

抗焦虑新药 AF-5 及其代谢物在人肝微粒体体外温孵体系中代谢研究

李 * , 张金兰, 周同惠

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究一类抗焦虑新药 AF-5 及其代谢物(I,II)在人肝微粒体体外温孵体系中代谢情况。方法 自制人肝微粒体,用 Lowry 法测定酶活性为 $8.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以此配制人肝微粒体体外温孵体系,加入药物,温孵后,提取分离,GC-MS 测定。结果 鉴定了 AF-5 在人肝微粒体体外温孵体系中的两个主要代谢物,并阐明了其体外代谢途径为 AF-5 的 4 位首先氧化为羟基,然后氧化成羰基。结论 AF-5 在体外人肝微粒体温孵体系中,100 min 后完全代谢成羟基代谢物 I 及羰基代谢物 II,以羟基代谢物为主要代谢产物。AF-5 代谢物 I 在人肝微粒体温孵体系中,可转化为代谢物 II,而代谢物 II 在人肝中则不再代谢。

关键词: 抗焦虑药; AF-5; 人肝微粒体

中图分类号: R917; R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)07 - 0528 - 04

国内使用的抗焦虑药多为苯二氮 类和丁螺环酮,苯二氮 类,长期服用有不同程度的副作用,丁螺环酮的副作用虽少,但起效较慢。因此研究新型的抗焦虑药是必要的,也很有前景。我所郭积玉教授课题组从 1992 年开始了抗焦虑新药的研究,根据中药沉香挥发油具有镇静作用的信息,合成了 20 多种新化合物,经药理筛选找到了抗焦虑新药 AF-5,结构见图 1。本文在完成 AF-5 在大鼠体内外的代谢研究^[1]的基础上,进一步报道 AF-5 及其代谢物(I,II)在人肝微粒体温孵体系中的代谢情况。

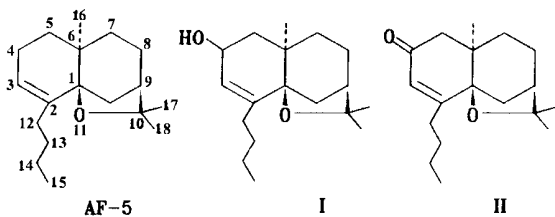


Figure 1 Structures of AF-5 and its two metabolites (I,II)

材料与 方法

药品与试剂 AF-5, 4-羟基 AF-5, 4-羰基 AF-5 均由本所合成室尹大力研究员提供。乙醚,分析纯,北京化工厂。正己烷,色谱级, Tedia 公司。无水

Na_2SO_4 , 分析纯,天津市塘沽邓中化工厂。6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)、6-磷酸葡萄糖、氧化型辅酶 II(NADP)和还原型辅酶 I(NADH)均系 Sigma 公司产品。三羟甲基氨基甲烷(Tris, AR),北京益利精细化学品有限公司。Tris-HCl 缓冲液:含 Tris $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用 HCl 调至 pH 7.4。

GC-MS 联用仪, Finnigan MD 800(英国);匀浆机(Heidolph, 日本)。

人肝微粒体的制备 用超速离心法^[2],新鲜人肝(取自车祸及其他意外死亡),称重,于 3 倍量体积的 Tris-HCl 缓冲液中,用搅碎机绞碎,然后用匀浆机匀浆。上述操作均在 4°C 以下冰浴中操作。匀浆液于 $9\,000 \times g$ 离心 20 min,取上悬液于 $10\,000 \times g$ 离心 30 min,弃去上清液,沉淀为人肝微粒体。在 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖溶液中制成悬浮液,液氮中保存。以 Lowry 法测得人肝微粒体蛋白质含量为 $8.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

人肝微粒体体外温孵体系组成 温孵体系最终体积为 5 mL,内含人肝微粒体 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6-磷酸葡萄糖(G-6-P) $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, G-6-PDH $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 氯化镁(MgCl_2) $4.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, NADP $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, NADH $1.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按上述浓度,混合摇匀后,于 37°C 水浴中振荡 3 min,配制 6 份,每一样品两份,根据情况,分别加入 Tween-80 助溶的 AF-5, 4-羟基 AF-5 或 4-羰基 AF-5 各 2 mg,然后用 Tris-HCl 补充体积至 5 mL。在 37°C 水浴中振荡反应,每 20 min 于液面通氧 0.5 min,温孵时间分为 40 min 及 100

收稿日期: 2000-12-20。

作者简介: 李 (1958 -),女,主管技师。

* Tel: (010) 63165309, Fax: (010) 63017757

min 二种, 到时加入 3 倍体积的乙醚终止代谢反应。

原药及代谢物提取 反应液与乙醚的混合液振荡 5 min, 分取乙醚层, 再以乙醚反复萃取 3 次, 合并乙醚层, 加入无水 Na_2SO_4 适量, 过夜, 过滤, 乙醚液浓缩蒸干。测定前加入正己烷 0.5 mL 溶解, 进行测定。

GC-MS 分析条件 $150\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) $\xrightarrow{7.5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$
 $180\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) $\xrightarrow{2.5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}}$ $260\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), 全离子扫描。EI: 70 eV, 接口温度: $250\text{ }^\circ\text{C}$, 源温: $200\text{ }^\circ\text{C}$ 。

结 果

1 AF-5 在人肝微粒体温孵体系中的代谢

按上述样品处理方法及 GC-MS 分析条件分析了 AF-5 在人肝微粒体体系中温孵 40 min 及 100 min 后的乙醚提取物。色谱图见图 2, 质谱图见图 3。两个代谢物的分子离子峰分别为 278 及 276, 原药的分子离子峰为 262, 可以推断一个为羟基代谢物, 另一个为羰基代谢物, 而且他们的质谱碎片峰与已合成

的 AF-5 类似物 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5 质谱碎片峰基本一致^[1], 因此确定 AF-5 在人肝微粒体中的主要代谢产物有两个, 即羟基代谢物, 及羰基代谢物。比较 AF-5 不同温孵时间, 可以看到温孵 100 min 后, AF-5 峰消失, 已完全转化成 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5, 而且以 4-羟基 AF-5 为主。

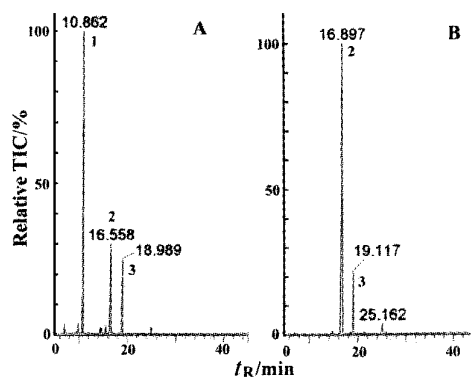


Figure 2 TIC GC chromatograms of AF-5 and its metabolites

A. Incubated for 40 min; B. Incubated for 100 min; 1. AF-5; 2. Metabolite I (4-OH AF-5); 3. Metabolite II (4-CO AF-5)

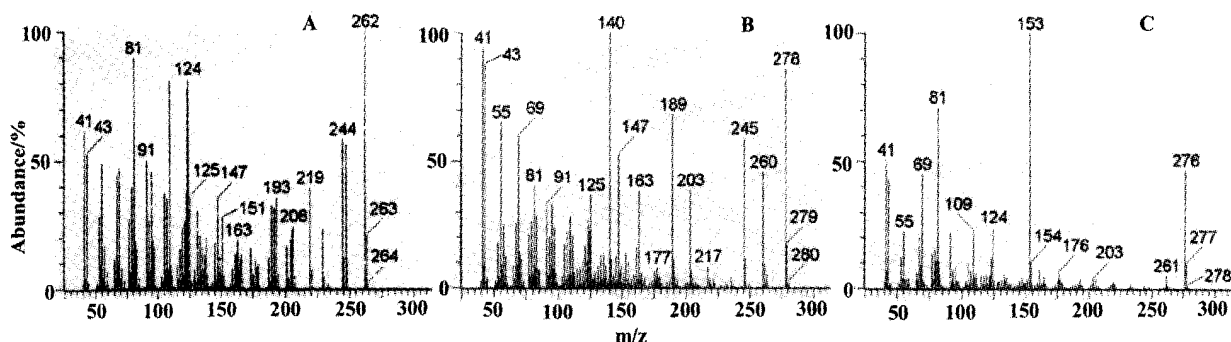


Figure 3 MS spectra of AF-5 and its metabolites

A. AF-5; B. Metabolite I; C. Metabolite II

2 AF-5 代谢物 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5 在人肝微粒体温孵体系中的代谢

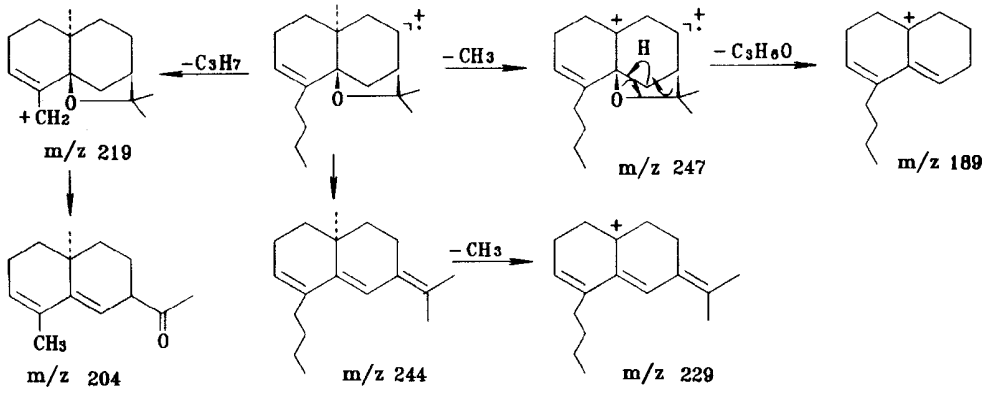
按上述 GC-MS 方法同样分析了 AF-5 两个代谢物 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5 人肝微粒体体系中温孵 40 min 及 100 min 后的代谢物。分析结果表明 4-羟基 AF-5 在两个时间点中都只有一个代谢物, 而且代谢转化率不高, 主要以原药形式存在。代谢物的

分子离子峰为 276, 为 AF-5 的羰基化产物, 质谱碎片峰与 4-羰基 AF-5 一致, 可以确定为 4-羰基 AF-5。4-羰基 AF-5 在人肝微粒体体系中不代谢, 以原药形式存在。

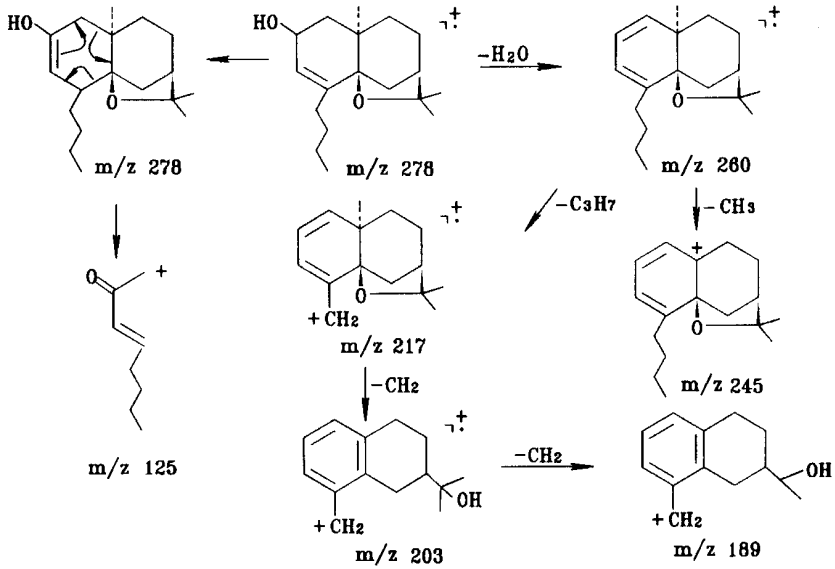
3 AF-5, 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5 质谱裂解规律

根据以上实验结果, 可推导出 AF-5, 4-羟基 AF-5 及 4-羰基 AF-5 的质谱裂解方式及主要碎片。

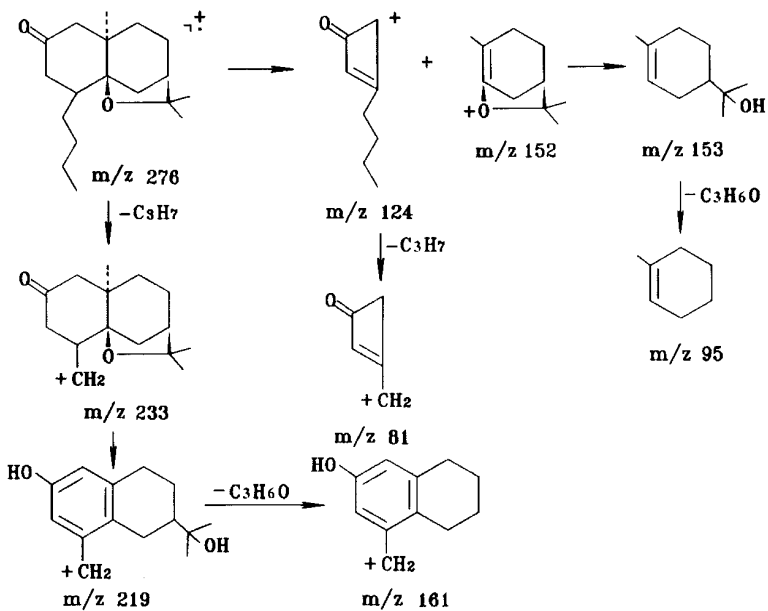
3.1 AF5



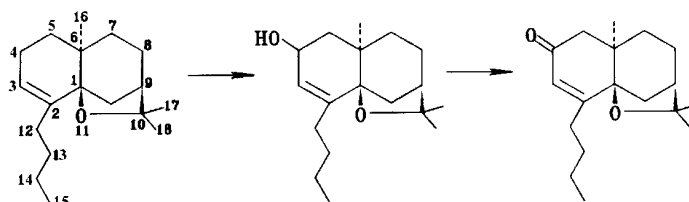
3.2 4-OH AF5



3.3 4-CO AF5



从以上实验结果可以推断 AF-5 在人肝微粒体中的代谢途径为:



讨 论

AF-5 在人肝微粒体体外温孵体系中的代谢,主要有两个代谢物,一个为 4-羟基 AF-5,一个为 4-羰基 AF-5。AF-5 在大鼠肝微粒体温孵体系中代谢时,代谢物有 15 至 16 个^[1],除了上述 4 位羟基及羰基代谢物外,还有 9 位羟基和羰基代谢物及二羟基、二羰基代谢物等,代谢物较复杂。

AF-5 在人肝微粒体体外温孵体系中的代谢速率较慢,100 min 后才代谢完全。而在大鼠肝微粒体

体外温孵体系中代谢速率较快,40 min 即代谢完全。因此从 AF-5 体外代谢来看,人与鼠的肝微粒体对 AF-5 的代谢存在较大差异,有待进一步深入研究。

REFERENCES:

- [1] Zhang WJ. Study on drug metabolism [D]. Beijing: Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 1997.
- [2] Von Bahr C, Groth CG, Jansson H, *et al.* Drug metabolism in human liver *in vitro*: Establishment of a human liver bank [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, 27(6): 711 - 725.

IN VITRO METABOLIC STUDIES OF THE NOVEL ANTI-ANXIETIC DRUG AF-5 AND ITS METABOLITES IN HUMAN LIVER MICROSOME INCUBATION SYSTEM

LI Nong, ZHANG Jir-lan, ZHOU Tong-hui

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: AIM To study the metabolism of a novel anti-anxiotic drug AF-5 and its metabolites (I, II) in human liver microsome incubation system. **METHODS** Human liver microsomes were prepared, the enzyme activity was determined to be $8.79 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ by Lowry's method. The human liver microsome incubation system consisted of: human liver microsomes $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, glucose-6-phosphate (G-6-P) $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, magnesium chloride (MgCl_2) $4.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, coenzyme II in oxidized form (NADP) $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, and coenzyme I in reduced form (NADH) $1.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$. Two milligrams of AF-5 solubilized by Tween 80 was then added, the mixture was diluted to 5 mL with Tris-HCl solution and the mixture was incubated in a 37°C water bath with shaking. Oxygen was passed over the liquid surface for 0.5 min every 20 minutes. The incubation was carried out for 40 min and 100 min respectively. Three volumes of ethyl ether were added to stop the metabolism, and more ethyl ether was used to extract the metabolites for 3 times. The ether extracts were pooled together, dried with anhydrous sodium sulfate, then evaporated to dryness. The residue was dissolved in 0.5 mL n-hexane and analyzed by GC/MS under the following conditions: 150°C (1 min) $\xrightarrow{7.5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}}$ 180°C (1 min) $\xrightarrow{2.5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}}$ 260°C (2 min), in the total ion current mode, EI: 70 eV, interface temperature: 250°C , ion source temperature: 200°C . **RESULTS** Two major metabolites were found and identified in this incubation system, and demonstrated that the *in vitro* metabolic pathway was that the carbon 4 was first oxidized to hydroxyl group, then further oxidized to a carbonyl group. **CONCLUSION** In human liver microsome incubation system AF-5 was completely metabolized in 100 min to the hydroxy derivative I and carbonyl derivative II, with hydroxymetabolite as the major metabolite. Metabolite I was further transformed to metabolite II, which was not metabolized any further by the human liver microsomes.

KEY WORDS: anti-anxiotic drug; AF-5; human liver microsomes; GC/MS