

## • 药代动力学 •

## 海南崖豆藤提取物 HN-1 的体内外代谢研究

豆彩霞<sup>1,2</sup>, 邱翔<sup>1,2</sup>, 万丽<sup>1\*</sup>

(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 肿瘤生物治疗研究室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 应用体外肝微粒体孵育体系, 采用超快速液相色谱质谱联用(UFLC-MS/MS)检测方法, 研究海南崖豆藤抗炎活性成分 6-methoxy-8- $\beta$ -dimethyl-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-4H- $\delta$ H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one (HN-1) 在大鼠、小鼠、恒河猴、Beagle 犬和人 5 种属肝微粒体中的代谢稳定性, 比较代谢种属间的差异; 采用化学抑制剂法确定其在人肝微粒体中的代谢表型。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测方法, 通过比较体外孵育 0、60 min 的样品, 初步推断各种属体外代谢产物; 比较粪便、尿液、血浆空白和给药后的生物样品, 推测 HN-1 在 SD 大鼠体内的代谢产物。结果表明 HN-1 在各种属肝微粒体中的代谢均较为稳定, 其中犬与人的肝微粒体代谢性质最相近; 在人肝微粒体中主要经 CYP1A1、CYP2D6、CYP3A4 3 种同工酶催化代谢; 初步推测出 HN-1 在体内体外的代谢产物, 其中包括 3 个体外代谢产物和 5 个体内代谢产物, 研究结果为 HN-1 进一步的药理药效研究奠定基础。

**[关键词]** 海南崖豆藤; 肝微粒体; 代谢稳定性; 代谢产物

### Investigation of metabolism of HN-1 isolated from *Millettia pachyloba* in vivo and in vitro

DOU Cai-xia<sup>1,2</sup>, QIU Xiang<sup>1,2</sup>, WAN Li<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** Ultra-fast performance liquid chromatography-mass spectrometry (UFLC-MS/MS) was used to study the anti-inflammatory active ingredient of *Millettia pachyloba*, 6-methoxy-8- $\beta$ -dimethyl-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-4H- $\delta$ H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one (HN-1), in liver microsomes of rats, mice, rhesus monkeys, Beagle dogs and humans metabolic stability, and compare the metabolic differences between different species. The metabolic phenotype in human liver microsomes was determined by chemical inhibitor method. Using UPLC-Q-TOF-MS/MS detection method, the *in vitro* metabolites of various liver microsomes were preliminarily inferred by comparing the samples incubated for 0 min and 60 min *in vitro*. The metabolites of HN-1 in SD rats were presumed by comparing feces, urine, plasma blanks and samples after administration. The results showed that the metabolism of HN-1 in various liver microsomes was stable, and the metabolic properties of dog and human liver microsomes were the closest. It is mainly catabolized by CYP1A1, CYP2D6 and CYP3A4 isoenzymes in human liver microsomes. The metabolites of HN-1 *in vitro* and *in vivo*, including 3 *in vitro* metabolites and 5 *in vivo* metabolites, were preliminarily estimated. The results laid the foundation for further pharmacological studies of HN-1.

**[Key words]** *Millettia pachyloba*; liver microsomes; metabolic stability; metabolites

doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20190620.201

黄酮类化合物是自然界中分布最广、数量最多的酚类化合物, 具有显著的抗肿瘤、抗菌、抗炎和免

疫调节等活性<sup>[1-13]</sup>。从豆科崖豆藤属植物海南崖豆藤 *Millettia pachyloba* Drake 茎中提取分离出的抗炎

**[收稿日期]** 2019-04-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673653); 国家自然科学基金青年基金项目(81703344)

**[通信作者]** \* 万丽 教授, 博士生导师, 研究方向为药物分析, E-mail: wanli@cdutcm.edu.cn

成分 6-methoxy-8,8-dimethyl-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-4H- $\delta$ H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one 属于异戊烯异黄酮类化合物,本研究暂将其命名为 HN-1, 见图 1。Ye H 等<sup>[14]</sup> 研究结果显示,在崖豆藤提取分离所得的化合物中,HN-1 显示出较强的抗炎活性,其主要通过抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性来降低 NO 产生,并同时抑制炎症反应的另一个主要参与者 TNF- $\alpha$  的分泌<sup>[15-16]</sup>,而表现出优异的抗炎作用。该研究还表明其降低 NO 产生和 TNF- $\alpha$  分泌的作用优于阳性对照地塞米松。Ting G 等<sup>[17]</sup> 研究发现,HN-1 在体外抗炎活性实验中表现出显著的活性,对人肿瘤细胞 BGC823 显示出中等活性(IC<sub>50</sub> 为 0.74  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。目前,国内外尚未见对 HN-1 体内体外代谢研究的相关报道。本研究旨在通过研究 HN-1 在人、大鼠、犬、猴和小鼠肝微粒体中的代谢稳定性,研究在人肝微粒体中参与其代谢的主要亚型,以及推断其体内体外代谢产物,为其进一步的药理活性及机制研究奠定基础。

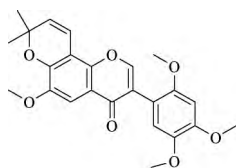


图 1 HN-1 的化学结构式

Fig.1 The structure of HN-1

## 1 材料

### 1.1 仪器

三重四极杆质谱仪(AB SCIEX QTRAP5500,美国 AB 公司);超高速液相色谱(UFLC)系统: SIL-30AC 进样器,LC-30AD 高压输液泵,CTO-20AC 柱温箱(日本岛津公司);色谱柱 Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm,1.7  $\mu\text{m}$ );数据处理软件(Mass Lynx V4.1);HDMS Q-TOF Premier™ 三重四极杆-飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司);AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);Heraeus Fresco 17 高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);S0200-230 涡旋混合仪(上海迪奥生物科技有限公司);Milli Q 超纯水仪(美国 Merck Millipore 公司)。

### 1.2 药品与试剂

HN-1(20170523,纯度 $\geq 99\%$ )由四川大学生物

治疗国家重点实验室提供;内标大黄素(MUST-12022716,纯度 $\geq 98\%$ ,成都曼斯特生物科技有限公司);人肝微粒体(HLM)、大鼠肝微粒体(RLM)、比格犬肝微粒体(DLM)、猴肝微粒体(MLM)、小鼠肝微粒体(MouLM):20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;NADPH 发生系统:A 液、B 液均购自武汉普莱特生物医药技术有限公司,于-80  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存; $\alpha$ -萘黄酮( $\alpha$ -naphthoflavone, ANF,纯度 $>98.0\%$ ,东京化成工业株式会社);毛果芸香碱(pilocarpine,中国食品药品检定研究院);盐酸噻氯匹定(ticlopidine, TCP,纯度 99.7%,中国食品药品检定研究院);奎尼丁(quinidine, QND,纯度 $>98.0\%$ ,TCI 上海化成工业发展有限公司);二乙基二硫代氨基甲酸钠(clomethiazole, DDTC,纯度 $>99\%$ ,Sigma 公司);酮康唑(ketoconazole, KCZ,纯度 99.0%,Dr. Ehrenstorfer 公司);磺胺苯吡唑(sulphaphenazole, SUP,纯度 $>99\%$ ,Sigma 公司);甲醇(批号 186343, Fisher Scientific 公司);甲酸(色谱纯,纯度 98%,批号 1001003297, Fluka Analytical 公司);水为纯化水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

2.1.1 HN-1 溶液的制备 精密称取 HN-1 适量,用甲醇溶解制备成质量浓度为 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱密封保存,备用。

2.1.2 内标溶液的制备 精密称取大黄素对照品适量,用甲醇稀释成 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的内标工作液。

### 2.2 LC-MS/MS 条件

2.2.1 液相条件 Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7  $\mu\text{m}$ ) 流动相为 0.1% 甲酸水(A 相)-甲醇(B 相),梯度洗脱(0~1 min,60%~95% B;1~2.5 min,95% B);流速 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,平衡 1 min,进样体积 1  $\mu\text{L}$ 。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI<sup>+</sup>);离子喷雾电压 5.5 kV;离子源温度 500  $^{\circ}\text{C}$ ;气帘气压力 20 psi(1 psi $\approx 6.895$  kPa)。采用多反应监测(MRM)模式监测,HN-1 和内标大黄素离子对分别为  $m/z$  425.2 $\rightarrow m/z$  395.2 和  $m/z$  271.1 $\rightarrow m/z$  169.1,碰撞能量(CE)48 eV,去簇电压(DP)均为 120 V;离子束聚焦电压(EP)10 V,碰撞池出口电压(CXP)10 V,驻留时间 0.10 s。

### 2.3 HN-1 在各种属代谢稳定性研究

参照文献方法<sup>[18]</sup>,配制孵育体系总体积为 200

$\mu\text{L}$ ,其中包含磷酸盐缓冲液(即 PBS,  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.4)  $188\text{ }\mu\text{L}$ 和 NADPH 孵育系统  $12\text{ }\mu\text{L}$ (含 A 液  $10\text{ }\mu\text{L}$ 和 B 液  $2\text{ }\mu\text{L}$ ,于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰浴上混合而得)冰浴上加入  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HN-1  $2\text{ }\mu\text{L}$ 后,在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预孵育  $5\text{ min}$ ,分别加入  $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 肝微粒体启动反应。在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中继续孵育  $0, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60\text{ min}$ 后,立即加入  $400\text{ }\mu\text{L}$ 含大黄素  $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的冰甲醇终止反应。涡旋  $3\text{ min}$ ,离心( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ )  $15\text{ min}$ ,取上清液进样,实验平行 3 份。

## 2.4 HN-1 在 RLM 中的代谢表型研究

参照文献方法<sup>[19]</sup>,采用化学抑制剂法对 HN-1 进行代谢表型研究,将 RLM 和各 CYP450 同工酶特异性抑制剂与 HN-1 共孵育,通过测定各抑制剂对 HN-1 代谢的影响,考察参与 HN-1 代谢主要的 CYP 酶。按照 2.2 项下孵育条件,实验组分别加入各特异性抑制剂 ANF(CYP1A1 抑制剂,  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), TCP(CYP2C19 抑制剂,  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), QND(CYP2D6 抑制剂,  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DDTC(CYP2E1 抑制剂,  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), KCZ(CYP3A4 抑制剂,  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), SUP(CYP2C9 抑制剂,  $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pilocarpine(CYP2A6 抑制剂,  $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。同时设置未反应的阴性对照组(不加抑制剂和 NADPH 系统,用等体积甲醇代替),完全反应的阳性对照组(不加抑制剂,用等体积甲醇代替)。测定各组 HN-1 的剩余浓度,考察不同抑制剂对其代谢的影响,实验平行 3 份。

## 2.5 HN-1 在 5 个种属中的体外代谢产物研究

在 2.3 项体系中,加入初始浓度为  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 HN-1 工作液  $2\text{ }\mu\text{L}$ ,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预孵  $5\text{ min}$ 后,加入  $5\text{ }\mu\text{L}$ 各种属肝微粒体,分别于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育  $0\text{ min}$ 和  $60\text{ min}$ 后加入  $400\text{ }\mu\text{L}$ 含内标的冰甲醇终止反应,按照 2.3 项下处理后,用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测,通过对比孵育  $0\text{ min}$ 和  $60\text{ min}$ 样品离子流图,推测 HN-1 在各种属肝微粒体中的代谢产物。

## 2.6 HN-1 体内代谢产物研究

### 2.6.1 生物样本采集

取 SD 大鼠 6 只,随机分为对照组、血样组和粪尿组,于代谢笼中适应性饲养 2 d,室内温度保持在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度在  $(50\pm 10)\%$ ,给药前 12 h 禁食不禁水,将空白血液、尿液和粪便样品收集在 BD 管中,于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

按  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药剂量,分别尾静脉注射生理盐水(对照组),HN-1 溶液(实验组)。血样组分别

于给药后 1, 2 h 收集血液样品,尿液和粪便样品于给药后 24 h 收集(每 8 h 收集 1 次)。血液样品经离心( $3\text{ }500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $15\text{ min}$ )后取上清液即得血浆样品,所有样品均保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.6.2 样品预处理

血浆、尿液样品:取  $1\text{ mL}$ 加入到活化的固相萃取小柱中,用 5% 甲醇  $1\text{ mL}$ 洗涤 3 次,弃去,再加入  $1\text{ mL}$ 甲醇,收集洗脱液于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行氮吹,所得残渣加入 95% 的甲醇  $100\text{ }\mu\text{L}$ 涡旋复溶,  $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心  $15\text{ min}$ ,取上层清液进样分析。

粪便样品:精密称定一定量的干燥粪便,研磨粉碎,每  $1\text{ g}$ 粪便粗粉加入  $5\text{ mL}$ 甲醇浸提 2 h 后,  $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心  $15\text{ min}$ ,取上层清液于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行氮吹,所得残渣加入 95% 的甲醇  $100\text{ }\mu\text{L}$ 涡旋复溶,  $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心  $15\text{ min}$ ,取上层清液进样分析。通过对比空白与给药后粪尿血浆样品离子流色谱图,推测 HN-1 的体内代谢产物。

## 2.7 数据处理与分析

体外代谢稳定性:将 HN-1 的  $0\text{ min}$ 浓度作为 100%,各时间点与其浓度比值得剩余底物浓度百分数。各剩余底物浓度百分数的自然对数( $y$ )与孵育时间( $x$ )进行线性回归,得斜率  $k$ ,由公式  $t_{1/2} = -0.693/k$ ,计算得体外代谢半衰期( $t_{1/2}$ );公式  $CL_{int} = 0.693 \times \text{孵育液}(\text{mL}) / [t_{1/2} \times \text{肝微粒体}(\text{mg})]$ ,计算得其固有清除率<sup>[20]</sup>。抑制率<sup>[21]</sup> =  $[1 - (\text{阴性对照组浓度} - \text{试验组样品剩余浓度}) / (\text{阴性对照组浓度} - \text{阳性对照组剩余浓度})] \times 100\%$ 。

## 3 结果

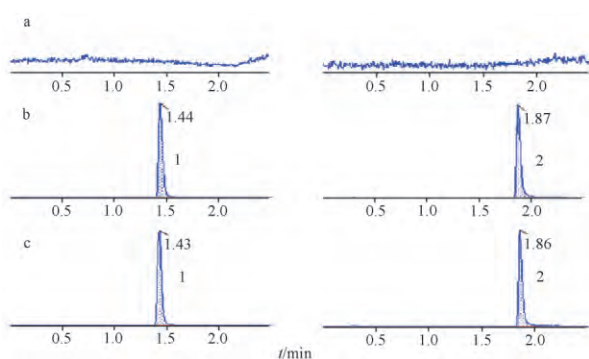
### 3.1 方法学验证

#### 3.1.1 专属性

按照 2.3 项下条件,用高温灭活的肝微粒体,分别制备空白样品和含内标和 HN-1 标准溶液的对照品,与实验温孵样品进行 LC-MS 分析,考察方法的专属性。结果显示:空白样品无干扰峰,内标大黄素与 HN-1 分离度好,保留时间分别为 1.87, 1.44 min,证明该方法专属性良好,特异性高,见图 2。

#### 3.1.2 线性与范围

于灭活的肝微粒体中加入系列浓度的 HN-1 标准溶液,配制成终浓度分别为 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的标准品溶液,进行 LC-MS 分析,将药物与内标峰面积比值与药物终浓度作线性回归,考察 3 条标准曲线,结果分别为  $y = 0.095\ 71x + 0.100\ 8$  ( $R^2 =$



a. 空白肝微粒体样品; b. 灭活肝微粒体加入 HN-1 (1) 和大黄素 (2) 对照品; c. HN-1 和内标大黄素肝微粒体温孵样品。

图2 HN-1 与内标大黄素的色谱图

Fig.2 Chromatograms of HN-1 and internal standard compound emodin

$y = 0.1018x + 0.08091$  ( $R^2 = 0.99954$ ),  $y = 0.0926x + 0.11739$  ( $R^2 = 0.99904$ ), 表明 HN-1 质量浓度在  $3.91 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  成线性相关, 根据信噪比  $S/N \geq 10$ ,  $S/N \geq 3$  得到最低定量限为  $3.91 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.1.3 精密度与准确度** 按照 3.1.2 项下, 配制质量浓度分别为  $7.81$ 、 $62.5$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的低、中、高质量浓度的质控样品, 每个质量浓度质控样品平行 5 份, 进样分析, 测定 HN-1 的浓度, 考察日内精密度; 连续进样 3 d, 考察日间精密度; 同法制备该质量浓度质控样品, 进样分析, 计算各质控样品测得浓度与理论浓度的回收率, 评价该方法的准确度; 低、中、高质量浓度质控样品的日内、日间 RSD 均小于 10%, 准确度(即回收率)在  $89.51\% \sim 104.03\%$ , 符合生物样品定量分析的相关要求<sup>[22]</sup>。表明该方法精密度、准确度良好, 测得结果准确可信, 见表 1。

表1 HN-1 的精密度、准确度和基质效应测定 ( $n=5$ )

Table 1 Precision, accuracy and matrix effect of HN-1 ( $n=5$ )

质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	精密度 RSD/%		准确度/%	基质效应/%
	日内	日间		
7.81	8.8	6.6	95.94±5.69	99.96±1.99
62.5	4.2	5.7	95.65±2.45	101.1±2.44
400	5.8	3.9	100.6±2.78	100.4±2.42

**3.1.4 基质效应** 按照 3.1.2 项下, 用灭活后的肝微粒体配制质量浓度分别为  $7.81$ 、 $62.5$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的低、中、高质量浓度的质控样品, 同时用流动相配

制相同质量浓度的 HN-1 对照品溶液, 进样分析, 分别得峰面积 A 和 B。每组平行 5 份。基质效应表示为  $A/B \times 100\%$ 。HN-1 基质效应在  $96.90\% \sim 103.5\%$ , 变异系数  $< 5\%$ <sup>[22]</sup>, 表明此提取方法无基质效应, 见表 1。

**3.1.5 稳定性** 按照 3.1.2 项下, 配制质量浓度分别为  $7.81$ 、 $62.5$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的低、中、高质量浓度的质控样品, 进样分析。每组平行 5 份, 考察各质控样品于自动进样室内放置 24 h 的稳定性、 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  放置 15 d 的长期稳定性以及冻融 5 次后的冻融稳定性。结果显示在上述各条件下, HN-1 样品稳定性良好, 见表 2。

表2 HN-1 的稳定性测定 ( $n=5$ )

Table 2 Stability measurement of HN-1 ( $n=5$ )

质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	进样器 12 h 稳定性 (RSD) /%	长期稳定性 (RSD) /%	冻融稳定性 (RSD) /%
7.81	6.6	5.6	2.9
62.5	1.5	2.8	1.6
400	4.5	4.4	2.9

## 3.2 HN-1 在不同种属肝微粒体中的代谢特征

**3.2.1 代谢稳定性** HN-1 在各种属肝微粒体中均有一定的代谢, 在鼠和猴肝微粒体中代谢较为明显, 犬与人的代谢相似。将 HN-1 剩余百分数的自然对数与孵育时间经线性回归, 可知 HN-1 在各种属肝微粒体中  $0 \sim 15 \text{ min}$  均呈良好的线性关系。在大鼠、小鼠、猴、犬和人肝微粒体中的线性回归方程分别为  $y = -0.0026x + 4.5922$  ( $R^2 = 0.9179$ ),  $y = -0.003x + 4.5729$  ( $R^2 = 0.9092$ ),  $y = -0.0027x + 4.5995$  ( $R^2 = 0.958$ ),  $y = -0.0012x + 4.5828$  ( $R^2 = 0.8577$ ),  $y = -0.0013x + 4.5654$  ( $R^2 = 0.5929$ )。HN-1 在各种属代谢均较慢, 人的  $t_{1/2}$  为  $533.08 \text{ min}$ , 与犬 ( $577.50 \text{ min}$ ) 相近, 见表 3, 图 3。

表3 HN-1 在各种属肝微粒体中代谢稳定性

Table 3 *In vitro* metabolic stability parameters of HN-1 in human, rat, Beagle dog, monkey and mouse liver microsomes

种属	$t_{1/2} / \text{min}$	$CL_{int} / \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
大鼠	231.00	0.0060
小鼠	266.54	0.0052
猴	256.67	0.0054
犬	577.50	0.0024
人	533.08	0.0026

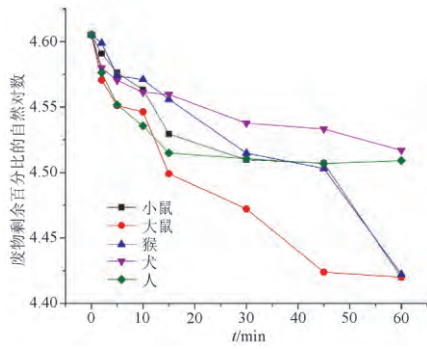


图3 HN-1 在各种属肝微粒体中不同时间点与底物剩余百分比的自然对数孵育曲线

Fig.3 The natural logarithmic incubation curves of HN-1 with the percentage of substrate remaining at each time point in various liver microsomes

表4 各抑制剂对人肝微粒体中 HN-1 代谢的影响

Table 4 Effect of inhibitors on metabolism of HN-1 in human liver microsomes

抑制亚型	HN-1 质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			平均质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	抑制率/%
	1	2	3			
ANF( CYP1A1)	403.29	415.68	432.50	417.16	3.5	86.92
TCP( CYP2C19)	368.85	378.95	419.41	389.07	6.9	17.91
QND( CYP2D6)	388.97	432.38	407.39	409.58	5.3	68.31
DDTC( CYP2E1)	390.16	408.47	379.74	392.79	3.7	27.05
KCZ( CYP3A4)	396.49	419.60	431.50	415.86	4.3	83.74
SUP( CYP2C9)	387.11	377.83	390.09	385.01	1.7	7.93
pilocarpine( CYP2A6)	384.52	402.41	379.30	388.74	3.1	17.11
阳性对照	349.88	400.83	394.63	381.78	7.3	0.00
阴性对照	392.05	418.33	457.06	422.48	7.7	-

以小鼠代谢产物为代表的总离子流图见图4。因M1、M2和M3在体内代谢中也产生,故代谢产物分析见后文。

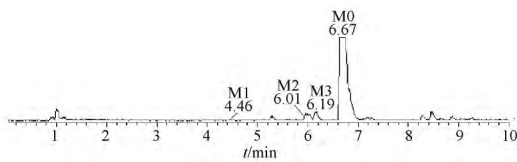


图4 以小鼠为代表的体外代谢产物总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of *in vitro* metabolites represented by mice

**3.2.4 体内代谢产物** 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS检测,通过对比给药前后的大鼠血浆、尿液和粪便生物样本图谱,结合色谱保留时间、精确相对分子质量以及各级碎片离子等信息分析,推测出的代谢产物可能的结构,预测HN-1化合物在体内可能

**3.2.2 代谢表型** 在化学抑制剂法中,利用不同酶抑制剂对RLM中CYP450同工酶特异性抑制,以确定参与HN-1代谢的酶。各选择性CYP450酶抑制剂对HN-1在人肝微粒体中代谢的影响,见表4。结果表明CYP1A1、CYP2D6和CYP3A4是参与HN-1代谢的主要同工酶,抑制率分别为86.92%、68.31%、83.74%。

**3.2.3 体外代谢产物** 采用一级全扫描正离子方式检测,比较0、60 min 2个时间点的色谱图差异,初步判断HN-1的体外代谢产物。结果显示5个种属均有3个体外代谢产物,M1(4.46 min)、M2(6.01 min)、M3(6.19 min), $m/z$ 依次为441.154 9([M+H]<sup>+</sup>)、411.144 5([M+H]<sup>+</sup>)、411.144 5([M+H]<sup>+</sup>)。

的代谢途径,共鉴定原型在内的6个代谢产物,其中粪便、尿液中均鉴定6个,血浆中鉴定5个,见图5、表5。

粪便中代谢产物总离子流图见图6,原药M0(C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>)洗脱时间为9.79 min,准分子离子峰为[M+H]<sup>+</sup> $m/z$  425.2,其二级质谱主要的特征碎片离子有 $m/z$  395.1 [M+H-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 411.1 [M+H-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 217.1 [M+H-C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>;可能的裂解途径见图7。利用代谢产物与原型药具有相似的断裂途径, $m/z$  395.2、411.1、217.1可作为快速鉴别HN-1体内代谢产物的特征性离子。各代谢产物的一级色谱图见图8,二级色谱图见图9。

M1的准分子离子峰为[M+H]<sup>+</sup> $m/z$  441.2,推测其分子式为C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>,比M0相对分子质量多16,推断为M0加上OH而成。其二级质谱主要的特征碎片离子有 $m/z$  411.1、383.1、395.1、425.2。其中

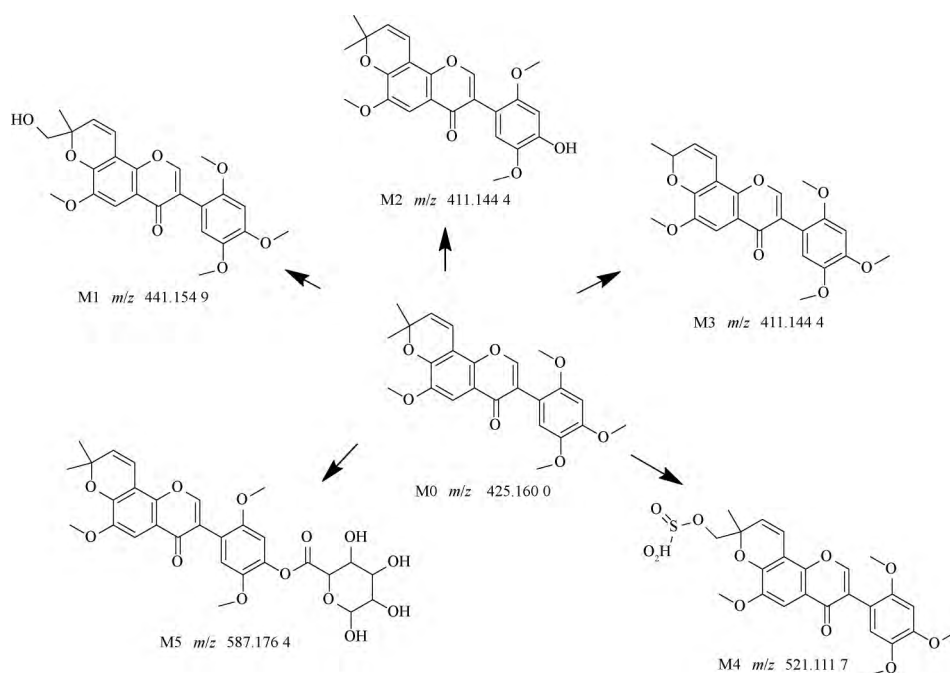


图5 HN-1在大鼠体内的主要代谢途径

Fig.5 The main metabolic pathway of HN-1 in rats

表5 给药后 HN-1 代谢产物表征

Table 5 Characterization of HN-1 metabolites after administration

化合物	分子式	$t_R$ /min	[M+H] <sup>+</sup> ( $m/z$ )			碎片	代谢途径
			实测值	理论值	误差		
M0	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	9.79	425.1601	425.1600	0.2	395.1490, 411.1444, 217.0857	
M1	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	7.04	441.1547	441.1549	0.5	383.1131, 411.1436, 425.1608, 395.1494	甲基羟基化
M2	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	8.99	411.1449	411.1444	1.2	381.1338, 203.0708, 175.0758, 123.0451, 259.0975	去甲基化
M3	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	9.14	411.1442	411.1444	0.5	381.1338, 217.0868, 187.0762, 169.0958	去甲基化
M4	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> S	6.26	521.1115	521.1117	0.6	441.1540, 353.0327, 371.1490	硫酸酯化
M5	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	6.92	587.1760	587.1764	0.7	411.1438, 471.1290, 395.1487	葡萄糖醛酸化

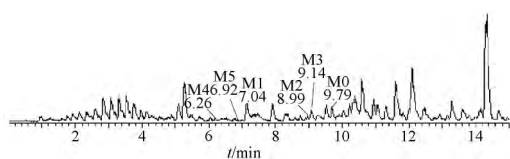


图6 粪便中代谢产物总离子流图

Fig.6 Total ion chromatogram of metabolites in feces

$m/z$  383.1 为 M1 脱去  $CH_2O$  和  $CH_2$  形成,由上推测 M1 可能为 HN-1 的羟基化代谢产物,见图 10。

M2 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  411.1,推测其分子式  $C_{23}H_{22}O_7$ ,与 M0 相对分子质量相差 14,推测为 M0 脱去 1 分子  $CH_2$  形成,其二级质谱主要

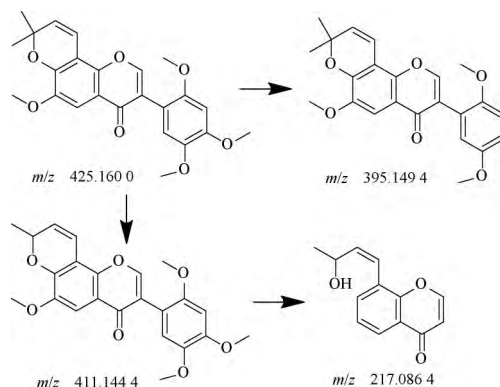


图7 HN-1 可能的裂解机制

Fig.7 Possible fragmentation pathways of HN-1

的特征碎片离子有  $m/z$  381.1, 203.1, 175.1, 123.0,

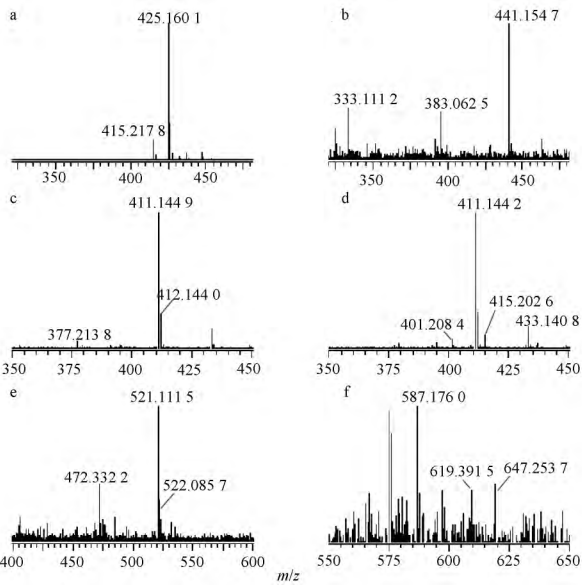


图 8 HN-1 体内代谢产物的一级质谱图  
Fig.8 The MS spectra of HN-1 and its metabolites *in vivo*

图 8 HN-1 体内代谢产物的一级质谱图

Fig.8 The MS spectra of HN-1 and its metabolites *in vivo*

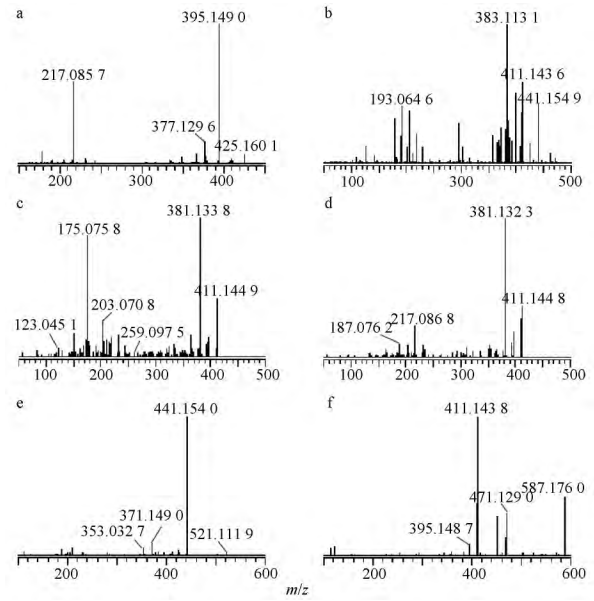


图 9 HN-1 体内代谢产物的二级质谱图

Fig.9 The MS/MS spectra of HN-1 and its metabolites *in vivo*

259.1。其中  $m/z$  381.1 为 M2 脱去  $\text{CH}_3\text{O}$  后形成的碎片;  $m/z$  123.0 和 259.1 为  $m/z$  381.1 碎片中苯环

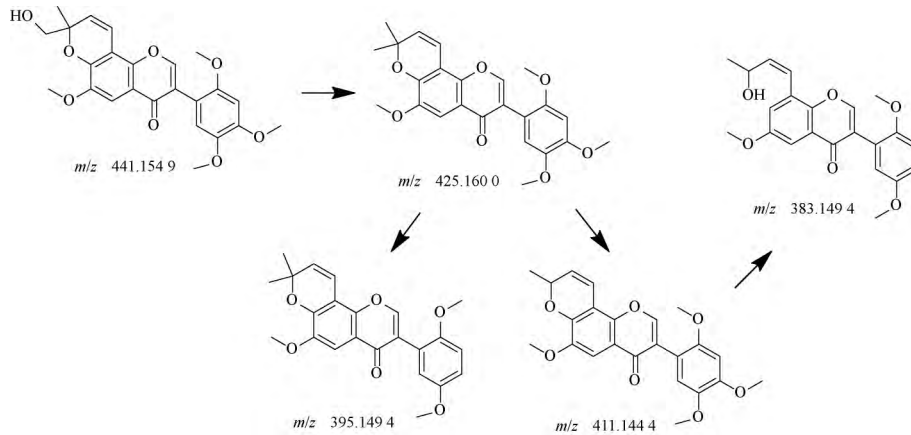


图 10 M1 可能的裂解机制

Fig.10 Possible fragmentation pathways of M1

与吡喃酮连接的碳碳键断裂而成;  $m/z$  203.1 和 175.1 分别为 M2 脱去  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$  而形成的碎片。由上分析, M2 可能为 HN-1 苯环上甲氧基的去甲基化代谢产物, 见图 11。

M3 的准分子离子峰为  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  411.1, 推测其分子式  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ , 与 M2 为同分异构体, 其二级质谱主要的特征碎片离子有  $m/z$  381.1, 217.1, 187.1, 217.1, 169.1。其中  $m/z$  217.1 和 187.1 分别为 M3 脱去  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$  形成的碎片;  $m/z$

169.1 为 M3 中苯环与吡喃酮连接的碳碳键断裂后的 3-甲氧基苯环碎片;  $m/z$  217.1 为  $m/z$  381.1 脱去  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$  形成的碎片; 由上推断 M3 可能为为 HN-1 六元环的去甲基化代谢产物, 见图 12。

M4 的准分子离子峰为  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  521.1, 分子式为  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ , 比 M1 多 80, 推测是由 M0 羟基化后硫酸酯化形成, 二级质谱主要的碎片离子有  $m/z$  441.2, 353.0, 371.1。其中  $m/z$  353.0 相对分子质量比 M4 少 167, 为 M4 脱去 3-甲氧基苯

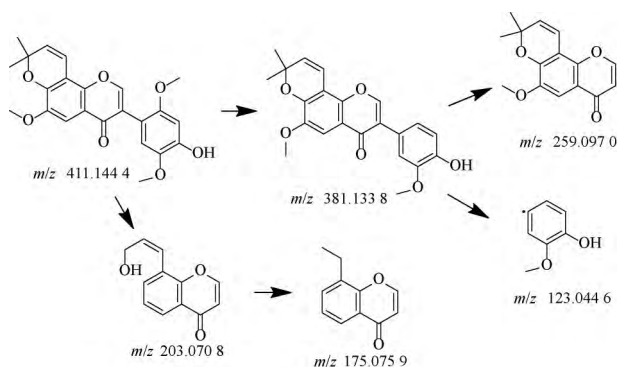


图 11 M2 可能的裂解机制

Fig.11 Possible fragmentation pathways of M2

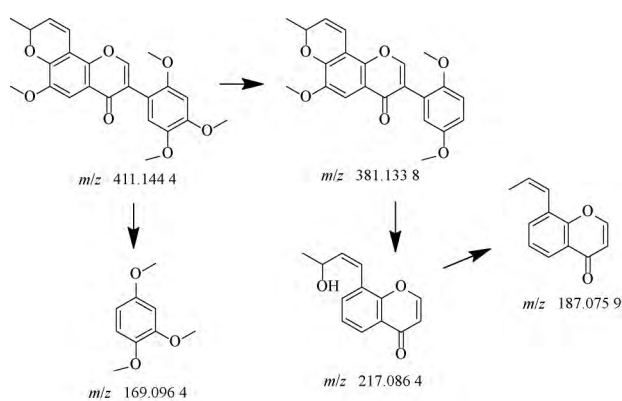


图 12 M3 可能的裂解机制

Fig.12 Possible fragmentation pathways of M3

环而成;  $m/z$  371.1 为碎片 441.2 脱去  $C_3H_2O_2$  形成。综上推测, M4 可能为 HN-1 的硫酸酯化产物, 见图 13。

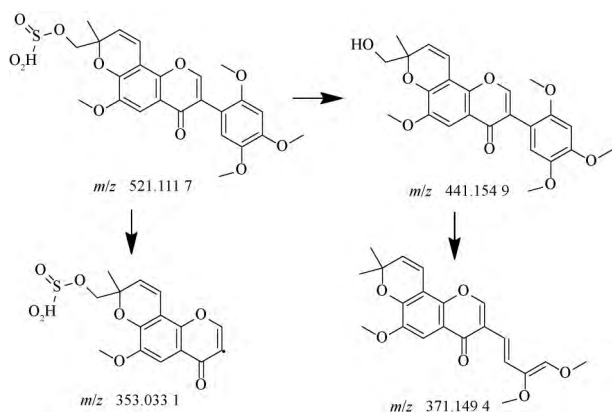


图 13 M4 可能的裂解机制

Fig.13 Possible fragmentation pathways of M4

M5 的准分子离子峰为  $[M+H]^+$   $m/z$  587.3 推

测其分子式为  $C_{29}H_{30}O_{13}$ , 比 M2 相对分子质量多 176, 推测 M5 是在 M3 的基础上葡萄糖醛酸化形成, 其主要的二级质谱特征离子碎片为  $m/z$  411.1, 471.1, 395.1, 176.0。其中  $m/z$  411.1 和 395.1 与 M0 碎片相同,  $m/z$  176.0 为脱落的葡萄糖醛酸,  $m/z$  471.1 为 M5 脱去  $C_5H_8O_3$  形成的碎片, 由上分析, M5 可能为 HN-1 葡萄糖醛酸化代谢产物, 见图 14。

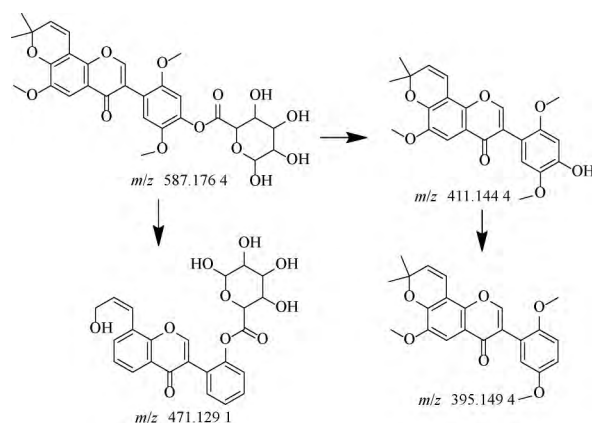


图 14 M5 可能的裂解机制

Fig.14 Possible fragmentation pathways of M5

#### 4 结论

海南崖豆藤是一味具有良好抗炎疗效的中药, HN-1 作为其主要的抗炎成分, 国内外对其研究较少, 尚未见关于其体内外代谢研究相关报道。本实验以小鼠肝微粒体为代表, 建立了肝微粒体中 HN-1 的 UFLC-MS/MS 检测方法, 并进行了方法学验证, 其专属性、线性、精密度、准确度、基质效应及稳定性均符合生物样品检测要求<sup>[23]</sup>。由代谢稳定性结果可知: HN-1 在小鼠、大鼠、猴、犬和人 5 个种属肝微粒体中均代谢较慢, 稳定性好, 与代谢产物较少结果一致; 半衰期分别为 231.00, 266.54, 256.67, 577.50, 533.08 min, 结果显示 HN-1 在人与犬肝微粒体中代谢半衰期接近, 后续研究中可将其作为人肝微粒体不良反应评估指标。

代谢表型研究作为分析药物代谢酶及判断药物间相互作用的重要手段, 对新药研发早期阶段具有重要意义。代谢表型研究结果显示 CYP1A1, CYP2D6 和 CYP3A4 是 HN-1 的主要代谢酶, 故在 HN-1 与其他药联用时, 应考虑经 CYP1A1, CYP2D6 和 CYP3A4 代谢的药物间相互作用。各种属体外代



谢产物均有 M1 (441.2), M2 (411.1) 和 M3 (411.1), 代谢产物无明显差异; 初步推断包括原型在内的体内代谢产物 6 个, 其中血浆中 5 个, 粪便和尿液均 6 个, 代谢途径包括去甲基化、羟基化、硫酸酯化和葡萄糖醛酸化。结果表明在疗效发挥过程中代谢产物占比较小, 其主要通过 HN-1 化合物原型起抗炎作用。本研究对 HN-1 进行了体内外代谢研究, 初步推断体内外代谢产物, 为其进一步的研究开发奠定了物质基础。

## [参考文献]

- [1] Shi X, Liu D, Zhang J, et al. Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara*, contribute to anti-tumor *in vitro* [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16 (1): 245.
- [2] Li Qinglin, Xin Wenxiu, Zhong Like, et al. A study on the anti-tumor mechanism of total flavonoids from Radix Tetrastigmae against additional cell line based on COX-2-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8 (33): 54304.
- [3] Cushnie T P T, Lamb A J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(2): 99.
- [4] Wan L, Jiang J G. Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury [J]. J Funct Foods, 2018, 44: 283.
- [5] Garcíalafuente A, Guillamón E, Villares A, et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease [J]. Inflamm Res, 2009, 58(9): 537.
- [6] Zeinali M, Rezaee S A, Hosseinzadeh H. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 998.
- [7] Teresa V, Rodríguez-Nogales Alba, Francesca A, et al. Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review [J]. Nutrients, 2016, 8(4): 211.
- [8] Fang S C, Hsu C L, Lin H T, et al. Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from *Millettia areticulata* Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells [J]. J Agr Food Chem, 2010, 58(2): 814.
- [9] 许梦莹, 郭日新, 张晓, 等. 沙苑子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1459.
- [10] 周北斗, 张项林, 牛海渊, 等. 蔓九节枝叶中化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 4878.
- [11] 王小俊, 邓玉环, 张丽萍, 等. UPLC-DAD-MS 定性和定量分析蕲艾中的酚酸和黄酮类成分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 983.
- [12] 郑雪花, 姜赞, 王小雨, 等. 黄酮类化合物对 AKR1C3 抑制作用的研究 [J]. 今日药学, 2018, 28(8): 505.
- [13] 邵葵阳, 张璇, 焦文君, 等. 珍珠梅黄酮纳米粒抑制脂多糖诱发肝癌细胞的炎性作用 [J]. 药学报, 2017, 52(10): 1549.
- [14] Ye H, Wu W, Liu Z, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammation flavonoids from the stems of *Millettia dielsiana* Harms. [J]. Fitoterapia, 2014, 95(2): 154.
- [15] Aggarwal B B, Gupta S C, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers [J]. Bri J Pharm, 2013, 169(8): 1672.
- [16] Kollias G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity [J]. Semin Arthritis Rheum, 2005, 34(5): 3.
- [17] Ting G, Dong-Xiao W, Ruo-Yun C, et al. Novel benzil and isoflavone derivatives from *Millettia adielsiana* [J]. Planta Med, 2009, 75(3): 236.
- [18] Cohen L H, Remley M J, Raunig D, et al. *In vitro* drug interaction of cytochrome P450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrants [J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(8): 1005.
- [19] Liu Z J, Fu D X, Tang G. FDA drug interaction research guide (draft) interpretation of 2006 edition [J]. J Int Pharm Res, 2008, 35(1): 50.
- [20] Mohutsky M A, Chienv J Y, Ring B J, et al. Predictions of the *in vivo* clearance of drugs from rate of loss using human liver microsomes for phase I and phase II biotransformations [J]. Pharm Res, 2006, 23(4): 654.
- [21] Li C Z, Lin Q H, Zhang X M, et al. *In vitro* O-demethylation of rotundine by recombinant human CYP isoenzyme [J]. Acta Pharm Sin, 2010, 45(3): 307.
- [22] 中国药典. 四部 [S]. 2015: 363.
- [23] 常立娟, 李佐静, 李清, 等. 雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 89.

[责任编辑 张宁宁]