发前景的天然化学成分。

药物代谢是药物在体内产生药效及毒性的主要过程,为筛选药物活性成分、降低药物研发过程中的高淘汰率,对候选化合物的代谢过程进行基础研究具有重要意义^[9]。肝脏富含众多药物代谢酶,是药物代谢的主要场所^[10]。肝微粒体是应用最为广泛的一个体外代谢模型,通过其获得的药物体外代谢特征可在一定程度上反映药物的体内代谢特性^[11]。目前,关于 Militarine 的体内过程研究鲜见报道,其吸收、分布、代谢和排泄特征尚不明确。因此,本课题组采用肝微粒体体外孵育法对 Militarine 进行代谢研究,通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用技术对 Militarine 的代谢产物进行结构鉴定,推测其在肝微粒体中可能的代谢途径;并通过超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用技术考察 Militarine 在肝微粒体中代谢的酶促动力学特征,为该活性成分的代谢机制及在体药动力学研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

UHPLC-QTOF 型超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪(包括 MassLynx V4.1 质谱工作站、UNIFI 数据库,美国 Bruker 公司);Acquity UPLC I-Class/Xevo TQ-S 型超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(包括 MassLynx V4.1 质谱工作站,美国 Waters 公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(四川沃特尔科技发展有限公司);NA-5L 型氮空一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司);TARGIN VX-III 型多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);HtPot70 型恒温孵育箱(美国 ABSOLUTE 科学仪器集团);Coulter Optima XPN-100 型智能型超速离心机(美国 Beckman 公司);ST40R 型台式大容量冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 药品与试剂

Militarine 对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号:ps171128-04,纯度:≥98%);葛根素对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:110752-201512,纯度:≥96.0%);二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物技术研究);人肝微粒体(武汉普莱特生物医药技术有限公司,批号:M10001.2017002,蛋白浓度:20 mg/mL;于-80℃冷冻保存,临用前用 PBS 稀释至所需浓度);还原性辅酶 II (NADPH,批号:1113N021)、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)均购自北京索

莱宝科技有限公司;氯化钠注射液(山东齐都药业有限公司,规格:500 mL:4.5 g;可作生理盐水使用);乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量为(220±20)g,由湖南长沙天勤生物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011。动物均在室温(23±2)℃、湿度(45±5)%的条件下适应性饲养 1 周后进行后续实验。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 Militarine 标准溶液 精密称取 Militarine 对照品适量,用甲醇溶解制成浓度为 100 nmol/mL 的对照品母液。临用前以甲醇稀释至所需浓度,即得。

2.1.2 内标溶液 精密称取内标对照品适量,用甲醇溶解制成质量浓度为 1 μg/mL 的内标溶液。

2.1.3 NADPH 溶液 精密称取 NADPH 适量,以 PBS 溶解制成 400 mg/mL(即 538 μmol/mL)的母液,于-80℃下保存,备用。临用前以 PBS 稀释至所需浓度。

2.2 大鼠肝微粒体的制备

取大鼠 6 只,禁食不禁水过夜,次日经股动脉取血,然后处死。开腹迅速取出肝脏,用生理盐水灌注至土黄色,以 1.15% 氯化钾溶液洗涤 3 次,滤纸吸干后称定质量。将肝脏剪碎至约 3 mm×3 mm×3 mm 的碎片,加 3 倍体积(mL/g)生理盐水,冰浴中匀浆。匀浆液在 4℃条件下以 3 000×g 离心 10 min;取上清液,以双层纱布滤过后,在 4℃条件下以 12 000×g 离心 20 min;取上清液,继续在 4℃条件下以 100 000×g 离心 45 min,所得沉淀即为大鼠肝微粒体。在沉淀中加入含 20% 甘油的生理盐水,用移液枪吹散均匀,取适量,采用 BCA 试剂盒测得总蛋白质量浓度为 15 mg/mL。剩余大鼠肝微粒体于-80℃冷冻保存,临用前以 PBS 稀释至所需浓度。

2.3 Militarine 在大鼠/人肝微粒中的代谢途径考察

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);保护柱:Waters VanGuard BEH C₁₈(5 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:0.01% 甲酸水溶液(A)-0.01% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~2 min,95%A;2~8 min,95%A→2%A;8~10 min,2%A;10~12 min,2%A→95%A);流速:0.4 mL/min;柱温:35℃;进样量:1 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);扫描方式:负离子扫描(ESI⁻);质荷比(*m/z*)扫描范围:50~1 200;毛细管电压:1.5 kV;离子源温度:100℃;锥孔电压:30 V;脱溶剂气温度:300℃;锥孔气流量:50 L/h;碰撞能量:20~30 eV;脱溶剂气流量:10 L/min;数据采集模式:全信息串联质谱;甲酸钠校正,校正模式:Sensitivity。

2.3.3 Militarine 在大鼠肝微粒体中的代谢产物测定

(1)孵育条件:在离心管中加入大鼠肝微粒体溶液 100 μL(蛋白终浓度为 1 mg/mL,下同)、PBS 48 μL、50 nmol/mL 的 Militarine 标准溶液 2 μL(作为样品组),于 37℃下预孵育 5 min;然后加入 1 μmol/mL NADPH 溶液 40 μL 启动反应。分别于反应 0、10、30、60、120 min 时,

加入预冷的甲醇 200 μL 并立即在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冻存 30 min 以终止反应。同时设置空白组和对照组,空白组除不加入 Militarine 标准溶液、对照组除加入灭活的大鼠肝微粒体(加适量甲醇灭活)之外,其余操作相同,并分别于反应 0、120 min 后终止反应。(2)代谢产物测定:将反应液涡旋混匀 3 min,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)5 min,5 000 r/min 离心 5 min;取上清液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以氮气流吹干,残渣加 50% 甲醇 200 μL 复溶,按“2.3.1”“2.3.2”项下色谱、质谱条件测定。每个时间点均采用双样本分析。

2.3.4 Militarine 在人肝微粒体中的代谢产物测定 取冻存的人肝微粒体溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下自然解冻、稀释后,按“2.3.3”项下方法同步操作,进行分组体外孵育反应及代谢产物测定。

2.3.5 Militarine 的代谢途径分析 经 MassLynx V4.1 质谱工作站对“2.3.3”“2.3.4”项下测定结果进行分析与处理,Militarine 在不同组大鼠/人肝微粒体中代谢 120 min 时的总离子流图见图 1、图 2。结果显示,Militarine 及其代谢产物在 ESI⁻ 模式下响应较好,结合 UNIFI 数据库并参考文献[12-13]后认为,在保留时间 4.44 min 处出现的 m/z 725.268 $1[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 峰所对应的化合物可能为 Militarine,而在 4.18 min 处出现的 m/z 457.174 $1[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6]^{-}$ 峰与 Militarine 对照品的主要碎片离子峰保留时间一致。由此确定,保留时间为 4.44 min 的峰(Y1)对应化合物为 Militarine;而对于保留时间为 4.18 min 的峰(M1),采用 Single Mass Analysis 功能模块预测其对应化合物的化学式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_{11}$ 。据此推测,M1 可能为 Militarine 的酯键水解代谢产物。Militarine 在肝微粒体中的可能代谢途径见图 3。

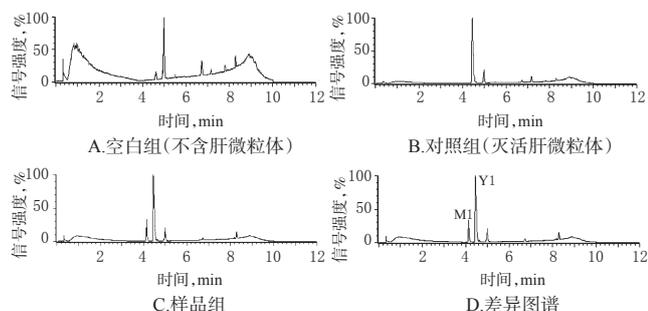


图 1 Militarine 在大鼠肝微粒体中代谢 120 min 时的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of the metabolites of Militarine in rat liver microsomes for 120 min

2.4 Militarine 在大鼠肝微粒体中的酶促动力学考察

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters BEH C_{18} (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 90% A; 0.5~1 min, 90% A \rightarrow 10% A; 1~2 min, 10% A; 2~3 min, 10% A \rightarrow 90% A);流速:0.3 mL/min;柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量:1 μL 。

2.4.2 质谱条件 ESI;毛细管电压:3 kV;离子源温度: $150\text{ }^{\circ}\text{C}$;去溶剂气温度: $600\text{ }^{\circ}\text{C}$;去溶剂气:氮气,流速:

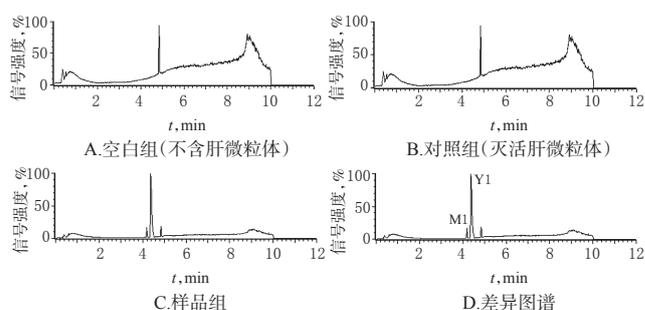


图 2 Militarine 在人肝微粒体中代谢 120 min 时的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatograms of the metabolites of Militarine in human liver microsomes for 120 min

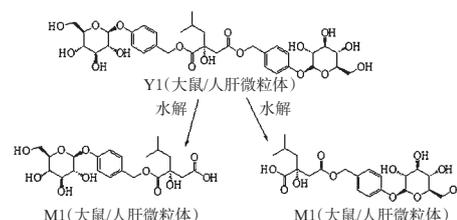


图 3 Militarine 在大鼠和人肝微粒体中的生物转化途径

Fig 3 Biotransformation pathway of Militarine in rat and human liver microsomes

1 000 L/h;反吹气:氮气,流速:50 L/h;碰撞气:氩气,流速:0.16 mL/min;扫描方式:多反应离子监测模式(MRM)。

2.4.3 方法学考察 (1)专属性考察。参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件,取空白大鼠肝微粒体 100 μL ,加甲醇 200 μL 灭活,除不加入 Militarine 标准溶液与内标溶液外,其余同法操作,孵育反应 60 min,得空白组样品。另取空白大鼠灭活或不灭活肝微粒体 100 μL ,均分别加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Militarine 标准溶液 2 μL 、内标溶液 200 μL ,同法操作,作为对照组样品和样品组样品。然后按“2.4.1”“2.4.2”项下色谱、质谱条件测定。结果显示,Militarine 与其他峰之间的分离度良好;Militarine 与内标的保留时间分别为 1.33、1.27 min(图略)。

(2)线性关系考察。取空白大鼠肝微粒体 100 μL ,加入适量甲醇灭活,再加入系列不同浓度的 Militarine 标准溶液 2 μL (终浓度分别为 0.001、0.01、0.1、1、5、10、15 nmol/mL)、内标溶液 200 μL ,参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件,孵育反应 60 min,再按“2.4.1”“2.4.2”项下色谱、质谱条件测定。以待测物浓度为横坐标(x)、待测物与内标的峰面积之比为纵坐标(y)进行线性回归,得标准曲线为 $y=1\ 232.1x+0.081$ ($r=0.999\ 9$),表明 Militarine 浓度在 0.001~15 nmol/mL 范围内线性关系良好。

(3)提取回收率和基质效应考察。按“2.4.3(2)”项下方法分别配制含 Militarine 低、中、高浓度(终浓度分别为 0.001、1、10 nmol/mL)的大鼠肝微粒体孵育体系质控(QC)样品,加入内标溶液 200 μL ,平行 6 份操作,参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件进行反应,得样品 A。另

配制空白灭活大鼠微粒体孵育体系,除不加 Militarine 标准溶液与内标溶液外,同法进行孵育反应,然后向沉淀蛋白后的上清液中加入相应低、中、高浓度的 Militarine 溶液与内标溶液,得样品 B。另以初始流动相配制对应浓度的 Militarine 标准溶液与内标溶液,作为样品 C。分别按“2.4.1”“2.4.2”项下色谱、质谱条件测定,计算样品 A 与样品 B 的峰面积之比,作为提取回收率;计算样品 B 与样品 C 的色谱峰面积之比,作为基质效应。结果显示,低、中、高浓度 Militarine 的提取回收率为 87.01%~99.29%,基质效应为 91.18%~99.92%。

(4) 准确度和精密度考察。按“2.4.3(3)”项下方法分别配制含 Militarine 低、中、高浓度的 QC 样品,加入内标溶液 200 μL ,平行 6 份操作,参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件进行反应,连续测定 2 d;同时建立随行标准曲线,按随行标准曲线计算 QC 样品的浓度。将测得值与 QC 样品理论值相比较,以其百分比评价方法准确度;同时,对测得值进行比较以评价方法精密度。结果显示,低、中、高浓度样品准确度为 80.24%~99.19%,测得值的 RSD 值均小于 10%,表明该方法准确度和精密度均良好。

(5) 稳定性考察。按“2.4.3(3)”项下方法分别配制含 Militarine 低、中、高浓度的 QC 样品,加入内标溶液 200 μL ,平行 6 份操作,参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件进行反应。然后在室温下放置 0、12 h 时分别进样测定。另配制低、中、高浓度 QC 样品,分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏 24 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻-融化循环 3 次,同法孵育反应后测定。结果显示, Militarine 在上述条件下放置后测得值的 RSD 值均小于 10%,表明其稳定性良好。

2.4.4 孵育条件优化 参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件,考察不同蛋白终浓度(0、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL)和不同孵育时间(0、10、20、30、60、90 min)对 Militarine (固定加入 50 nmol/mL Militarine 标准溶液 2 μL)代谢的影响,优化其孵育条件。分别以蛋白浓度和孵育时间为横坐标、Militarine 在微粒体中代谢转化量(Militarine 初始浓度为 C_0 ,终止反应后测定浓度为 C_t ,代谢转化量为 $C_0 - C_t$)为纵坐标,经 GraphPad Prism 5.0 软件拟合代谢转化曲线(见图 4)。结果显示, Militarine 的代谢转化量随微粒体蛋白浓度增大而增加;而随着孵育时间延长,其代谢转化量先增加,后逐渐趋于饱和。因此,选择蛋白浓度 0.5 mg/mL、孵育时间 30 min 作为最佳孵育条件进行酶促动力学试验。

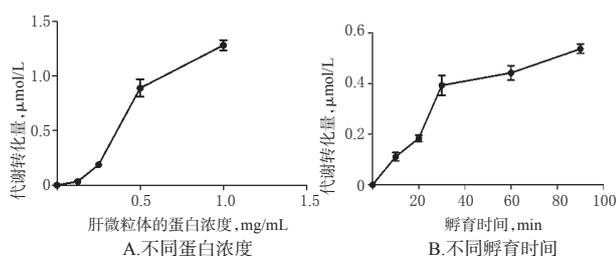


图 4 Militarine 在大鼠肝微粒体中的代谢转化曲线
Fig 4 Metabolic transformation curves of Militarine in rat liver microsomes

2.4.5 酶促动力学考察 为考察 Militarine 的酶促反应是否依赖于 NADPH,故分为 NADPH 组和 NADPH 阴性组进行考察。参照“2.3.3(1)”项下体外孵育条件操作,配制含不同浓度 Militarine 的孵育体系(终浓度分别为 0.005、0.01、0.25、0.5、0.1、0.25、0.5、0.75、1、5、10 nmol/mL,并确保反应体系中甲醇的体积分数 $\leq 1\%$),除加入或不加入 NADPH 外,其他条件相同,孵育 60 min 后终止反应。其中 NADPH 组的反应以加入 NADPH 时开始计时, NADPH 阴性组(加入等体积 PBS 代替 NADPH 溶液)的反应以加入 Militarine 时开始计时。反应完毕后将反应液涡混 3 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液,按照“2.4.1”“2.4.2”项下色谱、质谱条件测定。以 Militarine 的浓度(S)为横坐标、Militarine 的清除速率(v)为纵坐标绘制酶促反应动力学曲线。根据米氏方程 $v = v_{\max} \times S / (k_m + S)$,采用规划求解的方法计算最大清除速率(v_{\max})、米氏常数(k_m)和固有清除率(CL_{int} ,计算公式为: $CL_{\text{int}} = v_{\max} / k_m$)。Militarine 的酶促反应动力学参数结果见表 1, NADPH 组和 NADPH 阴性组 Militarine 酶促反应动力学曲线分别见图 5、图 6。经 SPSS 24 统计学软件处理,采用 t 检验,结果显示, Militarine 在有/无 NADPH 参与的反应条件下,其 CL_{int} 差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明其体外代谢不依赖于由 NADPH 启动的细胞色素 P₄₅₀(CYP)酶代谢途径,推测可能是经由肝微粒体中其他水解酶代谢。

表 1 Militarine 的酶促反应动力学参数

Tab 1 Kinetic parameters of Militarine enzymatic reaction

组别	v_{\max} , nmol/(h·mg)	k_m , nmol/mL	CL_{int} , mL/(h·mg)
NADPH 组	1.955	8.601	0.227 3
NADPH 阴性组	2.129	9.854	0.216 1

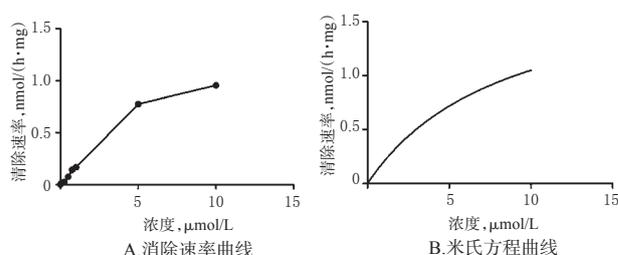


图 5 NADPH 组 Militarine 酶促反应动力学曲线
Fig 5 Kinetic curves of Militarine enzyme reaction in NADPH group

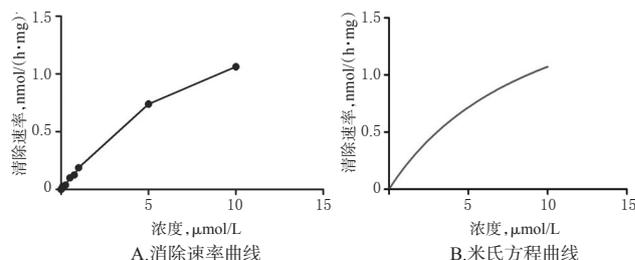


图 6 NADPH 阴性组 Militarine 酶促反应动力学曲线
Fig 6 Kinetic curves of Militarine enzyme reaction in NADPH negative group

3 讨论

肝脏是药物重要和主要的代谢器官,是药物发生生物转化的重要场所,因其富含药物代谢酶系统,故参与了大部分药物的体内代谢过程,因此药物的体外代谢模型主要以肝脏为基础。体外代谢研究具有排除体内代谢诸多干扰因素,为体内代谢研究提供可靠的理论依据,且不消耗大量的实验动物和样品等优点,在药物代谢研究中得以广泛的应用^[14-15]。肝微粒体体外温孵试验是采用从肝脏中获取的肝微粒体,在体外模拟生理环境下进行的代谢反应,该方法代谢过程快、结果重现性好,便于收集和积累代谢样品供代谢产物的结构确证研究,在实际工作中得到普遍运用^[11]。

药物在肝脏中的代谢分为 I 相代谢(生物转化)和 II 相代谢(结合反应),I 相代谢包括氧化、还原和水解,其中最主要的酶促反应为氧化反应,其次是还原和水解反应^[16]。水解反应相关的酶主要为酯酶和过氧化物水解酶,其中酯酶介导的水解反应包括酯类、酰胺类、腈类和氨基甲酸盐类化合物的水解,主要发生在血浆(由非特异性乙酰胆碱酯酶、假胆碱酯酶和其他酯酶催化)和肝脏(由作用于特异性化合物的酯酶催化)中,而过氧化物水解酶主要催化混合功能氧化酶系反应生成的过氧化代谢物^[17]。Militarine 是从白及中分离得到的单体,为丁二酸苄酯苷类化合物,是由 2-异丁基苹果酸与 4-葡萄糖基苄醇形成的双酯类衍生物,其化学结构中 C₁、C₄ 位存在的两个酯键使其极易发生水解反应^[11]。本研究采用超高效液相色谱-质谱联用技术分别对 Militarine 经大鼠或人肝微粒体体外孵育后的代谢产物进行定性鉴定,利用其质谱碎片离子信息对主要代谢产物进行鉴定;同时,建立了采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术测定 Militarine 含量的方法,该方法的专属性、回收率、精密度、稳定性较好,具有灵敏、准确、快速的特点,可为 Militarine 体内过程的定量分析提供技术支持。

本研究结果显示,Militarine 能在肝微粒体中代谢,主要代谢产物 M1 为 Militarine 酯键水解产物。但 Militarine 可分别在 C₁、C₄ 位发生酯键水解,所产生两个代谢产物互为同分异构体,具有相同分子式、碎片离子等信息,因此在缺乏 M1 对照品的情况下,本研究尚无法确定水解发生在 C₁ 位还是 C₄ 位,所生成的到底是哪一个代谢产物还需进一步研究。但能够明确的是,Militarine 在肝脏中的代谢为酯键断裂,所得代谢产物化学式预测为 C₂₁H₂₉O₁₁。

v_{\max} 、 k_m 和 CL_{int} 为酶促动力学的主要参数,其中 v_{\max} 值反映的是酶对底物的最大反应效力和酶促反应速度的快慢^[18]; k_m 值代表了酶对底物的亲和能力,该值越大,则提示酶对底物的亲和能力越弱; CL_{int} 则反映了酶对底物的清除能力,该值越大,则提示酶对底物的清除能力越强^[15]。本研究通过考察 Militarine 的酶促反应动力学发现,NADPH 参与或不参与的酶促反应的 CL_{int} 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明 Militarine 在肝微粒体中的代谢不依赖于由 NADPH 启动反应的 CYP 酶代谢途径,推测其可能经由肝微粒体中其他水解酶途径代谢。

综上所述,白及有效成分 Militarine 在肝微粒体中代谢的主要途径为 C₁、C₄ 位酯键的水解,且并不依赖于由 NADPH 启动的 CYP 酶代谢途径。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:103.
- [2] 杨铠银. 白及药理作用研究进展[J]. 科技展望, 2016, 26(24):312.
- [3] 赵菲菲, 蔺良才, 杨馨, 等. 白及非多糖组分对大鼠血小板活化及血液流变学的影响[J]. 中成药, 2017, 39(2):244-249.
- [4] 赵菲菲, 杨馨, 徐丹, 等. 白及非多糖组分的止血作用及其机制的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8):1121-1126.
- [5] 何迅, 王爱民, 李勇军, 等. HPLC 测定白及中 militarine 含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16):2076-2078.
- [6] 张艳静, 赵艳霞, 邓雁如, 等. HPLC 同时测定白及中 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21):40-42.
- [7] 王耀, 赵香玉, 李新娅, 等. Militarine 改善慢性脑缺血大鼠认知功能障碍及白质损伤的研究[J]. 药学学报, 2016, 51(5):738-742.
- [8] 徐晓雪, 徐广涛, 李小鹏, 等. Militarine 对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用及机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(3):617-620.
- [9] 陈竞洪, 李林, 屈英微, 等. 药物代谢研究在新药研究中的作用[J]. 河北工业科技, 2005, 22(2):114-116.
- [10] 马增春, 王宇光, 谭洪玲, 等. 中药与肝脏药物代谢酶之间的相互作用[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(7):994-1001.
- [11] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 2-异丁基苹果酸葡萄糖基苄酯类化合物在兰科植物中的分布特点及药理活性[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(10):724-726.
- [12] WU TY, CHEN CC, LAY HL, et al. Study on the components and antioxidant activity of the bletilla plant in Taiwan[J]. *J Food Drug Anal*, 2010, 18(4):279-289.
- [13] 丰暖, 梁惠, 马爱国, 等. 海兔素在大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学研究[J]. 营养学报, 2015, 37(1):62-67.
- [14] 宋川霞, 韩雪花, 郭大乐. 肝微粒体体外代谢在中药生物转化中的应用研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(2):115-118.
- [15] 朱根华, 梁新丽, 廖正根, 等. 延胡索乙素及延胡索提取物在大鼠肝微粒体内代谢动力学研究[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(6):30-33.
- [16] 张晓旭, 贾佩佩, 张智勇, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法鉴定连翘脂素在人肝微粒体中的代谢产物[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(3):226-230.
- [17] 曾苏. 药物代谢学[M]. 2版. 杭州:浙江大学出版社, 2008:28-47.
- [18] 刘莹, 王国丽. 葛根素及葛根提取物在大鼠肝微粒体内代谢动力学研究[J]. 药物生物技术, 2011, 18(5):392-395.

(收稿日期:2018-10-30 修回日期:2019-04-03)

(编辑:段思怡)