

• 药理与临床 •

小檗碱的酶反应动力学及其代谢酶表型和代谢产物研究

陈健龙^{1,2}, 张玉玲^{1,2}, 董宇², 张蕾¹, 刘丹¹, 杨建龙¹, 蔡广知¹, 贡济宇^{1*}, 崔翰明^{2*}

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: 目的 采用混合人肝微粒体和重组人源细胞色素酶 P450 (CYP) 同工酶, 研究小檗碱的代谢特性, 明确参与小檗碱代谢的 CYP 酶亚型及其贡献度, 并确证相关代谢产物的结构。方法 将混合人肝微粒体分别与 20、100、200、400、600、800、1 200 ng/mL 的小檗碱共同孵育后, 计算小檗碱酶反应动力学米氏常数 (K_m)、最大反应速率 (V_{max})、体外肝微粒体对药物的固有清除率 (CL_{int}); 采用 CYP 酶的特异性抑制剂研究小檗碱的代谢表型; 将重组人源 CYP 同工酶 CYP3A4、CYP1A2、CYP2D6、CYP2C9 与一定质量浓度的小檗碱孵育, UPLC 法测定孵育液中原型药物的剩余量和代谢产物的生成量; 整体归一化法计算各酶的代谢贡献度; LC-MS/MS 法鉴定相关代谢产物。结果 小檗碱在混合人肝微粒体中的 V_{max} 为 $1.51 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; K_m 为 2.69 nmol/mL ; CL_{int} 为 $0.56 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。CYP2D6 的特异性抑制剂奎尼丁和 CYP1A2 的特异性抑制剂呋喃茶碱对小檗碱的代谢有显著抑制作用, 其他 CYP 酶抑制剂对小檗碱的代谢无显著影响。CYP2D6、CYP1A2 对小檗碱代谢产物 M_1 (去亚甲基小檗碱) 的贡献度分别为 75.253 9%、23.323 6%; 对 M_2 产物 (唐松草分定或小檗红碱) 的贡献度分别为 46.893 8%、8.679 5%。小檗碱在体外混合人肝微粒体孵育体系中的主要代谢途径为 O-去甲基化, 可生成去亚甲基小檗碱和唐松草分定或小檗红碱。结论 小檗碱在肝脏中主要被 CYP2D6 和 CYP1A2 代谢, 分别生成去亚甲基小檗碱、唐松草分定或小檗红碱。

关键词: 小檗碱; 混合人肝微粒体; 重组人源细胞色素 P450 同工酶; 代谢产物; 去亚甲基小檗碱; 唐松草分定; 小檗红碱
中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)23-3334-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.014

Enzyme reaction kinetics, metabolic enzyme phenotype, and metabolites of berberine

CHEN Jian-long^{1,2}, ZHANG Yu-ling^{1,2}, DONG Yu², ZHANG Lei¹, LIU Dan¹, YANG Jian-long¹, CAI Guang-zhi¹, GONG Ji-yu¹, CUI Han-ming²

1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To study the metabolic characteristics of berberine using the pooled human liver microsomes and recombinant human cytochrome enzymes P450 (CYP) isozymes, to identify CYP isozymes responsible for berberine metabolism and its contribution, and to determine the structures of metabolism. **Methods** Pooled human liver microsomes were incubated with berberine (20, 100, 200, 400, 600, 800, and 1 200 ng/mL). The Michaelis-Menten parameters (K_m), maximum velocity (V_{max}), and clearance (CL_{int}) of pooled liver microsomes were initially estimated by analyzing Lineweaver-Burk plot. Various selective CYP inhibitors were used to investigate their inhibitory effects on the metabolism of berberine and the certain concentration of berberine was incubated with recombinant human CYP isozymes (CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, and CYP2C9). The concentration of berberine and metabolites in the incubation pool was determined by UPLC method. The P450 isozymes were ranked with the method of total normalized rate (TNR) and the related metabolites were identified by LC-MS/MS. **Results** The V_{max} , K_m , and CL_{int} of berberine in

收稿日期: 2013-05-22

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2009ZX09103-312, 2011ZX09102-011-08)

作者简介: 陈健龙, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析学。Tel: 13596446180 E-mail: 418295735@qq.com

*通信作者 贡济宇 Tel: (0431)86172207 E-mail: gjy0431@126.com

崔翰明 Tel: (010)88001470 E-mail: cui-yaoshi@163.com

pooled human liver microsomes were 1.51 nmol·mg⁻¹·h⁻¹, 2.69 nmol/mL, and 0.56 mL·mg⁻¹·h⁻¹, respectively. Quinidine (the specific inhibitor of CYP2D6) and Furaflavone (the specific inhibitor of CYP1A2) could significantly inhibit the berberine metabolism, and the other CYP inhibitors had no significant effect on the metabolism of berberine. CYP2D6 and CYP1A2 were responsible for 75.253 9% and 23.323 6% of the berberine metabolite M₁ (demethyleneberberine), and responsible for 46.893 8% and 8.679 5% of M₂ (thalifendine or berberrubine). The major metabolic pathway of berberine in pooled human liver microsomes incubation system is *O*-demethylated, demethyleneberberine, thalifendine, or berberrubine could be generated *in vitro*. **Conclusion** Berberine is metabolized by CYP2D6 and CYP1A2 in human liver, the metabolites of berberine are demethyleneberberine and thalifendine or berberrubine.

Key words: berberine; pooled human liver microsomes; recombinant human cytochrome enzyme P450 isozyme; metabolites; metabolic pathway; demethyleneberberine; thalifendine; berberrubine

小檗碱是中药黄连中的主要成分^[1], 在临床上用作抗生素和清热解毒药。随着对小檗碱研究的不断深入, 发现其还具有调血脂、抗肿瘤、降血糖等多种药理作用^[2-5]。然而关于小檗碱的肝药酶代谢动力学与其代谢相关的细胞色素酶 P450 (CYP) 亚型和代谢产物的研究鲜见报道, 本实验旨在研究小檗碱与混合人肝微粒体孵育后的酶反应动力学, 以及参与小檗碱代谢的肝药酶亚型的表征和代谢贡献度, 确证相关代谢产物的结构, 为进一步研究该药的代谢性相互作用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸小檗碱对照品 (批号 11073-200609)、酮康唑 (批号 100924-200602), 质量分数均为 99.9%, 中国药品生物制品检定所; 呋喃茶碱 (批号 022M 4716V), 质量分数为 98%, Sigma 公司; 奎尼丁 (批号 31334), 质量分数为 98%, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 氟康唑 (批号 100314-201204), 质量分数 99.9%, 中国食品药品检定研究院; 硫酸氢氯吡格雷 (批号 100819-201102), 质量分数为 99.5%, 中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇、乙酸铵、甲酸均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯, 0.5 mol/L 磷酸缓冲液, 美国 BD Gentest 公司, 水为超纯水。

20 份混合人肝微粒体, Supersomes 重组人源 CYP 同工酶 CYP3A4、CYP1A2、CYP2D6、CYP2C9 (均于-80 °C 保存) 以及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 再生系统 (于-20 °C 保存), 美国 BD Gentest 公司。

1.2 仪器

超高效液相色谱仪 (UPLC, 包括四元泵、PDA 光电二极管阵列检测器、Empower 3 工作站)、Xevo 型三重四级杆液质联用仪 (配备 ESI 电喷雾离子源、Masslynx V 4.1 化学工作站), 美国 Waters 公司; ME 215 P 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司;

HZS—H 水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术有限公司; RS—1 涡旋混合器, 北京吴诺斯科技有限公司; CT15RE 冷冻离心机, 日本日立公司。

2 方法

2.1 UPLC 条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水 (30:70, 含 0.05% 甲酸、2 mmol 乙酸铵, pH 为 3.20), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 346 nm。

2.2 UPLC-MS/MS 条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水 (28:72, 含 0.05% 甲酸、2 mmol 乙酸铵, pH 为 3.20), 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 离子源为电喷雾正离子模式电离, 检测方式全扫描 (MS Scan), 毛细管电压 2.5 kV, 去溶剂气为氮气, 体积流量为 850 L/h, 离子源温度 500 °C。

2.3 溶液的制备

精密称取小檗碱对照品适量, 置量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 200 μg/mL 的小檗碱对照品储备液。

选择 FDA 推荐的离体实验的特异性化学抑制剂和使用浓度^[6]: 分别精密称定酮康唑、呋喃茶碱、奎尼丁、氟康唑、硫酸氢氯吡格雷适量, 用二甲基亚砜 (DMSO)-甲醇 (1:10) 溶解, 用磷酸钾缓冲液分别稀释至浓度分别为 4、40、40、120、20 μmol/L 的溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取一定量的小檗碱对照品母液, 用磷酸钾缓冲液逐级稀释定容, 得小檗碱系列对照品溶液, 按“2.5.1”项下的条件孵育 (不加 NADPH 再生系统, 以等体积的磷酸钾缓冲液代替), 使小檗碱终质量浓度分别为 18.32、45.80、91.60、183.20、458.00、916.00、1 374.00 ng/mL。

按“2.1”项下的色谱条件测定,进样量 5 μL ,记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X),进行线性回归,得小檗碱回归方程 $Y=66.576 X-193.37$ ($r=0.9999$),线性范围 18.32~1 374.00 ng/mL。

2.4.2 精密度试验 分别取 18.32、183.20、1 374.00 ng/mL 3 种质量浓度的小檗碱对照品溶液,按“2.5.1”项下条件孵育(不加 NADPH 再生系统,以等体积的磷酸钾缓冲液代替)。按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次,检测日内精密度;连续测定 3 d,计算日间的精密度。结果高、中、低质量浓度日内精密度分别为 0.92%、3.87%、7.25%,日间精密度分别为 4.12%、8.71%、9.13%。

2.4.3 稳定性试验 取稀释成 183.20 ng/mL 的小檗碱磷酸钾缓冲液,按“2.1”项下条件,在 0、1、2、4、8、24 h 测定,记录峰面积,计算小檗碱质量浓度的 RSD。另取孵育后 183.20 ng/mL 的小檗碱孵育液,按“2.1”项下条件,在 0、1、2、4、8、24 h 测定,记录峰面积,计算小檗碱的 RSD。结果 24 h 内样品

稳定性的 RSD 分别为 3.37%、5.79%,均小于 10%。

2.4.4 回收率试验 精密吸取一定量小檗碱对照品储备液,用磷酸钾缓冲液稀释定容,按“2.5.1”项下色谱条件孵育(不加 NADPH 再生系统,以等体积的磷酸钾缓冲液代替),使小檗碱终质量浓度为 300 ng/mL,重复 6 次。按“2.1”项下色谱条件测定,计算小檗碱的回收率。结果小檗碱的回收率在 92.10%~101.40%,平均回收率为 97.7%。

2.4.5 检测限和定量限 分别取 10、20 ng/mL 的孵育后样品进样,根据 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ 计算最低检测限和最低定量限,结果分别为 5.025 9、16.753 0 ng/mL。

2.4.6 专属性试验 按“2.5.1”项下条件孵育(不加 NADPH 再生系统,以等体积的磷酸钾缓冲液代替),然后按“2.1”项下色谱条件测定;将 183.2 ng/mL 的小檗碱溶液加入到空白样品中,同法进行操作。结果在实验条件下,肝微粒体和同工酶孵育液中的其他物质不干扰小檗碱的测定,表明所建立的方法能满足孵育液中小檗碱检测的需要。结果见图 1。

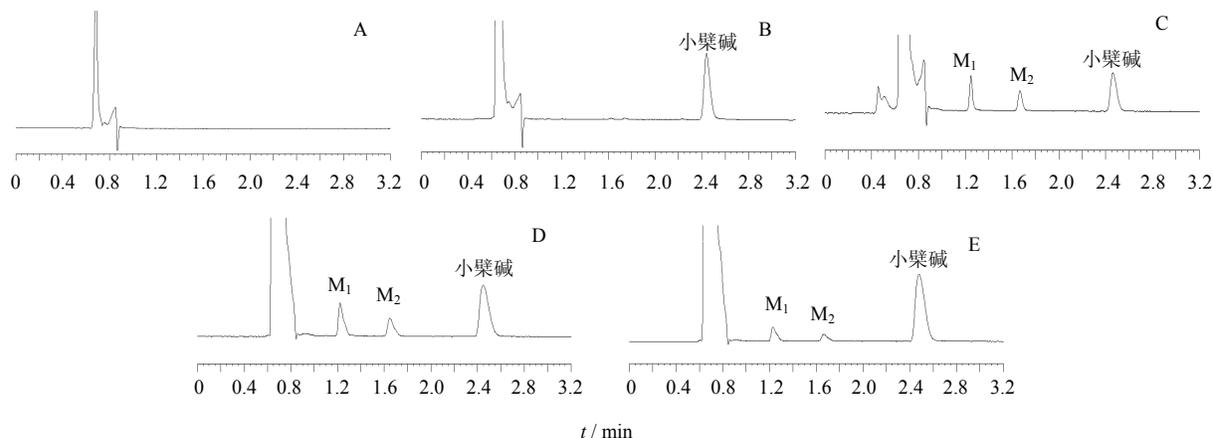


图 1 空白样品 (A)、对照品 (B)、混合人肝微粒体 (C)、重组酶 CYP2D6 (D) 和 CYP1A2 (E) 中小檗碱及其代谢产物 (M_1 和 M_2) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of berberine and its metabolites (M_1 and M_2) in blank sample (A), reference substances (B), pooled human liver microsomes (C), CYP2D6 (D), and CYP1A2 (E)

2.5 混合人肝微粒体孵育条件

2.5.1 酶动力学实验 磷酸盐缓冲液 (PBS) 孵育体系 (0.1 mol/L, pH 7.4), 总体积 500 μL , 含混合人肝微粒体蛋白 0.5 mg/mL。在孵育体系中分别加入终质量浓度为 20、100、200、400、600、800、1 200 ng/mL 的小檗碱溶液 (确保反应体系中甲醇终体积分数 $< 1\%$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵育 5 min, 加入 NADPH 再生系统 (由 1.3 mmol/L NADP^+ 、3.3

mmol/L 6-磷酸葡萄糖、0.4 U/mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、3.3 mmol/L 氯化镁组成) 启动反应^[7-9], 开始计时, 分别于 30 min 后取样, -20 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 按照“2.1”项下方法测定。

2.5.2 肝微粒体抑制实验 PBS 孵育体系 (0.1 mol/L, pH 7.4) 总体积为 200 μL , 反应体系中含有混合人肝微粒体蛋白 0.5 mg/mL。分别加入终浓度

为 1 μmol/L 酮康唑、10 μmol/L 呋喃茶碱、10 μmol/L 奎尼丁、30 μmol/L 氟康唑、5 μmol/L 硫酸氢氯吡格雷的磷酸钾缓冲液作为抑制剂，加入终质量浓度为 250 ng/L 的小檗碱溶液，并使反应体系中甲醇终体积分数 < 1%，DMSO 终体积分数 < 0.1%。37 °C 水浴中预孵育 15 min，加入 NADPH 再生系统（由 1.3 mmol/L NADP⁺、3.3 mmol/L 6-磷酸葡萄糖、0.4 U/mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、3.3 mmol/L 氯化镁组成）启动反应，孵育 30 min 后取样，-20 °C 终止反应，-80 °C 冰箱保存，4 °C、13 000 r/min 离心 20 min，取上清液，按照“2.1”项下方法测定。

2.6 Supersomes 人源 CYP 同工酶孵育条件

PBS 孵育体系（0.1 mol/L，pH 7.4）总体积 500 μL，含混合人肝微粒体蛋白 0.5 mg/mL。向孵育体系中加入 30 pmol/mL 重组酶（CYP3A4、CYP1A2、CYP2C9）或 10 pmol/mL 重组酶（CYP2D6），37 °C 水浴中预孵育 5 min，将各个重组酶与终质量浓度为 400 ng/mL 的小檗碱溶液共同孵育 30 min，加入 NADPH 再生系统（由 1.3 mmol/L NADP⁺、3.3 mmol/L 6-磷酸葡萄糖、0.4 U/mL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、3.3 mmol/L 氯化镁组成）启动反应，开始计时，分别于给定时间 30 min 后取样，-20 °C 终止反应，-80 °C 冰箱中保存，在 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min，取上清液，按“2.1”项下方法测定。

2.7 小檗碱代谢产物的鉴定

将混合人肝微粒体或重组酶与 1 μg/mL 小檗碱，按“2.5”或“2.6”项下的孵育条件孵育，按“2.2”项下方法检测。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件对不同组间进行方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 酶反应动力学

以小檗碱的浓度 (S) 为横坐标，小檗碱的消除速率 (V) 为纵坐标绘制曲线，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 V_{\max} 和 K_m (V_{\max} 为最大反应速率， K_m 为米氏常数， V 为反应速率， S 为底物浓度)。结果 $V_{\max} = 1.51 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ， $K_m = 2.69 \text{ nmol/mL}$ ，固有清除率 (CL_{int}) 为 $0.56 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结果见图 2。

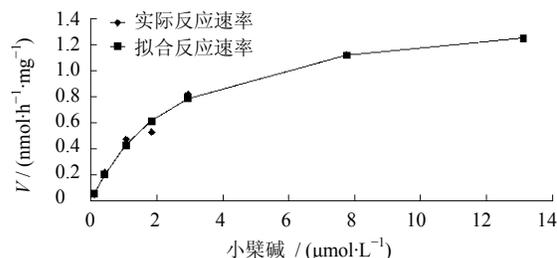


图 2 小檗碱酶反应动力学米氏方程图

Fig. 2 Michaelis-Menten equation plot of berberine enzyme reaction kinetics

3.2 小檗碱的代谢表型

3.2.1 混合肝微粒体抑制实验 奎尼丁和呋喃茶碱浓度分别为 10 μmol/L 时，明显抑制小檗碱的代谢；而酮康唑、氟康唑、硫酸氢氯吡格雷对小檗碱的代谢基本没有影响，因此判断小檗碱的主要代谢酶为 CYP2D6 和 CYP1A2。结果见表 1。

3.2.2 Supersomes 人源 CYP 同工酶代谢 将各重组酶分别与终质量浓度为 400 ng/mL 的小檗碱溶液共同孵育，结果小檗碱在 CYP3A4 和 CYP2C9 酶中均无代谢，而在 CYP2D6 和 CYP1A2 酶中的小檗碱代谢明显，表明 CYP2D6 和 CYP1A2 是小檗碱的主要代谢酶。结果见表 2。

表 1 混合人肝微粒体抑制实验中小檗碱代谢表型 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Metabolism phenotype of berberine in inhibitory experiments of pooled human liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	抑制剂 / (μmol·L ⁻¹)	CYP (亚型)	小檗碱 / (ng·mL ⁻¹)		
			初始	30 min	60 min
对照	—	—	242.35 ± 3.15	156.52 ± 4.75	133.33 ± 1.97
酮康唑	1	3A4	242.35 ± 3.15	156.24 ± 4.29	133.77 ± 4.61
呋喃茶碱	10	1A2	242.35 ± 3.15	173.55 ± 4.47*	152.76 ± 3.27*
奎尼丁	10	2D6	242.35 ± 3.15	239.19 ± 3.02*	236.60 ± 4.09*
氟康唑	30	2C9	242.35 ± 3.15	156.856 ± 2.04	133.60 ± 2.69
硫酸氢氯吡格雷	5	2B6	242.35 ± 3.15	156.69 ± 2.18	133.42 ± 2.80

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below

此外,从图 1 可同时观察到 2 个代谢产物 (M_1 和 M_2), 出峰时间分别为 1.24、1.64 min。应用整体归一化法评价各 CYP 同工酶在正常人肝微粒体中的平均量对相关代谢产物的贡献度^[6-7], 结果 CYP2D6、CYP1A2 对小檗碱代谢产物 M_1 的贡献度分别为 75.253 9%、23.323 6%; 对 M_2 产物的贡献度分别为 46.893 8%、8.679 5%。结果见表 3。

3.3 小檗碱代谢产物鉴定

在全扫描质谱图中出现 2 个新峰 (M_1 和 M_2), 其母离子的 m/z 分别为 324、322, 出峰时间分别为

1.19、1.91 min。小檗碱的母离子 m/z 为 336, m/z 为 324 的 M_1 , 判断是前者丢失一个 C 原子, 推断为去亚甲基小檗碱; m/z 为 322 的 M_2 , 判断是丢失一个 CH_2 基团, 推断为唐松草分定或小檗红碱。小檗碱代谢产物质谱图见图 3。小檗碱的肝代谢产物和肝药酶贡献度见图 4。

4 讨论

肝微粒体中含有多种药物代谢酶, 其中 CYP 是由多种类型的酶所组成的一个大家族, 人体内许多 CYP 表现出多态性, 是导致药物反应个体差异的

表 2 Supersomes 人源 CYP 同工酶代谢实验中小檗碱代谢表型 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

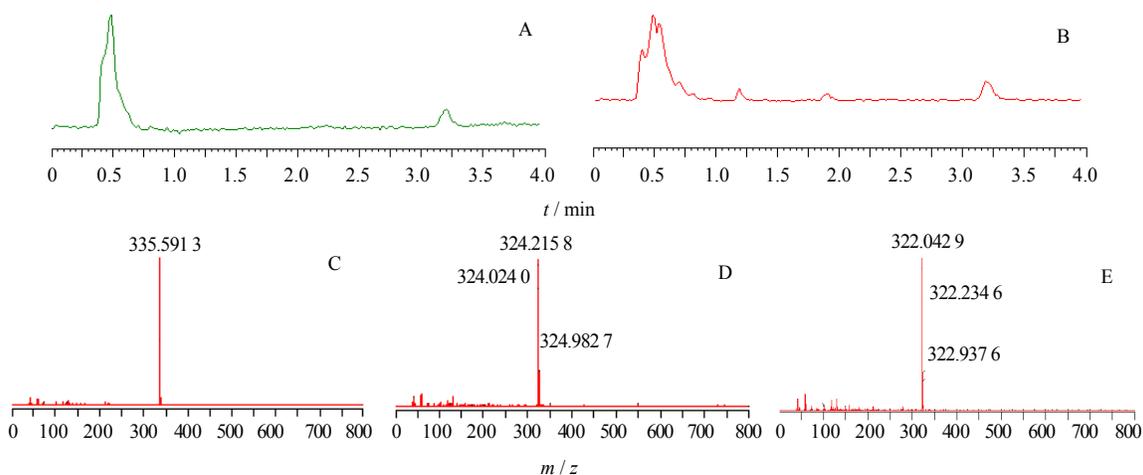
Table 2 Metabolism phenotype of berberine in metabolic experiments of supersomes human CYP isozymes ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	基因重组酶 / (pmol·孔 ⁻¹)	小檗碱 / (ng·mL ⁻¹)			
		初始	15 min	30 min	60 min
对照	—	466.97±3.44	466.01±4.35	465.54±4.33	465.77±5.16
CYP3A49	30	466.97±3.44	465.03±3.51	466.99±5.88	464.83±5.69
CYP1A2	30	466.97±3.44	333.97±4.46*	289.96±5.39*	258.83±4.60*
CYP2D6	10	466.97±3.44	292.76±4.17*	228.30±4.11*	114.91±4.21*
CYP2C9	30	466.97±3.44	466.42±5.32	466.96±5.47	466.94±5.69

表 3 Supersomes 人源 CYP 同工酶贡献度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Contribution of supersomes human CYP isozymes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	基因重组酶 / (pmol·孔 ⁻¹)	M_1		M_2	
		峰面积	贡献度 / %	峰面积	贡献度 / %
肝微粒体 (含 CYP2D6+CYP1A2)	3+19.5	2 791.75 ± 62.10	—	2 370.25 ± 54.99	—
CYP2D6	10	7 003.00 ± 146.02	75.253 9	3 705.01 ± 101.94	46.893 8
CYP1A2	30	1 001.75 ± 47.59	23.323 6	316.50 ± 9.26	8.679 5



A-对照品 B-样品 C-小檗碱 ($t = 3.20$ min, m/z 336) D- M_1 ($t = 1.19$ min, m/z 324) E- M_2 ($t = 1.91$ min, m/z 322)
A-reference substance B-sample C-berberine ($t = 3.20$ min, m/z 336) D- M_1 ($t = 1.19$ min, m/z 324) E- M_2 ($t = 1.91$ min, m/z 322)

图 3 小檗碱在混合人肝微粒体中的代谢产物

Fig. 3 Berberine metabolites in pooled human liver microsomes

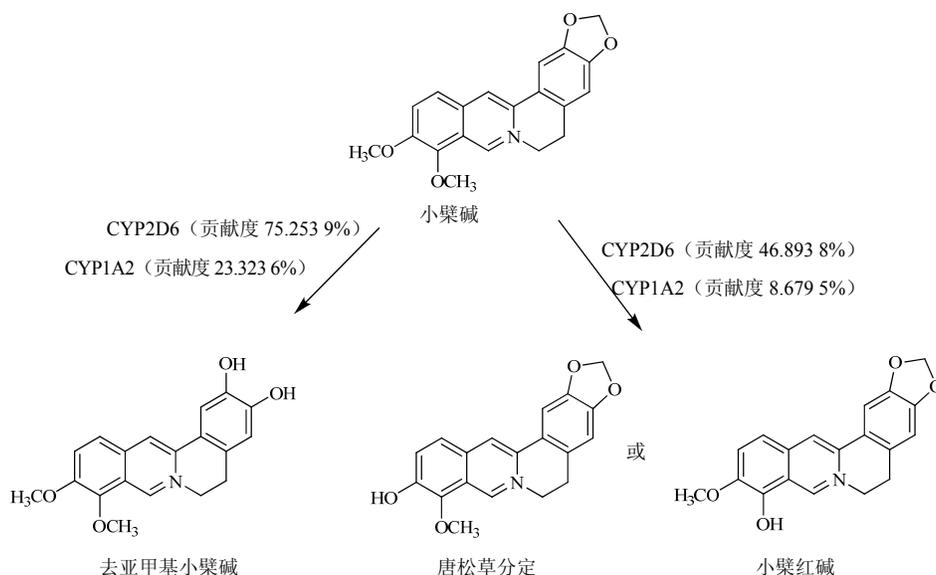


图 4 小檗碱代谢产物的结构和酶贡献度

Fig. 4 Structures and enzyme contribution of berberine metabolites

重要原因之一，其中以 CYP2D6 和 CYP2C9 的多态性最为典型^[10]。实验用 20 份混合肝微粒体，其 5 种主要酶的代谢活性见表 4；4 种 cDNA 重组酶的活性见表 5。各酶的活性均符合 FDA 的要求^[6]。

经方法学验证，本实验建立的测定肝微粒体中小檗碱的 UPLC 法具有灵敏、准确、快速的特点，可用于体外肝微粒体或重组酶的代谢研究。在上述色谱条件下，小檗碱的代谢产物 M₁ 和 M₂ 的生成量与小檗碱原型药的消失量具有高度的相关性，同时 UPLC/MS/MS 检测也证明 M₁ 和 M₂ 为小檗碱的代谢物峰。但由于没有代谢产物的对照品，无法准确定量，因此采用单一重组酶的 HPLC 谱图中代谢产物峰面积与对应混合人肝微粒体的 HPLC 谱图中代谢产物峰面积比较的方法来计算各酶代谢贡献度。

测定药物代谢的酶反应动力学参数已经成为药物代谢研究中的一项重要工作，K_m 和 V_{max} 对于确定药物代谢速率和代谢酶的参与程度至关重要；通过这些参数还可预测肝药酶对药物的内在代谢清除

率，并用于预测给药剂量以及体内药动学参数^[11]。用图解法分析药动学数据能快速计算相关的动力学参数，最常用的是双倒数作图法，但该法的数据点分布不均匀，可能在较低代谢速率得到的倒数点 (1/V) 是不可靠的，这些较低的速率主导了线性回归曲线，从而影响 K_m 和 V_{max} 的表观值；而应用米-

表 4 混合人肝微粒体中 5 种 CYP 酶活性

Table 4 Five CYP450 activities in pooled human liver microsomes

测定酶	测定物	酶活性 / (pmol·min ⁻¹ ·pmol ⁻¹)
CYP3A4	testosteron 6β-hydroxylase	4 200
CYP1A2	phenacetin O-deethylase	900
CYP2D6	bufuralol 1'-hydroxylase	72
CYP2C9	diclofenac 4'-hydroxylase	2 700
CYP2B6	(S)-mephenytoin N-demethylase	49
CYP2B6	coumarin 7-hydroxylase	1 100

表 5 4 种基因重组酶的活性

Table 5 Activities of four gene recombinases

测定酶	测定物	酶活性 / (pmol·min ⁻¹ ·pmol ⁻¹)	C / (pmol·mL ⁻¹)
CYP3A4	testosterone 6β-hydroxylase	16.0	2 000
CYP1A2	phenacetin deethylase	25.0	1 000
CYP2D6	bufuralol 1'-hydroxylase	59.0	1 000
CYP2C9	diclofenac 4'-hydroxylase	15.0	2 000

曼氏模型对数据进行拟合分析会获得更为准确的酶动力学参数。

药物代谢表型是研究药物的代谢酶及其相对贡献度的指标,对分析药物相互作用(DDI)或个体差异(代谢酶的遗传多态性)有重要作用^[12]。通常采用 3 种方法鉴别催化一条代谢途径的特定 CYP 酶:(1)用特定的人 cDNA 表达的 CYP 酶孵化;(2)用特殊化学抑制剂或者单克隆抗体与混合的人肝微粒体孵化;(3)用人肝微粒体库孵化,它由数个供体制备,并很好地表征了 CYP 活性;应至少采用其中 2 种方法鉴别催化某一代谢途径的特定酶^[13]。本实验采用前 2 种方法探寻小檗碱的代谢酶,结果基本一致。在肝微粒体抑制实验中,酮康唑和呋喃茶碱组小檗碱代谢明显减慢;在重组酶实验中,随时间延长,CYP3A4 和 CYP2C9 组小檗碱质量浓度无变化,无代谢产物生成,而 CYP2D6 和 CYP1A2 组小檗碱明显减少,同时生成 2 种代谢产物,最终确定小檗碱主要代谢酶为 CYP2D6 和 CYP1A2。

本实验采用整体归一化法评估小檗碱被 CYP 各亚型代谢程度,结果与肝微粒抑制实验有较高的一致性。但由于重组酶与真实的 CYP 存在一定差别(其主要表现在蛋白环境,与 NADPH-CYP 还原酶的比例不同),实验结果可能与人体真实的生理情况有所差异。然而目前此方法仍然是一种准确、快速确定药物 CYP 代谢亚型的方法^[14]。

氧化、还原和水解是药物一相代谢的常见反应,一般会使化合物的极性增大,从而促进药物的排泄。本实验根据小檗碱的结构特点,发现 4 种原小檗碱型生物碱的质谱离子化方式是一致的,即在 N 原子上带一个正电荷,由此根据产物和原型药物的离子化过程中质量的丢失情况来判断其代谢产物可能的结构。将肝微粒体与小檗碱共同孵育后,采用同样的液质条件,进行全扫描,在质谱图上发现了 2 个新峰,根据其 m/z 判断丢失的基团,判定 m/z 为 324 的新峰是去亚甲基小檗碱,而 m/z 为 322 的新峰可能是唐松草分定或小檗红碱。

参考文献

[1] Hua W, Ding L, Chen Y, *et al.* Determination of berberine in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*,

2007, 44(4): 931-937.

- [2] Chen J, Wang F, Liu J, *et al.* Analysis of alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by accelerated solvent extraction combined with ultra performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and tandem mass spectrometry detections [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 613(2): 184-195.
- [3] 丁阳平, 叶小利, 周洁, 等. 小檗碱降糖机制研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 763-769.
- [4] 罗映, 金磊, 何琦, 等. 小檗碱对兔血脂代谢及维生素 D 受体和胰岛素诱导基因 2 基因表达的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1566-1570.
- [5] Abourashed E A, Khan I A. High-performance liquid chromatography determination of hydrastine and berberine in dietary supplements containing goldenseal [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 90(7): 817-822.
- [6] *Guidance for industry: Drug Interaction Studies* [S]. 2006.
- [7] Jiang R, Yamaori S, Takeda S, *et al.* Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes [J]. *Life Sci*, 2011, 89(5/6): 165-170.
- [8] Kobayashi K, Kajiwara E, Ishikawa M, *et al.* Identification of CYP isozymes involved in benzbromarone metabolism in human liver microsomes [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2012, 33(8): 466-473.
- [9] Guo Y, Li F, Ma X, *et al.* CYP2D plays a major role in berberine metabolism in liver of mice and humans [J]. *Xenobiotica*, 2011, 11(11): 966-1005.
- [10] Blake C M, Kharasch E D, Schwab M, *et al.* Meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 9(3): 394-399.
- [11] Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* [M]. London: Portland Press, 2004.
- [12] Williams J A, Bauman J, Cai H, *et al.* *In vitro* ADME phenotyping in drug discovery: current challenges and future solutions [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2005, 8(1): 527-534.
- [13] Li Y, Ren G, Wang Y X, *et al.* Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes [J]. *J Transl Med*, 2011, 5(9): 62-72.
- [14] Rodrigues A D. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57(5): 465-480.