

银杏黄酮山奈酚的体外葡醛酸结合反应

顾少君, 姚彤炜*, 胡静

(浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室, 浙江 杭州 310031)

摘要: 目的 旨在了解银杏黄酮山奈酚代谢的有关酶系及酶动力学参数。方法 采用苯巴比妥(PB)、地塞米松(DEX)、 β -萘黄酮(BNF)和地非三唑(DIPH)诱导SD大鼠,与未诱导大鼠分别作为体外代谢的5种不同酶源。取山奈酚和鼠肝微粒体25℃下共孵育,HPLC法测定孵育液中剩余底物浓度。比较不同诱导剂处理的鼠肝微粒体对山奈酚代谢的催化活性,以未作任何处理的鼠肝微粒体为空白对照。结果 山奈酚在BNF和DIPH诱导的鼠肝微粒体中有较强的代谢作用,而在PB, DEX诱导的鼠肝微粒体和空白组微粒体中的代谢较弱。在 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的微粒体蛋白质浓度的孵育液中,山奈酚($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)经45 min 孵育后,分别有62.9% (DIPH), 40.1% (BNF), 21.1% (PB), 23.7% (DEX)和18.0% (空白组)的量被代谢。测得山奈酚在空白对照组、BNF和DIPH诱导的微粒体中的 K_m 值分别为(1.85 ± 1.05), (9.41 ± 2.45)和(72.4 ± 3.08) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; V_{\max} 值分别为(2.45 ± 0.63), (7.55 ± 1.40)和(25.2 ± 1.08) $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论 山奈酚在各种微粒体中被广泛代谢;BNF和DIPH葡醛酸转移酶的强诱导剂可使山奈酚II相葡萄糖醛酸苷结合反应增强。

关键词: 山奈酚; 葡萄糖醛酸苷结合; 微粒体; 药物代谢; 色谱法, 高效液相

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)06-0451-06

银杏叶提取物具有多种生理活性使其受到广泛

收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2003-06-11

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(302682)

作者简介: 顾少君(1979-),女,杭州人,硕士研究生,研究方向为药物分析和药物代谢研究。

*联系作者 E-mail: yaotw@zjuem.zju.edu.cn Tel/Fax: (0571)87217203

关注,已有不少文献^[1~4]报道了银杏黄酮的提取分离、定性定量分析和药理作用等。了解银杏黄酮在体内的生物转化、排泄及代谢产物的生理活性等,对指导临床用药有重要意义。本实验旨在研究银杏黄酮的主要成分山奈酚的代谢情况,了解其代谢相关的主要酶系,获得代谢酶动力学参数,为进一步研究银杏黄酮的体内外代谢打下实验基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

FD 10VA 组织匀浆机和 Jouan MR1822 自动高速冷冻离心机,日本日立公司;DKZ-1 型电热恒温震荡水槽,上海医用恒温设备厂;LC-10AT 高效液相色谱仪系统,SPD-10AVP 紫外检测器,日本岛津公司;HS2000 色谱处理软件,英谱科技开发有限公司;Agilent 1100 型高效液相色谱仪,G1315B 二极管阵列检测器,HP ChemStations 处理软件,安捷伦科技有限公司。

山奈酚(kaempferol),中国药品生物制品检验所;地非三唑(diphenyltriazol, DIPH)注射液,浙江仙居制药厂,三(羟甲基)氨基甲烷,中国医药上海化学生物试剂站;尿嘧啶二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)、Triton X-100、苯巴比妥(phenobarbital, PB)、地塞米松(dexamethasone, DEX)、 β -萘黄酮(β -naphthoflavone, BNF)为 Sigma 公司产品。UDPGA 溶液的配制:称取UDPGA 适量,加 pH 7.5 磷酸盐缓冲液制成浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液(临用新配)。

1.2 色谱条件

分析柱:Platinum EPS-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相:pH 2.0 磷酸水溶液-四氢呋喃-甲醇-异丙醇(65:15:10:20),流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:380 nm;进样量 20 μL 。

1.3 微粒体制备

取 Sprague-Dawley 雄性大鼠,体重 150 ~ 180 g,中国科学院上海实验动物中心(二级,证书号 003),

分为 DEX, BNF, PB, DIPH 和空白对照组, 每组 2~3 只, 共 3 批。PB 溶于生理盐水, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ip, 3 d; DIPH 油注射液, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ip, 4 d; DEX 混悬于水, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig, 3 d; BNF 溶于茶油, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ip, 3 d; 空白对照组不给任何药物。按文献[5~7]方法诱导、制备微粒体和测定微粒体蛋白质浓度。

1.4 体外孵育反应

取微粒体适量, 加 $2.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100 溶液 $50 \mu\text{L}$, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 溶液 $50 \mu\text{L}$, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 溶液 $10 \mu\text{L}$, 加底物适量, 用 pH 7.5 磷酸盐缓冲液稀释至 1.0 mL, 混匀。使微粒体蛋白质浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 底物终浓度为 $1 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 25°C 下预孵育 3 min, 加 UDPGA 溶液 $20 \mu\text{L}$, 启动反应。孵育一定时间后加 6% HClO_4 0.5 mL 终止反应, 加入内标 ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 桑色素甲醇溶液) $10 \mu\text{L}$, 用乙醚 2.8 mL 和丙酮 0.2 mL 的混合溶液提取, 旋涡 2 min, $2000 \times g$ 离心 10 min。取有机层于氮气流下挥干, 用 $100 \mu\text{L}$ 流动相溶解残渣, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 测定剩余底物浓度。

2 结果与讨论

2.1 最佳实验条件的选择

为求得酶反应的初速度, 以便能较好地反映酶的催化活性。将山奈酚 (终浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与不同蛋白浓度微粒体 ($0.18, 0.36, 0.54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 25°C 分别孵育 3, 6, 10 min。图 1-A 为酶反应进程曲线, 可见在 $0.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 反应曲线基本呈线性, 随着酶浓度的增加曲线弯曲程度变大, 反应速度下降提前。图 1-B 为酶浓度曲线, 时间为 3 min 的一条曲线有较好的线性关系, 而随反应时间增加曲线偏离线性越大。因此确定酶蛋白浓度 $0.18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应时间 3 min 为最佳实验条件。

2.2 山奈酚在孵育液中的稳定性

为消除山奈酚在反应过程中因非代谢因素引起的底物消耗所带来的误差, 比较了不同孵育温度, 不同孵育时间对其稳定性的影响。发现在 25°C 下较 37°C 下稳定, 但即使在 25°C 下, 水浴震荡 45 min 仍有 10% 左右的量被损耗。故为减少误差, 在做代谢-时间曲线时采用空白对照进行校正。即按实际孵育时间做空白对照时间曲线, 计算回归方程, $y = -0.0078x + 4.887$, 求出不同时间下的空白值,

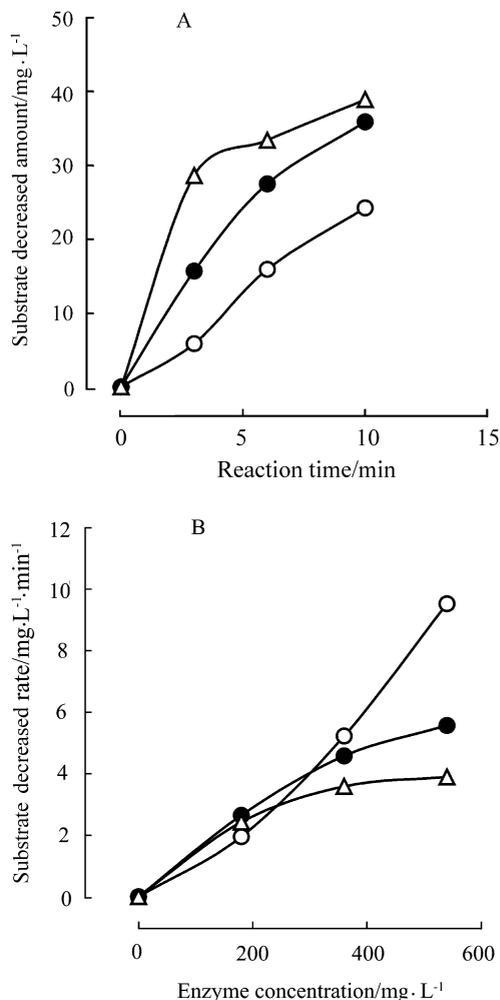


Fig 1. The reactive curve and the concentration curve for enzyme. A: The reactive curve for enzyme. (○) microsomal concentration of $180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, (●) $360 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, (△) $540 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. B: The concentration curve for enzyme. (○) reaction for 3 min, (●) 6 min, (△) 10 min.

对各时间点测定值进行校正。并选择 25°C 作为孵育温度, 在氮气流下挥干有机溶剂。

2.3 山奈酚在不同来源微粒体中的代谢活性和代谢-时间曲线

取不同处理的鼠肝微粒体适量, 按体外孵育项下方法, 使山奈酚终浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 于孵育 3, 10, 20, 30, 45 min 后终止反应, 测定剩余底物浓度 (表 1)。对不同时间孵育后山奈酚的浓度 (c_t) 以 $\lg c_0/c_t \sim t$ 回归^[8], 得回归方程 DIPH: $y = 0.0105x + 0.0166$ ($r = 0.996$); 空白对照组: $y = 0.0017x + 0.0155$ ($r = 0.930$); PB: $y = 0.0022x + 0.0169$ ($r =$

Tab 1. Metabolism of kaempferol in hepatic microsomes of rats treated with different agents

Group	Residual concentration of kaempferol in incubates/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$						Metabolic rate /%
	0	3	10	20	30	45 (min)	
Control	40.0	38.1 ± 0.83	36.2 ± 0.49	34.5 ± 0.63	34.9 ± 3.33	32.8 ± 3.24	18.0 ± 1.78
DIPH	40.0	34.7 ± 1.41	30.1 ± 4.55	23.6 ± 1.96	20.4 ± 3.74	14.5 ± 5.11	62.9 ± 22.2
BNF	40.0	34.8 ± 3.53	34.2 ± 1.75	28.4 ± 5.12	28.7 ± 2.50	24.0 ± 6.31	40.1 ± 10.5
PB	40.0	37.6 ± 0.25	36.1 ± 0.43	33.8 ± 1.84	32.6 ± 2.36	31.5 ± 2.81	21.1 ± 1.89
DEX	40.0	37.3 ± 0.72	36.4 ± 2.35	33.3 ± 0.18	32.2 ± 2.31	30.5 ± 1.39	23.7 ± 1.08

DIPH: diphenyltriazol; BNF: β -naphthoflavone; PB: phenobarbital; DEX: dexamethasone. The data in table are the average value for thrice determination.

0.957); DEX: $y = 0.0025x + 0.0159$ ($r = 0.968$); BNF: $y = 0.0044x + 0.0279$ ($r = 0.959$)。表明山奈酚在各种微粒体孵育液中的反应属于一级反应。孵育液中 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山奈酚经 45 min 孵育后, 分别有 62.9% (DIPH), 40.1% (BNF), 21.1% (PB), 23.7% (DEX) 和 18.0% (空白组) 的量被代谢。代谢半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为: DIPH 组 27.2 min; 空白对照组 167.9 min; PB 组 129.7 min; DEX 组 115.0 min; BNF 组 61.9 min。反应速度常数 (K_i) 分别为: DIPH 组 0.0255; BNF 组 0.0112; 空白对照组 0.00413; PB 组 0.00534; DEX 组 0.00603。以上结果表明 BNF 和 DIPH 诱导的鼠肝微粒体对山奈酚代谢能力较强。从各种微粒体中代谢结果看, 山奈酚在不同的细胞色素 P450 同工酶中有广泛的代谢。

2.4 山奈酚酶动力学参数测定

取 BNF 和 DIPH 诱导的鼠肝微粒体和空白微粒体, 分别加入 25 ~ 2500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山奈酚各 20 μL , 按体外孵育反应项下方法操作, 根据 Lineweaver-Burk 方程式^[9]: $1/v = K_m / (V_{\max} \times [S]) + 1/V_{\max}$, 以 $1/[S] - 1/v$ 进行线性回归, 计算得到山奈酚在 3 种微粒体中的 K_m , V_{\max} 和 Cl_{int} 值 (表 2)。

Tab 2. Enzymatic parameters of kaempferol metabolism in vitro

Inducer	$V_{\max} / \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$K_m / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$Cl_{\text{int}} / \text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
Control	2.45 ± 0.63	1.85 ± 1.05	1.32 ± 0.66
BNF	7.55 ± 1.40	9.41 ± 2.45	0.80 ± 0.05
DIPH	25.2 ± 1.08	72.4 ± 3.08	0.35 ± 0.01

$Cl_{\text{int}} = V_{\max} / K_m \cdot \bar{x} \pm s, n = 3$.

表 2 结果显示, 空白微粒体酶对山奈酚有最大的亲和力, 而 DIPH 诱导的肝微粒体对山奈酚的葡萄糖醛酸苷形成的催化能力最强。

2.5 山奈酚代谢产物的确认

图 2 为山奈酚在 BNF 诱导的鼠肝微粒体中的色谱图。图 2A 为空白孵育液的色谱图, 在内标物和底物色谱峰处无任何峰出现, 表明该实验条件下孵育液中各种成分不干扰山奈酚的测定。图 2C 为山奈酚孵育 3 min 后的色谱图, 与图 2B (不加 UDPGA) 相比, 在 9 min 左右出现了 2 个小峰, 该 2 个小峰随孵育时间延长而增大, 而底物峰随孵育时间延长而降低, 认为该 2 个峰可能为代谢物葡萄糖醛酸苷结合物所致。为使代谢物得到较好的分离, 以便准确定量, 将流动相比比例作适当调整, 在二极管阵列检测器中测得色谱图见图 3。在该流动相条件下, 2 代谢物的保留时间分别为 12 及 13 min, 2 代谢物间的分离度 > 1.3。

山奈酚随孵育时间的消除趋势与 2 代谢物随时间的增加趋势见图 4。因代谢物无对照品, 故采用代谢物与内标的峰面积比值与时间曲线来描述代谢物在孵育过程中的浓度变化情况。由图 4 可见, 山奈酚在前 10 min 的消除速度很快, 10 min 后呈缓慢趋势, 而 2 个代谢物色谱峰面积在前 10 min 的增加速度较快, 以后增加速度减慢, 40 min 时达最大, 然后反应曲线呈缓慢下降趋势, 可能为代谢物分解或进一步代谢所致。

以上实验结果与文献报道一致, Oliveira 等^[10,11] 应用人 UGT-1A9 微粒体和大鼠肝细胞研究山奈酚和槲皮素的体外代谢, 获得同样结果, 提出黄酮类的葡萄糖醛酸苷结合反应主要是由 UDP-葡萄糖

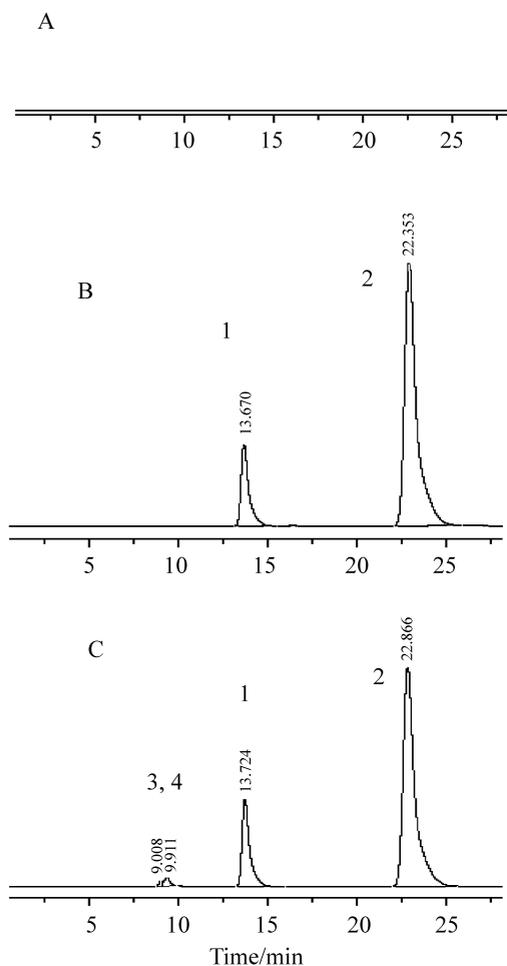


Fig 2. HPLC chromatogram of kaempferol in rat hepatic microsomal incubates. A: chromatogram of blank microsome; B: chromatogram of blank microsome spiked with kaempferol, C: chromatogram of kaempferol incubated at 25°C for 3 min in the microsomes induced by β -naphthoflavone. Peaks: 1. internal standard; 2. kaempferol; 3,4. metabolites.

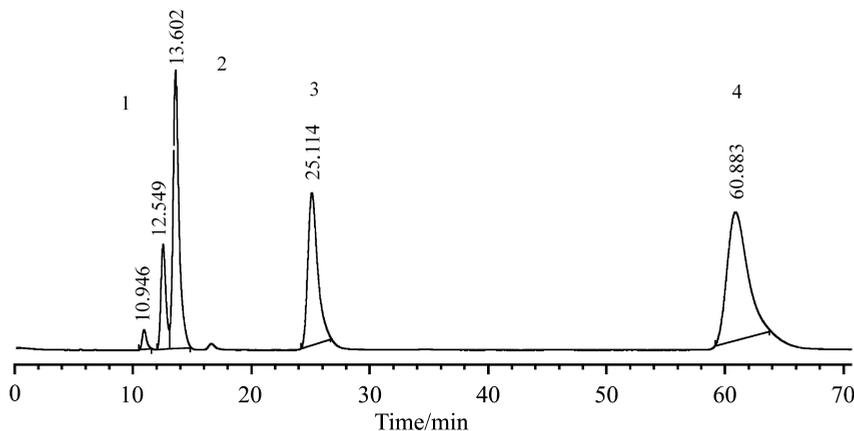


Fig 3. Chromatogram of kaempferol and metabolites incubated for 80 min. The mobile phase consisted of a mixed solution of pH 2 phosphate solution-tetrahydrofuran-methanol-isopropanol (80:11:6:18). Peak: 1. metabolite 1; 2. metabolite 2; 3. internal standard; 4. kaempferol.

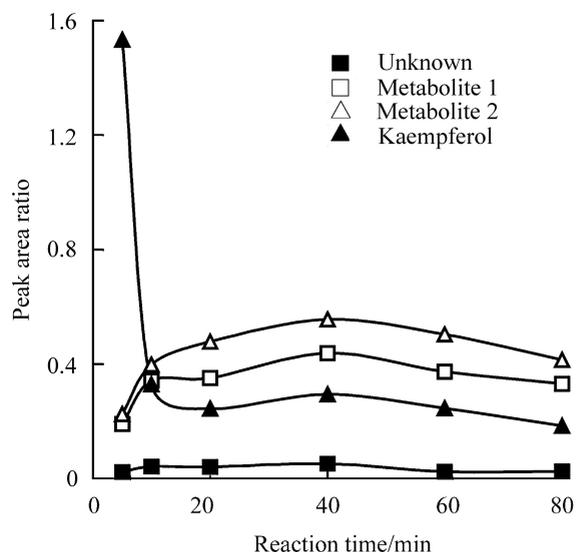


Fig 4. The concentration-time curve for kaempferol and metabolites. Mobile phase 1: pH 2 phosphate solution-tetrahydrofuran-methanol-isopropanol (65:15:10:20) for the determination of kaempferol. Mobile phase 2: pH 2 phosphate solution-tetrahydrofuran-methanol-isopropanol (80:11:6:18) for the determination of metabolites.

转移同工酶 UGT1A9 介导的。作者的实验结果, DIPH 和 BNF 诱导的鼠肝微粒体对山奈酚代谢作用明显强于其他诱导剂诱导的酶和空白对照组,表明这两种物质是葡萄糖醛酸转移酶的强诱导剂。BNF 是经典的药酶诱导剂, DIPH 为三氮唑类化合物,从作者实验室研究结果,该化合物是一种新的药酶诱导剂,其诱导的药酶与 BNF 诱导的酶有相似功能(待发表)。两者诱导的是否是 UGT1A9,则有待于作进一步实验确证。

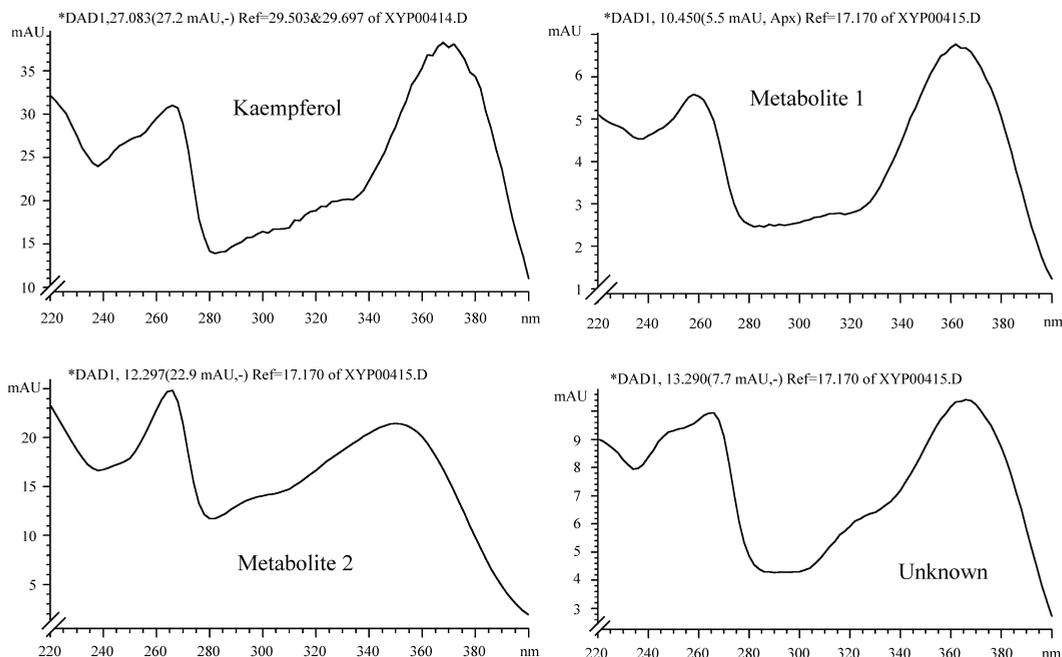


Fig 5. Spectra of kaempferol and metabolites.

采用二极管阵列检测,比较代谢物与底物的紫外吸收光谱图(图5)。由图5显示,代谢物1与底物均在370 nm 波长附近有最大吸收,而代谢物2在350 nm 附近有最大吸收,吸收光谱曲线大致相近。

考虑到葡醛酸结合物的水溶性较大,代谢物在水相中的量可能较乙醚提取液中多,遂取经乙醚提取后剩余的孵育液水相部分进行分析,结果见图6。代谢物形成百分率由各反应时间点单个代谢物的峰面积与浓度-时间曲线中达峰处两个代谢物峰面积和的比值计算得到的。其结果与乙醚相中所得结果比较,代谢物1与代谢物2在两相中的分配刚好相反(比较图4),代谢物2在乙醚相的分配较代谢物1多,而在水相中的分配较代谢物1少,说明其脂溶性较代谢物1大,这与其保留时间较代谢物1长是相一致的。

上述结果初步表明,2个代谢物为山奈酚的葡醛酸结合物。此外,图3中保留时间约为9 min 处还有一小峰,其光谱图与其他代谢物及底物的光谱图相似,此峰为代谢物还是其他有关物质所致将有待于进一步研究。

近年来黄酮类化合物的体内外代谢和其对药酶的诱导抑制作用已引起了人们的关注,Zhu 等^[12]研究表明黄酮类化合物对葡醛酸转移酶有一定的诱导

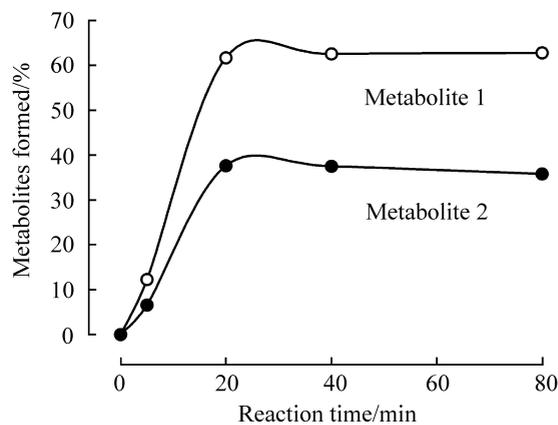


Fig 6. Glucuronidation-time curve for kaempferol. Each point was the ratio of peak area of single metabolite to the peak area sum of these two metabolites at the maximum metabolism level in concentration-time curve.

作用,体外肝微粒体实验表明其对雌激素类的葡醛酸结合有强的抑制作用。由于黄酮类化合物广泛存在于植物和日常饮食中,因此研究其体内外代谢机制和与其他药物或化合物在肝药酶分子水平上的相互作用,具有重要的临床意义。本结果为进一步

研究该类化合物的体内生物转化过程和药物相互作用提供了有益资料。

3 参考文献:

- [1] Deng FX, Zito SW. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations[J]. *J Chromatogr A*, 2003, **986**:121 – 127.
- [2] van Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts[J]. *J Chromatogr A*, 2002, **967**(1):21 – 55.
- [3] Li WK, Fitzloff JF. Simultaneous determination of terpene lactones and flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, **30**:67 – 75.
- [4] Hollman PCH, Katan MB. Absorption metabolism and health effects of dietary flavonoids in man[J]. *Biomed Pharmacother*, 1997, **51**:305 – 310.
- [5] Yao TW, Hu YZ. Metabolism of diphenyltriazol by rat liver microsomes *in vitro*[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2002, **16**(2):128 – 132.
- [6] Gibson GG, Skett P. *Introduction Drug Metabolism*[M]. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1994. 217 – 220.
- [7] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265 – 275.
- [8] Peng B. *Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications*(临床药动学)[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1999. 14 – 19.
- [9] Chen HL, Li WJ. *Molecular Enzymology*(分子酶学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1983. 197.
- [10] Oliveira EJ, Watson DG, Grant MH. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma[J]. *Xenobiotica*, 2002, **32**(4):279 – 287.
- [11] Oliveira EJ, Watson DG. *In vitro* glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes[J]. *FEBS Lett*, 2000, **471**(1):1 – 6.
- [12] Zhu BT, Taneja N, Loder DP, Balentine DA, Conney AH. Effects of tea polyphenols and flavonoids on liver microsomal glucuronidation of estradiol and estrone[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998, **64**(3 – 4):207 – 215.

Glucuronidation of kaempferol in *Ginkgo biloba* flavonoid *in vitro*

GU Shao-Jun, YAO Tong-Wei, HU Jing

(Department of Drug Metabolism, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **AIM** To explore which enzymes are related to the metabolism of *Ginkgo biloba* flavonoid and their kinetic parameters. **METHODS** The metabolism of the flavonoid kaempferol was investigated in hepatic microsomes of rats treated with phenobarbital (PB), dexamethasone (DEX), β -naphthoflavone (BNF), diphenyltriazol (DIPH). The kaempferol was incubated with rat hepatic microsomes at 25°C and the metabolites were determined by HPLC. **RESULTS** The kaempferol was extensively metabolized after 45 min incubation with 62.9% of metabolic rate in the microsomes induced by DIPH, 40.1% by BNF, 21.1% by PB, 23.7% by DEX and 18.0% in control, respectively. Two glucuronides of kaempferol were detected. The K_m of

kaempferol in control microsomes and in microsomes induced by BNF or by DIPH was (1.85 ± 1.05), (9.41 ± 2.45) and (72.4 ± 3.08) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively; V_{max} was (2.45 ± 0.63), (7.55 ± 1.40) and (25.2 ± 1.08) $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** DIPH and BNF, the two potent inducers of glucuronyltransferase could induce more potent glucuronidation of kaempferol in microsomes. **Key words:** kaempferol; glucuronidation; microsomes; drug metabolism; chromatography, high-performance liquid

Foundation item: The project supported by Provincial Natural Science Foundation of Zhejiang(302682)

(本文编辑 石涛)